

特集：放射光利用の広がり(3)

放射光微小血管造影法による再生血管の可視化

田中越郎¹, 笠原啓史¹, 八反尚一郎¹, 篠崎芳郎¹, 福山直人¹
 岩田美郎¹, 平 広之¹, 谷岡健吉², 望月 亮³, 河合敏昭⁴
 兵藤一行⁵, 梅谷啓二⁶, 盛 英三^{7*}

¹東海大学医学部生理科学・外科・放射線科・再生医学センター, ²NHK 放送技術研究所,
³NHK エンジニアリングサービス, ⁴浜松ホトニクス, ⁵高エネルギー加速器研究機構,
⁶高輝度光科学研究センター, ⁷国立循環器病センター研究所心臓生理部*

Visualization of Angiogenic Vessels by Synchrotron Radiation Microangiography

Etsuro TANAKA¹, Hirofumi KASAHARA¹, Naoichiro HATTAN¹, Yoshiro SHINOZAKI¹, Naoto FUKUYAMA¹,
 Yoshiro IWATA¹, Hiroyuki TAIRA¹, Kenkichi TANIOKA², Ryo MOCHIZUKI³, Toshiaki KAWAI⁴,
 Kazuyuki HYODO⁵, Keiji UMETANI⁶ and Hidezo MORI⁷

¹Departments of Physiology, Surgery, and Radiology, Tokai University School of Medicine;

²NHK Science & Technical Research Laboratories;

³NHK Engineering Services Inc.; ⁴Hamamatsu Photonics K.K.;

⁵National Laboratory for High Energy Physics; ⁶Japan Synchrotron Radiation Research Institute;

⁷Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute

Abstract

The usefulness of synchrotron radiation microangiography for evaluating angiogenic vessels in regenerative therapy is illustrated. In a rabbit model of microvascular myocardial ischemia, angiogenic vessels in the heart were well visualized. In a rabbit model of hindlimb ischemia, vessel-regenerative therapy with fibroblast growth factor 4-gene incorporated to gelatin hydrogel well ameliorated muscle necrosis. Synchrotron radiation microangiography confirmed significant blood flow increase to adenosine administration in these treated rabbits (vascular responsiveness), but not in the control. Thus, synchrotron radiation microangiography is shown to be useful for the depiction, quantification and evaluation of angiogenic vessels in reproductive therapy.

1. はじめに

血管再生医療は次世代医療として注目を集めている。たとえば虚血性疾患では虚血組織に対して血管再生を促進させることが治療の基本となる¹⁾。我々は再生血管が有効に機能するには血管の成熟度が重要であり、再生血管の制御の有無がその成熟度を示す指標になると主張している²⁾。しかしながら、この鍵を握っている再生血管はその直径が細く、既存の血管造影法ではその詳細な観察と制御の評価は不可能である。そこで我々は、X線源に放射光を利用した新しい微小血管造影法を開発し³⁻¹¹⁾、モデル動物において再生血管の観察を試みた。

2. 放射光を用いた血管造影システム

血管造影システムは大きく2つの部分から成り立っている。すなわちX線源と撮像系である。よりよい画像を得るためには両者の改良が必要である。本システムでは、X線源には既存のX線管球の代わりに単色放射光¹¹⁻¹³⁾を、撮像系にはイメージ増強型テレビシステムの代わりに蛍光板とハイビジョンテレビカメラ^{11,14-18)}を組み合わせ用いた (Fig. 1)。なお得られた画像にはデジタル処理を加えることもできる⁹⁾。

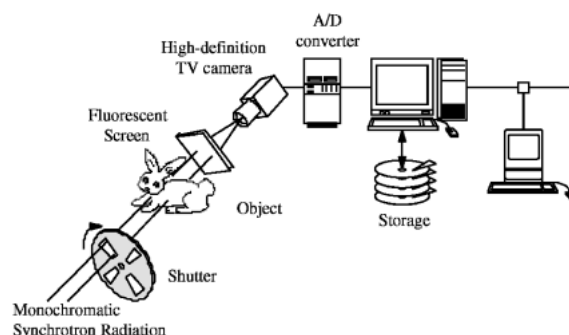


Figure 1. Schematic drawing of synchrotron radiation microangiographic system.

血管造影装置の画質は3種類の分解能 (空間分解能, 時間分解能, コントラスト分解能) で表示され, これらが総合的に画像の解像度を左右する。これら3者はお互いに密接に関連しあっている。血管造影法においては解像度の向上に伴う感度の低下は避けなければならない。例えば, 心臓のように動きの激しい臓器では, 1フレームあたりの時間分解能を高めなければならない, 露光時間が制限されるためにフレームあたりの光子数が減少し画質は低下す

* 国立循環器病センター研究所心臓生理部 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1
 TEL: 06-6833-5012 (2530) FAX: 06-6835-5416 E-mail: hidemori@ri.ncvc.go.jp

る。また、脳のように厚い骨で囲まれた臓器では、骨組織によるX線の減衰および造影剤のコントラストの低下が避けられず、その結果やはり画質が低下する。既存のイメージ増強管型テレビシステムではその構造上 $170\ \mu\text{m}$ 以上の空間分解能は期待できない。さらにこの既存のシステムで冠動脈や脳動脈の造影を行うと、上述した動きや骨との重なり等のために小血管内の微量の造影剤を検出することが困難となり、 $200\ \mu\text{m}$ 以下の血管の観察には困難が多い。再生医療に代表される次世代医療の目的を満たすためには、微小血管内に含まれる微量の造影剤を背景となる生体組織から識別できる必要があり、そのためには上述のすべての要件を満たすX線源と、高解像度を持つ撮像装置とが必要である。

本システムのX線源には高エネルギー加速器研究機構 (AR-NE5 と PF14C)¹²⁾ および SPring-8 (BL20B2)¹¹⁾ から得られる放射光を利用した。放射光はエネルギーレベルを造影剤 (ヨード) のK吸収端の直上 ($33.3\ \text{keV}$) に単色化して用いた。この場合、ヨードと周囲組織とのX線吸収の差が極大になるので、造影剤のコントラストを最大とすることができる。また放射光は指向性が鋭く平行光に近いので、被写体と検出器の距離を離しても半影はできにくく、血管造影にとっては理想的なX線源である。撮像系では、蛍光板にはX線シンチレータ付ファイバオプティクプレート (FOS, $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{S}:\text{Tb}$, 浜松ホトニクス) を用いた。この蛍光板から発する蛍光像をハイビジョンカメラを用いて横 $2.5\sim 3\ \text{cm}$ 、縦 $1.5\sim 2.0\ \text{cm}$ の視野を毎秒30コマで撮影した。

本システムの空間分解能をMTFチャート (MICK Type14: $2.0\text{--}20.0\ \text{lp/mm}$) を用いて測定すると最小間隔である20ラインペアを識別でき、少なくとも $25\ \mu\text{m}$ をしのぐ空間分解能を示した。コントラスト分解能を血管ファントム (Type76-700, Nuclear Associates 社) を用いて測定すると、厚さ $75\ \text{mm}$ のアクリル板を置いた状態で最低濃度 (ヨード濃度 $2.5\ \text{mg/ml}$) の造影剤を含んだ最小径 ($0.5\ \text{mm}$) の血管を識別することができた。また、本システムの時間分解能は33ミリ秒 (30コマ/秒) であるが、奇数番目 (あるいは偶数番目) の走査線だけから構成される画像であればその半分の時間 ($1/60$ 秒) で得られる。さらに高速メカニカルシャッターを併用すれば露光時間を1ミリ秒程度まで減らすことができ、心臓の動きに伴う画像のブレを防止するだけでなくX線被曝量の減少にも貢献する。

3. 心臓の虚血モデルにおける再生血管の可視化

心臓の虚血モデル動物において、放射光微小血管造影法による再生血管の可視化を試みた。家兎 (体重約 $3.5\ \text{kg}$) の冠動脈 (注: 心臓の筋肉に血液を供給している血管のこと) 内に直径 $15\ \mu\text{m}$ のプラスチック製マイクロスフェアを 2.8×10^5 個/kg注入し、慢性の心筋内微小血管虚血障害を

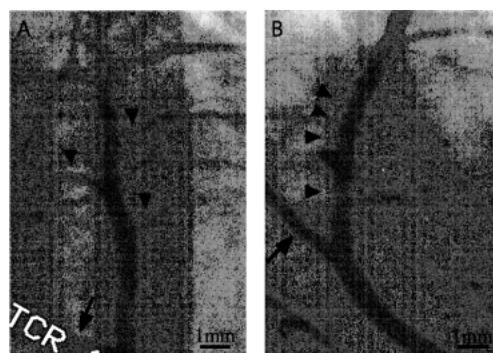


Figure 2. Synchrotron radiation microangiograms of the rabbit heart with microvascular myocardial ischemia. (A) Normal rabbit. (B) Ischemic rabbit. Arrows, the diagonal branch of the left coronary artery; arrowheads, small branches of the left coronary artery.

作製した。虚血作製17日後に右総頸動脈よりカテーテル (注: 造影剤等を注入する細いチューブ) を大動脈弁直上の左冠動脈入口部付近に留置し、水溶性ヨード系造影剤を投与しつつ撮影を行った (Fig. 2)。対照正常家兎の左冠動脈造影像 (Fig. 2A) では直径 $680\ \mu\text{m}$ の対角枝に相当すると思われる枝 (矢印) を分岐した後、長さ約 $9\ \text{mm}$ の間に矢印で示した直径約 $300\ \mu\text{m}$ の3本の枝を分岐していることが観察できた。この $9\ \text{mm}$ の区間においては明瞭に可視化できた直径 $100\ \mu\text{m}$ 以下の血管はなかった。これに対し心筋内微小血管虚血を作成した家兎 (Fig. 2B) では、直径 $520\ \mu\text{m}$ の対角枝に相当すると思われる枝 (矢印) を分岐した後、長さ約 $7\ \text{mm}$ の間に矢印で示した多数の直径 $100\ \mu\text{m}$ 以下の血管を直接分岐していることが観察できた。これらの血管は虚血により生じた再生血管と思われる、放射光を用いた微小血管造影法はこれらの細い再生血管の観察に有用であった。

この心筋内微小血管虚血を有する家兎は正常対照に比較して、明かな心機能の低下 (体重減少, 心収縮力の低下, 心筋酸素代謝の低下, 心筋微小梗塞巣の存在等) を認めるものの、マイクロスフェア法により測定したグラム心筋当りのベースラインすなわち安静時における平均血流は $2.22\pm 0.42\ \text{ml/min/g}$ と対照群 ($2.48\pm 0.62\ \text{ml/min/g}$) に比べ有意な減少を認めなかった。また組織学的検索では、直径 $30\ \mu\text{m}$ 以上の細動脈の心筋内密度は 1.55 ± 0.53 本/ mm^2 ($n=14$) と対照群 (1.17 ± 0.40 本/ mm^2 , $n=7$) よりもかえって増加傾向を示した (ただし統計学的には有意差はない)。以上の結果は、再生医療における再生血管の評価は安静時での観察だけでは不十分であり、成熟性のような機能面も含めた観察が必要であることを示している。

4. 下肢の虚血モデルにおける再生血管の可視化

遺伝子治療を代表とする血管再生療法では、臨床所見の改善度と既存の血管造影法で撮影した再生血管像の発達程度との間に相違が認められることが少なくない。我々は安

静時に加え血管拡張時等の微小血管造影像を合わせて評価することで再生血管の成熟度が検出でき、これが虚血性組織変化の改善度をよく反映すると考えている。そこで血管再生療法における血管の反応性の差の可視化を放射光微小血管造影法により試みた。

家兎を用い、左大腿動脈を結紮除去することにより下肢虚血モデルを作製した。この下肢虚血家兎に対し血管再生を誘導する遺伝子治療を行った。遺伝子として線維芽細胞成長因子4遺伝子 (FGF4)¹⁹を用い、対照には生理作用を有しないマーカー遺伝子である lacZ を用いた。なお遺伝子治療においては、遺伝子を単独投与するよりも、遺伝子をベクター (注: 投与したい遺伝子を細胞の中まで運搬する運び屋のこと。ウイルス性のものと非ウイルス性のものがある) と共に投与する方がその遺伝子導入効率が向上することがわかっている。そこで今回はベクターとして非ウイルス性のゼラチンハイドロゲル (GHG)²⁰も用いた。この GHG が遺伝子発現期間を延長しかつ発現領域を拡大することは既に確認済みである。下肢虚血作製10日後に、FGF4 単独 (500 μ g), FGF4-GHG (500 μ g と 4 mg) あるいは LacZ-GHG (500 μ g と 4 mg) を左大腿部の筋肉内に投与した。この3群に対し下肢虚血作製38日後に、各群の治療効果を血管造影を含む種々の方法で評価した。放射光微小血管造影は上記と同じシステムを用い、ベースラインの状態と血管拡張剤としてアデノシンを投与した状態とにおいて行った。

まず肉眼的所見であるが、LacZ-GHG 群では下肢先端の壊死脱落が見られ、FGF4-GHG 群では、ほとんど異常所見は見られなかった。FGF4 単独群ではちょうどその中間的所見であった。すなわち臨床症状における治療効果は、FGF4-GHG 群 > FGF4 単独群 > LacZ-GHG 群の順であった。また、筋肉壊死の程度や筋肉重量も同様な結果を示した。これらのことは、同じ遺伝子治療でも非ウイルス性ベクターを使用することにより、より有効な再生医療が行われたことを示している。

虚血下肢の放射光微小血管造影においては、治療群ではアデノシンに対する良好な血管拡張反応を可視化できた (Fig. 3)。しかし非治療群 (LacZ-GHG 群) では逆にアデノシン投与により虚血部の再生血管像は減少した。これは治療群では血管拡張刺激に反応しうる血管が再生されており、一方非治療群での再生血管は同刺激に対してむしろ局所血流を減少させることを示すものである。造影結果を造影スコアとして数値化すると、FGF4-GHG 群は他の2群に比べ有意に大であった ($0.51 \pm 0.15^*$, 0.43 ± 0.15 , 0.34 ± 0.10 , $*p < 0.05$ ANOVA)。アデノシンによる各群の変化率も $28 \pm 8^*$, 5 ± 10 , $0 \pm 10\%$ と FGF4-GHG 群でのみ有意に大 ($*p < 0.05$ ANOVA) であった。すなわち非ウイルス性ベクターと FGF4 との併用でより成熟した血管の再生が行われたことを放射光微小血管造影法によって確認できることを示している。

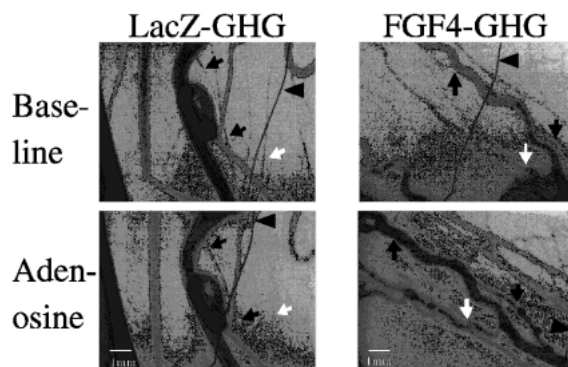


Figure 3. Synchrotron radiation microangiograms of the hindlimb ischemia taken under baseline conditions and after repeated adenosine administration in lacZ-GHG-treated rabbit and FGF4-GHG-treated rabbit. Arrows indicate the same point in the vessels. Arrowheads, reference copper wires with a diameter of 130 μ m.

以上、再生血管の成熟度の評価には放射光微小血管造影法が有用であった。血管再生医療における臨床効果の差は、血管の成熟度の差すなわち血管反応性の差として現れており、その血管反応性の差は放射光微小血管造影法で可視化することにより評価可能であった。

5. おわりに

次世代の治療としての再生医療では、より早期のそしてより正確な診断だけでなく、その治療効果の評価に対しても細かい再生血管の可視化が求められている。今回示した単色放射光を用いた微小血管造影法は再生医療の進歩とともに次世代の種々の疾患の診断と治療に役立つことが期待される。

謝 辞

実験に協力して頂いた京都大学田畑泰彦先生、国立がんセンター坂本裕美先生、NHK 山口孝一・久保田節・江上典文・大川裕司・斉藤信雄・宮川和典・松原智樹の各先生、浜松ホトニクス鈴木克彦先生、東海大学放射線科および共利研の皆様へ深謝いたします。本研究は文部科学省科研費 (12670064, 13470154, 13470381, 13877114, 14657460, 14657461), 循環器病研究委託費 (13C-1), 厚生労働科学研究費補助金 (H14ナノ-001, ゲノム-005) 医薬品機構, NEDO, 私立大学学術フロンティア推進事業の補助により行われた。

参考文献

- 1) J. M. Isner, K. Walsh, J. Symes, A. Pieczek, S. Takeshita, J. Lowry, S. Rossow, K. Rosenfield, L. Weir and E. Brogi: *Circulation* **91**, 2687 (1995).
- 2) H. Kasahara, E. Tanaka, N. Fukuyama, E. Sato, H. Sakamoto, Y. Tabata, K. Ando, H. Iseki, Y. Shinozaki, K. Kimura, E. Kuwabara, S. Koide, H. Nakazawa and H. Mori: *J Am Coll Cardiol*, (2002), in press.

- 3) 盛英三, 山川明彦, 篠崎芳郎, ミンハズウッドインモハマド, 田中越郎, 中澤博江, 田中豊, 後藤研一郎, 飛田浩輔, 石過孝文, 三富利夫, 岩田美郎, 松山正也, 青木直人, 阿部純久, 半田俊之介, 兵藤一行, 安藤正海, 谷岡健吉, 久保田節: *放射光* **8**, 398 (1995).
- 4) H. Mori, K. Hyodo, E. Tanaka, M.M. Uddin, A. Yamakawa, Y. Shinozaki, H. Nakazawa, Y. Tanaka, T. Sekka, Y. Iwata, S. Handa, K. Umetani, H. Ueki, T. Yokoyama, K. Tanioka, M. Kubota, H. Hosaka, N. Ishikawa and M. Ando: *Radiology* **201**, 173 (1996).
- 5) S. Takeshita, T. Isshiki, H. Mori, E. Tanaka, K. Eto, Y. Miyazawa, A. Tanaka, Y. Shinozaki, K. Hyodo, M. Ando, M. Kubota, K. Tanioka, K. Umetani, M. Ochiai, T. Sato and H. Miyashita: *Circulation* **95**, 805 (1997).
- 6) S. Takeshita, T. Isshiki, M. Ochiai, K. Eto, H. Mori, E. Tanaka, K. Umetani and T. Sato: *Circulation* **98**, 1261 (1998).
- 7) Y. Tanaka, H. Mori, E. Tanaka, S. Abe, H. Makuuchi, H. Nakazawa, S. Handa, K. Tanioka, M. Kubota, S. Kumaoka, K. Hyodo and M. Ando: Medical applications of synchrotron radiation, Eds: M. Ando, C. Uyama, Springer-Verlag, Tokyo, pp42, (1998).
- 8) H. Mori, E. Tanaka, K. Hyodo, M. Uddin Mohammed, T. Sekka, K. Ito, Y. Shinozaki, A. Tanaka, H. Nakazawa, S. Abe, S. Handa, M. Kubota, K. Tanioka, K. Umetani and M. Ando: *Am J Physiol* **276**, H429 (1999).
- 9) E. Tanaka, A. Tanaka, T. Sekka, Y. Shinozaki, K. Hyodo, K. Umetani and H. Mori: *Am J Neuroradiol* **20**, 801 (1999).
- 10) T. Sekka, S. A. Volchikhina, A. Tanaka, M. Hasegawa, Y. Tanaka, Y. Ohtani, T. Tajima, H. Makuuchi, E. Tanaka, Y. Iwata, S. Sato, K. Hyodo, M. Ando, K. Umetani, M. Kubota, K. Tanioka and H. Mori: *J Synchrotron Rad* **7**, 361 (2000).
- 11) 梅谷啓二: *放射光* **14**, 280 (2001).
- 12) K. Hyodo, K. Nishimura and M. Ando: Synchrotron radiation handbook. Eds. S. Ebashi, M. Koch, E. Rubenstein. Elsevier Science, Amsterdam, pp55, (1991).
- 13) H. Mori, K. Hyodo, K. Tobita, M. Chujo, Y. Shinozaki, Y. Sugishita and M. Ando: *Circulation* **89**, 863 (1994).
- 14) K. Tanioka, J. Yamazaki, K. Shidara, K. Taketoshi, T. Kawamura, T. Hirai and Y. Takasaki: *Adv Electronics Electron Phys* **74**, 379 (1988).
- 15) K. Tsuji, T. Ohshima, T. Hara, N. Gotoh, K. Tanioka and K. Shidara: *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **219**, 507 (1991).
- 16) K. Umetani, T. Kajiyama, K. Ueda, Y. Takasaki and H. Yokouchi: *Proc SPIE* **2163**, 361 (1994).
- 17) K. Umetani, H. Ueki, K. Ueda, T. Hirai, T. Takeda, T. doi, J. Wu, Y. Itai and M. Akisada: *J Synchrotron Rad* **3**, 136 (1996).
- 18) K. Umetani, H. Ueki, T. Takeda, Y. Itai, H. Mori, E. Tanaka, M.U. Mohammed, Y. Shinozaki, M. Akisada and Y. Sasaki: *J Synchrotron Rad* **5**, 1130 (1998).
- 19) H. Sakamoto, M. Mori, M. Taira, T. Yoshida, S. Matsukawa, K. Shimizu, M. Sekiguchi, M. Terada and T. Sugimura: *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 3997 (1986).
- 20) Y. Tabata and Y. Ikada: *Adv Drug Deliver Rev* **31**, 287 (1998).