

心筋の再生療法

慶應義塾大学呼吸循環器内科 八木 崇
 同心臓病先進治療学 福田恵一

概 説

これまで重症難治性心不全に対する治療法としては心臓移植が唯一の治療法であった。しかしドナー不足により、一般に普及する治療にはいたっていない。

これに対し、近年の再生医学の発達により心筋細胞を再生し、これを移植することにより治療する方法が模索されている。発生学や幹細胞に関する研究が飛躍的に進み、これらを応用して心筋細胞を再生することが現実的になってきた。本稿では心筋再生の現状を概説する。

胚性幹細胞(ES細胞)の利用

受精卵は身体のすべての組織に分化することができるが、この受精卵が胚盤胞に分化した段階で取り出したものがES細胞である。ES細胞は*in vivo*ではすべての組織の細胞に分化できるが、*in vitro*では一部の発生早期に出現する細胞に関しては分化誘導できるようになりつつある。心筋細胞は胎性早期に出現する細胞であり、ES細胞からも比較的容易に得ることができる。ヒトのES

細胞からも心筋細胞が得られたことがすでに報告されている。ES細胞からの心筋再生の利点として、①大量培養が可能なこと、②すでに心筋細胞を得る方法がある程度確立していること、があげられる。

これに対し、欠点は①同種移植となるため免疫抑制薬の使用が必要となること、②未分化細胞を除去しない場合には移植後に奇形腫を作製してしまう危険のあること、③倫理的問題が残されていること、などがあげられる。しかし、これらの問題はいずれ解決できる問題であり将来的には臨床応用されることが期待される。

体性幹細胞の利用

近年の研究により、骨髄中には造血幹細胞以外にも間葉系幹細胞が存在し、血液以外のさまざまな体細胞に分化することが明らかとなった。間葉系幹細胞は当初、中胚葉系の細胞(骨、軟骨、脂肪など)に分化すると考えられていたが、最近の研究では外胚葉由来の神経細胞にも分化することが明らかとなり、体性幹細胞(成体幹細胞)と呼ばれるようになった。われわれは体性幹細胞が心筋細胞に分化するのではないかと推測し、分化誘導を行ったところ心筋細胞に分化することに成功した。Table 1に体性幹細胞由来の性質のまとめを示した。

再生心筋の移植による心不全治療

再生心筋細胞を成体の心臓に移植する試みは、当初、直接心臓に心筋細胞を注射する方法で開始

Table 1. 再生心筋細胞の特徴

心筋細胞としての特徴	表現型の形式	発現タンパクなどの具体的内容
心筋収縮タンパク	胎児心筋型	α -skeletal actin, β -ミオシン重鎖, ミオシン軽鎖 2v
活動電位	胎児期早期(洞結節型)	分化の早期 I_f , $I_{Ca,L}$, I_{K1} , I_K 分化が進むと $I_{Ca,T}$, $I_{K1,ATP}$ など
交感神経 α_1 受容体	心筋型	α_{1A} 型, α_{1B} 型 $>$ α_{1D} 型 心肥大作用を示す
交感神経 β 受容体	心筋型	β_1 型 $>$ β_2 型 陽性変力, 陽性変時作用を有する
副交感神経ムスカリン受容体	心筋型	M_2 型 $>$ M_1 型 IP3 上昇作用を有した
自己拍動能		毎分 120-250
転写因子の発現	心筋型	Nkx2.5, GATA4, TEF1, MEF2A, MEF2C, MEF2D, HAND1, HAND2 など

された。しかし、この方法では多くの細胞が壊死により失われることから、さまざまな工学的手法により工夫がなされるようになった。

これらの中には、①生体内で溶解するポリ乳酸などの高分子化合物で鑄型となるスカフォールドを作製し、その上に心筋細胞を培養し形態をもたせる方法、②温度により疎水性・親水性が変化する *N*-イソプロピルアクリルアミドゲルを培養皿上に表層塗布し、その上で培養した心筋細胞に対し、傷害を与えることなく脱着することにより心筋シートをつくる方法などを利用し、個々の細胞でなく細胞の塊を組織として移植する技術の開発

が進められている。

厚みのある組織の作製、組織を栄養する血管の侵入など、今後解決すべき問題はある。しかしながら、こうした工学的手法の利用はこの領域の発展をより現実的な治療法の確立に導くものであり、さらなる発展が期待される。

— 文 献 —

- 1) Makino S et al : J Clin Invest 103 : 697, 1999
- 2) Fukuda K et al : Artificial Organs 25 : 183, 2001
- 3) Hakuno D et al : Circulation 105 : 380, 2002
- 4) Shimizu T et al : Circ Res 90 : e 40, 2002

3. 遺伝子による血管新生

國本 聡, 笠原啓史, 福山直人, 田中越郎, 知久正明, 永谷憲歳
西上和宏, 岩畔英樹, 増田治史, 浅原孝之, 盛 英三

サマリー
1994年に行われた循環器領域における遺伝子治療開始以来, 次々にその有効性が報告されている。これら循環障害に対しての遺伝子治療は遺伝子治療全体のなかでもっとも良好な結果が得られているといっても過言ではないと思われる。近年, nakedプラスミドや骨髄単核球投与による血管新生療法も臨床において開始されており, 増え続ける虚血性疾患に対しての新たな治療法としての位置を確保しつつある。本稿においては, 新たな治療法として行われてきている遺伝子投与による血管新生療法の現況を概説し, われわれが開発中の生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法と Cell/Gene Hybrid Therapy についても解説する。

再生医療の現状

Folkmanにより腫瘍発育に血管新生因子による新生血管が関与していることが示されて以来, 分子生物学の発展に伴い血管形成の機序が徐々に明らかになってきた。悪性新生物における血管新生の抑制, または虚血に対しての血管新生療法の可能性を示唆する研究報告がなされるなか, 血管新生促進因子による血管新生(再生)を得ることで虚血性疾患の治療を行う「治療的血管新生(therapeutic angiogenesis)」の概念が誕生した¹⁾。そして, 1994年に米国タフツ大学の Jeffrey M. Isnerらにより, 循環器領域における世界初の遺伝子治療が行われた²⁾。その後も, それ以外の血管新生促進因子を用いた治療的血管新生の検討が行われてきている。

1. 血管新生促進因子

種々の血管新生促進因子による血管新生(angiogenesis)あるいは血管形成(vasculogenesis)が報告されている(表1)。以下にその主なものについて述べる。

1) FGF (fibroblast growth factor : 線維芽細胞増殖因子)

FGFファミリーはヘパリンに親和性の高いポリペプチドであり, aFGF (acidic FGF : 酸性FGF=FGF-1), bFGF (basic FGF : 塩基性FGF=FGF-2), int-2 (FGF-3), hst-1 (FGF-4), FGF-5がある。FGFは内皮細胞のみでなく線維芽細胞や平滑筋細胞を増殖させる働きがある。このことは毛細血管のみでなく細小動脈の新生をきたす可能性があるが, 増殖性病変性のある可能性もある。aFGF, bFGFに関しては分泌シグナルが付いていないためにその分泌機序は詳細が不明である。一方, int-2, hst-1はシグナルペプチドをもち分泌されるタンパク質であり, VEGF産生を促進するhst-1/FGF-4は血管新生療法においてより有効である可能性があり狭心症に対しての臨床試験でも有効性が報告されている³⁾。また, FGF-5は脈絡膜血管新生に関与しているとの報告がある。

2) VEGF (vascular endothelial growth factor : 血管内皮増殖因子)

1つの遺伝子から5種類のアイソフォーム(121, 145, 165, 189, 206アミノ酸)が産生され, PDGF

(platelet derived growth factor : 血小板由来増殖因子)-Aあるいは-Bと似た構造をしている。in vitroでは内皮細胞の増殖促進, アポトーシスの抑制, in vivoでは血管新生, 血管透過性はもちろん管腔形成促進, 内皮細胞の遊走, 凝固線溶系タンパク質の産生, 細胞接着分子の内皮細胞上への発現等を誘導する。VEGFはシグナルペプチドをもつため, 分泌されパラクリン的に血管内皮細胞に働き, 低酸素状態に反応して働くという大きな特徴がある。これは, VEGFの転写開始点よりも上流に結合するHIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α : 低酸素誘導因子1 α)を介しての転写亢進が関与している。VEGF関連遺伝子群としてPIGF (placenta growth factor : 胎盤由来増殖因子), VEGF-B, -C, -D, -Eも発見されその効果について検討がなされている。最近, 生物学的活性の強いVEGF₁₆₅に特異的に結合するneuropilin-1 (NP-1)が報告された⁹⁾。これは単独では活性を示さないが, 内皮細胞に発現させるとVEGF受容体に対する結合が約10倍に上昇し, 活性も同程度上昇することが示された。VEGFは内皮細胞に限局的に働くが, 透過性の増大による浮腫をきたす例が少なくない。

3) HGF (hepatocyte growth factor : 肝細胞増殖因子)

HGFは, 肝臓の再生因子として発見されたが, 腎臓, 肺, 消化管そして血管等さまざまな臓器に関与している。HGFは典型的なシグナル配列をもつため細胞から分泌され, 受容体であるc-Metが内皮細胞に存在することから, VEGFと同様に血管平滑筋細胞には影響を与えず, 内皮細胞のみを増殖させることが明らかになっている⁹⁾。HGFは虚血の状況下においてはその発現は著明に低下しており, VEGFとは異なる。しかし, 受容体であるc-Metの発現は増加しており, HGFを遺伝子導入することによりその不足分を補うことが可能となり, 結果としてVEGFと同等な治療効果を得ることができるとされている。現在, 臨床においての投与が開始されており, その有効性が報告されている。副作用としての浮腫はVEGFと異なり報告されていない。

4) その他の血管新生促進因子

プロスタグランジン (PGE₁, PGE₂) は血管拡張作用と血管新生作用をもち, 化学的安定化を図ったプロドラッグの報告がある⁹⁾。

炎症性サイトカインにはIL-1/6/8, TNF- α , イン

略 語

FGF : fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)	G-CSF : granulocyte colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)
VEGF : vascular endothelial growth factor (血管内皮増殖因子)	GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)
PDGF : platelet derived growth factor (血小板由来増殖因子)	PGE ₁ , E ₂ : prostaglandin E ₁ , E ₂
HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α (低酸素誘導因子1 α)	PD-ECGF : platelet derived-endothelial cell growth factor (血小板由来内皮細胞増殖因子)
PIGF : placenta growth factor (胎盤由来増殖因子)	TNF- α : tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子- α)
NP-1 : neuropilin-1	EGF : epidermal growth factor (上皮成長因子)
HGF : hepatocyte growth factor (肝細胞増殖因子)	TGF- β : transforming growth factor- β (形質転換増殖因子)
PA : plasminogen activator	PAF : platelet-activating factor (血小板活性因子)
MMP : matrix metalloproteinase	ECK : epithelial cell kinase
PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1	

ターフェロン等があるが、これらは炎症に際してマクロファージ、好中球等から分泌される。血管新生に関与しているものとしてはIL-8とTNF- α がある。

IL-8はC-X-Cファミリーに属する α -ケモカインの1つで血管新生を誘導する⁸⁾。TNF- α は低濃度ではIL-8、VEGF、bFGFの細胞内での転写を亢進して血

○表1 血管新生促進因子

VEGFファミリー	
<ul style="list-style-type: none"> • VEGF • VEGF-B (VEGF-related factor : VRF) • VEGF-C (VEGF-related protein : VRP) • VEGF-D (c-fos-induced growth factor : FIGF) • VEGF-E • PlGF (胎盤由来増殖因子) • HIF-1α (低酸素誘導因子) • neuropilin-1 (NP-1) 	<p>本文参照 Flt-1と結合、内皮細胞増殖 リンパ管内皮細胞増殖、遊走促進、血管内皮細胞増殖、血管透過性亢進 血管内皮細胞増殖、心・肺・骨格筋 KDR/Flk-1とのみ結合、哺乳類では(-) 血管内皮増殖促進 低酸素により誘導、VEGF転写を誘導 KDR/Flk-1とVEGF₁₆₅結合を修飾、内皮細胞遊走能亢進</p>
FGFファミリー	
<ul style="list-style-type: none"> • FGF-1 (aFGF) • FGF-2 (bFGF) • FGF-3/fnt-2 • FGF-4/hst-1 • FGF-5 	<p>本文参照 シグナル配列(-) シグナル配列(-) シグナル配列(+) シグナル配列(+)、VEGF産生促進 脈絡膜血管新生に関与</p>
HGF	
プロスタグランジン	
<ul style="list-style-type: none"> • PGE1 • PGE2 	
thymidine phosphorylase	
<ul style="list-style-type: none"> • PD-ECGF (血小板由来内皮細胞増殖因子) 	血管内皮細胞遊走能亢進
サイトカイン	
Class I/II	
<ul style="list-style-type: none"> • IL-2, 15 • エリスロポエチン • G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) • GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) 	細胞増殖・分化性の亢進
IL-8	
TNF- α (腫瘍壊死因子- α)	低濃度にてIL-8、VEGF、bFGF転写の亢進
Fasリガンド (FasL)	
EGF (epidermal growth factor : 上皮成長因子)	
<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β (形質転換増殖因子) • PAF (血小板活性因子) 	
細胞間接着因子	
<ul style="list-style-type: none"> • VEカドヘリン • PECAM-1 	
プロテアーゼ	
<ul style="list-style-type: none"> • PA (plasminogen activator) • MMP (matrix metalloproteinase) -2, 9 	<p>血管内皮から産生 線維芽細胞、マクロファージから産生</p>
マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)	
アンジオゲニン (血管増生因子)	
アンジオポエチン1	RNA分解酵素と類似
アンジオテンシンII	VEGFによる血管新生促進作用
B61	ECK (epithelial cell kinase) のリガンド、TNF α により発現
ヒスタミン	
HIV-1 Tat protein	KDRの活性化
レグレン	脂肪細胞から分泌インスリン感受性ホルモン
leukotriene C4 (LTC4)	
PDGF-BB (血小板由来増殖因子)	VEGF誘導
$\alpha v \beta 3$	インテグリン

管内皮細胞の管腔形成を促進する等血管新生促進に働くが、高濃度では血管新生を抑制する⁹⁾。

内皮細胞の管腔形成を調節するため、PA (plasminogen activator), MMP (matrix metalloproteinase) といったプロテアーゼ, $\alpha v \beta 3$ といったインテグリン, VEカドヘリンとPECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 等の細胞間接着因子が働いている。プロテアーゼは血管基底膜を融解し、内皮細胞は刺激方向への遊走を開始する。遊走の際にはインテグリンが細胞外マトリックスと接着する働きをもつ。細胞間接着因子は血管内皮細胞の管腔形成に関与している。

アンジオポエチン-1は造血幹細胞が無血管領域に進入して分泌され血管内皮細胞の遊走を誘導する¹⁰⁾。

虚血によりAT-1受容体の発現が亢進し、アンジオテンシンIIを追加することによりさらに血流改善を認めた¹¹⁾。

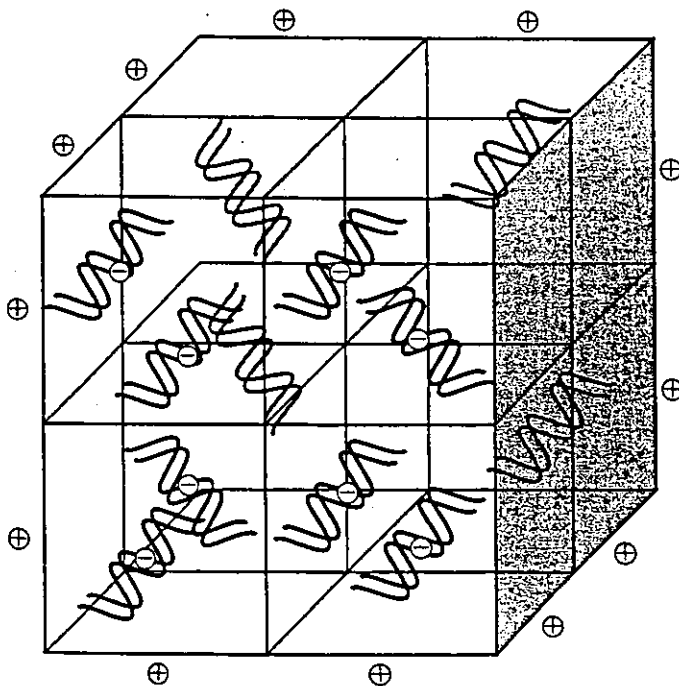
また、近年骨髄からの血管前駆細胞の動員を目的としたG-CSF, GM-CSFの投与によって虚血の改善が期待されている。

そして間接的あるいは直接的に血管新生を促進するアドレノメジュリン等数多くの因子が血管新生をきたすとの報告がある。

2. 遺伝子治療の方法・現状とその問題点

現在行われている遺伝子導入法としては、①プラスミドそのもの (nakedプラスミド)、②ウイルスベクターを用いる方法 (アデノウイルス、ヘルペスウイルス等)、③リポソーム法、④ハイドロゲル法といったものがあげられる。②は、遺伝子導入効率はよいもののウイルスによる感染の問題が指摘されており、安全性の問題から①のnakedプラスミドの筋肉内導入が行われることが多い。この方法はウイルスベクターを用いないので感染の危険性は低いものの、投与したプラスミドDNAが細胞内に導入される前に生体内に存在するさまざまな核酸分解酵素によって分解され、または組織内へ拡散してしまう可能性があり、有効な治療効果を得るには大量の遺伝子が必要となる。

以上の背景をふまえて、安全かつ有効な遺伝子導



● 図1 生分解性ゼラチンの格子構造模式図

遺伝子はマイナスに荷電しており、プラスに荷電しているゼラチン内に取り込まれることにより安定となり、生体内の酵素の影響を受けにくくなる

入法として考案された生分解性ゼラチンを用いた新しい遺伝子導入法に関するわれわれの最近の知見を中心に、次世代の遺伝子治療について以下に述べていきたい。

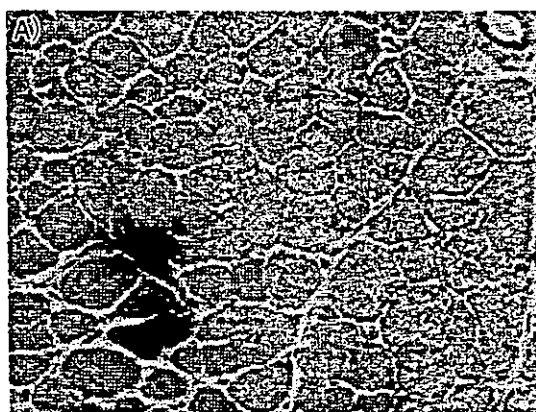
再生医療の最前線

1. ゼラチン・遺伝子複合体による遺伝子発現強化と徐放化

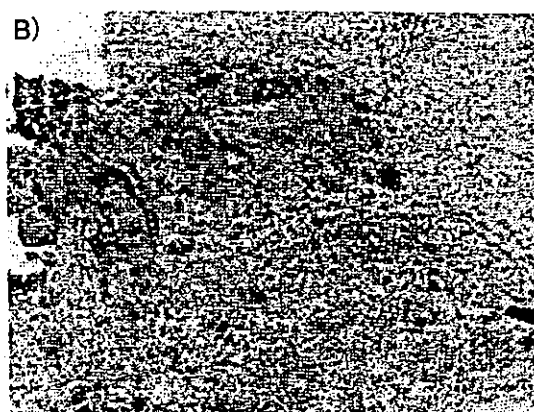
われわれはゼラチンの構造を格子状にして陰性荷電した遺伝子とイオンを結合させ、ゼラチン-遺伝子複合体を作製した(図1)。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内に封入して生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の代謝が緩徐となり、結果として安全かつ効率的に遺伝子を導入することができる。本法は安全性の問題が指摘されているウイルスベクターを用いずに済むということに加えて、ゼラチン自体も生体内でプロテアーゼにより分解されるという点で優れた方法であると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を飛躍的に延長させることに成功し、遺伝子の発現率も従来の遺伝子

の単独投与と比較して約10倍の増加が認められた。

次にわれわれは、家兎の下肢虚血モデルを用いてこのゼラチン-遺伝子複合体の治療効果を調べた。大腿動脈摘除後10日目に血管新生因子であるFGF-4やVEGF₁₆₅を虚血部位へ筋肉内投与した。動脈摘除後17日目においてLacZ遺伝子単独投与群では筋注部位にのみ発現を認める(図2A)が、ゼラチン-遺伝子複合体により投与した群では広い範囲に発現を認めている(図2B)。38日目において遺伝子非投与群と比較して通常の血管造影上有意味な血管新生とこれに伴う血流量の有意な増加が観察された(図3)。遺伝子単独投与群とゼラチン-遺伝子複合体投与群の比較において既存の血管造影法では差異は認められなかった。マイクロスフェア法を用いた血流計測法(図4A)と放射光微小血管造影法(図4B)で両群の新生血管の血管拡張物質に対する反応性に有意な差異が確認された。遺伝子非投与群ではアデノシンあるいはアセチルコリンの投与による血管造影上の血管拡張(図4B)および血流量(図4A)の明らかな増大が観察された。一方遺伝子単独投与群では有意な増加が認められなかった。この事実は、ゼラチン-遺伝子複合体による治療群では血流制御能を伴う血管床の再生が実現されていることを示唆している。

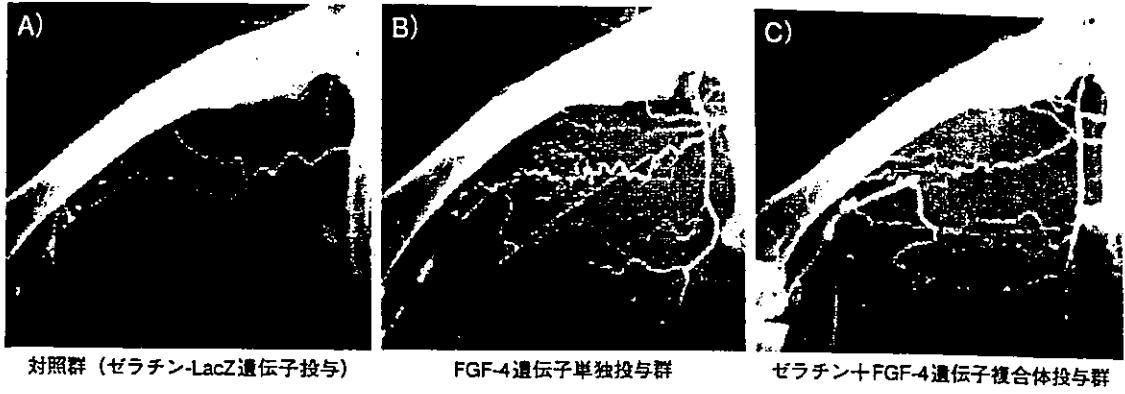


LacZ遺伝子単独投与

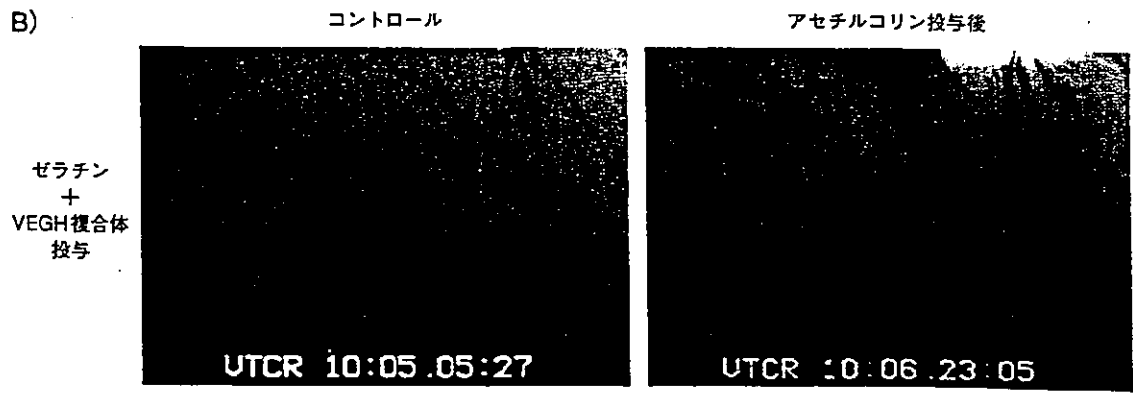
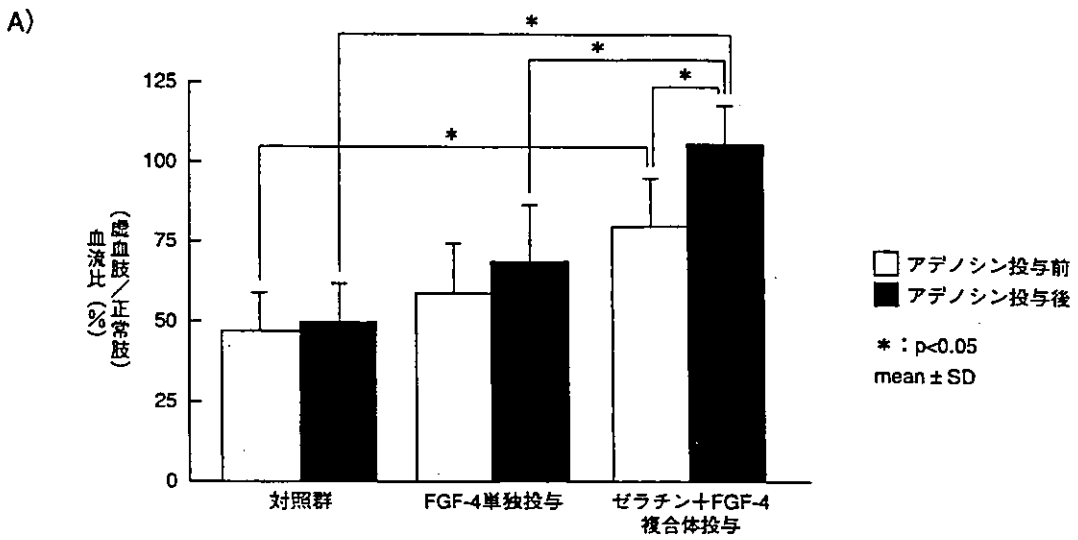


ゼラチン-LacZ遺伝子複合体投与

●図2 家兎下肢虚血モデルの筋肉内LacZ発現(虚血作製後17日目、筋注後7日目)(巻頭カラー6参照)
LacZ単独投与(A)において刺入部のみに発現を認めているが、ゼラチンと複合体での投与例(B)では周囲組織内での発現を認めている



●図3 下肢虚血モデル家兎の遺伝子治療後38日目における新生血管
 家兎虚血モデルの血管造影においてコントロール例 (A) に比較して、FGF-4 遺伝子投与群 (BおよびC) において有意な新生血管の増加を認めた



●図4 A) 下肢虚血モデルに対する遺伝子治療の効果とアデノシンに対する反応性 (マイクロスフェア法による). B) アセチルコリンに対する新生血管の反応性 (放射光微小血管造影法)

遺伝子治療汎用化への展望

1. 現行の遺伝子治療に求められる改良点

VEGFやbFGFの組換えタンパクあるいはプラスミドDNA・ウイルスベクターを用いた組換え遺伝子の投与による血管新生療法には問題や限界がある。VEGFを例にとると、虚血部位での周皮細胞の不足した未成熟な新生血管が発生し、結果として易出血性を示し、透過性亢進による浮腫が生じやすくなってしまふ。そうした問題に対してBlauらは、調和のとれた再生血管床を得るために以下の3つの概念を述べている¹⁴⁾。

- ①持続期間を調節する機能をもったベクターとともに投与して、至適な量と持続時間で血管成長因子が作用するようにする。
- ②内皮細胞を安定化させるアンジオポエチン-1や周皮細胞を動員するPDGF-BB等補完的な効果をもつ調節因子を血管成長因子とともに投与する。
- ③虚血時に分泌される血管成長因子、PDGF-BB、アンジオポエチン-2を血管内皮細胞から分泌させるHIF-1 α のような多面発現性をもった因子を投与する。または、HIF-1 α の代謝を抑制するPR39といったさらに上流の調節因子を投与することによって、最終的にはバランスのとれた複数の調節因子を作用させる。

2. 細胞を基地とした遺伝子治療 (Cell-based gene therapy)

遺伝子または調節因子の投与のみでは代謝による影響があり、必要とされる局所への有効量の到達の面で限界がある。目的としている臓器にある細胞の中に遺伝子を発現させてから投与し、細胞内での持続的遺伝子産生によって長期的に局所に遺伝子を発現させる方法がCell-based gene therapyである。血管においては内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞、心筋においては骨格筋筋芽細胞等が用いられ、細胞投与後2週間以上の遺伝子発現持続が認められ良好な効果が得られている¹⁵⁾。

3. 細胞/遺伝子ハイブリッド型治療 (Cell/Gene Hybrid therapy)

Cell-based gene therapyでは細胞は遺伝子発現の元としての機能しか果たしていない。われわれはBlauらの主張をふまえて、今後の遺伝子治療としてCell/Gene Hybrid-therapyという概念を提案する。

最近の血管新生療法においては、骨髄単核球や血管内皮前駆細胞を経管的に移植する方法が試みられており、細胞移植による血管新生療法の可能性が示唆されている。これらの細胞移植の長所に加えて細胞内で遺伝子を発現させることによって、細胞と遺伝子の相乗作用で血管床を再生するという概念がハイブリッド遺伝子治療法である。われわれは生分解性ゼラチンを用いた細胞内遺伝子導入法を考案した。貪食能をもつ細胞（マクロファージや血管内皮前駆細胞）は遺伝子を吸着させたゼラチンを高率に貪食するため、細胞内への導入が可能となる（図5）。走化性をもつマクロファージや単球に血管成長因子の遺伝子を導入し、この細胞を経管的に投与して血管再生治療を行う。これらの細胞は傷害部位に特異的に集まるために、局所の遺伝子発現効率が高まる。しかも、線維芽細胞や平滑筋細胞と異なり血管内へ投与しても凝集することがなく、血管内投与が可能となる。

さらに、血管内皮前駆細胞の有するvasculogenesis, angiogenesisと補完的な作用を有する遺伝子を導入することで、より成熟した血管床を再構築することを目指しており、本法の難治性の循環障害（心筋梗



●図5 ゼラチン-GFPを貪食しGFPが細胞質内で発現しているマウス・マクロファージ

塞, 下肢虚血, 原発性肺高血圧症等) の治療への適応を検討中である。血管発生能を有する血管内皮前駆細胞に強い血管拡張作用を有するアドレノメジュリンを組合せることにより, 毛細血管再生にとどまらず, 上流にあたる細小動脈のリモデリングを含めた総包括的な血管再生が期待されている。

これからの 基礎医学研究に望むこと

循環器領域における遺伝子治療, 再生医療が, 初期からその有効性が報告され臨床応用が進んでいるなかで, 遺伝子治療としての臨床応用はわが国としては米国に大きく後れをとっている。しかし, 近年, 骨髄単核球投与による血管新生療法が世界に先駆けての臨床応用が開始され, その有効性が報告されている。

臓器レベルの循環障害を血管再生医療で克服するには安全性と有用性の両面で一層の基礎医学における進歩が求められている。作用を患部にとどめること, そして十分に機能的な血管系の再構築が求められており, 細胞機能の強化を図るハイブリッド治療が必要部位に局限したより大きな効果を生むものとして, 新たな遺伝子治療の展開をみせていくものとして期待される。

文 献

- 1) Folkman, J. : n Engl. J. Med., 285 : 1182-1186, 1971
- 2) Hockel, M. et al. : Arch. Surg., 128 : 423-429, 1993
- 3) Isner, J. M. et al. : Lancet, 348 : 370-374, 1996
- 4) Cindy, L. G. et al. : Circulation, 105 : 1291-1297, 2002
- 5) Soker, S. et al. : Cell, 92 : 735-745, 1998
- 6) Nakamura, Y. et al. : J. Hypertens., 14 : 1067-1072, 1996
- 7) Igarashi, R. et al. : J. Controlled Release, 71 : 157-164, 2001
- 8) Koch, A. E. et al. : Science, 258 : 1798-1801, 1992
- 9) Fajardo, F. L. et al. : Am. J. Pathol., 140 : 539-544, 1992
- 10) Takakura, N. et al. : Cell, 102 : 199-209, 2000
- 11) Tateishi-Yuyama, E. et al. : Lancet, 360 : 427-435, 2002
- 12) Blau, H. M. et al. : Nature Med., 7 : 532-534, 2001
- 13) Suzuki, K. et al. : Circulation, 104 [Suppl I] : I 207-I 212, 2001

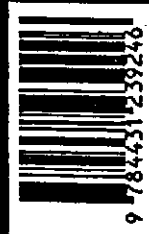
●筆頭著者プロフィール●

國本 聡 : 1989年日本大学医学部卒業, '95年日本大学大学院卒業, '96年から '98年まで米国ノースカロライナ大学循環器科に留学, Leonard S. Gettes教授のもと虚血性心疾患に伴う致死的不整脈の原因について研究。帰国後, 虚血性心疾患の遺伝子治療の研究に従事し, 東海大学医学部生理科学教室浅原孝之教授のもとで血管内皮前駆細胞について研究指導を受けた後, 現在国立循環器病センター研究所においてさらなる展開を目指して研究中。

**Cardiovascular Regeneration Therapies
Using Tissue Engineering Approaches**

The fact that the cardiovascular system transports oxygen and nutrients to all parts of the body makes any threat to its well-being a serious hazard to organs, tissues, and cells. This fundamental truth underlines the importance of research into cardiovascular regeneration and, therefore, of this collection containing the latest developments in the field. With input from many of the leading researchers and practitioners, this book describes techniques for therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for the treatment of ischemic diseases and examines the current approaches to angiogenic cytokines, cardiovascular stem cells, and tissue-engineering tools. The latest clinical results using bone marrow-derived mononuclear cell therapy for amenable circulatory disorders are also covered. This body of work will be a valuable resource for professionals in the fields of cardiovascular surgery, regenerative medicine, and tissue engineering.

ISBN 4-431-23924-3



springer.com

H. Mori
H. Matsuda (Eds.)



Cardiovascular Regeneration Therapies
Using Tissue Engineering Approaches

H. Mori • H. Matsuda (Eds.)

**Cardiovascular Regeneration
Therapies Using Tissue
Engineering Approaches**

Springer

Contents

Preface.....	V
--------------	---

Chapter 1: VASCULAR PRECURSOR CELLS AND THEIR POTENTIATION

EPC and Their Potentiation by Adenovirus Gene Delivery Iwaguro H and Asahara T	3
Potentiation of Regenerative Therapy by Non-Viral Vector, Gelatin Hydrogel Nagaya N, Fukuyama N, Tabata Y, Mori H.....	17
Regeneration of Myocardium Using Bone Marrow Cells Tomita S and Nakatani T	31

Chapter 2: DEVELOPMENT OF MYOCARDIAL SHEETS AND THEIR CELL SOURCES

Cell Sheet Technology for Myocardial Tissue Engineering Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Okano T	45
Myocardial Regeneration Therapy with Tissue Implantation of Autologous Myoblast Sheets for Severe Impaired Heart Failure Sawa Y, Memori I, and Matsuda H.....	53
Cardiovascular Cell Differentiation from ES Cells Yamashita J.....	67

Chapter 3: HYBRID TISSUES

Preparation and Recellularization of Tissue-Engineered Bioscaffold for Heart Valve Replacement Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S	83
---	----

Biotube Technology for a Novel Tissue-Engineered Blood Vessels Ishibashi-Ueda H and Nakayama Y	95
Clinical Application of Tissue-Engineered Blood Vessels Matsumura G and Shin'oka T	105

Chapter 4: NEW ASPECTS OF ANGIOGENESIS

Vascular Regeneration and Remodeling by Circulating Progenitor Cells Sata M and Nagai R	117
Gene Therapy with Hepatocyte Growth Factor for Angiogenesis in Severe Pulmonary Vascular Disease Ono M, Sawa Y, and Matsuda H	129
Basic Fibroblast Growth Factor and Angiogenesis Marui A, Doi K, Tambara K, Sakakibara Y, Ueyama K, Iwakura A, Yanamoto M, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M	145
Gene Therapy for Angiogenesis under a Ventricular Assist System Takewa Y, Shirakawa Y, Taenaka Y, Tatsumi E, Sawa Y, Matsuda H, Kitamura S, Takano H	157
The Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on Therapeutic Angiogenesis Using Bone Marrow Cells Maeda Y and Ikeda U	173

Chapter 5: CLINICAL RESULTS OF THERAPEUTIC ANGIOGENESIS AND VASCULOGENESIS

Clinical Survey of Cell Therapy in Japan Katsuda Y, Takeshita Y, Arima K, Saitoh Y, Imaizumi T, Asahara T, Nakatani T, Okano T, Kishida A, Ueda H, Shin'oka T, Nagai R, Sawa Y, Komeda M, Takewa Y, Matsuda H, Mori H	183
---	-----

IX Contents

A Novel Micro-Angiography Detecting Angiogenesis,
Application for Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells
Transplantation in the Patients with Critical Limb Ischemia
Nishigami K, Nakatani T, Chiku M, Mori H 191

Angiogenesis Induced by Intramyocardial Implantation of
Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells for the
Treatment of Ischemic Heart Disease
Li T, Matsuzaki M, and Hamano K 201

Effect of Bone Marrow Transplantation in Patients with Critical
Limb Ischemia
Katsuda Y, Takeshita Y, Arima K, Saitoh Y, Sasaki K,
Shintani S, Murohara T, Imaizumi T 213

Therapeutic Angiogenesis for a Patient with Arteriosclerosis
Obliterans by Autologous Transplantation of Bone Marrow
Mononuclear Cells
Fujimoto K, Miyagi H, Miyao Y, Kajiwara I, Oe Y, Kawano F,
Hidaka M 221

Autologous Bone Marrow Implantation for Burger's Disease
Ohtani M, Soma T, and Taguchi A 227

Closing Remarks 235

Index 237

第1章 心臓病診療の課題と展望(トピックス)

1. 再生医学による心臓病治療

1.1 はじめに

ここ10年の心臓病の治療を振り返る時、カテーテル治療や植え込み型除細動器の開発、アンジオテンシンII受容体遮断薬の一般臨床への普及、マルチスライスCTによる画像診断の進歩など、その目覚ましい発展には驚かされるものが多い。しかし、この10年間で著しい進歩がみられなかったものに、難治性重症心不全の治療が挙げられよう。この疾患に対してはこれまで心臓移植が根本治療とされてきたが、ドナーの不足は如何ともしがたく、補助人工心臓による一時的な延命がはかれるのみであった。これに対し、細胞生物学、遺伝子工学の発達は新たな展開をもたらそうとしている。未分化幹細胞を心筋細胞に分化誘導し、これを移植治療の材料として使うという、いわゆる再生医学である。本稿では再生医学による心臓病治療というテーマをいただいたが、そのなかでも特に心筋細胞に分化可能な多能性幹細胞に焦点をあて、現状を解説することとした。

1.2 心筋細胞に分化が可能な多能性幹細胞

近年の精力的な研究により、さまざまな幹細胞が明

らかにされている。このうち心筋細胞に分化可能なことが報告され、将来的に臨床応用可能と考える細胞は胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞、心筋内組織幹細胞であろう。それぞれに利点・欠点を有しており、現時点ではどの細胞が有望であるかについて結論は出ていない。以下、各々の細胞の特徴と現状につき説明する。

1.2.1 胚性幹細胞

胚性幹細胞 (ES 細胞) は受精早期の胚盤胞という時期の内部細胞塊という将来胎児になる部分より得られた細胞 (図 1.1.1) で、身体のすべての細胞に分化し得るという意味で万能幹細胞とも呼ばれる。しかし、*in vitro* で実際に分化することができるのは、胎生早期の段階で分化が達成される細胞である。心筋細胞は胎児期の早期に分化する細胞であり、胚性幹細胞からは比較的得られやすい。マウスの場合には培養液中に LIF (白血病阻止因子) を入れておくことにより、未分化機能が維持されることが知られている。多くの細胞株では feeder layer として MEF (マウス胎児線維芽細胞) の上に胚性幹細胞を重層して培養することが多いが、近年は技術の向上により feeder layer を必要としない培養も可能になった。ヒトの胚性幹細胞もす

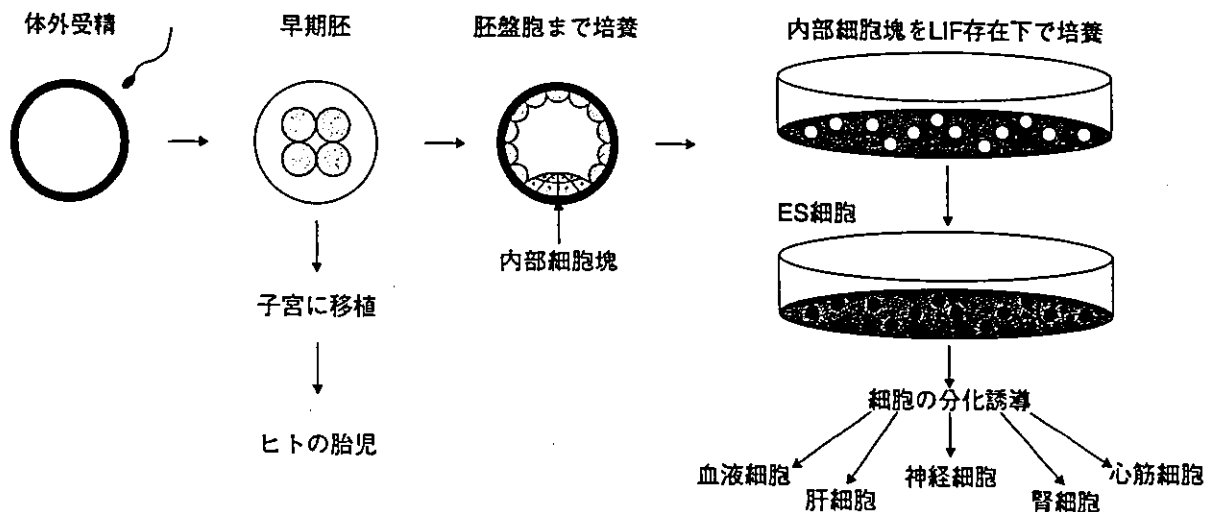


図 1.1.1 胚性幹細胞の樹立と利用
受精早期の胚盤胞より内部細胞塊を取り出し、胚性幹細胞を作成する。

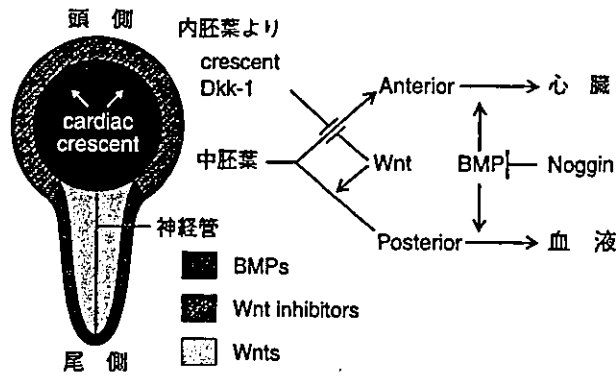


図 1.1.2 中胚葉より心筋細胞への分化経路(文献3より改変)

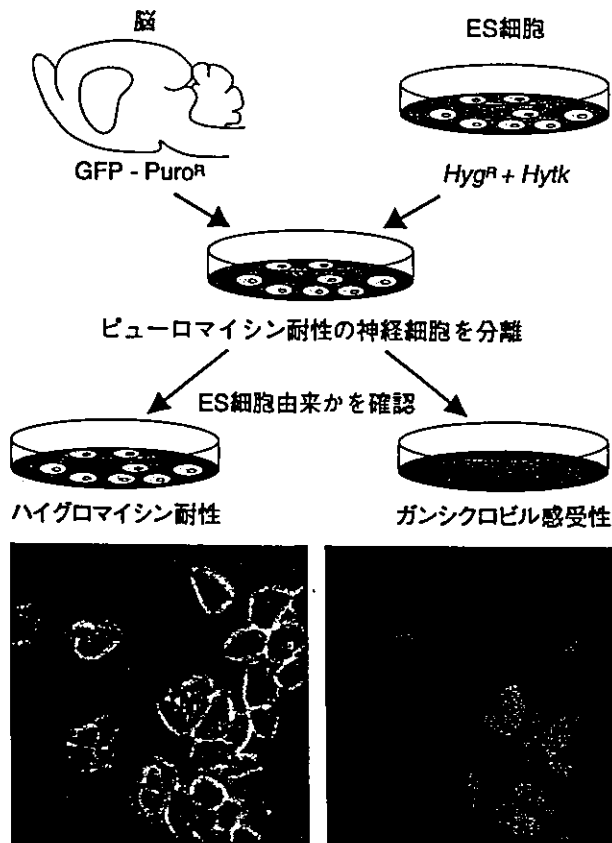


図 1.1.3 細胞融合の概念と証明(口絵1参照)
神経細胞と胚性幹細胞の細胞融合を証明した実験の概要を示した。

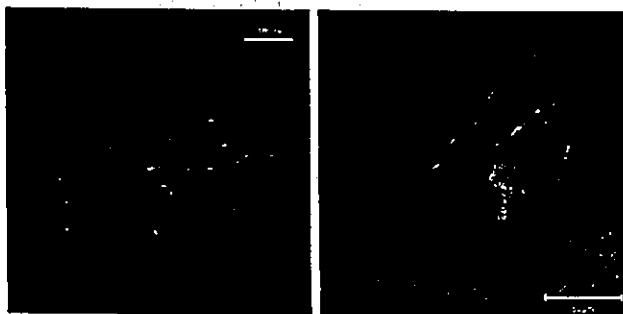


図 1.1.4 骨髄移植モデルマウスを用いた再生心筋(口絵2参照)
GFP 過剰発現マウスより得た骨髄を同系統マウスに骨髄移植し、心筋梗塞を作成した。骨髄由来細胞は GFP 陽性細胞として観察される。右図には GFP 陽性、アクチニン陽性の心筋細胞が少数観察された。

に多数樹立され、本邦においても京都大学の中辻先生により3株ほど胚性幹細胞が樹立されている¹⁾。ヒトの胚性幹細胞は LIF により未分化機構が維持されることはなく、MEF との共培養が必須であるとされている。また、マウスと同様にヒトの胚性幹細胞も心筋細胞に分化することがすでに報告されている²⁾。胚性幹細胞から心筋細胞への分化には図 1.1.2 のように BMP2 や Wnt といったシグナル伝達経路が重要であるとされているが、その詳細は明らかではない³⁾。胚性幹細胞の臨床応用上の問題点は、①未分化機構維持のため動物細胞 (MEF) と共培養が必要である点、②胚性幹細胞から心筋細胞への選択的分化誘導法の確立、③未分化細胞の混入による奇形腫形成の抑制、④同種移植であるため免疫拒絶が避けられない点、などが挙げられる。患者本人の体細胞の核を卵細胞に移植することによるクローン胚の形成は、動物レベルでは可能となった。近年、韓国よりヒトクローン胚の成功が報じられた。しかし、その場合でも 100 個以上の卵を用いて 1 個成功したとされている。先進諸国のほとんどでクローン人間の作成は禁止されているが、臓器作成を目的としたクローン胚性幹細胞は一部の国で行われる可能性はある。この点に関しては国民的な議論がなされるべきである。技術革新により、卵細胞を用いずに胚性幹細胞レベルでのクローン化ができれば、倫理的にはハードルが低くなって応用される可能性もあり、さらなる研究が望まれる。

1.2.2 骨髄間葉系幹細胞

骨髄は造血の主たる場であり、骨髄中の細胞のほとんどは造血幹細胞に由来する血液細胞である。しかし、骨髄中には間質細胞と呼ばれる接着系の細胞(培養皿に付着する細胞)が存在し、造血幹細胞の機能維持に働いている。そして、間質細胞の一部に多分化能を有する間葉系幹細胞と呼ばれる細胞が存在し、*in vitro*、*in vivo* でさまざまな細胞に分化することが知られている⁴⁾。骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの中胚葉系の細胞に主として分化するが、一部神経細胞などの外胚葉系の細胞にも分化することが報告されている^{5,6)}。一時期造血幹細胞にも多分化能があることが報告され、造血幹細胞の多分化能が誇張された。これは心臓移植後の剖検心臓を用いた研究より始まった。すなわち、女性ドナーから提供された心臓が男性レシピエントに移植され、一定時間後に別の理由で死亡し剖検したところ、心臓内に Y 染色体陽性の心筋細胞が観察されたと報告された⁷⁾。この現象は男性骨髄から多能性幹細胞が心臓に移動

し、心筋に分化したのであろうとされた。しかしその後、細胞融合という現象が報告され (図 1.1.3)、造血幹細胞のみかけの多能性に関しては細胞融合が原因ではないかという否定的な見解が多く示された⁹⁾。

われわれの GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄移植モデルによる検討でも、造血幹細胞の多能性に関しては否定的な所見が得られている (図 1.1.4)。しかし、間葉系幹細胞に関しては *in vitro* の実験同様、*in vivo* でも心筋細胞に分化する所見が得られており、骨髄由来細胞の多能性は間葉系幹細胞に起因するものと考えられる。

最近2年ぐらいのトピックは骨髄内の MAPC 細胞 (multipotent adult progenitor cell) であろう⁹⁾。MAPC 細胞はミネソタ大学の Verfeillie 教授らのグループが報告した多分化能を有する細胞で、あらゆる種類の細胞に分化誘導可能な細胞であると報告されている¹⁰⁾。MAPC を別のマウスの受精卵の胚盤胞に注射してキメラマウスを形成させると、MAPC は胚性幹細胞と同様にほぼすべての細胞に分化することが報告された。しかし、MAPC の培養法は極めて細胞密度の薄い条件で培養しないと細胞が分化するとされ、再現性も乏しいことから、細胞を *in vitro* で長期間培養することによるアーチファクトではないかとする声もある。MAPC に関しては今後の研究をみた上で慎重に判断されるべきであろう。

1.2.3 心筋内の幹細胞

昨年後半に米国で相次いで成体心臓内に存在する多能性幹細胞の存在が報告された。Anversa らは心筋細胞中の SCF (stem cell factor) 受容体である c-kit 陽性の小型の細胞を単離し培養すると、心筋、平滑筋、内皮細胞に分化すると報告した。この c-kit 陽性細胞は

クローナルに増殖し、心筋梗塞時には梗塞巣で心筋細胞に分化し、梗塞巣の修復に関与しているのではないかとしている¹¹⁾。また、この細胞は心尖部と心房内に散在して存在し、心筋梗塞時には梗塞巣に移動するとしている。これに対し Schneider らは成体心組織に Sca-1 (stem cell antigen-1) 陽性の細胞が存在し、この細胞は多分化能をもつわけではないが DNA 脱メチル化剤の 5-azacytidine を用いることにより心筋細胞に分化が可能であるとし、心筋細胞の progenitor (前駆細胞) ではないかとしている¹²⁾。この Sca-1 陽性細胞は尾静脈より注射すると心筋梗塞部に homing するという。さらに Hierlihy らは心臓内に存在する SP (side population) 細胞を採取してくると一部の細胞が心筋細胞に分化すると報告した¹³⁾ (図 1.1.5)。SP 細胞は Mulligan らが骨髄の造血幹細胞を濃縮する方法として開発したもので、DNA 結合色素の Hoechst33342 の細胞外への汲み出し能力を指標として幹細胞を分離する方法である。Hoechst33342 を細胞外に汲み出すポンプは ABC トランスポーターである MRD1 が関与しているとされ、この蛋白を発現する細胞に幹細胞として

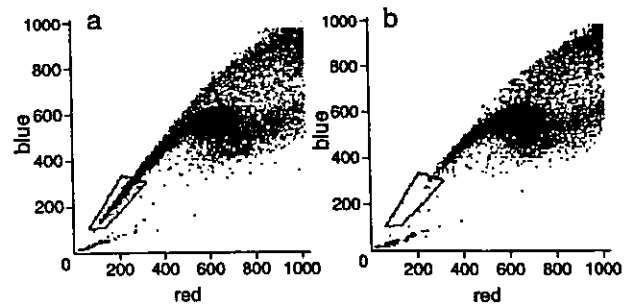


図 1.1.5 心臓由来の SP 細胞分画
a : reserpine (-) b : reserpine (+)

	c-kit	MRD1	Sca-1
構造	<p>免疫グロブリン様ドメイン チロシンキナーゼドメイン</p>	<p>細胞外領域 細胞内領域 ATP</p>	<p>PtdIns anchor</p>
分布	メラノサイト、マスト細胞、生殖細胞、幹細胞	肝細胞、胆管細胞、brush border cells 腎尿細管細胞、癌細胞、脳血管内皮細胞、幹細胞	血管壁、腎皮質細胞、胸腺、脾臓、Tリンパ球、幹細胞
機能	増殖、遊走、分化、分泌	膜に存在する排出ポンプ、アポトーシスの抑制	細胞接着、シグナル伝達、T細胞活性化

図 1.1.6 c-kit、MDR-1、Sca-1 の各種細胞における構造、機能と分布

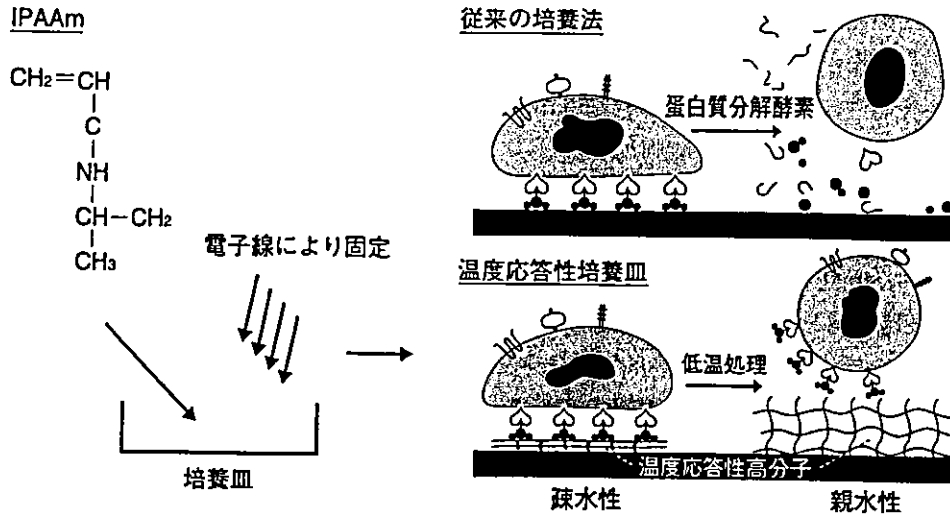


図 1.1.7 東京女子医科大学岡野らが開発した温度感受性培養皿の構造と機能

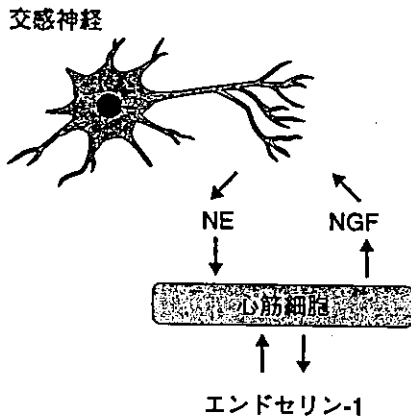


図 1.1.8 心臓と交感神経の関係

心筋細胞自身が分泌したエンドセリン-1がautocrineに心筋細胞に作用し、NGFを分泌する。このNGFが交感神経を呼び込むことにより心臓の交感神経が発達する。

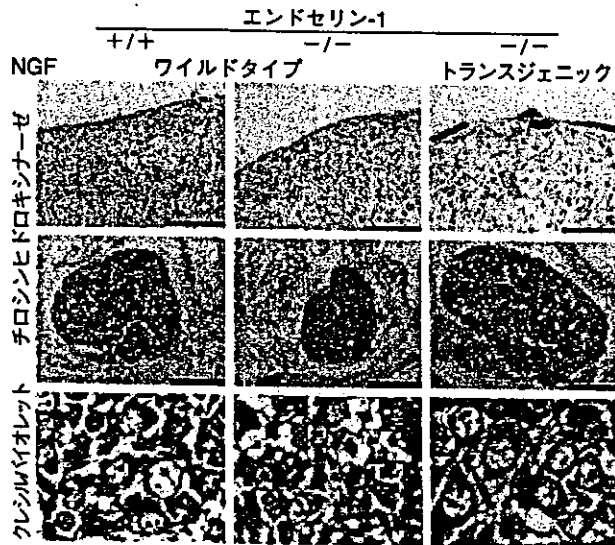


図1.1.9 エンドセリン-1欠損マウスの心臓における交感神経(口絵3参照)

エンドセリン-1欠損マウスでは心臓の交感神経が欠損するとともに星状神経節のアポトーシスが観察される。この表現型は心臓特異的にNGFを過剰発現することにより回復する。

の能力が高いとされる。c-kit、Sca-1、MRD1 自体の構造、機能、発現する細胞をまとめたものを図 1.1.6 に示した。これらの c-kit 陽性細胞、Sca-1 細胞、MRD1 陽性の SP 細胞は一部重複する性質をもつが、基本的には異なる細胞であると思われる、その存在頻度、生体での機能と存在意義は今後の解決すべき問題であろう。

これらの心臓内に存在する幹細胞が心筋細胞として存在するとして、これらを生体外に取り出して大量培養し、in vitro で心筋細胞に分化させて、再移植するには in vitro での大量培養法の確立と心筋分化誘導法が必要不可欠のものとなる。むしろ、生体内で増殖・分化させる方が現実的である。今後のさらなる研究の発展が期待される。

1.3 心筋細胞移植の方法

これまでの心臓への(再生)心筋細胞移植は、in vivo の心臓に直接注射針で細胞を移植するという方法がとられた(図 1.1.7)。しかし、この方法では移植した細胞の生着率が低く、移植できる細胞の数も限られたものであった。これに対し、東京女子医科大学の Okano らは、培養皿の表面に温度感受性に分子形態が変化し、脂溶性・水溶性を転換させる poly-N-isopropylacryl-amide (PIPAAm) という化合物をコーティングする温度感受性培養皿を作成した¹⁴⁾。この培養皿を用いると培養細胞をシート状に回収することができ、移植に直接用いることができる。Shimizu らはこの培養皿を用いて心筋細胞シートを作成し、ラット皮下に長期間生着し、拍動を続ける層状の心筋組織の開発に成功した¹⁵⁾。Shimizu らの研究成果は心筋細胞の移植法に大きなインパクトを与えた。これまで細胞レベルの再生のみに注目が集められてきたが、細胞レ

ベルから組織レベルの再生を論じる素地を作るものとなったといえよう。組織レベルの再生にはこれ以外にも血管の構築や神経支配も重要な問題であり、今後の研究を待つことになるだろう。

1.4 心臓の交感神経支配の形成

心臓は諸臓器のなかでも唾液腺と並び交感神経の分布密度が高い臓器である。交感神経の刺激により、心臓は心拍数の上昇、心収縮力の増強、刺激伝導速度の増強が起こる。心臓を支配する交感神経は主として星状神経節の神経細胞の支配を受けるが、これまで心臓を支配する交感神経がいかなる機序で形成されるかは解明されてこなかった。われわれの近年の解析では、心臓への交感神経支配は胎生後期に心筋細胞から分泌される神経成長因子 (NGF) を指標に星状神経節から軸索が伸長してくる。そしてこのときに心筋細胞が autocrine に分泌するエンドセリン-1 が心筋細胞自身に作用して ET-A 受容体、 $G_i\beta\gamma$ を介して経路で NGF を分泌させることが明らかとなった (図 1.1.8)¹⁰⁾。そしてこのエンドセリン-1/NGF 経路が存在しない場合には心筋細胞に交感神経がこないだけでなく、星状神経節の交感神経細胞体自身がアポトーシスを起こすことも明らかとなった (図 1.1.9)。心臓移植あるいは再生心筋細胞移植した臓器・組織に再神経支配を行うためには、種々のさらに基礎レベルの研究が必要であろう。

1.5 再生医学の今後

われわれが研究を始めた 10 年前は、心臓の再生などは SF の世界ではないかと考えられていた。しかし、今では骨髄間葉系幹細胞や胚性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が可能となり、再生心筋をシート状にした組織レベルでの再生も可能となってきた。もちろんこれだけでは現実の医療にすぐ結び付くものではない。血管構築や神経支配を伴う再生組織の作成にはまだ越えねばならないステップは山ほどあるであろう。過去 100 年間の医学の進歩を顧みると、これから先の 100 年後には必ず再生臓器は臨床応用されていると考えられる。子供の頃にみた鉄腕アトムが 2 足歩行するロボットとして現実味を帯びてきた今、再生臓器の具現化もそう遠い将来ではないと確信している。

文献

- 1) 京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターヒト ES 細胞プロジェクト情報公開ホームページ
<http://www.shigen.nig.ac.jp/escell/human/top.jsp>
- 2) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108: 407-414, 2001
- 3) Olson EN: The Path to the Heart and the Road Not Taken. *Science* 291: 2327-2328, 2001
- 4) Prockop DJ: Adult stem cells gradually come of age. *Nat Biotechnol* 20: 791-792, 2002
- 5) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999
- 6) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, et al: Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68: 235-244, 2001
- 7) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al: Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346: 5-15, 2002
- 8) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545, 2002
- 9) Reyes M, Verfaillie CM: Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938: 231-233, 2001
- 10) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 (6893): 41-49, 2002
- 11) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114(6): 763-767, 2003
- 12) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12313-12318, 2003
- 13) Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al: The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 530: 239-243, 2002
- 14) Okano T, Yamada N, Sakai H, et al: A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27: 1243-1251, 1993
- 15) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90: e40-48, 2002
- 16) Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, et al: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 113: 876-884, 2004

(福田恵一)

Weakly ionized plasma flash x-ray generator and its distinctive characteristics

Eiichi Sato^a, Yasuomi Hayasi^a, Rudolf Germer^b, Kazunori Murakami^a, Yoshitake Koorikawa^a,
Etsuro Tanaka^c, Hidezo Mori^d, Toshiaki Kawai^c, Toshio Ichimaru^f, Fumiko Obata^g,
Kiyomi Takahashi^g, Sigehiro Sato^g, Kazuyoshi Takayama^h and Hideaki Idoⁱ

^aDepartment of Physics, Iwate Medical University, 3-16-1 Honchodori, Morioka 020-0015, Japan

^bITP, FHTW FB1 and TU-Berlin, Blankenhainer Str. 9, D 12249 Berlin, Germany

^cDepartment of Nutritional Science, Faculty of Applied Bio-science, Tokyo University of
Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku 156-8502, Japan

^dDepartment of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1
Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

^eElectron Tube Division #2, Hamamatsu Photonics Inc., 314-5 Shimokanzo, Toyooka Village,
Iwata-gun 438-0193, Japan

^fDepartment of Radiological Technology, School of Health Sciences, Hirosaki University, 66-1
Honcho, Hirosaki 036-8564, Japan

^gDepartment of Microbiology, School of Medicine, Iwate Medical University, 19-1 Uchimarui,
Morioka 020-8505, Japan

^hShock Wave Research Center, Institute of Fluid Science, Tohoku University, 2-1-1 Katahira,
Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

ⁱDepartment of Applied Physics, Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University, 1-13-1
Chuo, Tagajo 985-8537, Japan

ABSTRACT

In the plasma flash x-ray generator, a high-voltage main condenser of approximately 200 nF is charged up to 50 kV by a power supply, and electric charges in the condenser are discharged to an x-ray tube after triggering the cathode electrode. The flash x-rays are then produced. The x-ray tube is a demountable triode that is connected to a turbo molecular pump with a pressure of approximately 1 mPa. As electron flows from the cathode electrode are roughly converged to a rod copper target of 3.0 mm in diameter by the electric field in the x-ray tube, weakly ionized linear plasma, which consists of copper ions and electrons, forms by target evaporation. At a charging voltage of 50 kV, the maximum tube voltage was almost equal to the charging voltage of the main condenser, and the peak current was about 15 kA. When the charging voltage was increased, the linear plasma formed, and the K-series characteristic x-ray intensities increased. The K-series lines were quite sharp and intense, and hardly any bremsstrahlung rays were detected. The x-ray pulse widths were approximately 700 ns, and the time-integrated x-ray intensity had a value of approximately 30 $\mu\text{C}/\text{kg}$ at 1.0 m from the x-ray source with a charging voltage of 50 kV.

Keywords: Flash x-ray, weakly ionized linear plasma, K-series characteristic x-rays, monochromatic x-rays, x-ray divergence, rectilinear power