

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- $\alpha$ がある。

IL-8はC-X-Cファミリーに属する $\alpha$ -ケモカインの1つで血管新生を誘導する<sup>8)</sup>。TNF- $\alpha$ 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

<b>VEGFファミリー</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• VEGF</li> <li>• VEGF-B (VEGF-related factor : VRF)</li> <li>• VEGF-C (VEGF-related protein : VRP)</li> <li>• VEGF-D (c-fos-induced growth factor : FIGF)</li> <li>• VEGF-E</li> <li>• PlGF (胎盤由来増殖因子)</li> <li>• HIF-1<math>\alpha</math> (低酸素誘導因子)</li> <li>• neuropilin-1 (NP-1)</li> </ul>	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VEGF <sub>165</sub> 結合を修飾、内皮細胞遊走能亢進
<b>FGFファミリー</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• FGF-1 (aFGF)</li> <li>• FGF-2 (bFGF)</li> <li>• FGF-3/int-2</li> <li>• FGF-4/hst-1</li> <li>• FGF-5</li> </ul>	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
<b>HGF</b>	
<b>プロスタグランジン</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PGE1</li> <li>• PGE2</li> </ul>	
<b>thymidine phosphorylase</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PD-ECGF (血小板由来内皮細胞増殖因子)</li> </ul>	血管内皮細胞遊走能亢進
<b>サイトカイン</b>	
Class I/II	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-2, 15</li> <li>• エリスロポエチン</li> <li>• G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子)</li> <li>• GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)</li> </ul>	細胞増殖・走化性の亢進
IL-8	
TNF- $\alpha$ (腫瘍壊死因子- $\alpha$ )	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"> <li>• TGF-<math>\beta</math> (形質転換増殖因子)</li> <li>• PAF (血小板活性因子)</li> </ul>	
<b>細胞間接着因子</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• VEカドヘリン</li> <li>• PECAM-1</li> </ul>	
<b>プロテアーゼ</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PA (plasminogen activator)</li> <li>• MMP (matrix metalloproteinase) -2, 9</li> </ul>	血管内皮から産生 線維芽細胞、マクロファージから産生
<b>アドレノメジュリン (AM)</b>	
<b>アンジオゲニン (血管増生因子)</b>	RNA分解酵素と類似
<b>アンジオポエチン-1</b>	VEGFによる血管新生促進作用
<b>アンジオテンシンII</b>	
B61	ECK (epithelial cell kinase) のリガンド、TNF $\alpha$ により発現
<b>ヒスタミン</b>	
<b>HIV-1 Tat protein</b>	KDRの活性化
<b>レプチン</b>	脂肪細胞から分泌インスリン感受性ホルモン
<b>leukotriene C4 (LTC4)</b>	
<b>PDGF-BB (血小板由来増殖因子)</b>	VEGF誘導
<b><math>\alpha</math>v<math>\beta</math>3</b>	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<sup>9)</sup>。

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<sup>10)</sup>。

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<sup>11)</sup>。

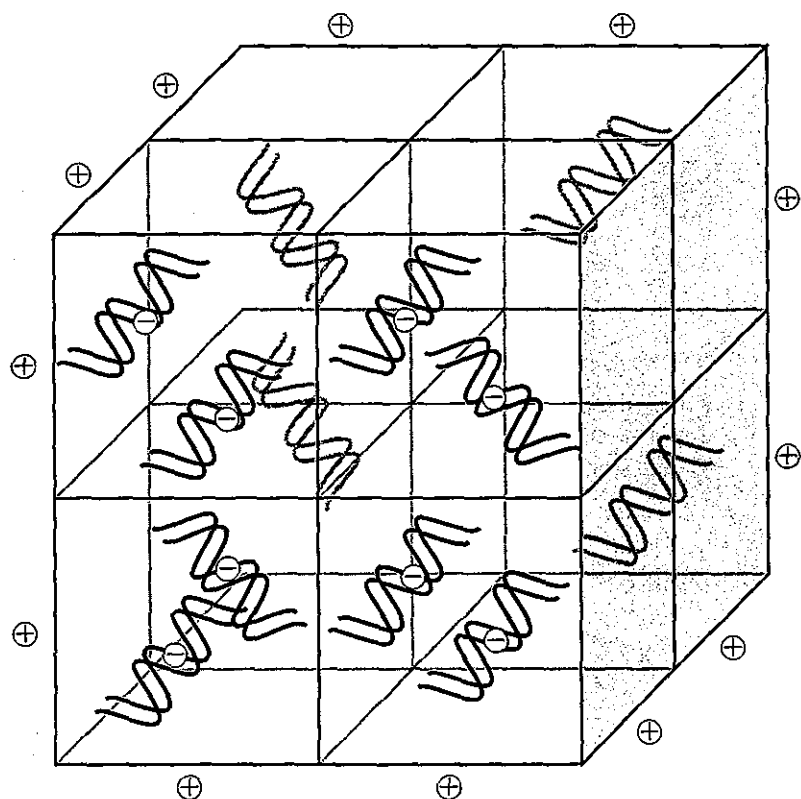
また、近年骨髄からの血管前駆細胞の動員を目的としたG-CSF, GM-CSFの投与によって虚血の改善が期待されている。

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。

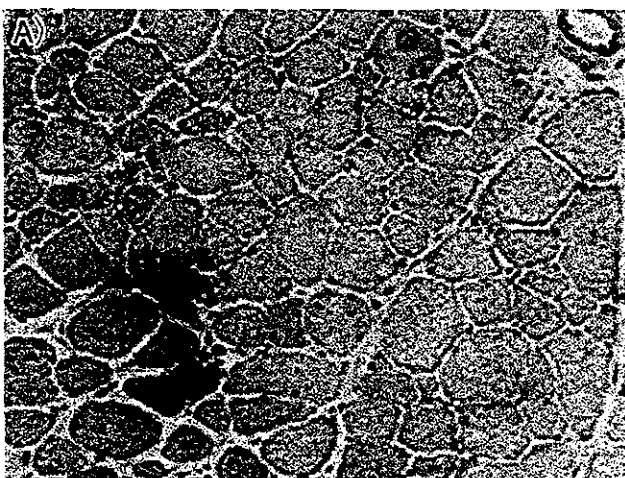
## 再生医療の最前線

### 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VEGF<sub>165</sub>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



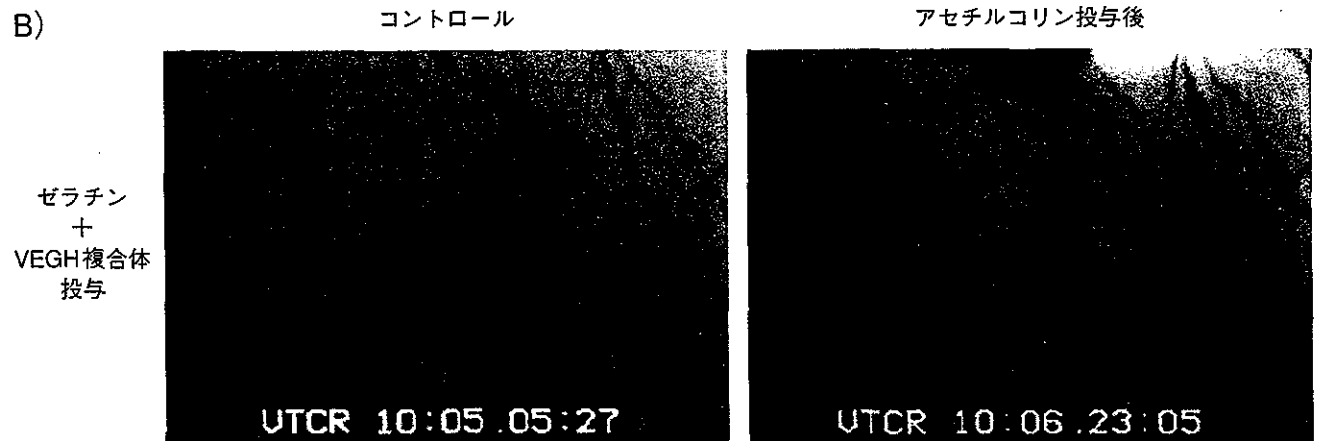
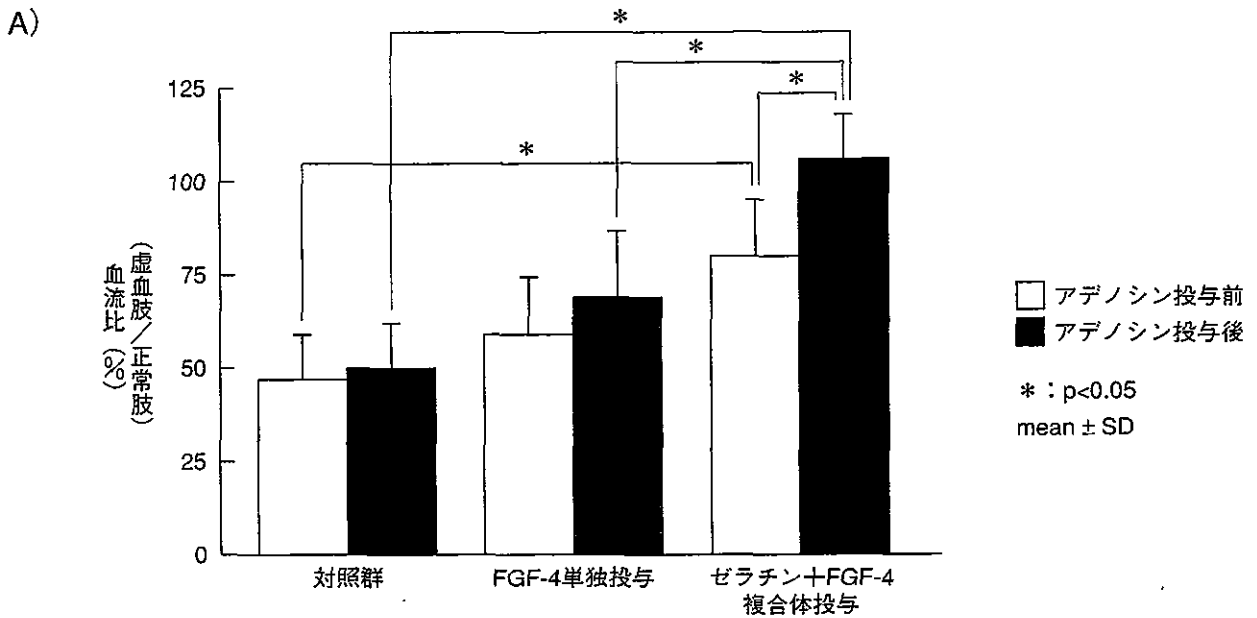
対照群 (ゼラチン-LacZ遺伝子投与)

FGF-4遺伝子単独投与群

ゼラチン+FGF-4遺伝子複合体投与群

● 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

家兎虚血肢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<sup>12)</sup>。

- 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等補充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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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)

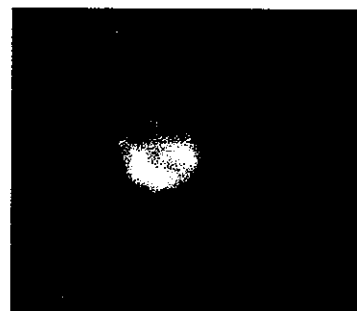
遺伝子または調節因子の投与のみでは代謝による影響があり、必要とされる局所への有効量の到達の面で限界がある。目的としている臓器にある細胞の中に遺伝子を発現させてから投与し、細胞内での持続的遺伝子産生によって長期的に局所に遺伝子を発現させる方法がCell-based gene therapyである。血管においては内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞、心筋においては骨格筋筋芽細胞等が用いられ、細胞投与後2週間以上の遺伝子発現持続が認められ良好な効果が得られている<sup>13)</sup>。

### 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限局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。

ISBN4-525-22621-8 C3047 ¥9500E

定価 (本体9,500円+税)



9784525226213



1923047095008



# 機能・代謝画像診断法と分子画像

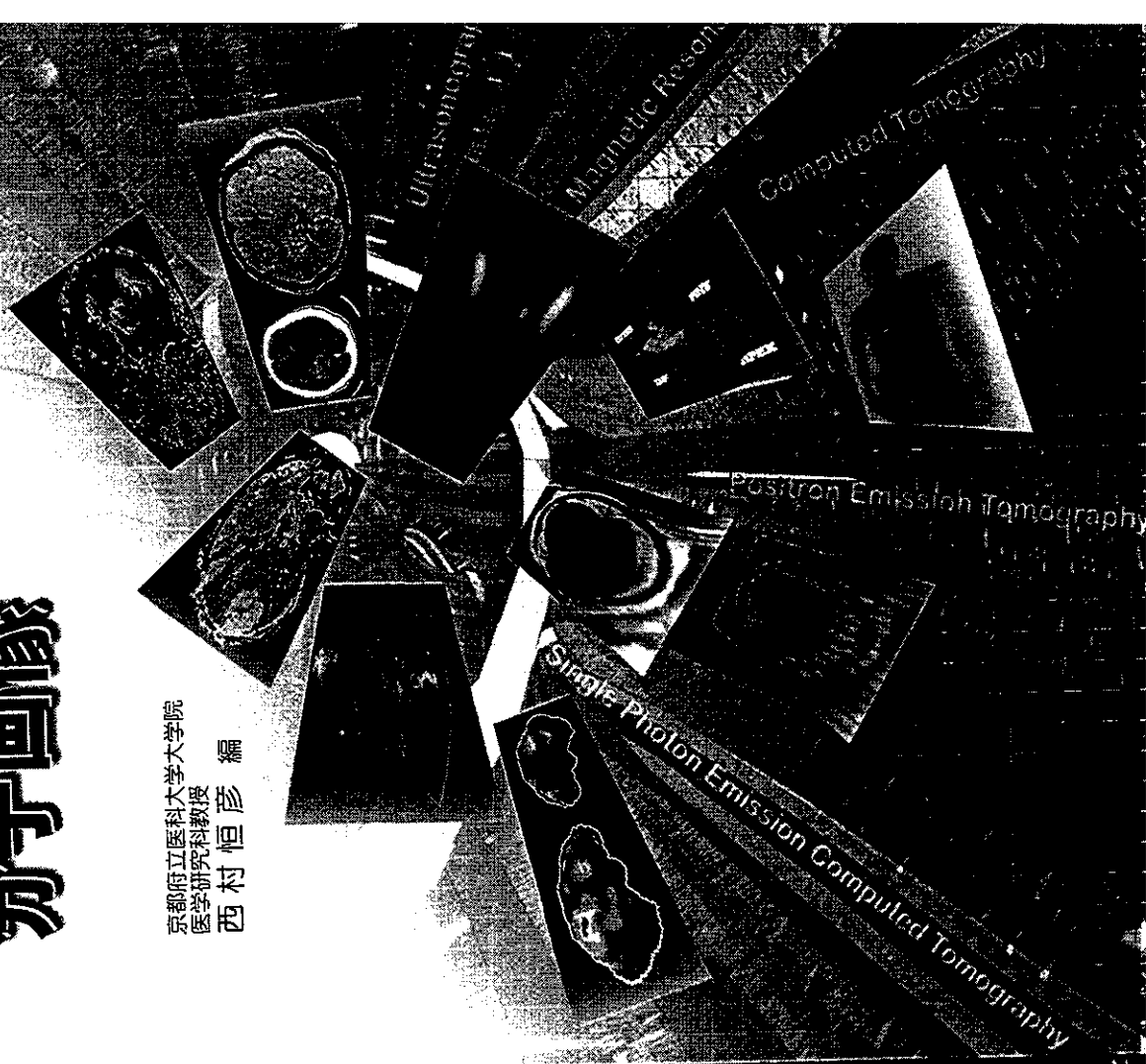
京都府立医科大学大学院 医学研究科教授 西村恒彦 編

南山堂

Functional · Metabolic and Molecular Imaging of Human Body

# 機能・代謝画像診断法と分子画像

京都府立医科大学大学院  
医学研究科教授  
西村恒彦 編



## 12

## 放射光および普及型X線源を用いた微小血管造影による再生血管の評価

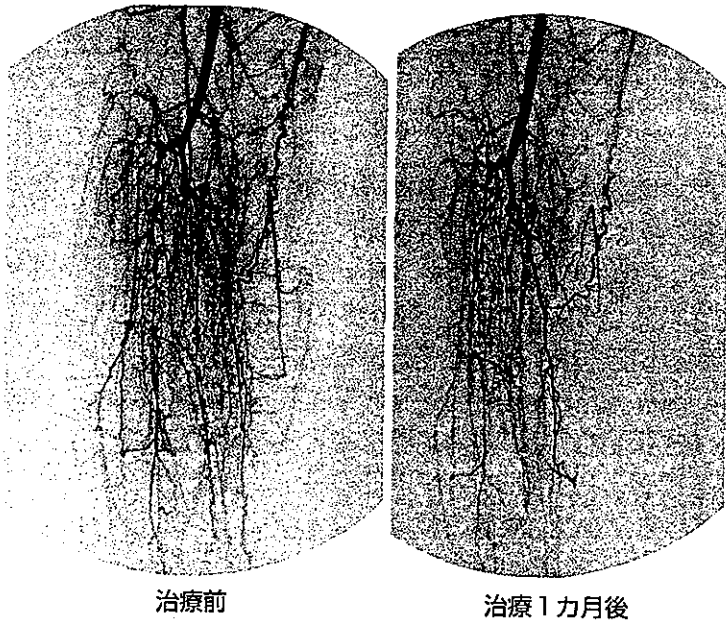
再生医療分野では、自己幹細胞および遺伝子導入による再生血管治療が臨床応用されつつあり、すでに末梢動脈閉塞症に対する骨髄単核球移植では良好な臨床成績が報告されている。しかし、通常の血管撮影では200  $\mu\text{m}$  以下の微小血管は描出できず、再生血管治療の効果判定は依然として困難とされている。一方、シンクロトロン放射光はヨードのK吸収端のエネルギーレベル(33keV)で単色化することにより、周囲組織とのコントラスト効果を最適化し100  $\mu\text{m}$  以下の微小血管を描出し、評価することが可能である。また、実際の臨床に導入することを目的として、既存の医療用の高出力X線源装置を用いた普及型(病院設置型)微小血管造影装置も開発中で、新たな再生血管治療の評価および診断方法として期待されている。

## 1. 背景

近年、動脈硬化性の疾病が増加しつつある。特に狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患、微小循環障害による多発性脳梗塞症、下肢動脈病変を代表する閉塞性動脈硬化症などは豊かな高齢化社会を実現するために、是非とも解決されるべき問題となっている。これらの既存の治療法としては薬物治療やカテーテル治療、また外科的バイパス術などが主に施行されている。しかし、糖尿病合併症例などでは、びまん性微小血管病変が高頻度にみられ、血行再建が困難な難治性症例も少なくなく、既存の治療法では解決できないことも多い。このような症例に対し、新しい治療戦略として血管再生治療による効果が期待されている。循環器領域における再生医療は、血管再生治療と心筋再生療法に大きく分けられており、前者は末梢動脈の閉塞性疾患に対し自家骨髄単核球治療や末梢血幹細胞治療などがすでに臨床導入されており、高率に臨床症状が改善していることが報告されている<sup>1)</sup>。後者は今のところ一部を除き研究段階であるが、臨床応用が広く開始されれば、動脈硬化疾患以外にも先天性や後天性心疾患の治療を含めた広範な応用に期待が持てる。

臨床における血管再生治療を行った下肢血管の他覚的評価方法として、一般に血管造影法(DSA)が施行される。しかしながら、臨床症状の改善に比し、血管造影上の有意な改善が見られないことが多い(図III-70)。ときに血管数の増加が見られることもあるが、側副血行路の発達(arteriogenesis)と考えられており、再生した血管そのものが造影されているわけではない。微小血管を評価するためには微量の造影剤を検出することができる微小血管造影法が必要になる。微小循環の検出には、高輝度のX線をヨードのK吸収端直上のエネルギーレベルで単色化する方法、X線を平行化し血管端を鮮明に描出する方





パージャール病の患者に自家骨髄細胞移植治療前と治療1カ月後に下肢血管造影(DSA)を施行した。治療前後では明らかな血管造影像の変化を認めない。

図Ⅲ-70 下肢血管造影(DSA)

法、さらに検出系を高感度、高解像度化するなどの方法がすべて実現される必要がある。

現在のところ、放射光を利用した施設で行われる微小血管造影法がこれらのすべてを可能としている<sup>2)</sup>。放射光とは広域のスペクトルを持つ白色光であり、シリコン結晶を用い単色化することにより微量のヨードを検出し、微小血管を描出することが可能となる。しかし、放射光施設はシンクロトロン加速器が必要であり、高額で広い敷地を要するため、微小循環造影を臨床へ普及する上で大きな障害となる。現時点で微小血管造影の臨床応用を実現した唯一の放射光施設が高エネルギー加速器研究機構であり、筑波大学のグループと共に経静脈的冠動脈造影を多くの臨床例に行っている。世界最大の放射光施設であるSPring-8では、医学利用の候補の1つとして微小血管造影の可能性が検討されている。微小血管造影法の臨床への導入の近道としては装置を小型化し、コストを低下させる必要がある。そこで既存の高出力のX線源を用い微小血管を造影する装置も開発されている(後出)。

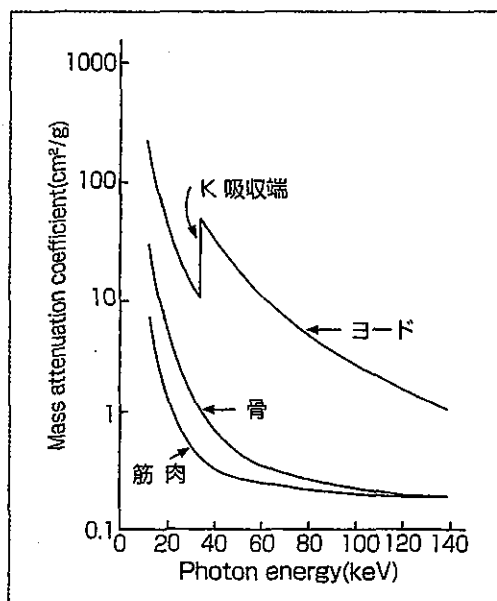
## 2. 微小血管の描出を実現するための要素

### a. 高輝度

輝度はイメージングプレートに像を映し出すために非常に重要な要素であり、単位面積あたりのX線のフォトン量を表している。血管撮影などでX線は被写体に当たったときに吸収を受けかつ散乱し、イメージングプレートまでたどり着くのに顕著に減衰してしまう。血管造影などで境界が鮮明な像を得るには、X線の輝度を十分保つ必要があり、既存のX線源では白色光のままで撮影するしかなかった。一方、放射光から得られる輝度は非常に高輝度であり、従来のX線発生装置と比べ約 $10^8$ 倍も明るく、人体による減衰を受けた後でも、撮像装置に有意なコントラストを結像できる十分なフォトン数を残すことができる。それ故にX線を単色化させるという著しいフォトン数の減

筋肉、骨およびヨードのK吸収端の関係を示す。33.3keV直上でヨードK吸収端は上昇し、人体との組織吸収係数の差が最大となる。

図Ⅲ-71 X線エネルギーと質量吸収係数の関係



少を伴う過程を経た後でも、通常の白色X線と同等の光子数を撮像系前面で確保することができる。この要素は、微小血管造影には必要不可欠であるといつてよい。

#### b. 単色化

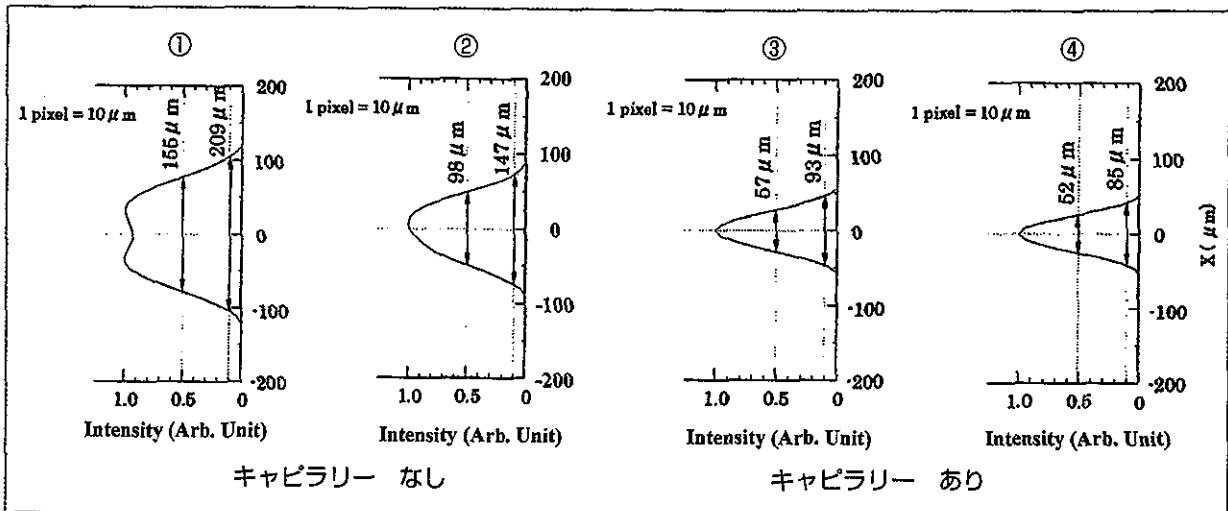
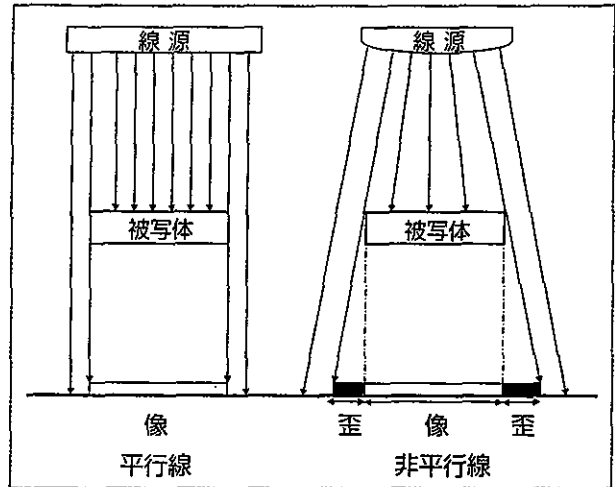
血管造影には通常ヨード含有造影剤が使用されている。ヨードは33.3 keVのエネルギーレベルで質量吸収係数が不連続に上昇するため（K吸収端）、X線のエネルギーをヨードのK吸収端の直上のエネルギーの直上に交換（シリコン結晶によるBragg反射を応用する）すると、ヨードと周囲組織との質量吸収係数の差（コントラスト）が最大となり、微量ヨードの検出ができる（図Ⅲ-71）。また、MRIなどに使用されているガドリニウム（Gd）がX線による血管造影時の造影剤として使用可能となれば、単色X線のエネルギーを50.5 keV（Gd吸収端直上）にしたときに最適の吸収の差を得られる。50.5 keVのX線の人体による吸収は33.3 keVのヨードK吸収端のそれと比較して著しく少ない。すなわち、Gd使用により患者被曝量を軽減した血管造影が実現できる。

#### c. 平行化

X線源が平行であれば、被写体とその像は理論的にいえば等大の大きさになる（正確には、X線が平行であっても散乱・回折するので本当の等大にはならない）。平行でない光線は被写体から像との距離が離れるほど像は拡大し、辺縁は歪んでしまう（図Ⅲ-72）。こうした変化はミクロの血管を評価するには、その血管の径を正確に検出するのに影響を与えることはいうまでもない。放射光は平行に限りなく近い性質を持ち、微小血管造影に理想的な線源といえるが、通常の医療用X線源は平行化されておらず、微小血管径の計測には不向きである。浜松ホトニクスが開発した微細な孔を多数有するキャピラリープレートは、そのキャピラリー（孔）にX線を通過させると平行化することができ、低コストで通常のX線源を平行化できる有効な手法と考えられる。実際にその効果をコンピューターシミュレーションにおいて評価した。X線源

線源が平行の場合、被写体と像は等大になるが、平行でない場合には像は拡大し、辺縁が歪む。

図Ⅲ-72 X線の平行化の影響



図Ⅲ-73 キャピラリーによる平行化の評価

検出器から10cm離れた場所に50 $\mu\text{m}$ のスリットを設置し、線源とスリットとの距離を変化させ平行化の効果を検討した。①②は線源とスリットとの距離がそれぞれ50cmと80cmで、キャピラリーによる平行化がない状態である。この時に検出器に入るX線幅は、それぞれ155 $\mu\text{m}$ 、98 $\mu\text{m}$ に拡大される。③④も同じく距離を50cmと80cmとし、キャピラリーで平行化した状態である。平行化した場合は、52~57 $\mu\text{m}$ 程度の誤差しかない。

と被写体の距離を近づけた場合、平行化しないと像が拡大するが、平行化すると像の拡大を防ぐことができる(図Ⅲ-73)。すなわち、X線の平行化は解像度を確保するのに有用であることがわかる。

#### d. 高解像度化・高感度化

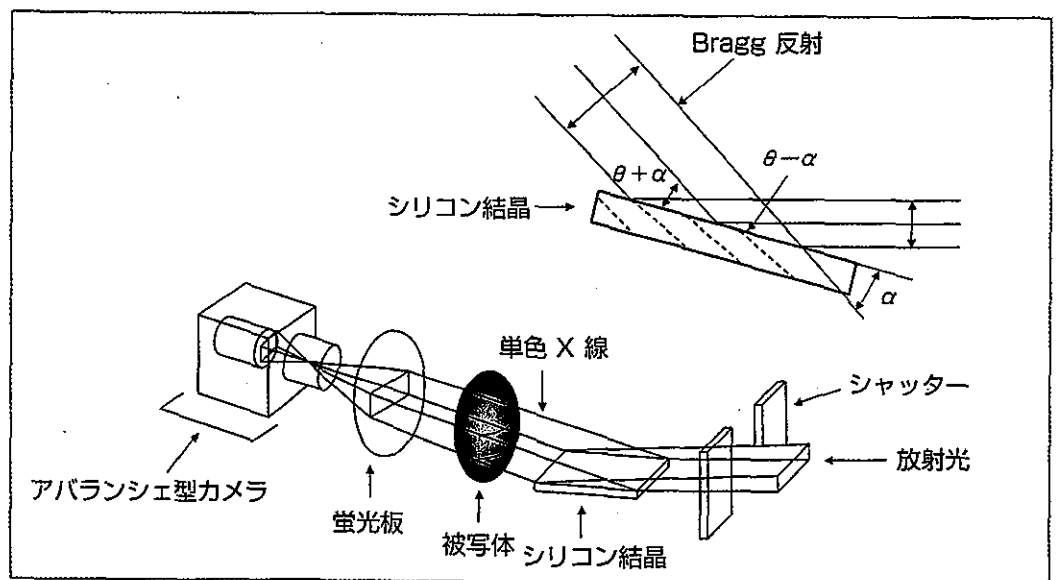
高輝度で単色化され、かつ平行化を有する理想的なX線源を実現できたとしても、検出器の解像度・感度が低ければ微小血管像は劣化してしまう。解像度を表すには通常チャート撮影が用いられる。1ミリ幅に40本のラインを引き(20ラインペア)、それを識別できれば25 $\mu\text{m}$ ( $1\text{mm}/40 = 25\mu\text{m}$ )の解像度が得られたことになる。通常の血管造影装置では2ラインペア程度が普通であるが(空間分解能250 $\mu\text{m}$ )、高解像度撮影装置であれば25 $\mu\text{m}$ レベルの解像度が可能である。また、感度が高くな

いと微量の X 線を検出することができないため、イメージングプレートとしては高感度蛍光板が使用される。装置の原理・構造については後述する。

### 3. 線源の種類

#### a. 放射光

放射光とは光速で直進する電子が磁石によって進行方向を変えられた際に発生する電磁波であり、1947年に電子シンクロトロンで観測された。負の電荷をもつ電子は周囲に電場があり、高エネルギーの電子が磁場で曲げられると光子となって放出される。その性質は、高エネルギーの電子を持ち、進行方向の変化が大きいほど高輝度となり、紫外線から X 線などの短い波長の光を含む広いスペクトルを有している。放射光施設は、電子ビームを発生させ光速近くまで加速する入射系加速器と、電子ビームを円形の軌道に留めておくための蓄積リングを必要とする。代表的な大型放射光施設は SPring-8 (日本)、APS (米国)、ESRF (仏) があり、それぞれ 8, 7, 6 GeV の電子ビームの加速エネルギーを有している。SPring-8 放射光の原理と方法は、電子銃から電子ビームを発射し、線形加速器で 1 GeV まで加速し、さらにシンクロトロンに導入して 8 GeV まで加速する。それを蓄積リングに導入し、8 GeV のエネルギーで偏向電磁石や挿入光源により放射光を発生させる。発生した放射光は、ビームラインを通して、数カ所に設置してある蓄積リング棟に導かれ医学利用、地球科学、生命科学、環境科学、材料科学などの分野で応用される。特に、医学分野にて放射光は微小血管を造影し再生医療における新生血管治療の効果判定、悪性腫瘍による栄養血管の



図Ⅲ-74 放射光施設での微小血管造影システムの概略

白色放射光をシリコン結晶に反射させ単色化する。被写体を通過した X 線は蛍光板に像を作り、高感度高解像度アバランシェ型カメラで撮影する。シリコン結晶の格子面の角度 (Bragg angle:  $\theta$ ) により単色化エネルギーが決定され、格子面と結晶表面の角度 ( $\alpha$ ) で Z 軸への拡大率が決定される。

早期発見・早期治療，脳血管系や循環器系の微小循環障害などの評価への応用が検討されている。

放射光はその非常に高い輝度を有し，限りなく平行で指向性のある性質から微小血管造影に適した条件を有している。放射光施設での単色化は，白色放射光をシリコン結晶によって Bragg 反射させ，その格子面の角度により回折を受け単色 X 線のエネルギーを決定する（図Ⅲ-74）。前述したが，単色化は放射線量を減衰させてしまうが，シンクロトロン放射光は非常に高い輝度を有しており，単色化しても通常の X 線白色光と同等量の単色 X 線を確保することができる。格子面の角度  $\theta$  を変化させることにより，エネルギーレベル（反射光の波長）の調節が可能となる。

#### b. 普及型微小血管造影装置

放射光はその輝度の高さと平行性では非常に優れているが，多額のコストが掛かり，広大な施設を必要とする。実際に臨床応用へ普及するにはその施設へ行くしかなく，時間的・空間的にも問題がある。そこで新エネルギー・産業技術開発機構（NEDO）の支援により，次世代単色 X 線診断・治療システムを開発し，開発グループの代表である浜松ホトニクスにより製造され，検出系は NHK エンジニアリングの技術により超高感度ハイビジョンカメラシステムが導入された（図Ⅲ-75）。普及型微小血管造影装置の線源として，高輝度の X 線を得るために大容量大出力をもつ CT 用の X 線管を用いた。撮影は冷却性能の改善により，連続 20 秒照射・8 分間休止で駆動することができる。単色化には金属フィルターを用い，高いエネルギーと低いエネルギーをカットし，33.3keV よりに近いエネルギーレベルの疑似単色 X 線を得る。単色 X 線の強度は  $7.74 \times 10^{-4} \text{C/kg/s}$  ( $= 3\text{R/s}$ ) に設定している。また，単色 X 線に X 線コリメータを使用し，ポリキャピラリーを通し平行化し，空間分解能を向上できる。これらにより  $50 \mu\text{m}$  以下の空間解像度を確保する。検出系は高解像度・高感度蛍光板（イメージングプレート）で作成した蛍光像を，超高感度・高精細撮像管であるアパランシェ型ハイビジョンモノクロ新 Super-HARP カメラ（NHK）で撮影する方式で

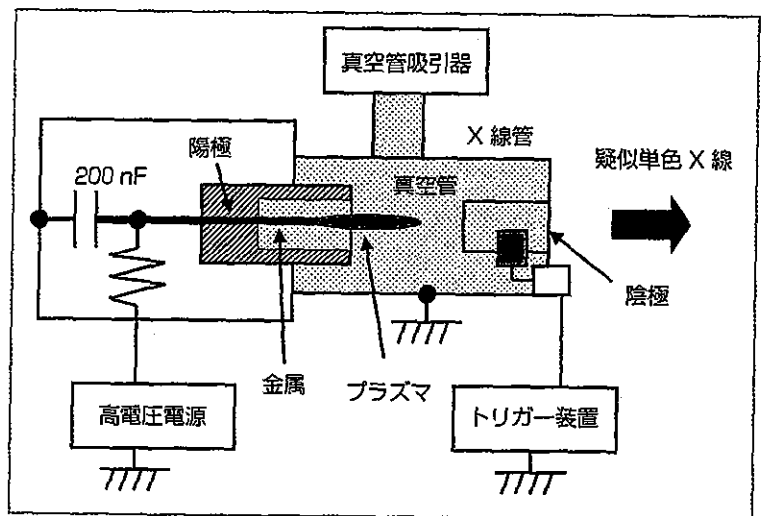


図Ⅲ-75 普及型微小血管造影装置の概略

Cアーム上端には蛍光板を有した検出器と HARP 管を有するカメラを搭載している（黒矢印）。筒型の X 線管は，現在臨床で使用されている CT 用の高出力線源である（白矢印）。

高電圧電源を用い50～60kVまで充電し、トリガ装置による印加によりX線管内へ放電される時に、陽極のターゲット金属が気化され、疑似単色X線が発生される。

図Ⅲ-76 プラズマX線装置の概略



ある。この装置の空間分解能は $25\ \mu\text{m}$ で、さらに感度は放送用CCDカメラの60～100倍の感度を持つ。現段階では50～100 $\mu\text{m}$ の血管の描出を確認している。本装置は、臨床応用の対象として、末梢動脈閉塞症に対する血管再生療法の効果判定を念頭においている。すなわち、体厚10cm程度の下肢血管造影に応用する。この普及型単色X線装置では、放射光を線源とした場合とは異なり、心血管系など厚い被写体を撮影することはできない。

### c. プラズマX線

プラズマX線の性質は高輝度でシャープなK系列特性X線で、SN比が非常に高い特徴がある。プラズマX線発生装置の原理は図に示すように、コンデンサーに50～60kV程度まで充電し、トリガ電圧の印加でX線管に放電する。放電された陽極側の金属は管電流により気化され、弱電離線状プラズマの成長とともに特性X線が発生する(図Ⅲ-76)。ヨードのK吸収端である33.3keV近傍の単色に近いX線を得たい場合には、ターゲットとしてCe(原子番号58)を選択すれば34.566keVにピークを有する特性X線が得られる。こうして得られたX線は、そのターゲット特性の疑似単色X線が得られるので、光子量を減少させるような金属フィルターなどの操作を必要としない。このプラズマX線装置は前述の普及型X線装置に比べ高輝度であり、人体のような比較的厚い被写体も通過することができる<sup>3)</sup>。

## 4. 検出法

### a. 高解像度・高感度蛍光体

本微小血管造影法では浜松ホトニクスファイバオプティクプレート(FOS)(Gd2O2S(Tb)またはCsI(Tl))を用いてX線透亮像を可視光線に変換し、HARPカメラで撮影する。FOSは数ミクロン径のガラスファイバを数千万本束ねた光学デバイスに、X線シンチレータを付加したX線イメージングデバイスである。蛍光体のみを堆

積しているため膜厚を薄くでき、光の拡散を小さくすることができ高解像度 ( $50 \mu\text{m}$  (20 ラインペア)) となる。また、蛍光体だけを堆積させ不純物を含まない高密度と微細な柱状結晶構造は、光ファイバに似た微細かつ緻密な構造が減光を大幅に削減し高感度を保てる。

#### b. HARP 法

CCD を用いたハイビジョンカメラでは、画素あたりの光子数が減少し感度が低下してしまうため、高精細画像として微小血管を描出するには限界がある。アバランシェ型ハイビジョン用撮影管は高解像度で、高感度の撮影が可能であり、その構造は非セレン膜で構成された光伝導電層を有し、高電圧操作下で電子なだれ現象が生じ、実効量子効率が数百倍の光電変換をすることができる。NHK の開発したモノクロ新 super-HARP カメラは、 $25 \mu\text{m}$  非セレン膜の構造を持ち、CCD カメラより 100 倍以上の感度を持ち合せている<sup>5)</sup>。

## 5. 症例提示

#### a. 放射光を用いた微小血管造影

ウサギ虚血肢の血管再生モデルを用いた、放射光施設での実験で血管径  $100 \mu\text{m}$  以下の血管が鮮明に描出されているのがわかる (図 III-77)。DNA は体内に投与すると、DNA 分解酵素の働きにより可及的速やかに分解されてその効果が失われてしまう。そこで著者らは、ゼラチンハイドロゲル (GHG) と DNA の複合体を形成し再生

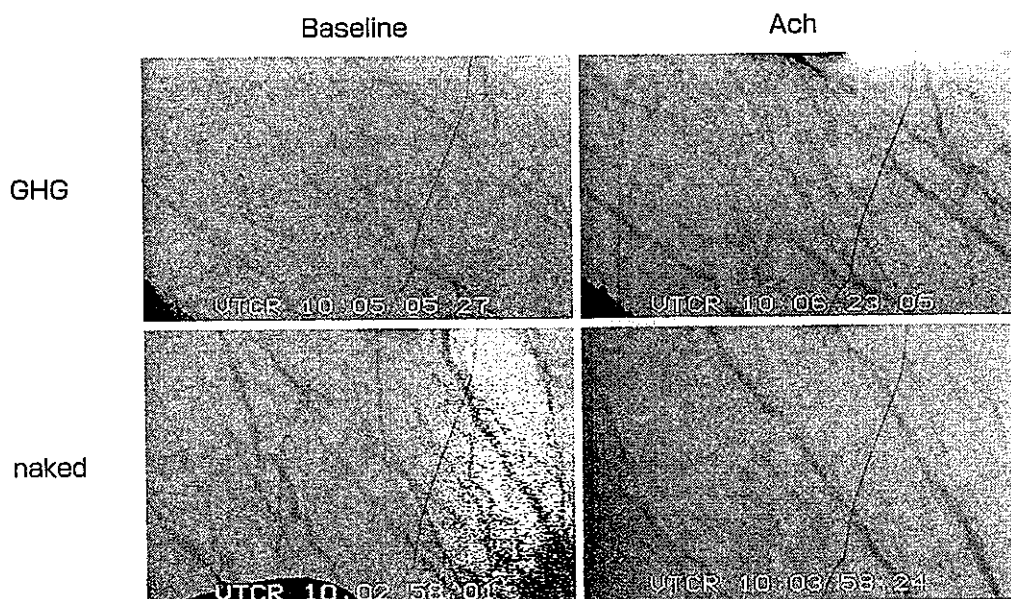


図 III-77 放射光を用いた微小血管の描出と血管機能の評価方法

再生治療により新生された血管径  $100 \mu\text{m}$  以下の血管が描出されている。GHG・VEGF 複合体投与群ではアセチルコリン (Ach) 投与にて Baseline と比べ、血管の拡張と血管数の増加を認めるが (図上)、DNA 単独群 (naked) では血管の拡張と増加は認められない (図下)。

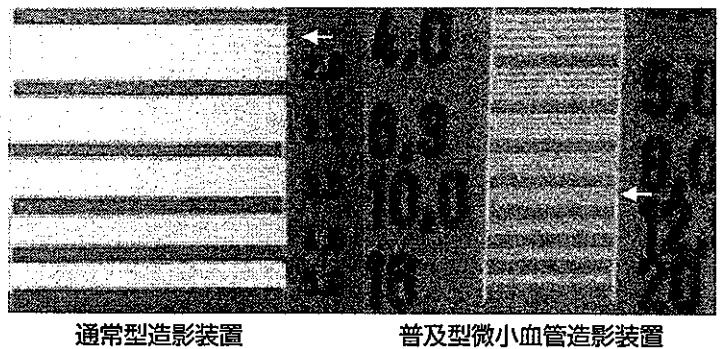
効果を徐放することにより、血管がより成熟度を増すかどうか微小血管造影法を用い検討した。DNAには血管成長因子であるVEGFを使用し、対象としてVEGF単独群、GHG・VEGF複合体群に血管再生治療を施行した。血管成熟度の評価方法はアセチルコリンの血管内投与による血管の反応性を用いた。結果はDNA単独群では血管の反応性は認めなかったが、GHG・VEGF複合体群では血管が拡張し、血管数が増加した(図Ⅲ-77)。

#### b. 普及型単色X線装置を用いた微小血管造影

微小血管撮影を通常の血管造影装置と普及型単色X線装置の比較を提示する。テストチャートとファントムを用い、両装置の空間解像度と微小血管の描出を検討した。テストチャートによる解像度は、通常型の造影装置は $250\mu\text{m}$ (2ラインペア)、普及型単色X線装置は $50\mu\text{m}$ (10ラインペア)であった(図Ⅲ-78)。単色X線装置の画像では、イヌ冠動脈の中隔枝が末梢まで分岐するたびに血管径が減ることが観察できるが(図Ⅲ-79右)、通常型X線装置の画像では血管端がぼやけて、分岐に伴う血管径の減少を確認できないので(図Ⅲ-79左)、微小血管の評価には不向きである。

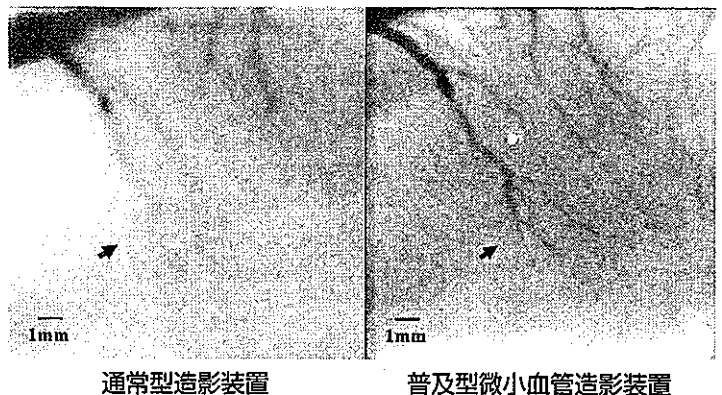
ポリキャピラリーによるX線平行化の効果を検討した。X線を平行化しない画像では、被写体を検出器から離すと血管端がぼやける。一方、キャピラリーによりX線を平行化すると、被写体を検出器から離れた場合でも血管両端の歪みがなく微小血管の描出をさらに向上させる(図Ⅲ-80)。

チャートを用いた図左の通常型血管造影装置の解像度は $250\mu\text{m}$ (2ラインペア)、図右の普及型微小血管造影装置の解像度は $50\mu\text{m}$ (10ラインペア)を示す。



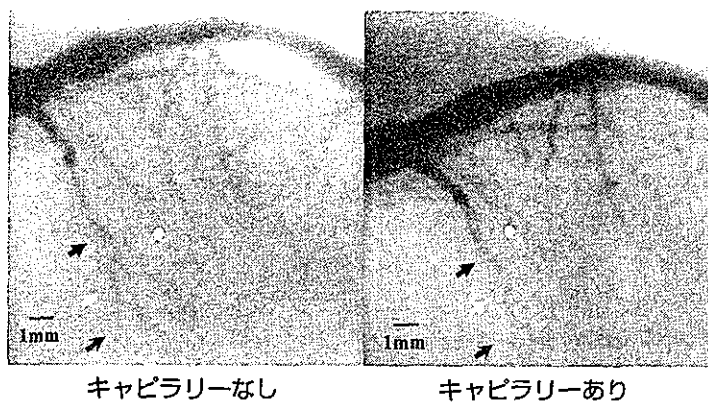
図Ⅲ-78 チャートによる通常型血管造影装置と普及型微小血管造影装置の比較

イヌ冠動脈にヨードマイクロスフィア(直径 $25\mu\text{m}$ )を詰めて結紮したファントムを用い、撮影した。図左は通常型血管造影装置で撮影したものであり、冠動脈末梢側はぼやけてしまっているが、図右の普及型微小血管造影装置で撮影したファントムは末梢側まで血管を追うことができる。



図Ⅲ-79 イヌ冠動脈ファントムによる通常型血管造影装置と普及型微小血管造影装置の比較





図Ⅲ-80 キャピラリーによる平行化の効果

イヌ冠動脈ファントムを検出器から15cm離れた状態で撮影した。血管は分岐すると血管径が小さくなるが、平行化していない図左の血管は分岐するごとに血管径が細くならないが、右のキャピラリーで平行化した場合には、分岐ごとに血管径が細くなるのが観察できる。

## 6. まとめ

再生医療が注目されているにもかかわらず、臨床において再生血管を可視化して評価する方法は確立されておらず、臨床症状の改善が唯一の治療評価となっているのが現状である。微小血管造影法の可及的速やかな普及化が期待されている。また、微小血管造影法は病理学的診断方法とは異なり、治療前後で血管の変化を検討することができ、臨床応用に有用と考えられる。さらに、動脈硬化・糖尿病などによる微小血管疾患、悪性腫瘍などの早期診断にも発展していく可能性も有する。本稿では、再生血管の評価方法として、微小血管造影法に必要な要素と放射光および普及型微小血管造影装置について概説した。

[知久正明・西上和宏・佐藤英一・盛 英三]

### 参考文献

- 1) Tateishi-Yuyama E, et al. : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360 : 427-435, 2002.
- 2) Mori H, et al. : Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation*, 89 : 863-871, 1994.
- 3) Sato E, et al. : Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-xray laser generator. *SPIE*, 4662 : 538-548, 2002.
- 4) Tanioka K, et al. : A highly sensitive camera tube using avalanche multiplication in an amorphous selenium photoconductive target. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 1656 : 1-12, 1992.
- 5) Kubota M, et al. : Ultrahigh-sensitivity new super HARP camera. *IEEE Trans Broadcast.*, 42 : 251-258, 1996.

## 4. 画像解析-微小血管造影-

知久 正明・西上 和宏・内藤 博昭・盛 英三・佐藤 英一

狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に対する新しい治療戦略として血管再生治療<sup>用解1)</sup>が期待されている。実際の臨床では、血管造影を含めた臨床検査で臨床症状の効果を十分には反映していない。これは、既存の血管造影装置の解像度は約200~300  $\mu\text{m}$ であり、再生される新生血管は約100  $\mu\text{m}$ 以下の微小血管であるからである。微小血管造影の先駆けとなったシンクロトロンによる微小血管造影法<sup>用解2)</sup>は200~500  $\mu\text{m}$ 以下の微小血管の定量と50~200  $\mu\text{m}$ 以下の微小血管の可視化が可能である。さらに、臨床の場で簡便に使用できる微小血管造影装置も開発された。本稿では、再生治療後の微小血管の評価方法について概説する。

### はじめに

血管再生には、一般に既存の血管から血管内皮細胞が増殖、リモデリングし、新しい血管枝が形成される狭義の血管新生 (angiogenesis) と、血管内皮前駆細胞である血管芽細胞が集合・分化して血管が形成される血管発生 (vasculogenesis) の2つが考えられている。血管発生は、主に胎生期に行われると考えられていたが、成人末梢血中のCD34陽性単核球の分画から血管内皮細胞へと分化する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) があることが報告され、成人においても血管発生による血管再生が起こりうることを示された<sup>1)2)</sup>。特に単核球分画中で血管内皮細胞に分化する単核球は、主に骨髄に存在するため、動物実験の虚血モデルに骨髄単核球細胞移植をすることにより、血管新生や側副血行路が発達し、下肢血流量増加作用や心機能が改善することが確認された。これに基づき、重症下肢虚血患者に対し自己

骨髄細胞移植や末梢血幹細胞移植が臨床導入され、良好な成績が報告されている<sup>3)</sup>。しかし、既存の血管造影装置では空間解像度が200  $\mu\text{m}$ 前後で、ミリメートルオーダーの血管を主たる観察対象としている。そのため、新生血管床の構築と機能の評価には極めて不十分といわざるを得ない。そこで、微小血管を観察できる微小血管造影法に期待がもたれている。

### I. 微小血管造影法

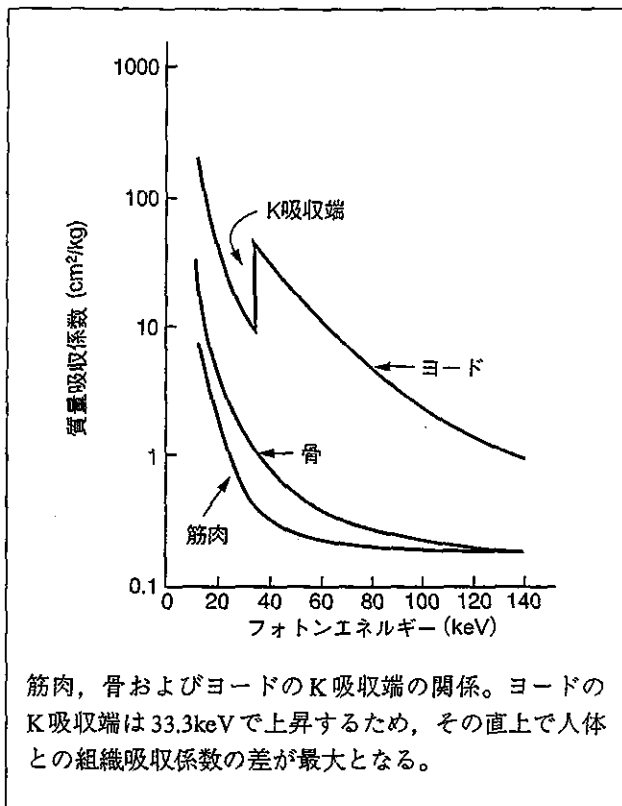
#### 1. 放射光微小血管造影法

再生された微小血管を血管造影検査で評価するためには、微量の造影剤を検出できる装置が必要となる。その要素としてはX線の性質が高輝度で、平行性、単色性であり、なおかつ検出系が高感度、高解像度であることが重要である。これらの要素をすべて取り揃えているのが放射光施設内の微小血管造影装置である<sup>4)</sup>。放射光とは広域のスペクトルを持つ白色光であり、太陽光のように限りなく

#### key words

微小血管造影, 血管再生治療, 新生血管, 単色X線, 放射光微小血管造影法, 病院設置型微小血管造影法, プラズマX線微小血管造影法, angiogenesis, vasculogenesis, endothelial progenitor cell

図① X線エネルギーと質量吸収係数



図② 病院設置型微小血管造影装置



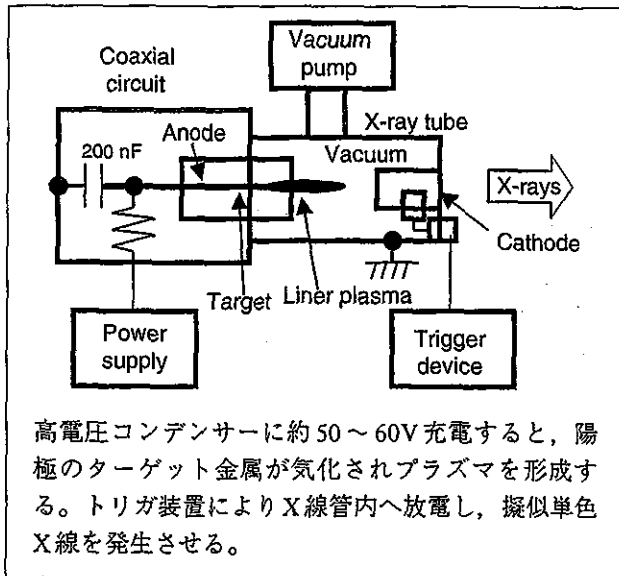
平行に近い性質がある。単色光の利点として、ヨードは33.3keVのエネルギーレベルでK吸収端を持つ。これは質量吸収係数が不連続に上昇し、X線のエネルギーをヨードのK吸収端の直上のエネルギーに変換すると、ヨードと周囲組織との質量吸収係数の差が最大となる(図①)。組織とヨードとのコントラストが最良となるため、微量のヨードを検出できやすくする効果がある。放射光のX線は、既存のX線装置より約108倍以上も輝度が高く、シリコン結晶を用いてヨード吸収端の直上に設定することにより、単色化しても十分な光子量を維持することが可能である。検出系は高解像度・高感度蛍光板で作製した蛍光像を、超高感度・高精細撮像管であるアバランシェ型ハイビジョンモノクロ新Super-HARPカメラで撮影する。これらの検出器系から高解像度微小血管造影像(50 $\mu$ m)が得られる<sup>3)</sup>。既存の撮影装置のようにイメージインテンシファイヤーとCCDカメラを用いた検出器では、感度と解像度が低いため、高精細画像として微小血管を描出するには限界がある。

## 2. 病院設置型微小血管造影法

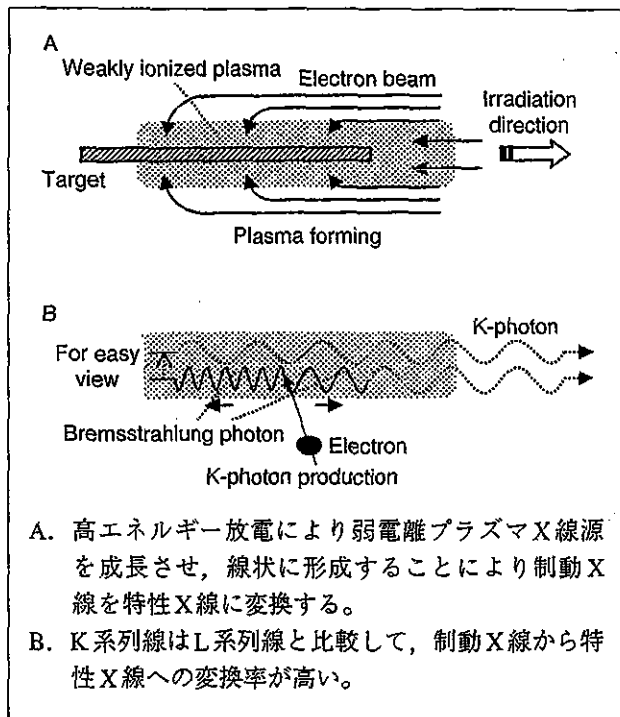
放射光施設は多額のコストと広大な敷地を必要とし、臨床導入するには時間的・空間的にも問題がある。そこで微小血管造影法が臨床応用できるように、新エネルギー・産業技術開発機構(NEDO)の支援により、病院設置型の微小血管造影装置を浜松ホトニクス・NHKエンジニアリングの協力を得て共同開発した。X線管は最大陽極熱容量が5MHUと世界最大級の大きさであるCT用管球を転用した(図②)。X線高電圧装置も大出力化し、市販の装置では不可能な70kVp・800mAで高輝度のX線を連続20秒間まで撮影できる。疑似単色化はランタノイド系の金属を複合したフィルターで、ヨードのK吸収端である33keV付近に頂点を有し、約20keVのバンド状の照射X線スペクトルに変換した。検出系は、放射光微小血管造影法と同じ、NHKの高感度・高精細撮像管であるアバランシェ型ハイビジョンモノクロ新Super-HARPカメラを用いている。

安全性の検討として、照射X線量と散乱X線量

図③ プラズマX線微小血管造影装置 (文献9より改変)



図④ プラズマ X 線の発生原理 (文献9より改変)



を計測した。X線発生装置から1mに検出器を設置し、管電圧70kV、管電流500mAで20秒照射した場合、0.547Sv (62.7R)であった。検査の撮影条件としては最低でも1検査あたり100R以下 (3R/sec) を目標としており、妥当な線量と考えられる。また、X線発生装置から1mの距離にファントムを置き、50cm側方で散乱X線を検出した場合の散乱X線量は0.0225mSv (2.58mR)であった。放射線医

療従事者の年間被曝量の限度は50mSvであり、許容範囲内と考えられる。本装置は、2004年3月に国立循環器病センターに設置され、医師主導のもと、臨床応用が開始される。

### 3. プラズマX線微小血管造影法

装置は高電圧電源、高電圧コンデンサー、プラズマX線管からなり、高電圧コンデンサーの容量を増すことによりX線の高輝度化が可能となる(図③)。プラズマX線はシャープなK系列特性X線であり、その発生原理は高エネルギー放電により弱電離プラズマX線源を成長させ、線状に形成することにより制動X線を特性X線に変換する。特性X線はプラズマを容易に通過するので、高線量の疑似単色X線が発生する(図④A)。さらに、K系列特性線は蛍光吸収率が高いので、L系列線と比較して制動X線から特性X線への変換率が高い(図④B)。プラズマX線は金属ターゲットの種類により、特性X線のエネルギーを任意に選択することができる。例えば、セリウムを陽極に用いると約34keVの特性X線を得られ、ヨードのK吸収端である33keV直上のエネルギーを持つ疑似単色X線での撮影が可能となる<sup>9)</sup>。

## II. 微小血管の画像による評価

### 1. 正常血管と再生血管の比較

Takeshitaらは、放射光微小血管造影装置を用い、ラットの大腿動脈を結紮した後の再生血管と結紮処置をしていないコントロールの血管性状を比較した<sup>10)</sup>。結紮してから4週後に血管撮影をした結果、線状とらせん状の2種類の血管が存在したが、コントロールでは線状の血管のみであり、らせん状の血管は観察されなかった。このことから、再生される血管には線状とらせん状の2種類の構造を持つ血管があるが、線状の血管は既存の血管であった可能性もあると示唆した。しかし、らせん状の血管はコントロールでは観察されないため、少なくとも虚血により再生した結果で生じた血管であるとしている。また、血管内皮依存性の血管拡張薬であるアセチルコリンを投与した場合、線状の血管は拡張するものの、らせん状の血管は拡張しなかった。さらに、血管内皮増殖因子である