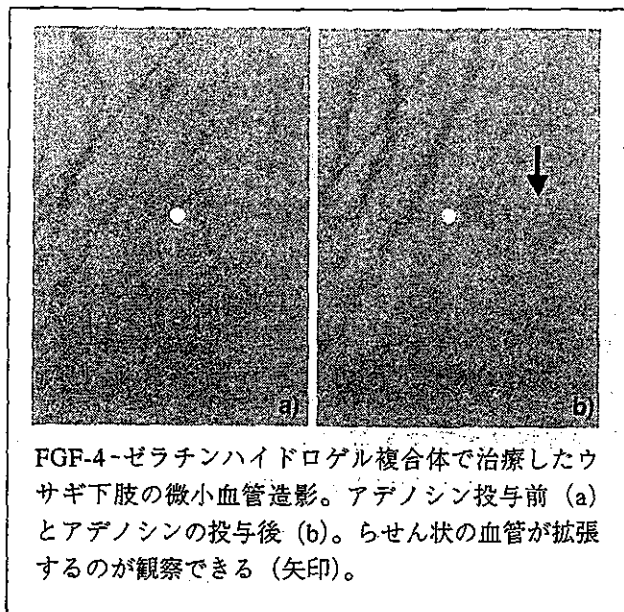


図5 再生血管のアデノシン投与による反応



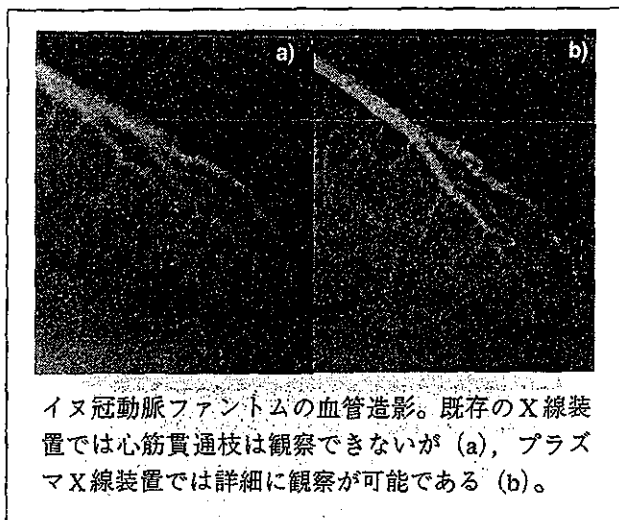
FGF-4-ゼラチンハイドロゲル複合体で治療したウサギ下肢の微小血管造影。アデノシン投与前 (a) とアデノシンの投与後 (b)。らせん状の血管が拡張するのが観察できる (矢印)。

vascular endothelial growth factor (VEGF) で治療したラットで観察されたらせん状の血管も拡張せず¹³⁾, 以上のことから虚血により生じた再生血管や VEGF により再生したらせん状の再生血管は, 内皮機能が備わっていない不完全な再生血管であると考えられた。一方, fibroblast growth factor 4 (FGF-4)-ゼラチンハイドロゲル複合体にて血管再生治療後のウサギの下肢虚血モデルを撮影した。観察されている血管は再生血管と考えられ, アデノシンの投与によりらせん状の血管が拡張したと報告されている¹⁴⁾。病院設置型の微小血管造影装置でも同様に, FGF-4-ゼラチンハイドロゲル複合体で治療した場合, アデノシンの投与によりらせん状の血管が拡張した (図5)。これにより, FGF-4-ゼラチンハイドロゲル複合体で治療した場合には, より成熟した血管が再生したと考えられる。

2. 病院設置型とプラズマX線微小血管造影装置

病院設置型の微小血管造影装置のX線源では, その単色X線光子数の限界から, 現在は体厚が8cmの下肢の微小血管造影に対象が限られている。

図6 既存のX線装置とプラズマX線装置の比較



イヌ冠動脈ファントムの血管造影。既存のX線装置では心筋貫通枝は観察できないが (a), プラズマX線装置では詳細に観察が可能である (b)。

体厚が8cm程度の被写体では微小血管を描出できるが, 10cmを超えると血管像をほとんど得ることができない。一方, プラズマX線装置は, コンデンサーの容量を増加させることで, 高輝度化することが可能であるため, 人体を通過する疑似単色X線が得られる可能性があると考えられている。マイクロスフィアを充填したイヌ冠動脈ファントムをプラズマX線装置と既存の血管造影装置とで比較した場合, プラズマX線で撮影した場合は心筋貫通枝レベルのミクロンオーダーの微小血管が詳細に観察できたが, 既存の血管造影装置では観察できなかった (図6)。

おわりに

微小血管造影法にて観察されている血管は, 必ずしも新生血管とは限らず, 側副血行路の血流の増加やあらかじめ存在していた微小血管の拡張であるかもしれないということを忘れてはならない。しかし, 微小血管造影法による画像評価は, 血管の種類や反応性の評価まで可能となる。今後の臨床導入により, さらに詳細に検討されることを期待している。

用語解説

1. 血管再生治療：虚血性疾患において、血行再建や薬剤治療に抵抗する症例に対し、新生血管を形成させ、血流を改善させる治療である。現在は、自己骨髄やサイトカインなどを用いて臨床応用されている。
2. 微小血管造影法：既存の血管造影装置の空間解像度は200～300 μm であるが、100 μm 以下の解像度を持つ撮影装置にて微小血管の造影が可能となっている。血管再生治療で再生された血管の評価に期待されている。

参考文献

- 1) Asahara T, Murohara T, et al : Science 275, 964-966, 1997.
- 2) Shintani S, Murohara T, et al : Circulation 103, 897-903, 2001.
- 3) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, et al : Lancet 360, 427-435, 2002.
- 4) Mori H, Hyodo K, et al : Circulation 89, 863-871, 1994.
- 5) Tanioka K : Proc SPIE Int Soc Opt Eng 1656, 1-12, 1992.
- 6) Kubota M, Kato T, et al : IEEE Trans Broadcasting 42, 251-258, 1996.
- 7) Umetani K, Ueki H, et al : J Synchrotron Rad 5, 1130-1132, 1998.
- 8) Tanioka K, Ohkawa Y, et al : IEEE Workshop on CCD and Advanced Image Sensors, 2001.
- 9) Sato E, Hayasi E, et al : SPIE 4682, 538-548, 2002.
- 10) Takeshita S, Isshiki T, et al : Circulation 95, 805-808, 1997.
- 11) Takeshita S, Isshiki T, et al : Circulation 98, 1261-1263, 1998.
- 12) Kasahara H, Tanaka E, et al : J Am Coll Cardiol 41, 1056-1062, 2003.

参考図書

- *機能・代謝画像診断法と分子画像，西村恒彦 編，南山堂，2003.
- *INNERVISION 17(8)，疑似X線レーザーを用いた普及型微小血管造影装置の開発，知久正明，西上和宏 他，インナービジョン，2003.

参考ホームページ

- ・大型放射光施設 SPring-8
<http://www.spring8.or.jp/j/>
- ・高エネルギー加速器研究機構
<http://www.kek.jp/ja/index.html>

知久正明

- 1994年 日本大学医学部卒業後、日本大学第二内科入局
 - 1996年 日本大学医学部大学院入学
 - 2000年 大学院卒業後、国立甲府病院循環器科に勤務
 - 2003年 国立循環器病センター修練医
- 現在は、大血管疾患から末梢血管疾患の非侵襲的診断法および血管再生治療における微小血管造影法の研究を行っている。

A Novel Micro-Angiography Detecting Angiogenesis, Application for Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation in the Patients with Critical Limb Ischemia

Kazuhiro Nishigami, Takeshi Nakatani, Masaaki Chiku, Hidezo Mori

National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka
565-8565, Japan

Summary. Conventional Anigiographic Findings in Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Transplantation for Critical Limb Ischemia: Bone marrow mononuclear cells have many of the characteristics of stem cells for mesenchymal tissues, and secrete many angiogenic cytokines. We performed autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in six patients with critical limb ischemia due to Buerger disease, who were not candidates for catheter or surgical revascularization. Leg pains at rest and skin ulcers improved after bone marrow transplantation in all patients, although significant collateral developments after the therapy by conventional angiography could not be observed. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells including stem cells improved critical limb ischemia due to Buerger disease. Neovascularization after therapeutic angiogenesis might be quite small and could not be visualized by conventional angiography.

Novel Micro-angiography: We developed in-hospital micro-angiographic equipment which consisted of a high power X-ray source for computed tomography and an avalanche type detector characterized by a high spatial resolution (20 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera). We visualized mid-zone collaterals after femoral arterial exfoliation with and without therapeutic angiogenesis in rabbit ischemic limbs and assessed the radio-absorptions in a clinical setting. The micro-angiography clearly demonstrated mid-zone collaterals after the treatment with a diameter of down to 50 μ m, but the conventional angiography did not. The sum of ra-

dio-absorptions for 10 seconds in clinical settings was 300 mSv. The newly developed in-house micro-angiography could illuminate micro-vessels with a diameter of down to 50 μ m in clinical settings safely and could be useful in the evaluation of therapeutic angiogenesis.

Keywords. Micro-angiography, Angiogenesis, Autologous bone marrow mononuclear cells transplantation, Critical limb ischemia, Buerger disease

Introduction

Endothelial progenitor cells (EPCs) possess the ability to mature into cells that line the lumen of blood vessels(Asahara T, et al. 1997). Therapeutic angiogenesis could be induced by the transplantation of bone marrow mononuclear cells including EPCs. Several studies demonstrated that therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow mononuclear cells transplantation (BMT) was effective for ischemic vascular diseases although conventional angiography could not precisely detect developed collaterals after therapeutic angiogenesis(Iba O, et al. 2002, Inaba S, et al. 2002, Shintani S, et al. 2001, Tateishi-Yuyama E, et al. 2002). We developed an in-hospital micro-angiographic equipment which consisted of a high power X-ray source for computed tomography and an avalanche type detector characterized by a high spatial resolution (20 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera).

The purpose of the present study was to evaluate the clinical effects and conventional angiographic findings on BMT for critical limb ischemia, and to validate the usefulness and safety of the novel micro-angiography technique for the evaluation of therapeutic angiogenesis.

Methods

Patients

Patients qualified for autologous BMT if they had chronic critical limb ischemia including rest pain and/or non-healing ischemic ulcers for a minimum of 4 weeks without evidence of improvement in response to

conventional therapies and were not optimal candidates for surgical or catheter revascularization. Buerger's disease was diagnosed by segmental occlusion of small- and medium-sized arteries, absence of atherosclerosis, and corkscrew collaterals circumventing the occlusion in angiogram and the exclusion of autoimmune diseases such as scleroderma or systemic lupus erythematosus, hypercoagulable states, diabetes, or acute arterial occlusion secondary to embolism. Patients with retinopathy and/or malignancy were excluded. Although 30 patients with atherosclerotic peripheral artery disease were candidates for BMT, they were excluded from the present study due to their systemic atherosclerotic complications. Six patients with Buerger's disease were recruited for the present study. All patients had leg pain at rest and five patients had foot ulcers. Written consent was obtained from all participants of this study. This clinical trial of autologous BMT for the treatment of patients with critical ischemia was approved by the Medical Ethics Committee of the National Cardiovascular Center.

Autologous BMT

Bone marrow fluid (700-800ml) was collected from the iliac bone under general anesthesia. The harvested bone marrow fluid was diluted with RPMI 1640 (Nikken Bio Medical Laboratory, Kyoto, Japan) containing heparin, then stored in a sterile pack from the Bone Marrow Collection Kit (Baxter, IL, USA). The mononuclear cell fraction was prepared with a Fresenius AS104 (AMCO, USA). The injection volume was 0.5ml and injections were spaced 2-3cm apart, using a 1ml syringe and a 27-gauge needle. Leg pains were measured by a visual analog pain scale and foot ulcers were evaluated by area and appearance.

Novel micro-angiography

The in-hospital micro-angiographic equipment consisted of a high power X-ray source for computed tomography and an avalanche type detector characterized by a high spatial resolution (20 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera) (Fig.1).

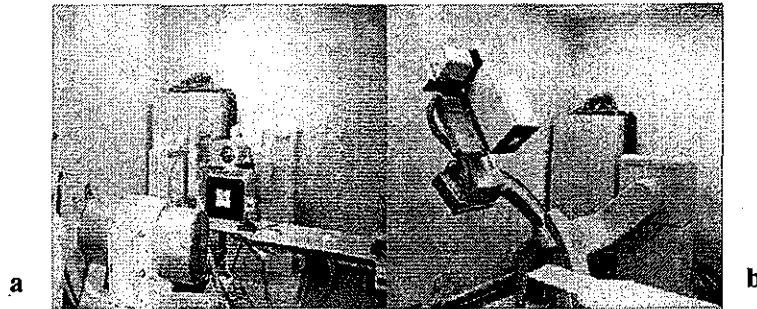


Fig. 1a, b. The micro-angiographic equipment that we developed. High-voltage power X-ray source a and a detecting system with a high spatial resolution (25 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera) b.

Limb ischemia models in rabbits were made by ligating the femoral artery and treated by fibroblast growth factor 4 (FGF-4) genes incorporated to gelatin hydro gel (GHG). One month after the treatment, we evaluated collateral micro-vessels by using conventional and micro-angiographic systems. The approach was via the left femoral artery so that the catheter was located in the abdominal aorta. A 5ml bolus of Iodine contrast medium (300mg/ml) was injected at 3ml/sec using an auto-injection system. Imaging was recorded using a digital source in 1000 x 1000 pixels. The sum of radio-absorptions for 10 seconds in clinical settings was studied.

Results

Autologous BMT for Critical Limb Ischemia

The number of transplanted bone marrow mononuclear cells were one to five multiplied 10^9 . Rest pains decreased or disappeared in one month after BMT (Fig.2) and Skin ulcers improved in one to three months after BMT in all patients (Fig.3).

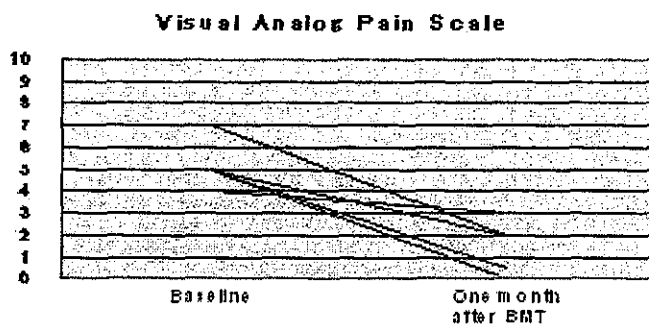


Fig. 2. The Visual analog pain scale in all patients.



Fig. 3a, b. The skin ulcers in a patient before a and one month after autologous bone marrow transplantation b.

Conventional angiography was performed before and one month after BMT, but there was no significant changes in any of the patients (Fig.4).

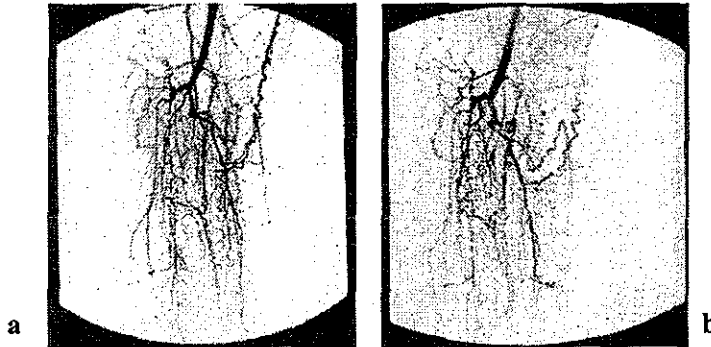


Fig. 4a, b. The conventional angiographic findings in the patient before a and one month after autologous bone marrow transplantation b.

Novel micro-angiography

The novel micro-angiography can detect to within a limit 50 of μm , although a detection limit of a conventional angiography is 250 μm (Fig.5).

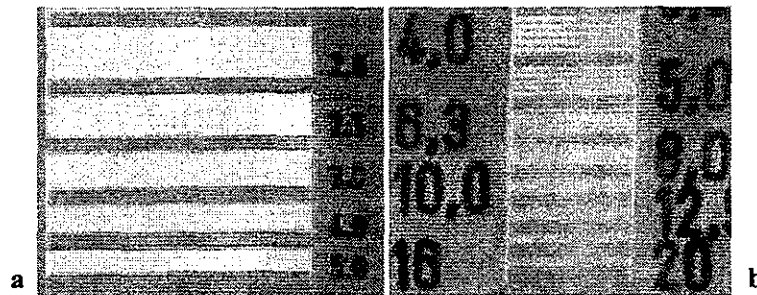


Fig. 5a, b. The detection limits on a conventional angiography a and the novel micro-angiography b using a line chart

Collateral micro-vessels, which were 100-500 μm or less in diameter, were demonstrated more clearly in micro-angiography than conventional angiography (Fig.6).

The sum of radio-absorptions at the point of 1m distance from the X-ray source in clinical settings was 300 mSv. for 10 seconds.

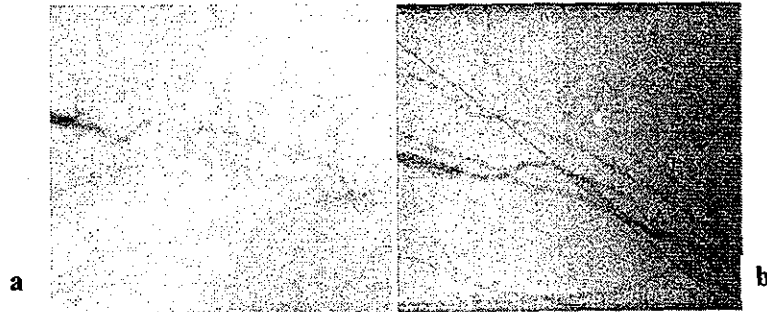


Fig. 6a, b. In 2.5x2.5cm view size, Collateral micro-vessels after therapeutic angiogenesis in the rabbit limb ischemia model. Vessel sizes in the range of 100-500 μ m or less, were demonstrated in the novel micro-angiography **b** more clearly than in a conventional angiography **a**. The diameter of the line in the micro-angiography is 130 μ m.

Discussion

Autologous BMT improved chronic severe limb ischemia due to Buerger's disease. Conventional angiography could not disclose developed collateral vessels after BMT. A novel micro-angiography technique could illuminate promoted collateral vessels after therapeutic angiogenesis in rabbit models although a conventional angiography did not. The sum of radio-absorptions in the novel angiography could be accepted in clinical settings.

Autologous BMT and Buerger's disease

Bone marrow harvests need an amount of more than 500ml bone marrow fluid and general anesthesia in therapeutic angiogenesis using BMT. Such factors have practical limitations to select candidates with peripheral artery disease complicated with systemic atherosclerosis and aging for BMT. Buerger's disease is a segmental vasculitis that affects the distal arteries of the upper and lower extremities. It typically occurs in young people. The majority of patients with Buerger's disease have pain at rest and digital

ulcerations and are hard to treat by revascularizations, including catheter angioplasty and surgical bypass grafting, because of peripheral artery lesions. Patients with Buerger's disease, however, tend to have less systemic atherosclerotic lesions and normal cardiac function. These suggest that patients with Buerger's disease are the ideal candidates for therapeutic angiogenesis using autologous BMT.

Discrepancy between clinical improvements and conventional angiographic findings after BMT

BMT improved critical limb ischemia clinically. Promoted collateral vessels after the treatment were not, however, visualized well by conventional angiography. These vessels are quite small and the detection limit of small vessels by conventional angiography is about 200 μ m in diameter.

Novel micro-angiography

Recently, synchrotron radiation system characterized by high brightness, monochromatic and collimated nature bypass, revealed micro-vessels *in situ*. However the high cost of a synchrotron system strictly limits its clinical application (100 million dollars or more). We developed an in-house micro-angiographic system with a relatively low cost of approximately 1million dollars, which consisted of a high-voltage power X-ray source and a detecting system with a high spatial resolution (25 μ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera). We evaluated collateral micro-vessels one month after therapeutic angiogenesis by using the conventional and micro-angiographic system. The *in-house* micro-vessel angiographic system could detect the micro-vessels more precisely than conventional angiographic system. We thought that the present micro-angiography should be useful for evaluating efficacy of therapeutic angiogenesis in clinical settings.

Conclusions

Conventional angiography failed to disclose the promoted collateral vessels after BMT although BMT improved the critical limb ischemia clini-

cally. The in-house micro-angiographic system could detect the micro-vessels more precisely than conventional angiographic system and the sum of the radio-absorption in the equipment could be acceptable in clinical settings. The novel in-house micro-angiographic system can be useful in the evaluation of therapeutic angiogenesis clinically.

References

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.(1997) Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 275:964-966
- Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al.(2002) Angiogenesis by Implantation of Peripheral Blood Mononuclear Cells and Platelets into Ischemic Limbs. *Circulation* 106:2019-2025
- Inaba S, Egashira K, Komori K (2002) Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* 360:2083.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al.(2001) Augmentation of Postnatal Neovascularization with Autologous Bone Marrow Transplantation. *Circulation* 103: 897-903
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al.(2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells:a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*,360:427-35

血管再生療法の未来と画像評価法

西上 和宏*・徳永 宣之**・神田 宗武**・白井 幹康**
笠原 啓史***・田中 越郎***・盛 英三**

1. はじめに

動脈硬化性疾患の増加，高齢化に伴って，重症の冠動脈疾患や末梢動脈閉塞症が増加している。これらの疾患に対しては，通常，カテーテル治療やバイパス手術などの血行再建術が施行されている。しかしながら，びまん性病変や末梢性病変に対しては，血行再建術は困難である。近年，血行再建術が困難な重症の虚血性循環器疾患に対して血管再生療法が試みられている。まずまずの臨床効果が報告されているが，評価法が確立されておらず，再生血管を描出できる微小循環撮影装置が望まれている。そこで，本稿においては，血管再生の機序，血管再生療法の現況と展望，微小循環造影法の開発と意義について，臨床応用の観点から基本的なことを中心に述べたい。

2. 虚血から血管再生へ

2.1 虚血によって生じる血管の変化

組織が虚血（低酸素）に陥ると，HIF (Hypoxia Induced Factor) などの転写因子や VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Angiopoietin などの血管内皮増殖因子とよばれるサイトカインが産生される¹⁾。これらのサイトカインの中で，特に Angiopoietin 2 の働きにより血管の平滑筋細胞が脱落する。VEGF はこの

Angiopoietin 2 の作用を増強させ，さらに血管内皮細胞の結合を緩やかにし，血管の透過性を亢進させる。また，マクロファージを介して，MMP (Matrix Metalloproteinase) などの組織分解酵素が産生される (図1)。

2.2 血管内皮細胞による血管再生 (狭義の Angiogenesis と Vasculogenesis)

血管平滑筋細胞の脱落，血管透過性の亢進，血管周囲組織の変成の後，血管内皮細胞による血管再生が生じる。血管内皮細胞による血管再生には，血管内皮細胞が増殖して，再生血管が進展する (狭義の Angiogenesis) と血管内皮前駆細胞が集合して，あらたに血管が形成される (Vasculogenesis) の二つがある。

狭義の Angiogenesis は，既存の血管から，VEGF などの血管内皮増殖因子により血管内皮細胞が血管の外側に増殖し，血管側枝として再生血管を形成していく現象である (図2 a)。以前から考えられていた血管再生の機序であるが，近年，これに関与する因子が多数発見されており，そのメカニズムが明らかにされつつある。

Vasculogenesis は主に胎生期に血管が形成される時に生じる血管再生であるが，近年，成人においても血管内皮前駆細胞が骨髄または末梢血液中に存在することが報告された²⁾。Vasculogenesis においては，血管内皮前駆細胞が VEGF などのサイトカインの影響下に，虚血部に遊走，集合して毛細血管網を形成する (図2 b)。毛細血管網は再構築を繰り返しながら，しだいに小血管へと成長していく。基礎および臨床

* Nishigami K 国立循環器病センター心臓血管内科

** Tokunaga N, Kanda M, Shirai M, Mori H 同研究所心臓生理部

*** Kasahara H, Tanaka E 東海大学医学部生理学

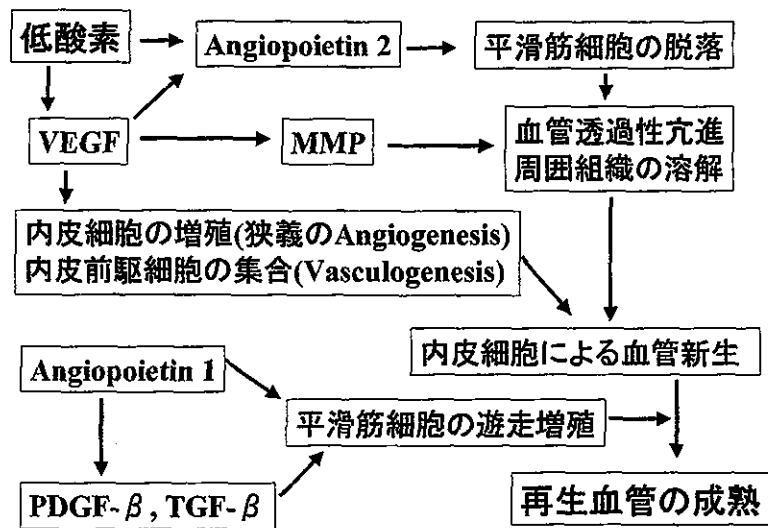


図1 虚血から血管再生までの機序
 VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, MMP: Matrix Metalloproteinase, PDGF: Platelet Derived Growth Factor, TGF: Transforming Growth Factor.

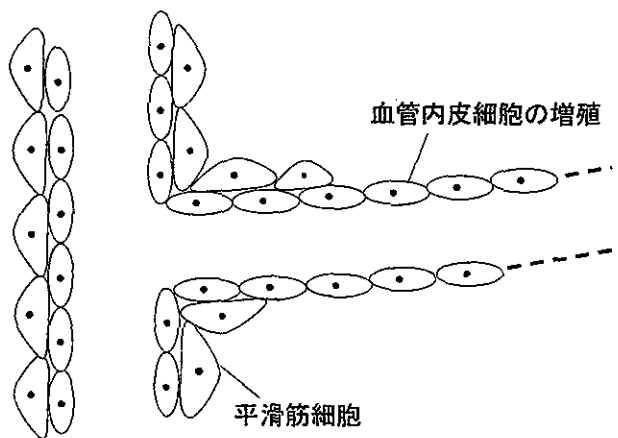


図2a 狭義のAngiogenesisの模式図

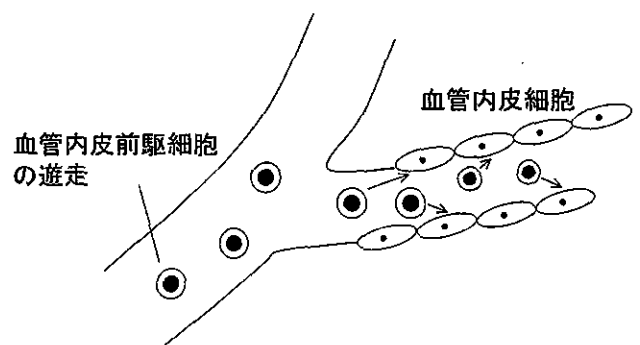


図2b Vasculogenesisの模式図

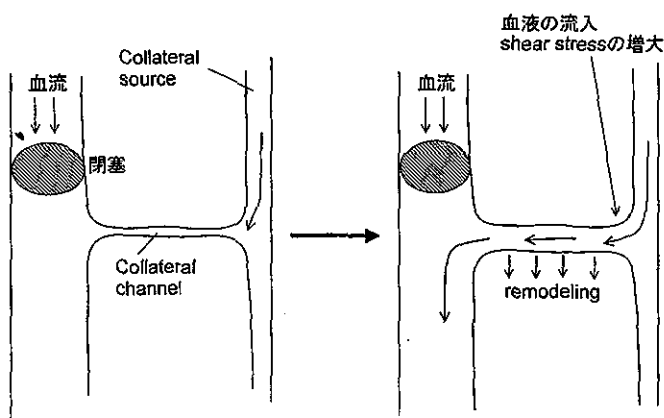


図2c Arteriogenesisの模式図

検討において、血管内皮前駆細胞が含まれる骨髓単核球を虚血部位の筋肉内に投与することにより、血管再生がみられることが報告されている³⁾。

2.3 再生血管の成熟

血管内皮細胞のみで形成された血管は、脆弱で破綻しやすい。例えば、糖尿病性網膜症で見られる再生血管は、血管内皮細胞のみで形成されており、瘤状に拡大したり、破綻出血したりする。このため、血管再生の最終過程において、Angiopoietin 1, TGF (Transforming Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

などのサイトカインにより血管平滑筋細胞が遊走、増殖し、血管内皮細胞で形成された血管の外側を覆い、成熟した再生血管へと変化する（図1）。

2.4 その他の血管再生（Arteriogenesis）

血管再生には、狭義の Angiogenesis と Vasculogenesis の他に、平静時は可視化できない側副路（いわゆる collateral channel）が、虚血時に collateral source からの血液の流入、remodeling によって拡大し、血管造影で新しい血管としてみとめられることがある。これは Arteriogenesis と呼ばれている。Arteriogenesis には、collateral source や他の新生血管から血液供給を受けることによる shear stress の増大、MMP などのサイトカインによる周囲組織の変性や血管の remodeling、血管内皮細胞や平滑筋細胞の発達増殖などが関与している（図2c）。

3. 血管再生療法の現状

3.1 血管内皮増殖因子による血管再生療法

血管再生においては、上述したように VEGF が大きな役割を担っている。Isner らは重症の下肢虚血患者において VEGF 遺伝子を虚血肢に筋注することにより、虚血症状の改善を報告している⁹⁾。VEGF を直接、筋肉内または動脈内に投与することも動物実験レベルでは考えられたが、局所で持続的に血管内皮増殖因子が効果発現するために、遺伝子導入による方法が選択された。ただ、遺伝子導入には当初、ウイルスがベクターとして用いられたが、ウイルス感染に伴う副作用が問題となった。現在、プラスミド DNA での遺伝子導入が行われている。しかしながら、この遺伝子導入法は、安全性は高いが、DNA 分解酵素により代謝され、導入効率が低いことが指摘されている。その他の臨床試験としては、欧米では FGF（Fibroblast Growth Factor）を用いた試験が、本邦では大阪大学において HGF（Hepatocyte Growth Factor）を用いた試験が開始されている。

3.2 骨髄細胞移植による血管再生療法

Vasculogenesis を目的に、骨髄細胞移植による血管再生療法が本邦を中心に開始されている。血管内皮前駆細胞は骨髄単核球の中に含まれており、骨髄液を採取し、遠心分離により単核球を選別する。これを虚血部に筋注することで、血管再生を試みる。閉塞性動脈硬化症やパーチャー病などの末梢動脈閉塞症の患者を対象に臨床治療が開始されているが、虚血性心疾患の患者に対しても、一部、試みられている。

3.3 血管再生療法の臨床効果

血管内皮増殖因子による遺伝子治療と骨髄細胞移植による血管再生療法の臨床試験においては、いずれも症状の改善は8割程度に認められており、皮膚所見を含め自覚症状的には良好な効果が示されている。しかしながら、血管造影上などの他覚的な検査での改善は少ない。自覚症状と他覚的な検査との結果で乖離がみられている。また、血管再生療法の長期的な効果については、現在の所、不明である。

4. 微小循環造影法による再生血管の評価

4.1 再生血管と血管造影

血管再生療法で再生される血管は主に 100 μm 以下の小血管が主体と考えられている。一般の血管造影装置では 200 μm 以下の血管は描出困難であるため、再生血管を評価することは困難と思われる。これが、前述した血管再生療法における血管造影での有意な改善がみられない理由と考えられる。時に、血管再生療法により血管造影で側副路の発達がみられることがあるが、この新しく描出された側副路は再生血管そのものではなく、再生血管により側副路の血流が増加したいわゆる Arteriogenesis と考えられている。血管再生療法による再生血管を直接描出しうる微小循環の造影装置が望まれている。

4.2 放射光を用いた微小循環撮影装置の開発

前述したように再生血管の評価には、100 μm 以下の小血管の描出が必要となる。著者らは、より微量の造影剤を検出可能とするため、放射光を

用いて微小循環造影装置の開発を行った^{5,6)}。

放射光は大型のシンクロトン加速器で作成される強い光（電磁波）である。これは、紫外部から硬 X 線までの広いスペクトルを持っている。さらに、これをシリコン結晶に通過させることで、単色放射光（一定のエネルギーレベルを持つ X 線）に変換することができる。ヨード剤は、質量吸収係数が不連続に上昇する X 線エネルギーレベルが存在する。したがって、そのエネルギーレベルの単色放射光を用いることで、ヨードと周囲組織との X 線吸収差を最大にし、造影剤のコントラスト効果を最良とすることができる。ここでは、ヨードの K 吸収端直上のエネルギーレベル（33.30 keV）に放射光を単色化し、この単色放射光を X 線源として用いた。

撮像系として、高解像度高感度蛍光板（FOS, $Gd_2O_2S:Tb$, 浜松ホトニクス）を用いた。撮影系として、アバランシェ型ハイビジョンモノクロ新 Super-HARP カメラ（NHK）を用いた⁷⁻⁹⁾。放射光微小循環撮影装置はこれらから構成され、25 μm 以下の空間分解能を可能とした。

4.3 放射光微小循環造影法による再生血管の描出と機能評価

著者らは、ウサギの虚血肢モデルを作成して、プラスミド FGF4 投与による血管再生療法を行い、放射光微小循環造影法を用いて再生血管の描出を試みた。図 3 で示すような、200 μm 以下の微小血管も描出されている。

また、放射光微小循環造影法は再生血管の機能評価も可能である。通常の血管は血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の両者によって構成されているが、血管再生療法においては、血管内皮細胞の増殖のみが注目され、血管平滑筋細胞に対しては十分な配慮はなされてこなかった。また、再生血管の数のみが問題とされ、質的、機能的な検討は、十分にはなされていない。

著者らは、DNA 分解酵素から遮断されるゼラチンハイドロゲル（GHG）と DNA の複合体を考案し、その徐放性から、より成熟した再生血管

(48)

の新生を試みた。ウサギの虚血肢モデルを用いて、FGF4 遺伝子単独投与と GHG-FGF4 遺伝子複合体投与の血管再生療法を行い、GHG-LacZ 複合体投与のコントロールを含めて 3 群において、放射光微小循環造影法により再生血管の機能評価を行った。アデノシン投与による再生血管の拡張反応は、GHG-FGF4 遺伝子複合体群でのみ認められ、FGF4 遺伝子単独群とコントロール群ではみられなかった（図 3）。GHG-FGF4 遺伝子複合体を用いた血管再生療法は、成熟した再生血管の形成に有効であると判断された。

放射光微小循環造影法は、再生血管の機能評価、成熟度の判定に有用であると考えられた。

4.4 普及型微小循環造影装置

放射光は、大型のシンクロトン加速器が必要

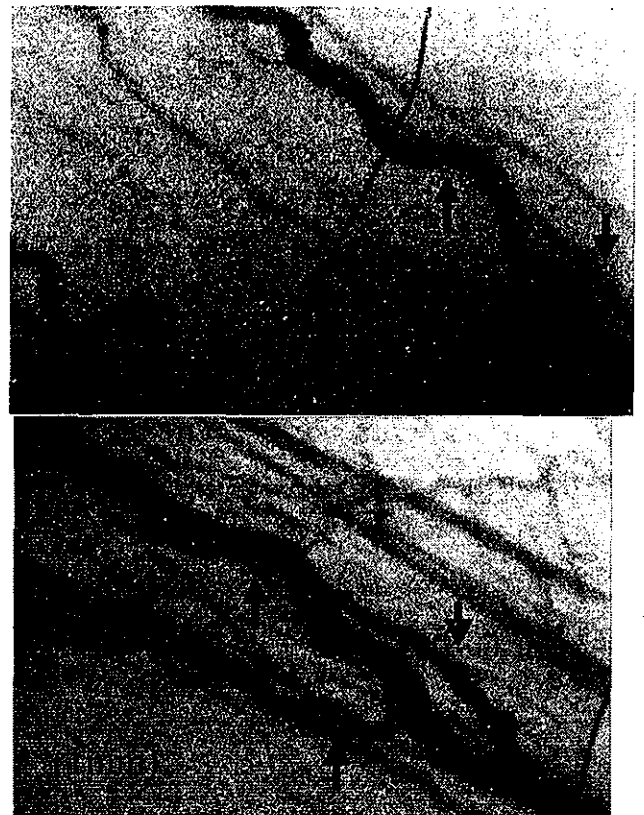


図 3 放射光微小血管造影法を用いた再生血管の描出と血管機能評価

上段：Baseline, 下段：アデノシン投与。ゼラチンハイドロゲル Fibroblast Growth Factor 遺伝子複合体投与による再生血管（蛇行した 100 μm 以下の小血管）が描出されている。アデノシン投与により血管の拡張がみられ（矢印）、描出される血管数も増えている。

であり、一般の臨床医療用として使用することは困難である。したがって、血管再生療法の臨床評価においては、小型で医療用 X 線源を利用した装置が望まれる。新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援を受けて、次世代単色 X 線診断・治療システム開発グループは、このような観点から、臨床で使用可能な微小循環の X 線診断装置を開発している。X 線源として高出力の医療用 X 線源装置を用い、X 線フィルターにより高域と低域のエネルギーをカットして、擬似的に単色線 (ヨードの K 吸収域) を得る。さらに、X 線コリメータにより疑似単色線を平行化して照射する。これにより、コントラスト効果の高い微小循環造影画像が得られる。また、超高感度ハイビジョンカメラシステムを搭載することで、高分解能の撮像が可能となる。この診断装置の開発により、血管再生療法の臨床応用における評価系の確立が期待される。

5. 血管再生療法の新たな展開

今後、血管再生療法の関心は、再生された血管の数から質へと展開していくと考えられる。すなわち、より成熟した再生血管の形成のために、種々の試みがなされるであろう¹⁰⁾。

5.1 上流の血管内皮増殖因子の選択

VEGF は血管内皮細胞に直接作用し、多くの血管内皮増殖因子の中で下流に位置する因子である。一方、他の血管内皮増殖因子は、VEGF の増加作用により、また VEGF を介して二次的に血管内皮細胞への作用を有するものが多く、他の血管構築細胞への影響を有するものも多い。虚血による生理的な血管再生では、低酸素により活性化する HIF-1 α 等の転写因子や上流の血管内皮増殖因子がまず活性化し、引き続いて VEGF を始めとする下流の血管内皮増殖因子が発現する。血管再生は下流の血管内皮増殖因子によって可能であるが、より生理的な血管再生を考慮すれば、HIF-1 α などの転写因子や FGF などのより上流の血管内皮増殖因子が望まれる。

5.2 複数の血管内皮増殖因子の投与

VEGF の作用は、血管内皮細胞に比較的限定している。そのため血管平滑筋に覆われた再生血管の形成には、さらに PDGF や Angiopoietin 1 などの平滑筋細胞に作用するサイトカインとの併用療法が望まれる。したがって、成熟した再生血管の形成のためには、上記のような作用部位の異なる複数のサイトカイン投与が、効果的と予想される。

5.3 効率的で持続性を有する安全な遺伝子導入法

VEGF の単独投与でも、一定期間、適切な発現濃度が保たれれば、2 次的に Angiopoietin や PDGF などのサイトカインが上昇し、成熟した再生血管が期待できる。これには、遺伝子導入法が重要な鍵となる。ウイルスベクターを用いた方法は、持続的な血管内皮増殖因子の発現が可能であるが、その持続性が逆に、血管腫や悪性腫瘍の発生につながる可能性も否定できない。また、ウイルス感染に伴う副作用も大きい。一方、naked DNA による遺伝子導入は、安全性は高いものの、DNA 分解酵素により代謝され、導入効率が低く、持続性も期待できない。著者らが開発した GHG-DNA 複合体は、徐放性により効果の持続が期待できる。マクロファージ等に貪食されて、細胞内で遺伝子を発現することも、遺伝子治療の効果を高めるのに役立っていると考えられる。成熟した再生血管の形成に効果的な遺伝子導入法の一つとして期待される。

5.4 血管内皮前駆細胞移植と血管内皮増殖因子との併用療法

Vasculogenesis を主体とする治療が血管内皮前駆細胞移植であり、狭義の Angiogenesis を主体とする治療が血管内皮増殖因子を用いた遺伝子治療である。血管内皮前駆細胞移植では、採取できる細胞数に限りがあり、その機能が血管再生に十分なものであるかどうかの問題となっている。その意味から、血管内皮前駆細胞移植に血管内皮増殖因子の遺伝子治療を併用すれば、上記の問題点を克服する可能性が考えられる。また、血管内

皮前駆細胞を投与する際、あらかじめ *ex vivo* で血管内皮増殖因子の遺伝子導入を行い、機能強化した後に生体に投与すれば、限られた血管内皮前駆細胞で効果的な血管再生療法となることも考えられる。GHG は血管内皮前駆細胞に貪食される性質を有しているため、血管内皮増殖因子の遺伝子導入による血管内皮前駆細胞の機能強化法にも有用と思われる。血管内皮前駆細胞移植と血管内皮増殖因子の遺伝子治療の併用療法は、今後、期待される血管再生療法の一つである。

6. おわりに

血管再生療法は、虚血性循環器疾患の次世代の治療として期待されており、基礎及び臨床で多数の研究が行われている。しかしながら、未だ評価法が定まっていない中で、血管再生療法の効果を判断することは困難である。実際、多くの血管再生療法が報告されているが、その効果については、今の所、明らかな結論は得られていない。微小循環造影法は、血管再生療法の評価法として大きな役割をはたすものと期待される。放射光微小循環造影法に続く臨床普及型の微小循環造影法の開発は、安全で効果的な血管再生療法の確立に貢献できる。

文 献

- 1) Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzendichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 (5302): 964-967, 1997

- 3) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903, 2001
- 4) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM: Constitutive expression of ph VEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97: 1114-1123, 1998
- 5) Mori H, Hyodo K, Tobita K, Chujo M, Shinozaki Y, Sugishita Y, Ando M: Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation* 89: 863-871, 1994
- 6) Mori H, Hyodo K, Tanaka E, Uddin-Mohammed M, Yamakawa A, Shinozaki Y, Nakazawa H, Tanaka Y, Sekka T, Iwata Y, Handa S, Umetani K, Ueki H, Yokoyama T, Tanioka K, Kubota M, Hosaka H, Ishikawa N, Ando M: Small vessel radiography in situ with monochromatic synchrotron radiation. *Radiology* 201: 173-177, 1996
- 7) Tanioka K, Shirada K: A highly sensitive camera tube using avalanche multiplication in an amorphous selenium photoconductive target. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 1656: 1-12, 1992
- 8) Umetani K, Kajiyama T, Ueda K, Takasaki Y, Yokouchi H: High-sensitivity digital radiography using an avalanche-type image pickup tube camera. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2163: 361-365, 1994
- 9) Kubota M, Kato T, Suzuki S, Maruyama S, Shirada K, Tanioka K, Sameshima K, Maki-shima T, Tsuji K, Hirai T, Yoshida T: Ultrahigh-sensitivity new super HARP camera. *IEEE Trans Broadcast* 42: 251-258, 1996
- 10) Blau HM, Banfi A: The well-tempered vessel. *Nat Med* 7: 532-534, 2001

疑似X線レーザーを用いた普及型微小血管造影装置の開発

知久正明* / 西上和宏* / 佐藤英一** / 盛 英三***

目的・意義

自己骨髄幹細胞移植や遺伝子治療による血管再生療法が臨床応用され、すでに末梢動脈閉塞症に対する良好な臨床成績が得られている¹⁾。一般に、治療効果の判定として血管造影法(DSA)が施行される。再生される新生血管は100 μ m以下の微小血管が主体と考えられるが、通常型血管造影装置の解像度は約250 μ m前後であるため、新生血管やそれらに直結する血管床を描出することは困難である。また、症例によっては血管数の増加が見られることがあるが、これは側副血行路の発達(arteriogenesis)を描出しており、再生した血管が造影されているわけではない。そこで、再生された新生血管が臨床症状の改善に関与していることを証明するには、再生血管もしくはそれに直結した血管床を描出することが重要である。しかし、微小血管内の微量な造影剤を検出するには高輝度のX線を用い、検出器を高感度、高解像度化する必要がある。現在、微小血管の描出を可能にしているのは放射光を用いた微小血管造影法だけである²⁾。しかし、放射光のX線源は、そ

の輝度の高さや平行性では優れているが、施設自体が多額のコストと広大な敷地を必要とし、臨床導入するための障壁となる。そこで、プラズマX線を線源に用い、新しい普及型微小血管造影装置を開発した³⁾。

方法・成果

1. プラズマX線を用いた微小血管造影装置

(1) X線源としての特徴

微小血管を描出するには高輝度のX線が必要である。X線の輝度は単位面積あたりのX線の光子量を表しており、イメージングプレートに映し出す像の良否を決定する重要な要素である。既存の血管造影装置のX線の輝度は低いため、被写体に吸収されかつ散乱し、その光子量はイメージングプレートにたどり着く前に顕著に減衰してしまう。このため、微細な血管の描出は困難である。

一方、プラズマX線はシャープなK系列特性X線で、コンデンサーの大容量化により容易に高輝度化を達成できるという特徴がある。プラズマX線発生装置の原理は、コンデンサーに50~60kV程度まで充電後、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(ターゲット)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1)。

通常使用されているヨード含有造影剤は、33,161keV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吸収端の直上に設定すると、人体組成と造影剤の質量吸収係数の差(コントラスト)が最大となる。さらに、ガドリニウム(Gd)は50,225keV(Gd吸収端)にK吸収端を持つ。50,225keVの人体によるX線吸収量は33,161keVのヨードK吸収端のX線吸収量より著しく少なくなるので、検出器に到達する光子数が増大する。このため、被曝量を軽減した血管造影が実現できる。プラズマX線装置のターゲットの金属を変えることにより、エネルギーレベルの異なる疑似単色X線が得られる。例えば、33,161keVのヨードK吸収端直上のX線を得たい場合には、セリウム(Ce)を選択すれば34,714keV(K α)と39,222keV(K β)に2つ

のピークを有する特性X線が得られる。

(2) イヌ冠動脈ファントムを用いた実験

K吸収端が33,161keVのヨードを含む(37%:重量濃度)マイクロファイバー(直径15 μ m)で充填した冠動脈のファントムを作成した。セリウム(K α 34,714keV, K β 39,222keV)をターゲットとして造影した。結果、心筋貫通枝など微小血管の微細な構造が観察することができた(図2a)。一方、K吸収端が40,446keVのセリウムマイクロファイバーで冠動脈を充填した心臓を同じセリウムターゲットで撮影すると微小血管の描出は劣化した(図2b)。AとBの実験結果は造影剤元素のK吸収端直上の単色X線による撮影法の利点を示すものである。上記の検出系として、画像解像度が約50 μ mの富士フィルム社製のコンピュータX線撮影(CR)のイメージングプレートを用いた。

【臨床応用の可能性】

血管再生治療の前後で微小血管を描出することができるので、再生医療の効果および機序の解明に有用と考えられる。さらに、このプラズマX線装置は高輝度のX線を確保することができ、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。よって、下肢血管病変以外にも、心血管系の臨床評価方法として期待されている。

まとめ(展望)

再生医療の臨床において適切に再生血管の臨床評価をする方法は確立されていない。今回開発された普及型微小血管造影装置は、高輝度でかつ疑似単色X線を持ち合わせ、心血管系の微小血管を評価することに応用が可能である。

●参考文献

- 1) Tateishi, Y., 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-x-ray laser generator. *SPIE*, 4662, 538~548, 2002.

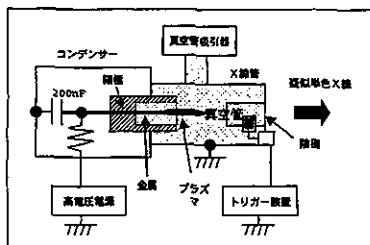


図1 疑似プラズマX線装置模式図 (参考文献3)より引用、改変)

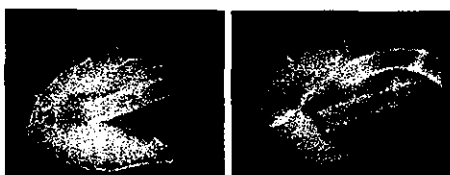


図2 微小血管の構造観察

- a: K吸収端が33,161keVのヨードを用いたイヌ冠動脈ファントムに、K吸収端直上のセリウムターゲット(K α 34,714keV, K β 39,222keV)にして撮影した場合、心室貫通枝の微細な構造が観察される。
- b: K吸収端が40,446keVのセリウムを用いたイヌ冠動脈ファントムに、同じセリウムをターゲットにして撮影した。心室貫通枝の微細な構造は観察されない。

* 国立循環器病センター心臓血管内科 ** 岩手医科大学教養部物理学科 *** 国立循環器病センター研究所心臓生理学部

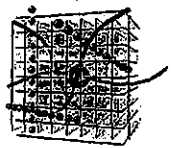


病院設置型微小血管造影装置の 開発と臨床応用の可能性

Kazuhiro Nishigami ◎ 西上和宏*
Toshiaki Kawai ◎ 河合敏昭§

Masaaki Chiku ◎ 知久正明*
Eizo Mori ◎ 盛 英三†
Ryo Mochizuki ◎ 望月 亮#

* 国立循環器病センター心臓血管内科 / † 同 心臓生理部
§ 浜松ホトニクス㈱ / # NHKエンジニアリングサービス



Summary

骨髄単核球細胞移植や末梢血幹細胞移植による血管再生療法が末梢動脈閉塞症に対し臨床応用され、疼痛や皮膚潰瘍など臨床症状の改善が報告されている。しかし、血管造影などの臨床検査では十分に評価できていない現状である。これは、現在使用されている解像度の低い血管撮影装置では、約100 μ m前後の微小な新生血管の描出が困難なためである。一方、シンクロトン放射光は100 μ m以下の微小血管を評価することが可能であるが、臨床導入にはその莫大なコストが問題になる。そこで、血管再生療法後の新たな診断方法として、病院に設置可能な微小血管造影装置を開発した。

Key words

- ◎血管再生療法
- ◎病院設置型微小血管造影装置
- ◎新生血管
- ◎シンクロトン
- ◎単色X線

循環器領域における微小血管造影

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治療選択は、①薬物治療、②カテーテル治療、③外科的バイパス術が主な治療法である。しかし、血行再建が困難な重症例や、糖尿病を合併した微小血管病変を伴う症例が高頻度にみられるようになった。このような症例は既存の治療法では限界があり、新しい治療戦略として血管再生治療が期待されている。Asaharaらは成人末梢血中の単核球分画に、血管内皮細胞に分化し得る内皮前駆細胞の存在を報告した¹⁾。単核球は主に骨髄に存在するため、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、動物実験の虚血モデルで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²⁾³⁾。これらの基礎および臨床結果に基づき、カテーテル治療や外科的バイパス術による血行再建が困難な重症末梢性動脈疾患に骨髄単核球細胞移植が臨床導入され、その有効性が報告された⁴⁾。当施設でも4例のパージャー病患者に骨髄細胞移植を施行し、全例とも安静時疼痛が改善し、皮膚潰瘍を呈する3症例も完全に回復した(図1)。しかし、骨髄細胞移植治療の評価に関しては、血管造影を