

Therapeutic angiogenesis is a promising strategy for the treatment of intractable cardiovascular diseases such as ischemic heart disease, peripheral vascular disease, and pulmonary arterial hypertension. Although gene therapy has been shown to be an effective approach for angiogenesis, it is still unsatisfactory because of biohazard of viral vectors, transfection efficiency, and premature tissue-targeting (St George JA 2003). Therefore, highly efficient and safe gene transfer is desirable. Recently, we developed a novel nonviral vector, gelatin which allows highly efficient and long-lasting gene transfer. Because positively charged biodegradable gelatin hold negatively charged plasmid DNA in its positively charged lattice structure, (Fukunaka Y 2002, Nagaya N 2003) DNA-gelatin complexes can delay gene degradation, leading to efficient gene transfer (Tokunaga N 2004).

Recently, transplantation of stem cells or progenitor cells has been shown to regenerate a variety of tissues. Endothelial progenitor cells (EPCs) have been discovered in adult peripheral blood (Asahara T, et al. 1997). EPCs are mobilized from bone marrow into the peripheral blood in response to tissue ischemia or traumatic injury, then migrate to sites of injured endothelium, and differentiate into mature endothelial cells in situ (Kawamoto A, et al. 2001). Transplantation of EPC induces therapeutic angiogenesis in ischemic heart or limb (Kawamoto A 2001. Murohara T, et al. 2000). However, some patients are refractory to conventional cell therapy because of insufficient cell number, poor survival, impaired differentiation, etc. Thus, a novel therapeutic strategy to enhance the angiogenic property of EPCs is desirable. Here, we present a new concept for hybrid cell-gene therapy using a nonviral vector, gelatin. Gene-modified EPCs may serve not only as a tissue-engineering tool to reconstruct the vasculature, but also as a vehicle for gene delivery to injured endothelium.

This chapter focuses on gelatin-mediated *in vivo* and *in vitro* gene transfer, and the rationale and preliminary results of combining cell (EPCs) and gene therapy for regenerative medicine.

Nonviral vector, gelatin

Tabata Y, et al. discovered biodegradable gelatin which controls the release of growth factors such as basic fibroblast growth factor. Positively charged biodegradable gelatin ionically link with negatively charged protein (Tabata Y 1999, Tabata Y 1987). Thus, the gelatin has been widely used as a carrier of proteins because of its capacity to delay protein degradation. Plasmid DNA is known to be negatively charged. Thus, we used the gelatin as a vector for gene therapy. Biodegradable gelatin was prepared from pig skin. The gelatin was characterized by a spheroid shape with a diameter of approximately $30\mu\text{m}$, water content of 95% and an isoelectric point (pI) of 9 after swelling in water (Tabata Y 1999, Tabata Y 1987). After a 2-hour incubation period, positively charged gelatin held negatively charged plasmid DNA in its positively charged lattice structure (Fig.1a and b). DNA particles are released from the gelatin through its degradation.

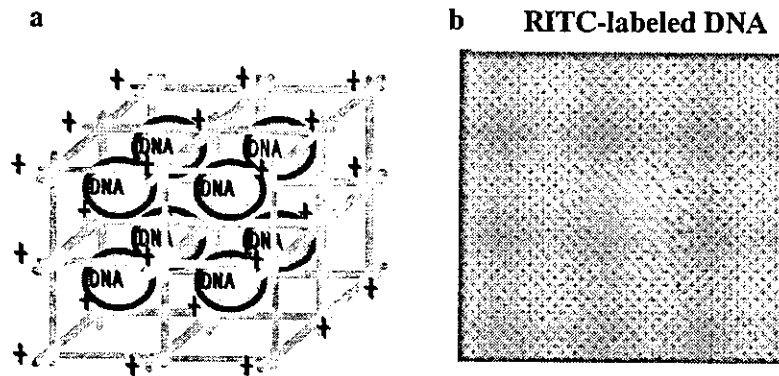


Fig. 1a, b. a Schema of DNA-gelatin complex. Biodegradable gelatin can hold negatively charged plasmid DNA in its positively charged lattice structure. b A number of RITC-labeled AM DNA particles were incorporated into gelatin.

Angiogenic potential of adrenomedullin

Adrenomedullin (AM) is a potent vasodilator peptide that was originally isolated from human pheochromocytoma (Kitamura K 1993). AM and its receptor are expressed mainly in vascular endothelial cells and vascular smooth muscle cells. AM not only induces vasorelaxation but also regulates growth and death of these vascular cells (Nagaya N, et al. 2000. Nishimasu H, et al. 2001). A recent study has shown that vascular abnormalities are present in homozygous AM knockout mice, suggesting that AM is indispensable for vascular morphogenesis (Shindo T, et al. 2001). Angiogenesis, the sprouting of new capillaries from preexisting blood vessels, is a multistep process that involves migration and proliferation of endothelial cells, remodeling of the extracellular matrix and functional maturation of the newly assembled vessels. Recently, AM induced tyrosine phosphorylation of Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) in human umbilical vein endothelial cells (Kim W, et al. 2003). Both signals play important roles in regulation of multiple critical steps in angiogenesis and vasculogenesis; endothelial cell survival, proliferation, migration, and capillary-like structure formation. These findings raise the possibility that AM gene transfer plays a role in modulating vasculogenesis and angiogenesis in ischemic tissues.

In vivo transfection

We examined the usefulness of gelatin as a nonviral vector for in vivo gene transfer (Tokunaga N, et al. 2004). AM plasmid DNA was used for therapeutic angiogenesis. We demonstrated that AM DNA was incorporated into positively charged gelatin. Interestingly, AM immunoreactivity surrounding AM DNA-gelatin complexes in the skeletal muscles was intense (Fig.2a). AM production of AM-gelatin group was enhanced compared with that of naked AM DNA group (Fig.2b). Furthermore, gelatin allowed long-lasting AM expression after gene transfer. These results suggest that biodegradable gelatin may serve as a nonviral vector for gene transfer. In fact, AM DNA-gelatin complexes induced more potent angiogenic effects in a rabbit model of hindlimb ischemia than naked AM DNA

(Fig.3), as evidenced by significant increases in histological capillary density, calf blood pressure ratio, and laser Doppler flow. These results suggest that the use of biodegradable gelatin as a nonviral vector augments AM expression and enhances AM-induced angiogenic effects. AM DNA-gelatin complexes were distributed mainly in connective tissues. We have recently demonstrated that gelatin-DNA complexes are readily phagocytosed by macrophages, monocytes, endothelial progenitor cells etc, resulting in gene expression within these phagocytes (Tabata Y and Ikeda Y 1987). These findings raise the possibility that AM secreted from these cells acts on muscles in a paracrine fashion. Unlike AM production in the Naked AM group, AM overexpression in the AM-gelatin group lasted for longer than two weeks. Thus, it is interesting to speculate that delaying gene degradation by gelatin may be responsible for the highly efficient gene transfer. These results suggest that the use of gelatin, which is considered to be less biohazardous than viral vectors, enhances the angiogenic potential of AM DNA. Thus, gelatin-mediated AM gene transfer may be a new therapeutic strategy for the treatment of severe peripheral vascular diseases.

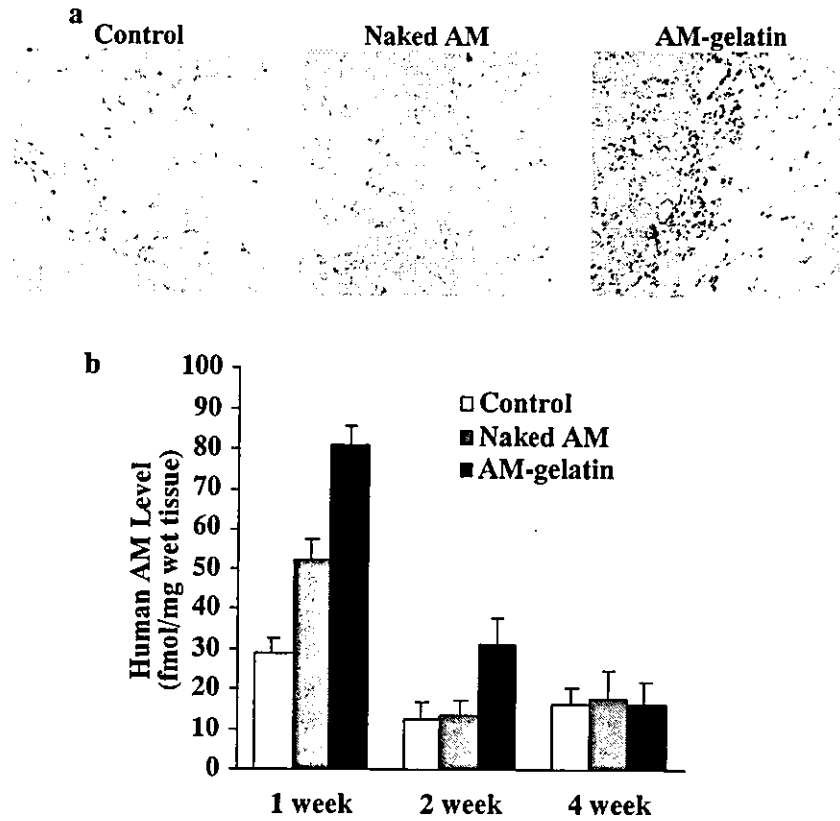


Fig. 2a, b. **a** Immunohistochemistry for AM 7 days after gene transfer. Intense immunostaining was observed surrounding gelatin in the AM-gelatin group. Magnification x200. **b** Time course of AM production in ischemic muscles after gene transfer. Data are mean \pm SEM. *P < 0.01 vs Control group; †P < 0.01 vs Naked AM group.

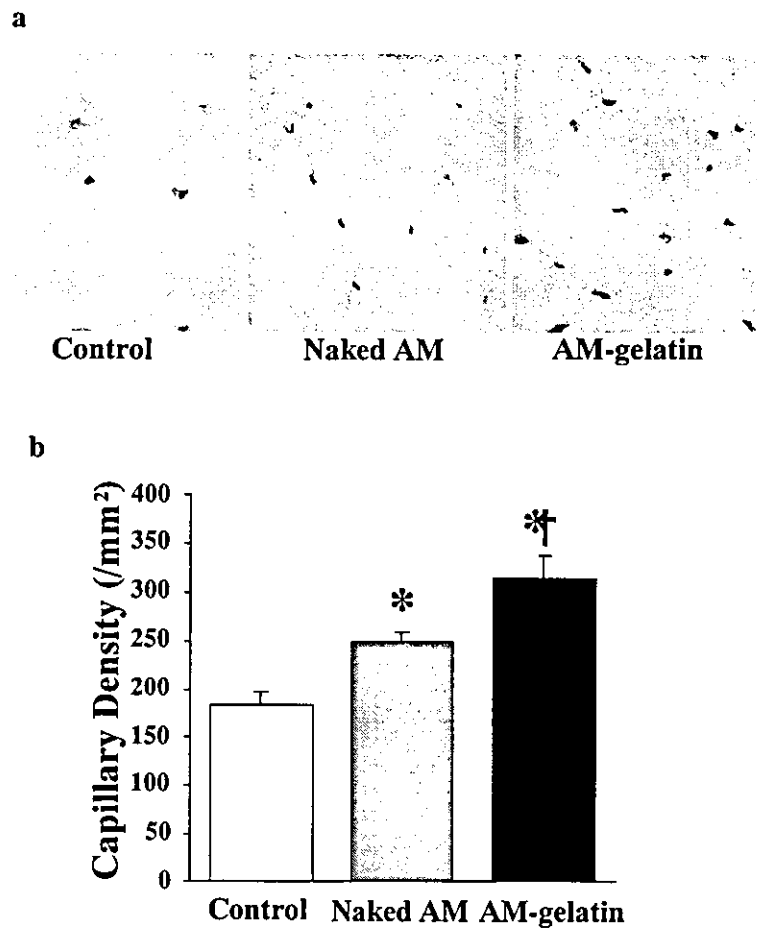


Fig. 3a, b. a Representative examples of alkaline phosphatase staining in ischemic hindlimb muscles. Magnification x200. b Quantitative analysis of capillary density in ischemic hindlimb muscles. Data are mean \pm SEM. *P < 0.05 vs Control group; †P < 0.05 vs Naked AM group.

In vitro transfection

We examined the usefulness of gelatin as a nonviral vector for in vitro gene transfer (Nagaya N, et al. 2003). Here we demonstrate that EPCs have a phagocytosing action which allows nonviral gene transfer into EPCs. To produce ionically linked plasmid DNA-gelatin complexes, we prepared positively charged biodegradable gelatin. Positively charged gelatin was readily complexed with negatively charged plasmid DNA after 24-hr incubation. Then, EPCs were cultured with green fluorescent protein (GFP) plasmid DNA-gelatin complexes. Interestingly, fluorescence microscopy revealed that GFP was expressed in EPCs after a 72-hr incubation period. Quantitative analyses confirmed a high incidence (approximately 70%) of GFP expression in EPCs. Transmission electron microscopy demonstrated that EPCs were phagocytosing DNA-gelatin complexes after 12-hr incubation (Fig.4a). These results suggest that EPCs phagocytose plasmid DNA-gelatin complexes in co-culture, which allows nonviral, highly efficient gene transfer into EPCs. A number of DNA particles labeled by rhodamine B isothiocyanate (RITC) were incorporated into gelatin. RITC-labeled DNA particles were gradually released from gelatin within EPCs through gelatin degradation (Fig.4b). After 72-hr incubation, RITC-labeled DNA particles released from gelatin were distributed in the cytoplasm, but not the nucleus, of EPCs (Fig.4c). These results suggest the ability of EPCs to take up DNA-gelatin complexes and dissolve the gelatin, freeing the DNA into EPCs. Unlike EPCs, neither human mature pulmonary artery endothelial cells (HPAECs) nor human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) phagocytosed DNA-gelatin complexes.

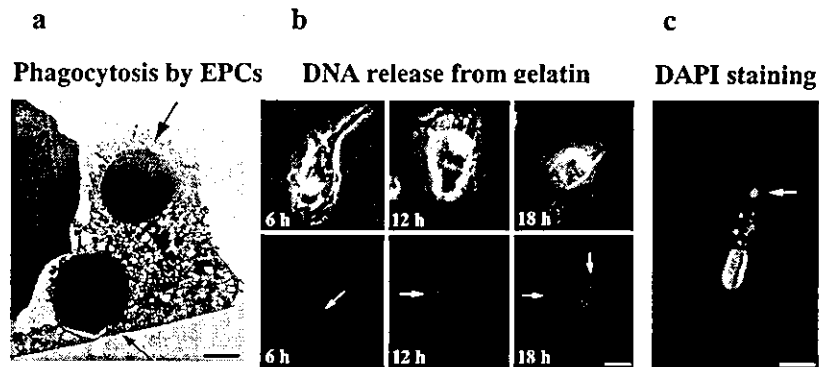


Fig. 4a, b, c. Ex vivo gene transfer into EPCs based on phagocytosing action. **a** Transmission electron microscopy revealed that EPCs had phagocytosed GFP DNA-gelatin complexes (arrows). **b** Time-course of changes in DNA-gelatin complexes within EPCs. RITC-labeled DNA particles (red, arrows) were released from gelatin through its degradation. **c** After 72-hr incubation, RITC-labeled DNA particles released from phagocytosed gelatin (arrow) were distributed in the cytoplasm, but not the nucleus, of EPCs. The nuclei of EPCs were identified by DAPI staining. Scale bars: 10 μ m (a); 5 μ m (b and c)

When EPCs were cultured with AM plasmid DNA-gelatin complexes, intense immunostaining for AM was observed in EPCs impregnated with AM DNA-gelatin (Fig.5a). After 72-hr incubation with AM DNA-gelatin complexes, EPCs markedly secreted AM into the culture medium (10-fold increase compared to EPCs alone, Fig.5b). AM overproduction lasted for more than 16 days after gene transfer. Finally, we examined the effects of AM gene transfer on EPC proliferation in vitro using MTS assay. Proliferative activity of AM DNA-transduced EPCs exceeded that of nontransduced EPCs. In addition, AM gene transfer inhibited apoptosis of EPCs in vivo and in vitro. This can be explained by recent findings that AM inhibits cell apoptosis through the PI3K/Akt pathway (Okumura H, et al. 2004). Thus, transfection of AM gene may strengthen therapeutic potential of EPCs.

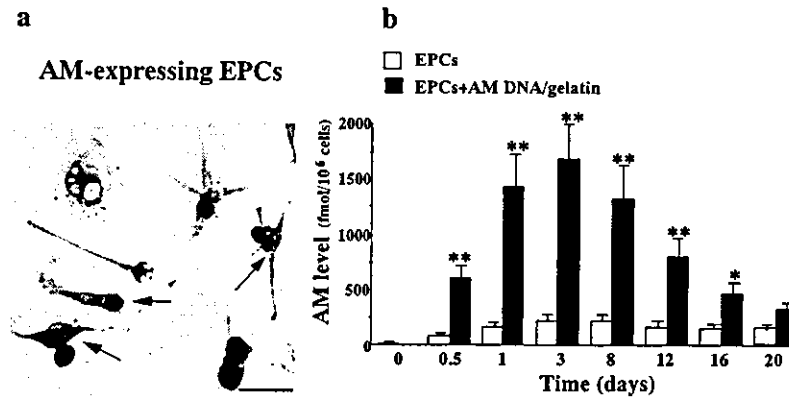


Fig.5a, b. a Immunohistochemistry for AM in EPCs after gene transfer. b Time course of AM secretion from EPCs during coculture with AM DNA-gelatin complexes. Each bar represents the mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ versus non-transduced EPCs.

Hybrid cell-gene therapy

Here, we present a new concept for cell-based gene delivery into the vasculature, consisting of three processes (Nagaya N, et al. 2003). First, positively charged gelatin is readily complexed with negatively charged plasmid DNA. Second, EPCs phagocytose ionically linked plasmid DNA-gelatin complexes in co-culture, which allows nonviral gene transfer into EPCs with high efficiency. Third, transplanted gene-modified EPCs are incorporated into injured vascular beds. This novel gene delivery system has great advantages over conventional gene therapy: nonviral, non-invasive, and highly efficient gene targeting into the vasculature. These benefits may be achieved mainly by the capability of EPCs to phagocytose DNA-gelatin complexes and to migrate to sites of injured endothelium. Primary pulmonary hypertension (PPH) is a rare, but life-threatening disease characterized by the progression of pulmonary hypertension, ultimately producing right ventricular failure and death. Median survival in

patients with PPH is considered to be 2.8 years from the time of diagnosis. Thus, novel and effective therapy is desirable for the treatment of pulmonary hypertension. Dysfunction of the endothelium may play a role in the pathogenesis of pulmonary hypertension such as PPH. Thus, pulmonary endothelial cells may be a therapeutic target for the treatment of pulmonary hypertension.

We present cell-based gene delivery into the pulmonary vasculature. EPCs are mobilized from within the bone marrow into the peripheral blood in response to tissue ischemia or injury, then migrate to sites of injured endothelium, and differentiate into mature endothelial cells in situ. These findings raise the possibility that transplanted EPCs may serve not only as a tissue-engineering tool to reconstruct the pulmonary vasculature, but also as a vehicle for gene delivery to injured pulmonary endothelium. AM is a potent vasodilator peptide which also inhibits cell apoptosis and enhances endothelial cell differentiation. Thus, we investigated the effects of AM gene-modified EPCs on pulmonary hypertension in rats.

GFP-expressing EPCs (1×10^6 /rat) were intravenously administered into rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Three days after transplantation, GFP-expressing EPCs were incorporated into the walls of pulmonary arterioles in monocrotaline rats and composed pulmonary vasculature. Transplanted GFP-expressing EPCs were distributed on the walls of pulmonary arterioles and capillaries. AM gene-transduced EPCs were similarly incorporated into the pulmonary vasculature. Immunohistochemical analyses of rat and human CD31 demonstrated that the transplanted EPCs were of endothelial lineage and constituted vessel structure similar to rat endothelial cells. However, transplanted EPCs were rarely distributed to other tissues such as cardiac ventricles, kidneys, aorta, and brain (data not shown).

Next, we examined the effects of AM-expressing EPCs on pulmonary hemodynamics. Monocrotaline rats received intravenous injection of 1×10^6 EPCs, 1×10^6 AM-expressing EPCs, or culture medium. Pulmonary hypertension developed three weeks after monocrotaline injection. Mean pulmonary arterial pressure was not strikingly decreased in the EPC group

(-14%), but was significantly lower in the AM-EPC group (-29%) compared to that in the CONTROL group. Pulmonary vascular resistance was significantly lower in both the EPC group (-16%) and AM-EPC group (-39%) than that in the Control group. Importantly, the AM-EPC group showed significantly greater improvement in pulmonary vascular resistance than the EPC group. Finally, we examined the effects of hybrid cell-gene therapy on survival in MCT-injected rats. AM-expressing EPCs were used immediately after 72-hr incubation with AM DNA-gelatin complexes. Kaplan-Meier survival curves demonstrated that MCT rats transplanted with AM-expressing EPCs had a significantly higher survival rate than those given culture medium or EPCs alone.

These findings suggest that gene-modified EPCs using gelatin may serve not only as a tissue-engineering tool to reconstruct the pulmonary vasculature, but also as a vehicle for gene delivery to injured pulmonary endothelium. This hybrid cell-gene therapy may apply for intractable cardiovascular diseases including ischemic heart disease. Thus, genetic manipulation of stem cells opens new avenues for regenerative medicine.

References

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967
- Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y (2002) Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J Control Release* 80:333-343
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T (2001) Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103:634-637
- Kim W, Moon SO, Sung MJ, Kim SH, Lee S, So JN, Park S K (2003) Angiogenic role of adrenomedullin through activation of Akt, mitogen-activated protein kinase, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *FASEB J* 13:1937-1939

- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T (1993) Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192:553-560
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T (2000) Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105:1527-1536
- Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H (2003) Hybrid Cell-gene Therapy for Pulmonary Hypertension Based on Phagocytosing Action of Endothelial Progenitor Cells. *Circulation* 108:889-895
- Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, Oya H, Kyotani S, Nakanishi N, Goto Y, Masuda Y, Miyatake K, Kangawa K (2000) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 101:498-503
- Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Satonaka H, Walsh K, Sata M, Kangawa K, Matsuo H, Goto A, Kitamura T, Hirata Y (2001) Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res* 89:63-70
- Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K (2004) Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 109:242-248
- Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H (2001) Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104:1964-1971
- St George JA (2003) Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* 10:1135-1141 Review
- Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H (1994) Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Commun* 203:719-726

- Tabata, Y. Ikada, Y (1987) Macrophage activation through phagocytosis of muramyl dipeptide encapsulated in gelatin microspheres. *J Pharm Pharmacol* 39:698-704
- Tabata Y, Nagano A, Ikada Y (1999) Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Engin* 5:127-138
- Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H (2004) Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hindlimb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 109:526-531

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¹⁾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 μm であり、再生される新生血管は約100 μm 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²⁾は200～500 μm 以下の微小血管の定量と50～200 μm 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³⁾。特に単核球分画中で血管内皮細胞に分化する単核球は、主に骨髓に存在するため、動物実験の虚血モデルに骨髓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

骨髓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⁴⁾。しかし、既存の血管造影装置では空間解像度が200 μm 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

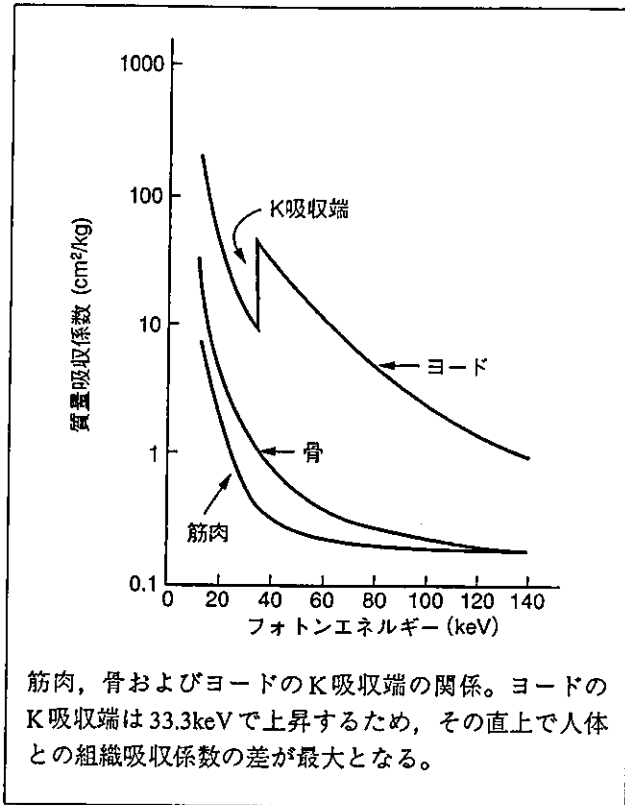
1. 放射光微小血管造影法

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⁵⁾。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



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 μm)が得られる²⁾。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。

図② 病院設置型微小血管造影装置



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)

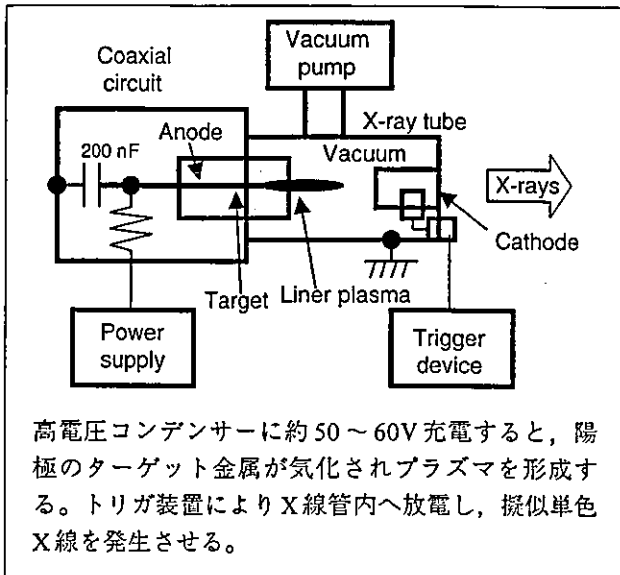
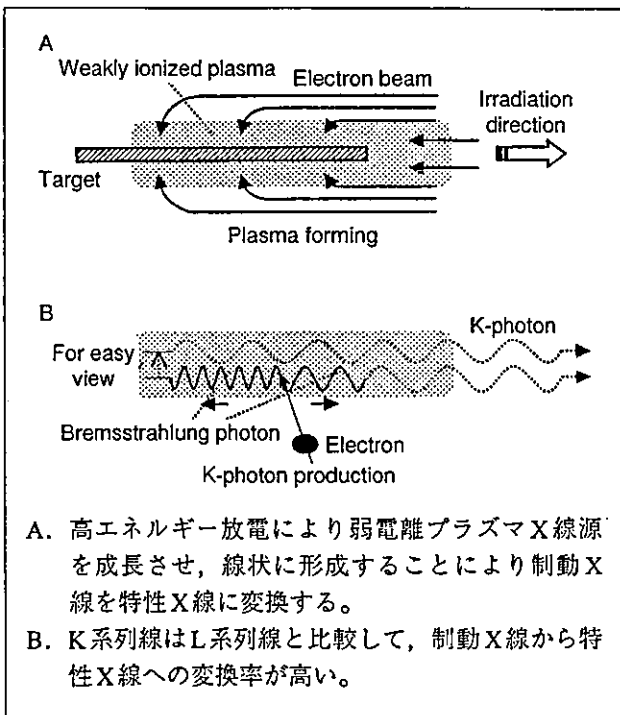


図4 プラズマX線の発生原理 (文献9より改変)



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

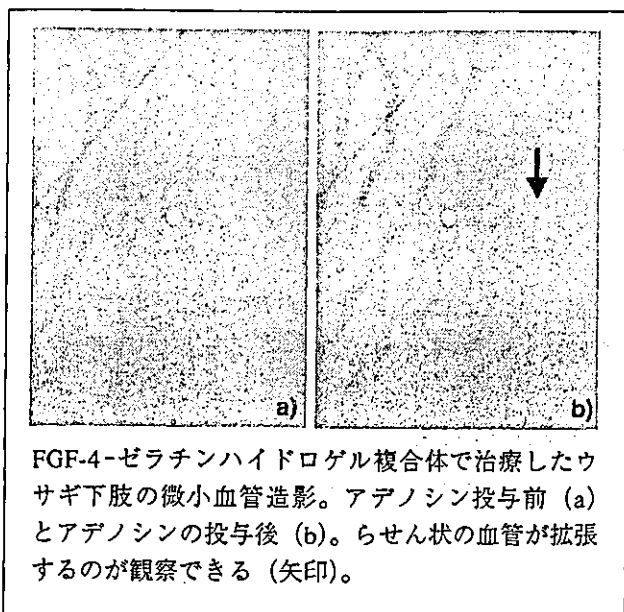
装置は高電圧電源、高電圧コンデンサー、プラズマX線管からなり、高電圧コンデンサーの容量を増すことによりX線の高輝度化が可能となる(図3)。プラズマX線はシャープなK系列特性X線であり、その発生原理は高エネルギー放電により弱電離プラズマX線源を成長させ、線状に形成することにより制動X線を特性X線に変換する。特性X線はプラズマを容易に通過するので、高線量の疑似単色X線が発生する(図4A)。さらに、K系列特性線は蛍光吸収率が高いので、L系列線と比較して制動X線から特性X線への変換率が高い(図4B)。プラズマX線は金属ターゲットの種類により、特性X線のエネルギーを任意に選択することができる。例えば、セ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

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¹⁰⁾。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

図⑤ 再生血管のアデノシン投与による反応

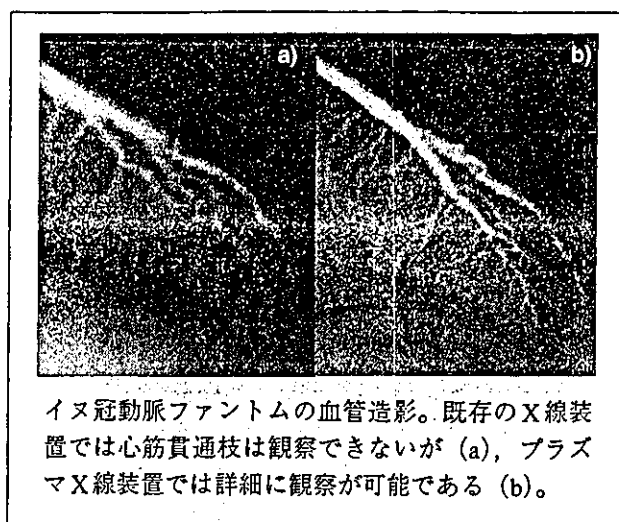


vascular endothelial growth factor (VEGF) で治療したラットで観察されたらせん状の血管も拡張せず¹³⁾, 以上のことから虚血により生じた再生血管や VEGF により再生したらせん状の再生血管は, 内皮機能が備わっていない不完全な再生血管であると考えられた。一方, fibroblast growth factor 4 (FGF-4)-ゼラチンハイドロゲル複合体にて血管再生治療後のウサギの下肢虚血モデルを撮影した。観察されている血管は再生血管と考えられ, アデノシンの投与によりらせん状の血管が拡張したと報告されている¹⁴⁾。病院設置型の微小血管造影装置でも同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



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。マイクロファイバー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 $200\sim 300\mu\text{m}$ であるが、 $100\mu\text{m}$ 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。

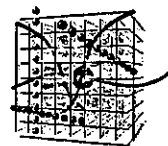
2

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見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例のパーチ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

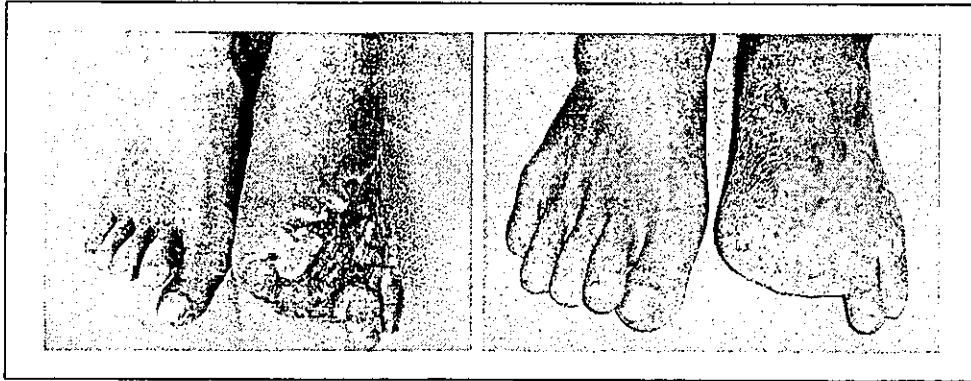


図1. バージャー病の
下肢皮膚潰瘍
移植治療前は左第1趾から第
3趾まで広範な皮膚潰瘍を認
めたが(左), 移植治療3ヵ月
後には完全に上皮化された
(右).

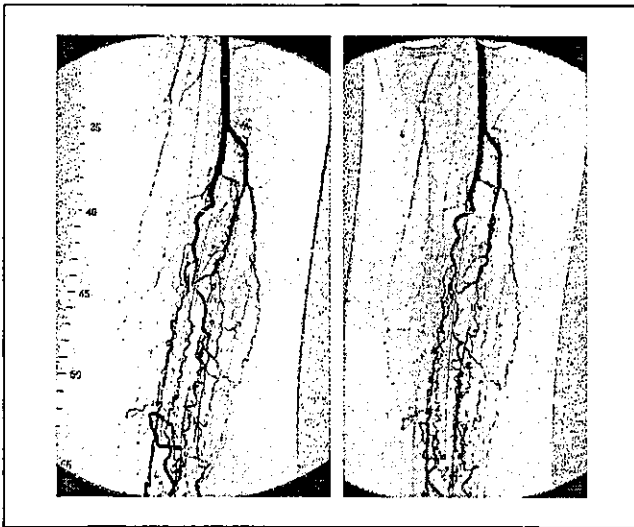


図2. 下肢血管造影

移植治療前の血管造影と比較し(左), 移植治療1ヵ月後に血管周辺にもやや像は認めるが, 新生血管の評価は困難である(右).

含めた臨床検査では臨床症状の改善を十分には反映しなかった(図2)。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。しかし, 既存の血管造影装置の解像度は約 $200\sim 300\mu\text{m}$ であり, 再生される新生血管は約 $100\mu\text{m}$ 程度の微小血管であり, その評価は困難である。症例によっては血管数の増加がみられることがあるが, 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。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, 再生血管を描出することが重要である。これら, 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線が高輝度で, 平行化, 単色化の性質を持ち, 検出系を高感度, 高解像度化することが重要である。

現在のところ, 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り, 微小血管の検出を可能としている⁵⁾。放射光の詳細については他稿に委ねるが, 簡単に列記する。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平行に近い性質がある。その白色光に対しシリコン結晶を用い, ヨード吸収端の直上に設定することにより単色化が可能となる。現在のところ, 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。しかし, 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