

## 血管新生療法

竹下 聡

## はじめに

血管新生療法 (therapeutic angiogenesis)<sup>1)</sup>は、血管増殖因子やその遺伝子、あるいは骨髓や末梢血細胞を用いて血管新生を促進させ、組織虚血の改善を図る治療法である。循環器領域における初の遺伝子治療としても知られる vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子を用いた血管新生療法が、米国の Isner らによって行われたのは 1994 年のことである<sup>2)</sup>。現在までにすでに 10 年以上が経過し、遺伝子以外にも増殖因子蛋白、骨髓細胞、末梢血細胞などを用いたさまざまな治療が試みられ、その有効性も検証されつつある。各々の治療法の詳細は他稿に譲り、ここでは血管新生療法がどのように生まれ、どのように育ってきたか、その歴史を概説する。

## 血管新生療法の臨床応用まで

血管新生療法のコンセプトそのものは決して新しいものではない。80 年代後半には、ネコの虚血肢モデルに対して大網の脂質分画を投与し、虚血を改善させる試みが行われている。大網や脂肪細胞の再生医療への応用は最近のトピックであり、このような研究がすでに 20 年近く前に存在したことは興味に値する。これらの血管新生療法と Isner らが行ったそれとの差異は、後者が VEGF という血管内皮細胞に特異的な増殖因子を用いた点にある。90 年代初頭、Isner らは家兔の虚血肢モデルに VEGF 蛋白を投与し、血管新生療法の臨床応用を検討した。動脈投与、静脈投与、繰り返し投与、ヘパリンの併用などさまざまな投与方法を検討し、投与方法のいかに関わらず、側副血行の促進には 100~1000 μg の VEGF 蛋白が必要なことを明らかにした。しかしながら、

大量の VEGF 蛋白を投与すると、投与した蛋白が全身を循環し、非目的部位へと到達するのは避け難い。血管増殖因子の全身への拡散は、糖尿病患者においては網膜症を悪化させ、癌患者では腫瘍血管の発達を促進させる。また、一部の血管増殖因子は NO を介した血管拡張作用を有し、遷延性低血圧を惹起する。事実、VEGF 蛋白を用いた血管新生療法の臨床試験では、低血圧を避けるために投与量が制限された。

大量の蛋白投与に伴う副作用を回避するために行き着いた結論が遺伝子を用いたローカルドラッグデリバリーであった。Isner らはカテーテルを用いて血管細胞へ VEGF 遺伝子を経皮的に導入し、それらの細胞から VEGF 蛋白を分泌させようと考え、表面が親水性ゲルでコーティングされた冠動脈形成術用バルーンカテーテル (ハイドロゲル・バルーンカテーテル) による遺伝子導入を試みた。ハイドロゲルは、狭窄部位におけるバルーン通過性を改善するために施されたコーティングであるが、Isner らはこのゲルにプラスミド DNA の水溶液をしみ込ませ、遺伝子キャリアとして用いた。通常の PTCA テクニックによりバルーンを目的部位へと進め、4~8 気圧で 1 分間バルーンを拡張させることで遺伝子の血管壁への導入が可能であった。その導入効率はいずれも 100 倍以上の高効率ではあったが、β ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた組織的検討では、導入部位のわずか 0.1% 以下の細胞にしか遺伝子発現が認められなかった<sup>3,4)</sup>。このわずかな細胞によって血管新生を促進することが可能なのか問題となるのだが、遺伝子の導入効率 (transfection efficiency) と治療効率 (therapeutic efficiency) とは同義ではない。遺伝子産物である増殖因子が細胞外へと分泌されれば、たとえ導入効率は低くとも、パラクリン効果が期待できる<sup>5)</sup>。この仮説は動物実験によって検証された。すなわち、ハイドロゲル・バルーンカテーテルを用いて家兔虚血肢モデルに VEGF 遺伝子の導入を行うと、約 3 週間にわたりその発現が認められ、VEGF 蛋白の動脈内投与と同等以上の側副路発達効果が得られたのである。一方、末梢血中の VEGF 蛋白の濃度は ELISA による測定限界付近にあり、きわめて低値であった。つまり遺伝子の導入効率は低くとも、治療効果を得るに十分な VEGF の局所濃度が維持可能であり、逆に末梢血中濃度は希釈効果によって低く抑えられたのであ

たけした さとし：国立循環器病センター心臓血管内科

る。ここで忘れてならないのは、本法がプラスミド DNA 以外には何らベクターを用いない遺伝子導入法 (naked DNA アプローチ) である点で、臨床応用における高い安全性が期待された。

#### 末梢動脈閉塞症に対する VEGF を用いた血管新生療法

1994 年、Isner らは血管新生療法の臨床試験を開始した<sup>2)</sup>。この臨床試験は、循環器領域における初の遺伝子治療としても知られており、内科治療や外科治療不応性の重症末梢動脈閉塞症患者を対象として行われた。遺伝子治療から 1~2 ヶ月で、血管造影上の新生血管出現が得られ、下肢疼痛や難治性潰瘍が消失した。副作用は下腿浮腫や良性血管腫など、一過性の軽微なものであった。しかしながら、バルーンカテーテルを用いた遺伝子導入は、動脈穿刺が不可能な例、下肢の動脈硬化が高度でカテーテルによるアプローチが困難な例、遺伝子導入に際し解離などの血管損傷リスクが高い例などには施行できない。そこで考案されたのが、虚血筋への遺伝子導入である<sup>6)</sup>。Baumgartner らは、VEGF プラスミドの筋注により、7~8 割の症例で血管造影上の側副路発達や臨床症状の改善を得ることに成功した<sup>7)</sup>。この遺伝子導入法の単純化により、カテーテルでは治療困難であった症例にも血管新生療法が可能となり、その適応は大きく拡大することとなる。また、本法は心筋へも応用可能であり、虚血性心疾患に対する血管新生療法の臨床応用への契機となった。

#### 虚血性心疾患に対する VEGF を用いた血管新生療法

90 年代後半、Losordo らは胸部小切開法により重症狭心症患者の左室に VEGF プラスミドを筋注し、狭心症状の著明な改善と心筋シンチによる虚血所見の改善を得ることに成功した<sup>8)</sup>。さらに Losordo らは、NOGA と呼ばれる心筋マッピングのシステムを用いて、心内膜側から経皮的に VEGF 遺伝子の導入を行い、良好な治療効果を得た<sup>9)</sup>。現在、この NOGA システムを用いた経皮的遺伝子治療は、二重盲検試験によって検証中である。最近、類似のプロトコールを用いた臨床試験の結果が Kastrup らにより報告されたが、VEGF 治療群において左室壁運動の改善は認められたものの、自覚症状や心筋シンチ所見の改善は得られていない<sup>10)</sup>。本法の有効性については、

さらなる検討が必要である。

#### 血管内皮前駆細胞の発見と細胞治療

遺伝子を用いた血管新生療法の臨床応用が進むなか、1997 年、Asahara らはヒト末梢血中の CD34 陽性細胞の分画中に成熟内皮細胞へと分化しうる血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) が存在することを明らかにした<sup>11)</sup>。これを契機として、遺伝子や蛋白を中心とした血管新生療法に、細胞移植を用いた血管新生療法の新しい流れが加わった。

EPC は血球血管芽細胞 (ヘマンジオブラスト) と呼ばれる幹細胞より分化するが、成人では通常骨髄中にあり、末梢血中にはぎわめてわずかしかな存在しない。Kalka らはヒト末梢血単核球から EPC を分離培養し、マウスの虚血肢モデルに投与することで下肢虚血の改善を得た<sup>12)</sup>。一方、Shintani らは自己骨髄由来単核球移植によって家兎虚血肢の血管新生が増強することを報告した<sup>13)</sup>。移植された自己骨髄単核球が虚血組織における血管形成に参加、もしくは血管増殖因子を放出することで局所の血管新生を刺激したものと思われ、自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の臨床応用への契機となった。

#### 自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法

末梢動脈閉塞症に対する自己骨髄細胞移植の有用性は、2000 年、国内 3 施設 (久留米大学、関西医科大学、自治医科大学) による Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation (TACT) trial において示された<sup>14)</sup>。全身麻酔下で採取した数百 cc の骨髄液から単核球を分離後、虚血肢に移植することで、ABI (上肢・下肢血流比) は 0.97 ポイント増え、トレッドミル歩行距離は 2.6 倍に改善した。また、下肢疼痛は 9 割、皮膚潰瘍は 8 割の症例で改善した。同様のプロトコールを用いた多施設臨床試験がすでに実施されており、少なくとも本法の短期成績に関しては確立された治療法といっても過言ではない。

末梢血細胞を用いた血管新生療法の臨床応用に関しては、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G-CSF) を用いて末梢血中の単核球から CD34 陽性細胞を分離したり、末梢血単核球細胞移植にアドレノメデュリンの局所投与を併用するなどさまざまな試みがなされている。その有効性に関してはまだ不明な点が多いものの、侵襲性の低さや細胞採取の容易さなど末梢血細胞移植の

メリットは大きく、今後の発展が期待される。

一方、虚血性心疾患に対する細胞治療に関しても、骨髄細胞の冠動脈内注入やNOGAシステムを用いた心筋内移植など、さまざまな臨床試験が進行中である。急性心筋梗塞患者の冠動脈内に骨髄単核球細胞を投与した初期の臨床試験では、梗塞サイズの減少や左室機能の改善、心筋バイアビリティーの改善が報告されているが、その治療効果については否定的な報告も少なくない。また、左室機能改善などの治療効果が血管新生によって得られたものなのか、あるいは心筋細胞の再生によるものなのか、その機序についても不明な点は多い。虚血下肢に対する細胞移植ほど確立された治療にはまだ至っていないというのが現状である。

### おわりに

血管新生療法は血管増殖因子を用いた遺伝子治療として幕を開けた。しかしながら、遺伝子のパテント問題や倫理的ハードルの高さから、現在では細胞移植による血管新生療法が主流となりつつある。

虚血下肢に対する細胞移植の治療成績は良好であるが、臨床症状の改善にもかかわらず血管造影での改善を認めないことも少なくない。果たして細胞移植により血管新生が本当に促進されたのか？ 単に潰瘍の創傷治癒機転が促進されただけではないのか？ その治療機序に関してはいまだ不明な点が多くはなく、今後の研究成果が期待される。

### 文献

- 1) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LO, Bunting S, et al. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 662-70.
- 2) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. *Lancet* 1996 ; 348 : 370-4.
- 3) Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, Riessen R, Bauters C, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 227 : 628-35.
- 4) Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, Asahara T, Bauters C, Symes J, et al. *Lab Invest* 1996 ; 75 : 487-501.
- 5) Takeshita S, Losordo DW, Kearney M, Rossow ST, Isner JM. *Lab Invest* 1994 ; 71 : 387-91.
- 6) Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, et al. *Circulation* 1996 ; 94 : 3281-90.
- 7) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. *Circulation* 1998 ; 97 : 1114-23.
- 8) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, et al. *Circulation* 1998 ; 98 : 2800-4.
- 9) Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, McDonald MC, Gravelin LM, Curry CM, et al. *Circulation* 2001 ; 103 : 2138-43.
- 10) Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. *J Am Coll Cardiol* 2005 ; 45 : 982-8.
- 11) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. *Science* 1997 ; 275 : 964-7.
- 12) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 3423-7.
- 13) Shintani S. *Circulation* 2001 ; 103 : 897-903.
- 14) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. *Lancet* 2002 ; 360 : 427-35.

## **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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera) (Fig.1).

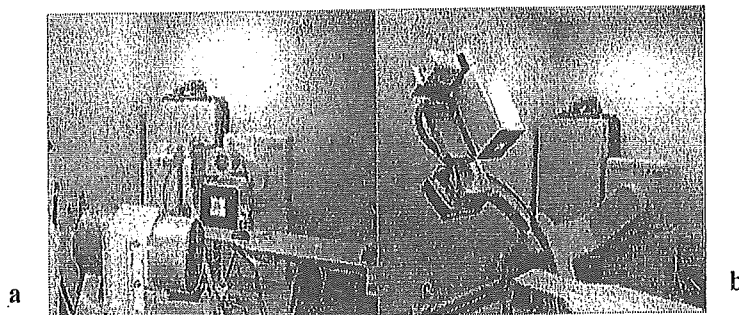


Fig. 1a, b. The micro-angiographic equipment that we developed. High-voltage power X-ray source a and a detecting system with a high spatial resolution (25 $\mu$ m) and high sensitivity (100 times of CCD camera) b.

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).

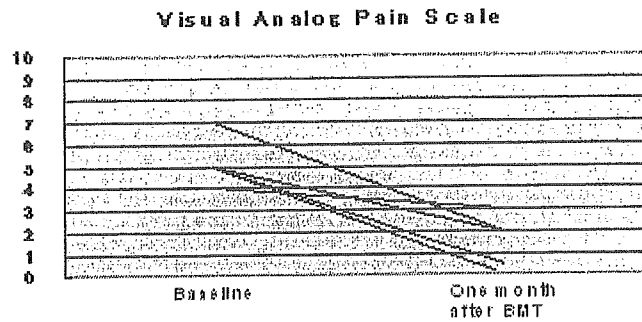


Fig. 2. The Visual analog pain scale in all patients.

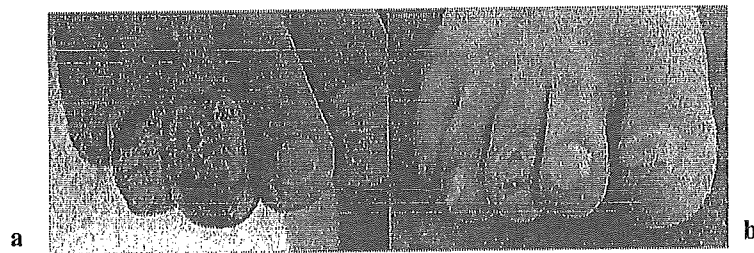


Fig. 3a, b. The skin ulcers in a patient before a and one month after autologous bone marrow transplantation b.

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



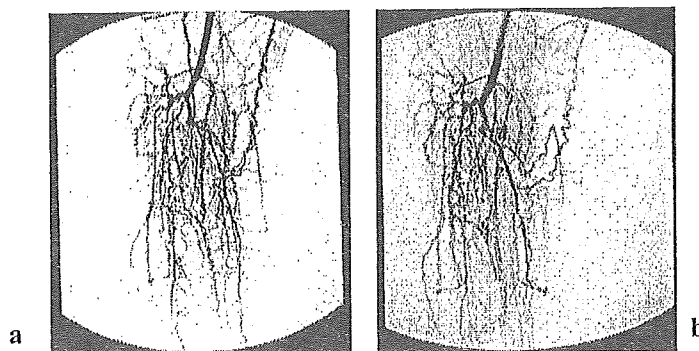


Fig. 4a, b. The conventional angiographic findings in the patient before a and one month after autologous bone marrow transplantation b.

#### *Novel micro-angiography*

The novel micro-angiography can detect to within a limit 50 of  $\mu\text{m}$ , although a detection limit of a conventional angiography is 250 $\mu\text{m}$  (Fig.5).

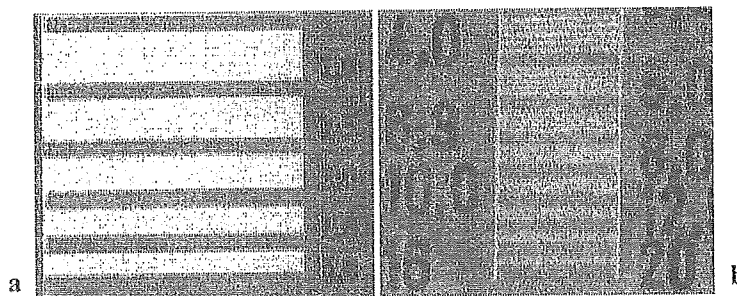
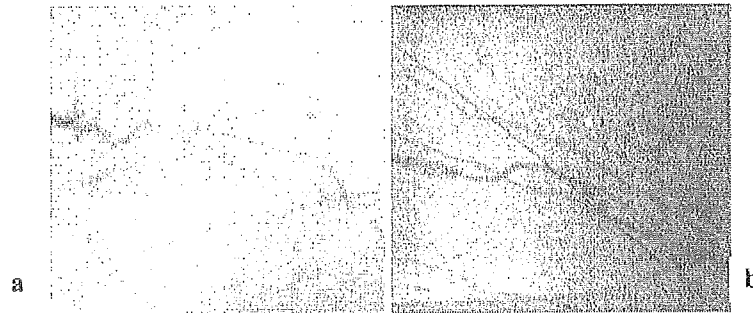


Fig. 5a, b. The detection limits on a conventional angiography a and the novel micro-angiography b using a line chart

Collateral micro-vessels, which were 100-500 $\mu\text{m}$  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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 Neovascularizaion with Autologous Bone Marrow Transplantation. *Circulation* 103: 897-903
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al.(2002) Therapeutic angiogenesis for patients with imb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells:a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*,360:427-35

## 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しう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>3)</sup>。特に単核球分画中で血管内皮細胞に分化しうる単核球は，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<sup>4)</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

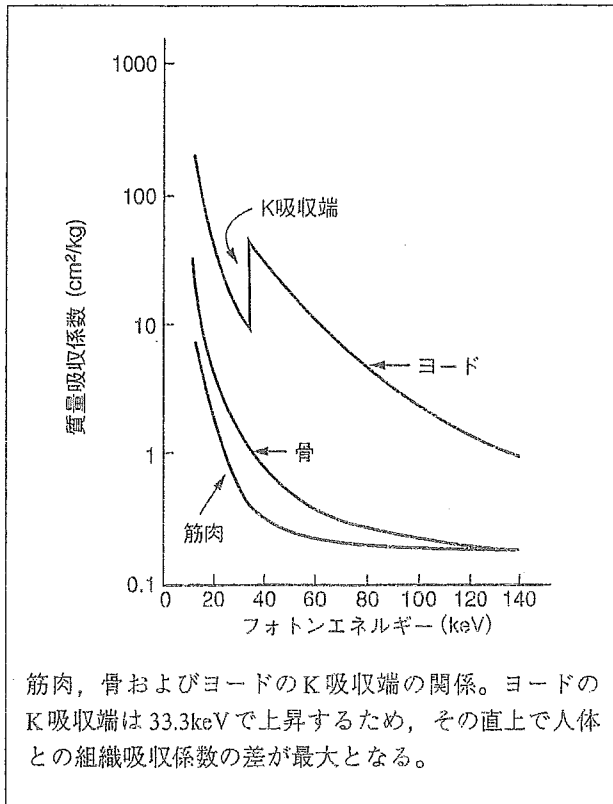
#### 1. 放射光微小血管造影法

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>5)</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



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>5)</sup>。既存の撮影装置のようにイメージ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

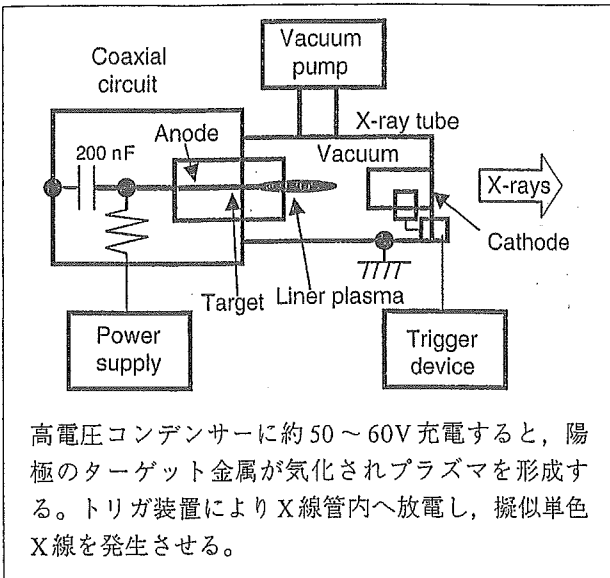


## 2. 病院設置型微小血管造影法

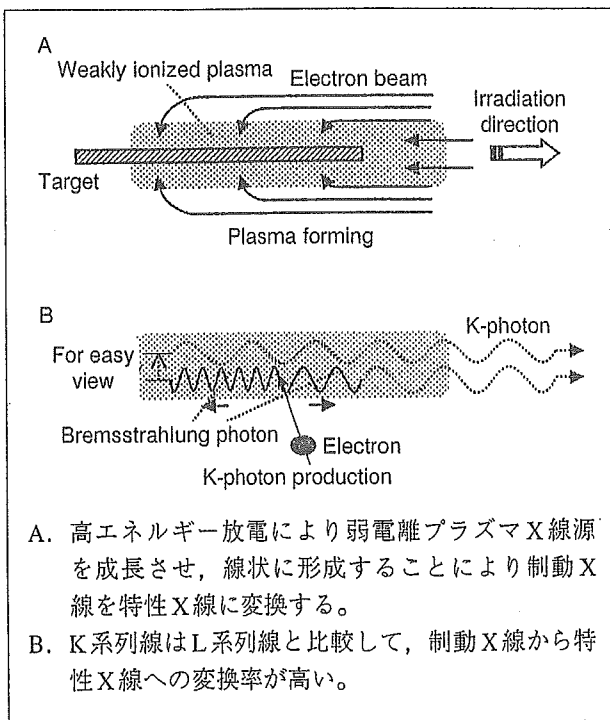
放射光施設は多額のコストと広大な敷地を必要とし, 臨床導入するには時間的・空間的にも問題がある。そこで微小血管造影法が臨床応用できるように, 新エネルギー・産業技術開発機構(NEDO)の支援により, 病院設置型の微小血管造影装置を浜松ホトニクス・NHKエンジニアリングの協力を得て共同開発した。X線管は最大陽極熱容量が5MHUと世界最大級の大きさであるCT用管球を転用した(図②)。X線高電圧装置も大出力化し, 市販の装置では不可能な70kVp・800mAで高輝度のX線を連続20秒間まで撮影できる。疑似単色化はランタノイド系の金属を複合したフィルターで, ヨードのK吸収端である33keV付近に頂点を有し, 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

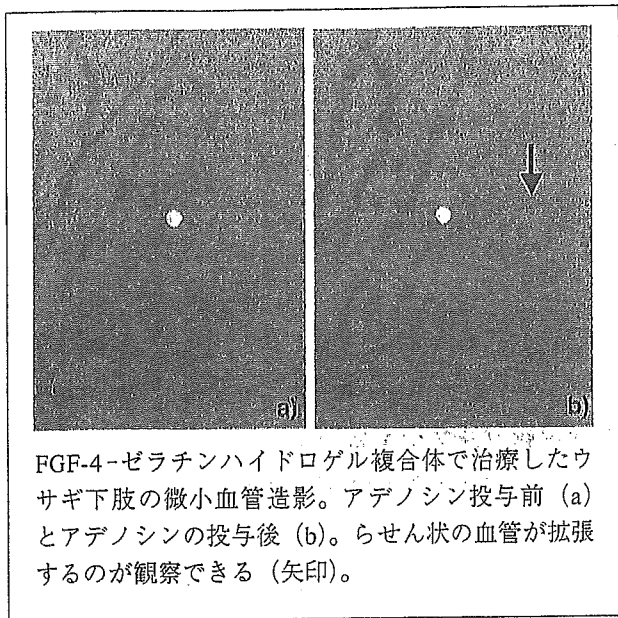
装置は高電圧電源、高電圧コンデンサー、プラズマX線管からなり、高電圧コンデンサーの容量を増すことによりX線の高輝度化が可能となる(図③)。プラズマX線はシャープなK系列特性X線であり、その発生原理は高エネルギー放電により弱電離プラズマX線源を成長させ、線状に形成することにより制動X線を特性X線に変換する。特性X線はプラズマを容易に通過するので、高線量の疑似単色X線が発生する(図④A)。さらに、K系列特性線は蛍光吸収率が高いので、L系列線と比較して制動X線から特性X線への変換率が高い(図④B)。プラズマX線は金属ターゲットの種類により、特性X線のエネルギーを任意に選択することができる。例えば、セ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

図⑤ 再生血管のアデノシン投与による反応

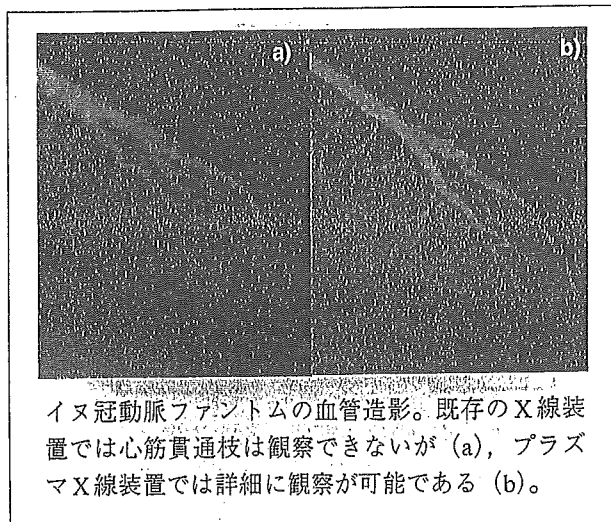


vascular endothelial growth factor (VEGF) で治療したラットで観察されたらせん状の血管も拡張せず<sup>11)</sup>, 以上のことから虚血により生じた再生血管や VEGF により再生したらせん状の再生血管は, 内皮機能が備わっていない不完全な再生血管であると考えられた。一方, fibroblast growth factor 4 (FGF-4)-ゼラチンハイドロゲル複合体にて血管再生治療後のウサギの下肢虚血モデルを撮影した。観察されている血管は再生血管と考えられ, アデノシンの投与によりらせん状の血管が拡張したと報告されている<sup>12)</sup>。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。



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。

- 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 1636, 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.

\*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.

- ・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。