

図2 セラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の血管新生効果  
 naked AM : アドレノメデュリン遺伝子単独投与群, AM-gelatin : セラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群  
 a : 虚血側大腿筋のアルカリホスファターゼ染色による毛細血管密度の比較 (×200).  
 b, c : 下腿血圧および下腿血流量は複合体投与群が有意に勝っていた.  
 d : 血管造影検査による再生血管の描出.  
 e : 治療後の筋肉組織内アドレノメデュリン濃度の経時的推移.

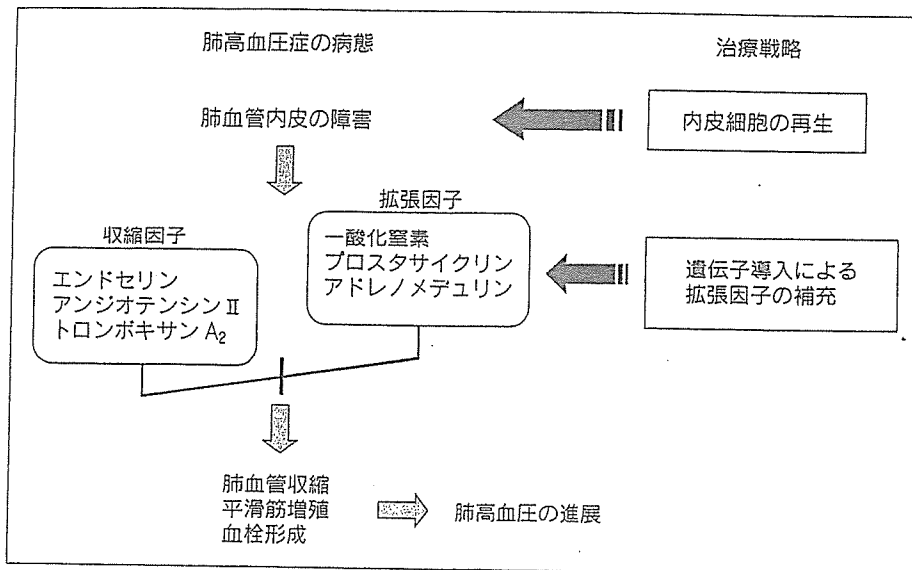


図3 肺高血圧症の病態に基づいた細胞-遺伝子ハイブリッド治療の戦略

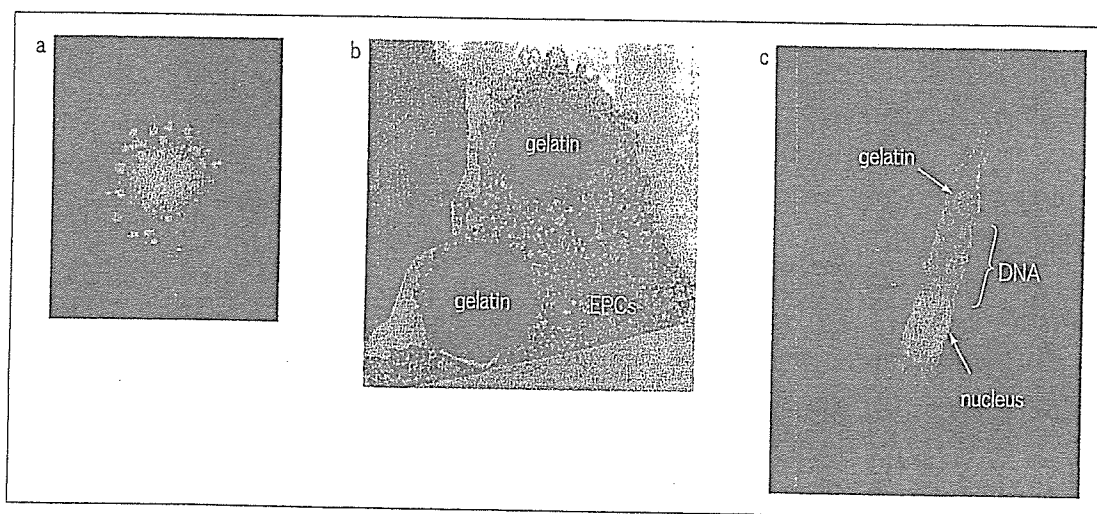


図4 ゼラチンを用いたEPCsへの遺伝子導入  
 a: ゼラチンに封入されたアドレノメデュリン遺伝子 (RITC-labeled)  
 b: ゼラチンを食食した血管内皮前駆細胞  
 c: ゼラチンから細胞核に向かってDNAが放出される様子。

かになった。

モノクローリン投与にて作製したラット肺高血圧モデルにアドレノメデュリン遺伝子を導入したEPCsを経静脈的に投与し、3週間後に肺高血圧

の軽減効果を検討した<sup>9)</sup>。EPCsは肺細動脈と間質に付着し、成熟した血管内皮細胞として血管を形成したが(図5a, b), EPCs単独投与では肺動脈の有意な低下には至らず、肺血管抵抗のわずか

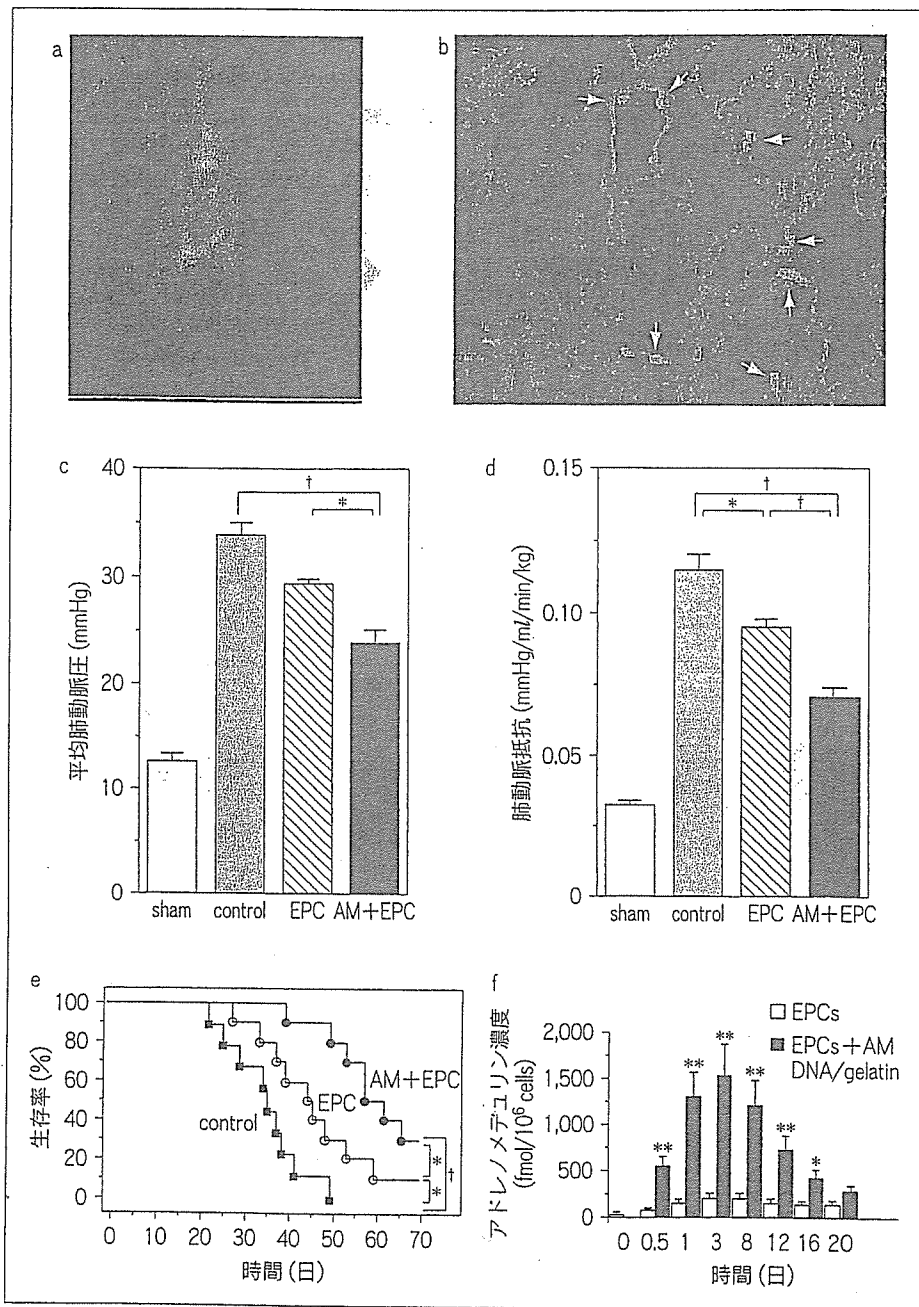


図5 肺高血圧ラットに対する血管内皮前駆細胞とアドレノメデュリン遺伝子のハイブリッド治療の効果  
a: GFP 遺伝子導入 EPCs.  
b: GFP 発現 EPCs は、肺細動脈の内面や肺組織の間質に付着し、血管を形成した。  
c, d, e: アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs の移植により、平均肺動脈圧、肺血管抵抗、および予後が有意に改善した。\*:  $p < 0.05$ , †:  $p < 0.01$   
f: 培養液中のアドレノメデュリン濃度。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs EPCs

な改善のみにとどまった。一方アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は平均肺動脈圧および平均肺動脈抵抗を有意に低下させ、生存率を有意に改善させた (図 5c, d, e)。また、アドレノメデュリン遺伝子導入 EPCs は EPCs 単独の約 10 倍のアドレノメデュリンを分泌し、約 3 週間にわたって発現が持続した (図 5f)。原発性肺高血圧症に対する治療としてプロスタサイクリン療法やエンドセリン受容体拮抗薬が開発され、その有効性が報告されているが、これらの治療にも抵抗性の症例が存在し、肺移植の適応とされながらもドナー不足により十分な治療が受けられないのが現状である。この細胞-遺伝子ハイブリッド治療が重症肺高血圧症に対する新たな治療法となる可能性がある。

## おわりに

われわれが開発した生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法は安全性、遺伝子の徐放化による持続発現の点で、従来のウイルスベクターを用いた方法よりも優れている可能性がある。本法は食能をもつ細胞であれば利用可能であると考えられ、肺高血圧症や虚血性心疾患などの難治性循環器疾患に対する新たな再生治療として期待されている。

## 文 献

- 1) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370-374
- 2) Tabata Y, Nagano A, Ikada Y et al: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 1999; 5: 127-138
- 3) Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N et al: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1056-1062
- 4) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 553-560
- 5) Tokunaga N, Nagaya N, Shirai N et al: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 2004; 109: 526-531
- 6) Plautz G, Nabel EG, Nabel GJ et al: Introduction of vascular smooth muscle cells expressing recombinant genes *in vivo*. *Circulation* 1991; 83: 578-583
- 7) Asahara T, Murohara T, Isner JM et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967
- 8) Asahara T, Kawamoto A: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C572-C579
- 9) Nagaya N, Kangawa K, Mori H et al: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; 108: 889-895
- 10) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637
- 11) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-435
- 12) Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M et al: Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2004; 109: 351-356
- 13) Owji AA, Smith DM, Coppock HA: An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology* 1995; 136: 2127-2134
- 14) Nakamura M, Yoshida H, Makita S et al: Potent and long-lasting vasodilatory effects of adrenomedullin in humans. Comparisons between normal subjects and patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997; 95: 1214-1221

## シンクロトロンにかわる医用単色X線装置の開発と応用

佐藤英一<sup>a</sup>, 林 保臣<sup>a</sup>, 小原春雄<sup>b</sup>, 田中越郎<sup>c</sup>, 盛英三<sup>d</sup>, 河合敏昭<sup>e</sup>, 井上敬<sup>f</sup>, 小川彰<sup>f</sup>,  
佐藤成大<sup>g</sup>, 市丸俊夫<sup>h</sup>, 高山和喜<sup>i</sup>, 白杵辰巳<sup>j</sup>, 佐藤公悦<sup>j</sup>

岩手医科大学教養部物理学<sup>a</sup>, 東北大学医学部保健学科<sup>b</sup>, 東京農業大学応用生物学部<sup>c</sup>, 国立循環器  
センター研究所<sup>d</sup>, 浜松ホトニクス株式会社<sup>e</sup>, 岩手医科大学医学部脳神経外科<sup>f</sup>, 岩手医科大学医学  
部細菌学<sup>g</sup>, 弘前大学医学部保健学科<sup>h</sup>, 東北大学流体科学研究所<sup>i</sup>, トーレック株式会社<sup>j</sup>

### Development of monochromatic x-ray generators instead of a synchrotron and applications

Eiichi Sato<sup>a</sup>, Yasuomi Hayasi<sup>a</sup>, Haruo Obara<sup>b</sup>, Etsuro Tanaka<sup>c</sup>, Hidezo Mori<sup>d</sup>, Toshiaki Kawai<sup>e</sup>, Takashi Inoue<sup>f</sup>,  
Akira Ogawa<sup>f</sup>, Shigehiro Sato<sup>g</sup>, Toshio Ichimaru<sup>h</sup>, Kazuyoshi Takayama<sup>i</sup>, Tatsumi Usuki<sup>j</sup> and Koetsu Sato<sup>j</sup>

<sup>a</sup>Department of Physics, Iwate Medical University, Morioka 020-0015, Japan

<sup>b</sup>Department of Radiological Technology, College of Medical Science, Tohoku University, Sendai 980-0872,  
Japan

<sup>c</sup>Department of Nutritional Science, Faculty of Applied Bio-science, Tokyo University of Agriculture,  
Setagaya-ku 156-8502, Japan

<sup>d</sup>Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka 565-8565 Japan

<sup>e</sup>Electron Tube Division #2, Hamamatsu Photonics K. K., Iwata 438-0193, Japan

<sup>f</sup>Department of Neurosurgery, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka 020-8505, Japan

<sup>g</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka 020-8505, Japan

<sup>h</sup>Department of Radiological Technology, School of Health Sciences, Hirosaki University, Hirosaki 036-8564,  
Japan

<sup>i</sup>Shock Wave Research Center, Institute of Fluid Science, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan

<sup>j</sup>Toreck Inc., Yokohama 223-0052, Japan

#### 1. はじめに

X線レーザーの研究は世界各国で行われており、レーザー発振のためのさまざまな方法が考案されている<sup>1-4)</sup>。レーザーは誘導放出による光の増幅を意味するが、誘導放出によっては光子エネルギーを高めることは難しい。このことから誘導放出とは異なるが、自由電子レーザー<sup>5)</sup>による方法が考案され、研究されている。人体をも撮影できるハードX線レーザーの発振はノーベル賞に値するといわれているが、まだそれらの発生は報告されていない。したがって、もし仮にハードX線レーザーが定常的に発生できれば、医療における診断や治療に大きく貢献すると思われる。

シンクロトロンとモノクロリメーターを用いて発生する単色平行X線はヨウ素のKエッジ造影

6-8) や位相コントラスト撮影<sup>9-11)</sup>等に応用され、X線撮影上革命的な成果をあげている。特に、血管造影にはK吸収端が33.2 keVのヨウ素系造影剤が利用されるので、吸収端よりもわずかに高いフォトンエネルギーのX線は造影剤に効率良く吸収される。したがって、35 keV程度の単色平行X線は微小血管造影には非常に有用であることから、造影室はシンクロトロン施設内に設置されている。

マイクロフォーカスX線管を用いた輪郭強調X線位相コントラスト撮影はWilkins<sup>12)</sup>により考案された。最近、100  $\mu\text{m}$ 程度の小焦点モリブデン管とCRを用いた高精細マンモグラフィシステム<sup>13,14)</sup>がコニカミノルタから発売され、普及しつつある。X線撮像においてもデジタル化は進んでいるが、イメージングプレートを用いたコンピューターラジオグラフィ(CR)<sup>15)</sup>やフラットパネルディテクター(FPD)はX線フィルムと比較して空間分解能が劣るので、拡大撮影による分解能の向上は必須である。さらに拡大により被写体からの散乱線の影響が低減され、位相コントラストの効果が加わる。このことから筆者等はデジタル拡大撮影の微小血管造影への応用を試み、良好な成果を得ている。

筆者等は単色X線撮影を行うため、エネルギー選択式のFPDの開発も行っているが、本稿では、近年開発した、種々のX線装置の特性やCRにより撮影した画像について簡単に説明する。

## 2. 低フォトンエネルギープラズマX線装置

低フォトンエネルギーの弱電離プラズマX線装置<sup>16-20)</sup>はハードX線レーザーの基礎研究のために開発され、銅やニッケル等のK系列特性X線を出力させるのに有用である。Fig. 1のように200 nFのコンデンサーを50 kV程度に充電し、蓄積された電荷をX線管の陰極にトリガ電圧を印加することにより放電する。この装置では高エネルギー放電により弱電離プラズマを成長させ、これを線状に形成することにより、制動X線が吸収され、蛍光X線(特性X線)に変換される。吸収係数が不連続なことから特性線はプラズマを容易に透過するので、単色化フィルターを挿入しなくとも高線量率の準単色X線が発生する。加えて、KエッジフィルターによりK $\beta$ 線を吸収すれば、K $\alpha$ 線が得られる。X線管には長い棒状ターゲットが取付けてあり、1 mPa程度に連続排気される。

管電圧と電流は減衰振動となり、それらの最大値は充電電圧を高めることにより増加した。実験結果より、管電圧の最大値は充電電圧にほぼ匹敵し、最大管電流値は約15 kAであった。また熱蛍光線量計で測定した最大X線強度は線源から1.0 mの位置で1パルス当たり1.5 mGy程度であった。

X線スペクトルの測定には、厚さ0.5 mmのフッ化リチウム湾曲単結晶付の透過式分光器を用いた(Fig. 2)。実験ではクリーンなK系列特性X線が観測され、充電電圧の増加によりX線強度は著しく増加した。驚くことに、充電電圧が50 kVでは、高調波が観測された。

X線撮影には厚さ10  $\mu\text{m}$ のニッケルフィルターを用い、撮影距離と充電電圧はそれぞれ1.2 mと50 kVであった。写真はプラスチックの試験管からこぼれ落ちるプラスチック弾である(Fig. 3)。この装置のX線照射時間は約1  $\mu\text{s}$ であるため、完全静止画像が得られた。

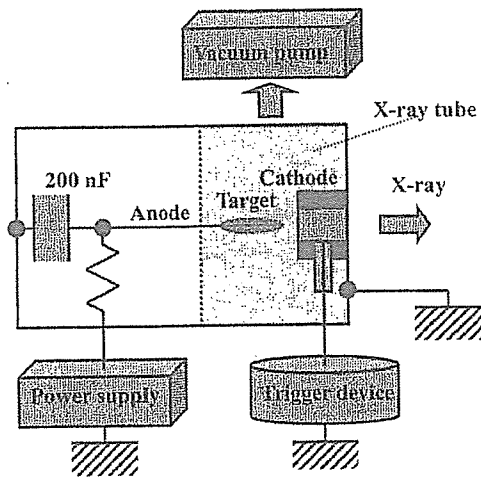


Fig. 1. Block diagram of the low photon energy plasma flash x-ray generator.

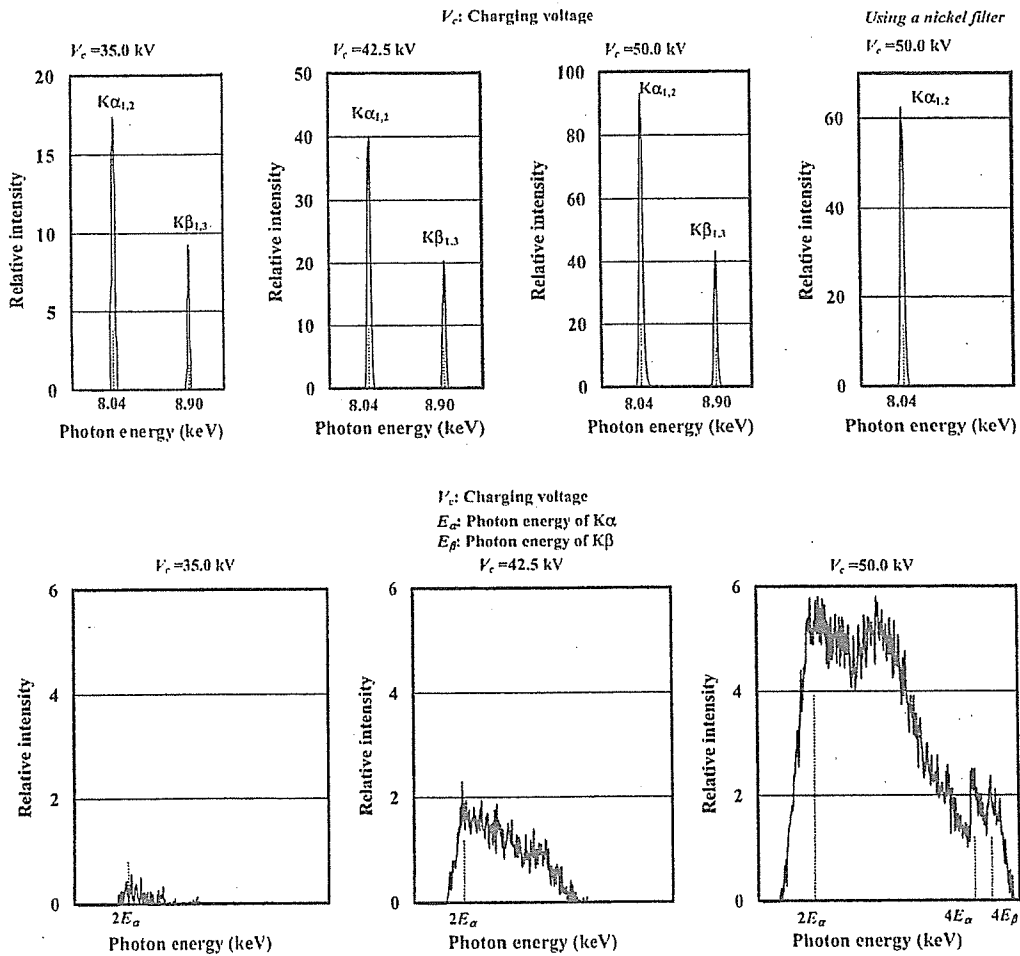


Fig. 2. X-ray spectra from weakly ionized linear plasma at the indicated conditions.

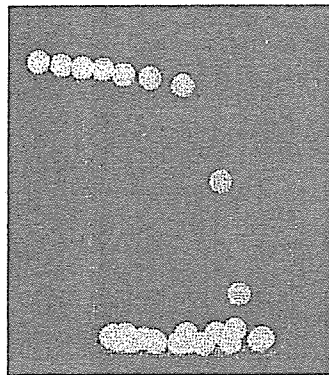


Fig. 3. Radiogram of plastic bullets falling into polypropylene beaker from a plastic test tube.

40 mm

### 3. 制動X線の角度分布を用いた単色フラッシュX線装置

この単色フラッシュX線装置<sup>21,22)</sup>は高光子エネルギーのクリーンな特性X線を発生させるために試作した。制動線は電子軌道と反対方向には出力し難い性質を利用した場合には、比較的容易に準単色あるいは単色のX線を得ることができる。この装置は高電圧パルス発生装置、ターボ分子ポンプ、X線管などからなる。パルス発生装置では2段マルクス回路を採用し、充電電圧の約2倍の高電圧パルスが出力する。X線管にはグラファイト製の円盤状陰極と棒状のモリブデンターゲットが付いており、陰極表面からの電子ビームがターゲット先端に衝突し、X線は陰極とマイラーX線窓を透過して出力する (Fig. 4)。管体はアクリル製で、1 mPa 程度に連続排気される。スペクトルは前述の結晶分光器を用いて測定した。厚さ 20  $\mu\text{m}$  のジルコニウムフィルターを用いた場合には  $\text{K}\beta$ 線が吸収されるので、クリーンな単色の  $\text{K}\alpha$ 線を得ることができた (Fig. 5)。フラッシュX線装置の管電圧と電流は減衰振動となり、それぞれの最大値は充電電圧が-70 kV の条件下で 120 kV と 1.0 kA であった。また熱蛍光線量計で測定した最大X線強度は線源から 0.5 m の位置で 1 パルス当たり 70  $\mu\text{Gy}$  であった。

Fig. 6 はガラス製試験管から流れ出る水で、撮影距離と充電電圧はそれぞれ 0.5 m と -70 kV であった。X線パルスの幅は約 70 ns であるため、水の完全静止画像を撮影できた。

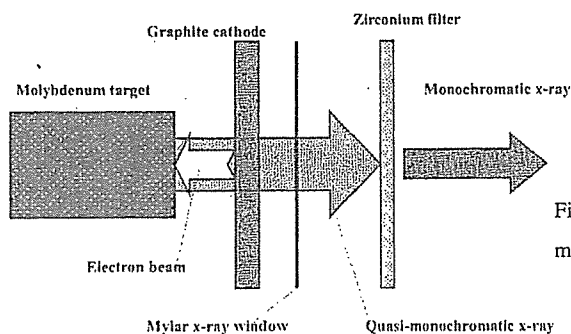


Fig. 4. K-photon irradiation using a monochromatic flash x-ray tube.



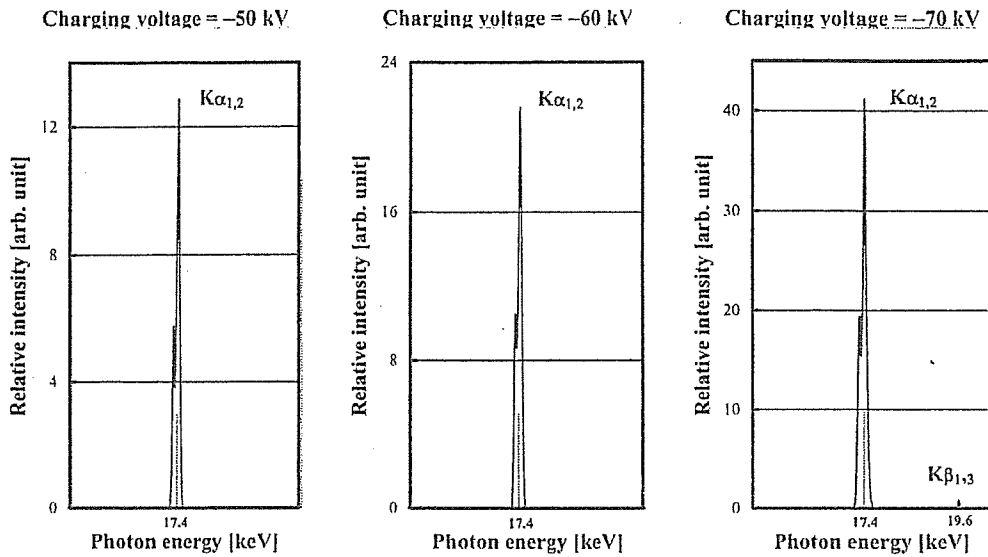


Fig. 5. X-ray spectra from a molybdenum target.

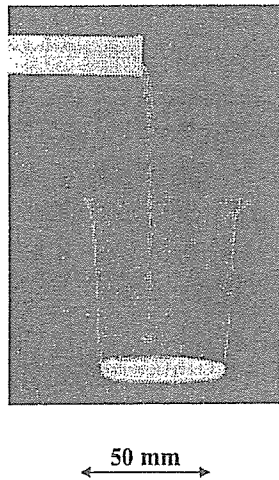


Fig. 6. Radiogram of water falling into polypropylene beaker from a glass test tube.

4. 高光子エネルギープラズマX線装置

高光子エネルギーのクリーンなK系列特性X線とそれらの高調波を発生させるため、高光子エネルギーのプラズマX線装置<sup>23)</sup>を製作した。このフラッシュX線装置は高電圧充電器、コンデンサーユニット、ギャップスイッチ、ターボ分子ポンプ、そしてフラッシュX線管等よりなる。150 nFのコンデンサーを80 kV程度に充電し、蓄積された電荷をギャップスイッチを閉じることによりX線管内に放電し、フラッシュX線を得る。管はターボ分子ポンプにより1 mPa程度に連続排気される。

Fig. 7はK系列特性X線発生原理図で、直径3.0 mmの棒状タンタルターゲットと内径4.5 mmのリング状グラファイト陰極が取り付けられている。陰極からの電子ビームはターゲット先端にほぼ垂直

に衝突するので、プラズマが形成され、図のようにK系列特性（準単色）X線が発生する。

ほぼ製品に近いプロトタイプゆえ、管電圧と電流の最大値を測定することは難しいが、充電電圧が80 kVの場合の最大値はそれぞれ160 kVと40 kA程度である。2極管を用いているので、X線照射時間は短く、約100 ns程度であった。次にフラッシュX線装置の線量率は極めて高いことから、半導体検出器を用いてスペクトルを測定することはできない。モリブデンターゲットから出力するX線スペクトルも結晶分光器を用いて測定したが、特性X線強度は充電電圧を高めることにより著しく増加した。しかし、20  $\mu\text{m}$ 厚のジルコニウムフィルターを用いてK $\beta$ 線を吸収することは難しく、高調波も発生しなかった。一方、タンタルターゲットでも、ほぼクリーンなK系列特性X線を得ることができた (Fig. 8)。また熱蛍光線量計で測定した最大X線強度は線源から1.0 mの位置で1パルス当たり約300  $\mu\text{Gy}$ であった。

Fig. 9はガドリニウムの質量吸収係数とタンタルK $\alpha$ 線の平均光子エネルギーの関係を示している。ガドリニウム造影剤はMRAで使用されるが、図のようにタンタルK $\alpha$ 線はガドリニウムに効率よく吸収される。実験結果から、重量百分率で15%程度の造影剤を用いれば、十分に高コントラストで撮影できる。酸化ガドリニウムを用いて造影したウサギ頭部をFig. 10に示す。図のように100  $\mu\text{m}$ 程度の微小血管が観察できた。

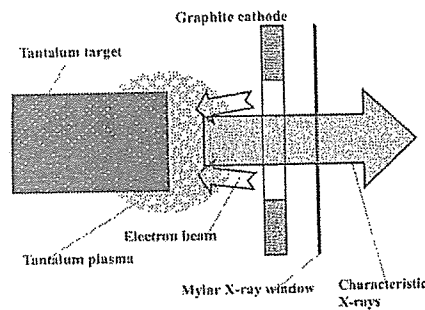


Fig. 7. K-photon irradiation from weakly ionized tantalum plasma.

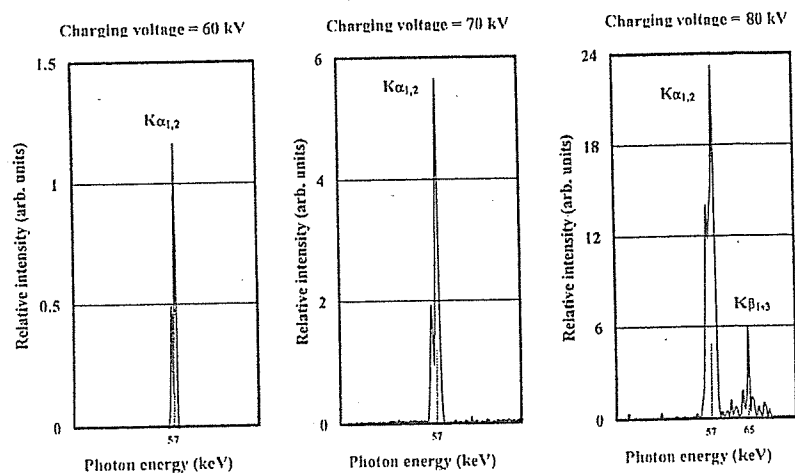


Fig. 8. X-ray spectra from a tantalum target.

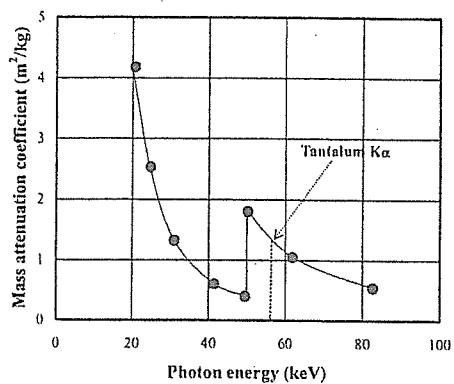


Fig. 9. Mass attenuation coefficient of gadolinium and the average photon energy of tantalum

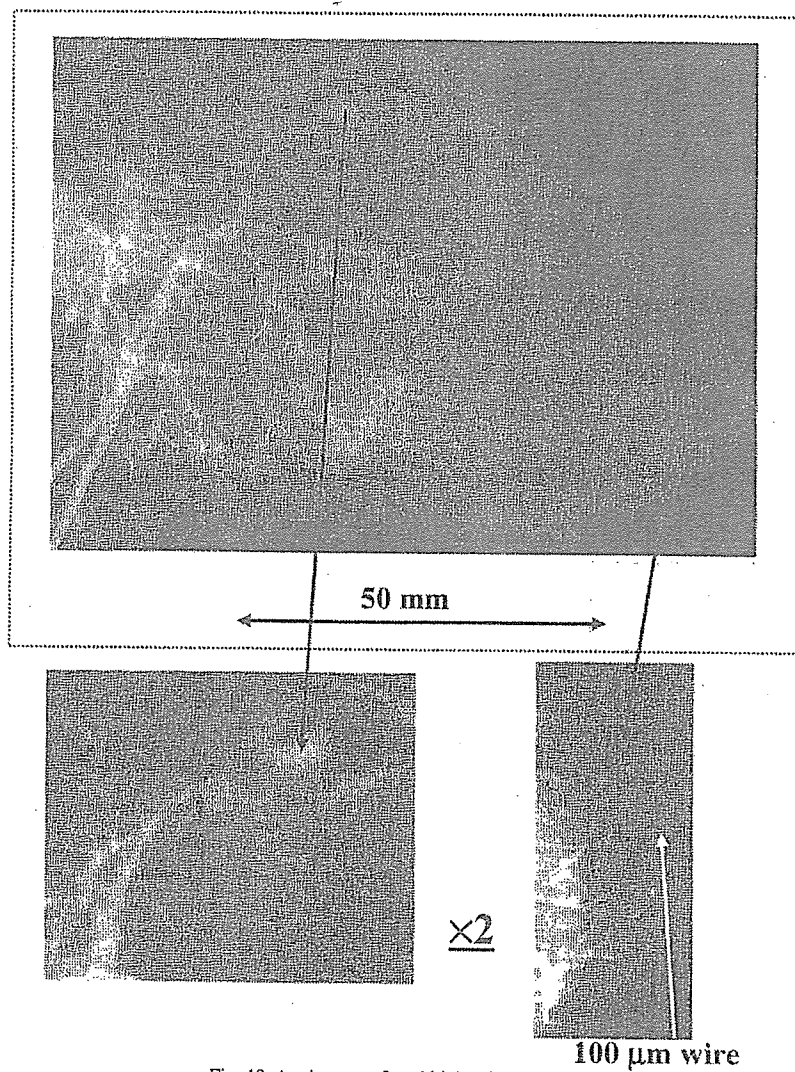


Fig. 10. Angiogram of a rabbit head

### 5. 制動X線の角度分布を用いた単色X線装置

定常的でクリーンなK系列特性X線を発生させるために、熱陰極（フィラメント）付きのX線管と制動X線の角度分布を用いた単色X線装置を製作した。この装置は高電圧電源、ターボ分子ポンプ、開放型のX線管等よりなる。管はターボ分子ポンプにより 0.5 mPa 程度に連続排気される。X線管の陽極には正の高電圧が印加され、陰極は接地されている。Fig. 11 はX線管の構造図で、フィラメントからの電子流は収束電極でターゲット先端に集められる。この実験では棒状ターゲットを使用した。管にはモリブデンターゲットを取付けたので、単色化のためのKエッジフィルターは 20  $\mu\text{m}$  厚のジルコニウムである。管電圧が 30 kV、管電流が 0.10 mA の条件におけるX線強度は、線源から 1.0 m の位置で 12.1  $\mu\text{Gy/s}$  で、クリーンな  $K\alpha$ 線が観測できた (Fig. 12)。Fig. 13 はウサギの大腿で、直径 15  $\mu\text{m}$  のヨウ素マイクロスフェアを使って造影した。マイクロスフェアは生体の造影ファントムを製作するのに有用である。フラッシュX線管と比較して、このX線管では高光子エネルギーのクリーンなK系列特性X線を得ることは難しい。

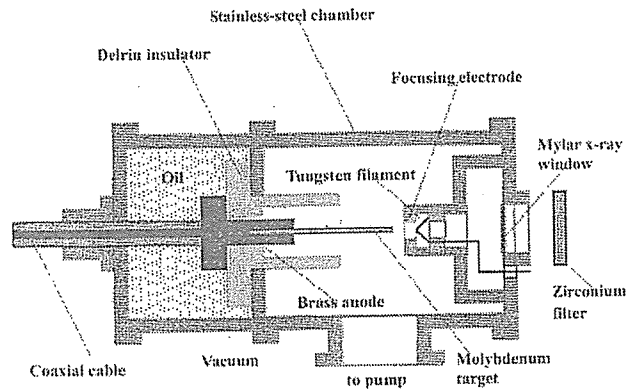


Fig. 11. Schematic drawing of the monochromatic x-ray tube.

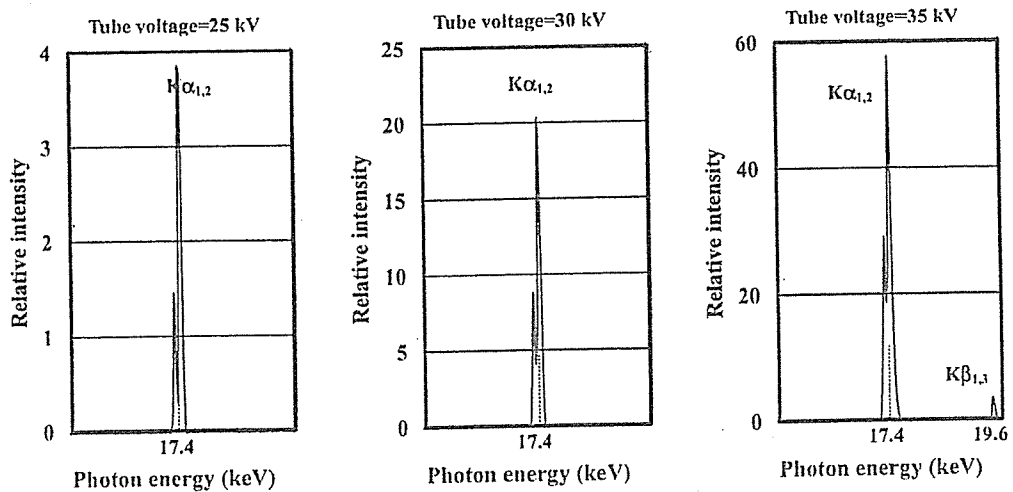


Fig. 12. X-ray spectra from the molybdenum target.

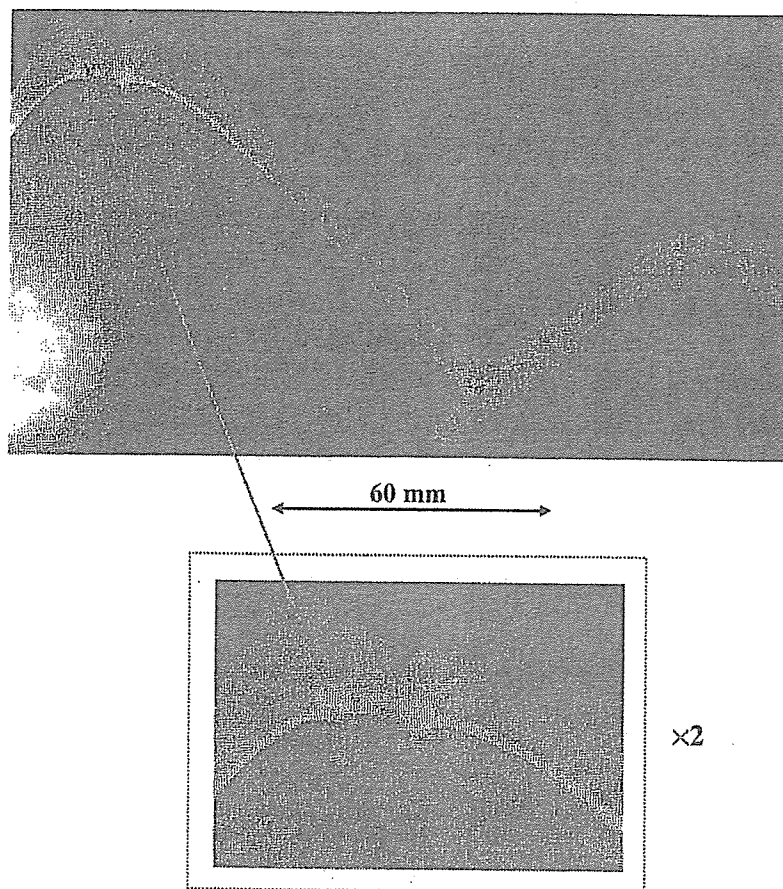


Fig. 13. Angiogram of a rabbit thigh.

#### 6. セリウムX線装置とヨウ素Kエッジ造影

コーンビームを用いてシンクロトロンと同等のヨウ素Kエッジ造影効果を得るため、 $K\alpha$ 線の平均光子エネルギーが 34.6 keV のセリウムX線管<sup>24,25)</sup>を製作し、高電圧電源と接続してポータブルX線装置を製作した。装置はメインコントローラーとコッククロフト・ウォルトン回路を組み込んだX線管ユニットからなる。メインコントローラーでは管電圧、管電流、そしてX線照射時間を調整できるが、コントローラーに接続したパソコンを用いても遠隔から制御できる。X線管の陽極は接地され、陰極に負の高電圧が印加される。X線管の焦点径は約 1 mm で、フィルター無し、そして硫酸バリウムフィルターを付けた場合のX線強度は、線源から 1.0 m の位置で、それぞれ 209 および 16.8  $\mu\text{Gy/s}$  であった。このとき、管電圧と電流は、それぞれ 60 kV と 0.5 mA であった。

Fig. 14 はセリウムX線管からのX線スペクトルで、管電圧が 60 kV のものである。図のようにシャープなK線が得られ、硫酸バリウムフィルターの挿入によって  $K\beta$ 線強度は著しく減弱した。ヨウ素マイクロスフェアを用いた犬の心臓の造影では、厚さ 100 mm の水ファントムを用いた場合にも、血管のコントラストはほとんど変化しなかった (Fig. 15)。

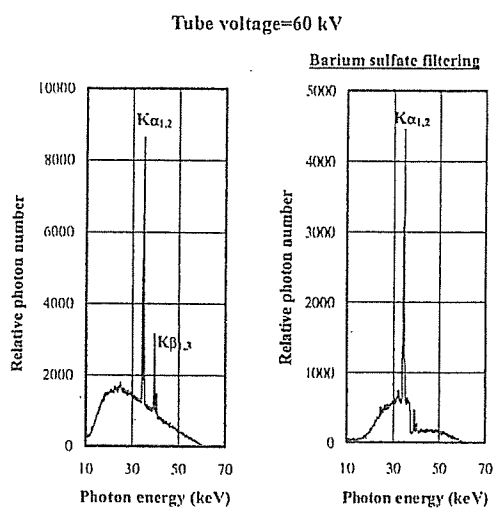


Fig. 14. X-ray spectra from a cerium target.

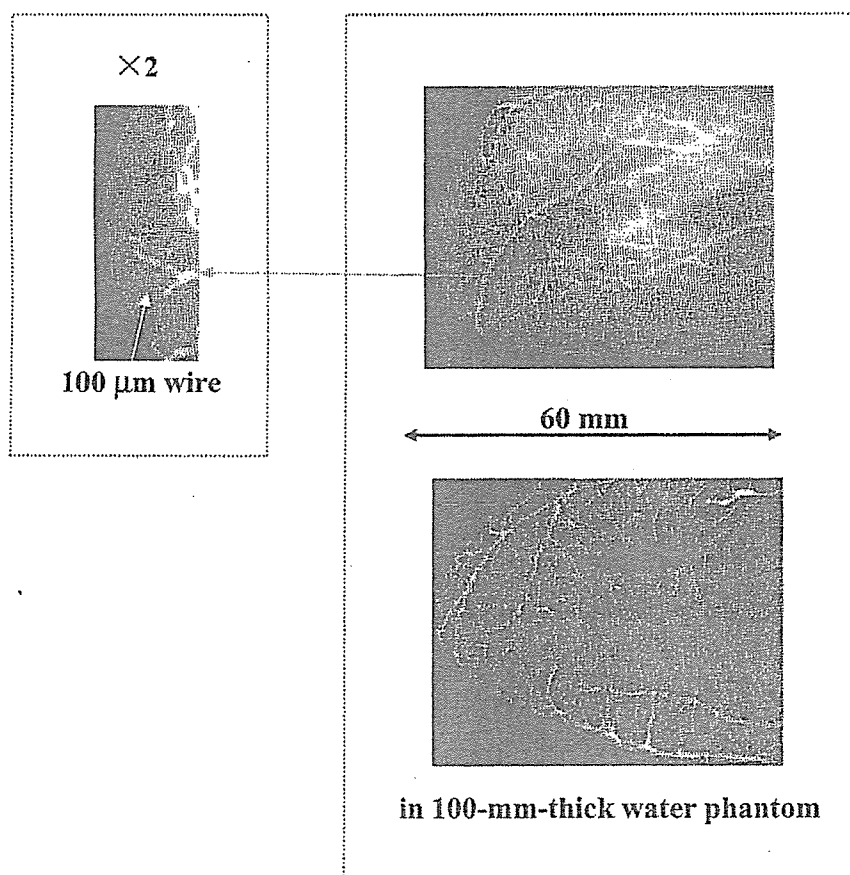


Fig. 15. Angiograms of a dog heart.

### 7. 制動X線の疑似単色化とデジタル拡大撮影

ターゲット材の融点等の問題から、セリウムを用いて微小焦点X線管を製作することは難しい。ここでは 100  $\mu\text{m}$  タングステン管付きポータブルX線装置から発生する制動X線を疑似単色化し、ヨウ素造影に適したスペクトルにした後、3倍拡大撮影による造影を試みた。撮影には厚さ 3.0 mm のアルミニウムフィルターを用い、管電圧と撮影距離 (X線源とイメージングプレート間) はそれぞれ 60 kV と 1.5 m であった。また管電圧と電流がそれぞれ 60 kV と 0.5 mA のとき、X線強度は線源から 1.0 m の位置で 26.0  $\mu\text{Gy/s}$  であった。

撮影に使用した CR のサンプリングピッチは 87.5  $\mu\text{m}$  であるが、8 LP (62.5  $\mu\text{m}$ ) の線が認識できた (Fig. 16)。また犬の心臓の造影でも 100  $\mu\text{m}$  程度の血管が観察でき、線源側に厚さ 100 mm のアクリル板を用いた場合でも画像のコントラストはそれほど変化しなかった (Fig. 17)。

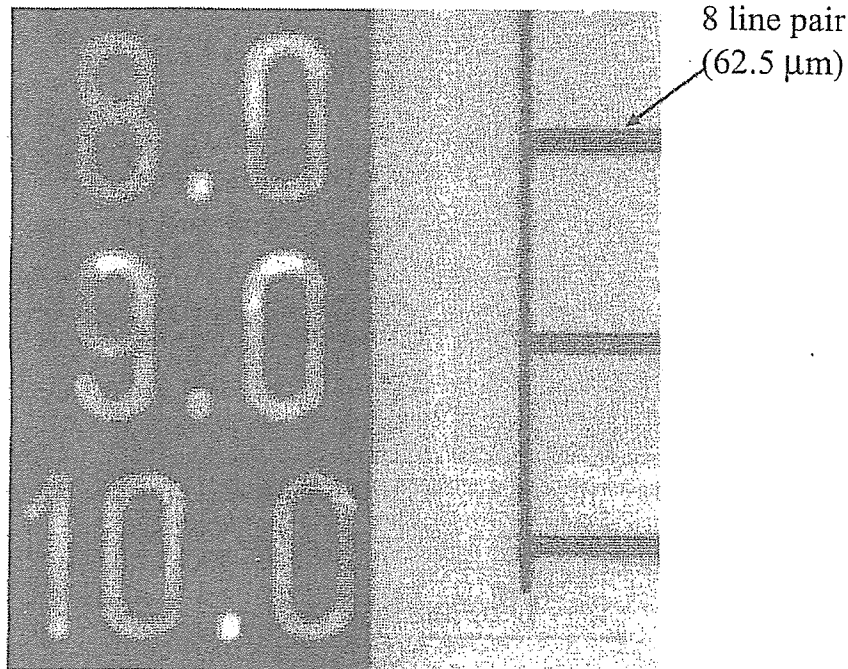


Fig. 16. Magnification radiogram of a test chart.

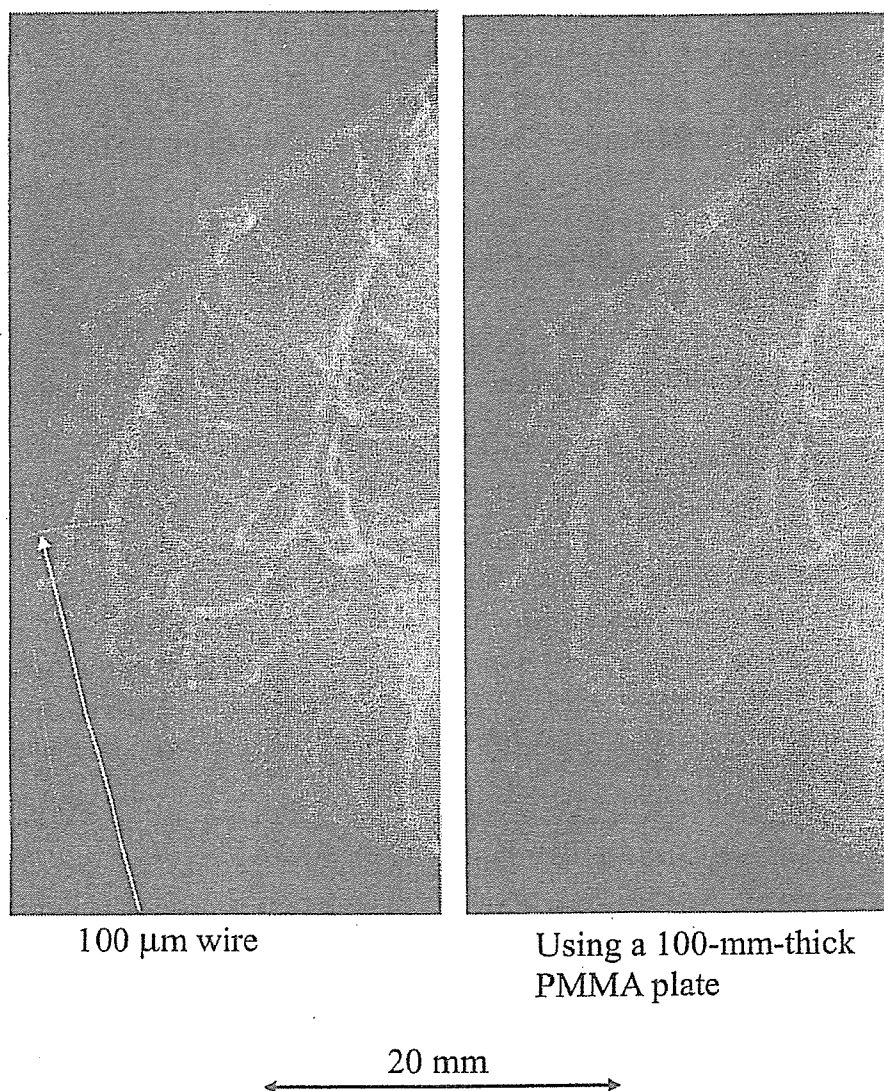


Fig. 17. Magnification angiograms of a dog heart.

7. おわりに

低光子エネルギープラズマX線装置では充電電圧の増加により、高調波が観測された。これらの高調波は制動X線のプラズマ内での吸収により発生したと思われる。要するに、K系列特性X線の整数倍の光子エネルギーに相当する制動線がプラズマを透過し易いと想像される。次にモリブデン管付き高光子エネルギープラズマX線装置ではジルコニウムフィルターにより Kβ線が吸収され難く、この現象は Kβ線の線吸収係数が低下したためと思われる。

セリウムX線装置から発生するK系列特性X線はシャープで、前述のように硫酸バリウムのフィル



ターを用いた場合には  $K\alpha$ 線を有効に用いることができる。しかし  $K\beta$ 線も効率よく吸収されることから、酸化セリウムのフィルターも有用であると思われる。現在、回転陽極管を製作するための基礎実験を行っており、高線量率セリウム管も実現するかもしれない。

血管のコントラストは若干劣るが、アルミニウムフィルター等を使って発生する疑似単色制動X線も有効であった。さらに被曝線量を考慮する必要はあるが、拡大撮影による空間分解能の向上、散乱線の低減、そして位相コントラスト効果の付加は、これからのデジタル撮影には必須であると思われる。100 W級の10  $\mu\text{m}$  フォーカス回転陽極管が実用化され、加えてkW級の100  $\mu\text{m}$  フォーカス管は製作可能であることから、特に高精細撮影を行う場合には小焦点管をお勧めする。

### 謝辞

本研究は文部科学省、厚生労働省、私学振興財団、JST、NEDO、そして岩手県からの研究助成金により遂行されている。

### 文献

1. J.J. Rocca, V. Shlyaptsev, F.G. Tomasel, O.D. Cortazar, D. Hartshorn and J.L.A. Chilla, "Demonstration of a discharge pumped table-top soft x-ray laser," *Phys. Rev. Lett.*, **73**, 2192-2195, 1994.
2. K. Yoshiaki, A. Nagashima, K. Nagashima, M. Kado, T. Kawachi, N. Hasegawa, M. Tanaka, A. Sasaki and K. Moribayashi, "X-ray lasers driven by optical lasers," *AIP Conference Proc.*, **506**, 613-620, 1999.
3. J.J.G. Rocca, J.L.A. Chilla, S. Sakadzic, A. Rahman, J. Filevich, E. Jankowska, E.C. Hammarsten, B.M. Luther, H.C. Kapteyn, M. Murnane and V.N. Shlyapsev, "Advances in capillary discharge soft x-ray laser research," *SPIE*, **4505**, 1-6, 2001.
4. S. Le Pape, Ph. Zeitoun, J.J.G. Rocca, A. Carillon, P. Dhez, M. Francois, S. Hubert, M. Idir and D. Ros, "Characterisation of an x-ray laser beam," *SPIE*, **4505**, 23-34, 2001.
5. C. Gerth, "Free-electron laser at the TESLA test facility at DESY: toward a tunable short-pulsed soft x-ray source," *SPIE*, **4505**, 131-145, 2001.
6. A. C. Thompson, H. D. Zeman, G. S. Brown, J. Morrison, P. Reiser, V. Padmanabahn, L. Ong, S. Green, J. Giacomini, H. Gordon and E. Rubenstein, "First operation of the medical research facility at the NSLS for coronary angiography," *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 625-628, 1992.
7. H. Mori, K. Hyodo, E. Tanaka, M. U. Mohammed, A. Yamakawa, Y. Shinozaki, H. Nakazawa, Y. Tanaka, T. Sekka, Y. Iwata, S. Honda, K. Umetani, H. Ueki, T. Yokoyama, K. Tanioka, M. Kubota, H. Hosaka, N. Ishizawa and M. Ando, "Small-vessel radiography in situ with monochromatic synchrotron radiation," *Radiology*, **201**, 173-177, 1996.
8. K. Hyodo, M. Ando, Y. Oku, S. Yamamoto, T. Takeda, Y. Itai, S. Ohtsuka, Y. Sugishita and J. Tada, "Development of a two-dimensional imaging system for clinical applications of intravenous coronary angiography using intense synchrotron radiation produced by a multipole wiggler," *J. Synchrotron Radiat.*, **5**, 1123-1126, 1998.
9. T. J. Davis, D. Gao, T. E. Gureyev, A. W. Stevenson and S. W. Wilkins, "Phase-contrast imaging of weakly absorbing materials using hard x-rays," *Nature*, **373**, 595-597, 1995.
10. A. Momose, T. Takeda, Y. Itai and K. Hirano, "Phase-contrast x-ray computed tomography for observing

biological soft tissues," *Nature Medicine*, **2**, 473-475, 1996.

11. M. Ando, A. Maksimenko, H. Sugiyama, W. Pattanasiriwisawa, K. Hyodo and C. Uyama, "A simple x-ray dark- and bright- field imaging using achromatic Laue optics," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, L1016-L1018, 2002.
12. S. W. Wilkins, T. E. Gureyev, D. Gao, A. Pogany and A. W. Stevenson, "Phase-contrast imaging using polychromatic hard x-rays," *Nature*, **384**, 335-338, 1996.
13. A. Ishisaka, H. Ohara and C. Honda, "A new method of analyzing edge effect in phase contrast imaging with incoherent x-rays," *Opt. Rev.*, **7**, 566-572, 2000.
14. H. Ohara, C. Honda, A. Ishisaka and F. Shimoda, "Image quality in digital phase contrast imaging using a tungsten anode x-ray tube with a small focal spot size," *SPIE*, **4682**, 1-11, 2002.
15. E. Sato, K. Sato, T. Usuki and Y. Tamakawa, "Film-less computed radiography system for high-speed imaging," *Ann. Rep. Iwate Med. Univ. Sch. Lib. Arts and Sci.*, **35**, 13-23, 2000.
16. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and applications," *Jpn. J. Med. Imag. Inform. Sci.*, **20**, 148-155, 2003.
17. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, H. Obara, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma," *Jpn. J. Med. Phys.*, **23**, 123-131, 2003.
18. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma," *Rev. Sci. Instrum.*, **74**, 5236-5240, 2003.
19. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Sharp characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 713-720, 2004.
20. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, S. Sato and K. Takayama, "Clean monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper plasma," *Opt. Eng.*, **44**, 049002-1-6, 2005.
21. E. Sato, M. Sagae, E. Tanaka, Y. Hayasi, R. Germer, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, 7324-7328, 2004.
22. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube," *Med. Phys.*, **32**, 49-54, 2005.
23. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Inoue, A. Ogawa, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "High-speed K-edge angiography achieved with tantalum K-series characteristic x rays," *SPIE*, **5745**, 810-817, 2005.
24. E. Sato, Y. Hayasi, R. Germer, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Portable x-ray generator utilizing a cerium-target radiation tube for angiography," *J. Electron Spectrosc. Related Phenom.*, **137-140**, 699-704, 2004.
25. E. Sato, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Demonstration of enhanced K-edge angiography using a cerium target x-ray generator," *Med. Phys.*, **31**, 3017-3021, 2004.

## Simultaneous monitoring of acetylcholine and catecholamine release in the in vivo rat adrenal medulla

Tsuyoshi Akiyama<sup>a,\*</sup>, Toji Yamazaki<sup>a</sup>, Hidezo Mori<sup>a</sup>, Kenji Sunagawa<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

<sup>b</sup> Department of Cardiovascular Dynamics, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Received 20 May 2003; accepted 3 September 2003

### Abstract

To simultaneously monitor acetylcholine release from pre-ganglionic adrenal sympathetic nerve endings and catecholamine release from post-ganglionic adrenal chromaffin cells in the in vivo state, we applied microdialysis technique to anesthetized rats. Dialysis probe was implanted in the left adrenal medulla and perfused with Ringer's solution containing neostigmine (a cholinesterase inhibitor). After transection of splanchnic nerves, we electrically stimulated splanchnic nerves or locally administered acetylcholine through dialysis probes for 2 min and investigated dialysate acetylcholine, choline, norepinephrine and epinephrine responses. Acetylcholine was not detected in dialysate before nerve stimulation, but substantial acetylcholine was detected by nerve stimulation. In contrast, choline was detected in dialysate before stimulation, and dialysate choline concentration did not change with repetitive nerve stimulation. The estimated interstitial acetylcholine levels and dialysate catecholamine responses were almost identical between exogenous acetylcholine (10  $\mu$ M) and nerve stimulation (2 Hz). Dialysate acetylcholine, norepinephrine and epinephrine responses were correlated with the frequencies of electrical nerve stimulation, and dialysate norepinephrine and epinephrine responses were quantitatively correlated with dialysate acetylcholine responses. Neither hexamethonium (a nicotinic receptor antagonist) nor atropine (a muscarinic receptor antagonist) affected the dialysate acetylcholine response to nerve stimulation. Microdialysis technique made it possible to simultaneously assess activities of pre-ganglionic adrenal sympathetic nerves and post-ganglionic adrenal chromaffin cells in the in vivo state and provided quantitative information about input–output relationship in the adrenal medulla.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Anesthetized rats; Microdialysis; Choline; Norepinephrine; Epinephrine

### 1. Introduction

Although acetylcholine is one of major neurotransmitters in the peripheral autonomic nervous system as well as central nervous system (Collier, 1977; Fibiger, 1991; Calabresi et al., 2000), it has been difficult to measure endogenous acetylcholine in the in vivo state since acetylcholine released from nerve endings is rapidly degraded by tissue acetylcholinesterase (Taylor and Brown, 1998). Recently, microdialysis technique with improved measurement has made it possible to monitor low levels of acetylcholine in the in vivo central nervous system. In the peripheral autonomic nervous system, we have measured acetylcholine release from post-ganglionic parasympathetic nerve endings using microdialysis technique (Akiyama et al., 1994; Akiyama and Yamazaki, 2000, 2001; Kawada et al., 2001).

Little information is, however, available on acetylcholine release from pre-ganglionic autonomic nerve endings in the in vivo state. The assessment of pre-ganglionic autonomic nerve activities is important for understanding the autonomic ganglionic transmission under physiological and pathophysiological conditions.

Adrenal medulla is one candidate suitable for investigating acetylcholine release from pre-ganglionic autonomic nerve endings (Holman et al., 1994). Compared to autonomic ganglia, adrenal gland is solid and suited to microdialysis probe implantation. Furthermore, microdialysis technique in the adrenal medulla provides a distinct advantage to monitor catecholamine release from adrenal medulla following acetylcholine release. Thus, we consider it possible to simultaneously assess pre- and post-ganglionic sympathetic nerve activities by monitoring acetylcholine and catecholamine release in the adrenal medulla.

In the present study, we applied the microdialysis technique to the adrenal medulla of anesthetized rats and tested the suitability of microdialysis technique to simultaneously

\* Corresponding author. Tel.: +81-6-6833-5012x2380; fax: +81-6-6872-8092.

E-mail address: [takiyama@ri.ncvc.go.jp](mailto:takiyama@ri.ncvc.go.jp) (T. Akiyama).

monitor acetylcholine and catecholamine release from adrenal medulla.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal preparation

The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Adult male Wistar rats weighing 390–460 g were anesthetized with pentobarbital sodium (50–55 mg/kg i.p.). The rats were ventilated with a constant-volume respirator using room air mixed with oxygen. The left femoral artery and vein were cannulated for monitoring arterial blood pressure and administration of anesthetic, respectively. The level of anesthesia was maintained with a continuous intravenous infusion of pentobarbital sodium (15–25 mg/(kg h) i.v.). Electrocardiogram was monitored for recording heart rate. A thermostatic heating pad was used to keep the esophageal temperature within a range of 37–38 °C. With the animal in the lateral position, the left adrenal gland and left splanchnic nerve were exposed by a subcostal flank incision, and the left splanchnic nerve was transected. In protocols requiring nerve stimulation, shielded bipolar stainless steel electrodes were applied to the distal end of the nerve, which was then stimulated with a digital stimulator (SEN-7203, Nihon Kohden, Japan) with a rectangular pulse (10 V and 1 ms in duration).

### 2.2. Dialysis technique

The materials of the dialysis probe were the same as those used in our previous dialysis experiments (Akiyama et al., 2003). Briefly, each end of the dialysis fiber (0.31 mm o.d., and 0.20 mm i.d.; PAN-1200 50,000 mol. wt. cutoff, Asahi Chemical, Japan) was inserted into the polyethylene tube (25 cm length, 0.50 mm o.d., and 0.20 mm i.d.; SP-8) and glued. The length of the dialysis fiber exposed was 3 mm. At perfusion speed of 10  $\mu$ l/min, in vitro recovery rates of acetylcholine, choline, norepinephrine, and epinephrine were (%):  $3.08 \pm 0.04$ ,  $2.93 \pm 0.10$ ,  $2.09 \pm 0.03$ , and  $2.16 \pm 0.03$ , respectively (number of dialysis probes: 3).

The dialysis probe was implanted in the medulla of the left adrenal gland and perfused with Ringer's solution containing the cholinesterase inhibitor, neostigmine (10  $\mu$ M) at a speed of 10  $\mu$ l/min using a microinjection pump (CMA/100, Carnegie Medicin, Sweden). Ringer's solution consisted of (in mM) 147.0 NaCl, 4.0 KCl, 2.25 CaCl<sub>2</sub>. All pharmacological agents tested were locally administered by perfusion through the dialysis probe after being dissolved in Ringer's solution. One sampling period was 2 min (one sample volume = 20  $\mu$ l). We started the protocols followed by a stabilization period of 3–4 h. Catecholamine release was evoked by 2 min-local administration of acetylcholine or

2 min-electrical stimulation of left splanchnic nerves. In protocols requiring repeated nerve stimulation, electrical stimulation was performed at 30 min-intervals. Taking the dead space volume into account, we continuously collected three dialysate samples per pharmacological or electrical stimulation: one before, one during, and one after stimulation. We subtracted the dialysate acetylcholine, norepinephrine, or epinephrine contents in control from those during stimulation, and expressed these values as indices of dialysate acetylcholine, norepinephrine or epinephrine response to stimulation.

Half of the dialysate sample was injected into high-performance liquid chromatography for the measurement of acetylcholine and choline (Akiyama et al., 1994), and the remaining half was injected into another high-performance liquid chromatography for the measurement of norepinephrine and epinephrine (Akiyama et al., 1991).

### 2.3. Experimental protocols

#### 2.3.1. Protocol 1

We repeated stimulations of splanchnic nerves at 2 and 4 Hz twice and examined dialysate acetylcholine, choline and catecholamine responses to nerve stimulation and their reproducibility in five rats.

#### 2.3.2. Protocol 2

To compare the estimated interstitial acetylcholine levels between administration of acetylcholine and nerve stimulation, we locally administered acetylcholine (10  $\mu$ M) in five rats and stimulated splanchnic nerves at 2 Hz in five other rats. The concentration of exogenous acetylcholine was determined to obtain a similar dialysate catecholamine response to nerve stimulation at 2 Hz.

#### 2.3.3. Protocol 3

We raised stepwise the frequency of nerve stimulation from 2 to 4, 10, 20 Hz and examined dialysate acetylcholine and catecholamine responses in five rats. In addition, to examine the input–output relationship in the adrenal medulla, we analyzed the relationship between dialysate acetylcholine and catecholamine responses of five rats.

#### 2.3.4. Protocol 4

We examined the effects of cholinergic receptor antagonists on dialysate acetylcholine and catecholamine responses. Nerve stimulations at 2 and 4 Hz were performed before and after 30 min-local administration of cholinergic receptor antagonists. We tested the nicotinic receptor antagonist, hexamethonium bromide (1 mM) in five rats or the muscarinic receptor antagonist, atropine sulfate (10  $\mu$ M) in five other rats.

### 2.4. Statistical methods

To examine the effect of nerve stimulation and pharmacological agents, we analyzed heart rate and mean