

体からコリメータをある程度離して撮像する。ただし、これは解像度と感度を妥協することになる。著者らは、Defriseらが2次元X線CTを対象として提案した理論[18]を基に、ピンホールSPECTでトランケーションを許す3次元画像再構成法 TC-OSEM (Truncation Compensated OSEM) を開発した[19]。本画像再構成理論では、Fig. 3に示すように収集データに被写体外のゼロ(既知)領域が含まれること、画像再構成マトリクスは被写体が完全に含まれるように十分に大きく設定することの2つの条件の下、OSEMなどの逐次近似画像再構成法によって視野内は正確な値に収束する。本手法により、トランケーションがあっても定量性が確保される(Fig. 4)。

5. マイクロ SPECT を用いた定量的機能評価の例

1) ラット心筋血流量・血管反応性

近年高血圧や高脂血症などの循環器疾患に関与する遺伝子が明らかになってきており、疾患発現に先行する病態生理の把握が重要になる。このとき、安静時のみの組織血流量や基質代謝量に加えて、種々の生理的・薬理的な賦活に対する反応性、たとえば血管反応性や代謝自動調節能などが指標になると考えられている。

著者らは、小動物でこのような生理機能の定量評価を目的として、小型高解像度ピクセル型 NaI シンチレータとピンホールコリメータを組み合わせた検出器[20]を4台搭載した小動物専用高解像度 SPECT 装置を開発した(Fig. 5)。

本装置を用いて、覚醒下での健常ラットの心筋血流量および血管反応性を評価した。ラット

は Fig. 6 のように装置にセットされた。8匹のラットを用いて ^{201}Tl を36分間隔で分割投与し、4匹は安静時と安静時、残りの4匹は安静時と血管拡張時の心筋血流量を測定した。血管拡張時には血管拡張薬アデノシン A2A アゴニスト CGS21680 を2回目の ^{201}Tl 投与の6分前に投与した。ピンホール用 3D-OSEM で画像再構成して得られた一連の時系列画像データに対して2コンパートメントモデル[21]を適用した。Fig. 7 は本実験で得られた心筋 SPECT 画像であるが、非常に鮮明な画像が得られた。入力関数は、別実験で10匹のラットの頻回採血から作成した標準入力関数を用いた。実験の結果、安静時と安静時の検査では血流値に変化はなく、安静時と負荷時の検査では血管拡張薬の量に依存して、血流上昇が認められた(Fig. 8)。本マイクロ SPECT システムで得られたデータを動態解析することで、小動物の心筋血流量および血管反応性を1回の検査で定量的に評価可能である。

2) マウス脳血流量

局所脳血流量は脳梗塞の治療効果を評価する

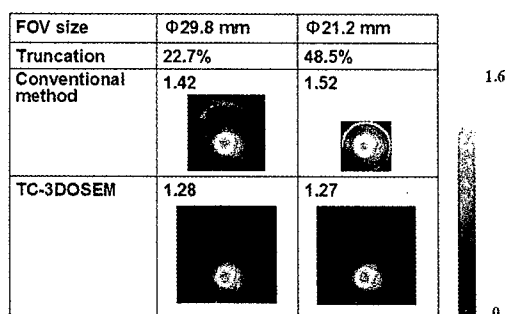


Fig. 4 Reconstructed images and myocardial counts obtained by conventional method and TC-3DOSEM. We artificially generated data with the different amount of truncation from rat experimental data. TC-3DOSEM method eliminates overestimation and provides quantitative image in independence of the amount of truncation.

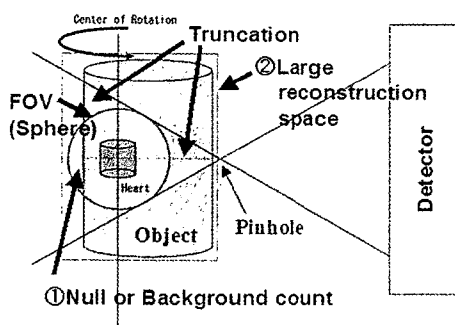


Fig. 3 Schematic diagram to show conditions for truncation compensated reconstruction in 3D pinhole SPECT.

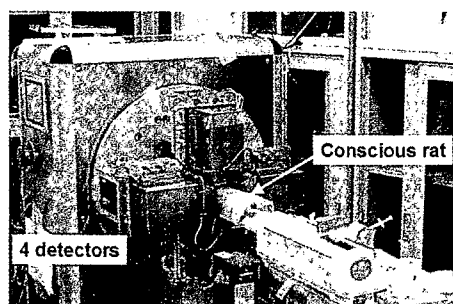


Fig. 5 Photograph of our microSPECT system and rat cardiac imaging study.

指標の1つである。6匹の脳梗塞モデルマウスを準備し、その中の3匹に対して骨髄単核球細胞を移植(治療)した。未治療群3匹と治療群3匹において、ピンホールSPECTと¹²³I-iodoamphetamine (IMP)を用いた脳組織血流定量の妥当性および移植治療効果を評価した。臨床用SPECT装置(GCA-7200A, Toshiba)にピンホールコリメータを装着し、IMP投与約10分後に摘出脳を回転ステージに載せ、各1時間SPECT撮像した。ピンホール用3D-OSEMで再構成して得られた画像に2コンパートメントモデル[22]を適用して、空

間解像度0.9mmの3次元脳組織血流分布像を得た(Fig.9)。入力関数は別実験で5匹のマウスの頻回採血によって得られた標準入力関数を利用し、分配定数は45ml/ml[23]を採用した。また、SPECT撮像の前にMRIでT2強調画像を得て位置合わせを行い、梗塞領域を特定した(Fig.9)。得られた局所脳血流量は、正常側で1.09 ± 0.21 ml/g/minであり、既報のノーマルマウスを14Cとオートラジオグラフィで測定した結果[24]の範囲であった。一方、梗塞巣で0.76 ± 0.18 ml/g/minであり、有意に血流低下がみられた。また、未治療群と治療群の比較では、治療群で脳血流量の改善効果がみられた。ピンホールSPECTでマウス脳梗塞モデルを用いた病態の定量評価が可能である。今後、同一マウスによるin vivo繰り返し撮像を予定している。また、¹²³I標識技術はペプチドやタンパクのイメージングを可能とし、マイクロPETを補う技術になりうるということが認められる。

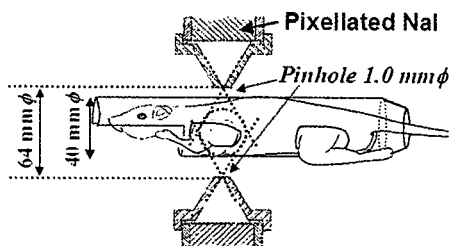


Fig. 6 Imaging geometry. Rat was set in a dedicated holder for conscious condition.

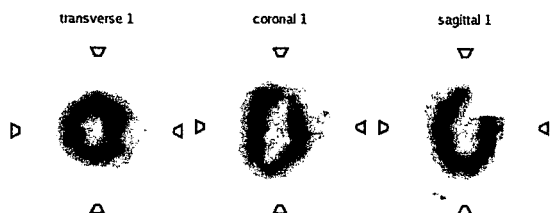


Fig. 7 Representative rat cardiac images obtained by our microSPECT and ²⁰¹Tl.

6. まとめ

創薬や治療法評価などの前臨床研究における小動物イメージングの定量的機能評価は重要な役割を担っている。高解像度を有するマイクロSPECT装置は最近の物理工学的な進歩によって小動物PET同様に定量解析が可能になったこと、検査の簡便さも手伝って今後広く普及するものと考えられる。

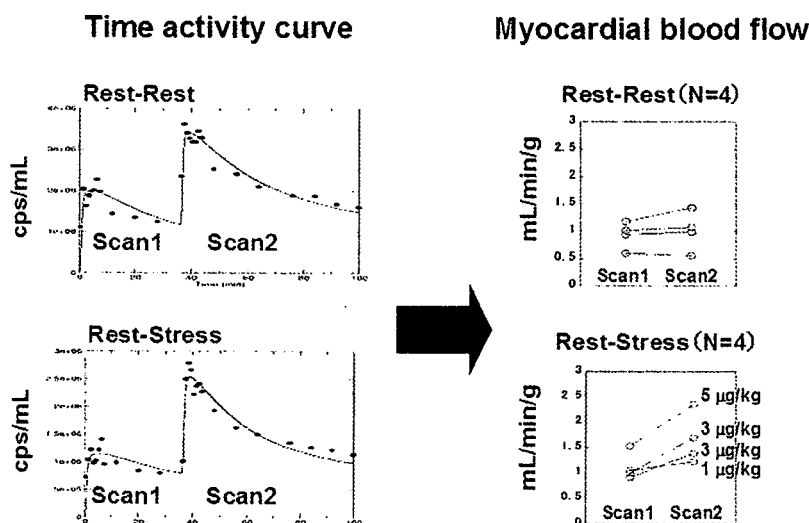


Fig. 8 Quantitation of rat myocardial blood flow using data from microSPECT. Left: Representative time activity curves in rest-rest and rest-stress studies. Right: Myocardial blood flows calculated by two-compartment model. Coronary flow reserves were assessed in rest-stress studies.

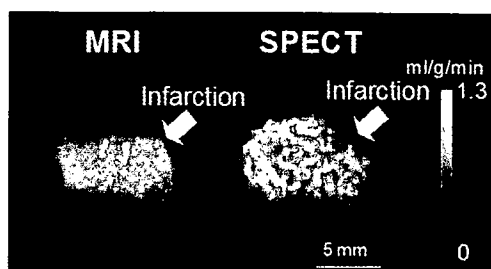


Fig. 9 Co-registered MR and SPECT images of cerebral infarction model mouse. Left: T2 weighted image obtained by MRI. Right: Quantitative cerebral blood flow image obtained by pinhole SPECT and ^{123}I -IMP.

謝 辞

本研究の一部は、独立行政法人科学技術振興機構課題番号 1702、および厚生労働科学研究費補助金「こころの健康科学研究」により実施された。

文 献

- [1] Larobina M, Brunetti A, Salvatore M: Small animal PET: a review of commercially available imaging systems. *Curr Med Imag Rev* 2: 187-192, 2006
- [2] Mickle SR, Kench P, Kassiou M et al: Small animal SPECT and its place in the matrix of molecular imaging technologies. *Phys Med Biol* 50: R45-R61, 2005
- [3] 銭谷 勉, 渡部浩司, 工藤博幸, 他: 完全データを利用したピンホール SPECT. *Med Imag Tech* 23: 9-16, 2005
- [4] Liu Z, Kastis GA, Stevenson GD et al: Quantitative analysis of acute myocardial infarct in rat hearts with ischemia-reperfusion using a high-resolution stationary SPECT system. *J Nucl Med* 43: 933-939, 2002
- [5] Schramm NU, Ebel G, Engeland U et al: High-resolution SPECT using multipinhole collimation. *IEEE Trans Nucl Sci* 50: 315-320, 2003
- [6] Beekman FJ, van der Have F, Vastenhouw B et al: U-SPECT-I: a novel system for submillimeter-resolution tomography with radiolabelled molecules in mice. *J Nucl Med* 46: 1194-1200, 2005
- [7] Zeniya T, Watabe H, Aoi T et al: A new reconstruction strategy for image improvement in pinhole SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31: 1166-1172, 2004
- [8] Watabe H, Ikoma Y, Kimura Y et al: PET kinetic analysis-compartmental model. *Ann Nucl Med* 20: 583-589, 2006
- [9] Kudomi N, Choi E, Yamamoto S et al: Development of a GSO detector assembly for a continuous blood sampling system. *IEEE Trans Nucl Sci* 50: 70-73, 2003
- [10] Acton PD, Choi S-R, Plössl K et al: Quantification of dopamine transporters in the mouse brain using ultra-high resolution single-photon emission tomography. *Eur J Nucl Med* 29: 691-698, 2002
- [11] Sohlberg A, Watabe H, Zeniya T et al: Comparison of multi-ray and point-spread function based resolution recovery methods in pinhole SPECT reconstruction. *Nucl Med Commun* 27: 823-827, 2006
- [12] 飯田秀博, 渡部浩司, 赤松哲哉, 他: SPECTを使った脳機能画像の定量化と標準化. *脳神経外科ジャーナル* 16: 742-752, 2007
- [13] Wang Y, Du Y, Mok SP et al: Towards quantitative high-resolution pinhole SPECT imaging. [Abstract] *J Nucl Med* 45(suppl 2): 110, 2005
- [14] Deloar H, Watabe H, Aoi T et al: Evaluation of penetration and scattering components in conventional pinhole SPECT: phantom studies using Monte Carlo simulation. *Phys Med Biol* 48: 995-1008, 2003
- [15] van der Have F, Beekman FJ: Penetration and scatter in channel micro-pinhole SPECT: a Monte Carlo investigation. 2004 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record 4: 2575 - 2578, 2004
- [16] Vanhove C, Defrise M, Franken PR et al: Interest of the ordered subsets expectation maximization (OS-EM) algorithm in pinhole single-photon emission tomography reconstruction: a phantom study. *Eur J Nucl Med* 27: 140-146, 2000
- [17] Metzler SD, Greer KL, Jaszczak RJ: Helical pinhole SPECT for small-animal imaging: a method for addressing sampling completeness. *IEEE Trans Nucl Sci* 50: 1575-1583, 2003
- [18] Defrise M, Noo F, Clackdoyle R et al: Truncated Hilbert transform and image reconstruction from limited tomographic data. *Inverse Probl* 22: 1037-1053, 2006
- [19] Zeniya T, Watabe H, Sohlberg A et al: 3D-OSEM reconstruction from truncated data in pinhole SPECT. 2007 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record: 4205-4207, 2007
- [20] Zeniya T, Watabe H, Aoi T et al: Use of a compact pixellated gamma camera for small animal pinhole SPECT imaging. *Ann Nucl Med* 20: 409-416, 2006
- [21] Iida H, Eberl S: Quantitative assessment of regional myocardial blood flow with thallium-201 and SPECT. *J Nucl Cardiol* 5: 313-331, 1998
- [22] Iida H, Itoh H, Nakazawa M et al: Quantitative mapping of regional cerebral blood flow using iodine-123-IMP and SPECT. *J Nucl Med* 35: 2019-2030, 1994
- [23] Iida H, Akutsu T, Endo K et al: A multicenter validation of regional cerebral blood flow quantitation using [^{123}I]iodoamphetamine and single photon emission computed tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 781-793, 1996
- [24] Maeda K, Mies G, Oláh L et al: Quantitative measurement of local cerebral blood flow in the anesthetized mouse using intraperitoneal [^{14}C]iodoantipyrine injection and final arterial heart blood sampling. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 10-14, 2000



銭谷 勉 (ぜにや つとむ)

1991年山形大学工学部情報工学科卒業。1993年山形大学大学院工学研究科情報工学専攻修士課程修了。同年㈱日立メディコ入社。2002年山形大学大学院理工学研究科システム情報工学専攻博士後期課程修了。2001-2002年日本学術振興会特別研究員。現在、国立循環器病センター研究所先進医学センター放射線医学部特任研究員。博士(工学)。小動物 SPECT、画像再構成法の研究開発に従事。1998年日本医用画像工学会論文賞。2005年日本核医学会研究奨励賞。

SPECT の定量化と標準化 Quantitative and Standardized SPECT Imaging

渡部 浩司*
Hiroshi WATABE

要 旨

SPECT 装置は、PET 装置よりも広く普及しており、分子イメージングにおいて SPECT は、ますます広く使われると考えられるが、現状、臨床利用されている SPECT 画像は、主に定性的な評価のみが行われており、分子イメージングのツールとして利用するためには、定量化と標準化を進める必要がある。SPECT の定量化、標準化のためには、精度の高い γ 線の吸収補正および散乱線補正を行わなければならない。本稿では、SPECT を概説し、SPECT の定量化および標準化のためのパッケージ QSPECT を紹介する。
キーワード：SPECT、OSEM 画像再構成、吸収補正、散乱線補正、QC

Although single photon emission computed tomography (SPECT) imaging is widely available as daily clinical application, image qualities among several SPECT cameras are not well controlled. We have developed QSPECT software package for quantitative and standardized SPECT imaging. The software is written by Java and C languages and is able to run on several platforms. This package has five features: 1) library for reading and writing several SPECT data formats, 2) iterative image reconstruction method with attenuation correction, 3) transmission-dependent convolution subtraction method to compensate scattered photons in the projection data, 4) dual table autoradiographic method to quantitate cerebral blood flow of different conditions by dual injections of radiotracer. 5) managements of BCF (Becquerel calibration factor) and CCF (cross-calibration factor) parameters for quality control purposes. By QSPECT package, SPECT imaging can be quantitative and standardized.

Key words: SPECT, OSEM image reconstruction, Attenuation correction, Scatter correction, Quality control

Med Imag Tech 26 (1): 9-13, 2008

1. はじめに

近年、分子イメージングが広く世間に認知され、分子イメージングがもたらすであろう新規薬剤開発、新しい治療・診断技術の開発に大きな期待が集まっている。分子イメージングは *in vivo* の生体内の分子をイメージングするものであるが、ラジオアイソトープを用いたイメージング装置は、その感度の高さから、古くから利用されている技術である。SPECT (single photon

emission computed tomography) 装置は、ラジオアイソトープ (radioisotope, RI) を用いたイメージング装置の 1 つであるが、しばしば比較される PET (positron emission tomography) 装置に比べ、定量性が乏しい、感度が低いなどの難点を持つが、その一方でサイクロトロンのような粒子加速器を必要とせず、PET 装置に比べ施設の規模を小さくできる。実際、2007 年 1 月の時点で PET および PET/CT 装置が国内で 354 台に対して、SPECT 装置は 1926 台ほど普及しており [1, 2]、普及率は PET 装置を大きく引き離している。分子イメージングの最終ゴールが臨床応用であることを考えると、この普及率は大きなアドバンテージである。また、SPECT 装置が一台あれば小動物から臨床まで対応でき、分子イメージング装置として、そのポテンシャルは高い。その

* 国立循環器病センター研究所先進医工学センター放射線医学部 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1] : Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute.
e-mail: watabe@ri.ncvc.go.jp
論文受付：2007 年 11 月 1 日
最終稿受付：2007 年 12 月 25 日

一方で、現在、臨床のルーチンで用いられる SPECT 画像診断は、定性的な評価のみで終わることがしばしばである。今後、分子イメージングの分野で、SPECT 装置が広く利用されるためには、単なる RI の分布を絵にする装置からの脱却を図らなければならない。さらに、近年、医療には EBM (evidence based medicine) が求められており、SPECT に関しても EBM の概念を取り入れた、定量性の向上、標準化は重要な課題である。

本稿では、SPECT 装置に関して概説し、著者らが取り組んでいる SPECT の定量化、標準化に関して紹介する。

2. SPECT の原理

前節で述べたように、SPECT 装置は RI イメージングのための装置である。RI イメージングは、RI をラベルした特定の薬剤の体内分布を体外に置かれた放射線検出器で得るものである。PET では、RI として 511keV の消滅 γ 線を放出する陽電子核種を用いるが、SPECT では、さまざまなエネルギーの核種が用いられる (Table 1)。

Table 1 Popular radioisotopes for SPECT imaging.

Isotope	Energy	Half life
^{99m}Tc	140 keV	6.01 hours
^{201}Tl	70 keV	72.9 hours
^{123}I	159 keV	13.3 hours
^{131}I	364 keV	8.04 days
^{67}Ga	93,185,300 keV	3.26 days

SPECT 装置は、 γ 線を検出する放射線検出器、検出器の前に設置された γ 線の方向を決めるコリメータ、カメラを回す回転部、そして被検者のベットからなる。被検者に投与された RI 薬剤から放出される γ 線をコリメータを通して、放射線検出器で検出する。その検出器は被検者のまわりを回転し、複数の方向からの投影データを取得する。この複数の投影データから、RI の分布を表す断層像を作成する。

PET の場合、お互いに 180 度方向に放出された 511keV の 2 本の γ 線を同時計測することにより、RI が同時計測された 2 つの検出器を結ぶ線分内に存在するとしているが、SPECT の場合は、コリメータにより γ 線の飛んでくる方向を規定している。コリメータは通常、多数の穴が開いた鉛などの γ 線の遮蔽能力の高い素材でできている。穴の開け方により、平行多孔型、ファンビーム型、ピンホール型などがある。通常、SPECT 装置には複数のコリメータが付属しており、目的とする RI の種類や、臓器によって使い分けている。SPECT 装置の大きな利点は、コリメータを変えることにより、一台で小動物のイメージング [3] から、臨床イメージングまで行えることである (Fig. 1 参照)。

3. SPECT における定量性の問題

イメージング装置の中で、RI イメージングは比較的定量性が高いといわれる。投与する放射線を 2 倍にすれば測定される放射線の量も 2 倍

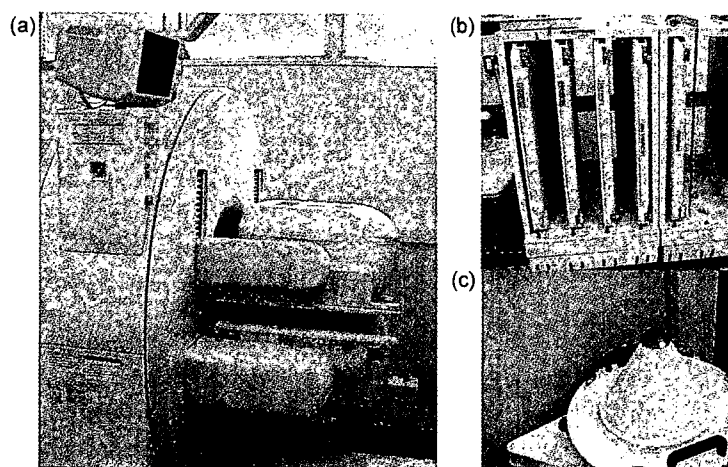


Fig. 1 GCA-7200A(Toshiba) (a), typical clinical SPECT camera which has two heads and multiple collimators(b) including pinhole collimator(c).

になり、放射能と画像の値が比例関係になっている。さらに、クロスキャリブレーションと呼ばれる補正を行うことにより、絶対定量を可能にしている。クロスキャリブレーションを行うためには、既知の放射能濃度の溶液を満たした均一ファントム（通常、アクリル製の円柱状容器を用いる）を撮像する。それを画像再構成し、画像の値と既知の放射能の間の比例定数を算出し、再構成した画像にその定数を乗じることにより、放射能濃度 (Bq/ml) を持った画像となる。この定数のことを CCF (cross-calibration factor) と呼ぶ。

理想的には、どのような被写体を撮像しても、CCFを再構成した画像に乗じることにより、放射能濃度を単位とする定量画像が得られる。しかし、とくに SPECT の場合、比較的低いエネルギーの γ 線を用いるために、体内で多くの光子が吸収される。また、体内で散乱された γ 線が、放射線検出器で検出される。この吸収と散乱は、被写体の大きさや形状に依存し、吸収と散乱の補正なしでは同一の放射能が入っている被写体であっても、大きさや形状が異なれば再構成された画像の値が異なってしまう。

研究レベルでは、すでに多くの吸収補正法や散乱線補正法が提案されている。その一方で、臨床のルーチンで使われる SPECT 装置には、絶対定量を行うという視点に欠け、煩雑あるいは計算時間のかかる精度の高い補正法を用いず、簡易的な補正法で画像を作成している場合がほとんどである。簡易法にもさまざまな方法があり、どの方法を用いるかは機器メーカーや各ユーザーに任されている。このため、得られた画像の値は、装置メーカーや機種によって大きく異なる。フランスのグループからは、SPECT を用いた多施設評価研究は困難であるという報告がされている [4]。

4. QSPECT パッケージ

QSPECT パッケージは、SPECT 画像の定量化、標準化を目的に、著者らが開発を行っているソフトウェアパッケージである。このパッケージを用いることにより、上に述べた吸収や散乱線の補正を正確に行うことが可能となる。クロスプラットフォームの開発言語である JAVA および C 言語を用いて開発されており、さまざまな

プラットフォームで稼働できる（ただし、現在配布しているのは Microsoft Windows OS 専用）。これにより、今まで SPECT 装置に付随するコンソールコンピュータのみで処理していたデータの可搬性を高めることができる。

QSPECT は以下の 5 つの要素からなる。

- 1) 複数の SPECT メーカーのデータ入出力
- 2) 吸収補正を含めた OSEM (ordered subset expectation maximization) 法 [7] による画像再構成
- 3) TDCS (transmission-dependent convolution subtraction) 法 [5, 6] による散乱線補正
- 4) DTARG (dual table auto-radiographic) 法 [8] による血管予備能の定量
- 5) SPECT 品質管理プラットフォーム

1) データの入出力

医用画像フォーマットとして、DICOM フォーマットが標準となっており、ほとんどの医用機器は DICOM フォーマットで画像を出力できる。しかし、DICOM フォーマットは画像再構成された断層像を想定しており、SPECT の投影データに関しては、SPECT 装置メーカーが独自に規定した DICOM タグを用いることが多い。そのため、汎用の DICOM ライブラリは用いることができない。QSPECT パッケージでは複数のメーカーの協力のもとに、さまざまなフォーマットに対応したデータ入出力プログラムを持つ。データの読み込み後は、すべてのデータは QSPECT 内部の画像フォーマットで共通化されており、どのメーカーの SPECT データも同一の計算方法で処理する。

2) 画像再構成

QSPECT パッケージにおいて画像再構成は、逐次近似に基づく再構成法である OSEM 法を利用している。吸収減弱のプロセスを計算に組み込むことで必要十分な精度での補正が可能となっている。吸収補正のためには、撮像対象内局所の γ 線の減弱係数をマップした吸収マップを必要とするが、その目的のために、投影データのしきい値処理により均一の吸収マップを自動的に作成できる。また、胸部のように均一な吸収マップが当てはまらない部位では、X 線 CT 画像などの外部吸収マップデータのインポートが可能である。

3) TDCS 法を用いた散乱線補正

QSPECT パッケージでは、吸収補正に利用するための吸収マップを利用して散乱線分布を推定し補正を行う TDCS 法を採用している。TDCS 法では以下の式を用いて、観測された投影データ ($g_{obs}(x, y)$, ここで x, y は投影データにおける二次元座標である) から散乱成分を除去した投影データ $g(x, y)$ を計算している。

$$g(x, y) = g_{obs}(x, y) - K(x, y) (g_{obs}(x, y) \otimes S) \quad (1)$$

$$S(r) = m_1 e^{-k_1 r} + m_2 e^{-k_2 r^2} \quad (2)$$

$$K(x, y) = 1 - \frac{1}{A - Bt(x, y)^{\beta/2}} \quad (3)$$

ここで、 $S(r)$ は距離に依存した散乱関数で、これと観測データを畳み込み積分することにより、散乱線分布の形を推定する。一方、 $K(x, y)$ は吸収マップ $t(x, y)$ に依存した散乱線成分の割合を示す関数で、これにより散乱線の量を規定する。推定された散乱線成分は、畳み込み積分のために十分平滑化されており、観測データから散乱成分を減算しても、ほとんど雑音成分を上昇させないという利点を持つ [9]。

通常、 $S(r)$ や $K(x, y)$ で使われるパラメータは ^{201}Tl や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などの低いエネルギーの γ 線のみ

を放出する核種において、SPECT 装置の種類やコリメータの種類には依存しない [6, 10]。一方、 ^{123}I は、わずかながら 1MeV 以上の γ 線を放出し、これがコリメータ内を透過するため、散乱線の分布はコリメータの材質などに影響して変化する [11]。このような場合、上式のパラメータは各 SPECT 装置、各コリメータについて、線源を用いた実験を行い、実験的に求める。

4) DTARG 法による血管予備能の定量

QSPECT では、正確な吸収および散乱線補正が可能となり、PET で用いられるコンパートメントモデルを用いた動態解析 [12] を SPECT データに対しても利用可能となる。DTARG 法は、短時間の間に複数回投与された RI 薬剤に対して、バックグラウンドの放射能を考慮した数理モデルを立てることにより、複数の状態における血流量を定量する手法である。脳の血管反応性 (血管予備能) を定量するために脳血流剤である ^{123}I -IMP を 2 回投与する。2 回目の ^{123}I -IMP 投与前に、血管拡張薬 (Acetazolamide) を投与することで血管拡張時の局所脳血流量画像が得られ、1 回目の投与時に得られた安静時局所脳血流量画像と比較することにより、血管反応性を定量できる。この方法は、血行力学的な脳虚血の重症度診断に有効である。

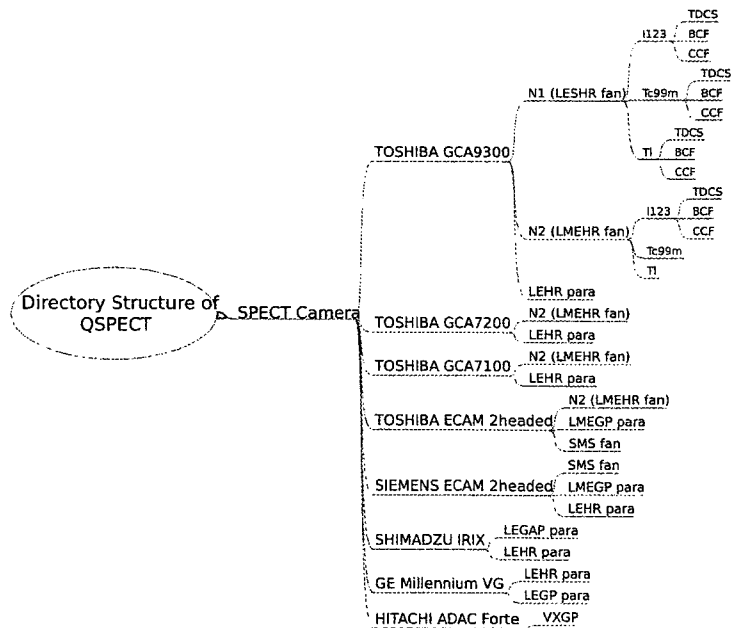


Fig. 2 Schematic diagram of directory structure of QSPECT package. QSPECT has configurations for several SPECT cameras.

QSPECTパッケージ内でDTARG法が組み込まれており、SPECT装置に依存しない脳血流の定量画像が得られる。

5) QSPECTパッケージによる SPECT品質管理

SPECTデータの標準化を行うためには、定期的にSPECT装置の品質管理をすることが重要である。QSPECTパッケージでは、品質管理のために前節で述べたCCFを計算するプログラムを組み込んでいる。さらに、BCF (Becquerel calibration factor) と呼ばれるSPECT装置間、あるいはコリメータ間の感度の違いを補正する係数を管理可能である。Fig. 2にQSPECTパッケージ内のディレクトリ構造を示すが、この図に見られるように各装置、各コリメータ、各核種で、BCF, CCF, TDCSパラメータを管理しており、この構造を利用することにより、多くのSPECT装置に対応が可能となっている。

さらに、各施設、各SPECTカメラで得られたBCF, CCFを集計したデータベースは、施設間の評価をする上で重要なデータとなり、今まで不可能とされてきたSPECTによる大規模多施設評価研究の道を拓くものである。

5. おわりに

本稿では、SPECTの標準化に関して、著者らの最近の取り組みを含めて概説した。本稿で紹介したQSPECTパッケージは、まだ発展途上であり、今後もSPECTの標準化を見据えて、さらなる発展が期待される。

文 献

- [1] PET・PET/CT・サイクロトロン設置予定施設一覧。月刊新医療。エム・イー振興協会、東京、2007、pp79-82
- [2] SPECT設置機関名簿。月刊新医療。エム・イー振興協会、東京、2007、pp182-189

- [3] Zeniya T, Watabe H, Aoi T et al: A new reconstruction strategy for image improvement in pinhole SPECT. Eur J Nucl Med Mol Imaging 31: 1166-1172, 2004
- [4] Hapdey S, Soret M, Ferrer L et al: Quantification in SPECT: myth or reality? a multi-centric study. IEEE Nucl Sci Symp Conf Record 5: 3170-3173, 2004
- [5] Hudson H, Larkin R: Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data. IEEE Trans Med Imag: 100-108, 1994
- [6] Meikle S, Hutton B, Bailey D: A transmission-dependent method for scatter correction in SPECT. J Nucl Med 35: 360-367, 1994
- [7] Narita Y, Eberl S, Iida H et al: Monte Carlo and experimental evaluation of accuracy and noise properties of two scatter correction methods for SPECT. Phys Med Biol 41: 2481-2496, 1996
- [8] Kim K, Watabe H, Hayashi T et al: Quantitative mapping of basal and vasoreactive cerebral blood flow using split-dose (123)I-iodoamphetamine and single photon emission computed tomography. Neuroimage 33: 1126-1135, 2006
- [9] Deloar H, Watabe H, Kim K et al: Optimization of the width of the photopeak energy window in the TDCS technique for scatter correction in quantitative SPECT. IEEE Trans Nucl Sci 51: 625-630, 2004
- [10] Narita Y, Iida H, Eberl S et al: Monte Carlo evaluation of accuracy and noise properties of and noise properties of two scatter correction methods for 201Tl cardiac SPECT. IEEE Trans Nucl Sci 44: 2465-2472, 1997
- [11] Kim K, Watabe H, Shidahara M et al: SPECT collimator dependency of scatter and validation of transmission-dependent scatter compensation methodologies. IEEE Trans Nucl Sci 48: 689-696, 2001
- [12] Watabe H, Ikoma Y, Kimura Y et al: PET kinetic analysis-compartmental model. Ann Nucl Med 20: 583-589, 2006



渡部浩司 (わたべ ひろし)

1995年東北大学大学院工学部卒業、博士(工学)。1993年英国ハマスミス病院MRCサイクロトンユニット、1997-1999年米国NIH PET部門に留学。1995年より国立循環器病センター研究所勤務。専門はPET/SPECT関連したトレーサー動態解析画像処理。2004年より国立循環器病センター研究所内に先進医工学センターが設立、分子イメージング関連の研究に従事する。

* * *

特集／分子イメージング時代の画像解析・
データ解析の新しい視点

—特集のねらい—

New Image Processing Technologies for Clinical and
Pre-clinical Molecular Imaging

— Aim of Special Issue —

飯田 秀博*

Hidehiro IIDA

分子イメージングの時代において臨床診断を支える画像処理の最近のトピックを紹介する目的で本特集を企画した。PET や SPECT は放射性同位元素で標識した種々の分子の動態を観察することができる。しかし生体で生命活動に関与する分子機能を正しく理解するためには、標識した化合物の体内動態を数理的に解析する必要がある、また入力関数などの計測も前提となる。体動や画像撮像にかかる多くの物理的誤差要因に対する補正が正しくなされることも前提条件である。本特集では、実際に臨床あるいは前臨床イメージング評価を行うのに本質的な新規かつ実用的な画像処理技術の概要とインパクトについて議論した上で、それぞれの分野における現在の課題を明らかにしたい。これらの活動をよく理解することで、今後さらに多くの医用画像工学研究者が最先端の分子イメージング研究に参加することを促したい。

以下のような内容で総説を依頼した。

◆光学的トラッキング法に基づく体動補正 - 越野一博 (国立循環器病センター研究所・先進医工学センター 放射線医学部) 光学的トラッキング法に基づく体動補正法の意義と特徴を概説する。従来から試みられてきた体動補正法のレビューの基に光学的トラッキング法の優位性を示す。また MRI 画像など異なるコントラストを有する画像との重ね合わせの試みを紹介し、将来の可能性についても概説する。

◆SPECT の定量化と標準化 - 渡部浩司 (国立循環器病センター研究所・先進医工学センター

放射線医学部) 正確な吸収補正と散乱線補正を組み込んだ SPECT 画像再構成プログラム (QSPECT) の開発を行い、PET に匹敵する定量精度を確保した。施設誤差を最小にする試みに基づき、初回循環移行係数の高い IMP 検査に数理モデル解析を適用することで、一回の検査で安静時と血管拡張後の局所脳血流量、血管反応性を定量評価する方法が可能になった。先行研究によって、施設を超えた再現性、施設内での再現性、PET との一致が確認でき、今後血行力学的脳虚血の病態診断への利用が期待される。

◆小動物イメージングの定量評価 (マイクロ SPECT) - 銭谷勉 (国立循環器病センター研究所・先進医工学センター 放射線医学部) 小動物イメージングにおける定量評価の意義、応用領域、入力関数の実測法などについて言及した上で、画像再構成の定量性について概論する。部分容積効果、散乱線や吸収に基づく定量性を劣化させる要因。その上で SPECT の完全性を保証する再構成について述べる。トランケーションの問題、局所を拡大する試み、ラット心筋血流量・血管反応性、マウス脳血流量の定量評価などの最新の成果を紹介する。

◆入力関数と非観血的定量化 - 久富信之 (フィンランド Turku 大学 PET センター) 入力関数とは？なぜ必要か？を概説する。SUV 法や単なる画像読影などの入力関数を推定しない診断の意義についても言及する。渡部法、Blind estimation 法、入力関数の再構成法、Di Bella 法、標準入力関数の利用、長縄法 (Logan plot) など、標準入

*国立循環器病センター研究所・先進医工学センター放射線医学部 [〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1] : Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute.
e-mail: iida@ri.ncvc.go.jp

Key words: PET, SPECT, MRI, Quantitation

力関数については IMPARG/DTARG, FDG, IMZ, 小動物定量 (マイクロ SPECT) など, これらの臨床への貢献の実例紹介. 肝血流量計測などふたつの入力関数システムの定量評価法についても触れる.

◆ 受容体機能解析法 (Dual トレーサ) - 生駒洋子 (奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科・情報生命科学専攻 生命機能計測学講座, 国立循環器病センター研究所・先進医工学センター放射線医学部) 受容体イメージングにおける定量評価法を概論した上で, K_d/B_{max} の同時評価, VT の過渡的変化の検出の必要性を述べ, その上で一回の検査でこれを実現する試みの紹介を行う.

◆ MRI Perfusion 解析の進歩 - 圓見純一郎 (国立循環器病センター研究所・先進医工学セン

ター放射線医学部) MRI を使って脳血流量を計測することのニーズ. 具体的な臨床応用範囲を述べた上で, 種々の誤差要因を紹介する. Delay, dispersion, sampling interval, 信号強度の非線形性の効果, 入力関数の spillover の問題とこれを補正する新規理論提案などを紹介する.



飯田秀博 (いいた ひでひろ)

1984 年筑波大学大学院博士課程物理学研究科修了. 理学博士. 秋田県立脳血管研究センター研究員, 主任研究員を経て1999 年より国立循環器病センター研究所・放射線医学部部長. その間, 英国ハマスミス病院客員研究員, フィンランドトウルク大学研究員, デンマークコペンハーゲン大学王立リス病院・客員教授. 現在奈良先端科学技術大学院大学連携大学院教授・大阪大学医学部連携大学院招聘教授を併任. 専門は PET, SPECT イメージングの方法論の開発と臨床応用.

* * *

OE-290

Time Lapse Analysis of Changes in Doppler-derived Index of Coronary Flow Reserve Over Time Could Reduce Frequency of Endomyocardial Biopsy

¹Shuji Hashimoto

¹Tomoko Kato, ¹Noboru Oda, ¹Akiko Mano, ¹Chizuko Kamiya, ¹Kazuhiko Hashimura, ¹Kazuo Komamura, ¹Satoshi Nakatani, ¹Masafumi Kitakaze, ²Takeshi Nakatani

¹Department of Cardiovascular Medicine, Osaka, ²Department of Organ Transplantation, Osaka

Background Invasive screenings for acute rejection by endomyocardial biopsy (EMB) in heart transplant (HTx) recipients are still standard procedures. We assessed the clinical utility of echocardiographic detection of coronary artery flow reserve (CFR) as a noninvasive method for monitoring acute rejection. **Methods** In 30 HTx recipients, 220 EBMs, right heart catheterization, conventional echocardiography and CFR recorded in within 12 hours of EMB were retrospectively reviewed. Baseline CFR in each patient was defined as a mean value of CFRs when EBMs showed grade 0 based on International Heart and Lung Transplantation criteria, and changes in CFR (δ CFR) defined as a difference between baseline CFR and that recorded when EBMs showed any grade of rejection were calculated. **Results** δ CFR increased and correlated with the biopsy-proven rejection grade, (0.3 ± 0.02 , 0.7 ± 0.11 , 1.2 ± 0.12 for grade 1a and 1b, grade 2, grade 3a or severer, respectively, $r=0.52$, $p < 0.001$). Multivariate analysis identified δ CFR as an independent predictor of greater than grade 2 rejection (odds ratio 2.2, 95% confidence intervals 1.2 to 3.9, $p < 0.001$). None of the hemodynamic variables could predict greater than grade 2 rejections. **Conclusions** δ CFR over time in a single is a good indicator of biopsy-proven acute rejection, even in a patients without hemodynamic changes. We might be able to reduce the frequency and repetition of EBMs by the use of this noninvasive method.

OE-291

Clinical Utility of Coronary Perfusion Reserve and Strain Obtained by Echocardiography for Sub-clinical Acute Rejection in Heart Transplant Recipients

¹Tomoko Kato

¹Shuji Hashimoto, ¹Chizuko Kamiya, ²Noboru Oda, ²Akiko Mano, ¹Kazuhiko Hashimura, ¹Masafumi Kitakaze, ¹Kazuo Komamura, ²Souitiroh Kitamura, ²Takeshi Nakatani

¹Department of Cardiology, National Cardiovascular Center, Osaka, ²Department of Organ Transplantation, Osaka

Background There has been a continued search for alternative diagnostic technique that does not necessitate endomyocardial biopsy (EMB) for detecting acute rejection in heart transplant (HTx) recipients. We assessed the use of coronary artery flow reserve (CFR) and strain rate imaging (SRI) obtained by echocardiography as a noninvasive methods for monitoring acute rejection. **Methods** In 33 HTx recipients, 180 EBMs, 180 CFRs and 134 SRIs recorded within 12 hours of biopsy were evaluated. **Results** CFR was reduced when EMB showed \geq grade 2 rejection defined by the International Heart and Lung Transplantation criteria compared with EMB showed $<$ grade 1b rejection (2.3 ± 0.4 vs. 3.4 ± 0.8 $p < 0.001$). Mean values of peak strain (ϵ sys) obtained from 8 LV segments were smaller when EMB showed \geq grade 2 rejection compared with EMB showed $<$ grade 1b rejection (-20 ± 12.5 vs. -31 ± 4.0 %, $p < 0.001$). The combination of CFR cutoff value of 2.67 and ϵ sys cutoff value of 26.1% showed a sensitivity of 74.7%, a specificity of 100%, and a predictive accuracy of 80.9% for detecting \geq grade 2 rejection. **Conclusions** The combination of CFR and SRI could be of clinical value in monitoring acute rejection in HTx recipients and could improve management of HTx recipients by reducing the frequency and repetition of EBMs performed.

AUC0-12 >90.1 had a significantly high risk of developing adverse events (40% sensitivity, 83% specificity). MPA C0 levels were not different between the groups. **Conclusions** Therapeutic monitoring of MMF Dose by MPA AUC0-12 reflect immunosuppressive efficiency and would be useful for avoiding acute rejection and/or adverse effects induced by inadequate MMF therapy in heart transplant recipients.

PE-271

Reduced Systolic Strain and Systolic Strain Rate Could Detect Sub-clinical Acute Rejection in Heart Transplant Recipients

Chizuko Kamiya
Tomoko Katou, Noboru Oda, Akiko Mano, Shuji Hashimoto,
Takeshi Nakatani, Masafumi Kitakaze
Cardiovascular Department, National Cardiovascular Center, Osaka

Background: Invasive screenings for acute rejection by endomyocardial biopsy (EMB) in heart transplant recipients are standard procedures. Strain rate imaging (SRI) derived from tissue Doppler Imaging (TDI) is sensitive in detecting sub-clinical myocardial abnormalities and could potentially detect sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. **Methods:** 150 EMBs and right heart catheterization were performed in 30 transplant recipients. Conventional echocardiography and TDI were recorded within 12 hours of biopsy. **Results:** According to the International Society of Heart and Lung Transplantation Criteria, 110 EMBs (Group AR-) showed grade 0 or 1a rejection, 40 EMBs (Group AR+) showed greater than grade 1b rejection. Mean values of peak systolic strain (ϵ sys) and systolic strain rate (SRsys) were smaller in Group AR+ compared with Group AR- (24 ± 5.9 vs $30 \pm 8.1\%$, $p < 0.001$, 2.12 ± 0.56 vs 3.17 ± 1.18 , $p < 0.01$, respectively). On the otherhand, early diastolic mitral annular velocity (E') and the ratio of peak early transmitral filling velocity and E' (E/E') were not significantly different between Group AR+ and Group AR-. Only when EMBs showed greater than grade 3a rejection (9 EMBs), E' was smaller and E/E' was greater than those with grade from 0 to 2 rejection (141 EMBs). Hemodynamic parameters were not significantly different between group AR+ and AR-. **Conclusions:** SRI derived from TDI could be of clinical value in monitoring sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients.

PE-270

Therapeutic Monitoring of Mycophenolate Mofetile Dose by Twelve-Hour-Area Under the Curve to Avoid Acute Rejection in Heart Transplant Recipients

¹Tomoko Kato
²Kyouichi Wada, ¹Noboru Oda, ¹Akiko Mano, ¹Chizuko Kamiya,
¹Kazuo Komamura, ¹Kazuhiko Hashimura, ³Souitiroh Kitamura,
¹Masafumi Kitakaze, ⁴Hatsue Ueda, ²Takeshi Nakatani
¹Department of Cardiovascular Medicine, National Cardiovascular Center, Osaka,
²Department of Organ Transplantation, Osaka, ³Department of Cardiac Surgery,
Osaka, ⁴Department of Pathology, Osaka

Background Mycophenolate mofetile (MMF) is widely used in heart transplant recipients. Inadequate MMF dose is a major risk factor for acute rejection or adverse effects. However, the relationship between the serum concentration of active metabolite of MMF, mycophenolic acid (MPA) and the incidence of acute rejection, monitoring of MMF dose by trough level (C0) or 12-Hour-Area Under the Curve (AUC0-12) is still controversial. We examined the impact of MPA concentration on acute rejection. **Methods** MPA C0 and AUC0-12 were routinely measured within 24 hours from endomyocardial biopsy (EMB) or when any symptoms of MMF-induced adverse effects were suspected. **Results** 186 MPA concentration measurements accompanied with EMBs were evaluated. MPA AUC0-12 were reduced when EMBs showed acute rejection (Group AR+; \geq grade 2 rejection according to ISHLT Criteria), compared with no rejection (Group AR-; grade 0, 1a or 1b) (23.9 ± 8.8 vs $46.9 \pm 18.3 \mu\text{g/hr/ml}$, $p < 0.005$). Patients with MPA AUC0-12 < 24.1 had a high risk of developing acute rejection (60% sensitivity, 94% specificity), and patients with

WS-6-3 末期心不全患者に対する治療選択としての心臓移植と補助人工心臓

中谷武嗣, 庭屋和夫, 田鎖 治, 船津俊宏, 中嶋博之, 加藤倫子, 真野暁子, 小田 登, 津田悦子, 越後茂之, 北風政史, 小林順二郎, 八木原俊克, 北村総一郎
(国立循環器病センター)

〔緒言〕当院から JOTNW に登録した移植待機例で末期心不全の治療選択を検討した。〔対象〕登録106例で、平均35歳であった。71例はLVAS装着を必要とし、東洋紡62例、植込み型9例であった。〔結果〕国内移植19例、渡航15例、死亡32例、取り消し10例、その他3例で、27例が待機中である。国内移植は全例 Status 1で17例がLVAS装着であり、待機は平均724日であった。術式は3例目から modified bicaval 法を用いた。全例退院し、1例が死亡したが、他は生存し最長7年7ヶ月である。LVAS 補助期間は平均508日で、24例が死亡し、死因は主に脳血管障害と感染症であった。10例は心機能改善を認め離脱した。〔結語〕心臓移植の成績は良好だが、施行数は少なく長期待機が必要である。LVASは長期補助可能であるが、QOL向上のため小型植込み型LVASが必要で、新しいシステムが期待される。

Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation

Toshia Fujisato¹, Seiichi Funamoto², Ken'ichi Yoshida³, Tetsuji Yamaoka¹, Tsuyoshi Kimura², Masahiro Kikuchi⁴, Yasuhiko Kobayashi⁴, Akio Kishida² and Takeshi Nakatani¹

¹National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

³Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan

⁴Takasaki Advanced Radiation Research Institute, Japan Atomic Energy Agency, Takasaki, Japan

Statement of Purpose: The reconstruction of heart valves using acellular xenogeneic scaffolds has been studied to have more durability with growth potential applicable to pediatric patients. Most of the groups developing acellular scaffolds have been using detergents and/or enzymes as decellularization media such as Triton® X-100, sodium dodecyl sulfate, deoxy-cholate, trypsin, DNase, and RNase. Since the detergents are generally cytotoxic and it takes time for their removal before the transplantation, it may lead denature of biological properties and contamination in the process. We have been developing several tissue processes for preparation of acellular grafts using ultrahigh pressure, microwave irradiation, and supercritical fluid extraction. In this paper, a novel process using γ -ray irradiation has been reported. All of these processes do not include any detergent and may be applicable to relatively large tissues.

Methods: Mouse, rat, and porcine vascular tissues were isolated and irradiated by the γ -ray of 10, 30, 100, 300, and 1000 Gy in PBS at room temperature. The dosage rates were 100, 300, 100, 300, and 1000 Gy/hr, respectively. They were then rinsed by PBS-based washing solution including DNase and RNase at 4 °C for 1 week. The tissues treated were subjected to histological study, residual DNA assay, and biomechanical study by the tensile strength measurement.

The acellular porcine aortas were implanted in subcutaneous space of Wister rats. The grafts were explanted and examined histologically after 2 weeks of implantation. All animals were carefully reared in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised in 1985).

Results / Discussion

There were no cells observed in the tissues pretreated by the γ -ray more than 300 Gy (Fig.1). The amount of DNA in the tissue was lower than 10% of that in the native tissue (Fig.2). There were no significant changes in biomechanical properties of breaking strength and elastic modulus in the acellular tissues.

There were mild tissue responses of T-cells and macrophages observed in the acellular tissue prepared by γ -ray irradiation of 1000 Gy whereas severe responses observed in the control tissue 2 weeks after the implantation to rat subcutaneous space (Fig.3).

Conclusions:

This process may have more secure acellular scaffolds for the tissue regeneration.

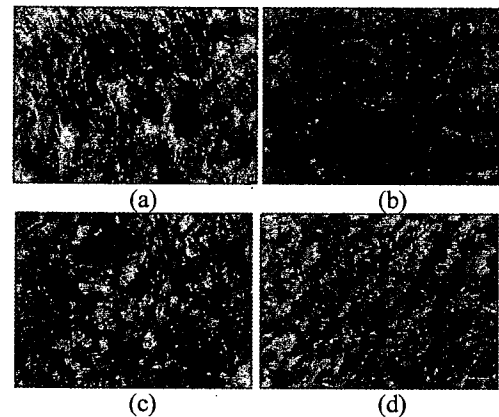


Fig.1 The (a) native and γ -ray pretreated porcine aortas of (b) 30, (c) 300, and (d) 1000 Gy followed by washing.

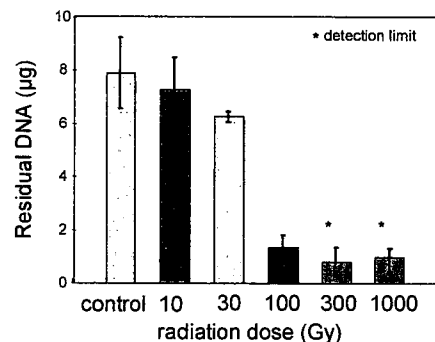


Fig.2 The amount of residual DNA in the treated aorta.

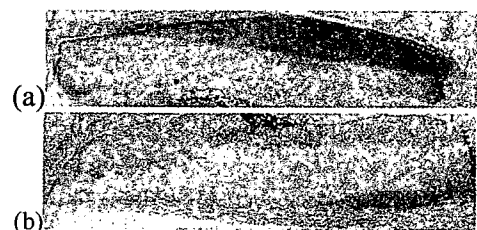


Fig.3 Anti-CD68 (macrophage) staining of (a) native and (b) acellular porcine tissues 2 weeks after implantation to rat subcutaneous space.

Acknowledgements: This study was supported by the Research Grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Abstract Number - 860

Separation of mesenchymal stem cells on a novel ligand-immobilized material

Atsushi MAHARA and Tetsuji YAMAOKA

Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center,
National Cardiovascular Center Research

Statement of Purpose: Insufficient isolation and purification of mesenchymal stem cell (MSC) is the critical problem for autologous cell plantation and tissue engineering. In general, the MSCs are isolated from the bone marrow cells in FACS or MACS system. However, the isolated MSCs are not homogeneous, and these separation procedures have the disadvantage to require some impurities such as modified antibodies. Under the clinical use, it is important to avoid the addition of dispensable reagents as much as possible. To secure the safety of MSCs transplantation in the clinical trials, it is necessary to develop a novel system for isolating the homogeneous population of MSCs. In addition, the isolated cells should maintain the high and uniform property in terms their differentiation ability. To isolate the homogeneous cells, we were focused on the surface marker density that dramatically changes with their differentiation. We designed a cell separation column that was immobilized with antibody against the cell surface marker. When the cells injected to the column, the cells roll on the inner surface of the column under a flow condition like a rolling adhesion phenomenon of the leukocyte in the blood vessel. In this work, the separation profile of established cell line (KG-1a and HL-60 cell) or MSCs on this column, and the differentiation property of the isolated MSCs were investigated.

Methods: Mesenchymal stem cells (MSCs) were collected according to a protocol modified from that supported by Tropel et al.[2]. Murine bone marrow (BM) was isolated from 10-12-weeks-old C57Bl/6 mice (Japan SLC, Inc., Japan). The MSCs were prepared by the BM cultured on fibronectin-coated dish (BD Pharmingen, Pont-de-Clax, France) with alpha-MEM (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA) containing 15% FBS, EGF 10ng/ml and PDGF-AA 10ng/ml (R&D systems, Minneapolis, USA). The cells were routinely cultured on fibronectin-coated dish in the medium. To prepare the cell separation column, poly(acrylic acid) was grafted on the surface of the polyethylene or silicone tube by ozone-induced graft polymerization. The anti-human CD34 antibody (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) or anti-mouse CD34 antibody (Serotec Ltd., Oxford, UK) was immobilized on the surface with carbodiimide activation methods. The amount of immobilized antibody was measured using horseradish peroxidase-labeled antibody. The shear flow was given by syringe pump (KD scientific Inc., Holliston, MA) in the column. The overview of this system was shown in Figure 1. The cell suspension of KG-1a (CD34 positive) and HL-60 (CD34 negative) passed through the column and fractional number and surface marker pattern of cells in each fraction were analyzed by FACS system. The adherent cells fraction of murine bone marrow cells on fibronectin coated dish (crude MSCs) was also injected to the column, and the

differentiation property of the MSCs in each fraction was evaluated.

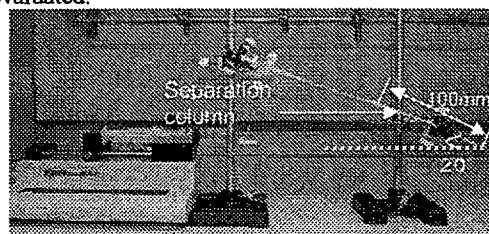


Figure 1. Photograph of cell separation system

Results/Discussion: The density of immobilized antibody was about $200\mu\text{g}/\text{m}^2$. Two types of cell lines were applied to the column, and the elution profiles were evaluated. When KG-1a (CD34 positive) cells were injected into the anti-CD34 immobilized column, about 50% of the injected cells were eluted as delayed fraction. The delayed fractions contained cells with high density of CD34 surface marker, and the content was increased with the elution time. In contrast, the delayed fraction was not observed in the case of HL-60 (CD34 negative) cells. When the KG-1a or HL-60 cells injected into the unmodified column, all cells were found on the early fractions, and the delayed fraction was not observed. These results suggest that the cells in delayed fraction interacted with the column surface in the surface marker density-specific manner under the shear flow. In the next stage, the MSCs were injected into the column, and the elution profile was analyzed. Even in this case, the delayed fractions were observed as well as the results for the established cell line. The CD34 expression level of MSCs in the later fractions was much higher than that in the first. The isolated cells were incubated on the fibronectin-coated dish with osteoblastic differentiation medium for 4 days. The expression of osteoblastic marker gene was measured by real-time PCR analysis. The expression level of isolated cells was largely increased compared with that of the original MSCs. It could be concluded that the MSCs with different stage of cell differentiation were separated by the antibody-immobilized column.

Conclusions: The subpopulations of the cells could be separated on the antibody-immobilized column in surface marker density-specific manner. The MSCs at the different differentiation stages were separated on the column, suggesting that this separation mechanism is useful for the all transplantation and the fundamental research of MSCs.

References:

1. Mahara, A and Yamaoka, T., ASAIO J., 2006; 52:16A
2. Tropel, P., Noël, D., Platet, N., Legrand, P., Benabid, A. and Berger, F., 2004; 295:395-406

Synthesis and Applications of New Contrast Agents for *In Vivo* Cell Tracking

Yoichi, Tachibana¹; Junichiro, Enmi²; Hidehiro, Iida² and Tetsuji, Yamaoka¹.

1. Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

2. Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

Statement of Purpose: Recently, there has been an increasing interest in developing various *in vivo* imaging techniques. Among them, magnetic resonance imaging (MRI) has proven to be a particularly powerful tool because of its ability to noninvasively attain the visualization of the internal structure in a high resolution. The noninvasive assessment is one of the most important factors for tracking the targeted cells in the field of cell transplantation therapy. To detect the targeted cells in distinction from the other cells, contrast agents by enhancing the signal intensity are needed. The contrast agents based on chelates of gadolinium (Gd) are the most widely applied contrast agents for general clinical MR imaging. Mainly, low molecular weight agents, such as Gd-DTPA (diethylenetriaminepentaacetate), are routinely used. However, when these agents were injected or somehow delivered into the cell for labeling them, they rapidly diffused into the extracellular space with a short retention time due to their small sizes. In order to prolong the retention of contrast agents, a novel technique should be developed. We then tried to increase the molecular size of the contrast agents using polymer which does not interact with cell membrane.

Polyvinyl alcohol (PVA) and its hydrogels have been studied extensively to produce new materials for various applications. PVA has advantages that make itself excellent candidates for biomaterials in the biomedical and pharmaceutical field. Some of these advantages include their water soluble, non-toxic and non-carcinogenic characteristics. In addition, the body distribution of PVA with different molecular weights was investigated in developing the drug delivery¹. The half-life of PVA with high molecular weights was much longer than that of the other polymers because of an insignificant interaction of PVA with cells, such as macrophages and blood cells. This weak interaction with various cells is important feature for cell tracking.

In this study, we have synthesized new contrast agents for cell tracking based on PVA and studied their behavior in the cells.

Methods: Contrast agents based on PVA were prepared by the reaction of the hydroxyl group on the PVA side chain and Gd chelates.

NIH/3T3 cells were cultured in DMEM-LG medium and labeled with the novel MRI-imaging agent by the method of electroporation. The number of surviving cells was assessed by WST-1 cell proliferation assay.

Relaxivity and MR cell studies were also performed using Tecmag Apollo NMR spectrometer equipped with a

20 mT/m max gradient set and 47 mm ID coil operating at 200 MHz, at ambient temperature (25 °C). Imaging was performed with a T1-weighted saturation recovery spin echo sequence with differing repetition times and an echo delay time of 16 ms.

Results/Discussion: Novel contrast agents were synthesized by using PVA (Mw:74800, DS:98%) and Gd. The degree of Gd introduction was 9.2, 5.3, and 2.5 mol %. The relaxivity of these PVA-Gd conjugates was slightly higher but on the same order of magnitude as Magnevist, which is typically using. This result demonstrates that these PVA-Gd conjugates can be used as effective contrast agents.

To determine the toxicity of these PVA-Gd conjugates, the synthesized PVA-Gds were added to the culture medium for NIH-3T3 cell at various concentrations, and the WST-1 cell proliferation assay was performed. All PVA-Gd conjugates did not affect the cell proliferation or viability of cells even at high concentration.

The intracellular behaviors of these PVA-Gd conjugates were examined using FITC-labeled PVA-Gd. In this case, not only the viability but also the proliferation rates of cells were not affected by the intracellularly delivered PVA-Gd. Furthermore, these PVA-Gd conjugates were retained stably in the cytosolic compartment up to 9 days, indicating that these PVA-Gd conjugates are safe materials for the cells.

MRI studies were performed to examine the ability of these PVA-Gd conjugates to enhance the contrast in the MRI image of the cells. At high concentration, enhanced image of the cells could be observed.

Conclusions: PVA-Gd conjugates were synthesized and evaluated as MRI contrast agents. The WST-1 cell proliferation assay showed that the toxicity of PVA-Gd conjugates was quite low. Moreover, these PVA-Gd conjugates have high ability as novel contrast agent for cell labeling. These results suggested that the ability of these PVA-Gd conjugates to be employed in the study of biological phenomena using MRI.

References: Yamaoka, T.; Tabata, Y.; Ikada, Y. "Comparison of Body Distribution of Poly(vinyl alcohol) with Other Water-soluble Polymers after Intravenous Administration" *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995, 47, 479-486.

細胞ローリングによる幹細胞分離技術の開発

馬原 淳、山岡 哲二

国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

MSC separation with different marker density on ligand-immobilized column

Atsushi Mahara, Tetsuji Yamaoka

Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center,

National Cardiovascular Center Research Institute

1. 緒言

間葉系幹細胞 (MSC) は、組織再生治療を実現化させる最も有力な細胞ソースとして着目されている。現在、密度勾配遠心法、FACS (Fluorescence activated cell sorter) および磁気ビーズ法を用いて MSC を分離する方法が採用されている。しかし単離した細胞懸濁液に抗体等の化学試薬が混入する危険性があること、および分化ステージの異なる MSC を分離できないことが、移植細胞を調製する上で大きな問題点である。

そこで本研究では、平面上に抗体を結合させた抗体固定化基板を作製し、細胞ローリング現象を模倣した細胞分離システムを開発した (図 (A))。この手法は、細胞表面マーカーとリガンドとの連続的な相互作用により目的の表面マーカー密度を有する細胞を分離するストラテジーである。発表では、KG-1a、HL-60 細胞を用いた細胞溶出挙動の検討、ならびにマウスより採取した MSC の分離と得られた細胞の分化効率について評価した結果を報告する。

2. 実験方法

オゾン処理したポリエチレン (内径 1mm) およびシリコンチューブ (内径 0.5mm) に対して内腔にポリアクリル酸のグラフト鎖を導入し、カルボン酸基の活性化により抗 CD34 抗体を固定化した。このカラムに対して CD34 陽性細胞である KG-1a および、陰性細胞である HL60 を通液し、FACS により回収したフラクション内に含まれる細胞数および表面マーカー密度について評価した。さらに、マウスより採取した MSC を抗マウス CD34 抗体固定化カラムにより分離した。その後、得られた各フラクションに含まれる細胞を骨芽細胞分化培地で培養後、mRNA を抽出しリアルタイム PCR 法により分化誘導効率を評価した。

3. 結果及び考察

カラム内腔に固定化されている抗 CD34 抗体量は $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ であった。抗 CD34 抗体を固定化したカラムに対して KG-1a 細胞を通液し、各フラクションに対する細胞数をプロットした結果、fraction6-8 付近に溶出時間が遅延するピークを確認した。しかし、HL60 細胞を通液した場合にはこのようなピークは確認されなかった (図 (B))。さらに、抗体を固定化していないカラムの場合でも遅延するピークは確認されなかった

ことから、表面マーカー特異的に細胞溶出時間が遅延することが示された。一方、マウス由来 MSC も同様に分離した結果、溶出時間が遅延する細胞ポピュレーションが確認された。分画した MSC を分化誘導培地で培養後、PCR 法により CBFA1, collagen1, osteopontin の遺伝子発現量を測定した。その結果、分画していない細胞に比べて分画した MSC は各遺伝子の発現が 5 - 15 倍程度の高い値を示した。即ち、本システムで MSC を分画することで分化能力の高い細胞を分離できる可能性が示唆された。

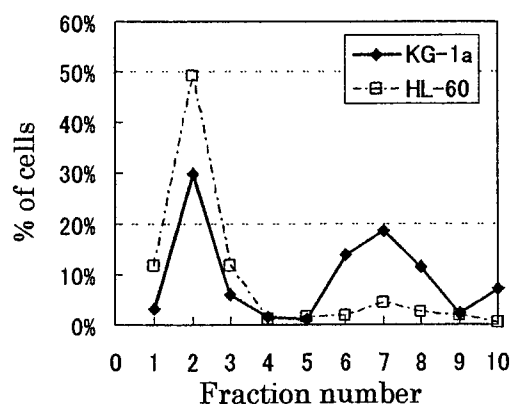
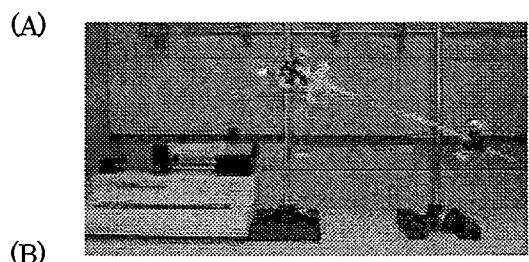


Figure (A) Photograph of ligand immobilized column system. (B) Elution profile of KG-1a (CD34⁺) and HL-60 (CD34⁻) cells using anti-CD34 antibody immobilized column. The cells were passed through the column and the number was measured by FACS analysis.

細胞追跡用 MRI 造影剤の開発

橋 洋一¹、圓見 純一郎²、飯田 秀博²、山岡 哲二¹国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部¹国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 放射線医学部²Synthesis and Applications of New Contrast Agents for *In Vivo* Cell TrackingYoichi, Tachibana¹; Jyunichiro, Ennmi²; Hidehiro, Iida² and Tetsuji, Yamaoka¹.

1. Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

2. Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

1. 緒言

これまでの虚血性心不全に対する治療戦略の一つとして細胞移植療法が注目されている。心筋障害モデルを用いた細胞の移植(例えば心筋細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、平滑筋細胞、骨髄細胞)では、心室壁の菲薄化や心拡大の抑制による心機能の改善が報告されてきた。しかし、臨床応用への研究が進む中で、組織再生における経時的な機序(移植細胞の分化、可塑性、融合など)は解明されていない。

これまでに蛍光剤を利用した細胞の標識化に関する膨大な研究があるが、大型動物を用いた長期間の細胞追跡には困難を伴う。これは、蛍光の検出深度が表層付近(約1cm)であることに起因する限界があるためである。標識細胞を長期間観察するためには、より内部の組織(移植細胞・再生組織)を非侵襲で測定することが最大の課題となる。

本研究では、MRI を用いることで細胞の追跡を行った。具体的には、ポリビニルアルコール(PVA)を主鎖とし、ガドリニウムを中心金属としたキレート側鎖を導入し、MRI による細胞の追跡を可能にする新規造影剤を開発した。

2. 実験方法

非生分解性高分子として知られるポリビニルアルコール(DP:1700, DS:98%)に対して、脱水縮合剤として1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid(DOTA)を導入し、続いてDOTA内にガドリニウムを内包させることで、導入率の異なるポリビニルアルコール誘導体を合成した。得られた誘導体のMRI用造影剤としての評価を行った。また、モデル細胞としてNIH-3T3細胞を用いて、誘導体を細胞内に導入し、細胞内における挙動、及び、細胞のMRI撮像について検討した。

3. 結果及び考察

得られたポリビニルアルコール誘導体の細胞毒性試験を行ったところ、汎用性造影剤であるマグネビストより高い安全性が確認された。さらに、エレクトロポレーション法を用いて細胞内に誘導体を導入した後に、細胞内における毒性及び滞在性について検討した。この結果、本誘導体を導入した細胞の増殖速度は、導入していない細胞と同程度であり、また、最低10日間、誘導体は細胞内に安定に滞在することがわかった(図1)。次に、誘導体を導入した細胞のMRI撮像を行ったところ、導入していない細胞に比べて輝度の増加が見られ、合成した誘導体は、細胞内でも造影効果を発揮することが明らかとなった。更に、*in vivo* イメージングについても報告する予定である。

4. 結言

本コンジュゲートは、細胞内滞在性を有する移植細胞標識用新規造影剤として有用であり、さらに、細胞種に依存せず導入が可能であることから、様々な再生移植治療における応用が期待できる。

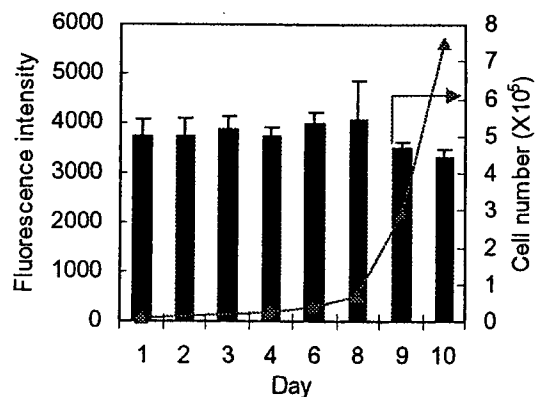


図1 細胞内での造影剤の滞在性と細胞増殖の経時変化

In vitro 血管組織再生のための灌流型バイオリアクター内 遺伝子導入システム

山本 敬介^{1, 2}, 北川 達哉¹, 平野 義明², 山岡 哲二¹ (1 国立循環器病センター研
究所 先進医工学センター 生体工学部、2 大阪工業大学大学院工学研究科)

Gene transfer in the radial-flow perfusion bioreactor for in vitro tissue regeneration

Keisuke YAMAMOTO^{1,2}, Tatsuya KITAGAWA¹, Yoshiaki HIRANO², Tetsuji YAMAOKA¹
Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute¹,
Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology²

1. 緒言

細胞と足場材料を用いた組織の三次元構築を静置培養で試みる場合、足場材料の内部まで酸素や栄養が行かないために、組織が壊死してしまうという問題が生じる。そこで、酸素や栄養をスキャホールド内部にまで供給させることができるバイオリアクター装置を用いた三次元構築が試みられている。

我々は、これまでに、灌流型バイオリアクターを用いた血管組織の再生を検討し、単層培養と同程度の細胞増殖効率を達成してきた。一方、2005年、Shea らのグループは、PLG 多孔質体に血管内皮増殖因子(VEGF)をコードしたプラスミドを付着させ、マウスに移植することで血管組織再生の亢進を報告した。¹⁾しかし、プラスミドのみでは、細胞への取り込みが悪いといったことが知られている。そこで、新たに設計した疎水化ポリカチオンキャリアーを作製した。

本研究ではバイオリアクター内で、ヒト平滑筋細胞に対して in vitro VEGF 遺伝子導入を試み、VEGF mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により評価することで導入条件の最適化を図り、組織再生速度のさらなる向上を目指した。

2. 実験方法

足場材料として 2wt% 中空ポリ乳酸スキャホールドを作製した。10 μ g のプラスミド VEGF と新規疎水化ポリカチオンキャリアーである poly(DMAPAA46-co-MPC53-co-stearylacrylate1)を用いて、アニオンとカチオンの比が 1:12 になるように中空ポリ乳酸スキャホールドをコートした。また、未コートのポリ乳酸スキャホールドをコントロールとして用いた。灌流型バイオリアクター装置を図 1 に示すように組み立て、上記の各スキャホールドを取り付け、これに平滑筋細胞 2.0×10^6 個/mL の懸濁液を 1.1 mL/cm² min の灌流速度で播種し、24 時間後、4.0 mL/cm² min の灌流速度で 48 時間培養を行った。

その後、ポリ乳酸スキャホールドに接着した平滑筋細胞から mRNA を抽出し、RT 反応を行った後、VEGF 遺伝子が導入されているか否かを確認するため、リアルタイム PCR を用いて VEGF の発現量の解析を行った。

3. 結果および考察

コートしたポリ乳酸スキャホールド上で培養した平滑筋細胞の VEGF mRNA の発現量を図 2 に示す。平滑筋細胞が持つ内在性の VEGF に比べて、コートした方では VEGF の発現量が高くなっていることが分かった。

4. 結語

リアルタイム PCR の結果よりスキャホールドに付着した平滑筋細胞はプラスミドを効率よく取り込み VEGF を発現していることが確認され、in vitro 血管組織構築効率の向上の可能性が示唆された。

参考文献

[1] Jang JH, Rives CB, Shea LD. et al. Mol Ther. 2005, 12(3), 475-8

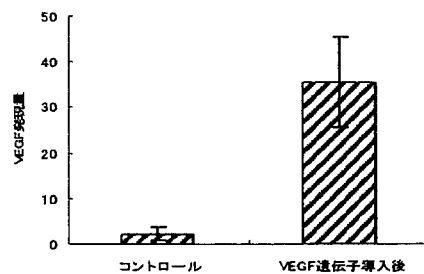
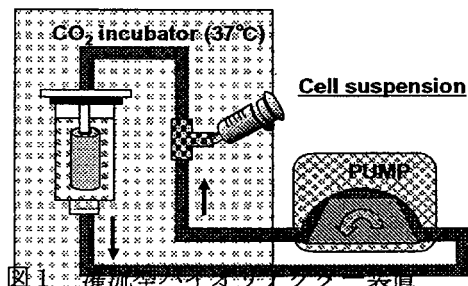


図 2 poly(DMAPAA46-co-MPC53-co-stearylacrylate1)とプラスミド VEGF をコートしたスキャホールド上で培養した SMC での VEGF mRNA の発現量

EBMs, right heart catheterization, conventional echocardiography and CFR recorded within 12 hours of EMB were retrospectively reviewed. Baseline CFR in each patient was defined as a mean value of CFRs when EMBs showed grade 0 based on International Heart and Lung Transplantation criteria, and changes in CFR (Δ CFR) defined as a difference between baseline CFR and that recorded when EMBs showed any grade of rejection were calculated.

Results: Δ CFR increased and correlated with the biopsy-proven rejection grade, (0.3 ± 0.02 , 0.7 ± 0.11 , 1.2 ± 0.12 for grade 1a and 1b, grade 2, grade 3a or severer, respectively, $r=0.52$, $p<0.001$). Multivariate analysis identified Δ CFR as an independent predictor of greater than grade 2 rejection (odds ratio 2.2, 95% confidence intervals 1.2 to 3.9, $p<0.001$). None of the hemodynamic variables could predict greater than grade 2 rejections.

Conclusions: Δ CFR over time in a single is a good indicator of biopsy-proven acute rejection, even in a patients without hemodynamic changes. We might be able to reduce the frequency and repetition of EMBs by the use of this noninvasive method.

173

CLINICAL UTILITY OF CORONARY PERFUSION RESERVE AND STRAIN RATE IMAGING OBTAINED BY ECHOCARDIOGRAPHY AS A NONINVASIVE EVALUATION FOR SUB-CLINICAL ACUTE REJECTION IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS

T.S. Kato,¹ S. Hashimoto,¹ N. Oda,¹ A. Mano,² T. Nakatani,² K. Hashimura,¹ H.I. Ueda,³ M. Kitakaze,¹ S. Kitamura,⁴

¹Department of Cardiovascular Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; ²Department of Transplantation, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; ³Department of Pathology, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; ⁴Department of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

Purpose: There has been a continued search for alternative diagnostic technique that do not necessitate endomyocardial biopsy (EMB) for detecting acute rejection in heart transplant recipients. Therefore, the purpose of this study was to assess the use of coronary artery flow reserve (CFR) and strain rate imaging (SRI) obtained by echocardiography as a noninvasive methods for monitoring acute rejection in heart transplant recipients.

Methods and Materials: In 33 transplant recipients without angiographically detectable transplant coronary artery disease, 180 EMBs, 180 CFRs and 134 SRIs recorded within 12 hours of biopsy were evaluated.

Results: CFR is reduced when EMB showed greater than grade 2 rejection defined by the International Heart and Lung Transplantation (ISHLT) criteria compared with EMB showed less than grade 1b rejection (2.3 ± 0.4 vs. 3.4 ± 0.8 $p<0.001$). Mean values of peak strain (ϵ_{sys}) obtained from 8 LV segments were smaller when EMB showed greater than grade 2 rejection compared with EMB showed less than grade 1b rejection (-20 ± 12.5 vs. -31 ± 4.0 %, $p<0.001$). The combination of CFR cut-off value of 2.67 and ϵ_{sys} cut-off value of 26.1% showed a sensitivity of 74.7%, a specificity of 100%, and a predictive accuracy of 80.9% for detecting greater than grade 2 rejection.

Conclusions: The combination of CFR and SRI could be of clinical value in monitoring acute rejection in heart transplant recipients and could improve patients' management by reducing the frequency and repetition of EMBs performed.

172

TIME LAPSE ANALYSIS OF CHANGES IN DOPPLER-DERIVED INDEX OF CORONARY FLOW RESERVE OVER TIME COULD REDUCE FREQUENCY OF ENDOMYOCARDIAL BIOPSY

N. Oda,¹ T.S. Kato,¹ S. Hashimoto,¹ C. Kamiya,¹ K. Hashimura,¹ A. Mano,¹ H.I. Ueda,² M. Kitakaze,¹ T. Nakatani,³ ¹Department of Cardiovascular Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; ²Department of Pathology, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; ³Department of Transplantation, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

Purpose: Invasive screenings for acute rejection by endomyocardial biopsy (EMB) in heart transplant recipients are still standard procedures. We assessed the clinical utility of echocardiographic detection of coronary artery flow reserve (CFR) as a noninvasive method for monitoring acute rejection in heart transplant recipients.

Methods and Materials: In 30 transplant recipients (19 male, 11 female, 9 to 91 years old, 14days to 13 years posttransplant), 220