

## 5. Discussion and Conclusions

In summary, we developed a new x-ray generator with a cerium-target tube and succeeded in producing cerium  $K\alpha$  lines, which can be absorbed easily by iodine-based contrast media. Both the characteristic and bremsstrahlung x-ray intensities increased with increases in the tube voltage, and  $K\beta$  lines were absorbed effectively by the barium sulfate filter.

In this preliminary experiment, although the maximum tube voltage and current were 65 kV and 0.40 mA, respectively, the voltage and current could be increased. Subsequently, the generator produced maximum number of  $K\alpha$  photons was approximately  $3 \times 10^7$  photons/cm<sup>2</sup>·s at 1.0 m from the source, and the photon count rate can be increased easily by improving the target.

## Acknowledgment

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (13470154, 13877114, and 16591222) and Advanced Medical Scientific Research from MECSS, Health and Labor Sciences Research Grants (RAMT-nano-001, RHGTEFB-genome-005 and RHGTEFB-saisei-003), Grants from Keiryō Research Foundation, The Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan, Japan Science and Technology Agency (JST), and New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO, Industrial Technology Research Grant Program in '03).

## References

1. 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.
2. 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.
3. 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 Rad.*, **5**, 1123-1126, 1998.
4. E. Sato, H. Isobe and F. Hoshino, "High intensity flash x-ray apparatus for biomedical radiography," *Rev. Sci. Instrum.*, **57**, 1399-1408, 1986.
5. E. Sato, S. Kimura, S. Kawasaki, H. Isobe, K. Takahashi, Y. Tamakawa and T. Yanagisawa, "Repetitive flash x-ray generator utilizing a simple diode with a new type of energy-selective function," *Rev. Sci. Instrum.*, **61**, 2343-2348, 1990.
6. A. Shikoda, E. Sato, M. Sagae, T. Oizumi, Y. Tamakawa and T. Yanagisawa, "Repetitive flash x-ray

- generator having a high-durability diode driven by a two-cable-type line pulser," *Rev. Sci. Instrum.*, **65**, 850-856, 1994.
7. E. Sato, K. Takahashi, M. Sagae, S. Kimura, T. Oizumi, Y. Hayasi, Y. Tamakawa and T. Yanagisawa, "Sub-kilohertz flash x-ray generator utilizing a glass-enclosed cold-cathode triode," *Med. & Biol. Eng. & Comput.*, **32**, 289-294, 1994.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. E. Sato, R. Germer, Y. Hayasi, Y. Koorikawa, K. Murakami, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, F. Obata, K. Takahashi, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Weakly ionized plasma flash x-ray generator and its distinctive characteristics," *SPIE*, **5196**, 383-392, 2003.
13. 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.
14. E. Sato, R. Germer, Y. Hayasi, K. Murakami, Y. Koorikawa, E. Tanaka, H. Mori, T. Kawai, T. Ichimaru, F. Obata, K. Takahashi, S. Sato, K. Takayama and H. Ido, "Weakly ionized cerium plasma radiography," *SPIE*, **5210**, 12-21, 2003.
15. 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.
16. E. Sato, K. Sato 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.

## 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 Hayashi<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フォトン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コ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 μm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Kβ線を吸収すれば、Kα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 μm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 μsであるため、完全静止画像が得られた。

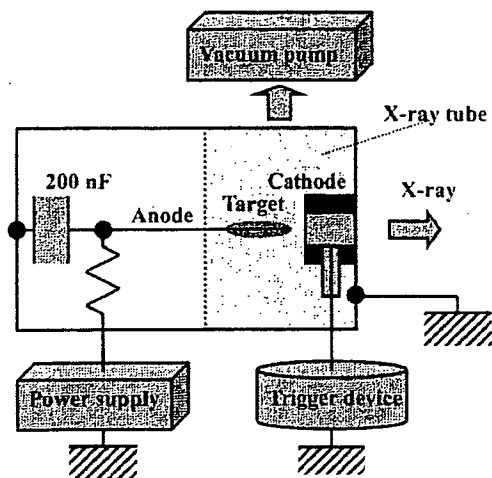


Fig. 1. Block diagram of the low photon energy plasma flash x-ray generator.

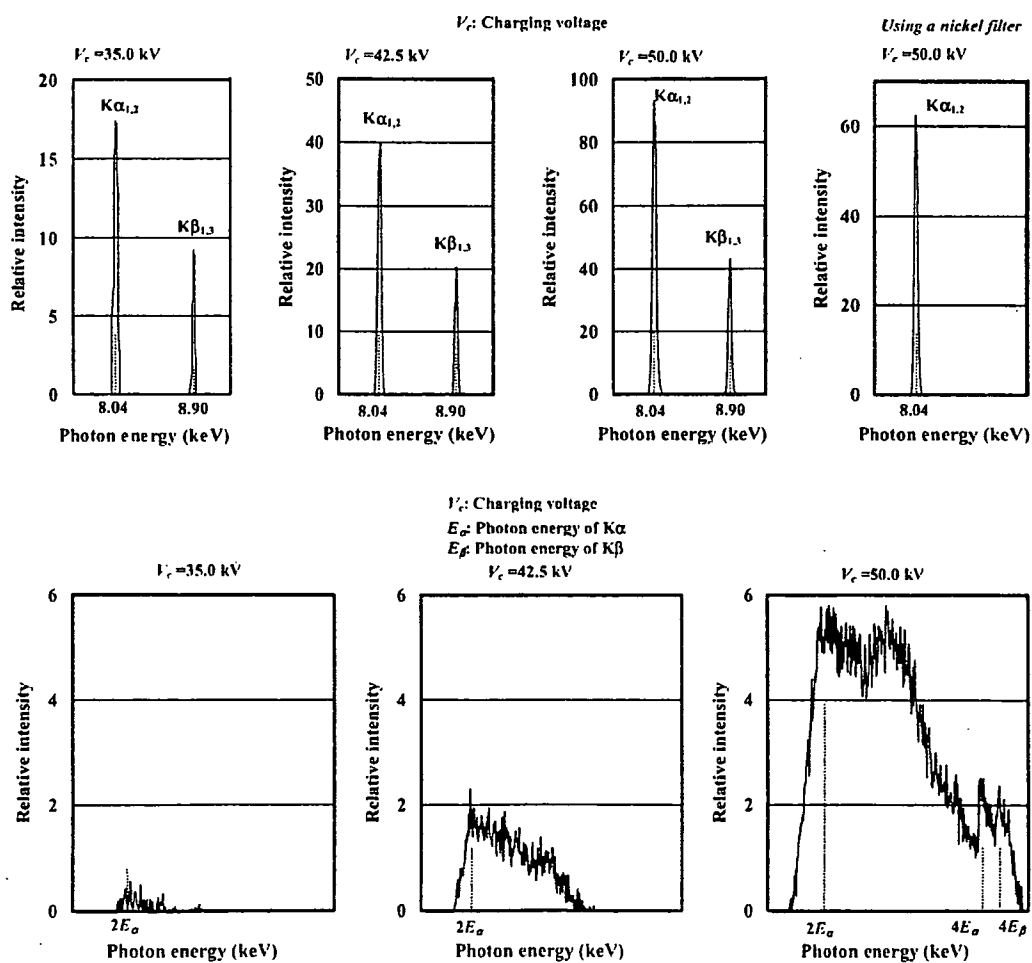


Fig. 2. X-ray spectra from weakly ionized linear plasma at the indicated conditions.

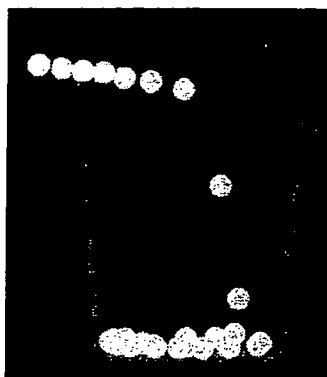


Fig. 3. Radiogram of plastic bullets falling into polypropylene beaker from a plastic test tube.

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。

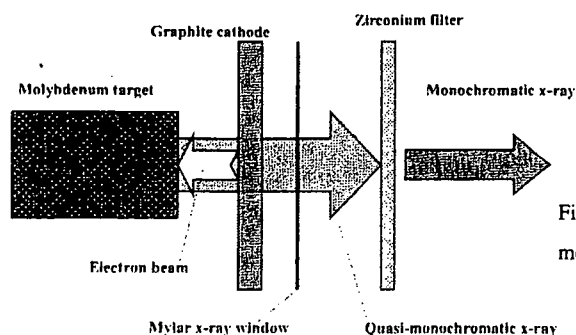


Fig. 4. K-photon irradiation using a monochromatic flash x-ray tube.

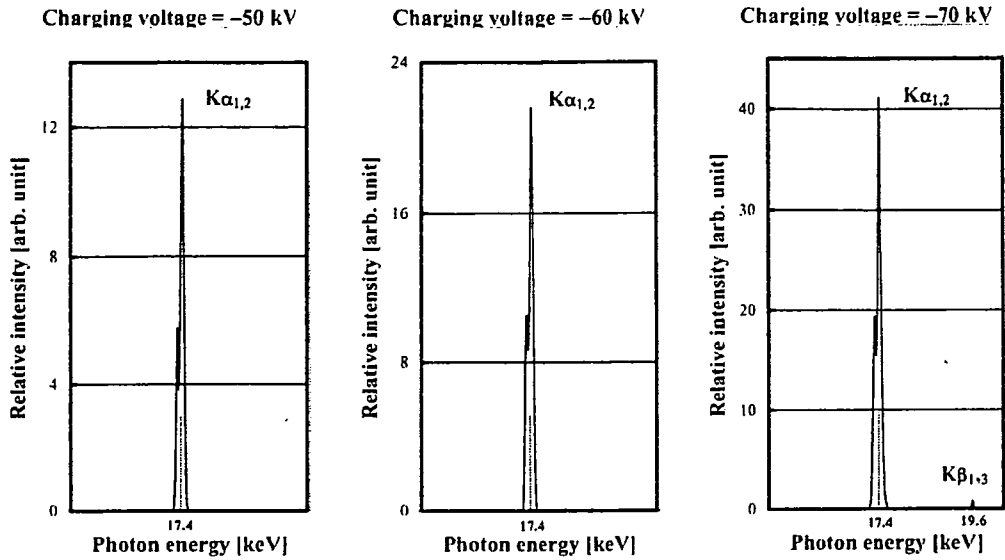


Fig. 5. X-ray spectra from a molybdenum target.

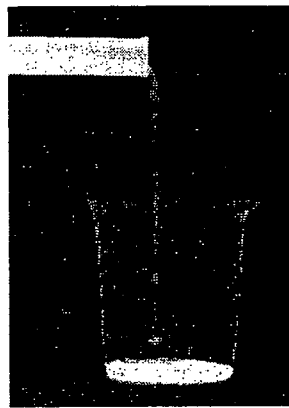


Fig. 6. Radiogram of water falling into polypropylene beaker from a glass test tube.

#### 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 $\alpha$ 線の平均フォトン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。

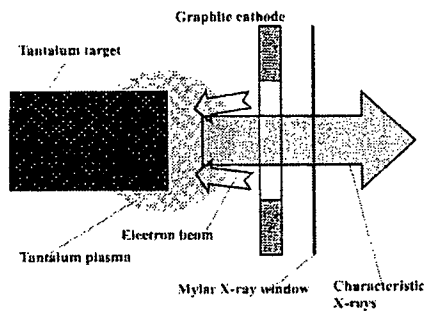


Fig. 7. K-photon irradiation from weakly ionized tantalum plasma.

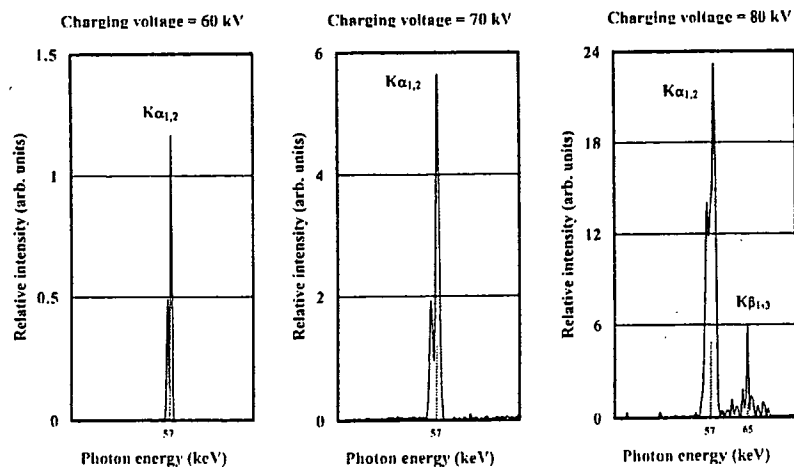


Fig. 8. X-ray spectra from a tantalum target.



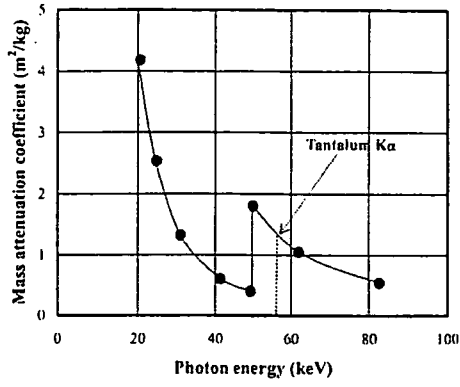


Fig. 9. Mass attenuation coefficient of gadolinium and the average photon energy of tantalum

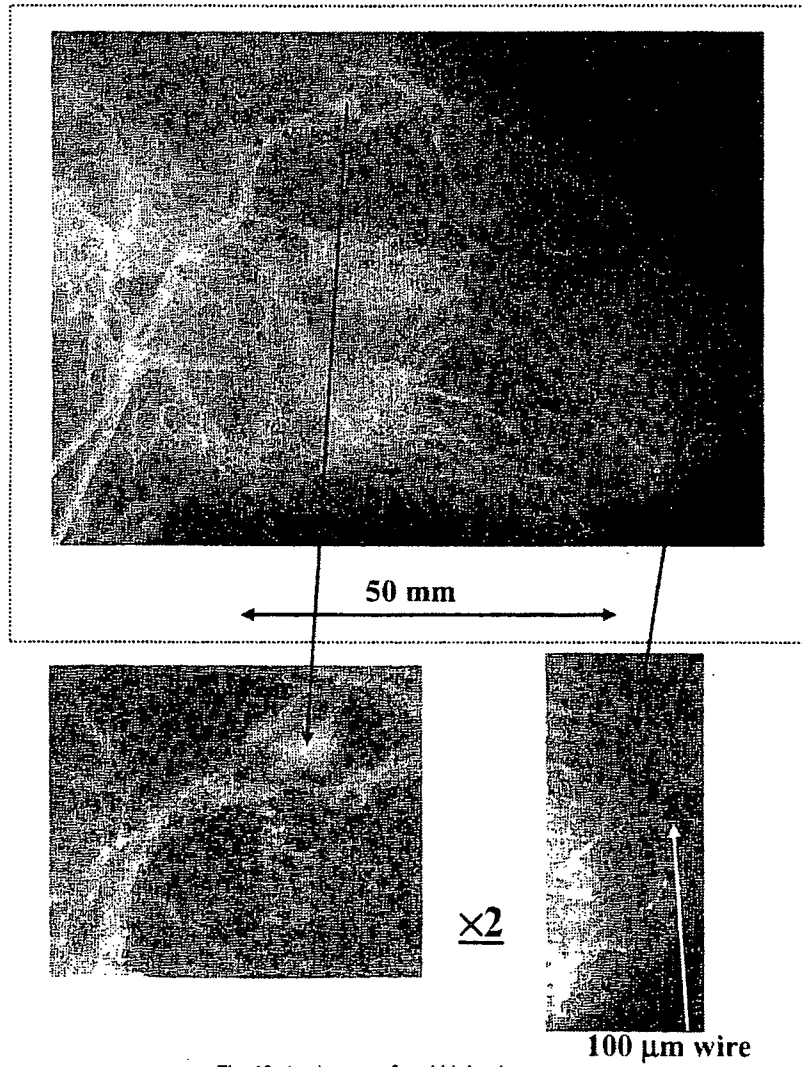


Fig. 10. Angiogram of a rabbit head

## 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 $\text{K}\alpha$ 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。

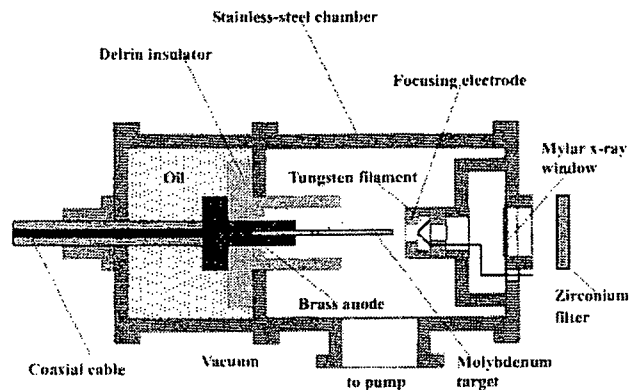


Fig. 11. Schematic drawing of the monochromatic x-ray tube.

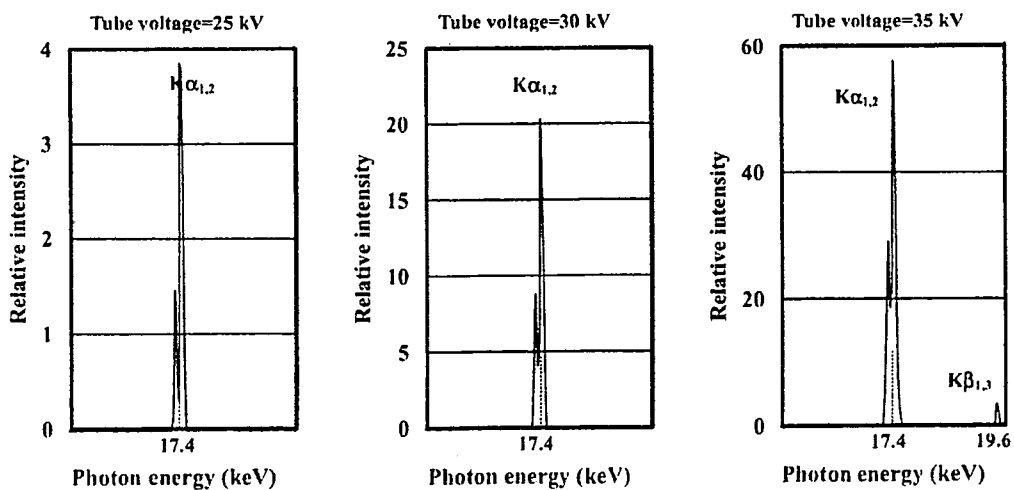


Fig. 12. X-ray spectra from the molybdenum target.

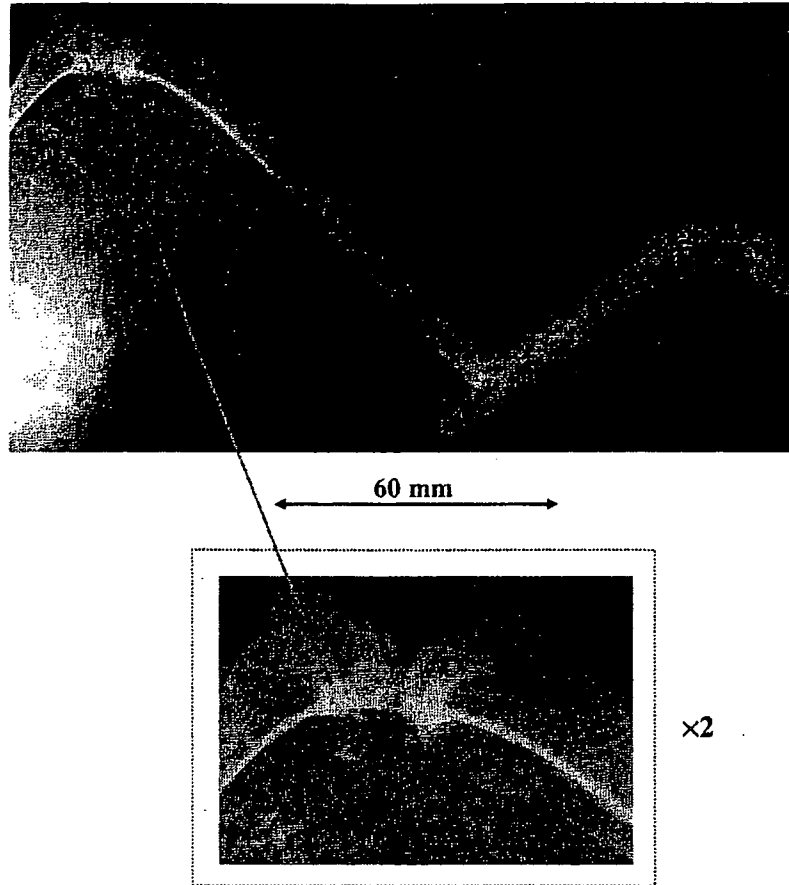


Fig. 13. Angiogram of a rabbit thigh.

#### 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)。

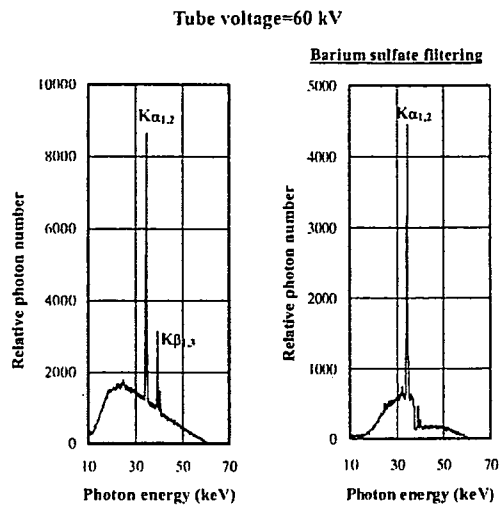


Fig. 14. X-ray spectra from a cerium target.

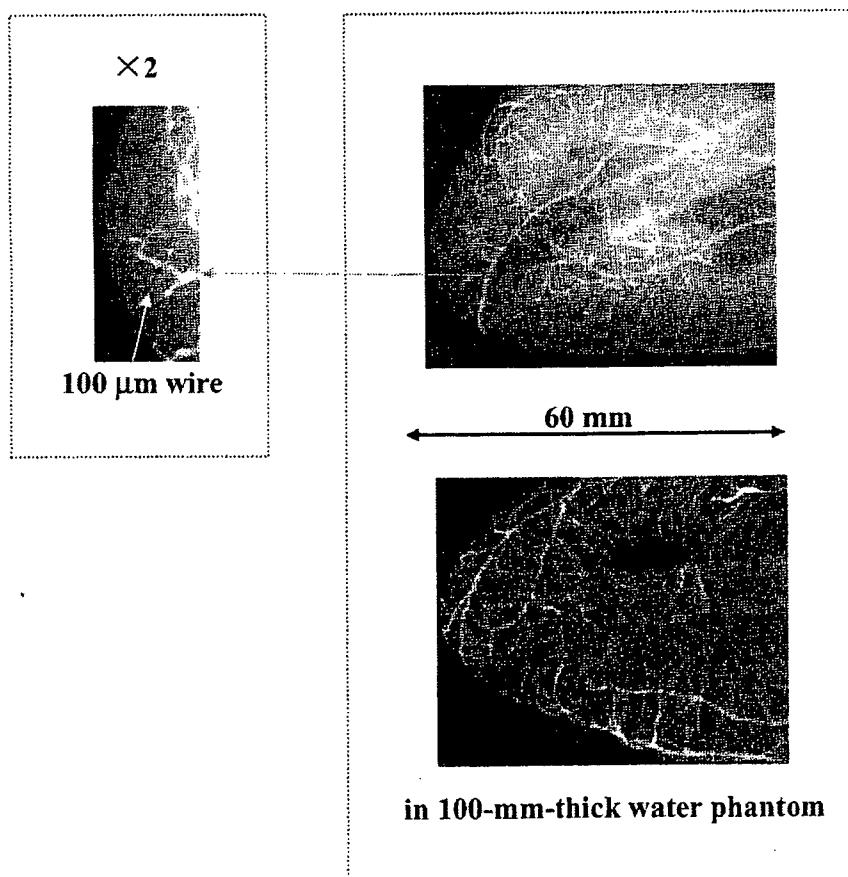


Fig. 15. Angiograms of a dog heart.

### 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)。

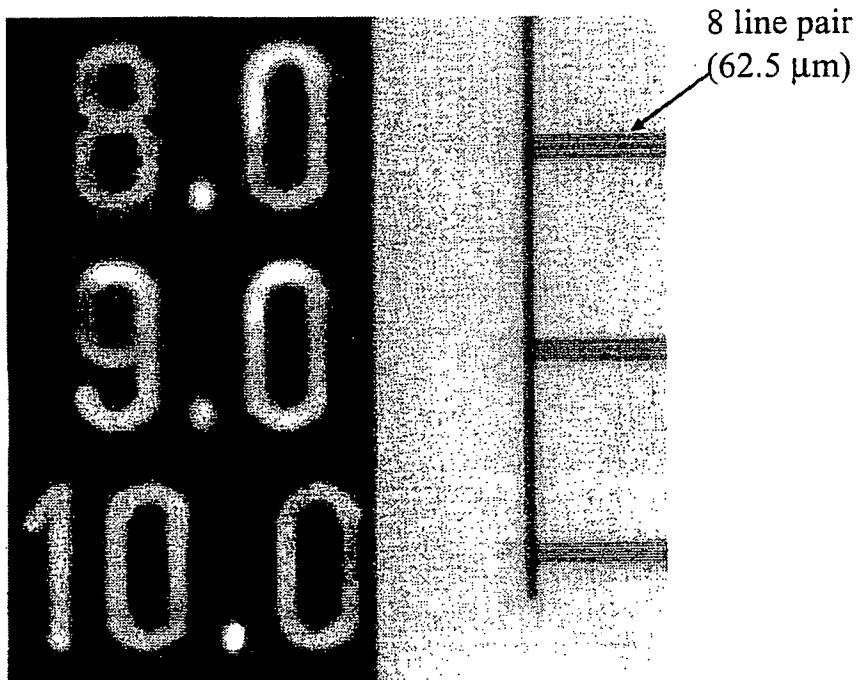


Fig. 16. Magnification radiogram of a test chart.

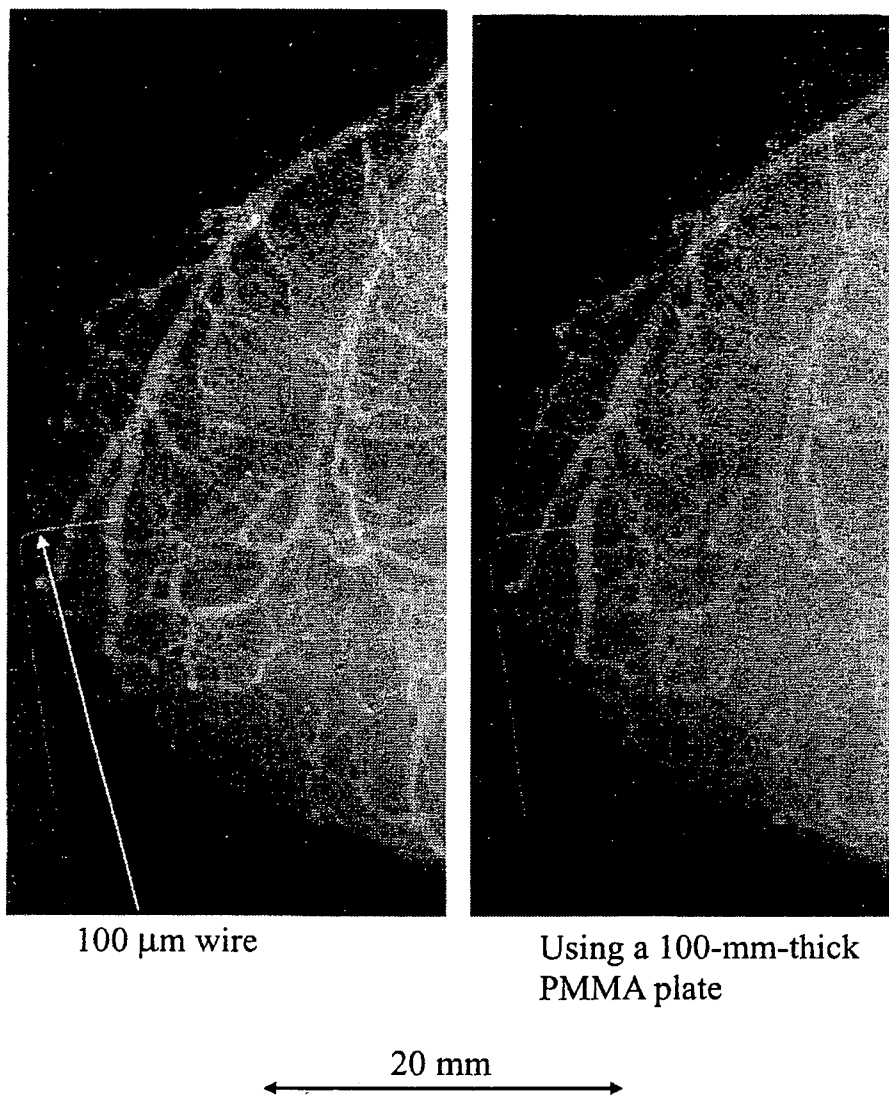


Fig. 17. Magnification angiograms of a dog heart.

#### 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  $K\beta$ 線が吸収され難く、この現象は  $K\beta$ 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.



## 心血管疾患における細胞-遺伝子ハイブリッド治療

国立循環器病センター研究所心臓生理部 宮原義典, 盛英三  
 国立循環器病センター研究所再生医療部 永谷憲歳

### はじめに

1980年代より遺伝性疾患を皮切りに、悪性腫瘍、自己免疫疾患などに対して遺伝子治療の臨床応用が開始され、現在では欠損遺伝子や変異遺伝子を補充する治療法から、生体の治癒力を補う目的の治療にも拡大施行されている。循環器疾患における遺伝子治療は、1994年に米国のタフツ大学で VEGF (血管内皮細胞増殖因子) 遺伝子の虚血肢への血管内投与という形で行われ、血管再生効果が確認された<sup>1)</sup>。以後、循環障害に対する遺伝子治療の臨床応用が多くの施設で行われている。

また、日本では1997年に臓器移植法が施行され、心臓、肺などの脳死臓器移植が可能となったが、ドナー不足のためにこれまで二十数例が施行されるにとどまっている。末期の臓器不全に対して何らかの代替治療が必要とされている中で、体性幹細胞移植や tissue-engineering などの再生医療が注目を集めている。当施設では、2004年より既存の治療に抵抗性の重症拡張型心筋症および虚血性心筋症の患者に対して、間葉系幹細胞移植の臨床研究を開始している。

われわれはこの遺伝子治療と細胞移植治療をハイブリッドし、基底 (base) となる機能細胞に補完的機能をもつ遺伝子を導入するという遺伝子-細胞ハイブリッド治療を考案した。遺伝子を格子

構造を有する生分解性ゼラチンに取り込ませ、このゼラチン-遺伝子複合体を食能を有する細胞に導入させる方法である。われわれは正常な血管床の再生という点に主眼を置き、細胞-遺伝子ハイブリッド治療を原発性肺高血圧症に応用した。

本稿では、ゼラチンを用いた遺伝子導入法、ゼラチン-遺伝子複合体、肺高血圧症に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療の研究成果について概説する。

### ゼラチンを用いた遺伝子導入法

従来用いられてきた代表的な遺伝子導入法として、プラスミド DNA そのものを組織に投与する方法、アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターを用いる方法などがあげられる。しかし、プラスミド DNA の直接投与では組織内で拡散・希釈され、細胞核内に到達する前に核酸分解酵素により分解されてしまうため、有効な治療効果を得るには大量の遺伝子を準備する必要がある。また、ウイルスベクター法は導入効率は良いものの、ウイルス蛋白の抗原性、ウイルスの突然変異の懸念など、安全性に重大な問題がある。われわれが考案した細胞-遺伝子ハイブリッド化は、*ex vivo* でウイルスベクターを用いることなく細胞への遺伝子導入が高効率に行える次世代の

[Key words] 細胞-遺伝子ハイブリッド治療, 血管新生, 肺高血圧症

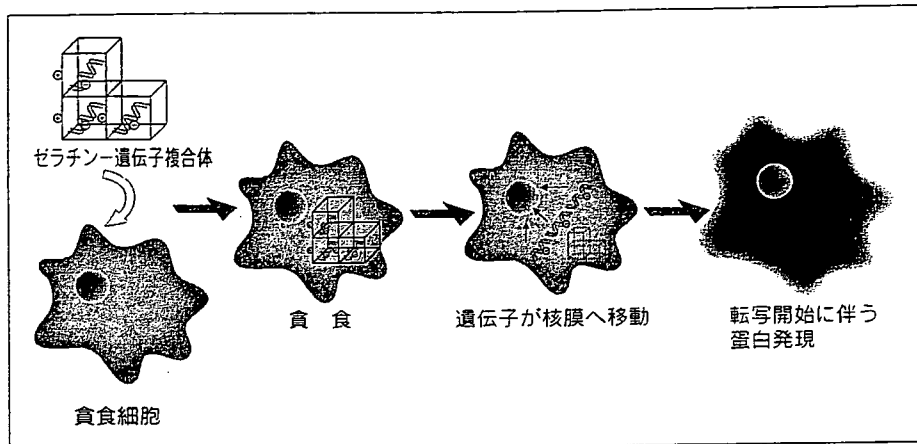


図1 ゼラチンを用いた遺伝子導入の概念図

貪食細胞がゼラチン-遺伝子複合体を取り込んだ後、ゼラチンは細胞内で分解され、封入されていた遺伝子が核膜へ向かい、蛋白発現に向けたプロセスが開始される。

遺伝子導入法である(図1)。このハイブリッド化を実現する鍵となる物質が生分解性ゼラチンである。

ブタの皮膚から抽出したゼラチンをグルタルアルデヒドの架橋反応により格子構造とし、エチレンジアミンを加えると正帯電ゼラチンが完成する<sup>2)</sup>。この正帯電ゼラチンの特徴として、

- ① 陽性に帯電しているのに、陰性に帯電しているDNAや蛋白質と数時間接触することにより容易にイオン結合し、電気的複合体を形成する。
- ② 構造が3次元格子状なので、結合物質をゲル内部に保護することにより、分解酵素の影響を受けにくくする。
- ③ 生体内で徐々に分解を受けて、この分解に伴い結合物質を徐々に放出する。
- ④ その分解速度はゼラチンの架橋度を変えることにより自由に調節できる。
- ⑤ ゼラチン-遺伝子複合体は貪食細胞(単球、マクロファージなど)に容易に貪食される。
- ⑥ 貪食細胞内で高率に遺伝子を発現する。

などがあげられる。

われわれはゼラチンを、その構造や表面電荷を自由に変えることが容易である性質から遺伝子の

担体として利用することを着想した。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内へ封入してゼラチン-遺伝子複合体を形成し、生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の分解・代謝が緩徐となり、結果として安全かつ高効率に遺伝子を導入することができると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を延長させることに成功し、遺伝子の発現率も従来の遺伝子単独投与と比較して約10倍の増加が認められた<sup>3)</sup>。

#### ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体による血管新生療法

血管内皮細胞から産生されるアドレノメデュリンは、生体内で最も強い血管拡張作用を示すペプチドであり<sup>4)</sup>、血管新生促進や抗アポトーシス作用などの多様な生理活性を併せもつ。われわれは家兎下肢虚血モデルを用いてゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の治療効果を検討した<sup>5)</sup>。大腿動脈摘除後10日目に大腿筋肉内にアドレノメデュリン遺伝子そのもの、およびゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体を投与した群を作製し、4週間後に下腿血圧、組織血流量および組

織内の毛細血管密度を調べた。いずれの治療もコントロール群と比較して著明な血管新生および血流改善効果を認めたが、ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体投与群が有意に勝っており(図 2a, b, c), 血管造影でもより多くの再生血管が描出された(図 2d)。また、筋肉組織中のアドレノメデュリン濃度は投与後2週間にわたって遺伝子単独投与群よりも高値を示した(図 2e)。この事実により、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチン内に封入して投与することで、遺伝子が虚血組織内で長期にわたり高濃度に維持され、徐放されながら遺伝子導入を果たし、より効果的な血管新生の発現が得られたと考えられる。

#### ゼラチンを介した細胞-遺伝子ハイブリッド治療

遺伝子または調節因子の投与のみでは代謝による影響があり、必要とされる場所への有効量の到達の面で限界がある。この問題を解決するために1991年に細胞を遺伝子発現の基地として用いる cell-based の遺伝子治療が Plautz らによって始められた<sup>6)</sup>。これをさらに発展させた細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、貪食能をもつ機能細胞にゼラチン-遺伝子複合体を取り込ませて遺伝子導入を行う。つまり、細胞が遺伝子発現の基地としてだけでなく、治療要素としての働きをもつことになる。細胞移植の観点から言い換えれば、移植細胞の機能強化のために遺伝子治療を併用した治療法といえる。細胞-遺伝子ハイブリッド治療は、ベクターにウイルスを使用せず、ゼラチンを用いることで安全性と効率の高い遺伝子導入を実現する。また、移植したマクロファージや単球などの貪食細胞が自身の走化性によって障害部位に特異的に集まるため、標的組織へ凝集したこれらの細胞が導入された遺伝子をもとにタンパク質を合成し、より高い治療効果を上げると考えられる。

#### 血管内皮前駆細胞を用いた原発性肺高血圧に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療

1997年 Asahara らは、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPCs) が生体内で虚血や血管内皮障害が起こったときに骨髄から末梢血中に動員され、障害部位に遊走・付着し、血管内皮細胞に分化して血管を形成することを明らかにした<sup>7,8)</sup>。また、われわれは EPCs がマクロファージのような貪食能を有し、ゼラチン-遺伝子複合体を貪食することを発見した<sup>9)</sup>。EPCs の移植は虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症の治療に有効であることが報告されており<sup>10,11)</sup>、この効果は、① EPCs 自身が血管形成に加わることで、② EPCs が VEGF などの血管新生因子を放出して局所の血管新生を促すためと考えられる。

原発性肺高血圧症の病態は、血管内皮細胞の機能障害およびそれに基づく血管作動物質の不均衡であると考えられている(図 3)。われわれは、肺血管床で強力な拡張因子として働くアドレノメデュリンを血管内投与することで、平均肺動脈圧を低下させることができることを示してきた<sup>12)</sup>。アドレノメデュリンの特異的受容体は、体血管よりもむしろ肺血管に多数存在し<sup>13)</sup>、血管平滑筋の受容体に直接作用して cAMP を増加させたり、血管内皮細胞に働き一酸化窒素を介して血管拡張を引き起こす<sup>14)</sup>。故に、原発性肺高血圧症は細胞-遺伝子ハイブリッド治療が適している疾患と考えられた。

まず、アドレノメデュリン遺伝子をゼラチンに封入して *ex vivo* にて EPCs に取り込ませた(図 4a, b, c)。この EPCs の貪食による遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いずに EPCs 自身への 50~70% という高効率の遺伝子導入を可能にした。近年アドレノメデュリンは PI3K-Akt 経路を活性化することで血管内皮細胞の生存、遊走、増殖に関与することがわかり、アドレノメデュリン遺伝子を導入することで EPCs 自身のアポトーシス抑制、増殖促進の効果も得られることが明らか

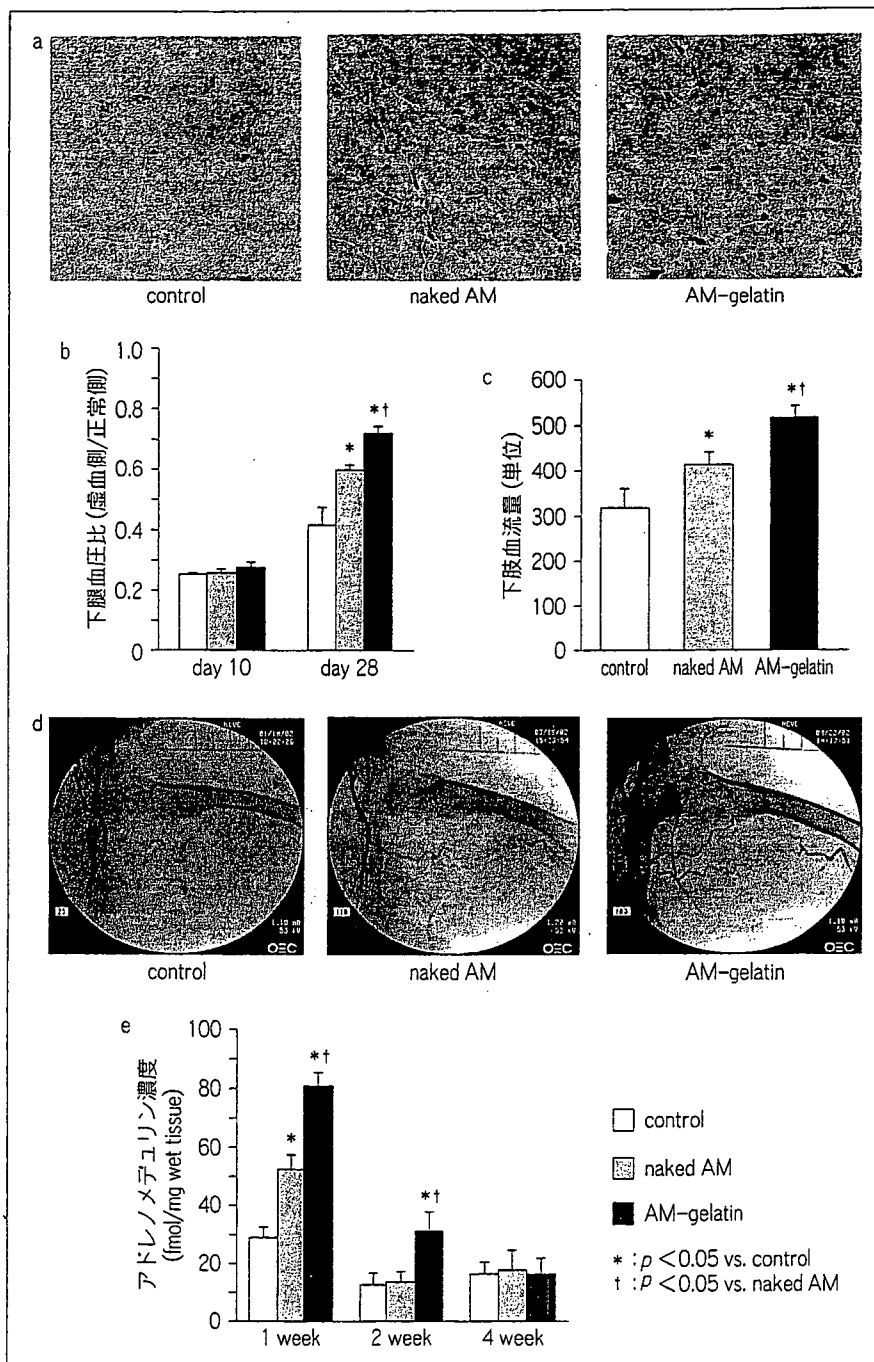


図2 セラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体の血管新生効果

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.