

Fig. 3. SEM micrographs of the electrospun P(3HB) and P(3HB-co-5 mol%-3HHx) in various conditions.

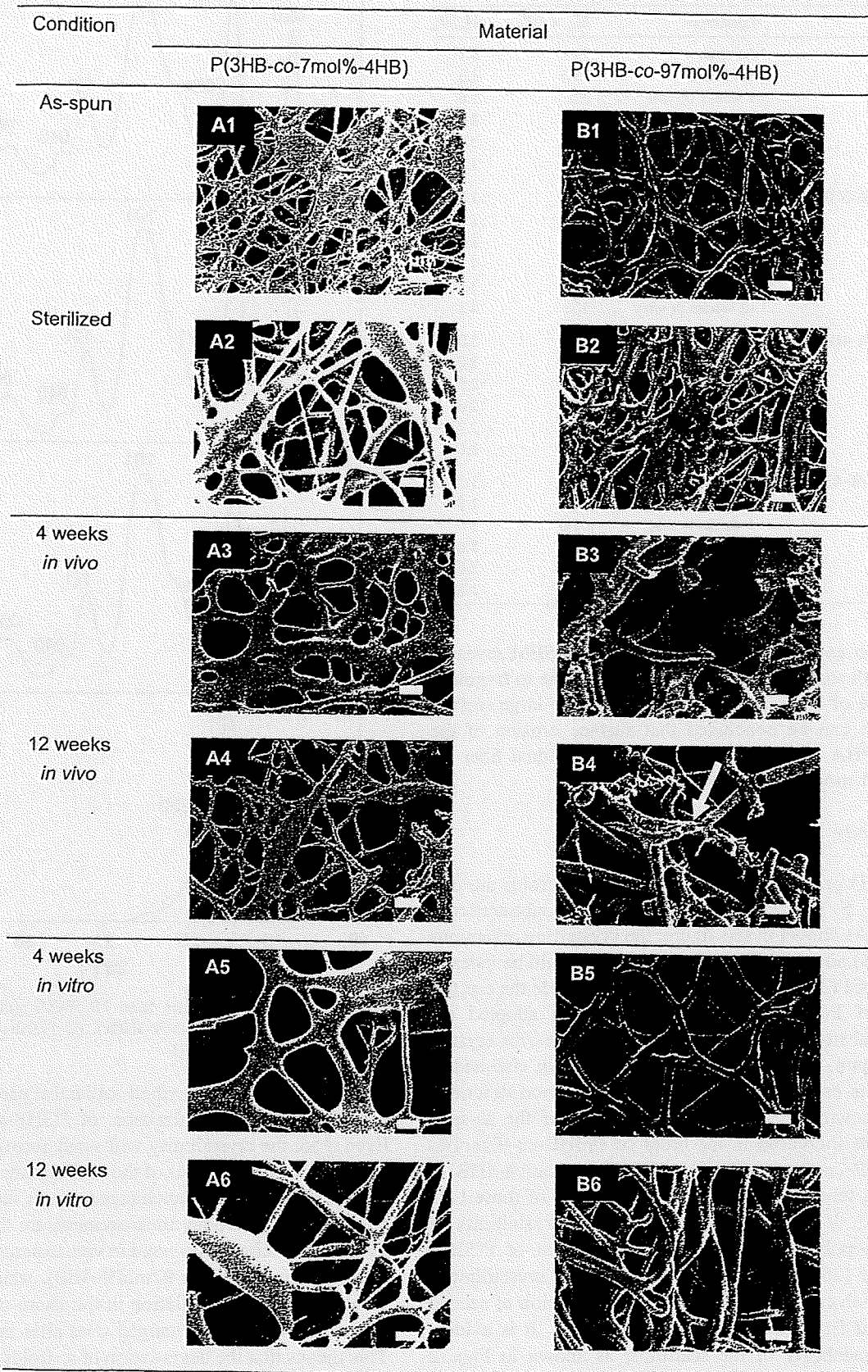


Fig. 4. SEM micrographs of the electrospun P(3HB-co-7 mol%-4HB) and P(3HB-co-97 mol%-4HB) in various conditions. The arrow shows the pores on the fiber.

Table 1
Molecular weight properties of the electrospun PHA scaffolds

Material	Condition	$M_w \times 10^5$	M_w/M_n
P(3HB)	As-spun	11	3.1
	Sterilized	9.1	3.3
	4 weeks <i>in vivo</i>	12	2.6
	4 weeks <i>in vitro</i>	11	2.6
	12 weeks <i>in vivo</i>	8.5	2.9
	12 weeks <i>in vitro</i>	17	3.3
P(3HB-co-5mol%-3HHx)	As-spun	13	3.6
	Sterilized	12	3.6
	4 weeks <i>in vivo</i>	12	3.1
	4 weeks <i>in vitro</i>	11	4.3
	12 weeks <i>in vivo</i>	11	3.3
	12 weeks <i>in vitro</i>	13	4.3
P(3HB-co-7mol%-4HB)	As-spun	7.0	3.0
	Sterilized	6.8	3.0
	4 weeks <i>in vivo</i>	6.4	2.6
	4 weeks <i>in vitro</i>	6.1	2.6
	12 weeks <i>in vivo</i>	3.9	2.7
	12 weeks <i>in vitro</i>	5.0	2.6
P(3HB-co-97mol%-4HB)	As-spun	1.7	1.5
	Sterilized	1.9	1.8
	4 weeks <i>in vivo</i>	1.0	1.6
	4 weeks <i>in vitro</i>	2.5	2.0
	12 weeks <i>in vivo</i>	1.2	2.0
	12 weeks <i>in vitro</i>	2.2	1.8

The *in vivo* and *in vitro* observations using SEM revealed that fibers with smaller diameter were more prone to fragmentation because of increased water contact due to large surface area. Thus, it can be concluded that surface erosion of the electrospun PHA scaffolds depends upon individual fiber dimensions and monomeric content.

3.2. Crystallinity

The WAXD profiles of the as-spun PHA scaffolds are displayed in Fig. 5. The profiles are the ones after subtraction of background. As shown in this figure, the crystalline reflections for the P(3HB) and the 3HB-rich copolymers could be indexed on the basis of P(3HB) α -form structure [25] while the crystalline phase of P(3HB-co-97mol%-4HB) fibers adopted the P(4HB) crystal structure [26]. From the 1D profiles, the crystallinity of as-spun, sterilized and scaffolds after *in vivo* and *in vitro* studies is estimated, according to the method described above. As shown in Fig. 6, the crystallinity of the as-spun PHA scaffolds increased in the order of P(3HB-co-97mol%-4HB) < P(3HB-co-5mol%-3HHx) \approx P(3HB-co-7mol%-4HB) < P(3HB). This tendency is the same as the case of those bulk materials [27]. It has been reported that the crystallinity of P(4HB) homopolymer is much lower than that of P(3HB) homopolymer [28]. The slight lowering of the crystallinities of the 3HB-rich copolymers is due to the exclusion of second monomer unit from the crystalline lattice [29]. It is evident that the degradability of the scaffolds, as shown in Figs. 2 and 3, strongly depends on the crystallinity.

We confirmed that the EtO sterilization did not appear to have any effect on the crystallinities of all the electrospun

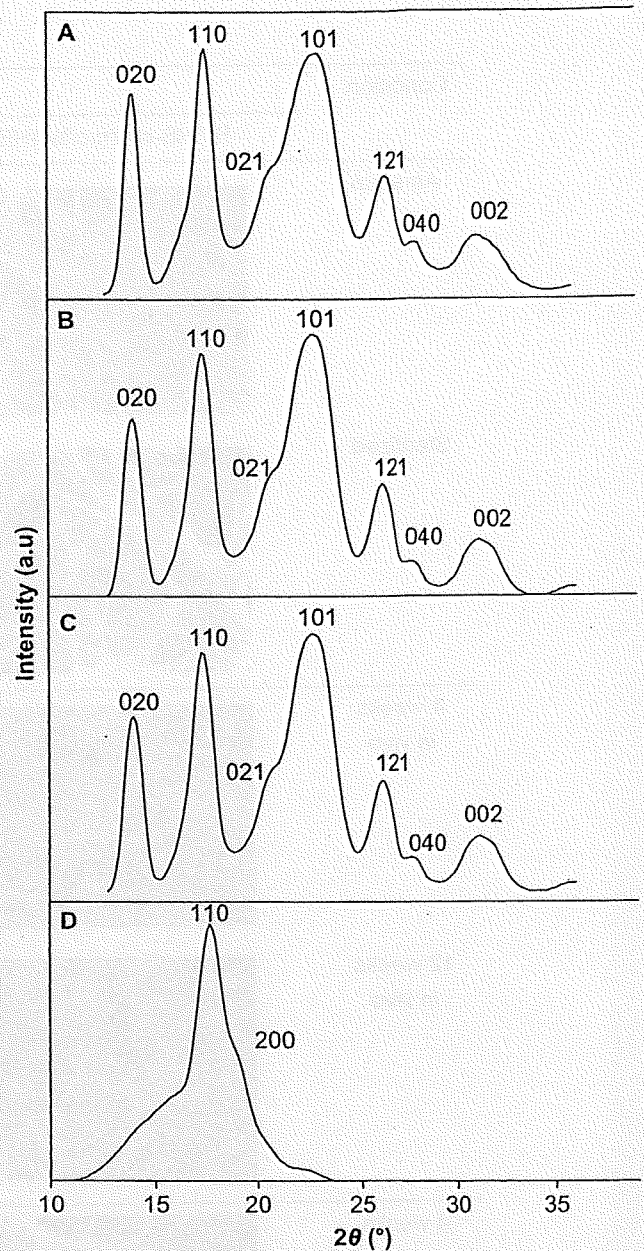


Fig. 5. Integrated 1D profiles from 2D WAXD patterns of as-spun: (A) P(3HB), (B) P(3HB-co-5 mol%-3HHx), (C) P(3HB-co-7 mol%-4HB) (D) P(3HB-co-97 mol%-4HB).

PHA scaffolds. We described earlier that partial melting may occur during the sterilization of P(3HB-co-97mol%-4HB). Even if so, the crystallinity will surely recover after the sterilization. The crystallinities of the scaffolds after the *in vivo* and *in vitro* studies remained unchanged. But, it should be noted that the scaffolds for X-ray measurements are the retrieved or maintained ones after *in vivo* and *in vitro* experiments. The crystallinity of the P(3HB-co-97mol%-4HB), which shows obvious bioabsorption or degradation in the macro-scale and SEM observations, also little changed even after implantation. This means that the degradation of scaffolds progresses preferentially from the surface of the scaffolds or interface which contacts with the tissues of rat. It is deduced that some substances such as tissue enzymes facilitate the degradation [30].

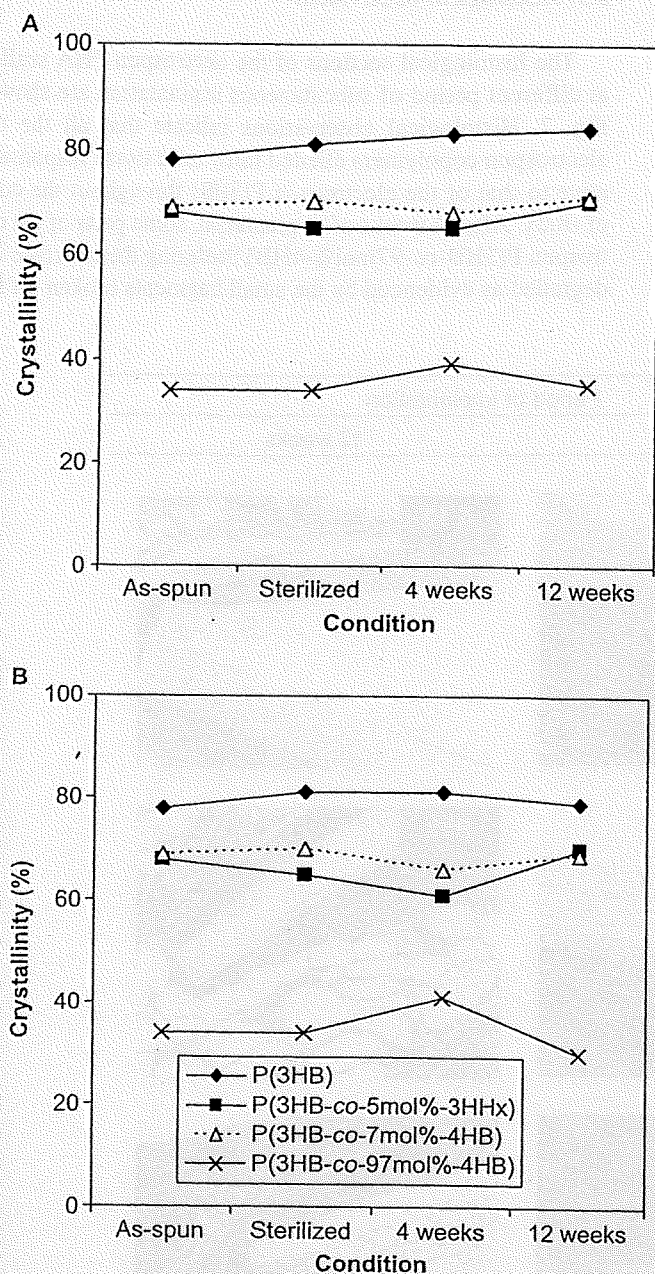


Fig. 6. Crystallinities of the electrospun PHA scaffolds in different conditions: (A) *in vivo* and (B) *in vitro*.

3.3. Molecular weight changes of electrospun PHA scaffolds

Table 1 summarizes the change in M_w and polydispersity index (M_w/M_n) for the as-spun scaffolds and scaffolds following sterilization, 4 and 12 weeks of *in vivo* and *in vitro* studies. After sterilization, all of the electrospun PHA scaffolds showed no significant differences in their molecular weight. Despite the large surface area of the fibers, PHA scaffolds remained intact in the *in vitro* study because they have higher resistance to hydrolysis in non-biological environment where specific enzymes are absent [27,31]. Furthermore, the immersion in PBS (pH 7.4) under sterile conditions up to only 12 weeks is short and

the temperature is low for any significant hydrolysis to occur. The subcutaneous implantation, however, seems to cause decrease in the M_w of PHA copolymers with 4HB unit. At 4 weeks, bioabsorption was the most pronounced for the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) with 47% loss M_w , while the M_w of P(3HB-co-7mol%-4HB) showed no decrease. Following longer implantation period, the electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) lost 43% of M_w . Unexpectedly, the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) recorded only 37% of M_w loss after 12 weeks. It was confirmed that the number of main-chain carbon atom strongly influences the rate of hydrolysis.

3.4. Mechanical properties of electrospun PHA scaffolds

Table 2 summarizes the mechanical properties of electrospun PHA scaffolds obtained. The mechanical properties of all the as-spun scaffolds were comparable to those of human skin, and hence suggest they are mechanically stable in supporting regenerated tissues. The Young's modulus of the as-spun scaffolds increased in the order of P(3HB-co-97mol%-4HB) \ll P(3HB-co-7mol%-4HB) $<$ P(3HB) $<$ P(3HB-co-5mol%-3HHx). Low Young's modulus, that is, high elasticity is a characteristic property in rubber-state amorphous polymers. Accordingly, this

Table 2
Mechanical properties of the PHA scaffolds

Material	Condition	Mechanical properties	
		Tensile strength (MPa)	Young's modulus (MPa)
P(3HB)	As-spun	17	223
	Sterilized	15	234
	4 weeks <i>in vivo</i>	12	182
	4 weeks <i>in vitro</i>	14	220
	12 weeks <i>in vivo</i>	15	152
	12 weeks <i>in vitro</i>	13	194
P(3HB-co-5mol%-3HHx)	As-spun	15	277
	Sterilized	12	272
	4 weeks <i>in vivo</i>	12	268
	4 weeks <i>in vitro</i>	13	208
	12 weeks <i>in vivo</i>	ND ^b	ND ^b
	12 weeks <i>in vitro</i>	15	230
P(3HB-co-7mol%-4HB)	As-spun	8	184
	Sterilized	8	139
	4 weeks <i>in vivo</i>	ND ^b	ND ^b
	4 weeks <i>in vitro</i>	8	163
	12 weeks <i>in vivo</i>	ND ^b	ND ^b
	12 weeks <i>in vitro</i>	9	110
P(3HB-co-97mol%-4HB)	As-spun	13	9
	Sterilized	15	16
	4 weeks <i>in vivo</i>	4	12
	4 weeks <i>in vitro</i>	11	14
	12 weeks <i>in vivo</i>	ND ^b	ND ^b
	12 weeks <i>in vitro</i>	14	16
Skin ^a		5–30	15–150

^a Data obtained from Ref. [13].

^b Not determined as the retrieved scaffolds from rat had cracks on the surface that prevented tensile test.

indicates that the P(3HB-co-97mol%-4HB) fibers are more amorphous than the other scaffolds, and this is consistent with the WAXD results. The distinct mechanical properties of the PHA could find different use as scaffolds for tissue engineering. For example, the 3HB-rich scaffolds which are more rigid could serve as preferential substrates for directional cell migration [32] while the compliant 4HB-rich scaffolds could be used to promote cell motility [33]. The EtO sterilization and the immersion in PBS buffer little affected the mechanical properties of all the scaffolds.

3.5. Histological observation

The histological sections of the electrospun PHA scaffold at different period of subcutaneous implantation are shown in Fig. 7. Histological observations indicate that all the three electrospun copolymers elicited fairly mild tissue response relative to that of the electrospun P(3HB) throughout the course of study. After 4 weeks of implantation, some parts of the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) bordering the interface were degraded as evidenced by the small fragments broken off from

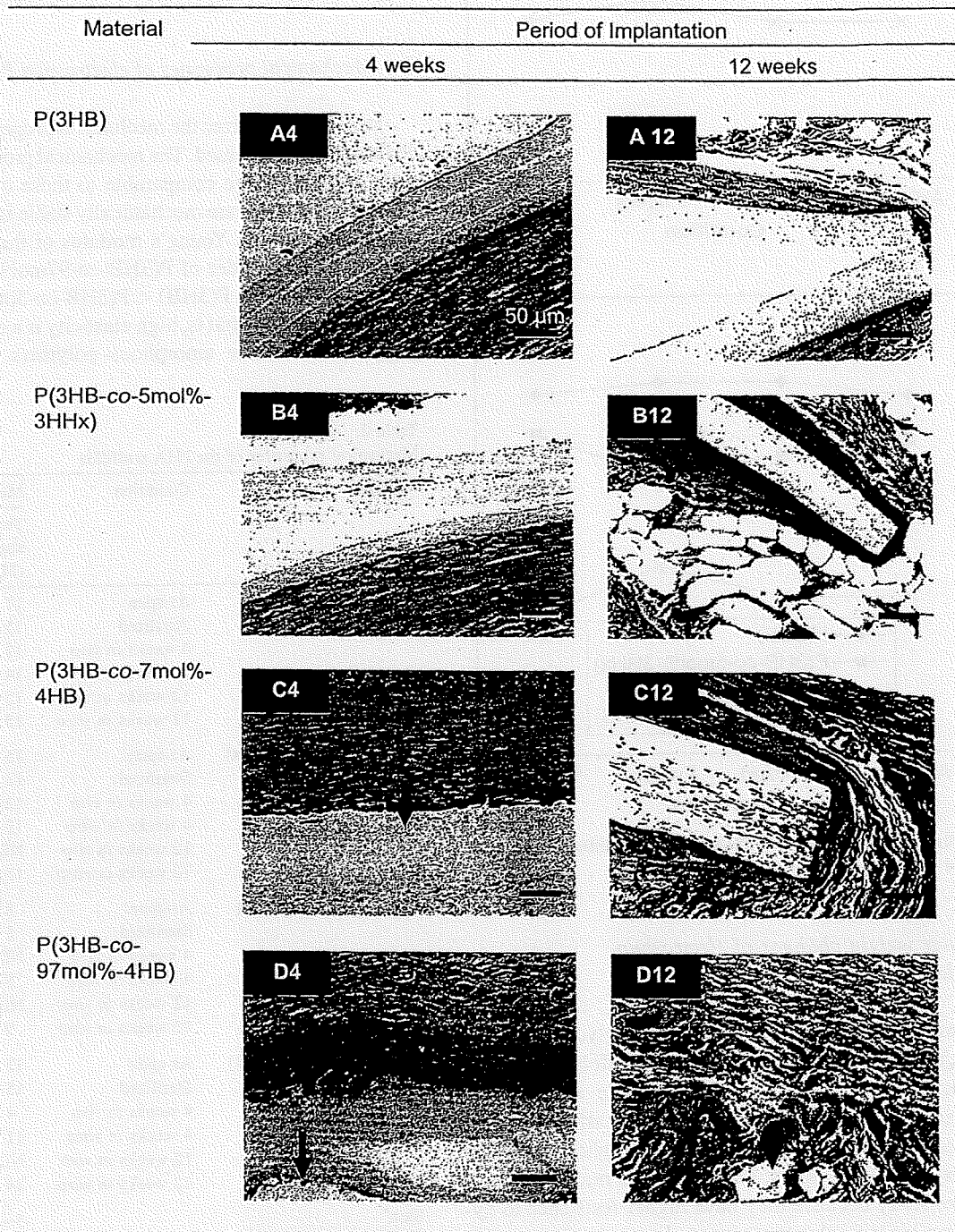


Fig. 7. Histological sections of the electrospun PHA scaffolds at different period of subcutaneous implantation. Arrows indicate the polymer surface.

the main scaffold (Fig. 7D4). More macrophages were found to be present along the interface connected to this copolymer in comparison to the electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) and P(3HB-co-5mol%-3HHx) (Fig. 7B4 and C4). This phenomenon is desirable during wound healing because the presence of macrophages is necessary for the regeneration of many cell types [34]. The presence of thin connective tissue surrounding the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) was also observed.

The most promising finding was the tissue response after 12 weeks of implantation for the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB). No fibrous encapsulation was observed around the degraded copolymer and there was also a substantial drop in the number of inflammatory cells (Fig. 7D12). This observation is similar to a study done on the biocompatibility of P(4HB) implanted subcutaneously in rats by Martin et al. [35], that reported minimal inflammatory responses. In this study, the number of inflammatory cells surrounding the electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) and P(3HB-co-5mol%-3HHx) did not appear to have lessened. The muscle cells surrounding these two scaffolds appeared compact as a result of inflammatory reaction (Fig. 7B and C). After 12 weeks of implantation, the number of macrophages bordering the electrospun P(3HB) increased. Inflammation was obvious due to the compacted muscle cells surrounding the scaffold. The difference in tissue response to the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) and the electrospun scaffolds with higher molar fraction of 3HB reflected their distinct physical properties. It has been reported that rigid polymer, such as P(3HB), elicit acute inflammatory reaction because it exerts a continuous mechanical stimulus to the surrounding tissues of the implants [36]. Although the tissue response to the electrospun P(3HB-co-7mol%-4HB) and electrospun P(3HB-co-5mol%-3HHx) was slightly more pronounced than that of the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB), the overall local tissue response to all three copolymers was found to be mild. The results have confirmed the biocompatibility of all three types of electrospun PHA copolymers.

3.6. Bioabsorption mechanism

The results from various analyses clearly demonstrated that the bioabsorption rate of the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) was the fastest relative to the other two PHA copolymers. Three possible reasons for this observation are as follows: Firstly, the P(3HB-co-97mol%-4HB) with low crystallinity is more susceptible to bioabsorption as water and enzymes penetrate easier into the amorphous regions. Secondly, previous studies have established that macrophages are able to phagocytize PHA *in vitro* [37,38] and free radicals, acidic products or enzymes produced by these cells may also accelerate the degradation [39]. As seen in Fig. 7, the number of inflammatory cells was the most concentrated at the interface of electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB) suggesting their active part in the bioabsorption process. Thirdly, possibly the enzymatic degradation by lipase also contributed to the rapid bioabsorption of the electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB). PHA can be enzymatically degraded by PHA depolymerases, but there is no

evidence to date that these are present *in vivo* [1]. P(4HB) was found to be also highly susceptible to lipase hydrolysis as opposed to P(3HB) [40]. Besides having good mechanical properties and biocompatibility, it is desirable for a medical implant to show good bioabsorption after its primary function has been fulfilled. The persistence of polymer at a wound healing site may lead to chronic inflammation as shown by the slowly degrading P(3HB) patches that elicited a long-term (greater than 2 years) macrophage response [41]. Hence the fast bioabsorption rates of the electrospun PHA containing 4HB have confirmed their potential in the application for medical implants.

4. Conclusion

In this study, electrospinning proved to be a simple and adaptable fabrication technique in producing constructs with dimensions approaching the native profile of ECM. Sterilization did not cause discoloration and damage to the PHA scaffolds. SEM revealed that both the *in vivo* and *in vitro* surface erosion of the electrospun PHA scaffolds progressed dependently on the individual fiber dimensions and monomeric contents. The mechanical properties demonstrated by all samples were comparable to those of human skin thus suggesting that their structures are able to provide sufficient biomechanical support. The electrospun scaffolds consisting of high 3HB content had higher degree of crystallinity and thus, they showed slower bioabsorption rate. GPC revealed that the *in vitro* degradation of the electrospun PHA scaffolds proceeded at a much slower rate in comparison to the *in vivo* bioabsorption. Histological evaluation showed that subcutaneous implantations of the electrospun PHA scaffolds were well tolerated *in vivo* as the tissue response continued to be very mild throughout the course of the study. Our results revealed that by changing the molar fraction of monomers in the PHA copolymers, it is possible to create tissue-engineering scaffolds that are tailor-made to meet the various needs in regenerating different cell type. The electrospun PHA copolymers proved to be promising biomaterials for scaffolds because of their biodegradability, flexible mechanical properties and excellent biocompatibility.

Acknowledgement

This work was supported by a Grant-in Aid for Scientific Research (B) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan (No.19350075) (to T. Iwata) and by a grant for Ecomolecular Science Research II provided by RIKEN Institute.

References

- [1] Williams SF, Martin DP. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In: Steinbüchel A, editor. Series of biopolymers in 10 volumes, vol. 4. Wiley/VCH/Verlag; 2002. p. 91–121.
- [2] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005;26:6565–78.
- [3] FDA clears first of its kind suture made using DNA technology. Available from: FDA News <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01560.html>; 2007 February 12 [accessed 25.04.07].

- [4] Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 1990;54:450–72.
- [5] Doi Y. *Microbial polyesters*. New York: VCH; 1990.
- [6] Kato M, Bao HJ, Kang CK, Fukui T, Doi Y. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996;45:363–70.
- [7] Hocking PJ, Marchessault RH. Biopolyesters. In: Griffin GJL, editor. *Chemistry and technology of biodegradable polymers*. London: Chapman & Hall; 1994. p. 48–96.
- [8] Nelson T, Kaufman E, Kline E, Sokoloff L. The extraneural distribution of gamma-hydroxybutyrate. *J Neurochem* 1981;37:1345–88.
- [9] Taylor MS, Daniels AU, Andriano KP, Heller J. Six absorbable polymers: *in vitro* acute toxicity of accumulated degradation products. *J Appl Biomater* 1994;5:151–7.
- [10] Iwata T, Tsunoda K, Aoyagi Y, Kusaka S, Yonezawa N, Doi Y. Mechanical properties of uniaxially cold-drawn films of poly((R)-3-hydroxybutyrate). *Polym Degrad Stab* 2003;217–24.
- [11] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci* 2000;25:1503–55.
- [12] Griffith LG. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci* 2000;961:83–95.
- [13] Zong X, Bien H, Chung CY, Yin L, Fang D, Hsiao BS, et al. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* 2005;26:5330–8.
- [14] Li WJ, Laurencin CT, Catterton EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Res* 2002;60:613–21.
- [15] Kim J, Reneker DH. Mechanical properties of composites using ultrafine electrospun fibers. *Polym Composites* 1999;20:124–31.
- [16] Lee WH, Azizan MNM, Sudesh K. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polym Degrad Stab* 2004;84:129–34.
- [17] Siew EL, Rajab NF, Osman A, Sudesh K, Inayat-Hussain SH. *In vitro* biocompatibility evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer in fibroblast cells. *J Biomed Res A* 2007;81A:317–25.
- [18] Dong H, Nyame V, Macdiarmid Jr AG, Jones WE. Polyaniline/poly(methyl methacrylate) coaxial fibers: the fabrication and effects of the solution properties on the morphology of electrospun core fibers. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 2004;42:3934–42.
- [19] Lyons J, Li C, Ko F. Melt-electrospinning part I: processing parameters and geometric properties. *Polymer* 2004;45:7597–603.
- [20] Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 1999;40:4585–92.
- [21] Zuo W, Zhu M, Yang W, Yu H, Chen Y, Zhang Y. Experimental study on relationship between jet stability and formation of beaded fibers during electrospinning. *Polym Eng Sci* 2005;45:704–9.
- [22] Zong X, Ran S, Kim KS, Fang D, Hsiao BS, Chu B. Structure and morphology changes during *in vitro* degradation of electrospun poly(glycolide-co-lactide) nanofiber membrane. *Biomacromolecules* 2003;4:416–23.
- [23] Li WJ, Cooper Jr JA, Mauck RL, Tuan RS. Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxyester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2006;2:377–85.
- [24] Jeong EH, Im SS, Youk JH. Electrospinning and structural characterization of ultrafine poly(butylene succinate) fibers. *Polymer* 2007;48:9338–43.
- [25] Yokouchi M, Chatani Y, Tadokoro H, Teranishi K, Tani H. Structural studies of polyesters: 5. Molecular and crystal structures of optically active and racemic poly(β -hydroxybutyrate). *Polymer* 1973;267–72.
- [26] Su F, Iwata T, Tanaka F, Doi Y. Crystal structure and enzymatic degradation of poly(4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* 2003;36:6401–9.
- [27] Doi Y, Kanetsawa Y, Kawaguchi Y, Kunioka M. Biodegradation of microbial polyesters in the marine environment. *Polym Degrad Stab* 1992;32:173–7.
- [28] Mitomo H, Hsieh WC, Nishiwaki K, Kasuya K, Doi Y. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Comamonas acidovorans*. *Polymer* 2001;42:3455–61.
- [29] Di Lorenzo ML, Raimo M, Cascone E, Martuscelli E. Poly(3-hydroxybutyrate)-based copolymers and blends: influence of a second component on crystallization and thermal behavior. *J Macromol Sci F* 2001;40:639–67.
- [30] Gogolewski S. Resorbable polymers for internal fixation. *Clin Mater* 1992;10:13–20.
- [31] Marois Y, Zhang Z, Vert M, Deng X, Lenz R, Guidoin R. Mechanism of degradation of polyhydroxyoctanoate films in aqueous media: a long term *in vitro* study. *J Biomed Mater Res* 2000;49:216–24.
- [32] Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 2000;79:144–52.
- [33] Pelham RJ, Wang YL. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13661–6.
- [34] Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotype typing. *Science* 1988;241:708.
- [35] Martin DP, Skraly FA, Williams SF. Polyhydroxyalkanoate composites having controlled degradation rates. PCT Patent Application No. WO 32536; 1999.
- [36] Qu XH, Wu Q, Zhang KY, Chen GQ. *In vivo* studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation tissue reactions. *Biomaterials* 2006;27:3540–8.
- [37] Ali SAM, Doherty PJ, Williams DF. Molecular biointeractions of bioactive polymers with extracellular exudates and inflammatory cells: their effects on the biocompatibility *in vivo*. *Biomaterials* 1995;15:779–85.
- [38] Saad B, Neuenschwander P, Uhlenschmid GK, Suter UW. New versatile elastomeric, degradable polymeric materials for medicine. *Intern J J Macromol* 1999;25:293–301.
- [39] Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, Wang Y, Dong N, Qian R, et al. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro*. *Biomaterials* 1999;20:1057–62.
- [40] Mukai K, Doi Y, Sema Y, Tomita K. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol Bioeng* 1993;15:601–4.
- [41] Malm T, Bowald S, Bylock A, Busch C, Saldeen T. Enlargement of right ventricular outflow tract and the pulmonary artery with a biodegradable patch in transannular position. *Eur Surg Res* 1994;298–308.

Fundamental Studies on Genetically Engineered Elastin Model Peptides for Biomaterials

Sachiro Kakinoki¹, Alyssa Panitch², David A. Tirrell³, and Tetsuji Yamaoka¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Weldon School of Biomedical Engineering, Purdue University, IN 47907, USA, and ³Department of Chemical Engineering, California Institute of Technology, CA 91125, USA
e-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Elastin model peptide ((Val-Pro-Gly-Ile-Gly)₄₀; VPGIG₄₀) was designed and biosynthesized as injectable scaffold for cell transplantation therapies. In this report, the thermoresponsiveness and the potential as the base materials for injectable scaffold of VPGIG₄₀ expressed using genetic-engineering technique were explored.

Keywords: biomaterials, elastin model peptide, genetic engineering, injectable scaffold, thermoresponsiveness

Introduction

Recently, cell transplantation therapies are much attended with progress of regenerative medicine and stem-cell research. It is known that substantial effects can not be obtained only by injecting the cell suspensions and then feasible scaffolds are necessary for the cell transplantation therapies. Therefore, various biodegradable polymeric materials have been investigated as scaffolds actively. However, these scaffolds are not suitable for the cell transplantation therapy, because these bulk-type scaffolds require invasive surgery, and the cells inside the scaffold often necrotize. In order to solve these problems, photo-crosslinkable and thermoresponsible hydrogels have been investigated as injectable scaffolds. However, these non-biodegradable materials are not approved for the clinical use yet.

Elastin, the major component of elastic fibers in basement membrane, provides the resilience or restorative force to tissues. Noteworthy, soluble elastin-related polypeptides, such as tropoelastin, α -elastin and synthetic elastin model peptides, indicate the characteristics of temperature-depending phase transition. Therefore, we are interested in the potential of elastin model peptides as injectable scaffolds. In this report, we try to biosynthesize and characterize an elastin model peptide ((Val-Pro-Gly-Ile-Gly)₄₀; VPGIG₄₀) and develop the gel matrices consisting of VPGIG₄₀ to apply as injectable scaffold.

Results and Discussion

The elastin model peptides with repetitive sequence, VPGIG₄₀, were biosynthesized using *E. coli* [BL21(DE3)pLysS] which was transformed with an

expression-vector encoding VPGIG sequence [pET-28ap (VPGIG₄₀)] [1]. The insert region in pET-28ap (VPGIG₄₀) was confirmed by direct PCR of *E. coli* using primers which were flanking sequence of the insert region. By agarose electrophoresis, a band was observed at approximately 650 bp corresponding to the DNA length for the insert region of VPGIG₄₀. Protein expression was induced with the addition of β -isopropyl thiogalactoside (IPTG) and was allowed to continue for 24 hours. Protein purification was performed using the thermoresponsible property of VPGIG₄₀, namely, VPGIG₄₀ was purified with temperature control over/below the transition temperature. By SDS-PAGE, it is confirmed that crude VPGIG₄₀ was gradually purified by repeating this method and a clear band was indicated at approximately 18 kDa (Fig. 1). The purified VPGIG₄₀ was also confirmed by MALDI-TOF/MS analysis.

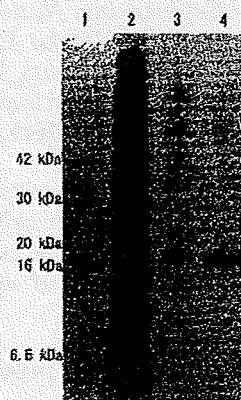


Fig. 1. SDS-PAGE (12%) for elastin model peptide VPGIG₄₀ at each purification step. (lane 1; marker, lane 2; bacterial lysate, lane 3; peptide purified once, lane 4; peptide purified twice)

Furthermore, the cloud points of purified VPGIG₄₀ were 28.2, 23.6 and 21.9 °C at 0.02, 0.05 and 0.1 w/v%, respectively. The mechanism for the temperature-depending phase transition of VPGIG₄₀ in solution has been suggested that the peptides are aggregated by hydrophobic interaction with conformational change from random-coil to β -spiral [2, 3].

The results suggest that genetically engineered VPGIG₄₀ has high potential as injectable scaffold for cell transplantation.

Acknowledgement

We are grateful to Prof. Shigeru Kunugi at Kyoto Institute of Technology.

References

1. Panitch, A., Yamaoka, T., Fournier, M. J., Mason, T. L., Tirrell, D. A. (1999) *Macromolecules*, **32**, 1701-1703.
2. Tamura, T., Yamaoka, T., Kunugi, S., Panitch, A., T., Tirrell, D. A. (2000) *Biomacromolecules*, **1**, 552-555.
3. Yamaoka, T., Tamura, T., Seto, Y., Tada, T., Kunugi, S., Tirrell, D. A. (2003) *Biomacromolecules*, **4**, 1680-1685.

特集論文／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

マイクロ SPECT を用いた小動物イメージングの 定量的機能評価 Quantitative Functional Imaging of Small Animals Using MicroSPECT

銭谷 勉*
Tsutomu ZENIYA

要 旨

創薬や新規治療法の評価を目的とした前臨床研究において、小動物モデルを用いた *in vivo* イメージングは不可欠である。その中でも PET や SPECT などの高感度トレーサ技術である核医学的手法は生体内の生理機能を定量的に評価できるため大きな役割を果たしている。本論文では、小動物イメージングにおける定量的機能評価の意義および応用領域について言及した上で、マイクロ SPECT における動態解析および画像再構成の定量的性について概論する。また、マイクロ SPECT を利用した定量的機能評価の例を紹介する。
キーワード：小動物、定量的機能評価、SPECT、ピンホールコリメータ、画像再構成

In vivo imaging of small laboratory animals facilitates objective assessment of pharmaceutical development and regenerative therapy in pre-clinical studies. Radionuclide imaging such as PET or SPECT is especially important because it allows to quantitatively assess physiological functions due to high sensitive tracing technique. This paper describes the significances and applications of quantitative functional assessment in small animal imaging, and then discusses quantitation about kinetic analysis and image reconstruction in microSPECT. Finally, it introduces quantitative functional imaging studies using microSPECT.

Key words: Small animal, Quantitative functional imaging, SPECT, Pinhole collimator, Image reconstruction

Med Imag Tech 26(1): 14-20, 2008

1. はじめに

創薬や新規治療法を目的とした前臨床研究において、ラットやマウスなどの小動物モデルを用いた *in vivo* イメージングは不可欠である。また、近年の分子イメージング分野の発展に伴い、小動物専用の X 線 CT (Computed Tomography), MRI (Magnetic Resonance Imaging), PET (Positron Emission Tomography), SPECT (Single Photon Emission CT) および光イメージングなどの装置が盛んに開発されている。その中でも、PET や SPECT などの放射性同位元素をトレーサとして用いる核医学検査手法は、高い感度を有し、ト

レーサの集積の対して正確に比例した信号強度を提示するため、病態生理や病態生化学的な変化を定量的に評価することが可能であるため重要な役割を果たしている。

PET 装置は高い感度を有するが、高解像度の小動物用 PET 装置でもその空間解像度は 1 mm を超えておらず [1], 小病変の画像化に不十分である。PET は放射線同位元素から放出される陽電子が電子と結合する際に反対方向に放出される 2 本の消滅放射線をリング状の検出器で同時計測することで、放射線同位元素の存在する位置を推定する。陽電子が静止するまでの距離を陽電子の飛程と呼ぶが、核種によっては飛程が装置の空間解像度よりも大きく、解像度を悪化させる。たとえば、 ^{15}O の場合、陽電子のエネルギーが高く、陽電子が消滅するまでに水中で平均 2.5 mm 移動する。また、PET 核種は半減期が短いため、小動物実験において、同一の個体の

* 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] : National Cardiovascular Center Research Institute. e-mail: zeniya@ri.ncvc.go.jp
論文受付：2007年12月25日
最終稿受付：2008年1月7日

繰り返し撮像が行いやすいという利点である反面、サイクロトロンや放射性薬剤合成装置などの大掛かりな設備を必要とする。一方、SPECT装置は放射線同位元素から放出されるガンマ線の飛来方向を特定するためのコリメータを必要とするため、コリメータを必要としないPETに比べ感度が劣るのは避けられないが、コリメータの工夫次第ではPETよりも高い空間解像度が得られる。ピンホールコリメータは対象物がコリメータに近いほど感度および空間解像度を高くできるので (Fig. 1), 小動物イメージングに適しており, 1 mm 以下の解像度が比較的容易に実現できる [2, 3]. ほとんどの小動物用 SPECT 装置 (マイクロ SPECT) ではこのピンホールコリメータを利用している。感度が低いという問題は、複数のピンホールを利用することで克服する試みが行われている [4~6]. また, Table 1 に示されているように SPECT 検査で使用される放射性核種は半減期が長いので, PET では観測できない, 長時間における薬剤の動態を観察した

という場合に適している。そして, 何よりも放射性薬剤を他施設から入手できるため, 安価で手軽に検査が実施できるという大きな利点がある。

従来のピンホール SPECT は, 体軸方向に画像が歪み, 視野内の解像度が不均一になるという問題があったため, 定量評価が困難であった。著者らは, この原因をデータの不完全性によるものと仮説をたて, 撮像軌道をラドン変換の完全性を満たすように設計し, 立体的な画像再構成理論を導入することで, 歪みのない視野全体で均一な解像度を有する 3 次元画像を得ることに成功した [7]. その結果, ピンホール SPECT においても小動物 PET 同様に定量評価が可能になった。しかしながら, PET や SPECT が得意とする, 定量的な機能評価をマイクロ SPECT で行う試みは, それほど広くなされていない。

本論文では, 小動物イメージングにおける定量的機能評価に必要とされる著者らの物理工学的な最近の進歩について述べる。最初に, 小動物イメージングの定量的機能評価の意義および応用領域について言及した上で, マイクロ SPECT における動態解析および画像再構成の定量性について概論する。最後に, 著者らが開発したマイクロ SPECT 装置を利用した定量的機能評価の例を紹介する。

2. 小動物イメージングにおける定量的機能評価の意義と応用領域

通常, 遺伝子改変や病態モデル動物はマウスやラットなどの小動物に対して行われており, 生きたまま, 小動物内の分子をイメージングする技術は非常に重要である。とくに, ヒトから実

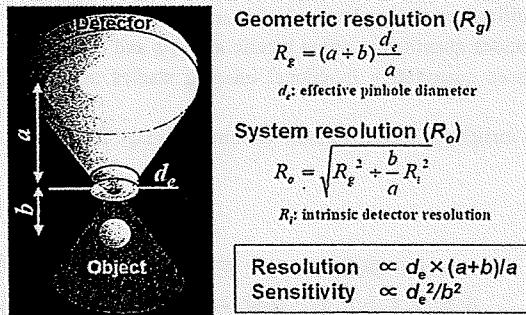


Fig. 1 Physics of pinhole SPECT. Spatial resolution and sensitivity can be improved by positioning a collimator closer to an object.

Table 1 Representative radionuclides used in SPECT study.

Isotope	Energy	Half life	Tracer	Application
^{99m}Tc	140 keV	6.01 hr	MDP/HMDP	bone scan
			MIBI	myocardial perfusion
			tetrofosmin	myocardial perfusion
			TRODAT	dopamine transporter
			TlCl	myocardial perfusion
^{201}Tl	70 keV	72.9 hr	TlCl	myocardial perfusion
^{123}I	159 keV	13.3 hr	BMIPP	beta-oxidation
			MIBG	sympathetic
			β -CIT	dopamine transporter
			Iomazenil	benzodiazepine receptor
^{131}I	364 keV	8.04 day		thyroid
^{67}Ga	93, 185, 300 keV	3.26 day	citrate	tumor

験小動物まで同じ手技で定量的機能評価が可能な核医学イメージング技術は、血流などの生理的機能から種々の受容体、遺伝子発現、ペプチド・タンパクなどの疾患関連物質の体内動態までを観察できるため、創薬の迅速化・低コスト化や、テーラーメイド医療、遺伝子治療、再生医療などに代表される新しい病気の診断・治療法の開発に大きく貢献するといわれている。

創薬においては、治療化合物の探索から体内吸収・体内動態の評価、臨床試験早期に必要な毒性と薬効評価、投与量の最適化などの分野においての利用が開始されている。再生医療分野においても、多くの局面で本質的な情報を提示し、有効な治療法の確立に向けて重要な役割を果たすことは明らかである。たとえば、心筋梗塞部位での血管新生治療、細胞移植治療では、細胞の定着や血管の発達などの形態的な再生だけでなく、生体の一部の組織として機能評価を行うことが必要である。定着した細胞および組織の血流がどの程度回復し、種々の生理的な負荷などによって本来持つべき反応力（血流の自動調節能と血管反応性、代謝の制御、神経連絡過程など）をどの程度有し、必要な生体フィードバックを可視化できることが望ましい。これらの分野の基盤技術を整備するためには、疾患の本質を理解すること、そのための基礎、前臨床、および臨床研究を並行して実施すること、また、本質的な治療実施のための各種基盤技術を有していることが不可欠である。

3. マイクロ SPECT による定量的機能評価の問題点

SPECT データから、血流量、結合能などの定量的な生理パラメータを得るためには、コンパートメントモデル解析やグラフ解析など、トレーサの動態解析を行う必要がある [8]。このとき、入力関数と呼ばれる動脈中の放射能濃度の投与時から時間変化が必要となる。ヒトの場合、通常、腕の動脈に穿刺し、撮像中にマニュアルで頻回採血やポンプを用いた連続採血を行って入力関数を得る [9]。ラットやマウスの血液量は、ヒトに比べて少量のため、採血量が多くなると貧血を起こし、生理状態も大きく変化する。そのため、最低限の採血量に抑える必要があり、動脈と静脈を短絡させる arteriovenous (AV) シヤ

ント術を施し、そこから入力関数を得る方法が提案されている。

心筋機能の定量では、撮像された左心室から入力関数を得る方法が用いられる。しかし、これらの方法で得られる入力関数はあくまでも全血の放射能濃度であり、放射性薬剤が体内で代謝される場合、代謝産物の定量も行う必要がある。微量の血液中の代謝産物の定量は非常に困難である。このため、あらかじめ複数の同一動物で測定した平均入力関数を用いる方法や、入力関数の代わりにリファレンス領域を用いる方法 [10] がしばしば使われる。

得られたパラメータを解釈する際には、ヒトとの違いを考慮する必要がある。代謝速度はヒトと小動物では大きく異なる。通常、小動物の撮像は麻酔下で行われるが、麻酔の影響も無視できない。著者らは覚醒下に適したラット専用のホルダーを作製し、1 週間の馴化を行うことによって、覚醒下でのラット心筋血流定量測定および血管反応性の評価を可能にした。

4. マイクロ SPECT 画像再構成における定量性

前述のようなトレーサの動態解析を行う場合、SPECT 画像の定量性が確保されていることが前提である。マイクロ SPECT 画像再構成においても、定量性を劣化させる要因を十分に考慮する必要がある。

1) 部分容積効果

核医学装置は、定量性が高いとしばしばいわれるが、部分容積効果（小さい対象物を空間解像度の悪い装置で撮像したとき発生する測定値の過小評価）は大きく定量性に影響する。とくに、小動物の場合サイズがヒトより小さいため、相応の高い空間解像度が要求される。たとえば、臨床で利用されている PET 装置は 5 mm 程度の空間解像度を持つが、この装置で得られた画像と同等の解像度でラットを撮像したければ 0.6 mm、マウスでは 0.4 mm の空間解像度が要求される [1]。実際の小動物用 PET の空間解像度は 1 ~ 2 mm 程度であるため、部分容積効果は小動物 PET ではヒトよりも大きな問題となる。これに対して、小動物用のピンホール SPECT では数百 μm の空間解像度を実現できるため、部分容積効果を抑制できる点で優位である。しかしなが

ら、部分容積効果の定量性に与える影響は少ないため、定量する際は十分に考慮する必要がある。コリメータ開口補正技術 [11] などを用いて解像度を改善するのも1つの方策である。

2) 吸収・散乱

SPECT で定量性を劣化させる大きな要因として、被写体内でのガンマ線の吸収および散乱がある。一般的な臨床脳 SPECT 検査では、60 ~ 80% の光子が体内での吸収を受け、30 ~ 40% の光子が散乱によって偽りの信号を与える。これらの影響を補正しなければ定量評価は難しい。飯田らは、実用的な手法によって吸収・散乱の影響を高い精度で補正することに成功し、SPECT でも PET 同様の定量評価を可能にした [12]。しかしながら、体内での吸収・散乱の影響は被写体の大きさに依存することを考えると、小動物ではヒトの場合に比べてそれほど大きくないと考えられる。Wang らはマウスにおける吸収・散乱の影響を、シミュレーションおよびファントム実験にて評価した。吸収も散乱も補正しない場合、15% 過小評価し、吸収補正のみ行った場合、9% 過大評価する。吸収と散乱の両方を補正して誤差は3%以下にできると報告している [13]。DeLoar らは散乱線の影響に加え、ピンホールコリメータを突き抜けるガンマ線の影響も考慮する必要があることをシミュレーションによって示している [14]。この突き抜けガンマ線の影響はピンホール形状を knife-edge 型に代えて、keel-edge (channel-edge と呼ぶ) 型を使用することで抑制することができる [15]。

3) データの完全性

ピンホールコリメータを用いた SPECT 装置は原理上、3次元収集を行っているが、コーンビーム型の3次元画像再構成法が必要となる。ピンホール SPECT において単一の円軌道でデータを収集した場合、体軸方向に画像が歪み、空間解像度が不均一となるため、定量解析は困難である。画像再構成法を解析的手法のFBP (Filtered Back-Projection) に代えて、OSEM (Ordered Subsets Expectation Maximization) などの統計学に基づいた逐次近似画像再構成法を使用することによって改善されるが、視野周辺では依然として解像度の劣化は残っている [16]。最近の研究で、著者らはこの原因をデータの不完全性に起因するものと仮説をたて、撮像軌道をラドン変換の完全性を満たすような複数回転軸軌道とし、これに立体的画像再構成理論を導入することで、視野内で均一な高解像度を得ることに成功した (Fig. 2) [7]。Metzler らはヘリカル軌道で完全データ収集を実現している [17]。従来は定性的な評価のみに利用されてきた高解像度撮像法のピンホール SPECT だが、この問題の解決によって PET 同様に定量解析が可能になった。

4) トランケーション

ピンホールコリメータは対象物がコリメータに近いほど感度および解像度を高くできるのが特長であるが、極端に近づけるとトランケーション (データの欠損) が生じ、再構成画像のカウントは過大評価され、定量評価の妨げとなる。通常は被写体が視野から外れないように、被写

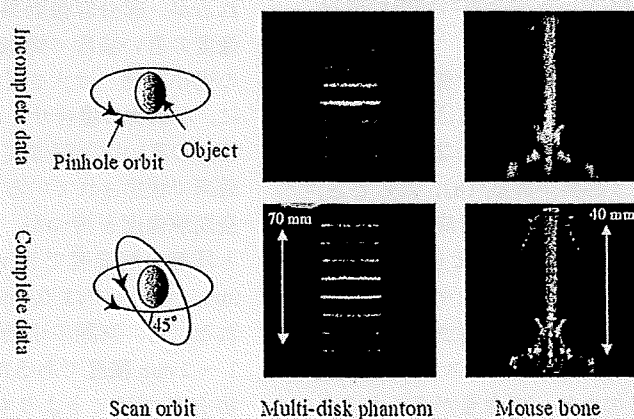


Fig. 2 Comparison between conventional acquisition and complete data acquisition in multi-disk phantom study and mouse bone scan with ^{99m}Tc. Data acquired by conventional single circular orbit are incomplete. Complete data are acquired by two-circular orbit. Complete data improve axial blurring and non-uniform spatial resolution in pinhole SPECT.

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

FOV size	$\Phi 29.8 \text{ mm}$	$\Phi 21.2 \text{ mm}$
Truncation	22.7%	48.5%
Conventional method	1.42	1.52
TC-3DOSEM	1.28	1.27

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.

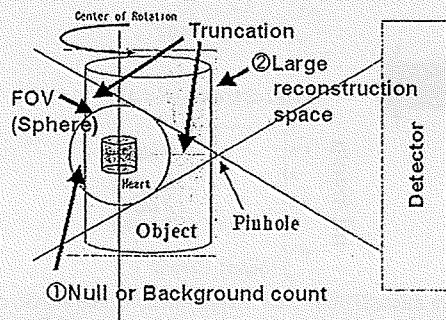


Fig. 3 Schematic diagram to show conditions for truncation compensated reconstruction in 3D pinhole SPECT.

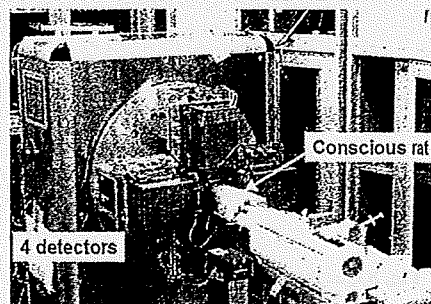


Fig. 5 Photograph of our microSPECT system and rat cardiac imaging study.

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。

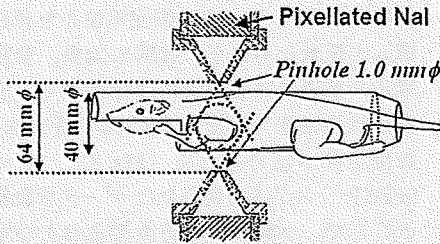


Fig. 6 Imaging geometry. Rat was set in a dedicated holder for conscious condition.

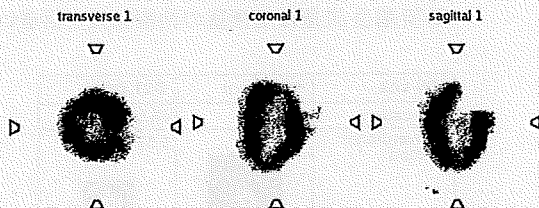
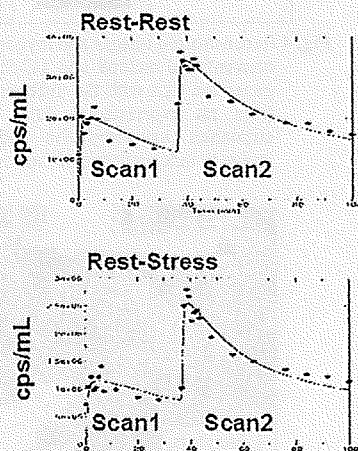


Fig. 7 Representative rat cardiac images obtained by our microSPECT and ²⁰¹Tl.

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。

Time activity curve



Myocardial blood flow

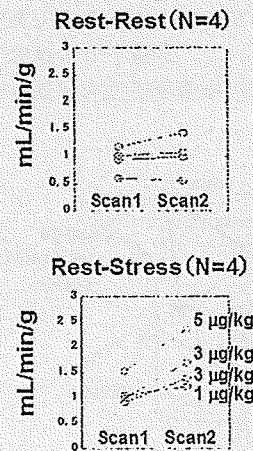


Fig. 8 Quantitation of rat myocardial blood flow using data from microSPECT. Left: Representative time activity curves in rest-rest and rest-stress studies. Right: Myocardial blood flows calculated by two-compartment model. Coronary flow reserves were assessed in rest-stress studies.

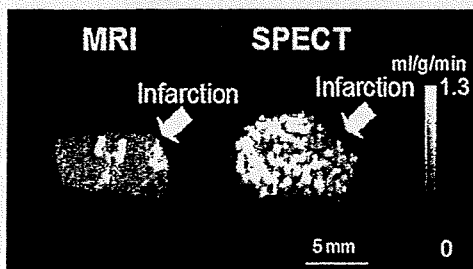


Fig. 9 Co-registered MR and SPECT images of cerebral infarction model mouse. Left: T2 weighted image obtained by MRI. Right: Quantitative cerebral blood flow image obtained by pinhole SPECT and ^{123}I -IMP.

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-pinholes for 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。同年朝日メディアコム入社。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年日本核医学学会研究奨励賞。

特集論文／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

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

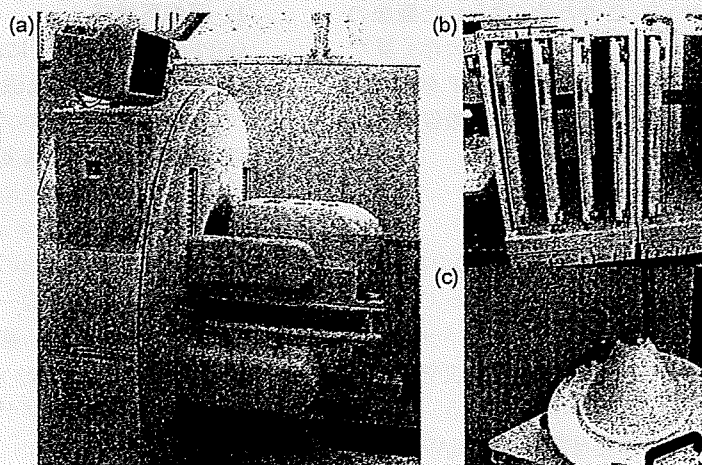


Fig. 1 GCA-7200A(Toshiba) (a), typical clinical SPECT camera which has two heads and multiple collimators(b) including pinhole collimator(c).

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 ($g_{\text{obs}}(x, y)$, 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。

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

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

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

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。

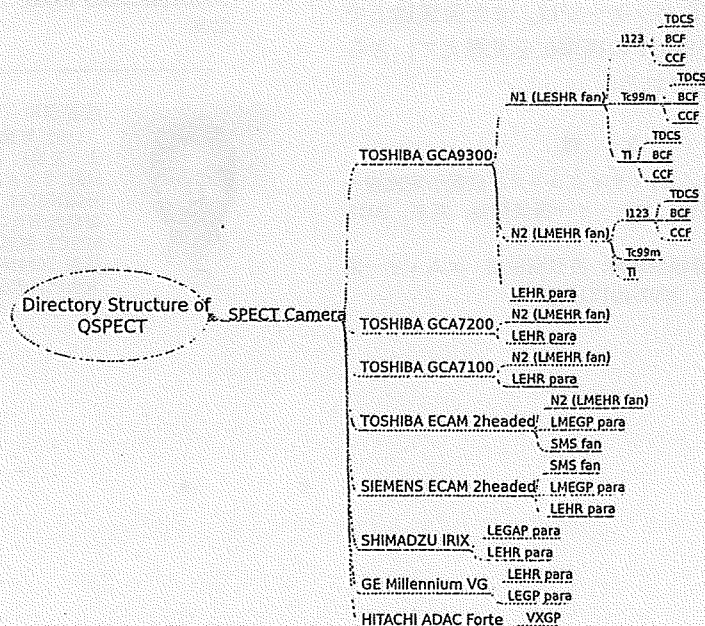


Fig. 2 Schematic diagram of directory structure of QSPECT package. QSPECT has configurations for several SPECT cameras.