

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18500359  
 研究課題名 (和文) 2次元及び3次元X線画像撮影によるラット心での冠血管再生治療法  
 評価装置の開発  
 研究課題名 (英文) Development of Evaluation System for Coronary Vessel Regenerative  
 Treatment Method Using 2- and 3-Dimensional X-ray Imaging  
 研究代表者  
 梅谷 啓二 (UMETANI KEIJI)  
 財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・バイオ実験支援チーム・チームリ  
 ーダー・主幹研究員  
 研究者番号：50344396

研究成果の概要：本研究では、大型放射光施設 SPring-8 での放射光を利用し、2次元で血管血流の動画像を撮影する微小血管造影装置と、高解像度で広視野な3次元マイクロCT装置を改良し、生体における血管再生効果を視覚的及び定量的に評価する方法を確立した。これにより、ラットの心臓を使い2次元での血管血流の動画像で、血管再生での新規血管形成による心臓血管血流の改善を明らかにするなど、動態画像をもとにした機能解析を可能とした。さらに、心臓血管へバリウム造影剤を注入してホルマリン固定した標本を作製し、ラット心全体の3次元CT像を解像度6 $\mu$ mで撮影し、立体的に定量的評価を実施可能とした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医用画像工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：医用・生体画像

## 1. 研究開始当初の背景

当初は、再生医療の分野において様々な幹細胞を用いた臓器形成や組織再生の研究が推し進められていた。血管研究においても血管内皮前駆細胞などを用いた研究が *in vivo*/*in vitro* の実験を通じて行われ、その治療応用の有用性(血管再生、機能改善)を示唆する知見が累積されていた。しかし、血管形成の評価に関しては、今まで新規血管形成を組織

学的にしか評価することができず、生体における血管再生効果を視覚的及び定量的に評価する方法は存在しなかった。

血管構築の視覚的及び定量的な評価に関して研究代表者らは、大型放射光施設 SPring-8 の高輝度放射光を線源として、撮像系に直接変換型高解像度検出器を用いたマイクロメータ解像度の微小血管造影装置を開発し、ラットなどの小動物において摘出灌

流心での心筋内血管の可視化を実現していた。さらに研究代表者らは、1000 万画素の CCD を検出器に使った放射光マイクロ CT 装置を開発し、高解像度化と広視野化を同時に実現して、センチメートルサイズの造影血管標本をマイクロメートル解像度で画像化した 3 次元 CT 像を得ることに成功していた。

ここで、SPring-8 では設備の高度化を順次に進めており、医学利用研究分野でも平成 18 年度から、X 線光学系の改良での X 線強度の増大による撮影速度の向上や、測定装置の改造による撮影画像の高画質化を実施する予定であった。

## 2. 研究の目的

### (1) 概要

本研究では、生体における血管再生効果を視覚的及び定量的に評価する方法を確立することを目指す。これにより、ラット摘出灌流心を使い 2 次元動態画像の微小血管造影で、新規血管形成による冠動脈血流の改善や、側副血行路の発達程度を明らかにするとともに微小血管障害の改善による左心機能への影響を解明するなど、動態画像をもとにした機能解析を実施する。さらに、摘出灌流心の冠血管へバリウム造影剤を注入してホルマリン固定した標本作製し、ラット心全体の 3 次元 CT 像を解像度  $6\mu\text{m}$  で撮影し、新規血管形成や側副血行路の発達程度を、立体的に定量的評価を実施して形態解析を行う。

### (2) 具体的な目的

#### ① 微小血管造影-目的 1

心拍数が高いラット摘出灌流心においては、短い X 線シャッター時間での高速撮影が要求される。ここで、従来は不可能であった内径約  $20\mu\text{m}$  までのラット心の微小血管を画像化するために、SPring-8 での設備高度化で X 線強度が 10 倍以上となることを利用し、従来のパルス幅  $1\sim 2\text{ms}$  (シャッター時間に対応) に対して X 線シャッターの改良でパルス幅  $0.1\sim 0.2\text{ms}$  を達成する。

#### ② 微小血管造影-目的 2

放射光はレーザー光のように平行性が高いビームであるが、逆にレーザーのようにビームサイズが小さく大視野撮影に向かないという欠点があった。SPring-8 での設備高度化での X 線強度増大を利用して、X 線光学装置を改良しビームサイズ拡大を可能として、従来のミリメートルサイズ視野に対してセンチメートルサイズの撮影視野を達成する。

#### ③ 3 次元 CT-目的 3

1000 万画素の CCD を検出器に使った放射光マイクロ CT 装置は、データ量が膨大であり投影像の全てを同じ解像度で画像化する

ことは非効率的である。このため、撮影視野自体は対象物全体を見る広視野でありながら、画像再構成においては視野内の着目部位のみを高解像度で 3 次元画像化し、着目部位以外は低い解像度で再構成する。このズーム再構成により、全てを同じ解像度で画像化した場合には約 12 日間を要する再構成処理時間を、半日以下の時間で処理可能とし試料撮影のスループットを大幅に向上させる。

#### ④ 3 次元 CT-目的 4

1000 万画素の CCD を検出器に使った放射光マイクロ CT 装置は、必要とする投影像数が 1800 以上であり、通常の 100 万画素の CCD を使う場合の 5~6 倍となり、投影像の撮影時間の短縮が試料撮影のスループット向上のために必須である。このために、CT 撮影設備での X 線光学装置の改良により X 線強度を 3~5 倍増大させ、投影像撮影時間の短縮を可能にする。

## 3. 研究の方法

### (1) 微小血管造影に関して

#### ① ビームライン

微小血管造影はビームライン BL28B2 を図 1 に示す。蓄積リング内を光速に近い速度で進む電子が偏向電磁石で軌道を曲げられるとき、軌道の接線方向に強い指向性を持ち放射される高輝度白色光が放射光である。放射光はスリットによりビーム断面形状が成形された後で、シリコン単結晶を使った分光器で単色化され、続いて X 線シャッターによりパルス X 線となる。そして、被写体を透過した単色パルス X 線による像を、動態画像として X 線直接変換型カメラで X 線シャッターによるパルス X 線生成に同期しながら撮影する。これにより、X 線パルス幅でシャッター時間が調整され、拍動する心臓血管の高速撮影が可能となる。

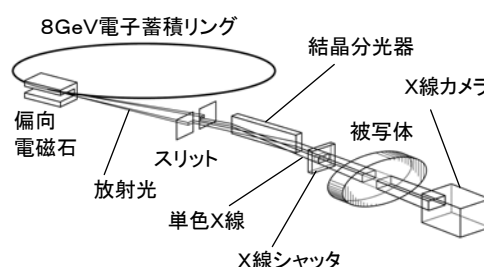


図1 ビームライン BL28B2 での装置構成

#### ② 微小血管造影

目的 1 と目的 2 は、この BL28B2 ビームラインでの装置開発・改造により実現する。平成 18 年度は、目的 1 のための予備実験として、結晶分光器の結晶の改良で X 線強度を約

3 倍増大させ、X線シャッタの調整で従来の Xパルス幅 1~2m s に対して、約 0.5m s のパルス幅を実現する。続く平成 19 年度において、結晶分光器の代わりに全反射ミラーの設置と調整を行い、X線強度の増大とビームサイズ拡大を同時に実施し、目的 1 と目的 2 を同時に達成する予定であった。

#### (2) 3次元CT

目的 3 と目的 4 は、微小血管造影用ビームライン BL28B2 とは別の、マイクロCT用ビームライン BL20B2 で平成 19 年度から実施の予定であった。これは、平成 18 年度及び 19 年度に実施する微小血管造影での目的 1 と目的 2 実験の結果を見てから、目的 3 でのズームング範囲の決定や、目的 4 での投影像撮影時間短縮の目標値も決まるためであった。

### 4. 研究成果

#### (1) 個別の目的

##### ①微小血管造影-目的 1

ビームライン BL28B2 で、結晶分光器の結晶の改良により X線強度を約 3 倍増大させ、X線シャッタの調整で従来の Xパルス幅 1~2m s に対して、約 0.5m s のパルス幅を実現できた。これにより、サブミリ秒シャッタ時間での撮影画像の画質評価を実施できた。ただし、予算的に当初予定の全反射ミラーの設置が難しくなり、パルス幅 0.1~0.2m s を達成することはできなかった。

##### ②微小血管造影-目的 2

センチメートルサイズの視野の達成について、平成 19 年度に施設予算で全反射ミラーを新たに設置する予定であった。しかし、予算的に全反射ミラーの設置が難しくなり、代わりに大型の非対称反射型結晶を使う方式に変更し、大型結晶を装着可能な分光器を製作した。

##### ③ 3次元CT-目的 3

平成 19 年度にズームング再構成プログラムの開発を行った。これにより、対象物全体を見る広視野でありながら、画像再構成においては視野内の着目部位のみを高解像度で 3次元により画像化できた。

##### ④ 3次元CT-目的 4

平成 19 年度にビームライン BL20B2 での分光結晶の改良による約 5 倍の X線強度増大を実現し、1000 万画素の CCD を検出器に使用した放射光マイクロCT装置での撮影時間の短縮を実施できた。

#### (2) 総合成果

動物実験では、平成 19 年度から引き続い

て平成 20 年度に 2 次元動態画像撮影の微小血管造影で、血管内皮前駆細胞治療などによるラット病態モデルでの心機能・血行改善の評価を、摘出心でのランゲンドルフ灌流下で実施した。

摘出灌流心を使った微小血管造影実験の後で、摘出灌流心の冠血管へバリウム造影剤を注入した標本を作製し、ラット心全体の 3 次元 CT 像を解像度 6 $\mu$ m で撮影した。これらの投影データをもとにして、ズームング再構成プログラム等を利用して、3 次元 CT 像の再構成を行い心臓血管系の立体的な構築を観察した。

これらの 2 次元微小血管造影と高解像度・広視野 3 次元マイクロCT で得られた撮影結果を統合して、虚血心筋の新生血管を総合的に観察・評価・定量する方法を確立できた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

[1] H. Yoshino, T. Sakurai, K. Umetani (8 人中 8 番目), Dilatation of perforating arteries in rat brain in response to systemic hypotension is more sensitive and pronounced than that of pial arterioles -Simultaneous visualization of perforating and cortical vessels by *in vivo* microangiography, *Microvasc Res.* 査読有, 77(2), 230-233 (2009).

[2] G. A. Eppel, D. L. Jacono, K. Umetani (6 人中 4 番目), Contrast angiography of the rat renal microcirculation *in vivo* using synchrotron radiation, *Am J Physiol Renal Physiol.* 査読有, 296(5), F1023-F1031 (2009).

[3] 梅谷啓二, 放射光マイクロCTでの腫瘍標本観察, 画像ラボ 査読無, 20(3), 36-40 (2009).

[4] K. Imamura, Y. Inada, K. Umetani (5 人中 4 番目), Sensitive inspection of void defects using synchrotron radiation imaging with quantitative modeling of contrast enhancement, *Insight* 査読有, 51(1), 12-15 (2009).

[5] M. Shirai, D. O. Schwenke, K. Umetani (8 人中 7 番目), Synchrotron-based angiography for investigation of the regulation of vasomotor function in the microcirculation *in vivo*, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 査読有, 36, 107-116 (2009).

[6] N. Nariyama, T. Ohigashi, K. Umetani (10 人中 3 番目), K. Shinohara (10 人中 4 番目), Spectromicroscopic film dosimetry for high-energy microbeam from synchrotron radiation, *Appl. Radiat. Isot.* 査読有, 67, 155-159 (2009).

[7] M. Torikoshi, Y. Ohno, K. Umetani (5人中4番目), Dosimetry for a microbeam array generated by synchrotron radiation at SPring-8, Eur. J. Radiol. 査読有, 688 (3) (Suppl. 1), S114-S117 (2008).

[8] T. Sera, K. Uesugi, K. Umetani (6人中4番目), High-resolution visualization of tumours in rabbit lung using refraction contrast X-ray imaging, Eur. J. Radiol. 査読有, 68 (3) (Suppl. 1), S54-S57 (2008).

[9] K. Umetani, K. Fukushima, K. Sugimura, Microangiography System for Investigation of Metabolic Syndrome in Rat Model Using Synchrotron Radiation, Proc. 30th Annual International IEEE EMBS Conference 査読有, 2693-2696 (2008).

[10] Y. Ohno, M. Torikoshi, K. Umetani (7人中4番目), Dose distribution of a 125 keV mean energy microplanar x-ray beam for basic studies on microbeam radiotherapy, Med. Phys. 査読有, 35(7), 3252-3258 (2008).

[11] K. Imamura, N. Ehara, K. Umetani (13人中12番目), Microcalcifications of Breast Tissue: Appearances on Synchrotron Radiation Imaging with 6- $\mu$ m Resolution, Am. J. Roentgenol. 査読有, 190, W234-W236 (2008).

[12] S. Nakajima, T. Kondoh, K. Umetani (8人中8番目), Loss of CO<sub>2</sub>-induced Distensibility in Cerebral Arteries with Chronic Hypertension or Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage, Kobe J. Med. Sci. 査読有, 53(6), 317-326 (2008).

[13] K. Umetani, T. Sakurai, T. Kondoh, In vivo microscopic X-ray imaging in rat and mouse using synchrotron radiation, SPIE 査読有, 6816, 68160U\_1-68160U\_6 (2008).

[14] D. O. Schwenke, J. T. Pearson, K. Umetani (5人中4番目), Changes in macrovessel pulmonary blood flow distribution following chronic hypoxia - assessed using synchrotron radiation microangiography, J Appl Physiol. 査読有, 104, 88-96 (2008).

[15] K. Umetani (8人中1番目), K. Kidoguchi, A. Morishita, In Vivo Cerebral Artery Microangiography in Rat and Mouse Using Synchrotron Radiation Imaging System, 29th Annual International IEEE EMBS Conference 査読有, 3926-3929 (2007).

[16] M. Morita, M. Ohkawa, K. Umetani (6人中5番目), Simultaneous observation of superficial cortical and intracerebral microvessels in vivo during reperfusion after transient forebrain ischemia in rats using synchrotron radiation, Brain Res. 査読有, 1158, 116-122 (2007).

[17] H. Iwasaki, K. Fukushima, K. Umetani (16人中4番目), K. Sugimura (16人中14番目), Synchrotron radiation coronary

microangiography for morphometric and physiological evaluation of myocardial neovascularization induced by endothelial progenitor cell transplantation, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 査読有, 27(6), 1326-1333 (2007).

[18] K. Myojin, A. Taguchi, K. Umetani (10人中3番目), Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography, AJNR Am J Neuroradiol 査読有, 28(5), 953-957 (2007).

[19] D. O. Schwenke, J. T. Pearson, K. Umetani (5人中3番目), Imaging of the pulmonary circulation in the closed-chest rat using synchrotron radiation microangiography, J Appl Physiol 査読有, 102(2), 787-793 (2007).

[20] K. Umetani (5人中1番目) K. Kobatake, A. Yamamoto, Microscopic X-ray imaging system for biomedical applications using synchrotron radiation, SPIE 査読有, 6501, 650112\_1-650112\_7 (2007).

[21] A. Yamamoto, S. Imai, K. Umetani (6人中6番目), Evaluation of Tris-acryl Gelatin Microsphere Embolization with Monochromatic X Rays: Comparison with Polyvinyl Alcohol Particles, J. Vasc. Interv. Radiol. 査読有, 17, 1797-1802 (2006).

[22] A. Morishita, T. Kondoh, K. Umetani (9人中9番目), Quantification of distension in rat cerebral perforating arteries, NeuroReport 査読有, 17, 1549-1553 (2006).

[23] M. Tamaki, K. Kidoguchi, K. Umetani (9人中9番目), Carotid artery occlusion and collateral circulation in C57Black/6J mice detected by synchrotron radiation microangiography, Kobe J. Med. Sci. 査読有, 52(5), 111-118, 2006.

[24] K. Kidoguchi, M. Tamaki, K. Umetani (9人中9番目), In Vivo X-Ray Angiography in the Mouse Brain Using Synchrotron Radiation, Stroke 査読有, 37(7), 1856-1861 (2006).

[25] X. S. Oizumi, T. Akisaki, K. Umetani (12人中7番目), Impaired Response of Perforating Arteries to Hypercapnia in Chronic Hyperglycemia, Kobe J. Med. Sci. 査読有, 52(2), 27-35 (2006).

[学会発表] (計 7 件)

[1] T. Fujii, N. Fukuyama Y. Ikeya, E. Tanaka, T. Sekka, Y. Shinozaki, E. Sato, K. Fukushima, K. Hyodo, K. Umetani, K. Yamada, T. Tanabe, H. Mori, Development of Microangiographic Systems for Visualization, Quantification and Therapeutic Evaluation of Angiogenic Vessels, 11th International Symposium on Anti-Angiogenic Agents: Recent Advances and Future Directions in Basic and Clinical Cancer Research (Hyatt Regency LaJolla, San Diego)

February, 2009.

[2] G. Kashino, T. Kondo, N. Nariyama, T. Ohhigashi, K. Umetani, K. Shinohara, A. Kurihara, M. Fukumoto, H. Tanaka, A. Maruhashi, M. Suzuki, Y. Kinashi, S. Masunaga, M. Watanabe, K. Ono: Bystander effects in microplanar beam irradiated glioma cells, Workshop on New prospects for brain tumour radiotherapy: Synchrotron light and Microbeam Radiation Therapy (The European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble) June, 2008.

[3] N. Nariyama, T. Ohhigashi, K. Umetani, K. Shinohara, H. Tanaka, G. Kashino, A. Maruhashi, T. Kondo, A. Kurihara, M. Fukumoto: Dose distribution measurements of microbeam X rays using a spectromicroscopic method with GafChromic film, Workshop on New prospects for brain tumour radiotherapy: Synchrotron light and Microbeam Radiation Therapy (The European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble) June, 2008.

[4] T. Kondoh, A. Katoh, E. Kohmura, A. Kurihara, M. Fukumoto, N. Nariyama, T. Ohhigashi, K. Umetani, K. Shinohara, G. Kashino, H. Tanaka, A. Maruhashi, K. Ono: Cross-planar microbeam irradiation can improve survival rate of rats with C6 glioma, Workshop on New prospects for brain tumour radiotherapy: Synchrotron light and Microbeam Radiation Therapy (The European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble) June, 2008.

[5] M. Torikoshi, Y. Ohno, N. Yagi, K. Umetani, Y. Furusawa: Dosimetry for a microbeam array generated by synchrotron radiation at SPring-8, the Medical Applications of Synchrotron Radiation workshop (the University of Saskatchewan, Saskatoon) August, 2007.

[6] T. Sera, K. Uesugi, N. Yagi, K. Umetani, M. Kobatake, S. Imai: High-resolution visualization of tumours in rabbit lung using refraction contrast X-ray imaging, the Medical Applications of Synchrotron Radiation workshop (the University of Saskatchewan, Saskatoon) August, 2007.

[7] K. Umetani, M. Kobatake, A. Yamamoto, T. Yamashita, S. Imai: Microangiographic Imaging of Tumor Angiogenic Blood Vessels in Rabbit Model of Cancer Using High-Resolution, Real-Time Imaging System, the 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation SRI2006 (Exco Center, Daegu, South Korea) May, 2006.

[その他]

ホームページ等

[http://www.spring8.or.jp/ja/users/new\\_user/medic/bio/publicfolder\\_view](http://www.spring8.or.jp/ja/users/new_user/medic/bio/publicfolder_view)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅谷 啓二 (UMETANI KEIJI)

財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・バイオ実験支援チーム・チームリーダー・主幹研究員

研究者番号：50344396

### (2) 連携研究者

篠原 邦夫 (SHINOHARA KUNIO)

財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・コーディネーター

研究者番号：10112088

### (3) 連携研究者

杉村 和朗 (SUGIMURA KAZURO)

神戸大学大学院・医学系研究科・教授

研究者番号：50167459