

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350547

研究課題名(和文) X線ミラーが生成する高強度な準単色放射光を使ったマウス冠状動脈の動体画像化

研究課題名(英文) Visualization of in vivo mouse coronary arteries using high intensity quasi-monochromatic x-rays generated by an x-ray mirror

研究代表者

梅谷 啓二(Keiji, Umetani)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・主幹研究員

研究者番号：50344396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大型放射光施設Spring-8の高輝度放射光を使い、ラットの冠状動脈造影で、ヒトの造影像での解剖学的構造に迫る血管構築が画像化され、多くの前臨床研究に使われている。この次の段階として、遺伝子組換えにより各種の病態モデルが作製できるマウスの冠状動脈の画像化へ進んだ。ラットに比べて小さく心拍数が多いマウスでの冠状動脈撮影のため、X線ミラーにより高輝度な準単色X線を生成し、さらにサブミリ秒でのX線露光が可能なX線シャッターを開発して、従来装置に比べ桁短いサブミリ秒での高速撮影を可能とした。そして、これを使った各種の病態モデルマウスでの実験により、薬効評価や病気の解明の高精度化が実現できるであろう。

研究成果の概要(英文)：Rat coronary microangiography at the SPring-8 synchrotron radiation facility has been applied to numerous pre-clinical studies by visualization of fine angioarchitectures comparable with those of human angiographic anatomy. Next, we undertook new studies on visualization of mouse coronary arteries because a lot of disease model mice can be produced by gene recombination. We developed a new high-speed imaging system using a combination of high intensity quasi-monochromatic x-rays generated by an x-ray mirror and a sub-millisecond precision x-ray shutter because mouse bodies are smaller than those of rats and mouse heart rates are faster than those of rats. The new system will be an effective tool for pharmacometrics and studies on disease mechanisms using various types of disease model mice.

研究分野：医用画像工学

キーワード：マウス冠状動脈撮影 血管造影 放射光 X線ミラー 準単色X線 心臓疾患診断

1. 研究開始当初の背景

大型放射光施設 SPring-8 ではシンクロトン放射光を使った医学応用研究において、空間解像度が $6\ \mu\text{m}$ で時間分解能が $2\ \text{ms}$ である血管造影装置を開発し、高血圧や糖尿病モデルラットなどを使い生体での冠状動脈の観察により、薬効評価や病気の解明のための研究が実用的に進められている。しかし、遺伝子組換えが容易なマウスの方が、はるかに多くのモデル動物を作製可能であり、ラットからマウスを使う研究へ移行する必要がある。この場合には、装置としては時間分解能の向上が課題である。

従来装置の性能評価をラット摘出灌流心で行い、心拍数約 300 における右冠状動脈の心尖部付近の造影像を図 1 に示す。左側の(a)が造影像であり、右側の(b)は(a)の画像からこれに続く $33.3\ \text{ms}$ 後の画像を引算処理した画像である。静止している $100\ \mu\text{m}$ 径のタングステン線は、引算処理後の(b)では消去されているが、動きの速い心臓表面近くの血管は $33.3\ \text{ms}$ での移動量が画像として現れている。図 1 から右冠状動脈の最大の移動量は $33.3\ \text{ms}$ で約 $100\ \mu\text{m}$ であり、露光時間の $2\ \text{ms}$ に換算すると約 $6\ \mu\text{m}$ となる。図 1 は拡張末期で心臓の動きが比較的遅いタイミングの画像であるが、露光時間 $2\ \text{ms}$ の間に装置の空間解像度に相当する約 $6\ \mu\text{m}$ だけ血管が動いている。つまり、動きの速い部分では解像度 $6\ \mu\text{m}$ の性能がでていない。

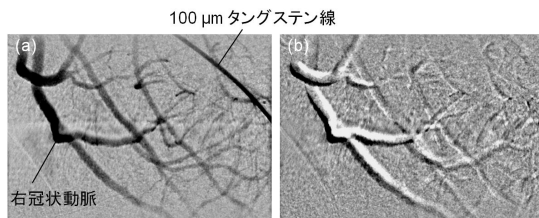


図 1 ラット摘出灌流心での右冠状動脈の撮影画像

ここで、露光時間を $1/10$ の $0.2\ \text{ms}$ とすれば、この間での冠状動脈の移動量は $0.6\ \mu\text{m}$ となり、動きの速い部分でも解像度 $6\ \mu\text{m}$ の性能を達成できる。この解像度が常に維持できれば、マウス冠状動脈の撮影も可能となるであろう。このため、本研究では動きの速い部分でも解像度 $6\ \mu\text{m}$ を達成できる最短露光時間が $0.2\ \text{ms}$ のマウス冠状動脈造影装置の開発を目標とする。

2. 研究の目的

大型放射光施設 SPring-8 の高輝度放射光を使い、ラットの冠状動脈造影で、ヒトの造影像での解剖学的構造に迫る血管構築が画像化され、多くの前臨床研究に使われている。この次の段階として、遺伝子組換えにより各種の病態モデルが作製できるマウスの冠状動脈の画像化へ進む。ラットに比べて小さく

心拍数が多いマウスでの冠状動脈撮影のため、X線ミラーにより高輝度な準単色X線を生成し、さらにサブミリ秒でのX線露光が可能なX線シャッターを開発して、従来装置に比べ桁短いサブミリ秒での高速撮影を可能とする。そして、これを使った各種の病態モデルマウスでの実験により、薬効評価や病気の解明の高精度化を実現する。

現在の撮影装置の構成を図 2 に示す。高エネルギー蓄積電子ビームが偏向電磁石で軌道を曲げられるとき、放射光が軌道の接線方向へ出射される。放射光は白色光であり、結晶分光器で $33.2\ \text{keV}$ のエネルギーの単色X線成分のみを選び出す。ここで、 $33.2\ \text{keV}$ のエネルギーは造影剤に含まれるヨウ素の吸収端エネルギーよりもわずかに高いエネルギーであり、ヨウ素に最も強く吸収されるため選択的に造影剤のコントラストのみを強調した画像が得られる。続いて、X線シャッターで露光時間 $2\ \text{ms}$ のパルスX線を生成し、被写体の透過像を検出器で撮影する。

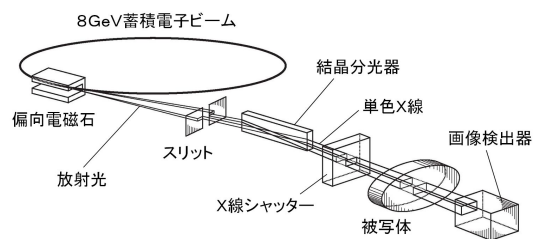


図 2 撮影装置の現状での構成

ここで、露光時間を $1/10$ の $0.2\ \text{ms}$ とするために、結晶分光器に対して全反射ミラーを用いる方式へ変更し、結晶分光器が生成する単色X線に対して、高強度な準単色X線を生成させる。また、X線シャッターは現状のミリ秒対応のものに対して、新たに高精度なサブミリ秒対応のX線シャッターを開発し $0.2\ \text{ms}$ までのシャッター時間を実現する。さらに、画像検出器は現状の 100 万画素で 30 画像/s の撮影に対し、 400 万画素で 100 画像/s の撮影が可能カメラへ入れ替える。これらの開発により、ラットに比べて小さく心拍数が多いマウスでの冠状動脈撮影を実現する。

3. 研究の方法

(1) X線ミラーの開発

結晶分光器で $33.2\ \text{keV}$ の単色X線を生成した場合は、エネルギーバンド幅が $15\sim 25\ \text{eV}$ である。これは白色X線である放射光の中から、 $33.200\sim 33.215\ \text{keV}$ (又は $33.225\ \text{keV}$) の間の非常に狭い範囲内のエネルギー成分のみを取り出したことになる。しかし、血管造影の場合は、X線のエネルギーが $33.2\ \text{keV}$ 以上ならば、エネルギーバンド幅が広くても問題ない。この性質を利用して、X線ミラーを使いエネルギーバンド幅が広い準単色X線を生成する。

図3の実線は、白金をミラーに使った場合で、ミラー表面に対して0.2度の角度で入射した場合のX線の反射率を示す。この場合は、25 keV以上のX線はほとんど反射されないため、出射されるX線は約25 keV以下のエネルギー成分のみとなる。

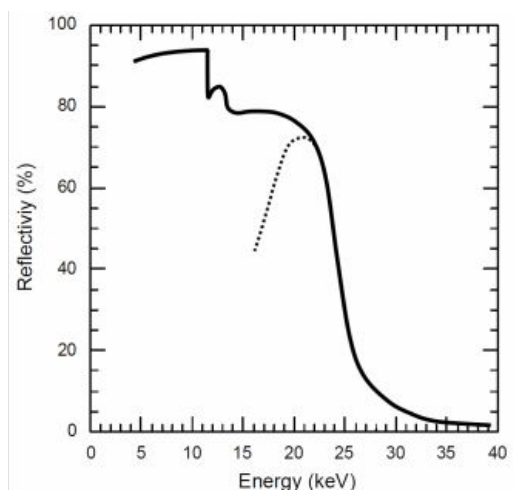


図3 白金ミラーに対するX線の反射率

ここで、出射されるX線に対して、さらに金属板フィルタを透過させると、通常のX線吸収により低いエネルギー成分ほど強く吸収される。この結果、金属フィルタを透過したX線は、図3の点線で示すような20 keV付近にピークを持つガウス分布曲線のようなエネルギースペクトルとなる。そして、このバンド幅は数 keV 以上に行うことができる。これを結晶分光器でのバンド幅 15~25 eV と比較すると 100 倍以上のバンド幅となり、100 倍以上のX線強度の向上が期待できる。結晶分光器でのバンド幅 15~25 eV を図3に描いたとすれば、それは幅の細い単なる縦線のみとなり、バンド幅の違いは歴然である。なお、図3はX線がミラー表面に対して0.2度の角度で入射した場合であるが、この角度を小さくし0.15度以下にすれば、金属フィルタを透過したX線のガウス分布曲線状のエネルギースペクトルのピークが33.2 keV以上となる。

(2) ビームの拡大

X線ミラーは図2の装置構成で、結晶分光器と置き換えて設置する。この場合は結晶分光器のように縦置きで横方向への反射ではなく、横置きで垂直上方向への反射である。ミラーは石英に白金をコーティングした長さ1mのものを予定している。しかし、長さ1mでも0.15度で入射したX線の内でも反射されるのは、縦方向で2.6mmしかない。このため、X線ミラー及び制御機構の開発に続いて、図4に示すようにミラーを湾曲させて、X線ビームの縦方向を拡大しマウス心臓が収まる縦5mm以上まで、約2倍拡大するミラー光学系の開発を行う。

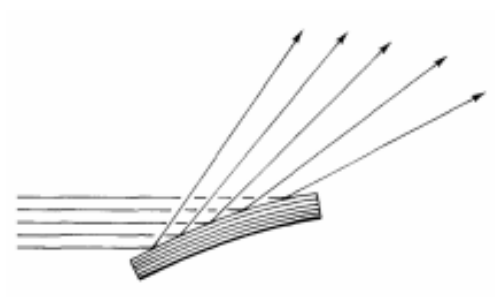


図4 湾曲ミラーでのビーム拡大

(3) X線シャッター及び画像検出器

X線シャッターは、現状のシャッター時間がミリ秒対応で撮影速度が30画像/sであるのに対して、シャッター時間が0.2msまたはこれ以下であり撮影速度100画像/sを目指している。このため、従来型のシャッターに対して、図5に示す構造の新たな回転円盤型シャッターを開発する。画像検出器は、新たにCMOSカメラを購入し、現有の蛍光板によるX線検出方式の装置へ組み込んで使用する。

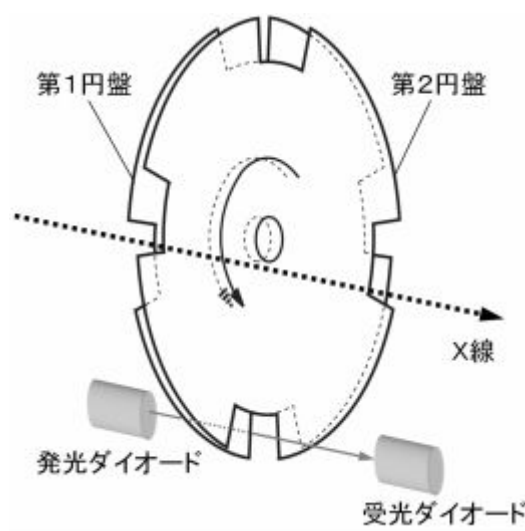


図5 回転円盤型シャッターの原理

厚さ15mmのステンレス板から成る円盤2枚は、4箇所スリットを有する同一形状で同期して回転する構造であり、スリットがビームを横切るときにパルスX線が作られる。図5に示すように円盤2枚を回転して互いにずらすと、2枚の円盤が作るスリットの幅が変わり、X線パルス幅(照射時間)を連続的に0.0~20.0msの範囲で設定できる。円盤2枚は、それぞれ独立した2台のサーボモータで回転し、発光及び受光ダイオードを組み合わせた光センサーで回転位置を検知して精密制御を受ける。従来のシャッターは同様な回転円盤型であるが、円盤2枚を1台のサーボモータで駆動する構造であり、1台のモータへの負荷のため撮影速度が30画像/s

以上の高速化には対応できなかった。

4. 研究成果

(1) X線ミラーの開発

開発したX線ミラーは、基板材質が石英であり、大きさは長さ1000 mm、幅100 mm、厚み50 mmである。X線ミラーとするために1000 mm×100 mmの面に白金が蒸着されている。ミラーのオリエンテーションは、反射面が上向きとなっている。ミラーはヘリウムチェンバーの中にあり、チェンバーは長さ1 mのミラーを保持し、ヘリウム中においてミラーの並進移動やX線入射角の調整を行う構造である。水冷のための冷却機構はないが、熱伝導性が高いヘリウムを流すことにより、ヘリウムによる冷却を行っている。

実験を行った SPring-8 のビームライン BL28B2 の全体構成を図6に示す。ここで、図を右側横から見たときに下の数字が光源からの距離を表している。X線は左側から入射し、図では省略しているが Front-end 部を通過し、真空を遮断するベリリウム窓 (Water-cooled Be window) を通過してからミラー部に入射する。光源から38 mの位置にある Mirror 1 が今回開発したミラーの設置位置である。なお、この上流にある Mirror 2 は、今後開発しこの位置に設置予定の別のミラーである。

40 m 位置から上流側が Optics hutch 1 と呼ばれミラーのようなX線光学系が収められており、40 m 位置から下流側が Optics hutch 2 と呼ばれ、この区画において撮影実験が実施される。真空チェンバーでないため構造は非常に単純であり、X線の入射・出射窓とミラー位置調整用の移動機構挿入のための小窓があるのみである。このため、非常に低価格での開発が可能となった。

ミラーによるX線の反射率を、ミラー表面と入射X線の成す角度 (Glancing angle of mirror) ごとに計算した結果を図7に表示する。図において、薄緑色で示す角度1.5 mrad のとき、カットオフ・エネルギーと呼ばれる反射されるX線の最大エネルギーが約40 keVとなる。この条件で低エネルギー側を吸収する金属フィルタを組合せれば、X線エネルギーバンド幅が約6 keVとなり、ほぼ理想的な準単色X線が得られる。低エネルギー側を吸収する金属フィルタの厚さと、ミラー表面と入射X線の成す角度とを変化させながら反射X線の強度を測定したが、ほぼ計算値と同等な結果を得ることができた。このため、従来の結晶分光器でのエネルギーバンド幅15~25 keVと比較すると100倍以上のバンド幅となり、100倍以上のX線強度の向上が期待できるようになった。

(2) ビームの拡大

湾曲ミラーによるビーム拡大に関しては、ミラー中心部を下から持ち上げ、両端はミラーの自重を利用して垂れ下がるようにして湾

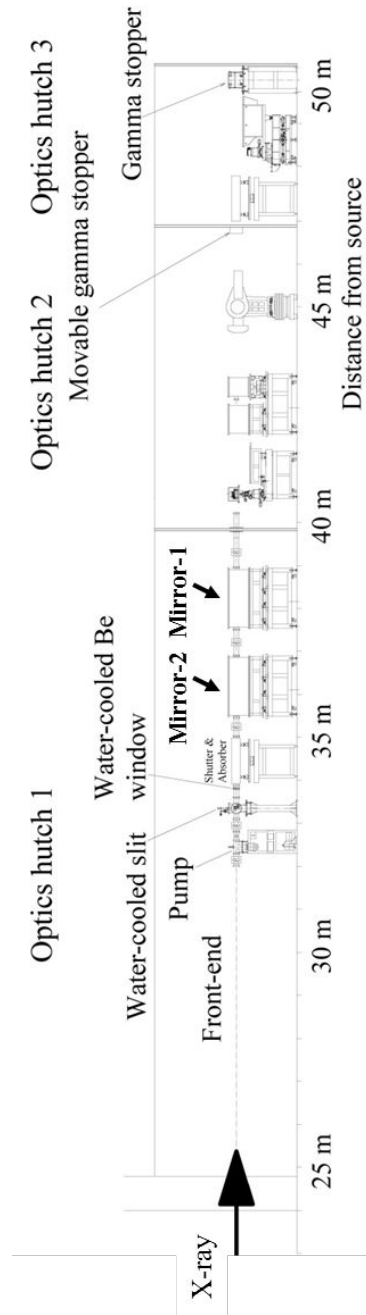


図6 ビームラインの全体構成

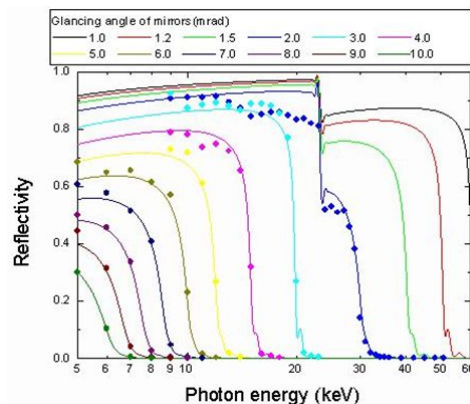


図7 X線ミラーのX線反射率

曲させる方式を検討した。しかし、自重を利用した方法では十分な湾曲が得られなかった。このため、強制的な湾曲機構の製作が必要であるという結論に達したが、予算的な問題で実現に至らなかった。

(3) X線シャッター及び画像検出器

X線シャッター及び画像検出器の開発に関しては、予定通り順調に進んだ。X線シャッターは回転円盤型であり、円盤2枚は4箇所スリットを有する同一形状で同期して回転する構造である。円盤2枚を回転して互いにずらすとスリットの幅が変わり、当初の予定どおり照射時間を連続的に0.0～20.0msの範囲で設定できる。

画像検出器には、新たにCMOSカメラを利用した装置を開発した。当初は、現有の蛍光板によるX線検出方式の装置へ組み込んで使用する予定であったが、高性能化のために新たに蛍光板方式の装置を別に製作し、この中にカメラを組み込んでX線検出器として使用した。ただし、撮影速度は最大で60画像/sであり目標の100画像/sには至らなかった。これは、購入したCMOSカメラの性能で決まった。

(4) 撮影実験

研究計画では、X線ミラーが生成する高強度準単色X線とX線シャッターを使い、新たに開発した画像検出器であるX線カメラによりマウスの血管撮影をする予定であった。しかし、SPring-8での放射光利用実験で、X線ミラー利用実験と動物実験の期間を合わせることができなかった。このため、X線ミラーが生成する高強度準単色X線の評価は、解像度チャートの撮影で実施した。新たに開発したX線カメラの評価は、通常の単色X線を使いラットの冠状動脈造影で実施した。

X線ミラーによる高強度準単色X線に関して解像度チャート撮影の結果から、大強度X線であるが従来の結晶分光器を使った場合と同等の解像度特性が確認できた。新たなX線カメラでのラット冠状動脈撮影では、従来のX線サチコンカメラに比べて同等な解像度であるが、新たなX線カメラはS/Nが良いため低ノイズである高画質画像が得られた。さらに、新たなX線カメラの撮影視野はX線サチコンカメラより横方向が1.5倍広いため、ラットの左冠状動脈前下行枝の全体を画像化することができた。これらの結果から装置開発に関して、それぞれの構成機器の性能は目標性能を達成することができた。

今後の課題については、まず高強度準単色X線とX線シャッターを使ったマウスの血管撮影を実施して性能の最終確認を行う。さらに、本研究に関連して、高強度準単色X線を使った高速イメージングの有効性が認められ、本研究で使用したX線ミラーより高性能な多層膜ミラーの開発が始まっており、本研究で開発した装置を多層膜ミラーを使っ

た実験にも提供する予定である。この多層膜ミラーは、図6のビームライン構成図において光源から36mの位置にあるMirror2に対応するものである。なお、本研究では、湾曲ミラーによるビーム拡大が成功しなかったため、強制的な湾曲機構の製作により問題を解決する必要がある。しかし、多層膜ミラーが順調に開発されれば、ビーム拡大に関しても多層膜ミラーの方で再検討した方が将来的には有効性が高いと思われる。

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15件)

Crystal Diong, Peter Jones, Hirotsugu Tsuchimochi, Emily Gray, Gillian Hughes, Tadakatsu Inagaki, Carol Bussey, Yutaka Fujii, Keiji Umetani, Mikiyasu Shirai, Daryl Schwenke, Sympathetic hyper-excitation in obesity and pulmonary hypertension - physiological relevance to the 'Obesity Paradox', Int J Obes (Lond), 査読有, 2016, in press.

DOI: 10.1038/ijo.2016.33

Rajesh Katare, Shruti Rawal, Pujika E Munasinghe, Parul Dixit, Hirotsugu Tsuchimochi, Tadakatsu Inagaki, Yutaka Fujii, Keiji Umetani, Kenji Kangawa, Mikiyasu Shirai, Daryl Schwenke, Ghrelin promotes functional angiogenesis in a mouse model of critical limb ischemia through activation of pro-angiogenic microRNAs, Endocrinology. 157(2), 査読有, 432-445, 2016.

DOI: 10.1210/en.2015-1799

Keiji Umetani, Yoshiki Kawata, Noboru Niki, Harumi Itoh, Development of 36M-Pixel Micro-CT Using Digital Single-Lens Reflex Camera, Proceedings of the 2015 IEEE International Conference on Imaging Systems & Techniques (IST), Macau, China, 査読有, 11-15, 2015.

DOI: 10.1109/IST.2015.7294461

Hisashi Nagai, Ichiro Kuwahira, Daryl O. Schwenke, Hirotsugu Tsuchimochi, Akina Nara, Sayoko Ogura, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, Yutaka Fujii, Rutsuko Yamaguchi, Lisa Wingenfeld, Keiji Umetani, Tatsuo Shimomura, Kenichi Yoshida, Koichi Uemura, James T. Pearson, Mikiyasu Shirai, Pulmonary Macrophages Attenuate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction via β 3AR/iNOS Pathway in Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia, PLoS ONE 10(7), 査読有, e0131923, 2015.

DOI:10.1371/journal.pone.0131923

Satoshi Kainuma, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, James Pearson, Chen Yi, Atsuhiko Saito, Akima Harada, Motoko Shiozaki, Hiroko Iseoka, Tadashi Watabe, Hiroshi Watabe, Genki Horitsugi, Mana Ishibashi, Hayato Ikeda, Hirotsugu Tsuchimochi, Takashi Sonobe, Yutaka Fujii, Hisamichi Naito, Keiji Umetani, Tatsuya Shimizu,

Teruo Okano, Eiji Kobayashi, Takashi Daimon, Takayoshi Ueno, Toru Kuratani, Koichi Toda, Nobuyuki Takakura, Jun Hatazawa, Mikiyasu Shirai, Yoshiki Sawa, Cell-sheet Therapy with Omentopexy Promotes Arteriogenesis and Improves Coronary Circulation Physiology in Failing Heart, *Mol. Ther.* 23(2), 査読有, 374-386, 2015.

DOI: 10.1038/mt.2014.225

Hisashi Nagai, Ichiro Kuwahira, Daryl O. Schwenke, Hirotsugu Tsuchimochi, Akina Nara, Tadakatsu Inagaki, Sayoko Ogura, Yutaka Fujii, Keiji Umetani, Tatsuo Shimosawa, Kenichi Yoshida, James T. Pearson, Koichi Uemura, Mikiyasu Shirai, β 2-adrenergic receptor-dependent attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction prevents progression of pulmonary arterial hypertension in intermittent hypoxic rats, *PLoS ONE* 9(10), 査読有, e110693, 2014.

DOI:10.1371/journal.pone.0110693

Mikiyasu Shirai, Hirotsugu Tsuchimochi, Hisashi Nagai, Emily Gray, James Todd Pearson, Takashi Sonobe, Misa Yoshimoto, Tadakatsu Inagaki, Yutaka Fujii, Keiji Umetani, Ichiro Kuwahira, Daryl Schwenke, Pulmonary vascular tone is dependent on the central modulation of sympathetic nerve activity following chronic intermittent hypoxia, *Basic Res Cardiol* 109(5), 査読有, 432-1-10, 2014.

DOI: 10.1007/s00395-014-0432-y

Keiji Umetani, Takeshi Kondoh, Phase contrast portal imaging using synchrotron radiation, *Rev Sci Instrum.* 85(7), 査読有, 073704-1-6, 2014

DOI: 10.1063/1.4885755

Keiji Umetani, Takeshi Kondoh, Phase contrast portal imaging for image-guided microbeam radiation therapy, *Proc. SPIE* 9033, 査読有, 90335P-1-6, 2014

DOI: 10.1117/12.2043216

Emily A. Gray, Hirotsugu Tsuchimochi, James T. Pearson, Takashi Sonobe, Yutaka Fujii, Misa Yoshimoto, Keiji Umetani, Mikiyasu Shirai, Daryl O. Schwenke, Assessment of the serotonin pathway as a therapeutic target for pulmonary hypertension, *J. Synchrotron Rad.* 20, 査読有, 756-764, 2013.

DOI:10.1107/S0909049513021213

James T Pearson, Mathew J Jenkins, Amanda J Edgley, Takashi Sonobe, Mandar Joshi, Mark T Waddingham, Yutaka Fujii, Daryl O Schwenke, Hirotsugu Tsuchimochi, Misa Yoshimoto, Keiji Umetani, Darren J Kelly, Mikiyasu Shirai, Acute Rho-kinase inhibition improves coronary dysfunction *in vivo*, in the early diabetic microcirculation, *Cardiovasc. Diabetol.* 12, 査読有, 111, 2013.

DOI: 10.1186/1475-2840-12-111

Satomi Kagota, Kana Maruyama, Yukari Tada, Kazuhito Fukushima, Keiji Umetani, Hirokazu Wakuda, Kazumasa Shinozuka, Chronic oxidative-nitrosative stress impairs coronary vasodilation in metabolic syndrome model rats,

Microvasc. Res. 88, 査読有, 70-78, 2013.

DOI: 10.1016/j.mvr.2013.04.001

Mikiyasu Shirai, Matthew Beard, James T Pearson, Takashi Sonobe, Hirotsugu Tsuchimochi, Yutaka Fuji, Emily Gray, Keiji Umetani, Daryl O Schwenke, Impaired pulmonary blood flow distribution in congestive heart failure assessed using synchrotron radiation microangiography, *J. Synchrotron Rad.* 20, 査読有, 441-448, 2013.

DOI: 10.1107/S0909049513007413

Keiji Umetani, James T. Pearson, Daryl O. Schwenke, Mikiyasu Shirai, Rat coronary microangiography system for preclinical imaging using synchrotron radiation, *Proc. SPIE* 8668, 査読有, 866864-1-7, 2013.

DOI: 10.1117/12.2006570

Keiji Umetani, Kazuhito Fukushima, X-ray intravital microscopy for functional imaging in rat hearts using synchrotron radiation coronary microangiography, *Rev Sci Instrum.* 84(3), 査読有, 034302-1-10, 2013.

DOI: 10.1063/1.4795830

〔学会発表〕(計 3 件)

Keiji Umetani, Yoshiki Kawata, Noboru Niki, Harumi Itoh, Development of 36M-Pixel Micro-CT Using Digital Single-Lens Reflex Camera, the 2015 IEEE International Conference on Imaging Systems & Techniques (IST), September 16-18, 2015 (Macau, China).

Keiji Umetani, Takeshi Kondoh, Phase contrast portal imaging for image-guided microbeam radiation therapy, *SPIE* 9033 Medical Imaging, February 15-20, 2014 (San Diego, California, USA).

Keiji Umetani, James T. Pearson, Daryl O. Schwenke, Mikiyasu Shirai, Rat coronary microangiography system for preclinical imaging using synchrotron radiation, *SPIE* 8668 Medical Imaging, February 9-14, 2013 (Orlando, Florida, USA).

〔その他〕

ホームページ等

公益財団法人 高輝度光科学研究センター (JASRI/SPRING-8) 利用研究促進部門 <http://rud.spring8.or.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅谷 啓二 (KEIJI UMETANI)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・主幹研究員

研究者番号：50344396