

放射光(単色 X 線)微細血管造影法を用いた腫瘍微細血管の形態評価：放射線照射および血管新生関与因子投与の腫瘍微小循環系への影響

釋舍 竜司

腫瘍血管の形態を、放射光微細血管造影法を用い観察可能とする生体実験系を作成する。また、血管新生関与因子の投与や放射線照射を行い、その形態変化や腫瘍循環動態を定量的に評価する。

ラットの下腹壁にラット乳腺腺癌を移植し、大型放射光施設 SPring-8 で発生される単色 X 線を用いた腫瘍微細血管造影を行い、同時に撮像した 100 μm のタングステン線をもとに最小描出血管径を同定した。また、移植 2 週後のラットを無処置群、放射線 (RT) 照射群、抗 VEGFR 中和抗体 (AI) 投与群、b-FGF (AP) 投与群の 4 つのグループ (各 $n = 5$) にわけ、移植 4 週後の腫瘍微細血管構築の変化を放射光で観察した。

腫瘍血管の定量的評価法には、腫瘍血管に特徴的な所見でスコア化し評価する手法と、microvessel density (MVD) につき、画像解析ソフトを用い 2 値化処理にて解析を行う手法を用いた。さらに、2 値化で得られた MVD と組織学的検討で得た MVD とを対比し、統計学的な解析を試みた。腫瘍循環動態の評価は、血管造影ダイナミック・スタディーで得た各群の time-density curve をパターン化し、それらを分類した。

放射光微細血管造影法による最小描出血管径は、20～30 μm であった。AP 群は無処置群と比較し、腫瘍血管のスコア合計は高値を示し、MVD も高値を示した。AI 群は無処置群と比較してスコア合計は低く、MVD も低値を示した。RT 群ではスコア合計は高く、MVD は低値を示した。無処置群における 2 値化で得た MVD と組織像より得た MVD との間に、統計学的に有意な相関関係を認めた。AP 群の微細血管造影法による time-density curve のパターンは漸減型を示し、AI と RT 群では漸増型を示す傾向にあった。

今回の実験結果より、従来の血管造影法では観察不可能であった 20～30 μm の腫瘍微細血管を生体下に、観察することができた。また、腫瘍微細血管新生の観察や処置前後の形態変化を定量的に評価することが可能であった。

(平成16年9月27日受理)

Analysis of the Microvasculature of Rat Transplanted Tumors Using the Synchrotron Radiation Microangiography System : Effects on Tumor Microvasculature and Microcirculation of Radiotherapy and Angiogenesis-Related Factors

Ryuji TOKIYA

The purpose of this study was to establish an *in vivo* experimental system using monochromatic synchrotron radiation microangiography (MSRA), with which we could observe morphological changes in tumor microvasculature. In addition, using this experimental system, we also investigated the morphological and dynamic changes occurring in the tumor microenvironment under the influence of an angiogenesis activator, an inhibitor, and irradiation.

Using male athymic rats into which N-nitrosomethylurea-induced mammary adenocarcinomas had been transplanted in the inferior epigastric wall, microangiography was performed with the SPring-8 BL20B2 beamline. At two weeks after tumor transplantation, the rats were divided into the following four different procedure groups of five rats each: a non-treated (NT) group, a radiation therapy (RT) group, an anti-VEGFR neutralizing antibody (AI) administered group, and a b-FGF (AP) administered group. In all groups, changes in tumor microvasculature were assessed four weeks after the tumor transplantation. The morphological changes in tumor microvessels were analyzed with a scoring system which involved the assignment of a special score to a typical finding, and microvessel density (MVD) was evaluated with binary data originating from image analyzing software. The MVD from binary analysis was compared with the MVD from histological analysis to evaluate the correlation between two groups. The circulatory dynamics of the tumor were assessed by the time-density-curve obtained from an angiographic dynamic study.

The minimal detectable vessel diameter was 20 to 30 μm . Compared to the NT group, the AP group showed a higher total tumor vessel score and a higher MVD. The AI group had a lower total score and lower MVD, and the RT group had a higher total score and lower MVD than the NT group. A statistically significant correlation was found between the binary MVD and histological MVD in both the marginal and central areas of the transplanted tumor ($p = 0.004$ and 0.02 , respectively). The time-density curve of the AP group revealed a rapid increase in the first pass curve with a peak and then a gradual decrease. The AI and RT groups showed on initial rapid increase without peak and continued gradual increase thereafter.

This experimental system could make possible *in vivo* observation of tumor microvessels with a minimal diameter about 20 to 30 μm which have not been identified before, and also provides methodology for the quantitative assessment of morphological changes in tumor vessels before and after administration of irradiation or angiogenesis related molecules. (Accepted on September 27, 2004) *Kawasaki Igakkaishi* 30(2): 83-97, 2004

Key Words ① Synchrotron radiation microangiography system ② SPring-8
③ Microvasculatur ④ Radiation therapy
⑤ Angiogenesis-related factor

はじめに

がんの転移は原発巣からのがん細胞の浸潤、血管内侵入、運搬、定着、血管外脱出、転移巣での初期増殖を経て成り立つ^{1),2)}。また、転移

巣内のがんは、直径約1~2 mmまでは、必要な栄養分を周囲組織の血管から受動的拡散によって得ることができるが、このサイズを超える増殖には持続的な血管新生が必要であり、これについてはFolkmanらが1970年代に報告³⁾している。がんの発育の初期段階よりがんの内部

やその周辺の微小循環を把握し、血管新生の主役である 100 μm 以下の既存血管や新生血管の形態を明らかにすることは、がんの転移初期の血管新生におけるモデル、リモデリングを理解する基礎を提供し、治療戦略の構築でも重要と思われる。

これまでがんの臨床では、腫瘍血管の形態を把握する主要な方法は選択的な腫瘍栄養血管造影であり、今日までの血管造影法の発展は、悪性腫瘍の診断、特に hypervascular tumor の診断と治療に貢献してきた。しかし、従来の血管造影法では、X 線管球から発生する連続 X 線をそのまま利用するため、コントラスト分解能や空間解像度に限界があり、200 μm 以下の腫瘍微細血管を描出し、評価することは困難であった⁴⁾。

大型放射光施設 SPring-8 は、従来の X 線発生装置から得られる連続 X 線に比べ、約 1 億倍の輝度を有する放射光を発生させることが可能である。放射光から分離された単色 X 線による微細血管造影システムを利用すれば、約 20~30 μm の空間解像度を持って腫瘍微細血管を描出することができる^{5), 6)}。また、この単色 X 線微細血管造影システムを使用すれば、顕微鏡下でのみ観察可能であった *in vivo* の腫瘍微細血管の形態評価や微小循環を、血管造影法で観察することが可能となる。

今回、SPring-8 の微細血管造影システムを用い、腫瘍増殖に特徴的な血管の形態変化⁷⁾を観察し、腫瘍移植後の微細血管構築の経時的変化、および血管構築に影響を与える種々の処置（放射線照射、vascular endothelial growth factor: VEGF 投与、basic-fibroblast growth factor: b-FGF 投与）の施行前後の影響について定量的な評価を試みた。さらに、血管造影法で得られる time-density curve のパターンを解析し、微細血管構築の形態変化と time-density curve のパターンの関連についても検討した。

方法および対象

Microangiographic system

高輝度放射光施設 SPring-8 (Super Photon ring-8 GeV)⁸⁾ は、兵庫県西播磨に 1997 年から開設された第三世代の放射光施設である。電子銃から発生した電子ビームは線型加速器とシンクロトロンで 8 GeV に加速され、周長 1436 m の蓄積リング内を一定の軌道で周回し、偏向電磁石により電子ビームの軌道が曲げられる際、接線方向に扇型の高輝度白色光である放射光⁹⁾が射出される。放射光は、赤外線から X 線領域までの広い連続エネルギー・スペクトルを有するが、二結晶分光器により単色化され、スリットで成形された後、被写体に照射されイメージングに使用する。今回の放射光微細血管造影法では、平行性が高く、画像のコントラストが鮮明となる単色 X 線吸収コントラスト法¹⁰⁾を用いた。使用した単色 X 線のエネルギーは、造影剤に含まれるヨウ素の固有の吸収端エネルギーよりわずかに高い 33.3 keV を使い、ヨード造影剤に最も強く吸収され、血管のコントラストが最良となる画像が得られるよう調整した¹¹⁾。実験は、全長 215 m、光源～スリット間距離 41 m、スリット～検出器間距離 170 m のビームライン (BL20B2) で行った。なお、本実験は、2002 年から 2003 年に SPring-8 利用研究課題として採択された課題番号 2002A0383-NL2-np, 2002B0666-NL2-np, 2003A0385-NL2-np として行ったものである。

Detector and imaging technique

今回の検討では、ハイビジョン級の走査線を用いる X 線直接変換型撮像管サチコンカメラを使用した。画像信号は 10 ビットデジタル信号に変換され、1024×1024 画素でデジタルフレーム・メモリシステムに格納する。電子ビームの走査範囲の一辺は 9.5 mm であり、1 画素の大きさは 9.5 μm である^{10)~13)}。また、撮像速度は 5 frames/s、露光時間 0.2 s/frame、被写体照射面での X 線強度は $\sim 10^7$ photons/mm²/s とし

た^{10), 11)}.

Experimental animal and tumor

平均重量 120～150 g (6 週齢) の雄の T 細胞機能欠如ラット(日本クレア)を Pentobarbital Sodium (大日本製薬) 体重 1 キログラム当たり 30～50 mg で麻酔の後、下腹壁に NMU 誘発腫瘍 (N-nitrosomethylurea induced rat mammary adenocarcinoma; 大日本製薬)^{14), 15)} を移植し、下腹壁腫瘍移植モデルを作製した。すなわち、移植当日に NMU 細胞株を 0.25% のトリプシンと 0.2% の EDTA で培養瓶より分離し、MEM 培養液中 (日水製薬) に 1×10^7 個の単細胞浮遊液を作製し、ラット下腹壁皮下に注入した。ラットは、ウッドチップを敷き詰めたゲージに一匹ずつ入れ、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 40-70% で、12 時間毎に部屋の照明が調節される環境で飼育した。またラットは、週 1 回、体重測定と健康状態のチェックがなされ、同時に腫瘍体積 (楕円体の公式: $V = \text{width} \times \text{length} \times \text{height} \times \pi / 6$) も測定された。移植 1 週後に、7 週齢の標準体重より 25% 以上の体重減少を示したもののや、腫瘍体積が同じ移植週数の平均体積の 50% 以下となったラットは除外した。Figure 1 に下腹壁腫瘍移植モデルを示す。実験ではラットを以下のごとく 4 群に分類した。

・無処置群 (n = 20) : 移植後 1～4 週間、無処置のまま観察した群

・RT (radiation therapy) 群 (n = 5) : 移植 2 週目の腫瘍に 4 MeV の電子線 10 Gy を一回照射した群

・AP (angiogenesis promoter) 群 (n = 5) : 移植 2 週目に $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ の b-FGF (科研製薬) で満たした動物実験用徐放性ポンプ (DURECT Corporation) を背部皮下に留置し、2 週間持続皮下投与した群

・AI (angiogenesis inhibitor) 群 (n = 5) : 移植 2 週目に $20 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ の抗 VEGFR 中和抗体: FLK-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) で満たした動物実験用徐放性ポンプを背部皮下に留置し 2 週間持続皮下投与した群

この動物実験計画は、川崎医科大学の動物実験委員会によって承認 (承認番号: 01-098, 02-114) されたものである。

Dynamic study (time-density curve)

ラットは人工呼吸管理下に十分な麻酔と筋弛緩が得られた状態で、腫瘍微細血管造影を行った。開腹後、外径約 0.5 mm のマイクロカテーテルを腹部大動脈より右総腸骨動脈に挿入し、全例、自動注入器 (M-120S, Nemoto Kyorindo) を用い、0.4 ml/s の注入速度で造影剤 (Iomeprol

400 (Eisai Co, Ltd,)) を投与した。ダイナミック・パターンの評価には first-pass 法を用いた。また、関心領域は腫瘍全体に設定し、各群の time-density curve を求めた。

Imaging analysis

1 回 30～40 秒の撮像で 150～200 フレームの連続デジタル画像が得られ、その中から腫瘍に關与する微細血管が鮮明に描出された動脈相の後期から一部静脈相にかかる連続 10 フレームを抜き出し、コンピュータ加算したものを検討に用いた。また、腫瘍微細血管径の測定は、検体撮像時の同一画面に配

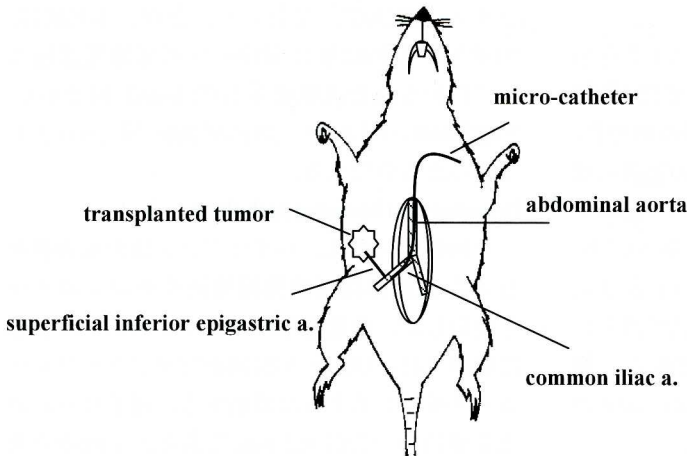


Fig. 1. Lower abdominal tumor transplanted model

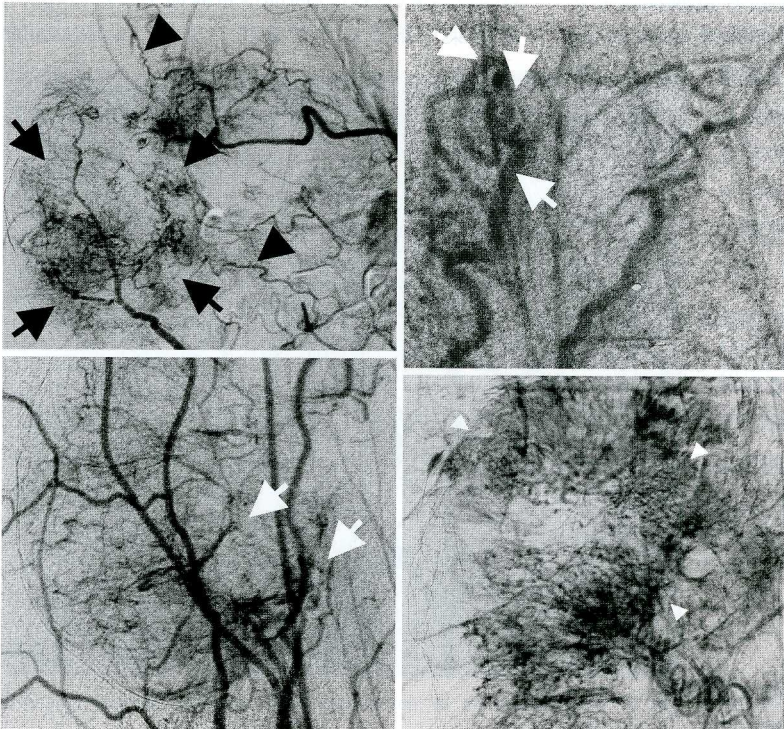
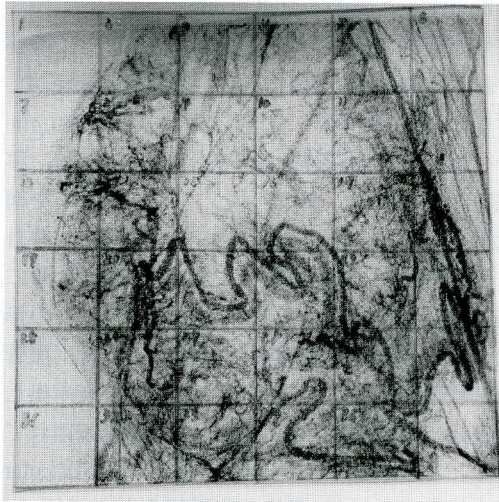
The main feeding vessels to a tumor transplanted in the lower abdominal wall are the superficial inferior epigastric arteries. An indwelling micro-catheter was placed in the right common iliac artery via the abdominal aorta.

置した，外径 $100\ \mu\text{m}$ のタングステン線のピクセル数と比較することで行った。

Scoring of tumor microvasculatures

腫瘍発育過程の微細血管の形態変化や，各処置が腫瘍微細血管構築に与えた影響を客観的に評価するため，山浦ら⁷⁾の報告をもとに腫瘍血管形成過程に特徴的な形態所見によりスコア化した．方法は，各群のコンピュータ加算血管造影合成画像 (1024×1024 画素) 上に， $6 \times 6 = 36$ 分画の正方形のグリッド (Fig. 2-A) を重ね，1～36の数字を無作為に抽出し，相当する区画につき，異常拡張，蛇行，網状構造，エンカースメント，血管周囲築み出し像 (Fig. 2-B) の5所見の内，どれか一つが認められれば1点とし，合計5点満点でカウントした．各画像につきこの操作を5回行い，平均点を算出した．また，各群で最も多く認められた項目もチェックし記録した．

A



B

a	b
c	d

Fig. 2. Scoring of the tumor vasculature

A. 36 division grid of 6×6

B. a : serpiginous (black arrow heads), retiform (black arrows)

b : dilated (white arrows)

c : encasement (white arrows)

d : extravasation (white arrow heads)

Measurement and quantification of angiological MVD

腫瘍微細血管造影法で得られた angio-MVD (angiological microvessel density) は、専用の画像解析ソフト (Image-Pro Plus version 4.5, Plantron Inc.) で二値化処理し、腫瘍の辺縁部と中心部のそれぞれ最も血管が密集する4ポイントで計測し、平均血管面積比を求めた。また、各測定ポイントの関心領域は、常に一定の大きさになるよう設定した。

Histological analysis and histological MVD

組織標本は、血管造影直後のラットより摘出した腫瘍塊で作製した。10%ホルムアルデヒドで固定後にパラフィン包埋し、5 μm の連続切片を作製、腫瘍中心線上の最大切断面標本をヘマトキシリン&エオシンで染色した。his-MVD (histological microvessel density) は、光学顕微鏡200倍率で1視野中に認められる血管数より算出した。対象となる腫瘍血管は endothelium を有し、内腔に血球の存在が確認できるものとし、壊死部は除外し腫瘍の辺縁部と壊死周辺部のそれぞれ最も血管が密集する4ポイントで計測し、平均血管数/視野として求めた。

Statistical analysis

各群の angio-MVD と his-MVD 間の相関は、 $p < 0.01$ を有意な相関、 $0.01 < p < 0.05$ を傾向ありと判定し、Spearman's rank test を用いて検定した。

結 果

Microangiographic imaging

放射光微細血管造影法で得られた微細血管は、同時に撮像された外径 100 μm のタングステン線とほぼ同径の血管からさらに3~4次分枝目の血管まで描出されており、100 μm のタングステン線幅

に相当するピクセルサイズから計算して、観察可能細小血管径は20~30 μm であると判定した (Figure 3)。

Microangiographic changes recognized in tumors of no-treated and treated groups

無処置群では腫瘍の成長に伴い、新たに観察される腫瘍血管の増生が認められた (Figure 4)。すなわち、移植後1週目には、径30~50 μm レベルの既存血管の拡張や蛇行が認められ、移植後2週目には、血管のエンケースメントや網状構造が認められるようになり、移植後3週目には、径30~50 μm レベルの既存の血管間に無数の新生血管による網状のネットワークの形成が認められた。移植後4週目には、新生血管の網状構造のさらに末梢側に造影剤の染み出し像が認められ、既存の血管と血管の距離が離れているところでは、そのほぼ中心部に hypovascular area が認められた。同部は組織標本との対比で、壊死巣であることが確認できた。hypovascular

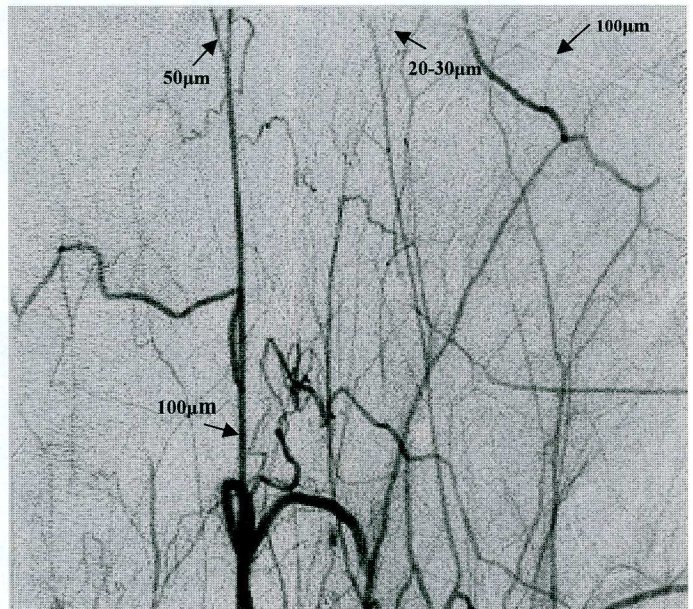


Fig. 3. Microangiogram of non-treated rat's superficial inferior epigastric vessels

Blood vessels with a diameter of about 20-30 micrometers which are the third branches from trunk vessels, are detectable. The diameter of the trunk vessels could be determined by comparing them with the tungsten wire (upper right part in the figure), which is equivalent to a diameter of an accurate 100 micrometers. (field of view : $9.5 \times 9.5\text{mm} / 1024 \times 1024$ pixel)

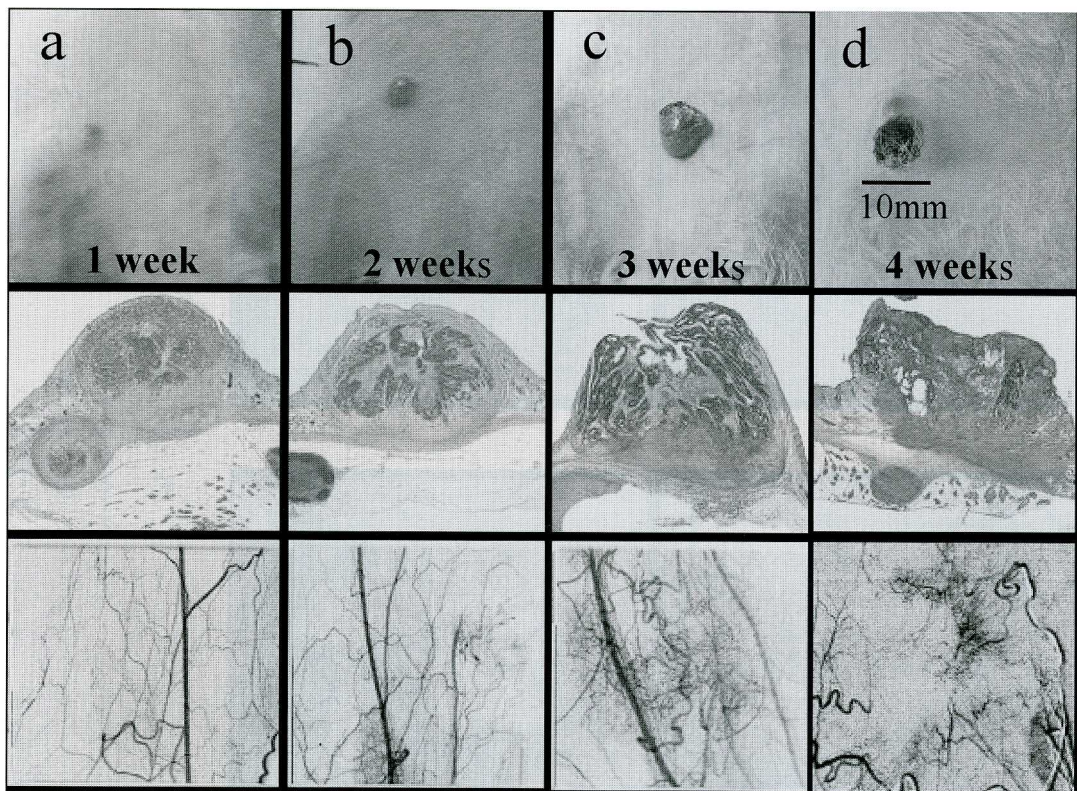


Fig. 4. Tumor growth and modification of the microvasculature according to time passage

Top : macroscopic changes in the transplanted tumor

middle : histological changes (hematoxylin and eosin stain, magnification $\times 20$)

bottom : microangiographic changes,

- a) one week : existing microvasculatures diameter about 30-50 micrometers show erpiginous and dilating changes
- b) two weeks : adding to changes noted in figure a), encasement and/or retiform changes in the existing vessels are recognized
- c) three weeks : fine retiform vessels developing between the existing 30-50 micrometer vessels have remarkably increased in number
- d) four weeks : extravasation and oozing are noted in the more peripheral part of the new fine retiform vessels

areaの多くが腫瘍のほぼ中心部に位置しており、逆に、腫瘍の辺縁部ではタンポポの綿帽子のようなhypervascular areaが形成されていた。

Figure 5に、各処置群における、移植後4週目の腫瘍微細血管造影の典型像を示す。移植後4週目のAP投与群の腫瘍微細血管造影像は、同じ移植週の無処置群と比較して、新生血管の網状ネットワークが密になり、異常拡張、網状構造、エンケースメントや血管周囲染み出し像が目立ち、中でも網状構造が最も多く認められた(**Fig. 5-B**)。また、全体のスコア合計も同じ移植週数の無処置群と比較して高値を

示した。移植後4週目のAI投与群では、同じ移植週の無処置群と比較して腫瘍の中心部にhypovascular areaが広く認められ、腫瘍辺縁部のhypervascular areaは狭く描出された。これらの血管像の構成は、径30~50 μm レベルの既存血管が中心で、径20~30 μm レベルの新生血管はまばらに描出されるのみであった(**Fig. 5-C**)。本群の腫瘍血管のスコアは無処置群と比較し低値を示し、新生血管の所見としてはエンケースメントが最も多く認められた。RT群では無処置群と比較して、染み出し像が最も多く認められた。また、RT群の血管造影像は同じ移植週

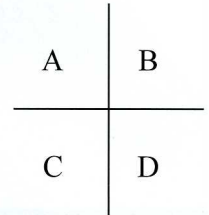
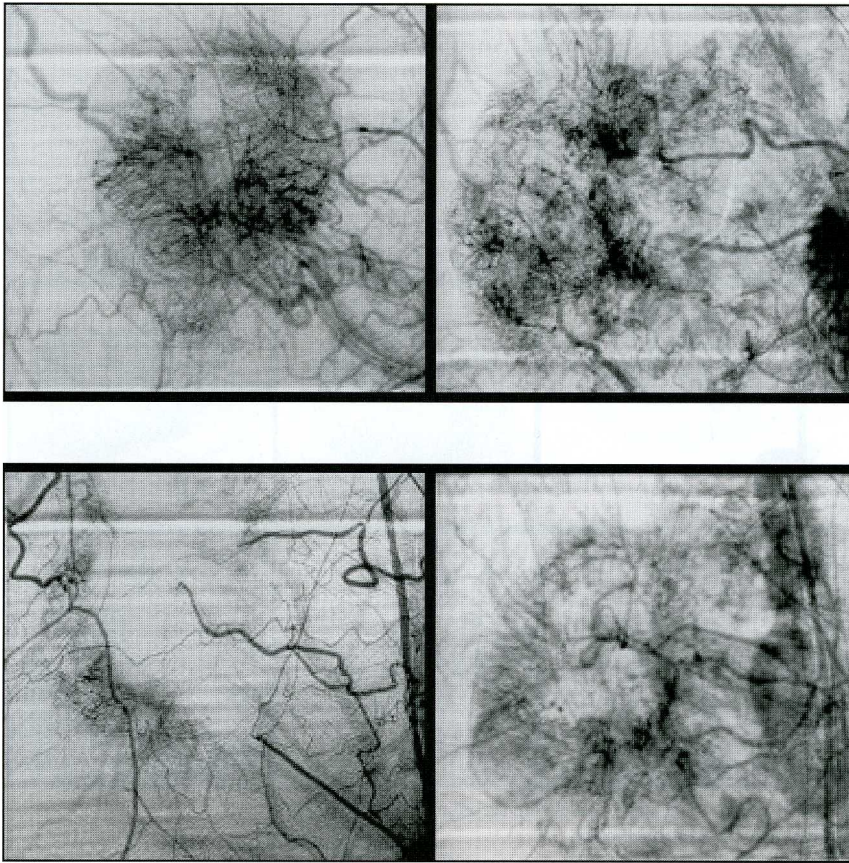


Fig. 5. Typical microangiographic changes recognized in tumors of the non-treated and treated groups (four weeks)

A) non-treated B) treated with angiogenesis promoter C) treated with angiogenesis inhibitor D) treated with irradiation

All findings are described in the text. See the corresponding chapter.

の無処置群と比較して、hypovascular areaが早期より認められる傾向がある反面、部分的には強い血管増生が認められ (Fig. 5-D), 結果としてスコア合計は高値を示した。

Assessment of the angio-MVD

移植後1～4週目の無処置群における腫瘍の中心部と辺縁部の angio-MVD を Figure 6 上段に示す。移植週数を経るに従い腫瘍辺縁部の angio-MVD は右肩上がりに上昇したが、腫瘍中心部の angio-MVD は3～4週目で緩やかに低下した。各処置群の移植後4週目における腫瘍中心部と辺縁部の angio-MVD を Figure 7 上段に示す。

Histological assessment (H&E stain) of the MVD

移植後1～4週目の無処置群における腫瘍中心部と辺縁部の his-MVD を, Figure 6 下段に示した。移植週数を重ねると腫瘍辺縁部の his-MVD は右肩上がりに上昇したが、腫瘍中心部の his-MVD は3週目でプラトーとなった。各処置群における、移植後4週目の腫瘍中心部と辺縁部の his-MVD を Figure 7 下段に示す。

Comparison between angiological MVD and histological MVD

無処置群の angio-MVD と his-MVD 間の相関関係を腫瘍辺縁部と中心部とで検討した。腫瘍の辺縁部では、his-MVD と angio-MVD 間に、有意な相関 ($r = 0.944$, $p < 0.01$) が認めら

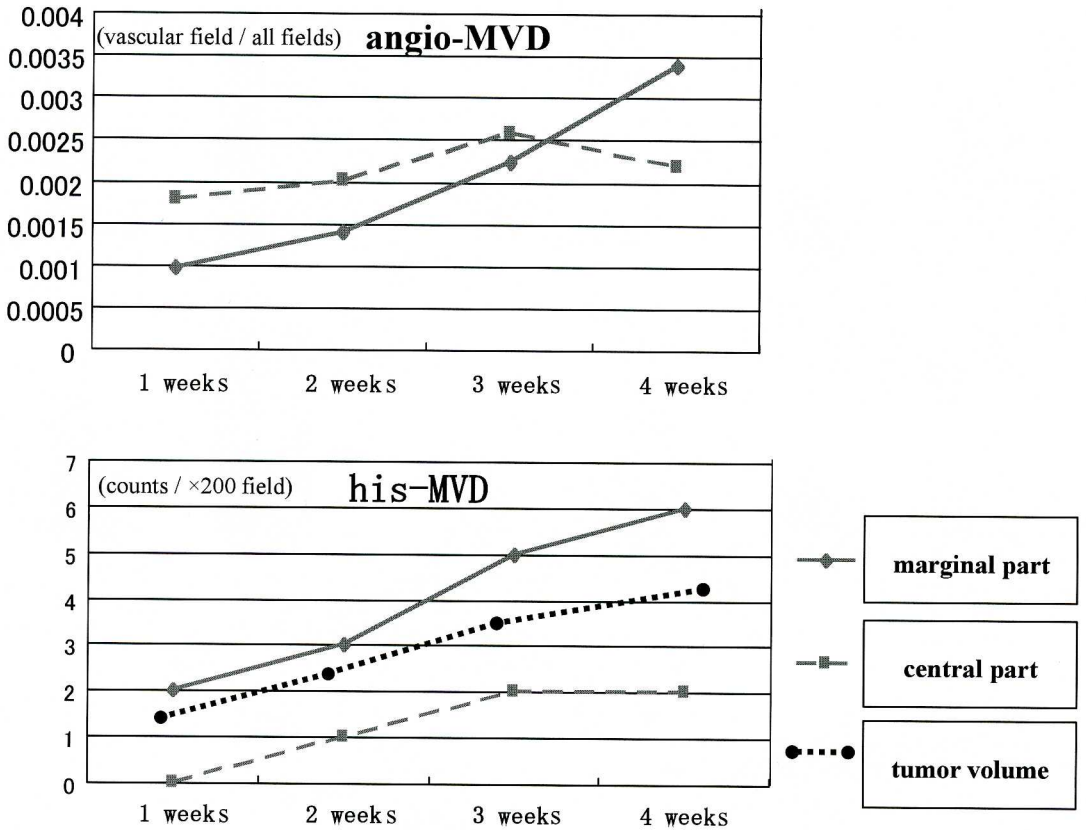


Fig. 6. Angiographical and histological microvessel density with tumor growth
 angio-MVD : angiographical microvessel density,
 his-MVD : histological microvessel density

れた。腫瘍中心部では、両者の相関係数はやや低下し相関関係の傾向 ($r = 0.732, 0.01 < p < 0.05$) が認められた。

また移植4週目の各処置群についても、腫瘍辺縁部と中心部の his-MVD と angio-MVD を対比・検討した (Figure 7 上・下段)。同じ移植週数の無処置群と比較して、RT 群では、辺縁部、中心部の angio-MVD, his-MVD はともに低値を示した。AI 投与群では、辺縁部、中心部の angio-MVD, his-MVD はともに低値を示した。AP 投与群では、辺縁部、中心部ともに angio-MVD, his-MVD が高値を示した。

Dynamic study

無処置群の微細血管造影法による time-density curve のパターンは、移植週数が増し腫瘍体積が増加すると、造影直後に急峻な立ち上

がりをみせ、ピークを形成後漸減する漸減型から、造影後に緩やかな立ち上がりを見せ、ピークを形成することなくプラトーとなる漸増型へと移行する傾向にあった (Fig. 8-A a, b, c, d)。また、各処置群における移植4週目の time-density curve は、AI 群と RT 群は漸増型に属する傾向が見られ、AP 群は漸減型に属した (Fig. 8-B e, f, g)。

考 察

1. 腫瘍移植実験モデル

1-1

本研究は、ラット下腹壁移植腫瘍の径 20~30 μm の微細な腫瘍血管構築を in vivo で観察し、得られた画像情報より腫瘍微細血管を形態

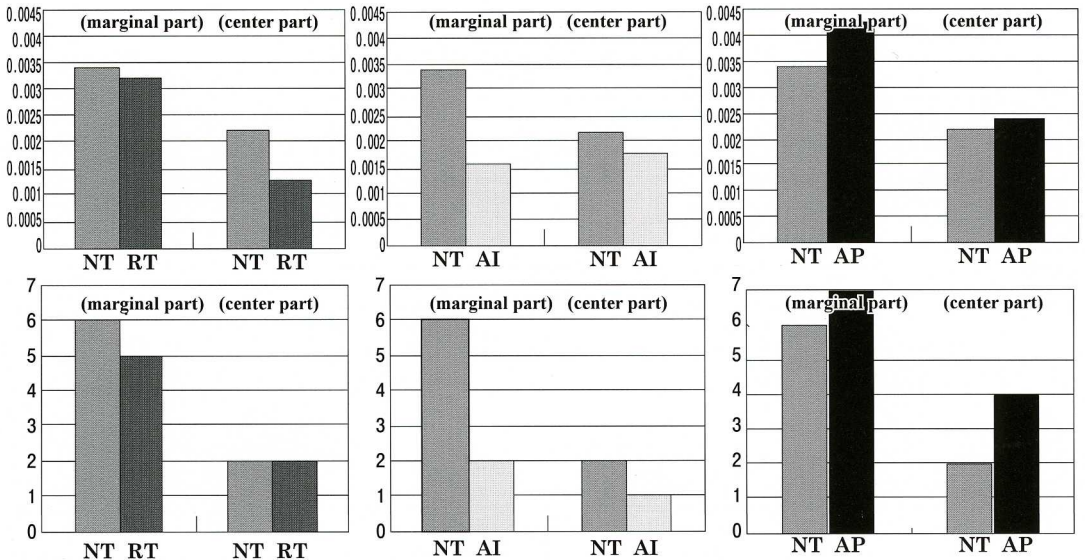


Fig. 7. Comparison of angio-MVD (top) and his-MVD (bottom) in non-treated and treated groups

Relative to the non-treated group (NTG), lower angio- and his-MVDs were observed in both marginal and central parts in the RT group. The AI group had lower angio- and his-MVDs in both marginal and central parts than the NTG. The AP group had higher angio- and his-MVDs in both marginal and central parts than the NTG group.

angio-MVD : angiological microvessel density

his-MVD : histological microvessel density

RT : radiation therapy, AI : angiogenesis inhibitor, AP : angiogenesis promoter

的に評価し、併せて腫瘍循環動態の評価を試みた最初の報告である。

我々が用いたラットの下腹壁移植腫瘍モデルは、従来の角膜¹⁶⁾や背部皮下^{6),7)}法による *in vivo* 移植腫瘍新生血管解析モデルに比べ腫瘍への栄養血管が単一化されており、微細血管まで高濃度の造影剤を到達させることが可能である。これは、造影剤の減量と反復使用を可能にし、腫瘍血管と周囲間質のコントラストをあげることで、細動脈、細静脈、毛細血管などの既存血管ばかりでなく、腫瘍の増殖に直接関与する新生血管レベルの微細な血管構築をも描出することを可能にした。

2. 放射光 (単色 X 線) を用いた腫瘍微細血管造影法からみた腫瘍血管

2-1 描出最小血管

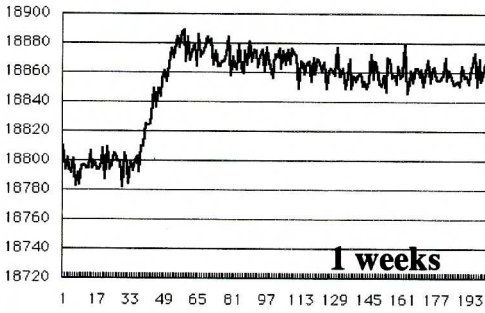
山下⁵⁾は、家兎の耳介に VX2 腫瘍を移植し、腫瘍発育に伴う腫瘍血管の変化につき、耳介動脈からゼラチン化硫酸バリウムを注入した標

本で単色 X 線により評価している。その際の最小描出血管径は、我々とほぼ同等の 25 μm であった。また、今回の検討の基礎実験として行なった、resolution test chart を用いたビームライン BL20B2 における最小空間分解能は、8.8 μm であった。理論上、同じ厚みの生体試料であれば、基礎実験結果と同じ最小描出血管径が得られたと思われるが、我々の生体試料の厚みは約 3~10 mm あり、さらには血管の微弱な拍動が影響したため、空間分解能が低下したと思われる。

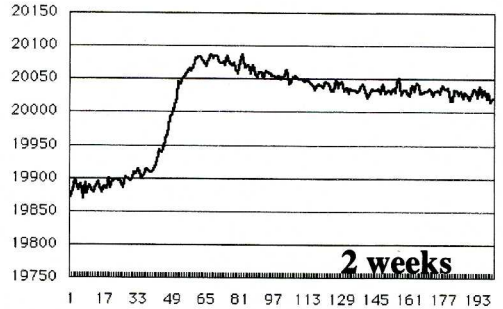
2-2 無処置群

無処置群の腫瘍微細血管像は移植週数やその平均腫瘍体積が増すごとに特徴的な形態を呈した。移植後 1~2 週目には、径 30~50 μm レベルの既存血管の拡張、蛇行やエンケースメントが中心所見となり、新生血管の網状構造は部分的に認められるのみであった。移植後 3 週目では、前述の異常な既存の血管と血管の間に無

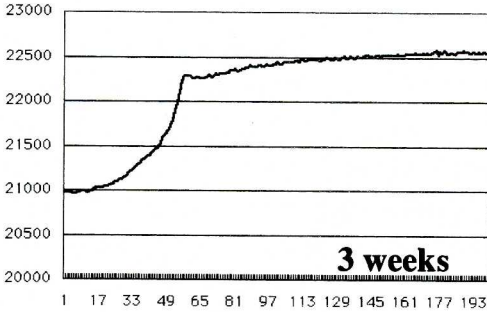
A.



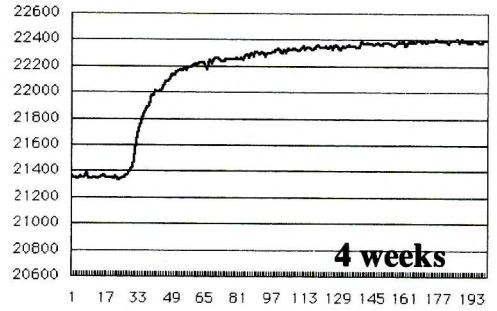
a) one week after transplantation



b) two weeks after transplantation

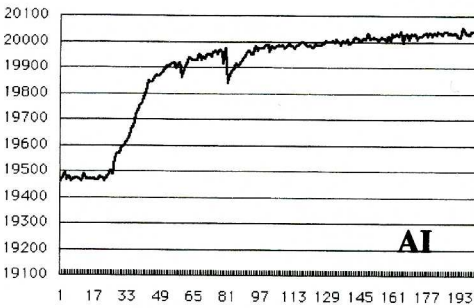


c) three weeks after transplantation

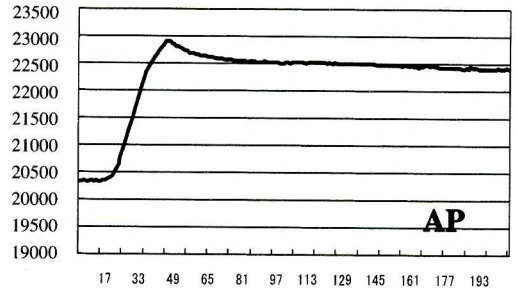


d) four weeks after transplantation

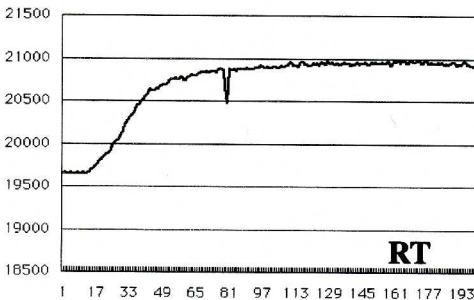
B.



e) angiogenesis inhibitor : AI



f) angiogenesis promoter : AP



g) radiation therapy

Fig. 8. Microangiographic time-density curves in tumors of non-treated and treated groups

A. Non-treated group

B. Treated groups (four weeks after transplantation)

数の新生血管のネットワーク形成が認められるようになり、4週目には、網状構造のさらに末梢側に造影剤の染み出し像が認められた。この結果は、血管新生の初期段階で、既存の血管が拡張するという報告¹⁷⁾やFolkmanらが報告した、腫瘍細胞が腫瘍血管新生因子を生成しており、それが腫瘍周辺の微小循環に影響し血管新生を引き起こすという説^{18), 19)}を形態学的に証明するものと思われた。また、腫瘍が一定の大きさを超えると、その発育には新生血管が必要となり、VEGFなどの腫瘍血管新生因子が血管内皮増殖作用や血管透過性作用を示し、腫瘍の血管新生に重要な役割を果しているとの報告^{20)~24)}の *in vivo* における証明になると考えられた。

2-3 処置群

腫瘍微細血管構築や微小循環に直接または間接的に影響を与える、b-FGF³⁾、抗VEGFR中和抗体^{25), 26)}の投与や放射線照射による影響について無処置群と同様の検討を行った。

移植後4週目のAP投与群では、同じ移植週の無処置群と比較して、新生血管の増生が著明となり、腫瘍微細血管に見られる特徴的な所見のなかでは網状構造が最も多く認められた。移植後4週目では、腫瘍の細胞密度が高くなり、腫瘍内圧は上昇し、脆弱な血管が閉塞されるため、新生血管が増えているにもかかわらず低酸素状態に陥ると考えられる。この低酸素状態は、VEGFの産生を亢進させるが、b-FGFのような血管新生因子の存在下では、VEGFの産生は過剰に亢進され²⁷⁾、その結果、移植後4週目のAP投与群では、無処置群に比べ新生血管の網状ネットワークが過剰に形成されたものと考えられた。

移植後4週目のAI投与群では、同じ移植週の無処置群と比較して腫瘍の中心部にhypovascular areaが広く認められ、腫瘍新生血管の増生が明らかに抑制されていた。おそらく血管内皮細胞の受容体に結合するVEGFの産生が抑制されることで、新生血管の誘導がなされず、壊死やアポトーシスに陥ったものと考え

られた^{28), 29)}。

RT群では無処置群と比較して、染み出し像が最も多く認められ、同じ移植週の無処置群と比較して、hypovascular areaが早期より認められる傾向があった。しかし、部分的には新生血管の増生傾向は強く、おそらく、放射線照射による血管障害作用に加え、腫瘍細胞の壊死やアポトーシスにより、低酸素下でかろうじて生き残った腫瘍細胞からの、強力なVEGFの産生要求により、新生血管が増生され、部分的な網状構造や染み出し像が目立つようになったものと考えられる。

2-4 組織学的形態評価の裏付け

我々は、angio-MVDの信頼性を検定する目的で、血管造影で使用した同一標本のhis-MVDとの対比を試みた¹¹⁾。his-MVDの評価法は、腫瘍の新生血管を定量評価するための一般的な方法であり、近年この方法により、腫瘍新生血管のMVDと予後の間にしばしば強い相関関係が認められることが報告されている^{30), 31)}。

今回の検討では、腫瘍の辺縁部と中心部にかけて、angio-MVDとhis-MVDの定量結果を比較した。その結果、腫瘍の辺縁部で統計的に有意な相関が認められ、中心部では有意ではないものの相関の傾向が認められた。腫瘍中心部での相関の低下は、中心部に存在するhypovascular領域をangio-MVDが過大評価した結果によるものと考えられる。his-MVDでは、腫瘍中心部のhypovascular領域は壊死巣に相当し、腫瘍血管はまったく認められなかったが、angio-MVDでは、壊死巣を囲む組織中を通過する腫瘍微細血管を誤ってカウントした可能性が考えられた。現在のところangio-MVDの手法では、hypovascular領域と壊死を区別する方法はなく、組織学的に壊死巣の多い腫瘍の場合はangio-MVDの評価に注意が必要と思われた。しかし今回の検討から、angio-MVDを定量的に評価することは、his-MVDと同等に意義があることが認識できた。

3. 腫瘍微小循環に影響をおよぼす腫瘍微細血管構築所見

腫瘍微小循環は、様々ながん治療に重要な役割を果たしている。例えば、化学療法では、腫瘍内の血流が腫瘍組織への薬剤分配を決定する要因であり^{32),33)}、放射線治療における治療効果は、腫瘍内の血流に影響される腫瘍組織酸素分圧に依存するといわれており^{34),35)}、温熱療法では、殺細胞効果は腫瘍内の血流を減少させることで増強することが知られている^{36),37)}。このようにがん治療を行う上で、腫瘍の血管系を単に構築や形態面のみでなく、微小循環動態の指標としても把握することが重要であり、われわれもそうした観点から検討を試みた。すなわち微小循環動態の指標として、造影剤の一定量、一定圧投与下での first-pass 法による time-density curve を用い、無処置群と処置群それぞれの time-density curve によるダイナミック・パターンを前項で述べたスコア化や MVD の結果と対比し血管形態と血流動態を分析・検討した。

3-1 スコア化および MVD との対比

無処置群において、径 30~50 μm レベルの既存血管の拡張、蛇行やエンケースメントが変化の主体をなす移植 1~2 週目では、time-density curve は造影直後に急峻な立ち上がりを見せ、ピークを形成後漸減する漸減型を呈した。また、腫瘍微細血管造影像においてエンケースメントや、径 20~30 μm レベルの新生血管に網状構造や染み出し像が多く認められる移植 3~4 週目の time-density curve は、造影後に緩やかな立ち上がりを見せ、その後ピークを形成することなくプラトーとなる漸増型を呈する傾向があった。次に、AP 投与群で最も高頻度に認められた特徴的所見は、新生血管の増生と密な網状構造の形成であり、その time-density curve は漸減型であった。また、AI 投与群では、全体として新生血管の形成は抑制され、hypovascular area の存在とエンケースメントが最も多く認められたが、それに対応するダイナミック・パターンは造影後に緩やかな立ち上

りを見せ、その後ピークを形成することなくプラトーとなる漸増型を呈する傾向にあった。RT 群では、hypovascular area の存在と染み出し像が最も多く認められ、ダイナミック・パターンは漸増型を呈する傾向にあった。

各群の angio-MVD と time-density curve の対比では、腫瘍辺縁および中心部の angio-MVD が減少する AI 群や、腫瘍移植 3~4 週目の無処置群のように、腫瘍辺縁の angio-MVD が相対的に増加していても腫瘍全体の細胞密度の増加や中心部の壊死巣の出現で腫瘍組織内の間質圧が上昇し、一時的な腫瘍血管の閉塞が起こっている場合³⁸⁾には、time-density curve は造影後に緩やかな立ち上がりを見せ、その後ピークを形成することなくプラトーとなる漸増型を呈する傾向にあった。また、造影直後に急峻な立ち上がりを見せ、ピークを形成後漸減する漸減型の time-density curve は、単純に腫瘍辺縁・中心部の angio-MVD が非常に増加している AP 群や、腫瘍内の間質圧が低く既存血管の循環動態が比較的保たれている腫瘍移植 1~2 週目群に見られるパターンであった。

ま と め

SPring-8 放射光から発生する単色 X 線を用い、移植腫瘍増殖に関与する径 20~30 μm レベルの微細な既存および新生血管構築を観察する新しい方法論を提示した。本方法では、従来の血管造影法では観察できなかった腫瘍内、および腫瘍周辺の微細血管の構築や腫瘍血管の微小循環動態の観察が可能であった。さらに、この実験系を用いることで、in vivo における腫瘍微細血管の分布密度が angio-MVD として定量化可能であり、この方法による処置前・後の形態変化の定量評価が、従来から行なわれている組織学的評価法 (his-MVD) で得られた結果と壊死巣の過大評価という留保条件下で相関することが分かった。本研究で得られた方法論や結果が、今後がんの治療戦略の一端をになう放射線治療や血管新生関与因子を含めた分子標的

治療薬投与による、腫瘍血管への形態学的影響やその効果を客観的に判定する際に、有用な一つのステップを提供するものと期待された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の方向性とデータ解析につき御指導いただきました川崎医科大学放射線（治療）学教室 今城吉成教授に深い感謝の意を表します。また、技術的な御指導をしていただきました川崎医科大学放射線（診断）学教室 梶原康正教授ならびに今

井茂樹助教授、（財）高輝度光科学研究センター（SPring-8）の梅谷啓二研究員、川崎医科大学組織・電子顕微鏡センターの吉田陽子、若林かずみ技術員に心から感謝いたします。本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費（代表者：今城吉成13-212, 14-210, 15-208A）の援助によって行われたものである。本論文の要旨は第15回日本放射線腫瘍学会総会（平成14年11月23日、東京）、第41回日本癌治療学会総会（平成15年10月24日、札幌）、the 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation Date: 7-11 September 2004, Hyogo, Japan において発表した。

文 献

- 1) Fidler IJ : Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 87 : 1588-1592, 1995
- 2) Fidler IJ, Ellis LM : The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79 : 185-188, 1994
- 3) Folkman J : The vascularization of tumors. *Sci Am* 234 : 58-64, 70-73, 1976
- 4) Mori H, Hyodo K, Tanaka E, Uddin-Mohammed M, Yamakawa A, Shinozaki Y, Nakazawa H, Tanaka Y, Sekka T, Iwata Y, Handa S, Umetani K, Ueki H, Yokoyama T, Tanioka K, Kubota M, Hosaka H, Ishikawa N, Ando M : Small-Vessel Radiography in Situ with Monochromatic Synchrotron Radiation. *Radiology* 201 : 173-177, 1996
- 5) Yamashita T : Evaluation of the microangioarchitecture of tumors by use of monochromatic x-rays. *Invest Radiol* 36 : 713-720, 2001
- 6) Umetani K, Itasaka S, Ogura M, Kimura H, Hiraoka M : Synchrotron radiation microangiography system for observation of blood flow in murine tumor vasculature. *Bioimages* 9 : 97-106, 2001
- 7) 山浦玄嗣 : 腫瘍血管の形態と機能に関する実験的研究. *抗研誌*23 : 100-120, 1971
- 8) Kamitsbo H : Spring-8 Program, *J. Synchrotron Rad* 5 . 1988, pp 162-167
- 9) 大柳編 : シンクロトロン放射光の基礎, 東京, 丸善, 1996
- 10) 梅谷啓二 : 高分解能動画検出器を使った微小血管造影, *放射光学会誌* 14(4) : 40-46, 2001
- 11) Tokiya R, Umetani K, Imai S, Yamashita T, Hiratsuka J, Imajo Y : Observation of Microvasculatures in Athymic Nude Rat Transplanted Tumor Using Synchrotron Radiation Microangiography System. *Academic Radiology* (in press)
- 12) Umetani K, Yamashita T, Maehara N, Imai S, Kajihara Y : Synchrotron radiation microangiography for real-time observation of angiogenic vessels in cancer. *Anal Sci* 17 (supp) : i531-i534, 2001
- 13) Umetani K, Yamashita T, Maehara N, Tokiya R, Imai S, Kajihara Y : Small-field angiographic imaging of tumor blood vessels in rabbit auricle using x-ray SATICON camera and synchrotron radiation. *EMBC supp* : 978-981, 2003
- 14) Osborne MP, Ruperto JF, Crowe JP, Rosen PP, Telang NT : Effect of tamoxifen on preneoplastic cell proliferation in N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 52 : 1477-1480, 1992
- 15) Quan C, Wang HL, Lu SJ : Resistance to mammary carcinogenesis in Copenhagen rats : Potential roles of vascular endothelial growth factor and mast cells. *Cancer Lett* 186 : 165-175, 2002
- 16) Gimbrone Jr MA, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J : Tumor growth and neovascularization : An experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52 : 413-427, 1974

- 17) Less JR, Skalak TC, Sevick EM, Jain RK : Microvascular architecture in a mammary carcinoma : Branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res* 51 : 264 – 273, 1991
- 18) Folkman J : Tumor angiogenesis : Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285 : 1182 – 1186, 1971
- 19) Folkman J, Klagsbrun M : Angiogenic factors. *Science* 235 : 442 – 447, 1987
- 20) Dvorak HF : Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor : a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20 : 4368 – 4380, 2002
- 21) Shibuya M : Vascular endothelial growth factor receptor family genes : when did the three genes phylogenetically segregate? *Biol Chem* 383 : 1573 – 1579, 2002
- 22) Toi M, Matsumoto T, Bando H : Vascular endothelial growth factor : its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2 : 667 – 673, 2001
- 23) Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K : Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 60 : 203 – 212, 2000
- 24) Karkkainen MJ, Petrova TV : Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 19 : 5598 – 5605, 2000
- 25) Ferrara N : The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 36 : 127 – 137, 1995
- 26) Terman BI, Dougher-Vermazen M : Biological properties of VEGF/VEPE receptors. *Cancer Metastasis Rev* 15 : 159 – 163, 1996
- 27) Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R : Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189 : 824 – 831, 1992
- 28) Senger DR, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF : Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation. *Invasion Metastasis* 14 : 385 – 394, 1994 – 5
- 29) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E : Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 : 843 – 845, 1992
- 30) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J : Tumor angiogenesis and metastasis—Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324 : 1 – 8, 1991
- 31) Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T : Tumor angiogenesis in breast cancer : Its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* 36 : 193 – 204, 1995
- 32) Suzuki M, Hori K, Abe I, Saito S, Sato H : Functional characterization of the microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 3 : 115 – 126, 1984
- 33) Jain RK : Determinants of tumor blood flow : A review. *Cancer Res* 48 : 2641 – 2658, 1988
- 34) Cater DB, Adir HM, Grove CA : Effects of vasomotor drugs and “mediators” of the inflammatory reaction upon the oxygen tension of tumors and tumor blood-flow. *Br J Cancer* 20 : 504 – 516, 1966
- 35) Kruuv JA, Inch WR, McCredie JA : Blood flow and oxygenation of tumors in mice. I. Effects of breathing gases containing carbon dioxide at atmospheric pressure. *Cancer (Phila.)* 20 : 51 – 59, 1967
- 36) Voorhees 3rd WD, Babbs CF : Hydralazine-enhanced selective heating of transmissible venereal tumor implant in dogs. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19 : 1027 – 1033, 1982
- 37) Horsman MR, Christensen KL, Overgaard J : Hydralazine-induced enhancement of hyperthermic damage in a C3H mammary carcinoma in vivo. *Int J Hyperthermia* 5 : 123 – 136, 1989
- 38) Leunig M, Yuan F, Menger MD, Boucher Y, Goetz AE, Messmer K, Jain RK : Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T on SCID mice. *Cancer Res* 52 : 6553 – 6560, 1992