

九州シンクロトロン光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：30-2406029I

B L 番号：BL07

(様式第 5 号)

血管病変を含むヒト疾患モデルマウス組織のマイクロ CT イメージング

Micro-CT imaging of tissues in mouse model of human disease including vascular lesion

権田幸祐^{1,2}、熊谷圭悟¹、木村森音¹、米山明男³

Kohsuke Gonda, Keigo Kumagai, Mone Kimura, Akio Yoneyama

¹ 東北大学大学院医学系研究科医用物理学分野

Department of Medical Physics, Graduate School of Medicine, Tohoku University

² 東北大学 国際放射光イノベーション・スマート研究センター

International Center for Synchrotron Radiation Innovation Smart (SRIS), Tohoku University

³ 九州シンクロトロン光研究センター・ビームライングループ
Beamline Group, SAGA Light Source

- ※ 1 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後 2 年以内に研究成果公開 {論文 (査読付) の発表又は研究センターの研究成果公報で公表} が必要です (トライアル利用を除く)。
- ※ 2 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※ 3 共著者には実験参加者をご記載ください (各実験参加機関より 1 人以上)。

1. 概要 (注：結論を含めて下さい)

癌、糖尿病、血栓症、筋萎縮など、国民の健康に大きな影響を及ぼす疾病は、血管の構造や機能の変化を伴う血管病変を発症していることが多い。我々は高感度血管造影剤として、金ナノ粒子を合成し、これを各種のヒト疾患モデルマウスに静脈注入することで、実験室の X 線 CT において各疾病組織の血管病変のイメージングを行ってきた。

本研究ではより微細なレベルでの血管病変の観察を目的として、上記病変の中でも腫瘍組織と血栓組織に着目し、10keV と 12keV の放射光を用いてイメージングに適した撮影条件の検討を行った。その結果、腫瘍組織では金原子の L 吸収端にあたる 12keV が高コントラストで造影できたが、血栓組織は、10keV の方が高コントラストになる面白い結果を得た。本検討条件を応用し、高輝度 X 線である放射光でさらに血管病変の詳細を明らかにすることができれば、各疾病の新診断技術開発や創薬への展開が期待される。

(English)

Diseases that have a significant impact on the health of the public, such as cancer, diabetes, thrombosis, and muscle atrophy, often develop vascular lesions accompanied by changes in the structure and function of blood vessels. We have synthesized gold nanoparticles as a highly sensitive vascular contrast agent and intravenously injected them into various human disease mouse models to image vascular lesions in various diseased tissues using laboratory X-ray CT.

In this study, with the aim of observing vascular lesions at a finer level, we focused on tumor tissues and thrombus tissues among the above lesions and investigated the imaging conditions suitable for imaging using 10keV and 12keV synchrotron radiation. As a result, we obtained an interesting result that tumor tissues could be imaged with high contrast at 12keV, which corresponds to the L absorption edge of gold atoms, but thrombus tissues had higher contrast at 10keV. By applying the conditions of this study to other diseased tissues, we will further clarify the details of vascular lesions using synchrotron radiation, which is a high-brightness X-ray. It is expected that this will lead to the development of new diagnostic

2. 背景と目的

本研究は、金ナノ粒子を X 線造影剤に用い、癌と血栓症のモデルマウスに対し、これらの病症を血管病変に注目して SAGA-LS の放射光吸収 CT で可視化する。獲得した「放射光吸収 CT で計測した一部の組織部位データ」と「実験室の X 線 CT で計測した組織全体のデータ」、「可視域の蛍光免疫染色で評価した組織切片のデータ」らを融合し、疾病の進行や抑制の機序解明を行う。得られた疾病情報は、診断技術開発や創薬の薬効評価に応用し、放射光を活用した医学研究の新領域開拓を目指す。

癌では、抗癌剤に関連した腫瘍血管の構造や機能変化を正しく理解することが重要となる。実験室の X 線 CT の分解能は $9\mu\text{m}$ 程度であり、微小血管（数 $\sim 10\mu\text{m}$ ）の観察には十分でなかった。よって分解能が数ミクロンの SAGA-LS の放射光吸収 CT で金ナノ粒子の詳細な局在解析が出来れば、腫瘍血管構造の理解が進み、血管の構造や機能を活用した診断や創薬に利用可能となる。

血栓症では、金ナノ粒子の血栓組織内への取り込みを指標に、放射光吸収 CT で血栓形成過程の詳細な評価を行うことで、血栓症の診断技術や血栓溶解剤の開発に役立てる。

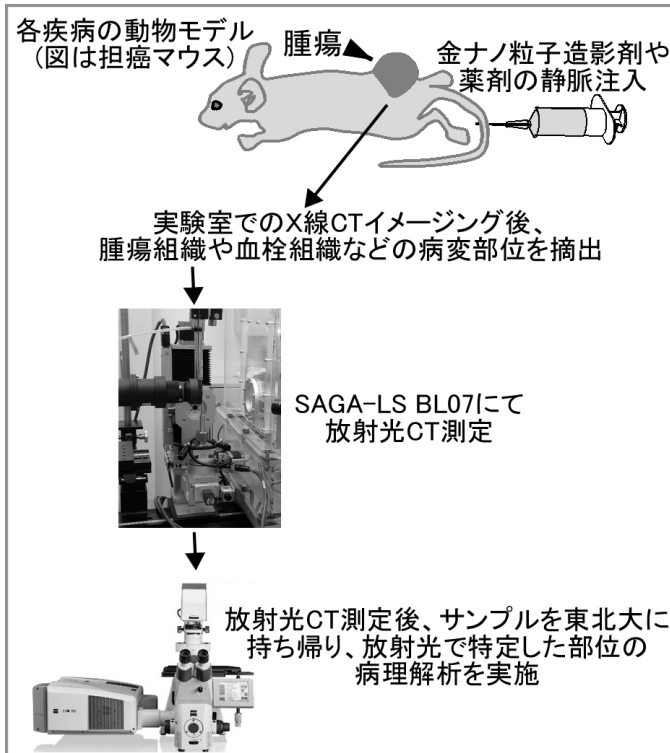
3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

【癌】マウス由来の癌細胞を野生型マウスに移植した担癌マウスを調製する。その後適切な大きさの腫瘍になったマウスに対し、目的の大きさや病態に変化したと想定されるマウスを調製する。これらのマウスに対して、尾静脈から金ナノ粒子血管造影剤を数百 μL 注入する。注入直後や注入から数時間後までを目安に実験室の X 線 CT で経時的に撮影し、腫瘍血管の病態を評価する。腫瘍血管を含む組織は全ての撮影後摘出し、ホルマリン固定を行う。固定後の腫瘍組織に対し、実験室 X 線 CT 画像の解析結果から決定した要観察領域の組織を切り出した後、内径 2mm のチューブ内に挿入する。チューブ内に格納した腫瘍血管を含む組織を SAGA-LS 施設に持ち込み後、BL07 光学ハッチに備わっている放射光用のマイクロ CT 装置でイメージングを実施し、詳細な解析を行う。放射光による CT 撮影後の組織は、蛍光免疫染色による病理組織解析を行うために東北大学に持ち帰り継続して評価を行う。

【血栓症】マウスの静脈を部分的に狭窄させる。この措置により 24 時間程度で十分な大きさの血栓が静脈内に形成される。予備的な検討では、血栓は狭窄部位に近い方から発達し短い血栓組織になるものや、長い組織に成長するものもある。血栓ができ始めから形成の成長が落ちつくまでの時間変化の条件でのサンプル調製が必要となる。具体的な計測法として、血栓成長の生体観察を行うため、静脈の狭窄後、尾静脈から金ナノ粒子血管造影剤数十 μL 注入する。実験室 X 線 CT で血栓組織の成長を経時的に撮影しつつ、血栓組織の摘出時間になったマウスから組織を摘出し、ホルマリン固定を行う。固定後の血栓組織に対し、実験室 CT 画像の解析結果から決定した要観察領域の組織を切り出した後、内径 2mm のチューブ内に挿入する。チューブ内に格納した血栓組織を SAGA-LS 施設に持ち込み後、BL07 光学ハッチに備わっている放射光用のマイクロ CT 装置でイメージングを実施し、詳細な解析を行う。放射光による CT 撮影後の組織は、蛍光免疫染色による病理組織解析を行うために東北大学に持ち帰り継続して評価を行う。

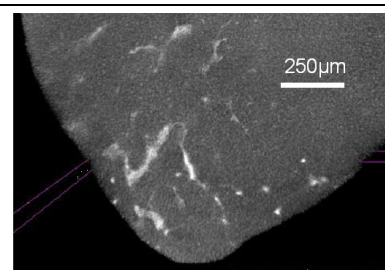
4. 実験結果と考察

放射光のエネルギーは、装置の設定上、最も光子密度が高いと考えられる 10keV と金原子の L 吸収端である 12keV でのイメージングを行なった。



その結果、右図にあるように両エネルギーにおいて、実験室の X 線 CT では可視化が困難な 10 μ m 以下の微細な血管の可視化に成功した。また腫瘍組織では金原子の L 吸収端にあたる 12keV の方が 10keV に比べて高コントラストで造影できた。

血栓組織においては、血栓組織内に取り込まれた金ナノ粒子の分布の可視化を試みた結果、血栓組織内に金ナノ粒子が不均一に存在していることが分かった。また腫瘍組織とは異なり 10keV の方が 12keV に比べ高コントラストになる面白い結果を得た。本検討条件を応用し、高輝度 X 線である放射光でさらに多くのサンプルの血管病変の詳細を明らかにすることで、各疾病の新診断技術開発や創薬への展開が期待される。



SAGA-LS BL07にて可視化された
腫瘍血管(白色部位)

5. 今後の課題

撮像するためのエネルギー条件に関しては一定の評価ができたため、今後はこの条件を応用し、サンプル数を増やし定量的な解析に結び付けること、放射光 CT の結果得られる画像データの 3 次元的な解析精度を向上させること、さらには放射光 CT で計測した情報と病理解析のデータを融合することが期待される。

6. 参考文献

1. Yoneyama A., et al., Advanced X-ray imaging at beamline 07 of the SAGA Light Source. *Journal of Synchrotron Radiation* 28: 1966-1977 (2021).

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

(*)は Corresponding Author を示す。

1. Kanabuchi S, Kitamura K, Takano-Kasuya M, Inose T, Nishidate C, Yamanashi M, Kudo M, Ito T, Ito N, Okamoto H, Taniyama Y, Kobayashi Y, Kamei T, **Gonda K***. X-ray irradiation negatively affects immune responses in the lymphatic network. *Microvascular Research* 148: 104511 (2023).
2. Une N, Takano-Kasuya M, Kitamura N, Ohta M, Inose T, Kato C, Nishimura R, Tada H, Miyagi S, Ishida T, Unno M, Kamei T, **Gonda K***. The anti-angiogenic agent lenvatinib induces tumor vessel normalization and enhances radiosensitivity in hepatocellular tumors *Medical Oncology* 38: 60 (2021).
3. Inose T, Kitamura N, Takano-Kasuya M, Tokunaga M, Une N, Kato C, Tayama M, Kobayashi Y, Yamauchi N, Nagao D, Aimiya T, Furusawa N, Nakano Y, Kobayashi Y, **Gonda K***. Development of X-ray contrast agents using single nanometer-sized gold nanoparticles and lactoferrin complex and their application in vascular imaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 203: 111732 (2021).
4. Nakagawa T, **Gonda K***, Kamei T, Cong L, Hamada Y, Kitamura N, Tada H, Ishida T, Aimiya T, Furusawa N, Nakano Y, Ohuchi N. X-ray computed tomography imaging of a tumor with high sensitivity using gold nanoparticles conjugated to a cancer-specific antibody via polyethylene glycol chains on their surface. *Science and Technology of Advanced Materials*.17: 387-397 (2016).

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を 2～3)

癌、血栓、金ナノ粒子、血管

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後 2 年以内です。例えば 2018 年度実施課題であれば、2020 年度末(2021 年 3 月 31 日)となります。)

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告

(報告時期：2026 年 3 月)