

令和元年6月25日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19346

研究課題名(和文) 超高磁場7テスラMRIを用いたミニマル肝性脳症の発現機序に関する臨床的研究

研究課題名(英文) Clinical study of pathogenic mechanism of minimal hepatic encephalopathy using ultra-high magnetic field 7 Tesla MRI

研究代表者

佐原 圭 (SAWARA, KEI)

岩手医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：40405816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミニマル肝性脳症(MHE)を認める肝硬変患者群では、ミニマル肝性脳症認めない(nonMHE)肝硬変患者群と比し、脳内グルタミンの増加と脳内ミオイノシトールの減少が顕著に認められた。MHEの発症予測因子を検討し、血中アンモニア値の上昇、血清総カルニチンと血清アシルカルニチンの比、クレアチン値の上昇、eGFR値の低下が予測因子になることを示した。脳内のdiffusion kurtosis imaging (DKI)を測定し、mean kurtosis (MK)が被殻においてMHE群ではnonMHE群と比較し減少していることを見出した。上記の結果からMHEの発症機序の解明を一歩進めたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変患者において肝性脳症は重篤な合併症であり、その前段階であるミニマル肝性脳症は記憶力や集中力の低下を招き交通違反や交通事故にも繋がる可能性があり、今後大きな社会的問題となることが示唆されている。従ってミニマル肝性脳症の病態を解明し、早期に診断することは非常に重要である。本研究では、ミニマル肝性脳症発症予測因子を検討し、高磁場MRIを用いて脳内の微細な変化を捉え、新たな知見が得られたことによりミニマル肝性脳症の病態を解明、早期診断に寄与したと考えられ、学術的、社会的に大きな意義があったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Compared with liver cirrhosis patients without minimal hepatic encephalopathy (non MHE), liver cirrhosis patients with minimal hepatic encephalopathy (MHE) showed marked increase in glutamine in the brain and decrease in myoinositol in the brain. We examined the predictors of onset of MHE, showed that elevated blood ammonia levels, the ratio of total serum carnitine to serum acylcarnitine (Ac-CA / T-CA ratio), elevated levels of creatine, and decreased levels of eGFR are predictors. We measured diffusion kurtosis imaging (DKI) in the brain and found that mean kurtosis (MK) decreased in putamen in the MHE group compared to the non MHE group. From these results, we considered that the elucidation of pathogenic mechanism of MHE has been advanced one step further.

研究分野：肝臓病

キーワード：ミニマル肝性脳症 カルニチン グルタミン ミオイノシトール MRI MRS DKI

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

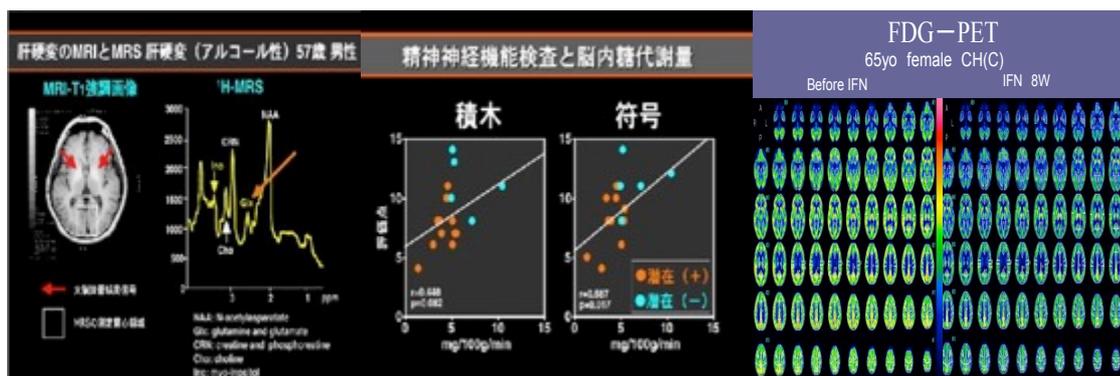
### 【研究の学術的背景】

ミニマル肝性脳症は、臨床症状として顕在化しておらず、鋭敏で定量的な精神神経機能検査により検出可能な軽微な精神神経機能異常を示す病態とされ、精神神経学的認知機能異常だけでなく顕性脳症の前段階の症例が含まれていると考えられている。従って、精神神経機能異常の早期発見は、患者のQOLの改善および病状をコントロールするためにも必要と考えられている。また、ウイルス性慢性肝炎については、明らかな肝硬変を伴わない状態においても、全身倦怠感やうつ症状のような精神神経機能異常を認める患者も多く、最近ではC型肝炎感染患者においては記憶力や集中力の低下が認められるとの報告もある(Mcandrews M, et al. Hepatology 2005)。欧米においては、潜在性肝性脳症患者に交通違反や交通事故のリスクが高いとの報告もあり社会的な問題となりつつある(Bajaj J, et al. Hepatology 2009)。本邦においても慢性肝炎、肝硬変の患者数の増加に伴いこのようなミニマル肝性脳症による問題が今後社会的にも重要になることが予想される。しかし、これまで顕性肝性脳症、精神神経機能異常に関する臨床的および基礎的検討がなされてきたがその発現機序は未だ不明な部分も多い。さらにミニマル肝性脳症は臨床上見過ごされることも多く、特徴的な臨床像も明確にされていない。申請者および研究グループは肝硬変における定量的精神神経機能検査法を世界に先駆けて開発し(Kato A, et al. Hepatol Res 2004) (Kato A, Sawara K, et al Hepatol Res 2008)、高磁場MRI, MRS検査、PET検査を用いて肝性脳症、肝硬変の脳の形態的、器質的変化および脳内物質代謝異常を研究し、世界に発信してきた(Sawara K, et al. Hepatol Res. 2004)、(Wang T, Sawara K, Suzuki et al. Neurochem Res 2012) <図1、2、3>また、以前から肝性脳症の細胞分子生物学的な機序の解析も進めている(Sawara K, et al Neurochem Int. 2009)。一方、2011年6月には本学共同施設に世界で11番目、本邦で2番目の超高磁場7t-MRI装置が設置され、画像処理法などの基礎的検討が順調に行われている。7t-MRIでは従来の3t-MRIでは得られない200ミクロンの超精密画像が撮影可能であり、いままで得られた多くの臨床的知見あるいは動物実験モデルで得られた知見を凌駕する知見が得られると考えられる。そこで我々は超高磁場7tesla MRI装置を用いて臨床的な研究を行い、ミニマル肝性脳症の発現機序を脳の形態的・器質的変化、脳内物質代謝の面より検討して解明を目指す。

<図1>

<図2>

<図3>



## 2. 研究の目的

本研究では、世界でも臨床応用が数少ない超高磁場7t-MRI装置を用いてミニマル肝性脳症、顕性肝性脳症の脳内形態的・器質的異常、物質代謝異常を解明し、ミニマル肝性脳症の機序解明および早期診断法の開発を目指す。具体的には、(1)健常者とミニマル肝性脳症患者、顕性肝性脳症患者で脳の形態的・器質的の違い、脳内物質代謝の違いを明らかにする。(2)脳の形態的・器質的変化、脳内物質代謝の変化と精神神経機能検査結果、各種検査値との関連性から、感度・特異度の高いミニマル肝性脳症の早期診断法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 健常者とミニマル肝性脳症患者、顕性肝性脳症患者で脳の形態的・器質的な違い、脳内物質代謝の違いを明らかにする。

(2) 脳の形質的・器質的变化、脳内物質代謝の変化と精神神経機能検査結果、各種血液生化学検査値との関連性から、感度・特異度の高いミニマルの早期診断法の開発を目指す。

健常者、顕性肝性脳症のない肝硬変患者（ミニマル肝性脳症のある群とない群に分ける）、顕性肝性脳症患者、各々10例を対象として、超高磁場MRI装置を用いてMRI、MRSを施行。同時にN-Pテストによる精神神経機能検査、脳波マッピング検査、血液生化学検査（アミノ酸、微量元素、アンモニア、カルニチン等）、血中、便中メタボローム解析、腸内細菌解析を測定し、画像検査測定値との相関性などを検討し、ミニマル肝性脳症の診断に感度・特異度の高い検査項目を抽出する。

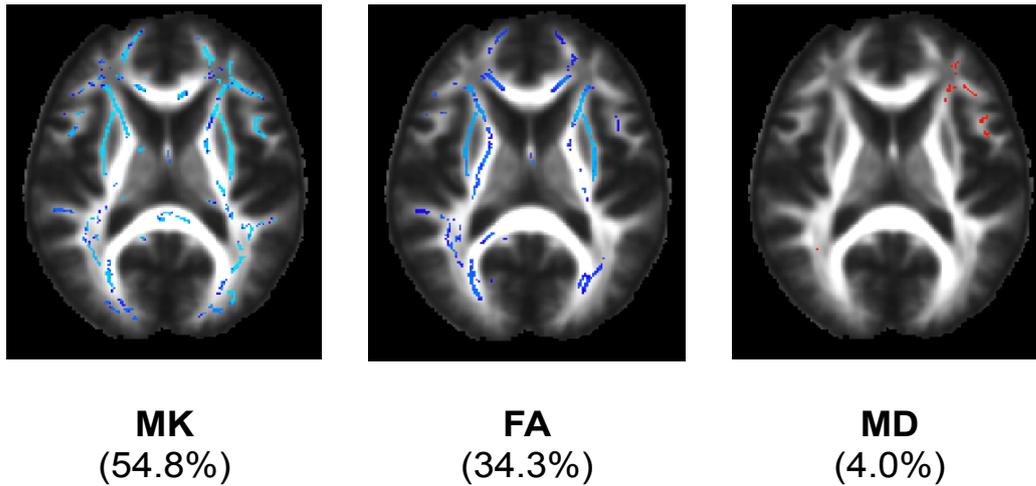
### 4. 研究成果

以前より継続する研究として、神経機能検査（NPテスト）を用いて、健常者、肝硬変患者の神経機能異常を精査し、ミニマル肝性脳症（MHE）、顕性肝性脳症（OHE）の診断を行いその解析を行った。(1) 肝硬変患者においてミニマル肝性脳症は約33%に認め、本邦における従来の報告と大きな差異がないことを確認した。(2) また、本邦では肝硬変患者の高齢化が進行しており、NPテストにおいて70歳以上の神経機能異常の評価の指標がなかったため、70歳以上の健常高齢者の対象として行った結果から健常者の10%-90%タイルをカットオフ値として70歳以上の高齢者の神経機能異常を判定し、ミニマル肝性脳症の診断の指標を作成した（業績文献参照）。(3) 超高磁場MRI装置を用いて、高精度MRSの測定、MRI T1, T2強調像, Diffusion imageを撮像、測定し、MRSでの検討において、ミニマル脳症を認める肝硬変患者群とミニマル肝性脳症を認めない肝硬変患者群を比較し脳内グルタミンの増加と脳内ミオイノシトールの減少が顕著に認められた。このことからミニマル肝性脳症患者においても従来から顕性脳症患者で確認されているものと同様の脳内物質代謝異常が発現していることが示唆された（業績文献参照）(4) ミニマル肝性脳症（MHE）の新たなバイオマーカーの検索として、血清カルニチンを測定し、以前から報告されている血清アンモニアと同様に血清総カルニチンと血清アシルカルニチンの比（Ac-CA / T-CA ratio）が予測因子となることを指摘した。（業績文献参照）。(5) 肝硬変患者におけるミニマル肝性脳症患者の発症予測因子を検討し、血中のアンモニア値の上昇、クレアチン値の上昇、eGFR値の低下が予測因子になることを示した。（業績文献参照）(6) 肝硬変患者のうち顕性肝性脳症のない肝硬変患者を対象として、神経機能検査（N-P test）を用いてMHEの有無を診断し2群に分け、超高磁場MRI装置3T-MRIを用いて、Diffusion imageのうちDiffusion kurtosis imaging(DKI)/Diffusion tensor imaging(DTI)を撮像取得し、mean kurtosis (MK), fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD)を基底核領域、白質領域で評価し、2群間で比較検討した。大脳基底核のROI解析において、MHEでは視床、淡蒼球、尾状核、被殻のMK値、および淡蒼球、尾状核、被殻のFA値が低下することが明らかとなった。また tract-based spatial statistics (TBSS)を用いて白質領域を網羅的に比較したところ、潜在性肝性脳症の白質領域の変化をFAやMDと比較してMKがもっとも広範囲に描出した。診断能をROC解析で比較したところ、被殻におけるMK値がもっともMHEの診断に有用と考えられた（AUC: 0.90、感度: 88.9%、特異度: 85.9%）<図4、5、6、>（業績文献参照）(7) 基礎的な研究においてヒト脳アストロサイト細胞を用いて肝性脳症の起因物質の一つであるアンモニアの毒性によるヒトアストロサイト細胞内の総酸化ストレス(ROS)の増加を確認。L-carnitine カルニチン (L-CA)負荷によるヒト脳アストロサイト細胞内総酸化ストレス(ROS)の増加の抑制を確認した。また、アンモニア負荷ヒト脳アストロサイト細胞内ではグルタミンを含むアミノ酸(AAs)および分岐鎖アミノ酸(BCAAs)の増加を認めており、それによる細胞の膨化が示唆され

た。しかし、L-carnitine カルニチン (L-CA)負荷により、そのアミノ酸 (AAs) および分岐鎖アミノ酸 (BCAAs) の増加の抑制を認めた。これらにより、ヒト脳アストロサイト細胞のアンモニア負荷による細胞毒性に対する L-carnitine カルニチン (L-CA)の保護的抑制効果が示唆された。〈図 7〉 (業績文献参照)以上(1)からの(7)研究成果により肝性脳症、ミニマル肝性脳症の詳細な病態の解明を一步、進められたと考えられた。

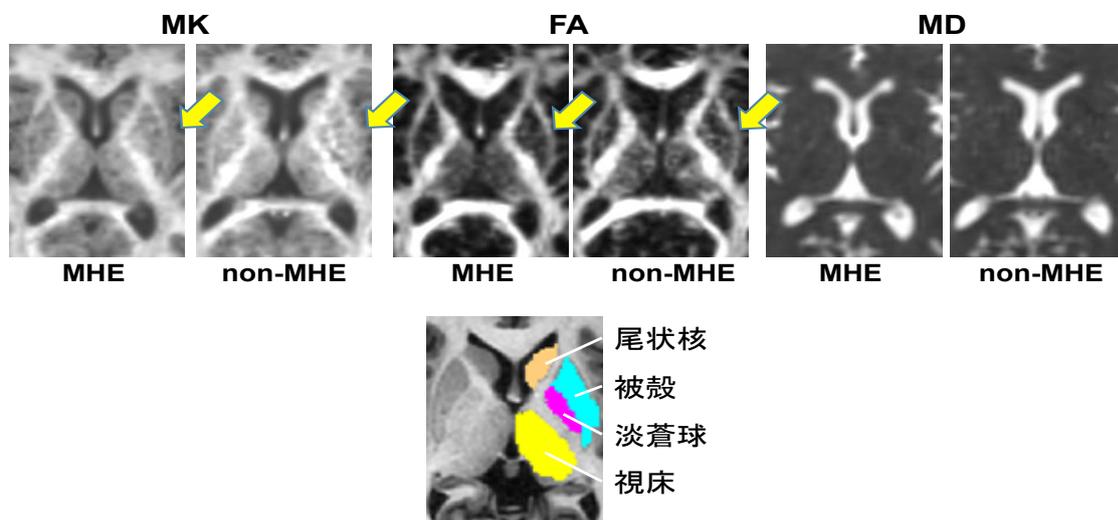
<図 4 >

## TBSS解析 (MHE, non-MHEの比較)



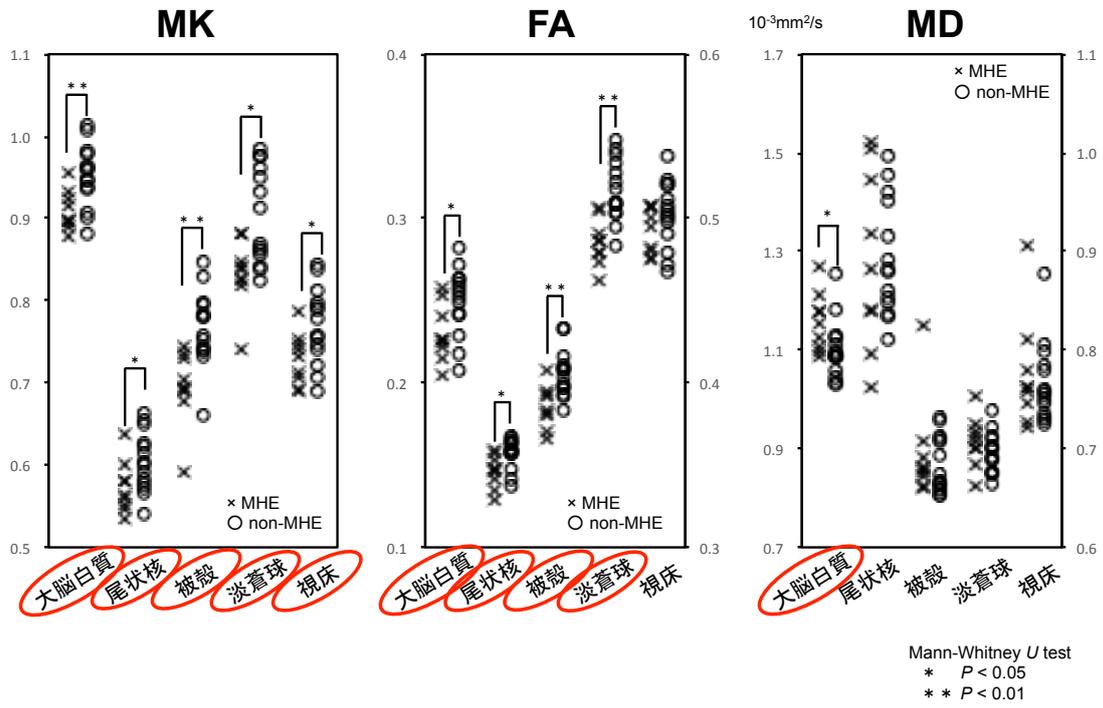
<図 5 >

## DTI / DKI画像

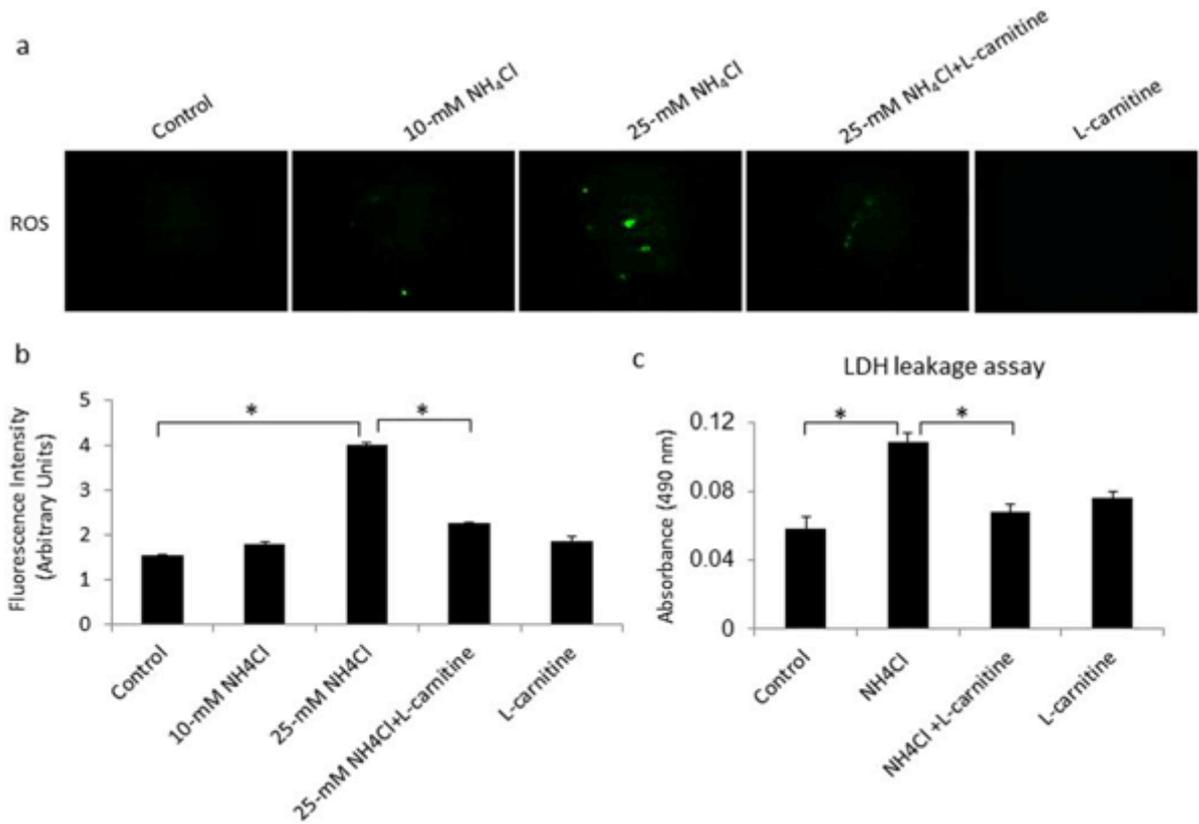


< 図 6 >

# ROI解析



< 図 7 >



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計5件）

①Decreased Mean Kurtosis in the Putamen is a Diagnostic Feature of Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis.

Sato T, Endo K, Kakisaka K, Suzuki Y, Kooka Y, Sawara K, Ito K, Sasaki M, Takikawa Y. Intern Med. 査読有 2019 May 1;58(9):1217-1224. doi: 10.2169/internalmedicine.2116-18.

②L-carnitine prevents ammonia-induced cytotoxicity and disturbances in intracellular amino acid levels in human astrocytes.

Wang T, Suzuki K, Kakisaka K, Onodera M, Sawara K, Takikawa Y.

J Gastroenterol Hepatol. 査読有 2018 Oct 2. doi: 10.1111/jgh.14497.

③Updating the neuropsychological test system in Japan for the elderly and in a modern touch screen tablet society by resetting the cut-off values.

Kawaguchi T, Konishi M, Kato A, Kato M, Kooka Y, Sawara K, Endo R, Torimura T, Suzuki K, Takikawa Y.

Hepatol Res. 査読有 2017 Jan 8. doi: 10.1111/hepr.12864.

④Predictive biomarkers for diagnosis of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: A preliminary result in a single center study in Japan

Kazuyuki Suzuki Hidekatsu Kuroda, Kei Sawara, Yuichi Yoshida, Keisuke Kakisaka, Yuji Suzuki, Akiko Suzuki, Mio Onodera, Takayoshi Oikawa, Wang Tei, Ryujin Endo, Akinobu Kato and Yasuhiro Takikawa Biomedical Research and Clinical Practice 査読有 2016 Volume 1(3):97-102  
doi:10.15761/BRCP.1000117

⑤Kooka Y, Sawara K, Endo R, Kato A, Suzuki K, Takikawa Y

Brain metabolism in minimal hepatic encephalopathy assessed by 3.0-Tesla magnetic resonance spectroscopy. Hepatol Res. 査読有 2016 Apr;46(4):269-76. doi: 10.1111/hepr.125

〔学会発表〕（計2件）

①佐原 圭 国際肝性脳症窒素代謝学会 ISHEN 2017

BRAIN METABOLISM IN PATIENTS WITH MINIMAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY ON 3.0-TESLA MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY 2017年 3月

②佐原 圭 ヨーロッパ消化器病週間 UEGW 2015

BRAIN METABOLISM IN PATIENTS WITH MINIMAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY ON 3.0-TESLA MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY 2015年 10月

〔図書〕（計2件）

①佐原 圭 他 Springer、The Liver in Systemic Disease 2016、343 ページ

②佐原 圭 他 南江堂、消化器疾患最新の治療 2015-2016 2015、512 ページ

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。