

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500428
 研究課題名 (和文) 非アルコール性脂肪性肝炎における非侵襲的、定量的機能診断法の確立
 研究課題名 (英文) Establishment of a new non-invasive and quantitative liver function assessment for Non-alcoholic steatohepatitis (NASH)
 研究代表者
 飯島 尋子 (IIJIMA HIROKO)
 兵庫医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80289066

研究成果の概要：

肝の Kupffer 細胞機能を高感度で定量的に評価できる方法は現在のところ報告がされていない。しかし、Kupffer 細胞機能が低下すると考えられている NASH の診断が、超音波造影剤を用いることにより非侵襲的に行い得る方法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：①超音波医学 ②検査診断システム ③肝臓病学 ④画像診断学

1. 研究開始当初の背景

NASH の確定診断は、血液生化学検査、超音波検査や CT で脂肪肝の診断の後、肝生検のみにより行われる。脂肪肝は、CT では、肝腎比 0.9 以下で診断され、超音波では、肝実質エコー、肝腎コントラスト等の診断により行われるのが通常である。しかし、いかなる画像診断を駆使しても NASH の画像診断はできないと報告されている。以上の背景から NASH

を早期に診断する難しさがあると考ええる。

実際の診療の現場では、NAFLD (NASH を含む非アルコール性脂肪性肝障害) の診断は、肝生検を行わずに行われていることが多く、NAFLD の中に NASH が含まれ、発見時には進行した NASH であることも多い。また、人間ドックの全国集計から脂肪肝を有する患者は実に 30% 超、肝機能異常を示す患者は 25% 超と報告される。その膨大な脂肪肝を有する患

者群の中から NASH を拾い上げ正確に診断することが今後、肝硬変へ進展した NASH を早期に診断する手段であると考える。

2. 研究の目的

超音波造影剤である Sonazoid を用いて NASH モデルラット、脂肪肝ラットを対象として、新しい造影剤を用いて、非侵襲的に NAFLD から NASH を定量的に診断する方法を確立することを目的として研究を行う。

3. 研究の方法

Wister 系ラットを CMD(コリン欠乏食)にて飼育し NASH モデルラットを作成する。作成した NASH モデルラットを用い 2 週、4 週、8 週、12 週にそれぞれ Sonazoid を投与し、投与後 1 分から 1 時間までの 5、10、20、30、40、50、60 分の間、肝臓の Sonazoid による造影を観察する。対象として同週の Wister 系ラット(通常食摂取)を使用する。通常の脂肪肝と NASH の差を検討するため、Wister 系ラット(高コレステロール食摂取)を使用する。

使用する超音波装置は、東芝社製 SSA770 (Aplio)である。Sonazoid は、中音圧系造影剤であるため、音圧は、MI で 0.1 から 0.3 程度が至適であるが、機能診断においてその撮影方法が適切であるか否かについても検討する。

小動物に対する至適投与量は、人とは異なる可能性がある。投与量に関しては、これまでの予備実験で 1/10, 1/100, 1/100, 1/10000 を検討した。機能診断を行うには、肝臓の Kupffer 細胞に 1 個の微小気泡が貪食されるまで気泡の量を減少させ、貪食能力を検討する必要がある。つまり超音波上、1 個の Kupffer 細胞に 10 個貪食された場合と 10 個の Kupffer 細胞に 1 個貪食されても 1 ピクセ

ルあたりの輝度の差は、極めて少ないと推測されるため、限界まで投与量を減少させ、しかも正確に診断する必要があると考える。そこで、1/5000 量、1/10000 量、1/20000 量で再検討する。その後蛍光ビーズを静注し貪食された気泡の数を FITC にて測定する。また、ED2 抗体による免疫染色により Kupffer 細胞の数と機能している Kupffer 細胞の数をそれぞれ検討し、造影超音波像と比較検討する。

4. 研究成果

NASH 動物モデルとしてメチオニン・コリン欠乏食投与ラットを、また単純脂肪肝動物モデルとして 5%オロト酸を加えた通常飼料を投与し作成した。雄性 Wister 系ラット 6 週令、50 匹に対しメチオニン・コリン欠乏食またはオロト酸含有食を与え 1 週、2 週、4 週、8 週、12 週目に造影超音波剤を使用して実験を行った。対照として通常食を与えたラットを使用し、同週で同様の実験を行った。実験に使用した超音波造影剤は Levovist および Sonazoid である。造影検査後、採血し生化学検査およびサイトカインなど採血後、ラットを sacrifice し肝組織を HE 染色、Kupffer 細胞染色のため ED2 抗体の染色を行った。さらに生体顕微鏡による Sonazoid および Levovist の貪食を経時的に検討した。

NASH モデルラットとしては、2 週以降が適切であり、8 週までは使用可能であることが解った。しかし、週数が進むにつれ脂肪化が著明となり 4 週目までが最も良いことが解った。投与量は、1/2000 が機能評価に適当量であることが解った。投与量が多いと超音波が飽和し輝度の測定が困難となった。さらに、測定は高音圧モードにより破壊されたマイクロバブルを輝度測定装置により測定する手法が定量評価に向いていた。

Kupffer の数および貪食の検討を数種類の

方法により行った。MCDD ラット及びコントロールラットに蛍光ラテックスビーズを尾静脈より投与し共焦点蛍光顕微鏡にて観察したところ、MCDD ラットではコントロールに比べてラテックスビーズを貪食した Kupffer 細胞が少なかった。さらに、生体顕微鏡を用いてノーマルラット及び MCDD ラットの Sonazoid の貪食について検討した。ノーマルラットでは、時間経過とともに 1 視野に観察される Sonazoid の数は増加する一方、MCDD ラットでは変化がなかった。MCDD ラット肝での造影効果の減弱が単に Kupffer 細胞数の減少によるものかどうかを確認するため、両群の肝組織切片を肝定住マクロファージ抗体を使用し、免疫染色を行い両群間で比較検討した。ZONE1、ZONE3 ともコントロール群と MCDD 群でその数の相違はなかった。

以上より、NASH モデルでは Kupffer 細胞数の変化はないがその貪食能力が低下していることが示された。さらに超音波造影剤による、肝 Kupffer 細胞機能定量化に適する造影手法および投与量が確立された。今後は、これらの手法を用い人での臨床応用およびその他の肝疾患への応用を検討しさらに研究をすすめる予定である。

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 11 件)

- ①飯島尋子, 森安史典 (2008) 次世代造影剤と Levovist の異同—Levovist は何を担えるか?— 5 (5), 92-94. 査読無
- ②飯島尋子, 齋藤正紀, 吉川昌平, 東浦晶子, 脇英彦, 森安史典, 西口修平 (2008) Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) の造影超音波診断. 肝胆膵画像, 10, 53-57. 査読無
- ③飯島尋子, 西口修平 (2008) NAFLD (非ア

ルコール性脂肪性肝疾患) の線維化スコア: NAFLD の非侵襲的線維化スコアリングシステムの検討. *Frontiers in Gastroenterology*, 13, 166-167. 査読無

- ④飯島尋子 (2008) Sonazoid 造影超音波検査の現状と未来. *INNERVISION*, 27, 76-77. 査読無
 - ⑤吉川昌平, 飯島尋子, 山口匡, 西口修平 (2008) Q-Q 確立プロットによる肝の線維化診断. *消化器科*, 47, 538-544. 査読無
 - ⑥飯島尋子, 森安史典 (2007) NAFLD の超音波診断. *治療*, 89, 1639-1644. 査読無
 - ⑦森安史典, 飯島尋子 (2007) ソナゾイドを使った造影超音波の造影読影の基礎. *Rad Fan*, 5(7), 77-78. 査読無
 - ⑧飯島尋子 (2007) ソナゾイドによる造影技術の基礎 ソナゾイドの投与法, 装置・撮像条件, 時相. *INNERVISION*, 22(10), 8-10. 査読無
 - ⑨飯島尋子 (2007) 微小気泡のマクロファージ貪食を利用した超音波造影診断医学の現状. *環境技術*, 36, 713-717. 査読無
 - ⑩Yanagisawa, K., Moriyasu, F., Miyahara, T., Miyata, Y. and Iijima, H. (2007) Phagocytosis of ultrasound contrast agent microbubbles by Kupffer cells. *Ultrasound Med. Biol.*, 33, 318-325. 査読有
 - ⑪Iijima, H., Moriyasu, F., Tsuchiya, K., Suzuki, S., Yoshida, M., Shimizu, M., Sasaki, S., Nishiguchi, S. and Maeyama, S. (2007) Decrease in accumulation of ultrasound contrast microbubbles in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Res.*, 37, 722-730. 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- ①Iijima, H., Saito, M., Aizawa, N., Tanaka, H. and Nishiguchi, S. (2008) Usefulness

of Kupffer imaging with contrast-enhanced ultrasound. In Diagnosis of hepatic tumor and assessment of hepatic function. The 10th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 12.13-14, Tokyo

- ②吉川昌平, 飯島尋子, 齋藤正紀, 西口修平, 中西憲司, 工藤 篤, 有井滋樹, 市野瀬志津子, 和氣健二郎 (2008) NASH ラットモデル (MCDD ラット) におけるクッパー細胞の貪食能の検討. 第 22 回肝類洞壁細胞研究会学術集会, 11.29-30, 福岡
- ③Saito, M., Iijima, H., Yoshikawa, S., Aizawa, N., Nishiguchi, S., Kudo, A. and Arii, S (2008) The mechanism of decrease in ultrasound contrast enhancement during kupffer phase in NASH patients—study using NASH rat model. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2008), 10.31-11.4, San Francisco, U.S.A
- ④中野宏朗, 飯島尋子, 山田大輔, 坂井良行, 吉川昌平, 山本晃久, 岩田恵典, 榎本平之, 康 典利, 齋藤正紀, 下村壯治, 今西宏安, 中村秀次, 西口修平 (2008) Sonazoid 造影超音波による肝硬変の肝循環動態の検討. 第 12 回日本肝臓学会大会 (JDDW2008), 10.1-4, 東京
- ⑤栗本亜美, 飯島尋子, 中野宏朗, 山田大輔, 坂井良行, 吉川昌平, 山本晃久, 岩田恵典, 榎本平之, 康 典利, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 中村秀次, 西口修平 (2008) 造影超音波の Kupffer phase からみた非アルコール性脂肪性肝炎の診断と病態. 第 50 回日本消化器病学会大会 (JDDW2008), 10.1-4, 東京
- ⑥飯島尋子, 東浦晶子, 吉川昌平, 山平正浩,

肥塚明日香, 柴田陽子, 橋本眞里子, 脇 英彦, 西口修平 (2008) Sonazoid と Levovist による Kupffer イメージを用いた肝細胞癌の造影診断. 日本超音波医学会第 81 回学術集会, 5.23-25, 神戸

- ⑦飯島尋子, 脇 英彦, 東浦晶子, 山平正浩, 肥塚明日香, 柴田陽子, 橋本眞里子, 齋藤正紀, 池田直人, 西口修平 (2008) Sonazoid[®] 造影超音波による time intensity curve (TIC) の検討—正常肝と肝硬変の比較—. 第 21 回日本腹部造影エコー・ドプラ診断研究会, 4.12, 東京
- ⑧吉川昌平, 飯島尋子, 片瀬竜司, 西口修平, 工藤 篤, 有井滋樹 (2007) NASH 患者におけるソナゾイド造影超音波肝実質相 (Kupffer phase) 染色低下機序の考察—NASH モデルによる検討—. 第 21 回肝類洞壁細胞研究会学術集会, 12.22-23, 松山.
- ⑨Waki, H., Sasaki, S., Yoshikawa, S., Ikeda, N. and Iijima, H. (2007) Dynamic US contrast study of the liver using Sonazoid: Vascular and Kupffer phase. The 9th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 12.15-16, Osaka, Japan.
- ⑩吉川昌平, 飯島尋子, 西口修平 (2007) 造影超音波検査からみた NASH における線維化の程度と Kupffer 機能に関する臨床的検討. 第 37 回日本肝臓学会西部会, 12.7-8, 長崎.
- ⑪佐々木俊一, 飯島尋子, 森安史典 (2007) 超音波造影剤ソナゾイドの造影時相および肝臓への取り込みに関する研究. 第 160 回東京医科大学医学会総会, 11.17, 東京.
- ⑫飯島尋子, 森安史典, 西口修平 (2007) Levovist と Sonazoid による Kupffer イメージングを使ったびまん性肝疾患と肝腫瘍の診断. 第 11 回日本肝臓学会大会,

10. 18-19, 神戸.
- ⑬脇 英彦, 東浦晶子, 山平正浩, 肥塚明日香, 柴田陽子, 橋本眞里子, 佐々木俊一, 飯島尋子 (2007) Sonazoid を用いた時相および肝実質輝度の検討. 日本超音波医学会第 34 回関西地方会学術集会, 10. 13, 大阪.
- ⑭吉川昌平, 飯島尋子, 齋藤正紀, 東浦晶子, 西口修平 (2007) 造影超音波による NASH 診断の有用性. 第 7 回関西肝血流動態イメージ研究会, 7. 14, 大阪.
- ⑮齋藤正紀, 飯島尋子, 西口修平 (2007) 非アルコール性脂肪性肝炎における Levovist 造影超音波検査後期相の意義. 第 43 回日本肝臓学会総会, 5. 31-6. 1, 東京.
- ⑯飯島尋子, 西口修平, 森安史典 (2007) Kupffer イメージングを使ったびまん性肝疾患と肝腫瘍の診断 - Levovist と Sonazoid を使った臨床的検討 -. 日本超音波医学会第 80 回学術集会, 5. 18-20, 鹿児島.
- ⑰齋藤正紀, 飯島尋子, 東浦晶子, 吉川昌平, 前山史朗, 西口修平 (2007) NASH における Levovist 造影超音波検査肝実質相の評価. 日本超音波医学会第 80 回学術集会, 5. 18-20, 鹿児島.
- ⑱脇 英彦, 飯島尋子, 東浦晶子, 山平正浩, 肥塚明日香, 平野貴史郎 (2007) ソナゾイドを用いた時相の検討. 日本超音波医学会第 80 回学術集会, 5. 18-20, 鹿児島.
- ⑲吉川昌平, 齋藤正紀, 東浦晶子, 飯島尋子, 西口修平 (2007) 造影超音波検査による C 型慢性肝炎における NASH の関与について. 日本超音波医学会第 80 回学術集会, 5. 18-20, 鹿児島.
- ⑳東浦晶子, 飯島尋子, 山平正浩, 肥塚明日香, 柴田陽子, 橋本眞里子, 脇 英彦, 吉川昌平, 齋藤正紀, 西口修平, 森安史典 (2007) 限局性低脂肪化領域及び脂肪化領

域の造影超音波による鑑別の試み. 日本超音波医学会第 80 回学術集会, 5. 18-20, 鹿児島.

[図書] (計 2 件)

- ①飯島尋子, 加納繁照 (2007) 肝硬変. よくわかる病態生理 3 消化器疾患, 日本医事新報社, 171-175
- ②飯島尋子 (2008) 画像診断. NASH 診療 best approach, 中外医学社, 184-189

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 尋子 (IIJIMA HIROKO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80289066

(2) 研究分担者

西口修平 (NISHIGUCHI SHUHEI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10192246

西上隆之 (NISHIGAMI TAKASHI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70131589

(3) 連携研究者

森安史典 (MORIYASU FUMINORI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80191055