

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791476  
 研究課題名（和文） クッパー細胞の鉄分解機能に着目した SPI0-MRI による肝癌の放射線治療の最適化  
 研究課題名（英文） Optimization of radiation therapy for liver cancer using SPI0-MRI monitoring the degradation of SPI0 by Kupffer cells  
 研究代表者  
 古田 寿宏 (FURUTA TOSHIHIRO)  
 東京大学・医科学研究所・助教  
 研究者番号：20597885

研究成果の概要（和文）：従来は困難であった、肝における放射線照射域を早期にかつ累積線量が少ない場合でも画像的に確認する手法の確立を目指し、動物実験を行った。照射前に SPI0 を投与し MRI を行ったところ、照射域の信号回復が非照射域よりも遅れたため、照射によりクッパー細胞が障害され SPI0 を分解する機能が低下し信号回復に差が生じたことが推測でき、クッパー細胞への鉄沈着数の差が、その推測の裏付けとなった。

研究成果の概要（英文）：We explored a new MR imaging technique for visualizing irradiated liver parenchyma several days after the start of irradiation. We gave SPI0 to rats prior to hepatic irradiation and performed serial MRI examinations to assess the changes in hepatic signal intensity. Hepatic signal intensity recovered to the normal range later in irradiated areas than non-irradiated areas, suggesting that degradation of SPI0 by Kupffer cells was delayed in the irradiated areas. The increased number of iron deposits in Kupffer cells in irradiated areas supported the delayed degradation of SPI0.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：放射線科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：SPI0、肝臓、放射線照射

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌の診断と治療は癌対策において重要な位置を占めている。日本における肝癌の罹患数は 2003 年度において約 43,000 人であり全癌腫のうち 7% を占める。死亡数は 2007 年度において約 34,000 人であり、予後は比較的悪い。治療の第一選択は切除であるが、肝硬変を合併し肝予備能に乏しい場合、血管侵襲のある場合、他臓器転移のある場合など、切除不能と診断されることも多い。

放射線照射は切除不能な肝癌に対しても有効な治療法の一つである。巨大腫瘍や腫瘍栓に対しても有効で、線量依存的に局所制御

率が向上する。放射線肝障害の合併を避けるため、非腫瘍部肝組織を避け腫瘍に線量を集中することで、肝機能を温存しながら腫瘍を制御することが重要となる。近年、治療計画や照射技術の進歩により、精密な照射が行われるようになったが、実際に計画通りの位置に放射線が当たったか否かを検証することは重要であり、生体内で照射域を画像化する意義は高い。なぜなら、もし、治療開始後早期から照射域を画像診断できれば、治療計画の見直しや、放射線肝障害の予測に役立つうえ、腫瘍が縮小せず治療効果が不良な場合に、それが、計画通りの照射が実現していないためか、腫瘍の放射線抵抗性によるためか鑑別

ができるからである。しかし、そのような画像診断技術は未確立である。通常、放射線肝障害による浮腫や肝萎縮といった形態学的変化は、治療終了後 2~6 週間後に CT や MRI で検出可能となる。解剖学的な変化が生ずる前に肝クッパー細胞の貪食能の低下が生じることを利用して、テクネチウムフィチン酸や超常磁性酸化鉄製剤 (SPIO) といったクッパー細胞に取り込まれる薬剤を投与し、シンチグラフィや MRI で照射域を早期に診断する試みもなされている。このうち、SPIO 造影 MRI は空間分解能に優れ、累積線量が少ない場合でも照射域を検出できる点で有利と考えられ、動物実験で 10Gy 程度の照射 3 日後に、照射域が検出できたとの報告があるものの、臨床では比較的多い累積線量で照射域が描出されたとの報告があるのみで、実用化されているとは言い難い。なお、放射線による肝細胞障害を検出するという観点から、肝細胞に特異的に取り込まれる MRI 造影剤であるガドキセト酸ナトリウム (Gd-EOB-DTPA) を用いた先行研究では、照射早期における異常の検出感度は SPIO 造影 MRI に劣ることが示されている。

上述のように、細胞特異的なトレーサーや造影剤を細胞内に取り込む機能を利用した方法には限界があるのに対し、細胞内に取り込まれた物質を分解する機能に着目した方が有望であることを示唆するデータがある。例えば、テクネチウム標識コロイドシンチグラフィでは、クッパー細胞がコロイドを貪食する機能よりも、一旦貪食したコロイドを分解する機能に着目した方が、軽度の肝障害の検出に有用であったという報告がある。また、我々は、塩化ガドリニウムにより人工的にクッパー細胞に障害を与えた動物モデルにおいて、SPIO 造影 MRI により肝の信号変化を調べ、クッパー細胞が一旦貪食した SPIO を分解する機能の異常を MRI で評価し示すことを示し、さらに貪食能の差よりも分解機能の差の方が大きな信号差を生じ得ることを見出した。この結果から、貪食能の差がない状態で SPIO を投与し、分解機能のみを反映した画像が得られれば、さらに大きな信号差を生むことが示唆される。

この予備実験をふまえて、我々は、SPIO を放射線照射に先行して投与しておき、MRI を利用して、SPIO がクッパー細胞で分解される途中の状態に照射がなされれば、照射部と非照射部で肝信号の回復に大きな違いが生じると予想した。そしてこの方法により、肝の放射線照射域を、早期に、かつ累積線量が少ない場合にも検出できるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

従来は困難であった、肝における放射線照射域を早期にかつ累積線量が少ない場合でも画像的に確認する手法の確立を目的とする。その手法には SPIO による造影 MRI を用いる。一般的には放射線照射後に SPIO を投与するが、本研究では放射線照射前に SPIO を投与する方法をとり、クッパー細胞が一旦取り込んだ SPIO を分解する機能に着目する。我々のこれまでの研究成果から、この手法により、高感度に照射域を検出できる可能性がある。本手法が確立すれば、放射線治療計画の正確な検証や、計画の再設定に有用であり、肝癌の放射線治療の最適化が実現する。

## 3. 研究の方法

単回照射実験：12 匹のラットに 20  $\mu\text{mol}$  iron/kg 体重の SPIO を静注し、投与 10 分後に肝 MRI を行った。投与 4 時間後、4 匹ずつ 3 群に分け、後述の方法にて照射を行った。2、4、7 日後に SPIO の追加投与なしに MRI を行った。7 日後の MRI の終了後に肝を摘出した。

分割照射実験：2 匹のラットに 20  $\mu\text{mol}$  iron/kg 体重の SPIO を静注し、投与 10 分後に肝 MRI を行った。投与 4 時間後から、1 回に 4.5 Gy ずつ、計 10 回、後述の方法にて照射を行った。2、4、7、9、11、14 日後に SPIO の追加投与なしに MRI を行った。

放射線照射には 160 kVp の X 線照射装置を用いた。麻酔下にラットを背臥位で固定し、照射なし (n=4)、50 Gy (n=4) または 70 Gy (n=4) の単回照射、45 Gy/10 回の分割照射 (n=2) を行った。各ラットとも、右上腹部以外を鉛のシールドで覆った。

MRI には 9.4 Tesla 装置を用い、麻酔下にラットを腹臥位で固定し、肝の T<sub>2</sub>\*強調軸位断像を撮影した。画像解析では肝と傍脊柱筋に関心領域を設け、照射域と非照射域についてそれぞれ肝の相対信号値 (肝/筋肉信号比) を求めた。摘出した肝から切片を作製し、HE 染色、プルシアンブルー染色、抗 CD68 抗体による免疫染色を行い、顕微鏡像を検討した。照射域と非照射域の各時相における肝相対信号値の差と、組織内の鉄沈着数および CD68 陽性細胞数の照射域と非照射域における差を、それぞれ Tukey 法を用いて検定した。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

図 1 において、最も左の列の画像は SPIO の投与により肝信号が低下した状態を示している。この後、肝への X 線照射が行われた。

図1の上段に示すように、照射をしなかったコントロール群では、1週間かけて徐々に肝信号が増加した。それと比較し、中段の50Gy照射群や下段の70Gy照射群では、右肝の信号の増加が遅れているのが分かる。図2は肝/筋肉信号比をグラフにしたものである。50Gyや70Gyを照射したラットの右肝は、シールドで覆っていた左肝や、照射しなかったラットの肝よりも信号の増加が遅れている。50 Gyと70 Gyの照射による信号増加の傾向の違いは認めなかった。分割照射実験では、1例において照射域の信号の増加がわずかに遅延した。

摘出した肝については、肉眼所見上も HE 染色による顕微鏡像も照射域と非照射域に差を認めず、プルシアンブルー染色でのクッパー細胞内の鉄沈着数は、非照射域よりも照射域で多い傾向を示した(図3)。抗 CD68 抗体陽性となるクッパー細胞数については、一定の傾向を認めなかった。

## (2) 考察

クッパー細胞の食食機能低下を SPIO 造影 MRI で評価した研究はこれまでに多数あるが、本研究はクッパー細胞の食食機能ではなく、鉄分解機能に着目した点に新規性がある。SPIO の投与後に照射を行うと、照射域では SPIO により一旦低下した肝信号の回復が正常と比べて遅延することが示された。照射域と非照射域における信号回復の傾向や SPIO 投与7日後の鉄沈着数の差から、照射域における信号回復遅延の原因は、SPIO に由来する鉄の、クッパー細胞からの分解あるいは排出遅延であると推定できる。

平成23年度の研究実施計画における「結果の判定基準」のうち、「1. SPIO を放射線照射よりも先に投与する方法により、照射域と非照射域に信号回復の差が生じるかどうか。」は、当初の研究計画と比べて実験方法を多少変更したが、本研究によって、信号回復の差が生じるという結論が示された。ただし、実験で認められた照射域と非照射域の信号回復の差は予想以上に軽微であり、本手法に何らかの改良を加えないと臨床応用は難しいと考えられた。よって、平成23年度の研究実施計画における「結果の判定基準」のうち、「2. 検出可能な最低線量と検出までの最短期間の同定、本提案法の優位性の評価。」「3. 検出された領域に、放射線肝障害が生じるかどうかの確認。」および、平成24年度以降に計画した実行可能性の研究については、研究計画を練り直す必要があると判断した。

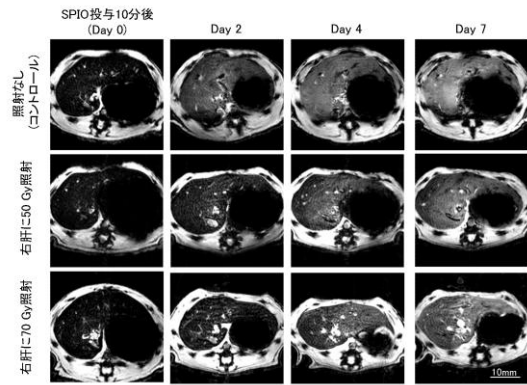


図1. 照射なし、50Gy照射、70Gy照射の群における T<sub>2</sub>\*WI の経時的変化。

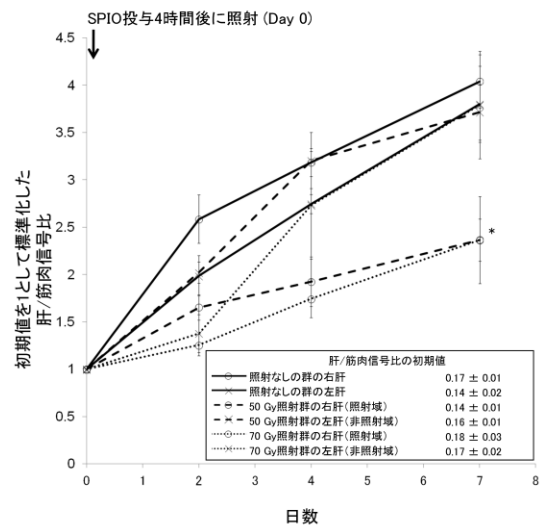


図2. MRIにおける肝/筋肉信号比の変化を示したグラフ。初期値を1として標準化してある。データは平均値で、エラーバーは標準誤差である(n=4)。\*照射なしの群の右肝と50Gy照射群の右肝、照射なし群の右肝と70G照射群の右肝との間に、それぞれ統計学的有意差を認めた(p<0.05)。

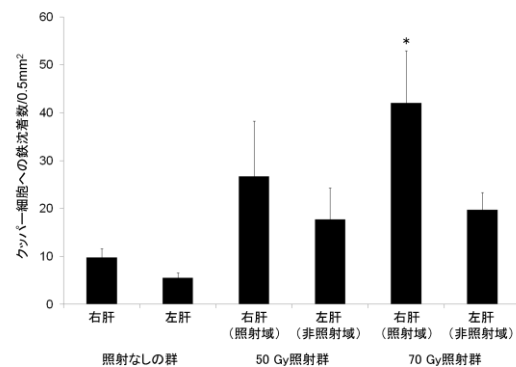


図3. クッパー細胞内の鉄沈着数。データは

平均値で、エラーバーは標準誤差である (n=4)。\*照射なしの群の左肝と 70Gy 照射群の右肝との間に、統計学的有意差を認めた (p<0.05)。

## 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 1 件)

Furuta T, Yamaguchi M, Nakagami R, Akahane M, Minami M, Ohtomo K, Moriyama N, Fujii H. Delayed hepatic signal recovery on ferucarbotran-enhanced magnetic resonance images: An experimental study in rat livers with gadolinium chloride-induced Kupffer cell damage. MAGMA. 2012 Nov 2. 印刷中 査読有 DOI 10.1007/s10334-012-0354-3

[学会発表] (計 3 件)

古田寿宏、山口雅之、中神龍太郎、赤羽正章、南学、大友邦、藤井博史、SPIO-MRI による肝癌の放射線治療マージン描出に関する実験的検討、第 40 回日本磁気共鳴医学会大会、2012 年 9 月 8 日、京都

古田寿宏、山口雅之、中神龍太郎、赤羽正章、南学、大友邦、藤井博史、クッパー細胞の鉄分解機能に着目した SPIO-MRI による新しい肝障害評価法：ラット肝での実験的検討、第 39 回日本磁気共鳴医学会大会、2011 年 9 月 29 日、小倉

Toshihiro Furuta, Masayuki Yamaguchi, Ryutaro Nakagami, Masaaki Akahane, Manabu Minami, Kuni Ohtomo, and Hirofumi Fujii. A new technique for the detection of liver damage by evaluation of impaired exocytotic activity of Kupffer cells; an experimental study of gadolinium chloride-induced liver injury in rats, ISMRM 19th annual meeting & exhibition, 2011 年 5 月 10 日、モントリオール、カナダ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古田 寿宏 (FURUTA TOSHIHIRO)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：20597885