

令和元年9月5日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19813

研究課題名(和文) 光音響イメージングによる腎組織酸素飽和度測定の腎障害予後のバイオマーカーへの応用

研究課題名(英文) Evaluation of renal oxygen saturation using photoacoustic imaging for the early prediction of chronic renal function in a model of ischemia-induced acute kidney injury

研究代表者

奥村 健一郎 (Okumura, Kenichiro)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：30743447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：欧米を中心に急速に普及しつつある新たなる画像診断機器として光音響画像がある。従来は被曝下の画像や造影剤の投与でしか評価不可能であった血流情報に起因する組織酸素化程度の画像化及び定量化を可能とした。腎臓は酸素を消費する臓器であり、従って一定の障害が生じると酸素が消費されないため組織酸素飽和度は増加すると考えられている。私は、腎臓虚血再灌流モデル(一旦、臓器虚血状態を生じさせ、一定時間後に解除する)を作成し、その虚血程度の時間の長さにより軽度及び重症虚血状態を生じさせたが、軽度虚血の場合には再灌流後早期に酸素化程度が上昇し、元に戻る一方で、重症ではその傾向が見られず遅れて酸素化上昇がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欧米を中心に急速に普及しつつある新たなる画像診断機器として光音響画像があり、特に組織酸素化の画像評価と定量化が可能であることから注目されている。その性質上、腫瘍学への応用がなされ、腫瘍の低酸素状態と悪性度の関連の蓄積がなされている。その一方で、虚血状態での組織酸素化評価への応用もされつつあり、動物モデルを用いた心筋梗塞の評価も経皮的に行われている。本研究では、腎臓虚血再灌流時の組織酸素化程度の画像化と定量化を行い、その評価が最終的な腎機能予後を予測することを見出した。これにより、血流とは異なったパラメーターとして、組織酸素化程度の状態評価の有用性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Photoacoustic imaging is one of the new diagnostic imaging devices that are rapidly spreading in Europe and the United States. It enabled imaging and quantification of the degree of tissue oxygenation due to blood flow information that could only be evaluated by exposure imaging and contrast agent administration. The kidney is an organ that consumes oxygen, and therefore, it is believed that tissue oxygen saturation increases because oxygen is not consumed when certain disorders occur. This study made a kidney ischemia reperfusion model (once, cause organ ischemia state and release after a certain time) and caused mild and severe ischemia state by the length of time of the degree of the ischemia. However, in the case of mild ischemia, the degree of oxygenation increased early after reperfusion and returned to the original level, while in severe cases the tendency was not seen and the oxygenation rise was delayed.

研究分野：放射線科学

キーワード：光音響 腎臓虚血再灌流 組織酸素化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

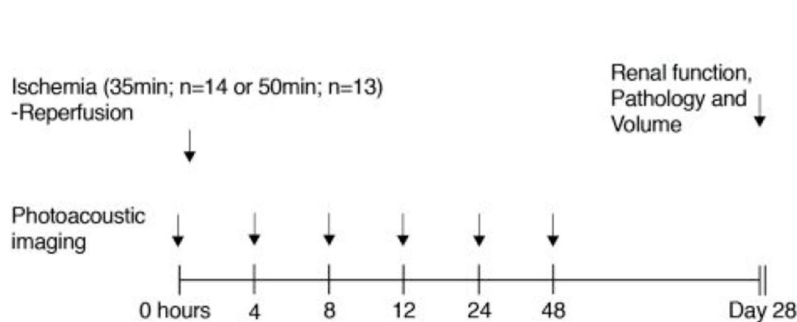
1. 研究開始当初の背景

近赤外光を用いた新たな画像診断機器として、光音響画像が欧米を中心とした臨床現場で急速に普及しつつある。光音響画像では、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの差異を検出する事による組織内酸素飽和度の画像化と定量化が可能である。これは従来の一般的な画像機器では評価不可能であったパラメーターであり、腫瘍学から虚血診療まで幅広い応用が期待されている。さらにその構造上、超音波プローブにレーザーユニットを組み合わせるだけで設置可能であり、利便性や導入のし易さ、無被曝の点からも普及が期待されている。腫瘍学における診断能に関しては研究が先行し、腫瘍の低酸素状態の性質を利用して、その臨床における診断能を前向きに評価する検討が施行されている。虚血診療に関しては、マウスの心筋虚血の評価を経皮的に評価する試みがされつつあった。虚血診療に関して、臨床的に重要な臓器で腎臓が知られている。腎臓は酸素を特に消費する臓器であり、障害が高度な場合には先行して組織酸素飽和度が低下することが知られている。その為、腎臓への虚血負荷後急性期の組織の酸素化程度状態の画像化と定量化は、最終的な腎臓予後予測に重要である。

2. 研究の目的

マウスにおける腎臓の虚血再灌流モデルを用いて、虚血程度（重度あるいは軽度虚血）と再灌流後早期の酸素化状態の程度評価が慢性期腎臓機能と線維化程度への予測しうる可能性に関して検討する。

3. 研究の方法

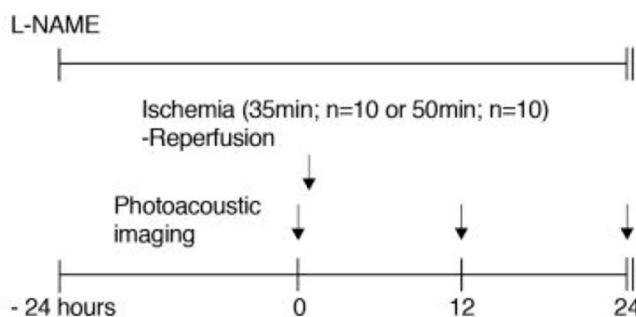


C57Bl/6N マウス(6-8週、20-25g)合計35匹のうち、5匹は正常群、15匹は重度虚血(虚血時間が50分)及び軽度虚血(虚血時間が35分)群として使用。重度虚血再灌流群では2匹、軽度虚血再灌流群では1匹観察期間内

に死亡したため、それぞれ

13匹、14匹に関して再灌流後急性期の腎臓組織酸化程度の画像化と定量化、慢性期の腎機能と組織像の評価を行った。

再灌流後急性期には、4時間後、8時間後、12時間後、24時間後、48時間後の画像を連続して評価した。また、再灌流後12時間後、24時間後の腎臓組織内NO(血管拡張作用に影響)とH2O2(組織障害程度に影響)の評価のため、それぞれ8匹ずつの群、及び5匹を正常群として用いた。

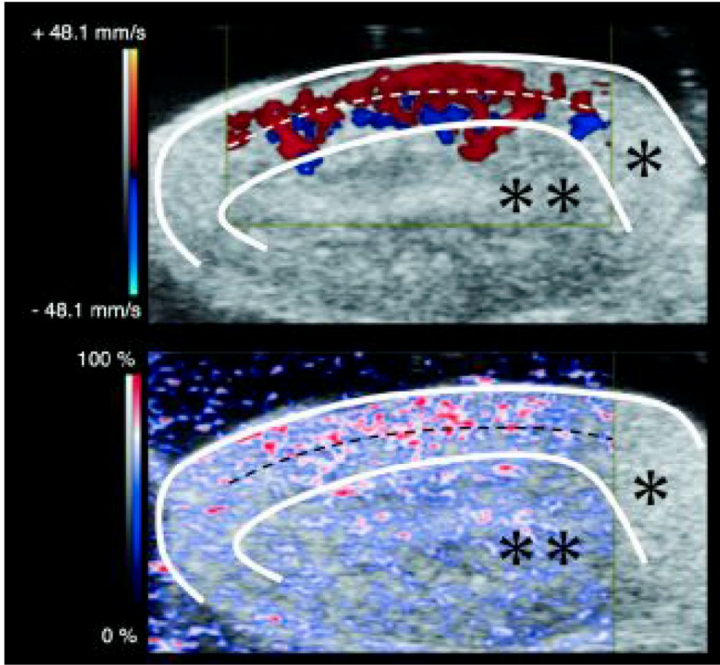


加えて、再灌流後急性期におけるNOの影響を推し量るため、NO合成阻害薬(L-NAME)を虚血24時間から24時間後まで引水投与して、虚血再灌流後12時間後及び24時間後の腎臓酸素化程度の画像定量評価を施行した。慢性期として約1ヶ月後に、腎臓サイズ測定及び、腎機能に関し非虚血再灌流腎を摘出の上で、血性Cr、BUN、及び尿量から算出される24時間クレアチニンクリアランス(CCr)

を評価した。さらに、虚血再灌流後の腎臓組織に対してH-E染色による障害程度評価、アザン染色による線維化評価を行った。線維化の評価は各ケースにおいて、皮髄境界域中心に5-7視野をランダムに選択し、アニリンブルーの着色程度をImage Jで定量評価して比較を行った。

4. 研究成果

まず、腎臓組織酸素飽和度評価に関して、下記の図を参照されたい。上段は通常のドップラー画像、下段は腎臓酸素飽和度画像評価である。腎実質（*）と非実質（**）が分離でき、ドップラーをメルクマールにすると皮質と髄質の境界（点線）が明瞭となる。

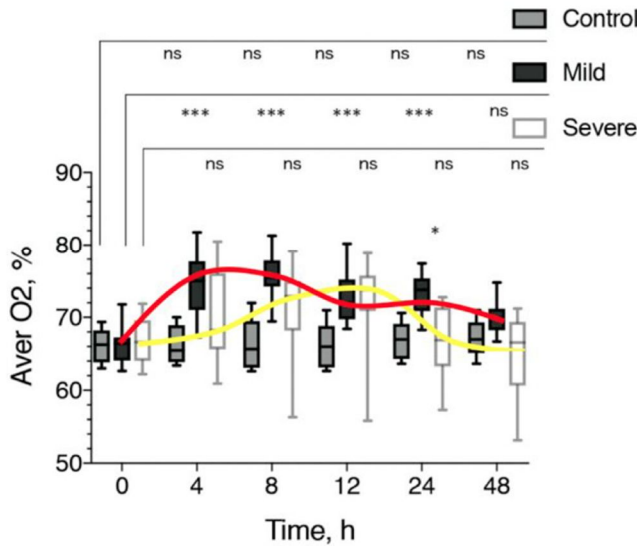


腎臓組織酸素飽和度の通常の値も 65-70%程度であり、従来古典的に言われている酸素飽和度に合致した。また、次に虚血再灌流後の経時的な変化を定量化した。

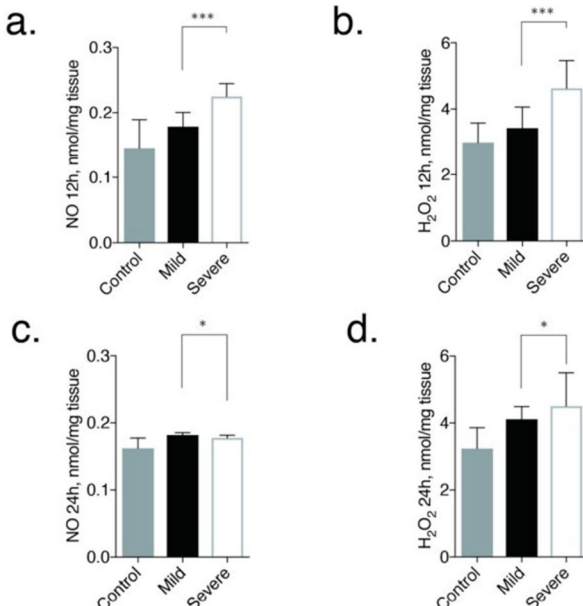
虚血再灌流後に関して、虚血が軽度群(Mild)では、4-8 時間後には酸素飽和度がピークを迎え、徐々に正常化していく(赤波線)一方で、虚血が重度群(Severe)では、8-12 時間後にピークがあり、徐々に正常化していく(黄波線)傾向がみられた。ただし、重度虚血群に関しては、中には全く組織酸素飽和度が上がりきらずに、そのまま緩徐に

低下していったものもあり、再灌流後 48 時間通してはかなり不均一な傾向が見られた。

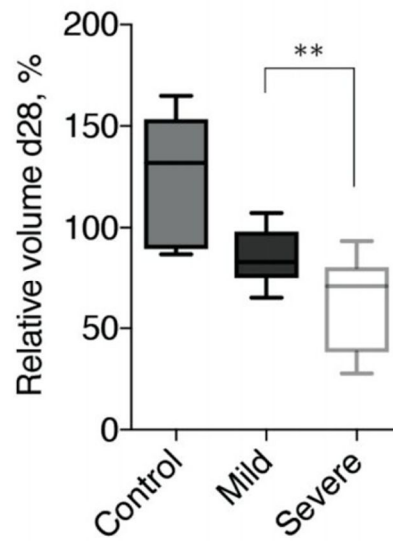
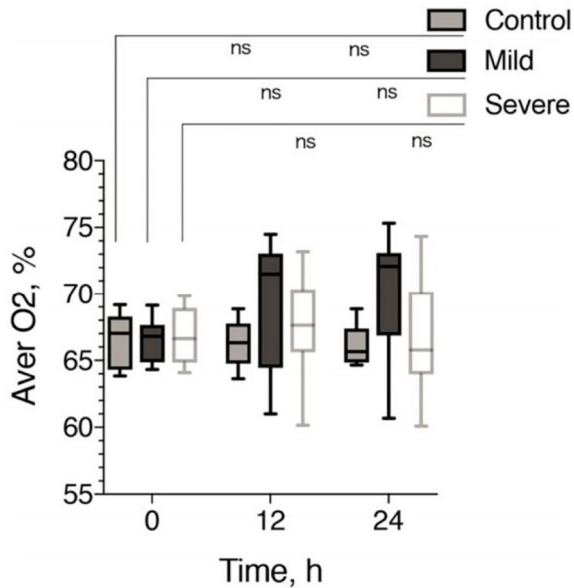
そこで、これを生じる原因として主に 2 点を考えた。血管(血流)と組織障害であり、それぞれを起因するマーカー濃度評価を行うこととなった。特に、12 時間後と 24 時間後が重要と考え、その 2 点評価とした。



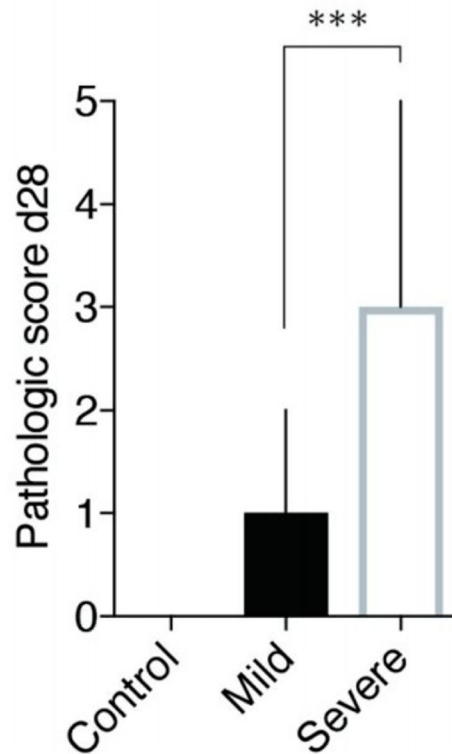
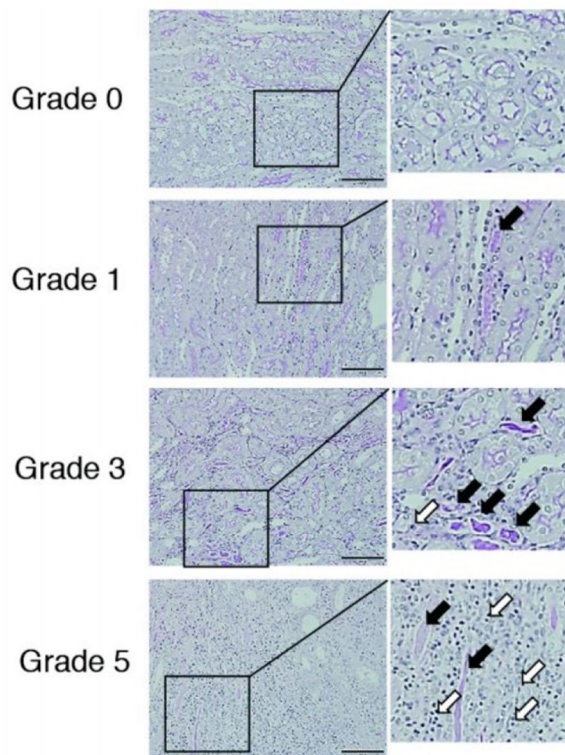
下記図(a-d)が結果である。虚血再灌流 12 時間後の NO 及び H2O2 は図 a 及び図 b、虚血再灌流 24 時間後の NO 及び H2O2 は図 c 及び図 d に示す。



重要なことに、酸素飽和度が 12 時間後は重度虚血群では高い傾向があったが、その時点では NO や H2O2 も統計学的に有意に高かったことである(図 a、b)。つまり、血管拡張作用による血流量増加と組織障害による酸素消費低下の結果、12 時間後の酸素飽和度高値をもたらしている可能性が考えられた。また、24 時間後になると、H2O2 は重度虚血群で、継続して統計学的に顕著に高かったが、逆に NO はわずかではあるが、統計学的に有意に低かった。つまり、24 時間後には既に障害が完成しつつあり、血管拡張作用もほぼおさまりつつある状態であることが考えられた。



そこで、それをさらに根拠づける為に、NO 合成阻害薬投与の上で酸素飽和度を評価したところ、12 時間後や 24 時間後の組織酸素飽和度の上昇はわずかで、統計学的に有意な傾向に乏しかった。



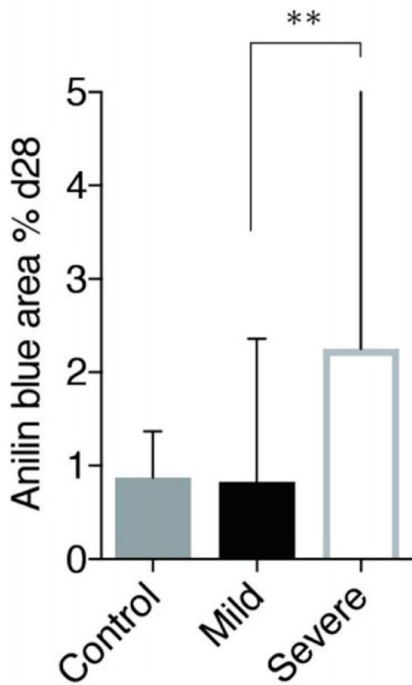
察するに、血流増加の阻害と組織障害の程度上昇のバランスに依存して、相対的に酸素飽和度が変化したことの差なのかもしれない。

また、次に、約 1 ヶ月の経過観察の上で、腎臓サイズにどの程度違いが出現するかを比較評価した (最上図、Relative volume)。

すると、重度虚血群においてサイズが統計学的に有意に小さいことが明らかとなった。サイズでは縮小していることが明らかとなったため、次にその組織障害程度の評価を行うべくまずは上左図の如く、障害程度を 5 段階に分けて検討した。

その上で、軽度虚血群と重度虚血群で障害程度を比較したところ、重度虚血群で統計学的に有意に高度な障害を生じていた (上右図)。

加えて、組織の線維化がどの程度出現しているかを比較した。

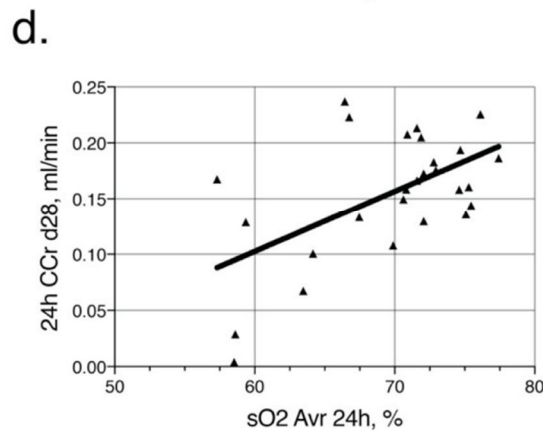
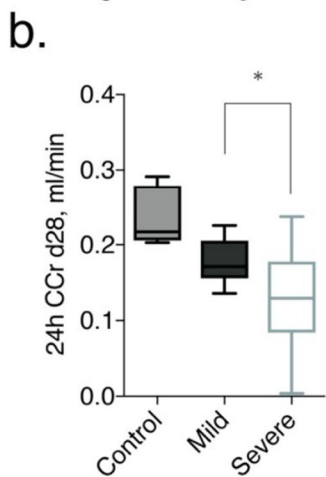
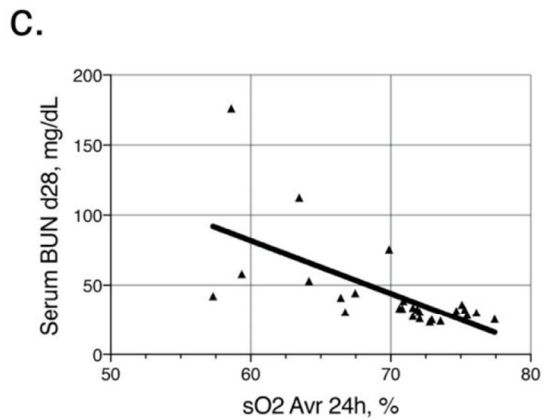
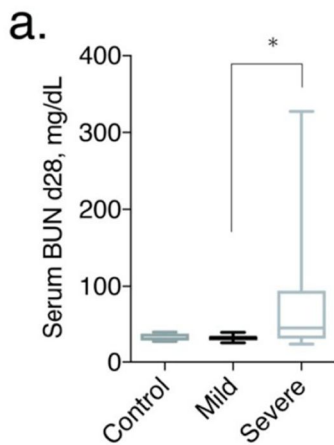


こちら、軽度虚血群と重度虚血群で障害程度を比較したところ、重度虚血群で統計学的に有意に高度な線維化を生じていた。

従って、この実験モデルにおける軽度虚血群と重度虚血群では腎臓形態的には有意な予後の差が見られたということである。これを踏まえて腎機能の差も比較することとした。左図の如く、血清 BUN 及び 24 時間クレアチンクリアランスの比較により、重度虚血群では軽度虚血群に比べて、統計学的に有意に腎機能が低下していることが明らかとなった。

そこで、さらに再灌流後の組織酸素飽和度の中で、統計学的に有意差のあった虚血再灌流後 24 時間後の腎臓酸素飽和度値に着目し、その値と慢性期腎機能との関連を明らかにすることになった。その結果下記の図の如くである。これは再灌流後 24 時間後の腎臓組織酸素飽和度の値と慢性期腎機能の相関関係を評価した図である。相関係数は BUN 及び 24 時間クレアチンクリアランスそれぞれ、 $r = -0.736, 0.405$ と相関関係を呈した。

つまり、本研究では恐らくは 24 時間後の障害程度に反映された酸素飽和度の値が、慢性期の腎機能に関係することが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kenichiro Okumura, Junichi Matsumoto, Yasunari Iwata, Evaluation of renal oxygen saturation using photoacoustic imaging for the early prediction of chronic renal function in a model of ischemia-induced acute kidney injury, PLoS One. 査読有, Dec 17, 2018, 13(12) DOI: 10.1371/journal.pone.0206461

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Kenichiro Okumura, Junichi Matsumoto, Dai Inoue, Yasunari Iwata, Takashi Wada.
Evaluation of renal oxygen saturation using photoacoustic imaging for the early prediction of chronic renal function in a model of ischemia-induced acute kidney injury
2019 年 SeRam 2019(Pamplona で開催)

以下、発表者名、演題名などは同様

(2) 2019 ARRS Annual Meeting (2019 年 5 月 5 日～5 月 10 日 Hawaii 開催)

(3) 2019 年 German Röntgen Congress

(4) 2018 年 39th National Congress of Radiology TURKRAD (2018 年 11 月 6 日～11 月 11 日 Antalya)

(5) 2018 年 Société Française de Radiologie(2018 年 10 月 12 日～15 日)

(6) The 73th Korean Congress of Radiology(KCR2018、2018 年 9 月 12 日～15 日)

(7) 奥村健一郎、松本純一、井上大. 腎虚血再灌流時の腎機能予後早期診断への、光音響画像による腎組織酸素飽和度の評価の有用性 第 77 回日本医学放射線学会総会, 2018 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 岩田 恭宜

ローマ字氏名: Iwata Yasunari

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。