

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12676

研究課題名（和文）骨格筋環境に対する音響学的識別指標の創生：健康寿命延伸へ向けた技術開発

研究課題名（英文）Creation of acoustic parameter for skeletal muscle abnormality: Technology development for extension of healthy life expectancy

研究代表者

丸山 紀史 (Maruyama, Hitoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90375642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：筋肉のインピーダンスは、安定した計測が可能なパラメータであることが細胞や動物モデルの実験で明らかとなった。インピーダンスはコントロールに比べてサルコペニアでは低く、1.75Mraylがサルコペニアの検出に有用なcut off値であることが示された。また、インピーダンスはHOMA-1Rや血中の中性脂肪ならびに総コレステロール値との相関を認め糖・脂質代謝異常を反映する新たなマーカーとしての役割を有すると考えられた。一方、体外走査超音波によるRawデータには、筋肉の病的状態を反映した情報が含まれていることが示唆された。今後、病的状態の程度とパラメータについて、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の成果によって、超音波診断装置によるサルコペニアや糖・脂質代謝疾患の診断やリスク例の拾い上げが可能となる。これは、検診レベルから病院での精密検査まで幅広い領域・分野で応用可能な技術である。最大の特徴は低負担で多くの生体情報を得ることができる超音波を基盤としていることにあり、コスト・普及の面でのアドバンテージは高い。疾患や高リスク群を効率的に拾い上げ個別化医療へ展開することで臨床プロセスの簡略・迅速化を実現し、医療経済上でも多大な貢献を示す。さらに予防医学の観点で具体的な生活指導指針の作成にも寄与したい。

研究成果の概要（英文）：Experiments using cell and animal models have revealed that the impedance is a parameter that can be stably measured in the muscle cell and muscle tissue. Impedance in the muscle was lower in sarcopenia compared to controls, indicating that 1.75 Mrayl is a useful cut-off value for the detection of sarcopenia. In addition, impedance was found to be correlated with HOMA-1R, triglyceride, and total cholesterol levels, and was thought to play a role as a new marker reflecting glucose and lipid metabolic abnormalities. On the other hand, it was suggested that raw data from extracorporeal ultrasound images contain parameters that may reflect the abnormality of muscles. It was considered necessary to conduct a more detailed examination to clarify the relationship between the degree of pathological condition of muscle and changes in acoustic parameters.

研究分野：消化器内科

キーワード：筋肉 サルコペニア 代謝異常 音響特性

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

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた今、長寿国日本では平均寿命と健康寿命の間に約 10 年の乖離がある[健康日本 21 の推進に関する参考資料]。そして筋肉は、自由かつ支障のない健康的な身体活動のための基盤をなす。同時に、世界の肥満人口は 6 億 4,100 万人に増加し[Lancet2016]、日本でも肥満者割合は男 31.3%、女 20.6%と高率である[2016]。また糖尿病患者数は地球全体で急速な増加傾向にある。日本の糖尿病患者は約 316 万人で[厚生省 2014]、糖尿病が疑われる成人は約 1,000 万人と言われている[2016]。その医療費は 1 兆円を超え(2014)、医療経済的にも極めて深刻な問題である。

骨格筋は身体支持基盤としての役割だけでなく代謝機能を担う臓器としての側面もある。グルコーストランスポーター4 を介した骨格筋細胞内への血糖の移動は、糖代謝における重要な経路である。またインスリン抵抗性(IR)は糖尿病発症の重要な病態因子であるが、筋肉の脂肪化が pro-inflammatory pathway の活性化を介して IR に関与すると報告されている[NEJM2014]。さらに高脂肪食に関連した thrombospondin 1 が IR と筋線維化を誘導すると指摘され[Endocrinology2013]、骨格筋の性状と各種代謝異常の関連が注目されている。

筋肉量や筋力の減少で定義されるサルコペニアは、高齢者の活動性低下や転倒事故などの主要因である。また、寝たきり人口の増加にも関わることから社会全体として対応すべき課題である。糖尿病や肝臓疾患は高齢者の主要慢性疾患であり、サルコペニアの合併頻度も高い。肝硬変患者でのサルコペニアの頻度は米国では 40-70% [JCG2015, APT2015]、本邦でも最大 70%と高率である[Nutrition2015, Hepatol R2016, JG2015]。すなわちサルコペニア合併慢性疾患患者が今後益々増加すると予想され、その対策は急務の課題と言える。

このように健康寿命延伸のためには、筋肉環境変化の早期の認識が重要であるが、筋肉はサンプル採取による組織検査が極めて困難な臓器であることから、画像などによる非観血的な評価法導入が医療現場における強いニーズである。

ここで、消化器領域やがん患者では筋肉量の評価法として CT 検査が用いられることが多い。しかし医療における過剰被曝への懸念は強い[NEJM2007]。米国での最大医療被曝要因は CT で、24% (約 1.5mSv)と報告されている[NCRP report160]。一方、本邦での CT 被曝は 2.3mSv とさらに高率で、CT への過度の依存を示す現状は日本の負の側面といえる [放射線量適正化のための医療被曝ガイドライン]。今こそ、筋肉の質の評価を可能とする非侵襲的な早期診断法を導入し、食事・生活指導や医療介入といった適切な対応を速やかに実践すべきである。

2. 研究の目的

本課題は、非侵襲的に筋肉の性状評価すなわちクオリティ診断を可能とする音響学的識別指標を創出し、健康寿命延伸へ向けた新たな画像診断の基盤構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞における音響学的特性の検討

細胞培養: マウス筋芽細胞とヒト筋芽細胞を、それぞれ 35mm の DISH(40,000-80,000/dish) にて培養した。また比較対照として Huh7 についても同様の条件下で培養した。

音響計測: 超音波顕微鏡(250MHz)を使用し、37℃、CO₂ 濃度 5%の条件下で行った。全体像の観察は、1200 μm*1200 μm(4 μm/pixel)とし、測定箇所については 300 μm*300 μm(1 μm/pixel)とした。また量子化ビット 8bit、サンプリング周波数 2GHz とし、DISH 上の複数点で各種パラメータ(音速、減衰、インピーダンス)を計測した。

(2) 動物モデルでの検討

サルコペニアモデル

STAM[®]マウスとして 12 週齢、3 匹(非担癌 3)と 16 週、5 匹(非担癌 1、早期がん 2、進行がん 2)、またコントロール 12 週、4 匹を使用した。高血圧自然発症ラット(SHR)として 52 週齢 3 匹と 53 週齢 3 匹、またコントロール(WKY)52 週齢 3 匹と 53 週齢 3 匹を使用した。そして画像所見(体外走査超音波、マイクロ CT)と病理像、血液検査値そして摘出筋肉標本における音響特性(インピーダンス、音速: 超音波顕微鏡での計測)の評価を行った。

糖脂質代謝異常症モデル

2 型糖尿病モデルラット SDT/Jo1(8 週)6 匹とコントロール 8 週、4 匹を使用した。サルコペニアモデルでの検討と同様に、画像所見と病理像、血液検査値、音響特性の評価を行った。

(3) 検査装置と評価方法

CT: CosmoScan GX(Rigaku)を使用した。マウス・ラットは麻酔器に接続した状態で背臥位とし全体をスキャン可能なシークエンスで撮像(8 sec × 3 scan)した。データ形式は DICOM とし、3 次元ボリュームデータ (X:512 pix, Y:512 pix, Z:795 pix)、ボクセルサイズ(空間分解能) 72-144 μm とし、筋肉の CT 値(筋肉断面トレース)を計測した。

超音波: GE Logiq S8、プローブとして 9L(6.5 MHz)と ML6-15(10 MHz)を使用した。フォーカス深度 20 mm とし Raw データ形式(ビデオコンバージョン前のライン信号)で画像情報を取得した。マウス・ラットは麻酔器に接続した状態で腹臥位とし背側の計測部分の剃毛を行った、そして背骨両側の筋肉について、長軸と短軸での観察を行った。手動で筋肉部分の解析領域を

選定し、振幅の平均と標準偏差を評価した。さらに解析領域内の全データを使用して、Nakagami 分布で振幅包絡特性を評価した。

筋組織の検討：安楽死の後、椎体両側の腰部筋肉を採取し、病理所見を検討した

音響学的特性計測：摘出直後の腰部筋肉を利用し、高周波超音波顕微鏡システムを使用して音響学的特性を計測した(中心数は数 250MHz、空間分解能 7 μ m、サンプリング周波数 2GHz、量子化ビット 8bit、scan size 1200 \times 1200 μ m²、計測点数 300 \times 300points、計測間隔 4 μ m)。

4. 研究成果

(1)培養細胞における音響学的特性の検討

条件設定：インピーダンスについては、今回の条件で安定した計測が可能であった。一方、音速と減衰については、DISH 上のサンプル厚が極めて薄いことから安定した計測は困難であった。筋肉細胞の評価に対する適切な音響因子はインピーダンスであった。

再現性：マウス・ヒト筋芽細胞と Huh7 におけるインピーダンスは、同一日、同一箇所における複数回の計測値に有意差を認めず、計測の再現性が示された。

筋芽細胞と Huh7 との比較検討：同時期に同環境下で培養した両細胞において、Day1 から Day5 の連日、インピーダンスを計測した。全ての日に於いて、インピーダンスは、Huh7 よりマウス筋芽細胞において有意に低値であり、ヒト筋芽細胞ではさらに低値であった。

経時的なインピーダンスの推移：筋芽細胞と Huh7 において Day1 から Day5 にかけて有意な変動を認めなかった。

これらの結果から、筋芽細胞におけるインピーダンスは再現性ならびに分化への非依存性を認め、筋肉評価のために有用な音響パラメータであることが示された。また筋芽細胞は、Huh に比べて低いインピーダンスを特徴とすることが明らかとなった。

(2)サルコペニア動物モデルでの検討

CT 値の検討：STAM マウスと高血圧自然発症ラットにおける筋肉の CT 値は、コントロールに比べて、有意差を認めないものの低値であり、サルコペニアによる筋組織への脂肪沈着を反映したものと考えられた。

体外走査超音波所見の検討：高周波プローブ(10MHz)を使用し、長軸像での観察条件が、アーチファクトが少なく高画質で最も安定した計測が可能であった。同条件下において、高血圧自然発症ラットではコントロールに比べて Amp variance が低い傾向を示した。このように体外超音波による Raw データには、筋肉の病的状態を反映したパラメータが含まれていることが示唆された。一方、STAM マウスではコントロールとの間に有意な所見の相違を認めなかった。今後、筋肉の病的状態の程度とパラメータの変化について、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

血液検査：中性脂肪、コレステロール、血糖、インスリン抵抗性(HOMA-IR)は、コントロールに比べ STAM マウスで有意に高値($p < 0.05$)であった。一方、高血圧自然発症ラットとコントロールでは、有意差を認めなかった。

筋組織の検討：STAM マウスでは、12 週より 16 週齢のモデルで、また非担癌モデルに比べ担癌モデルで、筋肉における線維化、筋萎縮、脂肪沈着を強く認めた。同様に高血圧自然発症ラットにおいても、コントロール(WKY)に比べて高度の線維化、筋萎縮、脂肪沈着を認めた。

音響学的特性計測：

- a. インピーダンス コントロールの筋組織ではインピーダンス 1.76Mrayl 以上であった。一方、担癌マウスならびに高血圧ラットの筋肉は萎縮と線維化・脂肪化を伴っており、1.75Mrayl 未満の低インピーダンス域が優位であった。このように、インピーダンスは筋肉における組織学的変化の差を反映しておりサルコペニアの検出に有用なパラメータであることが示された。
- b. 音速 コントロールに比べて担癌モデルで低い傾向を示したが有意な差は認められなかった。一方、高齢モデルラット(WKY、SHR)では非高齢モデルラットに比べて高い傾向を示した(1805 m/s vs 1748m/s)。

(3) 糖尿病動物モデルでの検討

CT 値の検討：2 型糖尿病モデルラットにおける筋肉の CT 値は、コントロールに比べて、有意差を認めないものの低値であった。

体外走査超音波所見の検討：高周波プローブ(10MHz)を使用し、長軸像での観察条件が適切であった。2 型糖尿病モデルラットではコントロールに比べて Amp variance には差を認めなかったが Nakagami- μ が高値を呈した。

血液検査：中性脂肪、コレステロール、血糖、インスリン抵抗性(HOMA-IR)は、コントロールに比べ 2 型糖尿病モデルラットにおいて有意に高値であった($p < 0.01$)。

筋組織の検討：2 型糖尿病モデルラットでは、コントロールとの間に、肉眼的所見の有意な差を認めなかった。

音響学的特性計測：

- a. インピーダンス：2 型糖尿病モデルラットでは 1.75Mrayl 以下であり、コントロールより低値であった。さらに HOMA-IR や中性脂肪、総コレステロール値との相関も認められた($r = 0.6 \sim 0.68$, $p < 0.05$)。従って、筋のインピーダンスは糖・脂質代謝異常を反映する新たなマーカー

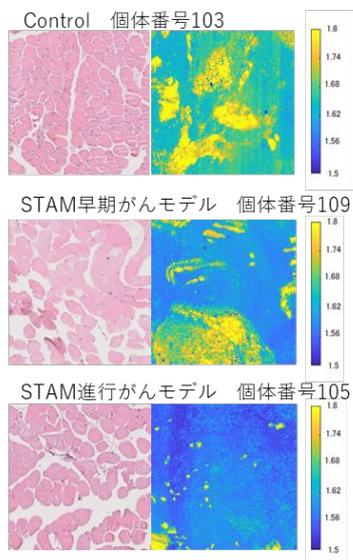
としての役割を有することが示唆された、

b. 音速：2 型糖尿病モデルラット (1802m/s) ではコントロール(1782m/s) に比べて音速が高い傾向を示した。

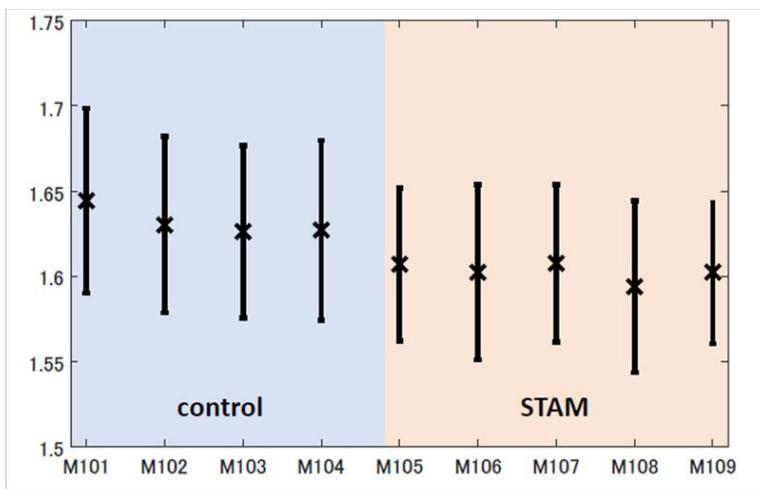
以上の結果から、筋肉のインピーダンスは安定した計測が可能なパラメータであることが細胞や動物モデルによる実験で明らかとなった。インピーダンスは、コントロールに比べてサルコペニアでは低く、1.75Mrayl がサルコペニアの検出に有用な cut off 値であることが示された。また、インピーダンスは HOMA-IR や中性脂肪、総コレステロール値との相関を認め糖・脂質代謝異常を反映する新たなマーカーとしての役割を有するものと考えられた。一方、体外走査超音波による Raw データには、筋肉の病的状態を反映したパラメータが含まれていることが示唆された。今後、病的状態の程度とパラメータの変化について、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

音速については、担癌モデルでは低い傾向を示したが、高齢モデルや糖尿病モデルでは高い傾向を呈し、筋肉における病的変化との関連は明らかでなかった。音速の計測について、本課題の後半で手技の習熟が得られ、安定した計測が可能となった。しかし至適条件や計測値の再現性などについては十分な検討がなされていない。筋組織所見との関連を含め、今後の検討課題と考えられた。

<担癌モデルでの検討>

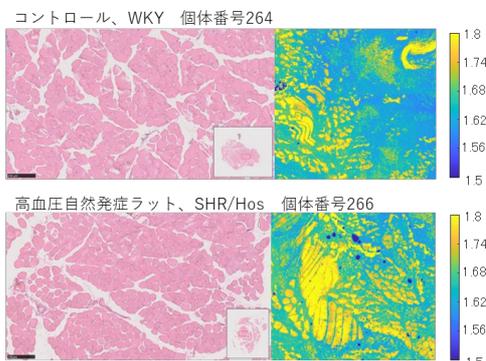


(左：HE染色、右：インピーダンスマッピング)

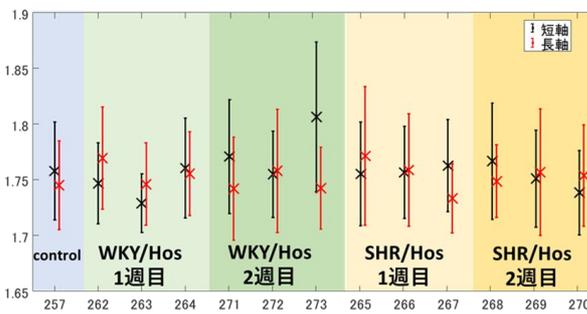


(縦軸：インピーダンス [Mrayl]、横軸：個体番号)

<高血圧自然発症モデルでの検討>



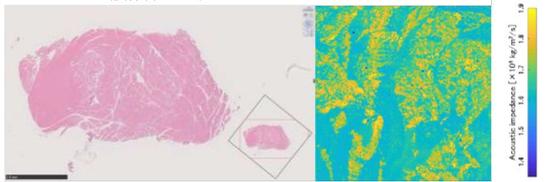
(左：HE染色、右：インピーダンスマッピング)



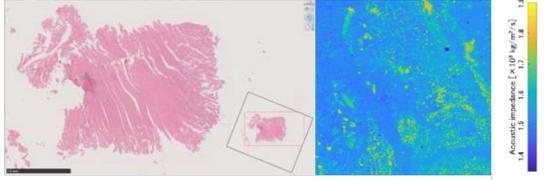
(縦軸：インピーダンス [Mrayl]、横軸：個体番号)

<2 型糖尿病モデルでの検討>

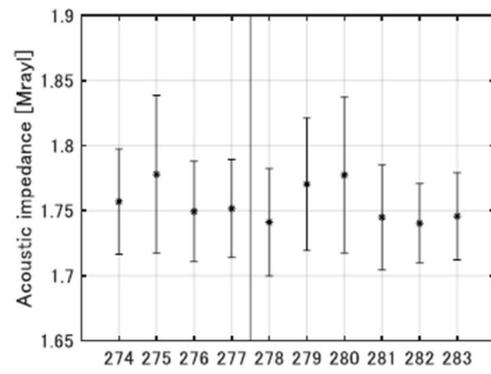
コントロール(個体番号274)



2型糖尿病モデル(個体番号282)



(左：HE染色、右：インピーダンスマッピング)



(横軸：個体番号)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Lee JY, Minami Y, Choi BI, Lee WJ, Chou YH, Jeong WK, Park MS, Kudo N, Lee MW, Kamata K, Iijima H, Kim SY, Numata K, Sugimoto K, Maruyama H, Sumino Y, Ogawa C, Kitano M, Joo I, Arita J, Liang JD, Lin HM, Nolsoe C, Gilja OH, Kudo M	4. 巻 28
2. 論文標題 The AFSUMB consensus statements and recommendations for the clinical practice of contrast-enhanced ultrasound using sonazoid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasound	6. 最初と最後の頁 59 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/JMU.JMU_124_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Yusuke, Tamura Kazuki, Mori Shohei, Tai Dar-In, Tsui Po-Hsiang, Yoshida Kenji, Hirata Shinnosuke, Maruyama Hitoshi, Yamaguchi Tadashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Fatty liver evaluation with double-Nakagami model under low-resolution conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SDDE06 ~ SDDE06
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abf07d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maruyama Hitoshi, Yamaguchi Tadashi, Nagamatsu Hiroaki, Shiina Shuichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 AI-Based Radiological Imaging for HCC: Current Status and Future of Ultrasound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 292 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11020292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本明楽、大澤侑暉、平田 慎之介、吉田憲司、丸山 紀史、山口 匡
2. 発表標題 臓器不全マウス・ラットにおける多種組織の音響インピーダンス評価
3. 学会等名 日本音響学会2021年秋季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本明栄、大澤侑暉、平田慎之介、吉田憲司、丸山紀史、山口匡
2. 発表標題 サルコペニアの早期評価に向けた多種組織の音響特性評価の基礎検討
3. 学会等名 日本音響学会2022年春季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本諒哉、丸山紀史、山口匡
2. 発表標題 サルコペニアの定量診断にむけた筋芽細胞の音響インピーダンス評価
3. 学会等名 第41回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤侑暉、橋本諒哉、丸山紀史、山口匡
2. 発表標題 マウス筋芽細胞及びHuh7の細胞の分化過程における音響インピーダンス評価
3. 学会等名 日本音響学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitoshi Maruyama
2. 発表標題 MAFLD: East Vs West
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 丸山紀史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 507
3. 書名 肝臓専門医テキスト改訂第3版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉田 憲司 (Kenji Yoshida) (10572985)	千葉大学・フロンティア医工学センター・准教授 (12501)	
研究 分担者	山口 匡 (Tadashi Yamaguchi) (40334172)	千葉大学・フロンティア医工学センター・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------