

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380193

研究課題名（和文） 犬および猫の肝胆道系疾患の鑑別と重症度評価を目的とした非侵襲的新規検査法の確立

研究課題名（英文） Establishment of novel non-invasive test for differential diagnosis and severity evaluation of hepatobiliary diseases in dogs and cats.

研究代表者

大野 耕一（OHNO KOICHI）

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90294660

研究成果の概要（和文）：

①ダイナミック CT 検査およびソナゾイドを用いた超音波造影検査は、犬における肝臓腫瘍性病変の良性、悪性の鑑別、さらには肝細胞癌とその他の悪性腫瘍の鑑別に有用であり、侵襲性の少ない診断方法として、临床上重要な検査であることが示唆された。

②犬でも、肝線維化においてヒトや実験動物と同様の分子病態が存在することが明らかとなり、今後の肝生検材料を用いた肝線維化の遺伝子検査に有用であることが示唆された。

③犬の慢性肝疾患症例では血中のヒアルロン酸濃度は上昇しており、とくに、肝硬変の血中マーカーとなりうるということが示唆された。

④超音波診断装置を用いた胆嚢の排泄率計測は比較的簡便であり十分に臨床応用可能な胆嚢機能評価法であり、今回この検査法によって胆泥症時の機能異常も明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

①Both Dynamic-CT and CEU using new contrast agent SONAZOID are useful for distinguish benign and malignant, hepatocellular carcinoma and other malignant tumors. These non-invasive diagnostic imaging, especially SONAZOID-CEU will be important tools in veterinary clinical field in the future.

②The expression of 9 fibrosis-related genes showed significant positive correlation with the degree of canine liver fibrosis, indicating the similar molecular regulation with human and mouse. Results suggest that the gene expression analysis using liver tissue sample could be a useful tool for evaluating the degree of fibrosis in dogs.

③Measurement of the blood hyaluronic acid (HA) concentration of dogs with suspected liver disease can be a useful diagnostic aid for canine cirrhosis.

④Gallbladder ejection fraction estimated by ultrasonography was easy and useful as the index of gallbladder emptying. In this study, we firstly found that biliary stasis occurs not only in dogs with gallbladder mucocele but also in dogs with biliary sludge.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，臨床獣医学

キーワード：内科，肝胆道系疾患

## 1. 研究開始当初の背景

犬および猫の肝臓における後天性の疾患において、肝炎などのび慢性・実質性の疾患と、肝細胞癌・転移性腫瘍などの腫瘍性疾患は比較的良好に認められる疾患である。これらの疾患は通常生化学検査による肝酵素値の異常や B モード超音波検査によって何かしら異常があると獣医師が判断した後に、組織生検・病理組織学的診断を行って診断することが必須となる。しかしすべての肝疾患の動物において肝組織生検を行うことは、麻酔、危険性、費用などの問題から極めて困難である上に、一般的な生検で採取される組織は肝臓全体の数千から数万分の 1 であるという事実もあり、採取した組織は肝臓全体の病気を表していないという問題が常に存在する。このようなことを考慮すると獣医領域では病理診断の整備の次に行われるべきは、非侵襲的検査・診断法の整備・充実であることは疑いようが無い。

## 2. 研究の目的

このように、犬猫の肝胆道系疾患は、肝酵素値測定や超音波検査などで漠然と異常を検出した後に侵襲性の高い肝生検を行って病理組織学的検査を行うことで診断されることがほとんどであり、非特異的検査である肝酵素値、超音波検査と侵襲性の高い生検・組織診断との間を埋める検査法が全く無いのが現状である。そこで本申請研究では犬および猫の肝胆道系疾患の鑑別や重症度判定、治療効果判定に利用できるような非侵襲的な検査法、即ち画像的、臨床病理学的、分子生物学的検査法の有用性を検討し臨床応用することを目的とする。具体的には、肝腫瘍性病変に対する新たな検査法として①新しい超音波造影剤を用いた造影超音波検査および CT 造影による犬の肝腫瘍性病変の診断方法の開発、また慢性炎症性肝疾患に対して②遺伝子発現解析による、針生検材料を用いた肝臓のび慢性疾患の診断・重症度判定ツールの開発③肝臓の線維化を反映する血中マーカーの検討、さらに④胆嚢運動性評価法の開発と肝・胆嚢疾患との関連性、についてそれぞれ研究する。

## 3. 研究の方法

### ①犬の肝腫瘍性病変の新規画像診断法の開発

発：犬において、原発性肝臓腫瘍のなかでは肝細胞癌がもっとも発生率が高く、その他に肝細胞腺腫、胆管細胞癌、カルチノイド、肉腫などが発生し、これらの腫瘍性病変は組織

学的なタイプにより予後に大きな違いがある。本研究の目的は、造影 CT 検査および造影超音波検査における犬のさまざまな肝臓腫瘍性病変の特徴をあきらかにし、画像診断における犬の肝臓腫瘍性病変の診断能を向上することである。

### <方法>

1. 東京大学附属動物医療センターに来院し、肝腫瘍性病変のある犬についてダイナミック造影 CT 検査を行い、その後に肝細胞由来の腫瘍性病変との組織学的診断が得られた症例について、各組織学的タイプとダイナミック造影 CT 検査所見を比較した。CT 撮影は全身麻酔下で常法通り行った。非造影画像においては病変の数、大きさ、マージン、被膜の有無、石灰化、腫瘍内血栓などについてそれぞれ評価を行った。また、ダイナミック造影は動脈相、門脈相、平衡相の 3 時相についてそれぞれ、周囲非病変肝実質と CT 値を比較することで hyperattenuation、isoattenuation、hypoattenuation の 3 つのカテゴリーに分類した。さらに、動脈相における血管増強パターンとして、central enhancement、marginal enhancement、diffuse enhancement の 3 タイプに分類し、各項目と病理組織学的診断との関連を統計学的に検討した。

2. 5 匹の健常な実験用ビーグルを用い、犬の肝臓でのソナゾイドによる超音波造影における造影効果を経時的に検討した。経静脈留置針を設置し、超音波造影剤ソナゾイドを 0.15ml/kg で投与、経時的に超音波画像を記録した。各画像について、肝実質および肝内門脈に LOI を設定し、その MGI (mean grayscale intensity) を、画像処理ソフトを用いて計測した。

東京大学附属動物医療センターに来院し、肝腫瘍性病変のある犬について、新しい超音波造影剤であるソナゾイドを用いた超音波造影検査を行い、その後に組織学的、細胞学的診断が得られた症例に着いて、各組織学的タイプと造影超音波検査所見を比較した。検査は覚醒下、もしくは一部の症例では麻酔下で行い、投与方法および各時相の設定は 2 と同様に行った。動脈相および門脈相においては、周囲非病変肝と病変部の造影効果を比較することで、hyperenhancement、isoenhancement、hypoenhancement の 3 つに分類した。また、肝臓実質相においては、周囲肝臓が造影されているのに対し、腫瘍性病変内部で全く造影効果が認められない clear defect、一部で欠損が認められる irregular defect、周囲肝臓と同様の造影効果を示す no defect の 3 タイプに分類した。各画像所見と病理学的な診断との関係を統計学的に検討した。

## ②肝び慢性疾患の遺伝子発現解析：

犬の慢性肝炎において、線維化は疾患の重症度をあらわす指標である。しかし、線維化の評価のためには生検および病理組織学的な評価が必要であり、その侵襲性が問題となる。またそもそも犬の線維化における分子病態はあきらかになっていなかった。そこで犬の慢性肝炎において、線維化と関連する遺伝子の発現量と、疾患の進行との関連をあきらかにすることを目的として以下の手法により研究を行った。

### <方法>

東京大学動物医療センターに来院し、慢性肝炎と組織学的に診断された犬15例の肝臓組織からRNAを抽出した。線維化と関連すると考えられる遺伝子について他の動物あるいは *in vitro* での研究に関する文献を検索し、これらの肝臓における遺伝子発現を、リアルタイムPCR法を用いて定量した。各遺伝子の発現量と、組織学的な線維化の程度の相関について検討し、さらに、臨床的な疾患ステージ（予後と関連があることがあきらかにされている、腹水または黄疸の有無）と遺伝子発現量の関係についても検討を行った。

## ③肝臓の線維化に関する血中マーカーの検索：

犬の慢性肝炎の重症度判定を行うことの出来る非侵襲的な検査として、ヒトおよび他の動物種で肝線維化のマーカーとして用いられているヒアルロン酸について以下の方法で検討した。

### <方法>

病理組織学的に慢性肝炎および肝硬変と診断された犬、健常ビーグル犬、および肝外疾患と診断された犬の血清および血漿を用い、血中マーカーとして有望なヒアルロン酸濃度を測定し、各群の測定値を比較した。さらに、肝疾患の症例については、その重症度を病理組織学的な線維化の程度を指標に評価し、血中ヒアルロン酸濃度との相関を評価した。また、肝臓組織におけるヒアルロン酸の局在を、組織化学的に染色し、評価した。

## ④犬の胆嚢運動性評価法の開発：

犬の胆嚢疾患に関しては、近年の胆嚢粘液嚢腫の概念の普及とともに、注目が集まっているが、その検査法は全く進歩していない。とくに胆嚢の機能に関する臨床的検査法は皆無といえる。胆嚢の重要な機能として胆汁の貯蔵排泄があるが、この生理作用のために重要な機能が食事刺激による胆嚢の運動性である。今回犬の胆嚢運動性をとくに臨床例に応用するために、簡便な超音波診断装置を

用いた胆汁排泄能評価法を検討した。

### <方法>

まず予備実験として6頭の実験ビーグル犬を用いた。12時間絶食にした後に、超音波診断装置を用いて胆嚢を描出し、長径と胆径を測定することによって胆嚢体積の近似値を算出する。その後食事を摂取させ、経時的に胆嚢の体積を測定・算出して、食前値と比較することで排泄能を算出した。また胆泥症群および胆嚢粘液嚢腫の犬を合計60頭集め、予備試験の結果をもとに食前および食後60分、120分の時点での胆嚢排泄率を算出した。

## 4. 研究成果

### ①犬の肝腫瘍性病変の新規画像診断法の開発：

・肝細胞癌14例、肝細胞腺腫14例、結節性過形成5例について検討を行った。3群のうち結節性過形成は有意に( $p < 0.05$ )小さく、シスト様構造および被膜を有する割合が有意に( $p < 0.05$ )低かった(表1)。

表1 CT所見

各数値は各項目の陽性症例数を示す。HCC: 肝細胞癌、HA: 肝細胞腺腫、NH: 結節性過形成

	Cyst-like	Capsule
HCC <i>n</i> = 14	13 (93%)	13 (93%)
HA <i>n</i> = 14	10 (71%)	9 (64%)
NH <i>n</i> = 5	1* (20%)	1* (20%)

・造影所見では、動脈相において肝細胞腺腫で hyperattenuation の割合が高く、逆に肝細胞癌では低かった( $p < 0.05$ )。また門脈相においては肝細胞癌で hyperattenuation の割合が有意に低く、平衡相においては肝細胞癌で hypoattenuation の割合が有意に( $p < 0.05$ )高かった(表2)。

表2 ダイナミックCT所見

各数値は各項目の陽性症例数を示す。Arterial: 動脈相、Portal: 門脈相、Equilibrium: 平衡相、HCC: 肝細胞癌、HA: 肝細胞腺腫、NH: 結節性過形成、Hyper: hyperattenuation、Iso: Isoattenuation、Hypo: Hypoattenuation、\* 他に比べて有意に高い、もしくは低い割合を示す。

	Arterial			Portal			Equilibrium		
	Hypo	Iso	Hyper	Hypo	Iso	Hyper	Hypo	Iso	Hyper
HCC ( <i>n</i> = 14)	7	7	0*	12	2	0*	13*	1*	0
HA ( <i>n</i> = 14)	6	4	4*	9	1	4	9	4	1
NH ( <i>n</i> = 5)	1	3	1	2	2	1	2	3*	0

さらに、動脈相における血管増強パターンは、肝細胞癌では central および marginal enhancement の割合が有意に高く、肝細胞腺腫では diffuse enhancement の割合が有意に( $p < 0.05$ )高かった(表3)。

表3 HCC: 肝細胞癌, CC: 胆管細胞癌, NH: 結節性過形成, HT: 造血系腫瘍, SA: 肉腫, HN: 良性結節性病変, Arterial: 動脈相, Portal: 門脈相, Parenchymal: 実質相, Hyper: hyperenhancement, Iso: Isoenhancement, Hypo: Hypoenhancement

	No. of Dogs								
	Arterial			Portal			Parenchymal		
	Hyper	Iso	Hypo	Hyper	Iso	Hypo	ND	ID	CD
HCC (n=6)	5		1	1	1	4		6	
CC (n=3)			2			2		1	2
HT (n=4)		2	2			4			4
SA (n=3)			3			3		1	2
HN (n=9)		5	3		4	4		8	1

・ソナゾイド投与後 10 秒程度で肝内の動脈が強く造影され、引き続き門脈および肝臓実質の造影が認められた。門脈の造影効果は造影剤投与後 30 秒で最大に達し、その後急速に減衰した。これに対し、肝臓実質の造影効果は投与後 45 秒で最大に達し、その後緩やかに減衰、少なくとも投与後 30 分まで造影効果が持続していることが確認された。

これらの結果から、犬の肝臓で、ソナゾイドによる良好な造影効果が確認され、造影剤投与直後から 20 秒程度までが動脈相、20 秒から 1 分程度までが門脈相、8 分から 15 分程度が肝実質相とすることができると考えられた。

・9 例の良性腫瘍性病変（結節性過形成 6 例、肝硬変性再生性結節 3 例）、16 例の悪性腫瘍（肝細胞癌 6 例、胆管細胞癌 3 例、造血系腫瘍 4 例、間葉系腫瘍 3 例）で検討を行った。造影所見では、肝臓実質相において、肝細胞癌では irregular defect、その他の悪性腫瘍では clear defect、良性病変では no defect の割合がそれぞれ有意に ( $p < 0.01$ )

	Enhancement pattern (%)		
	Central	Marginal	Diffuse
HCC (n=14)	11* (79%)	13* (93%)	0* (0%)
HA (n=14)	4* (29%)	4* (29%)	8* (57%)
NH (n=5)	1 (20%)	2 (40%)	3 (60%)

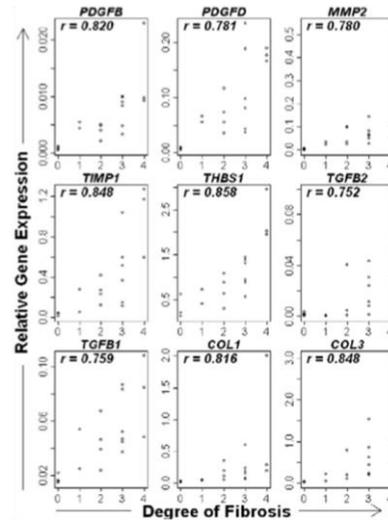
高かった (表 4)。

さらに、門脈相における hypoenhancement の割合は良性病変に比べて悪性腫瘍で有意に ( $p < 0.01$ ) 高かった。

これらの結果から、ダイナミック CT 検査およびソナゾイドを用いた超音波造影検査は、犬における肝臓腫瘍性病変の良性、悪性の鑑別、さらには肝細胞癌とその他の悪性腫瘍の鑑別に有用であり、侵襲性の少ない診断方法として、臨床上重要な検査であることが示唆された。

## ②肝び慢性疾患の遺伝子発現解析:

図1 線維化の程度と遺伝子発現量の関係  
すべての遺伝子で有意な相関が認められた。  
( $p < 0.005$ ,  $r > 0.70$ )



文献検索により 9 つの遺伝子を選択した (MMP2, TIMP1, PDGFB, PDGFD, THBS1, TGFBI, TGFBI, COL1A1, and COL3A1)。すべての遺伝子において、組織学的な線維化の程度と遺伝子発現量に有意な相関が認められた (図 1)。

さらに、負の予後因子である腹水あるいは黄疸のある群とない群においてこれらの遺伝子発現量を比較したところ、TGFBI をのぞくすべての遺伝子において、予後の悪い群において有意に発現が高かった。

これらの結果から、犬でも、肝線維化においてヒトや実験動物と同様の分子病態が存在することが示唆された。また、これらの遺伝子発現量は臨床的あるいは組織学的な病変の進行に関連して上昇することが示された。

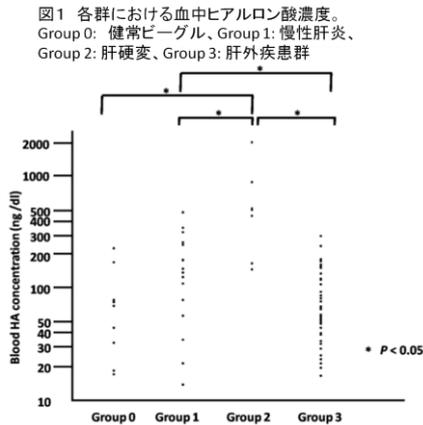
## ③肝臓の線維化に関する血中マーカーの検索:

血中ヒアルロン酸濃度測定値は、健常ビーグルで 73 microg/l (範囲: 19-232 microg/l)、慢性肝炎群で 153 microg/l (15-477 microg/l)、肝硬変群で 500 microg/l (151-1970 microg/l)、肝外疾患群で 61 microg/l (18-296 microg)であった (図 1、 $p < 0.05$ )。

肝硬変群では他の三群に比べて血中ヒアルロン酸濃度は有意に高く、また、慢性肝炎群では肝外疾患群に比べ有意に高かった。組織化学的染色では、ヒアルロン酸は線維化組織に一致して認められた。慢性肝炎群において、線維化の程度と血中ヒアルロン酸濃度には

相関は認められなかった。

これらの結果から、犬の慢性肝疾患症例では血中のヒアルロン酸濃度は上昇しており、とくに、肝硬変の血中マーカーとなりうることが示唆された。また組織化学的染色の結果

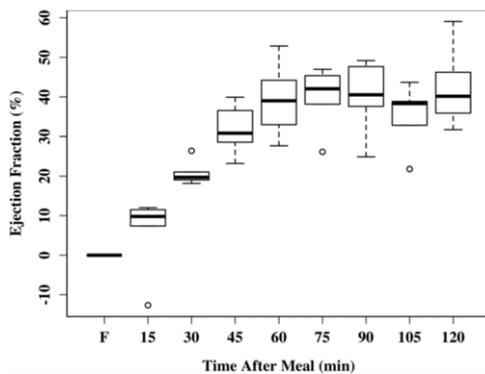


から、血中ヒアルロン酸濃度の上昇は、肝組織中の線維化組織に由来するものであることが示唆された。

#### ④犬の胆嚢運動性評価法の開発：

実験ビーグル犬を用いた予備試験の結果、食後 60 分から 120 分の間にかけて胆嚢体積がほぼプラトーに達することが判明した（図

図1 経時的に測定した食後の胆嚢排出能(犬)  
60分から120分の間でほぼプラトーとなることが分かった。



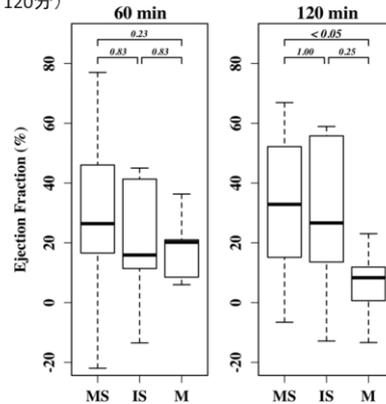
1)。この結果から症例において胆嚢排泄率を計測する場合には、絶食後（食前）、食後 60 分、食後 120 分の 3 点を計測することで、胆嚢運動性評価が可能であることがわかり、十分に臨床応用が可能な簡便さであると考えられた。

症例 60 頭を用いた検討では、予想通り胆嚢粘液嚢腫群では健常犬に比較して、有意には胆嚢排泄率が低下していたが、予想に反し、胆泥群（可動性および非可動性の両方）でも胆嚢排泄率が低下していた（図 2）。

また食前、食後を通して、胆泥群、胆嚢粘液嚢腫群では胆嚢体積が健常犬に比較して増

加しており、胆泥群でも運動性の低下だけでなく胆嚢体積が増加し、胆汁鬱滞を呈していることが示唆された。

図2 可動性胆泥(MS), 非可動性胆泥(IS)および胆嚢粘液嚢腫(M)の犬の胆嚢排出能(食後60分および120分)



今回の結果から、超音波診断装置を用いた胆嚢排泄率の計測は簡便で十分に臨床応用が可能であることがわかった。また今回初めて臨床的意義は犬ではほとんどないと言われていた胆泥症についても、排泄率低下や体積増加などの機能的異常が存在していることが示され、胆泥症と疾患との関連性が改めて示唆された。

#### 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 9 件）

① Kanemoto H, Ohno K, Nakashima K, Takahashi M, Fujino Y, Nishimura R, Tsujimoto H. Characterization of canine focal liver lesions with contrast-enhanced ultrasound using a novel contrast agent-sonazoid. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009, 50(2):188-94. 査読あり

② Kanemoto H, Ohno K, Sakai M, Nakashima K, Takahashi M, Fujino Y, Tsujimoto H. Blood hyaluronic acid as a marker for canine cirrhosis. *J Vet Med Sci*. 2009, 71(9):1251-4. 査読あり

③ Seki M, Asano K, Sakai M, Kanno N, Teshima K, Edamura K, Tanaka S., Serum hyaluronic acid in dogs with congenital portosystemic shunts., *J Small Anim Pract*. 2010, 51(5):260-3. 査読あり

④ Kanemoto H, Ohno K, Sakai M, Nakashima K, Takahashi M, Fujino Y, Tsujimoto H. Expression of fibrosis-related genes in canine chronic hepatitis. *Vet*

Pathol. 2011, 48(4):839-45. 査読あり

⑤ Osumi T, Ohno K, Kanemoto H, Nakashima K, Uchida K, Karasawa A, Fujino Y, Tsujimoto H. A case of recovery from canine destructive cholangitis in a Miniature Dachshund. J Vet Med Sci. 2011, 73(7):937-9. 査読あり

⑥ Ishida A, Ohno K, Fukushima K, Nakashima K, Takahashi M, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Tsujimoto H. Plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases: comparison with C-reactive protein. J Vet Med Sci. 2011, 73(9):1127-32. 査読あり

⑦ Tsukagoshi T, Ohno K, Tsukamoto A, Fukushima K, Takahashi M, Nakashima K, Fujino Y, Tsujimoto H. Decreased gallbladder emptying in dogs with biliary sludge or gallbladder mucocele. Vet Radiol Ultrasound. 2012, 53(1):84-91. 査読あり

⑧ Fukushima K, Kanemoto H, Ohno K, Takahashi M, Nakashima K, Fujino Y, Uchida K, Fujiwara R, Nishimura R, Tsujimoto H. CT CHARACTERISTICS OF PRIMARY HEPATIC MASS LESIONS IN DOGS. Vet Radiol Ultrasound. 2012, doi:10.1111/j.1740-8261.2011.01917.x.[Epub] 査読あり

⑨ 中嶋真弓・大野耕一・竹内由則・竹内文乃・中島亘・藤野泰人・辻本元 「イヌの動的栄養指標蛋白としての血漿トランスフェリン値の有用性」2012, 日本ペット栄養学会誌 (in press) 査読あり

[学会発表] (計5件)

① 中嶋真弓, 大野耕一, 他, 「重症動物における栄養状態評価法の有用性に関する検討—Tf 値の動的栄養指標蛋白としての有用性—」, 2010年, 日本ペット栄養学会

② H. Kanemoto, K. Ohno, M. Sakai, K. Nakashima, Y. Goto and H. Tsujimoto Microarray gene expression analysis for American Cocker Spaniel hepatopathy, a unique type of canine liver parenchymal disease. Asian Meeting of Animal Medicine Specialties, (台北、平成21年1月)

③ 塚越太郎, 大野耕一, 他, 「超音波検査を用いた犬の胆のう排出能の評価と胆泥症におけるその変化」, 日本獣医内科学アカデミ

ー2011年大会

④ 金本英之, 大野耕一, 他 肝細胞性腫瘍の画像診断 第6回日本獣医内科学アカデミー (東京、平成22年11月)

⑤ 五十嵐寛高, 大野耕一, 他, 「先天性門脈体循環シャントの犬における L-オルニチン L-アスパラギン酸のアンモニア低下効果の検討」, 日本獣医内科学アカデミー2012年大会

[図書] (計1件)

① 大野耕一, 他, 「疾患からみた検査の考え方: 肝胆道系疾患」, SAMedicine, インターズ社, 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 耕一 (OHNO KOICHI)

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 90294660

(2) 研究分担者

辻本 元 (TSUJIMOTO HAJIME)

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 60163804

藤野 泰人 (FUJINO YASUHIITO)

東京大学大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号: 70401180

(3) 連携研究者

西村 亮平 (NISHIMURA RYOHEI)

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 80172708

内田 和幸 (UCHIDA KAZUYUKI)

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 10223554

坂井 学 (SAKAI MANABU)

日本大学生物資源科学部・助手  
研究者番号: 90366625