

## 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 4 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591583

研究課題名（和文） 単色放射光を用いた肝血流イメージングによる局所肝血流の3次元の微細動態の解析

研究課題名（英文） 3D analysis of regional hepatic blood flow by means of hepatic imaging using monochromatic synchrotron radiation

研究代表者

伊東 克能（ITO KATSUYOSHI）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00274168

研究成果の概要（和文）：単色放射光を肝微小血流イメージング法として応用し、局所肝血流の3次元の微細動態の解析を行った。今回の検討から、末梢肝実質レベルでの動脈・門脈の吻合状態の変化や血管増生の程度を評価することができ、臨床例でしばしば経験される造影ダイナミックCTやMRIの動脈優位相で観察される早期濃染偽病変の成因解明の一助になると考えられた。また肝細胞特異性MRI造影剤であるGd-EOB-DTPAをマウスに投与し、Gd-EOB-DTPAの肝内分布の観察を行った。その結果、正常肝細胞質への優位な取り込みが認められ、またNASHモデルマウスを使った実験では、肝線維化の進行に伴い、肝細胞実質への取り込み分布が低下することが確認された。これにより肝細胞機能と微細肝動脈門脈血流動態との相互関係についても解明できる可能性が示された。腎不全モデルラットにおいては、Gd-EOB-DTPA投与後の肝内ガドリニウム蓄積は微量であることがわかった。一方で、肝腎不全モデルラットにおいては、Gd-EOB-DTPA投与後の肝内ガドリニウム蓄積は増加しており、胆道排泄と腎排泄の2経路を有するGd-EOB-DTPAでも肝腎不全では排泄遅延や障害が生じることが示された。

研究成果の概要（英文）：3D analysis of regional hepatic blood flow was performed by means of hepatic flow imaging using monochromatic synchrotron radiation. Our results showed that micro-CT enables the evaluation of microanastomosis between small arteries and portal veins as well as the degree of neovascularization. This fact may help elucidate the cause of early enhancing hepatic pseudolesions observed in contrast-enhanced dynamic CT or MRI. Intrahepatic distribution of Gd-EOB-DTPA as a hepatocyte-specific contrast agent was also assessed by using normal and NASH model mouse. In normal mouse, predominant uptake of Gd-EOB-DTPA in the hepatocyte was observed. In NASH model mouse, uptake of Gd-EOB-DTPA gradually decreased, according to the progression of hepatic fibrosis, suggesting the relationship between hepatocyte function and dynamic changes of hepatic blood flow. Regarding the Gd deposition in the liver, Gd deposition in renal dysfunction model rat was minimal. However, Gd deposition was increased in hepatorenal dysfunction model rat, indicating the increased risk of deterioration of liver function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：エックス線・CT、肝血流イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肝内血流は門脈血流と酸素飽和度の高い肝動脈血流により供給されており、さらに門脈には主として消化管からの豊富な栄養分を含有する上腸間膜静脈血流と血液フィルターとしての脾臓を経由した脾静脈血流が流入している。これら性格の異なる多重血流支配を受ける肝血流は病的状態下のみならず生理的状态下でも様々な因子により常に変化していると考えられる。肝血流の評価にはこれまで血管造影、dynamic CT、超音波、ラジオアイソトープを用いた方法などが用いられてきたが、それぞれ低空間分解能、低時間分解能や被曝の問題、1血流のみしか評価できない、門脈血管内での流れそのものの評価が困難などの問題点が含まれており、肝動脈血流と門脈血流の末梢レベルでの相互作用あるいは肝実質内での局所血流分布の差違や不均一性、上腸間膜静脈血流と脾静脈血流の末梢門脈内および肝内分布とその相対的变化など、十分に解明されていない点が多い。

(2) 一方、単色 X 線は、通常の血管造影用 X 線と異なり指向性が高く、格段に解像度の高い画像が得られ、これまで組織学的にしか評価できなかった  $30\mu\text{m}$  以下の微小血管の画像化を可能とし、生体内の微小血管構築の評価も可能としてきた。医学分野ではこれまで心筋血管、脳血管などを中心に研究が進められてきたが、近年、肝血管への応用もみられる。しかしながら、肝血管に関しては正常肝動脈の 2 次元 X 線像の検討が主体であり、末梢レベルでの門脈血流との相互作用や局所肝実質レベルでの血流分布の差違や不均一性、血管閉塞に伴う相対的变化、micro-CT による微小血管の 3 次元画像などについては検討されていない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、微小血管を描出可能な単色放射光を肝微小血流イメージング法として応用することで、これまで濃度分解能、空間分解能、時間分解能が不十分で評価できなかった局所肝動脈・門脈血流の 3 次元的微細動態の解析を行うことを目的としており、肝動脈血流と門脈血流の肝実質内での微小循環や相互作用と灌流域変化、末梢肝実質レベルでの上腸間膜静脈血流と脾静脈血流の経時的動的血流分布などについて総合的な評価を行う。

(2) また慢性ウイルス性肝炎やアルコール性肝炎、NASH などの慢性肝障害・肝硬変では病期の進行に伴い、血流動態の変化とともに肝細胞機能にも変化を来すことが考えられるため、肝細胞特異性 MRI 造影剤である Gd-EOB-DTPA を用いて肝細胞機能の評価も行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 実験シミュレーション施行後、日本白色家兔（クリーン）を用い、麻酔導入後に開腹操作を行い、肝臓を露出する。肝動脈、門脈にカテーテルを留置し、その状態で実験ハッチ内の資料台に固定する。撮影は造影剤構成元素であるヨードの K 吸収端直上のエネルギーに設定した単色 X 線を使用する。造影剤はインジェクターを用いて注入し、透過像はビームモニターを用いて、肝微小血流イメージングを行う。正常肝動脈・門脈の微小血管造影像および micro-CT による 3 次元的微細構造を解析し、末梢レベルでの動脈・門脈の吻合状態や流出血管の同定を行う。術後に摘出標本による組織学的所見と画像所見の対比を行う。

(2) 正常マウスおよび NASH モデルマウス（短期間において脂肪肝から肝硬変、肝癌への移行が見られるモデル）に対して、麻酔後に開腹して下大静脈を露出し、24G の留置針を留置する。同部位より Gd-EOB-DTPA の投与を行う。2ml/kg の投与後 20 分での肝臓を摘出する。摘出後、EPMA（日本電子製 X 線マイクロアナライザー）を用いて Gd のマッピングを行う。またミラー切片は HE 染色を行い Gd マッピング像と病理組織とを対比する。NASH モデルマウスでは肝線維化の経時的な変化～肝癌にいたるまでを病理組織と Gd の分布および定量性の比較検討を行う。

(3) 5/6 腎摘除術を施行した慢性腎不全モデルのラットおよび肝障害を併発させた慢性肝腎障害モデルのラットに対して、Gd-EOB-DTPA を尾静脈より連日投与したラットモデル群とコントロール群（生理的食塩水を連日投与）を作成する。各々の肉眼的皮膚所見を評価すると同時に、皮膚生検を行い、マイラー膜上に凍結皮膚切片を接着する。この標本に B37XU によるガドリニウム L 吸収端に設定した高感度蛍光 X 線にてガドリニウムマッピングを行い、HE 染色による病理組織像

と対比する。

#### 4. 研究成果

(1) 単色放射光を肝微小血流イメージング法として応用し、局所肝血流の3次元の微細動態の解析を行うために、まず川崎医科大学にて実験シミュレーションを行った。日本白色家兔(クリーン)を用い、門脈造影は、開腹下に腸間膜静脈を露出した後、末梢静脈を直接穿刺してカテーテルを挿入し、造影を行うことで、良好な門脈造影像が得られた。白色家兔の肝臓は尾状葉が比較的薄く分葉しているため、撮像に適しており、また動脈や門脈の結紮や塞栓術を区域性に行うことに適していた。肝動脈造影は、カテーテルを直視下で肝動脈まで誘導することが困難であったため、バルーンカテーテルを用いて大動脈内で膨らませて肝動脈造影を行うことで、比較的選択的な肝動脈造影像が得られることを確認した。この条件下で、肝血流の3次元の微細動態の解析を行うこととした。門脈造影は直接穿刺によるため、より末梢へのカテーテルの誘導が可能であり、局所微細肝内門脈血流の観察が可能であると考えられる。マイクロCTでは50マイクロメートルレベルの血管も描出可能であり、末梢肝実質レベルでの動脈・門脈の吻合状態の変化や血管増生の程度を評価することができる。これは臨床例でしばしば経験される造影ダイナミックCTやMRIの動脈優位相で観察される早期濃染偽病変の成因解明の一助になると考えられる。

(2) 一方で、これまでの経験から肝実質の炎症性変化や線維化の進行に伴い、血行動態の変化だけでなく、肝細胞機能にも変化を生じていることが推測されたため、肝細胞特異性MRI造影剤であるGd-EOB-DTPAをマウスに投与し、Gd-EOB-DTPAの肝内分布の観察も行った。その結果、正常肝細胞質への優位な取り込みが認められ、またNASHモデルマウスを使った実験では、肝線維化の進行に伴い、肝細胞実質への取り込み分布が低下することが確認された。これらの基礎的結果をふまえ、今後、肝細胞膜での膜蛋白(トランスポーター)による能動輸送により、Gd-EOB-DTPAが肝細胞内に取り込まれていく過程で、肝実質内にどのように分布するのか、類洞や間質などの血管外腔への分布はどの程度あるのか、血流動態や血管新生や血管分布との関連性があるのか、肝線維化の程度と関連があるのかなどを含めて、肝細胞機能と微細肝動脈門脈血流動態との相互関係についても解明できる可能性が示された。

(3) またGd-EOB-DTPAは肝細胞内に取り込まれた後、約50%が胆道系を介して胆汁中に排

泄されるが、肝細胞内にどの程度、蓄積されるか解明されていないため、その安全性を確認する意味でもラットモデルを応用し、高感度蛍光X線分析を用いて肝内のガドリニウム分布の可視化を行った。その結果、腎不全モデルラットにおいて、Gd-EOB-DTPA投与後の肝内ガドリニウム蓄積は微量であることがわかった。一方で、肝腎不全モデルラットにおいては、Gd-EOB-DTPA投与後の肝内ガドリニウム蓄積は増加しており、胆道排泄と腎排泄の2経路を有するGd-EOB-DTPAでも肝腎不全では排泄遅延や障害が生じることが示された。

#### 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8件)

① Tamada T, Ito K, Yamamoto A, Sone T, Kanki A, Tanaka F, Higashi H. Hepatic Hemangioma: Evaluation of enhancement pattern at dynamic MR imaging with Gd-EOB-DTPA. *American journal of roentgenology*. 査読有、VOL. 196、No. 4、2011、pp. 824-830

<http://www.ajronline.org/content/196/4/824.long>

② Tamada T, Ito K, Higaki A, Yoshida K, Kanki A, Sato T, Higashi H, Sone T. Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging: evaluation of hepatic enhancement effects in normal and cirrhotic livers. *Eur J Radiol*. 査読有、VOL. 80、No. 3、2011、pp311-316.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0720048X11000490>

③ Tamada T, Ito K, Yoshida K, Kanki A, Higaki A, Tanimoto D, Higashi H. Comparison of three different injection methods for arterial phase of Gd-EOB-DTPA enhanced MR imaging of the liver. *Eur J Radiol*. 査読有、VOL. 80、No. 3、2011、pp284-288

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0720048X11000313>

④ Tamada T, Ito K, Sone T, Kanki A, Sato T, Higashi H. Gd-EOB-DTPA enhanced MR imaging: evaluation of biliary and renal excretion in normal and cirrhotic livers. *Eur J Radiol*. 査読有、VOL. 80、No. 3、2011、pp207-211

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0720048X10004092>

⑤ Tamada T, Ito K, Yoshida K, Sone T, Murakami K, Kanki A, Watanabe S, Higashi H, Yamashita T. T2-weighted magnetic

resonance imaging of the liver: evaluation of the effect in signal intensity after Gd-EOB-DTPA enhancement. J Comput Assist Tomogr. 査読有、VOL. 34、No. 2、2010、pp 182-186.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351500>

〔学会発表〕(計 5 件)

① 伊東克能、腎性全身性線維症(NSF)とガドリニウム系 MRI 造影剤に関する基礎的検討、第 39 回日本磁気共鳴医学会大会、2011 年 9 月 29 日、小倉

② Tamada T, Ito K, Comparison of three different injection methods for arterial phase of Gd-EOB-DTPA enhanced MR imaging of the liver. 北米放射線学会、2010 年 11 月 30 日、シカゴ

③伊東克能、「肝血流動態イメージと病理・病態」肝硬変、第 45 回 日本医学放射線学会秋季臨床大会、2009 年 10 月 31 日、和歌山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

作成していない

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊東 克能 (ITO KATSUYOSHI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00274168

### (2)研究分担者

玉田 勉 (TAMADA TSUTOMU)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40278932

山下 武則 (YAMASHITA TAKENORI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30299200

### (3)連携研究者

梅谷 啓二 (UMETANI KEIJI)

高輝度光科学研究センター・利用研究促進

部門・主幹研究員

研究者番号: 50344396