

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460674

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎に対する非侵襲的診断支援システムの構築

研究課題名(英文)Acoustic property-based characterization of fatty acids for diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

丸山 紀史 (MARUYAMA, Hitoshi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90375642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、音響学的特性に基づいた脂肪酸組成の識別による非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の診断システムの基盤構築を目的とした。結果として、5種の脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、パルミトオレイン酸、リノール酸、リノレン酸)において音響学的特性(インピーダンス、80MHz条件下)に差があること、インピーダンスの相違に基づいた肝組織マッピングは肝疾患の進行段階によって異なるパターンを呈すること、そしてインピーダンス定量値が正常肝、単純性脂肪肝、NASHの差を反映することを明らかにした。これらの成果は、実臨床における脂肪関連肝疾患の診断能を大きく前進させるものである。

研究成果の概要(英文)：With the high prevalence of metabolic disorder, nonalcoholic fatty liver disease is increasing worldwide and is emerging as a social problem. Discrimination of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) from simple fatty liver by non-invasive and effective approach is the pivotal issue in clinical practice. The current project using 80MHz transducer reports that there is a significant difference in the acoustic property (impedance) in 5 kinds of fatty acid (palmitate, oleate, palmitoleate, linoleate, and α -linolenic acid), tissue color mapping based on the impedance reflects liver disease-related difference, and quantitative assessment of acoustic impedance shows significant difference between normal liver, simple steatosis and NASH with various degrees. These results suggest that acoustic property-based characterization of fatty acids greatly contributes to the improvement of diagnostic ability for fatty liver diseases.

研究分野：消化器

キーワード：肝臓 非アルコール性脂肪肝炎 脂肪酸 超音波 インピーダンス

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣に関連した病態であるメタボリックシンドロームが増加の傾向を示し、その一表現型としての脂肪肝が注目されている。脂肪肝の約 10%は非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis; NASH)と呼ばれ、飲酒歴がないにも関わらず肝細胞に著明な中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が起こり、アルコール性肝障害に類似の病理所見を認めることを特徴とした疾患である。本疾患は、1980 年にその概念が提唱され、肝硬変へと進展し肝癌の発症リスクも有することから、臨床的に極めて重要な病状として注目されている。

NASH は、生活習慣に関わる肝疾患であり肥満との関係が強く、米国成人の約 3~5%が罹患しているといわれている。日本では肥満者の割合は比較的少ないが、白人以外の人種が NASH 発症の危険因子であるとの報告もあり、肥満のアジア人種は NASH 発症のリスクが高いとも考えられる。また欧米・日本ともに、若年肥満者が増加傾向にあると指摘されており、とくに米国では、近い将来、NASH が重症肝疾患の中で最も頻度の高い疾患に上げられるものと推測されている。

近年、種々の抗ウイルス治療法が導入され、肝炎ウイルスの治療成績は飛躍的に向上した。ウイルス性肝炎の撲滅には未だ課題もあるが、食生活の欧米化が進む中、近い将来の日本の肝疾患は欧米型の病像に近づくことが予想される。すなわち NASH が、主要な肝臓病として社会的に重要視される時代が到来すると考えられる。NASH の約 50%が進行性の病像を有し 10 年で 20%が肝硬変に至るとの報告もあることから、本疾患の診療対策を講じておくことは重要な課題である。

さらに最近になって、NASH は肝線維化程度が軽い段階、すなわち肝硬変に至っていない状態でも、発癌が多いとされ(F1-2、男性の 30%)、ウイルス性肝疾患とは異なった病像を示すことが指摘されている。すなわち、線維化が進展した段階での診断を目標とするのでは既に遅く、より早期の段階での診断が必要である。線維化程度の診断に着目した従来の手法はこれらのニーズを満たしておらず、新たな視点での診断学の導入が急務の課題である。

現在、NASH の診断は、肝生検による侵襲的な組織診断が唯一の方法である。しかし、母集団ともいえる脂肪肝患者には、NASH ではなく単純な肝脂肪沈着症例も多く含まれていることから、NASH の拾い上げを目的とした肝生検を全例に適用するには臨床上限界がある。また線維化の進行例では出血傾向が強くなり、手技に伴った出血など合併症のリスクが高くなる。さらに肝内における脂肪化や線維化の分布・進展は均一ではないことから、針生検による組織診断の信頼性も疑問視されている。同時に、本疾患が比較的高頻度であることや増加傾向である点を考慮す

ると、簡便なスクリーニング検査の導入が急務の課題といえる。すなわち、画像を使用した非侵襲的な診断システムを構築し、多数例に対して広く施行可能な方法として社会に導入することが、NASH の拾い上げに極めて重要である。

本研究で注目する超音波検査は、簡便かつ非侵襲的な画像診断であり、肝疾患の日常診療で最も頻回に使用されている。すなわち超音波は、肝疾患患者の臨床上、極めて有用な診断法であり NASH の診断に対する貢献も極めて大きい。

2. 研究の目的

本課題は、超音波検査を応用し、肝における脂肪酸組成の識別による NASH の音響学的診断支援システムの基盤構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪酸単独での音響特性の検討

5 種の代表的な脂肪酸、すなわちパルミチン酸、オレイン酸、パルミトオレイン酸、リノール酸、リノレン酸について、信号分析を行った。まず至適溶媒で溶解した各種脂肪酸 1.5ml を準備した。次いで、細胞培養用 DISH 上に設置したセルクルに各脂肪酸を静置し、超音波顕微鏡で観察した。各脂肪酸につき 3 回の計測を行い、その信号平均値を求めた。

(2) 脂肪酸処理による培養細胞の音響特性の検討

培養細胞に対する脂肪酸処理の適正条件設定

Huh7 cell および HepG2 を使用し、35mm dish に 500000cells/well を培養した。まずパルミチン酸について、既報に従って 500 μ M を選択し、BSA と混和後に 1-12h で incubation した。各培養時間後に、PBS にて DISH を洗浄し、TRIzol 処理した後、RNA を抽出した。2 μ g の total RNA から cDNA を作成し、PCR にて IL8 (inflammatory pathway に対するマーカー)の発現を検討した。次いで、得られた最大発現時間において、脂肪酸濃度別 (100-1000 μ M)での IL8 の発現を検討した。

脂肪酸処理による細胞モデルに対する脂肪酸染色

上記で得られた適正条件下で、各種脂肪酸 (パルミチン酸、オレイン酸、パルミトオレイン酸、リノール酸、リノレン酸)処理後の培養細胞をホルマリン固定し、オイルレッド染色施行後に顕微鏡で観察した。

高周波超音波顕微鏡による観察

ホルマリン固定後の試料に対して、高周波超音波顕微鏡による観察を行った。超音波の周波数は 80MHz と 250MHz の二種を使用し、未使用の DISH ならびに未脂肪酸処理細胞をコントロールとした。

一つの DISH に対して、異なる 5 箇所計測を行い、その平均値を算出した。

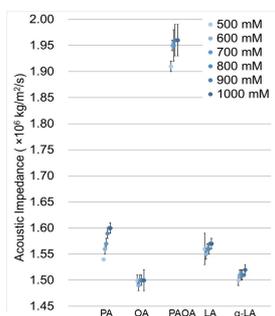
(3) マウスモデルにおける肝組織の検討
 正常、単純性脂肪肝および NASH のモデルマウスを安楽死させ肝組織を採取した。その後、薄切標本を作製し、プレパラート上でのマウス肝組織像の観察を行った。

次に視覚的に音響特性の差を表現する目的で、インピーダンスを色調別で示したマッピングを作成して肝組織を観察した。さらに、各標本におけるインピーダンスを計測して肝疾患別での相違を検討した。

4. 研究成果

(1) 脂肪酸の音響学的特性

計測条件に関して 250MHz では信号分析が困難であり高すぎる周波数条件と考えられた。また、パラメータの中で音速と減衰についても安定した結果が得られなかったことから、以下の検討は 80MHz の条件下で、インピーダンスに(Mrayl)に注目して検討を行った。各脂肪酸について 100 μ M から 1000 μ M まで 100 μ M 毎にサンプルを作成して計測を行った。下記には 500 μ M から 1000 μ M までの成績を図示する。

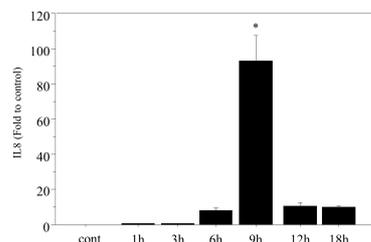


例えば 700 μ M では、パルミチン酸(PA)、オレイン酸(OA)、パルミトオレイン酸(PAOA)、リノール酸(LA)、リノレン酸(-LA)のインピーダンスは 1.57 ± 0.01 , 1.50 ± 0.01 , 1.95 ± 0.03 , 1.56 ± 0.01 , 1.51 ± 0.01 ($\times 10^6$ kg/m²/s)であった。

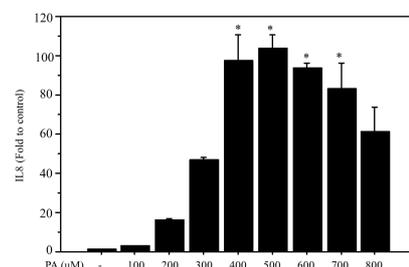
このように脂肪酸種によってインピーダンスは異なっており、その計測は脂肪酸種の識別に有用であると考えられた。そしてオレイン酸は他の脂肪酸に比べてインピーダンスが有意に低いことが示された。

(2) 脂肪酸処理細胞の音響特性の検討

脂肪酸処理細胞における IL8 の発現
 パルミチン酸 500 μ M を使用した場合、9 時間の培養時間で IL8 は最大発現を示した。



また 9 時間の培養時間では、500 μ M の条件が最も高い IL8 発現を示した。



以上から、培養細胞での脂肪酸処理条件は、500 μ M、9 時間培養とした。

脂肪酸染色

オイルレッド染色により細胞内外の脂肪の存在を確認した。



高周波超音波顕微鏡による信号分析

脂肪酸処理後の培養細胞における検討では、パルミチン酸 1.55 ± 0.003 、オレイン酸 1.49 ± 0.01 、パルミトオレイン酸 1.91 ± 0.01 、リノール酸 1.56 ± 0.03 、リノレン酸 1.67 ± 0.03 であった。すなわち、脂肪酸単独での信号計測結果と同様に、脂肪酸種で異なるインピーダンス値が得られ、オレイン酸処理モデルでインピーダンスが有意に低値であることが確認された ($p < 0.01$)。

(3) マウスモデル

病理所見

脂肪肝・NASH のモデルマウスにおける肝組織では、2~10 μ m 程度の多数の脂肪滴の存在が確認された。また進行した肝疾患のモデルマウスでは、主として門脈域における網目状の線維増生が認められ、いわゆる肝硬変の像を呈していた。以上の所見は、臨床例での単純性脂肪肝や種々の段階の NASH に相当するものであり、使用したモデルマウスにおける肝組織所見の妥当性が確認された。

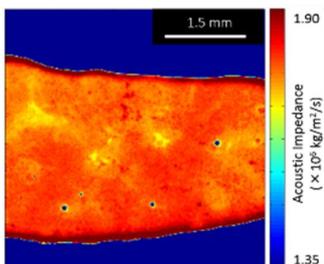
超音波インピーダンスマッピング

まず正常肝では赤を基調とした比較的均一なインピーダンスパターンを呈した。脂肪肝・NASH の肝組織には、黄色で表現される多数の類円形構造パターンが描出され、脂肪滴に対応したものと考えられた。

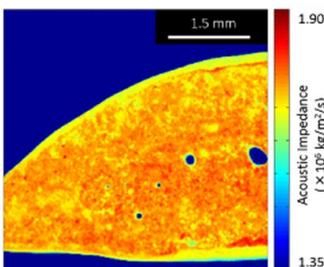
一方、線維化進行例の肝組織において、線維に相当する構造はインピーダンスパターンとして認識することはできなかった。これは、線維化の程度が高度でなかったこと、線

維の存在によって反射波を十分に受信できなかったこと、また 80MHz のトランスデューサにおける分解能不足などが要因と思われる、今後の検討課題と考えられた。

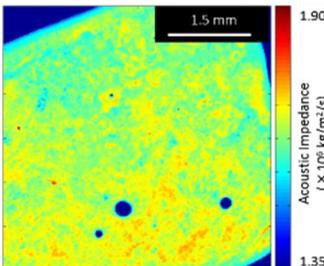
コントロール肝



単純性脂肪肝



NASH 肝



組織インピーダンス値の定量的検討
各組織におけるインピーダンスの平均値は、コントロールでは 1.72 ± 0.02 、脂肪肝では 1.69 、NASH では 1.66 ± 0.04 であった。NASH では、その他(正常肝、単純性脂肪肝)に比べてインピーダンスが有意に低値 ($F(3, 677958) = 86970.16, p < 0.000; N=30$, One-way ANOVA and post hoc multiple comparison Tukey tests)であることが示された。

以上より、5種の脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、パルミトオレイン酸、リノール酸、リノレン酸)において音響学的特性に差があること、インピーダンスの相違に基づいた肝組織マッピングは肝疾患の進行段階によって異なること、そしてインピーダンスの定量値が正常肝、単純性脂肪肝、NASH の差を反映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 2 件)

Irie S, Inoue K, Yoshida K, Mamou J, Kobayashi K, Maruyama H, Yamaguchi T. Speed of sound in diseased liver observed by scanning acoustic microscopy with 80-MHz and 250-MHz. J Acoust Soc Am. 2016;139:512. 査読有 DOI: 10.1121/1.4940126

Oguri T, Tamura K, Yoshida K, Mamou J, Hasegawa H, Maruyama H, Hachiya H, Yamaguchi T. Estimation of scatterer size and acoustic concentration in sound field produced by linear phased array transducer. Jpn J Appl Phys. 2015;54:07HF14. 査読有 DOI: 10.7567/JJAP.54.07HF14

〔学会発表〕(計 3 件)

丸山紀史, 横須賀 收, 山口匡 脂肪酸の音響特性分析と NASH 診断への展開. 第 51 回日本肝臓学会総会. 2015 年 5 月 21 日、ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)

山口匡, 丸山紀史 NASH における脂肪酸特定に向けた音響物性解析. 日本超音波医学会第 88 回学術集会. 2015 年 5 月 24 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

Ito K, Yoshida K, Irie S, Mamou J, Maruyama H, Yamaguchi T. The measurement of acoustic impedance of the cells cultured with five kinds of the fatty acid. 2015 IEEE International Ultrasonics Symposium, 2015/10/23, Taipei (Taiwan)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 脂肪酸種推定方法及び脂肪酸種推定プログラム

発明者: 山口匡、丸山紀史、吉田憲司、伊藤一陽

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-257726

出願年月日: 2015 年 12 月 30 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 紀史 (MARUYAMA, Hitoshi)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 90375642

(2) 研究分担者

山口 匡 (YAMAGUCHI, Tadashi)

千葉大学・フロンティア医工学センター・教授

研究者番号: 40334172