



Title	MRIを用いた、脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカー検出法に関する研究
Author(s)	吉野, 有香
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96345
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

MRI を用いた、脂肪肝及び脂肪肝炎の
安全性バイオマーカー検出法に関する研究

Investigation of safety biomarker detection method for hepatic
steatosis and steatohepatitis using MRI

大阪大学大学院生命機能研究科生命機能専攻

吉野 有香

2024 年 3 月修了

Abstract

Safety biomarkers are important for continuing new drug development while ensuring the subject's safety, and for identifying the adverse events in early clinical trials and making decisions to stop the drug development. However, safety biomarkers for hepatic steatosis and steatohepatitis have not been established and it is a concern in drug development. Researches about safety biomarkers for hepatic steatosis and steatohepatitis have been actively conducted and mainstream approach is blood tests. Several promising blood test markers have been reported. However, there are some concerns, and it has not yet reached practical use. Therefore, in this study, I focused on MRI, which is not yet widely used as a safety biomarker detection method, and aimed to establish safety biomarkers for hepatic steatosis and steatohepatitis using MRI.

In Chapter 2, I compared the usefulness of blood tests and MRI tests by using a non-diffuse hepatic steatosis rat model, which is considered to be difficult to evaluate among hepatic steatosis. The results showed that it was difficult to detect non-diffuse hepatic steatosis through blood tests, but it was possible through MRI tests. The reason for this was considered to be that blood tests reflect the overall condition of the liver, whereas MRI tests allow for local evaluation. Therefore, it was suggested that MRI tests have the potential to be more useful as a safety biomarker detection method than blood tests.

In Chapter 3, based on the usefulness of MRI shown in Chapter 2, I examined how to differentiate between hepatic steatosis and early steatohepatitis using MRI. In the development of drug-induced steatohepatitis, reactive oxygen species (ROS) has been reported to be excessively generated in the liver. Therefore, I focused on nitroxyl radical, which are used for ROS imaging. The results showed that early steatohepatitis could be noninvasively differentiated from hepatic steatosis in mice by using nitroxyl radical as an

MRI contrast agent.

These results in Chapter 2 and 3 suggested that MRI has the potential to accurately evaluate even non-diffuse lesions and to differentiate between hepatic steatosis and early steatohepatitis. Therefore, MRI warrants consideration as a candidate monitoring method for differentiating between early drug-induced steatohepatitis and hepatic steatosis in drug development.

要旨

安全性バイオマーカーは、被験者の安全性を確保しながら新薬開発を継続するために、また臨床試験早期に有害事象を把握し開発中止判断をするために、非常に重要である。しかしながら、脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカーは確立されていないため、医薬品開発上の課題となっている。脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカーは盛んに研究が行われており、主流は血液検査である。いくつか有望な血液検査項目が報告されているが、課題があり、未だ実用に至っていない。そこで本研究では、安全性バイオマーカー検出法としては未だ普及していない MRI に着目し、MRI を用いた脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカーの確立を目指した。第二章では、脂肪肝のなかでも評価が難しいと考えられる非びまん性脂肪肝モデルラットを用いることで、血液検査と MRI 検査の有用性を比較した。結果、肝臓全体の状態を反映する血液検査は非びまん性病変を検出することが難しいが、局所的な評価が可能な MRI 検査は非びまん性病変であっても正確に定量評価できることが明らかとなり、血液検査に比べ MRI 検査は安全性バイオマーカー検出法として有用である可能性が示された。第三章では、第二章にて示した MRI の有用性を踏まえ、MRI を用いた脂肪肝と早期脂肪肝炎を区別する方法について検証した。薬剤性脂肪肝炎では、活性酸素種（ROS）が過剰生成されると報告されている。そこで、ROS のイメージングに使用されるニトロキシラジカルに着目した。結果、ニトロキシラジカルを MRI 造影剤として用いることで、マウスにおける脂肪肝と早期脂肪肝炎を区別できることが示唆された。以上の結果から、非びまん性病変であっても正確に評価でき、また脂肪肝と早期脂肪肝炎を区別できる可能性のある MRI は、脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカー検出法として有望な候補の一つであることが示唆された。

目次

Abstract.....	1
要旨	3
目次	4
第一章：研究背景	7
1.1 バイオマーカー	7
1.2 安全性バイオマーカー	7
1.3 脂肪肝、脂肪肝炎	8
1.4 脂肪肝、脂肪肝炎の安全性バイオマーカー	9
1.5 本研究の目的	11
1.6 引用文献	11
第二章：非びまん性脂肪肝モデルラットにおける ^1H -MRS と血液生化学検査の比較	15
2.1 背景と目的	15
2.2 方法	16
2.2.1 動物	16
2.2.2 in vivo MRI 及び ^1H -MRS	16
2.2.3 血液生化学検査	17
2.2.4 病理組織学的検査	18
2.2.5 統計学的解析	18
2.3 結果	18
2.3.1 肉眼及び病理組織学的検査	18
2.3.2 in vivo MRI 及び ^1H -MRS	21
2.3.3 血液生化学検査	23
2.4 考察	24
2.4.1 非びまん性脂肪肝モデル	24
2.4.2 非びまん性脂肪肝モデルにおける ^1H -MRS の定量性について	25
2.4.3 非びまん性脂肪肝モデルにおける血液検査の定量性について	26
2.4.4 ^1H -MRS 以外の MRI を用いた脂肪肝定量評価法について	27
2.4.5 結論	28
2.5 引用文献	28
第三章：ニトロキシラジカルを用いた MRI における脂肪肝と脂肪肝炎の区別	31
3.1 背景と目的	31

3.2 ファントムを用いた実験	33
3.2.1 方法	34
3.2.1.1 ファントム	34
3.2.1.2 MRI 実験	35
3.2.1.3 解析	35
3.2.2 結果	36
3.2.3 考察	37
3.3 動物を用いた予備実験（マウス肝病変の検出）	38
3.3.1 方法	38
3.3.1.1 動物	38
3.3.1.2 MRI 実験	39
3.3.1.3 解析	40
3.3.1.4 病理組織学的検査	40
3.3.2 結果	40
3.3.2.1 MRI 実験	40
3.3.2.2 肉眼及び病理組織的検査	41
3.3.3 考察	42
3.4 動物を用いた予備実験（CmP の安全性）	43
3.4.1 方法	44
3.4.1.1 動物	44
3.4.1.2 血液生化学検査	44
3.4.1.3 病理組織学的検査	44
3.4.1.4 統計	45
3.4.2 結果	45
3.4.3 考察	46
3.5 本実験	46
3.5.1 方法	46
3.5.1.1 動物	46
3.5.1.2 MRI 実験	47
3.5.1.3 解析	48
3.5.1.4 病理組織学的検査	49
3.5.1.5 統計学的解析	50
3.5.2 結果	50
3.5.3 考察	61
3.5 引用文献	66
第四章：総括	72

業績	74
謝辞	76

第一章：研究背景

1.1 バイオマーカー

2015～2019年にU.S. Food and Drug Administration (FDA)及びEuropean Medicines Agency(EMA)に承認された医薬品の約65%は、少なくとも1つのバイオマーカーを開発の過程で使用している (Gromova et al., 2020)。この事実から明らかのように、近年の新薬開発においてバイオマーカーは無くてはならない重要なツールとなっている。バイオマーカーの定義は一義的ではなく、FDA-National Institutes of Health(NIH) biomarker working groupは“正常な生物学的プロセス、病理性プロセス、または曝露や介入に対する反応の指標として測定される、定義された特性”として (FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016)、またEMAは“人間及び動物の体の過程もしくは疾患を追うのに使われる、血液、その他体液、もしくは組織において認められる生物学的な分子”として定義している (EMA, 2020)。新薬開発においてバイオマーカーが多用されるのは、新薬開発の迅速化、効率化、正確性向上に有用だからである。例えば、薬力学応答バイオマーカーの活用によって新薬の効果をより早期にかつ正確に確認することや、予測バイオマーカーの活用によって新薬への応答可能性が高い患者集団を絞った臨床試験を実施することなどが可能となる (Califf, 2018)。

1.2 安全性バイオマーカー

安全性バイオマーカーは、新薬開発において多用されるバイオマーカーの一つである。医療介入の前後に測定されることで、有害事象としての毒性の可能性、存在、または程度を示すことができる (Califf, 2018)。安全性バイオマーカーの確立により、副作用リスクがあっても、被験者の安全性を確保しながら新薬開発を継続することが可能となる。また、臨床試験は段階が進むほど高額の出費が必要

であるため、臨床試験早期に有害事象を把握し開発中止判断をすることは、製薬企業にとって大きな利点となる。そのため、安全性バイオマーカーは新薬開発において重要視されている。標準的に用いられている安全性バイオマーカーとしては、臨床検査値やバイタルサインなどが挙げられる。さらに、非臨床安全性試験の結果から標準的な安全性バイオマーカーでは検出できない有害事象が臨床試験において発生する可能性が示唆される場合は、臨床試験で追加の安全性バイオマーカーを設定する。例えば、致死性不整脈リスクがある新薬を開発する場合、標準的な 12 誘導心電図検査に加え、ホルター心電図検査を実施することで、QT/QTc 間隔の延長について精査する。また腎障害リスクがある新薬を開発する場合、標準的な blood urea nitrogen (BUN)、血清クレアチニンだけでなく、kidney injury molecule 1(Kim-1)、アルブミン、クラスτεリン、trefoil factor 3(TFF-3)、総蛋白、シスタチンC、 β_2 -マイクログロブリンを臨床検査項目に追加することで、検出感度を向上させる (Dieterle et al., 2010)。安全性バイオマーカーは、臨床試験に先立ち非臨床安全性試験でその有用性を示す必要があるため、臨床及び非臨床の両方で一貫して使用できる方法でなければならない。また、回復が見込まれない重篤な症状に至る前の早期病変を正確に検出することが求められる。さらに、有害事象の有無を経時的に複数回評価するため、侵襲性の低い手法であることも必要である。

1.3 脂肪肝、脂肪肝炎

肝臓は薬物の取り込み、代謝、排泄において中心的な役割を果たし、毒性の影響を受けやすい臓器の一つである。肝臓の毒性所見の例として、薬剤性脂肪肝及び脂肪肝炎がある。アミオダロン、タモキシフェン、バルプロ酸などの医薬品が (Kolaric et al., 2021, Fontana et al., 2023)、また時に新薬候補物質が脂肪肝及び脂肪

肝炎を引き起こすことが知られる。脂肪肝及び脂肪肝炎は、肝細胞に脂質が蓄積する点は共通だが、脂肪肝は他に形態学的異常を伴わないのに対し、脂肪肝炎は炎症を伴う点で区別される。

一般診療で認められる脂肪肝及び脂肪肝炎は、その原因によって診断名が異なり、薬剤性脂肪肝・脂肪肝炎に加え、アルコール性脂肪肝・脂肪肝炎、non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD)(あるいは metabolic dysfunction-associated fatty liver disease)・non-alcoholic steatohepatitis(NASH)などが知られる。いずれも脂肪肝及び脂肪肝炎の有無は、血液検査、イメージング検査、生検などによって診断されている。症状や身体所見は、特に病態早期では認められない、もしくは疲労や倦怠感など非特異的な所見が認められるのみであるため、診断に活用されることはまれである。血液検査では、肝障害血漿マーカーとして知られる alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST)、alkaline phosphatase (ALP)、ビリルビンなどが使用されている。イメージング検査では、肝臓中の脂肪を検出することを目的とし、簡便であり検査費が比較的安価な超音波が使用される場合が多い。生検は脂肪肝と脂肪肝炎を区別し確定診断できる現状唯一の方法であるが、侵襲性があるため一般的なスクリーニングでは推奨されていない (Devarbhavi et al., 2021, Fontana et al., 2023)。

1.4 脂肪肝、脂肪肝炎の安全性バイオマーカー

非臨床安全性試験で認められる薬剤性脂肪肝は、脂肪沈着の程度が高度で肝障害血漿マーカーの上昇を伴う場合には有害な所見と判断される場合があるが、一般に良性であり非有害な所見として考えられている (Amacher, 2011, Kerlin et al., 2016)。しかしながら、脂肪肝は脂肪肝炎に進展する可能性を有する。薬剤性

脂肪肝炎は組織障害を伴うため明らかに有害な所見である。さらに、薬剤性脂肪肝炎における炎症が慢性化すると肝線維化、肝硬変、ひいては肝細胞癌に進展するリスクがある (Berardo et al., 2020)。したがって、薬剤性脂肪肝炎と、薬剤性脂肪肝炎に進展しうる薬剤性脂肪肝の両方が医薬品開発の課題と考えられている。薬剤性脂肪肝や早期の薬剤性脂肪肝炎は多くの場合休薬により回復するため (Ramachandran et al., 2009)、安全性バイオマーカーがあれば、適切なタイミングで休薬の必要性を判断し服薬者の安全性を担保することができる。しかし、一般診療で有用な診断方法である肝障害血漿マーカー、超音波、生検は安全性バイオマーカーとしては適していない。肝障害血漿マーカー及び超音波は、早期病変の検出や脂肪肝と脂肪肝炎の区別が困難であり、生検は侵襲的なため実施回数が制限されるためである (Wong et al., 2018, Fontana et al., 2023)。そのため、薬剤性脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカー研究が盛んに行われている。

現在の薬剤性脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカー研究の主流は、血液検査である。いくつか有望なバイオマーカーが報告されており、例えば Cytokeratin 18、miR-122、Glutamate dehydrogenase(GLDH)などが挙げられる (Pavlik et al., 2019, Roth et al., 2020)。しかしながら、肝臓以外の臓器障害によっても変動が認められることや、顕著な肝毒性がなくても変動が認められる場合があることなどが課題となり、未だ安全性バイオマーカーとして確立されるに至っていない (Pavlik et al., 2019, Tamber 2023)。他に薬剤性脂肪肝及び脂肪肝炎の安全性バイオマーカーとしての活用が期待される手法として、イメージング検査がある。超音波と同様に肝臓中の脂肪を検出できるイメージング装置として、computerized tomography (CT)と magnetic resonance imaging(MRI)がある。臨床のメタ解析では、これらイメージング検査のなかでは MRI と MRI の一手法であ

る ^1H -magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) が肝臓中脂肪の検出法として優れていることが示唆されている (Bohte et al., 2011)。しかしながら、安全性バイオマーカーとして使用された実績は未だなく、また脂肪肝と脂肪肝炎を区別する方法は未だ確立されていない。

1.5 本研究の目的

以上の背景より、本研究では、脂肪肝及び早期脂肪肝炎の安全性バイオマーカー検出法の確立を目指した。検出法としては、血液検査が長年研究の主流でありながら未だ課題があることを踏まえ、MRI を選択した。MRI は、臨床及び非臨床の両方で一貫して使用でき、侵襲性の低い手法である。肝臓中脂肪量の評価については一定の実績があるため、脂肪肝と早期脂肪肝炎を正確に検出できる手法を見い出すことができれば、脂肪肝及び脂肪肝炎の有望な安全性バイオマーカー検出法になりうると考えられた。

第二章では、安全性バイオマーカーの測定手法としての MRI の有用性を検証した。すなわち、脂肪肝のなかでも評価が難しいと考えられる非びまん性病変を用いることで、安全性バイオマーカー研究の主流である血液検査と MRI 検査の有用性を比較した。第三章では、第二章にて示した MRI の有用性を踏まえ、MRI を用いた脂肪肝と早期脂肪肝炎の区別する方法について検証した。

1.6 引用文献

1. Amacher DE. 2011. Strategies for the early detection of drug-induced hepatic steatosis in preclinical drug safety evaluation studies. *Toxicology*. 279(1-3):10-18.

2. Bohte AE., van Werven JR., Bipat S., Stoker J. 2011. The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and ¹H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: a meta-analysis. *Eur Radiol.* 21(1):87-97.
3. Berardo C, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Vairetti M, Ferrigno A. 2020. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis: Current Issues and Future Perspectives in Preclinical and Clinical Research. *Int J Mol Sci.* 21(24):9646.
4. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. 2018. *Exp Biol Med* (Maywood). 243(3):213-221.
5. Devarbhavi H, Aithal G, Treeprasertsuk S, Takikawa H, Mao Y, Shashtry SM, Hamid S, Tan SS, Philips CA, George J, Jafri W, Sarin SK; Asia Pacific Association of Study of Liver. 2021. Drug-induced liver injury: Asia Pacific Association of Study of Liver consensus guidelines. *Hepatol Int.* 15(2):258-282.
6. Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, Papaluca M, Ozer JS, Webb CP, Baer W, Senagore A, Schipper MJ, Vonderscher J, Sultana S, Gerhold DL, Phillips JA, Maurer G, Carl K, Laurie D, Harpur E, Sonee M, Ennulat D, Holder D, Andrews-Cleavenger D, Gu YZ, Thompson KL, Goering PL, Vidal JM, Abadie E, Maciulaitis R, Jacobson-Kram D, Defelice AF, Hausner EA, Blank M, Thompson A, Harlow P, Throckmorton D, Xiao S, Xu N, Taylor W, Vamvakas S, Flamion B, Lima BS, Kasper P, Pasanen M, Prasad K, Troth S, Bounous D, Robinson-Gravatt D, Betton G, Davis MA, Akunda J, McDuffie JE, Suter L, Obert L, Guffroy M, Pinches M, Jayadev S, Blomme EA, Beushausen SA, Barlow VG, Collins N, Waring J, Honor D, Snook S, Lee J, Rossi P, Walker E, Mattes W. 2010. Renal

- biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol.* 28(5):455-462.
7. EMA. Glossary: biomarker. 2020. Accessed Oct 4, 2023.
<https://www.ema.europa.eu/en/glossary/biomarker>.
 8. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US), 2016. Accessed Oct 4, 2023.
www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/.
 9. Fontana RJ, Liou I, Reuben A, Suzuki A, Fiel MI, Lee W, Navarro V. 2023. AASLD practice guidance on drug, herbal, and dietary supplement-induced liver injury. *Hepatology.* 77(3):1036-1065.
 10. Gromova M, Vaggelas A, Dallmann G, Seimetz D. 2020. Biomarkers: Opportunities and Challenges for Drug Development in the Current Regulatory Landscape. *Biomark Insights.* 15:1177271920974652.
 11. Kerlin R, Bolon B, Burkhardt J, Francke S, Greaves P, Meador V, Popp J. 2016. Scientific and Regulatory Policy Committee: Recommended ("Best") Practices for Determining, Communicating, and Using Adverse Effect Data from Nonclinical Studies. *Toxicol Pathol.* 44(2):147-162.
 12. Kolaric TO, Nincevic V, Kuna L, Duspara K, Bojanic K, Vukadin S, Raguz-Lucic N, Wu GY, Smolic M. 2021. Drug-induced Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Treatment. *J Clin Transl Hepatol.* 9(5):731-737.
 13. Pavlik L, Regev A, Ardayfio PA, Chalasani NP. Drug-Induced Steatosis and Steatohepatitis: 2019. The Search for Novel Serum Biomarkers Among Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic

- Steatohepatitis. *Drug Saf.* 42(6):701-711.
14. Ramachandran R, Kakar S. 2009. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol.* 62(6):481-492.
 15. Roth SE, Avigan MI, Bourdet D, Brott D, Church R, Dash A, Keller D, Sherratt P, Watkins PB, Westcott-Baker L, Lentini S, Merz M, Ramaiah L, Ramaiah SK, Stanley AM, Marcinak J. 2020. Next-Generation DILI Biomarkers: Prioritization of Biomarkers for Qualification and Best Practices for Biospecimen Collection in Drug Development. *Clin Pharmacol Ther.* 107(2):333-346.
 16. Tamber SS, Bansal P, Sharma S, Singh RB, Sharma R. 2023. Biomarkers of liver diseases. *Mol Biol Rep.* 50(9):7815-7823.
 17. Wong VW, Chan WK, Chitturi S, Chawla Y, Dan YY, Duseja A, Fan J, Goh KL, Hamaguchi M, Hashimoto E, Kim SU, Lesmana LA, Lin YC, Liu CJ, Ni YH, Sollano J, Wong SK, Wong GL, Chan HL, Farrell G. 2018. Asia-Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017-Part 1: Definition, risk factors and assessment. *J Gastroenterol Hepatol.* 33(1):70-85.

第二章:非びまん性脂肪肝モデルラットにおける ^1H -MRS と血液生化学検査の比較

2.1 背景と目的

薬剤性を含む脂肪肝及び脂肪肝炎は、病変パターンが 2 つに大別されることが臨床研究で報告されている (Venkatesh et al., 2016; Calistri et al., 2021)。1 つは肝臓全体に病変が認められるびまん性パターンであり、最も一般的である。もう 1 つは肝臓の一部にのみ病変が認められる非びまん性パターンである。地図状、巣状、多巣状、被膜下性、血管周囲性などに細別される。非びまん性病変は検査部位によって病変の有無や程度が異なるため、肝臓全体の状態が反映される血液検査では過小評価になる可能性があると考えられた。一方、肝臓全体を観察できる MRI 検査は病変パターンによらず正確に評価できることが期待された。しかしながら、肝病変の病変パターンを特定したうえで血液検査と MRI 検査の有用性を検証した報告はなく、不明である。

そこで、本章では非びまん性病変の検出に着目し、血液検査と MRI 検査の有用性について検証した。MRI 検査の手法としては ^1H -MRS に着目した。 ^1H -MRS は、水と脂肪、さらには脂肪分子内の官能基ごとにプロトン周囲の環境が異なるため、同じプロトンであっても共鳴周波数がそれぞれ異なることを利用し、組織中の脂肪量を定量評価できる検査法である。臨床及び非臨床において肝臓中脂肪量を正確に測定できると報告されている手法であり (Szczepaniak et al., 2005; Leiber et al., 2015, Marsman et al., 2010, Kim et al. 2022)、生検に代わる golden standard になりうると期待されているため、選択した。

2.2 方法

2.2.1 動物

第二章及び第三章におけるすべての動物実験は、住友ファーマ株式会社の実験動物委員会及び大阪大学動物福祉委員会によって承認されている。

実験には、15 例の雌性 Slc:Wistar ラット（日本エスエルシー株式会社）を用いた。ラットは餌と水を自由に摂取させ、室温 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間明期 12 時間暗期に制御された動物室において個別飼育した。

1 週間の順化期間中は標準的な飼料である CE-2（日本クレア株式会社）を摂餌させた。15 日間の投与期間において、メチオニンコリン欠乏食(Methionine choline deficient diet: MCDD)(オリエンタル酵母株式会社)を MCDD 群 11 例に、CE-2 を対照群 4 例に摂餌させた。12 時間以上絶食させた後、MCDD 群 8 例及び対照群全例を ^1H -MRS、病理組織学的検査、血液生化学検査に供した。MCDD 群の残り 3 例は、絶食後に病理組織学的検査及び血液生化学検査に供した。

2.2.2 in vivo MRI 及び ^1H -MRS

MRI 及び ^1H -MRS 検査は 11.7T vertical-bore Bruker Avance II imaging system (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) 及び 33 mm のボリウム高周波コイル (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany)を用いて実施した。呼吸数は physiological monitoring system (SA Instruments, Stony Brook, NY, USA) を用いてモニターし、体温は加熱パッドに水を循環させることで $36.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。

^1H -MRS のボクセル位置を決定するために、肝臓全体に対して冠状断、軸位断、矢状断の T2 強調画像を rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) シーケンスを用いて取得した。撮像パラメーターは以下の通りである。

Rare Factor 16, repetition time/echo time (TR/TE) 5000 msec/51 msec, field of view 30

× 30 mm, matrix of 256 × 256 pixels, 20 slices with thickness = 1.0 mm, and 4 NEX

ボクセルは肝臓の主要な血管を避け、外側左葉、外側右葉、尾状葉の 3 か所に設置した。また冠状断、軸位断、矢状断の T2 強調画像によって、ボクセルに肝臓以外の組織が含まれていないことを確認した。それぞれのボクセルにおけるデータは point-resolved spectroscopy (PRESS) シーケンスを用いて取得した。撮像パラメーターは以下の通りである。

TR/TE 5000 msec/11 msec, voxel dimensions 2 × 2 × 2 mm³, spectral width = 4000 Hz, 8K data points, 8 NEX, and no water suppression

¹H-MRS データは、LCModel ソフトウェア (version 6.3-1L; Stephen Provencher, Oakville, Ontario, Canada)を使って解析した (Provencher, 1993)。SPTYPE は liver-11 とした。LCModel ソフトウェアでは、内部シミュレーションでピークと半値幅をもとに単純な Gaussian カーブとの自動ピークフィットを行うことで、脂肪成分についての解析が可能となる。ピークフィットした際の推定標準偏差が 5% 未満であるピークのみ、有意な検出と判断した。¹H-MRS における肝脂肪分画 (hepatic fat fraction: HFF)は 1.3 ppm におけるメチレンピーク下面積を 1.3 ppm におけるメチレンピーク下面積と 4.7 ppm における水ピーク下面積の合計によって除することで算出した。さらに、飽和脂肪酸指標 (saturated fatty acid index:SI) も既報を参考に算出した (Johnson et al., 2008)。

2.2.3 血液生化学検査

¹H-MRS 検査あるいは絶食後、ラットはイソフルランを使用した麻酔下で放血により安楽死させた。MCDD 群から採取した血液をヘパリンリチウム入り採血管 (キャピジェクト II、テルモ) で抗凝固処理後、冷却下で遠心分離により血漿を得た。自動分析装置 (JCA-ZS050、日本電子株式会社) を用いて、血漿中のト

リグリセライド、総コレステロール、ALT、AST を測定した。

2.2.4 病理組織学的検査

採血後、肝臓を採材し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。外側左葉、外側右葉、尾状葉をパラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリンエオジン (hematoxylin and eosin: HE) 染色し、光学顕微鏡下で観察した。さらに、それぞれの肝葉における肝臓脂肪面積率 (hepatic fat area ratio: HFAR) を算出するため、組織切片全体を Aperio AT2 whole digital scanner を使ってスキャンした。Aperio Imagescope (Leica Biosystems Imaging Inc., Vista, CA, USA) に搭載されている nuclear algorithm を肝臓組織中の空胞を認識するように調整し、空胞面積を定量した。さらに、Aperio Imagescope に搭載されている positive pixel count algorithm を HE 染色陽性領域を認識するように調整し、空胞を除いた肝臓面積を定量した。それぞれの肝葉における HFAR は、空胞面積を空胞面積と空胞を除いた肝臓面積の和によって除することによって算出した。

2.2.5 統計学的解析

HFAR と HFF、HFAR と各血液生化学パラメーター、HFF と SI の相関はスピアマンの順位相関係数 (r) によって評価した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。すべての統計解析は GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を使って行った。

2.3 結果

2.3.1 肉眼及び病理組織学的検査

MCDD 群における肉眼検査では、8/11 例で肝臓の部分的な退色が認められ、

残りの例では異常は認められなかった。外側左葉、内側左葉、尾状葉が退色し、他葉に異常は認めない像が典型的であった (図 2-1A, 1B)。

MCDD 群における病理組織学的検査では、外側左葉及び尾状葉において中等度～高度の肝細胞空胞化が、また外側右葉において異常なし、もしくは軽微～軽度の肝細胞空胞化が認められた。数例において、1つの肝葉内に脂肪沈着の明らかな不均一性が認められた (図 2-1C)。肝細胞における空胞は大滴性で、小葉中心性に認められた (図 2-1D, 1E, 1F)。対照群における肉眼検査及び病理組織学的検査では、異常は認められなかった。

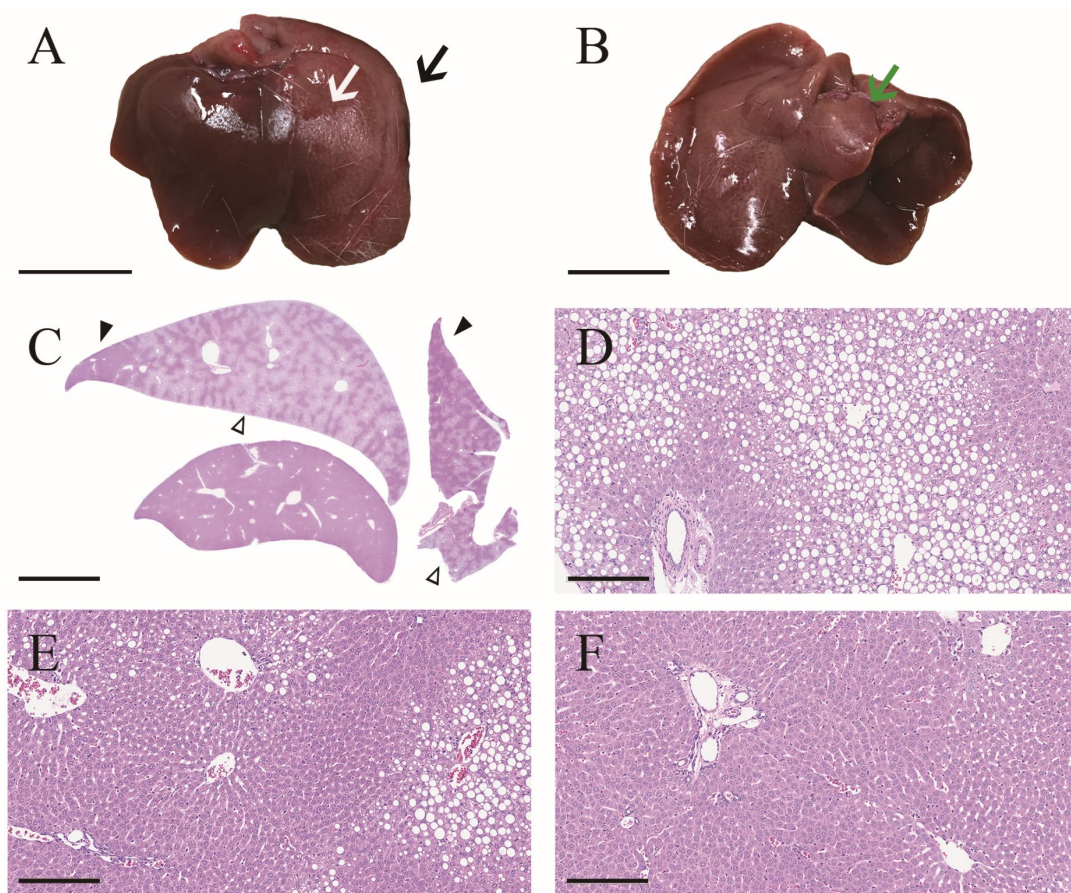


図 2-1 MCDD 群の肉眼及び病理組織像

(A, B) MCDD 群における、典型的な肝臓の腹側(A)及び背側(B)肉眼像。外側左葉(白色矢)、左側中葉(黒色矢)、尾状葉(緑色矢)は退色し、他葉に異常は認められない。スケールバー 1cm。(C) 代表例の HE 標本低倍像。左上、左下、右の肝葉は、それぞれ外側左葉、外側右葉、尾状葉。黒色矢頭で示す部位に比べ白色矢頭で示す部位の方がより空胞が多く認められ、同一葉内における脂肪沈着の不均一性が示唆された。スケールバー 4mm。(D, E, F) 図 2-1C の高倍像。外側左葉 (D)、尾状葉(E)において、それぞれ重度、軽微な肝細胞の空胞化が認められ、外側右葉(F)においては肝細胞の空胞化は認められなかった。スケールバー 200 μ m。

MCDD 群の全例において、HFAR は外側右葉に比べ外側左葉及び尾状葉においてより高値であった。外側左葉、尾状葉、外側右葉における平均 HFAR はそれぞれ 0.14 ± 0.11 , 0.09 ± 0.09 and 0.01 ± 0.01 であった (図 2-2)。

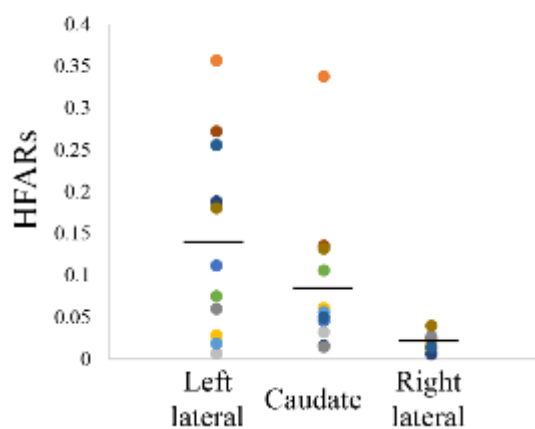


図 2-2 MCDD 群における、外側左葉、尾状葉、外側右葉の HFARs

同色のプロットは、同一動物のデータを示す。各葉の平均値をバーで示す。

2.3.2 in vivo MRI 及び ^1H -MRS

MCDD 群全例の肝臓において、T2 強調画像における非びまん性の高信号が観察された。信号強度は外側左葉及び尾状葉において高く、外側右葉では低いもしくは認められなかった (図 2-3A, 3B, 3C)。対照群の肝臓において、T2 強調画像で異常は認められなかった。

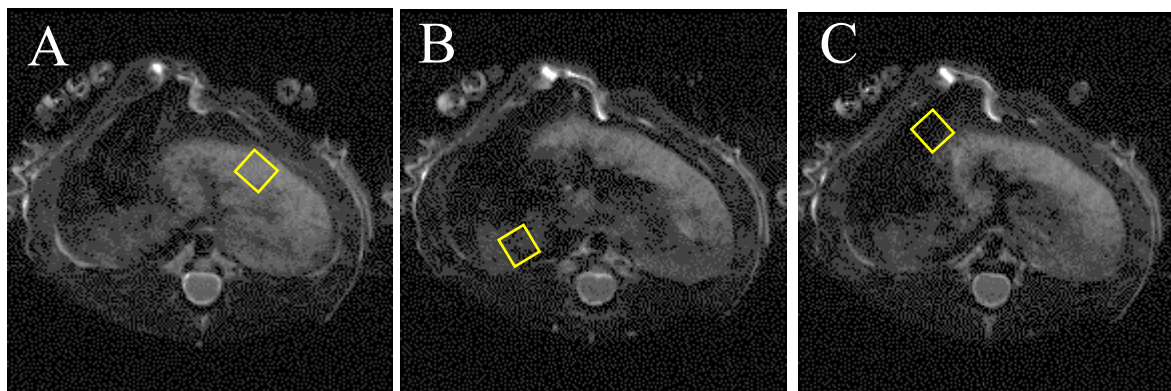


図 2-3 MCDD 群代表例の肝臓軸位断 T2 強調画像及びボクセル位置

(A, B, C) MCDD 群の肝臓軸位断 T2 強調画像において、外側左葉及び尾状葉に高信号が認められたが、外側右葉では認められなかった。黄色四角は、外側左葉(A)、尾状葉(B)、外側右葉(C)における MRS のボクセル位置を示す。

T2 強調画像で高信号となった MCDD 群の肝葉において、0.9-5.3 ppm に最大 9 つの脂質由来のピーク及び 4.7 ppm に水由来のピークが認められ、脂質の沈着が示唆された (図 2-4)。対照群では水由来のピークのみが認められ、ほとんど脂質が沈着していないことが示唆された。

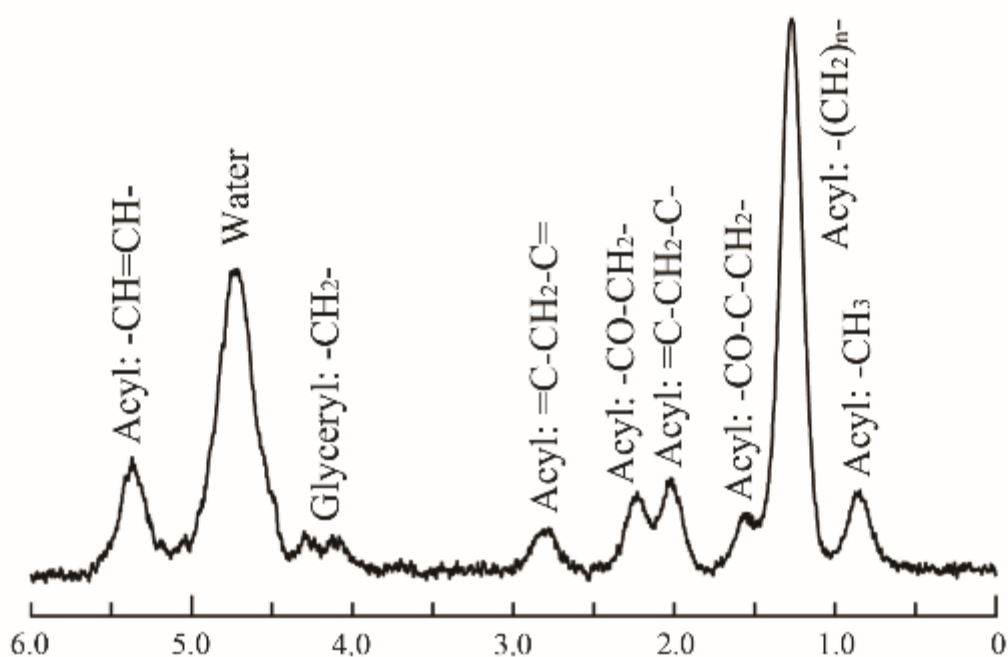


図 2-4 MCDD 群の代表的な ^1H -MRS スペクトル

水と脂質官能基のケミカルシフトを次に示す。Acyl: $-\text{CH}_3$ at 0.9 ppm, Acyl: $-(\text{CH}_2)_n-$ at 1.3 ppm, Acyl: $-\text{CO}-\text{C}-\text{CH}_2-$ at 1.6 ppm, Acyl: $=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$ at 2.1 ppm, Acyl: $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ at 2.3 ppm, Acyl: $=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$ at 2.8 ppm, Glyceryl: $-\text{CH}_2-$ at 4.1 ppm and 4.3 ppm, Water at 4.7 ppm, and Acyl: $-\text{CH}=\text{CH}-$ at 5.3 ppm.

MCDD 群の外側左葉、尾状葉、外側右葉における平均 HFF は、それぞれ 0.40 ± 0.17 , 0.26 ± 0.19 , and 0.01 ± 0.03 であった。それぞれの肝葉における HFF と HFAR には強い相関が認められた ($r=0.78$, $p<0.0001$) (図 2-5)。MCDD 群の外側左葉及び尾状葉における平均 SI はそれぞれ 0.72 ± 0.11 , and 0.73 ± 0.11 であった。MCDD 群の外側右葉における SI は、計算に必要なピークが有意に検出されなか

ったため、求めることができなかった。HFF と SI に相関は認められなかった ($r = 0.20, p = 0.61$)。

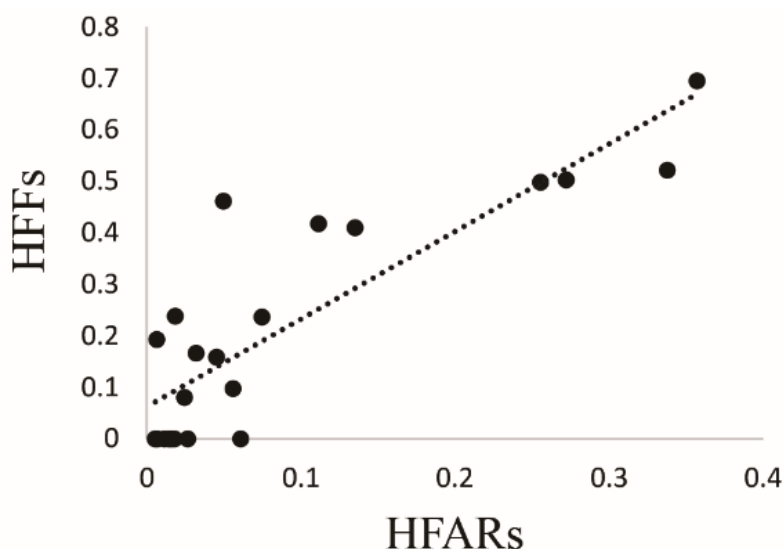


図 2-5 MCDD 群における、各肝葉の ^1H -MRS スペクトルから算出された HFF と病理組織標本から算出された HFAR の相関

HFF と HFAR には強い相関が認められた (Spearman coefficient, $r=0.78$, $p<0.0001$)。

2.3.3 血液生化学検査

MCDD 群において、トリグリセライド、総コレステロール、ALT、AST の平均値はそれぞれ、 19.55 ± 5.88 mg/dL, 65.73 ± 9.05 mg/dL, 75.09 ± 49.94 U/L, 144.73 ± 72.33 U/L であった。トリグリセライド、総コレステロール、ALT、AST の値と個々の平均 HFAR の間に相関は認められなかった。同様に、トリグリセライド、総コレステロール、ALT、AST の値と個々の最高 HFAR の間にも相関は認められなかった(表 2-1)。

表 2-1 MCDD 群における血液生化学検査値と HFAR の相関

	vs mean HFAR		vs high HFAR	
	r	p	r	p
Triglycerides	0.12	0.73	0.14	0.69
Total cholesterol	0.29	0.38	0.34	0.30
ALT	0.39	0.24	0.36	0.27
AST	0.06	0.86	0.08	0.82

r: Spearman coefficient

2.4 考察

2.4.1 非びまん性脂肪肝モデル

これまで非臨床において非びまん性脂肪肝あるいは脂肪肝炎が認められたという報告はなかったが、私は本実験において MCDD を用いてラットに非びまん性脂肪肝を誘発できることを見出した。MCDD 誘発性脂肪肝の脂肪沈着パターンについて明言した報告は少ないが、イメージング検査を実施した論文において、びまん性脂肪肝の誘発が示唆されている (Miyata et al., 2011)。本実験の条件で非びまん性脂肪肝が誘発されたメカニズムは不明であるが、肝葉における機能的不均一性が関与している可能性が考えられた (Palladini et al. 2019)。例えば、Wistar ラットに 8 週間 MCDD を摂餌させると、脂質過酸化マーカーであるチオバルビツール酸反応性物質 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 濃度が、内側葉及び右葉に比べ左葉において有意に高値となることが報告されている。さらに、標準的な飼料を与えた Wistar ラットにおいて、ROS 量及び TBARS 濃度が、右葉に比べ左葉において有意に高値となることが知られる (Palladini et al. 2019)。ROS 過多が脂肪肝を誘発する場合があることを考慮すると (Zhang et

al. 2019)、Wistar ラットでは右葉に比べ左葉において ROS 高値となる傾向にあり、本実験において外側右葉に比べ外側左葉において脂質高値となった可能性が示唆された。

2.4.2 非びまん性脂肪肝モデルにおける ^1H -MRS の定量性について

本実験では HFF と HFAR に有意な相関が認められ、 ^1H -MRS は非びまん性脂肪肝を正確に定量評価可能であることが明らかとなった。Marsman らは既に MCDD 誘発性脂肪肝モデルラットを用いて HFF と HFAR が有意に相関することを示している (Marsman et al., 2010)。しかし、Marsman らはびまん性脂肪肝を呈したラットを用いたため、本実験が非びまん性脂肪肝において HFF と HFAR が有意に相関することを示した初めての報告となる。また本実験と Marsman らの報告から、 ^1H -MRS は脂肪沈着パターンに寄らず肝臓中脂肪量を正確に定量できることが示された。臨床において薬剤性脂肪肝はびまん性、非びまん性の両方が報告されているため、どちらも正確に評価できる ^1H -MRS は安全性バイオマーカー検出法として有用である可能性が示唆された。

^1H -MRS では、検査者がボクセル位置を任意の場所に設定することができる。これは、非びまん性脂肪肝の評価に有用と考えられた。T2 強調画像において高信号を示す領域を選び、その場所にボクセルを設定することは、各例における最も重度の脂肪沈着部位を定量評価できる可能性が高い。飽和脂肪酸を含むいくつかの脂質成分の増加は、後述の通り NASH を誘発することが示唆されているため (Geng et al. 2021, Chiappini et al. 2017)、各例における最も高度な脂肪沈着部位の定量評価は、各例の状態を正確に把握するだけでなく、NASH への進展を予測する上でも有用であると考えられた。

HFF と HFAR の相関を示したグラフにおいて、いくつかのプロットは線形相

関から外れた。外れた理由として、病理組織学的検査に使われた肝部位と ^1H -MRS 検査に使われた肝部位が完全には一致していないことが考えられた。MCDD 誘発性非びまん性脂肪肝モデルにおいて、明らかな脂質沈着の不均一性は、肝葉間だけでなく同一の肝葉内においても認められた。故に、検査部位の不一致が評価精度に大きな影響をもたらしたと考えられた。また、HFF と HFAR の算出方法の違いも理由として考えられた。HFF は 3 次元のボクセルを算出範囲としているのに対し、HFAR は 2 次元の病理組織切片を算出範囲としている。また、HFF は可動性トリグリセライドに対する可動性水の比を脂質の指標としているのに対し、HFAR は肝臓面積に対する空胞面積の比を脂質の指標としている。故に、HFF と HFAR では肝組織中脂肪率を算出するために着目している対象が異なるため、線形相関から外れたプロットが認められた可能性が考えられた。

2.4.3 非びまん性脂肪肝モデルにおける血液検査の定量性について

本実験において、血液生化学検査値は HFAR と相関しなかった。一方、Leiber らは MCDD 誘発性脂肪肝ラットにおいて、血中トリグリセライド値と血中総コレステロール値が肝臓中総トリグリセライド量と有意に負の相関を示すことを示しており (Leiber et al., 2015)、本実験の結果に反する。本実験の結果と Leiber らの結果が異なった原因として、脂肪沈着パターンが関連すると考えられた。Leiber らの報告で示された MR 画像は、MCDD によってびまん性脂肪肝が誘発されたことを示唆している。びまん性脂肪肝を呈したヒトにおいても肝葉間に脂肪沈着量の差があることが報告されているが (Bonekamp et al. 2014)、肝葉間の脂肪沈着量の差がびまん性脂肪肝に比べ非びまん性脂肪肝で大きいことは明らかである。したがって、血液検査値が肝臓全体の状態を反映することをふま

ると、本実験で血液生化学検査値と HFAR に相関が認められなかった原因は非びまん性の脂肪沈着パターンにある、つまり血液検査は病変パターンによって検出精度が変わる可能性があると考えられた。

2.4.4 ^1H -MRS 以外の MRI を用いた脂肪肝定量評価法について

^1H -MRS と同様に脂肪肝を定量評価可能な手法として、MRI-based proton density fat fraction(MRI-PDFF)が知られる。MRI-PDFF も、水のプロトンと脂肪のプロトンの共鳴周波数が異なることを利用して、HFF を算出可能である。ただし算出方法に違いがあり、 ^1H -MRS では得られたスペクトルのピーク下面積値を使って HFF を算出するのに対し、MRI-PDFF は水及び脂肪分画画像から算出する。脂肪肝の定量評価において、 ^1H -MRS によって算出した HFF だけでなく、MRI-PDFF によって算出した HFF も病理組織検査結果と強く相関することが示されている (Kim et al. 2022)。MRI-PDFF にはない ^1H -MRS の利点として、脂質ピークの描出が挙げられる。 ^1H -MRS によって描出されたピークは、飽和、不飽和、多価不飽和脂肪酸指標の算出に使うことができる (Johnson et al. 2008)。本実験においても、描出されたピークを使って SI を算出した。結果、SI は HFF と相関しない、つまり SI は必ずしも総脂質量と正比例しないことが分かり、SI は HFF に追加して計測する意義のある指標である可能性が示唆された。飽和脂肪酸を含むいくつかの脂質は毒性を有し、脂肪肝から NASH への進展に関与することが示唆されている (Geng et al.2021)。肝臓中飽和脂肪酸は、健常人及び脂肪肝患者に比べ NASH 患者で増加しており、飽和脂肪酸高値は肝毒性を有することが *in vitro* 試験で示されている (Chiappini et al.2017)。これらの所見は、肝臓の特定の部位における飽和脂肪酸高値が、同部における NASH を誘発する可能性があることを示唆する。故に、 ^1H -MRS によって脂質ピークを描出し、飽和脂肪

酸を算出することは、脂肪肝をモニターすることだけでなく、NASH のバイオマーカーとしても有用である可能性があるが、¹H-MRS によって脂肪肝から NASH への進展を検出できるかを示すにはさらなる実験が必要と考えられた。

2.4.5 結論

本章では、¹H-MRS 検査値は非びまん性脂肪肝の病理組織学的定量値と関連するが、血液生化学検査値とは関連しないことを初めて示した。既報より、¹H-MRS 検査値はびまん性脂肪肝の病理組織学的定量値と関連することが示されている。したがって、薬剤性脂肪肝で認められるびまん性及び非びまん性脂肪肝の両方を正確に定量評価できる ¹H-MRS は、血液検査よりも有用な安全性バイオマーカー検出法である可能性が示唆された。

2.5 引用文献

1. Bonekamp S, Tang A, Mashhood A, Qolfson T, Changchien C, Middleton MS, Clark L, Gamst A, Loomba R and Sirlin CB. 2014. Spatial distribution of MRI-determined hepatic proton density fat fraction in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *J Magn Reson Imaging*. 39(6):1525-32.
2. Calistri L., Rastrelli V., Nardi C., Maraghelli D., Vidali S., Pietragalla M., Colagrande S. 2021. Imaging of the chemotherapy-induced hepatic damage: Yellow liver, blue liver, and pseudocirrhosis. *World J Gastroenterol*. 27(46):7866-7893.
3. Chiappini F., Coilly A., Kadar H., Gual P., Tran A., Desterke C., Samuel D., Duclos-Vallée LC., Touboul D., Bertrand-Michel J., Brunelle A., Guettier C., and Naour FL. 2017. Metabolism dysregulation induced a specific lipid signature pf

nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci Rep.* 24;7:46658.

4. Geng Y., Faber KN., de Meijer VE., Blokzijl H., and Moshage H. 2021. How dose hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol Int.* 15(1):21-35.
5. Johnson NA., Walton DW., Sachinwalla T., Thompson CH., Smith L., Ruell PA., Stannard SR. and George J. 2008. Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology.* 47(5):1513-23.
6. Kim JW, Lee CH, Yang Z, Kim BH, Lee YS and Kim KA. 2022. The spectrum of magnetic resonance imaging proton density fat fraction (MRI-PDFF), magnetic resonance spectroscopy (MRS), and two different histopathologic methods (artificial intelligence vs. pathologist) in quantifying hepatic steatosis. *Quant Imaging Med Surg.* 12(11):5251-5262.
7. Leiber LM., Bourisier J., Michalak S., Roullier V., Fizanne L., Chaigneau J., Roux J., Moal V., Flamment M., Bazerries P., Ducluzeau P-H., Aube C. 2015. MRI versus histological methods for time course monitoring of steatosis amount in a murine model of NAFLD. *Diagn Interv Imaging.* 96(9):915-922.
8. Marsman HA., van Werven JR., Nederveen AJ., Ten Kate FJ., Heger M,Stoker J., van Gulik TN. 2010. Noninvasive quantification of hepatic steatosis in rats using 3.0T ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson Imaging.* 32(1):148-154.
9. Miyata Y., Miyahara T., Moriyasu F. 2011. Decreased accumulation of ultrasound contrast in the liver of nonalcoholic steatohepatitis rat model. *World J Gastroenterol.* 17(37):4191-4198.
10. Palladini G., Pasqua LG., Berardo C., Siciliano V., Richelmi P., Perlini S., Ferrigno

- A., Vairetti M. 2019. Animal models of steatosis (NAFLD) and steatohepatitis (NASH) exhibit hepatic lobe-specific gelatinases activity and oxidative stress. *Can J gastroenterol Hepatol.* 5413461.
11. Provencher SW. 1993. Estimation of metabolic concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson. Med.* 30, 672-679.
 12. Szczepaniak LS., Nurenberg P., Leonard D., Browning JD., Reingold JS., Grundy S., Hobbs HH, Dobbins RL. 2005. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(2):E462-8.
 13. Venkatesh SK., Hennemige T., Johnson GB., Hough DM., Fletcher JG. 2017. Imaging patterns and focal lesions in fatty liver: a pictorial review. *Abdom Radiol(NY).* 42(5):1374-1392.
 14. Zhang L., Wang X., Cueto R., Effi C., Zhang Y., Tan H., Qin X., Ji Y., Wang H. 2019. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* 26:101284.

第三章：ニトロキシラジカルを用いた MRI における脂肪肝と脂肪肝炎の区別

3.1 背景と目的

第二章において示された MRI の有用性をふまえ、本章では MRI を用いた脂肪肝と早期脂肪肝炎を区別する方法について検証した。薬剤性脂肪肝炎の発症にはミトコンドリアの機能障害が重要な役割を担うと考えられている。ミトコンドリアの機能障害は、酸化リン酸化やミトコンドリア呼吸鎖阻害によって引き起こされることがある (Schumacher et al. 2015)。これらの障害が発生すると、活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS) の生成が増加する。実際に、動物及び HepG2 細胞を用いた実験において、イリノテカン、メトトレキサート、バルプロ酸、アミオダロン、オキサリプラチンなどによって誘発された薬剤性脂肪肝炎における ROS 生成の増加が報告されている (Abo-Haded et al., 2017, Donato et al., 2009, Liu et al., 2022, Lu et al., 2019)。ROS は炎症反応の進行における重要なシグナル伝達分子である。肝臓における ROS 濃度の上昇は、炎症メディエーターに寄与する可能性があるため、ROS と炎症は相互作用し、相互強化の悪循環をもたらすと考えられている (Ma et al., 2021, Duvigneau et al., 2019)。これは、脂肪肝に比べ脂肪肝炎で ROS 生成が増加したという報告と一致する (Seki et al., 2002, Pirola et al., 2021)。したがって、薬剤性脂肪肝と脂肪肝炎の区別に ROS が活用できるのではないかと考えた。

ROS のイメージングに関しては、electron spin resonance (ESR) のプローブや dynamic nuclear polarization-MRI(DNP-MRI)の造影剤としてニトロキシラジカルを使用した非臨床研究が報告されている (Utsumi et al. 2006, Fujii et al. 2013, Eto et al., 2015)。ニトロキシラジカルは、ROS による酸化を含む様々な生体内

酸化還元反応に関与し、最終的には不対電子を有さないヒドロキシルアミンに変換される (Soule et al., 2007) (図 3-1)。ESR は電子スピン信号を検出する手法である。そのため ESR を用いると、ニトロキシルラジカルを生体に投与した後、信号が徐々に減衰する様子を観察することができる。この信号変化の速度は **decay rate** と呼ばれる。一方、MRI は核スピンを検出する手法であるため、電子スピン信号の減衰を直接検出することはできない。しかし、ニトロキシルラジカルが水プロトンの T1 緩和に影響を与えることによって生じる T1 強調効果を観察することは可能である。そのため MRI を用いると、ニトロキシルラジカルを生体に投与した後、T1 強調画像における高信号が徐々に減少する様子を観察することができる。この信号変化の速度は **reduction rate** と呼ばれる。DNP-MRI では、MRI パルスシーケンスを適用する前にフリーラジカルの電子常磁性共鳴周波数で組織を照射することで、ニトロキシルラジカルの T1 強調画像における信号強度を増強している (Overhauser, 1953)。ニトロキシルラジカルの **decay rate** は、胃潰瘍、敗血症時の頭部、筋炎などの過剰な ROS が生じた組織で高値となることが報告されている (Utsumi et al. 2006, Fujii et al. 2013, Eto et al., 2015)。しかし、MCDD 誘発性脂肪肝炎では、正常肝臓または MCDD 誘発性脂肪肝に比べ、**reduction rate** が低値であると報告されている (Nakata et al., 2017)。他の脂肪肝炎モデルにおいても **decay/reduction rate** に変化が認められるのか、またその変化は高値あるいは低値となるかは不明である。また ESR、DNP-MRI と異なり臨床普及している MRI によって、脂肪肝と脂肪肝炎の **reduction rate** の違いを検出できるのかについても不明である。

よって本章では、MRI を用いた脂肪肝と早期脂肪肝炎の区別を目指し、MCDD 誘発性モデル以外の脂肪肝及び脂肪肝炎モデルにおける **reduction rate** について MRI を用いて検証した。実験は、ファントムを用いた実験、動物を用いた予備

実験、本実験の順に進めた。

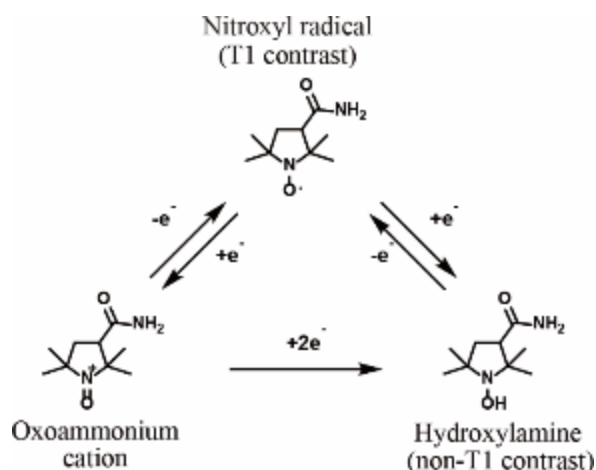


図 3-1 ニトロキシルラジカルの酸化還元変換

ニトロキシルラジカルは還元、あるいは酸化されてオキソアンモニウムカチオンに変換された後、さらに還元されることで、ヒドロキシルアミンに変換される。これらの変換は可逆的であり、生体内投与後しばらくするとニトロキシルラジカルとヒドロキシルアミンとの間で平衡状態になる。ニトロキシルラジカルは不対電子を持つため、T1 増強効果を有する。対して、ヒドロキシルアミンは不対電子を持たないため、T1 増強効果を有さない。

3.2 ファントムを用いた実験

動物実験に先立ち、ファントムを用いた実験を行った。ファントムとは、生体を使用せずにイメージング装置や造影剤の性能確認や撮影パラメーターの最適化などを行うための物体である。4.7T MRI において、200 mg/kg (静注) の Tempol 及び CmP はマウスにとって有害でなく、また十分なコントラストを有することが報告されている (Hyodo et al., 2006)。しかしながら、磁場強度の上昇に伴い T1 短縮による信号強度よりも T2 短縮による信号低下の方が優勢となるため、本実験で用いる 11.7T MRI において 200 mg/kg (静注) が十分なコントラストを有するかは不明であった。そこで、動物実験に先立ち 11.7T におけるニトロキシルラジカルのコントラストを確認するためのファントム実験を行った。また、ファン

トムの造影能力の指標となる緩和能(relaxivity; r_1 , r_2)の測定も行った。

ROS はミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソームなどの細胞内小器官で産生される (Ramos-Tovar et al., 2020)。そこで、市販ニトロキシルラジカルのなかで細胞膜を通過することが知られる、4-Hydroxy-TEMPO(Tempol)と 3-Carbamoyl-PROXYL(CmP)を本実験の造影剤候補とした。MRI における信号強度は、同濃度で比べると Tempol より CmP の方が弱いため (Matsumoto, 2009)、ファントムを用いた実験は CmP を用いた。

3.2.1 方法

3.2.1.1 ファントム

CmP のファントムは、12 本の使い捨てキャピラリーピペット (ringcaps; 内径 1.89 mm, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Germany) を phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 で満たしたポリプロピレンチューブに静置することで作成した。12 本のキャピラリーピペットには、それぞれ、0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 mM の CmP を充填した。また、緩和能測定の比較対照として、臨床で使用実績のある T1 強調造影剤である Gd HP-DO3A(ProHance, Eisai, Tokyo, Japan)のファントムも作成した。Gd HP-DO3A のファントムは、9 本の使い捨てキャピラリーピペットを PBS pH7.4 で満たしたポリプロピレンチューブに静置することで作成した。9 本のキャピラリーピペットには、それぞれ、0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.7, 1, 1.5, 2 mM の Gd HP-DO3A を充填した。ファントム実験は、都度新しく作成したファントムを用いて 3 から 4 回行った。

3.2.1.2 MRI 実験

動物実験を含む以下すべての MRI 撮像は、11.7T vertical-bore Bruker Avance II imaging system (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) に送受信用のボリウム高周波コイル (m2m Imaging Corp., Cleveland, OH, USA) を用いて実施した。

CmP のコントラストを確認するため、fast low-angle shot (FLASH) シーケンスを用いて T1 強調画像を取得した。各撮像パラメーターを以下に示す。

TR/ TE = 24 msec/ 1.32 msec, FA 30°, FOV 20 mm × 20 mm, matrix of 128 × 128 pixels, slice with thickness = 1.5 mm, 4 NEX, and number of repetitions 1.

T1 短縮能を表す r_1 値を算出するために、saturation-recovery spin echo シーケンスを用いて撮像した。各撮像パラメーターを以下に示す。

16 TRs (12.711, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 5000, 10000, and 15000 ms), TE = 7.7 msec, matrix 128 × 128 pixels, 1 NEX, and number of repetition 1.

T2 短縮能を表す r_2 値を算出するために、multi-echo spin echo シーケンスを用いて撮像した。撮像パラメーターを以下に示す。

TR = 15000 ms, TE = from 10 to 300 in increments of 10, FA 8°, FOV 25 × 25 mm, matrix of 192 × 192 pixels, 1 slice with thickness = 0.8 mm, 3 NEX, and number of repetition 1.

3.2.1.3 解析

ROI はそれぞれのキャピラリーピペットの中心に、 0.9 mm^2 の正円で設定した。ROI における信号強度は ImageJ (NIH, MD, USA) を用いて測定した。Contrast-to-noise ratio (CNR) は下記の式から算出した。

$$\text{CNR} = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \frac{[\text{SI}(x) - \text{SI}(0)]}{\text{SI}(\text{air})} \quad (1)$$

SI(x)、SI(0)、SI(air)はそれぞれ、CmP 算出対象の CmP が入ったキャピラリーピペットにおける信号強度、PBS のみが入ったキャピラリーピペットにおける信号強度、空気における信号強度である。CNR が 5 以上であれば、背景と十分に区別可能なコントラストを有すると判断した (Rose, 1948)。

r1 値、r2 値を算出するために、それぞれの濃度における T1 値、T2 値をまず算出した。T1 値、T2 値は、SI(T1)と SI(T2)が実測の信号強度に最も近くなるように、以下の方程式を当てはめることによって決定した。

$$\text{SI}(T1) = S_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{\text{TR}}{T1}\right) \right] \quad (1)$$

$$\text{SI}(T2) = S_z \exp\left(-\frac{\text{TE}}{T2}\right) \quad (2)$$

S₀ は完全に回復したときの縦磁化強度、S_z は初期信号強度である。r1 値、r2 値はそれぞれ、濃度に対する 1/T1 値、1/T2 値の傾きから算出した。

3.2.2 結果

CmP の r1 値、r2 値はそれぞれ $0.162 \pm 0.005 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $0.193 \pm 0.006 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ で、Gd HP-DO3A の r1 値、r2 値はそれぞれ $7.210 \pm 0.148 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $9.162 \pm 0.178 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。

1 mM の CmP の平均 CNR は 8.500 ± 0.960 であり、1 mM 以上の CmP は背景から区別可能なコントラストを有することが分かった。

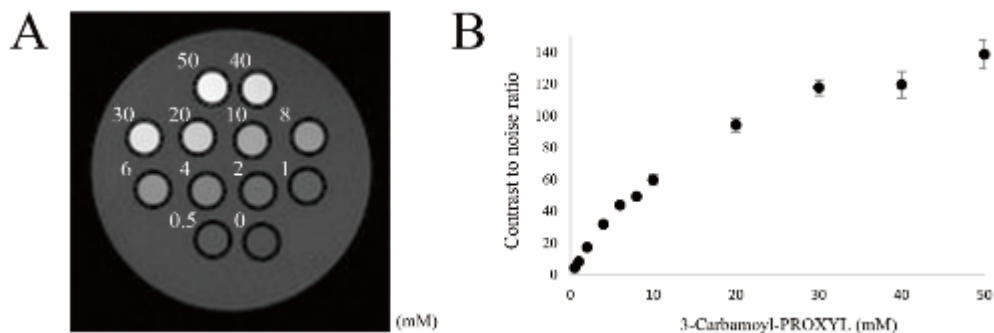


図 3-2 ファントム

(A) CmP(0-50 mM)を充填したファントムの T1 強調画像。(B) 濃度が増加するにつれ、平均 CNR は増加した。プロットされた濃度は図 3-2A と同じである。1 mM 以上で平均 CNR は 5 を越え、背景から明らかに区別可能となるコントラストの定義を満たした。

3.2.3 考察

CmP の r_1 値は、Gd HP-DO3A の r_1 値の約 1/44 倍であり、CmP の T1 増強効果は Gd HP-DO3A に比べかなり弱いことが分かった。これは有する不対電子の数が CmP は 1 つであるのに対し、Gd HP-DO3A は 7 つであることが一因と考えられた。高磁場 MRI では T1 短縮による信号強度よりも T2 短縮による信号低下の方が優勢となる。しかし、CmP は r_2 値も Gd HP-DO3A に比べ約 1/47 倍と小さいため、低磁場 MRI と高磁場 MRI で信号強度が変わらない可能性が示唆された。

CmP の CNR より、11.7T MRI において 1 mM 以上の CmP は背景から区別可能なコントラストを有することが明らかとなった。200 mg/kg の CmP をマウスに静注した際、最大肝臓 CmP 濃度は下記記載の理由より約 9 mM と予測された。よって、MRI における信号強度は、同濃度で比べると Tempol より CmP の方が弱いことをふまえると (Matsumoto, 2009)、11.7T MRI において 200 mg/kg の Tempol 及び CmP は肝臓に十分なコントラストをもたらすと考えられた。最大

肝臓 CmP 濃度の予測は次の手順で行った。CmP をマウスに静注した際の血中濃度シミュレーションでは、初期分布容積は血漿容積の 3 倍とされており (Matsumoto et al., 2004)、CmP は投与後すぐに組織に移行することが示唆されている。CmP が全組織に均等に分布すると仮定した場合、CmP の最大肝臓濃度は投与直後の血中濃度と同等となる。よって、予定投与量 200 mg/kg をマウスに静注した際の最大肝臓濃度は約 9 mM と計算された。マウスの循環血液量は既報を参照した (Diehl et al., 2001)。

3.3 動物を用いた予備実験（マウス肝病変の検出）

次に動物を用いた予備実験を行い、ニトロキシラジカルを MRI 造影剤として使用した場合、マウス肝病変における ROS 過多を検出することが可能か検証した。造影剤としては Tempol を用いた。Tempol は CmP に比べ酸化還元電位が低い (Iwamoto et al., 2010)、ROS 検出感度がより高いと考え選択した。

3.3.1 方法

3.3.1.1 動物

予備実験及び本実験において、肝病変モデルマウスは STAMTM マウス (SMC Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。STAMTM マウスは、2 日齢の雄性 C57BL/6J マウスにストレプトゾシンを投与し、4 週齢以降に高脂肪食を給餌することで作製される。5~6 週齢で脂肪肝、7~8 週齢で NASH、9~12 週齢で肝臓における線維増生、12 週齢以降で肝結節形成、そして 16 週齢以降で肝細胞癌を呈する。12 週齢の STAMTM マウスの肝臓は ROS 過多であることが既に報告されている (Ishikawa et al., 2014)。そこで本予備実験では、より病態が進んでいるためさらに ROS 過多となっていることが予期される 15 週齢の STAMTM マウ

ス 1 例を用いた。また、対照マウスとして 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 1 例を用いた。対照マウスの週齢は、本実験では 5 及び 8 週齢の STAMTM マウス及び C57BL/6J マウスの使用を予定していたため、まずは予備的に 8 週齢を選択した。

3.3.1.2 MRI 実験

すべてのマウスは MRI 及び/あるいは病理組織学的検査の 12 時間以上前から絶食させた。体重測定及び尾静脈へのカニューレーションの後、1-2%のイソフルランを用いて麻酔を維持した。呼吸数は physiological monitoring system (SA Instruments, Stony Brook, NY, USA) を用いてモニターし、体温は加熱パッドに水を循環させることで $36.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。

まず Tempol 投与後の肝臓の撮像位置を決定するため、肝臓全体の冠状断、軸位断、矢状断の T2 強調画像について RARE シーケンスを用いて取得した。各撮像パラメーターを以下に示す。

Rare Factor 16, TR/TE 3000 msec/45 msec, FOV 25 mm $\times$ 25 mm, matrix of 256 $\times$ 256 pixels, 20 slices with thickness = 1.0 mm, and 8 NEX.

次に、冠状断における Tempol 投与後の T1 強調画像について FLASH シーケンスを用いて取得した。Tempol 200 mg/kg は撮像開始 2 分後に尾静脈カニューレーションから延長したチューブを介し MRI 装置外からボラス投与した。各撮像パラメーターを以下に示す。

TR/TE 24 msec/1.34 msec, scan time = 20 s, FA 30°, FOV 20 mm $\times$ 20 mm, matrix of 128 $\times$ 128 pixels, 1 slice with thickness = 1.0 mm, 8 NEX, and number of repetitions 45.

3.3.1.3 解析

ROI における信号強度を ImageJ (NIH, MD, USA)を用いて測定した。肝臓における ROI は、体動の影響が少なく、目視で確認可能な血管及び肝臓以外の組織を避けた位置に設定した。ROI は 1.27 mm^2 の正円とし、これは ROI 内に血管や他組織が含まれないことを担保できる、概ね最大の大きさであった。

3.3.1.4 病理組織学的検査

肝臓を採材し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。肝臓をパラフィン包埋及び薄切後、HE 染色し、光学顕微鏡下で観察した。

3.3.2 結果

3.3.2.1 MRI 実験

15 週齢の STAMTM マウスの T2 強調画像において、高信号の円形部位が認められた(図 3-3A)。8 週齢の対照マウスの T2 強調画像では、異常は認められなかった(図 3-3B)。

Tempol 投与後の信号強度の減衰について、図 3-3A, 3B に示す 3 か所に ROI を設定し、測定した。投与前の平均信号強度を基準とした、信号強度変化の推移をグラフで示す(図 3-3C)。対照マウスは最大輝度到達 40～60 秒後に投与前と同等の輝度を示したのに対し、15 週齢の STAMTM マウスの T2 強調画像高信号部位は最大輝度到達 20～40 秒後に投与前と同等の輝度を示した。15 週齢の STAMTM マウスの T2 強調画像高信号部位以外は、上述 2 か所の ROI と比べ、最大信号強度変化が低く、信号強度の推移を追うことが難しかった。

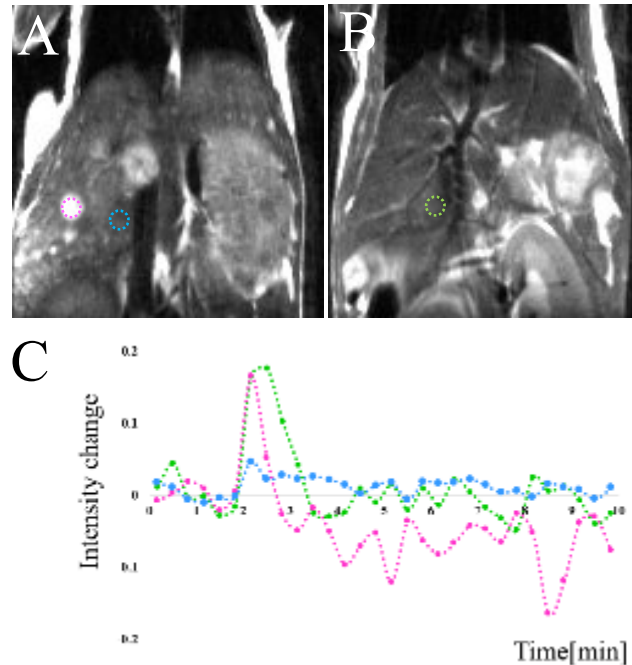


図 3-3 15 週齢の STAMTM マウスにおける MRI

(A) 15 週齢の STAMTM マウスの T2 強調画像。ピンクの破線円は T2 強調高信号部位の ROI、青の破線円は T2 強調画像高信号部位以外の ROI を示す。(B) 8 週齢の対照マウスの T2 強調画像。黄緑の破線円は ROI を示す。(C) 15 週齢の STAMTM マウスの T2 強調高信号部位(ピンク)、T2 強調画像高信号部位以外(青)、対照マウス(黄緑)の ROI における、投与前の平均信号強度を基準とした、信号強度変化の推移。撮像開始後 2 分に Tempol を投与した。

3.3.2.2 肉眼及び病理組織学的検査

肉眼検査では、15 週齢の STAM マウスの肝臓において複数の結節が認められた(図 3-4A)。病理組織学的検査では、結節部位において肝細胞腺腫が認められた(図 3-4B)。肝細胞腺腫において、中に血液を容れた偽嚢胞を散見した(図 3-4C)。また、結節部位以外を含め肝組織全体に肝細胞の空胞化及び炎症細胞浸潤が認められた(図 3-4D)。対照マウスにおいて、肉眼所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

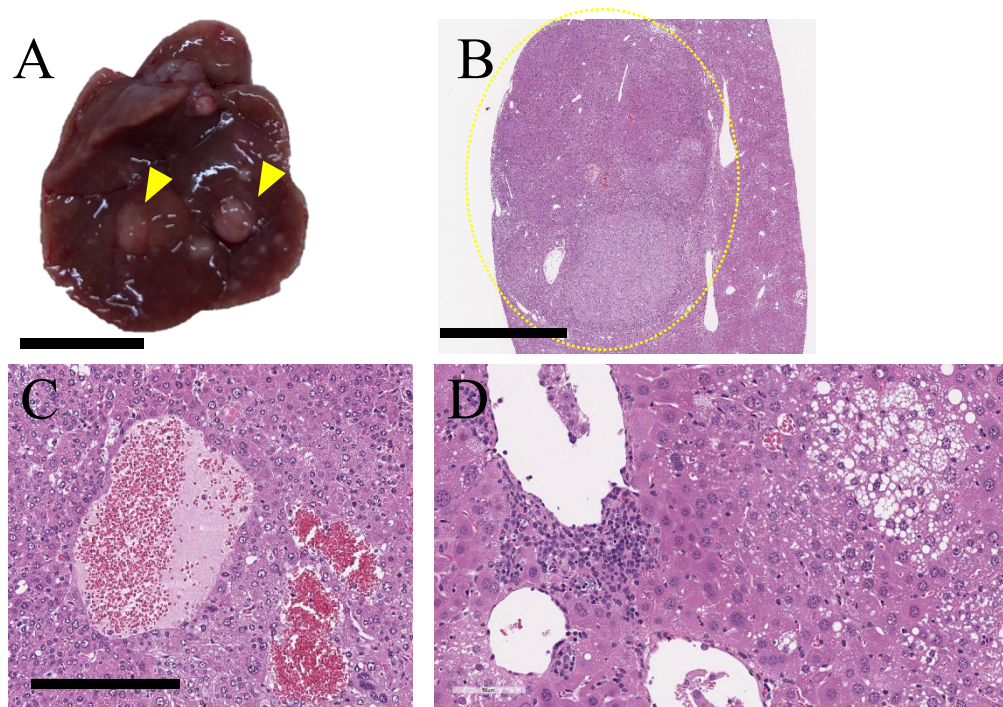


図 3-4 15 週齢 STAM™ マウスにおける病理像

(A) 肉眼検査において、結節(黄色矢頭)が複数認められた。スケールバー 1cm。
 (B) 病理組織学的検査において、結節部位において肝細胞腺腫 (黄色破線)(B)が認められた。スケールバー 2mm。
 (C) 同部において内部に血液を容れた偽嚢胞が散見された。スケールバー 200 μm 。
 (D) 肝組織全体に、肝細胞空胞化、炎症細胞浸潤が認められた(写真は非結節部位における病理組織像を示す)。スケールバー 90 μm 。

3.3.3 考察

T2 強調画像における高信号部位は、病理組織学検査において肝細胞腺腫を呈していることが明らかとなった。肝細胞腺腫では血液を容れた偽嚢胞が散見されたため、この血液によって T2 強調画像では高信号が描出されたと考えた。

Tempol 投与後の信号強度変化の推移では、最大輝度到達から投与前と同等の輝度に戻るまでの時間は、対照肝臓に比べ肝細胞腺腫で速かった。本予備実験において ROS 過多の有無は検索していないため、この違いが ROS によってもた

らされたかは不明である。しかし、何かしらの原因によるマウス肝臓における酸化還元バランスの違いを、MRI 造影剤として用いた Tempol によって検出可能であることは本実験から示唆され、ニトロキシルラジカルを MRI 造影剤として用いたマウス肝臓中における ROS 検出は検討する価値があると考えた。

一方で、Tempol はマウス対照肝臓においても 40～60 秒と速やかに変換されることも明らかとなった。40～60 秒では Decay rate 算出に使用できるデータポイント数が少なく、信頼できる decay rate を算出することは難しいと考えた。よって、本実験では CmP を選択することとした。

15 週齢の STAMTM マウスの肝細胞腺腫以外の部位では、肝細胞腺腫及び対照肝臓に比べ、Tempol 投与後の最大信号強度変化が小さかった。原因として、肝細胞腺腫は偽嚢胞中に貯留した血液によって Tempol が曝露されるのに対し、周囲は腺腫による圧排等によって血流障害が生じており、肝臓に曝露した Tempol 量が少ない可能性が考えられた。そこで本実験では、対照マウスと脂肪肝炎マウスにおいて肝臓における血液が同等であるか、Gd 造影剤を用いて検証することとした。

3.4 動物を用いた予備実験（CmP の安全性）

ニトロキシルラジカルはヒトに塗布されたことはあるものの (Metz et al., 2004)、造影剤としては未承認であり、安全性に関する情報は乏しい。そこで CmP の安全性について検討した。CmP 静脈内投与後 1000 秒でラットの心臓、肝臓、腎臓及び腸管における T1 強調画像の輝度が背景と同等となること (Uchida et al., 2018))、また CmP 静脈内投与時のマウスにおける血中、肝臓中、腎臓中半減期は 30 分以内であることから (Hirayama et al., 2003, Matsumoto et al., 2004))、CmP は蓄積性が低いことが示唆されている。そこで本予備実験では CmP 単回投与後

翌日の安全性について検証した。

3.4.1 方法

3.4.1.1 動物

7週齢の雄性 C57BL/6J マウス 10 例を、vehicle (PBS)群と CmP 200 mg/kg 群に 5 例ずつ分けた。PBS あるいは CmP は尾静脈から単回投与した。

3.4.1.2 血液生化学検査

投与翌日、イソフルラン麻酔下で後大静脈より採血し、血液生化学検査に用いた。採取した血液をヘパリンリチウム入り採血管で抗凝固処理後、冷却下で遠心分離により得られた血漿を用い、以下の項目を測定した。測定には自動分析装置 (JCA-ZS050、日本電子株式会社) を用いた。

AST、ALT、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、総ビリルビン (T-Bil)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP)、クレアチンキナーゼ (CK)、総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL)、トリグリセライド (TG)、グルコース (Glu)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、無機リン (P)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロライド (Cl)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)

3.4.1.3 病理組織学的検査

肝臓、腎臓、心臓、肺、脳、投与部位 (尾) を採材し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。各臓器をパラフィン包埋及び薄切後、HE 染色し、光学顕微鏡下で観察した。

3.4.1.4 統計

Vehicle 群と CmP 200 mg/kg 群の血液生化学検査値の各データについて、F 検定により分散の均一性を両側、有意水準 25%で検定し、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Welch の検定により両側、有意水準 5%で検定した。検定には、SAS version 9.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

3.4.2 結果

血液生化学検査において、vehicle 群と CmP 200 mg/kg 群との間に統計学的に有意な変化は認められなかった (表 3-1)。肝臓、腎臓、心臓、肺、脳、投与部位 (尾) の病理組織学的検査において、いずれの動物においても病理組織学的異常は認められなかった。

表 3-2 Vehicle 群と CmP 200 mg/kg 群における血液生化学検査値

	TP g/dL	Alb g/dL	A/G	T-Bil mg/dL	LDH U/L
Vehicle group	4.5 ± 0.2	3.2 ± 0.2	2.41 ± 0.12	0.06 ± 0.01	144 ± 46
CmP 200 mg/kg group	4.4 ± 0.3	3.1 ± 0.1	2.44 ± 0.18	0.08 ± 0.03	174 ± 54

	AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	γ-GTP U/L	CK U/L
Vehicle group	36 ± 3	18 ± 1	192 ± 9	1 ± 1	70 ± 29
CmP 200 mg/kg group	49 ± 14	19 ± 3	213 ± 29	1 ± 0	69 ± 20

	BUN mg/dL	Cre mg/dL	Glu mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL
Vehicle group	38 ± 2	0.1 ± 0.0	280 ± 23	96 ± 4	159 ± 66

CmP 200 mg/kg group	32 ± 6	0.1 ± 0.0	287 ± 24	84 ± 23	142 ± 77	
---------------------	--------	-----------	----------	---------	----------	--

	PL	P	Ca	Na	K	Cl
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mEq/L	mEq/L	mEq/L
Vehicle group	211 ± 12	6.6 ± 0.3	9.2 ± 0.2	149 ± 1	4.8 ± 0.2	112 ± 1
CmP 200 mg/kg group	186 ± 49	6.0 ± 0.6	9.2 ± 0.2	150 ± 1	4.8 ± 0.4	112 ± 3

3.4.3 考察

血液生化学検査と主要臓器及び投与部位（尾）における病理組織学的検査の結果、CmP に関連した変化は認められず、CmP 200 mg/kg 単回静注投与は安全である可能性が示唆された。3T MRI において CmP 1 mM は背景から区別可能なコントラストを有することが報告されているため (Uchida et al., 2018)、ニトロキシルラジカルは高磁場非臨床用 MRI だけでなく、臨床用 MRI においても造影剤として機能しうると考えられる。CmP が臨床用造影剤として承認を得るためには有効性・安全性を示すためのさらなる試験が必要だが、将来的に臨床承認が得られることが期待できる。

3.5 本実験

脂肪肝モデルマウス、脂肪肝モデルマウス及び対照マウスを用いた本実験を、CmP を MRI 造影剤として用いて行った。

3.5.1 方法

3.5.1.1 動物

脂肪肝及び脂肪肝モデルマウスとして、5 週齢及び 8 週齢の STAMTM マウス 40 例を用いた。対照マウスとして、5 週齢及び 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 14 例を用いた。STAMTM マウス 19 例及び C57BL/6J マウス 7 例を MRI 実験に用

い、STAMTM マウス 21 例及び C57BL/6J マウス 7 例を免疫組織化学的染色標本を用いた検査に用いた。HE 染色標本を用いた病理組織学的検査には全例用いた。

3.5.1.2 MRI 実験

すべてのマウスは MRI 及び/あるいは病理組織学的検査の 12 時間以上前から絶食させた。体重測定及び尾静脈へのカニューレーションの後、1-2%のイソフルランを用いて麻酔を維持した。呼吸数は physiological monitoring system (SA Instruments, Stony Brook, NY, USA) を用いてモニターし、体温は加熱パッドに水を循環させることで $36.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。

まず CmP 投与後の肝臓の撮像位置を決めるため、肝臓全体の冠状断、軸位断、矢状断の T2 強調画像について RARE シーケンスを用いて取得した。各撮像パラメーターを以下に示す。

Rare Factor 16, TR/TE 3000 msec/45 msec, FOV 25 mm $\times$ 25 mm, matrix of 256 $\times$ 256 pixels, 20 slices with thickness = 1.0 mm, and 8 NEX.

次に、冠状断における CmP 投与後の T1 強調画像について FLASH シーケンスを用いて取得した。CmP 200 mg/kg は撮像開始 2 分後に尾静脈カニューレーションから延長したチューブを介し MRI 装置外からボラス投与した。各撮像パラメーターを以下に示す。

TR/TE 24 msec/1.5 msec, scan time = 10 s, FA 30°, FOV 20 mm $\times$ 20 mm, matrix of 128 $\times$ 128 pixels, 1 slice with thickness = 1.5 mm, 4 NEX, and number of repetitions 102.

また、予備実験（マウス肝病変の検出）の結果をふまえ、8 週齢の STAMTM マウス 1 例と 8 週齢の C57BL/6J マウス 1 例に Gd HP-DO3A (ProHance, Eisai, Tokyo, Japan) を投与し、肝臓における血流が同等であるか検討した。当該 2 例においては、CmP を用いた撮像が完了した後に Gd HP-DO3A 投与後の T1 強調画像を

FLASH シーケンスを用いて取得した。撮像パラメーターは CmP 投与時の T1 強調画像取得時と同じとした。Gd HP-DO3A は、尾静脈カニューレーションから延長したチューブを介し MRI 装置外からボラス投与した。

3.5.1.3 解析

Reduction rate を算出するために、まず ROI における信号強度を ImageJ (NIH, MD, USA)を用いて測定した。ROI は肝臓と胃に設定した。胃における ROI は、ROS を臓器特異的に検出できるか検証するための比較対象として設定した。いずれの ROI も、体動の影響が少なく、目視で確認可能な血管を避けた位置に設定した。また T2 強調画像より、ROI に目的以外の組織が含まれていないことを確認した。ROI は肝臓は 1.27 mm^2 、胃は 0.29 mm^2 の正円とした。これは ROI 内に血管や他組織が含まれないことを担保できる、概ね最大の大きさであった。

次に、ある時点の ROI における信号強度から、CmP 投与前の平均信号強度を差し引いた値を、CmP 投与前の平均信号強度で割った値である、信号強度変化率を算出した。信号強度変化率のピークから 5.83 分間であればいずれの例も線形性の変化を示したので、5.83 分間における信号強度変化率の片対数プロットの線形回帰直線の傾きから、reduction rate を算出した。なお、胃における reduction rate は、体動の影響のため数例で算出できなかった。

また、ROI における reduction rate 算出と同様の方法で、対照肝臓、脂肪肝、脂肪肝炎の代表例におけるピクセルごとの reduction rate を算出し、画像化した。

肝臓における血流量を評価するため、Gd HP-DO3A による肝臓信号強度変化率-時間曲線の曲線下面積 (AUC: area under the curve) を算出した。算出区間は、投与後 50 秒、80 秒、170 秒、290 秒の 4 区間とした。Gd HP-DO3A による信号強度は、reduction rate 算出と同様の ROI を用いて算出した。

3.5.1.4 病理組織学的検査

肝臓について、採材、10%中性緩衝ホルマリン液への浸漬、パラフィン包埋、薄切、及び HE 染色を実施し、光学顕微鏡下で観察した。胃における reduction rate を算出した動物においては、胃についても同様の処理を実施し、光学顕微鏡下で観察した。さらに、non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) Activity Score (NAS)を用いて脂肪肝炎の程度を評価した。NAS は、脂肪肝(0-3)、炎症(0-3)、バルーニング(0-2)のサブスコアを合算することで求められる。NAS 3 未満は non-NASH、3-4 は境界病変、5 以上は NASH と判断される。病理組織学的検査結果に基づいて、STAMTM マウスを脂肪肝群、脂肪肝炎 (NAS of 2)群、脂肪肝炎 (NAS of 3)群に分けた。

さらに、4-hydroxynonenal (4-HNE) 抗体 (clone: HNEJ-2) (Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan)を用いた免疫組織化学的染色を行った。4-HNE は脂質過酸化マーカーの 1 種であり、ROS を評価するために一般的に用いられる指標である。ニトロキシラジカルは酸化ストレスに対して治療効果を持つことが知られる (Assayag et al., 2021, Eguchi et al., 2015)。単回投与の影響は不明であるものの、免疫組織化学的染色は CmP を投与していない動物に対して行った。対照肝臓マウス 7 例 (5 週齢の C57BL/6J マウス 3 例、8 週齢の C57BL/6J マウス 4 例)、脂肪肝マウス 7 例 (5 週齢の STAMTM マウス)、脂肪肝炎(NAS of 2)マウス 6 例 (5 週齢の STAMTM マウス)、脂肪肝炎(NAS of 3)マウス 8 例(5 週齢の STAMTM マウス 4 例、8 週齢の STAMTM マウス 4 例)を免疫組織化学的染色に用いた。

免疫染色標本全体は Aperio AT2 whole digital scanner を使ってスキャンした。スキャンした画像を、HALOTM digital image analysis software version 3.4.2986.209

(Indicalabs, Corrales, NM, USA)の CytoNuclear algorithm を用いて解析することで、評価対象範囲の肝臓面積に対する免疫染色陽性面積率を算出した。

また、NAS のサブスコアである脂肪肝、炎症、バルーニング以外に HE 標本で判別可能な reduction rate の違いに関与する指標があるか、CmP を投与したマウスの HE 染色標本において検索した。後述の通り、4-HNE 陽性を示す物質の中で、単核細胞の細胞質内に泡沫状に認められる物質であれば、HE 染色標本においても判別可能であることが分かった。そこで、reduction rate を算出した動物において、評価対象範囲の肝臓面積に対する同泡沫物質を容れた単核細胞の面積率を算出した。算出には HALO™ digital image analysis software version 3.4.2986.209 (Indicalabs, Corrales, NM, USA)を用いた。算出した泡沫細胞面積率について、脂肪肝群の平均値以下であれば 0、高値であれば 1 として NAS のサブスコアに組み込み、指標として有用か検証した。

3.5.1.5 統計学的解析

対照群と STAM™ マウス各群、脂肪肝群と脂肪肝炎(NAS of 2, 3)群、脂肪肝炎(NAS of 2)群と脂肪肝炎(NAS of 3)群について、Reduction rate 及び免疫染色陽性面積率について、Dunnett の多重比較検定により差を両側、有意水準 5%で検定した。検定には、SAS version 9.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

3.5.2 結果

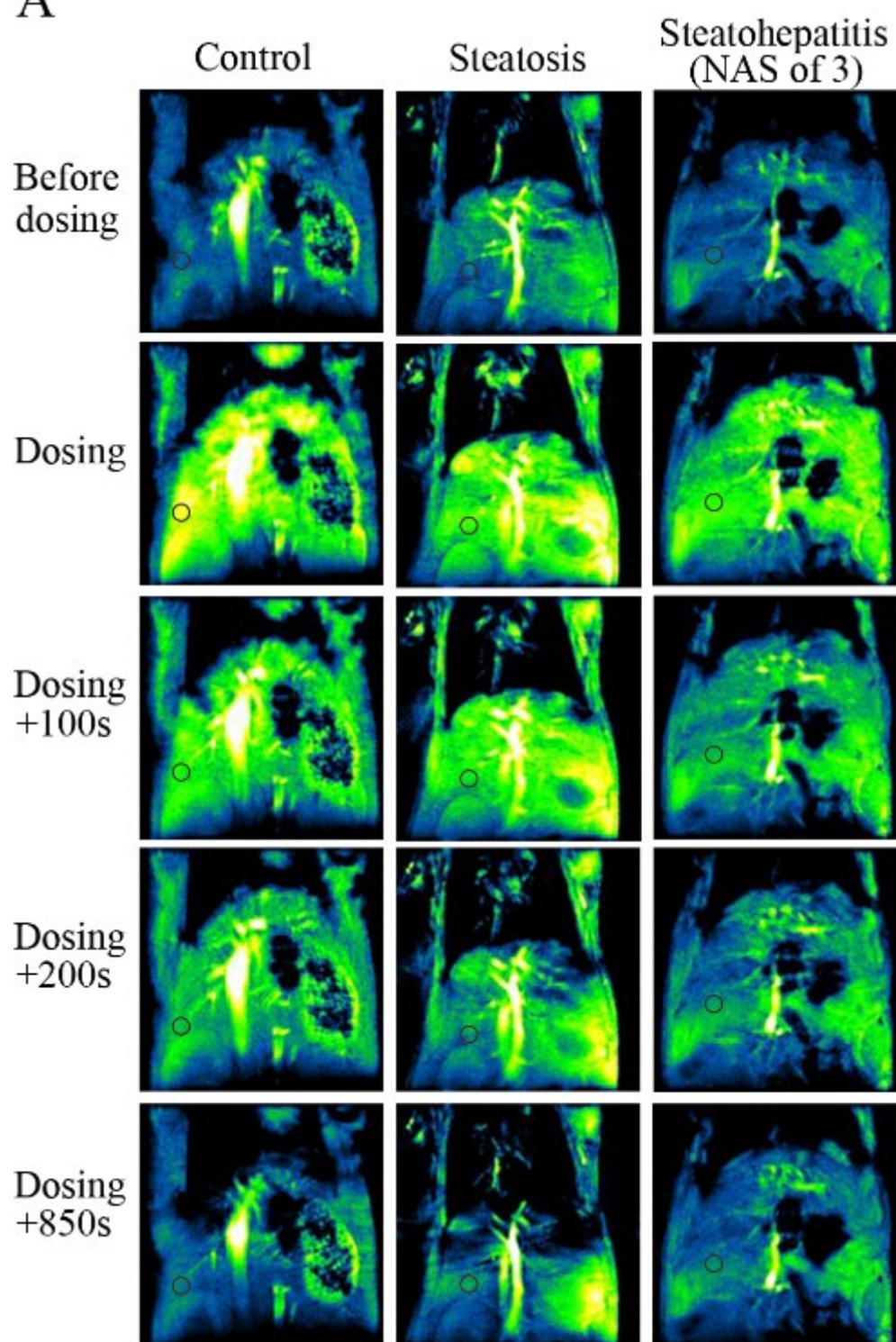
3.5.2.1 MRI 実験

図 3-5A は対照群、脂肪肝群、脂肪肝炎(NAS of 3)群の代表例における、T1 強調画像の信号強度推移を示す。全群において、CmP 投与後の肝臓における信号

強度は、投与直後に高輝度となった後、徐々に減衰し、CmP 投与後 15 分時点では投与前と同等の信号強度となった。また、脂肪肝炎(NAS of 3)の例では、対照及び脂肪肝の例に比べて、肝臓における信号強度が早く減衰することが示された。当該 3 例について、ピクセルごとの reduction rate を算出し画像化したところ、対照群及び脂肪肝群の例に比べて脂肪肝炎(NAS of 3)の例では、肝臓全体の reduction rate が高値であることが示された(図 3-5B)。さらに、当該 3 例の肝臓の ROI における信号強度変化率の時間推移について図 3-5C に示す。Reduction rate に相当する線形回帰直線の傾きは、対照群及び脂肪肝群の例に比べて脂肪肝炎(NAS of 3)の例では、高値であることが示された。

群における統計学的解析を実施したところ、脂肪肝炎(NAS of 3)群の肝臓の reduction rate は他群に比べ有意に高値であった (図 3-5D)。さらに、NAS が 2、3、6 と高値になるにつれ、肝臓における reduction rate は高値傾向を示した。対照群と脂肪肝群、対照群と脂肪肝炎(NAS of 2)群の肝臓における reduction rate に統計学的有意差は認められなかった。

A



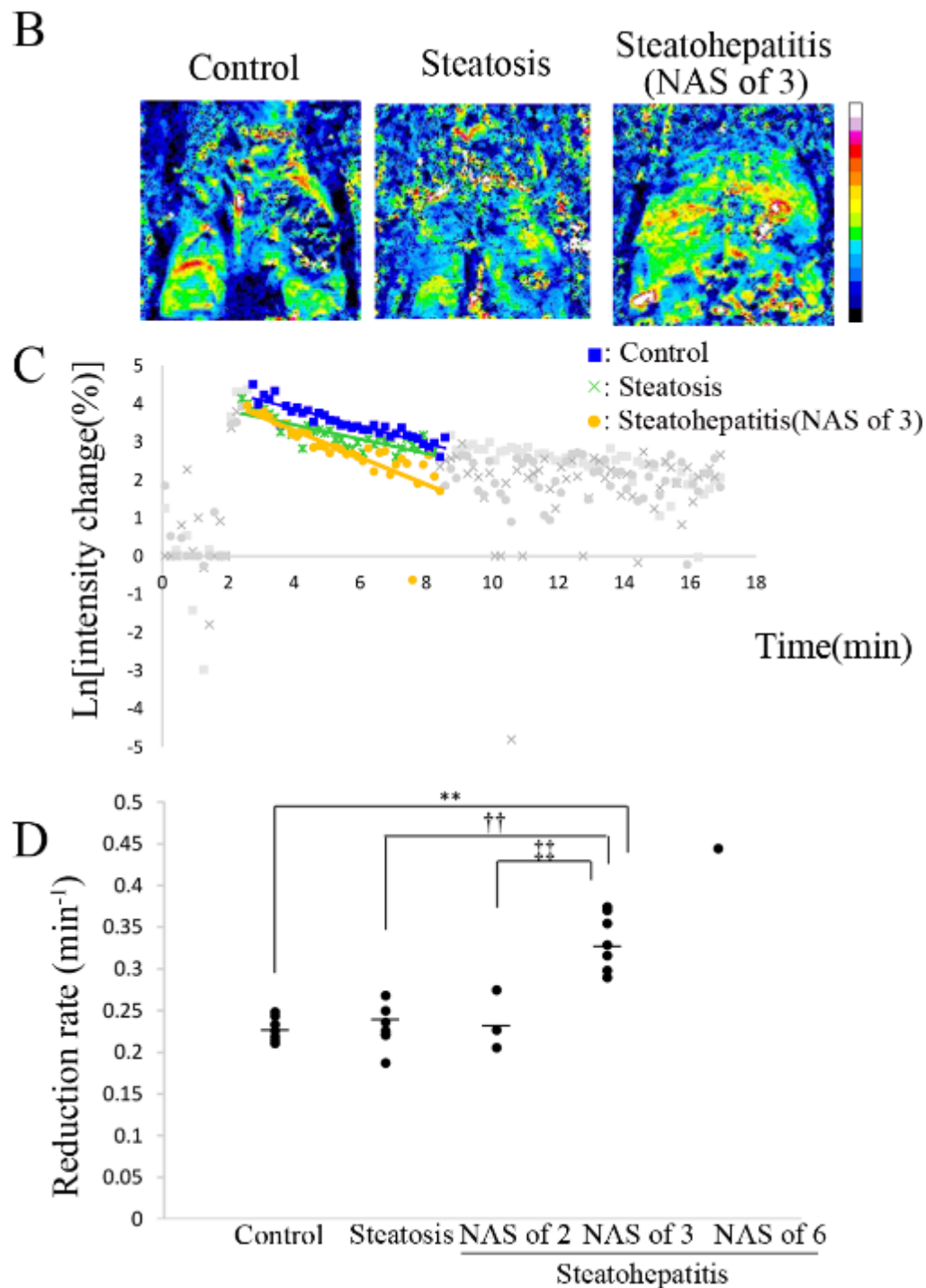


図 3-5 肝臓における CmP 投与後の T1 強調画像及び reduction rate

(A) 典型的な CmP 投与後の T1 強調連続画像。左から、対照群、脂肪肝群、脂肪肝炎(NAS of 3)群の画像を示し、円は ROI を示す。T1 強調画像における肝臓の高信号は、対照群及び脂肪肝群に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群においては早く消失した。(B) 図 3-5A に示した 3 例における、ピクセルごとの reduction rate を表した画像。カラスペクトラムの両端である白と黒はそれぞれ、reduction rate の最

高値と最低値を意味する。脂肪肝炎(NAS of 3)では肝臓全体が概ね黄緑色を呈するが、対照肝臓と脂肪肝では肝臓全体が概ね水色を呈し、肝臓の部位によらず対照肝臓及び脂肪肝に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)は **reduction rate** が高値であることが示唆された。(C) 肝臓における信号強度推移を示したグラフ。四角、クロス、丸のプロットはそれぞれ、対照肝臓、脂肪肝、脂肪肝炎(NAS of 3)の代表例における信号強度変化率の片対数値を示す。**Reduction rate** は線形回帰直線の傾きから得られる。解析に使用したデータ範囲は青、緑、黄色のプロットで示した。対照肝臓及び脂肪肝に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)の傾きは大きく、**reduction rate** が高値であることが示された。(D) 各群における **reduction rate** の個別プロット。対照群及び脂肪肝群に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群 **reduction rate** は統計学的に有意に高値であった。対照群(** $p<0.01$)、脂肪肝群($\dagger\dagger p<0.01$)、あるいは脂肪肝炎(NAS of 2)群($\ddagger\dagger p<0.01$)と比べ、統計学的に有意な差が認められた(Dunnett's test)。バーは平均値を意味する。

また、8 週齢 STAMTM マウスの 1 例は T2 強調画像で局所的な高信号を示した (図 3-6A)。同例の病理組織学的検査では、T2 強調画像の高信号部位は脂肪肝炎 (NAS of 6)、その他の部位は脂肪肝炎(NAS of 3)を示した (図 3-6B, C)。T2 強調画像の局所的な高信号部位における **reduction rate** は他部位に比べ高値であった (図 3-6D)。同例のピクセルごとの **reduction rate** を画像化したところ、T2 強調画像で局所的な高信号部位を示した領域は他部位に比べ、**reduction rate** が高値となる傾向が認められた (図 3-6E)。

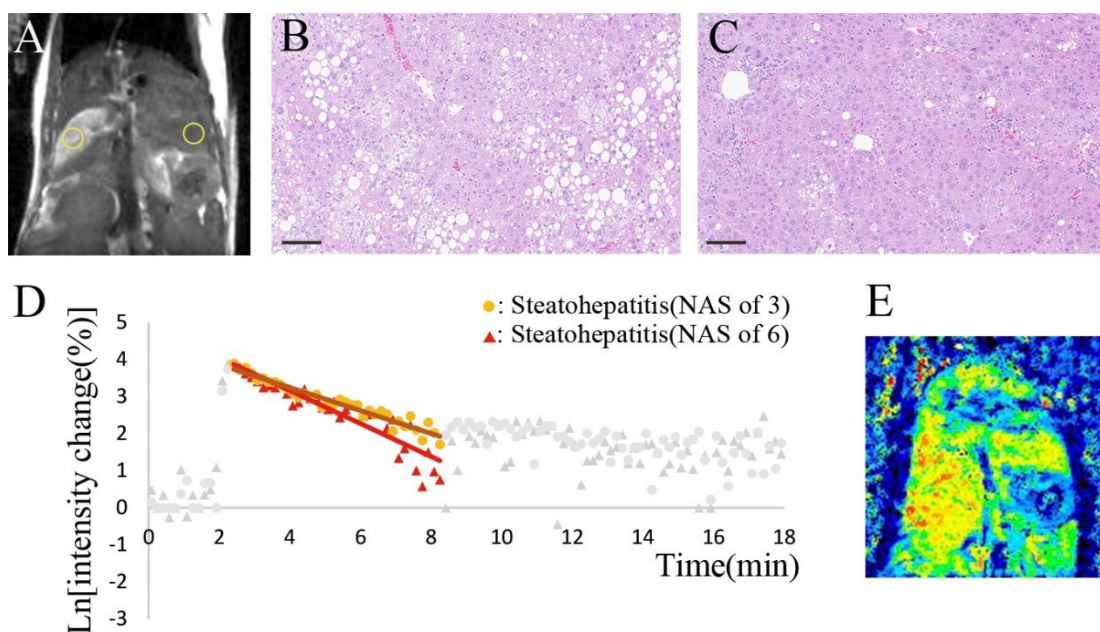


図 3-6 局所的に脂肪肝炎が進行していた STAMTM マウス 1 例における MRI 及び病理組織像

(A) 肝臓の T2 強調画像において、局所的な高信号が認められた。円は ROI を示す。(B, C) T2 強調画像において局所的な高信号を示した部位(B)と同例の他部位(C)の病理組織像。局所的な高信号部位の NAS は 6、他部位の NAS は 3 であった。スケールバー 100 μm 。(D) 肝臓における信号強度推移を示したグラフ。丸と三角のプロットはそれぞれ、脂肪肝炎(NAS of 3)と脂肪肝炎(NAS of 6)における信号強度変化率の片対数値を示す。Reduction rate の解析に使用したデータ範囲は黄色と赤のプロットで示した。脂肪肝炎(NAS of 3)に比べ脂肪肝炎(NAS of 6)における線形回帰直線の傾きの方が大きく、reduction rate が高値であることが示された。(E) ピクセルごとの reduction rate を表した画像。肝臓全体は概ね黄色を呈するが、脂肪肝炎(NAS of 6)付近は橙色を呈し、reduction rate が高値であることが示唆された。

胃における reduction rate について、対照群と他群、あるいは脂肪肝群と脂肪肝炎(NAS of 3)群において統計学的有意差は認められなかった (図 3-7)。

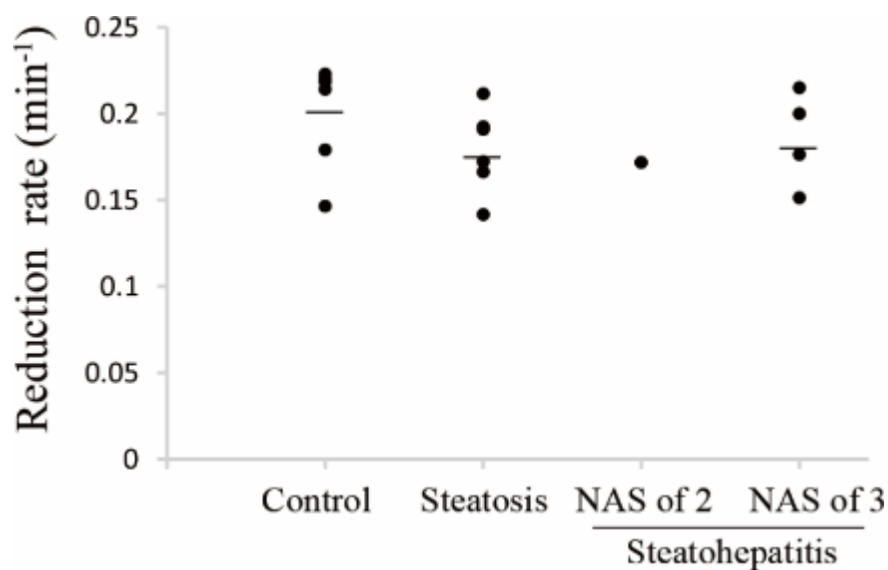


図 3-7 胃における reduction rate

各例の胃における reduction rate のプロット。バーは平均値を意味する。

Gd HP-DO3A による肝臓信号強度変化率の AUC について、対照肝臓、脂肪肝
炎(NAS of 3)、脂肪肝炎(NAS of 6)のいずれの区間も同等であった (図 3-8)。

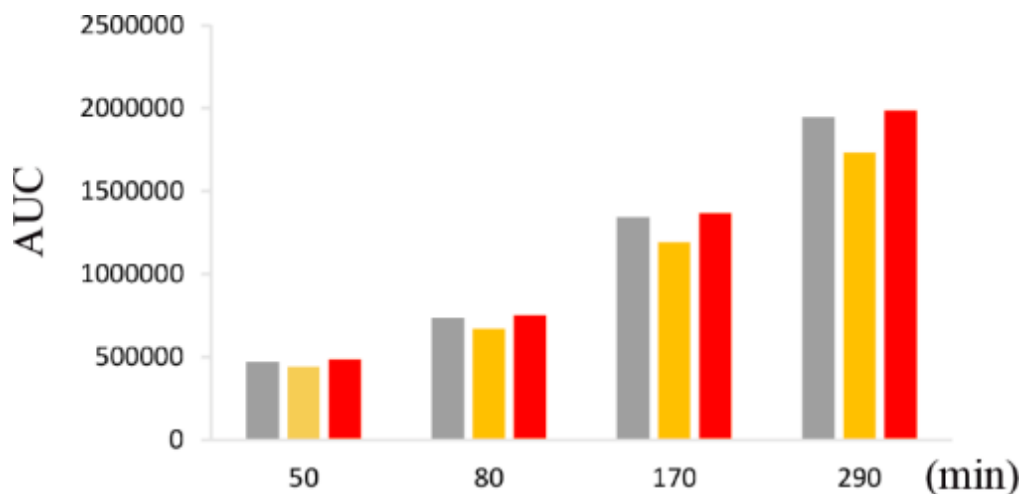


図 3-8 Gd HP-DO3A 投与後の AUC

各区間における正常肝臓、脂肪肝炎(NAS of 3)、脂肪肝炎(NAS of 6)の AUC を、それぞれ灰色、黄色、赤色で示す。いずれの区間においても、各病態の AUC は同等であった。脂肪肝炎(NAS of 3)と脂肪肝炎(NAS of 6)は、図 3-6 で示した例から得られたデータを示す。

3.5.2.2 病理組織学的検査

3.5.2.2.1 HE 染色

MRI 実験を行った 5 週齢の STAMTM マウスにおいて、脂肪肝が 8/13 例、脂肪肝炎(NAS of 2)が 3/13 例、脂肪肝炎(NAS of 3)が 2/13 例に認められた。MRI 実験を行った 8 週齢の STAMTM マウスにおいて、脂肪肝が 1/6 例、脂肪肝炎(NAS of 3)が 4/6 例に認められた。残る 1 例は、3.4.2.1 項に記載の通り、T2 強調画像の高信号部位は脂肪肝炎(NAS of 6)、その他の部位は脂肪肝炎(NAS of 3)を示した。肝細胞の空胞化及び炎症細胞浸潤はすべての脂肪肝炎において認められ、バルーニングは(NAS of ≥ 3)において認められた。脂肪肝炎 5 週齢及び 8 週齢の対照マウスでは、肝臓に病理組織学的異常は認められなかった。肝線維化はいずれの動物においても認められなかった。脂肪肝群、脂肪肝炎(NAS of 2)群、脂肪肝炎(NAS of 3)群、対照群の肝臓における代表的な病理組織像を図 3-9 に示す。また胃について、いずれの動物においても病理組織学的異常は認められなかった。

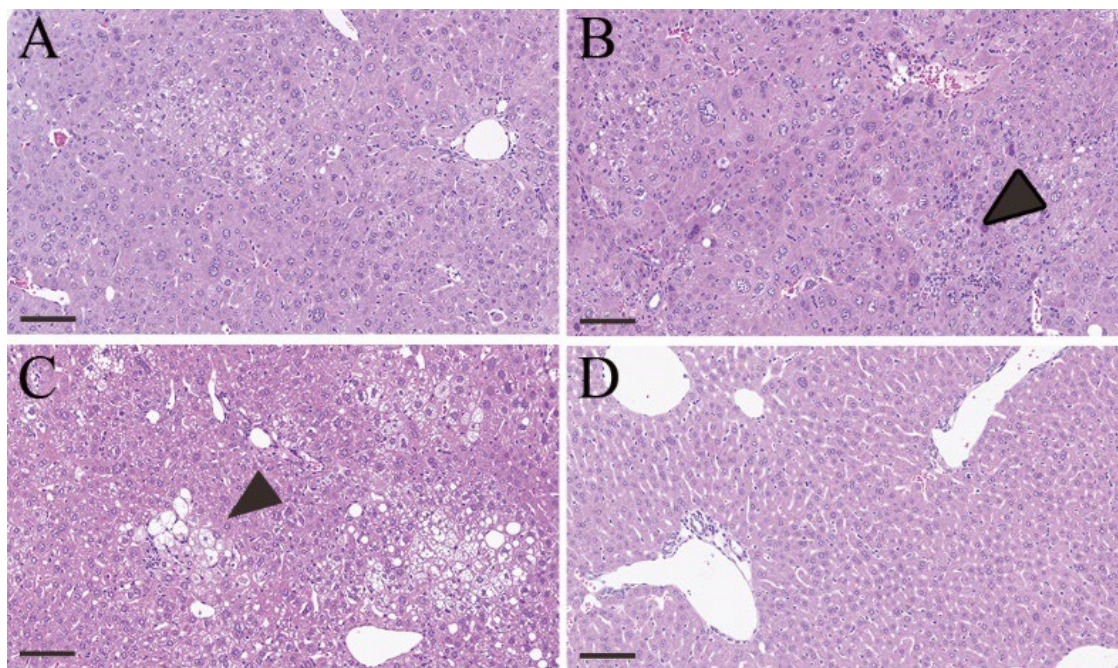
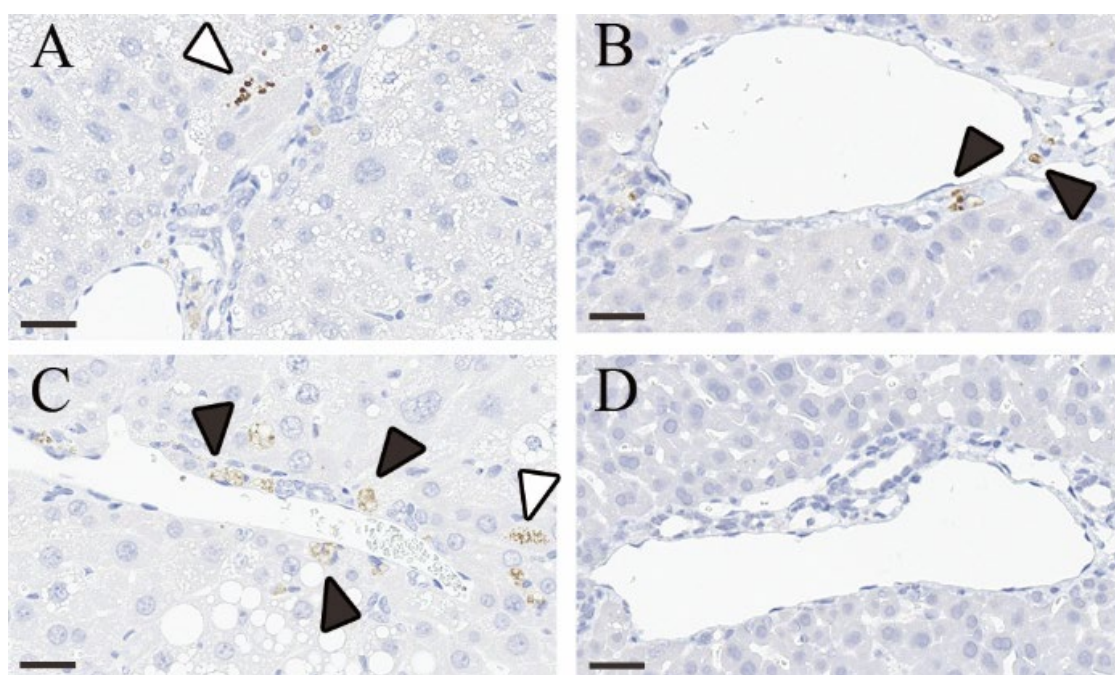


図 3-9 肝臓の病理組織像

(A, B, C, D) 脂肪肝群(A)、脂肪肝炎(NAS of 2)群(B)、脂肪肝炎(NAS of 3)群(C)、対照群(D)の典型的な病理組織像を示す。脂肪肝及び脂肪肝炎群において肝細胞の空胞化が認められた。肝細胞のブルーニング及び/あるいは炎症細胞浸潤を黒矢頭で示す。スケールバー 100 μm 。

3.5.2.2.2 免疫組織化学的染色

脂肪肝群において、4-HNE 陽性像は肝細胞及び/あるいは単核細胞の細胞質内に低頻度で認められた。単核細胞の細胞質内の陽性物質は一部で泡沫状を呈した。脂肪肝炎群において、4-HNE 陽性像は単核細胞の細胞質内に高頻度で、また肝細胞の細胞質内に低頻度で認められた。対照群において、4-HNE 陽性像は認められなかった。脂肪肝群、脂肪肝炎(NAS of 2)群、脂肪肝炎(NAS of 3)群、対照群の肝臓における代表的な 4-HNE に対する免疫組織学的染色像を図 3-10A, B, C, D に示す。4-HNE 免疫組織化学的染色標本を用いた画像解析では、他群に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群において、4-HNE 陽性面積率が有意に高値であった (図 3-10E)。



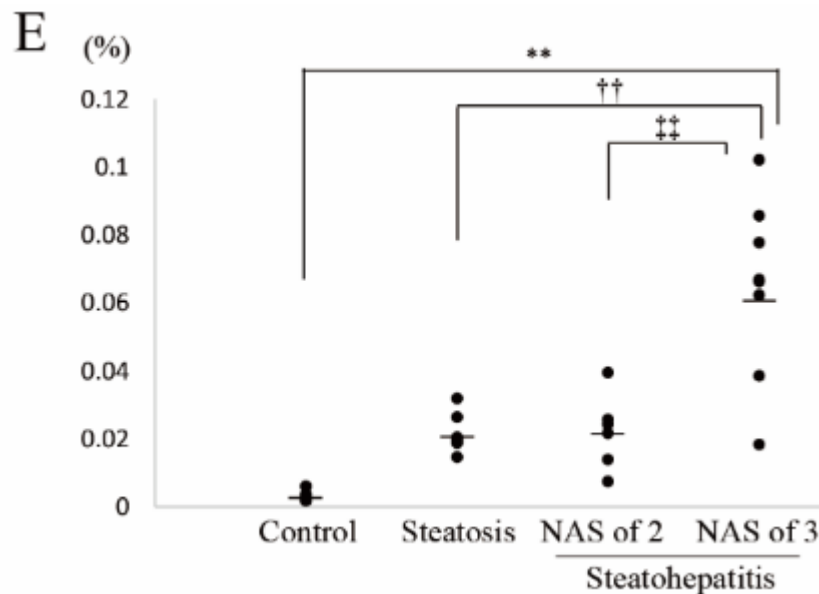


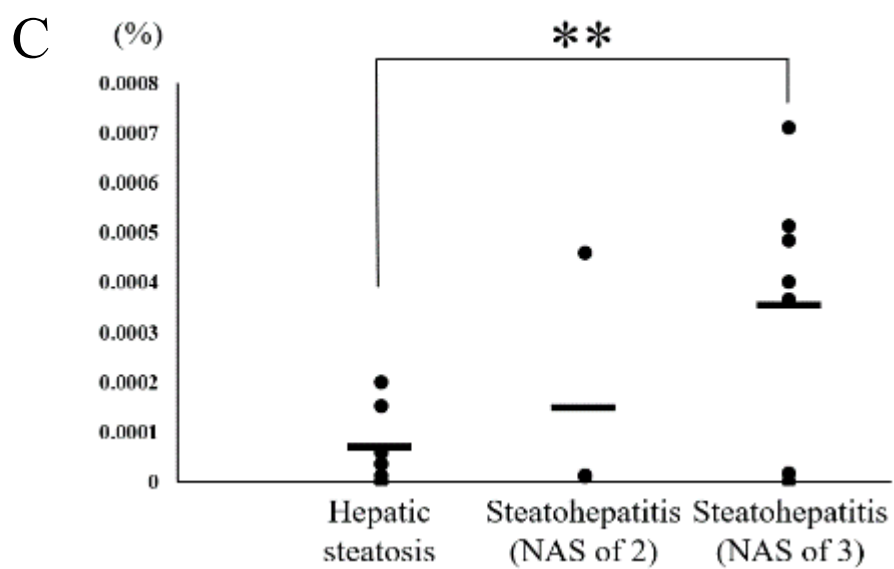
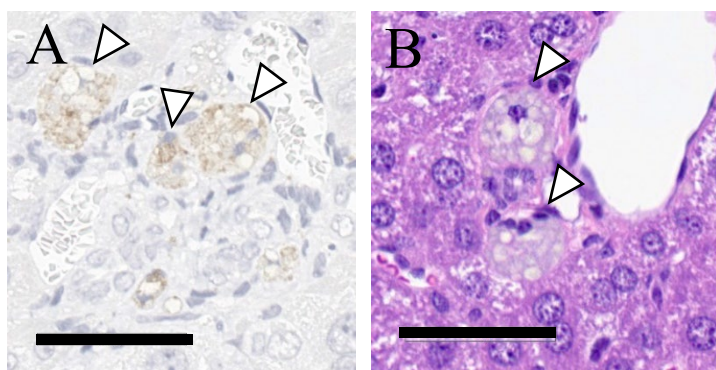
図 3-10 肝臓における 4-HNE に対する免疫組織学的染色像及び解析

(A, B, C, D) 脂肪肝群(A)、脂肪肝炎(NAS of 2)群(B)、脂肪肝炎(NAS of 3)群(C)、対照群(D)の典型的な 4-HNE に対する免疫組織学的染色像を示す。肝細胞の細胞質、単核細胞の細胞質における陽性像をそれぞれ白矢頭、黒矢頭で示す。スケールバー 30 μm 。(E) 各例における 4-HNE 陽性面積率のプロット。対照群(** $p<0.01$)、脂肪肝群(†† $p<0.01$)、あるいは脂肪肝炎(NAS of 2)群(†† $p<0.01$)と比べ、脂肪肝炎(NAS of 3)群の 4-HNE 陽性面積率は統計学的に有意に高値であった(Dunnett's test)。バーは平均値を意味する。

3.5.2.2.3 サブスコアの検証

4-HNE 陽性を示す単核細胞細胞質内の泡沫状物質は、HE 染色標本では好塩基性あるいは褐色を呈することが分かった(図 3-11A, B)。対照群では本物質は認められなかった。Reduction rate を測定した動物において同泡沫物質を容れた単核細胞の面積率を算出したところ、脂肪肝群に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群で有意に高値であった(図 3-11C)。また、NAS のサブスコアとして組み込んだところ、スコアが高値になるにつれ reduction rate の平均値も高値となる傾向が認められた

(図 3-11D)。一方で、個別値としてはスコアと reduction rate に相関が認められない値もあった。



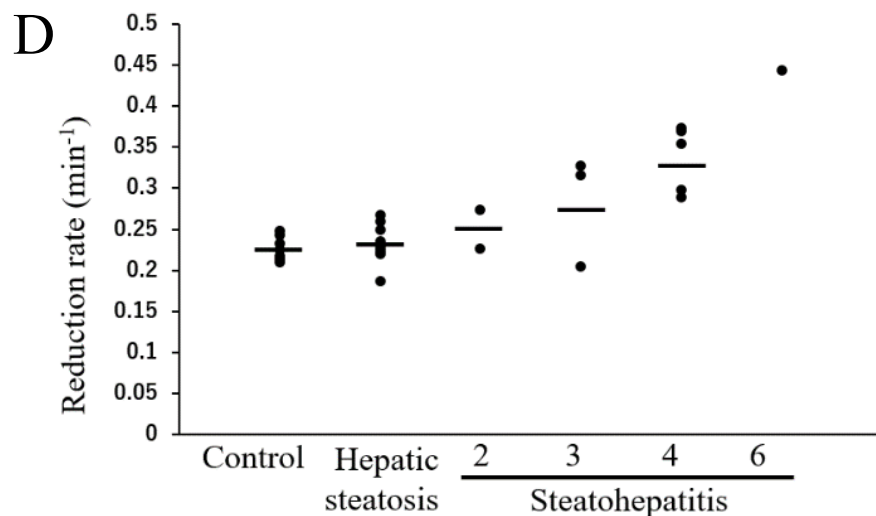


図 3-11 4-HNE 陽性を示す単核細胞細胞質内の泡沫状物質に関する解析

(A) 脂肪肝炎(NAS of 3)群 1 例の 4-HNE に対する免疫組織学的染色像。単核細胞の細胞質内泡沫状物質が陽性を示す(白矢頭)。スケールバー 50 μm 。(B) 図 3-11A と同例の HE 染色像。単核細胞の細胞質内に好塩基性あるいは褐色を呈する泡沫状物質を認める(白矢頭)。スケールバー 50 μm 。(C) Reduction rate を算出した各例における泡沫細胞面積率のプロット。脂肪肝群と比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群の泡沫細胞面積率は統計学的に有意に高値であった(** $p < 0.01$, Dunnett's test)。バーは平均値を意味する。(D) 新たなスコアを元に分類した場合の reduction rate の個別プロット。バーは平均値を意味する。

3.5.3 考察

3.5.3.1 Reduction rate

ピクセルごとの reduction rate を表した画像から、肝臓はびまん性に同様の reduction rate を示すことが明らかとなった。したがって、ROI から算出された reduction rate を各例の代表値として扱うことは適切であると考えた。生体に投与された CmP は少なくとも投与後 30 分間は循環血液中に残存するため(Matsumoto et al., 2004)、reduction rate は血流による組織への CmP の繰り返しの供給、血流による組織からの CmP の繰り返しの排出、組織における酸化還元反応によって決定される。脂肪肝炎(NAS of 3)群の肝臓における reduction rate が他

群に比べ有意に高値であった理由について、血流と酸化還元反応の観点から以下の通り考察した。

胃における reduction rate は、対照群と他群あるいは脂肪肝群と脂肪肝炎(NAS of 3)群において統計学的に有意な違いが認められなかった。また、胃において病理組織学的に異常は認められなかった。酸化還元反応が同等と考えられる胃において reduction rate が同等であったことは、全身血流が対照群、脂肪肝群、脂肪肝炎(NAS of 3)群において同等であることを示唆した。さらに、Gd HP-DO3A による肝臓信号強度変化率の AUC は、対照肝臓、脂肪肝炎(NAS of 3)、脂肪肝炎(NAS of 6)において同等であった。したがって、肝臓内の血流も各病態で同等であることが示唆された。以上より、血流は各群で同等であり、脂肪肝炎(NAS of 3)群の肝臓における reduction rate の有意な高値は酸化還元反応によると考えられた。他群に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群では 4-HNE 陽性面積率が有意に高値であり、脂肪肝炎(NAS of 3)群における ROS 過多が示された。ニトロキシラジカルは ROS によってオキシアンモニウムカチオンに変換されること、また胃潰瘍、敗血症時の頭部、筋炎など ROS 過多の組織では decay rate が高値であることから (Utsumi et al., 2006, Fujii et al., 2013, Eto et al., 2015)、脂肪肝炎(NAS of 3)群における reduction rate の有意な高値は酸化還元反応のなかでも ROS 過多による可能性があると考えられた。したがって、本実験によって初めて、MRI 造影剤として使われた CmP が ROS 過多に基づいて脂肪肝と早期脂肪肝炎を区別できる可能性があることを示した。なお、4-HNE 陽性面積率に統計学的有意差が認められなかった対照群、脂肪肝群、脂肪肝炎(NAS of 2)群は、reduction rate にも統計学的有意差が認められず、reduction rate の違いが ROS 過多によることを裏付けた。ESR、DNP-MRI と異なり、MRI は臨床及び非臨床の両方で普及している。MRI を用いた本実験の方法は臨床及び非臨床で一貫して活用できるため、より

安全性バイオマーカー検出法として適していると考えられた。

1 例の STAM™ マウスは T2 強調画像において局所的な高信号を示した。同部位における reduction rate は同例の他部位に比べ高値であり、脂肪肝の程度も同例の他部位が NAS of 3 であるのに対し NAS of 6 に進行していた。1 例のデータではあるものの、この結果は、本方法が同一個体内の局所的な病態進行を検出できる可能性を有すること、また脂肪肝の程度に合わせて reduction rate が高値になる可能性があることを示唆した。臨床において、局所性の薬剤性脂肪肝及び脂肪肝が報告されている (Calistri et al., 2021, Choi et al., 2011)。したがって、同一個体内の局所的な病態進行を検出できる可能性を持つ本方法は、局所性の薬剤性脂肪肝の発現及び進行のモニターに役立つ可能性がある。また脂肪肝の程度を非侵襲的に把握できることは、予後予測に役立つと考えられた。

Nakata らは MCDD 誘発性 NASH モデルにおいて、CmP を造影剤として用いた DNP-MRI を行った (Nakata et al., 2017)。本実験と異なり、Nakata らの報告では、対照群に比べ脂肪肝群で、また対照群及び脂肪肝群に比べ脂肪肝群で、reduction rate は有意に低値であった。酸化ストレスは対照群に比べ脂肪肝群で、また脂肪肝群に比べ脂肪肝群で有意に増加していた。Reduction rate が低値であったことについて、Nakata らは ROS 過多によって産生された脂質過酸化物質によってミトコンドリア呼吸鎖複合体IVが阻害されたことが関与すると考察している。したがって、脂肪肝を誘発するメカニズムの違いによって酸化還元バランスが ROS 過多によって影響されるか、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVによって影響されるかが異なり、この違いが reduction rate の違いとして反映される可能性があると考えられた。脂肪肝を誘発するメカニズムが何であれ脂肪肝と脂肪肝で酸化還元バランスの崩れ方が異なり、reduction rate の有意な違いとして検出できることは同じである。医薬品開発では臨床試験に先立って非臨床試

験を実施するため、非臨床試験において reduction rate の変化方向を確認しておくことで、臨床試験における変化方向を予測できると考えられた。

3.5.3.2 免疫組織化学的染色

免疫組織化学的染色では、脂肪肝及び脂肪肝炎群において 4-HNE 陽性像は肝細胞及び/あるいは単核細胞の細胞質内に認められた。免疫組織化学的染色標本を用いた画像解析では、他群に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群において、4-HNE 陽性面積率が有意に高値であった。これは、脂肪肝炎(NAS of 3)を呈した STAMTM マウスにおいて ROS 産生が過多であることを示した。脂肪肝炎を呈した 12 週齢の STAMTM マウスにおいて ROS 過多であることは既に報告されている(Ishikawa et al., 2014)。しかしながら、脂肪肝炎(NAS of 3)を呈した 5 及び 8 週齢の STAMTM マウスにおいても ROS 過多であることは、本実験において初めて示された。STAMTM マウスと同様の 4-HNE 陽性像は、脂肪肝及び NASH 患者の肝細胞、また NASH 患者の類洞細胞においても認められており(Seki et al., 2002, Podszun et al., 2020)、少なくとも 4-HNE の沈着において、STAMTM マウスはヒトの脂肪肝及び脂肪肝炎と類似している可能性が示唆された。STAMTM マウスは薬剤性脂肪肝炎モデルではないが、STAMTM マウスと薬剤性脂肪肝炎モデルの両方で ROS 過多であることは共通であり(Lu et al., 2019, Abo-Haded et al., 2017)、本実験の結果は薬剤性脂肪肝炎に外挿できることが示唆された。

Reduction rate を算出した例の HE 染色標本において、泡沫細胞面積率は脂肪肝群に比べ脂肪肝炎(NAS of 3)群で有意に高値であった。4-HNE に対する免疫組織化学的染色において泡沫細胞は陽性を示したため、reduction rate を算出した脂肪肝炎(NAS of 3)群においても ROS 過多であった可能性が示唆された。泡沫細胞面積率をサブスコアに組み込んだ結果、スコアが高値になるにしたがって

reduction rate も高値になる傾向が認められた。しかし個別値では相関が得られない値もあり、サブスコアに組み込むことは有用でないと考えた。泡沫細胞は形態からマクロファージあるいはクッパー細胞が脂質を貪食した像であることが示唆される。4-HNE の解毒に必要なグルタチオンは肝細胞内に比べクッパー細胞内の方が少ないため、クッパー細胞は酸化ストレスによるグルタチオン枯渇の影響を受けやすいことが報告されている (Luckey et al., 2001)。また、脂質を含むクッパー細胞は炎症誘発性の表現型であることも知られる (Leroux et al., 2012)。したがって、4-HNE 陽性泡沫細胞面積率の高値は ROS 過多及び炎症誘発を示唆することが考えられた。

3.5.3.3 MRI を用いた NASH バイオマーカー検出に関する既報との比較

薬剤性脂肪肝及び脂肪肝炎と、NAFLD/NASH は異なる疾患群である。しかし、病理組織学的特徴や臨床学的特徴がいくつか共通しているため、バイオマーカーも共通する可能性があることが示唆されている (Pavlik et al., 2019)。MRI を用いた NASH と脂肪肝の区別については、いくつか報告がある。例えば、¹H-MRS によって測定された炎症の嫌気性条件下で産生された肝臓中代謝物濃度は、ヒト及びマウスにおいて、脂肪肝(NAS of <5)に比べ NASH(NAS of ≥5)において高値であること (Kim et al., 2017)、また NASH 患者におけるクッパー細胞の食作用機能不全を反映し、脂肪肝患者(NAS of ≥5)及び健常人に比べ NASH(NAS of <5)患者において、肝臓における微小超常磁性酸化鉄粒子 (ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles; USPIO) の取り込みが減少していることなどが報告されている (Smits et al., 2016)。こうした既報と比べ本方法は、ROS 過多及びより早期の脂肪肝炎の検出に着目している点が異なる。脂肪肝炎を誘発する薬剤の多くは、ROS 過多につながるミトコンドリア障害を副作用として有す

ることが報告されている(Schumacher et al. 2015)。また、脂肪肝炎(NAS of 3)は NASH(NAS of ≥ 5)に至る前の早期病変であり、早期の薬剤性脂肪肝炎は多くの場合休薬により回復する (Ramachandran et al., 2009)。したがって、ROS 過多に着目し早期脂肪肝炎を検出できる可能性を有する本方法は、薬剤性脂肪肝炎の検出に適していると考えられた。さらに、病理組織学的に異常がない胃における reduction rate は各群で同等であったことは、本方法が ROS 過多となった臓器を特異的に検出できる手法であることも示した。

3.5.3.4 結論

CmP を MRI 造影剤として用いることで、ROS 過多に基づき、脂肪肝あるいは正常肝臓と早期脂肪肝炎を非侵襲的かつ臓器特異的に区別できる可能性があることを初めて示した。薬剤性脂肪肝炎の発症にはミトコンドリア機能障害が重要な役割を担うと考えられており、ミトコンドリア障害は ROS 過多を誘発しうる。また、薬剤性脂肪肝や早期の薬剤性脂肪肝炎は多くの場合休薬により回復するが、薬剤性脂肪肝炎における炎症が慢性化すると肝線維化、肝硬変、ひいては肝細胞癌に進展するリスクがある。したがって、ROS 過多に基づき早期脂肪肝炎を検出できる可能性がある本方法は薬剤性脂肪肝炎の安全性バイオマーカー検出法として有用である可能性が示唆された。

3.5 引用文献

1. Abo-Haded HM, Elkablawy MA, Al-Johani Z, Al-Ahmadi O, El-Agamy DS. 2017. Hepatoprotective effect of sitagliptin against methotrexate induced liver toxicity. PLoS One. 12(3):e0174295.
2. Assayag M, Goldstein S, Samuni A, Berkman N. 2021. 3-Carbamoyl-proxyl

- nitroxide radicals attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Free Radic Biol Med*. 171:135-142.
3. Calistri L., Rastrelli V., Nardi C., Maraghelli D., Vidali S., Pietragalla M., Colagrande S. 2021. Imaging of the chemotherapy-induced hepatic damage: Yellow liver, blue liver, and pseudocirrhosis. *World J Gastroenterol*. 27(46):7866-7893.
 4. Choi JS, Kim MJ. 2011. Education and imaging: hepatobiliary and pancreatic: focal steatohepatitis mimicking a metastasis. *J Gastroenterol Hepatol*. 26(2):415.
 5. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C; European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 21(1):15-23.
 6. Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Negro A, Herrera G, Castell JV, O'Connor JE, Gómez-Lechón MJ. 2009. Cytometric analysis for drug-induced steatosis in HepG2 cells. *Chem Biol Interact*. 181(3):417-423.
 7. Duvigneau JC, Luís A, Gorman AM, Samali A, Kaltenecker D, Moriggl R, Kozlov AV. 2019. Crosstalk between inflammatory mediators and endoplasmic reticulum stress in liver diseases. *Cytokine*. 124:154577. Liu B, Ding C, Tang W, Zhang C, Gu Y, Wang Z, Yu T, Li Z. 2022. Hepatic ROS Mediated Macrophage Activation Is Responsible for Irinotecan Induced Liver Injury. *Cells*. 11(23):3791.
 8. Eguchi A, Yoshitomi T, Lazic M, Johnson CD, Vong LB, Wree A, Povero D, Papouchado BG, Nagasaki Y, Feldstein AE. 2015. Redox nanoparticles as a novel treatment approach for inflammation and fibrosis associated with nonalcoholic steatohepatitis. *Nanomedicine (Lond)*. 10(17):2697-2708.

9. Eto H, Hyodo F, Kosem N, Kobayashi R, Yasukawa K, Nakao M, Kiniwa M, Utsumi H. 2015. Redox imaging of skeletal muscle using in vivo DNP-MRI and its application to an animal model of local inflammation. *Free Radic Biol Med.* 89:1097-1104.
10. Fujii HG., Sato-akaba H., Emoto MC., Itoh K, Ishihara Y., Hirata H. 2013. Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging.* 31(1):130-138.
11. Hirayama A, Yoh K, Nagase S, Ueda A, Itoh K, Morito N, Hirayama K, Takahashi S, Yamamoto M, Koyama A. 2003. EPR imaging of reducing activity in Nrf2 transcriptional factor-deficient mice. *Free Radic Biol Med.* 34(10):1236-1242.
12. Hyodo F, Matsumoto K, Matsumoto A, Mitchell JB, Krishna MC. 2006. Probing the intracellular redox status of tumors with magnetic resonance imaging and redox-sensitive contrast agents. *Cancer Res.* 66(20):9921-9928.
13. Ishikawa H., Takaki A., Tsuzaki R., Yasunaka T., Koike K., Shimomura Y., Seki H., Matsushita H., Miyake Y., Ikeda F., Shiraha H., Nouse K., Yamamoto K. 2014. L-Carnitine prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis in a mouse model with upregulation of mitochondrial pathway. *PLoS One.* 9(7):e100627.
14. Iwamoto S., Kai W., Isogai T., Saito T., Isogai A., Iwata T. 2010. Comparison study of TEMPO-analogous compounds on oxidation efficiency of wood cellulose for preparation of cellulose nanofibrils. *Polym. Degrad. Stab.* 95:1394-1398.
15. Kim TH., Jun HY., Kim KJ., Lee YH., Lee MS., Choi KH., Yun KJ., Jeong YY., Jun CH., Cho EY., Yoon KH. 2017. Hepatic alanine differentiates nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in human and mice: a proton MR spectroscopy study with ling echo time. *J Magn Reson Imaging.* 46(5):1298-1310.

16. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, Naveau S, Prévot S, Makhzami S, Perlemuter G, Cassard-Doulcier AM. 2012. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol.* 57(1):141-149.
17. Liu B, Ding C, Tang W, Zhang C, Gu Y, Wang Z, Yu T, Li Z. 2022. Hepatic ROS Mediated Macrophage Activation Is Responsible for Irinotecan Induced Liver Injury. *Cells.* 11(23):3791.
18. Lu Y, Lin Y, Huang X, Wu S, Wei J, Yang C. 2019. Oxaliplatin aggravates hepatic oxidative stress, inflammation and fibrosis in a non-alcoholic fatty liver disease mouse model. *Int J Mol Med.* 43(6):2398-2408.
19. Luckey SW, Petersen DR. Metabolism of 4-hydroxynonenal by rat Kupffer cells. 2001. *Arch Biochem Biophys.* 389(1):77-83.
20. Ma Y, Lee G, Heo SY, Roh YS. 2021. Oxidative Stress Is a Key Modulator in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Antioxidants (Basel).* 11(1):91.
21. Matsumoto K, Krishna MC, Mitchell JB. 2004. Novel pharmacokinetic measurement using electron paramagnetic resonance spectroscopy and simulation of in vivo decay of various nitroxyl spin probes in mouse blood. *J Pharmacol Exp Ther.* 310(3):1076-1083.
22. Matsumoto K. 2009. Utility decay rates of t(1)-weighted magnetic resonance imaging contrast based on redox-sensitive paramagnetic nitroxyl contrast agents. *Biol Pharm Bull.* 32(4):711-716.
23. Metz JM, Smith D, Mick R, Lustig R, Mitchell J, Cherakuri M, Glatstein E, Hahn SM. 2004. A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 10(19):6411-6417.

24. Nakata R, Hyodo F, Murata M, Eto H, Nakaji T, Kawano T, Narahara S, Yasukawa K, Akahoshi T, Tomikawa M, Hashizume M. 2017. In vivo redox metabolic imaging of mitochondria assesses disease progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 7(1):17170.
25. Overhauser, AW. 1953. Polarization of Nuclei in Metals. *Physical Review*, 92:411-415.
26. Pavlik L., Regev A., Ardayfio PA., Chalasani NP. 2019. Drug-induced steatosis and steatohepatitis: The search for novel serum biomarkers among potential biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Drug Saf.* 42(6):701-711.
27. Pirola CJ, Garaycoechea M, Flichman D, Castaño GO, Sookoian S. 2021. Liver mitochondrial DNA damage and genetic variability of Cytochrome b - a key component of the respirasome - drive the severity of fatty liver disease. *J Intern Med.* 289(1):84-96.
28. Ramos-Tovar E, Muriel P. 2020. Molecular Mechanisms That Link Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis in the Liver. *Antioxidants (Basel).* 9(12):1279.
29. Rose A. 1948. The sensitivity performance of the human eye on an absolute scale. *J Opt Soc Am.* 38:196-208.
30. Schumacher JD, Guo GL. Mechanistic review of drug-induced steatohepatitis. 2015. *Toxicol Appl Pharmacol.* 289(1):40-47.
31. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. 2002. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol.* 37(1):56-62.
32. Smits LP, Coolen BF, Panno MD, Runge JH, Nijhof WH, Verheij J, Nieuwdorp M,

- Stoker J, Beuers UH, Nederveen AJ, Stroes ES. 2016. Noninvasive differentiation between hepatic steatosis and steatohepatitis with MR imaging enhanced with USPIOs in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a proof of concept study. *Radiology*. 278(3):782-791.
33. Soule BP., Hyodo F., Matsumoto K., Simone NL., Cook JA., Krishna MC., Mitchell JB. 2007 The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med*. 42(11):1632-1650.
34. Uchida T., Togashi H., Kuroda Y., Haga K., Sadahiro M., Kayama T. 2018. In vivo visualization of redox status by high-resolution whole body magnetic resonance imaging using nitroxide radicals. *J Clin Biochem Nutr*. 63(3):192-196.
35. Utsumi H., Yasukawa K., Soeda T., Yamada K., Shigemi R., Yao T., Tsuneyoshi M. 2006. Noninvasive mapping of reactive oxygen species by in vivo electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 317(1):228-235.

第四章：総括

本研究では、MRI を用いた脂肪肝及び早期の脂肪肝の安全性バイオマーカーの確立を目指し、以下の知見を得た。

1. ^1H -MRS 検査値は非びまん性脂肪肝の病理組織学的定量値と相関するが、血液生化学検査値は相関しないことを初めて示した。既報より、 ^1H -MRS 検査値はびまん性脂肪肝の病理組織学的定量値とも相関することが示されている。したがって、薬剤性脂肪肝で認められるびまん性及び非びまん性脂肪肝の両方を正確に定量評価できることが示唆される ^1H -MRS は、血液検査よりも有用な安全性バイオマーカー検出法である可能性が示唆された。

2. CmP を MRI 造影剤として用いることで、ROS 過多に基づき、脂肪肝あるいは正常肝臓と早期脂肪肝を非侵襲的かつ臓器特異的に区別できる可能性があることを初めて示した。薬剤性脂肪肝の発症にはミトコンドリア機能障害が重要な役割を担うと考えられており、ミトコンドリア障害は ROS 過多を誘発しうる。また、薬剤性脂肪肝や早期の薬剤性脂肪肝は多くの場合休薬により回復するが、薬剤性脂肪肝における炎症が慢性化すると肝線維化、肝硬変、ひいては肝細胞癌に進展するリスクがある。したがって、ROS 過多に基づき早期脂肪肝を検出できる可能性がある本方法は薬剤性脂肪肝の安全性バイオマーカー検出法として有用である可能性が示唆された。

安全性バイオマーカー検出法は、臨床及び非臨床で一貫して使用できること、侵襲性が低いこと、早期病変を検出できることが求められる。MRI が臨床及び非臨床で一貫して使用でき、侵襲性が低く、びまん性脂肪肝の早期病変を検出で

きる手法であることは既知の通りである。さらに本研究において、MRI は血液検査では検出し難い非びまん性脂肪肝を検出できること、また ROS 過多に基づいて早期脂肪肝炎を検出できる可能性があることが初めて明らかとなった。MRI は、薬力学応答バイオマーカー検出法としては広く活用されているが、安全性バイオマーカー検出法としての活用は未だ限定的である。本研究が一つのきっかけとなり、今後安全性分野において MRI の活用が進むことを期待する。

業績

[Academic paper]

1. Yoshino Y, Fujii Y, Chihara K, Nakae A, Enmi JI, Yoshioka Y, Miyawaki I. 2023. Comparison of ¹H-magnetic resonance spectroscopy and blood biochemistry as methods for monitoring non-diffuse hepatic steatosis in a rat model. *Toxicol Rep.* 10:481-486.
2. Yoshino Y, Fujii Y, Chihara K, Nakae A, Enmi JI, Yoshioka Y, Miyawaki I. 2023. Non-invasive differentiation of hepatic steatosis and steatohepatitis in a mouse model using nitroxyl radical as an MRI-contrast agent. *Toxicol Rep.* 12:1-9.
3. Yoshino Y, Chambers JK, Nakamori T, Goto-Koshino Y, Nishigaki K, Tsujimoto H, Matsuki N, Nakayama H, Uchida K. 2017. Primary cerebellar lymphoma with Hodgkin lymphoma-like morphology in a cat. *J Vet Diagn Invest.* 29(5):707-710.
4. Ano Y, Yoshino Y, Uchida K, Nakayama H. 2019. Preventive Effects of Tryptophan-Methionine Dipeptide on Neural Inflammation and Alzheimer's Pathology. *Int J Mol Sci.* 20(13):3206.
5. Ano Y, Yoshino Y, Kutsukake T, Ohya R, Fukuda T, Uchida K, Takashima A, Nakayama H. 2019. Tryptophan-related dipeptides in fermented dairy products suppress microglial activation and prevent cognitive decline. *Aging (Albany NY).* 11(10):2949-2967.
6. Chambers JK, Yoshino Y, Fujiwara R, Nishimura R, Nakayama H, Uchida K. 2016. Thymic Carcinoma with Cartilage Formation in a Dog. *J Comp Pathol.* 154(1):38-41.
7. Fujii Y, Yoshino Y, Chihara K, Nakae A, Enmi JI, Yoshioka Y, Miyawaki I. 2022. Detection of fenoldopam-induced arteritis in rats using *ex vivo* / *in vivo* MRI. *Toxicol*

Rep. 9:1595-1602.

8. Fujii Y, Yoshino Y, Chihara K, Nakae A, Enmi JI, Yoshioka Y, Miyawaki I. 2023. Evaluation of *in vivo* MRI for detecting midodrine-induced arteritis in rats. Toxicol Rep. 10:97-103.
9. Tochitani T, Kouchi M, Fuji Y, Yoshino Y, Matsumoto I. 2020. Spontaneous membranoproliferative glomerulonephritis in a young Crl:CD-1(ICR) mouse. J Toxicol Pathol. 33(3):177-181.

[Domestic conference]

1. ○吉野有香, 藤井雄太, 吉沢佑基, 上松泰明, 中江文, 圓見純一郎, 吉岡芳親, 宮脇出, 「11.7T ¹H-Magnetic Resonance Spectroscopy を用いた脂肪肝モデルラットにおける肝脂肪蓄積量の定量」第46回日本毒性学会, 徳島, 2019年6月.
(ポスター発表)
2. ○吉野有香, 藤井雄太, 千原和弘, 中江文, 圓見純一郎, 吉岡芳親, 宮脇出, 「Examination of progression to mice steatohepatitis focusing on the detection of reactive oxygen species using MRI」第49回日本毒性学会, 北海道, 2022年6月.
(ポスター発表)

[Award]

1. 優秀研究発表賞, 第46回日本毒性学会, 徳島, 2019年6月.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました八木健先生及び吉岡芳親先生に謹んで感謝いたします。

また、実験及び解析手技のご指導と多くの貴重なご助言を賜りました、圓見純一郎先生に心より感謝申し上げます。

さらに、本研究の機会を与えて頂き、多くの貴重な議論や助言、時に励ましのお言葉をいただいた住友ファーマ株式会社 宮脇出博士、千原和弘博士、上松泰明博士に深く感謝いたします。

最後に、研究の遂行を常に支援してくれた家族に、感謝申し上げます。