

論文の内容の要旨

論文題目

クッパー細胞の鉄排出機能を画像化する新しい MRI 診断法の開発

—塩化ガドリニウム投与ラットおよび X 線照射ラットにおける

SPIO 造影 MRI での肝信号回復遅延—

氏名 古田 寿宏

<序文>

肝癌に対する治療法は、手術、ラジオ波焼灼療法、肝動脈化学塞栓療法、放射線治療、など様々あるが、いずれの治療法にも肝機能を温存しながら癌を制御することが求められる。肝癌症例の多くが肝硬変を伴い、肝予備能が低いためである。肝癌治療では癌組織の存在範囲よりも広く治療域を設定し、再発のリスクを抑える。その結果生ずる非癌部肝実質の損傷範囲を治療マージンと呼び、治療マージンを極小とすることが理想である。

MRI をはじめとする画像検査は、肝癌の存在範囲を正確に診断する技術としての有用性が確立している。一方で、治療マージンを診断する技術は未確立であるが、先行研究により、ラジオ波焼灼療法では酸化鉄を含んだ造影剤の洗い出し速度に着目した肝癌の治療マージン描出の可能性が示された。その知見を応用し、肝癌に対して局所再発のない十分な放射線治療マージンが得られているかインビボ・イメージングを用いて正確に判定するため、クッパー細胞の鉄排出機能に着目した新しい MRI 診断法を開発することを目指し、本研究を行った。実験には塩化ガドリニウム ($GdCl_3$) 投与あるいは肝への X 線照射によりクッパー細胞に障害を与えた動物モデルを用い、SPIO (superparamagnetic iron oxide、本研究ではフェルカルボトランを用いた) の肝からの洗い出しが遅延するかどうか、すなわち SPIO 造影 MRI において一旦低下した肝信号の回復が遅延するかどうかを確かめ、その原因を調べるため組織学的検討を加えた。

<塩化ガドリニウム投与ラット肝での実験的検討 A>

【方法】

15匹のラットに0 (Control群)、0.9–7.5 (計4群) mg/kg体重のGdCl₃を静注した。GdCl₃の投与1日後に、8 μmol iron/kg体重のSPIOを静注し、SPIOの投与前後に肝MRIを行った。1、2、3、4週後にSPIOの追加投与なしにMRIを行った。SPIOを投与せずGdCl₃のみ単回投与する群(6匹)を別に設定し、同様にMRIを4週後まで行った。これら21匹のラットから、4週後のMRIを施行した後に肝を摘出した。

上記と同様、0–7.5 mg/kg体重のGdCl₃を静注し、1日後に8 μmol iron/kg体重のSPIOを静注した15匹のラットを、SPIOの投与3時間後に肝を摘出した。さらに、7.5 mg/kg体重のGdCl₃を静注した3匹のラットを、1日後にSPIOを投与せず肝を摘出した。

MRIには3.0 Tesla装置を用い、麻酔下にラットを腹臥位で固定し、肝のT₂*強調軸位断像を撮影した。画像解析では肝と傍脊柱筋に関心領域を設け、肝の相対信号値(肝/筋肉信号比)を求めた。摘出した肝から切片を作製し、HE染色、プルシアンブルー染色、抗CD68抗体による免疫染色を行い、顕微鏡像を検討した。各群の各時相における肝相対信号値の差と、組織内の鉄沈着数およびCD68陽性細胞数の各群の差を、それぞれTukey法を用いて検定した。

【結果】

GdCl₃を投与されたラットでは、SPIOにより一旦低下した肝信号の回復が正常と比べて遅延し、SPIO投与1週後から4週後の肝の相対信号値にはGdCl₃の用量依存性を認めた。組織学的検索において、SPIO投与4週後に摘出した肝では、GdCl₃の投与量が多いほど、すなわち肝の相対信号値が低いほど、類洞細胞内や肝細胞内の鉄沈着数が増加した。

<塩化ガドリニウム投与ラット肝での実験的検討 B>

【方法】

15匹のラットに8 μmol iron/kg体重のSPIOを静注し、投与5時間後に肝MRIを行った。SPIOの投与6時間後に0 (Control群)、0.9–7.5 (計4群) mg/kg体重のGdCl₃を静注した。1日後、1週後、2週後、3週後、4週後にSPIOの追加投与なしにMRIを行った。4週後のMRIを施行した後に肝を摘出した。MRI、画像解析、組織学的検索および統計解析を実験的検討Aと同様の方法で行い、さらに、実験的検討AおよびBにおいてSPIO投与4週後にMRIを行い、かつ組織学的検索を行った36匹のラットについて、肝の相対信号値と、類洞細胞内の鉄沈着数、肝細胞内の鉄沈着数、CD68陽性細胞数のそれぞれとの相関を解析した。

【結果】

SPIO の投与後に GdCl₃ を投与した場合でも、SPIO により一旦低下した肝信号の回復が正常と比べて遅延した。この所見は、GdCl₃ の投与量が最も多い群でのみ認めた。実験的検討 A と B を合わせたデータで行った相関分析の結果、肝の相対信号値と類洞細胞内の鉄沈着数、肝の相対信号値と肝細胞内の鉄沈着数との間に相関を認めた。

<放射線照射ラット肝での実験的検討>

【方法】

単回照射実験：8 匹のラットに 20 μmol iron/kg 体重の SPIO を静注し、投与 10 分後に肝 MRI を行った。投与 4 時間後、4 匹ずつ 2 群に分け、後述の方法にて照射を行った。2、4、7 日後に SPIO の追加投与なしに MRI を行った。7 日後の MRI の終了後に肝を摘出した。

分割照射実験：2 匹のラットに 20 μmol iron/kg 体重の SPIO を静注し、投与 10 分後に肝 MRI を行った。投与 4 時間後から、1 回に 4.5 Gy ずつ、計 10 回、後述の方法にて照射を行った。2、4、7、9、11、14 日後に SPIO の追加投与なしに MRI を行った。

放射線照射には 160 kVp の X 線照射装置を用いた。麻酔下にラットを背臥位で固定し、50 Gy (n=4) または 70 Gy (n=4) の単回照射、45 Gy/10 回の分割照射 (n=2) を行った。各ラットとも、右上腹部以外を鉛のシールドで覆った。

MRI には 9.4 Tesla 装置を用い、麻酔下にラットを腹臥位で固定し、肝の T₂*強調軸位断像を撮影した。画像解析では肝と傍脊柱筋に関心領域を設け、照射域と非照射域についてそれぞれ肝の相対信号値 (肝/筋肉信号比) を求めた。摘出した肝から切片を作製し、HE 染色、プルシアンブルー染色、抗 CD68 抗体による免疫染色を行い、顕微鏡像を検討した。照射域と非照射域の各時相における肝相対信号値の差と、組織内の鉄沈着数および CD68 陽性細胞数の照射域と非照射域における差を、それぞれ Tukey 法を用いて検定した。

【結果】

SPIO の投与後に肝への X 線照射を行うと、照射域において、SPIO により一旦低下した肝信号の回復が非照射域と比べて遅延した。MRI の軸位断画像上、X 線が通過したと想定される領域のうち、肝信号の回復が遅延する領域は、肝の辺縁部に目立った。50 Gy と 70 Gy の照射による回復傾向の違いは認めなかった。分割照射実験では、1 例において照射域の信号回復がわずかに遅延した。類洞細胞内の鉄沈着数は、非照射域よりも照射域で多い傾向を示した。GdCl₃ 投与モデルとは異なり、肝細胞内には鉄沈着を認めなかった。

<考察>

GdCl₃、あるいは放射線照射によるクッパー細胞の貪食機能低下を SPIO 造影 MRI で評価した研究はこれまでに多数あるが、本研究はクッパー細胞の貪食機能ではなく、鉄排出機能に着目した点に新規性がある。

GdCl₃ 投与モデルの実験結果により、T₂*強調 MRI 上、先に投与した GdCl₃ の量に依存して、SPIO 投与後に一旦低下した肝信号の回復が遅延することが示された。また、SPIO の投与後に GdCl₃ を投与した場合でも、SPIO により一旦低下した肝信号の回復が正常と比べて遅延した。GdCl₃ が単独で T₂*強調 MRI 信号に影響を与えることも示唆され、GdCl₃ により誘導された鉄沈着の磁化率効果やガドリニウム自体の磁化率効果がその原因と考えられるが、相対信号値として 0.2 程度と影響は少なく、SPIO 投与後に一旦低下した肝信号回復が遅延する現象を完全には説明できない。したがって、肝信号回復の遅延の原因は、SPIO 由来の鉄が肝から洗い出されるメカニズムの障害と考えられる。組織学的検索において鉄沈着が類洞細胞内および肝細胞内に認められ、鉄沈着を伴う類洞細胞はその形態からクッパー細胞と考えられた。クッパー細胞内の鉄沈着のサイズは大きく、相関分析の結果、肝の相対信号値におよぼす鉄沈着 1 個あたりの影響も大きかった。よって、SPIO に由来する鉄の、クッパー細胞からの排出遅延が肝信号回復遅延の最も大きな原因であると推定できる。

X 線照射モデルの実験結果により、SPIO の投与後に照射を行うと、照射域では SPIO により一旦低下した肝信号の回復が正常と比べて遅延することが示された。単回照射実験において SPIO 投与 7 日後の肝組織では、鉄沈着はクッパー細胞内のみ見られ、肝細胞内には見られなかった。照射域と非照射域における信号回復の傾向や SPIO 投与 7 日後の鉄沈着数の差から、照射域における信号回復遅延の原因は、SPIO に由来する鉄の、クッパー細胞からの排出遅延であると推定できる。

X 線照射モデルの実験結果は、生体内での線量分布の検証が必要なことや、MRI 装置の静磁場強度の違いなどの問題があり、直ちに臨床に応用できるわけではない。しかしこの手法を発展させれば、SPIO の単回投与によりクッパー細胞をラベル後、肝癌周囲の非癌部肝実質における鉄の洗い出し速度を MRI によりモニターすることで、肝癌に対して十分な照射範囲が得られたかを治療開始後の早期に判定でき、肝癌の放射線照射治療計画の最適化に貢献できる可能性がある。

<結論>

GdCl₃ 投与あるいは肝への X 線照射により、SPIO 造影 MRI において一旦低下した肝信号の回復が遅延することが示された。その原因は、SPIO に由来する鉄の、クッパー細胞からの排出遅延であると推定できた。