

学位論文審査結果の要旨

氏名	山本 晋
審査委員	主査 松田 正司 副査 渡部 祐司 副査 藤山 泰二 副査 宮川 正男 副査 鵜久森 徹

論文名 二光子励起蛍光(TPEF)による第二次高調波発生(SHG)と自家蛍光を用いた NASH モデルマウスの肝臓の線維性・形態変化の定量的イメージング

審査結果の要旨

本論文は肝線維化とビタミンAの2光子励起顕微鏡によるイメージング定量化技術の開発とNASHモデルマウスを用いたその有用性に関するものである。

【背景】近年、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease）は増加しており、本邦で約1000万人存在するとされる。そのうち約20%が、非アルコール性脂肪肝炎（NASH: nonalcoholic steatohepatitis）を発症し、肝炎および線維化の進行により肝硬変、肝細胞がんを発症する。NASHの診断は、肝の線維化を反映する各種線維化マーカーの測定や血小板数、超音波検査であるフィブロスキャン、エラストグラフィが参考になるが、確定診断には肝生検による肝組織所見が重要である。肝組織におけるNASHの診断は、主に脂肪沈着と肝炎症および肝細胞の変性、肝線維化の評価によって行われる。とりわけNASHと、非NASHである非アルコール性脂肪肝（NAFL: nonalcoholic fatty liver）との鑑別に肝線維化の有無が重要であるが、病理組織を鍍銀染色するなどの特殊染色が必要であり、またその診断において観察者間のバイアスが存在する。そのため正確な診断とその進行度の評価のため、客観的な肝線維化組織画像診断方法の開発が望まれる。

一方、病理組織評価のためのイメージング技術進歩は目覚ましく、特に蛍光イメージングは、高感度・高解像度で生体内分子を特異的に可視化できるため、その有用性が注目されている。中でも、非線形光学を駆使した第二高調波発生（Second harmonic generation : SHG）と自家蛍光（auto-fluorescence : AF）は、無染色で生体内のコラーゲンや分子・細胞を画像化できるために、

その臨床応用が期待されている。

【目的】本研究では、イメージングプロセッシング法と SHG/AF イメージング法を組み合わせた新たな肝組織画像解析法を開発し、NASH の初期病変の診断および進行度の評価におけるその有用性を明らかにすることを目的とする。

【方法】実験には、糖尿病を背景に 7 週齢時に NASH、9 週齢時に肝線維化を生じる雄の NASH モデルマウス (STAM[®]マウス) を用いた。対照群として同週齢の雄の C57BL/ 6J を使用した。6 週齢と 9 週齢で体重測定後に深麻酔下に、下大静脈より脱血し安楽死した。血清を用いて肝機能、総コレステロール、中性脂肪、随時血糖値を測定した。肝臓を摘出し、重量測定後、2 光子励起顕微鏡を用いてイメージングを行った。具体的には、SHG イメージと AF イメージを取得し、最大値投影法 (maximum intensity projection : MIP) 画像を取得し、画像解析ソフト Image J を用いて 2 値化し、定量的画像処理を行った。MIP-SHG 法では SHG シグナルの占める割合を算出し、MIP-AF 法では点状構造の平均サイズを比較検討した。また、肝臓の一部をホルマリン固定し、HE 染色と EMG (Elastica Masson-Goldner) 染色の病理組織学的検討を行った。

【結果】二次元 (2D) の SHG 画像解析を行うと、6 週齢の pre-NASH 病期においては対照群と比較してコラーゲン線維の変化が乏しかったが、9 週齢の典型的な NASH 病期ではコラーゲン線維の走行の乱れが認められた。2D の AF 画像解析を行うと、6 週齢の pre-NASH 病期では大きな点状構造が認められ、それは NASH 病期では顕著であった。三次元 (3D) の SHG/AF 画像解析を行うと、肝被膜におけるコラーゲン線維のネットワーク構造とその内部の AF の点状構造が観察でき、それらは NASH 病期のみならず、pre-NASH 病期においても、対照群と比較して構造的変化を認め、それは病態の進行に応じてより顕著になった。具体的には、SHG によるコラーゲン線維の太さや走行の異常、AF による点状構造の大小不同などの構造的変化が観察された。これらの構造的変化をより定量的に解析するために、イメージングプロセッシング法を駆使した MIP-SHG 法と MIP-AF 法で解析を進めた。MIP-SHG 法では、NASH 病期のみならず、pre-NASH 病期においても、対照群と比較して、3D 画像で観察されたネットワーク構造の異常が、SHG シグナルの占める割合によって評価できた。また、MIP-AF 法でも、NASH 病期のみならず、pre-NASH 病期において、3D 画像で観察された点状構造の大小不同が、構造物の平均サイズによって評価できた。この点状構造は、その波長と局在からビタミン A と推定され、本研究成果は NASH 診断に新たな可能性を見いだすものである。

審査会は平成 28 年 1 月 14 日に開催された。発表後の質疑応答では、本イメージング定量化技術と従来の肝生検との検査方法の違いによる検査精度の差に関する質問が多く出された。サンプルの場所と選び方、画像誤差の可能性、炎症程度の評価、ビタミン A の代謝と臨床的意義、本方法の臨床応用への問題点等多くの質問が出され、申請者はこれらに的確に回答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。