

## 学内グラント 報告書

## 平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

## BOLD MRIを用いた腎機能評価法の確立

研究代表者 井上 勉 (医学部 腎臓内科)

研究分担者 小澤 栄人<sup>1)</sup>, 岡田 浩一<sup>2)</sup>, 竹中 恒夫<sup>2)</sup>, 鈴木 洋通<sup>2)</sup>

## 緒言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) は進行して末期腎不全・透析に至る他に, 心血管病変の強力なリスク因子であることが明らかとなった。CKDの早期発見, 進行予防は, 透析患者数の抑制に留まらず, 心血管病変やその他, 全身の動脈硬化病変の発症予防の観点から急務とされている。我々は以前から慢性腎臓病の最終共通路である尿細管間質病変に注目して研究を続けてきた<sup>1-3)</sup>。尿細管間質病変の形成・進行には種々のサイトカイン, 炎症細胞浸潤, 腎構成細胞の形質変化, 細胞外基質の蓄積などが関与するが, その原因及び結果として虚血・低酸素の関与が想定されている<sup>4,5)</sup>。さらに, 尿細管間質病変の程度は残腎機能を規定するだけでなく, 腎機能予後とも相関が認められる。つまり, 尿細管間質病変や虚血・低酸素状態を評価する事が出来れば, 直接的なCKDの病態評価が可能となり, 加えて腎機能予後を予測可能になると考えられている。我々は, これまでの基礎研究の成果を臨床応用するため, *in situ*かつ非侵襲的に尿細管間質病変や腎虚血を評価する手段の開発を最終目標とし, MRI (magnetic resonance imaging) が使用可能か否か検討している。多くの健常コントロール, CKD患者を対象にした検討結果から, Diffusion-weighted (DW) MRIおよびBlood oxygenation level-dependent (BOLD) MRIが腎臓の病理・生理学的変化を評価しうるfunctional MRIとして応用可能であることが明らかとなった。

## 材料と方法

健常コントロール10名 (男性5名, 女性5名), 当院の腎臓内科および内分泌・糖尿病内科に通院中で, 顕性蛋白尿か腎機能低下が3ヶ月以上継続しCKDと診断された84名 (男性54名, 女性30名) を対象とした。

1) 医学部 放射線科  
2) 医学部 腎臓内科

糖尿病腎症は, 糖尿病が診断されており, かつ顕性蛋白尿を認める事とした。CKDの原疾患は病歴, 血液検査および必要に応じて腎生検を施行して決定した。推定糸球体濾過量 (estimated-glomerular filtration rate: eGFR) は血清クレアチニン値から日本腎臓学会の推奨するMDRD式を用いて計算した。急性腎障害, 閉塞性腎症, 腎血管性高血圧症, ネフローゼ症候群の症例は本研究では対象から除外した。MRIは1.5-T imager (Sonata; Siemens, Erlangen, Germany) と six-channel body coilを用いて撮像した。通常の形態評価のために coronal proton density-weighted half-Fourier single-shot fast spin echo (PDWI), coronal T2-weighted half-Fourier single-shot fast spin-echo sequence (HASTE), coronal T1-weighted fast low-angle shot gradient-echo sequences (T1WI) を用い, 加えてDWI MRIとBOLD MRIを撮像した<sup>6,7)</sup>。画像構成はMRIのコンソールで行い, 計測は画像解析ソフトOsiriXを用いた。測定 (関心) 領域 (region of interest: ROI) は腎皮質とした (ROI: 2.65-12.61 cm<sup>2</sup>; mean 5.56 cm<sup>2</sup>)。皮質髄質境界の判別にはPDWIを, 嚢胞やその他の腎実質病変の有無はHASTEとT1WIで確認した。数値の表記はmean ± SDとし, 2群間の比較にはunpaired t-testを, 多群間の比較にはOne way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey's Honestly Significantly Different (HSD) testを用いた。eGFR, BOLD MRIにおけるT2\*値, DWI MRIにおけるADC (apparent diffusion coefficients) 値は連続変数であり正規分布するものとしてPearson's product moment correlation coefficientを用いて相関を検討した。p < 0.05を統計学的に有意と見なした。すべての統計はJMP ver. 8 (statistics software; JMP Japan, 東京) で処理した。

## 結果

対象症例をtable 1にまとめた。糖尿病腎症は40症例, 非糖尿病腎症は44症例であり性別, 原疾患の内訳は示した通りである。両群の比較では糖尿病腎症群が

有意に高齢で有り, 蛋白尿が多かった. DWI MRIのADC値に関してeGFRとの相関を検討したところ, 糖尿病腎症, 非糖尿病腎症の両群でほぼ同様の値と傾向を示し, eGFRの低下に伴ってADC値も低下する傾向があり, 有意な相関をみとめた (Figure 1a). CKD stage別に比較すると, 糖尿病腎症, 非糖尿病腎症の両群でCKD stage 1, 2の平均は健常コントロールと有意差を認めなかったが, CKD stageが進行する毎にADC値の平均は減少し, CKD stage 4, 5では両群で健常コントロールの平均と比較して有意な減少を認めた (Figure 1b, 1c). 次にBOLD MRIのT2\*値とeGFRの相関を検討した (Figure 2a). 非糖尿病腎症群では, ADC値と同様にeGFRの低下に伴ってT2\*値も減少する傾向があり, 有意な相関を認めた. しかし, 糖尿病腎症群においてはeGFRが低下した症例でもT2\*値が減少していない症例がある一方で, eGFRが保たれているのにT2\*値が減少している症例も有り, eGFRとT2\*値の間に有意な相関を認めなかった (Figure 2a). CKD stage別の検討で, 非糖尿病腎症群においてCKD stage 1, 2ではT2\*値の平均は健常コントロー

ル群と有意差が無かったが, CKDの進行に伴ってT2\*値は減少し, CKD stage 4, 5ではstage 3, stage 1, 2の両群と比較しても有意な減少を認めた (Figure 2b). 糖尿病腎症群では, どのCKD stageにおいてもT2\*値の平均の減少は認められず, 健常コントロールと比較しても有意差が無かった (Figure 2c).

## 考 察

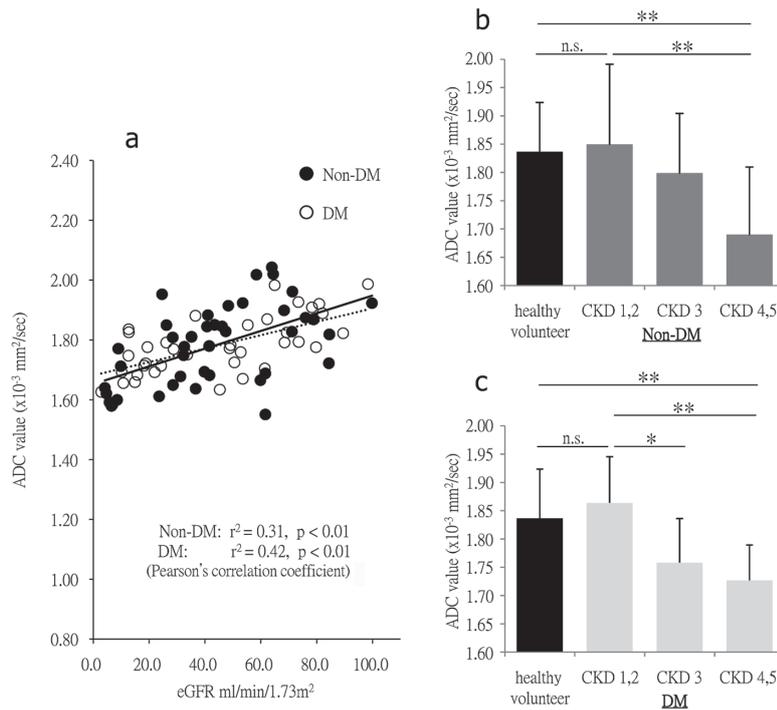
本研究で我々は, eGFRの低下に伴ってDWI MRIのADC値, BOLD MRIのT2\*値が減少し, MRIの測定値が腎機能に有意に相関することを示した. また, 糖尿病腎症と非糖尿病腎症ではeGFRの低下に伴うADC値, T2\*値の変化に差違があり, 両腎症の病態の相違を反映している可能性があった. 測定原理から考察すると, ADC値は腎線維化を, T2\*値は腎虚血を捉えている可能性があり, ヒト生体内の腎臓を*in situ*, 非侵襲的に評価しうる, 謂わば腎のfunctional MRIとして両撮像法が有用である可能性が示された.

糸球体病変の重症度と同様に, 尿細管間質病変の重症度が残腎機能と高い相関を示すことが報告されてか

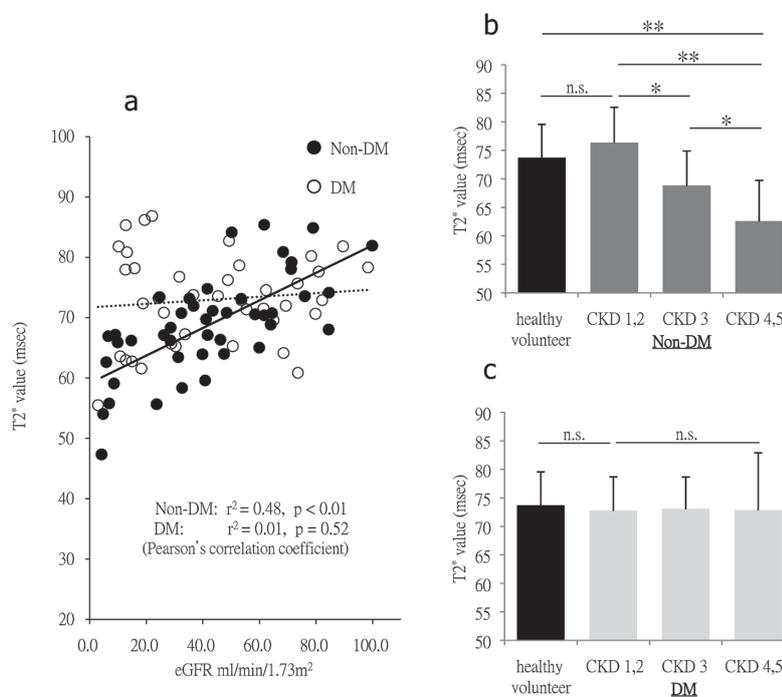
**Table 1.** Comparison of clinical and laboratory data in the non-DM and DM groups

Group	Non-DM (n = 44)	DM (n = 40)	
Sex			
male	23	31	
female	21	9	
Diagnosis			
Diabetic nephropathy		40	
Chronic nephritis	21		
Hypertensive nephrosclerosis	13		
Asymptomatic proteinuria	5		
Vasculitis	5		
Age (year)			
	54.6±15.5	62.0±9.7	p < 0.05
Estimated GFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )			
	42.5±24.9	43.4±26.8	p = 0.875
CKD stage (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )			
Stage 1, 2 (60 ~ )	12	13	
Stage 3 (30 ~ 59)	18	11	
Stage 4, 5 ( ~ 29)	14	16	
Serum Albumin (mg/dl)			
	3.55±0.84	3.54±0.75	p = 0.965
Hemoglobin (g/dl)			
	12.6±2.4	12.7±2.4	p = 0.906
Hemoglobin A1c (%)			
	na	7.35±1.12	
Urinary protein (mg/g ·uCr)			
	1671.9±2094.3	4266.7±3405.2	p < 0.01

Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated renal limited vasculitis is described as "Vasculitis". There were no significant differences between the non-DM and DM groups, except for the extent of proteinuria and age.



**Figure 1.** Relationship of ADC values with kidney function in CKD patients. Closed circles and solid lines depict individual subjects belonging to the non-DM group while regression line, open circles and the broken line depict those in the DM group in the correlation graph (a). Bar graphs show the averages and SD of ADC values represented by the CKD stage in the non-DM (b) and DM (c) groups. The data from healthy volunteers was acquired using the same MRI techniques. n.s.: no significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .



**Figure 2.** Relationship of T2\* values with kidney function in CKD patients. Closed circles and solid lines depict individual subjects belonging to the non-DM group and regression line, open circles and the broken line depict those in the DM group in the correlation graph (a). Bar graphs show the averages and SD of T2\* values represented by the CKD stage in the non-DM (b) and DM (c) groups. The data from healthy volunteers was acquired using the same MRI techniques. n.s.: no significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

ら40年余りが経過した<sup>8)</sup>。さらに、多くの糸球体疾患において、診断時の尿細管間質病変が、引き続く腎機能予後を予見することが種々の臨床研究から明らかとなっている。尿細管間質病変の進行機序には多くの仮説が存在するが、障害された糸球体から濾過される血清蛋白成分やサイトカイン類が、尿細管上皮を刺激・活性化し炎症細胞浸潤を生じる事が、初期の病変形成に重要であると考えられている<sup>1,3,9)</sup>。しかし、多くの糸球体が障害され原尿が減少しても、腎障害の進行速度は遅延するどころか加速する印象さえある。CKDの初期から末期腎不全にいたるまで、CKDの進行に関与しているとされる有力な因子が虚血である<sup>4)</sup>。腎実質の虚血は尿細管間質病変を進行させ、病変の進行は新たな虚血を生み悪循環が形成される。生体内にあるがまま非侵襲的に虚血と線維化の程度が評価できれば、採血では得られない腎機能評価が可能になるばかりか、治療介入による腎機能予後の変化を予測可能となり、新たな腎臓病治療薬の効率的な開発にも有効であると考えた。

*In vivo*で非侵襲的に臓器の虚血を評価する手段は無いに等しい。理論的には酸化、還元ヘモグロビンの物理特性の差を利用すれば、両者の比の変化をモニターすることは可能である。脳神経科学の分野では、古くから脳の機能をMRIで画像化する手法の開発が盛んであり、形態を見る手法と区別してfunctional MRIと呼ばれている。Functional MRIの原理の一つに酸化・還元ヘモグロビンのT1, T2特性の差を利用して、両者の比の変化を評価する方法があり、BOLD MRIと呼ばれている。腎臓においてもBOLD MRIを撮像しながら水負荷を行ったり、利尿薬を投与することで、主に髄質の酸素需要量の変化がBOLD信号の変化として記録されたとする研究結果が複数報告されている<sup>10,11)</sup>。著者らはCKDにおける腎虚血を、同様の方法で評価出来ないか検討した。はじめに健常コントロールおよびCKD患者の、糸球体濾過量(eGFR)とBOLD MRIのT2\*値の相関を見たが、両者には有意な相関が認められなかった。しかしながらCKD患者群の原疾患を糖尿病腎症とそれ以外に分けたところ、非糖尿病腎症群でeGFRの低下に伴うT2\*値の短縮、つまりは虚血状態の進行が明らかとなった。現在、広く臨床で利用されている1.5 Tの機器でもCKD stage 1, 2とstage 4, 5では明らかなBOLD信号の差違を認め、腎実質における酸化・還元ヘモグロビン比の違いを反映していると考えられた。

臓器の線維化を*in vivo*で数値化しようとする試みは、腎臓に限らず多くの臓器、腫瘍の分野で取り組まれている。腎臓に並ぶ代表的な「線維化する臓器」は肝臓である。肝臓は体表面にあり肋間走査で腹壁直下にアプローチできることから、超音波を用いた臓器硬度計が開発されている。Real-time Tissue Elastography

(日立メディコ、日本)は、腹部走査用のリニアプローブに専用の圧迫板を装着し、肝臓を走査しながらプローブを体表に押しつけ、受動的に変形する肝臓の変形率を数値化することで肝線維化を評価する事が可能である。Fibroscan (Echosens, France)も同様に、超音波を用いて肝線維化を評価する。超音波を用いたこれらの装置は、基本的に標的臓器をプローブ直下に捉えることが必要であり、例えば直腸からのアプローチで前立腺を評価したり、体表から乳腺腫瘍を評価することは可能であるが、残念ながら腎臓の評価には不向きである。著者らは、DW MRIを用いて肝硬変の進行度を評価したとする研究報告<sup>12)</sup>を参考に、腎機能とDW MRIで得られる「見かけの(水分子の)拡散係数」= ADC値の相関を検討した。BOLD MRIと異なり原疾患を問わず、eGFRの減少はADC値の低下と有意に相関していた。腎生検は腎機能が正常の症例しか対象にならないため、生検組織における線維化程度とADC値を比較検討することは困難である。しかし、尿細管間質病変の程度は残腎機能に相関すると考えられており、ADC値は尿細管間質病変、すなわち腎線維化程度に相関している可能性がある。

我々の検討結果によれば、糖尿病腎症群においてはT2\*値とeGFRが相関しなかった。糖尿病腎症と、それ以外の腎症における虚血の程度を定量的に比較した研究はこれまでに例が無く、本研究が初めて明らかにした注目すべき結果だと考えている。糖尿病群においてもT2\*値が明らかに短縮している症例もあることや、平均HbA1c値を見ても、高血糖や糖尿病の存在そのものがMRIの検査値に影響しているとは考えにくい。実際、各症例のHbA1cとT2\*値、ADC値は統計学的に有意な相関は認められなかった。一般的に、過去の動物実験や腎生検標本の免疫組織学的検討の結果から、間質線維化に伴う尿細管周囲毛細血管密度の減少が、腎機能や虚血に関与・相関するとされている。しかし、ラット糖尿病モデルでは、尿細管周囲毛細血管密度の減少が明らかでは無い時期から尿細管の虚血が証明されている。つまり、糖尿病腎症では構造的な変化(=線維化や毛細血管の減少)を伴わない機序で虚血が生じている可能性が想定されていたが、本研究は臨床的にその仮説を裏付ける結果となった。

## 結 論

腎機能障害のあるCKDは、原則的に腎生検が不可能な為、採血・採尿以外には有効な評価手段に乏しいのが現状である。超音波検査、核医学検査に加えて、DW MRI, BOLD MRIは、CKDの進行に関与する腎の虚血や線維化を非侵襲的に評価しうる手段であり、しかも、CKD stage 1から末期腎不全に至るまで、全経過に応用可能な検査法である。

## 謝 辞

研究計画立案当初に貴重な統計学的御意見を頂いた本学地域医学医療センターの大野洋一先生、荒木隆一郎先生に深謝いたします。腎機能正常、軽度低下例に関しては本学内分泌・糖尿病内科の片山茂裕先生、犬飼浩一先生に数多く御紹介頂きました。また、本共同研究(腎臓内科・放射線科)が実現いたしましたのは本学放射線科の田中淳司先生の御高配の賜です。さらに、多くの貴重な時間を割いて頂き、時には放射線技師として、時には健康コントロールとして健康な腎臓を撮像させて頂いた、本学放射線科の技師の皆様にご心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Inoue T, Takenaka T, Hayashi M, Monkawa T, Yoshino J, Shimoda K, et al. Fibroblast expression of an IkappaB dominant-negative transgene attenuates renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:2047-52.
- 2) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kikuta T, Kanno Y, et al. TGF-beta1 and HGF coordinately facilitate collagen turnover in subepithelial mesenchyme. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:255-60.
- 3) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kanno Y, Kopp JB, et al. Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor-beta1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *FASEB J* 2003;17:268-70.
- 4) Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:17-25.
- 5) Fine L, Norman J. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int* 2008;74:867-72.
- 6) Juillard L, Lerman LO, Kruger DG, Haas JA, Rucker BC, Polzin JA, et al. Blood oxygen level-dependent measurement of acute intra-renal ischemia. *Kidney Int* 2004;65:944-50.
- 7) Thoeny HC, Zumstein D, Simon-Zoula S, Eisenberger U, De Keyser F, Hofmann L, et al. Functional evaluation of transplanted kidneys with diffusion-weighted and BOLD MR imaging: initial experience. *Radiology* 2006;241:812-21.
- 8) Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 1968;2:363-6.
- 9) Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, Inoue T, Kanno Y, Takigawa M, et al. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:133-43.
- 10) Schachinger H, Klarhofer M, Linder L, Drewe J, Scheffler K. Angiotensin II decreases the renal MRI blood oxygenation level-dependent signal. *Hypertension* 2006;47:1062-6.
- 11) Epstein FH, Prasad P. Effects of furosemide on medullary oxygenation in younger and older subjects. *Kidney Int* 2000;57:2080-3.
- 12) Boulanger Y, Amara M, Lepanto L, Beaudoin G, Nguyen B, Allaire G, et al. Diffusion-weighted MR imaging of the liver of hepatitis C patients. *NMR Biomed* 2003;16:132-6.

## 研究成果リスト

## 論文

- 1) 井上勉, 小澤栄人, 竹中恒夫, 鈴木洋通. 【慢性腎臓病CKDの新たなパラダイムを求めて】CKDの診断と評価CKDの画像診断 新たな試み. *内科* 2011;107:214-7.
- 2) Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, Suzuki H. Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 2011 (in press)

## 学会発表

- 1) 井上勉, 小澤栄人, 渡部進一, 渡辺裕輔, 菊田知宏, 佐藤貴彦, 津田昌宏, 新井鐘大, 小林和裕, 池田直史, 岡田浩一, 竹中恒夫, 田中淳司, 鈴木洋通. 腎機能評価におけるBOLD (blood oxygenation level dependent) MRIの有用性, 第52回日本腎臓学会学術総会, 平成21年6月, 横浜
- 2) 井上快児, 小澤栄人, 佐藤洋一, 井上勉, 鈴木洋通, 木村文子, 田中淳司. MRI拡散強調画像のADC値を用いた慢性腎臓病に関する有用性の評価検討, 第69回日本医学放射線学会学術集会, 平成22年4月, 横浜
- 3) 井上勉, 小澤栄人, 菊田知宏, 佐藤貴彦, 大野洋一, 渡辺裕輔, 岡田浩一, 竹中恒夫, 田中淳司, 鈴木洋通. MRI拡散強調画像は分腎機能評価に有用である, 第107回日本内科学会総会, 平成22年4月, 東京
- 4) 小澤栄人, 井上勉, 井上快児, 西直子, 水越和歌, 鈴木洋通, 田中淳司. 腎機能評価の拡散強調画像によるADC値のb値の相違による評価検討, 第38回

- 日本磁気共鳴医学会, 平成22年5月, 筑波
- 5) 井上 勉, 小澤 栄人, 渡辺 裕輔, 犬飼 浩一, 岡田 浩一, 渡部 進一, 菊田 知宏, 佐藤 貴彦, 津田 昌宏, 大野 洋一, 竹中 恒夫, 片山 茂裕, 田中 淳司, 鈴木 洋通. Functional MRIを用いた非侵襲的腎評価法の検討, 第53回日本腎臓学会学術総会, 平成22年6月, 神戸
- 6) Tsutomu Inoue, Eito Kozawa, Hirokazu Okada, Kouichi Inukai, Tsuneo Takenaka, Yusuke Watanabe, Junji Tanaka, Hiromichi Suzuki. Different contribution ratio of hypoxia to renal insufficiency, comparison between diabetic and non-diabetic nephropathy, ASN's annual meeting 2010 (アメリカ腎臓学会総会), 平成22年11月, Denver, USA