

ラットの肝臓の T₁ 強調画像における銅の影響

中越 凡道¹, 藤田 信行¹, 姜 貞憲², 武市 紀年³,
宮坂 和男¹

¹北海道大学医学部放射線医学教室 ²同 癌研究施設病理部門
³同 癌研究施設細胞制御部門

はじめに

体内に存在する金属は MRI の信号強度に影響を与えることがある。たとえば、体外から投与されたガドリニウム (Gd) は MRI の造影剤として使用されるし, hemosiderosis や hemo-chromatsis で蓄積した鉄 (Fe) は肝臓の信号強度を下げる事がわかっている^{1),2)}。最近では, 組織内に蓄積した銅 (Cu) が肝細胞癌 (HCC) の T₁ 強調像の信号強度を変化させる原因として報告されている³⁾。しかしながら, 銅の肝 MRI への影響をみた報告は少ない。

今回我々は遺伝的に銅の代謝異常をもつ Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットを用いて, 肝の MRI における銅の影響を報告する。この LEC ラットは出生直後から肝臓に銅が徐々に蓄積し, 肝炎⁴⁾, それにひき続く肝細胞癌を発症する⁵⁾。それゆえ, LEC ラットを肝臓の MRI における銅の影響を見るためのよいモデルと考えた。

対象と方法

急性肝炎発症前の LEC ラット 6 頭とコントロールとして Sprague-Dawley (SD) ラット 4

頭から MRI を撮影した。使用した MR 装置は Sisco 製 spectroscopy/imaging 装置 sis 300/183 で, 静磁場強度は 7.05T であり, proton の共鳴周波数は 300MHz である。コイルはメーカー提供の 89mm 径鞍型コイルを用いた。ラットに抱水クロラル 300-400mg/kg で腹腔内麻酔をした後, 仰臥位にて撮影した。Sequence は TR=500ms, TE=13ms, 128 phase encoding step, 2 回加算の 2 次元 spin echo 法で, slice 厚 2mm, slice gap 0.5mm でほぼ全肝にわたり撮影した。信号強度は, 横隔膜から約 7.5mm 下の肝臓が最も大きく写る画像で, Fig.1 のように

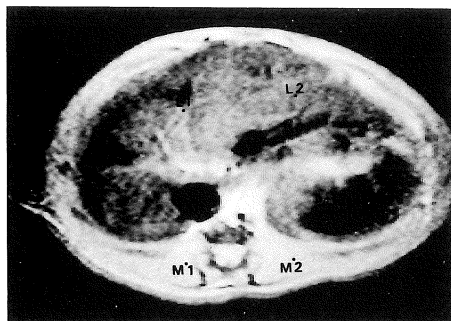


Fig.1. Measuring points of signal intensity. L1,2 are those in the liver, and M1,2 are those in the muscles
Liver/Muscle intensity ratio = (L1+L2)/(M1+M2).

キーワード copper, LEC rat, liver, MRI

肝臓と筋肉から2点ずつアーティファクトを避けて測定し、それらから肝/筋信号強度比を算出した。この肝/筋信号強度比の student-*t* test 平均値にて検定した。

MRI 撮影後、全ラットの下大静脈から血液を採取し、総ビリルビン値と GPT 値を測定して肝機能を確認した。その後、解剖し、肝臓を病理組織学的に検討した。染色法は、hematoxylin-eosin 染色と、銅を見るための Timm 法⁶⁾、銅結合タンパクを見るための orcein 染色、鉄 (Fe³⁺) を見るための Berlin-blue 染色の4法を施行した。

結 果

Fig.2 に LEC ラットと SD ラットの代表的な腹部画像を示す。両種の肝臓に明らかな差を認めない。肝/筋信号強度比は、LEC で 0.708 ± 0.084 であり、SD ラットの 0.772 ± 0.066 (Fig. 3) よりわずかに低いが、*t*-test では有意差は認められなかった。

Table.1 に総ビリルビン値と GPT 値を示す。総ビリルビン値に差はないが、GPT 値は LEC ラットで軽度上昇している傾向があった。

Hematoxylin-eosin 染色では、LEC, SD 両ラットとも肝の組織像には異常は認めなかった

(Fig.4)。銅は LEC ラットにおいてのみ多量に蓄積していた (Fig.5) が、orcein 染色両種ともに銅結合タンパクは認めなかった (Fig.6)。Berlin-blue 染色で鉄はなかった。

考 察

肝臓は主要な銅代謝臓器であり、様々な病態において銅が蓄積する。蓄積した銅が肝 MRI の信号強度に影響を与えることは十分考えられる。銅イオンの常磁性効果は T₁強調像の信号強度を上昇させることが予想される³⁾。しかし、肝臓において著明に銅が蓄積する Wilson 病の患者においては肝臓の T₁強調像の信号強度は特に変化しない。

銅には1価、2価の2種類のイオンがある。1価銅イオンは不対電子をもたず、したがって反磁性体である。これに対して2価の銅イオンは1個の不対電子をもつ常磁性体であり、周囲の組織の T₁, T₂時間を短縮する可能性がある。我々は、2価の銅イオンの常磁性効果は、その周囲組織に MR 信号を出す程度の水分があれば、周囲組織が腫瘍であるとか、炎症であるとかの状態と関係なく表れると考える。なぜならば、同じく常磁性体である Gd は造影剤として用いられたとき、周囲に病変があっても T₁短縮効果を

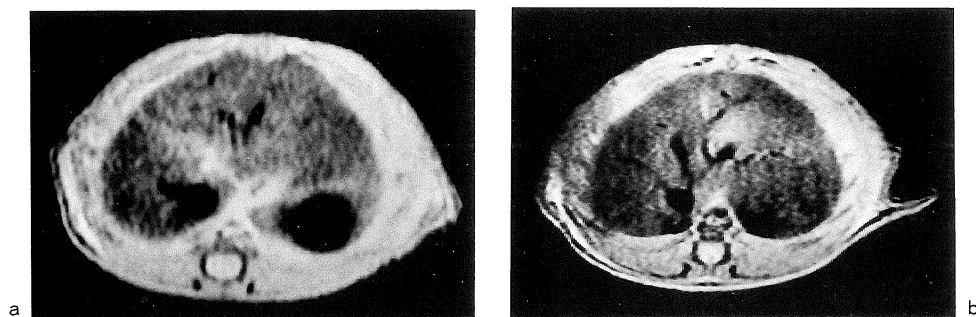


Fig.2. T₁-weighted images (SE 500/13) of the liver of (a) LEC rats and (b) SD rat. There was no significant difference.

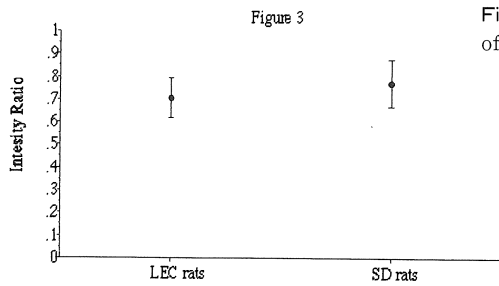


Fig.3. Graph comparing signal intensities of the livers of LEC rats with those of SD rats.

Table 1. Total Bilirubin and Glutamic Pyruvic Transaminase Concentrations in the Serum of SD Rats and LEC Rats

	Total Bilirubin Concentration (mg/dl)	Glutamic Pyruvic Transaminase Concentration (K.U)
SD rats	0.10±0.00	46.5±12.3
LEC rats	0.10±0.00	79.4±27.6

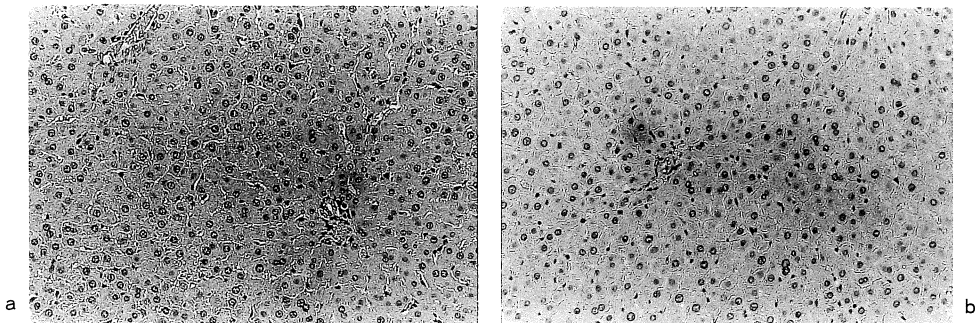


Fig.4. Hematoxylin-eosin stains of the livers of (a) LEC rat and (b) SD rat. There were no definite abnormalities in both specimens.

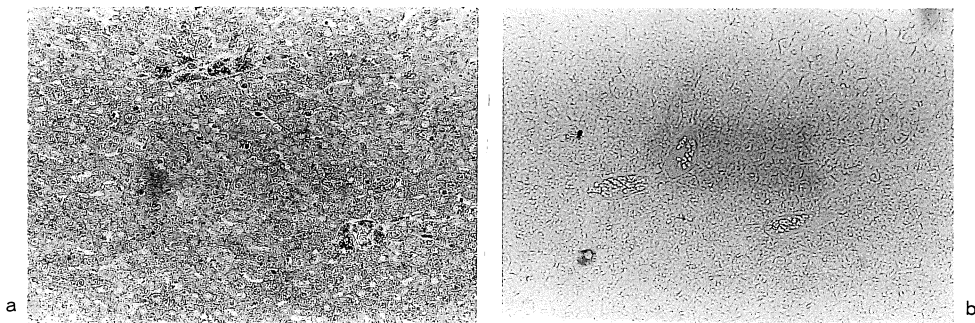


Fig.5. Copper distribution in the liver of (a) LEC rat and (b) SD rat. (Copper stained by modified Timm's method.) Copper accumulated exclusively in LEC rat.

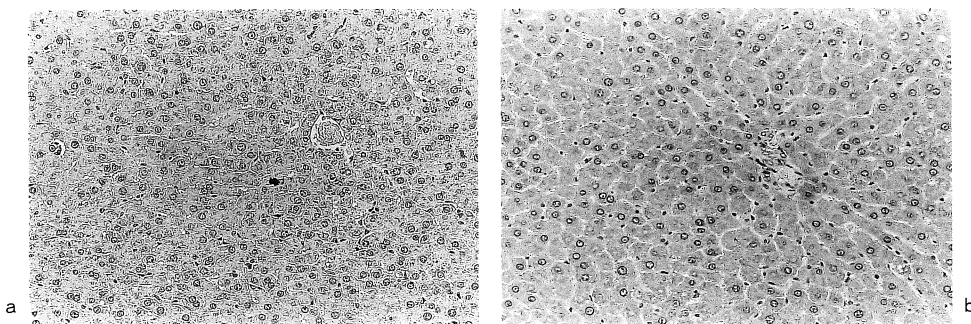


Fig.6 Orcein stains of the livers of (a) LEC rat and (b) SD rat. Copper-binding protein should demonstrated as black intracytoplasmic granules, but there were such granules in the livers of both strains.

発揮するからである。

肝臓内の銅は種々の金属結合タンパクと結合している。それらは、metallothionein, ceruloplasmin, cytochrome oxidase, tyrosinase, monoamine oxidase, superoxide dismutase, lysyl oxidase など⁷⁾である。これらの中で、metallothionein と ceruloplasmin が他のタンパクより圧倒的に量が多く重要である。

Metallothionein は肝臓内で最も多い金属結合タンパクであり、金属の貯蔵と無毒化の機能をもつ⁸⁾。肝臓内の銅含有量が増加するほど metallothionein の量も増加する。Metallothionein は7-9個の1価銅イオンと結合しており^{9),10)}、この銅イオンは肝細胞にとって無害である。しかし、肝臓内の銅含有量が metallothionein の結合能を超えたとき、細胞毒性をもつ2価銅イオンが出現し、肝細胞に障害を与える¹¹⁾。Orcein 染色で認められる銅結合タンパクは lysosome 内の重合した metallothionein であり、この銅結合タンパクに結合している銅イオンはおそらく1価と考えられる¹²⁾。LEC ラットの肝内の metallothionein と結合した銅は細胞質・核内に考えられるので染色されなかった¹³⁾。

Ceruloplasmin は肝臓だけで合成される銅依存性 ferroxidase であり、血清中の銅の95%と結合している。Ceruloplasmin は6-8個の銅イオンと結合し、そのうち半数ずつを1価、2価イオンが占める。LEC ラットは Wilson 病の患者

と同様に銅の apoceruloplasmin への取り込みに遺伝的な障害をもつ⁷⁾。

Ebara ら³⁾は、肝臓内の銅は常磁性体である2価イオンであり、HCC 内の2価銅イオンが T_1 強調像の信号強度を上昇させると考えた。それゆえ、彼らは2価銅イオンをもつ硫酸銅と ceruloplasmin を用いてファントム実験を行った。Wilson 病で肝臓内の銅が T_1 強調像の信号強度を上げない理由として Ebara らは、肝臓内の繊維化が起こっており、HCC と違って銅がびまん性に蓄積することを挙げている。

一方、Kitagawa ら¹⁴⁾は、腫瘍内に銅の蓄積した HCC が T_1 強調像で必ずしも高信号を示さないことを報告している。この原因として、彼らは HCC 内に蓄積する銅のほとんどは metallothionein と結合して反磁性体である1価イオンとなっていることを考えている。さらに、わずかに存在している2価銅イオンも binuclear complex を形成するなどして常磁性効果を持たない可能性があるとしている。

本実験では、LEC ラットと SD ラットの両方に繊維化などの病変はなく、LEC にだけ多量の銅が蓄積していた。Li ら⁵⁾の報告によれば、6週齢の LEC ラットの銅含有量は正常ラットの約30倍とのことである。この銅の量はそれが T_1 、 T_2 短縮効果をもつとすれば、その効果が表れるのに十分な量と考えられる。しかしながら、LEC ラットの肝臓の T_1 強調像の信号強度は SD ラッ

トのそれとなら変化はなかった。

この理由として第一に、LEC ラットの肝臓に蓄積している銅が1価イオンであることが考えられる。確かに LEC ラットの肝臓内には metallothionein が著明に増加している¹⁵⁾。しかし、LEC ラットには軽度の肝機能障害があることから、LEC ラットの肝臓には metallothionein と結合しない2価の銅イオンも存在していると我々は考える。

第二の理由として、2価の銅イオンの T₁短縮効果がそれほど強くないことが考えられる。常磁性体である2価の銅イオンは不対電子を1個しかもっておらず、その effective atomic magnetic dipole moment も 1.73¹⁶⁾と小さい。(この値は Gd のその約1/4である。)

いずれにせよ、LEC ラットにおいて肝臓内の銅は T₁強調像の信号強度に影響をあたえることはなかった。今後は、さらに LEC ラットに発生する HCC において銅の影響を見る必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、標本の染色法にご協力いただきました本学第二病理学教室の藤井幸子さんに厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Stark D, Moseley E, Bacan R, et al. : Magnetic resonance imaging and spectroscopy of hepatic iron overload. *Radiology*, 1985 ; 154 : 137-142.
- 2) Ehman L, Kjos O, Hricak H, Brasch C, Higgins B : Relative intensity of abdominal organs in MR images. *JCAT*, 1985 ; 9 : 315-319.
- 3) Ebara M, Watanabe S, Kita K, et al. : MR imaging of small hepatocellular carcinoma : Effect of intratumoral copper content on signal intensity. *Radiology*, 1991 ; 180 : 617-621.
- 4) Yoshida MC, Sasaki M, Masuda R : Origin of the LEC strain with a new mutation causing hereditary hepatitis. In : Mori M, Yoshida MC, Takeichi N, Taniguchi N, ed. *The LEC rat*, 1991. Tokyo : Springer-Verlag ; 1991, 3-19.
- 5) Li Y, Togashi Y, Takeichi N : Abnormal copper accumulation in the liver of LEC rats : A rat form of Wilson's disease. In : Mori M, Yoshida MC, Takeichi N, Taniguchi N, ed. *The LEC rat*, 1991. Tokyo : Springer-Verlag ; 1991, 122-132.
- 6) Kozma M, Szerdahelyi P, Kasa P : Histochemical detection of zinc and copper in various neurons of the central nervous system. *Acta Histochem*, 1981 ; 69 : 12-17.
- 7) Martin D. Water & Minerals. In : Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, Granner DK, ed. *Harper's review of biochemistry*, 20th ed, 1985. Los Altos : Lange Medical Publications, 1981 ; 539.
- 8) Bremner I : Metallothionein and copper metabolism in liver. *Method in Enzymology*, 1991 ; 205 : 584-591.
- 9) Freedman J, Powers L, Peisach J : Structure of the copper cluster in canine hepatic metallothionein using X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry*, 1986 ; 25 : 2342-2349.
- 10) Beltramini M, Giacometti G, Salvato B, Giacometti G, Munger K, Lerch, K : Luminescence emission from Neurospora copper metallothionein. *Biochem J*, 1989 ; 260 : 189-193.
- 11) Elmes M, Jasani B : Metallothionein and copper in liver disease. *Lancet*, 1987 ; 2 : 866.
- 12) Wilson's disease and copper-associated protein (editorial). *Lancet*, 1981 ; 1 : 644-646.
- 13) 桜井 弘, 鎌田裕子, 佐藤ひろみ, 他 : LEC ラット肝臓における銅-メタロチオネインの誘導と分布. 第3回 LEC ラット研究会プログラム抄録集, p.4, 1993.
- 14) Kitagawa K, Matsui O, Kadoya M, et al. : Hepatocellular carcinoma with excessive copper accumulation : CT and MR findings. *Radiology*, 1991 ; 180 : 623-628.
- 15) Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Katakura M, Takahashi H, Mori M : Copper metabolism in LEC rats aged 30 and 80 days old : Induction of Cu-metallothionein and status of zinc and iron. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1991 ; 72 : 353-362.
- 16) Saini S, Frankel B, Stark D, Ferrucci T : Magnetism : A primer and review. *AJR*, 1988 ; 150 : 735-743.

Influence of Copper Concentrations on Signal Intensity on T₁-Weighted Images of The Livers of Long-Evans Cinnamon Rats

Tsunenori NAKAKOSHI¹, Nobuyuki FUJITA¹, Kan JONG-HON²,
Noritoshi TAKEICHI³, Kazuo MIYASAKA¹

¹*Department of Radiology, ²Laboratory of Pathology, Cancer Institute,*
³*Laboratory of Cell Biology, Cancer Institute,*
Hokkaido University School of Medicine
North 15 West 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060

The effect of hepatic copper on MR imaging is still controversial. To investigate whether abnormally accumulated copper changes signal intensity of the liver on MR images, we performed MR imaging of the livers of Sprague-Dawley (SD) rats, and Long-Evans Cinnamon (LEC) rats which develop hepatitis and hepatocellular carcinoma due to an abnormal copper metabolism. The livers of LEC rats were imaged before developing hepatitis ; absence of hepatic disease and accumulation of copper were confirmed histopathologically. Signal intensity of T₁-weighted images of the livers of LEC rats was not significantly different from that of SD rats. The result suggests that hepatic copper, even though it accumulates abnormally, does not influence signal intensity of MR images.