

PET を用いたミトコンドリア機能評価による心筋障害の早期診断

- 1) 阪和インテリジェント医療センター、2) 浜松ホトニクス(株)中央研究所
- 3) 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻
堀 俊博¹⁾、大庭 弘行²⁾、細井 理恵³⁾、金澤 奨勝²⁾、
西山 新吾²⁾、塚田 秀夫²⁾、小川 洋二¹⁾、井上 修¹⁾

1.緒言

ドキシソルビシン (Doxorubicin : DOX) 等のアントラサイクリン系抗腫瘍薬は、広い抗腫瘍スペクトルを有し、白血病、乳癌、転移性胃癌、転移性非小細胞肺癌、転移性卵巣癌等多くの癌に単剤、または他剤との併用で使用されている。しかし心毒性を誘発することが大きな問題であり、特に累積投与量に依存して心筋症の発現頻度がかかなり高くなり、心不全を発症した場合の死亡率は非常に高いことが臨床的に重大な課題となっている。従って、出来るだけ早期の段階 (心機能障害が可逆的な段階) で心機能低下を鋭敏に評価出来る方法論を確立することが、臨床的にも社会的にも強く望まれている状況にある。DOX 誘発性の心毒性にはミトコンドリアの機能異常や、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) による酸化ストレスが深く関与しているとの仮説が強く示唆されている。報告者等はこれまでに、ミトコンドリアの電子伝達系の構成要素である Complex-1 に選択的に結合する陽電子放出断層撮影 (positron emission tomography : PET) 薬剤である^{[18F]BCPP-BF}を用いて、Acetaminophen で誘発される肝毒性を極めて鋭敏に早期検出できること¹⁾、並びに非アルコール性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) の早期診断の可能性が高いこと²⁾を報告してきた。

本研究では、ラットに DOX 0、15、20 mg/kg の用量を単回投与し、5 日後に^{[18F]BCPP-BF}を用いた PET 測定を実施し、PET によるミトコンドリア機能イメージングが心筋障害の早期診断法として有用であるか否かについて検証した。また、本研究で使用する DOX 誘発性の心毒性モデルについて、ミトコンドリアの膜電位に依存して心筋に取り込まれる SPECT 製剤である^{[99mTc]MIBI}を用いて、DOX 投与ラット心筋への取り込み率についても、正常群との比較を行った。

2.方法

2.1 試薬・動物等

DOX は日本化薬工業株式会社から購入し、用時生理食塩水にて希釈して注射剤とした。雄性 SD ラット（7 週令）は日本 SLC 株式会社から購入し、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で 1 週間、自由飲水・摂食下で飼育したのち実験に供した。動物実験はそれぞれ大阪大学医学系研究科保健学専攻、並びに浜松ホトニクス(株)中央研究所の動物倫理委員会の承認を得たうえで実施した。

2.2 [^{18}F]BCPP-BF および [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]MIBI 注射剤の調製

[^{18}F]BCPP-BF は既報³⁾の方法に準じて標識・製剤化を行った。 [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]MIBI は富士フィルム富山化学株式会社から購入し、生理食塩水にて希釈し（10 kBq/0.5 mL）、実験に供した。

2.3 [^{18}F]BCPP-BF を用いた PET 測定

雄性 SD ラットに DOX 0、15、20 mg/kg を腹腔内に単回投与し、5 日間体重変化を測定すると同時に全身状態の観察を行った。5 日後に [^{18}F]BCPP-BF（14 MBq）を静脈内投与し、以後 30 分間自由行動させた後、イソフルレン麻酔下、浜松ホトニクス社製の動物専用 PET 装置（SHR-38000）を用いて投与 45～90 分後の心臓の断層画像を取得した。画像上の心筋部位に関心領域（region of interest : ROI）を設定し、各群における心筋集積の経時的動態（time activity curve : TAC）および放射能の心筋への集積度を体重当たり投与放射能で除した Standardized Uptake Value（SUV）で算出した。

2.4 [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]MIBI を用いたラット心筋への取り込み率の測定

雄性 SD ラットに DOX 0、15、20 mg/kg を腹腔内に単回投与し、5 日間体重変化を測定すると同時に全身状態の観察を行った。5 日後に [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]MIBI を静脈内投与し、60 分後に過剰麻酔にて安楽死させたのちに心臓を摘出し、その湿重量及び放射能を計測した。半減期補正後に心臓への取り込み率を % Injected Dose/gram（%ID/g）で算出し各群で比較した。

2.5 血液中の生化学的指標並びに病理組織像

PET 撮像後、直ちにラットを過剰麻酔にて安楽死させ、採血及び心臓の摘出を行った。血液は遠心分離にて血漿分画として冷凍保存し、troponin-I、AST、ALT、Cr、BUN をそれぞれ、心筋、肝臓、腎機能のバイオマーカーとして測定した。心臓は直ちにホルマリン処理し、5 μm の切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン（hematoxylin eosin : HE）染色で心筋の病理画像を得た。

3.結果

3.1 DOX 投与後の所見

Saline（control 群）および DOX 15 mg/kg を単回投与した後の 14 日間にわたるラットの体重変化、並びに 5 日後における心臓の重量を図 1 に示す(n=6～7)。

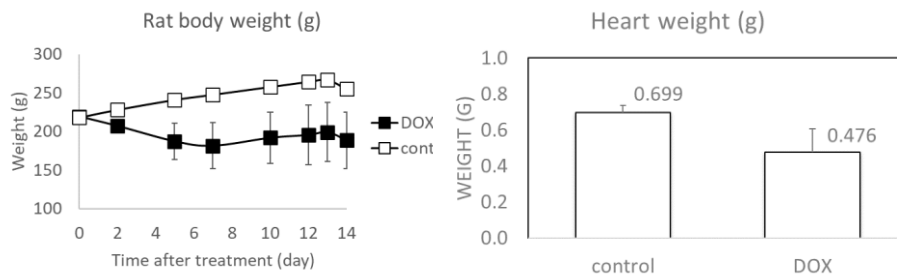


図1 DOX投与後の体重変化と5日後の心臓重量

3.2 [¹⁸F]BCPP-BFを用いたPET計測結果

図2に[¹⁸F]BCPP-BF投与後の心筋における放射能濃度のTACを示す。

[¹⁸F]BCPP-BFは投与45~90分後にわたり比較的良好に保持された。

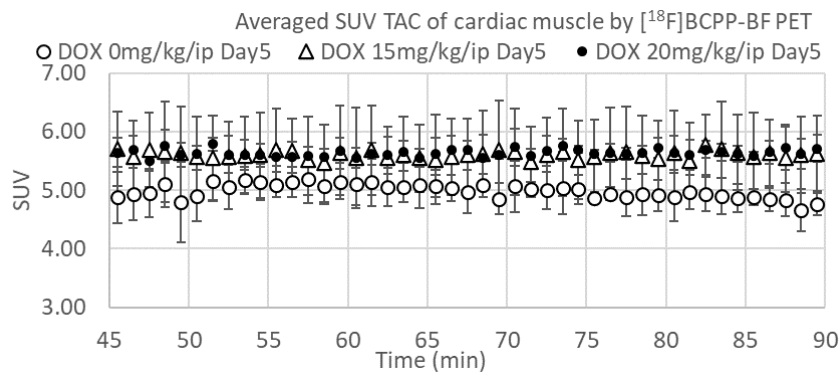


図2 [¹⁸F]BCPP-BF投与後の心筋における放射能濃度の経時変化

TACに基づき、トレーサ投与45-60分における15分間の集積画像を図3に示す。PET断層画像上において、[¹⁸F]BCPP-BFは心臓に選択的に集積し、極めて鮮明な画像が取得できた。

図3には心臓における放射能の集積度をSUV値として表示している。DOX投与群における心臓のSUV値は15、20mg/kgの両群ともにコントロール群との間に著明な差を認めなかった。

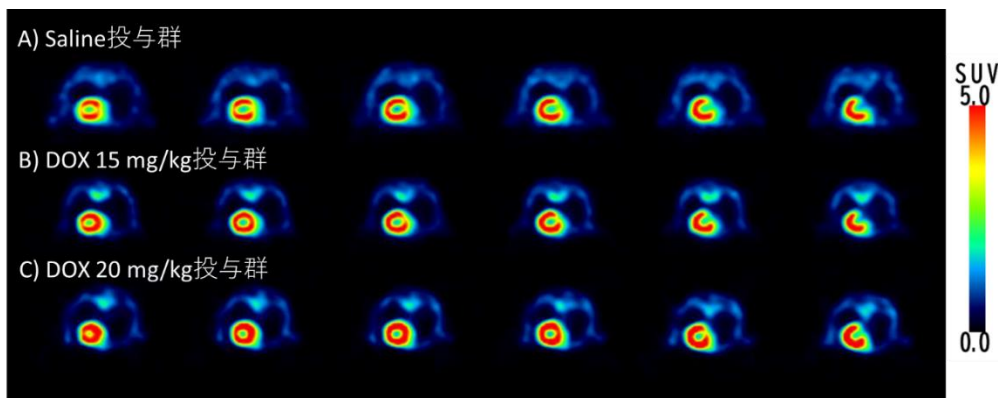


図3 心筋を含むPET断層画像(45-60分間の集積画像)

3.3 [^{99m}Tc]MIBI の心筋への取り込み率の測定

図 4 に DOX 投与 5 日後における [^{99m}Tc]MIBI の各群における心筋への取り込み率を測定した結果を放射能濃 (% Injected Dose /gram) で示す。心筋への取り込みは、DOX 15 mg/kg 投与群と control 群との間に有意な差を認めなかった。

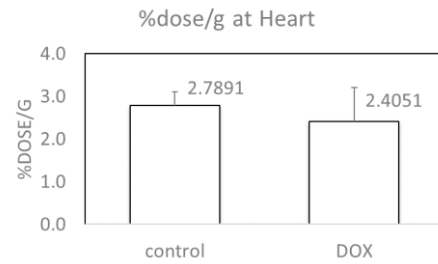


図 4 [^{99m}Tc]MIBI の取り込み

3.4 血液の生化学的所見並びに病理所見

血液中の AST、ALT、Cr は用量依存的に著明な上昇を示したのに対し、BUN は 15 mg/kg と 20 mg/kg 投与群間で有意な差を認めた (図 5)。troponin-I 及び病理所見については現在計測継続中である。

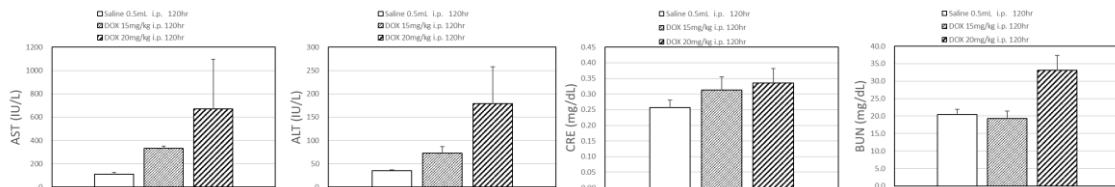


図 5 血中 AST、ALT、Cr、BUN の値

4. 考察

今回は [¹⁸F]BCPP-BF および [^{99m}Tc]MIBI の心臓における摂取率には DOX 投与群とコントロール群との間に著明な差を認めなかった。心臓の重量は、DOX の単回投与によって 5 日後には顕著に減少しているため、心筋細胞死が生じていることは確実であり、急性心不全が起きていることは容易に推定できる。しかし、残存している心筋細胞におけるミトコンドリア機能は、Complex-I との結合を指標としても、またミトコンドリアの膜電位を指標としても正常な水準を保持していることが推定される。

今回用いた、比較的少量の DOX を単回投与するモデルは、全身状態を観測した限りでは、体重減少も顕著でありかつ腹水の貯留をも認めたことから、多臓器不全あるいは急性心不全モデルに近いと思われる。そこで次のステップとして、より臨床の心筋障害に類似していると考えられる、少量の DOX を中長期にわたって投与し、心不全に至る慢性投与ラットを用いて適時 [¹⁸F]BCPP-BF の取り込みを計測し、PET によるミトコンドリアの機能測定が、DOX 誘発の心毒性の早期診断に有用であるか否かについて最終的判断を行いたい。同時に、肝臓、腎臓等のミトコンドリア機能についても測定を行う予定である。

5.結語

DOX の単回投与 (15、20 mg/kg) により、急性の心筋障害を引き起こし、心重量は著明に減少した。一方残存している心筋細胞におけるミトコンドリア機能は、PET による Complex-1 との結合を指標としても、また、膜電位を反映する [^{99m}Tc]MIBI の摂取率を指標としても正常値を保持していた。

6.文献

- 1) Ohba H, Kanazawa M, Kakiuchi T, Tsukada H. EJNMMI Res. Effects of acetaminophen on mitochondrial complex I activity in the rat liver and kidney: a PET study with ¹⁸F-BCPP-BF. 2016;6:82-91.
- 2) Sakai T, Ohba H, Nishiyama S, Kakiuchi T, Inoue O, Tsukada H. Sensitive and early detection of mitochondrial dysfunction in the liver of NASH model mice by PET imaging with ¹⁸F-BCPP-BF. EJNMMI Res. 2018;8:61-68.
- 3) Tsukada H, Nishiyama S, Fukumoto D, Kanazawa M, Harada N. Novel PET Probes ¹⁸F-BCPP-EF and ¹⁸F-BCPP-BF for Mitochondrial Complex I: A PET Study in Comparison with ¹⁸F-BMS-747158-02 in Rat Brain. J Nucl Med. 2014;55:473-80.