

新規超音波ドプラーイメージングによる
肝線維化診断法の確立

学位申請者

山口大学大学院 医学系研究科 保健学専攻

生体情報検査学分野

三浦大輔

| | |
|--|----|
| 第 1 章 緒論 | |
| 1-1 慢性肝疾患の疾患概念 | 4 |
| 1-2 経皮的肝生検による組織学的線維化評価法の利点と欠点 | 4 |
| 1-3 超音波検査法における古典的 B-mode 評価法の利点と欠点 | 5 |
| 1-4 超音波検査法における elastography の利点と欠点 | 5 |
| 1-5 血液検査による線維化評価法 | 6 |
| 1-6 日常検査の経験から生じた新規線維化診断法の必要性 -クリニカルクエスチョン- | 7 |
| 1-7 線維化の過程で生じる肝内血管の複雑な形態変化 | 8 |
| 1-8 超音波カラードプラ技術の技術革新 -リサーチクエスチョン- | 9 |
| 1-9 本研究の目的 | 10 |
| 第 2 章 本論 研究 I 「新規 Stacked Microvascular Imaging を使用した慢性肝疾患における線維化ステージ診断能の解析」 | |
| 2-1 研究の背景および目的 | 11 |
| 2-2 対象と方法 | 12 |
| 2-3 結果 | 21 |
| 2-4 考察 | 29 |
| 第 3 章 本論 研究 II 「Stacked Microvascular Imaging と AI 解析を組み合わせた客観的な線維化ステージ診断能の解析」 | |
| 3-1 研究の背景および目的 | 32 |
| 3-2 対象と方法 | 33 |
| 3-3 結果 | 39 |
| 3-4 考察 | 46 |
| 第 4 章 結論 | 49 |
| 謝辞 | 51 |
| 引用文献 | 52 |

要旨

目的と背景：慢性肝疾患において線維化進展度を適切に評価することは重要な臨床的課題である。肝線維化進展度評価のゴールドスタンダードは肝生検であるが、その侵襲性の高さから、頻回の評価やモニタリングには適さない。近年、肝生検に代わり超音波 elastography による非侵襲的肝線維化予測法が出現したが、これらの肝硬度検査法は急性炎症や鬱血の影響を受けるなど一定の問題が存在する。本研究の目的は、肝線維化によって生じる血管改変の定量的評価を可能にするために、新たに開発した stacked microvascular imaging (SMVI)の線維化診断法を確立することである。

方法：福岡徳洲会病院で肝硬度検査を受けた慢性肝疾患群と正常コントロール群を合わせた SMVI 画像データを解析した。肝線維化ステージは肝硬度値から病因別に判定し、METAVIR score に対応する 5 段階に分類した (F0-1Low, F0-1High, F2, F3, F4)。SMVI は microvascular imaging を infinite accumulation mode で 3-5 秒間作動させることで取得し、検査者による定量化であるスコアリング法と人工知能を用いた AI (artificial intelligence)解析法の 2 法を開発した。スコアリング法は SMVI 画像から肝線維化の過程で生じる 3 つの特徴的画像所見(狭小化, 口径不整, 屈曲蛇行)をその程度により 0-2 点で配点し、合計点を SMVI score とした。AI 解析法では SMVI 画像から convolutional neural network モデルを構築し、機械学習法による肝線維化ステージ分類を実施し、2 法の診断能を比較検証した。

結果：多重ロジスティック回帰分析の結果、SMVI score は、B-mode score や血清学的線維化スコアと比較して、F0-1Low と F0-1High の鑑別において最も良好であった。比較を F0-1Low と F0-1High の 2 つの初期ステージに限定した standard deviation ratio (SDR)は、SMVI score は B-mode score ($SDR_{0-1}=0.54$)に比べ、より高いステージ間分離($SDR_{0-1}=0.70$)を示した。また、AI 解析では F0-1 と F2-4 の分類精度は 83.8%であり、有意に AI 判定が検者によるスコアリング法判定を上回った。

考察：SMVI 法によって肝内血管の連続性を保持したまま血管を描出することが可能となり、肝線維化進展の課程における血管構築の改変の可視化に成功した。特に肝線維化早期の微小血管の変化を高感度に捉えられたことにより、従来の B-mode score や Fib-4 のような線維化スコアと比較して、スコアリング法は優れた早期の線維化診断能を示した。一方で、AI 解析法は中等度以上の線維化進展例検出に対して優れた診断能を示した。

第 1 章 緒論

1-1 慢性肝疾患の疾患概念

慢性肝疾患(chronic liver disease: CLD)とは、ウイルスや生活習慣病などにより肝臓に炎症が続く状態が 6 ヶ月以上持続する状態を指す疾患の総称である¹⁾。肝臓に生じる炎症が持続するとその修復機転で起こる線維化により、正常肝から早期慢性肝炎、後期慢性肝炎、肝硬変と進行していく。このように線維化ステージが上昇するにつれ、発癌リスクは増大し、終末像としての肝不全に至ることが知られていることから、正確に線維化ステージを予測していくことが予後を決める上で重要である。

肝発癌の主な危険因子は B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルスによる慢性ウイルス感染であったが、C 型肝炎ウイルスによる発癌リスクは新規直接作用型抗ウイルス薬の登場により大幅に減少している^{2,3)}。しかし、近年はメタボリックシンドロームや糖尿病に伴う代謝異常関連脂肪性肝疾患 (Metabolic-dysfunction associated steatotic liver disease: MASLD) がより頻度の高い危険因子となりつつある⁴⁾。

1-2 経皮的肝生検による組織学的線維化評価法の利点と欠点

慢性肝疾患における線維化ステージ評価法としての gold standard は経皮的肝生検である⁵⁾。肝生検は得られた標本から線維化や炎症の程度を診断することや、組織学的特徴から自己免疫性肝炎や原発性胆汁性胆管炎などを鑑別することも可能であるが⁶⁾、肝生検にはいくつかの問題がある。肝生検は高侵襲的検査であるため大出血により血行動態が不安定になることがあり、死亡率は約 0.01%と低いものの、死亡リスクも考慮する必要がある⁷⁾。また、肝生検は肝実質の極めて小さな部分を採取する方法であり、採取されたこの部分が肝臓全体を表していると仮定されている。しかしながら、非アルコール性脂肪性肝炎などいくつかの肝疾患では肝実質は一様ではなく⁸⁾、採取する部位でも線維化ステージの診断は異なる⁹⁾。さらに、異なる病理診断医の間でも線維化ステージの不一致は生じる¹⁰⁾。

肝生検が線維化ステージを診断する上での重要な礎であることには変わらないが、このような限界と後述する非侵襲的検査法の登場により、近年では肝生検の実施件数は著しく減少している¹¹⁾。

1-3 超音波検査法における古典的 B-mode 評価法の利点と欠点

超音波検査における古典的な肝線維化予測法として、B-mode 評価法がある。これは肝臓を肝縁、内部エコー、肝表面という 3 つの形態学的特徴から評価する手法であり¹²⁻¹⁴⁾、肝線維化進展に伴い、肝縁は鋭から鈍に、内部エコーは均一から粗雑に、肝表は平滑から凹凸不整になるというこれら 3 つの特徴を、その所見の強弱からスコアリングすることで、ある程度の線維化診断が可能と報告されている。例えば、F3 以上の線維化進展例では 62-66% 程度の診断能があるが、早期線維化(F1)では 56% 程度の診断能と報告されている¹²⁾。他の研究でも同様に、この B-mode scoring system は肝硬変の診断には有用であることが示されているが、早期の線維化診断は劣ると報告されている¹³⁻¹⁵⁾。

このように古典的 B-mode scoring system は簡便であり、現在の日常検査にも広く使われている有効な診断法であるにも関わらず、評価が主観的であることから、判定の信頼性に関する課題は依然として残っている¹⁴⁾。

1-4 超音波検査法における elastography の利点と欠点

肝硬変という言葉が示すように、慢性肝疾患における線維化進展は硬さで表現することが可能である。すなわち、慢性的かつ持続的な肝細胞壊死と再生による線維化の結果として生じる”硬さ”は、定量的に数値化することが可能で、elastography を使用することで弾性率として算出可能である。現在本邦で使用されている超音波 elastography には、transient elastography, acoustic radiation force impulse, real time elastography, 2D-shear wave elastography (2D-SWE) などがある¹⁶⁾。

MRI をベースとした magnetic resonance elastography は肝全体を評価することができることから、最も優れた線維化診断能がある^{17,18)}。しかし、非常に高額であり、一部の高次医療施設に導入実績があるのみであり、また検査時間もかかるため、日常検査で実施するには限界がある。

Transient elastography は FibroScan® (Echosens, Paris, France) で採用されている手法であり、機械的に発生したプッシュパルスによる剪断波が肝臓を横切る速度を計測することで、肝硬度値である liver stiffness measurement (LSM) を算出することが可能である。この LSM と組織学的線維化ステージを比較した多くのメタ解析が行われており、病因別に LSM

から組織学的線維化ステージを高い精度で予測することが可能である¹⁹⁻²⁵⁾。したがって、事実上、FibroScan[®]が慢性肝疾患における非侵襲的線維化診断法としての gold standard となっている。

このように優れた線維化診断能を有する FibroScan[®]であるが、これにもいくつかの限界がある。例えば、肥満、術者の未熟な手技、炎症、鬱血、胆汁鬱滞など線維化とは無関係ないくつかの交絡因子が知られている²⁶⁾。特に重要な問題が、生体側の問題である。硬さを測るという検査の性質上、肝臓内圧が上昇する状態、すなわち鬱血^{27,28)}や急性炎症²⁹⁾の影響を強く受けてしまうことから、これらの患者では得られた LSM が真の線維化による硬さを反映しない場合がある (Figure 1)。

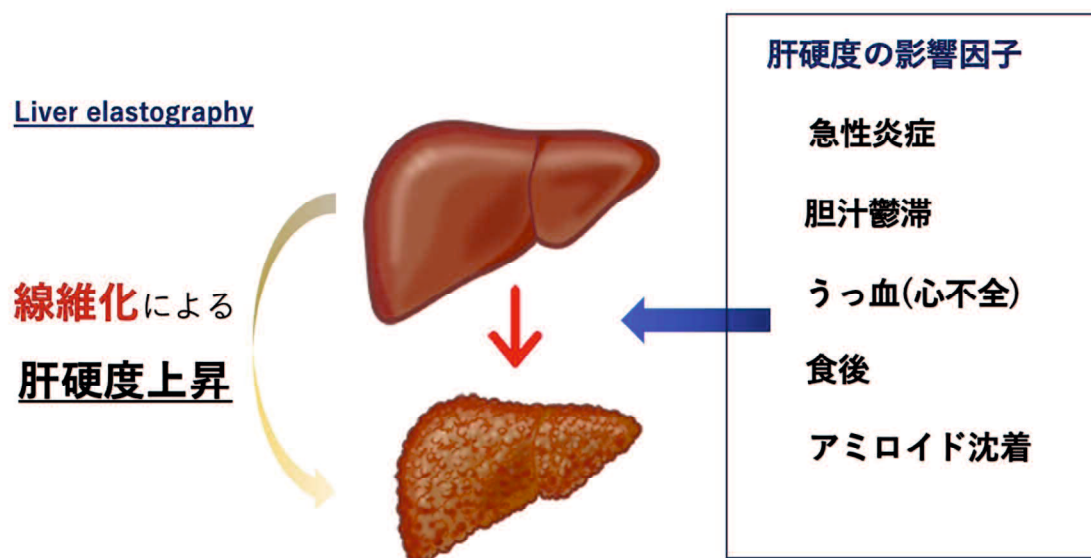


Figure 1. Elastography は線維化による硬度を反映するが他にも多くの影響因子がある

1-5 血液検査による線維化評価法

本邦で使用可能な血清学的肝線維化マーカーはいくつかあるが、汎用性が高い血液単項目/組み合わせ指標としては、aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), AST/ALT ratio (AAR), platelet (PLT), prothrombin time-international normalized ratio (PT-INR), AST to PLT ratio index (APRI), fibrosis-4 index (Fib-4), Mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi), autotaxin (ATX)が挙げられる。

Fib-4 は元々 Human Immunodeficiency Virus と Hepatitis C Virus 共感染患者の肝線維化を評価するために提案された組み合わせ指標であり、年齢と日常的な臨床検査項目で得られる ALT, AST, PLT の 3 つのパラメーターを組み合わせることで算出可能で、線維化進展リスクが高い患者を早期に拾い上げることができる³⁰⁻³²⁾。

APRI は AST と PLT の比を見たものである。Fib-4 より診断性能は劣るが、日常検査で用いる最小限の値から算出可能であるため、血清学的バイオマーカーとして広く使用されている^{33,34)}。

M2BPGi は肝線維化進展中に星細胞から分泌される糖蛋白であり、本邦で開発された比較的新しいバイオマーカーである^{35,36)}。M2BPGi は慢性 B 型 C 型肝炎、ウイルス学的著効達成後の慢性 C 型肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患における肝線維化診断、肝細胞癌合併リスク、肝機能の予後を評価するのに有用であると報告されている³⁷⁾。

ATX は肝線維化を予測する直接的バイオマーカーとして開発された³⁸⁾。健常人では ATX は肝臓で代謝される酵素蛋白質であり類洞内皮細胞に取り込まれるが、線維化進展に伴い肝機能が低下することでそのクリアランスが低下し、血中 ATX 濃度が上昇する³⁹⁾。F2-F3 といった比較的線維化が進展した症例に有効とされている⁴⁰⁾。

1-6 日常検査の経験から生じた新規線維化診断法の必要性 -クリニカルクエスチョン-

著者の勤務する病院では、慢性肝疾患患者の線維化モニタリングとして、超音波検査では B-mode 評価法、2D-SWE、FibroScan[®]による LSM を、血液検査では Fib-4、M2BPGi、ATX を使用して多角的に線維化モニタリングをおこなっている。これらの項目が全て一致すれば、線維化ステージの推定は比較的容易で妥当性が担保されるが、しばしば不一致例が散見される。

ここで、不一致症例を **Figure 2** に提示する。本症例では LSM 13.9 kPa と肝硬変相当の硬さを示唆しているにも関わらず、古典的な B-mode 評価法では肝硬変を示唆する肝臓の形態学的変化は認めず正常の範疇であった。このような症例の場合、どちらの結果が正しいのか解釈に難渋し、非線維化症例(F0-1)に対し、肝硬変(F4)として治療介入してしまう場合も起こり得るし、逆に肝硬変であるにも関わらず、非線維化症例として治療介入のタイミングを逸することもあり得る。

このような臨床上的の問題に対し、超音波検査時に全く別の視点から新たに線維化予測ができれば問題解決の一助となると考えられた。これが本研究の契機となったクリニカルケースである。

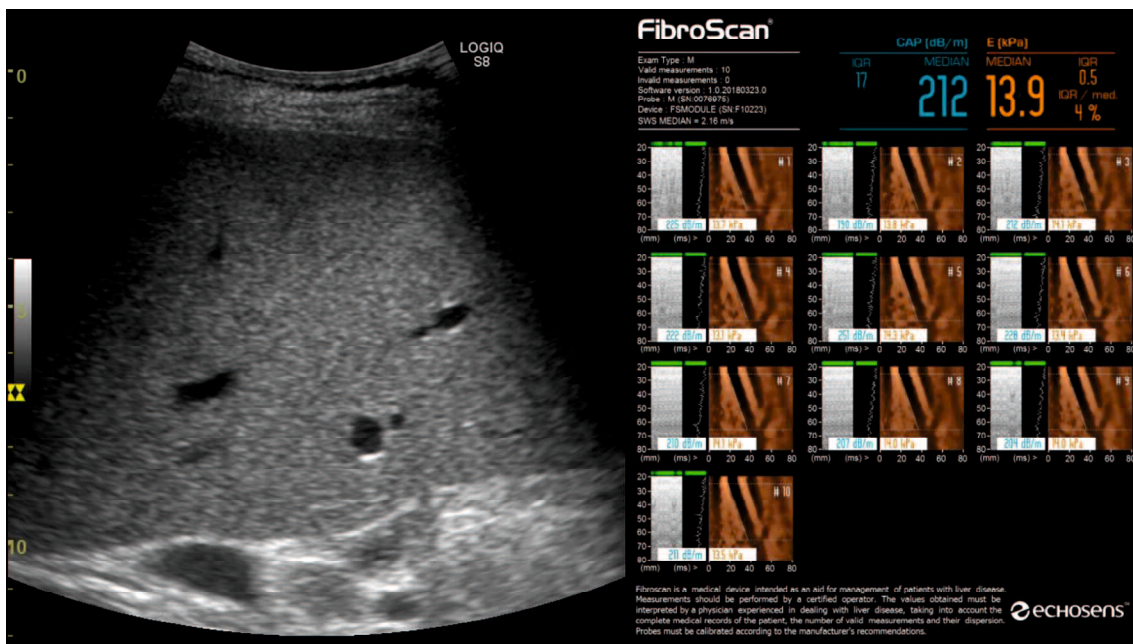


Figure 2. B-mode 評価法と elastography の結果に著しい乖離を認めた症例

1-7 線維化の過程で生じる肝内血管の複雑な形態変化

慢性肝疾患において、線維化の過程で複雑な血管の改変が生じることは古くから知られている⁴¹⁾。Bausらは、肝硬変の肝臓を注入腐食鋳型法およびラテックス注入法によって肝内血管を観察したところ、門脈や肝静脈の小枝や大枝の圧迫は肝硬変に共通して見られるものであったと報告した⁴²⁾。Hanoらは、肝硬変における血管構造の連続組織切片を用いて病理学的に解析し、3次元的にグラフィック再構築したところ、門脈分枝に狭窄、消失、分枝数の増減、歪んだ空間配置が見られ、その変化は門脈2次分枝レベルですでに始まっていることを明らかにした⁴³⁾。同様に、ジメチルニトロサミン誘発肝硬変ラットでは肝静脈末梢枝でも狭窄と蛇行が生じることも報告された⁴⁴⁾。このように慢性肝疾患における線維化の過程で複雑な血管改変を生じることは知られていたが、臨床応用するには侵襲的血管造影が必要であり、臨床的にはベネフィットよりもリスクの方が多いのが現状であった。

1-8 超音波カラードプラ技術の技術革新

超音波検査のカラードプラ法は血流表示に用いられ、超音波パルスエコー法で得られた解剖学的情報と、超音波ドプラ法で得られた速度情報を組み合わせることで、血流に色をつけてマッピングすることが可能である⁴⁵⁾。しかしながら、この従来のカラードプラ法ではモーションアーチファクトを除去すると同時に低流速域の血流情報も失っていた。したがって、従来のカラードプラ法では低流速血流を検出することは困難で、真の血流を検出するには大きな課題があった。

このような課題を克服するために microvascular imaging が開発された。microvascular imaging は組織の動く速度に近い低流速血流を組織の動きの特徴を解析して分離することで、モーションアーチファクトを大幅に減少し、高フレームレートかつ低ノイズを実現し、これまで困難であった低流速の血流を高精細に描出できる新しいドプラモードである (Figure 3)。この microvascular imaging は発売メーカー各社で呼称が異なり、Microvascular imaging (MVI; [GE healthcare]), High Definition Color (HDC; [GE healthcare]), Superb Microvascular Imaging (SMI; [Canon medical systems]) など呼ばれている。Figure 4 に通常のカラードプラと microvascular imaging を比較した画像を提示する。

この microvascular imaging を使用することで、造影剤を静脈内投与することなく微小血管の血流を可視化することができるので、近年腹部領域で臨床応用の可能性を模索する研究が増えている^{46,47)}。

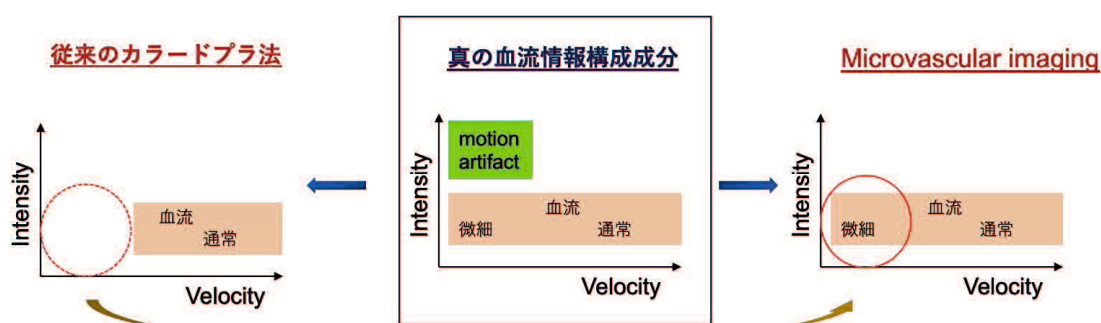


Figure 3. 従来のカラードプラ法と Microvascular imaging の画像処理比較

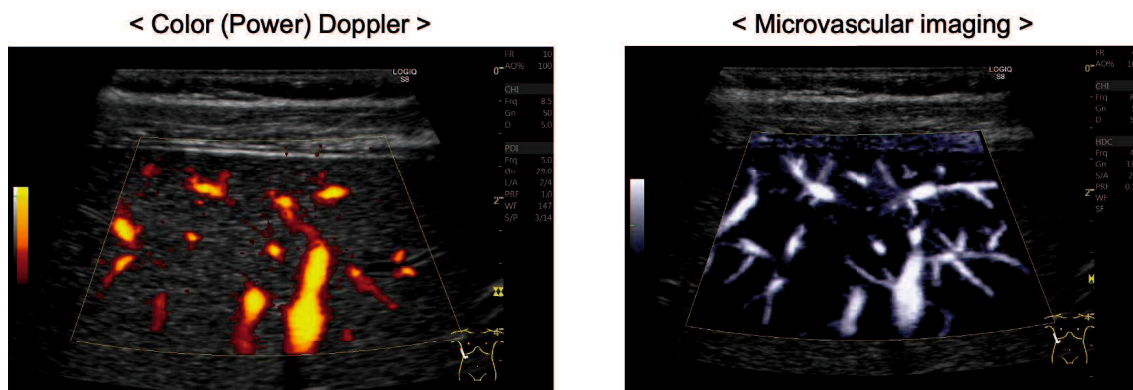


Figure 4. 従来のカラードプラ法と Microvascular imaging の画像的差異

1-9 本研究の目的 -リサーチクエスチョン-

慢性肝疾患における線維化の結果として生じる肝内血管の改変を microvascular imaging を使用することによって可視化し、その評価法を確立することができれば、新たな視点から線維化予測することが可能である。しかし、microvascular imaging はプローブを当てている任意の 1 断面における肝内血管の断面を見ているにすぎず、断片化された血管の形態的解釈と評価に非常に難渋した。

そこで我々は、新たに microvascular imaging を画像積算することを考案し、厚みを持った二次元画像を開発した。これを stacked microvascular imaging (SMVI) と呼び、SMVI による慢性肝疾患における線維化診断法の確立を試みた。

第2章 本論

研究 I 新規 Stacked Microvascular Imaging を使用した 慢性肝疾患における線維化ステージ診断能の解析

2-1 研究の背景および目的

慢性肝疾患 (chronic liver disease: CLD) は、主にウイルス感染、過度のアルコール摂取、脂肪性肝疾患によって引き起こされる⁴⁸⁾。肝臓は優れた再生能力を持つが、破壊と再生を繰り返すと、最終的には組織の線維化を引き起こす⁴⁹⁾。したがって、正確に線維化進展をモニタリングすることは、胃食道静脈瘤、肝不全、肝発癌などの予後を予測する上で極めて重要である⁵⁰⁾。線維化モニタリングの gold standard は経皮的肝生検であると認識されてきたが、生検には侵襲性、検体サンプリングエラー、病理医による組織診断のばらつきといった看過できない欠点がある⁷⁾。高侵襲的である肝生検の代替手段として、近年 FibroScan[®] (Echosens, Paris, France) に代表される各種 elastography が台頭し、肝線維化を診断するための非侵襲的超音波検査法として臨床使用されている。この進歩に伴い、European Association for the Study of the Liver (EASL) は最新の 2021 年ガイドラインの中で、FibroScan[®] を用いた肝硬度値 (liver stiffness measurement: LSM) が Fib-4 などの肝線維化予測マーカーと一緒に利用できる場合、肝生検なしでも進行した肝線維化を診断できると述べている⁵¹⁾。したがって、非侵襲的検査の組み合わせによる線維化の診断は、現在では CLD の管理において極めて臨床的妥当性が高いアプローチであるといえる。

しかしながら、elastography にも、再現性の担保には熟練した検査者が必要であること、急性炎症やうっ血が交絡することなど、いくつかの欠点がある^{27-29,52)}。すなわち、elastography による線維化ステージ診断は、肝実質の硬さに基づいており、単純に線維化による硬さを特異的に表しているわけではないため、結果の解釈には十分な注意が必要である。

病理組織学的に CLD における形態学的変化は、炎症による血管新生の誘導⁵³⁾と、豊富な吻合を有する細動脈に囲まれた肝硬変結節の形成、いわゆる結節周囲細動脈叢⁵⁴⁾によって特徴づけられる。線維化が進行すると、門脈枝および肝静脈は線維性結合組織によって歪め

られ、圧迫されるようになる⁴²⁻⁴⁴⁾。すなわち、線維化の過程で肝内血管の複雑な改変が生じる。

近年 2014 年ごろから、従来のカラードプラ法の改良版である新しい microvascular imaging が開発された。この高感度高精度ドプラ法は HDC (high definition color; GE healthcare), MVI (microvascular imaging; GE healthcare), SMI (superb microvascular imaging; canon medical systems) などと呼ばれ、最近の汎用超音波検査にて容易に実施できるようになった。SMI や MVI によって肝内血管の可視化を行うことで、線維化診断への応用可能性を示した報告があるが^{55,56)}、プローブ直下の 1 断面の切り取り画像であるために断片的な血管画像が得られ、血管の構造を描出する上での信頼性は依然として不十分であった。

このような臨床上的の問題点を是正するために、我々は MVI を連続合成することで、血管画像の断片化を改善する新しいドプライメージングを開発し、この手法を stacked microvascular imaging (SMVI) と命名した。さらに、SMVI における肝内血管の特徴を定量的に評価するために、3 つの特徴的な血管変化、すなわち narrowing (狭小化), caliber irregularity (口径不整), tortuosity (屈曲蛇行) に着目した SMVI scoring system を考案した。

本研究の目的は、CLD 患者を対象とし、従来の single MVI や各種線維化マーカーと比較することで、肝線維ステージ診断における SMVI の臨床的有用性を評価した。

2-2 対象と方法

2-2-1 研究のデザインと参加者の募集

本研究は福岡徳洲会病院において 2019 年 9 月から 2022 年 4 月に超音波検査による肝 elastography を受けた患者 516 名を登録した cross-sectional study である。

CLD 群は、20 歳以上かつ慢性肝疾患に対する定期検査で来院した患者とした。除外基準は、肝周囲腹水、多発性または巨大肝腫瘍の存在、急性肝障害 (ATL >200U/L)、心不全、胆汁鬱滞性黄疸、妊娠、重度の脂肪症、呼吸停止不可患者とした。これらのフローチャートを **Figure 5** に示す。

最終的に連続した CLD 患者 469 人(男性 233 人, 女性 236 人, 年齢中央値 66 歳 (四分位範囲 [IQR]: 54–72 歳) が登録された。肝臓専門医により診断された慢性肝疾患の病因は、

慢性 C 型肝炎ウイルス感染，慢性 B 型肝炎ウイルス感染，代謝機能障害関連脂肪性肝疾患 (metabolic dysfunction associated steatotic liver disease: MASLD)，代謝機能障害アルコール関連肝疾患 (MASLD and increased alcohol intake: MetALD)，アルコール性肝疾患 (alcohol-associated liver disease: ALD)，原因不明の脂肪性肝疾患 (cryptogenic steatotic liver disease: cryptogenic SLD)，自己免疫性肝炎 (Autoimmune hepatitis: AIH)，原発性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis: PBC)，薬剤性肝障害および病因不明であった。

HCV 感染は抗 HCV 抗体検査と HCV-RNA 検査で，HBV 感染は HBV-DNA 定量と HBs 抗原で診断した。脂肪性肝疾患については，通常の B-mode 画像と controlled attenuation parameter (cut-off value >246dB/m) の両方の陽性所見に基づいて脂肪性肝疾患の診断を行った。5 つの心代謝危険因子のうち少なくとも 1 つを併せ持つ脂肪性肝疾患患者は MASLD，アルコール摂取とこれらの危険因子に基づいて MetALD または ALD，これらの危険因子を伴わない肝脂肪症は cryptogenic SLD と診断された。AIH は抗核抗体 and/or 抗平滑筋抗体が陽性，血清 IgG 高値，持続的炎症性変化があることで診断された。PBC の診断は，血液検査で慢性胆汁鬱滞所見 (ALP, γ -GTP) と抗ミトコンドリア抗体陽性の検査所見に基づいて行われた。すべての患者は慢性期であり，急性炎症が存在しないことを確認した。

一方，対照群として組み入れられた 31 例 (男性 5 例，女性 26 例，年齢範囲：47-64 歳) は，本研究期間中に良性肝腫瘍 (肝血管腫または嚢胞) の精査のために elastography を受けたが，最終的には肝機能障害はなく異常なしとされた患者であった。

本研究のプロトコールは，福岡徳洲会病院施設審査委員会 (承認番号 220101) により審査・承認され，本研究に参加したすべての患者からインフォームドコンセントを得た。ヘルシンキ宣言 (最新版)，及び「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」(令和 5 年 3 月 27 日一部改正，7 月 1 日施行) に従って実施した。

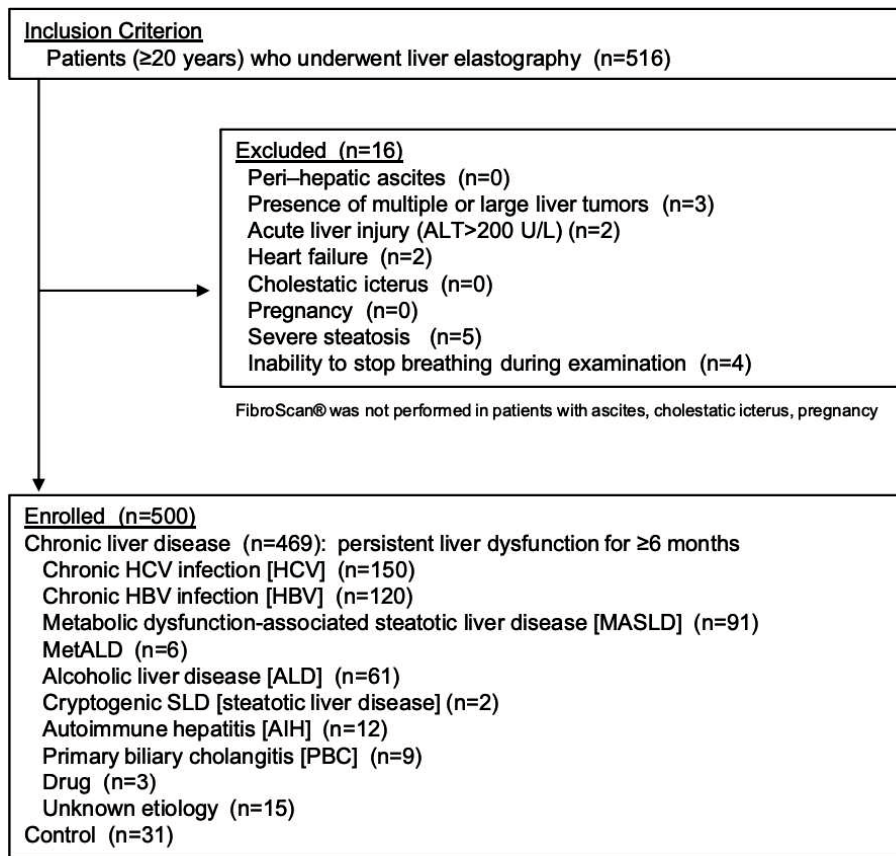


Figure 5. 本研究に参加した患者のフローチャート

2-2-2 超音波診断装置と手技

使用した超音波診断装置は Logiq S8+FS (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) で、FibroScan®が内蔵されている限定版モデルである。FibroScan®は通常、盲目的に肝臓にプローブを当てる必要があり、適切なサンプリングポイントにプローブが置かれているか、検査精度の点においてしばしば問題となる。その点、本研究で使用した Logiq S8+FS は B-mode 画像でリアルタイムに肝臓を確認しながら FibroScan®の適切なサンプリングポイントを設定可能で、信頼性が高いモデルである。

通常の B-mode 検査では C1-6 transducer (周波数：3.0MHz) と 9L transducer (周波数：8.5MHz) の probe を使用し、SMVI では肝表面で限定して撮影するため、高い周波数帯域を持つ 9L transducer (周波数：8.5MHz) のみを使用した。

2-2-3 B-mode ultrasound scoring system

従来の B-mode を用いて、肝縁、実質エコー、肝表の形態学的変化を評価した。B-mode scoring system は、上記の 3 つの形態学的特徴をそれぞれ 0-3 グレードに分類するために用いられている¹²⁾。しかし、B-mode scoring system では、各段階の明確な区切りがないため、段階を細分化すればするほど信頼性が低下する。そこで、本研究では分類の信頼性を向上させるために 3 段階に分類した：(1) 肝縁(edge)：0=sharp, 1=mild dull, 2=dull; (2) 内部エコー(parenchymal echotexture)：0=normal, 1=mild coarse, 2=coarse; (3) 肝表(surface)：0=smooth, 1=mild irregular, 2=irregular. これらの合計点 0-6 点を B-mode score とした。Figure 6 に本研究で判定に用いた B-mode 判定表を提示する。

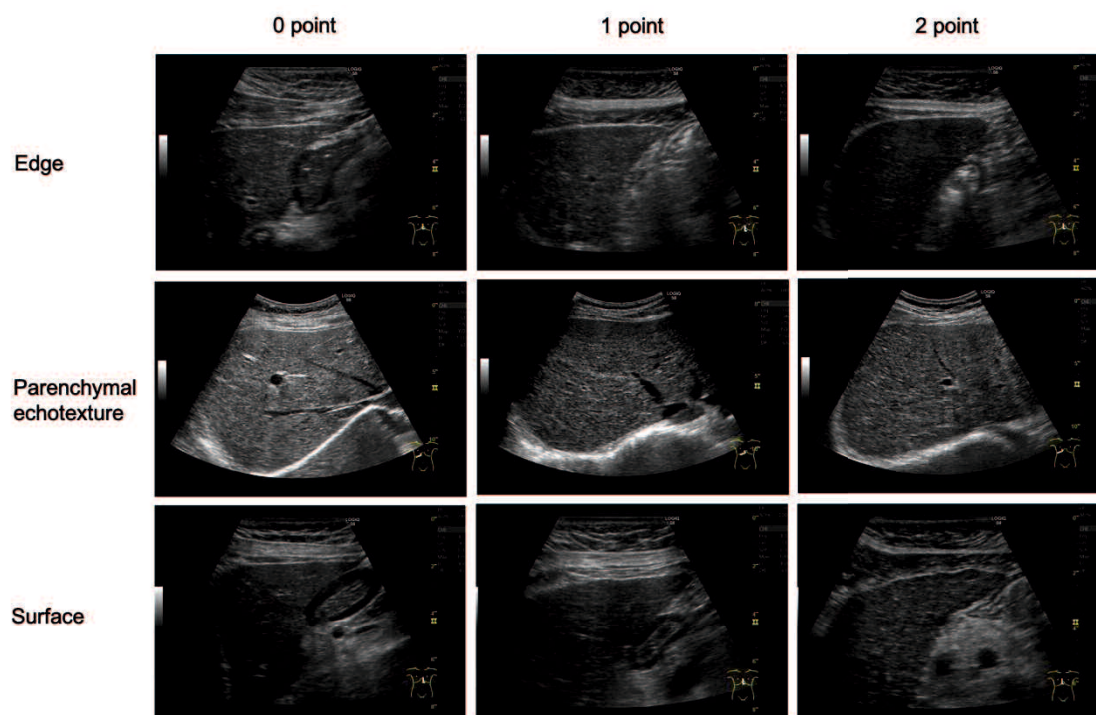


Figure 6. B-mode scoring system のアセスメントマップ

2-2-4 SMVI 法の手技

SMVI 法の基礎となる microvascular imaging は HDC を使用し、パルス繰り返し周波数は関心領域の深さに応じて 0.18-0.20 MHz に自動的に設定された。手技は以下のとおりである：(1)プローブを右肋間腔と腋窩正中線の交点で、肝臓の前区域/後区域境界が広く描出できる位置に置き、(2)microvascular imaging mode として HDC を選択、(3)肝臓の depth

は 5cm とし、関心領域は肝臓表面から 2.5×4.0cm に設定、(4) パネルから HDC の Infinite accumulation を選択した後、3-5 秒の息止めの間に one sweep でゆっくりとチルトスキャンを行った。すべての超音波検査は、腹部検査の実施経験が 15 年の筆頭著者が行った。

代表的な 3 症例（対照群から 1 例，CLD 群から 2 例）について、MVI と SMVI の画像的差異を Figure 7 に示す。

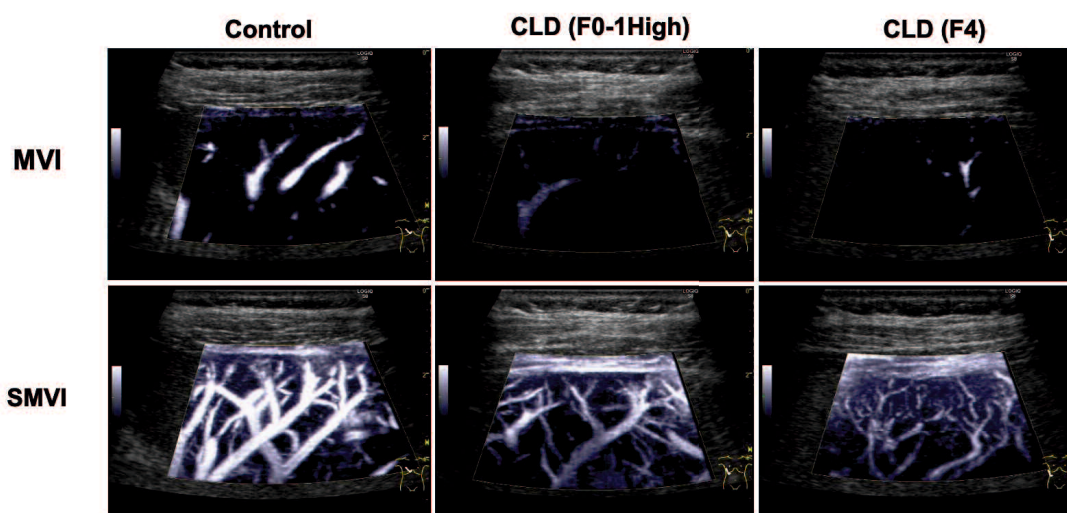


Figure 7. Microvascular imaging と stacked microvascular imaging の画像的差異

2-2-5 SMVI scoring system の構築

SMVI 画像を客観的に解釈するために、線維化進展に伴う肝内微小血管改変の 3 つの形態的特徴、すなわち narrowing, caliber irregularity, tortuosity に注目した^{55,56}。これら各特徴の強弱に基づき、0-2 点で評価した：0=なし，1=軽度あり，2=あり (Figure 8)。それぞれの所見の定義は以下のように決定された。

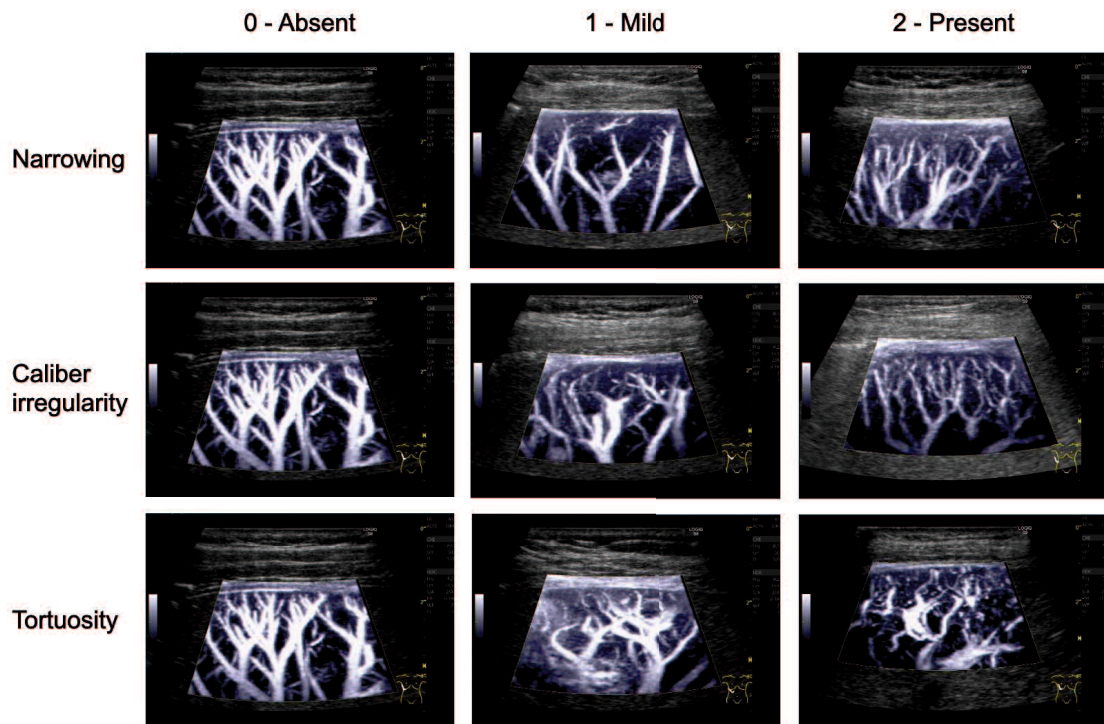


Figure 8. SMVI score 決定のためのアセスメントマップ

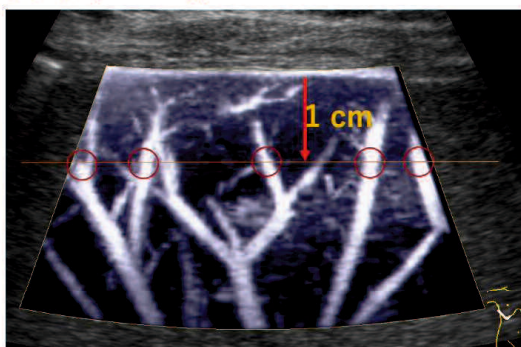
「狭小化 (narrowing)」は、肝表から 1cm の深さの位置にある 5 本の最も太い血管の平均径と定義した。配点は 0 point: $\geq 1.50\text{mm}$, 1 point: $1.25 - 1.49\text{mm}$, 2 point: $\leq 1.24\text{mm}$ とした。

「口径不整 (caliber irregularity)」は血管径の不均一さで定義され、肝表面から 1.5cm 以内に位置する血管輪郭の不整化によって決定された。すなわち、0 point: 血管輪郭の不整なし、1 point: 描出血管の 50%未満が不整、2 point: 描出血管の 50%以上が不整。

「屈曲蛇行 (tortuosity)」は描出された血管の蛇行の程度によって定義された。口径不整と同様に、肝臓表面から 1.5cm 以内の血管を注意深く観察し、以下のようにスコア化した。すなわち、0 point: 直線的(蛇行なし)、1 point: 50%未満の血管に蛇行あり、2 point: 50%以上の血管に蛇行あり。

これらの計測画像を Figure 9 に提示する。3 つの所見のスコアの合計点を SMVI score と定義した(0-6 point)。

狭小化 (narrowing)



口径不整 (caliber irregularity), 屈曲蛇行 (tortuosity)

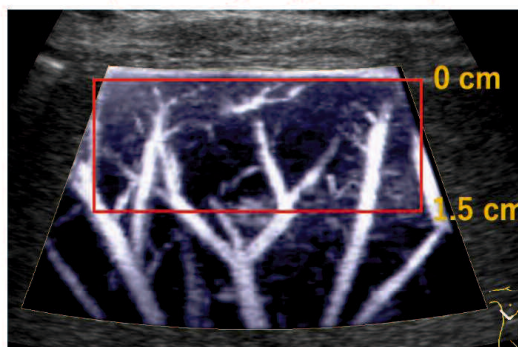


Figure 9. SMVI score 決定のための計測画像

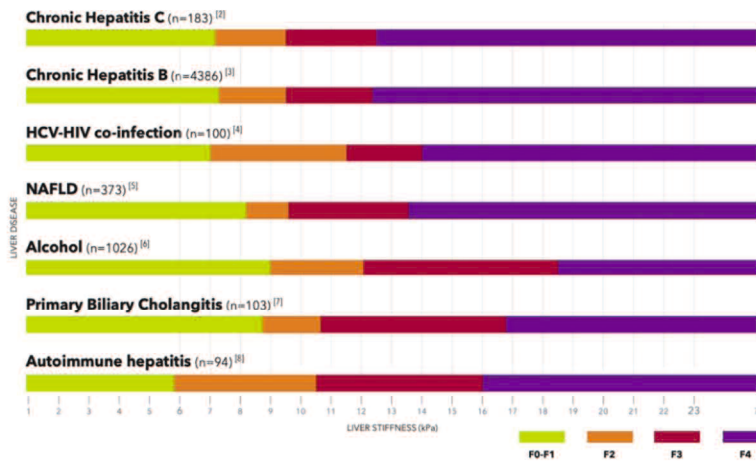
2-2-6. エラストグラフィに基づく線維化病期分類

SMVIスコアと比較する比較基準は、ECHOSENS™で定義されたFibroScan®によるLSMから決定した(Figure 10)。この interpretation guide は病因毎に cut-off 値が定められており、LSM という肝硬度値から病因毎に線維化ステージを予測することが可能である。MASLD に関しては、2018年に発行された最新の interpretation guide を用いて LSM を決定した⁵⁷⁾。FibroScan®は F0 と F1 を明確に識別できないため、正常上限値 5.0kPa をカットオフ値とし、LSM 値が 5.0 未満を F0-1Low、5.0 以上を F0-1High とした⁵⁸⁾。結果として CLD 患者は F0-1Low、F0-1High、F2、F3、F4 の 5 つの線維化ステージに分けられた。

LSM by VCTE™ Interpretation Guide

Quantifying fibrosis with FibroScan®

- FibroScan®: medical device which measures liver stiffness (fibrosis) and CAP® (steatosis) simultaneously on the same volume of tissue (3 cm³).
- Liver stiffness measurement with FibroScan® is a fast, reproducible, non-invasive and point of care test allowing quantification of fibrosis in patients with chronic liver diseases.
- High reproducibility of exams results, irrespective of operator (Intra-class correlation coefficient: 0.84)^[1].
- More than 2,300 peer-reviewed publications* on liver stiffness measurement (LSM).



Liver stiffness confounding factors^[9]

- Fibrosis (portal, sinusoidal...)
- But also:
- Acute inflammation, flares, elevated transaminases
- Congestion (right sided heart failure)
- Calorie intake
- Cholestasis
- Hepatic amyloidosis

[1] Bock, E., et al. Interobserver concordance in controlled attenuation parameter measurement, a novel tool for the assessment of hepatic steatosis on the basis of transient elastography. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2013; 25(10): 1055-11. [2] Cantin, et al. Prospective comparison of transient elastography, FibroScan, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2009; 136(2): 343-50. [3] Li, et al. Systematic review and meta-analysis of FibroScan for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2014; 61(4): 824-32. [4] Li, et al. Systematic review and meta-analysis of FibroScan for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 2014; 61(4): 824-32. [5] Li, et al. Systematic review and meta-analysis of FibroScan for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 2014; 61(4): 824-32. [6] Li, et al. Systematic review and meta-analysis of FibroScan for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 2014; 61(4): 824-32. [7] Li, et al. Systematic review and meta-analysis of FibroScan for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 2014; 61(4): 824-32. [8] Li, et al. Systematic review and meta-analysis of FibroScan for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 2014; 61(4): 824-32. [9] Li, et al. Systematic review and meta-analysis of FibroScan for liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 2014; 61(4): 824-32.

Figure 10. Echosens™ から公開されている FibroScan の interpretation guide. LSM から病因毎に線維化ステージを予測することが可能. [INTERPRETATION GUIDE, Retrieved December 18, 2024 from <https://www.echosens.com/wp-content/uploads/2021/01/Interpretation-Guide-2020.pdf>].

2-2-7. 血液学的線維化予測マーカー

血液学的検査は SMVI と同日に行われた。検査項目は AST, ALT, T-Bil, PT-INR, PLT, albumin, ATX, M2BPGi である。AST to ALT ratio は AST/ALT として, AST to platelet ratio index (APRI) は [(AST/upper limit of the normal AST range) × 100] / PLT とし

て、Fib-4 index は $\text{age} \times \text{AST} / (\text{PLT} \times \sqrt{\text{ALT}})$ として計算した⁵⁹⁾。

2-2-8. 統計解析

結果のサマリは中央値と IQR で表した。また、カテゴリデータは % (n) でまとめた。線維化ステージ間の肝線維化マーカーの群間差を解析するために、Kruskal-Wallis 検定を用いた。群間差の大きさを定量化するために、一元配置分散分析に基づいて標準偏差比、いわゆる群間差指数(standard deviation ratio : SDR)を計算した⁶⁰⁾。群間 SD (SD_{BG})は、総平均からの群平均の変動として計算され、群内 SD (SD_{WG})は、群固有の SD の平均として計算された。したがって、SDR は SD_{BG}/SD_{WG} として計算され、どのパラメータの測定単位にも影響されない群間差の普遍的な効果量を表す。SDR の有意水準は一般的に 0.4 に設定されている⁶⁰⁾。

多重ロジスティック回帰分析(multiple logistic regression analysis: MLRA)は、特定の 2 つの線維化ステージを区別する場合に寄与しうる因子を探索するために実施した。最も低い線維化ステージ(F0-1Low)とそれ以外の病期(F0-1High - F4)を区別する各線維化指標の有効性を調査するために、線維化ステージの目的変数を以下の 2 通り設定して解析を行った：(1) F0-1Low vs 他の全ステージ(F0-1High - F4)、(2) F0-1Low vs F0-1High に限定した場合。説明変数は、年齢、性別、B-mode score、SMVI score、Fib-4 index、APRI、M2BPGiの中から選び、ステップワイズ変数選択法により最適回帰モデルを構築した。

SWE、LSM、AST、ALT、T-Bil、APRI、ATX、M2BPGi など非正規分布を示すパラメータは対数変換を行った。例外として、Fib-4 index は、その高度に歪んだ分布を修正するために、四分位尺度(Q1、Q2、Q3、Q4)に変換された。SMVI score の早期線維化とそれ以外の線維化を区別する診断精度は、ROC 曲線下面積(area under the curve : AUC)として評価した。

SMVI スコアリングにおける検査者内および検査者間の一致度は、重み付けカッパ係数を用いて評価した。検査者間の一致度は、2 人の判定者によって実施され、初回判定を行った認定超音波検査士とは異なる認定超音波検査士が事前の情報なしに判定することでその一致度をみた。また、検査者内の一致度は、初回判定から 3 ヶ月以上経過した時点で、最初の判定を行った認定超音波検査士が、すべての SMVI 画像について再度 SMVI score を決定した。

すべての統計解析は、汎用統計ソフト StatFlex（バージョン 7.0；Artech, 大阪, 日本）を用いて行い、本研究の統計的評価は、医学的背景を持つ生物統計学者である市原清志(MD, Ph.D)が行った。

2-3 結果

2-3-1. 患者集団 (Patient population)

全参加者の測定項目における統計学的パラメータを **Table 1** に示す。CLD 患者群は LSM 値によって病因毎に決定された線維化ステージによってサブグループ分類された。CLD 患者群の群間差の有意性は Kruskal-Wallis 検定で検定し、群間差の効果量は SDR を用いて表した。CLD 患者の 62.5% (242/469 人) が F0-1Low の線維化ステージにあり、対照群と比較して検査値に有意差は認めなかった。しかし、線維化ステージが進むにつれて、AST, ALT, Alb, PLT, APRI, Fib-4, M2BPGi に有意差がみられた ($p < 0.05$)。

Table 1. 登録された全患者の統計学的情報と各種検査情報

| | Fibrosis stage | CLD group | | | | | | SDR | Statistical test |
|----------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|------------------|
| | | Control | F0-1Low | F0-1High | F2 | F3 | F4 | | |
| Age (year) | n | 31 | 242 | 101 | 36 | 33 | 57 | 0.25 | H=21.1 |
| | Me(Q1-Q3) | 58.0 (47.0-64.5) | 62.5 (50.0-70.0) | 69.0 (57.0-74.3) | 68.5 (58.5-76.0) | 66.0 (61.0-72.0) | 68.0 (59.8-74.0) | | P<0.001 |
| Sex | Female | 26 (83.9) | 135 (55.8) | 46 (45.5) | 18 (50.0) | 10 (30.3) | 27 (47.4) | | $\chi^2=9.3$ |
| | Male | 5 (16.1) | 107 (44.2) | 55 (54.5) | 18 (50.0) | 23 (69.7) | 30 (52.6) | | P=0.05 |
| BMI (%) | n | 23 | 218 | 96 | 33 | 32 | 55 | 0.06 | H=5.0 |
| | Me(Q1-Q3) | 20.2 (19.1-21.7) | 23.0 (21.0-24.7) | 23.4 (21.5-25.8) | 22.4 (20.0-26.8) | 23.7 (21.2-26.8) | 23.4 (20.2-26.2) | | P=0.29 |
| B mode score n (%) | 0 | 31 (100.0) | 155 (64.0) | 41 (40.6) | 5 (13.9) | 1 (3.0) | 0 (0.0) | 1.93 | H=233.387 |
| | 1 | 0 (0.0) | 54 (22.3) | 23 (22.8) | 5 (13.9) | 1 (3.0) | 0 (0.0) | | P=0.00000 |
| | 2 | 0 (0.0) | 29 (12.0) | 25 (24.8) | 12 (33.3) | 3 (9.1) | 1 (1.8) | | |
| | 3 | 0 (0.0) | 4 (1.7) | 8 (7.9) | 5 (13.9) | 7 (21.2) | 4 (7.0) | | |
| | 4 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3 (3.0) | 4 (11.1) | 13 (39.4) | 6 (10.5) | | |
| | 5 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 4 (11.1) | 4 (12.1) | 13 (22.8) | | |
| SWE (kPa) | n | 31 | 242 | 101 | 36 | 32 | 57 | 2.89 | H=326.2 |
| | Me(Q1-Q3) | 3.87 (3.73-4.18) | 4.18 (3.93-4.45) | 5.46 (4.67-6.51) | 7.16 (5.84-8.07) | 9.26 (7.89-10.3) | 11.6 (10.6-12.7) | | P<0.001 |
| LSM (kPa) | n | 31 | 242 | 101 | 36 | 33 | 57 | 3.03 | H=396.8 |
| | Me(Q1-Q3) | 3.8 (3.5-4.0) | 3.8 (3.4-4.3) | 5.8 (5.3-6.4) | 8.1 (7.6-8.9) | 11.3 (10.4-12.9) | 22.8 (18.6-34.9) | | P<0.001 |
| SMVI score n (%) | 0 | 31 (100.0) | 123 (50.8) | 8 (7.9) | 1 (2.8) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1.50 | H=236.5 |
| | 1 | 0 (0.0) | 56 (23.1) | 35 (34.7) | 6 (16.7) | 2 (6.1) | 0 (0.0) | | P<0.001 |
| | 2 | 0 (0.0) | 45 (18.6) | 40 (39.6) | 8 (22.2) | 6 (18.2) | 2 (3.5) | | |
| | 3 | 0 (0.0) | 16 (6.6) | 14 (13.9) | 12 (33.3) | 8 (24.2) | 9 (15.8) | | |
| | 4 | 0 (0.0) | 2 (0.8) | 4 (4.0) | 9 (25.0) | 15 (45.5) | 18 (31.6) | | |
| | 5 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (3.0) | 17 (29.8) | | |
| AST (U/L) | n | 24 | 238 | 99 | 36 | 33 | 54 | 0.63 | H=98.3 |
| | Me(Q1-Q3) | 20.5 (18.0-25.0) | 22.0 (18.0-27.0) | 25.0 (22.0-33.0) | 30.5 (21.0-51.0) | 38.0 (22.0-47.3) | 42.0 (30.0-56.0) | | P<0.001 |
| ALT (U/L) | n | 24 | 239 | 100 | 36 | 33 | 57 | 0.29 | H=38.0 |
| | Me(Q1-Q3) | 16.0 (12.5-18.5) | 18.0 (14.0-27.8) | 23.0 (16.5-39.5) | 28.0 (15.0-54.0) | 28.0 (17.8-45.5) | 31.0 (21.0-43.0) | | P<0.001 |
| T-Bil (mg/dL) | n | 22 | 233 | 99 | 35 | 33 | 55 | 0.32 | H=33.4 |
| | Me(Q1-Q3) | 0.70 (0.60-1.00) | 0.70 (0.60-0.90) | 0.80 (0.60-1.00) | 0.80 (0.60-1.10) | 0.70 (0.60-0.93) | 1.10 (0.80-1.50) | | P<0.001 |
| Alb (g/dL) | n | 23 | 237 | 100 | 36 | 33 | 57 | 0.72 | H=89.1 |
| | Me(Q1-Q3) | 4.40 (4.10-4.68) | 4.40 (4.20-4.60) | 4.40 (4.10-4.55) | 4.30 (4.10-4.50) | 4.20 (3.90-4.50) | 3.80 (3.40-4.00) | | P<0.001 |
| PLT ($\times 10^4/mm^3$) | n | 24 | 236 | 100 | 36 | 33 | 57 | 0.74 | H=115.5 |
| | Me(Q1-Q3) | 216 (160-243) | 214 (178-257) | 210 (175-246) | 192 (162-230) | 150 (108-198) | 105 (74-148) | | P<0.001 |
| PT-INR | n | 19 | 221 | 87 | 34 | 31 | 54 | 0.33 | H=94.7 |
| | Me(Q1-Q3) | 0.99 (0.94-1.05) | 0.98 (0.95-1.02) | 0.98 (0.95-1.04) | 1.00 (0.97-1.07) | 1.05 (1.00-1.13) | 1.14 (1.08-1.31) | | P<0.001 |
| AAR | n | 23 | 239 | 100 | 36 | 33 | 56 | 0.20 | H=13.2 |
| | Me(Q1-Q3) | 1.33 (1.04-1.57) | 1.17 (0.90-1.50) | 1.13 (0.84-1.47) | 1.39 (0.87-1.65) | 1.18 (0.93-1.43) | 1.34 (1.15-1.68) | | p<0.05 |
| APRI | n | 24 | 236 | 100 | 36 | 33 | 57 | 0.95 | H=145.8 |
| | Me(Q1-Q3) | 0.28 (0.18-0.33) | 0.27 (0.21-0.34) | 0.32 (0.25-0.39) | 0.47 (0.28-0.65) | 0.61 (0.44-0.91) | 1.04 (0.54-1.54) | | P<0.001 |
| Fib-4 | n | 23 | 237 | 100 | 36 | 33 | 57 | 1.05 | H=152.4 |
| | Me(Q1-Q3) | 1.48 (1.00-2.00) | 1.47 (1.02-2.03) | 1.73 (1.23-2.42) | 2.18 (1.75-2.88) | 2.94 (2.13-4.57) | 5.51 (3.37-8.05) | | P<0.001 |
| ATX | n | 3 | 185 | 73 | 25 | 26 | 40 | 0.86 | H=93.9 |
| | Me(Q1-Q3) | | 0.90 (0.75-1.13) | 0.94 (0.78-1.30) | 1.11 (0.90-1.29) | 1.22 (1.07-1.48) | 1.92 (1.54-2.28) | | P<0.001 |
| M2BPGi (mg/L) | n | 8 | 208 | 81 | 27 | 26 | 46 | 1.35 | H=135.4 |
| | Me(Q1-Q3) | 0.46 (0.37-0.59) | 0.72 (0.52-0.94) | 0.93 (0.67-1.39) | 0.90 (0.70-1.54) | 1.79 (1.07-2.38) | 5.56 (1.92-7.95) | | P<0.001 |

2-3-2. 異なる線維化段階における SMVI 所見

異なる線維化ステージにおける 3 つの SMVI 所見の分布を Table 2 に示す。F0-1High 群ではすでに 92.0% に狭小化(narrowing)が認められ、線維化の進行とともに最終的には全例

に狭小化(narrowing)が認められた。口径不整(caliber irregularity)に関しては、F0-1Low 群では 10.3%にしか認められなかったが、F4 群では 89.5%に増加した。屈曲蛇行(tortuosity)に関しては、F0-1Low 群では全例で蛇行がなく直線的な血管走行を認めたが、F4 群では 80.7%に軽度を含めた明らかな蛇行を認めた。

異なる 5 つの線維化ステージにおいて、これらの SMVI 所見出現頻度は全ての群間で有意差を認めた(Kruskal-Wallis 検定： $P < 0.001$)。また、F0-1Low 群を対象としたとき、各群との SMVI score の差はすべて有意であった(Dunn 検定： $P < 0.001$)。

Table 2. LSM 値で分類された 5 つの線維化ステージにおける SMVI 所見の分布

| Score | Fibrosis stage | | | | | K-W test p value |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | |
| | F0-1Low n= 273 | F0-1High n= 101 | F2 n= 36 | F3 n= 33 | F4 n= 57 | |
| Narrowing | | | | | | < 0.001 |
| 0 | 155 (56.8) | 8 (7.9) | 2 (5.6) | 0 (0) | 0 (0) | |
| 1 | 66 (24.2) | 46 (45.5) | 13 (36.1) | 9 (27.3) | 4 (7.0) | |
| 2 | 52 (19.1) | 47 (46.5) | 21 (58.3) | 24 (72.7) | 53 (93.0) | |
| p-value: (1) vs. (2-5) | | P=0.00 | P=0.00 | P=0.00 | P=0.00 | |
| Caliber irregularity | | | | | | < 0.001 |
| 0 | 245 (89.7) | 79 (78.2) | 12 (33.3) | 8 (24.2) | 6 (10.5) | |
| 1 | 24 (8.8) | 16 (15.8) | 17 (47.2) | 16 (48.5) | 27 (47.4) | |
| 2 | 4 (1.5) | 6 (5.9) | 7 (19.4) | 9 (27.3) | 24 (42.1) | |
| p-value: (1) vs. (2-5) | | P=0.01 | P=0.00 | P=0.00 | P=0.00 | |
| Tortuosity | | | | | | < 0.001 |
| 0 | 273 (100) | 96 (95.1) | 29 (80.6) | 19 (57.6) | 11 (19.3) | |
| 1 | 0 (0) | 5 (4.9) | 6 (16.7) | 10 (30.3) | 23 (40.4) | |
| 2 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2.8) | 4 (12.1) | 23 (40.3) | |
| p-value: (1) vs. (2-5) | | NS | P=0.00 | P=0.00 | P=0.00 | |

3 つの特徴的所見に関して、所見の強弱で 0-2 点を振り分けている。0=所見なし、1=軽度あり、2=あり。P 値は Kruskal-Wallis 検定と Dunn 検定を使用している。()内の数値はパーセント。

2-3-3. SMVI score と他の肝線維化パラメータとの多変量評価

F0-1Low 群 (=1, 他の線維化ステージ=0) を目的変数に設定して MLRA を実施したところ, F0-1Low 群と他の群との区別に寄与するパラメータは, 強い順に SMVI score (オッズ比=2.61; 95%CI=2.00-3.39), B-mode score (1.80; 1.41-2.30), Fib-4 index (1.66; 1.20-2.29) であった (Table 3A). 回帰モデルを用いた F0-1Low を区別する全体的な精度は多変量 AUC = 0.903 であり, 個々のパラメータの単変量 AUC は高い順から SMVI score = 0.864, B-mode score = 0.823, Fib-4 index = 0.724 であった (Figure 11A).

高度線維化群に影響を受ける可能性も考慮し, F0-1Low vs F0-1High に限定して 2 つの早期線維化ステージを区別するための second analysis を行った. 両者の区別に寄与した説明変数は SMVI score (2.26; 1.70-3.00) と B-mode score (1.53; 1.16-2.02) であった (Table 3B). また, 本回帰モデルの多変量 AUC は 0.804 で, 個々のパラメータの単変量 AUC は高い順から SMVI score = 0.764, B-mode score = 0.665 であった (Figure 11B). これらの分析は全体として, SMVI score の早期線維化に対する顕著な予測有用性を示した.

Table 3. MLRA による早期線維化ステージの鑑別に寄与するパラメータの検索

| A. | | | | | | |
|--------------|---------|----------------|--------------|---------|--------------|-------------|
| | β | SE (β) | z | P | OR | 95% CI |
| Age | 0.0128 | 0.0132 | 0.969 | 0.3327 | 1.013 | 0.987-1.039 |
| Sex | -0.1587 | 0.2648 | -0.599 | 0.5490 | 0.853 | 0.508-1.434 |
| B-mode score | 0.5889 | 0.1235 | 4.768 | < 0.001 | 1.802 | 1.415-2.296 |
| SMVI score | 0.9582 | 0.1338 | 7.161 | < 0.001 | 2.607 | 2.006-3.389 |
| Fib-4Rank | 0.5059 | 0.1627 | 3.110 | 0.002 | 1.659 | 1.206-2.282 |
| B. | | | | | | |
| | β | SE (β) | z | P | OR | 95% CI |
| Age | 0.0259 | 0.0143 | 1.815 | 0.0695 | 1.026 | 0.998-1.055 |
| Sex | -0.2960 | 0.2734 | -1.083 | 0.2790 | 0.744 | 0.435-1.271 |
| B-mode score | 0.4259 | 0.1407 | 3.027 | 0.002 | 1.531 | 1.162-2.017 |
| SMVI score | 0.8136 | 0.1418 | 5.739 | < 0.001 | 2.256 | 1.709-2.979 |
| Fib-4Rank | 0.1704 | 0.1692 | 1.007 | 0.314 | 1.186 | 0.851-1.652 |

A: F0-1Low と F0-1High 以上の線維化ステージを区別するための多変量ロジスティック回帰分析 (n=486). 多変量 AUC の回帰の適合度指数は 0.903 (95%CI = 0.877-0.930) で

あった。Fib-4 index は四分位に分けられた(Q1=1.20, 中央値=1.78, Q3=2.69)。

B: F0-1Low と F0-1High の線維化ステージを区別するための多変量ロジスティック回帰分析 (n=360)。多変量 AUC による回帰の適合度指数は、AUC が 0.804 (95%CI: 0.755–0.852), AIC が 352.6 であった。Fib-4 index は四分位に分けられた (Q1=1.055, 中央値=1.56, Q3=2.125)。

Abbreviations: AIC: Akaike's information criterion; AUC: area under the receiver operating characteristic curve; Fib-4: fibrosis-4 index; SMVI: stacked microvascular imaging.

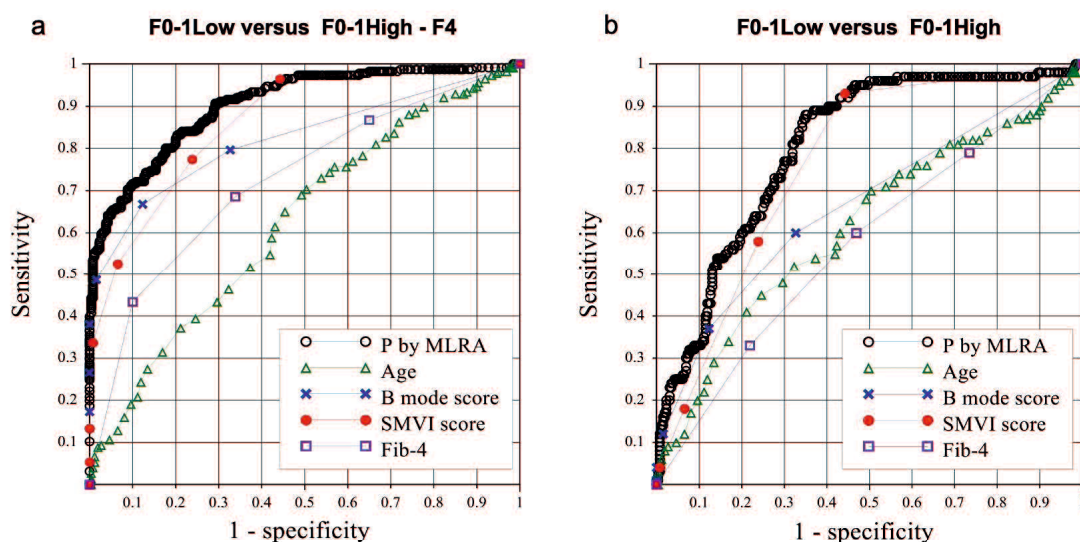


Figure 11. 早期線維化を予測する診断精度に関する ROC 解析

A: F0-1Low vs. F0-1High-F4 (n=486).

MLRA による多変量 AUC=0.903; SMVI score: AUC=0.864 (95%CI=0.833–0.896); B-mode score: AUC=0.823 (95%CI=0.784–0.862); Fib-4: AUC=0.724 (95%CI=0.678–0.769).

B: F0-1Low vs F0-1High (n=360).

MLRA による多変量 AUC=0.804; SMVI score: AUC=0.764 (95%CI=0.714–0.815); B-mode score: AUC=0.665 (95%CI=0.599–0.731).

Abbreviations: AUC: area under the receiver operating curve; CI: confidence interval; Fib-4: fibrosis-4; H: high; L: low; MLRA: multivariate logistic regression analysis; SMVI: stacked microvascular imaging.

この分析結果を裏付けるために、代表的な 5 つの線維化指標について線維化ステージ間の分離の程度をグラフ化した(Figure 12). 各パネルの上部には、5 つのステージすべての群間(SDR₀₋₄)と F0-1Low と F0-1High 群間(SDR₀₋₁)の 2 つの場合で計算された SDR 値が示されている. SDR₀₋₄では, B-mode score (SDR₀₋₄=2.00) が最も高く, 次いで SMVI score (1.56), M2BPGi (1.37), Fib-4 (1.05), APRI (0.97)と続き, いずれも有意水準 0.4 を超えていた. 一方, 比較を F0-1Low と F0-1High の 2 つの初期ステージ (SDR₀₋₁)に限定した場合, SMVI score は B-mode score (SDR₀₋₁=0.54)に比べ, より高いステージ間分離(SDR₀₋₁=0.70)を示した. 一方, 残りの 3 つの検査マーカーはいずれも有意な群間差は認めなかった.

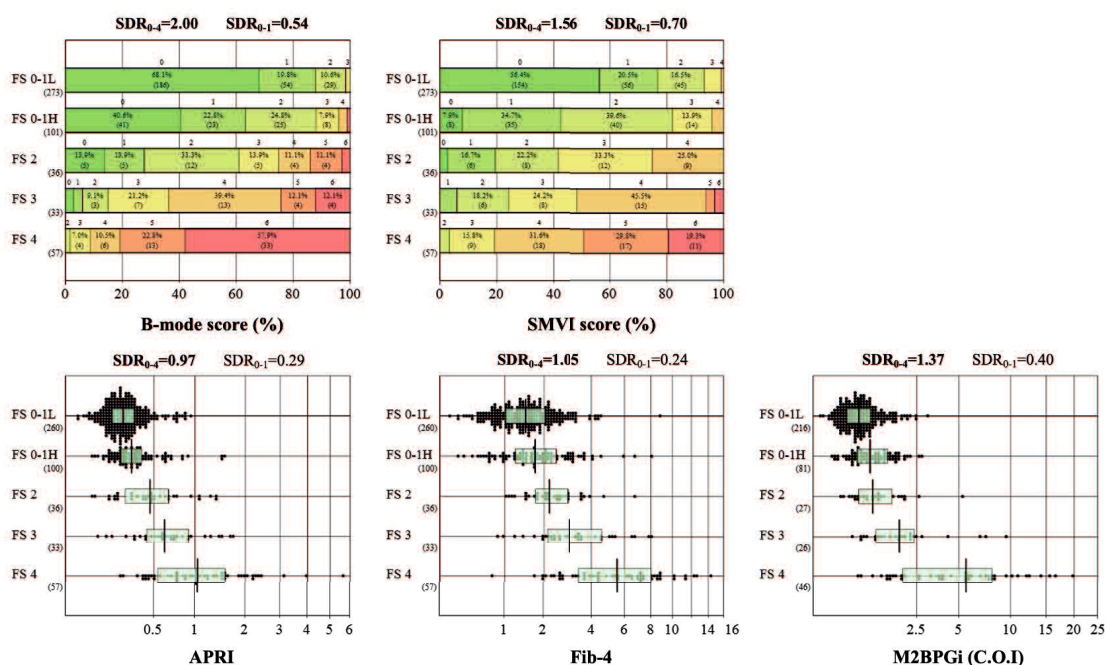


Figure 12. 5 つの線維化マーカーによる線維化ステージ予測能の比較

線維化ステージ間の分離の程度は SDR を用いて 5 つのステージすべて (SDR₀₋₄) と F0-1Low と F0-1High 間 (SDR₀₋₁) の 2 つの方法で表した. これらの SDR 値は 0.4 以上を有意とし, 各グラフの上に太字の数字で示した.

Abbreviations: APRI: aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index; Fib-4: fibrosis-4 index; FS: fibrosis stage; LSM: liver stiffness measurement; M2BPGi: mac-2 binding protein glycosylated isomer; SDR: standard deviation ratio; SMVI: stacked microvascular imaging.

ただし, これらの診断能の解析は elastography を reference として線維化ステージを分類

したにすぎない。すなわち、elastography は線維化だけを表しているわけではないため、この線維化ステージ分類は肝線維化の重症度を区別する SMVI score の真の能力を反映していない可能性がある。このような観点から、SMVI score の代替診断能分析として、Figure 13 に示すように、他の 6 つの肝線維化マーカーの値を SMVI score の 0-6 点をカテゴリーでサブグループ化し、SMVI score 間の区別の程度を再び SDR(SDR₀₋₆)として計算した。SDR₀₋₆ は、B-mode score (1.43)、SWE (1.40)、LSM (1.47)の 3 つの超音波画像関連指標で同程度に高値であった。一方、血液検査項目である APRI、Fib-4、M2BPGi の SDR₀₋₆ は、それぞれ 0.78、0.73、0.90 とやや低いレベルであった。さらに SMVI score 低値側の 0-2(SDR₀₋₂)に限定して群間差の程度を計算すると、超音波検査関連の B-mode score、SWE、LSM の SDR₀₋₂ はすべて SDR>0.4 の有意水準を超えていた一方、3 つの血液検査関連マーカーの SDR₀₋₂ はすべて閾値以下であった。

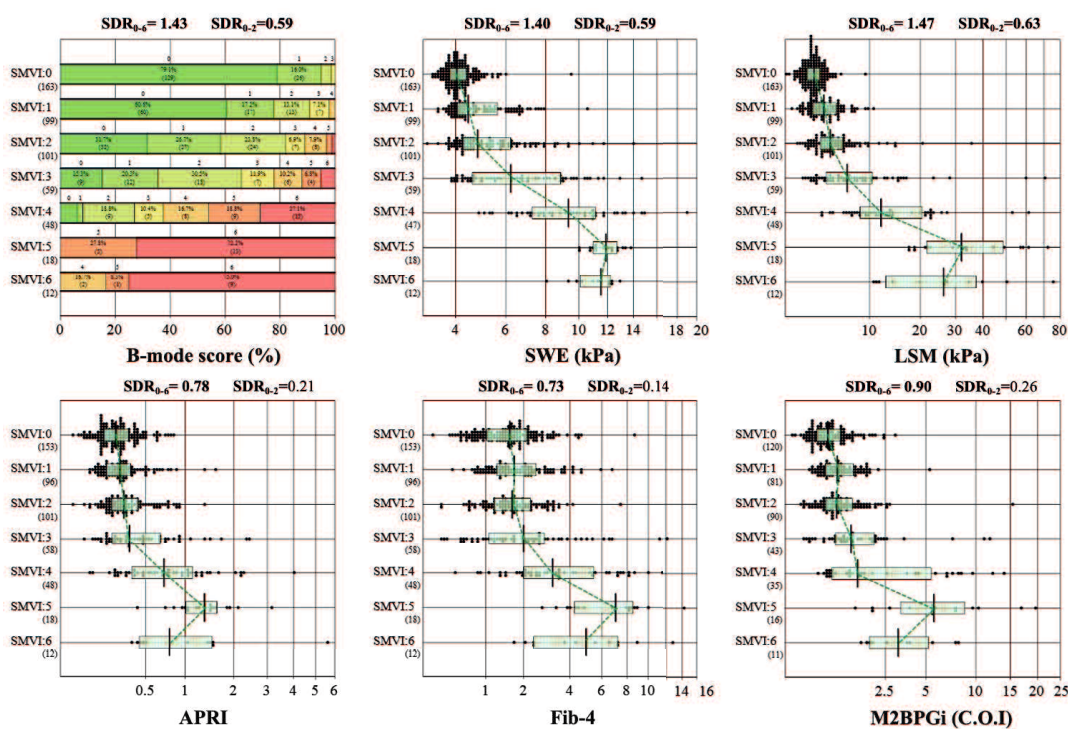


Figure 13. 肝線維化の 6 つの線維化指標に対する SMVI score の診断的意義

肝線維化の 6 つのマーカーの値を SMVI score の程度によってサブグループ化した SMVI 0-6 までの散布図を示した。中央の箱は 50%範囲、その中央の縦線は中央値を表し、中央値は群間差の検出を容易にするために線で結んだ。Kruskal-Wallis 検定により、6 つのパラメ

ータすべてで有意な群間差が認められた($P < 0.001$). 7段階の SMVI score における違いの大きさを SDR_{0-6} , 低値側の3つのスコアにおける違いの大きさは SDR_{0-2} として計算し, 各グラフの上に掲示した.

Abbreviations: APRI: aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index; Fib-4: fibrosis-4 index; LSM: liver stiffness measurement; M2BPGi: mac-2 binding protein glycosylated isomer; SDR: standard deviation ratio; SMVI: stacked microvascular imaging; SWE: shear wave elastography.

2-3-4. 病因別に見た SMVI score の特徴

全 CLD 症例から HBV, HCV, MASLD, ALD の4つの主要な病因分類を抽出し, 各病因について SMVI score と B-mode score を比較した(Figure 14). HCV, MASLD, ALD の3つの病因カテゴリーでは, SMVI score は B-mode score と比較して低スコア群の割合が高かった (それぞれ $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.05$).

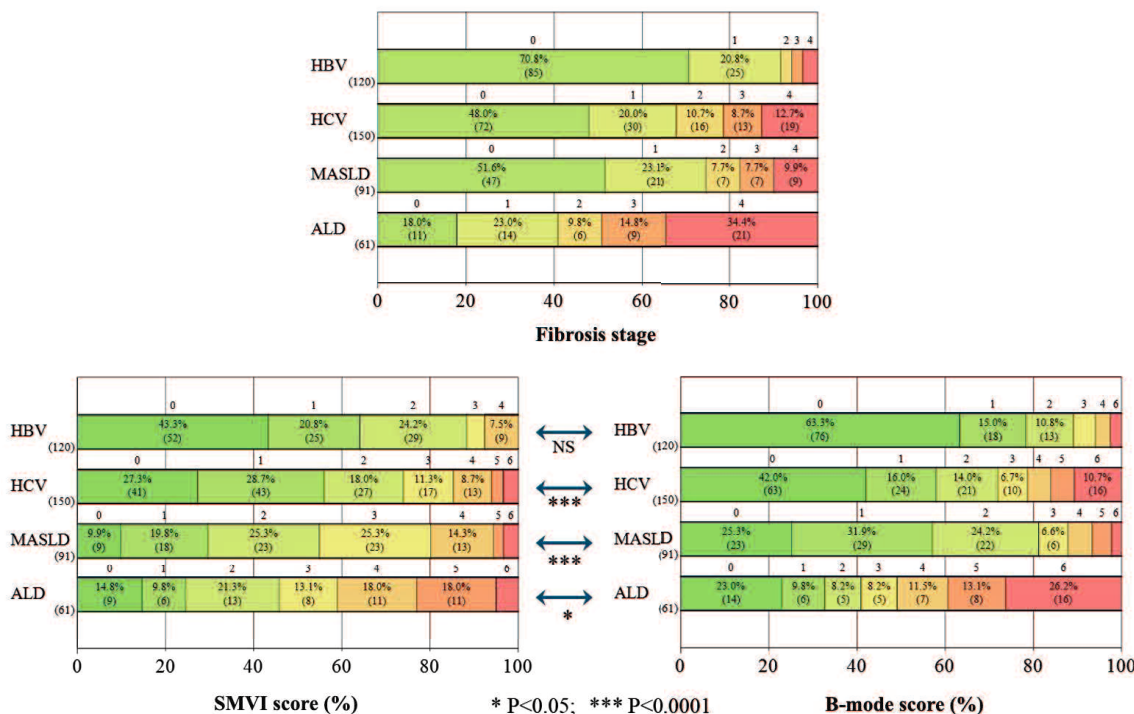


Figure 14. 4つの主要な病因における SMVI score と B-mode score の比較

上段:4つの病因における elastography に基づく線維化ステージの分布は, 下段:SMVI score

と B-mode score の分布を比較した。Mann-Whitney 検定では HCV, MASLD, ALD において SMVI score は B-mode score よりも有意に低値側にシフトしていることが明らかとなった。

Abbreviations: ALD: alcoholic liver disease; HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; MASLD: metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; SMVI: stacked microvascular imaging.

2-3-5. SMVI score の再現性

検者間信頼性と検者内信頼性を検定するために weighted kappa 係数を算出した。すなわち、検者間信頼性は 2 人の検査者の判定の一致度として、検者内信頼性は 1 回目の評価と 2 回目(少なくとも 3 ヶ月後)の評価の間に 1 人の検査者が行った判定の一致度として計算された。SMVI の 3 つの各所見における検査者間一致度は狭小化(narrowing): kw 0.89 (95% CI = 0.81–0.89), 口径不整(caliber irregularity): kw 0.73 (0.44–0.82), 屈曲蛇行(tortuosity): kw 0.78 (0.64–0.79)であった。同様に、観察者内一致度は狭小化(narrowing): kw 0.89 (0.82–0.90), 口径不整(caliber irregularity): kw 0.72 (0.56–0.69), 屈曲蛇行(tortuosity): kw 0.78 (0.64–0.79)であった。

2-4 考察

肝内血管形態変化を高感度に検出する SMVI の開発

従来の MVI の弱点を克服するために、我々はチルトスキャンモードにて 3–5 秒間の画像を蓄積する stacked microvascular imaging (SMVI)を新規に考案した。SMVI は肝内血管を"厚みを持った 2 次元画像"として表現するため、CLD における肝内血管構造の改変を容易に検出することができる。

肝線維化診断における SMVI の定量評価を可能にするために、我々は肝線維化における特徴的な血管変化を各所見の強弱でスコアリングする SMVI scoring system を考案した。このアプローチの根拠は、肝線維化における肝内血管の進行性変化に関する以下の病理学的知見にある。簡単に説明すると、グリソン被膜の進行性線維化と肝小葉のリモデリングにより、比較的壁の薄い門脈枝が線維化組織内で圧迫・崩壊され、また再生結節は肝静脈の圧

迫・崩壊を引き起こす⁶¹⁾。肝臓の壊死や瘢痕萎縮も門脈枝の巻き付きや歪みを引き起こす。このような肝内血管の改変はすべて、肝線維化進展度分類に用いるべき重要な特徴である。

そこで、これらの CLD における線維化の病理学的知見をもとに、SMVI 画像に現れる 3 つの特徴的な肝内血管の形態的変化を 0–2 点（合計 0–6 点）で数値化し、SMVI score を算出した。CLD 患者 469 人から得られた SMVI score から、狭小化(narrowing)が最も早く現れ、次いで口径不整(caliber irregularity)、そして屈曲蛇行(tortuosity)が最後に現れることが明らかになった。このように肝線維化が進行するにつれて、血管構造の変化はより多様で複雑になることが示された。

他の肝線維化マーカーと比較した SMVI スコアの診断能

従来の B-mode scoring system と新規 SMVI scoring system はともに、各画像における肝線維化の代表的な特徴について 0–2 point の 3 段階評価法を用いている。しかし、B-mode scoring system は、それぞれの重症度を視覚的に半定量化するものであり、主観的で検査者間のばらつきが大きい。対照的に、SMVI scoring system は、グレード間の境界をより明確にすることにより、優れた検者内および検者間の再現性 (kw: 0.72–0.89) を実現した。

SMVI の臨床的有用性に関して、MLRA を行ったところ、SMVI score が B-mode score や他の血清学的線維化マーカーと同様に線維化ステージと密接に相関していることを明らかにした。SMVI score の最も顕著な特徴は、他のマーカーと比較して F0-1Low と F0-1High を区別する分解能が高いことであった。この分析結果は、散布図における群間分離の程度と SDR から確認された(Figure 12)。事実、F0-1Low と F0-1High の鑑別において、SMVI score の SDR は 0.70 で B-mode score の 0.54 よりも高い SDR を達成し、線維化早期段階における SMVI score の優位性を示した。この所見は、肝線維化の最も早期の徴候である狭小化(narrowing)を捉える SMVI の感度の高さによるものと考えられる。

一方で、elastography に基づく線維化ステージ分類を用いた SMVI score の診断的有用性の評価は、elastography が肝臓の硬さに依存した評価であるため、適切でない可能性があった。そこで、従来の肝線維化マーカーを SMVI score の 7 つのカテゴリ(0–6 point)にサブグループ化することで、SMVI score の代替的診断有用性の解析を行った(Figure 13)。その結果、B-mode score, SWE, LSM のすべての超音波画像関連の線維化スコアにおいて、SMVI スコア間で有効な区別が可能であることが明らかとなった。一方、血清学的線維化マ

ーカー(APRI, Fib-4, M2BPGi)の値も SMVI score によって変化したが, SMVI score が低値の 0-2 に限定された場合には, ステージ間の有意な区別はできなかった. これらの所見は, SMVI score が肝線維症の病期分類, 特にその初期段階において優れたツールであることを示している. 病因別解析では, HCV, MASLD, ALD では B-mode score と比較して SMVI 低スコア群の割合が有意に高いことから, これらの疾患群では早期の線維化検出が特に有用であることが示唆された.

研究の限界

肝線維化の病期を推定するための参考方法として, 古典的な肝生検ではなく, elastography に基づく LSM に依存した. これは, 肝生検は侵襲性が高く, 頻回の検査に適していないためである. 実際, 臨床診療の大部分は, 2021 年 EASL ガイドラインに記載されているように, 肝線維化の病期分類に非侵襲的検査を使用することに移行している^{11,51)}. したがって, LSM を使用した線維化ステージ分類は, 主として我々の SMVI scoring system を検証する上で必然的な選択であった. また, ドプライメージングの基本原理に依存する SMVI の限界として, 重度の脂肪症, 肥満, 様々な原因による肝外干渉因子の影響を受ける可能性がある.

結論

SMVI は血管の連続性を損なうことなく微小血管を強調する画像であり, CLD, 特に HCV, MASLD, ALD の早期線維化を検出するのに有効であることが証明された. SMVI score は, 3 つの特徴的な微小血管の変化(narrowing, caliber irregularity, tortuosity)の重症度から構成され, 従来 of B-mode score や Fib-4 index のような線維化予測マーカーと比較して, 線維化の重症度を区別する上で優れた性能を示した. SMVI は通常の汎用超音波診断装置で簡単に実施できるため, CLD 患者の肝線維化を評価するために, 特にその早期段階での日常臨床での使用が推奨される.

第3章 本論

研究Ⅱ Stacked Microvascular Imaging と AI 解析を組み合わせた客観的な線維化ステージ診断能の解析

3-1 研究の背景および目的

慢性肝疾患(chronic liver disease: CLD)とは、様々な原因により肝臓に慢性的な炎症が生じ、肝機能障害が持続する疾患である⁴⁸⁾。特に近年登場した直接作動型抗ウイルス薬は C 型慢性肝炎患者を大幅に減少させたが、代わりに過剰飲酒やメタボリックシンドロームなどの生活習慣に起因する慢性肝炎の増加が世界的な問題となっている⁶²⁾。このような慢性炎症に伴う肝線維化は、肝不全や肝発癌などの肝臓関連合併症の発症を予測する上で重要な因子と考えられている⁵⁰⁾。

肝線維化の評価において依然として肝生検は重要な役割を担っているが、その高い侵襲性、再現性の低さ、サンプリングバイアス、病理学的診断の不一致などの課題が残っている⁷⁾。超音波 elastography は、肝生検よりも日常診療に適した非侵襲的な線維症診断検査として最近注目されている^{63,64)}。しかし、elastography で得られる肝硬度値(liver stiffness measurement : LSM)は、急性炎症、胆汁うっ滞、うっ血などの影響で肝線維化ステージを過大評価する可能性がある⁶⁵⁾。これらの課題を克服するために、我々は線維化による肝内血管変化を詳細に描出できる新しいドプラ画像法である stacked microvascular imaging (SMVI)を開発した。さらに、SMVI 画像における3つの肝内血管の特徴的所見(narrowing, caliber irregularity, tortuosity)に基づく SMVI scoring system を用いた肝線維化評価法も同時に考案した。古典的 B-mode 評価法がそれぞれの判定ボーダーが主観的であったのに対し、SMVI scoring system では判定ボーダーを明瞭に規定することで、高い検査者間および検査者内と高い線維化ステージ分類能力を実証した⁶⁶⁾。他のいくつかの線維化評価指標と比較して、特に早期線維化ステージにおいて高い診断精度を示した⁶⁶⁾。しかし、SMVI scoring system は人間の主観的な判断による評価法であるという弱点があり、より客観的な評価法が求められていた。

近年の医用画像解析分野において、人工知能(artificial intelligence: AI)、特に deep learning

を用いたコンピュータ画像解析が盛んに行われている。実際、甲状腺^{67,68)}、乳房⁶⁹⁾、軟部腫瘍⁷⁰⁾、肝臓腫瘍⁷¹⁾において、畳み込みニューラルネットワーク(convolutional neural network: CNN)を用いた超音波画像分類の報告がいくつもある。CNNを用いた deep learning は、コンピュータ自身が高次の画像特徴を自動的に学習し、それらの特徴を抽出し、ネットワーク内の完全連結層を使用して分類するという多段階プロセスに基づいており、人間が特徴を設計する必要はない。

今回我々は、517 枚の SMVI 画像を用いて CNN を構築し、AI による肝線維化ステージ分類能と人間による SMVI scoring system を比較することで、AI 判定による SMVI の診断能を評価した。

3-2 対象と方法

3-2-1. 倫理的配慮

本研究は福岡徳洲会病院施設審査委員会（承認番号 220101）の審査および承認を受け、本研究に参加するすべての患者からインフォームド・コンセントを得た。ヘルシンキ宣言（最新版）、及び「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」（令和 5 年 3 月 27 日一部改正，7 月 1 日施行）に従って実施した。

3-2-2. 研究サンプル

2019 年 8 月から 2022 年 10 月の間に福岡徳洲会病院で vibration-controlled transient elastography (FibroScan[®])による肝硬度検査を実施した CLD 患者 564 人から SMVI 画像を得た。LSM に影響を及ぼす以下の疾患を有する患者は除外した：(1)多発性または大きな肝腫瘍、(2)急性肝障害、(3)心不全、(4)重症脂肪肝疾患、(5)息止め不能。また、黄疸、肝周囲腹水、妊娠のある症例には FibroScan を実施しなかった。さらに、精査の結果、肝障害がなかった健常人 31 人も除外され、最終的に CLD 患者 517 人が登録された (Figure 15)。

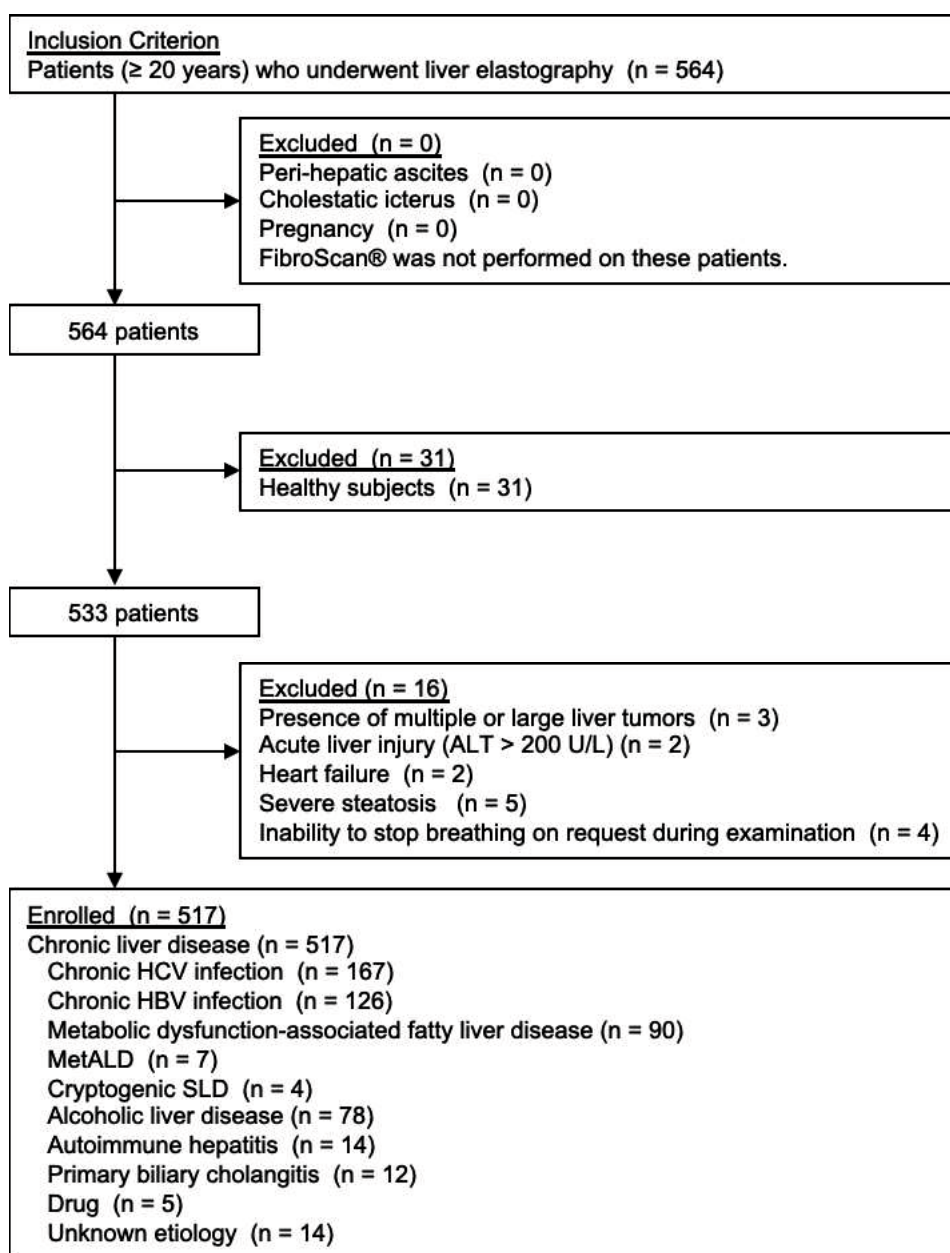


Figure 15. 参加者の組み入れおよび除外基準フロー

ALD, alcohol-associated liver disease; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; SLD, steatotic liver disease.

3-2-3 比較となる肝線維化ステージの決定

EASL のガイドラインでは、肝線維症の診断に肝生検は必ずしも必要ないとされており、transient elastography がその代替法として合意されている⁵¹⁾。実際、市中病院においては、CLD に対する線維化ステージ分類は FibroScan® による肝硬度検査で代替されており、ステ

ージング目的の肝生検はほとんど実施されていない。したがって、本研究では LSM に基づく線維化ステージ分類が採用された。

線維化ステージは病因ごとに分類され、ECHOSENS™ で定義された LSM から決定した (Figure 10)。また、FibroScan® では F0 と F1 を明確に識別できないため、正常値の上限 (5.0 kPa) をカットオフ値とし、LSM 値が 5.0 未満を F0-1Low, 5.0 以上を F0-1High とした⁵⁸⁾。これにより、線維化ステージは F0-1Low, F0-1High, F2, F3, F4 の 5 つのステージに分類された。

3-2-4 画像の前処理と畳み込みニューラルネットワークモデルの設計

SMVI 画像を得るために使用した超音波装置は Logiq S8+FS (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)、使用プローブは 9L probe である。SMVI 画像を得るためのプロトコルは、以前に開発された方法(2-2-4 SMVI の手技 参照)に基づいた。すなわち、(1)プローブを右肋間腔と腋窩正中線の交点で、肝臓の前区域/後区域境界が広く描出できる位置に置き、(2)カラー Doppler として HDC を選択、(3)肝臓の Depth は 5cm とし、関心領域は肝臓表面から 2.5 × 4.0cm に設定、(4) パネルから HDC の Infinite accumulation を選択した後、3-5 秒の息止めの間に one sweep でゆっくりとチルトスキャンを行った。初期線維化における肝内微小血管の形態学的変化を可視化するため、SMVI 画像は肝表を標的にした。これらの画像は筆頭著者によって、肝表直下を含むカラー Doppler 関心領域内において 200 × 300 ピクセルの長方形に切り取られた。この切り抜きサイズに規定することにより、カラー Doppler アーチファクトが確実に除去された。

一般的に deep learning モデルは、大量の学習データを入力し、データに含まれる特徴を学習することで、高い予測性能を示す。しかし、SMVI はまだ広く実装されていない新しい手法であり、大規模なデータセットを入手することは困難であったため、データ補強を行った。Google (Mountain View, CA, USA) が開発した TensorFlow に実装された ImageDataGenerator を使用して、回転範囲、垂直フリップ、水平フリップ、ズーム、幅シフト、高さシフトなどのデータ増強を実施した。データの前処理手順を Figure 16A に示す。

本研究で使用した CNN モデルは、Kaming ら⁷²⁾によって 2015 年に導入された ResNet50 である。ResNet50 は、層が深くなっても勾配の損失を防ぐ残差ブロックを導入することで、高い精度を達成している CNN model であり、ImageNet や医用画像⁷³⁾などの様々なデータ

セットに対してかなり高い画像分類精度を示している。さらに、Tensorflow や PyTorch などのディープラーニングフレームワークで容易に構築できるため、臨床応用への応用も容易である。このような理由で ResNet50 を使用した。

ResNet50 のアーキテクチャは、Figure17 に示すように、ResNet の原著論文⁷²⁾と同じアーキテクチャを使用し、16 個の残差ブロック(全 49 層)と 1 個の完全接続層が接続されている。オプティマイザは Adam を使用した。Adam は移動平均により振動をさらに抑制する momentum と、学習率を調整することにより振動を抑制する RMSProp を組み合わせたものである。ラベルは整数であるため、損失関数として sparse categorical cross-entropy を用いた。データセットの被験者数の不均衡を是正するため、クラス数比の逆数で重み付けを行った($lass_weights = total_count / class_count$)。これらの重みを損失関数に適合させることで、クラスの不均衡の影響を軽減した。全 517 枚の画像を 10 のサブセットに分割し、性能評価のための内部検証として 10-Fold Cross-Validation を実施した。学習では、ResNet50 の十分な学習を考慮して実験的に決定したエポック数を 70 とした。テストでは、学習した ResNet50 をテストデータに適用し、accuracy, precision, recall, F1 score を評価した。これらの CNN の概念図を Figure16B に示す。

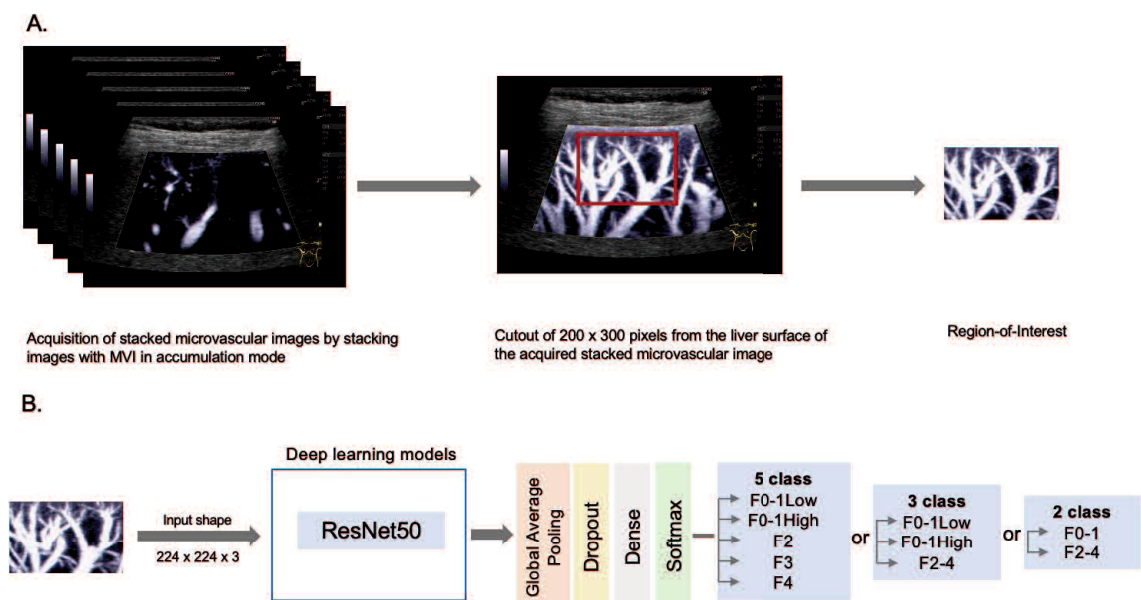


Figure 16. SMVI 画像の前処理と畳み込みニューラルネットワークモデルの設計

A. SMVI 画像の作成。HDC と呼ばれる高感度ドプラモードを数秒間蓄積することで生成される SMVI は、連続性を失うことなく多数の肝内血管を描出することができる。アーチフ

アクトを避けるため、ドプラ関心領域から 200×300 ピクセルを切り出した。B. 畳み込みニューラルネットワークモデルの構築. ResNet50 をベースとし、Global Average Pooling, Dropout, Dense, Softmax を追加したアーキテクチャを採用した。

| layer name | output size | 50-layer |
|------------|------------------|---|
| conv1 | 122×112 | $7 \times 7, 64, \text{stride } 2$ |
| conv2_x | 56×56 | $3 \times 3 \text{ max pool, stride } 2$ |
| | | $\begin{bmatrix} 1 \times 1, 64 \\ 3 \times 3, 64 \\ 1 \times 1, 256 \end{bmatrix} \times 3$ |
| conv3_x | 28×28 | $\begin{bmatrix} 1 \times 1, 128 \\ 3 \times 3, 128 \\ 1 \times 1, 512 \end{bmatrix} \times 4$ |
| conv4_x | 14×14 | $\begin{bmatrix} 1 \times 1, 256 \\ 3 \times 3, 256 \\ 1 \times 1, 1024 \end{bmatrix} \times 6$ |
| conv5_x | 7×7 | $\begin{bmatrix} 1 \times 1, 512 \\ 3 \times 3, 512 \\ 1 \times 1, 2048 \end{bmatrix} \times 3$ |
| | 1×1 | average pool, 1000-d fc, softmax |
| FLOPs | | 3.8×10^9 |

Figure 17. ImageNet のアーキテクチャ

ResNet50 には 16 の残差ブロック（合計 49 層）があり、1 つの完全連結層がある。

3-2-5 SMVI scoring system を用いた超音波検査士による判定

人の目による判定方法として、SMVI scoring system を採用した(2-2-5 SMVI scoring system の構築 参照)。すなわち、SMVI 画像における肝内微小血管の形態変化の 3 つの特徴(narrowing, caliber irregularity, tortuosity)に着目し、各特徴の所見の強度に基づいて 0-2 でスコアリングを行った(0=absent, 1=mild, 2=present)。具体的な閾値の設定に関しては以下に示す。

「狭小化 (narrowing)」は、肝表から 1cm の深さの位置にある 5 本の最も太い血管の平

均径と定義した. 0 point: $\geq 1.50\text{mm}$, 1 point: $1.25\text{--}1.49\text{mm}$, 2 point: $\leq 1.24\text{mm}$.

「口径不整 (caliber irregularity)」は血管径の不均一さで定義され, 肝表面から 1.5cm 以内に位置する血管輪郭の不整化によって決定された. 0 point: 血管輪郭の不整なし, 1 point: 描出血管の 50% 未満が不整, 2 point: 描出血管の 50% 以上が不整.

「屈曲蛇行 (tortuosity)」は描出された血管の蛇行の程度によって定義された. 口径不整と同様に, 肝臓表面から 1.5cm 以内の血管を注意深く観察し, 以下のようにスコア化した. 0 point: 直線的(蛇行なし), 1 point: 50% 未満の血管に蛇行あり, 2 point: 50% 以上の血管に蛇行あり.

最終的に 3 つのスコアの合計 $0\text{--}6$ point が SMVI score と定義された. 1 人の超音波検査士が SMVI 画像を取得し, すべての臨床情報にアクセスできないもう 1 人の超音波検査士がブラインドで全症例のスコアリング判定を行った. SMVI 画像を取得した超音波検査士は 15 年, 判定を行った超音波検査士は 10 年の経験を有し, 両者とも日本超音波医学会認定超音波検査士である.

異なる線維化ステージにおける代表的な SMVI 画像の比較を Figure18 に示す.

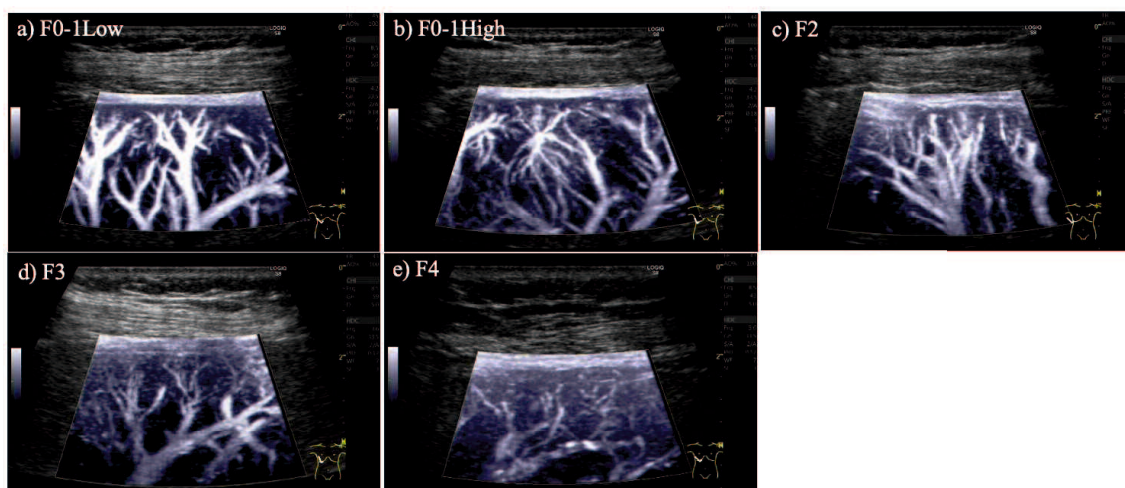


Figure 18. 5 つの異なる線維化ステージにおける SMVI 画像の差異.

線維化の進展に伴い複雑な肝内血管の形態的变化が起こる. 各線維化段階の点数は, narrowing, caliber irregularity, tortuosity の順に以下の通りである. a) F0-1Low. 0, 0, and 0 points, b) H0-1High. 2, 0, and 0 points, c) F2. 2, 1, and 0 points, d) F3. 2, 1, and 1 points, e) F4. 2, 2, and 2 points.

3-2-6 統計

データの正規性の検定には Shapiro-Wilk 検定を用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。異なる線維化ステージにおける AI による分類能の検証は、2 クラス(F0-1, F2-4)、3 クラス(F0-1Low, F0-1High, F2-4)、5 クラス(F0-1Low, F0-1High, F2, F3, F4)の3つの条件で行われた。Significant fibrosis (\cong F2) を他のステージと区別するための SMVI score の診断精度は、受信者動作特性曲線下面積 (area under the curve: AUC) として評価され、カットオフは Youden index に基づいて決定された。統計解析はすべて EZR⁷⁴⁾ (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いて行った。

3-3 結果

3-3-1 患者の集団

本研究は後ろ向き横断研究である。517 人の連続した CLD 患者(平均年齢 63.9 ± 12.9 歳, 男性 254 人[49.1%], 女性 263 人[50.9%]) を登録した。これらの患者の統計学的情報を [Table 4](#) にまとめた。

Table 4. 全体の研究対象者情報

| Parameter | Participants (n = 517) |
|--|------------------------|
| Age (years) | 63.6 ± 12.9 |
| Sex (male/female) | 254/263 |
| Etiology, n (%) | |
| HCV | 167 (32.3) |
| HBV | 126 (24.3) |
| MASLD | 90 (17.4) |
| MetALD | 7 (1.4) |
| Cryptogenic SLD | 4 (0.8) |
| ALD | 78 (15.1) |
| PBC | 12 (2.3) |
| AIH | 14 (2.7) |
| Drug | 5 (1.0) |
| Unknow | 14 (2.7) |
| Elastography-based fibrosis stage, n (%) | |
| F0–1Low | 243 (47.0) |
| F0–1High | 109 (21.1) |
| F2 | 43 (8.3) |
| F3 | 49 (9.5) |
| F4 | 73 (14.1) |
| SMVI score, n (%) | |
| 0 | 140 (27.1) |
| 1 | 99 (19.1) |
| 2 | 108 (20.9) |
| 3 | 64 (12.4) |
| 4 | 56 (10.8) |
| 5 | 28 (5.4) |
| 6 | 22 (4.3) |

値は平均値±標準偏差または数値 (%) で表されている。

HCV, hepatic C virus; HBV, hepatic B virus; MASLD, metabolic dysfunction associated with steatotic liver disease; ALD, alcohol-associated liver disease; AIH, autoimmune hepatitis; LSM, liver stiffness measurement; PBC, primary biliary cholangitis.

CLD 患者の 56.7%の病因は B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルスによるウイルス性肝疾患であり, 34.6%の病因は脂肪性肝疾患であった. 中等度以上の線維化 (\geq F2) は 31.9%の患者にみられた. 線維化の各ステージに関する詳細な統計学的情報を [Table 5](#) に示す.

Table 5. 異なる線維化ステージ別の患者情報の比較

| Variable | | LSM-Based fibrosis stage | | | | | K-W test |
|-----------------------------|--------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | F0-1Low | F0-1High | F2 | F3 | F4 | |
| Age (year) | n | 243 | 109 | 43 | 49 | 73 | P < 0.001 |
| | Median | 62 | 69 | 70 | 67 | 68 | |
| | Q1~Q3 | 51~70 | 59~74 | 62~77 | 57~74 | 56~75 | |
| Sex | Male | 104 (42.8) | 61 (56.0) | 19 (44.2) | 33 (67.3) | 37 (50.7) | P < 0.05 |
| | Female | 139 (57.2) | 48 (44.0) | 24 (55.8) | 16 (32.7) | 36 (49.3) | |
| BMI (kg/m ²) | n | 218 | 103 | 41 | 48 | 67 | P = 0.241 |
| | Median | 22.8 | 23.4 | 22.2 | 23.1 | 22.8 | |
| | Q1~Q3 | 20.9~24.5 | 21.5~25.7 | 20.4~26.0 | 20.9~26.0 | 20.3~25.7 | |
| Skin Capsular Distance (mm) | n | 243 | 209 | 43 | 49 | 73 | P = 0.177 |
| | Median | 15.9 | 16.4 | 15.7 | 15.6 | 14.6 | |
| | Q1~Q3 | 13.7~17.5 | 14.3~18.3 | 13.5~17.5 | 13.6~17.1 | 13.0~17.6 | |
| SMVI score | 0 | 129 (53.9) | 10 (9.2) | 1 (2.3) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | P < 0.001 |
| | 1 | 55 (22.6) | 37 (33.9) | 6 (14.0) | 1 (2.0) | 0 (0.0) | |
| | 2 | 43 (17.7) | 29 (40.4) | 13 (30.2) | 6 (12.2) | 2 (2.7) | |
| | 3 | 15 (6.3) | 13 (11.9) | 15 (34.9) | 12 (24.5) | 9 (12.3) | |
| | 4 | 1 (0.4) | 5 (4.6) | 8 (18.6) | 23 (46.9) | 19 (26.0) | |
| | 5 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 6 (12.2) | 22 (30.1) | |
| | 6 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (2.0) | 21 (28.8) | |
| SWE (kPa) | n | 243 | 109 | 43 | 48 | 73 | P < 0.001 |
| | Median | 4.2 | 5.5 | 7.3 | 9.2 | 11.3 | |
| | Q1~Q3 | 3.9~4.4 | 4.7~6.5 | 6.1~8.0 | 7.9~10.1 | 10.4~12.3 | |
| LSM (kPa) | n | 243 | 109 | 43 | 49 | 73 | P < 0.001 |
| | Median | 3.8 | 5.8 | 8.1 | 11.4 | 23.7 | |
| | Q1~Q3 | 3.4~4.3 | 5.3~6.4 | 7.6~9.0 | 10.4~12.4 | 18.8~33.6 | |

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AST (U/L) | n | 240 | 108 | 43 | 49 | 73 | |
| | Median | 22 | 26 | 30 | 34 | 42 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 18~26 | 22~33 | 21~48 | 23~46 | 30~61 | |
| ALT (U/L) | n | 240 | 108 | 43 | 49 | 73 | |
| | Median | 18 | 23 | 27 | 27 | 31 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 14~27 | 17~39 | 15~41 | 17~44 | 21~46 | |
| Albumin (g/dL) | n | 237 | 108 | 43 | 49 | 73 | |
| | Median | 4.4 | 4.4 | 4.3 | 4.2 | 3.8 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 4.2~4.6 | 4.1~4.6 | 4.1~4.6 | 3.9~4.5 | 3.4~4.1 | |
| PLT ($\times 10^4/\text{mm}^3$) | n | 238 | 108 | 43 | 49 | 73 | |
| | Median | 214 | 207 | 202 | 147 | 115 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 178~257 | 174~242 | 163~236 | 105~186 | 77~154 | |
| PT-INR | n | 220 | 94 | 42 | 45 | 70 | |
| | Median | 0.98 | 0.98 | 1.02 | 1.05 | 1.16 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 0.95~1.02 | 0.95~1.03 | 0.97~1.10 | 1.02~1.13 | 1.08~1.27 | |
| AAR | n | 240 | 108 | 43 | 49 | 73 | |
| | Median | 1.16 | 1.14 | 1.44 | 1.20 | 1.38 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 0.92~1.50 | 0.86~1.50 | 0.99~1.67 | 0.98~1.44 | 1.18~1.66 | |
| APRI | n | 238 | 108 | 43 | 49 | 73 | |
| | Median | 0.26 | 0.33 | 0.43 | 0.60 | 1.04 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 0.21~0.33 | 0.26~0.45 | 0.28~0.60 | 0.38~0.91 | 0.63~1.60 | |
| Fib-4 | n | 238 | 108 | 43 | 49 | 73 | |
| | Median | 1.44 | 1.79 | 2.42 | 3.19 | 4.89 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 1.02~1.94 | 1.30~2.48 | 1.75~3.02 | 2.26~5.03 | 3.12~7.35 | |
| ATX (mg/L) | n | 181 | 76 | 28 | 30 | 47 | |
| | Median | 0.92 | 0.94 | 1.08 | 1.22 | 1.89 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 0.75~1.14 | 0.74~1.30 | 0.89~1.29 | 1.07~1.64 | 1.50~2.26 | |
| M2BPGi (C.O.I) | n | 205 | 85 | 29 | 30 | 53 | |
| | Median | 0.72 | 0.93 | 1.09 | 1.81 | 4.01 | P < 0.001 |
| | Q1~Q3 | 0.53~0.94 | 0.67~1.40 | 0.71~1.61 | 1.15~2.48 | 1.92~7.71 | |

Abbreviations: AAR: aspartate aminotransferase-to-alanine aminotransferase ratio; ALT: alanine aminotransferase; APRI: aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index; AST:

aspartate aminotransferase; ATX: autotaxin; BMI: body mass index; Fib-4: fibrosis-4 index; LSM: liver stiffness measurement; M2BPGi, mac-2 binding protein glycosylated isomers; PLT: platelet; PT-INR: prothrombin time-international normalized ratio; SMVI: stacked macrovascular imaging; SWE: shear wave elastography; T-Bil: total bilirubin.

*P-values were determined using the Kruskal-Wallis test.

3-3-2. 異なる線維化ステージ分類数における SMVI 画像の識別性能

まず CLD 患者は F0-1Low(<5.0 kPa), F0-1High(\geq 5.0 kPa), F2, F3, F4 の 5 つの線維化ステージに分けられた。さらにこれらの線維化ステージを 5 クラス (F0-1Low, F0-1High, F2, F3, F4), 3 クラス (F0-1Low, F0-1High, F2-4), 2 クラス (F0-1, F2-4) の場合に分類し, それぞれのクラス分類モデルにおける診断精度を比較した。AI 診断精度は 5 クラス分類で 53.8%, 3 クラス分類で 66.3%, 2 クラス分類で 83.8%であり, 分類数が少なくなるにつれて accuracy は高くなった([Table 6](#))。precision, recall, F1 score についても同様の傾向が見られた。2 クラス分類における人間の判断と AI の判断を比較すると, accuracy は若干 AI 判定が優れる程度であったが, F1 score は明らかに AI 判定が上回っており, AI 判定の方が優れた分類モデルであることが明らかとなった。3 クラス分類と 5 クラス分類では, AI と人間の判断の性能はほぼ同等であった。各分類モデルの混同行列を [Figure 19](#) に示す。

Table 6. 分類クラス数の違いによる AI 判定と人間判定の診断精度の比較

a)

| Classification | Accuracy | Precision | Recall | F1 score |
|---|----------|-----------|--------|----------|
| 2 class (F0-1, F2-4) | 0.838 | 0.812 | 0.839 | 0.821 |
| 3 class (F0-1Low, F0-1High, F2-4) | 0.663 | 0.590 | 0.592 | 0.585 |
| 5 class (F0-1Low, F0-1High, F2, F3, F4) | 0.538 | 0.368 | 0.395 | 0.372 |

b)

| Classification | Accuracy | Precision | Recall | F1 score |
|---|----------|-----------|--------|----------|
| 2 class (F0-1, F2-4) | 0.816 | 0.636 | 0.775 | 0.698 |
| 3 class (F0-1Low, F0-1High, F2-4) | 0.655 | 0.580 | 0.586 | 0.583 |
| 5 class (F0-1Low, F0-1High, F2, F3, F4) | 0.557 | 0.375 | 0.396 | 0.385 |

a) AI による画像識別能, b) 人間による画像識別能

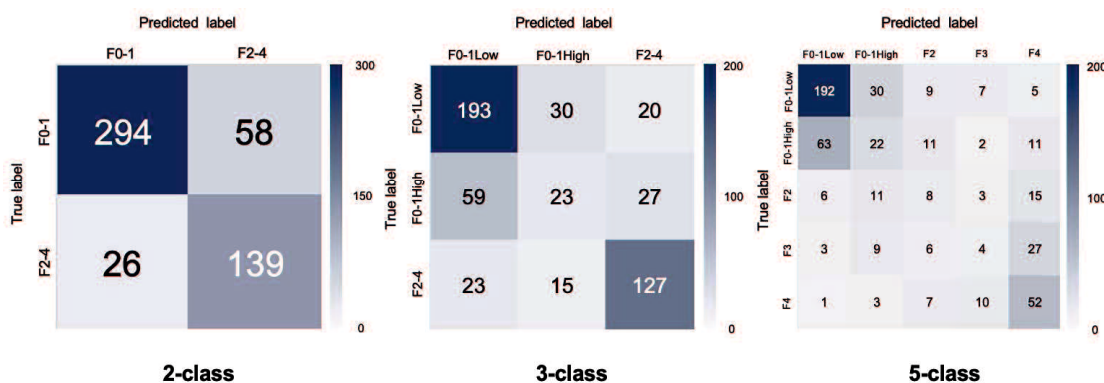


Figure 19. AI 解析における Confusion matrix

SMVI 画像解析における線維化ステージの真のクラス (行) とモデルによって生成された予測クラス (列) の混同行列. 数値は網掛けした色で数値として示す.

3-3-3. 中等度線維化(≧F2)識別を目的とした SMVI スコアの決定

SMVI スコアリングシステムは 3 つの血管形態学的特徴(narrowing, caliber irregularity, tortuosity)に基づき, 検者が主観的に判断する評価法である. AI 解析の結果から 2 クラス分類に着目し, 中等度線維化 (≧F2)を区別できる SMVI スコアを決定するために ROC 解

析を行った。最適なカットオフ値は SMVI score 3 point で、感度は 82.4%、特異度は 90.3% であった(AUC=0.93, 95%CI: 0.91–0.95)。

3-3-4. F0-1 vs F2-4 を分類する AI 及び検者判定の性能評価

AI による判定と人間による判定の診断精度を比較した。AI 診断精度 83.8% に対し、検者診断精度 81.6% であり、AI 判定は F2 以上の線維化の診断において有意に優れた精度を示した(t 検定, $p < 0.05$)。同様に、AI 判定は感度 84.2%、特異度 83.5% であり、検者判定よりも優れていた。分類性能の詳細は Table 7 に示す。

Table 7. 中等度線維化(F0-1 vs F2-4)を識別する AI 判定と検者判定の診断成績比較

| | Judge | |
|----------------------|---------------------|---------------------|
| | AI | Sonographer |
| Sensitivity (95% CI) | 0.842 (0.778–0.894) | 0.775 (0.697–0.840) |
| Specificity (95% CI) | 0.835 (0.792–0.872) | 0.832 (0.790–0.868) |
| PPV (95% CI) | 0.706 (0.637–0.768) | 0.636 (0.559–0.708) |
| NPV (95% CI) | 0.919 (0.883–0.946) | 0.907 (0.871–0.936) |
| Accuracy (95%CI) | 0.838 (0.803–0.868) | 0.816 (0.780–0.849) |
| LR+ (95% CI) | 5.113 (4.005–6.527) | 4.611 (3.620–5.874) |
| LR- (95% CI) | 0.189 (0.132–0.269) | 0.271 (0.199–0.369) |

Abbreviations: AI, artificial intelligence; CI, confidence interval; PPV, positive-predictive value; NPV, negative-predictive value; LR+, positive-likelihood ratio; LR-, negative-likelihood ratio

3-3-5. AI による SMVI の代表画像

本 CNN モデルにおいて正しい線維化ステージに分類された画像の例を Figure 20 に示す。F0-1 では、血管が太く、輪郭が滑らかで、走行が直線的な画像が多かったが、F2-4 では、血管が細く、輪郭が不規則で、走行が非直線的な画像が多かった。一方で正しく分類されなかった SMVI 画像の例を Figure 20 に示す。すべての症例に共通する分類の規則性を同定することはできなかったが、太く明確な輪郭を持つ血管の画像は F0-1 に分類され、細く複雑な走行を持つ血管の画像は F2-4 に分類されたと考えられた。

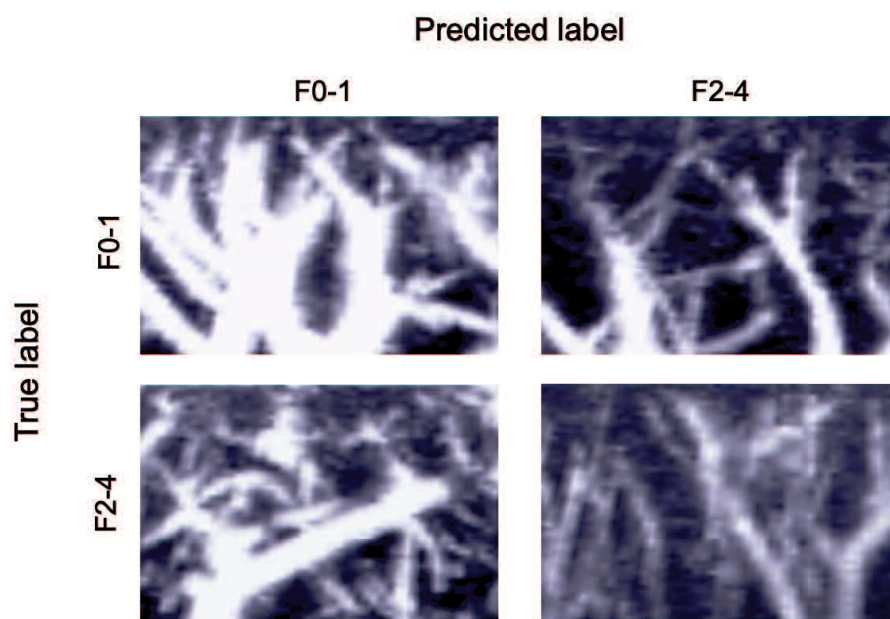


Figure 20. 線維化ステージ予測のための畳み込みニューラルネットワークモデルによって分けられた SMVI の代表画像.

トリミング画像のサイズは 200×300 ピクセル (22×14mm).

3-4 考察

本研究は、CLD 患者における SMVI 画像の解析手法としての deep learning の有用性を明らかにした。特に、AI による SMVI 解析は中等度以上の線維化($\geq F2$)の検出に有用であることを示した。

炎症と進行性の線維化を特徴とする慢性肝疾患は、病因に関係なく肝血管新生を起こすことが示されている⁵³⁾。肝硬変では、肥大した偽小葉結節が門脈や肝静脈の分枝を圧迫し、肝内血管の狭窄や蛇行をもたらす^{42-44,54)}。近年、このような肝内血管構造の改変を可視化するために、superb microvascular imaging や microvascular imaging といった高感度ドプラ法を用いた研究がされている。しかし、これらの方法は 2 次元の薄い 1 断面に過ぎないため、描出される血管は断片的であり、結果の解釈はしばしば困難であった^{55,56)}。このような高感度ドプラ法の画像上の問題を解決するために、我々は microvascular imaging (MVI) をベースとし、数秒間の画像加算を行うことで厚みを持った肝内血管強調画像を作成した。この stacked MVI という独自の手法により、従来の血管断片化という問題は解決され、厚み

を持った 2 次元画像を作成することに成功した。この画像的進化により、肝内血管の詳細な可視化が可能となった⁶⁶⁾。さらに、SMVI 画像における 3 つの特徴に基づいた scoring system も考案したが、このシステムは人間の判断に依存するため、潜在的な主観性バイアスの可能性を否定できなかった。そこで本研究では、人の目を介さない、AI を用いた SMVI 画像の判定を試みた。

以前の我々の研究において、SMVI scoring system を用いることで、健常者を適切に除外することができたため、本研究では、慢性肝疾患患者に限定した CNN モデルの構築を行なった。Deep learning に基づく AI 判定による分類性能は、2 クラス分類の精度は 83.8%、3 クラス分類の精度は 66.3%、5 クラス分類の精度は 53.8%であり、AI 判定は分類クラス数が増えると精度が低下することが示された。これは、各線維化ステージ間のサンプルサイズの不均衡に加え、サンプルサイズが 517 例と小さいことに依存したと考えられた。現時点では 3 クラス分類と 5 クラス分類の診断性能は良くないが、サンプルサイズが大きくなれば改善する可能性がある。一方、2 クラス分類の診断能は優れており、SMVI 画像の AI 解析は中等度以上の線維化を効果的に検出するスクリーニングツールとして重要な可能性が示唆された。また特に 2 クラス分類において、AI 判定による F1 score は 0.821 であり、人間による判定よりも高いため、AI 解析の方が優れたモデルフィッティングであることが示された。

中等度以上の線維化(\geq F2)は肝硬変と総死亡の危険因子であることから⁷⁵⁾、本研究では中等度以上の線維化を検出するための 2 クラス分類に着目した。中等度以上の線維化を検出する 2 クラス分類の診断精度は、AI 判定が 83.8%、検者判定が 81.6%であり、AI 判定の方が若干優れた分数性能を示した。また、感度は AI 判定が 84.2%、人間判定が 77.5%、特異度は AI で 83.5%、人間判定で 83.2%であり、いずれも AI の方がわずかに優れていた (Table 7)。したがって、中等度以上の線維化進展を診断する場合、AI を使用することで、人間の検査者による主観性バイアスの混入の可能性がなく、客観的な判断が可能となる。この超音波検査における客観性の向上は、経験や技術スキルの差に起因する評価者間差の減少につながる。また医療分野における AI の開発は加速しており、特に、コンピュータ支援診断と AI を組み合わせた AI-CAD への期待は大きい⁷⁶⁾。

SMVI scoring system は、従来の線維化評価法と比較して、肝線維化の早期変化である血管狭窄を検出しやすいため、特に早期線維化に敏感である⁹⁾。一方、SMVI の AI 解析は線

維化進展群の検出に有効であった。これは、SMVI scoring system が narrowing, caliber irregularity, tortuosity といった個々の血管の特徴に基づいた系統的な判定であるのに対し、AI 解析は非系統的に画像パターンを texture として解析するためと考えられる。今後、汎用超音波診断装置に AI-CAD として SMVI が搭載されれば、肝線維化評価法として日常臨床に広く普及される可能性がある。

SMVI 法は血管の形態学的走行に基づく解析であるため、elastography に比べてうっ血や急性炎症の影響を受けにくいと考えられる。したがって、elastography と SMVI は相補的な役割を持ち、両者の併用により肝線維化ステージの診断能が向上する可能性がある。従来の SMVI scoring system で早期の線維化を判定し、この AI 解析で線維化進展群を客観的に識別することで、SMVI は elastography の弱点を補うことができる有効な手法と考えられる。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、この研究で用いられた線維化ステージは、肝生検ではなく elastography に基づくものであった。しかし、プライマリケア／糖尿病クリニックのコホートにおいて EASL アルゴリズムを適用した場合、肝生検の必要性はわずか 3% であることが報告されている⁷⁷⁾。さらに、臨床現場では、LSM を用いた非侵襲的検査が肝線維化ステージの診断に広く用いられており、侵襲性の高い肝生検の必要性が制限されている。第二に、本研究は、deep learning 研究としてはサンプル数が少ない (517 例)。

結論として、SMVI の AI 解析は人間の目を介さない客観的な解析が可能となった。特に CLD 患者における中等度以上の線維化進展群の拾い上げに有効であることが証明された。

第4章 結論

本論文では、新規に開発した stacked microvascular imaging (SMVI)が慢性肝疾患における線維化ステージ診断に有用であることを解明した。本研究で得られた知見は、以下の通りである。

1. **Stacked microvascular imaging は肝内血管を可視化する優れた手法である**：従来の microvascular imaging ではプローブを当てた部位の 1 断面でしか肝内血管を描出することができなかった。結果として描出された肝内血管は断片化された画像であり、しばしば血管の形態を解釈するのに難渋した。この欠点を克服するために、我々は microvascular imaging に画像加算を加えた stacked microvascular imaging を考案し、肝内血管の連続性を保ちながら、多くの血管を 1 画面に描出することを可能にした。非造影で詳細な肝内血管形態の可視化を確立することに成功した。
2. **SMVI scoring system は優れた線維化診断能を有し、特に線維化早期の判別に有効である**：SMVI によって描出された肝内血管の形態的特徴から狭小化、口径不整、屈曲蛇行の 3 つ特徴に着目し、それぞれ所見の強弱で 0 から 2 点を振り分けるスコアリングシステムを開発した(SMVI score: 0–6 点)。MLRA および SDR の結果から、SMVI score は他の線維化予測マーカーと比較して F0-1Low と F0-1High を区別する分解能が最も高いことが明らかとなった。この所見は、SMVI が肝線維化の最も早期の所見である”狭小化”を捉える感度の高さに起因するものと考えられる。
3. **AI による SMVI 画像解析は線維化進展群の拾い上げに有効である**：人間による SMVI scoring system と deep learning を用いた AI 解析法の線維化ステージ診断能を比較した。F0-1(非線維化進展群)と F2-4(線維化進展群)の判別において、AI 解析は検者による scoring system をわずかに上回った。最も重要なことは AI 解析を使用することで、人間の目を介した主観が排除され、客観的な解析が可能という点である。

慢性肝疾患の線維化診断は経皮的肝生検がゴールドスタンダードであるが、その侵襲性から繰り返し実施するにはハードルが高い。一方で、非侵襲的な代替法として超音波を利用した elastography による肝硬度検査が普及し始めている。しかし、elastography は線維化による硬さの他に、急性炎症や鬱血による肝内圧上昇も硬さとして計測してしまうという臨床的問題が存在する。今回我々が開発した SMVI 法は線維化による血管形態変化を見ているため急性炎症や鬱血の影響を受けにくく、elastography と併用することで相補的な役割を果たすことが可能である。また、SMVI 法は通常の超音波装置で誰でも実施できる手技であり、導入コストが発生しない。SMVI 法が広く臨床に普及することで、慢性肝疾患に対する早期の治療介入が期待される。今後はより定量的で客観的な解析法を模索していきたい。

謝辞

本研究に取り組み、学位論文をまとめ上げるまでには、多くの方々のご支援とご指導を賜りました。博士論文を上梓するにあたり、お世話になった皆様方にこの場を借りて感謝の意を申し上げます。

主指導教員の山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 末永 弘美 講師には終始あたたかいご指導と激励を賜りました。常に適切なお助言をしていただき、心から感謝の意を表します。

山口大学大学院 医学系研究科 生体情報検査学領域 市原 清志 先生には情熱的に統計学的指導を賜りました。論文の書き方、科学者としての心構えもご指導いただき、ここに深謝の意を表します。

山口大学大学院 創生科学研究科 工学系学域 知的情報工学分野 間普 真吾 教授には AI 解析に関する実践的指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。

そして、本研究に協力していただいた福岡徳洲会病院 臨床検査科 超音波検査部門のスタッフ、並びに本研究に参加していただいた福岡徳洲会病院の患者様には感謝の念にたえません。本当にありがとうございました。

本研究には H.U グループ 公益信託 臨床検査医学研究振興基金の研究奨励金が使用されています。ご協力に感謝いたします。

引用文献

1. Sharma A, Nagalli S. Chronic Liver Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jul 3.
2. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):6.
3. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, et al. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology*. 2017;153:996-1005.
4. Moon JH, Jeong S, Jang H, Koo BK, et al. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease increases the risk of incident cardiovascular disease: a nationwide cohort study. *EClinicalMedicine*. 2023 Oct 28;65:102292.
5. Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20:16820-30.
6. Chowdhury AB, Mehta KJ. Liver biopsy for assessment of chronic liver diseases: a synopsis. *Clin Exp Med*. 2023;23:273-285.
7. Thampanitchawong P, Piratvisuth T. Liver biopsy: complications and risk factors. *World J Gastroenterol*. 1999;5:301-304.
8. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, et al.; LIDO Study Group. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2005;128:1898-906.
9. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:2614-8.
10. Rousselet MC, Michalak S, Dupré F, Croué A, et al.; Hepatitis Network 49. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology*. 2005;41:257-64.
11. Mózes FE, Lee JA, Vali Y, Alzoubi O, et al. LITMUS investigators. Performance of non-invasive tests and histology for the prediction of clinical outcomes in patients with non-alcoholic fatty liver disease: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2023;8:704-713.

12. Choong CC, Venkatesh SK, Siew EP. Accuracy of routine clinical ultrasound for staging of liver fibrosis. *J Clin Imaging Sci.* 2012;2:58.
13. Moon KM, Kim G, Baik SK, Choi E, et al. Ultrasonographic scoring system score versus liver stiffness measurement in prediction of cirrhosis. *Clin Mol Hepatol.* 2013;19:389-98.
14. Afzal S, Masroor I, Beg M. Evaluation of Chronic Liver Disease: Does Ultrasound Scoring Criteria Help? *Int J Chronic Dis.* 2013;2013:326231.
15. Nishiura T, Watanabe H, Ito M, Matsuoka Y, et al. Ultrasound evaluation of the fibrosis stage in chronic liver disease by the simultaneous use of low and high frequency probes. *Br J Radiol.* 2005;78:189-97.
16. Frulio N, Trillaud H. Ultrasound elastography in liver. *Diagn Interv Imaging.* 2013;94:515-34.
17. Selvaraj EA, Mózes FE, Jayaswal ANA, Zafarmand MH, et al.; LITMUS Investigators. Diagnostic accuracy of elastography and magnetic resonance imaging in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2021;75(4):770-785.
18. Xiao H, Shi M, Xie Y, Chi X. Comparison of diagnostic accuracy of magnetic resonance elastography and Fibroscan for detecting liver fibrosis in chronic hepatitis B patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12:e0186660.
19. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;128:343-50.
20. Li Y, Huang YS, Wang ZZ, Yang ZR, et al. Systematic review with meta-analysis: the diagnostic accuracy of transient elastography for the staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43:458-69.
21. Sánchez-Conde M, Montes-Ramírez ML, Miralles P, Alvarez JM, et al. Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers. *J Viral Hepat.* 2010;17:280-6.
22. Eddowes PJ, Sasso M, Allison M, Tsochatzis E, et al. Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and

- Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156:1717-1730.
23. Nguyen-Khac E, Thiele M, Voican C, Nahon P, et al. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in patients with alcohol-related liver disease by transient elastography: an individual patient data meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3:614-625.
 24. Corpechot C, Carrat F, Poujol-Robert A, Gaouar F, et al. Noninvasive elastography-based assessment of liver fibrosis progression and prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2012;56(1):198-208.
 25. Hartl J, Denzer U, Ehlken H, Zenouzi R, et al. Transient elastography in autoimmune hepatitis: Timing determines the impact of inflammation and fibrosis. *J Hepatol*. 2016;65:769-775.
 26. Patel K, Sebastiani G. Limitations of non-invasive tests for assessment of liver fibrosis. *JHEP Rep*. 2020;2:100067.
 27. Hopper I, Kemp W, Porapakham P, Sata Y, et al. Impact of heart failure and changes to volume status on liver stiffness: non-invasive assessment using transient elastography. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:621-7.
 28. Zeng M, Chen Y, Zhao B. Higher liver stiffness in patients with chronic congestive heart failure: data from NHANES with liver ultrasound transient elastography. *Ann Palliat Med*. 2021;10:6859-6866.
 29. Huang LL, Yu XP, Li JL, Lin HM, et al. Effect of liver inflammation on accuracy of FibroScan device in assessing liver fibrosis stage in patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2021;27:641-653.
 30. Blanco-Grau A, Gabriel-Medina P, Rodriguez-Argarra F, Villena Y, et al. Assessing Liver Fibrosis Using the FIB4 Index in the Community Setting. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11:2236.
 31. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, et al.; APRICOT Clinical Investigators. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317-25.
 32. Moini M, Onofrio F, Hansen BE, Adeyi O, Khalili K, Patel K. Combination of FIB-4 with

- ultrasound surface nodularity or elastography as predictors of histologic advanced liver fibrosis in chronic liver disease. *Sci Rep.* 2021;11:19275.
33. Poynard T, Ngo Y, Perazzo H, Munteanu M, et al. Prognostic value of liver fibrosis biomarkers: a meta-analysis. *Gastroenterol Hepatol.* 2011;7:445-54.
 34. Itakura J, Kurosaki M, Setoyama H, Simakami T, et al. Applicability of APRI and FIB-4 as a transition indicator of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol.* 2021;56:470-478.
 35. Hur M, Park M, Moon HW, Choe WH, et al. Comparison of Non-Invasive Clinical Algorithms for Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis B to Reduce the Need for Liver Biopsy: Application of Enhanced Liver Fibrosis and Mac-2 Binding Protein Glycosylation Isomer. *Ann Lab Med.* 2022;42:249-257.
 36. Narimatsu H. Development of M2BPGi: a novel fibrosis serum glyco-biomarker for chronic hepatitis/cirrhosis diagnostics. *Expert Rev Proteomics.* 2015;12:683-93.
 37. Tamaki N, Kurosaki M, Loomba R, Izumi N. Clinical Utility of Mac-2 Binding Protein Glycosylation Isomer in Chronic Liver Diseases. *Ann Lab Med.* 2021;41:16-24.
 38. Nakagawa H, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R, et al. Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2011;412:1201-6.
 39. Shao X, Uojima H, Setsu T, Okubo T, et al. Usefulness of autotaxin for the complications of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2020;26:97-108.
 40. Honda Y, Imajo K, Kobayashi T, Kessoku T, et al. Autotaxin is a valuable biomarker for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2019;49:1136-1146.
 41. Hiroyasu T. Experimental and Clinical Studies on the Intrahepatic Vascular Changes in Chronic Liver Injury (II) Radiological Observations in Chronic Hepatitis and Liver Cirrhosis. *Jap. Circulation J.* 1966;30:297-308.
 42. Baus WP, Hoffbauer FW. Vascular changes in the cirrhotic liver as studied by the injection technic. *Digest Dis Sci* 1963;8:689-700.
 43. Hano H, Takasaki S. Three-dimensional observations on the alterations of lobular architecture in chronic hepatitis with special reference to its angioarchitecture for a

- better understanding of the formal pathogenesis of liver cirrhosis. *Virchows Arch.* 2003;443:655-63.
44. Shibayama Y, Nakata K. The role of pericentral fibrosis in experimental portal hypertension in rats. *Liver.* 1991;11:94-9.
 45. Evans DH, Jensen JA, Nielsen MB. Ultrasonic colour Doppler imaging. *Interface Focus.* 2011;1:490-502.
 46. Wilson A, Lim AKP. Microvascular imaging: new Doppler technology for assessing focal liver lesions. Is it useful? *Clin Radiol.* 2022;77:e807-e820.
 47. Cannella R, Pilato G, Mazzola M, Bartolotta TV. New microvascular ultrasound techniques: abdominal applications. *Radiol Med.* 2023;128:1023-1034.
 48. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells* 2020;9:875
 49. Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A. Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine. *Am J Pathol* 2018;188:1316-1327
 50. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335-1374.
 51. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis – 2021 update. *J Hepatol* 2021;75:659-689.
 52. Pang JX, Pradhan F, Zimmer S, Niu S, et al. The feasibility and reliability of transient elastography using Fibroscan®: a practice audit of 2335 examinations. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2014;28:143-149.
 53. Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol* 2018;29:14-21.
 54. Yamamoto T, Kobayashi T, Phillips MJ. Perinodular arteriolar plexus in liver cirrhosis. Scanning electron microscopy of microvascular casts. *Liver* 1984;4:50–54.
 55. Kuroda H, Abe T, Kakisaka K, Fujiwara Y, et al. Visualizing the hepatic vascular architecture using superb microvascular imaging in patients with hepatitis C virus: A novel technique. *World J Gastroenterol* 2016;22:6057-6064.

56. Tosun M, Uslu H. Comparison of superb microvascular imaging and shear wave elastography for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Ultrasonography* 2022;41:394-402.
57. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:454-462.
58. European Association for Study of Liver; Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hígado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015;63:237-264.
59. Sonneveld MJ, Brouwer WP, Chan HL, Piratvisuth T, et al. Optimisation of the use of Apri and FIB-4 to rule out cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: results from the SONIC-B study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4:538-544.
60. Ichihara K. Statistical considerations for harmonization of the global multicenter study on reference values. *Clin Chim Acta* 2014;432:108-118.
61. Peeters G, Debbaut C, Friebe A, Cornillie P, et al. Quantitative analysis of hepatic macro- and microvascular alterations during cirrhogenesis in the rat. *J Anat* 2018;232:485-496.
62. Staufer K, Stauber RE. Steatotic Liver Disease: Metabolic Dysfunction, Alcohol, or Both? *Biomedicines*. 2023;11:2108.
63. Yang J, Li J, Ye G, Luo Y. Comparison of Visual Transient Elastography and Shear Wave Elastography in Evaluating Liver Fibrosis in Patients with Chronic Liver Disease. *Int J Gen Med*. 2021;14:3553-3561.
64. Kovatsch A, Honcharova-Biletska H, Segna D, Steigmiller K, et al. Performance of two-dimensional shear wave elastography and transient elastography compared to liver biopsy for staging of liver fibrosis. *Eur J Clin Invest*. 2023;53:1-10.
65. Barr RG, Wilson SR, Rubens D, Garcia-Tsao G, Ferraioli G. Update to the Society of Radiologists in Ultrasound Liver Elastography Consensus Statement. *Radiology*. 2020;296:263-274.
66. Miura D, Suenaga H, Ichihara K. The Utility of a Novel Stacked Microvascular Imaging

- for Enhanced Detection of Fibrosis in Chronic Liver Diseases. *Ultrasound Med Biol.* 2024; S0301-5629(24)00134-0.
67. Ma J, Wu F, Jiang T, Zhu J, Kong D. Cascade convolutional neural networks for automatic detection of thyroid nodules in ultrasound images. *Med Phys.* 2017; 44:1678-1691.
 68. Chi J, Walia E, Babyn P, Wang J, Groot G, Eramian M. Thyroid Nodule Classification in Ultrasound Images by Fine-Tuning Deep Convolutional Neural Network. *J Digit Imaging.* 2017;30:477-486.
 69. Fujioka T, Mori M, Kubota K, Oyama J, et al. The Utility of Deep Learning in Breast Ultrasonic Imaging: A Review. *Diagnostics (Basel).* 2020;10:1055.
 70. Wang B, Perronne L, Burke C, Adler RS. Artificial Intelligence for Classification of Soft-Tissue Masses at US. *Radiol Artif Intell.* 2020; 3: e200125.
 71. Nakata N, Siina T. Ensemble Learning of Multiple Models Using Deep Learning for Multiclass Classification of Ultrasound Images of Hepatic Masses. *Bioengineering (Basel).* 2023;10:69.
 72. K. He, X. Zhang, S. Ren, J. Sun, Deep residual learning for image recognition. In *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* 770-778, 2016.
 73. Schmauch B, Herent P, Jehanno P, Dehaene O, et al. Diagnosis of focal liver lesions from ultrasound using deep learning. *Diagn Interv Imaging.* 2019;100(4):227-233.
 74. Kanda. Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:452-458.
 75. Lomonaco R, Godinez LE, Bril F, Shrestha S, et al. Advanced liver fibrosis is common in patients with Type 2 diabetes followed in the outpatient setting: the need for systematic screening. *Diabetes Care* 2021;44:399-406.
 76. Fujita H. AI-based computer-aided diagnosis (AI-CAD): the latest review to read first. *Radiol Phys Technol.* 2020;13:6-19.
 77. Canivet CM, Costentin C, Irvine KM, Delamarre A, et al. Validation of the new 2021 EASL algorithm for the noninvasive diagnosis of advanced fibrosis in NAFLD. *Hepatology.* 2023;77:920-30.