

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

初代培養伊東細胞におけるTGF β シグナル伝達とその制御に関する研究

主任研究者 井上 恭一 関西医科大学 第三内科 教授

研究要旨：[目的] 初代培養伊東細胞におけるTGF β (Transforming Growth Factor-beta) のシグナル伝達機構を明らかにする。[方法] TGF β のシグナル伝達機構は、野生型受容体、Smad2,3および構成的活性型I型受容体TGF β RI (T204D)、不活性Smad2,3 (3S-A)を作成し、伊東細胞にリポフェクタミンを用い遺伝子導入した後、Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) の転写活性を調べた。またTGF β 添加に伴うリン酸化は、抗Smad2リン酸化抗体を用いて検討した。[結果] TGF β 添加によりSmad2は15分後からリン酸化されるが、これはSmad2のC末端に存在するSSXSモチーフに対する抗リン酸化抗体で認識されたことより同部位がリン酸化されているものと考えられた。さらにTGF β 添加並びにTGF β RI (T204D) は、PAI-1の転写活性を促進した。またこれらのシグナルは、不活性型 Smad2,3 (3S-A) により抑制されたことから、TGF β RI、Smad2,3を通じて伝達されているものと考えられた。[総括] 伊東細胞におけるTGF β シグナル伝達は、基本的にこれまで報告されている培養細胞と類似していた。今後、障害肝を用いた肝繊維化過程におけるTGF β シグナル伝達の制御機構を解明する必要があるものと考えられた。

分担研究者

松崎 恒一 関西医科大学 第三内科 講師

A. 研究目的

TGF β (Transforming Growth Factor-beta) は、伊東細胞などの非実質細胞に対して細胞外マトリックス蛋白の産生を促し肝線維化を促進する。特に肝障害におけるTGF β 自身の過剰な発現が、肝硬変症などに認められ、それら疾患の形成と進展に重要な因子であると考えられている。

またTGF β のシグナル伝達機構に関する知見もここ数年間で急速に進歩してきている。TGF β のシグナル伝達機構は、まずTGF β がそのII型受容体に結合した後、I型受容体がII型受容体のキナーゼによってリン酸化され、活性化される。これまで我々は、このうちTGF β ファミリーのI型受容体cDNAsの単離に成功し、SKR1, 2 (serine kinase receptor) と名付けた^{1) 2)}。その後、SKRsがTGF β ファミリーに属するアクチビンのI型受容体であり、アクチビンの肝細胞におけるSKRsを介した増殖抑制機序に関する考察を行ってきた³⁾。活性化されたI型受容体は、細胞質内の特異的Smad2あるいはSmad3と結合し、I型受容体のキナーゼによってリン酸化される。リン酸化されたSmad2とSmad3はすぐにI型受容体から離れ、Smad4と複合体を形成し核内に移行する。その後この複合体はさまざまな転写因子と結合、あるいは自身が直接DNAに結合し、コラーゲンやプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) などのTGF β 標的遺伝子の転写を活性化してTGF β によるさまざまな生物学的反応を引き起こすと考えられている。また最近になって抑制型Smad6,7の存在が明らかにされた。抑制型SmadはTGF β によりその発現が誘導

され、活性化されたI型受容体に結合し、特異的Smad2,3のI型受容体への結合を阻害してTGF β によるシグナル伝達を抑制していると考えられている(図1)。

したがって、肝繊維化にとって中心的な役割を演じる伊東細胞におけるTGF β のシグナル伝達機構が解明されれば、肝繊維化の病態解明ひいては治療に結びつくものと期待される。そこで今回我々は、初代培養伊東細胞を用い、TGF β のシグナル伝達機構をSmad2のリン酸化、PAI-1の転写活性等を指標に検討した。

B. 研究方法

I. 初代培養伊東細胞におけるSmad 2蛋白のTGF β 依存性リン酸化能の検索：初代培養伊東細胞は、ラット肝臓をコラーゲナーゼで還流しプロナーゼ処理を行った後、ナイコデンツ勾配により分離した。伊東細胞は、TGF β で刺激した後、15分、1時間、2時間、3時間後にSDSサンプル溶液を用いて可溶化した。リン酸化した蛋白は、ウエスタンブロットし抗Smad2リン酸化抗体を用いて検出した。II. TGF β 受容体、Smad2, 3ミュータントの作成：Smad 2, 3のC末端に位置するSSXSモチーフのセリン残基は、I型受容体によりリン酸化される。我々は、伊東細胞においてI型受容体によってSmad 2, 3がリン酸化されるか、あるいはSmad 2, 3を介してそのシグナルが伝達されているか確かめるために、同部位のセリンをアラニンに置換した不活性型Smad 2, 3 (3S-A)をPCRを用いて作成した。またTGF β の受容体結合後のシグナルがI型受容体を介して伝達されるか否か調べるために、I型受容体の204番目のスレオニン残基をアスパラギン酸に置き換えたいわゆる構成的活性型I型TGF β 受容体「TGF β RI (T204D)」を作成し

た。Ⅲ. 初代培養伊東細胞におけるPAI-1転写のルシフェラーゼ活性を用いた解析: PAI-1のpromoter部分をルシフェラーゼ活性を有するreporter geneに組み込んだベクター (p3TP-lux reporter) はMassague両博士より享受いただいた。本ベクターならびに上記のTGFβ受容体、Smadsのconstructをリポフェクタミンを用いて細胞にtransfection後、ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

1) Smad2のTGFβによるリン酸化 (図2) TGFβ添加によりSmadは15分後からリン酸化されるが、これはSmad2のC末端に存在するSSXSモチーフに対する抗リン酸化抗体で認識されたことより同部位がリン酸化されているものと考えられた。

2) PAI-1転写のTGFβRI (T204D), Smad 2, 3(3S-A) による影響 (図3) PAI-1のLuciferase活性は、TGFβ1添加およびTGFβRI (T204D)を遺伝子導入すると、約40倍増加した。野生型Smad2,3を遺伝子導入してもPAI-1の転写活性に影響を及ぼさなかったが、不活型Smad2(3S-A)を導入すると、その転写活性は10%に、Smad3(3S-A)では40%に低下した。従って、本細胞におけるTGFβのシグナルは、I型受容体、Smad2,3を通じて伝達されているものと考えられた。

D. 考察・結論

我々は、この3年間にTGFβ、TGFβファミリーに属するアクチビンの肝再生過程における生物学的反応性並びにリガンド、受容体の分布、及びそれらの発現変化を調べることにより、同因子の肝再生、繊維化における意義に関して報告してきた。つまりTGFβは、肝再生後期に伊東細胞など非実質細胞において産生され肝細胞増殖を停止させる役割があると考えられる。また伊東細胞に対して、細胞外基質を産生・蓄積させるすべての生物活性を有したことから、いわば地固め的に肝再構築を完成させ、繊維化を促進させる役割を演じていると考えられた^{4) 5)}。一方、アクチピンは、肝臓を静止期に保つ重要な因子と思われる。しかし障害時肝細胞でアクチピン受容体が一過性に低下したことから、増殖促進因子への反応性が向上し、肝再生の誘導が起こると考えられた。また肝再生初期において著明に増加したアクチピンは、伊東細胞に対してファイブロネクチンの産生のみを促進し、いわば肝再構築におけるペースメーカーとして働いているものと推測された⁶⁾。また大腸癌発生過程におけるTGFβシグナル伝達の意義について、主に受容体の発現を調べることで、報告してきた⁷⁾。

一方、受容体からTGFβ並びにアクチピンのシグナルを伝達させる物質としてSmad2,3が同定されるに至り、近年シグナル伝達に関する研究が急速に進歩した。従って、各種細胞においてリガンド依存性のシグナルが伝達しているか検討するために、リガンドと受容体の発現変化を調べただけでは、不十分であると

思われた。そこで今回我々は、初代培養伊東細胞を用いてSmad2,3の活性化に関する検討を行った。本細胞におけるSmad2,3は、原発性肝癌細胞(HuH-7, Hep-G2, HCC-M, HCC-T cell等)と同様にTGFβ受容体によりリン酸化されていた^{8) 9)}。また急性肝障害、慢性肝炎モデルの伊東細胞におけるSmad2,3の発現推移を検討したが、mRNA、蛋白レベルで変化を認めなかった(未発表データ)。従って、肝繊維化過程におけるTGFβシグナル伝達は、伊東細胞におけるSmad2,3の発現変化よりも、Smad2,3の活性化(リン酸化等)が必須であると考えられた。

今後かかるシグナル伝達で解析してきた方法を用い、以下の実験を計画することで肝繊維化の病態解明と治療への応用を模索してゆく予定である。(1)伊東細胞におけるSmad2,3活性化の制御機構に関する検討(2)TGFβシグナル伝達を抑制する低分子物質のスクリーニング。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuzaki K., Xu J, et al. A widely expressed transmembrane serine / threonine kinase that does not bind activin, inhibin, transforming growth factor β, or bone morphogenic factor. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 : 12719-12723.

2) Xu J, Matsuzaki K., et al. Genomic structure and cloned cDNAs predict that four variants in the kinase domain of serine / threonine kinase receptors arise by alternative splicing and poly (A) addition. *Proc. Natl. Sci. USA.* 1994; 91: 7957-7961.

3) Xu J, McKeehan K., Matsuzaki K. et al. Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 : 6308-6313.

4) Date M., Matsuzaki K., and Inoue K. Differential Expression of Transforming Growth Factor-β Receptors in Hepatocytes and Nonparenchymal Cells of Rat Liver Injury. *Journal of Hepatology* 1998; 28: 572-581.

5) Date M., Matsuzaki K., and Inoue K. Modulation of Transforming Growth factor-β Function in Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells in Rat Liver Injury. *Gut* in press.

6) Date M., Matsuzaki K., and Inoue K. Differential Regulation of Activin A Signal Transduction in Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells of Rat Liver Injury. *Journal of Hepatology* in press.

7) Matsushita M., Matsuzaki K., and Inoue K. Transcriptional down-regulation of TGF-β receptors in Human Colorectal Cancer:

Implications for Cancer Development. British Journal of Cancer 1999; 80 (1/2), 194-205.

8) Matsuzaki K., Date M., and Inoue K. Autocrine stimulatory mechanism by TGF- β in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. in press.

9) Matsuzaki K., Date M., and Inoue K. Regulatory Mechanisms for TGF- β as Autocrine Inhibitor in Human Hepatocellular Carcinoma: Implications for Roles of Smads in Its Growth. Submitted to Gastroenterology.

2. 学会発表

1) Matsuzaki K., Date M., and Inoue K. Regulatory Mechanisms for TGF- β as Autocrine Inhibitor in Human Hepatocellular Carcinoma: Implications for the roles of Smads in Tumor Growth. 50th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases, October, 1999, Dallas, Texas

2) Matsuzaki K., Date M., and Inoue K. Autocrine Stimulatory Mechanism by TGF- β in Human Hepatocellular Carcinoma. 50th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases, October, 1999, Dallas, Texas

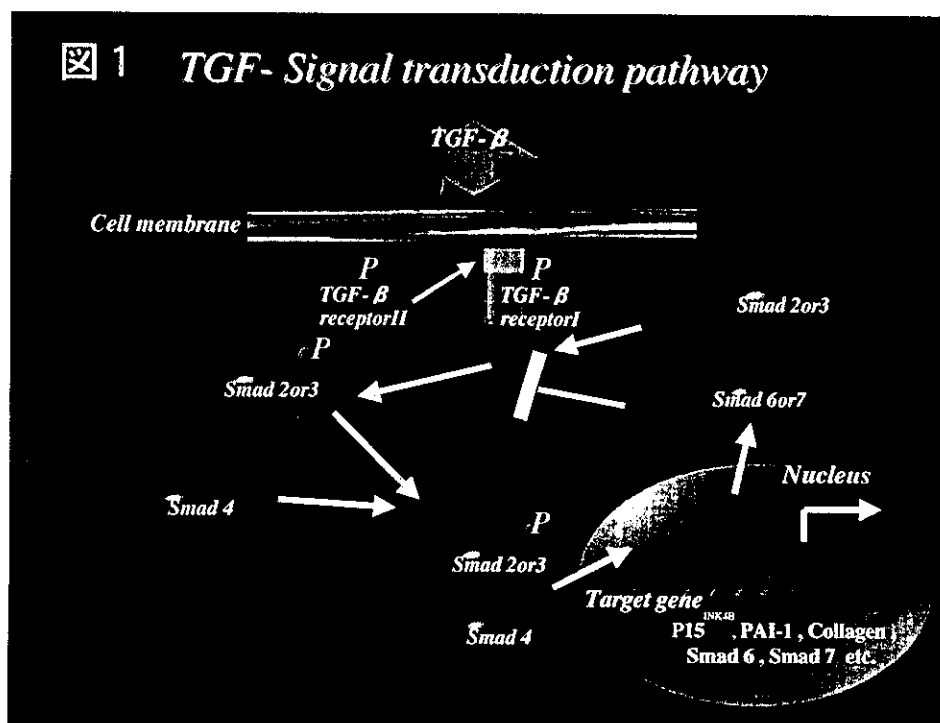


Figure 2

Smad2 phosphorylation induced by TGFβ₁ in HSC

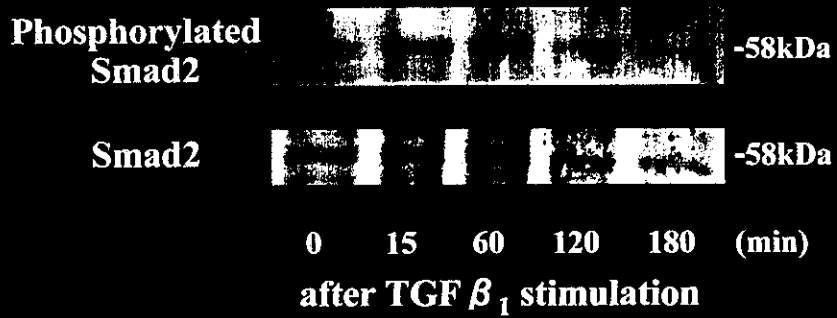
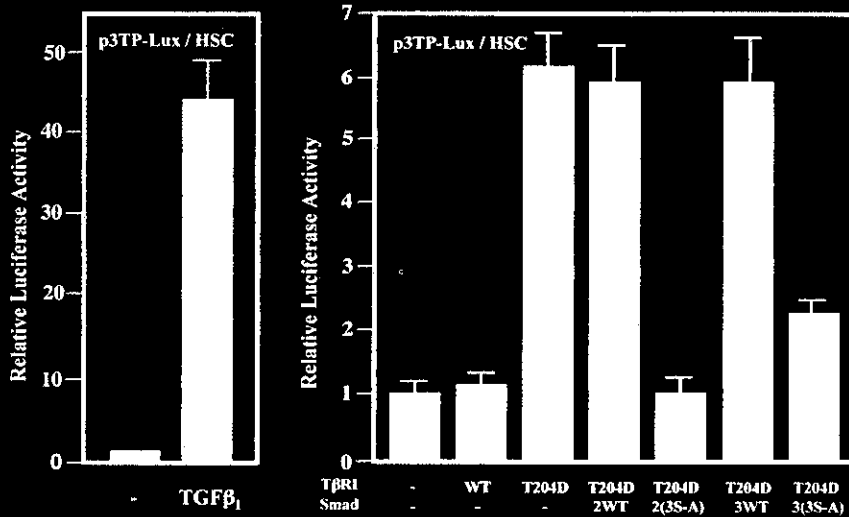


Figure 3 TGFβ-mediated transcriptional responses are suppressed by dominant negative Smad 2/3



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

分子生物学的手法を用いた難治性の肝疾患に対する新治療戦略（増殖型アデノウイルスによる肝細胞遺伝子導入の基礎的検討とB型肝炎ウイルス治療薬の開発に関する研究）

分担研究者 小俣 政男 東京大学大学院医学系研究科消化器内科 教授

研究要旨：本研究は、難治性肝疾患を対象とする各種肝疾患（自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、劇症肝炎）の今後の治療法の開発を目指して、その基礎的検討と臨床への応用を検討した。本検討においてはAd5dlXはAxE1AdBと同程度に培養肝細胞で増殖し、かつAxE1AdBより細胞傷害性が低いことが明らかになった。またAFPプロモーターで増殖を制限したアデノウイルスは十分な特異性を持って増殖および細胞傷害性を示すことが示唆された。このようなウイルスベクターは、肝臓において異常な発現を示している肝細胞除去を目的とした新たな遺伝子治療戦略法として利用できる可能性がある。また、今回開発したHBV DNAの複製、増殖するin vitro複製系を用いることにより、今後、劇症肝炎や治療抵抗性B型肝炎ウイルス感染の個々の患者に応じて適した抗ウイルス薬の選択が可能となることが期待される。

A. 研究目的

分子生物学手法の広がりとともに、臨床への利用法が広がってきている。本研究は、難治性肝疾患を対象とする各種肝疾患（自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、劇症肝炎）の今後の治療法の開発を目指して、その基礎的検討と臨床への応用を検討した。

(a)非増殖型組換えアデノウイルスベクターは遺伝子導入効率が高いことから、遺伝子治療を施行する際に臨床の場で用いることが可能なベクターとして有望視されている。だが非増殖型ベクターを用いる場合、治療遺伝子の導入を対象細胞の全てに行うことは困難であると考えられる。そこで生体肝における遺伝子治療を念頭におき、三種類の増殖型アデノウイルスを用いて検討した。

(b)また、肝移植時のB型肝炎ウイルスの再感染予防や劇症肝炎の治療に逆転写酵素阻害剤の有用性が示され、その効果も期待されているが、薬剤に対する耐性も問題となってきた。本研究では、簡便なin vitro測定系を確立して治療薬の簡便な選択システムの開発をも行なった。

B. 研究方法

(a)アデノウイルス5型からE3部分を欠失させた増殖型アデノウイルスであるAd5dlX、Ad5dlXをベースにE1B55k蛋白を発現しないように組換えたAxE1AdB、そしてAFPプロモーターを用いてAFP産生細胞でのみ増殖するようにしたAxE1AdBであるAxAFPE1AdBの三種類の増殖型アデノウイルスを用いた。またCAGプロモーターでレポーター遺伝子であるlacZ遺伝子を発現するウイルスAxCALacZを遺伝子導入効率の評価に用いた。培養肝細胞および肝癌細胞株5株Hep3B、HepG2、PLC/PRF/5（以上AFP産生肝癌細胞株）、HLE、HLF（以上AFP非産生肝癌細胞株）を用いた。各細胞株における50%遺伝子導入効率をAxCALacZ感染後のX-gal染色にて評

価した。50%の細胞に遺伝子導入されるウイルス量で各細胞株に各増殖型ウイルスを感染させ、感染4日後のウイルス増殖を透過型電子顕微鏡により評価した。感染後のウイルス感染細胞のviabilityを、MTT assayを用いて検討した。

(b)血液中HBV遺伝子全長をPCR法にて増幅し、肝癌細胞株にこの全長HBVを導入することによりHBVのin vitro複製系確立の検討を行なった。このin vitro複製系を用いてHBVに対する抗ウイルス薬の薬剤感受性の検討を行なった。

C. 研究結果

(a)50%遺伝子導入効率は培養肝細胞ではmoi (multiplicity of infection) 100、Hep3Bではmoi 3、その他の肝癌細胞株ではmoi 10であった。培養肝細胞ではAd5dlXおよびAxE1AdBは感染細胞の60%においてウイルス増殖が認められたが、AxAFPE1AdBでは1%以下であった。Ad5dlXおよびAxE1AdBは全ての肝癌細胞株でウイルス増殖が認められたが、AxAFPE1AdBはAFP産生肝癌細胞株でのみウイルス増殖を認めた。培養肝細胞では、感染8日後にAd5dlXでは60%、AxE1AdBで10%のviabilityであったが、AxAFPE1AdBではほぼ100%であった。Ad5dlXおよびAxE1AdBは全ての肝癌細胞株で感染8日後に生存細胞を認めなかったが、AxAFPE1AdBはAFP産生肝癌細胞株では生存細胞が認められないものの、AFP非産生株では70から80%のviabilityを示した。

(b)PCRにて血液中HBV遺伝子3.2kb全長の増幅し、肝癌細胞株にこの全長HBVを導入することによりHBV DNAの複製、増殖するin vitro複製系を確立した。また、この系を用いてHBVに対する抗ウイルス薬の薬剤感受性の検討が可能であった。

D. 考察

(a)本検討においてはAd5dlXはAxE1AdBと同程度に培養肝細胞で増殖し、かつAxE1AdBより細胞傷害性が低いことが明らかになった。またAFPプロモーターで増殖を制限したアデノウイルスは十分な特異性を持って増殖および細胞傷害性を示すことが示唆された。このようなウイルスベクターは、肝臓において異常な発現を示している肝細胞除去を目的とした新たな遺伝子治療戦略法として利用できる可能性がある。

(b)また、今回開発したHBV DNAの複製、増殖するin vitro複製系を用いることにより、今後、劇症肝炎や治療抵抗性B型肝炎ウイルス感染の個々の患者に応じて適した抗ウイルス薬の選択が可能となることが期待される。

E. 結論

(a)Ad5dlXはAxE1AdBと同程度に培養肝細胞で増殖し、かつAxE1AdBより細胞傷害性が低いことが明らかになった。このようなウイルスベクターは、肝臓において異常な発現を示している肝細胞除去を目的とした新たな遺伝子治療戦略法として利用できる可能性がある。

(b)HBV DNAの複製、増殖するin vitro複製系を開発した。今回開発したHBV DNAの複製、増殖するin vitro複製系を用いることにより、個々の患者に応じて適した抗ウイルス薬の選択が可能となる。

F. 研究発表

論文発表

Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan K-H, Carrilho FJ, Omata M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: a study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 29: 939-945, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

小児劇症肝炎の早期診断と早期治療に関する研究

主任研究者 与芝 真 昭和大学藤が丘病院 消化器内科

研究要旨：小児劇症肝炎の場合も成人の劇症肝炎の場合と同様、脳症発症前に劇症化を予知し、早期に肝炎治療を行うことで劇症化を阻止し得る事が明かになった。

分担研究者

井上 和明、山田 雅哉
昭和大学藤が丘病院 消化器内科
須磨崎 亮、松井 陽
筑波大学医系専門学群 小児科

A. 研究目的

小児劇症肝炎は生体肝移植が標準治療となっている。成人では劇症化前に劇症化予知し、その時期から適切な肝炎治療を行い劇症化を阻止する事が試みられている。今回は小児でも同様の試みにより劇症肝炎症例数、ひいては移植症例数が減少し得るか否かを検討する。

B. 研究方法

与芝の予知式 $Z = -0.89 + 1.74 \text{ (原因)} + 0.056 \times \text{総ビリルビン(mg/dl)} - 0.014 \times \text{コリン・エステラーゼ(U/l)}$ 、但しこの場合、原因がA型ないし急性感染のB型1点、その他2点、コリン・エステラーゼ正常値135~413U/l、において $Z > 0$ の場合劇症化を予知する。

(倫理面への配慮)

万一劇症化しても対処し得るよう万全の治療体制をひいた。又、移植に対応し得る準備も行った。

C. 研究結果

9才男子（非A～非G型）、10才女子（C型）の2例において劇症化を予知し（それぞれ $Z = 1.55$ 、 1.26 ）、この時点からインターフェロン、メチルプレドニソロンのパルス投与、サイクロスポリン投与により治療した。

【結果】2例ともに速やかにトランスアミナーゼの正常化を始めとする肝機能の回復が見られ、劇症化することなく無事退院した。

D. 考察

以上、与芝の式により劇症化を予知し、劇症化を阻止したと考えられる小児急性肝炎の2例の経過を紹介した。

尤も2例ともに劇症化予知の時点ではいずれの症例も $PT < 40\%$ とはなっておらず、厳密には与芝の式によ

り劇症化を予知したとは言えない。しかし、現実にはこの2例のように $PT > 40\%$ の時点でも劇症化の予知をせざるを得ないので $PT < 40\%$ 以下に拘泥する必要はないと思われる。事実、肝細胞破壊の進行するHBVキャリアの重症化例では $p = 40\%$ の場合も $PT = 60\%$ の場合も与芝の予知式の判別力には大差はなかった。

次に治療についてだが、2例目はHCV RNA (+)であり、HCV RNA量の低下を目標にインターフェロン療法を行い、その消失と共に肝機能の回復を見た。一方、1例目は原因が不明であったが、未だ発見されていないウイルスを原因と想定してインターフェロンを中心とする抗ウイルス療法と免疫抑制療法を行い、肝機能の回復を見た。

一般に小児劇症肝炎では原因ウイルスが確定できる例は少数であり、この事が小児劇症肝炎の内科治療を困難にしている。しかし、我国は東南アジア諸国の一員として肝炎ウイルスの蔓延国であり、未だ未知の肝炎ウイルスの存在は想定し得る。第2例目はその想定のもとにインターフェロン療法を行い、治療に成功したものと考えている。

E. 結論

小児劇症肝炎は予知し得る。予知前から適切な肝炎治療を行う事により劇症化を阻止する事が可能であり、劇症肝炎例数ひいては移植症例数を減少させる事が期待できる。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業） 分担研究報告書

乳児劇症肝炎生存例における重篤な中枢神経後遺症とその対策

分担研究者 松井 陽 筑波大学臨床医学系小児科 教授
与芝 真 昭和大学藤が丘病院 消化器内科

研究要旨：小児肝疾患治療の進歩により、乳児の重篤な肝障害症例に対しても積極的に集学的治療や生体部分肝移植が行われるようになってきた。一方、著者らは人工肝補助療法や生体部分肝移植により生存しえた乳児劇症肝炎症例の中に、重篤な中枢神経後遺症を呈した症例を3例経験した。成人劇症肝炎では、肝移植後例を別にすれば、高度の脳障害を残したとの報告はない。乳児を中心とした幼若小児の劇症肝炎に対する各種治療の適応を決定するにあたり、中枢神経系の予後判定及び肝性昏睡症例における中枢神経障害の可逆性を慎重に評価すべきである。ならびに成人劇症肝炎と同様に肝性脳症の防止を効率的に行い得る、人工肝補助療法の開発が重要である。

A. 研究目的

小児劇症肝炎（15歳以下の劇症肝炎）は成人の劇症肝炎と同様に予後不良の疾患である。乳児（1歳未満）の劇症肝炎は小児劇症肝炎の約半数を占め、重症例が多い。近年、これらの症例に対して肝移植を含めた集学的治療が実施されるようになってきたが、各治療法の適応や治療後の長期予後は不明である。分担研究者らは乳児劇症肝炎の治療後に、重篤な中枢神経後遺症を呈した3症例を経験した。これらの症例は乳児の肝性昏睡の評価、人工肝補助の重要性、肝移植の適応などについて示唆する点が多い。本報ではこの3症例を報告し、問題点および今後の対策について検討した。

B. 研究方法

当院で経験した乳児劇症肝炎のうち、重篤な中枢神経後遺症を合併した3症例の病因、脳浮腫の有無、昏睡度、治療、頭部CT画像の所見、現在の神経学的所見について、retrospectiveに検討した。

C. 研究結果

劇症肝炎治療後に中枢神経障害後遺症をきたした3症例の概要を図1に記した。症例1と2はB型肝炎ウイルス（以下HBVと略す）母児感染による劇症肝炎、症例3は原因不明の非A-C型亜急性型劇症肝不全の症例である。

症例1は生後4か月時に発症した急性型劇症肝炎例である。母親はHBe抗原陰性のHBVキャリアであり、患児はHBV母児感染予防措置をうけていなかった。突然灰白色便が出現し、2日後には黄疸に気付かれ、第4病日に高度の肝機能異常を指摘されて近医に入院した。その夜から発熱と意識障害がはじまり、交換輸血が行われたが意識状態は改善せず、第6病日に当科に転院した。転院時、肝臓は触知されず、昏睡度IV度で多量の血便がみられ、ALT 83 IU/L, PT 31.4 sec, 血漿アンモニア 378 μ g/dL, 脳波所見は

Reye症候群に対する青木の分類でStage 4であった。直ちに気管内挿管され、人工換気療法と血漿交換が開始された。経過中硬膜外にセンサーを挿入して脳圧がモニターされたが、最高値は40cmH₂Oであった。発症1か月後の肝生検では、portal-portal bridging necrosisを伴う亜広汎性肝細胞壊死とcobble-stone様の肝細胞再生像が認められた。22日間、連日血漿交換が行われ、しだいに吸啜・追視がみられるようになり、肝機能も3か月後には正常化した。CT所見の推移を図2に示した。急性期には高度の脳浮腫が認められたが、頭蓋内には出血はなかった。回復期には両側大脳皮質の萎縮と大脳全体にわたるlow density areaがみられた。現在15歳であり、重度心身障害の状態で痙性麻痺、てんかん、血漿交換の後遺症によるC型慢性肝炎の合併がみられている。

症例2は生後4か月発症の亜急性型劇症肝炎例である。母親はHBVキャリアであったが、患児はやはりHBV母児感染予防措置をうけていなかった。灰白色便出現後3日目に黄疸に気付かれ、5日目の肝機能検査で高度の肝機能障害が見出され、第6病日に近医に入院した。肝庇護療法にもかかわらず黄疸が増強するため、第15病日に当科に転院した。転院時、易刺激性がみられたが、明らかな意識障害は認められなかった。肝の縮小、黄疸に加え、ALT 670 IU/L, PT 33.1 secであり、脳波ではhigh voltage slow wave（青木の分類でStage2）がみられた。ただちに血漿交換、GI療法が開始されたが意識障害は進行し、第18病日に全身性ミオクローヌス様痙攣が頻発して昏睡度IV度に陥り、人工換気が開始された。その後も約2か月間血漿交換が継続され、肝機能はしだいに改善したが、意識障害は開眼するのみで追視不能のまま経過した。CT所見の変化を図3に示した。急性期には高度の脳浮腫がみられ、1か月後から急激に脳萎縮が進行し、巨大な硬膜下水腫が形成された。硬膜下水腫のドレナージにもかかわらず脳萎縮は回復せず、肝性昏睡に伴う脳血流の低下が主たる病態と推測された。

現在14歳で高度の知能低下とてんかんを伴う重度心身障害がある。

症例3は生後3か月発症の亜急性型劇症肝炎例で、生体部分肝移植により救命された症例である。灰白色便、黄疸が出現し、肝萎縮、PT延長が進行し、第9病日からほぼ連日交換輸血が行われた。第26病日に肝性昏睡Ⅱ度が出現し、33病日に脳死肝移植の希望が表明され、37病日に信州大学へ転院した。脳死肝移植はグラフト肝の状態が悪く断念され、45病日に生体部分肝移植が行われた。術直前の評価では頭部エコーで軽度脳浮腫があり昏睡度Ⅳ度であった。術後6日目に共同偏視、眼振、四肢の強直発作が出現し、14日目にCTで脳萎縮と両側深部白質の低吸収域が認められた。タクロリムスからシクロスポリンへの変更が行われたが、生後10か月の現在も四肢不全麻痺、痙攣が残り、運動発達は2か月相当（発達指数は20以下）、聴性脳幹反応は両側無反応、皮質盲の状態である。

D. 考察

乳児肝性昏睡の評価は、坂本の乳児339分類に基づいて行われる。第5回大山小児肝臓ワークショップで成人劇症肝炎における犬山の昏睡度分類との対応が決められた。しかし乳児では臨床的に肝性昏睡の評価を厳密に行うことは困難であり、脳波などのより客観的な評価法が重要である。一方、本報告で示したように、とくに乳児劇症肝炎では生存例であっても高度の脳障害を残す場合があり、中枢神経系の予後判定を念頭に置いて治療方針をたてる必要がある。予後不良の小児劇症肝炎例では、両親は生体部分肝移植を望む場合が多いが、移植による治療を推進する場合に、中枢神経系の予後はもっとも留意すべき点である。今後、乳幼児に適し、かつ信頼性の高い肝性脳症の評価法の開発が必要である。

乳児劇症肝炎で中枢神経後遺症を残しやすい理由は明らかではない。3症例に共通していることは、1) 脳浮腫を伴う肝性昏睡Ⅳ度であること、2) CT所見上、脳浮腫以外には例えば頭蓋内出血など中枢神経障害の原因がみられないこと、3) 血漿交換や肝移植などの治療が必要であったことの3点である。上記の1), 2)を考慮すると、中枢神経障害の病態として、脳浮腫の進行による脳血流の低下が推測される。乳児では頭蓋骨の縫合が離開しており、高度の脳浮腫に対する耐性が成人と異なる可能性がある。すなわち、成人劇症肝炎では脳ヘルニアによって死亡する症例が、乳児では中枢神経障害後遺症を残して生存する例もあると考えられる。この意味でも中枢神経の長期予後の判定にあたっては、画像診断における脳浮腫の存在が重要である。CTを含めた非侵襲的で客観的な予後評価法の確立が必要である。さらに、乳児劇症肝炎例における脳圧の非侵襲的な評価法の開発についても検討することが望まれる。

肝性脳症の改善、脳浮腫のコントロールには、人工肝補助療法が必要不可欠であるが、現行のシステムで

は乳児の人工肝補助療法が困難である。乳児劇症肝炎における人工肝補助の問題点は、まず、体のサイズが小さい点である。対策としては、回路を小さくしプライミングもアルブミン製剤で行うなど体外循環ボリュームを少なくする工夫が必要である。ブラッドアクセスの確保も困難であるが、中心静脈に比較的太いダブルルーメンのカテーテルを挿入することができれば、血漿交換、血液濾過透析に必要な30ml/min以上の血流速度を維持できよう。太いカテーテルが挿入困難な場合は複数の血管確保が必要となる。また、血漿交換の他に、循環動態の変化を最小限に抑え、かつ肝性昏睡物質の透析効率を上げるために、持続血液濾過透析(CHDF)を利用するのが良いと考えられる。今後、これらの改善点を満足した人工肝補助療法システムを確立し、経験を積み重ねる必要がある。

E. 結論

乳児劇症肝炎では、治療により生存しても中枢神経障害後遺症を合併する可能性がある。それは、肝性脳症に伴う脳浮腫が、その程度により可逆性を異にするためと考えられる。特に移植などの治療にあたっては、中枢神経系の予後を念頭に置いた肝性昏睡の評価が必要となる。さらに可逆的な肝性脳症に対して、乳児にも適用可能で効率的な人工肝補助システムを導入し、中枢神経後遺症の発生を可能な限り予防することが必要である。

参考文献

- 1) 原田友一郎, 白木和夫: 日本における劇症肝炎の全国調査, 小児科診療58:1689, 1995
- 2) 須磨崎亮: 乳児劇症肝炎の治療の進歩, 小児科診療53:2699, 1990
- 3) 志賀英敏, 平澤博之, 貞広智仁: 急性肝不全, 劇症肝炎, 集中治療10:561, 1998
- 4) 志賀英敏, 平澤博之: 小児血液浄化法の適応と実際, 集中治療11:571, 1999
- 5) 与芝 真: 劇症肝炎診療の最前線—治療現場からのレポート, 医薬ジャーナル社
- 6) Hattori H, Tanaka K, et al.: Living-related liver transplantation and neurological outcome in children with fulminant hepatic failure. TRANSPLANTATION 65:686, 1998

図1 劇症肝炎治癒後の中枢神経障害後遺症例

劇症肝炎治癒後の中枢神経障害

発症年齢	病因	脳浮腫	昏睡度	治療	現在状態
1 4か月	HBV	あり	IV	PE	痙性麻痺 精神遅滞
2 4か月	HBV	あり	IV	PE GI	硬膜下水腫 精神遅滞 てんかん
3 3か月	不明	あり	IV	ET 肝移植	精神遅滞、痙攣 痙性麻痺 難聴、皮質盲

図2 症例1のCT所見の変化

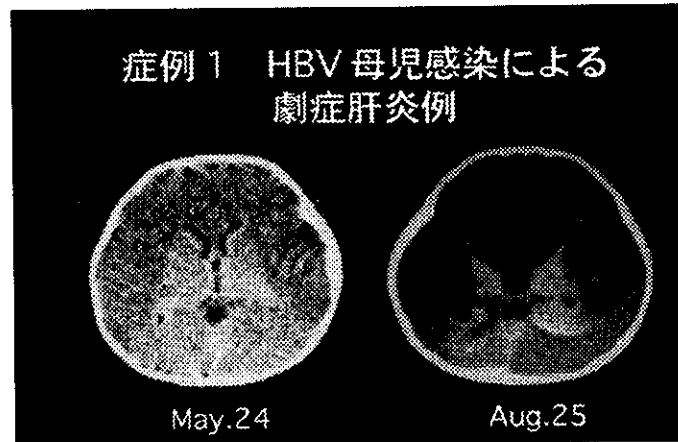
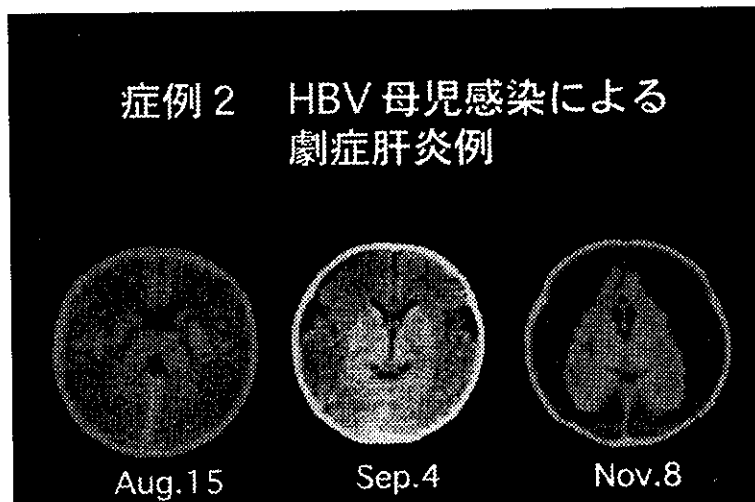


図3 症例2のCT所見の変化



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

ウイルス性肝硬変（B型、C型）に対する肝移植の適応拡大に関する研究

分担研究者 川崎 誠治 信州大学医学部 第一外科

研究要旨：劇症肝炎、ウイルス性肝硬変は、内科的治療が有効でない場合には肝移植による治療を考慮する必要がある。本研究では、これらの疾患に対する肝移植の適応ならびに治療成績向上のための対策について、自施設の生体肝移植症例において検討した。

A. 研究目的

劇症肝炎、ウイルス性肝硬変に対する肝移植の適応ならびに治療成績向上のための対策について検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象は信州大学第一外科における生体肝移植症例116例。このうち劇症肝炎は16例、ウイルス性肝硬変は2例であった。これらを対象に適応、術前術後管理、成績を検討した。本研究は患者とその家族へのインフォームド・コンセントの後に学内の適応検討委員会で検討され、学内の倫理委員会による審議・承認を得た。

C. 研究結果

劇症肝炎は亜急性型で内科的治療に反応しない症例を中心に移植を適応した。手術開始時まで血漿交換などの集中治療を行った。16例全例が順調な経過で退院したが、1例は術後8ヶ月目に血液疾患で失った。ウイルス性肝硬変は、内科的治療に反応しない末期肝不全例を適応とし、B型肝炎ウイルス性ではHBV-DNA陽性に対してlamivudineの術前投与にてウイルス量を低下させ、術中から術後にかけてのHBIG+lamivudine投与で術後5ヶ月現在肝炎の再発を認めていない。C型ウイルス性では術後肝炎再発に対しIFN+ribavirin投与を考慮しているが、自験例では肝炎再発をきたしていない。

D. 考察

対象とする疾患に対する生体肝移植の成績は良好であった。生体肝移植は部分肝移植であることから、特に成人例においてその適応限界を明らかにしていく必要があるものと考えられた。

E. 結論

劇症肝炎、ウイルス性肝硬変に対する生体肝移植の有用性が示された。今後さらに適応と術前術後管理を中心に検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表: Miwa S, Hashikura Y, Mita A, Kubota T, Chisuwa H, Nakazawa Y, Ikegami T, Terada M, Miyagawa S, Kawasaki S: Living-related liver transplantation for patients with fulminant and subfulminant hepatic failure. *Hepatology* 1999;30:1521-1526.

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変に対する生体部分肝移植の適応と成績

分担研究者 幕内雅敏 東京大学肝胆膵外科, 人工臓器移植外科 教授

研究要旨：東京大学にて施行した原発性胆汁性肝硬変症に対する生体部分肝移植の適応と成績について検討した。対象は原発性胆汁性肝硬変症 10 例で、女性 8 例、男性 2 例、年齢は 45～64 才であった。適応の参考となる日本肝移植適応研究会モデルによる 6 か月死亡率と Mayo モデル(update)による 6 か月生存率との間には相関は認められなかった。risk score は中央値 8.96 (5.85～10.38) であり、8 例で手術リスクの高いとされる 7.8 を越えていた。術後合併症として 3 例の骨折がみられた。1 例は多発性肋骨骨折により frail chest となり、3 週間の人工呼吸器管理を必要とした。10 例中 9 例が生存中であるが、術後早期より抗ミトコンドリア抗体が再度陽性化していた。症候性原発性胆汁性肝硬変に対しては骨粗鬆症の予防など、将来の肝移植を視野に入れた内科管理が必要である。具体的には血清総ビリルビン値が 5mg/dl を越えたら移植施設にコンサルトして頂き、その後は経過をみながら、血清総ビリルビン値が 8-10mg/dl 程度となったら、肝移植を実施するのが適当と考えられた。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変は、成人における胆汁うっ滞性肝疾患の代表として、肝移植の良い適応と考えられている。東京大学における原発性胆汁性肝硬変に対する生体部分肝移植症例について、その適応と成績について検討した。

B. 研究対象と方法

東京大学では 1996 年 1 月より 1999 年 12 月までに 76 例 77 回の生体部分肝移植を施行した。成人例 (18 歳以上) 28 例、小児例 48 例で、成人例中 10 例が原発性胆汁性肝硬変に対して肝移植の行われたものであった。原発性胆汁性肝硬変症例の内訳は女性 8、男性 2 で、年齢は 45～64 才 (中央値 53 才)、体重は 42～60kg (中央値 49kg) であった (表 1)。

ドナーは息子 3 例、娘 3 例、兄弟、姉妹、夫、妻各 1 例ずつであった。その年齢は 21～57 才 (中央値 33 才) で、体重は 45～82kg (中央値 58kg) であった (表 2)。

十分なインフォームドコンセントに基づいて生体部分肝移植を実施しており、倫理的問題はないと考えられる。

表 1 原発性胆汁性肝硬変症例

レシピエントの内訳 1996/1-1999/12

Case	Age (yrs)	Sex	B.W. (kg)	T.Bil (mg/dl)	Alb (g/dl)	PT (%)	Edema
21	53	F	50	13.4	2.4	49.2	(+)
35	62	F	46	8.5	2.2	63.0	(+)
48	53	F	48	24.0	2.1	43.7	(++)
51	45	F	56	21.6	3.2	61.5	(-)
53	61	F	42	30.8	3.0*	52.0	(+)
57	51	F	52	2.6	3.0	90.2	(-)
59	53	M	49	21.9	2.2	55.2	(+)
62	49	F	49	17.0	2.4	80.0	(+)
72	64	M	60	17.9	1.9	52.0	(+)
75	55	F	51	30.4	2.8*	18.0	(++)

*アルブミン補充後

表 2 原発性胆汁性肝硬変症例ドナーの内訳

1996/1-1999/12

Case	relation	Age (yrs)	Sex	B.W. (kg)	graft	GW/SLV ratio(%)
21	daughter	25	F	50	left liver	38
35	son	35	M	61	left+caudate	38
48	son	25	M	52	left+caudate	33
51	daughter	21	F	57	left+caudate	35
53	sister	57	F	58	left+caudate	49
57	brother	45	M	75	left liver	55
59	wife	47	F	58	left+caudate	34
62	husband	51	M	60	left+caudate	40
72	son	31	M	82	left liver	39
75	daughter	27	F	45	left+caudate	38

表3 原発性胆汁性肝硬変症例
予後予測データ 1996/1-1999/12

Case	日本肝移植 適応研究会 model	Mayo model	
	6ヶ月死亡率	6ヶ月生存率	risk score
21	96.9	50.1	8.84
35	91.0	54.7	8.73
48	89.0	3.1	10.23
51	83.8	84.7	7.52
53	80.7	35.3	9.08
57	74.1	98.3	5.85
59	59.2	26.4	9.29
62	89.2	61.8	8.51
72	96.2	5.8	9.88
75	98.9	1.9	10.38

C. 研究結果

ドナーの術式としては中肝静脈を含む左葉切除を3例に、左側尾状葉を付加した左葉切除を7例に行った。グラフト重量/レシピエント標準肝容積比 (GW/SLV 比) は33~55% (中央値 38%) であったが、左側尾状葉の付加により2~4%のGW/SLV 比の増加が得られた (表2)。

日本肝移植適応研究会モデルによる6か月死亡率は59.2~98.9% (中央値 89.1%) 1), Mayoモデル (update model)による6か月生存率は1.9~98.3% (中央値 42.7%) であった2)。またMayoモデル (original version) によるrisk scoreは5.85~10.38 (中央値 8.96) であった3)。日本肝移植適応研究会モデルによる6か月死亡率とMayoモデルによる6か月生存率, risk scoreとの間には相関は認められなかった (P=0.45 および p=0.26) (表3)。

食道静脈瘤破裂は原発性胆汁性肝硬変患者

のリスクの一つであるが、移植のための入院後に食道静脈瘤破裂を起こし、血清総ビリルビン値が47mg/dlまで上昇した症例を経験した。この症例では血漿交換を行ない、全身状態の改善を図りながら、娘をドナーとする生体部分肝移植を施行した。移植後2年4か月経過し、移植肝機能もほぼ正常で外来通院中である。当然ながらこのように状態が急激に変化するものについてはモデルに基づく予後予測は困難であり、迅速な対応のためには、前もって移植の準備が進めてあることが重要と考えられた。

肝移植後の経過について、血清総ビリルビン値の推移を原発性胆汁性肝硬変症例とそれ以外の成人症例とで比較した。両者間でGW/SLV 比には差を認めなかった。術前の血清総ビリルビン値 2.0mg/dl 以下であった症例を除いて検討すると、両者間で第6病日から第13病日までの間で有意差を認め、原発性胆汁性肝硬変症例の方がこの期間での血清総ビリルビン値の低下は良好であった (図1)。

急性拒絶反応は10例中4例で認められた。急性拒絶反応の発症率は他の成人症例や小児例と差を認めなかった。原発性胆汁性肝硬変症の急性拒絶反応には全例ステロイドパルス療法が有効で、OKT3を必要とした症例はなかった (表4)。

移植後合併症として胆汁瘻、腹腔内膿瘍、骨折、多量の胸水腹水などが認められた。骨折は10例中3例に認められており、カルシウム吸収障害に伴う骨粗鬆症がその原因と考えられた。理学的療法としてのタッピングや体位変換により多発性肋骨骨折を起こしたと考えられる症例では frail chest となり、3週間にわたる人工呼吸器管理を必要とした。

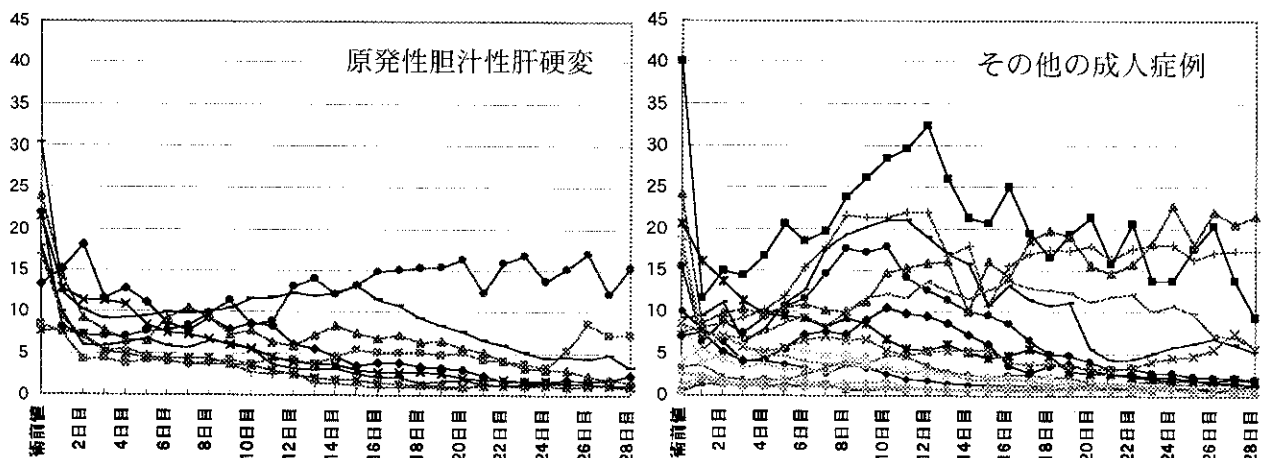


図1 移植後T. Bil.の推移の比較

表4 原発性胆汁性肝硬変症例
合併症と予後 1996/1-1999/12

Case	rejection	complications	inhospital days	prognosis
21	(+)	右横隔膜下膿瘍, 胆汁瘻	110	alive
35	(+)	右横隔膜下膿瘍, 胆汁瘻, 骨折	123	alive
48	(+)	門脈逆流, 腹腔内膿瘍, (腹水)	90	alive
51	(-)	特になし	36	alive
53	(+)	多発肋骨骨折 (frail chest)	48	alive
57	(-)	特になし	48	alive
59	(-)	肺炎, 敗血症, 多臓器不全, 骨折	58	dead
62	(-)	特になし, (腹水)	90	alive
72	(-)	特になし, (腹水)	75	alive
75	(-)	呼吸不全, 腎不全, (入院中)	>46	alive

移植後入院日数は 36~123 日 (中央値 66 日) であった。これは原発性胆汁性肝硬変症以外の成人例の移植後入院日数と比較しても差は認められなかった。

術後の経過観察期間は 1 か月~28 か月であるが、現在までのところ、10 例中 9 例が生存中である。なお 1 例は術後 58 日目に感染症に伴う多臓器不全にて失った (表 4)。

移植後の抗ミトコンドリア抗体価の推移について検討したところ、移植前より陽性であった症例では、移植後の評価可能なものについては全例移植後早期に陽性となっていることが明らかとなった (表 5)。

D. 考 察

肝移植は現在のところ原発性胆汁性肝硬変に対する唯一の根本的治療法である。進行した原発性胆汁性肝硬変症を肝移植の適応とすることは一般に異論のないところであるが、具体的にどの時点で肝移植の準備をし、どのような段階で肝移植を実施するのが適切かについてはまだ十分なコンセンサスは得られていない。

表5 移植後の抗ミトコンドリア抗体価
1996/1-1999/12

Case	pretransplant	posttransplant
21	x160	3 か月後より x80
35	x320	7 か月後より x320
48	x160	6 か月後より x160
51	(-)	(-)
53	x 80	4 か月後より 陽性
57	(-)	(-)
59	x320	死亡により評価不能
62	(-)	(-)
72	(-)	(-)
75	x320	術後早期にて評価不能

脳死肝移植の場合には原発性胆汁性肝硬変症について、日本肝移植適応研究会モデルによる 6 ヶ月死亡率 50%以上および Mayo モデル(update model)における 6 ヶ月生存率 40%以下が患者登録の目安とされている。実際にこれらのモデルを用いて、我々の症例での 6 ヶ月死亡率や 6 ヶ月生存率を算出すると、両者の結果には大きな隔たりが認められた。日本肝移植適応研究会モデルでは死亡率が高く算出される傾向があり、また Mayo モデル(update model)では逆に生存率が高く算出される傾向があると思われた。現在用いられている日本肝移植適応研究会モデルは、以前の古い症例のデータに基づいて作られていることが実際とのズレの原因と考えられるので、最新の内科管理を受けている症例のデータに基づく新しいモデルの作成が望まれる。

欧米では risk score が 7.8 を越えると合併症のリスクが高いと報告され、それ以前の肝移植が勧められている。我々の症例では 10 例中 8 例で 7.8 を越えており、最高では 10.38 で、厳しい症例に対して肝移植を実施していると考えられた。

移植施設の立場としては、重篤な肝不全状態となる前の、少しでも成功率の高い時期に移植を行うのが望ましいと考えており、具体的には血清総ビリルビン値が 5mg/dl を越えるようになった時点で、移植施設にコンサルトして頂き、肝移植の準備を整え、血清総ビリルビン値が 8-10mg/dl 程度になったら肝移植を実施するのが望ましいと考えている。プロトロンビン時間などの合成能が極端に低下する前に移植を実施することが重要である。術後合併症として骨折を 10 例中 3 例で経験した。特に痰排出のための理学療法 (タッピン

グと体位変換)が原因となり多発性肋骨骨折を起こしたと思われる症例では frail chest となり、長期間の人工呼吸器管理を必要とした。骨の脆弱性を考慮に入れた愛護的な術後管理が必要なことはいうまでもないが、症候性原発性胆汁性肝硬変の患者では骨の脆弱化を最小限に抑えるような内科的管理を早期より積極的に行うことが必要と思われた。

移植肝に原発性胆汁性肝硬変が再発する危険が指摘されている。特に生体部分肝移植の場合には欧米の脳死肝移植と比較して、HLAの適合性がよいため、返って逆に原発性胆汁性肝硬変の再発の危険が高い可能性のあることが指摘されている。我々の症例でも移植前に抗ミトコンドリア抗体陽性であったものは移植後一旦抗体陰性となるが、比較的早期に全例再度陽性となっていた。この肝移植後の原発性胆汁性肝硬変症の再発に関しては組織学的な検討も含めて今後の注意深い経過観察が必要と考えられた。

E. 結論

症候性原発性胆汁性肝硬変患者の場合には最終的に肝移植が必要となる可能性を考慮に入れた長期的な内科管理が望まれる。具体的には骨の脆弱化を抑える治療を早期より積極的に行いながら、血清総ビリルビン値が5mg/dlを越えるようになった時点で移植施設にコンサルトして頂き、その後は肝移植の準備を進めながら、内科的管理を続け、血清総ビリルビン値が8-10mg/dl程度となったら肝移植を実施するのが望ましいと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

*以下、論文、学会発表はすべて1999年のもの

平田 勝、針原 康、幕内雅敏 劇症肝炎に対する肝移植-成人生体肝移植の開発 Modern Physician19(10): 1283-1285

針原 康、幕内雅敏 生体部分肝移植例でのラミブジンの使用経験 Pharma Medica17(12): 49-54

針原 康、幕内雅敏 肝移植時の急性拒絶に対する免疫抑制療法 集中治療 11(7) 683-689

針原 康、幕内雅敏 肝移植と肝炎ウイルス 臨床成人病 29(4): 498-503

針原 康、幕内雅敏 成人生体肝移植におけるドナーの選択と安全確保 Pharma Medica17(3)89-93

河原崎秀雄、伊東充宏、吉野浩之、橋都浩平、針原 康、

窪田敬一、高山忠利、幕内雅敏 生体肝移植の手術手技上の発展 Pharma Medica17(3): 83-88

針原 康、幕内雅敏 ウイルス肝炎に対する肝移植の適応 外科 61(10): 1090-1096

河原崎秀雄、吉野浩之、水田耕一、橋都浩平、針原 康、窪田敬一、高山忠利、幕内雅敏 本邦における生体肝移植の集計 外科 61(10): 1103-1106

橋倉泰彦、三田篤義、窪田達也、三輪史郎、池上俊彦、寺田 克、松波英寿、河原崎秀雄、針原 康、幕内雅敏、川崎誠治 肝移植におけるシクロスポリン MEPC の使用経験-第1報-現行製剤からの切り替え投与 今日の移植 12(Suppl): 99-107

Sakamoto Y, Harihara Y, Nakatsuka T, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Kimura W, Kita Y, Hashizume K, Makuuchi M. Rescue of liver grafts from hepatic artery occlusion in living-related liver transplantation. British Journal of Surgery 86: 886-889

Harihara Y, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Hirata M, Kita Y, Kusaka K, Sano K, Hashizume K. Portal venoplasty for recipients in living-related liver transplantation. Transplantation 68(8): 1199-1200

Nakatsuka T, Takushima A, Harihara Y, Makuuchi M, Kawarasaki H, Hashizume K. Versatility of the inferior epigastric artery as an interpositional vascular graft in living-related liver transplantation. Transplantation, 67(11): 1490-1492

Matsukura A, Kita Y, Harihara Y, Tanaka H, Ito M, Kawarasaki H, Kubota K, Takayama T, Hashizume K, Makuuchi M. Does peripheral blood eosinophilia predict allograft rejection in living-related liver transplantation? Transplantation Proceedings 31(7): 2729-2730

Harihara Y, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Ito M, Tanaka H, Yoshino H, Hirata M, Kita Y, Kusaka K, Sano K, Saiura A, Ijichi M, Matsukura A, Watanabe K, Hashizume K, Nakatsuka T. Effect of fluconazole on blood level of Tacrolimus Transplantation Proceedings 31(7): 2767

Harihara Y, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Ito M, Yoshino H, Tanaka H, Hirata Y, Kita Y, Kusaka K, Sano M, Ijichi M, Watanabe A, Hashizume,

- T. Nakatsuka. Initial experience with 40 cases of living-related liver transplantation at the University of Tokyo. Transplantation Proceedings 31(7): 2893-2894
- Matsukura A, Kita Y, Harihara Y, Kubota K, Takayama T, Kawarasaki H, Hashizume K, Makuuchi M. Is splenic artery ligation effective for thrombocytopenia early after liver transplantation? Transplantation Proceedings 31(7): 2906-2907
- Hirata M, Harihara Y, Sano K, Kusaka K, Kita Y, Nakao A, Taniguchi S, Seki G, Yoshino H, Ito M, Kubota K, Takayama T, Kawarasaki H, Hashizume K, Makuuchi M. Recovery of renal function after living-related liver transplantation in a case of HBV liver cirrhosis with renal failure. Transplantation Proceedings 31(7): 2904-2905
- Kita Y, H. Sakakura, M. Hirata T. Y. Harihara, H. Tanaka, M. Ito K. H. Yoshino, T. Takayama, K. Kubota, K. Hashizume, M. Makuuchi. Ursodeoxycholic acid in serum and liver tissue in patient with end-stage cholestatic cirrhosis. Transplantation Proceedings 31(7): 2897-2898
- Tanaka H, Harihara Y, Kita Y, Kawarasaki H, Hashizume K, Takayama T, Makuuchi M. Changes in graft volume after living-related liver transplantation. Transplantation Proceedings. 31(7): 2895-2896
- Hirata M, Saito S, Nishimura M, Sano K, Kusaka K, Kita Y, Harihara Y, Yoshino H, Ito M, Kawarasaki H, Hashizume K, Makuuchi M. Changes in natural killer cell activity before and after living-related donor liver transplantation. Transplantation Proceedings. 31(7): 2701-2703
2. 学会発表
- 北 嘉昭、針原 康、高山忠利、平田 勝、日下浩二、佐野圭二、伊東充宏、吉野浩之、森 正也、河原崎秀雄、窪田敬一、中尾彰秀、前川和彦、橋都浩平、幕内雅敏 B 型肝硬変に対する成人生体肝移植 第 53 回日本消化器外科学会総会 京都 1999/2/17-19
- 針原 康、幕内雅敏、高山忠利、窪田敬一、平田 勝、北 嘉昭、日下浩二、佐野圭二、河原崎秀雄、橋都浩平 生体部分肝移植における門脈再建 第 53 回日本消化器外科学会総会 京都 1999/2/17-19
- 針原 康、幕内雅敏、河原崎秀雄、高山忠利、窪田敬一、平田 勝、北 嘉昭、佐野圭二、久富伸哉、谷合信彦、伊東充宏、水田耕一、吉野浩之、橋都浩平 ドナーからみた生体部分肝移植の適応拡大とその限界 第 61 回日本臨床外科学会総会 東京 1999/11/24-26
- 針原 康、幕内雅敏、高山忠利、窪田敬一、平田 勝、北 嘉昭、佐野圭二、三浦泰朗、河原崎秀雄、橋都浩平 生体肝移植の治療成績-成人例と小児例を比較して- 第 54 回日本消化器外科学会総会 名古屋 1999/7/15-16
- 高山忠利、幕内雅敏、針原 康、窪田敬一、平田 勝、渡辺 稔、回 愛民、北 嘉昭、日下浩二、佐野圭二 尾状葉加左葉による成人生体肝移植 第 53 回日本消化器外科学会総会 京都 1999/2/17-19
- 高山忠利、幕内雅敏、窪田敬一、佐野圭二、伊地知正賢、渡辺 稔、針原 康 尾状葉加左葉グラフト 第 99 回日本外科学会総会 福岡 1999/3/24-26
- 窪田敬一、高山忠利、針原 康、幕内雅敏 肝胆臓における再建術式「生体肝移植における胆道再建手技：ロト・ステントを用いた胆管-空腸吻合術」第 54 回日本消化器外科学会総会 名古屋 1999/7/15-16
- 成瀬勝俊、酒井康行、Carmelo PULIATTI、針原 康、Francesco LEONE、鈴木基之、幕内雅敏 不織布充填型人工肝臓ハイリファクターを用いた灌流実験の検討と臨床応用の展望 第 99 回日本外科学会総会 福岡 1999/3/24-26
- 針原 康、幕内雅敏、高山忠利、窪田敬一、平田 勝、北 嘉昭、佐野圭二、久富伸哉、三浦泰朗、谷合信彦、日下浩二、回 愛民、青木 琢、平井一郎、松倉 聡、長谷川潔、前間 篤、阪本良弘、小林 隆、緑川 泰、加藤正人、高津 光、伊東充宏、水田耕一、田中秀明、吉野浩之、河原崎秀雄、橋都浩平 肝炎ウイルス陽性例に対する生体部分肝移植 第 17 回肝移植研究会、第 25 回日本急性肝不全研究会合同学術会議 東京 1999/6/22-23
- 平田 勝、針原 康、北 嘉昭、幕内雅敏 原発性胆汁性肝硬変に対する成人間生体部分肝移植 第 3 回日本肝臓学会大会 広島 1999/10/28-29
- 谷合信彦、針原 康、北 嘉昭、平田 勝、佐野圭二、久富伸哉、窪田敬一、高山忠利、幕内雅敏、吉田 寛、秋丸琥甫、田尻 孝、恩田昌彦 成人生体部分肝移植患者における術前骨密度の検討 第 3 回日本肝臓学会大会 広島 1999/10/28-29
- 北 嘉昭、針原 康、高山忠利、平田 勝、日下浩二、佐野圭二、窪田敬一、河原崎秀雄、橋都

- 浩平、幕内雅敏 成人肝移植後の術後合併症対策 第 99 回日本外科学会総会 福岡 1999/3/24-26
- 平田 勝、針原 康、三浦泰朗、佐野圭二、日下浩二、北 嘉昭、窪田敬一、高山忠利、幕内雅敏 生体部分肝移植後の ITP に対し、脾摘が有効であった B 型肝硬変成人例の一例 第 54 回日本消化器外科学会総会 名古屋 1999/7/15-16
- 北 嘉昭、針原 康、高山忠利、平田 勝、佐野圭二、三浦泰朗、窪田敬一、河原崎秀雄、大友邦、幕内雅敏 門脈逆流を認めた成人肝移植の一例 第 54 回日本消化器外科学会総会 名古屋 1999/7/15-16
- 北 嘉昭、針原 康、平田 勝、窪田敬一、高山忠利、幕内雅敏 生体肝移植後に原疾患の再発が疑われる graft failure のため、米国で再移植を受けた原発性硬化性胆管炎(PSC)の一例 第 85 回日本消化器病学会総会 長崎 1999/4/22-24
- 針原 康、幕内雅敏、川崎誠治、橋倉泰彦、河原崎秀雄、平田 勝、北 嘉昭、日下浩二、佐野圭二、伊東充宏、吉野浩之、窪田敬一、高山忠利、橋都浩平 生体部分肝移植における HLA 適合度の影響 第 99 回日本外科学会総会 福岡 1999/3/24-26
- Kubota K, Makuuchi M, Takayama T, Harihara Y, Kawarasaki H. Hepatic vein reconstruction in living related liver transplantation. 9th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Oslo, Norway 1999/6/19-24
- Hirata M, Harihara Y, Hisatomi S, Miura Y, Yoshino H, Mizuta K, Ito M, Sano K, Tani ai N, Kusaka K, Kita Y, Kawarasaki H, Kubota K, Takayama T, Makuuchi M. A case of esophageal variceal rupture following acute portal thrombosis three days after living-related liver transplantation. The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Kita Y, Harihara Y, Takayama T, Hirata M, Kusaka K, Sano K, Ito M, Yoshino H, Mori M, Kawarasaki H, Kubota K, Nakao A, Maekawa K, Makuuchi M. Adult-to-adult living-related liver transplantation for hepatitis B-related cirrhosis. The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Harihara Y, Sano K, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Ito M, Mizuta K, Yoshino H, Hirata M, Kita Y, Hisatomi S, Kusaka K, Miura Y, Hashizume K, Correlation between graft size and optimal tacrolimus dosage after living-related liver transplantation. The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Tani ai N, Harihara Y, Kita Y, Hirata M, Sano K, Kubota K, Takayama T, Makuuchi M, Yoshida H, Akimaru K, Tajiri T, Onda M. Formation and rupture of esophageal varices after adult-to-adult living related liver transplantation. The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Fukunishi I, Kita Y, Fukuhara S, Harihara Y, Takayama T, Kubota K, Kawarasaki H, Makuuchi M. Health status survey of living related liver transplantation recipients by A36-item short-form(SF-36). The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Hirata M, Harihara Y, Kita Y, Hisatomi S, Miura Y, Yoshino H, Mizuta K, Ito M, Sano K, Kusaka K, Kawarasaki H, Kubota K, Takayama T, Hashizume K, Makuuchi M. Impact of HLA matching in living-related liver transplantation. The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Harihara Y, Sano K, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Ito M, Mizuta K, Yoshino H, Hirata M, Kita Y, Hisatomi S, Kusaka K, Miura Y, Hashizume K. Influence of donor age on the graft function after living-related liver transplantation. The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Harihara Y, Sano K, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Ito M, Mizuta K, Yoshino H, Hirata M, Kita Y, Hisatomi S, Kusaka K, Hashizume K. Influence of HLA compatibility on living-related liver transplantation. The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24
- Matsukura A, Kita Y, Harihara Y, Tanaka H, Ito M, Kawarasaki H, Kubota K, Takayama T, Hashizume K, Makuuchi M. Is peripheral blood eosinophilia a predictor of allograft rejection in living-related liver transplantation? The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapore 1999/9/20-24

Harihara Y, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Ito M, Mizuta K, Yoshino H, Hirata M, Kita Y, Sano K, Hisatomi S, Kusaka K, Miura Y, Taniai N, Asato H, Nakatsuka T, Hashizume K, Living related liver transplantation in adults compared with in children.

The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation.Singapole1999/9/20-24

Hirata M, Harihara Y, Hisatomi S, Miura Y, Yoshino H, Mizuta K, Ito M, Sano K, Taniai N, Kusaka K, Kita Y, Kawarasaki H, Kubota K, Takayama T, Hashizume K, Makuuchi M.Living-related liver transplantation for patients with primary biliary cirrhosis.The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation.Singapole 1999/9/20-24

Taniai N, Harihara Y, Kita Y, Hirata M, Sano K, Kusaka K, Kubota K, Takayama T, Makuuchi M, Yoshida H, Akimaru K, Tajiri T, Onda M.Persisitent discharge of ascites and/or pleural effusion after adult-to-adult living related liver transplantation.The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation.Singapole1999/9/20-24

Kita Y, Harihara Y, Takayama T, Hirata M, Kusaka K, Sano K, Ito M, Yoshino H, Kawarassaki H, Kubota K, Nakao A, Maekawa K, Makuuchi M.Persistent hyperbilirubinemia following adult-to-adult living-related liver transplantation.The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation.Singapole1999/9/20-24

Taniai N, Harihara Y, Tanaka K, Akune T, Kita Y, Hirata M, Sano K, Kusaka K, Kubota K, Pre-transplant evaluation of bone mineral density of adult patients with end-stage choestatic liver disease.The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapole1999/9/20-24

Harihara Y, Guo L, Hirata M, Kita Y, Sano K, Kusaka K, Hisatomi S, Miura Y, Makuuchi M.The role of natural killer cells in allo-and xenograft rejection.The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation. Singapole1999/9/20-24

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝疾患に対する肝移植

分担研究者 田中紘一 京都大学大学院医学研究科移植免疫医学 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変20例に対して生体肝移植を行った。また、同期間中に2例の重症自己免疫性症例に対して生体肝移植を行った。原発性胆汁性肝硬変20例中7例が死亡した。死亡原因は敗血症4例、肺炎2例、脳梗塞1例であった。死亡症例と生存例を、術前状態、肝機能所見、移植されたグラフト重量、ステロイド投与の有無等で比較すると、術前に感染症を合併していた症例が有意に移植後感染症で死亡する確率が高かった。重症自己免疫性肝炎の2例は1例は移植後アスペルギルス感染症で死亡したが、1例は移植後11ヶ月の現在生存中である。

A. 研究目的

当初は小児肝疾患患者に適用されていたが、次第に成人症例への適用拡大が進められるようになってきた。京都大学においては肝左葉を用いた自己肝温存同所性部分肝移植（APOLT）で適用拡大に努め、さらに1998年からは肝右葉を用いた成人間生体肝移植を行っている。原発性胆汁性肝硬変症例の生体肝移植治療は1994年から開始し、現在までに20例に行っている。移植成績を患者の術前状態と手術術式を対象に検討してみた。また、同期間中に重症自己免疫性肝炎2例に生体肝移植を行った。

B. 研究方法

20例の原発性胆汁性肝硬変症例の内訳は、女性19例、男性1例で、平均年齢47才（27-66才）であった。掻痒感、黄疸、全身倦怠感などの症状の病期期間は平均63ヶ月（15-156ヶ月）であった。17例が移植前に血清総ビリルビン値は10mg/dl以上であり、平均血清総ビリルビン値は23mg/dl（6-64mg/dl）であった。術前に食道静脈瘤からの消化管出血をきたしたのは12例（60%）、II度以上の肝性昏睡をきたしたのは5例（25%）であった。日本肝移植適応委員会の定める6ヶ月後の予測死亡率は平均72%（21.5-99.6%）であり、Mayo-up dateモデルによる6ヶ月後の予測生存率は平均58%（4.3-98.0%）であった。術前に肺炎を合併していたのは2症例、特発性細菌性腹膜炎（SBP）を合併していたのが2例、起炎菌の特定はできないが、37.5度以上の発熱があり、CRPが5.0mg/dl以上、血中β-Dグルカンが50以上、あるいは血中エンドトキシンが20以上である症例は3例であり、これらの7症例は術前感染症陽性症例とした。生体肝移植におけるドナーの内訳は、兄弟が3人、姉妹7人、夫4人、息子2人、娘2人、父1人、アミロイドーシス患者からのドミノ移植が1例で、平均年齢46才（20-62才）であった。移植に用いたグラフトは左葉12、右葉8であり、左葉を用いた3例はグラフトが小さいためAPOLT術式を行った。重症自己免疫性肝炎で生体肝移植を行った2例は50才と46才の女性で、ステロイド療法が無効で、急速に肝不全が進行した症

例であった。両者とも抗核抗体陽性、抗ミトコンドリア抗体陰性で、国際診断基準でのスコアはそれぞれ15点と16点であった。それぞれ姉と弟の肝右葉を用いた生体肝移植を行った。摘出肝臓の病理所見はともに肝細胞のmassive necrosisの所見であった。生体肝移植実施にあたっては本人および家族からのインフォームドコンセントを取得し、当施設の倫理委員会に申請し、実施の許可を得た。

C. 研究結果

原発性胆汁性肝硬変20例中、7例が死亡した。死亡原因は肺炎2例（カンジダと緑膿菌）、腹膜炎からの敗血症2例、腸管からのトランスロケーションによる腹膜炎2例、免疫抑制剤の副作用と考えられる多発性脳梗塞1例であった。生存例と死亡例を術前の血液検査所見で比較検討したが、AST、ALT、血清総ビリルビン値、血清アルブミン値、プロトロンビン時間で両者の間に差を認めなかった。移植術式においては、左葉グラフトでの生存率58%（7/12）は右葉グラフトの生存率75%（6/8）と差がなかった。また、APOLT手術での生存率は67%（2/3）で差がなかった。グラフトと患者体重の％比（graft-recipient weight ratio; GRWR）も両者の間で差がなかった。術前状態で比較すると、食道静脈瘤からの出血の有無、肝性昏睡の有無、腹水の有無、Sheuerのステージ、血漿交換の有無、ステロイド投与の有無は両者の間で差がなかったが、術前感染症を合併していた症例は有意に死亡症例が多かった。重症自己免疫性肝炎の2例とも、肝炎治療のためにステロイド治療を長期間受けていた。1例は移植後に全身のアスペルギルス感染症をきたし死亡した。1例は移植後1年の現在元気にしているが、移植後1ヶ月は発熱と血中βDグルカンの高値が持続し、免疫抑制剤がいらぬimmunocompromizedな状態が続いた。

D. 考察

生体肝移植を受けた原発性胆汁性肝硬変症例は血清総ビリルビン値が高く進行した症例が多かったが、移植後の予後に影響を与えたのは病状の進行度よりも感

染症の合併であった。したがって、移植の成績を向上させるためには、術前の感染症の管理が重要であると考えられた。自己免疫性肝炎の治療はステロイドであるため、移植を必要とする重症自己免疫性肝炎は長期間のステロイド投与を受けており、移植時には感染症を合併したimmunocompromizedな状態になっていることが避けがたい。肝移植治療においては感染症の管理と免疫抑制療法の微調節が重要であると考えられた。

E. 結論

自己免疫性肝疾患患者の生体肝移植後の成績は、術前の感染症が大きく影響し移植後感染症で死亡する。したがって、移植成績の改善のためには術前の感染症（細菌性・真菌性）のチェックアップと治療が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
肝臓病学会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし