

平均 541 日で再発し、種々の interventional therapy を平均 663 日行うも、その後多発再発を来し、平均 8.5 ヶ月で死亡している。死亡までの平均生存期間は 1204 日であった。他方肝癌再発がなく、肝不全死した症例は平均術後 795 日目に肝機能が悪化し（総ビリルビン 2mg/dl 以上、アルブミン 3mg/dl 以下）平均 8.3 ヶ月後に死亡した。

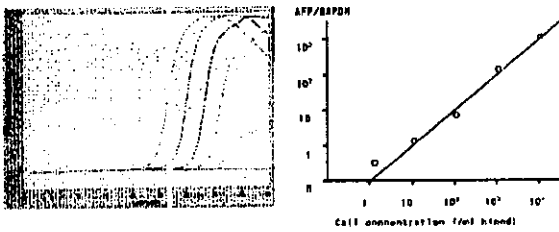
2) 肝癌の micrometastasis の検討

(1) 基礎的條件の検討

plasmid DNA template を用いて AFP の定量的 PCR の定量性を検討したところ、有意の相関を示した。次いで、HuH7 細胞の血液希釈サンプルを用い、AFP の定量的 PCR を行った結果、1cc 当たりの HuH7 細胞数は AFP/DAPGH と有意の相関を示した (図 5)。次いで buffy coat の AFP 免疫組織染色では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 細胞/ML 血液では、HuH7 細胞を同定出来たが、 1×10^2 細胞/ML 血液以下では検出出来なかった (図 6)。

図 5

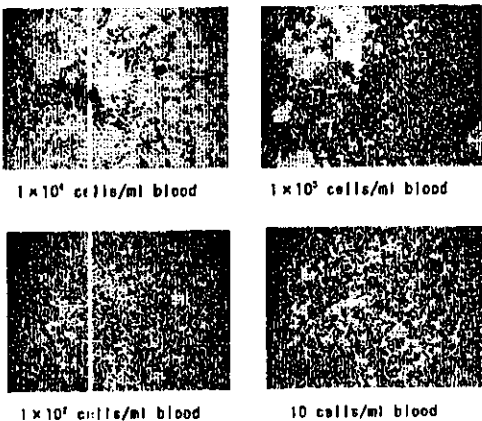
Sensitivity of Quantitative Real-time PCR
Cell Line Derived cDNA Template



HuH7 cells were diluted in peripheral blood
Quantitative PCR of AFP

図 6

Immunohistochemical Detection of HuH7 Cells
AFP staining



(2) 臨床的條件の検討

4℃及び室温で 48 時間まで保存した血液細胞の RT-PCR 法による分析では、室温 48 時間後でやや RNA の変性がやや見られるものの、ほぼ安全に血液が 48 時間まで保存出来ることが確認された。肝部切除を行った T1, M0, vp0, vv0 の C 型肝硬変合併肝癌症例では術前、術中、術後を通じて末梢血門脈血、肝静脈血、及び骨髓に AFP の mRNA は検出出来なかった。他方、T4, N0, M0, vp0, vv1 で腫瘍径 7cm の stage 4A 症例 (図 7) は、術前、術中、術後を通じて末梢血に AFP mRNA が検出された (図 8)。Stage 1 肝切除症例は肝癌再発がなく、術後 10 ヶ月目の現在、健康に生活している。他方、2 例目の症例は、術後種々の化学療法にも拘わらず術後 6 ヶ月目に残肝再発を来している。

図 7

H C C

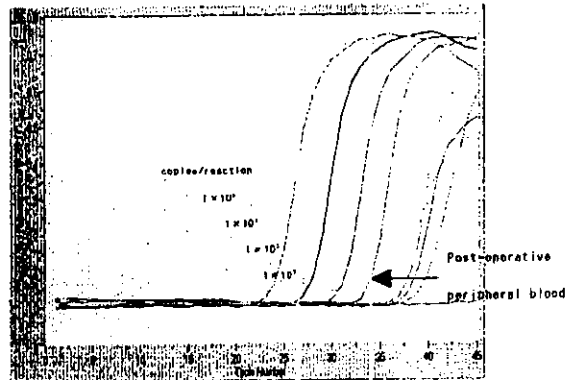
Patient 46 y.o. Male
Diagnosis HCC (HBV+)
T4, N0, M0, vp0, vv1, Tumor Size 7cm, Stage4A



図 8

Micro Metastasis

Pre-operation	Intra-operation		Post-operation					
Peripheral blood (PB)	BV	PB	Peripheral blood					
+	-	+	Day 1	2	3	5	7	14
			+	+	-	+	+	-



生体肝移植を希望して当科を受診した5例の肝癌症例についてAFPをプライマーとした定量的PCRを行った。その結果2例は骨髄にAFP mRNAが陽性で、共に受診後3ヶ月以内に死亡した。術後PET画像診断でリンパ節転移が確認されている。他方、定量的PCRでmicrometastasisが確認出来なかった3症例の1例は平成12年3月18日長男をドナーとして右葉を用いた生体肝移植を行った。術前血管造影で20数個認められた肝癌病巣に対し、TAEと術前化学療法を併用した(図9)。1年後の現在、生化学、画像診断、及び計量的PCR法で肝癌再発は認められていない。他の例は現在生体ないし脳死肝移植で待機中である。

図9
LDLTx for HCC

Patient 52 y.o. Male
Diagnosis HCC (HBV+)
T4, N0, M0, vp0, vv0, Tumor Size 2cm, Stage4A
Therapy LDLTx (Rt lobe from his son)



D. 考察

肝移植は種々の原因による末期肝不全患者の最も有効な治療法として欧米では日常に行われるようになった。これには手術法、麻酔法、免疫抑制法、術後管理法等の向上により移植成績が飛躍的に向上したためである。肝移植後の予後を規定するこれら諸因子がほぼ確立された現在、未解決のその他の重要な予後規定因子の一つである術前の患者の状態の把握、すなわち肝移植適応患者の客観的評価法を確立することと、B型肝炎・C型肝炎・肝癌等の再発性肝疾患の診断法と治療法を明らかにすることは、肝移植成績の更なる向上の為に必須である。

我が国で死因の8位を占める肝不全死のうち、B型・C型肝炎に合併する肝癌症例は全体の4分の3を占める。1990年代前半まで、肝移植の絶対禁忌とされていたHBVウイルスによる肝疾患は、HBVIGやLamivudine、Adefovir等の抗ウイルス剤の開発により、良性肝疾患に並ぶ良い

移植適応となっている。又、HCVウイルスによる肝疾患も、全例移植後にHCVウイルスの感染が生じるが、5年以内に慢性肝炎、肝硬変に進行するのはその10%に過ぎず、またHCV肝炎が再発してもIFNやrabavirinの併用により良好な予後が得られるようになった。しかし、他方肝癌に対する現行の移植適応症例以外は不良とされている。1980年代に積極的に行われた肝癌に対する肝移植成績は、多くが移植後2年以内に肝癌が再発することが明らかとなった。これら症例の臨床病理学的分析の結果、リンパ節転移や肝外転移、明らかな血管浸潤を呈する症例は移植適応から除外すべきであること、また、ピッツバーグやミラノからの報告でも、肝癌そのものについては単発の場合、最大腫瘍径5cm以下、多発でも最大腫瘍径3cm以下で3個以内に限るべきだとの結論が出された。現在、欧米の脳死肝移植はこれらの適応を満足する症例のみに限られている。

本研究でinterventional therapyを含む内科的初回治療を受けた症例の内、clinical stage 3症例の大部分が治療後一年以内に死亡することが明らかとなった。又、初回治療として肝切除術を受けた症例では術後3ヶ月以内に多発再発を来す症例と術後1年以上経って再発し種々のinterventional therapyを駆使しても、最終的には術後2年前後で多発再発し、その後8ヶ月前後で死亡する症例があることが明らかとなった。又、肝癌再発は無いが、術後平均2年前後で肝不全が進行し、肝不全出現後8ヶ月前後で死亡する症例があることも明らかとなった。これらの症例の予後を定量的客観的に評価するために、現在更なるデータを収集中であるが、今までの分析結果から少なくともclinical stage 3の症例及び肝切除後数年経って多発再発ないし肝不全を生じた症例は、肝移植を考慮すべきであろう。

Clinical stage 3症例でも肝癌の進展度により、移植適応、非適応に分けることが出来ると考えられる。一般には先に述べたとおり、リンパ節・肝癌転移を移植適応とするのに異論は無いが、腫瘍径や腫瘍個数、血管浸潤に関して、現行の適応基準からはずれても脳死肝移植後に長期生存している症例があることも事実である。これら長期生存する可能性がある症例を客観的に選択する方法の一つとして、micrometastasisを検討した。肝癌のmicrometastasisに関する報告は限られているが、肝切除症例や肝移植症例で末梢血や骨髄中のAFPやアルブミンmRNAのRT-PCRによる同定が予後と相関することが知られている。本研究では、このmicrometastasisを定量的RT-PCR法により、より簡便迅速に行う方法を確立した。症例が限られているために断定的な結論ではないが、

micrometastasis 陽性の2症例が検査後3ヶ月以内に死亡したのに対して、現在の肝移植適応では対象とならない20個以上の肝内多発肝癌を有し micrometastasis が陰性の症例が生体肝移植後1年以上無再発で生存していることから、我々が開発した方法が、肝癌の肝移植適応患者の選定において重要な役割を果たすことが予想される。

E. 結論

B型・C型肝炎硬変合併肝癌症例で clinical stage 3の症例は、肝移植適応を考慮すべきである。肝切除術後、1年以上経って再発した肝癌症例で、種々の治療を施行中に多発再発を来した者、及び肝癌再発が無いにも拘わらず、肝機能不全が生じた症例は肝移植を考慮すべきである。

AFP mRNA をプライマーとした定量的 RT-PCR による micrometastasis の検出法を確立した。肝移植適応を決定する上で、定量的 RT-PCR 検査の有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 嶋村剛、小林裕明、陳孟鳳、古川博之、藤堂省：3. 脳死肝移植 肝移植術前の管理 肝胆膵フロンティア 肝移植のup to date: 107-113, 2001.
- 2) 嶋村剛、長佐古良英、古川博之、藤堂省：移植再生医療の実際 肝移植 総合臨床 50(1): 57-65, 2001 Jan.
- 3) 古川博之、岸田明博、大村孝志、神山俊哉、松下通明、藤堂省：日本における生体および脳死肝移植の適応とシステムの問題点 北海道医学雑誌 75(4): 219-222, 2000.
- 4) Fujita M, Furukawa H, Hattori M, Todo S, Nagashima K: Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT). *Modern Pathology* 13(2): 152-157, 2000.
- 5) 藤堂省：始まった脳死肝移植—これからの課題— 外科治療 82(2): 179-184, 2000 Feb.
- 6) Tokoro T, Hayashi S, Liu DK, Kato T, Kobayashi T, Yokoyama I, Hamada H, Nakano: Adenovirus-mediated IL12 gene therapy for multiple hepatic cancer. *Molecular Therapy* 1:162, 2000.
- 7) 林衆治：原発性及び転移性肝癌に対する遺伝子治療の研究—転移性肝癌に対する治療戦略— 消化器外科学会雑誌 33: 543-548, 2000.
- 8) Ikehara Y, Yasunami Y, Kodama S, Nakano M, Maki T, Nakayama T, Taniguchi M, Ikeda S: CD4+ V α 14KNT cells are essential for the acceptance of rat islet xenografts in mice. *J Clin Invest* 105(12): 1761-1767, 2000.

2. 学会発表

- 1) 藤堂省：講演「我が国の成人生体肝移植の動向について」、第8回臨床肝臓カンファレンス、東京、2000.11.18.
- 2) 藤堂省：講演「臨床肝臓移植の現況と今後の問題」、第12回日本生命倫理学会年次大会、旭川市、2000.11.3.
- 3) Todo S: Invited speaker, "Living donor liver transplantation in adults, outcome in Asia," AASLD, Dallas, USA, 2000.10.27.
- 4) 藤堂省：シンポジスト「移植医療を推進するために—21世紀にすべきこと—」第36回日本移植学会総会市民公開講座、岐阜市、2000.10.11.
- 5) 藤堂省：特別シンポジウム「21世紀の消化器外科—移植外科—」第55回日本消化器外科学会総会、宮崎市、2000.7.20.
- 6) 藤堂省：講演"Adult to adult LDLTx in Japan" 第1回日韓肝移植シンポジウム、京都市、2000.7.16.
- 7) 藤堂省：特別講演「肝臓移植；過去、現在、未来」第88回日本泌尿器科学会総会、札幌市、2000.6.8.
- 8) 藤堂省：特別講演「臓器移植と21世紀」第73回日本細菌学会総会、札幌市、2000.5.30.
- 9) 藤堂省：講演「移植医療の将来に向けて—肝臓移植の現状—」第86回日本消化器病学会総会新潟市民公開講座、新潟市、2000.4.22.
- 10) 藤堂省：基調講演「我が国における生体及び脳死体肝移植の現状と展望」第100回日本外科学会総会、東京、2000.4.14.
- 11) Todo S: Invited Speaker, "Evolution of Clinical Intestinal Transplantation," The 59th Scientific Meeting of the Surgical Association R.O.C., 2000.3.25.
- 12) Todo S: Invited Speaker, "Experience with LDLT in Japan," *Controversies in Transplantation*, Breckenridge, Colorado, U.S.A., 2000.3.18.
- 13) Kato T, Yokoyama I, Hayakawa A, Tokoro T, Liu D, Kobayashi T, Hayashi S, Nakano A: Tacrolimus and its effect on apoptosis related genes in experimental tumors. 4th International Conference on New Trends in Clinical and Experimental, Geneva, 2000 Feb.
- 14) 林衆治：成人生体部分肝移植5例の検討、愛知県周術期管理研究会、名古屋市、2000.9.
- 15) Yasunami Y, Nakamura Y, Takehara M, Uede T, Todo S, Katsuta H, Ono J, Nakayama T, Taniguchi M, Ikeda S: V14 α NKT cells are essential for acceptance of murine islet allografts by donor specific transfusion. Accepted for oral presentation in Transplant 2001, Chicago, May12-16, 2001.

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成12年度(2001年3月)
厚生科学研究費補助金
「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」研究報告書

発行

事務局 国立佐倉病院
〒285-8765
千葉県佐倉市江原台2-36-2
Tel 043-486-1151(代)

印刷所 株式会社文友堂印刷
〒260-0001
千葉県千葉市中央区都町998
Tel 043-231-7301
