

ヒト由来マクロファージ細胞株へのheme oxygenase-1遺伝子導入の効果

慶應義塾大学医学部医化学

末松 誠

研究要旨

Heme oxygenase-CO系は肝臓・門脈循環の維持に必要なシステムであり肝硬変症では肝細胞およびKupffer cellで発現増加が起り、IPHではKupffer cellにおける発現が対照的に低下する。ヒト単球系細胞株U937を用いて本酵素が発現増加することの病態生化学的意義を解析した。野生型HO-1cDNAおよび酵素活性を持たないH25A変異型HO-1cDNAの高発現株をそれぞれ樹立しtranscriptomeを解析したところ本ストレス蛋白質の酵素活性依存性・非依存性の生物活性の存在が示唆された。

はじめに

門脈血行異常症のうち特発性門脈圧亢進症 (IPH) は原因不明の前類洞性血管収縮反応による門脈圧の上昇を呈する疾患と考えられている。しかし門脈終末枝周辺の血管抵抗が上昇するメカニズムについては明らかにされていない。我々はヒトにおける血管拡張性メディエータの生成異常、とくに新しい血管拡張性ガスであるCO(1)を生成するheme oxygenase-1(HO-1)の発現がIPHで著明に低下すること、また肝硬変症では増加することを明らかにしてきた(2)。そこでHO-1発現変化の病態生理学的意義を明らかにする目的でヒト由来マクロファージ細胞株であるU937を用いてHO-1のstable transfectantを作成し、そのphenotype変化をtranscriptome analysisをもとにした網羅的解析により検討したので報告する。

対象と方法

著者らが作成した抗ラットHeme oxygenase(HO)-

1抗体(3)のヒト抗原に対する交叉反応性をWestern blot analysisにより確認した。ヒト由来monoblastic leukemia cell lineであるU937を用いてすでに樹立したヒトHO-1cDNA およびHO-2cDNAのtransfectantからcell lysateを作成しWestern blotを行ったところヒトHO-1に対しては交叉反応性を示し、HO-2に対しては反応性を示さなかった。一方ヘムの酸化的開裂反応に必要なアミノ酸残基であるHistidine25をalanineに置き換えたH25AHO-1cDNA mutantを作成し、そのstable transfectantを作成した。mock transfectant, wild-type HO-1, H25A mutant HO-1のそれぞれの細胞株からmRNAを抽出し、Affimetrix社のGene chip analysisによりヒトの異なる11,000種類のmRNAの発現解析を行った。細胞株の樹立過程でいくつかの異なるクローンを得たが、wild-type HO-1とmutant HO-1の比較にはWestern blot analysisにより蛋白量が同等の細胞株を選択して比較検討を行った。HO-1導入株ではbasal HO activityがmock transfectantの7-8倍に増加したが同等の蛋白発現を認められたmutant HO-1細胞株では酵素活性の上昇を全く認めなかった。

結果・考察

まずヒト単球系細胞株であるU937細胞を用いてHO-1遺伝子を高発現させたときの細胞機能の変動を、細胞の異なる11,000種類のmRNAを網羅的に解析することのできるtranscriptome analysisを行うことにより解析を試みた。その結果HO-1の発現増加を起こした細胞株ではelastase-1, leukotriene B4 synthaseなどのmRNAの増加、あるいは接着分子CD11a/CD18の発現量の低下あるいはconnective tissue growth factor (CTGF)の発現低下などの変化が起きることが明らかになった。またU937はHO-1導

入によりPMAによりCD11/CD18を介して起る homotypic aggregationがほぼ完全に阻害された。従ってCD11b/CD18の低下はmRNAのみならず蛋白レベルでも証明され且つ機能的にも意味のある現象であることが証明された。さらにelastase活性はmutant HO-1株では有意な増加を認めなかった。

詳細な機序は不明であるがproteinase-3の発現増加はwild-typeおよびmutantの双方の細胞株で発現増加が確認され、酵素活性を持たないHO-1蛋白になんらかの生理作用があることが示唆された。またCTGFの発現低下は肝臓の繊維化に対しては拮抗的に作用する可能性がありその病態生理学的意義を今後さらに検討する必要があると思われる。本研究により門脈血行異常症におけるHO-1発現異常がはじめて明らかにされたが、その結果肝臓機能が全体としてどのように調節されるか、またtranscriptome解析で明らかにされた発現変動を示す分子群の生物学的検討をさらに解析を進める予定である。なお本研究の内容のうち、門脈血行異常症におけるHO-1の発現変化に関する記載は文献3に詳細をpublicationした。

謝 辞

transcriptome解析で御助言と御助力をいただいた東京大学先端研 見玉龍彦先生、和田洋一郎先生に深謝致します。

文献および今年度の関連業績

- 1 Suematsu, M., Goda, N., Sano, T., Kashiwagi, S., Egawa, T., Shinoda, Y., Ishimura, Y. Carbon monoxide: An endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 96, 2431-2437, 1995.
- 2 Goda, N., Suzuki, K., Naito, M., Takeoka, S., Tsuchida, E., Ishimura, Y., Tamatani, T., Suematsu, M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.* 101, 604-612, 1998.
- 3 Makino, N., Suematsu, M., Sugiura, Y., Morikawa, H., Shiomi, H., Goda, N., Sano, T., Nimura, Y., Sugimachi, K., Ishimura, Y. Altered expression of heme oxygenase-1 in the livers of patients with portal hypertensive diseases. *Hepatology* 33, 32-42, 2001.
- 4 Kyokane, T., Norinizu, S., Taniai, H., Naito, M., Takeoka, S., Tsuchida, E., Nimura, Y., Ishimura, Y., Suematsu, M. Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 120, 1227-1240, 2001.
- 5 Taniai, H., Suematsu, M., Suzuki, T., Hori, R., Ishimura, Y., Nimura, Y. Protective roles of endothelin B receptor-mediated nitric oxide generation in hepatobiliary dysfunction in anoxia-reoxygenated perfused rat liver. *Hepatology* 33, 894-901, 2001.
- 6 Imai T, Morita T, Shindo T, Nagai R, Yazaki Y, Kurihara H, Snematsu M, Katayama S. Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ Res.* 89(1):55-62, 2001.
- 7 Hori, R., Kashiba, M., Goda, N., Kajimura, M., Yachie, A., Toma, K., Makino, N., Soejima, A., Nagasawa, T., Nakabayashi, K., Suematsu, M. Gene transfer of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* in review.

IPH動物モデルの作成 (CTGF遺伝子導入マウスによる検討)

大阪市立大学大学院核医学
塩見 進

共同研究者
大阪市立大学大学院肝胆脾病態内科学
森川 浩安、西口 修平
岡山大学歯学部生化学教室
中西 徹、滝川 正春

はじめに

特発性門脈圧亢進症(IPH)の病因として免疫異常を中心に報告が散見されるが、1)2)その解明には至っていない。その原因を探るために、本学会議において検体保存センター構想がスタートし、3)IPH症例については現在までに肝臓31例、脾臓37例、血清125例の検体が集積されている。我々はその検体を用いて、Altas cDNA micro alley法により数種類のIPH肝に特異的に発現する遺伝子群をピックアップし、その中で特に connective tissue growth factor(CTGF)に注目し検討を行ってきた。その結果、IPH症例ではELISA法にて測定したCTGF値は健常コントロールやC型慢性肝疾患患者に比べ異常高値を示す症例が存在し、それら症例ではCTGFが病態と関連している可能性がある。4)さらに、IPHの肝組織中でin-situ hybridizationを用いたmRNAレベルの発現の検討では、IPHの特異的病変である門脈線維化の周辺にシグナルが認められた。5)このCTGFの機能解析のためにはトランスジェニックマウスの作成が必要となる。そのため我々は動物モデルの作成をアデノウイルスを用いた遺伝子導入法にて検討した。

対象および方法

human CTGFのmRNAのアミノ酸配列は2075塩基から成っている。このCTGFのmRNAからcDNAを作製した。アデノウイルスへの遺伝子導入は

Adenovirus Expression Vector Kit (Takara Biochemical) を用いて行った。作製したcDNAををコスミドベクターのE1領域に導入する。E1領域を制限酵素で切断し欠失させたアデノウイルスのゲノムDNA(DNA-TPC)とこのコスミドベクターをE1を恒常的に発現している293細胞にco-transfectionにより導入する。293細胞内で相同組み換えが起こり、組換えアデノウイルスが出現する。このウイルスを目的の細胞に感染させることによりウイルスは増殖せず、目的のタンパクを発現させることができる(図1)。

結果および考察

現在、組換えアデノウイルスの作製および精製ウイルスの調整まで終了している。今後、このウイルスを肝臓に感染させることにより、CTGFを発現させる予定である。

CTGFは今までに様々な線維化という病態をもちうる疾患に関して、主にノーザンやウエスタンブロットティングにより報告されてきた。特発性肺線維症6)や強皮症7)に関して血清レベルでのCTGFの上昇を認め病因や病期分類での有用性が述べられている。さらに肝疾患に関して、胆道閉鎖症、8)慢性肝炎、9)non-alcoholic steatohepatitis10)などにおいて肝組織中にCTGF-mRNAの発現が報告されている。また、強皮症では通常の線維化の課程で発現するCTGFとは違い、オートクラインループがかかることが示唆されており、血清中にCTGFが過剰発現しているIPH症例においても同じことが起きている可

能性がある。CTGFの線維化における機能解析を進めるにはトランスジェニックマウスの作成が必要となる。しかし、胚移植によるトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成は発育・継代が困難であるため、アデノウイルスを用いた遺伝子導入法を検討した。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる利点として、1)高ウイルスを得る(108~109PFC/ml)ことができる、2)ヒトだけでなくマウスやラットを含む広い動物種に用いることができる、3)増殖細胞だけでなく静止期細胞にも感染・発現できる、4)動物個体に直接注入・投与可能であるなどの点あげられる。アデノウイルスは主として肝臓や神経系に集まるため組み換えアデノウイルスを用いれば目的のタンパクを肝臓に発現させることが可能である。しかし、その発現は一過性であるため、動物モデルの作成には繰り返し投与する必要がある。今後、このモデルを用いてIPHの線維化における機能解析を進めていく予定である。

文 献

- 1) 黒木哲夫、森川浩安、河田則文ほか：IPH症例における免疫学的検討。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告書1998:29-30.
- 2) Tokushige K, Hirose S, Nishimura H, et al. Abnormal T-cell activation and skewed T-cell receptor V-beta repertoire usage in Japanese patients with idiopathic portal hypertension. Clin Immunol Immunopathol 1995;75:206-213.
- 3) 黒木哲夫、塩見 進、森川浩安ほか：門脈血行異常症検体保存センター構想。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告書1998:82-83.
- 4) 塩見 進、森川浩安、西口修平ほか：特発性門脈圧亢進症の遺伝子異常に関する研究。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成11年度研究報告書2000:17-19.
- 5) 塩見 進、森川浩安、西口修平ほか：特発性門脈圧亢進症の遺伝子に関する研究。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成12年度研究報告書2001:20-22.
- 6) Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. Am J Physiol 1998;275:L365-371.
- 7) Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. J Rheumatol 2000;27:149-154.
- 8) Tamatani T, Kobayashi H, Tezuka K, et al. Establishment of the enzyme linked immunosorbent assay for connective tissue growth factor (CTGF) and its detection in the sera of biliary atresia. BBRC 1998;251:748-796.
- 9) Paradis V, Dargere D, Vidaud M, et al. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. Hepatology 1999;30:968-976.
- 10) Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, et al. High glucose and hyper insulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2001;34:738-744.

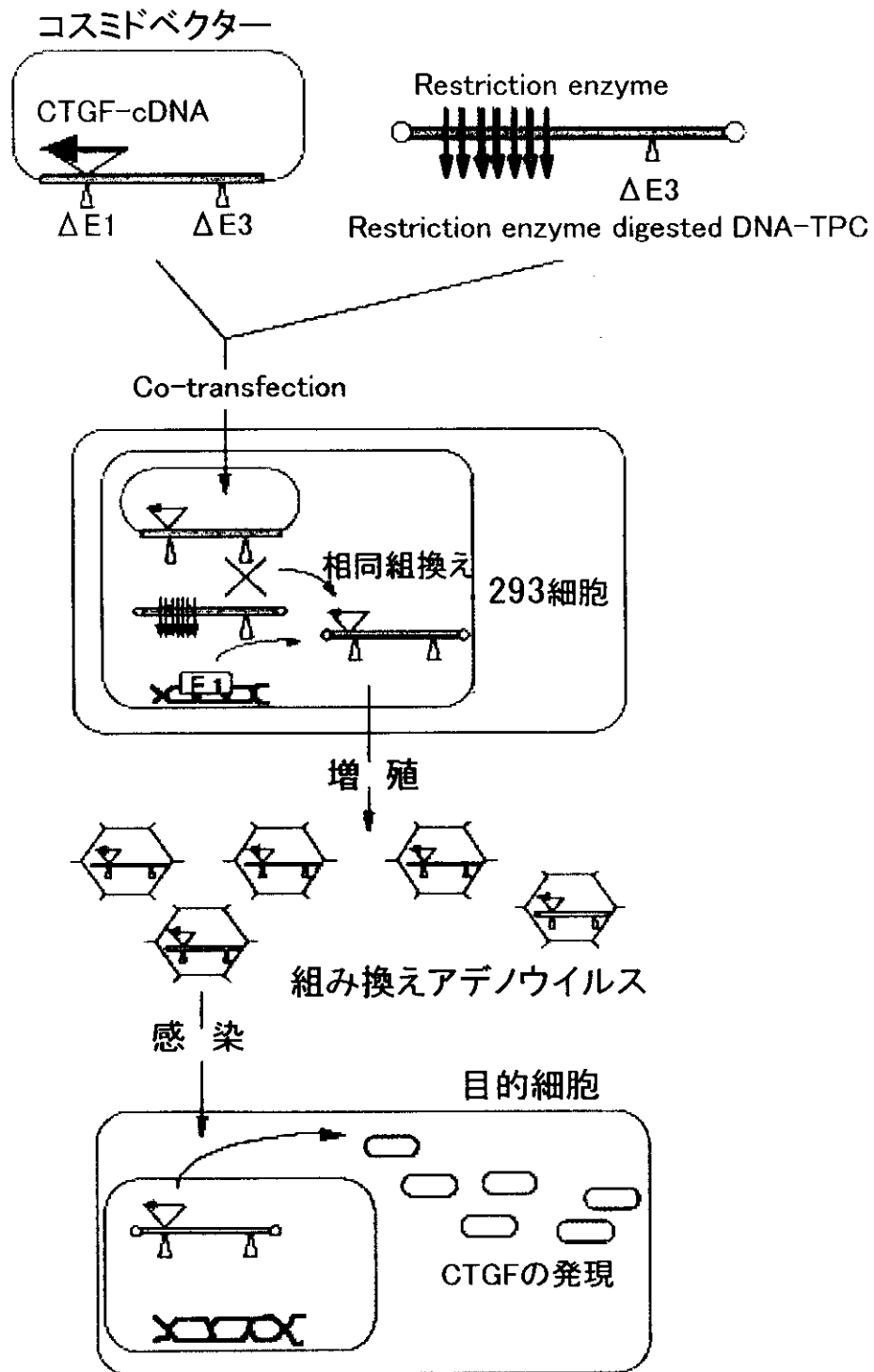


図1. 組換えアデノウイルスの作製

In Vivo Microscopy による胃粘膜微小循環の解析

大分医科大学第一外科

北野 正剛

共同研究者

大分医科大学第一外科

甲斐 成一郎、板東 登志雄、松本 敏文

はじめに

門脈圧亢進症性胃症 (Portal Hypertensive Gastropathy : PHG) は門脈圧亢進症 (PHT) にしばしば認められる病態であり、門亢症患者の上部消化管出血の原因¹⁾ となり、予後規定因子の一つと考えられている。PHG では様々な刺激に対する易傷害性²⁾ や、粘膜傷害の治癒遷延³⁾ が認められており、Endothelin (ET)⁴⁾ や Nitric Oxide (NO)^{5) 6)} などの関与が示唆されている。PHG の原因として胃壁の微小循環異常⁷⁾ が言われており、胃粘膜血流量は増加している⁸⁾ との報告が多くなされているが、減少している⁹⁾ との報告もあり、いまだ一定の見解が得られていない。

そこで今回我々は、In Vivo Microscope を用いて胃粘膜微小血管内血流を測定し PHG における微小循環異常の血行動態を検討した。

対象と方法

5 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) Rat を用いて実験を行った。PHT ラットは門脈の2段階結紮法により作製し、対象群は開腹のみを行った sham operation (SO) ラットとした。微小循環の観察は初回結紮の14日後に行った。Pentobarbital 50 mg/kg 腹腔内投与にて麻酔後、気管切開、大腿動静脈にカニューレーションを行い、正中切開で開腹後、十二指腸を結紮し経口的に胃内へプラスチックチューブを挿入し頸部食道を結紮した。

腸間膜静脈にカニューレーションを行いマノメータ

ーを用いて門脈圧を測定した。

胃内へ37℃の温生食を50ml/kg 注入し胃壁を伸展させ、胃体中部前壁の5mm 四方の漿膜筋層を丁寧に除去後、胃内の生食を70% に減じ、フルオレセインで標識した赤血球を静注後30分してから倒立式蛍光顕微鏡のステージに腹臥位にのせ、漿膜筋層を除去した胃壁の粘膜底部の微小循環を高感度高速カメラで観察、録画した。録画した画像を用いて動静脈径と血管内赤血球移動速度をコンピューター解析し、血管内血流量を算出した¹⁰⁾。

血管径は一本の血管につき5カ所を計測しその平均値を、赤血球速度は一本の血管につき5個のフルオレセイン標識赤血球の速度の平均値を使用した。なお、実験中は加温パットにてラットの体温を36℃前後に調節し、25ml/kg/h で生食を持続静注した。得られたデータの比較はPHT群とSO群間でt検定を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

結 果

全身の血行動態はPHT群とSO群に差はなく、門脈圧はPHT群 $19.6 \pm 1.1 \text{ cmH}_2\text{O}$ 、SO群 $10.9 \pm 1.2 \text{ cmH}_2\text{O}$ とPHT群が有意に高値を示した (図1)。胃粘膜血管径は動脈径がPVL群 $56.6 \pm 9.8 \mu\text{m}$ 、SO群 $48.3 \pm 10.9 \mu\text{m}$ 、静脈径がPVL群 $61.5 \pm 10.7 \mu\text{m}$ 、SO群 $55.4 \pm 9.4 \mu\text{m}$ と共にPVL群の方が有意に拡張していた (図2)。血管内赤血球移動速度は動脈がPVL群 $1.99 \pm 0.7 \text{ mm/s}$ 、SO群 $1.88 \pm 0.5 \text{ mm/s}$ 、静脈がPVL群 $1.1 \pm 0.3 \text{ mm/s}$ 、SO群 $0.9 \pm 0.3 \text{ mm/s}$ と共に有意差はなかった (図3)。血管径、血流速度より算出した血管内血流量は動脈でPVL群 $(49.0 \pm 18.1) \times$

105 μ m³/s、SO群(38.1 \pm 24.8) \times 105 μ m³/s、静脈でPVL群(32.6 \pm 15.3) \times 105 μ m³/s、SO群(22.1 \pm 9.6) \times 105 μ m³/sと共にPVL群の方が有意に増加していた(図4)。

考 察

PHGについては胃粘膜微小循環異常がその原因と考えられており多くの報告がなされている。これらの報告では胃粘膜血流の測定はレーザードップラー法、水素ガスクリアランス法などで行われているが、結果は一定していない。今回我々は、胃粘膜血管内の赤血球移動を直接観察し、微小循環を血管内血流量として測定した。血管内の赤血球移動速度は動脈・静脈ともにPHT群とSO群間に有意差はなかったが血管径はPHT群の方が有意に拡張しており、その結果血管内血流量は動、静脈ともにPHT群で有意に増加、微小循環は亢進し、いわゆる active congestionの状態と考えられた。

PHTではEndothelin (ET)、Nitric Oxide (NO)などの血管作働物質の過剰発現が認められており、さらにPHTにおける胃粘膜でのこれらの発現が亢進(4) 5)してあり、これら血管作働物質の作用を阻害することによる門脈圧の低下(11)、胃粘膜血流量の変化(4) 5)、胃粘膜易傷害性の軽減(4) 5)などの効果に関する多くの研究報告がなされている。またETのreceptorについてはPHTにおいてET-A receptorとET-B receptorのうち、ET-B receptorの発現の方が亢進している(12)との報告がある。

以上、今回の実験結果と併せるとETとET-B receptorの発現亢進により、ET-B receptorを介したNOの産生増加をきたし血管が拡張、その結果血管内血流量が増加したと推測された。

今後の展開として、ET-receptor antagonistやその他の血管作働物質阻害剤などの作用によるPHTでの胃粘膜微小循環の変化を観察し、PHGにおける微小循環異常の病態解明を進める予定である。

結 語

In Vivo Microscopyによる観察では、PHTラットの胃粘膜血管内血流がSOラットに比べ有意に増加していた。またその血行動態にはactive congestionの関与が示唆された。

文 献

- 1) McCormack TT, Sim J, Eyre-Brook I, et al. Gastric Lesions in portal hypertension: Inflammatory gastritis or congestive gastropathy? Gut 1985; 26: 1226-1232
- 2) Sarfer IJ, Soliman H, Waxman K, et al. Impaired oxygenation of gastric mucosa in portal hypertension: the basis for increased susceptibility to injury. Dig Dis Sci 1989; 34: 225-228
- 3) Baatar D, Kitano S, Yoshida T, et al. Delayed healing of acetic-acid-induced gastric ulcer in portal hypertensive rats. Eur Surg Res 1999; 31: 340-346
- 4) Ohta M, Nguyen TH, Tarnawski A, et al. Overexpression of endothelin-1 mRNA and protein in portal hypertensive gastric mucosa of rats: A key to increased susceptibility to damage? Surgery 1997; 122: 936-942
- 5) Ohta M, Tanoue K, Tarnawski A, et al. Overexpression nitric oxide synthase in portal-hypertensive stomach of rats: A key to increased susceptibility to damage? Gastroenterology 1997; 112: 1920-1930
- 6) Baatar D, Kitano S, Yoshida T, et al. The role of nitric oxide in the inhibition of gastric epithelial proliferation in portal hypertensive rats. J Hepatol 1999; 30: 1099-1104
- 7) Kitano S, Inokuchi K, Sugimachi K, et al. Hemodynamic and morphological changes in the stomach of portal hypertensive rats. Eur Surg Res 1981; 13: 227-235
- 8) Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszman RJ.

Hyperdynamic circulation in a portal hypertensive rat model: A primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. Am J Physiol 1983; 244: G52-G57

9) Nishiwake H, Asai T, Sowa M, et al. Endoscopic measurement of gastric mucosal blood flow with special reference to the effects of sclerotherapy in patients with liver cirrhosis. Am J Gastroenterol 1990; 85: 34-37

10) Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, et al. Effect of endotoxemia on hepatic portal sinusoidal blood flow

in rats. J Surg Res 2000; 89: 26-29

11) Sogni P, Moreau A, Gadano A, et al. Beneficial hemodynamic effects of Bosentan, a mixed ETA and ETB receptor antagonist, in portal hypertensive rats. Hepatology 1998; 28: 655-659

12) Yokoyama Y, Warzyniak A, Baveja R, et al. Altered endothelin receptor expression in prehepatic portal hypertension predisposes the liver to microcirculatory dysfunction in rats. J Hepatol 2001; 35: 29-36

	MAP (mmHg)	HR (bpm)	PP (cmH2O)
PHT	108.9±2.4	430±20.2	19.6±1.17 *
SO	121.6±4.5	446±10.6	10.9±1.2

* p<0.05

図 1. PhT/SO Ratの全身血行動態

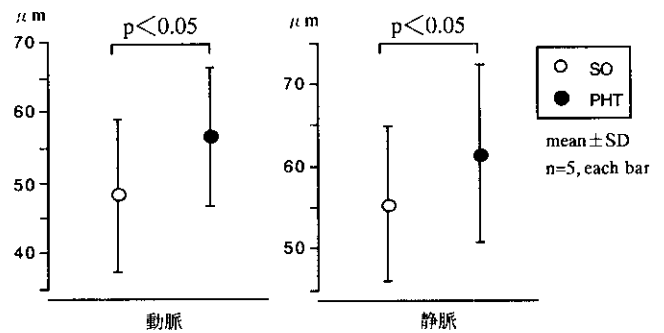


図 2. 胃粘膜血管径

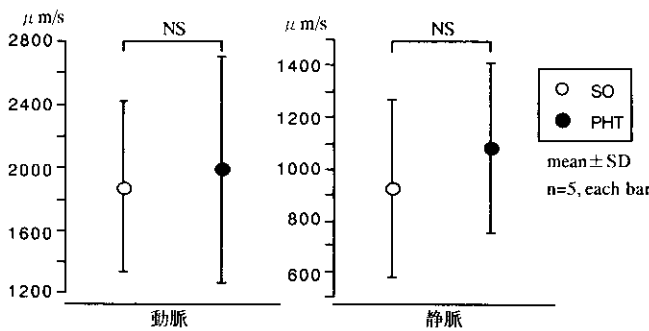


図 3. 血管内血流速度

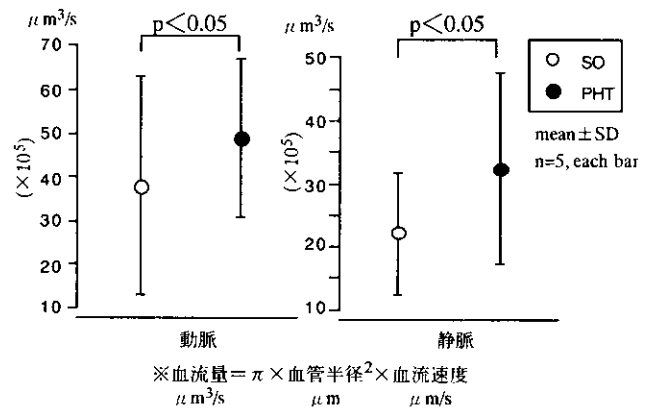


図 4. 血管内血流量

肝外門脈閉塞症モデルにおける血管新生因子の検討

長崎大学医学部第二外科
兼松 隆之

共同研究者
長崎大学医学部第二外科
大野 康治

はじめに

肝外門脈閉塞症（以下EHO）は一次的EHOと二次的EHOに分類され、その発症年齢は10歳未満と40歳代の2つのピークをもつ。肝外門脈に局所的に血栓が形成される正確な機序に関しては現在に至るも明らかにされていない。著者らは厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班の一員として、肝外門脈閉塞症の動物モデルの開発¹⁻⁵⁾、診断基準の改定^{6、7)}、遺伝子異常の検討⁸⁻¹⁰⁾、凝固系異常の検討¹¹⁾等に従事してきた。特に動物モデルに関しては、我々は既報の如くエンドトキシンを経門脈的に区域門脈枝内に投与することにより家兎に門脈血栓を作成し得た。今回は、この門脈血栓症モデルにおける海綿状脈管増生像と血管新生因子発現との関係を免疫組織学的に検討した。

対象と方法

実験動物として日本白色家兎（体重2.0-4.0kg、雌、非妊娠）を用いた。E. coli endotoxin (EX) (0111:B4)3mgを48% Urografin 1mlに溶解し、EXのcarrierとして3倍量のLipiodol(LPD)と混和してEX-LPD emulsionを作成した。このEX-LPD emulsion 0.3-0.8mlを当該肝葉支配門脈分枝に直接穿刺注入し実験に供した。

実験群として、I：EX-LPD emulsion注入48時間後犠牲死群、II：EX-LPD emulsion注入72時間後犠牲死群、III：EX-LPD emulsion注入7日後犠牲死群の3群を作製し、また、対照群としてIV：EXを含ま

ないLPD-Urografin emulsion注入48時間後犠牲死群を作製した。

血管新生因子として、vascular endothelial growth factor (VEGF)を一次抗体として用い、Dako ENVISION staining systemにて染色した。各群におけるVEGFの発現を組織学的に比較検討した。

結 果

VEGFはエンドトキシン注入48時間後に最も高度に発現し、その発現は7日後には対照群と同程度に収束した。48時間後には他の群には認められなかった拡張類洞内皮や類洞壁細胞にも高度な発現が認められた（表1）。

考 察

エンドトキシンを経門脈的に区域門脈枝内に投与し門脈血栓を作製する我々のモデルでは、エンドトキシン注入後72時間以内にEHOに類似した海綿状脈管構造の著明な増生を認め、これは7日目にかけて減少した。注入後72時間における増生海綿状脈管の70%は門脈枝由来であった¹⁻⁵⁾。門脈血栓発症後の早期の段階で、途絶あるいは減少した門脈血流量を補うように著明な側副血行路が増生し、これが発達することによりEHOに特徴的な求肝性側副血行路である海綿状脈管像に進展していくものと考えられた。

1980年代前半に腫瘍細胞から強力な血管透過性因子が放出されることが確認され、その後、この物質が血管内皮細胞に特異性の高い細胞増殖因子と同一

分子であることが確認されvascular endothelial growth factor (VEGF)として解析されてきた12、13)。VEGFは血管内皮細胞特異的な増殖因子・透過性因子で、そのファミリーや受容体Fltファミリーも明らかにされている。VEGF-Flt系は、正常な循環器系の発生から病的血管まで、血管内皮細胞の増殖と遊走を刺激することにより多くの血管新生に関与し、特に近年、多種の癌に発現し血管新生に関与することが注目されてきた。

今回、我々の門脈血栓症モデルにおける海綿状脈管増生像と血管新生因子であるVEGF発現との関係を免疫組織学的に検討したところ、血栓形成早期に極めて強いVEGFの発現が認められた。VEGFは海綿状脈管・門脈・中心静脈・動脈等の内皮のみならず、類洞内皮や類洞壁細胞にも出現しており、このVEGFの強力な発現が海綿状脈管増生に大きく関与しているものと推測された。

文 献

- 1) 兼松隆之 他 肝壊死実験モデルにおける門脈血栓の検討. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成8年度研究報告書
- 2) 兼松隆之 他 門脈血栓症モデルの確立と病態解明. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告書
- 3) 兼松隆之 他 門脈血栓症モデルにおける異常脈管様構造物の検討. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告書
- 4) 兼松隆之 他 肝外門脈閉塞症実験モデルの作成. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平

- 成10年度研究報告書
- 5) 兼松隆之 他 EHOの実験モデル. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成11年度研究報告書
- 6) 兼松隆之 肝外門脈閉塞症(EHO)の重症度基準案. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成10年度研究報告書
- 7) 兼松隆之 他 EHO重症度基準の再評価. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成11年度研究報告書
- 8) 兼松隆之 肝外門脈閉塞症(EHO)の遺伝子異常に関する研究. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告書
- 9) 兼松隆之 他 肝外門脈閉塞症(EHO)の遺伝子異常に関する研究. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成10年度研究報告書
- 10) 兼松隆之 他 EHOの遺伝子異常に関する研究. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成11年度研究報告書
- 11) 兼松隆之 他 肝外門脈閉塞症における病因・病態の研究. 厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成12年度研究報告書
- 12) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM et al. Related Articles Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science. 1983; 219: 983-985.
- 13) Carmeliet P, Collen D. Related Articles Vascular development and disorders: Molecular analysis and pathogenic insights. Kidney Int. 1998; 53: 1519-1549.

表1：vascular endothelial growth factorの発現

	海綿状脈管	門脈	中心静脈	動脈枝	類洞内皮	その他
48時間群	+++	+++	+++	+	+++	拡張類洞、類洞壁細胞
72時間群	++	+	++	+	-	-
7日群	+	-	+	-	-	-
対照群	+	-	+	-	-	-

門脈圧亢進症胃粘膜におけるeNOS 活性化のsignaling mechanismの解明

九州大学大学院消化器・総合外科
杉町 圭蔵

共同研究者
九州大学大学院消化器・総合外科
川中 博文
九州大学大学院災害救急医学
橋爪 誠

はじめに

門脈圧亢進症（門亢症）胃粘膜の特徴として、hyperdynamic circulationがあり、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 活性化によるNOの過剰産生が原因と考えられている。また、門脈圧亢進症におけるeNOS活性化のトリガーとしてTNF- α の過剰発現が報告されている¹⁾。しかし、門亢症胃粘膜におけるeNOS活性化のシグナリングメカニズムは不明である。

最近、血管内皮細胞におけるeNOS活性化はphosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)とその下流のEffector分子であるSerine/threonine kinase Aktを介したeNOSのリン酸化が必要であることが報告された²⁾。PI 3-Kは、調節サブユニットである分子量85kDのP85蛋白と触媒サブユニットである分子量110kDのp110蛋白からなり、p85のリン酸化により細胞膜近傍に移動し、細胞膜内でPIP3などのセカンドメッセンジャーを産生する。これによりAktがリン酸化され、Aktは直接eNOSと結合し、eNOSの1177番目のSerine残基がリン酸化されることによりeNOSは活性化される (Fig. 1)。

そこで、今回われわれは、門亢症胃粘膜において、PI 3-K/Aktを介したeNOSのSer 1177のリン酸化が増加しているかどうか検討し、さらに、TNF- α がeNOS活性化のシグナリングに関与しているかについても検討した。

対象と方法

Study 1: 門亢症ラット胃粘膜において (1) eNOSのリン酸化、(2) PI 3-Kの活性化の指標であるP85蛋白のリン酸化および細胞膜分画への移行、(3) Aktのリン酸化および酵素活性、(4) AktのeNOSへのbindingについてをWestern BlotおよびCo-immunoprecipitationなどの手技をもちいて検討した。

Study 2: 抗TNF- α 抗体のeNOSのリン酸化やPI 3-K/Aktに対する影響について検討した。

Study 3: ラット胃粘膜の毛細血管内皮細胞において、TNF- α がPI 3-K/Aktを介したeNOSリン酸化に関与していることをin vitroで検討した。

結 果

Study 1: (1) 対照群に比べ門亢症胃粘膜においてeNOS蛋白およびSer 1177のリン酸化も増加しており、リン酸化率においても有意に増加していた。(2) PI 3-Kの活性化の指標であるP85蛋白の細胞膜分画へのtranslocation およびP85蛋白のリン酸化は門亢症ラットにおいて有意に増加していた。

(3) Aktのリン酸化は門亢症ラットにおいて有意に増加していた。また、Akt活性は、immunoprecipitation (IP) によって得られたAktによりヒストンH2B (Aktの基質) がどれだけリン酸化されるかによって定量化したが、門亢症ラットにおいて有意に増加していた。

(4)門亢症胃粘膜において、IPされたAktに結合しているeNOSは有意に増加しており、また、IPされたeNOSに結合しているAktも有意に増加していた(Fig.2)。

Study 2:門亢症ラットで増加していたP85蛋白のリン酸化、Aktの活性化およびeNOSリン酸化は、抗TNF- α 抗体により対照群のレベルへと低下した。このことは、門亢症胃粘膜においてTNF- α がPI 3-K/Aktを介したeNOSのリン酸化に関与していることを示唆している(Fig.3)。

Study 3:ラット胃粘膜の毛細血管内皮細胞においてTNF- α は有意にeNOSのリン酸化を増加させたが、PI3Kの特異的阻害剤であるWortmanninによりeNOSのリン酸化は抑制された(Fig.4)。

考 察

以上より、門亢症胃粘膜におけるhyperdynamic circulationのメカニズムとして、TNF-aによりPI 3-K/Akt が活性化されeNOSのSer 1177のリン酸化が増加し、NOが過剰産生されることが考えられた(Fig.5)¹⁾。また、hyperdynamic circulationによるshear stress²⁾や肝硬変症で認められる高エストロゲン血症³⁾などもPI 3-K/Aktを介したNOの過剰産生に寄与している可能性がある。

文 献

- 1) Ohta M, Tarnawski A, Itani R, et al. TNF- α regulates nitric oxide synthase expression in portal hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology* 1998;27:906-913.
- 2) Fulton D, Gratton J, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597-601.
- 3) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-605.
- 4) Kawanaka H, Jones MK, Pai R, et al. Activation of eNOS in rat portal hypertensive gastric mucosa is mediated by TNF- α via the PI 3-Kinase/Akt signaling pathway. *Hepatology* 2002;35:393-402.
- 5) Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998;28:1467-1473.
- 6) Haynes MP, Sinha D, Russell KS, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI 3-K pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 2000;87:677-682.

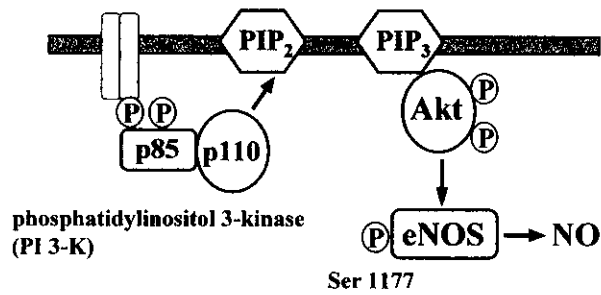


Fig.1. Phosphorylation of eNOS at serine 1177 by the PI 3-K/Akt is required for eNOS activation leading to NO production in endothelial cells.

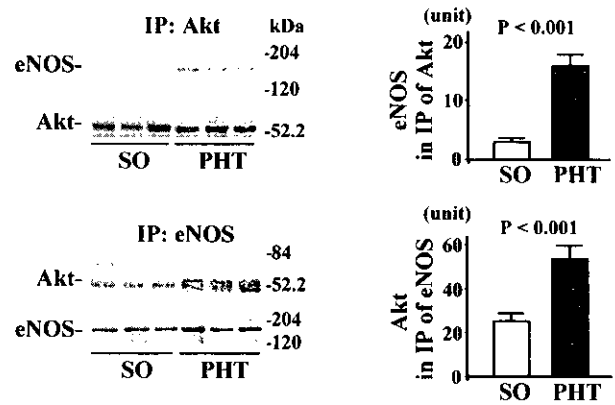


Fig.2. The binding of Akt to eNOS is enhanced in gastric mucosa of PHT rats.

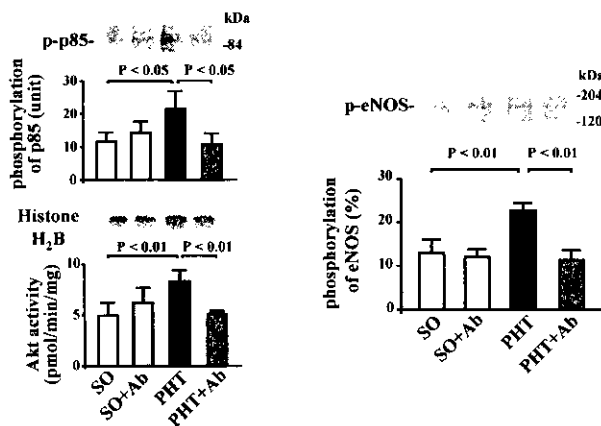


Fig.3. TNF- α -neutralizing antibody treatment reduces activation of PI 3-K/Akt and eNOS phosphorylation in gastric mucosa of PHT rats.

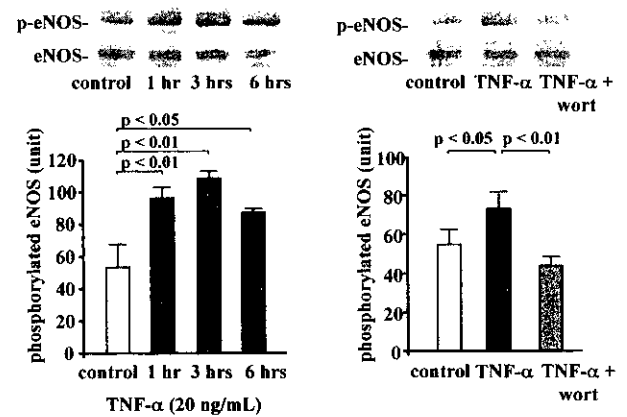


Fig.4. TNF- α stimulates phosphorylation of eNOS at serine 1177 via the PI 3-K/Akt in rat gastric microvascular endothelial cells.

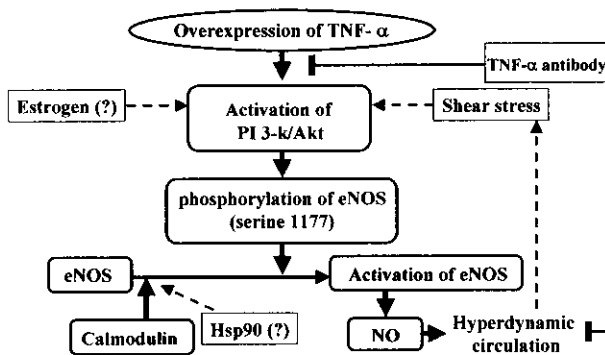


Fig.5. Diagrammatic representation of the factors potentially regulating eNOS activation.

門脈血行異常症3疾患の転帰に及ぼす 診断時所見および各種治療の影響

— 全国疫学調査2次調査より —

大阪市立大学大学院公衆衛生学

廣田 良夫

共同研究者

大阪市立大学大学院公衆衛生学

田中 隆、福島 若葉

聖マリア学院短期大学

井出 三郎

名古屋大学大学院予防医学

林 櫻松、玉腰 暁子、大野 良之

京都大学保健管理センター

川村 孝

九州大学大学院災害救急医学

橋爪 誠、赤星 朋比古

九州大学大学院消化器・総合外科

杉町 圭藏

はじめに

門脈血行異常症に関しては、厚生省特定疾患研究班により過去数度の全国調査が行われ、全国患者数、男女比、年齢分布などの記述疫学特性が明らかにされている。2次調査にあたっては、これまでの解析1)からとくに臨床情報の収集方法に工夫をこらした調査票を用いて行った。その集計結果については昨年度の報告集2)にまとめた。この調査票の最後の項目である「診断時と比較した最終観察時の状況」に及ぼす診断時の各所見および各種治療の影響を検討した。

対象と方法

調査は「特定疾患に関する疫学研究班」において確立されているプロトコールに従って実施した3)。第1次調査において、1998年の1年間に受療した特発性門脈圧亢進症(IPH)、肝外門脈閉塞症(EHO)、Budd-Chiari症候群(BCS)各々の患者報告を得た施設に対し、個人調査票を送付し、症例毎の個人情報を収集した。重複例、不適格例を考慮し、最終的に

IPH 169例、EHO 97例、BCS 44例を解析対象とした。今回の解析モデルとして、Proportional Odds Modelを用い、その目的変数は「診断時と比較した最終観察時の状況」であり、「死亡」と「悪化」をまとめて「悪化」、「不変」は「不変」、「改善」と「治癒」をまとめて「改善」の3段階に分けた。一方、説明変数は診断時の検査所見のうち、各血球数と肝予備能、さらには各種治療法の各変数とし、性別、診断時年齢、診断から最終観察日までの期間を調整因子とした。すべての解析はStatistical Analysis System (SAS) ver.6.12を用いて行った。

結果および考察

「診断時と比較した最終観察時の状況」を死亡・悪化／不変／改善・治癒の3段階にした目的変数に対する、各説明変数の影響を性、診断時年齢、診断から最終観察までの期間で調整したProportional Odds Modelにてオッズ比(OR)を算出した。このORの値が1より大きければ、要因を持っている方が転帰が悪い方向に、逆に値が1より小さければ、転帰がよい方向に働くという意味である。

(1) 転帰に及ぼす診断時の血球数の影響

各血球系の減少と転帰との関連を3疾患別に検討した。IPHにおけるヘマトクリット減少と血小板減少のOR (95%信頼区間)はそれぞれ0.53 (0.34-0.82)と0.55 (0.34-0.91)であり、有意な低下を示した(表1)。診断時にヘマトクリット減少や血小板減少のみられた症例はむしろ転帰がよいという結果であった。この解釈は困難であるが、診断時に上記2血球系の減少がみられても何らかの適切な治療により改善されやすい可能性を示すものかもしれない。EHOとBCSにおいては、いずれの項目に関しても有意な関連はみられなかった。

(2) 転帰に及ぼす診断時の肝予備能の影響

肝予備能を表す肝機能検査項目のうち、血清アルブミン値、ビリルビン値およびICGR15値と転帰との関連を3疾患別に検討した。IPHにおけるアルブミン減少のORは0.53 (0.30-0.94)と有意な低下を示している。前記ヘマトクリット減少および血小板減少と同様の解釈が可能であろう。一方、EHOにおけるビリルビン値上昇とICGR15値上昇のORはそれぞれ3.40 (1.60-7.22)、8.27 (1.66-41.3)と有意な上昇を認めた。すなわち、診断時にすでにビリルビン値やICGR15値の上昇がみられた症例は、治療の反応性が悪く、さらには予後が悪い可能性が示唆された(表2)。

(3) 転帰に及ぼす診断後各種治療の影響

まず、実施されている治療方法を、シャント術、直達術、内視鏡治療、薬剤治療の4項目に要約し、各治療法の転帰に及ぼす影響を検討した。その際、「対象と方法」で示した調整因子の他に、他の治療法すべてを調整因子として多変量解析を行った。その結果、IPHでは直達術のORが0.12 (0.05-0.33)と有意な低下を認めた。内視鏡治療も0.50 (0.23-1.09)と低下傾向を認めた($p=0.08$)。逆に薬剤治療は5.88 (1.88-18.4)と有意なORの上昇を認めた。EHOとBCSでも、直達術と内視鏡治療についてのORの低下は有意差もしくは傾向差を示した。

以上より、3疾患とも直達術と内視鏡治療で良好な反応性が得られる可能性が示唆された。ただし、多彩な治療方法を4分類にまとめたこと、また診断時の重篤度によって最終観察時の転帰の判断が異なることから、この解析結果については慎重な解釈が必要である。

おわりに

- 1) IPHにおいては、血球系の減少およびアルブミン値の減少は適切な治療により改善されやすい可能性が示唆された。
- 2) EHOにおいては、貧血は改善されやすいが、黄疸やICGR15値の上昇のみられた症例は治療の反応性が悪く、転帰が悪くなる可能性が示唆された。
- 3) 各種治療それぞれの影響を互いに補正した結果、3疾患とも直達術と内視鏡治療は転帰がよく、IPHにおける薬剤治療は転帰が悪かった。

文 献

- 1) 井出三郎, 廣田良夫, 橋爪誠, 他: 特発性門脈圧亢進症の生命予後に及ぼす既往歴, 合併症の影響. 厚生省特定疾患調査研究事業特定疾患に関する疫学研究班平成10年度研究業績集, 1999: 190-193.
- 2) 廣田良夫, 田中隆, 井出三郎, 他: 門脈血行異常症全国疫学調査二次調査集計報告. 厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成12年度研究報告書, 2001: 38-43.
- 3) 川村孝, 玉腰暁子, 橋本修二: 難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル(大野良之編), 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班, 1994.

表 1. 転帰に及ぼす診断時血球数 (Phoportional-Odds Model)

		死亡・悪化 / 不変 / 改善・治癒		
		*Adjusted OR (95% CI)	p	
IPH	白血球数減少	0.63	(0.32-1.22)	0.170
	ヘマトクリット減少	0.53	(0.34-0.82)	0.004
	血小板減少	0.55	(0.34-0.91)	0.019
EHO	白血球数減少	0.66	(0.25-1.71)	0.387
	ヘマトクリット減少	0.59	(0.31-1.11)	0.102
	血小板減少	1.12	(0.53-2.37)	0.776
BCS	白血球数減少	2.46	(0.51-11.7)	0.261
	ヘマトクリット減少	1.14	(0.28-4.70)	0.863
	血小板減少	2.95	(0.66-13.2)	0.158

*性, 診断時年齢, 診断から最終診察までの期間で調整

表 2. 転帰に及ぼす肝予備能 (Phoportional-Odds Model)

		死亡・悪化 / 不変 / 改善・治癒		
		*Adjusted OR (95% CI)	p	
IPH	アルブミン減少	0.53	(0.30-0.94)	0.029
	ビリルビン上昇	0.72	(0.37-1.43)	0.353
	ICGR15 上昇	1.03	(0.51-2.09)	0.937
EHO	アルブミン減少	1.01	(0.54-1.90)	0.982
	ビリルビン上昇	3.40	(1.60-7.22)	0.002
	ICGR15 上昇	8.27	(1.66-41.3)	0.010
BCS	アルブミン減少	1.52	(0.54-4.24)	0.425
	ビリルビン上昇	0.67	(0.19-2.34)	0.531
	ICGR15 上昇	0.15	(0.02-1.11)	0.064

*性, 診断時年齢, 診断から最終診察までの期間で調整

表 3. 転帰に各種治療の影響 (Phoportional-Odds Model)

		死亡・悪化 / 不変 / 改善・治癒		
		*Adjusted OR (95% CI)	p	
IPH	シャント術	0.88	(0.15-5.14)	0.886
	直達術	0.12	(0.05-0.33)	0.000
	内視鏡治療	0.50	(0.23-1.09)	0.080
	薬剤治療	5.88	(1.88-18.4)	0.002
EHO	シャント術	6.94	(0.29-168.2)	0.233
	直達術	0.05	(0.00-0.93)	0.044
	内視鏡治療	0.01	(0.00-0.08)	0.000
	薬剤治療	0.34	(0.09-1.37)	0.131
BCS	シャント術	0.42	(0.03-5.79)	0.513
	直達術	0.13	(0.02-0.86)	0.035
	内視鏡治療	0.09	(0.01-1.41)	0.086
	薬剤治療	3.71	(0.60-22.9)	0.158

*性, 診断時年齢, 診断から最終診察までの期間, 各治療法で調整

全国検体保存センターの現況

九州大学大学院消化器・総合外科

杉町 圭蔵

共同研究者

九州大学大学院消化器・総合外科

富川 盛雅、起田 桂志、堤 敬文

九州大学大学院災害救急医学

橋爪 誠、赤星朋比古、後藤 謙和、小西 晃造、山口 将平

背景

厚生労働省特定疾患門脈血行異常症調査研究班の調査研究対象となる特発性門脈圧亢進症(IPH)、肝外門脈閉塞症(EHO)、パッドキアリ症候群(BCS)の病因は未だに不明であるが、わが国におけるこれら3疾患の頻度は極めて少ない。したがって、病因や病態の解明を行うには、調査研究対象となる症例数の効率的な確保が必要不可欠である。

目的

全国症例登録および検体保存センターを設立・運営することにより、全国より広く症例を登録し、これら3疾患の病因や病態に必要な検体を収集・集中し、当研究班における病因・病態解明への研究を円滑にすることを目的とする。

方法

研究協力施設において患者が発生した場合には、事前に配布している登録用紙を用いて、事務局を兼ねる九州大学消化器・総合外科(第二外科)にFAXしていただき、連絡のあった時点でその症例を登録した。検体採取日には最寄りの大塚アッセイ研究所の担当者が検体の回収を行った。検体として可能な限り全血、血漿、血清の3種類を採取することとし、またIPHの手術症例では、必要に応じ脾臓

と肝臓の組織の一部を大阪市立大学第3内科のスタッフもしくは大塚アッセイ研究所の担当者が回収した。検体の保存や検査の実施は主に大塚アッセイ研究所で行った。結果の解析は、IPHについては大阪市立大学第3内科(塩見 進)、EHOについては長崎大学第2外科(兼松隆之)、BCSについては九州大学消化器・総合外科(第二外科)(杉町圭蔵)が担当した(図1)。

結果

平成8年12月の全国検体保存センターの設立以来、平成13年10月までに研究協力に同意していただいた施設は258施設、実際に登録症例のあった施設は167施設であった。平成13年10月31日現在、IPH 92例、EHO 47例、BCS 34例の計173例の検体の登録を完了した。昨年度よりそれぞれIPH 25例、EHO 18例、BCS 10例の計53例の増加であった。全血検体よりDNAを抽出し、血漿および血清は凍結保存した。

今後の方針

稀な疾患である門脈血行異常症の病因や病態を解明するためには一人ひとりの遺伝情報の違いと疾病との関連を研究し(遺伝子解析)、それを疾病の予防、早期発見、早期治療に結びつけることが必要であり、当研究班でもこれまでにIPHにおけるconnective tissue growth factor (CTGF)遺伝子異常やパッドキアリ症候群における凝固因子遺伝子の多型

性などを明らかにしてきた。

しかし、遺伝子解析を行うにあたり、その研究の結果が様々な倫理的・法的・社会的問題を招く可能性を十分考慮しなければならず、研究に当たっては、試料等提供者、その家族や血縁者さらには同じような病気にかかっている他の患者の尊厳を尊重し、人権を守り、利益を保護することが重要である。平成13年3月、文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が告示され、この指針に定められた手続きを遵守することが求められている。

せっかく研究協力に同意した施設がその気になっても、具体的かつ十分な手続きを踏めないようであれば、貴重な症例を前にして検体の採取を断念せざるを得ない場合もでてくる可能性がある。今後は、患者のプライバシー保護を第一とし、各施設の倫理委員会にて申請認可されるようなガイドラインを作成し、登録症例のあった施設からの検体提供数の増加を図ることが重要である。

現在、九州大学大学院医学系研究院の遺伝子解析倫理審査委員会に「門脈血行異常症の遺伝子異常に関する調査研究」の審査を申請し、審議を委ねているところである。途中経過であるが、その答申内容の一部を表1にまとめた。申請内容の一部である実験計画書や患者説明同意文書は今後、参考資料として研究協力施設に配布する予定である。

表1：九州大学大学院における倫理委員会の答申内容（抜粋）

1. 遺伝子解析は倫理委員会の承認後に行う。
2. 文書による遺伝子研究の同意が得られていない既採取試料については改めて説明を行い、研究への協力の同意が得られた試料についてのみ本研究に用いる。
3. 各研究協力施設所属の倫理委員会の承認、およびそれを証明する文書の獲得が必要である。

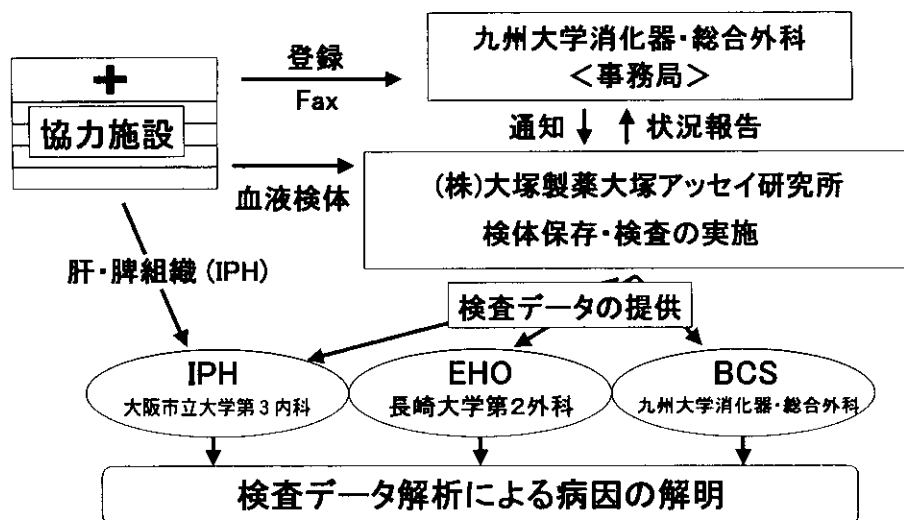


図1. 全国症例登録および検体保存センターの運用

Budd-Chiari症候群に対する肝移植の経験

長崎大学医学部第二外科
兼松 隆之

共同研究者
長崎大学医学部第二外科

矢永 勝彦、奥平 定之、大野 康治、藤田 文彦、江口 晋、山之内 孝彰、
濱田 貴幸、藤田 利枝、犬尾 浩之、古井 純一郎

はじめに

下大静脈の完全閉塞を合併したBudd-Chiari症候群に対する治療は容易でなく、進行肝硬変合併例は従来は手術不能とされてきた。今回、このように進行的にBudd-Chiari症候群に末期肝不全を伴う患者に対し、一期的に下大静脈血栓除去・静脈形成ならびに生体肝移植術を施行し、良好な結果を得たので報告する。

症 例

63歳男性、13年来の肝機能障害歴あり、肝性昏睡を伴う急性肝不全発症後の精査で下大静脈横隔膜部の膜様閉塞とそれに伴う腎下部から横隔膜にかけての下大静脈血栓症を合併したBudd-Chiari症候群と診断された。非代償性肝硬変で下大静脈が完全閉塞しているため、カテーテル拡張術の適応外とされ、肝移植目的で当院へ転院となった。術前肝機能はT. Bil12.8mg/dl, Alb.2.8g/dl, PT 50%, 血小板数7.4万/cmm, 血中アンモニア162 μ g/mlであった。ドナーは血液型同一の29歳長男で、肝右葉(640g、

患者の標準肝重量の56%)を採取した。患者は両肋弓下切開と正中上方延長で開腹した。肝門部剥離と肝周囲靭帯剥離の上、バイオポンプによる門脈-上大静脈バイパス下に、横隔膜を正中で縦切開して心臓内で下大静脈を遮断し自己肝を全摘した。下大静脈内血栓をバルーン使用下あるいは直視下に除去し、下大静脈を形成した上で同所性肝移植を施行した。胆道再建は右肝管同士の間々吻合によった。手術時間29時間17分、出血量51,415g、肝冷保存時間8時間28分、無肝時間8時間48分であった。摘出肝は高度のmixed nodular cirrhosisを呈し、重量は871gであった。術後の免疫抑制はtacrolimus/steroidsにより、heparin/coumadinによる抗凝固療法を並施した。

ドナー、患者共に術後合併症なく、ドナーは術後20日で、患者は術後28日で自宅退院した。

結 語

カテーテル治療の適応外とされた、下大静脈完全閉塞と進行肝硬変を合併したBudd-Chiari症候群に対して、静脈バイパス下の一期的下大静脈血栓除去・静脈形成ならびに生体肝移植術は有用な手術手技である。

異なった経過を示したBudd-Chiari症候群の3例

順天堂大学医学部第二外科
二川 俊二

共同研究者
順天堂大学医学部第二外科
深沢 正樹、別府 倫兄

はじめに

Budd-Chiari症候群においては病態が多岐に亘るため、その閉塞部位や血行動態に応じた対応が必要とされる。今回教室のBudd-Chiari症候群のうち、異なった経過を示した3例を経験したので報告する。

【症例1】50歳、男性。昭和59年下肢静脈瘤、腹壁静脈の怒張が出現し、他院でBudd-Chiari症候群の診断を受け当科紹介。入院後の検査にて肝機能障害はなく、下大静脈造影にて肝部下大静脈に膜様閉塞があり、その尾側に右、中、左の肝静脈が開存する杉浦分類a型を示した(図1左)ため、同年、開胸開腹膜様閉塞部用手穿破術施行。その結果下大静脈圧は330mmH₂Oから110mmH₂Oに下降した。その1年10カ月後下肢静脈瘤や腹壁静脈の怒張の増悪がみられたことから穿破部の再狭窄が疑われた。下大静脈造影では、穿破部に血栓と思われる陰影欠損を認め(図1右)、下大静脈圧は180mmH₂Oと軽度上昇していたため、これを除去したところ下大静脈圧は130mmH₂Oまで下降した。さらに2年後に経カテーテル的拡張術を行った後、12年間は下肢静脈瘤や腹壁静脈の怒張の発生、肝機能の増悪や肝癌発生もなく経過し、平成13年4月年、右大腿静脈のうっ血、疼痛が出現し、血栓性静脈炎の診断で入院した。(図2)は今回入院時の下大静脈造影であるが、下大静脈の狭窄はなく、また下大静脈圧も130mmH₂Oとほぼ正常で、血栓溶解剤の投与にて軽快退院した。

【症例2】62歳、男性。昭和50年ごろから下肢静脈瘤、腹壁静脈の怒張が出現し、本症の診断をうけ、平成6年に当科を紹介された。この時下大静脈造影では杉浦分類II型を示し(図3左)、経皮的バルーン拡張術を試みたが、閉塞部位が広範で不成功に終わっている。また直達手術によって閉塞部の拡張も考慮したが、高度の肥満と心不全のため手術を断念した。しかしその後も肝機能や下肢静脈瘤の増悪、閉塞部位の伸展は認めず(図3中)、平成10年以降外来通院を行っていなかった。平成12年10月、腹痛、嘔吐、下痢が出現し、腹腔内出血の診断で緊急入院となった。入院時検査所見では、白血球の上昇、色素の低下のほか、GOT、GPT、 γ -GPTなどの上昇、AFP、PIVKA-IIなど腫瘍マーカーの上昇を認めた。また下大静脈造影では閉塞部に変化を認めないが(図3、右)、CT検査では外側区域より肝外に突出した直径10cm大のenhanceされる腫瘍が認められ、内側区域にも直径3cm大の腫瘍が存在した(図4)。以上より、Budd-Chiari症候群に合併した肝左葉の肝細胞癌の診断で平成12年12月手術を施行。腫瘍は肝外外側区域全体を占めており、また内側区域から右葉にかけ肝表面に米粒大の腫瘍を多数認めたため、肝外側区域切除を行い、内側区域の腫瘍に関してはマイクロ波凝固療法を施行した。非癌部の肝臓には肝硬変様の結節が認められた。病理組織学的検査では非癌部では末梢肝静脈周囲のうっ血、中心静脈内膜の肥厚を認め、また中心静脈を中心に線維が小葉内に進展しているいわゆるreversed lobulationの所見を認め、ところによっては中心静脈と門脈域間に線維性の架橋形成もみられた(図5左上、右上、左下)。また癌部は中分化型の偽腺管型肝細胞癌で