

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

末期肝硬変に対する治療に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石 井 裕 正

平成15(2003)年3月

目次

I. 総括研究報告書

- 末期肝硬変に対する治療に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
石井裕正

II. 分担研究報告

1. 肝硬変による肝性脳症例の治療成績と今後の問題点・・・・・・・・・・ 33
鈴木一幸
2. 肝硬変における就寝前分岐鎖アミノ酸投与の効果・・・・・・・・・・ 41
森脇久隆
3. 食道・胃静脈瘤に対する至適内視鏡治療に関する臨床的研究・・・・ 46
幕内博康
4. 難治性腹水の病態と治療・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51
福井 博
5. 末期肝硬変に対する生体肝移植・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 62
市田隆文
6. ウイルス性肝硬変に対する肝移植と再発予防のストラテジー・・・・ 68
田中紘一
7. 肝線維化におけるアンギオテンシン II の役割と新たな治療の可能性
石井裕正・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72
8. 肝線維化改善における神経幹細胞の関与・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 84
渡辺 哲
9. 肝硬変に対する遺伝子治療を目標とした肝への遺伝子導入に関する研
究・・ 90
栗山茂樹
10. 肝硬変診療における医療経済学的分析と診療報酬のあり方に関する
研究・・ 100
小林廉毅

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 107

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 120

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
平成14年度 総括研究報告書

末期肝硬変に対する治療に関する研究

（主任研究者 石井裕正 慶應義塾大学医学部消化器内科）

研究要旨：肝硬変では患者の生活の質（QOL）は最大 72.2%低下していると評価された。肝性脳症に対する BCAA 輸液療法の効果には限界がみられ、重症度の高い患者への投与は無効と考えられた。しかし、軽症患者における就寝前 BCAA 投与は患者の PEM を改善する可能性があった。またわが国の難治性腹水の定義と薬物療法は欧米の基準と合わず、本邦独自の基準が必要だと考えられ、食道静脈瘤の管理は ETP 法による内視鏡硬化療法により、再発のない治療法を確立できる可能性が考えられた。

ウイルス性肝硬変に対する生体肝移植を考慮するに当たって、従来の CTP 分類に加えて MELD 分類を加味することにより、より適切な肝移植実施時期の設定が容易になった。また、HCV の再感染に関しては術前の抗ウイルス療法を工夫することにより、術後の再感染が防御できる可能性が示唆された。B 型肝炎ウイルス性肝硬変、C 型肝炎ウイルス肝硬変に対する生体肝移植術は、生存率に関しては他疾患と同等であるものの、生体肝移植後の B 型肝炎の再発が十分予防が可能であるのに対して、C 型肝炎の再発予防法に関しては極めて立ち遅れている。移植前治療も考慮すべきと思われた。

肝線維化の抑制には、新たに局所レニン-アンギオテンシン系の阻害薬を活用できる可能性があった。また、神経細胞由来の幹細胞が線維融解に重要な役割を持つ可能性があり、こうした幹細胞移植が新たな治療法となる可能性が示唆された。さらに、アデノウイルスは、正常肝のみならず肝硬変を含む傷害肝にも安全かつ有効に遺伝子導入を行えるベクターであり、アデノウイルスに対する中和抗体を保有するヒトに対しても、免疫抑制剤の投与を行えば肝における外来遺伝子発現を誘導し得る可能性が示された。以上の結果より、肝硬変に対する遺伝子治療の臨床応用の有用性が示唆された。

分担研究者名：市田隆文（新潟大学），栗山茂樹（香川医科大学），小林廉毅（東京大学），鈴木一幸（岩手医科大学），田中紘一（京都大学），福井 博（奈良県立医科大学），幕内博康（東海大学），森脇久隆（岐阜大学），渡辺 哲（東海大学）（五十音順）

A. 研究目的

肝硬変は進行性、あるいはコントロール不能の慢性肝疾患の最終的な到達点である。肝硬変の定義は「肝臓全体に偽小葉結節を形成した病態」であり、組織学的に間質性隔壁を形成する線維化とその隔壁に取り囲まれた再生結節を含み、肝小葉構造が改築された状態をさす。線維の隔壁と再生結節による改築された組織構造は類洞の線維化と合わせ、肝細胞の酸素、栄養分等の摂取低下を引き起こし肝細胞自体の生存活性を低下させ、また肝細胞内で代謝された、あるいは産生された物質の分泌障害を起こし、肝としての機能の著しい低下をきたす慢性肝不全をきたす最も頻度の高い疾患である。

わが国の肝硬変の 70-80%はB型あるいはC型肝炎ウイルスの感染に起因するものとされているが、イタリア、フランス、スペインなどに代表されるアルコール消費量の多い国ではアルコール性肝硬変の頻度が高

く、他の国との間に大きな違いがみられる。本研究班の施設において、肝硬変症例数 1951 例の成因別実態調査では、C型肝炎ウイルスによるものが 58.3%、B型肝炎ウイルスによるものが 14.6%、両者の重複によるものが 4.25%で、これらを合わせてウイルス感染による肝硬変はいまや全体の 77.1%を占めている。それに対してアルコール性肝硬変は 12.3%と欧米の統計とは対比的であった。今回の調査では、その他の成因によるものとして、原発性胆汁性肝硬変 2.6%、自己免疫性 1.7%、原因不明（非B非Cを含む）5.2%となっている。

末期肝硬変は肝細胞機能不全に基づく黄疸、低蛋白血症、低アルブミン血症や肝性脳症、門脈圧亢進に伴う食道静脈瘤などの側腹血行路・浮腫、腹水・消化管出血、特発性細菌性腹膜炎、肝腎症候群などがみられ、これらに基づく症状をいかにコントロールできるかが予後を規定すると考えられる。さらに、こうした症状の根本的な原因は肝内の線維化にあり、理想的には線維化の改善を求める治療が望まれる。

このような背景から、本研究班では「末期肝硬変に対する治療」を考えるに当たり、低栄養状態の改善、肝性脳症の管理、食道静脈瘤の管理、難治性浮腫・腹水の管理、特発性細

菌性腹膜炎の治療、などを主体に検討し、現状の問題点の把握とその解決を目標に研究を進める。さらにこうした症状を管理しきれなくなった場合には、最終的には肝移植を考慮せざるを得ないが、移植を考慮する時期については明確な基準がないのが現状である。この問題点の解決と、さらに移植後のウイルス再感染という大きな問題点は、わが国の慢性肝不全に対する肝移植として解決しなければならない点と思われる。最後に保険診療の最大の問題点である診療報酬のあり方については、慢性肝疾患の中でも特に肝硬変治療で考慮しなければならない。本研究では最終的に本邦における肝疾患の社会的費用推計と、肝疾患診療の医療経済評価を行うことにより、将来の診療報酬のあり方を検討することを目標にした。

以上の観点から、本研究では既存治療法の問題点と今後の展望を合併症対策、肝移植、薬物療法、将来の幹細胞を用いた治療法、遺伝子治療につき整理した。具体的には以下の点を本研究の目的とした。

(1) 肝性脳症は意識障害を中心とする種々の神経障害であり、肝硬変にみられる肝性脳症の病態としては門脈・大循環短絡が主因なものと、肝細胞障害が主因なものに分類さ

れる。前者は慢性再発型、後者は末期昏睡型とも呼ばれるが、肝硬変の多くはこれらの二つの因子が種々の程度に関与していると考えられている。こうした肝硬変に伴う肝性脳症に対する治療法としては我が国では合成二糖類（ラクツロース、ラクチトール）の投与とともに分岐鎖アミノ酸を多く含有する特殊組成アミノ酸 (BCAA) 輸液療法が定着している。しかし、BCAA 輸液療法の評価については欧米の成績では必ずしもコンセンサスはえられていないため、肝性脳症に関する研究としては BCAA の効用を retrospective に評価することを目的とした。

(2) 肝硬変患者は蛋白とエネルギーの両者が不足する蛋白・エネルギー低栄養状態 (protein-energy malnutrition: PEM) にあり、PEM が患者の予後あるいは生活の質 QOL に影響することが明らかとなってきた。近年、肝硬変患者の PEM の改善に就寝前エネルギー投与が有効であるとともに、肝硬変患者における BCAA の投与が、患者の予後あるいは QOL の改善に有効であることが報告されている。そこで肝硬変患者の PEM の改善に就寝前 BCAA 投与の有効性につき明らかにすることを目的とした。

(3) 次に合併症のうちでも食道静脈瘤についてであるが、出血の可能性が高い食道静脈瘤を有する肝硬変患者を無作為に内視鏡的硬化療法(EIS)と内視鏡的静脈瘤結紮術(EVL)に割り付け、食道静脈瘤の血行動態を把握した後 EIS あるいは EVL を待機的、予防的に 1-2 回行う。その後地固め法により徹底的に治療を行い、静脈瘤の完全消失を目指す。治療後の静脈瘤の再発率と出血率、胃静脈瘤の出現、portal hyper tensive gastropathy (PHG)、門脈血行動態および肝機能に与える影響を両群で経時的に検討し、静脈瘤治療の最良の標準的治療を模索することを目的とする。

(4) 難治性腹水の治療に関して問題となるのは、利尿剤抵抗性腹水と利尿剤不耐性腹水である。利尿剤抵抗性腹水は食塩摂取制限と大量の利尿剤治療(スピロノラクトン 400mg+フロセミド 160 mg)でコントロールできない腹水、利尿剤不耐性腹水は副作用のために有効量の利尿剤を投与できない腹水を指す。わが国の腹水治療経験からはこのように多量の利尿剤を日本人に投与することは不可能であるため、日本人に適合した腹水治療のプロトコールな

らびに難治性腹水の定義を考案することを目的とした

(5) 末期肝硬変の治療として欧米では肝移植が標準的な治療法となっているが、先に述べたようにわが国の肝硬変の成因と欧米の肝硬変の成因には大きな違いがあり、わが国ではウイルス感染に対する対策が重要な問題点となる。この中で問題となるものが、ウイルス性肝炎の再発である。B 型肝炎ウイルス肝硬変、C 型肝炎ウイルス肝硬変に対する生体肝移植術とその成績・再発について検討する。

(6) 術前の問題としては肝移植の適応時期である。従来から生体肝移植の場合も脳死肝移植と同様に CTP スコアを用いた医学的緊急度を参考に移植患者の順位付けを行ってきた。最近では 3 ヶ月以内の予後を推測する MELD スコアも評価され、UNOS を初めとする肝移植候補者の順番の決定に重要な役割を演ずるようになってきた。この脳死肝移植に用いられている MELD スコアが生体肝移植の場合に有用か否かを自験例で検討することを研究目的とした。

次に新しい治療法に関する基礎的検討として、レニン-アンギオテン

シン（R-A）系の抑制による薬物療法、幹細胞移植による線維化改善治療、さらに将来の遺伝子治療の可能性につき検討することとした。

（7）薬物治療としては、肝線維化における組織 R-A system の関与を明らかにすると共に Angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害薬および angiotensin II (Ang II) 受容体拮抗薬の肝線維化に対する作用を解明し、慢性肝疾患の肝線維化抑制の新しい治療法の可能性を探ることを目的とした。

（8）肝臓に骨髄由来幹細胞がみられることが種々の病態で報告されているため、線維化改善に対する幹細胞導入の可能性を明らかにすることを目標に、ラット肝線維化改善における幹細胞の出現と肝線維化改善との関連について明らかにすることを目的とした。

（9）肝硬変に対する遺伝子治療については、臨床応用が容易である *in vivo* 遺伝子導入法を用いて、肝への遺伝子導入の有効性と安全性を基礎的に検討し、遺伝子導入ベクターとしては、肝への遺伝子導入効率が良い組換えアデノウイルスの有用性を明らかにし、さらに、傷害肝への *in vivo* 遺伝子導入の可能性を検討

するために、肝硬変モデルおよび劇症肝炎モデルマウスを作製し、組換えアデノウイルスを用いた傷害肝への遺伝子導入の有効性と安全性を評価することを目的とした。

（10）最後に医療経済的解析であるが、本年度は研究デザインについて検討し、具体的な実証研究の第一歩として、わが国では未評価の肝疾患の効用値・生活の質（以下、QOL）を測定するための質問表を作成し、この調査票を用いて種々の重症度・進行度の肝疾患の QOL を調査した。

B. 研究方法

（1）肝性脳症に関する検討

1972年～2002年2月の入院した肝硬変による肝性脳症112例（のべ197回肝性脳症発現）を対象とし、脳症改善効果（完全覚醒率、完全覚醒までの日数）と予後（生死）について BCAA 輸液療法併用例と非併用例（合成二糖類投与、一部は非吸収性抗生物質の併用）に分けて肝の重症度分類を加味して検討した。また今回の検討では重症度判定に新しい重症度分類を作成した。すなわち、従来の Child-Turcotte 分類や Pugh 分類には肝性脳症や腹水の程度さらに栄養状態などの項目が選択されているが、これらの項目は客観的判定が難しいため、これら項目を除外し

定量的評価が可能な血液生化学検査項目である、総ビリルビン、血清アルブミン、プロトロンビン時間の3項目のみを用いた重症度分類(modified-Pugh 分類)により検討した。肝性脳症の治療に当たっては個人の情報が漏出せぬよう倫理面に配慮した。

(2) PEMに関する検討

肝硬変患者 12 名に研究の趣旨と起こりうる副作用につき説明し、同意の上、研究に参加していただいた。入院にて 30kcal/kg/日のエネルギー量、1.3g/kg/日の蛋白量の食事量摂取とし、入院 1 週間後の早朝空腹時に採血、採尿ならびに間接カロリーメトリーを施行。その後患者を 6 名ずつ 2 群に分け、一群には毎食後 BCAA 4g 投与し、もう 1 群には朝食後 4g、就寝前 8g 投与。投与開始後 1 週間にて採血、採尿ならびに間接カロリーメトリーを施行。その後 2 群の投与方法をクロスオーバーとし、さらに 1 週間後に同検査を施行した。間接カロリーメトリーは患者の頭部にフードをかぶせ、分時酸素消費量、分時二酸化炭素排泄量、および尿中空素排泄量より安静時エネルギー消費量 (resting energy expenditure: REE)、呼吸商 (respiratory quotient: RQ)、非蛋白呼吸商 (nonprotein RQ:

npRQ)、燃焼基質としての糖、脂肪、蛋白燃焼比率を算出した。また Harris-Benedict の理想式より basal metabolic rate (BMR) を算出した。REE の標準化のため REE/BMR を算出した。さらに肝硬変患者 1 例において BCAA 顆粒投与を毎食後投与より就寝前投与に変更し、臨床症状ならびに血清アルブミンにつき経過を観察した。

(3) 食道静脈瘤に関する検討

出血の可能性が高い食道静脈瘤を有する肝硬変患者で、食道胃静脈瘤内視鏡所見記載基準 (1991 年) に従い、原則 red color (RC) sign を有する F2 以上の食道静脈瘤で、F1 の場合は必ず RC sign がある症例、出血例で SB tube などで一時的に止血の得られている場合は待機例として扱った。治療後の静脈瘤の再発率と出血率、胃静脈瘤の出現、portal hypertensive gastropathy (PHG)、門脈血行動態および肝機能に与える影響を封筒法により EIS か EVL を無作為に割り付け、EIS 群 20 例、EVL 群 20 例で経時的に検討した。

(4) 難治性腹水に関する検討

入院し、段階的腹水治療を加えた肝硬変腹水例 54 例、および副作用出現のために腹水治療に難渋した利

利尿剤不耐性腹水 10 例を対象に、まず、肝硬変腹水例に対して、第 1 段階：安静と食塩制限(2g/日)、第 2 段階：スピロラクトン(100mg)またはカンレノ酸カリウム(400mg)投与追加、第 3 段階：フロセミド(40～80mg)投与追加（血清アルブミンが 2.5g/dl 以下の際アルブミン静注追加）という段階的腹水治療を加えた。また、段階治療不応例のうち 12 例には腹水穿刺排液アルブミン静注を加え、この療法に対する反応例と不応例について背景因子を比較した。

さらに別の利尿剤不耐性腹水 10 例については、利尿剤の投与量、副作用、対応策ならびに予後について検討するとともに、個々症例の臨床経過を分析した。

（5）移植後のウイルス再感染に関する検討

京都大学附属病院移植外科において施行された B 型肝炎ウイルス肝硬変 40 例、C 型肝炎ウイルス肝硬変 54 例に対する生体肝移植術の成績・ウイルス肝炎再発などを検討した。B 型肝炎ウイルス肝硬変に対しては、術前、術中、術後の抗ウイルス治療プロトコールを、C 型肝炎ウイルス肝硬変に対しては、慢性肝炎再発後のインターフェロン+リバビリン療法について検討を行った。

（6）肝移植時期に関する検討

Waiting list の脳死肝移植候補者の死亡率増加に伴う適切な順位の再構築として生まれた MELD スコアが果たして生体肝移植において、肝移植の時期決定に重要な役割を演じるか否かを、CTP スコアと比較検討し、末期肝硬変に対する生体肝移植の適応時期を検証する。対象は自験例（成人例）ならびに他院での肝移植例 35 例中解析対象となる肝硬変 12 例、原発性胆汁性肝硬変 10 例と肝細胞癌 5 例を選択した。方法は MELD スコア算定、CTP スコア算定ならびに生体肝移植後の outcome である。

MELD score :

$9.57 \times \log \text{ creatinine mg/dL} +$
 $3.78 \times \log \text{ bilirubin mg/dL} + 11.20$
 $\times \log \text{ INR} + \text{etiology (0;$
cholestatic and alcohol, 1;
otherwise)

([www.mayo.edu/int-med/gi/
model/mayomodl.htm](http://www.mayo.edu/int-med/gi/model/mayomodl.htm))

（7）新たな薬物治療に関する検討

CCl₄ 慢性投与ラットにより肝硬変モデルを作成する過程で ACE 阻害剤 lisinopril を飲料水に 50 mg/l の濃度で溶解し、自由飲水法で投与した。ラットを 4 群に分け (①CCl₄ 単独投与群、②CCl₄, lisinopril 併用投与群、③lisinopril 単独投与群、④

オリーブオイル単独投与群)、8週後、12週後、24週後に屠殺し、肝組織における線維化、脂肪変性の程度を比較検討し、摘出した肝臓より Jamall らの方法に基づき Hydroxyproline 量を測定した。さらに各グループともラット血清中の IV型 collagen7s、hyarulonic 酸を測定した。線維化抑制機序を検討するために、ラットより採取した伊東細胞(肝星細胞)に Ang II 受容体の存在を確かめるために伊東細胞より mRNA を抽出し、AngII 受容体核酸増幅を行った。伊東細胞に対する Ang II の細胞増殖効果をみた。またラット伊東細胞の pro α (I) collagen, TGF- β 1 産生を検討した。別に、ラットにコリン欠乏食, choline deficient L-Amino acid-defined (CDAA)飼料を投与し、肝線維化および肝発癌モデルを作成し、Ang II 受容体拮抗薬としてカンデサルタンを 10mg/kg/日で連日投与した。①CDAA 単独投与群、②カンデサルタン+CDAA 投与群、③標準飼料投与群、④カンデサルタン+標準飼料投与群の4群に分け、12週後に屠殺し肝組織線維化の程度を比較検討した。

(8) 幹細胞に関する検討

肝線維化は、Wistar 系雄性ラットを用い、オリーブオイルに 30%の

濃度にした CCl₄ を週 2 回腹腔内に注射し作成した。CCl₄8 週および 12 週間投与後 2 日目、5 日目、7 日目にラットを屠殺し、肝を摘出した。神経幹細胞のマーカーである Musashi-1 の発現を RT-PCR および酵素抗体法で、また、骨髄由来幹細胞のマーカーとして *c-kit* の発現を検討した。その他、 α -SMA、アルブミン、 α -fetoprotein (AFP)、ED2、CK19、MMP-13 の発現について酵素抗体法、蛍光抗体法で検討した。

(9) 遺伝子治療に関する検討

初期遺伝子領域 1A(E1A)、E1B、E3 を欠損させた 5 型のアデノウイルスを骨格とし、サイトメガロウイルスのエンハンサーと chicken β -actin プロモーターから成る CAG プロモーターの制御下に、lacZ 遺伝子を発現する組換えアデノウイルスを作製し、高力価アデノウイルスを精製した。肝 lacZ 遺伝子発現は、X-gal 染色を用いて免疫組織学的に検討し、肝における β -galactosidase 活性を定量的に評価した。傷害肝モデル動物としては、雌性 BALB/c マウスに lipopolysaccharide と D-galactosamine を腹腔内投与し、劇症肝炎モデルマウスを作製した。肝硬変モデルマウスは、雌性 BALB/c マウ

スに thioacetamide を腹腔内投与し作製した。

なお、以上（項目 7, 8, 9）の組換え DNA 実験および動物実験のプロトコールは各研究施設の承認を受けたものであり、各施設ガイドラインを遵守して行われた。

（10）医療経済的検討に関する検討

C 型肝炎に関わる 6 つの健康状態に対する QOL 評価には visual analogue scale (VAS) を用いた。肝炎患者の 5 つの状態及び肝炎治療に伴う副作用についての記述をもとに、合計 6 段階についての QOL 値を得た。また肝炎治療としてインターフェロン及びリバビリンによる治療を想定し、これに伴う副作用状態の QOL 値を尋ねた。本研究では倫理面を考慮して医師としての立場からの評価を尋ね、C 型肝炎患者の QOL 値の評価を明らかにした。

C. 研究結果

（1）肝性脳症に関する検討

対象症例の主な誘因を検討すると、食道静脈瘤破裂を含む消化管出血が 22.3%、蛋白摂取過剰を含む便秘が 25.9%、電解質異常を含む利尿剤過剰投与が 11.7%、感染症が 7.6%、睡眠薬を含む鎮静剤、鎮痛剤が 2.5%、その他 7.6%、不明 22.8%であり、

消化管出血、便秘や原因不明の頻度が高かった。誘因の頻度を年代別にみると肝性脳症の治療において合成二糖類が中心であった 1972 年～1978 年は「消化管出血や便秘」、BCAA 輸液療法が定着した 1979 年～1985 年は「消化管出血」であったが、食道静脈瘤に対する硬化療法施行が定着した 1986 年前以降は食道静脈瘤からの出血のコントロールが可能となったことから、消化管出血の誘因は激減し、誘因不明の脳症例の頻度の割合が増加していた。重症度別の BCAA 輸液療法の意識覚醒効果を見ると、grade A では全例完全覚醒し、grade B では完全覚醒率は平均 93%で、一時的に覚醒し再び昏睡に陥る例が 5%、不変・悪化例が 2%にみられた。grade C では完全覚醒率は 50%で score points が高くなるにつれ完全覚醒率は低下し、不変・悪化例が増加した。BCAA 輸液療法併用の有無による完全覚醒までの日数について、BCAA 輸液を併用した群での完全覚醒までの日数は平均 5.5 ± 4.0 日であり、非併用群での完全覚醒までの日数 (7.8 ± 4.9 日) に比し有意 ($p < 0.05$) に短い期間で完全覚醒がえられた。重症度別では grade A で完全覚醒までの日数は、BCAA 輸液併用群で 5.8 ± 3.9 日、非併用群で 8.7 ± 4.0 日、grade B でそれぞれ 5.9 ± 5.2 日、

12.5±8.1 日であり BCAA 輸液使用群での完全覚醒までの日数が早く、grade B では有意 (p<0.05)であった。一方、grade C ではそれぞれ 5.5±3.0 日、6.0±2.9 日と差を認めなかった。重症度別の肝性脳症の予後、grade A ではどちらの群 (併用群 11 例、非併用群 3 例) も全例生存した。grade B では併用群の生存率は 77% (36/47 例)、非併用群での生存率は 40% (2/5 例) と併用群での予後が良好であった。一方、grade C では併用群の生存率は 38% (31/81 例)、非併用群での生存率は 39% (7/18 例) と差はみられなかった。多重ロジスティックモデルにより肝性脳症の完全覚醒に關与する因子を検討すると説明変数として年齢、総ビリルビン値、血清アルブミン値、プロトロンビン時間、尿素窒素が説明変数として選択された。ことに総ビリルビン値やプロトロンビン時間のオッズ比が高値であり、いずれも重症度を評価する項目であった。予後に関する因子を同様に検討すると総ビリルビン値、プロトロンビン時間、血漿分岐鎖アミノ酸濃度のオッズ比が高値であった。

(2) PEM に関する検討

BCAA 非投与時において低値を示した Fischer 比は、BCAA 毎食後投与により有意の上昇を示したが、

BCAA 就寝前投与によりさらに有意の改善をみた。また窒素バランスも非投与時に比べ、BCAA 毎食後投与により有意の改善を認め、就寝前投与によりさらに有意に改善した。筋肉崩壊の程度を示す 3-MH、3-Mh/Cr は BCAA 非投与時に比べ有意差を認めないものの、BCAA 毎食後投与により低値となり、就寝前投与によりさらに低下した。間接カロリーメトリーによる REE/BMR、npRQ、糖、脂肪、蛋白燃焼比率は BCAA 非投与、毎食後投与、就寝前投与の間に有意な変化を認めなかった。また観察期間中、血清アルブミン、プロトロンビン時間、ヘパラスチン時間、アンモニア、血糖に有意の変化を認めなかった。

(3) 食道静脈瘤に関する検討

上部内視鏡検査を食道静脈瘤の治療前、3、6、12 ヶ月後に施行し、内視鏡所見を経時的に観察した。食道静脈瘤の評価法を食道胃静脈瘤内視鏡所見記載基準 (1991 年) に準じて行った。PHG の評価を MaCormack らの分類 (1985 年) に準じ、各群における内視鏡治療の回数を EIS と EVL で比較検討し、造影 CT あるいは MRI を施行し、治療後の静脈瘤供血路および門脈血行動態の変化を検討した。評価時期としてプライマリーエンドポイント

を EIS あるいは EVL 後 3 ヶ月、セカンダリーエンドポイントを EIS あるいは EVL 後 12 ヶ月とし、現在進行中である。

(4) 難治性腹水に関する検討

段階治療を行った 54 例の腹水例の各治療段階別の有効率は、段階 1 で 20.3% (11 例)、段階 2 で 38.9% (21 例)、段階 3 で 13.0%(7 例)であり、段階治療不応例は 27.8%(15 例)を占めた。この際、治療段階を先に進めねばならなかった例では血清 Na 値ならびに腎機能の低下が目立った。内分泌系のパラメーターを比較すると、第 3 段階まで治療を進めねばならなかった例ではそれ以前に腹水が消失した例に比べ、血漿レニン活性、ノルアドレナリンが高値で、治療抵抗例ではそれに加えて血漿アルドステロン、ADH 濃度も有意に高値であった。さらに利尿剤抵抗性腹水の 12 例には腹水穿刺排液 + アルブミン静注を加えたが、腹水穿刺排液アルブミン静注を繰り返して腹水が消失した 6 例とこの治療にも反応しなかった難治例 6 例についてその背景因子を比較したところ、不応例は反応例に比べ、Child-Pugh スコアが高値で、血漿フィブリノーゲンが低値であった。また不応例では 6 例中 5 例で治療開始後早期に肝

性昏睡の徴候が現れたが、反応例では肝性昏睡を認めなかった。

利尿剤不耐性腹水 10 例のうち 9 例はスピロラクトン 75-175mg/日、フロセマイド 40-160mg/日、ブメタミド 1-1.5mg/日の投与で、BUN が 30-56mg/dl に上昇し、5 例にクレアチニンの上昇 (1.3-2.3mg/dl)、8 例で低 Na 血症 (117-130mEq/L)、6 例で I-II 度の肝性脳症の出現を認めた。これら 9 例では全例利尿剤の減量あるいは中止を余儀なくされ、8 例に対しては腹水穿刺排液アルブミン静注を加えたが、腹水が消失したのは 3 例で、残りの症例では腹水が残存した。とくに、肝性昏睡合併例、ビリルビン高値例 (5mg/dl 以上) では反応不良で 3 例が 1~2 ヶ月の間に死亡した。電解質異常では低 Na 血症の対処が困難であり、2 例では利尿剤の減量、中止、飲水制限に加えて 35Meq/日の Na 補充を必要とした。少量の穿刺排液でも肝性昏睡が誘発された例では、新鮮凍結血漿、アルブミンの輸注を繰り返すことにより排液量を 3L 以上にまで増加できた。

(5) 移植後のウイルス再感染に関する検討

生体肝移植の生存率を見ると、B 型肝炎ウイルス肝硬変、C 型肝炎ウイルス肝硬変の成績は、施設の全体

成績と差がなかった。術後早期死亡例と B 型肝炎ウイルス陽性ドナーの計 4 例を除いた 36 例が検討された。B 型肝炎ウイルス再発予防として、Group 1: 移植後 HBIG のみ=3 例、Group 2: 移植後 lamivudine+HBIG=5 例、Group 3: 術前 lamivudine、移植後 lamivudine+HBIG=28 例を行い、Group 1 に seroconversion しなかった 1 例を除いて再発を認めなかった。C 型肝炎ウイルス再発の予防としてのプロトコールは現在なく、肝炎再発確認時点より、インターフェロン+リバビリン療法を開始した。54 例中 20 例 (51.3%) に再発が確認され 12 例が同治療法を施行された。結果は、有効 5 例、無効 3 例、中止 4 例であった。移植前のインターフェロン+リバビリン療法も 4 例に試みられたが、1 例に改善が見られ、移植そのものが中止となった以外、副作用あるいは効果がなく治療中止となった。

(6) 肝移植時期に関する検討

原発性胆汁性肝硬変とウイルス性肝硬変との間で CTP スコアはほぼ同じであるが、MELD スコアは原発性胆汁性肝硬変で有意に高値をとることが示された。MELD スコアでの平均 3 ヶ月生存率は 10 点未満で 1.9%、20 点未満で 6.0%、30 点未満で 19.6%そして 40 点未満で

52.6%、40 点以上 71.3%とされ、同様に CTP スコア 9 点以下で 4.3%、12 点以下で 11.2%、13 点以上で 40.1%と脳死肝移植での各々の分類での成績が報告されている。この脳死肝移植の成績と比較検討すると、生体肝移植症例は CTP スコアに比して MELD スコアが低い病態での適応が考慮されていることが判明した。さらに、肝移植の成績と比較すると、MELD スコアの高値例では予後が比較的不良であることも見出された。

(7) 新たな薬物治療に関する検討

実験開始 12 週後の CCl₄ 単独投与群では門脈周囲の線維化の拡大とそこから進展する線維を認め、P-P bridge の形成、脂肪滴の沈着を認めた。lisinopril 併用群では線維の幅が狭く、P-P bridge の程度も軽度であった。実験 24 週後では線維性隔壁の厚みが増し再生結節を認め、典型的な肝硬変像であったが、lisinopril 併用群では CCl₄ 単独投与群と比較し明らかに隔壁の厚みは薄く、再生結節はほとんど認めなかった。肝内 hydroxyproline 量は実験開始 24 週後 lisinopril により有意に低下していた。血清 type IV collagen 7s はいずれの実験群の間にも有意差は認めなかった。一方血清 hyaluronic 酸は、実験開始後 24

週の時点で CCl₄ 単独投与群と比較すると lisinopril 併用群で有意に減少していた。Ang II にはラット伊東細胞自体に対する細胞増殖作用は認めなかったが、Ang II 受容体 1A の mRNA の発現を確認した。ラット伊東細胞を 24 時間培養後、 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} mol/l ずつ Ang II 連日添加したが、Ang-II 添加により濃度依存性に pro α (I) collagen、TGF- β 1 の mRNA の発現増加を認めた。ラットの肝重量は標準飼料投与群に比し CDAA 飼料投与群で有意に増加しており、candesartan 投与によりこの増加は有意に抑制された。肝組織の HE 染色では、標準飼料投与群、標準飼料、candesartan 併用群では肝組織に有意な変化は認められなかった。CDAA 飼料投与群では門脈周囲の線維化の拡大とそこから進展する厚い線維を認め、再生結節が形成され肝硬変の所見であり、また著明な脂肪滴の沈着を認めた。一方実験開始 12 週後の candesartan 併用群では軽度の線維化と脂肪化を認めるのみであった。また CDAA 飼料投与群では標準飼料投与群に比し有意に血清ヒアルロン酸値の上昇を認めたがこの上昇も candesartan 投与により抑制された。

(8) 幹細胞に関する検討

四塩化炭素投与 8 週で肝線維化が、12 週で肝硬変が作成された。投与中止後は線維化の改善がみられた。Musashi-1 抗原陽性細胞が四塩化炭素投与 12 週後の改善過程で血管周囲と線維束にみられた。陽性細胞は小型細胞で、大きさや形態から oval cell に類似していた。RT-PCR による遺伝子発現は、12 週投与 2 日目に最も強くみられ、その後漸減した。蛋白発現は 5 日目に最も多くみられた。いずれも 8 週投与群ではわずかにみられるのみであった。蛍光抗体法による二重染色では、Musashi-1 陽性細胞の一部は α -SMA が陽性であった。また、c-kit 陽性細胞もみられた。Musashi-1 と MMP-13 との二重染色では、一部の細胞に両者とも陽性の細胞が観察された。

(9) 遺伝子治療に関する検討

マウスおよびラットの腹腔内、門脈内、あるいは尾静脈内に lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与し、7 日後に肝における lacZ 遺伝子の発現を X-gal 染色によって評価したところ、投与ルートに如何に拘わらず、40%-60%の細胞において lacZ 遺伝子発現を認め、肝における効率の良い外来遺伝子発現を誘導し得た。肝硬変モデルおよび劇症肝炎モデルマウスの尾静脈より lacZ

遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与し、傷害肝においても外来遺伝子発現を誘導し得るかを検討した。劇症肝炎モデルマウスの肝では約40%程度の細胞が染色され、肝硬変マウスの肝では約60%の細胞がX-gal染色陽性であった。正常肝マウスの尾静脈よりアデノウイルスを投与した場合には、約40%程度の肝内細胞がX-gal染色陽性であった。さらに、肝におけるlacZ遺伝子発現を定量的に評価したところ、正常肝に比し有意に低値を示したが、十分なlacZ遺伝子発現が誘導されており、硬変肝における β -galactosidase活性は正常肝におけるそれよりも有意に高値を示した。さらに、アデノウイルス投与前後におけるALT、AST、LDHなどの肝関連血清パラメーターを測定したところ、正常肝マウス同様に、劇症肝炎マウスおよび肝硬変モデルマウスにおいても、軽度の上昇を認めたのみであった。以上の結果より、劇症肝炎や肝硬変などの重篤な傷害肝においても、アデノウイルスを経静脈的に全身投与すれば、有効かつ安全な遺伝子発現を肝において誘導し得ることが判明した。遺伝子発現は一過性であり、投与35日後には肝におけるlacZ遺伝子発現は消失した。アデノウイルスの初回投与35日後に、経門脈あるいは経尾静脈的にアデノウイルス

の再投与を行ったが、肝におけるlacZ遺伝子の再発現は誘導されなかった。そこで、アデノウイルスの初回投与より1年の期間を置き再投与を行ったが、やはり肝におけるlacZ遺伝子発現は誘導されなかった。アデノウイルス投与を行ったラットにおける免疫誘導の有無を検討したところ、アデノウイルスに対する中和抗体とアデノウイルス特異的T細胞の誘導を認めた。さらに、アデノウイルスに対する中和抗体とアデノウイルス特異的T細胞は、アデノウイルスの再投与によって著明な上昇を認めた。より臨床に近似した条件での検討を行うために、アデノウイルスの初回投与時ではなく再投与時のみに、シクロスポリンあるいはFK506による免疫抑制処置を行い、lacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスを経門脈あるいは経尾静脈的に再投与したところ、アデノウイルス再投与に対する液性ならびに細胞性免疫反応が有意に抑制され、肝における外来遺伝子の再発現を誘導することが可能であった。

(10) 医療経済的検討に関する検討

肝炎・肝硬変の各状態に対するQOL値は、病状の進行にそって低下する傾向が示された。副作用のもとでのQOL値は、状態3「中程度

の肝炎症状、肝硬変なし」より低く、状態 4「軽度の肝硬変」と近い評価を得、状態 5「重度の肝硬変」より良好であることが示された。肝炎・肝硬変の各状態と副作用の状態との差を対応付き t 検定で検討したところ、状態 4 以外は有意差($p < 0.01$)を認め、副作用の状態は「軽度の肝硬変」とほぼ同等と評価された。

D. 考察

(1) 肝性脳症に関する検討

肝性昏睡の誘因には時代的変遷が認められ、最近の傾向としては消化管出血による脳症の頻度が著しく減少し、誘因不明によるものが増加してきている。これには内視鏡的静脈瘤硬化療法などの食道・胃静脈瘤に対する治療の進歩が大きく関与していると考えられる。また、肝性脳症の誘因対策を充分に行うようになってきたことから、肝細胞障害の強い例を含む、誘因の明らかでない肝性脳症の割合が増加していると考えられた。

BCAA 輸液療法の重症度別の意識覚醒効果については grade A、grade B での完全覚醒率は高率であるが、grade C では完全覚醒率は 50%以下で重症度の score points が高くなるにつれ完全覚醒率は低下した。非併用群に比し BCAA 輸液併用群で有意 ($p < 0.05$)に短い期間で

完全覚醒がえられた。しかし、重症度別に完全覚醒までの日数を比較すると grade A、grade B では併用群で日数が早いものの、grade C では両群間に差を認めず、重症度の進行した例では BCAA 輸液療法の効果には限界が見られた。BCAA 輸液療法の効果を肝性脳症の予後の面から検討すると、grade A では併用群、非併用群とも生存に差が無く、grade B では併用群の生存率が非併用群に比し良好であった。一方、grade C では併用群、非併用群とも生存率は低く差が無く、完全覚醒率の成績と同様に重症度の進行した例での BCAA 輸液療法の効果の限界が見られた。

完全覚醒ならびに肝性脳症の予後に関与する因子を多重ロジスティックモデルにより検討すると、いずれも総ビリルビン値やプロトロンビン時間といった重症度に関与する因子が選択された。

(2) PEM に関する検討

肝硬変患者における BCAA 療法は、患者の予後、あるいは QOL の改善に有効であることが明らかとなってきた。今回の検討においては、1 日の BCAA 投与量を変えずに就寝前に 8g 投与することにより、早朝空腹時の有意の Fischer 比、ならびに窒素バランスの改善を

認めており、蛋白代謝状態の改善に就寝前 BCAA 投与法が有効であることが示された。BCAA の毎食後投与にもかかわらず、Fischer 比の上昇がみられない理由として、投与した BCAA がエネルギーとして用いられ、アルブミン合成のために有効に利用されない可能性が考えられる。健常者では糖のエネルギー効率がもっとも高いのに比較し、肝硬変では BCAA 含有アミノ酸がもっとも高かった。このことはエネルギー基質として肝硬変患者では BCAA が有効であることを示すが、エネルギーとして利用される分、蛋白同化作用には必ずしも有効に利用されない可能性がある。したがって BCAA を就寝前に投与することは、睡眠中に BCAA をエネルギー源としてでなくタンパク合成に利用されるのに有効である可能性が示唆される。

(3) 道静脈瘤に関する検討

肝硬変において食道胃静脈瘤は重大な合併症の1つである。本邦における肝硬変の死因を経時的にみると、消化管出血死は1970年代には約12%を占めていたが、食道静脈瘤に対する内視鏡治療の進歩により80年代以降出血死は著明に減少し、90年代には約5%にまで低下した。しかしながら末期肝硬変に対しては未だ満足な結果を挙げているとはい

えず、今後安全かつ確実に施行する至適内視鏡治療が望まれる。内視鏡的静脈瘤結紮術(EVL)はその手技の簡便性、有用性により急速に普及したが、その問題点として治療後の静脈瘤再発率が高いことが指摘された。現在は EVL に続いて血管外に EIS を加える地固め法が食道静脈瘤に対する標準的治療法として行われ、地固め法を行うことにより EVL 後の再発率はかなり減少したといわれている。胃静脈瘤の緊急例では cyanoacrylate を用いた EIS が主に行われているが、止血困難な場合、最近では緊急 B-RTO を行う施設もみられる。この2年間での食道静脈瘤に対する内視鏡治療の内訳は、EIS が46.7%、EVL と地固め法としての EIS あるいは APC を施行した例が53.3%で、EIS と EVL がほぼ同等に行われている。

(4) 難治性腹水に関する検討

難治性腹水に対しては種々の治療が試みられるが、肝不全の進行のためにこれらの効果は一過性にとどまることが多く、肝予備能の保持が最も重要であるといえる。では、肝予備能を回復させる方法があるかどうかという点であるが、高分岐鎖アミノ酸経口栄養剤や Dibutyryl cyclic AMP の投与により肝予備能が徐々に改善し、ついには利尿剤に対する

反応性も回復して腹水の消失をみた肝不全例を経験している。また最近では、B 型末期肝硬変にラミブジンを投与して難治性腹水のコントロールに成功した経験もあり、ウイルス性肝硬変に対する抗ウイルス薬の保険適応の拡大が望まれる。

(4) 移植後のウイルス再感染に関する検討

B 型肝炎再発予防の試みとして Hong Kong Group などから lamivudine 単独法の報告があるが、YMDD 変異株の出現もあり現在のところ最善の予防法とはいえない。Lamivudine +HBIG 法では再発例も YMDD 変異株も見られないが、今後 HBIG の減量等の考慮が必要である。C 型肝炎ウイルス肝硬変に対する生体肝移植術は、生存率に関しては他疾患と同等であるが再発率が 50% を超え再発予防が急務である。現在の IFN+リバピリン併用療法も、12 例中 5 例にしか効果が認められず十分な再発予防となっていない。生体肝移植後の肝再生に伴う C 型肝炎ウイルス増殖が脳死移植と比べ肝炎再発までの期間が短いと報告されており、今後さらなる検討が必要である。

(6) 肝移植時期に関する検討

ウイルス性肝硬変は原発性胆汁性肝硬変に比して、比較的 MELD スコアが低い病態で生体肝移植が施行されていた。原発性胆汁性肝硬変は肝不全末期まで血清アルブミン値や凝固系たんぱく質が良く保たれ黄疸の極期まで生体肝移植の実施が延ばされるが、ウイルス性肝硬変は非代償性状態が早期に出現し、生体肝移植の実施が比較的早期に考慮されていることを物語っている。また、MELD スコアの基本がビリルビン、クレアチニンならびにプロトロンビン時間であることより、これら数値が上昇した場合は肝不全や腎不全の進行が考えられ、術後の成績不良に関連しても致し方ないと考えられる。したがって、ウイルス性肝硬変の生体肝移植の適応時期は CPT で 12 点以上を呈した場合であり、その中でも MELD スコアを経時的に計算し、高値をとるような傾向があれば直ちに実施すべきと考えられた。

(5) 新たな薬物治療に関する検討

Ang II をラット伊東細胞に添加し、濃度依存性に TGF- β 1 の mRNA の発現増加を認めた。このことは Ang II がラット伊東細胞に対し線維化増強効果をもつことが示唆された。ACE 阻害剤が肝線維化に対し抑制的に働くことが今回の検討で明らかとなったが、ラットにおいては Ang I

から Ang II への変換に寄与する酵素は ACE によるところがほとんどであるが、人間においては ACE が 50%程度であり、キマーゼなどの他の酵素の関与が大きいことが報告されている。すなわち受容体レベルで Ang II の効果を抑制できる Ang II 受容体拮抗薬のほうが人間においてはより効果的に Ang II の作用を抑制できる可能性がある。そこで Ang II 受容体拮抗薬 candesartan を用いて実験を行ったところ、ACE 阻害剤同様 Ang II 受容体拮抗薬によっても肝線維化は有意に抑制された。本実験で使用した薬物濃度は臨床的にも投与可能な濃度であり、今後慢性活動性肝炎患者に ACE 阻害剤あるいは Ang II 受容体拮抗薬の投与により臨床的効果が期待されると考えられる。

(8) 幹細胞に関する検討

ラットの実験的肝線維化モデルでは神経系の幹細胞のマーカーである Musashi-1 陽性細胞がみられた。この細胞は c-kit も陽性であることより、骨髄由来と考えられた。Musashi-1 陽性細胞は、一部が α -SMA 陽性であることより肝星細胞に分化すると考えられた。今回の成績では肝細胞への分化ははっきりしなかったが、一部の Musashi-1 陽性細胞が MMP-13 を産生すること

より、肝硬変の回復過程に出現する骨髄由来幹細胞が肝線維化改善に直接関与していることが示唆された。肝硬変治療への応用を計るためには、いかに骨髄由来幹細胞を肝臓に誘導し、コラゲナーゼ産生に導くかが重要な課題である。

(9) 遺伝子治療に関する検討

肝硬変に対する遺伝子治療を考えた場合には、肝予備能が著明に低下しているため標的細胞の採取に外科的手技を要する ex vivo 遺伝子治療は実用的とは言い難く、臨床応用可能な遺伝子治療は in vivo 遺伝子治療に限られる。そこで、肝硬変に対する臨床応用可能な遺伝子治療を目指した基礎的検討として、組換えアデノウイルスを用いた in vivo 遺伝子導入によって、肝への効率的かつ安全な遺伝子発現の誘導が可能かを検討した。組換えアデノウイルスをマウスあるいはラットの肝内に直接注入あるいは開腹後に門脈内、さらにより簡便な投与方法である経静脈的な全身投与を行った場合にも、肝内注入および門脈内注入に匹敵する遺伝子発現の誘導が可能であった。さらに、傷害肝においてもアデノウイルスを経静脈的に全身投与すれば、肝における有効な遺伝子発現を誘導し得ることが示された。アデノウイルスの初回投与時ではなく、再投与