

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。

E. 結論

従来より内科的治療に難渋する腹水に対して漠然と用いられてきた難治性腹水概念が Arroyo らにより厳密にされた意義は確かに大きい。われわれの難治性腹水例の経験ではスピロラクトン 50~175mg、フロセミド 40~160 mg の単独または併用投与ですでに BUN 上昇、電解質異常、肝性昏睡などの副作用が出現しており、Arroyo らの定義ではこれらは利尿剤不耐性腹水の範疇に入ってしまう。日本人の薬物耐用量に即した難治性腹水の定義が必要とされる所以である。今回は 10 例のみの集計にとどまったが、今後さらに症例を増やして日本人に適合した難治性腹水の定義を策定せねばならない。次年度はさらなる症例の集積とともに、難治性腹水発現にかかわる局所因子の解明と穿刺排液アルブミン静注に代るべき腹水濾過濃縮再静注法のさらなる工夫に努めたい。

文献

- 1) Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club. *Hepatology* 23:164-76, 1996
- 2) Takaya A, Fukui H, Matsumura M, et al: Stepped care medical treatment for cirrhotic ascites: analysis of factors influencing the response to treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 10:30-35, 1995
- 3) Fukui H, Uemura M, Tsujii T. Pathophysiology and treatment of cirrhotic ascites. In Yamanaka M, Toda G, Tanaka T, et al eds: *Liver cirrhosis update*. Elsevier, Amsterdam, 1998, p63-76
- 4) 植村正人、山尾純一、福井 博: 難治性腹水の病態と治療、*消化器科* 35: 448-452, 2002
- 5) 福井 博: 腹水・肝腎症候群. *肝臓* 43:84-93, 2002
- 6) Witte MH, Witte CL, Dumont AE: Progress in liver disease: physiological factors involved in the causation of cirrhotic ascites. *Gastroenterology* 61:742-50, 1971
- 7) Witte MH, Witte CL, Dumont AE: Lymph imbalance in the

- genesis and perpetuation of the ascites syndrome in hepatic cirrhosis. *Gastroenterology* 78:1059-1068, 1980
- 8) Lieberman FL, Ito S, Reynolds TB. Effective plasma volume in cirrhosis with ascites. Evidence that a decreased value does not account for renal sodium retention, a spontaneous reduction in glomerular filtration rate (GFR), and a fall in GFR during drug-induced diuresis. *J Clin Invest* 48:975-81, 1969
 - 9) Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, et al. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: A proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 8:1151-1157, 1988
 - 10) Epstein M. Diuretic therapy in liver disease. In: Epstein M, (ed.) *The Kidney in Liver Disease*, 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 537-550, 1988
 - 11) Arroyo V, Epstein M, Gallus G, et al. Refractory ascites in cirrhosis: mechanism and treatment. *Gastroenterol Int* 2:195-207, 1989
 - 12) Bernardi M, Laffi G, Salvagnini M, et al. Efficacy and safety of the stepped care medical treatment of ascites in liver cirrhosis: a randomized controlled clinical trial comparing two diets with different sodium content. *Liver* 13:156-162, 1993
 - 13) Uemura, M., Matsumoto, M., Tsujii, T., Fukui, H., Miyamoto, Y., Kojima, H., Kikuchi, E., Fukui, K., Fujimoto, M., Mitoro, A., Matsumura, M., and Takaya, A. Effects of body compression on parameters related to ascites formation: therapeutic trial in cirrhotic patients. *J Gastroenterol*, 34: 75-82, 1999
 - 14) Gentilini, P., Casini-Raggi, V., Di Fiore, G., Romanelli, R. G., Buzzelli, G., Pinzani, M., La Villa, G., and Laffi, G. Albumin improves the response to diuretics in patients with cirrhosis and ascites: results of a randomized, controlled trial. *J Hepatol*, 30: 639-45, 1999
 - 15) Le Veen HH, Christoudias G, Moon JP, et al. Peritoneovenous shunting for ascites. *Ann. Surg* 180:580-591, 1974
 - 16) Epstein M: Peritoneovenous shunt in the management of ascites and the hepatorenal

- syndrome. In: Epstein M (ed.)
The Kidney in Liver Disease, 4th
ed. Philadelphia: Hanley &
Belfus, Inc., 1996;491-506
- 17) Le Veen HH, Vujic I, D'Ovidio
NJ, et al. Peritoneovenous shunt
occlusion. Etiology, diagnosis,
therapy. Ann Surg 200;212-23,
1984
- 18) Zervos EE, McCormick J,
Goode SE, Rosemurgy AS.
Peritoneovenous shunts in
patients with intractable ascites:
palliation at what price? Am
Surg 63:157-162, 1997
19. Graziotto A, Rossaro L, Inturri
P, Salvagnini M. Reinfusion of
concentrated ascitic fluid
versus total paracentesis. A
randomized prospective trial.
Dig Dis Sci 42:1708-14, 1997
- 19) Borzio M, Romagnoni M,
Sorgato G, et al. A simple
method for ascites concentration
and reinfusion. Dig Dis Sci
40:1054-1059, 1995

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukui H: Does angiotensin II
type 1 receptor blocker offer a
clinical advantage to cirrhotics
with ascites? J Gastroenterol 37:
235-237, 2002

2) 福井 博: 腹水・肝腎症候群.
肝臓 43:84-93, 2002

3) 福井 博: 腹水. 新臨床内科学
第8版 高久史麿、尾形悦郎、黒川 清、
矢崎義雄編、医学書院、東京、2002、
P849-853

4) 福井 博: 腹水. 今日の治療指
針第5版、医学書院、東京、2002、
P402-404

5) 植村正人、山尾純一、福井 博:
難治性腹水の病態と治療、消化器科
35: 448-452, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
末期肝硬変に対する治療に関する研究
平成14年度分担研究報告書

末期肝硬変に対する生体肝移植に関する研究

分担研究者 市田隆文 新潟大学医学部附属病院・臨床試験部

研究要旨 従来のCTPスコアによる肝移植の実施時期をMELDスコアを用いることにより、適切な生体肝移植時期の設定が可能になった。さらに、生体肝移植後のC型肝炎ウイルスの再感染に関しては術前の適切な抗ウイルス療法により防御されることが示唆された。

A. 研究目的

末期肝硬変に対する生体肝移植には幾つかの問題点がある。その中でも術前的问题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肝移植の順位付けを行ってきた。最近ではさらにその中でも3ヶ月以内の予後を推測するMELDスコアも評価され、今日では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。さらに、術後の問題として最近の問題点となりつつあるHCVの再感染についても考

察した。すなわち、1990年代後半までにはHCV陽性レシピエントと非HCV陽性レシピエントの間では生存率やグラフト生着率に差は無いとされていたが、最近では脳死肝移植の場合、明らかにHCV陽性レシピエントの方が生存率、グラフト生着率が低いことが判明してきた。この理由に関する考察を加え、次年度への研究テーマとして考えた。

B. 研究方法

Waiting listの脳死肝移植candidate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(図1)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 スコアー算定、CTP スコアー算定ならびに生体肝移植後の outcome である。一方、HCV 感染に関しては自験例 3 例に対するインターフェロン治療効果を示す。

図 1 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)

C. 研究結果

表 1 に原発性胆汁性肝硬変、肝硬変ならびに肝細胞癌の生体肝移植直前の MELD スコアーならびに CTP スコアーの平均値を示した。原発性胆汁性肝硬変とウイルス性肝硬変との間で、CTP スコアーはほぼ同じであるが、MELD スコアー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 スコアーでの平均 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

ー 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(Wiesner et al.

Gastroenterology2003;124:91)。

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 スコアーに比して MELD スコアー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 スコアー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。

表 1 生体肝移植施行例の MELD スコアー

病名 (施行例数)	死亡	MELD スコアー	CTP スコアー
原発性胆汁性肝硬変(10)	(3)	24.7±9.6	10.9±2.1
肝硬変(12)	(3)	18.8±8.1	10.1±2.2
肝細胞癌(5)	(5)	7.8±4.5	7.5±2.4

表 2 各疾患の MELD 分類と CPT 分類の分布状況

	MELD					CPT		
	<9	10-19	20-29	30-39	>40	7-9	10-12	13-15
PBC (10)	0	5	2 ***	2	1	4	3 **	3 *
LC (12)	1	7	3 **	1 *	0	4	6 **	2 *
HCC (5)	0	5 *****	0	0	0	4 ****	1 *	0

* Death

D. 考察

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。

一方、HCV の再感染に関しては肝移植前の抗ウイルス治療と肝移植後の治療に分けられる。自験例は肝移植前の抗ウイルス療法のみを結果を記す。HCV 陽性レシピエントにインターフェロンβを 300 万から 600 万単位を投与し、血中の HCVPCR が陰性になるまで持続投与した。3 例に施行し、2 例は HCVPCR 陰性化し、術後 1 例は肝移植後 3 年を経て陰性化が持続している。残りの一例は肝移植後 HCV の再感染を見た。さらに他の一例は術前の投与中に血小板などの骨髄抑制が顕性化し、術前に投与中断した。この症例は肝移植後 HCV の再感染を見た。HCV の再感染防御の strategy は肝移植後ではなく肝移植前に血中の HCV を陰性化し、術後の免疫抑制剤としては副腎皮質ホルモンの離脱を早期に行うこととしている。問題点としては非代償性の肝

硬変の場合、インターフェロン投与により容易に骨髄抑制が生じ、投与中断が余儀なくされる点である。したがって、HCV 陽性レシピエントとしては非代償性肝硬変よりは再発を繰り返す肝細胞癌の方が代償性肝病態の背景であることからより良い適応病態になるかもしれない。さらに、HCV の再感染防御のための免疫抑制剤と HCV の増殖も検討課題になるものと推測された。なぜならば、欧米での脳死肝移植レシピエントの生存率低下と免疫抑制剤の種類の変化が関与している可能性が欧米の報告から考えられるからである。

E. 結論

末期肝硬変、特に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。

F. 健康危険情報

特に記載することなし。

G. 研究発表

論文発表

1. 市田隆文、ほか：原発性胆汁性肝硬変の肝内リンパ球解析－生体肝移植レシピエント組織を用いて－厚生科学研究研究補助金、特定疾患対策研究事業、難治性の肝疾患に関する研究、平成 13 年度総括・分担研究報告書、2002 年、78-82 頁。
2. Ichida T and Satoh Y: Prophylaxis and posttransplant treatment of viral hepatitis in living donor liver transplantation. In; Current Issues in Liver and Small Bowel Transplantation, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Volume 9. Edited by M Kitajima, M Shimazu, G Wakabayashi, K Hoshino, M Tanabe, S Kawauchi, Springer-Verlag, Tokyo, 2002, pp62-71.
3. Ichida T: Viral cirrhosis and hepatocellular carcinoma in relation to living-donor liver transplantation. In; Molecular Biology and Immunology in Hepatology, edited by T. Tsuji, Higashi T, Zeniya M and K-H. Meyer zum Buschenfelde, Elsevier Science, Amsterdam, Tokyo, 2002, pp319-335.

4. 市田隆文、ほか：肝移植-原発性胆汁性肝硬変、臨床肝臓病-症例による生検、電顕、画像、治療-改訂第3版、市田文弘、市田隆文編、日本メディカルセンター、東京、2001年、312-316頁
5. 市田隆文、ほか：肝移植の適応、肝細胞癌、肝胆膵フロンティア12 肝移植の up to date、沖田 極、神代正道、小林健一、二川俊二編、診断と治療社、東京、2001年3月、23-27頁.
6. 松波英寿、市田隆文、ほか：C型肝硬変に対する生体肝移植、第21回犬山シンポジウム 高度進行肝細胞癌、生体部分肝移植、B型、C型慢性肝炎治療、犬山シンポジウム記録刊行会編、中外医学社、東京、2000年、pp 111-117.
7. 市田隆文：肝癌に対する肝移植。劇的な予後の改善が見込めないという立場から。Frontiers in Gastroenterology 2002; 7(3): 2002-2007.
8. 市田隆文：成人肝移植を考慮するタイミング移植を考慮するタイミング。消化器画像 2002;4(2):159-164.
9. Takimoto M, Ichida T, et al: Interferon inhibited the progression of liver fibrosis and reduced the risk of hepatocarcinogenesis in the patients with chronic hepatitis C. Dig Dis Sci 2002; 47(1): 170-176.
10. Sato Y, Ichida T, et al: Preoperative administration of 5-FU and IFN beta may prevent recurrence of hepatitis B and C virus. Amer J Gastroenterol 2002; 97(1): 215-216.
11. 市田隆文：肝不全に対する生体肝移植。臨床と研究 2001; 78(11): 2082-2084.
12. 佐藤好信、市田隆文：肝腎複合移植。腎と透析 2001; 51(4): 489-492.
13. 市田隆文：肝臓移植、移植の適応-消化器内科医はどのような成人肝疾患や肝病態を肝移植の適応と考えるのか。臨床消化器内科 2001; 16(13): 1723-1729.
14. 市田隆文、ほか：肝移植における肝炎ウイルス対策。外科 2001;63(11):1345-1353.
15. Sato Y, Ichida T, et al: Real time measurement of anti-HBs levels and donor specific transfusion via portal vein may reduce amount of HBIG after living related donor liver transplantation. Amer J Gastroenterol. 2002;97(2):488-489

16. 市田隆文, 佐藤好信 : 劇症肝不全に対する肝移植の適応基準. 肝胆膵 2001; 42(4):505-510.
17. 市田隆文 : 肝移植後における原疾患の再発とその対応. 肝臓 2001 ; 42(2):63-75.
18. 市田隆文, ほか : UNOS の肝移植レシピエント候補者選択基準と優先順位ーわが国の肝移植レシピエント選択基準との比較ー. 日本消化器病学会雑誌 2001;98(1):1-7.
19. 市田隆文 : 肝移植 : 現況と展望. 治療成績と問題. 原発性胆汁性肝硬変 . 日本内科学会雑誌 2001;90(1):35-42.
- 学会発表
20. Sato Y, Ichida T, Suzuki S, Yamamoto S, Oya H, Nakatsuka H, Kobayashi T, Watanabe T, Kameyama H, Hatakeyama K. Living related donor liver transplantation for preoperative a-fetoprotein mRNA-positive patients of hepatocellular carcinoma: Description of five cases. Transplantation Proc 2003; 35: 352-353.
21. Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Hirano K, Kobayashi T, Oya H, Nakatsuka H, Watanabe T, Hatakeyama K. Shear stress theory and small-for-size graft in adult living related liver transplantation. Transplantation Proc 2003; 35: 78.
22. Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Oya H, Nakatsuka H, Kobayashi T, Watanabe T, Kameyama H, Hatakeyama K. Analysis of microchimerism in peripheral blood by short tandem repeat sequences immediately after living related liver transplantation. Transplantation Proc 2003; 35: 412-413.
- H. 知的財産権の出願・登録状況特に記載することなし。

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）
末期肝硬変に対する治療に関する研究
平成14年度分担研究報告書

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

分担研究者 田中紘一 京都大学附属病院 移植外科

研究要旨 ウイルス性肝硬変に対する肝移植の有効性は、欧米を中心に確立しているが、生体肝移植術という異なった状況下での、治療・再発予防の評価はいまだ検討の余地がある。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に対する生体肝移植術は、B型肝炎ウイルスキャリアーをドナーに用いた例外を除いて、再発例はない。現在用いている lamivudine + HBIG が著効しているものと考えられるが、今後 HBIG の減量等を考慮したい。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、再発率が50%を超え、再発予防が急務である。現在の IFN + リバビリン併用療法も、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。部分肝再生に伴うウイルス増殖が考えられる C型ウイルス肝炎再発に対しては、投薬開始時期、投薬量などの検討が今後必要である。

A. 研究目的

ウイルス性肝硬変に対する肝移植の有効性は、欧米を中心に確立しているが、生体肝移植術という異なった状況下での、治療・再発予防の評価はいまだ検討の余地がある。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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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見られなかった。

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ている。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。

D. 考察

B型肝炎再発予防の試みとしてHong Kong Groupなどより、lamivudine単独法の報告がなされているが、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。現在の我々の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ものの、再発率が50%を超え、再発予防が急務である。現在のIFN+リバビリン併用療法も、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。Colorado大学より、生体肝移植後の部分肝再生に伴う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いる。投薬開始時期、投薬量などの検討が今後必要である。

E. 結論

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。

今後、B型肝炎の再発を予防しながら、どの程度までHBs抗体価を下げ、高価なHBIGの使用を抑えることが出来るか検討を要する。C型肝炎に関しては、治療開始の時期、投薬量、使用薬剤などの検討を行い、再発予防の方策の検討を必要とする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 鍋島紀滋、千葉勉、田中紘一：肝移植における抗ウイルス薬の意義。総合臨床 51 (6) : 2016-2021, 2002
- 3) 横井川規巨、鍋島紀滋、上本伸二、田中紘一：ウイルス性肝炎患者への生体肝移植。現代医療 34 (1) : 44-47, 2002

学会発表

- 1) Motoshige Nabeshima: Hepatitis and Transplantation. 3rd Korea-Japan Transplantation Forum, Seoul, 2002.9.28,

- 2) 鍋島紀滋、岩井晃男、上本伸二、木内哲也、江川裕人、貝原聡、田中紘一、千葉勉：肝移植後C型肝炎に対する治療経験。第38回日本肝臓学会総会 大阪 2002.6.13

- 3) 鍋島紀滋、千葉勉、田中紘一：ウイルス性肝硬変に対する生体肝移植。第99回日本内科学会講演会 名古屋 2002.3.28

- 4) 鍋島紀滋、千葉勉、田中紘一：シンポジウム「消化器疾患診療における最先端 肝胆臓」ウイルス性肝硬変に対する生体肝移植。第74回日本消化器病学会近畿支部例会 大阪 2001.9.8

- 5) 鍋島紀滋、千葉勉、田中紘一：ワークショップ 21「肝不全の病態と治療」ウイルス性肝硬変に対する生体肝移植。第37回日本肝臓学会総会 横浜 2001.5.18

- 6) 鍋島紀滋、千葉勉、田中紘一：パネルディスカッション「ウイルス性肝硬変、肝細胞がんに対する生体肝移植—current strategy—」ウイルス性肝硬変、肝細胞癌に対する生体肝移植の成績と適応。第4回日本肝臓学会大会 (DDW-Japan 2000) 神戸 2000.10.26

- 7) 鍋島紀滋、千葉勉、田中紘一：パネルディスカッション「症例から見た生体肝移植適応時期の決定」胆汁うっ滞性肝硬変、ウイルス性肝硬変、劇症肝炎に対する生体肝移植適応時期についての検討。第36回日本肝臓学会総会 福岡 2000.6.9

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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）
末期肝硬変に対する治療に関する研究
平成14年度分担研究報告書

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

総括・分担研究者 石井裕正 慶應義塾大学医学部消化器内科

研究要旨 肝線維化における rennin-angiotensin system の関与を解明し、angiotensin converting enzyme 阻害剤および angiotensin II の肝線維化に対する効果を明らかにすることを目的とした。肝線維化における主要な役割を果たすとされる伊東細胞をラットより分離し、angiotensin II を添加したところ pro α (I) collagen および transforming growth factor- β 1 の mRNA の発現の増強を認めた。すなわち伊東細胞の活性化に rennin-angiotensin system の関与が示唆された。四塩化炭素投与ラット肝線維化モデルに angiotensin converting enzyme 阻害剤を、コリン欠乏食投与肝線維化モデルに angiotensin II 受容体拮抗薬を投与したところ、著明な肝線維化抑制効果と血清中肝線維化マーカーの低下を認めた。以上より慢性肝疾患患者に対し rennin-angiotensin system の阻害剤が有効な治療法となりうる可能性が考えられた。

研究協力者

齋藤英胤、大石温子、多田慎一郎（慶應義塾大学医学部消化器内科）

A. 研究目的

Rennin - angiotensin - aldosterone system は全身の血圧調節と体液、電解質出納バランスの保持において重要な役割を担っている。この rennin-angiotensin (RA) system を抑制することにより降圧効

果が得られることから、angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害剤の開発が行われてきた。しかしながら本態性高血圧患者において血漿 rennin 活性が高値を示す症例が少なく、ACE 阻害剤が血漿 rennin 活性に関係なく降圧効果をもたらすことが明らかになってきた。このことから血漿 rennin 活性によって反映される循環血液中の R-A system 以外の R-A system が存在し、その R-

A system が高血圧の発症維持機構に深く関与していると考えられるようになり、組織 R-A system という概念が提唱され、さまざまな報告検討がなされてきた。

一方 R-A system の生理活性物質である angiotensin II (Ang II) は様々な作用が報告されている。すなわち心筋収縮力増強、心室筋容量増加、血管平滑筋収縮、毛細血管透過性亢進、腎血流量減少、抗利尿ホルモン分泌促進、アセチルコリン分泌亢進などの高血圧発症と維持に関わるもののみではなく、線維芽細胞に対する増殖促進や間質細胞に対する collagen 合成促進作用などが報告されている。後者の作用を介して ACE 阻害剤による血清線維化マーカーの減少、心筋 collagen 含量の減少、放射線照射ラットにおける肺線維化抑制効果や Ang II 受容体拮抗薬による蛋白尿、糸球体障害の改善などの報告がなされている。

肝線維化は進行した慢性肝疾患に共通してみられる病理像であり、細胞外マトリックスの異常増生を特徴とする。増生した細胞マトリックスは、単純な物理的障害として血流障害、酵素や蛋白質の拡散障害などをきたすことから、肝全体の機能低下をもたらすことが知られている。現在、肝線維化に直接関与する主要な細胞は、Disse 腔に常在する伊東細胞

といわれている。伊東細胞は肝細胞が傷害されると腫大、増殖し筋線維芽細胞に変化する。この形質転換した伊東細胞が局所で各種の細胞外マトリックスを合成、分泌し、線維化が生じる。伊東細胞と同様に、筋線維芽細胞化する間質細胞の存在が各臓器において報告されている。それらのひとつである腎臓の mesangial 細胞や心臓の Interstitial cells in the myocardium において Ang-II の線維化促進効果が確認されており、肝臓においても同様に R-A system が線維化に関与している可能性考えられる。

肝線維化が進行すると慢性肝疾患は終末像として肝硬変に進展する。肝硬変症は最終的に肝不全症状を呈し重篤な状態になる。また肝線維化が進行すると肝発癌を来す危険度も著しく上昇する。このため線維化を抑制することは慢性肝疾患患者の予後を改善する上で大変重要である。

本研究では、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 ACE 阻害薬および 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する。

B. 研究方法

すべての動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して施行した。

1. CCl₄惹起慢性肝障害に対するACE阻害剤 lisinopril の効果の検討

6週齢雄性 Sprague-Dawley ラットに CCl₄ (ultra pure grade, 関東化学、東京) をオリーブ油で 50% (v/v) に希釈し、0.2 ml/kg、週 2 回投与した。lisinopril (シオノギ製薬、東京) を使用した。lisinopril は肝での代謝は受けず、肝機能低下を示す生体内においても薬物動態上変化を認めず、飲料水で溶解後も 1 カ月間安定していることが報告されている。Lisinopril は飲料水に 50 mg/l の濃度で溶解し、自由飲水法で投与した。飲水量は平均して、30±6 ml/kg/day であり、lisinopril の推定投与量は 6.5 mg/kg/day で、血清濃度に換算すると約 120 mg/ml 程度であった。

ラットを 4 群に分け (① CCl₄ 単独投与群、② CCl₄, lisinopril 併用投与群、③ lisinopril 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、脱血後肝を摘出し実験に供した。また採血後直ちに遠心分離し血漿を -20℃ で保存した。摘出した肝は、10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋後、4 μm の薄切片を作成し

た。Hematoxylin-eosin 染色、銀染色を施し、線維化、脂肪変性の程度を比較検討した。また摘出した肝臓より 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 collagen^{7s}、hyaluronic 酸を測定した。

2. 伊東細胞に対する Ang II の効果

まず伊東細胞に 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 1A および 1B cDNA、Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)cDNA に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。つぎに伊東細胞に対する Ang II の効果の細胞増殖効果を見る目的で、Ang II を 10⁻⁵, 10⁻⁷, 10⁻⁹ mol/l ずつ添加した後、48 時間培養し、³H]-thymidine の取り込みを測定した。またラット伊東細胞に Ang II を 10⁻⁵, 10⁻⁷, 10⁻⁹ mol/l ずつ連日添加あるいは無添加で、培養前と培養 72 時間後に全 RNA を抽出し pro α(I) collagen, TGF-β1, G3PDH の cDNA を用い Northern blot hybridization を行った。

3. コリン欠乏食投与ラットに対する Ang II 受容体拮抗薬の効果

6週齢雄性 Wistar ラットにコリン欠乏食, choline deficient L-Amino

acid-defined (CDAA)飼料を投与した。CDAA 飼料を投与すると 12 週程度で肝線維化がみられ、24 週後には肝発癌が起こることが報告されている。Ang II 受容体拮抗薬としてカンデサルタンをラットに胃管を挿入し 1 日 10mg/kg 連日投与する。6 週齢ウイスター系雄性ラットを① CDAA 飼料のみ投与する群、②カンデサルタン、CDAA 飼料の双方を投与する群、③標準飼料のみを投与する群、④カンデサルタン、標準飼料の双方を投与する群の 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。また肝重量、体重、血中線維化マーカーも合わせて検討した。

C. 研究結果

1. CCl₄惹起慢性肝障害に対する ACE 阻害剤 lisinopril の効果の検討

各ラットの体重と肝重量は各々の実験群にほとんど差はなかった。

図 1 に、実験開始 8, 12, 24 週後の各実験群の銀染色ラット肝組織像を示す。いずれの時期においても lisinopril 単独投与群では組織学的変化はなかった。図 1A に実験開始 8 週後の CCl₄ 単独投与群を、図 1B に実験開始 8 週後の lisinopril 併用群を示した。両群とも肝細胞に軽度の脂肪滴の沈着を認めるのみでほとんど差はなかった。図 1C に実験開始 12

週後の CCl₄ 単独投与群を、図 1D に実験開始 12 週後の lisinopril 併用群を示した。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。一方、実験開始 12 週後の lisinopril 併用群では CCl₄ 単独投与群と比較し線維の幅が狭く、P-P bridge の程度も軽度であった。図 1E に実験開始 24 週後の CCl₄ 単独投与群を、図 1F に実験 24 週後の lisinopril 併用群を示した。CCl₄ 単独投与群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。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。

図 2 に各実験群の肝内 hydroxyproline 量をす。実験開始 8, 12 週後の CCl₄ 単独投与群、lisinopril 併用群の両群間に有意差を認めなかったが、実験開始 24 週後の CCl₄ 単独投与群では肝内 hydroxyproline 量は $5.61 \pm 0.59 \mu\text{g/g rat liver}$ と他の実験群に比較し優位に高値であった。

表 1 に各実験群の血清 type IV collagen 7s と hyaluronic 酸の測定値を示した。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。

2. 伊東細胞に対する Ang II の効果

ラット伊東細胞に Ang II を添加後、³H]-thymidine にて細胞増殖能を検討したが、既に報告されているように²⁴⁾、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(data not shown)。

ラット伊東細胞より全 RNA の抽出を行い、Ang II 受容体 1A, 1B の primer を用い RT-PCR 法を行ったところ、図 3 に示すようにラット伊東細胞における Ang II 受容体 1A の mRNA の発現を確認した。Ang II 受容体 1B の発現は認められなかった。

ラット伊東細胞を 24 時間培養後、 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} mol/l ずつ連日添加あるいは無添加で、培養前と培養 72 時間後に全 RNA を抽出し pro α (I) collagen、TGF- β 1、コントロールとして G3PDH の cDNA を用い Northern blot hybridization を行ったところ、図 4 に示すごとく 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。

3. コリン欠乏食投与ラットに対する Ang II 受容体拮抗薬の効果

各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。図 5 a および b に CDAA 飼料投与群の肝組織像を示す。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った。また著明な脂肪滴の沈着を認めた。一方図 5 c および d に示すごとく、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。

D. 考察

肝線維化は通常、肝小葉を構成する肝実質細胞と間質細胞の増殖制御のアンバランスによって発症するものと考えられている。慢性ウイルス性肝障害やアルコール性肝炎のような慢性の経過をたどる肝疾患においては線維化が進行し肝硬変へと進展する。このため線維化を抑制することは重要な課題であり、現在までに肝線維化を抑制する薬剤として

dexamethasone、Interferon- γ 、colchicines と 16,16 dimethyl prostaglandin E₂などが知られているが、いずれも臨床応用されるにいたっていない。新たな薬物療法の開発が望まれている。

ラット伊東細胞に対する Ang II の作用は、細胞膜上に存在する特異的受容体に結合することによりさまざまな生理作用を発現する。この Ang II 受容体には少なくとも 2 つのサブタイプ (type1, 2) が存在し、Ang II 受容体 type1 (AT-1) にはさらに 2 つのサブタイプ (1A, 1B) が存在することが報告されている。AT-1 の分布は広く血管平滑筋、肺、心臓、腎臓、肝臓、脳、副腎皮質などに存在を認め、その中で肝臓、心臓、肺には AT-1A のみ、副腎皮質には AT-1B のみの存在が確認されている。我々はラット伊東細胞において AT-1A, 1B の RT-PCR法を行い AT-1A のみ mRNA の発現を確認した。この結果は Ang II が伊東細胞に作用することも示唆する。

肝線維化の基本現象は、肝細胞壊死部の伊東細胞が、局所に分泌された各種のサイトカインや Disse 腔の変化により活性化され、分裂増殖し筋線維芽細胞様に形質転換することにあるとされている。現在までに伊東細胞の活性化因子として TGF- β 1 や platelet derived growth factor

などが同定され、その中でも TGF- β 1 は有力な線維化促進因子として知られている。TGF- β 1 は伊東細胞に対して細胞外マトリックス産生能を亢進させるとともに伊東細胞自体からも TGF- β 1 を分泌亢進させ細胞外マトリックス産生に関与している。我々は、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可能性が示唆された。腎臓のメサンギウム細胞においても Ang II が TGF- β 1 を介して細胞外マトリックス産生能を亢進させるとの報告があり、伊東細胞においても同様な経路の存在が推測された。

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。ACE 阻害剤同様 Ang II 受容

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。

E. 結論

肝線維化過程において、伊東細胞における R-A system の関与と、この R-A system 抑制効果をもつ ACE 阻害剤や Ang II 受容体拮抗薬が線維化抑制効果を示すことが明らかとなった。