

ていた病因 (B型肝炎または不明) とSIRSの有無(yes), T/D ratio (>2.0), day4とday8, day15を通じて2週間後の死亡と最も強く関連していた肝性脳症の程度(IIIまたはIV)の4項目より成る2-week予後予測システムを考案し、各項目を満たした場合は+1点とした。このシステムをI群に適用した場合、2週間後の生存率はスコア2点以下ではおおむね80%以上、スコア3点以上ではおおむね30%以下であった。

2. II群における検討

2-week予後予測システムをII群に適用するに際して、day1またはday4, day8, day15におけるスコアが3点以上では2週間以内に死亡と予測、スコア2点以下では次の予後予測日に再度このシステムを適用した。これに従って検討した場合、この予後予測システムの2週間後の死亡に対する感度と特異度は87.5%と90%であった。

D. 考察

劇症肝不全の予後予測システムとしてはKing's College criteria³⁾が世界で最も汎用されており、わが国でもKing's College criteriaに基づいて肝移植適応ガイドラインが作成された。しかし、近年これらの予後予測システムの正診率が低下してきており、2002年にKing's College criteriaも改定された⁴⁾。わが国においても劇症肝不全の現状に適した新たなガイドラインの作成が必要と考えられる。

初発発症から脳症発現までの日数は、以前より予後予測因子として頻用されてきた。過去の報告でも初発発症から脳症発現までの日数によって予後が著しく異なることが報告されている⁵⁾。しかし、発症から脳症発現までの日数はA型肝炎やB型肝炎に比し非A非B型で有意に長い⁶⁾。また、劇症肝不全の中には初発症状の出現時期がはっきりしない症例も少なくない。これらのために今回の検討では初発発症から脳症発現までの日数と短期予後との関連が認められなかったものとする。

現行のガイドラインの予後因子には検査項目としてプロトロンビン時間と血清総ビリルビン、直接/総ビリルビン比が含まれている。しかし、今回の検討ではプロトロンビン時間及び血清総ビリルビンと短期予後との関連は認められなかった。プロトロンビン時間及び血清総ビリルビンは、劇症肝不全にルーチンで行われる血漿交換の影響を強く受ける。また、近年では脳症発現前の重症肝炎の時期から血漿交換が行われる傾向にあり、劇症肝不全診断時にプロトロンビン時間が40%を超えている症例も認められる。以上から判断するとプロトロンビン時間及び血清総ビリルビンを予後予測因子とすることは劇症肝不全の現状に適合していない可能性が高い。

劇症肝不全の予後予測システムには多くのものが報告されている。しかし、肝移植の適切なタイミングを予測するためのシステムは考案されていなかった。今回の検討で考案した2-week予後予測システムは、2週間後の予後を死亡と予測された患者は緊急に肝移植を必要とすると判断することにより肝移植のタイミング

を予測することにも役立つ。また、このシステムは治療経過を通して劇症肝不全患者の短期予後予測に適用できることがvalidationでも示された。今後、さらに多くの症例でのvalidationによって2-week予後予測システムの有用性が証明されることが必要と考える。

E. 結論

劇症肝不全患者における2週間後の予後と関連した因子を検討し、これらの予後予測因子に基づき2-week予後予測システムを考案した。このシステムは、2週間後の予後予測だけでなく肝移植のタイミングを予測するうえでも有用と考えられた。

F. 参考文献

- 1) 藤原研司. 劇症肝炎, 遅発性肝不全 (LOHF: late onset hepatic failure) の全国集計 (2000年). 厚生科学研究補助金 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, pp.87-96, 2002.
- 2) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 20: 864-74, 1992.
- 3) O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. Gastroenterology 97: 439-45, 1989.
- 4) Bernal W, Donaldson N, Wyncoll D, Wendon J. Blood lactate as an early predictor of outcome in paracetamol-induced acute liver failure: a cohort study. Lancet 359: 558-63, 2002.

G. 研究発表

論文発表: なし

学会発表:

肝移植非施行例の検討による「劇症肝炎に対する肝移植の適応ガイドライン」の問題点
三宅康広、坂口孝作、白鳥康史
第89回に日本消化器病学会総会

肝移植を視野に入れた劇症肝不全の新たな分類

三宅康広、坂口孝作、白鳥康史

DDW-Japan 2003

急性肝炎の劇症化予知に関する研究

研究協力者 鈴木 一幸 岩手医科大学第一内科 教授

研究要旨：[目的] 急性肝炎の発症早期に劇症化を予知する方法を確立する。[方法] 全国主要施設へのアンケート調査により、PTが80%を下回った急性肝炎259例を集計し多変量解析により予知式の作成を行った。[結果] 1. 急性肝炎の劇症化を早期に予測する時期としてPT80%の時点が妥当であることを再確認した。2. PTが80%を下回った急性肝炎の20%が劇症化した。3. 多変量解析により、年齢、血清総ビリルビン、PT、成因（HBV carrierの再燃、自己免疫性肝炎、成因不明）の4つが有意の説明変数として選択され、予測劇症化確率20%の段階を専門施設への搬送基準、50%の段階を治療開始基準とすることが可能と考えられた。[結論] PT80%の時点で急性肝炎の予測劇症化率を算出する式を作成し、専門施設への搬送基準、治療開始基準とすることが可能と考えられた。さらに精度の高い予知式を得るには新たな指標の開発が必要と考えられた。

共同研究者

滝川康裕 岩手医科大学第一内科 講師
遠藤龍人 岩手医科大学第一内科 助手

た。さらに、それらを用いた多重ロジスティック解析（尤度比による変数選択）により昏睡発現の予知式を作成した。

A. 研究目的

劇症肝炎、遅発性肝不全を急性肝炎の段階で予知し、早期に治療を開始することにより、肝性昏睡発現の阻止あるいは救命率の向上に繋げられる可能性がある。この観点から、研究班では1997年から2001年までの5年間、全国の多施設共同で急性肝炎重症型（プロトロンビン時間（PT）40%以下、肝性脳症I度以内）を登録しプロスペクティブな経過観察により、劇症化の実態、昏睡発現（劇症化）予知の可能性、早期治療の有効性を検討してきた。その結果、急性肝炎重症型のうち約30%が昏睡を発現すること、そのうち約60%がPT40%を下回ってから3日以内に昏睡を発現することを明らかにし、予知式を作成した(1)。しかし、早期の治療開始により予後を改善するという目的からは、PT40%の段階での予知は遅いと考えられた。

この問題を解決するために、昨年度自験例の急性肝炎234例を対象として、早期予知の可能性を検討した(2)。その結果、従来のマーカーでは有効な予知式を得ることができなかったが、Prothrombin time (PT) 80%の段階での予知が妥当であること、および、新しい指標として、Cholinesterase, HDL-Cholesterol, 尿素窒素などが有効な可能性があることが示唆された。そこで、全国の主要な施設へのアンケート調査によりPT 80%の段階での予知式の作成を試みた。

B. 研究方法

1997年から2001年まで当研究班のprospective studyに多数の症例を提供して頂いた20施設に依頼し、急性肝炎のうち、PT80%以下を初めて確認した時点でのデータをアンケート調査した。調査項目は、背景因子、基礎疾患、成因、PT80%以下を初めて確認した時点での肝機能検査値である。単変量解析により昏睡発現予測に寄与する可能性の高い因子を抽出し

C. 研究結果

1. 患者背景

17施設から279症例が集計され、昏睡発現後にPTを確認した症例など不適切症例を除外した259例を解析した。解析症例の患者背景を表1に示す。

表1. 解析症例の患者背景

例数	259 例
年齢	42 ± 17 歳
性（男 / 女 / 不明）	148 / 110 / 1
昏睡発現率	20.5%
HBVキャリア	12.0%
HCVキャリア	1.9%
基礎疾患	14.3%
内科的救命	82.5%
劇症化例の内科的救命率	21.6%
劇症化例の移植率	11.8%

2. PTの分布

図1に初めてPT80%以下を確認した時点でのPTの分布を示す。初めて確認した時点で既にPT40%以下に低下している例が全体の30%にも及んだ。昏睡発現例はPT20%台をピークとするほぼ正規分布を示したが、50から70%台で捉えられている例もあった。一方、昏睡非発現例は50-70%台に多く分布したが、昏睡発現例とほぼ同様の分布を示す群が見られた。

3. 昏睡発現例の昏睡発現時期

図2に昏睡発現例で、PT80%以下を確認した時点から昏睡発現までの日数を示した。PT検査後3日以内に昏睡発現するものが最も多く51%を占め、70%が10日以内に昏睡発現した。

図1. 初めてPT<80%を確認した時点のPTと昏睡発現との関連

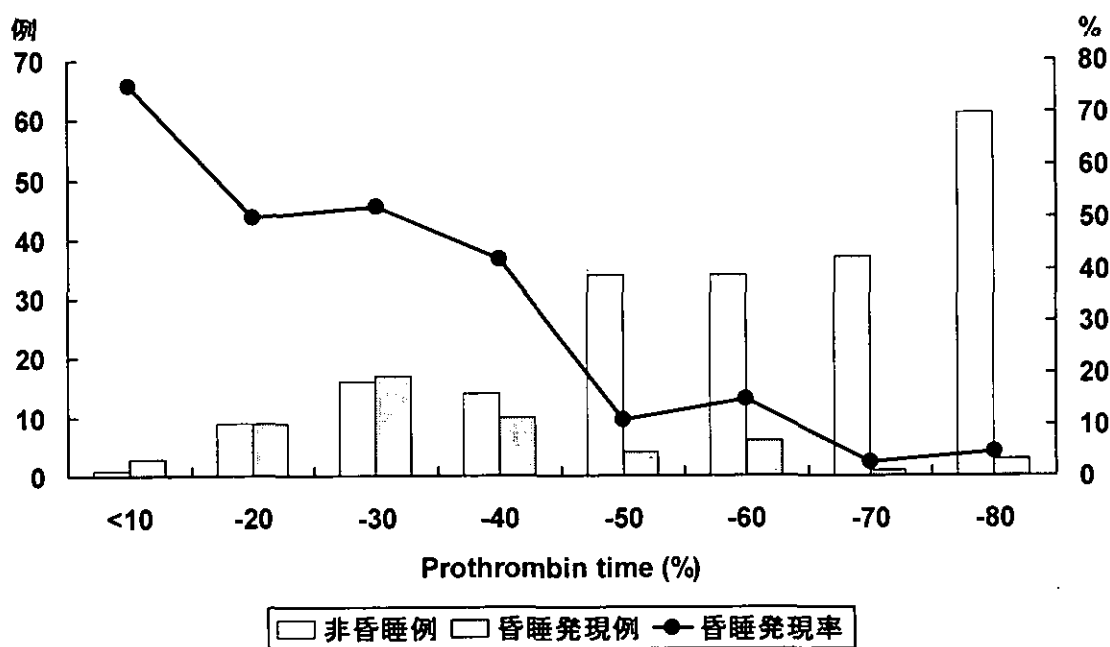
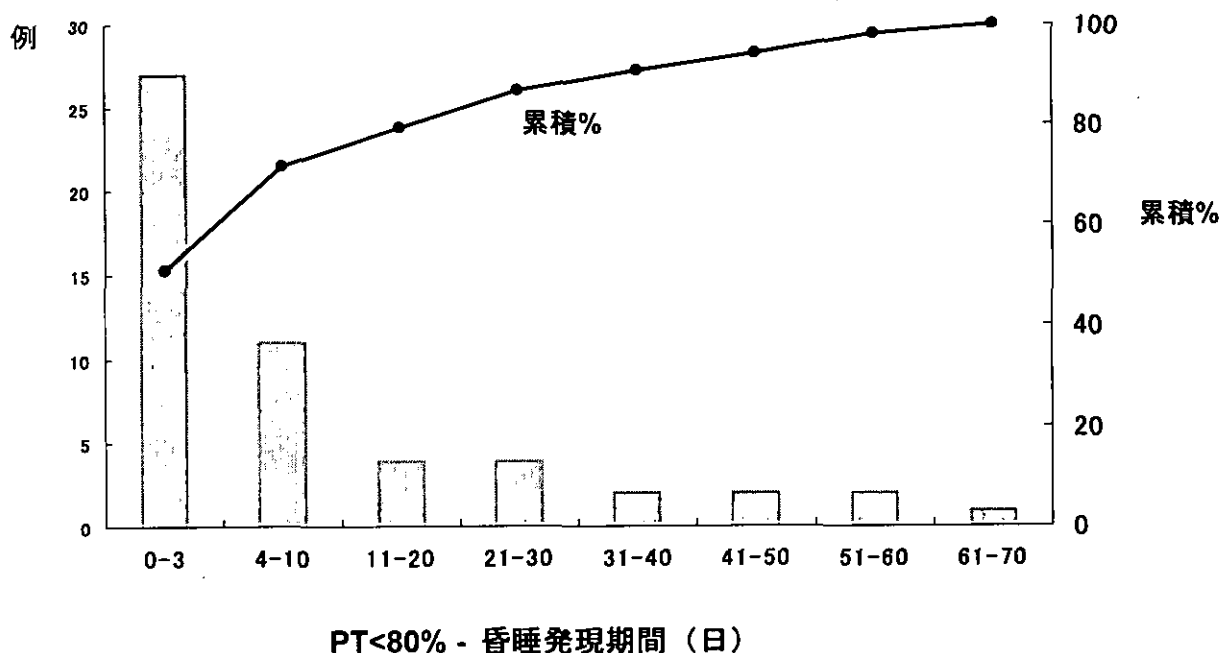


図2. 昏睡発現例のPT<80%から昏睡発現までの期間



4. 単変量解析

昏睡発現例と非発現例の単変量での比較を表2-5に示す。

5. 多重ロジスティック解析

単変量解析で200例以上の症例で有意差を認めた要因を用いて多重ロジスティック解析を行った(表6)。この予知式による判別結果のROC曲線解析を図3に示す。予測昏睡発現確率50%の点をcutoffとすると、高い特異度、accuracy、陽性結果の予測値 (PPV) が得られた。予測昏睡発現確率が事前確率と同じ20%の点

をcutoffとすると、比較的高い感度が得られ、一方、特異度、accuracy、PPV も比較的に保たれた。

与芝式 (3) による判別結果を同様に図4に示す。今回得られた新しい予知式に比し、有効性は明らかに低かった。

6. 発症、検査、昏睡発現の時間的關係

昏睡発現例について発症から検査 (PT<80%) までの日数とPT値との關係を図5に示す。発症から10-20日以内に検査された症例でPTが50-70%台を保っている例が7例あり、これらは昏睡非発現と誤判定されてい

る。同じく昏睡発現例で検査から昏睡発現までの期間とPTとの関連を見ると(図6)、昏睡発現前10日以内でもPTが50-70%台を保っているものが数例認められ、やはり昏睡非発現と誤判定された。

全症例について、発症から検査までの日数とPTの

値の関連を見ると(図7)、先に述べたように発症から間もない症例で、かつPTが比較的保たれている症例は昏睡発現のない急性肝炎とほぼ同じ位置に分布しており、この両者の重なりが判別を困難にしていると考えられた。

表2. 昏睡発現に関与する因子：患者背景

	非昏睡発現 (206)	昏睡発現 (53)	P
年齢	40 ± 17	49 ± 18	0.001
性 (男性の率)	58%	57%	n. s.
基礎疾患	11%	26%	0.007
HBV carrier	9.8%	21%	0.03
HCV carrier	2.4%	0%	n. s.

表3. 昏睡発現に関与する因子：成因

成因	例数	昏睡発現率 例 (%)
HAV	49	2 (4.1)
HBV 急性発症	67	12 (17.9)
HBV キャリア再燃	23	9 (39.1)
HCV	7	1 (14.3)
HEV	2	0 (0)
他のウイルス	4	1 (25.0)
薬剤性	19	2 (10.5)
自己免疫性肝炎 (含む疑診)	13	4 (30.7)
成因不明	75	22 (29.3)
計	259	53 (20.5)

表4. 昏睡発現に関与する因子：症状、合併症

	有所見率	昏睡発現率	p
発熱	39.0	17.8	n. s.
食欲不振	59.1	24.2	n. s.
全身倦怠感	73.4	20.0	n. s.
悪心	38.6	21.0	n. s.
嘔吐	17.4	31.1	0.044
感染	5.9	46.7	0.017
腎不全	3.5	66.7	0.003
消化管出血	1.5	75.0	0.028
DIC	4.2	36.4	n. s.
脳浮腫	0.4	100	n. s.
他の合併症	3.1	12.5	n. s.

図1. 初めてPT<80%を確認した時点のPTと昏睡発現との関連

検査項目	n	非昏睡	昏睡発現	p
発症-検査 (日)	259	11.0±12.1	15.6±14.8	n. s.
白血球 (/uL)	257	6800±9200	7600±4500	n. s.
血小板 (x10 ³ /uL)	258	175±85	136±73	0.03
T. Bilirubin (mg/dl)	259	7.3±6.4	12.7±8.5	<0.001
D / T 比	225	0.67±0.14	0.68±0.06	n. s.
AST (IU/L)	259	2340±2800	3300±5230	n. s.
ALT (IU/L)	259	2590±2130	2750±3010	n. s.
LDH (IU/L)	256	1840±2870	2910±7340	n. s.
GGTP (IU/L)	242	268±213	217±186	n. s.
ALP (IU/L)	245	490±320	480±280	n. s.
Cholinesterase (IU/L)	218	152±77	101±101	0.007
TBA (IU/L)	63	201±177	211±137	n. s.
T. Cholesterol (mg/dl)	219	137±45	121 ±39	0.035
HDL-C (mg/dl)	82	32±23	20±11	0.016
T. Protein (g/dl)	250	6.57±0.75	6.18±0.74	0.01
Albumin (g/dl)	246	3.68±0.55	3.27±0.63	<0.001
UN (mg/dl)	250	11.7±7.9	15.9±19.9	n. s.
CRNN (mg/dl)	245	0.82±0.61	1.29±1.75	n. s.
NH3 (ug/dl)	177	60.7±32.1	88.2±46.1	0.001
Prothrombin time (%)	259	56±18	33±18	<0.001
INR	179	1.79±1.28	2.95±1.94	0.001
HPT (%)	152	43±19	24±12	<0.001

表6. 多重ロジステック解析

選択変数	回帰係数	有意確率	オッズ比
ln(1+TB)	0.692	0.016	1.997
PT	-0.065	0.000	0.937
年齢	1.388	0.001	4.009
成因	0.868	0.031	2.382
定数	-1.156		

TB: 血清総ビリルビン (mg/dl)、 PT: prothrombin time (%)

年齢: 0: 50歳以下、1: 51歳以上

成因: 0: HAV, HCV, HEV, acute HBV, 他のウイルス, 薬剤

1: HBV carrier, 自己免疫性肝炎、成因不明

図3. 新予知式による2つのcutoffの比較

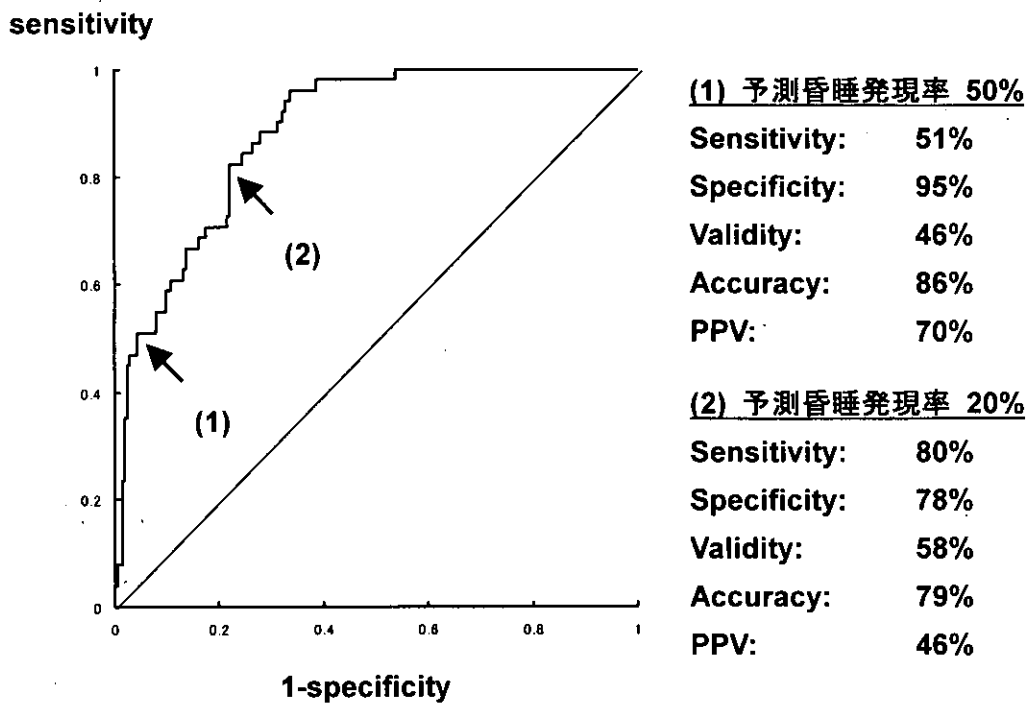


図4. 予芝式による判別結果

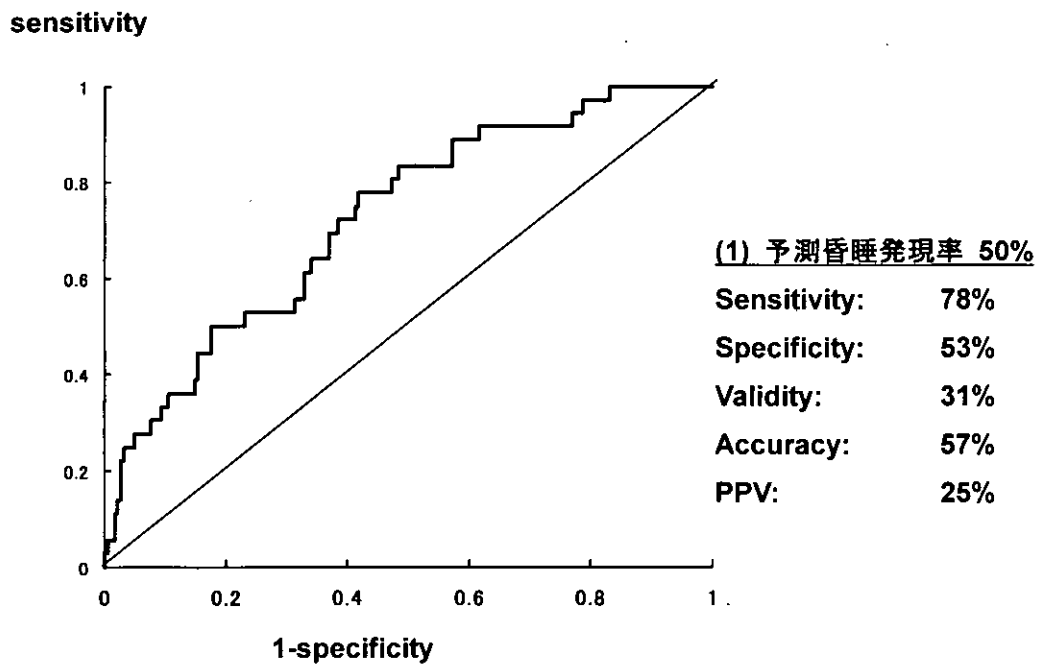


図5. 昏睡発現例の発症から検査 (<PT80%) までの期間と

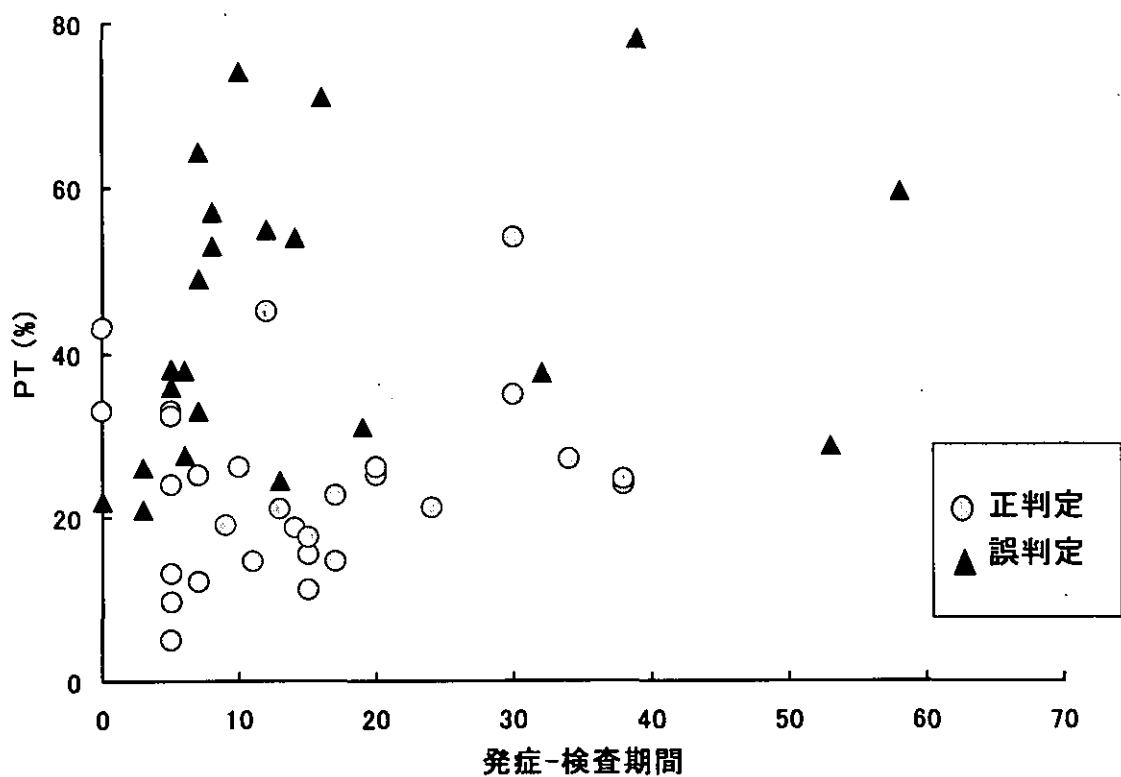


図6. 昏睡発現例のPT80%からの昏睡発現までの期間と

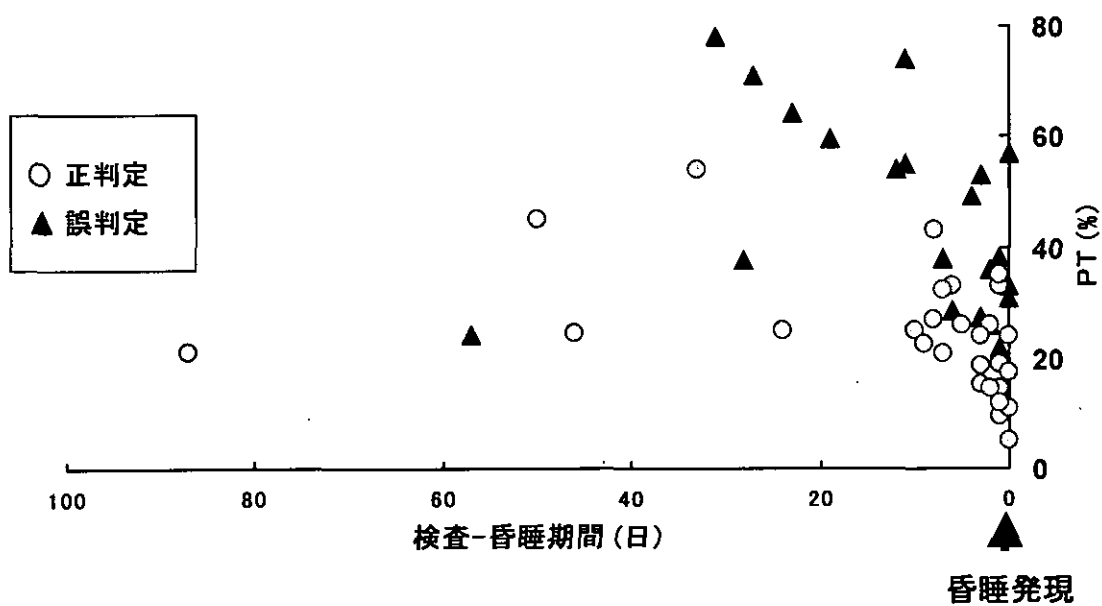
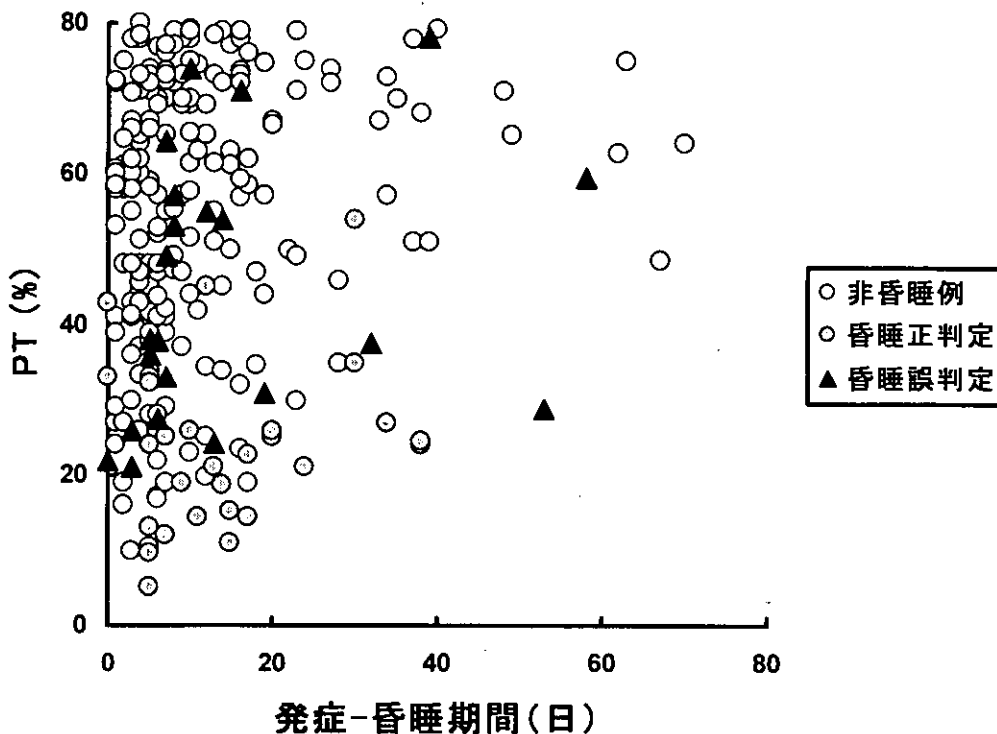


図7. 全症例の発症から検査 (<PT80%) までの期間と



D. 考察

1. 劇症化予知判定時期

急性肝炎の劇症化予知の対象および時期は、理想的には急性肝炎の全症例を対象として、診断と同時に進むべきである。予知の対象や時期を限定するのは、急性肝炎の劇症化率(事前確率)が2%と低率なため、全例を対象にすると予知の効率が上がらない事による。そのため、対象の絞り込みを行い事前確率を上げておくことが、予知ことにPPVの向上に重要である。この際、劇症肝炎のような生死に関わる疾患においては、劇症化例を落とすことなく絞り込む必要がある。

急性肝炎における対象の絞り込みにはPTが優れていること言うまでもなく、その時期としてPTが80%を下回った時点が妥当であることは、自験例による検討で昨年既に報告している(2)。今回の全国調査の結果でも、PTが50-70%台で捉えられているにも関わらず数日以内に昏睡を発現している例があることから、予知の対象と時期はPT 80%が妥当であると考えられた。PT 76%で捉えながら数日後に劇症化して死亡した1症例を根拠に、早期予知法の確立を主張する報告(4)があることから、成否はともかくとして研究班としてはPT80%の時期での予知法の開発を目指すべきと考えられる。

2. 予知式とその活用、問題点

今回、多変量解析から得られた判別式では予測劇症化確率50%で高い特異度(95%)が得られたことから、劇症化率20%の集団ではPPV 70%を示し、治療開始基準としてはほぼ満足すべき値と思われた。しかし、一般病院から専門施設への搬送基準としては、感度が

51%と低いこと、偽陰性率(49%)が高いことから不適切と考えられた。そこで、予測劇症化確率20%の点をcutoffとして用いると、80%の感度が得られ、特異度も78%と比較的保たれたことから、搬送基準としては、ほぼ満足すべき値と思われた。この場合、PPVは46%と低下するが、搬送された症例のうち約半数が劇症化することになる。

与芝らはPT 40%以下を示した症例を対象に自ら作成した劇症化予知式がPT 40%以上の症例にも有効であることを少数例ながら主張している(4)ことから、今回の全国調査症例でその検証を行ったが、有効性は認められなかった。

予測時期の項で述べた、PT 50-70%台で捉えられながら数日で昏睡を発現した7例は、今回の判別式では予測劇症化確率20%のcutoffを用いても、結局、正しく劇症化を予知できなかった。その原因は、図7に示した如く昏睡非発現例との重なりが極めて強いためと考えられ、現在用いられている指標では判別に限界があると考えられる。今後は、これらの症例を如何に正確にpickupするかが大きな課題であり、そのためには従来の指標とは異なる新たな指標の開発が重要と考えられた。

E. 結論

1. 急性肝炎の劇症化を早期に予測する時期としてPT 80%の時点が妥当であることを再確認した。
2. PTが80%を下回った急性肝炎の20%が劇症化した。
3. 多変量解析により、年齢、血清総ビリルビン、PT、成因(HBV carrierの再燃、自己免疫性肝

炎、成因不明)の4つが有意の説明変数として選択され、予測劇症化確率20%の段階を専門施設への搬送基準、50%の段階を治療開始基準の目安とすることが可能と考えられた。

4. より精度の高い予知基準のためには、新たな指標の開発が必要と考えられた。

F. 謝辞

この調査に多くの貴重な症例をご提供下さった施設および先生方に心から感謝申し上げます。

F. 参考文献

- 1) 鈴木一幸、他：急性肝炎重症型の劇症化予知に関するprospective study. 厚生労働省 特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班 平成13年度研究報告書. P104-109,2002.
- 2) 鈴木一幸、他：急性肝炎の劇症化予知に関する研究. 厚生労働省 特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班 平成14年度研究報告書. P85-89,2003.
- 3) 関山和彦、他：劇症化の予知. 肝臓 1999; 40: 168-170.
- 4) 与芝 真、他：厚生労働省 特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班 平成12年度研究報告書. P112-113,2001.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Biswas KK, Endo R, Suzuki K, Maruyama I, et al. Membrane Cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. Hepatology 2003;38:1167-1177.
- 2) 加藤章信、鈴木一幸、他：肝性脳症の機序と潜在性肝性脳症の診断 肝胆膵 2003;47:63-73.
- 3) 遠藤龍人、鈴木一幸、他：劇症肝炎の内科的治療 日本アフェレーシス学会誌2003;22:151-159.
- 4) 岩井正勝、鈴木一幸、他：肝不全の輸液療法と栄養補給 臨床と研究 2003;80:1006-1012.
- 5) 滝川康裕、鈴木一幸、他：劇症肝炎の動向 臨床医 2003;29:566-569.
- 6) 滝川康裕、他：胆汁酸によるアポトーシス誘導と細胞生存シグナル経路 肝胆膵 2003;46(1):27-34.
- 7) 滝川康裕、鈴木一幸：我が国における急性肝不全の現況とバイオ人工肝への期待 細胞 2003;35:459-462.
- 8) 滝川康裕、鈴木一幸：肝炎. 薬局 2003;54:947-954.

2. 学会発表

- 1) Takikawa, Y, Suzuki K, Abe, K: HEV infection in patients with acute or fulminant hepatitis in Iwate prefecture, Japan. The 24th Joint Meeting of the United States-Japan Hepatitis Panels. Jan, 2003, Tokyo.
- 2) Ushio A, Suzuki K, et al. Prostaglandin E2 agonist inhibits hepatocyte apoptosis by direct induction of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. DDW USA Meeting. May, 2003, Orlando, USA.
- 3) Miyamoto Y, Suzuki K, et al. Apoptotic hepatocytes accelerate blood coagulation. AASLD Liver Meeting. Oct., 2003, Boston, USA.
- 4) Takikawa Y, Suzuki K, et al. Serum anandamide level reflects severity of acute hepatitis. International Congress of Inflammation. Aug., 2003, Vancouver, Canada.
- 5) 滝川康裕、鈴木一幸、他：急性肝不全の成因と診断基準に関する検討 第89回日本消化器病学会総会 シンポジウム3「急性肝不全：概念と分類の見直し」2003年4月 さいたま市.
- 6) 遠藤龍人、鈴木一幸、他：急性肝不全治療法の評価：早期治療は劇症化阻止、予後を改善させるか？第7回日本肝臓学会大会 ワークショップ20 急性肝不全の治療戦略（移植を含む）2003年10月、大阪市.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

迅速簡便な肝細胞増殖因子 (HGF) 半定量測定キットの有用性

研究協力者 坪内 博仁 宮崎大学医学部第二内科 教授

研究要旨：ELISA法による血清の肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 測定は、劇症肝炎患者の早期診断や予後予測に極めて有用であり、現在すでに臨床応用されている。しかし、この測定は外注検査として行われることが多く、結果を得るには数日を要する。今回、イムノクロマト法を用いて、迅速で簡便なHGF半定量測定キットを開発し、その有用性を検討した。対象は劇症肝炎を含む急性肝炎患者と慢性肝炎の急性増悪患者で、経時的に測定した検体も含めて77検体である。HGF半定量測定は標準HGF濃度液の反応の濃淡をもとに、それらの濃度もしくは中間の値として10段階で評価した。HGF半定量測定は100 μ lの血清を用いて、20分で簡便に測定でき、しかも判定は容易でHGF濃度を半定量することができた。また、このキットを用いたHGF濃度の半定量測定結果はELISA法によるHGF濃度と相関し、予後予測にも有用である可能性が示唆された。ベッドサイドでの測定は劇症肝炎の予知に極めて有用な検査法となることが期待できる。

A. 研究目的

わが国における劇症肝炎の患者数は年間約1,000人で、急性肝炎患者数の1~2%を占めると推定される。劇症肝炎はその致死率が50%を超える極めて予後不良の疾患であり、急性肝炎からの劇症化を速やかに予知し、専門施設での早期治療開始が極めて重要である。肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は我々が劇症肝炎患者血漿から単離・精製した肝再生因子で、劇症肝炎患者の早期診断や予後予測に極めて有用で、ELISAによる血清HGF測定法は現在すでに臨床応用されている。しかし、ほとんどの施設は血清HGF測定を外注検査として行っているため、その測定結果を得るには数日を要し、必ずしも劇症肝炎患者の早期診断や予後予測に貢献していない。今回、肝臓専門施設でなくとも測定が可能なイムノクロマト法による迅速で簡便なHGF半定量測定キットを開発し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

(1) HGF半定量測定キット：本測定キットはイムノクロマト法を用いて作製した。塗布した金コロイド標識抗HGFマウス抗体と血清中のHGFが反応して試験紙を浸透し、テストライン部位(T)で、この「金コロイド標識抗HGFマウス抗体+HGFの免疫複合体」が抗HGFマウス抗体とさらに反応して赤い反応線が出現する。HGF量と金コロイド標識抗HGFマウス抗体の量は比例し、反応線の濃淡がHGF量により変動する。コントロール部位(C)には抗マウス抗体が塗布されており、血清が十分浸透したことを確認出来る。(2) 測定方法：100 μ lの血清を試料穴に添加し、反応線の濃淡を20分後に判定した。標準HGF液として0ng/ml (I)、0.12(II)、0.51(III)、2.11(IV)、8.88(V)、34.5(VI)の6種類のHGF濃度を用意し、中間を含めて10段階に分け判定した。(3) 対象者：劇症肝炎、急性肝不全を呈した症例を含めて急性肝炎49例 (HAV 6例、

HBV19例、HCV3例、その他21例)と慢性肝炎急性増悪12例 (HBV7例、その他5例)で、経時的に測定したのもも含め77検体を測定した。

C. 研究結果

(1) HGF標準液では判定Ⅲで薄い赤い反応線が確認でき、HGF濃度依存的に反応線の赤色が濃くなった。(2) HGF半定量と実測HGF濃度 (平均値 \pm 標準偏差 (ng/ml)、N=測定数)：判定Ⅱ(N=1):0.4、Ⅱ~Ⅲ(N=1):1.13、Ⅲ(N=23):0.74 \pm 0.43、Ⅲ~Ⅳ(N=18):0.73 \pm 0.48、Ⅳ(N=17):1.52 \pm 0.64、Ⅳ~Ⅴ(N=9):2.95 \pm 1.51、Ⅴ(N=2)3.65 \pm 0.52、Ⅴ~Ⅵ(N=6):5.50 \pm 1.49でHGF半定量と実測HGF濃度は有意に相関した ($r=0.81$, $P<0.01$) が、ややHGF濃度を高く予想する傾向であった。(3) 劇症肝炎例と急性肝不全例はその他に比較して有意に半定量値が高く($P<0.01$)、死亡例は生存例より半定量値が有意に高かった($P<0.01$)。

D. 考案

劇症肝炎や急性肝不全だけでなく、急性肝炎をはじめとした各種肝疾患患者では血清HGFレベルが変動し、とくに劇症肝炎や急性肝不全でプロトロンビン時間などの重症度を反映する検査値が異常値を示すよりも早期に血清HGF値が上昇している症例も存在する。また、血清HGFの測定は急性肝炎の劇症化の予知に有用であり、とくに予後不良とされる劇症肝炎亜急性型における血漿交換療法等の特殊治療導入の時期決定の指標となり、本疾患の救命率向上に役立つ検査と考えられている。本研究ではイムノクロマト法を用いて、HGF濃度を大まかに推測できるHGF半定量測定キットを開発し、その有用性を検討した。今回作製した測定キットの判定は容易で、HGF濃度を大まかに判断でき、迅速簡便にHGF濃度を推測でき、劇症肝炎、急性肝不全の予後予測に有用である可能性が示唆

された。

E. 結論

我々が開発したHGF半定量測定キットは迅速簡便にHGF濃度を推測でき、ベッドサイドでの測定は劇症肝炎、急性肝不全の予知や予後予測に極めて有用な検査法となることが期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

・論文発表

なし

・学会発表

桑田剛 他. 迅速簡便なHGF半定量測定キットの作製とその有用性. 第82回日本消化器病学会九州支部例会. 平成15年11月21-22日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

劇症肝炎発症における肝細胞死とその制御機構

研究協力者 森脇 久隆 岐阜大学医学部臓器病態学講座消化器病態分野 教授

研究要旨：肝細胞アポトーシスにおける生と死の細胞内シグナル機構について研究を行った。TNF受容体は、肝細胞にアポトーシスのシグナルを伝えながら、同時に抗アポトーシスのシグナルを伝えるため、そのメカニズムには不明な点が多い。今回の研究で、TNFによる広範な肝細胞アポトーシスが惹起されるにはNF- κ BとPI3K/Aktの両生存シグナルが抑制されて初めて生じることが証明された。NF- κ Bの下流シグナルを検討した結果、NF- κ BはIL-8を誘導してアポトーシスを抑制していたが、一方では、IEX-1sを誘導してアポトーシスを増強していた。これら細胞内シグナル機構の詳細な理解は、劇症肝炎発症のメカニズムのならびに病態の理解ひいては治療に寄与すると思われる。

共同研究者

永木 正仁	岐阜大学医学部第一内科
大澤 陽介	岐阜大学医学部第一内科
芋瀬 基明	岐阜大学医学部第一内科

A. 研究目的

劇症肝炎は、広範かつ急激に生じる肝細胞死に基づいた、高度の肝細胞機能障害による、肝性昏睡をはじめとした肝不全症状を呈する、極めて予後不良な疾患である。この疾患に対する治療法として、肝性昏睡の改善を主たる目的とした人工肝補助療法、肝細胞壊死の進展抑制や肝再生促進を期待した種々の薬物療法が試みられている。しかし、いまだ単独で予後改善に寄与する治療法はない為、その生存率は極めて低く、また過去10年の間、改善がみられない。一方、通常の急性肝炎は、劇症肝炎とは病因が同じでありながらその予後は良好であり、両者間の相違は肝細胞死進展の程度と肝再生不全の有無によるが、そのメカニズムは不明である。

近年、細胞死の機構にアポトーシスの概念が導入され、Fasリガンドやtumor necrosis factor (TNF) といったサイトカインが、どのように細胞内で伝達されて細胞死を調節しているのかが明らかになりつつある。劇症肝炎の発症機構においてもアポトーシスの関与が注目され、これらサイトカインの重要性が報告されている。しかし、特にTNF受容体は細胞にアポトーシスのシグナルを伝えながら、同時に抗アポトーシスのシグナルを伝えるように、そのメカニズムには不明な点が多い。肝細胞アポトーシスにおけるアポトーシス感受性 (sensitization機構) 並びに肝細胞の生死を決定するメカニズムの分子機構を解明することで有効な治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

(in vitroでの検討)

ヒト高分化型肝癌由来であるHuh-7細胞、正常ヒト肝細胞由来のHc細胞を用いて、I κ B変異体遺伝子を組み込んだI κ Bアデノウイルスベクター (Ad5I κ B: NF- κ B活性の阻害)、LY (phosphatidylinositol 3-

kinase/Akt阻害剤)、DMS (N, N-dimethylsphingosine : sphingosine kinase 阻害剤) の共存、非共存下でTNF- α の肝細胞アポトーシス誘導効果を検討し、その際の細胞内シグナル伝達をゲルシフトアッセイ、RT-PCR、ノーザンブロット、ウェスタンブロットを用いて解析した。また、sphingosine 1-phosphate (S1P) 添加によるPI3K、Akt活性並びにアポトーシスに及ぼす影響を検討した。

Hc細胞にAd5I κ Bあるいはcontrol virusを感染後、TNF- α を添加し、誘導される各々の遺伝子発現をcDNAマイクロアレイ法を用いて検討した。発現に変化のあったIL-8およびIEX-1sについてノーザンブロット法を用いて変化を確認した。IEX-1s発現プラスミドをHc細胞に導入し、IEX-1s強制発現細胞株を樹立した。強制発現株において、TNF- α により誘導されるアポトーシス、PI3K/Akt活性をcontrol vector 導入細胞と比較検討した。

(in vivoでの検討)

BALB/c マウスにI κ Bアデノウイルスベクター、Wortmannin (Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt阻害剤)を各々単独、併用で投与し、主要な生存シグナルであるNF- κ B、Aktを抑制した状態でのTNF- α 投与による肝細胞障害、肝細胞アポトーシスを検討し、アポトーシス感受性に及ぼす生存シグナルの関与を検討した。

C. 研究結果

・肝細胞アポトーシスにおけるアポトーシス感受性機構の解明

(in vitroでの検討)

TNF- α 添加後のNF- κ Bの活性化は、Ad5I κ Bにより抑制された。Ad5I κ B感染細胞において、TNF- α によって20%のHc細胞にアポトーシスが誘導されたが、sphingosine kinaseの阻害剤であるDMSやPI3Kの阻害剤であるLY添加によりアポトーシス細胞の著明な増加(40-70%)が認められた。また、DMSやLYはTNF- α によるNF- κ Bの活性に影響しなかった。以上のことより、massiveな肝細胞アポトーシスが

TNF- α によって誘導されるには、NF- κ Bと同時にそれ以外の経路も抑制されることが必要であると考えられた。

TNF- α 添加によってsphingosine kinaseの活性化とそれに伴うS1Pの上昇およびPI3K/Aktの活性化が認められ、それらはDMSによって抑制された。また、S1Pの投与によりPI3K/Aktの活性化が認められ、肝細胞アポトーシスが抑制された。

以上のことより、TNF- α は肝細胞において、NF- κ B活性化のほかに、sphingosine kinase/S1Pを介したPI3K/Aktの活性化による生存シグナルを誘導することで、TNF- α 自身のアポトーシス誘導に対し抵抗性を示していると考えられた(図1)。

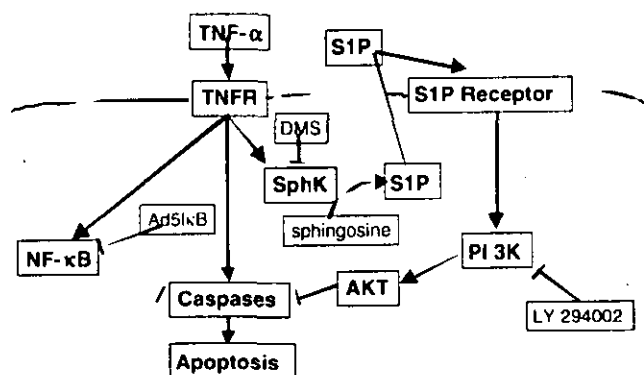


図1. TNF- α により誘導されるアポトーシス並びに生存シグナル

(in vivoでの検討)

TNF- α 単独投与では肝障害は全くみられなかったのに対し、Ad5I κ B並びにWortmanninとの併用で軽度の肝障害と肝細胞アポトーシスが誘導された。ところが一方、3者の併用では高度の肝障害と広範な肝細胞アポトーシスが惹起された。このことより、in vitroで認められたのと同様、in vivoにおいても広範なTNF- α により誘導される肝細胞アポトーシスは、NF- κ BとPI3K/Aktの両生存シグナルが抑制されて初めて生じることが証明された。

・転写因子NF- κ Bを介した抗アポトーシス機構の解明

TNF- α によって誘導されるNF- κ Bの下流の抗アポトーシス因子を検索する目的で、遺伝子発現をcDNAマイクロアレイ法を用いて検討した。TNF- α により2倍以上発現増加が認められ、Ad5I κ B感染により25%以上発現が減少した遺伝子は検索した1081遺伝子の1%(10)であった(表1)。

表1. TNF- α により誘導される遺伝子プロファイル

	Ad5LacZ+TNF vs. Ad5LacZ	Ad5I κ B+TNF vs. Ad5LacZ+TNF
interleukin-8	14.1	0.57
jagged2	10.0	0.58
eph-related receptor ligand1	5.0	0.65
B94 protein	3.2	0.26
procollagen 3 alpha 1 subunit	3.0	0.63
IEX-1	2.6	0.73
FLICE like inhibitory protein	2.4	0.64
EDG-4	2.1	0.75
HGF-like protein	2.0	0.36
Bcl2 and p53 binding protein	2.0	0.59

このうち、IL-8とアポトーシスとの関連が注目されているIEX-1sに着目し、その機能を検討した。IL-8はin vivo、in vitroにおいてTNF- α による肝細胞アポトーシスを抑制したが、IEX-1sは逆に促進した。

IEX-1s強制発現細胞株ではvector導入細胞に比し、Ad5I κ B+TNF- α によって誘導されるアポトーシスが増加し、PI3K/Aktの活性化およびその下流に存在するBcl-2ファミリーのMcl-1の発現は減弱した。また逆にPI3K/Aktの活性化はIEX-1sの発現を抑制した。IEX-1sについてはアポトーシスの増強および抑制の両者の報告が存在するが、今回の実験結果から、IEX-1sはNF- κ Bの下流に位置するにもかかわらずアポトーシス増強因子であることが示された。IEX-1sのアポトーシス増強のメカニズムとしては、PI3K/Aktの活性が抑制され、Mcl-1の発現が減弱するためと考えられた(図2)。

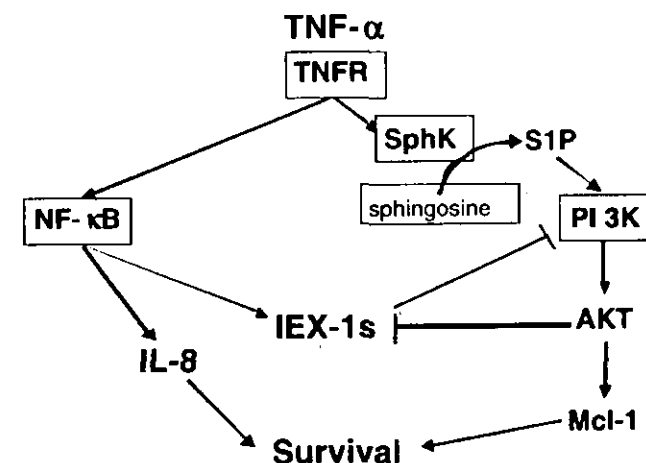


図2. TNF- α により誘導される生存シグナル伝達機構

D. 考察

ヒト肝細胞由来のcell line (Hc細胞、Huh-7細胞)を用いて、NF- κ BとPI3キナーゼの生存シグナルとTNFで誘導される肝細胞アポトーシスについて検討を行った。両細胞ともTNF単独では全くアポトーシスは誘導されなかったが、mutant I κ Bを発現するアデノウイルスベクター (Ad5I κ B) を感染させることでNF- κ Bを不活性化させるとTNF添加によりアポトーシスが

増加することを認めた。しかしその程度は軽度(高々20%の細胞にアポトーシスが誘導された)であった。しかしながら、PI3キナーゼの阻害剤であるLY294002を併用添加して、NF- κ BとPI3キナーゼ/Aktの両経路をブロックしておく、TNF添加によってアポトーシス細胞の著明な増加を認めた。また、Ozesらの報告と異なり、肝細胞ではNF- κ BとPI3キナーゼ/Aktの経路は各々独立して抗アポトーシス作用を発現していた。これらの事実はNF- κ BとPI3キナーゼの生存シグナルの一方を抑制すると肝細胞はTNFに対して感受性を示すようになるが、その効果は軽度であり、両生存シグナルが抑制された状態で初めてTNF誘導肝細胞アポトーシスが惹起されることを示している。また、LY294002の代わりにスフィンゴシンキナーゼの阻害剤であるDMSをAd51kBと併用添加すると、LY294002と同様に著明な肝細胞アポトーシスが誘導された。さらに、スフィンゴシンキナーゼを介してスフィンゴシンから生成されるスフィンゴシン1リン酸が、ヒト肝細胞にPI3キナーゼを活性化するとともに、TNFならびにFasリガンドにより惹起されるアポトーシスを抑制した。つまりTNFによってPI3キナーゼが活性化される経路において、スフィンゴシン1リン酸の重要性が示された。

NF- κ Bによって誘導される抗アポトーシス因子を同定するため、cDNAマイクロアレイ法を用いて遺伝子発現を検討した。NF- κ BはIL-8等の抗アポトーシス因子を誘導していたが、一方では、IEX-1s等のアポトーシス増強因子を誘導していた。さらにこれら死のシグナルと生存シグナルはクロストークしており、きわめて複雑な機構を形成していた。

E. 結論

肝細胞におけるTNF受容体を介した細胞死のシグナルはミトコンドリアを介しているため、死のシグナルと生存シグナルがクロストークしており、きわめて複雑な機構を形成していた。広範な肝細胞アポトーシスが惹起されるにはNF- κ BとPI3K/Aktの両生存シグナルが抑制されて初めて生じることが証明された。

NF- κ BはIL-8を誘導してアポトーシスを抑制していたが、一方では、IEX-1sを誘導してアポトーシスを増強していた。臨床的に肝細胞障害をコントロールするには、今後これらの下流シグナル機構のより詳細な理解が必要である。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nagaki M, Naiki T, Brenner DA, Osawa Y, Imose M, Hayashi H, Banno Y, Nakashima S, Moriwaki H. Tumor necrosis factor α prevents tumor necrosis factor receptor-mediated mouse hepatocyte apoptosis but not Fas-mediated apoptosis: role of NF- κ B. *Hepatology* 2000; 32: 1272-1279

Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Brenner DA, Naiki T, Nozawa Y, Nakashima S, Moriwaki H. TNF- α induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J Immunol* 2001;167:173-180

Yasuda S, Nagaki M, Moriwaki H. Staphylococcal enterotoxin B induces hepatic injury and lethal shock in endotoxin-resistant C3H/HeJ mice despite a deficient macrophage response. *J Endotoxin Res* 2002;8:253-261

Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Takahiko Asano, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. TNF- α -induced IL-8 production via NF- κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infect Immun* 2002;70:6294-6301

Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Expression of the NF- κ B target gene x-ray-inducible immediate early response factor-1 short enhances TNF- α -induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation. *J Immunol* 2003;170:4053-4060

Imose M, Nagaki M, Naiki T, Osawa Y, Brenner DA, Asano T, Hayashi H, Kato T, Moriwaki H. Inhibition of nuclear factor- κ B and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt is essential for massive hepatocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor α in mice. *Liver Int* 2003;23:386-396

2. 学会発表

54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2003年10月27日
Lefrnomide protects from T cell-mediated liver injury in mice.

Nagaki M, Imose M, Kimura K, Naiki T, Osawa Y, Suetsugu A, Asano T, Takai S, Hayashi H, Kato T, Moriwaki H

54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2003年10月27日
Expression of the NF- κ B target gene IEX-1S enhances TNF- α induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation.
Osawa Y, Nagaki M, Brenner DA, Moriwaki H

54th Annual Meeting of the American Association
for the Study of Liver Diseases 2003年10月27日
Inhibition of nuclear factor- κ B and
phosphatidylinositol 3-kinase/Akt is essential for
massive hepatocyte apoptosis induced by tumor
necrosis factor α in mice.

Imose M, Nagaki M, Naiki T, Osawa Y, Brenner
DA, Asano T, Hayashi H, Imao M, Takai S, Kimura
K, Kato T, Moriwaki H.

第39回日本肝臓学会総会 2003年5月22日

Con A 誘導マウス肝障害モデルにおけるleflunomide
投与の効果

芋瀬基明、永木正仁、木全崇之、今尾要浩、浅野貴
彦、大澤陽介、向井強、林秀樹、内木隆文、加藤則
廣、森脇久隆

G. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

肝不全時の肝外分泌蛋白の生成調節に関する研究

研究協力者 与芝 真 昭和大学藤が丘病院消化器内科 教授

研究要旨：これ迄劇症肝炎の診断においてはプロトロンビン時間（PT）が重要視されてきた。しかし、劇症肝炎亜急性型やLOHF症例ではPTよりアルブミンやコリンエステラーゼの低下が目立つ症例が存在する。この機序を知る目的で緩徐な急性肝不全モデルを作成し、肝でのアルブミンとフィブリノーゲンのmRNAの発現を比較したところ前者の発現が後者より大幅に減少する事が明らかとなった。生体の生命維持のため代謝調節を表現したものと考えられる。

共同研究者
井上和明、安田 宏

A. 研究目的

肝は自らを構造する構造蛋白の他に数々の外分泌蛋白を生成している。それらの外分泌蛋白は肝疾患の診断上重要な役割を果たしている。その中でも血中の半減期の短い第Ⅶ因子の活性やそれを含んで測定するヘパラスチン時間（HPT、第Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ因子の活性をまとめて測定する）や、プロトロンビン時間（PT、第Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ因子の活性をまとめて測定する）、rapid turnover proteinと言われるプレアルブミン、 α -HS-グリコプロテイン、レチノールバイディングプロテインなどの値は急性肝不全の診断に重用視されてきた。PT40%が我が国の劇症肝炎診断基準の骨子の1つになっていることは周知の事実である。一方相対的に半減期の長いアルブミンやコリンエステラーゼ（ChE）は肝硬変や慢性肝不全時の診断に重視されてきた。

確かに肝の全摘や瞬時に肝が破壊されるようないわゆる「超急性」劇症肝炎の際には全ての外分泌蛋白の生成が急激に停止するので、それらの血中値は半減期に従って低下していくことになる。然し我が国の診断基準による亜急性型劇症肝炎や英国で言うlate onset hepatic failure（LOHF、遅発性肝不全）のように緩徐に肝が破壊される病態では肝の外分泌蛋白の生成は直ちには停止せず徐々に減少していくことになる。肝硬変ではその速度は更に緩やかになる。

この場合は各蛋白の半減期のみならず生成もこれらの外分泌蛋白血中値に影響するはずである。

今回我々はこの点の確認のため「超急性」「急性」「亜急性」型の各劇症肝炎と慢性肝不全のラットモデルにおいて肝でのアルブミンとフィブリノーゲンとプロトロンビンのmRNAの発現の差を検討した。

B. 研究方法

ウイスター系ラット（体重200g）に以下の方法で肝不全モデルを作成した。

1) 超急性型劇症肝炎モデルはラット 6匹を用い四塩化炭素液0.06mlを脾内に注入することで作成し、同日夕刻に屠殺した。

2) 急性型劇症肝炎モデルはラット 5匹を用い四塩化炭素液0.4mlを6日間連日腹腔内に投与することで作成し、6日目に屠殺した。

3) 亜急性型劇症肝炎モデルはラット18匹を用いオリーブ油と混合した四塩化炭素 0.4mlを週3回3週間腹腔内投与することで作成し、3週間目の終わりに屠殺した。

4) 慢性肝不全モデルはラット20匹を用い、オリーブ油と混合した四塩化炭素0.6mlを週2回3ヶ月間皮下投与することで作成し、3ヶ月の終りに屠殺した。

各ラットから採取、採肝し、以下の実験を行った。血清については各種肝機能検査、プロトロンビン時間を測定した。肝組織からはpoly A カラムを用いた自動核酸抽出機（MaGNA, Roche Diagnostic S）によりRNAを抽出し、その一部からSuper Script IIを用いてcRNAを合成した。合成したcDNAをTaq Man Universal Mixtureを用いてreal time detection PCR（RTD PCR）を行い、各サンプルごとの目的遺伝子であるアルブミン、フィブリノーゲン（ α 、 β 、 γ ）プロトロンビンとhouse keeping遺伝子の発現量を比較して計算した。

C. 研究結果

正常ラットの肝機能の平均値はPT 44%、フィブリノーゲン 263mg/dl、アルブミン 2.4g/dl、GOT 111 U/l、GPT 40U/l、ChE 87U/l、T.Bil 0mg/dlであった。超急性型モデルではPT<10%、フィブリノーゲン<40mg/dl、アルブミン3.2g/dl、GOT 54013U/l、GPT 26000U/l、ChE 192U/l、T.Bil 1.2mg/dl、急性型モデルではPT 34%、フィブリノーゲン67mg/dl、アルブミン 1.8g/dl、GOT 346U/l、GPT 501U/l、ChE 56U/l、T.Bil 1.2mg/dl亜急性型モデルではPT 43.4%、フィブリノーゲン 243mg/dl、アルブミン2.2g/dl、GOT 1970U/l、GPT 1760U/l、ChE 83U/l、T.Bil 0.2mg/dl、慢性肝不全モデルではPT 13.9%、フィブリノーゲン 141mg/dl、アルブミン1.8g/dl、GOT 1119U/l、GPT 470U/l、ChE 75U/l、T.Bil 1mg/dlであった。

正常群のmRNA量を100とした場合各モデルの平均mRNA量は超急性モデルではアルブミン（以下Alb）mRNA 18、 α -fibrinogen（以下Fbn）mRNA 117、

β -Fbn mRNA 93, γ -Fbn mRNA 89, プロトロンピン (PT) mRNA 18, 急性モデルではAlb mRNA 7.6, α -Fbn mRNA 57, β -Fbn mRNA 41, γ -Fbn mRNA 46, PT mRNA 18, 亜急性モデルではAlb mRNA 11,

α -Fbn mRNA 69, β -Fbn mRNA 60, γ -Fbn mRNA 49, PT mRNA 19, 慢性肝不全モデルではAlb mRNA 16, α -Fbn mRNA 61, β -Fbn mRNA 42, γ -Fbn mRNA 30, PT mRNA 78であった(図1~4)。

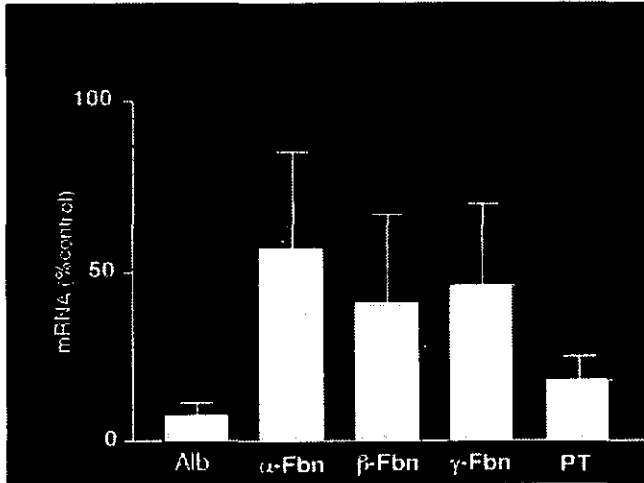


図1. 超急性型モデルラットでのmRNA発現量

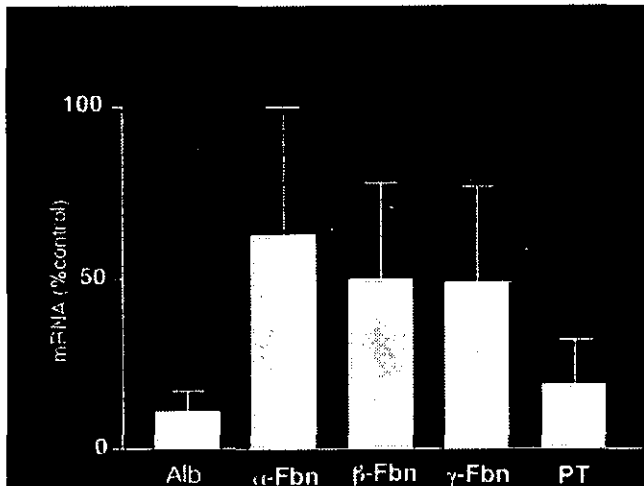


図2. 急性型モデルラットでのmRNA発現量

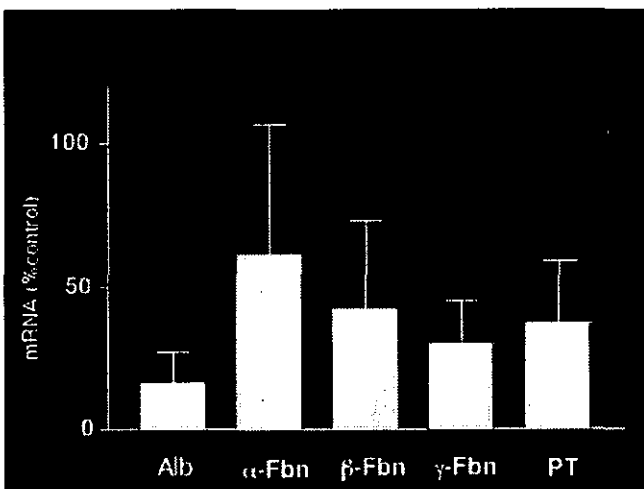


図3. 亜急性型モデルラットでのmRNA発現量

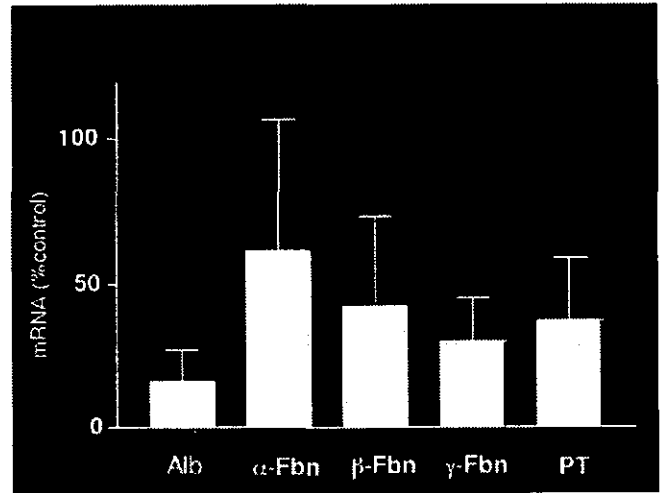


図4. 慢性肝不全型モデルラットでのmRNA発現量

D. 考察

昨年度は亜急性型劇症肝炎モデルでアルブミン mRNA と α 、 β 、 γ -フィブリノーゲンの mRNA を測定し、亜急性型モデルではフィブリノーゲンに比してアルブミン合成が大きく抑制されることを見出した。今年度は超急性型、急性型、亜急性型劇症肝炎ならびに慢性肝不全モデルの四モデルにおいてアルブミン、フィブリノーゲンおよびプロトロンビンの mRNA を測定した。アルブミン mRNA はいずれのモデルにおいても正常に比して大幅に低下しており、肝不全ではあらゆる病態でアルブミン合成は高度に抑制されることが明らかになった。フィブリノーゲンについては超亜急性型では PT 値や血中フィブリノーゲン値が著明低値にもかかわらずむしろ mRNA 量は正常より増加し、急性型モデルや亜急性型モデルより慢性肝不全型モデルで低下する傾向を認めた。またプロトロンピンはむしろ慢性肝不全では抑制が軽度となりフィブリノーゲンとは異なる生成調整を受けている可能性が示唆された。この点は今後他の凝固因子についても検討し、全体像を明らかにする予定である。

E. 結論

肝不全ではアルブミンの合成が高度抑制される。凝固因子の抑制はそれに比して軽度である。これは生体の生命維持に合致した調節によると考えられる。

研究発表

1. 論文発表

Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, Watanabe T, Yasuda H, Yoshida M. Combined interferon α 2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. J Gastroenterol 2003; 38: 567-672

井上和明, 山田雅哉, 井上紫津子, 大石祐希, 安田宏, 与芝 真. ラミブジン耐性慢性B型肝炎患者に対するアデフォビルの使用経験. 肝臓 第44巻 第8号 p428

Tanaka T, Inoue K, Abe A, Nuriya Y, Hayashi Y, Aoki Y, Kawaguchi R, Kubota K, Yoshiba M. Significance of Low Level Hepatitis B Virus Infection in Patients with Hepatitis C Liver Disease. J Med Virol (in press)

2. 学会発表

Inoue K, Sekiyama K, Yoshiba M. Administration of interferon- β divided into 2-6 times a day accelerates disappearance of serum hepatitis C virus RNA. Single Topic Conference on HCV. AASLD, Chicago, USA 2003.3

井上和明、与芝 真、小原道法. HCVは自然免疫系から逃避していかに持続感染するか. 第39回日本肝臓学会総会 福岡 2003年5月22~23日

井上和明、小原恭子、与芝 真、小原道法. C型肝炎ウイルスによる自然免疫系の阻害およびその機序の解析. 第62回日本癌学会総会 名古屋 2003年9月27日

小原道法、井上和明、小原恭子、柴崎 太、須藤正幸、与芝 真. シクロスポリンAによるC型肝炎ウイルス遺伝子複製の阻害およびその機序の解析. 日本ウイルス学会 第51回学術集会・総会. 京都 2003年10月27~29日

小原道法、井上和明、小原恭子、藤田尚志、与芝 真. C型肝炎ウイルスによるIRF-3活性化の阻害およびその機序. 日本ウイルス学会 第51回学術集会・総会. 京都 2003年10月 27~29日

井上和明、与芝 真. 劇症肝炎の予知と肝移植適応基準-内科側から-. 第30回日本小児栄養消化肝臓学会. 福岡 2003年11月8日

Yoshiba M, Inoue K, Watanabe T, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Cyclosporin A in the treatment of viral hepatitis. 1st Tokyo International Symposium on Hepatitis C Virus. Tokyo, Japan, 2003.12.1

Inoue K, Kohara K, Amako Y, Fujigata T, Yoshiba M, Kohara M. Impairment of the dimer formation of interferon regulatory factor -3 by hepatitis C virus core protein leads to evade interferon system. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Kyoto, Japan, 2003.12.2-6

Inoue K, Yoshiba M. IFN combined with CsA is more beneficial antiviral and chemopreventive treatment than other IFN-related treatments. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Kyoto, Japan, 2003.12.2-6

Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Yoshiba M, Sudoh M, Kohara M. Cyclosporin A is a potent and useful HCV replication inhibitor. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Kyoto, Japan, 2003.12.2-6

Inoue K, Oishi Y, Yoshiba M. Administration of divided interferon- β into 2-6 times a day accelerates disappearance of serum hepatitis C virus RNA. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Kyoto, Japan, 2003.12.2-6

小原道法、井上和明、小原恭子、藤田尚志、須藤正幸、与芝 真. C型肝炎ウイルスにおけるIRF-3活性化阻害機序の解析. 第26回分子生物学会年会. 神戸 2003年12月10~13日

井上和明、小原恭子、柴崎 太、須藤正幸、与芝 真、小原道法. シクロスポリンAによるC型肝炎ウイルス遺伝子複製阻害解析. 第26回分子生物学会年会. 神戸 2003年12月10~13日

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

CTLA4-Igを用いた急性肝不全治療とその免疫学的解析

研究協力者 渡辺 明治 富山医科薬科大学第三内科 教授

研究要旨：劇症肝炎に対する補助シグナルの抑制による治療効果を解析する目的で、*P. acnes*/LPS投与マウスに対しCTLA-4Igを発現する組換えアデノウイルス(AdCTLA4)の前投与を行い、その肝障害、生存率、血中サイトカイン濃度を調べたところ、AdCTLA4前投与群は肝障害が軽度で全てが生存し、LPS投与後の血中TNF- α /IFN- γ 上昇が著明に抑制されていた。機序としては、CTLA-4Igによる補助シグナルの抑制が肝リンパ節において抗原特異的CD4+T細胞の活性化と増殖を抑制することにより肝局所への活性化T細胞の集積を減少させ、それが同T細胞を含む浸潤単核球から産生されるIFN- γ やchemokineの肝局所での減少を引き起こし、結果として二次的なT細胞・マクロファージ・樹状細胞の集積を減少させて、LPSに対する反応性を低下させることにより肝障害を抑制したものと考えられた。これらの結果より、CTLA-4Igは劇症肝炎の治療に有効であり、また肝障害の病態における補助シグナルの役割を解析する上でも有用であると考えている。

共同研究者

清水 幸裕¹⁾、峯村 正美¹⁾、新敷 吉成²⁾、

平野 克治³⁾、中山 康弘³⁾、安村 敏⁴⁾

¹⁾富山医科薬科大学第三内科 講師

²⁾富山医科薬科大学第三内科 助手

³⁾富山医科薬科大学第三内科 大学院生

⁴⁾富山医科薬科大学輸血部 講師

A. 研究目的

肝臓の炎症反応のinitiationには樹状細胞などの抗原提示細胞からT細胞へのMHC-TCRを介する抗原提示と同時に補助刺激分子を介した補助シグナルが必須である。我々はCTLA-4Igを用いて急性肝障害マウスモデルに対する補助シグナルを抑制し、その肝局所および2次リンパ組織での免疫反応の変化を解析した。

B. 研究方法

P. acnes/LPS投与マウス急性肝不全モデルを用いて、補助シグナルを抑制するCTLA-4Igを発現する組換えアデノウイルス(AdCTLA4)やLacZ発現組換えアデノウイルス(AdLacZ)の前投与を行い、その肝障害や生存率および血中サイトカイン濃度を比較検討した。更に*P. acnes*投与7日後に肝臓・脾臓・肝リンパ節の単核球を分離し、細胞分画、表面形質、抗原特異的増殖能、サイトカイン分泌能を評価した。また、肝局所のサイトカインおよびケモカインのmRNAの発現をRT-PCR法で解析した。

C. 研究結果

P. acnes/LPS投与マウスおよびAdLacZ前投与群では24時間以内に殆どが死亡したのに対し、AdCTLA4前投与群はLPS投与後の血中TNF- α /IFN- γ 上昇が抑制され、肝障害が軽度で全て生存した(n=8)。LPS投与直前の肝組織の比較検討では、AdCTLA4投与群においてはAdCTLA4非投与群に比

し肝内での肉芽形成が著明に減少していた。分離した単核球の検討では、肝内浸潤単核球数は約1/10に減少しており、特にCD4+細胞の減少が著明であった(約1/40)。一方、脾臓・肝リンパ節の単核球は約1/2に減少し活性化マーカーであるCD44の発現も有意に低下していた。LPS投与前の血清IFN- γ はAdCTLA4非投与群と比較してAdCTLA4投与群で低値だったが、肝臓・脾臓より分離した単核球にLPSもしくは*P. acnes*を加えて24時間培養したところ、その培養上清中のIFN- γ 濃度もAdCTLA4投与群において低く、その主たる産生細胞はCD4+細胞であった。また、*P. acnes*による抗原特異的増殖能の検討では、肝臓由来単核球ではAdCTLA4非投与群・AdCTLA4投与群共に増殖反応は認めず、肝リンパ節細胞では、AdCTLA4非投与群では活発な増殖反応を認めたが、AdCTLA4投与群では有意に抑制されていた。またLPS投与前の肝臓内サイトカインおよびケモカインのmRNA発現の解析では、AdCTLA4投与群でMCP-1、RANTES、MIP-1 α のmRNAの発現が低下しており、それが肝内への単核球の集積を低下させる一因であると考えられた。

D. 考察

今回の結果から、CTLA-4Ig投与により以下のような現象が起こったと考えている。

まず、リンパ節においてDCが*P. acnes*由来のペプチドをCD4陽性ナイーブT細胞に抗原として提示する際の補助刺激をCTLA-4Igがブロックする。それによってリンパ節におけるCD4陽性T細胞の活性化・増殖が著明に抑制され、ごく一部のCD4陽性T細胞のみが活性化され肝臓へホーミングする。肝臓でのCD4陽性T細胞の減少は、肝局所でのIFN- γ 産生の低下を生じ、二次的なマクロファージやDCの活性化を抑制する。その結果、それらの細胞から分泌されるIL-12が減少し、更にCD4陽性T細胞のIFN- γ の分泌が減少す

ることになる。同時に活性化が低下し数が減少したCD4陽性T細胞やマクロファージなどの肝内単核球から分泌されるRANTES、MIP-1 α 、MCP-1などのケモカイン産生が肝局所で著明に低下し、更なる肝臓内浸潤単核球数の減少やgranuloma形成の抑制が生じる。このようにして肝障害発症のprimingが抑制され、LPS投与時には、IFN- γ 産生細胞の減少と共に、TNF- α を産生するマクロファージ数の減少と活性化の低下から、それらサイトカインの血中濃度が上がらず、肝障害が軽度となり、最終的に生存率の上昇を導いたと考えられる。

E. 結論

CTLA-4Igは、樹状細胞からCD4+細胞への活性化を抑制し、急性の重症肝障害マウスを救うことができるだけでなく、肝障害の病態形成における補助刺激分子を介したシグナルの役割を解析する上でも有用である。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

DDWJapan 2003 シンポジウム