

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

肝硬変における就寝前分岐鎖アミノ酸投与の長期効果

分担研究者 森脇久隆・岐阜大学医学部臓器病態学講座消化器病態学分野

研究要旨 肝硬変患者における就寝前分岐鎖アミノ酸の3ヶ月間の投与は血清アルブミン値を有意に改善し、患者の予後やQOLの改善につながる可能性が示唆された。

共同研究者 三輪佳行・岐阜大学医学部生体支援センター・助手
福島秀樹・岐阜大学医学部臓器病態学講座消化器病態学分野・大学院生

1. 研究目的

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、その程度が患者の予後やQOLに影響を及ぼす。近年、患者のエネルギー代謝異常に対し、就寝前エネルギー投与の有効性が報告されている。一方、分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acids: BCAA）は肝硬変患者における低アルブミン血症の治療に用いられ、患者の予後やQOLの改善につながる事が報告されている。しかし、BCAAが血清アルブミン値を改善するメカニズムはいまだ不明である上、肝硬変患者のなかにはBCAAの通常投与が無効な症例もみられる。我々は肝硬変患者においてBCAAを就寝前に投与し、Fischer比や窒素バランスが有意に改善することを既に報告した。そこで今回我々は就寝前BCAAを長期投与（3ヶ月間）することで血清アルブミン値や肝予備能などの改善につながるか否かにつき検討したので報告する。

2. 研究方法

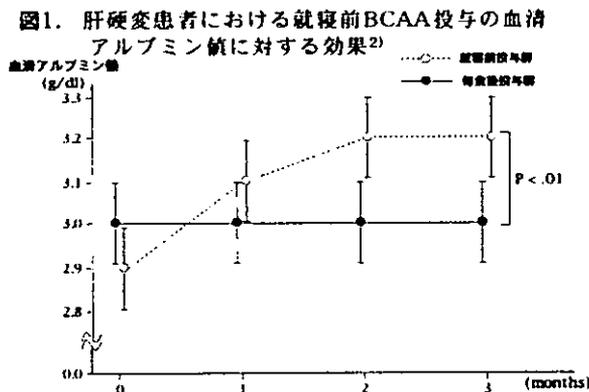
対象：過去6ヶ月以上、毎食後BCAA顆粒（リーバクト®:BCAA量4g/1包）1包投与しているにも関わらず、低アルブミン血症（血清アルブミン値<3.5g/dl）が改善し

ないC型肝硬変患者12例（平均年齢67±2歳、男性2名、女性10名、Child-Pugh分類A:6例、B:6例）。但し、腹水、食道静脈瘤（破裂のリスクのあるもの）、肝性脳症（Ⅱ度以上）、黄疸（T-Bil≥3.0mg/dl）、肝臓癌の合併例は除いた。なお、患者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。方法：対象者のうち6名はBCAA顆粒毎食後投与継続（毎食後投与群）とし、残り6名は朝食後BCAA顆粒1包、就寝前2包投与（就寝前投与群）とした。対象者は全例、外来通院中患者であり、研究開始後2週間に1回の外来通院とした。研究開始時、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後の早朝空腹時に血液検査にて血清アルブミン、総ビリルビン、プロトロンビン時間、アンモニアを測定し、その結果と臨床所見によりChild-Pugh scoreを算出した。また、同日に身体計測を行い、身長、体重、上腕周囲長（arm circumference: AC）、上腕三頭筋皮下脂肪厚（triceps skinfold thickness: TSF）を測定し、BMI（body mass index）ならびに上腕筋囲（arm muscle circumference: AMC）を算出した。対象者全員に対して研究開始前に管理栄養士により30kcal/kg/日のエネルギー量と1.3g/kg/日の蛋白質量の食事指導を行った。さらに研究期間中、

摂取量を維持できるように記録法にて食事摂取量調査を行い、外来受診時に適切な栄養指導を行った。

3. 研究結果

血清アルブミン値は就寝前投与群では前値 $2.9 \pm 0.1 \text{g/dl}$ 、1 ヶ月後 $3.1 \pm 0.1 \text{g/dl}$ 、2、3 ヶ月後 $3.2 \pm 0.1 \text{g/dl}$ と有意な改善をみた (図 1)。一方、毎食後投与群では前値、1~3 ヶ月の間で、 $3.0 \pm 0.1 \text{g/dl}$ と変化を認めなかった。両群間の変化は統計学上有意であった ($p < 0.01$)。その他の血液検査や身体計測値には両群とも変化はみられなかった。しかし、Child-Pugh 分類では就寝前投与群 6 例のうち 1 例で Child B から A へ改善した。一方、毎食後投与群 6 例のうち 1 例では 3 ヶ月後 Child A から B へ悪化した。Child-Pugh score でみると就寝前投与群では開始時 6.7 ± 0.3 点から 3 ヶ月後 6.2 ± 0.3 点と改善傾向にあるのに対し、毎食後投与群では開始時 6.7 ± 0.3 点から 3 ヶ月後 6.8 ± 0.3 点と悪化する傾向にあった。



D. 考察

肝硬変患者において BCAA は蛋白代謝の改善に有効で、その長期投与では血清アルブミン値、ひいては患者の予後や QOL の改善につながる事が報告されている。しかし、肝硬変患者のなかには通常の BCAA 毎食後投与では血清アルブミン値の改善を認めない症例がある。その理由として BCAA の毎食後投与では十分な Fischer 比の改善が得られず、アルブミン合成に働かない可能性がある。肝硬変患者における Fischer

比の日内変動をみていると健常者と比較して著しく低値であり、BCAA12g を毎食後分 3 で投与しても十分な上昇が得られず、アルブミン合成に適正とされる生理学的濃度 (Fischer 比 3-6) に達しない症例があることが教室の検討で明らかになっている。こういった患者に対し、BCAA を就寝前に投与すると夜間から午前中にかけて Fischer 比は高い値を維持し、Fischer 比と時間を乗じた 1 日の総和 (AUC: area under the curve)においても就寝前投与の方が毎食後投与より高値であった。このように就寝中の Fischer 比を生理学的濃度に引き上げたことが、血清アルブミン値の上昇につながったと示唆された。

BCAA の毎食後投与が Fischer 比の十分な上昇につながらない理由に BCAA のエネルギー源としての利用が考えられる。BCAA は肝硬変ではエネルギー基質として利用されやすく、そのため日中の投与は Fischer 比の上昇、ひいてはアルブミン合成につながらず、エネルギー源として利用されてしまう可能性がある。したがってエネルギー消費の少ない就寝前に BCAA を投与すると BCAA は血中に長く保持され、窒素バランスを改善し、ひいては血清アルブミン値の合成に関与した可能性がある。

Fischer 比ならびに窒素バランスの改善以外に血清アルブミン値が改善した理由として BCAA 投与のタイミングが重要であったと考える。蛋白同化ホルモンであるグルココルチコイドには日内リズムがあり、早朝に高値となる。また、ラットの肝細胞にはアルブミン合成に関与する転写因子の 1 つとして D-site binding protein (DBP) があり、これには日内変動があることが報告されている。DBP はグルココルチコイドにより down-regulate され、ラットの肝細胞では朝方認めず、夜 8 時頃最高値となる。また、DBP はアルブミン合成を down-regulate する。したがってアルブミン合成には日内リズムがあり、早朝に高い可能性が考えられる。就寝前 BCAA 投与は生体の日内リズムによりアルブミン合成能が高まっている早朝に Fischer 比を高くすることで、アルブミン合成を促進した可能性が示

唆された。

BCAAの問題点としてBCAA自体が窒素負荷となり、肝性脳症を惹起する可能性がある。今回の症例はすべてChild A～Bの比較的軽度の肝硬変患者であり、3ヶ月間の投与ではアンモニアの上昇や顕在性脳症は認めなかった。しかし、重度の肝硬変患者においてはBCAA 8gの投与が窒素負荷になる可能性があり、その適応については今後の検討が必要と考える。

E. 結論

肝硬変患者における就寝前分岐鎖アミノ酸の長期投与はFischer比ならびに窒素バランスの改善を介して血清アルブミン値の改善につながる事が明らかとなった。今後は就寝前エネルギー投与との長期併用にて肝硬変患者のPEMの指標である身体計測値や血清アルブミン値は改善するか否か、さらにはQOLや予後の改善につながるか否かにつき検討する予定である。

F. 健康危険情報

特に記載することなし

G. 研究発表

1) Fukushima H, Miwa H, Tomita E, Moriwaki H, et al. Nocturnal branched-chain amino acid administration improves protein metabolism in patients with liver cirrhosis: comparison with daytime administration The 8th Congress of Parenteral and Enteral Nutrition Society of Asia 2002年11月6日 高知

2) Fukushima H, Miwa Y, Ida E, Moriwaki H, et al: Nocturnal branched-chain amino acid administration improves protein metabolism in patients with liver cirrhosis: comparison with daytime administration. J Parenter Enteral Nutr. 2003; 27: 315-22.

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 15 年度分担研究報告書

食道静脈瘤の治療に関する研究

分担研究者 幕内博康 東海大学医学部外科

研究要旨

内視鏡治療の進歩により静脈瘤出血は著明に減少したが、末期肝硬変に対しても施行し得る至適内視鏡治療が望まれる。我々は ETP 法による内視鏡硬化療法(EIS)を開発し、再発再出血のない EIS を完成させた。内視鏡的静脈瘤結紮術(EVL)は手技の簡便性、有用性により急速に普及したが、治療後の再発率が高いことが問題となった。地固め法により EVL 後の再発率はかなり減少したといわれているが、詳細に検討した報告はほとんどなく、今後 EIS と EVL の無作為比較による検討が必要と考えられる。今回、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 EIS と EVL に割り付け、食道静脈瘤の血行動態を把握した後治療を待期的、予防的に行った。その後静脈瘤の完全消失を目指し地固め法により徹底的に治療を行い、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)、CT あるいは MRI からみた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する臨床研究を立案し実際に症例を登録、経過観察を行った。

A. 研究目的

食道静脈瘤に対する内視鏡治療として内視鏡的硬化療法(EIS)と内視鏡的静脈瘤結紮術(EVL)が各施設で行われている。EVL 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ため、EVL に続いて血管外に EIS を加える、いわゆる地固め法が標準的治療法として現在施行されている。これにより EVL 後の再発率はかなり減少したといわれているが、詳細に検討した報告は未だなく、無作為比較による臨床試験が必要と考えられる。今回出血の可能性が高い食道静脈瘤を有する肝癌合併、非合併の肝硬変患者を無作為に EIS と EVL 群に割り付け、食道静脈瘤の血行動態を把握した後 EIS あるいは EVL を待期的、予防的に行った。その後静脈瘤の完全消失を目指し地固め法により徹底的に治療を行い、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両群で経時的に検討した。

B. 研究方法

1. 対象

東海大学消化器センター（消化器外科、内科）において、出血の可能性が高い食道静脈瘤を有する肝癌合併、非合併の肝硬変患者で、以下の条件を満たす症例を対象とした。

(1)食道胃静脈瘤内視鏡所見記載基準（1991年）に従い、原則的に 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 がある症例とした。

(2)待期例、予防例を対象とし、緊急例で止血を行う必要がある症例は除外したが、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期例として扱った。

(3)背景となっている肝硬変の原因（B 型、C 型、アルコール性、自己免疫性など）および肝予備能の程度は問わず、したがって Child A、B、C いずれの症例も可とした。

(4)血小板数は原則として 5 万/ μ l 以上とした。3 万/ μ l 未満の症例、あるいは全身出血傾向を有する症例は除外したが、3 万-5 万/ μ l の症例では主治医の判断によって可

とした。

(5)原則として肝がん合併の有無は問わないが、門脈本幹に腫瘍塞栓を有する Vp3 症例は除外した。

(6)重篤な合併症のある症例、および主治医が不相当と判断した症例は除外した。

(7)治療前後での H2 ブロッカー、胃粘膜保護剤の投与は可とした。ただし、βブロッカーなどの門脈降下剤の併用を禁じた。

(8)年齢は原則として、20 歳以上、80 歳未満とした。

2. 方法

(1) 割り付け

本臨床研究を患者に説明し同意を得た後、封筒法により EIS か EVL を無作為に割り付けを行い、患者の登録を行った。

(2) 評価時期

評価時期を EIS あるいは EVL 治療前、3 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後とし、プライマリーエンドポイントを治療後 3 ヶ月、セカンダリーエンドポイントを 12 ヶ月とした。なお、治療 12 ヶ月後も観察を継続し、その後は 6 ヶ月毎に評価を行った。

(3) 治療の方法

上部内視鏡検査を食道静脈瘤の治療前、3、6、12 ヶ月後に施行した。内視鏡所見（食道静脈瘤の再発、IMVD の出現、胃静脈瘤の出現、PHG の所見）を経時的に観察した。IMVD を含む F1 以上の静脈瘤が出現した場合を再発とした。また、各群における内視鏡治療の回数を EIS と EVL で比較検討した。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、mild gastritis (Superficial reddening, Snake-skin appearance)、severe gastritis (Cherry red spots, Diffuse hemorrhage) およびその部位を記載した。

1) EIS

基本的な手技は我々が報告した ETP 法 (ethanol-polidocanol-thrombin 法) に準じて血管内注入を行った。すなわち、第 1 回目は原則的に硬化剤として 5 % ethanolamine oleate (EO)、1 %

aethoxysklerol (AS)、無水エタノールなどを用いて血管内注入を行い、やむを得ず血管外注入となった場合は AS による硬化療法を行った。静脈瘤の治療経過により同様に第 2 回目の EIS を行い、さらに追加治療が必要な場合は 3 回以上繰り返し、静脈瘤の完全消失を目指し徹底治療を行った。

2) EVL

第 1 回目は EVL キットを用い、EG junction かららせん状に 7-8 cm 口側まで、できるだけ密に静脈瘤を結紮した。追加の結紮が必要な場合は 2 回目に同様に EVL を行い、結紮が不可能となった場合は血管外に EIS を静脈瘤が消失するまで繰り返し行った。

(4) 門脈系の血行動態

治療前に magnetic resonance angiography (MRA) あるいは computed tomography (CT) により、左胃、短胃、後胃静脈などの静脈瘤の供血路を把握し、EIS あるいは EVL 後の血行動態の変化を検討した。MRA では造影剤を急速静注して広い範囲を一度に撮像できる dynamic MRA を行い、ほぼリアルタイムで撮像可能な balanced fast field echo (bFFE) 法を用いて内視鏡治療前後の供血路の血行動態を観察した。

背景となっている肝硬変の肝機能に及ぼす影響、すなわち末梢血、凝固系、一般肝機能検査、ICG、胆汁酸、アンモニアなどを治療前後に経時的に測定した。

(倫理面への配慮)

倫理的に特別な問題はないと考える。通常の食道胃静脈瘤の内視鏡治療と同等と考えられる。さらに治療を行う前に IC を行い文章で同意書を得る。

C. 研究結果

平成 15 年度の本臨床研究に登録された症例は 13 例であった。性別では EIS 群が男性 3 例、女性 4 例、EVL 群は男性 6 例、女性 0 例で、平均年齢はそれぞれ 62.4 ± 9.8 、 60.2 ± 3.9 歳であった。背景となっている肝硬変の原因は、EIS 群では B 型肝硬変 0 例、C 型肝硬変 7 例、アルコール性肝硬変 0 例で、EVL 群ではそれぞれ 1 例、3 例、

2 例であった。Child 分類により背景肝の重症度を検討すると、EIS 群で A 2 例、B 3 例、C 1 例と EVL 群の A 2 例、B 2 例、C 2 例と差異は認められなかった (表 1)。

表 1 登録症例の臨床背景

	EIS (n=7)	EVL (n=6)
性別 男	3	6
女	4	0
年齢 (歳)	62.4±9.8	60.2±3.9
肝硬変の原因		
B型	0	1
C型	7	3
アルコール	0	2
Child分類	A 2, B 3, C 1	A 2, B 2, C 2

登録症例の血液検査所見を EIS 群と EVL 群で比較すると、総ビリルビン値(T.Bil)がそれぞれ 1.6±0.9、1.7±0.7 mg/dl、プロトロンビン時間(PT%)が 67±12、66±13、血小板数(PLT)が 5.6±1.9 万、8.8±2.4 万といずれも両群に差はみられなかった (表 2)。

登録時の各症例における肝硬変の合併症に関しては、腹水の合併が EIS 群および EVL 群でそれぞれ 1 例、2 例、肝性脳症が 2 例、2 例、肝細胞癌の合併が 2 例、1 例で、両群に差異はなかった (表 2)。

表 2 登録症例の臨床検査値と合併症

	EIS (n=7)	EVL (n=6)
T.Bil (mg/dl)	1.6±0.9	1.7±0.7
PT (%)	67±12	66±13
PLT (×10 ⁴ /μl)	5.6±1.9	8.8±2.4
腹水	1	2
肝性脳症	2	2
肝癌合併	2	1

症例の登録後 1 年が経過していないので、6 ヶ月までの再発率、再出血率を検討した。再発率に関しては、内視鏡治療 3 ヶ月後では EIS 群、EVL 群とも 0 %であったが、6 ヶ月後 EIS 群で 1 例(14.3 %)、EVL 群 2 例(33.3 %)再発がみられた。再発症例はそ

の時点で、追加治療を行い続けて経過観察を行った (表 3)。いずれの治療においても食道静脈瘤からの出血は、治療後 6 ヶ月までの観察期間では 1 例も認められなかった。

表 3 食道静脈瘤治療後の累積再発率と出血率

	累積再発率		出血率	
	3ヶ月	6ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
EIS (n=7)	0 (0%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)
EVL (n=6)	0 (0%)	2 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)

本研究では、内視鏡治療前後の側副血行動態の変化を MRA あるいは造影 CT で検討した。ガドリニウムの急速静注による dynamic MRA で食道静脈瘤の供血路を観察すると、ほとんどの症例が左胃静脈から供血を受け、すだれ血管を経て食道静脈瘤に繋がっていた。左胃静脈から分岐する傍食道静脈も MRA で同定可能であった。また一部の症例では、短胃静脈を介する血行路もみられた。

食道静脈瘤への血管内注入による EIS 群では、主な供血路である左胃静脈が硬化され、MRA でみると明らかに左胃静脈からスダレ状血管を経由して食道静脈瘤に至る側副血行路が消失していた。一方 EVL 群では、食道静脈瘤の血流は消失していたが、左胃静脈の血流が一部残存していた。

D. 考察

我々は食道静脈瘤に対して ETP 法による内視鏡的硬化療法(EIS)を 1980 年頃より開始し、再発、再出血ない硬化療法を完成させた。さらに胃静脈瘤に対しても、積極的に cyanoacrylate を用いた硬化療法を行ってきた。一方、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。

本邦における食道静脈瘤に対する一般的な治療指針として、緊急例では手技が簡便な EVL がしばしば行われ、待期例、予防例では患者の状態によって EVL、EIS がほぼ同等に使い分けられている。一般に EVL は手技が簡便で、背景肝の肝機能の程度にかかわらず、血小板数が低下している症例にも安全に施行でき、VP3 の症例では EIS より EVL が推奨されている。一方、EIS は確実な治療効果が得られるが、主に Child A,B の肝機能が保たれている症例で施行されている。

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。一方、待期例、予防例では食道静脈瘤と連続する Lg-c では血管内に硬化剤を逆流させる EIS が施行され、Lg-c、Lg-cf などの孤立性胃静脈瘤では安全で、確実な治療効果が得られる B-RTO がしばしば行われる。

東海大学消化器センターは多数の内視鏡治療経験を持つ施設の1つで、最近5年間における食道静脈瘤に対する内視鏡的治療件数の年次推移をみると、年間平均約70例で本年度は78症例に施行された。この3年間での食道静脈瘤に対する内視鏡治療の内訳をみると、EISが48.4%、EVLと地固め法としてのEISあるいはAPCを施行した例が51.6%で、EISとEVLがほぼ同等に行われていた。この成績からも、当院が今回のEISとEVLの無作為臨床比較試験を行う上で実施に適した施設と考えられる。

今回の食道静脈瘤に対するEIS、EVLによる無作為比較試験では、患者の臨床背景としての肝硬変の重症度を示すChild分類、血液検査所見に差はなく、合併症としての腹水、肝性脳症、肝癌も同等の割合であった。ファーストエンドポイントである治療3ヶ月において、EIS、EVLのいずれの群でも食道静脈瘤の再発は認められなかったが、6ヶ月後EIS群で1例(14.3%)、EVL群で2例(33.3%)再発がみられた。再発例ではその時点で追加治療を行ったが、今

後セカンドエンドポイントである12ヶ月まで経過観察してゆかねばならない。治療後の食道静脈瘤からの出血例は、治療6ヶ月まで両群とも1例もみられていない。症例数がEIS群7例、EVL群6例と少ないため有意差検定はできなかったが、今後症例数を増やした後検討していきたい。

Helical CT, 多列(multidetector row) CTでは高速・高分解能化が著しく、コンピュータを用いたmultiplaner reformation(MPR)などの画像再構成法の進歩と相まって、造影剤の静注だけで血管造影とほぼ同等レベルの画像が得られるようになった。一方、放射線被曝がなく、少量の造影剤で施行しうるMRIは多くのメリットからその応用が急速に拡大している。近年MRAの進歩によって、門脈系、特に側副血行路の観察が可能となり、食道胃静脈瘤の供血路、排血路がMRAで同定できるようになった。MRAは現在種々の方法が開発されているが、今回用いたbalanced fast field echo(bFFE)法によるdynamic MRAではほぼリアルタイムに撮像可能で、血管造影同様に動脈相、門脈相、静脈相での観察が可能である。本研究では、食道静脈瘤のほとんどが左胃静脈を流入路としており、血管内注入によるEIS後左胃静脈の血流が減少していることがMRAで明らかにされた。今後門脈圧亢進にともない、新たな側副血行路が発達しないか経時的に観察していく必要がある。傍食道静脈がMRAで同定可能であるので、傍食道静脈存在例における内視鏡治療後の再発率、血行動態の変化も同時に検討していきたい。

E. 結論

今回末期肝硬変に対する治療法の一環として、食道静脈瘤に対する至適内視鏡治療を確立することを目的に、出血の可能性が高い食道静脈瘤を有する肝硬変患者対象としてEISとEVLの無作為試験を開始した。観察期間はまだ1年に達していないが、内視鏡治療後3ヶ月ではEIS、EVLのいずれの群でも食道静脈瘤の再発は認められなかった。6ヶ月後EIS群で1例(14.3%)、EVL群で2例(33.3%)再発がみられたが、出

血例は両群とも 1 例も認められなかった。
MRA による側副血行路の観察は食道静脈瘤
の血行動態を把握する上で、きわめて有用
な検査法であると考えられた。今後症例数
を増やし、エンドポイントである 1 年後の
成績を検討していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

長田成彦, 渡辺勲史, 幕内博康, 他: 肝
癌合併、非合併食道静脈瘤に対する EIS、
EVL の治療効果の比較. 第 10 回日本門脈
圧亢進症学会総会. 横浜. 9.11-12,2003

H. 知的所有権の取得状況

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15年度分担研究報告書

難治性腹水および特発性細菌性腹膜炎の病態と治療

福井 博 奈良県立医科大学

要旨：平成15年度に経験した特発性細菌性腹膜炎例を解析した結果、腹水中の好中球数測定に一般の自動血球測定器を用いることには限界があることが明らかとなった。また、腹水中の細菌培養の検出率を高めるためにカルチャーボトル法が有用であることが示唆された。

難治性腹水の治療に関して、国際腹水委員会（IAC）の利尿剤の投与基準が日本人には適応困難であることが明らかにされた。難治性を予測するためには腹水中の血管内皮増殖因子の測定が有用であることが示唆された。

共同研究者 山崎正晴、藤本正男、吉治仁志、植村正人

A. 研究目的

肝硬変患者にとって腹水はその日常生活動作（ADL）を著しく損なう合併症である。肝硬変腹水治療の基本は減塩食と利尿剤投与にあり、これらにより腹水初発例、軽症例では十分な効果が得られることが多いが、肝硬変の進行に伴い上記の治療のみでは腹水のコントロールが困難となってくることが知られている。中には、他の肝予備能の指標が比較的保たれているにもかかわらず、著明な腹水のみが目立つ症例も経験される。このような、いわゆる難治性腹水としてとらえられる症例に対して腹水大量排液、腹水濾過濃縮再静注、TIPS、腹腔-頸静脈シャントなどが試みられるが、これらの手法はコストや安全性の面でそれぞれに問題を有しており、どの時点で、どの治療法を選択すべきかが臨床家にとって大きな課題である。この課題を克服するためには、難治性腹水の定義を統一することと腹水難治化の機序を解明することが不可欠である。1996年、Arroyoら¹⁾はInternational Ascites Club（IAC）の提唱する難治性腹水の定義を発表し、その明確な分類は欧米での腹水研究の標準化に寄与している。しか

し、その定義に用いられている利尿剤の投与量は我が国で用いられる量に比して著しく多量であり、そのままでは我が国の腹水患者への適用は困難であると考えられる。そこで、本研究では我が国の肝硬変腹水例に適用できる難治性腹水の定義を策定する目的で、自験肝硬変腹水例において利尿剤の投与量とその反応性を解析した。

腹水の発症機序に関しては、underfilling説、overflow説、末梢動脈拡張説が提唱されているが、腹水難治化の機序については未だ十分解明されていない。難治化にかかわる可能性のある腹水中の因子を解析することは、病態の理解を深めるとともに、難治化の予測や治療につながる可能性があるが、今回我々は、その因子としてVEGF Familyに着目した。このうち、VEGFはその血管新生因子としての知見が近年集積されてきているが、同時に強力な血管透過性因子であることも知られており、癌性腹膜炎における腹水産生に関与することが報告されている^{2,3)}。一方、腹水産生には腹腔内リンパが深く関与するが、VEGF-CおよびVEGF-Dはそのレセプターである

VEGFR-3 を介してリンパ管形成を制御するとされている。これらの知見から VEGF が腹水難治化にかかわる可能性を考え、今回腹水中の VEGF Family を測定して病態との関連について検討した。

ところで肝硬変腹水患者の重大な合併症として特発性細菌性腹膜炎(SBP)が知られている。本症は経過が急速で致死率が高く、欧米での報告では肝硬変腹水例の 8~18% に出現するとされているが、本邦では肝硬変の罹患率に比して SBP の報告例が少ない。その理由として、1) 対象とする肝硬変患者の背景が欧米とは異なるため実際に SBP が少ないのか、2) 本邦において重症肝硬変では抗生剤が多用されるために本症の存在に気づきにくいのか、3) 診断努力が不足しているのか、等が考えられるが、現在までにこの問題に対する十分な検討はなされていない。そこで、平成 15 年度に当科にて経験した SBP 症例の臨床像を分析し、診断上の問題点について考察した。特に診断基準項目である腹水好中球数の計測に問題があることが示唆され、その計測法について検討を加えた。SBP の予後は早期診断・早期治療にかかっていると看做すのではなく、このためには、診断基準項目以外に迅速かつ特異性の高い診断マーカーが不可欠である。我々は ELISA 法により SBP 腹水中に高濃度に存在することが報告されている好中球エラスターゼに着目し、汎用の自動分析装置とラテックス凝集免疫比濁法の組み合わせにより本酵素の迅速な測定を試みた。

B 研究方法

1. 腹水の難治性分類の試みと利尿剤投与量

本邦の肝硬変症例に適合する難治性腹水の定義を策定するために、まず IAC の定義¹⁾を再検討した。この定義では、内科的治療により軽減できない、あるいは早期再発を防止できない中等量以上の腹水を難治性腹水としており、これをさらに利尿剤抵抗性(diuretic-resistant)腹水と利尿剤不耐性(diuretic-intractable)腹水に分類している。利尿剤抵抗性腹水は 1 週間以上の食塩摂取

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。しかし、本邦においてこれだけの高用量の利尿剤の連続投与は一般的ではない。そこで、通常なされている利尿剤の漸増法を基本として、相当量の利尿剤を用いた治療経過中に起こる利尿剤抵抗性もしくは不耐性の判定を、IAC の定義に準じて行い症例数を記録した。また、それらを分類しえた段階での利尿剤の最大使用量を調査した。対象としたのは、平成 9 年から平成 15 年までに当科に腹水治療の目的で入院した肝硬変患者のうち無作為に選択した、C 型肝硬変 14 名 21 例(複数回治療を含む)、B 型肝硬変 6 例、自己免疫性肝硬変 1 例、アルコール性肝硬変 1 例であり、このうち肝細胞癌の合併を C 型肝硬変例の 10 例、B 型肝硬変例の 2 例に認めたが、門脈腫瘍塞栓を合併した症例は含まれていない。

2. 腹水 VEGF Family の測定

平成 15 年度に当科病棟に入院した腹水患者のうち、本人の同意を文書にて得られた症例から腹水を血清分離用採血管に採取し、直ちに 4℃, 3000rpm, 15 分間遠心し、その上清を測定時まで -80℃ に保存した。これらの検体の VEGF, VEGF-C および VEGF-D 濃度を Human VEGF Immunoassay (R&D), Human VEGF-C 測定キット (IBL) および Human VEGF-D Immunoassay (R&D) を用いたサンドイッチ法 ELISA にて測定した。対象となった腹水検体の内訳は 1) VEGF 測定では、利尿剤抵抗性で、週 1~2 回の腹水大量排液を要する難治性腹水 2 症例 12 検体、門脈浸潤をともなう肝細胞癌合併 C 型肝硬変 2 症例 3 検体、原発性胆汁性肝硬変 1 検体、B 型肝硬変 1 検体、アルコール性肝硬変 1 検体、特発性門脈圧亢進症 1 検体、Budd-Chiari 症候群 1 症例 2 検体、2) VEGF-C および VEGF-D 測定では、難治性腹水 2 症例 18 検体、門脈浸潤をともなう肝細胞癌合併 C 型肝硬変 3 症例 4 検体、原発性胆汁性肝硬変 1 検体、B 型肝硬変 1 検体、アルコール性肝硬変 1 検体、特発性門脈圧亢

進症 1 検体、Budd-Chiari 症候群 1 症例 2 検体であった。また、平成 15 年度に当科で診断し得た SBP 4 症例の発症時と回復期の腹水検体についても同様の方法で VEGF、VEGF-C および VEGF-D を測定し、非 SBP 腹水と比較検討した。

3. 特発性細菌性腹膜炎(SBP)の診断上の問題点

平成 15 年度に当科において診断しえた SBP 症例の臨床像について検討し、SBP を診断する上で問題となる腹水中の細菌検出率の低さを改善するために、当科で経験した SBP 腹水検体の一部を通常の細菌培養法と Ortis ら⁴⁾が報告した BacT/ALERT システム (Organon Teknika) を用いたカルチャーボトル法での起菌検出能を比較検討した。次に、SBP の診断基準項目に着目し、SBP の本邦報告例 16 文献を検討したところ、その診断基準の柱となる腹水好中球数が明確に記載されているのは全体の 12.5%(2 文献)にすぎなかった(Fig.1)。腹水好中球数の正確な測定のために、当科ではヘモサイトメータを用いた有核細胞数の測定と塗抹標本での細胞分画を組み合わせで算出しているが(Fig.2)、その測定に自動血球計数装置を用いている報告も散見される。そこで、平成 15 年度に当科に入院した腹水患者の腹水検体 (SBP4 例、SBP 経過観察 5 例、原発性胆汁性肝硬変 1 例、Budd-Chiari 症候群 2 例、C 型肝硬変 17 例、計 29 例) の一部を直ちに EDTA 含有採血管に採取し、汎用の自動血球計数装置 (KX-21、シスメックス) を用いて測定した白血球数とヘモサイトメータを用いて得られた有核細胞数の比較検討を行った。

SBP と腹水中の好中球エラスターゼの関連を検討するために、平成 15 年度に当科で採取し血清分離用採血管で分離した腹水上清中の好中球エラスターゼ濃度を PMN Elastase/ α 1-PI Complex ELISA Kit (Oncogene) を用いて測定した。さらに、腹水上清検体 (SBP4 例、SBP 経過観察 5 例、Budd-Chiari 症候群 2 例、アルコール性肝硬変 1 例、原発性胆汁性肝硬変 1 例、難治性腹水の濾過濃縮後の腹水 2 例、C 型

肝硬変 10 例、計 25 例) を、好中球エラスターゼに対するモノクロナル抗体を用いた EIA 法 (エラスパック®、三和化学研究所) およびラテックス凝集免疫比濁法 (イノテック・エラスターゼ®、三和化学研究所) にて再度測定し、各測定値間の相関性を検討した。次にラテックス凝集免疫法を用いた腹水中エラスターゼ測定の正確性を評価するために、測定に用いた腹水上清 10 検体を用いて添加回収試験、同 2 検体を用いて検体希釈試験および 3 検体を用いて同時再現性試験を施行した。

C 研究結果

1. 腹水の難治性分類と利尿剤投与量

大量の利尿剤投与を先行させず、腹水の減少傾向を見ながら利尿剤を漸増する治療過程で、その反応性を IAC の基準に準じて評価すると(Fig.3)、全体の 34.5%(10 例)が難治性腹水とされ、27.6%(8 例)が利尿剤不耐性腹水、6.9%(2 例)が利尿剤抵抗性腹水に分類された。利尿剤抵抗性腹水の 2 例は腹水による自覚症状の改善のために週 2 回の腹水大量排液(LVP)を要したが、LVP 開始後は、それによる副作用をさけるため利尿剤は減量した。肝癌合併肝硬変症例 12 例について検討すると、41.7%(5 例)が難治性腹水に分類され、33.3%(4 例)が利尿剤不耐性腹水、8.4%(1 例)が利尿剤抵抗性腹水に分類された。この際、難治性腹水の比率は肝癌の合併の有無によって著明な相違を示さなかった。また、全症例における最大利尿剤投与量はフロセミド 100mg/スピロノラクトン 100mg の併用であった。

2. 腹水の難治性および SBP と腹水中 VEGF Family との関連

凍結保存した腹水上清を 4℃にて融解し、その原液中の VEGF、VEGF-C、VEGF-D を ELISA 法にて測定した。まず、SBP 症例を除いた検体を用いて難治性腹水と非難治性腹水とに分類し、それぞれの VEGF Family の濃度を比較すると、難治性腹水では非難治性腹水に比べ有意に VEGF が高値であった (Fig.4A) が、VEGF-C、VEGF-D 値は両群間で有意差を認めなかつ

た(Fig.4B,C)。一方で難治性腹水症例の経過において腹水 VEGF-C 濃度の漸減が認められた(Fig.5A,B)。さらに、SBP 症例における発症時と回復期での VEGF Family の推移と非 SBP 症例との比較を行った(Fig.6)。VEGF に関しては、SBP 発症時あるいは回復期に非難治性腹水例に比して高値を示す例を認めたが、総じて明らかな傾向はみられなかった。また、SBP の 1 例では SBP 発症時に腹水 VEGF-C の高値を認めたが、それ以外の症例において VEGF-C および VEGF-D と SBP の経過との間に明らかな関連は認められなかった。

3. SBP 症例の臨床像と起因菌同定のためのカルチャーボトル法の有用性

平成 15 年度に当科において診断しえた SBP 3 症例 4 エピソードの臨床像については、全例で 38℃以上の発熱を認めたが、腹痛・腹部圧痛・Blumberg サインなどは全く認めず、臨床所見から SBP と診断することの難しさが浮き彫りとなった(Table.1)。また、細菌培養検査については 2 症例で起因菌の同定はできなかったが、1 例で通常培養検査で検出されず BacT/ALERT システムを用いたカルチャーボトル法で起因菌を同定可能であった。

4. ヘモサイトメータを用いた腹水有核細胞数と自動血球計数装置を用いた白血球数との対比

SBP 症例を含めた計 29 検体の腹水を EDTA 含有採血管に採取し、同一検体についてヘモサイトメータを用いて算定した有核細胞数と汎用の自動血球計数装置を用いた白血球数とを比較すると(Fig.7)、両者には良好な相関が得られたが、SBP の診断基準で問題となる好中球数 250~500/ μ l に対応する有核細胞 1000/ μ l 以下の領域での対比では、ヘモサイトメータで求めた有核細胞数より自動血球計数装置を用いた白血球数が高値となる傾向があり、診断基準に合致するか否かの境界域にある場合、測定値の信頼性において自動血球計数装置の使用に問題が残ることが示された。

5. 腹水中の好中球エラスターゼと SBP

当科において採取した SBP 症例 4 検体と非 SBP 症例 15 検体 (C 型肝硬変 11 例、

Budd-Chiari 症候群 2 例、アルコール性肝硬変 1 例、原発性胆汁性肝硬変 1 例) の腹水上清中の好中球エラスターゼを ELISA 法にて測定すると、非 SBP 腹水に比し SBP 腹水で明らかな高値を示した(Fig.8A)。また、上記の腹水検体中の好中球数と好中球エラスターゼ値を比較すると、SBP 症例で両者の明らかな相関が認められた(Fig.8B)。次に、SBP 4 症例の発症前、発症時および回復期の腹水好中球エラスターゼ値の推移を ELISA 法にて検討すると、発症時に明らかに高値を示し、発症前および回復期には非 SBP 腹水と同程度の低値を示した(Fig.9)。

6. ラテックス凝集免疫比濁法を用いた腹水好中球エラスターゼ値の正確性評価

SBP 腹水中の好中球エラスターゼを迅速かつ簡便に測定するために、汎用の自動分析装置とラテックス凝集免疫比濁法を用いる測定を試み、その正確性を評価した。まず、同一検体を測定してラテックス凝集免疫比濁法の測定値を ELISA 法、モノクロナル抗体の測定値と比較したところ、どちらの測定値とも良好な相関性を認めた(Fig.10A,B)。また、ラテックス凝集免疫比濁法を用いた添加回収試験(Table.2)、検体希釈試験(Fig.11)、同時再現性試験(Table.3)においても、その回収率、検体希釈直線性、同時再現性は良好であり、同法による腹水検体の測定に問題はないと考えられた。

D. 考察

難治性腹水に対する包括的な治療戦略を確立するためには、新しい診断・治療の試みを客観的に評価できるように難治性腹水の定義を統一する必要がある。LAC が提唱した難治性腹水の定義は現在の腹水治療の基本である利尿剤に対する反応性を機軸としており、この点に関して異議は少ないものと考えられる。その判定に先だって強化利尿剤療法ともいべき大量の利尿剤投与が必須とされているが、本邦の肝硬変例では欧米の症例とは異なり、より少量の利尿剤投与により腎機能障害、肝性脳症、低 Na 血症が出現すること⁵⁾から、LAC の定義を本邦症例にそのまま適用するのは問題があ

ると考えられる。そこで今回我々は強化利尿剤療法を経ずに、従来の利尿剤を漸増する治療過程において IAC の利尿剤不耐性および抵抗性に関する定義を用いて難治性腹水を分類することを試みた。その結果、腹水症例のうち約約3分の2が最大量でフロセミド 80~100mg/スピロラクトン 50~100mg の併用投与に反応する腹水であり、残りの約3分の1が難治性腹水であった。難治性腹水のうち8割が利尿剤不耐性腹水であり、それらの症例で用いられた利尿剤の最大用量はフロセミド 100mg/スピロラクトン 100mg の併用であった。利尿剤抵抗性腹水の2例(6.9%)は腹水穿刺大量排液を要したため利尿剤の減量がなされた。これらの例は利尿剤不耐性を示さなかったが、臨床症状から利尿剤の増量による反応を待たずに腹水穿刺大量排液に踏み切っており、仮により大量の利尿剤が早期から投与されていたなら、それに反応したかもしれない、厳密な意味で利尿剤抵抗性と言い切れない可能性が残る。この点が一定量の利尿剤投与を先行させずに難治性腹水を分類する場合の問題といえる。利尿剤抵抗性腹水を定義するために漸増法による利尿剤の最大耐用量を求めるには様々なアプローチが考えられるが、本研究において利尿剤反応性および利尿剤不耐性腹水の最大利尿剤投与量がフロセミド 100mg/スピロラクトン 100mg の併用であったことから、この用量が本邦におけるそのひとつの目安になりうると考える。肝硬変腹水患者に対する利尿剤の漸増法は全身循環動態因子と腎性因子のホメオスタシスを維持しながら治療効果を得るため推奨されるが、利尿剤に対する反応が悪い例では最終的に利尿剤抵抗性を判定するまでに長期間を要する。このため、難治性腹水を治療前に予測できるか否かは重要な課題である。腎機能異常の程度が利尿剤に対する反応性を左右する重要な因子であることが指摘され、フロセミド 80 mg 1回静注後の尿中 Na 排泄量が難治性腹水の予測に有用であると報告されている⁶⁾が、それ以外の因子として腹膜の血管透過性や腹膜リンパの異常が腹水の難治性に関与している可能性があり、今回我々

は腹水中の VEGF Family に着目した。このうち VEGF は代表的な血管新生因子であり、特に腫瘍血管形成に関する研究が近年急速に進み、その知見が積み重ねられているが、同時に VEGF は強力な血管透過性因子としての性質をもつ。腹水と VEGF との関連は癌性腹膜炎腹水中で VEGF が高値を示すこと^{7, 8)}からもうかがわれるが、我々は実験的肝癌腹水モデルにおいて VEGF の抗体である KDR/Flk-1(VEGFR-2)が肝癌腹水生成に重要であることを報告している⁹⁾。一方、VEGF-C および VEGF-D はそのレセプターである VEGFR-3 を介してリンパ管形成を制御するとされており、VEGF-C のノックアウトマウスではリンパ管の欠損に伴う組織内への液体貯留が引き起こされ出生前に死亡することが知られている⁹⁾。腹水の産生と吸収に腹腔内のリンパ組織が深く関与することは明らかであるが、その組織形成に与るこれらの因子と腹水との関連については未だ報告がなされていない。そこで、当科で採取した腹水上清中の VEGF, VEGF-C および VEGF-D を ELISA 法で測定したところ、難治性腹水において VEGF が非難治性腹水に比べて有意に高値を示した。この結果は、VEGF が腹水の難治化に関与する可能性を示唆するとともに、難治化の指標として用いることを示している。近年、病的血管新生過程を阻害する目的で VEGF および VEGF レセプターの中和抗体、VEGF レセプターのチロシンキナーゼ阻害剤などが開発されており¹⁰⁾、これらを用いた難治性腹水の治療の可能性も考えられる。今回、腹水中の VEGF-C, VEGF-D 濃度は難治性腹水と非難治性腹水の間で有意差を認めなかったが、難治例 2 例の経過において腹水 VEGF-C が漸減傾向を示した。腹水 VEGF-C の機能については不明であるが、先に述べた背景から腹腔内リンパ組織の改変に関与している可能性が考えられ、難治性腹水が完成・固定化する過程に影響を与えているのかもしれない。ともあれ、腹腔内リンパ組織と難治性腹水との関連は検討されるべき重要な課題であると考えられる。一方、本研究においては SBP と腹水 VEGF

Family の濃度と間に一定の関係は見いだせなかったが、SBP 症例において腹腔マクロファージ由来の VEGF 産生の増加が報告されており¹¹⁾、本邦における SBP もしくは肝硬変症例の腹腔マクロファージの質的・量的解析を今後の課題としたい。

本研究において自験 SBP 例にみられた明らかな症状は発熱のみであった。本邦における SBP が欧米のそれに比して臨床症状に乏しいのか否かについては、より大規模な調査が必要であるが、元来 SBP における発熱、腹痛、腹部圧痛、Blumberg 徴候などの顕性症状の出現頻度は約半数にすぎないとされており、診断のためには穿刺液培養が重要である。ただし、通常培養法では起菌の同定率は 35% にすぎないと報告¹²⁾もあり、採取直後の腹水をカルチャーポトルに直接入れる方法で培養することが推奨されている。さらに血液培養法として一般に用いられている BacT/ALERT システム（自動比色細菌検出法）により短時間で高い検出率が得られるとの報告⁹⁾があるため、今回は SBP 全例について通常培養法と BacT/ALERT システムとの起菌検出の比較を行った結果、4 例中 1 例において通常培養陰性、BacT/ALERT システム陽性の所見が得られた。現在、腹水検体に対して BacT/ALERT システムを用いる細菌培養法は保険適応となっていないが、早期の適応追加が望まれる。

次に我々は SBP の診断基準にある腹水好中球数の測定について検討を加えた。本邦の SBP 報告文献において腹水好中球数を測定しているのは全体の 4 分の 1 に過ぎないが、これには末梢血用の自動血球計測装置を腹水検体に用いることの困難さが関係していると考えられる。すなわち、1) 腹水検体が血液に比して粘稠度が高かったり、フィブリンが析出したりして自動血球計測装置の回路に閉塞を起こすこと、2) 腹水中には血中には見られない中皮細胞などの大型の細胞が存在し、これらが回路の閉塞を引き起こしたり、細胞選別プログラムに組み込まれていないため正確に分類されないことが挙げられる。自動血球計測装置の中には上記の点を克服する機種も存在する

が、高価なため一般病院には普及していない。正確な腹水好中球数の算定のため当科では Fig.4 の方法を採用しているが、ヘモサイトメーターによる有核細胞数の算定と塗沫標本作製、細胞分画の判定との 2 段階に分けて行う必要があり煩雑である。そこで、腹水検体の有核細胞数の算定における汎用の自動血球計数装置の有用性について検討した。その結果、ヘモサイトメーターによる有核細胞数と自動血球計数装置による白血球数とは良好な相関性を示すものの、特に SBP の診断上問題となる 1000/ μ l 以下の領域では実際の有核細胞数より自動血球計数装置による白血球数が高値となる傾向があり、この値に塗沫標本から得られた好中球の比率を乗じて腹水好中球数とすると大きな誤差が生じると考えられる。さらに、今回腹水検体を測定した後に回路閉塞等のトラブルも経験し、腹水好中球数算定に汎用自動血球計数装置を適用するのは困難であるとの結論に達した。

SBP は診断後直ちに適切な抗生物質の投与が必要であることから、迅速な診断が要求される。我々はその要求に応えられる SBP の補助診断法を文献的に検索した結果、腹水中 TNF- α 、IL-6 の測定^{13,14)}に加えて、検尿に用いられる白血球エステラーゼ判定試験紙による診断法¹⁵⁾に注目した。そこで、まず SBP 4 例を含む凍結保存腹水上清 26 検体を同種の検尿用試験紙（ウロヘマコンピスティクス SG-L $\text{\textcircled{R}}$ 、バイエルメディカル）の「白血球反応」の部位に滴下して白血球エステラーゼの検出を試みたが、すべて陰性であった。次に白血球エステラーゼに比べ、より好中球に特異性の高い好中球エラスターゼに着目した。好中球エラスターゼは、体内に侵入した病原性微生物の感染部位に早期に遊走する好中球から放出される中性プロテアーゼで、異物や細菌の破壊、殺菌に直接働き、生体防御の中心的役割を担っている。一方で基質特異性が低いため、病原微生物の排除に伴い自己組織をも破壊し炎症反応を起こすことから生体における炎症マーカーとしても利用されている。Casafont ら¹⁶⁾は SBP 症例において ELISA 法を用いて α -1 proteinase

inhibitor(α -1PI)と結合した腹水中の好中球エラストラーゼが有意に高値であることを報告した。我々はまずこの ELISA 法にて SBP 腹水好中球数と好中球エラストラーゼ値の高い相関を確認し、さらに上記の結合型好中球エラストラーゼと α -1PI に結合していない遊離型好中球エラストラーゼとを総じて測定でき、かつ迅速に結果を得られるラテックス凝集免疫比濁法を用いた測定を試みた。このラテックス凝集免疫比濁法は子宮頸管粘液中の好中球エラストラーゼの測定に用いられ、膣炎・頸管炎から絨毛膜羊膜炎の早期診断に応用されている実績があり、一般病院の検査施設に設置されている汎用の自動分析装置を用いて約 10 分の反応コースで結果が得られる。今回の検討の結果、ELISA 法で得られた結果とラテックス凝集免疫比濁法のそれとは良好な相関が得られた。SBP 腹水において ELISA 法で得られた α -1PI/好中球エラストラーゼ結合体の重量を好中球エラストラーゼ単体の重量に換算して得られた値に比し、ラテックス凝集免疫比濁法で得られた測定値がより高値を示したが、その差異が両測定法の標準物質の違いに由来するのか SBP 腹水中の遊離型好中球エラストラーゼもしくは α -1PI の量的相違によるのかは不明であり、今後の検討課題としたい。さらに、添加回収試験、検体希釈試験および同時再現性試験によりラテックス凝集免疫比濁法による測定値の正確性についても確認した。羊水中好中球エラストラーゼの測定により臨床症状を認めない段階の潜在性絨毛膜羊膜炎を診断し得ること¹⁷⁾や、抗生剤治療によっても腹水好中球エラストラーゼが低下しない SBP 症例の予後が不良であること¹⁶⁾が報告されており、迅速かつ簡便な腹水好中球エラストラーゼの測定により SBP の病態解析が容易となり、潜在性 SBP の診断や SBP に罹患しやすい病態や患者の選別、SBP 発症後に肝腎機能が急速に悪化する症例の予測が可能になると考えられる。

E. 結論

1. IAC の難治性腹水の定義に定められている大量の利尿剤投与を先行させる方法を

本邦症例に対してそのまま適用することには問題があるが、その利尿剤に対する反応性を元にした分類は、利尿剤を漸増する治療過程においても原則的に応用できることが示された。ただし、腹水治療過程で早期に利尿剤を減量もしくは中止して腹水大量排液療法などに移る例もあり、利尿剤抵抗性と判断するために少なくとも本邦肝硬変腹水例における利尿剤耐用量の目安が必要である。当科における利尿剤漸増法での利尿剤反応性および不耐性腹水の分析において最大使用量として示されたフロセミド 100mg/スピロノラクトン 100mg の併用がその目安になると考えられた。

2. 難治性腹水における腹水 VEGF は非難治例に比して有意に高値を示した。この結果は VEGF を腹水難治化の指標として用いうる可能性を示唆し、さらに VEGF 阻害剤を用いた難治性腹水治療の可能性も視野に入るものと考えられた。

3. SBP 自験例の分析の結果、起因菌同定のためにはカルチャーボトル法を用いる自動比色細菌検出法が有用であることが示された。また、SBP の診断基準にある腹水好中球数の計測に関し自動血球計測装置の利用を検討したが、その信頼性には問題があり、従来の検鏡法による判定を凌駕しえないと結論された。

4. SBP 腹水における好中球エラストラーゼが非 SBP 腹水に比して有意に高値であることを確認し、さらにラテックス凝集免疫比濁法を用いた腹水好中球エラストラーゼ測定の正確性が示された。この測定法は汎用の自動分析装置との組み合わせにより短時間で結果が得られるため、SBP のより迅速な診断に寄与するだけでなく、潜在性 SBP の診断や SBP 発症後の予後判定にも応用し得る可能性があると考えられる。

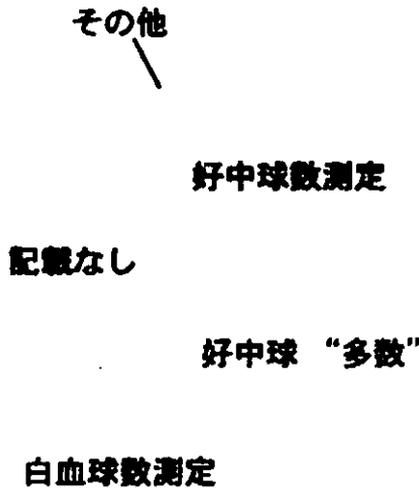


Fig.1 本邦における SBP 報告文献における腹水好中球に関する記述

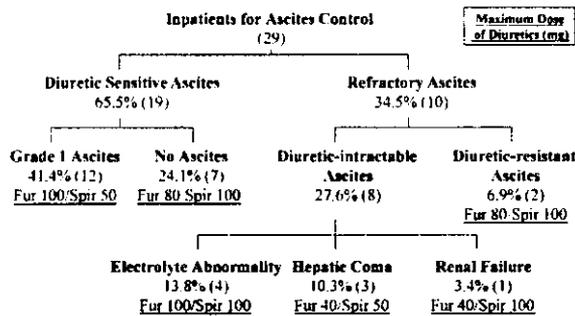


Fig.2 当科における腹水好中球数の算定法

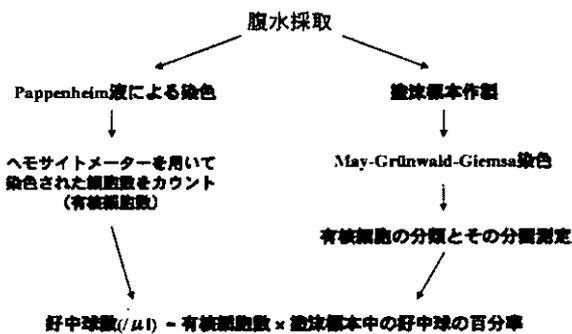


Fig.3 当科における腹水治療成績

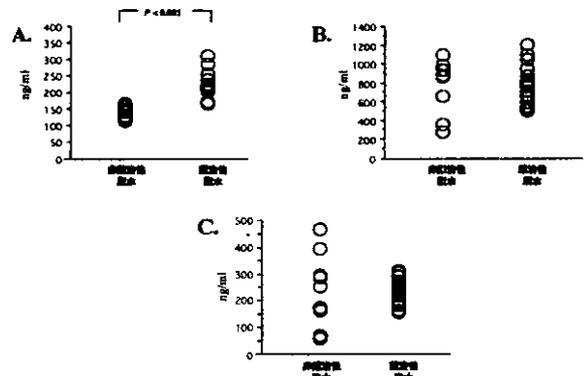


Fig.4 難治性および非難治性腹水中における VEGF (A), VEGF-C (B), VEGF-D (C) の対比

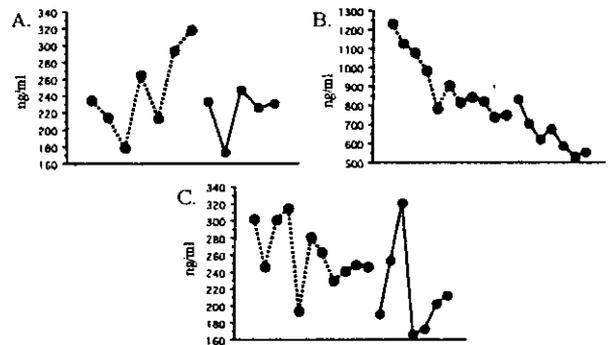
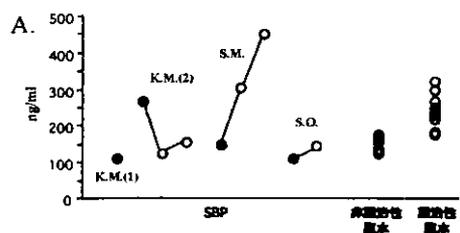


Fig.5 難治性腹水中における VEGF (A), VEGF-C (B), VEGF-D (C)の時間経過による推移



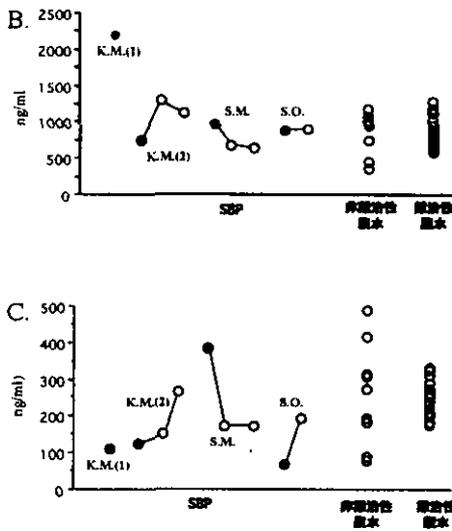


Fig.6 SBP 症例の発症時 (●) および回復期 (○) における腹水中 VEGF (A), VEGF-C (B), VEGF-D (C) の推移難治性腹水と非難治性腹水の対比

name	age	base	date	PMN (/μl)	PMN%	Protein (g/dl)	Alb(g/dl)
K.M.	81	HCV-LC,DM	3.26.03	7811	83.2	1.2	0.7
K.M.	81	HCV-LC,DM	5.13.03	4224	66	0.9	0.9
S.M.	64	HBV-LC,DM	8.20.03	342	88	0.9	0.4
S.O.	56	Alcoh-LC	12.2.03	1600	90	0.1	0.1

name	Fever	Pain	Tenderness	Blumberg	Conventional culture	BacT/ALERT
K.M.	+	-	-	-	K.Pneumoniae (72h)	n/a
K.M.	+	-	-	-	N.O.	N.O.
S.M.	+	-	-	-	N.O.	E.coli
S.O.	+	-	-	-	N.O.	N.O.

Table.1 当科における SBP 症例の臨床像と起因菌の同定結果
PMN: 好中球数、PMN%: 総有核細胞数に対する好中球数の割合 N.O.: 細菌増殖を認めず、n/a: 検査不施行

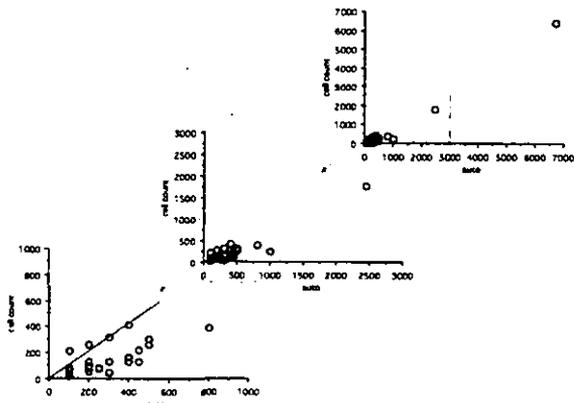


Fig.7 同一腹水検体におけるヘモサイトメーターを用いた有核細胞数と自動血球計数

装置を用いた白血球数の比較
cell count: 有核細胞数、auto: 白血球数

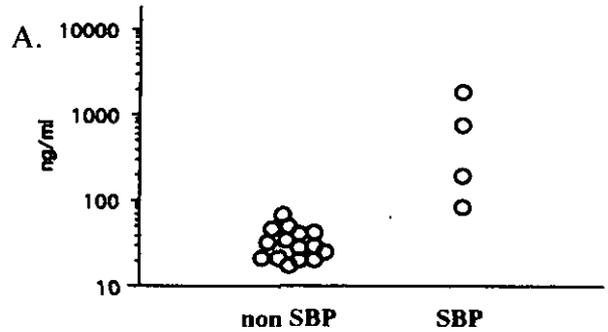


Fig.8 SBP 合併例(SBP)および非合併例(non SBP)の ELISA による腹水好中球エラスターゼの比較(A) および腹水好中球数と好中球エラスターゼの関係(B)

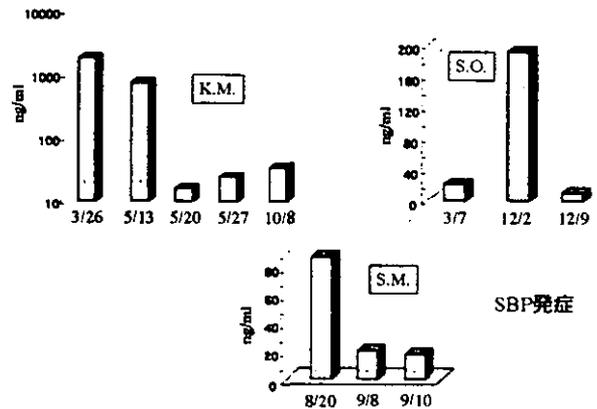


Fig.9 SBP の発症前後における腹水好中球エラスターゼの推移

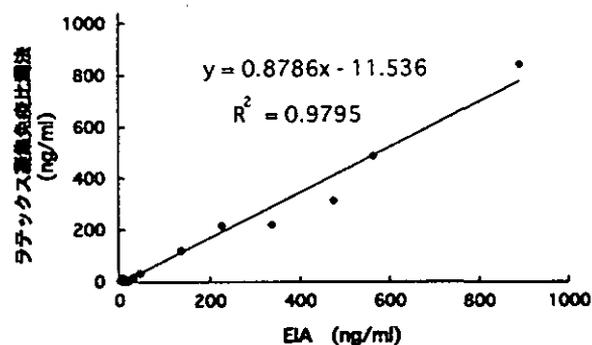
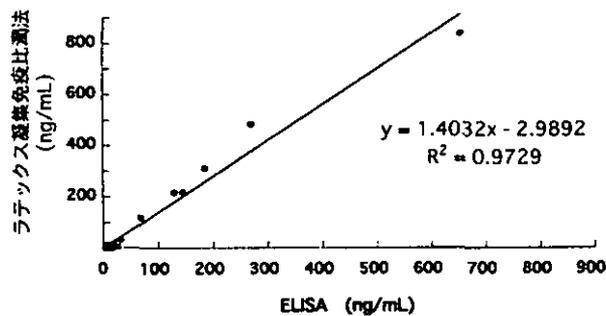


Fig.10 腹水検体を用いたラテックス凝集免疫比濁法と ELISA (A)および EIA (B) による好中球エラストラーゼ値の相関

Sample ID	原液希釈率 (ng/mL)			添加回収率 1			添加回収率 2		
	1原液	2原液	4原液	測定濃度 (ng/mL)	回収率 (%)	誤差 (%)	測定濃度 (ng/mL)	回収率 (%)	誤差 (%)
0274Q	0	0	0	480	451	101	958	990	103
0274R	15	0	0	480	496	102	958	975	101
0274S	0	0	0	480	510	104	958	975	101
0274T	0	0	0	480	509	104	958	975	101
0104E	0	3	1	480	510	104	958	975	101
0134E	0	3	1	480	489	101	958	985	102
0144E	15	3	1	480	523	107	958	989	102
0164E	35	35	35	480	533	104	958	1025	104
0174E	0	0	0	480	508	104	958	985	101
0274A	315	323	318	480	781	98	958	1270	94

Table.2. 腹水検体を用いたラテックス凝集免疫比濁法の添加回収試験

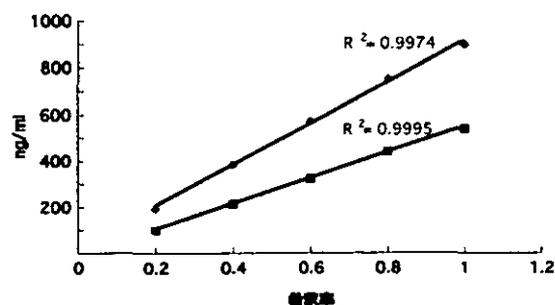


Fig.11. 腹水検体を用いたラテックス凝集免疫比濁法の検体希釈試験

検体	028ST	006KM	004KM
	230	560	905
	230	525	910
	235	550	905
	220	555	915
	220	540	910
	225	540	895
	230	560	910
	230	540	885
	225	530	900
	225	530	905
mean	227	543	904
S.D.	4.83	12.74	8.76
C.V	2.13	2.35	0.97

Table.3. 腹水検体を用いたラテックス凝集免疫比濁法の同時再現性試験

F. 健康危惧情報
なし

G. 研究発表

1. Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Scholmerich J. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club. *Hepatology* 23:164-76 (1996).
2. Zebrowski BK, Yano S, Liu W, Shaheen RM, Hicklin DJ, Putnam JB, Jr., Ellis LM. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 5:3364-8 (1999)
3. Yoshiji H, Kuriyama S, Hicklin DJ, Huber J, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. The vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 is a major regulator of malignant ascites formation in the mouse

- hepatocellular carcinoma model. *Hepatology* 33:841-7 (2001)
4. Ortiz J, Soriano G, Coll P, Novella MT, Pericas R, Sabat M, Sanchez F, Guarner C, Prats G, Vilardell F. Early microbiologic diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis with BacT/ALERT. *J Hepatol* 26:839-44 (1997)
 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* 35:448-58 (2002)
 6. Spahr L, Villeneuve JP, Tran HK, Pomier-Layrargues G. Furosemide-induced natriuresis as a test to identify cirrhotic patients with refractory ascites. *Hepatology* 33:28-31 (2001)
 7. Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, Unger C, Marme D, Gastl G. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* 85:178-87 (1999)
 8. Zebrowski BK, Liu W, Ramirez K, Akagi Y, Mills GB, Ellis LM. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol* 6:373-8 (1999)
 9. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5:74-80 (2004)
 10. Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rosel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreves J, Martiny-Baron G, Totzke F. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 60:2178-89 (2000)
 11. Perez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-del-Arbol L, Cejudo P, Claria J, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Jimenez W. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 29:1057-63 (1999)
 12. Siersema PD, de Marie S, van Zeijl JH, Bac DJ, Willson JH. Blood culture bottles are superior to lysis-centrifugation tubes for bacteriological diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol* 30:667-9 (1992)
 13. Zeni F, Tardy B, Vindimian M, Comtet C, Page Y, Cusey I, Bertrand JC. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the ascitic fluid of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 17:218-23 (1993)
 14. Le Moine O, Deviere J, Devaster JM, Crusiaux A, Durand F, Bernuau J, Goldman M, Benhamou JP. Interleukin-6: an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 20:819-24

- (1994)
15. Castellote J, Lopez C, Gornals J, Tremosa G, Farina ER, Baliellas C, Domingo A, Xiol X. Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. *Hepatology* 37:893-6 (2003)
 16. Casafont F, Rivero M, Fernandez MD, Crespo J, Fabrega E, Sanchez E, Pons-Romero F. Granulocyte elastase in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci* 44:1985-9 (1999)
 17. 樋口誠一、他. 羊水顆粒球エラストーゼ値による早産管理の臨床的意義. *産婦人科治療* 68, 484-5 (1994)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし