

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

肝線維化の評価における弾性度測定の有用性

石井裕正 慶應義塾大学消化器内科教授

要旨

肝硬変の診断に欠かせない肝線維化の程度は肝生検によって行われてきたが、種々の合併症と患者の肉体的・精神的苦痛を伴うものであった。肝内線維化の進行に従い肝の弾性度が硬化することから、線維化の程度を弾性度の測定により代替できると考えられる。フランスで開発されたエラストメーターは肝の弾性度を測定できる機器であるため、われわれはこの器械による肝弾性度と肝線維化の相関を検討した。その結果良い相関が得られ、全く非侵襲的な検査法として極めて有用であることが判明した。

研究協力者：慶應義塾大学消化器内科 齋藤英胤、多田慎一郎

A. 研究目的

肝硬変は慢性肝疾患の最終到達疾患であり、長期に亘る炎症の結果肝内に多量の線維あるいはマトリックスが蓄積した状態である。肝硬変の診断には肝生検による線維の蓄積と再生結節の形成を確認する必要がある。しかし、肝生検は観血的操作であるため出血などの合併症を起こすことが知られており、また、生検部位の情報しか得られないため、組織に偏りがある場合には誤った診断を下す可能性も指摘されている。慢性肝疾患ではしばしば肝生検が必要となるが、患者の多くはこの観血的操作に対して恐怖心を持ち、検査が精神的・肉体的苦痛を与えていることは確かである。

肝線維化に伴い肝臓は柔らかい状態から次第に硬くなるが、その際肝の弾性度も次第に高くなることが知られている。1994年よりフランス・パリ市工業物理化学院の波動・音響研究所においてトランジェントパルス波を用いた弾性測定（エラストメトリー）の技術が集中的に研究され実用化に至り、エコセンス社が特許を保有した。この器械は超音波と可聴振動を利用したもので、

皮膚表面で振動を与え、振動は皮膚から脂肪組織、肝へと伝播するが、その進行を超音波で追跡し、特定の距離を振動が進む速度を測定して弾性度を計算する原理である。波動を追跡する超音波プローブにはスピーカーに似た特性を持つ電子ダイナミック振動発生装置と超音波トランスデューサーが内蔵されている。この技術により計測が短時間でできるようになり動く臓器に対しても使用可能となった。また一過性の波動を使うことにより解析が難しい波動形成を避けることができ、さらに最も重要なことに全く非侵襲的な検査ができることが特徴である。この器械は高度先進医療研究会の岩井宏方先生が中心となり日本へ導入された。弾性度はアメリカに保有されている弾性度の標準物質を基準に絶対値として測定されるため、物体の固有の弾性度を客観的に評価できると考えられる。

本研究の目的は肝線維化の程度と弾性度測定値の相関の有無を知ることである。

B. 研究方法

本研究では、肝線維化と弾性度測定値の相関を検討するために慢性肝炎・肝硬変患

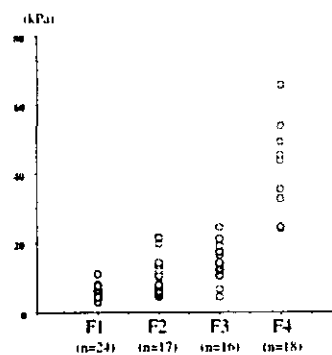
者で肝生検を施行する予定者から研究内容などを説明し承諾の得られた個人を対象に、肝生検上の線維化の程度と弾性度測定値の相関をみた。肝弾性度は脂肪化などの影響も受ける可能性があるため、なるべく均一な被験者集団を考慮し、2003年3月から9月までに慶應義塾大学病院で肝生検の必要となったC型慢性肝炎・肝硬変患者の中から承諾の得られた症例で、組織上脂肪化が30%未満の症例を対象とした。肝組織は経験ある病理医2名により新犬山分類に従って診断された。

肝の弾性度の測定はエコセンス社のフィブロスキャン (version 1) を用いて測定した。この器械はプローブ (図1) を患者の右肋間から皮膚に軽く押し当て、手元のスイッチを押すことにより自動的に振動波と超音波を発生 (本体; 図2)、コンピューター画面に測定値が出るようになっている (図3)。

肝生検の病理組織診断上、新犬山F分類と弾性度測定値 (kPa) の相関を検討した。相関はKruskal Wallis検定により求めた。

C. 研究結果

症例は18歳から74歳 (中央値50歳) 75症例であった。新犬山分類F1, F2, F3, F4はそれぞれ24症例、17症例、16症例、18症例であった。各Fステージと弾性度測定値の間には有意な相関が認められた ($p < 0.0001$ by Kruskal-Wallis)。各Fステージにおける弾性度測定中央値と50%値は、F1で6.25 kPa (4.60-7.80)、F2で7.80 kPa (5.70-12.48)、F3で13.85 kPa (11.20-17.40)、F4で34.00 kPa (24.00-48.20)であった。F1とF2 ($p=0.009$)、F2とF3 ($p=0.018$)、F3とF4 ($p < 0.0001$)の間には有意差が認められ、各ステージの値は重なるの低いことが確認された。特に慢性肝炎と肝硬変の間には極めて有意な違いがあった。



D. 考察

慢性肝疾患の進展を診断するために肝生検は大変有用な検査である。肝内の線維化の程度を知ることは診断のみならず、特にC型慢性肝炎においては治療の時期や患者の動機付けのために重要な因子となる。しかし一方では、肝生検は術者の経験や超音波ガイド下における施行により危険率を減少できるとは言え、患者の痛み、出血、気胸、血胸、胆汁性腹膜炎、血胆汁、他臓器の穿刺、患者の恐怖感、あるいは死の合併症が全くないわけではない。

本研究により肝の弾性度を非侵襲的に測定することで、肝線維化をよく診断できることが明らかとなった。従来肝硬変の診断には血小板数や診断の式を用いてきたが、これらの信頼度は極めて高いわけではなかった。本研究で示された非侵襲的な弾性度測定はこれらの診断法に加えてより正確な肝硬変の診断へと繋がることが示唆され、肝硬変の診断に非侵襲的な検査として極めて有用なものと考えられた。

近年、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の存在とその臨床的意義が報告されるようになった。この疾患では脂肪化と線維化が生ずるが、肥満や糖尿病に合併することが多いため単なる脂肪肝と誤解される傾向にある。本研究におけるエラストメーターはこのような疾患にも重要な情報を非侵襲的に与えることができると思われる。しかし、肝脂肪化が弾性度測定にどのような影響を及ぼすかは未だに定かではないため、今後脂肪化を含む線維化の検討を重ねていかなければならない。

肝線維化の診断は全世界的に肝生検によ

り行われているが、線維化の分類は日本の新犬山分類の他に、Knodell、Scheuer、Metavir、Batts-Ludwig、Ishak らが分類しており、それぞれ少しずつ異なっている。肝の弾性度は標準弾性度を基準にして測定する絶対値であるので、各国の肝線維化を共通して議論する際にはたいへん有用な指標になることが予測される。こうした議論の場にも本器械は大変有用と考えられた。

E. 結論

肝硬変の診断に非侵襲的な肝弾性度の測定が極めて有用であることが明らかとなった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

- 肝線維化評価におけるエラストメーターの有用性。多田慎一郎、齋藤英胤、石井裕正。ワークショップ：肝線維化治療の評価法。第45回日本消化器病学会総会（DDW-Japan 2003 OSAKA）
- 高齢者に対する低侵襲性診断：肝線維化のエラストメーターによる測定。齋藤英胤、多田慎一郎、中本伸宏、岩井宏方、石井裕正。第6回日本高齢消化器医学会議
- コリン欠乏ラット肝の脂肪化および線維化に対するアンギオテンシン II 受容体拮抗薬の抑制効果。北村公美、多田慎一郎、中本伸宏、戸田京子、栗田 聡、齋藤義正、常松 令、熊谷直樹、齋藤英胤、石井裕正。第89回日本消化器病学会総会、04/26/03、さいたま
- Kitamura K, Toda K, Tsunematsu S, Kumagai N, Horikawa H, Nakamoto N, Saito H, Ishii H. Possible involvement of rho-kinase pathway in the tissue angiotensin system of the hepatic fibrogenesis. 54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 10/24/03, Boston, USA (Hepatology 38(4), 332A-333A, 2003)
- Tada S, Nakamoto N, Kameyama K, Tsunematsu S, Kumagai N, Saito H, Ishii H. Clinical usefulness of edaravone for acute

liver injury. J Gastroenterol Hepatol 18(7), 851-857, 2003

- Nakamoto N, Tada S, Kameyama K, Kitamura K, Kurita S, Saito Y, Saito H, Ishii H. A free radical scavenger, edaravone, attenuates steatosis and cell death via reducing inflammatory cytokine production in rat acute liver injury. Free Radic Res 37(8), 849-859, 2003
- Horie Y, Yamagishi Y, Kato S, Kajihara M, Kimura H, Ishii H. Low-dose ethanol attenuates gut ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats via nitric oxide production. J Gastroenterol Hepatol 18, 211-217, 2003
- Ishii H, Adachi M, Jose C, Fernandez-Checa, Arthur I, Cederbaum. Ion V, Deaci U, Amin A, Nanji. Role of Apoptosis in Alcoholic Liver Injury. Alcohol Clin Exp Res 27, 1207-1212, 2003
- Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ikeda Y, Ishii H, Kuwana M. A role of autoantibody-mediated platelet destruction in thrombocytopenia in patients with cirrhosis. Hepatology 37(6), 1267-1276, 2003

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15年度分担研究報告書

アデノウイルスの経胆管的投与による肝への反復遺伝子導入に関する検討

分担研究者 栗山茂樹 香川医科大学

要旨：組換えアデノウイルスを用いた遺伝子治療の基礎的研究を行った。本年度は外来遺伝子導入の発現を継続するための方策としてアデノウイルス反復導入による発現効率の改善策として血管内投与ではなく、経胆管的投与の効率を検討した。その結果、経胆管的投与は外来遺伝子を効率良く肝細胞に導入でき、反復投与によっても、抗体成立によるアデノウイルスの消失もみられずに反復投与が可能であることが判明した。

A. 研究目的

組換えアデノウイルスを用いれば、in vivo 遺伝子導入においても効率的な外来遺伝子発現の誘導が可能であることが知られている。われわれの検討においても、組換えアデノウイルスを直接肝臓内、経静脈的あるいは経門脈的に注入すれば、肝において効率の良い外来遺伝子発現を誘導し得ることが確認された。さらにわれわれは、組換えアデノウイルスを用いれば、正常肝のみならず硬変肝や劇症肝炎肝においても、安全かつ有効な遺伝子発現が誘導されることを報告している。しかし、組換えアデノウイルスを用いた遺伝子導入の問題点として、外来遺伝子の発現が一過性であり、さらに遺伝子の再導入が困難であることが挙げられる。そこで本研究においては、経胆管的に組換えアデノウイルスを投与すれば、肝臓における効率の良い外来遺伝子発現を誘導できるか、さらに遺伝子の再導入が可能であるかを基礎的に検討した。

B. 研究方法

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 backbone 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、大腸菌の β -galactosidase 遺伝子である lacZ 遺伝子を発現する組換えアデノウ

イルスを作製し、高力価のアデノウイルス (2×10^9 plaque-forming units/ml) を精製した。

10 週齢の雌性 SD ラットをエーテル麻酔下を開腹し、総胆管を十二指腸乳頭部直上でクランプした後に、その肝側の総胆管を 30 ゲージ針で穿刺し、500 μ l (1×10^9 plaque-forming units) のアデノウイルス液を逆行性に肝へ注入した。抜針後に総胆管穿刺部を 5 分間圧迫し、クランプを解除した後に閉腹処置を行った。

ラット肝における lacZ 遺伝子発現は、X-gal 染色を用いて免疫組織学的に検討するとともに、chemiluminescent アッセイを用いて lacZ 遺伝子発現由来の β -galactosidase 活性を定量的に評価した。また、経胆管的アデノウイルス注入の安全性を評価するために、ラット肝の組織学的検討を行うとともに、ラット血清中の種々の生化学的パラメーターを測定した。

なお、組換え DNA 実験および動物実験のプロトコールは、研究施設の承認を受けたものであり、ガイドラインを遵守して行われた。

C. 研究結果

1. 経門脈的投与と比較した経胆管的遺伝子導入効率

経胆管的な肝への遺伝子導入効果を評価するために、経門脈的なアデノウイルス注

入との遺伝子導入効率を、アデノウイルス投与2日後にX-gal染色を用いて比較検討した。アデノウイルスを門脈内に投与した場合には、グリソン鞘領域を中心に肝の約40%の領域がX-galによって染色された。アデノウイルスを経胆管的に逆行性に肝へ注入した場合にも、経門脈的投与に匹敵するlacZ遺伝子発現の誘導が可能であり、グリソン鞘領域を中心に約30%の領域がX-galによって染色された。さらに、X-gal染色陽性領域は、肝小葉内さらに中心静脈近傍にも及んでおり、アデノウイルスを胆管内に注入すれば、肝全体への効率の良い遺伝子導入が可能であることが示された。さらに、X-gal染色後に肝組織をHE染色したところ、X-gal染色陽性細胞は肝内の胆管上皮細胞ではなく、肝細胞であることが判明した。

次に、アデノウイルスの経胆管的投与によって誘導された肝におけるlacZ遺伝子発現を経時的に検討したところ、アデノウイルスを経門脈的に投与した場合と同様に、肝におけるlacZ遺伝子発現は一過性であり、投与28日後には肝内のX-gal染色陽性細胞はほぼ完全に消失した。lacZ遺伝子発現をchemiluminescentアッセイによって定量的に評価したところ、経胆管的アデノウイルス投与2、7、14、28日後の肝における β -galactosidase活性は、それぞれ19000、3500、910、47 pg/mg proteinであった。

2. 経胆管的アデノウイルス投与による肝細胞障害の検討

経胆管的アデノウイルス投与による肝への遺伝子導入の安全性を検討するために、アデノウイルス投与2日後にラットを犠死させ、肝を組織学的に検討したところ、極めて軽微な炎症細胞の浸潤を認めたのみであり、胆管の障害や破壊像などの所見はまったくみられなかった。さらに、アデノウイルス投与前後における血液生化学的パラメーターを検討したところ、軽微な血清ALT値の上昇を認めたが、アデノウイルスを投与していないコントロールラットの血清ALT値と比較して統計学的な有意差はみられなかった。

3. 経胆管的アデノウイルス投与による液

性ならびに細胞性免疫応答

ラット総胆管へのアデノウイルス投与2、7、14、28日後の血清におけるアデノウイルスに対する中和抗体価は、それぞれ120、704、2816、6656倍であり、経胆管的にアデノウイルスを投与した場合にも、アデノウイルスを静脈内あるいは門脈内に投与した場合と同様に、アデノウイルスに対する中和抗体が速やかに血中に出現することが判明した。さらに、ラット総胆管へのアデノウイルス投与14日後にラットを犠死させ、脾臓においてアデノウイルス特異的T細胞が誘導されているかを検討したところ、アデノウイルスを静脈内あるいは門脈内に投与した場合と同様に、脾細胞においてアデノウイルス特異的T細胞が誘導されていることが判明した。

4. 経胆管的アデノウイルス再投与による肝における外来遺伝子再発現

lacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスを経胆管的に逆行性に注入すれば、ラット肝における効率の良い遺伝子発現の誘導が可能であったが、遺伝子発現は一過性であり、投与28日後には肝におけるlacZ遺伝子発現は消失した。そこで、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。大多数のヒトは小児期にアデノウイルスに感作されているため、アデノウイルスに対する液性ならびに細胞性免疫が誘導されていると考えられる。したがって、ヒトにおけるアデノウイルスを用いた遺伝子治療は、実験動物におけるアデノウイルスの再投与に相当すると考えられる。そこで、より臨床に近似した条件で、経胆管的アデノウイルス再投与による肝における外来遺伝子の再発現の可能性を検討するために、アデノウイルスの総胆管への初回投与時には一切免疫抑制的な処置は行わず、再投与時のみにFK506による免疫抑制処置を行う群と行わない群を作製し、lacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスを経胆管的に再投与したところ、FK506処置の有無に拘わらず、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。この

際、脾細胞におけるアデノウイルス特異的 T 細胞の増殖は、FK506 処置群において非処置群に比し有意な抑制が認められたが、経胆管的アデノウイルス再投与による血中抗アデノウイルス抗体価の上昇の程度には、FK506 処置群と非処置群間において有意差を認めなかった。さらに、経胆管的アデノウイルス投与による肝への反復遺伝子導入の可能性を確認するために、アデノウイルスの胆管内への再投与からさらに 35 日後に、アデノウイルスを総胆管内に注入し、アデノウイルス 3 回投与後の肝における lacZ 遺伝子発現を X-gal 染色ならびに chemiluminescent アッセイを用いて検討したところ、アデノウイルス 2 回投与後の肝と比較して有意差の無い lacZ 遺伝子発現を確認し得た。

D. 考察

遺伝子治療のプロトコールとしては、遺伝子導入を行うための標的細胞を体内より採取し、*in vitro* において遺伝子導入を行った後に再び体内に戻す *ex vivo* 遺伝子治療と、体内の標的細胞に直接遺伝子導入を行う *in vivo* 遺伝子治療が存在する。先天性の遺伝子病などに対する遺伝子治療としては、遺伝子導入効率を高めるために、専ら *ex vivo* 遺伝子治療が行われている。しかし、肝硬変に対する遺伝子治療を考えた場合には、肝硬変患者において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、肝硬変に対する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と言っても過言ではない。われわれはすでに、組換えアデノウイルスを経静脈あるいは経門脈的にラットに投与すれば、肝において極めて効率の良い遺伝子発現を誘導し得ることを報告している。さらに、正常肝のみならず、劇症肝炎モデルマウスさらに肝硬変モデルマウスの尾静脈内へ組換えアデノウイルスを投与した場合にも、正常肝に匹敵する遺伝子発現の誘導が可能であることを確認している。しかし、上記すべての基礎実験において、肝における外来遺伝子発現は一過性であり、約

30 日後には肝における遺伝子発現は完全に消失した。そこで、これらのアデノウイルス投与動物の尾静脈内あるいは門脈内にアデノウイルスを再投与したところ、肝において遺伝子の再発現を誘導することは不可能であった。

アデノウイルスを用いた *in vivo* 遺伝子導入において、再投与の可能性を示したいくつ論文が報告されている。しかし、これらの検討では、アデノウイルスの初回投与時に免疫抑制剤などによる免疫抑制処置がとられており、アデノウイルスの再投与時にも免疫抑制処置が施されている。一方、ヒトはマウスやラットと異なりアデノウイルスの自然宿主であり、大半のヒトは小児期にアデノウイルス感染を経験しており、アデノウイルスに対する中和抗体を保有している。したがって、ヒトにおけるアデノウイルスの初回投与は、実験動物におけるアデノウイルスの再投与に相当すると考えられる。そこでわれわれは、より臨床に近似した条件でアデノウイルスの再投与の可能性を検討するために、アデノウイルスの初回投与時には何ら免疫抑制的処置を行わず、再投与時のみにシクロフォスファミドあるいは FK506 による免疫抑制処置を行ったところ、肝において遺伝子の再発現を誘導することが可能であった。しかし、肝硬変などの肝予備能が低下した症例に免疫抑制処置を施すことは、感染症などの重篤な合併症を惹起する可能性があり、安全な治療法とは言い難い。そこで、本研究においては、総胆管へのアデノウイルスの初回投与時には一切免疫抑制的な処置を行わず、アデノウイルスの総胆管への再投与の際に FK506 処置群と非処置群を作製し、肝における lacZ 遺伝子発現を定量的に評価したところ、FK506 非処置群においても処置群と有意差のない lacZ 遺伝子の再発現を確認することができた。

アデノウイルス再投与における細胞性ならびに液性免疫応答を検討したところ、脾臓におけるアデノウイルス特異的 T 細胞の増殖は、FK506 処置群において有意な抑制がみられたが、ラット血中の抗アデノウイルス抗体価は、FK506 処置の有無に拘わら

ず著明に上昇した。さらに、胆汁内のアデノウイルスに対する中和抗体価を測定したところ、FK506 処置の有無に拘わらず、胆汁中の抗アデノウイルス抗体価は測定感度以下であった。したがって、アデノウイルスを胆管内に投与した場合には、アデノウイルスに対する中和抗体に遭遇することなく胆管上皮を通過して肝細胞に到達できるので、肝細胞への遺伝子の再発現を誘導し得るのではないかと考えられた。また、肝内の胆管上皮細胞では lacZ 遺伝子の発現がみられなかったことより、ラットの胆管上皮細胞はアデノコクサッキーウイルスレセプターを発現していない、あるいは極めて弱い発現しかみられない可能性が示唆された。さらに、アデノウイルスを総胆管内に3回にわたり投与したラットにおいても、肝における lacZ 遺伝子発現を確認し得たことより、アデノウイルスの経胆管的投与による肝への反復遺伝子導入の可能性が示された。

E. 結論

アデノウイルスを経胆管的に逆行性に肝内に注入すれば、アデノウイルスの血管内投与に匹敵する効率の良い外来遺伝子発現を肝において誘導することが可能であった。この際、肝内において導入遺伝子を発現した細胞は、胆管上皮細胞ではなく肝細胞であることが判明した。さらに、免疫抑制的処置を施すことなくアデノウイルスを経胆管的に反復投与した場合にも、肝において外来遺伝子の発現を誘導し得たことより、アデノウイルスを用いたヒト肝への遺伝子導入の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuriyama S, Tsujinoue H, Yoshiji H. Immune response to suicide gene therapy. In: Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews. Springer CJ, ed.

Humana Press, Totowa, New Jersey, pp353-369, 2003.

2) Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Renin-angiotensin system and hepatocellular carcinoma: role of angiogenesis. In: Recent Research Development in Cancer Vol 5. Mukhtar H, Labrie F, eds. Transworld Research Network, Kerala, India, pp39-51, 2003.

3) Morishita A, Murota M, Fujita J, Wu F, Kurokohchi K, Masaki T, Arima K, Watanabe S, Kuriyama S. Autoreactive helper T cells specific for cytokeratin 19 in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatol Res* 25: 415-422, 2003.

4) Murota M, Watanabe S, Fujita J, Ohtsuki Y, Wu F, Yoshida S, Kita Y, Funakoshi F, Masaki T, Kurokohchi K, Uchida N, Ishida T, Kuriyama S. Aberrant cytokeratin expression and high susceptibility to apoptosis in autoimmune hepatitis. *Hepatol Res* 25: 271-280, 2003.

5) Kobara H, Uchida N, Tsutsui K, Kurokohchi K, Fukuma H, Ezaki T, Kuriyama S. Abnormal bile flow in patients with achalasia. *J Gastroenterol* 38: 327-331, 2003.

6) Wakabayashi H, Ushiyama T, Ishimura K, Izuishi K, Karasawa Y, Masaki T, Watanabe S, Kuriyama S, Maeta H. Significance of reduction surgery in multidisciplinary treatment of advanced hepatocellular carcinoma with multiple intrahepatic lesions. *J Surg Oncol* 82: 98-103, 2003.

7) Masaki T, Shiratori Y, Rengifo W, Igarashi K, Yamagata M, Kurokohchi K, Uchida N, Miyauchi Y, Yoshiji H, Watanabe S, Omata M, Kuriyama S. Cyclins and cyclin-dependent kinases: comparative study of hepatocellular carcinoma versus cirrhosis. *Hepatology* 37: 534-543, 2003.

8) Li J-Q, Kubo A, Wu F, Usuki H, Fujita J, Bandoh S, Masaki T, Saoo K, Takeuchi

- H, Kobayashi S, Imaida K, Maeta H, Ishida T, Kuriyama S. Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes. *Int J Oncol* 22: 1101-1110, 2003.
- 9) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. Extracellular matrix remodeling may predominate over hepatocyte injury in hepatocellular carcinoma development. *Oncol Rep* 10: 957-962, 2003.
- 10) Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the *timp-1* transgenic mouse model. *Int J Cancer* 105: 340-346, 2003.
- 11) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. The copper-chelating agent, trientine, attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions in rats by angiogenesis suppression. *Oncol Rep* 10: 1369-1373, 2003.
- 12) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin D-J, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 52: 1347-1354, 2003.
- 13) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. Angiotensin-II induces the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through the protein kinase-C signaling pathway in rat liver fibrosis development. *Hepatol Res* 27: 51-56, 2003.
- 14) Iihara N, Kurokohchi K, Tsukamoto T, Masaki T, Kuriyama S, Ohnishi H, Taminato T, Morita S. Hypoglycaemia in patients with liver diseases administered levothyroxine. *J Clin Pharm Ther* 28: 355-361, 2003.
- 15) Li J-Q, Wu F, Usuki H, Kubo A, Masaki T, Fujita J, Bandoh S, Saoo K, Takeuchi H, Kuriyama S, Ishida T, Imaida K. Loss of p57^{KIP2} is associated with colorectal carcinogenesis. *Int J Oncol* 23: 1537-1543, 2003.
- 16) Uchida N, Tsutsui K, Ezaki T, Fukuma H, Kobara H, Kamata H, Aritomo Y, Masaki T, Watanabe S, Kobayashi S, Nakatsu T, Nakano H, Kuriyama S. Combination of assay of human telomerase reverse transcriptase mRNA and cytology using bile obtained by endoscopic transpapillary catheterization into the gallbladder for diagnosis of gallbladder carcinoma. *Am J Gastroenterol* 98: 2415-2419, 2003.
- 17) Noguchi R, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Mitoro A, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Combination of interferon- β and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 9: 6038-6045, 2003.
- 18) Uchida N, Tsutsui K, Ezaki T, Fukuma H, Masaki T, Kobara H, Watanabe S, Kuriyama S. Conversion from external nasobiliary drainage to internal drainage using endoscopically available scissor forceps. *Hepatogastroenterology* 50:1891-1893, 2003.
- 19) Watanabe S, Uchida N, Masaki T, Kurokohchi K, Touge T, Kuriyama S, Ohnishi Y, Tanaka H, Kurose T, Hata T. Measurement of left portal vein blood

flow velocity by doppler sonography in a patient with acute fatty liver of pregnancy. *J Med Ultrasound* 30: 57-61, 2003.

20) Uchida N, Tsutsui K, Kobara H, Ezaki T, Fukuma H, Yachida M, Masaki T, Watanabe S, Nakatsu T, Nakano H, Kuriyama S. A case of gallbladder carcinoma diagnosed preoperatively by the detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in endoscopically obtained gallbladder bile. *Endoscopy* 35: 185-188, 2003.

21) Tsujimoto T, Kuriyama S, Yoshiji H, Fujimoto M, Kojima H, Yoshikawa M, Fukui H. Ultrasonographic findings of amebic colitis. *J Gastroenterol* 38: 82-86, 2003.

22) Akahane T, Kuriyama S, Matsumoto M, Kikuchi E, Kikukawa M, Yoshiji H, Masui K, Fukui H. Pancreatic pleural effusion with a pancreaticopleural fistula diagnosed by magnetic resonance cholangiopancreatography and cured by somatostatin analogue treatment. *Abdom Imaging* 28: 92-95, 2003.

23) Uchida N, Ezaki T, Fukuma H, Tsutsui K, Kobara H, Matsuoka M, Masaki T, Watanabe S, Yoshida M, Maeta T, Koi F, Nakatsu T, Kuriyama S. Concomitant colitis associated with primary sclerosing cholangitis. *J Gastroenterol* 38: 482-487, 2003.

24) Kurokohchi K, Masaki T, Arima K, Miyauchi Y, Funaki T, Yoneyama H, Yoshida S, Deguchi A, Nakai S, Watanabe S, Kuriyama S. CD28-negative CD8-positive cytotoxic T lymphocytes mediate hepatocellular damage in hepatitis C virus infection. *J Clin Immunol* (in press).

25) Yuji J, Masaki T, Yoshida S, Kita Y, Feng H, Uchida N, Yoshiji H, Kitanaka A, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S. Identification of p46 Shc expressed in the nuclei of hepatocytes with high

proliferating activity: study of regenerating rat liver. *Int J Mol Med* (in press).

26) Kita Y, Masaki T, Funakoshi F, Yoshida S, Tanaka M, Kurokohchi K, Uchida N, Watanabe S, Matsumoto K, Kuriyama S. Expression of G1 phase-related cell cycle molecules in naturally developing hepatocellular carcinoma of Long-Evans Cinnamon rats. *Int J Oncol* (in press).

27) Funakoshi F, Masaki T, Kita Y, Hitomi M, Kurokohchi K, Uchida N, Watanabe S, Yoshiji H, Kuriyama S. Proliferative capability of hepatocytes and expression of G1-related cell cycle molecules in the development of liver cirrhosis in rats. *Int J Mol Med* (in press).

28) Kinekawa F, Kubo F, Matsuda K, Fujita Y, Kobayashi M, Funakoshi F, Uchida N, Watanabe S, Tomita T, Uchida Y, Kuriyama S. Effect of an aldose reductase inhibitor on esophageal dysfunction in diabetic patients. *Hepatogastroenterology* (in press).

29) Tanaka M, Watanabe S, Masaki T, Kurokohchi K, Kinekawa F, Inoue H, Uchida N, Kuriyama S. Fulminant hepatic failure caused by malignant melanoma of unknown primary origin. *J Gastroenterol* (in press).

2. 学会発表

1) 辻之上裕久、西脇 功、櫻井伸也、栗山茂樹、北出光輝、中田吉宏、吉治仁志、福井 博. 多剤耐性遺伝子発現肝細胞癌に対する electrochemotherapy の有用性: アドリアマイシンとシンプラスチンとの比較検討. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003.5.22-23, 福岡.

2) 吉田周平、正木 勉、松村 正、宮内嘉明、舟木利治、行政聡子、小原英幹、韓 峰、金 玉姫、黒河内和貴、佐々原勝幸、高杉健太、渡辺精四郎、栗山茂樹. ヒト肝細胞癌における Shc の発現増強とその局在. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003.5.22-23, 福

岡.

- 3) 正木 勉、韓 峰、金 玉姫、田中美鈴、吉田周平、行政聡子、木田裕子、船越文美、宮内嘉明、舟木利治、小原英幹、黒河内和貴、渡辺精四郎、栗山茂樹. 肝細胞癌における癌遺伝子 c-Yes の活性化. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003.5.22-23, 福岡.
- 4) 渡辺精四郎、宮内嘉明、黒河内和貴、正木 勉、栗山茂樹. 牛肝臓を用いたエタノール注入後ラジオ波焼灼効果の検討. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003.5.22-23, 福岡.
- 5) 木田裕子、正木 勉、船越文美、田中美鈴、行政聡子、宮内嘉明、舟木利治、黒河内和貴、渡辺精四郎、栗山茂樹. LEC ラットの肝癌発生過程における細胞周期関連遺伝子の発現レベルの検討. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003.5.22-23, 福岡.
- 6) 渡辺精四郎、黒河内和貴、栗山茂樹. 表在性型肝細胞癌の局所療法 of 検討. 経皮的ラジオ波焼灼、エタノール注入療法及び腹腔鏡的マイクロ波凝固療法の比較. 第 65 回日本消化器内視鏡学会総会. 2003.5.29-31, 福岡.
- 7) 池中康英、吉井純一、野口隆一、山崎正晴、栗山茂樹、築瀬公嗣、浪崎 正、吉治仁志. ワークショップ 1「湿潤・転移モデル (I)」TIMP-1 トランスジェニックマウスを用いた外因性 TIMP-1 のマウス腫瘍発育におよぼす影響. 第 12 回日本がん転移学会学術集会. 2003.6.27-28, 金沢.
- 8) 吉治仁志、吉井純一、池中康英、野口隆一、築瀬公嗣、浪崎 正、山崎正晴、栗山茂樹. ワークショップ 3「血管新生」Retro-Tet system を用いた VEGF 腫瘍増大作用に対する VEGFR-1、VEGFR-2 各受容体. 第 12 回日本がん転移学会学術集会. 2003.6.27-28, 金沢.
- 9) 吉井純一、池中康英、野口隆一、築瀬公嗣、浪崎 正、山崎正晴、栗山茂樹、吉治仁志. ワークショップ 3「血管新生」銅キレート剤を用いた血管新生阻害による肝癌抑制作用. 第 12 回日本がん転移学会学術集会. 2003.6.27-28, 金沢.
- 10) 築瀬公嗣、吉井純一、池中康英、野口隆一、浪崎 正、山崎正晴、栗山茂樹、吉治仁志. ワークショップ 3「血管新生」血管

新生阻害に基づく肝癌治療の可能性：低用量 ACE 阻害剤、5-FU 併用の肝癌発育抑制効果. 第 12 回日本がん転移学会学術集会. 2003.6.27-28, 金沢.

11) 浪崎 正、池中康英、吉井純一、築瀬公嗣、野口隆一、山崎正晴、栗山茂樹、吉治仁志. ワークショップ 7「分子標的治療」インターフェロンと ACE 阻害剤の VEGF 阻害作用に基づく肝癌発育抑制に対するアジュバント効果. 第 12 回日本がん転移学会学術集会. 2003.6.27-28, 金沢.

12) 吉田周平、正木 勉、黒河内和貴、木田裕子、田中美鈴、舟木利治、辻之上裕久、吉治仁志、栗山茂樹. 肝発癌過程における Shc の動態：ヒト肝細胞癌における検討. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27, 名古屋.

13) 池中康英、吉治仁志、吉井純一、野口隆一、築瀬公嗣、浪崎 正、北出光輝、山崎正晴、美登路 昭、辻之上裕久、栗山茂樹、福井 博. 肝発癌過程における肝細胞癌と細胞外マトリックスの役割. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27, 名古屋.

14) 木田裕子、正木 勉、船越文美、黒河内和貴、吉田周平、宮内嘉明、樋本尚志、吉治仁志、栗山茂樹. 肝発癌過程における細胞周期関連分子の発現変化：LEC ラットを用いた検討. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27, 名古屋.

15) 吉治仁志、吉井純一、池中康英、野口隆一、築瀬公嗣、浪崎 正、北出光輝、山崎正晴、美登路 昭、辻之上裕久、栗山茂樹、福井 博. 肝発癌および自然肺転移過程における VEGFR-1、VEGFR-2 受容体の役割. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27, 名古屋.

16) 築瀬公嗣、吉治仁志、吉井純一、池中康英、野口隆一、浪崎 正、北出光輝、山崎正晴、美登路 昭、栗山茂樹、福井 博. 血管新生阻害による ACE 阻害剤、低用量 5-FU 併用による肝癌発育抑制効果. 第 62 回日本癌学会総会. 2003.9.25-27, 名古屋.

17) 黒河内和貴、正木 勉、渡辺精四郎、舟木利治、宮内嘉明、米山弘人、木田裕子、船越文美、金 玉姫、栗山茂樹. 自己免疫性肝炎(AIH)における肝浸潤単核球の

costimulatory molecule の意義について。
第 45 回日本消化器病学会大会。

2003.10.15-17, 大阪。

18) 飯領田久巳男、渡辺精四郎、木田裕子、船越文美、黒河内和貴、西岡幹夫、栗山茂樹。低用量インターフェロン療法により著効を呈した後に自己免疫性肝炎を発症した血小板 5.5 万の C 型肝硬変の 1 例。第 45 回日本消化器病学会大会。2003.10.15-17, 大阪。

19) 辻之上裕久、櫻井伸也、中谷吉宏、北出光輝、吉治仁志、栗山茂樹、福井 博。アドリアマイシン、ビンブラスチン、マイトマイシン C を用いた MDR-1 発現肝癌細胞に対する electrochemotherapy の有用性。第 45 回日本消化器病学会大会。

2003.10.15-17, 大阪。

20) 黒河内和貴、正木 勉、渡辺精四郎、舟木利治、樋本尚志、米山弘人、木田裕子、船越文美、金 玉姫、宮内嘉明、栗山茂樹。大型進行肝癌に対するエタノール注入併用ラジオ波凝固療法(PEI-RFA)の有効性に関する 3 つのエビデンス。第 7 回日本肝臓学会大会。2003.10.15-16, 大阪。

21) 木田裕子、正木 勉、船越文美、田中美鈴、宮内嘉明、舟木利治、黒河内和貴、渡辺精四郎、栗山茂樹。LEC ラットの肝発癌における細胞周期関連分子および細胞増殖因子の発現変動に関する検討。第 7 回日本肝臓学会大会。2003.10.15-16, 大阪。

22) 吉田周平、正木 勉、韓 峰、金 玉姫、行政聡子、舟木利治、宮内嘉明、小原英幹、内田善仁、渡辺精四郎、黒河内和貴、栗山茂樹。肝細胞癌における Shc の発現増強とその局在：ヒトおよびラットにおける検討。第 7 回日本肝臓学会大会。

2003.10.15-16, 大阪。

23) 船越文美、正木 勉、木田裕子、田中美鈴、宮内嘉明、舟木利治、黒河内和貴、渡辺精四郎、栗山茂樹。肝硬変形成過程における INK ファミリー(p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C})の発現レベルの検討：real-time RT-PCR 法を用いた検討。第 7 回日本肝臓学会大会。2003.10.15-16, 大阪。

24) 金 玉姫、正木 勉、吉田周平、韓 峰、行政聡子、舟木利治、宮内嘉明、小原英幹、

渡辺精四郎、黒河内和貴、栗山茂樹。肝再生過程における Shc の発現増強とその局在。p46Shc は増殖肝細胞の核に強発現する。第 7 回日本肝臓学会大会。2003.10.15-16, 大阪。

25) 舟木利治、渡辺精四郎、栗山茂樹。主題示説 1 「原因不明の肝硬変、肝癌の実態」非 B 非 C 型肝癌の臨床像_B 型および C 型肝癌との比較検討_。第 35 回日本肝臓学会西部会。2003.11.28-29, 岡山。

26) 樋本尚志、宮内嘉明、舟木利治、正木 勉、黒河内和貴、杵川文彦、井上秀幸、渡辺精四郎、栗山茂樹。IGF-II mRNA 結合蛋白に対する自己抗体の意義：肝細胞癌患者における検討。第 35 回日本肝臓学会西部会。

2003.11.28-29, 岡山。

27) 米山弘人、黒河内和貴、正木 勉、樋本尚志、舟木利治、宮内嘉明、吉武 晃、渡辺精四郎、栗山茂樹。インターフェロン治療によるウイルス陰性化後 6 年 6 ヶ月で肝細胞癌を発症した C 型慢性肝炎の 1 例。第 35 回日本肝臓学会西部会。2003.11.28-29, 岡山。

28) 田中美鈴、渡辺精四郎、船越文美、木田裕子、舟木利治、宮内嘉明、正木 勉、樋本尚志、細見直樹、黒河内和貴、栗山茂樹。広範な肝転移による急性肝不全により死亡した原発巣不明の悪性黒色腫の一例。第 35 回日本肝臓学会西部会。2003.11.28-29, 岡山。

H. 知的財産権

特記すべきこと無し。

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

肝線維化改善における幹細胞の関与

分担研究者 東海大学医学部環境保健学 渡辺 哲

要旨：ラット慢性四塩化炭素投与による肝硬変モデルを用いて、遺伝子導入による MMP-13 発現の効果と骨髄細胞移入の線維化改善効果につき検討した。遺伝子導入はアデノウイルスを用いた。骨髄細胞は宿主細胞との対比をするため GFP 陽性マウスからの細胞を通常マウスへ導入して骨髄由来幹細胞の分化につき基礎的な検討を行った。その結果、MMP-13 の発現により肝線維化は改善することが明らかとなった。また骨髄由来幹細胞は幼弱肝細胞や間質細胞へ分化することが判明した。

共同研究者

東海大学医学部地域保健学 稲垣 豊

A 研究目的：

一旦形成された肝線維化が改善することは、実験的にまた臨床例でも観察されている。肝臓における蓄積した細胞外マトリックスからなる線維化がどのような機序で崩壊し、消失するのかは、古くから興味を持たれ研究されてきた。四塩化炭素投与で作成した実験的ラット肝線維化モデルでは、四塩化炭素投与中止により肝線維化の改善がみられる。我々は、この実験的肝線維化・肝硬変の改善過程初期に、間質性コラーゲンを特異的に分解する間質性コラーゲナーゼ遺伝子発現の著明な上昇が一過性にみられ (J. Hepatology, 2000; J. Hepatology, 2001)、特に四塩化炭素 12 週間投与の肝硬変の改善過程ではその産生細胞が骨髄由来幹細胞であることを見いだした (Hepatology, 2001; Academic Press, 2003)。このことは、間質性コラーゲナーゼを肝臓で効率よく発現させることによる肝硬変の新しい治療の可能性を示している。しかし、実際に間質性コラーゲナーゼを肝臓で発現させれば肝硬変の治療が可能か否か、また、骨髄由来幹細胞がどのように肝臓で分化し、どのような機能を発揮しているのか、また効率よく幹細胞を肝臓に誘導する

方法や、幹細胞の硬変肝における癌化の問題など未知の点が多い。

そこで本研究では、肝硬変ラットに間質性コラーゲナーゼ発現アデノウイルスを感染させ、間質性コラーゲナーゼ発現が実際に肝硬変の改善に関与しているか否か、また、マウスの肝線維症の肝臓において、移植された骨髄由来幹細胞の分化の過程を詳細に検討し、肝線維化・肝硬変改善における幹細胞の役割を明らかにすることを目的とする。

B 研究方法

肝線維化は、Wistar 系雄生ラットを用い、オリーブオイルに 30% の濃度に調整した四塩化炭素を週 2 回腹腔内に注射し作成した。四塩化炭素 11 週投与 4 日後にヒト MMP-13 を組み込んだアデノウイルスベクター (RADMMP-13) を大腿静脈より 1 回注入した (1×10^{10} pfu)。その後 1 週、2 週、4 週目に肝臓を摘出した。陰性コントロールとして、LacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (RADlacZ)、空のアデノウイルスベクター (Rad66)、生食投与群を作成した。

肝線維化の程度を定量化するため、Azan

染色画像をコンピューターに取り込み、NIH Image で青色の線維化面積を算出した。遺伝子発現は RT-PCR で、酵素活性は gelatin zymography で検討した。

一方、骨髄幹細胞の肝線維化改善における役割を検討するため、放射線照射した C56/BL6 マウスに、GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞移植を行い、4-6 ヶ月後に四塩化炭素の週 1 回経口投与を開始し 8 週間で肝線維症を作成した。移植実験は、GFP トランスジェニックマウスの一個の CD45 陽性細胞に 10^5 個の GFP 陰性全骨髄細胞を混ぜたものを移植する群と、GFP トランスジェニックマウスの全骨髄細胞を移植する群に分けて行った。

肝組織については、 α -smooth muscle actin (α SMA)あるいは α -fetoprotein (AFP)と GFP の発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

C 研究結果

ラットの実験では、四塩化炭素投与 11 週で肝硬変が作成された。RADlacZ 投与群の 1 週目の肝を X-gal 染色で調べると、肝線維束に沿って陽性所見がみられたが、陽性細胞は間質細胞であった。RADMMP-13 投与群とコントロール群との間で、肝線維化の面積を比較すると、RADMMP-13 投与 2 週目で肝線維化の面積が多群と比較して有意に減少していた。4 週目では群間に差はみられなかった。いずれの群も投与前と比較し、肝線維化は有意に減少していた。血清 ALT 値は群間で差はみられなかったが、2 週、4 週と下がる傾向がみられた。RT-PCR でヒト MMP-13 の遺伝子発現を調べると、発現量はきわめて少なかった。そこで他の MMP の活性を gelatin zymography でみると、RADMMP-13 投与群で 1 週目にコントロール群と比較して MMP-9 の活性上昇を認めた。MMP-2 の活性には差がなかった。

マウスを用いた骨髄細胞移植実験では、single stem cell を移植した群では肝における GFP 陽性細胞の数が少なかったため、今回は全骨髄細胞を移植した系で解析した。GFP 陽性細胞は血管周囲に集まっており、

多くは血液細胞と考えられた。一部に α SMA あるいは AFP のシグナルと GFP が重なっている細胞が観察され、それぞれ活性化星細胞あるいは幼若な肝細胞と考えられた。

D 考察

アデノウイルスを用いた今回の MMP-13 遺伝子導入実験では、MMP-13 の発現はわずかであったが、導入 2 週目に線維化の著明な改善がみられた。4 週目に差がみられなかったことは、導入した遺伝子の発現が 4 週目では減少したこと、またこのモデルは自然にも肝線維化の改善がみられるためと考えられる。いずれにせよ、今回の結果から、MMP-13 の一過性発現は肝線維化の改善に直接的あるいは間接的に関与していることが示された。この機序については現在解析中であるが、Zymography では MMP-9 の活性が強くみられることより、導入 MMP-13 が MMP-9 の活性化を促したことが考えられる。事実 MMP-13 が MMP-9 の酵素活性を上昇させるとの報告がみられる。また、MMP-9 が CD34 骨髄幹細胞を誘導すると報告もあり、この面での解析も今後必要と考えられる。

E 結論

ラット及びマウスの四塩化炭素の慢性投与により作成した肝線維化・肝硬変モデルでは、間質性コラゲナーゼ MMP-13 の一過性発現が線維化改善に重要であることが認められた。マウスの骨髄細胞移植実験から、肝線維化マウスの肝臓に移植された骨髄細胞が認められ、一部は活性化星細胞に、一部は幼若肝細胞に変化していた。

F 健康危険情報：なし

G 健康発表：なし

H 知的所有権の取得状況：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 15 年度分担研究報告書

末期肝硬変の治療アルゴリズムにおける肝移植適応と克服すべき問題点

分担研究者 市田隆文（所属）新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 助教授

研究要旨：わが国の生体肝移植レシピエントを調査し、肝細胞癌を合併する肝炎ウイルス陽性レシピエントを除いた慢性肝不全症例を retrospective に検討し、末期肝硬変に対する治療アルゴリズムを考察した。ここで取り上げた非ウイルス性末期肝硬変は自己免疫性肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎で今まで生体肝移植を受けた症例は 313 例であった。これらを検討すると、その生存率は 5 年生存率 75% と平均的であり、劇症肝炎や小児の肝移植症例には劣るが、ウイルス性肝硬変や肝細胞癌の成績を凌駕していた。この中で、肝移植後の死因を検討すると感染症でグラフトを失う率が最も高率で、難治性腹水や突発性細菌性腹膜炎治療例が大半を占めた。従って、今回の検討では生体肝移植の術前状態で黄疸、肝性脳症よりは敗血症や特に特発性細菌性腹膜炎を来した術前状態ではその生存率が低下することが判明した。末期肝硬変の治療アルゴリズムを構築する上で、最終的には

A. 研究目的

生体肝移植を施行した非ウイルス性肝硬変を日本肝移植研究会の基本資料から抽出し、班研究として当班員がアンケート調査を施行し、集計した生体肝移植レシピエントの術前、術後状態を検討し、末期肝硬変の治療アルゴリズムに生体肝移植が如何に寄与し、どのような問題点が存在し、それが治療アルゴリズムに如何に影響を与えるかを検討した。ここで非ウイルス性肝硬変を対象に末期肝硬変を抽出した理由としてウイルス性肝硬変の多くが肝細胞癌を合併し、これら生体肝移植は代償性肝硬変を合併した症例が多いため、本研究班の目的である末期肝硬変を対象とした症例が肝炎ウイルス陽性レシピエントには少ないことが判明した。そして、そのために、本研究では肝細胞癌非合併で非代償性肝硬変の臨床像を呈する非ウイルス性肝硬変症例として自己免疫性肝疾患を主に検討対象とした。勿論、その対象として近年増加傾向にある C 型肝炎ウイルス陽性肝硬変を取り上げた。

B. 研究方法

わが国における生体肝移植の実態調査を日本肝移植研究会の資料を基に独自のアンケート調査を施行し、特に肝細胞癌の合併を示さない純粹に末期肝硬変で生体肝移植が施行された症例を抽出して、その術前状況と術後成績ならびに死因を検討し、末期肝硬変の治療アルゴリズムとして生体肝移植が如何に寄与するか検討した。対象は非ウイルス性肝硬変（自己免疫性肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎の 313 例）とし、対比検討として C 型肝硬変 218 例も調査した。

C. 研究結果

生体肝移植を受けた自己免疫性肝疾患を中心とする末期肝硬変は 313 例で平均年齢 44.9 ± 12.7 (3-69) 歳であった。その 5 年生存率は 74.5% であり、小児生体肝移植症例の平均や劇症肝不全、胆道閉鎖症の 80% に劣るが、ウイルス性肝硬変や肝細胞癌の成績を遙かに凌駕していた。そして、これらの死亡例を検討すると追跡し得た 305 例中 78 例が死亡し、いずれも術後短期死亡であ

り、78 例中 35 例 (45%) が感染症による死亡であった。その大半は特発性細菌性腹膜炎の治療を行っていた症例であり、生体肝移植施行時期には感染症が制御していても、これら治療歴のある症例は術後の感染症が最大の問題点であることが判明した。それ以外の死亡例は動脈閉塞、GVHD、門脈閉塞、拒絶、特発性血小板減少性紫斑病と肝不全など短期死亡例が数例ずつ認められ、原疾患よる再発が要因となった死亡例は長期死亡例として 2 例に認められただけであった。

一方、対比検討として C 型末期肝硬変を検索し、その総数は 218 例であった。C 型末期肝硬変の生存率は非ウイルス性肝硬変に比して遜色無いが、問題は生体肝移植後の C 型肝炎ウイルス再感染による死亡例 103 例中 12 例 (12%) で、その中に C 型肝炎ウイルス関連死は 9 例 (9%) に及んだことである。しかも、生存中の C 型肝炎ウイルス陽性レシピエント 218 例中 103 例 (47%) はすでに慢性肝炎に陥っていることが判明し、その長期予後は極めて不良なことが判明した。短期死亡例は上述の非ウイルス性肝硬変の死亡例を凌駕しているが、明らかに異なる点は原因肝炎ウイルスによる長期予後の不良であり、術前の難治腹水例は極めて少ないことが判明した。

D. 考察

ウイルス性肝硬変の生体肝移植レシピエントの検討では、術前の非代償期性肝不全の程度が軽微で感染症などの術後合併症は少なく、短期生存率は非ウイルス性肝硬変に勝っているが、長期予後を検討すると、大半がウイルス肝炎、特に C 型肝炎ウイルスの再感染により容易に慢性肝炎から肝硬変へ移行し、その予後は極めて不良であることが判明した。一方、非ウイルス性肝硬変は術前の非代償期の重篤度が高く、特に細菌性腹膜炎など術前の感染症の程度が術後の感染症による死因の増加に深く関わることが判明した。このことは末期肝硬変の治療アルゴリズムを考慮する上で、感染症、特に門脈敗血症、難治性腹水に関連する特発性細菌性腹膜炎の治療の成否が最終目標

の肝移植の成績を左右すると言ってしまうと過言でないと考えられた。

E. 結論

末期肝硬変に対する治療アルゴリズム構築では原因疾患の治療 (抗ウイルス剤、副腎皮質ホルモン剤、UDCA など) と後線維化、運動、栄養療法確立とともに末期肝硬変に合併する腹水、黄疸、肝性脳症、難治性腹水、特発性細菌性腹膜炎などの直接治療の三系統が重要である。その中で、今回最終的な肝移植医療への移行を考えるにあたって、感染症、特に特発性細菌性腹膜炎の制御が極めて重要であることが判明した。これらを考慮に入れた適切な治療アルゴリズムの構築と肝移植医療への移行を考えなければならないと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

市田隆文：肝移植時の B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルス再感染の予防と治療. 肝胆膵 2003;47(5):715-724.

Ichida T: Artificial liver support system for fulminant hepatic failure as bridge-use to living donor liver transplantation. Internal Med 2003; 42(10): 920-921.

市田隆文：生体肝移植におけるドナー選択のピットホール. 今日の移植 2003;16(5):440-450

市田隆文：バイオ人工肝臓の臨床成績と適応. 細胞 2003;35(12):456-458

2. 学会発表

Ichida T: Living donor liver transplantation for autoimmune hepatitis in Japan. The Second Single Topics Conference of Japanese Society of Hepatology, 2004-10-13, (Otsu, Shiga)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

なし

平成 15 年度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)
分担研究報告書

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

分担研究者 小林 廉毅 東京大学

研究要旨：「社会医療診療行為別調査」と「患者調査」を用いて、傷病中分類別、入院・外来別の肝疾患医療費を推計した。その結果、わが国における肝疾患の年間総医療費は推計 5328 億円だった。内訳は、傷病中分類別に多い順で、肝及び肝内胆管の悪性新生物 (1515 億円)、ウイルス肝炎 (1466 億円)、肝硬変 (961 億円)、その他の肝疾患 (585 億円)、慢性肝炎 (510 億円)、アルコール性肝炎 (290 億円) であった。入院・外来の医療費比率は傷病で違いがあり、各傷病の性質や治療法の違いを反映していた。

A. 研究目的

本分担研究では、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最終的な目標としている。本年度は肝疾患診療に関わる医療費について、厚生労働省の「社会医療診療行為別調査」ならびに「患者調査」を用いて、傷病別 (中分類)、性別、年齢別、入院・外来別の推計を試みた。

B. 研究方法

(1) 資料

厚生労働省「社会医療診療行為別調査」は全国の医療機関から、支払基金または国民健康保険連合会に提出される診療報酬明細書 (レセプト) の毎年6月分について、傷病別、性別、年齢別、入院・外来別等の診療行為の件数や点数を推計したものである。公表されている推計値は集計単位が大きく、本研究の推計に使えないため、厚生労働省統計情報部に対して調査票 (個票) 使用の目的外申請を行い、平成14年度調査の肝疾患に関わる匿名化された個票データの使用許可を得た (平成16年1月7日付)。

厚生労働省「患者調査」は3年毎に行われるが、現時点で最新の平成11年版公表データを用いた。

(2) 推計方法

「社会医療診療行為別調査」の個票データから、性別、年齢別、傷病別 (中分類)、入院・外来別の総点数 (及び診療行為別点数)、診療実日数を抽出し、一人あたり平均値を算出した。これに「患者調査」公表データの、性別、年齢別、傷病別 (中分類)、入院・外来別の患者数 (入院については調査日の入院者数、外来については外来患者総数 (推計値) を乗じる等により、年間医療費を推計した。以下に推計式を示す。

(3) 推計式

(i) 入院医療費 (年) = (性別・年齢別・傷病別点数 / 診療実日数) × (調査日の性別・年齢別・傷病別入院患者数) × 365 (日)

(ii) 外来医療費 (年) = (性別・年齢別・傷病別点数 (1月あたり)) × (調査月の性別・年齢別・傷病別外来患者推計数 (初診及び再来)) × 12 (月)

なお、外来患者推計数 (初診及び再来) については、「患者調査」の総患者数から入院患者数を減じて求めたものである。この数値は、調査日には受診しなかったが、当該月において継続して受療している者を含んでいる。

C. 研究結果

「社会医療診療行為別調査」より得た肝疾患に関わる対象患者（レセプト）5,601人の概要を表1に、レセプト1件当たり平均医療費を表2に示す。

表1 対象患者（レセプト）の概要

	人数（割合）	
	性別	男性
	女性	2,509 (44.8%)
年齢 (欠損値=23)	14歳以下	31 (0.6%)
	15～64歳	2,692 (48.3%)
	65歳以上	2,855 (51.2%)
傷病名 (入院1,553人、 入院外4,048人)	ウイルス肝炎	2,167
	肝及び肝内胆管の悪性新生物	782
	アルコール性肝炎	188
	慢性肝炎（アルコール性のものを除く）	1,106
	肝硬変（アルコール性のものを除く）	648
	その他の肝疾患	710

表2 レセプト1件当たり平均医療費（千円）

ウイルス肝炎	入院	302
	入院外	21
肝及び肝内胆管の悪性新生物	入院	412
	入院外	31
アルコール性肝炎	入院	281
	入院外	17
慢性肝炎（アルコール性のものを除く）	入院	222
	入院外	17
肝硬変（アルコール性のものを除く）	入院	304
	入院外	24
その他の肝疾患	入院	233
	入院外	13

肝疾患に限って見る限り、性別では男性がやや多く、年齢では15歳以上の者がほとんどを占め、入院が3割弱（入院外が7割強）、傷病別（中分類）ではウイルス肝炎、慢性

肝炎の順に多かった。

表3に、年間総医療費の推計結果を示す。なお、ここでは各カテゴリーの標本数を確保するため、年齢と性別については細分化せず、傷病別（中分類）、入院・外来別の推計値を示した。

表3 傷病別の年間医療費推計値（百万円）

ウイルス肝炎	入院	51,693
	入院外	94,938
肝及び肝内胆管の悪性新生物	入院	134,203
	入院外	17,331
アルコール性肝炎	入院	18,702
	入院外	10,337
慢性肝炎（アルコール性のものを除く）	入院	17,798
	入院外	33,164
肝硬変（アルコール性のものを除く）	入院	66,397
	入院外	29,739
その他の肝疾患	入院	40,711
	入院外	17,776

表3に示すように、総額として多いのは、肝及び肝内胆管の悪性新生物（1515億円）、ウイルス肝炎（1466億円）、肝硬変（961億円）などであった。総額では推計5328億円となった。また入院・入院外を比較すると、悪性新生物では入院医療費が大半を占めるが、ウイルス肝炎では入院外（外来）医療費が相対的に多く、各傷病の性質や治療方法・療養方法の違いが医療費にも表れていた。

資料として、傷病別（中分類）、性別、年齢別、入院・外来別の推計結果を後掲した（なお推計方法が異なるため、この推計値を用いた傷病中分類別の合計と表3の傷病中分類別の推計値は必ずしも一致しない）。資料1, 2に示す14歳以下の推計値は人数が少ないので正確でないと思われるが、15歳以上についてみると、年齢・性別によって傷病別医療費に違いがあり、各傷病の性質（罹患しやすい年齢、性別など）が医療費にも表れていた。

D. 考察

本研究によれば、わが国における肝疾患の

年間総医療費は推計5328億円だった。内訳は、傷病中分類別に多い順で、肝及び肝内胆管の悪性新生物（1515億円）、ウイルス肝炎（1466億円）、肝硬変（961億円）、その他の肝疾患（585億円）、慢性肝炎（510億円）、アルコール性肝炎（290億円）だった。また入院・外来の医療費比率は、傷病によって違いがあり、各傷病の性質あるいは治療法の違いを反映していると思われた。

従来、わが国における肝疾患関連の医療費は、厚生労働省「国民医療費」の推計値を用いるしかなかったが、同調査は傷病大分類レベルでの推計値の公表のみであり、ウイルス肝炎については「Ⅰ. 感染症及び寄生虫症」に、肝及び肝内胆管の悪性新生物については「Ⅱ. 新生物」に、肝炎や肝硬変等については「XⅠ. 消化器系の疾患」の肝疾患に含まれている。したがって中分類別の医療費や肝疾患全体を包括する医療費を求めることは困難であった（なお「XⅠ. 消化器系の疾患」の肝疾患については、平成13年度時点で、3710億円という推計値が公表されている）。「国民医療費」推計の元データと、本研究で用いた元データは異なるため、推計結果が必ずしも同じ値になるとは限らないが、傷病中分類レベルでの医療費を得たという点で、今後、肝疾患診療の医療経済評価を行う上で、本研究成果は有意義であると考えられる。

E. 結論

わが国における肝疾患の年間総医療費は推計5328億円だった。内訳は、傷病中分類別に多い順で、肝及び肝内胆管の悪性新生物（1515億円）、ウイルス肝炎（1466億円）、肝硬変（961億円）、その他の肝疾患（585億円）、慢性肝炎（510億円）、アルコール性肝炎（290億円）であった。また入院・外来の医療費比率は、傷病によって違いがあり、各傷病の性質あるいは治療法の違いを反映していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

研究協力者

大森正博（お茶の水女子大学）

豊川智之（東京大学）

資料：傷病別（中分類）、性別、年齢別、入院・外来別の推計結果

資料1 男性・14歳以下の年間医療費推計値（百万円）

ウイルス肝炎	入院	0
	入院外	0
肝及び肝内胆管の悪性新生物	入院	0
	入院外	0
アルコール性肝炎	入院	0
	入院外	0
慢性肝炎（アルコール性のものを除く）	入院	0
	入院外	0
肝硬変（アルコール性のものを除く）	入院	0
	入院外	0
その他の肝疾患	入院	0
	入院外	256

資料2 女性・14歳以下の年間医療費推計値（百万円）

ウイルス肝炎	入院	0
	入院外	245
肝及び肝内胆管の悪性新生物	入院	0
	入院外	0
アルコール性肝炎	入院	0
	入院外	0
慢性肝炎（アルコール性のものを除く）	入院	0
	入院外	0
肝硬変（アルコール性のものを除く）	入院	0
	入院外	0
その他の肝疾患	入院	0
	入院外	117