

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究

分担研究報告書

C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究

分担研究者 宮川眞一 信州大学移植外科 教授

研究要旨: 2003年10月の日本肝臓学会、Single topic conference(大津)に際し、我々はC型肝炎に対する生体肝移植の術後成績について全国調査を行い、その調査結果を解析検討した。本邦の36施設にて、1998年4月から2003年3月までに生体肝移植が施行されたC型肝炎症例200例について移植後4年までの患者・グラフト生存率影響する因子を基礎免疫抑制剤の種類を含め検討した。移植後6ヶ月、1年、4年の患者生存率はそれぞれ82.8%、78.8%、68.2%であり、グラフト生存率もほぼ同様であった。移植後4年までの死亡例50例のうち9例(18%)の死亡原因は再発C型肝炎であった。また、レシピエントの年齢が55歳以上、術前血清クレアチニン値が1.5mg/dl以上、術前血清総ビリルビン値が10mg/dl以上、術前MELD scoreの値25以上が生体肝移植後の生存率に有意に影響を及ぼす因子であったが、基礎免疫抑制剤の種類は影響を及ぼさなかった。C型肝炎に対する生体肝移植の短期予後には術前状態が密接に関連しているものと考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎に対する肝移植後の予後については、現在まで脳死肝移植を受けた症例において詳細に検討されてきている。それらによると再発C型肝炎が長期予後に深刻な影響を与えるとされ、また、C型肝炎に対する肝移植後の予後に影響する因子は、肝炎ウイルスの増殖、それによる肝炎の進行あるいは線維化の進行に寄与する因子と認識されている。

さらに移植時のレシピエントの年齢あるいは移植をうけるレシピエントの術前状態も移植後の成績に関与しているとされ

ている。一方、C型肝炎に対しての生体肝移植後の成績についての検討は未だ十分でなく、それに関わる因子についても必ずしも明らかにされていない。そこで今回、本邦におけるC型肝炎に対して生体肝移植が行われた患者の患者・グラフト生存率に及ぼす因子を基礎免疫抑制剤(シクロスポリン/タクロリムス)の影響を含めて検討した。

B. 研究の方法

本邦の36施設にて生体肝移植が上記期間内に施行された200例について、患者・グラフト生存率ならびに移植後4年ま

での患者死亡に影響を及ぼす因子について解析した。今回の検討のもととなる調査においては、患者氏名が明らかにならないように配慮した。

C. 研究結果

200 例の生体肝移植後 6 ヶ月、1 年、2 年、4 年の患者生存率はそれぞれ 82.8%、78.8%、71.8%、68.2% であり、グラフト生存率もほぼ同様で、それぞれ 82.8%、78.2%、71.9%、68.3% であった。また、移植時のレシピエント年齢が 55 歳以上、術前血清 Cr 値が 1.5mg/dl 以上、術前血清 T.Bil 値が 10mg/dl 以上、術前の MELD score が 25 以上の 4 因子が移植後の予後不良因子であることが明らかとなった。しかし、性別、術前の HCC の合併、プロトロンビン値 (PT-INR)、術前 Child-Pugh 分類、基礎免疫抑制剤 (シクロスポリン/タクロリムス)、術後の拒絶反応の有無、と small-for-size graft の有無などの因子と患者予後との関連は認められなかった。

D. 考察

本研究においては C 型肝炎再発の組織所見について未検討のため、C 型肝炎再発に及ぼす生体肝移植の影響の正確な評価は困難であった。C 型肝炎に対する生体肝移植後 4 年以内の死亡に基礎免疫抑制剤 (シクロスポリン/タクロリムス) の種類は影響を及ぼしていないが、

移植時の年齢、ビリルビン高値、クレアチニン高値、MELD score 高値などの術前因子が関連していることが検証された。生体肝移植では部分肝が移植されるため、肝移植直後一時的な肝予備能の低下が必然的に起こるものと考えられる。術前状態が不良な場合、移植後にこの肝予備能低下状態が相乗的に作用し、感染症などの合併症が致命的となる可能性が高くなるものと考えられる。本邦における C 型肝炎に対する生体肝移植後の患者生存率は、最近の欧米からの報告のそれに比しやや低い結果となっている。フォローアップ期間がほぼ同等で再発 C 型肝炎による死亡率もやはりほぼ同じ点を考慮すると、移植の時期の差すなわち術前状態の差が、その違いの大きな要因と考えられた。

E. 結語

C 型肝炎に対する生体肝移植の術後 4 年までの患者死亡に関わる主因子は、レシピエントの年齢 (55 歳以上) とビリルビン高値、クレアチニン高値、MELD score 高値で示される不良な術前状態である。よって、これらパラメーターは C 型肝炎症例の生体肝移植施行時期決定に有用であると考えられた。本研究では C 型肝炎症例の生体肝移植の予後に基礎免疫抑制剤 (シクロスポリン/タクロリムス) は影響しないという結果であったが、本研究は retrospective study であり各々の施設

で免疫抑制剤の使用量等も一定しておらず、また施設によってプロトコール肝生検の施行率にも差が見られており、したがって再発C型肝炎の診断の基準も一定でない。今後、C型肝炎の肝移植後再発に及ぼす因子の解析にはプロトコール肝生検を含めた prospective study が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichikawa E, Hida S, Omatsu Y, Shimoyama S, Takahara K, Miyagawa S, Inaba K, Taki S.: Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient forINF regulatory factor-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101(11):3909-14.
- 2) Yazaki M, Hashikura Y, Takei Y, Ikegami T, Miyagawa S, Yamamoto K, Tokuda T, Kobayashi K, Saheki T, Ikeda S. : Feasibility of auxiliary partial orthotopic liver transplantation from living donors for patients with adult-onset type II citrullinemia. Liver Transpl. 2004 ,10(4):550-4.
- 3) Ogino S, Hashikura Y, Katsuyama Y, Ikegami T, Nakazawa Y, Urata K, Terada M, Miyagawa S, Kawasaki S.: Conversion from tacrolimus to cyclosporine microemulsion therapy in liver transplant recipients. Transplant Proc. 2004, 36(2 Suppl) :299S-301S.
- 4) Hashikura Y, Ikegami T, Nakazawa Y, Urata K, Ogino S, Terada M, Miyagawa S, Kawasaki S, Takei Y, Ikeda S. : Delayed domino liver transplantation: use of the remnant liver of a recipient of a temporary auxiliary orthotopic liver transplant as a liver graft for another patient. Transplantation. 2004, 27;77(2):324.
- 5) Miyagawa S, Soeda J, Takagi S, Miwa S, Ichikawa E, Noike T.: Prognostic significance of mature dendritic cells and factors associated with their accumulation in metastatic liver tumors from colorectal cancer. Hum Pathol. 2004, 35(11):1392-6.
- 6) Takagi S, Miyagawa S, Ichikawa E, Soeda J, Miwa S, Miyagawa Y, Iijima S, Noike T, Kobayashi A, Kawasaki S.: Dendritic cells, T-cell infiltration, and Grp94 expression in cholangiocellular carcinoma. Hum Pathol. 2004 ,35(7):881-6.
- 7) Koide N, Nishio A, Sato T,

- Sugiyama A, Miyagawa S. :
Significance of macrophage
chemoattractant protein-1
expression and macrophage
infiltration in squamous cell
carcinoma of the esophagus. *Am J
Gastroenterol.* 2004 ,99(9):1667-74.
- 8) Koide N, Kishimoto K, Komatsu O,
Yoshizawa A, Sugiyama A,
Miyagawa S. Thoracoscopic
enucleation of esophageal stromal
tumor. : *Dis Esophagus.* 2004 ;
17(1):104-8
- 9) Saito H, Yamaoka Y, Ishizone S,
Maruta F, Sugiyama A, Graham D.
Y., Ota H, Katsuyama T, Miyagawa
S.: Roles of vir D4 and cag G in the
cag pathogenicity island of
Helicobacter pylori in the gastric
pathogenesis using a Mongolian
gerbil model. *Gut* (in press)
- 10) Suzuki F, Hashikura Y, Ise H, Ishida
A, Nakayama J, Takahashi M,
Miyagawa S, Ikeda U.: MCI-186
(Edaravone), a free radical scavenger,
attenuates hepatic warm
ischemia-reperfusion injury in rats.
Transplant Int (in press)
- 11) Ogawa S, Tagawa Y, Kamiyoshi A,
Suzuki A, Nakayama J, Hashikura Y,
Miyagawa S. Crucial roles of
mesodermal cell lineages in a murine
embryonic stem cell-derived in
vitro liver atresia and congenital
cardiac right to left shunt. 19th World
Congress of
International organogenesis system.
Stem Cells (in press)
- 12) 中沢勇一、佐近雅宏、三原基弘、
三田篤義、浦田浩一、池上俊彦、
寺田克、橋倉泰彦、宮川眞一、中
山淳。生体肝移植後の再発 C 型肝炎
の臨床病理学的検討。今日の移
植 17 卷 6 号 825-828. 2004

2. 学会発表

- 1) Yuichi Nakazawa. Living-donor liver
transplantation for HCV in Japan: a
national survey. 2nd Prograf summit
symposium 6th April 2004, Miyazaki,
Japan
- 2) Mita A, Ikegami T, Hashikura Y,
Terada M, Nakazawa Y, Urata K,
Miyagawa S. A successful case of
living related liver transplantation
with biliary Society for Digestive
Surgery. December 2004, Yokohama,
Japan
- 3) Kobayashi A, Miyagawa S, Miwa S,
Nomura K, Nakata T, Akabane Y,
Kusama K. Liver resection in
patients with hepatocellular
carcinoma who met Milan Criteria.
19th World Congress of International

Society for Digestive Surgery.

December 2004, Yokohama, Japan

- 4) Nakata T, Miyagawa S, Miwa S, Kobayashi A, Nomura K, Nimura Y, Seki N. Identification of genes associated with multiple nodules in hepatocellular carcinoma using cDNA microarray. 19th World Congress of International Society for Digestive Surgery. December 2004, Yokohama, Japan
- 5) 橋倉泰彦、池上俊彦、中澤勇一、浦田浩一、三田篤義、三原基弘、宮川眞一:ウイルス性肝硬変症例に対する生体肝移植. 第34回日本消化器病学会甲信越支部例会 2004.6.5. 甲府
- 6) 宮川眞一、三田篤義、三原基弘、浦田浩一、池上俊彦、寺田克、橋倉泰彦. B型、C型肝炎に起因する肝硬変、肝細胞癌に対する肝移植の成績. 第22回日本肝移植研究会. 2004.7.1. 新宿
- 7) 中澤勇一、橋倉泰彦、池上俊彦、寺田 克、三原基弘、浦田浩一、宮川眞一. C型肝炎に対する生体肝移植後に難治性拒絶反応を合併し肝不全へ進行した症例. 第22回日本肝移植研究会 移植病理検討会 2004.7.2、新宿
- 8) 池上俊彦、橋倉泰彦、宮川眞一. 肝移植後ウイルス肝炎の予防ならび
- に治療に関する検討 DDW-Japan 2004. 2004.10.5. 福岡
- 9) 宮川眞一、池上俊彦、橋倉泰彦. 肝細胞癌に対する生体肝移植の適応と成績. DDW-Japan 2004 2004.10.5 福岡

H. 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
なし

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1) 梅下浩司, 他	生体肝ドナーの術後合併症と予後—日本肝移植研究会のとりくみを中心に	外科	66(9)	1019-1024	2004
2) Tanaka Y, et al.	Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation.	Immunological Investigations	33(3)	309-324	2004
3) Tanaka Y, et al.	Low incidence of acute rejection after living donor liver transplantation: Immunological analyses by MLR using a CFSE labeling technique.	Transplantation			(in press)
4) Sato Y, et al.	Wall shear stress and intrahepatic leukocytes of graft in living related donor liver transplantation	Hepatogastroenterology	51(56)	329-33	2004
5) Takeishi T, et al.	Rapid progressive hepatitis C after liver transplantation: a case report	Transplant Proc	36(8)	2304	2005
6) 山際訓, 他	インターフェロン抵抗性に関する宿主免疫関連因子	肝胆膵	49(6)	1039-1046	2004
7) Muto H, et al.	Types of human leucocyte antigen and decrease in HCV core antigen in serum for predicting efficacy of interferon- α in patients with chronic hepatitis C: analysis by a predictive study.	J Gastroenterol	39	674-680	2004
8) Makiyama A, et al.	Characteristics of patients with chronic hepatitis C who developed hepatocellular carcinoma after a sustained response to interferon therapy.	Cancer	101	1616-1622	2004
9) Imai Y, et al.	Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response.	J Gastroenterol	39	1069-1077	2004
10) Kasahara A, et al.	Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death.	J Viral Hepatitis	11	148-156	2004
11) Takashi Orii, et al.	Rehospitalization after pediatric living-donor liver transplantation	Transplantation	77(6)	880-885	2004

12) 川岸直樹, 他	腹部救急疾患における深部真菌症への対策、生体肝移植における真菌感染症対策	日本腹部救急医学会雑誌	24(1)	57-65	2004
13) 白幡康弘, 他	家族性高コレステロール血症・ヘテロタイプの父親をドナーとして生体肝移植を行った同ホモタイプの1例	日本消化器外科学会雑誌	38(1)	57-62	2004
14) 川岸直樹, 他	生体肝移植における感染症治療の up date	Surgery Frontier	11(4)	59-62	2004
15) 川岸直樹, 他	特殊病態下の真菌治療-抗真菌薬の洗濯と使い方 3) 臓器移植後	感染と抗菌薬	7(4)	413-417	2004
16) 里見進	肝移植の現状と展望	第353回東北医学会例会シンポジウム, 第353回東北医学会例会誌		30-32	2004
17) Kasahara M, et al.	Auxiliary partial orthotopic living donor liver transplantation: Kyoto University experience.	Am J Transplant	5(3)	558-565	2005
18) Kasahara M, et al.	Impact of enteral nutrition in adult-to-adult living donor liver transplantation: a preliminary study.	The Japanese Journal of Surgical Metabolism and Nutrition	38	1-7	2004
19) Iwasaki M, et al.	Noninvasive evaluation of graft steatosis in living donor liver transplantation.	Transplantation	78(10)	1501-1505	2004
20) Kasahara M, et al.	Functional portal flow competition after auxiliary partial orthotopic living donor liver transplantation in noncirrhotic metabolic liver disease.	J Pediatr Surg	39(7)	1138-1141	2004
21) Takada Y, et al.	End-to side portocaval shunting for a small-for-size graft in living donor liver transplantation.	Liver Transplantation	10	807-810	2004
22) Takada Y, et al.	Living related liver transplantation.	Transplant Proc	36	271S-273S	2004
23) 高田泰次, 他	肝細胞癌の再発は必ず起こるか。	肝胆膵	50	141-146	2005
24) 高田泰次, 他	肝細胞癌に対する肝移植	肝疾患Review 2004		300-301	2004
25) 上田幹子, 他	当科における肝癌に対する生体肝移植の成績	癌の臨床	50	905-912	2004

26) 上田幹子, 他	B型肝炎と肝移植	肝胆臓	49	523-528	2004
27) Takeishi T, et al.	Rapid progressive hepatitis: C after liver transplantation: A case report.	Transpl Proc	36	2304	2004
28) Mochida S, et al.	Genetic Polymorphisms in Promoter Region of Osteopontin Gene May be a Marker Reflecting Hepatitis Activity in Chronic Hepatitis C Patients	Biochem Biophys Res Commun	313	1079-1085	2004
29) Naito M, et al.	SNPs in the Promoter Region of Osteopontin Gene as a Marker Predicting the Efficacy of Interferon-Based Therapies in Chronic Hepatitis C Patients.	J Gastroenterol			(in press)
30) 武富紹信, 他	移植医療の現状	福岡医学雑誌	95(10)	269-273	2004
31) 米村祐輔, 他	C型肝炎変に対する生体肝移植後に急速な経過をたどり死亡したfibrosing cholestatic hepatitisの1例	日本臨床外科学会雑誌	65(12)	3257-3262	2004
32) Kishi Y, et al.	Alternatives to the double vena cava method in partial liver transplantation	Liver Transpl.	11(1)	101-103	2004
33) Sugawara Y, et al.	Advances in adult living donor liver transplantation: a review based on reports from the 10th anniversary of the adult-to-adult living donor liver transplantation meeting in Tokyo	Liver Transpl	10(6)	715-20	2004
34) Sugawara Y, et al.	Refinement of venous reconstruction using cryopreserved veins in right liver grafts	Liver Transpl	10(4)	541-547	2004
35) Kishi Y, et al.	Sharing the middle hepatic vein between donor and recipient: left liver graft procurement preserving a large segment VIII branch in donor	Liver Transpl	10(9)	1208-1212	2004
36) Kishi Y, et al.	Hepatic arterial anatomy for right liver procurement from living donors	Liver Transpl	10(1)	129-33	2004
37) Hata S, et al.	Volume regeneration after right liver donation	Liver Transpl	10(1)	65-70	2004
38) Akamatsu N, et al.	Surgical repair for late-onset hepatic venous outflow block after living-donor liver transplantation	Transplantation	77(11)	1768-70	2004
39) Dulundu E, et al.	Duct-to-duct biliary reconstruction in adult living-donor liver transplantation	Transplantation	78(4)	574-579	2004

40) Kaneko J, et al.	Prediction of hepatic artery thrombosis by protocol Doppler ultrasonography in pediatric living donor liver transplantation	Abdom Imaging	29(5)	603-605	2004
41) Dulundu E, et al.	Revolution and refinement of surgical techniques for living donor partial liver transplantation	Yonsei Med J	45(6)	1076-88	2004
42) Ichikawa E, et al.	Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient for TNF regulatory factor-2	Proc Natl Acad Sci U S A.	101(11)	3909-3914	2004
43) Yazaki M, et al.	Feasibility of auxiliary partial orthotopic liver transplantation from living donors for patients with adult-onset type II citrullinemia	Liver Transpl	10(4)	550-554	2004
44) Ogino S, et al.	Conversion from tacrolimus to cyclosporine microemulsion therapy in liver transplant recipients	Transplant Proc	36(2 Suppl)	299S-301S	2004
45) Hashikura Y, et al.	Delayed domino liver transplantation: use of the remnant liver of a recipient of a temporary auxiliary orthotopic liver transplant as a liver graft for another patient	Transplantation	27;77(2)	324	2004
46) Miyagawa S, et al.	Prognostic significance of mature dendritic cells and factors associated with their accumulation in metastatic liver tumors from colorectal cancer	Hum Pathol	35(11)	1392-1396	2004
47) Takagi S, et al.	Dendritic cells, T-cell infiltration, and Grp94 expression in cholangiocellular carcinoma	Hum Pathol	35(7)	881-886	2004
48) Koide N, et al.	Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus	Am J Gastroenterol	99(9)	1667-1674	2004
49) Koide N, et al.	Thoracoscopic enucleation of esophageal stromal tumor	Dis Esophagus	17(1)	104-108	2004
50) Saito H, et al.	Roles of vir D4 and cag G in the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori in the gastric pathogenesis using a Mongolian gerbil model	Gut			(in press)
51) Suzuki F, et al.	MCI-186 (Edaravone), a free radical scavenger, attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury in rats	Transplant Int			(in press)
52) Ogawa S, et al.	Crucial roles of mesodermal cell lineages in a murine embryonic stem cell-derived in vitro liver atresia and congenital cardiac right to left shunt. 19th World Congress of International organogenesis system	Stem Cells			(in press)
53) 中沢勇一, 他	生体肝移植後の再発C型肝炎の臨床病理学的検討	今日の移植	17(6)	825-828	2004

5. 生体肝ドナーの術後合併症と予後 ——日本肝移植研究会のとりくみを中心に*

梅下浩司 門田守人**

【要旨】日本肝移植研究会は1992年より肝移植症例の登録を行ってきたが、2002年4月に米国で生体ドナーが術後死亡し大きな社会問題となったことにいち早く注目し、生体肝ドナーに関する緊急調査を行った。100%のドナーについて回答を得、1,841人のドナー中手術関連死亡は1例もなかったが、12.4%に有意な合併症を認めた。また、研究会内にドナー安全対策委員会を設け、その後本邦で発生した不幸な1事例につき厳密な検証を行い、公表した。さらに生体肝ドナーの登録と生涯にわたる追跡のシステムを構築し、またドナー本人へのQOLなどに関するアンケート調査も開始した。結果がまとまり次第、順次公表していく予定である。

はじめに

日本肝移植研究会(門田守人会長)は、1992年より肝移植症例の登録を開始し、これまでレシピエントに関する情報を中心に集計結果を誌上報告してきた¹⁾。一方、本邦の肝移植の大部分を占める生体移植のドナーの面にもいち早く着目し、その安全性に関して種々の検討と対策を行ってきた。

本稿では、生体肝ドナーの術後合併症と予後についての調査結果を報告するとともに、生体肝ド

ナーについての本研究会のとりくみにつき紹介する。

I. 生体肝ドナーの短期予後(手術関連死亡と術後合併症)

死体臓器移植の場合と異なり、生体臓器移植においては健康人であるドナーの安全を確保することが最重要課題となる。腎移植に比べ、肝移植は生体ドナーへの負担が大きく、危険性が高いと予測された。そこで移植医は、まず外側区域グラフトから始めドナーの安全を確かめながら、大きなレシピエントを助けるため、徐々により大きなグラフトへと適応を広げて行った。一方、欧米からは生体肝ドナーの死亡が、一部は論文報告により、一部は風聞により伝えられていた。

2002年4月米国のSurmanは、ニューヨークにおいて生体肝ドナーの死亡が社会問題化したのを

キーワード：日本肝移植研究会，症例登録，生体肝移植，ドナー

* Operative morbidity and prognosis of living liver donors in Japan

** K. Umeshita, M. Monden(教授)：大阪大学病態制御外科。

表1. 調査協力施設

北海道 北海道大学	東海・北陸 金沢医科大学 金沢大学 名古屋市立大学 名古屋大学 松波総合病院 三重大学
東北 東北大学 弘前大学 福島県立医科大学	近畿 大阪医科大学 大阪市立大学 大阪大学 京都大学 神戸大学 奈良県立医科大学 兵庫医科大学
関東・甲信越 神奈川県立こども医療センター 北里大学 群馬大学 慶應義塾大学 自治医科大学 昭和大学 信州大学 千葉大学 筑波大学 東京医科歯科大学 東京医科大学 東京女子医科大学 東京大学 獨協医科大学 新潟大学 日本医科大学 日本大学 横浜市立大学	中国・四国 愛媛大学 岡山大学 国立病院岡山医療センター 島根医科大学 徳島大学 広島大学 山口大学 九州・沖縄 鹿児島大学 九州大学 熊本大学 長崎大学

契機に、全米で7人の生体肝ドナーが死亡しており、さらに他の2人が肝提供後に肝不全となり肝移植を受けるにいたったと【New England Journal of Medicine】で述べ⁵⁾、警鐘を鳴らした(ただし、その後上記の死亡者数は3人であったと訂正された⁶⁾)。日本肝移植研究会は、これを受けたに本邦の生体肝ドナーに関する緊急調査を行うことを2002年4月の役員会で決定した。この緊急調査の結果はすでに【Lancet】に掲載された⁷⁾ので、本稿では若干の未発表データを加え、要点のみ触れることとする。

2002年4月の時点で研究会のデータベースに登録されていた1,852生体肝移植の1,853ドナー(1人のレシピエントは、2人のドナーからそれぞれ

右葉と左葉を移植される“dual graft”を受けていた)を対象とし、それらの移植を施行した46施設(表1)に調査用紙を発送し回答を依頼した。調査項目は、ドナーの性別、年齢、レシピエントとの続柄、同種輸血の有無、術後入院日数、合併症の有無、再手術の有無、予後の8項目であった。

全1,853ドナーについて回答が得られた。12人のドナーはドミノ移植の2次ドナーであり同時にレシピエントでもあることから、解析から省いた。ドナーの性別は、男性943、女性898であった。年齢分布は表2の通りであり、30歳代がもっとも多かった。20歳未満が13人あったが、最低齢は17歳でレシピエントの母親であった。一方、最高齢は69歳であった。グラフトのタイプ別のド

表2. ドナーの年齢分布

年齢(歳)	10～19	20～29	30～39	40～49	50～59	60～69	計
人数	13	472	670	429	204	53	1,841

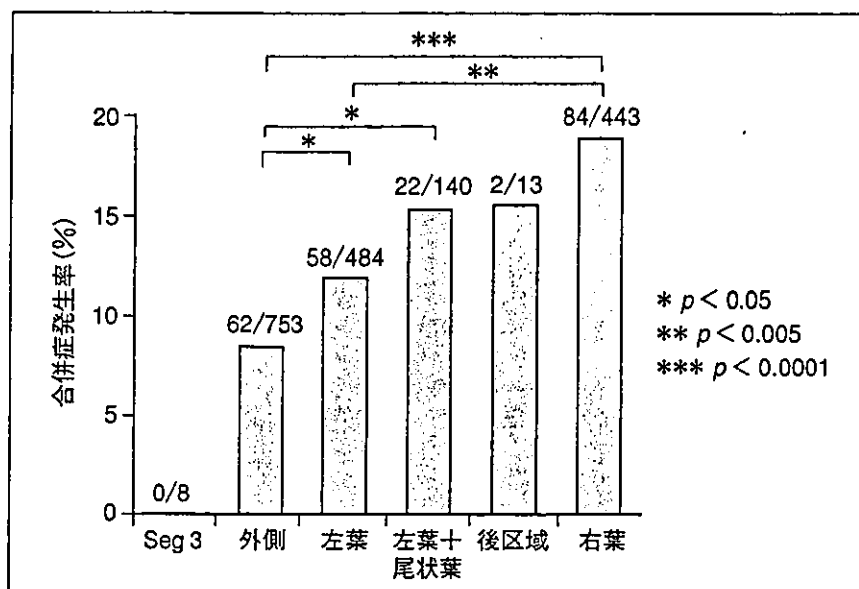


図1. グラフト別にみた肝提供後の合併症発生率

ナーの平均年齢は、右葉グラフト40.9歳、左葉グラフト40.1歳、左葉+尾状葉グラフト37.5歳、外側区域グラフト33.0歳であり、外側区域グラフトは他の3種のグラフトに比べて有意に若かった。同種輸血は、21人(1.1%)のドナーで行われていた。

手術関連死亡は1人もなかったが、228人(12.4%)のドナーに計244の術後合併症が認められた。グラフト別の合併症発生率は図1の通りであり、右葉グラフトに多く、外側区域グラフトは少なく、左葉グラフトと左葉+尾状葉グラフトはその中間であった。合併症の内容別でみると、胆汁瘻(術後入院日数30日以上またはなんらかのinterventionを要したものと定義)は右葉グラフトに多く、逆に胃内容停滞(肝切離面と胃が癒着することによる)を主とする胃十二指腸合併症は左葉系グラフト(左葉グラフト、左葉+尾状葉グラフト、外側区域グラフト)に多かった。術後入院日数は平均15.6日、中央値14日であった。グ

ラフト別では図2の通りであり、右葉グラフトで長く、次いで左葉+尾状葉グラフトであり、外側区域と左葉グラフトは短かった。再手術は23人(1.2%)で行われていた。

一方海外では、やはり2002年4月のSurmanの論説を受け、多施設を対象とした調査が米国で行われた⁹⁾。われわれの報告のように生体肝移植開始後の国内の全例を網羅した調査ではなく、ある一定期間の症例を対象とし、回答のあった42施設の449ドナーを集計した結果である。ドナーの死亡は1例(0.2%)で、14.5%に合併症を認めたとしている。同種輸血が4.9%、再手術率が4.5%など、われわれの結果より若干高い数字が報告されている。

II. 生体肝ドナーの長期予後とQOL

前項の緊急調査を通じて、肝提供手術の術後早期には少なからぬ合併症のあることがわかった。ほとんどは一過性であるが、一部は症状が長期に

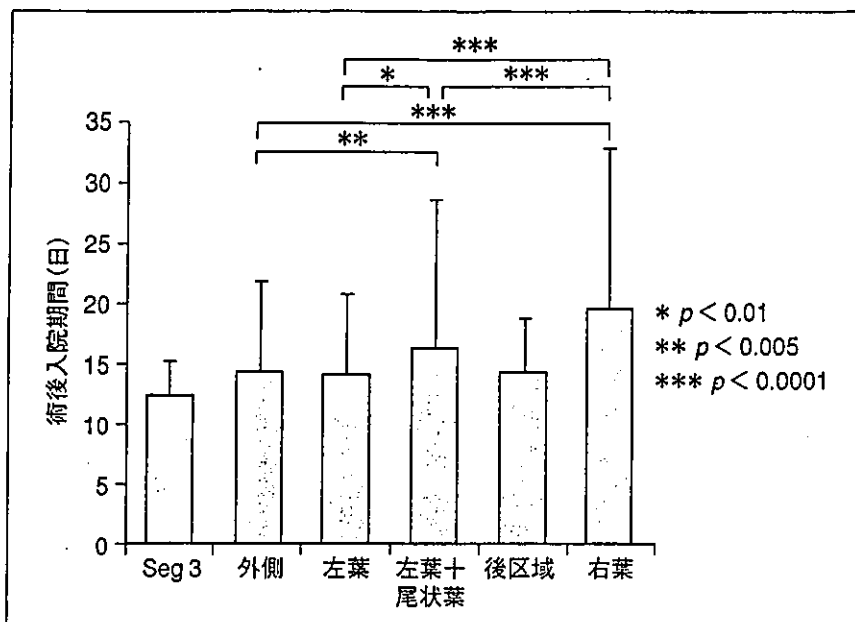


図2. グラフト別に見た肝提供後の入院日数

表3. 生体肝ドナーの登録と長期追跡調査

・術前
イニシャル, 年齢, 性, 身長, 体重, BMI, 既往歴, 併存症, 脂肪肝, 倫理的問題
・術中～術後
肝グラフトの種類, 出血量, 手術時間, 残肝率, グラフト重量, 血管グラフト採取の有無, 血清T-Bil最高値, 血清ALT最高値, PT最高値, 血清アンモニア最高値, 輸血の有無と種別, 術後入院日数, 術後合併症, 再手術
・現状
術前状態への完全復帰の可否(否の場合:理由, 活動状況%), 生死(死の場合:死亡日, 死因)

わたる可能性が示唆された。また1人のドナーは、提供手術後約10年を経てからではあるが、死亡していることがわかった。これらのことより、生体肝ドナーのフォローアップは短期では不十分であり、長期に行うことが必要と考えられた。

そこで日本肝移植研究会は、生体肝ドナーの登録と生涯にわたる追跡調査を行うことを決定し(担当:里見進常任世話人)、登録/追跡項目を表3のように定め、2003年10月に本邦の全49移植施設に調査用紙を発送した。現在回答を集計中で

あり、解析ができ次第公表する予定である。なお、この調査は毎年繰り返して行い、新規ドナーの登録と登録済みドナーのフォローアップを行う。

さらに、移植施設を通じての医学的な観点からの調査のみでなく、生体肝ドナー本人からみた合併症、QOLに関する調査の必要性が内外より指摘されていた。日本肝移植研究会は、里見進常任世話人を中心としてアンケート調査を行うことを決定した。内容については、移植医のみでなく、社会学者や生体肝提供の経験者を含めて慎重に検討した。2004年6月に調査用紙を発送した。なお、データの解析は移植施設の医療従事者ではなく、第3者が担当する。

III. 生体肝ドナーに関するその他のとりくみ

さらに、日本肝移植研究会は2002年4月、①研究会として生体肝ドナー手術のインフォームド・コンセントのガイドラインを作成すること、②ドナーに重篤な合併症が発生した場合に専門的な検証を行う委員会を設けることを決定した。前者については、里見進常任世話人と矢永勝彦幹事を中心として作業をすすめ、2003年1月に完成し、全会員に送付するとともにホームページ上に

公開した(<http://jlts.umin.ac.jp/donor.html>). 後者については、清澤研道常任世話人を委員長とする安全対策委員会を立ち上げた。その後2003年1月に生体肝ドナーが術後に肝不全となり肝移植を受けた事例(2003年5月に死亡)が発生したさいには本委員会が厳密な検証を行い、その結果を2003年4月の学術集会で報告するとともに、誌上報告も行った⁹⁾。

また、生体肝ドナーの一部より、提供後長期を経て体調の不良があった場合などに、移植を受けた施設にかかわらず広くドナーを受け入れる外来を設けてほしいとの要望があり、いわゆる「ドナー外来」を各施設で設けることを2003年10月に決定した。その後多くの施設でドナー外来が開設され、これに関する最新情報は逐次研究会のホームページ上に公開している [[http://jlts.umin.ac.jp/donor\(outpatient\).htm](http://jlts.umin.ac.jp/donor(outpatient).htm)].

おわりに

生体肝移植は、健康なドナーの体にメスを入れなければならないという本質的な問題点を含んだ医療である。過去15年の歴史のうちに多くの進歩があったが、解決しなければならない新たな問題も次々と現れてくる感がある。移植医のみならず医学界全般、ひいては広く社会全体とともに一

歩ずつ解決していく必要がある。最後に、移植医は常に脳死肝提供の増加に向けての努力も怠ってはならないという私見を付け加え、本稿を終えさせていただく。

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) 肝移植研究会：肝移植症例登録報告。肝臓 39：5-12, 1998
- 2) 日本肝移植研究会：肝移植症例登録報告。移植 35：133-144, 2000
- 3) 日本肝移植研究会：肝移植症例登録報告。移植 37：245-251, 2002
- 4) 日本肝移植研究会：肝移植症例登録報告。移植 38：401-408, 2003
- 5) Surman OS：The ethics of partial-liver donation. N Engl J Med 346：1038, 2002
- 6) Surman OS：Transplantation of the right hepatic lobe. N Engl J Med 347：618, 2002
- 7) Umeshita K, Fujiwara K, Kiyosawa K et al：Operative morbidity of living liver donors in Japan. Lancet 362：687-690, 2003
- 8) Brown RS, Russo MW, Lai M et al：A survey of liver transplantation from living adult donors in the United States. N Engl J Med 348：818-825, 2003
- 9) 日本肝移植研究会ドナー安全対策委員会：生体肝移植ドナーが肝不全に陥った事例の検証と再発予防への提言。移植 39：47-55, 2004

Multiparameter Flow Cytometric Approach for Simultaneous Evaluation of Proliferation and Cytokine-Secreting Activity in T Cells Responding to Allo-stimulation

Yuka Tanaka, Hideki Ohdan,* Takashi Onoe, and Toshimasa Asahara

Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research,
Department of Surgery, Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University, Hiroshima, Japan

ABSTRACT

We report a method combining mixed lymphocyte reaction (MLR) using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labeling technique, intracellular cytokine immunofluorescence staining (ICIS), and multiparameter flow cytometry for simultaneous determination of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. C57BL/6 (B6) mice and Balb/c mice were used in the experiments. CFSE-labeled responder splenocytes were cultured with irradiated stimulator splenocytes, followed by ICIS. In both the Balb/c stimulator-versus-B6 responder (Balb/c-vs.-B6) and the B6-vs.-Balb/c allogeneic combinations, interleukin (IL)-2 secreting cells and interferon (IFN)- γ secreting cells were identified predominantly in proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T cell fractions, respectively. The suitability of this method was proven by demonstrating a close relationship between the values of cytokines in culture supernatants (that were determined by Cytometric Bead Array assay) and indexes for cytokine-production (that were obtained by

*Correspondence: Hideki Ohdan, M.D., Ph.D., Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Department of Surgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-Ku, Hiroshima, 734-8551, Japan; Fax: + 81-82-257-5224; E-mail: hohdan@hiroshima-u.ac.jp.

multiplying the percentage of cytokine-producing cells in T cells and mean fluorescence intensity of cytokine-staining determined by the combined MLR and ICIS).

Key Words: Cytometric; Cytokine-secreting; Allo-stimulation; MLR; CFSE; ICIS.

INTRODUCTION

The mixed lymphocyte reaction (MLR) is a widely used method for evaluating immune responses to allo-antigens in both experimental and clinical transplantation. Tritiated thymidine incorporation into dividing cells is the most commonly used method for quantifying cell division in MLR. However, this traditional method does not enable phenotypic analysis of proliferating cells in heterogeneous MLR. Flow cytometric analysis of lymphocyte division by the serial halving of the fluorescence intensity of the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) has recently been used instead of the tritiated thymidine method in the MLR (Krupnick et al., 2001; Nitta et al., 2001; Popma et al., 2000; Rentenaar et al., 2002). CFSE stably stains intracellular proteins without toxicity, and the fluorescence of each stained cell segregates equally to daughter cells upon cell division, resulting in sequential halving of cellular fluorescence intensity with each successive generation (Paramore et al., 1992). When analyzed by flow cytometry (FCM), this sequential halving of fluorescence is visualized as distinct peaks or populations of cells and can be used to track cell division in populations of proliferating cells. This, then, allows phenotypic analysis of proliferating cells in addition to determining the number of cells produced in each generation by multicolor FCM analysis. The MLR assay using a CFSE-labeling technique (hereafter referred to as CFSE-MLR assay) enables determination of the number of proliferating cells in response to allogeneic stimulation and simultaneous determination of the phenotype of the proliferating cells by use of multiparameter FCM analysis.

In addition to the determination of the phenotype of the proliferating T cells in response to allogeneic stimulation, cytokine-secreting activity in those T cells could be simultaneously determined by combining intracellular cytokine immunofluorescence staining (ICIS). Quantifying the cell populations expressing specific cytokines along with identification of the cytokine-secreting cell phenotype in MLR would be much more informative than just the detection of cytokines in culture supernatants. We have demonstrated the utility of a method combining CFSE-MLR, ICIS, and multiparameter FCM for the simultaneous determination of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allogeneic stimulation in mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Eight-to-ten-week-old female C57BL/6J (B6) (H-2^b) and Balb/c (H-2^d) mice were purchased from Clea Japan, Inc. (Osaka, Japan). All animals were maintained in a specific pathogen-free micro-isolator environment.

Cell Isolation and CFSE Labeling

Mice were sacrificed by cervical dislocation. Spleen was aseptically removed and mechanically dissociated by gently pressing using a syringe plunger. The pellet was treated with the 1 ml/mouse of erythrocyte-lysing solution (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA-2Na, and phosphate-buffered saline: PBS, pH7.4) for 3 minutes at room temperature and filled up with MLR medium, i.e., RPMI culture medium containing 15% controlled process serum replacement-type 3 (Sigma, St.Louis, USA), 5 μM 2-mercaptoethanol (Katayama, Osaka, Japan), 1% HEPES buffer (GIBCO, NY, USA), and 100 IU/ml penicillin–100 μg/ml streptomycin (GIBCO, NY, USA) through the 70 μm cell strainer. The cells were then washed twice and resuspended with MLR medium until assay. Cell viability was determined by exclusion of 0.4% trypan blue solution. For CFSE labeling, 1×10^7 cells/ml of splenocytes from either B6 or Balb/c mice were resuspended in PBS. 5-(and 6)-CFSE (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) was added to make a final concentration of 5 μM, and the cells were gently mixed and incubated for 15 min at 37°C in a CO₂ incubator protected from light. Labeling of cells was stopped by adding cold PBS with 2% fetal bovine serum (FBS) (Sanko, Tokyo, Japan), and the cells were then washed and resuspended in MLR medium.

Mixed Lymphocyte Reaction

The splenocyte stimulator cells were prepared from either B6 or Balb/c mice and were irradiated with 30 Gy, and the responder cells were labeled with CFSE, as described above. Both the stimulator and responder cells in the MLR medium were adjusted to 4×10^6 cells/ml of medium and co-cultured in a total volume of 2 ml of medium in 24-well flat-bottom plates (BD Labware, Franklin Lakes, NJ) at 37°C in a 5% CO₂ incubator in the dark for 5 days. At the end of MLR culture, cells were stimulated with 1 μM ionomycin (Sigma, St. Louis, USA), 10 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, St. Louis, USA) and GolgiPlug™ (a protein transport inhibitor containing brefeldin A) (BD Pharmingen, San Diego, USA) (2 μl into 2 ml medium) for 4 hours to enhance content of intracellular cytokines without affecting cell-proliferation, as described previously (Baran et al., 2001; Openshaw et al., 1995; Pala et al., 2000; Rostaing et al., 1999). After MLR culture, non-adherent cells were harvested and stained for cell surface marker, annexin V, intracellular cytokine, and analyzed by flow cytometry.

Cell Surface Marker and Intracellular Cytokine Staining for Multiparameter FCM

Proliferation of the MLR cultured cells was detected in CFSE-labeled lymphocytes in a multi-parameter FCM setting as follows. After harvesting, the cultured cells were washed twice and suspended in PBS at a concentration of 1×10^6 cells/100 μl. Monoclonal antibodies (mAbs) used for identifying T cell subsets were PerCP-Cy-Chrome™ (PerCP-Cy5.5)-conjugated anti-CD4 (GK1.5) and anti-CD8a (53–6.7). Non-specific Fcγ Receptor binding of labeled antibodies was blocked by CD16/32 (2.4G2). All mAbs were purchased from BD Pharmingen (San Diego, USA) and their appropriate dilution was determined by titration studies. Cells were stained with anti-CD4

or anti-CD8 mAb together with anti-CD16/32 mAb for 30 minutes at 4°C. After cell surface antigen staining, the cells were stained with annexin V for gating out either dead or apoptotic cells as follows. The cells were resuspended in 100 µl of annexin V binding buffer (BD Pharmingen) after washing with plain PBS and then stained with allophycocyanin (APC)-conjugated annexin V for 15 minutes at a room temperature. Following cell surface antigen and annexin V staining, the cells were washed with PBS, and the washing was followed by fixing, permeabilizing and intracellular cytokine immunofluorescence staining (ICIS) according to the manufacturer's instructions. Briefly, one million cells were fixed and permeabilized using 200 µl of Cytofix/Cytoperm™ solution (containing 4% of paraformaldehyde and saponin) (BD Pharmingen) for 20 minutes at room temperature, and washed twice with Perm/Wash™ buffer (containing FBS and saponin) (BD Pharmingen). For intracellular cytokine staining, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-cytokine mAbs, i.e., anti-IL-2 (JES6-1A12), IFN-γ (XMG1.2) or and rat IgG1 (an isotype matched control), were used. One million of the fixed and permeabilized cells were incubated with 20 µl of anti-cytokine mAbs in 100 µl of Perm/Wash™ buffer for 20 minutes at room temperature, and were washed and resuspended in 200 µl of Pharmingen Stain Buffer (containing 2% FBS and 0.09% sodium azide) (BD Pharmingen) for use of FCM analysis. Four-color FCM was performed on a FACSCalibur® dual-laser cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) using standard Cell Quest™ acquisition/analysis, and fluorescence compensation was achieved using an appropriate single fluorochrome-labeled sample. For compensation in multiparameter FCM, CFSE intensity of undivided cells was set at between 10^3 and 10^4 , and an equilibrium between the FL-1 (CFSE) and FL-2 (PE) was sought, by adjusting the FL-1 and FL-2 parameters, to properly scale both FL-1 and FL-2 in a dot plot. Then, the FL-2 and FL-3 (PerCP-Cy5.5) signals and the FL-3 and FL-4 (APC) signals were compensated in turn. Typical compensation values were as follows: 1% for FL-1–FL-2, 30% for FL-2–FL-1, 5% for FL-2–FL-3, 15% for FL-3–FL-2, 5% for FL-3–FL-4, and 10% for FL-4–FL-3. Between 5 and 10×10^5 total events were collected yielding 1×10^5 annexin V-negative events.

Quantitative Estimation of T Cell Proliferation in Response to Allo-stimulation by MLR Assay Using a CFSE-Labeling Technique

On CFSE fluorescence histograms, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were selected by gating and analyzed for CFSE fluorescence. Divisions of alloreactive T cells, which were identified and determined by their CFSE intensities, were labeled from 0 to n as division round. From the experimentally determined values of percentage of either CD4⁺ or CD8⁺ T cell events in each division n (a) and total number of living CD4⁺ or CD8⁺ T cell events at the time of harvest (b), the total number of daughter T cells that had divided n times was calculated (c). The total number of original or precursor T cells required to have generated these daughters was extrapolated by dividing the number of daughters at n divisions by 2^n (d). The total number of proliferation events was determined by subtracting the number of division precursors from the number of daughters generated by each precursor population (c minus e is f). Precursor frequency was calculated by dividing the sum of alloreactive precursor T cells that had divided once or more by the sum of all precursor T cells, including the precursor T cells that had not divided (c divided by d is e). Because the value of a proliferation event is

influenced by the sum of T cells subjected to FCM analysis, the proliferation index was extrapolated by dividing the sum of proliferation events by the sum of all precursor T cells (h divided by g).

Cytokine Levels in MLR Culture Supernatants

Interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ) levels in the MLR culture supernatants were measured by FCM using a BD Mouse Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array (CBA) Kit[®] according to the manufacturer's instructions. The recently developed CBA assay is based on the principle of the sandwich immunoassay using uniform-sized microparticles coupled to multiple mAbs against cytokines.

Statistics

The results were statistically analyzed by the unpaired or paired Student's T test or the linear regression analysis when appropriate. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Exclusion of Non-viable Cells from Analysis by Staining with Annexin V Prior to Fixation and Permeabilization

Since intracellular esterases hydrolyze CFSE into a fluorescent dye that binds covalently to cytoplasmic protein residues such as lysine, only viable cells are labeled. However, labeled cells that die during the culture period remain detectable until they disintegrate. These apoptotic/necrotic cells and cell fragments can cause an overall increased, less-defined, CFSE signal that may artifactually affect results. In addition, dead or dying cells may nonspecifically bind mAbs used for immunophenotyping or compromise analysis due to autofluorescence. In order to accurately detect the proliferative response of CFSE-labeled lymphocytes by FCM analysis, therefore, viable cells should be discriminated from apoptotic or dead cells. For that purpose, in the present study, the MLR cultured cells were stained with APC-conjugated annexin V, a Ca²⁺-dependent phospholipid-binding protein that has a high affinity for phosphatidylserine (PS), prior to fixation and permeabilization for the following ICIS. Since the membrane PS is translocated from the inner leaflet to the outer leaflet of the plasma membrane in apoptotic cells, cells in the early stage of apoptosis as well as cells that are in the late stage of apoptosis or already dead are stained with annexin V. In the present experiments, cell fixation and permeabilization did not interfere with annexin V-staining. As shown in Fig. 1, from the analysis by forward-scatter and annexin V-staining, non-viable cells could be excluded from further analysis, making the proliferated cells visible as cells that exhibited a decrease in CFSE intensity. The stimulator cells could be excluded from the analysis by use of this method. In our preliminary experiments, all of the annexin V-negative cells that had been harvested after the MLR were stained with anti-responder-type major histocompatibility complex class I (data not shown). The percentage of live cells (annexin V-negative cells) after

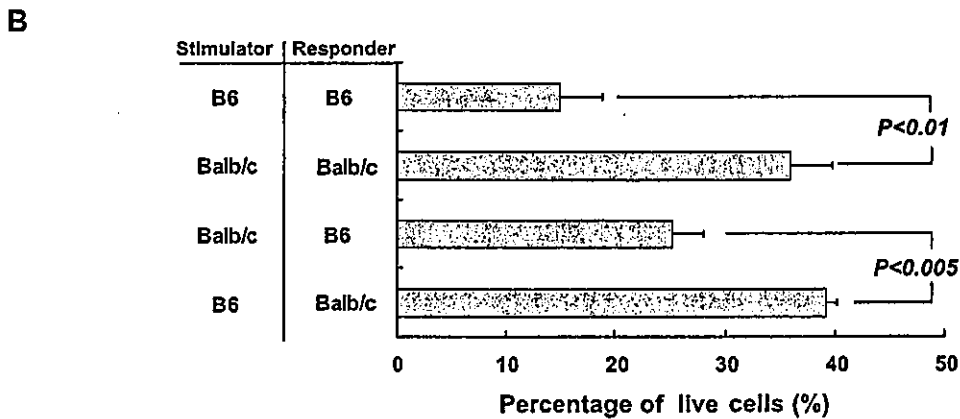
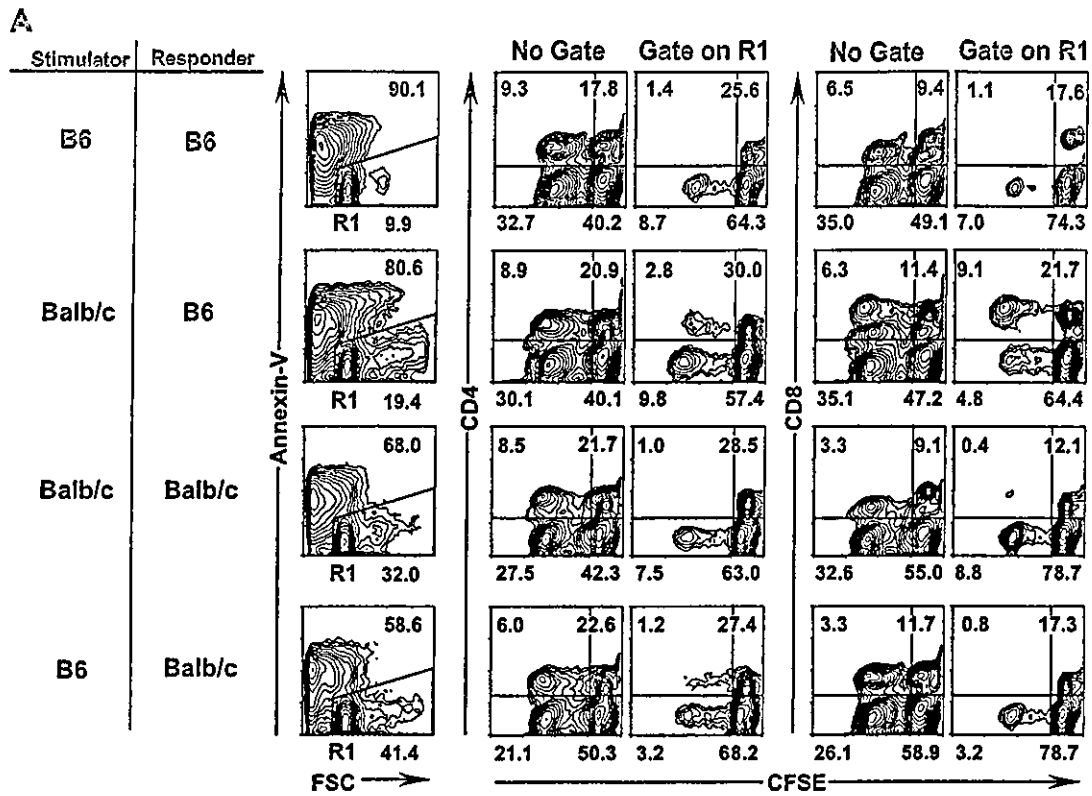


Figure 1. Exclusion of non-viable cells from analysis by staining with annexin V. The MLR cultured cells were stained with APC-conjugated annexin V prior to fixation and permeabilization for the following ICIS. Cells in the early stage of apoptosis as well as cells in the late stage of apoptosis or already dead are stained with annexin V. By setting a gate on annexin V-negative cells (R1), non-viable cells could be excluded from further analysis. A) FCM profiles of the MLR cultured cells with and without setting a gate on annexin V-negative cells are shown. Percentages given are of total cells in each scan. To ensure statistical significance, 150,000 – 300,000 events were collected for each sample. The result was consistent in four repeated experiments. B) Percentages of live cells (annexin V-negative cells) after MLR are shown. Average values ± SEM for four independent experiments are shown ($P < 0.05$, analyzed by Student's *t* test).