

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

末期肝硬変に対する治療に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 石 井 裕 正

平成17(2005)3月

現在わが国には、約 200 万人の慢性肝炎患者と約 30 万人の肝硬変患者が存在すると推定され、これらの慢性肝疾患を背景に年間約 3 万人に発症する肝細胞癌は大きな医学的かつ社会的問題である。その多くは C 型肝炎ウイルス感染例であり、インターフェロン治療著効例は全治療例の約 3 割に過ぎない。従って無効症例において肝線維化進展のメカニズムを解明し、それに続く肝発癌を制御することは、肝臓病学の分野における重要な研究課題であるとともに、社会的急務である。

本研究班では、肝硬変の病態とその合併症を取り巻く諸問題を臨床的、基礎的に解明した上で、従来の治療法の見直しとわが国における標準的治療指針(ガイドライン)の確立を目指した。さらに末期肝硬変症例に対する新しい治療法として、骨髄ならびに末梢血幹細胞移植や遺伝子治療法を提唱し、その安全性と治療効果について十分な基礎的臨床的検討を行った。また現行の治療法を医療経済的側面から見直すことも行った。

これらにより末期肝硬変患者の予後と QOL を向上させるとともに、血液製剤の使用に関する標準化、入院日数の削減などが可能となることが期待される。さらにガイドラインの作成・普及による治療の標準化と医療費の削減も目指した。

次に平成 15 年度からはこれまでの研究課題から移植に関する研究は除外し、分担研究者の変更を行った。

その結果、既存治療法の問題点と今後の展望を(1) 合併症対策(肝性脳症・難治性腹水・特発性細菌性腹膜炎・食道静脈瘤)、(2) 遺伝子療法、(3) 薬物療法につき整理した。平成 14~15 年度までの成果として、胃静脈瘤に対するシアノアクリレートの効果、肝性脳症、腹水、筋萎縮に対する分枝鎖アミノ酸製剤の有用性、実施時期判定に対する Child-Turcotte-Pugh 分類、MELD 分類の有用性、骨髄由来幹細胞を利用する新たな治療法の可能性、アンギオテンシン受容体拮抗薬の臨床応用などが示された。これらの成果をもとにして、入院期間の短縮などによる医療経済の改善、新たな薬物療法の推進、治療ガイドラインの標準化などを平成 16 年度の目標としたが、特に末期肝硬変の標準的治療ガイドライン作成が最終年度の主な目標となった。

平成 16 年度の研究成果としては、まず肝性脳症の MRI によるモニターの可能性、低アルブミン血症改善のための就寝前分枝鎖アミノ酸投与の有用性、特発性細菌性腹膜炎の早期診断における好中球エラスターゼ測定の有効性の実証、肝線維化の診断におけるエラストメトリーの有効性を明らかにした。さらに肝線維化治療に対するアンギオテンシン経路の遮断、遺伝子治療の可能性を示した。ガイドライン作成に関しては平成 15 年度より開始し、クリニカルクエスションと治療アルゴリズムの作成から始めて、肝硬変の標準的治療のためのガイドライン作成の最終段階に入っており、試案の完成とともに肝臓学会理事会での検討などを経て公聴会・一般公開へと進める予定である。

目次

I. 総合研究報告

末期肝硬変に対する治療に関する研究

石井裕正 慶應義塾大学名誉教授 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 92

III. 研究成果の刊行物・別刷 105

I. 総合研究報告

末期肝硬変に対する治療に関する研究

石井裕正 慶應義塾大学

研究要旨

末期肝硬変の治療に関して従来の治療法を見直し、将来の新たな治療の可能性を検討するとともに医療経済学的な評価を行った。また肝硬変診療の標準化を目指し診療ガイドラインを作成中である。

肝硬変の様々な合併症に対し、その診断と治療の改善を目指して以下のような結果を得た。

1. 低アルブミン血症に対し分子鎖アミノ酸製剤の就寝前投与の有用性を示した。
2. 肝性脳症の病態解明を目指して、脳内におけるグルタミン-グルタミン酸の動態を MRI を用いて測定し、肝性脳症との関連を示した。また肝性脳症との関連が注目される脳内での BZ 受容体結合能の変化をポジトロン CT にて解析し、その関連をモニターすることに成功した。
3. SBP の早期診断および SBP 予知に対するカルチャーボトル法および腹水中好中球エラストラーゼ測定の有用性を示した。
4. 日本人の腹水に対する至適利尿剤投与量の決定に向けて臨床研究を遂行中である。
5. 食道静脈瘤に対する至適内視鏡治療法の検討するため内視鏡的硬化療法と結紮術の無作為比較試験による治療効果の検討を現在遂行中である。

また肝硬変の病態を評価するために、非侵襲的弾性測定装置であるエラストメトリーが肝生検に変わりうる可能性を持つ線維化測定装置であることを示した。

将来に向けた新たな治療法として線維素分解酵素を用いた遺伝子治療、骨髄幹細胞移植による肝不全治療、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬による新たな薬物療法の可能性を示した。さらには慢性肝炎、肝硬変の治療費の推定を行い、肝硬変治療のあり方を医療経済学的に検討した。

以上の点を踏まえ、合併症の診断、治療のみならず、原因療法にも言及した診療ガイドラインを作成中である。このガイドラインにおいては医療経済学的な検討も加え、医療の標準化と効率化を目指している。

分担研究者

平成 14 年度～平成 16 年度
鈴木一幸 (岩手医科大学)
森脇久隆 (岐阜大学医学部)
幕内博康 (東海大学医学部)
福井 博 (奈良県立医科大学)
栗山茂樹 (香川医科大学)
渡辺 哲 (東海大学医学部)
市田隆文 (順天堂大学医学部)
小林廉毅 (東京大学医学部)

平成 14 年度
田中紘一 (京都大学医学部)

平成 16 年度
沖田 極 (山口大学医学部)
森實敏夫 (神奈川歯科大学)
齋藤英胤 (慶應義塾大学)

I. 研究目的

末期肝硬変に対する治療は外国のガイドラインによれば肝移植とされているが、わが国の移植医療の状況から考察すると簡単に移植と片付けることはできない。末期肝硬変は肝細胞機能不全に基づき黄疸、低タンパク血症、肝性脳症、門脈圧亢進に伴う食道静脈瘤などの側副血行路、浮腫・腹水、消化管出血、特発性細菌性腹膜炎、肝腎症候群などを生ずる慢性疾患で、肝硬変の予後は移植抜きで考えればこれら合併症をうまく制御することにある。本研究班では当初、末期肝硬変の治療を再考する予定で企画されたことから、移植も含めた治療方針の決定を考えていたが、研究の第 2 年度から当局のご指導により、移植に関する研究は他の研究班で行われるために移植以外の問題を研究することとなった。

合併症の生ずる主因は肝線維化にあり、予後の改善は線維化の制御や改善に求められる。しかし完成された肝硬変組織の線維化を効率よく溶解することは現時点では不可能である。C 型肝硬変において C 型肝炎ウ

イルス (HCV) がインターフェロン (IFN) を含む抗ウイルス治療により駆除されると、その後時間を経て次第に肝内の線維化が解消していくことが報告され、肝線維は溶解するのだということが証明されたが、末期肝硬変の状態では肝不全症状を可及的速やかに改善するほどの線維化対策は困難を極めているのが現状である。

こうした背景から、本研究班では「末期肝硬変に対する治療」を考えるにあたり、従来の合併症対策の治療を見直し、新たな治療法の開発を大きな目的とした。また、肝硬変の医療経済に関する研究は皆無に等しかったことから、医療経済評価をすることをもう一つの大きな目的とした。そして、移植が主な治療とされる外国のガイドラインでは、わが国における診療ガイドラインとしてそぐわないことから、新たな診療ガイドライン作成をさらにもう一つ大きな目標として研究活動を行った。

II. 研究方法

(1) 合併症対策の見直し

現状の合併症治療の見直しを①肝性脳症 ②低タンパク、低アルブミン ③難治性腹水、特発性細菌性腹膜炎 ④食道静脈瘤の 4 点に絞り、分担研究を行った。肝硬変患者を対象に研究を行う際には、研究目的と研究方法、開示、利益・不利益、個人情報保護、結果の公表、費用負担など倫理的に正当性を保持し、患者に十分な説明と理解を文書にて得て、個別研究の各施設の患者さんを対象とした。

(2) 線維化評価の新たな方法の開発

従来肝線維化の程度は、肝生検による観血的方法のみが信頼性があり、血清線維化マーカーはいまだ信頼性に欠けていた。肝硬変患者では血小板数の低下、凝固因子の低下、などから肝生検などの観血的検査は危険が高い。さらに最近の肝硬変患者の多くは C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染によるもので、肝硬変に至っている患者の平均年齢も高い。高齢者ではまた侵襲的検査に対して恐怖心もあり、非侵襲的検査の確率が望まれている。こうした背景を基に、非侵襲的検査法としてエラストメーターを導入す

ることを考えた。エラストメーターはフランスエコセンス社で開発された肝の弾性を計測する器械で、患者の体表からプローブを軽く押し当てて瞬時に計測できるものである。本器械を使い HCV 感染者を中心に肝の弾性度を測定し、肝生検組織所見との対比を行い、新たな診断法としての評価を行った。

(3) 新たな治療法の開発

新たな治療法として ①アデノウイルスによる遺伝子導入 ②幹細胞移入を考案した。アデノウイルスは肝での遺伝子発現が十分に起こるか、いかに発現を慢性に行うかを問題として基礎実験を重ねた。遺伝子導入の一つの候補としては肝線維化を改善すると思われる MMP-13 を検討した。

幹細胞移入に関しては、骨髄細胞移入を行った。

(4) 肝硬変の医療経済

肝硬変の医療経済的分析はいまだに明確にされていない。そこで本研究班では医療経済に関する分析に挑戦した。

(5) 肝硬変治療のガイドライン作成

標準的診療のために本研究班でガイドラインを作成することとなった。外国の診療ガイドラインも肝硬変に関するものはなく、肝移植の盛んな外国のガイドラインはわが国の事情に合わないために、その作成は意義のあるものと考えられた。

III. 研究結果

(1) 合併症対策

1) 肝性脳症

1972年から2002年まで岩手医科大学第一内科にて入院加療を受けた肝性脳症を有する肝硬変(112例; 肝性脳症回数のべ197回)の治療成績について検討した。重症度(modified-Pugh分類)別の意識覚醒効果はgrade A 100%、grade B 80.8%、grade C 48.2%と重症度の進行にともない完全覚醒率は低下した。肝性脳症の予後をアミノ酸療法施行例(95例)と非施行例(23例)に分けて比較すると、grade Aでは両群とも全例生存した。grade Bでは非施行例(40%)に比し施行例(77%)での予後が良好であるが、grade Cでは施行例(38%)、非施行例(39%)とも不良であった。多変量解析により完全覚醒や予後に関与する因子を検討すると、総ビリルビン値、血清アルブミン値、プロトンピン時間など肝の重症度に関与する因子が変数として選択された。以上の成績より、肝性脳症の完全覚醒率や予後は肝の重症度によって左右され、重症度の進行した症例では効果に限界がみられる。

磁気共鳴分析法(MRS)による検討で、肝硬変では glutamine (Gln)と glutamate (Glu)の総和の上昇という脳内物質代謝異常がみられ、astrocyteの機能異常との関連から注目されている。しかし、従来のMRSではGlnとGluとの分離は困難であり、物質分解能の高い高磁場MR装置と新しく開発したdata処理方法を用いてGlnとGluの分離を試みた。脳疾患既往のない肝硬変23例を対象とした。対照は健常成人11例である。3.0teslaMR装置を用い、被検者の後頭葉灰白質に関心領域を設定し¹H(proton)-MRSを施行した。3.0teslaMRにより脳内Glu、Glnの分離は可能であった。さらに、肝硬変では対照に比し脳内Glnの信号強度は有意($p<0.05$)に高値であった。一方、Gluの信号強度は差がなかった。以上の成績より高磁場MRSにより、脳内GluとGlnの分離が可能となり、肝硬変でみら

れる脳内GluとGlnの総和の増加は、Glnによることが明らかとなった。

近年、肝性脳症の成因として中枢神経系の抑制神経伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA)とbenzodizepine (BZ)の関与が注目されている。しかし脳内BZ受容体の変化についての検討は極めて少ない。そこでBZの拮抗薬(Ro15-1788: flumazenil)を用いたポジトロン断層法を用いてin situに肝硬変の脳内BZ受容体結合能を測定し、さらに肝の重症度との関連について検討した。過去3ヶ月間、BZ系薬剤服用の既往が無く、顕性脳症の認められない肝硬変23例を対象とした。three-dimensional stereotaxic region of interest (ROI) templateにより12区域に分類された脳各部位のBZ受容体結合能をstandardized uptake value(SUV)として示した。脳内BZ受容体結合能はSUVとして半定量することが可能であり、脳の部位別には中心前、角回、側頭、後大脳、小脳半球においてBZ受容体結合能は健常者の平均に比し高い傾向を示した。さらに脳内BZ受容体結合能と血液生化学検査成績との関連を検討すると血中アンモニアが12関心領域中、海馬を含む6領域で有意の正の相関を認め、アンモニア濃度が、脳内でのBZ受容体結合能の変化に関与している可能性があると考えられた。

2) 分岐鎖アミノ酸の効用と投与法の検討

肝硬変患者における就寝前分岐鎖アミノ酸投与は、エネルギー代謝動態に影響を与えることなくFischer比や窒素バランスの有意の改善を認め、患者の蛋白低栄養状態を改善する可能性が示唆された。

実際に、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。

肝硬変患者における就寝前分岐鎖アミノ酸ならびにエネルギーの投与は血清アルブミン値や筋肉量の改善をもたらし、患者の予後やQOLの改善につながる可能性が示唆された。

2) 食道静脈瘤の治療に関する研究

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機的、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。

現在までに EIS 例 11 例、EVL 例 11 例の計 22 例を登録し、その経過観察を行っている。

3) 難治性腹水の対策

欧米では利尿剤抵抗性腹水は食塩摂取制限と大量利尿剤治療(スピロラクトン 400 mg+フロセミド 160mg)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と定義されているが、われわれが解析した難治性腹水 10 例ではスピロラクトン 50~175mg、フロセミド 40~160mg の単独または併用投与で BUN 上昇、電解質異常。電解質異常では低 Na 血症の対処が困難で、2 例では利尿剤の減量、中止に加えて 35Meq/日の Na 補充を必要とした。難治性腹水には穿刺排液アルブミン静注で対応したが、肝性昏睡合併例、ビリルビン高値

例(5mg/dl 以上)では反応不良であった。少量の穿刺排液でも肝性昏睡が誘発された例では、新鮮凍結血漿、アルブミンの輸注を繰り返すことにより排液量を 3L 以上にまで増加できた。

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。

肝硬変患者から得られた腹水中における各種サイトカイン、線溶系因子、顆粒球エラスターゼを測定し、その背景病態との対比を行った結果、1) 腹水中の IL-6 および TNF- α の動態は特発性細菌性腹膜炎(SBP)の病態を反映し、また、Stage II 以上の肝細胞癌に合併する肝硬変腹水中の IL-8 が有意に高値を示した。2) 線溶系因子では難治性腹水において有意に tPA/PAI-1 比が低値を示したことから、腹水の難治化に tPA 系を介した線溶抑制の機序が関与する可能性が示唆された。3) 切迫早産を予防するために用いられている子宮頸管粘液中好中球エラスターゼ検出用試験紙の腹水検体への適用を検討した結果、SBP 腹水が高い特異的をもって陽性を示し、同試験紙法が SBP の早期診断に有用であることが示唆された。

4) 肝移植の適応についての研究

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

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、最終的には現時点で肝移植に頼らざるを得ない現状であることより、感染症の制御が極めて重要であることが改めて認識させられた。

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における生体肝移植の位置づけを考察した。ここで取り上げたウイルス性末期肝硬変の肝移植前の抗ウイルス療法の有無と治療効果を検討し、さらに術後肝炎ウイルスの再発によるグラフトの正着率に関係する因子を検討した。その結果、大半の症例で C 型肝硬変では過去の抗ウイルス治療の既往があり、すべて無効例であった。一方、B 型肝硬変は前例に抗ウイルス療法を術前から術後まで継続して投与を受け、そのグラフト生着率はきわめて高かった。

さらに、今期は再発する C 型肝炎ウイルスグラフト肝臓を用いた、網羅的遺伝子解析を行い、連続解析結果を踏まえて、いくつかの有力な遺伝子群の同定を試みたが、時間的制約から、継続調査が必要と考え、症例数を増やした検討が、遺伝子相関としての因子を導き出すものと考えられた。

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

この中で問題となるものが、ウイルス性肝炎の再発である。

B 型肝炎ウイルス肝硬変に対する生体肝移植術は、B 型肝炎ウイルスキャリアーをドナーに用いた例外を除いて、再発例はない。現在用いている lamivudine + HBIG が著効しているものと考えられるが、今後 HBIG の減量等を考慮したい。

C 型肝炎ウイルス肝硬変に対する生体肝移植術は、生存率に関しては他疾患と同等であるものの、再発率が 50%を超え、再発予防が急務である。現在の IFN + リバビリン併用療法も、12 例中 5 例にしか効果が認められず、十分な再発予防となっていない。部分肝再生に伴うウイルス増殖が考えられる C 型肝炎ウイルス再発に対しては、投薬開始時期、投薬量などの検討が今後必要である。

(2) 線維化評価の新たな方法の開発

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。

(3) 新たな治療法の開発

1) アンギオテンシン系、Rho kinase 系を介した線維化抑制の試み

肝線維化における rennin-angiotensin system の関与を解明し、angiotensin converting enzyme 阻害剤および angiotensin II の肝線維化に対する効果を明らかにすることを目的とした。肝線維化における主要な役割を果たすとされる伊東細胞をラットより分離し、angiotensin II

を添加したところ pro α (I) collagen および transforming growth factor- β 1 の mRNA の発現の増強を認めた。すなわち伊東細胞の活性化に rennin-angiotensin system の関与が示唆された。四塩化炭素投与ラット肝線維化モデルに angiotensin converting enzyme 阻害剤を、コリン欠乏食投与肝線維化モデルに angiotensin II 受容体拮抗薬を投与したところ、著明な肝線維化抑制効果と血清中肝線維化マーカーの低下を認めた。以上より慢性肝疾患患者に対し rennin-angiotensin system の阻害剤が有効な治療法となりうる可能性が考えられた。

肝線維化やその原因と考えられる脂肪化における酸化ストレス・レニンアンジオテンシン系の関与を明らかにすることを目的とした。急性肝障害における酸化ストレスの関与をラット四塩化炭素 (carbon tetrachloride; 以下 CCl_4) 急性肝障害モデルにて検討し、肝線維化・脂肪化のモデルとしてコリン欠乏食ラットを用い、アンジオテンシン系、Rho/Rho kinase 系における酸化ストレスの関与を検討した。その結果、fatty degeneration, necrosis, apoptosis といったいずれの組織学的側面においても酸化ストレスの関与があり、ラジカル消去薬にて組織学的変化が抑制された。その際、炎症にともなうサイトカインの産生がみられ、組織障害の増幅、あるいは線維化亢進を引き起こすことが考えられた。また慢性肝障害における肝線維化、脂肪化に局所アンジオテンシン系の関与が認められ、アンジオテンシンシグナルの下流に Rho シグナルが位置すると考えられた。これら種々因子の阻害薬により組織酸化ストレスが有意に低下し、アンジオテンシン系の組織傷害過程に酸化ストレスが働いていることが示唆された。肝線維化には酸化ストレスを含めた種々の因子が形成する悪性回路が存在していて、治療にはその回路のどこかを断ち切ることが重要と思われた。

2) 遺伝子治療の試み

四塩化炭素 12 週間投与にてラットに作成した肝硬変モデルの回復過程で、神経幹

細胞のマーカーである Musashi-1 陽性細胞が血管周囲や線維束にみられた。これらの細胞は、一部 c-kit 陽性であることより、骨髄由来の幹細胞と考えられた。また、MMP-13 陽性細胞もみられたことより、骨髄由来幹細胞が肝線維化の改善に関与していると考えられた。

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。

四塩化炭素投与で作製した肝硬変ラットに、ヒト MMP-13 (間質性コラゲナーゼ) をアデノウイルスベクターを用いて強制発現させた。LacZ 遺伝子を導入した群や生食を投与した群に比べ、MMP-13 を導入した群では肝線維化が著明に改善し、腹水や食欲も改善した。これは、MMP-13 導入による MMP-9 の発現や、HGF の発現誘導によるものと考えられた。

3) 遺伝子導入法の検討

肝硬変に対する遺伝子治療を目標とし、マウスおよびラットを用いた肝への遺伝子導入に関する基礎的検討を行い、以下の如き研究成果を得た。

1. アデノウイルスベクターを用いて、外来遺伝子を直接肝内に注入、経門脈的に肝内に注入、あるいは経静脈的に全身投与すれば、投与ルートの如何に拘わらず、肝における極めて効率の良い外来遺伝子発現を誘導し得た。

2. 傷害肝に対する遺伝子導入の可能性を検討するために、肝硬変および劇症肝炎モデルマウスを作製し、尾静脈より組換えアデノウイルスを投与したところ、正常肝マウスに投与した場合と同程度に有効な外来遺伝子発現を肝において誘導し得た。さ

らに、正常肝マウスに投与した場合と同様に、傷害肝マウスにおいても重篤な副作用の発現は認めなかった。

3. 大多数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特異的免疫が誘導されているため、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の検討を行うために、アデノウイルスの初回投与時ではなく、再投与時のみにシクロスポリンあるいはFK506による免疫抑制処置を行い、組換えアデノウイルスを経門脈的あるいは経尾静脈的に再投与したところ、アデノウイルス再投与に対する液性ならびに細胞性免疫反応が抑制され、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。

4. 以上の研究結果より、肝硬変などの重篤な肝疾患を有する場合にも、組換えアデノウイルスを経静脈的に全身投与すれば、肝における有効かつ安全な外来遺伝子発現の誘導が可能であり、肝硬変患者に対する *in vivo* 遺伝子治療の可能性が示された。

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。

4) 肝再生の抑制解除に関する検討

肝硬変は、すべての慢性肝疾患の終末像であり、非可逆的な変化と考えられており、極めて予後不良の病態である。肝硬変における線維の増殖は、肝実質の欠落によって生じた組織間隙を補填するためであり、肝の慢性炎症に伴う肝細胞の再生能低下が第一の原因と考えられる。しかし、この肝細胞の再生能低下の機序に関しては、現在ま

でほとんど詳細な検討がなされていない。そこで、今年度の研究において、肝硬変モデルラットを作製し、肝硬変進展過程における肝細胞の増殖能変化、さらに細胞増殖に重要な役割を演じている G1 期関連細胞周期分子の発現変化を経時的に検討したところ、肝の慢性炎症に伴う肝細胞の増殖能低下機序として、肝内における cyclin D1 の発現低下と p15 および p16 の発現上昇が重要な役割を演じていることが示された。したがって、肝内におけるこれらの分子の発現調節を行うことにより、慢性肝疾患から肝硬変への進展を制御しうる可能性が示唆された。

5) 骨髄細胞による肝再生の試み

我々はより多くの肝不全患者を救命するために、生体肝移植前に行うブリッジ的な治療法として『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発を進めたいと考え研究を行ってきた。(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法)の臨床応用を進める基盤モデルとして骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CCl4 モデル)の開発し、骨髄細胞が持続的肝障害の肝硬変時に肝臓に遊走され肝細胞へ分化・増殖することを明らかにした (JB 2003、特公 2003-70377)。さらにこのモデルの解析を通じ、骨髄細胞移植により生存率の回復、また肝線維化の改善を発見した (Hepatology 2004、この発見は Wiley 社より Hepatology News Alert 記事とし世界に発信された)。さらに骨髄細胞を用いた再生療法をより効率的に行うための骨髄細胞の肝細胞への分子制御機構を Micro array-Self Organization Map(SOM)解析法にて解析した (FEBS letters 2004、生データは <http://liver-project.med.vamaguchi-u.ac.jp/research> のサイトにて公開している。)。また我々の開発した Liv8 抗体は骨髄中の肝再生に有効な細胞分画の分離に有効であることが明らかになった(BBRC 2004)。今後は抗原同定を進め人抗体を作ることで、効率的な再生療法の臨床開発を目指す。

(4) 肝硬変の医療経済

肝疾患診療に関わる医師を対象に、肝炎・肝硬変患者の効用値・生活の質 (QOL) を評価したところ、肝炎の進行とともに患者の QOL 値は最大で 72.2% 低下することが示唆された。

「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。

わが国の肝炎・肝硬変治療に関して、(1) 医療経済学的なクリニカルクエッションを作成し、(2) それに関わる国内で行われた医療経済評価の実証研究を広く収集し、(3) 批判的吟味を行った後、エビデンスのレベルに応じて結論の臨床的応用について考察した。その結果、想定したクリニカルクエッションについて以下のような結論を得た。すなわち、「C 型肝炎に対するインターフェロン治療の費用対効果は他の一般的な生活習慣病治療と同等か。」というクリニカルクエッションについては、腎移植や乳がん検診などの費用対効果の値に相当し、肯定的と考えられた。もともなった研究は、過去のデータの基づくシミュレーション研究のため、エビデンスの分類としては V 相当と考えられる。「C 型慢性持続性肝炎 (CPH) に対するインターフェロン治療の費用対効果は、C 型慢性活動性肝炎 (CAH) に対するそれと同等 (以上) か。」については、文献中のデータを再計算したところ、割引率が 0~3% 程度であれば、両者の費用対効果の大きさはほぼ同等と推定された。エビデンスの分類は前項と同様の理由で V である。

(4) 肝硬変診療のガイドライン作成

進行肝硬変は腹水、食道静脈瘤、肝性脳症など合併症に対する診断・治療が重要である。QOL の改善と、生存の延長のために有効な診断・治療の確立が望まれる。そのために、肝硬変診療のフローチャートを作成し、各フローの中で、臨床決断の必要な点を明らかにした。次に、それぞれの点における選択肢、その選択基準、得られる効果などに関して、臨床上生じうる疑問 (クリニカルクエッション、CQ) を作成し、それに基づいた検索式を作成した。CQ 作成時点で、CQ の各要素の定義づけ、その範囲の設定をし、文献選定の基準として用いた。文献検索は包括的であるべきであり、CQ の 4 つの要素、すなわち、P(atient), I(ntervention), C(ontrol), O(utcome) (PICO) あるいは、P(atient), E(xposure), C(ontrol), O(utcome) (PECO) とそれに解答を与えうる研究デザインと全部で 5 つの要素を表現する語句をできるだけ多く想起し、それらを組み合わせることによって検索式を作成した。MEDLINE 検索には、PubMed を利用するが、PubMed のフィールドタグ、Automatic Term Mapping などの検索アルゴリズムを熟知する必要がある。試験検索を繰り返し施行し、最適の検索式を作成する必要があるが、その作業を効率化するためには、検索式を構成する語句を AND、OR、NOT で結合し、検索式を作成し、さらに PubMed ホームページを開き、検索式データを渡し、検索し、Details 情報を取り込み、それらの記録ができるコンピュータプログラムが望まれる。

肝硬変診療ガイドライン作成の経過

肝硬変は、各種慢性肝疾患の最終到達疾患であり、肝予備能の低下にともない臓器としての肝臓機能が低下し、生体を維持できない状態（肝不全）に至る。最も単純な治療法は、正常な肝臓と取り替えること、すなわち肝移植であるが、わが国における脳死肝移植の普及は厳しく、生体肝移植に頼らざるを得ないが、ドナーとなりうる血縁者がいない場合には移植は不可能な状態である。医療の細分化が進んだ現代、医療の現場では逆にプライマリーケア医のニーズが高まっており、その教育、育成に大きな労力がかけられている。プライマリー医に必要な標準的診療を提供する意義は極めて大きいと考えられる。

わが国の肝硬変の実情に即した診療は前述のごとく移植に向けての準備ではなく、慢性肝炎から肝硬変への進展阻止、肝硬変の肝不全への進展阻止である。欧米のように移植が背後に存在する診療では、合併症を乗り越え、移植まで保たせれば良いわけであり、実際、欧米の診療ガイドラインには肝硬変の合併症に対するものしか存在していない。しかし、移植のままならぬわが国においては個々の合併症を乗り越えるガイドラインよりも、大きく肝硬変症をいかに長期に亘って管理するかが診療の大きな鍵となる。従って、肝硬変診療のガイドラインを作成することは極めて重要な作業と考えられる。

以上から、「末期肝硬変に対する治療に関する研究」班では、現行の肝硬変治療を再評価し、新たな治療の可能性を追求しながら、肝硬変の標準的診療を普及させることが重要な任務の一つと考え、ガイドライン作成に着手した。

ガイドライン作成には専門家が必要と考えられ、研究班2年目より神奈川歯科大学内科 森實敏夫教授に参入していただいた。また、日本肝臓学会との連携が必要と考えられたため、2年目より山口大学大学院、日本肝臓学会理事長である沖田 極教授に参入していただいた。

1. クリニカルクエスチョン（clinical question, CQ）の作成

ア) 診断に関していえば、保健医療供給者が患者さんから得られた情報をどのように解釈したら良いか、あるいは患者さんからみればどのような疾患なのかということ、治療に関していえば、どのような働きかけをしたら良いか（治療）、あるいはどのようにして直したら良いか、どのように説明したら良いか、どのように受け取ったらいいのか、などの疑問がCQである。

イ) 今回の研究班では、肝硬変の治療に関するガイドラインを作成することになったため以下のようなものが考えられる。

①治療：患者に利益をもたらす治療法をどう選択するか？

②予防：疾患・病態の発生をどう低減するか？

③医療経済：健康増進法や介入の費用と便益の関係は？である。

2. CQの作成法

ア) 一つのセンテンスとし、疑問形とする。

イ) Yes, NoあるいはWhat, Whichで聞く形でも良い。

ウ) このCQで（疾患・病態）（予知因子）（介入あるいは曝露）（対照）（アウトカム）の各項目を含めることにより文献検索を特異的に行うことができる。さらに（回答を提供できると考えられる研究デザイン）を明確にすることにより検索範囲を狭めることができる。

3. この利点を考慮し作成用テーブルを考案し、班員全員でCQを考案した。

案として取り上げられたCQは事務局と各分担研究者の間で数回やり取りし、完成度の高いCQリストを作成した。また、治療のアルゴリズムを作成し、そのアルゴリズムに基づいて疑問点を考慮すればCQの

大きな欠落が防げると考えられたため、アルゴリズムの作成も同時に行った。

診療ガイドライン報告書作成までの作業手順と役割分担

1. CQ 追加・変更	班員 (R)
2. 全体の中で位置づけ採用・不採用を決定	事務局 (R)
3. CQ の分類と番号付け	事務局 (R)
4. 最終 CQ リストの作成	事務局 (R)
5. 最終 CQ リストの班員への送付	事務局 (R)
6. 全 CQ の承認	班員 (A)
7. 全 CQ の確定 (A)	事務局・班長
8. 各 CQ に対する検索語句の選定、検索式作成用フォームに入力	班員 (R)
9. 各 CQ に対する検索式の作成(複数)	IMIC (C)
10. 検索式のチェック・変更の提示	事務局 (R)
11. それぞれの検索式による 1 回目試験検索：文献数と最新 5 件のアブストラクトを提示	IMIC (C)
12. 検索式のチェックと変更の提示（上位概念への変更も含む）	事務局 (R)
13. それぞれの検索式による 2 回目試験検索：文献数と最新 5 件のアブストラクトを提示	IMIC (C)
14. 検索式のチェックと必要に応じた変更の提示	事務局 (R)
15. それぞれの検索式による 3 回目試験検索：全件含アブストラクト	IMIC (C)
16. 検索式のチェックと必要に応じた変更の提示	事務局 (R)
17. それぞれの検索式による 4 回目試験検索：全件含アブストラクト	IMIC (C)
18. 検索結果の確定	事務局 (R)
19. それぞれの CQ ごとに複数の検索式の検索結果のマージ	IMIC (R)
20. それぞれの CQ ごとにマージした検索結果の確定	事務局 (R)
21. 不要な文献を削除（一次選定）	事務局 (R)
22. 文献が存在しない場合 CQ を不採用にする	事務局 (R)
23. CQ ごとの検索結果（アブストラクト含む）の担当班員への送付	IMIC (R)
24. 担当班員による採用文献と不採用文献の選択と確定	班員 (A)
25. 確定した採用、不採用文献のリストを事務局に送付	班員 (A)
26. 採用文献について各班員の担当分の重複のマージ	IMIC (R)
27. 全班員にわたる重複の洗い出し	IMIC (R)

- | | | |
|-----|--------------------------------------|----------|
| 30. | 班員間の重複分についてアブストラクト作成担当の割り当て | 事務局 (R) |
| 31. | 各班員へのアブストラクト作成の依頼送付 | IMIC (R) |
| 32. | アブストラクト、アブストラクトテーブルの作成 (エビデンスレベルの設定) | 班員 (R) |
| 33. | アブストラクト、アブストラクトテーブルの事務局への提出 | 班員 (R) |
| 34. | アブストラクト、アブストラクトテーブルのまとめ、編集 | IMIC (R) |
| 35. | 章立ての決定 | 事務局 (R) |
| 36. | 章立ての承認 | 班長 (A) |
| 37. | 各 CQ に対する推奨と根拠の執筆、章立ても送付 | 班員 (R) |
| 38. | 班長によるイントロダクションの執筆 | 班長 (R) |
| 39. | 追加分がある場合に原稿執筆を依頼 | 事務局 (R) |
| 40. | 原稿の事務局への提出 | 班員 (R) |
| 41. | 原稿のチェック | 事務局 |
| 42. | 章立てにしたがって、全体をまとめる | IMIC (R) |
| 43. | 最終原稿の作成 | IMIC (R) |
| 44. | 最終原稿の承認 | 班員 (A) |
| 45. | 報告書冊子の作成 | IMIC (R) |

C : Consultation

A : Approval

R : Responsibility

I : Keep informed 原則としてすべてのステップについて班長

O : Ownership 班長

平成 17 年 3 月 31 日の時点で、上記行程の 3 2 まで終了している。

CQ 確定以後のプロセス：CQ ごとに見たマネージメント

分類	
番号	

1 つの CQ ごとに、以下のステップを完了するたびににチェックを入れ、日付を記載し、最後までフォローする。

Step	Done	Date	Task	Whom	Data
1			CQ の 5 項目に対する検索用語の選定の依頼：表形式の検索式作成用フォーム（Word のファイル）を担当班員に送付する。締切日を指定すること	担当班員	Doc
2			締切日を過ぎた場合、1 週間後に催促のメール発信。	担当班員	
3			検索式作成用フォームを受信したら、内容チェックを依頼。	事務局	
4			内容チェックの終了した検索式作成用フォームを IMIC に送信し、検索式の作成を依頼。	IMIC	
5			IMIC の作成した検索式を受信し、内容チェックを依頼。	事務局	
6			内容チェックの終了した検索式作成用フォームを IMIC に送信し、第 1 回目の試験検索を依頼。	IMIC	
7			第 1 回試験検索の結果：文献数と最新 5 文献のアブストラクトからみた妥当性のチェックとそれぞれの検索式の調整を依頼。	事務局	
8			試験検索の結果によって調整された検索式作成用フォームを IMIC に送信し、第 2 回目の試験検索を依頼。	IMIC	
9			第 2 回試験検索の結果：文献数と最新 5 文献のアブストラクトからみた検索式の妥当性のチェックを依頼。必要に応じて、検索式の調整を依頼。	事務局	
10			文献が存在しない場合、CQ の不採用の決定を依頼。	事務局	
11			試験検索の結果によって調整された検索式作成用フォームを IMIC に送信し、第 3 回目の試験検索（すべてアブストラクトを含む）を依頼。	IMIC	File Maker
12			第 3 回試験検索結果（すべてアブストラクトを含む）：検索結果から見た検索式の妥当性のチェックを依頼。	事務局	

13		試験検索の結果によって調整された検索式作成用フォームを IMIC に送信し、第4回目の試験検索（すべてアブストラクトを含む）を依頼。	IMIC	
14		第4回試験検索結果（すべてアブストラクトを含む）：検索結果から見た検索式の妥当性のチェックおよび結果の確定を依頼。	事務局	
15		それぞれの CQ ごとに複数の検索式の検索結果のマージを IMIC に依頼。	IMIC	
16		それぞれの CQ ごとにマージした検索結果の確定と不要な文献の削除を依頼（一次選定）。	事務局	
17		CQ ごとの検索結果（アブストラクト含む）を担当班員へ送付する。	班員	
18		担当班員による採用文献と不採用文献の選択（二次選定）と確定の結果の送付を各班員に依頼する。	班員	
19		採用文献について、1)各班員の担当分の重複のマージ、2)全班員にわたる重複の洗い出し、3)全文献をマージした全文献のリストの作成を IMIC に依頼する。	IMIC	
20		全文献リストの確定、班員間の重複分についてアブストラクト作成担当の割り当ての決定を依頼。	事務局	
21		各班員ごとに必要な文献の全文コピーを入手を IMIC に依頼する。	IMIC	
22		全文コピーの各班員への送付を IMIC に依頼する。	IMIC	Paper
23		アブストラクト、アブストラクトテーブルの作成（エビデンスレベルの設定）を各班員に依頼する。		Doc
24		完成したアブストラクト、アブストラクトテーブル、エビデンスレベルの設定の送付を各班員に依頼する。	班員	
25		各班員から回収したアブストラクト、アブストラクトテーブルのまとめ、編集を IMIC へ依頼する。	IMIC	
26		各 CQ に対する推奨と根拠の執筆を各班員に依頼する。	班員	
27		原稿の事務局への送付を各班員に依頼する。	班員	
28		原稿のチェックを依頼する。	事務局	

平成 17 年 3 月 31 日現在で上記テーブルの 24 までの行程を終了している。

考案されたクリニカルクエスションとそれに対して選定された文献を以下にまとめた。

運動療法、薬物療法

1. 運動療法は肝硬変の予後を改善するか

1. Moriwaki H, Miwa Y, Tajika M, Kato M, Fukushima H, Shiraki M: Branched-chain amino acids as a protein- and energy-source in liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:405-9.
2. Riggio O, Angeloni S, Ciuffa L, Nicolini G, Attili AF, Albanese C, Merli M: Malnutrition is not related to alterations in energy balance in patients with stable liver cirrhosis. *Clin Nutr* 2003;22:553-9.
3. Girgrah N, Reid G, MacKenzie S, Wong F: Cirrhotic cardiomyopathy: does it contribute to chronic fatigue and decreased health-related quality of life in cirrhosis? *Can J Gastroenterol* 2003;17:545-51.
4. Degoricija V, Zjacic-Rotkvic V, Marout J, Sefer S, Troskot B: Clinical and neurohumoral response to posture, physical exercise, and ascites treatment in Child-Pugh C liver cirrhosis: randomized prospective trial. *Croat Med J* 2003;44:178-86.
5. Parik-Patel A, Gold EB, Utts J, Worman H, Krivy KE, Gershwin ME: Functional status of patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2871-9.
6. Wachsberg RH: Cardiac response to exercise in cirrhosis. *Gut* 2002;51:755; author reply 755.
7. Wiesinger GF, Quittan M, Zimmermann K, Nuhr M, Wichlas M, Bodingbauer M, Asari R, Berlakovich G, Crevenna R, Fialka-Moser V, Peck-Radosavljevic M: Physical performance and health-related quality of life in men on a liver transplantation waiting list. *J Rehabil Med* 2001;33:260-5.
8. Puthumana L, Chaudhry V, Thuluvath PJ: Prolonged QTc interval and its relationship to autonomic cardiovascular reflexes in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;35:733-8.
9. Wong F, Girgrah N, Graba J, Allidina Y, Liu P, Blendis L: The cardiac response to exercise in cirrhosis. *Gut* 2001;49:268-75.
10. Jacobsen EB, Hamberg O, Quistorff B, Ott P: Reduced mitochondrial adenosine triphosphate synthesis in skeletal muscle in patients with Child-Pugh class B and C cirrhosis. *Hepatology* 2001;34:7-12.
11. Kugelmas M: Preliminary observation: oral zinc sulfate replacement is effective in treating muscle cramps in cirrhotic patients. *J Am Coll Nutr* 2000;19:13-5.
12. Kok T, van der Jagt EJ, Haagsma EB, Bijleveld CM, Jansen PL, Boeve WJ: The value of Doppler ultrasound in cirrhosis and portal hypertension. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999;230:82-8.
13. Tsumura K, Hayashi T, Suematsu C, Endo G, Fujii S, Okada K: Daily alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes in Japanese men: the Osaka Health Survey. *Diabetes Care* 1999;22:1432-7.
14. Chin-Dusting JP, Kaye DM: Restoration of nitric oxide function in human hyperlipidaemia, congestive heart failure and liver cirrhosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:645-52.
15. Epstein SK, Zilberberg MD, Jacoby C, Ciubotaru RL, Kaplan LM: Response to symptom-limited exercise in patients with the hepatopulmonary syndrome. *Chest* 1998;114:736-41.
16. Bandi JC, Garcia-Pagan JC, Escorsell A, Francois E, Moitinho E, Rodes J, Bosch J: Effects of propranolol on the hepatic hemodynamic response to physical exercise in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1998;28:677-82.
17. Epstein SK, Ciubotaru RL, Zilberberg MD, Kaplan LM, Jacoby C, Freeman R, Kaplan MM: Analysis of impaired exercise capacity in patients with cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1998;43:1701-7.
18. Petrides AS, Matthews DE, Esser U: Effect of moderate exercise on insulin sensitivity and substrate metabolism during post-exercise recovery in cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:972-9.
19. Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, Hashimoto O, Tsuji R, Tamaki S, Torimura T, Inuzuka S, Sata M, Tanikawa K: Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 1997;27:103-7.
20. Salo J, Guevara M, Fernandez-Esparrach G, Bataller R, Gines A, Jimenez W, Gines P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J: Impairment of renal function during moderate physical exercise in cirrhotic patients with ascites: relationship with the activity of neurohormonal systems. *Hepatology* 1997;25:1338-42.

21. Garcia-Pagan JC, Santos C, Barbera JA, Luca A, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Bosch J, Rodes J: Physical exercise increases portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology* 1996;111:1300-6.
22. Agusti AG, Roca J, Rodriguez-Roisin R: Mechanisms of gas exchange impairment in patients with liver cirrhosis. *Clin Chest Med* 1996;17:49-66.
23. Muller MJ, Dettmer A, Tettenborn M, Radoch E, Fichter J, Wagner TO, Balks HJ, von zur Muhlen A, Selberg O: Metabolic, endocrine, haemodynamic and pulmonary responses to different types of exercise in individuals with normal or reduced liver function. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996;74:246-57.
24. Nielsen K, Kondrup J, Martinsen L, Dossing H, Larsson B, Stilling B, Jensen MG: Long-term oral refeeding of patients with cirrhosis of the liver. *Br J Nutr* 1995;74:557-67.
25. Salo J, Gines A, Anibarro L, Jimenez W, Bataller R, Claria J, Gines P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J: Effect of upright posture and physical exercise on endogenous neurohormonal systems in cirrhotic patients with sodium retention and normal supine plasma renin, aldosterone, and norepinephrine levels. *Hepatology* 1995;22:479-87.
26. Salo J, Francitorra A, Follo A, Navasa M, Gines A, Jimenez W, Gines P, Arroyo V, Rivera F, Rodes J: Increased plasma endothelin in cirrhosis. Relationship with systemic endotoxemia and response to changes in effective blood volume. *J Hepatol* 1995;22:389-98.
27. Grose RD, Nolan J, Dillon JF, Errington M, Hannan WJ, Bouchier IA, Hayes PC: Exercise-induced left ventricular dysfunction in alcoholic and non-alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 1995;22:326-32.
28. Selberg O, Radoch E, Walter GF, Muller MJ: Skeletal muscle glycogen content in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994;20:135-41.
29. Iwao T, Toyonaga A, Ikegami M, Sumino M, Oho K, Sakaki M, Shigemori H, Nakayama M, Tanikawa K, Iwao J: Cardiovascular responsiveness after isotonic exercise in cirrhotic patients: study on sympathoadrenergic and renin-angiotensin systems. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1043-6.
30. Muller MJ, Bottcher J, Selberg O: Energy expenditure and substrate metabolism in liver cirrhosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17 Suppl 3:S102-6; discussion S115.
31. Lindor KD: Management of osteopenia of liver disease with special emphasis on primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1993;13:367-73.
32. Thorens JB, Junod AF: Hypoxaemia and liver cirrhosis: a new argument in favour of a "diffusion-perfusion defect". *Eur Respir J* 1992;5:754-6.
33. Okumura H: [Drug therapy and patient management of liver cirrhosis] *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 1991;80:1611-6.
34. Bernardi M, Rubboli A, Trevisani F, Cancellieri C, Ligabue A, Baraldini M, Gasbarrini G: Reduced cardiovascular responsiveness to exercise-induced sympathoadrenergic stimulation in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1991;12:207-16.
35. DeLissio M, Goodyear LJ, Fuller S, Krawitt EL, Devlin JT: Effects of treadmill exercise on fuel metabolism in hepatic cirrhosis. *J Appl Physiol* 1991;70:210-5.
36. Nambu M, Iijima T: Indocyanine green (ICG) test before and after exercise in patients with chronic liver diseases. *Gastroenterol Jpn* 1990;25:212-7.
37. Campillo B, Fouet P, Bonnet JC, Atlan G: Submaximal oxygen consumption in liver cirrhosis. Evidence of severe functional aerobic impairment. *J Hepatol* 1990;10:163-7.
38. MacGilchrist AJ, Reid JL: Impairment of autonomic reflexes in cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1990;85:288-92.
39. Agusti AG, Roca J, Bosch J, Rodriguez-Roisin R: The lung in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1990;10:251-7.
40. Zhu SS, Hu F, Li DG, Jin GQ, Jiang SJ, Lu HM, Li R: Intravenous tryptophan tolerance test for liver function. *Chin Med J (Engl)* 1990;103:146-51.
41. Campillo B, Chapelain C, Bonnet JC, Frisdal E, Devanlay M, Bouissou P, Fouet P, Wirquin E, Atlan G: Hormonal and metabolic changes during exercise in cirrhotic patients. *Metabolism* 1990;39:18-24.
42. Murai K, Tsuji H, Kawadoko T, Fujishima M: [Extents of daily activities allowed in chronic hepatitis and liver cirrhosis] *Fukuoka Igaku Zasshi* 1989;80:422-4.