

パターンは多様な増減を示した(図2)。これら遺伝子群において、特に有意の変動を示す遺伝子および血中ヒアルロン酸、肝ハイドロキシプロリンと有意の相関を示す60遺伝子を選択した。

60遺伝子のRT-PCRプライマー(TaqManプローブ)を作成し、C型慢性肝炎・肝硬変患者37例(F1:16例、F2:8例、F3:7例、F4:6例)の肝組織にて定量的PCRを行った。まずウイルスの $\Delta$ の計算により遺伝子を選択する過程をMulti-scale bootstrap法で繰り返し行い、個々の遺伝子が選択された回数を集計した。こうして順位をつけた遺伝子の上位遺伝子の組み合わせで、遺伝子を制限した多群判別の線形判別式を作成し、leave-one-outのクロスバリデーションにより判別式の陽性的中率を計算し、80%以上の正解率が得られる判別式を計算した。この様にして、線維化のステージを予測する判別式を特異的な3~5遺伝子の組み合わせで作成できる20遺伝子を選択できた。

## 考 察

gene chipを使った網羅的遺伝子発現プロファイルは分子レベルで病態の全体像を把握する上で強力な手段である。我々は肝線維化と関係のある遺伝子を選択するため、ラット肝線維化モデルを作成し、そのgene chip解析を行った。

我々はすでにAtlas cDNA micro-alley法を用いてIPH患者の肝臓においてCTGF遺伝子が有意に多く発現していることを報告してきた。<sup>1)</sup>しかし、この方法では512遺伝子しか評価していないが、今回用いたgene chip解析では8,000遺伝子を一度に評価することができる。その結果、肝線維化の進展に伴い有意の変動を示す60遺伝子を抽出した。

慢性肝疾患患者の肝組織において、まず第一段階としてbootstrap法にて元データベースから復元抽出を複数回行い、検証用データベースを作成し、個々の遺伝子が選択された回数を計算した。次に回数の多い上位遺伝子の組み合わせで、遺伝子数を3~5個に制限した多群判別の線形判別式を作成した。ここで得られた判別式の汎用性が失われないように、つまりデータのオーバーフィッティングを防ぐため、leave-one-outのクロスバリデー

ションで判別式の陽性的中率を計算し、80%以上の正答率が得られる判別式を計算した。線形判別式に遺伝子を多く入れるほど正答率が上がるが、10数個の遺伝子を用い99%の正答率を得られるより、3~5個の遺伝子での適当な正答率が得られる予測式を作り、遺伝子候補について判別能力を検証していく方が重要である。その結果、遺伝子候補として22遺伝子を選択しているが、新たな臨床サンプルを用いた本判別式の検証により候補遺伝子を絞り込む必要がある。

今回はインフォームドコンセントを得た慢性肝疾患を対象として検討を行ったが、今後は検体センターに肝組織を保管しているIPH患者に関して、インフォームドコンセントを得られれば同様の解析を行う予定である。

## 文 献

1. 塩見 進、森川浩安、西口修平他：特発性門脈圧亢進症の遺伝子異常に関する研究。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成11年度研究報告書2000:17-19.
2. 塩見 進、森川浩安、西口修平他：特発性門脈圧亢進症の遺伝子に関する研究。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成12年度研究報告書2001:20-22.
3. 塩見 進、森川浩安、西口修平他：IPH動物モデルの作成（CTGF遺伝子導入マウスによる検討）。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成13年度研究報告書2002:18-20.
4. 塩見 進、田守昭博、羽生大記他：IPHおよびPBC特異的タンパク質の解析。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成15年度研究報告書2004:5-8.

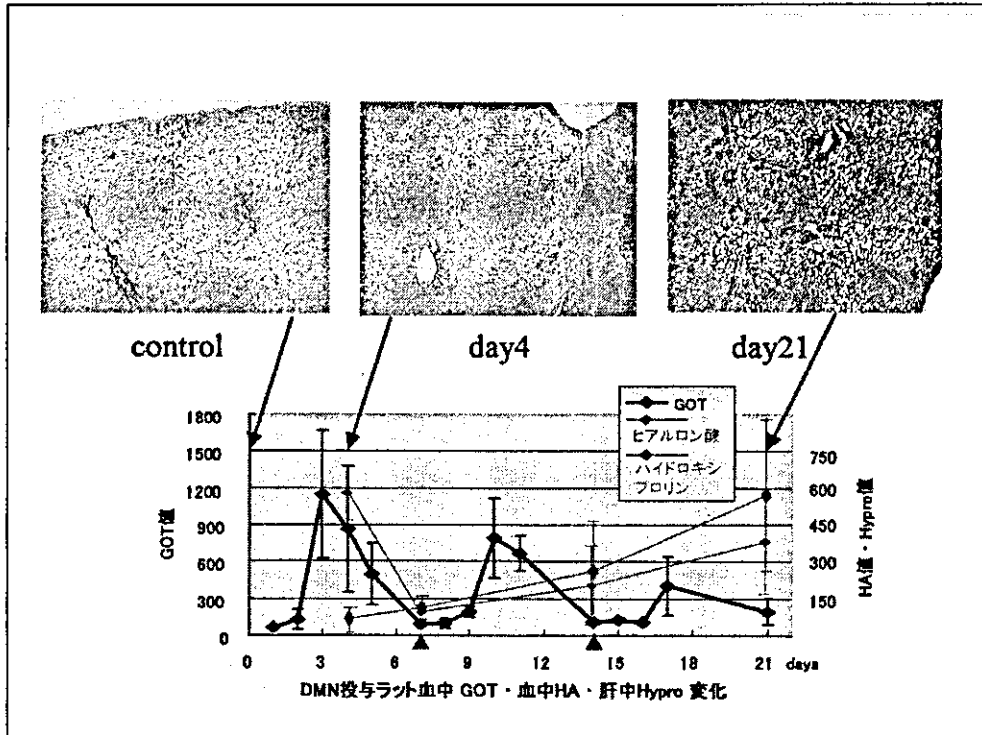


図1 DMN投与肝線維症モデルにおける線維化マーカーの推移

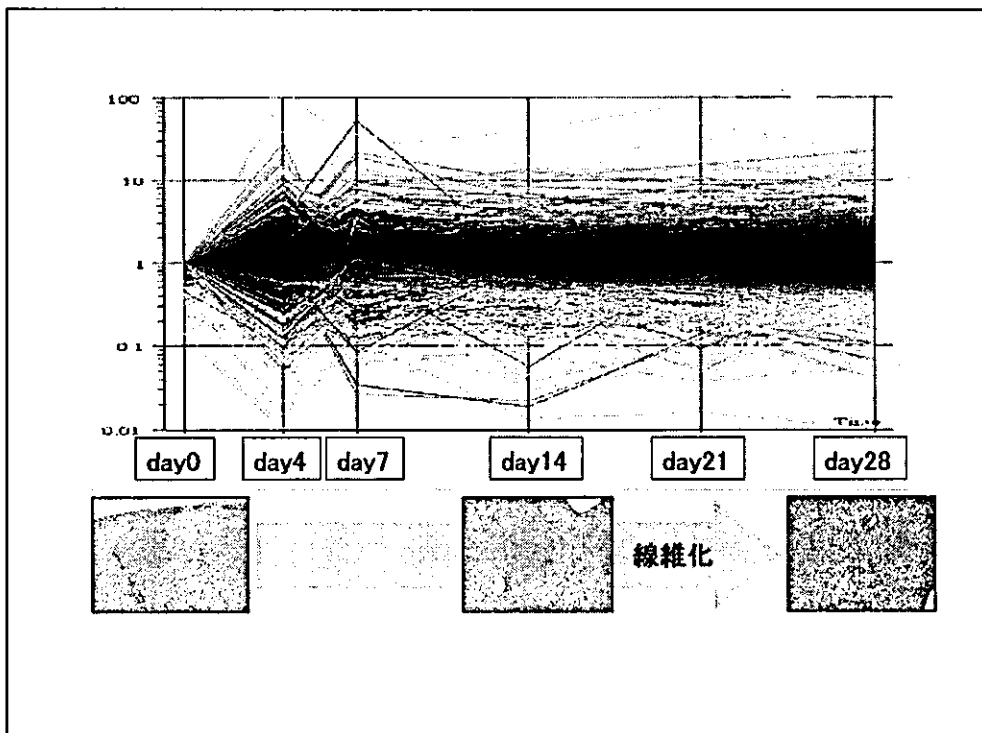


図2 肝線維化過程における全gene chip遺伝子の経時的発現変動

# 肝臓特異的な低酸素感受性転写制御因子hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ 欠損マウスの確立と肝再生能に関する解析

慶應義塾大学医学部医化学教室  
末松 誠

## 研究要旨

門脈血行動態変動は肝小葉内局所酸素濃度を劇的に変化させ、臓器レベルでの適応結果として肝臓の形態的・機能的なリモデリングを誘導することが知られている。転写制御因子hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)は局所酸素濃度変化を鋭敏に感受し様々な低酸素応答遺伝子群の発現を誘導することが知られているが、本研究では肝実質細胞内酸素濃度応答機構の破綻が臓器としての肝臓のリモデリング機構に如何なる影響を及ぼしうるのかを解析するために、肝実質細胞特異的なHIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損マウス(HIFDFAlbCre)を用いることで肝再生応答におけるHIF-1の生物学的意義について検討を行った。HIFDFAlbCreはメンデルの法則に従い正常に発生・発育し、組織学的な肝臓形態およびその湿重量変化には特に異常は認められなかった。しかし、HIFDFAlbCreにおける70%肝切除後の肝再生過程はコントロール群と比較して有意に遅延すること、またこの遅延効果は肝実質細胞の細胞増殖反応の減少を伴っていることが明らかになった。これらの結果より、HIF-1は肝再生過程の重要な制御因子として機能していることが示された。

## はじめに

生体は外界の酸素濃度変化を鋭敏に感受し、様々な遺伝子発現を誘導することでその酸素環境に適応する能力を備えている。Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)はこの細胞内低酸素応答機構の中心に位置する転写制御因子であり、酸素濃度依存性にその発現量が規定されるHIF-1 $\alpha$ と恒常的に発現するHIF-1 $\beta$ のヘテロ2量体から成る。これまでに解糖系酵素群、血管新生因子、血管作動性物質など数多くの遺伝子群が低酸素環境下においてHIF-1により制御されることが報告されている。また、近年HIF-1 $\alpha$ のgene targetingでは胎生10日頃に全身血管網形成不全、神経管閉鎖不全などにより胎生致死に至ることが明らかにされ胎児発生にHIF-1が重要な機能を有していることが示された。しかし、一方で成熟個体における生理的あるいは病態下のHIF-1の生物活性に関する解析は非常に限られてきた。

我々はこれまで本研究班において細胞内遊離ヘムの

分解に関与する酵素heme oxygenase (HO)、特に誘導型HOであるHO-1、が肝硬変症により肝実質細胞、類洞壁細胞などの肝構成細胞群に発現増加が起こることまた、このHO-1発現誘導が肝臓臓器の機能的・形態的リモデリングにおいて重要な役割を演じている可能性を示してきた。肝硬変症においては肝小葉内局所酸素濃度が正常時と比較し低下した低酸素環境であること、また低酸素環境刺激によりHIF-1を介してHO-1が転写亢進することを考えれば、肝硬変症時の病態形成に於いてはHIF-1が上位に位置する制御因子として機能していると推察される。そこで、本年度は肝実質細胞内酸素濃度応答機構の破綻が臓器としての肝臓の形態的・機能的リモデリング機構に如何なる影響を及ぼしうるのかを解明することを目的とした。この解析のために我々は、肝実質細胞特異的なHIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損マウス(HIFDFAlbCre)を新規に確立し、このマウスにおける肝再生応答変化について検討を行った。

## 対象と方法

### 1) .肝細胞特異的HIF-1 $\alpha$ conditional knockout miceの作成

共同研究者であるカリフォルニア大学サンディエゴ校生物学部のRandall S. Johnson研究室で作成されたHIF-1 $\alpha$  遺伝子のエクソン2の両端にそれぞれloxP配列を挿入した遺伝子改変マウス(HIFDF)とラットアルブミンプロモーターの制御下にCre recombinase蛋白を発現するトランスジェニックマウス(AlbCre)との交配により、肝細胞特異的なHIF-1 $\alpha$  遺伝子欠失マウス(HIFDFAlbCre)を作成した。作成したマウスは既に報告のある方法を用いて尻尾より抽出したgenomic DNAを鋳型としてPCRを行い遺伝子型を決定し、さらにサザンプロット法にて成熟個体の肝臓におけるHIF-1 $\alpha$  遺伝子のエクソン2欠失効率を検討した。

### 2) .70%部分肝切除術後の肝再生過程の評価

8-12週齢の雄マウスを用いてエーテル麻酔下にてHigginsとAndersonらが確立した方法に準じて70%部分肝切除術を試行した。肝再生の評価には術後の経時的な肝湿重量変化を用いた。また、部分肝切除後の肝細胞増殖能を解析するために、Bromodeoxyuridine (BrdU; 50mg/kg)を肝臓のサンプリング1時間前に腹腔内投与した。BrdU投与後の肝臓はPLP (periodate-lysine-paraformaldehyde)固定後10 $\mu$ mの凍結切片を作成した。作成した切片は抗BrdU単クローン抗体を用いて既に報告がなされている方法に準じて染色を行い、DABにより発色、その後メチルグリーンによる核染色を行った。BrdU陽性率は切片上の1000個の肝実質細胞をカウントしてDAB陽性細胞の割合を%表示にて表した。

## 結果及び考察

HIFDFAlbCreマウスはメンデルの法則に従い発生すること明らかになった。さらに出生後12週齢までの体重変化の検討ではコントロール群(HIFDF)と同程度の発

育が認められた。また、10週齢の成獣における肝湿重量及びマクロ肝臓形態はHIFDFマウスと比較して有意な変化は認められなかった。成獣肝臓のH.E.による組織学的な解析においても肝小葉構築には明らかな変化は認められなかった。一方、生後10週齢のこの遺伝子欠損マウスにおいて、肝臓組織の約70%がHIF-1 $\alpha$  遺伝子エクソン2が欠失していることがサザンプロットの解析により明らかになった。以上の結果より、今回利用したCre-loxPシステムによるHIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損効率は完全ではないものの高率に欠失させることに成功しHIF-1の生物作用解析に十分に用いることが出来ること、またHIF-1はマウス肝臓の形態的発生・発達において重要な決定因子として機能していない可能性が示された。しかし、今後HIF-1が肝臓の有する様々な機能維持に関与しているか否かを解析する必要があると考えられる。

次に肝再生過程におけるHIF-1の役割について解析するために70%部分肝切除術を施行した。その結果、HIFDFAlbCreマウスは切除後の再生肝湿重量回復は24時間まで全く認められず36時間後より始まり、その後急速に増加し術後72時間経過時にコントロール群に追いつくことが明らかになった。また、部分肝切除後72時間以降はHIF-1 $\alpha$  遺伝子欠失肝臓はコントロール群とほぼ同じ肝湿重量変化を示した(図)。

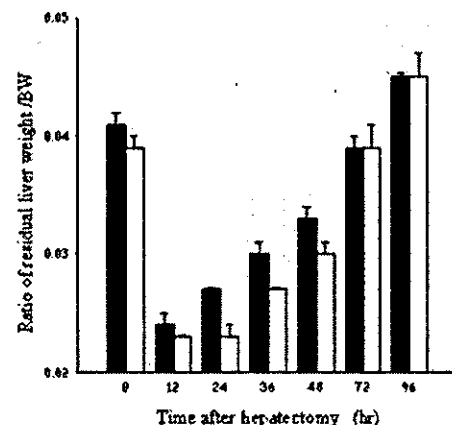


図 70%部分肝切除後の肝湿重量変化に及ぼすHIF-1の影響

縦軸はマウス体重に対する肝湿重量比、横軸は部分肝切除後の時間を表す。黒カラムはコントロール(HIFDF)

マウスを、白カラムはHIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損(HIFDFAlbCre)マウスの切除後の各時間帯における比を示す。

さらにHIFDFAlbCreマウスにおいて認められた早期肝再生遅延現象が肝実質細胞の増殖応答低下によるものか否かを明らかにするために、S期の細胞に特異的に取り込まれるBrdUを投与した。その結果、コントロール群では切除後36時間より劇的なBrdU陽性細胞の増加が認められ、そのピークは36~42時間であった。一方、HIF-1 $\alpha$  遺伝子欠損マウスでは、コントロール群同様に切除後36時間よりBrdU陽性細胞の出現が認められたが、その陽性率は激減しており、またそのピークは術後60時間と遅延していることが明らかになった(表)。これらの結果は、肝再生過程においてHIF-1の転写活性が起き、肝実質細胞の増殖応答を正に制御する転写因子として機能していることが明らかになった。

	0	24	36	48	60	72 (hr)
HIF(+/+)	0.29 ±0.20	0.17 ±0.03	26.65 ±6.45	26.80 ±7.11	21.80 ±4.68	9.28 ±1.57
HIF(-/-)	0.20 ±0.02	0.19 ±0.07	4.01 ±2.68	7.11 ±2.97	20.56 ±1.75	10.49 ±1.39

表 70%部分肝切除後の肝実質細胞BrdU陽性率

データは1000個の肝実質細胞中のBrdU陽性細胞率を%±標準誤差で表示。

今後、肝再生過程においてHIF-1がどのような分子群の発現を誘導することで肝再生過程の制御を行っているかを更に詳細に検討する予定である。

# 門脈血栓症における門脈血行動態の検討—静脈瘤血行路におよぼす影響について

千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学  
松谷正一

共同研究者  
千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学  
丸山紀史、吉住博明、小林 哲、奥川英博、福沢 健

## はじめに

門脈血栓は、門脈血行異常症の成因や病態の進展に深くかかわっている。特に門脈血栓による門脈血流の障害は、門脈血行異常症の主要な病態である食道胃静脈瘤の増悪因子として重要と考えられる。最近、画像診断の進歩と普及により、従来にくらべ容易に血栓症を診断することができることから、様々な部位での多様な門脈血栓を診断する機会が増加している。そこで、本研究では、血栓症の形成部位や範囲が静脈瘤への供血路の血流にどのような負荷を与えているかについて検討を行なった。

## 対象と方法

門脈血栓を伴った食道静脈瘤(F2以上)合併肝硬変18例、特発性門脈圧亢進症6例において、左胃静脈径、平均血流速度(遠肝性血流方向)を超音波ドプラ法により計測した。使用した超音波装置は、東芝POWER VISION8000、SSA 390Aである。また、門脈血栓を伴わない食道静脈瘤(F2以上)合併肝硬変76例を対照として、同様の計測を行った。門脈血栓の形成部位と程度は表に示した。

## 結 果

### 1.門脈血栓と左胃静脈径(図1)

門脈血栓合併例では、非合併例に比べて、左胃静脈径が増大していた。また、血栓合併例では門脈左右枝と

もに閉塞した例や門脈の半周以上を血栓が占拠した例では、血栓が半周以下の例に比べて、左胃静脈径の増大傾向がみられた。

### 2.門脈血栓と左胃静脈血流速度(図2)

左胃静脈の血流速度は、門脈血栓の合併の有無で有意な差は見られなかった。しかし、門脈血栓例では門脈1次分枝の閉塞例や門脈での半周以上の血栓占拠例では、血栓が半周以下の例に比べて、左胃静脈血流速度が高値となる傾向が見られた。また、抗凝固療法により血栓の減少がみられた例では、左胃静脈血流速度の低下が見られた(図3)。

### 3.門脈血栓例における左胃静脈血行動態の特徴について(図4)

門脈血栓による1次分枝閉塞例や、門脈で半周以上に血栓が占拠した例では、同様の静脈瘤を伴った、門脈血栓非合併例に比べて、左胃静脈径、血流速度ともに散布図上、高値の領域に分布していた。

## 考 察

門脈血栓は、門脈圧亢進症の原因や増悪因子として重要である。特に、特発性門脈圧亢進症では、門脈血栓の頻度が高く、その対策は、予後の向上に不可欠と言える。門脈血栓は、画像診断の進歩と普及により、その診断が従来にくらべて容易になったことから、診断する機会が増加している。また、診断能の向上に伴って、肝内の門脈分枝に局限したものから、門脈内を広範囲に占めるものまで、様々な部位や程度の血栓を検出するよう

になってきている。しかし、このような多様な範囲の血栓が、門脈血行動態にどのような異常をおよぼすかについては、不明な点が少なくない。そこで、本研究では、食道静脈瘤を伴った門脈血行異常症での門脈血栓の合併を想定して、血栓が静脈瘤の血行動態にどのような影響を、およぼすかについて検討を行った。左胃静脈は、食道静脈瘤への主要な血液供給路となることから、その血行動態の解析は、静脈瘤の血行動態を推定する上で有用と考えられる。そこで中等度以上の食道静脈瘤を有する門脈圧亢進症例で血栓の部位や程度と左胃静脈血行動態との関係を見ると、血栓範囲がある程度をこえると、左胃静脈径や血流速度が増加し、食道静脈瘤への血流負荷が生じてくるようであった。このことから、門脈血栓の範囲の判定が、食道静脈瘤への対処を決める上で、重要と考えられた。門脈血栓では、薬物治療が多く試みられているが、門脈血行異常症では、消化管出血の危険度が高いこと、脾機能亢進や肝障害による出血傾向がみられることから、血栓に対する薬物治療の適応や効果については十分に明らかにされていない。今回の検討からも、中等度以上の血栓例では、静脈瘤への血流負荷がかかっているため、血栓に対する薬物治療も注意を要するものと考えられた。今後、血栓形成の背景因子を解明することにより、血栓症の予防や伸展を阻止していくことが、門脈血行異常症の治療ならびに予後の向上に重要と考えられた。

## 結 語

1. 門脈血栓は、占拠範囲により、静脈瘤血行路におよぼす影響は様々であった。
2. 門脈血栓の範囲の診断は、血栓症や静脈瘤の治療適応の判定に重要と考えられた。

## 文 献

1. Webster GJM, Burroughs AK, Riordan SM. Review article: portal vein thrombosis-new insights into aetiology and management. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1-9.
2. Bilbao JJ, Vivas I, Delgado C, Martinez-Cuesta A,

Pardo F. TIPS: Portal thrombosis. In: Rossi P, Ricci P, Broglia L eds. *Portal hypertension Diagnostic imaging and imaging-guided therapy*. Berlin: Springer-Verlag, 2000: 231-247.

3. Amitrano L, Guadrascione MA, Brancaccio V, Margaglione M, Manguso F, Iannaccone L, et al. Risk factors and clinical presentation of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 40: 736-41.
4. Matsutani S, Furuse J, Ishii H, Mizumoto, K Kimura, M Ohto. Hemodynamics of the left gastric vein in portal hypertension. *Gastroenterology* 1993; 105: 513-518.
5. Hillaire S, Bonte E, Denninger MH, Casadevall N, Cadranel J-F, Lebrec D, Valla D, Degott C. Idiopathic non-cirrhotic intrahepatic portal hypertension in the West: a re-evaluation in 28 patients. *Gut* 2002; 51: 275-80.
6. 松谷正一：特発性門脈圧亢進症における門脈血栓の検討—長期経過との関連について。厚生労働省特定疾患・門脈血行異常症調査研究班，平成15年度研究報告書，班長 橋爪 誠，2004，42-45.
7. 松谷正一：抗凝固療法を行った門脈血栓症の二症例。厚生労働省特定疾患・門脈血行異常症調査研究班，平成14年度研究報告書，班長 橋爪 誠，2003，45-47.

表1 門脈血栓の部位と程度

n=24				
	n	壁在	半周	閉塞
1次分枝	14	3	5	6(2)
門脈幹	10	2	5	3

図1 門脈血栓例における左胃静脈径一非合併例との比較

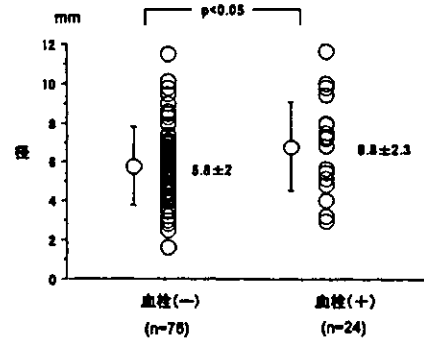


図2 門脈血栓例における左胃静脈血流速度一非合併例との比較

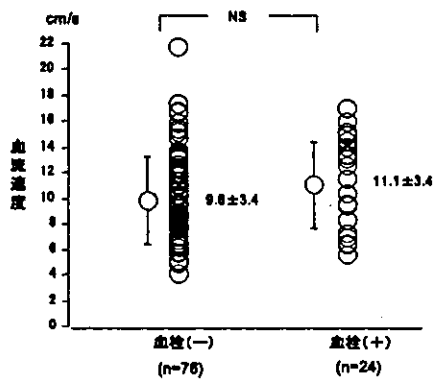


図3 血栓の短期経過と左胃静脈血行動態の変化

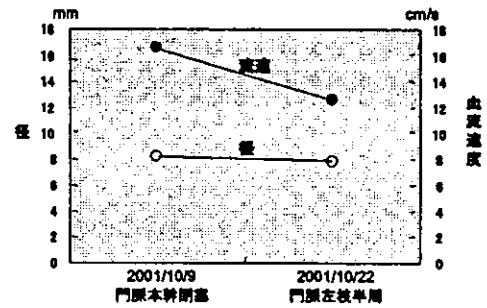
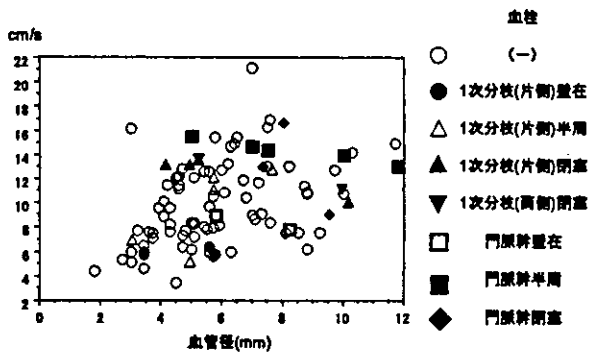


図4 門脈血栓例における左胃静脈血行動態の特徴一非合併例との比較





# 孤立性胃静脈瘤症例における超音波造影剤を用いた肝血行動態変化の検討

東京医科大学内科学第四講座  
森安史典

共同研究者  
東京医科大学内科学第四講座  
古市好宏、目時 亮、中山大寿、古川雅也、真田 淳

## はじめに

近年、肝血流動態を経時的に視認できるレボピストの特徴を利用した新しい肝循環動態の評価法が試みられている。<sup>\*</sup>David O Cosgroveらは超音波造影剤(レボピスト)を用い、肝静脈への到達時間が肝硬変症例では正常例と比較し有意に短縮することを報告している。

<sup>\*</sup>Non-invasive diagnosis of hepatic cirrhosis by transit-time analysis of an ultrasound contrast agent  
Thomas Albrecht et al, *Lancet* 1999; 353: 1579-83

## 目的

そこで我々は静脈瘤を有する症例に対し、治療前後における肝の循環動態の変化について、超音波造影剤を用い肝静脈到達時間を測定することにより検討した。

## 対象と方法

対象は孤立性胃静脈瘤を有するC型肝硬変5例、アルコール性肝硬変1例、十二指腸静脈瘤を有するアルコール性肝硬変1例、食道静脈瘤を有する特発性門脈圧亢進症1例、B型肝硬変1例である。

男女比は、男性:女性=4:5で、平均年齢は62.2±6.5歳であった。また、コントロールとして正常例2例についても検討した。

使用した超音波診断装置はSequoia512で、レボピスト2.5gを蒸留水7mlで溶解した後、毎秒1mlで肘静脈より投与した。

スキャン方法は右肝静脈と門脈が描出される肋間からスキャンし、造影剤投与から右肝動脈-門脈-右肝静脈が造影される様子を5分間観察した。

## 結果

### 1. 正常例と肝硬変症例での肝静脈到達時間の比較

超音波造影剤投与後の肝静脈到達までの時間的推移を正常例と肝硬変症例、特発性門脈圧亢進症例で検討した。造影剤投与後はいずれも肝動脈、門脈、肝静脈の順に到達していた。正常例と比較すると、肝硬変症例および特発性門脈圧亢進症例では肝静脈への到達時間が短縮しており、肝硬変症例では平均18.8秒、特発性門脈圧亢進症例では平均10秒短縮していた。しかも、両症例とも特に門脈から肝静脈到達までの時間が短縮していることが判明した。

### 2. 食道静脈瘤治療前後における造影剤投与後の時間的推移

次に、食道静脈瘤を有する肝硬変症例、特発性門脈圧亢進症例について食道静脈瘤治療前後で肝静脈到達時間に変化が生じるかどうか検討した。

超音波造影剤投与後の肝動脈から肝静脈到達までの時間的推移を治療前後で比較したところ、いずれも肝動脈、門脈、肝静脈の順番に到達していたが、到達時間において変化は認めなかった。

### 3. 経静脈的塞栓術前後における造影剤投与後の時間的推移

胃・十二指腸静脈瘤を有する肝硬変症例について経

静脈的塞栓術前後で到達時間に変化が生じるかどうか検討した。超音波造影剤投与後の肝動脈から肝静脈到達までの時間的推移を比較した結果、造影剤は肝動脈、門脈、肝静脈の順番に到達していた。

しかし、食道静脈瘤治療症例と異なり、経静脈的塞栓術後には全例において肝静脈到達時間の延長がみられた(正常例に近づく傾向にあった)。因みに、治療前では、造影剤が肝動脈から肝静脈到達するまでの時間は平均6.9秒であり、治療後は平均9.9秒であった。

また、特に門脈から肝静脈に到達するまでの時間が治療後では延長しており、治療前と比べ2.5秒延長していた。

#### 4. 肝予備能と到達時間の関係について

治療による肝予備能の変化をICG15分値にて評価したところ、治療後は全例ともにICG15分値が改善していた。また、ICG15分値と造影剤投与後の肝静脈到達時間の関係を検討したところ、両者には負の相関関係がみられ、ICG15分値が改善するほど、到達時間は延長する傾向が認められた。

#### まとめ

肝硬変例及び特発性門脈圧亢進症例では正常例と比較してレボピストの門脈から肝静脈到達までの時間が短縮していた。

経静脈的塞栓術後にはレボピストの門脈から肝静脈到達までの時間が延長した。

しかし、食道静脈瘤治療後では到達時間は延長しなかった。

ICG15分値と肝静脈到達時間には負の相関関係がみられた。

#### 考 察

肝硬変による肝血行動態変化の原因として

1. 肝臓の動脈血化
2. 肝内シャント
3. 肺動静脈短絡
4. 心拍出量の増加と血管抵抗低下に伴う過循環状態 (Hyperdynamic circulatory state)

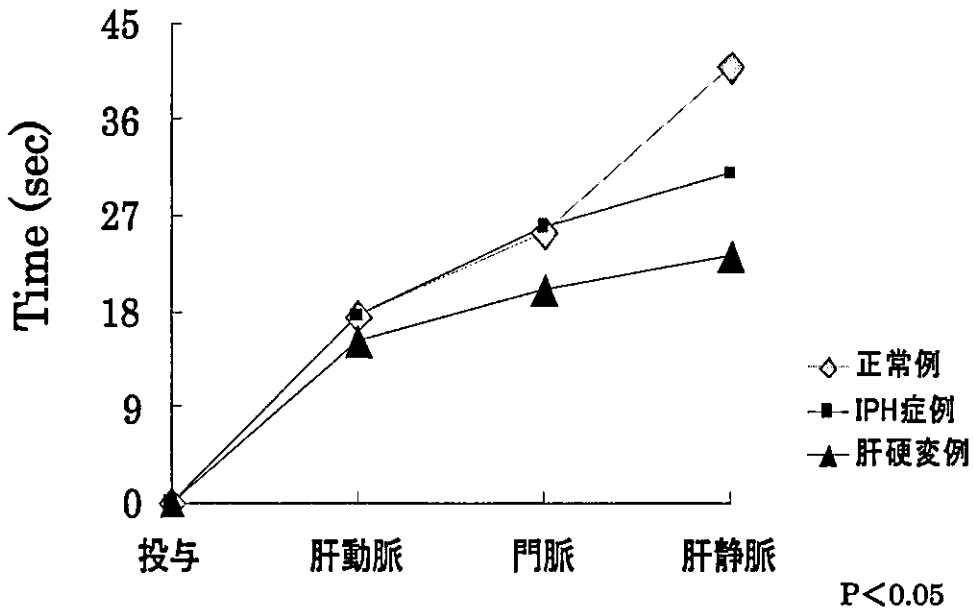
が提唱されており、その影響によって肝硬変症例では肝静脈到達時間が短縮するものと考えられている。

今回我々は胃・十二指腸静脈瘤を有する肝硬変症例において経静脈的塞栓術を試み、治療後は全例ともに肝静脈到達時間が延長する傾向(正常に近づく傾向)を確認した。肝硬変症例の門脈大循環短絡を閉鎖させることは、短期的には肝予備能を改善させ、肝内の微小循環を正常に近づける効果を示唆しているのかもしれない。

しかし、今回の検討方法においてはこれ以上の肝内微小循環を明瞭化することは難しく、治療後に肝静脈到達時間が延長する血行動態を完全に解明するには更なる工夫が必要だと考えられた。

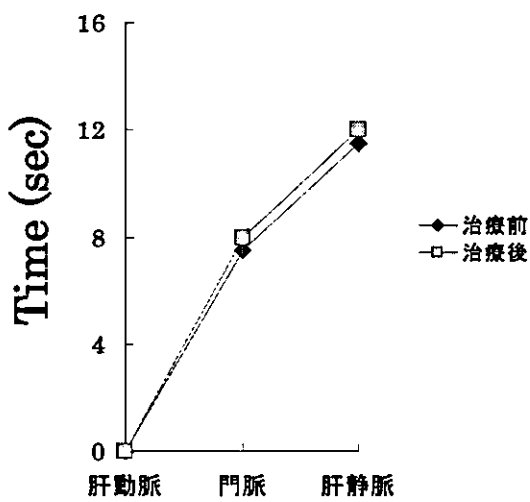
ただし、今回我々が検討したこの方法は、到達時間を計測することで側副血行路の遮断効果や肝硬変の程度の目安を視認できる可能性があると思われた。

## 肝静脈到達までの時間的推移 (正常例と肝硬変症例の比較)



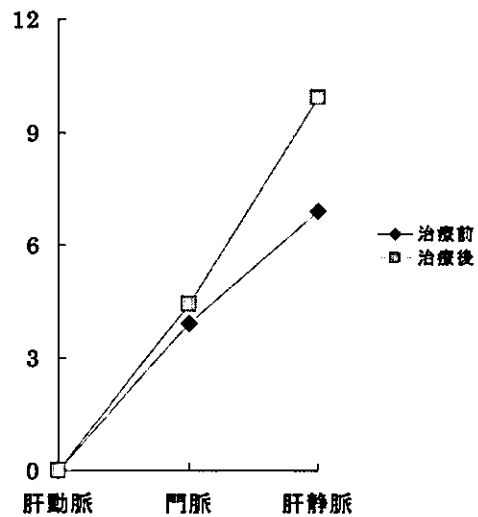
## 食道静脈瘤治療前後 (EIS)

Arrival Time(肝動脈～肝静脈)



## 胃・十二指腸静脈瘤治療前後 (経静脈的塞栓術)

Arrival Time(肝動脈～肝静脈)



# 門脈血行異常症における脾の役割 ～脾におけるEndothelin-1、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の発現についての検討～

九州大学大学院医学研究院災害・救急医学  
橋爪 誠

共同研究者  
九州大学大学院医学研究院災害・救急医学  
山口将平、吉田大輔

九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科  
金城 直、川中博文、前原喜彦

九州大学大学院医学研究院次世代低侵襲治療学  
小西晃造、田上和夫

## はじめに

門脈血行異常症における脾臓の役割は未だ明らかでない。今までの基礎的実験では、脾摘は肝再生を促進させ1)、肝線維化を抑制するという報告がされている2)。また、臨床的にはBanti症候群に対する脾摘や、肝硬変の脾機能亢進症に対する部分的脾動脈塞栓術(PSE)により肝機能が改善されるとの報告もされている3)4)。脾摘やPSEは門脈血流量を減少させるにも関わらず、このような肝臓に対する好影響を及ぼすのは、脾臓から肝臓に放出される肝再生抑制因子や肝線維化促進因子の存在の可能性を示唆する。

今回、我々は肝脾相関の視点から門脈血行異常症の脾の役割について検討した。

## 対象と方法

1) ラット肝硬変モデルにおいて、脾摘の肝線維化に関する影響を検討した。

6週齢のWistar系ラットを用いて、Thioacetamide (TAA) 200mg/kgを週3回、24週間腹腔内投与して肝硬変ラットモデルを作成した。肝硬変ラットモデルを作成後、脾臓摘出群(SP群 n=18)及び単開腹群(SO群 n=18)の2群に

分け、術後10、30、60日に肝組織、及び門脈血中を採取し、以下の項目を検討した(図1)。

- a) ラット肝硬変モデル完成時の脾臓におけるTGF- $\beta$ 1発現(免疫染色)
- b) 術後10、30、60日後の肝組織における肝線維化(Azan染色を行い、肝線維化率をNIH imageで測定)
- b) 術後10、30、60日後の肝組織における肝再生(PCNA labeling index)
- b) 術後10、30、60日後の門脈血中におけるTGF- $\beta$ 1濃度

2) ヒト肝硬変症の脾臓において、肝線維化に関与する次のmRNAの発現を半定量RT-PCRにて検討した。

- a) ET-1 b) TNF- $\alpha$  c) TGF- $\beta$ 1

## 結果及び考察

1) ラット肝硬変モデルの脾臓では非肝硬変の脾臓に比べ、TGF- $\beta$ 1の高発現が認められた(図2)。また、肝硬変完成後、脾摘群は非脾摘群に比べ有意に肝線維化改善傾向が認められ(図3)、肝再生の増加も認められた(図4)。また、門脈血中TGF- $\beta$ 1濃度はSP群がSO群に比べ有意に低下していた(図5)。

2) ヒト肝硬変症の脾臓では対照群の脾臓に比べ、ET-1、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  1ともにmRNAの発現が増加していた。(図6)

TGF- $\beta$  1は肝再生を抑制し、肝線維化を促進するサイトカインである。今回の実験ではラット肝硬変モデルにおいて脾摘群(SP群)は、非脾摘群(SO群)に比べ、肝線維化改善傾向及び肝再生の増加が見られた。これらに対する脾臓の関与を明らかにするために、門脈血中のTGF- $\beta$  1濃度を測定したところ、SP群がSO群に比べ低下しており、脾臓由来のTGF- $\beta$  1が肝線維化を促進し、肝再生を抑制している可能性が示唆された。今まで脾臓マクロファージはTNF- $\alpha$  やIL-1 $\beta$  など、肝細胞障害に関与する様々なサイトカインを産生していると報告されているが、TGF- $\beta$  1に関する報告は未だ為されていない。しかし、従来から肝切後の肝再生を抑制する脾臓由来の物質の存在の可能性が示唆されていた。Ohiraらは、肝細胞初代培養系を用いて肝再生を抑制する脾臓由来の物質を指摘し5)、TomikawarらはHGFを抑制する脾臓由来の物質の存在を指摘した6)。これらの物質がTGF- $\beta$  1だった可能性も考えられる。

肝臓内ではTGF- $\beta$  1はKupffer細胞で産生されている。肝臓が障害を受けるとKupffer細胞のactivityが低下するため、脾臓内のマクロファージが活性化され、そこで産生されたTNF- $\alpha$  やIL-1 $\beta$  が肝臓での炎症を増加させるとの報告が為されている。肝硬変においても同様にKupffer細胞のactivityが低下するため、脾臓内系が活性化し、結果としてTGF- $\beta$  1が高発現した可能性が考えられる7)。

今回、ヒト肝硬変症の脾臓による検討も行った。その結果、TNF- $\alpha$ 、ET-1、TGF- $\beta$  の発現が正常の脾臓に比べ亢進しており、仮説を裏付ける結果となった。

### 参考文献

1. Tomikawa M et al. The role of the spleen, platelets, and plasma hepatocyte growth factor activity on hepatic regeneration in rats. Am. Col. Surg. 1996; 182:12-6
2. Wang Q et al. The mechanism for splenic promoting effect on liver cirrhosis. Chung Hua I Hsueh Tsa Chih 1995; 75: 594-8
3. Durham RH. The result of splenectomy in Banti' s syndrome. Am. Int. Med 1951;34: 1372-8
4. Murata K et al. Long term follow-up for patients with liver cirrhosis after partial splenic embolization. Hepato-Gastol. 1996; 43:1212-7
5. Ohira M et al. An experimental study of a splenic inhibitory factor influencing hepatic regeneration. Surg. Gynecol. Obstet. 1987;164: 438-44
6. Tomikawa M et al. The role of the spleen, platelets, and plasma hepatocyte growth factor activity on hepatic regeneration in rats. J. Am. Coll. Surg. 1996; 182: 12-6
7. Akahoshi T et al. J Gastroenterol Hepatol. 2002 Jan;17 (1):59-65

図1 Schedule of the experimental procedures

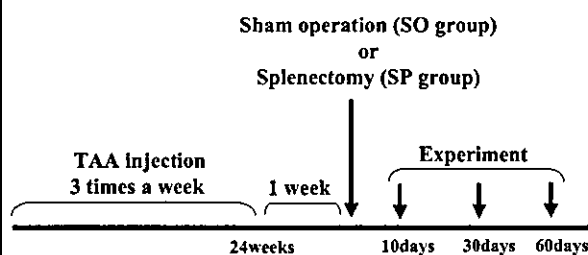


図2 肝硬変ラット脾臓におけるTGF $\beta$ <sub>1</sub>の発現



図3 脾臓摘出と肝線維化の関係

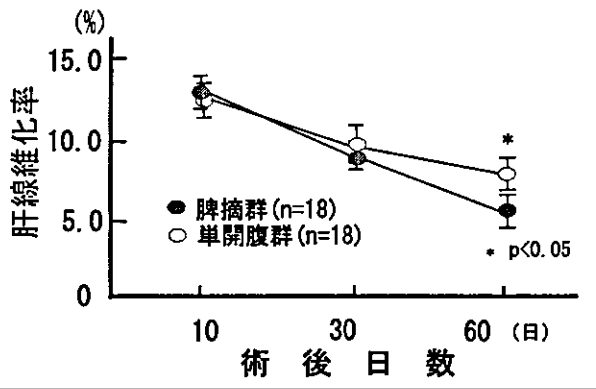


図4 脾臓摘出と肝再生

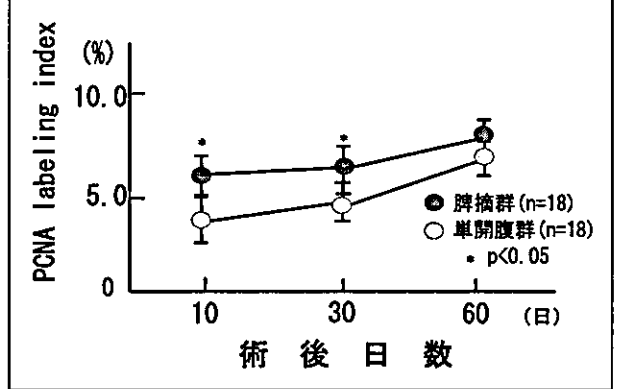


図5 脾摘と門脈血中TGFβ1濃度の関係

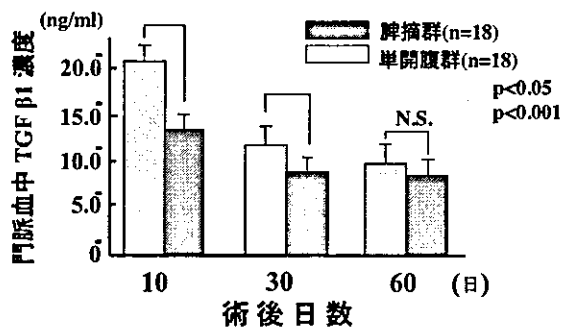
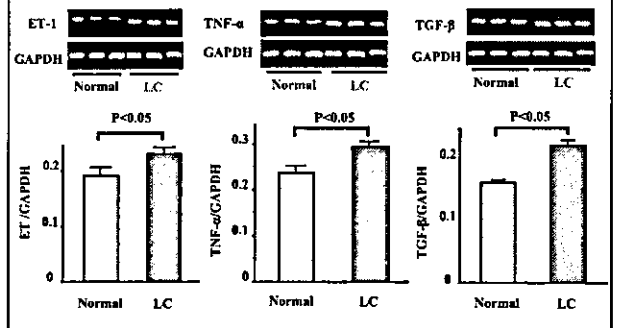


図6 ヒト脾臓におけるmRNA発現



# IPHにおける免疫異常

昭和大学医学部第二内科（消化器内科）  
井廻道夫

共同研究者  
昭和大学医学部第二内科（消化器内科）  
馬場俊之

特発性門脈圧亢進症 (IPH) は門脈血行異常症の一疾患であり、その病因は不明である。これまで免疫異常の関与が示唆されており、今回の研究では、免疫制御機構とIPHの病態に関して検討する。

IPHではIPHには自己抗体の出現 (39.4%)、高 $\gamma$ グロブリン血症 (26.3%)、自己免疫疾患の合併 (11.9%) などの免疫異常が認められる<sup>1)</sup>。またV $\beta$ 9陽性T細胞の増加が報告されていることから、スーパー抗原がその候補の一つ考えられているが<sup>2)</sup>、病因は確定されていない。しかし何らかの要因によるhyperimmunityの結果、活性化された脾内Th1 typeのCD4細胞が増加し、さらにIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ の放出が促進し、肝血管内皮細胞上に発現増強されたHLA-DR分子やICAM-1、VCAM-1などの接着分子を攻撃することにより門脈の炎症、潰れが発症し、脾腫や門脈圧亢進を発症すると推測されている(図1)<sup>2,3,4)</sup>。さらに抗リン脂質抗体が関与する肝内門脈の微小血栓形成や血管炎が門脈圧亢進の原因に関与するという報告もある<sup>5)</sup>。以上のようにIPHは様々な免疫異常の関与が示唆されているが、未だ解明されていない分野も多い。

一方、免疫調節において、サイトカイン産生パターンの違いによって分類される「Th1/Th2バランス」は重要な概念である。ナイーブT細胞 (Thp) は抗原提示細胞 (APC) 上に提示されたMHC/ペプチド複合体により刺激され、環境に依存するサイトカインネットワークによりTh1またはTh2に偏位した分化が誘導される(図2)。APCからはIL-12、ThpからIFN- $\gamma$ が産生され、さらにNK細胞から産生されるIFN- $\gamma$ がTh1への分化を誘導する。一方、NKT細胞、肥満細胞、メモリーTh2細胞から産生されるIL-4がTh2への分化を誘導する。Th1およびTh2は相互に制御し均衡を保っているが、Th1/Th2バランスの制御機構が

破綻すると、Th1への偏向により自己免疫疾患が、Th2への偏向によりアレルギー疾患が発症する。なおIPHにおけるTh1/Th2バランスは、末梢血および脾内リンパ球のサイトカイン産生パターンによる検討から、Th2への偏向が抑制され、結果的にTh1優位となることが明らかとなっている<sup>3)</sup>。

一方正常固体において、胸腺での除去を逃れた自己反応性T細胞は、様々の制御を受けている。一群の制御性T細胞もその一つであるが、特にCD4+CD25+T細胞 (Treg) は、Th1細胞およびTh2細胞の活性化・増殖を抑制するなどTh1/Th2バランスに深く関与している。TregはCD4+T細胞の5-10%を占め、CD25 (IL-2R $\alpha$ ) やCD125 (CTLA-4) を発現するメモリータイプの細胞である。マウスモデルにおいてTregを除去すると自己免疫疾患を発症することから<sup>6)</sup>、その異常が自己免疫疾患の発症に関与すると考えられている。Tregは免疫自己寛容の維持に重要な役割を果たしており、自己免疫疾患の発症阻止に関与するばかりでなく、慢性感染症において病原微生物に対する免疫応答を調節していることから、免疫制御機構を考える上で重要である。

今回の研究では、IPHにおけるTregの関与をはじめ、Th1/Th2バランス、Th1およびTh2タイプの各種サイトカインに関する検討を加え、免疫学的側面から病態を考察したい。

## 参考文献

1. Saito, K. et al. Non-specific immunological abnormalities and association of autoimmune disease in idiopathic portal hypertension. A study by

- questionnaire. Hepato-Gastroenterol. 40; 163-166, 1993.
2. Tokushige, K. et al. Abnormal T cell activation and skewed T cell receptor Vβ repertoire usage in Japanese patients with idiopathic portal hypertension. Clin. Immunol. Immunopathol. 75 ; 206-213, 1995.
  3. Tokushige, K. et al. Predominant T helper 1 cells in patients with idiopathic portal hypertension. J. Gastroenterol. Hepatol. 15 ; 1312-1317, 2000.
  4. 徳重克年他. 特発性門脈圧亢進症のHLA及び免疫学検討のまとめ. 門脈血行異常症調査研究班平成10年度研究報告書, pp15-17, 1999.

図1. 特発性門脈圧亢進症における免疫学的検討のまとめ

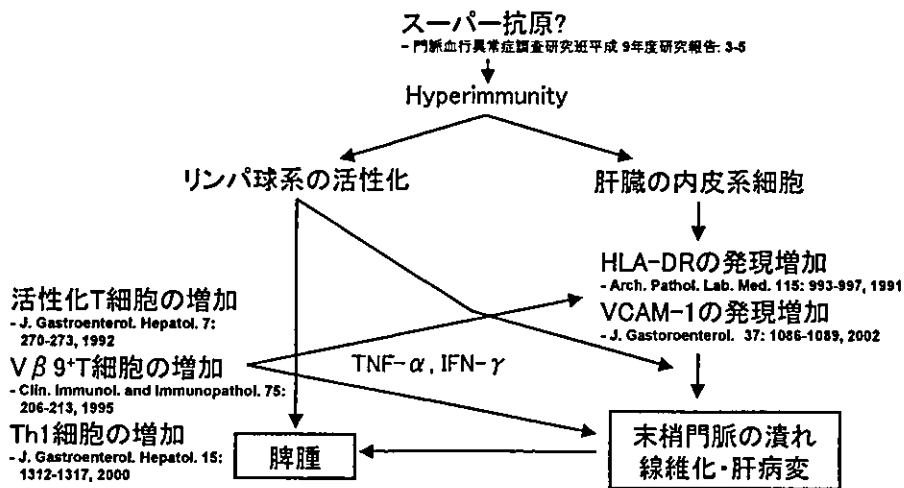
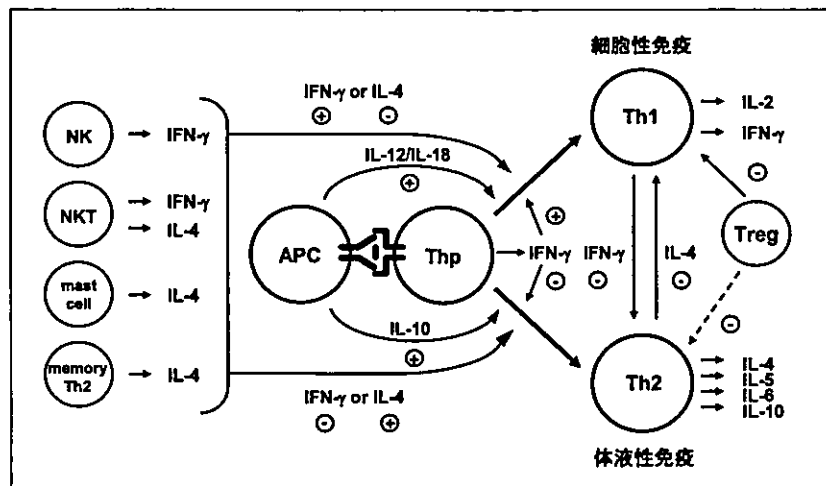


図2. Th1/Th2 バランスとサイトカインネットワーク





〔病 理〕

# 沖縄のBudd-Chiari症候群の肝病理形態

久留米大学医学部病理学教室  
鹿毛政義

本研究班で、我々はBudd-Chiari症候群(BCS)と肝細胞癌との関連について臨床病理学的検討を行ってきた。今回は、琉球大学医学部機能制御外科学 古謝景謝教授のご好意により、沖縄の肝細胞癌合併BCS症例を検討する機会を得たので、その肝病理所見について報告する。

## 対象と方法

琉球大学医学部機能制御外科学では、過去23年間(1979～2003)にBCSに対し直視下根治術が施行された症例は、46例(男:女=16:30、平均年齢48.9歳)であり、この内11例(23.9%)に肝細胞癌の合併が見られている。これら肝細胞癌を合併したBCS症例は、男:女=5:6、平均51.1(27～76)歳であった。11例中3例はBCSと肝細胞癌が同時に診断され、BCS根治術+肝部分切除術の一期的手術が行われている。8例はBCS根治術後遠隔期(術後2.3から9.0年、平均4.6年)に肝細胞癌が発見診断され、肝切除等の治療が施行されている。いずれも肝細胞癌の診断の契機は $\alpha$ -fetoprotein(AFP)値の上昇であった。経過は、11例中術後遠隔期に2例は肝細胞癌再発にて、1例は他因にて死亡していたが、他の症例は、肝細胞癌術後平均7.7年の時点では、再発徴候は認められていない。肝細胞癌を合併した症例全て、B型およびC型肝炎ウイルスマーカーは、陰性であった。

## 結果

表は、11例の肝細胞癌合併BCS症例のプロフィールを示している。

今回、これら肝細胞癌合併BCS症例のうち、組織学的検討を行った4例(症例2、8、10、11)について略病歴と肝組織所見を記す。

## 症例2

男性。43歳時に、下肢の色素沈着が認められた。44歳時に、肝硬変と食道静脈瘤と診断され、意識障害も認められた。48歳、下大静脈閉塞に対する手術が行われ、経過を観察されていたが、56歳、肝細胞癌と診断され切除術が行われた。

## 肝病理組織像

肝細胞癌は中等度分化、索状型であるが、偽腺管の形成も見られた。非癌部は、うっ血性肝硬変であり、中心帯領域と門脈域を連結する緻密な線維性隔壁の形成が見られた。再生結節は大小不同であり、粗大な再生結節が観察され、混合型肝硬変の所見を呈した。

## 症例8

女性。38歳時、白血球、血小板の減少を指摘された。41歳時には、脾腫が指摘され外来にて経過観察されていた。58歳、エコーとMRIにて、下大静脈閉塞が確認され、BCSの診断がなされた。59歳、BCSに対し直達根治術を行い、肝静脈閉塞部を切除した。肝うっ血は改善した。61歳、経過観察中にAFPが上昇し、S7とS8に肝細胞癌が発見された。

## 肝病理組織所見

肝細胞癌は中等度分化、索状型であり、被膜を形成していた。非癌部は、進行したうっ血性肝硬変を呈し、幅が広い線維性隔壁を形成していた。線維化が高度の部位では、小さな再生結節が目立ったが、大きな再生結節も散見された。肝細胞索は保持されていた。肝細胞のdysplasiaが観察された。

## 症例10

72歳 男性。 下肢の色素沈着と背部痛が出現し

た。画像検査にて、BCSの診断がなされ、S 6に肝細胞癌の合併も認められた。76歳、肝細胞癌に対し、TAEを行った後に、下大静脈の閉塞の根治術ならびに肝細胞癌切除術が施行された。

#### 肝病理組織像

非癌部は、うっ血性肝線維症であり、閉塞した肝静脈から伸展する線維化と結節状の肝細胞の再生により、肝小葉構築の改変が観察された。肝細胞索に乱れはなかったが、dysplasiaが目立った。

#### 症例11

72歳、男性。発熱、肝脾腫、下肢の浮腫が出現した。エコーにて、下大静脈および右・中肝静脈の閉塞が明らかとなり、BCSと診断された。AFPが高値であった。肝細胞癌切除と下大静脈閉塞に対する根治術が施行された。

#### 肝病理組織像

非癌部は、進行したうっ血性肝硬変を呈し、大小の再生結節が観察されたが、小さな再生結節が主体をなしていた。肝細胞の旺盛な再生活動とともにdysplasiaが不規則に観察された。

#### 肝細胞癌合併BCS4症例のまとめ

1. 2例には、BCSに対する直達手術と肝細胞癌の切除術が同時に行われた。他の2例では、BCSの手術から発癌までの期間は2年と9年であった。2. 非癌部肝病変は、3例がうっ血性肝硬変、1例はうっ血性肝線維症を呈していた。これらの症例には、顕著な肝細胞の再生性変化は観察されなかったが、3例にdysplasiaが認められた。3. 4例は、すべて血清学的に肝炎ウイルスマーカーは陰性であり、組織学的にも、ウイルス肝炎を含め、他の肝傷害因子の関与を示唆する所見は認められなかった。

#### 考 察

過去の本班研究の疫学調査で、沖縄ではBCSの頻度が高いと推測されたことがある。今回、これを裏付けるように、琉球大学では、機能制御外科学で46例ものBCS

症例が経験され、内科のBCS症例も併せると、多数の患者が存在することが明らかになった。なぜ沖縄が、他の地域に比べてBCSの頻度が高いか、その理由は明らかでない。何らかの沖縄固有の環境因子がBCSの発生に関与しているのかもしれない。ただし、肝病理組織に関しては、肝細胞癌を合併していないBCS症例も検討したが、沖縄のBCS症例に特異な変化は見出せなかった。

BCSに肝細胞癌が合併することはよく知られているが、その合併頻度は、報告者により大きく異なる。最も新しい報告は、平成3年度、本研究班より行われたBCSの全国調査であり、BCS症例157例中肝細胞癌10例、6.4%と報告され、従来、考えられていた合併頻度より低いものとの認識されるようになった。しかし、今回検討した琉球大学のBCSの肝細胞癌合併率は24%と高率であり、ウイルス肝炎と同様にBCSは肝細胞癌の高危険因子であることが改めて示された。

興味深い点は、BCSに対する根治術により、うっ血が解除されても肝細胞癌の発生が見られる症例があり、しかも症例によっては肝硬変の前段階のうっ血性肝線維症の状態からも発癌していることである。病歴期間が長いBCS症例では、うっ血性肝線維症の状態でも発癌のリスクがある銘記すべきであり、肝静脈・下大静脈の閉塞を速やかに開存し、肝うっ血を解除すること、さらに肝機能が正常化しても、肝発癌のリスクは持続することを念頭に置き、長期に経過観察を行うことが肝要と考えられている。

今回検討した肝細胞癌合併BCSの非癌部には、肝細胞のdysplasiaが目立った。dysplasiaは、慢性ウイルス性肝炎に通常みられる所見であり、現在前癌病変とは考えられていないが、肝細胞癌の非癌部に高率に出現する変化である。すでに報告したようにカナダの肝細胞癌合併BCSの非癌部肝組織にも旺盛な肝細胞再生とともにdysplasiaも目立った。肝細胞の再生変化やdysplasiaについての病理学的検討は、BCSの発癌機序の解明に手掛りを与える可能性がある。

#### 文 献

1. 國吉幸男、古謝景春、宮城和史ほか：Budd-Chiari症候群に伴う肝細胞癌症例の検討。日本外科学会雑誌

105:688, 2004

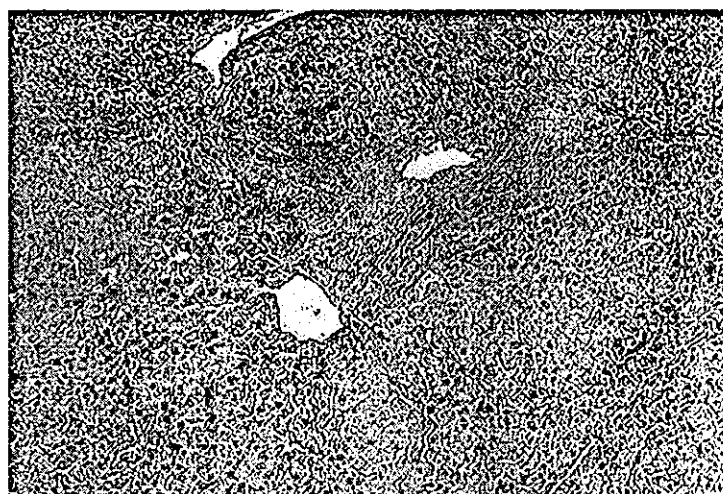
2. 古謝景春、國吉幸男：Budd-Chiari症候群に対する外科治療 閉塞肝静脈再建と肝静脈再開通術式 手術 57:1666-1670, 2003
3. 鹿毛政義：カナダのBudd-Chiari症候群. 門脈血行異常症調査研究班平成13年度研究報告書 11-13, 2002
4. Okuda H, Yamagata H, Obata H, et al. Epidemiological and clinical features of Budd-Chiari syndrome in Japan. J Hepatology 22;1-9, 1995

### Budd-Chiari Syndrome Associated with HCC

No.	Age	BCS (+HCC) Ope	HCC Ope	Interval (yrs)	Date of Death	Causes of death	Follow-up Post ope. (years)
1	31	1982.7	1986.12	4.4	1994.7	Recurrence of HCC (7.6y)	(7.6)
2	48	1985.1	1994.1	9.0	2001.1	Cerebral bleeding (7.0y)	(7.0)
3	27	1985.7	1991.9	6.2			12.3
4	59	1987	1990.11	3.0			13.1
5*	38	1988.8					15.3
6	42	1988.12	1994.1	5.1	2000.6	Recurrence of HCC (6.4y)	(6.4)
7	51	1992.7	1995.8	3.1			8.3
8*	73	1994.2					9.9
9	58	1999.6	2003.3	3.8			6.8
10*	76	2000.9					3.3
11	59	2001.2	2003.6	2.3			6.6

No. of Patients 5\*,8\*,10\* underwent simultaneous operation of BCS and HCC

症例11の肝病理所見



(A) 肝静脈の閉塞と線維化の進展 (HE X50)



(B) 肝細胞のdysplasia。(HE X200)