

- 田幹子、江川裕人、高田泰次: 生体肝移植例における原発性硬化性胆管炎 (PSC) の検討、第106回日本外科学会定期学術集会、2006年3月29-31日(東京)
- 44) 小崎浩一、江川裕人、高田泰次: 生体肝移植予後予測因子としての腎機能評価の意義、第106回日本外科学会定期学術集会、2006年3月29-31日(東京)
- 45) 福田晃也、斉藤俊一、重田孝信、平良薫、伊藤孝司、阪本靖介、小川晃平、尾池隆文、上田幹子、高田泰次、江川裕人、: 生体肝移植術前に悪性腫瘍の既往を有する症例の検討、第106回日本外科学会定期学術集会、2006年3月29-31日(東京)
- 46) 高田泰次: 生体肝移植周術期における問題点とその対策(ランチョンセミナー)、第106回日本外科学会定期学術集会、2006年3月29-31日(東京)
- 47) 高田泰次: 生体肝移植の Surgical Site Infection 対策、第14回日本外科学会生涯教育セミナー「Surgical site infectionの新しい対策」、2006年5月13日(和歌山)
- 48) 高田泰次: 急性肝不全に対する生体肝移植(ランチョンセミナー)、第32回日本急性肝不全研究会、2006年5月24日(京都)
- 49) 羽賀博典、高田泰次、上田佳秀: 肝移植後に出現する小葉内の好酸性小体の定量の意義-C型肝炎の再発と急性拒絶反応の鑑別-、第42回日本肝臓学会総会、2006年5月25,26日(京都)
- 50) 高田泰次、貝原聡: 肝移植臨床の最前線(ワークショップ、司会)、第42回日本肝臓学会総会、2006年5月25,26日(京都)
- 51) 小崎浩一、柴田登志也、羽賀博典、江川裕人、高田泰次、上本伸二: 小児生体肝移植における肝静脈狭窄の検討、第42回日本移植学会総会、2006年9月7-9日(千葉)
- 52) 江川裕人、尾池文隆、大森勝之、小川晃平、阪本靖介、平良薫、伊藤孝司、福田晃也、高田泰次: 成人血液型不適合肝移植における術前リツキサン投与戦略、第42回日本移植学会総会、2006年9月7-9日(千葉)
- 53) 重田孝信、阪本靖介、伊藤孝司、平良薫、小川晃平、羽賀博典、尾池隆文、上田幹子、江川裕人、高田泰次: 原発性硬化性胆管炎の術前診断で施行した生体肝移植後に、抗酸菌による硬化性胆管炎が示唆された一例、第42回日本移植学会総会、2006年9月7-9日(千葉)
- 54) 平良薫、上田幹子、江川裕人、高田泰次、上本伸二: 冬期に発症し、診断・治療に難渋した生体肝移植後下痢症、第42回日本移植学会総会、2006年9月7-9日(千葉)
- 55) 高田泰次、伊藤孝司、上本伸二: 肝細胞癌に対する生体肝移植の適応と成績、(パネルディスカッション)、第10回日本肝臓学会大会、2006年10月11,12日、(北海道・札幌)

- 56) Takada Y, Ito T, Haga H, Taira K, Sakamoto S, Ogawa K, Oike F, Ueda M, Egawa H, Uemoto S. Living donor liver transplantation for HCV-positive patients. World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 57) Ogawa K, Ito T, Taira K, Sakamoto S, Oike F, Ueda M, Egawa H, Takada Y, Uemoto S. Magnetic compression anastomosis for biliary stricture of hepaticojejunostomy after living donor liver transplantation. World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 58) Uchida Y, Sakamoto S, Egawa H, Ogawa K, Takada Y, Uemoto S. Impact of early and meticulous management for hepatic artery thrombosis on long-term outcome after pediatric living donor liver transplantation. World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 59) Sakamoto S, Egawa H, Takada Y, Uemoto S. Duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation using left lobe graft. World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 60) Kozaki K, Yoshizawa A, Oike F, Ueda M, Egawa H, Takada Y. The role of apheresis therapy for ABO incompatible living donor liver transplantation. World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 61) Ueda M, Takada Y, Maetani Y, Haga H, Ito T, Sakamoto S, Ogawa K, Oike F, Egawa H, Uemoto S. Accuracy of preoperative tumor evaluation in patients who underwent living donor liver transplantation (LDLT) for unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 62) Fukuda A, Sakamoto S, Ito T, Taira K, Ogawa K, Oike F, Ueda M, Takada Y, Egawa H, Uemoto S. Results of living donor liver transplantation in patients with preexisting malignancies. World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 63) Ito T, Takada Y, Ueda Y, Sakamoto S, Ogawa K, Oike F, Ueda M, Egawa H, Uemoto S. The new antiviral strategy for recurrent hepatitis C combined with double filtration plasmapheresis after living donor liver transplantation. World Transplant Congress, 2006 July 22-27, (Boston USA)
- 64) Takada Y, Ito T, Ueda M, Egawa H, Uemoto S. Living donor liver transplantation for patients with HCC exceeding Milan criteria. 7th world Congress of IHPBA, 2006 September 3-7, (Edinburgh, Scotland)
- 65) Ito T, Takada Y, Haga H, Ueda Y, Sakamoto S, Ogawa K, Oike F, Ueda M,

- Egawa H. Living donor liver transplantation for HCV-positive patients. 7th world Congress of IHPBA, 2006 September 3-7, (Edinburgh, Scotland)
- 66) Takada Y. Liver transplantation for HCC expanding Milan criteria. The 3rd Japan-Korea Liver symposium (JKLS). 2006 November 3-4, (Awaji, Japan.)
- 67) Takada Y. Living donor liver transplantation using a right lobe graft with MHV. (invited speaker) 14th Postgraduate Course of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists, and Oncologists. 2006 December 7-9, (Athens, Greece.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

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 田中紀章

岡山大学大学院医歯学総合研究科消化器・腫瘍外科学 教授

研究要旨: C型肝硬変に対する生体肝移植後のHCV移植肝再発は、再発時期・肝炎の組織学的程度・臨床経過が症例によって異なり、多彩である。今回、Steroid 投与下でのHCV移植肝再発において、再発時期・組織所見・Steroid regimen およびHCV抗原染色の組織学的早期診断における有用性について検討した。

A. 研究目的

HCV移植肝再発の病態は、再発時期・肝炎の組織学的程度・臨床経過において多彩である。今回、Steroid 投与を伴う免疫抑制下において、HCVの組織学的再発時期による臨床経過・再発組織所見の相違およびHCV抗原染色による組織学的早期診断について検討した。

B. 研究方法

C型肝炎硬変に対する生体肝移植 28 症例のうち、早期死亡 3 例を除いた 25 例を対象とした。23±14Mの平均観察期間にて 25 例中 12 例 (48%) に組織学的HCV再発を認めた。Steroid regimen は通常投与 10 例・早期少量投与 12 例・早期離脱 3 例であり、①組織学的再発時期と組織所見 ②Steroid regimen/pulse と組織学的再発 に関して検討した。また、25 症例に施行した移植肝生検 84 検体中、HE 染色での組織診断結果に

よって、HCV再発確診 12 検体・HCV再発疑診 6 検体・拒絶反応確診 7 検体・他の合併症 8 検体を認めた。それらの肝生検検体をHCV-envelope 2 (E2) に対するモノクローナル抗体IG222を用いて免疫組織学的染色を行い、その染色強度と血中HCV-RNA量を4群間で比較・検討した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

A. 組織学的再発時期は、3M以内 2例・3~6M 4例・6M以降 6例であり、6M以内の再発 6例はすべてacute hepatitisの組織像を呈していた。B. 組織学的再発はSteroid通常投与 10例中 4例・早期少量投与 11例中 6例・早期離脱 3例中 1例であり、Steroid regimen 別では組織学的再発率に差を認めなかった。C. 6M以内の組織学的再発6例中4例にSteroid pulseが施行

されており、6M以降の再発例・組織学的無再発例と比べ有意に Steroid pulse 施行が高率であった。D. 血中 HCV-RNA 量は上記の4群間で差を認めなかった。移植肝のIG222染色強度に関しては、HE染色でHCV再発疑診とされた生検6検体で、拒絶反応確認および他の合併症と診断された検体と比べ、有意に染色強度が高かった。

D. 考察

当施設における Steroid 投与を伴う免疫抑制下においては、23±14Mの平均観察期間にて24例中12例(48%)に組織学的HCV再発を認めた。それら12例の組織学的再発を再発時期によって検討すると、6M以内の再発6例はすべてacute hepatitisの組織像を呈しており、IFNによる早期の抗ウイルス療法を要した。Steroid regimen別では、Steroid通常投与・早期少量投与・早期離脱の各群において組織学的HCV再発率に差を認めなかった。これに対し、Steroid pulseの施行率は6M以内の組織学的再発例において、6M以降の再発例・組織学的無再発例と比べ有意に高率であり、Steroid pulse療法の施行あるいは急性拒絶反応の存在が組織学的HCV移植肝再発の危険因子であることが示唆された。

特に移植後早期の再発症例では、HE染色所見にてHCV再発疑診とされた肝生検を6検体認め、HE染色所見のみで組織学的再発を早期に確定診断することが難しいと思われた。今回、我々はHCV-E2蛋白に対するモノクローナル抗体IG222を用いて、肝生

検検体を免疫組織学的に染色し、染色強度とHE染色所見・臨床経過を比較・検討した。その結果、HE染色でHCV再発疑診とされた肝生検検体では、HCV確認とされた肝生検検体と同様に、拒絶反応確認および他の合併症と診断された検体と比べ、有意に染色強度が高かった。HCV-E2モノクローナル抗体IG222によるHCV抗原染色がHCV移植肝再発の組織学的早期診断に有用となる可能性が示唆された。

E. 結論

C型肝硬変における生体肝移植において、Steroid投与下におけるHCVの組織学的移植肝再発を主体とした移植後成績を報告した。特に移植後早期のHCV再発例ではHCV抗原染色による組織学的早期診断と再発治療に配慮を要すると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 貞森裕・八木孝仁・松川啓義・岩垣博巳・田中紀章・荻野哲也・白鳥康史. : 「C型肝硬変に対する生体肝移植の対策:移植前抗ウイルス療法と再発の組織学的早期診断」今日の移植 Vol.18 No.2 199-205 2005
- 2) 高木章乃夫・八木孝仁・岩崎良章・坂口孝作・白鳥康史. : 「ウイルス性肝炎と肝移植 Ⅲ. 施設における現状と対

2. 学会発表

- 1) 貞森裕、八木孝仁、松川啓義、篠浦先、尾崎倫孝、荻野哲也、岩垣博巳、田中紀章:HCV 肝硬変に対する生体肝移植の対策—IFN β 術前投与と HCV 再発の組織学的早期診断. 第 40 回日本移植学会総会 2004 年 9 月(岡山)
- 2) Yagi T, Shinoura S, Sadamori H, Matsukawa H, Umeda Y, Murata H, Hamano R, Tanaka N: AN EARLIER STEROID WITHDRAWAL USING LOW DOSE MYCOPHENOLATE MOFETIL DECREASE DELAYED / REFRACTORY ACUTE REJECTION IN ADULT LIVING DONOR LIVER TRANSPLANTATION. 14th Congress of the European Transplant Coordinators Organization 2005 年 10 月(Geneva, Switzerland)
- 3) Umeda Y, Yagi T, Matasukawa H, Murata H, Sadamori H, Shinoura S, Hamano R, Tanaka N: A SECURE PREOPERATIVE PORTAL DECOMPRESSION TECHNIQUE, PROXYMAL SPLENIC ARTERY EMBOLIZATION, IMPROVES SURVIVAL OF ADULT LIVING DONOR LIVER TRANSPLANTATION FOR VIRA / ALCOHOLOC HEPATITIS. 14th Congress of the European Transplant Coordinators Organization 2005 年 10 月(Geneva, Switzerland)
- 4) 貞森裕、八木孝仁、松川啓義、篠浦先、榎田祐三、伊藤充矢、濱野亮輔、田中紀章: 生体肝移植後の C 型肝炎再発に対する組織学的早期診断と移植前抗ウイルス治療. 第 17 回日本肝胆膵外科学会 2005 年 6 月(神奈川・横浜)
- 5) 貞森裕、八木孝仁、松川啓義、篠浦先、榎田祐三、岩垣博巳、田中紀章、荻野哲也、白鳥康史、坂口孝作: C 型肝炎硬変に対する生体肝移植における対策. 第 23 回中国四国臨床臓器移植研究会 2005 年 8 月(広島)
- 6) Sadamori H, Yagi T, Iwagaki H, Ogino T, Tanaka N: EARLY DIAGNOSIS OF RECURRENT HCV HEPATITIS USING IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF LIVER GRAFTS WITH A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HCV-E2. The 2006 Joint International Congress of ILTS, ELTA & LICAGE 2006 年 5 月(Milan, Italy)
- 7) 貞森裕、八木孝仁、松川啓義、松田浩明、篠浦先、榎田祐三、成島道樹、田中紀章: C 型肝炎硬変に対する生体肝移植の成績と問題点. 第 24 回日本肝移植研究会 2006 年 6 月(長野・松本)
- 8) 貞森裕、八木孝仁、松川啓義、松田浩明、篠浦先、榎田祐三、成島道樹、岩垣博巳、田中紀章: C 型肝炎硬変に対する生体肝移植成績と組織学的再発診断. 第 68 回日本臨床外科学会総会 2006 年

11月(広島)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

分担研究報告書

臓器移植における免疫抑制剤の HCV 増殖に対する影響

分担研究者	南木浩二	東京女子医科大学腎臓病総合医療センター外科	助手
	中島一郎	同上	講師
	澁之上昌平	同上	助教授
	寺岡慧	同上	教授

研究要旨: C 型肝炎ウイルス(HCV)は現在、肝移植の最大の適応疾患となっており、年々増加の一途を辿っているが、肝移植後の C 型肝炎は高率に早期再発するため、重要な予後不良因子である。また、血液透析患者の C 型肝炎ウイルス(HCV)陽性率は高いが、腎移植後の C 型肝炎治療はいまだ確立されていない。そこで、臓器移植で投与される免疫抑制剤が HCV 増殖に与える影響を調べる目的で、培養系と HCV 陽性の肝移植、腎移植の臨床症例を解析した。その結果、*in vitro*においてシクロスポリン(CsA)はインターフェロン(IFN)とは異なる経路による直接的な HCV 増殖抑制作用を示した。また、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)の活性体であるミコフェノール酸(MPA)は IFN の抗 HCV 効果を増強させた。一方、肝移植症例では、CsA と IFN 療法の併用により HCV RNA の陰性化が高率に得られた。腎移植症例においても CsA は肝機能障害と慢性肝炎の発生率を低下させる傾向にあり、CsA 投与例に対する IFN 療法が奏功した。しかし、肝移植における C 型肝炎の急速な進展は腎移植では見られず、肝移植特有なものであることが明確にされ、その機序解明が今後の研究課題である。

A. 研究目的

臓器移植において使用される各種免疫抑制剤が C 型肝炎ウイルス(HCV)増殖に与える影響を解析し、臓器移植後の C 型肝炎再発予防のための至適免疫抑制プロトコルを確立する。

また、各種免疫抑制剤によるインターフェロン(IFN)の抗 HCV 効果に対する影響についても解析し、IFN 療法下における HCV 制御に最も有利な免疫抑制療法についても説明する。

B. 研究方法

基礎的な解析として *in vitro* の培養実験系を、また臨床症例として肝移植と腎移植につき検討した。

(培養系)

in vitro における HCV の培養は確立されていないため、HCV サブゲノムを自律的に複製するレプリコン細胞の培養系を用いた。われわれの保有するレプリコン細胞(Huh7/Rep-Feo)は導入した HCV 非構造領域の上流にルシフェラーゼ遺伝子を合わ

せ持つため、遺伝子の定量化を簡便かつ迅速に行える。これに対し、各種免疫抑制剤シクロスポリン(CsA)、タクロリムス(Tac)、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)の活性体であるミコフェノール酸(MPA)、メチルプレドニゾロン(MP)の4剤を最終濃度0.01、0.1、1、10 μ g/mLにて投与した。さらに、インターフェロン α -2b(IFN α -2b)を0.01、0.1、1、10IU/mLで単独および上記免疫抑制剤4剤各々と併用投与した。これらを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内で3日間培養後にルシフェラーゼアッセイを行い、ルミノメーターにて活性を定量測定した。

さらに、上記と同様の培養系で、IFN下流蛋白である2-5オリゴアデニル酸合成酵素(2-5AS)の遺伝子発現をRT-PCR法にて検出した。

(肝移植症例)

当院ならびに海外にて肝移植が行われ、経過観察中であるHCV陽性肝移植12例を対象とした。それぞれにつき、投与されているカルシニューリン拮抗剤(CsAまたはTac)の種類、HCV genotype、IFN療法またはIFN・リバビリン(Rib)療法の治療歴、血中HCV RNA量の推移につき検討した。なお、HCV RNAの定量は、2004年3月まではreverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)法および分岐プローブ法を用い、2004年4月以降はRT-PCR法(オリジナル法、ハイレンジ法)によった。

(腎移植症例)

1990年から2003年までに当センターにて施行した腎移植1222例のうち、術前にHCV

抗体陽性の72例を対象とし、現在までの肝機能ならびにHCV量の推移を解析した。さらに、このうちIFN療法またはIFN・Rib併用療法を行った6例の臨床経過を検討した。

(倫理面への配慮)

TacからCsAへの変更、IFNおよびRib投与については、その必要性、副作用について十分に説明した上で行った。

C. 研究結果

(培養系)

CsAは単独投与において、最終濃度0.01、0.1、1、10 μ g/mLの各濃度にて、それぞれ63.4、61.5、13.1、14.1%のHCV RNA増殖抑制率を認めた。その他のTac、MPA、MPは単独ではHCV増殖抑制効果を示さなかった。一方、IFN単独投与では0.01、0.1、1、10IU/mLの各濃度で59.3、53.2、51.4、34.6%という濃度依存的な増殖抑制効果が見られ、さらにMPAとの併用により、51.0、35.3、26.6、25.4%と抗HCV効果は増強された。

2-5AS遺伝子はIFN投与により強力に誘導されるものの、CsAをはじめとする免疫抑制剤単独での発現は見られなかった。

(肝移植症例)

HCV陽性肝移植12例の内訳は、男9女3、年齢21~69歳(平均48.8歳)、原疾患はC型肝硬変10例(うち肝細胞癌合併5例)、アルコール性肝硬変1例、先天性胆道閉鎖症1例。グラフトは海外での脳死全肝移植4例、生体部分肝移植(左葉)8例。HCV genotype

は 1b が 10 例, 1a, 2b が 1 例ずつ。カルシニューリン阻害剤は CsA 4 例, Tac 5 例, CsA から Tac への変更が 3 例で, 免疫抑制剤として全例にステロイド, 他に症例によって MMF や抗 CD25 抗体である Basiliximab が投与された。

この中で, IFN 療法が 3 例, IFN・Rib 併用療法が 3 例に行われた。

その結果, 周術期に他病死した 1 例を除く 11 例で, CsA 群 3 例中 2 例で HCV RNA 陰性化し, 残り 1 例でも HCV RNA 量の減少を認めた。しかし, Tac 群 5 例中 HCV RNA 陰性化したのは 1 例のみで, 4 例で HCV RNA 量の増加を認めた。Tac から CsA への変更群 3 例では 2 例が HCV RNA 陰性化し, 残り 1 例も HCV RNA 量が減少した。

(腎移植症例)

移植前よりの HCV 陽性腎移植 72 例のうち, 1 ヶ月以上持続する肝機能障害 (AST, ALT ≥ 50) を認めたのは 23 例 (31.9%), うち慢性肝炎化したのは 13 例で, 急性肝炎 1 例を含む 3 例が肝不全死したが, 無治療による肝機能正常化も 9 例あり, うち 3 例は HCV RNA 陰性化した。腎移植後肝機能障害を認めなかった 49 例のうち, 11 例についても経過中に HCV RNA 陰性化した。

CsA 投与 23 例と Tac 投与 45 例での比較では, 肝機能障害が CsA 群で 4 例 (17.4%), Tac 群で 18 例 (40.0%), さらには慢性肝炎化は CsA 群で 2 例 (8.7%), Tac 群で 10 例 (22.2%) と, いずれも有意差はないものの CsA 群で低い傾向にあった。

また, IFN 療法または IFN・リバビリン併用

療法を施行した 6 例のうち, 治療完遂は 4 例で, serological biochemical response は 4/4 (100%), serological virological response は 2/4 (50%) であった。なお, この 6 例全例に CsA ならびに MMF が投与されていた。

D. 考察

肝移植後の C 型肝炎の再発は, 早期に高率で起こることが知られ, 近年増加し続けている C 型肝炎に対する肝移植において, その成績を低下させる原因となっている。これは, 通常の C 型肝炎が 20 年以上の長期経過をたどるのに比べて, 肝移植特有の現象であり, その違いに免疫抑制剤が大きく関与していることが推察される。

そこで, われわれはこの研究で, 免疫抑制剤が HCV に与える影響を培養系と臨床症例を用いて検討した。

その結果, 培養系では免疫抑制剤の中で CsA が唯一, 臨床的有効血中濃度における強力な HCV 増殖抑制効果を示し, 同じカルシニューリン阻害剤である Tac に比し, C 型肝炎への進展阻止に関して有利であると思われた。IFN 下流蛋白である 2-5AS は, CsA 単独によってはその遺伝子発現が見られなかったことから, CsA のもつ HCV 増殖抑制効果は IFN とは別の経路を介していると考えられる。また, MPA は単独では抗 HCV 効果を示さなかったが, IFN との併用でその HCV 増殖抑制効果を増強させ, IFN 療法における MMF の併用投与の有用性が示唆された。

肝移植においては、CsA 投与に加え IFN 療法を行った 6 例中 4 例で HCV RNA 陰性化が達成され、臨床症例においても HCV 制御における CsA の有用性が示唆された。

一方、これまで腎移植では C 型肝炎の経過に関するまとまった報告はなく、短期的には HCV 陰性と予後は変わらないが、長期的には通常の C 型肝炎の経過をたどると考えられ、HCV 増殖に対する免疫抑制剤の影響は重要視されてこなかった。そこで、今回われわれは自施設で経験した HCV 陽性腎移植症例の長期経過を解析し、さらには投与された免疫抑制剤の中でもカルシニューリン拮抗剤の CsA と Tac で比較・検討した。その結果、HCV 陽性腎移植では C 型肝炎に対する肝移植でのような C 型肝炎の急速な進展は見られず、むしろ無治療であるにもかかわらず、HCV RNA 陰性化した症例も見られた。加えて、投与されたカルシニューリン阻害剤別に比較したところ、肝機能障害と慢性肝炎の発生率で CsA 群が Tac 群に比べ低い傾向にあった。また、CsA 群において IFN 療法または IFN・Rib 併用療法を施行したところ、高い奏効率が得られ、腎移植においても HCV 制御における CsA の有用性が示唆された。

われわれは 1988 年に非 A 非 B 肝炎患者血清を接種したチンパンジーに CsA を投与し、電顕で肝細胞内ウイルス病変の histometric score の減少を見出し、CsA の抗ウイルス効果をいち早く報告してきた。また、2003 年に Watashi らが in vitro における CsA の抗 HCV 効果を報告し、臨床において

もその有用性を示そうとするさまざまな試みがなされてきたが、確実な効果を証明した報告はいまだなお出されていない。今回、われわれは、肝移植と腎移植の臨床症例で IFN 療法における CsA の有用性を見出した。また、MPA による IFN の抗 HCV 効果増強作用の報告は初めてである。今回得られた結果で、臓器移植後の C 型肝炎再発予防のための至適免疫抑制プロトコールとしては、CsA をベースとして、IFN を中心とした積極的な抗ウイルス療法に加え、効果増強を狙って MMF の併用が最も有利であると考えられる。

C 型肝炎変に対する肝移植後の C 型肝炎再燃に関して、HCV 陽性腎移植では同様の経過が見られなかったことから、これは肝移植特有のものと考えられ、腎移植との差異の検討が肝移植後急速な C 型肝炎再発の機序を解明する手がかりとなるかもしれない。同じ肝移植でも、今回対象とした先天性胆道閉鎖症の 1 例は、肝移植前から HCV 陽性であったにも関わらず、15 年という長期経過の後に初めて慢性肝炎の発症をみた。この症例と HCV 陽性腎移植の経験から、C 型肝炎への早期進展は原疾患が C 型肝炎変特有のものであり、おそらく、すでに HCV により末期肝硬変となった状態とそうでない移植における宿主の HCV に対する何かしらの免疫学的要因の違いによるものと推察された。

E. 結論

HCV 陽性臓器移植において C 型肝炎進

展阻止には、HCVに対する直接的な増殖抑制効果を示す CsA 投与が有用である。さらに、IFN 療法の際には MMF の併用により、抗 HCV 効果増強が期待できる。また、肝移植における C 型肝炎の急速な進展は腎移植では見られず、肝移植特有なものであることが明確にされた。しかし、肝移植と腎移植で C 型肝炎再発に差異を生じさせる機序はいまだ不明であり、その解明は今後の研究課題である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 唐仁原全, 南木浩二, 中島一朗, 瀧之上昌平, 寺岡慧. :HCV 陽性肝移植レシピエントにおけるウイルス量の変動. 第 41 回日本移植学会, 2005, 10, 30(新潟県・新潟市)
- 2) 南木浩二, 唐仁原全, 中島一朗, 瀧之上昌平, 坂本直哉, 渡辺守, 寺岡慧. : HCV 陽性肝移植におけるウイルス制御を目指した治療戦略—免疫抑制剤の選択と IFN 療法—. 第 106 回日本外科学会定期学術集会(ワークショップ), 2006, 3, 30(東京都)
- 3) 南木浩二, 唐仁原全, 中島一朗, 瀧之上昌平, 桂川秀雄, 山本雅一, 坂本直

哉, 渡辺守, 寺岡慧. :C 型肝炎ウイルス増殖に対する免疫抑制剤の及ぼす影響—肝移植後 C 型肝炎再発予防を目的とした免疫抑制プロトコールの開発—. 第 24 回日本肝移植研究会(シンポジウム), 2006, 6, 23(長野県松本市)

- 4) 南木浩二, 唐仁原全, 中島一朗, 瀧之上昌平, 坂本直哉, 渡辺守, 寺岡慧. : HCV 陽性肝移植ならびに腎移植におけるウイルス制御を目指した治療戦略の開発. 第 42 回日本移植学会総会, 2006, 9, 9(千葉県幕張市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
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 橋本俊 藤田保健衛生大学小児外科 教授

研究要旨:C型肝炎症例における肝移植後の免疫抑制療法として Cyclosporin と Mycophenolate mofetil を併用し、服薬の安定により HCV-RNA の増幅抑制効果が示唆される結果を得た。

A. 研究目的

C型肝炎患者に対する肝移植後の肝炎再発、肝硬変への進行を防止するのに適した術後免疫抑制法として Cyclosporin(CsA)と Mycophenolate mofetil(MMF)を併用し、免疫抑制と HCV-RNA 増殖抑制効果の検討を目的とした。

B. 研究方法

HCV 肝硬変に対する肝移植後症例では免疫抑制剤を CsA+MMF に変更を、初回生体肝移植症例では術前3日間の MMF 投与、術後 CsA+steroid にて免疫抑制を開始して、経口摂取開始とともに MMF を再開、steroid の早期減量を行う。経過中の肝機能検査の推移と共に血中 HCV-RNA の定量を行い、症例における肝炎再発状況及び HCV の増幅状況の経時的推移を検討する。

(倫理面への配慮)

当研究における研究対象者への不利益、倫理面の問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

当施設における3例の生体肝移植症例と1例の海外での死体全肝移植症例に対し CsA+MMF の併用免疫抑制療法を実施した。1例は門脈血栓症のため術後7ヶ月目に、1例は ARDS、敗血症のため術後58日目に死亡した。いずれの症例も経過中に拒絶反応の再燃や、感染、腎障害などにより免疫抑制療法の変更、steroid pulse 療法などを余儀なくされ、steroid 投与後には HCV-RNA が増幅したものの、CsA+MMF の投与が安定した状況下では HCV-RNA の増幅抑制効果を認めた。

D. 考察

HCV 肝硬変症に対する肝移植後の免疫抑制療法としての CsA+MMF 併用療法は報告が比較的少なく、その効果の是非は明らかになっていない。しかるに、高濃度下ではあるが CsA は HCV-RNA の増殖抑制がほうこくされ、MMF においても Rivavirin と同じ核酸合成阻害作用を有することから、この両薬剤の併用効果は HCV 肝硬変症に対する肝移植後の免疫抑制療法としての有用性

が推測された。自験例でも FK506 主体からの変更投与においても投薬量の安定に伴い HCV-RNA の増幅抑制効果を認めた。HCV 肝硬変患者では基礎に HCV 感染に起因するネフローゼ症候群や肺高血圧症が存在したり、糖尿病の合併などがあり併用薬剤も多く CsA+MMF の安定投与が困難なこともある。今後はこうした複雑な状況下における薬剤の安定投与に関する工夫をはじめ、症例を重ねさらなる検討を必要とする。

なし

E. 結論

CsA と MMF による免疫抑制療法には C 型肝炎ウイルスの増幅抑制効果が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 橋本俊, 杉岡篤, 加藤充純・・HCV 肝硬変に対する肝移植後における免疫抑制療法(CsA,MMF 併用療法)の経験.(京都府京都市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

生体肝移植後 C 型肝炎再発におけるドナー白血球門脈内投与の免疫学的解析

分担研究者 畠山勝義 新潟大学医歯学総合病院 病院長

研究要旨:C 型肝炎硬変肝移植における当施設で行なってきたドナー血門脈内投与(DST)と肝炎再発そして免疫学的解析を通して新たな免疫抑制療法模索した。DST 群7例中4例でウイルス消失内2例は SVR であった。その1例ではドナーNKT細胞のマクロキメリズムがグラフト内で確認され、またもう1例の自然消滅例では、NKT 細胞で FasL,TRAIL の発現が増強、抑制性レセプターである NKG2A の発現が減少していた。DST により NKT 細胞の活性化が促され、C 型肝炎再発に何らかの免疫学的関与をしている可能性が示唆された。今後さらなる検討を加え、IFN-リバビリン療法の再発予防の新たな治療法を模索する。

A. 研究目的

C 型肝炎硬変肝移植における当施設で行なってきたドナー血門脈内投与(DST)と肝炎再発そして免疫学的解析を通して新たな免疫抑制療法模索する。

さらに自然消滅例では NKT 細胞の FasL,TRAIL,CD69 の発現が増強、抑制性レセプターNKG2A 発現が減少していた。DST 群7例中4例でウイルス消失を認めた(2例 SVR)。

B. 研究方法

DST の免疫学的効果と DST 施行例の肝炎再発について検討した。

(倫理面への配慮)

患者家族から十分な説明と同意をいただき得た後もいつでも撤回する権利があることを認める。

D. 考察

移植後 C 型肝炎再発にはドナー、およびレシピエントの免疫系が何らかの関与をしている可能性が示唆された。

C. 研究結果

DST は臨床的にはステロイドの早期離脱(2ヶ月以内)を可能とし、拒絶反応の頻度を有意に減少させた。免疫学的解析では、グラフト肝内でドナーNKT 細胞の長期にわたるマクロキメリズムが確認された。

E. 結論

今後門注 DST の免疫学的解析をさらに進めるとともに、IFN-リバビリン療法を加えた有効な C 型肝炎再発予防法を開発する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Sato Y, Ichida T, Ito S, Hatakeyama K.: Preoperative administration of 5-FU and interferon beta may prevent recurrence of hepatitis B and C virus. Am J Gastroenterol. 2002 Jan;97(1):215-6. No abstract available.
- 2) Sato Y, Ichida T, Watanabe H, Yamamoto S, Abo T, Hatakeyama K.: Macrochimerism of donor type CD56+ CD3+ T cells in donor specific transfusion via portal vein following living related donor liver transplantation. Hepatogastroenterology. 50 (54):2161-5. 2003
- 3) Sato Y, Ichida T, Watanabe H, Yamamoto S, Oya H, Nakatsuka H, Kobayashi T, Watanabe T, Kameyama H, Hatakeyama K.: Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation. Hepatogastroenterology. 50(51):601-606.2003
2. 学会発表
- 1) 佐藤好信, 大矢洋, 山本智, 中塚英樹, 小林隆, 渡辺隆興, 畠山勝義. : ドナ一血門脈内投与は生体肝移植後 HCV 再感染に影響するか. HCV 自然消滅例の免疫学的解析. 日本肝移植研究会 (長野県・松本市)
- 2) 中塚英樹, 佐藤好信, 山本智, 竹石利之, 平野謙一郎, 大矢洋, 畠山勝義. : 当院における C 型肝硬変に対する生体肝移植. 第 41 回日本移植学会総会. 2005,10,30
- 3) 中塚英樹, 佐藤好信, 小林隆, 大矢洋, 平野謙一郎, 山本智, 畠山勝義. : C 型肝炎に対する生体肝移植. 第 60 回日本消化器外科学会. 2005,7,20
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝移植後に発症する C 型肝炎の活動性を予測する方法の確立
- Osteopontin Promoter SNPs の有用性 -

分担研究者 藤原研司 横浜労災病院 院長

研究要旨: C 型肝硬変, 肝細胞癌に対する肝移植では, 術後の HCV 再感染がほぼ必発であるが, その際に生じる肝炎の活動性は症例によって多彩である。我々は Th1 系免疫応答の開始に必須の cytokine である osteopontin の塩基配列を解析し, その promoter 領域にはほぼ 100% の連鎖不平衡を呈する nt -155, -616, -1,748 の 3 ヶ所の単塩基変異 (SNPs) と, これと独立した nt -443 の SNP が存在することを見出した。これらのうち, nt -443 の SNP は C 型慢性肝炎の活動性との関連性が認められた。一方, 同 SNPs の機能を評価するために, HepG2 細胞, THP1 細胞を用いて dual-luciferase receptor assay を実施したところ, nt -443 のみならず, nt -155 の SNP も遺伝子型によっても転写活性が異なることが判明した。特に, nt -155 の SNP 近傍の oligonucleotide には Y 染色体でコードされる SRY が転写因子として結合することから, 同 SNP を介する転写調節機構は男女で異なると推定される。従って, 肝移植後に発症する C 型肝炎の活動性を規定する宿主要因を解明するためには, nt -443 のみならず nt -155 の遺伝子型も同定し, 性差を考慮して成績を解析する必要があると考えられた。そこで, 現在, 肝移植を実施している 8 施設の協力を得て, C 型肝硬変, 肝細胞癌の治療として肝移植を実施したドナー, レシピエントの末梢血を採取して, osteopontin promoter SNPs の遺伝子型を同定する多施設共同研究を進めている。現在までに 9 移植例の 18 検体で nt -155 および nt -443 の SNP 解析が終了している。今後は症例数を増加させるとともに, 術後の臨床経過との関連性を解析し, 同 SNPs の意義を明確する予定である。一方, 基礎的検討としては nt -155 および nt -443 の SNPs 近傍の oligonucleotide と転写因子の結合性を解析するため, 競合 gel-shift assay の系を確立し, osteopontin の発現調節を性差との関連で検討している。

<研究協力者>

菅原通子 埼玉医科大学消肝内科 助手
濱岡和宏 埼玉医科大学消肝内科 助手
稲生実枝 埼玉医科大学消肝内科 講師
名越澄子 埼玉医科大学消肝内科 助教授
持田智 埼玉医科大学消肝内科 教授
(消肝内科: 消化器内科・肝臓内科)

C 型肝硬変, 肝細胞癌に対する肝移植では, 術後の HCV 再感染がほぼ必発である。肝移植後に再発する C 型肝炎の活動性は多彩であり, 短期間に肝硬変に進展する症例が存在する一方で, 血清 ALT 値が正常を持続する症例も認められる。HCV に対する免疫反応性を規定する肝局所の要因が存在し, ドナーとレシピエントの肝におけるその差異によって, 肝移植後の肝炎

A. 研究目的

活動性が規定される可能性がある。

Osteopontin は RGD 配列を有する細胞外 matrix であるが、Th1 系免疫応答の開始に必須の cytokine としても作用する。障害肝では活性化 macrophage や星細胞とともに、肝細胞における osteopontin 発現が高度になり、免疫応答を調節している可能性がある^{1, 2)}。我々は、human serum amyloid P component promoter を利用することで、肝細胞のみに osteopontin を過剰発現する transgenic マウスを作成した³⁾。本マウスでは 12 週齢以降でリンパ球の肝浸潤、小葉内壊死巣が観察されることから³⁾、肝炎の活動性は肝における osteopontin 発現を介して調節されている可能性がある。一方、ヒト osteopontin 遺伝子の promoter 領域の解析では nt -155, -443, -616, -1,748 の 4 カ所に単塩基変異 (SNPs) を発見した⁴⁾。これらのうち、nt -155, -616, -1,748 の 3SNPs はほぼ 100% に近い連鎖不平衡を呈している。また、これと独立した nt -443 の SNP は C 型慢性肝炎における肝炎活動性を規定している可能性があり、無治療で血清 ALT 値が 2 年以上にわたって正常範囲内の患者では、その allele が C/T ないし C/C を呈する頻度が異常値を示す患者に比して有意に高率であった⁴⁾。従って、同 SNP は osteopontin 発現を介して肝局所の免疫応答を調節しており、肝移植後の肝炎活動性はドナーとレシピエントの遺伝子型の差異によって規定される可能性がある。そこで、肝移植後に発症する C 型肝炎の活動性を予測する方法を確立するために、osteopontin 遺伝子の promoter SNPs に関して、肝移植を実施した C 型肝硬変、肝細胞癌を対象にドナーとレシピエントの遺伝子型を検討する多施設共同研究を開始した。また、同 SNPs の機能を解明するた

に、in vitro での検討を進めた。

B. 研究方法と成績

① 多施設共同研究の進展状況

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「C 型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究班」(主任研究者：門田守人教授)に参加している肝移植実施 14 施設(東北大学、東京大学、慶応義塾大学、順天堂大学、東京女子医科大学、新潟大学、信州大学、藤田保健衛生大学、京都大学、大阪大学、岡山大学、広島大学、九州大学、長崎大学)で生体部分肝移植を実施した HCV 陽性の肝硬変ないし肝細胞癌患者およびそのドナーを対象とする。各移植実施施設において術前後に、患者およびドナーに文書によるインフォームド・コンセントを得た上で、5 mL の末梢血を EDTA 添加試験管に採取する。末梢血検体は埼玉医科大学に輸送し、DNA を抽出して Invader 法で osteopontin 遺伝子の promoter SNPs (nt -155, -443, -616, -1,478) を同定する。各施設は肝移植 1 年後までの経過を患者経過用紙に記載して、埼玉医科大学に郵送し、術後経過と患者およびドナーの SNPs との関連を検討することにした。

上記の計画に関しては、埼玉医科大学の倫理委員会による承認が得られている。また、14 施設のうち 8 施設(東北大学、東京大学、信州大学、藤田保健衛生大学、岡山大学、広島大学、九州大学、長崎大学)において、各大学の倫理委員会へ研究計画を申請中し、平成 18 年度中に承認が得られた。現在まで、これら 8 施設で 9 移植例(ドナー、レシピエント計 18 例)の末梢血が採取され、埼玉医科大学に送付されて DNA を抽出後に osteopontin 遺伝子の

promoter SNPs を同定した。

今後は SNPs を同定する対象数を増加させるとともに、その allele と臨床経過、患者背景との関連を解析し、同 SNPs の意義を明確にする予定である。

② In vitro での検討

遺伝子解析の同意を得ている C 型慢性肝炎患者から抽出した DNA を用いて、Invader assay により osteopontin 遺伝子 promoter SNPs を同定した。これらのうち、nt -155, -433 の遺伝子型が何れも homozygote の DNA に関して、nt 0 から -658 までの領域を PCR で増幅した。この fragment を pCR 2.1 にサブクローニングし、plasmid DNA の塩基配列を解析して、PCR 産物が挿入されていることを確認した。次いで、plasmid の挿入配列部位を切り出し、pGL3 Vector のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトにサブクローニングした。作成した Vector とウミイシタケルシフェラーゼ遺伝子を含む pTK Vector を HepG2 細胞ないし THP 細胞に co-transfection し、dual-luciferase receptor assay によって、転写活性を測定した。

500 例以上を対象に遺伝子型を同定したが、日本人で homozygote の場合には 3 種類の haplotype ([nt -155, -443]: 1 型 [deletion, T], 2 型 [deletion, C], 3 型 [G, T]) が見られるものの、[G, C] を呈する症例は存在しないことが明らかになった。HepG2 細胞を用いた検討では、転写活性は haplotype 2 型が 1 型に比して約 1.5 倍と高度であり、nt -443 の allele は C より T における活性が亢進していた。しかし、同細胞では haplotype 3 型の活性は 1 型の 1/10 以下と軽度であり、nt -155 は deletion mutation に比して allele G の活性が低下し

ていた。一方、THP1 細胞では haplotype 1 型は 2 型よりも活性が高度であったが、3 型は HepG2 細胞の場合と同様に 1 型に比して著しく軽度であった。従って、nt -443 の SNP に関しては、細胞の種類によって allele C と T の転写活性に差異が認められるのに対して、nt -155 の SNP は何れの細胞でも deletion mutation が allele G に比して活性が高度であると考えられた。

PC による解析では、nt -155 の近傍の oligonucleotide には deletion, G の何れの場合でもあって SRY が結合するのに対して、HFH-2 は deletion の場合にのみ結合すると推定された。SRY は Y 染色体でコードされることから、nt -155 の SNP を介する転写調節は性差が存在する可能性がある。現在、その結合性の差異を gel-shift assay で証明する基礎実験を進めているが、1 塩基の違いを同 assay で証明するのは困難であることが判明した。そこで、ビオチン標識 oligonucleotide と異なる allele の非標識 oligonucleotide を量を変えて添加する競合 gel-shift assay 系で、更に、雄性、雌性細胞由来の核抽出物を利用することで転写調節における性差をも評価できる実験系の確立することを目指して、preliminary な検討を進めている。

C. 考案と結語

Osteopontin 遺伝子の promoter SNPs は、C 型慢性肝炎の活動性と関連が認められた nt -443 の SNP のみならず、関連の明らかでなかった連鎖不平衡にある 3SNPs も、in vitro の検討では allele による転写活性の差異が認められた。また、連鎖不平衡にある 3SNPs のうち、nt -155 の SNP を介する転写調節には性差があると推定された。

多施設共同研究では、現在までに 9 移植例のドナーおよびレシピエントにおいて、osteopontin 遺伝子の promoter SNPs の allele を同定している。今後、症例数を増加させる必要があるが、これらの allele と臨床経過との関連を解析することによって、肝移植後に再発する C 型肝炎の活動性を規定する宿主要因としての同 SNPs の意義を明確にできるものと考えている。なお、同 SNPs に関する基礎検討の成果を考慮して、今後、nt -155 の SNP の成績を評価する際には性差を考慮した検討が必要であろう。

D. 健康危険情報

特になし

E. 参考論文

- 1) Kawashima R, Mochida S, Matsui A, et al. Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: A possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 527-531.
 - 2) Wang Y, Mochida S, Kawashima R, et al. Increased expression of osteopontin in activated Kupffer cells and hepatic macrophages during macrophage migration in Propionibacterium acnes-treated rat liver. *J Gastroenterol* 2000; 35: 696-701.
 - 3) Mochida S, Yamamoto T, Mimura S, Inao M, Matsui A, Ohno A, et al. Transgenic Mice Expressing Osteopontin in Hepatocytes as a Model of Autoimmune Hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 114-120.
 - 4) Mochida S, Hashimoto M, Matsui A, 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.
- #### F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) 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.
 - 2) Naito M Matsui A, Inao 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* 2005; 40: 381-388.
 2. 学会発表
 - 1) Matsui A, et al. SNPs in the Promoter Region of Osteopontin Gene can be a Predictive Marker for Therapeutic Efficacy of Interferon in Chronic Hepatitis C Patients. 55th Annual Meeting of American Association of Study of Liver Diseases, Boston, Nov., 2004.
 - 2) Nakao N, et al. SNPs in the Promoter Region of Osteopontin Gene as Host Factors to Determine Development of Autoimmune Hepatitis. 55th Annual