

表4 Management of ABO-incompatible liver grafts

Reduction of anti-donor blood type antibody
Perioperative plasma exchange
Splenectomy
Anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab)
Prevention of humoral & cellular rejection
Tacrolimus
Steroid
Antiproliferative agents (CPMA, AZA, MMF)
Prevention of single organ DIC
Intraportal infusion therapy
Intraarterial infusion therapy

現在、わが国で行われている ABO 不適合生体肝移植の周術期管理をまとめてみます(表4)。まず、血液型抗体価を下げるために血漿交換ならびに脾摘を行い、最近ではリツキシマブの投与が試みられています。脾摘をしない施設もありますが、その功罪、リツキシマブの補助効果についてはさらなる検討が必要です。

免疫抑制剤に関しては、FK506、ステロイド、さらに代謝拮抗剤を組み合わせた triple therapy がスタンダードです。1998年以降はsingle organ DICを防ぐために局所投与療法が開発されました。いまのところ日本独自の治療法だと思いますが、門脈投与、動脈投与の併用、あるいは動脈投与を単独で行うことによって、成績が一段階向上したことは事実です。今後、さらに症例を蓄積してその有効性が評価されるべきであります。

未来：今後の課題と新しい方向性

今後解決しなければならない課題の一つとしては、局所投与療法に用いる薬剤の再評価とその作用機序の解明です。われわれはステロイド、PGE₁、およびFOYの3剤を提唱しましたが、それらの基礎的な根拠を明らかにしているわけではありません。特に後2者が移植免疫、液性免疫に対してどのような作用を持つのか、今後の検討が必要です。さらに、局所投与における投与経路の選択につい

ても、門脈がよいのか肝動脈がよいのか、結論は出ていません。

最近話題になっているリツキシマブは術前、術中、術後のレスキュー、単回投与、複数回投与、とさまざまな投与方法が報告されています^{19,20)}が、どの方法がよいかわかりません。術後の抗体価の上昇に対して使用し有効な症例も多いのですが、術前投与しても抗体価が下がらない場合もあり、血中 B cell のみならずリンパ組織中 B cell の動態や、既存の形質細胞の影響も考慮しなければなりません。脾摘を行わない場合の抗体価の抑制に有用な可能性も考えられますが、まだ十分に検討されていません。適応および投与方法については各施設で模索中であり、引きつづき成績を検証しながらそれらを明らかにしていきたいと存じます。

現在、液性拒絶を抑えるためには、レシピエントの ABO 血液型抗体を除去することが治療の主体ですが、将来的にはグラフト内の血液型抗原を消失させるような試みも考えられます。血液型抗原は糖鎖なので、選択的な糖分解酵素を用いて抗原性を消失・減弱させることは理論的には可能です。

たとえば、A 抗原に対する α -N-acetyl-galactosamidase、あるいは B 抗原に対する α -galactosidase を、グラフトを *ex vivo* で灌流中に投与し、バイアピリティーを損なわずに A、B 抗原性を減弱させることが出来れば、新しい治療法となりうると思います。また、A 抗原、B 抗原がつけられるための糖転位酵素の発現をなんらかの方法で阻害するという発想もあります。すなわち、A 抗原に対する α -1, 3-N-acetyl-D-galactosaminyl-transferase などの酵素が知られているわけで、これを遺伝子工学的な手法で *in vivo* で産生阻害し、内皮上の血液型抗原の発現を抑制するのです。

このようなグラフト内の糖鎖抗原を修飾するという新しい発想に基づく方法は、臨床応用されるためにはまだ多くの基礎的検討が必要なのですが、ABO 血液型不適合移植に対する治療戦略のなか

で、新しい方向性を示すものとして期待したいと思えます。

文 献

- 1) Takahashi K, Saito K, Takahara S et al. : Excellent long-term outcome of ABO-incompatible living donor kidney transplantation in Japan. *Am J Transplant* 4 : 1089-1096, 2004.
- 2) Starzl TE, Ishikawa M, Putnum CW et al. : Progress in and deterrents to orthotopic liver transplantation, with special reference to survival, resistance to hyperacute rejection, and bile duct reconstruction. *Transplant Proc* 4 : 129-139, 1974.
- 3) Demetris AJ, Jaffe R, Tzakis A et al. : Antibody-mediated rejection of human orthotopic liver allografts. *Am J Pathol* 132 : 489-502, 1988.
- 4) Gugenheim J, Samuel D, Reynes M et al. : Liver transplantation across ABO blood group barriers. *Lancet* 336 : 519-523, 1990.
- 5) Farges O, Kalil AN, Samuel D et al. : The use of ABO-incompatible grafts in liver transplantation : A life-saving procedure in highly selected patients. *Transplantation* 59 : 1124-1133, 1995.
- 6) Tanaka A, Tanaka K, Kitai T et al. : Living related liver transplantation across ABO blood groups. *Transplantation* 58 : 548-553, 1994.
- 7) Takayama J, Ohkohchi N, Oikawa K et al. : Living related liver transplantation in patients with ABO incompatibility. *Transplant Proc* 30 : 3504-3506, 1998.
- 8) Hashimoto T, Kondo S, Suzuki T et al. : Strategy for ABO-incompatible living-related liver transplantation. *Transplant Proc* 32 : 2104-2106, 2000.
- 9) Alexandre GPJ, Bruyere MDE, Squifflet JP et al. : Human ABO-incompatible living donor renal homografts. *Neth J Med* 28 : 231-234, 1985.
- 10) Takahashi K : A review of humoral rejection in ABO-incompatible kidney transplantation, with local (intrarenal) DIC as the underlying condition. *Acta Med Biol* 45 : 95-102, 1997.
- 11) Tanabe M, Shimazu M, Wakabayashi G et al. : Intraportal infusion therapy as a novel approach to adult ABO-incompatible liver transplantation. *Transplantation* 73 : 1959-1961, 2002.
- 12) Ruers TJ, Daemen MJ, Thijssen HH et al. : Sensitivity of graft rejection in rats to local immunosuppressive therapy. *Transplantation* 46 : 820-825, 1988.
- 13) Iwata K, Shimazu M, Wakabayashi G et al. : Intraportal perfusion of prostaglandin E1 attenuates hepatic postischemic microcirculatory impairments in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 14 : 634-641, 1999.
- 14) Kawachi S, Shimazu M, Wakabayashi G et al. : Efficacy of intraportal infusion of prostaglandin E1 to improve the hepatic blood flow and graft viability in porcine liver transplantation. *Transplantation* 64 : 205-209, 1997.
- 15) Egawa H, Oike F, Buhler L et al. : Impact of recipient age on outcome of ABO-incompatible living-donor liver transplantation. *Transplantation* 77 : 403-411, 2004.
- 16) Hanto DW, Fecteau AH, Alonso MH et al. : ABO-incompatible liver transplantation with no immunological graft losses using total plasma exchange, splenectomy, and quadruple immunosuppression : evidence for accommodation. *Liver Transpl* 9 : 22-30, 2003.
- 17) Sawada T, Fuchinoue S, Teraoka S : Successful A1-to-O ABO-incompatible kidney transplantation after a preconditioning regimen consisting of anti-CD20 monoclonal antibody infusion, splenectomy, and double-filtration plasmapheresis. *Transplantation* 74 : 1207-1210, 2002.
- 18) Haga H, Egawa H, Shirase T et al. : Periportal edema and necrosis as diagnostic histological features of early humoral rejection in ABO-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl* 10 : 16-27, 2004.
- 19) Monteiro I, McLoughlin LM, Fisher A et al. : Rituximab with plasmapheresis and splenectomy in ABO-incompatible liver transplantation. *Transplantation* 76 : 1648-1649, 2003.
- 20) Usuda M, Fujimori K, Koyamada N et al. : Successful use of anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) for ABO-incompatible living-related liver transplantation. *Transplantation* 79 : 12-16, 2005.

I. 生体肝移植術後管理上の留意点

生体部分肝移植レシピエントの主たる術後合併症は、血管・胆管合併症、拒絶反応、および各種感染症など基本的には脳死全肝移植と同様であり、術後管理もそれに準ずる。肝移植の術後管理は二律背反的な治療の微妙なバランスの上に成り立っている。すなわち、血管吻合部の血栓予防のために抗凝固療法が必要であるが、過度になると出血を引き起こす。また拒絶反応の予防に免疫抑制薬を投与するが、一方では感染症対策も必要である。このように通常の外科手術とは異なる特殊かつ慎重な術後管理が要求される¹⁾。

さらに生体肝移植では、グラフトの質に起因する primary non-function (PNF) がまれである反面、グラフトの相対的容量不足による small-for-size graft syndrome (SSGS) とよばれる合併症が起こるという特徴がある。SSGS とは、特に成人例で過小グラフト（グラフト重量/レシピエント体重 < 0.8%、またはグラフト容積/レシピエント標準肝容積 < 35%）が移植された場合、術後早期から高ビリルビン血症、大量腹水、血液凝固障害、腎機能障害、門脈圧亢進などの徴候を呈する病態であり、グラフト肝の再生が遅延すれば致命的となる。現段階ではその治療法は確立されていないが、当科では後述するように肝血管床のコンプライアンス改善を目的としてプロスタグランジン E₁ (PGE₁) 門脈内投与を行い、重篤な SSGS は経験していない²⁾。

生体肝移植後は、以下に述べる基本的な合併症に対する対策を適切に行い、血栓と出血、感染と拒絶など二律背反する病態に対し微妙なバランスをとる必要があり、さらに個々の症例に合わせた柔軟かつきめ細やかな術後管理をすることが重要である。

II. 術後の各時期における管理の要点

生体肝移植の術後管理は、時期別に移植後早期（術後1週間以内）、中期（1～3週）、後期（4週～2ヵ月）に分けられ、経過良好であれば、移植後2ヵ月以内に退院し、外来経過観察となるのが普通である。移植後早期の管理では、呼吸循環状態の安定化を図る全身管理に加えて、この時期に遭遇する重要な合併症である後出血や肝動脈、門脈、肝静脈の血栓症をはじめとする血管合併症の予防、早期発見、早期治療が非常に重要である。術後中期では主に急性拒絶反応と細菌感染症に注意して管理する。術後後期はウイルス感染症と真菌感染症の好発時期であり、発熱が認められた場合、まずこの2つの感染症を念頭に置かなければならない。各合併症の好発時期は以上の通りであるが、感染症や拒絶反応はいずれの時期においても発症し得るものであり、血管合併症も吻合部狭窄などは後期に発症するので、総合的に診断・治療する必要がある。

III. 早期術後管理

慶應義塾大学病院では麻酔科の協力のもとに術後1週間はICUで以下の集中管理を行っている。

1 呼吸管理

手術当日はレスピレーター下に呼吸管理を施行している。抜管は覚醒状態、血液ガス、胸部X線、水分出納などを総合的に評価して早期に行う。一般的には2～4病日で抜管することが多いが、術前状態の不良な患者では1週間以上の人口呼吸管理を要する場合もある。術後しばしば右側の胸水貯留を認めるが、エコーガイドに穿刺可能になった段階で出血傾向がなければドレナージする。

2 循環管理

従来、成人例ではスワンガンツカテーテルを術直前に挿入していたが、現在はほとんど使用していない。移植臓器の保護や血流維持のため、 PGE_1 ($0.005\sim 0.01\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$)、ドパミン ($2\sim 3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$) を術後1週間程度持続投与している。前述のごとく、成人症例では門脈カテーテルを術中に挿入し、 PGE_1 の持続門注を施行する症例も多い。術直後はインアウトを3時間ごとに集計し、ドレーンからの排液はプラズマネートカッターの2倍希釈溶液にて全量補正している。投与する薬剤が多く、輸液量は絞り込んでも相当量に達するため、適正な尿量を確保できない場合は積極的に利尿薬を投与する。術前状態の悪い患者や免疫抑制薬などの影響で、一時的な腎不全状態をしばしば経験するが、ループ利尿薬で反応が悪い場合には心房性ナトリウム利尿ペプチド (hANP) を投与し、それでも無効な場合は積極的に持続濾過透析 (CHDF) を導入して対処する。

3 抗凝固療法

術中は出血や無肝期のため凝固因子の欠乏が生じ、著しいAPTT, PTの延長を認め、術後早期は肝機能の回復に伴い相対的な凝固亢進状態となることが知られている。したがって、術中の積極的な凍結新鮮血漿 (FFP) 投与と、術後の抗凝固療法が、大量出血や肝動脈血栓症の予防に重要である³⁾。当科では術直後から1週間メシル酸ガベキサート (FOY)、アンチトロンビンⅢ (AT-Ⅲ) を投与し、一定の基準を設けてヘパリンを追加投与している (表1)。過度の抗凝固療法は後出血の原因となることもあるため、ドレーンからの排液の性状・量には十分注意を払い、術後早期は1日に最低2回は超音波ドプラ検査を施行し、各血管の血流に問題がないことを確認すると同時に、腹腔内の血腫の有無も注意深く観察することが肝要である。

IV. 免疫抑制療法

当科ではカルシニューリン阻害薬とステロイドの2剤による免疫抑制を基本とし、適宜ミコフ

表1 抗凝固療法

○メシル酸ガベキサート (FOY)
1 mg/kg/時で1週間持続投与
○アンチトロンビンⅢ (AT-Ⅲ)
70%以上を維持するように適宜補充
○ヘパリン投与の目安
【成人】PT-INR < 1.5 かつ A-PTT < 40 秒, 第7病日まで
【小児】PT-INR < 2.0 かつ A-PTT < 45 秒, 第10病日まで
○凍結新鮮血漿 (FFP) 投与の目安
【成人】PT-INR \geq 2.0 または A-PTT \geq 60 秒
【小児】PT-INR \geq 2.5 または A-PTT \geq 70 秒

ェノール酸モフェチル (MMF) やミゾリビンなどの核酸合成阻害薬を併用している。そのプロトコルを表2に示した。カルシニューリン阻害薬の投与量は薬剤服用後12時間後の血中濃度であるトラフ値を参考に決定し、至適血中濃度を維持するように努めることが、拒絶反応を回避するのに必須であると同時に、しばしば遭遇する腎機能低下、神経症状、高血糖、高血圧などの副作用を回避するためにも重要である。

キメラ型抗IL-2受容体 (CD25) 抗体であるバシリキシマブは腎移植および脳死肝移植で移植後早期の急性拒絶反応抑制効果が評価され⁴⁾、わが国では腎移植で保険適用となった。術直前および4病日に20 mg ずつ予防投与する薬剤であり、当科ではリンパ球交差試験陽性患者や腎機能不良でカルシニューリン阻害薬の投与量を減らしたい患者に使用している。

急性拒絶反応は肝機能値 (トランスアミナーゼ値、ビリルビン値、 γ -GTP, ALPなどの胆道系酵素値) の悪化した場合に疑われるが、超音波検査により血流障害や胆管の拡張を除外することが必要である。肝生検による組織診断が診断確定の決め手となる。基本的な病理組織学的三徴候は、①Glisson鞘への炎症細胞浸潤、②胆管傷害、③静脈内皮炎であり、重症度の客観性をもたせるためにBanff schema⁵⁾を利用している。拒絶反応の治療は免疫抑制薬の血中濃度を是正するとともに、中等度以上の拒絶が疑われればステロイドパルス治療 (メチルプレドニゾロン 10 mg/kg/日

表 2 免疫抑制療法

○カルシニューリン阻害薬		
【手術前日】		
プロGRAF (タクロリムス) 0.05 mg/kg/日 またはネオオーラル(シクロスポリン)5 mg/kg/日 朝, 夕 2 分服		
【術後】		
術直後は経鼻胃管より, 以後は経口投与 目標血中濃度 (12 時間トラフ値)		
移植後	タクロリムス	シクロスポリン
1~2 週	10~15 ng/ml	300~400 ng/ml
3~4 週	8~12 ng/ml	200~300 ng/ml
1~2 ヶ月	5~10 ng/ml	150~250 ng/ml
3 ヶ月以降	5 ng/ml	100~150 ng/ml
○ステロイド		
ソルメドロール静注		
術中: 門脈再灌流直前 10 mg/kg		
術後: 帰室時 1 mg/kg		
1~3 POD 1 mg/kg × 2		
4~6 POD 0.5 mg/kg × 2		
7 POD 0.5 mg/kg × 1		
以後プレドニン内服		
8~21 POD 0.5 mg/kg/日		
~3 POM 0.3 mg/kg/日		
~6 POM 0.1 mg/kg/日		
○第 3 の免疫抑制薬		
セルセプト (ミコフェノール酸モフェチル) 500~ 1,500 mg/日		
ブレディニン (ミソリピン) 100~150 mg/日		

を 3 日間投与, または半量ずつ減量) を施行する。ステロイドパルス治療によっても改善しないステロイド抵抗性の拒絶反応に対しては OKT3 療法を施行する。OKT3 療法は肺水腫, 痙攣, ショック (cytokine release syndrome) など重篤な副作用を生じる可能性があり, 十分慎重に投与すべきである。

V. 感染症対策

1 細菌感染症

術後早期は広範囲なスペクトルをもつ抗生物質を予防的に投与する。当科ではグラム陽性球菌, グラム陰性桿菌にそれぞれ強い感受性をもつペニシリン系, セフェム系抗生物質を 2 剤併用で使用している。感染の兆候がなければ漫然と続けることなく短期間で中止し, 菌交代現象を助長しないように努めている。交換可能なライン類は 1 週間を目安に交換する: 定期的に口腔, 鼻腔, 喀痰, 尿, ドレーン排液などの細菌培養検査を行い, 細菌感染を見逃さないように努めるとともに, 感染が顕在化した場合は起因菌を同定し, 感受性の高い適切な抗生物質を選択して早期に治療することが重要である。

2 真菌感染症

術後早期から消化管真菌感染症の予防のため, 抗真菌薬 (ミコナゾールゲルまたはアムホテリシン B シロップ) の内服をルーチンで処方している。真菌感染症は術前ステロイド治療や遷延する細菌感染症に対する長期抗生物質投与などが大きなリスクとなるため, ハイリスクと思われる症例に対してはミコナゾールやフルコナゾールの予防的静脈内投与を行っている。深在性真菌感染症は発症すれば難治性であるため, 血中 β -D-グルカン値と培養検査を定期的に行い早期発見, 早期治療を心掛けている。真菌感染症の起因菌としては *Candida* が多く, フルコナゾールが有効なことが多いが, 耐性株にはミカファンギンやアムホテリシン B を投与する。*Aspergillus* や *Cryptococcus* 感染症はきわめて予後不良である。

3 ウイルス感染症

Cytomegalovirus (CMV) 感染症に対しては, 術直後から CMV 高力価免疫グロブリンを予防的に投与している (術直後 3 日間, 以後 1~2 週に 1 回)。発熱や下痢などの臨床症状に注意し, CMV 抗原血症検査を週 1 回の頻度で定期的に測定し, 早期診断, 早期治療を心掛けている。抗原血症が陽性で臨床症状に欠ける不顕性感染から,

肺炎、肝炎、腸炎などをきたす症例まで臨床像はさまざまである。当科では抗原血症が陽性になればガンシクロビル (GCV) 5 mg/kg/日の投与を始め、発熱や下痢、肝機能異常などが認められる有症状のCMV感染に対しては免疫抑制薬を減量し10 mg/kg/日のGCV投与を施行し、抗原血症が陰性化するまで投与を続けている。

EBウイルス (EBV) 感染症は発熱、リンパ節腫大、肝機能障害など伝染性単核症様の症状を呈し、ときにリンパ球増殖症 (PTLD) をきたし致命的になることがある。診断には末梢血単核球の *in situ* ハイブリダイゼーションによるEBER (Epstein-Barr virus encapsulated RNA) の検出や、リアルタイムPCR法によるEBVの定量が有用である。PTLDの診断のために、体表のリンパ節だけでなく、縦隔や腹腔内のリンパ節をCT検査でチェックし、腫大があればリンパ節生検を行うことも必要である。EBV感染症の診断が確定すれば、免疫抑制薬を減量ないし中止し、アシクロビルの大量投与またはガンシクロビルの投与を行う。

VI. 肝炎ウイルス対策

わが国のウイルス性肝硬変、特にC型肝炎に対する生体肝移植は増加傾向であるが、2004年1月の健康保険適用拡大に伴い、その傾向に一層拍車がかかると予想され、その再発予防と治療はますます重要な課題となりつつある。

B型肝炎ウイルス (HBV) の場合には、高力価HBs抗体免疫グロブリン (hepatitis B immunoglobulin, HBIG) とラミブジンの併用が現時点では最も有効な予防法と考えられている。ラミブジンはスクレオシドアナログの逆転写酵素阻害薬であり、当初、HIVに対する抗ウイルス薬として開発されたが、HBVにも有効なことが明らかとなった。筆者らは移植8週間前からラミブジン 100 mg/日の内服を開始し、移植後も継続投与するとともに、HBIGは術中無肝期および術後数日間200単位/kg、以後は血中HBs抗体価を500 IU/l以上に維持するように1,000単位を

適宜静注している。今後の課題は高価なHBIGの投与期間の設定とラミブジン耐性ウイルスに対する対策である。免疫抑制薬が減量された時点で、HBVワクチンを投与してHBs抗体価を維持し、HBIGを中止しようとする試みもなされている。ラミブジンの長期投与によりDNAポリメラーゼの活性中心 (YMDD領域) に変異を有するラミブジン耐性ウイルスが出現することが知られている。これに対してはアデホビルやエンテカビルが有効な場合があると報告されている。

C型肝炎ウイルス (HCV) の活性化予防についていまだ確立された治療法はないが、現在のところ最も効果の期待されているのはインターフェロンとリバビリンの併用療法である。理論的には肝炎再発以前のウイルス量の少ない時期に予防的に投与するのが望ましいと考えられるが、予防的投与の効果についてまだコンセンサスは得られていない⁶⁾。また、溶血性貧血、顆粒球減少、発熱、うつ病など副作用も強いため、移植後早期の予備力の乏しい時期に投与するのは無理があり、肝炎再発後に治療するのが一般的である。

◀◀ 文 献 ▶▶

- 1) 島津元秀ほか：生体肝移植の術後合併症と対策。小児外科 33: 353-358, 2001
- 2) Shimazu M et al: Living donor liver transplantation with special reference to ABO-incompatible grafts and small-for-size grafts. World J Surg 28: 2-7, 2004
- 3) 篠田昌宏ほか：生体肝移植における術中・術後の凝固線溶系の変動とその管理。移植 35: 243-254, 2000
- 4) Neuhaus P et al: Improved treatment response with basiliximab immunoprophylaxis after liver transplantation: Results from a double-blind randomized placebo-controlled trial. Liver Transpl 8: 132-142, 2002
- 5) Demetris AJ et al: Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. Hepatology 25: 658-663, 1997
- 6) Wiesner et al: Report of the first international liver transplantation society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. Liver Transpl 9: S1-9, 2003

4. 肝移植

うめしたこうじ もんでんもりと
梅下浩司, 門田守人

大阪大学大学院 外科学講座 消化器外科学

最近の動向

HCVの移植後再発はひき続き大きな課題であり、予防的治療や、再発の早期発見/治療が試みられている。また、免疫抑制法の影響が検討され、ステロイドを用いない免疫抑制が有力視されているが、現時点では明らかな優位性は示されていない。移植時期の指標として用いられる MELD スコアについて、腹水/低ナトリウム血症に関するパラメーターの追加、あるいはスコアの変化率をみる Δ MELD の導入により、より正確な予後予測が試みられている。ドナー臓器の不足に対しては、小児ドナー肝の split 移植が報告されている。また、生体肝ドナーについては、必要にして十分な術前検査を求めて色々な検討が行われている。

適応

1. B型ウイルス性肝炎 (HBV)

HBV に対する肝移植後の再発予防策は、既に一定のレベルに達し、最近大きな進展は無いようである。昨年はベルリンのグループが新しい adjuvant を用いたワクチンにより 80% の患者で HB Immunoglobulin (HBIg) を中止し得たという encouraging な成果を紹介したが、今回香港大学からは対照的な結果が報告された¹⁾。HBV 関連の肝疾患に対する移植後 lamivudine 単独による予防を行い 1 年の時点で再発の無い 52 例を対象とし、ワクチン投与 (月 1 回の 3 回投与を 1 クールとし、十分な免疫の得られなかった場合はもう 1 クール追加) を行ったが、response rate はわずか 7.7% であった。同論文が掲載された Journal of Hepatology 誌の editorial²⁾ では、ワクチンそのものの違い、あるいは、ベルリンのグループが HBIg 投与下で vaccination を行ったのに対し香港大学は lamivudine しか投与していなかったことについて discussion しているが、HBV の genotype の差も含めてさらに検討する必要がある。

2. C型ウイルス性肝炎 (HCV)

肝移植後の HCV 再発に対するインターフェロン (IFN)- α と ribavirin の併用療法については過去の本稿で紹介してきたが、多くは慢性病変ができあがっ

- 1) Lo CM, Liu CL, Chan SC et al: Failure of hepatitis B vaccination in patients receiving lamivudine prophylaxis after liver transplantation for chronic hepatitis B. J Hepatol 43: 283-287, 2005
- 2) Samuel D, Shouval D: The questionable role of immunization against hepatitis B in HBV infected liver transplant patients. J Hepatol 43: 203-206, 2005

た後に治療を行ったものであった。これに対して、東京大学からは移植後の再発予防として IFN と ribavirin の併用療法を行った結果が報告されている³⁾。生体肝移植 23 例を対象とし、術後約 1 ヶ月目から治療を開始し、うち 15 例で予定の 12 ヶ月間の投与を行うことができた。そのうち 9 例は治療終了後 6 ヶ月の時点で血清 HCV RNA 陰性であったとのことで、有望なデータである。一方、バルセロナのグループは、HCV 再発の急性期に pegylated IFN と ribavirin の併用療法を開始することにより、34.7% の sustained virological response が得られたと報告している⁴⁾。安全に施行でき、治療から脱落する率も低かったことから、プロトコール・バイオプシーを積極的に行い再発肝炎の急性期に併用療法を始めるべきであると結論している。再発前に予防を行うのが良いのか、あるいは再発後であればどの時期に治療を開始するのが良いのか、今後の重要な研究課題である。

HCV の移植後に Human hepatitis C antibody enriched Immune globulin product (HCIg) を投与した米国多施設の trial の結果が報告されている⁵⁾。75mg/kg または 200mg/kg の HCIg を移植後 14 週間に 17 回投与するプロトコールである。安全性は他のグロブリン製剤と同様であった。残念ながらコントロール群に比し血清 HCV RNA レベルを低下させることはできなかったが、ALT は低値の傾向にあったようである。HBIg ほどの効果は期待できないと思われるが、HCV 再発に対する一つの武器となりうるのか、さらなる検討が待たれる。

HCV については、脳死肝移植に比べて生体肝移植の場合に、あるいは若いドナーに比べて高齢のドナーの場合に、再発が多いとの報告がある一方、差が無いとの報告もあり、controversial である。バルセロナのグループは、生体移植と死体移植を比較し、移植 2 年後の重度の再発（生検で肝硬変 and/or 臨床的に非代償性）の発生率は、各々 45%、22% であり、生体移植で有意に高いと報告している⁶⁾。ただし、死体移植が 95 例であるのに対し、生体移植は 22 例と少ない。Villejuif のグループは、移植 10 年後のグラフトの histology を検討し、ドナーの年齢が強く影響すると報告している⁷⁾。ただし、非 HCV のレシピエントの場合にも同様の結果を認め、HCV の有無にかかわらずドナーの年齢が重要なファクターであるとしている。

3. 肝細胞癌

肝細胞癌に対する肝移植前のラジオ波焼灼 (RFA) に関する論文が目立った。ミラノのグループは、移植待機中に RFA を受けた 50 人の HCC/肝硬変患者 (60 結節) につき、移植時の摘出肝を組織学的に検討した⁸⁾。3cm 以下の結節は、63% が完全壊死していた。3cm を超える結節の場合、あるいは RFA 後 1 年以上を経過した場合は、結節内に腫瘍の残存がみられる可能性が高いとしている。なお、本研究の対象患者のほとんどはミラノ・クライテリア

3) Sugawara Y, Makuuchi M, Matsui Y et al : Preemptive therapy for hepatitis C virus after living-donor liver transplantation. *Transplantation* 78 : 1308-1311, 2004

4) Castells L, Vargas V, Allende H et al : Combined treatment with pegylated interferon (alpha-2b) and ribavirin in the acute phase of hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 43 : 53-59, 2005

5) Davis GL, Nelson DR, Terrault N et al : A randomized, open-label study to evaluate the safety and pharmacokinetics of human hepatitis C immune globulin (Civacir) in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 11 : 941-949, 2005

6) Garcia-Retortillo M, Fornis X, Llovet JM et al : Hepatitis C recurrence is more severe after living donor compared to cadaveric liver transplantation. *Hepatology* 40 : 699-707, 2004

7) Rifai K, Sebah M, Karam V et al : Donor age influences 10-year liver graft histology independently of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 41 : 446-453, 2004

8) Mazzaferro V, Battiston C, Perrone S et al : Radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients awaiting liver transplantation : a prospective study. *Ann Surg* 240 : 900-909, 2004

を満たしており、本邦でしばしば行われるようにミラノ・クライテリア外の症例をクライテリア内に down-staging するための目的ではない。一方、UCLA からは、52 人の移植待機患者の 87 結節に RFA を施行した結果が報告されている⁹⁾。

ニュージャージー等の多施設の研究として、Stage I, II の HCC を伴う肝移植術前患者において、胸部 CT、骨シンチを行うことの意義について検討した結果が報告されている¹⁰⁾。両検査を受けた 107 人中、どちらかの結果が陽性であった症例は一人も無く、78 人はともに陰性、29 人はどちらかが“intermediate”であった。両群の患者のその後は、waiting list に乗った率、移植を受けた率、臨床のおよび病理的 stage、移植後の再発、のいずれにおいても差が無かった。平均して 2,933 ドルのコストがかかり、また、“intermediate”のため侵襲的検査を行った症例のうち 1 例が検査の合併症で死亡している（結果的に転移は無かった）ことから、これらの検査は全例に行うのではなく、臨床的に必要と判断される場合に限るべきであるとしている。

4. 移植時期決定の指標

Model for End-stage Liver Disease (MELD) スコアは、末期肝疾患の患者の予後予測に有用であるとされ、実際米国においてドナー肝の allocation に用いられている。MELD スコアは、Child 分類に含まれている腹水や肝性脳症のような主観的要素をもつ指標が含まれない点の特徴（あるいは利点）であるが、今年はその限界を指摘する論文が目立った。まず、米国リッチモンドのグループは、肝移植のため紹介された退役軍人 296 人を対象とし、早期死亡に関連する因子を検討した¹¹⁾。180 日以上生存した症例の MELD は低値に集中したのに対し、180 日以内の早期に死亡した症例の MELD は幅広く分布し、中央値である 21 より低いにもかかわらず死亡した症例がかなり存在した。全例で検討すると、早期死亡を予測する独立した因子は、MELD、遷延する腹水、低ナトリウム血症 (<135 meq/L) の 3 つであった。MELD が 21 以上であった患者に限ると MELD のみが独立した予後予測因子であったのに対し、MELD が 21 未満の場合は低ナトリウム血症と遷延する腹水のみが独立した予後予測因子であった。すなわち、MELD が低値にもかかわらず死亡する症例が少なくなく、遷延する腹水と低ナトリウム血症を加えたスコアを考慮すべきであるとしている。次いで UCSF から、移植に listing された時点において、あるいは待機中において血清ナトリウムが <126 meq/L となることは独立した予後予測因子であり、MELD に血清ナトリウム値を加えることにより肝硬変患者の 3 ヶ月および 6 ヶ月死亡率の予測をより確実に行えると結論している¹²⁾。

一方、ある一時点での MELD のみでなく、MELD の経時的変化 (Δ MELD) が予後予測に重要であるという主張がある。今回台北のグループから、 Δ MELD の有用性を示唆する論文が発表された¹³⁾。まず、Child-

9) Lu DS, Yu NC, Raman SS et al : Percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma as a bridge to liver transplantation. *Hepatology* 41 : 1130-1137, 2005

10) Koneru B, Teperman LW, Manzarbeitia C et al : A multicenter evaluation of utility of chest computed tomography and bone scans in liver transplant candidates with stages I and II hepatoma. *Ann Surg* 241 : 622-628, 2005

11) Heuman DM, Abou-Assi SG, Habib A et al : Persistent ascites and low serum sodium identify patients with cirrhosis and low MELD scores who are at high risk for early death. *Hepatology* 40 : 802-810, 2004

12) Biggins SW, Rodriguez HJ, Bacchetti P et al : Serum sodium predicts mortality in patients listed for liver transplantation. *Hepatology* 41 : 32-39, 2005

13) Huo TI, Wu JC, Lin HC et al : Evaluation of the increase in model for end-stage liver disease (Δ MELD) score over time as a prognostic predictor in patients with advanced cirrhosis : risk factor analysis and comparison with initial MELD and Child-Turcotte-Pugh score. *J Hepatol* 42 : 826-832, 2005

Turcotte-Pugh (CTP) スコアが7, 8, 9点 (つまり Child B) の肝硬変 58 例の prospective な追跡から, MELD の増加に有意に関連する因子として, 腹水と肝性脳症を挙げている. 次に, CTP スコアが7~12点の 351 例を対象として, Δ MELD (1 ヶ月あたりの MELD 増加), 初期の MELD, 初期の CTP スコアの予後予測における意義を retrospective に比較し, Δ MELD/month > 2.5 のみが独立した予後予測因子であったとしている. ただし, 同論文が掲載された Journal of Hepatology 誌の editorial¹⁴⁾ にも述べられているように, 単純に最終の MELD で評価する方法も考えられ, Δ MELD との比較が必要である.

Child 分類による肝疾患の重症度と QOL が相関することは, すでに多くの研究により示されている. 今回, UCLA を中心としたグループより, 肝移植の candidate において MELD スコアと QOL との関連を調べた研究が報告された¹⁵⁾. その結果, MELD スコアによる重症度評価は QOL と関連しなかった. 腹水 and/or 肝性脳症の存在は低い QOL と関連しており, これが Child 分類と QOL との相関に寄与しているものと考えられた.

以上紹介したように, MELD の有用性は広く認められているものの, Child 分類・スコアも捨て難いとする意見も根強い. さらに有用な指標を求めて, 模索を続けていく必要がある.

手術術式, 免疫抑制, 周術期管理

原発性高尿酸血症 (PH1) は, 常染色体劣性の肝細胞の peroxisome の酵素欠損であるが, 多くは腎障害の発生後に診断されるため, その治療にはしばしば肝腎移植が必要となる. ヨーロッパの registry による 1984~2004 年の肝腎移植のデータが American Journal of Nephrology 誌に紹介されている¹⁶⁾. 35 の移植センターで 117 人の患者に計 127 の移植が行われ, うち 100 が同時移植, 6 が肝移植後に腎移植, 21 が肝移植のみ (再移植, 腎移植前に早期死亡, 腎障害発生前の予防的移植など) であった. 肝移植後の累積生存率は, 1 年 86%, 5 年 80%, 10 年 69% であった. 生存率は移植直前の状態と関連し, “very good” や “good” とされたものでは 5 年生存率が 100% であったのに対し, “fair” では 73%, “poor” では 45% であった. 本邦の原発性高尿酸血症に対する肝移植後の累積生存率は 1 年, 5 年とも 37.5% と不良である¹⁷⁾ が, これには不良な術前状態が関与しているのかもしれない.

免疫抑制に関しては, 小児肝移植において tacrolimus と ciclosporin microemulsion を比較したヨーロッパ多施設の randomized trial の結果が Lancet 誌に掲載された¹⁸⁾. 16 歳以下, 体重 40kg 以下の小児を対象とし, tacrolimus/corticosteroids (n=93) または ciclosporin microemulsion/corticosteroids/azathioprine (n=92) を投与した. 両群間で, 移植後 12 ヶ月

14) D'Amico G : Developing concepts on MELD : delta and cutoffs. J Hepatol 42 : 790-792, 2005

15) Saab S, Ibrahim AB, Shpaner A et al : MELD fails to measure quality of life in liver transplant candidates. Liver Transpl 11 : 218-223, 2005

16) Jamieson NV European PHI Transplantation Study Group : A 20-year experience of combined liver/kidney transplantation for primary hyperoxaluria (PH1): the European PHI transplant registry experience 1984-2004. Am J Nephrol 25 : 282-289, 2005

17) 日本肝移植研究会 : 肝移植症例登録報告. 移植 39 : 634-642, 2004

18) Kelly D, Jara P, Rodeck B et al : Tacrolimus and steroids versus ciclosporin microemulsion, steroids, and azathioprine in children undergoing liver transplantation : randomised European multicentre trial. Lancet 364 : 1054-1061, 2004

の生存率、生着率には差が無かった。一方、終了時点での acute rejection free rate (Kaplan-Meier) は tacrolimus 群 55.5%, ciclosporin microemulsion 群 40.2% であり、前者が有意に優っていた。また、ステロイド抵抗性の急性拒絶に限れば、各々 94.0%, 70.4% であり、やはり tacrolimus が優っていたとしている。

HCV の再発と免疫抑制法の関連について、ステロイドの投与が再発を促進するとの見解がある。イタリアの多施設より、ステロイドの有無を比較する double-blind の試験の結果が報告されている¹⁹⁾。Ciclosporin + azathioprine + basiliximab を基本とし、ステロイドまたは placebo に randomize された。Primary endpoint の 12 ヶ月の組織学的な HCV 再発率は両群間に差が無かったが、secondary endpoint の treatment failure rate (死亡, graft failure, 副作用による脱落) においてはステロイド・フリー群が優っていた。

ABO 血液型不適合肝移植については、薬剤の経門脈的あるいは経動脈的な投与により成績の改善が示されているが、今回東北大学より抗 CD20 抗体 (rituximab) を用いた 2 症例の経験が報告された²⁰⁾。Rituximab は B 細胞を選択的に減少させることから、不適合肝移植後の液性拒絶に対する効果を期待して用いたものである。小児の 1 例では術後の液性拒絶反応に対して用い、また、成人の 1 例では予防的に用い、いずれも良好な経過を辿ったとしている。今後 ABO 不適合肝移植における有力な武器となる可能性がある。

進行した肝硬変の存在は、他の臓器の機能にも影響を及ぼす。バルセロナのグループは、echocardiography や stress ventriculography により肝硬変患者の心臓の変化を検討した²¹⁾。その結果、明らかな臨床症状が無くとも sub-clinical な異常が高率に存在し、また、それらの異常は肝移植により正常化することが示された。

ドナーをめぐる諸問題

1. HBs 抗原陽性ドナー肝の移植

HCV 抗体陽性ドナーの肝を HCV のレシピエントに移植することが、controversial でありながらも、世界で広く行われていることを過去の本稿で紹介してきた。今回イタリアより、HBs 抗原陽性ドナー肝を HBV 関連のレシピエントに移植した事例が報告された²²⁾。HBV/HCC の 3 例に移植を行い、HBIG 投与にもかかわらず全例で HBs 抗原の陽性が術後も持続した。D 型肝炎ウイルス (HDV) の重複感染を伴っていた 2 例では早期に HDV の再感染を生じ、うち 1 例は再移植を要した。HDV の重複感染の無かった 1 例は順調に経過した。HDV の重複感染の無い HBV の場合のみに HBs 抗原陽性ドナー肝の移植が正当化されると結論しているが、1 例のみの経験では明らかに時期尚早といわざるを得ない。

19) Filippini F, Callea F, Salizzoni M et al : Double-blind comparison of hepatitis C histological recurrence rate in HCV + liver transplant recipients given basiliximab + steroids or basiliximab + placebo, in addition to cyclosporine and azathioprine. *Transplantation* 78 : 1488-1495, 2004

20) Usuda M, Fujimori K, Koyamada N et al : Successful use of anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) for ABO-incompatible living-related liver transplantation. *Transplantation* 79 : 12-16, 2005

21) Torregrosa M, Aguade S, Dos L et al : Cardiac alterations in cirrhosis : reversibility after liver transplantation. *J Hepatol* 42 : 68-74, 2005

22) Franchello A, Ghisetti V, Marzano A et al : Transplantation of hepatitis B surface antigen-positive livers into hepatitis B virus-positive recipients and the role of hepatitis delta coinfection. *Liver Transpl* 11 : 922-928, 2005

2. Split 移植

一人のドナー肝で二人のレシピエントを助けることができる split 移植は魅力的な方法であり、少なからず論文が発表されているが、通常ドナーは成人であった。今回北イタリアの多施設における、15歳以下の小児ドナーからの split 移植の経験が報告された²³⁾。39人のドナーから74人に肝移植が行われ、そのうち66人について解析された。2年生存率と生着率は各々87%、82%と良好であった。ドナーを11~15歳と10歳以下とに分けても成績に差は無かったとのことである。

3. 生体ドナー

生体移植においては、ドナーの安全性を確保することが最も重要である。本書2004年度版で、本邦および米国の生体肝ドナーの術後合併症に関する論文を紹介した。今回は、生体肝ドナーの術前検査に関するエッセン大学の論文を2つ紹介する。まず、700人のpotential donorを評価した経験が報告されている²⁴⁾。同施設では1998年4月から2003年7月までに111例の生体肝移植が行われているが、この間297人の成人レシピエントについて622人、52人の小児成人レシピエントについて78人のpotential donorが検討された。特に成人のレシピエントの場合、そのうちドナーとして適当と判断されたのはわずかに14%であったとのこと、時間と資源の無駄を省くべく効率的なスクリーニング・プロトコルを樹立する努力が必要であると結論している。なお、同施設でプロトコルどおりの評価を行った場合のコストは4,589ユーロとのことである。また、術前の肝生検を必須とした2000年10月以降の144人のpotential donorの経験を報告している²⁵⁾。血液検査と腹部CTの後に肝生検を行い、実に31人(21%)に異常(21人は脂肪肝、10人は肝炎・線維症など)を認めドナーとして不適となり、一方肝生検に伴う合併症は2人(いずれも肝実質内出血)であった。以上の結果から術前肝生検が必須であると主張しているが、筆者らのドナー手術中の肝生検の印象とはかなり乖離しており、さらなる検討が必要と思われる。

4. 臓器を介しての感染症の伝播

移植臓器を介して狂犬病が4人のレシピエントへ伝播した事例が報告された²⁶⁾。肝、2腎、腸骨動脈のレシピエント4人全員が移植後30日以内に脳炎を発症し、神経症状出現後平均13日で死亡した。ドナーは、コウモリに噛まれたと言っていたとのことであり、これにより狂犬病に感染していたと思われる。

23) Cescon M, Spada M, Colledan M et al : Split-liver transplantation with pediatric donors : a multicenter experience. *Transplantation* 79 : 1148-1153, 2005

24) Valentin-Gamazo C, Malago M, Karliova M et al : Experience after the evaluation of 700 potential donors for living donor liver transplantation in a single center. *Liver Transpl* 10 : 1087-1096, 2004

25) Nadalin S, Malago M, Valentin-Gamazo C et al : Preoperative donor liver biopsy for adult living donor liver transplantation : risks and benefits. *Liver Transpl* 11 : 980-986, 2005

26) Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ et al : Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 352 : 1103-1111, 2005

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¹⁻⁴⁾。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
東北 東北大学 弘前大学 福島県立医科大学	名古屋市立大学 名古屋大学 松波総合病院 三重大学
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	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
	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、これを受けただけ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

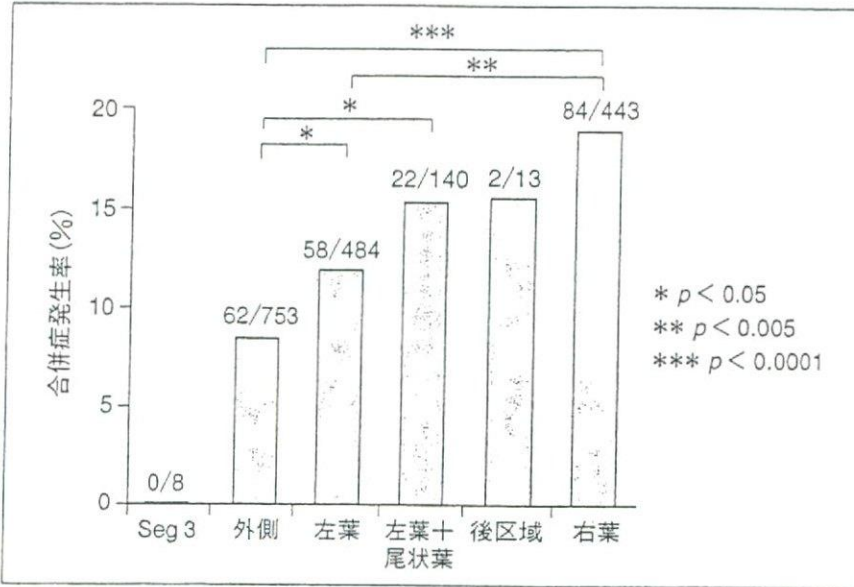


図1. グラフト別にみた肝提供後の合併症発生率

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⁸⁾。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

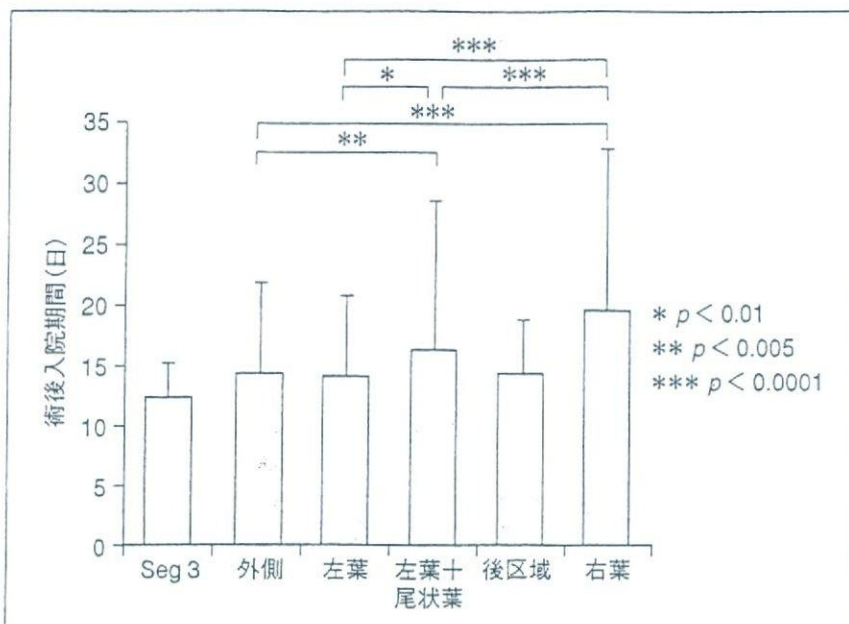


図2. グラフト別にみた肝提供後の入院日数

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 NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 CO_2 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% CO_2 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 Fc γ 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