

肝再生不全に対する低adiponectin血症の関与

研究協力者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

研究要旨：脂肪肝で肝再生が障害されることは広く知られているがそのメカニズムは未だ十分に解明されていない。Adipocytokineの一つであるAdiponectin (Ad)は肝臓の脂肪酸代謝に関与しており、私どもはこれまでAdiponectinが肝臓において抗線維化および抗炎症作用を有することを報告してきた。今回はAdiponectinの肝再生への関与を検討するため、Ad欠損マウスにおける70%部分肝切除後の肝再生を検討した。【方法】12週齢、雄の野生型およびAd欠損マウスに70%部分肝切除を施行し、経時的にマウスより肝臓、血液を採取した。1) 肝重量/体重比、免疫組織染色にてbromodeoxyuridine (BrdU)のlabeling index, mitotic index (H-E染色上分裂像を示す肝細胞の比率)、Western blot法によるPCNA蛋白の発現を検討した。2) 部分肝切除前、1.5, 12時間後に前初期応答遺伝子(c-fos, c-myc, junB)の発現をrealtime RT-PCRで、TNF- $\alpha$ , IL-6の血清濃度をELISA法で、肝での遺伝子発現をrealtime RT-PCRで、STAT-3のリン酸化をWestern blot法で評価した。3) 肝切除後の肝臓内の脂肪蓄積を肝中性脂肪量として測定し、脂肪酸代謝( $\beta$ 酸化)の律速酵素であるcarnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) 遺伝子の発現を検討した。【結果】1) Ad欠損マウスの肝重量/体重比は、野生型マウスに比して24, 48, 72時間後で有意に低下していた。BrdUのlabeling indexは、48, 72時間後にAd欠損マウスで有意な低下を認め、mitotic indexも同様に低下していた。またPCNA蛋白発現は48時間後Ad欠損マウスで有意に低下していた。これらの結果からAd欠損マウスで部分肝切除後の肝再生に障害があると考えられた。2) 肝再生初期において、前初期応答遺伝子(c-myc, junB)の発現は、Ad欠損マウスで低い傾向を示したが有意な差は認めなかった。TNF- $\alpha$ , IL-6の発現、それに引き続くSTAT-3のリン酸化は両群間に大きな差を認めなかった。3) 肝の中性脂肪含有量は、肝切除後72時間後においてAd欠損マウスで有意に増加していた。また、肝内CPT-1遺伝子は、肝切除後6, 12, 72時間後においてAd欠損マウスで有意に減少していた。【結論】Ad欠損マウスにおいて部分肝切除後の肝細胞増殖は障害されていた。このことからAdiponectinは肝再生に関与していると考えられた。肝内CPT-1遺伝子の減少からこの再生の障害には、脂肪酸代謝( $\beta$ 酸化)の低下の関与が考えられた。

共同研究者

田村 信司 大阪大学 消化器内科学  
木曾 真一 大阪大学 消化器内科学  
吉田 雄一 大阪大学 消化器内科学  
江崎 久男 大阪大学 消化器内科学

A. 研究目的

肝臓は、古くから再生の盛んな臓器であることが知られているが、その再生の詳細なメカニズムはいまだに不明な点も多い。部分肝切除後の再生肝内で一過性に脂肪滴が沈着することや肝臓移植後の再生において、脂肪肝が再生不全因子の一つであることも知られているが、そのメカニズムも十分には解明されていない。一方、脂肪細胞はさまざまな生理活性物質(アディポサイトカイン)を分泌していることが明らかになり、単なるエネルギーの貯蔵庫ではないことが実証されている。そしてアディポサイトカインの分泌は、種々の病態において変化することが判明している。アディポネクチンは、アディポサイトカインの中のキー分子として注目されている。アディポネクチンは、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、抗炎症作用をあわせもつ分子であることが多くの研究者により明らかにされてきた。私どもはこれまでにアディポネクチンが肝臓において

抗線維化作用を有することを報告した。また、前年度本分担研究報告において、私どもはアディポネクチン欠損マウスを用い、D-galactosamine (GalN)/lipopolysaccharide (LPS)の投与により作成した重症障害モデルにおけるアディポネクチンの作用について検討し、アディポネクチンが、Kupffer細胞に作用してGalN/LPSによる肝障害を抑制することを報告した。本年度は、アディポネクチン欠損マウスの部分肝切除後の肝臓の再生を検討し、アディポネクチンの肝再生に対する影響を検討した。

B. 研究方法

実験動物として12週齢、雄の野生型およびアディポネクチン欠損マウスを用いた。両群のマウスに70%部分肝切除術を施行し、経時的に前、および肝切除後1.5, 6, 12, 24, 48, 72時間後にマウスより残存肝および血清を採取した。

1. 部分肝切除前後経時的に肝重量/体重比を検討した。また、肝臓を取り出す4時間前にbromodeoxyuridine (BrdU)を腹腔内に投与し免疫組織染色にてlabeling indexを検討した。HE染色上、分裂像を示す肝細胞の比率を測定しmitotic indexを比較検討した。PCNA蛋白の発現は、残存肝から蛋白を抽

出しWestern blot法により検討した。

2. 部分肝切除前, 1.5, 12時間後の肝内における前初期応答遺伝子 (c-fos, c-myc, junB) の発現をreal time RT-PCRで検討した。TNF- $\alpha$ , IL-6 の血清濃度を Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法で, 肝でのTNF- $\alpha$ , IL-6 遺伝子発現をrealtime RT-PCRで測定した。また, STAT-3 のリン酸化は, Western blot法で評価した。
3. 肝切除後の再生肝内において, 発現する中性脂肪量を経時的に測定し, あわせて再生肝内における carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) 遺伝子の発現をrealtime RT-PCRで検討した。

#### C. 研究結果

1. 部分肝切除後再生肝においてアディポネクチン欠損マウスの肝重量/体重比は, 24, 48, 72時間後で野生株に比して有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。BrdUの免疫染色によるlabeling indexは, 48, 72時間後にアディポネクチン欠損マウスで有意な低下を認めた。mitotic indexもアディポネクチン欠損マウスで同様に, 48, 72時間後に有意に低下していた。PCNA蛋白発現は48時間後にアディポネクチン欠損マウスで有意に低下していた。これらからの結果からアディポネクチン欠損マウスで部分肝切除後の肝再生に障害があると考えられた。
2. 肝再生初期において, 前初期応答遺伝子 (c-myc, junB) の発現は, アディポネクチン欠損マウスで低い傾向を示したが, 有意な差は認められなかった。血中並びの肝組織中のTNF- $\alpha$ , IL-6 の発現は, 両群間において有意な差を認めなかった。それに引き続くSTAT-3 のリン酸化においても, アディポネクチン欠損マウスで低い傾向がみられたが有意なものではなかった。
3. 部分肝切除後再生肝内の中性脂肪含有量は, 48時間では両群間でほぼ同程度の増加を認めたが, 72時間後には野生型の中性脂肪含有量は軽度減少しているのに比して, アディポネクチン欠損マウスにおいてはさらに中性脂肪に蓄積亢進がみられ, 両群間で有意な差を認めた。また, 脂肪酸代謝 ( $\beta$ 酸化) の律速酵素であるcarnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) 遺伝子の発現は, 部分肝切除後 6, 12, 72時間においてアディポネクチン欠損マウスにおいて有意な低下を認めた ( $p < 0.05$ )。

#### D. 考 察

アディポサイトカインの代表的分子であるアディポネクチンは, 抗動脈硬化, 抗糖尿病作用をもつ因子で, 内臓脂肪蓄積時に分泌不全が起こり血中のアディポネクチン濃度が低下することが知られている。アディポネクチンは, グルコースの取り込みと糖利用の促進, ミトコンドリアにおける脂肪酸 $\beta$ 酸化の促進を行う。また, アディポネクチンによる脂肪燃焼促進のメカニズムに関しては, PPAR- $\alpha$  を活性化することとAMPキナーゼを活性化する系が報告されている。近年では,

肝臓の線維化や癌などの過栄養状況に起因する多くの疾患にアディポネクチンが関与していることが明らかになってきた。

アディポネクチン欠損マウスにおける肝再生の障害 (遅延) のメカニズムに肝臓の再生初期における priming に関与するTNF- $\alpha$  やSTAT3 などの因子やIL-6 の変動を両群間で比較検討したが, 両群間に有為の差は認めず, アディポネクチンは, 肝再生初期の priming には, 関与しないと考えられた。

近年, 肝臓の再生におけるエネルギー代謝の影響が, 注目されている。AMP-activated protein kinase (AMPK) は, アディポネクチンやレプチンなどのアディポサイトカインによる活性調節をうけエネルギーのバランスを調節することが知られている。先述したようにアディポネクチンはグルコースの取り込みと糖の利用の促進, ミトコンドリアにおける脂肪酸 $\beta$ 酸化の促進を行う。今回の検討では, 肝切除後に脂肪酸代謝 ( $\beta$ 酸化) の律速酵素であるCPT-1遺伝子の発現がアディポネクチン欠損マウスにおいて有意低下しており, おそらくアディポネクチンを介したミトコンドリアでのエネルギー代謝障害のためにアディポネクチン欠損マウスで肝臓の再生が遅延あるいは障害されている可能性が考えられた。今後, アディポネクチンを中心にしたアディポサイトカインの肝再生不全への関与をエネルギー代謝面から検討していきたい。

#### E. 結 論

アディポネクチン欠損マウスにおいて部分肝切除後の肝細胞増殖は障害されていた。このことからアディポネクチンは肝再生に関与していると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

Ezaki H, Saji Y, Yoshida Y, et al : Impaired liver regeneration in adiponectin knockout mice after partial hepatectomy. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, Boston, 2006.

#### 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（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### ① 肝炎重症化を規定する宿主要因 ② ワーキンググループの進行状況

研究協力者 持田 智 埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 教授

研究要旨：① 肝炎劇症化にはTh 1系免疫応答の過剰反応が関与し、その開始にはosteopontinが重要な役割を果たしている。そのpromoter領域には連鎖不平衡を呈するnt-155, -616, -1,748の3 SNPsとこれと独立したnt-443のSNPsが認められ、転写活性はnt-155がdeletion, nt-443がCの場合に最も高度である。そこで両SNPsの近傍のoligonucleotideと転写因子の結合を計測したところ、nt-443はalleleがTの場合にCdxAが結合するのに対して、nt-155はdeletionの場合にSRVとHFH-2が、allele Gの場合にはSRVのみが結合すると推測された。SRV遺伝子はY染色体に存在することから、nt-155のSNPsは肝炎重症度の性差を規定している可能性がある。そこで、nt-443, nt-155近傍の30塩基からなるoligonucleotideを合成し、HepG2細胞およびHele細胞の核抽出物を用いてGel-shiftアッセイを実施したが、1塩基の差異による結合能の違いは明らかにならなかった。そこで、標識および非標識oligonucleotideを用いた競合Gel-shiftアッセイの系を確立して、SNPsのalleleによる転写因子との結合の差異に関する検討を進めている。② 劇症肝炎、LOHFには分類されない急性肝不全を対象としたアンケート用紙を作成した。血清ALT値が300IU/ℓ以上に上昇し、発症から24週以内に肝性脳症を発症ないしはプロトロンビン時間（PT）が50%以下またはINR 1.5以上になった急性肝不全の調査を実施した。1998～2005年に同条件を満たした急性肝不全334例が登録され、劇症肝炎、LOHFの定義を満たさない症例は168例であった。これら症例の実態に関して、劇症肝炎、LOHFとの比較で検討を進める予定である。また、1998～2003年に発症した劇症肝炎648例、LOHF 64例のうち、65歳未満で昏睡Ⅱ度以上出現時に血液製剤を投与されていない490例を抽出し、これらを基に劇症肝炎肝移植ガイドラインの再評価も進めている。

#### 共同協力者

|       |        |          |     |
|-------|--------|----------|-----|
| 菅原 通子 | 埼玉医科大学 | 消化器・肝臓内科 | 助手  |
| 内木佳代子 | 埼玉医科大学 | 消化器・肝臓内科 | 研助手 |
| 稲生 実枝 | 埼玉医科大学 | 消化器・肝臓内科 | 講師  |
| 中山 伸朗 | 埼玉医科大学 | 消化器・肝臓内科 | 講師  |
| 名越 澄子 | 埼玉医科大学 | 消化器・肝臓内科 | 助教授 |

#### ① 肝炎重症化を規定する宿主要因

##### A. 研究目的

肝炎はウイルス感染肝細胞に対するTh 1系免疫応答によって発症する。このため広汎肝壊死を特徴とする劇症肝炎は、Th 1/Th 2系免疫応答の不均衡が原因で成立すると考えられている。従って、Th 1系免疫応答を規定する遺伝的要因を明らかにすることは、肝炎劇症化に関わる宿主要因の解明に繋がると考えられる。

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。我々はヒトosteopontin遺伝子のpromoter領域を解析し、nt-155, -443, -616, -1,748の4ヶ所に単塩基変異（SNP）を見出した。これらのうちnt-443のSNPはC型慢性肝炎患者における血清ALT値と関連が認められ、肝炎重症化を規定する宿主要因である可能性が想定された。一方、nt-155, -616, -1,748の3SNPsにはほぼ100%の連鎖不平衡が認められ、日本人では各SNPsのhomozygotesとして3種類のhaplotype（[nt-155, -443]：1型 [deletion, T], 2型 [deletion, C], 3型 [G, T]）

が存在した。そこで、これらSNPsの機能を明らかにするために、各haplotypeを呈するDNAを用いて、nt 0から-658の領域をPCRで増幅し、pGL3 basic vectorに組み込み、上皮系のHepG2細胞に導入した後、転写活性を測定したところ、転写活性はhaplotype 1型に比して2型が高度であり、3型は1型に比して著しく軽度であった。従って、ヒトosteopontin遺伝子のpromoter SNPsは機能的であり、osteopontin発現調節を介して肝炎重症化に関わる宿主要因となる可能性があると考えられた。

そこで、本研究では各種転写因子とosteopontin遺伝子promoter領域の相互作用を、各SNPsのalleleとの関連で評価し、肝炎劇症化に関わる宿主要因の分子機構の解明を試みた。

##### B. 研究方法と C. 研究結果

1. コンピューター解析による関連転写因子の予測  
転写因子バンクのPCソフトを用いた解析では、ヒトosteopontin遺伝子のpromoter領域には、nt-443のalleleがTの場合にCdxAが結合するのに対して、Cの場合はこの結合は見られないと推定された。一方、nt-155はdeletion mutationの場合にSRVとHFH-2が結合するが、allele がGの場合はSRVのみが結合すると推測された。SRV遺伝子はY染色体に存在することから、nt-155のSNPsは肝炎重症度に関わる性差を規定している可能性がある。
2. Gel-shiftアッセイによる検討  
nt-155, -443のSNPsに関して、PCで解析した

CdxA, SRY, HFH-2 の結合領域を含む30塩基からなるoligonucleotideをalleleごとに合成した, ビオチン標識した。一方, 男性のHepG2細胞, 女性のHela細胞にdexamethasoneを添加した後に核蛋白質を抽出し, 男性および女性の活性化核蛋白抽出分画を作成した。標識oligonucleotideと活性化核蛋白抽出分画の混合液を電気泳動してgel-shiftアッセイを行ったところ, HepG2細胞の核抽出物を用いた検討ではCdxA, SRY, HFH-2と, Hela細胞での場合にはCdxA, HFH-2とoligonucleotideの結合を示すビオチンシグナルが検出された。しかし, そのシグナルは何れのSNPsに関してもoligonucleotideのalleleによる差異が認められなかった。また, 異なるalleleの非標識oligonucleotideを混合液に過剰に添加すると, ビオチンのシグナルは消失した。

#### D. 考察と E. 結論

PCによる解析では, nt-155, nt-443のSNPsはalleleにより転写因子との結合性が異なると推定された。しかし, 一般的なgel-shiftアッセイでは1塩基の差異による転写因子との結合性の違いを明確にするのは困難であることが判明した。そこで, 相反するalleleの非標識oligonucleotideの添加量を変化させることで, 両oligonucleotideの結合性の差異を定量的に評価できる競合gel-shiftアッセイの系を確立する基礎検討を進めている。これによって, 1塩基の差異による転写因子との結合能の差異を明確にする予定である。

#### 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) 濱岡和宏, 菅原通子, 稲生実枝, 他: C型慢性肝疾患における肝発癌を規定する宿主要因: Osteopontin遺伝子promoter SNPsと性差の関連. 第10回日本肝臓学会大会, 札幌, 2006.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号: P2003332067 2003年9月24日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

## ② ワーキンググループの進行状況

### A. 研究目的

わが国における劇症肝炎、LOHFは、病理組織学的にリンパ球浸潤などの肝炎像を呈する急性肝不全に限定しており、肝炎ウイルス感染、自己免疫性肝炎、薬物アレルギーなどがその成因である。薬物中毒、循環障害、術後肝不全、妊娠脂肪肝など肝炎像を呈しない急性肝不全は劇症肝炎、LOHFから除外しているが、欧米ではこれらも含めて劇症肝不全と診断している。また、先行する慢性肝疾患が存在する場合は劇症肝炎、LOHFから除外しているが、B型キャリアの急性増悪例や自己免疫性肝炎例には慢性肝障害を基盤に発症している症例が混入している可能性があり、劇症肝炎、LOHFとacute-on-chronicを区分する意義に関しても、再検討する必要があると考えられる。一方、劇症肝炎、LOHFの予後は、日本急性肝不全研究会の肝移植ガイドライン（1996年）を基に予測されてきた。しかし、このガイドラインは最近の劇症肝炎、LOHF症例を対象にした検討では、正診率が低下していることが指摘されている。

以上のような、わが国における劇症肝炎、LOHFの新たな課題、特に、定義、診断基準、予後予測指針を再評価することを目的として、研究班に所属する施設の研究者からなるワーキンググループが発足した。構成員は以下の通りである。

責任者：持田 智（埼玉医科大学）  
構成員：滝川 康裕（岩手医科大学）  
中山 伸朗（埼玉医科大学）  
多田慎一郎（慶應義塾大学）  
市田 隆文（順天堂大学）  
内木 隆文（岐阜大学）  
矢野 公士（長崎医療センター）  
桶谷 真（鹿児島大学）

### B. 研究方法と C. 研究結果

#### 1. 全国調査用紙の作成

劇症肝炎、LOHFの全国調査で平成11年度以降に用いている調査用紙を改変し、これら疾患に分類されない急性肝不全の実態調査を実施する際に利用可能な調査用紙の作成を目指した。従来の調査用紙の問題点をWG-1の構成員が抽出し、各事項を全員で議論し、その成果を滝川、桶谷が集約することで、新たな調査用紙が完成した（参考資料1）。

同調査用紙では、中毒型、循環障害、術後肝障害など肝炎以外の急性肝不全も登録できるように作成されている。また、症候、合併症などの基準も明記することによって、全国全ての施設において画一的に症例の登録を行うことが可能になっている。

#### 2. 急性肝不全の実態に関する全国調査

研究班の所属施設を対象に1998～2005年に発症した急性肝不全症例に関するアンケート調査を実施した。血清ALT値が300IU/ℓ以上を示した急性肝障害で、これに起因する症状発現から24週以内に昏睡Ⅱ度以上の肝性脳症が出現、ないしはプロトロンビ

ン時間（PT）50%以下またはINR1.5以上を示した症例を対象とした。

16施設から計334例が登録されたが、この中には劇症肝炎またはLOHFと診断される症例が157例含まれており、小児などの除外すべき7例を除くと、対象は168例（45.7±17.4：15～83歳）であった。その病型は、臨床経過は劇症肝炎急性型と同等であるが肝炎以外の肝障害（急性型類型）6例、亜急性型類型5例、LOHF類型1例、亜急性肝炎非昏睡型14例、重症アルコール性肝炎13例、Acute-on-Chronic11例、急性肝炎など118例であった。成因はウイルス性66例（A型24例、B型急性感染例30例、B型キャリア例8例、C型2例、E型2例）、薬物アレルギー22例、自己免疫性7例、成因不明例30例、分類不能例1例であった。また、劇症肝炎、LOHFからは除外する症例としては、アルコール性18例、薬物中毒7例、循環障害3例、悪性腫瘍2例、代謝性3例、その他10例であった。

現在、回収した調査用紙を基に不明確な事項に関して再調査を実施している。この内容を解析して、わが国における劇症肝炎、LOHF以外の急性肝不全の実態を明らかにし、これら疾患群の診断基準、概念を改変する際の参考にする予定である。

#### 3. 劇症肝炎適応ガイドラインの改変

1998～2003年に発症した劇症肝炎648例、LOHF64例のうち、65歳未満で昏睡Ⅱ度以上出現時に血液製剤を投与されていない490例を抽出し、これらを基に劇症肝炎肝移植ガイドラインの再評価も進めている。

### D. 考案と E. 結論

ワーキンググループが発足し、劇症肝炎、LOHFの概念、診断基準、肝移植適応ガイドラインの改変に向けての作業を進めている。

### 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 なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

施設名 \_\_\_\_\_ 識別記号 \_\_\_\_\_

急性肝不全個人調査表

-平成10 - 17年の症例に関する全国調査-  
(急性肝障害での入院日が平成10年1月1日~17年12月31日の症例)

施設名: \_\_\_\_\_ 該当項目に○を付け、空欄に記入して下さい  
 主治医氏名: \_\_\_\_\_ 記載年月日: 平成 18 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日  
 血液検査結果の調査対象 1. 登録症例

| 患者識別<br>記号 | 各施設で2文字のアルファベットを記定                 |              | 性<br>男・女 | 年齢<br>M T S H 年 月 日 |       |       | 職業    |
|------------|------------------------------------|--------------|----------|---------------------|-------|-------|-------|
|            | 初診平成                               | 年            |          | 月                   | 日     | 歳     |       |
| 病型         | 創型肝炎急性型                            | 初発症状発現日      | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            | 創型肝炎急性型<br>LOHF                    | 黄疸発現日        | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            | 亜急性肝炎非昏睡型                          | 急性肝不全基準合致日   | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            | 重症アルコール性肝炎<br>Acute on chronic 肝障害 | 昏睡II度以上発現    | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            | その他( )                             | 昏睡III度以上発現日  | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            |                                    | 昏睡IV度以上発現日   | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            |                                    | 昏睡V度以上発現日    | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            |                                    | 昏睡VI度以上発現日   | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            |                                    | 昏睡VII度以上発現日  | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            |                                    | 昏睡VIII度以上発現日 | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            |                                    | 昏睡IX度以上発現日   | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |
|            |                                    | 昏睡X度以上発現日    | _____    | _____               | _____ | _____ | _____ |

2. 患者プロフィール

発症時体格 身長: \_\_\_\_\_ cm 体重: \_\_\_\_\_ kg

基礎疾患 無・有: \_\_\_\_\_ 不明  
 肝疾患 無・有: \_\_\_\_\_ 不明  
 HB carrier 無・有・不明

(肝炎発症前または治療後の成績からHBVcarrierと確定している場合のみ有にしてください)

手術歴 無・有: \_\_\_\_\_ 不明  
 輸血症 無・有・薬剤名 \_\_\_\_\_ 不明

施行日: 平成 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

飲酒歴 無・有: 種類 \_\_\_\_\_ 不明

1日量: 年数: \_\_\_\_\_

積算アルコール摂取量: \_\_\_\_\_

家族歴 無・有: 病名 \_\_\_\_\_ 不明

薬剤歴 (含む健胃食品) 無・有: 薬剤名 \_\_\_\_\_ 不明

(薬剤性の症例のみならず、基礎疾患を有する症例や冊Vキャリアでも、使用薬剤を詳細に記入するようお願い致します)

3. 成因(該当するものに○をつけて下さい)

- 1) ウイルス性 A型  
 B型: HBV急性感染(確定・疑診)・HBVcarrier例(確定・疑診)・判定不能  
 その他: C型・E型・GBV-C/HGV・ITV・その他: \_\_\_\_\_
- 2) 薬剤性アレルギー 薬剤名: \_\_\_\_\_  
 根拠: D-LST・臨床経過・再投与・その他: \_\_\_\_\_
- 3) 自己免疫性(確定・疑診) 5) 分類不能
- 4) 成因不明
- 6) 中毒性 アセトアミノフェン・キノコ ( )・その他: \_\_\_\_\_
- 7) アルコール性 8) 循環障害 9) 悪性腫瘍の広汎な肝浸潤
- 10) 代謝性 Wilson病・急性妊娠性脂肪肝・甲状腺機能亢進症・その他: \_\_\_\_\_
- 11) 術後肝不全 12) その他: \_\_\_\_\_  
 (同封した新たな成因分類表を参照して下さい)

| IgM-HBc抗体 (法)    | +・-・不明 | IgM-HA抗体 (法)   | +・-・不明                           |
|------------------|--------|----------------|----------------------------------|
| 陽性の場合に抗体価を記入:    | _____  | 陽性の場合に抗体価を記入:  | _____                            |
| HBs抗体 (法)        | +・-・不明 | HBV抗体 (法)      | +・-・不明                           |
| HBs抗体 (法)        | +・-・不明 | HBV抗体(コア) (法)  | +・-・不明                           |
| HBc抗体 (法)        | +・-・不明 | HBV-RNA (法)    | +・-・不明                           |
| 陽性の場合に測定値と単位を記入: | _____  | GBV-C/HGV -RNA | 血液製剤使用前 +・-・不明<br>血液製剤使用後 +・-・不明 |
| 陽性の場合に測定値と単位を記入: | _____  | TIV-DNA        | 血液製剤使用前 +・-・不明<br>血液製剤使用後 +・-・不明 |
| IgM-HEV (法)      | +・-・不明 | 測定法に○          | _____                            |
| HEV-RNA (法)      | +・-・不明 | その他:           | _____                            |
| 抗核抗体 (法)         | +・-・不明 | IgG            | _____ mg/dL・不明                   |

(成因と関係のない検査値も、測定していただら記入をお願い致します)

施設名 \_\_\_\_\_ 識別記号 \_\_\_\_\_

4. 転帰

1) 肝移植非施行例

・ 生存: \_\_\_\_\_

昏睡発現例: 覚醒日: \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日 (昏睡II度以上発現より) \_\_\_\_\_ 日)

・ 死亡: \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日  
 直接死因 (肝不全死・その他: \_\_\_\_\_)  
 経過中における覚醒 (無・有・期間 \_\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ 日)

2) 肝移植施行例

施行日 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

施設名: \_\_\_\_\_

・ 生存: \_\_\_\_\_

・ 死亡: \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日 (術後 \_\_\_\_\_ 日)

直接死因: \_\_\_\_\_

5. 初発症状

発熱 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 食欲不振 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 前身倦怠感 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 悪心・嘔吐 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 黄疸 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 腹部膨満感 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 その他: \_\_\_\_\_

6. 昏睡発現例: 昏睡II度発現時の身体所見

他: 急性肝不全基準合致時の身体所見  
 体温 : \_\_\_\_\_ °C  
 脈拍 : \_\_\_\_\_ / min  
 呼吸数 : \_\_\_\_\_ / min  
 黄疸 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 腹水 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 痙攣 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 肝濁音界縮小 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 羽ばたき振戦 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 肝性口臭 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 下腿浮腫 : 無・有・不明 \_\_\_\_\_  
 その他: \_\_\_\_\_

7. 血液検査所見

|                             | 昏睡基準<br>合致時<br>(月 日) | 昏睡II度<br>出現時<br>(月 日) | 治療開始<br>5日後 a<br>(月 日) | 覚醒時 b<br>(月 日) | 死亡または<br>移植時<br>(月 日) |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|----------------|-----------------------|
| 昏睡度                         |                      |                       |                        |                |                       |
| PT (%)                      |                      |                       |                        |                |                       |
| HPPT (%)                    |                      |                       |                        |                |                       |
| ATIII (%)                   |                      |                       |                        |                |                       |
| Alb (g/dL)                  |                      |                       |                        |                |                       |
| T. bil (mg/dL)              |                      |                       |                        |                |                       |
| D. bil (mg/dL)              |                      |                       |                        |                |                       |
| D/T 比                       |                      |                       |                        |                |                       |
| AST (IU/L)                  |                      |                       |                        |                |                       |
| ALT (IU/L)                  |                      |                       |                        |                |                       |
| AFP (ng/mL)                 |                      |                       |                        |                |                       |
| WH3 (μg/dL)                 |                      |                       |                        |                |                       |
| Fisher 比                    |                      |                       |                        |                |                       |
| BTR                         |                      |                       |                        |                |                       |
| HGF (ng/mL)                 |                      |                       |                        |                |                       |
| 血小板数<br>(/mm <sup>3</sup> ) |                      |                       |                        |                |                       |
| 白血球数<br>(/mm <sup>3</sup> ) |                      |                       |                        |                |                       |

a ここでの治療とは、昏睡II度出現または基準合致時以降に行った集学的治療を意味します。

B 経過中に覚醒が見られた症例は全例記入して下さい。生存例では最終覚醒期間における初日の成績を記載して下さい。肝移植例では手術時に覚醒している場合は生存例と、昏睡している場合は死亡例と同様の扱いで成績の記入をお願いします。

7. 画像診断

| 所見      | 出現時期          | 診断法   |
|---------|---------------|-------|
| 腹水      | 無・不明・有<br>月 日 | US・CT |
| 肝萎縮     | 無・不明・有<br>月 日 | US・CT |
| 地図状パターン | 無・不明・有<br>月 日 | US・CT |
| その他:    | 無・不明・有<br>月 日 | US・CT |

8. 合併症

感染症 不明・無・有(発現日 月 日)(転帰: 治癒・不変・死亡原因)

感染臓器: \_\_\_\_\_

脳浮腫 不明・無・有(発現日 月 日)(転帰: 治癒・不変・死亡原因)

消化管出血 不明・無・有(発現日 月 日)(転帰: 治癒・不変・死亡原因)

腎障害 不明・無・有(発現日 月 日)(転帰: 治癒・不変・死亡原因)

DIC 不明・無・有(発現日 月 日)(転帰: 治癒・不変・死亡原因)

心不全 不明・無・有(発現日 月 日)(転帰: 治癒・不変・死亡原因)

その他 \_\_\_\_\_(発現日 月 日)(転帰: 治癒・不変・死亡原因)

9. 治療

ステロイド 無・有(開始 月 日)

投与方法と量: \_\_\_\_\_

G-I療法 無・有(開始 月 日)

特殊組成アミノ酸 無・有(開始 月 日)

血漿交換療法 無・有(開始 月 日)

総施行回数: \_\_\_\_\_回

血液(濾過)透析 無・有(開始 月 日)

総施行回数: \_\_\_\_\_回

方法: \_\_\_\_\_

PGE1 無・有(開始 月 日)

IFN 無・有(開始 月 日)

CyclosporinA 無・有(開始 月 日)

ラミブジン 無・有(開始 月 日)

抗凝固療法 無・有(開始 月 日)

使用薬剤: \_\_\_\_\_

その他: \_\_\_\_\_(開始 月 日)

10. 肝臓病理検査

無・有: \_\_\_\_\_ 月 日

方法: 針生検・死後針生検・剖検・移植臓出肝所見

割検肝量: \_\_\_\_\_g 割検脾量: \_\_\_\_\_g

11. 肝移植治療に関する調査(移植非施行例も記入して下さい)

- 肝移植の施行に際して最初に考慮した時期  
考慮しなかった・考慮した( 月 日)
- 急性肝不全研究会の脳死移植適否判定基準  
脳死・生体部分  
適否決定のために 用いなかった・用いた  
その他に用いた基準: \_\_\_\_\_
- 患者ないし家族に対する肝移植に関する最初の説明  
無・有( 月 日)
- 肝移植実施施設への連絡  
無・有( 月 日)
- レシピエントに対する Informed Consent  
無・有( 月 日)
- ドナーに対する Informed Consent  
無・有( 月 日)
- 移植に際しての患者の移送  
方法: \_\_\_\_\_  
経路: \_\_\_\_\_  
移送に伴う患者容態の変化: \_\_\_\_\_

8) 肝移植を考慮した症例で実施できなかった場合は、その理由を記入をお願いします

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

13. 転送元または転送先の病院が存在する場合は、転送先をお教えください。

| 施設名  | 転送元 | 転送先 |
|------|-----|-----|
| 主治医  |     |     |
| 電話番号 |     |     |
| Fax  |     |     |

患者名を匿名化しておりますので重複登録を避けるため必ずご記入をお願いいたします。



## 急性肝不全症例調査票

対象：1998-2005年に発症した急性肝不全症例  
急性肝不全の定義：発症から8週以内に、PT 50%以下 and/or INR 1.5以上もしくは肝性脳症を発現した急性肝障害症例。先行する慢性肝障害を有する症例も含むが、発症時期は急性肝障害症状を発現した時期とする。

調査票：「劇症肝炎ならびに亜急性性の経過をとる重症肝炎（昏睡型）個人調査票 -平成16年の症例に関する全国調査-」に準じてこれを変更

以下、本調査のための変更点(案)・定義事項(案)を示す。

調査票の名称他

- 1) 対象：亜急性肝炎非昏睡型も対象とするため「昏睡型」の記載を削除。
- 2) 血液検体保存の調査を削除

## 1. 登録症例

1) 病型を追加：肝炎としては亜急性肝炎非昏睡型、重症アルコール性肝炎、Acute on chronic 肝障害を追加、その他の急性肝不全として、急性妊娠性脂肪肝、ショック肝、中毒性肝障害（アセトアミノフェン）などを記載してもらう。

2) 昏睡発現例は経過の基準日を昏睡発現日、非発現例は急性肝不全基準合致日とする。

## 2. 患者プロフィール

- 1) 体格を追加：標準肝容積の算出、肥満による肝障害悪化の可能性を見るため。
- 2) 基礎疾患を定義：高橋善弥太先生の定義階層  
悪性腫瘍、血液疾患（白血病、再生不良性貧血、悪性リンパ腫）、腎不全、甲状腺機能亢進症、II度以上熱傷、重症交通外傷、免疫抑制剤使用者（リウマチ他）  
（包括的な定義を検討、例えば「入院を要する外傷」など）
- 3) 手術歴：肝臓移植症前2週間以内の全身麻酔手術
- 4) 家族歴：肝疾患、肝疾患、自己免疫疾患、遺伝性代謝疾患
- 5) 薬剤歴：健康食品含む旨明記

## 3. 成因

- 1) 1-5は従来劇症肝炎の成因をそのまま踏襲
- 2) 従来の薬剤性がアレルギー性であること明記
- 3) 1-5以外のいっような急性肝不全の成因を6-11に記載。熱中症やDIC 臓器症候はその他へ。
- 4) ウイルスマーカーその他は従来ものを踏襲。

## 4. 転帰

- 1) 昏睡発現例のみ覚醒日を記載。
- 2) 他の経過日数は登録症例の欄の日付より計算
- 3) 初発症候
- 4) 昏睡II度発現時の身体所見
- 5) 昏睡II度発現時の身体所見
- 6) 昏睡II度発現時の身体所見
- 7) 昏睡II度発現時の身体所見
- 8) SIRSとの関連もあり、発熱、頻脈、呼吸促進はそれぞれ体温、脈拍数、呼吸数とする。

## 血液検査所見

1) 昏睡発現日、急性肝不全基準合致日両方の検査値を記載する。

## 画像診断

1) 変更なし

9. 合併症  
基準

1) 感染症：①感染の臓器症状または画像所見、②発熱38℃以上、③白血球10000/mm<sup>3</sup>以上、④感染が疑われる臓器からの起炎菌培養陽性あるいは体液白血球増多のうち2項目以上陽性。

2) 脳浮腫：①頭部CT検査での典型的所見。②脳圧測定：25mmHg以上、のいずれか。

3) 消化管出血：①吐血あるいは上部消化管留置カテーターからの血液流出、②ターゲル便あるいは新鮮血下血、③内視鏡での出血性病変の確認、のいずれか。

4) 腎障害：①一日尿量400ml以下、②クレアチニン2.5 mg/dL以上、のいずれか。

5) DIC：日本救急医学会「急性期のDIC 診断基準」

6) 心不全：①胸部X線 心拡大所見、②胸部X線 肺うっ血所見、③心エコー 駆出率 低下、のうち2つ以上

## 10. 治療

1) 昏睡発現日、基準合致日との関連は登録症例の欄の日付より計算。

11. ラミブジン投与例に関する調査  
1) 削除

## 12. 肝組織病理検査

1) 変更なし

## 13. 肝移植治療に関する調査

1) 昏睡発現日、基準合致日との関連は登録症例の欄の日付より計算。

14. 転送元または転送先病院が存在する場合の連絡先  
1) 変更なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 非A～非G型劇症肝炎の病理学的検討

研究協力者 与芝 真彰 昭和大学藤が丘病院 消化器内科 教授

研究要旨：本邦では劇症肝炎の約30%が原因不明であり、病態が十分に解明されていないために対症療法のみが行われてきた。今回我々は原因不明の劇症肝炎28例を対象とした肝組織の病理学的検討を行い、約80%の症例で肝細胞破壊の原因が肝炎であることを明らかにした。この結果より劇症肝炎の内科治療においては対症療法に加えて肝炎治療の必要性が示唆された。

#### 研究協力者

井上 和明 昭和大学藤が丘病院 助教授  
安田 宏 昭和大学藤が丘病院 講師  
山田 雅哉 昭和大学藤が丘病院 助手  
渡邊 綱正 昭和大学藤が丘病院 助手

#### A. 研究目的

劇症肝炎の原因は国や地域により大いに異なり、米英では薬剤が原因の過半数を占めるが、本邦ではウイルス性の原因が最多である。さらに本邦の劇症肝炎のもう一つの特徴は、原因不明例が全体の約30%を占めていることである。

壊死炎症反応が持続して肝細胞破壊の進行する場合は肝炎治療を早期に開始することが望ましいが、本邦の原因不明の劇症肝炎に今までに行われた病理学的検討では、死亡例ではmassive necrosis、生存例では病理学的反応がほとんど見られない場合が多く、病態を解明するに至っていない。今回我々は原因不明例の病態を解明する目的で、生存例では回復早期の、死亡例では死後直後の肝組織を用いて病理学的検討により病態の解明を試みた。

#### B. 研究方法

対象は1990年から2005年までに昭和大学藤が丘病院に入院して治療を受けた原因不明の劇症肝炎26例とlate onset hepatic failure 2例である。原因不明例の定義は既知のウイルスマーカーがすべて陰性で明確な薬物服用歴が無く、さらに各種自己抗体も陰性的なものとした。

これらの患者に原則として施行した治療は、肝不全に対する対症療法としては血漿交換と血液濾過透析を組み合わせ、肝炎治療としてはインターフェロンによる抗ウイルス療法とステロイドパルスとサイクロスポリンAの持続点滴を組み合わせた免疫抑制療法である。これらの患者から原則として生存例では回復早期に腹腔鏡下肝生検により、死亡例では死亡直後の剖検により、移植例では摘出肝より肝組織をえた。また一部の症例で脳症が出現する前の急性肝炎の段階で腹腔鏡下肝生検により肝組織をえた。

#### C. 研究結果

28例中17例が救命された（60.7%）。肝組織の病理診断は肝炎型22例（78.6%）、胆汁うっ滞型1例、自己免疫性肝炎型1例、回復期で肝炎の所見に乏しいものの2例、massive necrosis 1例、veno occlusive disease 1例であった。

#### D. 考 察

原因不明例と臨床的に診断された劇症肝炎の約80%に病理組織学的検討により壊死炎症反応が認められ、肝細胞破壊の原因は肝炎であることが示された。これまで劇症肝炎原因不明例の多くは対症療法のみ行われ、生体肝移植を行わなければ内科的には救命が困難であった。今回の検討から肝炎に対する治療の必要性が示され、さらにウイルスの持続感染を想定した肝炎治療が高率の救命に寄与している可能性も示唆された。

#### E. 結 論

これまで劇症肝炎の病理学的検討は死亡例ではmassive necrosis、生存例では病理学的反応のほとんど無いものが大半であった。今回の我々の検討から原因不明の劇症肝炎の多くは病理組織学的にも約80%以上の症例で肝炎であることが明らかになり、ウイルスの持続感染を想定した治療法が内科的治療による救命率の向上に寄与している可能性が示唆された。

#### 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 なし

#### 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（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 劇症肝炎に対する生体部分肝移植

分担研究者 幕内 雅敏 東京大学大学院医学系研究科 臓器病態外科学 教授

研究要旨：東京大学にて施行した劇症肝炎に対する生体部分肝移植の適応と成績について検討した。対象は劇症肝炎症例32例で、男性18例、女性14例、年齢は8～64歳であった。適応の参考として、1. King's College Hospitalの基準（1989年）、2. 肝移植研究会基準（1990年）、3. 高橋らによる予測式（1994年）、4. 武藤らによる予測式（1994年）、5. 日本急性肝不全研究会基準（1996年）、6. 与芝らの基準（1995年）、7. 千葉大学基準（1999年）の基準を用い予後予測を行った。肝移植施行例では死亡の判定となることが多かった。脳症発現までの期間では急性型10例、亜急性型22例、LOHF例はなかった。原因としては原因不明が23例、B型肝炎が7例、自己免疫性肝炎1例、Wilson病が1例であった。十分なインフォームドコンセントと迅速なドナー評価の後肝移植手術を実施した。グラフトは右葉グラフト17例、左葉グラフト13例、後区域グラフト2例で、ドナーは全例軽快退院している。平均観察期間49ヶ月現在、29例が生存中であり、累積生存率は91%である。右葉グラフトの導入により、成人に対しても、移植可能であるが、グラフトは生体肝であり、十分生存を見込める症例に適応を限定すべきと考える。

#### A. 研究目的

劇症肝炎・肝不全（以下劇症肝炎）は、内科的治療に抵抗性の場合死亡率が高く、肝移植は治療手段として確立している。一方近年が透析医療の発展により内科的治療で救命しうる症例も少なからず存在する。そこで問題となるのは、移植を回避できる症例と移植が必要な症例を見極めることである。そこで東京大学における劇症肝炎に対する生体部分肝移植症例について、その適応と成績について検討した。

#### B. 研究方法

東京大学では1996年1月より2006年11月までに376例380回の生体部分肝移植を施行した。成人例（18歳以上）307例、小児例73例で、今回成人例中29例、小児例中3例の劇症肝炎に対して肝移植の行われた症例を対象とした。症例の内訳は男性18例、女性14例で、年齢は8～64歳（平均値41歳）、体重は32～84kg（56kg）であった。脳症発現までの日数で見ると急性10例、亜急性22例、LOHF例はなかった。脳症の程度としては、脳症Ⅰ4例、Ⅱ13例、Ⅲ11例、Ⅳ4例であった。劇症肝炎に至る原因別では、原因不詳23例、HBV7例、Wilson病1例、自己免疫性肝炎1例であった。紹介のあった時点でレシピエント側の評価として以下の基準により術前の予後予測を判定した。すなわち、1. King's College Hospitalの基準（1989年）、2. 肝移植研究会基準（1990年）、3. 高橋らによる予測式（1994年）、4. 武藤らによる予測式（1994年）、5. 日本急性肝不全研究会基準（1996年）、6. 与芝らの基準（1995年）、7. 千葉大学基準（1999年）により術前に予後予測を判定した。

肝移植の紹介はあったが出張診療の時点で、適切なドナーがない、すでに平坦脳波等の理由で、60例を肝移植適応から除外した。

肝移植を施行した症例の血清学的データは以下の通

り。総ビリルビン2.4-43.1mg/dl（14.2mg/dl）、アルブミン2.6-3.8g/l（3.2g/l）、プロトロンビン時間11.9-28.6秒（16.9秒）。

ドナーの内訳は男性17例、女性15例で、年齢は18～57歳（平均値37歳）、体重は45～82kg（58kg）であった。患者との関係では、兄弟が12例と最も多く、ついで、子供10例、父母5例、配偶者5例であった。

ドナー候補の迅速な評価および十分なインフォームドコンセントを行い、必要に応じて当院倫理委員会でも検討した上で生体部分肝移植を実施した。

#### C. 研究結果

術前の予後予測では、32例中25例は予測基準の過半数以上で死亡または肝移植適応と判定された。残り7例については、補助療法にて脳症もしくは肝萎縮の改善を認めなかったため、肝移植の適応と判断した。2例には、APOLT（Auxiliary partial orthotopic liver transplantation）を採用した。

グラフトは、1999年以前は全例、左葉もしくは尾状葉加左葉であり、2000年以降は、右葉グラフトを採用しており、左葉グラフトでレシピエント標準肝容積の40%に満たず、かつ右葉切除の後にドナー肝の残肝が35%以上見込める場合、右葉グラフトを採取した。実際移植に用いられたグラフトは、拡大右葉グラフトを含めた右葉グラフトが最も多く17例で、以下左葉グラフト（尾状葉加を含む）13例、後区域グラフト2例であった。グラフト重量は276～777g（530g）で、これは患者およびドナーの標準肝容積の各々、25%～71%（47%）、28%～56%（46%）に相当した。レシピエントの手術時間は550～970（815）分、体重あたりの出血量は36.0～17.9（71.3）g/kgであった。

生体肝移植を施行した劇症肝炎症例32例は全例退院した。在院日数は21～218（65）日であった。観察期間3～115（平均49）ヶ月で、29例が現在生存中であ

る。43歳男性の1例を、一旦退院の後敗血症、肺梗塞で失った。移植後de novo悪性腫瘍で2例失った。

合併症は32例中17例(57%)に認めており、1例PNF(primary non function)で再移植を必要とした。急性拒絶反応が10例(31%)で合併症としてはもっとも多く見られた。全例ステロイドパルス療法で軽快し、OKT3を必要とする症例はいなかった。急性拒絶反応の発症率は他の疾患症例と差を認めなかった。

血管合併症として門脈血栓症・動脈血栓症は劇症肝炎症例では経験しなかったが、1例肝静脈吻合部の狭窄で再手術を要した。胆管系の合併症率は未だ高く、胆汁瘻は5例(16%)、胆管吻合部狭窄は5例(16%)に経験した。胆管吻合部狭窄の症例は内視鏡的拡張や再手術を必要とした。移植手術時の入院日数は24~218日(平均55日)であった。

#### D. 考 察

劇症肝炎に対する生体肝移植は1992年Matsunamiらにより、小児例に対し父親をドナーとし左葉グラフトを用い初めて行われた。以降信州大学では1999年のMiwaらの報告によれば14例劇症肝炎に対し生体肝移植を施行し、13例(93%)生存と良好な累積生存を得ている。

1990年代は左葉グラフトが中心であったため、成人劇症肝炎への適応は限定されていたが、1994年Yamaokaらが右葉グラフトを用いての生体肝移植を報告以来、症例によっては右葉グラフトでも十分安全に施行されることが確認され、右葉グラフトを用いることで成人劇症肝炎への生体肝移植の適応が拡大してきた。2000年Uemotoらの報告によると京都大学では成人を含め34例の劇症肝炎に対し生体肝移植を施行し、19例(56%)の累積生存を得ている。

近年の血液透析、持続濾過透析の発展により、劇症肝炎、特に急性型に対しては内科的治療で大幅に救命率が上昇している。しかしながら亜急性型、LOHFに対しては、内科的治療での救命率はいまだ20%前後であり、生体肝移植治療がこれらに対し果たす役割は大きい。そこで問題となるのは、内科的治療のみで移植を回避できる症例と移植が必要な症例を見極めることである。

移植施設の立場としては、重篤で非可逆的な肝性脳症をきたす前の、少しでも成功率の高い時期に移植を行うのが望ましいと考えており、具体的には劇症肝炎を疑った時点で御一報いただき、御家族には生体肝移植の治療のオプションを説明し、血漿交換などの補助療法により脳症改善が認められない段階で、転送を考慮することが望ましいと考えている。肝性脳症V度となると肝移植の適応とならないのでそうなる前に移植を実施することが重要である。

今回アセトアミノフェン中毒で服用当日から脳症を発現した急性型劇症肝炎に対し、APOLTを適用した。この症例の場合予後予測は千葉大学基準を除き、生存もしくは移植非適応であったが、補助療法により脳症

改善認めず、またnaive liverの回復が見込めると判断しAPOLTを適用した。術後経過は良好で、現在免疫抑制剤は服用していない。今後安全にAPOLTを施行しうる基準の解明が待たれる。

#### E. 結 論

劇症肝炎の場合には最終的に肝移植が必要となる可能性を考慮に入れた内科管理が望まれる。脳症が出現した時点で肝移植の準備が望ましい。右葉グラフトの導入により、成人に対しても、移植可能であるが、グラフトは生体肝であり、十分生存を見込める症例に適応を限定すべきと考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sugawara Y, Kaneko J, Makuuchi M : Cyclosporina A for treatment of hepatitis C Virus after liver transplantation . Transplantatlon 82 : 579-580, 2006.
- 2) Kishi Y, Sugawara Y, Tamura S, et al : Impact of incidentally found hepatocellular carcinoma on the outcome of living donor liver transplantation. Transpl Int 19 : 720-725, 2006.
- 3) Sugawara Y, Makuuchi M : Living donor liver transplantation to patients with hepatitis C virus cirrhosis . World J Gastroenterol 12 : 4461-4465, 2006.

##### 2. 学会発表 なし

#### 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（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 細胞外マトリックスにより誘導される細胞骨格の変化と肝細胞分化機能制御

研究協力者 森脇 久隆 岐阜大学医学部腫瘍制御学講座 消化器病態学 教授

研究要旨：重篤な肝不全に対する根本的治療法として肝臓移植の有用性が確立されつつあるが、ドナー不足という臓器移植医療の抱える限界があるのが現状である。現在、肝臓移植に代わる治療法として、肝細胞移植が注目されている。以前より我々は細胞外マトリックスであるEHS（Engelbreth-Holm-Swarm）gel上で培養された肝細胞が長期間、肝細胞特異的遺伝子の発現を維持することを報告してきた。我々は、細胞外マトリックスによって誘導または抑制される遺伝子をcDNA microarrayを用いて網羅的に検索し、肝細胞分化におけるactinの重合/脱重合制御に関するシグナル伝達の役割について検討した。また、HNF-4 $\alpha$  siRNAやHNF-1 siRNAを用いてHNF-4 $\alpha$  mRNAやHNF-1 mRNAの発現を抑制することで、EHS gelやcollagen上で培養される肝細胞における肝特異的遺伝子の発現と細胞形態について検討し、細胞療法に応用できる高度特異的機能を発現する肝細胞の確立を目的とする。

#### 共同研究者

永木 正仁 岐阜大学大学院 消化器病態学  
木全 崇之 岐阜大学大学院 消化器病態学

#### A. 研究目的

細胞外マトリックス（ECM）は、単に細胞に足場を提供しているだけではなく、細胞の増殖や分化に深く関わっている。肝細胞においても基底膜に類似した細胞外マトリックスである Engelbreth-Holm-Swarm（EHS）gel上で培養された細胞は球状で、肝特異的遺伝子の発現を長期間維持しているのに対し、collagen上で培養された肝細胞は、扁平に進展し肝特異的遺伝子やタンパクの発現は早期に低下する。このようにECMは肝細胞分化と細胞形態並びに骨格に深く関与することを報告してきた。

細胞の分化は、主に細胞特異的遺伝子を制御する一群の遺伝子の発現と深く関係している。肝特異的遺伝子の発現は、hepatocyte nuclear factor（HNF）-1、-3、-4 $\alpha$ 、-6やCCAATエンハンサーなどの肝特異的転写制御因子群の発現および相互作用によって制御されている。我々はHNF-4 $\alpha$  cDNAを肝癌細胞やラット肝細胞に導入することで、肝特異的遺伝子の発現を増加させることを報告し、また、ECMによる肝細胞分化制御が転写因子HNF-4 $\alpha$ やHNF-1を介したものであることを証明している。しかしながら、ECMによって誘導される肝細胞分化が、HNF-4 $\alpha$ やHNF-1によって直接制御されるかどうかは証明されていない。細胞骨格と転写因子との関連においても不明な点が多い。

ECMによって制御される肝細胞分化と細胞骨格ならびにHNF-4 $\alpha$ との関係を解明するために、我々は、ECMによって誘導または抑制される遺伝子発現をcDNA microarrayを用いて網羅的に検索し、肝細胞分化とactinの重合/脱重合制御に関するシグナル伝達の役割について検討した。

#### B. 研究方法

Wistarラットよりコラゲナーゼ灌流法で肝細胞を分離し、EHS gelおよびcollagen上で培養し、肝細胞の遺伝子発現をcDNAマイクロアレイを用いて網羅的に比較検討した。その中で肝細胞特異遺伝子と細胞骨格に関連した遺伝子発現に変化が認められたため、細胞骨格ならびにactinの重合/脱重合と肝細胞分化との関連について検討した。

また、HNF-4 $\alpha$  siRNAまたはHNF-1 siRNAの存在下で肝特異的遺伝子の発現と細胞骨格の変化を検討した。

#### C. 研究結果

##### 1. 細胞外マトリックスと細胞骨格、肝細胞分化の解析

EHS gel上で培養した肝細胞は、培養早期より球状の細胞形態を示したが、collagen上で培養した肝細胞は扁平に進展し、異なる細胞形態が観察された。肝機能特異遺伝子としてのアルブミンは、EHS gel上で培養した肝細胞では3週間たってもその発現は維持されるのに対し、collagen上で培養した肝細胞は培養早期よりアルブミンの発現の低下が認められた。また、同様にEHS gel上で培養した肝細胞においてHNF-4 mRNAの発現が長期間維持された。

細胞骨格との関係を検討するため、actin filamentを染色した。EHS gel上の肝細胞はactin filamentがほとんど染まらず、actinは脱重合していたのに対し、collagen上の肝細胞ではactinは重合していた。EHS gelは、laminin, entactinやtype IV collagenから構成されており、各々の構成成分と細胞骨格について検討したところ、type IV collagen上で培養した肝細胞では、actinは重合しており、またlamininでは肝細胞はやや球状の形態を示し、若干の脱重合傾向を、laminin / entactin gel上では、EHS gelと類似の形態を示し、肝細胞内のactinは脱重合を示していた。以上より、EHS gel内のlaminin/entactinの構成が、肝細胞

の形態変化に影響を与えていると考えられた。

EHS gelによって誘導または抑制される遺伝子発現をcDNA microarrayを用いて網羅的に検索した。その中で phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate [PI(4,5)P<sup>2</sup>] phosphatase Mrna やcofilin mRNAといったactin関連タンパク遺伝子の発現変化が認められた。Northern blot Analysisの検討にて、EHS gel上で培養された肝細胞では albumin mRNA, PI(4,5) P<sup>2</sup> phosphatase mRNAの発現が増加していたに対し、PI(4) P 5 kinase mRNA発現の低下が認められた。これらの結果は、EHS gel上の肝細胞でのPI(4,5) P<sup>2</sup>の発現低下を推測し、それを証明するためにPI(4,5) P<sup>2</sup> 染色を行ったところ、collagen上で培養された細胞に比べてEHS gel上で培養された肝細胞では細胞内PI(4,5) P<sup>2</sup>の発現量が低下していた。またphospholipase CのinhibitorであるU73122やPI(4,5) P<sup>2</sup>の添加によって、肝細胞PI(4,5) P<sup>2</sup>量を増加させると、EHS gel上の肝細胞は扁平化しactin filamentの重合形成が認められた。一方、actinの脱重合を促進させるcofilinやgelsolinの添加によって、collagen上の肝細胞はcuboidalな形態を示すようになり、actinの脱重合が誘導された。これら細胞骨格の変化に伴い、PI(4,5) P<sup>2</sup>やU73122の添加によりEHS gel上での肝細胞では albumin mRNAやHNF-4 mRNAの発現低下が認められ、一方、gelsolinを添加し肝細胞内のactinを脱重合させると、collagen上の肝細胞で albumin mRNAやHNF-4 mRNAの発現の誘導が認められた。以上のことより、細胞骨格が脱重合すると肝細胞分化能が亢進されると考えられる。

## 2. HNF-4 $\alpha$ siRNA, HNF-1 siRNA遺伝子導入後の肝特異的遺伝子の解析

Northern blotによる検討から、HNF-4 $\alpha$  siRNAやHNF-1 siRNAの導入にて、HNF-4 $\alpha$  mRNAやHNF-1 mRNA発現を抑制すると、EHS gel, collagen上の肝細胞において肝特異的遺伝子である albumin mRNA, transthyretin mRNA, apolipoprotein AI mRNA, apolipoprotein CIII mRNAの発現低下が認められた。HNF-4 $\alpha$  siRNA導入後も、EHS gel並びにcollagen上の肝細胞に形態変化は観察されず、また、アクチン骨格にも変化が認められなかった。以上のことより、HNF-4 $\alpha$ やHNF-1 siRNAの導入は、細胞形態や細胞骨格に変化を与えることなく、肝特異的遺伝子の発現を抑制することが示された。

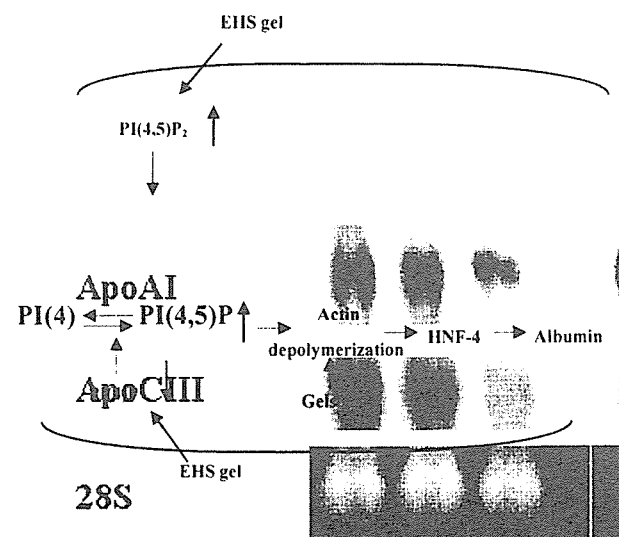
## D. 考 察

HNF-4 $\alpha$ は、apolipoprotein CIII遺伝子上流のエンハンサー/プロモーター領域に結合するタンパクとして発見された。肝や腸、腎、膵などで発現し、肝の発生や分化に重要な役割を果たすとともに、脂質や糖代謝に密接に関連している。細胞とECMの相互作

用によって、HNF等の肝特異的転写制御因子が誘導され、その結果、肝特異的遺伝子の発現が制御されることは知られている。しかし、これまでは、ECMによって肝特異的遺伝子と転写因子が同時に制御されるという事実の報告がなされているのみであり、ECMによる肝細胞分化誘導機構においては、転写制御因子による肝特異的遺伝子の直接的な制御が必ずしも証明されていなかった。今回の我々の研究は、HNF-4 $\alpha$  siRNAやHNF-1 siRNAを用いて、HNF-4 $\alpha$  mRNAやHNF-1 mRNAをノックダウンすることで、ECMによって誘導される肝特異的遺伝子である albumin mRNA, transthyretin mRNA, apolipoprotein AI mRNA, apolipoprotein CIII mRNAの発現が抑制されることを初めて示した。これらの実験結果は、EHS gelがHNF-4 $\alpha$ やHNF-1を誘導し、その結果、肝細胞特異的遺伝子が制御されていることを証明している。

細胞形態と細胞分化のメカニズムについてはいまだ十分に解明されていない。EHS gel上で培養された肝細胞は球状で小さな集合体を作り、肝細胞内のactin filamentは脱重合していた。一方、collagen上で培養した肝細胞は扁平に進展し、actin filamentは重合していた。actinの細胞骨格は、actin結合タンパクによって制御されていることが知られている。その中でPI(4,5) P<sup>2</sup>を中心とした脂質シグナルがECMによって誘導される肝細胞分化機構に重要な役割を果たしていることが立証できた。また、HNF-4 $\alpha$  siRNAを導入した肝細胞において、細胞形態やactin filamentに変化は認められなかった。これらの結果より、ECMにより誘導される肝細胞分化において、HNF-4 $\alpha$ が細胞骨格を制御する遺伝子の下流にあることが示された(図1)。

図1：細胞外マトリックスによる肝細胞分化シグナル



|                      |   |   |   |
|----------------------|---|---|---|
| Control siRNA        | - | + | - |
| HNF-4 $\alpha$ siRNA | - | - | + |

## E. 結 論

EHS gelは肝細胞内でactinの脱重合を促進し、細胞形態に変化が生じ、その結果、肝細胞分化を誘導していると考えられた。HNF-4ならびにHNF-1 siRNAでその発現を低下させると肝細胞特異的遺伝子の発現が低下することより、細胞外マトリックスによって制御される分化機構は転写因子HNFを介していることが立証された。またHNF siRNAにより細胞骨格に変化が認められないことより、肝細胞分化制御機構においてHNFは細胞骨格に変化をもたらすことなく、その下流の肝細胞特異的遺伝子に作用すると考えられ、肝細胞分化機構の一端が解明された。より詳細な肝細胞分化機構の解明は、今後人工肝作成や肝再生治療を確立していく上で必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kimata T, Nagaki M, Ogiso T, et al : Actin organization and hepatocyte differentiation are regulated by extracellular matrix via PI-4,5-bisphosphate in the rat. *Hepatology* 44 : 140-151, 2006.
- 2) Kimata T, Nagaki M, Tsukada Y, et al : Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  and -1 small interfering RNA inhibits hepatocyte differentiation induced by extracellular matrix. *Hepatol Res* 35 : 3-9, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 木全崇之, 永木正仁, 小木曾富生, 他 : 細胞外マトリックスにより誘導される肝細胞分化とアクチン重合/脱重合. 第4回日本再生医療学会総会, 大阪, 2005.
- 2) 木全崇之, 永木正仁, 小木曾富生, 他 : 細胞外マトリックスにより誘導される肝細胞分化と細胞骨格制御のシグナル伝達. 第41回日本肝臓学会総会, 大阪, 2005.
- 3) Kimata T, Nagaki M, Ogiso T, et al : Organization of the actin cytoskeleton and subsequent hepatocyte differentiation are regulated by the extracellular matrix through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. The 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, San Francisco, 2005.
- 4) Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, et al : Differentiation of mouse hepatic stem cells by hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 and cell transplantation of liver cirrhosis in mice. The 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, San Francisco, 2005.

- 5) 木全崇之, 永木正仁, 塚田良彦, 他 : 細胞外マトリックスにより誘導される肝細胞分化と転写因子HNFの役割. 第42回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.

## H. 知的財産権の出願, 登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 自己骨髄細胞投与による肝再生療法の確立

研究協力者 坂井田 功 山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科学 教授

研究要旨：肝不全症に対する生体肝移植に代わる次世代の自己完結型の再生療法を開発するため、山口大学医学部消化器病態内科学、山口大学医学部附属病院再生細胞療法センターにて、平成15年11月より、適応基準を満たす非代償性肝硬変患者に対して国内初のPhase I臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法（自己骨髄細胞の投与療法，Autologous Bone Marrow Cell Infusion（ABMI）療法』を開始した。現在までに当大学にて15例の患者に施行し、本治療には、重篤な副作用の発生はなく、肝機能、肝線維化が改善する結果を得ている（Stem Cell 2006, この発表についてはNew Scientist誌にも紹介された）。平成17年度は多施設研究を実施している（山形大学で施行1例）、また国際共同研究の一環として韓国Yonsei大学にもABMI療法が平成18年11月28日に実施された。以上のことより、多施設を含めたABMI療法の実施によりABMI療法の安全性、有効性については確立されたと考える。

#### 共同研究者

寺井 崇二 山口大学大学院医学系研究科  
消化器病態内科学 講師

#### A. 研究目的

生体肝移植に代わる自己完結型の肝硬変症に対する治療法を確立するため、以下の肝硬変症の対する臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法（自己骨髄細胞の投与療法，Autologous Bone Marrow Cell Infusion（ABMI）療法』を平成15年11月14日より開始した。

#### B. 研究方法

臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法（自己骨髄細胞の投与療法，Autologous Bone Marrow Cell Infusion（ABMI）療法』の適応条件は以下の条件を満たした肝硬変症とした。

（対象）

- 1) 総ビリルビン値；3.0mg/dl以下
- 2) 血小板数； $5.0 \times 10^{10}/l$ 以上
- 3) 食道胃静脈瘤及び肝細胞癌のコントロールが良好である。
- 4) 心肺機能が良好で、その他に重篤な併存疾患が認められない。
- 5) CT, MRI等の画像診断にてviableな肝細胞癌が存在しないこと。

（プロトコール）

実際のプロトコールは、全身麻酔下にて、自己骨髄細胞を400ml採取する。採取した骨髄液は濃縮器セルプロセッサ-Cytomateを使用し骨髄細胞を濃縮・洗浄し、患者の末梢静脈より投与する。その後経時的に血液検査を施行し、肝再生についてモニターしていく。また画像的にも腹部エコー、CT検査等にて、肝再生の促進の有無について評価する。first endpointは1

ヶ月後、second endpointは6ヶ月後の肝機能に対する改善について評価した。実際の臨床研究では骨髄細胞投与後6ヶ月間嚴重な経過観察を続け、血液生化学検査・肝組織学検査、腹部CT検査など、安全性及び有効性の評価を行った。また経過観察中において、内服剤、抗ウイルス剤等の使用については変化させない。

#### C. 研究結果

最初の10症例の経過、1例は経過観察中のアルコール摂取のため脱落例とした。施行症例のうち長期に経過観察可能であった9症例についてデータは骨髄細胞投与後、血清アルブミン値、総蛋白値、Child-Pugh Scoreの改善効果が明らかになった。また骨髄細胞投与前後に評価した肝臓の生検組織の結果においてアルファフェトプロテイン、PCNAなどの肝再生のマーカーの誘導を確認した（Terai S, Sakaida I et al. Stem Cells 2006）。さらに同様な方法で症例を重ね、現在までに山口大学においては15症例に対してABMI療法が施行された。さらに同様なプロトコールにて、山形大学（河田 純男教授）および韓国Yonsei大学においてもABMI療法は安全に実施された。

#### D. 考察

多施設臨床研究として、本大学以外の2施設（山形大学、Yonsei大学）においてもABMI療法は安全に実施された。今後はさらに症例数の増やし、エビデンスを明確化していくために、多施設臨床研究の準備を行っており、我々が開発してきた自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法を確立した治療にしていきたい。

#### E. 結論

ABMI療法は安全に実施できており、さらにその有効性は明らかになった。その基本的な方法については確立できたと考える。



## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al : Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 24 : 2292-2298, 2006. (ABMI療法の最初の臨床論文として報告, *New Scientist*に取り上げられた)
  - 2) Ishikawa T, Terai S, Urata Y, et al : Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res* 327 : 463-470, 2007.
  - 3) Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, et al : Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics* 6 : 2564-2570, 2006.
  - 4) Ishikawa T, Terai S, Urata Y, et al : Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res* 323 : 221-231, 2006.
  - 5) Terai S, Sakaida I, Nishina H, et al : Lesson from the GFP / CCl<sub>4</sub> model-translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12 : 203-207, 2005.
  - 6) Takami T, Terai S, Yokoyama Y, et al : Human homologue of maid is a useful marker protein in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 128 : 1369-1380, 2005.
  - 7) Omori K, Terai S, Ishikawa T, et al : Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett* 578 : 10-20, 2004.
  - 8) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40 : 1304-1311, 2004.
  - 9) Yamamoto N, Terai S, Ohata S, et al : A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 313 : 1110-1118, 2004.
  - 10) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al : An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 134 : 551-558, 2003.
  - 11) 寺井崇二, 浦田洋平, 丸本芳雄, 他 : 多施設臨床研究 : 肝硬変症の対するABMI療法の開発 再生医療. *日本再生医療学会雑誌* 5 : 535-543, 2006.
- ### 2. 学会発表
- 1) 寺井崇二, 坂井田功 : 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法 (ABMI therapy) の開発. *Translational Research Forum II. 第43回日本臨床分子医学会学術集会—トランスレーショナルリサーチの推進と臨床展開—*, 札幌, 2006.
  - 2) Terai S : Development of autologous bone marrow cell infusion (ABMI) therapy for liver cirrhosis patients. *The 4th Catholic International Stem Cell Symposium, symposium, Seoul, 2006.*
  - 3) 丸本芳雄, 寺井崇二, 坂井田功 : 骨髄細胞の肝細胞への分化過程における  $\beta$  catenin と E-cadherin の関与についての検討. *第13回肝細胞研究会*, 2006.
  - 4) 寺井崇二, 坂井田功 : 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発. *第79回日本内分泌学会学術総会. メインシンポジウム 骨髄細胞を用いた治療*, 京都, 2006.
  - 5) 寺井崇二, 横山雄一郎, 坂井田功 : 肝幹細胞分化を制御するHHMの発現の視点から考えた肝発癌制御機構について. *第42回日本肝臓学会総会, シンポジウム*, 京都, 2006.
  - 6) 寺井崇二, 石川剛, 青山浩司, 他 : 多施設臨床研究 : 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発. *第5回日本再生医療学会総会*, 岡山, 2006.
  - 7) 丸本芳雄, 寺井崇二, 松本俊彦, 他 : 骨髄細胞の肝細胞への分化制御における周辺環境の検討. *第5回日本再生医療学会総会*, 岡山, 2006.
  - 8) 丸本芳雄, 寺井崇二, 松本俊彦, 他 : 肝障害モデルマウスに対するG-CSF投与の検討. *第5回日本再生医療学会総会*, 岡山, 2006.
  - 9) 石川剛, 寺井崇二, 坂井田功 : r FGF 2 併用骨髄移植の肝線維化改善効果とその分子制御機構. *第5回日本再生医療学会総会*, 岡山, 2006.
  - 10) 寺井崇二, 坂井田功 : 肝臓再生療法の有用な間葉系幹細胞自動分離装置. *産業・知的クラスター (中国地域). 合同成果発表会*, 2006.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

寺井 崇二, 坂井田 功 (平成17年9月30日). 肝再生骨髄細胞画分 特願2005-286546.

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## Ⅲ－４．難治性の肝疾患に関する３回の全国疫学調査における二次調査結果の比較

難治性の肝疾患に関する３回の全国疫学調査における二次調査結果の比較…………… 129  
札幌医科大学医学部 公衆衛生学教室 教授 森 満

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 難治性の肝疾患に関する3回の全国疫学調査における二次調査結果の比較

研究協力者 森 満 札幌医科大学医学部 公衆衛生学教室 教授

**研究要旨：**難治性の肝・胆道疾患に関する研究班と特定疾患の疫学に関する研究班とが共同で行った3回の全国疫学調査の二次調査から、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、自己免疫性肝炎（AIH）、および、劇症肝炎（FH）の臨床疫学像の年次推移を検討した。PBCの年次推移としては、発症時や診断時の高齢化、AMA陽性割合の減少、腹水・静脈瘤破裂・肝性脳症の併発割合の減少、死亡割合の減少、UDCA投与割合の増加が示された。また、AIHの年次推移としては、発症時や診断時の高齢化、膠原病合併割合の増加、肝疾患既往歴割合の減少が示された。そして、FHの年次推移としては、A型肝炎感染関連割合の減少、B型肝炎感染関連割合の増加、薬物・薬剤服用関連割合の増加、消化管出血併発割合の減少、死亡割合の減少が示された。しかし、一次調査や二次調査の低回答率が結果に影響している可能性があるため、臨床調査個人票の集計に基づく報告なども加味して総合的に判断する必要があると考えられた。

#### A. 研究目的

難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班（大西三朗・主任研究者）と特定疾患の疫学に関する研究班（永井正規・主任研究者）とが共同で原発性胆汁性肝硬変（以下、PBC）、自己免疫性肝炎（以下、AIH）、および、劇症肝炎（以下、FH）に関する全国疫学調査を行い、その一次調査の結果については、大浦、他が本研究業績集に報告した<sup>1)</sup>。このたび、今回の調査を含めて過去3回の全国疫学調査における二次調査の結果から、臨床疫学像の年次推移を検討したので報告する。

#### B. 研究方法

1990年（1回目）<sup>2)</sup>、1997年（2回目）<sup>3)</sup>、および、2005年（3回目）<sup>1)</sup>に、それぞれの前年である1989年、1996年、2004年1年間に診療した難治性の肝疾患（PBC、AIH、FH）の患者に関する全国疫学調査を行った。1回目の調査は、内科、外科、小児科のうちのいずれかのある200床以上の病院すべてを調査の対象とした。一方、2回目と3回目の調査は、特別階層病院を設定した層化無作為抽出法によって行った。二次調査では、一次調査の報告患者すべてを対象として、その臨床所見などに関して調査票に記入して返送してもらうように主治医に依頼した。なお、3回目の調査のみ、文書による患者本人に対する説明と同意を得ることとした。

一次調査では1年間に受診した全国の患者数の推計を主たる目的であった<sup>1)</sup>。二次調査では、一次調査で症例のあった施設の担当医が個々の症例に関して人口学的変数に関する項目、受療状況、臨床所見などを報告したが、それらのデータを活用して、統計解析用ソフトウェアであるSAS Ver. 9.1を用いてWilcoxon-Mann-Whitneyの検定（傾向性の検定）などを行って、難治性の肝疾患の臨床疫学像の年次推移を検討した。

#### C. 研究結果

表1に、一次調査の回収率、一次調査の報告患者数、二次調査が完了した患者数、および、その一次調査の報告患者数に対する割合を示した。3疾患とも、2回目の調査と比べて3回目の調査の方が二次調査を完了した患者の割合が低かった。

表2のとおり、過去3回の二次調査によるPBCの年次推移では、発症時や診断時の年齢が有意に高くなる傾向がみられ、抗ミトコンドリア抗体（AMA）陽性の割合が有意に減少する傾向がみられた。また、腹水の併発、静脈瘤破裂の併発、および、肝性脳症の併発の割合が有意に減少し、死亡の割合が有意に減少する傾向がみられた。さらに、ウルソデオキシコール酸（UDCA）を投与していた割合が有意に増加する傾向がみられた。

表3のとおり、過去3回の二次調査によるAIHの年次推移では、発症時や診断時の年齢が有意に高くなる傾向がみられ、膠原病を合併していた割合が有意に増加する傾向がみられた。また、肝疾患の既往歴を有する割合が有意に減少する傾向がみられた。さらに、黄疸を併発した割合が有意に増加する傾向がみられた。

表4のとおり、過去3回の二次調査によるFHの年次推移では、IgM型HA抗体陽性の割合が有意に減少し、IgM型HBc抗体陽性の割合が有意に増加し、薬物・薬剤の服用歴がある割合が有意に増加する傾向がみられた。また、消化管出血併発の割合が有意に減少し、死亡の割合が有意に減少する傾向がみられた。

#### D. 考察

2回の全国疫学調査で得られた1990年（1回目）と1997年（2回目）のデータの比較を以前に報告<sup>4-6)</sup>したが、今回、2005年（3回目）のデータを加えて解析したところ、以前に示された結果と符合していた部分と異なっていた部分がみられた。

PBCでは、患者の平均年齢が上昇し、死亡割合が減少し、腹水の併発割合が減少し、UDCA投与の割

合が増加していたが、これは以前の報告<sup>6)</sup>と符合していた。しかし、抗ミトコンドリア抗体陽性割合の減少については、以前の報告<sup>6)</sup>では有意ではなかった。

AIHでは、患者の平均年齢が上昇していたが、これは前回の報告<sup>6)</sup>と符合していた。しかし、膠原病を合併していた割合の増加と、肝疾患の既往歴があった者の割合の減少に関しては、以前の報告<sup>6)</sup>では有意ではなかった。

FHでは、A型肝炎関連の割合が減少し、B型肝炎関連の割合が上昇し、薬物や薬剤関連の割合が上昇し、消化管出血併発の割合が減少していたが、これは前回の報告<sup>6)</sup>と符合していた。しかし、死亡の割合の減少は、以前の報告<sup>6)</sup>では有意ではなかった。

患者数や臨床疫学像の年次推移を把握することは、全国疫学調査を行うことの主要な目的の一つであると考えられ、3回の全国疫学調査の比較からその年次推移を検討することができた。しかし、今回の比較研究で観察された年次推移については、一次調査や二次調査の回答率が低いことによるバイアスが入っている可能性を否定することはできない。今後は、臨床調査個人票から得られる年次推移の結果とも照らし合わせてみる必要があるだろう。

## E. 結 論

3回の全国疫学調査の二次調査の比較から、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、自己免疫性肝炎(AIH)、および、劇症肝炎(FH)の臨床疫学像の年次推移を検討し、それぞれに疾患について、いくつかの傾向が示された。

## 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 なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## (謝 辞)

調査に関するご指導を賜りました1998年～2004年までの難治性の肝疾患に関する研究班・主任研究者の戸田剛太郎先生、同事務局長の銭谷幹男先生に深く感謝致します。調査にご協力下さいました多くの先生に深謝致します。資料の取りまとめをご担当下さいました名古屋大学大学院医学研究科健康社会医学専攻社会生命科学大講座予防医学・医学推計・判断学事務の服部秀美様に感謝致します。

## (参考文献)

- 1) 大浦麻絵, 大西浩文, 坂内文男, 他: 全国疫学調

査による難治性肝疾患の日本の患者数の推計. 特定疾患の疫学に関する研究班平成18年度研究業績集, 2007: In press.

- 2) 佐々木隆一郎, 鈴木貞夫, 玉腰暁子, 他: 難病の全国疫学調査による患者数の推計. 難病の疫学調査研究班平成2年度研究業績集: 27-29, 1991.
- 3) 森満, 小嶋雅代, 川村孝, 他: 難治性肝疾患の全国疫学調査成績. 特定疾患に関する疫学研究班平成8年度研究業績集: 23-27, 1997.
- 4) 森満, 小俣政男, 白鳥康史, 他: 原発性胆汁性肝硬変, 自己免疫性肝炎, および, 劇症肝炎に関する2回の全国疫学調査の比較研究. 特定疾患に関する疫学研究班平成9年度研究業績集: 94-98, 1998.
- 5) 森満, 小俣政男, 白鳥康史, 他: 原発性胆汁性肝硬変, 自己免疫性肝炎, および, 劇症肝炎に関する2回の全国疫学調査の比較研究. 第2報. 特定疾患に関する疫学研究班平成10年度研究業績集: 91-97, 1999.
- 6) 森満, 小俣政男, 白鳥康史, 他: 原発性胆汁性肝硬変, 自己免疫性肝炎, および, 劇症肝炎に関する2回の全国疫学調査の比較研究. 肝胆膵 38: 735-739, 1999.