

2例, 急性肝炎13例), 慢性肝不全24例51検体およびワーファリン経口投与中で肝障害がみられない15例66検体を対象とした。PT測定にはSTA試薬シリーズPT (ロシュ・ダイアグノスティックス), 全自動血液凝固線溶測定装置STAないしSTA-Rを用いた。

C. 研究結果

7年間の測定期間を通して%表記とINR表記の相関は変化しなかった。%表記の値をX, INR表記の値をYとすると $\text{Log } Y = -0.95 \text{ Log } X + 4.2735$ となり, この関係は急性, 慢性肝不全, ワーファリン投与患者の何れでも同様であった。PT40%に相当するINRは2.16であった。

D. 考察および E. 結論

年間にはPT測定キットの試薬などのロットは変化していると考えられるが, 単施設での検討ではPT (%)とINRの関連は変化しなかった。埼玉医科大学病院ではPT40%に相当するINRは2と設定して, これを劇症肝炎の基準に採用するのが可能と考えられた。

しかし, 試薬メーカーを対象とした調査では, PT測定キットは国内で19種類が販売されており, そのシェアはトロンボプラスチンCプラス (シスメックス) が29%, トロンボチェックPT (シスメックス) が25%, トロンボレルS (シスメックス) が29%, STA試薬シリーズPT (ロシュ・ダイアグノスティックス) が6%, ドライヘマトPT (和光) が6%である。これらキットのうちトロンボプラスチンCプラスでは正常新鮮プール血漿を用いた計測を各施設で実施し, その数値 (秒) から作成した標準曲線を基に, 検体のPT (%)を算出している。一方, INRは検体の測定値 (秒) を正常新鮮プール血漿の測定値 (秒) で割り, これの数値にロット毎に設定されたISI値を乗することで算出する。これに対してSTA試薬シリーズPTでは, 各施設で標準曲線を作成する必要がなく, ロット毎に設定されたバーコード情報を測定機器に入力すると, 自動的にPT (%)とINRが算出されるシステムを採用している。このため同一キットではPT (%)とINR値との関連は一定でも, キットが異なるとその関連性には大きな差異が生じる可能性があると考えられた。

そこで, WG-1では構成員の施設を対象に検査部で採用しているキットを調査し, 施設ごとにPT (%)とINR値との関連を評価し, 比較することを決定した。

②劇症肝炎, 急性肝不全の概念の改変

B. 研究方法

研究班の所属施設を対象に2006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, その実態を検討した。対象は血清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PT50%以下またはINR1.5以上を示した症例である。また, 平成19年度に実施した1998~2005年に発症した急性肝不全症例に関する調査に登録された353例を対象に3

次調査を実施し, 劇症肝炎, LOHFを除外した170例に関しても同様に実態を検討した。

C. 研究結果

2006年は51例が登録され, 1998~2005年の発症した170症例と合計すると計221例 (9~79歳) が解析対象となった。

病型は, 亜急性肝炎非昏睡型19例, アルコール性肝炎30例 (昏睡Ⅱ度以上出現10例, PT 40%以下9例), acute-on-chronic23例 (昏睡Ⅱ度以上出現8例, PT 40%以下6例), 急性肝炎および重症型147例 (昏睡Ⅱ度以上出現するがPT40%以上3例), 劇症肝炎, LOHFの類型であるが肝炎以外が成因の急性肝不全2例 (急性型1例, 亜急性型1例) であった。

成因はウイルス性86例 (A型31例, B型急性感染例32例, B型キャリア例15例, B型判定不能1例, C型3例, E型3例, ヘルペス1例), 薬物アレルギー29例, 自己免疫性15例, 成因不明例46例, 分類不能例0例, アルコール性30例, 薬物中毒6例, 循環障害5例, 悪性腫瘍1例, 代謝性2例, その他1例 (拒食症) であった。

D. 考察および E. 結論

研究班の施設を対象に劇症肝炎, LOHFとは診断できない急性肝不全の集計を実施し, 1998~2006年に発症した221例が登録された。しかし, うち178例は成因が劇症肝炎ないしLOHFと同様であった。アルコール性肝炎は30例, acute-on-chronicは23例登録されており, これらの実態に関する検討は可能であるが, 肝炎所見の認められない急性肝不全は15例に過ぎなかった。

従って, 消化器内科が中心の研究班施設を対象とした検討では, 肝炎所見の認められない急性肝不全の実態を解明することは困難と考えられた。当該症例は循環器内科, 血液内科, 救急救命部などで診療している可能性がある。そこで, WG-1構成員の7施設を対象に, 平成20年2月以降に全診療科における該当症例の状況をprospectiveに調査することに決定した。

③-1. 肝移植適応ガイドラインの改変: 従来法

B. 研究方法

対象は1998~2003年に発症した劇症肝炎症例で肝移植未施行の556例 (生存208例, 死亡348例)。昏睡Ⅱ度以上の脳症出現時における臨床成績を基に, 単変量解析及びステップワイズ法による多変量解析を実施した。

C. 研究結果

予後に寄与する因子としては, 単変量解析で年齢, 発症から昏睡Ⅱ度以上出現までの期間, 頻脈, 肝濁音界消失, 浮腫, 肝萎縮, アルブミン, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, 直接/総ビリルビン, ALT, アンモニア, HGF, 血小板数が抽出された。名義ロジスティックで有意と考えられる要因 ($p < 0.2$) としては, 直接/総ビリルビン, HGF, アンモニア, 年齢, PT (%), 肝萎縮, ヘパプラスチン, 血小板数, 発症から昏睡Ⅱ

度以上出現までの期間が、ステップワイズ法による多変量解析ではHGF、直接/総ビリルビン、肝萎縮、PT(%)、肝萎縮、発症から昏睡Ⅱ度以上出現までの期間、アンモニア、ATⅢ、血小板数、年齢、総ビリルビンの10項目が抽出された。ヒストグラム解析、探索的モデル作成により下記の6項目を選択し、ポイント割付で総得点による分類を試みた。

- 1) 発症から脳症まで：0=0~5日, 1=6~10日, 2=11日以上
- 2) PT(%)：0=20.1%以上, 1=5.1%~20.0%, 2=5.0%以下
- 3) TB：0=10mg/dl未満, 1=10~15mg/dl, 2=15mg/dl以上
- 4) D/T：0=0.7以上, 1=0.5~0.69, 2：0.5未満
- 5) 血小板数(万)：0=10.1以上, 1=5.1~10.0, 2=5.0以下
- 6) 肝萎縮：0=なし, 1=あり

総得点にて5点以上の症例における死亡率は84.1%であった。5点以上を死亡予測として、実際の予後と比較するとsensitivity 0.80, specificity 0.76, PPV 0.84, NPV 0.70であった。また、正診率は急性型75.0%、亜急性型87.1%で若干亜急性型が高いが、有意差は認められなかった。2004~2005年の肝移植非実施の劇症肝炎、LOHF129例(救命57例, 死亡72例)のうち欠損値のない83例を対象としたvalidationでは正診率は68.7%であった。

D. 考察およびE. 結論

スコア化するシステムを採用した新たな肝移植適応ガイドラインを作成した。正診率は急性型、亜急性型とも差異がなく良好で、sensitivity, specificity, PPV, NPVともに0.70以上の値が得られた。従来のガイドラインはspecificityが低いことが問題であったが、この課題は克服できたと考えられる。validationの対象例が少数であること、今回検討したdatabaseでは肝萎縮の観察された時期が明確でないことが問題として残る。昏睡Ⅱ度出現時における肝萎縮の有無を正確に評価し、さらに多数例でvalidationを実施することが、今後の課題である。

③-2. 肝移植適応ガイドラインの改変：データマイニング法

B. 研究方法

1998-2003年発症の劇症肝炎およびLOHF698例を対象とした。これらから、65歳以下、昏睡Ⅱ度の肝性脳症出現時に血液製剤を不使用、肝移植非施行の3条件を満たす369例(生存169例, 死亡200例)を分析対象として、クラスタリング解析を基に決定木手法によるモデリング解析を行った。尚、今回は初期解析であるため、Ⅱ度の脳症発現時のデータに限定せず、全経過の調査項目を対象として解析した。

C. 研究結果

予後に規定する要因としては合併症数が最も寄与が

大きく、次いでⅡ度以上の脳症出現5日後のプロトロンビン時間(PT)、脳浮腫、肝萎縮、その他の合併症(感染、脳浮腫、消化管出血、腎障害、DIC以外)の有無の順に予後決定因子が抽出された(図1)。

- 1) 合併症数2以上の症例(198例)：脳症出現5日後のPTが65%未満で、その他の合併症として、尿道出血、肺炎、右小脳出血、脳出血、急性呼吸不全、貧血、消化管穿孔、無気肺、溶血性貧血を発症しなかった177例中152例(A：86%)が死亡例であった。一方、PTが65%以上の13例では12例(92%)が生存した。
- 2) 合併症数1以下の症例：脳症出現後PTが35%以上の症例は107例で、うち98例(92%)が生存した。一方、PTが35%未満でも脳浮腫と肝萎縮が認められない18例は17例(94%)が生存した。しかし、脳浮腫ありまたは不明の26例中24例(B：92%)は死亡した。上記のうち、AとBの条件を満たす症例は176例で、死亡例の88%がこれに含まれていた。

D. 考察および E. 結論

データマイニング手法によると、従来の予後予測で重要とされた病型、ビリルビン濃度やD/T比は予後規定要因にはならず、PTとともに合併症、肝萎縮が上位因子として抽出された。これら因子を基に作成したアルゴリズムによると80%以上の確率で予後を予測することが可能であった。今後、Ⅱ度以上の脳症出現時のデータに限定したモデルも作成し、肝移植適応ガイドラインとしての有用性を評価する予定である。

F. 健康危険情報

なし

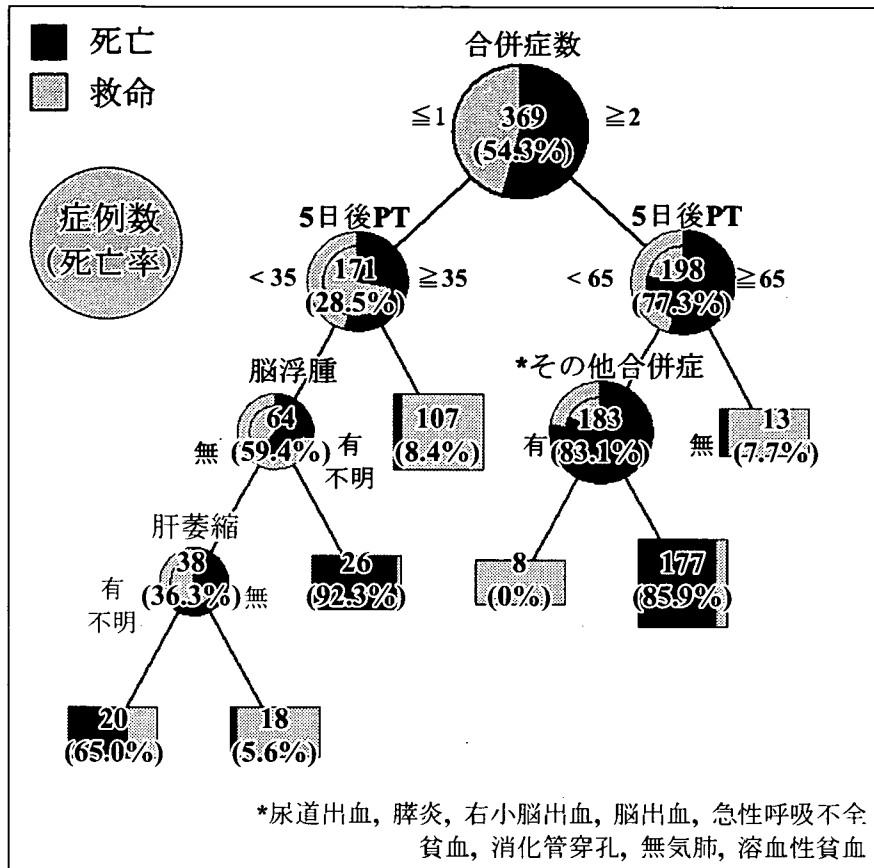
G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 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

図1 決定木法による劇症肝炎，LOHFの予後予測モデル



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

肝性脳症モデルにおける脳内神経性アミノ酸のリアルタイム解析

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: 【目的】肝性脳症は急性肝不全、慢性肝障害などの肝障害に伴い、様々な神経精神症状を示し、意識障害だけでなく、人格変化や行動異常をしめすものまで、症状はさまざまである。肝性脳症についていくつかの説が報告されているが、まだそのメカニズムは解明されていない状態である。今回我々は急性肝不全モデルを作成し、異常行動を観察したうえで、リアルタイムに神経性アミノ酸の変化を検討し、同時に脳の組織学的変化も検討した。

【方法】Wistarラットを用い以下の4群に分けた。1) アセトアミノフェン+3メチルコランセン群 (APAP+MC 群), 2) APAP 単独群 (APAP 群), 3) 3-MC 単独群 (MC 群), 4) 無投与群。①血中トランスアミナーゼ (ALT), NH₃, Tb, PT の測定, 肝臓の組織学的変化の検討。②スクラッチングテストシステムによる異常行動の定量化。③microdialysis 法を用いた異常行動時の神経性アミノ酸の測定。④抗GFAP 抗体を用いた脳内のアストロサイトのwestern blot, 免疫染色法による観察。

【結果】APAP+MC 群は生化学的にも、組織学的にも急性肝不全の所見を呈した。APAP+MC 群はジャンプ、ゲージのよじ登りといった異常行動が観察され4時間から7時間の間で有意にvertical activity (垂直方向の運動量) の増加を認めた。APAP+MC 群で4時間後からグルタミン酸 (Glu), アスパラギン酸 (Asp) といった興奮性アミノ酸の有意な上昇を認めた。また脳組織学的変化としてアストロサイトはwestern blot 法で有意な差を認めなかったが、免疫染色でアストロサイトの腫大といった形態変化を認めた。

【考察】APAP+MC 群は急性肝不全を起こし、肝性脳症の一症状である興奮行動と類似した異常行動を示した。同時に脳内の興奮性アミノ酸であるGlu, Aspの有意な上昇を認めた。よって、異常行動の発現にGlu, Aspの上昇が関与していることが示唆された。また同時にアストロサイトの形態変化が認められたことから、アストロサイトの形態変化がこれら神経性アミノ酸の変化、異常行動出現の原因となりうることを示唆された。(liver international 2008)

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
播磨夕美子 山口大学大学院医学系研究科
消化器病態内科学

A. 研究目的

肝性脳症は急性肝不全、慢性肝障害などの肝障害に伴い、様々な神経精神症状を示し、意識障害だけでなく、人格変化や行動異常をしめすものまで、症状はさまざまである。肝性脳症の原因について、いくつかの説が報告されているが、まだそのメカニズムは解明されていない状態である。現在までいくつかの肝性脳症モデルで脳内神経伝達物質やレセプターの変化が報告されている。しかし、現在まで肝性昏睡Ⅲ度にあたるような興奮状態をしめす肝性脳症モデルは報告がなく、また異常行動が出現しているときのリアルタイムな脳内の神経伝達物質の変化をとらえた報告もない。今後、肝性脳症のメカニズムを解明していく上で各昏睡度における肝性脳症モデルでの研究が必要と考える。そこで、我々は異常行動を伴う初の急性肝不全肝性脳症モデルを作成した。さらに異常行動時の神経性アミノ酸の変化と脳の組織学的変化について検討した。

B. 研究方法

急性肝不全、肝性脳症モデルの作成 ;APAP+MC model

雄のWistarラット (250-300g) を使用した。急性肝不全肝性脳症モデル (APAP+MC model) はacetaminophen (APAP) と3-methyl-cholanthrene (MC) の併用投与し作成した。コントロール群は3群作成した [APAP 単独群 (APAP); 3-MC 単独群 (MC); 無投与群]。肝障害は生化学的検討と組織学的検討を行った。生化学的検討として、血清の総ビリルビン、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、プロトロンビン時間、アンモニア (NH₃) を測定した。組織学的検討として、APAP投与8時間後の肝組織をヘマトキシリンエオジン染色し観察した。

行動観察

我々は垂直方向の運動量 (vertical activity) を数値化するため、スクラッチングテストシステム (Neuroscience, Tokyo, Japan) を用いた。ラットの後頭部に小さな正方形のマグネットを接着させ、周囲に金属コイルの巻いてあるプラスチックゲージラットを入れる。Faradayの法則により発生したコイル電流は電圧に変換された数値として標示される。垂直方向により素早く高く動くほど、より大きな値として記録される。

異常行動時の神経性アミノ酸の測定 (マイクロダイアリシス法)

測定日の5日前にpentobarbital (50mg/kg) での麻酔下で海馬〔十字縫合より+0.28mm (sagittal), -0.2mm (lateral), -0.2mm (depth)〕にguide cannulaを挿入する。測定時にラットのguide cannulaにprobeを挿入することで脳内の神経伝達物質はprobeの先端にある半透膜を介して、回収されてくる。この方法により、ラットの行動変化を観察しながらリアルタイムに変化時の神経性アミノ酸の変化を観察することができる。神経性アミノ酸は高速液体クロマトグラフィー (JASCO PU-980, Tokyo, Japan) により測定した。

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) を用いた海馬のアストロサイトの観察

免疫染色法:

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) はアストロサイトに存在する構造蛋白でありアストロサイトのmarkerとしてよく用いられる。抗GFAP抗体を用い、Western blot法、免疫染色法を用いてアストロサイトの変化について検討を行った。

C. 研究結果

急性肝不全モデルの証明

APAP+MC群において、血液中のアンモニアは投与3時間からその他の群と比較し有意に上昇した。また、APAP+MC群において無投与群、MC群と比較しALTは投与3時間から有意に上昇し、さらに投与6時間でAPAP群と比較しても有意に上昇した。一方、APAP群でアンモニア、ALTとも上昇傾向にあるものの有意差を認めなかった。またAPAP+MC群において総ビリルビンは投与6時間でその他の群と比較し有意に上昇していた。APAP+MC群において、その他の群と比較しプロトロンビン時間が投与3時間で有意に延長し ($p < 0.05$)、投与6時間ではさらに延長した。

また、APAP+MC群の肝組織は広範な中心小葉性の壊死を認めた

APAP+MC群は生化学上、組織学上も急性肝不全の所見を認めた。

急性肝不全時の興奮行動の観察

APAP+MC群では、APAP投与後4時間から6時間の間でジャンプ、さらにゲージをよじ登るといった異常行動をしめた。一方、その他の群でそのような行動は示さなかった。またスクラッチングテストシステムの結果、APAP+MC群ではAPAP投与4時間後からその他の群と比較しvertical activityの有意な上昇が認められ ($p < 0.05$)、6時間でピークに達した (38倍)。その後、運動量は低下していき、投与8時間前後で死亡した。その他の群において、vertical activityは変化を認めなかった。

急性肝不全時の神経性アミノ酸の変化

APAP+MC群で、APAP投与4時間後からグルタミン酸 (Glu)、アスパラギン酸 (Asp) は有意に上昇した〔投与4時間でAspは16.1倍まで達し、投与7時間でGluは23.9倍に達した ($p < 0.05$)〕。一方、APAP単独群、

MC単独群、無投与群は投与前と比較して脳内アミノ酸に有意な変化は認められなかった。また、グルタミン (Gln) はいずれの群に関しても有意な変化は認められなかった。

急性肝不全に伴うアストロサイトの変化

Western blotの結果、すべての群においてGFAPの発現に差は認めなかった。APAP+MC群において、その他の群と比較しアストロサイトの数に有意な変化は認めなかった。しかし、個々のアストロサイトを観察してみると、APAP+MC群において、アストロサイトは、正常のアストロサイトと比較し、細胞体が腫大し、primary processesは太くなり、peripheral processesは細く波打つような変化を認めた。我々はそのアストロサイトをmossy astrocyteとし、countした。APAP+MC群において、mossy astrocyteの比率はその他の群と比較し有意に増加していた。

D. 考察

今回我々は興奮性神経性アミノ酸と異常行動 (ジャンプ行動、vertical activityの上昇) の関係を明らかにした初の急性肝不全時肝性脳症モデルを開発した。さらに、それらの変化と同時にアストロサイトの形態変化を観察することができた。

【興奮性神経性アミノ酸 (Glu, Asp) と肝性脳症時の興奮行動の関係】

Glu, Aspは脳内では興奮性神経性アミノ酸として働く。今回、急性肝不全時の興奮行動を伴う異常行動に、シナプス間隙中のGlu, Aspの上昇が関わっていることを示した。これまで、急性肝不全の肝性脳症モデルで脳内のGlu, Aspの変化についていくつか報告されている。意識レベルの低下に伴いGluが上昇するとの報告がある一方で、意識レベルとAspの濃度の間には関係がないとの報告もあり、確立した意見が無いのが現状である。しかし今までの報告と違い、我々は急性肝不全の興奮行動時にシナプス間隙中の興奮性アミノ酸の上昇をリアルタイムに測定することができた。肝性脳症は様々な精神神経症状を示すため、各々の症状に対して脳内の変化を考える必要があるのではないかと考える。このAPAP+MC modelは肝性脳症の原因を解明するための有用なモデルであると考えられる。

【肝性脳症とアストロサイトの形態変化の関係】

APAP+MC modelにおいてGFAP染色でアストロサイトの形態変化が認められた。アストロサイトは脳内の代謝の調節のための多くの役割を担っている。アンモニアは主にアストロサイトで代謝される。Gluはglutamate/aspartate transporterやGLT-1によりアストロサイト内へ輸送され、アンモニアとGluからGlnへ代謝される。アストロサイトの機能が正常であれば、Gluはアンモニア上昇時に代謝されシナプス間隙中では増加しない。またアンモニア負荷時、シナプス間隙中のGlnはアストロサイト内でGlnが定常状態に達した後、増加するとの報告がある。しかし我々のモデル

ではアンモニア上昇時にシナプス間隙中のGluは上昇し、一方、Glnは増加しなかった。また、我々のモデルでアストロサイトの形態変化を認めたことから、このアストロサイトの変化がアストロサイトの機能障害を引き起こしGlu、Aspの上昇に関与していると考えられる。

【今後の展望】

今後、脳内のアストロサイトの変化をとらえる非侵襲的なマーカーを検討し、さらに劇症肝炎の予測のマーカーとして臨床応用可能かを検討していく。

E. 結 論

我々は、興奮性アミノ酸と異常行動の関係を明らかにした新しい肝性脳症モデルの開発に成功した。さらにアストロサイトの形態変化は急性肝不全時の興奮性アミノ酸の上昇、異常行動の出現に関与していることが示唆された。今後肝性脳症の原因を明らかにしていく上で有用なモデルと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Isobe-Harima Y, Terai S, Miura I, et al : A new hepatic encephalopathy model to monitor the change of neural amino acids and astrocytes with behavior disorder. *Liver Int* 28 : 117-125, 2008.
- 2) Isobe-Harima Y, Terai S, Segawa M, et al : Serum S100b (astrocyte-specific protein) is a useful marker of hepatic encephalopathy in patients with fulminant hepatitis. *Liver Int* 28 : 146-147, 2008.

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

G-CSFの肝再生抑制効果：IL-1 β の役割

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分野 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。近年になり、骨髄液中には、赤血球、免疫リンパ球、血小板を作り出す血球幹細胞の他に、骨、軟骨、脂肪、心臓、神経、肝臓など多様な細胞に分化する性質を持った間葉系細胞が存在することが明らかになってきている。骨髄中に存在するこのような幹細胞が報告されて以来、再生医療の新たな細胞源として骨髄細胞が注目されてきた。しかし、成熟肝において肝幹細胞は障害に反応し、増殖、分化するといわれているが、それらがどのように関与し、またどこから誘導されているかは未だ明らかにされていない。granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) は造血や免疫反応を調節するのに重要な役割を果たすサイトカインであり、骨髄での好中球の著しい増加を起こし、末梢血中に好中球および幹細胞を誘導することが知られている。肝疾患におけるG-CSFの役割は未だ不明な点が多い。そこでdimethylnitrosamine (DMN) 肝障害モデルにおいてG-CSFの効果を検討した。

共同研究者

永木 正仁 岐阜大学医学部 腫瘍制御学講座
消化器病態学分野
小木曾富生 岐阜大学医学部 腫瘍制御学講座
消化器病態学分野

瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患においてもG-CSFの役割が検討され、さまざまな疾患において投与が試みられている。しかし肝疾患におけるG-CSFの役割は未だ不明な点が多い。そこで今回我々はdimethylnitrosamine (DMN) 肝障害モデルにおいてG-CSFの効果を検討した。

A. 研究目的

肝臓は、他の臓器ではみられない強い再生力をもっており、肝切除や障害などによって肝細胞死が生じると、残存肝細胞は分裂増殖する。現在、肝不全患者に対して、生体肝移植による治療が行われているが、ドナー不足の問題、手術侵襲の問題、経済的な問題などがあり、普及するには障害が多い。近年になり、骨髄液中には、赤血球、免疫リンパ球、血小板を作り出す血球幹細胞の他に、骨、軟骨、脂肪、心臓、神経、肝臓など多様な細胞に分化する性質を持った間葉系細胞が存在することが明らかになってきている。骨髄中に存在するこのような幹細胞が報告されて以来、再生医療の新たな細胞源として骨髄細胞が注目されてきた。しかし、成熟肝において肝幹細胞は障害に反応し、増殖、分化するといわれているが、それらがどのように病態に関与し、またどこから誘導されているかは未だ明らかにされていない。また、さまざまな障害モデルに骨髄幹細胞の細胞移植が試みられ、筋肉や肝臓、脳、上皮系細胞へ分化するとの報告がされており、またマウスやヒトにおいて、組織障害下に骨髄細胞が肝細胞へ分化するとの報告も散見される一方、骨髄細胞の肝再生への寄与は少ないとの報告もある。

granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) は造血や免疫反応を調節するのに重要な役割を果たすサイトカインであり、骨髄での好中球の著しい増加を起こし、末梢血中に好中球および幹細胞を誘導することが知られている。G-CSFが、骨髄幹細胞を心筋梗塞組織に誘導し、血管細胞や心筋細胞への分化を促進させるとの研究も報告されている。また、クローン病や潰

B. 研究方法

ICRマウス（雌）にDMN (10mg/kg) をDay1-3に腹腔内投与後、Day4-7は休業し、1クールとした。Day0, 3にG-CSF (150 μ g/kg) を、control群では生理食塩水を皮下投与した。2クール終了時の生存率および、血清トランスアミン値、HE染色による肝障害の程度を検討した。また、Azan染色、肝内のヒドロキシプロリン量を用いて肝線維化の程度を検討した。proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色を用いて肝細胞増殖を、flow cytometryを用いて肝内炎症細胞浸潤を、ribonuclease Protection Assay (RPA) を用いて肝内サイトカインの発現をmRNAレベルで解析した。さらにinterleukin-1 β (IL-1 β) を中和する目的でIL-1 β 中和抗体 (200 μ g/body) をDay0, 7に投与し、2クール終了時の生存率、肝障害の程度、肝線維化の程度、肝細胞増殖の程度を検討した。さらに肝内の細胞周期関連蛋白の発現をWestern blot法にて検討した。

C. 研究結果

G-CSF投与による生存率、肝障害、肝線維化、肝細胞増殖の解析

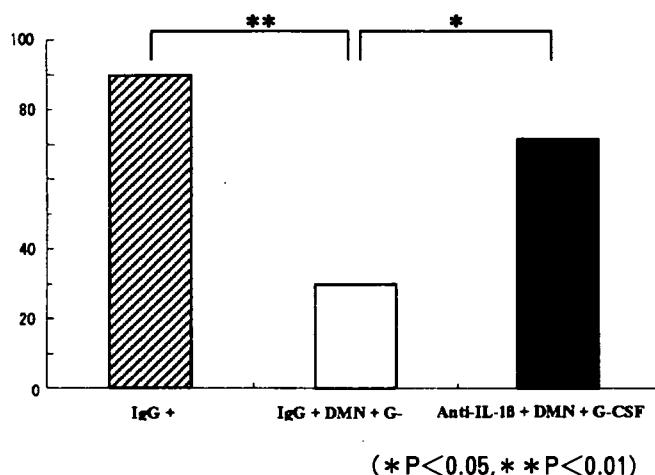
投与14日後の生存率は、DMN単独群82.3%に対し、G-CSF投与群では50%と、G-CSF投与により有意に低下した。肝障害の程度を検討したところ、血清ALT値はday4をピークに上昇し、day11には減少していたが、どの時点においても両群間に有意な差はなかった。また組織学的な検討では、DMNの投与により肝の線

維化の増大や小葉中心壊死、巣状壊死が惹起されたが、その程度は両群間では差がなかった。肝線維化を定量的に評価するためハイドロキシプロリン量を測定したが、両群間に差はなかった。しかしながら、PCNA染色を用いて肝細胞増殖を検討したところ、PCNA陽性肝細胞は、DMN単独群 $36 \pm 3\%$ に対し、G-CSF群 $10 \pm 0.8\%$ と、G-CSF投与により肝細胞増殖能は有意に低下していた ($P < 0.01$)。flow cytometryを用いて肝内炎症細胞浸潤を検討したところ、肝内浸潤白血球の総数はday4においてコントロール群に比して有意に増加していた ($P < 0.05$)。なかでもGr-1陽性、CD11b陽性の好中球数は、day4、11において有意に増加しており、G-CSFによって好中球が肝へ誘導されたと思われる。肝内サイトカインやケモカインmRNA発現をRPAにて解析したところ、IL-1Ra、IL-18、TNF α 、IFN β 、TGF β mRNAはどの時点においても両群間に差異はみられなかったが、G-CSF投与群でコントロール群に比してIL-1 α 、IL-1 β mRNAが有意に増加していた。

IL-1 β 中和による生存率、肝障害、肝線維化、肝細胞増殖の解析

IL-1は肝細胞のDNA合成を抑制することが知られている。G-CSF投与により認められた肝細胞増殖阻害作用がIL-1を介したものであるかどうかを検討するために、G-CSF投与マウスにIL-1 β 中和抗体を投与した。14日後の生存率は、抗体投与群70%、G-CSF単独群30%とIL-1 β 抗体により有意な改善がみられたが (図1)、一方、ALT値による肝障害、Azan染色やハイドロキシプロリン量に基づいた肝線維化には有意な差がみられなかった。

図1 IL-1 β 中和抗体投与14日後の生存率

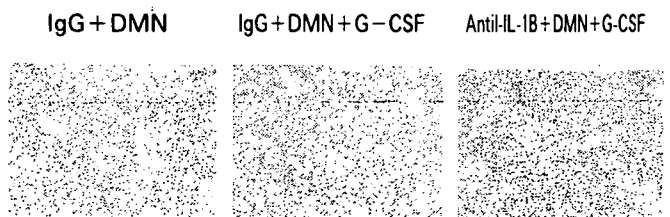


しかし、IL-1 β 抗体投与群のPCNA陽性肝細胞はDMN群と同等なレベルまで顕著に改善した (図2)。さらに、細胞周期関連蛋白の測定により、cyclin D1およびcyclin Eは、IL-1 β 抗体+DMN+G-CSF群やDMN群と比較してDMN+G-CSF群において減少していることが判明した。一方、CDKインヒビター (p21, p27) の発現は、DMN+G-CSF群で、他の2群

と比較して高いレベルで発現していた。これらの結果により、IL-1 β 中和抗体の投与によりG-CSF投与によって引き起こされる肝再生の抑制が改善されたと考えられた。

しかし、IL-1 β 抗体投与群のPCNA陽性肝細胞はDMN群と同等なレベルまで顕著に改善した (図2)。

図2 PCNA染色による肝細胞増殖の検討



さらに、細胞周期関連蛋白の測定により、cyclin D1およびcyclin Eは、IL-1 β 抗体+DMN+G-CSF群やDMN群と比較してDMN+G-CSF群において減少していることが判明した。一方、CDKインヒビター (p21, p27) の発現は、DMN+G-CSF群で、他の2群と比較して高いレベルで発現していた。これらの結果により、IL-1 β 中和抗体の投与によりG-CSF投与によって引き起こされる肝再生の抑制が改善されたと考えられた。

D. 考 察

dimethylnitrosamine (DMN) は多くの実験動物において急性肝障害を引き起こし、反復投与によって約4週間で肝硬変が形成され、肝不全によりマウスは死亡する。DMN肝障害モデルにおいてG-CSFが、肝前駆細胞を活性化し、生存率を改善させるのではないかと当初予想していたが、G-CSFの投与は、むしろ肝細胞増殖を阻害し、DMN投与マウスの死亡率を有意に増加させることが判明した。G-CSFによる肝細胞増殖阻害の原因を明らかにするため、肝組織中のサイトカイン発現をRPAにて検討したところ、G-CSF群ではIL-1 β mRNAが著明に増加していた。反対に肝細胞増殖の重要なサイトカインであるIL-6やTNF α 、肝細胞増殖の阻害因子であるTGF β はG-CSF投与群とコントロール群との間に差異はみられなかった。IL-1はさまざまな細胞により産生され、炎症や免疫応答において基本的な役割を果たしており、肝臓においても急性期の炎症反応をコントロールしている。また、IL-1は、培養肝細胞でのDNA合成阻害作用があり、肝細胞増殖を抑制することや、部分肝切除後のDNA合成の抑制に重要な役割を果たすことが報告されており、重要な肝再生抑制因子の一つである。

さらに、IL-1 β 中和抗体の投与により、DMN亜急性肝障害マウスにおいてG-CSFの投与によって引き起こされた肝細胞増殖阻害作用が改善され、生存率が有意に改善されたことが確認され、この結果はIL-1 β がDMN肝障害マウスの肝細胞増殖において重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。

E. 結 論

以上より、今回の研究により、急性肝障害時でのG-CSFの投与は慎重に考慮されるべきであると考えられた。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogiso T, Nagaki M, Takai S, et al :
Granulocyte colony-stimulating factor impairs liver
regeneration in mice through the up-regulation of
interleukin-1 β . J Hepatol 47 : 816-825, 2007.

2. 学会発表

1) 小木曾富生, 永木正仁, 高井信治, 他 : マウス
DMN肝障害モデルにおけるG-CSFの肝再生抑制
効果 : IL-1 β の役割. 第11回日本肝臓学会大会.
神戸, 2007.

G. 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

急性肝障害劇症化の予知・予防に関するプロスペクティブスタディー

研究協力者 鈴木 一幸 岩手医科大学 第一内科 教授

研究要旨：【目的】急性肝炎劇症化の予知式をプロスペクティブに評価するとともに劇症化の予防法を検討する。【方法】2002年に定めた研究班の劇症化予知式および搬送基準（予測劇症化率20%）、特殊治療開始基準（予測劇症化率50%）に基づいて、岩手、青森、秋田、宮城4県の39研究協力施設において、PTが80%を下回った時点での急性肝障害例の臨床データを登録しプロスペクティブに評価した。【結果】1. 2004年8月から2007年12月までの41ヶ月間に適格症例147例が登録され、55例が搬送基準を満たし、41例が搬送された。2. 搬送基準を満たした55例中42例（76%）が重症化（PT40%以下）し、8例（15%）が昏睡を発現したが、搬送基準を満たさない症例で昏睡が発現した例はなかった。3. 予知効率は劇症肝炎対象成因例で高くそれ以外の症例では充分ではなかった。4. 劇症肝炎対象成因以外の急性肝障害例ではアルコール、敗血症・循環障害が多く、これらはPTの低下が著しいものの総ビリルビンの上昇程度が小さく、重症度過大評価の要因と考えられた。【結論】研究班の劇症化予知式に基づいた搬送基準は有効であったが、劇症肝炎の対象成因以外の成因による急性肝障害の予後評価に関しては肝不全の評価に加え合併症の評価が必要と考えられた。

研究協力者

滝川 康裕 岩手医科大学 第一内科 准教授
遠藤 龍人 岩手医科大学 第一内科 講師

A. 研究目的

劇症肝炎、遅発性肝不全を急性肝炎の段階で予知し、早期に治療を開始することにより、肝性昏睡発現の阻止あるいは救命率の向上に繋げられる可能性がある。この観点から、PT80%以下の時点での劇症化予知式を作成し、専門施設への搬送基準（予測劇症化確率20%）および特殊治療開始基準（予測劇症化確率50%）を設定した^{1)~3)}。この基準の有効性を評価するとともに、治療法の評価や新たな劇症化の要因、劇症化阻止に有効な治療法を検討する目的でプロスペクティブ多施設共同研究を行った。

また、昨年までの検討⁴⁾で、劇症肝炎の対象成因に比し、それ以外の急性肝不全の対象成因では予知式の有効性が劣ることが明らかになったため、その昏睡発現率から、予知式の成因項目を新たに定義し、プロスペクティブに検討を加えた。

B. 研究方法

岩手医科大学第一内科（岩手医大）を急性肝不全治療の専門施設として、岩手、青森、秋田、宮城4県の39施設と共同で患者登録、搬送システムを構築し、プロスペクティブスタディーを行った。

各協力施設において、PT80%以下を初めて確認した時点の急性肝障害患者の臨床データを、所定のFAX用紙を用いて岩手医大に登録し、逐次重症度および搬送基準、特殊治療開始基準の合否を判定し、搬送および治療法のアドバイスを行った。また、非搬送例に関しては、後日、転帰調査用紙を用いて転帰調査を行った。

尚、本研究の倫理性に関しては、岩手医科大学医学倫理委員会の審査および承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 登録症例の転帰

2004年8月から2007年12月までの間に適格症例147例が登録された。そのうち55例が搬送基準に合致した。そのうち8例に肝性昏睡が発現し6例が死亡した。搬送基準に合致しなかった92例に昏睡が発現した例はなかった（表1）。

2. 成因と予後予測効率

同様の検討を、成因別に行った。すなわち、わが国の劇症肝炎の対象成因に含まれるウイルス性（非A非B、成因不明も含む）、薬剤アレルギー性、自己免疫性に相当する101例（劇症肝炎対象成因群）とその他の成因による急性肝障害46例（その他の成因群）に分けて行った（表2）。搬送基準に合致した症例数（予測劇症化確率20%以上）は、その他の成因群の方がむしろ多かった。劇症肝炎対象成因群では、予測劇症化確率20-50%の例からの昏睡発現割合は11%、予測劇症化確率50%以上の例からは44%と、予測が実際をやや上回ったが、ほぼ的確な予知と考えられた。また、昏睡発現割合と致死率は一致した。一方、その他の成因群では重症化（PT40%以下）する割合が高いのに比して昏睡発現割合が低く、死亡割合が高いという結果であった。

劇症肝炎対象成因群について、予測劇症化確率の分布を3つの臨床病型（非重症化、重症化、昏睡発現）および生命予後で比較すると（図1）、予測劇症化確率は臨床病型間で有意の差を示し、昏睡発現例を比較的効率良く判別することが可能であった。また、予測劇症化確率が低いにもかかわらず、多臓器不全と消化管出血で死亡した2例を除くと、予測劇症化確率は生

命予後とも比較的強い関連を示した。

3. その他の成因群における劇症化予測効率

その他の成因群の成因と予後を(表3)に示す。症例数ではアルコールや敗血症・循環障害が大半を占め、これらでは昏睡発現例はない反面、死亡割合がそれぞれ31%、9%と高かった。一方、悪性腫瘍、術後肝不全、薬物中毒では、症例数は多くないものの、重症化する例、昏睡発現割合、致死率ともに高かった。そこで、劇症化予知式の成因項目を、アルコール、敗血症・循環障害では0、悪性腫瘍、術後肝不全、薬物中毒で1と定めて、予測劇症化確率と実際の転帰とを比較した(図2)。

その結果、予測劇症化確率は重症化例極めて高く、非重症化例と重症化例の判別には有効であったが、本来の目的である昏睡発現例の予知の効果はほとんどみられなかった。さらに、生存例と死亡例で重なりが大きく、生命予後の判別効果も高いとは言えなかった。

劇症肝炎対象成因群における予知とその他の成因群における予知の項率の差を検討するために、初回の予測劇症化確率と、経過中のPTの最低値とを比較したところ(図3)、予測劇症化確率20%前後の症例で、その他の成因群でPTが低値を示す傾向が強く認められた。また、初回予知時のPTと総ビリルビン(T.Bil)を比較しても、その他の成因群ではT.Bilに比しPTが低い傾向を示した。

D. 考 察

PT80%以下を示した急性肝障害147例のうち、52例(35%)が重症化し、8例(5.4%)に昏睡発現をみた。予測劇症化確率20%以下の症例すなわち専門施設搬送基準に満たない症例からの昏睡発現例はなく、予測劇症化確率20%以上、50%以上の症例からそれぞれ15%、33%の昏睡発現率であった。

我々の行っている劇症化予知・搬送システムでは、3段階の症例選別を行っている。すなわち、予知対象症例の選別(PT 80%以下)、専門施設への搬送症例の選別(予測劇症化確率20%)、特殊治療開始症例の選別(予測劇症化確率50%)である。第一段階の選別の目的は、昏睡発現する例を見落とすことなく予知対象に入れることにあるので、特異度は問題ではなく感度100%が要求される。従って、本来であれば急性肝障害例全症例を対象とすべきであるが効率の点からPT80%としている。第二段階の選別の目的は、劇症化する可能性が比較的高い症例を専門施設で緊急対応可能な状況で厳重な監視下に置くことにあるので、ここでも特異度よりも感度すなわち昏睡発現する症例を見落とさないことが要求される。これに対し、第三段階の選別の目的は、近い将来昏睡発現する確率が極めて高いので、早期に特殊治療を開始すべき症例を診断することにあるため、過剰な治療行為を避ける必要性から、感度よりも高い特異度が要求される。今回の147例の検討で、搬送基準(予測劇症化確率20%)に満たない症例からの昏睡発現がなく、満たした症例の15%に昏睡発現がみられた点は、第一、第二の選別の目

的を充分果たしていると考えられる。また、第三の選別に関しては、劇症肝炎対象成因群では、感度67%、特異度95%、陽性結果予測値44%であったことから、ほぼ目的を果たしていると考えられる。これに対し、その他の成因群では、感度50%、特異度89%、陽性結果予測値17%であり、必ずしも充分とは言えなかった。しかも、昏睡発現率に比し、致死率が高い傾向にあり、肝不全とは別の原因で死亡する可能性が高いと考えられた。

今後は全症例の31%に及ぶ、劇症肝炎の対象成因外の急性肝不全に対し、どのような予知・搬送・治療システムを取っていくかが大きな課題と考えられる。今回、現在の予知システムの成因項目を、それぞれの昏睡発現率に沿った形で修正して検討したが、十分な予知効率は得られなかった。その原因を解析すると、その他の成因群では、肝不全の程度に比してPTが低下する傾向が強く、DICの合併率が高いための現象と推定された。

今後、国際的な疾患定義に準じて、急性肝不全症候群として症例を扱うことを想定すると、重症度・予後診断のためには、肝不全の評価に加えて、DIC診断や多臓器不全の診断も含めた重症度評価が必要になると考えられる。その観点から、急性期DIC診断基準、SOFA score、SIRS scoreなどを含めた複合的な予後評価システムが重要になると考えられる。

また、本来の目的が、早期予知、専門施設搬送、早期集中治療開始による救命割合の向上でありことから、このシステムによる肝不全の救命率向上の評価も重要と考えられ、多施設間の治療法の統一による救命割合の評価も進める必要があると考えられた。

E. 結 論

1. PT80%以下の急性肝障害例を対象とした予後予測および患者搬送システムを構築し多施設プロスペクティブスタディーを行った。
2. 登録患者147例中、55例(37%)が搬送基準に合致し、そのうち8例(15%)に昏睡が発現したが、搬送基準に満たない症例からの昏睡発現例はなかった。
3. 劇症化の予測効率は、劇症肝炎の成因対象例で高かったが、それ以外の成因による肝障害例では充分ではなかった。
4. それ以外の成因による肝障害例ではアルコール、循環障害/敗血症例が多く、これらはPT低下が著しいものの、T.Bilの上昇程度が小さく、肝不全の他に合併症の評価が重要と考えられた。
5. それ以外の成因による急性肝障害の予後評価に関しては判定基準の改良が必要と考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, et al : Interleukin-17 as new marker of severity of acute hepatic injury. *Hepatology* 37 : 248-254, 2007.
 - 2) Takikawa Y, Yasumi Y, Sato S, et al : A case of acute hepatitis E associated with multidrug hypersensitivity and cytomegalovirus reactivation. *Hepatology* 37 : 158-165, 2007.
 - 3) Kumagai I, Abe K, Oikawa T, et al : A male patient with severe acute hepatitis who was domestically infected with a genotype H hepatitis B virus in Iwate, Japan. *J Gastroenterol* 42 : 168-175, 2007.
 - 4) Sainokami S, Abe K, Sato A, et al : load of hepatitis B virus (HBV), its changing profile and precore/core promoter mutations correlate with the severity and outcome of acute HBV infection. *J Gastroenterol* 42 : 241-249, 2007.
 - 5) 滝川康裕, 鈴木一幸 : 急性肝不全 治療戦略. *治療学* 41 : 343-347, 2007.
 - 6) 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸 : 劇症肝炎・肝不全の原因と病態. *Surgery Frontier* 14 : 126-132, 2007.
 - 7) 加藤章信, 鈴木一幸 : 肝性脳症 診断・検査. *日本消化器病学会雑誌* 104 : 344-351, 2007.
- ### 2. 学会発表
- 1) Takikawa Y, Suzuki T : The Effect of Artificial Liver Support on Acute Liver Failure. APDW, kobe, 2007.
 - 2) Takikawa Y, Suzuki T : Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan. 6th JSH Single Topic Conference. Morioka, 2007.
 - 3) Kato A, Suzuki K : Diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy by neuropsychological tests (NP tests). 6th JSH Single Topic Conference. Morioka, 2007.
 - 4) Yasumi Y, Takikawa Y, Watanabe Y, et al : Significance of a novel biomarker for hepatocellular apoptosis (caspase 3 - cleaved cytokeratin - 18 product) in acute and fulminant hepatic injury. DDW USA, Washington DC, 2007.
 - 5) Endo R, Takikawa Y, Suzuki K : Establishment and prospective verification of early prediction and patient transferring system for fulminant hepatic failure in Japan. 6th World Congress of the International Society for Apheresis, Yokohama, 2007.
 - 6) 八角有紀, 滝川康裕, 片岡晃二郎, 他 : 急性肝障害の劇症化におけるIL-17の関与. 第93回日本消化器病学会総会. 青森, 2007.
 - 7) 柿坂啓介, 滝川康裕, 八角有紀, 他 : 肝細胞の細胞生存および増殖シグナルの包括的検討: 増殖因子, Fasリガンド, 胆汁酸の影響. 第43回日本

肝臓学会総会. 東京, 2007.

- 8) 佐原圭, 加藤章信, 滝川康裕, 他 : 急性肝不全モデルラットにおける脳内血管内皮細胞マーカー遺伝子の変化 体温調節による影響. 第43回日本肝臓学会総会. 東京, 2007.
- 9) 八角有紀, 滝川康裕, 佐藤彰宏, 他 : 抗IL-17抗体によるマウス急性肝障害の抑制. 第43回日本肝臓学会総会. 東京, 2007.
- 10) 三浦典正, 遠藤龍人, 中山伸朗, 他 : 劇症肝炎の予後予測マーカーとしての血清TGF- α mRNAの臨床的意義. 第43回日本肝臓学会総会. 東京, 2007.
- 11) 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸 : High-flow HDF主体の血液浄化を余儀なくされつつも救命し得た亜急性型劇症肝炎. 第11回日本肝臓学会大会 ワークショップ4 症例から学ぶ急性肝不全. 神戸, 2007.
- 12) 日下部篤宣, 田中靖人, 狩野吉康, 他 : B型肝炎劇症化に寄与するウイルス因子の検討. 第11回日本肝臓学会大会. 神戸, 2007.
- 13) 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸, 他 : EBM時代の劇症肝炎治療はどうあるべきか 急性重症肝炎における劇症化阻止に対する血液浄化療法の有効性評価 観察研究による治療効果の推定は可能か? 第33回日本急性肝不全研究会. 東京, 2007.
- 14) 佐藤彰宏, 滝川康裕, 柿坂啓介, 他 : 劇症肝炎診断基準におけるプロトロンビン時間の意義と表記法に関する検討. 第104回日本内科学会総会. 大阪, 2007.

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

(参考文献)

- 1) 鈴木一幸, 他 : 急性肝炎重症型の劇症化予知に関するprospective study. 厚生労働省 特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」平成13年度総括・分担研究報告書. 104-109, 2002.
- 2) Takikawa Y, Endo R, Suzuki K, et al : Prediction of hepatic encephalopathy development in patients with severe acute hepatitis. *Dig Dis Sci* 51 : 359-364, 2006.
- 3) 鈴木一幸, 他 : 急性肝炎の劇症化予知に関する研究. 厚生労働省 特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」平成15年度総括・分担研究報告書. 85-89, 2004.
- 4) 鈴木一幸, 他 : 急性肝炎の重症化要因に関するプロスペクティブスタディー. 厚生労働省 難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する研究」平成18年度総括・分担研究報告書. 107-110, 2007.

表1 予測劇症化確率と予後との関連（全症例）

予測劇症化確率	n	重症化(PT<40%) (%)	昏睡発現 (%)	致死率 (%)
<20%	92	11 (12)	0 (0)	3* (3.3)
20~50%	40	28 (70)	3 (23)	11 (28)
>50%	15	13 (87)	5 (33)	8 (53)

*:他疾患（悪性腫瘍，甲状腺クリーゼ等含む）

表2 予測劇症化確率と予後との関連（成因別）

予測劇症化確率	n	重症化(PT<40%) (%)	昏睡発現 (%)	致命率 (%)
劇症肝炎成因 (101)				
<20%	74	6 (8.1)	0 (0)	2 (2.7)
20~50%	18	9 (50.0)	2 (11)	2 (11.0)
>50%	9	7 (78.0)	4 (44)	4 (44.0)
他の成因 (46)				
<20%	18	5 (28)	0 (0.0)	1 (5.6)
20~50%	22	19 (86)	1 (4.5)	1 (4.5)
>50%	6	6 (100)	1 (17.0)	4 (67.0)

図1 肝障害の予後，生命予後と予測劇症化確率：劇症肝炎対象成因

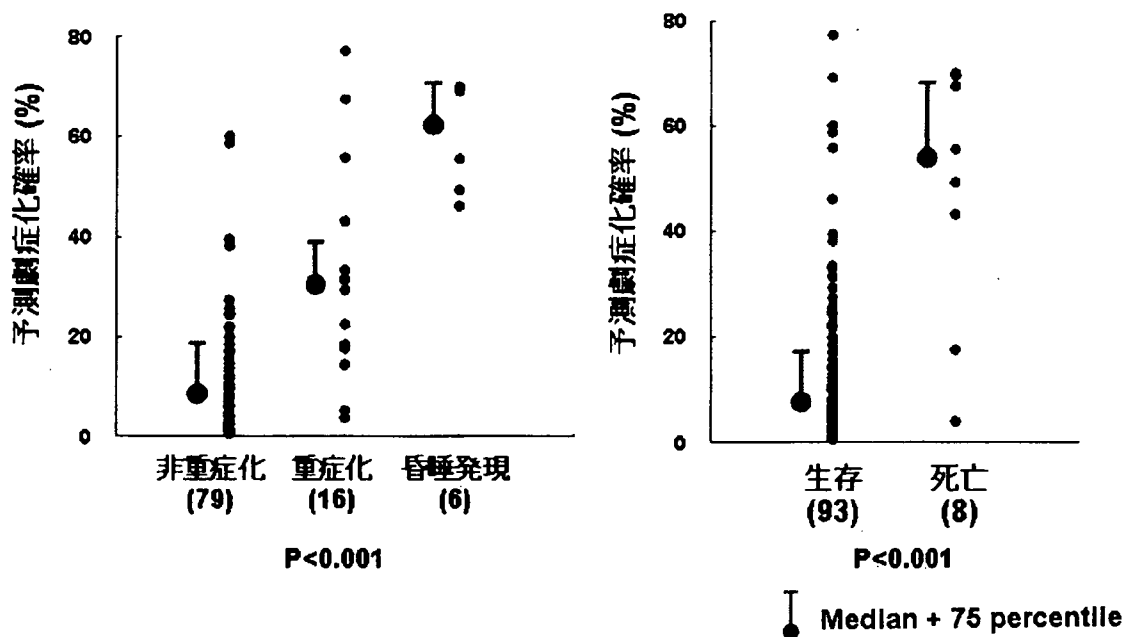


表3 劇症肝炎対象成因以外の昏睡発現率と予後

	搬送基準合致例			全症例		
	n	昏睡発現率 (%)	致死率 (%)	n	昏睡発現率 (%)	致死率 (%)
アルコール	11	0	36	16	0	31
敗血症・循環障害	11	0	18	23	0	8.7
悪性腫瘍・術後肝不全他	4	50	100	4	25	100
薬物中毒	2	50	50	3	33	33
系	28	11	39	46	4.3	26
劇症肝炎対象成因	27	22	22	101	5.9	7.9

図2 肝障害の予後、生命予後と予測劇症化確率：その他の成因

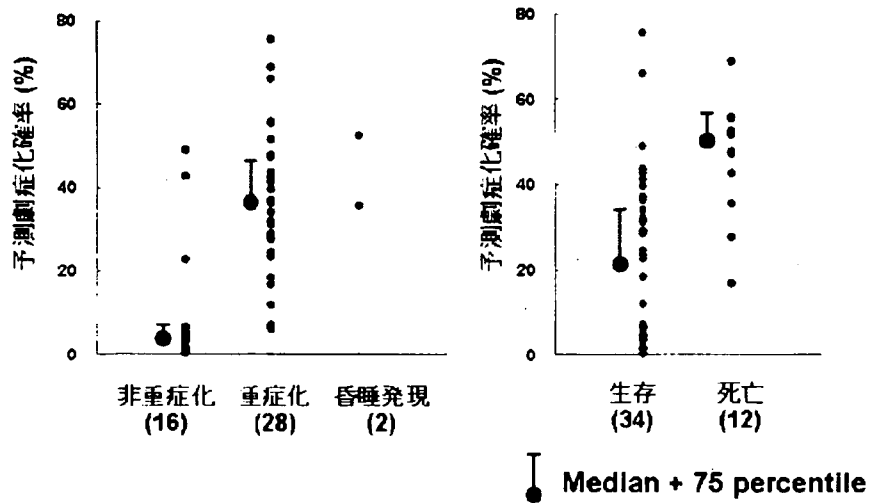


図3 初回の予測劇症化確率と経過中最低PT値との関連

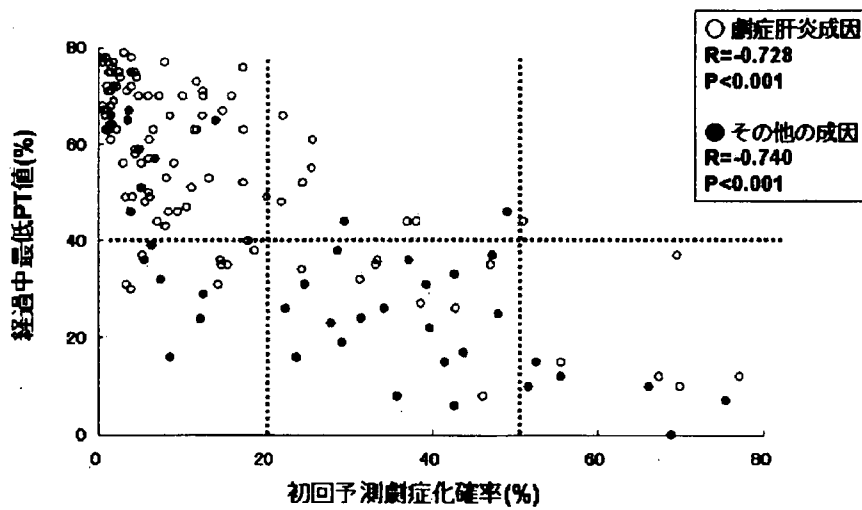
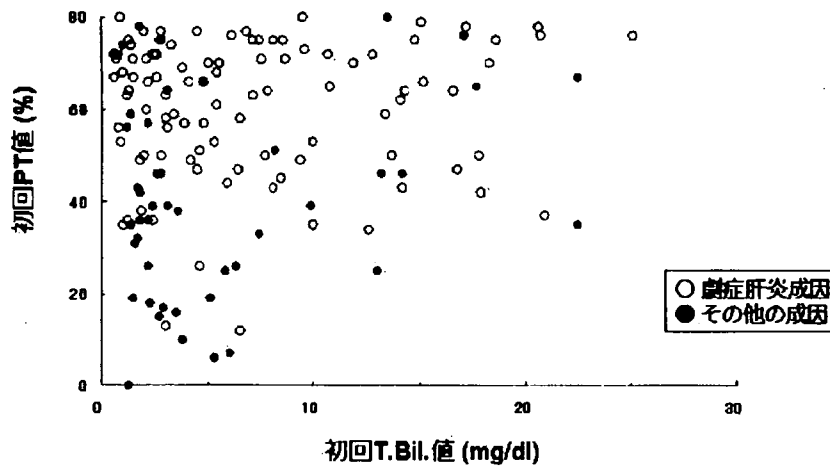


図4 登録時T.BilとPTの分布：成因区分による差異



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

肝再生不全に対する低アディポネクチン血症の関与—その脂肪酸代謝の障害について

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：前年度、アディポネクチン欠損マウスの70%部分肝切除後の肝再生において再生の遅延が見られることを明らかにしたが、本年度はその低アディポネクチン血症における肝再生遅延の原因を明らかにする目的で、その脂肪酸代謝障害について検討をすすめた。【方法】野生型、アディポネクチン（APN）欠損マウスに70%部分肝切除（Phx）を施行し、以下の検討をおこなった。1) 肝細胞増殖の評価として残肝重量/体重比、肝細胞のBrdU取り込み、PCNA蛋白の発現を検討した。2) 再生早期におけるTNF α 、IL-6の血清濃度と遺伝子発現、前初期応答遺伝子の発現、3) 再生肝内のcyclin D1の蛋白発現、cyclin A2、cyclin B1の遺伝子発現をrealtime PCRで検討した。4) 再生肝内の中性脂肪含有量および脂肪酸代謝の制御因子であるCPT-1とPPAR- α の遺伝子発現を検討した。【成績】1) アディポネクチン欠損マウスの肝重量/体重比およびBrdU labeling indexは、PHx48、72hr後で、PCNA蛋白発現は48hr後で野生型に比し有意に低下していた。BrdU labeling indexは96hr後では逆にアディポネクチン欠損マウスで有意な高値を示した。2) 再生早期のTNF α 、IL-6の血清濃度および遺伝子発現、前初期応答遺伝子の発現には両群間に有意差を認めなかった。3) 再生肝内のcyclin D1蛋白発現は24hr後で、cyclin A2、cyclin B1の遺伝子発現は48、72hr後でアディポネクチン欠損マウスで有意に低下していた。4) 肝内中性脂肪含有量は72hr後でアディポネクチン欠損マウスで有意な高値を示し、肝内CPT-1の遺伝子発現は24、72hr後で、PPAR- α の遺伝子発現は72、96hr後で野生型に比しアディポネクチン欠損マウスで有意に低下していた。【結論】アディポネクチン欠損マウスではPHx後の肝細胞増殖の遅延、肝内脂肪蓄積の増加がみられた。再生肝内CPT-1、PPAR- α の遺伝子発現の低下がみられたことから、脂肪酸代謝の障害がこれらに関与している可能性が示唆された。低アディポネクチン血症において再生肝では脂肪酸代謝障害からATPなどのエネルギー産生障害が生じている可能性が考えられ現在検討をすすめている。

共同研究者

木曾 真一 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学
吉田 雄一 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学
江崎 久男 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学

A. 研究目的

これまで脂肪肝動物モデルや脂肪肝患者で肝再生が障害されることが示されており、臨床的にも生体肝移植において高度の脂肪肝はドナーの適応基準から外されている。また肝切除後の再生肝では肝細胞内に脂肪の蓄積がみられることが知られているがその意義や機序については十分解明されていない。アディポネクチンは肝の脂肪酸代謝に関与しており、その血中濃度は脂肪肝患者で低下している。私どもは、これまでの分担研究においてアディポネクチン欠損マウスをもちい、D-galactosamine (GalN) / lipopolysaccharide (LPS) の投与により作製した重症肝障害モデルにおいて、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。また、前年度70%部分肝切除後の肝再生においても再生の遅延が見られることを明らかにしたが、本年度はその低アディポネクチン血症における肝再生遅延の原因を明らかにする目的で、その脂肪酸代謝障害について検討した。

B. 研究方法

アディポネクチン血症の肝臓の再生への関与を検討するため、実験動物としてアディポネクチン欠損マウスを用いた。12週齢、雄の野生型およびアディポネクチン欠損マウスに70%部分肝切除術を施行し、経時的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。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realtime RT-PCRで検討した。TNF- α 、IL-6の血清濃度をEnzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法で、肝でのTNF- α 、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. 再生肝内のcyclin D1の蛋白発現、cyclin A2、cyclin B1の遺伝子発現をrealtime RT-PCRで検討した。
4. 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) 遺伝子ならびにPPAR- α の遺伝子の発現をrealtime RT-PCR

で検討した。

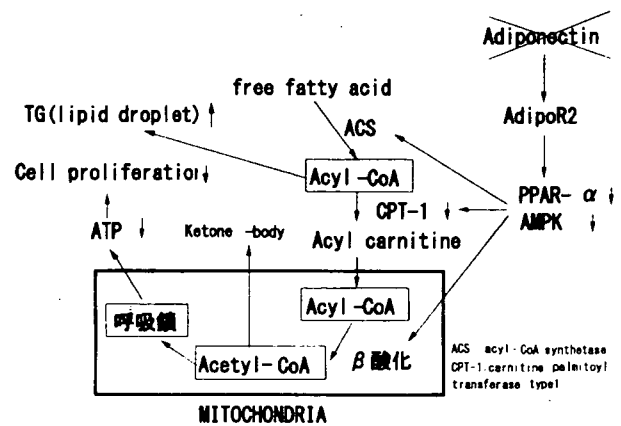
C. 研究結果

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/体重比およびBrdU labeling indexは、PHx48, 72hr後で、PCNA蛋白発現は48hr後で野生型に比し有意に低下していた。BrdU labeling indexは96hr後では逆にアディポネクチン欠損マウスで有意な高値を示した。これ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. 再生早期のTNF α , IL-6の血清濃度および組織中遺伝子発現, 前初期応答遺伝子の発現には両群間に有意差を認めなかった。
3. 再生肝内のcyclin D1蛋白発現は24hr後で、cyclin A2, cyclin B1の遺伝子発現は48,72hr後でアディポネクチン欠損マウスで有意に低下していた。
4. 部分肝切除後再生肝内の中性脂肪含有量は、48hrでは両群間でほぼ同様程度の増加を認めたが、72hr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。脂肪酸代謝 (β 酸化) の律速酵素であるCPT-1遺伝子の発現は、部分肝切除後6, 12, 72hr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 ($p < 0.05$)。また、PPAR- α の遺伝子発現は72, 96hr後で野生型に比しアディポネクチン欠損マウスで有意に低下していた。

以上よりアディポネクチン欠損マウスではPHx後の肝細胞増殖の遅延, 肝内脂肪蓄積の増加がみられた。再生肝内CPT-1, PPAR- α の遺伝子発現の低下がみられたことから、脂肪酸代謝の障害がこれらに参与している可能性が示唆された。低アディポネクチン血症において再生肝では脂肪酸代謝障害引き続いてATPなどのエネルギー産生障害が生じている可能性が考えられ検討をすすめている

D. 考 察

アディポネクチン欠損状態では、肝再生が遅延し、その脂肪酸代謝に障害が生じることが明らかになった。一般に糖質代謝によるエネルギー供給のほか、脂肪酸が β 酸化されることによりエネルギーが供給される。脂肪酸は、ミトコンドリアやペルオキシソームで酸化され、最終的には、アシルCoAをすべて経てアセチルCoAとなる。1分子の脂肪酸から β 酸化全体で129分子のATPが産生される。この脂肪酸酸化全体の調整経路には、核内受容体型転写因子のPPAR- α が関与し、CPT-1がその律速酵素であることが知られている。以下に今回の検討から考える脂肪酸代謝障害から生じる肝内中性脂肪沈着ならびにエネルギー代謝障害の仮説を提示する。



図中に示すように低アディポネクチン血症 (今回は、欠損状態) では、アディポネクチンからそのアディポネクチンレセプターを介したPPAR- β , AMPKの低下からCPT-1の低下やミトコンドリア内の β 酸化の障害が生じ、流入遊離脂肪酸からのATPなどのエネルギー産生が低下し肝細胞の増殖が遅延し、正常状態に比して多くの中性脂肪が再生肝内に沈着することが考えられた。

E. 結 論

アディポネクチン欠損状態において、再生肝内の脂肪酸代謝障害が生じ、肝再生遅延がおこ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

- 1) Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, et al : Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. J Hepatology 47 : 556-564, 2007.

2. 学会発表

- 1) Ezaki H, Saji Y, Yoshida Y, et al : Delayed liver regeneration and impaired fatty acid metabolism in adiponectin knockout mice after partial hepatectomy. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, Massachusetts, 2007.
- 2) Kamada Y, Tamura S, Saji Y, et al : Murine adipose tissue derived stromal cells trans-differentiate into hepatic lineage cells by basic fibroblast growth factor. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, Massachusetts, 2007.
- 3) 江崎久男, 佐治雪子, 吉田雄一, 他 : アディポネクチン欠損マウスにおいて70%部分肝切除後の肝再生は障害される. 第43回日本肝臓学会総会. 東京, 2007.

4) 江崎久男, 佐治雪子, 吉田雄一, 他: アディポネクチン欠損マウスにおいて部分肝切除後肝再生の障害, 脂肪酸代謝との関連について, 第11回日本肝臓学会大会, 神戸, 2007.

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

劇症肝不全の成因に関する臨床研究（Ⅱ）

研究協力者 市田 隆文 順天堂大学医学部附属静岡病院 消化器内科 教授

研究要旨：前年度に引き続き、原因が肝炎ウイルスや薬剤以外で劇症肝炎と同じような病態を呈する劇症肝不全の成因に関する臨床研究を行った。劇症肝炎の診断基準（PT40%以下、肝性昏睡Ⅱ度以上の脳症）を示し、血液疾患などの悪性腫瘍の肝浸潤も存在することが判明した。専門医以外の医療機関での悪性腫瘍の肝浸潤は早期診断に困難性を示すが、肝生検を積極的に行うことでその診断精度は高まる。それにより不必要な肝サポート治療は回避でき、即座に現疾患の治療を開始できる。この種の劇症肝不全も理解しておくことが重要と考えられた。

A. 研究目的

原因が肝炎ウイルスや薬剤と比較的明瞭な劇症肝炎とは異なり、それ以外の要因で劇症肝炎と同じような病態を呈する症候群を劇症肝不全とするならば、この2つの疾患と症候群を正確に区別することが重要である。そこで、昨年、一昨年度の継続研究として、心疾患、他臓器悪性腫瘍の肝臓への浸潤とともに臨床的にPT40%以下、肝性昏睡Ⅱ度以上の脳症を有する症例を集積し、劇症肝炎との相違点を見出し得ることが出来た。さらに本年度はその他の成因による劇症肝不全を検討し、特に最近問題になっている血液疾患の肝浸潤とその診断、治療に関する検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

臨床的にPT40%以下、肝性昏睡Ⅱ度以上を示し、明らかな肝炎ウイルスや薬剤の関与が認められない疾患を集積し、その臨床経過、画像所見、PT%の推移、HGFによる鑑別診断、肝生検組織所見などを検討し、通常の劇症肝炎との相違点を検討した。その中で、血液疾患による肝浸潤が劇症肝不全のカテゴリーに入るのか、そしてそれが劇症肝炎と異なるか否かを検討した。

C. 研究結果

本年度、劇症肝炎は一例も経験せず、血液悪性腫瘍の肝浸潤による劇症肝不全2例を認めた（表）。

症例のまとめを示すと、(1) ガリウムシンチグラムでは明らかな異常集積像は認められなかったが、脾腫や血球減少を認めたため、肝臓原発リンパ腫には該当しなかった。骨髄・肝臓・脾臓に病変のある節外性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、特にCD5陰性よりnon-GCB型であり、悪性リンパ腫関連血球貪食症候群（B-LAHS）に近い病態と考えられた。(2) この種の病態はAggressiveな経過をたどるため、早期に肝生検を施行し、リツキシマブやステロイドによる治療を開始する必要がある。(3) このような劇症肝不全と思われる症例も存在することが判明した。症例で学んだことは、脳症診断に問題があり、PT（%）のみの

診断の脆弱性を感じた。肝委縮、進行性の脳症の程度、発熱、肝障害の程度、感染症の合併など、この種のリンパ腫の急激な肝浸潤による病態では、適切な早期診断と早期治療が予後を決定すると考えられた。

表 2007年度自験例

劇症肝炎の成因分類	
1) ウイルス性	0例
2) 自己免疫性	0例
3) 薬物性	0例
4) 成因不明	0例
劇症肝不全の成因分類	
5) 分類不能	0例
6) 中毒性	0例
7) アルコール性	0例
8) 循環障害	0例
9) 悪性腫瘍の肝浸潤	2例
(悪性リンパ腫)	2例
胃内分泌癌	0例
10) 代謝性	0例
11) 術後肝不全	0例
12) その他	0例
合 計	2例

D. 考 察

血液悪性腫瘍の肝浸潤を基礎とした劇症肝不全例はその臨床像は肝炎ウイルスや薬剤性起因の劇症肝炎と差を認めなかった。予想外にガリウムシンチスキャンによる診断の困難性は、侵襲性検査の肝生検を必要としたが、臨床的判断は予想されるが確定診断に辿り着くのに時間を要することが判明した。早期診断が極めて重要で、肝生検による確定診断後、原疾患に対する早急な治療開始が可能となり、一例は救命することができた。この際、通常の劇症肝炎の治療を優先していると、病態はますます悪化したものと推測された。

E. 結 論

血液悪性腫瘍の肝臓への浸潤による劇症肝不全症例を経験し、これら病態も劇症肝炎とは異なる劇症肝不全のカテゴリーに加えて、検討する必要性を見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 市田隆文, 森広樹, 玄田拓哉, 他: 急性肝不全に対する栄養管理. ICU&CCU 31: 357-360, 2007.
- 2) 藤澤知雄, 乾あやの, 市田隆文, 他: (座談会) 小児の急性肝不全. 肝胆膵 55: 337-358, 2007.
- 3) 市田隆文, 玄田拓哉, 成田諭隆, 他: 劇症肝炎の内科的治療の限界と肝移植の適応—内科の立場から—. Surgery Frontier 14: 25-31, 2007.

2. 学会発表

- 1) Mori H, Ichida T, Ishikawa M, et al: Fulminant hepatic failure based on cardiac diseases; APASL Annual Meeting. Kyoto, 2007.

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

ラミブジン導入以降のB型重症肝炎の診断と治療

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：自験のB型劇症肝炎70例（急性感染による29例，HBVキャリアの急性発症41例），与芝の予知式により劇症化が予知された重症肝炎12例を対象に3TC投与開始（1995年から）前後での予後の差を検討した。当施設では，1987年よりキャリア発症全例，急性感染でもウイルス増殖の変遷が推定される例ではIFNを使用しており，3TC非使用とはIFN単独，3TC使用とはIFN+3TC併用を意味する。急性感染例では生存率が3TC非使用12/18（67%），3TC使用9/11（82%），キャリア発症例では3TC非使用8/19（42%），3TC使用10/22（45%）と生存率に有意差はなく，重症型では急性感染とキャリア発症を合計して3TC非使用例9/9（100%），3TC使用3/3（100%）と全例生存でした。3TC使用開始1週目と2週目のウイルス量は有意の低下を示さなかった。予後に独立して影響する因子は先行病変の有無，総ビリルビン値，PT値の早期の改善であった。

B型劇症肝炎の治療に於いてはウイルス学的改善より早期の肝機能の改善を目指すことが重要である。

共同研究者

井上 和明 昭和大学藤が丘病院 消化器内科 准教授
山田 雅哉 昭和大学藤が丘病院 消化器内科 助教
渡邊 綱正 昭和大学藤が丘病院 消化器内科 助教

A. 研究目的

当院での統計によれば，B型劇症肝炎〔B型肝炎ウイルス（HBV）の急性感染（以下急性感染）とHBVキャリアの急性発症（以下キャリア発症）の両方を含む〕の発症頻度は1986～1993年の間はそれぞれ全体の27%と19%であったが（N=143），1998～2007年の間ではそれぞれ13%および26%と相対的に急性感染が減少し，キャリア発症が増加している（N=101）。

急性感染の減少の原因としては，急性感染の感染源となる若年HBVキャリア数の減少が考えられる。一方，キャリア発症の増加の原因としては，HBVキャリアが固形癌や血液学的悪性腫瘍に罹患した際，強力な化学療法や免疫抑制療法やB細胞に対するモノクローナル抗体を使用した治療後に劇症化することが知られており，このような医原的原因がHBVキャリアの重症化，劇症化がキャリア発症を増加させている可能性がある。

近年lamivudineなどの核酸アナログがB型肝炎治療に導入され，慢性肝疾患での有用性が認められている。本研究では自験の急性感染例とキャリア発症例を対象にB型重症，劇症肝炎例の診断とlamivudine導入前と導入後の治療効果について比較検討した。

B. 研究方法

3TC導入までの治療としては，1986年から血漿交換（PE）と血液濾過透析（HDF）を併用した人工肝補助療法（ALS），1988年から抗ウイルス剤としてインターフェロン（IFN），1990年免疫抑制剤としてサイクロスポリンA（CsA），ステロイド（CS）を用いていたが，1994年からはメチルプレドニゾン（mPSL）パルス投与→漸減投与，CsA漸増投与の組み合わせによる免

疫抑制療法を確立した。1995年に当時Epirivの販売名でHIV治療薬として英国で認可されていたlamivudineを家族の希望によりcompassionate useの名目で入手し，HBVキャリアの劇症化例に試験的に使用し，その後1997年よりキャリア発症全例，急性感染ではウイルス増殖が推定される例にIFNと共に3TCを投与している。

検討対象は1986年～2007年の20年間に当院で治療したB型劇症肝炎70例〔急性感染29例，キャリア発症41例〕，与芝の予知式（急性感染ではプロトロンビン時間（PT）<40%， $Z=-0.89-1.74 \times (\text{原因ウイルス：A型・急性感染のB型は1点，HBVcarrier・非A非B・その他は2点})+0.056 \times (\text{総ビリルビン，T-Bil値})-0.014 \times (\text{ChE値})$ （注：ChE正常値135～413U/l），キャリア発症ではPT<60%，Z=同上式で劇症化を予知し得たB型重症肝炎12例〔急性感染（PT）4例，キャリア発症8例〕である。

検討項目としては，1. B型劇症肝炎（急性感染，キャリア発症）のそれぞれ診断根拠，2. 両者の鑑別，3. 3TC導入前後での治療成績の差，4. 3TCを含めた患者の生存，死亡に寄与する因子の発見の4点である。

研究方法としては各症例の一般肝機能，患者の年齢，性別，先行肝病変，化学療法や免疫抑制療法歴などの臨床事項の他，HBV関連マーカーやその推移，3TC使用の有無などを生存例，死亡例に分けて解析した。

C. 研究結果

1. B型劇症肝炎（急性肝炎およびキャリアの急性発症）の診断根拠

HBVの急性感染の診断根拠はHBs抗原陽性22例，HBs抗原陰性，IgM HBc抗体陽性5例，HBs抗原陰性，IgMHBc抗体陰性，HBV DNA（PCR）陽性2例である。キャリアの診断はHBs抗原価の持続高値，家族歴，既知のキャリア歴，慢性肝疾患発症後の経過等，病理組織より総合的に診断した。急性感染のうち2例，キャリアのうち26例に先行病変を認めた。