

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

小児期の劇症肝不全

研究協力者 藤澤 知雄 済生会横浜市東部病院こどもセンター 部長

研究要旨：2008年に当研究班から発表された新しい『劇症肝炎対する肝移植適応ガイドライン』が小児の劇症肝不全に対して適用できるかどうかを検討した。脳症Ⅱ度以上に進行した日の判定では正確に予後を判定できなかったが、5日後に判定すると正診率87.5%と成人とほぼ同様の結果が得られた。小児では発症時のみならず、経時的に判定することが望ましい。

共同研究者

十河 剛 済生会横浜市東部病院こどもセンター
日衛嶋栄太郎 済生会横浜市東部病院こどもセンター
菅原 秀典 済生会横浜市東部病院こどもセンター
角田 知之 済生会横浜市東部病院こどもセンター
小松 陽樹 済生会横浜市東部病院こどもセンター
乾 あやの 済生会横浜市東部病院こどもセンター
森實 雅司 同 MEセンター
小原由起子 同 集中治療科
阿久津麗華 同 集中治療科
小林光太郎 同 集中治療科
高橋 宏行 同 集中治療科

A. 研究目的

小児の劇症肝不全では1歳未満が予後不良因子であるにも関わらず、1996年の旧『劇症肝炎対する肝移植適応ガイドライン』（以下、旧ガイドライン）では「45歳以上」のみリスク因子と扱っていたため、小児においては適応が難しかった。2008年、当研究班より新しい『劇症肝炎対する肝移植適応ガイドライン』（以下、新ガイドライン）が発表され、年齢の因子が取り払われた。我々はこの新ガイドラインが小児において適用できるか否かを検討した。

B. 研究方法

対象は2007年4月より2009年6月の間に当院で加療した15歳未満の劇症肝不全8例〔男：女＝4：4、年齢10か月～13歳（中央値 3.5歳）〕。原因は血球貪食症候群2例、劇症肝炎型ウィルソン病1例、不明5例であった。これらの患者に対して、後方視的に肝性昏睡Ⅱ度以上へ進行した日（Day 0）およびその5日後（Day 5）の時点で新ガイドラインによるスコアリングと旧ガイドラインでの判定を同時に行ない、実際の転帰と比較検討した。

C. 研究結果

Day 0で旧ガイドラインでは1例のみ死亡と予測され、この症例はDay 5における判定でも死亡と予測された。しかし、実際にはこの症例は内科的治療のみで救命できた。一方、新ガイドラインではDay 0の時点では劇症肝炎型ウィルソン病の症例が6点で死亡と予測されたが、その他の症例では4点以下で生存と予測

された。Day 5の判定ではDay 0で死亡と予測された症例も含めて3例が5点以上で死亡と予測され、これらの症例は全例内科的な救命は困難と判断され、生体部分肝移植により救命されていた。また、5例では4点以下で生存と予測されていたが、血球貪食症候群の1例は実際には死亡したが、その他の4例は内科的治療のみで救命されていた。

D. 考 察

小児の劇症肝不全の特徴は、原因が多岐にわたり、ウイルス性肝炎が少なく、原因不明例が多いという特徴がある。今回の検討でも原因不明は8例中5例であり、いずれも組織学的には肝炎の所見を認めた。2例は血球貪食症候群であったが、死亡した1例は剖検では肝細胞の広範な脱落がみられ、もう1例では肉眼的に白色を呈するほどの著明な肝細胞の脂肪変性がみられた。成人とは主な原因が異なるにも関わらず、今回の検討では新ガイドラインによる5日目の判定では成人と同程度の正診率が得られた。

また、小児においては、とくに肝性脳症Ⅰ／Ⅱ度の判定が難しいということも小児の劇症肝不全の診療においては重要である。Ⅲ度以上の明らかな意識障害が出現してからでは救命できないこともあるため、経時的に評価を行うことが重要である。

E. 結 論

新ガイドラインではDay 5の判定では死亡した1例を除き、正確に転帰を反映した結果であり（正診率87.5%）、小児においてはDay 0の判定のみでなく、経時的に予後予測を行なうことが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

十河剛、日衛嶋栄太郎、菅原秀典、角田知之、小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄、森實雅司、小原由起子、阿久津麗華、小林光太郎、高橋宏行。新しい『劇症肝炎対する肝移植適応ガイドライン』は小児劇症肝

不全に適用できるか？. 第36回日本小児栄養消化器
肝臓学会, 札幌, 2009

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

急性肝不全の予後予測：データマイニングによるアルゴリズムの作成

研究分担者 持田 智 埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 教授

研究要旨：厚労省研究班に登録された1998～2003年発症の劇症肝炎634例，LOHF 64例を対象にデータマイニングの手法を用いて予後予測法を確立した。決定木法とRBF法は既に前年度までに確立していたが，データベースを整備してより高精度のものを再構築した。また，BP法による予後予測法も新たに作成した。これら症例を2004～2007年の症例を対象として validation を実施したところ，正診率，sensitivity，specificity，PPV，NPV が何れも同等に高率であり，多変量解析による従来法に比して精度が高い予後予測法であると考えられた。今後は Web 上でアクセスして予後予測の結果を判定できるシステムの構築が課題となる。

共同研究者

中山 伸朗 埼玉医科大学 消・肝内科 講師
名越 澄子 埼玉医科大学 消・肝内科 教授
桶谷 真 鹿児島大学 消化器・生活習慣病
坪内 博仁 鹿児島大学 消化器・生活習慣病

A. 研究目的

わが国における急性肝不全の予後は，内科的治療では劇症肝炎急性型が54%，亜急性型が24%，LOHF が12%であり，特に亜急性型とLOHFでは救命のために肝移植が必須である¹⁾。一方，肝移植の適応は日本急性肝不全研究会の作成したガイドライン（1996年）に従って決定されてきたが²⁾，1998～2003年の肝移植非実施例を対象にその正診率を評価すると，急性型は67%，亜急性型は78%であり，特に急性型において低率であった³⁾。急性型ではsensitivity，specificityとも低率であるが，特にsensitivityが56%と低く「死亡例を生存と誤って予測する」ことが問題になった。一方，亜急性型はsensitivityが高いもののspecificityが39%と低く，「救命例を誤って死亡と予測する」ことが問題となった。また，急性型，亜急性型ともに5日後に予後を再予測しても，正診率は殆ど向上していないことも大きな問題として指摘された。厚生労働省科学研究費補助金「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班では多変量解析に基づいたスコア法による新たなガイドラインを作成したが⁴⁾，我々はより高精度の予後予測法を確立するためにデータマイニングの手法を利用して新たな予後予測法の確立を試みている。既に決定木法とRBF法による新たな予後予測法を発表したが⁵⁾，今回はデータベースを更に整備してこれらの方法も更新し，新たにニューラルネットワークの手法であるBP (back propagation) 法による予後予測法も確立した。これらの方針に関して，2004～2007年の症例を対象に有用性の評価も実施したので報告する。

①決定木法による予後予測アルゴリズムの更新

B. 方 法

厚労省研究班の全国集計に登録された1998～2003年発症の劇症肝炎及びLOHF 698例のうち，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371例（救命170，死亡201）を分析対象とした。前年度とは異なって，肝萎縮や合併症の出現時期も明確にして，経過中の全成績，昏睡Ⅱ度以上の肝性脳症出現時及びその5日後の成績に基づいた新たなデータベースを作成し，夫々に基づいて決定木法による予後予測アルゴリズムを作成し直した。また，2004～2007年の発症例のうちモデル作成に用いた症例と同等の条件を満たす160例（救命78，死亡82）を対象にして，validationを実施した。なお，全経過で利用可能な決定木は，作成モデルに用いた症例にvalidationの症例も加えて，全531例（救命248例，死亡283例）を対象に作成した。

C. 成 績

1) 昏睡出現時のモデル（図1）：予後予測要因として総ビリルビン濃度（17.9mg/dL），血小板数（10.19万），腹水の有無，成因，年齢（39歳）の4項目からなるアルゴリズムが作成され，前年度のデータベースによるものとはほぼ同一であった。モデル作成に利用した症例での正診率は79%（sensitivity 78%，specificity 81%，PPV 83%，NPV 75%）であり，validationを行うと各数値は夫々71%（76%，65%，70%，72%）となった。

2) 昏睡出現5日後のモデル（図2）：5日後における前年度と同様にプロトロンビン時間（PT：39.5%），脳浮腫，肝萎縮，5日後の腎不全，心不全の有無，昏睡出現時の総ビリルビン濃度（17.45mg/dL）の6項目が抽出されたが，7項目目は副腎皮質ステロイド投与の有無ではなく，昏睡出現時の腎不全が選ばれた。これら7項目からなるアルゴリズムは，モデル作成に利用した症例での正診率が84%（sensitivity 83%，specificity 85%，PPV 87%，NPV 81%）であり，validationを行うと各数値は夫々73%（64%，83%，80%，68%）となった。

3) 全経過を通じてのモデル（図3）：全年度と同様に合併症数が予後を規定する最も重要な要因であった。この数が1つまでの場合は昏睡発現5日後のPTが36.5%以上か未満で，2つ以上の場合同値が65%以上か未満かで予後が規定された。また，合併症数が

1つまでの場合は5日後の総ビリルビン濃度とともに、前年度の脳浮腫ではなくアンモニア濃度が予後を規定する要因として抽出された。また、合併症が2つ以上のリーフでは前年までの「その他の合併症」の代わりに、総ビリルビン濃度が抽出された。

② RBF 法による予後予測アルゴリズム

B. 方法

決定法によるアルゴリズム作成に用いたのと同じの更新したデータベースを利用して、昏睡出現時とその5日後における予後予測法をRBF法によって作成し直した。また、同様に2004～2007年の発症例を対象にvalidationを実施した。なお、RBF法では各サンプルについて0を死、1を生とする0～1までの予後予測値を算定し、0.5以上を死亡予測とした。

C. 成績

1) 昏睡出現時のモデル

モデル作成に用いたサンプルは死亡率が91.8%から25.7%までの8群に分類され、それぞれに34例、35例、16例、59例、19例、27例、23例、35例が振り分けられた。このモデルの作成に利用した症例での正診率は74% (sensitivity 71%, specificity 77%, PPV 78%, NPV 72%) であり、validationを行うと各数値は夫々68% (72%, 64%, 68%, 69%) となった。

2) 昏睡出現5日後のモデル

サンプルは死亡率が90.9%から25.7%の8群に、それぞれ33例、35例、16例、59例、19例、27例、23例、35例が分類された。その正診率は78% (sensitivity 79%, specificity 77%, PPV 80%, NPV 75%) であり、validationを行うと各数値は夫々68 (60%, 80%, 75%, 65%) となった。

③ BP 法による予後予測アルゴリズム

B. 方法

決定法によるアルゴリズム作成に用いたのと同じの更新したデータベースを利用して、昏睡出現時とその5日後における予後予測法をBP法によって作成した。また、同様に2004～2007年の発症例を対象にvalidationを実施した。なお、BP法では救命例は生存日数を10,000日、死亡例は昏睡出現までの日数を指標としてモデルを作成し、予測される生存日数が5,000日以上を生存予測とした。

D. 成績

1) 昏睡出現時のモデル

モデル作成に用いたサンプルは生存日数が8,969日から34日までの8群に分類され、それぞれに7例、30例、56例、93例、92例、56例、30例、7例が振り分けられた。このモデルの作成に利用した症例での正診率は82% (sensitivity 79%, specificity 86%, PPV 87%, NPV 78%) であり、validationを行うと各数値は夫々85% (81%, 90%, 89%, 82%) となった。

2) 昏睡出現5日後のモデル

サンプルは生存日数が9,782日から1,011日の8群に、

それぞれ7例、30例、56例、93例、92例、56例、30例、7例が分類された。その正診率は85% (sensitivity 86%, specificity 84%, PPV 86%, NPV 84%) であり、validationを行うと各数値は夫々79 (81%, 77%, 79%, 79%) となった。

E. 考案と結語

更新した精度の高いデータベースを基に、データマイニング手法で再構築した決定木は前年までのものとはほぼ同一であった。但し、昏睡5日後に用いる決定木は、前年までのものでは副腎ステロイドの投与などの治療内容が含まれていたが⁵⁾、新たな決定木はこれが昏睡出現時の腎不全の有無に変更されており、より利用しやすいものに更新できたと考えられる。また、全経過で利用する予後予測アルゴリズムも、前年度までの脳浮腫、その他の合併症の代わりに、アンモニア濃度、総ビリルビン濃度が加わった決定木に更新され、更に利用しやすいものに更新できたと考えられる。

なお、今年度はRBF法による予後予測法を新たなデータベースを基に更新するとともに、BP法による予後予測法も確立した。このため、データマイニングの3手法による予後予測法が確立され、2004～2007年の160例を用いたvalidationが実施できた。何れの方法も昏睡出現時、その5日後ともに正診率が高く、sensitivity, specificity, PPV, NPVともにバランスがとれて高率であった。特にBP法の精度は高く、有用であることが期待される。今後はこれらの3種類の手法にWeb上で全ての医師がアクセスし、予後予測に関する情報を獲得できるシステムの確立が課題となる。

F. 参考文献

1. Fujiwara K, Mochida S, Matsui A, Nakayama N, Nagoshi S, Toda G; Intractable Liver Diseases Study Group of Japan. Fulminant hepatitis and late onset hepatic failure in Japan. *Hepatology Res* 2008; 38: 646-657.
2. 杉本潤一, 内藤智雄, 石木佳英, et al. わが国における劇症肝炎の予後予測と肝移植の適応に関する多施設研究: 日本急性肝不全研究会1996年肝移植適応ガイドライン策定の経緯. *肝臓* 2001; 42: 543-556.
3. Mochida S, Nakayama N, Matsui A, Nagoshi S, Fujiwara K. Re-evaluation of the Guideline published by the Acute Liver Failure Study Group of Japan in 1996 to determine the indications of liver transplantation in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology Res* 2008; 38: 970-979.
4. 持田 智, 中山伸朗, 森吉美穂, 名越澄子, 滝川康裕, 多田慎一郎, 市田隆文, 内木隆文, 矢野公士, 桶谷 真. ①劇症肝炎の診断基準: プロトロンビン時間の扱いに関する検討, ②劇症肝炎, 急性肝不全の概念の改変, ③肝移植適応ガイドラインの改訂. 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」平成20年度報告書, 2009; pp16-18.

図1. 新たに更新した決定木法による昏睡Ⅱ度以上の肝性脳症が出現した時点における予後予測アルゴリズム

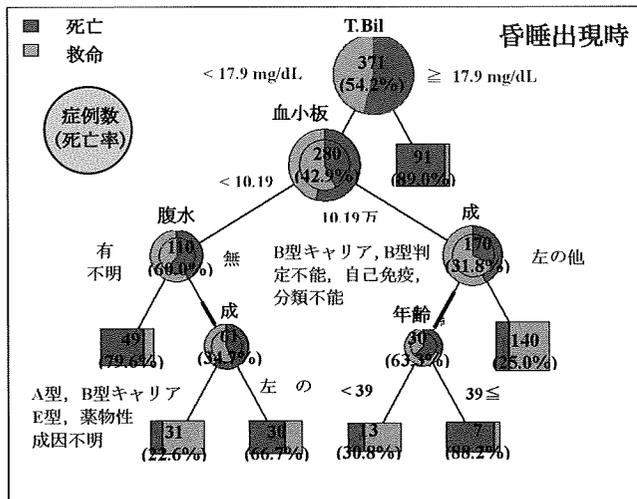


図2. 新たに更新した決定木法による昏睡出現5日後における予後予測アルゴリズム

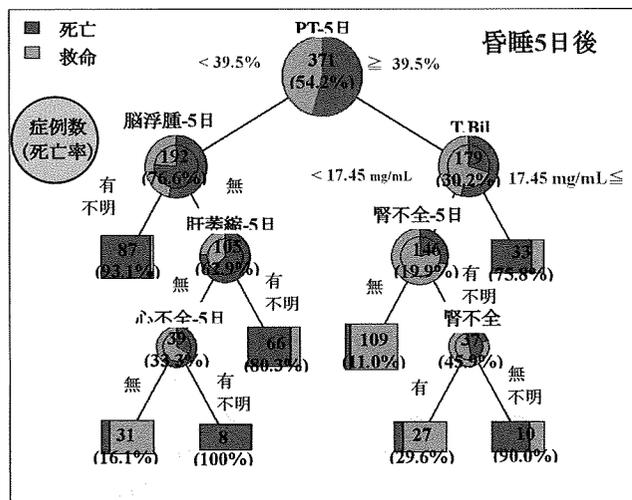
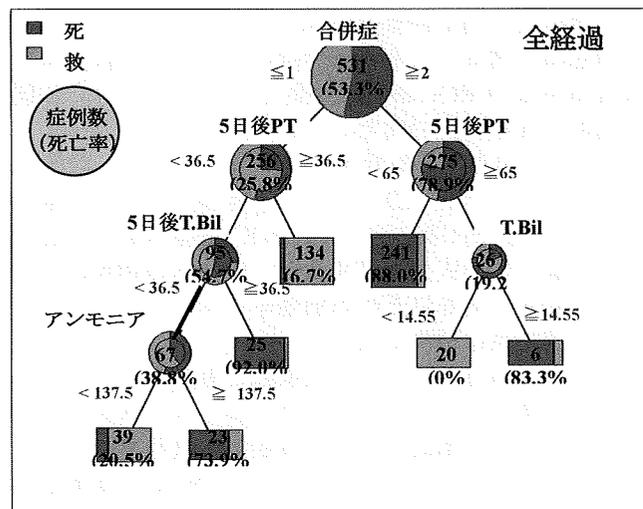


図3. 新たに更新した決定木法による全経過で利用可能な予後予測アルゴリズム



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

急性肝障害劇症化予知精度向上と予防治療の可能性に関する研究

研究協力者 鈴木 一幸 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授

研究要旨：岩手医大消化器・肝臓内科を中心として、近隣40施設と共同で急性肝障害患者の登録、搬送システムを構築し、劇症化予知・予防に関するプロスペクティブスタディーを行った。2004年8月から2009年12月までの間に、適格症例213例が登録され、うち155例が肝炎症例で、48例が搬送基準に合致し、40例が実際に岩手医大消化器・肝臓内科に搬送された。劇症肝炎成因例（155例）では良好な予測効果が得られたが、肝炎以外の成因では過剰な予測の傾向が見られた。肝炎、搬送例において、劇症化例の昏睡発現までの日数がおおむね5日以上を確保できた点は、本研究の目的の一つである早期予知・早期治療開始をある程度達成し得たと考えられた。第2高危険群以下の観察劇症化率が予測を下回ったことから、早期搬送・治療の介入の効果と考えられた。予知式に加え、アシアロシンチグラフィ LHL15が昏睡発現判別に有効であり、肝萎縮の客観的評価方法として優れていた。劇症化阻止に有効な治療法の評価には、無作為試験が必要と考えられた。

共同研究者

滝川康裕 岩手医科大学第一内科 准教授

A. 研究目的

劇症肝炎の救命率向上の目的で、我々はこれまで、専門施設（岩手医大消化器・肝臓内科）を中心とする急性肝炎の劇症化予知・患者搬送に関する地域医療ネットワークを構築し、肝炎劇症化の予知・予防に関するプロスペクティブな検討を進めてきた。これまでの検討で、予知式は特異性が高く、予測劇症化確率20%以下（搬送基準に満たない）の症例から、劇症化例は見いだされていない。従って、これらの症例に特殊治療の必要はなく、一般病院での加療の適応と考えられた。一方、専門施設に搬送される症例の、約15%が昏睡発現することから、搬送後の更なる重症度評価と治療方針について検討した。

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40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可否を判定し、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。

2004年8月から2009年12月までの間に、適格症例213例が登録され、うち155例が肝炎症例で、48例が搬送基準に合致し、40例が実際に岩手医大消化器・肝臓内科に搬送された。この40例を対象として、予知式の予知精度、他の検査項目の予知精度、治療法の現状とその有効性について検討した。

C. 研究結果

1. 劇症化予知式の評価

肝炎症例155例と非肝炎症例58例に分け、予測劇症化確率と観察劇症化確率とを比較した（表1）。肝炎症例で予測劇症化確率50%以上と判定された16例中7例（44%）が脳症を発現し、比較的良好な予知精度を示した。一方、非肝炎では予測は重症度を過大評価する傾向があり、この傾向は昨年までの結果と変わらなかった。

2. 肝炎症例、搬送40症例に関する検討

1) 予知精度の検討

搬送40症例のうち9例に昏睡発現を認めた（内科的救命は1例）。これらの症例で、搬送時の予測劇症化確率と搬送基準合致日から昏睡発現までの日数との関連を図1に示す。基準合致日にすでに極めて重症だった2例を除くと、5日以上昏睡前治療期間が確保された。

予測劇症化率と観察劇症化割合とを Hosmer-Lemeshow test で比較すると（図2）、第1高危険群は良好な予測精度が示されたが、第2高危険群以下では、重症度の過大評価の傾向が見られた。

搬送時の精査による昏睡発現の予測の可能性を単変量解析およびROC解析で検討した（表2, 3）。昏睡発現群と非発現群の間で、アシアロシンチグラフィ LHL15（LHL15）、血漿アンモニア（NH₃）、血清ビリルビンD/T比（D/T比）が有意の差を、血清HGFが有意の傾向を示した。ROC曲線解析で判別効率を劇症化予知式と比較すると、これらの指標はいずれも予知式と同等以上の判別効率を示した。

2) 治療効果に関する検討

搬送後に施行されている治療法と重症度との関連を表4に示す。アルブミン、ラクツロース、ステロイドパルス、人工肝補助は、より重症例に投与される傾向があった。N-アセチルシステイン（NAC）は重症度と無関係に1/4の症例に投与されていた。

治療法と昏睡発現率との関連を表5に示す。投与傾

向を反映して、ほとんどの治療法は、施行例で昏睡発現率が高い傾向を示した。NACは非投与例でやや昏睡発現率が高かった。

D. 考察

劇症化予知式の予知効率は、昨年までの傾向と同様、肝炎例で予知効率が優れているものの、非肝炎例で過剰な予測の結果となった。その理由は、循環障害例やアルコール例では一過性にPTが高度に低下すること、また、敗血症症例ではDICによるPT低下や胆汁うっ滞を来す例が多く、肝障害が過大評価される傾向があることが考えられた。また、予測劇症化確率20%以下の症例からの昏睡発現はなく、搬送基準として適切であると考えられた。

肝炎、搬送例において、劇症化例の昏睡発現までの日数がおおむね5日以上を確保できていた点は、本研究の目的の一つである早期予知・早期治療開始にある程度達成し得たと考えられた。

一方で、観察劇症化率が予測を下回った点について、検討を行った。Hosmer-Lemeshow testに示されたように、第1高危険群では、予測精度が良好であったことから、最重症例の評価に関して、予知式の精度は問題なく、むしろ第2高危険群以下の観察劇症化率の低下は、早期搬送・治療の介入効果と考えられた。

予知式の変数以外で最も高い予知精度を示したのはLHL15で、しかも、そのカットオフ値0.73で高い判別効率を示したことは、肝萎縮の客観的評価方法としてアジアロシンチグラフィが優れていることを示すものと考えられた。

先に述べた、早期介入による劇症化阻止に有効に働いている治療法を見いだす目的で、治療法の評価を行ったが、今回の検討では明らかに有効な治療法は見いだせなかった。その原因として、より重症例に特殊治療が施行されていることがあげられた。また、比較的重症度に関係なく投与されたNACでは、治療有効の傾向が見られたことから、治療法を限定した上での無作為試験の重要性が示された。

E. 結論

1. 劇症化予知式では、比較的高い予知効果が得られ、昏睡発現前の治療期間もある程度確保された。
2. 搬送例に関しては、アジアロシンチグラフィ、LHL15、HGF、アンモニア、D/T比を加えるとさらに予知精度が増すと考えられた。
3. この患者管理システムにより、第2高危険群以下の観察劇症化割合が低下した可能性があると考えられたが、劇症化阻止に有効な治療法は見出せなかった。
4. 今後は、治療法の評価には無作為化比較試験が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takikawa Y, Endo R, Suzuki K, Tsubouchi H. Early prediction of short-term development of hepatic encephalopathy in patients with acute liver disease unrelated to paracetamol. A prospective study in Japan. *J Hepatol* 2009;51:1021-1029.
- 2) Suzuki K, Takikawa Y. Biomarkers of Malnutrition in Liver Cirrhosis. In: Preedy VR, Lakshman R, Srirajaskanthan R, Watson RR. Editors. *Nutrition, Diet Therapy and Liver*. CRC Press; 2009:p. 203-215.
- 3) 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝炎劇症化の予知は可能か. *肝胆膵* 2009;59:459-467.
- 4) 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝炎の劇症化予知と患者搬送システムに関する多施設共同研究. *日本腹部救急医学会誌* 2009;29:591-596.

2. 学会発表

- 1) Kakisaka K, Takikawa Y, Onodera M, Wang T, Suzuki K. The plasma of acute liver failure patients promotes the survival of mouse liver stem/progenitor cells through JNK activation. *AASLD Boston, USA, Nov 2-5, 2009*.
- 2) 滝川康裕, 渡辺雄輝, 鈴木一幸. 肝炎劇症化予知式を基にした急性障害管理ガイドラインの試み. 第45回総会: ワークショップ「劇症肝炎: 診療ガイドラインの作成の現状と問題点」2009年6月5日, 神戸.
- 3) 片岡晃二郎, 小野寺美緒, 柿坂啓介, 熊谷一郎, 渡辺雄輝, 宮坂昭生, 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝炎登録システムからみた劇症肝炎診断名の意義. 第106回日本内科学会講演会, 東京, 4月10日, 2009.
- 4) 小野寺美緒, 滝川康裕, 柿坂啓介, 八角有紀, 渡辺雄輝, 遠藤龍人, 鈴木一幸. 急性肝障害例の成因別による肝細胞死機構(アポトーシス, ネクローシス)の血清指標の差異. 第45回日本肝臓総会, 神戸.
- 5) 滝川康裕, 小野寺美緒, 柿坂啓介, 宮本康弘, 遠藤龍人, 鈴木一幸. 急性肝炎劇症化の予知と予防治療の可能性. 第35回急性肝不全研究会シンポジウム1「肝炎劇症化と再生不全: 阻止は可能か?」神戸, 6月3日, 2009.
- 6) 宮本康弘, 滝川康裕, 小野寺美緒, 柿坂啓介, 片岡晃二郎, 鈴木一幸. 劇症肝炎に対する肝移植判定基準の評価と適応判定時期の検討. 第35回急性肝不全研究会シンポジウム2「急性肝不全治療の標準化: いつ移植を考えるか?」神戸, 6月3日, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し

表1

		昏睡			
		非発現	発現		
肝炎	< 20%	107	0	107	
	予測劇症化率	20-50%	29	3 (9.4)	32
		> 50%	9	7 (43.8)	16
		計	145	10 (6.5)	155
非肝炎	< 20%	25	0	25	
	予測劇症化率	20-50%	25	2 (7.4)	27
		> 50%	5	1 (16.7)	6
		計	55	3 (5.2)	58

図1

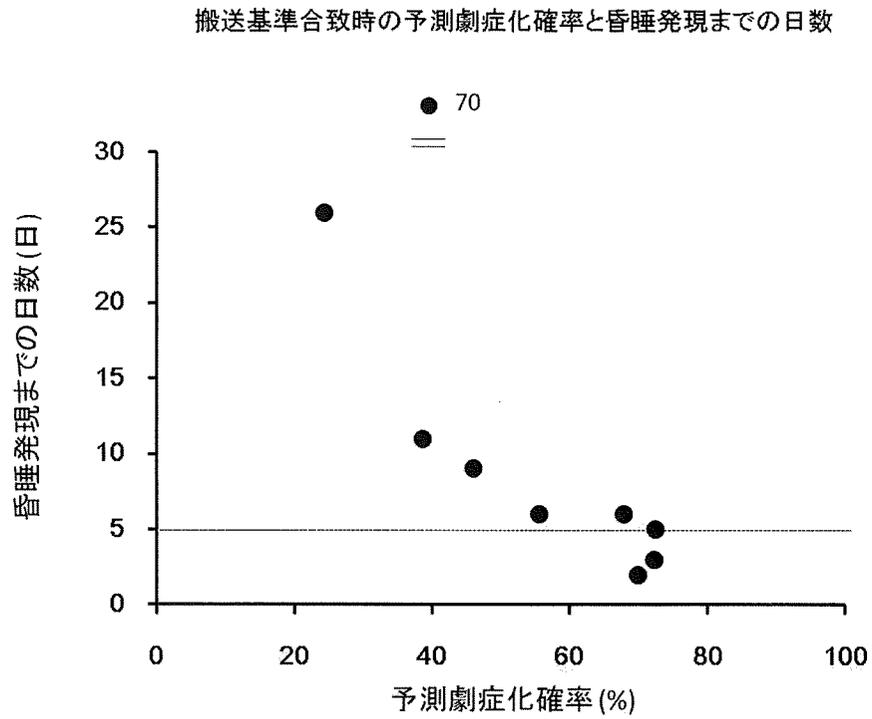


図2

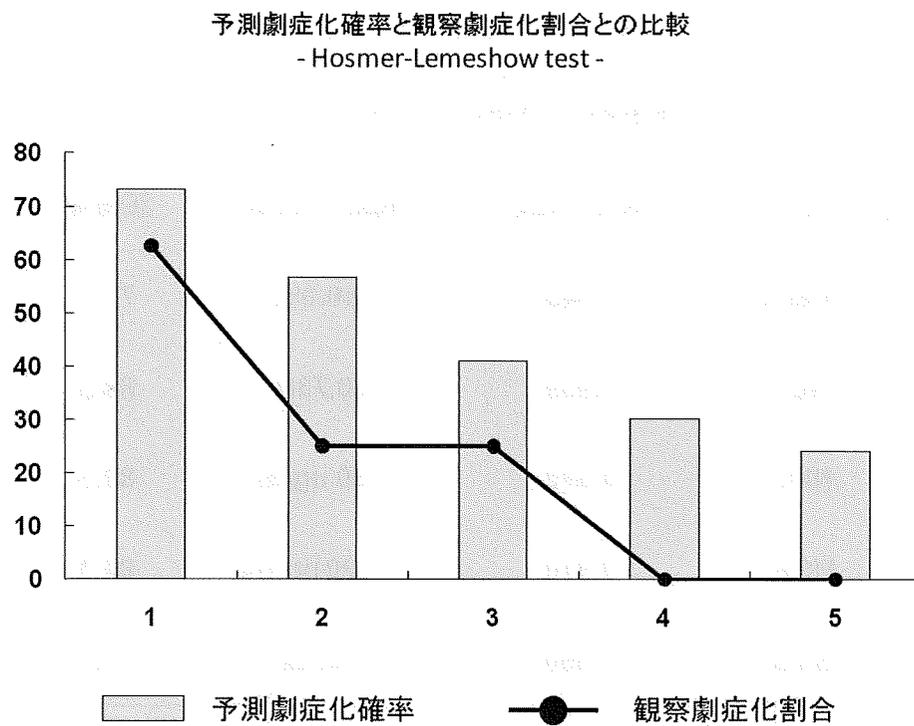


表 2

昏睡発現および予後と予測因子以外の要因との関連

因子	昏睡非発現群	昏睡発現群	p
LHL15	0.83 ± 0.07	0.66 ± 0.09	<0.01
Albumin	3.04 ± 0.34	2.90 ± 0.39	n.s.
AT III	49.2 ± 25.4	33.6 ± 13.9	n.s.
D-dimer	4.04 ± 6.47	4.07 ± 5.18	n.s.
NH3	62.8 ± 25.5	108 ± 37.2	<0.01
HGF	1.00 ± 0.47	8.07 ± 16.2	n.s.
HDL-C	16.1 ± 11.2	23.0 ± 15.7	n.s.
D/T比	0.75 ± 0.05	0.67 ± 0.08	<0.01

表 3

昏睡発現の予測効率: ROC解析および分割表

因子	ROC AUC	ROC cut-off	正診率
予知式	0.849	≥ 40.0%	77.5
LHL15	0.939	< 0.730	88.5
NH3	0.872	≥ 80 ug/dl	82.5
HGF	0.910	> 1.20 ng/ml	84.3
D/T比	0.850	< 0.722	77.5

表4

重症度と昏睡発現前治療施行率の実態

治療法	重症度順位					計
	1	2	3	4	5	
アルブミン	87.5	87.5	62.5	37.5	62.5	67.5
ラクツロース	87.5	75.0	62.5	50.0	0	55.0
FOY	25.0	0	0	0	25.0	10.3
フサン	42.9	12.5	14.3	0	0	13.2
AT III	100	87.5	62.5	75.0	75.0	80.0
ステロイドパルス	62.5	62.5	50.0	37.5	37.0	50.0
SNMC	25.0	62.5	37.5	62.5	62.5	50.0
ウリナスタチン	62.5	12.5	25.0	37.5	25.0	62.5
NAC	12.5	37.5	25.0	37.5	12.5	25.0
ATP	0	0	12.5	0	0	2.5
人工肝補助	50.0	12.5	12.5	0	0	15.0

表5

昏睡発現前治療法と昏睡発現との関連

治療法	昏睡発現率(%)		有意差
	投与例	非投与例	
アルブミン	25.9	15.4	n.s.
ラクツロース	40.9	0	n.s.
FOY	25.0	22.9	n.s.
フサン	80.0	12.1	n.s.
AT III	28.1	0	n.s.
ステロイドパルス	35.0	10.0	n.s.
SNMC	25.0	20.0	n.s.
ウリナスタチン	38.5	14.8	n.s.
NAC	20.0	23.3	n.s.
ATP	100	20.5	n.s.
人工肝補助	83.3	11.8	n.s.

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

劇症肝炎治療標準化を目指して 人工肝補助療法標準化への定量的指標－

研究協力者 井上 和明 昭和大学藤が丘病院 消化器内科 准教授

研究要旨：劇症肝炎患者を救命するためには、人工肝補助療法が不可欠である。本邦の人工肝補助療法は体内容積の大きな水溶性物質の除去を目的として大量の緩衝液で血液を洗浄することに特徴がある。この治療法を行うと劇症肝炎の致死合併症である脳浮腫の頻度は自験例では5%以下であった。これまでグルタミンと脳浮腫の関連が示唆されているが、今回の研究でグルタミン除去総量の血漿相当量は使用した buffer の総量と有意に相関することが示され、グルタミン除去総量は人工肝補助の評価指標となりうる可能性が示唆された。

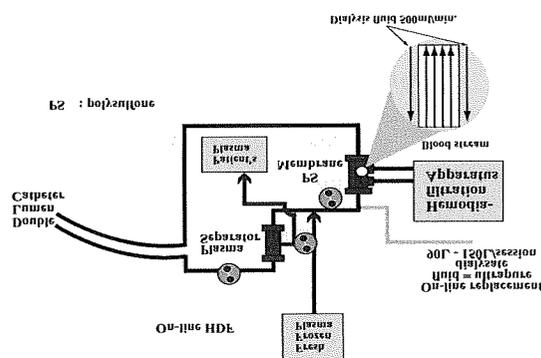
A. 研究目的

急性肝不全の治療において人工肝補助療法は必須である。血漿交換 (Plasma exchange, PE) は欠乏する凝固因子を供給する上で他の治療法に代え難い利点を持つものの、体内分布の大きな水溶性物質の除去は困難である。昏睡覚醒と脳浮腫の改善には、蓄積した毒性物質を除去する別の戦略が必要である。日本においては、昏睡惹起物質は水溶性であるとの仮定の下に血液濾過透析 hemodiafiltration (HDF) や high flow の持続血液濾過透析 (CHDF) のように大量の水で血液を浄化する治療法が発展した。これまで Randomized control trial (RCT) で有効性の証明された人工肝補助療法はない。現在急性肝不全時の脳浮腫のメカニズムを説明する仮説としてグルタミン-アンモニア仮説がある。今回体内分布の極めて大きなグルタミンの除去能が人工肝補助療法の能力の評価指標となりうるかどうか検討した。

B. 研究方法

対象は昭和大学藤が丘病院に入院した劇症肝炎亜急性型の患者 5 例と急性型 2 例である。男性 4 例、女性 3 例で年齢は 42 (32-69) 歳で、全例既知のウイルスマーカーと自己抗体が陰性の成因不明例であった。劇症肝炎の診断は犬山シンポジウムの診断基準に従い、全例 PE と HDF を組み合わせた血液浄化療法を施行した。PE は膜分離法を用いて行い (OP-05W, Asahi Medical Co., Tokyo, Japan) 一回の PE で新鮮凍結血漿 40pack を使用した。HDF は online 法を用いて行い、前希釈法で置換液を時間あたり 15リットル前後注入した。また透析液は同時に毎分 500ml 使用した。HDF に使用する膜は合成高分子のポリスルホン膜 TS-BP1.8L (Toray Medical Co., Tokyo, Japan) を用いた。抗凝固剤は Futhan (Torii, Tokyo, Japan) をプライミングに 30mg と持続で一時間 30mg 用いた。患者の血液を 1 回当たりの治療で 200L 以上の緩衝液を用いて洗浄した。HDF を施行中に廃液の 1% を連続的に採取し、採取した廃液は解析まで -80℃ で保存した。廃液中のグルタミン濃度の測定を行い一回の血液浄化療法あたりの総グルタミン除去量を推定した。また人工肝補助療法施行直前に血液を採取して血漿中のグ

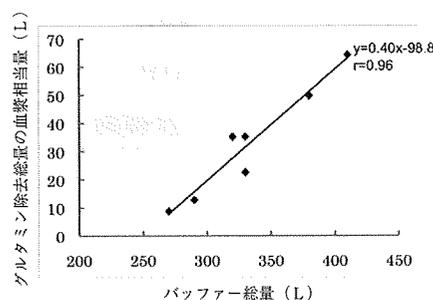
ルタミン濃度を測定して、総グルタミン除去量を血漿グルタミン濃度で割ることにより除去されたグルタミンの血漿相当量を推定した。



C. 研究結果

対象患者 7 例全例が一旦は昏睡から覚醒したが、そのうち 4 例が生存し 3 例が死亡した。最大昏睡度は III 度が 1 例、IV 度が 5 例、V 度が 1 例であった。またプロトロンビン時間の最小値は 21 (10-38.1)% であった。また人工肝補助療法の施行回数数は 20 (4-30) 回であった。7 例の患者のグルタミン除去総量は中央値で 41165mmol (6678-188947mmol) で、グルタミン総除去量の血漿相当量は中央値で 35.2L (8.8-64.3L) であった。血漿グルタミンの除去総量は緩衝液の総量と有意な相関を示した ($r=0.96$)。

個人間におけるバッファー総量とグルタミン除去総量 (血漿相当量) との相関



D. 考 察

人工肝補助療法は、内科治療により肝臓が再生するまでの期間、または肝移植を施行するまでの期間の bridge として、肝不全に陥った肝臓の様々な機能のうち生命維持に必要な機能を代行する対症療法と位置づけることができる。急性肝不全の2大症候は合成能の低下による出血傾向と解毒能の低下による意識障害である。合成能の低下に対抗するために PE が開発されたが、その解毒能に対する代償能力は不十分で、新たな治療上の対応が求められた。ヨーロッパではタンパク結合性物質が意識障害の原因であるとの仮定の下にアルブミン dialysis の発展型である MARS や Prometheus が治療の手段として登場してきたがその昏睡覚醒効果は不十分なものである。一方本邦では体内容積の大きな水溶性物質が意識障害の原因であるとの仮定の下に、大量の buffer で血液を浄化する治療法が発達した。今日まで RCT での評価はないものの我々の施設を含めて、いくつかの施設から優れた昏睡覚醒効果が報告されている。しかし未だに肝性昏睡の原因物質は同定されていないので、肝性昏睡起因物質の除去能を人工肝補助療法の評価の指標とすることはできない。脳浮腫は肝性脳症と同様に生命予後に関わる重篤な合併症であり、治療効果が不十分な人工肝補助療法下に移植を行うとたとえ患者が生存しても、永続的な神経障害を残す可能性がある。従って脳浮腫に十分に対抗しうる能力を持つことは昏睡覚醒能力と同様に人工肝補助療法に必須である。脳浮腫の原因物質としてグルタミンが注目されており、グルタミン除去能力は人工肝補助療法の能力を判定するのに有効な指標と考えられ、今回の研究では人工肝補助療法のグルタミンの除去能力を評価した。今回の研究の成果で示されたように大量の緩衝液で血液を洗浄することにより体内分布の大きなグルタミンの除去も可能であった。除去されるグルタミンの血漿相当量は明らかに血液浄化に用いた buffer の量に相関したことから、本邦で行われている治療法の正当性が一部証明された。

E. 結 論

大量の緩衝液を用いた HDF は脳浮腫の予防に有効であり、グルタミン除去量は人工肝補助療法を評価する有用な指標となりうる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue K, Kourin A, Watanabe T, Yamada M, Yoshida M. Artificial Liver Support System Using Large Buffer Volumes Removes Significant Glutamine and Is an Ideal bridge to Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 259-261
- 2) 井上和明, 与芝真彰. 治療の前提としての強力

な人工肝補助療法. *日本腹部救急医学会会誌* 2009; 29: 603-608

- 3) 井上和明, 与芝真彰. 劇症肝炎に対する血液浄化療法 (HDF と PE) による救命 その歴史的変遷と治療上の意義. *肝胆膵* 2009; 59: 421-434

2. 学会発表

- 1) 井上和明, 与芝真彰. 劇症肝炎の治療システムの標準化を目指して. 第35回日本急性肝不全研究会. 神戸, 2009年6月3日
- 2) 井上和明, 与芝真彰. 劇症化の予知と阻止は可能か. 第35回日本急性肝不全研究会. 神戸, 2009年6月3日
- 3) 井上和明, 与芝真彰. 人工肝補助療法標準化への定量的指標. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 2009年6月5日
- 4) 井上和明, 与芝真彰. 劇症肝炎は内科治療で救命できる. 第27回日本肝移植研究会. 三島, 2009年7月11日
- 5) 井上和明, 与芝真彰. 人工肝補助療法の定量的評価は可能か. 第30回日本アフェリシス学会. 札幌, 2009年9月12日

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

劇症肝不全の臨床研究

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：脳死肝移植の成績に関して、医学的緊急度9点の症例の脳死肝移植例の対象症例が純粋なる劇症肝炎かあるいは他の要因による劇症肝不全かを検討する目的で検証を加えた。その結果、医学的緊急度9点で生体肝移植後グラフト機能不全の劇症肝炎に準ずる症例の生存率が低く、劇症肝炎そのものの脳死肝移植成績は生体肝移植の成績と同等であることが判明した。平成21年度の医学的緊急度9点34例の転帰は3例が脳死肝移植を受け、生存中である。一方、10例に生体肝移植が施行され7例が生存中であるが、肝移植医療を受けないで内科的治療を継続した20例中17例は死亡した。移植医療による救命率は73%、内科的治療による救命率は23%と判断された。

研究協力者

玄田 拓哉
平野 克治

A. 研究目的

日本脳死肝移植適応評価委員会に申請依頼を受け医学的緊急度9点（推測余命一ヶ月）と評価をされた症例を対象とし、その劇症肝炎もしくは劇症肝不全の要因の探索と、申請症例の予後追跡調査を行った。

B. 研究方法

2009年5月15日より2010年1月31日まで日本脳死肝移植適応評価委員会に申請された850例のうち医学的緊急度9点、すなわち予後余命1カ月と推定され評価された34例の病態ならびのその予後に関して検討を加えた。この解析は日本臓器移植ネットワークとの共同研究でもある。

C. 研究結果

2010年1月30日までにわが国で脳死肝移植を受けた67例の5年生存率は74.5%である。一方、わが国における生体肝移植5,058例の5年生存率は77.6%であることより、わが国における脳死肝移植と生体肝移植の生存率に隔たりがないことが判明している。その中で医学的緊急度9点の5年生存率は65.7%と医学的緊急度6点の72.6%と比較すると少しその生存率の低下が認められる。この医学的緊急度9点の17例中5例に死亡を認めているが、その原疾患は劇症肝炎が3名、生体肝移植後のグラフト不全が2例であった。そこで劇症肝炎と生体肝移植後のグラフト不全症例を分けて生存率を検討してみると、劇症肝炎10例の5年生存率68.5%に比して、生体肝移植後のグラフト不全例4例のそれは34%と極めて低率であることが判明した。

肝臓移植 レシピエント原疾患別生存・生着

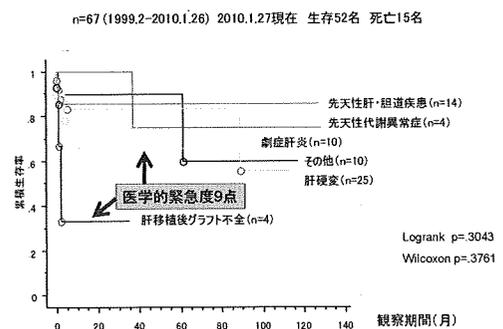


図1 緊急度別肝移植後（予後余命別）の生存曲線

そこで、検討期間内に脳死肝移植適応評価委員会に申請された医学的緊急度34例の成因を検討すると、劇症肝炎25例中、HBV 5例、薬剤7例、自己免疫性4例、原因不明9例であった。さらに生体肝移植後の不可逆的グラフト機能不全例が9例に認められた。

医学的緊急度9点の34例の転帰を検討すると、3例は5日から13日以内に脳死肝移植を受けることが出来、いずれの生存中である。一方、待機期間の延長により適切な脳死ドナーの出現がないことより生体肝移植に変更した9例中6例は生存中であったが、内科的治療を継続しながら脳死肝移植の待機期間中であった13例中10例は死の転帰をとった。救命率から判定すると、医学的緊急度9点の内科的救命率は13例中3例の23%であった。一方、脳死肝移植もしくは生体肝移植の移植医療による救命率は11例中8例の73%であることが判明した。生体肝移植後の不可逆的グラフト機能不全例は9例に認められ、生体肝移植施行後から一年未満が6例、一年以上が3例であった。いずれも脳死肝移植に申請されたが転帰は1例に生体肝移植、1例に脳死肝移植による生存を認めたが、残る7例は内科的治療に不応で全例死の転帰となっている。

D. 考察

昨年報告で脳死肝移植と生体肝移植で急性肝不全に対する移植成績が大きく異なる点を強調したが、純粋は劇症肝炎では脳死肝移植と生体肝移植の移植成績

はほぼ同等であることが判明した。脳死肝移植登録の中の生体肝移植後のグラフト機能不全症例が医学的緊急度9点の全体的生存曲線の低下を招いていることが今回の調査で理解することが出来た。臓器移植法案の改正で2010年7月からの実施を考慮し、年間推定80例近くの脳死ドナーが出現するとするならば、現在のわが国における劇症肝炎の出現頻度を持ってすると脳死ドナーによる肝移植で劇症肝炎の治療を十分賄える試算が成り立つ。迅速な脳死肝移植の申請と評価と共に、今後は生体肝移植の短期、長期グラフト不全に対する内科的治療の困難性からも、適応基準の厳格化が望まれるものである。すべての生体肝移植後のグラフト不全を脳死肝移植で補うことは現実的にもひずみが生じると思われる。

E. 結 論

脳死肝移植評価申請例を対象に適応疾患、予後、転帰を検討した。ここ一年以内の脳死肝移植例は3例全例生存した。生体肝移植に移行した症例も10例中7例生存を得た。生体肝移植後グラフト機能不全例は9例中2例の生存を得たが、いずれも肝移植施行例であった。

今後、評価申請されている1000例弱の蓄積 data を解析し、例えば慢性肝障害に用いられる MELD スコアなどを Modified して劇症肝炎の予後予測を反映するスコア作成も視野に入れ、適切な脳死肝移植の施行と、それによる劇症肝炎への治療応用を考えたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 市田隆文：肝移植医療の最前線。内科2010; 99(1): 349-357.
- 2) 松波英寿, 市田隆文, その他. 肝移植後の肝癌再発に対する治療. 肝胆膵2009; 59(5): 831-846.
- 3) 市田隆文, 玄田拓哉, 平野克治, 菊池哲, 成田論隆, 佐藤俊輔, 金光芳生. 肝移植とウイルス肝炎. 臨床とウイルス2009; 37(4): 355-359.
- 4) 市田隆文, 井上和明, 坂井田功, 武富紹信. (座談会) 急性肝不全/劇症肝不全. 肝胆膵2009; 59(3): 497-510.
- 5) 玄田拓哉, 市田隆文: 循環不全による急性肝障害の病態と病像. 肝胆膵2009; 59(3): 407-412.
- 6) Hashikura Y, Ichida T, Umeshita K, Kawasaki S, Mizokami M, Mochida S, Yanaga K, Monden M, Kiyosawa K: Donor complications associated with living donor liver transplantation in Japan. Transplantation 2009; 88: 110-114

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

自己免疫性急性肝不全の診断に関する検討

研究協力者 横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院 腫瘍内科学 教授

研究要旨：診断困難で肝不全に陥った場合に予後不良の急性発症型自己免疫性肝炎の診断基準の作成を目指して、千葉大学腫瘍内科学教室において経験した自己免疫性急性肝不全症例について、臨床・病理・画像的に総合的な検討を行なった。自己免疫性急性肝不全例では他原因の肝炎に比較して、重症化・劇症化までの経過が長いものが多く、また慢性例と比較してIgG正常例や自己抗体陰性例が多かった。組織学的にはcentrizonal necrosisが急性発症型自己免疫性肝炎に特徴的であった。CT画像ではheterogeneous hypoattenuationが特徴的であった。Scoring systemに示されている臨床・病理学的特徴に加えて、画像的特徴を総合的にとらえることで、自己免疫性急性肝不全の診断率の改善が期待される。

協同研究者

藤原 慶一 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学
助教

A. 研究目的

自己免疫性肝不全症例の多くは急性発症型であり、病初期には抗核抗体陰性例やIgG正常例も含まれ、診断が困難である。病期が進行して肝再生不全に陥ると、免疫抑制療法にも抵抗性となり、人工肝補助を含めた内科的治療では救命困難な状態となる。劇症化するとHBVキャリア発症例、成因不明例と並んで劇症肝炎の中でも予後不良で、その内科的救命率は20%に満たない。

1999年のautoimmune hepatitis(AIH)scoring systemの提唱以来、(本来のfor research purposeという趣旨とは異なるかもしれないが)それを臨床利用することで、従来成因不明とされていた症例の中に、AIHと診断されるものが何割か存在することがわかってきた。しかし、scoring systemでは、acute onset AIH、特に発症早期の非重症例では低スコアとなるものも多い。Acute onset AIHの診断のためのgold standardが存在しないことが、自己免疫性急性肝不全の診療における最大の問題点である。

そこで、現状において早期に、より適切に、acute onset AIHの診断を行なうことを念頭において、急性肝不全症例を検討した。

B. 研究方法

①1990-2008年に当科で経験した急性発症型の自己免疫性肝不全例を対象として、臨床・病理・画像的検討を行なった。Eligibility criteriaは、(1)臨床的にAIHが疑われ、抗核抗体(ANA)または抗平滑筋抗体(ASMA)が陽性で、AIH scoreがprobable以上、(2)肝障害の既往のない急性肝障害で、画像的にも慢性所見がない、(3)PT 50%以下あるいはT-BIL 20mg/dl以上とした。

②1990年から2009年までに当科で経験した急性肝炎例(HAV, HBV, HBVex, AIH)のうちPT 60%以下で単純CTを撮像している症例を対象とした。単純

CTで認められた低吸収域(広範壊死部)を、その分布からdiffuse, heterogeneousに分類し、自己免疫性肝炎群とウイルス性急性肝炎群(発症から入院まで10日以内の急性経過群, 11日以上の中急性経過群)で比較検討を行った。

C. 研究結果

①対象は28例(重症15例, 劇症肝炎10例, LOHF 3例)であった。年齢は 48.2 ± 16.2 歳, 性別は男性8例・女性20例, ALT 547 ± 483 IU/l, T-BIL 23.4 ± 11.5 mg/dl, PT $30 \pm 15\%$, 発症から免疫抑制療法開始までの期間は 51.8 ± 43.6 日であった。IgGは 2480 ± 1156 mg/dlであり, 21%が正常上限値以下であった。ANAは32%で40倍以下, ASMAは67%で40倍以下であった。組織所見はmassive necrosis 41%, submassive necrosis 9%, severe acute hepatitis 27%, chronic hepatitis 23%とacute hepatitisが77%を占め, centrizonal necrosisを全例に, plasma cell infiltrationを77%に認めた。AIH scoreは 16.2 ± 2.8 であり, 54%がdefinite, 46%がprobableであった。ステロイド治療反応群(16例)と比較して非反応群(7例)は, 年齢が高く($p=0.02$), T-BILが高値($p=0.03$)・PT活性が低値($p<0.001$)の肝不全進行例であった。

②CT低吸収域は、ウイルス性急性肝不全ではdiffuse patternが多く、AIHではheterogeneous patternが多く、有意差を認めた。AIHとウイルス性中急性経過群との比較においても有意差を認めた(それぞれ $p<0.05$, $p=0.002$)。

D. 考察

自己免疫性急性肝不全例では他原因の肝炎に比較して、重症化・劇症化までの経過が長いものが多かった。また、慢性例と比較して、IgG正常例や自己抗体陰性例が多かった。組織学的にはcentrizonal necrosis(+/- plasma cell accumulation)が急性発症型自己免疫性肝炎に特徴的であった。

腹部単純CTは広範壊死の評価、治療反応性の経時的評価に有用であった。従来のAIH scoring systemに、AIHの組織に特徴的なheterogeneityを表現する

CT 画像所見 (heterogeneous hypoattenuation) を組み合わせることで自己免疫性急性肝不全の診断を補足できる可能性が示唆された。

E. 結 論

Acute onset AIH の診断基準の作成が急務である。

臨床・病理・画像的特徴を総合的にとらえることで、acute onset AIH の診断率の改善が期待される。

早期診断により、重症化・劇症化する前に (肝再生不全に陥る前に) 免疫抑制療法を開始することにより、重症肝炎・劇症肝炎の減少、救命率の改善が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤原慶一. 知っておきたい肝臓病の病態・診断と治療. 急性肝炎と慢性肝炎の鑑別; 今何が問題か? レジデント 2: 16-23, 2009.
- 2) Fujiwara K, Kojima H, Yonemitsu Y, Yasui S, Imazeki F, Miki M, Suzuki K, Sakaida I, Okita K, Tanaka E, Omata M, Yokosuka O. Phylogenetic analysis of hepatitis A virus in sera from patients with hepatitis A of various severities. *Liver Int* 29: 838-845, 2009.
- 3) 藤原慶一, 横須賀収. A型肝炎の update. *外科* 71: 343-347, 2009.
- 4) 藤原慶一, 横須賀収. 劇症肝炎. 今日の消化器疾患治療指針 第3版, 印刷中.

2. 学会発表

- 1) 安井伸, 藤原慶一, 沖津恒一郎, 米満裕, 新井誠人, 神田達郎, 深井健一, 今関文夫, 横須賀収. 急性発症型自己免疫性肝炎の重症・劇症例における臨床病理学的検討. 第23回千葉集中治療研究会. 千葉.
- 2) 藤原慶一, 安井伸, 沖津恒一郎, 米満裕, 横須賀収. 自己免疫性急性肝不全症例の診断についての検討. 第35回日本急性肝不全研究会. 神戸.
- 3) 藤原慶一, 安井伸, 米満裕, 中野雅行, 横須賀収. 急性発症型自己免疫性肝炎における肝再生状態の形態的検討. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸.
- 4) 安井伸, 藤原慶一, 横須賀収. 急性発症型自己免疫性肝炎重症例, 劇症例の検討. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸.
- 5) 安井伸, 藤原慶一, 沖津恒一郎, 米満裕, 新井誠人, 神田達郎, 深井健一, 今関文夫, 横須賀収. 急性発症型自己免疫性肝炎の CT 画像における壊死形態についての検討. 第51回日本消化器病学会大会. 京都.

- 6) Yasui S, Fujiwara K, Yonemitsu Y, Okitsu K, Nakano M, Yokosuka O. Clinicopathological

features of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. 59th Annual meeting of American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco.

- 7) Fujiwara K, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Kanai F, Oda S, Nakano M, Yokosuka O. Autoimmune hepatitis is not a rare cause of fulminant hepatitis in Japan. 6th APASL single topic conference. Karachi.
- 8) Yokosuka O. Fulminant hepatitis in Japan. 6th APASL single topic conference. Karachi.

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

劇症肝炎の発症、進展に関する検討

研究協力者 福井 博 奈良県立医科大学 第3内科 教授

研究要旨：劇症肝炎の発症、進展の病態生理に関して実験的、臨床的検討を行った。ガラクトサミン（GalN）ラット急性肝不全モデルにおいて肝 Toll-like receptor 4（TLR4）の upregulation に関連して TNF- α の増加、肝障害の進展がみられ、TLR4阻害剤の投与により肝障害の改善効果、致命的急性肝不全（GalN+LPS 投与）での救命効果を認めた。合併症を伴う急性肝不全症例の血液中では血小板凝集を制御する ADAMTS13活性の著減と VWF 抗原の著増がみられ、これらは血漿エンドトキシン（Et）濃度と相関した。劇症肝炎の発症、進展に Et とそれに関連する高サイトカイン血症と血小板機能異常がかかわっている可能性がある。

共同研究者

植村 正人 奈良県立医科大学第3内科准教授
藤本 正男 同 講師
北澤 利幸
石川 正之 奈良県立医科大学第3内科
辻本 達寛 奈良県立医科大学中央内視鏡・
超音波部 助教

A. 研究目的

- 1) 実験的研究：哺乳動物の自然免疫（innate immunity）に関わる受容体として現在まで10種類以上の Toll-like receptor（TLR）が報告されている。それぞれ異なる病原体関連分子パターンの認識に関与しており、なかでも TLR4はマクロファージをはじめとする生体内の各種細胞表面に存在し、エンドトキシン（Et；LPS）のシグナルを伝達する受容体分子であることが明らかにされており、臓器障害との関連が注目されている。劇症肝炎モデルとして知られるガラクトサミン（GalN）肝障害では肝障害の進展に内因性 Et の関与が考えられているが、今回われわれは重症敗血症の治療薬として開発が進められている TLR4アンタゴニスト E5564の GalN 投与および GalN + LPS 投与急性肝不全ラットにおける肝障害抑制効果に関して検討する。
- 2) 臨床的研究：劇症肝炎の予後予測因子として血小板数の意義が注目されているが、血小板の過剰凝集は臓器、組織の微小循環障害の原因となり、肝炎重症化、合併症の発現に大きくかかわる可能性がある。ADAMTS13は血管内非細胞が分泌する超高分子量 VWF multimer の切断酵素でその欠損は血栓性血小板減少性紫斑病を惹起する。われわれはこれまで重症アルコール性肝炎、非代償性肝硬変、重症急性膵炎などで血中の本酵素活性が著減し、合併症の発現にかかわっている可能性を指摘してきたが、本研究では急性肝不全症例において血漿 ADAMTS13、VWF、エンドトキシンを測定して、これらと合併症との関連について検討する。

B. 研究方法

- 1) 実験的研究：体重200g の Wistar 系雄性ラットに GalN（1g/kg 体重）を腹腔内投与して急性肝不全

ラットを作成し、直後に E5564（3mg/kg 体重）を静脈内投与した。24時間後に採血して血清 T.Bil、ALT および TNF- α 値を測定した。また、肝臓を採取して肝 RNA を抽出し、RT-PCR 法にて肝内 TNF- α mRNA の発現レベルを E5564非投与群と比較検討した。さらに同系ラットに GalN500mg/kg 体重と E. coli O55:B5 LPS 50 μ g/kg 体重を投与する致命的肝障害モデルに対する E5564の救命効果を検討した。

- 2) 臨床的研究：対象は、急性肝炎26例（B型8例、C型5例、非B非C型4例、薬物4例、自己免疫3例、その他2例）と急性肝不全11例（B型2例、非B非C型4例（B型2例、非B非C型4例、薬物1例、その他4例；9例死亡、2例生存）。血漿 ADAMTS13活性は従来の VWFM 法と EILSA の両方で測定。血漿 VWF 抗原、血漿サイトカインは ELISA、超高分子量 VWF multimer は vertical SDS 電気泳動にて測定。血漿エンドトキシンは血漿に Triton-X 混和後、加熱処理し LS-50M キットを用い kinetic assay を行った。

C. 研究結果

- 1) 実験的研究：血清 ALT 値は GalN 投与急性肝不全ラットでは著増し、血清 T.Bil 値も増加したが、E5564投与群ではその増加は軽度にとどまり、E5564非投与群との間に有意差が認められた。2) 血清 TNF- α 値は GalN 投与急性肝不全ラットでは著増していたが、E5564投与によりその増加は抑制された。3) E5564投与により GalN 投与急性肝不全ラットの肝内 TNF- α mRNA 発現は抑制された。4) E5564投与により GalN+LPS 投与急性肝不全ラットの24時間生存率は改善した（8.3% vs 42.9%）。
- 2) 臨床的研究：入院時の ADAMTS13活性は急性肝炎では高低幅広く分布したが、平均は正常値の60%前後であったのに対し、急性肝不全では全例50%以下で、平均して20%前後であった。一方、VWF 抗原量については健常人100%に比し、急性肝炎では平均250%、急性肝不全では800%と著明に上昇し、基質/酵素比は、正常1に比し急性肝炎8、急性肝不全は約100と著明高値を示した。急性肝炎の血漿エンドトキシン（Et）濃度（基準値10pg/ml 未満）

は1例を除き、ほぼ正常範囲にあったが、急性肝不全例では、全例基準値以上に上昇し、平均30pg/mlであった。血漿 Et 濃度は ADAMTS13活性と負の相関傾向を示し、Et20pg以上の群は以下の群に比し、ADAMTS13活性が有意に低値 ($p < 0.005$)であった。また、血漿 Et 濃度と VWF 抗原量との間には正の相関関係 ($r = 0.432, p < 0.02$) が存在し、Et20pg以上の群は以下の群に比し、VWF 抗原量が有意に高値 ($p < 0.001$)であった。血漿 Et 濃度は急性肝炎および急性肝不全生存例2例では回復期にほぼ基準値にまで改善したが、急性肝不全死亡例では4例が上昇、1例が高値持続、3例が低下するもののなお異常高値を示した。急性肝不全死亡例は高率 (6/9例) に多臓器不全を合併し、これら症例では血漿 IL-6, IL-8の上昇、ADAMTS13活性の低下、VWF 抗原量の著増を認めた。

D. 考 察

TNF- α などの炎症性サイトカインカスケードの活性化は重症肝障害の発症、進展に重要である。肝マクロファージである Kupffer 細胞は Toll 様受容体4 (TLR4) というエンドトキシン認識膜貫通蛋白を有しており、この受容体がマクロファージの活性化と炎症性サイトカインの放出に働く。部分肝切除1、阻血再灌流2, 3、慢性アルコール投与4などの種々の実験的肝障害で TLR4の発現と機能の亢進が認められる。急性肝不全では Kupffer 細胞数の増加と炎症性サイトカイン、ケモカインの産生亢進が認められるが、TLR4, TLR4シグナルの動態は十分解析されていない。

D-ガラクトサミンは肝細胞の RNA 合成を特異的に阻害する薬物で動物のエンドトキシンや TNF- α に対する感受性を高め、ヒト劇症肝炎に類似した重症肝細胞障害をきたす。われわれは D-ガラクトサミン投与急性肝不全ラットにおいて肝障害の進行とともに肝 TLR4 mRNA, CD14 mRNA, TNF- α mRNA 発現が亢進していることをまず確認した。急性肝不全発症における自然免疫の関与を検討した研究はきわめて少ないが Wang ら⁵はガラクトサミン+LPS投与ラットにおいて CD14 mRNA, TLR4 mRNA 発現の亢進を認めている。次に、われわれは D-ガラクトサミンと TLR4阻害薬 E5564をラットに同時投与したところ、本急性肝不全モデルでの TNF- α の産生は抑制され、血清 ALT の上昇は軽度にとどまることを認めた。これに続いて、致死性急性肝不全モデルであるガラクトサミン+LPS投与ラットに E5564を投与したところ救命率の著明な改善をみたが、ガラクトサミン+LPS投与1時間前に E5564を投与すると生存率はさらに改善することを確認している。重症急性肝炎や敗血症における多臓器不全発症に TNF- α の関与が示唆されており、これは急性肝不全についてもあてはまると考えられる。われわれは肺マクロファージが Kupffer 細胞に比して同濃度の LPS 存在下においてはるかに多量の TNF- α を産生することを確認しており、投与

した E5564が Kupffer 細胞のみならず全身マクロファージに働いた結果 TNF- α 産生が抑制され、救命につながったのではないかと推測している。

ところで、障害をうけた血管内皮細胞で超高分子量 VWF multimer が産生され、毛細血管内に移行すると、high shear stress をうけ、伸張構造をとるが、ADAMTS13はこの進展した超高分子量 VWF multimer を切断する。ADAMTS13が十分量存在すると、超高分子量 VWF multimer は適当な大きさの VWF Mに切断されるが、この酵素が不足すると、超高分子量 VWF multimer が切断されず、血小板と反応し、血小板血栓が形成され、微小循環障害が惹起される。われわれはこれまで血漿 ADAMTS13活性が多臓器不全を合併する重症アルコール性肝炎、非代償性肝硬変、重症急性肺炎などで著減するとともに、血漿 VWF が著増し、超高分子量 VWF multimer もしばしば出現することを報告⁶⁻⁸し、これらが相俟って血小板の過剰凝集と微小循環障害を招き、肝、脾を初めとする全身諸臓器の虚血性障害を助長する可能性を指摘してきたが、今回、急性肝不全においても同様の異常が認められた。ADAMTS13の減少、VWFの増加はエンドトキシン血症と密接に関連することが示唆され、エンドトキシンが ADAMTS13の動態に影響を及ぼす可能性が考えられたが、肝星細胞で合成される ADAMTS13の分泌制御機構は全く未解明である。今後、培養細胞系を用いてエンドトキシンの ADAMTS13に及ぼす直接的影響について検討する予定である。

E. 結 論

劇症肝炎の発症、進展にエンドトキシンとそれに関連する高サイトカイン血症と ADAMTS13活性の著減がかかわっている可能性がある。ADAMTS13活性の減少は超高分子量 VWF の増加を招き、血小板過剰凝集と微小循環障害を惹起すると考えられるが、ADAMTS13の調節系と劇症肝炎における調節系の破綻については今後の検討を要する。

文 献

1. Takayashiki T, et al.: Increased expression of toll-like receptor 4 enhances endotoxin-induced hepatic failure in partially hepatectomized mice. *J Hepatol* 2004;41:621-8.
2. Peng Y, et al.: Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10:2890-3.
3. Zhai Y, et al.: Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004;173:7115-9.
4. Gustot T, et al.: Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic

fatty liver. Hepatology 2006; 43:989-1000.

5. Wang H, et al. :Protective effect of bicyclol on acute hepatic failure induced by lipopoly-saccharide and D-galactosamine in mice. Eur J Pharmacol 2006;534:194-201.
6. Uemura M, et al. :Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. Alcohol Clin Exp Res 2005;29:264S-71S.
7. Morioka C, et al. : Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 2008;43:1387-96.
8. Uemura M, et al. : Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. Thromb Haemost 2008;99:1019-29.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fujimoto M, Fukui H. Expression of Toll-like receptor 4 in various organs in rats with D-galactosamine-induced acute hepatic failure. J Gastroenterol Hepatol 2008;23:e494-8.
- 2) Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H. Therapeutic approach to regulate innate immune response by Toll-like receptor 4 antagonist E5564 in rats with D-galactosamine-induced acute severe liver injury. J Gastroenterol Hepatol 2009;24:1089-94.

2. 学会発表

- 1) Kitazawa T, Fukui H, Tsujimoto T, Kawaratani H: New therapeutic approach to acute liver failure through Toll-like receptor 4 regulation. IEIS 10 Edinburgh, Scotland, UK 2008.7.30-8.2
- 2) Fukui H, Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Hoppou K, Kitano H, Nakatani Y, Fujimoto M: Endotoxin and acute liver failure: New therapeutic approach by regulation of macrophage innate immunity UEGW 2008 Vienna, Austria 2008.10.18-10.22

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