

- ③歯科：齲歯の有無及び治療。(保存補綴科)
- ④整形外科：胆汁うっ滞性肝疾患の場合に骨塩定量、体脂肪率による栄養評価
- ⑤婦人科： 婦人科的感染症、子宮癌の有無。
- ⑥第3内科：上下の消化管内視鏡検査依頼、内科的適応評価
- ⑦精神科： 小児例では両親がそろって受診。小児患者自身は脳波・MRIのみの受診。
- ⑧小児科：小児例では小児神経科、小児循環器（心エコー依頼）を受診
- ⑨麻酔科：全身麻酔実施可否の判断

(3) 生体肝移植の実施方法

生体ドナーの肝グラフト採取術および対象患者の肝移植術、ならびに生体ドナーと肝レシピエントの術後管理法は現在、北海道大学病院第一外科にて行っている標準的肝移植術および術後管理法に準じる。

(4) 肝移植後の検査

肝移植術後は、定期的な血液生化学検査および必要に応じて肝生検を行い、グラフトの機能や拒絶反応の有無を評価する。なお、臨床データは下記診療情報を利用する。

(a) 患者基本情報：年齢、性別、ID番号

(b) 疾患情報：臨床診断名、病理診断名、血液生化学検査所見、病理組織学的所見など

(c) 定期的血液生化学検査は下記の通り(移植直後で入院中は基本的に毎日行う)

- ①一般：CBC、血液像
- ②肝機能：TP、Alb、T-Bil、D-Bil、ZTT、TTT、GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、LAP、ChE、T-Cho、TG、CPK、NH₃、胆汁酸
- ③腎機能：BUN、Cr、UA、Na、K、Cl、Ca、Mg、P、Na
- ④凝固系：PT、PT-s、INH、aPTT、Fbg、AT-III、FDP、D-dimer
- ⑤尿検査：尿糖、尿蛋白、尿沈渣
- ・原疾患によっては下記検査を追加する(1-2/週もしくは1-2/月)
- ⑥感染症：HBsAg、HBsAb、HCV-RNA(定量)
- ⑦ウイルス：CMV antigenemia (C10, C11)、EBV PCR
- ⑧真菌、原虫：カンジダ抗原、 β -D グルカン
- ⑨腫瘍マーカー：CEA、AFP、AFP-L3、CA19-9、PIVKA-II

(5) 免疫抑制療法

(a) 本研究での免疫抑制療法(制御性T細胞を用いた免疫抑制療法)

- ①プログラフ：移植術後3日目から投与(1日2回)開始し、血中トラフ濃度8-12 ng/mlを維持する。全身状態や肝機能検査、拒絶反応の有無などにより血中トラフ濃度を5-7 ng/mlまで漸減した後は、これを維持する。
- ②セルセプト：移植手術翌日から500 mg/dayを内服開始し、1週間後に1000 mg/dayへ増量する。必要に応じて2000 mg/dayまで増量する場合がある。

③ステロイド：再灌流時-1000 mg、術翌日から20 mg/dayを1週間投与する。基本的には1週間毎に5 mg/dayずつ減量する。上記の標準的免疫抑制療法に加え、以下の治療を行う。

- ①サイクロフォスファミド：術後5日目から25 mg/kg/dayを3日間
- ②培養リンパ球（制御性T細胞）：術後14日目に誘導細胞を輸注

(6) 免疫抑制剤からの離脱

定期的に血液生化学検査や免疫学的検査および必要に応じて肝生検を行い、グラフト機能、拒絶反応の有無や免疫状態を注意深くモニタリングし、免疫抑制剤(コルチコステロイド>ミコフェノール・モフェチール>タクロリムス)を段階的に減量する。

免疫抑制剤の減量は以下の通りとする。

(a) ステロイド

現行の標準的免疫抑制プロトコールに従い、20 mg/dayの初期量から1週間ごとに5 mg/dayを減量し、術後5週目に中止する。

(b) セルセプト

現行の標準的免疫抑制プロトコールに従い、500 mg/dayの初期量から1週間に1000 mg/day、2週間目に1500 mg/dayまで増量する。術後5週目から500 mg/dayを1ヶ月ごとに減量し、術後4ヶ月目に中止する。

(c) タクロリムス

術後6ヶ月間は、2分割/日投与による血中トラフ濃度を8-12 ng/mlで維持し、その後は半量に漸減する。その後は、ピッツバーグ大学の漸減スケジュールを遵守して行う⁹⁾。

- ①1日一回 (2-3ヶ月間)
- ②1日おき (2-3ヶ月間)
- ③週3回 (2-3ヶ月間)
- ④週2回 (2-3ヶ月間)
- ⑤週1回 (2-3ヶ月間)
- ⑥投与中止

(7) 拒絶反応の診断と治療

(a) 拒絶反応の診断

①身体所見

発熱・全身倦怠などの出現に注意を払う。

②血液/生化学的検査

T-Bil/AST/ALT/ γ -GTPなどのいずれかが基準値の2倍以上に上昇した場合、拒絶反応を疑い、直ちに肝生検を行い、迅速診断で確認する。その後永久標本で確認する。免疫組織染色、浸潤細胞の解析用に凍結切片を保存しておく。

③生検肝の病理学的診断

Glisson鞘の細胞浸潤、胆管上皮細胞異形、細胆管壁内リンパ球浸潤、中心静脈炎などの所見により拒絶反応の組織診断を行う。特に免疫抑制療法中止後は、肝機能検査が正常でも肝繊維化や慢性拒絶の存在があり得るので、免疫抑制剤中止直前、中止後1年以内は3ヶ月毎、2年目は6ヶ月毎、その後は1年毎に肝生検を定期的に行う。

(b) 拒絶反応の治療

①細胞性拒絶反応

ステロイドパルス療法を行い、これに不応性の場合はOKT3モノクローナル抗体を静脈内投与する。ステロイドパルス療法は、ソルメドロール200mgの静脈内投与し、その後40 mg/dayで漸減・減量する。

②液性拒絶反応

ステロイドパルス療法を行い、その後直ちに血漿交換を行う。必要に応じてリツキシマブ375 mg/m²、

OKT3 モノクローナル抗体を静脈内投与する。

③拒絶反応後の治療

上記の方法により拒絶反応と診断・治療された場合には、本プロトコールからによる免疫寛容導入療法は中止となり、従来の免疫抑制療法へと移行する。すなわち、カルシニューリンインヒビター、代謝拮抗薬、ステロイドによる免疫抑制療法が再開とする。

C. 結果

症例 1

39 歳、男性

疾患名：C 型肝硬変

血液型：A 型(+)

術前状態：UNOS 2B

肝障害度：Child-Turcotte-Pugh：12

=Child C、MELD：16

HLA typing: A-24/-, B-52/54, Cw-

01/12, DRB1- 04/15, DQB1-03/06

(DONOR:A-24/-, B-52/54, Cw-01/12, DRB1-04/15, DQB1-03/06)

入院時現症：身長 176.2cm, 体重

65.1 kg、意識レベル 清明、肝性脳

症認めない。眼球結膜に軽度黄染

認め、眼瞼結膜貧血なし。Vascular

spider (+), Pulmar erythema (-),

Gynecomastia (-)

胸部：呼吸音清 心雑音なし。

腹部：軽度膨満。圧痛なし。脾臓

を左肋弓下に 2 横指触知します。

手術痕無し。

四肢：下肢に軽度の浮腫を認める。

術前検査：

血液検査所見：表 1

ECG：NSR、HR80、ST 変化なし

呼吸機能検査： %VC

120.7%：FEV1/FVC 84.5% シヤ

ント 4.5%

心エコー(循内)：肺高血圧なし。

FS:40%と心機能良好

血液ガス：

表 1

	評価時	入院時				
WBC	2400 ↓	3000 ↓	HBs Ag	0.00	AFP	7.2
RBC	272 ↓	238 ↓	HBs Ab	2.34	AFP-L3	5.9
Hb	10.6 ↓	9.1 ↓	HBe Ag	0.4	CEA	5.9
HCT	29.2 ↓	25.9 ↓	HBe Ab	18.6	CA19-9	133.3 ↑
PLT	4.4万 ↓	5.1万 ↓	HBc Ab	0.17	PIVKA-II	23
不規則抗体	(-)		HBc Ab 200倍希釈	未検査	DUPAN-II	62
PMN/Lymph	2628/432		HB-DNA	(-)	Fe	175
PT	19.6 ↑	19.3 ↑	HCV Ab	9.47 ↑	フェリチン	692 ↑
PT-INR	1.74 ↑	1.73 ↑	HCV-RNA(定量)	6.4 ↑	S-Cu	107
APTT	58.5 ↑	56.5 ↑	HCV genotype	1	U-Cu	2
HPT	28 ↓		HTLV-I	(-)	セロプラスミン	26.9
AT-III	26 ↓	25 ↓	HIV	0.14	Zn	39 ↓
Fibrinogen	111 ↓	99 ↓	TPHA	(-)	α-1アンチトリプシン	136
FDP	11.8 ↑	7.7	ガラス板	(-)	抗核抗体	40 ↑
TP	6.6 ↓	6.8	CMV IgG	63.9 ↑	AMA	(-)
ALB	2.2 ↓	3.0 ↓	CMV IgM	<1.0	RF	9.7
T-Bil	4.7 ↑	5.3 ↑	EBV IgG	7.8 ↑	ASO	938 ↑
D-Bil	2.1 ↑	2.7 ↑	EBV IgM	1.8 ↑	CRP	0.17
TTT	27.6 ↑	8.9 ↑	VZV IgG	52.8 ↑	IgG	3277 ↑
ZTT	10.9 ↑	21.7 ↑	VZV IgM	1.8 ↑	IgM	203 ↑
GOT	93 ↑	72 ↑	HSV IgG	(-)	IgA	502 ↑
GPT	82 ↑	58 ↑	HSV IgM	(-)	IgE	7.7
LDH	370 ↑	330 ↑	トキノIgG	(-)	CH-50	14 ↓
γ-GTP	23	18	トキノIgM	(-)	C3	30 ↓
ALP	534 ↑	511 ↑	カンジダ抗原	(-)	C4	6 ↓
LAP	102 ↑	83 ↑	β-D グルカン	7.7	原糖	(-)
Ch-E	71 ↓	53 ↓	FT3	2.7	原蛋白	(-)
T-Cho	138	102 ↓	FT4	1.2	原沈査	(-)
TG	58	52	TSH	4.6 ↑	原比重	1.012
HDL-Cho	17 ↓	20 ↓	TgAb	<0.12	尿中WBC/視野	1~4
CPK	312 ↑	319 ↑	TPOAb	<0.05	尿中RBC/視野	1~4
NH ₄	66	108 ↑	TRAb	(-)	便潜血	
BUN	15	13	FBS	109	グアヤック	(-)
Cr	0.84	0.68	HbA1c	5.0	ラテックス	(-)
24-Ccr	84.4 ↓		HbA1c	4.3	骨塩定量(BMD)	0.747
UA	4.9	3.9	prealbumin	3.3 ↓	T-score(対若年成人)	-2.5
Na	133 ↓	127 ↓	RBP	0.4 ↓	Z-score	-1.9
K	3.8	3.8	transferrin	140 ↓	オステオカルシ	3.1
Cl	100	98 ↓	renin	16.0 ↑	γ-Pth	12
Ca	8.6 ↓	8.6 ↓	aldosterone	325 ↑	尿中NTx	
Mg	2.1	2.0	B2mg	0.173		
P	3.0	2.3 ↓	NAG/Cr	48.1 ↑		
T-Amy	79	121	ICG15%	未検査		
U-Amy	72					
胆汁酸	444.8 ↑	665.4 ↑				

PO₂-99.4, PCO₂-35.9, pH-7.51,
BE-5.2, SpO₂-98.7, HCO₃ · 28.1
(Room air)

PO₂-599, PCO₂-33.3, pH-7.52,
BE-4.3, SpO₂-100, HCO₃ · 26.9
(FiO₂ 1.0)

胸部XP：骨軟部陰影に異常なし。
両側 CPA sharp。肺野に異常影なし、
CTR：47.0%。

腹部XP：骨軟部陰影に異常なし。
異常ガス像認めない。

腹部エコー：肝表面は凹凸不正、
肝辺縁は鈍。右葉は萎縮。門脈血
流は求肝性。脾臓は 114×42.7mm。
spleen 下極寄りに副脾あり(10.6×
6.8mm)。pancreas body に境界明瞭
な嚢胞性病変(7.2×3.2mm)一ヶ認め、
MPD との連続性みられ IPMN 分枝
型を疑う。

胸部CT：肺野に腫瘤性病変認めな
い。縦隔、肺門リンパ節に腫大を
認めない。胸水なし。

腹部CT：肝臓は全体に萎縮し、表
面凹凸不整・辺縁鈍で肝硬変の所
見。肝臓周囲に腹水を認めます。
肝内に明らかな腫瘤影なし。

動脈：腹腔動脈から脾動脈、左胃
動脈が分岐しその後総肝動脈、固
有肝動脈となる。肝門部で左右の
肝動脈に分岐し、中肝動脈は左肝
動脈から分岐する。PHA の長さ
10mm、径 5.3mm、左右肝動脈は分
岐部でそれぞれ径 3mm。

門脈：IMV は脾静脈に合流。SMV
と脾静脈とが合流し、門脈本幹を
形成します。門脈本幹は、太い
coronaly を合流後、肝門部で左右に
分岐します。本幹径は 11mm、
Coronary 合流部から左右分岐部ま
での長さは 45mm、左枝は長さ
20mm、径 10mm、右枝は長さ
15mm、径 10mm。

静脈：右肝静脈は独立して、中肝
静脈と左肝静脈が共通幹を形成し、

それぞれ下大静脈に還流する。右
肝静脈は径 7mm、左中共通管は径
6mm。

食道静脈瘤、脾腎短絡路、傍臍静
脈拡張を認める。その他、腹腔内、
骨盤内臓器に明らかな異常認めな
い。

左肝動脈径：3.1 mm 右肝動脈
径：3.9mm

門脈本幹：14.8mm 右枝：7.7mm
距離 10.1mm 左枝：9.4mm 距離
15mm

左肝静脈：5.1mm 中肝静脈：5.7
mm 右肝静脈：4.1 mm

MRI (EOB)：肝全体の萎縮と肝
辺縁に凹凸不整あり。肝内に明ら
かな腫瘤の形成なし。門脈系の側
副路の描出がある。

上部消化管内視鏡：食道静脈瘤は
2条あり F2LsCwRC(-)、

F1LmCwRC(-)を認める。胃静脈瘤
なく、体上部全体に浮腫状、発赤
あり portal hypertension gastropathy
の所見。

下部消化管内視鏡：特記すべき所
見なし。

頭部MRI： T1で両側淡蒼球から
大脳脚内側頭側にかけて、高信号
を認める。慢性肝機能障害などの
所見。

移植手術：弟の肝左葉グラフトを
用いた生体肝移植術

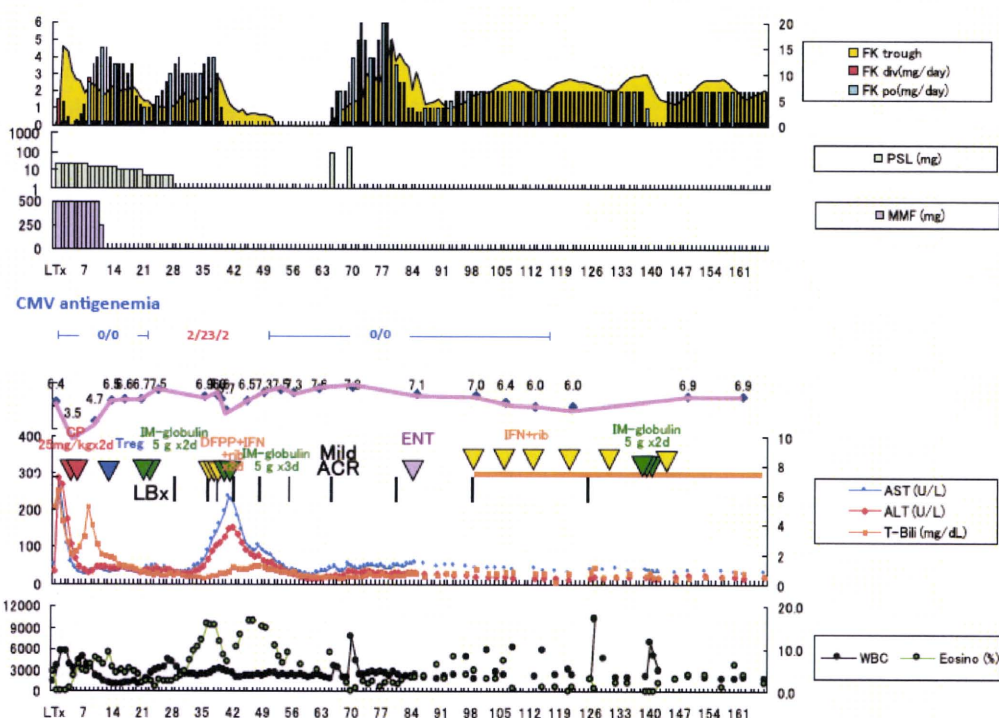
術後経過：図 1

術後は ICU にて人工呼吸器下に全
身管理を施行。呼吸・循環動態は
安定しており、グラフト機能は順
調に回復。プロトコール通りにプ
ログラフ、ステロイド、セルセブ
トの 3 剤で免疫抑制を開始し、術
後 4 および 5 日目に、エンドキサ
ン 25 mg/kg を投与した。血清肝逸
脱酵素値は順調に低下し、術後 7
日目にはほぼ正常値まで復した。9
日目より経口摂取を開始した。エ

ンドキサンにより WBC は 900 mm³ まで低下し、11 日目にセルセプトを中止し、13 日目に予定通り、培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。この間、ステロイドは漸減し、28 日目にはプログラフ単剤での免疫抑制となった。術後 34 日目に CMV antigenemia 陽性となり、AST/ALT 再上昇認められ、肝生検を施行。CMV hepatitis と診断され、免疫抑制を完全に中止し、デノシン投与を開始し、CMV 感染は軽快した。また、術後は一過性

ソルコーテフ投与後、プログラフによる免疫抑制を再開した。その後は肝機能も安定したまま順調に経過し、プログラフ 1 mg/day (trough 7 ng/ml) 単剤での免疫抑制で退院となった。退院後は外来通院にて経過観察を施行。術後 98 日目の肝生検で C 型肝炎再発が疑われ、インターフェロン・リバビリン治療を開始した。現在、術後約 6 ヶ月経過しているが、プログラフ 2 mg/day (trough 7 ng/ml) 単剤で肝機能は安定している。

図1. 臨床経過(症例1)



に低値となっていた血中 HCV-RNA 値が 6 台まで上昇し、C 型肝炎再発疑われ、DFPP を計 3 回施行した。その後、AST/ALT 値は漸減し正常化した。免疫抑制は中止したまま経過観察を行った。術後 65 日目に AST/ALT 値が軽度上昇し、肝生検を施行。Mild ACR と診断され、

症例 2

63 歳、男性
 疾患名：アルコール性肝硬変
 血液型：B(+)
 術前状態：UNOS 2B
 Liver damage: C、Child-Turcotte-Pugh : 10 点=C、MELD : 14

HLA typing: A-24/-, B-40/52, Cw-08/12, DR -09/15, DRw-09/15, DQ-03/06
 身体所見：意識：清明，肝性脳症無し。

眼球結膜軽度黄染(+), 眼瞼結膜軽度貧血(+)

体表面：Vascular spider (+), Pulmar erythema (-)

胸部：心音・呼吸音異常無し。

腹部：膨満・軟、圧痛なし。腹水少量。肝/脾：触知せず。

四肢：上肢および下肢浮腫なし。

術前検査：

血液検査所見：表2

PO₂:65.5, PCO₂: 30.8, pH:7.485, BE: 0.3, SpO₂:93.1%, HCO₂:23.0 (Room air)

PO₂:495, PCO₂ : 26.1, pH : 7.515, BE : -1.2, SpO₂ : 100, H₂CO₃-20.9, シヤント率 : 9.9 (FiO₂=1.0)

胸部 XP 骨軟部陰影に異常なし、両側 CPAsharp、肺野クリア。

CTR : 36.4%

腹部 XP 骨軟部陰影に異常なし、異常腸管ガスなし。右下腹部に腹腔内カテーテルを認める。

心エコー(循内) 左室内腔の拡大

表2

入院時					
WBC	4000	HBs Ag	0.00	AFP	4.3
RBC	320	HBs Ab	0.22	AFP-L3	0
Hb	10.6	HBc Ab	0.15	CEA	7.9 ↑
HCT	31.4			CA 19-9	114.2 ↑
PLT	9.6			PVKA-II	20
不規則抗体	(-)	HCV Ab	(-)	DUPAN-2	182
PMN /Lymph				Zn	53
PT(PT%)	15.6	HTLV- I	(-)	Fe	284
PT-INR	1.39	HIV	(-)	フェリチン	72
APTT	54.3	TPLA	(-)	S-Cu	107
D-dimer	12.59			U-Cu	4
AT-III	45	CMV IgG	133.1	セルロプラスミン	28.8
Fibrinogen	133	CMV IgM	<1.0	α1-アンチトリプシン	181
FDP	20.8	EBV IgG	14.7		
TP	6.5	EBV IgM	<1.0	抗核抗体	80
ALB	2.7 ↓	VZV IgG	509	AM2A	(-)
T-Bil	4.3 ↓	VZV IgM	<1.0		
D-Bil	1.9 ↓	HSV IgG	7.7	RF	2.8
TTT	7.3	HSV IgM	<0.8	ASO	53
ZTT	19.2	トキノIgG	(-)	CRP	0.37
GOT	35	トキノIgM	(-)	QTF	(-)
GPT	14	カンジダ抗原	2	IgG	1707
LDH	333	β-D-グルカン	<6.0	IgM	312
γ-GTP	23	FT3	1.97	IgA	717
ALP	473 ↑	FT4	1.71	IgE	53.3
LAP	76	TSH	4.00	CH-50	22.4
Ch-E	75 ↓	FBS	161	C3	44
T-Cho	95	HbA1c	5.0	C4	8
TG	44	prealbumin	5.5	尿酸	(-)
HDL-Cho	50	RBP	0.4	尿蛋白	(±)
CPK	226	transferrin	222	尿沈査	
NH ₃	34			尿比重	1.02
BUN	13	B 2mg	2.58	尿中WBC/視野	<1
Cr	0.79	B 2mg/U	0.045	尿中RBC/視野	1~4
Ccr	69.9 ↓			尿中NTx	1306.5
UA	5.1	NAG/U	27.7	レニン	31.2 ↓
Na	132			アルドステロン	457 ↑
K	3.5	s-PTH	38	25(OH)-VitD	21
Cl	98	オステオカルシン	2.5	抗TPO抗体	<0.05
Ca	8.5			抗サイログロブリン抗体	<0.12
Mg	2.2			TSHRAb	(-)
P	3.3			便潜血	(-)
T-Amy	94				
U-Amy	254				
胆汁酸	312.1				

ECG HR : 75、NSR+PVC

呼吸機能検査：%VC 167.6、1秒率 58.5% Shunt率：

9.9%, %DLCO : 67.4%

血液ガス：

及び軽度の左房拡大を認めるが、EF 66%であり手術に支障なし。

腹部エコー：

肝表面-肝実質は萎縮し、軽度凹凸不整、辺縁は鈍化しており肝硬変の所見。肝内変化-左葉肝内胆管拡

張を認めるが、内腔は開存しており、壁肥厚や tumor、stone の閉塞性病変は指摘できず。Ascites：肝表面、脾周囲、ダグラス窩に少量、Spleen=13.8x4.6cm, 脾腫あり。Main Portal Trunk=15.2mm, 血流は求肝性, Flow:1.54L/min。

腹部 CT:

肝表面は凹凸不整、辺縁は鈍、肝は萎縮しており肝硬変の所見。脾臓は 13.8x4.6cm と腫大し脾腫の所見。肝外側区に肝内胆管の拡張を認めるが、明らかな腫瘍性病変認めない。腹腔内に腫瘍性病変認めない。

動脈：Celiac から脾動脈、左胃動脈、総肝動脈が分岐。総肝動脈から先に左肝動脈が分岐した後 GDA 及び右肝動脈が分岐。中肝動脈は左肝動脈からの分岐。LHA:2.2mm, MHA:2.7mm, RHA:4.6mm。

門脈：SMV と脾静脈が合流し本幹を形成。肝門部で左右に分岐し、右枝から前後区域枝が分岐している。左枝は UP を形成している。門脈径は 13.5mm、本幹の長さは

5.0cm。左枝径は 10.5mm、右枝径は 12.5mm。

静脈：左・中肝静脈が共通幹を形成し、右肝静脈が独立して IVC に流入する通常分岐。共通幹径 8.8mm、右肝静脈径 8.3mm。

上部消化管内視鏡：胃十二指腸潰瘍癒痕、食道静脈瘤 EVL 後癒痕のみ。

大腸ファイバー(前医)：S 状結腸～直腸に 3-4mm 大の Is polyp 多数。

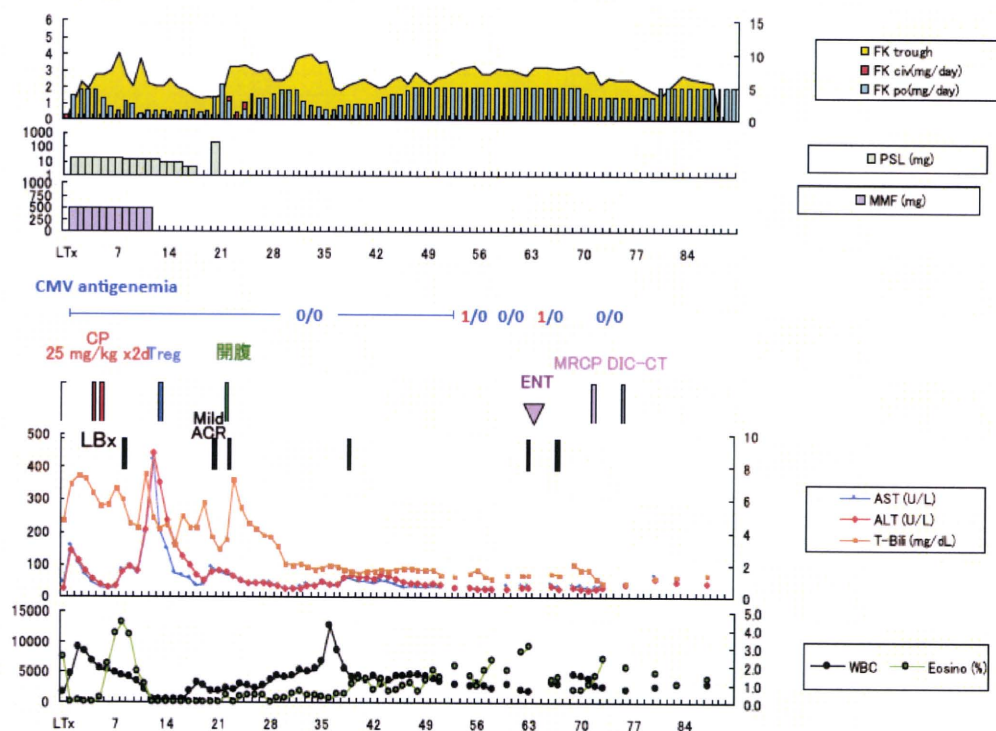
胸部 CT：両肺野気腫性変化を認める。腫瘍性病変無し。縦隔リンパ節腫大無し。

頭部 MRI：脳室・脳溝は軽度拡大。両側淡蒼球に左右対称性の高信号を認め慢性肝障害の所見。両側大脳白質に左右対称性の高信号を複数認め加齢性変化。その他、明らかな異常なし。

EOB-MRI：肝外側区肝内胆管拡張を認めるが、肝内に腫瘍性病変なし。

移植手術：息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術 (GV 344g、GV/SV 28.6%)。過小グラフトの

図2. 臨床経過(症例2)



ため、門脈—下大静脈シャントを増設した。

術後経過：図 2

術後は ICU にて人工呼吸器下に全身管理を施行。呼吸・循環動態は安定しており、グラフト機能は順調に回復。プロトコール通りにプログラフ、ステロイド、セルセプトの 3 剤で免疫抑制を開始し、術後 4 および 5 日目に、エンドキサン 25 mg/kg を投与した。血清肝逸脱酵素値は順調に低下していたが、体位変換を契機にグラフト裂傷をきたし、AST/ALT は再上昇した。エンドキサン投与により WBC は 400 mm³ まで低下し、G-CSF 投与が必要であった。11 日目にセルセプトを中止し、13 日目に予定通り、培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。ステロイドも漸減し、17 日目にはプログラフ単剤での免疫抑制となった。術後 20 日目に AST/ALT 値が軽度上昇し、肝生検を施行。Mild ACR と診断され、ソルコーテフ投与後、プログラフを trough 7-8 ng/ml まで増量した。術後 22 日目に門脈—下大静脈シャント閉鎖術を施行。一過性に再上昇していた AST/ALT はその後漸減、全身状態も安定し、退院。外来通院にて経過観察を行っている。現在、術後約 3 ヶ月経過しているが、プログラフ 2 mg/day (trough 6 ng/ml) 単剤で肝機能は安定している。

症例 3

56 歳、男性

疾患名：NASH 肝硬変

血液型：AB(+)

術前状態：UNOS2B

Liver damage: Child-Turcotte-Pugh :

13 点=C、MELD : 18

Lymphocyte Cross Match: TW(5%),
BW(5%), BC(5%), FACS:24.0%
HLA typing: A-02/-, B-40/40, Cw-03/-,
DRB1- 04/04, DQB1-04/04

(DONOR:A-02/24, B-40/40, Cw-
03/15, DRB1-04/11, DQB1-03/04)

身体所見：

意識：清明，肝性脳症無し

眼球結膜黄染(+), 眼瞼結膜軽度貧血(-)

体表面：Vascular spider (-), Pulmar erythema (-)

胸部：呼吸音異常無し

腹部：膨満。腹水大量に貯留する肝/脾：触知せず。

四肢：軽度下腿浮腫あり。

術前検査：

血液検査所見：表 3

ECG HR : 90、NSR

呼吸機能検査：%VC 82.2%、1
秒率 87.4%、シャント率 9.3%、
DLCO 74.4%

血液ガス：

PO₂:500, PCO₂ : 27.1, pH : 7.445,
BE : -4.5, SpO₂ : 100, H₂CO₃-18.3,
シャント率 : 9.9 (FiO₂=1.0)

胸部 XP : 骨軟部陰影に異常なし、
両側 CPAsharp、肺野クリア CTR :
41.2%。左鎖骨下に IVH を認める。

腹部 XP : 骨軟部陰影に異常なし、
右横隔膜下に大腸ガスを認める。
異常腸管ガス (-)

心エコー：TR mild、EF : 72%、
FS : 42% PH(-)

腹部エコー：肝表面-肝実質は萎縮し、凹凸不整、辺縁は鈍化しており肝硬変の所見。肝内変化-高エコーの結節性病変を数箇所認め、再生結節疑い。最大径は 10.2×7.7mm。肝内胆管拡張無し。Ascites : 多量、Spleen-15.0x4.8cm、脾腫あり。Main Portal Trunk-12.5mm、血流は求肝性、Flow:0.76L/min。

表3

入院時					
WBC	9500 ↑	HBs Ag	0.00	AFP	9.8
RBC	292 ↓	HBs Ab	0.31	AFP-L3	4.6
Hb	10.7 ↓	HBc Ab	0.14	CEA	6
HCT	29.7 ↓			CA 19-9	49.6
PLT	5.6 ↓			PIVKA-II	15
不規則抗体	(-)	HCV Ab	(-)	DUPAN-2	25>
PMN /Lymph				Zn	66
PT(sec)	16.1 ↑	HTLV-I	(-)	Fe	80
PT-INR	1.43 ↓	HIV	(-)	フェリチン	562 ↑
APTT	67.4 ↑	TPLA	(-)	S-Cu	50 ↓
D-dimer	3.84 ↑			U-Cu	4
AT-III	44 ↓	CMV IgG	47.2 ↑	セルロプラスミン	9.7 ↓
Fibrinogen	211	CMV IgM	<1.0	α1-アンチトリプシン	169
FDP	6.9	EBV IgG	5.0 ↑		
TP	4.9 ↓	EBV IgM	<1.0	抗核抗体	40
ALB	2.4 ↓	VZV IgG	11.7 ↑	抗ミトコンドリア抗体	(-)
T-Bil	4.5 ↑	VZV IgM	<1.0	PSA	<3.25
D-Bil	1.1 ↑	HSV IgG	4.6 ↑	RF	3
TTT	10.9	HSV IgM	<0.8	ASO	122
ZTT	1.9	トキノIgG	(-)	CRP	2.85
GOT	27	トキノIgM	(-)	GTF	(-)
GPT	27	カンジダ抗原	(-)	IgG	1015
LDH	238	β-D グルカン	8.1	IgM	112
γ-GTP	19	FT3	1.51	IgA	506
ALP	288	FT4	1.07	IgE	14.2
LAP	76	TSH	1.41	CH-50	36.5
Ch-E	57 ↓	FBS	122	C3	46 ↓
T-Cho	66 ↓	HbA1c	4.2	C4	10 ↓
TG	39	prealbumin	6.0 ↓	尿糖	(-)
HDL-Cho	39	RBP	0.6 ↓	尿蛋白	(-)
CPK	54 ↓	transferrin	116 ↓	尿沈査	
NH ₄	169 ↑			尿比重	1.011
BUN	44 ↑	B 2mg	5.22 ↑	尿中WBC/視野	5~9
Cr	1.18 ↑	B 2mg/U	1.244 ↑	尿中RBC/視野	5~9
Cor	83.9			尿中NTx	377.4
UA	4.8	NAG/U	30.8 ↑	レニン	21.0 ↑
Na	128 ↓			アルドステロン	2120 ↑
K	4.3	s-PTH	9	25(OH)-VitD	12
Cl	105	オステオカルシン	4.2	抗TPO抗体	6.37
Ca	8.6			抗サイトクログリン抗体	6.42
Mg	1.7			TSHRab	<1.0
P	3.3			便潜血	(-)
T-Amy	110				
U-Amy	337				
胆汁酸	159.2 ↑				

腹部CT：肝表面は凹凸不整、辺縁は鈍、肝は萎縮しており肝硬変の所見。腹水著明。肝全体に斑状に低吸収を認め、肝脾比0.97と脂肪肝の所見。脾臓は15.0x4.8cmと腫大し脾腫の所見。脾臓内部に低吸収域を認めPSE後の所見。肝内に腫瘍性病変認めない。腹腔内に腫瘍性病変認めない。食道静脈瘤および臍傍静脈の拡張を認める。

動脈：Celiacから脾動脈、左胃動脈、総肝動脈が分岐。総肝動脈が左右の肝動脈に分岐。中肝動脈は左肝動脈からの分岐。

LHA:1.8mm,MHA:2.2mm,RHA:3.9mm。

門脈：SMVと脾静脈が合流し本幹を形成。肝門部で左右に分岐し、右枝から前後区域枝が分岐している。前区域は萎縮している。左枝

はUPを形成している。門脈径は14.3mm、本幹の長さは5.2cm。左枝径は10.0mm、右枝径は12.5mm。静脈：左・中が共通管を呈し、右肝静脈は独立してIVCに流入する3分岐パターン。左肝静脈径5.7mm中肝静脈径5.7mm共通管10.2mm右肝静脈径4.5mmと狭小化を認める。

上部消化管内視鏡：食道静脈瘤Li,F1,Cb,RC(-),TE(+)

下部消化管内視鏡：異常所見無し
胸部CT：腫瘍性病変無し。肺門・縦隔リンパ節腫大無し。

頭部MRI：脳室・脳溝はほぼ正常大。両側大脳白質にT2強調像やFLAIR像で高信号を認め、加齢性変化。T1で両側淡蒼球の信号がわずかに上昇し、慢性肝機能障害の所見。

腹部 MRI：肝内に腫瘍性病変は認めない。

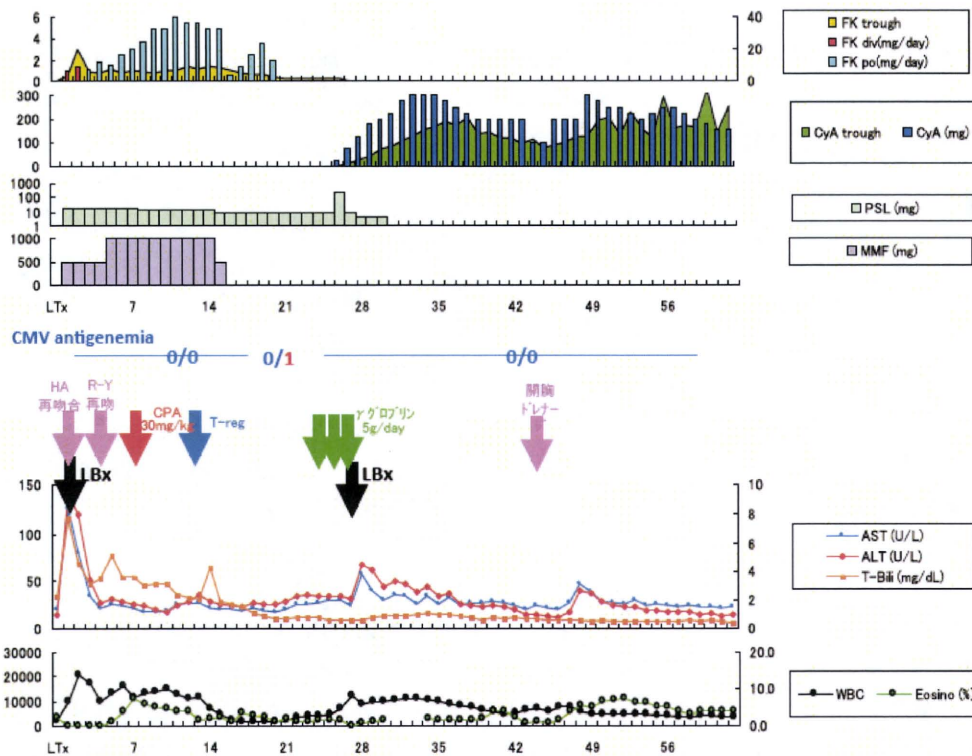
移植手術：

息子の肝左葉グラフトを用いた生体肝移植術（GV 444g、GV/SV=34.4%）

術後経過：図3

1700 mm³ まで低下した。13 日目に予定通り、培養リンパ球を輸注した。細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。術後 15 日目にセルセプトを中止した。プログラフは 5-6 mg/day、trough 6-9 ng/ml で維持していたが、錐体外路

図3. 臨床経過(症例3)



術後はICUにて人工呼吸器下に全身管理を施行。呼吸・循環動態は安定しており、グラフト機能は順調に回復。プロトコール通りにプログラフ、ステロイド、セルセプトの3剤で免疫抑制を開始した。術翌日と術後4日目に、肝動脈屈曲およびR-Y脚吻合部再出血のため再手術を行った。症例1および症例2においてエンドキサンによるWBC減少が著しく、過量投与と考えられ、本症例では術後7日目に、30 mg/kgを1回投与とした。エンドキサン投与によりWBCは

症状を主体とする神経症状が出現したため、術後20日目にプログラフ投与を中止し、ステロイド単独での免疫抑制を行った。26日目よりAST/ALT値が軽度上昇し、ネオオーラル投与を開始した。翌日、肝生検を施行するも拒絶反応を認めず、脂肪肝と診断された。ステロイドを漸減し、術後30日目に投与を中止した。その後、AST/ALT値は漸減し、神経症状も改善していった。免疫抑制はネオオーラル単剤で維持（現在、200 mg/day、trough 100-150 ng/ml）し、全身状態およ

び肝機能も安定しており、近々の退院を予定している。

D. 考察

北海道大学病院第一外科では、肝移植後の標準的免疫抑制療法として、プログラフ、セルセプト、ステロイドの3剤併用に加え、抗CD25抗体であるシムレクトを移植手術終了時および術後4日目に、一回20mgを静脈内投与しているが、抗CD25抗体の制御生T細胞に対する影響を鑑み、本臨床試験では、シムレクトを使用しないプロトコールとした。

当科において、肝移植後のCMV感染予防的治療は、CMV既感染ドナーからCMV未感染レシピエントへの移植例で無い限り行っていない。しかし症例1では、CMV既感染ドナーからCMV既感染レシピエントへの移植例にも関わらずCMV hepatitisを来したことから、以降の症例においてガンシクロビルもしくはヴァルガンシクロビルの予防的投与を行うこととした。症例2および症例3でもCMV antigenemiaは一過性に陽性となったものの、CMV diseaseを発症することはなかった。CMV感染については、エンドキサン投与の弊害と考えられた。

エンドキサンは先行する東京女子医大での腎移植症例のプロトコール同様の投与量および投与回数で症例1および2では投与を行ったが、これら症例ではWBC低下が著しく、症例2では連日G-CSF投与が必要となった。また、これらの症例ではWBC再上昇を認めたものの長期にわたりWBCは比較的低値で推移していたため、症例3では、エンドキサンを30mg/kgで1回投与とした。この症例では、術

後WBC値が高値で推移したこともあり、WBC値は1700/mm³を底値とし、速やかに再上昇した。このWBC減少が本細胞治療において十分か否か今後の経過を見守る必要があるが、非代償性肝硬変で門脈圧亢進症となっている多くの肝移植レシピエントの場合、エンドキサンの投与量・投与回数は検討の余地があると考えられる。

本年度は3症例において本臨床試験を施行した。培養細胞輸注に伴う明らかな副作用は認められなかった。周術期に3例中2例で急性拒絶反応が見られたが、両者とも免疫抑制剤を早期に完全中止していた際に拒絶を来しており、その程度はmildであった。今後も注意深い経過観察が必要であるが、全例、カルシニューリン阻害剤の単独投与で良好な肝機能を維持しており、今後、免疫抑制剤の漸減が期待される。

E. 結論

3例の肝移植症例において、制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法の臨床試験を施行した。エンドキサン投与量・回数については今後も検討の余地はあるが、細胞輸注に伴う副作用は認められず、安全に臨床試験を施行し得た。本臨床試験例でも拒絶反応が認められたものの、いずれも免疫抑制剤中止もしくは減量のさなかであり、拒絶も軽微であった。免疫寛容誘導効果を判断するためには、今後、さらなる経過観察が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

「制御性T細胞を用いた肝移植症例の免疫モニタリング」

研究分担者：山下 健一郎

北海道大学 大学院医学研究科 移植外科・准教授

研究分担者：清野 研一郎

北海道大学 遺伝子病制御研究所 病態研究部門 免疫生物分野・教授

研究分担者：垣生 園子

順天堂大学医学部 免疫学講座・教授

研究要旨：臓器移植後は適切な免疫抑制（薬剤の種類や投与量）を施すことが肝要であるが、臨床的に宿主の免疫状態や拒絶反応を予知しうる確立されたバイオアッセイやマーカーは存在しない。本研究では、制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法を施行した生体肝移植症例3例において、種々のアッセイ法を用いて免疫モニタリングを試みた。Cylexは抗ドナー反応には非特異的だが、over immunosuppression、CMV感染やHCV再発など状態を判断する上で有用なアッセイと考えられた。MLR、IFN- γ ELISPOT、抗原特異的CD4⁺CD154⁺ T細胞を用いたドナー抗原に対する反応を総合的に判断することで、免疫抑制の適正化を図れる可能性が示唆された。培養制御性T細胞輸注後は末梢血液中のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T細胞、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺ T細胞、CD4⁺CD45RA⁻Foxp3⁺ T細胞の割合が増加した。肝移植後はnaïve T細胞の割合は減少し代わってmemory T細胞が増加する傾向が認められた。本試験において行っている免疫モニタリング法の有用性を確認するためには今後症例を重ね更なる検討が必要である。

A. 目的

臓器移植後にはグラフト拒絶を予防するため免疫抑制剤の投与が必須である。しかし、今日臨床使用されている免疫抑制剤はすべて非特異的（汎）免疫抑制であり、これらはグラフトに対する拒絶反応を抑制するかわりに、さまざまな感染症や悪性腫瘍発生に対する宿主の免疫抵抗性を奪うことや、免疫抑制剤自体の副作用が問題となっている。免疫抑制中の免疫状態を把握し、適切な免疫抑制（薬剤の種類や投与量）を施すことが

肝要であるが、現状では、臨床的に宿主の免疫状態や拒絶反応を予知しうるバイオアッセイやマーカーは存在せず、免疫抑制剤の投与量は主に免疫抑制剤の血中トラフ値や血液生化学検査でグラフト機能をみながら調整し、拒絶反応が疑われる場合には臓器生検を行い病理性的診断よらざるを得ない。

制御性T細胞を用いた肝移植症例において、末梢血液を用い、種々の免疫アッセイを行うことで免疫状態をモニタリングする事を目的とした。

B. 方法

(1) 検討材料

① 生体肝移植後患者およびその生体ドナーから、診断あるいは治療目的で採取された末梢血 10-20 ml の提供を受ける（ドナーおよびレシピエント共に、手術直後で入院中の場合は 1-2 回/週程度、外来の場合は 2-4 回/年程度の頻度）。

② 上記より得られた血液中の全血および分離した白血球分画 PBMC を使用し、免疫生物学的解析を行う。採血管は EDTA およびヘパリン (Cylex 用) を使用。比重遠心液は Ficoll-Paque PLUS (GE healthcare) を用いた。培養液は RPMI-1640 (SIGMA) に 10%FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、50 μ M の 2-メルカプトエタノールに調整して使用した。ヒト末梢血を 840 xg、20 分、室温で比重遠心を行い、中間層を回収。HANK'S Balance Salt Solution (SIGMA) で 2 回洗浄後、培養液に再懸濁した。

(2) 評価項目

① Immuknow (Cylex)

T細胞が活性化する際に細胞内で産生・蓄積される ATP 量を測定することで活性能を評価する。レシピエント末梢血液(4倍希釈)100 μ l に PHA (25 μ l) を加え、37°C・5%CO₂ インキュベータ内で 16 時間培養を行う。CD4 Dynabeads で CD4⁺ T細胞を抽出・溶解し、ルミノメーターで ATP 濃度を測定した。

② リンパ球混合培養試験 (MLR)

Stimulator (ドナー および 3rd パーティ) は 30 Gy で放射線照射をした細胞を使用した。Responder (レシピエント) および Stimulator の細胞濃度は 1x10⁵/well で、これら細胞を 7 日間共培養した。培養終了 16 時間前に チミジン を 1 μ Ci/well 加え β 線シンチレーションカウンターで チミジン と取り込みを評価した。

③ IFN- γ ELISPOT

レシピエント末梢血リンパ球を Ficol 比重分離で抽出し、IFN- γ 補足抗体をコーティングした BDTM ELISPOT プレートに ヒトリンパ球を放射線照射したドナーリンパ球と共に混合培養する。24-48 時間後に IFN- γ スポットを ビオチン標識抗マウス IFN- γ 抗体にて反応させ HRP-streptavidin、3-amino-9-ethyl-carbasole substrate で視覚化し、ELISPOT リーダーにて spot を評価し定量化した。なお、本アッセイでは抗原にドナー末梢血リンパ球およびその lysate もしくは MHC class II の違いに応じたペプチドを使用することで、direct および indirect pathway の両反応を同時に検討した。Direct response は 24 時間培養、Indirect response は 48 時間培養後に評価した。

④ ドナー抗原特異的 CD40L⁺リンパ球

レシピエント末梢血リンパ球を放射線照射したドナーリンパ球と混合培養し、CD28 抗体にて刺激する。培養開始後 6 時間後に細胞を採取して Fixation

Solution (BD Cytofix/Cytoperm Buffer)および Permeabilization Buffer (BD Perm/Wash buffer)を用いて CD40L の細胞内染色を行う。抗体は BD Bioscience の PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE Anti-Human CD154 (TRAP1)を用い、細胞内染色のプロトコールに従って染色を行い、Flow cytometry で CD40L の発現を解析・検討する。

⑤ 制御性 T 細胞の染色

抗体は BD Bioscience の PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD8 (RPA-T4), FITC Mouse Anti-Human CD25 (M-A 251), FITC Mouse Anti-Human CD127 (hIL-7R-M21), FITC Mouse Anti-Human CD45RA (HI100), FITC Mouse Anti-Human CD28 (CD28.2), PE Mouse Anti-Human FoxP3 (259D/C7)を用いて FoxP3 染色推奨プロトコールに従って染色した。

⑥ Effector Memory T cell

抗体は BD Bioscience の PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD4 (RPA-T4), PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD8 (RPA-T4), PE Mouse Anti-Human CD45RA (HI100), FITC Mouse Anti-Human CD62L (DREG-56)を用いて細胞表面染色を行った。

⑦ 臨床データとの統合

当該患者の臨床データとの統合解析を行い、免疫状態の把握や拒絶反応などの予測に有用な方法・因子について検討する。なお、臨床データは下記診療情報を利用する。

- ・患者基本情報：年齢、性別、ID 番号
- ・疾患情報：臨床診断名、病理診断名、血液生化学検査所見、生検病理組織学的所見 など

C. 結果

症例 1

- ・ Immuknow (cylex)：図 1

術前値は43 ng/mlと低値であった。移植後早期は400台まで上昇するも HCV-RNA値上昇とともにその後は漸減し、CMV罹患時には100台となった。CMV感染軽快後は約200-250 ng/mlで推移している。

- ・ MLR：図 2

移植後約5週間は術前値に比し低値であったが、6-10週目までドナー抗原に対する反応は漸増した。この間、免疫抑制剤はすべて中止されていた。プログラム再開後は反応が一過性に低下したが、術後14週以降はCPM値、SI値ともに上昇している。

- ・ IFN- γ ELISPOT：図 3

肝移植後はdirectおよびindirect responseともに陰性であったが、8週目より両者のpathwayで反応が上がった。この時期は、CMV感染症のため免疫抑制剤を中止しており、術後65日目には肝生検でMild ACRと診断されている。免疫抑制再開後はdirectおよびindirect responseともに低下傾向にある。

- ・ 末梢血中の抗原特異的 CD4⁺CD154⁺ T細胞：図 4

術前値は約1.5%であり、感染症や拒絶反応によらず術後は2-3%で推移した。

- ・ 末梢血中のRegulatory T細胞：図 5

Regulatory T細胞のphenotypeとしてCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T細胞および

CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺ T細胞の割合を
検討した。これら細胞の術前値は

約2%であったが、培養細胞輸注後
は4.5%まで上昇し、その割合は次

図1. Cylex (症例1)

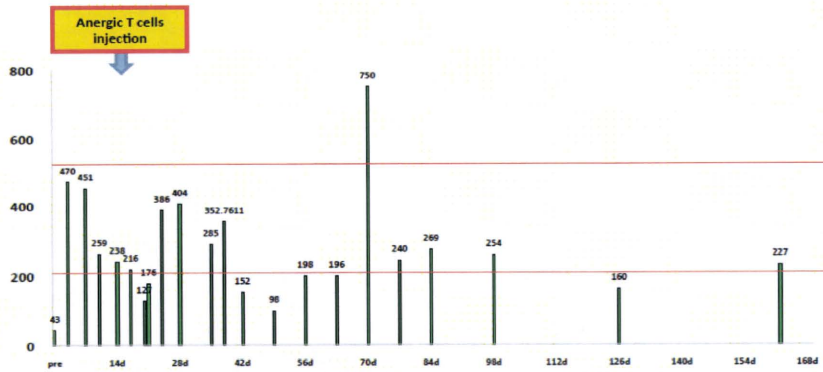


図2. MLR (症例1)

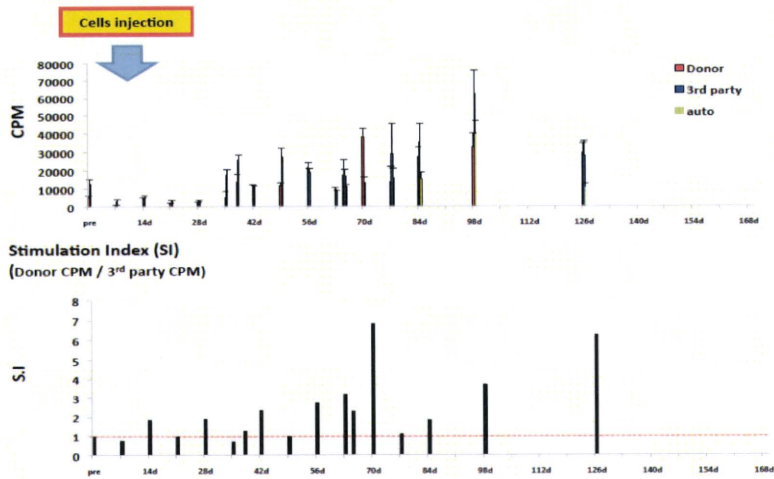
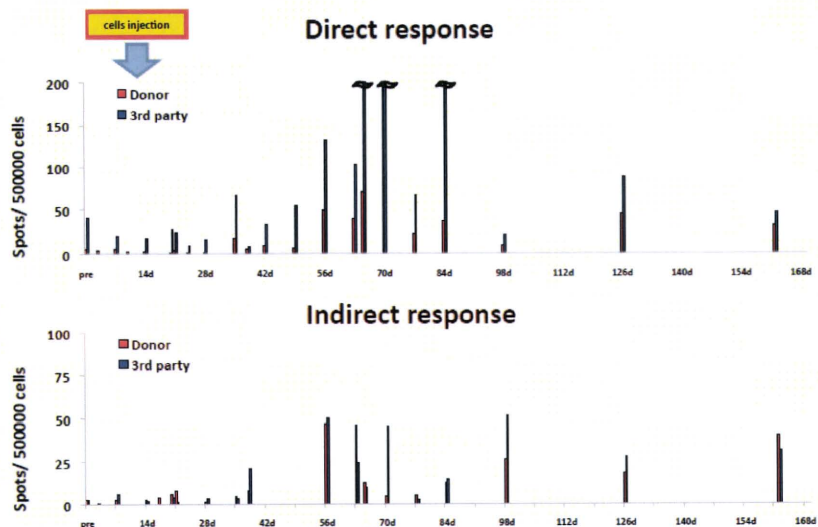


図3. IFN-γ ELISPOT (症例1)



第に漸減したものの、約10週目で術前値以上の割合が維持された。その後は、ほぼ前値に復している。
 ・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図6

経過中、CD4⁺ central memory T細胞の割合に大きな変動は認められなかったが、CD8⁺ central memory T細胞の割合はCD8⁺ effector memory T細胞と同様に術後3週目

図4. CD4⁺CD154⁺(症例1)

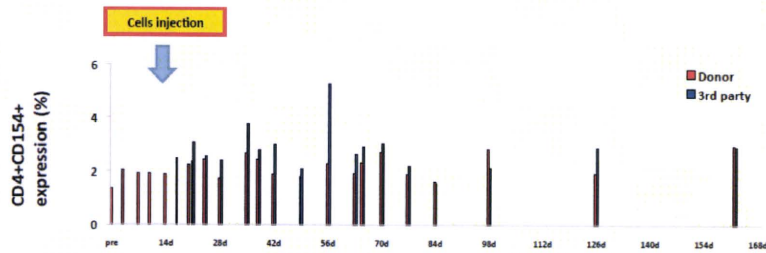


図5. Regulatory T cells(症例1)

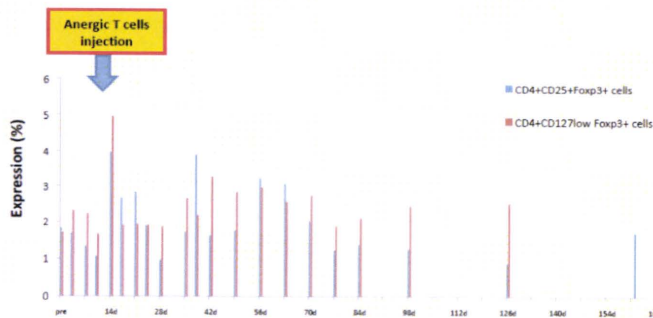
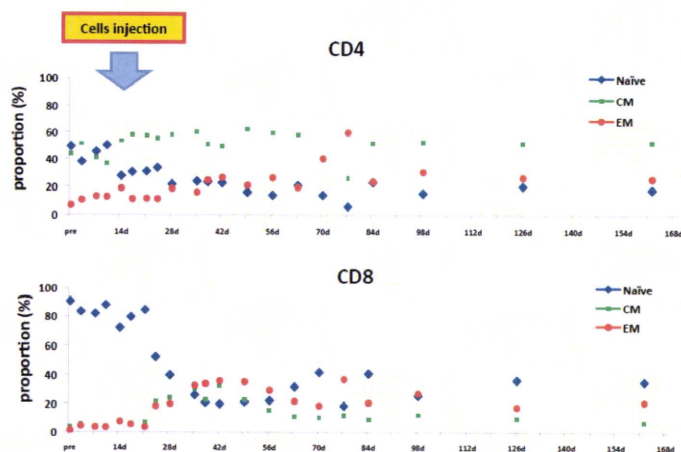


図6. Naïve/Memory T cells(症例1)



CD4⁺およびCD8⁺ Naïve T細胞は移植手術後10-21日目頃より漸減し、代わりにCD4⁺、CD8⁺ともにmemory T細胞、特にeffector memory T細胞の割合が漸増した。

より漸増し、6週を境に漸減した。

症例 2

・Immuknow (cylex)：図7

術前値は318 ng/ml、術後3日目には531 ng/mlと高値を示したが、その後は急速に低値となり、術後17日目には12 ng/mlまで低下した。この推移はWBCのそれとほぼ並行し

ていた。術後3週目にmild ACRを来したが、Immuknow値は200台であった。全身状態回復とともに、その値は上昇し、300-400 ng/ml台で推移している。

図7. Cylex (症例2)

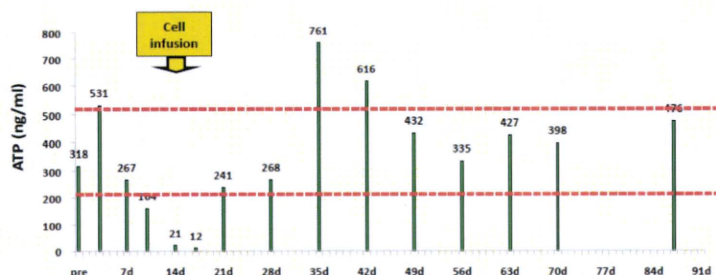


図8. MLR (症例2)

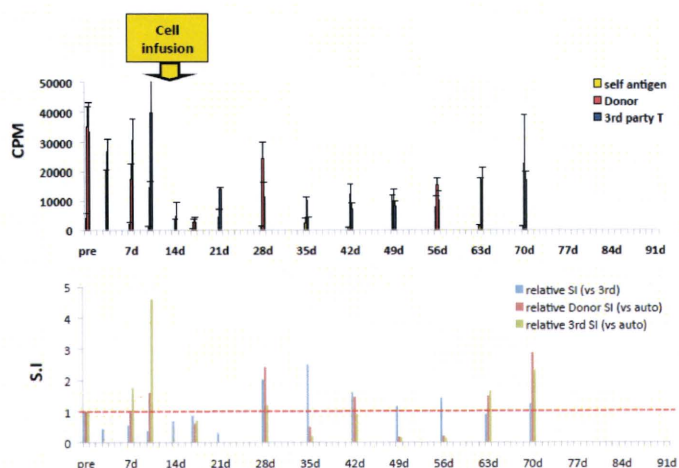
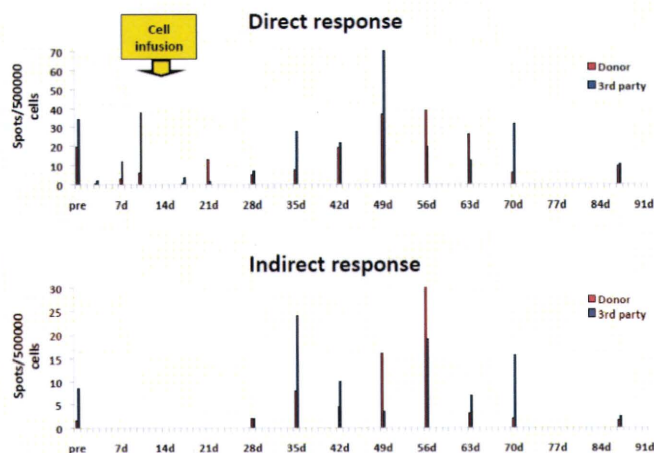


図9. IFN-γ ELISPOT (症例2)



・ MLR : 図 8
 移植前MLRではdonorおよび3rd

かった。自己抗原に対する反応を
 ベースとしたSIで見ると術後4-5週

図10. CD4⁺CD154⁺ (症例2)

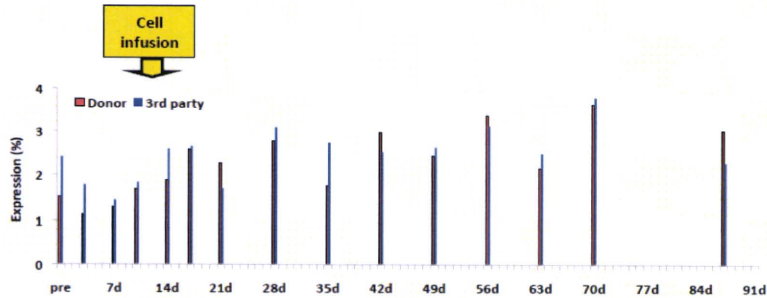


図11. Regulatory T cells (症例2)

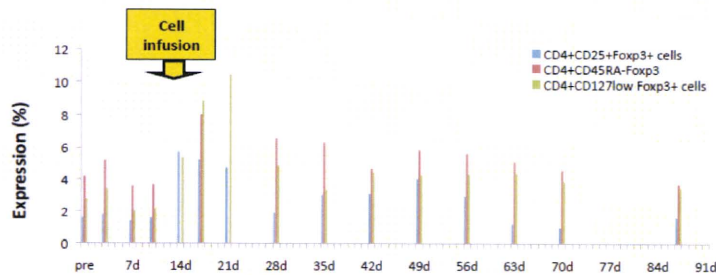
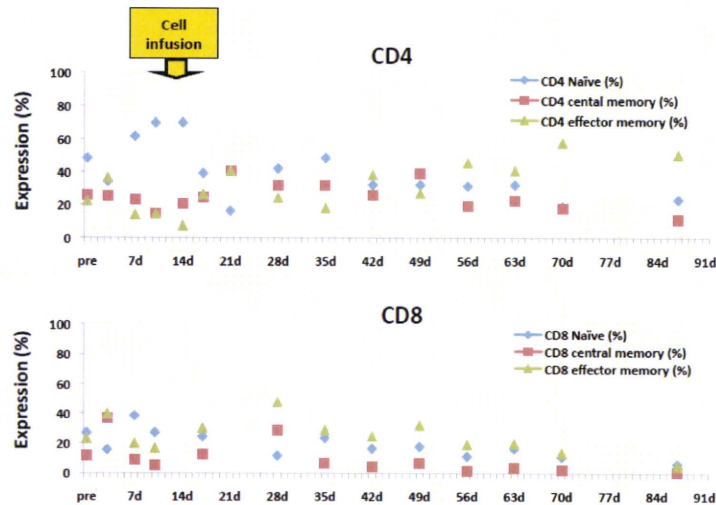


図12. Naïve/Memory T cells (症例2)



party抗原に対する反応は約35000 cpmと高値であったが、術後はこの値を超えることなく経過した。術後10日から21日目までは特に低値であった。donorおよび3rd party抗原に対する反応に差異を認めな

目にSI値は約2まで上昇したが、その後SI値はほぼ1で経過した。

・ IFN- γ ELISPOT : 図 9

術後4週目までdirect・indirect responseともに陰性であった。Direct responseは7-8週目で軽度上昇

したが、9週目以降は低下し術前値を下回った。Indirect responseは5週目以降で上昇したが、direct responseと同様に8週目をピークに低下した。10週目のdonor抗原に対するdirectおよびindirect responseは認められなかったが、3rd partyに対する反応は保たれていた。

・末梢血中の抗原特異的CD4⁺CD154⁺ T細胞：図10

術前値は約1.5%であり、経過中のイベントによらず術後は2-3%で推移した。

・末梢血中のRegulatory T細胞：図11

本症例ではRegulatory T細胞のphenotypeとしてCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T細胞、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺ T細胞に加え、CD4⁺CD45RA⁻Foxp3⁺ T細胞の割合を検討した。いずれの

Regulatory T細胞も術後10日目までは術前値とほぼ同等の割合であったが、培養細胞輸注後はすべてのphenotypeでその割合が一過性に上昇し、術後8-10週目まで術前値以上の割合が維持された。

・末梢血中のNaïve/Memory T細胞：図12

CD4⁺およびCD8⁺ Naïve T細胞は移植手術後10-14日目頃より漸減し、代わりにCD4⁺、CD8⁺ともにmemory T細胞の割合が漸増した。CD8⁺ centralおよびeffector memory T細胞の割合は術後5週目以降低下した。

症例3

図13. Cylex (症例3)

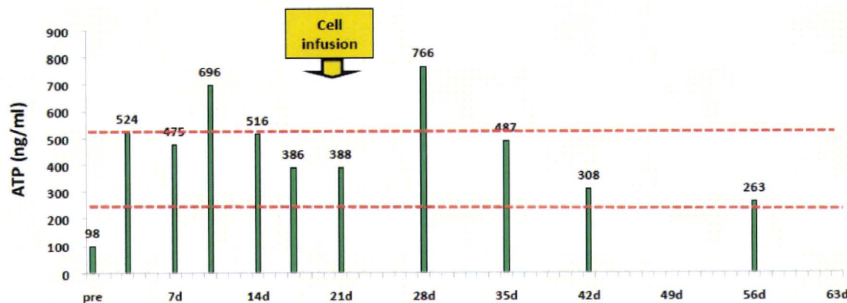


図14. MLR (症例3)

