

injury or preemptive therapy for the progression of hepatocellular death. For example, pancaspase inhibitor can potentially suppress hepatocyte apoptosis in many liver diseases.¹⁵

Recently a novel biomarker of hepatocyte apoptosis, caspase 3-cleaved cytokeratin (CK)-18 product (CK-18 fragment), had become available for clinical use.¹⁶ However, the significance of serum CK-18 fragment level is still unclear, because at least two distinct pathophysiological steps are needed for the appearance of CK-18 fragment in the serum.¹⁷ The first step is an activation of execution caspases in hepatocytes and the second is the leakage of the CK-18 fragments through the hepatocyte plasma membrane. On the other hand, an architectural chromatin-binding factor, high mobility group box-1 (HMGB-1), was identified to be passively released by necrotic cells but not by apoptotic cells.¹⁸ Therefore, the serum level of HMGB-1 in patients with liver injury is considered to be a marker of necrotic cell death of hepatocytes. Those findings therefore indicate the possibility of differential evaluation of necrotic and apoptotic hepatocellular death by the combined use of the new serum markers, CK-18 fragment and HMGB-1.

In this study, we experimentally investigated the mechanism by which CK-18 fragment and HMGB-1 appear outside hepatocytes, and clinically evaluated the usefulness of serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1 in evaluating the severity and the mechanism of acute liver injury.

METHODS

Experimental study

Cells and culture condition

HEPG2 CELLS WERE propagated at 37°C in 5% CO₂ in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Grand Island NY, USA) containing 10% (V/V) fetal calf serum (Hyclone, Logan UT, USA) and 100 units/mL penicillin (Sigma Chemicals, St Louis MO, USA) and were passaged every 5–7 days. The cells were cultured until they reached 80–100% confluence.

Stimulation and sample preparation

The confluent cells were rinsed three times in 10 mL of phosphate buffered saline (PBS), and then were treated with 3 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) or 1 μM staurosporin (STS) in DMEM lacking fetal calf serum for inducing typical necrosis or apoptosis, respectively. The medium were serially obtained and provided for deter-

mination of aspartate aminotransferase (AST) using chemical autoanalyzer (BM2250: Japan Electron Optics Laboratory, Tokyo Japan), cytochrome c using Western blotting with anti-cytochrome c antibody (Calbiochem, Darmstadt, Germany), CK-18 fragment using M30-Apoptosense ELISA kit (Peviva; Alexis, Grunwald, Germany) and HMGB-1 using HMGB-1 ELISA kit II (Shino-test, Sagami-hara, Japan) according to the manufacture's instruction.

In addition, intracellular CK-18 fragment was also serially determined in cell lysate. The cells were lysed with lysis buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.5), 10% glycerol (Wako Chemicals, Osaka, Japan), 5 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF; Sigma Chemicals), 1% thioglycol (Wako Chemicals), 1% Triton X-100 (Sigma Chemicals) and a protease inhibitor cocktail (Sigma Chemicals). After centrifugation, the total protein concentration was adjusted to 5 mg/mL before assay.

Evaluation of cell viability and apoptosis

The number of viable cells was functionally estimated using the cell count reagent SF (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). Briefly, the cell count reagent SF contains 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, which generates tetrazolium salt by the effect of intracellular dehydrogenase, a water soluble formazan dye, the concentration of which can be determined by absorbance at 450 nm. Ten microliter of the cell count reagent SF was added to each well containing cultured HepG2 cells in 100 μL of medium. After 1 h incubation, absorbance at 450 nm of the well was measured by a microplate photometer (ImmunoMini NJ-2300; Inter Medical, Tokyo, Japan). The changes in cell number were arbitrary represented by a proportion of absorption at each time point to that before stimulation in corresponding experiment.

Apoptotic cells were determined by 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma Chemical) staining and fluorescence microscopy (ECLPSE, TE300; Nikon, Tokyo, Japan), and the degree of apoptosis was represented by the apoptosis index (AI; percentage of apoptotic cells with respect to the total number of cells in each microscopic field).

Clinical study

The serum CK-18 fragment and HMGB-1 levels were determined in 84 patients with acute hepatic injury.

Table 1 Number of patients for each disease type and the etiology of acute hepatic injury in clinical study

	Conventional acute hepatic injury	Severe acute hepatic injury	Fulminant hepatic failure	Late-onset hepatic failure	Total
Viral hepatitis	19	4	3	0	26
Epstein–Barr virus hepatitis	6	0	0	0	6
Drug-induced hepatic injury	20	1	1	0	22
Alcohol	2	2	0	0	4
Circulation disturbance	0	3	1	0	4
Unknown	10	4	5	3	22
Total	59	14	10	3	84

Venous blood samples were collected from the patients on admission and were immediately centrifuged at 1500 g and 4 °C for 10 minutes. The obtained serum samples were stored at –80 °C until use. The serum levels of the two peptides were determined by the same methods mentioned in experimental study methods.

The patients were divided into the following four subgroups on the basis of disease type as determined by their clinical outcomes: patients with conventional AHI or CAHI (recovered with a prothrombin time activity [PT] not less than 40%; $n = 59$), patients with severe AHI or SAHI (PT less than 40%, but no hepatic encephalopathy [HE]; $n = 14$), patients with FHF (patients with HE within 8 weeks after the onset; $n = 10$), and patients with late-onset hepatic failure or LOHF (patients with HE developed after 8 weeks after the onset; $n = 3$). Of 10 FHF patients, only two patients showed acute type disease (preencephalopathy disease duration ≤ 10 days), while the other eight patients showed subacute type disease (the preencephalopathy disease duration ≥ 11 days); four patients spontaneously recovered, four died of hepatic failure and two underwent living donor liver transplantation. All LOHF patients died of hepatic failure. The classification of patients according to the etiologies of the liver injury was listed relating to the disease types in Table 1. The etiologies of liver injury were determined as mentioned in a previous report.¹⁹ Four cases with circulation disturbance include two cases of liver shock due to acute heart failure (arrhythmia and hyperthyroidism crisis), an acute type Budd–Chiari syndrome and an acute hepatic congestion by acute exacerbation of constrictive pericarditis. Among 26 viral hepatitis cases, number of hepatitis A cases was four cases, hepatitis B was 15, hepatitis C was one, hepatitis E was four and herpes simplex was two.

The logarithmically transformed levels of serum CK-18 fragment and serum HMGB-1 were compared

among subgroups of disease types and etiologies using an analysis of one-way variance (ANOVA) and Scheffé's test. The values of each subgroup were represented by median [25–75 percentile]. Correlations between serum CK-18 fragment or HMGB-1 levels and serum aminotransferase levels or plasma prothrombin activities were determined by Pearson's correlation coefficient. The upper normal limit of each protein was determined by the serum levels of normal volunteer as the mean value plus two times the standard deviation. All statistical analyses were carried out using the computer program, SPSS v. 15.0 (SPSS Japan, Tokyo, Japan) and the significance was determined at $P = 0.05$.

RESULTS

Experimental study on the mechanism of release of CK-18 fragment and HMGB-1 from HepG2 cells

THE SERIAL CHANGES in the relative number of viable HepG2 cell and in the apoptosis index after stimulation with 1 μM STS or 3 mM H_2O_2 were shown in the Fig. 1a and b panels, respectively. The number of viable HepG2 cells markedly decreased and synchronically the apoptosis index markedly increased 12 h after the stimulation with STS. The AST levels in the medium increased 12 hrs after stimulation with STS (Fig. 1c). In contrast to the STS stimulation, viable cell numbers rapidly decreased after stimulation with H_2O_2 and the apoptosis index show few increase over the course. In the H_2O_2 stimulation experiment, extracellular cytochrome c was determined as a marker of plasma membrane leakage instead of AST, because the AST assay could not be successfully performed under H_2O_2 stimulation. Cytochrome c was detected in the medium at 3 hrs after stimulation with H_2O_2 (Fig. 1d).

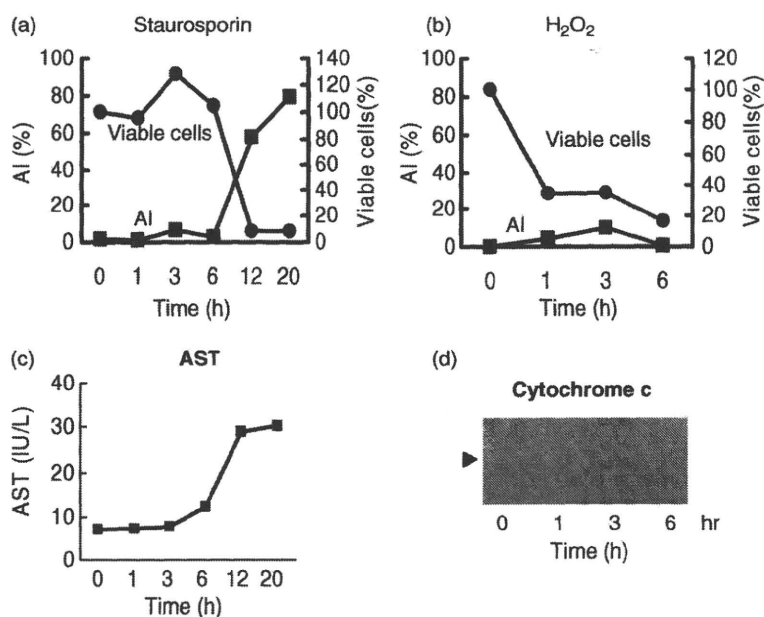


Figure 1 Serial changes in the population of viable and apoptotic cells, and cell membrane leakage after staurosporin (STS) and H_2O_2 stimulation. The relative numbers (%) of viable cells in comparison to those in pretreatment and the apoptosis index (AI, %) were serially plotted in the upper panel. (a) $1 \mu M$ staurosporin stimulation. (b) $3 mM H_2O_2$ stimulation. (c) The extracellular aspartate aminotransferase (AST) activities were serially plotted prior and after STS stimulation. (d) A Western blotting analysis of extracellular fluid with anti-cytochrome c prior and after stimulation with H_2O_2 .

The intracellular concentration of CK-18 fragment began to increase after STS stimulation and peaked much earlier than the appearance of morphological apoptosis which occurred at 12 hours, while the extracellular level did not increase until most cells showed morphological apoptosis and most viable cells disappeared (Fig. 2a). In contrast, H_2O_2 stimulation induced a very small increase in the intracellular and extracellular concentration of CK-18 fragment (Fig. 2b).

Similarly, the serial changes of the extracellular concentration of HMGB-1 after stimulation of STS and H_2O_2 are shown in Fig. 2c and d, respectively. The extracellular concentration of HMGB-1 markedly increased 3 h after stimulation with H_2O_2 but did not increase with STS.

Impact of the disease type on the serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1

The association of the serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1 with disease types of severity are shown in Fig. 3. The logarithmically transformed serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1 in 10 normal volunteers were 2.31 ± 0.15 (mean \pm SD) log U/L and -0.398 ± 0.238 log ng/mL, respectively, and the upper normal limit of those markers were set at 428 U/L ($2.31 \pm 2 \times 0.15$ log U/L) and 1.2 ng/mL ($-0.398 \pm 2 \times 0.238$ log ng/mL). The serum CK-18 fragment levels in CAHI, SAHI, FHF and LOHF were 1758 [551–4969] U/L

(median [25–75 percentil]), 3192 [1327–6765], 2674 [497–3441] and 703 [451–2159], respectively. The serum HMGB-1 levels in CAHI, SAHI, FHF and LOHF were 2.2 [0.6–3.9] ng/mL, 4.1 [2.1–6.1], 1.0 [0.4–1.2] and 0.7 [0.1–2.5], respectively. The CK-18 fragment level distributed from within normal limit to 100 times the level of upper normal limit, whereas serum HMGB-1 level in most patients was distributed within 10 times of the upper normal limit. There was no significant difference associated with the disease severity in either the CK-18 fragment level or in HMGB-1 level.

Impact of the etiology of acute liver injury on the serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1

The serum levels of both markers were compared among various etiologies (Fig. 4). The CK-18 fragment level showed no significant difference among the etiologies, while the HMGB-1 level in circulation disturbance group showed a significantly higher level than those in all other etiologies.

Figure 5 shows the correlation between the serum CK-18 fragment and HMGB-1 levels in all of the cases. Although no significant correlation was found between the two markers, four cases with acute hepatic injury due to circulation disturbance were plotted in the area that shows high HMGB-1 and low CK-18 fragment levels.

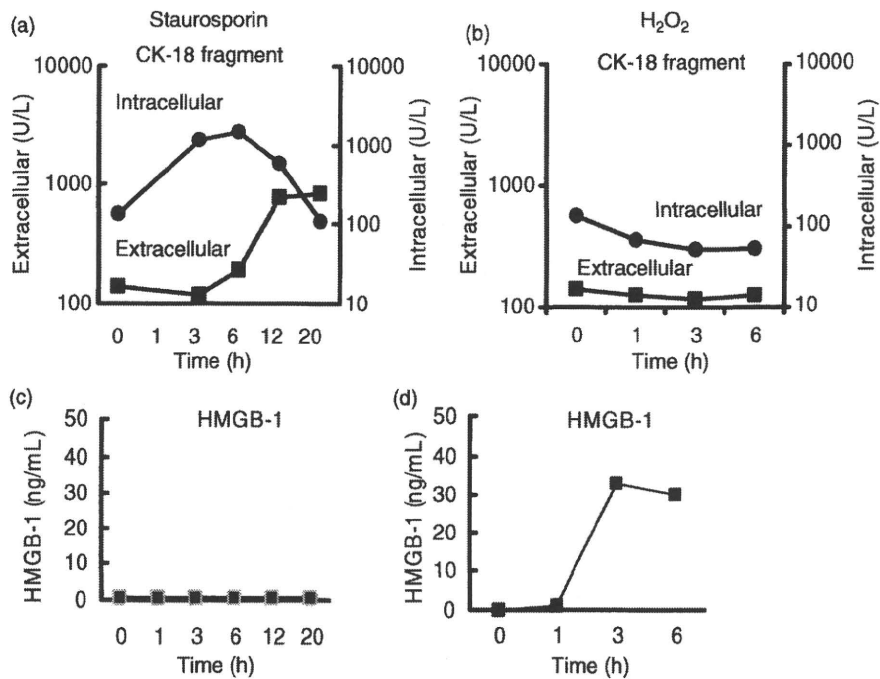


Figure 2 Intracellular generation of cytolactin (CK)-18 fragment and extracellular leakage of CK-18 fragment and HMGB-1 in apoptosis and necrosis. The intracellular and extracellular CK-18 fragment levels prior and after stimulation with staurosporin (a) and H₂O₂ (b) were serially plotted. The extracellular levels of HMGB-1 after stimulation with staurosporin (c) and H₂O₂ (d) were serially plotted.

The correlation between the general liver test and CK-18 fragment or HMGB-1

The serum AST, ALT, total bilirubin levels and plasma PT activity were compared with the CK-18 fragment and

HMGB-1 levels. The AST level ($r=0.826, P<0.001$, Fig. 6) and ALT level ($r=0.727, P<0.001$) were highly correlated to the CK-18 fragment level while PT activity ($r=-0.214, P=0.057$) did not. In contrast, none of those three liver tests showed a significant correlation to

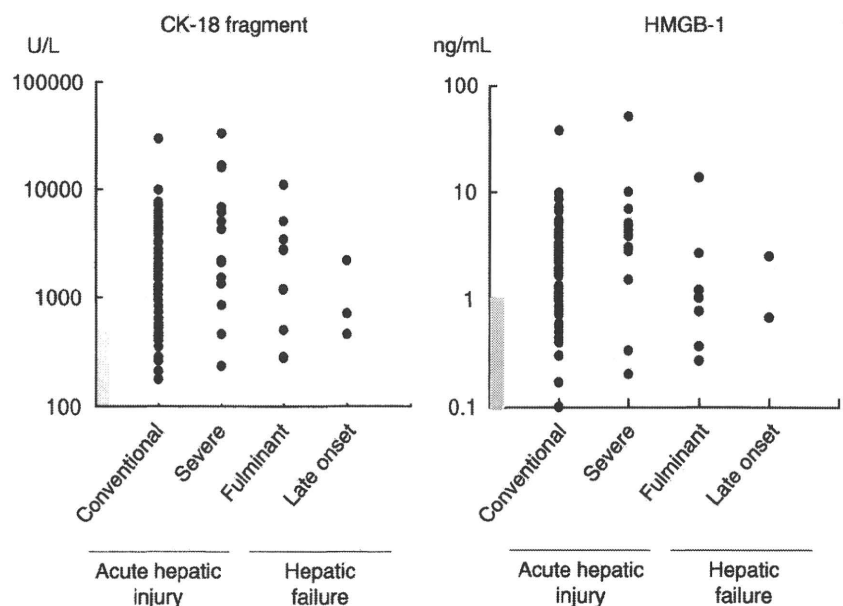


Figure 3 The relationship between the serum levels of cytolactin (CK)-18 fragment and HMGB-1 and severity of acute liver injury. The serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1 on admission were plotted by disease types. The bar on the vertical line shows the normal range of the each marker.

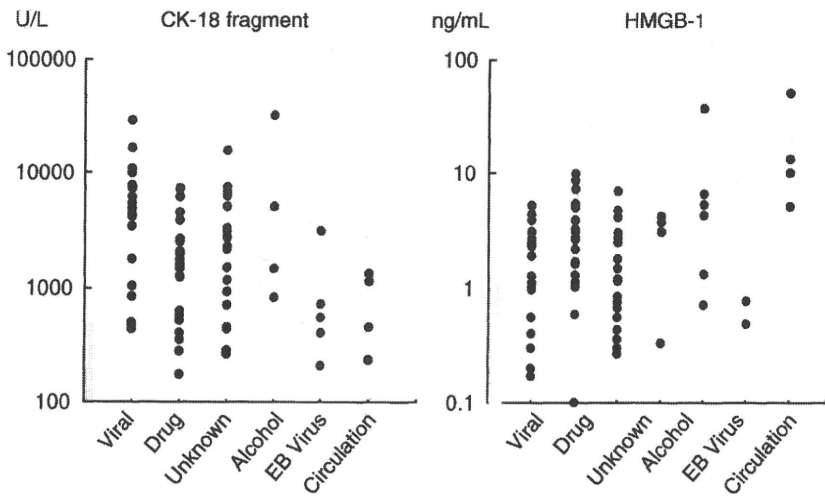


Figure 4 A comparison of the serum levels of cytokeletin (CK)-18 fragment and HMGB-1 among various etiologies of acute hepatic injury. The serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1 on admission were plotted based on the etiologies of acute hepatic injury. The bar on the vertical line shows the normal range of the each marker.

the HMGB-1 level (Fig. 6). The serum total bilirubin level showed no significant correlation with either the CK-18 fragment level ($r = -0.097$, $P = 0.379$) or the HMGB-1 level ($r = -0.090$, $P = 0.431$).

DISCUSSION

THE PRINCIPAL FINDINGS of this study are that the combination assay for the CK-18 fragment and HMGB-1 is effective for clinical differentiation of the mechanisms of hepatocellular death, necrosis and

apoptosis, in patients with acute liver injury and that apoptosis but not necrosis is the principal mechanism of hepatocellular death in almost patients with liver injury regardless the severity of the disease and etiology except for those with circulation disturbance. Those findings support the possible efficiency of pancaspase inhibitor for pre-emptive treatment of patients with acute severe liver injury for preventing the progress to FHF.

The experimental study demonstrated that the CK-18 fragment was substantially generated inside the HepG2 cells in the early stage of the apoptotic process but those cells did not release the fragment until the cells loses their membrane integrity, which was demonstrated by the elevation of AST in the medium. On the other hand, CK-18 fragment was not generated inside the HepG2 cells in the process of pure necrosis thus that fragment did not appear outside the cells even after the loss of membrane integrity, which was demonstrated by the appearance of cytochrome c in the medium. These data indicate that an increase in the extracellular CK-18 fragment means the existence of not only an activated intracellular apoptotic cascade but also a plasma membrane disintegration of the cultured cells. These experimental findings therefore suggest that an increase of serum CK-18 fragment level in clinical setting means the existence of substantial hepatocellular death by apoptotic mechanism.

On the other hand, HMGB-1 was not released from apoptotic HepG2 cells even after the loss of cell membrane integrity as shown by the AST elevation in the medium, while it was substantially released from necrotic HepG2 cells as observed in previous studies.¹⁸

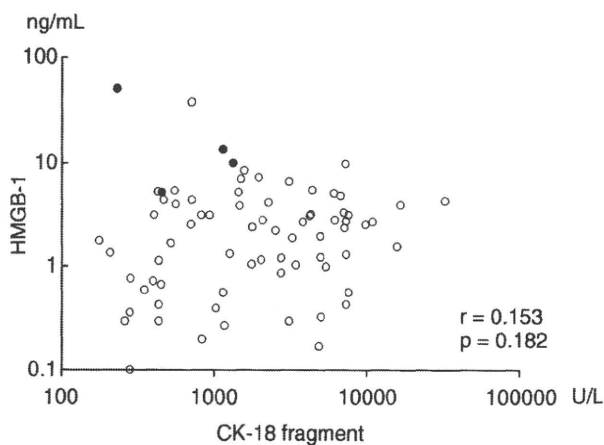


Figure 5 The correlation between the serum levels of cytokeletin (CK)-18 fragment and HMGB-1. The serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1 on admission were plotted. The four closed circles represent the values in patients with circulation disturbance. The bar on the horizontal and vertical line shows the normal range of the each marker.

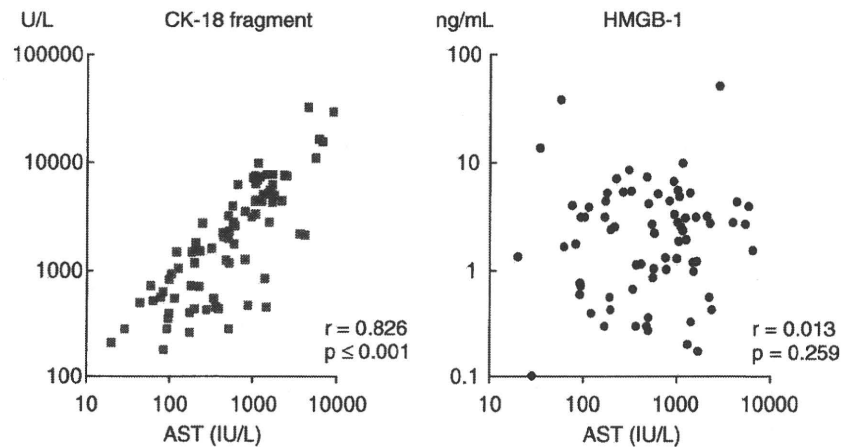


Figure 6 The correlation between the serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and cytokelatin (CK)-18 fragment and HMGB-1 levels. The serum levels of CK-18 fragment and HMGB-1 on admission were plotted in relation to serum AST levels.

These data suggests that an increase of the serum level of HMGB-1 means the presence of tissue damage by necrotic mechanism. Since HMGB-1 is not a hepatocyte specific protein but a ubiquitous nuclear protein unlike CK-18, an increase of serum level of HMGB-1 does not always mean hepatocyte necrosis, but the lack of an increase of HMGB-1 in the setting of acute liver injury indicates that no significant hepatocyte necrosis is implicated in the liver injury.

Previous studies suggest that necrosis and apoptosis are not contradictory, but in fact they can coexist.²⁰ Apoptosis processes can be switched to necrotic cell death by ATP depletion, which is called "secondary necrosis". The experimental findings in this study suggest that secondary necrosis leads to release of CK-18 fragments but not of HMGB-1 and that the release of HMGB-1 indicate the existence of only pure necrosis. Therefore, the simultaneous measurement of the CK-18 fragment and HMGB-1 could differentially evaluate hepatocyte apoptosis and necrosis in acute liver injury, although a kinetic study of those markers is still needed in the future to establish the clinical significance of this methods.

Although the mode of hepatocyte death in most of clinical liver injuries associated with inflammation is considered to be apoptosis,¹⁵ the mode of cell death during circulation disturbance is thought to be necrosis because the cells may be killed by ATP depletion following to anoxia. In addition, microcirculation disturbance by intrasinusoidal microthrombi is thought to be implicated in the extensive hepatocyte death in FHF.^{13,20–22} Therefore, patients with acute liver injury caused by circulation disturbance or FHF patients show high serum HMGB-1 level compared to CK-18 fragment and that the determination of these two serum markers can thus

be an indicator for initiating anti-apoptotic reagents or anticoagulant treatments in patients with acute liver injury.

The exclusive increase of serum HMGB-1 level in patients with circulation disturbance demonstrated in this study support the existence of presumed necrotic cell death in that kind of liver injury. In contrast to the circulation disturbance, most patients with acute liver injury despite the cause and severity showed elevation of serum CK-18 fragment levels with a strong correlation with the serum aminotransferase level and without substantial elevation of serum HMGB-1. These data suggest that apoptosis but not necrosis is dominantly implicated in most causes of liver injury even in FHF patients and that the elevation of serum aminotransferase in acute liver injury mainly indicates the extension of apoptotic hepatocellular death. These findings are consistent with the previous studies that the modes of cell death in experimental and clinical liver injury are supposed to be mainly apoptosis.^{14,15}

Recently, a patient management system was proposed for acute liver injury for the purpose of early prediction of hepatic failure using newly developed prediction model and an early start of pre-emptive therapy to stop the development of hepatic encephalopathy.^{19,23} Although the prediction efficiency for liver failure in that system was satisfying, no effective therapy to prevent progression to liver failure has been established. From this point of view, the findings in this study indicate the significance of the development of anti-apoptotic therapies such as a caspase inhibitor, because a potent anti-apoptotic therapy may be effective to suppress the progression of hepatocellular death and to prevent the development of hepatic failure.

In conclusion, the combined findings of the experimental and clinical data in this study suggest that the main mode of cell death in acute liver injury except for circulation disturbance is apoptosis, as well as indicating the potential utility of pancaspase inhibitor for the pre-emptive therapy against progression to FHF of acute liver injury.

ACKNOWLEDGEMENTS

THE AUTHORS GREATLY appreciate the assistance of Dr Kazuyuki Suzuki for making useful suggestions on this study and reviewing the manuscript. This work was supported partly by grants (19590785) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan and by Open Translational Research Center Project, Advanced Medical Center, Iwate Medical University.

REFERENCES

- Muto Y. Present status of fulminant hepatitis in Japan. *Gastroenterol Jpn* 1993; 28 (Suppl 4): 120–7.
- Mori M, Itanai F, Washio S *et al.* Estimated number of patients with intractable diseases in Japan based on nationwide epidemiology surveillance. Annual Report of Epidemiology Research for Intractable Diseases in Japan, the Ministry of Health, Welfare and Labor (2005). 2006; 39–42. [In Japanese.]
- Sato S, Suzuki K, Takikawa Y *et al.* Clinical Epidemiology of Fulminant Hepatitis in Japan before the Substantial Introduction of Liver Transplantation: an Analysis of 1309 Cases in a 15-Year National Survey. *Hepatol Res* 2004; 30: 155–61.
- Fujiwara K, Mochida S, Matsui A *et al.* Summary of 698 patients between 1998 and 2003 analyzed by the annual national survey. *Hepatol Res* 2008; 38: 646–57.
- Takikawa Y, Suzuki K. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan. *Hepatol Res* 2008; 38 (Suppl 1): S14–18.
- Heathcote J, Elewaut A, Fedail S *et al.* OMGE practice guideline. Management of acute viral hepatitis. *World Gastroenterol News* 2004; 9 (Suppl): 1–12.
- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS *et al.* Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. II. Recommendations for Use of Laboratory Tests in Screening, Diagnosis, and Monitoring. *Clin Chem* 2000; 46: 2050–68.
- Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med* 1993; 329: 1862–72.
- Sainokami S, Abe K, Sato A *et al.* Initial 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* 2007; 42: 241–9.
- Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A *et al.* Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988; 2: 72–4.
- Nagaki M, Naiki T, Brenner DA *et al.* Tumor necrosis factor alpha prevents tumor necrosis factor receptor-mediated mouse hepatocyte apoptosis, but not fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor-kappaB. *Hepatology* 2000; 32: 1272–9.
- Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R *et al.* Interleukin-17 as new marker of severity of acute hepatic injury. *Hepatol Res* 2007; 37: 248–54.
- Rake MO, Flute PT, Pannell G *et al.* Intravascular coagulation in acute hepatic necrosis. *Lancet* 1970; 1: 533–7.
- Malhi H, Gores JC, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: S31–44.
- Chisari FV. Virus, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol* 2000; 156: 1118–32.
- Bantel H, Luger A, Heidemann J *et al.* Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* 2004; 40: 1078–87.
- Feldstein AE, Gores GJ. An apoptosis biomarker goes to the HCV clinic. *Hepatology* 2004; 40: 1044–6.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191–5.
- Takikawa Y, Endo R, Suzuki K *et al.* Prediction of hepatic encephalopathy development in patients with severe acute hepatitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 359–64.
- Shibayama Y. Sinusoidal circulatory disturbance by microthrombosis as a cause of endotoxin-induced hepatic injury. *J Pathol* 1987; 151: 315–21.
- Mochida S, Arai M, Ohno A *et al.* Deranged blood coagulation equilibrium as a factor of massive liver necrosis following endotoxin administration in partially hepatectomized rats. *Hepatology* 1999; 29: 1532–40.
- Rake MO, Flute PT, Pannell G *et al.* Experimental hepatic necrosis: studies on coagulation abnormalities, plasma clearance, and organ distribution of 125I-labelled fibrinogen. *Gut* 1973; 14: 574–80.
- Takikawa Y, Endo R, Suzuki K *et al.* 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: 1021–9.

急性肝不全

岩手医科大学内科学講座消化器・肝臓内科学分野 滝川康裕 鈴木一幸

急性肝不全 (fulminant hepatic failure あるいは acute hepatic failure) とは、急激かつ高度の肝細胞機能障害に基づいて、肝性脳症をはじめとする肝不全症状 (黄疸、腹水など) をきたす予後不良の疾患群である¹⁾。基本的には先行する肝疾患がなく可逆的な病態をいうが、近年は、Wilson 病や自己免疫性肝炎の急性増悪、あるいは HBV キャリアへの HDV 重複感染も含めるのが一般的である²⁾。急性肝不全は臨床的な症候群であり、種々の成因によるものを含むため、病理学的にはウイルス性劇症肝炎のように強い炎症性細胞浸潤と広汎肝細胞壊死を示すものから、急性妊娠性脂肪肝や Reye 症候群のようにほとんど壊死炎症反応をみないものまでさまざまである。

「急性肝不全」の「急性」とは、発症から 8 週以内に肝性脳症が出現する場合に用いられる¹⁾。一方、「慢性」の肝障害は、肝機能障害が少なくとも 6 ヶ月 (24 週) 以上続く場合をいう。8 週から 24 週の間肝性脳症が出現した場合を、「遅発性肝不全 (late onset hepatic failure : LOHF)」と呼ぶ³⁾。

■ 診断基準

わが国では急性肝不全のうち、ウイルス、薬物アレルギー、自己免疫 (急性発症) によるものを「劇症肝炎 (fulminant hepatitis)」と呼び、その以外の成因による「急性肝不全」と区別している。これに対し、欧米では成因にかかわらず「急性肝不全」と一括している (Fig. 1)。わが国では、厳密には「急性肝不全」としての定義はなく、劇症肝炎の診断基準が

肝炎以外にも適用され用いられている。

わが国の劇症肝炎の診断基準は 1981 年の犬山シンポジウムで定められ、2002 年の消化器病学会で若干の修正が加えられた (Table 1)。この基準の特徴は、脳症を客観的な評価が可能な「肝性昏睡Ⅱ度以上」と定めたこと、また、脳症が「重篤な肝機能障害に基づ」くことの根拠として「プロトロンビン時間 40% 以下」と定めている点である。

なお、劇症肝炎の類縁疾患として、亜急性肝炎、急性肝炎重症型 (PT が 40% 以下を示すも昏睡度が 0 またはⅠ度以内)、LOHF がある。現在、わが国の診断基準・疾患概念を、国際的な疾患概念に合わせて修正する作業が進められている。

■ 病型分類

劇症肝炎の病型は、肝炎の初発症状から昏睡発現までの日数 (onset-coma days : OCD) によって、OCD が 10 日以内の急性型と 11 日以上亜急性型の二つの臨床病型に分類されている。この分類の意味は、劇症肝炎の予後が OCD により大きく異なることから、比較的予後のよい急性型と予後がきわめて不良の亜急性型に分類したことである。OCD 10 日が予後をもっともよく判別する日数であることは、わが国の劇症肝炎の全国集計をもとに何度か確認されている⁴⁾。

急性肝不全の予後が、OCD により異なることは国際的にも古くから認められており、英国の基準 (King's College)、フランスの Clity の基準、アジア太平洋肝臓病学会 (APASL) の基準でも類似し

成因	責任因子	急性肝不全症候群	劇症肝炎 (欧米)	劇症肝炎 (日本)
ウイルス性肝炎	Hepatitis A, B, C, D, E virus 単純ヘルペスウイルス, 他	↑ ↓	↕	↕
薬剤性肝障害	アセトアミノフェン含む中毒性 過敏反応			↕
自己免疫性肝炎 (急性発症)				↕
毒素	四塩化炭素 毒キノコ (テングタケ) リン化合物			
循環障害	虚血 中心静脈閉塞症 熱射病 悪性腫瘍の浸潤			
その他	Wilson 病 急性妊娠性脂肪肝 Reye 症候群			

Fig. 1. 急性肝不全, 劇症肝炎の概念と成因 (欧米との比較)

Table 1. わが国における劇症肝炎の診断基準

劇症肝炎とは、肝炎のうち初発症状発現後 8 週以内に高度の肝機能障害に基づいて肝性昏睡Ⅱ度以上の脳症をきたし、プロトロンビン時間 40% 以下を示すものとする。そのうちには発病後 10 日以内に脳症が発現する急性型と、それ以後に発現する亜急性型がある

- (注 1) 先行する慢性肝疾患が存在する場合は劇症肝炎から除外する。ただし、B 型肝炎の無症候性キャリアからの急性増悪例は劇症肝炎に含めて扱う
- (注 2) 薬物中毒、循環不全、妊娠性脂肪肝、Reye 症候群など、肝炎を伴わない肝不全は劇症肝炎から除外する
- (注 3) 肝性脳症の昏睡度分類は犬山分類(1972 年)に基づく
- (注 4) 成因分類は「難治性の肝疾患に関する研究班」の指針(2002 年)に基づく
- (注 5) プロトロンビン時間が 40% 以下を示す症例のうち、肝性脳症が認められないか、昏睡Ⅰ度以内の症例は急性肝炎重症型、初発症状出現から 8 週以降 24 週以内に肝性昏睡Ⅱ度以上の脳症を発現する症例は遅発性肝不全に分類する。これは劇症肝炎の類縁疾患であるが、診断に際しては除外して扱う

[第 12 回犬山シンポジウム(1981 年 8 月), 第 89 回日本消化器病学会総会より, 2003 年 4 月改訂]

た病型分類がなされている (Table 2)。これに対し、米国は「予後に関係するのは OCD ではなく成因である」として、病型分類をしていない。確かに、わが国の全国集計では、急性型は HAV, HBV 急性感染が多く、亜急性型では、HBV キャリア再燃と成因不明が多くなっており、成因構成が大きく異なることから、臨床病型による予後の違いの本質が OCD ではなく成因にある可能性がある。英国の肝移植適応基準でも、OCD はアセトアミノフェン以外の急性肝不全にのみ用いられており、アセトアミノフェンによる急性肝不全では判定項目に

入っていない。米国の急性肝不全の 46% がアセトアミノフェンによるものであることを考えると、OCD をもとにした臨床病型による予後の判定は、肝炎による急性肝不全(劇症肝炎)にのみ当てはまることで、その他の成因による急性肝不全では当てはまらない可能性がある。

■ 重症度

劇症肝炎は内科的救命率が約 30% のきわめて重篤な疾患ではあるが、基本的に可逆的な病態であり、内科的に治癒した場合にはほとんど後遺症

Table 2. 代表的な急性肝不全の定義(診断基準)と臨床病型分類

	定義	臨床病型
日本	劇症肝炎：発症から 8 週以内、昏睡Ⅱ度以上、PT<40%	急性型：0~10 日 亜急性型：11~56 日 遅発性肝不全：8~24 週
King's College	acute liver failure：発黄から 12 週以内に昏睡	hyperacute：0~7 日 acute：8~28 日 subacute：29~12 週
Clity	acute liver failure：PT または FV≤50% fulminant, subfulminant hepatic failure：昏睡	fulminant hepatic failure：0~2 週 subfulminant hepatic failure：2~12 週
米国	発症から 24 週以内に昏睡、PT INR>1.5	分類なし
APASL	acute liver failure：発症から 4 週以内に昏睡 subfulminant hepatic failure：4 週から 6 カ月以内に昏睡/腹水	acute hepatic failure：0~4 週 ・ hyperacute：0~9 日 ・ fulminant：10~30 日 subacute hepatic failure：4~24 週

APASL：アジア太平洋肝臓病学会，FV：凝固第Ⅴ因子活性。

Table 3. 劇症肝炎の肝移植判定基準

I. 脳症発症時に次の 5 項目のうち 2 項目を満たす場合は、死亡と予測して肝移植の登録を行う
1) 年齢>45 歳
2) 亜急性型
3) プロトロンビン時間<10%
4) 血清総ビリルビン濃度≥18 mg/dl
5) 直接/総ビリルビン比≤0.67
II. 治療開始(脳症発現)から 5 日後における予後の再予測
1) 脳症がⅠ度以内に覚醒、あるいは昏睡度でⅡ度以上の改善
2) プロトロンビン時間が 50% 以上に改善
以上の項目のうちで、認められる項目数が
2 項目以上の場合：生存と予測して肝移植の登録を取り消す
0 または 1 項目の場合：死亡と再予測して肝移植の登録を継続する

[杉原潤一ほか：肝臓 42：543, 2001 より引用]

を残さない。したがって、重症度の判定は、内科的に救命可能か、肝移植が必要かの判断に重要である。

先に述べた英国の移植適応基準をはじめとして、いくつかの移植適応基準が提唱されている。わが国における劇症肝炎の肝移植適応ガイドラインを、Table 3 に示す。このガイドラインは研究班の全国集計データから作成された、脳症発現時における予後予測式(多重ロジスティックモデル)をもとにしており、式に採用された変数個々の receiver operating characteristics(ROC)曲線から、

それぞれの変数のもっとも有効な予後判別点を項目として採用したものである⁵⁾。

これらの項目は英国の基準に採用されているものとはほぼ一致しており、予後因子としての重要性がうかがわれる。さらにこのガイドラインでは、5 日間の内科的集中治療後の再評価の基準も示している。この 5 日後判定の基準がしばしば誤解され、5 日間の内科的治療が必須と受け取られている場合があるが、ガイドラインの主旨は 5 日以内に移植ができなかった場合の再判定により、脳症発現時の判断の精度を高めようとするものであ

Table 4. 新しい移植適応判定基準案：厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患調査研究」班 劇症肝炎分科会

ポイント	0	1	2
発症～昏睡(day)	0～5	6～10	11～
PT(%)	>20	5～20	<5
TB(mg/dl)	<10	10～15	>15
D/T 比	>0.7	0.5～0.7	<0.5
血小板数(万/ μ l)	>10	5～10	<5
肝萎縮	なし	あり	

5点以上：移植適応あり。

る。

しかし、この基準は脳死移植を前提に作成されており、しかも制定から10年以上が経過していることから、治療法の進歩に伴って予後予測精度の低下が指摘されている。現在、全国調査をもとに新たな基準の作成が進められており、その試案をTable 4に示す⁶⁾。

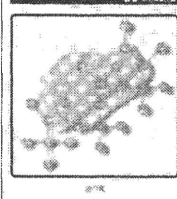
近年では、米国は慢性肝障害の移植適応基準のために採用されたMELD(model for end-stage liver disease)scoreを、急性肝不全にも適用するこ

とが試みられている⁷⁾。

文 献

- 1) Trey C et al: Fulminant hepatic failure: presumable contribution to halothane. N Engl J Med **279**: 798, 1968
- 2) Mas A, Rodes J: Fulminant hepatic failure. Lancet **349**: 1081, 1997
- 3) Gibson AES et al: Late onset hepatic failure: clinical serological and histological features. Hepatology **6**: 288, 1986
- 4) Takikawa Y, Suzuki K: Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan. Hepatol Res **38**[Suppl 1]: S14, 2008
- 5) 杉原潤一ほか：わが国における劇症肝炎の予後予測と肝移植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 **42**: 543, 2001
- 6) 持田 智：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：平成19年度総括・分担研究報告書, p110-113, 2008
- 7) Yantorno SE et al: MELD is superior to King's college and Clichy's criteria to assess prognosis in fulminant hepatic failure. Liver Transpl **13**: 822, 2007

実践
肝疾患の栄養療法



実践 肝疾患の栄養療法

編集●肝と栄養の会

■A5判・242頁 2006.2. ISBN978-4-524-23973-3

慢性肝炎や肝硬変の治療に栄養療法が効果的であることが認識され、日常臨床で広がりを見せている。栄養療法を取り入れたくてもよくわからないという医師や、具体的な指導法を知りたいという

定価 3,150 円 (本体 3,000 円+税 5%)

栄養士待望の書。肝疾患における原因療法と栄養療法の接点、治療の実際を現場で役立つようわかりやすく解説。症例が呈示されて実践的。

急性肝障害

滝川康裕* 鈴木一幸**

岩手医科大学 内科学講座消化器・肝臓内科学分野 *准教授 **教授

はじめに

急性肝障害はしばしば無症状のため、肝酵素(AST, ALT)を測定しないと早期に発見できないことがある。また、障害の成因と重症度により、不顕性感染から劇症肝炎まで予後が大きく異なる。したがって、診療に当たっては、まず肝障害の可

能性に思い至ることが重要で、肝障害を確認したら次の段階として、速やかに成因を同定、重症度を判定し、専門施設に紹介するか否かを判断する必要がある。

I 肝障害と自覚症状

肝は大きな予備能を有するために、軽度の障害では自覚症状をきたさない。このため、慢性の肝障害では肝硬変に至るまでほとんど無自覚・無症状のこともまれではない。急性肝障害の場合、自覚症状はあったとしても感冒様症状、消化器症状などの非特異的な症状のことが多く、初期には感冒や急性胃腸炎などと診断されることが多い。肝障害に比較的特異的な症候である黄疸でも、「家族に指摘される徴候」とまでいわれる。このため、重篤な肝障害がしばしば見逃される。

一方、各種健康診断で無症状の「肝機能障害」が高頻度(受診者の4人に1人)に見つかり¹⁾、こういった患者に対して、一般病院・専門病院でそれぞれのレベルで二次検診が行われている。二次検診施設の選択は多くの場合、患者の任意であり、昨今の大病院指向の傾向から専門施設に集まりがちで、必要以上の精査が行われる傾向がうかがえる。

以上のことは、肝障害の診療に関して、各地域ごとに専門病院と一般病院がそれぞれの特性を生かした診療ができるよう、紹介・逆紹介の効率よい基準を作る必要性を示している。

教訓

- 急性肝障害は特異的な症状・所見に乏しく、発見が遅れることがある。感冒様症状、消化器症状を見たら肝障害の可能性を考える必要がある。

II 急性肝障害の定義, 発見と経過

1 定義

一般に「肝機能検査」と呼ばれるのは, 肝・胆道酵素(AST, ALT, LDH, ALP, GGT), ビルビンなどであるが, 周知のごとく, 肝胆道酵素は真の意味での肝機能検査ではなく, 肝障害の指標である。真の肝機能検査とは, プロトロンビン時間, 血清アルブミンなどの肝合成能やICG検査などの解毒・排泄能検査をいう。したがって, 一般に行われる「肝機能異常」は肝障害を意味する。

肝障害が認められた場合は, 急性肝障害か慢性肝障害かが問題となる。厳密には6ヵ月以上の肝障害の持続が確認された場合, あるいは肝組織検査で特徴的な所見が得られた場合に慢性の肝障害と診断でき, 通常, ワンポイントの臨床検査所見のみで鑑別することは困難である。この点, アメリカの診療ガイドラインでは, AST200IU/L以上, ALT300IU/L以上を基準にすると, いずれも感度・特異度ともに90%以上の確率で急性肝障害を診断できることが示されている²⁾。

2 発見の契機

急性肝障害の患者が発見される契機は, 無症状で偶然の臨床検査(定期健康診断, あるいはかかりつけ医の定期検査)で発見される場合と, 何らかの症状があって医療機関を受診し, 肝疾患が疑われたために検査を受けて判明する場合とがある。

後者の場合は, 症状・病歴・身体所見から肝障害を疑うことが大切で, 急性肝障害の非特異的症候(感冒様症状, 消化器症状)のなかから, 黄疸の初期症状である皮膚痒痒感や尿の濃染を聞き出すことが重要である。

教訓

急性肝障害を早期に発見するためには, 皮膚痒痒感や尿の濃染を聞き出すことと, 肝酵素を測定することが大切である。

3 経過

急性肝障害は, 大きく肝細胞障害型と胆汁うっ滞型の2つの病型に分けられ, 典型的な場合にはその後の成因鑑別に有力な情報となるが, 多くの場合, 混合した形で認められる。

急性肝障害は, 成因が判明してそれが排除されれば, 多くの場合, 自己終息する。たとえば, A型急性肝炎では, ほとんどが不顕性あるいは自己終息的経過で, 致命的な経過をとるのは0.5%以下といわれている。また, 血清ビルビンが15mg/dLを超えるのは10~20%, 20mg/dLを超えるのは4%に過ぎない。

一方, まれではあるが, 急性肝炎が劇症化する

表1 急性肝炎の劇症化率

成立	急性肝炎(%) [*]	PT<80%以下の急性肝炎(%) ^{**}
A型肝炎	0.1~0.4	4.1
B型肝炎急性感染	0.24~4.0	17.9
慢性B型肝炎の急性増悪	—	39.1
急性C型肝炎	まれ	14.3
E型肝炎	—	0.0
非肝炎ウイルス急性肝炎(EBVなど)	—	6.3
薬物性肝炎	—	10.9
急性発症自己免疫性肝炎	—	30.8
成因不明(いわゆる非A非B肝炎)	2.3~4.7	29.3
計	—	20.5

*: McNeil: Med J Aust, 141: 637, 1984, Pavaevangelou Hepatology, 4: 369, 1984, Kim WR: Hepatology, 36: 227, 2002より

** : 文献4)より

表2 劇症肝炎の内科的救命率

成因	症例数	救命率(%)
A型肝炎	11	54.5
B型肝炎	171	35.7
その他のウイルス	149	24.8
薬物性肝炎	51	35.3
成因不明	5	40.0
計	124	32.0

(厚生労働省: 難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究報告, 2003~2007年)

と内科的な救命率は30%程度ときわめて予後不良であることから、急性肝障害の診療に当たっては常に最悪の事態である劇症化を念頭に置いて診療する必要がある。急性肝障害の劇症化率、劇症化後の救命率は成因によりかなり異なる(表1, 2)。また、薬物性肝障害の場合、重篤化するとやはり予後はきわめて不良で、ALTが正常上限の3倍以上に上昇し、血清総ビリルビンが2.0mg/dLを超えた例の10%が死亡する(Hy's rule)といわれて

いる。

以上のように、急性肝障害では成因・重症度により予後が大きく異なることから、まず、成因の同定と重症度の判定が何よりも重要である。

教訓

・急性肝障害の診療に当たっては、最悪の事態である急性肝不全(劇症肝炎)を念頭に置くことが大切で、そのためには成因の検索と重症度判定が重要である。

III 成因の同定と重症度判定

成因の同定

急性肝障害の約半分はウイルス性肝炎であり、ついで薬物性肝障害、アルコール性肝障害、自己免疫性肝障害(自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎)などがある。アルコール性肝障害は通常、急性肝障害に入れないことが多いが、無症状の肝障害や初診時の肝障害ではアルコールによるものが多く、日常の臨床では急性肝障害として扱われる。また、ALTが300IU/Lを超えることはほとんどないが、過栄養性脂肪肝(NAFLD)も近年著明に増加しており、無症状の肝障害の原因として第一に鑑別すべき疾患である³⁾。

ウイルス性肝炎の原因と診断に必要な検査を表

3に示す。発症年齢、既往歴、家族歴、身体所見を参考に、可能な限り鑑別する必要がある。

薬物性肝障害では病歴が最も大切である。薬品のみではなく、健康食品やサプリメントなども含めて、最近服用した薬物の検討が必要である。DDW-J 2004の診断基準案を参考に診断する。

自己免疫性肝疾患は基本的には慢性肝障害であるが、急性に発症するものや、慢性の経過中に偶然肝障害を指摘されて受診することも少なくない。とくに自己免疫性肝炎は、急性発症型のものには抗核抗体やIgGが典型的でない場合があり、注意が必要である。原発性胆汁性肝硬変は、急性の肝障害をきたすことはまれであるが、自己免疫性

表3 ウイルス性劇症肝炎の成因判定に必要な所見・検査

ウイルス	必須検査	補助的検査	参考
HAV	IgM HAV抗体		家族内感染の有無
HBV	IgM HBc抗体	HBV DNA	抗体価、病歴、家族歴を参考に判断
HCV	HCV RNA	HCV抗体	発症前のHCV関連情報が必要
HEV	HEV RNA		海外渡航、(ブタ、イノシシなどの)生肉・肝摂取の有無
TTV	TTV DNA		発症前、発症後の経過から判断
EBV	IgM EBV-VCA抗体	IgG EBV-VCA抗体、EBNA抗体、EBEA、EBV DNA	慢性感染の再活性化も考慮(発熱、咽頭発赤、リンパ節腫脹、莓舌、眼瞼浮腫)
CMV	IgM CMV抗体、CMV antigenemia (HRP-C7)	IgG CMV抗体	慢性感染の再活性化も考慮(発熱、リンパ節腫脹、眼瞼結膜充血)
HSV	IgM HSV抗体	IgG HSV抗体	
HHV-6	IgM HHV-6抗体	IgG HHV-6抗体	
Parvovirus B19	IgM Parvovirus B19抗体	Parvovirus B19 DNA	伝染性紅斑小児との接触

表4 「その他の成因」に含まれる鑑別疾患

疾患	スクリーニング検査	参考
ヘモクロマトーシス	血清鉄, TIBC (鉄飽和度), フェリチン	家族歴, 皮膚色素沈着, 血糖など
ウイルソン病	セルロプラスミン, 血清銅, 尿中銅	家族歴, 精神神経症状, 眼所見など
α1-アンチトリプシン欠損症	α1-アンチトリプシン	家族歴, 呼吸困難など
アジソン病	血清電解質, 副腎ホルモンなど	脱力, 低体温, 色素沈着, 助脈など
甲状腺機能異常症	甲状腺ホルモン関連検査	甲状腺機能亢進・低下症状
横紋筋融解症	CK, 尿検査	薬物などの誘因, 乏尿など
循環障害 (うっ血肝, バッドキアリ症候群など)	心機能検査, 画像検査	心不全症状, 腹痛, 腹水など
自己免疫疾患 (SLE, スティル病など)	尿蛋白, 赤沈, 自己抗体, フェリチンなど	発熱, 皮疹など
妊娠に伴う肝障害 (急性妊娠性脂肪肝, HELLP症候群)	アンモニア, 血小板など	妊娠経過

肝疾患のなかでは最頻であり, 中年以降の女性の無症状の肝障害では重要な鑑別疾患である。原発性硬化性胆管炎では, 合併する胆管炎のためにALTが300IU/Lを超えることがあり, 胆道酵素の値や潰瘍性大腸炎の合併などを参考に鑑別を進める。

「その他」の成因のなかには, 希少だが見逃してはならない重要な疾患が多数ある(表4)。

教訓

- 急性肝障害の成因の推定には, 病歴が何よりも大切である。
- ウイルスの感染経路と潜伏期や薬物アレルギーなどを念頭に置き, 食べ物, 旅行, 嗜好品, 生活歴, 薬物, 健康食品などについて聞く。

2 重症度判定

血清ビリルビンとならんで, 急性肝障害の最も優れた重症度指標はプロトロンビン時間(PT)である。その理由は, 凝固因子が肝のタンパク合成能をリアルタイムで鋭敏に反映するからである。PT 80%以下を示した急性肝障害は, 将来劇症化する可能性が否定できないため, 嚴重に経過観察する必要があり, 入院設備をもった各地域の中核病院に紹介するべきである。

PT 80%以下の患者を対象に, 予測劇症化確率を計算する劇症化予知式が岩手医科大学消化器・

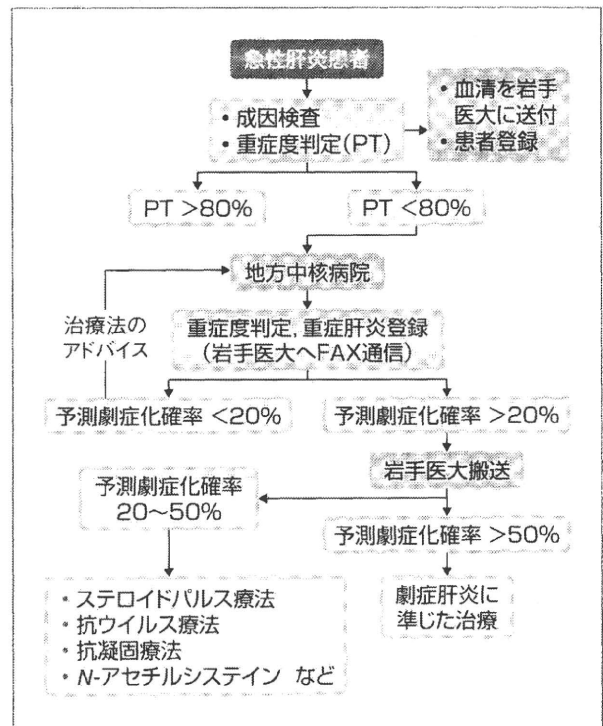


図1 急性肝障害の患者管理システム
岩手医科大学を中心とする多施設共同管理システム。

肝臓内科のホームページ(<http://intmed1.iwate-med.ac.jp/>)で提供されている。

劇症化の可能性が高い場合は, 人工肝補助などの対処が迅速に行える専門施設で管理すべきである。筆者らの地域では, 予測劇症化確率20%以上は専門施設(岩手医科大学消化器・肝臓内科)に搬送することとしている⁴⁾が, 各地域の実情に合わせて, このような共同管理体制を構築することが望まれる(図1)。

血清ビリルビンやPT以外に、急性肝障害の重症度判定に有効な一般検査を表5に示す。

教訓

- 急性肝障害の治療法は重症度により大きな幅があり、重症度により紹介先医療機関を選択すべきである。
- プロトロンビン時間などを参考に重症度を判定し、しかるべき医療機関に紹介することが望ましい。

表5 急性肝障害の重症度判定に有効な一般検査

- プロトロンビン時間、ヘパラスチンテスト
- 血清総ビリルビン、直接・間接ビリルビン比
- ヒト肝細胞増殖因子
- HDL-コレステロール
- 血清アンモニア
- 血漿遊離アミノ酸(Fischer比)
- 尿素窒素、血糖、総コレステロール
- 白血球、血小板

IV 紹介までにすべきこと・避けるべきこと

急性肝障害の診療に当たっては、先にも述べたように、速やかな成因判定と重症度判定が重要である。成因の判定にはこれまで述べたように、家族歴・旅行歴・服薬歴も含めた詳細な病歴の聴取が不可欠である。

次に、ウイルス血清学的検査をはじめとした各種検査が重要で、しかも初期の血清がきわめて重要であることから、必要性を説明したうえで患者の承諾を得て、血清を凍結保存しておくことが望ましい。こうすることによって、保険適応上、一般病院では不可能な検査でも、研究機関で検査することが可能になり、稀少な感染症が発見されることもあり得る。

また、健康食品なども含めた服用薬物は、後に

薬物リンパ球刺激試験に用いる可能性もあり、保存を指導すると同時に服用期間の詳細な記録をとることが重要である。

また、急性肝障害では原則として一切の薬物を中止することが望ましいことと、急性肝障害発症後の薬物投与が劇症化に関与しているとの報告もある。さらに、ヘルペス属の感染症では薬物過敏になっていることもある。肝障害を呈した患者の感冒様症状や消化器症状に対し、安易な対症療法は極力避けるべきである⁵⁾。

教訓

- 急性肝障害の初期診療では、詳細な病歴聴取、血清保存、被疑薬物の保存が大切であると同時に、安易な薬物投与は慎む必要がある。



参考文献

- 1) 笹森典雄：2008年人間ドック全国集計成績。人間ドック。24：71-118, 2009.
- 2) Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, et al: Diagnosis and monitoring of hepatic injury. Recommendations for use laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. Clin Chem. 46: 2050-2068, 2000.
- 3) Ishikawa K, Nitatori T, Nakakarumai C, et al: Frequency of fatty liver in the medical screening and clinical significance in residents in Iwate Prefecture: etiological relationship with metabolic syndrome. 岩手県立大学看護学部紀要, 11: 23-31, 2009.
- 4) 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. 51: 1021-1029, 2009.
- 5) Bernuau J: Acute liver failure: avoidance of deleterious cofactors and early specific medical therapy for the liver are better than late intensive care for the brain. J Hepatol. 41: 152-155, 2004.

プロトロンビン時間による肝障害の評価

Prothrombin Time as a Liver Function Test

滝川康裕¹⁾ 鈴木一幸¹⁾ 持田 智²⁾

■はじめに

プロトロンビン時間(PT)をはじめとする凝固検査は、肝障害の優れた指標として古くから用いられており、PTを採用した数多くの肝疾患予後評価基準が、世界中で使用されている。しかし、その表記法は(延長)秒数、活性%、INRなど様々であり、しかも測定法の標準化もなされていないのが現状である。本稿では、肝疾患における凝固検査の意義、検査法の現状、今後の展望などについて述べる。

■肝障害指標としての凝固検査の意義

PTが肝機能の指標として用いられる理由は、肝の蛋白合成能を的確に表すからである。すなわち、血液凝固因子のほとんどが肝細胞で特異的に生成・分泌される糖

タンパクであることから、その血漿濃度を反映する凝固時間は肝の蛋白合成能を表わすことになる。しかも、凝固因子の血中半減期は数時間から数日と極めて短いため、PTはリアルタイムの肝の蛋白合成能を表わす。Fig. 1は劇症肝炎に対する血漿交換前後のPTの推移を示したものである。血漿交換前に30%程度であったPTは血漿交換直後には70%程度にまで上昇するが、その後速やかに減少し、24時間でほぼ前値に戻る。この推移からも明らかのように、補充した血漿中の凝固因子は極めて短時間に血中から消失するため、24時間後のPTは肝の本来の蛋白合成能を的確に反映することがわかる。したがって、連日血漿交換で凝固因子を補充するような場合でも、血漿交換直前のPTは、患者の病態を正確に反映する(Fig. 2)。

半減期が短いことに加えて、肝細胞での凝固因子の合成が栄養状態の影響を受けにくいことも、肝機能指標と

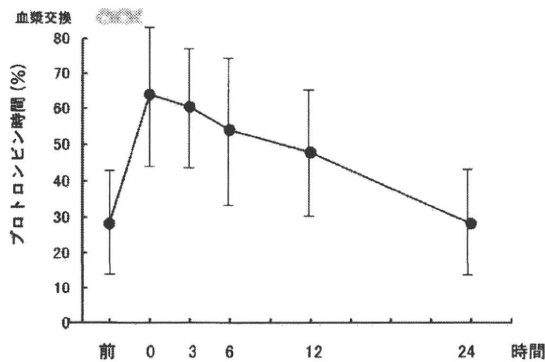


Fig. 1 血漿交換前後のPTの推移；岩手医大消化器・肝臓内科

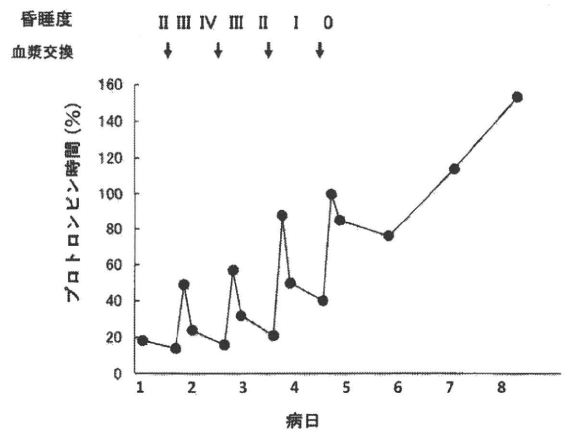


Fig. 2 血漿交換治療中のPTの推移；岩手医大消化器・肝臓内科

¹⁾岩手医科大学 消化器・肝臓内科

²⁾埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科

Table 1 劇症肝炎の診断基準 (第89回日本消化器病学会総会, 2003年), 抜粋

劇症肝炎とは肝炎のうち初発症状発現後8週以内に高度の肝機能障害に基づいて肝性昏睡II度以上の脳症をきたし、プロトロンビン時間40%以下を示すものとする。そのうちには発病後10日以内に脳症が発現する急性型と、それ以後に発現する亜急性型がある

して有利な点である。これは、アルブミンやコリンエステラーゼが栄養状態の影響を受け易く、半減期の比較的長い蛋白であることと対照的である。

以上の点から、PTは肝の蛋白合成能、ことに急性肝障害時の合成能の指標として優れており、日本の劇症肝炎の診断基準¹⁾ (Table 1) に採用されている。劇症肝炎は、基本的には肝性脳症を来した急性肝炎であるが、発現した意識障害が確かに“高度の肝機能障害に基づいて”いることの客観的証拠として、PT40%以下が採用されたといえる。40%という値は、急性肝炎の予後を判別するカットオフポイントとして定められた。

■凝固検査による肝障害指標の現状

Table 2 に、現在、普及している肝障害の基準と採用されている指標を示す^{11,12)}。すべての基準にPTが採用されていることから、肝障害の重症度評価法としてPTの重要性は国際的にも認められているといえる。しかし、その表記法をみると、(延長)秒数、%表記、INRなど様々で未だに統一されておらず、米国はINRをそのまま肝障害にも採用し、ヨーロッパでは英国が秒数表記、フランスは%表記を採用している。わが国では、%表記が基準として採用されているが、これまで施設間較差の大規模な検討はなされていない。

わが国の重症肝炎に関する多施設集計から、PT表記

法の妥当性を検討した結果を以下に示す。1983年から1997年に毎年集計された劇症肝炎全国集計例1309例の昏睡発現時のPTの値を見ると (Fig. 3), 10%代にピークを持つやや右裾広がりの分布を示し、40%以下の症例が94.1%を占めた。この傾向は年代によっても変化なく、1983~1987年91.5%, 1988~1993年95.8%, 1994~1997年99.0%であった。したがって、劇症肝炎にみられる意識障害が“高度の肝機能障害”による結果であることを裏付ける指標として、PT40%はほぼ適切な基準であり、多施設集計でも機能しうると考えられた。

また、PTが80%以下を示した急性肝炎の劇症化率 (昏睡発現率) を全国主要施設を対象に調査した結果 (Fig. 4) では、PT40%を境に劇症化率が大きく上昇しており、劇症化予知の判定基準にPTが採用された¹⁰⁾。さらに、これを基準にプロスペクティブに行なった検討でも劇症化予知式が有効に機能することが示されている。以上の結果から、急性肝障害の重症度の指標として、PTの%表記は、少なくとも日本国内では有効に機能していると考えられる。

しかし、PTの施設間較差の問題はこれまで数多く指摘されており、PTを真に国際的な肝障害指標にするためには、表記法の統一も含めた標準化が望まれる^{11,12)}。

Table 2 主な肝重症度の基準と用いられている項目

	PT	総ビリルビン	アルブミン	他	PT表記法	文献
急性肝不全の診断						
日本	○			昏睡	%	1)
フランス	○			V因子, 昏睡	%	2), 3)
USA	○			昏睡	INR	4)
肝硬変の重症度						
Child-Pughスコア	○	○	○	腹水, 昏睡度	秒	5)
肝移植適応						
日本	○	○		昏睡, 臨床病型	%	6)
King's College	○	○		成因, 年齢, 臨床病型	秒	7)
USA (MELD)	○	○		クレアチニン	INR	8)
重症アルコール性肝炎						
Discrimination F.	○	○			秒	9)

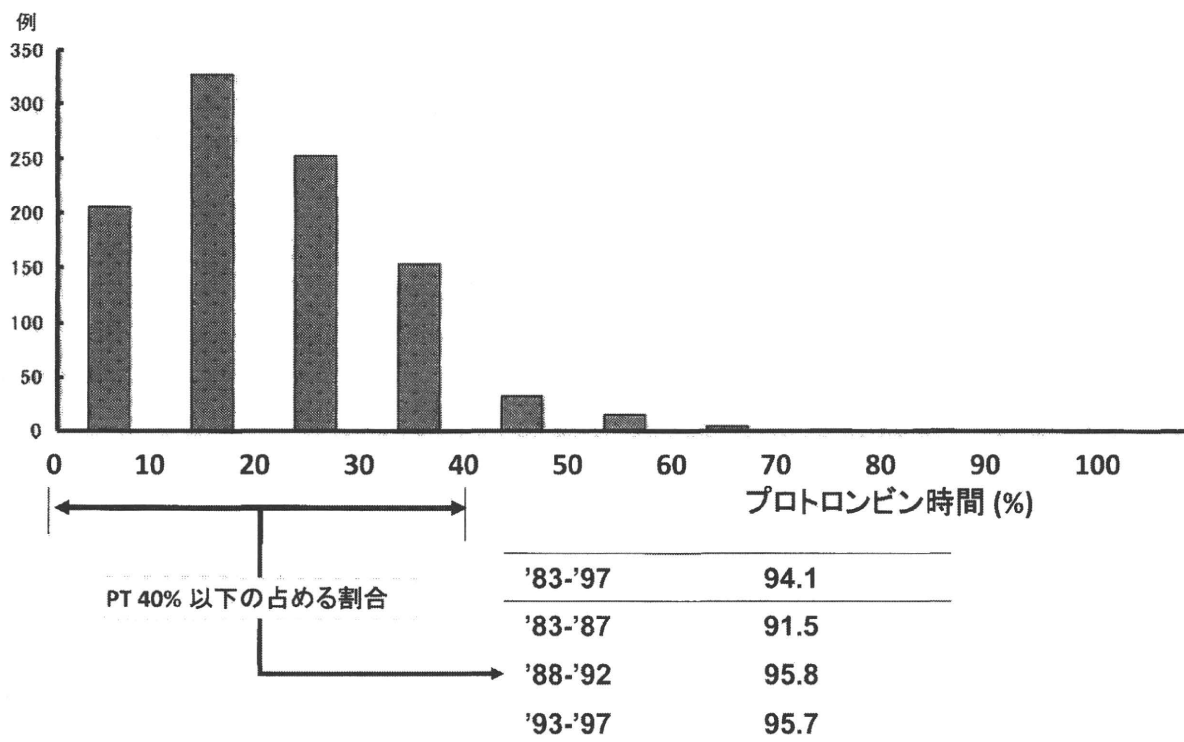


Fig. 3 昏睡発現時のPT (%)の分布；'83-'97劇症肝炎全国集計1309例

■肝障害指標としてのPT標準化の試み

肝疾患以外では、経口抗凝固療法薬による治療のモニタリング指標としてINRが開発された。INRは国際的に普及しているため、肝疾患の指標としてのPT表記にもINRをそのまま用いる傾向が見られる。特に米国が急性肝不全の基準、肝移植の優先順位の基準 (Model for end-stage liver disease: MELD score) にINRを採用している¹³⁾。

INRの算出に用いるInternational sensitivity index (ISI)は、あくまでワーファリン治療患者の凝固時間延長に対する試薬の感度であり、この値が、肝疾患患者のPT凝固時間延長にもそのまま当てはまるとは限らない。その理由は、ワーファリン治療患者の血漿では、ビタミンK依存性凝固因子 (II, VII, IX, X) のみが低下しているのに対し、肝疾患患者ではVIII因子以外のはばすべての凝固因子が低下していると考えられるからである。

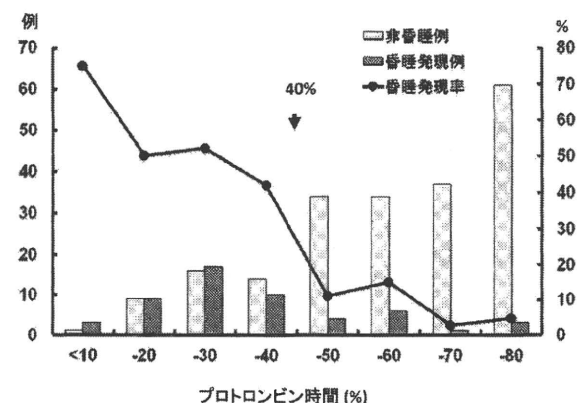


Fig. 4 プロトロンビン時間と昏睡発現との関連：PT80%以下急性肝炎全国集計 厚労省班会議

事実、急性肝不全の肝障害の評価には%表記の方が試薬間較差が少なく標準化に適しているという報告が見られる¹³⁾。これは、%表記の求め方が、標準血漿の単純倍数希釈系を検量線に用いており、肝疾患にみられる一様な因子活性低下に類似しているためかも知れない。また、INRに関しては、肝疾患患者特有のISIを求め、独自のINRを定めるべきだという主張も見られる¹⁴⁻¹⁵⁾。しかし、一方では、INRが“標準化”された唯一のPT表記法であり、目的とする肝疾患の予後推定効率が優れている (C係数=0.8) ことを考慮すれば、現行のINRをそのまま肝疾患に適用すべきだという現実的な意見も見られる¹⁶⁾。

このような国際的な状況を踏まえて、わが国では、厚生労働省「難治性の肝疾患に関する調査研究」班 (研究班, 班長: 鹿児島大学 坪内博仁教授) の劇症肝炎分科会、

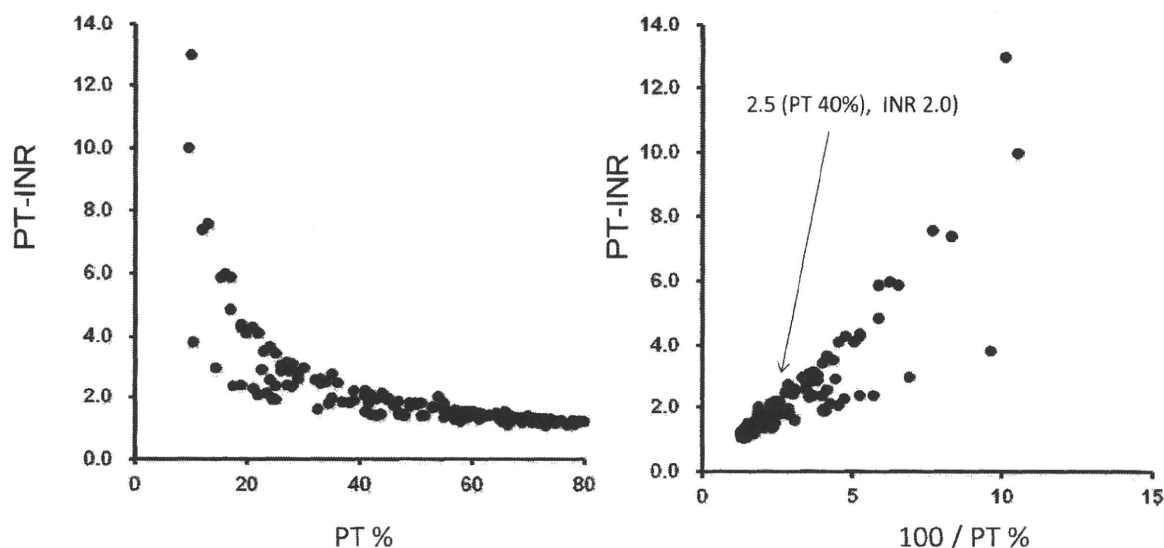


Fig. 5 急性肝炎におけるPT%表示とINRとの関連：PT80%以下の急性肝炎の全国調査

ワーキンググループI (委員長：埼玉医科大学 持田智教授) で、PT測定 の標準化に向けた検討が進められている。

班会議の研究の一環として、急性肝障害の%表記とINRとを多施設で比較した成績を示す。2006年にPT80%以下を示した急性肝障害に関する全国調査を行った際、257例中179例が両表記法を併記していた。PT%の逆数とINRは直線相関を示し、 $100/PT(\%) = 0.789 \times INR + 0.028$ ($r=0.892$, $p<0.001$) の回帰直線が得られた¹⁷⁾ (Fig. 5)。この式から得られるPT40%相当のINRは2.0であったが、この付近のINRは施設間の較差が大きく、1.5~2.5程度の分布を示した。この較差がINR、%表記のいずれのバラツキに由来するのかわからない。また、2007年に行なった、研究班内の主要施設のアンケート調査では、同一施設内あるいは同一試薬、同一機器を用いた施設間では、INRと%表記との安定した相関が見られ、施設間較差も認められないが、使用試薬の異なる施設間では、特にPT40%以下の領域での施設間較差が大きいことが明らかとなっている。すなわち、施設間較差の主たる要因は、当然ながら使用する試薬、機器にあると考えられる。現在、調査対象施設を広げてPT試薬・機器とPT%、INRとの関連について実態調査とともに、診断基準への両表記法併記が検討されている。

■おわりに

肝障害の指標として、PTが最も有用であることは国際的に認められているにもかかわらず、測定法はおろか

表記法さえも標準化されていないのが現状である。近年、種々の重症度指標が国を超えて用いられる傾向が顕著になっていることから、PT標準化の議論も活発化しており、近い将来、これが達成されることが期待される。

文献

- 1) 犬山シンポジウム記録刊行会. A型肝炎・劇症肝炎. 第12回犬山シンポジウム, 中外医学社; 東京 1982;110-230.
- 2) Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis* 1986;6:97-106.
- 3) Bernuau J, Benhamou JP. Classifying acute liver failure. *Bernuau Lancet* 1993;342:252-253. Rossaro L, Lee W an the acute liver failure study group. Acute liver failure: early referral is the Key. *Prac Gastroenterol* 2004;28:15-42.
- 4) Rossaro L, Lee W and the acute liver failure study group. Acute liver failure: early referral is the Key. *Prac Gastroenterol* 2004;28:15-42.
- 5) Pugh RNH, et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;69:646-669.
- 6) 杉原潤一, 内藤智雄, 石木佳英ほか. 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;42:543-557.
- 7) O'Grady JG, Alexander GJM, Hayllier KM, et al. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989;97:439-45.
- 8) Kamath, P, et al. A model to predict survival in