

肝内には消化管常在細菌由来のエンドトキシン / LPS が存在するが、これが Kupffer 細胞や類洞内皮細胞の抗原提示能を抑制することが報告されている。LPS により活性化した Kupffer 細胞は、抑制性サイトカイン (IL-10, TGF- β) や免疫抑制物質 (PGE2) を産生する。また、LPS は Kupffer 細胞での抗原プロセッシングや補助分子発現を抑制する。これらの機序により、Kupffer 細胞から自己抗原の提示を受けた T 細胞は寛容化する可能性が考えられている²⁰⁾。

CD4⁺CD25⁺T 調節性 T 細胞 (Treg 細胞) は、末梢性免疫寛容誘導機構において重要な役割を演じる。最近、マウスの肝臓から分離した Kupffer 細胞、類洞内皮細胞および肝細胞の存在下で、CD4⁺CD25⁺Treg 細胞が CD4⁺CD25⁺T 細胞の増殖を抑制することが報告された²⁰⁾。しかし、微生物による肝内炎症を模倣して、非生理量の LPS の存在下で同様の実験を行うと、toll-like receptor (TLR)-4 依存性に Treg 細胞の免疫抑制効果は消失している。すなわち、Kupffer 細胞、類洞内皮細胞および肝細胞は Treg 細胞の抑制活性を肝内で制御している可能性が考えられる。また、Kupffer 細胞は Treg 細胞そのものの増殖を誘導するが、類洞内皮細胞および肝細胞には同様の効果は認められていないことも確認されているが、Kupffer 細胞の寛容特性を考察する上で非常に興味深い現象である。

3. 同種異系免疫応答における Kupffer 細胞の役割

さまざまな動物種において主要組織適合性抗原 (MHC) が異なる同種異系肝移植を施行した際に、移植後の免疫抑制剤を使用しなくても、移植肝に対する拒絶反応が起こらず容易に生着する現象は以前より観察されている^{21, 22)}。また、ドナーからの移植肝が生着しているレシピエントに、ドナーと同系の他臓器を移植しても拒絶反応は生じないことから、肝移植が成立したドナーに対しては免疫学的寛容が誘導されるものと考えられている。このような肝移植後に誘導される免疫寛容には、肝臓が産生する免疫抑制因子 (可溶性 MHC

class I 分子など) の作用や、移植肝内に存在する樹状細胞、Kupffer 細胞や類洞内皮細胞などの抗原提示細胞と、レシピエントの T 細胞との相互作用が関与する可能性が指摘されている²³⁾。

同種異系肝移植後の免疫応答における Kupffer 細胞の役割に関しては、相反する報告がなされている。異系ラット間の肝移植モデルを用いた検討では、移植前にドナーを Kupffer 細胞阻害剤 (gadolinium chloride) で処理すると、自然生着する組み合わせでは生着率に影響を認めなかったが、拒絶反応が生じる組み合わせでは生着延長効果が認められたことから、Kupffer 細胞は移植後の寛容誘導ではなく、むしろ拒絶誘導に関連すると考察している²⁴⁾。一方、同じく異系ラット間肝移植モデルで、長期生着した肝臓から分離した Kupffer 細胞には Fas リガンドが発現し、ドナー反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導すること、さらに抗ドナーリンパ球混合試験に添加すると Th2 サイトカインを産生することから、Kupffer 細胞は肝移植後のドナー特異的寛容に重要な役割を果たすとの見解もある²⁵⁾。

異系ドナー細胞の門脈内投与によって T 細胞のドナー特異的低反応性が誘導される現象も、肝臓が免疫寛容に関わる臓器であると考えられる根拠のひとつである。この、門脈内投与によって誘導される免疫抑制効果は、gadolinium chloride の前投与によって消失することから、Kupffer 細胞が重要な役割を果たす可能性が指摘されている²⁶⁾。また、門脈内投与後には、Kupffer 細胞からの PGE2 産生が亢進することも報告されている²⁷⁾。

4. 異種移植における Kupffer 細胞の役割

臓器移植ドナー不足の究極的解決策として、生理学的・解剖学的類似性からブタを用いた異種移植に期待がかかる。しかし、ブタ-ヒト間異種移植では、補体性、B 細胞性および T 細胞性の激しい拒絶反応が障壁となる。ブタ移植細胞・臓器は細胞上の表出する Gal α 1,3Gal (Gal) 抗原が標的となり、抗原抗体反応により補体が活性化し廃絶される。最近、Gal 合成酵素遺伝子をノックアウトし

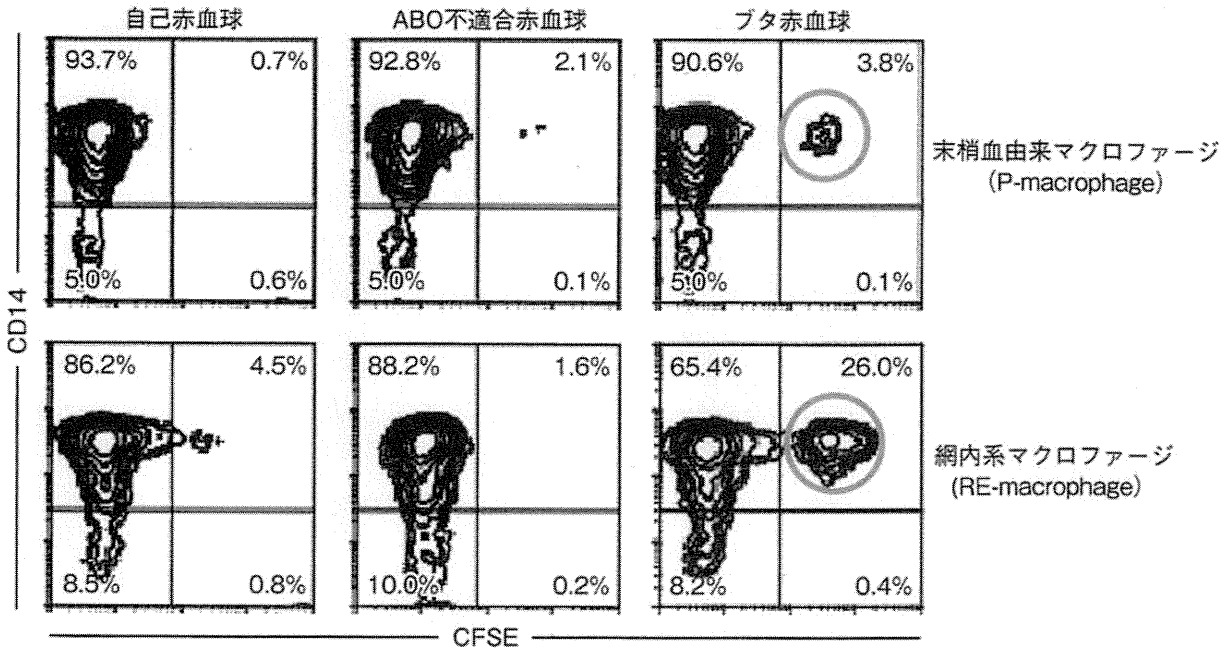


図9 ヒトマクロファージによるブタ細胞の貪食能定量法

細胞質染色蛍光色素 CFSE でブタ細胞をラベル後に PMA 刺激マクロファージと共培養。CD14 陽性細胞 (ヒトマクロファージ) の CFSE 蛍光強度により貪食能が定量し得る。同種同系赤血球, 同種異系 (血液型不適合) 赤血球, 異種 (ブタ) 赤血球に対する末梢循環血液中のマクロファージと網内系マクロファージ (Kupffer 細胞) の貪食作用をフローサイトメーターで判定した。

Gal 抗原を欠いたブタからの腎臓や心臓が数カ月間ヒトに生着した報告がなされ, 異種細胞・組織・臓器移植の臨床導入に現実性が増してきた^{28, 29)}。

異種臓器および細胞が長期間生着しない理由のひとつに, マクロファージの細胞傷害性が関与することが指摘されているが, 詳細な機序は解明されていない³⁰⁾。最近我々は, ヒトマクロファージが Gal を除去したブタ細胞に対しても, 抗体補体非依存性の貪食能を示すことを解明した³¹⁾。マクロファージによる異種細胞傷害機構は, 抗体依存性と非依存性に分けられる。抗体依存性傷害機構にはブタ移植細胞・臓器は細胞上の表出する Gal α 1,3Gal (Gal) 抗原に対するヒト血清中の自然抗体 (抗 Gal 抗体) が主要な働きを担う。ブタ細胞に抗体が結合し, Fc 受容体を介したマクロファージの直接傷害機構が作動する。また古典経路からの補体活性化がマクロファージを動員する。これらの抗 Gal 抗体依存性応答は, 最近開発された Gal ノックアウトブタの使用によって回避される

可能性がある。しかし, ヒト Kupffer 細胞は, 抗体・補体非依存性にブタ細胞を貪食・傷害することを我々は確認した (図 9)³¹⁾。さらに Kupffer 細胞は, Gal 抗原を欠損したブタ細胞も強く貪食したことから, Gal ノックアウトブタを用いた移植でもヒトマクロファージ性の拒絶機構は免れない可能性が懸念される。

一方で, マクロファージの自己寛容機構として, 阻害受容体シグナル制御蛋白 α (SIRP α) が自己細胞上の CD47 (インテグリン関連蛋白質) を認識し, 貪食活性を抑制することが報告された^{32, 33)}。CD47 分子は殆どの生体組織に表出し, ブタ細胞にも表出する。しかし, 異種間では CD47-SIRP α によるシグナル伝達が作動せず, 貪食活性が抑制されないことを我々は確認した。さらに, 遺伝子導入によりヒト CD47 をブタ細胞上に表出させることで, マクロファージによる貪食が回避できることを報告した (図 10)³⁴⁾。この結果は, 従来克服できなかったブタ移植片に対するマクロファ-

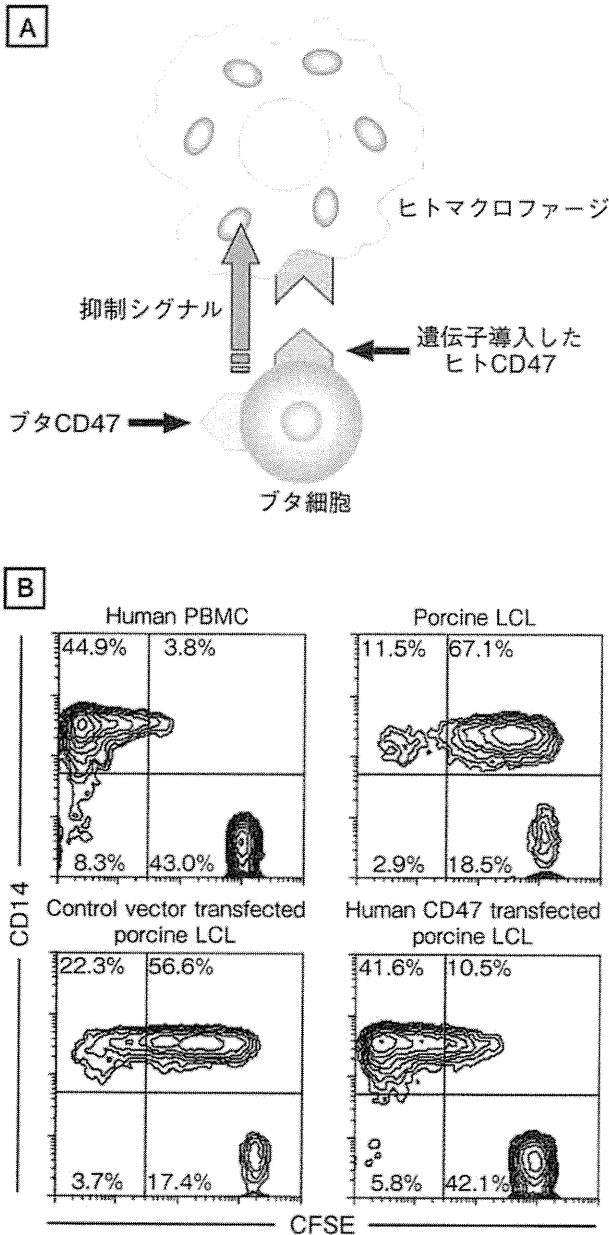


図 10 異種間では CD47-SIRP α によるシグナル伝達が作動せず、貪食活性が抑制されない。

【A】 遺伝子導入によりヒト CD47 をブタ細胞上に表出させることでヒト Kupffer 細胞による貪食が回避できる。

【B】 ヒト CD47 遺伝子導入ブタリンパ芽球様細胞はヒト Kupffer 細胞による貪食に抵抗性を示した。リンパ芽球様細胞を CFSE で細胞質染色した。

CD14⁺CFSE⁺ 細胞：Kupffer 細胞に貪食されたブタ細胞

CD14⁻CFSE⁺ 細胞：貪食されずに生存するブタ細胞

ジ性拒絶反応を回避するには、ヒト CD47 遺伝子導入ブタの作製が有効であることを意味する。

まとめ

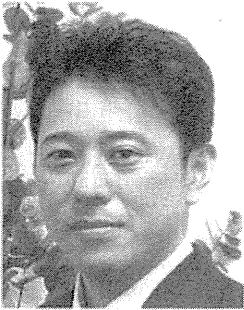
肝臓外科領域の周術管理において、免疫学的防御器官として肝臓が示す機能を掌握し戦略的に制御する可能性について、類洞内皮細胞、NK 細胞、Kupffer 細胞と、標的とした我々の研究例を挙げて紹介した。

参考文献

- 1) Calne RY, Sells RA, Pena JR, *et al.*: Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223: 472-476, 1969
- 2) Qian S, Demetris AJ, Murase N, *et al.*: Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 19: 916-924, 1994
- 3) Kamada N, Davies HS, Roser B: Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* 292: 840-842, 1981
- 4) Zavazava N, Kronke M: Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 2: 1005-1010, 1996
- 5) Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, *et al.*: Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 339: 1579-1582, 1992
- 6) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, *et al.*: Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int* 18: 206-214, 2005
- 7) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, *et al.*: Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 175: 139-146, 2005
- 8) Tokita D, Ohdan H, Onoe T, *et al.*: Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 18: 237-245, 2005
- 9) Tokita D, Shishida M, Ohdan H, *et al.*: Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity. *J Immunol* 177: 3615-24, 2006
- 10) Ishiyama K, Ohdan H, Ohira M, *et al.*: Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans. *Hepatology* 43: 362-72, 2006
- 11) Ochi M, Ohdan H, Mitsuta H, *et al.*: Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self

- hepatocytes in mice. *Hepatology* 39: 1321-31, 2004
- 12) Ohira M, Ohdan H, Ishiyama K, *et al.*: Adoptive transfer of TRAIL-expressing natural killer cells prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Transplantation* 82: 1712-9, 2006
 - 13) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, *et al.*: Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest* 33(3): 309-324, 2004
 - 14) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, *et al.*: Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation* 79(9): 1262-1267, 2005
 - 15) Ohira M, Ishifuro M, Ide K, *et al.*: Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients: a concept for predicting persistent thrombocytopenia. *Liver Transpl* 15(2): 208-215, 2009
 - 16) Ohira M, Ishiyama K, Tanaka T, *et al.*: Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes shows anti-HCV activity after liver transplantation. *J Clin Invest* 119(11): 3226-3235, 2009
 - 17) Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, *et al.*: The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev*, 174: 47-62, 2000
 - 18) Kmiec Z: Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 161: 1-151, 2001
 - 19) Crispe IN: Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3: 51-62, 2003
 - 20) Wiegard C, Frenzel C, Herkel J, *et al.*: Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology* 42: 193-199, 2005
 - 21) Calne RY, Sells RA, Pena JR, *et al.*: Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223: 472-476, 1969
 - 22) Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, *et al.*: Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation* 37: 406-410, 1984
 - 23) Zavazava N, Kronke M: Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 2: 1005-1010, 1996
 - 24) Savier E, Lemasters JJ, Thurman RG: Kupffer cells participate in rejection following liver transplantation in the rat. *Transpl Int* 7 Suppl 1: S183-186, 1994
 - 25) Sun Z, Wada T, Maemura K, *et al.*: Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 9: 489-497, 2003
 - 26) Yu S, Nakafusa Y, Flye MW.: *In vitro* analysis of gadolinium chloride abrogation of the systemic tolerance induced by portal venous administration of ultraviolet B-irradiated donor cells. *Transplantation* 64: 1684-1688, 1997
 - 27) Perez RV, Swanson C, Morgan M, *et al.*: Portal venous transfusion up-regulates Kupffer cell cyclooxygenase activity: a mechanism of immunosuppression in organ transplantation. *Transplantation* 64: 135-139, 1997
 - 28) Basker M, Alwayn IP, Buhler L, *et al.*: Clearance of mobilized porcine peripheral blood progenitor cells is delayed by depletion of the phagocytic reticuloendothelial system in baboons. *Transplantation* 72: 1278-1285, 2001
 - 29) Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, *et al.*: Heart transplantation in baboons using α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 1: 29-31, 2005
 - 30) Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, *et al.*: Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 1:32-34, 2005
 - 31) Ide K, Ohdan H, Kobayashi T, *et al.*: Antibody- and complement-independent phagocytotic and cytolytic activities of human macrophages toward porcine cells. *Xenotransplantation* 12: 181-188, 2005
 - 32) Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, *et al.*: Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288: 2051-2054, 2000
 - 33) Oldenburg PA, Gresham HD, Lindberg FP: CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* 193: 855-862, 2001
 - 34) Ide K, Wang H, Tahara H, *et al.*: Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5062-5066, 2007

著者紹介



大段秀樹 (おおだん ひでき)

- 1988年3月 広島大学医学部医学科卒業
 1988年4月 広島大学医学部附属病院研修医
 1989年1月 県立広島病院 医員
 1992年5月 国立循環器病院 レジデント
 1993年4月 広島大学大学院 医学系研究科
 博士課程 外科系専攻
 1997年4月 Harvard Medical School/
 Massachusetts General Hospital 留学
 2000年3月 Miami Medical School 留学
 2000年5月 広島大学医学部附属病院 医員
 2003年4月 同・助手
 2003年7月 同・学部内講師
 2007年4月 広島大学大学院医歯薬学総合研究科
 講師
 2008年4月 同・教授

【研究テーマ】

臓器移植医療成績の向上を目指した基礎的研究
 と臨床移植治療。

最近の研究内容を以下に挙げる。

- 1) 移植免疫応答の主役を演じるT細胞やB細胞のうち、ドナー抗原に高親和性のクローンを選択的に寛容化させる方法の開発。
- 2) 拒絶反応の早期診断と感染症との鑑別が重要であり、鋭敏で特異性の高い“免疫監視法”の開発を目指して研究。
- 3) ドナー不足の究極的解決策として、計画的な臓器の供給が期待できる“異種臓器移植”の研究。
- 4) 臓器移植後に生じる阻血再灌流障害を軽減する方法の開発に関する研究。

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
 先進医療開発科学講座 外科学 (旧第2外科)
 〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3
 TEL: 082-257-5220 FAX: 082-257-5224
 E-mail: hohdan@hiroshima-u.ac.jp

肝臓移植の現況と展望

広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学

大段 秀樹

肝臓移植は、末期肝疾患、先天性代謝疾患、劇症肝不全、肝細胞癌患者の根本的治療手段で、一般的治療法として定着してきた。欧米では、脳死ドナー（臓器提供者のこと）からの肝臓で移植（脳死肝移植）が活発に行われている。一方、日本では1997年に脳死臓器移植法が成立したものの、脳死の移植が普及せず（脳死肝移植は年間で5例前後）、健康な家族から肝臓の一部を頂いて移植する生体部分肝移植が主体である。近年、移植を取り巻く厳しい環境から、移植法改正の機運が高まり、臓器移植法改正案が2009年7月3日に成立した。本年7月からは提供者の年齢制限が撤廃され、家族の合意のみによる臓器提供が今後可能となり、ドナー不足の解消が期待される場所である。しかし、移植外科医の減少、救急医療現場の環境悪化、移植コーディネーター不足など問題は山積している。肝臓外科が進歩した今日では、生体肝ドナーの手術的合併症の危険性も低い。しかし、健康人の犠牲を伴う治療より世界的に普及している死体肝移植の方が望ましく、生体部分肝移植は脳死移植が普及するまでの一時的な手段との指摘もある。一方で、最も安全な時期に、予定手術で条件の良いグラフト（肝臓）を移植できることは、脳死肝移植に比べ生体部分肝移植の有利な点といえ、欧米でも日本に追従して生体肝移植が行われている。今後の移植医療においても、生体肝移植は依然重要な選択肢であると予測される。

2005年に公開された「科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン」におけるリサーチクエスチョンの中に「肝移植は、肝細胞癌に対する治療法として肝切除より優れているか？」という問いが掲載されている。これに対して、「肝機能不良により

切除の対象とならない症例に関しては、腫瘍数と腫瘍径に一定の基準を設けて肝移植の適応を決定すれば成績はよく、肝移植は切除よりも優れた治療法である。」との推奨がなされている。一定の基準（ミラノ基準：単発腫瘍径< 5 cm, あるいは腫瘍個数< 3 個かつ腫瘍径< 3 cm, 脈管侵襲なし, 遠隔転移なし）を満たす肝細胞癌症例が、他の良性肝疾患と同等の肝移植成績が得られることが示されて以降、この基準が肝細胞癌に対する移植適応のgold standardとなっている。しかし遠隔転移や血管浸潤がないミラノ基準外の肝移植症例に相当数の無再発生存症例があることも示されており、再発のリスクファクターやミラノ基準外への適応拡大の可能性の検討が盛んに行われている。

我々は、肝細胞癌症例に対する肝臓移植後に、宿主の自然免疫応答を選択的に増強する制癌療法の可能性について研究を重ねてきた。自然免疫応答を司るナチュラルキラー（NK）細胞は、腫瘍転移形成およびウイルス感染の初期段階に腫瘍細胞やウイルス感染細胞を自己正常細胞から識別し、選択的に殺傷する能力を有するリンパ球である。ヒトの肝臓内には大量のNK細胞が含有され、強力な抗腫瘍分子（TNF-related apoptosis inducing ligand: TRAIL）や抗ウイルス因子（IFN- γ ）を誘導し得る。肝移植の際には、ドナー（提供者）から摘出した肝臓をレシピエント（患者）に移植する前に臓器保存液で肝臓内の血液を置換するために灌流を行う。その際に回収される灌流液から無菌操作でNK細胞を効率よく回収するシステムを開発し、倫理委員会の承認のもと、肝癌症例に対する肝移植後の癌再発予防を目的とした肝由来

NK細胞移入療法を臨床導入した。現在まで、21例の肝移植症例に施行し、有意な有害事象は認めていない。その内、9例は病理診断でミラノ基準外肝癌と診断されたが、現在まで全例が無再発である（平均観察期間24カ月）（*J Clin Invest.* 2009, 119: 11: 3226-3235）。

C型ウイルス（HCV）性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つであるが、移植後C型肝炎の再発が高率に起こり、また肝炎の進行も移植患者以外と比較すると急速であることが分かっている。HCV陰性患者では術後急性拒絶反応は予後と関連しないのに対し、HCV陽性の移植患者における急性拒絶反応は予後不良因子とされている。HCV肝炎合併例では拒絶反応に対する免疫抑制療法がウイルスの増勢を助長するためと理解されている。移植後のHCV肝炎再発治療として、IFN療法が適応となることには既にコンセンサスが得られている。しかし、臨床的に肝炎が再発す

以前に開始すべきか、あるいは再発後に施行すべきか、今後の検討課題の一つである。

体細胞に表出するCD81分子とC型ウイルスの構造蛋白との結合が、感染の成立に深く関わると考えられている。ヒト肝細胞で置換されたマウス（ヒト肝細胞キメラマウス）に抗CD81抗体を予防投与すると、HCVの感染が回避できたとの報告がなされた（*Hepatology* 2008, 48: 1761-1768）。一般に、ウイルスが感染するとNK細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、HCV感染ではC型ウイルスのE2蛋白とNK細胞上のCD81分子の結合によってNK細胞機能が抑制され、高頻度に持続感染に移行する。抗CD81抗体は、ウイルスがE2蛋白/CD81結合によって自然免疫応答を巧妙に回避し、持続感染に移行する機構を断ち切る可能性もあるのかもしれない。今後、肝移植後のHCVの再感染予防の新展開として期待がかかる。

肝移植における免疫モニタリング

大 段 秀 樹*

Frontier in Liver Transplantation

Liver Transplant Frontier

Immunomonitoring in liver transplantation

Hideki Ohdan*

key words : 免疫モニタリング, 肝移植, 拒絶反応, 免疫寛容

肝移植後では、免疫抑制薬を徐々に減量可能であるというコンセンサスはあるものの、なにを指標にしてどの程度まで減量するかは、各施設によって方針が異なります。当施設における免疫モニタリングの実際とそれによる免疫抑制療法の最適化について紹介し、さらに、免疫抑制療法を最適化することによって得られる利点、特にB型肝炎

炎のワクチン療法とC型肝炎の免疫細胞療法の可能性についてもお話しします。

免疫モニタリング下における免疫抑制療法の最適化 私たちの行っている免疫モニタリングは、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合試験 (mixed lymphocyte reaction assay : MLR) です^{1,2)} (図1)。

CFSE色素は細胞傷害性なく細胞内蛋白を染色し、細胞分裂回数に比例して色素が半減化する性

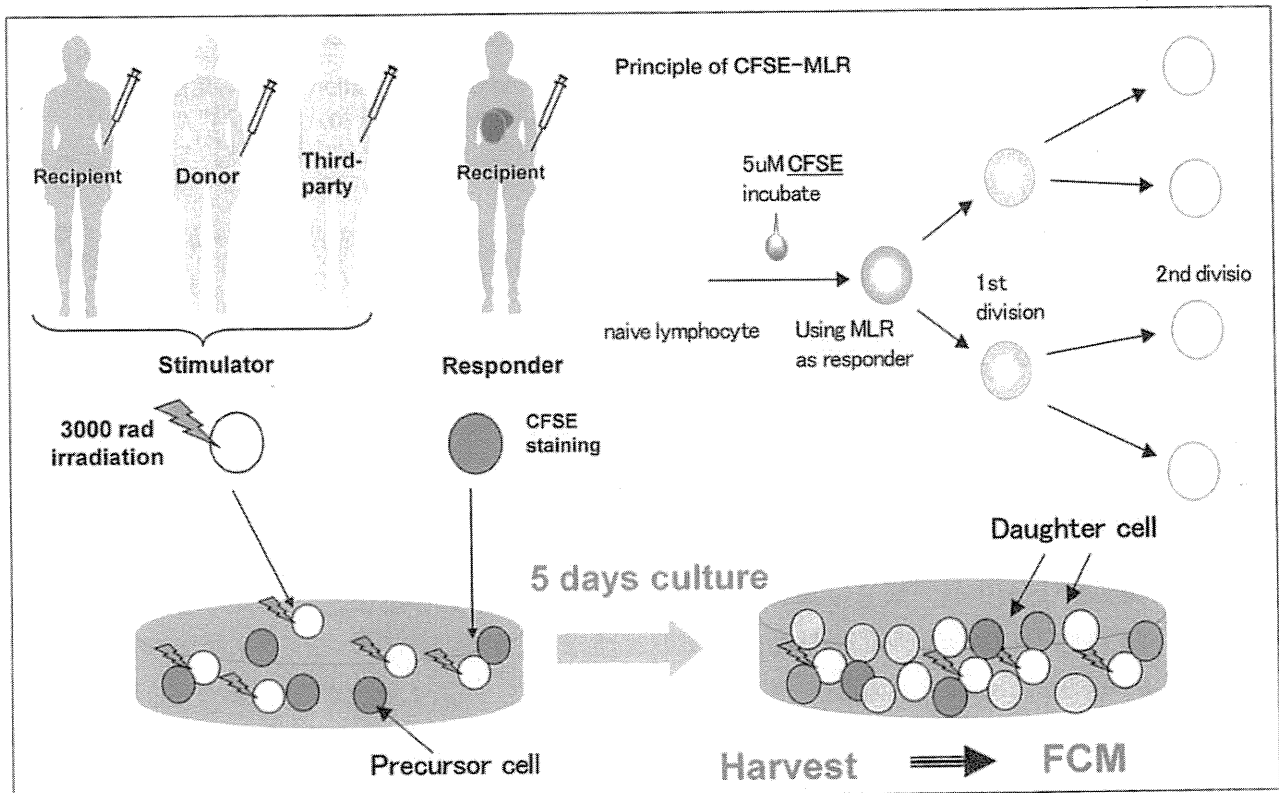


図1 CFSE細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合試験

*Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University 広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学

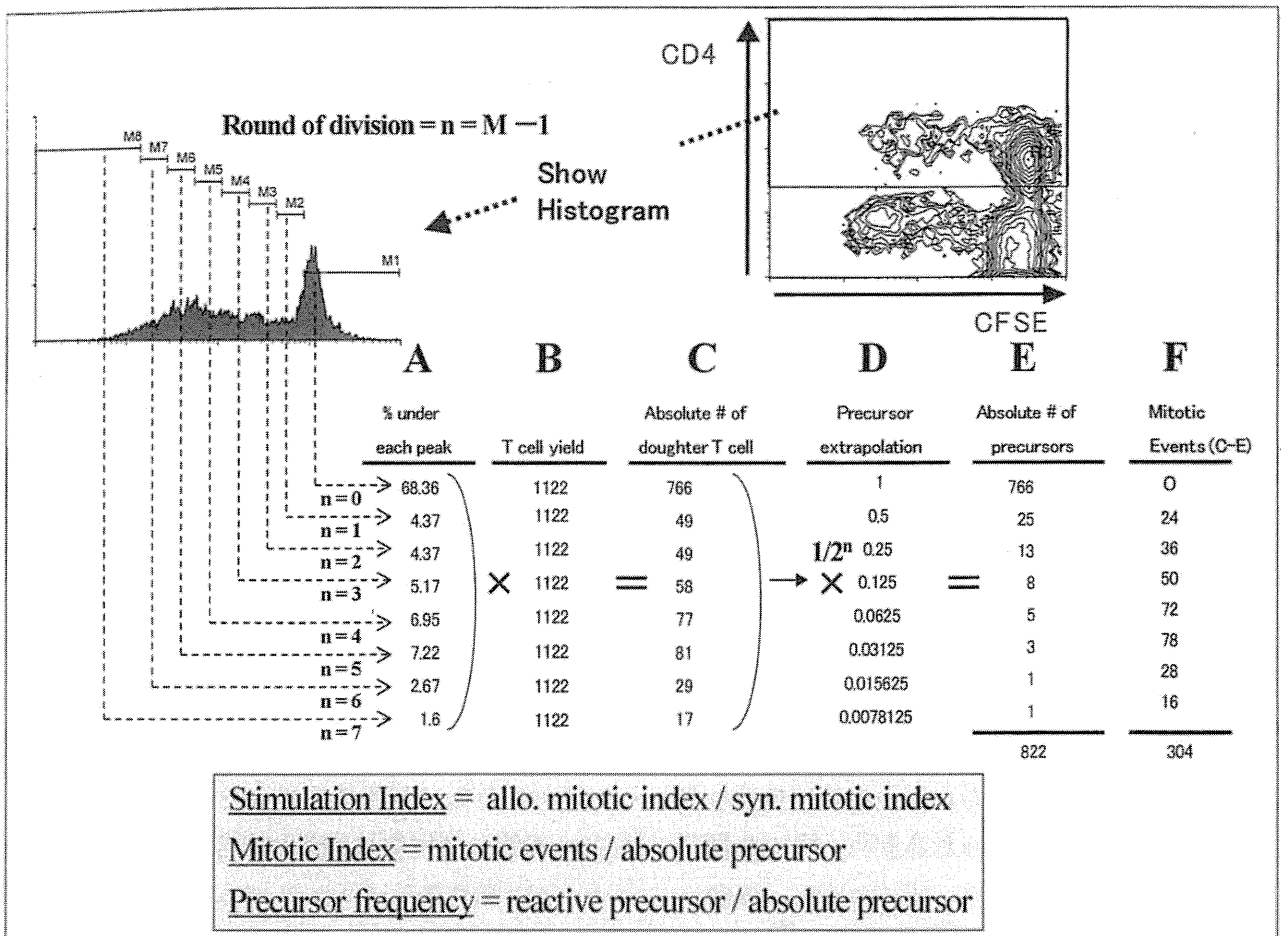


図2 アロ反応性 T 細胞の precursor frequency, mitotic index と stimulation index の定量法 (Tanaka Y et al. : Immunol Invest 33 : 309-324, 2004¹⁾より)

質を有し、反応性リンパ球の表面分子や活性化マーカーと同時にフローサイトメトリーを用いて解析できるため、反応性 T 細胞の precursor frequency, mitotic index や stimulation index (SI) の算出、定量化が可能です(図2)。

すなわち、4~5日間リンパ球培養後にフローサイトメーターで解析します。フローサイトメーターでは CD4 あるいは CD8 表出によって展開して CFSE の intensity を測定し、SI を計算します。同時に、CD8T 細胞上の CD25 表出率を測定します。その理由は、CD8⁺ CD25⁺ T 細胞に抗ドナー細胞傷害性を認め、CD25⁻ CD8⁺ T 細胞には抗ドナー細胞傷害性がほとんど存在しないからです。

また、MLR のフローサイトメーター解析時に、細胞内サイトカイン染色を同時に施行すると、増殖する CD4 T 細胞にのみ IL-2 産生が観察できます。そして、増殖する CD8⁺ T 細胞はインター

フェロン γ (IFN γ) を産生していることが確認できます。したがって、CD4⁺ T 細胞の抗ドナー応答 (stimulation index) をカルシニューリンインヒビター (CNI) 増減の指標として使い、CD8⁺ T 細胞の抗ドナー応答をステロイドの増減の指標として用いています。

図3は、MLR データに基づいた免疫抑制薬の最適化アルゴリズムです。MLR 後にフローサイトメーターで解析して、CD8⁺ T 細胞の SI を算出します。前感作のない CD8⁺ T 細胞の SI の平均値が2ですから、2以上か2未満かで分類します。つぎに、抗ドナー応答と抗 third-party 応答の優位性を判定します。そして CD25 分子の表出率をもって、CD8 の抗ドナー応答の亢進 (hyper-response on CD8⁺ T 細胞) があるかどうかを判定します。

CD8⁺ T 細胞の SI が2以下である場合には、CD4⁺ T 細胞の応答を観察します。同じく平均値

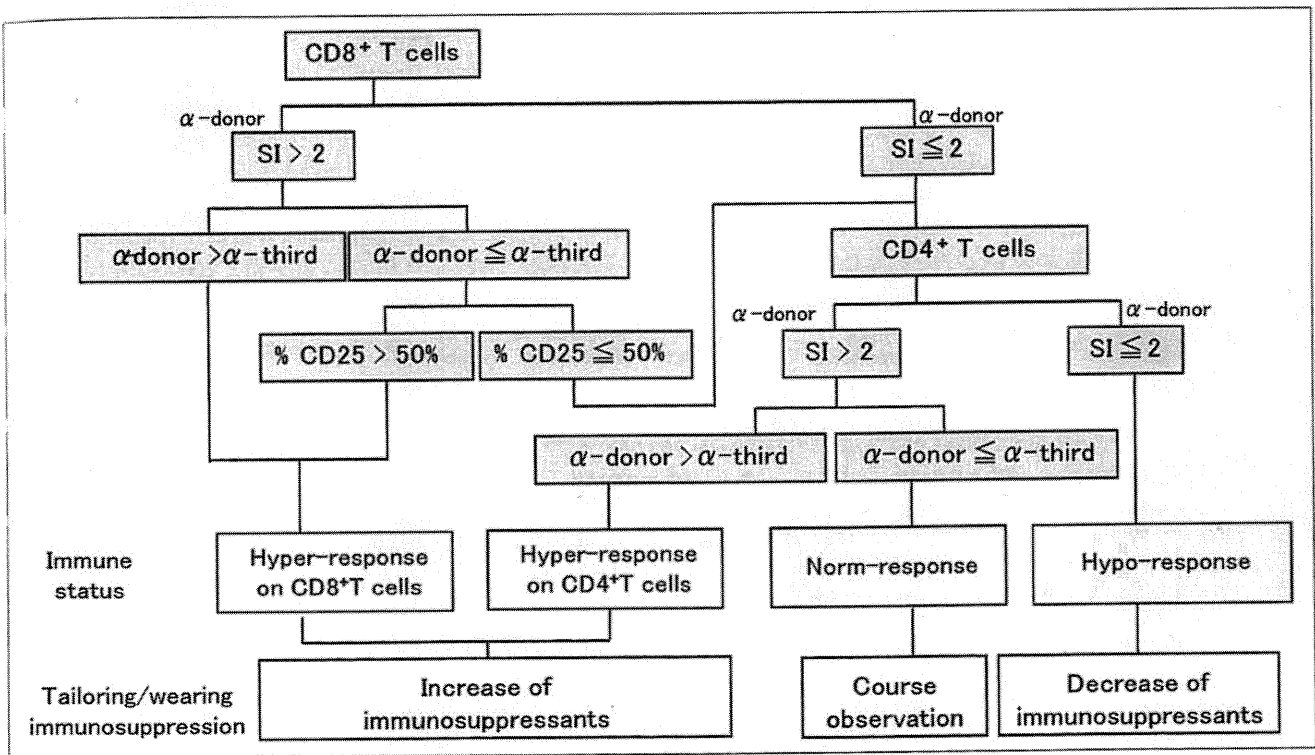


図3 免疫抑制薬の最適化のアルゴリズム

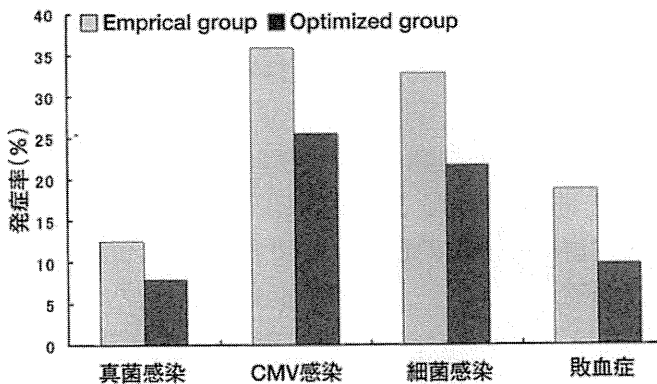


図4 免疫モニタリングの有用性試験
対象は生体肝移植 115 例(2002 年 1 月~08 年 12 月)

間中の真菌感染症の発症率、サイトメガロウイルス(CMV)感染症の発症率、細菌感染症の発症率、血流感染症の発症率は、有意差を認めないもののいずれも empirical 群にくらべ optimized 群が低値でした(図4)。また、optimized 群は、拒絶反応も empirical 群にくらべ発症率は低く、慢性拒絶に陥った症例は認められませんでした。生存率も optimized 群のほうがやや良好でした。

2 以上と 2 未満にわけて分類します。そして、抗ドナー応答と抗 third-party 応答の優位性を判定し、免疫学的に四つのカテゴリーに分類して免疫抑制薬を増減しています。

2002 年 1 月~08 年 12 月までに行われた生体肝移植 115 例のうち、リンパ球混合試験によって 51 例に免疫抑制薬を最適しました(optimized 群)。一方、残りの症例では、通常どおり肝機能の安定をもって、徐々に免疫抑制薬を減量する empirical protocol を応用しました(empirical 群)。観察期

免疫抑制療法の最適化による功：HBV ワクチネーション

B 型肝炎は抗 HBs ヒト免疫グロブリン(HBIG)と核酸合成アナログの併用で再発予防治療が行われていますが、耐性株の出現や医療経済的に問題があり、当施設では HBV ワクチネーションを行っています。しかし、免疫抑制下において能動免疫を期待すること自体、相反する治療を行っていることとなります。必要最低限の免疫抑制による抗ドナー特異的免疫抑制状態を導くことができれば、HBV ワクチンの成功率は改善するはずです。そこで当施設では、MLR アルゴリズムによって免疫抑制薬を最少化していくと同時に、HBV

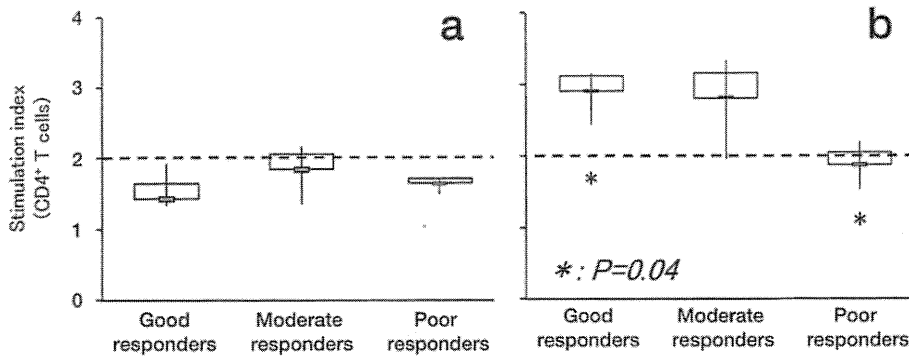


図5
ドナー特異的低反応状態で
HBV ワクチンが効果的
a: 抗ドナー応答
b: 抗 third party 応答
(Tahara H et al. : Transpl Int
22 : 805-813, 2009³⁾より)

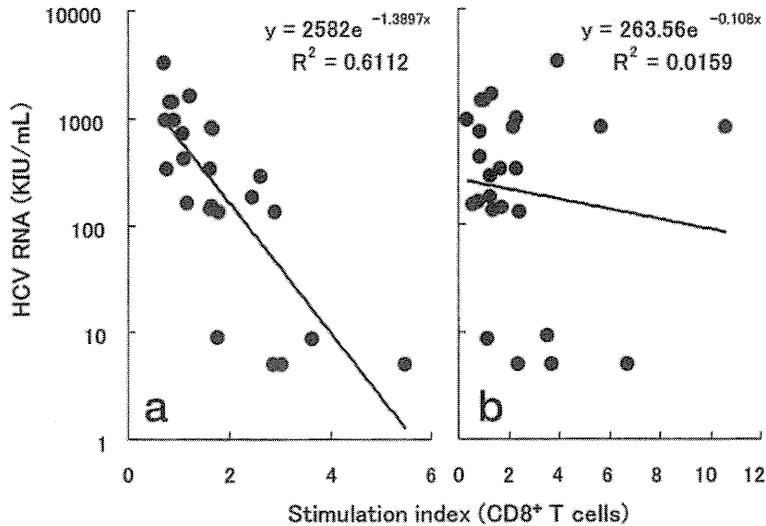


図6
HCV RNA タイターと
アロ免疫応答の関係
a: 抗ドナー応答
b: 抗 third party 応答

ワクチネーションを行っています。HBIG, ラミブジンなどの投与は併用して行い、ワクチネーションは抗体の上昇を認めるまで継続的に投与します。

ワクチネーションの成績は、1年以内に抗HBs抗体の上昇を認めたものを good responder, 1~2年以内に抗HBs抗体の上昇を認めHBIGの離脱ができたものを moderate responder とすると、レスポンスした症例では抗ドナー応答は低下したままで抗 third-party 応答は正常化しています(図5)³⁾。すなわち、外来抗原に対しては応答できる状態であることを意味しています。一方、ワクチネーションに反応しなかった poor responder をみると、抗ドナー応答も抗 third-party 応答も、いずれも低下したままであることがわかります。免疫抑制薬の最適化ができていない症例では、ワクチンの効率も不良であることが予測されます。

当施設のHBVワクチネーションの成功率、すなわちHBIGと核酸合成アナログの離脱率は

65%です。従来の報告例からすると良好な成績です。

免疫抑制療法の最適化による功：HCV免疫細胞療法

つぎに、免疫モニタリングによって明らかとなったC型肝炎に関わる重要な現象について紹介します。C型肝炎患者の末梢血中のRNA titerとMLRで測定したアロ免疫応答の推移をプロットしました。両者の関係を見てみると、抗ドナー応答の stimulation index が高ければHCV量が減り、強い逆相関が観察できます(図6)。しかし、抗 third-party 応答との関係はほとんど認められず、非特異的免疫抑制状態がHCVに対する免疫応答を抑制するのではなく、拒絶反応自体がHCVの増幅を抑制する可能性が示唆されます。

私たちはつぎのような仮説を立てました。肝移植後に拒絶反応が惹起されると、門脈流域にリンパ球が浸潤します。CD4⁺T細胞からはIL-2が、CD8⁺T細胞からはIFN γ がリリースされます

IL-2 産生細胞の近傍にナチュラルキラー(NK)細胞が存在すれば、そこから IFN γ が産生され、近傍の hepatocyte 中の HCV の増幅を抑制するというものです。

そこで、つぎのような *in vitro* スタディを行いました。ダブルチャンバー・カルチャーシステムの下層に HCV レプリコン細胞を培養し、その上層でリンパ球混合試験を行いました。リンパ球混合試験が HLA の 0-mismatch, すなわち alloimmune response が起きない状態をコントロールとして HCV 増勢の程度を比較すると、3-mismatch で培養すると有意に HCV のリプリケーションが抑制され、6-mismatch で培養するとさらなる抑制効果が認められました。この培養系に IFN γ ブロッキング抗体を添加すると、抑制効果は消失してしまいます。したがって、拒絶反応が惹起されたときにリリースされる IFN γ が HCV の増幅を抑制しているといえます。HCV を制御するために拒絶反応を起こしっぱなしにするということは現実的ではないので、組織傷害を起こすことなく、いかに肝グラフトに IFN γ 産生細胞を集めるかが、治療戦略となりえます。

私たちが考えた戦略は、肝臓に内在する NK/NKT 細胞は拒絶反応を惹起しない細胞ですが、これを直接 IL-2 で活性化して抗ウイルス効果を誘導しようというものです。ヒト肝リンパ球を採取して、NK/NKT 細胞を分離して、ダブルチャンバーシステムで培養してみると、期待どおり NK/NKT 細胞に強い抗 HCV 効果の誘導が観察できました。

また、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた実験を行いました。UPA トランスジェニック・スキッドマウス、すなわち、肝不全・免疫不全マウスにヒトの肝細胞を移植すると、90%以上がヒト肝細胞

に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが作成できます。C 型肝炎感染血清を注入すると C 型肝炎感染マウスが作製され、ここに肝由来ヒト NK/NKT 細胞を注入すると HCV は消失することが観察できました⁴⁾。

これらの基礎実験を踏まえて、ドナー肝由来活性化 NK/NKT 細胞療法を開発しました。肝移植時に肝臓を摘出して臓器灌流を行います。この廃液には NK/NKT 細胞が豊富に存在します。これを IL-2 と CD3 抗体の存在下で 3 日間培養して、レシピエントに点滴静注する治療法です。

7 例の C 型肝炎患者にこの治療法を行ったところ、2 例で HCV が消失しました。この 2 例は移植前の HCV-RNA が比較的 low、一方、高い症例では効果が認められていません。本療法を行わなかったコントロール群と比較すると、本療法を行った群は有意に HCV-RNA 量が移植後 4 週間以内では低下していることがわかります。しかし、7 例中 2 例とその確率は低く、いかに移植前の HCV を低下させるか、あるいは投与するリンパ球数を増加させるかが今後のテーマになります。

文 献

- 1) Tanaka Y et al. : Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest* 33(3) : 309-324, 2004.
- 2) Tanaka Y et al. : Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation : immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation* 79(9) : 1262-1267, 2005.
- 3) Tahara H et al. : Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int* 22(8) : 805-813, 2009. Epub 2009 Mar 17.
- 4) Ohira M et al. : Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 119(11) : 3226-3235, 2009.

討 論

宮川 どなたか質問はございますか。

古川 大段先生の発表された免疫モニタリングの手法は、煩雑で時間がかかり、なにか事象が起きたときには治療が追いつかない可能性があります。

す。拒絶反応が起きたとき、通常は肝生検を行い、その日に結果が出て治療に移りますが、そういった場合、どういう選択をされますか。

大段 私たちは事象が起きたときに MLR をし

ているのではなくて、移植後2週間おきに定期的にMLRをしています。その間になにかあったとしても、その前のMLRの結果が参考になります。

古川 理想的には、大段先生がおっしゃるようMLRをしながら拒絶反応をその時点で抑えられればいいのですが、なにか事象が出てきたときは対応が難しいと感じました。

大段 MLRの結果を待っていれば治療が間に合わない拒絶反応はきわめて強いものです。この場合、4日の培養を待たずに細胞分裂が肉眼的にも観察できるようになります。その段階で、フローサイトメーターで解析をして判断しています。常に5日間の培養が必要ではなく、強い拒絶反応は3日ほどで判定ができます。翌日に結果の出る肝生検のテンポには追いつかないかもしれません。

古川 そういうときはどちらを重視しますか。

大段 拒絶反応かどうかという判定は、組織診よりも免疫モニタリングを重視しています。

古川 それならば効率的ではありますね。

大段 そうですね。ウイルス性肝炎に対する肝移植例では、拒絶反応なのか肝炎再発なのか、早期では組織学的にも鑑別しにくい症例も経験しているので、免疫抑制薬を増量するか減量するかという指標としては、免疫モニタリングを用いています。

古川 拒絶反応の発現率は差が出ましたが、それをもっと下げられる可能性はありますか。

大段 いまの段階では、免疫モニタリングによってリアルタイムに免疫調整をしているというよりは、移植後早期は一般的な減量プロトコルを行い、退院後に免疫モニタリングによって免疫抑制薬をどれくらいまで減量できるか判断しています。

古川 長期だといいいのですが、急性期をどのよ

うに乗り切ることが問題だと思いましたが、質問させていただきました。

ワクチン療法においては、late responderでは反応が抗ドナー応答と抗third-party 応答とも高かったですね。

大段 Good responderでは抗ドナー応答は低く、抗third-party 応答だけが回復しています。Poor responderは両方とも抑制されています。

古川 1年以内に反応するのがearly responderですか。

大段 そうです。

古川 それか、抗ドナー応答は低くて抗third-party 応答は同じくらいですが、1年以上経って反応するものは両方とも同じくらいであると。

大段 時期の差はありますがMLRで判定される免疫状態とワクチンに対するレスポンスの関係は同等です。

古川 抗third-party 応答には同じように反応しているのに、なぜワクチン治療の成績はわるいのでしょうか。

大段 呈示したデータはHBVワクチネーションに成功したときのMLRのデータです。1~2年の間にワクチネーションに成功した症例は最適化に時間がかかっていると理解していただければと思います。免疫抑制薬の最適化に時間がかかる症例は、拒絶反応を経験しているとかそれなりの理由があるので、そういった症例では最適化までに時間がかかってしまいます。

古川 C型肝炎については、いつもながらすばらしい結果なので、大段先生にはもっと研究を押し進めていただきたいです。

武富 C型肝炎の治療については、プロトコルでは肝移植直後にリンパ球を入れて、自然免疫を検討されていますが、たとえば採取したNK/NKT細胞をある一定期間ストックしておいて、IFN+リバビリン併用療法時に使用する、または、末梢血のNK/NKT細胞を代用して使用するということは可能でしょうか。また、そのときの相乗効果をどう予想されますか。

大段 その方向で検討しています。ヒト肝細胞キメラマウスを使った実験でもウイルス量が下げ

発言者

- 宮川 真一 (信州大学医学部外科)(司会)
古川 博之 (旭川医科大学外科学講座消化器病態外科学分野)
大段 秀樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学)
武富 紹信 (九州大学大学院消化器・総合外科)
猪股 裕紀洋 (熊本大学小児外科・移植外科)

れば、リンパ球療法で完全にウイルスを消失しますが、ウイルス量が多いとリンパ球を移入しても効果が認められません。肝移植時も、ウイルス前値が低ければ活性化リンパ球療法1回でウイルスが消失しています。そういう意味では、IFN治療を行いつつ、ウイルス量を減少させて、リンパ球療法を併用するというのは理論的で、凍結保存してIFNと同時に使用するという試みをしようという方向でいます。

末梢血中のリンパ球を培養して免疫細胞療法に使用する発想については、100 ccの末梢血からリンパ球を分離して4週間培養すると40倍ほどのNK細胞が採取できます。これを繰り返し投与するプロトコルの確立を目指しています。

武富 肝臓を摘出すると、HCVもボトムネックでかなり下がります。そのタイミングに合わせて培養リンパ球を入れていると考えていいのでしょうか。

大段 移植後3日に移入しているので、HCVは少し戻りはじめている時期かもしれませんが、もしかするとHCV消失症例では、ボトム時にリンパ球が移入されたのかもしれませんが、リアルタイムにウイルス量を観察していませんので、今後は免疫細胞移入のタイミングを図るための観察が必要です。

宮川 移植後の肝機能異常の場合、C型肝炎再発か拒絶反応かの判断が難しく、私たちも肝組織でHCVをFISH法によって測定しHCVの増殖をみましたが、拒絶反応とHCVの増殖はオーバーラップしている症例が多くありました。

拒絶反応が起こるくらいの免疫状態であればHCV増殖を抑制できるという点について、私たちの結果からみると、肝内で実際に起こっていることは非常に複雑だと思いますが、どうお考えでしょうか。

大段 ご指摘のように、拒絶反応とHCV量の相互作用は複雑である可能性はあります。拒絶反応によって産生されたIL-2が肝炎を誘導している可能性もあります。

宮川 ドナーのリンパ球をIL-2で活性化して

入れるのは1回だけですか。

大段 いまのところ1回だけです。

宮川 リンパ球には寿命があるので、繰り返して入れるというお考えはありますか。

大段 今後は末梢血中から増殖したNK細胞を細胞療法に使用したいと考えています。先ほど、末梢血中リンパ球を4週間培養するとNK細胞が40倍ほどになるとお話ししましたが、その40倍の培養細胞には強い抗HCV効果が認められました。つまり、肝臓内のNK細胞と同等の抗HCV効果は誘導できます。しかし、生体に投与した場合の細胞寿命が短縮することが今後の課題です。

宮川 MLRで免疫反応をご覧になっていますが、フォローアップ症例をずっとみていくのですか。

大段 50数例に行いましたが、入院中は2週間間隔で、退院後は3カ月から半年間隔でMLRを行い、その数値を参考にして免疫抑制薬を増減しています。

宮川 $CD8^+$ $CD25^+$ T細胞の割合は、長期的にはどのように変わるのでしょうか。

大段 長期では $CD8^+$ T細胞の応答は徐々に消失して、 $CD4^+$ T細胞の応答が残存する症例で肝機能障害が認められることがあります。その場合は、CNIを調整することが多くあります。 $CD8^+$ T細胞の応答が長期まで残るのはまれです。

猪股 この戦略を用いての実際的な免疫抑制の修飾方法ですが、CNIとステロイドについては発表されましたが、代謝拮抗薬のMMF等を加えることに関してはどうでしょうか。武器としてもCNIとステロイドだけでいこうと考えているのか、 $CD4^+$ $CD8^+$ T細胞によってこういう状況であれば代謝拮抗薬も加えるといった具体的な方法があるのでしょうか。

大段 本来、免疫抑制療法はCNIとステロイドの二剤併用ですが、腎機能障害あるいは糖尿病などでCNIを減量する必然のある症例では代謝拮抗薬を併用しています。その場合には、代謝拮抗薬を維持して、CNIを最適化しています。

宮川 ありがとうございます。



5. 肝移植

おおだん ひで き おのえ たか し ぼんしょうたけ まさたか
大段秀樹, 尾上隆司, 番匠谷将孝
広島大学大学院 外科学

最近の動向

肝移植は、末期肝疾患、先天性代謝疾患、劇症肝不全、肝細胞癌患者の根本的治療手段で、一般的治療法としてすでに定着している。肝移植の治療成績の向上に伴い、急性肝不全、ウイルス性肝炎、肝細胞癌、胆管細胞癌などの適応拡大と、管理の改良や quality of life の改善に関わる報告が重要化している。また、肝臓は免疫寛容に関わる臓器として知られ、一部の肝移植症例では免疫抑制剤の完全離脱が可能である。その機序は未だ不明で、離脱可能な症例の選定法はない。この古くて新しい重要課題についても、いくつかの新しい情報が報告された。

急性肝不全

近年の人工肝補助療法の進歩や抗ウイルス薬の出現により、急性肝不全に対する内科的治療が向上したとはいえ、肝移植は有効な治療法であることに変わりはない。肝移植の適応・施行時期の指標として、本邦では1996年に日本急性肝不全研究会で提唱された肝移植適応ガイドライン等が用いられているが、正診率が急性型で67%、亜急性型で78%と低く、新たな予後予測法の確立が試みられている¹⁾。

最近、イギリスから急性肝不全の緊急肝移植症例の長期成績が報告された²⁾。肝疾患既往のない発症から26週以内に肝性脳症と凝固障害が出現した急性肝不全60例が対象で、生存率は1年で80%、5年で76%、10年で69%であり、グラフト生着率は1年で73%、5年で65%、10年で59%であった。単変量解析で、①脳浮腫、②ドナー（脳死）年齢>59歳、③ドナーBody Mass Index (BMI)>35 kg/m²、④冷阻血時間>12時間、が有意な予後不良因子であったとしている。

従来、広く予後予測の指標として用いられてきたKing's College Hospital Criteriaにもあるように、高齢者が予後不良因子であるとする報告が多くなされてきたが、US Acute Liver Failure Study Groupから、興味深い高齢者の急性肝不全に対する緊急肝移植症例の成績が報告された³⁾。肝疾患既往のない急

- 1) Mochida S, Nakayama N, Matsui A et al. 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. *Hepatol Res* 38: 970-979, 2008
- 2) Chan G, Taqi A, Marotta P et al. Long-term outcomes of emergency liver transplantation for acute liver failure. *Liver Transpl* 15: 1696-1702, 2009
- 3) Schiødt FV, Chung RT, Schilsky ML et al. Outcome of acute liver failure in the elderly. *Liver Transpl* 15: 1481-1487, 2009

性肝不全 1126 例が対象で、overall survival (肝移植を含む) は 60 歳未満群 (n = 1016) で 70.3%, 60 歳以上群 (n=110) で 50.9% ($p < 0.001$), spontaneous survival (内科的治療のみ) はそれぞれ 47.4%, 32.7% ($p = 0.004$) と、ともに 60 歳以上で予後不良であったが、病因をアセトアミノフェンとそれ以外のものの 2 つに分けて二群 (60 歳未満群と 60 歳以上群) 間を多重ロジスティック回帰分析で再検討したところ、spontaneous survival はいずれの病因においても有意差はなく、overall survival もアセトアミノフェンによる急性肝不全では有意差がなかった。著者らは、今までの報告で高齢者の overall survival が不良であった原因として、高齢者を移植適応とする割合が若年者に比べて低く、発症初期での移植施設への紹介が若年者に比べて少ないことを挙げている。以上より、高齢そのものは内科的治療において有意な予後不良因子とはならず、高齢者においても積極的に移植を考慮すべきであるとしている。

小児の急性肝不全では、病因が多彩であり、肝炎を伴わない代謝性疾患や原因不明例が多く、成人と比べ脳症の判定が困難なことが特徴として挙げられる。UCLA の小児の急性肝不全 122 人 159 例の報告では、単変量解析で、① 年齢 < 24 ヶ月、② クレアチニンクリアランス (cCrCl) < 60 mL/min/1.73 m²、③ Pediatric End Stage Liver Disease (PELD) score > 25、④ 温虚血時間 > 60 分が有意なグラフト生着不良因子であり、① アフリカ系アメリカ人、アジア人、② 年齢 < 24 ヶ月、③ cCrCl < 60 mL/min/1.73 m²、④ 黄疸出現から脳症出現までの期間 < 7 日、が有意な予後不良因子であった⁴⁾。また多変量解析では、① cCrCl < 60 mL/min/1.73 m²、② PELD score > 25 ポイント、③ 年齢 < 24 ヶ月が有意なグラフト生着不良因子であり、① cCrCl < 60 mL/min/1.73 m²、② 黄疸出現から脳症出現までの期間 < 7 日、が有意な予後不良因子であった。グラフト生着率は 5 年で 73%、10 年で 72%、レシピエント生存率は 5 年で 77%、10 年で 73% であり、多変量解析での危険因子が存在する症例では、有意にグラフト生着率・レシピエント生存率が不良であったとしており、小児における早期肝移植の適応の指標になりうると思われる。

4) Farmer DG, Venick RS, McDiarmid SV et al : Fulminant hepatic failure in children : superior and durable outcomes with liver transplantation over 25 years at a single center. Ann Surg 250 : 484-493, 2009

B 型ウイルス性肝炎 (HBV)

HBV に対する肝移植では、抗 HBs ヒト免疫グロブリン製剤 (HBIG) と抗ウイルス核酸アナログ併用療法により肝炎再発の予防が可能であり、それゆえ、移植成績は非常に良好である。移植後に血中の HBV ウイルスが陰性化しても、HBIG と核酸アナログの併用療法を中止すれば肝炎再発の可能性があるが、いつまで抗ウイルス療法を継続すべきか定説がない。これに対して、HBV ワクチンの投与により能動免疫を獲得することで HBIG 離脱をはかる試みが報告されてきた。しかし、免疫抑制療法下で能動免疫を誘導することは、相反する治療を行うことといえる。こういった背景の中、免疫モニター下に必要最小限

の免疫抑制を行うことで、抗ドナー特異的免疫抑制状態を導きつつ HBV ワクチネーションを行えば、約 60% の症例で HBs 抗体の上昇を認め、HBIG 離脱の離脱が可能であったと著者らは報告をした⁵⁾。

C 型ウイルス性肝炎 (HCV)

ドナーに脂肪肝がある場合、その程度が HCV に対する肝移植後の線維化や予後に影響するか否かは未だ不明である。この疑問に対する検討の結果として、「ドナーの脂肪肝の程度は移植後の肝線維化と 3 年生存率に影響を及ぼさないため、グラフトとして安全に使用できる」という報告と⁶⁾、「中程度～高度脂肪肝グラフトでは移植後 HCV 肝炎の再発率が高く、30% 以上の脂肪肝では線維化への進展が高率で、肝移植ドナーとして排除すべきである」と結論した、相反する報告があった⁷⁾。

体細胞に表出する CD81 分子と C 型ウイルスの構造蛋白との結合が、感染の成立に深く関わると考えられている。ヒト肝細胞で置換されたマウス (ヒト肝細胞キメラマウス) に抗 CD81 抗体を予防投与すると、HCV の感染が回避できたとの報告がなされた⁸⁾。一般に、ウイルスが感染すると natural killer (NK) 細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、HCV 感染では C 型ウイルスの E2 蛋白と NK 細胞上の CD81 分子の結合によって NK 細胞機能が抑制され、高頻度に持続感染に移行する。抗 CD81 抗体は、ウイルスが E2 蛋白/CD81 結合によって自然免疫応答を巧妙に回避し、持続感染に移行する機構を断ち切る可能性もあるのかもしれない。今後、肝移植後の HCV の再感染予防の新展開として期待がかかる。

NK 細胞と移植後の HCV 再感染に関連する重要な報告をもう 1 つ紹介する。NK 細胞は、表出する killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) がヒト組織適合性抗原 class I (HLA-C) を認識して抑制シグナルを受ける。HLA が欠落したウイルス感染細胞を正常細胞から識別して標的としうる機序の一つである。ドナー/レシピエント間の HLA-KIR ligands のミスマッチが (特にレシピエントが KIR2DL3 を示す場合)、移植後再発 HCV 肝炎の進行・線維化と関わるとの報告がなされた⁹⁾。

肝細胞癌 (HCC)

Milan 基準 (遠隔転移や血管浸潤がなく、HCC が単発で腫瘍径 5 cm 以下か、多発例では 3 個以内で径 3 cm 以下) を満たす HCC 症例が、他の良性肝疾患と同等の肝移植成績が得られることが示されて以降、この基準が HCC に対する移植適応の gold standard となっている。しかし、遠隔転移や血管浸潤がない Milan 基準外の肝移植症例に相当数の無再発生存症例があることも示されており、UCSF 基準のような再発のリスクファクター、Milan 基準外 HCC への適応

5) Tahara H, Tanaka Y, Ishiyama K et al : Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int* 22 : 805-813, 2009

6) Burra P, Loreno M, Russo FP et al : Donor livers with steatosis are safe to use in hepatitis C virus-positive recipients. *Liver Transpl* 15 : 619-628, 2009

7) Briceño J, Ciria R, Pleguezuelo M et al : Impact of donor graft steatosis on overall outcome and viral recurrence after liver transplantation for hepatitis C virus cirrhosis. *Liver Transpl* 15 : 37-48, 2009

8) Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M et al : Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection *in vivo*. *Hepatology* 48 : 1761-1768, 2008

9) de Arias AE, Haworth SE, Belli LS et al : Killer cell immunoglobulin-like receptor genotype and killer cell immunoglobulin-like receptor-human leukocyte antigen C ligand compatibility affect the severity of hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 15 : 390-399, 2009

拡大の可能性の検討が盛んに行われている。

今年、イタリアの National Cancer Institute からは、36 施設から登録された HCC に対する肝移植症例 1556 例の解析が報告された¹⁰⁾。移植後の病理検査で、444 例は Milan 基準内、1112 例は Milan 基準外 HCC 症例であり、5 年全生存率はそれぞれ 73.3%と 53.6%であったが、微小血管浸潤がなく、最も大きい腫瘍の径 (cm) と腫瘍個数の和が 7 以内 (up-to-seven criteria) に収まる 283 例での 5 年全生存率は 71.2%と Milan 基準内症例と同等であり、同基準によりより多くの HCC 症例が移植の適応となりうることを示している。またカナダ Alberta 大学のグループは、腫瘍総体積 (TTV) が肝移植における再発のリスク予測に有用とする論文を発表している¹¹⁾。この論文では、ROC 曲線により腫瘍総体積のカットオフ値を 115 cm³としたところ、肝細胞癌再発リスクは Milan 基準、UCSF 基準と変わらないとしている。また同グループは、さらに Scientific Registry of Transplant Recipient (SRTR) に登録された 6478 例の肝移植 HCC 症例の解析を報告している¹²⁾。この報告では、Milan 基準外症例は全症例の 5%以下であり、TTV と AFP が独立した予後規定因子であること、TTV > 115 cm³ または AFP > 400 ng/mL 症例では 3 年生存率は 50%以下であること、Milan 基準内症例の 8.8%が AFP > 400 ng/mL 症例であったことを報告している。Essen 大学のグループも、同様に AFP 値を用いた適応基準を提唱しており、腫瘍マーカーが HCC 症例に対する肝移植適応決定において個々の症例の腫瘍特性を反映したバイオマーカーになりうることを示している¹³⁾。

胆管細胞癌 (CCC)

CCC 症例の長期予後を得るには、切除断端陰性となる切除術が必須である。肝移植は、切除断端の確保の理由から成績が期待され、1990 年代に欧米で試行されたが、高い再発率、特に局所再発のため 3 年生存率が 20~30%台と満足するものではなかった。しかし、肝移植は肝切除よりも有意に 5 年生存率が高く、後の解析により予後規定因子が T2 以下、リンパ節転移陰性、切除断端陰性であり、肝移植長期生存者が高率に chemo-radiation を術前後に受けていたことが判明した。これらの背景をもとに、Mayo クリニックのグループが行っている治療成績は注目に値する。同施設でのプロトコールでは、T2 以下、リンパ節転移陰性、遠隔転移陰性の切除不能肝門部 CCC 例に対し、neoadjuvant chemoradiation therapy を行い、staging laparoscopy でリンパ節転移陰性、肝内外転移・播種陰性を確認後、肝移植を行っている。最新の報告では 148 例が enroll し、90 例が肝移植を受けている¹⁴⁾。肝移植施行例での 1, 3, 5 年生存率は 90, 80, 71%, 全体では 82, 63, 55%と良好な成績を保っている。さらに再発因子として、高年齢、胆摘の既往、CA19-9 > 100 ng/mL、長期の待機時間、腫瘍径 > 2 cm、神経浸潤を挙げている。ドイツのグループからも少数ながら、

- 10) Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R et al : Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria : a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 10 : 35-43, 2009
- 11) Toso C, Trotter J, Wei A et al : TTV predicts risk of recurrence following liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 14 : 1107-1115, 2008
- 12) Toso C, Asthana S, Bigam DL et al : Reassessing selection criteria prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma utilizing the scientific registry of transplant recipients database. *Hepatology* 49 : 832-838, 2009
- 13) Sotiropoulos GC, Lang H, Sgourakis G et al : Liberal policy in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma : Lessons learned. *Dig Dis Sci* 54 : 377-384, 2009
- 14) Rosen CB, Heimbach JK, Gores GJ : Surgery for cholangiocarcinoma : the role of liver transplantation. *HPB* 10 : 186-189, 2008

切除不能肝門部胆管癌に対する PD+肝移植の成績が報告されている¹⁵⁾。1, 5, 10 年生存率は 63, 38, 38% であり, リンパ節転移陰性例では 10 年生存率は 56% であった。これらの結果は, 改めて厳格な症例選択の必要性和 neoadjuvant chemoradiation therapy の必要性を示唆するものである。Mayo プロトコールの問題点として, 再発のリスクとしての長期の待機時間および腫瘍進展による脱落が挙げられる。この問題解決のため今後生体肝移植の適応が考慮されるが, この点については議論が必要であろう。

ABO 血液型不適合移植

血液型不適合肝移植の周術期管理の要点は, 術前からの抗 B リンパ球療法と血漿交換, 術直後では内皮炎の予防と感染予防, 長期管理では肝内胆管合併症症例における慢性胆管炎の管理である。肝持続注入療法と抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) の組合せでほぼ液性免疫拒絶は制御可能となり, 成人においても不適合移植を施行する施設が増加しつつある。局所注入療法は, 抗原抗体反応による内皮障害を軽減することを意図したものである。抗体産生そのものを効果的に抑制できれば, 血栓症や出血の危険性をもつ局所注入療法は回避しうる。肝局所注入療法を行わず, リツキシマブ, イムノグロブリン静脈投与, 血漿交換, 脾摘を併用したより安全なプロトコールを 4 例の血液型不適合生体部分肝移植に適用し, 全例良好な経過をとった報告がされた¹⁶⁾。

一方, UNOS データベースから, 1990~2006 年の血液型不適合脳死ドナー肝移植成績が報告された¹⁷⁾。アメリカにおける不適合移植は, 適合移植が不可能な緊急例に制限され, 乳児 (0~1 歳; N=156), 小児 (2~17 歳; N=170), 成人 (>17 歳; N=667) の患者に施行されていた。グラフト生着率は, 乳児と小児患者では適合症例と差を認めず, 成人患者では有意に不適合例が悪かった。本邦における生体肝移植の成績と類似した結果である。

免疫抑制療法と免疫寛容

カルシニューリンインヒビター (CNI) とステロイドの併用を中心とする肝移植後の免疫抑制療法の確立は, 良好な移植成績の要因である。しかし, 非特異的免疫抑制に起因する感染症や悪性腫瘍の問題が重要視されている。正常な生体防御能を保ちつつ, 移植抗原に対する免疫応答のみを抑制しうる必要最小限の免疫抑制を実施しうるプロトコールの確立が求められる所以である。

必要最小限の免疫抑制療法に関して注目すべき報告として, 156 例の成人肝移植症例を対象としたタクロリムス単剤とステロイド併用の無作為前向き比較試験の結果が挙げられる¹⁸⁾。両群に生存率や拒絶治療頻度に差を認めないことから, タクロリムス単剤による免疫抑制療法は特別な症例を選定することなく可能であると結論している。

15) Seehofer D, Thelen A, Neumann UP et al: Extended bile duct resection liver and transplantation in patients with hilar cholangiocarcinoma: long-term results. *Liver Transpl* 15: 1499-1507, 2009

16) Ikegami T, Taketomi A, Soejima Y et al: Rituximab, IVIG, and plasma exchange without graft local infusion treatment: a new protocol in ABO incompatible living donor liver transplantation. *Transplantation* 88: 303-307, 2009

17) Stewart ZA, Locke JE, Montgomery RA et al: ABO-incompatible deceased donor liver transplantation in the United States: a national registry analysis. *Liver Transpl* 15: 883-893, 2009

18) Lerut J, Mathys J, Verbaandert C et al: Tacrolimus monotherapy in liver transplantation: one-year results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Surg* 248: 956-967, 2008

肝移植の場合、一部の症例で免疫抑制剤の完全な離脱が可能な場合がある (Operational tolerance)。しかし、その機序は不明なうえ、離脱可能な症例の選定は未だ不可能である。Operational tolerance と制御性 T 細胞の関わりは以前から指摘されているものの、説得力のあるエビデンスはまだない。12 例の肝移植症例を対象とした前向き試験では、Operational tolerance を示した 5 例においては、末梢血の CD4⁺CD25^{high} T 細胞の存在比率と FoxP3 表出の増加を認めたが、そうでなかった 7 例では認めなかったと報告された¹⁹⁾。Tolerant 症例と non-tolerant 症例の識別に関する注目すべき報告として、肝移植患者の末梢血の遺伝子転写パターン解析を挙げたい²⁰⁾。その結果から、NK 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞などの自然免疫系の細胞が Operational tolerance の維持に深く関わると結論している。

一方、Operational tolerance の状態で管理している症例でも、グラフト肝生検を行えば線維化を認める場合が多く、免疫抑制剤の再導入によって線維化の改善もはかれることが報告された²¹⁾。グラフトの線維化は、急性あるいは慢性拒絶像とは異なるが、抗原特異的な変化か否かは不明である。いずれにせよ、肝機能の安定した Tolerant 症例といえども、ラフト生検による形態学的な監視の必要性が強調されている。

肝肺症候群

肝肺症候群とは、肝疾患に伴う肺血管拡張による動脈血酸素化障害を特徴とする。肺血管が拡張すると、混合静脈血が直接的にまたは肺内シャントを經由して肺静脈へ流入しやすくなる。肺胞換気は増加しないのに、肺血流が増えるため換気血流不均衡が起こり酸素化不良となる。肝硬変患者では低酸素性肺血管収縮が抑制または消失する場合があるため、さらに肺血流が増大する。

肝肺症候群に対する有効な内科的治療法は現在のところ存在せず、肝移植が唯一の治療法である。術後死亡率および移植後から低酸素血症の改善までの期間は、肝肺症候群の重症度が高く術前低酸素血症が重篤であるほど延長することが明らかにされている²²⁾。

肝移植待機患者のうち、肝肺症候群を伴う 72 名と伴わない 146 名を前向きに比較検討した結果、肝肺症候群症例では New York Heart Association functional class 分類と quality of life が悪く、有意に死亡率が高いことが報告された²³⁾。したがって、肝肺症候群の患者は他の疾患で肝移植の候補になっている患者より優先度を高く考えねばならない。

肝移植後の腎障害

Model for End-Stage Liver Disease (MELD) スコアが導入されて以来、腎機能障害を伴った肝移植症例は増加している。移植後の慢性腎不全の発症を予測

- 19) Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A et al : FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation* 86 : 1370-1378, 2008
- 20) Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I et al : Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 118 : 2845-2857, 2008
- 21) Yoshitomi M, Koshiba T, Haga H et al : Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation* 87 : 606-614, 2009
- 22) Rodríguez-Roisin R, Krowka MJ : Hepatopulmonary syndrome—a liver-induced lung vascular disorder. *N Engl J Med* 358 (22) : 2378-2387, 2008
- 23) Fallon MB, Krowka MJ, Brown RS et al : Impact of hepatopulmonary syndrome on quality of life and survival in liver transplant candidates. *Gastroenterology* 135 (4) : 1168-1175, 2008