

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した

臨床的ならびに基礎的研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上本 伸二

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

- 肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した
臨床的ならびに基礎的研究 上本 伸二 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した
臨床的ならびに基礎的研究
上本伸二・千葉 勉・上田佳秀・丸澤宏之 ----- 29
2. 移植後ウイルス血漿を呈する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発
下遠野邦忠 ----- 41
3. HCV 陽性肝移植におけるステロイドフリー免疫抑制法と
preemptive 抗ウイルス療法の意義に関する研究
森 正樹 ----- 47
4. 移植後 C 型肝炎再燃に対する IFN 治療効果とドナー・レシピエント
IL28B 遺伝子多型 (SNP) の関連性についての解析
大段秀樹 ----- 51
5. 生体肝移植後の C 型肝炎再発におけるインターフェロンの治療効果に基づく
IL28B 遺伝子多型と ISGs の発現に関する研究
太田哲生 ----- 57
6. 肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した臨床的ならびに基礎的研究
－疾患関連タンパク質の解析基盤の研究－
朝長 毅 ----- 61

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 67

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

総括研究報告書

肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した 臨床的ならびに基礎的研究

研究代表者 上本 伸二 京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科学講座 教授

研究要旨

肝移植後 C 型肝炎ならびに B 型肝炎に対する最適な治療法を確立することを目的とし、臨床研究ならびに基礎研究の両面から解析を行った。

肝移植後 C 型肝炎についての臨床研究の結果、これまでの肝移植後 C 型肝炎再発に対する治療成績は、ウイルス排除 (SVR) 率が 33～54%であった。治療効果予測因子として、C 型肝炎ウイルス (HCV) 遺伝子型、肝移植前 HCV-RNA 量、ドナー・レシピエント IL28B 遺伝子多型が明らかとなった。また、低用量ペグインターフェロン維持療法やステロイドフリー免疫抑制法の効果も明らかにした。

肝移植後 B 型肝炎についての臨床研究の結果、肝移植後に B 型肝炎ウイルス (HBV) の活性化が問題となる 2 つの病態について、HBV 活性化の実態が明らかとなった。HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植レシピエントに対して HBIG の投与が行われてきたが、HBs 抗体エスケープ変異株の活性化により B 型肝炎が発症することが明らかとなった。一方、HBs 抗原陽性レシピエントに対する肝移植後には HBIG+核酸アナログ製剤 (エンテカビルまたはラミブジン) にて B 型肝炎再発予防が可能であることが示された。

肝移植後 C 型肝炎ならびに B 型肝炎についての基礎研究については、次世代ゲノムアナライザーによる肝炎ウイルス解析、肝組織におけるプロテオーム解析、ならびに HCV 複製を抑制する宿主因子の探索のための基礎研究の準備が整った。今後、肝移植後の肝炎ウイルス再発や進行、治療効果に関与するウイルス因子ならびに宿主因子の解析から、より有効で有害事象の少ない治療法の確立へとつなげていくことが期待される。

研究分担者

千葉 勉：京都大学大学院医学研究科

消化器内科学講座 教授

下遠野 邦忠：千葉工業大学 附属総合研究所

教授

森 正樹：大阪大学大学院医学系研究科

消化器外科学 教授

大段 秀樹：広島大学医歯薬学総合研究科
外科学 教授

太田 哲生：金沢大学大学院医学系研究科
がん局所制御学 教授

朝長 毅：独立行政法人 医薬基盤研究所
創薬基盤研究部 プロテオーム
プロジェクト プロジェクトリーダー

上田 佳秀：京都大学医学部附属病院
臓器移植医療部 講師

丸澤 宏之：京都大学大学院医学研究科
消化器内科学講座 講師

A. 研究目的

C 型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス治療が積極的に行われるようになってきたが、すでに肝硬変、肝癌へと進行し抗ウイルス治療が困難な症例が多数存在する。これら進行した C 型肝硬変・肝癌に対する治療法として、近年肝移植が選択されるようになり、その数は年々増加しつつある。

しかしながら HCV 陽性レシピエントに対する肝移植後は、大部分の症例で C 型肝炎が再発し、再発後は免疫抑制剤などの影響を受け急速に進行することが明らかとなっている。この進行を抑制し予後を改善させるためには抗ウイルス治療が不可欠であるが、現在のところ、移植後 C 型肝炎の標準的治療法は確立されていない。移植後 C 型肝炎は、免疫抑制剤の使用など通常の C 型肝炎とは異なる点が多く、その治療成績は不良で有害事象が多いことが明らかとなってきている。以上より、移植後 C 型肝炎に対する有効かつ安全な治療法を確立することが急務である。本研究では、肝移植後 C 型肝炎症例の臨床像、治療成績を詳細に解析し、その予後、治療効果に關与するウイルス側、宿主側の因子を、それぞれ次世代ゲノムアナライザー、プロテオミクスを用いて解析することにより、移植後 C 型肝炎に対する、効果的で副作用の

少ない治療法を確立し、標準化することを目的とした。

さらに、肝移植後の B 型肝炎ウイルス(HBV)感染の問題として存在する異なる 2 つの病態、HBs 抗原陽性レシピエントにおける肝移植後の B 型肝炎、ならびに、HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後のレシピエントにおける B 型肝炎、に対する最適な治療法を確立することも本研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 肝移植後 C 型肝炎についての臨床研究

1-a. 肝移植後 C 型肝炎に対する抗ウイルス治療の効果の現状と効果予測因子の同定：京都大学にて2011年6月までに行われた肝移植後 C 型肝炎再発に対する抗ウイルス治療施行例 125 例の治療効果ならびにそれに関与する因子について解析を行った。

1-b. 肝移植後 C 型肝炎に対する低用量ペグインターフェロン維持療法：2001年1月から2007年8月までに京都大学にて抗ウイルス治療を行った肝移植後 C 型肝炎症例 80 例のうち、C 型肝炎以外の肝障害の原因疾患を認めず、抗ウイルス治療を開始して2年以上経過後に肝生検を行った 40 例について、ウイルス排除例（11例）、低用量ペグインターフェロン維持例（17例）、ならびに治療中止例（12例）の 3 群に分けて組織学的変化を解析した。

1-c. 肝移植後C型肝炎再燃に対するインターフェロン治療効果とドナー・レシピエントIL28B遺伝子多型(SNP)の関連性についての解析：2011年4月までに広島大学にて行われたHCV陽性肝移植症例61例について、治療効果ならびに治療効果ならびにそれに関与する因子をドナー・レシピエントIL28B遺伝子多型(SNP)を含めて解析を行った。

1-d. HCV 陽性肝移植におけるステロイドフリー免疫抑制法と preemptive 抗ウイルス療法の意義に関する研究：1999年より2008年の間に大阪大学にて行われたHCV陽性成人間生体肝移植症例28例について解析を行った。抗ウイルス治療は、術後肝機能が安定し次第速やかに低用量より開始し、副作用に応じて増減を行い、HCV-RNAが陰性化してから48週間投与を行った。免疫抑制剤はステロイドを全く使用しないステロイドフリー群(F群、n=17)とステロイドを漸減し3か月で終了するステロイド群(S群、n=11)を用いた。

1-e. 生体肝移植後のC型肝炎再発におけるインターフェロンの治療効果に基づく IL28B 遺伝子多型と ISGs の発現に関する研究：C型肝炎患者の肝臓内の ISGs に注目してIL28Bの遺伝子多型(SNP)との関係やインターフェロン治療抵抗性との関係について解析を行い、金沢大学に

おける生体肝移植後HCV再感染例においてレシピエントのIL28B SNPとインターフェロン治療効果との関係について検討をした。

2. 肝移植後B型肝炎についての臨床研究

2-a. HBc抗体陽性ドナーからの肝移植後B型肝炎ウイルス活性化の現状：1995年7月から2008年8月までに京都大学にてHBIGの予防投与を行ったHBc抗体陽性ドナーからHBs抗原陰性の肝移植レシピエント75例について、肝移植後のHBV活性化について解析を行った。

2-b. HBs抗原陽性レシピエントに対するHBIGとエンテカビルの併用療法の効果：2002年9月から2010年12月までに京都大学にてHBIG+エンテカビルの予防投与を行ったHBs抗原陽性レシピエントに対する肝移植後の経過について解析した。

3. 肝移植後C型肝炎ならびにB型肝炎についての基礎研究

3-a. 次世代ゲノムアナライザーによるHBV解析：肝移植症例ならびにB型慢性肝炎症例の血中ならびに肝組織に存在するHBVクローンの多様性の特徴と薬剤耐性変異を持つHBVの存在様式を明らかにするため、HBVの次世代ゲノムアナライザー解析を行った。血中ならびに肝組織からDNAを抽出し、HBV-DNAをHBV特異的なプライマーを用いたPCR法にて増幅後、次世代シーケンサーにて遺伝子配列を同定し、コンピューターソフトを用いてHBVの多

様性や薬剤耐性変異を含む既知のHBV変異解析を行った。

3-b. 次世代ゲノムアナライザーによるHCV解析：C型慢性肝炎症例においてもHBVの場合と同様に、血中ならびに肝組織に存在するHCVクローンの多様性の特徴ならびにインターフェロン治療前後の多様性の変化を明らかにするため、次世代ゲノムアナライザーを用いて解析を行った。

3-c. HCV 陽性肝組織におけるプロテオーム解析：定量的プロテオミクスの手法を駆使することによって、C型肝炎硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝炎硬変・肝癌発症サンプル、正常肝サンプル間のタンパク質発現を比較定量するため、プロテオーム解析システムの構築ならびにその実用性の検証を以下の手順で行った。①サンプルの破碎・タンパク質抽出・サンプルの品質検査、②タンパク質の消化・安定同位体タグによるサンプルの標識、③陽イオン交換カラムによる分画、④液体クロマトグラフ質量分析・データ解析。

3-d. HCV 複製を抑制する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発：

HCV ゲノム複製を抑制する宿主遺伝子を探索する方法として以下の実験系の構築を行う。HCV ゲノムが自立的に複製する細胞(レプリコン細胞)に、ウイルス複製を許容しない細胞からcDNA ライブラリーを調製して、発現ベクターを用いてレプリコン細胞に導入する。ウイルス複製を抑制する遺伝子が導入された細胞では HCV ゲノムが消滅すると期待される。その結果ウイルスタンパク質も消滅するので、ウイルスのプロテアーゼ活性も失われる。あらかじめ、レプリコン細胞にHCV プロテアーゼ依存的にヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (TK) を発現するようにしておけば、レプリコンの消失と共に TK 活性も失われることになるので、その細胞はガンシクロビル (GCV) 耐性になる結果、コロニーとして単離可能になると期待される。その細胞に導入した cDNA 情報を得ることにより、宿主遺伝子を明らかにできる。スクリーニングの方法を図に示した。(下図 HCV ゲノム複製を抑制する宿主因子の探索方法)

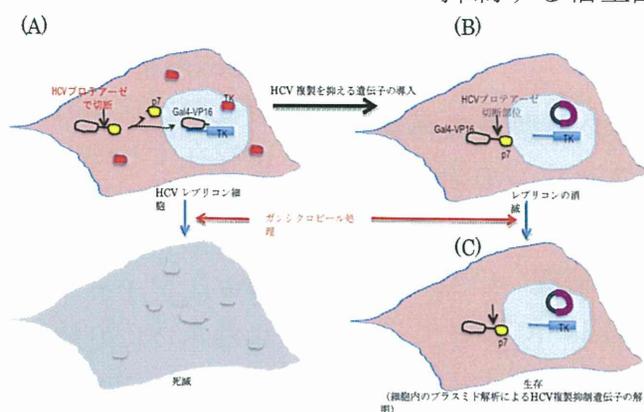


図 HCVゲノム複製を抑制する宿主因子の探索方法
細胞にGal4-VP16-NS5A/B-p7を発現するプラスミドと、Gal4依存的にTKを発現するプラスミドを導入しておく。この細胞にHCVレプリコンを導入するとウイルスプロテアーゼ (NS3) の働きでp7が取り除かれる。その結果、Gal4-VP16は核内に移行してTK遺伝子を活性化する。HCV複製を許容しないかあるいは抑制する細胞の遺伝子をこの細胞に導入する事により、HCV複製活性が止まると、TK遺伝子発現も止まる。細胞をGCVで処理する事により、レプリコンが失われた細胞を特異的に単離する事が可能になる。

C. 研究結果

1. 肝移植後 C 型肝炎についての臨床研究

1-a. 肝移植後 C 型肝炎に対する抗ウイルス治療の効果の現状と予測因子:

肝移植後 C 型肝炎再発に対する抗ウイルス治療施行例 125 例のうち、現在治療中の症例 8 例を除く 117 例中、ウイルス排除(SVR)に至った症例は 50 例であり、SVR 率は 43%であった。有害事象による中止例は 26 例(22%)と高率であった。SVR の予測因子として、HCV 遺伝子型が非 1 型であること、移植前の HCV-RNA 量が低値であることの 2 点が同定された。有害事象発現の予測因子は同定されなかった。

1-b. 肝移植後 C 型肝炎に対する低用量ペグインターフェロンによる維持療法:

長期経過における組織学的変化を解析したところ、ウイルス排除例では肝炎活動性の改善と線維化進行抑制を認めた。一方、非ウイルス排除例の中では、治療中止例で肝炎の活動性は増悪し、著明な線維化進行を認めたのに対して、低用量ペグインターフェロン維持療法を行なった症例は、ウイルス排除症例と同様に肝炎活動性の改善と線維化進行抑制効果を認めた。線維化が改善または維持された症例は、ウイルス排除例では 11 例中 10 例、低用量ペグインターフェロン維持療法例では 17 例中 13 例であったのに対し、治療中止例では 12 例中 0 例であった。肝移植

から 5 年での F3 以上への肝線維化進行症例はウイルス排除例では 0%、低用量ペグインターフェロン維持療法例では 14%、治療中止例では 54%であった。

以上より、肝移植後 C 型肝炎の進行抑制のためには、ウイルスの排除が重要であることが明らかとなった。また、ウイルス排除が困難な症例に対しては、低用量ペグインターフェロン維持療法が肝線維化進行抑制に有効であった。

1-c. 肝移植後 C 型肝炎再燃に対するインターフェロン治療効果とドナー・レシピエント IL28B 遺伝子多型(SNP)の関連性についての解析:

術後早期に pegIFN/RBV 療法を開始し、投与期間は HCVRNA 陰性化してから最低 1 年間の継続投与 (long term IFN 療法) とした。治療中を除く術後 IFN 療法を行った症例は 35 例であり、治療完遂した genotype1 症例は 20 例であった。背景は、年齢中央値 58 歳、男性:女性 = 15/5。IFN 前 HCVRNA は平均 6.6LogIU/ml、移植から IFN 開始までの期間は平均 4 ヶ月。pegIFN α +RBV を原則として行い、pegIFN α は週一回、RBV は 200mg/日から始め 800mg/日へ増量した。

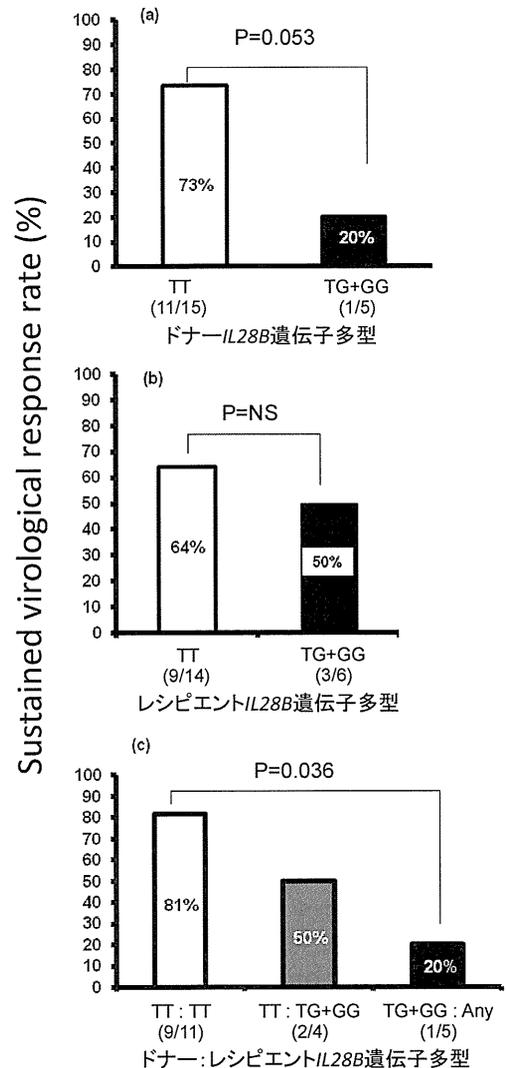
治療成績: long term IFN 療法を施行した症例における、全体の SVR 率は 54.2%(19/35)であった。genotype1 型の SVR 率は 46.4%(13/28)、genotype2 型の SVR

率は 85.7%(6/7)であった。治療完遂は genotype1 型では 20 例で SVR/nonSVR は 12/8 例、治療中止は 8 例で SVR/nonSVR は 1/7 例であった。Genotype2 型では 7 例全例が治療完遂し、SVR/nonSVR は 6/1 例であった。

RBV 治療における貧血と IPTA (rs1127354) との関連解析 : RBV 開始後 4 週における Hb の減少は CC 群 0.2g/dl (中央値)、CA 群 0.7g/dl と有意差を認めなかった。また治療中の Hb 最低値、治療開始後 3 ヶ月間の RBV アドヒアランスに両群間で差を認めなかった。

Genotype1 型症例に対する pegIFN/RBV 治療における SVR 率と IL28B 遺伝子多型との関連解析 : ドナーIL28B 遺伝子多型 TT 群における SVR 率は 73.3%(11/15)、TG+GG 群の SVR 率は 20% (1/5) であった (P=0.053)。一方、レシピエント IL28B 遺伝子多型 TT 群における SVR 率は 64.2%(9/14)、TG+GG 群の SVR 率は 50% (3/6) と差を認めなかった。ドナーおよびレシピエントの IL28B 遺伝子多型の組み合わせでの比較ではドナーTT・レシピエント TT 群の SVR 率は 81.8%(9/11)、ドナーTG+GG・レシピエント any 群の SVR 率は 20%(1/5)と有意な差を認めた (P=0.036)。単変量解析では“ドナーTT”、“ドナーTT およびレシピエント TT”、“RBV アドヒアランス 50%以上”の 3 因子が SVR 率と有意な関連を認めた。これらの

因子で多変量解析を行ったところ、“ドナーTT およびレシピエント TT”が SVR 率に対する唯一の独立した有意性のある予後因子であった (オッズ比:15.0、95%CI1.2-185.1、P=0.035)。



【図】: HCV genotype1 型における IFN 治療後 SVR 率

(a)ドナー IL28B 遺伝子多型、(b)レシピエント IL28B 遺伝子多型、(c)ドナー : レシピエント IL28B 遺伝子多型組み合わせによる SVR 率

1-d. HCV 陽性肝移植におけるステロイドフリー免疫抑制法と preemptive 抗ウイルス療法の意義に関する研究：

Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy は 14 例(50%)に施行しえた。LDIR が施行できなかつた原因は、HCV 早期再発 6 例(21.4%)、早期グラフト損失 4 例(14.3%)、その他(血小板減少、腎機能障害など)4 例(14.3%)であった。LDIR 治療導入率は、免疫抑制法別では F 群:70.6%、S 群:18.2%と F 群で高かつた。28 例中 HCV 肝炎再発を 8 例(29.6%)で、SVR は 9 例(33.3%)に認められた。HCV 肝炎再発危険因子は、LDIR 施行(P=0.001)、S 群(P=0.026)、急性拒絶反応(P<0.001)であった。

1-e. 生体肝移植後の C 型肝炎再発におけるインターフェロンの治療効果に基づく IL28B 遺伝子多型と ISGs の発現に関する研究：

C 型肝炎患者の肝臓内での遺伝子の発現を検討したところ、ISGs の発現が高い状態が IFN 抵抗性と密接な関係にあることが明らかとなった。IFN 治療に良く反応する症例(responder)では、IFN 治療前の ISGs が低く抑えられているものの、IFN 治療に伴って ISGs が強く誘導されることが明らかとなった。一方、治療抵抗例(non-responder)では治療前から ISGs が既に高く誘導されているものの、治療後はあまり ISGs の誘導が増加しないことが明らかとなった。次に、IL28B の

遺伝子多型と肝内の ISGs の発現の関連について検討したところ、IFN の効果が乏しいとされる IL28B マイナーアレルを有する症例は、メジャー症例に比べて肝内の ISGs の発現が高いことが判明した。同時にマイナータイプの肝臓では、治療前からインターフェロン α シグナルがより強く発現し、Wnt シグナルが増えていることも判明した。一方、メジャータイプの肝臓では、IL12、IL2 や IL7 シグナルなどの T、B 細胞系、DC 系に関連する遺伝子がマイナーより強く発現していることが明らかとなった。

さらに、生体肝移植後 HCV 再感染例におけるレシピエントの IL28B 遺伝子多型(SNP)、肝内 ISGs と IFN の治療効果との関係についても検討を開始した。肝移植後の C 型肝炎再発に対する Peg-IFN/RBV 併用療法の治療反応性と IL28B 遺伝子多型(SNP)との関連では、IL28B メジャーアレル型では SVR 率が有意に高いことが示されているため、当科における生体肝移植後 HCV 再発症例におけるレシピエント自身の IL28B 遺伝子多型(SNP)と Peg-IFN/RBV 療法の治療成績について検討した。その結果、当科における C 型肝炎変生体肝移植後 HCV 再感染症例においては、IL-28B メジャーアレル型の Peg-IFN/RBV 療法の治療効果はきわめて良好であり、63.6%(7/11 例)で SVR が得られた。メ

ジャーアレル症例の中には治療効果が期待できたにもかかわらず、やむを得ない理由で IFN 治療を中止した症例も含まれているため、さらに高い奏効率が期待できるものと推察される。一方、IL28B マイナーアレル型では SVR は 1 例も認められず、治療成績はきわめて不良であった。

2. 肝移植後 B 型肝炎についての臨床研究

2-a. HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植

後 B 型肝炎ウイルス活性化の現状：

HBs 抗原陰性・HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後の長期経過について検討した。HBIG の予防投与を行った HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植レシピエント 75 例中 19 例 (25%) で HBV 活性化を認めた。原因は、HBs 抗体エスケープ変異株出現が 7 例、HBIG の投与中断が 8 例、不明が 4 例であった(右図)。HBs 抗体エスケープ変異株は、肝移植後 15.7~54.9 ヶ月で活性化し、HBs 抗体と HBs 抗原が共に陽性であった。HBV 活性化早期にエンテカビルを投与した 4 例は全例で HBs 抗原が陰性化したのに対し、他の 3 例は B 型慢性肝炎へと移行した。以上より、HBIG 投与により HBs 抗体陽性が維持されている症例でも HBs 抗体エスケープ変異株による *de novo* B 型肝炎が生じること、発症早期のエンテカビル投与が効果的であることが明らかとなった。本研究からの知見は、肝移植後の B 型肝炎ウイルス対策の発展のみではなく、抗癌剤や

免疫抑制剤による通常の *de novo* B 型肝炎ならびに HBV ワクチン導入後の B 型肝炎の対策を立てる上でも非常に重要である。

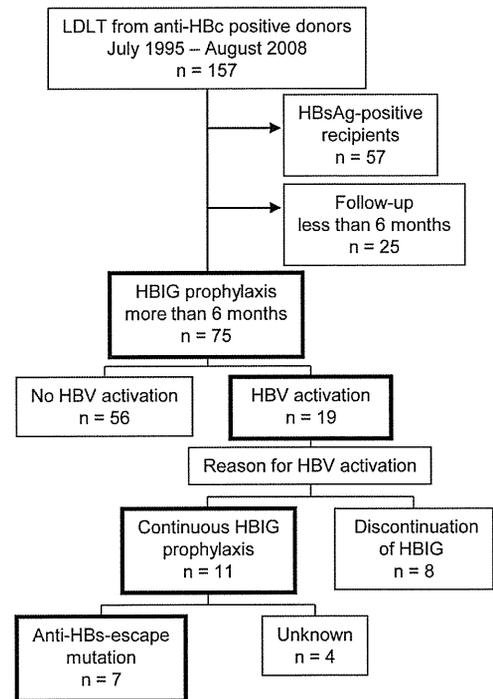


図 HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後の HBV 活性化

2-b. HBs 抗原陽性レシピエントに対する高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤 (HBIG) とエンテカビルの併用療法の効果：

HBs 抗原陽性レシピエントに対する生体肝移植後に、HBIG+エンテカビルを使用した HBV 活性化予防法を 26 例に行った。1 年生存率ならびに 3 年生存率はいずれも 73%であった。中央値 25.1 ヶ月の観察期間内に HBV 再発は認めなかった。これらの予防薬による有害事象は認めなかった。HBIG+ラミブジンによる予

防策を行った 63 例と比較して、生存率と HBV 再発率のいずれも有意な違いを認めなかった。

3. 肝移植後 C 型肝炎ならびに B 型肝炎についての基礎研究

3-a. 次世代ゲノムアナライザーによる HBV 解析：

HBV の次世代ゲノムアナライザー解析の結果、血中と肝組織に存在する HBV はいずれも多様性に富んでおり、大部分の多様性は 1 塩基変異であった。変異は HBV 遺伝子のすべての領域に認められた。抗

HBV 作用を持つ核酸アナログ製剤であるラミブジン、アデフォビル、エンテカビルに対する薬剤耐性変異やプレコア変異、コアプロモーター変異、HBs エスケープ変異を持つウイルスが各症例で種々の割合で存在していることが明らかとなった（下表）。これらの薬剤耐性変異株は、治療中の症例だけでなく、未治療症例においても存在しており、核酸アナログ投与によってこれらの耐性変異を持つ HBV が選択的に増殖することが薬剤耐性獲得のメカニズムであると推測された。

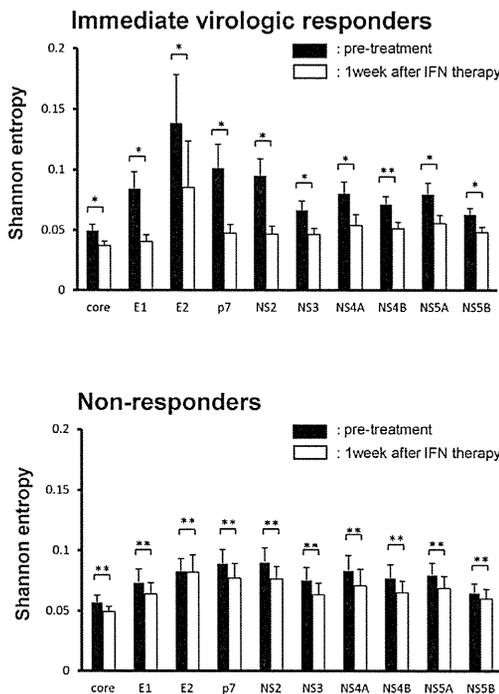
Drugs	M204V/I		L180M		T1845/A/I L/G/C/M		S202C/G/I		I169T	
	LAM/ETV	LAM/ETV	LAM/ETV	ETV	ETV	ETV	ETV	ETV	ETV	ETV
Chronic-naïve										
Liver #1	27/5421	(0.5%)	2/3694	(-)	9/3886	(-)	5/5613	(-)	5/3784	(-)
Liver #2	35/5344	(0.7%)	0/538	(-)	1/563	(-)	17/6340	(-)	0/512	(-)
Liver #3	13/1363	(1.0%)	0/304	(-)	1/358	(-)	1/1379	(-)	0/264	(-)
Liver #4	11/5113	(-)	0/556	(-)	2/547	(0.4%)	11/5133	(-)	0/639	(-)
Liver #5	2/117	(1.1%)	0/409	(-)	1/380	(-)	1/189	(-)	1/474	(-)
Liver #6	12/8451	(-)	0/309	(-)	0/328	(-)	22/8457	(-)	0/334	(-)
Liver #7	10/3098	(0.3%)	1/1547	(-)	3/1477	(-)	8/3161	(-)	0/1621	(-)
Liver #8	13/2442	(0.5%)	1/2378	(-)	6/2312	(-)	1/2564	(-)	1/2507	(-)
Liver #9	67/13879	(0.5%)	2/5443	(-)	2/5107	(-)	6/13804	(-)	0/5650	(-)
Liver #10	16/7400	(-)	0/3524	(-)	3/3283	(-)	5/7113	(-)	0/3492	(-)
Liver #11	0/412	(-)	1/1328	(-)	1/295	(0.3%)	0/425	(-)	3/4729	(-)
Liver #12	4/1098	(0.4%)	1/1389	(-)	0/1272	(-)	2/1102	(-)	0/1544	(-)
Liver #13	8/2476	(0.3%)	1/2192	(-)	3/2085	(-)	4/2529	(-)	4/5029	(-)
Liver #14	5/3713	(-)	0/2009	(-)	4/1925	(-)	2/3820	(-)	5/3784	(-)
Chronic-NA										
Liver #15	0/339	(-)	0/49	(-)	0/49	(-)	0/338	(-)	0/40	(-)
Liver #16	28/7278	(0.4%)	0/4403	(-)	6/4053	(-)	14/7556	(-)	6/6084	(-)
Liver #17	177/945	(18.7%)	0/1059	(-)	0/1009	(-)	0/945	(-)	0/1051	(-)
Liver #18	13/2655	(0.5%)	0/1239	(-)	0/1185	(-)	10/2708	(0.4%)	0/1332	(-)
Liver #19	80/6795	(1.2%)	0/3168	(-)	2/2971	(-)	3/6734	(-)	0/3384	(-)
Drugs	M250V/I		A181T/V		N236T		P237H			
	ETV	ETV	ADV	ADV	ADV	ADV	ADV	ADV	ADV	ADV
Chronic-naïve										
Liver #1	23/2719	(0.9%)	10/3755	(-)	4/4210	(-)	2/4139	(-)		
Liver #2	9/2079	(0.4%)	2/549	(0.4%)	1/1144	(-)	1/1188	(-)		
Liver #3	10/1699	(0.6%)	1/298	(0.3%)	3/1636	(-)	1/1666	(-)		
Liver #4	3/388	(0.8%)	3/549	(0.5%)	0/560	(-)	0/533	(-)		
Liver #5	2/91	(2.2%)	1/409	(-)	0/55	(-)	0/60	(-)		
Liver #6	0/214	(-)	6/305	(2.0%)	1/294	(0.3%)	0/257	(-)		
Liver #7	7/1289	(0.5%)	4/1531	(-)	24/2738	(0.9%)	1/2692	(-)		
Liver #8	2/1117	(-)	689/2336	(29.5%)	2/1713	(-)	0/1639	(-)		
Liver #9	27/7325	(0.4%)	38/5334	(0.7%)	1/6607	(-)	4/6702	(-)		
Liver #10	12/3815	(0.3%)	0/3454	(-)	13/3245	(0.4%)	2/3272	(-)		
Liver #11	1/199	(0.5%)	1/972	(-)	0/251	(-)	0/251	(-)		
Liver #12	2/672	(0.3%)	408/1362	(30.0%)	0/598	(-)	0/597	(-)		
Liver #13	1/947	(-)	2/2160	(-)	0/1406	(-)	1/1374	(-)		
Liver #14	23/2719	(0.9%)	10/3755	(-)	4/4210	(-)	2/4139	(-)		
Chronic-NA										
Liver #15	1/303	(0.3%)	2/49	(4.1%)	0/377	(-)	0/384	(-)		
Liver #16	1/922	(-)	0/4403	(-)	1/1597	(-)	3/1572	(-)		
Liver #17	0/755	(-)	1/1050	(-)	0/698	(-)	145/698	(20.8%)		
Liver #18	1/1464	(-)	2/1206	(-)	0/3156	(-)	0/3107	(-)		
Liver #19	8/3834	(-)	16/3128	(0.5%)	0/3372	(-)	0/3428	(-)		

3-b. 次世代ゲノムアナライザーによる HCV 解析：

C 型慢性肝炎症例においても HBV の場合と同様に、血中ならびに肝組織に存在する HCV クローン

の次世代ゲノムアナライザー解析を行った。その結果、血中と肝組織に存在する HCV は多様性に富んでおり、いわゆる quasispecies の全容が明らかになった。Shannon

entropy 値で計算される genetic complexity について、治療前においてはインターフェロン感受性例と非感受性例では相違は認めなかった。しかしながら、治療開始 1 週間後には、インターフェロン感受性例では著明な genetic complexity の低下を認めることが明らかになった(下図)。さらに、HCV に対するプロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤などの direct-acting antivirals に対する薬剤耐性変異の存在について解析した結果、これらの薬剤を投与していない症例全例で種々の割合で薬剤耐性変異をもつ HCV が存在していることが明らかになった。



3-c. HCV 陽性肝組織におけるプロテオーム解析:

以下の研究手法を確立させた。

① サンプルの破碎・タンパク質抽出・サンプルの品質検査

京都大学病院にて手術を受けた C 型肝炎非発症サンプル、C 型肝炎発症サンプル、正常肝サンプルを、粉末状に破碎後、Phase Transfer Surfactant 法を用いて抽出されたタンパク質に対してトリプシンで消化を行った。また抽出されたタンパク質は SYPRO Ruby 染色を行い、サンプルの品質検査を同時に行った。

② タンパク質の消化・安定同位体タグによるサンプルの標識

アミン特異的安定同位体標識タグである iTRAQ 試薬を用いて、タンパク質を消化した各サンプル中のペプチドを標識した。

③ 陽イオン交換カラムによる分画

標識ペプチドは、陽イオン交換カラム(ZORBAX 300SCX, Agilent)で 20 分画した後に C18 StageTip を用いて脱塩濃縮し、液体クロマトグラフ質量分析に供した。

④ 液体クロマトグラフ質量分析・データ解析

LC (AMR, Paradigm)-MS/MS (AB Sciex, Qstar Elite) を用いて、各分画中の標識ペプチドを分析した。データ解析は解析ソフト Mascot Daemon (version 2.3)と Proteome Discoverer (version 1.3)を用いて、ペプチド・蛋白質の偽陽性同定率が 1%以下となるように解析した。以上の解析の結果、C型肝炎非発症サンプル、C型肝炎発症肝

癌発症サンプル、正常肝サンプル各 2 検体をプロテオーム解析した結果、合計して 1688 タンパク質を同定した。そのうち、C型肝硬変・肝癌非発症サンプルとC型肝硬変・肝癌発症サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 19 個、C型肝硬変・肝癌非発症サンプルと正常肝サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 174 個、C型肝硬変・肝癌発症サンプルと正常肝サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 337 個同定した。

3-d. HCV 複製を抑制する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発:

以下の研究計画の内、(1)から(5)までを確立させた。

- (1) 酵母 Gal4 遺伝子とヘルペスウイルスの VP16 を融合させた発現プラスミドの構築。
これらの遺伝子をコードするプラスミドから PCR により融合プラスミドを構築し、hygromycin 耐性遺伝子を入れる。
- (2) Gal4-VP16 融合遺伝子と HCV p7 タンパク質のコーディング領域の配列を HCV プロテアーゼ切断配列をコードする塩基配列で繋ぐ。
100 塩基以下からなる HCV p7 タンパク質をコードする領域の上流に HCV NS5A と NS5B の切断部位の配列 (約 20 アミノ酸残基相当分の塩基配列) を繋ぎ、それを Gal4-VP16 の下流に繋いだ融合タンパク質発現プラスミドを構築す

る。puromycin を薬剤耐性因子として導入する。

- (3) Gal4 結合 DNA 配列をプロモーターに導入した TK 発現プラスミドの構築。
HSV TK 遺伝子を持つプラスミドから TK 遺伝子のコーディング領域を PCR でクローニングし、それを Gal4 結合ドメインを 4 回繰り返すプロモーター配列を持つプラスミドに導入する。
- (4) レプリコン細胞への上記プラスミドの導入。
通常のトランスフェクション法で行う。
- (5) HCV 複製を許容しないヒト肝臓細胞からの cDNA 発現ベクターの構築。
HepG2 細胞およびヒト肝臓不死化細胞から cDNA を抽出し、常法により cDNA に変換。それをレンチベクター発現系に組み込む。
- (6) 発現 cDNA ライブラリーのレプリコンへ細胞への導入と、GCV による細胞の選択 (次年度に予定)

D. 考察

1. 肝移植後 C 型肝炎についての臨床研究

肝移植後 C 型肝炎再発に対する治療成績はまだ満足できるものではなく、肝移植成績改善のために、より有効で有害事象の少ない治療法の確立が急務である。治療効果ならびに有害事象発現率は、各施設間で大きな相違は認めなかった。効果予測因子として、HCV 遺伝子型、肝移植前 HCV-RNA

量、ドナー・レシピエント IL28B 遺伝子多型が明らかとなった。また、低用量pegインターフェロン維持療法やステロイドフリー免疫抑制法の効果が期待できる。

2. 肝移植後 B 型肝炎についての臨床研究

HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植レシピエントに対して HBIG の投与が行われてきたが、HBs 抗体エスケープ変異株の活性化により B 型肝炎が発症することが明らかとなり、新たな対策が必要である。一方、HBs 抗原陽性レシピエントに対する肝移植後には HBIG+核酸アナログ製剤（エンテカビルまたはラミブジン）にて B 型肝炎再発予防が可能である。

3. 肝移植後 C 型肝炎ならびに B 型肝炎についての基礎研究

次世代ゲノムアナライザーによる肝炎ウイルス解析、肝組織におけるプロテオーム解析、ならびに HCV 複製を抑制する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発の基礎研究の準備が整った。今後、肝移植後の肝炎ウイルス再発や進行、治療効果に関与するウイルス因子ならびに宿主因子の解析から、より有効で有害事象の少ない治療法の確立へとつなげていくことが期待される。

E. 結論

肝移植後 C 型肝炎ならびに肝移植後 B 型肝炎対策の現状を明らかにした。現時点での肝移植後肝炎ウイルス対策の効果は十分とは言えず、今後さらに有効で有害事象の少ない対策法の検討が必要である。治療効果予測因子の臨床的解析からいくつかの有意な因子の同定に成功している。一方で、次世代ゲノムアナライザーによる肝炎ウイルス解析、肝組織におけるプロテオーム解析、ならびに移植後ウイルス血漿を呈する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発の基礎研究の準備が整っており、これらの解析結果と臨床研究の結果とを総合することにより、より有効で有害事象の少ない治療法の確立へとつなげていくことが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohe H, Li Y, Nafady-Hego H, Kayo W, Sakaguchi S, Wood K, Calne R, Uemoto S, Koshiha T. Minimal but essential doses of immunosuppression: a more realistic approach to improve long-term outcomes for pediatric living-donor liver transplantation. *Transplantation* 91(7): 808-810, 2011.

2. Chihara Y, Egawa H, Tsuboi T, Oga T, Handa T, Yamamoto K, Mishima M, Tanaka K, Uemoto S, Chin K. Immediate noninvasive ventilation may improve mortality in patients with hepatopulmonary syndrome after liver transplantation. *Liver Transpl* 17(2): 144-148, 2011.
3. Vikram R, Uemoto S. Management of ABO-incompatible living-donor liver transplantation: past and present trends. *Surg Today* 41(3): 317-322, 2011.
4. Yagi S, Doorschodt BM, Afify M, Klinge U, Kobayashi E, Uemoto S, Tolba RH. Improved preservation and microcirculation with POLYSOL after partial liver transplantation in rats. *J Surg Res* 167(2): e375-383, 2011.
5. Noma S, Hayashi A, Uehara M, Uemoto S, Murai T. Comparison between psychosocial long-term outcomes of recipients and donors after adult-to-adult living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 25(5): 714-720, 2011.
6. Hori T, Egawa H, Takada Y, Ueda M, Oike F, Ogura Y, Sakamoto S, Kasahara M, Ogawa K, Miyagawa-Hayashino A, Yonekawa Y, Yorifuji T, Watanabe K, Doi H, Nguyen JH, Chen F, Baine AM, Gardner LB, Uemoto S. Progressive familial intrahepatic cholestasis: a single-center experience of living-donor liver transplantation during two decades in Japan. *Clin Transplant* 25(5): 776-785, 2011.
7. Hori T, Kaido T, Oike F, Ogura Y, Ogawa K, Yonekawa Y, Hata K, Kawaguchi Y, Ueda M, Mori A, Segawa H, Yurugi K, Takada Y, Egawa H, Yoshizawa A, Kato T, Saito K, Wang L, Torii M, Chen F, Baine AM, Gardner LB, Uemoto S. Thrombotic microangiopathy-like disorder after living-donor liver transplantation: a single-center experience in Japan. *World J Gastroenterol* 17(14): 1848-1857, 2011.
8. Nafady-Hego H, Elgendy H, Moghazy WE, Fukuda K, Uemoto S. Pattern of bacterial and fungal infections in the first 3 months after pediatric living donor liver transplantation: an 11-year single-center experience. *Liver Transpl* 17(8): 976-984, 2011.
9. Ogawa E, Hori T, Doi H, Segawa H, Uemoto S. Living-donor liver transplantation for moderate to severe porto-pulmonary hypertension accompanied by pulmonary arterial hypertension: a single-center experience over 2 decades in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* Nov 16, 2011 Epub.
10. Baine AM, Hori T, Chen F, Gardner LB, Uemoto S, Nguyen JH. Fulminant liver failure models with subsequent encephalopathy in the mouse. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 10(6):

- 611-619, 2011.
11. Muraki Y, Usui M, Isaji S, Mizuno S, Nakatani K, Yamada T, Iwamoto T, Uemoto S, Nobori T, Okuda M. Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients. *Ann Transplant* 16(4):55-62, 2011.
 12. Raut V, Mori A, Kaido T, Ogura Y, Iida T, Nagai K, Sasaki N, Endo K, Hata K, Yagi S, Egawa H, Uemoto S. Splenectomy does not offer immunological benefits in ABO-incompatible liver transplantation with a preoperative rituximab. *Transplantation* 93(1): 99-105, 2012.
 13. Ohe H, Waki K, Yoshitomi M, Morimoto T, Nafady-Hego H, Satoda N, Li Y, Zhao X, Sakaguchi S, Uemoto S, Bishop GA, Koshiha T. Factors affecting operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation: impact of early post-transplant events and HLA match. *Transpl Int* 25(1): 97-106, 2012.
 14. Tanizawa K, Okamoto S, Uemoto S, Chin K. Beneficial effects of continuous positive airway pressure therapy in a pediatric intestinal transplant recipient with obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 13(3): 321, 2012.
 15. Mori A, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Hata K, Yagi S, Yoshizawa A, Isoda H, Shibata T, Uemoto S. Standard of hepatic vein reconstruction with patch plasty using native portal vein in adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 18(5):602-607, 2012.
 16. Yano I, Masuda S, Egawa H, Sugimoto M, Fukudo M, Toshida Y, Hashi S, Yoshizawa A, Ogura Y, Ogawa K, Mori A, Kaido T, Uemoto S, Inui K. Significance of trough monitoring for tacrolimus blood concentration and calcineurin activity in adult patients undergoing primary living-donor liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 68(3): 259-266, 2012.
 17. Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Yoshizawa A, Iida T, Yagi S, Uemoto S. Living donor liver transplantation for recurrence hepatocellular carcinoma after liver resection. *Surgery* 151(1): 55-60, 2012.
 18. Hori T, Uemoto S, Gardner LB, Sibulesky L, Ogura Y, Nguyen JH. Left-side grafts for living-donor liver transplantation and split grafts for deceased-donor liver transplantation: their impact on long-term survival. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36(1): 47-52, 2012.
 19. Srinivasan PK, Yagi S, Doorschodt B, Nagai K, Afify M, Uemoto S, Tolba R. Impact of venous systemic oxygen persufflation supplemented with nitric oxide gas on cold-stored, warm

- ischemia-damaged experimental liver grafts. *Liver Transpl* 18(2): 219-225, 2012.
20. Ogawa E, Hori T, Doi H, Segawa H, Uemoto S. Living-donor liver transplantation for moderate to severe porto-pulmonary hypertension accompanied by pulmonary arterial hypertension: a single-center experience over 2 decades in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* Nov 16, 2011 Epub.
21. Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Hata K, Yoshizawa A, Yagi S, Uemoto S. Effects of post-transplant enteral nutrition with an immunomodulating diet containing hydrolyzed whey peptide after liver transplantation. *World J Surg* Feb 29, 2012 Epub.
22. Ueda Y, Marusawa H, Egawa H, Okamoto S, Ogura Y, Oike F, Nishijima N, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. De novo activation of HBV with escape mutations from hepatitis B surface antibody after living donor liver transplantation. *Antivir Ther*. 2011; 16(4): 479-487.
23. Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One*. 2011;6(9):e24907.
24. Egawa H, Ueda Y, Ichida T, Teramukai S, Nakanuma Y, Onishi S, Tsubouchi H. Risk Factors for Recurrence of Primary Sclerosing Cholangitis after Living Donor Liver Transplantation in Japanese Registry. *Am J Transplant*. 2011; 11(3): 518-527.
25. Miyagawa-Hayashino A, Egawa H, Yoshizawa A, Ueda Y, Ichida T, Ueno Y, Uemoto S, Harada K, Nakanuma Y. Frequent overlap of active hepatitis in recurrent primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation relates to its rapidly progressive course. *Hum Pathol* 2011; 42(9): 1329-1336.
26. Kim SK, Marusawa H, Eso Y, Nishikawa H, Ueda Y, Kita R, Kimura T, Chiba T, Osaki Y, Kudo M. Clinical characteristics of non-B non-C hepatocellular carcinoma: a single-center retrospective study. *Digestion*. 2011;84 Suppl 1:43-49.
27. Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama H, Kim ID, Chiba T, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Translational Med* 9:55:2011.
28. Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S,

- Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T. Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy: A single center study. *J Gastroenterol*. 2012; 47(4): 444-451.
29. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat*. 2012; 19(1):32-38.
30. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of Hepatitis B Virus Quasispecies in Association with Nucleos(t)ide Analogue Treatment Determined by Ultra-Deep Sequencing. *PLoS One*. 2012;7(4):e35052.
31. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. *Hepatol Res*. in press.
32. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. *Microbiol Immunol*. 56(1): 1-9, 2012.
33. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: A necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res*. 163(1): 390-395, 2012
34. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funmi K, Shimotohno K. Lipoprotein components associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology*. 1(1): 19-26, 2011
35. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 6(6): e21284, 2011
36. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 6(5): e19799, 2011

37. Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F. Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. *PLoS One*. 6(4): e18285. 2011
38. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families. *PLoS One*.6(1): e16081, 2011
39. Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Okumura N, Takao T, Doki Y, Mori M, Nagano H. Significance of Alanine Aminopeptidase N (APN) in Bile in the Diagnosis of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation. *J Surg Res*. 2012; 175(1): 138-148.
40. Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. Donor hepatectomy for living donor liver transplantation: learning steps and surgical outcome. *Dig Dis Sci*. 2011; 56(8):2482-2490.
41. Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in peripheral blood in liver resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18(8): 2200-2209.
42. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Takeda Y, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Successful adult ABO incompatible living donor liver transplantation: Experience with double infusion through the hepatic artery and portal vein. *Hepatogastroenterol*. 2011; 58(106): 503-507.
43. Marubashi S, Dono K, Nagano H, Asaoka T, Hama N, Kobayashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Monden M. Efficacy of Minimal Dosage of Calcineurin Inhibitor for Living Donor Liver Transplant Recipients with Preoperative Renal Dysfunction. *Hepatogastroenterol*. 2011; 58(106): 508-511.
44. Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Once-Daily Prolonged-Release Tacrolimus in De Novo Liver Transplantation: A Single Center Cohort Study. *Hepatogastroenterol*. 2012; 59(116): 1184-1188.
45. 永野浩昭、丸橋 繁、小林省吾、和田浩志、江口英利、種村匡弘、土岐祐一郎、森 正樹. 脳死肝移植の現状と問題点 —これからの脳死移植— *日消病誌*, 2011; 108(5): 735-742