

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 劇症肝炎に対する肝移植の成績：移植手術適応時期についての客観的な評価

研究分担者 國土 典宏 東京大学大学院医学系研究科 臓器病態外科学 教授

**研究要旨：**当研究班が行ってきた劇症肝炎および遅発性肝不全の調査報告のうち、肝移植実施症例212例について肝移植後の成績を検討した。肝移植後の成績は肝移植研究会のデータベースから得た。成人例192例で、209例が生体肝移植を受けた。肝移植後の1年・5年生存率は80%、73%であった。移植後短期（90日以内）および長期（90日超）死亡に寄与する因子を解析したところ、血液型不適合移植とドナー年齢は移植後短期予後の危険因子であり、患者年齢は短期長期予後の危険因子であった。診断後短期間のうちに生体肝移植手術に至っている一方で、脳死肝移植を受けた3例については長期待機中に頻回の血漿交換を余儀なくされていた。今回の結果は今後の脳死肝移植待機中の治療戦略を考えるうえで重要な基礎的データであると思われた。

#### 共同研究者

菅原 寧彦 東京大学医学部 人工臓器移植外科  
田村 純人 東京大学医学部 人工臓器移植外科  
山敷 宣代 東京大学医学部 臓器移植医療部  
坪内 博仁 鹿児島大学 消化器・生活習慣病  
桶谷 真 鹿児島大学 消化器・生活習慣病  
持田 智 埼玉医科大学 消化器内科  
中山 伸朗 埼玉医科大学 消化器内科  
梅下 浩司 大阪大学医学部 消化器外科  
上本 伸二 京都大学医学部 肝胆膵・移植外科

#### A. 研究目的

難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班が行ってきた全国施設を対象とした調査により、劇症肝炎および遅発性肝不全（LOHF: late onset hepatic failure）の患者背景、臨床像、予後および治療法が報告されている。平成22年度には、それらのうち肝移植実施症例を抽出し、それらの症例について肝移植後の成績を日本肝移植研究会のデータベースから統合し、手術成績を検討した。本年度はさらに詳細な患者背景因子、術前の治療、ドナー因子についても検討し、手術成績への関連を明らかにする。

#### B. 研究方法

- 平成22年度は、難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班のデータベース（以下研究班 DB）から得た226例中、212例の移植時背景および予後データを肝移植研究会の「肝移植症例登録」データベース（以下肝移植研究会 DB）で得た。
- 患者背景因子、術前の治療、ドナー因子について記述統計学的に検討した。
  - 患者因子：  
年齢・性・BMI・成因・病型・脳症発現から移植までの日数・血漿交換有無・ステロイド投与有無・脳症発現時の血液検査データ・肝萎縮有無・MELD スコア
  - ドナー因子：  
年齢・性・BMI・血液型・グラフトタイプ
- 上記因子について、肝移植術後短期（ $\leq 90$ 日）お

および長期（ $> 90$ 日）生存に寄与する因子について検討した。解析にはCox 回帰分析を用い、単変量解析にて  $p < 0.1$  であった因子については多変量解析にも検討を行った。

- 本研究にあたっては、匿名化された既存のデータによる観察研究であり、本研究に際して新たな介入は要しないことから、倫理面の問題がないと判断した。

#### C. 研究結果

##### (1) 患者背景

212例のうち急性型は71例（34%）、亜急性型は126例（59%）、LOHF は15例（7%）であった。性別は男性82（38%）例、女性130（62%）例、年齢は中央値40歳（2歳～70歳）で、20例が18歳未満の症例であった。成因は、急性型ではB型肝炎ウイルスによるものが最多（44/71, 62%）であったが、亜急性型では自己免疫性肝炎（17/126, 13%）および薬物性（16/126, 13%）が多数を占めた。また104例（49%）では成因が不明であった。脳症診断時のデータは、Total bilirubin 9.0（16.7-23.8）mg/dL（中央値、4分位範囲）、PT 活性21（14-29）%、クレアチニン0.6（0.4-0.8）mg/dl であった。INR 値の入手できた59例ではINR 3.2（2.2-4.1）であり、MELD score を計算すると25（20-30）であった。209例（97%）が生体肝移植を受け、3例が脳死肝移植を受けた。脳症発現から手術までの期間は生体肝移植で4（3-9）日（中央値、4分位範囲）であり、脳死肝移植では16日、22日、71日と有意に待機日数は長かった。

##### (2) ドナー背景

ドナーの年齢は38（19-60）歳で、グラフトタイプは全肝3例、左肝99例、外側区1例、右肝105例、後区域グラフト3例であった。197例がABO 適合または一致のグラフトの移植を受け、13例がABO 不適合移植を受けた。生体ドナーの続き柄は親51例（24.1%）、同胞54例（25.5%）、子52例（29.3%）、配偶者38例（17.9%）、その他17例（8.0%）であった。

##### (3) 移植前の治療

205例（96%）で血漿交換が行われた。試行回数は

中央値（範囲）2（1-13）回であった。血液ろ過透析は156例（73%）で施行され、試行回数は2（1-25）回であった。B型肝炎関連の59例中43例（73%）でLamivudineが投与されていた。Entecavirの投与は4例であった。その他の移植術前治療としては、ステロイド投与134例（63%）、GI療法61例（28%）、PGE1投与44例（20%）、抗凝固療法106例（50%）、Cyclosporine A投与12例（5.6%）であった。

#### (4) 累積生存率

1年、5年、10年累積生存率は、18歳以上の症例で78%、72%、71%、18歳未満の症例で94%、89%、89%であった。病型別、成因別、ドナー年齢別の検討ではグループ間に有意差はなかった。患者年齢別に検討すると、年齢が高い群で予後が悪く、血液型不適合例は適合・一致の群より予後不良であった。

#### (5) 短期・長期予後と背景因子

短期予後について単変量解析、多変量解析を行ったところ、ドナー年齢1.040（1.014-1.066）（ハザード比、95%CI）、 $p=0.002$ および血液型不適合4.169（1.567-11.090）、 $p=0.004$ は短期予後の独立危険因子であった。一方長期予後について単変量解析で有意な危険因子を認めなかった。累積の死亡については、患者の年齢1.038（1.019-1.058）、 $p<0.001$ が独立寄与因子であった。

### D. 考 察

昨年度に引き続き、劇症肝炎の全国調査データベースを用いた肝移植症例の解析を行った。本年度は患者およびドナー背景因子の他、診断時の血液検査所見や治療内容、治療回数等についてのデータも使用し、累積生存率と短期・長期生存率にわけてリスク因子を解析した。患者の年齢、血液型不適合の他、短期予後にはドナーの年齢も危険因子であった。成因や、病型、術前治療、診断時の血液検査所見や待機期間は予後への有意な関連を認めなかった。

肝移植研究会による予後調査データと、本研究班のデータを統合することにより、日本における劇症肝炎に対する肝移植の成績に関する、よりも多くの因子を検討することが可能であった。

症例のほとんどが生体肝移植を受けているため、脳死肝移植と生体肝移植の比較はできなかった。しかし、今回の検討では脳死肝移植を受けた3例については、診断から移植までの待機日数が生体肝移植例に比較して長かった。生体肝移植では、診断初期にガイドラインに沿って移植適応を早期に判断することが可能であったと考えられる。一方、脳死肝移植については、実際にはどのような症例が脳死肝移植手術を待機すべき病状であり、そのうちの何例がどのような状況下で移植を受けたのかは不明である。今後、非移植症例の検討も加え、移植可能であったのにタイミングが遅れたため適応外となってしまった症例との対比が必要であろう。

### E. 結 論

日本における劇症肝炎に対する肝移植の予後は良好

であり、原疾患や病型に左右されない。脳死肝移植が推進される現在、どのようなタイミングであれば移植実施が可能かどうか、長期待機によりどのようなリスクが生じるかについて、今後の検討を予定している。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Yamashiki N, Kokudo N. Long-term outcome of living donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Transpl Int* 2012;25:7-12.
- 2) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Yoshida H, Aoki T, Hasegawa K, Akahane, M, Ohtomo K, Fukayama M, Koike K, Kokudo N. Diagnostic accuracy of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in screening for hepatocellular carcinoma in liver transplant candidates. *Hepato Res* 2011;41:1199-1207.
- 3) Togashi J, Sugawara Y, Tamura S, Yamashiki N, Kaneko J, Aoki T, Hasegawa K, Beck, Y, Makuuchi, M, Kokudo N. Donor quality of life after living donor liver transplantation: a prospective study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011;18:263-267.
- 4) Tamura S, Sugawara Y, Kokudo N. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: the Japanese experience. *Oncology*. 2011;81 Suppl 1: 111-115.
- 5) Sugawara Y, Tamura S, Kokudo N. Liver transplantation in HCV/HIV positive patients. *World J Gastrointest Surg*. 2011;3: 21-28.
- 6) Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Iida T, Mihara M, Makuuchi M, Koshima I, Kokudo N. Single artery reconstruction in left liver transplantation. *Surgery* 2011;149:841-845.
- 7) Sugawara Y, Miyata Y, Kaneko J, Tamura S, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Yamashiki N, Kokudo N. Once-daily tacrolimus in living donor liver transplant recipients. *Biosci Trends* 2011;5:156-158.

#### 2. 学会発表

- 1) 山敷宣代, 菅原寧彦, 田村純人, 金子順一, 青木琢, 長谷川潔, 野尻佳代, 小池和彦, 國土典宏, 理想的な肝移植チームの在りかた 脳死肝移植を支える移植チームおよびかかりつけ医療機関との協調, 第29回日本肝移植研究会, 仙台, 2011年7月
- 2) 田村純人, 山敷宣代, 野尻佳代, 金子順一, 菅原寧彦, 國土典宏, 原疾患の背景の差異により生じているわが国の肝移植の特殊性 (PSC, PBC)

PSC, PBC に対する生体肝移植移植, 第29回日本肝移植研究会, 仙台, 2011年

- 3) 堤俊之, 石井俊哉, 田村知大, 中津智子, 足立香代, 根岸龍二郎, 小林稔, 村尾命, 野尻佳代, 山敷宣代, 國土典宏, 佐藤明, 脳死肝移植にて救命し得た自己免疫性肝炎による亜急性型劇症肝炎の1例, 第15回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011年
- 4) 山敷宣代, 菅原寧彦, 田村純人, 金子順一, 青木琢, 長谷川潔, 野尻佳代, 國土典宏 移植医療における内科医と外科医との連携 脳死肝移植時代に向けての移植チーム医療の課題, 第47回日本移植学会総会, 仙台, 2011年
- 5) 田村純人, 山敷宣代, 野尻佳代, 金子順一, 菅原寧彦, 國土典宏 移植医療の新展開 改正臓器移植法施行後1年を経過して 改正脳死法案施行後1年を経過して, 第47回日本移植学会総会, 仙台, 2011年
- 6) 山敷宣代, 菅原寧彦, 田村純人, 金子順一, 青木琢, 長谷川潔, 別宮好文, 野尻佳代, 小池和彦, 國土典宏 肝移植 現状と今後の課題 脳死肝移植における適応評価の現状と改善策, 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011年
- 7) 山敷宣代, 菅原寧彦, 國土典宏 急性肝不全の治療戦略と移植医療 劇症肝炎に対する肝移植の適応と問題点, 第97回日本消化器病学会総会, 東京, 2011年
- 8) 菅原寧彦, 國土典宏 急性肝不全の肝移植をめぐる諸問題 術後ウイルス対策 (B型肝炎とC型肝炎) 第36回日本急性肝不全研究会, 山形, 2010年

## 2. 学会発表

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 新劇症肝炎肝移植ガイドラインの治療効果判定への応用

研究協力者 森脇 久隆 岐阜大学大学院医学研究科消化器病態学 教授

**研究要旨：**2008年の劇症肝炎肝移植ガイドラインスコアリングにより予後の評価を数値化することが可能となり、そのポイントが重症度ならびに治療経過における効果判定に応用し得ないか検討した。最近の当科の検討では内科生存例では治療開始後の経過においてほぼ4点以下で推移するのに対し、内科死亡例では多くの症例は5点以上で推移し、4点以下に改善する症例はごく少数であった。また2004年～2009年までの全国調査においても、内科生存例は4点以下で推移する症例が多いことが確認された。ポイントによる治療効果判定はある程度有効であると考えられた。

#### A. 研究目的

2008年に当班会議のワーキンググループ1より発表した劇症肝炎肝移植ガイドラインスコアリングシステムは現在臨床応用され、肝移植判断時における有用な指標になっている。このスコアリングの最大の特徴は、脳症発症時の死亡予測割合をポイントおよびパーセントで明示することである。このガイドラインは脳症発症時のみの評価ではあるが、スコアリングのポイントの推移は脳症発症以前および経過中における重症度評価としても有用であると考えられるため、当院の最近の症例および多施設での全国調査により明らかにしていく。

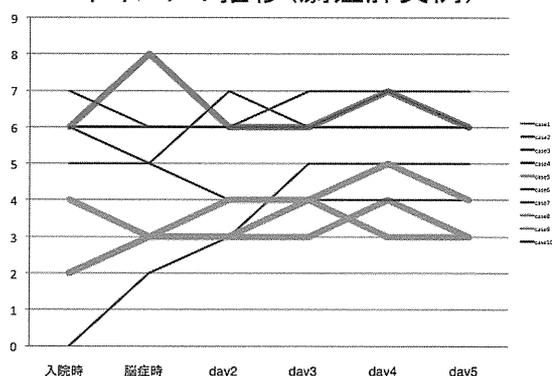
#### B. 研究方法

最近当院で経験した急性肝不全昏睡型（劇症肝炎）症例10例、急性肝不全非昏睡型（急性肝炎重症型）8例を元にレトロスペクティブな解析にてスコアリングの推移を確認した後、鹿児島大学にて集積された当班会議でのアンケートによる全国調査総計488例のうち解析可能症例365例にて、スコアリングの経過を確認し、その有用性を検討する。

#### C. 研究結果

対象は2004年以降当科にて経験した急性肝不全昏睡型（劇症肝炎）症例10例（平均年齢54.3歳，男性：女性3：7，FHA：FHS5：5，病因HBV5例，HAV1例，AIHおよび不明4例，生存4例（うち肝移植1例）：死亡6例），および急性肝不全非昏睡型（急性肝炎重症型）8例（平均年齢40.8歳，男性：女性5：3，病因HBV2例，HAV1例，AIH，薬剤性および不明5例，生存7例：死亡1例）。脳症発症時では、劇症肝炎生存例の平均は2.7（2-4）点であり死亡例の平均は5.4（0-7）点であり正診率は90%となり良好な結果が得られた。また急性肝炎重症型においてPT40%以下の時点で移植基準を適応すると、全体の平均は2.5（0-4）点，移植基準を満たす症例はなかった。急性肝炎重症型における唯一の死亡例は、経過中に大動脈解離を呈した重篤な合併症死であった。

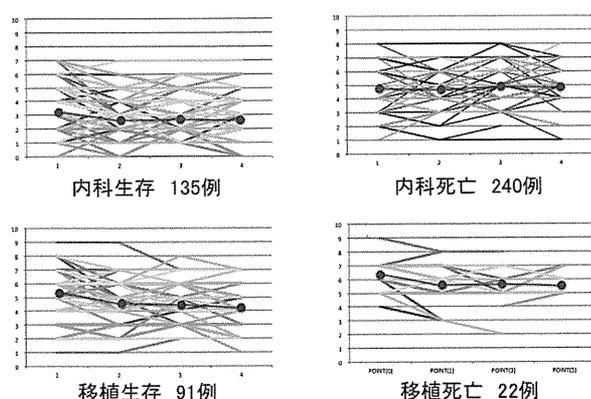
ポイントの推移（劇症肝炎例）



スコアリングを経過として治療開始5日間まで検討すると、劇症肝炎診断時より死亡例は殆どの症例が5点を下回るほど回復することはなく、また生存例も同様に5点を上回ることも無く推移していることが観察された（図1）。

当班会議の班員諸施設ならびに日本肝臓学会所属施設を対象とした劇症肝炎全国集計のうち2004年～2009年までの鹿児島大学にて集積された症例をもとに経過を確認出来た症例を解析した。劇症肝炎診断時でのポイントの平均は内科生存135例では3.3（0-7）点，内科死亡240例では4.9（1-9）点，肝移植生存91例では5.2（1-9）点，肝移植死亡21例では6.3（4-9）点となり，肝移植はポイントが高い妥当な症例に多く施行されていることが分かる。5日後のポイントは，経過が観察できたものに限ると，内科生存74例の平均は2.9（0-7）点，内科死亡130例では5.0（0-8）点，肝移植生存36例では4.3（1-7）点，肝移植死亡11例では5.5（2-7）点となり，内科生存例では当科の検討と同様に5点未満で推移する症例が多く，また肝移植生存例ではある程度内科治療に反応している症例の救命が多いことが確認された。また内科死亡例においてはほぼ5点以上で推移する症例が多く，平均としてはポイントの改善に乏しい症例であり，内科治療に抵抗性であることが確認出来た。

#### スコアリングポイントの推移 (2004-2009 全国調査より)



#### D. 考察

当科における検討では、急性肝炎重症型における検討では、脳症を認めない診断時点において有用な予後予測として活用でき、また劇症肝炎例の経過の検討においても、判定を明らかに逸脱することなく推移することが観察され、併せて考えれば、脳症出現以前からの継続的な使用により早期の移植準備が可能であると考えられた。全国集計においても脳症発症後の検討ではあるが、同様の傾向であり有用と考える。ただし肝萎縮の経過が確認出来ないなどアンケート調査の限界があり、個々の施設での臨床判断が必要と考えられた。

#### E. 結論

スコアリングのポイントを経過観察することにより治療効果のある程度判断することが可能であり、その有用性が確認出来た。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimizu M, Sakai H, Shirakami Y, Iwasa J, Yasuda Y, Kubota M, Takai K, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Acyclic retinoid inhibits diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BLKS/J- +(db)/+Lepr(db) mice. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 128-136.
- 2) Shimizu M, Sakai H, Shirakami Y, Yasuda Y, Kubota M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Hara Y, Tanaka T, Moriwaki H. Preventive effects of (-)-epigallocatechin gallate on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-db/db Mice. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 396-403.
- 3) Shimizu M, Yasuda Y, Sakai H, Kubota M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Kochi T, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Pitavastatin

suppresses diethylnitrosamine-induced liver preneoplasms in male C57BL/KsJ-db/db obese mice. *BMC Cancer* 2011; 11: 281.

- 4) Shimizu M, Adachi S, Masuda M, Kozawa O, Moriwaki H. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 832-843.
  - 5) Shimizu M, Sakai H, Moriwaki H. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma by acyclic retinoid. *Front Biosci* 2011; 16: 759-769.
  - 6) Osawa Y, Kanamori H, Seki E, Hoshi M, Ohtani H, Yasuda Y, Ito H, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. L-tryptophan-mediated enhancement of susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease is dependent on the mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* 2011;286:34800-34808.
  - 7) Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, Ito H, Shiratori Y, Banno Y, Olefsky JM, Nagaki M, Moriwaki H, Brenner DA, Seishima M. Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. *FASEB J* 2011;25:1133-1144.
  - 8) Chayama K, Hayes CN, Yoshioka K, Moriwaki H, Okanoue T, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Toyota J, Izumi N, Hiasa Y, Matsumoto A, Nomura H, Seike M, Ueno Y, Yotsuyanagi H, Kumada H. Factors predictive of sustained virological response following 72 weeks of combination therapy for genotype 1b hepatitis C. *J Gastroenterol* 2011;46:545-555.
  - 9) Tatsukawa H, Sano T, Fukaya Y, Ishibashi N, Watanabe M, Okuno M, Moriwaki H, Kojima S. Dual induction of caspase 3- and transglutaminase-dependent apoptosis by acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 2011;10:4.
2. 学会発表
- 1) 内木隆文他：新劇症肝炎肝移植ガイドラインを用いた治療効果判定への応用 第47回日本肝臓学会総会 ワークショップ8 新潟 2011.6
  - 2) 内木隆文他：スコアリングシステムによる劇症肝炎肝移植ガイドラインを用いた治療効果判定への応用 JDDW2011 ワークショップ9 福岡 2011.10

別紙参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 脳死肝移植待機リストにおける劇症肝炎患者の現状

研究協力者 市田 隆文 順天堂大学医学部附属静岡病院消化器内科 教授

**研究要旨：**2011年8月までに脳死肝移植待機リストに登録された18歳以上のレシピエント候補患者は1295例であり、そのうち劇症肝炎患者は142例、11.0%を占めていた。脳死待機劇症肝炎患者の待機中死亡率は高率で、登録後10日の累積死亡率は約30%、全体の58.5%が死亡により待機リストから除外されていた。改正臓器移植法実施は、劇症肝炎患者の脳死肝移植施行に寄与する有意な要因であり、改正法実施後の実施前に対するOdds比は約5倍であった。この結果、改正法実施後は待機患者の転帰における死亡割合と生体肝移植移行割合が減少した。

#### 共同研究者

玄田 拓哉 順天堂大学医学部附属静岡病院消化器内科 准教授

#### A. 研究目的

内科的治療で救命不能な劇症肝炎患者の予後は極めて不良で、その唯一の救命手段は肝移植である。このため脳死肝移植レシピエント待機リストでは劇症肝炎患者に対し最も高い priority が与えられている。2010年7月の改正臓器移植法実施後の脳死ドナー臓器提供数増加は、待機リスト上位にある劇症肝炎患者の転帰に大きな変化をもたらしたと推測されることから、本検討では脳死肝移植待機リストにおける劇症肝炎患者待機状態の現状を検討した。

#### B. 研究方法

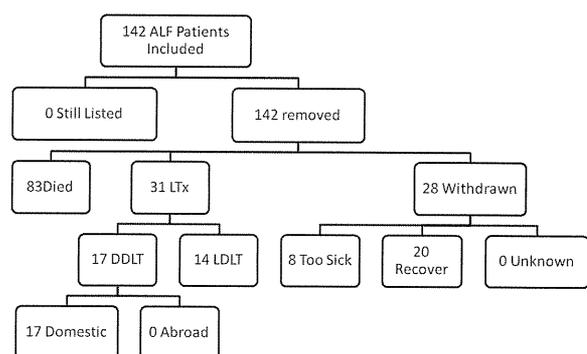
1997年10月から2011年8月末までに日本脳死肝移植適応評価委員会において評価を受け、臓器移植ネットワークに脳死肝移植レシピエント候補として登録された18歳以上の劇症肝炎患者142例を対象とした。日本脳死肝移植適応評価委員会事務局データベースに登録された適応評価時の臨床情報、検査成績と臓器移植ネットワークに登録された転帰を用いて、累積待機死亡率、累積脳死肝移植率および脳死肝移植施行に寄与する要因、最終転帰について解析した。

#### C. 研究結果

2011年8月末までに脳死肝移植待機リストに登録された18歳以上のレシピエント候補患者は1295例であり、そのうち劇症肝炎患者は142例、11.0%を占めていた。2011年9月末時点の転帰は、脳死肝移植施行17例、生体肝移植移行14例、回復20例、待機中死亡83例、病状悪化による申請取り下げ8例であり、その結果待機リスト上で待機継続している患者は残存していなかった（図1）。待機中に死亡した例と病状悪化による申請取り下げ例を合わせて待機死亡とし Kaplan-Meier 法で累積待機死亡率を算出したところ、登録後10日、20日、30日の死亡率はそれぞれ29.5%、45.2%、53.8%であり、待機生存期間の中央値は29日であった（図2）。適応評価時のデータが日本脳死肝移植適応評価委員会事務局に登録されている

2007年以降の71例を用いて脳死肝移植施行に寄与する要因をロジスティック回帰分析で検討したところ、年齢、性別、血液型、肝障害の成因、待機時間、肝機能などの要因とは関連が認められず、登録時期すなわち改正臓器移植法実施前か後かのみが有意な要因であった（Odds ratio 5.41, P=0.01）。累積脳死肝移植施行率を算出したところ、登録後10日目の移植施行率は改正法実施前の3.9%に対し実施後は25.5%と上昇していた（図3）。待機リストから除外された時点の転帰は、改正法実施前は脳死肝移植施行、生体肝移植移行、回復、待機死亡の比率はそれぞれ7.8%、14.7%、17.2%、61.2%であったが、実施後はそれぞれ34.6%、0%、7.7%、57.7%となった（図4）。

図1 登録後の転帰：劇症肝炎患者（≥18歳、n=142）



(2011年9月末時点)

図2 待機生存曲線：劇症肝炎患者（≥18歳、n=142）

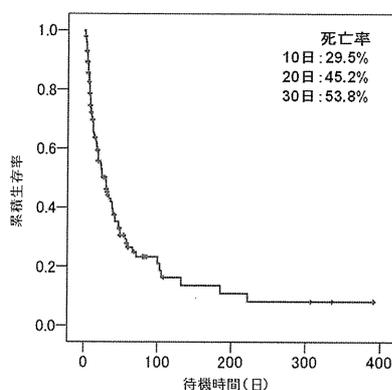


図3 脳死肝移植施行率:登録時期別(≥18歳、n=142)

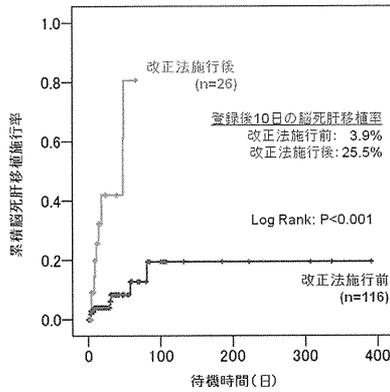
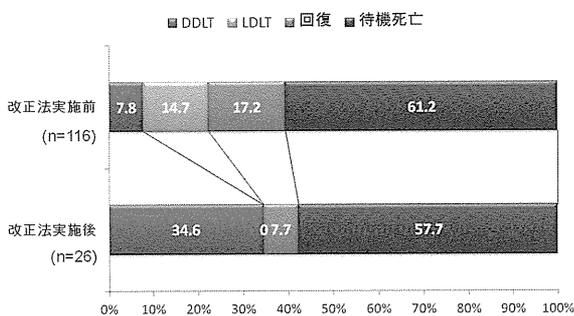


図4 最終転帰(≥18歳、n=142)



#### D. 考 察

改正臓器移植法実施により脳死肝移植待機リストに登録された劇症肝炎患者に対する脳死肝移植施行率は約5倍に上昇し、転帰における死亡と生体移植移行例の割合が減少していた。すなわち、改正臓器移植法実施による脳死ドナーの増加は肝移植レシピエント待機リストにおける劇症肝炎患者の待機中死亡の減少と共に生体ドナーを回避する効果も認められた。ただし、依然として待機中死亡の割合は高く、更なるドナー活動の普及が予後改善には必要と考えられた。

#### E. 結 論

改正臓器移植法実施により肝移植レシピエント待機リストにおける劇症肝炎患者の待機死亡例、生体肝移植移行例が減少傾向にある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

- 1) 市田隆文, 玄田拓哉, 平野克治: 脳死肝移植適応評価に関する今後の展望. 移植2011;46(6):406-411.
- 2) Naiki T, Nakayama N, Mochida S, Oketani M, Takikawa Y, Suzuki K, Tada SI, Ichida T, Moriwaki H, Tsubouchi H; the Intractable Hepato-Biliary Disease Study Group supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

Novel scoring system as a useful model to predict the outcome of patients with acute liver failure: Application to indication criteria for liver transplantation. *Hepato Res.* 2011 Nov 2. doi: 10.1111/j. 1872-034X.2011.00902.x. [Epub ahead of print]

- 3) 有井滋樹, 辺見聡, 古川博之, 市田隆文, 國土典宏. 座談会 我が国の肝移植医療に与える改正臓器移植法のインパクト. *肝臓*2011;51(10):625-643.
- 4) Mochida S, Takikawa Y, Nakayama N, Oketani M, Yamagishi Y, Ichida T, Tsubouchi H. Diagnostic criteria of acute liver failure: A report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. *Hepato Res* 2011; 41(9): 805-812.
- 5) Gouw AS, Balabaud C, Kusano H, Todo S, Ichida T, Kojiro M. Markers for microvascular invasion in hepatocellular carcinoma : Where do we stand? *Liver Transplant* 2011; Oct17 Suppl 2:S72-80.
- 6) 市田隆文: 脳死肝移植適応評価委員会はどう変わったか. *肝胆膵*2011; 63(1): 87-91.
- 7) 持田智, 滝川康裕, 中山伸郎, 桶谷真, 内木隆文, 山岸由幸, 市田隆文, 坪内博仁. 我が国における「急性肝不全」の概念, 診断基準の確立: 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班, ワーキンググループ1, 研究報告. *肝臓*2011;52(6):393-398.
- 8) 市田隆文, 玄田拓哉, 平野克治: 肝移植は肝癌治療の第一選択となりうるか? *内科*2011; 107(6): 1106-1111.
- 9) 市田隆文, 玄田拓哉, 平野克治: 肝移植後のHBV再活性化とその対応. *日本臨床*2011; 69(4): 526-528.
- 10) 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. *Human Path* 2011; 2(9):1329-36.
- 11) Egawa H, Ueda U, Ichida T, Teramukai S, Nakanuma Y, Ohnishi S, Tsubouchio H: Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation in Japanese registry. *Ame J Transplant* 2011; 11(3): 518-527
- 12) 市田隆文: Editorial わが国における脳死肝移植の現状. *肝臓*2011; 52(2): 81-86.

2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 自己免疫性急性肝不全の画像的 heterogeneity を用いた診断の試み

研究協力者 横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 教授

**研究要旨：**急性発症型の自己免疫性肝炎（AIH）は AIH として非典型的であり，診断基準も存在しないため診断困難である。急性肝不全に至ると免疫抑制療法にも抵抗性となることが多く，さらに劇症化した場合には肝移植なしでは救命率は世界的に20%程度であり，劇症肝炎中でも HBV キャリアの急性増悪例と並んで最も予後不良である。AIH の組織学的特徴は heterogeneity であり，それが画像的・臨床的な heterogeneity につながる。自己免疫性急性肝不全例では単純 CT において heterogeneous hypoattenuation を呈することが特徴であり，従来の AIH スコアにこの CT 所見を加点することで，その診断率が改善することが期待される。肝不全例では凝固能低下や腹水のため経皮的肝生検自体が困難なことが多く，組織検査を補う意味でも，また治療反応性を経時的に評価する面においても自己免疫性急性肝不全における肝臓全体の画像所見は有用である。

#### 共同研究者

藤原 慶一 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 講師

#### A. 研究目的

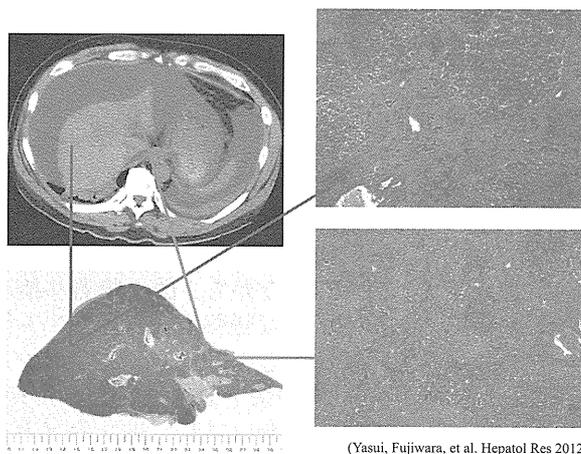
2000年以降の当科における劇症肝炎の成因を検討してみると，それ以前と比較してウイルス性や薬剤性の割合は変化していなかったのに対して自己免疫性肝炎（AIH）は有意に増加し約30%を占め，その分成因不明は減少していた。アメリカ急性肝不全グループからも，成因不明の急性肝不全例の58%が組織学的に AIH と考えられるという報告がみられた。当科における自己免疫性急性肝不全例の推移を図1に示す。重症化した場合の内科的救命率は59%，そのうち劇症化した場合の内科的救命率は17%にすぎなかった。

AIH の組織学的な特徴は heterogeneity であることが臨床医・病理医に経験的に認知されている。組織学的な heterogeneity は画像的な heterogeneity につながり，さらには臨床的な heterogeneity を呈するようになる。

AIH の診断自体，challenging であるが，急性発症型の AIH の診断はなお一層 challenging である。しかしながら，その組織学的な特徴は centrilobular necrosis/collapse であることが，自験例・国内外の報

告から明らかになってきている。

組織学的に massive necrosis の部位は単純 CT 画像では hypoattenuation を呈する。自験例では AIH による急性肝不全においてはウイルス性と比較して heterogeneous hypoattenuation を呈することが多く観察された（図2，3）。



(Yasui, Fujiwara, et al. Hepatol Res 2012)

図2. 自己免疫性劇症肝不全死亡例の画像・組織所見

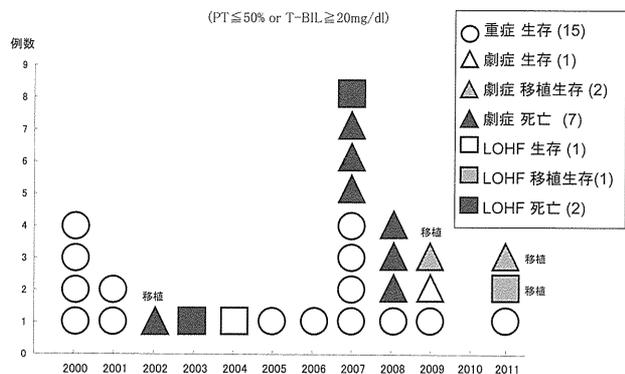
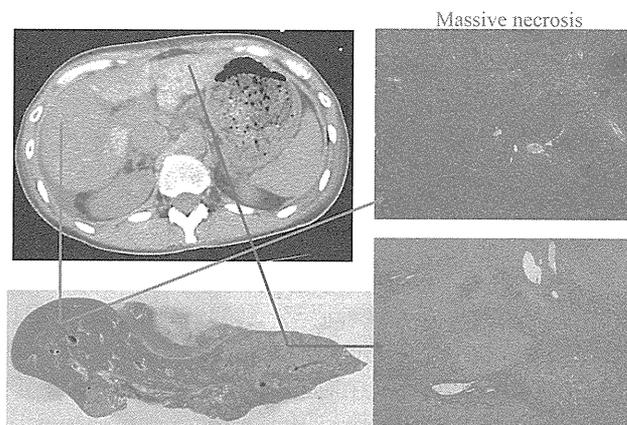


図1. 自己免疫性急性肝不全例の推移(千葉大学腫瘍内科学)



(Yasui, Fujiwara, et al. Dig Liver Dis 2011)

図3. 自己免疫性劇症肝不全移植例の画像・組織所見

そこで、自己免疫性急性肝不全症例ではウイルス性の症例と比較して有意に画像的な heterogeneity を呈するのか、さらに急性発症型 AIH の診断基準の作成を念頭において、画像的な heterogeneity を用いた診断を試みた。

## B. 研究方法

①自己免疫性急性肝不全とウイルス性急性肝不全の画像的な壊死所見の特徴を比較するために、当科で経験した対象症例について、まず臨床・血液生化学・免疫学的検査項目について比較・検討した。

②対象症例について、腹部単純 CT 画像所見について検討した。脾より CT 値の低い領域を低吸収域 (hypoattenuation) とした。脂肪肝は腹部超音波検査あるいは肝組織検査にて鑑別・除外した。Hypoattenuation が存在した場合、その pattern を diffuse および heterogeneous に分類した。

③一部の AIH 症例については、経時的な CT 画像の変化を観察した。

④従来の Revised original AIH score に画像所見を加点することで、AIH の診断を補足できないか (特に組織所見の得られない症例) というのを念頭において、AIH 症例で heterogeneous hypoattenuation を認めた場合に、histology を含まない score と histology を含む score にそれぞれ 2 点・3 点を加点し、診断率の変化を観察した。

## C. 研究結果

①対象は68例で自己免疫性23例、ウイルス性45例であった。急性発症型の AIH は亜急性の経過で進展するため、現実に臨床的に鑑別上問題になるのは急性発症型 AIH (group 1) と亜急性の経過をとる肝炎である。そのため、ウイルス性は発症から入院まで10日以内の early admission type 25例 (group 2) と11日以上の上の late admission type 20例 (group 3) に分類した。Group 2は HAV 11例、HBV 13例、HBV キャリア 1例、group 3は HAV 2例、HBV 6例、HBV キャリア 12例から成っていた。Group 1は group 3と比較して、有意に女性が多く ( $p=0.015$ )、発症から入院までの期間が長かった ( $p=0.006$ )。年齢、ALT、T-BIL、PT には差異を認めなかった (表1)。

② AIH 23例中15例で hypoattenuation を認め、全例が様々な heterogeneous pattern を呈していた (図4、表2)。一方、ウイルス性45例中23例に hypoattenuation を認め、22例が diffuse pattern を呈し、heterogeneous pattern は1例のみであった (図5、表2)。

AIH とウイルスの比較では、AIH では heterogeneous、ウイルスでは diffuse が有意に多かった。また、亜急性の経過をとる group 1と group 3の比較でも同様に有意差を認めた (表2)。

さらに AIH の中で、heterogeneous hypoattenuation の有無により、臨床・血液生化学免疫学的検査成績・転帰について検討してみると発症年齢が陰性群で高い ( $p=0.046$ ) 他には有意差を認めなかった (表3)。

③経時的な CT 画像の変化を観察した AIH 症例においては、治療反応例では壊死域 (hypoattenuation) の縮小と再生域の拡大が認められ、血液検査所見と併せて治療反応性を評価するのに有用であった (図6、7)。

また、非重症例でも経過中に heterogeneous hypoattenuation が明らかになる症例があった (図8)。

④ Histology (-) score に3点を加点することで、ANA・IgG が低値の non-diagnostic の2例が probable となり、probable の4例が definite となって、全例が diagnostic となり、definite も39%を占めるようになった (図9)。

Histology (+) score では全例が既に diagnostic であったが、3点を加点すると、probable の7例が definite となり、definite が78%を占めるに至った (図10)。

	Group 1 (autoimmune ALF)	Group 2 (early-adm viral ALF)	Group 3 (late-adm viral ALF)	P value	
				Group 1 vs Group 2	Group 1 vs Group 3
n	23	25 (HAV 11, HBV 13, HBVex 1)	20 (HAV 2, HBV 6, HBVex 12)		
Age	48.8±15.4	45.3±13.6	47.5±13.1	0.401	0.764
Sex (M/F)	7/16	13/12	14/6	0.154	0.015
Days (onset-adm)	39.8±28.6	5.7±2.3	20.5±9.3	<0.001	0.006
ALT (IU/l)	581±487	6358±375	1292±175	<0.001	0.070
T-Bil (mg/dl)	19.5±11.2	2	9	<0.001	0.139
PT (%)	35.5±13.9	6.6±3.1	14.5±10.4	0.028	0.480

表1. 自己免疫性・ウイルス性急性肝不全の臨床背景の比較

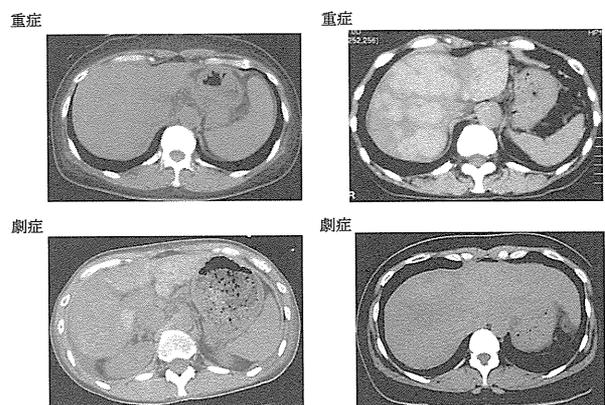


図4. 自己免疫性急性肝不全例のheterogeneous hypoattenuation pattern

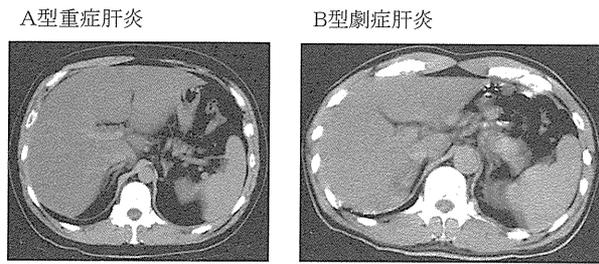


図5. ウイルス性急性肝不全例のdiffuse hypoattenuation pattern

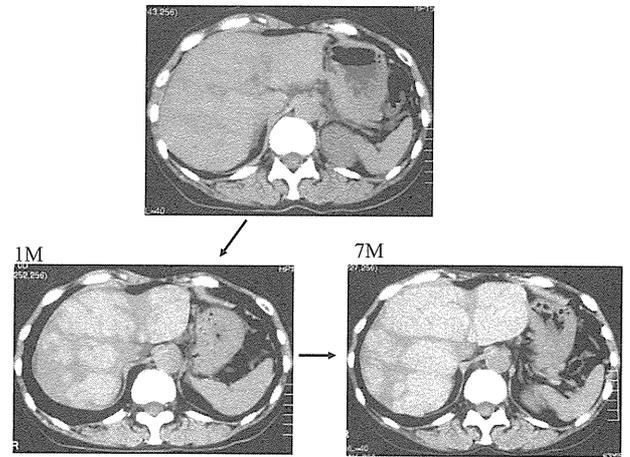


図6. 自己免疫性重症肝炎例の治療後の画像経過

	Group 1 (autoimmune ALF)	Group 2 (early-adm viral ALF)	Group 3 (late-adm viral ALF)	P value	
				Group 1 vs Group 2	Group 1 vs Group 3
n	23	25	20		
CT findings					
Hypoattenuation	15	15	8	0.772	0.131
Diffuse	0	15	7	<0.001	0.002
Heterogeneous	15	0	1	<0.001	<0.001

Viral → diffuse pattern  
AIH → heterogeneous pattern

表2. 腹部単純CT画像・壊死所見の比較

	Hypoattenuation (+)	Hypoattenuation (-)	P value
n	15	8	
Age	44.2±16.6	57.5±7.8	0.046
Sex (M/F)	3/12	4/4	0.182
Days (onset-adm)	38.7±32.2	42.0±22.3	0.797
ALT (IU/l)	517±439	702±579	0.399
T-Bil (mg/dl)	19.2±8.9	20.0±15.3	0.881
PT (%)	34.5±13.4	37.4±15.6	0.652
IgG(mg/dl)	2182±831	2757±819	0.120
ANA $\leq \times 40$	5	1	0.369
$\geq \times 80$	10	7	
AIH score	15.9±2.7	15.5±2.4	0.754
Outcome			
Recovery	8	6	0.400
Death	5	2	1.000
LT	2	0	0.526

(Yasui, Fujiwara, et al. Hepatol Res 2012)

表3. 自己免疫性急性肝不全heterogeneous hypoattenuationの有無による比較

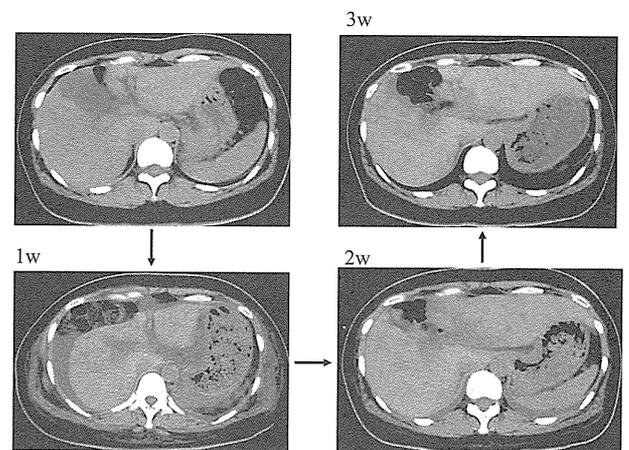


図7. 自己免疫性劇症肝不全回復例の画像経過

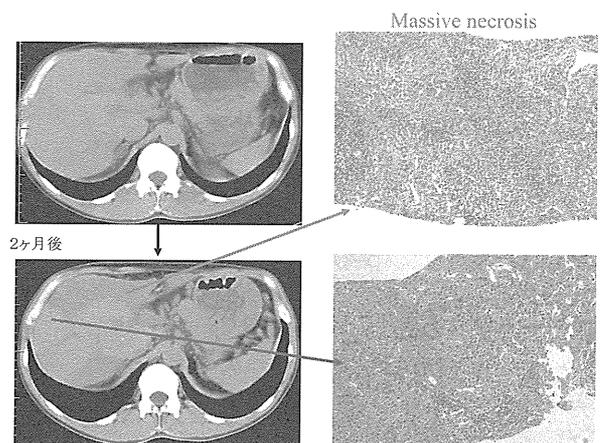


図8. Heterogeneous hypoattenuationを呈した非重症型自己免疫性肝炎例

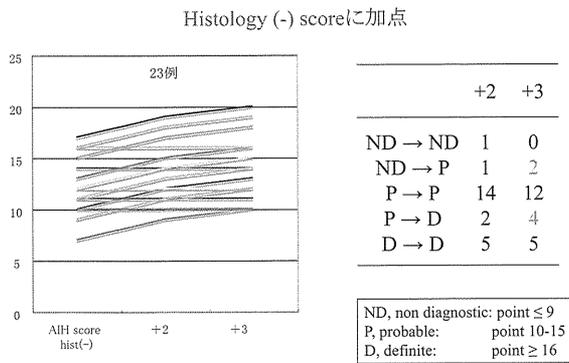


図9. 画像加点によるAIH scoreの変化(histologyなし)

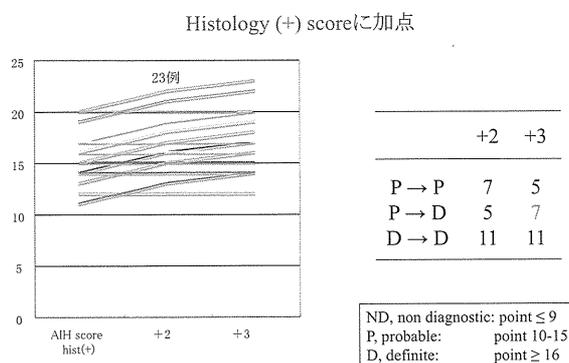


図10. 画像加点によるAIH scoreの変化(histologyあり)

#### D. 考 察

急性発症例型のAIHでは、自己抗体陰性例やIgG正常例も多く、また組織学的にも急性肝炎像を呈することが多い。AIHとして非典型的であり、国際AIHスコアも低値となるため診断は困難で、原因不明とされて結果として適切な治療も困難となる。重症肝炎に至ると免疫抑制療法にも抵抗性となることが多く、さらに劇症化した場合には肝移植なしでは救命率は全国的に20%程度であり、これは世界共通の認識である。劇症肝炎中でもHBVキャリアの急性増悪例と並んで最も予後不良である。また、原因不明の急性肝障害の中にはステロイド反応性のものがあり、AIHの急性発症例が少なからず含まれていると思われる。前述したように、自験例・欧米例のデータからは、原因不明の急性肝不全例の60%程度はAIHによるものが推測される。

しかしながら、急性発症型のAIHには診断のためのgold standardが存在しない。診断基準の作成を念頭において、これまでに我々はcentrilobular necrosis、特にcollapseがその特徴的所見であることを報告してきた。急性肝不全に至るような症例においては、そうしたmassive necrosisの部位が多いため、

単純CT画像でhypoattenuationを呈するようになる。ウイルス性急性肝不全では肝臓全体がmassive necrosisになることが多いためCTではdiffuse hypoattenuationを呈し、AIHでは部位によるheterogeneityが強いいためheterogeneous hypoattenuationを呈すると推測され、今回の検討でこのことが確認された。

急性発症型AIHの鑑別対象になるのは、臨床的には亜急性の経過をとる薬剤性や成因不明例であるので、本来は画像比較の対象としてこれらの疾患を選択するのが理想的ではある。しかし、典型的なchronic AIHや薬剤性を除いて、各々の明確な診断自体が困難であることが多く、非典型例での両者の鑑別は非常に困難であるのが実情である。薬剤性は薬剤の種類や基礎疾患によって様々な病態を呈し、また「真の」成因不明例は雑多な成因の集団から成ると考えられ、こちらも様々な病態を呈するため、今回は素性の明確な亜急性のウイルス性肝炎を現実的な画像検討対象とした。

この自己免疫性急性肝不全に特徴的なheterogeneous hypoattenuationはrevised AIH scoring systemの他の項目と比較して2-3点のインパクトはあるものと考えたため、今回AIH scoreに2点・3点を加点して検討した。Experienced hepatologistが臨床的にAIHを疑い、診断が困難な場合、特にANA・IgG低値で組織所見が得られない症例において、この画像加点法は有用であると思われる。しかし、急性肝不全に至る前にcentrilobular collapseに基づいて早期診断・治療し重症化させないことが最も重要であることは言うまでもない。

#### E. 結 論

従来のAIHスコアに、特徴的なCT所見を加点することで、IgG・ANA低値の自己免疫性急性肝不全の診断率が改善することが期待される。肝不全例では凝固能低下や腹水のため経皮的肝生検自体が困難なことが多い。また経静脈的肝生検では検体量・採取部位が限定される。組織検査を補う意味でも、また治療反応性を経時的に評価する面においても自己免疫性急性肝不全における肝臓全体の画像所見は有用である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujiwara K, Nakano M, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Advanced histology and impaired liver regeneration are associated with disease severity in acute onset autoimmune hepatitis. *Histopathology* 2011; 58, 693-704.
- 2) Yasui S, Fujiwara K, Yonemitsu Y, Oda S, Nakano M, Yokosuka O. Clinicopathological features of severe and fulminant forms of

- autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol* 2011; 46: 378-390.
- 3) Yasui S, Fujiwara K, Yokosuka O. Autoimmune fulminant hepatic failure in chronic hepatitis C during peg-interferon-alfa 2b plus ribavirin treatment showing histological heterogeneity. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 666-667.
  - 4) Fujiwara K, Yasui S, Tawada A, Fukuda Y, Nakano M, Yokosuka O. Diagnostic value and utility of the simplified International Autoimmune Hepatitis Group criteria in acute onset autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2011; 31: 1013-1020.
  - 5) Fujiwara K, Yasui S, Yokosuka O. Efforts at making the diagnosis of acute onset autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2011; 54: 371-372.
  - 6) Yasui S, Fujiwara K, Tawada A, Fukuda Y, Nakano M, Yokosuka O. Efficacy of intravenous glycyrrhizin in the early stage of acute onset autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 3638-3647.
  - 7) Yasui S, Fujiwara K, Okitsu K, Yonemitsu Y, Ito H, Yokosuka O. Importance of computed tomography imaging features for the diagnosis of autoimmune acute liver failure. *Hepatol Res* 2012; 42: 42-50.
  - 8) Fujiwara K, Yokosuka O. Histological discrimination between autoimmune hepatitis and drug-induced liver injury. *Hepatology* 2012; 55: 657.
  - 9) Fujiwara K, Yokosuka O. Frequent detection of IgM anti-herpes simplex viral antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2012 in press.
  - 10) Miyamura T, Ishii K, Kanda T, Tawada A, Sekimoto T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Kiyohara T, Wakita T, Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: Recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatol Res*. 2011 Dec 13. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00919.x. [Epub ahead of print]
  - 11) Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Int J Med Sci*. 2012; 9: 27-32.
  - 12) 藤原慶一, 横須賀收. 難治性急性肝不全の診断・内科的治療に関する考察. 急性肝不全—今, 何が討論され, 問題になっているのか (アークメディア) 24-32, 2011.
  - 13) 横須賀收. 急性肝炎・劇症肝炎: 臨床的な課題・問題点は何か. 平成23年度日本肝臓学会生涯教育講演会テキスト
  - 14) 藤原慶一, 神田達郎, 横須賀收. A型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 (医療ジャーナル社) 印刷中.
2. 学会発表
    - 1) Fujiwara K, Yasui S, Tawada A, Fukuda F, Chiba T, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of intravenous glycyrrhizin in the early stage of acute onset autoimmune hepatitis. The 21<sup>th</sup> conference of the asian pacific association for the study of the liver. 2011.2.18
    - 2) 藤原慶一, 横須賀收. 難治性急性肝不全の診断・内科的治療に関する考察. 第37回日本急性肝不全研究会 (東京) 2011.6.1 パネルディスカッション
    - 3) 藤原慶一, 安井伸, 横須賀收. 急性発症型自己免疫性肝炎の進展様式と治療についての検討. 第47回日本肝臓学会総会 (東京) 2011.6.3 ワークショップ
    - 4) 横須賀收. 急性肝炎・劇症肝炎: 臨床的な課題・問題点は何か. 平成23年度日本肝臓学会生涯教育講演会 (東京) 2011.8.14
    - 5) 藤原慶一, 安井伸, 横須賀收. 急性発症型の自己免疫性肝炎における simplified diagnostic criteria の有用性についての検討. 第15回日本肝臓学会大会 (福岡) 2011.10.21
    - 6) 安井伸, 藤原慶一, 大塚将之, 宮崎勝, 横須賀收. C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法中に発症した自己免疫性急性肝不全の一例. 第1回東京・神奈川劇症肝炎研究会 (東京) 2011.12.3
    - 7) 藤原慶一, 安井伸, 横須賀收. 急性発症型の自己免疫性肝炎の病態・治療についての検討. 第39回日本肝臓学会西部会 (岡山) 2011.12.10 パネルディスカッション
    - 8) Fujiwara K, Yasui S, Kanda T, Yokosuka O. Histological and radiological heterogeneity is characteristic of autoimmune acute liver failure. The 22<sup>th</sup> conference of the asian pacific association for the study of the liver. 2012.2.17
  - H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
    1. 特許取得 なし
    2. 実用新案登録 なし
    3. その他 なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 急性肝不全における ADAMTS13の動態

研究協力者 福井 博 奈良県立医科大学第三内科 教授

**研究要旨：**急性肝不全における ADAMTS13の動態をガラクトサミン + LPS 投与ラット肝不全モデルで検討し、肝不全の進行と共に血漿 ADAMTS13活性、VWF 抗原は減少するが、VWF 抗原 /ADAMTS13活性比は増加し、肝内 ADAMTS13-mRNA は増加傾向、VWF 抗原は減少傾向を示すこと、障害肝では中心静脈周囲、類洞内、肝壊死部に VWF の沈着を認めることを明らかにした。血漿 ADAMTS13著減の機序についてはなお検討を要するが、VWF 抗原 /ADAMTS13活性比の低下は血小板血栓と微小循環障害を惹起し、肝障害の進展を助長している可能性がある。

#### 共同研究者

植村 正人 奈良県立医科大学第3内科准教授  
高谷 章広 奈良県立医科大学第3内科  
石川 正之 奈良県立医科大学第3内科  
森岡 智恵 奈良県立医科大学第3内科

#### A. 研究目的

劇症肝炎の予後予測因子として血小板数の意義が注目されているが、血小板の過剰凝集は臓器、組織の微小循環障害の原因となり、肝炎重症化、合併症の発現に大きくかわる可能性がある。ADAMTS13は血管内皮細胞が分泌する超高分子量 VWF マルチマー (UL-VWFM) の切断酵素でその欠損は血栓性血小板減少性紫斑病を惹起する。われわれはこれまで重症アルコール性肝炎、非代償性肝硬変、重症急性膵炎症例に続き、劇症肝炎症例においても、ADAMTS13活性の著減と超高分子量 VWF の増加、さらに血小板過剰凝集による微小循環障害が肝障害の進展や合併症の発現にかかわっている可能性を指摘してきたが、本研究では急性肝不全における ADAMTS13の動態を詳しく解析するために実験的急性肝不全モデルにおいて血漿 ADAMTS13活性、VWF 抗原、UL-VWFM、全肝 ADAMTS13、VWF 抗原発現量を測定する。

#### B. 研究方法

体重200gの Wistar 系雄性ラットに D-ガラクトサミン (GalN : 700mg/kg 体重) および E. coli O55:B5 LPS (50  $\mu$ g/kg 体重) を腹腔内に同時投与して致死的な急性肝不全モデルを作成した。GalN + LPS 投与前、12時間、20時間、24時間後にラットを犠死させ、血漿 ADAMTS13活性、VWF 抗原を ELISA で測定した。また、VWFM パターンは SDS -0.9% アガロースゲル電気泳動で解析した。全肝 ADAMTS13 mRNA、VWF mRNA 発現量は real-time PCR で測定した。さらに、24時間の時点で肝内の VWF 染色を加えた。

#### C. 研究結果

急性肝不全ラットでは血清 AST、ALT、総ビリルビン、LDH、BUN、クレアチニンは肝障害が進展するにつれて上昇し、血小板数は減少した血漿

ADAMTS13活性は12時間後で GalN + LPS 投与前値の39%、20時間後、24時間後で前値の0.5%未満と検出感度以下にまで著減した。VWF 抗原は12時間後前値の55%、20時間後55%、24時間後32%と12時間後以後減少した。20時間、24時間の血漿 ADAMTS13活性を0.5%として計算すると VWF 抗原 /ADAMTS13活性比は12時間後には前値の133%、20時間後には800%、24時間後には400%と著増を示した。UL-VWFM は12時間に出現し、その後マルチマーパターンは degraded pattern を示した。血漿 ADAMTS13活性は血清総ビリルビン、BUN と負の相関関係、VWF とは正の相関関係にあり、血小板数とは正の相関傾向を示した。24時間後の肝組織 HE 染色像では肝細胞に広範な出血凝固壊死を認め、VWF 染色では中心静脈周囲、類洞内、肝壊死部に VWF の沈着を認めた。全肝で real-time PCR を行ったところ、ADAMTS13-mRNA は肝障害が進展するにつれて増加傾向を示し、VWF-mRNA は低下した。なお肝組織内 ADAMTS13-mRNA と血清総ビリルビン、クレアチニンの間には正の相関関係が認められた。

#### D. 考察

障害をうけた血管内皮細胞では UL-VWFM が産生される。これが毛細血管内に移行すると、high shear stress を受け、伸展構造をとるようになるが、ADAMTS13はこの進展した UL-VWFM を切断する酵素である。ADAMTS13が十分量存在すると、UL-VWFM は適当な大きさの VWF マルチマーに切断されるが、この酵素が不足するとこれが切断されず、血小板と反応して血小板血栓が形成され、微小循環障害が惹起される。われわれはこれまで血漿 ADAMTS13活性が多臓器不全を合併する重症アルコール性肝炎、非代償性肝硬変、重症急性膵炎などで著減するとともに、血漿 VWF が著増し、UL-VWFM の出現をみることを報告<sup>1-3</sup>してきた。さらにこれまでの本研究班の個別研究において急性肝不全とりわけ多臓器不全合併例でも同様の血漿 ADAMTS13活性の著減がみられ、血小板の過剰凝集と微小循環障害を招き、全身諸臓器の虚血性障害に陥る可能性を指摘してきた。

今回は急性肝不全における ADAMTS13活性の動態

を詳細に解析する目的で GalN + LPS 投与急性肝不全ラットにおいて血漿 ADAMTS13活性, VWF 抗原, UL-VWFM, 全肝 ADAMTS13活性, VWF 抗原発現量を経時的に測定し, 肝障害の進展との関連性を検討した。その結果, 血漿 ADAMTS13活性および VWF 抗原は肝不全の進行と共に低下し, VWF 抗原 / ADAMTS13活性比は増加すること, 肝内 ADAMTS13-mRNA は肝不全の進行に伴い増加傾向, VWF 抗原は減少傾向を示すこと, 肝内 ADAMTS13-mRNA は黄疸, 腎機能障害が高度になるに従い増加することなどを明らかにした。

血漿 ADAMTS13活性と肝内 ADAMTS13-mRNA の動態が解離した原因は明らかではないが, 過剰に産生された VWF を切断するための本酵素の消費亢進, あるいは肝星細胞における本酵素の産生・分泌不全などがかかわっているのではないかと考える。今後さらに肝内の ADAMTS13蛋白量の測定に加えてより早期 (GAL+LPS 投与 3 ~ 9 時間) の肝内 ADAMTS13蛋白, m-RNA の分布・発現動態を VWF 抗原との関連のもとに検討していく必要がある。

## 文 献

1. Uemura M, et al. Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:264S-71S.
2. Morioka C, et al. Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1387-96.
3. Uemura M, et al. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 2008;99:1019-29.

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Determination of ADAMTS13 and its clinical significance for ADAMTS13 supplementation therapy to improve the survival of patients with decompensated liver cirrhosis. *Int J Hepatol* 2011; 1 1-12:759047 (電子出版).
- 2) Ishikawa M, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Morioka C, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Tsujimoto T, Takimura C, Fujimura Y, Fukui H. Potential role of enhanced cytokinemia and plasma inhibitor on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis: relationship to

endotoxemia. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34 Suppl 1:S25-33.

- 3) Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Pivotal role of ADAMTS13 function in liver diseases. *Int J Hematol* 2010;91:20-9.
- 4) Uemura M, Fujimura Y, Matsuyama T, Matsumoto M, Ishikawa M, Ishizashi H, Kato S, Tsujimoto T, Fujimoto M, Yoshiji H, Morioka C, Fukui H. Potential role of ADAMTS13 in the progression of alcoholic hepatitis. *Curr Drug Abuse Rev* 2008;1:188-96.
- 5) Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Matsuyama T, Isonishi A, Ishikawa M, Yagita M, Morioka C, Yoshiji H, Tsujimoto T, Kurumatani N, Fukui H. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 2008;99:1019-29.

### 2. 学会発表

- 1) 高谷広章, 植村正人, 森岡千恵, 松本雅則, 松山友美, 石川昌利, 藤本正男, 辻本達寛, 瓦谷英人, 石指宏通, 早川正樹, 藤村吉博, 福井博. 門脈血栓合併肝硬変における ADAMTS13関連マーカーの動態. 第47回日本肝臓学会総会 2011.6.2
- 2) 森岡千恵, 植村正人, 福本江梨, 高谷広章, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 重症肝・膝疾患における微小循環障害に伴う多臓器不全の病態解析 ADAMTS13を中心に 第97回消化器病学会総会 2011.5.15
- 3) 高谷広章, 植村正人, 松本雅則, 森岡千恵, 藤本正男, 豊原眞久, 山崎正晴, 辻本達寛, 瓦谷英人, 山尾純一, 石指宏通, 藤村吉博, 福井博. 肝硬変における ADAMTS13活性と予後に関する検討 Child score, MELD score との対比. 第14回日本肝臓学会 大会 2010.10.13
- 4) 藤本正男, 植村正人, 石川昌利, 松山友美, 森岡千恵, 辻本達寛, 瓦谷英人, 松本雅則, 石指宏通, 藤村吉博, 福井博. 急性肝不全における顆粒球エラストラーゼと血漿 ADAMTS13活性との関連. 第14回日本肝臓学会大会 2010.10.13
- 5) 高谷広章, 植村正人, 藤本正男, 松山友美, 森岡千恵, 石川昌利, 辻本達寛, 瓦谷英人, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 肝不全における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態. 第16回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2010.11.13

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### Fas 型劇症肝炎における Bcl-2ファミリー蛋白の意義

研究協力者 竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

**研究要旨:** Fas 刺激は劇症肝炎を誘発する 1 つの重要なシグナルと考えられている。Fas 刺激により肝細胞は、Bcl-2ファミリー蛋白である Bak/Bax を活性化させることで、ミトコンドリアから cytochrome c を放出する。一度ミトコンドリアから cytochrome c が放出されると、アポトーシスは抑制することができないため、この cytochrome c の放出を制御する Bak/Bax がミトコンドリア経路では重要である。しかし Fas 刺激時における肝細胞の Bak/Bax の重要性は明らかではないため、Fas 型劇症肝炎の肝細胞アポトーシスにおける Bak/Bax の意義を検討した。本年度は Bak ノックアウト (KO) マウス、Bax KO マウス、肝細胞特異的 Bak/Bax ダブル KO マウスを用いて、Fas 抗体投与後の 3 時間の肝障害、肝細胞アポトーシスの評価を行った。その結果、Fas 抗体投与後の肝細胞アポトーシスは、Bax の単独欠損では変化を認めなかったが、Bak の単独欠損で減弱し、Bak/Bax 両者の欠損で完全に抑制されることを明らかにした。以上より Fas 型劇症肝炎の治療には、Bak/Bax の両者の抑制が有用であることが示唆された。

#### A. 研究目的

劇症肝炎では Fas 及び Fas リガンドの発現が増強していることが知られており、Fas 刺激が劇症肝炎を誘発する 1 つの重要なシグナルと考えられている。細胞が Fas 刺激を受けると、BH-3 only 蛋白質が活性化し、最終的に Bcl-2ファミリー蛋白である Bak/Bax を活性化させることで、ミトコンドリアから cytochrome c が放出される。この放出された cytochrome c が caspase-9、-3/7 を順次活性化しアポトーシスが遂行される。一度ミトコンドリアから cytochrome c が放出されると、アポトーシスは抑制することができないため、この cytochrome c の放出がアポトーシスの point of no return とされており、この point of no return を司る Bak/Bax がミトコンドリア経路では重要であると考えられる。しかし、Fas 刺激時における肝細胞の Bak/Bax の重要性は明らかではない。そこで、本研究では Fas 型劇症肝炎の肝細胞アポトーシスにおける Bak/Bax の意義を検討した。

#### B. 研究方法

Bak ノックアウト (KO) マウス (*Bak*<sup>-/-</sup>)、Bax KO マウス (*Bax*<sup>-/-</sup>) に Fas アゴニスト抗体 (Jo2 抗体) 1.5mg/kg を腹腔内投与することで、Fas 型劇症肝炎を惹起させ、3 時間後の肝細胞アポトーシスの解析を行った。また、アルブミンプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現する Alb-Cre マウスと、2 つの lox P 配列で挟まれた Bax 遺伝子を持つ Bak KO マウス (*Bak*<sup>-/-</sup> *Bax*<sup>flax/flax</sup>) との交配により、肝細胞特異的 Bak Bax ダブル KO マウス (*Alb-Cre* *Bak*<sup>-/-</sup> *Bax*<sup>flax/flax</sup>) を作製し、同様に Fas アゴニスト抗体を投与し、肝細胞アポトーシスの評価を行った。

#### C. 研究結果

Wild-Type (WT) マウスと Bak KO マウスに Fas アゴニスト抗体を投与し、3 時間後に血清 ALT 値を

測定したところ、WT マウスは著明な ALT の上昇を認めた (図 1)。これに比し Bak KO マウスでは ALT 値の上昇を完全に抑えることはできなかったが、その上昇は有意に軽減していた (図 1)。Fas 刺激後 WT マウス肝切片の HE 染色像では広範な肝細胞死が認められるのに対して、Bak KO マウスではその程度は軽減していた。また、アポトーシス細胞を検出する TUNEL 染色では、HE 像と一致して WT マウスでは多数の TUNEL 陽性肝細胞を認めたが、Bak KO マウスでは有意に陽性細胞数が減少していた。

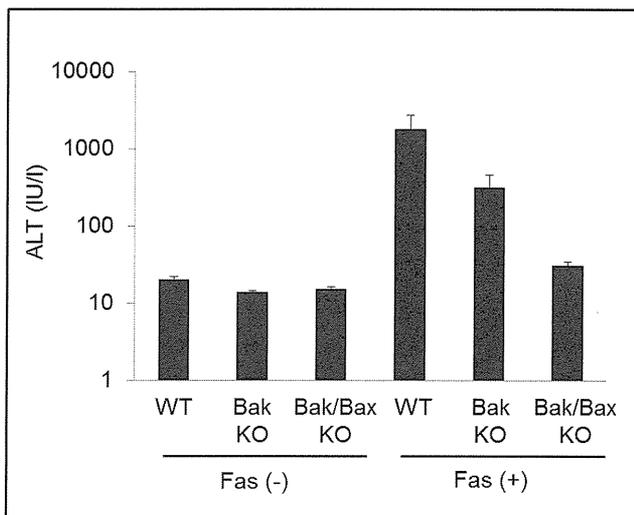
アポトーシスの実行には、先述したように、ミトコンドリアから放出される cytochrome c が caspase-9 を活性化し、さらに活性化した caspase-9 が caspase-3/7 を順次活性化することが必要である。そこで、それぞれの caspase の活性化を検討した。Fas 刺激を行っていない状態では caspase-9、-3、-7 の活性はいずれも認めなかったが、Fas 刺激後の WT マウスでは caspase-9、-3、-7 の強い活性化を認めた。一方、Fas 刺激後の Bak KO マウスでは、WT マウスに比しこれらいずれの caspase の活性化も減弱を認めた。以上より、Bak KO マウスでは Fas 刺激後の caspase 活性が減弱し、アポトーシスが抑制されることが明らかとなった。

しかし、Bak 単独の欠損では完全に caspase の活性化や肝細胞アポトーシスを抑制できなかったため、ミトコンドリア経路で重要なもう片方の蛋白である Bax に注目した。Bax はアポトーシス刺激がないときには主に細胞質に存在しており、アポトーシス刺激を受け活性化すると、ミトコンドリアに移動し、ミトコンドリア外膜で重合化する蛋白質である。そこで、Fas 刺激を与えた時の Bax の状態を検討するために、ミトコンドリアを単離し、その蛋白質を抽出して Bax の量を検討したところ、WT マウスでも Bak KO マウスでも Fas 刺激後にミトコンドリア分画で Bax が増加することが確認された。また、Bax の重合化を検討するため、クロスリンカーを使用し重合した蛋白が解

離しないようにして、ウエスタンブロットを行うと、WT マウスでも Bak KO マウスでも Fas 刺激後のみ Bax の 2 量体が検出された。以上より、Fas 刺激後の caspase の活性化やアポトーシスの実行には Bax の活性化も寄与していることが示唆された。

そのため、次に Fas 刺激における Bax の重要性を検討するために Bax KO マウスに Fas アゴニスト抗体を投与した。しかし Bak とは異なり、Bax 単独の欠損では ALT 値や TUNEL 陽性細胞の減少効果は認められなかった。また、Bax 単独の欠損では Fas 刺激後の caspase 活性も変化は認められなかった。

そこで、最後に Bak 欠損下での Bax の意義を検討するために、肝細胞特異的な Bak Bax ダブル KO マウスを作成し、このマウスに Fas アゴニスト抗体を投与した。投与 3 時間後、同腹個体の Bak KO マウスは投与 3 時間後には ALT 値で数百程度の肝障害を認めたのに対して、Bak Bax ダブル KO マウスでは ALT 値は 30 程度であり上昇を認めなかった (図 1)。また、TUNEL 陽性細胞数も、無刺激の肝臓と同程度にまで抑制された。さらに caspase-3 の活性化も認めず、Bak/Bax 両者の欠損で Fas 刺激によるアポトーシスは完全に抑制された。



#### D. 考察と結論

Fas 刺激に対するアポトーシスの実行は Bax 単独の欠損では抑制されず、Bak 単独の欠損にて抑制された。Bak 及び Bax が欠損していると、Fas 刺激後 3 時間のアポトーシスは完全に抑制された。以上より、Fas 型劇症肝炎に対して Bak/Bax の両者を標的とした治療の有用性が示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T,

Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N, Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 121:3343-3356, 2011

- 2) Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hayashi N, BH3-only activator proteins, Bid and Bim, are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: Molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets. *J Biol Chem.* 286:13905-13913, 2011

- 3) Ishida H, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: Involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 412:92-97, 2011

- 4) Shigekawa M, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 406:614-620, 2011

- 5) Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N, Delayed-onset caspases-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bax/Bak-deficient mice. *Hepatology.* 54: 240-251, 2011

##### 2. 学会発表

The 62nd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease

Nov 4~ Nov 8, 2011 San Francisco

Continuous hepatocyte apoptosis is sufficient for liver cancer development. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Satoshi Tanaka, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara

Requirement of BH3-only activator proteins Bid and Bim for apoptosis by genetic ablation of Bcl-xL is completely different between hepatocytes and platelets. Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Minoru Shigekawa, Hinako

Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa,  
Satoshi Shimizu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui,  
Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto,  
Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara

Digestive Disease Week 2011

May 7~May 10, 2011 Chicago

Delayed onset of caspase-dependent liver failure induced by Fas stimulation in Bak and Bax double knockout mice. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara.

A crucial role of hepatocyte p53 in liver fibrogenesis. Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 急性肝障害におけるマクロファージの役割の役割

分担研究者 井戸 章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学 准教授

**研究要旨：**オステオアクチビンは傷害組織においてマクロファージなどの抗原提示細胞で発現し、炎症の調節、傷害組織の再生・修復に関与していることが推測されている。本研究では、四塩化炭素肝障害モデルを用いて、肝炎の進展過程におけるオステオアクチビンの役割を解析した。四塩化炭素を単回投与した急性肝障害モデルでは、肝障害誘導96時間後の肝組織において障害部位周囲にCD68陽性マクロファージの集積が認められた。さらに肝障害誘導後の修復過程においてマクロファージを欠損させると、障害肝の再生・修復が遷延化した。オステオアクチビンの発現は肝障害のピークに遅れて亢進し、肝組織の壊死巣周囲に浸潤したマクロファージにオステオアクチビンの発現がみられた。浸潤マクロファージのほぼ全てがCD68陽性で、オステオアクチビン発現細胞の90%以上がCD68陽性であった。さらにオステオアクチビン発現細胞は高い貪食能を有していた。以上の結果から、肝障害の極期に遅れて、障害部位周囲に浸潤するCD68陽性またはオステオアクチビン陽性マクロファージが障害肝の再生・修復過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、オステオアクチビン陽性マクロファージはより高い貪食能を有し、さらに炎症の調節（抗炎症）にも重要な役割を果たしていることも報告されていることから、広範な肝細胞壊死に引き続く肝再生のみならず、急性肝不全にみられる過剰な免疫亢進状態による肝細胞障害を取り巻く微小環境にも深く関与していることが推測される。

#### 共同研究者

宇都 浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 講師  
桶谷 真 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 講師  
森内 昭博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 助教  
玉井 努 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 特任助教  
熊谷公太郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学  
呉 建 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学  
梶 一晃 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学

#### A. 研究目的

傷害組織の修復過程では、残存した有害物質や壊死組織の除去および欠損した組織の修復といった二つのメカニズムが存在する。マクロファージは傷害部位周囲に集積し、サイトカインなどの産生や有害物質や壊死組織の貪食などを介して、傷害組織の修復過程において重要な役割を果たしている。

一方、オステオアクチビンは、我々がコリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラット肝臓において発現亢進している遺伝子群から単離した遺伝子で、ヒト肝硬変および肝細胞癌組織においても発現している。オステオアクチビンはヒト乳癌細胞から単離された glycoprotein nmb (gpnm) および マウス樹状細胞から単離された DC-HIL のラットホモログであり、最近、急性肝障害モデルの肝マクロファージにおいて発現していることが報告され、さらにマクロファージなどの抗原提示

細胞で発現されるオステオアクチビンは炎症のフィードバック調節因子として作用していることが報告された。以上の知見から、オステオアクチビンは傷害組織に浸潤した抗原提示細胞に発現し、炎症の持続、傷害組織の再生・修復に関与していることが推測される。

本研究の目的は、急性肝障害の後に誘導される障害肝の再生・修復過程におけるマクロファージの役割を、特にオステオアクチビンという分子に着目して明らかにすることである。

#### B. 研究方法

##### 1. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチビンの発現

8週齢のC57BL/6マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し、下記の検討を行った。

- (1) 血清 ALT および組織学的検討
  - (2) 肝組織におけるサイトカイン、ケモカインの発現レベル：RT-PCR 法
  - (3) 障害肝に浸潤したマクロファージの解析：免疫組織化学染色、FACS 解析
- ##### 2. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復に及ぼす影響

8週齢のC57BL/6マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し、その48時間後に Clodronate 200 μL を腹腔内投与して下記の検討を行った。

- (1) 血清 ALT, 組織学的検討
  - (2) 免疫組織化学染色によるオステオアクチビンおよび CD68 の発現
- ##### 3. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチビン発現マクロファージの検討

8週齢のC57BL/6マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し、下記の検討を行った。

- (1) オステオアクチビンの発現：real-time RT-PCR, ウェスタン法, 免疫組織化学染色
- (2) オステオアクチビン発現細胞の解析：蛍光二重染色および肝臓より単離した単核細胞のFACS解析
- (3) マクロファージの貪食能の検討

### C. 研究結果

#### 1. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチビンの発現

- (1) 四塩化炭素投与48時間後にみられた血清 ALT の上昇は96時間後には低下した。組織学的には投与48時間後にみられた炎症細胞浸潤, 巣状壊死は96時間後には改善傾向を示した。
- (2) 肝組織における IL-1 $\beta$  および IL-6発現は48および96時間後に低下したが, TNF- $\alpha$  発現はいずれも増強していた。一方, IL-10発現は48および96時間後に徐々に増強した。また, CCL2発現は48時間後に増強したが, 96時間後には低下した。
- (3) F4/80を用いた免疫染色では, 肝障害誘導48時間後の肝組織において, マクロファージは障害部位周囲に集積していた (図1)。

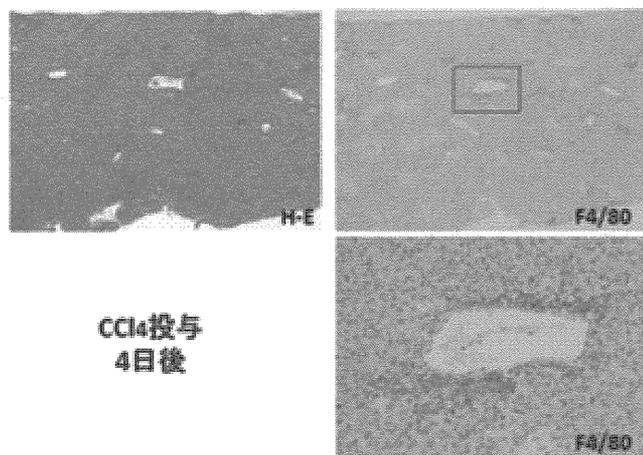


図1 マクロファージは障害部位周囲に集積する

また, 肝障害誘導48時間後の肝臓から単核球を単離しFACS解析を行ったところ, 浸潤したマクロファージ (F4/80陽性) のほぼ全てが CD68または CD11b 陽性であり, CD68陽性細胞はその95%を占めていた。

#### 2. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復におよぼす影響

- (1) 四塩化炭素投与48時間後に Clodronate にて浸潤マクロファージを欠損させると, 四塩化炭素投与96時間後も ALT が優位に上昇しており, 組織学的にも広範な壊死巣が残存しており, 肝障害が遷延化していることが考えられた (図2)。
- (2) 免疫組織化学染色では, CD68発現細胞が欠損していた (図2)。

#### 3. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチビン発現マクロファージの検討

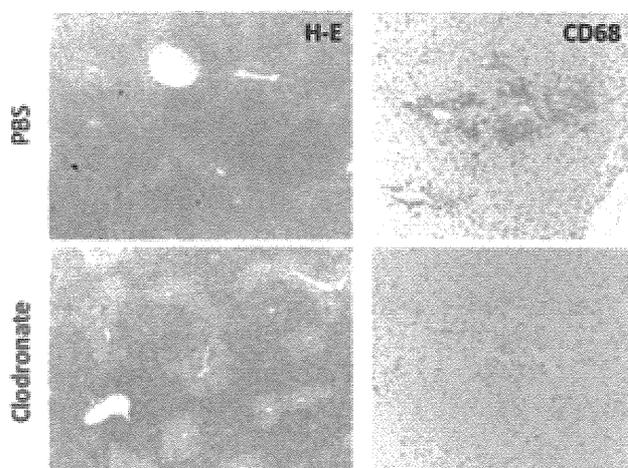


図2 マクロファージの欠損は肝障害を遷延化する

- (1) オステオアクチビンは, 投与48時間から96時間にかけて発現が増強した。免疫組織化学染色では, 組織学的に改善を認めた96時間後に, 門脈域および壊死巣周囲に集積しているマクロファージにオステオアクチビンの発現を認め, オステオアクチビン陽性マクロファージには貪食像が認められた。
- (2) 蛍光二重染色では, 肝障害部位周囲に浸潤した CD68陽性マクロファージの一部にオステオアクチビンが発現しており, オステオアクチビン発現細胞はほぼ全てが CD68陽性であった。一方, 肝臓より単離した単核細胞の FACS 解析では, オステオアクチビン陽性細胞90%以上が CD68陽性 / CD11b 陰性であり, CD68陽性細胞ではその約50%にオステオアクチビンが発現していた。
- (3) マクロファージの貪食能を microsphere-FITC を用いて検討したところ, CD68陽性マクロファージは CD11b マクロファージよりも高い貪食能を有しており, CD68陽性マクロファージのうち, オステオアクチビン陽性マクロファージは, オステオアクチビン陰性マクロファージに比して有意に高い貪食能を有していた。

### D. 考察

障害肝に浸潤するマクロファージにはサイトカイン産生を主体とする CD11b 陽性マクロファージと, 高い貪食能を有する CD68陽性マクロファージが浸潤することが報告されている。本研究では, まず障害肝の修復過程におけるマクロファージの役割を検討した。四塩化炭素肝障害モデルにおいて, 肝障害誘導96時間後の肝組織において障害部位周囲に CD68陽性マクロファージの集積が認められた。さらに肝障害誘導後の修復過程においてマクロファージを欠損させると, 障害肝の再生・修復が遷延化したことから, 障害部位周囲に CD68陽性マクロファージが障害肝の再生・修復に重要な役割を果たしていることが推測された。一方, オステオアクチビンは四塩化炭素肝障害誘導後, 肝障害のピークに遅れてその48~96時間後に発現増強し, 障害部位周囲に浸潤した CD68陽性マクロファ

ジにおいて発現していた。さらにオステオアクチビン発現細胞は高い貪食能を有していた。以上の結果から、肝障害誘導後、その修復過程で障害部位周囲に浸潤する高い貪食能を有するマクロファージ、なかでもオステオアクチビン陽性マクロファージはより高い貪食能を有していることから、障害肝の再生・修復過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。

障害肝の再生・修復過程において、高い貪食能を有するCD68陽性またはオステオアクチビン陽性マクロファージがどのような機序で障害組織の再生・修復に寄与するかは今後明らかにする必要がある。

## E. 結 論

肝障害の極期に遅れて、障害部位周囲に浸潤するCD68陽性またはオステオアクチビン陽性マクロファージが障害肝の再生・修復過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、オステオアクチビン陽性マクロファージはより高い貪食能を有し、さらに炎症の調節（抗炎症）にも重要な役割を果たしていることも報告されていることから、広範な肝細胞壊死に引き続く肝再生のみならず、急性肝不全にみられる過剰な免疫亢進状態による肝細胞障害を取り巻く微小環境にも深く関与していることが推測される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 高見陽一郎, 佐々木文郷, 小田耕平, 最勝寺晶子, 橋口正史, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割 第47回日本肝臓学会総会. 2011年6月. 東京
- 2) 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 榊一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中大, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝炎進展に伴い発現するオステオアクチビンは肝マクロファージの貪食に関与する 第15回JDDW2011. 2011年10月. 福岡
- 3) 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 榊一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中大, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 障害肝において発現するオステオアクチビンは肝マクロファージの貪食に関与する 第48回日本消化器免疫学会総会. 2011年7月. 金沢

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし