

## 目的システムの選択画面

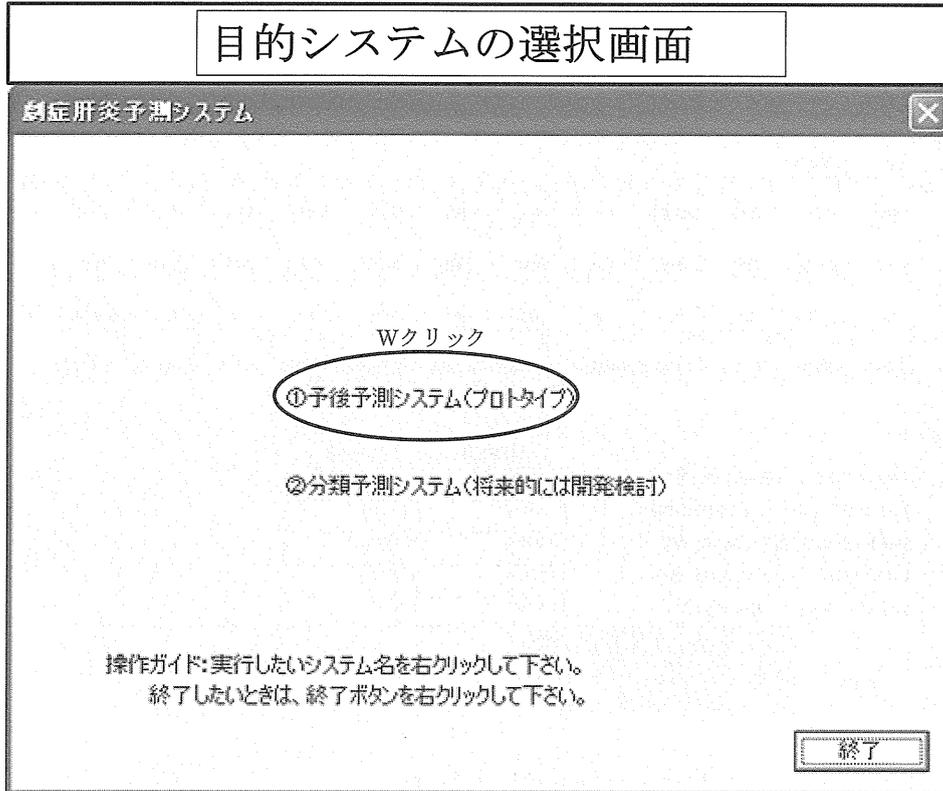


図1. 目的システムの選択画面

## データ入力画面

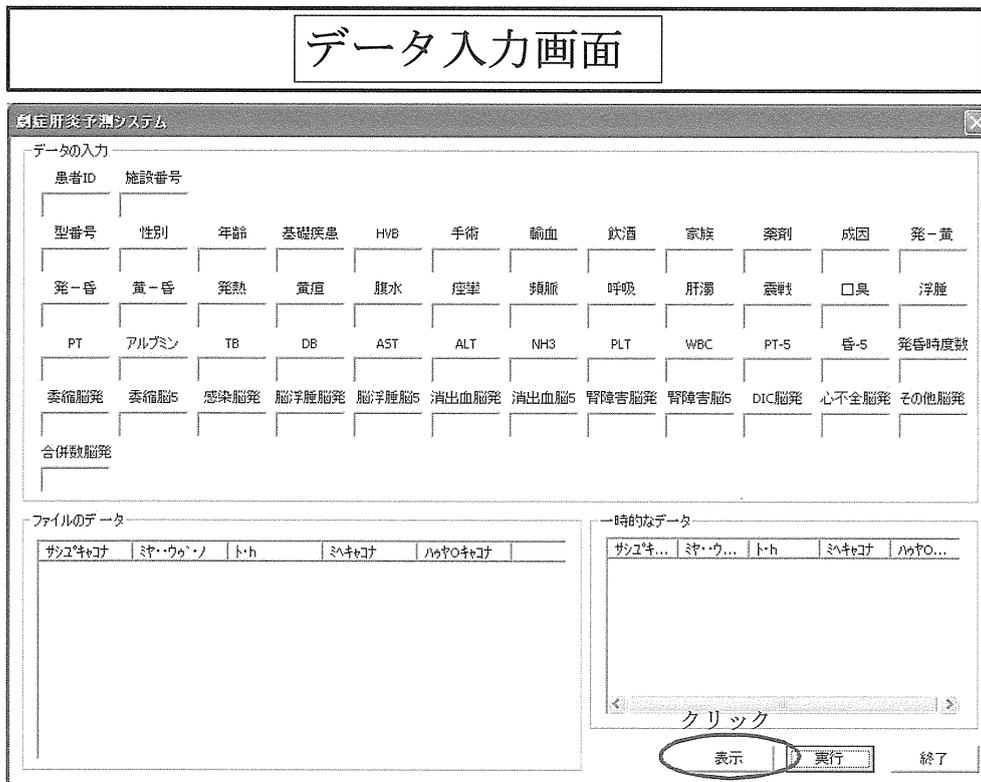


図2. サーバーでのデータ入力画面

# データ出力画面

肝炎予測システム

入力データ

患者ID	施設番号											
KY	284											
型番号	性別	年齢	基礎疾患	HVB	手術	輸血	飲酒	家族	薬剤	成因	発黄	
2	2	32	1	0	0	0	0	1	1	7	2	
発熱	黄疸	発熱	黄疸	腹水	症象	頻脈	呼吸	肝臓	震戦	口臭	浮腫	
11	9	0	1	0	0	0		0	0	0	1	
PT	アルブミン	TB	DB	AST	ALT	NH3	PLT	WBC	PT-5	昏-5	発熱時度数	
15	2.2	10.4	5.8	190	322	107	17.3	6.69	40	2	2	
委縮脳死	委縮脳死	感染脳死	脳浮腫脳死	脳浮腫脳死	消出血脳死	消出血脳死	腎障害脳死	腎障害脳死	DIC脳死	心不全脳死	その他脳死	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

出力データ

	発現時予測	5日後予測
①決定木モデルによる予後予測結果(死亡確率)	30.7692%	11.0092%
②RBF判別モデルによる予後予測結果(死亡確率)	76.1841%	79.0671%
③BP判別モデルによる予後予測結果(死亡確率)	84.6193%	83.7452%
④BP数値モデルによる予後予測結果(死亡確率)	75.7143%	19.3774%
⑤統合モデルによる予後予測結果(死亡確率)	66.9665%	47.8337%

※入りの情報

BP判別 - 5日後モデルの入力の不足: 56 57項目  
 BP判別 - 発現時モデルの入力の不足: 56 57項目  
 BP数値 - 5日後モデルの入力の不足: 56 57項目  
 BP数値 - 発現時モデルの入力の不足: 56 57項目  
 決定木 - 5日後モデルの入力の不足: 56 57項目  
 決定木 - 発現時の入力の不足: 56 57項目

念のため、入力データに記入のないことと再確認された上、上記予測結果を意思決定の参考として下さい。

出力  終了

図3. サーバーでのデータ出力画面

# 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 劇症肝炎予後予測における Prothrombin index slope の有用性の検討

研究代表者 坪内 博仁 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 教授

**研究要旨：**2012年に急性肝不全における Prothrombin index slope（以下 PI slope）の有用性がフランスから報告され、本邦の急性肝不全の予後予測における有用性を検討した。対象は2004から2009年に本研研究班で集積した劇症肝炎および LOHF の488症例（内科治療生存：135例，内科治療死亡240例，肝移植：113例）で、PI slope はその予後と相関した。さらに劇症肝炎の肝移植ガイドラインの項目を含めた多変量解析で、PI slope<0.1は有意な因子として抽出された。本研究より、PI slope が劇症肝炎の治療効果の新規評価項目や、新規の予後予測因子として有用と考えられた。今後、劇症肝炎以外の急性肝不全における有用性を検討する必要がある。

#### 共同研究者

井戸 章雄 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 准教授  
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

#### A. 研究目的

平成19年度に当研究班から発表された「劇症肝炎に対する肝移植適応ガイドライン」は、劇症肝炎の予後予測に用いた場合、正診率は78%と高率とされている。一方、我々は、近年の劇症肝炎の高齢化に伴い、ガイドラインの正診率が低下していることを報告した。また、2011年に当研究班より「我が国における急性肝不全の診断基準」が発表され、新診断基準に基づいて症例の集積が行われている。幅広い症例に対応しうる新規の治療効果予測因子の出現が期待される中で、2012年に急性肝不全における Prothrombin index slope（以下 PI slope）の有用性がフランスから報告された。

本邦の急性肝不全の予後予測における PI slope の有用性を検討する目的で、以下の検討を行った。

#### B. 研究方法

2004から2009年にアンケート調査で集積した劇症肝炎（急性型：227例，亜急性型：233例）および LOHF28例，計488症例（内科治療生存：135例，内科治療死亡240例，肝移植：113例）を対象とした。

##### ①劇症肝炎の予後と PI slope

PI slope は脳症発現時の PT% を起点とし1日後，3日後，5日後それぞれの PT% から減じ，さらにそれぞれの PT% で除することで算出し，それぞれ24時間後，72時間後および120時間後の PI slope とした。生存群，死亡+移植群で各 PI slope を比較した。さらに PI slope が0.1未満と0.1以上の2群間で内科治療での生存率を比較した。

##### ②新肝移植適応ガイドラインとの比較

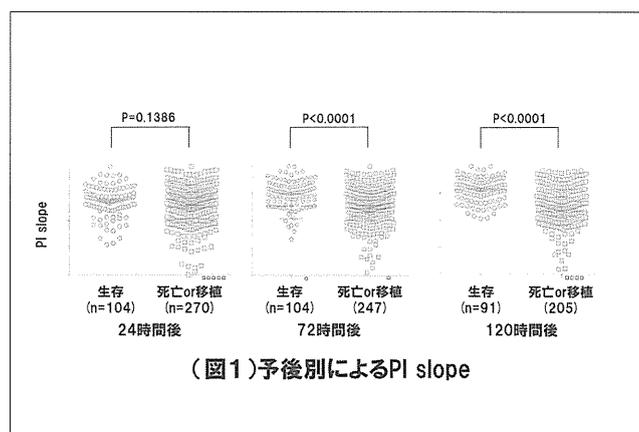
新肝移植適応ガイドラインの評価項目（脳症までの

期間，PT%，Tbil，D/T 比，血小板数および肝萎縮の有無）に PI slope を加えて単変量および多変量解析し，PI slope の有用性を検討した。

#### C. 研究結果

##### ①劇症肝炎の予後と PSI

24時間後の PI slope は生存群（n=104）：0.357±0.281，死亡+移植群（n=270）：0.256±0.446，72時間後は生存群（n=104）：0.264±2.325，死亡+移植群（n=247）：0.227±0.960，120時間後は生存群（n=91）：0.559±0.229，死亡+移植群（n=247）：0.167±1.05であり，72時間後，120時間後では生存群で有意に高値であった。（図1）

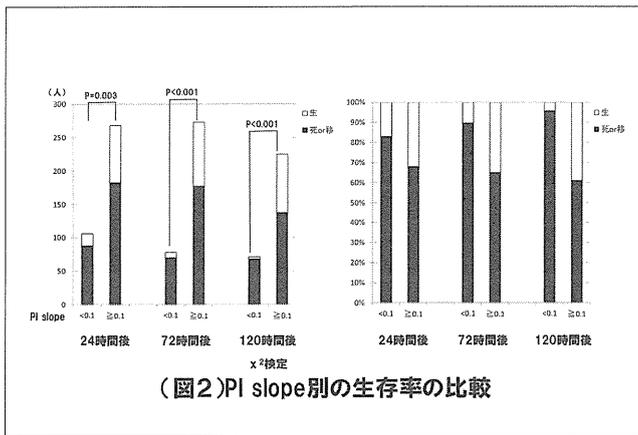


（図1）予後別によるPI slope

さらに、PI slope を0.1未満の群と0.1以上の2群間で生存率を比較すると、24，72および120時間後のすべてで、0.1以上の群の生存率が有意に高かった。（図2）

##### ②新肝移植適応ガイドラインとの比較

新肝移植適応ガイドラインの評価項目（脳症までの期間，PT%，Tbil，D/T 比，血小板数および肝萎縮の有無）の各項目に24，72，120時間後の PI slope 値または PI slope<0.1で単変量解析を行い，24時間後の PI slope 値以外のすべての項目で優位差が認められた。さらにガイドラインの評価項目に72時間後の PI slope 値または PI slope<0.1を加えて多変量解析を行



い, PT%, Tbil, D/T 比, 血小板数および肝萎縮の有無と同様に PI slope<math><0.1</math>が予後と相関する有意な因子として抽出された。

#### D. 考 察

脳症発現時期を起点とした72および120時間後の PI slope は, 劇症肝炎の予後と相関した。さらに, 劇症肝炎の肝移植ガイドラインの項目を含めた, 多変量解析においても PI slope 72h<math><0.1</math>は有意に予後と相関した。PI slope は人工肝補助療法を中心とした内科治療への反応性を反映していると考えられ, 治療評価項目として有用性が高い。さらに, これまで利用されてきた脳症発現時のデータに PI slope を加えることで, より正確な治療効果予測が可能になる可能性が示唆された。2011年に急性肝不全の新診断基準が示されているが, 今後, 肝炎を伴わない急性肝不全や非昏睡型の急性肝不全における PI slope の有用性を検討する必要があると考えられた。

#### E. 結 論

本研究において, PI slope が劇症肝炎の治療効果の新規評価項目や, 新規の予後予測因子として有用と考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

## 分担研究報告書

### 急性肝障害の劇症化率と劇症化予防に対する N-アセチルシステインの効果に関する研究

研究協力者 鈴木 一幸 岩手医科大学 消化器・肝臓内科 教授

**研究要旨：【目的】** 急性肝不全の定義に非昏睡型が含まれたことから、PT が40% 以下に低下した急性肝障害の昏睡発現割合が注目され、非昏睡型急性肝不全からの昏睡発現阻止が、これまでも増して注目される結果となった。しかし、その実態の把握は十分ではないことから、北東北の肝炎調査・治療研究会のシステムを用いて解析した。**【方法】** システムに登録された428例中、PT 80% 以下を示した313例を対象にPT と昏睡発現割合との関連および治療による昏睡発現抑制の可能性を検討した。**【成績】** 1. 搬送基準合致前のPT 最低値が0-40% (98例), 40-60% (98例), PTmin60-80% (117例) で昏睡発現割合は、それぞれ21.4%, 2.0%, 0.9% であり、PT 40% の重要性が改めて確認された。2. 急性肝障害治療薬の非無作為化投与では、より重症な例に治療が行われている傾向がある中で、N-アセチルシステイン (NAC) は投与例で昏睡発現割合が低い傾向を示した。3. NAC の傾向スコア分析では、有意の昏睡発現阻止効果は示されなかった。**【結論】** 非昏睡型急性肝不全の昏睡発現阻止に向けて、NAC をはじめとした候補薬の厳密な臨床試験が必要である。

#### 共同研究者

滝川 康裕 岩手医科大学内科学講座  
消化器肝臓内科学分野教授  
宮本 康弘 岩手医科大学内科学講座  
消化器肝臓内科学分野助教  
小野寺美緒 岩手医科大学内科学講座  
消化器肝臓内科学分野助教  
遠藤 龍人 岩手医科大学内科学講座  
消化器肝臓内科学分野准教授

#### A. 研究目的

わが国では2011年急性肝不全の新しい定義が定められ、これまでの昏睡型に加え、非昏睡型が定義された<sup>1)</sup>。これに基づく全国調査により、急性肝不全の昏睡発現率が明らかにされつつある。しかし、これまでのところ、非昏睡型の概念の普及が不十分なため、正確な昏睡発現率は明らかにされていない。我々はこれまで、北東北の急性肝障害登録・患者搬送システム(登録システム)を構築し、重症化の可能性のある急性肝障害患者を早期に専門施設に搬送し、昏睡発現予防治療を検討してきた<sup>2)</sup>。今回、このシステムを利用し、急性肝不全の昏睡発現率の検討を行った。

また、昏睡発現前から積極的な治療介入することによって昏睡発現(劇症化)を予防する目的から、種々の治療が試みられているが、有効な治療法は未だに見出されていない。一方、米国では、昏睡発現後の治療開始でも昏睡度がI, II度の段階であれば、N-アセチルシステイン(NAC)が救命率を改善することが示されている<sup>3,4)</sup>。従って、昏睡切迫例の劇症化阻止には更に有効と推測される。この観点から、登録システムの症例で、NACを中心とした劇症化阻止治療の有効性を検討した。

#### B. 研究方法

登録システムに登録された急性肝障害482例のうち、経過中PTが80%を下回り、治療および転帰の調査を

完了した313例を対象とした。このうち急性肝不全の定義に合致する98例を対象に昏睡発現率を求めた。次に、NACの有効性の研究が開始された後の症例で天気登録が完了した142例について昏睡発現前治療の有無と昏睡発現率を単変量解析で比較し、NACについて、傾向スコア分析(多重ロジスティックモデル)で有効性を検討した。

#### C. 研究結果

1. 昏睡発現割合および死亡割合：搬送基準合致前のPT最低値(PTmin)に応じた昏睡発現割合および死亡割合は、PTminが0-40%(98例)ではそれぞれ21.4%, 37.6%, PTmin 40-60%(98例)で2.0%, 5.1%, PT60-80%(117例)で0.9%, 1.7%であった(図1)。従って、急性肝不全の昏睡発現割合は21.4%で、肝不全の基準に入らないPT 40%以上の症例の昏睡発現割合と著しい差を示した。
2. PT 40%の意義：PTと昏睡発現割合をPTの値10%単位で比較すると(図1)、PTの悪化とともに昏睡発現割合は上昇したが、PT 30%台の昏睡発現割合が8.1%であるのに対し、PT 40%台では2.0%であり、PT 40%を境に昏睡発現割合が急激に悪化することが示された。
3. 昏睡発現予防治療の有無と昏睡発現率：アルブミン投与例および非投与例の昏睡発現率はそれぞれ24.6%, 4.1% ( $p<0.001$ )であった。以下同様に、ラクツコース45.0%, 2.0% ( $p<0.001$ )、抗凝固療法28.6%, 2.5% ( $p<0.001$ )、ステロイドパルス26.1%, 8.3% ( $p<0.006$ )、B型肝炎例における核酸アナログ製剤27.5%, 0% ( $p<0.001$ )、ウリナスタチン31.3%, 11.9% ( $p<0.052$ )といずれも投与例で有意に昏睡発現率が高かった。これに対し、NACでは投与例(9.5%)が非投与例(14.9%)に比し昏睡発現率が低下する傾向を示した(表1)。
4. NAC投与の傾向スコア分析：NAC投与の傾向スコアは総ビリルビンのみが有意の説明変数として選

扱され、これによるNAC投与の判別に関するROC解析のAUCは0.70であった(図2)。NAC投与傾向スコアとNAC投与を説明変数としたロジスティック解析では昏睡発現抑制効果は有意ではなかった(表2)。

#### D. 考 察

急性肝不全の定義に、非昏睡型が含まれたことから、PTが40%以下に低下した急性肝障害例の劇症化割合が検討されるようになった。しかし、未だに昏睡発現をもって急性肝不全と診断する認識が根強いことから、非昏睡型の症例の集積が十分ではなく、急性肝不全としての昏睡発現割合はまだ明らかとなっていない。

我々は、肝障害の劇症化を阻止するという観点から、急性重症肝障害を早期に専門施設に搬送するシステムを構築して、劇症化阻止治療を検討してきた経緯がある。このシステムでは、PT80%以下の肝障害を対象として扱っており、急性肝不全の基準であるPT40%以下の症例はほぼ全例登録されていると考えられる。今回、このシステムの登録例を用いて、劇症化割合を検討した結果、PTと劇症化割合との間には強い関連があることが再確認され、また、従来基準とされてきたPT40%が極めて重要な意義を持つことが改めて確認された。そして急性肝不全の劇症化割合は約20%と推定された。

次に、昏睡発現前に施行される種々の治療が、劇症化阻止に有効か否かの検討を行った。疾患の性質上、無作為化比較試験が困難なこともあり、より重症な例に種々の治療が施行されるという傾向がある中で、NACは投与例で劇症化割合が低い傾向を示したことから有効性が示唆された。

そこで、NAC投与に関する傾向スコア分析を施行したところ、NAC投与傾向として血清ビリルビン値が選択された。このスコアによるNAC投与のROC解析では、AUCが0.7とあまり高くなかったこともあり投与傾向としては明確ではなかった。このためか、NAC投与傾向スコアとNAC投与によるロジスティック解析では、昏睡発現に対するNACの有効性は明らかではなかった。

米国では、昏睡I-II度の急性肝不全に対し、NAC投与が、救命率<sup>3)</sup>、肝機能<sup>4)</sup>ともに改善することが示されており、早期の肝障害に対するNACの有効性が証明されつつある。こういった中で、昏睡発現前の急性肝不全に対するNACの有効性を示すことは、劇症化した後の医療資源投入を削減する意味からも極めて重要と考えられ、今後更に質の高い臨床研究が必要と考えられる。

#### E. 結 論

1. 急性肝不全の昏睡発現割合は約20%と考えられた。
2. 非昏睡型急性肝不全の昏睡発現抑制に対するNACの有効性は明らかではなかったが、今後更に

検討すべきと考えられる。

#### 参考文献

- 1) 持田智, 滝川康裕, 中山伸朗, 他. わが国における「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: 393-398.
- 2) Takikawa Y, Endo R, Suzuki K, et al. Early prediction of short-term development of hepatic encephalopathy in patients with acute liver disease unrelated to paracetamol. A prospective study in Japan. *J Hepatol* 2009; 51: 1021-1029.
- 3) Lee WM, Hynan LS, Rossaro L, et al. Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure. *Gastroenterology*. 2009; 137: 856-864.
- 4) Singh S, Hynan LS, Lee W, et al. Improvements in Hepatic Serological Biomarkers Are Associated with clinical benefit of intravenous N-acetylcysteine in early stage non-acetaminophen acute liver failure. *Dig Dis Sci* 2013; online(doi: 10.1007/s10620-012-2512-x).

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) 鈴木一幸. 肝性脳症. *Medicina* 2012; 7: 1170-1173.
  - 2) 滝川康裕. 重症肝炎克服に向けた取り組み. *岩手医誌* 2012; 63: 343-349.
  - 3) 滝川康裕, 宮本康弘. 肝胆膵領域のEBM Update2012 劇症肝炎(急性肝不全)肝胆膵 2012; 64(3): 297-307.
  - 4) Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes & Development* 2013; 27: 169-181.
  - 5) Takikawa Y, Miyamoto Y, Onodera M, Kuroda H, Kasai K, Miyasaka A, Okamoto H, Takahashi M, Suzuki K. A case with icteric acute hepatitis E with no response of IgM class anti-HEV antibody. *Hepatol Res* 2012; 42: 1196-1199.
  - 6) Wang T, Takikawa Y, Sawara K, Yoshida Y, Suzuki K. Negative regulation of human astrocytes by Interferon(IFN)  $\alpha$  in relation to growth inhibition and impaired glucose utilization. *Neurochem Res* 2012; 37: 1898-1905.
  - 7) Wang T, Takikawa Y, Tabuchi T, Kosaka K,

Satoh T, Suzuki K. Carnosic acid prevents lipid accumulation in hepatocytes through EGF/MAPK pathway. J Gastroenterol 2012; 47: 805-813.

- 8) Naiki T, Nakayama N, Mochida S, Oketani M, Takikawa Y, Suzuki K, Tada S, 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. Hepatol Res 2012; 45: 68-75.
- 9) Takikawa Y, Harada M, Wang T, Suzuki K. The usefulness and accuracy of international normalized ratio (INR) and activity percent of prothrombin time in patients with liver disease. Hepatol Res 2013, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Onodera M, Takikawa Y, Kakisaka K, Kataoka K, Miyamoto Y, Oikawa K, Kumagai I, Suzuki K. The usefulness and accuracy of the international normalized ratio (INR) and activity percent of prothrombin time in patients with liver disease. AASLD Boston, USA 2012.
- 2) 宮本康弘, 吉田雄一, 小野寺美緒, 片岡晃二郎, 及川寛太, 黒田英克, 宮坂昭生, 滝川康裕, 鈴木一幸. 第38回日本急性肝不全研究会 ワークショップ1 「北東北における急性肝不全の現状」, 2012年6月5日, 金沢.
- 3) 宮本康弘, 滝川康裕, 鈴木一幸. 北東北における急性肝不全の実態. 第54回日本消化器病学会大会 パネルディスカッション14「急性肝不全: 新たな定義とこれに準拠した診療の展望」2012年10月11日, 神戸.
- 4) 小野寺誠, 井上義博, 鈴木一幸. 当高度救命救急センターに搬送された劇症肝炎以外の急性肝不全例の検討. パネルディスカッション14「急性肝不全: 新たな定義とこれに準拠した診療の展望」2012年10月11日, 神戸.
- 5) 黒田英克, 滝川康裕, 鈴木一幸. 急性肝炎における Virtual Touch Tissue Quantification (VTTQ) の有用性: 急性期における肝細胞壊死と炎症評価に関する基礎検討をふまえて. 第54回日本消化器病学会大会 ワークショップ11「低侵襲な肝疾患診断法の進歩」2012年10月11日, 神戸.
- 6) 小野寺誠, 井上義博, 滝川康裕. 劇症肝炎以外の急性肝不全症例の検討 - 高度救命救急センターからの報告 - 第39回日本肝臓学会東部会 特別ポスターセッション2「急性肝不全症例報告 (各施設の統計と問題症例の提示)」2012年12月7日, 東京.
- 7) 宮本康弘, 滝川康裕, 鈴木一幸. 当院における急性肝不全の現状. 第39回日本肝臓学会東部会

特別ポスターセッション2「急性肝不全症例報告 (各施設の統計と問題症例の提示)」2012年12月7日, 東京.

- 8) 佐原 圭, 加藤章信, 鈴木一幸. 潜在性肝性脳症に対する瑛湯治療介入の効果. 第54回日本消化器病学会大会 シンポジウム3「ミニマル肝性脳症の診断・病態・治療」2012年10月11日, 神戸.
- 9) 小野寺美緒, 滝川康裕, 原田真理, 柿坂啓介, 片岡晃二郎, 宮本康弘, 及川寛太, 熊谷一郎, 鈴木一幸. 肝疾患患者における Prothrombin Time 測定と表記法の妥当性に関する検討. 第109回日本内科学会 2012年4月14日, 京都市.
- 10) 宮本康弘, 宮坂昭生, 吉田雄一, 小野寺美緒, 館道芳徳, 片岡晃二郎, 佐原 圭, 及川寛太, 黒田英克, 葛西和博, 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸. 当科における免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策の現状. 第48回日本肝臓学会総会 オープンワークショップ34「B型肝炎1」, 2012年6月8日, 金沢市.
- 11) 小野寺美緒, 吉田雄一, 片岡晃二郎. 宮本康弘, 佐原 圭, 及川寛太, 黒田英克, 宮坂昭生, 葛西和博, 宮坂昭生, 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸. 当科における B 型肝炎 genotype A の年齢分布から見た浸淫時期の推定. 第48回日本肝臓学会総会 2012年6月8日, 金沢市.
- 12) 小野寺美緒, 黒田英克, 館道芳徳, 及川隆吉, 宮本康弘, 佐原 圭, 及川寛太, 遠藤龍人, 若林剛, 滝川康裕, 鈴木一幸. Acoustic Structure Quantification (ASQ) 法を用いた脂肪肝の非侵襲的定量的診断. 第16回日本肝臓学会大会2012年10月10日, 神戸.

## 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

図1

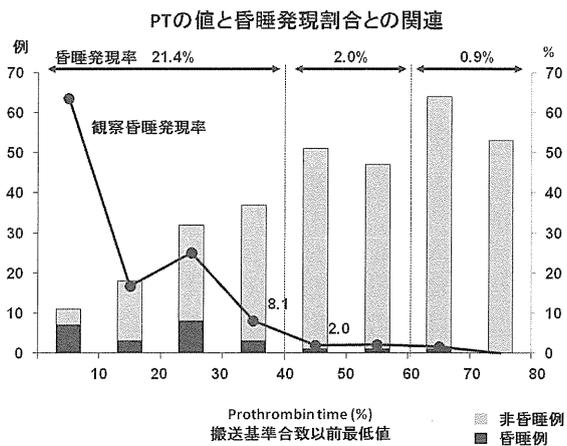


図2

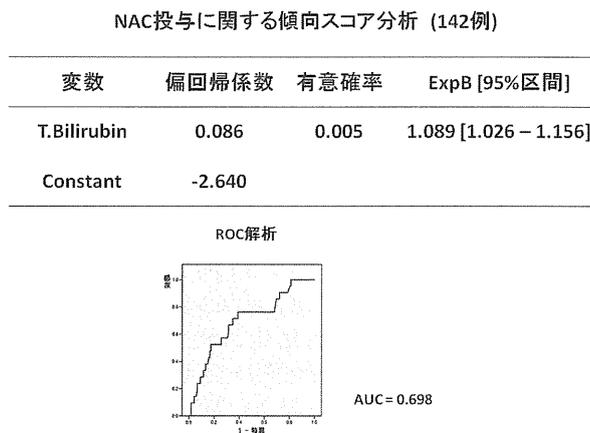


表1

急性肝障害の劇症化予防治療法の可能性 (搬送基準合致80例)

	昏睡発現率 (全体25%)		p
	施行例	非施行例	
NAC	10.5	29.5	0.132
ステロイドパルス	34.2	23.8	0.621
プレドニン	25.0	31.8	0.333
アルブミン	29.8	13.0	0.157
ラクツロース	47.4	4.8	0.000
FOY	56.5	21.1	0.039
フサン	66.7	21.6	0.032
ATIII	32.1	8.3	0.026
ウリナスタチン	33.3	23.1	0.509
SNMC	29.2	18.3	0.430

表2

昏睡発現抑制に対するNAC投与の有効性 (142例)

多重ロジスティックモデル

目的変数: logit (昏睡発現確率)  
説明変数: NAC投与傾向スコア  
NAC投与

変数	偏回帰係数	有意確率	ExpB [95%区間]
NAC傾向スコア	3.866	0.060	47.7 [0.846 - 2696]
NAC投与	-0.853	0.300	0.424 [0.084-2.149]
Constant	-2.347		

# 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

## 分担研究報告書

### 劇症肝炎スコアリングからみた臨床病態の検討

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:** 昨年の当研究により劇症肝炎肝移植ガイドラインスコアリングのポイントの経過は劇症肝炎の内科的治療の治療効果にある程度相関することを示した。本年度は肝移植症例において、ポイントの経過が、肝移植の予後に関与しうるかどうかを検討した。さらにスコアリングのポイントが示唆するいくつかの臨床的バイオマーカーとの相関性を検討した。移植症例においても内科症例と同様にスコアリングの改善が乏しい症例は移植成績が悪い傾向が見られ、特に治療後5日目のデータがいくつか有意差が付くことが示された。また臨床的バイオマーカーではIgGやLDHなどがスコアリングと相関もしくは逆相関することが認められ、劇症肝炎の臨床背景の多様性を裏付ける結果となった。

#### A. 研究目的

当班会議より2008年に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多くの施設で臨床応用され、肝移植判断時における有用な指標の1つとなっている。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、昨年の検討より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った。今回は内科的治療例のみならず、移植成績における有用性を検討した。また、スコアリングポイントは各種パラメーターの統計的検討により導き出されたものであるがそのポイントからいくつかのバイオマーカーを検討することにより臨床病態の検討を併せて行った。

#### B. 研究方法

2004年から2009年までで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より肝移植症例におけるスコアリングの経過を確認し、その有用性を検討した。

#### C. 研究結果

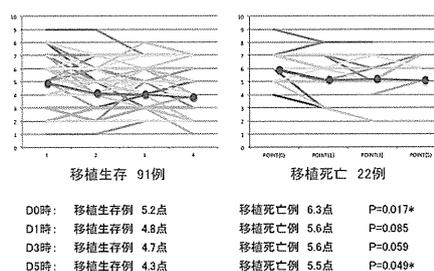
当班会議の班員諸施設ならびに日本肝臓学会所属施設を対象とした劇症肝炎全国集計のうち2004年～2009年までの鹿児島大学にて集積された488症例のうち移植未施行277例、移植施行例113例が解析可能症例であった。移植症例の内訳は平均年齢42.1歳、男性：女性49：64、FHA：FHS：LOHF 36：72：5

病因HBV35例、その他ウイルス3例、AIH11例、薬物性11例、成因不明51例、その他2例、移植生存91例：死亡22例、救命率80.5%、脳症発症時では、劇症肝炎スコアリングの平均は5.4 (1-9) 点であり移植生存例では5.2 (1-9) 点、移植死亡例では6.3 (4-9) 点であった。

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、移植症例においても生存例では劇症肝炎診断時よりスコアリングの経過において回復する傾向を認めるにもかかわらず、移植死亡例はほとんどの症例が

5点を下回るほど回復することはない。(図1)。

スコアリングポイントの推移 (2004-2009 移植症例)



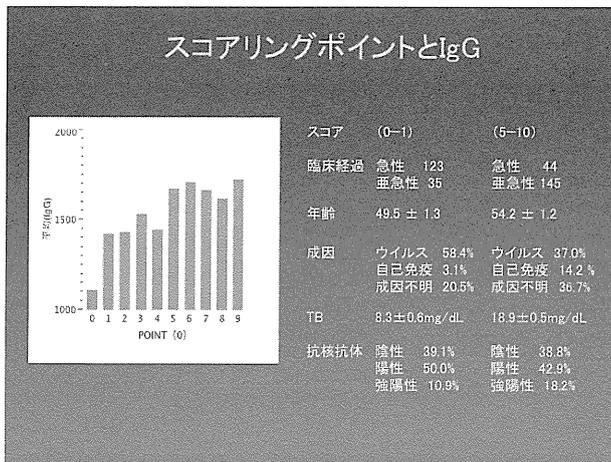
移植死亡群は生存群より点数が高くポイントが推移することが観察される。

また治療病日毎にスコアリングの推移を確認すると、治療開始翌日では移植生存および移植死亡群いずれにおいても差は認められないが、5日を経過した時点で、プロトロンビン時間、ビリルビン値、血小板値などに有意差をもって移植死亡例においては悪くなる傾向があり、これらの症例は内科摘治療に反応が乏しい可能性が高いと示唆された。(図2)

	生存 99例	死亡 10例	P
PT(%) 5日後	50.1±2.8	32.7±5.5	0.008
PT(INR) 5日後	1.77±0.10	2.24±0.20	0.044
ALB 5日後	3.4±0.09	3.2±0.19	N.S.
TB 5日後	9.7±0.97	15.1±1.95	0.017
D/T 5日後	0.51±0.03	0.38±0.06	0.071
PLT 5日後	8.2±0.6	5.3±1.3	0.051
NH3 5日後	104.4±11.1	135.4±22.3	N.S.

また臨床病態の検討においてはスコアリングポイント毎に各種バイオマーカーを検討し、IgG, CRP, LDH

などがそのポイントと相関または逆相関する傾向が認められた。(図3)



#### D. 考 察

肝移植に至った症例においてもスコアリングポイントの経過を確認すると、移植治療前の内科的治療時の反応性がある程度移植成績に關与する可能性が示唆された。勿論移植成績の最大の寄与因子は術中術後管理にあることは論を待たないが興味深い事実としてはさらなる解析が必要であると考え。また臨床病態の検討においては、もともとは生死をエンドポイントとしたパラメータの解析によりこのスコアリングは成立しているが、逆にスコアリングから確認するといくつかのバイオマーカーがもともと多様性のある劇症肝炎の臨床病態の成 因などを示唆する結果となった。

#### E. 結 論

スコアリングポイントを経過を追うことにより治療効果が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. 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48回日本肝臓学会総会 ワークショップ1 金沢 2012. 6
- 2) 内木隆文他：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 JDDW2012 ワークショップ4 神戸 2012. 10

##### 2. 論文発表

- 1) 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. *Hepatol Res* 2012; 42: 68-75.

- 2) Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Iwasa J, Shiraki M, Takai K, Naiki T, Moriwaki H. Combination of acyclic retinoid with branched-chain amino acids inhibits xenograft growth of human hepatoma cells in nude mice. *Hepatol Res* 2012; 42: 1241-1247
- 3) Terakura D, Shimizu M, Iwasa J, Baba A, Kochi T, Ohno T, Kubota M, Shirakami Y, Shiraki M, Takai K, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Preventive effects of branched-chain amino acid supplementation on the spontaneous development of hepatic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-*db/db* obese mice. *Carcinogenesis* 2012; 33: 2499-2506.
- 4) Shimizu M, Imai K, Takai K, Moriwaki H. Role of acyclic retinoid in the chemoprevention of hepatocellular carcinoma: Basic aspects, clinical applications, and future prospects. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12: 1119-1128.
- 5) Shimizu M, Shirakami Y, Imai K, Takai K, Moriwaki H. Acyclic retinoid in chemoprevention of hepatocellular carcinoma: targeting phosphorylated retinoid X receptor- $\alpha$  for prevention of liver carcinogenesis. *J Carcinog* 2012; 11: 11.
- 6) Shimizu M, Kubota M, Tanaka T, Moriwaki H. Nutraceutical approach for preventing obesity-related colorectal and liver carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 579-595.
- 7) Ohno T, Shirakami Y, Shimizu M, Kubota M, Sakai H, Yasuda Y, Kochi T, Tsurumi H, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid and GW4064, a farnesoid X receptor ligand. *Cancer Lett* 2012; 323: 215-222.
- 8) Suzuki K, Endo R, Kohgo Y, Ohtake T, Ueno Y, Kato A, Suzuki K, Shiraki R, Moriwaki H, Habu D, Saito M, Nishiguchi S, Katayama K, Sakaida I; for the Japanese Nutritional Study Group for Liver Cirrhosis 2008. Guidelines on nutritional management in Japanese patients with liver cirrhosis from the perspective of preventing hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2012; 42: 621-626.
- 9) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y. Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of

- Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol Res* 2012; 42: 523-542.
- 10) Ninomiya S, Shimizu M, Imai K, Takai K, Shiraki M, Hara T, Tsurumi H, Ishizaki S, Moriwaki H. Possible role of visfatin in hepatoma progression and the effects of branched-chain amino acids on visfatin-induced proliferation in human hepatoma cells. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 2092-2100.
- 11) Watanabe N, Takai K, Imai K, Shimizu M, Naiki T, Nagaki M, Moriwaki H. Increased levels of serum leptin are a risk factor for the recurrence of stage I/II hepatocellular carcinoma after curative treatment. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 49: 153-158.
- 12) 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.

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 難治性疾患等克服研究事業 (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：**2012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1515例であり、そのうち劇症肝炎患者は174例、12%を占めていた。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、改正法実施後は待機10日で約25%の症例に脳死肝移植が施行されていた。これに伴い最終転帰における死亡の割合は62.9%から30.5%に半減した。一方、D/T比低下は登録後早期死亡に関連する要因であり、このような例では十分な待機時間が確保できない可能性が高い。

#### 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

改正臓器移植法施行後2年経過時点での、劇症肝炎患者の脳死肝移植待機状態を検討した。

#### B. 研究方法

1997年10月から2012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174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、待機生存率、脳死肝移植施行および早期死亡に関する因子、転帰について検討を行った。

#### C. 研究結果

2012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1515例であり、そのうち劇症肝炎患者は174例、12%を占めていた。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法で累積生存率を算出したところ、生存期間の中央値は30日であり、登録後10日での死亡率は22.7%であった(図1)。脳死肝移植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、登録時期すなわち改正臓器移植法施行前か後かのみが有意な要因であった(Odds ratio 4.15, P=0.02)。累積脳死肝移植施行率は、改正法実施前は登録後7日、14日、28日でそれぞれ3.6%、3.7%、5.5%であったが、改正法実施後はそれぞれ19.6%、39.3%、58.0%であった(図2)。改正法実施後は登録後10日で約25%の症例で脳死肝移植が施行されていた。最終転帰における脳死肝移植実施の割合は、改正法実施前は7.3%であったが、改正法実施後は25.6%と上昇していた。また待機死亡の割合は62.9%から30.5%に減少していた(図3)。登録後10日以内での早期死亡に関連する要因を検討したところ、年齢、病型、成因、Alb, PT, T-bil, Cr, MELD score

などは有意な要因ではなく、D/T比のみが有意な要因として抽出された。多変量解析の結果D/T $\leq$ 0.58の症例はD/T $>$ 0.58の症例と比較して約10倍の早期死亡リスクを有することが明らかとなった。待機生存曲線を比較からも、D/T比低下を伴う症例での登録後早期死亡が明らかであった(図4)。

図1 待機生存率：劇症肝炎患者(≥18歳, n=174)

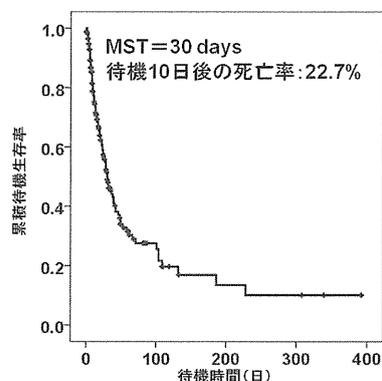


図2 法改正前後での脳死肝移植施行率の変化

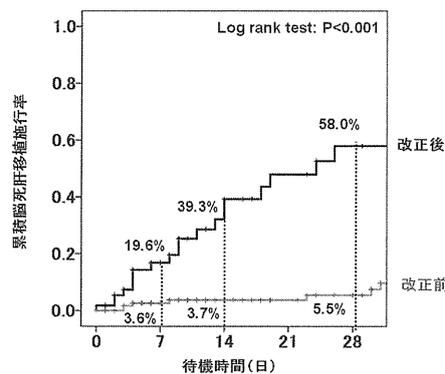


図3 法改正前後での転帰の変化

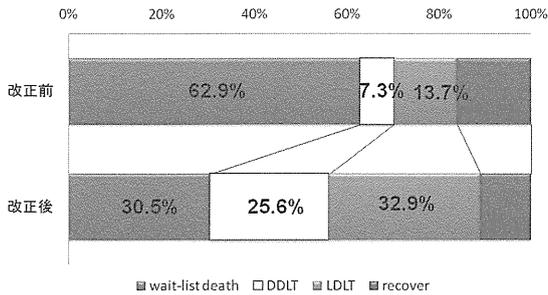
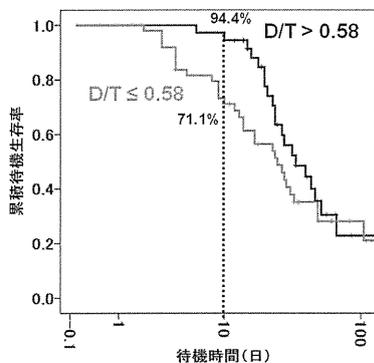


図4 待機生存率：D/T 比別



#### 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移植施行率は改善し、登録後10日で約25%の症例に脳死肝移植が施行された。また、これに伴い待機死亡の割合も半減している。このように、劇症肝炎患者に対する脳死肝移植は現実的な治療選択肢のひとつになりつつあるが、D/T比の低下を伴う症例では十分な待機時間を確保できない可能性が高く、早急な生体肝移植が必要と考えられる。

#### E. 結 論

改正臓器移植法実施後、劇症肝炎患者に対する脳死肝移植施行率が上昇し、待機死亡率が低下した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sato S, Genda T, Hirano K, Tsuzura H, Narita Y, Kanemitsu Y, Kikuchi T, Iijima K, Wada R, Ichida T. Up-regulated aldo-keto reductase family 1 member B10 in chronic hepatitis C: association with serum alpha-fetoprotein and hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012; 32: 1382-90.
- 2) Marubashi S, Umeshita K, Asahara T,

Fujiwara K, Haga H, Hashimoto T, Hatakeyama K, Ichida T, Kanemitsu T, Kitajima M, Kiyosawa K, Makuuchi M, Miyagawa S, Satomi S, Soejima Y, Takada Y, Tanaka N, Teraoka S, Monden M.: Steroid-free living donor liver transplantation for HCV-a multicenter prospective cohort study in Japan. *Clin Transplant*. 2012; 26(6): 857-67.

- 3) Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, Mochida S, Onishi S, Tsubouchi H; Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepato Res*. 2013 Feb; 43(2): 97-105.

- 4) 玄田拓哉, 市田隆文: 原発性胆汁性肝硬変に対する肝移植. *日本消化器病学会誌*2013; 110(1): 22-28.

##### 2. 学会発表

- 1) 玄田拓哉, 市田隆文. 脳死肝移植待機リストにおける劇症肝炎患者の現状. 第38回日本急性肝不全研究会. 2012年6月6日, 金沢.
- 2) 玄田拓哉, 市田隆文. 脳死肝移植待機患者の待機死亡リスク要因の解析: 予後予測スコアと背景肝疾患の重要性. 第48回日本肝臓学会総会. 2012年6月7日, 金沢.
- 3) 玄田拓哉, 市田隆文. 脳死肝移植待機リストにおける劇症肝炎患者の現状. 第30回日本肝移植研究会. 2012年6月14日, 福岡.
- 4) 玄田拓哉, 市田隆文. 脳死肝移植待機死亡リスク要因としての原発性胆汁性肝硬変. 第30回日本肝移植研究会. 2012年6月14日, 福岡.
- 5) 玄田拓哉, 市田隆文. 現行の臓器配分システムの問題点: 原発性胆汁性肝硬変患者の待機死亡リスク. 第16回日本肝臓学会大会. 2012年10月10日, 神戸.

#### 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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

## 分担研究報告書

### ウイルス性急性肝不全に対する免疫抑制療法の有用性の評価

研究協力者 横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学 教授

**研究要旨:** 急性肝不全の頻度は低い致死率が高く、世界的に重要な問題となっている。わが国の急性肝不全の成因の半数弱はウイルス性である。有効性が示されている治療法は肝移植のみであるが、わが国ではドナー・レシピエント双方の問題から施行可能な症例は限られる。そのため肝移植以外の治療法の検討が必要である。そこでウイルス性急性肝不全の病初期におけるステロイド療法の肝炎鎮静効果について検討したところ、病初期における高用量のステロイド投与は肝細胞破壊を有意に抑制した。ステロイド投与群ではコントロール群と比較して、生存率・肝再生率がやや高かったが有意差は認めなかった。死亡群ではHBV感染が有意に多かった。治療開始時に既に肝不全が進展している場合には (PT<10%) 免疫抑制療法の効果が期待しがたいため、早急に肝移植を考慮すべきである。

#### 共同研究者

藤原 慶一 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学

#### A. 研究目的

劇症肝炎や昏睡を伴う急性肝不全は頻度の少ない疾患であるが致死率が高く、その診断・治療は臨床的に重要である。有効性が示されている治療法は肝移植のみであるが、ドナー・レシピエント双方の問題から施行可能な症例は限られる。そのため肝移植以外の治療法の検討が必要である。

急性肝不全における massive hepatic necrosis の機序として、炎症性サイトカインが関与した微小循環障害や肝細胞アポトーシスが報告されている。わが国では、近年サイトカイン産生抑制の目的から発症早期にステロイドパルス療法が行なわれるようになってきたが、その効果と安全性に関するコンセンサスは得られていない。

そこでウイルス性急性肝不全の病初期におけるステロイド療法の肝炎鎮静効果について検討した。

#### B. 研究方法

対象は2000-2012年に当科で経験したウイルス性急性肝不全例で、病初期 (発症から15日以内) に治療を開始し治療経過の明らかなものに限定した。ステロイド療法可能例について informed consent を得た上で prospective にメチルプレドニゾロンによるパルス療法を開始し、治療反応性をみながら漸減、終了した。一次検討項目は治療開始後2週間におけるAST, ALT, LDH 値の推移とした。二次検討項目は同期間におけるT-BIL, PTの推移、および最終転帰とした。また合併症・副作用についても検討した。昏睡を伴う症例については、劇症肝炎の移植適応新ガイドラインスコア (Novel scoring system for predicting the outcome of patients with fulminant hepatitis. Naiki et al. Hepatol Res 2012) も検討した。

#### C. 研究結果

- ①31例が検討対象となった。男性16例、女性15例、平均年齢は $47.6 \pm 13.4$ 歳。病型は昏睡を伴わない急性肝不全 (急性肝炎重症型) 18例、昏睡を伴う急性肝不全13例、うち劇症肝炎急性型10例、劇症肝炎亜急性型3例。成因はA型肝炎11例、B型肝炎17例 (すべて transient infection)、E型肝炎3例であった。治療開始時の検査成績は、 $PT 22 \pm 15\%$ ,  $AST 7069 \pm 6424 U/l$ ,  $ALT 6481 \pm 3426 U/l$ ,  $LDH 4896 \pm 7268 U/l$ ,  $T-BIL 7.0 \pm 3.6 mg/dl$  であった。
- ②19例にステロイドが投与された (CS群)。CS群と有意差のない臨床・生化学的背景を有し、ステロイドを投与されなかった12例をコントロール群 (non-CS群) とした (表1)。ステロイド総投与量は $4019 \pm 934 mg$  (3000-5250) であった。経過観察期間中、AST, ALT, LDHは低下し、その改善度は両群間で有意差を認めなかった (図1, 2, 3)。T-BIL, PTの推移にも有意差を認めなかった (図4, 5)。AST/ALT比は治療開始4日目以降、CS群で有意に低値となった (図6)。治療開始後6例に感染合併症、1例に消化管出血を認めたが、両群間で差を認めなかった。
- ③最終的な転帰は、31例中23例が生存、8例が死亡した、移植例は認めなかった。CS群19例中8例、コントロール群12例中5例が劇症化し ( $p=0.64$ )、CS群19例中15例、コントロール群12例中8例が生存した ( $p=0.36$ )。死亡群では、HBV感染が多く ( $p=0.038$ )、治療開始時に既に肝不全が進展しているものが多かった (PT  $p<0.001$ , T-BIL  $p=0.040$ ) (表2)。CS群とコントロール群で肝再生 (PT回復) 率はそれぞれ、89%, 67% で有意差は認めなかった ( $p=0.13$ )。
- ④昏睡を伴う13例について移植適応新ガイドラインスコアを検討すると、死亡予測の5点以上の4例全例が死亡した。一方で、4点以下の9例中4例が死亡した。うち3点の2例は肝再生の改善は認められたが、最終的に感染症が死亡原因であった。また4点の2例は肝不全死であった (うち1例はHBV

hyperacute) (図7)。

#### D. 考 察

我々の liver unit においては、劇症肝炎の成因の約50%をウイルス性が占めていた(2000-2012年, Fujiwara et al. Hepatol Res 2011改変)。2010年の急性肝不全全国調査でも43%がウイルス性であり(Sugawara et al. J Gastroenterol 2012), わが国の劇症肝炎・急性肝不全の半数近くが未だにウイルス感染によるものであり, universal vaccination で予防できるはずのものが予防されておらず, 先進国として由々しき事態である。

劇症肝炎の頻度はまれであるが致死率が非常に高いため, 世界的に問題となる疾患である。現時点で肝移植以外に有効性の認められた治療法はない。

急性肝不全の治療として欧米では, 1950-1960年代にコルチコステロイド(CS)が用いられ始め, 初期の uncontrolled study において生存における効果が認められたが, その後の1970年代の controlled study では生存率に改善を認めなかったため, それ以降CSは急性肝不全の治療法から排除され, 再評価も行われていない。しかしながら, 肝移植ドナーの不足したわが国では肝移植以外の治療法を模索することが不可欠である。

急性肝不全における massive hepatic necrosis の機序として, 炎症性サイトカインが関与した微小循環障害や肝細胞アポトーシスが報告されている。わが国の肝疾患専門施設では, 近年サイトカイン産生抑制の目的から発症早期にメチルプレドニゾロンを用いたステロイドパルス療法が70%の症例に行なわれるようになってきている。特に肝性昏睡を伴わない急性肝不全例の超急性期におけるCSの急速な肝炎鎮静効果およびそれに続く再生能の回復は, 現実に院内外で年間30例以上の急性肝不全の診療に携わる者として実感するところである。しかし, 急性肝不全の性質から randomized controlled study を施行することは困難であり, また retrospective study さえほとんどなく, CSの効果と安全性に関するコンセンサスは得られていないのが現状である。劇症肝炎全国調査では, 病態・成因から本来施行率が高いはずの劇症肝炎急性型で64%であるのに対して, 亜急性型で76%, LOHFで78%であり, CS治療の適応・使用法について治療施設による認識の相違があると推測される。

そこで, 抗真菌薬をはじめとする抗菌薬・抗CMV薬などの抗ウイルス薬・抗潰瘍薬の発達した近年において, ウイルス性急性肝不全の病初期におけるCS療法の肝炎鎮静効果について検討した。病初期(発症から15日以内)に限定したのは, CS投与の目的を肝再生のための大前提である早急な肝炎鎮静化に求め, 発症から時間の経過した明らかな肝再生不全状態を改善するまでの効果は求めなかったからである。CS群において, 急速なAST/ALT ratioの低下を認めた。ASTは肝小葉全体の肝細胞に分布し半減期は17時間と短い。これに対し, ALTは主に門脈周囲の肝細胞

に多く分布し半減期は47時間と長い。ウイルス性急性肝炎では肝細胞膜の破壊が起こり, ALTより多くのASTが放出される。そのため, 高いAST/ALT ratioはより強い肝細胞障害を反映し, 高値からの低下は肝細胞障害の鎮静を示唆する。つまり, CS投与群ではコントロール群より, 肝細胞破壊が抑制され急速に終息に向かったことが示された。

CS投与において懸念されるのは副作用であるが, 転帰までの長期間観察中において投与群とコントロール群の間で有意差を認めなかった。

#### E. 結 論

ウイルス性急性肝不全の病初期における高用量のステロイド投与は肝細胞破壊を抑制する。CS群ではコントロール群と比較して, 生存率・肝再生率がやや高かったが有意差は認めなかった。

治療開始時に既に肝不全が進展している場合には(PT<10%)免疫抑制療法の効果が期待しがたいため, 早急に肝移植を考慮すべきである。欧米と比べて急性肝不全におけるウイルス感染の割合が多いわが国においては, 本来は, 国際標準で行なわれている universal vaccination による予防がウイルス性急性肝不全の診療において最も重要であることは言うまでもない。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujiwara K, Yokosuka O. Frequent detection of IgM anti-herpes simplex viral antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2012; 56: 395.
- 2) 藤原慶一, 横須賀収, 織田成人, 荒田慎寿, 井上和明, 滝川康裕, 井戸章雄, 持田智, 坪内博仁: 「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班 劇症肝炎分科会 血液浄化法の有効性評価を目的としたワーキンググループ 急性肝不全に対する血液浄化療法の有効性評価: 急性肝不全に対する人工肝補助療法の現状に関するアンケート調査報告 *肝臓* 2012; 53: 530-533.
- 3) Fujiwara K, Yasui S, Yokosuka O. Autoimmune acute liver failure: An emerging etiology for intractable acute liver failure. (Review) *Hepatol Int* in press.
- 4) 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* 2012; 42: 248-53.
- 5) Ishibashi H, Maruyama H, Takahashi M,

Shimada T, Kamesaki H, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Demonstration of intrahepatic accumulated microbubble on ultrasound represents the grade of hepatic fibrosis. Eur Radiol. 2012; 22(5): 1083-90.

- 6) Maruoka D, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Fujiwara K, Yokosuka O. Longitudinal changes of the laboratory data of chronic hepatitis C patients with sustained virological response on long-term follow-up. J Viral Hepat. 2012; 19(2): e97-104.
- 7) Wakamatsu T, Kanda T, Tawada A, Miyamura T, Takahashi M, Chiba T, Arai M, Maruyama H, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Acute liver failure in an antimitochondrial antibody-positive 63-year-old man. Case Rep Gastroenterol. 2012; 6(2): 394-9.
- 8) Miyamura T, Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Jiang X, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Roles of ITPA and IL28B genotypes in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon plus ribavirin. Viruses. 2012; 4(8): 1264-78.
- 9) Kanda T, Nakamoto S, Nishino T, Takada N, Tsubota A, Kato K, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Tanaka T, Arai M, Mikami S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin in Japanese Patients Infected with Hepatitis C Virus Genotype 2 Who Failed Previous Interferon Therapy. Int J Med Sci 2013; 10(1): 43-9.
- 10) 藤原慶一, 神田達郎, 横須賀収. 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) 58-66, 2012.
- 11) 藤原慶一, 横須賀収. 自己免疫性急性肝不全をどのように診断し治療すべきか (アークメディア) 印刷中.

2. 学会発表

- 1) 安井伸, 藤原慶一, 横須賀収. 劇症肝炎の内科的救命率を改善する使命と挑戦：急性発症型の自己免疫性肝炎についての検討. 第109回日本内科学会講演会 (京都) 2012. 4. 13
- 2) 安井伸, 藤原慶一, 横須賀収. 画像所見を加点した急性発症型自己免疫性肝炎のスコアリング診断の試み. 第48回日本肝臓学会総会 (金沢) 2012. 6. 7
- 3) 藤原慶一, 横須賀収. 自己免疫性急性肝不全をどのように診断し治療すべきか. 第38回日本急性肝不全研究会 (金沢) 2012. 6. 6 ワークショップ
- 4) 藤原慶一, 安井伸, 横須賀収. 自己免疫性急性肝不全についての考察. 第16回日本肝臓学会大会 (神戸) 2012. 10. 10 パネルディスカッション
- 5) 安井伸, 藤原慶一, 横須賀収. B型急性肝炎の病型分類. 第16回日本肝臓学会大会 (神戸)

2012. 10. 11 パネルディスカッション

- 6) Yokosuka O, Fujiwara K. Acute liver failure and acute on chronic liver failure in Japan. APASL meeting (Dhaka) 2012.10.5

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

表1 CS投与群, 非投与群の臨床・血液生化学的背景

背景 (CS群 vs Control群)

	Corticosteroid (+)	Corticosteroid (-)	p
n	19	12	
Age	50.6 ± 11.3	42.8 ± 15.4	0.11
Sex (M/F)	11/8	5/7	0.30
Type (FHa/FHs/AHs)	7/1/11	3/2/7	0.64
Etiology (HAV/HBV/HEV)	7/12/0	4/5/3	0.21
PT (%)	20 ± 11	26 ± 20	0.36
AST (U/l)	8084 ± 7189	5462 ± 4834	0.28
ALT (U/l)	7229 ± 3547	5296 ± 2988	0.13
LDH (U/l)	6039 ± 8810	3086 ± 3350	0.20
T-BIL (mg/dl)	6.5 ± 2.9	7.8 ± 4.4	0.41
Outcome (recovery)	15	8	0.36

表2 生存群、死亡群の臨床・血液生化学的背景

生存群 vs 死亡群

	Recovery	Death	p
n	23	8	
Age	47.0 ± 14.1	49.1 ± 11.8	0.71
Sex (M/F)	10/13	6/2	0.13
Type (FHa/FHs/AHs)	5/0/18	5/3/0	<0.001
Etiology (HAV/HBV/HEV)	10/10/3	1/7/0	0.038
PT (%)	27 ± 13	9 ± 10	<0.001
AST (U/l)	5996 ± 4444	10155 ± 10006	0.12
ALT (U/l)	5874 ± 2946	8227 ± 4281	0.095
LDH (U/l)	3761 ± 3995	8160 ± 12642	0.14
T-BIL (mg/dl)	6.2 ± 3.4	9.2 ± 3.4	0.040
CS (+/-)	15/8	4/4	0.36

図1 治療開始後のASTの推移

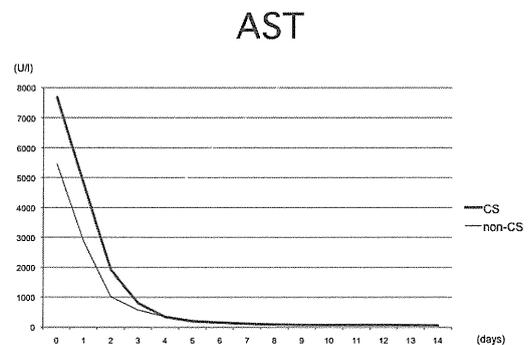


図2 治療開始後の ALT の推移

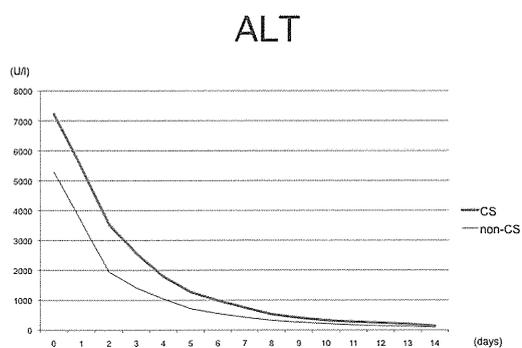


図5 治療開始後の PT 活性の推移

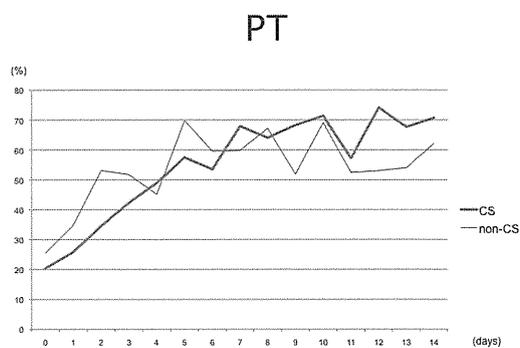


図3 治療開始後の LDH の推移

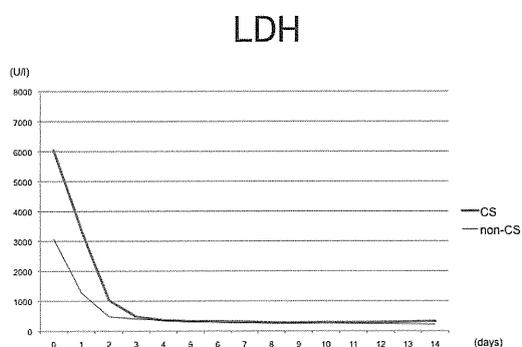
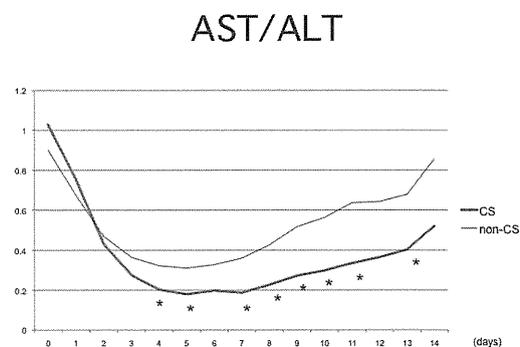


図6 治療開始後の AST/ALT ratio の推移



\* p<0.05

図4 治療開始後の T-BIL の推移

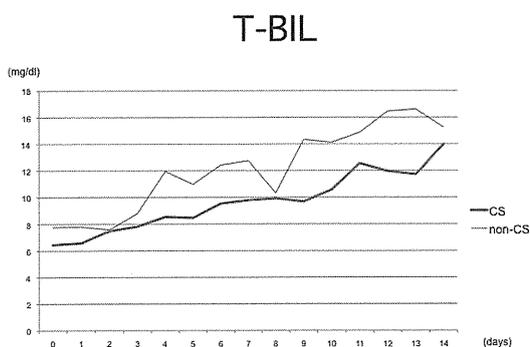
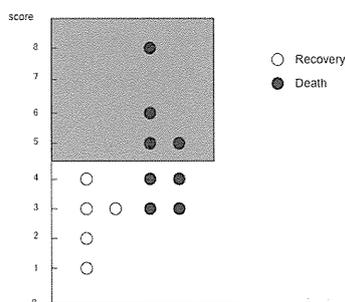


図7 劇症化例における肝移植適応新ガイドラインスコア

肝移植適応新ガイドラインスコア



# 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (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。cytochrome c が放出されるとアポトーシスの遂行は不可逆的となるため、cytochrome c の放出を制御する Bak/Bax がアポトーシス遂行の鍵となる。しかし Fas 刺激時における肝細胞 Bak/Bax の重要性は明らかではなく、Fas 型劇症肝炎における Bak/Bax の意義を検討した。Bak ノックアウト (KO) マウスや Bax KO, Bak/Bax ダブル KO マウスに対する Fas 刺激の解析より、Fas 刺激による早期の肝細胞アポトーシスは、Bak もしくは Bax の片方が保たれていれば障害なく実行されるが、Bak/Bax 両者の欠損で完全に抑制された。しかし、Bak/Bax の両者が欠損していても、マウスの肝不全による死亡率は軽度改善を認めるものの、遅発性の細胞死を認め、肝不全の進行は完全には抑制できなかった。この遅発性肝細胞死では、Bak/Bax 依存的なアポトーシスで認めるカスパーゼ活性と比べると弱いものの、やはりカスパーゼの活性を認めた。また、電子顕微鏡観察にて Bak/Bax 依存的なアポトーシスではミトコンドリアの膜崩壊・膨化が認められたのに対して、Bak/Bax 依存的な遅発性細胞死ではミトコンドリアの形態は保たれていた。以上より、Bak/Bax 欠損時に認められる遅発性の細胞死にはミトコンドリア非依存的なアポトーシス経路が関与している可能性が示唆された。Fas 型劇症肝炎の治療には、Bak/Bax の両者の抑制はある程度生存率を改善させる可能性があるが、さらなる生存率改善にはそれだけでは不十分であり、遅発性細胞死の抑制が必要であると考えられた。

#### 共同研究者

疋田 隼人 大阪大学消化器内科学

#### A. 研究目的

劇症肝炎では Fas 及び Fas リガンドが発現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る。Fas 刺激により肝細胞は、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 を放出する。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。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、その肝細胞アポトーシスや生存率の解析を行った。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や生存率の評価を行った。(倫理面への配慮)

組み替え遺伝子を用いた実験は、大阪大学遺伝子組み換え安全委員会の承認のもと行った。また、すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行った。

#### C. 研究結果

始めに、Bak KO マウスに Fas 抗体を投与した。投与 3 時間後、Wild-Type (WT) マウスに比し Bak KO マウスでは著明に TUNEL 陽性細胞が減少していた。また ALT 値も WT マウスに比し有意に Bak KO マウスで減少を認めました。しかし、投与 3 時間後の ALT は 600 (IU/L) 程度と完全にアポトーシスを抑制することはせず、投与 12 時間以内にほとんどのマウスは死亡し、生存曲線を有意に延長するに至らなかった。次に Bax 単独の効果を検討するために Bax KO マウスに Fas 抗体を投与した。しかし Bak とは違い、Bax 単独の KO マウスでは WT マウスに比し投与 3 時間後の ALT 値や TUNEL 陽性細胞に有意な差を認めなかった。

そのため、Bak 欠損下での Bax の効果を検討するため、肝細胞特異的な Bak/Bax ダブル KO マウス作成し、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、ALT 値は 30 程度と上昇を認めなかった。また、caspase-3 の活性も認めず、Bak/Bax 両者の欠損で Fas 刺激による早期のアポトーシスは完全に抑制できた。そこで Fas 刺激を行った Bak/Bax ダブル KO マウスの生存率の解析を行った。Bak/Bax

ダブル KO マウスの生存率は、Bak KO マウスの生存率に比して有意に改善したものの、Fas 刺激8時間以降に死亡するマウスが出現し、24時間以内に約半数のマウスが死亡した。死亡原因を検討するため投与6時間後を解析したところ、Bak/Bax KO マウスでも肝臓に多数の TUNEL 陽性細胞の出現を伴って、ALT 値の上昇を認め、やはり肝不全により死亡していると確認された。アポトーシスの指標である DNA の laddering も、Bak KO マウスの Fas 刺激3時間後と同様に Bak/Bax ダブル KO マウスの Fas 刺激6時間後に認められた。また Caspase-3及び7の活性化も、Bak KO マウスの Fas 刺激3時間後と比較すれば弱いものの、Bak/Bax ダブル KO マウスの Fas 刺激6時間後には認められた。Bak/Bax が欠損していても、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出を完全に抑制できていない可能性を考え、肝細胞内のミトコンドリアを電子顕微鏡で観察した。Bak KO マウスの Fas 刺激2時間の肝細胞ではミトコンドリアの膜破壊や、膨化が認められたのに対して、Bak/Bax ダブル KO マウスの Fas 刺激6時間の細胞死を起こしている肝細胞では、ミトコンドリアの破壊や膨化は認めなかった。また放出された cytochrome c は caspase-9 を活性化させることが知られているが、Bak KO マウスのアポトーシスでは caspase-9 の活性化を認めたのに対して、Bak/Bax ダブル KO マウスのアポトーシスでは認めず、遅発性細胞死にはミトコンドリア経路以外の細胞死経路の関与が示唆された。

#### D. 考察と結論

Fas 刺激による早期の肝細胞アポトーシスは、Bak もしくは Bax の片方が保たれていれば支障なく実行されるが、Bak/Bax 両者の欠損で完全に抑制され、Fas 型劇症肝炎による肝不全死の発生率を低下させることが解明された。しかし、Bak/Bax の両者が欠損していても、遅発性の肝細胞アポトーシスによる肝障害は抑制できず、Fas 型劇症肝炎の肝不全死を 0% にすることはできないことも明らかとなった。この遅発性肝細胞死は、Bak/Bax 依存的な早期のアポトーシスに比べゆっくと起こり、弱い caspase の活性に完全に依存しており、ミトコンドリア非依存的なアポトーシス経路が関与している可能性が示唆された。そのため Fas 型劇症肝炎の治療には、Bak/Bax の両者の抑制はある程度生存率を改善させる可能性があるが、さらなる生存率改善にはそれだけでは不十分であり、遅発性細胞死の抑制が必要であると考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T,

Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. (2012) Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol*. 57: 92-100.

2. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 131: 548-557.

##### 学会発表

1. 疋田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞障害が誘導する酸化ストレスと肝発癌. 第54回日本消化器病学会総会. 神戸, 10月10-12日. (oral presentation)
2. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Boston, USA, November 8-12. (oral presentation)
3. Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Wei Li, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. (2012) Bid and Bim are essential regulators involving the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Boston, USA, November 8-12. (oral presentation)

#### 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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

## 分担研究報告書

### 障害肝の再生・修復におけるマクロファージの役割に関する研究

研究分担者 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:** 肝細胞癌は慢性肝炎、肝硬変を背景に発生し、慢性炎症と密接に関連（炎症性発癌）している。本研究では、肝障害とその再生・修復という一つの単位（急性肝障害）で、その修復期の微小環境、なかでも傷害組織の修復に重要な役割を果たしているマクロファージに着目して、肝発癌およびその進展に関わる微小環境を解析した。四塩化炭素で誘導した急性肝障害のピークに遅れて syngeneic な肝癌細胞を脾臓に接種したところ、肝障害のない対照群に比して著明に肝癌結節が発生した。さらに肝癌結節の周囲および内部に VEGF 陽性のマクロファージが集簇し、さらに VEGF 陽性マクロファージが内部に浸潤していた肝癌結節では肝癌細胞自体が VEGF を発現していた。これらの結果から傷害肝の修復のためにマクロファージから産生される VEGF が血管新生を介して肝癌結節の生着、進展に関与していることが示唆された。

傷害組織の再生・修復過程では抗炎症サイトカインのみならず、増殖因子などの血管新生や線維形成に重要な種々の液性因子が作用している。修復期マクロファージは障害肝の再生・修復に重要な役割を果たしているが、傷害組織の修復に重要な VEGF が肝癌結節の生着や進展にも関与していることが推測された。

#### 共同研究者

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  
楠 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  
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  
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  
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

を、特に Gpnmb 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. 急性肝障害の修復過程における肝マクロファージの解析

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) F4/80免疫組織化学染色によるマクロファージの浸潤とその分布
- (2) 肝障害誘導 4 日目に単離した肝マクロファージの FACS 解析
- (3) 蛍光標識ラテックスビーズを用いた CD11b あるいは CD68陽性マクロファージの貪食能の検討
- (4) 四塩化炭素投与 2 日後に Clodronate liposome を腹腔内投与して浸潤マクロファージを欠損させ、肝障害に及ぼす影響を検討した。

##### 2. 急性肝障害モデルにおける Gpnmb の発現と Gpnmb 陽性マクロファージの機能解析

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、下記を検討した。

- (1) Gpnmb の発現を RT-PCR, ウェスタン法, 免疫蛍光染色を用いて検討した。
- (2) 四塩化炭素障害肝から単離したマクロファージの貪食能を蛍光標識ラテックスビーズを用いて検討した。

##### 3. Gpnmb 変異型マウスを用いた検討

Gpnmb 変異型マウス (DBA/2J) および Gpnmb 野生型マウス (DBA/2J-gpnmb+) に四塩化炭素肝障害を誘導し、下記について検討した。

- (1) 血清 ALT 値および組織学的所見
- (2) TGF- $\beta$ , MMP9 および MMP13 の発現 (RT-PCR)
- (3)  $\alpha$  SMA, Ki-67 の免疫染色

#### 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、Gpnmb (osteostatin or DC-HIL) 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。最近、Gpnmb が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 Gpnmb 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、Gpnmb 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