

図1 肝細胞癌に対する肝切除術と生体肝移植後の長期予後
肝切除例の予後は第18回全国原発性肝癌追跡調査報告の肝切除全症例(n=25,066), 生体肝移植例の予後は日本肝移植研究会肝移植症例登録(第二報)の肝細胞癌レシピエント症例(n=805)の結果をもとに生存曲線を作成した。

表1 肝細胞癌に対する肝移植の適応基準拡大の試み

発表施設	発表年	適応基準	
		腫瘍因子	腫瘍マーカー
Milan, Italy ¹⁾	1996年 (n=48)	5 cm 以下単発 3 cm 以下3個以内	
UCSF, USA ^{3,4)}	2001年 (n=168)	6.5 cm 以下単発 4 cm 以下2個以内 腫瘍径合計8 cm 以内	
Kyoto, Japan ⁶⁾	2007年 (n=125)	5 cm 以下 10個以内	PIVKA-II ≤ 400 mAU/mL
Kyushu, Japan ^{7,8)}	2007年 (n=60)	5 cm 以下	PIVKA-II ≤ 300 mAU/mL
Tokyo, Japan ⁹⁾	2007年 (n=78)	5 cm 以下 5個以内	
Japan ¹⁰⁾	2007年 (n=653)		AFP ≤ 200 ng/mL PIVKA-II ≤ 100 mAU/mL
Asan, Korea ⁵⁾	2008年 (n=221)	5 cm 以下 6個以内 肉眼的脈管侵襲なし	
Multicenter ¹¹⁾	2009年 (n=1,556)	腫瘍径+腫瘍個数 = 7	

PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, AFP: alfa-fetoprotein

癌のみならず、その発生母地としての慢性肝障害が原因であることは周知の事実であり、これらを一挙に治癒させ得る肝移植に期待が寄せられた。しかし、欧米での肝細胞癌に対

する肝移植は、当初進行肝細胞癌に施行されていたため移植後早期に癌再発が高頻度に起こり、その成績は惨憺たるものであった。1996年に Mazzaferro ら¹⁾によって提唱され

たミラノ基準により、肝細胞癌でも症例を選択すれば他の良性肝疾患と同等の移植成績が得られることが示され、それ以降肝細胞癌が再び肝移植の良い適応と考えられるようになった。本邦においても2004年1月からミラノ基準を満たす症例に限り、肝細胞癌に対する肝移植が保険適応となった。実際、肝移植症例登録報告(第2報)による肝細胞癌に対する生体肝移植の10年生存率は60%であり、やはり長期予後を目指す場合は明らかに肝移植が勝っており(図1)、肝細胞癌治療の現実的なオプションとして肝移植が本邦でも重要な位置を占めるようになった。2005年版の肝臓診療ガイドラインでは肝移植は肝障害度Cでミラノ基準内の肝細胞癌に推奨されているが、日本肝臓学会(JSH)コンセンサス2007²⁾によるとChild A/Bであってもミラノ基準内で65歳以下であれば現実的には肝移植が施行されていると記載されている。

しかし、腫瘍径や腫瘍個数以外に肝移植後の予後を規定する因子が少なからず存在することは十分予想される。ミラノ基準外症例の中で予後良好例を見逃すことのないような新たな基準での適応決定が模索されるべきであるが、どこまで適応を拡大可能であるかはコンセンサスが得られていないのが現状である。

3

肝細胞癌に対する肝移植適応基準拡大の試み

これまでの肝細胞癌に対する肝移植の適応拡大の試みを表1に示す。まず腫瘍径と個数でミラノ基準を拡大したUCSF基準が2001年にYaoら³⁾によって提唱された。単発例では腫瘍径6.5 cm以内、多発例では腫瘍個数3個以内で最大径が4.5 cm以内かつすべての腫瘍径の合計が8 cm以内というもので1年、5年生存率がそれぞれ90%、75.2%であり、

特にミラノ基準外症例におけるUCSF合致例の2年生存率が86%と良好な成績であった。2007年に同施設から168例における検証の結果が報告されたが、ミラノ基準外症例におけるUCSF合致例の5年無再発生存率が93.6%と極めて良好であった⁴⁾。この基準を適応することでミラノ基準に比べ5~10%の症例の適応拡大がなされると考えられた。Leeら⁵⁾は、221例の肝細胞癌に対する生体肝移植症例の解析を行い、腫瘍個数が6個以下、腫瘍径が5 cm以内、肉眼的脈管侵襲なしの条件(アサン基準)を満たす186例の5年生存率は76.3%であり、基準を満たさない症例の18.9%と比べ有意に良好であった。さらにミラノ基準外症例におけるアサン基準合致例の5年再発率はわずか9.1%であり適応拡大に有用であると報告している。

本邦においても肝細胞癌に対する適応拡大としていくつかの報告がある。Itoら⁶⁾は125例の肝細胞癌に対する生体肝移植症例の解析を行い、術前画像診断にて55例がミラノ基準外であった。この中で、腫瘍個数が10個以下、これらすべての腫瘍の最大腫瘍径が5 cm以内、protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II)が400 mAU/mL以下の条件(京都大学基準)を満たす78例の5年再発率は4.9%であり、基準を満たさない40例の60.5%と比べ有意に良好であった。すなわちミラノ基準外であっても京都大学基準内であればミラノ基準内症例と同等の再発率であったと報告している。Soejimaら⁷⁾は、60例の肝細胞癌に対する生体肝移植症例の解析を行い、術前画像診断にて40例がミラノ基準外であった。予後因子を解析した結果、腫瘍個数にかかわらず腫瘍径が5 cm以内、PIVKA-IIが300 mAU/mL以下(九州大学基準)であればミラノ基準

外であっても適応拡大可能であると報告した。その後、同施設より90例での検証結果も報告されている⁸⁾。Sugawaraら⁹⁾は、78例の生体肝移植例において同様の解析を行い、腫瘍個数が5個以下、腫瘍径が5 cm以内(東京大学基準)であれば予後良好であり、適応拡大の可能性を報告した。さらにTodoら¹⁰⁾は、本邦の49施設における肝細胞癌に対する生体肝移植653例の解析した結果、*alpha*-fetoprotein (AFP) が200 ng/mL以下とPIVKA-IIが100 mAU/mL以下が有意な独立予後因子であった。この基準を満たせば、ミラノ基準外であっても5年無再発生存率は84.3%であったと報告している。

最近、ミラノ基準を提唱したMazzaferroらが適応拡大の可能性を自ら検証した¹¹⁾。36施設において、術前画像診断に基づくミラノ基準外肝細胞癌1,556例のデータを収集して解析を行った。まず、444例(28.5%)もの症例が病理学的にはミラノ基準内であり術前画像診断による適応決定の限界を示した。予後因子の解析では、腫瘍径は増大するとともに直線的にハザード比が増すが、腫瘍個数については3個までは直線的に、その後はごく緩やかにハザード比が増すことがわかった。したがって新たな基準(Up to Seven基準)として、「最大腫瘍径(cm)と腫瘍個数の和が7以下であること」が肝移植のよい適応であると報告した。

4

Up to Seven基準とミラノ基準の比較

ミラノ基準外の進行肝細胞癌症例のうち、予後良好な症例、すなわち肝移植の可能性がある候補者を拾いあげるためにUp to Seven基準が考案されたが、ミラノ基準とUp to Seven基準を他施設で比較した文献が散見さ

れる。D'Amicoら¹²⁾は、肝細胞癌肝移植479例を対象としてミラノ基準とUp to Seven基準を比較しており、ミラノ基準内症例の全再発率は約7%、ミラノ基準外かつUp to Seven基準内症例の全再発率は約11%であり、両基準内の再発リスクは同等であると報告している。さらに、ミラノ基準内症例での肝移植後5年時の再発率は11%、ミラノ基準外症例では39%、Up to Seven基準内症例での肝移植後5年時の再発率は14%、Up to Seven基準外症例では51%であり、Up to Seven基準はミラノ基準と比較して有意に予後を反映するとも報告しており、この基準を適応することでミラノ基準に比べ適応拡大がなされることが考えられた。また、Marshallら¹³⁾は、肝細胞癌肝移植67例の再発リスクについてミラノ基準とUp to Seven基準を検証しており、ミラノ基準内症例、Up to Seven基準内症例での肝移植後5年無再発生存率は約65%、約65%であり、それぞれの基準外症例においての肝移植後5年無再発生存率は約40%、約35%であり、予後予測に関して両基準間では同等であると報告している。一方、Cesconら¹⁴⁾は、肝細胞癌肝移植283例を対象として、術前ミラノ基準内、術前ミラノ基準外かつ術前Up to Seven基準内、術前Up to Seven基準外症例での肝移植後5年無再発生存率は、それぞれ75%、71%、73%と有意差は認めなかったが、組織学的ミラノ基準内、組織学的ミラノ基準外かつ組織学的Up to Seven基準内、組織学的Up to Seven基準外症例での肝移植後5年無再発生存率は、それぞれ78%、70%、58%であり有意に予後を反映していたとし、術前画像診断でのUp to Seven基準は予後予測には統計学的に効果的ではないと報告している。以上より、ミラノ基準外症例中の肝移植候補者は、ミラノ基準外かつUp

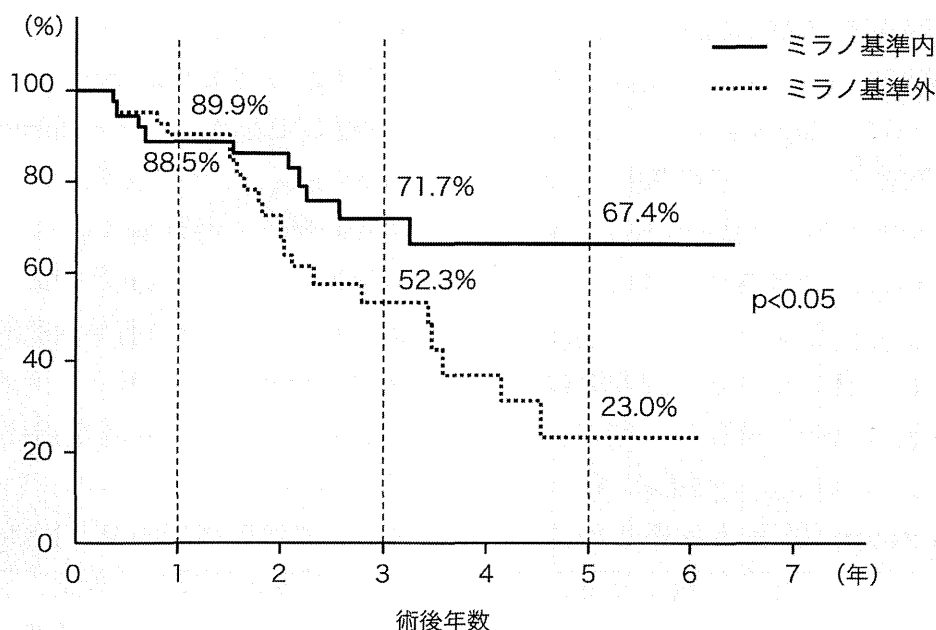


図2 ミラノ基準内・外別肝切除術後生存率

表2 初回ミラノ基準内が肝切除後再発時にミラノ基準内となる因子

要因	再発時ミラノ内 (n=15)	再発時ミラノ外 (n=5)	p値
肝障害度 (A/B/C)	10/5/0	3/2/0	n.s.
AFP (≤ 300 / >300 ng/ml)	11/4	5/0	n.s.
PIVKAII (≤ 300 / >300 mAU/ml)	14/1	2/3	< 0.05
組織学的肝内転移(-/+)	14/1	4/1	n.s.
組織学的血管侵襲(-/+)	13/2	4/1	n.s.
分化度(高/中・低分化型)	4/11	0/5	n.s.
腫瘍個数(≤ 2 / >2 個)	11/4	2/3	n.s.
腫瘍径(≤ 3 / >3 cm)	9/6	3/2	n.s.

AFP : alpha-fetoprotein, PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence or antagonist-II

to Seven 基準内症例中に含まれることより、Up to Seven 基準による適応拡大の可能性が示唆される一方で、Up to Seven 基準はミラノ基準と同等、もしくは予後予測に効果的でないとする可能性も報告されており、Up to Seven 基準による適応拡大については、今後さらなる検討を要する。

自験例において肝細胞癌肝切除症例に対するミラノ基準との関連を検証したところ、ミラノ基準内と基準外症例の肝切除術後1年、

3年、5年累積生存率は、88.5%、71.7%、67.4%と89.9%、52.3%、23.0%でありミラノ基準内で有意に良好であった(図2)。また、肝切除症例において、初回肝切除時にミラノ基準内が再発時に再びミラノ基準内となるのは75%であり、初回肝切除時にミラノ基準外から再発時ミラノ基準内となる割合37%と比べ有意に高かった。さらに、初回ミラノ基準内が再発時に再びミラノ基準内となるための因子はPIVKA-II < 300 mAU/mlで

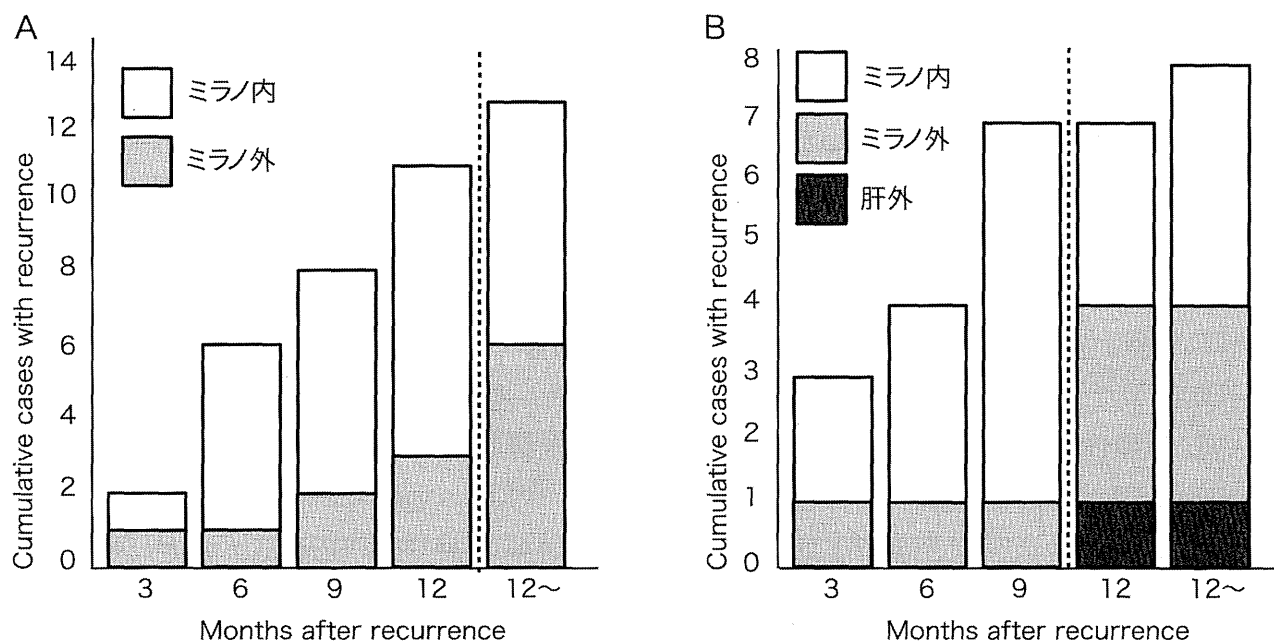


図3

A) 初回ミラノ基準内症例の肝切除術後再発の経時的再発様式

B) 初回ミラノ基準内症例の肝切除術後再発の経時的再発様式

表3 初回ミラノ基準外が肝切除後再発時にミラノ基準内となる因子

要因	再発時ミラノ内 (n=13)	再発時ミラノ外 (n=22)	p値
肝障害度 (A/B/C)	9/2/2	18/4/0	n.s.
AFP (≤300 / >300 ng/ml)	10/3	11/11	n.s.
PIVKAII (≤300 / >300 mAU/ml)	4/9	4/18	n.s.
組織学的肝内転移(-/+)	12/1	13/9	<0.05
組織学的血管侵襲(-/+)	11/2	7/15	<0.05
分化度(高 / 中・低分化型)	2/11	0/22	<0.05
腫瘍個数(≤3 / >3個)	6/7	1/21	<0.05
腫瘍径(≤6 / >6 cm)	12/1	5/17	<0.05*

AFP: alpha-fetoprotein, PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence or antagonist-II

*: 多変量解析でp<0.05

あり(表2), 再びミラノ基準外に逸脱するのは1年以降, つまり肝切除後のサルベージ肝移植の可能性は1年以内であった(図3A). また, ミラノ基準外肝細胞癌切除後再発がミラノ基準内となる因子は腫瘍径<6cmであり(表3), 再び基準外に逸脱, 肝外病変が出現するのは1年以降であった(図3B)¹⁵⁾. そこで, ミラノ基準を拡大して提唱されたUp

to Seven基準についてもサルベージ肝移植の可能性を含めて同様の検証を試みたところ, Up to Seven基準内と基準外症例の肝切除術後1年, 3年, 5年累積生存率は, 97.4%, 80.6%, 71.1%と95.1%, 66.7%, 51.1%でありUp to Seven基準内で有意に良好であった(図4). また, 肝切除症例において, 初回Up to Seven基準内が再発時に再びUp to

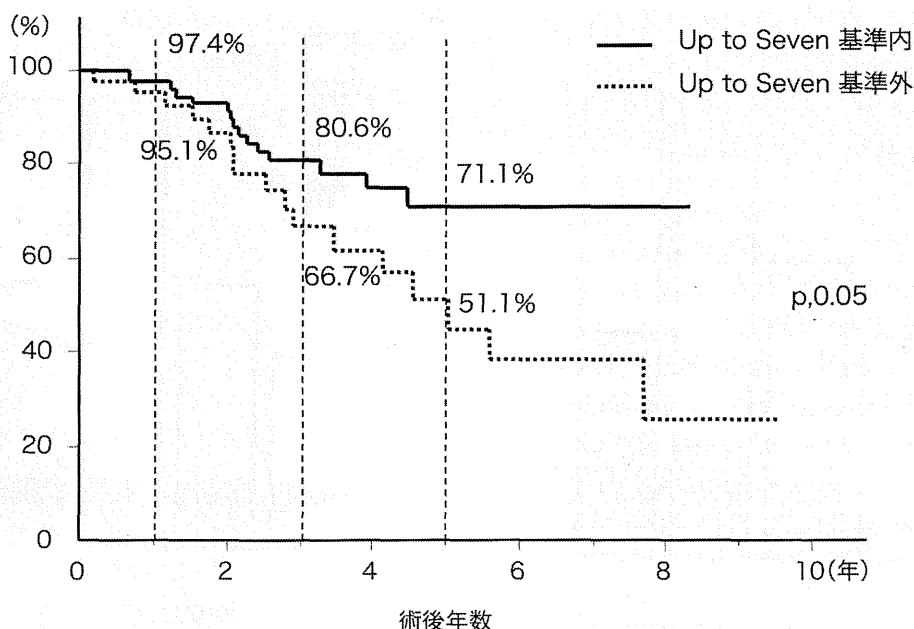


図4 Up to Seven 基準内・外別肝切除術後生存率

表4 初回 Up to Seven 基準内が肝切除後再発時に Up to Seven 基準内となる因子

要因	再発時 Up-to-7 内 (n=36)	再発時 Up-to-7 外 (n=8)	p 値
肝障害度 (A/B/C)	34/1/1	7/1/0	n.s.
AFP (≤ 300 / >300 ng/ml)	28/8	7/1	n.s.
PIVKAI (≤ 400 / >400 mAU/ml)	26/10	2/6	< 0.05
組織学的肝内転移 (-/+)	34/2	7/1	n.s.
組織学的血管侵襲 (-/+)	33/3	6/2	n.s.
分化度 (高 / 中・低分化型)	10/26	1/7	n.s.
腫瘍個数 (≤ 3 / >3 個)	35/1	8/0	n.s.
腫瘍径 (≤ 4 / >4 cm)	33/3	3/5	< 0.05

AFP : alpha-fetoprotein, PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence or antagonist-II
Up-to-7 : Up to Seven

Seven 基準内となるのは 82% であり，初回 Up to Seven 基準外から再発時 Up to Seven 基準内となる割合 43% と比べ有意に高かった。さらに，初回 Up to Seven 基準内が再発時に Up to Seven 基準内となるための因子は腫瘍径 4 cm 以下，PIVKA-II 400 mAU/ml 未満 (表 4)，初回 Up to Seven 基準外が再発時に Up to Seven 基準内となる因子は腫瘍が高分化型であった (表 5)。しかし，再発時に Up to Seven

基準内であった症例が Up to Seven 基準外へ逸脱するまでの期間，すなわちサルベージ肝移植の待機可能な期間には，初回切除時 Up to Seven 基準内と基準外では差はなく，早期に肺転移をきたし逸脱する症例も認められた (図 5A, 図 5B)。したがって Up to Seven 基準をもとに遠隔転移を含めた Up to Seven 基準外への逸脱のリスクや時期を予測することは困難であると考えられた。以上より，

表5 初回Up to Seven基準外が肝切除後再発時にUp to Seven基準内となる因子

要因	再発時Up-to-7内 (n=12)	再発時Up-to-7外 (n=16)	p値
肝障害度 (A/B/C)	12/0/0	14/2/0	n.s.
AFP (≤300 / >300 ng/ml)	9/3	9/7	n.s.
PIVKAI (≤400 / >400 mAU/ml)	1/11	1/15	n.s.
組織学的肝内転移(-/+)	10/2	9/7	n.s.
組織学的血管侵襲(-/+)	9/3	8/8	n.s.
分化度(高 / 中・低分化型)	5/7	1/15	<0.05
腫瘍個数(≤3 / >3個)	7/5	13/3	n.s.
腫瘍径(≤4 / >4 cm)	2/10	0/16	n.s.

AFP : alpha-fetoprotein, PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence or antagonist-II

Up-to-7 : Up to Seven

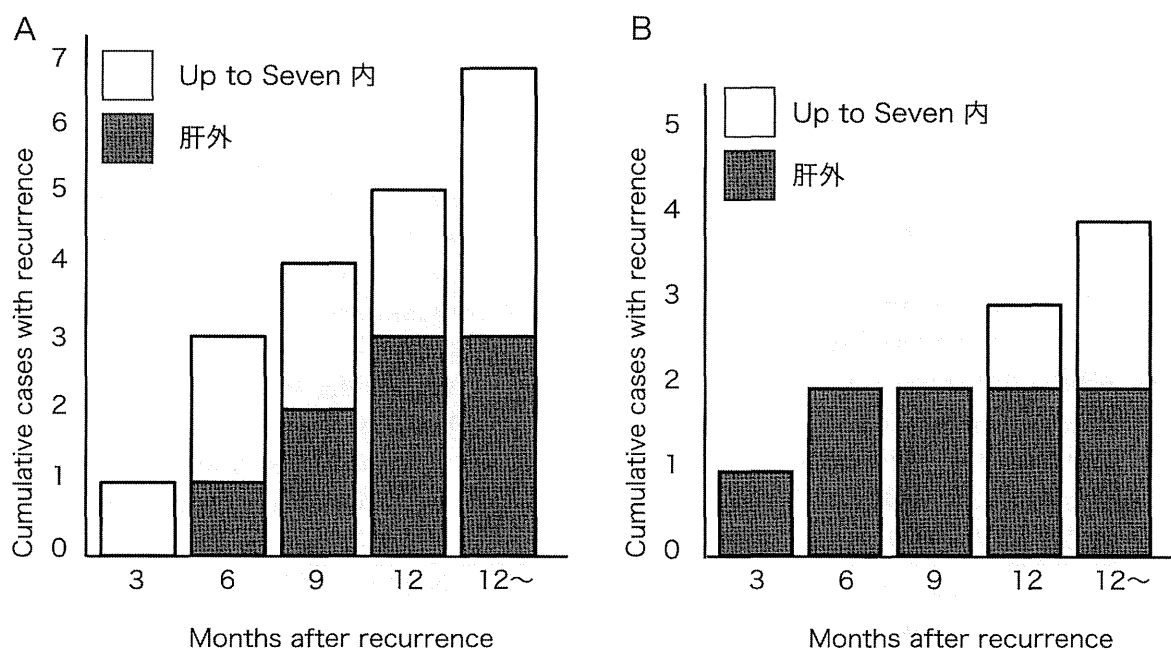


図5

A) 初回Up to Seven基準内症例の肝切除術後再発の経時的再発様式

B) 初回Up to Seven基準外症例の肝切除術後再発の経時的再発様式

Up to Seven基準外肝細胞癌でも高分化型であれば切除後再発時に基準内となる可能性があるが、Up to Seven基準内でも早期にUp to Seven基準外へ逸脱する症例が多く、再発時の肝移植適応評価という点ではUp to Seven基準よりもミラノ基準の方が適していると考えられた。

5 おわりに

肝細胞癌に対する肝移植は10年以上という長期生存を期待し得る有力な治療オプションとなった。画像診断的基準であるミラノ基準は必ずしも肝細胞癌のbiologyを反映しているとはいえないが、ミラノ基準を超える進

行肝細胞癌症例における肝移植後の予後が不良であるのもまた事実である。現在国内外の肝移植施設でミラノ基準の見直しが進んでおり、これまでの腫瘍径と個数をアレンジした適応拡大の試みが多い。今回検討したUp to Seven基準については、ミラノ基準と同様に予後を反映するが、再発時の肝移植適応評価、すなわちサルベージ肝移植適応評価という点では、Up to Seven基準よりミラノ基準の方が適していると考えられた。

文 献

- 1) Mazzaferro V, Regalia E, Doci R et al : Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334 : 693-699, 1996
- 2) 日本肝臓学会：肝癌診療マニュアル，医学書院，東京，2007
- 3) Yao FY, Ferrell L, Bass NM et al : Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 33 : 1394-1403, 2001
- 4) Yao FY, Xiao L, Bass NM et al : Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging. *Am J Transplant* 7 : 2587-2596, 2007
- 5) Lee SG, Hwang S, Moon DB et al : Expanded indication criteria of living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma at one large-volume center. *Liver Transpl* 14 : 935-945, 2008
- 6) Ito T, Takada Y, Ueda M et al : Expansion of selection criteria for patients with hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 13 : 1637-1644, 2007
- 7) Soejima Y, Taketomi A, Yoshizumi T et al : Extended indication for living donor liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Transplantation* 83 : 893-899, 2007
- 8) Taketomi A, Sanefuji K, Soejima Y et al : Impact of des-gamma-carboxy prothrombin and tumor size on the recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Transplantation* 87 : 531-537, 2009
- 9) Sugawara Y, Tamura S, Makuuchi M : Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Tokyo University series. *Dig Dis* 25 : 310-312, 2007
- 10) Todo S, Furukawa H, Tada M et al : Extending indication: role of living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 13 : S48-54, 2007
- 11) Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R et al : Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 10 : 35-43, 2009
- 12) D'Amico F, Schwartz M, Vitale A et al : Predicting recurrence after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma exceeding the up-to-seven criteria. *Liver Transpl* 15 : 1278-1287, 2009
- 13) Marshall AE, Rushbrook SM, Vowler SL et al : Tumor recurrence following liver transplantation for hepatocellular carcinoma: role of tumor proliferation status. *Liver Transpl* 16 : 279-288, 2010
- 14) Cescon M, Ravaioli M, Grazi GL et al : Prognostic factors for tumor recurrence after a 12-year, single-center experience of liver transplantations in patients with hepatocellular carcinoma. *J Transplant* 2010
- 15) Ikegami T, Shimada M, Imura S et al : The Timing of Liver Transplantation After Primary Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma: A Special Reference to Recurrence Pattern and Milan Criteria. *Transplantation* 86 : 641-646, 2008

*

*

*

Q22

肝がん（肝移植も含む）

回答：徳島大学
消化器・移植外科

いむら きとる しまだみつお うつのみやけい
居村 暁，島田光生，宇都宮徹

point

- 2010年4月より肝腫瘍に対する腹腔鏡下肝部分切除術，肝外側区域切除術が保険収載された。
- 腹腔鏡下肝切除術で最も注意すべき術中合併症は，制御不能な出血やガス塞栓であり，適切な対応を要する。
- 肝がんに対する肝移植の累積生存率は，1年84.4%，3年73.9%，5年68.5%，10年58.8%である（日本肝移植研究会・肝移植症例登録報告）。
- 血液型不適合肝移植はリツキシマブ導入により成績は向上している。
- 肝移植後の肝がん再発は，コントロール不能なグラフト内再発，他臓器転移が難治化の重要な一因として挙げられる。

Q 単発肝がんの治療法選択基準を教えてください

A 「科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン」が2009年に改訂され¹⁾，肝障害度・腫瘍個数・腫瘍径の3つの因子を基に設定される治療アルゴリズム（図1）も一部

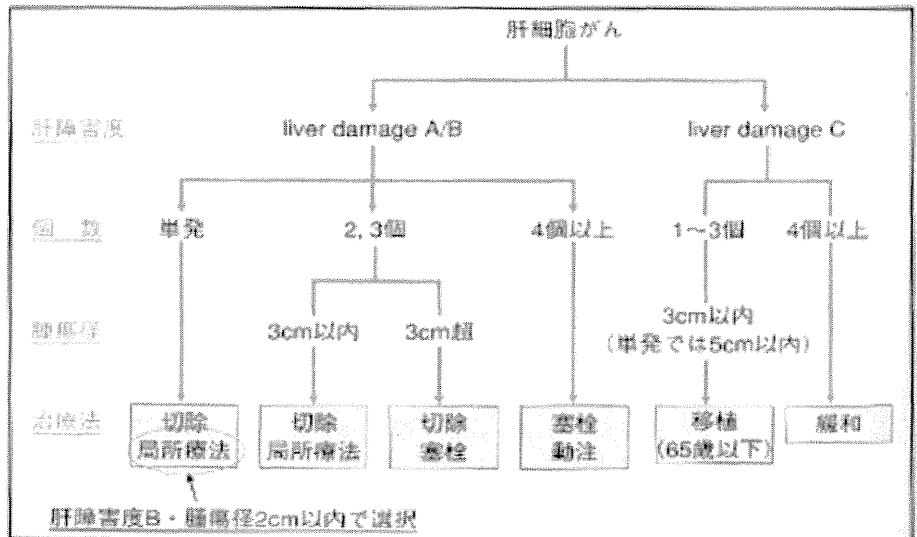


図1 「科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン2009年版」における肝がん治療アルゴリズム（文献1を参照して作成）

注釈が加わりましたが、本質的な治療方針は2005年度版と大きく変わりません。単発肝がんの治療は、腫瘍が単発なら腫瘍径にかかわらず、肝切除が推奨されています。ただし、肝障害度Bの症例で腫瘍径が2cm以内であれば、穿刺局所療法も選択されます。肝障害度Cであれば、腫瘍径5cm以内は肝移植適応（65歳以下、多発例では3cm以内3個ま

で）となっています。

2009年度版の治療アルゴリズムには、「脈管侵襲を有する肝障害度Aの症例では、肝切除・肝動脈塞栓療法・肝動注化学療法が選択される場合がある」という注釈が加わっています。しかしながら、肉眼的脈管侵襲陽性の進行肝がんに対する肝切除後の補助療法については、規定されていません。

Q 腹腔鏡下肝切除術の保険適応術式、施設基準などについて教えてください

A 本邦においては、腹腔鏡下肝切除術は先進医療として特定施設を中心に実施されてきましたが、2010年4月に一部の術式に限り、腹腔鏡下肝切除術が保険収載されました。厚生労働省から告示された施設基準（表1）に適合する病院において、「腹腔鏡下肝部分切除術（肝外側区域切除術を含み、肝腫瘍に係るものに限る）」が保険を適用して施行できるようになりました。適応疾患として、良性腫瘍では腺腫、限局性結節性嚢形成、海綿状血管腫、肝嚢胞などが主なものですが、

近年では悪性疾患（主に肝細胞がんと大腸が

表1 腹腔鏡下肝切除術に関する施設基準

- ①専ら消化器外科に従事しており、腹腔鏡下肝切除術を、当該手術に習熟した医師の指導の下に、術者として、10例以上実施した経験を有する医師が配置されていること。
- ②当該保険医療機関が消化器外科および麻酔科を擁しており、消化器外科において常勤の医師が3名以上配置されていること。
- ③病理部門が設置され、病理医が配置されていること。
- ④緊急手術が可能な体制を有していること。

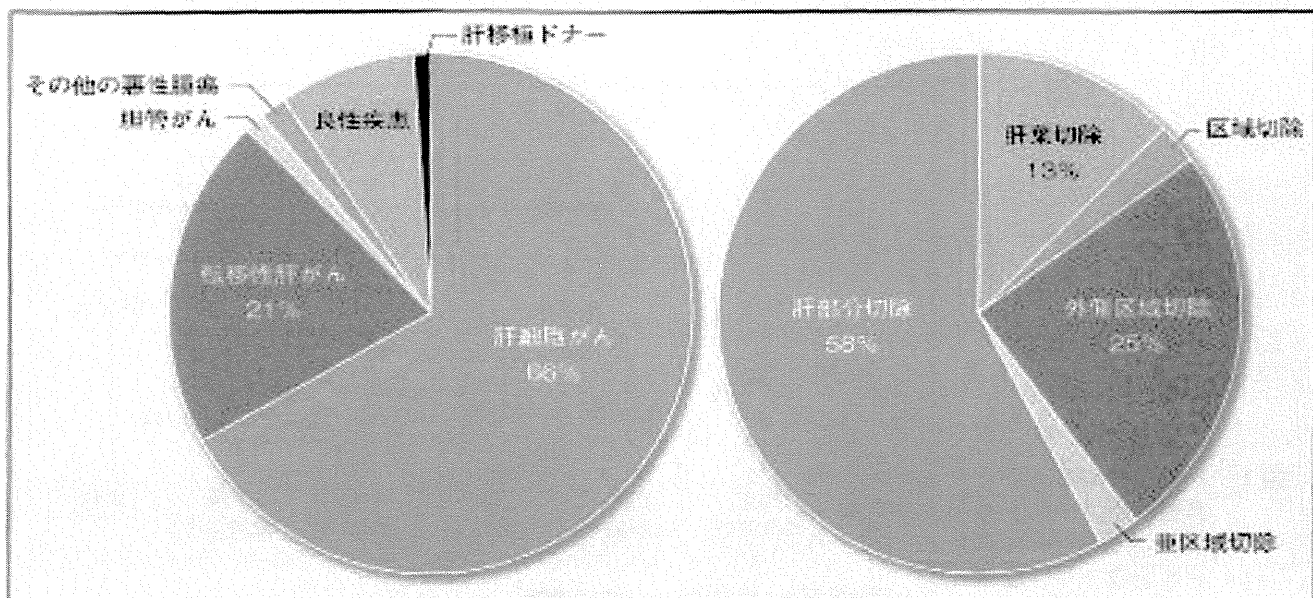


図2 対象疾患の内訳（肝臓内視鏡研究会報告）

ん肝転移)に対する本術式の適応が増加しています。肝臓内視鏡外科研究会で報告されたアンケート調査報告によると、対象疾患では肝細胞がんが66%と最も多く、腹腔鏡下肝切除術の半数以上は肝部分切除術でした(図2)。

腫瘍の存在部位や切除範囲により難易度は異なりますが、腹腔鏡下肝部分切除術の手術適応は、①腫瘍径3cm以下、3個以下の肝

腫瘍、肝外発育型では5cm以下、②太いGlisson鞘や肝静脈を切離ラインに認めない、③開腹肝切除が可能な肝機能、全身状態である、などが一般的です²⁾。最も適した腫瘍占拠部位は、肝両葉の下区域(S3, S4, S5, S6)ですが、肝の授動が十分に行えるなら上区域(S2, S7, S8)にも応用は可能と考えます。



腹腔鏡下肝切除術におけるアプローチ法の違いについて教えてください



腹腔鏡下肝切除術のアプローチ法に関しては、2008年に開催された国際コンセンサス会議の内容「Louisville Statement 2008」に、以下のような定義が示されています³⁾。

①Pure-Lap (pure laparoscopic procedure) : 標本摘出のために小切開を要することもあるが、すべての肝切除手技が腹腔鏡用ポートから施行される。

②HALS (hand-assisted laparoscopic surgery) : 肝切除を容易にするためにハンドポートをあらかじめ設置して行う。一方、Pure Lapで施行中に出血などが

原因で施行困難になりハンドポートを設置する場合は、Pure-Lap with hand-port conversionと定義する。

③Hybrid (hybrid technique) : Pure-LapもしくはHALSで手術を開始したのちに、実際の肝切除は小切開下で行うアプローチをいう。これは本邦で腹腔鏡補助下(laparoscopy-assisted : Lap-Assist)とよばれるものである。

実際にどのアプローチを選ぶかは、正常肝か硬変肝か、腫瘍局在と大きさ、術者の経験と用意できる手術機器に影響されます。



腹腔鏡下肝切除術で用いるエネルギーデバイスは、何がありますか？



肝切除を行う際、肝実質切離、尿管の露出、尿管や切離面の凝固などの手術操作が必要であるが、肝切除術に用いられているエネルギーデバイスにはそれぞれの原理、機能に特徴があり、術者は用途により使い分けしているのが現状です⁴⁾。肝実質切離をとってみても切離する部分が表層部か深部

かにより使用するデバイスも異なります。表層部か深部かの違いは主要尿管が出現するかしないかの違いと言い換えることもできるでしょう。一般的には、肝表層部の実質切離は超音波凝固切離装置(LCS)が適しており、肝実質深層部での尿管露出には超音波外科吸引装置(CUSA)が有用です。ただし自動的

に吸引機能が働くため、気腹圧低下により術野確保の妨げとならないよう気腹下での使用では注意が必要です。ラジオ波を用いたデバイスもいろいろな種類があります。生理食塩水をモノポーラ電極通電時に媒介させて組織凝固させます。Salient Monopolar Sealers (TissueLink®)はその代表的なもので、腹腔鏡手術では先端の形状により Sealing Hook、Floating Ball などが市販されています。CU-SA や TissueLink® に電気メスジェネレーター (VIO®) のソフト凝固モードを併用することで、良好な凝固止血が得られます。その理由は、ソフト凝固では電圧がスパークの発

生する 200 V を超えないように制御されていること (組織炭化がない)。また生理食塩水が介在することで、組織周囲の電流が流れやすくなることから、比較的低温でかつ広範囲の凝固が可能になるからです。また、血管を含んだ肝実質組織を凝固・切離できるデバイスとして、EnSeal® や LigaSure® があります。脈管、組織の sealing 効果に優れており、さらにそのまま組織の切離も行えるため、肝実質切離時間の短縮も期待できます。ただし、エネルギーデバイスの長所・短所を熟知したうえで適切に使い分けることが安全な腹腔鏡下肝切除につながるといえます。

Q 腹腔鏡下肝切除術を行う際に注意すべき術中合併症とその対策について教えてください

A 肝切除術に限ったことではありませんが、腹腔鏡下肝切除術において最も注意すべき術中合併症は出血とガス塞栓です。

腹腔鏡下肝切除における出血回避は基本的には開腹肝切除と同じであるため、開腹でも出血しやすい場所、例えば肝静脈根部、横隔膜下静脈流入部位、右葉転位時の副腎などに十分注意する必要があります。肝切離時、実

質臓器である肝からの出血に対する対策としては、マイクロ波やラジオ波を用いての pre-coagulation (前凝固) を肝切離予定線に沿って行うことが有用です (図3)。肝表層部より pre-coagulation 後に肝実質切離を行い、深部に向かって切離を進める場合は、適宜 pre-coagulation を追加していくと良好な出血コントロールが可能になります。また、肝の

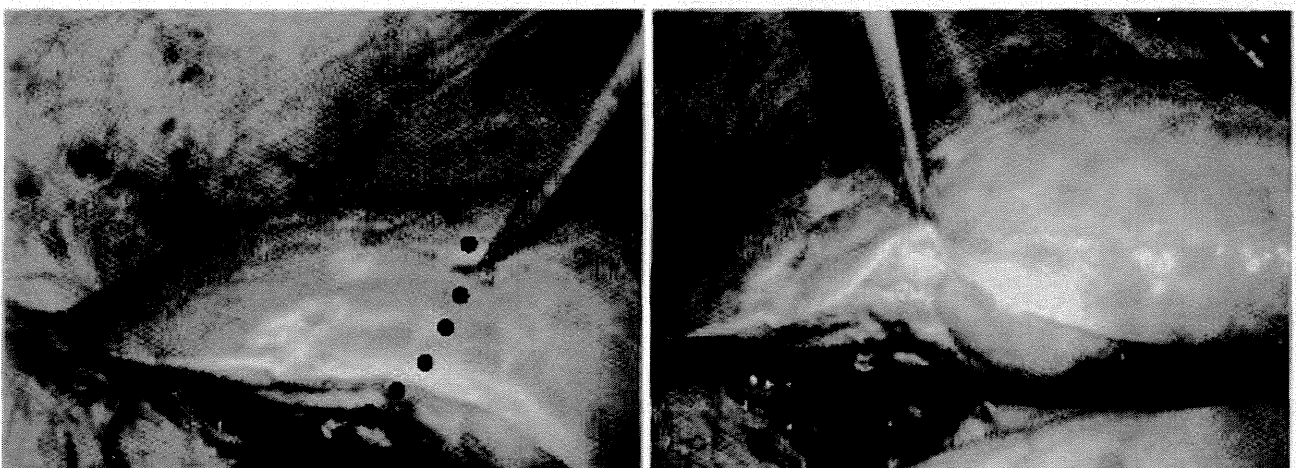


図3 マイクロ波凝固を用いた前凝固
切離予定線 (点線) に沿って、マイクロ波凝固 (MCT) で前凝固していく。

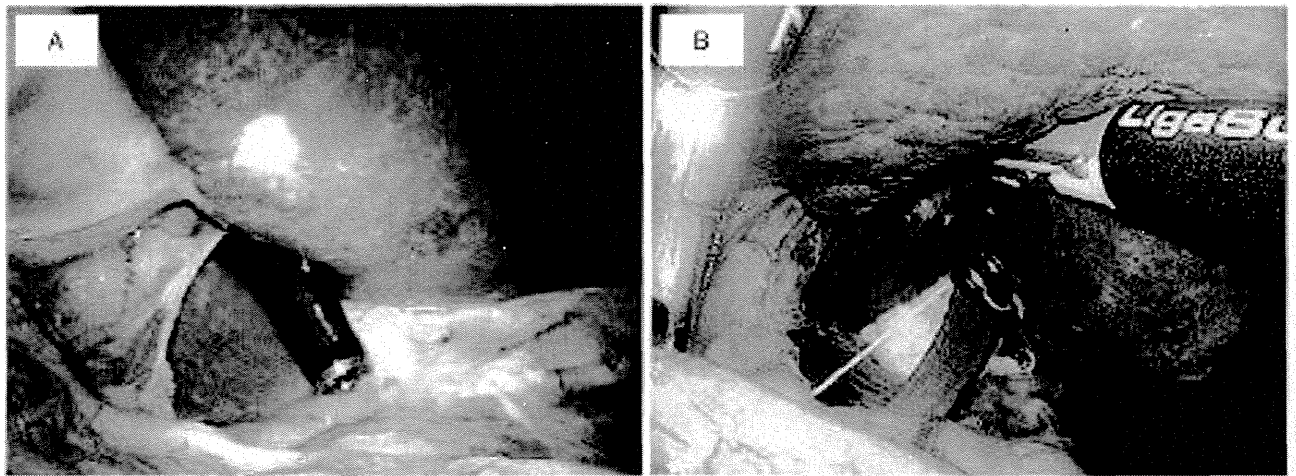


図4 (A) 胆道鏡、(B) EndoRetract™ Maxiを用いた肝十二指腸靱帯のテーピング

inflow・outflowをコントロールすることも出血への対策として有用です。肝表面の小病変はpre-coagulation後に超音波凝固切開装置(LCS)やvessel sealing device(LigaSure®)などを使ってPringleなしで切除可能と思われていますが、系統的切除などの切除範囲の大きな術式ではPringleや場合によっては肝下部大静脈のテーピングが必要となります。Pringle用に肝十二指腸靱帯をテーピングする際は胆道鏡やEndoRetract™ Maxiを用いる方法など安全にテーピングを行ういくつかの工夫があります(図4)。実際に出血した場合に開腹手術と大きく異なるのは、用手的に圧迫止血ができないということです。鉗子を持ったガーゼで圧迫止血を行い、出血が弱まった時点で何を損傷したのかを確認し、状況に応じてクリップをかける、マイク

ロ波やラジオ波で凝固するといった止血操作を試みます。コントロール不能な出血であれば、小開腹下腹腔鏡補助、あるいは開腹へ移行せざるを得ません。

腹腔鏡下肝切除に限らず腹腔鏡下手術において炭酸ガス塞栓が起これば、突然の血圧低下や不整脈・徐脈が出現します。循環動態の変動をきたすようなガス塞栓の場合、呼気終末二酸化炭素濃度の低下により発見されることが多く、低下を認めた際には、経食道心エコーや胸壁ドップラーで心雑音の検査を行います。気腹を止めて、笑気投与を中止し、純酸素を投与します。また、体位は低頭位、左側臥位として右房カテーテルから炭酸ガスを吸引・除去します。ガス塞栓が起きたときの迅速な対応はもちろん大切ですが、起こさないような工夫を心がけることが重要です。

Q 肝がんに対する生体肝移植の適応基準と成績について教えてください

A 肝がんに対する治療法として肝切除やラジオ波凝固などの局所療法が主に選択されますが、肝がんの発生母体であるウイルス性肝炎・肝硬変により生じる高率な再発が問題です。非代償性肝硬変では肝がんに対

する局所治療や、抗ウイルス療法など背景肝に対する治療を行うことは困難であります。生体肝移植は、肝がんのみならず背景にある肝硬変も一挙に治療させうる究極の治療法であり、肝切除後の予後と比べ長期予後が良好

であるのが最大のメリットといえます(図5)。

本邦でも2009年末までに1131例(成人生体肝移植のうち32.3%)の肝細胞がんに対して生体肝移植が施行されています¹⁾。その成績を背景肝病変別にみると、HCVが1年83.6%、3年71.8%、5年65.7%、10年53.4%、HBVが1年86.0%、3年79.0%、5年73.4%、10年67.5%、アルコール性が1年84.9%、3年73.7%、5年73.7%と報告されています¹⁾。肝がん全体の肝移植成績をみると、2003年の報告(n=208)では累積生存率が1年76.1%、3年67.2%、5年62.0%、2006年の報告(n=652)では1年82.2%、3年71.0%、5年66.5%、10年61.6%、2010年の報告(n=1131)では1年84.4%、3年73.9%、5年68.5%、10年58.8%となっており短期成績は向上しています¹⁻³⁾。

肝硬変合併肝がんに対する肝移植の保険適応は、1996年に発表されたミラノ基準²⁾(脈

管浸潤がなく5cm以下単発もしくは3cm以下3個以内)に準じており、「科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン」でも肝障害程度Cでミラノ基準を満足する症例が肝移植の適応としています¹⁾。しかし、本邦では生体肝移植がほとんどであるため、「科学的根拠に基づく肝臓診療マニュアル」ではChild-Pugh A/B症例でもミラノ基準を満たす再発例(稀に初発例)では、生体肝移植が選択されることがあるとされています³⁾。生体肝移植の特殊性、つまり特定の肝がん患者に対して特定のドナーが存在することから、十分なインフォームドコンセントのもとであればミラノ基準を逸脱する肝がんであっても保険適応外ではあるものの、移植適応として各施設で基準を決めて行われています(表2)。当初、ミラノ基準による成績は4年生存率が75%(無再発生存率83%)とそれ以前の症例に比べ、肝がんへの移植成績は向上し、肝がんでも症例を選択(再発リスクの少ない)す

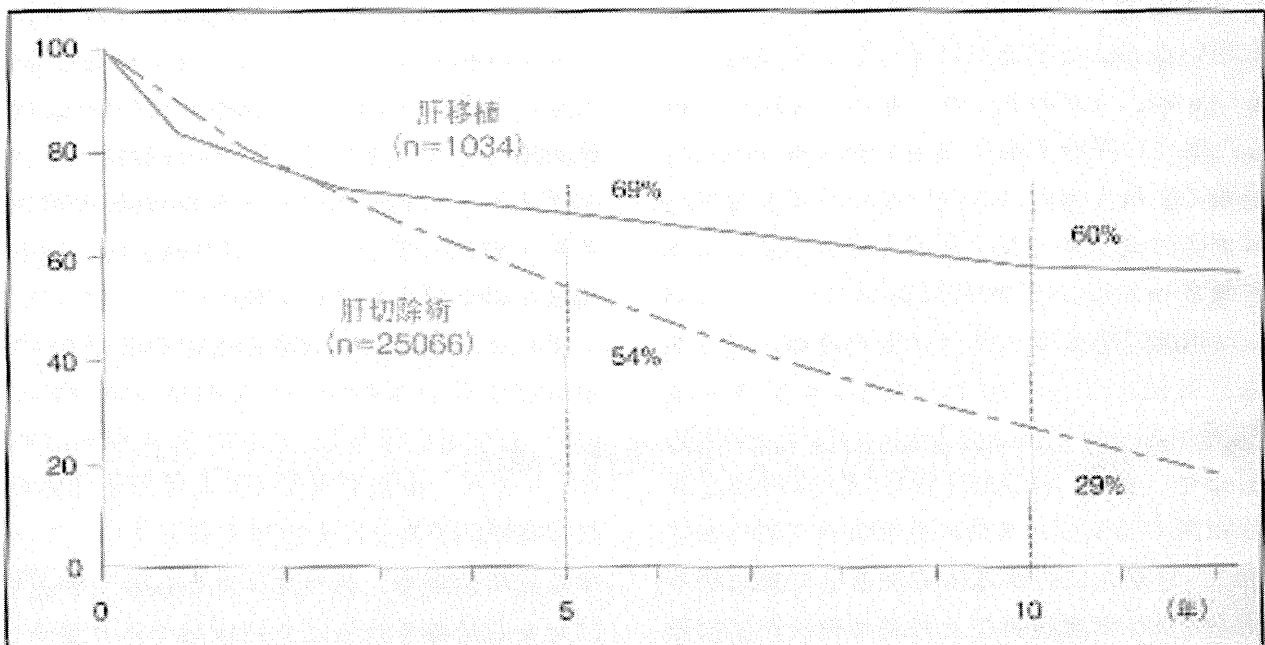


図5 肝がんに対する長期成績—肝移植と肝切除術—

第18回全国慢性肝炎疫学調査報告(2004-2006)
 (日本肝臓病研究会の調査委員会)
 肝移植症例登録報告(日本移植学会雑誌, 2009)

表2 肝細胞がんに対する肝移植適応基準

	適応基準	5年生存率
Milan 基準	腫瘍径 ≤ 5 cm・単発もしくは腫瘍径 < 3 cm・腫瘍数 ≤ 3 個	73.3%
Up-to-seven 基準	腫瘍最大径 (cm) と腫瘍個数の和が7以内	71.2%
UCSF 基準	腫瘍径 ≤ 6.5 cm・単発もしくは腫瘍径 ≤ 4.5 cm・腫瘍数 ≤ 3 個 (トータルの直径が8 cm 以下)	75.2%
東京基準	腫瘍径 ≤ 5 cm, 腫瘍数 ≤ 5 個	91%
京都基準	腫瘍径 ≤ 5 cm, 腫瘍数 ≤ 10 個, PIVKA-II 値 ≤ 400 mAU/mL	87%
訪田 Asan 基準	腫瘍径 ≤ 5 cm, 腫瘍数 ≤ 6 個	76%

(全基準ともに脈管浸潤を伴わない症例を対象)

ることで他の良性疾患に対する肝移植と同等の成績が担保できること示されましたが、東京基準では腫瘍径5 cm 以下、腫瘍個数5 個以下という基準で5 年生存率は91%、京都基

準では腫瘍径5 cm 以下、腫瘍個数10 個以下 PIVKA-II 400 mAU/mL 以下という基準で5 年生存率は87%と良好な成績が報告されています。

Q 血液型不適合肝移植の成績と周術期管理について教えてください

A 本邦の生体肝移植症例のうち血液型不適合肝移植が占める割合は、いちばん最近の報告では10.3%となっています。レシピエントとドナーの血液型適合度別の予後は、不適合群が1年74.6%、3年70.2%、5年68.2%、一致群が1年84.4%、3年80.2%、5年77.8%、適合群は1年83.4%、3年79.3%、5年76.9%であり、不適合群は一致群、適合群に比べ有意に予後が悪かったと報告されています⁹⁾。

血液型不適合移植では通常の臓器移植で見られる細胞性免疫拒絶に加え液性免疫拒絶 (antibody mediated rejection: AMR) が問題となり、術後の抗体価上昇がAMRの有意な危険因子であると本邦の全国集計で明らかになりました⁹⁾。これまでに不適合移植における合併症を予防するため血漿交換、交換輸血といった血液浄化療法、抗体産生抑制目的での脾摘、さらに免疫抑制プロトコルの強化など、さまざまな工夫がなされてきました。

2000年以降では、グラフト内 (局所) でのDIC予防 (肝血管内皮炎の抑制) を目的とした門注、肝動脈からの持続注入療法やB細胞抑制による抗体産生抑制を目的として、抗CD20抗体 (リツキシマブ: リツキサン[®]) が導入されるようになり、血液型不適合肝移植の成績も一段と向上しました。最近では免疫グロブリン (IVIg) がAMRの抑制に有用であるという報告もあり^{10,11)}、今後さらなる成績向上が期待されます。

図6に当科での血液型不適合プロトコールを示します。リツキサン[®]は術前3週間前に500 mg/body 投与し、CD20抗体価をフォローします。劇症肝炎などの急性肝不全症例では術前日であっても投与するようにしています。血漿交換はAB型の凍結血漿を用いて行い、目標抗体価を16倍以下としています。原則的には左葉グラフトを用いており、グラフト肝門索から門脈内にカテーテルを留置し、再灌流後よりPGE₂などを門脈内注入し

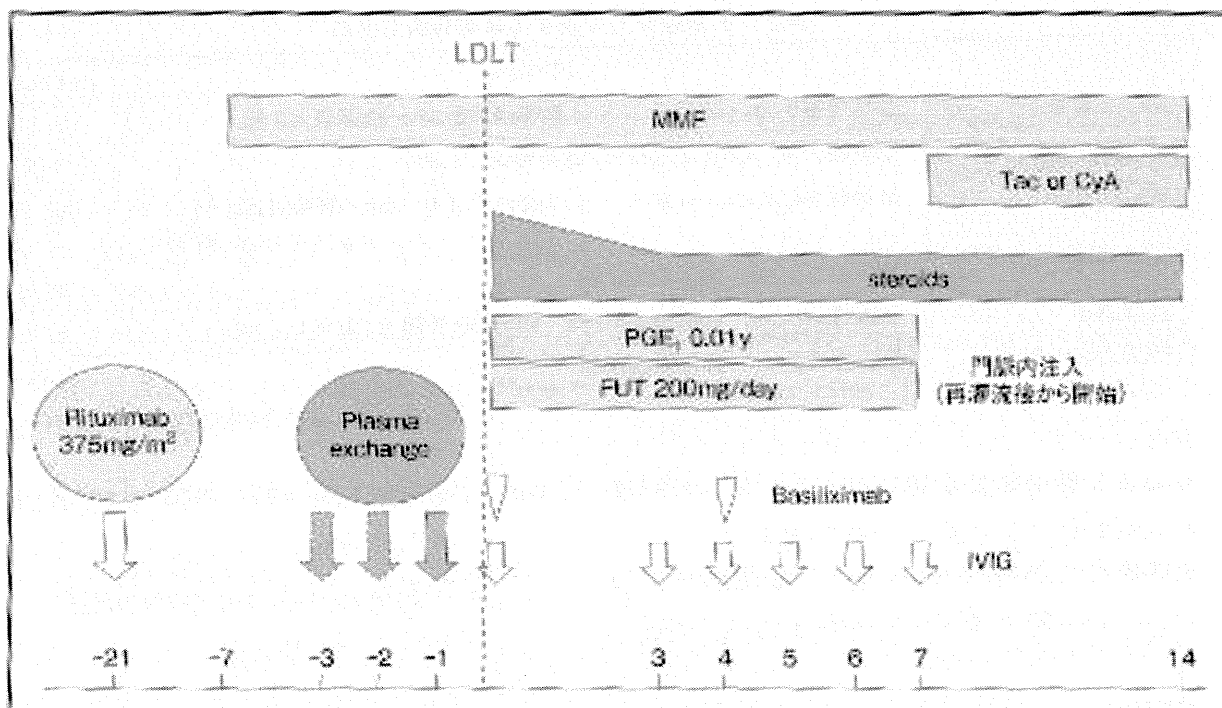


図6 当科での血液型不適合肝移植における周術期プロトコール

ています。C型肝炎症例でなければ脾摘は行いません。また、作用機序が不明な部分もありますが、抗体関連拒絶を予防する目的で、術中・術後にグロブリン (IVIG) を大量投与 (0.5 g/kg) しています。このように、血液型不適合肝移植症例では強力な免疫抑制療法を行うため、C型肝炎症例では血液型一致・適合でのC型肝炎レシピエントより移植後のC型肝炎治療が難しいため、当科では、シクロスポリンと併用するベグインターフェロンおよびリバビリンを低用量で導入することで、コンプライアンス向上に努めています(図7)。

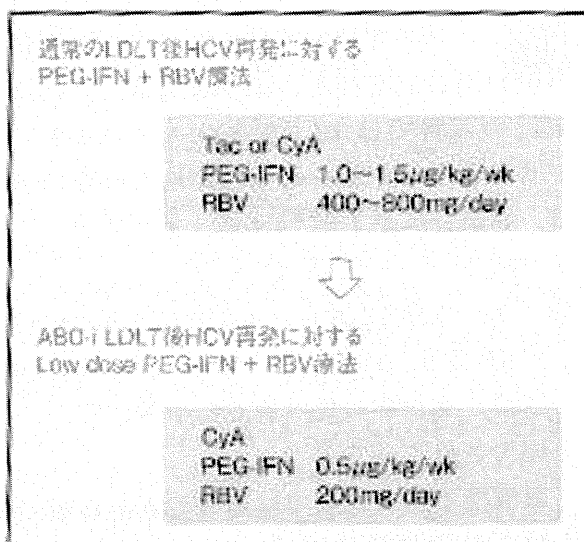


図7 血液型不適合肝移植後の低用量ベグリバ療法 (Low dose PEG-IFN+RBV療法)

Q 肝移植後の肝がん再発について教えてください

A 肝移植後の肝がん再発を規定する因子を考えるうえで、肝切除やラジオ波凝

固局所治療後の再発と異なる点は、肝移植後の再発では多中心性発がんや肝内転移再発は

存在せず、すべて循環血中に浮遊するがん細胞あるいは移植時、すでに肝以外の臓器に存在していた micrometastasis (微小転移巣) による再発であるという点です。肝移植後の肝がん再発は、コントロール不能なグラフト内再発、他臓器転移が難治化の重要な一因として挙げられます。肝がんに対する肝移植後の再発危険因子として AFP や PIVKA-II 高値が報告されていますが、micrometastasis を術前に検索しうる方法は、現在のところ確立されたものではありません。また、肝移植後

の肝がん再発に対する治療についても、現時点で明確な指針はありません。

肝移植前に肝がんに対して TACE などの局所治療を再発防止目的に行うのはどうかという点に関しては、「科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン」で「肝移植前の肝細胞癌に対する治療は予後を改善するか?」という CQ に対して「肝移植前の肝細胞癌に対する治療が予後を改善する十分な科学的根拠はない」(グレード C1) と記載されています¹¹⁾。

[文 献]

- 1) 日本肝臓学会 編: “科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン 2009 年版”, 金原出版, 2009
- 2) 肝臓内視鏡外科研究会 監修, 金子弘真, 若林剛 編著: “腹腔鏡下肝切除術”, 南山堂, 2010
- 3) Buell JF, Cherqui D, Geller DA et al: World Consensus Conference on Laparoscopic Surgery: The international position on laparoscopic liver surgery: The Louisville Statement, 2008. *Ann Surg* 250: 825-830, 2009
- 4) 日本肝移植研究会: 肝移植症例登録報告, 移植 45: 621-631, 2010
- 5) 日本肝移植研究会: 肝移植症例登録報告, 移植 38: 401-408, 2003
- 6) 日本肝移植研究会: 肝移植症例登録報告, 移植 41: 599-608, 2006
- 7) Mazzaferro V, Regalia E, Doci R et al: Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 14 334: 693-699, 1996
- 8) 日本肝臓学会 編: “肝癌診療マニュアル”, 医学書院, 2007
- 9) Egawa H, Teramukai S, Haga H et al: Present status of ABO-incompatible living donor liver transplantation. *Hepatology* 47: 143-152, 2008
- 10) Ikegami T, Taketomi A, Soejima Y et al: Successful ABO incompatible living donor liver transplantation in a patient with high isoagglutinin titer using high-dose intravenous immunoglobulin. *Transplant Proc* 39: 3491-3494, 2007
- 11) Ikegami T, Taketomi A, Soejima Y et al: Rituximab, IVIG, and plasma exchange without graft local infusion treatment: a new protocol in ABO incompatible living donor liver transplantation. *Transplantation* 88: 303-307, 2009

Significance of Alanine Aminopeptidase N (APN) in Bile in the Diagnosis of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation

Chiwan Kim, M.D.,* Shintaro Aono, M.S.,† Shigeru Marubashi, M.D., Ph.D.,*,¹ Hiroshi Wada, M.D., Ph.D.,* Shogo Kobayashi, M.D., Ph.D.,* Hidetoshi Eguchi, M.D., Ph.D.,* Yutaka Takeda, M.D., Ph.D.,* Masahiro Tanemura, M.D., Ph.D.,* Nobuaki Okumura, Ph.D.,† Toshifumi Takao, Ph.D.,‡ Yuichiro Doki, M.D., Ph.D.,* Masaki Mori, M.D., Ph.D.,* and Hiroaki Nagano, M.D., Ph.D.*

*Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; †Laboratory of Homeostatic Integration, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan; and ‡Laboratory of Protein Profiling and Functional Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

Submitted for publication November 29, 2010

Background. Allograft dysfunction after liver transplantation requires histopathologic examination for confirmation of the diagnosis, however, the procedure is invasive and its interpretation is not always accurate. The aim of this study was to find novel protein markers in bile for the diagnosis of acute cellular rejection (ACR) after liver transplantation.

Materials and Methods. Quantitative proteomic analysis using the ¹⁸O labeling method was used to search for bile proteins of interest. Nine recipients were selected who had liver dysfunction, diagnosed by liver biopsy, either with ACR (ACR group, $n = 5$) or without (LD group, $n = 4$). Donor bile samples were obtained from nine independent live liver donors. Enzyme activity in bile samples was assayed and liver biopsy specimens were immunostained for candidate protein of ACR.

Results. The analysis identified 78 proteins, among which alanine aminopeptidase N (APN/CD13) was considered a candidate marker of ACR. Comparative analysis of the ACR and LD groups showed high APN enzyme activity in three (60%) of five cases of the ACR group, while it was as low as donor level in all patients of the LD group. APN enzyme activity in bile samples of liver dysfunction liver transplantation (LDLT) recipients of the ACR group collected within 3 d before biopsy-confirmed ACR ($n = 10$) was significantly higher (584 ± 434 U/g protein) than in those of recipients free of ACR ($n = 96$, 301 ± 271 U/g protein)

($P = 0.004$). APN overexpression along bile canaliculi was observed during ACR in all five cases of the ACR group.

Conclusion. APN in bile seems to be a useful and noninvasive biomarker of ACR after liver transplantation. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key Words: living donor liver transplantation; bile; alanine aminopeptidase N (APN); acute cellular rejection; proteomic analysis; ¹⁸O labeling method.

INTRODUCTION

Liver transplantation (LT) is a widely accepted as an effective and life-saving treatment for end-stage liver disease or acute liver failure. Despite improvement in immunosuppressive therapy and continuous advances in surgical techniques, the patient and graft survival rates after liver transplantation remain around 80% at 1 y and 70% at 5 years according to the databases of the United Network for Organ Sharing (UNOS) and Japanese Liver Transplant Society. The suboptimal outcome is due to the complexity of management of allograft liver function. Acute cellular rejection, recurrence of viral hepatitis, *de novo* hepatitis, drug-induced hepatitis, and/or other causes of allograft dysfunction occur during the early period after liver transplantation, and some of these pathologies could mimic the histologic and clinical presentation of each other, which emphasizes the need for the development of new techniques for accurate diagnosis of early allograft dysfunction. Acute cellular rejection (ACR) accounts for 7% to 42% of living liver transplant recipients [1–3], but other conditions should be always

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita city, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: smarubashi@gesurg.med.osaka-u.ac.jp.



considered in the differential diagnosis. Therefore, a feasible and reproducible diagnostic method for ACR is important in clinical practice.

In kidney transplantation, urinary enzymes or low-molecular weight proteins are considered useful markers of ACR during the early post-transplantation period [4, 5]. Other biomarkers of ACR after renal transplantation are being investigated at present using proteomic analysis of urine [6, 7]. Analogous to kidney transplantation, several studies reported the identification of serum and bile biomarkers of ACR after liver transplantation [8–15]. Our group reported previously that interleukin-6 (IL-6) in bile correlated with ACR after liver transplantation in rats and deceased liver transplantation in human [16, 17]. Another group reported that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bile was associated with ACR after liver transplantation [8, 9]. However, a subsequent study from another group showed that these protein markers in bile were not associated with ACR [12] after liver transplantation. Thus, no specific biomarker in bile associated with ACR in liver transplantation is yet available.

In the present study, we used ^{18}O labeling-based proteomic analysis of bile after liver transplantation to identify candidate proteins in bile that can predict allograft rejection. The proteomic analysis identified the enzyme alanine aminopeptidase N (APN/CD13) as a candidate marker for ACR after liver transplantation. In the second part of the study, we evaluated APN in clinical samples of the donors and recipients of liver transplantation. The results indicated that APN seems to be a useful and noninvasive marker for ACR after liver transplantation.

MATERIALS AND METHODS

The present prospective study was approved by the Human Ethics Review Committee of Osaka University, and a signed consent form was obtained from each patient.

Quantitative Bile Analysis by ^{18}O Labeling Method to Identify Biomarkers of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation

Bile Samples

To identify novel candidate biomarkers of bile proteins for ACR after liver transplantation, we first analyzed three bile samples [obtained on postoperative day (POD) 1, 4, and 14] from a single liver transplant recipient who developed ACR, in whom ACR was confirmed by histopathology of liver biopsy on POD7. The patient showed improvement of liver function tests on POD14 following steroid recycle therapy, and a repeat liver biopsy on POD14 showed amelioration of ACR. Relative quantitative protein analysis using ^{18}O labeling was applied to this set of bile samples from this recipient.

Preparation of Bile Sample

The crude bile sample (protein concentration: 1.0 mg/mL) was centrifuged at 4°C, 14,000 rpm for 60 min by using microcon YM-10 (MWCO 10 kDa) (Millipore, Bedford, MA) for desalting and concentration. The sample was washed with 100 μL of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) by centrifugation at 4°C, 14,000 rpm for 60 min. The resultant protein fraction was dissolved in lysis buffer [8 M urea and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)] and incubated at 37°C for 30 min, and then reduced with 25 mM dithiothreitol (DTT) at 37°C for 3 h, followed by alkylation of the thiols with 55 mM iodoacetamide in the dark for 30 min. The protein concentration was determined by the Bradford method (Pierce, Rockford, IL).

SDS-PAGE and In-Gel Digestion

The proteins (200 μg per lane) were separated by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, the gel was stained with Sypro-Ruby solution. Each lane was cut into 20 contiguous slices at the same position in the gel. All gel slices were incubated in a solution of 100 mM NH_4HCO_3 and 30% acetonitrile at 40°C for 30 min, and the supernatant was discarded; this process was repeated twice. All gel slices were placed in 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, and then subjected to in-gel digestion with lysylendopeptidase (substrate:enzyme ratio, 50:1) at 37°C, overnight. The protein digest was applied to a reverse-phase resin (InertSep RP-1; GL-Science, Tokyo, Japan) for desalting, and the effluent was dried under vacuum.

Post ^{18}O Labeling

The digested peptides, derived from bile samples harvested on POD1, POD4, and POD14, were re-dissolved in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 9.0), prepared with H_2^{16}O and H_2^{18}O , respectively, and incubated overnight with lysylendopeptidase (substrate:enzyme ratio, 200:1) at 37°C. Then, the samples were boiled at 100°C for 10 min for inactivation of the enzyme. Equal amounts of the ^{18}O -labeled (POD4) and non-labeled peptide pools (POD1 or POD14) were mixed and desalted with InertSep RP-1. The mixtures of POD1+POD4 and POD4+POD14 were subjected to strong cation-exchange(SCX)-high performance liquid chromatography(HPLC).

SCX-HPLC, Nano-Flow RP-HPLC, and Protein Identification by MALDI-MS/MS

The peptides were applied to a column (TSK-Gel SP-2SW I.D. 1.0 \times 150 mm) in the LC system (Agilent 1100series, Agilent Technologies), and eluted into 20 fractions by using a linear gradient (solution A, 10 mM phosphate, pH 3.2, 10% CH_3CN , versus solution B, 1 M NaCl in solution A). Each of the 20 fractions was further separated using a C_{18} Pepmap column (0.075 \times 150 mm, Dionex, Sunnyvale, CA) in an Ultimate nano-LC system (Dionex). A linear gradient using solvent A (0.1% trifluoroacetic acid in water) and solvent B (0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile) were used for the separation; the peptides were eluted by increasing solvent B from 5% to 25% over a period of 55 min, and then from 25% to 50% over a period of 20 min, at a flow rate of 200 nL/min. The effluents were monitored at 214 and 280 nm, and directly blotted onto a flat surface of a stainless steel plate [a matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) sample plate]. Thereafter, the matrix solution (5 mg/mL of α -CHCA) was blotted manually onto each sample spot, and then air-dried.

The overall protein identification was carried out by the MALDI-TOF/TOF (4700 proteomics analyzer, Applied Biosystems, Framingham, MA) followed by database search using Mascot ver. 2.0 (Matrix Science, Manchester, UK). Ions were generated by irradiating the sample area with a 200 Hz Nd:YAG laser operated at 355 nm. Calibration was performed using $[\text{M} + \text{H}]^+$ ions of a mixture of angiotensin I (m/z 1296.6), dynorphin (m/z 1604.0), ACTH (1-24) (m/z 2932.6), and β -endorphin (m/z 3463.8).

Western Blot Analysis

Each bile sample was diluted by 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) and 20 μ g of bile protein was electrophoresed onto 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to Immobilon PVDF membrane (Millipore). After the addition of a blocking solution (5% nonfat dry milk, 0.1% Tween-20, and PBS), the membrane was incubated overnight with the recommended dilution of goat anti-CD13 (APN) polyclonal antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The primary antibodies were washed in a solution of 0.05% Tween-20 and PBS and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Proteins were visualized using enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) followed by exposure to X-ray film.

Evaluation of APN in Bile Samples After Living Donor Liver Transplantation

Patients

A total of 53 patients underwent living donor liver transplantation between June 2004 and January 2009 at our hospital. The inclusion criteria for the study were living donor liver transplant recipients with liver dysfunction within 3 months after liver transplantation. The latter was confirmed by liver biopsy with the diagnosis of either ACR or liver dysfunction other than ACR (nonACR). Donor bile samples were also obtained from nine live liver donors.

The immunosuppressants used after liver transplantation included tacrolimus or cyclosporine A, with or without mycophenolate mofetil (MMF) and corticosteroids. Following the histopathologic diagnosis of ACR, steroid recycle therapy was started with 1 g of methylprednisolone, followed immediately by steroid tapering to 20 mg/d. After the steroid recycle therapy, a second liver biopsy was obtained to confirm the allograft status and establish the effect of treatment on ACR.

Allograft dysfunction was defined as serum total bilirubin greater than 2.0 mg/dL and/or increased levels of aspartate aminotransferase (AST) and/or alanine aminotransferase (ALT) above the normal ranges. The diagnosis of ACR was based on histopathological examination conducted by two independent expert transplant pathologists. We classified recipients with liver dysfunction into two groups, liver dysfunction with ACR (ACR group) and liver dysfunction without ACR (LD group).

Bile Sample Collection

Bile samples were collected from living donors from the common bile duct *via* 3 Fr tube during surgery. Bile samples were collected from the biliary external drainage tube inserted into the bile duct during liver transplantation. Bile samples from the liver transplant recipients were prospectively collected from the biliary external drainage tube inserted into the bile duct during liver transplantation at POD1 to POD7 daily, POD10, POD14, POD21, POD28, and POD90 (when the external biliary drainage tube was removed). We also collected other bile samples during the course of the liver biopsy procedure. Bile samples were handled under sterile conditions, divided into several corning tubes, and stored at -80°C until analysis.

Enzyme Activity Assay of Alanine Aminopeptidase N (APN)

We used alanine-*p*-nitroanilide hydrochloride (Calbiochem) as a substrate of APN, as described by Jung and Scholz [18]. APN activity was measured at 405 nm at 37°C by monitoring the increase of absorbance of *p*-nitroanilide liberated by APN during 30 min. The amount of APN that converted 1 μ M of the substrate into *p*-nitroanilide at 37°C for 30 min was taken as a unit of enzyme activity. Each bile sample was diluted to 1:300 by 50 mM Tris-HCl (pH 7.8). Then each sample started the reaction by adding the substrate 2 mmol/L alanine-*p*-nitroanilide hydrochloride. A standard curve was obtained between 0-20 mU APN (porcine kidney) using alanine-*p*-nitroanilide.

Each diluted bile sample (100 μ L) and 30 μ L of the substrate solution were applied into each well, and the diluted bile sample (100 μ L) and 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) buffer (30 μ L) were applied in each of the other wells. After incubation at 37°C for 30 min, the optical density (OD) was measured at 405 nm by a UV/VIS spectrophotometer (Ultrospec 1100pro; GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden). Each bile sample was quantified using 'Coomassie' Bio-Rad protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). The final APN activity (mU) was expressed relative to the amount of protein (mg) in the bile sample.

Immunostaining of Alanine Aminopeptidase N (APN)

Liver biopsy specimens of the ACR group ($n = 5$) and LD group ($n = 4$) were evaluated by immunostaining. In each case, we evaluated the expression of APN in graft liver biopsy specimens at three time points, (1) post-reperfusion during liver transplantation, (2) at the time of liver dysfunction, and (3) stable allograft function after treatment of allograft dysfunction.

Each liver biopsy specimen was fixed in formalin, embedded in paraffin, and cut into serial sections of 4 μ m thickness. These were deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol. Immunohistochemical staining was performed using a Vectastain ABC peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The sections were treated for antigen retrieval in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) for 40 min at 95°C , followed by incubation in methanol containing 0.3% hydrogen peroxidase at room temperature for 20 min to block endogenous peroxidase. After blocking endogenous biotin, the sections were incubated with normal protein-block serum solution at room temperature for 20 min in wet condition, to block nonspecific staining. Then they were incubated overnight at 4°C with the primary antibody, anti-CD13 (3D8, mouse monoclonal IgG, diluted 1:100, Santa Cruz Biotechnology). After washing three times for 5 min in PBS, the sections were incubated with a biotin-conjugated secondary antibody (horse anti-mouse for CD13) at room temperature for 20 min and finally incubated with peroxidase-conjugated streptavidin at room temperature for 20 min. The peroxidase reaction was then developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Finally, the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. For negative controls, sections were treated similarly except they were incubated with non-immunized rabbit IgG or Tris-buffered saline (TBS) instead of the primary antibody. Immunohistochemical staining was assessed by two investigators independently, without the knowledge of the corresponding clinicopathologic data.

Image Analysis for APN Immunostaining in the Liver

After immunostaining for APN in graft liver biopsy specimens, we evaluated the expression of APN using an image analysis software (Win roof ver. 5.6; Mitani Corporations, Fukui, Japan). Images were captured with a $\times 400$ magnification under constant exposure control. Threshold tools were used to precisely define and measure the total hepatocyte area and the APN-stained area. The fields were edited manually to eliminate nonspecific artifacts. The average area of three fields was analyzed in each biopsy specimen. The percentage of APN immunostaining area per total field hepatocyte area was computed.

Statistical Analysis

Values were expressed as mean \pm SD. Differences between groups were examined for statistical significance using the two-tailed *t*-test. Correlations analyses were performed using Pearson's correlation coefficient. *P* value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using StatView software, ver. J 5.0 for Windows (SAS Institute, Cary, NC).