

術として有効であるのみならず、これまでの医用工学的手法を用いた治療法²⁾と比較し、臨床応用に向けたいくつかの特徴的利点を有している。本稿では、脱細胞化技術の特徴と肝再生医療における役割について、現在の知見を述べたい。

1 細胞外マトリックスと脱細胞化技術

細胞外マトリックス (extracellular matrix : ECM) が細胞機能に果たす役割の重要性が、近年強く認識されてきている³⁾。ECM は、コラーゲン・ラミニン・フィブロネクチン・グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan : GAG) などから構成され、産生/吸収によって細胞周囲環境を動的に制御する足場構造として、細胞自身の増殖・安定化・分化などの基本的な機能すべてに影響を与えている。生体内で細胞一つひとつは細胞塊を形成しているのではなく、いわば ECM のベッドに横たわって細胞間相互作用を示していると考えられている。したがって、従来から細胞機能を研究するうえで、ECM との相互作用を理解することは避けて通れない課題であった。この ECM が最近注目を集めてきた理由の1つに、幹細胞技術のめざましい進歩がある。すなわち、幹細胞技術を用いた再生医療の発展のなかでとくに成熟細胞を分化誘導する過程において、ディッシュ上の通常培養条件と比較して、生体により近い構造すなわち三次元立体構造や細胞間相互作用・ECM-細胞間相互作用を正しく制御することがいかに重要であるかという認識が、幹細胞研究において広く浸透してきたことがその1つと考えられる。

ECM の細胞培養への適用は、コラーゲンやマトリゲルといったおもに小動物の組織由来の成分として利用されているのが一般的であり、ある種の細胞培養、とくに肝細胞の培養などで必須であることが知られている。これらは生体内に存在する ECM の役割の一端として、ECM-細胞間相互作用を *in vitro* で再現するために有効である。実際に ECM を使用した培養系では、使用しない場

合と比較して細胞の長期生存や機能の維持の点で有意に高い。またこの ECM を細胞培養のみならず細胞移植治療へ応用する試みが、肝細胞移植の分野でも試みられてきた⁴⁾。細胞塊を ECM と同時に生体内に移植することで、生体内にとどまった肝細胞が ECM の相互作用によって一定の組織構造を保ち、細胞のみを移植したものと比較して有意に長期の生着・機能発現が可能となった。しかしながら、このような *in vitro* での細胞培養系や細胞塊移植の補助としての ECM 利用は、ECM が担うもう一方の重要な役割である三次元立体構造の再現や細胞間相互作用の制御機構という点では不十分であるうえ、使用されている ECM には有効な成分のごく一部しか含有されておらず、またこれらの一部は腫瘍組織由来であるなど、とくに細胞治療など臨床応用を考えた場合には大きな障壁となりうる。

これに対して、生体に従来ある ECM、とくに使用する細胞の由来組織特異的な ECM を用いることによって、より生体に近い培養・移植環境を構築する技術が、組織の脱細胞化法として開発されてきた⁵⁾。この手法は、組織を種々の細胞傷害性薬剤に曝露させることによって生細胞を除去し蛋白のみを残存させるものであり、得られた ECM は種々の細胞培養の基盤として応用され、通常用いる ECM 成分より高い有効性を示しただけでなく、実際に皮膚・血管・心臓弁などの再生に応用され、大動物を含めた動物実験レベルでは良好な結果が示された。しかしながら、さまざまな臓器への臨床応用を考えた場合、この手法をもってしても臓器レベルでの立体構造の再現は非常に困難であることは否めなかった。

このような生体内の三次元立体構造を培養環境に再現する試みが、医用工学的アプローチの発展とともに、近年急速に広まってきた。マイクロ流体デバイスを用いた肝類洞構造の再構築⁶⁾など、これまでにはなかった新しい技術の応用によって、生体に近い立体環境を再現することが可能と

なってきた。このような技術を基盤としてECMを立体構造内に適用することにより、生体内でECMがもつ多くの性質を生体外で提供できうるため、この技術融合はこれからの臓器再生にとって大いに期待される。しかしながら、臓器再生とその移植を考えた場合、この技術で制御可能と考えられる微細な構造の再現だけでなく、実際に血管吻合の可能な大脈管構造までの連続する複雑な構築を再現することが必要となるため、この点でとくに移植可能な実質臓器構造の再現は非常に困難であるといえる。

2 臓器脱細胞化技術の出現

臓器の再生を考えた場合、①適切なECM、②微小構造から大血管までの連続する三次元構造、そして③量・質ともに十分な細胞の供給、の条件を満たすことが必要となる。これまで述べてきたさまざまな技術革新をふまえ、これらの条件を満たすような臓器再生手法を実現化するために、既存技術の欠点を補うべく、2008年Ottら⁷⁾は、実質臓器そのものを脱細胞化する手法を世界に先駆けて報告した。本法は、先に述べた脱細胞化の手法を経脈管的アプローチを用いて実質臓器そのものに適応することによって、これまでその保持が困難であった実質臓器の立体構造を損なうことなく、臓器特異的ECMを保持する手法である。本報告では、大血管から細胞傷害性薬剤を循環させて脱細胞化した心臓に、心筋細胞を再度生着させて電氣的洞調律を発現させており、臓器そのものの再生の可能性を示唆する大変興味深い結果を示した。

心臓や血管と比較して、肝臓はその複雑な内部構造と多種多様な機能から、臓器としての再生が非常に困難とされている。われわれはこの臓器脱細胞化の手法を世界ではじめて肝臓に適応し、肝細胞を再度生着させることで、生体外で肝細胞機能の一部を発現するだけでなく、そのままグラフトとして生体への移植が技術的に可能であること

を示した¹⁾。つづいて肺でも同様の報告がなされたこと⁸⁾、これまで再生医療実現化の障壁となっていた実質臓器の再生に、1つの技術革新とよべる手法が出現したといえる。本手法の最大の特徴的は、臓器内の末梢まで行き渡る血管を細胞傷害性薬剤のアクセスに利用することによって臓器全体に薬剤が均等に循環し、均一に臓器全体の細胞除去が可能であること、加えてこれまで最も困難であった、生体に従来あるべき細胞レベルの微細構造から大きな脈管への連続的な立体構造の再現を可能にしたことであり、さらに重要なことはこれらの構造をすべて生体由来の臓器特異的ECMがそのまま担っているという点である。すなわち外部由来の素材を使用することなく複雑な構造を保つことで免疫の問題点もクリアし、これから発展すべき臨床応用へ向けた大きなアドバンテージを有していると考えられる。

ただ本手法にもまだ改善すべき点が多い。その1つが、適切な細胞傷害性薬剤の選択である。心臓・肝臓および肺で報告されたような、いわゆる界面活性剤を用いて組織を脱細胞化した場合、細胞の除去には非常に効果的であるが、とくに肝臓のような複雑かつ脆弱な微細構造をもつ組織では、逆に必要なECMの一部が脱落することで立体構造が細部で破綻する可能性のあることがわかった。またこれまでの培養環境と比較した場合に、脱細胞化によって残存した臓器特異的ECMの細胞、とくに幹細胞の分化に対する詳細な影響はまだ検討されていない。さらに、小動物における脱細胞化臓器作製の経験から、漏出・出血など組織の脆弱性の問題や生体内での長期的な変化を観察する必要性など、今後明らかにすべき課題は数多く残っている。またこれから示していくべき大きな課題の1つが、ヒトサイズへのスケールアップである。とくに臓器再生を考えた場合、小動物での成功は必ずしも臨床応用への明確な方向づけにはならない。単純にサイズの相違のみならず、必要細胞数や解剖学的相違なども含めて、今

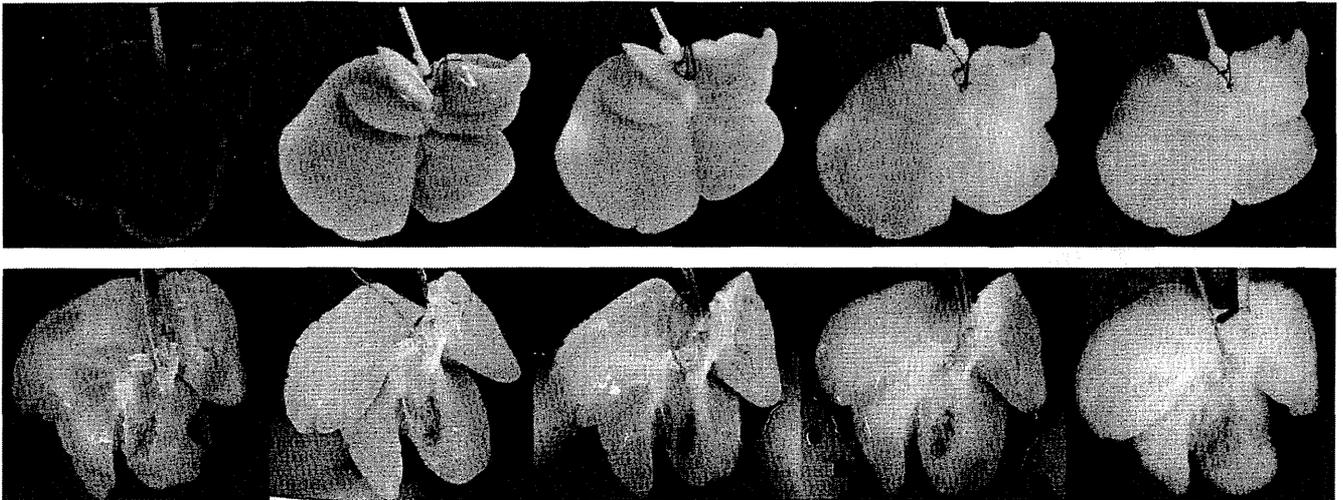


図 1. 肝臓脱細胞化の過程 (上段ラット：0～72 時間, 下段ブタ：0～96 時間)

後は多くの観点から修正をおこなったシステムを確立しなければならない。これをふまえて、われわれは世界に先駆けて、大動物の肝臓を用いた脱細胞化システムを提示してきた⁹⁾。図 1 に示すように、脱細胞化したブタ肝臓は、ラットと比較して構造がより安定しており、その強固な ECM 構造から、これを用いた再生グラフトであれば血管吻合による移植が可能ではないかとの期待をもっている。

3 | 幹細胞技術との融合

脱細胞化技術を含めたさまざまな医用工学的手法を再生医療に応用する道筋を考えた場合、多くの手法でなんらかの細胞を使用することは避けられず、結局はその細胞のドナーが必要となることで、ドナー不足という移植医療が抱える根本的な問題は解決されないため、少なくとも再生医療が移植医療に代わる画期的な新しい治療法とはなり得ない。したがって、これが医用工学的手法の抱える限界の 1 つであったともいえる。近年、これまで以上に再生医学研究が脚光を浴びるようになったのは、ほかでもない胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞) / 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) 技術の創

出によると考えられる。とくに胎児由来である ES 細胞と比較して倫理的問題をクリアしやすい iPS 細胞の創出は、日本発の画期的技術として再生医療の可能性を大幅に広げた¹⁰⁾。とくに臓器再生を考えた場合、患者やドナーの皮膚をわずかに採取することによって樹立した、自己あるいは家族由来 iPS 細胞を使用することで、ドナー負担をほとんど考えることなく必要とする大量の細胞を入手できることで、これまでの医療を根本的に変える新しい治療法となる期待が高まっている。しかしながら、現在の急速な発展をもってしても、幹細胞から臨床応用に耐えうるような成熟度の高い細胞を多量に得ることは、いまだに困難である。その原因の 1 つとして、*in vitro* における成熟過程での適切な細胞周囲環境の欠落が考えられている。第 1 項でも述べたように、生体により近い構造、すなわち三次元立体構造や細胞間相互作用・ECM-細胞間相互作用を正しく制御することが、細胞の分化・成熟に大変重要な役割を担っていることが近年示されている。したがって、培養環境を生体内に本来あるべき状態に近づけるために、微細構造を人工的に制御可能なさまざまな医用工学的手法を応用することが、これからの再生医療の発展に必須であるといえる。実際に幹細胞を成

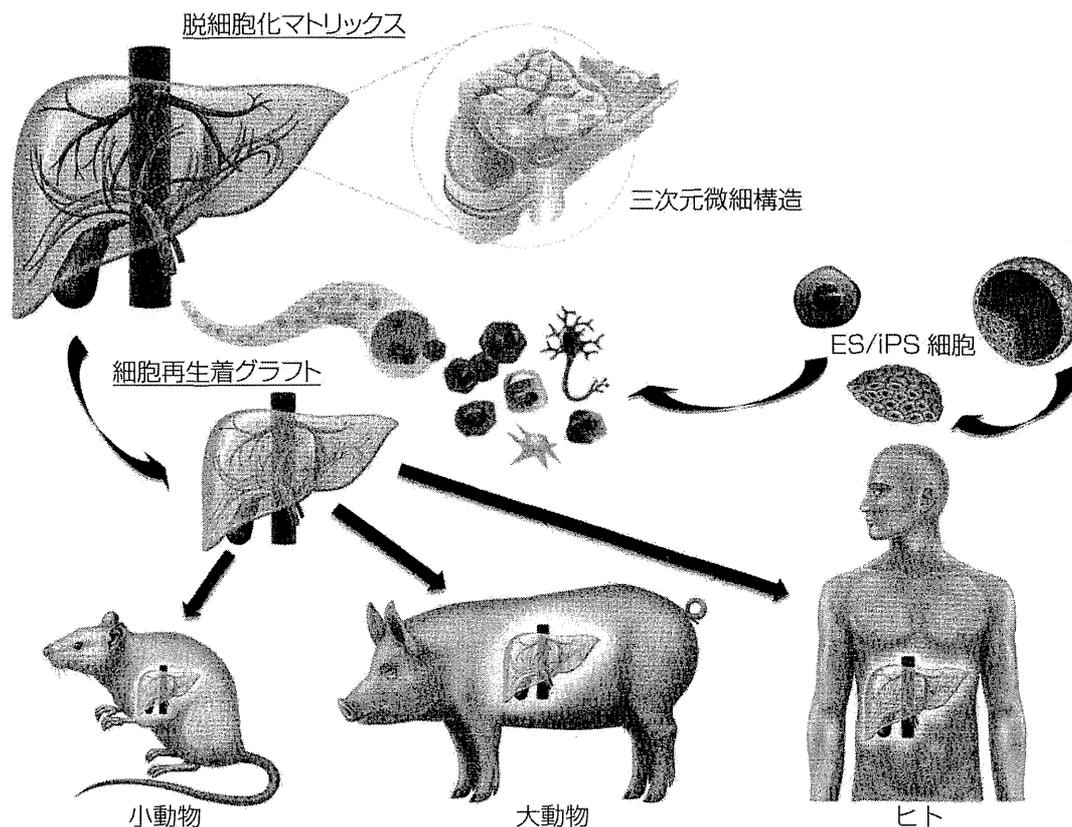


図 2. 脱細胞化肝骨格と幹細胞技術の融合による移植グラフトの開発

熟肝細胞へ分化誘導する場合，ECM-細胞間相互作用が重要な役割を果たすことが報告されており¹¹⁾¹²⁾，どのようなECMを使用するかについて多くの考察がなされている．しかしながら生体由来のECMを，立体構造を含めて丸ごと使用する試みはまだなされておらず，われわれが用いている脱細胞化三次元ECM構造を幹細胞培養・細胞/臓器移植の基盤技術として応用することは，幹細胞が性質・局在ともに適切な変化を示すのに寄与し，ひいてはこれからの肝再生医療の発展に大きな布石となりうると考えている．このように，脱細胞化技術が臓器移植に取って代わるような革新的手法に発展するためには，ES細胞/iPS細胞をはじめとした多分化能を有する細胞を適切に使用することが必須であり¹³⁾，図2に示すようにこれらをふまえて，今後大動物を経てヒトに応用できる技術へと発展させていきたいと考えている．

おわりに

再生医療は従来の治療法を根本的に置き換える可能性を秘めているが，実際の臨床応用までに越えるべき壁は高い．これを乗り越えるためには，組織・臓器構造と細胞との関係の正しい理解が必須であり，肝臓も例外ではない．とくに最近になって，肝臓を構成する星細胞などが担うECMの病的変化に伴う細胞-ECM間相互作用の変性が，細胞自体の病的変性よりも，むしろ臓器としての機能低下に強くかかわっていることが示されてきている¹⁴⁾．実際に線維化の強い肝炎の肝臓から肝細胞のみを分離した後，環境を可能な限り正常化できれば，細胞機能の低下は可逆的であることが示されている．肝臓のなかに一定の割合で存在すると考えられている幹細胞¹⁵⁾が，肝細胞や胆管細胞などへの分化・成熟はもとよりそれ自身が細胞機能制御の一部を担っているのであれば，す

で *in vitro* で明らかにされているように、これらの幹細胞の役割を念頭においたうえでも、肝臓由来の ECM が肝臓そのものの再生に大変重要であることが容易に想像できる。われわれは生体由来の ECM を効果的に用いながら臓器固有の立体構造を保った脱細胞化肝骨格を有効に活用し、これからの再生医療の基盤技術として発展させていきたいと考えている。

文献

- 1) Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H *et al* : Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* **16** : 814-820, 2010
- 2) Yagi H, Parekkadan B, Suganuma K *et al* : Long-term superior performance of a stem cell/hepatocyte device for the treatment of acute liver failure. *Tissue Eng Part A* **15** : 3377-3388, 2009
- 3) Rozario T, DeSimone DW : The extracellular matrix in development and morphogenesis : a dynamic view. *Dev Biol* **341** : 126-140, 2009
- 4) Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Chen Y *et al* : Intramuscular transplantation of engineered hepatic tissue constructs corrects acute and chronic liver failure in mice. *J Hepatol* **52** : 211-219, 2010
- 5) Badylak SF : The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* **28** : 3587-3593, 2007
- 6) Sudo R, Mitaka T, Ikeda M *et al* : Reconstruction of 3D stacked-up structures by rat small hepatocytes on microporous membranes. *Faseb J* **19** : 1695-1697, 2005
- 7) Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK *et al* : Perfusion-decellularized matrix : using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* **14** : 213-221, 2008
- 8) Ott HC, Clippinger B, Conrad C *et al* : Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* **16** : 927-933, 2010
- 9) Yagi H, Fukumitsu K, Fukuda K *et al* : Human-Scale Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation : a Regenerative Medicine Approach. *Cell Transplant* 2011 (accepted)
- 10) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al* : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
- 11) Snykers S, De Kock J, Rogiers V *et al* : *In vitro* differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes : state of the art. *Stem Cells* **27** : 577-605, 2009
- 12) Peerani R, Zandstra PW : Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering. *J Clin Invest* **120** : 60-70, 2010
- 13) Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Yagi H *et al* : Stem cells for liver repopulation. *Curr Opin Organ Transplant* **14** : 667-673, 2009
- 14) Liu L, Yannam GR, Nishikawa T *et al* : The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology*, 2011 [Epub ahead of print]
- 15) Dollé L, Best J, Mei J *et al* : The quest for liver progenitor cells : a practical point of view. *J Hepatol* **52** : 117-129, 2010

特集：外科感染症における分子生物学的研究

トピックス

Alarmin (HMGB1) など 一代表的 Alarmin, HMGB1 研究の今—

慶應義塾大学外科

篠田昌宏, 田邊 稔, 須田康一, 竹内裕也, 北川雄光

要旨：感染下において損傷組織から遊離される内因性物質 alarmin (危険信号分子) の中でも、核内タンパク HMGB1 が最近世界中の研究者から注目を浴びている。1999年に HMGB1 の敗血症における late mediator としての重要性が報告されて以来、急性肺損傷、心筋障害、膵炎、外傷、各種術後、DIC、虚血再灌流障害等の急性炎症のみならず、慢性関節リウマチ等の慢性炎症、悪性腫瘍の増殖や浸潤、転移等、さまざまな病態における key mediator の一つであることが明らかとなった。われわれも、この「運命決定因子」に着目し、敗血症、小腸・肝虚血再灌流傷害、劇症肝不全での HMGB1 動態を解明するとともに、各種の HMGB1 制御法の開発を試みている。HMGB1 中和抗体のほか、HMGB1 の阻害剤タンパク A Box の遺伝子導入、HMGB1 吸着カラムによる体外循環等であり、市販薬の遺伝子組み換えヒトトロンボモジュリンにも注目している。

【索引用語】 HMGB1, alarmin, 敗血症, 炎症

I. Alarmin とは

感染下においては、損傷組織から「危険に付随した分子パターン」すなわち alarmin (危険信号分子) が遊離されるといわれる。Alarmin とは、2006年2月、イタリア、ミラノにおける The European Molecular Biology Organization (EMBO) 主催のワークショップにて定義された炎症反応に繋がる各種の内因性物質の総称である。同ワークショップでは、①アポトーシスではなくネクローシスに陥った細胞から急速に分泌される、②活性化された免疫担当細胞から能動的に分泌される、③樹状細胞を含む自然免疫系を受容体を介して活性化する、④侵襲そのものや炎症による二次的な障害によって破壊された組織の再生を促し、生体の恒常性維持に寄与する、の4つの性質を有する内因性物質を alarmin と定義することが提唱された。このワークショップの内容は Harris ら¹⁾ によってミーティングレポートに詳細にまとめられ (図1)、エンドトキシン (以下、LPS) をはじめとする病原微生物に関連した外因性の物質、病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : 以下、PAMPs) とともに alarmin を理解するうえで貴重な資料となっ

ている。Alarmins と PAMPs を総称して、傷害関連分子パターン (damage-associated molecular patterns : 以下、DAMPs) とする論文がある一方、PAMPs を外因性物質、DAMPs を内因性物質とする論文も認められ、特に DAMPs という用語の理解には注意を要する。Alarmin の仲間 (表1)²⁾ には heat shock protein, S100 蛋白, hepatoma-derived growth factor 等多数の分子が含まれるが、本稿ではその代表格、high mobility group box chromosomal protein 1 (以下、HMGB1) について、教室で最近得られた知見とともに概説する。

II. Alarmin の代表格 HMGB1

1. HMGB1 について

HMGB1 は、約30年前に DNA 結合蛋白として発見された分子量 30kD の蛋白である。平常時には核内に存在し、DNA ラセン構造の維持等生命に不可欠な役割を担っている。その存在に脚光をあげたのは、1999年の Wang ら³⁾ の発表である。Wang ら³⁾ は、マウス敗血症モデルにおいて血中 HMGB1 が上昇していること、HMGB1 の中和抗体を用いることで病態が改善することを報告し、HMGB1 の敗血症における late mediator としての

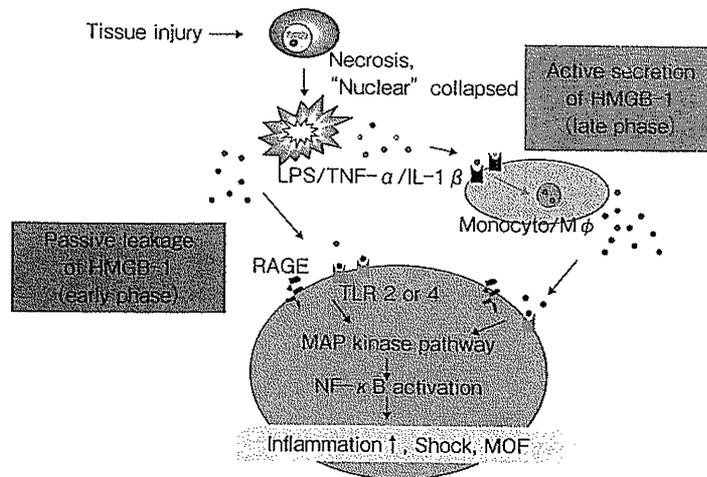


図1 Alarminの産生経路：2006年のThe European Molecular Biology Organization (EMBO) 主催のワークショップのミーティングレポートでは，alarminが受動的に漏れでてくる経路と，活性化されたマクロファージなどが能動的に産生する経路が紹介されている。

表1 Alarminの仲間（文献2より引用，改変）

Molecule	Passive release	Active nonclassical secretion	Role in inflammation/immunity	Promoting tissue regeneration
HMGB1	●	●	●	●
S100s		●	●	●
HDGF	●	●		●
HSPs		●	●	
IL-1a		●	●	
Uric acid			●	
Cathelicidins		●	●	●
Defensins		●	●	
EDN		●	●	
Galectins		●	●	
Thymosins			●	●
Nucleolin		●	●	
Annexins		●	●	

機能，重症度のマーカーや治療標的としての有用性を報告した。1999年当時は，HMGB1関連論文は年間に数件であったが，その後，敗血症のみならず急性肺損傷，心筋障害，肺炎，外傷，各種術後，disseminated intravascular coagulation（以下，DIC），虚血・再灌流障害等の急性炎症，さらには慢性関節リウマチや動脈硬化等の慢性炎症，悪性腫瘍の増殖や浸潤，転移等，さまざまな病態におけるkey mediatorの一つであることが明らかとなり，近年ではHMGB1関連論文は増加の一途である（図2）。数多くある炎症性メディエータのなかでも，HMGB1は個体の運命を決定する「運命決定因子」「死のメディエータ」と呼ばれるようになる。徐々に明らかとなってきたことは，HMGB1の産生経路には上述のalarminで記述したごとく2つあり，一

つは組織が壊死に陥り受動的に漏れでてくる「passive leakage」，もう一つは活性化されたマクロファージなどが能動的に産生する「active secretion」ということである。いずれの経路によって産生されたHMGB1も，血中に存在するフリーのHMGB1は細胞表面上のreceptor for advanced glycation end-product（RAGE）やtoll like receptor（TLR）-2,4等に結合し細胞内に炎症性シグナルを伝達し，NFκBを活性化するなど各種の炎症反応や細胞遊走を促進する⁴⁾⁵⁾。また，もっとも最近の知見では，HMGB1は単独では炎症を惹起する作用は弱く，炎症性サイトカイン，single strand DNA，LPSなどと複合体を形成して初めて炎症性作用を持つことも明らかになりつつある⁶⁾。

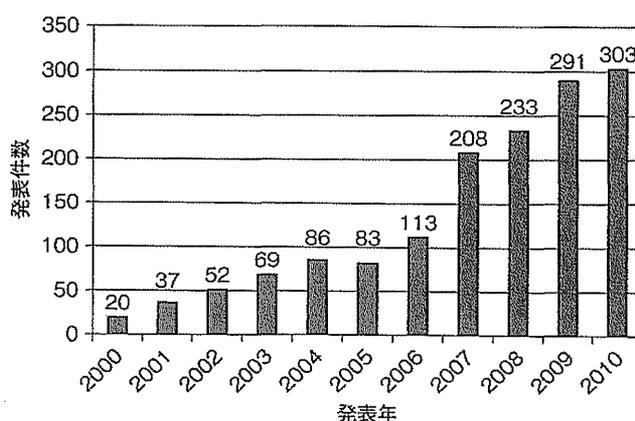


図2 HMGB1 関連論文の年次推移 (著者が PubMed にて検索した結果)。

2. 本邦, 教室での HMGB1 関連研究

HMGB1 に対する世界的な注目が集まりつつある中, 本邦では 2006 年に鹿児島大学丸山征郎教授を中心として厚生労働科学研究「侵襲の運命決定因子 HMGB1 を分子標的とした救命的治療法の開発」が始動する⁷⁾。国内の数多くの HMGB1 研究者が丸山教授を中心に HMGB1 研究成果を世界に発信すべく集まったわけである。構成員であった慶應義塾大学外科教授の北川雄光は, まず敗血症における HMGB1 動態と病態制御の実験に取り組んだ。すなわち, ラット盲腸穿孔による敗血症モデルにおいて中和抗体が病態を改善しうることを報告した⁸⁾。続いて, 食道癌術前の血中 HMGB1 値が術後の合併症発生と関連があると病態予知的価値を発表⁹⁾。さらに, ラット肝虚血再灌流モデルにおいても HMGB1 が病態改善の鍵を握っているとの仮説を立て, 血中 HMGB1 動態を明らかにし, 中和抗体による病態改善効果を報告した¹⁰⁾。その後, ラット小腸虚血再灌流モデル¹¹⁾, ラット急性肝不全モデル¹²⁾, ブタ急性肝不全モデル¹³⁾, 急性肝不全患者において¹⁴⁾, 血中 HMGB1 動態を詳細に検討し, 敗血症のみならず, 組織の壊死が起こる腹部内の各種の病態で HMGB1 の血中動態を次々と明らかにした。特に, 肝組織中 HMGB1 に関しては, 免疫組織染色, 組織内 HMGB1 タンパク定量によって検討を追求した (図 3)。教室で過去に行った炎症性サイトカイン関連研究では, ラット肝虚血再灌流モデル, ラット急性肝不全モデルいずれにおいても, 肝臓内マクロファージが炎症性サイトカインを過剰産生し血中レベルが上昇するという結果が得られていたため^{15) 16)}, HMGB1 に関しても同様の結果を予想していたが, 実際には肝内 HMGB1 は免疫組織染色も組織内 HMGB1 タンパク定量も明らかな

低下を示し, 壊死によって HMGB1 タンパクは組織内より「leak」してくることが強く示唆されたのである。

III. HMGB1 を制御する各種の strategy

1. 特異的中和抗体

1999 年の Wang ら³⁾ の報告で用いられた方法は, HMGB1 の特異的中和抗体であった。以後, 各種の病態で HMGB1 関連研究が行われてきたが^{8) 10)~12)}, 用いられた制御法のほとんどは特異的中和抗体である。教室の実験においても上述のごとく, ラット敗血症モデル, ラット肝虚血再灌流モデル, ラット急性肝不全モデル (図 4) で絶大な病態改善効果を発揮した。

2. 吸着体の開発

Yamamoto ら¹⁷⁾ は, ラット肝虚血再灌流モデルにおいて HMGB1 吸着体を体外循環下に使用し, 血中 HMGB1 レベルが低下すること, さらには病態改善に有効であることを報告した。同じ年, 教室でも, 同様の吸着体が *in vitro* で, さらには動物モデルの血中 HMGB1 レベルを低下させることを報告した¹⁸⁾。従来より HMGB1 を血漿ごと除去する血漿交換という手法はあったにせよ, HMGB1 を特異的に吸着する同吸着体の開発のインパクトは大きかった。この研究結果を受け, 教室では同吸着体を内蔵したカラムを大動物に使用可能なサイズにスケールアップして体重 25kg のブタ実験に用いることを試みた。しかし, 同吸着体の特性が現時点ではスケールアップに適さないことが判明し, 実験半ばで断念している。一方, 教室は同吸着体と全く構造を異にする吸着体を東レ株式会社 (東京都) より供与され, ブタ急性肝不全モデルに体外循環下に用い

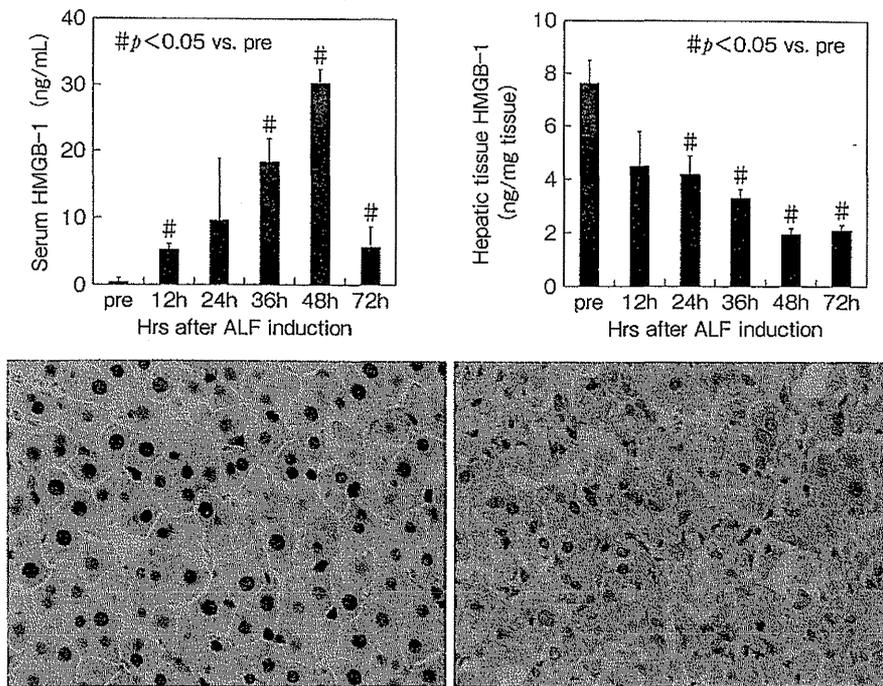


図3 ラット急性肝不全モデルにおける HMGB1 動態：ラット急性肝不全モデルにおいては血中 HMGB1 が経時的に上昇するのに比し（左上），肝組織中 HMGB1 は対照的に低下していく様子（右上）が観察された。肝組織の HMGB1 免疫染色の結果，肝炎誘導前に核内に濃く染まっていた HMGB1（左下）が，肝炎誘発後 48 時間後に壊死した核内には存在していない（右下）ことが判明し，受動的漏出を観察したものと考えられた。ALF, 急性肝不全。

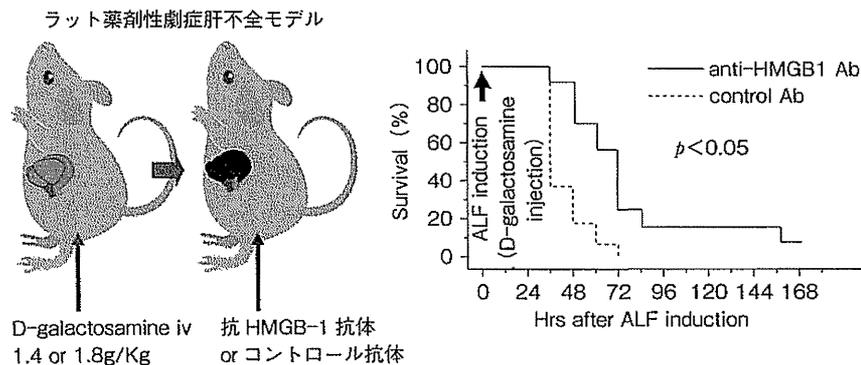


図4 ラット急性肝不全モデルにおける抗 HMGB1 抗体の生存率改善効果：ラット急性肝不全モデルに抗 HMGB1 抗体を投与したところ生存率の劇的改善効果を認める。ALF, 急性肝不全。

たところ，血中 HMGB1 レベルを低下させることを明らかにした¹³⁾ (図5)。急性肝不全，特に脳症をきたす劇症肝不全においては，血漿交換，持続血液透析等の体外循環治療はしばしば行われる治療選択肢であり，対外循環システムのカラムを入れ替えることで本カラムによる治療が可能となるならば臨床的メリットは大きいものと考えている。同カラムによる治療効果が動物実験で証明されれば，臨床

応用も十分可能であると期待している。

3. HMGB1 A box

HMGB1 制御法を別の観点から報告した論文がある。2004 年に Yang ら¹⁹⁾ は，HMGB1 は A box, B box, C tail の3つの部分から成り，A box 部分は RAGE や TLR などの膜受容体に結合するものの炎症性シグナルを伝達する力が弱い，すなわち

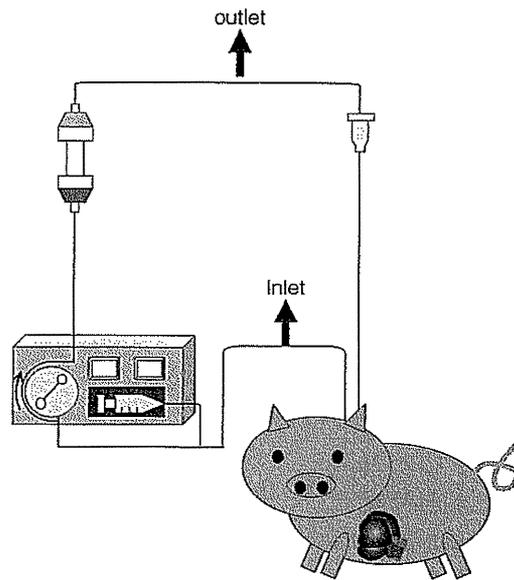


図5 プタを用いての体外循環実験：HMGB1 吸着カラム（非売品，東レ株式会社）がプタ急性肝不全モデルで血中 HMGB1 レベルを低下させることが明らかになりつつある。

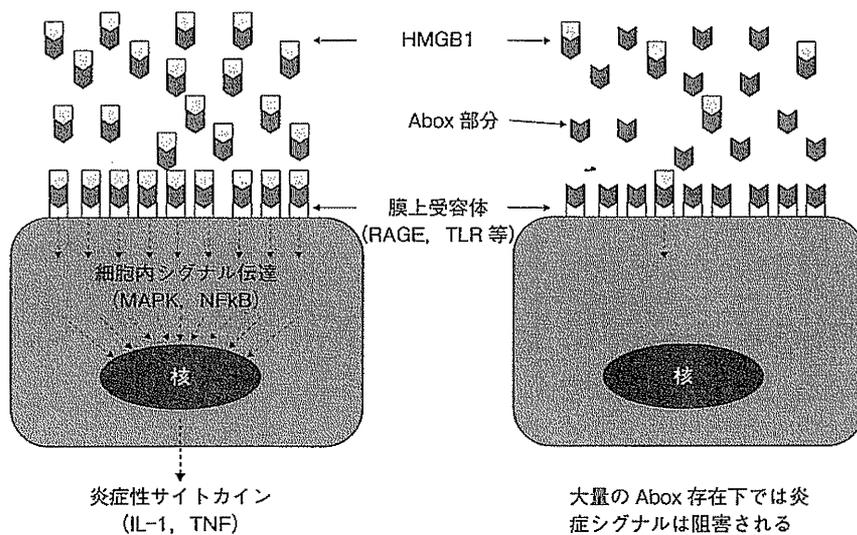


図6 HMGB1 A box：HMGB1 の A box domain は、HMGB1 と競合的に膜上受容体に結合するが、炎症性シグナルを伝達しないため、HMGB1 に拮抗的に働く。

HMGB1 と競合的に膜受容体と結合する HMGB1 阻害タンパクであると報告した (図6)。彼らは実際 HMGB1 の A box 部分のタンパクを精製し、*in vitro* において HMGB1 刺激によるマクロファージからの TNF 産生を阻害すること、*in vivo* においてラット敗血症モデルの病態を改善することを示した。この A box タンパクは、敗血症のほかいくつかの病態でもその有用性が示され、現在ではイタリアの HMGBiotech 社によって市販されている。教室にお

いても本タンパクの存在に早期に着目、敗血症のみならず肝・小腸虚血再灌流モデル、急性肝不全モデルにてその有用性を検証する計画を立てた。しかしながら、同タンパクの購入には 2mg=1,400 ユーロという、*in vivo* 実験を想定した際には大変高額な費用がかかることが大きな問題となった。そこで、教室は A box 研究を安価に遂行するため、独自に A box タンパクを encode するアデノウイルスベクターを作製することとした。アデノウイルスベク

ターを門脈内に投与した際、遺伝子導入された肝が目的タンパクを産生し血中に高濃度の目的タンパクが出現する手法を教室は得意としていたのである^{20)~23)}。本手法は、ラット初代培養肝細胞にウイルスベクター感染後培養上製中に A box タンパクが確認される、ラット門脈内に投与したのち肝での発現が確認されるなど *in vitro*, *in vivo* での基礎実験が進行中である。

4. 遺伝子組み換えヒトトロノボモジュリン

各種の基礎実験が進行中であるなか、臨床家の立場から極めて注目を浴びる研究結果が 2005 年 Abeyama から報告された²⁴⁾²⁵⁾。ヒトトロノボモジュリンの lectin domain が HMGB1 の直接的阻害作用を持つことを報告したのである。その後世界初の遺伝子組み換えヒトトロノボモジュリンが製剤化され、旭化成株式会社によって 2008 年よりリコモジュリンとして市販された。すでに市場で主に DIC を伴う敗血症にて威力を発揮しているが、HMGB1 の直接的阻害作用を有する唯一の市販薬として極めて注目に値する薬剤である。今後、高 HMGB1 血症を伴う炎症性疾患で同薬剤が効果を持つか否か検証が待たれるところである。教室では、高 HMGB1 血症を伴う病態としてラット急性肝不全モデルの作成に力を注いできた経緯から、同薬剤を同モデルに投与する試みを行ってきた。投与経路を経静脈的、経腹膜的、投与回数を単回、複数回に変えるなどして実験中であるが、肝不全下では出血傾向を助長するという問題点が浮上している。外科手術後早期の DIC、敗血症、各種臓器不全に同薬剤を用いる際には、surgical site からの出血にも配慮が必要との認識を持っている。

IV. Alarmin, 特に HMGB1 研究の今後

1999 年に Wang ら³⁾ が HMGB1 の敗血症における late mediator としての機能を報告してから 10 余年の歳月が経った。Alarmin, 特に HMGB1 関連の研究への国際的注目は高まる一方である。なかでも国内の HMGB1 研究の進捗ぶりには目を見張るものがある。鹿児島大学、丸山征郎教授をはじめ多くの研究者が活発に HMGB1 研究を行っている。当初動物モデルを用いた基礎研究が中心であったが、臨床検体を用いた研究も散見されつつある。測定系においては、シノテスト株式会社(神奈川県)が再現性に優れた精巧な HMGB1 測定系を有している。日本発の HMGB1 阻害薬剤が市販され、今後の高 HMGB1 血症を伴う各種病態での効果が期待されて

いる。日本発の HMGB1 吸着カラムの登場にも期待が集まる。今後、日本の alarmin 研究者、HMGB1 研究者がこの「運命決定因子」の各種病態における役割をよりいっそう明らかにし、世界に先駆けてどう患者治療に役立てていくかが次の 10 年の課題であり期待であると考えている。

謝辞：本稿にて紹介した関連実験の遂行および本稿執筆には、以下の諸先生にご協力、ご指導をいただきました。心より御礼申し上げます。鹿児島大学、丸山征郎先生。シノテスト研究開発部、山田晋吾先生。酪農学園大学獣医学、宮庄 拓先生。慶應義塾大学分子生物、高柳 淳先生。慶應義塾大学呼吸器内科、福永興孝先生。(故)石坂彰敏先生。慶應義塾大学消化器内科、海老沼浩利先生、山岸由幸先生、齋藤英胤先生、日比紀文先生。慶應義塾大学小児外科、渕本康史先生。慶應義塾大学外科、田中真之先生、西山 亮先生、大島 剛先生、高野公德先生、林田 哲先生、八木 洋先生、河地茂行先生。東レ株式会社、旭化成株式会社。

文 献

- Harris HE, Raucci A : Alarmin (g) news about danger : Workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 774-778
- Bianchi ME : DAMPs, PAMPs and alarmins : all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007 ; 81 : 1-5
- Wang H, Bloom O, Zhang M, et al : HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999 ; 285 : 248-251
- 丸山征郎 : 生体反応の相互関連. *救急医* 2006 ; 30 : 1021-1024
- Wang H, Yang H, Tracey KJ : Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 2004 ; 255 : 320-331
- Bianchi ME : HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol* 2009 ; 86 : 573-576
- 丸山征郎 : 侵襲の運命決定因子 HMGB1 を分子標的とした救命的治療法の開発 : 平成 18 年度-20 年度総合研究報告書 : 厚生労働科学研究費補助金基礎研究成果の臨床応用推進研究事業. 2009 年
- Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, et al : Anti-high-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis. *World Journal of Surgery* 2006 ; 30 : 1-8
- Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, et al : Serum concentrations of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy : a predictor of clinical course after surgery? *Dis Esophagus* 2006 ; 19 : 5-9
- 清水裕智, 河地茂行, 田辺 稔, ほか : 肝虚血再灌流障害と HMGB-1 の関与における実験的検討. 第

- 105 回日本外科学会定期学術集会. 2012 年, 名古屋
- 11) Kojima M, Tanabe M, Shinoda M, et al : Role of HMGB1 in ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* (in press)
 - 12) Takano K, Shinoda M, Tanabe M, et al : Protective Effect of High-Mobility Group Box 1 Blockade on Acute Liver Failure in Rats. *Shock* 2010 ; 34 : 573-579
 - 13) 西山 亮, 篠田昌宏, 田邊 稔, ほか : 急性肝不全患者における血清 HMGB1 とブタ肝不全モデルを用いた HMGB1 吸着カラムの開発. *日腹部救急医学会誌* 2011 ; 31 : 326
 - 14) Oshima G, Shinoda M, Tanabe M, et al : Increased Plasma Levels of High Mobility Group Box 1 in Patients with Acute Liver Failure. *Eur Surg Res* (in press)
 - 15) Shinoda M, Shimazu M, Wakabayashi G, et al : Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. *J Gastroenterol Hepatol* 2002 ; 17 : 1211-1219
 - 16) Shinoda M, Wakabayashi G, Shimazu M, et al : Increased serum and hepatic tissue levels of interleukin-18 in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2006 ; 21 : 1731-1736
 - 17) Yamamoto T, Ono T, Ito T, et al : Hemoperfusion with a high-mobility group box 1 adsorption column can prevent the occurrence of hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Crit Care Med* 2010 ; 38 : 879-885
 - 18) Suda K, Takeuchi H, Hagiwara T, et al : Spherical sulfated cellulose adsorbs high-mobility-group box chromosomal protein 1 in vitro and in vivo. *ASAIO J* 2010 ; 56 : 210-214
 - 19) Yang H, Ochani M, Li J, et al : Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 296-301
 - 20) Harada H, Wakabayashi G, Takayanagi A, et al : Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002 ; 74 : 1434-1441
 - 21) Shinoda M, Tilles AW, Wakabayashi G, et al : Treatment of fulminant hepatic failure in rats using a bioartificial liver device containing porcine hepatocytes producing interleukin-1 receptor antagonist. *Tissue Eng* 2006 ; 12 : 1313-1323
 - 22) Shinoda M, Tilles AW, Kobayashi N, et al : A bioartificial liver device secreting interleukin-1 receptor antagonist for the treatment of hepatic failure in rats. *J Surg Res* 2007 ; 137 : 130-140
 - 23) Ono S, Obara H, Takayanagi A, et al : Suppressive Effects of Interleukin-18 on Liver Function in Rat Liver Allografts. *J Surg Res* (in press)
 - 24) Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al : The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high mobility group-B1 protein. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 1267-1274
 - 25) Esmon C : Do-all receptor takes on coagulation, inflammation. *Nat Med* 2005 ; 11 : 475-477

Up-to-date research of HMGB1 and inflammatory diseases in the surgical field

Masahiro Shinoda, Minoru Tanabe, Koichi Suda, Hiroya Takeuchi, Yuko Kitagawa
Department of Surgery, Keio University School of Medicine

Endogenous molecules which initiate inflammatory responses by interacting with signalling receptors are known as alarmins. The alarmin family includes high-mobility-group box 1 (HMGB1) protein. Since Wang et al. reported the significant role of HMGB1 in mouse sepsis in 1999, a lot of investigators have recognized its important role in various inflammatory conditions and diseases including heart injury, lung injury, brain ischemia, pancreatitis, trauma, liver and intestine ischemia reperfusion, rheumatoid arthritis, malignant diseases, etc. We are also focusing on this mediator, and investigating HMGB1-targeting therapy employing animal models. Anti-HMGB1 neutralizing antibody is usually used as a standard method to inhibit HMGB1. We are now interested in gene transfer of A box domain of HMGB1 and HMGB1 adsorption column which is applicable to large scale animal. Recombinant human thrombomodulin is a clinically available medicine, which directly inhibits HMGB1.

胆管合併症 (成人)

河地茂行¹, 田邊 稔¹, 島津元秀², 若林 剛², 板野 理¹, 尾原秀明¹, 篠田昌宏¹,
北郷 実¹, 八木 洋¹, 日比泰造¹, 松原健太郎¹, 星野 健¹, 瀧本康史¹, 下島直樹¹,
森川康英⁴, 北島政樹⁴, 黒田達夫¹, 北川雄光¹

¹ 慶應義塾大学医学部外科, ² 東京医科大学八王子医療センター消化器外科・移植外科, ³ 岩手医科大学医学部外科,
⁴ 国際医療福祉大学

◆はじめに

生体肝移植 (living donor liver transplantation: LDLT) 後の胆管合併症はレシピエントの QOL を左右する重要な合併症であり, 治療に難渋することも多く, まさに肝移植医療のアキレス腱といえる。LDLT においてはグラフトが切除された部分肝であることから, グラフト胆管はつねに脳死全肝移植 (cadaveric whole-graft liver transplantation: CWLT) に比べて小さい, ときに複数の胆管再建を要するため, 胆管合併症, とくに胆管狭窄の頻度は CWLT に比べて高く¹⁾, これを克服するためのさまざまな工夫が各施設でおこなわれている。

LDLT が小児の胆道閉鎖症 (biliary atresia: BA) に対する医療としてはじまり, 片側の小さな胆管を再建する必要性から, 胆道再建は肝管空腸吻合 (Roux-en Y hepaticojejunostomy: HJ) が黎明期の主流であった。しかし, 生理的で, 逆流の心配のない, 肝管胆管吻合 (duct-to-duct hepaticocholedochostomy: DD) が成人レシピエントで徐々におこなわれるようになり²⁾, その簡便性もあいまって, 現在では成人 LDLT (adult living donor liver transplantation: ALDLT) の胆道再建の主流となった。

ここでは ALDLT 後の胆管合併症について概説するとともに, 当科における胆管合併症の現状についても述べる。

1. ALDLT 後の胆管合併症

ALDLT 後の代表的な胆管合併症は胆汁漏と胆管吻合部狭窄であり, その発症率は施設により大きく異なる。現在, DD 法ができない特殊な理由がないかぎり (たとえば原疾患が BA や原発性硬化性胆管炎など), DD 法を選択する施設が多い。アジアの主要な肝移植施設における胆道再建・合併症のまとめを表①に示す^{1)3)~7)}。

DD 法の手技に関しては, 選択する糸 (太さ, 吸収糸 or 非吸収糸), 縫合法 (連続 or 結節), スtent留置の

方法, 期間などが, その導入当時から変わらぬ議論的となっている。アジアの high volume center においては, 6-0 のモノフィラメント吸収糸を使って結節縫合をおこない, 結び目をすべて外側に持ってくる施設が多い (表①)。香港や韓国は施設でステントを置かない DD 法を実践しているが, ステントの有用性を実感している移植医は多く, 経総胆管的に吻合部を超えるところまでステントを留置するのが主流と思われる。多穴症例の取り扱いはずかしく, 完全に離れて一穴形成ができない症例に対して HJ 法をおこなうか, 胆嚢管などを使って 2カ所の DD 法をおこなうかはむずかしい選択である。多穴症例に対してはそれぞれにステントを置く施設が多く, ステント留置期間や抜去法に関しては統一された見解はない。

Marubashi ら⁶⁾は, グラフト胆管にあらかじめ 6-0 モノフィラメント吸収糸を全周にかけて開いておく "Open-Up" による DD 法を提唱し, 胆管狭窄発症率が 7.2% ときわめて良好な成績を報告している。一穴に形成できないような離れた二穴例を DD 法の適応から除外しているとはいえ, 手技的工夫により合併症を軽減できる可能性を示唆した興味深い報告である。

これらのさまざまな手技的工夫をもってしても, 胆管合併症を 0 にすることはできない。一般的に胆汁漏は HJ 法に多く, 胆管狭窄は DD 法に多くみられる。胆管狭窄は多くの施設で 10~20% 程度のレシピエントに発症しており, 最も頻度の高い重要な合併症である。胆管狭窄のリスクファクター (表②) に関しては, DD 法をあげる施設は多いが, 胆管狭窄のほとんどが再手術をすることなく治療可能なため, DD 法を否定する根拠にはなっていない。また, 胆管狭窄や胆管合併症は, レシピエントの QOL を一時的に損なうものの, 生命予後に影響を及ぼさない事実も, DD 法が胆道再建の第一選択であり

表① 胆道再建・合併症に関する報告のまとめ

報告者 (施設)	年	症例数	グラフト	吻合法	連続 or 結節	糸	ステント	胆汁漏 (%)	狭窄 (%)	形成	文献
Kasahara M (Kyoto)	2006	321	右葉	DD 192 HJ 121 両方 8	連続が主	6-0吸収糸	+	DD 4.7 HJ 12.4	DD 26.6 HJ 8.3		3
Kyoden Y (Tokyo)	2010	310	右葉 164 左葉系 124 後区域 20	DD 223 HJ 87	結節	4-0 Vicryl	+(86%)	21	27	2→1 近いとき	4
Soejima Y (Kyushu)	2006	182	右葉 50 左葉 118 外側 14	DD 106 HJ 76	連続 結節	6-0 PDS II	+	DD 8.5 HJ 15.8	DD 25.5 HJ 25		5
Marubashi S (Osaka)	2009	83	右葉 47 左葉系 26 後区域 10	DD 61 HJ 22	結節	6-0吸収糸	+	DD 0 HJ 4.5 計 1.2	DD 6.6 HJ 9.1 計 7.2	2, 3 →1	6
Hwang S (Asan, Korea)	2006	259	右葉 225 左葉 34	DD 160 HJ 95 両方 4	結節	6-0	症例による	4.9	16.2		7
Liu CL (Queen Mary, Hong Kong)	2006	124	右葉		結節	6-0 Prolene	なし	4.0	25		1

DD : duct-to-duct hepaticocholedochostomy, HJ : Roux-en Y hepaticojejunostomy

表② 胆管吻合部狭窄のリスクファクター

報告者 (施設)	年	症例数	リスクファクター	文献
Kasahara M (Kyoto)	2006	321	DD	3
Kyoden Y (Tokyo)	2010	310	DD	4
Soejima Y (Kyushu)	2006	182	DD での連続縫合	5
Marubashi S (Osaka)	2009	83	後区域グラフト, 胆管径が小さい	6
Hwang S (Asan, Korea)	2006	259	右葉グラフト, 胆管径<4 mm の DD	7
Liu CL (Queen Mary, Hong Kong)	2006	124	生体肝移植 (右葉): 脳死全肝移植にくらべ高い	1

つづけている大きな理由と思われる。

右葉グラフト, 後区域グラフト, 胆管径の太きなども重要な胆管狭窄の危険因子であり (表②), ほかに多穴例, 肝動脈合併症, 血流不良, 拒絶などの免疫学的イベント, サイトメガロウイルス感染症, 長い冷阻血時間, 血液型不適合など, さまざまな要素との関連が報告されている。

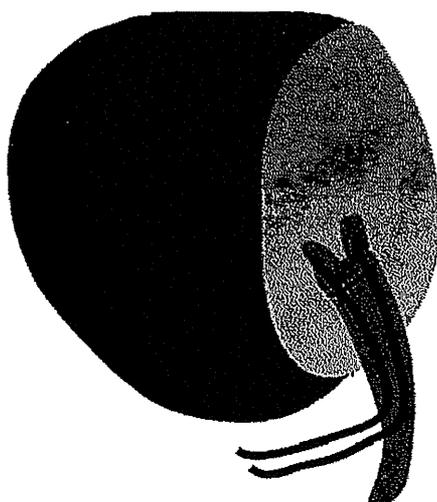
胆管合併症の治療は, 内視鏡的手技, 放射線科的 intervention を駆使しておこなわれ, ほとんどの症例が再手術に至ることなく治療されている。胆管吻合部狭窄に対して, 内視鏡的アプローチにより, バルーン拡張やステント挿入が可能であることが DD 法による再建の大きなメリットである。ALDLT 後の胆管狭窄では, 末梢胆管の拡張が乏しい例も多く, 経皮経肝的なアプローチをむずかしくしているが, 一度 PTCD が入れればその後の治療の利便性は高く, 経皮経肝アプローチが内視鏡的手技とならぶ大きな柱であることはいうまでもない。

2. 当科における胆管合併症の現状

当科では, 2000年6月より DD 法を導入したが, DD 法後に胆管狭窄例が頻発し, とくに右葉グラフトの例に多かったことから, 右葉グラフトでの DD 法の選択に早期から警鐘を鳴らしていた⁸⁾。

その後, さまざまな試行錯誤を経て, 2006年10月より経総胆管的ステント (P-tube) を, 吻合部を越えて留置 (多穴症例にはすべての穴に留置) し, 6ヵ月留置した後抜去する方針で, とくに禁忌がないかぎり, 全例に DD 法を施行するようになった。現在まで 33 例のレシピエントにこの定型化した DD 法を施行した (観察期間中央値 16 ヶ月) (図①)。

胆管狭窄は定型化前の 62 例中 17 例 (27.4%) に認められていたが, 定型後の 33 例では 6 例 (18.2%) に発症し, 頻度が減少する傾向にあった。発症までの期間は約 8.4 ヶ月で, 5 年以上経過後に狭窄を発症した例もあった。とくに DD 法にかぎって胆管狭窄発症を比較する



1. 経経胆管的に胆管ステント(胆管チューブ)を置く。
2. 多穴症例では、すべての胆管にステントを置く。
3. 術後ステントチューブを6ヵ月間留置する。
4. レシビエント側胆管の剥離を最小限にし、胆管血流 (peri-choledochal plexus) を可能なかぎり温存する。

胆管吻合法(連続 or 結節, 使用する系), 多穴症例に対する胆管形成の有無に関しては術者の裁量による。

図① 定型化後のDD法

と、35%から19.4%に減少しており、一定の効果が認められたものと考えている。全症例でのDD法後の胆管狭窄に寄与する因子を単変量解析すると、多穴症例、高齢ドナーからのグラフトなどが有意な因子として抽出されたが、多変量解析では有意な因子は残らず、明らかな危険因子を特定することはできなかった。

23例の狭窄例のうち他因死や再移植を受けた6例を除外し、17例の治療を検討すると、経皮的に14例、内視鏡的に3例と経皮中心の治療をおこなってきた。治療完遂してtube freeとなった症例は内視鏡的3例を含む11例で、ほか5例が治療中であり、1例のみ経皮的内瘻化ができず再手術（肝内胆管空腸吻合）を施行した⁹⁾。グラフト生存率の検討では胆管狭窄の有無で有意な差を認めなかった。

◆おわりに

ALDLT後の胆管合併症につき概説した。合併症を減らすべく手技的な改良・工夫を継続するとともに、合併症発症例には、移植医のみならず、他科との連携による適切な治療法の選択・実施・完遂がきわめて重要と思われた。

文献

- 1) Liu CL *et al* : *Ann Surg* 243 : 404, 2006
- 2) Kiuchi T *et al* : *Transplant Proc* 33 : 1320, 2001
- 3) Kasahara M *et al* : *Ann Surg* 243 : 559, 2006
- 4) Kyoden Y *et al* : *Clin Transplant* 24 : 535, 2010
- 5) Soejima Y *et al* : *Liver Transpl* 12 : 979, 2006
- 6) Marubashi S *et al* : *Transplantation* 88 : 1123, 2009
- 7) Hwang S *et al* : *Liver Transpl* 12 : 831, 2006
- 8) Kawachi S *et al* : *Surgery* 132 : 48, 2002
- 9) Shimazu M *et al* : *Transplantation* 79 : 621, 2005

抗ドナー抗体と拒絶反応

富田紘史¹, 星野 健¹, 瀧本康史¹, 加藤源俊¹, 狩野元宏¹, 藤村 匠¹, 有末篤弘¹, 高里文香¹, 下島直樹¹, 松原健太郎¹, 八木 洋¹, 北郷 実¹, 篠田昌宏¹, 尾原秀明¹, 板野 理¹, 河地茂行¹, 田邊 稔¹, 杜 雯林², 坂元亨宇², 若林 剛³, 島津元秀⁴, 森川康英⁵, 北島政樹⁵, 北川雄光¹, 黒田達夫¹

¹慶應義塾大学医学部外科, ²慶應義塾大学医学部病理, ³岩手医科大学医学部外科, ⁴東京医科大学八王子医療センター消化器外科・移植外科, ⁵国際医療福祉大学

◆はじめに

移植医療の成績向上には、カルシニューリン阻害薬の登場でT細胞による細胞性拒絶反応のコントロールがよくなったことが大きく貢献している。一方で、超急性拒絶反応や慢性拒絶反応のような抗体関連型拒絶反応の制御に関しては、いまだ十分とはいえない¹⁾。

われわれは、門脈閉塞まで至るほどの重症拒絶を起こし、直接クロスマッチの推移から抗ドナー抗体が出現したと考えられたが、治療が奏効し救命し得た症例を経験した。ここでは抗体関連型拒絶反応に関する知見を含め、若干の文献的考察を加えて症例を報告する。

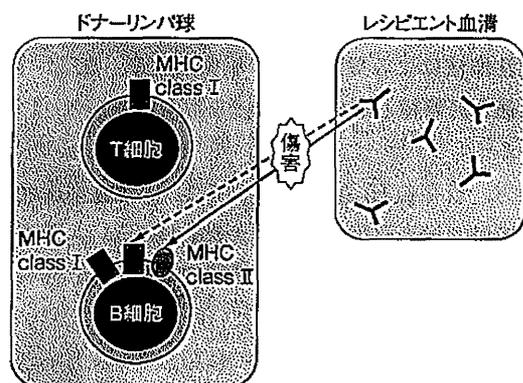
1. 抗ドナー抗体の検査法

1969年に Patel と Terasaki²⁾が、腎移植においてドナーリンパ球に対する抗体をレシピエント血清が有する場合に早期グラフト不全が多いことを報告して以来、直接クロスマッチは臓器移植の術前検査としてルーチンにおこなわれるようになった。直接クロスマッチはドナーのT/B細胞を用いてドナーに特異的に反応する抗体(donor specific antibody : DSA)を検出する方法であり、lymphocytotoxic crossmatch test : LCT法(別名 complement-dependent cytotoxicity : CDC法)が従来用いられてきた。また、より感度の高い方法としてフローサイトメトリー法が登場し、臓器移植の世界では直接クロスマッチの標準法になっている¹⁾。

直接クロスマッチにおける DSA の検出では、検査にドナーの生きたリンパ球が必要で、その入手と準備に手間とコストがかかることが問題である。入手が不可能なこともまれではない。これに対し、ドナーのリンパ球を必要とせずに検出できる HLA 抗体は panel reactive antibody (PRA) とよばれている。PRA では十数種~数十種のパネル(細胞または抗原蛋白)を用意し、それに

検体血清を反応させて抗体の有無をみる。近年では単一の HLA 精製抗原が得られるようになり、フローサイトメトリー法やルミネックス法による高感度の HLA 抗体スクリーニングがおこなわれている¹⁾。

後述する症例報告にある、直接クロスマッチで T 細胞陰性 B 細胞陽性の場合の解釈であるが、T 細胞には MHC class I しか発現していないが、B 細胞には MHC class II と T 細胞より多い量の MHC class I が発現している。したがって T 細胞陰性 B 細胞陽性のリンパ球クロスマッチは、ドナー MHC class II に対する抗体か、もしくはドナー MHC class I に対する少量の抗体を有することを示唆する(図①)。腎臓移植術前においても T 細胞陰性 B 細胞陽性のリンパ球クロスマッチが予後に及ぼす影響は定まっていないが、Engら³⁾は CDC 法での直接



図① T細胞陰性B細胞陽性のリンパ球クロスマッチ
T細胞にはMHC class Iしか発現していないが、B細胞にはMHC class IIとT細胞より多い量のMHC class Iが発現している。したがってT細胞陰性B細胞陽性のリンパ球クロスマッチは、ドナーMHC class IIに対する抗体か、もしくはドナーMHC class Iに対する少量の抗体を有することを示唆する。

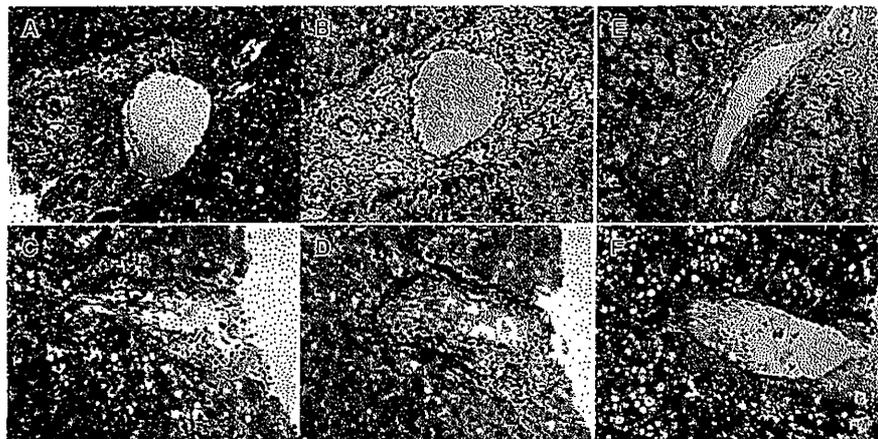


図2 症例の病理組織像

A~D: 術後11日目: A, C: HE染色; B: C4d染色; D: EVG染色; E, F: 術後22日目, HE染色, 10×20倍. 上段は門脈域, 下段は中心静脈を示す. 術後11日目の病理組織像では門脈域の炎症細胞浸潤, 軽度の門脈内皮炎, 高度の中心静脈内皮炎を認め, 門脈内皮にC4d染色陽性所見を認めた. 術後22日目の病理組織像では炎症細胞浸潤はほぼ消失していた.

クロスマッチでT細胞陰性B細胞陽性となった症例にルミネックス法で精査したところ, 33%の症例に抗ドナー特異的抗体が検出され, 晚期グラフト不全が有意に多かったと報告している.

2. 超急性拒絶反応

超急性拒絶反応は, 既存のABO抗体やHLA抗体などによる液性免疫が主たる原因で, いったん起こった場合, 治療困難で移植後早期にグラフト不全を引き起こす⁴⁾.

ABO血液型不適合肝移植は脳死ドナーが決定的に不足しているわが国以外ではほとんどおこなわれていないのが現状ではあるが, ABO抗体による超急性拒絶反応は, 術前のリツキシマブによるB細胞除去療法や, 術後の門注療法による局所反応の制御により, ABO一致または適合肝移植と遜色ない成績を上げられるようになってきている⁵⁾.

一方, 既存のHLA抗体などによる超急性拒絶反応に対しては, 従来直接クロスマッチをおこない, 陽性例では移植を避けることでこれを予防する戦略がとられてきた¹⁾. 腎移植においては禁忌といわれている直接クロスマッチ陽性であるが, 肝移植では超急性拒絶反応がおきにくいことが1970年代から知られている⁴⁾. この仕組みとしては, 門脈と肝動脈の二重の血流支配を受けていること, 類洞内のクッパー細胞が沈着した抗体や血栓, 免疫複合体を処理していること, 可溶性のMHC class I抗原を放出していることなどが想定されている⁴⁾. 肝移植においては, 術前の直接クロスマッチ陽性が拒絶反応

など合併症の発生率や予後に与える影響は議論が分かれるところである. こと小児肝移植においては直接クロスマッチが陽性でも通常の管理で合併症や拒絶の頻度は増加せず, 予後にも影響しなかったと報告されており⁶⁾, 当科においてもとくに禁忌とはしていない.

3. 慢性拒絶反応

慢性拒絶反応は, 胆管, 肝動脈, 中心静脈と周囲の肝実質の障害を病理学的な特徴とする病態で, 多くは急性拒絶反応に引きつづいて起こる. 肝移植後5年間の発生率は3~5%と他の固形臓器とくらべて頻度は低いものの, 進行性の胆汁うっ滞を示し治療抵抗性である⁷⁾.

腎臓をはじめとする固形臓器移植において, 慢性拒絶の原因は移植後の*de novo* HLA抗体であると考えられるはじめて⁸⁾. HLA抗体出現時の抗体除去や抗体産生の制御は今後の課題であるが, わが国で保険認可された方法としてはミコフェノール酸モフェチル(MMF)の投与があり, 腎移植後の慢性抗体関連型拒絶反応に対する有効性が提唱されている⁹⁾.

4. 急性細胞性拒絶反応における液性免疫の関与

急性細胞性拒絶反応ではT細胞が中心的な役割を果たすわけであるが, 活性化T細胞の存在はB細胞を介する液性免疫反応を促進する. Kasaharaら¹⁰⁾はABO適合肝移植後の急性細胞性拒絶反応の76.5%に, 同時, もしくはこれに先立って, T細胞フローサイトメトリークロスマッチによりDSAが検出されたことを報告している. この報告ではクロスマッチ陽性と拒絶反応の重症度とは

関連していない。慢性拒絶反応への移行に関しては今後データの集積が必要であろう。

5. 症例提示

1歳7ヵ月男児。胆道閉鎖症に対して日齢73に肝門部空腸吻合術を施行するも減黄不良であり、父をドナーとする生体部分肝移植術を施行した。血液型は一致。術前の直接クロスマッチはT細胞、B細胞ともに陰性であった。術直後から門脈吻合部狭窄を認めていたが血流は良好であった。免疫抑制療法としては術直後よりシクロスポリンA (CyA) の静注、少量ステロイドを投与し、術後4日目からMMFの投与を開始した。術後10日目からトランスアミナーゼの上昇を認め、術後11日目に肝生検を施行した。術後12日目に急性門脈閉塞を発症したが、前日の肝生検から中心静脈が閉塞するほどの内皮炎を伴う重症急性細胞性拒絶 [Banff分類: rejection activity index (RAI)=6; P2 B1 V3] と診断したことから、吻合部狭窄に加えて拒絶に伴う門脈血流の低下により急性門脈閉塞に陥ったと判断した(図9)。このため、治療方針としては拒絶の治療に重点を置き、可能なかぎり低侵襲な方法での門脈閉塞の解除をおこなうこととした。小開腹下、経腸間膜静脈的に門脈の血栓溶解、吻合部バルーン拡張術を施行し、弱いながらも求肝性の門脈血流が得られたことを確認した。その後ただちに拒絶に対するステロイドパルス、タクロリムス (FK506) の持続静注を開始し、外科的に安定した後MMFの増量をおこなった。

術後18日目に直接クロスマッチを再検したところ、T細胞クロスマッチは陰性であったがB細胞クロスマッチが陽性化 (scale 8/8/6) していた。術後11日目の肝生検検体でC4d染色をおこなったところ門脈内皮と中心静脈内皮に陽性所見が得られ、抗ドナー抗体の関与が示唆された。治療への反応は良好で、術後22日目の肝生検で拒絶の所見が消失していることを確認した。術後47日目に直接クロスマッチを再検し、反応が低下していることを確認した (scale 4/2/2)。肝機能は良好となり、術後61日目に軽快退院した(図9)。術後1年で門脈狭窄の再燃による肝機能障害、食道静脈瘤を認めたため経皮経肝的に門脈吻合部バルーン拡張術を施行したが、このときのB細胞クロスマッチはscale 2/2/1とさらに反応が低下していた。

◆おわりに

中心静脈周囲炎はBanff分類で重症拒絶とするのに必

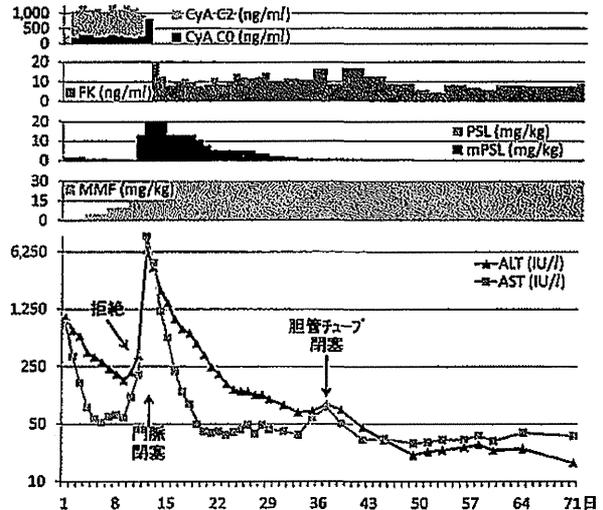


図9 症例の術後経過
術後トランスアミナーゼの推移と免疫抑制薬の投与量を示す。CyA:シクロスポリンA, C2:投与後2時間値, C0:トラフ値, PSL:プレドニゾン, mPSL:メチルプレドニゾン, FK:タクロリムス(トラフ値), MMF:ミコフェノール酸モフェテル

要な所見である¹¹⁾。拒絶により門脈血流が遠心性となった過去の報告では、免疫抑制療法が奏効した例¹²⁾もあるが、死亡例も報告されている¹³⁾。また、脾摘やシャント結紮などの外科的治療が有効であったとの報告¹⁴⁾もある。本症例ではベースに門脈狭窄という外科的合併症が存在していたことから一概には比較できないが、門脈拡張術と免疫抑制療法の組み合わせにより救命が可能であった。液性因子と細胞性拒絶の重症度との関連や、慢性拒絶への移行などはいまだ明らかとなっていない課題であり、慎重な経過観察が肝要と思われた。

文献

- 1) 佐治博夫: 移植 45 : 494, 2010
- 2) Patel R *et al* : *N Engl J Med* 280 : 735, 1969
- 3) Eng HS *et al* : *Am J Transplant* 8 : 2335, 2008
- 4) 羽賀博典ほか: 今日の移植 20 : 537, 2007
- 5) Tanabe M *et al* : *Eur J Clin Invest* 40 : 943, 2010
- 6) Saito T *et al* : *Pediatr Transplant* 13 : 194, 2009
- 7) Demetris A *et al* : *Hepatology* 31 : 792, 2000
- 8) Terasaki PI *et al* : *Transplantation* 86 : 377, 2008
- 9) 中川健: 医学のあゆみ 237 : 549, 2011
- 10) Kasahara M *et al* : *Transplantation* 67 : 568, 1999
- 11) Demetris AJ *et al* : *Hepatology* 25 : 658, 1997
- 12) Jones VS *et al* : *Pediatr Transplant* 14 : E34, 2010
- 13) Sugimoto H *et al* : *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8 : 573, 2001
- 14) Kyoden Y *et al* : *Abdom Imaging* 30 : 303, 2005

PTLD

三原規奨¹, 田邊 稔¹, 河地茂行¹, 板野 理¹, 尾原秀明¹, 篠田昌宏¹, 北郷 実¹,
八木 洋¹, 日比泰造¹, 松原健太郎¹, 藤崎洋人¹, 西山 亮¹, 下島直樹¹, 淵本康史¹,
星野 健¹, 若林 剛², 島津元秀³, 森川康英⁴, 北島政樹⁴, 黒田達夫¹, 北川雄光¹

¹ 慶應義塾大学医学部外科, ² 岩手医科大学外科, ³ 東京医科大学八王子医療センター消化器外科・移植外科,

⁴ 国際医療福祉大学

◆はじめに

移植後リンパ増殖性疾患 (post-transplant lymphoproliferative disorder: PTLD) は, まれではあるが, 骨髄移植や固形臓器移植後に生命を脅かす危険のある重要な合併症の一つである。PTLD は, 良性リンパ増殖性疾患から悪性リンパ腫を含む疾患群であり, その多くは B リンパ球由来で, 活動性 Epstein-Barr virus (EBV) 感染と関連するとされている。また, PTLD は, 医原性免疫抑制を原因とし, その経過は, 病勢が強くなりリンパ節外性病変が多い特徴がある¹⁾。成人肝移植例での発生頻度は 1~3% で, 免疫抑制期間, 程度, EBV の血清学的な状態と肝移植原疾患に関連すると報告されている²⁾。これまでの報告の多くが, 小児肝移植や脳死肝移植例を中心に なされている一方で, 成人生体肝移植における PTLD の報告例は少ない。当科では, これまで, 1997 年から 2011 年 3 月まで 176 例の生体肝移植をおこなった。成人 (18 歳以上) の生体肝移植例 102 例のうち, 2 例で PTLD の発症を認めたが, いずれも EBV 感染との関連性は示唆されず, 移植後 10 年の経過で発症, 原疾患は原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis: PSC) であった。これらは, 小児肝移植症例や欧米の多くの脳死肝移植後報告例とくらべた成人生体肝移植例の特徴を示唆する可能性があると考えられた。

1. 定義と疫学¹⁾

PTLD は, 固形臓器移植後や骨髄移植後のレシピエントに免疫抑制をおこなったあとに発症するリンパ球増殖性疾患と定義される。PTLD は, 免疫抑制状態の患者に起こる EBV 由来の伝染性単核球症から悪性リンパ腫までの幅広いスペクトラムを含む疾患群である (表 1)¹⁾²⁾。

PTLD の臨床的特徴は, 施設間である程度異なることが報告されており, それは, 人種やグラフト, 免疫抑制薬の種類や量が異なることによる可能性が高い。さまざま

まなりスクファクターが報告されているが, 最も重要なものの一つに, 移植時の EBV の血清学的陰性があげられる。また, 成人の固形臓器移植後レシピエントにおいては, 免疫抑制薬のレジメンや強さに関連するとされている。成人肝移植後の発症頻度は 1~3% である一方で, 肺や小腸移植後では 5% 以上と報告されている。また, 小児レシピエントにおいては, 発症頻度がより高く, これは, 移植を契機とした EBV の初感染によるものと考えられている。

2. etiology¹⁾

PTLD の多くが EBV 感染との関連を認める一方で, 30% の PTLD は, EBV 感染との関連を認めない。さらに EBV 陰性 PTLD は, 増加傾向にあり, 成人に多く, EBV 陽性例とくらべて発症が遅く, 移植後 4, 5 年を経て発症, monomorphic type の PTLD の割合が多いなどの特徴をもつ。EBV 陰性 PTLD の病因は明らかでないことが多く, 未知のウイルスや移植グラフトによる慢性的な抗原提示によるともいわれている。

表 1 PTLD の WHO 分類

I. 初期病変
形質細胞性過形成
伝染性単核球症様
II. 単形性 PTLD (これらの病態と似たリンパ腫による分類)
III. 多形性 PTLD
B 細胞性腫瘍
びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL)
バーキットリンパ腫
形質細胞性骨髄腫
形質細胞腫様病変
その他
T 細胞性腫瘍
末梢性 T 細胞リンパ腫, その他の病態に分類できないもの
肝脾リンパ腫
その他
IV. 古典的ホジキンリンパ腫様 PTLD

(Steven HS *et al.* 2008¹⁾, Végso G *et al.* 2011²⁾より引用)

表② 欧米の成人肝移植後の報告のまとめ

	症例数	PTLD (n)	TTD (月)	EBV (%)	Late-onset (%)	節外病変	Monomorphic (%)
Duvoux 2002	480	16	5.5	87	19	81	88
Avolio 2007	236	5	27	80	60	80	40
Patel 2007	1,179	15	25	79	65	71	53
Dhillon 2007	1,755	23	50	39	83	65	—

TTD: 移植後 PTLD 発症までの中位時間, Late-onset: 移植後 1 年以上を経て発症
(Kataoka K *et al.* 2010³⁾より改変引用)

3. 臨床的特徴¹⁾²⁾

PTLD は、グラフトの種類によらずリンパ節や消化管、肺や肝臓に病変が多い一方で、中枢神経系の病変進展はまれである。固形臓器移植においては、グラフトに PTLD が起こることが多く、感染や拒絶反応と混乱することもある。グラフトの PTLD 病変は、移植後早期 (1 年以内, early-onset type) に発症することが多い。

PTLD 患者の発症時の症状は、非特異的な全身倦怠感、易疲労感、体重減少、発熱といったもののほかに、リンパ節腫大やグラフト機能障害といったものがある。

4. 治療¹⁾

PTLD の治療は、第一に免疫抑制薬の減量が行われる。とくに early lesions, polymorphic type では、治療に反応しやすく、拒絶反応さえ起こらなければ、減量治療反応例の予後はきわめてよい。しかし、免疫抑制薬の減量に伴う急性や慢性の拒絶反応によりグラフトロスに陥った例もあり、注意が必要である。多くの monomorphic type PTLD は、免疫抑制薬の減量のみでは治療に反応せず、抗 CD20 抗体 (リツキシマブ) やそのほかの化学療法による治療を必要とする。予後不良因子として、病変の広がりが多臓器にわたる、診断時の年齢が高い、late-onset type, International Prognostic Index が高い、LDH 高値などの報告があるが、施設間で大きくその結果は異なっている。

5. 成人肝移植と PTLD^{3)~5)}

生体肝移植は、1989 年にはじめて小児例でおこなわれ、end-stage liver diseases を患う患者に対して、脳死ドナーの少ないわが国で多く広まった。比較的歴史が浅いためか、生体肝移植例における PTLD の報告は少なく、多くが欧米からの脳死肝移植後の PTLD についてである。以下に欧米からの成人肝移植後 PTLD の報告を示す(表②)³⁾。

Kremers ら⁴⁾は、成人肝移植後 PTLD 37 例について報告した。移植後 4 年以内に発症する早期発症例は、EBV 陽性で、それ以降の発症例は、EBV 陰性例が多い。また、移植後早期に発症する PTLD の原疾患として劇症肝

炎が有意に多く、拒絶反応に対する高用量ステロイドやムロモナブ-CD3 による治療について、PTLD 発症リスクが高く、さらに PTLD 関連の死亡率も高いと結論した。

Patel ら⁵⁾は、PTLD 17 例について、リンパ節外病変が多く、41%の症例で、グラフト肝に病変を認めた。また、79%の症例で EBV 陽性であり、免疫抑制薬の減量とリツキシマブを中心とした化学療法の有効性を報告した。

その他の報告も含め、表②³⁾に成人肝移植後 PTLD の特徴を示した。成人肝移植後の PTLD の発症頻度は、1~3%である。生存率は、50%前後であり、肝移植後に生命を脅かす危険のある重篤な合併症の一つといえる。

6. 症例提示

1) 症例 1

46 歳女性、原疾患は PSC であった。2000 年に、生体部分肝移植術を施行した。術後の免疫抑制薬は、タクロリムスとステロイド、ミコフェノール酸モフェテル (MMF) を使用した。移植後 11 年、38.5 度の発熱と全身倦怠感を主訴に外来を受診。胸腹部骨盤部の CT 検査をおこない、後腹膜に 10 cm 大の mass と傍大動脈のリンパ節腫大を認めた (図①A)。CT ガイド下生検をおこない、diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) と診断した。EBV-PCR は陰性。骨髓穿刺で病変の浸潤を認めず、消化管内視鏡でも明らかな病変を認めなかった。

治療は、免疫抑制薬の減量と化学療法をおこなった。タクロリムスの減量と、ステロイドと MMF を中止した。化学療法は、R-CHOP 療法 (リツキシマブ 375 mg/m², シクロホスファミド 750 mg/m², アドリアマイシン 50 mg/m², ビンクリスチン 1.4 mg/m², プレドニゾロン 100 mg/日) を合計 8 サイクルをおこなった。有害事象は、白血球減少を一度認めたものの治療を完遂した。R-CHOP 6 サイクル施行後の CT 上病変の消失を認め、complete remission (CR) と判定した (図①B)。治療後免疫抑制薬は、減量のまま注意深く肝機能を評価する方針とした。また、治療中に肝生検を施行し、今後の拒絶反応などの評価のコントロールとした。