

**Table 5** Survival rates and etiology of patients with fulminant hepatitis (FH) and late-onset hepatic failure (LOHF) who did not have liver transplantation

	FH			LOHF (n = 23)
	Total (n = 352)	Acute type (n = 191)	Subacute type (n = 161)	
Viral infection	39.8 (70/176)	49.2 (58/118)	20.7 (12/58)**	14.3 (1/7)
HAV	57.1 (8/14)	61.5 (8/13)	0 (0/1)	–
HBV	36.2 (55/152)	46.1 (47/102)	16.0 (8/50)**	14.3 (1/7)
(1) Transient infection	52.6 (40/76)	54.4 (37/68)	37.5 (3/8)	–
(2) Acute exacerbation in HBV carrier	15.1 (8/53)	21.4 (3/14)	12.8 (5/39)	14.3 (1/7)
(i) Inactive carrier, without drug exposure	29.2 (7/24)	27.3 (3/11)	30.8 (4/13)	0 (0/1)
(ii) Reactivation in inactive carrier†	7.7 (1/13)	0 (0/3)	10.0 (1/10)	20.0 (1/5)
(iii) Reactivation in transiently infected patients‡	0 (0/16)	–	0 (0/16)	0 (0/1)
(3) Indeterminate infection patterns	30.4 (7/23)	35.0 (7/20)	0 (0/3)	–
HCV	50.0 (2/4)	100 (1/1)	33.3 (1/3)	–
HEV	75.0 (3/4)	100 (2/2)	50 (1/2)	–
Other viruses	100 (2/2)	–	100 (2/2)	–
Autoimmune hepatitis	32.4 (9/28)	40.0 (2/5)	30.4 (7/23)	12.5 (1/8)
Drug allergy-induced	32.8 (19/58)	43.3 (13/30)	21.4 (6/28)	0 (0/3)
Indeterminate§	37.6 (32/85)	54.5 (18/33)	26.9 (14/52)*	20.0 (1/5)
Unclassified¶	1.5 (7)	40.0 (2/5)	–	–

\*\* $P < 0.01$  vs acute type.

†Reactivation in inactive carrier by immunosuppressant and/or anticancer drugs.

‡Reactivation in transiently infected patients by immunosuppressant and/or anticancer drugs (de novo hepatitis).

§Indeterminate etiology despite sufficient examinations.

¶Unclassified due to insufficient examinations.

Data in parentheses indicate patient numbers.

HAV, hepatitis A virus; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HEV, hepatitis E virus.

Recently, powerful HDF using large buffer volumes (HF-HDF or HF-CHDF), or on-line HDF has been used. HF-HDF or HF-CHDF has a high recovery rate from a coma.<sup>22–24</sup> On-line HDF has an excellent recovery rate from a coma and is useful as a liver support system.<sup>25</sup> However, only 16% of patients with FH received these powerful HDF in the survey examined in the current study. The frequency of brain edema, gastrointestinal bleeding and congestive heart failure was decreased compared with that in the previous survey. Advances in artificial liver support and management may contribute to prevent these complications. Further evaluation is required to determine whether a new powerful support system can improve the prognosis of FH. The survival rate for FH patients with autoimmune hepatitis improved 17.1% in the previous survey to 32.4% in the 2004–2009 survey. Early commencement of corticosteroids may improve the prognosis. However, the efficacy of these drugs has not been evaluated statistically.

Recently, in patients with acute liver failure due to HBV, entecavir has been used more frequently than

lamivudine because of its high potency and extremely low rates of drug resistance.<sup>26</sup> Entecavir beneficially affects the course of acute liver failure as lamivudine.<sup>27,28</sup> Despite the use of entecavir, the prognosis of HBV-infected patients, especially in HBV carriers, has not improved. In the case of HBV reactivation, it is difficult to prevent development of liver failure, even when nucleoside analogs are administered after the onset of hepatitis. Because these agents require a certain amount of time to decrease HBV DNA in serum, they need to be administered in the early phase of hepatitis. Guidelines for preventing HBV reactivation recommend the administration of nucleoside analogs before the start of immunosuppressive therapy in inactive carriers and at an early stage of HBV reactivation during or after immunosuppressive therapy in transiently infected patients.<sup>29</sup>

Despite new therapeutic approaches and intensive care, the prognosis of patients without LT with both types of FH and LOHF appeared similar to that in the previous survey. In contrast, the prognosis of patients receiving LT was good in the present survey. Yamashiki

*et al.* reported that the short-term and long-term outcomes of living-donor LT for acute liver failure were good, irrespective of the etiology and disease types.<sup>30</sup> In the current survey, the implementation rate of receiving LT was almost equivalent to that in the previous survey, irrespective of disease type. Notably, only two patients received deceased-donor LT in the current survey. Recently, patients with FH who received deceased-donor LT have been increasing since the new organ transplant bill passed in 2009. Hepatologists should realize that more donor action to increase deceased-donor LT is necessary to improve the prognosis of patients with FH or LOHF. Determining appropriate judgment to move forward to LT is the most important step. The indications for LT in cases of FH are determined according to the 1996 Guidelines of the Acute Liver Failure Study Group of Japan.<sup>31</sup> To improve the low sensitivity and specificity of assessment in patients with acute and sub-acute types,<sup>32</sup> new guidelines for using a scoring system have been established by the Intractable Hepato-Biliary Disease Study Group of Japan.<sup>33</sup> This novel scoring system showed sensitivity and specificity of 0.80 and 0.76, respectively, and greater than those in the previous guideline.<sup>33</sup> Recently, new prediction methods using data-mining analysis has been established.<sup>34,35</sup>

In conclusion, the demographic features and etiology of FH and LOHF have been gradually changing. HBV reactivation due to immunosuppressive therapy is a particular problem because of poor prognosis. The sub-acute types of FH and LOHF have a poor prognosis, irrespective of the etiology. Despite recent advances in therapeutic approaches, the implementation rate for LT and survival rates of patients without LT are similar to those in the previous survey.

## ACKNOWLEDGMENT

THIS STUDY WAS performed with the support of the Ministry of Health, Labor and Welfare as an official project by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan.

## REFERENCES

- 1 Inuyama Symposium Kiroku Kanko-kai. Hepatitis Type A and Fulminant Hepatitis. *The Proceedings of the 12th Inuyama Symposium*. Tokyo: Chugai Igaku-sha, 1982. (In Japanese.)
- 2 Takahashi Y, Shimizu M. Aetiology and prognosis of fulminant viral hepatitis in Japan: a multicentre study. The Study Group of Fulminant Hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 159–64.
- 3 Gimson AE, O'Grady J, Ede RJ, Portmann B, Williams R. Late onset hepatic failure: clinical, serological and histological features. *Hepatology* 1986; 6: 288–94.
- 4 Mochida S, Takikawa Y, Nakayama N *et al.* Diagnostic criteria of acute liver failure: a report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. *Hepatol Res* 2011; 41: 805–12.
- 5 Sugawara K, Nakayama N, Mochida S. Acute liver failure in Japan: definition, classification, and prediction of the outcome. *J Gastroenterol* 2012; 47: 849–61.
- 6 Sato S, Suzuki K, Takikawa Y, Endo R, Omata M, Japanese National Study Group of Fulminant H. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan before the substantial introduction of liver transplantation: an analysis of 1309 cases in a 15-year national survey. *Hepatol Res* 2004; 30: 155–61.
- 7 Fujiwara K, Mochida S, Matsui A *et al.* Fulminant hepatitis and late onset hepatic failure in Japan. *Hepatol Res* 2008; 38: 646–57.
- 8 Oketani M, Ido A, Uto H, Tsubouchi H. Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy. *Hepatol Res* 2012; 42: 627–36.
- 9 Mochida S, Fujiwara K. Symposium on clinical aspects in hepatitis virus infection. 2. Recent advances in acute and fulminant hepatitis in Japan. *Intern Med* 2001; 40: 175–7.
- 10 Bone RC, Balk RA, Cerra FB *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644–55.
- 11 Mori M, Itanai F, Washio S. Estimated number of patients with intractable liver diseases in Japan based on nationwide epidemiology surveillance. *Annual Report of Epidemiology Research for Intractable Diseases in Japan, the Ministry of Health, Welfare and Labor (2005)*. 2006: 39–42. (In Japanese.)
- 12 Lammert C, Einarsson S, Saha C, Niklasson A, Bjornsson E, Chalasani N. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology* 2008; 47: 2003–9.
- 13 Dhiman RK, Jain S, Maheshwari U *et al.* Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure: an assessment of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) and King's College Hospital criteria. *Liver Transpl* 2007; 13: 814–21.
- 14 Schiodt FV, Chung RT, Schilsky ML *et al.* Outcome of acute liver failure in the elderly. *Liver Transpl* 2009; 15: 1481–7.
- 15 Yeo W, Chan TC, Leung NW *et al.* Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J Clin Oncol* 2009; 27: 605–11.

- 16 Hui CK, Cheung WW, Zhang HY *et al.* Kinetics and risk of de novo hepatitis B infection in HBsAg-negative patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *Gastroenterology* 2006; 131: 59–68.
- 17 Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362: 371–3.
- 18 Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F *et al.* Sporadic acute hepatitis E occurred constantly during the last decade in northeast Japan. *J Gastroenterol* 2009; 44: 329–37.
- 19 Yasui S, Fujiwara K, Yonemitsu Y, Oda S, Nakano M, Yokosuka O. Clinicopathological features of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol* 2011; 46: 378–90.
- 20 Fujiwara K, Yasui S, Yokosuka O. Efforts at making the diagnosis of acute-onset autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2011; 54: 371–2.
- 21 Stravitz RT, Lefkowitz JH, Fontana RJ *et al.* Autoimmune acute liver failure: proposed clinical and histological criteria. *Hepatology* 2011; 53: 517–26.
- 22 Inoue K, Kourin A, Watanabe T, Yamada M, Yoshida M. Artificial liver support system using large buffer volumes removes significant glutamine and is an ideal bridge to liver transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 259–61.
- 23 Yokoi T, Oda S, Shiga H *et al.* Efficacy of high-flow dialysate continuous hemodiafiltration in the treatment of fulminant hepatic failure. *Transfus Apher Sci* 2009; 40: 61–70.
- 24 Shinozaki K, Oda S, Abe R, Tateishi Y, Yokoi T, Hirasawa H. Blood purification in fulminant hepatic failure. *Contrib Nephrol* 2010; 166: 64–72.
- 25 Arata S, Tanaka K, Takayama K *et al.* Treatment of hepatic encephalopathy by on-line hemodiafiltration: a case series study. *BMC Emerg Med* 2010; 10: 10.
- 26 Colonno RJ, Rose R, Baldick CJ *et al.* Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 1656–65.
- 27 Torii N, Hasegawa K, Ogawa M, Hashimo E, Hayashi N. Effectiveness and long-term outcome of lamivudine therapy for acute hepatitis B. *Hepatol Res* 2002; 24: 34.
- 28 Jochum C, Gieseler RK, Gawlista I *et al.* Hepatitis B-associated acute liver failure: immediate treatment with entecavir inhibits hepatitis B virus replication and potentially its sequelae. *Digestion* 2009; 80: 235–40.
- 29 Tsubouchi H, Kumada H, Kiyosawa K. Prevention of immunosuppressive therapy or chemotherapy-induced reactivation of hepatitis B virus infection: joint report of the Intractable Liver Disease Study Group of Japan and the Japanese Study Group of the Standard Antiviral Therapy for Viral Hepatitis. *Acta Hepatol Jpn* 2009; 50: 38–42. (In Japanese.)
- 30 Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S *et al.* Outcome after living donor liver transplantation for acute liver failure in Japan; results of a nationwide survey. *Liver Transpl* 2012; 18: 1069–77.
- 31 Sugihara J, Naito T, Ishiki Y *et al.* A multicenter study on the prognosis and indication of liver transplantation for fulminant hepatitis in Japan: details of decision of the guideline for liver transplantation in Japanese Acute Hepatic Failure Study Group. *Acta Hepatol Jpn* 2001; 42: 543–57. (In Japanese.)
- 32 Mochida S, Nakayama N, Matsui A, Nagoshi S, Fujiwara K. Re-evaluation of the Guideline published by the Acute Liver Failure Study Group of Japan in 1996 to determine the indications of liver transplantation in patients with fulminant hepatitis. *Hepatol Res* 2008; 38: 970–9.
- 33 Naiki T, Nakayama N, Mochida S *et al.* 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.
- 34 Nakayama N, Oketani M, Kawamura Y *et al.* Novel classification of acute liver failure through clustering using a self-organizing map: usefulness for prediction of the outcome. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1127–35.
- 35 Nakayama N, Oketani M, Kawamura Y *et al.* Algorithm to determine the outcome of patients with acute liver failure: a data-mining analysis using decision trees. *J Gastroenterol* 2012; 47: 664–77.

# 10 ウイルス性急性肝炎，劇症肝炎の治療

井上和明\*  
いの うえ かず あき

## ポイント

- 急性肝炎の大半は自然回復するので，慎重に経過観察をすれば十分である。
- 肝炎治療は抗ウイルス療法と免疫抑制療法からなる。
- 抗ウイルス療法は持続感染するウイルスに対して行う。
- 免疫抑制療法は肝細胞破壊を急速に停止させるためにステロイドパルス療法とシクロスポリンの持続点滴を組み合わせて行う。
- 血液浄化療法は血漿交換と血液濾過透析を組み合わせて施行する。
- 血漿交換の目的は欠乏する因子の補充と体内分布の小さい蛋白結合性物質の除去である。
- 血液濾過透析の目的は大量のバッファーを用いて体内分布の大きな水溶性物質の除去である。

## キーワード

抗ウイルス療法，免疫抑制療法，血液浄化療法，血漿交換，血液濾過透析

\*昭和大学藤が丘病院 消化器内科

一般臨床の場で急性肝炎および劇症肝炎の原因として遭遇するウイルスはHAV，HBV，HCV，HEV，EBVなどに限られるが，劇症肝炎では成因不明例が30%近くを占め，そのなかにも少なからずウイルス性の原因が含まれると筆者は考えている。劇症肝炎の原因は予後に影響を与える重要な因子の一つである。したがって症候に対する治療に加えて，原因に対する治療をしていくことはきわめて重要である。治療に当たっては病態を検討するうえで病初期の肝生検も適切な治療を行うための重要な手がかりになりうる。本稿では筆者らが実際に行っている治療経験をもとに述べる。

## ●急性肝炎の治療

### 1. 経過観察

急性肝炎は基本的に特異的な治療をすることなく自然回復するものが大半である。そのため基本的には経過観察と食餌がとれない場合は輸液やビ

$$\lambda = -0.89 + 1.74(\text{etiology}) + 0.056 \times T. \text{ Bil.} - 0.014 \times \text{CHE}$$

成因1: HAV, HBV, Drug 2: その他

$\lambda > 0$ : development of FHF

図1 与芝の予知式

(Yoshihisa M: J Gastro 37: 916-921, 2002 より引用)

タミン剤の投与をする程度の治療で十分である。経過観察をしてトランスアミナーゼが低下し，凝固能も回復していく場合は特に経過観察を継続するだけで十分であるが，トランスアミナーゼ低下が遅く，黄疸が増強してくるような場合は劇症化の危険性があるかどうかを判断するため与芝の予知式(図1)が重要である。臨床経過に伴い予知式のZ値が明らかに増加してくる場合は(図2)劇症化する危険があるので，肝炎を起こしている原因に対する治療と脳症が出れば人工肝補助療法が必要となる。



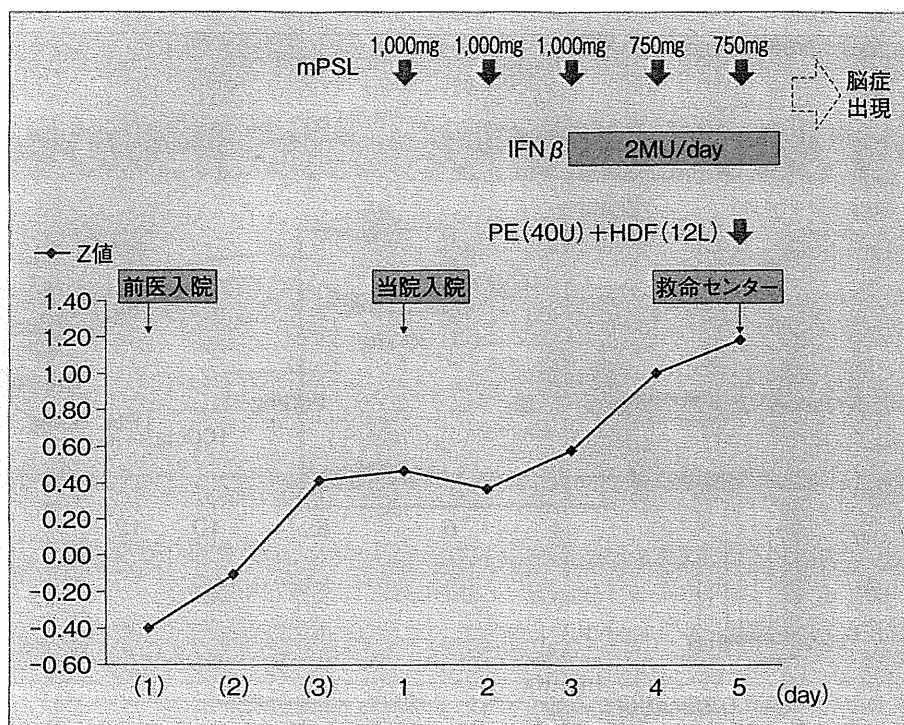


図 2 42 歳，男性：予知式 Z 値の時間推移

## 2. 肝炎治療

一般に肝炎に対する治療を行う場合は、炎症反応を抑えるための免疫抑制療法と抗ウイルス療法にわけられる。免疫抑制療法のなかでもステロイドパルスとその漸減は、経験的にトランスアミナーゼ高値の症例で効きやすい。トランスアミナーゼが 1,000 U/L 以上で PT も延長している場合は迷うことなく、最初にステロイドパルスを施行する (図 3)。治療効果のモニターはトランスアミナーゼ値の推移と EBV のように Kupffer cell activation を強く起こすような原因の場合はそれにフェリチンの推移を加えてみていく。原因ウイルスが急速に排除される場合は、パルスとその漸減中にトランスアミナーゼは急速に低下する。一方ウイルス感染が持続する場合はソルメドロールを 750~500 mg くらいまで減量した段階でトランスアミナーゼの低下が鈍化するので、抗ウイルス療法を加えている。一般には 1~3 MU の少量のインターフェロン  $\beta$  の投与から開始しているが、HCV が原因であればペグインターフェロ

ンの投与も有効である。HCV は急性感染後に 75% が持続感染して慢性化するので、持続感染が成立する前に抗ウイルス療法を行うことが必要である。HCV でも重症化、劇症化するケースでは非常に増殖力が強く、脳症が出現したときにウイルス量が RT-PCR で振り切っていた症例も経験している。

HBV の急性感染の場合は自然回復する症例が多く、積極的に抗ウイルス療法が必要となることは比較的まれであるが、投与の容易さも手伝って近年では拡散アナログの投与を行うことが多い。HBV キャリアからの急性増悪の場合はウイルス増殖が高いレベルで続くので抗ウイルス療法が必要となる。この場合にラミブジンとエンテカビルのどちらを選択するか議論のあるところであるが現在まだ結論は出ていない。筆者の経験では明らかな差を認めず、どちらも効き目が遅いのでトランスアミナーゼを低下させるためには、キャリアの場合免疫抑制療法が必須となる。HAV と HEV も抗ウイルス療法を施行した症例は少ない

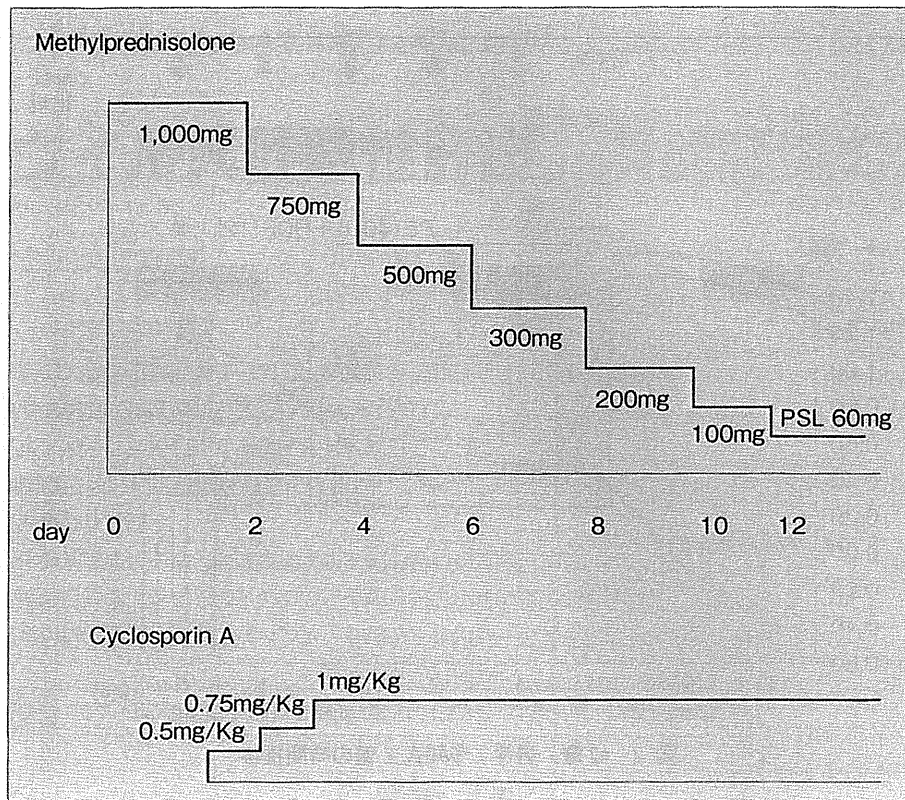


図 3 免疫抑制療法のプロトコール

IFN $\beta$	3 MU/day or 1 MU $\times$ 2~3/day
ETV	0.5 mg or 1 mg/day

図 4 抗ウイルス療法のプロトコール

ETV の適応は HBV carrier の急性増悪, HBV の急性感染ではウイルス量の多いもの, genotype A の急性感染, denovo HBV 肝炎。

が, IFN は両者とも RNA ウイルスなので有効と考えられる (図 4)。

免疫抑制療法と抗ウイルス療法の組み合わせは, ステロイドパルスの減量中に抗ウイルス治療を組み合わせてトランスアミナーゼが速やかに低下していくケースはステロイドを減量していけるが, トランスアミナーゼの下がりが悪い場合や多峰性にトランスアミナーゼが変動する場合はステロイドを減量しながらサイクロスポリン A の持続点

滴に切り替えていくことが多い。急性肝炎の段階で早めに治療を開始すればサイクロスポリン A の持続点滴は必要にならないことが多い。筆者らも以前報告したが, PT 60% 以下で予知式陽性となった場合でもこの段階で治療を開始すれば劇症化するのは約 40% であり, 90% の症例が救命されることより早期の治療開始は有効である。

### ●劇症肝炎の治療

劇症肝炎の治療の実際は以上の治療に人工肝補助療法が加わるだけと考えてよい。筆者らの行う人工肝補助療法は血漿交換に血液濾過透析を組み合わせた治療法である。

#### 血液浄化療法の実際 (図 5)

##### ① 血漿交換 (plasma exchange : PE)

血漿交換は大体 40~60 単位の新鮮凍結血漿を用いて行う。劇症肝炎治療における血漿交換の意

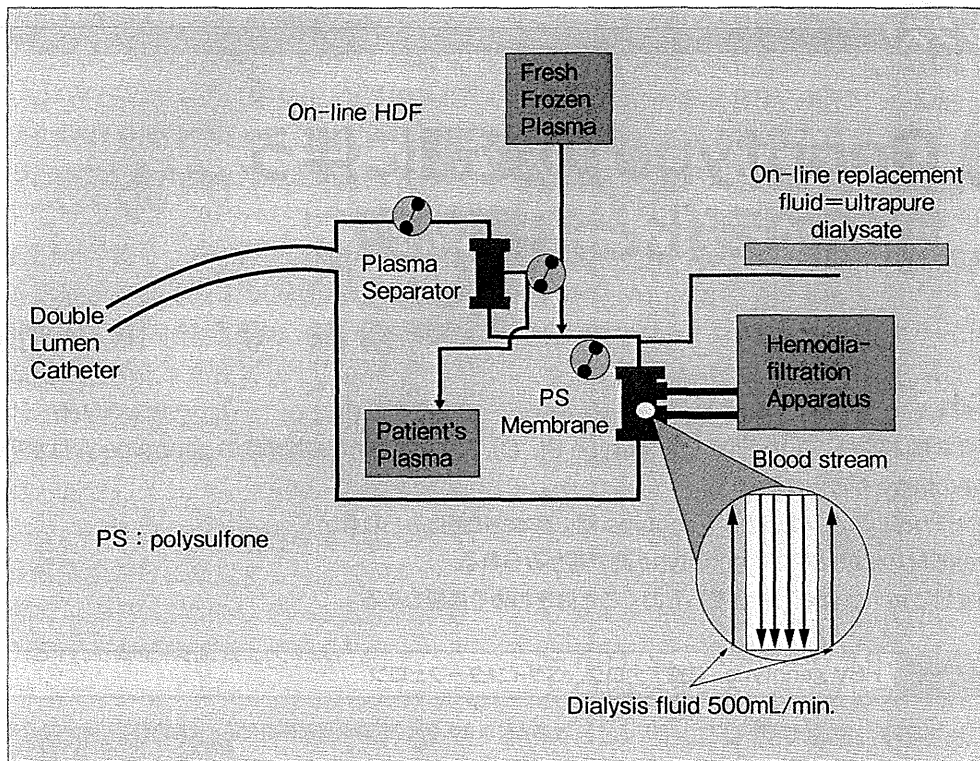


図 5 回路図

義は、安全に効率よく凝固因子などの欠乏する因子を補充すること、蛋白結合性の体内分布容積の小さな毒性物質の除去である。血漿交換単独では体内分布の大きな低分子水溶性物質の除去能はいちじるしく低いので、昏睡覚醒効果はきわめて限定的である。また血漿交換は単独で施行すると大量のクエン酸と電解質が血中に入ることにより①低カルシウム血症、②心機能の抑制、③クエン酸の代謝後に起こる overalkalization と、その結果生じるアンモニアの血液脳関門の透過性の亢進、④電解質異常などの副作用を引き起こすので、必ず血液濾過透析を併用すべきである。

② 血液濾過透析 (hemodiafiltration : HDF)

肝不全患者の血液濾過透析は重炭酸をバッファの主成分とした置換液と透析液とを用いて、大量のバッファで血液を浄化することが治療上もっとも重要な点である。大量のバッファで血

液を浄化すれば体内分布の大きな水溶性の低分子物質の除去も可能となる。実際に大量のバッファを使用する online HDF を施行すると細胞内からも大量のグルタミンが除去される。HDF が脳浮腫の発生の予防になるのはそのためである。Online HDF は中央配管から供給される RO 水 700 mL を透析液 450~500 mL、置換液 200~250 mL に振りわけて血液を浄化する。筆者らは前希釈法を用いて血液浄化を行っており、この方法だと膜の管理も容易である。

●肝炎に対する治療

肝炎に対する治療は急性肝炎のところでも述べたものと基本的に同じである。血液浄化、劇症化予知、現疾患治療を組み合わせれば劇症肝炎患者の 70% 近くは救命可能である。

# 急性肝不全へ移行する可能性のある症例の見分け方とその治療

井上和明\*

## 要旨

- 急性肝不全に移行する可能性のある症例は、B型の急性感染の一部で見られるようなトランスアミナーゼのピーク値が著しく高い症例とごく一部のHCVの急性感染や成因不明例の一部で認められる。
- トランスアミナーゼのピーク値があまり高くなくとも肝細胞破壊の持続により、コリンエステラーゼ、アルブミン、コレステロールなどの肝予備能の低下する症例では、急性肝不全に進展する危険性が高い。
- このよう症例では、早期にステロイドパルス療法を開始して、トランスアミナーゼを急速に低下させ、肝細胞破壊を止めることを試みるのが、まず行われるべき治療法である。
- HCVの持続感染例では、ステロイドパルスだけではトランスアミナーゼの低下が悪く抗ウイルス療法が必要となる。
- 成因不明例では、治療法の標準化は難しいが、まずステロイドパルスを行い治療に対する反応性をみながら、その後の治療を考える必要がある。

## はじめに

急性肝不全の原因はさまざまである。頻度は減少しているもののHBVは主要な原因の一つであり、またHCVもまれではあるが急性肝不全の原因の一つとわれわれは考えている。急性肝不全の病型は周知のように急性型と亜急性型の二つに大きく分けられる。急性型は急激に肝細胞障害が進行して発症から10日以内に脳症が出現する。一方、亜急性型は、比較的ゆっくりと、しかし着実に肝細胞破壊が進行して発症から11日～8週以内に脳症が出現する。

急性型は10日以内に脳症が出現するので、与芝の予知式 $Z = -0.89 + 1.74(\text{原因: HAV と HBV の急性感染が1点, HBV キャリアの急性増悪, HCV, 自己免疫, 成因不明が2点}) + 0.56 \times \text{総ビリルビン} - 0.14 \times \text{コリンエステラーゼ値}$ (正常135～413 U/l)に使われている、総ビリルビンの上昇やコリンエステラーゼの低下が明らかでない症例が多く<sup>1)</sup>、亜急性型の進行を判断するのに使われるアルブミンやコレステロールの低下もないことが多い。したがって、急性型の病型を取ることが予想されるケースでは脳症発現にこの予知式は有用とはいえない。

実際の対応として脳症が発症した時に人工肝補

\*昭和大学藤が丘病院消化器内科〔〒227-8501 横浜市青葉区藤が丘1-30〕INOUE Kazuaki



助療法をいつでも施行し得る準備をして<sup>2,3)</sup>、ステロイドパルスとその漸減により高サイトカイン血症を抑制してトランスアミナーゼを急速に低下させることを目的としている<sup>4)</sup>。

一方、亜急性型の症例においては予知式、その他の簡便なバイオマーカーであるアルブミンやコレステロールの低下、number connection test (NCT)の時間の延長に加えて、研究の域を出ないものであるがMRSのグルタミンのピークなどを参考にして総合的に脳症の出現の予知を行っている。

脳症の発症を予知して早期治療を開始することは理論的には有効なことであるが、一方で成因不明例では有効な治療が確立されていないジレンマもある。

本稿では、かつてわれわれが報告した予知の成績と実際の症例の治療経過について述べる。

## 肝性脳症発症の予知と早期治療

当院では、重症肝炎のうちに脳症の発症を予知して、早期治療を行っている。早期治療を行うことにより予後の改善を図ることは原理的には正しいものの、急性肝不全は肝炎以外の成因を除いても成因不明の症例が多く適切な治療法が確立されていないために、予後を必ずしも改善しないとの意見がある。また、ステロイドの大量投与が感染を誘発して移植の機会を失うのではないかとの危惧を抱かれる方も少なくはないことも事実である。

しかし、内科治療の目的は早期に脳症の出現を予知して、肝炎をコントロールすることにより急性肝不全の大半を消滅させることにあり、われわれの施設ではすでに早期治療により脳症の発症を阻止するか急性肝不全に進展しても高率に救命を達成している。ドナー数が少ない本邦においては、内科治療により急性肝不全の発症を可能な限り阻止しないと、急性肝不全以外の移植待機患者の臓器提供を受けられるチャンスは極めて低い

が現実であり、日本の移植医療のひずみをなくすためにも内科医の努力は重要である。

### 1 対象症例

本総説で対象とする症例は、昭和大学藤が丘病院に2002～2008年に入院してPT 60%以下を認めた重症肝炎119例である。当時の劇症肝炎の診断基準を入院時にすでに満たしていた症例が45例あり、残り74例で予知式の有用性を検討した。先行肝病変の明らかなものは検討対象から外したが、先行肝疾患の病歴が明確でない症例は検討に加え、剖検時に肝病変が判明した症例も含まれる。

### 2 治療法

肝性脳症に対する治療は、脳症出現後速やかに血漿交換と血液濾過透析またはonline血液濾過透析を組み合わせた人工肝補助療法を行った<sup>2,3)</sup>。肝炎に対する治療は、基本的に肝細胞破壊をできるだけ早く停止させることを目標にした。免疫抑制療法はステロイドのパルスとその漸減を行い、経過中に肝炎が鎮静化してこない症例ではシクロスポリンの持続点滴も併せて行った。シクロスポリンの血中濃度はおおむね300 ng/ml前後に維持することが多かった<sup>5)</sup>。

原因がHBVである場合にはラミブジンかエンテカビルの経口投与を行い、症例によってはインターフェロン $\beta$ の投与を加えた。インターフェロン $\beta$ は、100万単位1回打ちか100万単位2回打ちで慎重に開始し可能であれば増量した。HCVが原因である場合はペグインターフェロンとリビリンの投与を行った。成因不明の症例の治療については、免疫抑制療法は上記と同様に行った。インターフェロンの投与は、ステロイドパルスとその漸減で肝炎が鎮静化する症例には行わなかった。ステロイドとシクロスポリンで肝炎が鎮静化してこない症例には上記の方法でインターフェロンの投与を行い、トランスアミナーゼが下がる症例にはインターフェロンの投与を継続した。また、明らかにトランスアミナーゼがflare upする場合には投与を打ち切った<sup>4)</sup>。

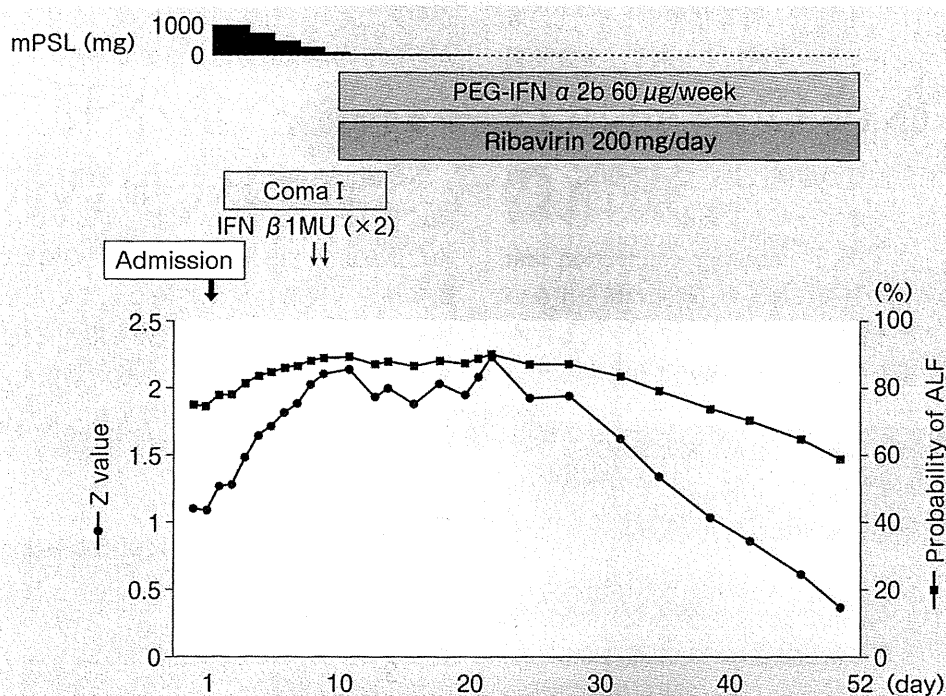


図1 60歳代女性のHCVの急性感染

ステロイドパルスとペグインターフェロンとリバビリンによる治療で急性肝不全への進展を阻止して救命

### 3 治療成績

予知式陽性は35例で、予知式陰性は39例であった。予知式陽性35例のうち13例(37%)で脳症がみられた。急性肝不全となった13例のうち10例が救命され3例が死亡した。死亡した3例の内訳は、1例は成因不明の70歳代の男性で、肝炎は鎮静化し人工肝補助で一時的に覚醒したが肝臓は萎縮したままで再生しなかった。剖検肝では既存の線維化が認められたことより、先行肝疾患による線維化が再生を阻んだ可能性が考えられた。また、60歳代の女性の成因不明例は、入院時に肝萎縮が進行しており前述の治療にまったく反応せず肝不全の進行により死亡した。残りの1例は10歳代の女性で肝炎は鎮静化し人工肝補助療法で意識も覚醒したにもかかわらず、カテーテル抜去に肺梗塞を起こし合併症により死亡した。

予知式陽性で脳症を発症しなかった22例のうち21例が救命された。死亡した1例は68歳の男

性で関節リウマチ(RA)の治療でステロイド投与中にinactiveなHBVが再活性化して重症化し、肝炎は治療によりコントロールがしたが、RA治療中に発症した肺のアスペルギルス症が悪化して呼吸不全で死亡した。予知式陽性の35例の救命率を成因別にみてゆくとHBVキャリアが14/15、成因不明例が16/19、HCVの急性感染1/1例であった。

予知式陰性の39例のうち4例で脳症の発症が認められた。この4例はいずれも治療により救命された。また、脳症の発症が認められなかった35例は34例が救命され、1例は合併症の悪性リンパ腫の増悪により死亡した。39例の成因はHAV 3例、HBVの急性感染11例、HBVキャリア8例、成因不明例14例、薬剤3例でHBVがその成因の約半数を占めていた。



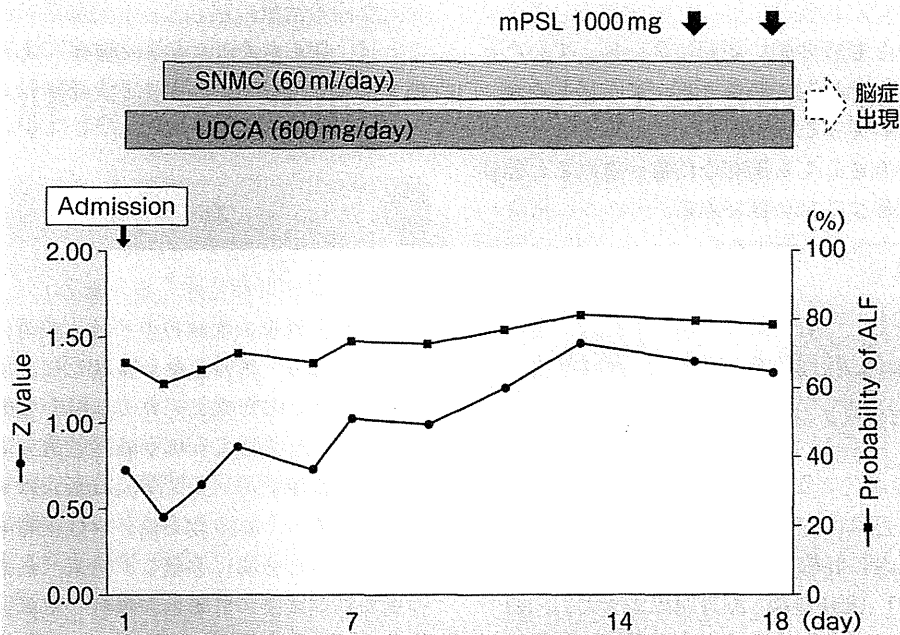


図2 10歳代女性の自己免疫性肝炎の急性発症

ステロイドを使わなかったために急性肝不全に進展したが、その後の治療で回復

### 急性肝不全への進展(脳症発症)を阻止して救命し得た症例(図1)

60歳代の女性。地域の病院で巨大肝嚢胞の腹腔鏡手術を受け退院後10日目に全身倦怠を生じ、同病院を受診したところASTとALTがともに200 IU/lを超えていた。その後も症状の改善がないので入院して経過観察となったが、入院から1週間後のトランスアミナーゼが1000 U/lを超え、その翌日にはAST 2240 U/l, ALT 2332 U/l, T-Bil 4.85 mg/dl, PT 52%と増悪したので、急性肝不全への進展の危険性を考え同日当院救命センターに転院となった。

治療としてステロイドパルスとその漸減を行ったが、漸減過程でトランスアミナーゼの低下が悪く減量過程で上昇傾向を示した。入院時の採血結果よりHCV RNAが陽性であることが判明し、ペグインターフェロンとリバビリンの併用を開始し

た。脳症はI度を越えることなく治療経過とともに意識清明になり肝機能も改善した。ウイルスが原因の症例ではステロイドパルスのみでは減量過程でトランスアミナーゼのflare upを起こし、抗ウイルス療法が必要となることは明白である。

本例では治療開始から1カ月以上にわたりウイルス量が定量上限を超える非常に増殖力の強いウイルスであり、重症化に結びついたと考えられた。本例は予知と適切な肝炎治療が急性肝不全への進展を阻止し得た事例である。

### 急性肝不全に進展したがその後の治療で回復した症例(図2)

10歳代の女性に生じた自己免疫性肝炎の急性発症例である。抗核抗体が320倍陽性(homogeneous)で回復後の肝生検所見も自己免疫性肝炎の特徴を示して、自己免疫性肝炎の急性発症の確

定診断のついた比較的希有な症例である。ステロイドの投与を家族の強い要望に従い控えていたところ、脳症が出現して急性肝不全に進展したが、その後ステロイドと人工肝補助の組み合わせで回復した。予知をしても適切な治療が遅れると急性肝不全に進展する良い例である。

### 予知して治療を行ったにもかかわらずまったく治療が奏功しなかった症例

症例は60歳代の女性で、はじめに倦怠感を感じてから2カ月後に肝機能障害のため近隣の病院に入院した(AST 1864 U/l, ALT 1819 U/l, T-Bil 14.8 mg/dl)。入院後約1カ月間ウルソのみ内服でAST 337 U/l, ALT 358 U/lとトランスアミナーゼは低下傾向を示したが、ビリルビンが上昇(T-Bil 28.2 mg/dl)しPTも40%まで低下したので当院へ転院となった。入院時にCTで測定した肝容積は700 cm<sup>3</sup>まで萎縮していた。その後ステロイドパルス、インターフェロン、シクロスポリンなどの治療を行ったがLOHFに進展し、意識は人工肝補助療法で清明となったが、肝臓は再生せず死亡した。内科集中治療は肝萎縮が著明になって開始しても奏功しないことを物語る一例である。

有効な内科治療の遅れにより高齢者に移植をすることは、限られた社会資源の無駄であり、内科治療で決着をつける必要があると筆者は考える。

### おわりに

筆者が劇症肝炎治療に取り組みだした20年前には、亜急性型の症例の多くは入院時に肝萎縮が進行しており、内科治療が奏功しにくく再生の限界を超えていると考えられる症例が多かった。そのため劇症化を予知して早期に治療に取りかかる必要性を痛感した。そこでわれわれは劇症化の予知式を作成し、劇症化予知と早期治療を実践してその重要性を近隣に啓発した結果、最近では不可逆的なレベルまで肝萎縮が進行して転院してくる症例は減少しており、当施設では着実に救命率の底上げに繋がっている。

20年前には劇症化の成因としてHBVが多く、劇症肝炎≡急性肝不全であったが、近年では成因も多様化しており急性肝不全というより広い症候名で呼ばれるようになったが、成因不明でもバイオマーカーと治療に対する反応を整理することで判断できる、どこでも誰でもできる治療のアルゴリズムの確立が必要であると考えられる。

### 文献

- 1) Yoshida M, Sekiyama K, Inoue K, et al : Accurate prediction of fulminant hepatic failure in severe acute viral hepatitis : multicenter study. *J Gastroenterol* **37** : 916-921, 2002
- 2) Inoue K, Kourin A, Watanabe T, et al : Plasma exchange in combination with online-hemodiafiltration as a promising method for purifying the blood of fulminant hepatitis patients. *Hepatol Res* **38**(Suppl 1) : S46-51, 2008
- 3) Inoue K, Kourin A, Watanabe T, et al : Artificial liver support system using large buffer volumes removes significant glutamine and is an ideal bridge to liver transplantation. *Transplant Proc* **41** : 259-261, 2009
- 4) Inoue K, Watanabe T, Maruoka N, et al : Japanese-style intensive medical care improves prognosis for acute liver failure and the perioperative management of liver transplantation. *Transplant Proc* **42** : 4109-4112, 2010
- 5) Yoshida M, Sekiyama K, Inoue K, et al : Interferon and cyclosporin A in the treatment of fulminant viral hepatitis. *J Gastroenterol* **30** : 67-73, 1995

### O-249 HCV core 蛋白 BASIC AMINO ACID REGION 1 の持続感染成立における役割

○井上和明<sup>1</sup>, 小原道法<sup>2</sup>

昭和大学藤が丘病院消化器内科<sup>1</sup>, 東京都医学研究所感染症プロジェクト<sup>2</sup>

【目的】HCV は持続感染して慢性肝炎患との原因となり、肝細胞癌や末期肝不全における肝移植の原因疾患の筆頭を占めている。HCV の持続感染機構は十分理解されているとはいえない。生体に感染が起こったときに先ず作動するのは自然免疫であり、その中でも 1 型インターフェロンは重要である。HCV やその他のウイルスはインターフェロン系の作動を押さえて持続感染を成立させているものと考えられる。インターフェロン系の転写因子として IRF-3 はきわめて重要な因子であり今回は HCV core 蛋白が IRF-3 の機能に影響を及ぼして持続感染に寄与する新たな機構を見出したので報告する。

【方法】HepG2 細胞に HCV の全長、core から NS2、E1 から NS5b のそれぞれをスイッチング発現する系と HCV の各蛋白と core 蛋白の一部の領域に deletion を加えた蛋白の一時的な発現系を作成して実験に供した。IFNβ の RNA の誘導は Real time-PCR にて定量した。ブランクアッセイは NDV とペロ細胞を用いた。IRF-3 の単量体、二量体、Ser386-リン酸化 IRF-3、HCV のコア蛋白は immunofluorescence と western blotting にて検出した。IRF-3 の活性レベルは NDV または poly IC により誘導された IRF-3 の二量体化とリン酸化により検討し、IRF-3 の活性レベルに各種の HCV 蛋白の及ぼす影響を検討した。

【結果】HCV の全長、core から NS2 のスイッチング発現は NDV 感染により誘導される IRF-3 の二量体化、IFNβ の RNA の誘導を抑制した。ブランクアッセイでの同様にブランクの数の増加が認められた。今回の検討で HCV core 蛋白の basic amino acid region1 が poly I:C または NDV により誘導される IRF-3 の二量体化および Ser-386 のリン酸化の抑制に重要な領域であることが判明した。

【考案】これまでの研究で HCV の NS3 が IRF-3 の活性化を抑制することはすでに報告されてきたが、NS3 の IRF-3 抑制効果はクローンにより異なる。今回の検討で core 蛋白の N 末端の basic amino acid region1 が IRF-3 活性化抑制に関与することが判明した。この部位は同時に DDX-3 への結合部位であることより DDX-3 を介して cell growth に影響を与える可能性も考えられる。

【結語】HCV の core 蛋白、なかでも basic amino acid region 1 は IRF-3 の不活化を介して、NDV や poly IC で誘導されるインターフェロニングナルを抑制した。HCV core 蛋白は持続感染成立と病態形成に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

### O-250 ヒト肝細胞キメラマウスと次世代シーケンサーを用いた新規抗ウイルス薬に対する HCV ノムの解析

○阿部弘美<sup>1,2,3</sup>, Hayes C. Nelson<sup>2,3</sup>, 平賀伸彦<sup>2</sup>, 今村道雄<sup>2</sup>, 柘植雅貴<sup>2</sup>, 三木大樹<sup>2,3</sup>, 高橋祥一<sup>2</sup>, 越智秀典<sup>2,3</sup>, 茶山一彰<sup>2,3</sup>

広島大学大学院医歯薬保健学研究院医療人大学院教育・研究センター<sup>1</sup>, 広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門消化器・代謝内科学<sup>2</sup>, 理化学研究所ゲノム医科学研究センター消化器疾患研究チーム<sup>3</sup>

【目的】DAAs は強力に HCV の複製を抑制し、今後の C 型慢性肝炎の中心的役割を担うものと思われるが、耐性ウイルスの出現が問題となる。今回、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて DAA の組み合わせと治療効果、また次世代シーケンサーを用いて耐性変異の出現について解析した。

【方法】Genotype 1b または 2 型の HCV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに telaprevir (田辺三菱製薬株式会社より供与)、NS5A 阻害剤あるいはポリメラーゼ阻害剤を投与し、その前後における血中 HCV RNA 量および次世代シーケンサーによる deep sequence にて HCV quasispecies の変化を検討した。

【成績】Telaprevir と NS5A 阻害剤の併用により血中 HCV RNA は投与 4 週間後に検出限界以下まで減少した。一方、HCV genotype 2 の患者血清を感染させたマウスでは併用投与による HCV RNA の低下は 1 log のみであった。次に 1b 型 HCV クローン(KT-9)を用いてマウスにモノクローナルな HCV を感染させた。NS3 V36A 変異クローン感染マウスでは telaprevir と NS5A 阻害剤の併用により血中 HCV RNA は検出限界以下まで減少した。しかし、NS5A L31V 変異クローン感染マウスでは、ウイルス量の再上昇を認め、さらに NS5A Y93H、NS3 V36A の変異が出現した。NS5A L31V+Y93H 変異クローン感染マウスに対する telaprevir と NS5A 阻害剤の併用療法でもウイルス量の再上昇が見られ新規の NS5A (NS3) 変異が出現した。また、このマウスの治療 14 週後に telaprevir を NS5B ポリメラーゼ阻害剤に置き換えるとウイルス量の上昇が再び見られ P495S (NS5B) の変異が出現した。NS3 V36A+NS5A L31V+Y93H の変異クローンに対する telaprevir と NS5A 阻害剤の併用療法では血中 HCV RNA の低下は治療 4 週間で 1 log のみであった。さらに telaprevir とポリメラーゼ阻害剤の併用療法 4 週間を行うと血中 HCV RNA は検出限界以下に減少した。しかし、治療終了 11 週間後にウイルス量は再上昇した。

【結語】今回検討した 3 種類すべての DAA の組み合わせで耐性変異の出現が見られた。3 者併用療法では予めこれらの耐性変異が治療前に存在するかどうか考慮する必要がある。HCV の完全排除に向けてさらに検討する必要がある。

**O-279** 急性肝不全の概念と予後予測システムが改変された時代における肝移植適応ガイドラインの在り方

○中山伸朗, 稲生実枝, 持田 智  
埼玉医科大学消化器内科・肝臓内科

【目的】脳死臓器移植法の改正で劇症肝炎患者は脳死肝移植を実施する機会が増加し、急性肝不全の予後はより正確に予測することが求められている。一方、厚労省研究班は劇症肝炎の予後予測システムとしてスコア法、決定木法などを導入し、疾患概念も劇症肝炎から拡大して、非昏睡型、肝炎以外の症例も急性肝不全として扱うようになった。急性肝不全に関わる概念、基準が大きく変化した時代における肝移植適応ガイドラインの在り方を検討した。

【方法】対象は全国調査に登録された2010年発症の急性肝不全211例（非昏睡型96例、急性型61例、亜急性型54例）、LOHF9例。昏睡型はII度以上の肝性昏睡出現時、非昏睡型はINRが1.5以上になった時点のデータを用いて、スコア法と決定木で予後を予測し、その正診率を評価した。

【成績と考案】1) 非昏睡型：スコア法で発症からINRが1.5以上までの日数を用いて算出すると、肝炎症例84例中62例が解析可能で、うち非移植症例は60例（死亡7例）であった。スコアは最大で6点で、5点以上を死亡と判定すると正診率は83%であった。決定木では肝炎症例76例が解析可能で、うち非移植例74例（死亡11例）を対象とすると、7リーフのうち最も該当症例が多かったのは死亡率25%のリーフで、内訳は生存37例、死亡6例、正診率は68%であった。2) 劇症肝炎、LOHFに相当する肝炎例：113例中非移植例は85例で、うち54例がスコア法で解析可能であった。5点以上を死亡と判定した際の正診率は61%であった。決定木法では非移植例のうち77例が解析可能で、死亡率89%のリーフに死亡例24例と生存2例、死亡率80%のリーフに死亡例9例と生存例1例、死亡率25%のリーフに死亡例8例と生存例12例が分類され、正診率は77%であった。3) 肝炎以外の症例：昏睡型13例はスコア法では10例が解析可能であり、全て非移植例で9例が死亡し、5点以上を死亡予測すると正診率は40%であった。決定木法では昏睡型全例で解析が可能で、正診率は62%であった。非昏睡型はスコア法で6例、決定木で7例が解析可能で、正診率はそれぞれ67%と57%であった。

【考案と結語】スコア法、決定木法の予後予測システムは急性肝不全非昏睡型にも適応が可能であるが、データマイニングを用いた後者のシステムの有用性は昏睡型症例に比して乏しいと考えられた。また、肝炎以外の症例の予後予測では、昏睡型、非昏睡型ともにこれらシステムでは限界があり、対応を別途考慮する必要があると考えられた。

**O-280** 急性肝不全、劇症肝炎の近年の傾向と今後の治療対策

○井上和明<sup>1</sup>, 与芝真彰<sup>2</sup>  
昭和大学藤が丘病院消化器内科<sup>1</sup>, せんば東京高輪病院<sup>2</sup>

【目的】劇症肝炎の成因は近年様変わりしてきており、成因不明例が増加しそのなかに薬剤性肝障害とウイルス性の原因も含まれていると考えられる。我々はこれまでに劇症肝炎治療に血漿交換と血液濾過透析を組み合わせた人工肝補助療法、肝細胞破壊を止めるための肝炎治療、劇症化の予知による早期治療の導入により高率の救命率を達成してきた。成因不明例の増加した近年の治療上の対応をまとめて報告する。

【方法】平成8年1月より現在までに経験した急性肝不全症例30例を対象としている。そのうち急性肝不全非昏睡型10例、劇症肝炎急性型7例、劇症肝炎亜急性型12例、LOHF1例である（男性19例、女性11例、年齢40才（16-77才））。急性肝不全の成因はHAV0例、HBV急性感染7例、HBVキャリア発症3例、HCV1例、AIH2例、薬剤1例、成因不明例16例である。脳症発症後は速やかに血漿交換と血液濾過透析を組み合わせた人工肝補助療法を施行した。肝炎に対する治療は、肝細胞破壊を早期に取戻させるためにステロイドパルスとその漸減、必要に応じてシクロスポリンAの持続点滴を行った。原因としてウイルスの関与が明らかなものとウイルスの関与が想定されるものにはインターフェロンによる抗ウイルス療法を施行した。HBVが原因の場合は持続感染しているか、その危険性の高い場合、ウイルス量の多い場合はETVを投与した。

【結果】急性肝不全非昏睡型は10例全例生存した。劇症肝炎急性型は7例中5例が生存した（救命率71%）。劇症肝炎亜急性型は12例中7例が生存した（救命率58%）。劇症肝炎亜急性型のうち8例は劇症化を予知して早期に治療を開始し、そのうちの7例が救命された。LOHFの1例は敗血症で死亡した。移植した2症例はHBVの急性感染で肝機能が早期に廃絶したものと、HBVキャリアからの発症で肝不全に陥ってから1ヶ月以上経過して転院してきた計2症例である。成因不明例は16例中13例（救命率81%）が生存した。

【考案】今日なお劇症肝炎は予後不良の症候群で、肝移植以外に有効な治療法が無いと考えられている。しかし劇症化を予知して早期に治療介入して肝炎を鎮静化してゆけば高率に内科治療で救命することが可能である。成因不明例こそ早期に治療介入すれば高率の救命が可能である。

【結論】劇症肝炎治療は欧米では究極の症候に対する治療の肝移植が主流であるが、早期に肝細胞破壊を止めることができれば、内科的に高率の救命が可能である。

## 肝W2-5 急性肝不全の新診断基準による早期治療介入と予後改善の可能性

慶應義塾大・消化器内科  
○山岸 由幸, 海老沼 浩利, 日比 紀文

【目的】2011年に厚労省研究班より急性肝不全の新診断基準が発表された。今回、当院急性肝不全症例につき昏睡例（以下昏）、非昏睡例（以下非）を含め解析し、新基準に伴う早期治療介入が疾患予後改善に寄与する可能性につき検討した。【方法】2000年以降の新診断基準に合致し解析可能であった急性肝不全87例を対象に病態、治療と転帰を解析した。また特に、予後不良因子の一つとされる肝委縮を伴う症例でのステロイドパルス治療（以下puls）の早期介入の効果につき検討した。肝委縮は診断時のCT肝容積（CTLV）と標準肝容積（SLV）の比（CTLV/SLV）0.8以下を肝委縮ありとした。【成績】87例中昏45例、非42例であった。人工肝補助は昏100%、非21%に、ステロイド治療は昏91%（puls 84%）、非83%（puls 60%）で行われた。内科救命率は61%（昏40%、非83%）、死亡率は18%（昏24%、非12%）、移植は21%（昏36%、非5%）であった。肝委縮は全体の42.5%（37例）に、昏の53.3%、非でも31.0%に認められた（ $p=0.051$ ）。診断時CTLV/SLVは昏 $0.67\pm 0.12$ 、非 $0.73\pm 0.08$ であった（ $p=0.08$ ）。肝委縮例の内科救命率は40.5%であり、委縮のない例（同76%）と比較して不良であった（ $p=0.002$ ）。肝委縮有の37例中、pulsについては84%（31例）に施行されていたが、内科救命例を予後良好群、死亡あるいは移植例を予後不良群とすると、施行有無で両群間に有意差はなかった（ $p=0.67$ ）。しかし、昏の脳症発症前と非にpulsを施行した18例を脳症前puls施行例とすると、昏の脳症発症後施行と未施行をあわせた19例と比較して予後良好であった（ $p=0.003$ ）。尚、それ以外には昏睡有無、PT、MELD、CTLV/SLVで両群間に有意差を認め、多変量解析にてPTが独立した因子として抽出された。【結論】肝委縮は急性肝不全の予後不良因子とされるが、脳症のない段階でpulsなど早期治療介入を検討することにより、内科的救命の可能性が増すことが示唆された。新診断基準はこのような症例の拾い上げにつながることを期待される。

急性肝不全

ステロイドパルス

## 肝W2-6 急性肝不全患者における日和見感染—発生頻度とその予測について—

千葉大・消化器内科  
○新井 誠人, 神田 達郎, 横須賀 収

【目的】我々は、急性肝不全治療中に発生した日和見感染例3例を以前報告した（Clin J Gastroenterol 2009）。日和見感染の診断や治療は近年飛躍的に向上したが、重篤な感染は肝再生の妨げとなり、肝移植も困難となる。急性肝不全治療時の日和見感染の特徴を明らかにすることを目的とした。【対象】2007年1月から2012年12月までの6年間に入院した劇症肝炎および急性肝炎85例を対象とした。重症例あるいは重症化の恐れが高い症例に対して、ステロイドパルス（Pulse, mPSL 1000mg 3日間）、改善なければセミステロイドパルス（SemiP, 500mg 3日間）、ミニステロイドパルス（MiniP, 250mg 3日間）を行った。自己免疫性肝炎が成因と考えられる場合は、ステロイド投与を継続した。日和見感染の診断は、血液、画像検査などにより、総合的に診断し、年齢、性別、成因、入院時の肝機能（PT時間、ALT、T-Bil）、ステロイドの投与形式（Pulse+MiniP+MiniP / Pulse+SemiP / Pulse単独 / Pulse等+PSL継続投与/通常量PSL）、脳症、生命予後との関連を多項ロジスティック回帰解析で検討した。【成績】85症例のうち、22例が劇症肝炎。予後は、死亡19例、生存59例、生体肝移植7例、14例（全体の16.5%、ステロイド投与例の29.2%）で日和見感染症を認め、全例ステロイドの投与がなされていた。ステロイドの投与形式はそれぞれ15/5/8/12/8例で、投与開始後平均34日目（9-87日）に、日和見感染を発生した。内訳は、PCP/CMV/アスペルギルス/クリプトコッカス/ノカルジアがそれぞれ9/8/4/1/1例（重複あり）。ステロイド投与例での日和見感染発症に関する因子として、高齢（中央値54歳以上、オッズ比7.795%CI 1.5-39.3）、男性（オッズ比10.795%CI 2.0-58.2）があげられた。【結論】急性肝不全治療において、ステロイド投与例では日和見感染が数多くみられた。特に、高齢、男性例での発症が多く、ステロイドの適正使用と的確なスクリーニング検査による感染の早期発見および治療が重要である。

日和見感染

急性肝不全

## 肝W2-7 急性肝不全に対する人工肝補助療法 Continuous Plasma-Dia Filtrationの有効性

金沢大附属病院・集中治療部<sup>1)</sup>、金沢大附属病院・消化器内科<sup>2)</sup>  
○小村 卓也<sup>1)2)</sup>、谷口 巧<sup>1)</sup>、金子 周一<sup>2)</sup>

【背景】急性肝不全に対する人工肝補助療法（ALS）は、肝再生や肝移植までのbridgingとして非常に重要であるが、代表的なALSである血漿交換（PE）だけでなく、多くの症例で血液濾過透析（HDF）が併用されている。我々は第47回日本肝臓学会にて、1本の膜型血漿分離器、エバキューア EC-2A™を継続的に使用するContinuous Plasma-Dia Filtration（CPDF）は、通常のPEより少ないFFP投与量で血漿交換が行え、さらに、その中空糸外側に灌流液を流し低・中分子量のアルブミン結合物質を除去し腎代替療法の役割も担い、血圧低下をきたさない安全なALSである事を報告した。今回我々は、急性肝不全におけるCPDFの臨床的有用性を検討した。【方法】厚労省研究班（2011年）の急性肝不全診断基準を満たす37例中、2009年12月から2012年10月までに当院にてCPDFを行った9例（男性5名、女性4名、平均年齢48.6±14.0歳、病因：HBV 2名、AIH 2名、薬剤2名、アルコール1名、HELLP症候群1名、不明1名）を対象とした。CPDF施行による肝予備能、肝性昏睡起因物質除去効果および腎機能の推移を検討し、bridgingが良好に行えなかったを検討した。【結果】全9例でのCPDF 5日間施行前後における血中濃度の推移は、PT 34.1±17.5%から48.8±13.9%（ $p=0.0336$ ）、総ビリルビン値13.6±10.7 mg/dLから11.0±9.71 mg/dL（ $p=0.0799$ ）、アンモニウム値154±79.7 mg/dLから172±104 mg/dL（ $p=0.0661$ ）、クレアチニン値2.17±1.70 mg/dLから1.82±1.24 mg/dL（ $p=0.0758$ ）であった。肝予備能の維持が不十分な3例はPEを、脳症コントロール不良の2例はHDFを併用することで、良好なbridgingを行うことができた。全例でCPDF特異的な合併症は認めず安全に施行し得た。【結論】急性肝不全に対するCPDFは非常に有用であり、病勢によりPEやHDFを追加することで効率的かつ安全にbridgingを施行し得る可能性が示唆された。

人工肝補助療法

CPDF

## 肝W2-8指 人工肝補助療法と原病治療からみた急性肝不全の病態理解

昭和大学大塚病院・消化器内科<sup>1)</sup>、せんば東京高輪病院<sup>2)</sup>  
○井上 和明<sup>1)</sup>、与芝 真彰<sup>2)</sup>

【目的】劇症肝炎の治療は人工肝補助と原病治療から成り立つ。前者は患者を覚醒させ肝不全期間を乗り切るのに必須の対症療法である。我々は1986年より血漿交換に血液濾過透析を併用した人工肝補助を開発し、2004年からより効率的なonline HDFを併用している。原病治療としては肝細胞破壊を早期に停止させる目的でステロイドパルスとその漸減シクロスポリンの持続点滴、病態に応じてインターフェロン、エンテカピルの投与もを行っている。今回はこれらの治療に対する反応性を解析して、劇症肝炎の病態の解明の手がかりを掴みたいと考えて検討を行った。【対象と方法】対象は2004年以降昭和大学大塚病院に入院して人工肝補助療法を含む集中治療の対象となった急性肝不全（acute on chronic10例を除く）65例である。人工肝補助療法は脳症が出現した場合に速やかに開始した。またほぼ全例に肝細胞破壊を停止させる目的でステロイドパルスとその漸減を行った。またステロイドパルスの反応を見てシクロスポリンの持続点滴も行った。免疫抑制療法への反応性と肝細胞破壊に対するウイルス増殖が関与の2点を考慮し、インターフェロンの投与も行った。またHBVキャリアの急性増悪の場合はエンテカピルを投与した。これらの症例を対象に昏睡覚醒率、覚醒までの人工肝補助回数、ALTの低下スピードを全例で検討し、さらに一部の症例では血液および持続的に解析した透析濾液から物質の除去効率とサイトカインのprofileの変化について解析を行った。【結果】65例中46例が生残り19例が死亡した。昏睡からは覚醒率、昏睡覚醒までの血液浄化の回数は生存群で少ない傾向が見られた。ALT低下のスピードも生存群でより速い傾向が認められた。体内分布の大きいグルタミンも緩衝液の量を増加させれば細胞内からの除去が可能であり、体内分布小さな胆汁酸は短時間で感度以下まで除去された。サイトカインは無差別に大量に除去が可能であった。肝炎の鎮静化とサイトカインprofileに一定の傾向が見られた。【結論】血液浄化と原病治療が有効に作用すれば液性環境、炎症ともに改善する。個々の免疫応答を詳細に解析して、新たな治療の開発につながるべきである。

人工肝補助

原病治療



## POSTERS

998

### THE INTENSIVE ARTIFICIAL LIVER SUPPORT SYSTEM IMPROVES SURVIVAL RATE OF FHF AND MAKES PERIOPERATIVE MANAGEMENT MORE APPROPRIATE

K. Inoue, Gastroenterology, Showa University Fujigaoka Hospital, Yokohama, Japan  
E-mail: kazuakiinoue59@gmail.com

**Aim:** The purpose of artificial liver support (ALS) is to sustain patients with fulminant hepatic failure (FHF) for long enough for the patient's liver to regenerate. In cases where the liver cannot regenerate, ALS should support liver function until transplantation is successfully performed. If ALS had the capability to sustain patients with FHF in a favorable condition, survival rates would be improved and the criteria for liver transplantation would be simpler and more accurate.

**Method:** Our study group of 159 patients comprised 90 cases of FH, 16 cases of LOHF, and 53 cases of severe acute hepatitis (SAH). Immediately after the onset of hepatic coma, patients were placed on ALS involving plasma exchange and hemodiafiltration using huge volumes of buffer. Treatment for underlying hepatitis consisted of immunosuppressive therapy and antiviral treatment.

**Results:** Of the 90 FH cases, 3 were the hyper-acute type and progressed to an ahepatic state. They were immediately placed on ALS, which sustained them in a good condition. One of the three patients subsequently underwent LDLTx and survived. Although the ALS system sustained the remained two in a favorable condition for more than two weeks, they died because an organ donor was not found. Of the remaining FH cases, 42 were FH acute type and 36 of the 42 patients survived under ALS. The remaining 45 patients were FH subacute type and 32 of these survived. They were placed on the ALS system and underwent treatment for underlying liver disease. Four of the remaining 13 patients underwent LDLTx and 2 survived. The survival rate of LOHF patients under the same treatment as FH subacute type was 50%. Of the 53 SAH patients, 51 survived (96%). After several session of ALS, 109 of 116 (94%) patients regained consciousness and the 2-week survival rate was 107 of 116 (92.2%).

**Conclusions:** The Japanese treatment system for FH improved the prognosis of acute liver failure. The treatment system described in this study would sustain patients in good condition until the liver recovers or an adequate donor is found, and make perioperative management including organ sharing more appropriate.

999

### THE USE OF CARDIOPULMONARY EXERCISE TESTING IN PREDICTING PRE- AND POST-OPERATIVE MORTALITY IN LIVER TRANSPLANT CANDIDATES

M. Joseph<sup>1</sup>, P. Erasmus<sup>2</sup>, G. Minto<sup>2</sup>, J. Mitchell<sup>1</sup>, M. Cramp<sup>1</sup>, T.J. Cross<sup>3</sup>. <sup>1</sup>South West Liver Unit, <sup>2</sup>Department of Anaesthesia, Derriford Hospital, Plymouth, <sup>3</sup>Hepatology Department, Royal Liverpool University Hospital, Liverpool, UK  
E-mail: mobyoseph@nhs.net

**Aims and Background:** Accurate assessment of a patient's pre-operative cardiorespiratory reserve could help identify those with high mortality risk on the liver transplant (LT) waiting list and post-operatively. Identification of such patients could help optimize the use of the limited organ donor supply. The aim of the study was to assess if variables measured in cardiopulmonary exercise testing (CPET) could predict death pre and post LT.

**Methods:** Patients with end-stage liver disease considered for LT were enrolled. Subjects underwent a maximally progressive CPET on an electronically braked ergometer. Expired gases were collected and analysed for minute ventilation (VE), ventilatory oxygen uptake (VO<sub>2</sub>), ventilatory carbon dioxide production (VCO<sub>2</sub>), peak work (watts), and anaerobic threshold (AT). Cardiac function was assessed with 12-lead electrocardiography. The test was

terminated according to standard criteria including chest pain, fatigue, dizziness or failure to maintain the required rate on the ergometer. Standard biochemical and demographic data were also recorded. Continuous variables were expressed as medians with interquartile and analysed using the Mann Whitney U test. The chi squared test or Fishers exact test was used to analyse categorical variables.

**Results:** 107 Patients had CPET performed, disease etiologies included: ALD n=34 (32%); HCV n=16 (15%); NASH n=3 (3%); PBC n=5 (5%); PSC n=9 (8.4%), HCC n=18 (17%); Others n=22 (21%). 75 (70%) of patients were male, median age 56 years (48–61 years). 36 (34%) patients had LT performed. Follow up post-LT was 694 days (IQR 283–1003). Of the pre-transplant variables assessed only AT predicted post LT mortality (p=0.04), (survivors AT 13 (12–15 mL/min/kg vs. death 10 (10.5–11)). 71 patients did not have a LT, of who 21 died (30%). The CPET variables that predicted death pre-LT were peak VO<sub>2</sub> p=0.03 (survivors 21 mL/kg/min (18–25) Vs death 18 (15–23)); and peak work, p=0.006 (survivors 115w (100–128) vs. death 78 (55–118)). A higher bilirubin (p=0.002), and higher UKELD also predicted death pre-LT.

**Conclusions:** CPET provides pre- and post LT mortality information. It should be used more commonly to prevent injudicious listing and LT in unsuitable candidates.

1000

### EARLY DIAGNOSIS OF LIVER FAILURE IN SEPTIC PATIENTS USING MAXIMAL LIVER FUNCTION CAPACITY TEST (LiMAX TEST). COMPARISON WITH CONVENTIONAL METHODS

M. Kaffarnik, J. Lock, M. Stockmann, P. Neuhaus. *General and Transplantation Surgery, Charite – University of Berlin, Campus Virchow, Berlin, Germany*  
E-mail: magnus.kaffarnik@charite.de

**Introduction:** Patients with bacterial sepsis often suffer from multiorgan failure. No reliable parameter exists for the exact estimation of the liver function. The indocyaninegreen-test (ICG-test) showed a correlation between liver function and mortality rate. The new Maximal Liver Function Capacity Test (LiMAX-test) is a realtime method to investigate the liver function. With the LiMAX-test we may detect a liver dysfunction in septic patients earlier than with other methods.

**Methods:** 30 septic patients were prospectively included in the study. The septic group was compared with a healthy group and a group of patients with a systemic inflammatory response syndrom (SIRS) after elective abdominal surgery. The LiMAX-test was performed on day 0, 2, 5 and 10 after sepsis onset and was compared with ICG-test and liver-specific laboratory parameters. The severity of illness was documented with the APACHE-II-score and during treatment with the SAPS-II- and SOFA-score. Primary endpoint was the mortality rate after 90 days. Secondary endpoint was the comparison with the ICG-Test. Beyond this, other parameters were correlated, such as LOS-hospital, LOS-ICU, dialysis and various infectious and liver parameters.

**Results:** The LiMAX-test showed low results initially with increasing values on days 5 and 10. The 90 day mortality rate in patients with a low LiMAX-test on day 2 (<100 µg/kg/h) was significantly higher than in patients with a LiMAX-test >100 µg/kg/h. The LiMAX-test was comparable with the ICG-Test. Patients with indication for renal replacement therapy during hospital treatment showed significantly lower LiMAX-values than patients without dialysis. Other parameters such as Lactate, INR, Bilirubin, ASAT and ALAT could not discriminate between mild and severe liver dysfunction.

**Conclusion:** With the LiMAX-test we can detect a liver dysfunction in septic patients early on day 0–2. The LiMAX-Test is equal with the ICG-Test and a result of <100 µg/kg/h on day 2 suggests a low probability of survival in septic patients.



level was not associated with subsequent spontaneous clearance (AOR = 1.33; 95% CI=0.48–3.69;  $P=0.583$ ).

**Conclusion:** HCV RNA level decline was observed between one and months following infection, with continued decline among those with spontaneous clearance. IL28B genotype influenced early HCV dynamics, particularly among women, suggesting gender-specific HCV innate immune responses.

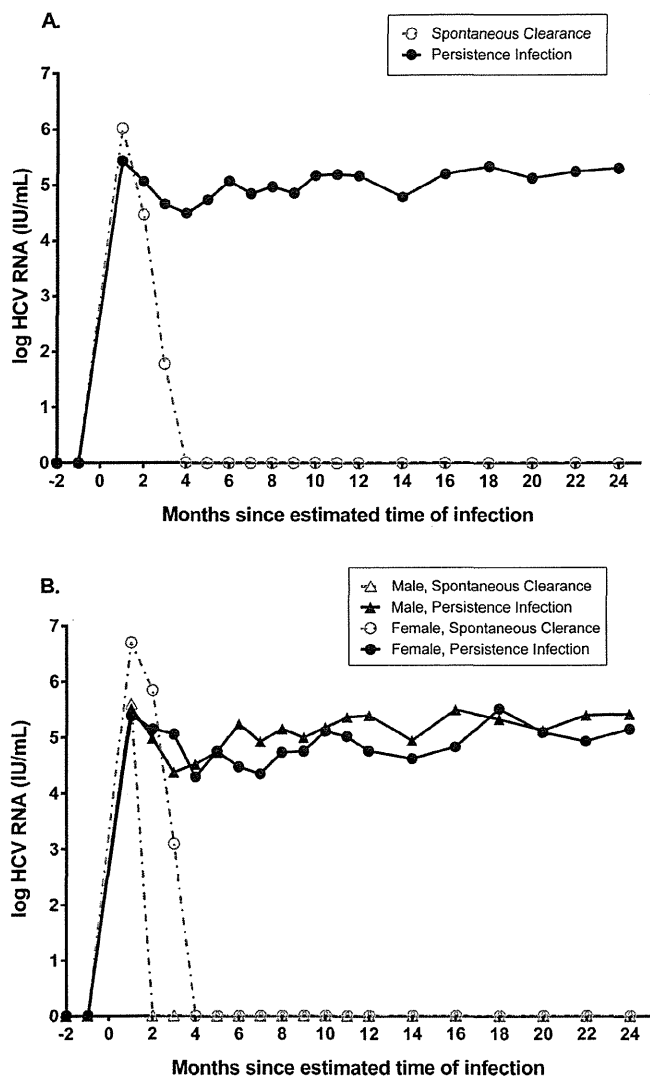


Figure: Monthly medians of HCV RNA levels in acute HCV.

1158

#### HEPATITIS C VIRUS CORE PROTEIN BASIC AMINO ACID REGION 1 IS RESPONSIBLE FOR THE IMPAIRMENT OF IRF-3 ACTIVATION

K. Inoue<sup>1,2</sup>, M. Kohara<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Gastroenterology, Showa University Fujigaoka Hospital, Yokohama, <sup>2</sup>Microbiology and Cell Biology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan  
E-mail: kazuakiinoue59@gmail.com

**Aim:** Hepatitis C virus (HCV) causes persistent disease in infected individuals. The innate immune system is activated immediately upon infection as the first line of host defense against invading pathogens, with type I interferon (IFN) signaling being the crucial step in the antiviral response. The IFN system is a prime target of HCV for persistent infections. IRF-3, a key transcriptional factor in the type I interferon system, is frequently impaired by HCV, in order to establish persistent infection. However, the exact mechanism

by which the virus establishes persistent infection has not been fully understood yet. The present study aimed to investigate the effects of various HCV proteins on IRF-3 activation, and elucidate the underlying mechanisms.

**Methods:** To achieve this, full-length HCV and HCV subgenomic constructs corresponding to structural and each of the nonstructural proteins were transiently transfected into HepG2 cells. IFN- $\beta$  induction, plaque formation, and IRF-3 dimerization were elicited by Newcastle disease virus (NDV) infection. The expressions of IRF-3 homodimer and its monomer, Ser386-phosphorylated IRF-3, and HCV core protein were detected by immunofluorescence and western blotting. IFN- $\beta$  mRNA expression was quantified by real-time PCR (RT-PCR), and IRF-3 activity was measured by the levels of IRF-3 dimerization and phosphorylation, induced by NDV infection or polyribinosinic: polyribocytidylic acid [poly(I:C)]. Switching of the expression of the complete HCV genome as well as the core proteins, E1, E2, and NS2, suppressed IFN- $\beta$  mRNA levels and IRF-3 dimerization, induced by NDV infection.

**Results:** Our study revealed a crucial region of the HCV core protein, basic amino acid region 1 (BR1), to inhibit IRF-3 dimerization as well as its phosphorylation induced by NDV infection and poly(I:C), thus interfering with IRF-3 activation. Therefore, our study suggests that rescue of the IRF-3 pathway impairment may be an effective treatment for HCV infection.

**Conclusion:** A crucial region of the HCV core protein interferes with IRF-3 activation and thereby inhibits the IFN signaling cascades. Future studies involving DDX3 modification by the HCV core protein may be interesting to explore the cell growth-dysregulation mechanisms.

1159

#### SEQUENCING THE HEPATITIS C VIRUS: A SYSTEMATIC REVIEW

B. Jacka<sup>1</sup>, F. Lamoury<sup>1</sup>, P. Simmonds<sup>2</sup>, G.J. Dore<sup>1</sup>, J. Grebely<sup>1</sup>, T. Applegate<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Viral Hepatitis Clinical Research Program, The Kirby Institute for Infection and Immunity in Society, Darlinghurst, NSW, Australia; <sup>2</sup>Centre for Immunity, Infection and Evolution, University of Edinburgh, Edinburgh, UK  
E-mail: bjacka@kirby.unsw.edu.au

**Background and Aims:** Viral population sequencing has long been important in understanding HCV classification, epidemiology, evolution, transmission clustering, treatment response and natural history. The length and diversity of the HCV genome has resulted in analysis of particular regions of the virus, however there has been limited standardisation of protocols. This systematic review was undertaken to map the location and frequency of population sequencing on the HCV genome in peer reviewed publications, with the aim to produce a database of population sequencing primers and amplicons to inform future research.

**Methods:** Medline and Scopus databases were searched for English language publications based on keyword/MeSH terms related to sequence analysis (16 terms) or HCV (3 terms), plus "primer" as a general search term. Exclusion criteria included non-HCV research, review articles, duplicate records, and incomplete description of HCV sequencing methods. The PCR primer locations of accepted publications were noted, and purpose of sequencing was determined.

**Results:** A total of 435 studies were accepted from the 2042 identified, with 608 HCV population sequencing amplicons identified and mapped on the HCV genome. As seen in Figure 1 there is great diversity in the positioning of HCV population sequencing amplicons.

The most commonly sequenced region was the Hypervariable Region-1, often utilised for studies of evolution and clustering/transmission analysis. Studies related to genotyping/classification and epidemiology favoured a defined segment of the NS5B region, likely as a result of the consensus guidelines

## Topic: 2 Acute Liver Failure

**Absno: 2328**

### Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1

**Kazuaki Inoue**

Gastroenterology, Showa University Fujigaoka Hospital, Yokohama, Japan

**Background:** Interferon regulatory factor-3 (IRF-3), a key transcriptional factor in the type I interferon system, is frequently impaired by hepatitis C virus (HCV), in order to establish persistent infection. However, the exact mechanism by which the virus establishes persistent infection has not been fully understood yet. The present study aimed to investigate the effects of various HCV proteins on IRF-3 activation, and elucidate the underlying mechanisms.

**Methods:** To achieve this, full-length HCV and HCV subgenomic constructs corresponding to structural and each of the nonstructural proteins were transiently transfected into HepG2 cells. IFN- $\beta$  induction, plaque formation, and IRF-3 dimerization were elicited by Newcastle disease virus (NDV) infection. The expressions of IRF-3 homodimer and its monomer, Ser386-phosphorylated IRF-3, and HCV core protein were detected by immunofluorescence and western blotting. IFN- $\beta$  mRNA expression was quantified by real-time PCR (RT-PCR), and IRF-3 activity was measured by the levels of IRF-3 dimerization and phosphorylation, induced by NDV infection or polyriboinosinic: polyriboecytidylic acid [poly(I:C)].

**Results:** Switching of the expression of the complete HCV genome as well as the core proteins, E1, E2, and NS2, suppressed IFN- $\beta$  mRNA levels and IRF-3 dimerization, induced by NDV infection. Our study revealed a crucial region of the HCV core protein, basic amino acid region 1 (BR1), to inhibit IRF-3 dimerization as well as its phosphorylation induced by NDV infection and poly (I:C), thus interfering with IRF-3 activation.

**Conclusion:** Our study revealed a crucial region of the HCV core protein, basic amino acid region 1, to interfere with IRF-3 activation and thereby inhibit the IFN signaling cascades. Therefore, our study suggests that rescue of the IRF-3 pathway impairment may be an effective treatment for HCV infection.

## Topic: 2 Acute Liver Failure

**Absno: 2362**

### Study of the evaluation the outcomes of acute-on-chronic hepatitis liver failure

**Kexin Hu<sup>1</sup>, Lequan Min<sup>1</sup>, Yuqun Zhang<sup>1</sup>, Yang Wang<sup>1</sup>, Hongbo Du<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>School of Mathematics and Physics, University of Science and Technology Beijing, <sup>2</sup>Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University Medical University, Beijing, China

**Background:** Acute-on-Chronic Hepatitis Liver Failure (ACHLF) is characterized by jaundice, coagulopathy, hepatic encephalopathy, and associated with a high mortality. The aim of this study is to provide a model for predicting the outcomes of ACHLF patients.

**Method:** We retrospectively divided 101 patients with ACHLF into two groups I (N = 23, average age: 50.8 years, male: 18) and II (N = 78, average age: 40.7, male: 63) according to their outcomes to be deaths or survivals during 8 weeks' therapy. The patients' clinical, and biochemical data were collected at each week. The p-values

( $\alpha = 0.05$ ) of the data of the two groups were analyzed by using *t* test. A normalized linear regression model (NLRM) was introduced to regress and analyze the data with significant differences.

**Results:** The biochemical data with significantly differences were TBil (2–8 weeks), ALB (0–3 weeks), PTA (0–8 weeks) and INR (0–8 weeks). Choose normalized data  $TBil/(TBil^2 + ALB^2 + PTA^2)^{1/2}$ ,  $ALB/(TBil^2 + ALB^2 + PTA^2)^{1/2}$ , and  $PTA/(TBil^2 + ALB^2 + PTA^2)^{1/2}$  to regress linearly. It has been found that the Groups I patients' regressed plane with maximum relative error 0.22 % at the week 4 can correctly distinguish Groups I/II patients in percentages: 56.5 %/37.2 % (at week 0), 100 %/69.8 % (at week 4), 85.7 %/90.5 % (at week 8), respectively.

**Conclusions:** The study results may suggest that the NLRM of Group I at the week 4 is able to be used as a predictor to evaluate the efficacy of the ACHLF patients' treatment and outcomes.

**Acknowledgments:** This work is supported by the National Science Foundation of China (No. 61074192) and the Fund of Student Science Innovation Program (No. 11210711) at the University of Science and Technology Beijing.

## Topic: 2 Acute Liver Failure

**Absno: 2400**

### Surgical model of fulminating hepatic insufficiency in rabbits. New approach

**Mario Alberto Secchi<sup>1</sup>, Lisandro Quadrelli<sup>1</sup>, Enzo Peralta<sup>2</sup>, Maria Mamprin<sup>3</sup>, Leonardo Rossi<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Surgery, <sup>2</sup>Biology, IUNIR-HIG-Medical School-Experimental Unit, <sup>3</sup>Pharmacology, IUNIR-HIG-Medical School, Rosario, <sup>4</sup>Surgery, IUNIR-HIG-Medical School-Experimental Unit, Rufino, Argentina

**Introduction:** The increasing demand for organs to treat terminal hepatic diseases requires the development of new cell transplant methods and bioartificial systems. To develop them, it is necessary an experimental hepatic insufficiency model in previously healthy animals and in which hepatic damage would be the initial factor of the irreversible multiorgan failure followed by death. The surgical model has always been the most appropriate one to meet these requirements.

**Method:** From 2001 to 2012, 3 series of 17; 5 and 7 female rabbits (New Zealander race) weighting between 3–4 kg. have been used. Procedures were performed on animals in fast with ad libitum water. General anesthesia with Ketalar and Sodium Thiopental without M.R.A. Group 1: Control-Sham (n = 6) Group 2: Fulminating Hepatic Insufficiency (n = 29). They were performed the same treatment as Group 1 but first an end to side porto-caval shunt was performed and then a total hepatectomy (of 95 %) (PCS + TH) and hepatic artery ligation. Their lives were enlarged by means of hidroelectrolitic reposition until cardiorespiratory attack. Then necropsia was performed. Laboratory results from both groups were compared with the Student test for odd numbers.

**Results:** Group 1 Sham: n = 6: there was no surgery mortality. Group 2: n = 29: PCS + TH: five animals died while adjusting the model in PCS + TH step and they were discarded from the research. 24 animals tolerated the whole surgery and survived between 3 and 6 h (X:  $4.6 \pm 1.7$ ). In necropsy's, technical complications were discarded as death cause. The brain histological exams revealed the presence of edema as initial lesion.

**Conclusion:** The fulminating hepatic insufficiency surgical models were experimented on animals for a long time. However, there is a safe model of its application on 3 series of rabbits.

## Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice

Takuya Iwamoto · Shuji Terai · Takuro Hisanaga · Taro Takami · Naoki Yamamoto · Shoko Watanabe · Isao Sakaida

Received: 1 June 2012 / Accepted: 7 November 2012 / Published online: 27 November 2012  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

**Abstract** We have previously developed autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy for liver cirrhosis patients. One problem associated with ABMi therapy is that general anesthesia is required to obtain 400 ml bone marrow fluid from liver cirrhosis patients. However, many patients with decompensated cirrhosis do not meet the criteria, because of decreased liver function or an increased bleeding tendency. To overcome these issues, our aim is to derive liver repair cells from small amounts of autologous bone marrow aspirates obtained under local anesthesia and to use these cells in liver cirrhosis patients. Here, we conducted, by using a mouse model, basic research aimed at achieving novel liver regeneration therapy. We cultured bone marrow cells aspirated from the femurs of C57 BL/6 Tg14 (act-EGFP) OsbY01 mice (green fluorescent protein [GFP]-transgenic mice). After 14 days of culture with serum-free medium (good manufacturing practice grade), the obtained spindle-shaped GFP-positive cells were injected ( $1 \times 10^4$  cells) via the caudal vein into mice with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced cirrhosis. Numerous cultured macrophages and some mesenchymal stem cells repopulated the cirrhotic liver. The results showed that serum albumin, liver fibrosis and liver function were significantly improved in the group treated with cultured bone marrow cells ( $P < 0.01$ ). Moreover, matrix metalloproteinase-9

expression was increased in the liver ( $P < 0.01$ ). Thus, infusion of bone-marrow-derived cultured cells improved liver function and liver fibrosis in mice with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis.

**Keywords** Bone marrow cell · CCl<sub>4</sub> · Liver cirrhosis · Liver regeneration · Stem cell therapy · Mouse

### Abbreviations

BMC	Bone marrow cell
GFP	Green fluorescent protein
CCl <sub>4</sub>	Carbon tetrachloride
ABMi	Autologous bone marrow cell infusion
MSC	Mesenchymal stem cell
GMP	Good manufacturing practice
PBS	Phosphate-buffered saline
FITC	Fluorescein isothiocyanate
PE	Phycocerythrin
PI	Propidium iodide
DAB	Diaminobenzidine
FBS	Fetal bovine serum
α-SMA	α-Smooth muscle actin
MMP9	Matrix metalloproteinase-9

This study was supported by Grants-in-Aid for scientific research from the Japan Society for the Promotion of Science (no. 22390150) and the Ministry of Health, Labour and Welfare, the Japan Science and Technology Agency (JST) and the Project of Realization of Regenerative Medicine and Highway.

T. Iwamoto · S. Terai (✉) · T. Hisanaga · T. Takami · N. Yamamoto · S. Watanabe · I. Sakaida  
Department of Gastroenterology & Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Minami Kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan  
e-mail: terais@yamaguchi-u.ac.jp

### Introduction

Cirrhosis is an end-stage condition in liver disease and its treatment is extremely difficult. One of the few available options is liver transplantation but donor supply, surgical invasiveness and costs continue to be problems. On the other hand, cell therapy with autologous stem cells is a promising approach for novel organ regeneration, without the risk of immunorejection and is compatible with biological tissue in patients.

As a basic model to advance clinical indications for liver regeneration therapy with autologous bone marrow cells (BMCs), we have developed an *in vivo* mouse model (the green fluorescent protein [GFP]/carbon tetrachloride [CCl<sub>4</sub>] model) and have reported that GFP-positive BMCs infused via a tail vein efficiently repopulate cirrhotic liver under conditions of persistent liver damage induced by CCl<sub>4</sub> (Terai et al. 2003). In evaluations with this model, we have found that the infusion of BMCs can improve liver fibrosis, restore liver function and increase survival rates (Sakaida et al. 2004; Terai et al. 2005). Based on these basic studies, in November 2003, we began clinical studies of liver regeneration therapy with autologous BMCs from the iliac crest for autologous BMC infusion (ABMi). To date, the treatment has been safe and as in the basic research, ABMi therapy has improved liver function in patients with decompensated liver cirrhosis (Terai et al. 2006).

A multi-center trial for ABMi therapy was performed in Korea and Yamagata and its efficacy was demonstrated (Kim et al. 2010; Saito et al. 2011; Terai and Sakaida 2011). However, a problem associated with ABMi is that, because general anesthesia is required to obtain about 400 ml bone marrow fluid, restrictions occur with regard to liver function. In addition, to ensure safe collection, this procedure is limited to patients with platelet counts of at least 50,000/ $\mu$ l. Thus, many patients with decompensated cirrhosis do not meet the criteria. To overcome these issues, we have developed a method whereby bone-marrow-derived liver repair cells can be cultured and grown from small amounts of autologous bone marrow aspirates obtained under local anesthesia.

Using BMCs, we have conducted basic research aimed at achieving novel liver regeneration therapy. Human mesenchymal stem cells (MSCs) are present in adult bone marrow, can replicate as undifferentiated cells, have the ability to develop into several different types of tissue and are regarded as pluripotent cells. MSCs were first reported by Friedenstein et al. (1982). From human bone marrow, MSCs can be isolated by simple seeding on a plastic dish in the presence of fetal bovine serum (FBS; Pittenger et al. 1999). On the other hand, macrophage fractions from mouse bone marrow tend to be increased in the same way. Macrophages have a broad repertoire of context-dependent immune, inflammatory, trophic and regulatory actions. Treatment of cirrhosis with macrophages has been reported (Thomas et al. 2011). Because our experimental concept is to study the effects of cultured BMCs obtained by simple culture methods without sorting, we decided to study the effects of a culture cell population that mainly comprised macrophage fractions in the mouse. For potential clinical application in humans, the culture medium used in this study was serum-free and of a good manufacturing practice (GMP) grade.

Here, we report the development of a method for culturing bone-marrow-derived cells in serum-free medium. We have also examined the efficacy of these cultured cells in improving liver fibrosis and liver function.

## Materials and methods

### Animals

Female C57 BL/6 mice were purchased from Nippon (Shizuoka, Japan) and male C57 BL/6 Tg14 (act-EGFP) OsbY01 mice (GFP-transgenic mice) were kindly provided by Dr. Masaru Okabe. Mice were maintained in specific pathogen-free housing at the Animal Experiment Facility of Yamaguchi University School of Medicine and were cared for in accordance with the requirements of Yamaguchi University School of Medicine for the ethical treatment of animals and after obtaining approval for the experimental protocol.

### BMC preparation

For the isolation of BMCs, GFP-transgenic mice (aged 6 weeks) were killed by cervical dislocation and their limbs were removed. GFP-positive BMCs were flushed from the medullary cavities of tibias and femurs with phosphate-buffered saline (PBS; Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA) by using a 25 G needle. The cell suspension was filtered through a cell strainer (100  $\mu$ m) to remove debris, followed by centrifugation at 500g for 5 min. After centrifugation, the supernatant was removed and the cells were resuspended to give  $1.0 \times 10^7$  cells/ml. The preparation of BMCs took approximately 1.5 h. Cellular characterization of uncultured and cultured cells was performed by flow cytometric analysis (Fig. 1; see also below).

### Culture of bone-marrow-derived cells

GFP-positive BMCs were isolated from male GFP-transgenic mice as described previously (Agata et al. 2009). Under standard culture protocols, BMCs are seeded at a density of  $1 \times 10^{5-6}$ /ml but the proliferation rate is insufficient in GFP-transgenic mice. By increasing the cell density for primary culture to  $1 \times 10^7$ /ml, BMCs could be grown more efficiently (Fig. 2). Thus, isolated GFP-positive BMCs ( $1 \times 10^7$ ) were cultured on a CELL-start-coated dish (9.6 cm<sup>2</sup>/well) in StemPro MSC Xeno Free medium (Life Technologies) with 2 mM L-glutamine (Life Technologies), StemPro LipoMax supplement (Life Technologies) and 100  $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin (Life Technologies). StemPro MSC Xeno Free medium was prepared under GMP and qualified by using a human MSC performance