

E. 結論

登録例数は358例と着実に増加している。来年度以降はネットワークセキュリティの整備を中心に臨床情報の収集体制を再構築する必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

発表の詳細は分担研究報告を参照のこと。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

小児肝移植オンラインシステムの整備と乳児劇症肝不全の臨床病理学的解析

研究分担者：中澤 温子 国立成育医療研究センター 病理診断部
研究協力者：辰野美知子 国立成育医療研究センター 病理診断部
研究協力者：小野ひろみ 国立成育医療研究センター 病理診断部

研究要旨 炎症性サイトカイン X は肝障害因子であり、グラフト不全の病態にも関与している可能性が示唆された。そこで、平成 27 年度は肝移植後のグラフト不全症例を中心に肝細胞アポトーシス因子である炎症性サイトカイン X の発現を解析した。その結果、グラフト不全では血管内膜下の著明な線維化と同部位のサイトカイン X の発現局在が確認された。このことからサイトカイン X は劇症肝不全のみならず、血管性(液性)拒絶反応を介してグラフト不全にも関与する可能性が示唆された。今後は血管症の観点から病態検証を進めることで、移植片拒絶の分子機構が明らかになるものと考えた。興味深いことに、移植片の拒絶症例でもサイトカイン X の発現を分解するプロテアーゼ Y (内因性の肝酵素) の発現が著減しており、炎症性サイトカイン X を標的としたプロテアーゼ Y 補充療法という新規治療の開発を目指す。

A. 研究目的

本分担研究の目的は小児肝移植症例後のグラフト不全症例の病態研究を行い、移植医療の発展に寄与することにある。

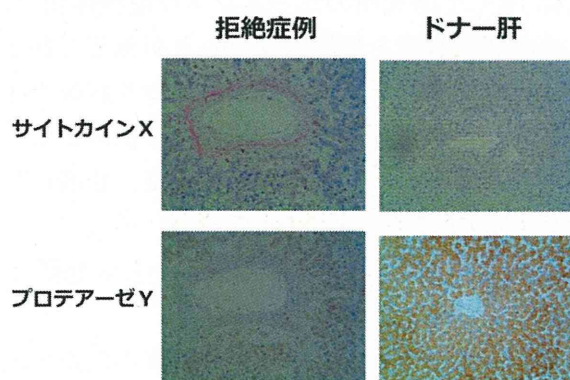
B. 研究方法

国立成育医療センターで施行された小児肝移植症例のデータを集計・分析する。今年度は肝移植後のグラフト不全の 6 症例を中心に炎症性サイトカイン X とサイトカイン X を分解するプロテアーゼ Y 発現を解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料を使用する研究は、「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・保存：受付番号 385」および小児劇症肝不全の病態解明に関する研究(課題番号 466 成育医療研究センター)の倫理承認済みであり、臨床研究の倫理指針と個人情報保護法を遵守し研究を実施した。

C. 研究結果



上段) サイトカイン X はアルカリフォスファターゼの発色基質としてニューフクシンを用いて赤色で検出した。中心静脈の血管壁とその周囲の結合組織にサイトカイン X の発現局在を認めるが、ドナー肝では認めない。

下段) プロテアーゼ Y 発現は DAB 発色で検出した。ドナー肝細胞はプロテアーゼ Y を発現するが、拒絶症例ではその発現が著減していた。

グラフト不全症例で炎症性サイトカイン X とその発現を制御するプロテアーゼ Y 発現を免疫組織学的に解析した。症例間で発現レベルにはばらつきがあるが、6 症例に共通して血管内膜下の著明な線維化と同部位のサイトカイン X の発現局在を確認した。興味深いことに、傷害組織ではサイトカイン X の発現を分解するプロテアーゼ Y 発現が著減しており、このことが局所でのサイトカイン X のクリアランスの低下を誘導し局所炎症を遷延させているものと推察した。

D. 考察

移植片の拒絶には大きく細胞性拒絶反応、血管性(液性)拒絶反応、それらの混合性拒絶反応の3重系に分類されるが、そのうちサイトカインXは血管性(液性)拒絶反応に関与する可能性が示唆された。実際に、サイトカインX発現と血管症の進展度に一定の相関を見出している。本研究課題は臓器移植医療を受けた患者のQOL改善に大きく寄与できる可能性がある。

E. 結論

当センターは世界最多の小児肝移植手術の臨床実績を誇るが、依然として術後管理や免疫抑制治療に難渋する症例も多いのが現状である。本症の更なる治療成績の改善には、分子情報に基づく先駆的診断および治療法開発の確立が急務であり、引き続き臓器移植センター、病理診断部、そして研究所のシームレスな連携体制で、本症の病態研究を推進させることが重要である。

小児劇症型肝不全は、成人と異なり肝炎ウイルスの関与がまれで、その病態には依然として不明な点が多い。今後は細胞性免疫、組織球および貪食細胞の活性化、液性免疫、そしてMicroparticle等の複合的な観点から病態研究を行う必要があると考えた。

今回、尿中のサイトカインX濃度の測定が劇症肝不全の病勢検査として有効であることが明らかとなっており、今後は病理診断技術と体外診断技術とを統合させることで本症の多様性の理解と確度の高い臨床診断が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Sasaki K, Sakamoto S, Uchida H, Shigeta T, Matsunami M, Kanazawa H, Fukuda A, Nakazawa A, Sato M, Ito S, Horikawa R, Yokoi T, Azuma N, Kasahara M. Two-step transplantation for primary hyperoxaluria: a

winning strategy to prevent progression of systemic oxalosis in early onset renal insufficiency cases. *Pediatr Transplant.* 2015 Feb;19(1):E1-6.

(2) Fukuda A, Imadome K, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Matsunami M, Sasaki K, Kanazawa H, Kawano F, Nakazawa A, Fujiwara S, Kasahara M. Evaluation of the immune function assay in pediatric living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2015 Mar; 19(2):144-52.

(3) Kanazawa H, Nosaka S, Miyazaki O, Sakamoto S, Fukuda A, Shigeta T, Nakazawa A, Kasahara M. The classification based on intrahepatic portal system for congenital portosystemic shunts. *J Pediatr Surg.* 2015 Apr; 50(4):688-95.

(4) Nakazawa A, Nakano N, Fukuda A, Sakamoto S, Imadome K, Kudo K, Matsuoka K, Kasahara M. Use of serial assessment of disease severity and liver biopsy for indication for liver transplantation in pediatric Epstein-Barr Virus-induced fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2015 Mar; 21(3):362-368.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

“急性肝不全の診断方法、および予防又は治療剤”

2015年5月特許出願(特願2015-101759)

2016年2月PCT出願

出願者 成育医療研究センター。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

乳児劇症肝不全の臨床病理学的解析とその新しい重症度分類の確立

研究分担者：小林健一郎 国立成育医療研究センター研究所 造血腫瘍発生研究室

研究協力者：岡田 容子 国立成育医療研究センター研究所 造血腫瘍発生研究室

研究要旨

本症は急激な経過で多臓器不全に進展するため、迅速な対応が求められる。本症の最終診断は肝生検に基づく病理組織診断がゴールドスタンダードであるが、手技自体の侵襲性および結果判明までに時間を要する等の問題がある。そこで、平成 27 年度は劇症肝不全のバイオマーカーであるサイトカイン X の検出に基づく体外診断法の可能性を検討した。本症では積極的に血液浄化療法を導入しており、血清中のサイトカイン濃度に基づく病勢把握が困難であると考えられた。そこで、透析廃液、胸水、尿を用いて検証した結果、尿検体からサイトカイン X を安定的に検出することに成功し、その経時変化が病勢の指標として有用であることを確認した。今後は、この体外診断技術(平成 27 年度成果)と組織診断(平成 26 年度成果)とを統合させて確度の高い診断を可能とする診断システムの構築をめざす。

A. 研究目的

小児劇症型肝不全は、成人と異なり肝炎ウイルスの関与がまれで、その病態には依然として不明な点が多い。これまで、本症に対して血液浄化療法や肝移植等の集学的治療が積極的に取り組まれているが、乳児症例での救命率は 54% と依然として低い。この理由として、本症の病態メカニズムが依然と不明であること、客観的な指標に基づく重症度分類が確立されていないこと、病態特異的な治療介入が不十分であったこと等の要因が挙げられる。平成 26 年度はサイトカイン X の組織発現解析に基づく重症度分類が確立できた。そこで、本年度はその体外診断技術の基盤整備を行った。

B. 研究方法

平成 27 年度に国立成育医療センターで施行された肝移植症 5 症例でサイトカイン X の組織発現および尿中濃度を測定し、それを分析する。

(倫理面への配慮)

ヒト試料を使用する研究については、すでに成育医療研究センターで「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・保存：受付

番号 385」および小児劇症肝不全の病態解明に関する研究(課題番号 466)の倫理承認済みであり、臨床研究の倫理指針と個人情報保護法を遵守し研究を実施した。

C. 研究結果

(1) Epstein Barr virus (EBV) 感染に伴う劇症肝不全症例の 2 例を含む計 5 症例でサイトカイン X の組織発現と尿中サイトカイン X との相関性が示された(図 1)。

(2) EBV 感染に伴う劇症肝不全症例(症例 5)の組織像および経過を示す。EBER(in situ hybridization 法)陽性の CD8 陽性 T 細胞が門脈を中心に集簇し、中心静脈周囲の結合組織に特徴的なサイトカイン X の発現局在を確認した(図 2)。入院後に施行した血漿交換とステロイドパルス療法に反応し、尿中のサイトカイン X レベルは速やかに低下した。本症例は EBV 感染症に関連した劇症肝不全に対する集学的治療に示唆を与える症例であった(図 3)。

D. 考察

検索した限りでは、尿中サイトカインに着目した急性肝不全の体外診断技術は先行事例がない。今後は、集中治療室に入室する急性肝不全を含む、いわゆる全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome) を対象として網羅的に炎症性サイトカインを検討して尿中サイトカインに注目した体外診断システムの基盤構築を進めたい。尿中サイトカイン濃度は免疫抑制薬や血漿交換等の影響を受けるため、マルチポイントでも比較検証が可能な臨床指標(アイソタイプ比率に基づく相対比、尿中クレアチニンによる補正值)の診断的意義も検証していく。

E. 結論

本症の最終診断は肝生検による病理組織採取を必要とする。しかし、重症の凝固障害がある場合は肝生検の施行そのものが困難であることも少なくない。急性肝不全は緊急度および重症度がともに高い危急的疾患であるが、その臨床実践では、依然として上記の課題が未解決である。尿を用いた体外診断が確立されると、これまでの臨床現場のジレンマが一気に解消される。また、客観的指標に基づく重症度の評価は患者家族に対する病状説明にも有用であり、しいては肝移植のドナー確保、そして肝移植施設への救急搬送等の一連の救命の連鎖(chain of survival)を円滑に進めることが期待される。また、確度の高い治療方針の決定で本症の予後を大きく改善できる可能性がある。

[参考文献]

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

“急性肝不全の診断方法、および予防又は治療剤” 2015年5月特許出願(特願2015-101759)
2016年2月PCT出願
出願者 成育医療研究センター。

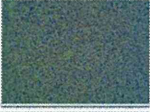
2. 実用新案登録

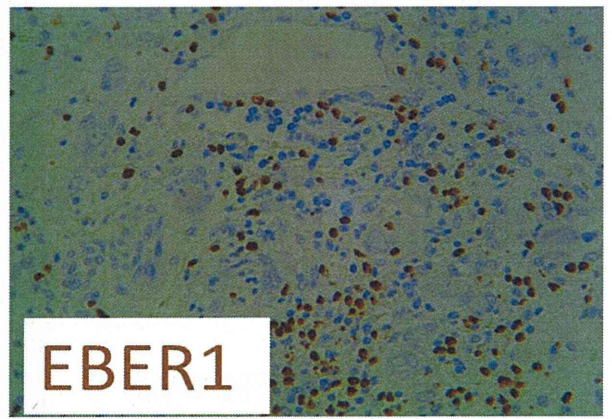
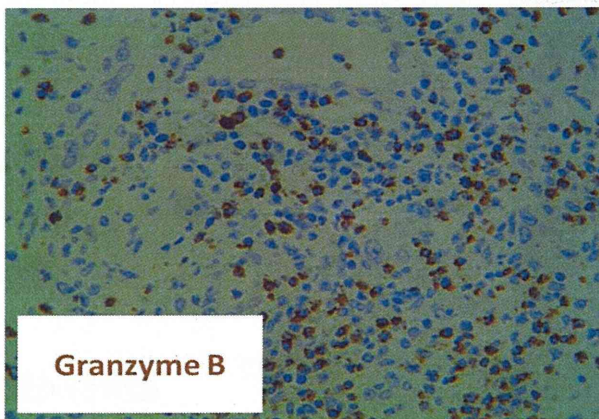
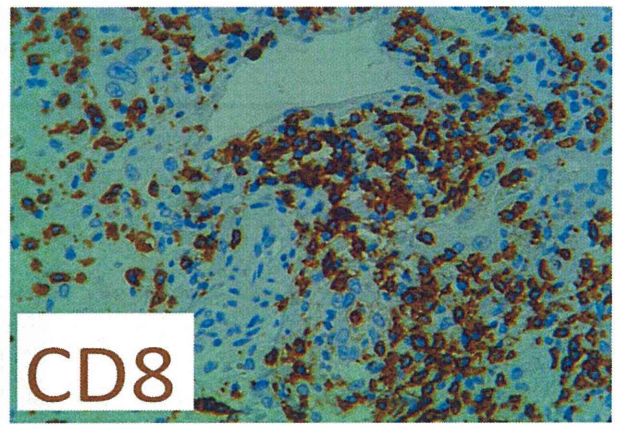
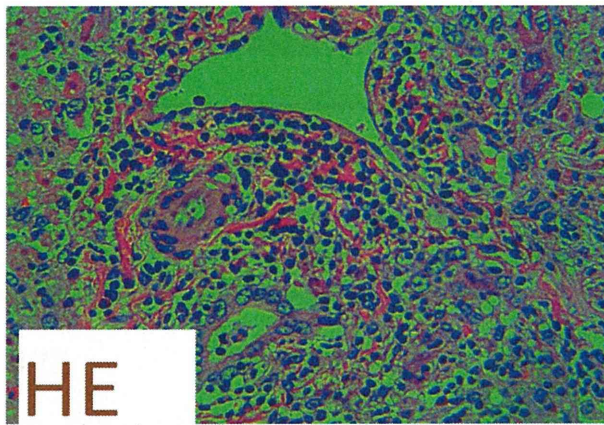
なし

3. その他

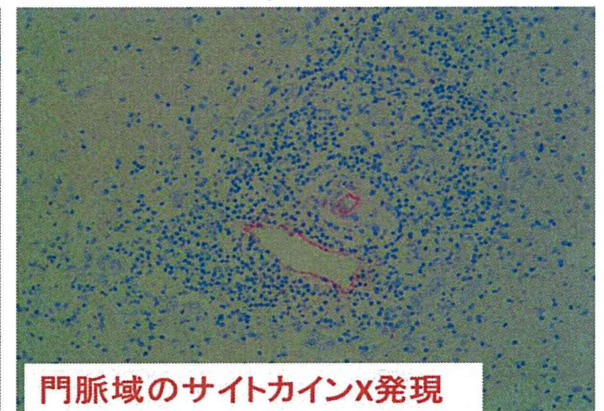
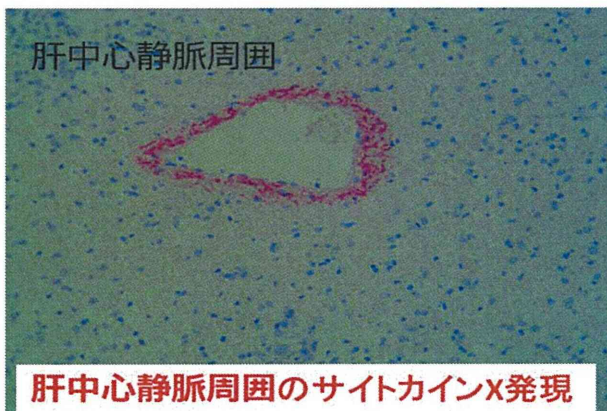
なし

図1 劇症肝不全におけるサイトカインXの組織診断および体外診断

症例番号	臨床診断	サイトカインX		臨床経過
		組織診断	体外診断	
1	劇症肝不全		一旦低下したが、治療中に再上昇	肝移植
2	劇症肝不全 EBV(+)		一旦低下したが、治療中に再上昇	肝移植
3	急性肝不全(凝固障害軽度)		測定感度以下	支持療法で回復した
4	劇症肝不全(再移植)		持続高値かつ、漸増	肝移植
5	劇症肝不全 EBV(+)		ステロイドパルスと血漿交換で速やかに低下した	凝固障害の改善なく肝移植



EBV感染 T 細胞の浸潤の証明



肝中心静脈周囲の結合組織、門脈域の門脈内皮および動脈弾性版(F)におけるサイトカインX発現局在。サイトカインX発現はニューフクシン(赤)で発色した

図2 EBV感染に伴う劇症肝不全の1例(症例番号5)

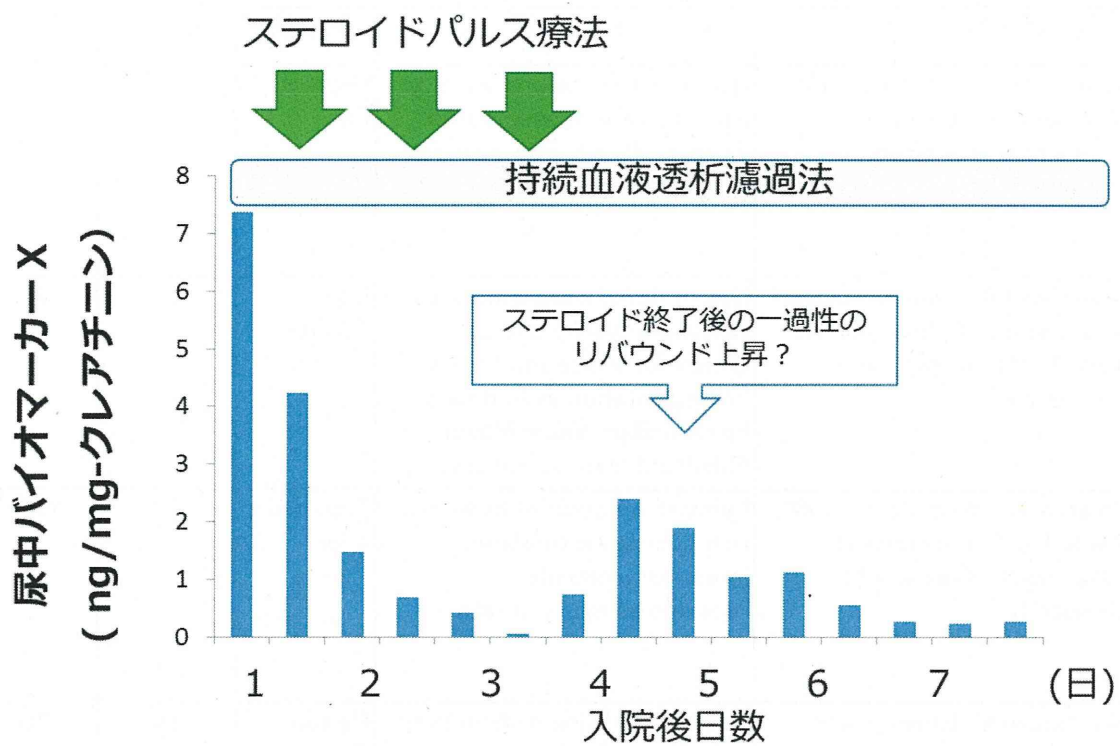


図3 経時的に尿中バイオマーカー X濃度を測定した。測定値は尿中クレアチニン値で補正した。ステロイドパルス療法と持続血液透析濾過法でバイオマーカーは速やかに低下しているが、終了後に一過性に上昇していた。

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsunoda T, Inui A, Kawamoto M, Sogo T, Komatsu H, Kasahara M, Nakazawa A, Fujisawa T	Neonatal liver failure owing to gestational alloimmune liver disease without iron overload	Hepatol Res	45	601-5	2015
Nakazawa A, Nakano N, Fukuda A, Sakamoto S, Imadome K, Kudo T, Matsuoka K, and Kasahara M	Use of Serial Assessment of Disease Severity and Liver Biopsy for Indication for Liver Transplantation in Pediatric Epstein-Barr Virus-Induced Fulminant Hepatic Failure	Liver Transpl	21	362-8	2015
Shigeta T, Sakamoto S, Li XK, Cai S, Liu C, Kurokawa R, Nakazawa A, Kasahara M, Uemoto S.	Luminal injection of hydrogen-rich solution attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury in rats.	Transplantation	99	500-7	2015
Matsunami M, Ishiguro A, Fukuda A, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Kanazawa H, Sakamoto S, Ohta M, Nakadate H, Horikawa R, Nakazawa A, Ishige M, Mizuta K, Kasahara	Successful living domino liver transplantation in a child with protein C deficiency	Pediatr Transplant	19	E70-4	2015
Kanazawa H, Nosaka S, Miyazaki O, Sakamoto S, Fukuda A, Shigeta T, Nakazawa A, Kasahara M.	The classification based on intrahepatic portal system for congenital portosystemic shunts.	J Pediatr Surg.	50	688-95	2015
Uchida H, Fukuda A, Masatoshi M, Sasaki K, Shigeta T, Kanazawa H, Nakazawa A, Miyazaki O, Nosaka S, Sakamoto S, Kasahara M.	A central approach to splenorenal shunt in pediatric living donor liver transplantation	Pediatr Transplant	19	E142-5	2015
Tomita H, Fuchimoto Y, Fujino A, Hoshino K, Yamada Y, Masugi Y, Sakamoto M, Kasahara M, Kanamori Y, Nakazawa A, Yoshida F, Akatsuka S, Nakano M, Kuroda	Development and Validation of a Novel Fibrosis Marker in Biliary Atresia during Infancy.	Clin Transl Gastroenterol	19	e127	2015
Matsunami M, Fukuda A, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Hirata Y, Kanazawa H, Horikawa R, Nakazawa A, Suzuki T, Mizuta K, Kasahara M.	Living donor domino liver transplantation using a maple syrup urine disease donor: A case series of three children - The first report from Japan.	Pediatr Transplant	doi: 10.1111/ petr.1268 1		2016

Successful living domino liver transplantation in a child with protein C deficiency

Matsunami M, Ishiguro A, Fukuda A, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Kanazawa H, Sakamoto S, Ohta M, Nakadate H, Horikawa R, Nakazawa A, Ishige M, Mizuta K, Kasahara M. (2015) Successful living domino liver transplantation in a child with protein C deficiency. *Pediatr Transplant*, 19: E70–E74. DOI: 10.1111/ptr.12446.

Abstract: PC is produced in the liver and inhibits blood coagulation by catalyzing active factors V and VIII. PC deficiency causes abnormal blood clotting that is difficult to regulate by anticoagulative treatments. Four reports of PC deficiency treated with LTx have been published; however, no report of DLT as a therapy for PC deficiency is available. We describe a case of a 23-month-old girl who received DLT for compound heterozygous PC deficiency. Her PC activity was below 5%. She developed intracranial lesion and frequent refractory purpura fulminans. Both her parents had heterozygous mutations of PC genes and were excluded as living donors. Furthermore, she was a low priority on the waiting list of deceased-donor transplantation. We performed living DLT using the liver from a patient with MSUD. Activated PC concentrate safely supported the perioperative period. After DLT, she maintained normal PC activities and BCAA levels. This is the first case of PC deficiency successfully treated by living DLT with MSUD. We propose that DLT using liver from patients with MSUD is a treatment option for PC deficiency.

Masatoshi Matsunami¹, Akira Ishiguro², Akinari Fukuda¹, Kengo Sasaki¹, Hajime Uchida¹, Takanobu Shigeta¹, Hiroyuki Kanazawa¹, Seisuke Sakamoto¹, Motoki Ohta³, Hisaya Nakadate², Reiko Horikawa⁴, Atsuko Nakazawa⁵, Mika Ishige⁶, Koichi Mizuta⁷ and Mureo Kasahara¹

¹Transplantation Center, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan, ²Division of Hematology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan, ³Department of Pediatrics, Shiga University of Medical Science, Shiga, Japan, ⁴Division of Endocrinology and Metabolism, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan, ⁵Division of Clinical Pathology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan, ⁶Department of Pediatrics, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan, ⁷Department of Transplant Surgery, Jichi Medical University, Tochigi, Japan

Key words: protein C deficiency – protein C concentrate – domino liver transplantation – neonatal purpura fulminans – maple syrup urine disease

Masatoshi Matsunami, MD, Transplantation Center, National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan
Tel.: +81 3 3416 0181
Fax: +81 3 3416 2222
E-mail: matsunami-m@ncchd.go.jp

Accepted for publication 23 January 2015

Abbreviations: 3D-CT, three-dimensional computerized tomography; aPTT, activated partial thromboplastin time; BCAA, branched-chain amino acid; DDLT, deceased-donor liver transplantation; DLT, domino liver transplantation; FAP, familial amyloidotic polyneuropathy; FFP, fresh frozen plasma; HA, hepatic artery; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; HV, hepatic vein; LDLT, living-donor liver transplantation; LHV, left hepatic veins; LTx, liver transplantation; M + LHV, middle and left hepatic veins; MHV, middle hepatic vein; MSUD, maple syrup urine disease; PBC, primary biliary cirrhosis; PC, protein C; PFIC, progressive familial intrahepatic cholestasis; PSC, primary sclerosing cholangitis; PT, prothrombin time; PV, portal vein; RHV, right hepatic vein.

PC is a vitamin K-dependent serine protease synthesized and secreted by liver cells as a zymogen. Activated PC downregulates the blood coagulation cascade through its proteolytic effect on factors Va and VIIIa, in conjunction with its cofactor protein S (1, 2). PC deficiency is inherited as an autosomal dominant disorder, and in most cases, derived from heterozygous mutations. Homozygous or compound heterozygous patients often suffer severe and life-threatening complications from birth. The most common presentation is purpura fulminans, a rapidly progressing hemorrhagic necrosis of the skin, which