

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)

乳児劇症肝不全の新しい重症度分類の確立に関する研究

平成26年度～27年度総合研究報告書

研究代表者 小林 健一郎

平成28(2016)年 3月

目 次

I . 総合研究報告 -----	1
乳児劇症肝不全の新しい重症度分類の確立に関する研究 -----	3
小林健一郎	
II . 分担研究報告	
1 . 小児肝移植オンラインシステムの整備と日本肝移植研究会を通じた 全国規模の疫学調査に関する研究 -----	9
笠原群生	
2 . 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 臨床病理学的解析-----	12
中澤温子	
3 . 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--	15
小林健一郎	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	20
IV . 研究成果の刊行物・別刷 -----	21

乳児劇症肝不全の新しい重症度分類の確立

研究代表者：小林 健一郎 国立成育医療研究センター 造血腫瘍発生研究室 室長

研究要旨

1. 小児肝移植オンラインシステムの整備

1989年に本邦で肝移植の第一例目を実施されてから20年以上が経過し、肝移植は肝不全に対する治療として確立されている。国立成育医療研究センターは、2013年からは本邦における小児肝移植医療の現状把握と肝移植を受けた小児患者の成長発達の評価のためのオンライン登録を開始し、平成28年3月の段階で358例を登録した。その内訳は男児156例、女児202例で、主たる原因疾患は胆道疾患(205例)、代謝性疾患(67例)、急性肝不全(55例)であった。本データベースでは詳細な小児の成長・発達の調査項目を整備しており、こどもの成長発達、そして復学・進学・就業状況を継続的に評価できる。今回の調査で、肝移植後の約80%の例で通常の就労・就学(学齢期以前では正常な成長)と判定され、難病を克服したあとの比較的良好なるQOLの実態を明らかにすることができた。今後とも本調査を継続し、この情報を患者家族に還元することで包括的な患者支援に繋げてゆくことが期待できる。

2. 乳児劇症肝不全の新しい重症度分類の確立

平成26年度はサイトカインX(肝細胞アポトーシス誘導因子)とそれを分解する肝酵素Yの発現に基づく“新しい重症度分類(組織診断)”を構築した。さらに成人例でも追加検証を行い、その臨床的意義を明らかとした。本症の最終診断には肝生検が必要であるが、重度の凝固障害を合併した場合は肝生検の施行が困難なことも少なくない。そこで、27年度は尿中のサイトカイン測定に基づく体外診断技術とマルチポイントで比較検討できる臨床指標を整備した。今後はこの体外診断技術の感度および特異度の検証に向けて臨床研究を進める予定である。この尿中のサイトカイン測定に基づく体外診断技術と従来の病理診断技術との統合で、さらに迅速かつ確度の高い診断が見込まれる。

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る。近年、炎症性サイトカインは肝不全の治療標的として注目されている。興味深いことに、本症では炎症性サイトカインXを失活させるプロテアーゼ(内因性の肝酵素Y)の発現が著減しており、このことが肝局所でのサイトカインストームの増悪因子になっている可能性が推察された。今後は炎症性サイトカインXを標的としたプロテアーゼ補充療法という新規治療の可能性を検討してゆく。

なお、上記の研究成果は“急性肝不全の診断方法、および予防又は治療剤”として知財確保した。2015年5月に特許出願(特願2015-101759)2016年2月PCT出願済みである。

研究分担者

笠原 群生 国立成育医療研究センター
臓器移植センター センター長
福田 晃也 国立成育医療研究センター
臓器移植センター 医長
重田 孝信 国立成育医療研究センター
臓器移植センター 医員
金澤 寛之 国立成育医療研究センター
臓器移植センター 医員
中澤 温子 国立成育医療研究センター
病理診断部 部長
瀧本 哲也 国立成育医療研究センター
臨床研究開発センターデータ
管理部 小児がん登録室長

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 非常勤研究員
小野ひろみ 国立成育医療研究センター
病理診断部・検査部非常勤技師
岡田 容子 国立成育医療研究センター
造血腫瘍発生研究室 技術職員

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。1995年から2005年の全国調査では、本邦での小児劇症肝不全の発生率は9.3例/年で、そのうち43%は原因不明例であった。全体の7割で肝移植が導入されていたが、救命率は1歳未満で54%、1歳以上で76%であり、乳児例では予後不良であった。また、当センターは肝移植医療の実態調査と肝移植後の小児の成長発達のアウトカムの観察研究を目的として、平成25年1月から小児肝移植オンラインシステムを開始した。加えて、申請者らは、本症のバイオマーカーである新規バイオマーカー(炎症性サイトカインX)の同定に成功した。

本研究班の目的は小児期の劇症肝不全の実態把握と臨床病態の解明に基づく新しい重症度分類の確立である。

B. 研究方法

1) 小児肝移植オンラインシステムに基づき本邦における実態調査を行う。

2) 国立成育医療センターで施行された小児肝移植症例の臨床病理像を解析する。

(倫理面への配慮)

小児肝移植オンライン登録システムには九州大学、京都大学、熊本大学、慶應義塾大学、自治医科大学、福島県立医科大学、藤田保健衛生大学、国立成育医療研究センターの計8施設が登録されている。集積データは、個人情報保護に係る体制の整備、資料の保存および利用等に関する措置が行われ、連結可能匿名化のうえ国立成育医療研究センターで管理されている。

本研究結果の公表は、集団の解析結果のみとし、個人が特定される情報は一切公表されない。また、臨床研究データに関するネットワークおよびシステムセキュリティは確保済である。ヒト試料を使用する研究にあたり、「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(成育医療研究センター)を経て、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

小児肝移植オンラインシステムの整備と日本肝移植研究会を通じた全国規模の疫学調査(笠原)

1989年に肝移植が開始されてから20年以上が経過し、肝移植は肝不全に対する治療として確立されてきた。国立成育医療センターでは2005年10月から本症に対して生体肝移植・血液浄化療・免疫抑制治療等の集学的治療を積極的に取り組み、世界的にも優れた治療成績を挙げている。加えて、2013年1月から本邦における小児肝移植医療の現状把握と肝移植を受けた小児移植の成長発達の評価のための小児肝移植オンライン登録を開始した。

このシステムの特徴として、移植医療の実態把握のみならず、肝移植後の小児の成長発達およびに及ぼす影響を明らかにするための評価

項目を充実させていることが挙げられる。

今回の長期予後調査では約 80%の例で通常の就労・就学（学齢期以前では正常な成長）と判定されており、肝移植後の QOL の実態を明らかにすることができた。今後とも、妊娠出産・就学・就労状況および免疫抑制剤内服に伴う合併症についても継続的にデータを集積してゆき、これらの情報を患者家族に還元することで、退院後の包括的な患者支援に繋げてゆく。

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(中澤)

平成 26 年度は炎症性サイトカイン X とそれを分解する肝酵素 Y の発現度に基づく“新しい重症度分類(組織診断)”の構築に成功した。間質細胞が産生する炎症性サイトカイン X が肝細胞アポトーシスであり、小児のみならず成人例でも本症の重症度を規定する因子であることを明らかとした。この分子はパラフィン固定標本を用いた後方視的解析が可能であり、過去の症例の再整理にも有用である。

平成 27 年度は肝移植後のグラフト不全症例を中心に急性肝不全のバイオマーカーである炎症性サイトカイン X の発現を解析し、この発現が移植片拒絶の病態にも関わることが示唆された。炎症性サイトカインの機能は、当初考えられていた白血球走化活性に留まらず、受容体を介した細胞アポトーシスや線維化にも関わることから、今後とも炎症性サイトカインの関与を検討することで、本症および移植医療の治療成績の向上に向けた知見が集積されることが期待できる。

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(小林)

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、検査自体の侵襲性や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 年度は体外診断の整備を開始した。本症には積極的に血液浄化療法が導入されているため、血清中のサイトカイン濃度に基づく病勢把握が困難と考えられた。そこで、胸水、尿、

透析廃液からサイトカイン X の検出を試みた。

その結果、尿検体からサイトカイン X を含めた肝不全のバイオマーカーを安定的に検出することに成功した。加えて、相対値として尿中サイトカインレベルを導出することで経時的に比較検証が可能な新たな臨床指標を独自に開発した。平成 27 年度は Epstein Barr virus (EBV) 感染に伴う劇症肝不全症例の 2 例を含めた 5 症例で尿中サイトカイン解析を行い、その臨床的意義を確認した。

D. 考察

(1) 本研究班で取り組んだ小児肝移植データベースの特徴の一つに、小児の成長・発達のフォローアップデータ評価項目を充実させた点が挙げられる。今後とも、本データベースの整備を継続し、こどもの心身の成長・発達、そして復学・進学あるいは就業状況を継続的にフォローアップし包括的な患者支援に繋げてゆく。将来的には国際連携も視野に入れて希少疾患の QOL について質の高い研究エビデンスの発信を目指してゆきたい。

(2) 急性肝不全は多彩な臨床像で発症するが、脳炎や心筋炎なども著明な肝酵素上昇をきたすため、初期診療での鑑別診断はしばしば困難である。新規バイオマーカーの検出に基づく体外診断技術が確立できれば他施設でも非侵襲的な診断・重症度判定が可能になり、重症例の早期発見と高次医療施設への搬送が図られ、しいては急性肝不全の治療成績の更なる改善が期待できる(P-8 図表将来的な波及効果)。

E. 結論

本研究班では新規バイオマーカーの発現に基づく組織診断と体外診断技術を整備した。とくに、後者では非侵襲的かつ簡便な point of care testing (POCT) を目指してゆきたい。この臨床検査法が確立できれば重症例の早期発見と小児センター等の高次医療施設への搬送が図られ、しいては肝移植のドナー確保等の救命の連鎖(chain of survival)をさらに円滑に進めることが期待される。

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

“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。

既存の研究インフラと診療ネットワークを統合して
難治希少疾患の新しい重症度分類を確立する。

小児肝不全のデータベース

250症例
2005-2013

臨床情報
+
組織サンプル

病理診断部 臓器移植センター



研究のシーズ

乳児劇症肝不全の
新規バイオマーカー
の同定と検証

研究所

全国の主要な肝移植施設とのネットワーク



小児劇症肝不全は年間で10例発症

そのうち 成育医療研究センターは 4.5 症例 / 年の診療実績。現時点での乳児例の救命率は100%である。

臓器移植センター長	笠原群生 (分担研究者)
病理診断部長	中澤温子 (分担研究者)
病理診断部非常勤研究員	辰野美知子 (研究協力者)
病理診断部・検査部 非常勤技師	小野ひろみ (研究協力者)
研究所 技術職員	岡田容子 (研究協力者)
研究所 室長	小林健一郎 (研究代表者)

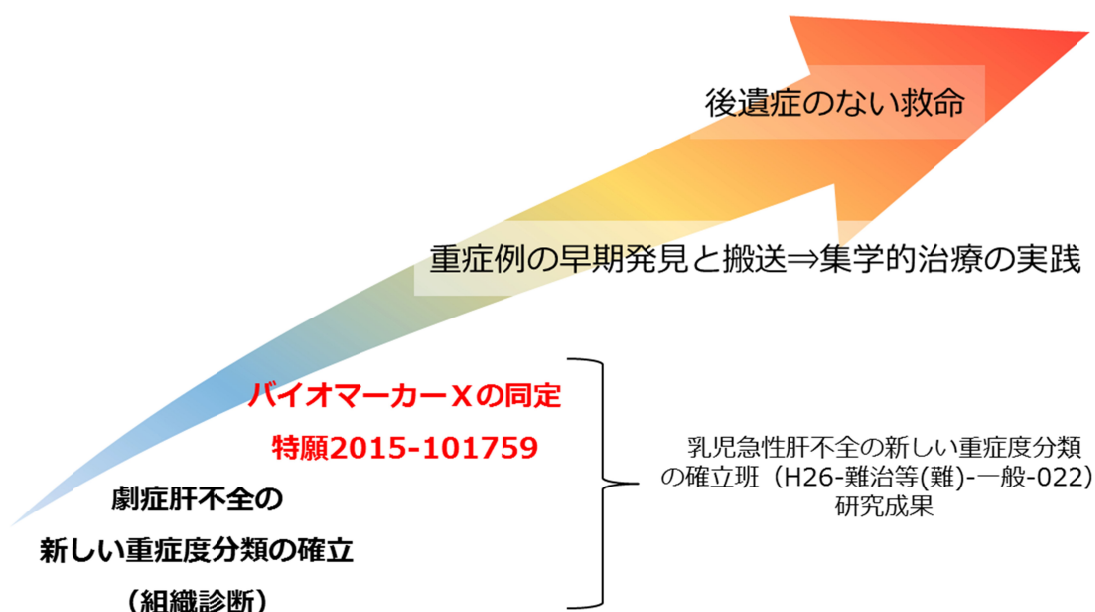


独立行政法人
国立成育医療研究センター
National Center for Child Health and Development

乳児劇症肝不全の新しい重症度分類の確立班 研究体制

将来的な波及効果

(1) 速やかな救命の連鎖の体制構築に貢献



次なるステップ：本研究班で確立した組織診断技術を発展させて尿を用いた体外診断技術の確立を目指す。これにより重症例の早期発見と高次医療施設への搬送による救命の連鎖の体制構築に貢献できる。

(2) 将来的な波及効果：病態特異的な抗炎症治療の開発

バイオマーカーXを標的とする抗サイトカイン治療

革新的な肝不全治療へ

小児肝移植オンラインシステムの整備と日本肝移植研究会を通じた全国規模の疫学調査

研究分担者：笠原群生 国立成育医療研究センター 臓器移植センター
研究協力者：福田晃也 国立成育医療研究センター 臓器移植センター
研究協力者：重田孝信 国立成育医療研究センター 臓器移植センター
研究協力者：瀧本哲也 国立成育医療研究センター 臨床研究開発センターデータ管理部

研究要旨 本分担研究は、本邦における小児肝移植医療の現状把握と肝移植を受けた小児移植の成長発達の評価を含めたオンラインデータベースの構築を目指している。平成 28 年 3 月の登録例数は 358 例である。その内訳は男児 156 例、女児 202 例で、主たる原因疾患は胆道疾患(205 例)、代謝性疾患(67 例)、急性肝不全(55 例)であった。

A. 研究目的

成育医療研究センターは平成 25 年 1 月から小児肝移植オンライン登録を開始した。本分担研究の目的は、本登録システムに基づく小児肝移植のデータベースの構築と移植後の成長発達の評価を含む小児肝移植の実態解明である。

B. 研究方法

小児肝移植データベースオンライン登録システムに登録されたデータを集計・分析する。

(倫理面への配慮)

小児肝移植オンライン登録システムは、現在、九州大学、京都大学、熊本大学、慶應義塾大学、自治医科大学、福島県立医科大学、藤田保健衛生大学、国立成育医療研究センターの計 8 施設が登録されている。集積データは、個人情報保護に係る体制の整備、資料の保存および利用等に関する措置が行われ、連結可能匿名化のうえ国立成育医療研究センターで管理されている。本研究結果の公表は、集団の解析結果のみとし、個人が特定される情報は一切公表されない。

C. 研究結果

平成 27 年度は成育医療研究センターの情報管理部の承認のもとに本データベースのサーバを筑波大学から当センターに移行した。これにあわせて、データベースの管理を File Maker v.11 から v.12 に変換し、登録項目の見直しを行った。

平成 28 年 3 月の時点での登録例数は、前年度比で 60 例増加して 358 例(男児 156 例、女児

202 例)となった。主たる原因疾患は胆道疾患 205 例(胆汁うっ滞性疾患 159 例、先天性肝線維症 20 例等)、代謝性疾患 67 例(OTC 欠乏症 14 例、メチルマロン酸血症 13 例、糖原病 10 例等)、急性肝不全 55 例、腫瘍性疾患 17 例(肝芽腫 13 例含む)、血管性疾患 2 例などであった。

グラフトの内訳は生体肝が 345 例、脳死肝が 13 例であった。ドナー男女比は 150 : 208 で、母からの移植が最多 201 例(56.1%)で、父が 134 例(37.4%)であった。本年度に新たに追加された症例のデータは日本肝移植研究会のデータベースにも送付された。

平成 26 年度の集計結果に基づく肝移植症例の累積生存曲線(図 1)と原疾患別の累積生存曲線(図 2)とを示す。

D. 考察

近年、情報ネットワークセキュリティの維持のためにサーバアクセスを限定的にせざるを得ない状況があり、今後は PN ネットワークの導入などを検討することも新たな課題と考えている。

E. 結論

今後とも、小児肝移植を受けたこどもの心身の成長・発達、そして復学・進学あるいは就業状況をフォローアップし、本データベースの構築を継続する。

F. 健康危険情報

なし。

2. 実用新案登録

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。

3. その他

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

なし。

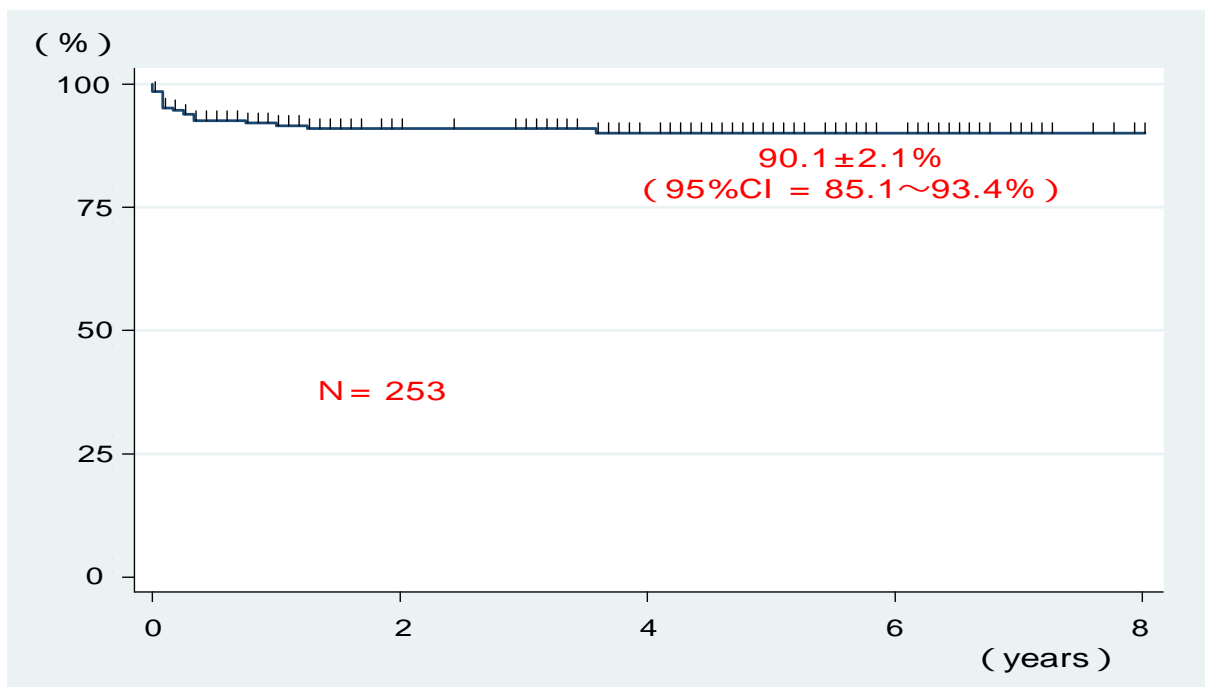


図1 肝移植症例の累積生存曲線

生存率を原疾患別にみると、胆汁うっ滞性疾患 $93.3 \pm 2.2\%$ (87.5~96.5%)、代謝性疾患 $93.4 \pm 3.7\%$ (81.0~97.8%)、急性肝不全 $79.9 \pm 7.2\%$ (61.0~90.3%)、腫瘍性疾患 $37.5 \pm 28.6\%$ (1.1~80.8%)、血管性疾患 $85.7 \pm 13.2\%$ (33.4~97.9%)、肝細胞性疾患(肝硬変)・その他 100%であった。

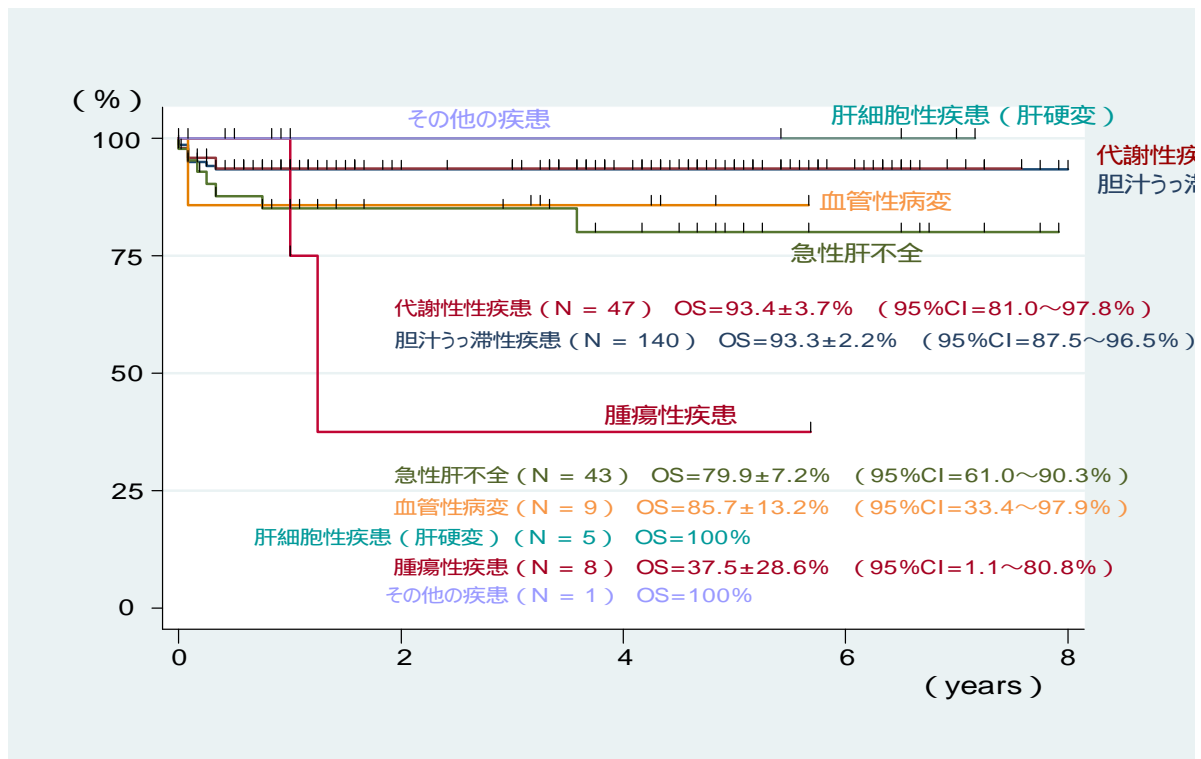


図2. 原疾患別の累積生存曲線

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 平成 26 年度は炎症性サイトカイン X とそれを分解する肝酵素 Y の発現度に基づく “新しい重症度分類(組織診断)” の構築に成功した。間質細胞が産生する炎症性サイトカイン X が本症の病態を制御することを示し、成人例でも追加検証を行い、小児同様に劇症肝不全の重症度判定にも有用であることを明らかとした。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、グラフト不全の全例で血管内膜下の著明な線維化と同部位のサイトカイン X の発現局在を認めた。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)拒絶反応を介した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) の発現が著減していた。炎症性サイトカインの機能は、当初考えられていた白血球走化活性に留まらず、受容体を介した細胞アポトーシスや組織線維化にも関わることから、今後とも炎症性サイトカインの関与を検討することで、本症および移植医療の治療成績の向上に向けた知見が集積されることが期待できる。

A. 研究目的

本分担研究は、国立成育医療研究センターで施行された小児肝移植の臨床病理学的研究の基盤整備と新しい重症度分類の確立を目的とする。

傷害と本症の重症度は一定の相関があることから、サイトカイン X は臨床病理学的な観点からも本症の病勢を制御する重要な因子であると考えられる(図 1)。

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。

C. 研究結果

(1) 劇症肝不全の新しいバイオマーカーの組織診断技術の確立

劇症肝不全は、急激な肝細胞死で重篤な肝機能障害と多臓器不全を呈する症候群である。摘出肝の病理学的検索では、高度の肝実質の出血壊死により 80%以上の肝細胞の脱落を認める。サイトカイン X は、正常肝および慢性肝不全の門脈域の結合組織に弱く発現するが、それ以外には発現はない。興味深いことに、劇症肝不全では肝中心静脈の血管壁とその周囲の結合組織に強発現し、その発現度は血管傷害の重症度と相関していた。この病理所見は、劇症肝不全の病態特異的であるとともに、肝中心静脈の血管

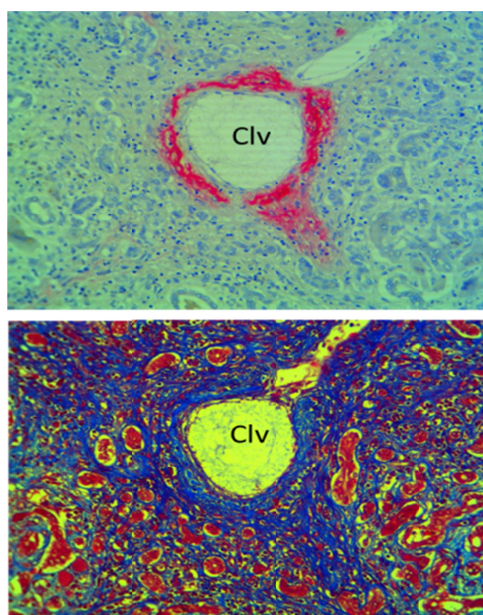
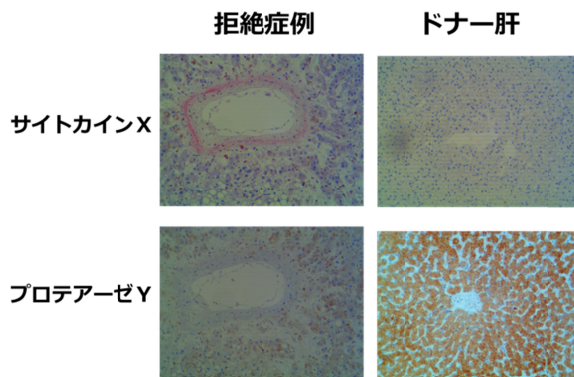


図 1. 劇症肝不全症例におけるサイトカイン X の免疫組織学的検討 Clv:centeral vein 中心静脈の血管壁とその周囲の結合組織にサイトカイン X の発現局在を認める。

上段) 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。
下段) 血管壁およびその周囲の間質における膠原線維の増生がマッソントリクローム染色のアニリン青で検出される。

(2) サイトカイン X は移植片の予後にも関与する。

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させ、局所炎症を遷延させる要因になっていると推察された。



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。

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 亜系に分類されるが、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、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

劇症肝不全の新しいバイオマーカーであるサイトカイン X とその組織傷害活性を制御する分子群の組織発現に基づき、その臨床的意義を検証した。その結果、劇症肝不全の肝組織中の炎症性サイトカイン X とそれを分解する肝酵素 Y の発現度に基づき、亜急性、急性、超急性型の臨床病型が層別化できることが判明した。今後、この客観的指標の導入で本症に対する確度の高い診断が可能になると考える。平成 26 年度は上記の新規バイオマーカーの発現に基づく重症度分類(組織診断)を、平成 27 年度は尿検体から炎症性サイトカイン X を含めた肝不全のバイオマーカーの検出系(体外診断)が構築できた。加えて、マルチポイントで解析可能な臨床指標を独自に開発した。本症の最終診断は病理組織診断がゴールドスタンダードであるが、病理診断技術と体外診断技術とを統合させることで確度の高い診断が可能になると考える。

興味深いことに、サイトカイン X の分解酵素である肝酵素 Y は、慢性肝不全では健常者と比較して高値であるが、劇症肝不全では極低値であった。このことが、劇症肝不全ではサイトカイン X が分解されず異常高値が遷延する原因の一つと考えた。肝酵素 Y は炎症性サイトカイン X の N 末端アミノ酸を切断することで、その肝傷害性をリセットできるため、酵素 Y 補充療法が本症に対する分子標的治療になる可能性が示唆された。

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。平成 27 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

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。
(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)RayBiotech 社のプロテインアレイを用いて、正常肝臓(生体肝移植ドナー)、小児慢性肝不全、小児劇症肝不全の 3 群の肝組織で炎症性サイトカインの網羅的解析を行い、劇症肝不全に特徴的なケモカインプロファイルを同定した(図 1)。

(2)サイトカイン X は間質細胞が産生する肝細胞アポトーシス誘導因子であり、肝局所ではサイトカイン X のパラクラインな作用による肝実質傷害が劇症肝不全の本態に組み込まれてい

るものと推察された。劇症肝不全では、発症に至る時間経過(急性経過)とその重症度には一定の相関があり、英国の診断基準では黄疸発症から肝性脳症までの時間経過に基づき病型分類が行われている。興味深いことに、発症から肝移植が施行される期間(0~7日間、8~28日間、29~72日間)とサイトカイン X との間に強い相関を認めた(図2)。

(3)すでに先行研究では、セリンプロテアーゼ活性を有する肝酵素 Y が、サイトカイン X の N 末端アミノ酸を切断して、その細胞傷害性をリセットすることを見出している。そこで、サイトカイン X とそれを分解する肝酵素 Y の発現度に基づく“新しい重症度分類(組織診断)”を構築した(図3)。

(4) 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 に基づく体外診断結果との相関性が示された(図4)。

(5)尿中サイトカイン X による病勢モニタリングを施行した1例を示す。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。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5)。

D. 考察

(1)サイトカイン X と肝酵素 Y の発現度に基づく乳児劇症肝不全の新しい重症度分類では劇症肝不全の患者を健常者や慢性肝不全から識別することが可能で、急性度のバイオマーカーとして活用できる。

(2)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)で、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を構築すめたい。

E. 結論

本症の最終診断には肝生検による病理組織採取を必要とする。しかし、重症児に対する肝生検の施行が困難であることも多く、このことが本症の早期診断の障壁となっている可能性がある。尿を用いた体外診断は簡便で、早期診断のジレンマを解消できる。また、客観的指標に基づく重症度の評価を行うことは、患者家族への病状説明、肝移植施設への救急搬送、肝移植のドナー確保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

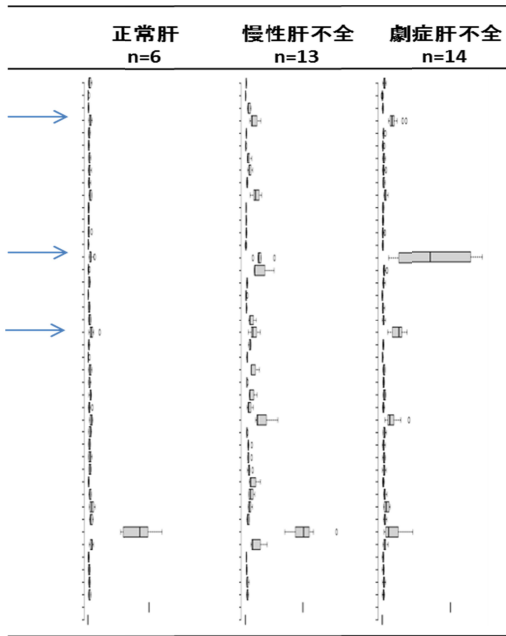


図 1
 正常肝臓(生体肝移植ドナー)、小児慢性肝不全、小児劇症肝不全の 3 群の肝組織で炎症性サイトカインの網羅的解析を行い、劇症肝不全に特徴的なサイトカインプロファイルを認めた。本症で有意に上昇したサイトカインを矢印で示す。

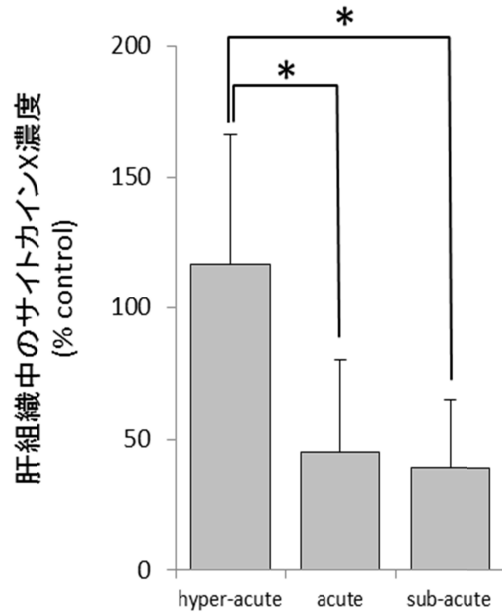
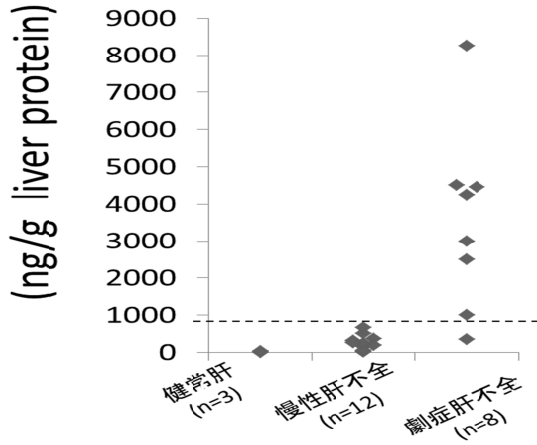
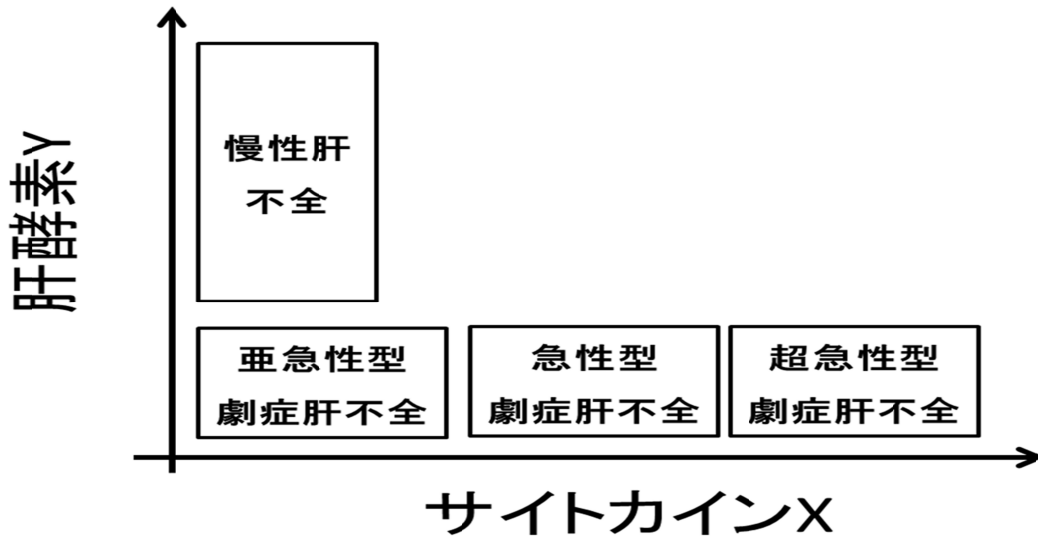
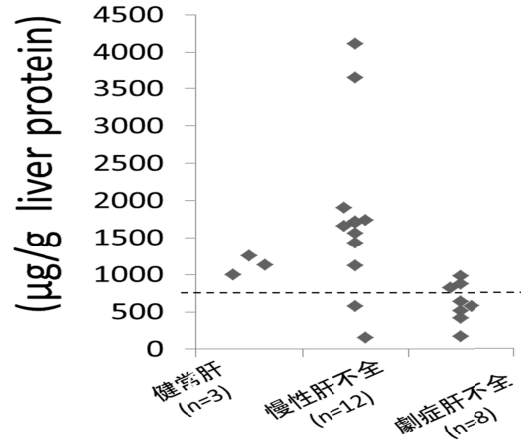


図 2
 サイトカイン X と病型との関連性。
 発症から肝移植が施行される期間(0~7 日間, hyper-acute; 8~28 日間, acute; 29~72 日間, sub-acute)とサイトカイン X との間に強い相関を認めた。

サイトカインX



肝酵素Y



肝組織中のサイトカインXと肝酵素Y濃度を2次元でプロットすると各病型に細分類できる。

図3

(上段) 健常肝、慢性肝不全及び劇症肝不全の肝組織中のサイトカイン X (左) 及び肝酵素 Y 濃度 (右) を示す。劇症肝不全では肝組織中のサイトカイン X 濃度が上昇するが、肝酵素 Y 濃度は著減する。(下段) 劇症肝不全 (超急性、亜急性、急性) 及び慢性肝不全の肝組織におけるサイトカイン X 濃度及び肝酵素 Y の分布を示す。

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

図4 劇症肝不全におけるサイトカインXの組織診断と体外診断

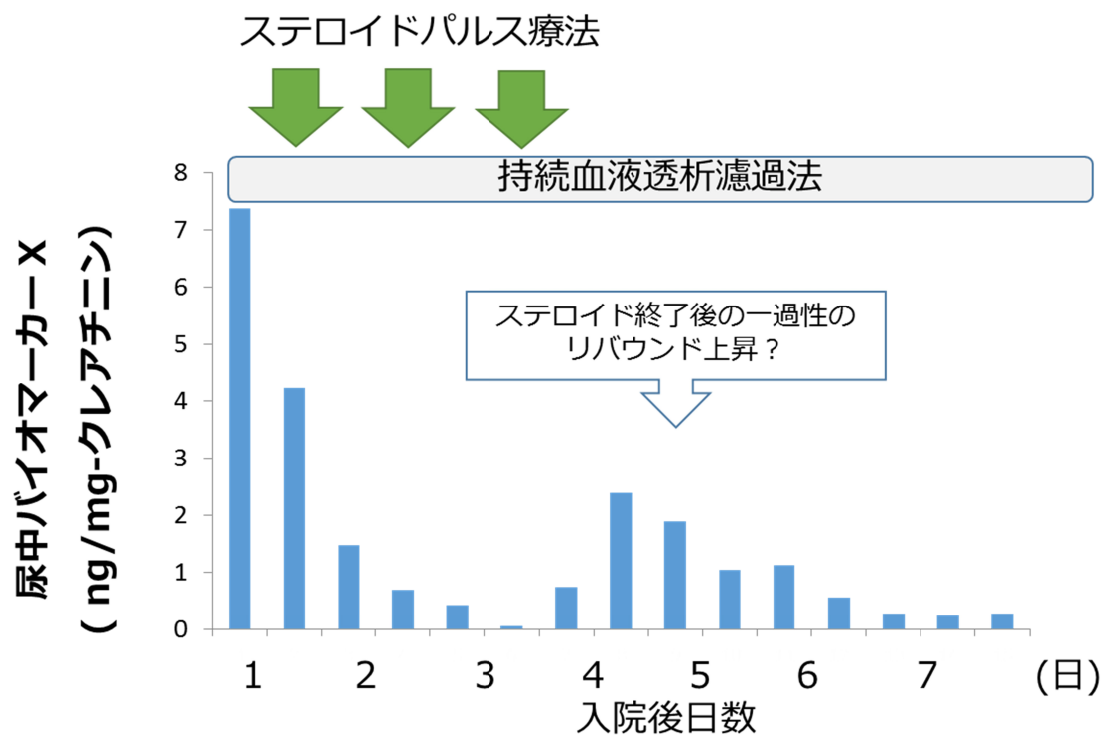


図5 劇症肝不全における尿中サイトカインXの経時モニタリング結果

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Hamano I, Sasaki K, Kanazawa H, Dale Loh, Kakee N, Nakazawa A, Kasahara M	Clinical outcomes and evaluation of the quality of life of living donors for pediatric liver transplantation: A single center analysis of 100 donors.	Transplant Proc	46	1371-6	2014
Minowa K, Arai K, Kasahara M, Sakamoto S, Shimizu H, Nakano N, Ito R, Obayashi N, Nakazawa A, Ishiguro A	Romiplostim treatment allows for platelet transfusion-free liver transplantation in pediatric thrombocytopenic patient with primary sclerosing cholangitis	Pediatr Transplant	18	E212-5	2014
Hatanaka M, Nakazawa A, Nakano N, Matsuoka K, Ikeda H, Hamano I, Sakamoto S, Kasahara M.	Successful living donor liver transplantation for giant extensive venous malformation.	Pediatr Transplant	18	E152-6.	2014
Uchida H, Sakamoto S, Matsunami M, Sasaki K, Shigeta T, Kanazawa H, Fukuda A, Nakazawa A, Miyazaki O, Nosaka S, Kasahara M.	Hepatic artery reconstruction preserving the pancreaticoduodenal arcade in pediatric liver transplantation with celiac axis compression syndrome: report of a case	Pediatr Transplant	18	E232-5.	2014
Kanazawa H, Sakamoto S, Matsunami M, Sasaki K, Uchida H, Shigeta T, Fukuda A, Matsumoto K, Nakazawa A, Tanaka R, Kasahara M	Technical refinement in living-donor liver transplantation for hepatoblastoma with main portal vein tumor thrombosis - a pullout technique	Pediatr Transplant	18	E266-9	2014
Shigeta T, Sakamoto S, Uchida H, Sasaki K, Hamano I, Kanazawa H, Fukuda A, Kawai T, Onodera M, Nakazawa A, Kasahara M.	Basiliximab treatment for steroid-resistant rejection in pediatric patients following liver transplantation for acute liver failure.	Pediatr Transplant	18	E860-7	2014
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	19	E1-6	2015
Fukuda A, Imadome KI, 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	19	E144-52	2014
Uchida H, Sakamoto S, Hamano I, Kobayashi M, Kitajima T, Shigeta T, Kanazawa H, Fukuda A, Kasahara M.	Urgent living donor liver transplantation for biliary atresia complicated by a strangulated internal hernia at Roux-en Y limb: a case report.	Ann Transplant	19	149-152	2014
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/ptr.12681		2016