

平成23年4月30日現在

機関番号：17102  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21890180  
 研究課題名（和文） 生体肝移植における過小グラフト機能不全の病態解明に関する研究  
 研究課題名（英文） Study for the pathogenesis of Small-for-Size Syndrome after living donor liver transplantation  
 研究代表者  
 二宮 瑞樹 (NINOMIYA MIZUKI)  
 九州大学・大学病院・特任助教  
 研究者番号：30546461

研究成果の概要（和文）：ラット大量肝切除術直後の急激な肝細胞の再生を抑制することで肝小葉構造の乱れを最小限とし、生存率を有意に改善させることができた。再生過程での肝細胞と類洞内皮の再生の不均衡が過小グラフト機能不全に関与していることが示唆された。当科における生体肝移植レシピエント 334 例中 41 例に術後敗血症の発症を認め、1 年生存率は敗血症非発症例と比し有意に不良であった。多変量解析による検討では過小グラフト症候群、早期経腸栄養の有無が敗血症発生の有意なリスクファクターであった。

研究成果の概要（英文）：Suppression of MEK/ERK signaling pathway in the early phase after hepatectomy resulted in gradual regenerative response and ameliorated the prognosis of rats after critical hepatic volume reduction as a consequence of coordinated replication of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells. Among 334 liver transplant recipients, 41 patients developed postoperative septic complications, and their 1-year survival rates were significantly worse than those without sepsis. In a multivariate analysis, small graft syndrome and delayed enteral nutrition were selected as independent risk factors for development of postoperative septic complications.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,050,000 | 315,000 | 1,365,000 |
| 2010年度 | 950,000   | 285,000 | 1,235,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：7302

キーワード：過小グラフト、生体肝移植

## 1. 研究開始当初の背景

成人間生体肝移植において、graft size mismatch は避けられない問題である。過小グラフト(Small-for-size graft; SSG)は移植後に胆汁うっ滞や遷延性腹水をひきおこし、十分な周術期管理なしではしばしばグラフト機能不全、患者の死亡につながる。

## 2. 研究の目的

成人間生体肝移植において重大な問題である SSG による移植肝機能不全の原因は、部分肝移植後の急激な肝再生であるという仮説を検証し、臨床応用により SSG を安全

に移植する方法を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) 肝再生抑制が再生過程での肝機能・構造へ及ぼす影響の解析：70%部分肝切除モデルでの検討

① 肝再生抑制法の至適条件の決定；ラット部分肝切除後肝組織を経時的に採取し、肝重量再生率・PCNA labeling index・MAPK cascade 活性化(Western blot 法)・肝特異遺伝子発現(RT-PCR 法)を評価し、至適再生抑制法を設定する。

② 肝再生抑制による肝機能・形態・循環動態への影響の検討；in vitro にて肝細胞分裂中の肝特異的遺伝子発現の変化を検討する。また、in vivo にて肝再生過程の肝組織にて CD31 (類洞内皮細胞)・AGp110 (網細胆管) の免疫組織化学染色にて肝小葉構造の乱れ、Hepatocyte Island の形成を評価する。また、肝再生過程での肝再生調節因子(HGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ )、門脈圧の経時的変化・肝微小循環を評価する。

(2) 肝再生抑制が致死的大量肝切除後の生存率へ及ぼす影響の検討：90%部分肝切除モデルでの検討

① 肝再生速度が生存率へ及ぼす影響の検討；肝再生抑制群(NS-398 投与)・再生促進群(deletion variant Hepatocyte growth factor; dHGF 投与)・Control 群(Vehicle 投与)で生存率を比較する。また、他の方法で肝再生を抑制した群(PD98059; MEK inhibitor)でも同様の結果が得られることを確認する。

② 肝再生速度が肝特異機能へ及ぼす影響の検討；90%肝切除後の肝組織中の肝特異遺伝子(HNF-4 $\alpha$ , C/EBP- $\alpha$ , Albumin 等)の発現を比較。血清中 T-Bil, Albumin, Bile Acid, Glucose, Hyaluronic acid も比較。

(3) 肝移植モデルでの検討

① ラット SSG 肝移植モデルの確立；ラット 30%部分肝移植を施行し、高ビリルビン血症、肝不全等のため長期生存不可能なモデルを作成する。

② 肝再生抑制がラット SSG 肝移植後の肝機能・生存率へ及ぼす影響の検討；肝再生抑制至適条件下で、過小グラフト肝移植モデルを用いて、肝再生抑制が及ぼす影響を検討する。

(4) 臨床症例における検討

① 生体肝移植術後レシピエントより経時的に採血を行い、肝再生の指標として血清中 HGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 を、また類洞内皮機能の指標としてヒアルロン酸を測定し、CT volumetry より算出される移植後 1 週間のグラフト再生率と Small-for-size 症候群発生(移植後 14 日目の T-Bil>5mg/dl かつ腹水

1000ml/日)との相関を検討する。

② 肝移植術時の Graft volume/Standard Liver Volume (GV/SLV) 比が 40%未満の症例を SSG 症候群発生群(SSG 群)と非発生群(non-SSG 群)に分け、多変量解析による SSG 症候群発生のリスクファクターをピックアップする。

主要評価項目：SSG 症候群の発生(移植後 14 日目の T-Bil>5mg/dl かつ腹水 1000ml/日)

副次評価項目：SSG 症候群によるグラフトロス、生存率、移植後在院日数

その他の検討因子：移植後 1 週間のグラフト再生率、HGF peak 値、TGF- $\alpha$  peak 値、TGF- $\beta$  peak 値、移植前後門脈圧、グラフト重量あたりの門脈流量、手術データ(出血量、輸血量、虚血時間等)、合併症(出血、感染症等)。

### 4. 研究成果

(1) 肝再生抑制が再生過程での肝機能・構造へ及ぼす影響の解析：70%部分肝切除モデルでの検討

ラット 70%肝切除モデルに NS-398 (ERK1/2 阻害剤)を投与すると、Vehicle 群でみられていた肝切除直後の肝細胞の急激な分裂反応を有意に抑制することができた(図 1)。

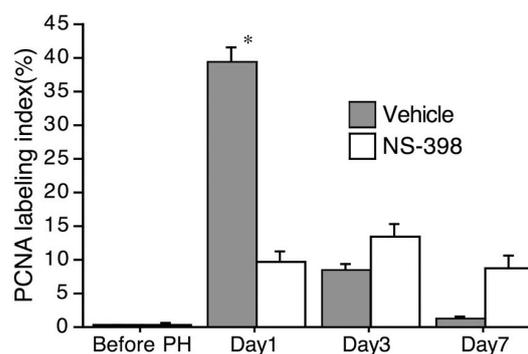


図 1

類洞内皮細胞の分裂には 2 群間で差を認めなかった。

肝重量再生率は肝切除後 3 日目で NS-398 群は有意に抑制されていたが、7 日目には Vehicle 群と同等の再生率であった。

肝切除 3 日目の肝組織を CD31, AGp110 免疫染色にて比較すると、NS-398 群は Vehicle 群に比し小葉構造の乱れが軽微であった。

(2) 肝再生抑制が致死的大量肝切除後の生存率へ及ぼす影響の検討：90%部分肝切除モデルでの検討

致死モデルであるラット 90%肝切除モデルにて検討したところ、NS-398 群は Vehicle 群に比し有意に生存率が改善した。NS-398 は COX2 阻害効果もあるため、プロスタグランジン等の経路を介した炎症反応への影響で生存率が改善した可能性も除外できないため、選択的 MEK 阻害剤である PD98059 を投与したところ、NS-398 群と同様に生存率は改善した。

さらに肝再生促進の効果をみるために、強力な肝細胞分裂促進効果を持つ dHGF を投与したところ、生存率改善効果はみられなかった (図 2)。

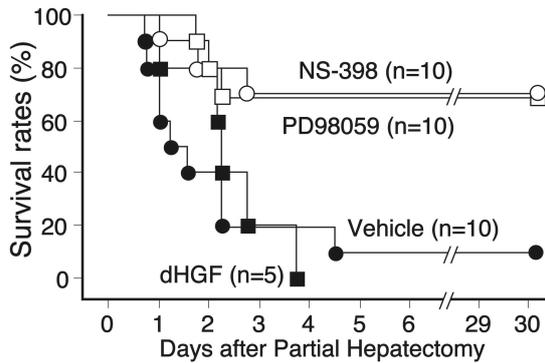


図 2

以上より、生体肝移植における過小グラフト症候群のように、残肝が肝予備能ぎりぎりの状態では肝細胞と類洞内皮細胞の細胞分裂開始時期の差により、術直後に肝細胞のみが急激な細胞分裂を開始するため細胞比率の不均衡が生じ、機能的な肝再生の効率が非常に悪く、肝不全を生じている可能性が示唆された。NS-398 等により術直後の急激な肝細胞分裂を阻止することで肝細胞と類洞内皮細胞の均衡のとれた再生を誘導し、大量肝切除後の肝不全を回避することができた (図 3)。

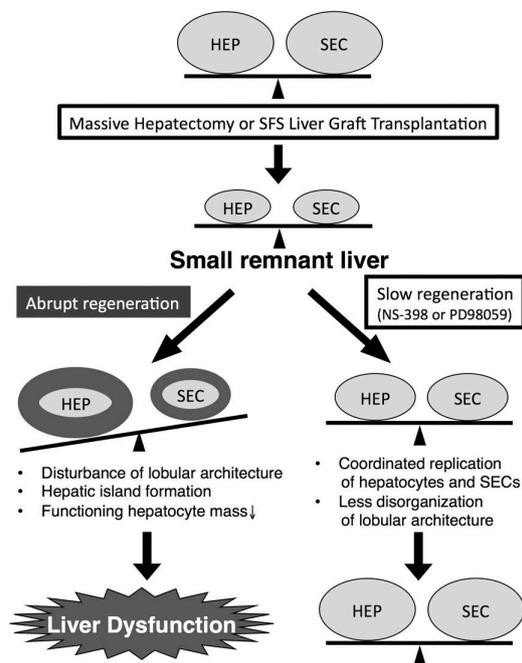


図 3

(3) 臨床症例における検討

① 生体肝移植後敗血症と過小グラフト症候群発生に関する検討

当科における生体肝移植レシピエント 334 例

(1996 年 10 月～2009 年 8 月)を対象に術後 1 ヶ月以内の敗血症の発症、その危険因子を検討した。334 例中 41 例(12.3%)に敗血症を認め、1 年生存率は非敗血症群に比し有意に不良であった(48.8 vs. 91.5%,  $P < 0.0001$ )。検出菌は *P. aeruginosa*(22.9%), MRSA(18.8%)が多かった。2 群間で危険因子を比較したところ、敗血症群で SSG 症候群が有意に多かった(34.2 vs. 11.3%,  $P < 0.001$ )。レシピエント年齢、性、出血量、手術時間、糖尿病の有無、MELD score、移植時の GV/SLV 値、胆道再建の種類、脾摘の有無には有意差を認めなかった。また、敗血症群は非敗血症群に比し過小グラフト症候群の発生率が有意に高かった (図 4)。

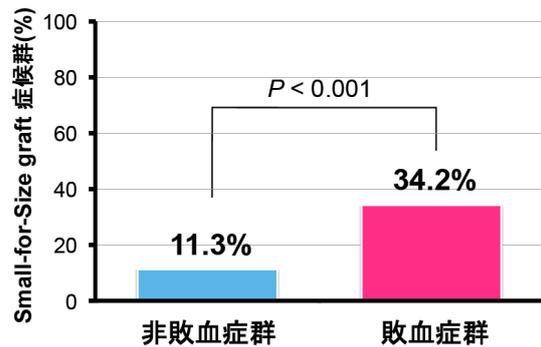


図 4

発症敗血症予防策を講じた後期症例では前期症例に比し有意に敗血症発症率が低かった(2.2 vs. 16.0%,  $P < 0.001$ )。予防策により過小グラフト症候群の発生、移植後生存率も有意に改善した (図 5)。

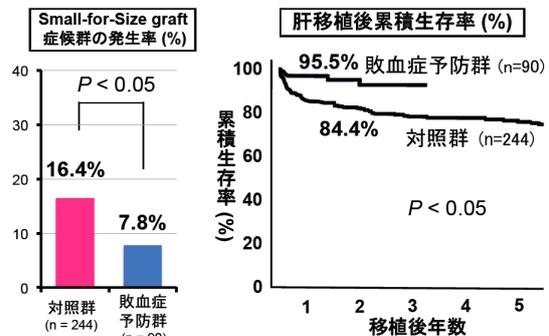


図 5

生体肝移植術後敗血症の予後は不良で、過小グラフト症候群が重要な危険因子であった。また、早期の経腸栄養、CV line 抜去、排便促進などの予防策によりその発症率を低下させることが可能となった。

② ARFI を用いた生体肝移植ドナー術後の残肝、脾臓硬度の検討

音響放射圧により組織硬度判定を可能とした新技術である Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) を搭載した超音波診断装置

(ACUSON S2000: 持田シーメンスメディカルシステム、東京)を用い、生体肝移植ドナー術前後(術前、POD1, 3, 5, 7)の肝、脾臓のARFIのせん断弾性波伝播速度(m/s)を測定した。術後ドナー残肝のAFRI値は上昇し、peakは左葉ドナーPOD3、右葉ドナーPOD5で、POD3-9で右葉ドナーが有為の高値であった(図6)。

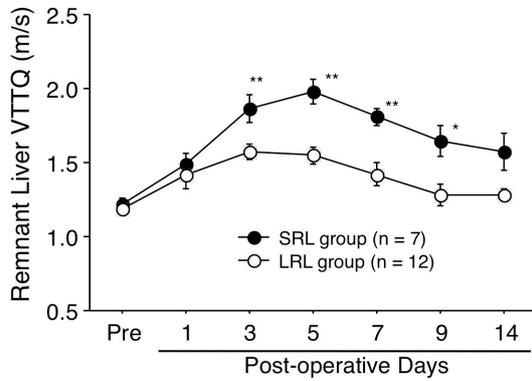


図6

脾臓のARFI値も術後上昇し、POD3-14で右葉ドナーが有為の高値であった(図7)。

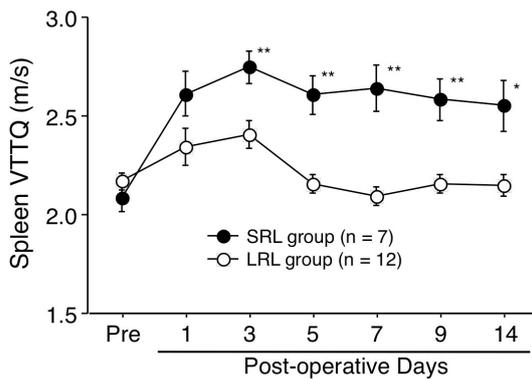


図7

ドナー術後のVTTQ peak値はT-Bil peak値と相関していた(図8)。

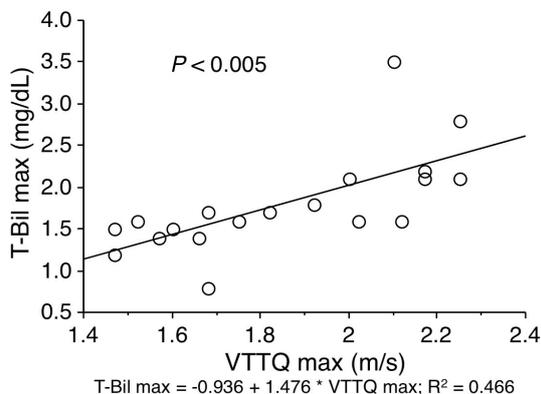


図8

レシピエント術前の脾臓VTTQ値はレシピエント術中の門脈圧実測値と有意に相関していた(図9)。

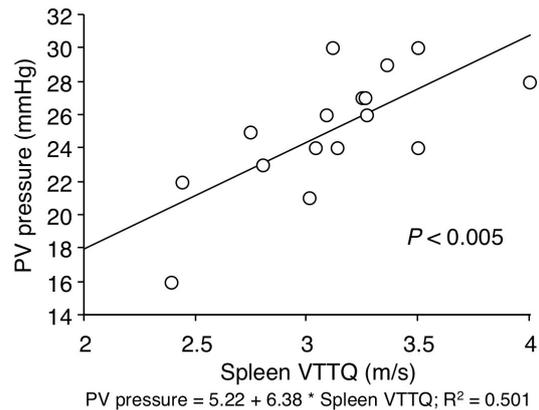


図9

生体肝移植ドナー術後のVTTQ値(組織硬度)の検討にて、以下のことが明らかとなった。

1. 右葉ドナー術後(残肝:小)のVTTQ値は左葉ドナー(残肝:大)に比べ高値で、これは肝再生過程の細胞密度の変化を反映している可能性がある。2. 脾臓のVTTQ値は門脈圧と相関しており、右葉ドナーは術後門脈圧上昇が遷延していることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- (1) Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T et al. (計10名) Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. American Journal of Transplantation, 2010;10(7):1580-1587. 査読有。
- (2) Ninomiya M, Ikeda T. Compressive stenosis of the left hepatic vein as a pathogenesis of postresectional liver failure: a case report. J Med Case Reports. 2010;4:163. 査読有。
- (3) Ninomiya M, Shirabe K, Ijichi H et al. (計9名) Temporal changes in the stiffness of the remnant liver and spleen after donor hepatectomy as assessed by Acoustic Radiation Force Impulse: A preliminary study. Hepatology Research, in Press. 査読有。

[学会発表] (計5件)

- (1) 二宮瑞樹、調憲、副島雄二 他(計13名) 生体肝移植術後管理における温故知新-敗血症性合併症の危険因子とその対策- 第65回日本消化器外科学会総会 平成22年7月14日-16日、山口

- (2) 二宮瑞樹、調憲、副島雄二 他(計 13 名)  
ARFI を用いた生体肝移植ドナー術後の  
残肝、脾臓硬度の検討  
第 28 回日本肝移植研究会  
平成 22 年 7 月 2 日、広島
- (3) 二宮瑞樹、調憲、副島雄二 他(計 13 名)  
生体肝移植術後における敗血症性合併症  
の危険因子とその対策  
第 110 回日本外科学会定期学術集会  
平成 22 年 4 月 8 日-10 日、名古屋
- (4) 二宮瑞樹、調憲、副島雄二 他(計 13 名)  
生体肝移植術後における早期経腸栄養の  
意義  
第 35 回九州代謝・栄養研究会  
平成 22 年 3 月 6 日、熊本
- (5) Ninomiya M, Kayashima H, Uchiyama H et al. (計 7 名)  
THE PATHOGENESIS OF SMALL-FOR-SIZE  
SYNDROME AFTER LIVING DONOR LIVER  
TRANSPLANTATION(Oral Presentation)  
5<sup>th</sup> Annual Academic Surgical Congress  
February 3-5, 2010, San Antonio, TX.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二宮 瑞樹 (NINOMIYA MIZUKI)  
九州大学・大学病院・特任助教  
研究者番号：30546461