

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月12日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791546

研究課題名（和文） 肝硬変患者における脾臓摘出術後門脈血栓症の分子的機序の解明とその臨床応用

研究課題名（英文） Study of postoperative portal venous thrombosis after splenectomy in cirrhotic patients and its therapeutic implication

研究代表者

金城 直（KINJYO NAO）

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：00507791

研究成果の概要（和文）：本研究は、肝硬変患者における、脾摘術門脈血栓症にメカニズムの解明を目的とした。脾摘後血栓形成（PVT）症例は、非血栓形成症例（nonPVT）に比べ、術前のプロトロンビン時間が長い傾向（ $p=0.0593$ ）にあり、またアンチトロンビンⅢ（ATⅢ）は有意に低かった（ $p=0.0054$ ）。PVT群では、nonPVT群に比べ、脾摘術後にATⅢ値は低値のまま回復が遅れ、術後7日目では有意に低下していた（ $p<0.05$ ）。肝硬変患者における門脈血栓症は、脾摘術後に肝機能が回復せずに過凝固の状態となったことが、門脈血栓形成の一因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of study is to elucidate the mechanism of portal venous thrombosis (PVT) after splenectomy in cirrhotic patients. Preoperative study showed that prothrombin time was more prolonged in PVT group than in non PVT group ( $p=0.0593$ ), and value of antithrombin III was lower in PVT group ( $p=0.0054$ ). In non PVT group, value of antithrombin III was recovered in a few days after splenectomy, however recovery of antithrombin III was delayed in PVT group after splenectomy and value of antithrombin III was significantly lower in PVT group on 7<sup>th</sup> postoperative day ( $p<0.05$ ) than in non PVT group. It is supposed that hypercoagulopathy might be one of causes of PVT after splenectomy due to delayed functional recovery of liver.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：脾門脈外科学

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、肝癌や肝硬変に対する治療が困難となっていた肝硬変患者に脾摘を施行することで、慢性C型肝炎に対するインターフェロンや肝癌の治療が可能となることを報告してきた。またHirookaらやMoriyamaらも、肝硬変患者に脾摘を施行することで予後が改善した（Hirooka M et al, Hepatol Res 2008;38:1172-1177, Moriyama D et al, Hepatol Res 2009;39:439-447）と報

告しており、肝硬変患者に対する脾臓摘出術は非常に有用である。一方で、肝硬変患者に対する脾摘術の術後合併症の一つに門脈血栓症がある。門脈血栓症は、門脈本幹、上・下腸間膜静脈、肝内門脈に発生した血栓症をさし、肝硬変患者においては0.6%～15%の頻度で発症すると報告されている。脾摘術そのものも門脈血栓症の発症のリスクがある。臨床的には特異的な症状はなく、血液検査でも特異的なものはない。急性に経過すると静脈

還流異常に伴う腸管浮腫や壊死、静脈瘤出血、肝不全などを認め、慢性では食道静脈瘤出血や門脈閉塞に伴う肝機能低下の原因となり、逆に肝硬変患者の治療の妨げとなり、その病態の解明、治療法の開発が必要である。

肝硬変患者においては、肝硬変症の進展や脾機能亢進症に伴う血小板減少や肝機能低下に伴う凝固蛋白の合成低下による出血のリスクが存在する。出血と血栓形成という、相反する病態が肝硬変患者には存在する。その原因として、肝機能低下に伴って凝固蛋白・抗凝固蛋白のいずれも減少し、いずれかの消費・減少によってそれまで保たれていた微妙なバランスはなんらかのストレス時に不安定となりやすく、過凝固または過線溶状態となることがその原因と考えられている (Northup PG et al, J Thromb Haemost 2008;6(1):2-9)。

脾摘後門脈血栓症の機序として、(1)肝硬変に伴う蛋白合成能の低下と脾摘術というストレスによる凝固蛋白、抗凝固蛋白のバランスの破綻、過凝固状態や(2)盲端となった脾静脈内での門脈血流の停滞または血流の乱れ、が考えられるが、門脈血栓症に対する詳細な分子メカニズムに関する詳細は不明で、治療に関しては、現在でもワーファリンを中心とした抗凝固療法が中心で、術後出血のリスクを伴うため、より安全で効果的な治療が求められている。脾摘術後のみならず、肝硬変に伴う門脈血栓症の発症メカニズムへの応用も期待される。肝硬変症における門脈血栓症の発症メカニズムが解明されれば、それを制御することは、慢性肝疾患患者の予後に寄与するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1)肝硬変患者における、脾臓摘出術というストレスを加えた時の凝固蛋白、抗凝固蛋白の動態を観察し、(2)さらに動物実験モデルを使用した、門脈血栓発症の分子メカニズムを詳細に検討することにより、脾摘術後のみならず肝硬変患者に対しても、より安全で効果的な門脈血栓症治療を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 肝硬変患者に対する脾摘後門脈血栓形成症例の背景因子の検討

九州大学病院において、肝硬変を有する脾機能亢進症患者に対して脾臓摘出術を施行した症例の術後門脈血栓症に対して、各種検討を行う。脾摘後門脈血栓は、脾摘後1週間目に全例腹部造影 CT を施行し、門脈本幹または肝内門脈枝、上腸間膜静脈に血栓形成を認めた症例とする(脾静脈血栓のみの症例は除く)

(※抗凝固薬(ワーファリンなど)を術前

に内服していた症例は対象から除いた。)

## (2) 方法

① 下記項目に関して、門脈血栓形成症例と非形成症例に分けて、両群を比較する。

・血液凝固検査(プロトロンビン時間(PT), fibrinogen, d-dimer)

・肝機能(アルブミン値、ビリルビン値、プロトロンビン時間)

・抗凝固蛋白の活性・発現(Protein C, Protein S, AntithrombinIII)

・手術因子(手術時間、出血量、脾重量)

(3) 血栓性素因の原因となる遺伝子異常の検出

ダイレクトシーケンス法にて、次の3つの遺伝子に関する遺伝子異常を検討する

Factor V Leiden, ProthrombinII, MTHFR

Prothrombin(G20210A)

Forward 5' -TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3'

Reverse 5' -TCC AGT AGT ATT ACT GGC TC-3'

Factor V Leiden(G1691A)

Forward 5' -TGG CCA GTG CTT AAC AAG ACC A-3'

Reverse 5' -CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA-3'

MTHFR(C677T)

Forward 5' -TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'

Reverse 5' -AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

(4) 脾摘術前後の凝固・線溶系の動態に関する検討

脾摘術前後の凝固・線溶系の動態に関して、下記項目の検討を行う。

測定日; 術前、術後1日目、3日目、5日目、7日目

検査項目; ・凝固系検査(PT)

・線溶系検査(FDP, d-dimer)

・Antithrombin III(ATIII)

(5) 肝硬変における脾摘後門脈血栓の発症メカニズムの検討(動物実験モデル)

胆管結紮肝硬変モデルを作成し、脾摘後門脈血栓に関して検討を行う。

肝硬変形成と同時に脾摘を行い、それぞれ検討を行う。

① 脾摘前後の止血機構に関して、下記項目に関して検討を行う。

測定日; 脾摘前日、術後1、3、5、7日目  
検査項目;

- ・血液凝固検査(PT, APTT)
- ・凝固蛋白活性(第Ⅷ因子, 第Ⅴ因子, 第Ⅱ因子)

・抗凝固蛋白活性・発現(Protein C, Protein S, AntithrombinⅢ)

② 脾摘後に脾静脈を採取し、脾静脈内皮細胞における、凝固促進や凝固抑制因子の発現を免疫組織学的および蛋白定量(Western blotting)にて経時的に検討する。

- ・凝固促進(組織因子, 第Ⅷ因子)
- ・凝固抑制因子(ヘパリン様物質、トロンボモジュリン)

#### 4. 研究成果

(1) 当科にて肝硬変症を有する患者に対して脾臓摘出術を行った29例を対象とし、術後の門脈血栓症の発症に関して、検討を行った。

①門脈血栓症例の頻度 31.8%

②背景因子の検討

術後に血栓を形成した群(n=7)と非形成群(n=22)の2群に分けて、術前の肝機能(アルブミン、ビリルビン、プロトロンビン時間)、肝硬変の線維化のマーカー(Ⅳ型コラーゲン、ヒアルロン酸)、抗凝固蛋白活性・発現

(Protein C, Protein S, antithrombin Ⅲ)を比較したところ、表1の結果となった。肝機能や線維化マーカー、Protein S、Protein Cに関しては、両群間に有意差を認めなかった。プロトロンビン時間は血栓形成群が低い傾向(p=0.0593)にあり、またアンチトロンビンⅢは血栓形成群が有意に低かった(p=0.0054)。線溶系に関しては両群に有意差を認めなかった。

因子	血栓形成群 (n=7)	血栓非形成群 (n=22)	p value
年齢(歳)	57.2±9.2	58.8±7.5	0.6000
アルブミン値(g/dL)	3.43±0.27	3.58±0.42	0.3013
総ビリルビン値(mg/dL)	1.45±0.59	1.42±0.70	0.9122
プロトロンビン時間(%)	61.4±13.7	70.8±13.9	0.0593
アンチトロンビンⅢ(%)	49.3±7.8	65.1±13.9	0.0054
Protein S (%)	48.0±7.8	46.1±11.2	0.8047
Protein C (%)	44.6±8.0	45.0±17.3	0.976
FDP (ug/ml)	2.60±0.00	3.35±1.38	0.3697
D-dimer (ng/ml)	0.75±0.21	0.64±0.58	0.7977
Ⅳコラーゲン (ng/ml)	300±193	315±162	0.8372
ヒアルロン酸 (ng/ml)	364±345	569±554	0.3757

<表1> 背景因子の比較

門脈血栓を形成する症例は、凝固蛋白、抗凝固蛋白が非血栓症例に比べ、合成が低下していることが分かった。

③手術因子に関して検討を行ったところ、手術時間が血栓形成症例で有意に長く(PVT 303±94min vs nonPVT 238±67min, p=0.0323)、脾重量が有意に大きかった(PVT 573±296g vs 340±150g, p=0.0068)。出血量は有意差を認めなかった。

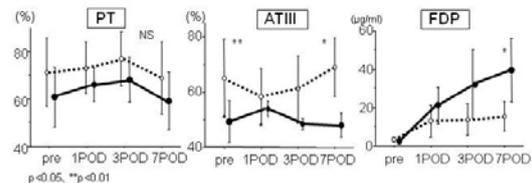
④血栓性素因の原因となる遺伝子異常の検出

上記29名に対して、ダイレクトシーケンス法による遺伝子異常の検出を行ったところ、三つの遺伝子に関して、それぞれ遺伝子異常を認めた症例は1例も存在せず、両群間に有意差は認めなかった。

元々日本人には、この3種類の遺伝子異常の割合が少ないことから、一部に報告されている、この3種類の遺伝子異常が今回の門脈血栓症に関与している、という可能性は低いことが考えられた。

⑤周術期の凝固・抗凝固蛋白の動態(プロトロンビン時間(PT)、アンチトロンビンⅢ(ATⅢ)、FDP)

PTは、血栓形成群、非形成群共に有意差を認めなかった。抗凝固蛋白であるATⅢに関しては、血栓非形成症例では術直後に低下するものの、その後は上昇しているのに対して、血栓形成群では術後経過において低いままとなっており、術後7日目では血栓形成群において有意に低下を認めた(p<0.05)。FDPに関しては、ATⅢと相反する結果となり、血栓非形成群が上昇しないのに対して、血栓形成群は上昇を認め、術後7日目に、血栓形成群において有意に高値を認めた(p<0.05)。



<図1> 周術期におけるPT、ATⅢ、FDPの経過(実線 門脈血栓(PVT)群、波線 門脈非形成(non PVT)群)

以上より、肝硬変患者における脾摘後血栓形成の原因の一つに、肝硬変に伴う蛋白合成能の低下により、術前は凝固蛋白、抗凝固蛋白がともに低い状態であること、脾摘というストレスにより術後に凝固線溶系のバランスが破綻し、過凝固状態に傾いたことが、門脈血栓形成の一因となったことが考えられた。

(2) 肝硬変における脾摘後門脈血栓の発症メカニズムの検討(動物実験モデル)

胆管結紮による肝硬変モデル(ラット)を作成した。

BDLラットはSDラットの胆管を結紮し、その後21日目に開腹し、それぞれ検討を行った。脾摘症例は胆管結紮と同時に施行し、胆管結紮後21日目に開腹し、検討を行った。

肝硬変モデルの作成は、良好で、AST、ALT、TBに関しては、表2となった。

<表2；sham、BDL群、BDL+脾摘(BDL+sp)群のAST、ALT、総ビリルビン値(TB)の比較>

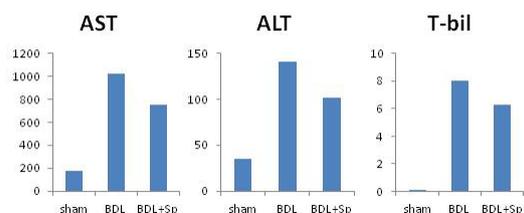
開腹時に門脈を採取し、門脈血栓形成に関して検討を行ったが、脾静脈内に一部血栓形成を認めるものの、門脈本幹や門脈一次分枝内に明らかな門脈血栓形成は認めず、肝硬変ラットにおける脾摘後門脈血栓モデルの作成には至らなかった。また採血量が十分確保できず、血液検査による各種検討(肝機能、凝固線溶系)は難しかった。

以上より、ラットによる脾摘後門脈血栓モデルの作成は難しく、より大動物による検討が必要と考えた。

### (3) まとめと今後の展望

以上、本研究の結果をまとめると、①脾重量が大きな症例、蛋白合成能が多い症例は血栓形成のリスクが高い、②肝硬変患者の脾摘後血栓形成症例では凝固蛋白、抗凝固蛋白がともに低い状態となっていること、③脾摘後に過凝固へと傾いていること、が判明した。また③日本人の肝硬変患者における脾摘後門脈血栓症例では、異常 prothrombin、Factor V Leiden、MTHFR といった遺伝子の異常による血栓形成素因の関与が少ないことが判明した。

今回得られた結果から、脾摘術後の門脈血栓に関して、①脾重量が大きな症例、蛋白合成能が多い症例は血栓形成のリスクが高いため、術後に注意深い経過観察が必要なこと、②術後に肝硬変患者において、凝固線溶のバランスが過凝固へと傾かないように、術後の適切な抗凝固蛋白の補充や薬剤投与を行うことが必要であることが分かった。また今後の展望として、①蛋白合成能をはじめとした術後肝機能の低下を最小限とする手術術式または治療方法の開発、②肝硬変脾摘後門脈血栓動物モデルを作成し、脾摘後門脈血栓形成の詳細な病態の検討と効果的な治療法の開発を今後も引き続き検討していくことが必要と考えられた。



## 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 8 件)

- (1) Kinjo N, Nagao Y, Akahoshi T (11人中1番目). Hepatic vein waveform and splenomegaly predict improvement of prothrombin time after splenectomy in hepatitis C virus-related cirrhotic patients. *Hepatol Res.* 2012 Dec 12. doi: 10.1111/hepr.12040. 査読
- (2) Nagao Y, Akahoshi T, Kinjo N (12人中5番目). Balloon-occluded retrograde transvenous obliteration is feasible for prolonged portosystemic shunts after living donor liver transplantation. *Surg Today.* 2013 Mar 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23467977. 査読有
- (3) Sugimachi K, Kinjo N, Ikebe M (7人中2番目). Significance of hepatic resection for hepatocellular carcinoma with sustained virological response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2012 Oct 18. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01112.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23145902. 査読
- (4) Sugimachi K, Tajiri H, Kinjo N (10人中3番目). Incidence and predictors of deep venous thrombosis after abdominal oncologic surgery: prospective Doppler ultrasound screening. *J Surg Res.* 2012 Dec;178(2):657-61. doi: 10.1016/j.jss.2012.06.002. Epub 2012 Jun 20. PubMed PMID: 22739045. 査読有
- (5) Yoshida D, Nagao Y, Kinjo N (10人中6番目). Predictive factors for platelet count after laparoscopic splenectomy in cirrhotic patients. *Hepatol Int.* 2011 Sep 30. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21959984. 査読有
- (6) Akahoshi T, Tomikawa M, Kinjo N (10人中5番目). Laparoscopic splenectomy with interferon therapy in 100 hepatitis-C-virus-cirrhotic patients with hypersplenism and thrombocytopenia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Feb;27(2):286-90. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06870.x. PubMed PMID: 21793908. 査読有
- (7) Uehara H, Akahoshi T, Kinjo N (8人中4番目). Prediction of improved liver function after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration:

relation to hepatic vein pressure gradient. J Gastroenterol Hepatol. 2012 Jan;27(1):137-41. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06835.x. PubMed PMID: 21722180. 査読

- (8) Hashimoto N, Shimoda S, Kinjo N (14人中7番目). Modulation of CD4<sup>+</sup> T cell responses following splenectomy in hepatitis C virus-related liver cirrhosis. Clin Exp Immunol. 2011 Aug;165(2):243-50. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04393.x. Epub 2011 May 25. PubMed PMID: 21615390; PubMed Central PMCID: PMC3142649. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) 金城 直他、第 18 回日本門脈圧亢進症学会 (2011 年 9 月 18 日～19 日、福岡) 慢性 C 型肝炎、肝硬変に対する脾摘後の肝機能改善予測における肝静脈波形の有用性の検討
- (2) 金城 直他、第 24 回日本内視鏡外科学会総会 (2011 年 12 月 7 日～9 日、大阪) 当院における肝硬変・脾機能亢進症に対する腹腔鏡下脾摘術の治療成績の検討
- (3) 金城 直他、第 67 回日本消化器外科学会総会 (2012 年 7 月 18 日～20 日、富山) 慢性 C 型肝炎、肝硬変患者の脾摘後肝機能改善予測における肝静脈波型の有用性の検討

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金城 直 (キンジョウ ナオ)

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：00507791