

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26461906
 研究課題名(和文) 免疫抑制剤による白質脳症発症に関わるビリルビン・サイトカインの影響に関する研究

 研究課題名(英文) The impacts of blood bilirubin levels on calcineurine-inhibitor concentrations in the brain to develop neurotoxicity in Rats.

 研究代表者
 佐藤 和重 (Sato, Kazushige)

 東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

 研究者番号：40375043
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：無処置ラットではタクロリムス投与により濃度依存性のTACの脳内移行性を認めることが示唆された。また、タクロリムスの神経症状発症の脳内タクロリムス濃度の閾値は870ng/gと推察された。血中タクロリムス血中濃度と脳内濃度は有意に相関関係を示した($p<0.001$)。神経症状を発症するタクロリムス血中濃度は28.6ng/mLと推察された。急性/劇症型肝炎ラットモデルを用いて高ビリルビン血症モデルラットを作成した。血清ビリルビン値、タクロリムス投与量、および脳内濃度、血中濃度を測定した。血清ビリルビン値の上昇に伴い、血液脳関門が破綻し、低濃度のタクロリムスが脳内移行することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the correlation between neurotoxicity and the intracerebral concentration of tacrolimus using Rats. The levels of the whole blood and the corresponding intracerebral concentration were evaluated. The threshold concentration of tacrolimus in the brain resulting in neurotoxic events was therefore estimated approximately 870 ng/g. Using a linear correlation between the whole blood and intracerebral concentrations of tacrolimus, the pharmacological threshold for the whole blood level was estimated as 28.6 ng/mL. Next, we investigated the effects of higher blood bilirubin levels to the intracerebral concentrations using galactosamine-induced liver failure rats. There was very strong correlations between the blood bilirubin levels and the intracerebral concentration of tacrolimus. Thus, the prolonged higher levels of bilirubin may alter capillary endothelial cells of blood-brain-barrier, and consequently lead to tacrolimus-associated cytotoxic injuries in the brain.

研究分野：移植免疫学

キーワード：カルシニューリンインヒビター 中枢神経毒性 白質脳症 脳内移行 ビリルビン

1. 研究開始当初の背景

タクロリムス (TAC)、シクロスポリン (CSA) は、臓器移植における拒絶反応の抑制のために使用される免疫抑制剤のひとつであるカルシニューリン阻害剤 (CNI) である。CNI の使用により臓器移植成績は飛躍的に向上した。成績向上が認められた一方で、免疫抑制療法の中心的な役割を担う CNI 製剤による副作用、とりわけ中枢神経毒性は移植患者の生活と質を著しく低下させる。臨床症状は、手指の振戦から白質脳症に伴う痙攣や視野障害、意識障害を呈し、移植後 1 ヶ月以内の早期に発症する。なかでも白質脳症は後頭葉白質に可逆性の病変をきたすことが多く、PRES (posterior reversible encephalopathy syndrome) と呼ばれている。不可逆性の白質病変を認めることがあり、発症年齢が学童期であると移植後の QOL (Quality of life) のみならず、就学にも大きな支障をきたす。1991 年より当科において肝臓移植後、中枢神経障害を認め頭部画像検査にて CNI による白質脳症と診断された症例は、TAC で導入した 136 例中 10 例 (7.4%)、CSA で導入した 24 例中 1 例 (4.2%) であった。白質脳症と診断された 11 例は、移植時年齢が 8 歳より 15 歳までの学童児に集中していた。1 歳未満では発症例はなく、成人症例では軽微な神経障害を認めた数例以外に白質脳症を発症した症例は認めなかった。18 歳未満の症例 (N=79) 中、白質脳症と診断された患児 (N=11, 13.9%) では、移植後 3 週以内に発症し、移植後早期の血清総ビリルビン値が高く遷延し、TAC 血中濃度 (トラフ値) は同等あるいは低いにもかかわらず、体重で換算した TAC 総投与量が少ないことが明らかになった。多変量解析では、年齢が 8 - 15 歳、移植後平均血清ビリルビン値が 7 mg/dL 以上であることが危険因子と考えられた。他施設では、による CNI 中枢神経障害の発症が移植臓器別では肝臓が最も多く、心臓、腎臓あるいは脾臓では少なく [Transpl Int 22 (3), 269:2009]、肺移植では重症感染等による敗血症を合併した子供の発症率が高い [Neurology 53, 1542:1999] と報告されている。幼児・小児は脳の大部分において血液脳関門が未発達であり、その機能が不十分である [J. Physiol 429, 47:1990, Histochem Cell Biol 122(1), 51, 2004]。これらの報告を考慮し、肝移植後早期のサイトカイン血症あるいは肝機能低下に伴う高ビリルビン血症が CNI の脳内移行に何らかの影響を及ぼし、低濃度の CNI が脳内に移行することにより中枢神経障害を惹起し白質脳症に進行させている可能性が示唆された。実際の臨床的結果およびこれまでの諸家の報告を踏まえると、学童期の肝移植症例においては、移植後遷延する高ビリルビン血症あるいは随伴する高サイトカイン血症が学童期の脳での脳血液関門 (Blood brain barrier) での CNI の脳内移行に影響を及ぼし、CNI による中枢神経障害の発症の初期過程に関与していることが

示唆され本研究の発想に至った。

2. 研究の目的

免疫抑制剤である CNI による中枢神経障害を認めた肝移植症例について臨床検討した結果、移植後早期の遷延する高ビリルビン血症、CNI 投与量、移植時年齢が危険因子として考えられた。この結果より、CNI による中枢神経障害発症の機序のひとつとして、高ビリルビン血症あるいはビリルビン上昇に随伴する高サイトカイン血症に伴う血液脳関門機能傷害による CNI の脳内移行による直接作用が原因と示唆された。動物実験モデルあるいは培養細胞モデルにて、高ビリルビン血症あるいは高サイトカイン血症に伴う血液脳関門の破綻に伴う CNI の脳内移行性について生物学的研究をおこない、実際の臨床結果を検証することが本研究の主題である。CNI による中枢神経障害は CNI の血中濃度に関わらず発症する。その機序は CNI の脳内移行による CNI による直接的な中枢神経細胞障害と考えられているが、CNI は通常の治療域の血中濃度では血液脳関門の存在により、そのバリア機能のため脳内に移行しない。本研究では臨床結果より血清ビリルビン値に着目し、CNI による中枢神経障害の機序のひとつとして、動物実験モデルで血清ビリルビン値の上昇に伴った高サイトカイン血症の状態では低濃度 CNI が脳内に移行しやすくなることを生物学的に明らかにする点で独創的であると考えられる。本研究にて CNI の中枢神経障害の機序のひとつを明らかにすることにより、肝移植をふくめた臓器移植後、高ビリルビン血症を伴う高サイトカイン血症が遷延する場合、学童期症例では CNI 投与を一時休薬し、代替免疫抑制剤 (抗 CD25 抗体、mTOR 阻害剤等) を用いて免疫抑制療法をおこなうことにより、CNI による白質脳症による中枢神経障害の発症を回避できる可能性が期待され、移植後の QOL を高めることが可能になる。急性/劇症型肝炎ラットモデルを用いて高ビリルビン血症モデルラットを作成し、ビリルビン値、CNI 投与量・脳内および血中濃度を測定し CNI の脳内移行に関与している因子について明らかにする。さらに、ビリルビン値上昇に伴い、血液脳関門が破綻し、低濃度 CNI が脳内移行することを明らかにする。

3. 研究の方法

4 - 5 週齢 Winster ラット (270 - 300g) を用いて以下の実験を行った。吸入麻酔下にて内頸静脈よりシリコンチューブを留置しハースで固定し静注ラインとして使用し飼育した。タクロリムス溶解液を TAC 濃度 0.075mg/kg、m 0.150mg/kg、0.300mg/kg、0.450mg/kg、0.600mg/kg の 5 群で精密シリンジポンプ (テルモ社) を用いて持続投与をおこない以下の内容について検討した。ただし、実験動物に痙攣を伴う呼吸抑制を認めたと確認された場合、エンドポイントとして吸入

麻酔を用いて安楽死させた。
剖検方法：剖検時期は痙攣を認めた時点でおこなった。タクロリムス投与量は開始時よりエンドポイントまでの総量から算出した。剖検は麻酔下に腹大動脈より採血を行い施行し、血清および全血を保存した。開頭し全脳を摘出し脳重量の測定後、脳サンプルを-4度に保存し脳内タクロリムス血中濃度測定に使用した。

検討項目

(1) 神経症状の観察・スコア化：剖検までの神経症状の有無、程度について以下のようにスコア化(2回/日)し検討した。スコア：症状なし(0点) 振戦(1点)、軽度痙攣(2点) 持続する痙攣(3点) 呼吸抑制(4点)
(2) 血液・生化学検査およびタクロリムス濃度測定：血清生化学検査(総ビリルビン、直接ビリルビン、総蛋白、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、アンモニア等)を生化学自動分析装置(富士ドライケム7000V)にて各々を測定する。脳組織をホモジネートした試料を用いて脳内のタクロリムス濃度および全血のタクロリムス濃度とタクロリムス代謝産物濃度はARCHITECTアナライザーi1000SRを用いてCLIA法にて検討した。

(3) 脳内タクロリムス濃度と神経障害発症およびタクロリムス血中濃度と脳内タクロリムス濃度との相関関係を検討した。

実験1) 正常ビリルビン群では無処置ラットにおいてタクロリムス(TAC)が脳内に移行開始する血中TAC濃度、TAC投与量よりTAC総投与量を算出した。

実験2) 混合型高ビリルビン群ではガラクトサミンを腹腔内に投与した急性肝不全モデルラットを用いてTACが脳内に移行開始する血中TAC濃度、TAC投与量よりTAC総投与量を算出した。ガラクトサミンの投与量は1500mg/kg、1000mg/kg、500mg/kgとした3群を設定した。

4. 研究成果

実験1) 無処置群では総ビリルビン値(T-Bil)

は0.3 mg/dL (0.4-0.9)、直接ビリルビン値(D-Bil) 0.2 mg/dL (0.1-0.3)、血中TAC濃度 49.3 mg/mL (39.2-60.1)、TAC総投与量 0.42mg (0.32-0.54)であった。神経症状のスコアとタクロリムス脳内濃度の相関関係を図1に示す。神経発症インデックス値が上昇するとともに脳内タクロリムス濃度は高く認められた。今回の検討では神経症状発症のタクロリムス脳内血中濃度のthreshold(閾値)は870ng/gと推察された。次に、タクロリムス血中濃度とタクロリムス脳内濃度の相関関係を図2に示した。タクロリムス血中濃度と脳内タクロリムス濃度は有意に相関関係を示した($p < 0.001$, $r = 0.912$)。相関式より神経症状発症のタクロリムス脳内血中濃度のthreshold(閾値) 870ng/g に対応する神経症

状を発症するタクロリムス血中濃度は28.6ng/mLと算出された。

実験2) 急性肝不全モデルラットでは直接、間接ビリルビン値以外の因子である総蛋白、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、アンモニアの血中濃度に関してはガラクトサミンの投与量に関わらず各群間で有意差を認めなかった。

ガラクトサミン 1500mg/kg 投与群ではT-Bilは16.1 mg/dL (13.2-25.9)、D-Bilは15.1 mg/dL (12.1-23.3)、血中TAC濃度は23.3 mg/mL (18.2-30.1)であった。TAC総投与量は0.23mg (0.15-0.34)と算出された。ガラクトサミン 1000mg/kg 投与群ではT-Bilは10.7 mg/dL (7.2-15.1)、D-Bilは8.1 mg/dL (6.7-10.2)、血中TAC濃度は43.3 mg/mL (34.6-62.2)であった。TAC総投与量は0.43mg (0.35-0.54)と算出された。ガラクトサミン 500mg/kg 投与群ではT-Bilは6.2 mg/dL (2.2-8.8)、D-Bilは5.3 mg/dL (3.1-6.9)、血中TAC濃度は48.3 mg/mL (42.2-55.1)であった。TAC総投与量は0.51mg (0.43-0.61)と算出された。

実験3) ビリルビン溶解液投与群ではガラクトサミン誘発性肝不全モデルラットと同様にT-Bil, D-Bil値のみが有意差を認めた。

ビリルビン溶解液 30mg/kg 投与群ではT-Bilは11.4 mg/dL (9.1-15.2)、D-Bilは8.3 mg/dL (6.4-11.3)、血中TAC濃度は42.5 mg/mL (32.2-49.1)であった。TAC総投与量は0.53mg (0.43-0.59)と算出された。ビリルビン溶解液 20mg/kg 投与群ではT-Bilは10.2 mg/dL (7.8-13.4)、D-Bilは7.5 mg/dL (6.1-9.7)、血中TAC濃度は43.9 mg/mL (37.9-53.2)であった。TAC総投与量は0.58mg (0.41-0.67)と算出された。ビリルビン溶解液 10mg/kg 投与群ではT-Bilは9.1 mg/dL (8.1-10.1)、D-Bilは7.1 mg/dL (5.6-8.3)、血中TAC濃度は58.7 mg/mL (46.8-63.7)であった。TAC総投与量は0.59mg (0.49-0.68)と算出された。

以上の実験結果から、無処置ラットにおいて、濃度依存性のタクロリムスの脳内移行を認めることが明らかになった。タクロリムスによる神経障害発症を誘発する脳内タクロリムス濃度の閾値は870ng/gと推察された。タクロリムス血中濃度と脳内タクロリムス濃度は有意に相関関係を示した($p < 0.001$, $r = 0.912$)。神経症状を発症するタクロリムス血中濃度は28.6ng/mLと推察された。ガラクトサミン誘発性急性肝不全モデルラットおよびビリルビン溶解液投与モデルラットでは各種の血清因子の中で総ビリルビン値および直接ビリルビン値のみが有意差を認められた。若年Winsterラットでは血清ビリルビン値上昇に伴い、血液脳関門が破綻し、低濃度タクロリムスが脳内に移行し神経障害を発症させていることが明らかになった。

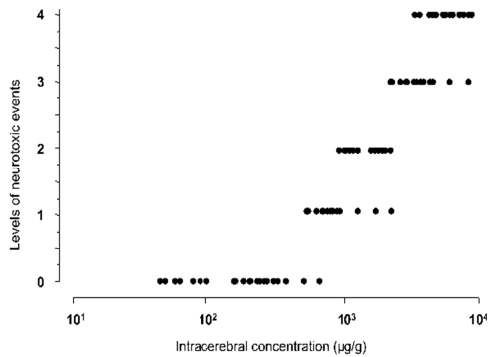


図 1)

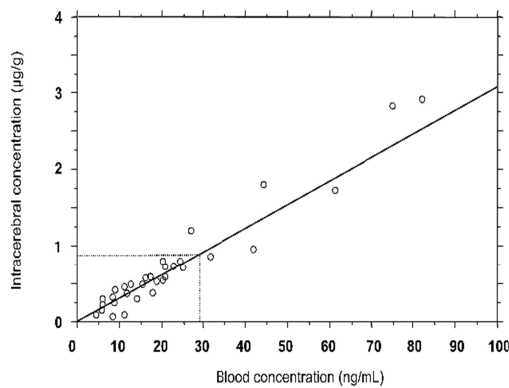


図 2)

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 2 件)

(1) Late onset of progressive speech impairment due to tacrolimus-associated leukoencephalopathy after kidney transplantation.

Sato K, Miura Y, Marui Y, Tanaka K, Tomikawa S. Int Urol Nephrol. 2015 Aug;47(8):1437-8. doi: 10.1007/s11255-015-1026-9. Epub 2015 Jun 14. (査読あり)

(2) Early post-transplant hyperbilirubinemia is a possible predictive factor for developing neurological complications in pediatric living donor liver transplant patients receiving tacrolimus. Sato K, Kobayashi Y, Nakamura A, Fukushima D, Satomi S. Pediatr

Transplant. 2017 Mar;21(2). doi: 10.1111/petr.12843. Epub 2016 Nov 1. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 和重 (SATO KAZUSHIGE)
 東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号：40375043

(2) 研究分担者

藤盛 啓成 (FUJIMORI KEISEI)
 東北大学・大学病院・准教授
 研究者番号：50238622

西村 隆一 (NISHIMURA RYUICHI)
 東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号：90710864

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

