

はしがき

近年、本邦において小児レシピエントに対する生体肝移植は一般的医療として定着してきた。特に成人間生体肝移植は急速に増加しつつあるが、ドナーの安全性を含め、まだ解決されるべき問題を抱えている。脳死ドナーは絶対的に不足しており、欧米で行なわれているような、慢性拒絶反応に対する二次移植は極めて特殊な事象となっている。また血縁関係にあるドナーからの生体肝移植といえども、脳死肝移植に比して免疫学的な優位性は確立されておらず、依然として長期から終生にわたる免疫抑制加療が必要とされている。しかしながら、この免疫抑制剤の最も懸念されるべき副作用が感染症である。そしてグラフトが生着した移植後の生命予後を脅かす合併症の殆どが感染症に起因するものであることは良く知られた事実である。このような状況下においては、免疫抑制剤の使用を減少又は不要にする研究は依然として必要であると考えられる。

本研究は、レシピエントにドナー特異的な免疫寛容状態を誘導するための研究に用いられている骨髄移植によるキメラを作成するに当たって、臨床応用不可能な大量の骨髄を必要とする状況を打開するための解決策としてスタートした。脳死ドナー手術においてはリンパ球クロスマッチやHLAのタイピングのために脾細胞を採取する。この脾細胞をもっと有効に利用できないかと考えたのが始まりである。主たる内容は1)脾細胞を骨髄細胞に混入することで必要とされる骨髄細胞を節約できないか、2)脾細胞のどの分画がその事象に拘わるのか、3)骨髄細胞ではなく、抹消血幹細胞を用いてキメラを作成することが可能であるか、に関する研究である。

ここの詳細に関しては欧文16論文を含む発表論文を掲載したので参照いただきたい。

本研究課題の成果は、移植免疫機構解明および移植治療一般の術後合併症の軽減に大きく貢献するものと期待される。

【研究組織】

研究代表者： 鳴海俊治 (弘前大学医学部 外科学第二講座 助手)
研究分担者： 佐々木睦男 (弘前大学医学部 外科学第二講座 教授)
研究分担者： 袴田健一 (弘前大学医学部附属病院 第二外科 講師)

研究経費：

平成 12 年度	1,600	千円
平成 13 年度	700	千円
平成 14 年度	400	千円
計	2,700	千円

【研究成果の概要】

本研究課題では、移植医療一般において免疫抑制剤の使用量を減量、または不要にさせるドナー特異的免疫寛容を誘導することを目的とし、骨髄細胞移植に脾細胞を加える手法での chimerism の有効性の確立とそのメカニズムの解明を目指して総合的な研究を行なった。以下に研究の概要を述べる。個々の詳細に関しては発表論文を掲載したので参照いただきたい。

1 chimerism を誘導するための脾細胞と骨髄細胞の至適割合の検索

これまで通常の報告ではマウスでは 30×10^6 個以上の骨髄細胞が投与されないとドナー特異的免疫寛容を確立するための有効な chimerism を作成できなかったが、これに 10×10^6 以上の脾細胞を混入することで、報告されている $1/10$ の量である 3×10^6 個の骨髄細胞で有効な chimerism が作成された。この研究成果により、ごく少量の骨髄細胞を用いた chimerism の誘導が可能であることが判明した。すなわち、生体ドナーに及ぼす危険性を減少させる可能性が示唆された。また、脾細胞を加えることの有効性のメカニズムの解明を目的として、脾細胞分画を T-cell-enrich, B-cell-enrich, macrophage-depleted に分け、それぞれの役割を検討したところ、T-cell-enrich でより有効な chimerism が作成された。すなわち脾細胞の内 T-Cell がこの chimerism の成立に大きな役割を果たしていることが判明した。また macrophage-depleted でも通常の脾細胞を混入した場合と同様に chimerism が作成された。これにより macrophage は chimerism の成立に関して抑制的に働いているかもしくは関与が少ないことが示唆された。これらに加えて、macrophage-depleted 群で GVHD が生じる頻度が有意に減少したため、macrophage が GVHD に対する関与が示唆された。

2 抹消血幹細胞移植との組み合わせの検討

この脾細胞を混入した chimerism 成立を臨床的に応用するために、ドナーに大きな負担となる骨髄移植を回避する目的とし、抹消血幹細胞移植との組み合わせの可能性を検討した。すなわち G-CSF をドナーマウスに投与し抹消血幹細胞を採取し、骨髄細胞と同様に脾細胞と組み合わせて投与した。この研究において通常 1 匹から採取される抹消血幹細胞では成立しなかった chimerism が脾細胞との混入により作成された。これにより、実験的な意味合いが強かった骨髄細胞移植との併用によるキメラ作成技術において、より臨床的応用が可能であることが示唆された。特に末梢血幹細胞は大量に採取することが困難であるため、脾細胞との混入によるプロトコールは意義深い物と考えられる。

3 GVHD 抑制に関して

上記の実験系では少数ながら GVHD が発生することから、その抑制が急務となる。臨床的には GVHD のコントロールは困難であり、これを克服するプロトコールの作成は重要な事項である。基本的には GVHD の成立には T-cell がその大きな役割を果たしていると考えられる。しかしながら T-cell は chimerism の誘導にも大きく関与している研究成果が得られているため、T-cell を除去せずに GVHD を抑制する方法の開発が今後の課題である。また上記の研究成果から macrophage の関与も重要な課題と考えられ、もう少し掘り下げて研究する必要性が有る。

4 総括

以上、これまでの研究概略について述べた、未だ、継続研究を要する部分が多い。しかしながら重要な事項として、ドナー特異的免疫寛容を作成するために大量の骨髄細胞が必要であるとしたこれまでの報告・概念をうち破る知見が得られたことが大きな成果と考えられる。如何にして臨床応用を可能にするかが今後の大きな課題である。これらが、移植治療一般の基礎的研究の向上及び移植成績の向上に寄与することを希望してやまない。

【研究発表】

(ア) 学会誌等

[欧文原著]

1. Totsuka E, FungJJ, Urakami A, Moras N, Takahashi K, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M. Influence of donor temporal cardiopulmonary arrest in human liver transplantation; possible role of ischemic-preconditioning. *Hepatology* 2000; 21: 577-580.
2. Totsuka E, Fung JJ, Ishii T, Urakami A, Moras NP, Watanabe N, Nara M, Hashimoto N, Takiguchi M, Nozaki T, Umehara Y, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M. Influence of donor condition on postoperative graft function in human liver transplantation. *Transplant Proc* 2000; 32: 322-326.
3. Totsuka E, Fung JJ, Blessios G, Nara M, Takiguchi M, Nozaki T, Yoshida A, Wajima N, Takahashi K, Seino K, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M. Influence of prolonged harvesting time during organ procurement on early graft outcome in human liver transplantation. *Hirosaki Med J* 2000; 51: 1-6.
4. Itabashi Y, Hakamada K, Narumi S, Toyoki Y, Totsuka E, Umehara Y, Aoki K, Sasaki M. A case of living-related partial liver transplantation using the right gastroepiploic artery for arterial reconstruction. *Hepatogastroenterol* 2000; 47: 512-513.
5. Totsuka E, Itou S, Suzuki K, Matura K, Nozaki T, Takiguchi M, Narumi S, Hakamada K, Endoh M, Sasaki M. Usefulness of Raedox Tolerance Test in Evaluating Fatty Liver. *Hepato-Gastroenterology* 48;184-187,2001
6. Takiguchi M, Totsuka E, Umehara M, Chang TH, Nara M, Nozaki T, Wajima N, Takahashi K, Seino K, Narumi S, Sugai M, Hakamada K, Sasaki M. Attenuation of canine hepatic warm ischemia-reperfusion injury associated with neutrophil infiltration by cytokine suppressive antiinflammatory agent, RF167653. *Hirosaki Med J* 2001; 53: 16-32.
7. Nara M, Hakamada K, Totsuka E, Nozaki T, Takiguchi M, Ono H, Aoki K, Umehara Y, Takahashi K, Umehara M, Chang TH, Hasimoto N, Itabashi Y, Toyoki Y, Seino K, Narumi S, Sasaki M. Xenogeneic bioartificial liver support by double filtration plasmaphoretic cross circulation using a

- high performance semipermeable membrane. Hirosaki Med J 53;104-110, 2002
8. Itabashi Y, Narumi S, Hakamda K, Watanabe N, Aoki K, Sasaki M. Allogeneic chimerism established with a mixture of low dose bone marrow cells and splenocytes in sublethally irradiated mice. Transplant Immunol 10;25-30, 2002
 9. Hashimoto N, Narumi S, Itabashi Y, Hakamada K, Sasaki M. Efficacy of donor splenocytes mixed with bone marrow cells for induction of tolerance in sublethally irradiated mice. Transplant Immunol 10;37-41, 2002
 10. Totsuka E, Fung JJ, Lee MC, Isii T, Umehara M, Makino Y, Chang TH, Toyoki Y, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M. Influence of cold ischemia time and graft transport distance on postoperative outcome in human liver transplantation. Surg Today 32;792-799, 2002

[邦文原著]

1. 十束英志, John J. Fung, Forrest Dodson, 袴田健一, 野崎剛, 和嶋直紀, 高橋克郎, 清野景好, 鳴海俊治, 佐々木睦男. 脳死全肝移植におけるドナー全身状態の移植片機能に及ぼす影響: Pittsburgh 大学における成人全肝移植 186 例の検討. Organ Biol 2000; 7: 47-54.
2. 新岡丈典, 大久保正, 菅原和信, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男, 生体肝移植後におけるタクロリムスの血中濃度解析, 医薬品相互作用研究シンポジウム, 2000, 23, 157-160
3. 新岡丈典, 大久保正, 菅原和信, 鳴海俊治, 袴田健一, 十束英志, 豊木嘉一, 佐々木睦男, 小島佳也, 保嶋 実. 生体肝移植患者におけるタクロリムス点滴持続静注時の体内動態解析. TDM 研究 19(2);151-152, 2002
4. 十束英志, Fung JJ, 梅原 実, 小野裕明, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男. 心停止及び心停止後蘇生ドナーからの肝移植の経験. 今日の移植 15(1);100-104, 2002

[邦文その他]

1. 十束英志, John J. Fung, 野崎剛, 滝口純, 高橋克郎, 清野景好, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男. Pittsburgh 大学における心停止後ドナー

- (non-heart-beating donor, NHBD)からの肝移植8例の経験;uncontrolled NHBDの危険性とcontrolled NHBDの有用性). 肝臓 2000; 41: 295-297
2. 佐々木睦男, 袴田健一, 鳴海俊治. わが国初の生体肝移植: 動物実験から臨床へ. 小児外科 2001; 33: 376-9

(イ) 口頭発表

[海外発表]

1. Narumi S, Hashimoto N, Itabashi Y, Hakamada K, Sasaki M, Experimental transplantation: Splenocyte mixture saves bone marrow cells for induction of mixed chimerism in sublethally irradiated mice, Transplantation Odyssey 2001, Istanbul, 2001年8月
2. Toyoki Y, Hakamada K, Narumi S, Totsuka E, Chang TH, Umehara U, Sasaki M. A case of living donor liver transplantation from 69 year and 9 month aged donor, 7th Congress of The Asian Society of Transplantation, New Delhi, India, 2002年3月.
3. Totsuka E, Fung JJ, Umehara M, Chang TH, Ono O, Toyoki Y, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M. Influence of cold and warm ischemia time on postoperative GRAFT outcome in human liver transplantation. 2nd Annual Winter Symposium, American Society of Transplant Surgeon, Miami, 2002年3月

[国内発表]

1. 十束英志, John J. Fung, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男 シンポジウム「生体および脳死肝移植の現状と将来的展望」全肝移植における移植片輸送距離, 冷保存時間の術後成績に及ぼす影響について 第100回日本外科学会総会 東京 2000年4月
2. 滝口純, 十束英志, 奈良昌樹, 野崎剛, 吉田淳, 和嶋直紀, 高橋克郎, 清野景好, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男 ワークショップ「サイトカインと臓器障害」肝温阻血再灌流障害に対するFR167653投与の有効性 第7回日本臓器保存生物医学会 奈良 2000年6月
3. 袴田健一, 鳴海俊治, 十束英志, 豊木嘉一, 梅原豊, 佐々木睦男 シンポジウム「アルコール性肝障害における最近の問題点」アルコール性肝硬変に対する肝移植適応上の問題点 第33回日本肝臓学会東部会 東京 2000年

11月

4. 奈良昌樹, 袴田健一, 十束英志, 滝口 純, 鳴海俊治, 佐々木睦男. ハイパフォーマンス膜を用いた二重濾過異種血漿交差灌流による人工肝機能補助. 日本異種移植研究会. 2001年2月
5. 豊木嘉一, 袴田健一, 鳴海俊治, 十束英志, 佐々木睦男. 69歳9か月のドナーによる生体肝移植の一例. 東北地区肝移植臨床検討会. 2001年3月
6. 橋本直樹, 鳴海俊治, 板橋幸弘, 袴田健一, 佐々木睦男. ドナー特異的免疫寛容誘導におけるドナー骨髄細胞, 脾細胞, 末梢血幹細胞移入の意義. 日本外科学会総会. 2001年4月
7. 奈良昌樹, 袴田健一, 十束英志, 野崎剛, 滝口純, 鳴海俊治, 豊木嘉一, 梅原豊, 張同輝, 佐々木睦男. ハイパフォーマンス膜を用いた二重濾過異種血漿交差灌流による人工肝機能補助効果の検討. 日本肝移植研究会. 2001年5月
8. 野崎剛, 十束英志, 梅原実, 小野裕明, 奈良昌樹, 滝口純, 清野景好, 高橋克郎, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男. 肝温阻血再灌流障害における nitric oxide donor (FK409) 投与の有効性. 日本肝移植研究会. 2001年5月
9. 豊木嘉一, 袴田健一, 鳴海俊治, 十束英志, 奈良昌樹, 橋本直樹, 佐々木睦男. 69歳9か月のドナーからの生体肝移植例. 日本肝移植研究会. 2001年5月
10. 袴田健一, 鳴海俊治, 清野景好, 十束英志, 豊木嘉一, 板橋幸弘, 青木計績, 梅原 豊, 張 同輝, 鈴木英登士, 佐々木睦男. 生体肝移植における高齢者ドナーの問題. 弘前医学会総会. 2001年6月
11. 新岡丈典, 大久保正, 菅原和信, 鳴海俊治, 袴田健一, 十束英志, 豊木嘉一, 佐々木睦男, 小島圭也, 保嶋 実. 生体肝移植患者におけるタクロリム点滴持続静注時の体内動態解析. 弘前医学会総会. 2001年6月
12. 袴田健一, 鳴海俊治, 豊木嘉一, 十束英志, 佐々木睦男. 成人間生体肝移植成績向上と高齢者ドナーの問題. 日本消化器外科学会. 2001年7月
13. 十束英志, 袴田健一, 鳴海俊治, 豊木嘉一, 梅原 豊, 張 同輝, 吉原秀一, 鈴木英登士, 佐々木睦男. 生体肝移植の依頼を受けながら実施に至らなかった症例の検討. 青森県肝胆膵研究会. 2001年9月
14. 豊木嘉一, 袴田健一, 鳴海俊治, Rosenthal P, Roberts JP, Ascher NL, 佐々木睦男. 長期生存肝移植患児における免疫抑制剤からの離脱の可能性. 日本移植学会総会. 2001年12月

15. 袴田健一, 鳴海俊治, 豊木嘉一, 十束英志, 青木計績, 板橋幸弘, 梅原 実, 張同 輝, 梅原 豊, 清野景好, 佐々木睦男. 年齢からみた成人生体肝移植ドナーの適否と問題点. 日本移植学会総会. 2001年12月
16. 鳴海俊治, 袴田健一, 豊木嘉一, 十束英志, 清野景好, 佐々木睦男. 肝移植患者の適応と選択 MELD scale 応用の可能性. 日本移植学会総会. 2001年12月
17. 十束英志, 袴田健一, 鳴海俊治, 清野景好, 豊木嘉一, 梅原 豊, 青木計績, 板橋幸弘, 佐々木睦男. 生体肝移植術後肝静脈狭窄4例の経験. 日本移植学会総会. 2001年12月
18. 豊木嘉一, 袴田健一, 鳴海俊治, 十束英志, 板橋幸弘, 梅原 実, 張 同輝, 佐々木睦男, ワークショップ「生体肝移植周術期のクリティカルケア」 当科での生体肝移植における血管合併症について, 日本腹部救急医学会総会, 下関, 2002年3月.
19. 張 同輝, 袴田健一, 豊木嘉一, 梅原実, 石澤義也, 吉田 淳, 十束英志, 鳴海俊治, 佐々木睦男. 「閉塞性黄疸の病態と対策」 Small-for-size liver 再生時の高ビリルビン血症と Multi-drug resistance protein (MRP) 発現の経時的推移. 東北肝臓外科研究会, 仙台, 2002年6月.
20. 梅原 実, 十束英志, 石澤義也, 張 同輝, 豊木嘉一, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男. 摘出全肝交叉灌流システムの人工肝としての有用性. 日本肝移植研究会, 東京, 2002年7月
21. 張 同輝, 袴田健一, 梅原 実, 吉田 淳, 石澤義也, 十束英志, 豊木嘉一, 鳴海俊治, 佐々木睦男. 過少グラフトによる術後遷延性黄疸における MRP の役割の検討. 日本肝移植研究会, 東京, 2002年7月
22. 豊木嘉一, Philip Rosenthal, John P Roberts, Nancy L Ascher, 袴田健一, 鳴海俊治, 十束英志, 佐々木睦男. 長期経過小児肝移植患者における移植後成績に影響を及ぼす因子. 日本肝移植研究会, 東京, 2002年7月
23. 梅原 実, 十束英志, 石澤義也, 張 同輝, 豊木嘉一, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男. 半透膜を介した体外全肝灌流 zoonosis の予防. 日本消化器外科学会総会. 京都, 2002年7月
24. 豊木嘉一, 袴田健一, 鳴海俊治, 十束英志, 梅原実, 張 同輝, 佐々木睦男. 当科での生体肝移植における周術期合併症の検討. 日本消化器外科学会総会. 京都, 2002年7月
25. 張 同輝, 袴田健一, 石澤義也, 梅原 実, 吉田 淳, 十束英志, 豊木嘉一,

- 鳴海俊治, 佐々木睦男. ラット 90%肝切除後術後黄疸時のビリルビン排泄蛋白 MRP2, MRP3 の経時的発現に関する検討. 日本胆道学会総会, 名古屋, 2002 年 9 月
26. 梅原 実, 十束英志, 石澤義也, 張 同輝, 豊木嘉一, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男. 摘出全肝交叉灌流システムの人工肝としての有用性. 日本移植学会総会, 東京, 2002 年 10 月
27. 張 同輝, 袴田健一, 石澤義也, 梅原 実, 吉田 淳, 十束英志, 豊木嘉一, 鳴海俊治, 佐々木睦男. Small-for-size liver 再生時における MRP 発現の経時的推移. 日本移植学会総会, 東京, 2002 年 10 月
28. 豊木嘉一, Rosenthal P, Ascher NL, Roberts JP, 袴田健一, 鳴海俊治, 佐々木睦男. 低年齢肝移植患児の移植成績. 日本移植学会総会, 東京, 2002 年 10 月

(ウ) 出版物

1. Totsuka E, Todo S, Starzl TE, Takiguchi M, Nozaki T, Nara N, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M. Attenuation of ischemic liver injury by prostaglandin E1 analogue, misoprostol, and prostaglandin I2 analogue, OP-41483. In: Sasaki M, Yokoyama M, Suzuki T eds. New Directions for Cellular and Organ Transplantation. 2000: 195-199.
2. Hakamada K, Narumi S, Seino K, Totsuka E, Takahashi K, Umehara U, Nara M, Sasaki M. Liver regeneration after living donor partial liver transplantation. In: A Munakata editor. Progress in Transplantation. Amsterdam: Elsevier; 2000. p.63-70.
3. Itabashi Y, Hakamada K, Narumi S, Hashimoto N, Sasaki M. Development of allogeneic microchimerism after living-related liver transplantation. In: A Munakata editor. Progress in Transplantation. Amsterdam: Elsevier; 2000. p.59-62.
4. Itabashi Y, Narumi S, Hakamada K, Watanebe N, Aoki K, Sasaki M. Allogeneic chimerism induced by a mixture of low-dose bone marrow cells and splenocytes in sublethally irradiated mice. In: Sasaki M, Yokoyama M, Suzuki T eds. New Directions for Cellular and Organ Transplantation. Hiroasaki: Elsevier; 2000. p.51-54.
5. Nozaki T, Hakamada K, Narumi S, Totsuka E, Takahashi K, Nara M, Hashimoto

- N, Takiguchi M, Watanabe N, Sugai M, Endoh M, Suzuki H, Munakata H, Sasaki M. Living-related liver transplantation: the Hirosaki experience. In: M Sasaki et al editor. New Directions for Cellular and Organ Transplantation. Amsterdam: Elsevier; 2000. p.131-135.
6. Ohkubo T, Niioka T, Sugawara K, Narumi S, Hakamada K, Sasaki M, Kozima K, Yasujima M. Therapeutic monitoring of tacrolimus in liver transplant recipients. In: Sasaki M, Yokoyama M, Suzuki T, Iwaki Y, editors. New directions for cellular and organ transplantation. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2000: 137-146.