

小児生体肝移植後の急性拒絶反応を抑制するための メチルプレドニゾロンの時間治療

牛島健太郎

眞田 幸弘

大友 慎也

大柿 景子

平田 雄大

岡田 憲樹

大西 康晴

佐久間康成

和田由喜世

藤村 昭夫

水田 耕一

小児生体肝移植後の急性拒絶反応を抑制するための メチルプレドニゾロンの時間治療

Methylprednisolone chrono-therapy for prevention for acute rejection in
pediatric patients with living-donor liver transplantation

牛島 健太郎*¹ 眞田 幸弘*² 大友 慎也*³ 大柿 景子*⁴ 平田 雄大*⁵ 岡田 憲樹*⁶
大西 康晴*⁷ 佐久間 康成*⁸ 和田 由喜世*⁹ 藤村 昭夫*¹⁰ 水田 耕一*¹¹

Key words : 急性拒絶反応、時間治療、小児肝移植、メチルプレドニゾロン、夜投与

要 旨

目的 副腎皮質ホルモン剤の投与は、内因性副腎皮質ホルモン分泌の日内変動に合わせて、朝に行われることが多い。一方、血液中の白血球分画にも日内変動が認められ、リンパ球数は夜間に高値となる。従って、夜間の方が日中よりもリンパ球が臓器に浸潤しやすく、免疫反応が大きくなると思われる。そこで本研究は、肝移植後の急性拒絶反応発現率を指標とし、メチルプレドニゾロン (mPSL) の夜投与の有効性を明らかにすることを目的とした。

方法 2014年10月から2022年3月31日までに、自治医科大学にて生体肝移植術が実施された15歳未満の小児患者60名を対象とした。代諾者等からの同意取得後、mPSL朝(8時)投与群あるいはmPSL夜(20時)投与群のいずれかに無作為に割付けた。有効性の評価は急性拒絶反応の発現率が高い手術後14日目まで、安全性の評価は手術後から初回退院までとした。手術後15日目以降、朝投与群はそのまま朝投与を継続し、夜投与群は投与時刻を夜から朝に変更した。主要評価項目は手術後14日目までの急性拒絶反応発現率とした。

結果・考察 手術後14日目までの急性拒絶反応発現例は、朝投与群で29名中10名、夜投与群で27名中3名であった。また、その病理組織学的スコアは夜投与群の方が朝投与群よりも小であった。併用薬であるタクロリムスの血中濃度は、2群間とも同程度に調整された。移植手術後から退院までの期間における感染症罹患率については、投与群間で有意差を認めなかった。

結語 術後14日間のmPSL夜投与は朝投与よりも、小児肝移植後の急性拒絶反応発現を抑制する有効な投与方法である。

はじめに

生体肝移植術後の小児レシピエントにおける急性拒絶反応を抑制するため、免疫抑制療法としてメチル

プレドニゾロン(mPSL)とカルシニューリン阻害薬の2剤による併用療法が行われている。自治医科大学附属病院・移植外科では、mPSLとタクロリムスによる併用療法を行っているが、急性拒絶の

*¹ USHIJIMA KENTARO 自治医科大学医学部 薬理学講座 臨床薬理学部門、山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部 薬剤学・製剤学分野
*² SANADA YUKIHIRO 自治医科大学医学部 外科学講座 一般消化器・移植外科部門
*³ OTOMO SHINYA 自治医科大学附属病院 薬剤部
*⁴ OGAKI KEIKO 同 上
*⁵ HIRATA YUTA 自治医科大学医学部 外科学講座 一般消化器・移植外科部門
*⁶ OKADA NORIKI 同 上
*⁷ ONISHI YASUHARU 同 上
*⁸ SAKUMA YASUNARU 同 上
*⁹ WADA YUKIYO 山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部 薬剤学・製剤学分野
*¹⁰ FUJIMURA AKIO 自治医科大学医学部 薬理学講座 臨床薬理学部門、山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部 薬剤学・製剤学分野
*¹¹ MIZUTA KOICHI 自治医科大学医学部 外科学講座 一般消化器・移植外科部門

発現率は約 35% である¹²⁾。急性拒絶が発現した場合には、ステロイドパルス療法を行うなどにより免疫抑制を強化している。その結果、感染症を合併することが多く、在院期間も延長することがある。したがって、急性拒絶の発現を抑制することは、移植後の患児の予後に関する重要な課題である。

一般に副腎皮質ホルモン剤の投与は、内因性副腎皮質ホルモン分泌の日内変動に合わせて早朝であることが多い。一方、血液中の白血球分画にも日内変動が認められ、リンパ球数は夜間に高値となる^{3,4)}。従って、夜間の方が日中よりもリンパ球の浸潤を来しやすいものと思われる。

ラットを用いた副腎皮質ホルモン剤の時間治療研究が自治医科大学で実施され、その成績が次のように報告されている⁵⁾。同種異系・異所性の移植手術を行い、副腎皮質ステロイド剤(プレドニゾロン)を 16 時(ラットの活動期前、内因性ステロイド分泌のピーク直前)あるいは 4 時(ラットの休息期前、内因性ステロイド分泌が低値)に投与した。コントロール群(未治療群)における移植臓器の平均生存日数は 5.8 日であった。一方、活動期前にプレドニゾロンを投与したラットでは、移植臓器の平均生存日数は 7.3 日であり、休息期前に投与したラットでは移植臓器の平均生存日数は 8.4 日であった。これらより、ヒトでは副腎皮質ステロイド剤を夕方～夜に投与した方が、急性拒絶反応予防効果は大であると考えられる。

本研究は、小児肝移植後の急性拒絶反応発現率の減少および安全性に及ぼす mPSL 投与時刻の影響を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

試験のスケジュール

自治医科大学附属病院・移植外科にて生体肝移植をうける 15 歳未満の小児患者を対象として臨床研究を行った。除外基準は、劇症肝炎や緊急に移植手術を行う症例、プロトコル通りの免疫抑制療法が実施できないと判断される症例とした。臨床研究

のプロトコルは、自治医科大学附属病院臨床研究等倫理審査委員会および山陽小野田市立山口東京理科大学・人を対象とする医学系研究に関する倫理審査委員会にて審査を受け、施設長から実施の許可を得て実施した(臨 B16-013, 22004)。また、本臨床研究の内容を大学病院医療情報ネットワークに登録した(UMIN000015793)。移植手術の前に、対象者の代諾者に対して文書を用いて研究内容に関する説明を行い、書面による同意を得た後、研究を行った。

臨床研究の概要

本研究は、無作為割付けオープンラベル並行群間比較法で実施した。移植手術終了後、通常の診療に従いバイタルサインの確認、血液検査(血算、凝固能、生化学・電解質、血液ガス)、尿検査、腹水検査、腹部超音波エコー検査を行った。また、mPSL 以外の併用薬に関しては制限を設けず、通常の治療通りに行った。検査結果から急性拒絶反応が疑われた場合は肝生検を実施し、急性拒絶反応の有無を病理組織学的に評価した。急性拒絶反応が発現した場合には試験治療を中止し、mPSL パルス治療(20 mg/kg を 3 日)を開始した。

mPSL の投与時刻および割付け

mPSL を 1 日 1 回 8 時に投与する朝投与群、あるいは 20 時に投与する夜投与群に分けた。投与群の割付けは、乱数表を用いて無作為割付けを行った。層別化因子は、手術前リツキシマブ投与の有無とした。

mPSL の夜投与は、急性拒絶反応の発現率が高い手術後 14 日目までとした。15 日目以降の mPSL 投与は、夜投与群では投与時刻を 1 日ごとに 16 時頃、12 時頃さらに 8 時頃へと変更し、その後は 8 時投与を継続した。朝投与群では、試験期間中は朝投与を継続した。

免疫抑制療法

免疫抑制療法として、mPSL とタクロリムスの

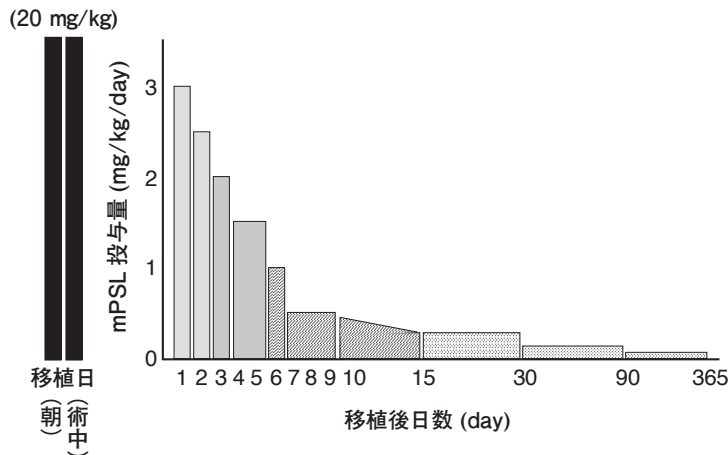


図1 mPSLの漸減投与量

2剤併用療法を行った。mPSLの1日投与量は図1に示す通りに、経口的に漸減した。タクロリムスは手術後に集中治療室に入室後より開始し、平均血中濃度20 ng/mLを目標として持続点滴を行った。経口摂取が可能になった頃に、1日2回経口投与に切り替えた。採血は、手術後7日目までは6時頃および18時頃の1日2回、その後は6時頃に1日1回実施した。採血後は、速やかに血中タクロリムス濃度を測定した。

ミコフェノール酸モフェチル (MMF) は、肝機能異常を認めた場合に主治医の判断で投与を開始した。手術後にMMFを使用しても、試験治療は中止せずに継続した。

評価項目

主要評価項目は、手術後14日目までの急性拒絶反応発現率とした。急性拒絶反応の病理組織学的重症度は、門脈域の炎症、胆管の炎症/傷害、静脈内皮炎の程度から病理専門医が評価するRejection Activity Index (RAI) スコアを用いた。副次的評価項目は、手術後退院時までの急性拒絶反応発現率、手術後のインスリンおよび経口降圧薬の使用の有無、サイトメガロウイルス (CMV) 感染、血液培養陽性および腹腔内感染の有無とした。

統計解析

急性拒絶反応発現率の解析は、手術後14日目までにプロトコール通りにmPSLが投与され、さらに肝生検により急性拒絶反応を認めたものを対象とした。肝生検を実施せずにmPSLパルス治療を実施した症例は解析対象から除外した。その他副次的評価項目は全症例を解析対象とした。

急性拒絶反応の発現率などのカテゴリー変数の関係性は、Fisher's exact testを用いて解析した。連続変数の2群間比較にはMann-Whitney U testまたはun-paired *t*-testを用いた。検査値の推移についてはrepeated measured two-way ANOVAを用いた。得られた結果を平均値±SDで示し、また全ての統計解析において有意水準を5%とした。

表1 被験者の背景

	朝投与群 (n=30)	夜投与群 (n=30)
年齢 (years)	1.8 (0.4 - 14)	1.0 (0.3 - 13)
体重 (kg)	12.7 (6.0 - 49)	7.9 (6.1 - 44)
性別 (M / F, n)	(14 / 16)	(10 / 20)
原疾患 (n)		
胆道閉鎖症	19	27
アラジール症候群	3	0
代謝性疾患	6	1
その他	2	2
術前リツキシマブ投与 (n)	7	6

中央値 (最小値-最大値)

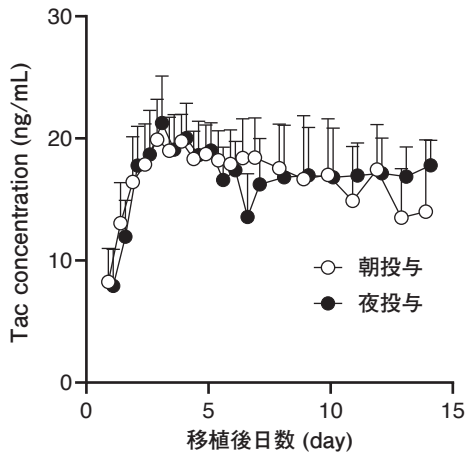


図2 血中タクロリムス濃度の推移
朝投与群 (n=30, ○)、夜投与群 (n=30, ●)。平均値±SD。

結 果

2014年10月から2022年3月31日の期間に60症例から同意が得られた(表1)。タクロリムスの血中濃度推移には、朝投与群と夜投与群の間に有意差は認めなかった(図2)。また、手術後14日までにMMFを追加投与した症例は朝投与群で6例、夜投与群で4例であった。

急性拒絶反応の発現率

肝生検による急性拒絶反応の病理組織学的診断の前に、mPSL投与量がプロトコールから逸脱した4例(朝投与群:1例、夜投与群:3例)を解析から除外した。解析対象者は56例(朝投与群:29例、夜投与群:27例)であった。手術後14日までに急性拒絶反応が発現したものは朝投与群で10例(34.5%)、夜投与群で3例(11.1%)であり、その発現率は夜投与群の方が低かった(表2)。肝生検時に

表2 手術後14日目までの急性拒絶反応発現率

	朝投与群 n=29	夜投与群 n=27
AR あり	10 (34.5%)	3 (11.1%)
AR なし	19 (65.5%)	24 (88.9%)

$p = 0.058$ (Fisher's exact test)
AR: acute rejection

病理診断部の専門医によって評価されたRAIスコアは、夜投与群の方が朝投与群よりも有意に小さかった(図3)。

術前リツキシマブ投与後の有無で層別解析した結果を表3に示す。リツキシマブ投与がない場合、夜投与群では手術後14日目までに急性拒絶反応が発現したものはなく、朝投与群では8例(36.4%)に急性拒絶反応を認めた($p < 0.01$)。一方、リツキシマブの投与がある場合は朝投与群で2例(28.6%)、夜投与群で3例(50%)で急性拒絶反応が発現した。

リツキシマブ投与がない43例について、手術後28日目までの急性拒絶反応の累積発現率を図4に示した。夜投与群では手術後14日目までに急性拒絶

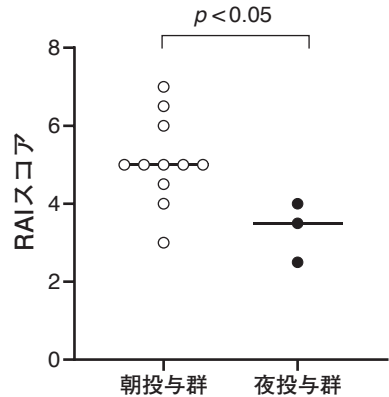


図3 急性拒絶反応時のRAIスコア
手術後14日目までに急性拒絶反応が発現した朝投与群11例および夜投与群3例のRAIスコア(Mann-Whitney U test)。バーは中央値。

表3 手術後14日目までの急性拒絶反応発現率(層別化)
a) リツキシマブ投与なし

	朝投与群 n=22	夜投与群 n=21
AR あり	8 (36.4%)	0 (0%)
AR なし	14 (63.6%)	21 (100%)

$p < 0.01$ (Fisher's exact test)

b) リツキシマブ投与あり

	朝投与群 n=7	夜投与群 n=6
AR あり	2 (28.6%)	3 (50%)
AR なし	5 (71.4%)	3 (50%)

$p = 0.59$ (Fisher's exact test)
AR: acute rejection

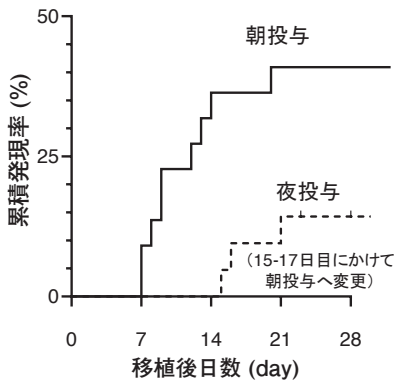


図4 急性拒絶反応の累積発現率(リツキシマブ投与なし) 夜投与群のmPSL投与時刻は、15日目から17日にかけて夜から朝に変更した。朝投与群(実線)、夜投与群(破線)。

反応を認めた症例はなかったが、mPSLの夜投与を終了した後から急性拒絶反応が発現した。

臨床検査値の推移

免疫活性の指標として、血中の好酸球数およびリンパ球数の推移を図5に示した。手術後の好酸球数の推移は夜投与群の方が朝投与群よりも有意に低かった。また、朝投与群および夜投与群のリンパ球数の推移は、好酸球数と同様であったが、2群間で差を認めなかった。

副腎機能を評価するため、手術後14日目の朝に血中ACTH濃度およびコルチゾール濃度を測定した(図6)。夜投与群のACTHおよびコルチゾール濃度は朝投与群よりも有意に低値であった。mPSL

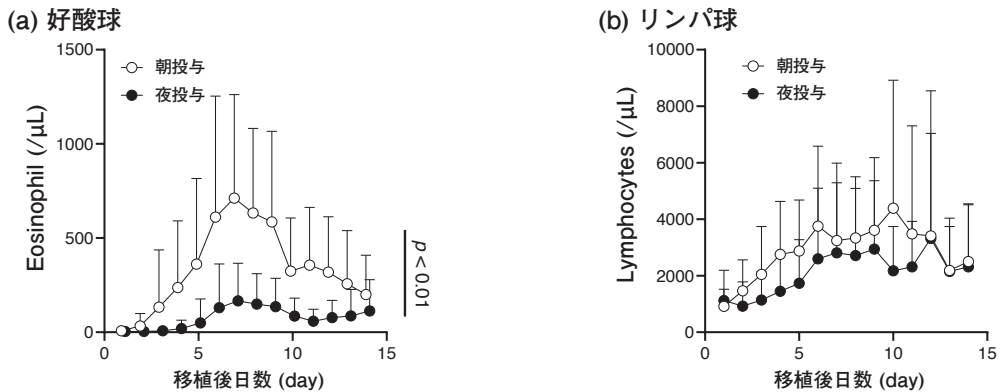


図5 血中好酸球(a)およびリンパ球数(b)の推移 朝採血時の血球数の推移を示す。朝投与群(n=30, ○)、夜投与群(n=30, ●)、平均値±SD (repeated measured two-way ANOVA)。

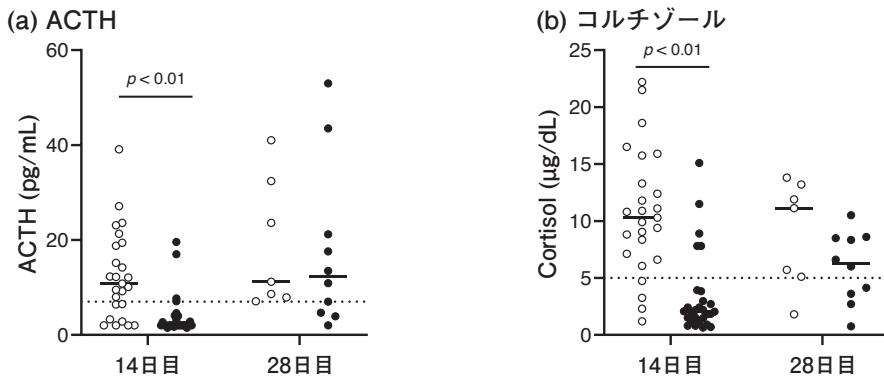


図6 血中ACTH(a)およびコルチゾール濃度(b) 採血検査は早朝食前に実施した。朝投与群(n=25(14日目)、n=7(28日目)、○)、夜投与群(n=28(14日目)、n=10(28日目)、●)。バーは中央値。点線は基準値下限。(Mann-Whitney U test)。

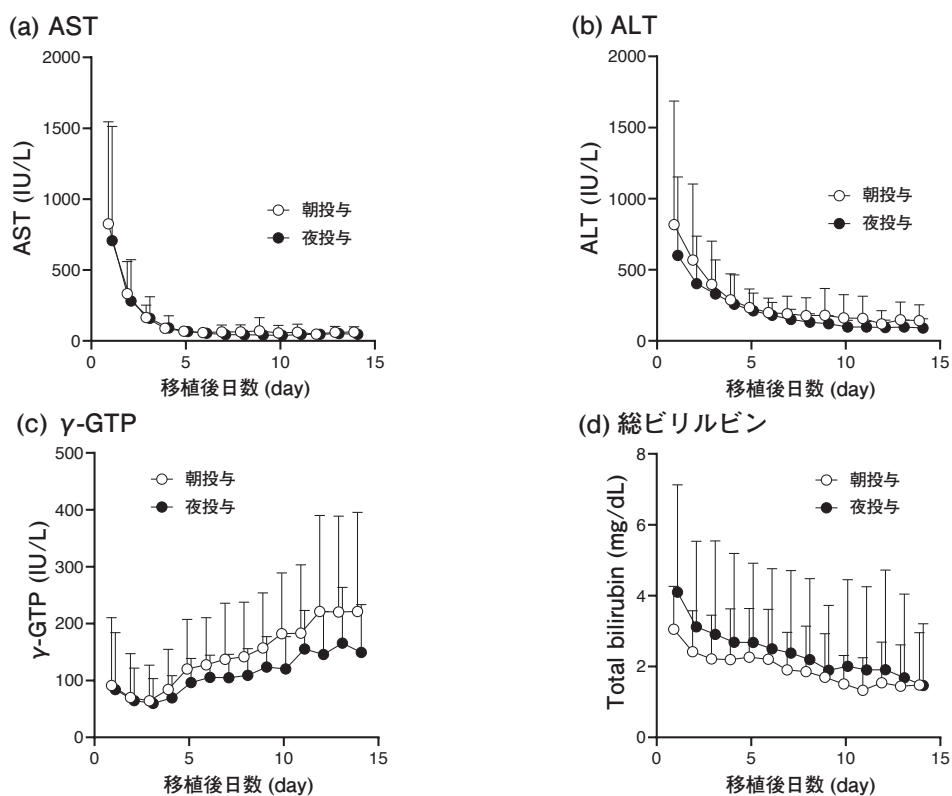


図7 肝胆道系酵素および総ビリルビン濃度の推移
朝投与群(n=30, ○)、夜投与群(n=30, ●)。平均値±SD。

表4 手術後から退院日までの感染

	朝投与群 n=30	夜投与群 n=30
a) 血液培養陽性		
あり	3 (10%)	3 (10%)
なし	27 (90%)	27 (90%)
b) 腹腔内感染		
あり	0 (0%)	0 (0%)
なし	30 (100%)	30 (100%)
c) CMV陽性細胞出現		
あり	16 (53.3%)	9 (30%)
なし	14 (46.7%)	21 (70%)

表5 周術期以降における併用薬の有無

	朝投与群 n=30	夜投与群 n=30
a) インスリンのスライディングスケール実施		
AR あり	3 (10%)	3 (10%)
AR なし	27 (90%)	27 (90%)
b) 経口降圧薬の服用		
AR あり	8 (26.7%)	9 (30%)
AR なし	22 (73.3%)	21 (70%)

を夜投与から朝投与に変更した後の手術後 28 日目頃に再度検査すると、夜投与群のほとんどの症例でこれらの値は基準値以上まで改善していた。

AST/ALT、総ビリルビンおよび γ -GTP 濃度の推移には、朝投与群と夜投与群の間に有意差は認めなかった (図 7)。

併用薬使用の有無および感染症の有無

手術終了後から退院時までの間において、血液培養陽性および腹腔内感染を認めた症例数、CMV 陽性細胞を認めた症例数を表 4 に示した。いずれの出現率も、朝投与群と夜投与群で同程度であった。また、周術期以降にインスリンスライディングスケールを実施した症例および経口降圧薬を服用した症例の割合も、朝投与群と夜投与群で同程度であった (表 5)。

考 察

急性拒絶反応は移植手術後 2～3 日後から発現することがあるが、手術後 7 日目から 14 日目の間に発現する人が多い。本研究において、急性拒絶が発現しやすい移植後周術期における mPSL 時間治療の有用性が明らかとなった。特に、リツキシマブの前投与がない mPSL 夜投与群では、手術後 14 日目までに急性拒絶反応が 1 例も発現しなかった。

急性拒絶反応には特異的な臨床所見や検査所見はなく、腹水貯留や門脈血流低下、肝胆道系酵素の上昇から急性拒絶反応を疑っている。さらに、急性拒絶反応発現における免疫反応の指標として、好酸球数増加の有用性を示す報告がある⁶⁻⁸⁾。本研究において、夜投与群は手術後周術期における好酸球数の推移が有意に低値であったことから、mPSL 夜投与は朝投与よりも免疫抑制作用が大であると考えられる。この投与時刻によって免疫抑制作用の程度が異なるために、急性拒絶反応の発現率が mPSL 夜投与により有意に抑制したと考えられる。

mPSL 夜投与群では、手術後 14 日目から 28 日目

までの期間に急性拒絶反応が発現した。この期間は、mPSL の投与時刻を夜から朝に変更した期間と一致する。これは、mPSL 夜投与によって抑制されていた免疫反応が、mPSL の投与が朝に変更されたことにより活性化したために急性拒絶反応が発現したものと考えられる。mPSL 夜投与の長期間継続により、副腎機能抑制以外の有害反応が懸念されるが、手術後 28 日目まで夜投与を継続すると急性拒絶反応の発現がさらに抑制できるものと思われる。

ABO 血液型不適合やリンパ球クロスマッチ陽性のためにリツキシマブを手術前投与した症例では、mPSL 夜投与による急性拒絶反応の抑制効果が発揮されなかった。リツキシマブは抗 CD-20 モノクローナル抗体であり、臓器移植では抗体関連拒絶反応の抑制のために使用される。炎症性疾患や自己免疫性疾患を対象にした基礎研究および臨床研究により、リツキシマブの作用は B 細胞だけにとどまらず、CD4(+)T 細胞のコンパートメントに影響を及ぼすことが指摘されている^{9,10)}。臓器移植後の急性拒絶反応発現に、リツキシマブの B 細胞非依存的な作用がどのように影響しているか詳細は不明であるが、リツキシマブ投与例で mPSL 夜投与の有効性が認められなかった要因である可能性がある。

副腎皮質ホルモン剤は多様な有害作用を持ち、生体リズムの観点では視床下部-下垂体-副腎系への影響がある。これまでの基礎研究において、休息期の副腎皮質ホルモン剤の投与は体内時計を乱すことが報告されている¹¹⁾。臨床研究においては、mPSL を 660 μ g/h で持続投与した時の副腎機能は深夜～4 時投与で最も強力に、さらに 16 時～20 時投与で中程度に抑制されている¹²⁾。一方、8 時～16 時投与では副腎機能抑制はほとんど認められていない。本研究における mPSL の夜投与は 20 時頃に行われており、手術後 14 日目では夜投与群のほとんどで ACTH およびコルチゾールの分泌低下を認めた。この副腎機能抑制は、mPSL の投与時刻を朝に切り替えることで回復する傾向にあった。その他にも副腎皮質ホルモン剤には感染症の誘発、

耐糖能異常や血圧上昇などの有害作用があるが、インスリンや降圧薬などの補助薬の使用頻度は朝投与と夜投与で同程度であり、肝移植後の小児患者において mPSL 夜投与には忍容性があると考えられる。

最後に本研究における limitation として、研究対象者が 15 歳未満の小児であることが挙げられる。本研究で有効性を認めた mPSL 夜投与が、成人や高齢患者においても認容されるものであるか、慎重に検証する必要がある。

結 論

本研究により、mPSL の夜投与は、小児肝移植後の急性拒絶反応発現を抑制する有効な投与方法

であることが明らかとなった。mPSL の夜投与をより有効に、かつ安全に行うことのできる期間について、今後検討する必要がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり研究費を助成いただきました臨床薬理研究振興財団に深謝いたします。本研究にご協力いただきました自治医科大学附属病院移植再生医療センター 吉田幸世氏、尾沼恵梨香氏に感謝の意を表します。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文献

- 1) Mizuta K, Sanada Y, Wakiya T, Urahashi T, Umehara M, Egami S, et al. Living-donor liver transplantation in 126 patients with biliary atresia: single-center experience. *Transplant Proc* 2010; **42**: 4127-31.
- 2) Sanada Y, Sakuma Y, Onishi Y, Okada N, Yamada N, Hirata Y, et al. Outcomes after living donor liver transplantation in pediatric patients with inherited metabolic diseases. *Ann Transplant* 2021; **26**: e932994.
- 3) Melchart D, Martin P, Hallek M, Holzmann M, Jurcic X, Wagner H. Circadian variation of the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes and of various other parameters in 13 healthy male adults. *Chronobiol Int* 1992; **9**: 35-45.
- 4) Smaaland R, Sothorn RB, Lote K, Sandberg S, Aakvaag A, Laerum OD. Circadian phase relationships between peripheral blood variables and bone marrow proliferative activity in clinical health. *In Vivo* 1995; **9**: 379-89.
- 5) Tomizawa N, Uchida H, Xiu DR, To H, Fujimura A, Kobayashi E. Chronopharmacology of oral prednisolone in rats. *J Med* 2001; **32**: 135-51.
- 6) Barnes EJ, Abdel-Rehim MM, Goulis Y, Abou Ragab M, Davies S, Dhillon A, et al. Applications and limitations of blood eosinophilia for the diagnosis of acute cellular rejection in liver transplantation. *Am J Transplant* 2003; **3**: 432-8.
- 7) de Groen PC, Kephart GM, Gleich GJ, Ludwig J. The eosinophil as an effector cell of the immune response during hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1994; **20**: 654-62.
- 8) Sanada Y, Ushijima K, Mizuta K, Urahashi T, Ihara Y, Wakiya T, et al. Prediction of acute cellular rejection by peripheral blood eosinophilia in pediatric living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2012; **44**: 1341-5.
- 9) Kessel A, Rosner I, Toubi E. Rituximab: beyond simple B cell depletion. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; **34**: 74-9.
- 10) Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 236-47.
- 11) Koyanagi S, Okazawa S, Kuramoto Y, Ushijima K, Shimeno H, Soeda S, et al. Chronic treatment with prednisolone represses the circadian oscillation of clock gene expression in mouse peripheral tissues. *Mol Endocrinol* 2006; **20**: 573-83.
- 12) Smolensky MH, Lemmer B, Reinberg AE. Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; **59**: 852-82.