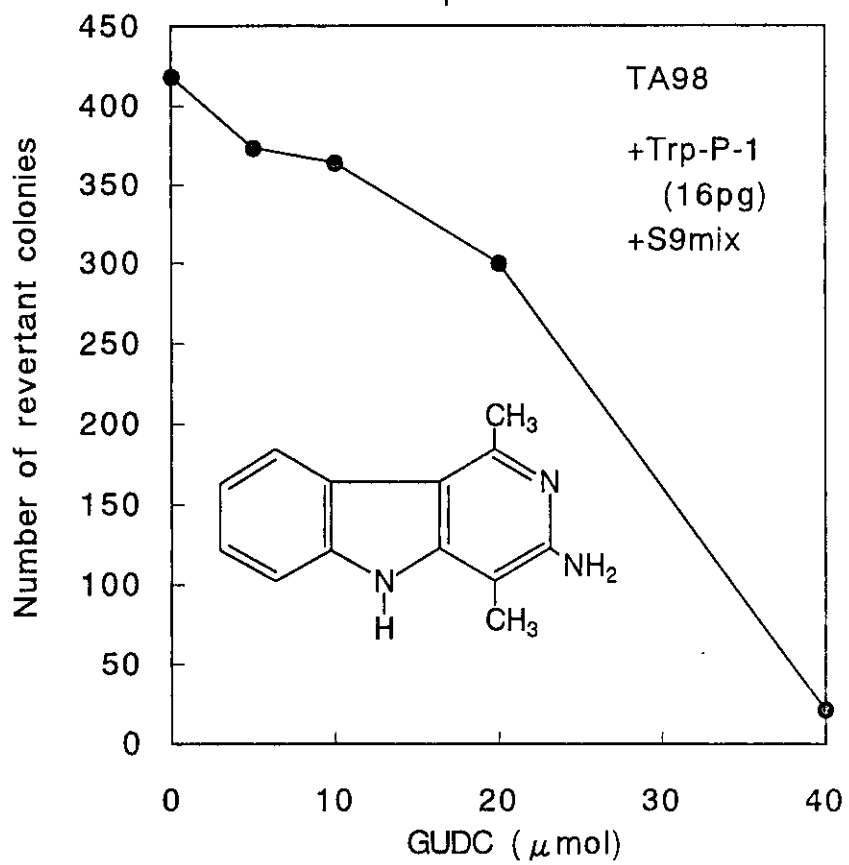
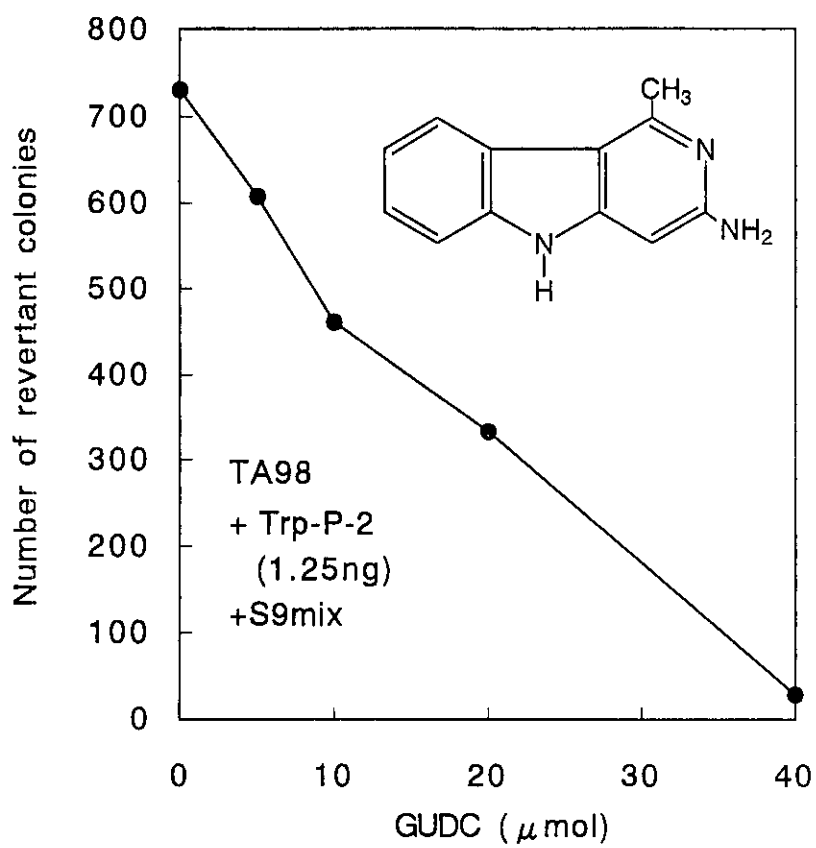


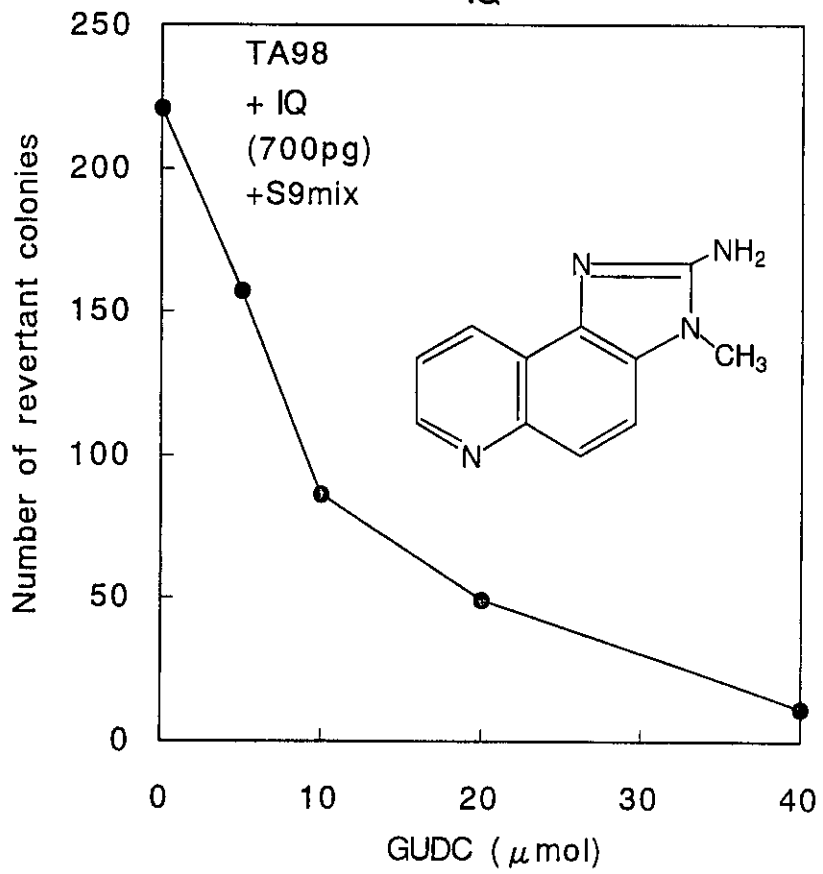
Glycoursodeoxycholic acid with
Trp-P-1



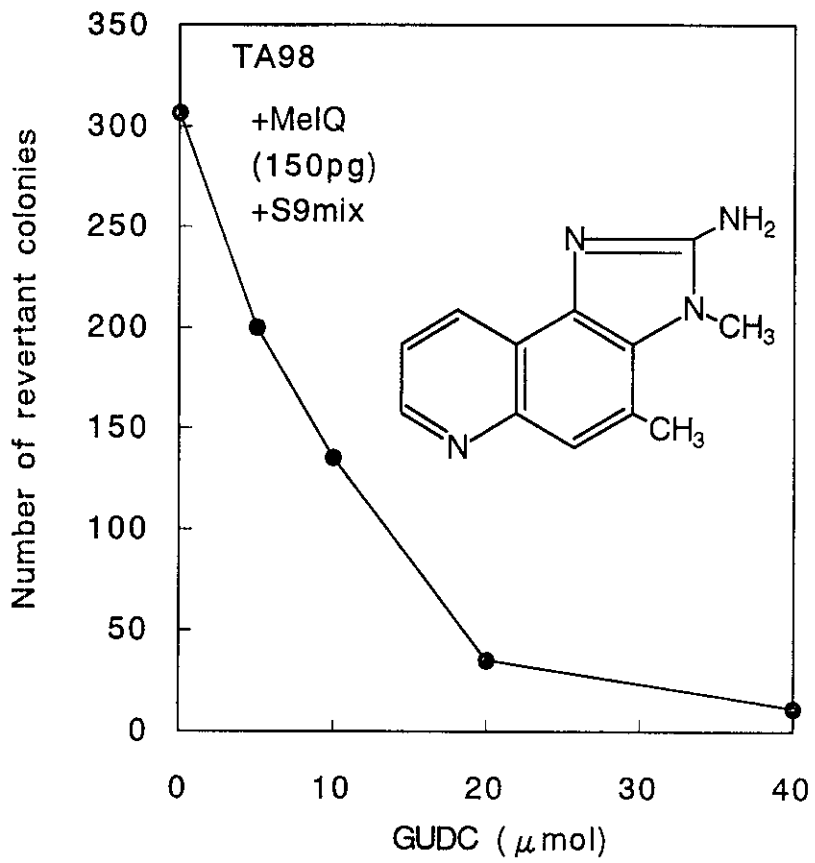
Glycoursodeoxycholic acid with Trp-P-
2



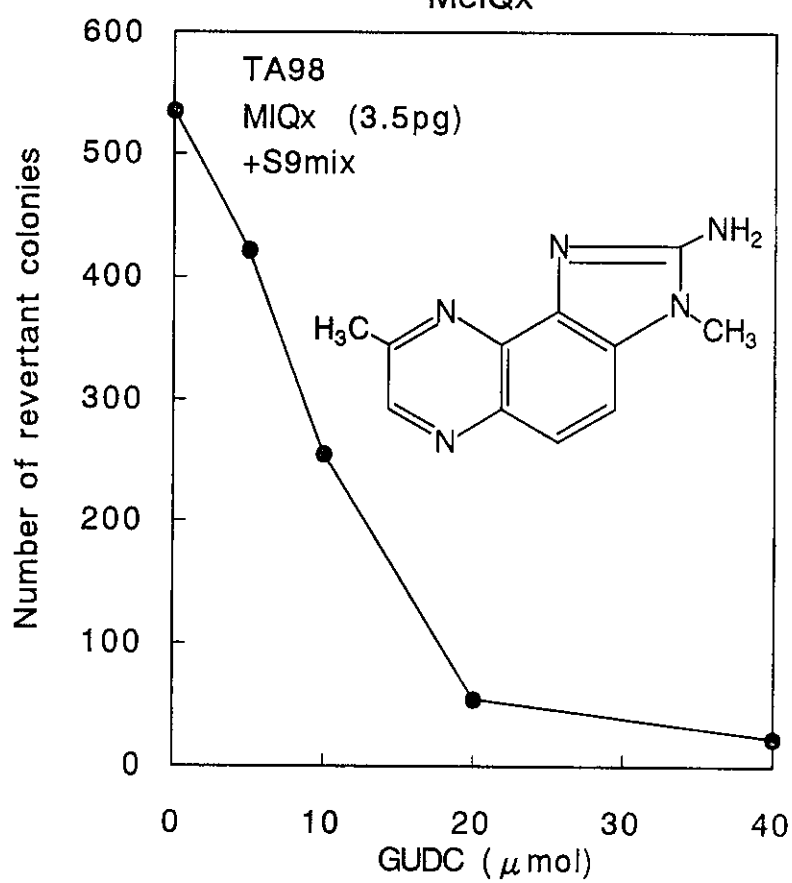
Glycoursodeoxycholic acid with
IQ



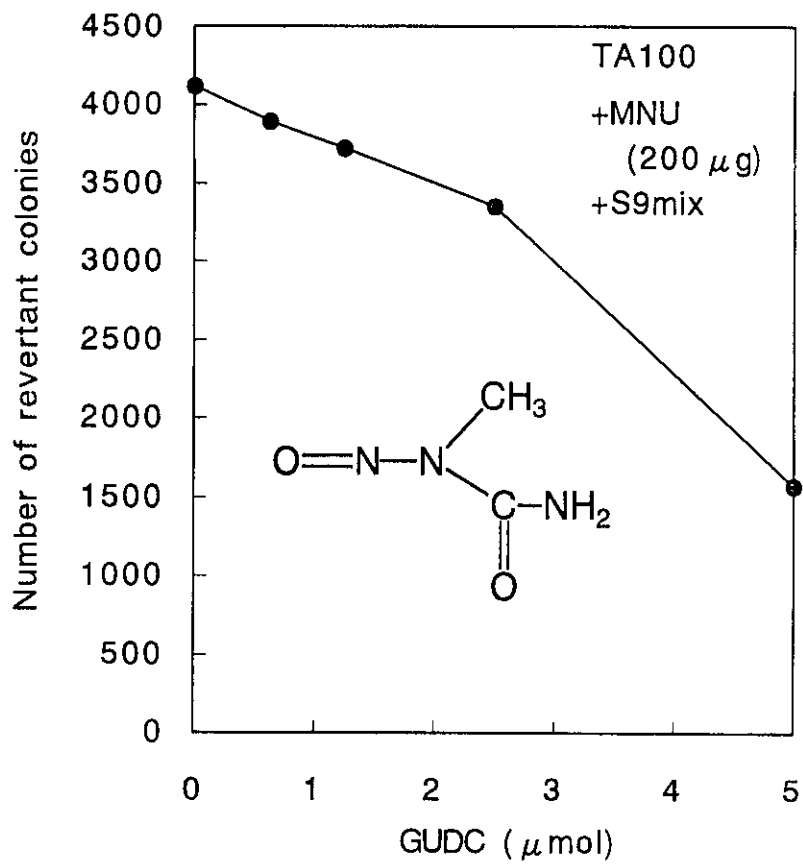
Glycoursodeoxycholic acid with MeIQ



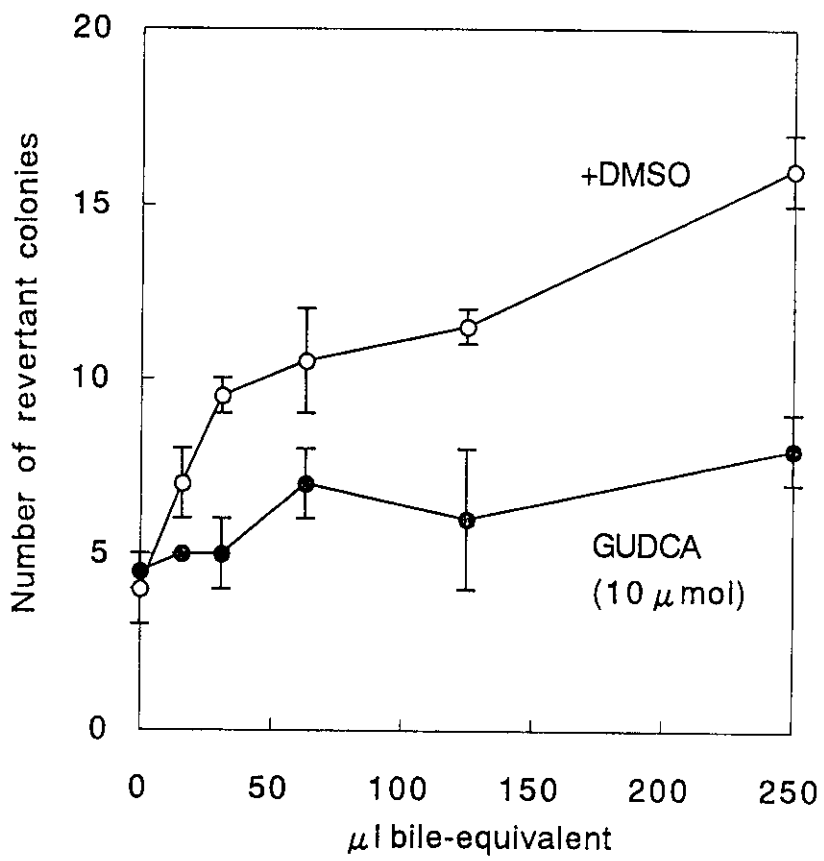
Glycoursodeoxycholic acid with
MeIQx



Glycoursodeoxycholic acid with
MNU



GUDCA with Blue-chitin Extract from Human Bile



厚生科学研究費補助金（がん克服戦略事業）
分担研究報告書

胆道がんの成因に関する疫学的研究

分担研究者 山本 正治 新潟大学医学部
衛生学教室 教授

研究要旨

胆道がん（胆嚢がん、肝外胆管がん）の成因解明研究の一環として次の研究を行った。死亡率の時系列変化では、平成7年以降の急激な減少（女性）、胆嚢がん多発地域（新潟）は稀発地域（高知）に比べ、変異原性を抑制する脂肪酸量が少なかった。脂肪酸の影響を除いても、多発地域では胆汁中に質的又は量的に変異原性物質が多いことが示唆された。また女性胆嚢がんでのCYP1A1遺伝子多型の変異が確認された。

A. 研究目的

環境要因の検討として近年の本症死亡率減少傾向の確認、特に本症多発県・新潟での状況（死亡率変化）を人口動態統計を用いて検討し、疑わしい環境要因との関わりについての考察を行う。さらに個体レベルで環境要因の関わりを検討するため、ヒト胆汁の突然変異原性の強度とその抑制作用を有する遊離脂肪酸（種類と濃度）との関連を明らかにする。遺伝要因としては肺がんの疾病感受性が明らかになっているCYP1A1遺伝子多型の分析を行い、胆道がん特に胆嚢がん発生に関わる遺伝の関与を明らかにする。

B. 材料及び方法

1. 胆道がん死亡率の時系列分析

昭和33年～平成9年までの粗死亡率及び年齢調整死亡率は、人口動態統計の資料によった。平成5～9年の都道府県別SMR（標準化死亡比）は平成7年国勢調査人口を基準として算出し、昭和33年か

ら5年毎の推移を検討した。

2. 胆汁の突然変異原性

ヒト胆汁標本は胆石症の胆摘胆汁である。本症多発県の新潟と稀発県の高知で採取した。これら胆汁の突然変異原性と遊離脂肪酸濃度との関連を調べた。

変異原性はAmes法（TA98+S9mix）を用いた。遊離脂肪酸の分析には、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた。分析方法の詳細は発表論文を参照されたい。

3. CYP1A1遺伝子の多型

患者25例（男性9例、女性16例）と対照71例（それぞれ24、47例）から静脈血を採取後、DNA抽出し、CYP1A1遺伝子多型：MspI型、Ile-Val型の検討を行った。

C. 結果及び考察

1. 胆道がん死亡率の時系列分析

図1に示したように、胆道がんの粗死亡率は増加傾向を続けているものの、平成元年頃から年齢調整死亡率は、男性では停滞、女性では低下を示している。10歳年齢階級別にみると、増加を続けてい

るのは男女とも80歳以上だけであった。

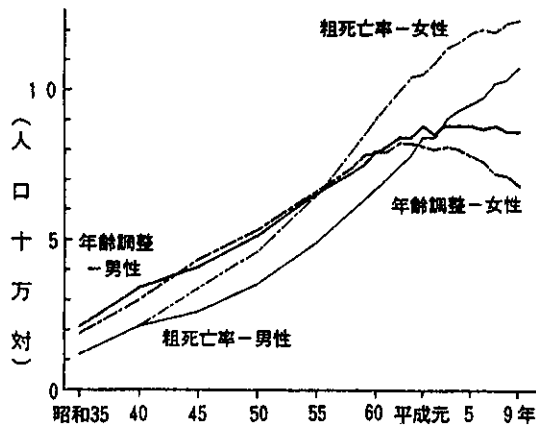


図1. 胆道がん死亡率の推移

平成5～9年の新潟県SMRは、男性6位、女性は第1位であったが、平成7～9年の3年間に限ると、男性10位、女性6位であり、今後の動向が注目される。また、全国的分布は、男性の滋賀県、女性の長崎県のように、従来の「東高西低」の傾向からはずれる県の推移が大きく、都道府県格差は縮まってきた。

2. 胆汁の突然変異原性

胆汁中の突然変異原性について、新潟では高知より有意に復帰コロニー数が多く ($p=0.0003$)、陽性の割合も高かった ($p=0.002$)。また新潟で認められた性差 ($p=0.0103$) は高知では認められなかった。胆汁中の遊離不飽和脂肪酸のうち、パルミトレイン酸 ($C_{16:1}$, $p<0.001$)、もリノール酸 ($C_{18:2}$, $p=0.0087$) 及びリノレン酸 ($C_{18:3}$, $p=0.0087$) の濃度は新潟より高知で有意に高かった。ただし、不飽和脂肪酸の割合及び遊離脂肪酸組成については両者で差が認められなかった。

不飽和脂肪酸と復帰コロニー数の関係は図2に示したように、有意な負の相関関係を認めた。すなわち、遊離不飽和脂肪酸の胆汁中の突然変異原性に対する抑制

作用は、前者の濃度と後者の強度とに関係することがわかった。

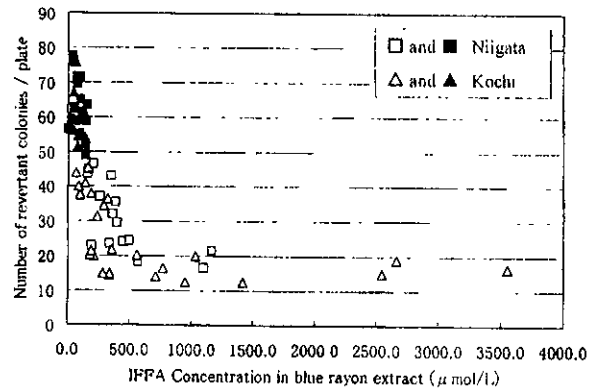


図2. 遊離飽和脂肪酸濃度と復帰コロニー数との関係

3. CYP1A1遺伝子の多型(表1)

女性患者と対照のC型 ($m2/m2$) は31.3%(5/16)、8.5%(4/47)で有意な増加を認めた。Ile-Val型では68.8%(11/16)、34.0%(16/47)と増加した。なおいずれも男性では差を認めなかった。この結果から、女性ではこれら変異により、がん原性を示す反応性中間体の生成増加を引き起こす可能性がある。

表1. 女性胆嚢がん患者のCYP1A1遺伝子多型の出現頻度

MspI型	A	B	C	合計
患者群	4(25.0)	7(43.8)	5(31.3)*	16
対照群	25(53.2)	18(38.3)	4(8.5)	47

Ile-Val型	Ile-Ile	Ile-Val	Val-Val	合計
患者群	4(25.0)	11(68.8)*	1(6.2)	16
対照群	30(63.8)	16(34.0)	1(2.1)	47

注: (%), * $p<0.05$

D. 結論及び今後の研究課題

1. 胆道がん死亡率の時系列分析

随時新たなデータを追加分析して、最近の死亡率の傾向を確認するとともに、胆嚢がん及び胆管がんに分けてSMRを計

算し、新潟県内の地域集積性についても再度検討を行う予定である。

2. 胆汁の突然変異原性

地域相関研究で得られた成績は、同一集団の個人の結果に必ずしも反映できないものの、県民栄養調査での各栄養素摂取状況を検討するとともに、血中脂肪酸(健常人も測定可能)濃度についても測定して検討する予定である。

3. CYP1A1遺伝子の多型

胆汁中に排泄される外来異物の反応性中間体に関する研究が必要である。

6) Kodama K, Nakadaira H, Yamamoto M et al. Geographic clustering patterns in mortality from biliary tract cancer in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:6-11.

7) Serra I, Yamamoto M, Garcia V. et al. Diet, gallstones and gallbladder cancer. *Jpn J Cancer Clin* 1997;43:404-12.

2. 口頭発表

1) 遠藤和男, 山本正治, 他: 胆道がんの時系列分析. 日衛誌, 印刷中.

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto M, Serra I, Ogoshi K, et al. Epidemiology of Gallbladder and Bile Duct Cancers. Smith-Gordon and Nishimura, London, 1999.
- 2) Hori Y, Nakamura K, Yamamoto M, et al. Geographical variations in the concentration of biliary free fatty acids with anti-mutagenic action. *Mutation Res* 1999;444:41-7.
- 3) 山本正治, 遠藤和男, 中平浩人, 中村和利: 水道水源別にみたがん標準化. 罹患比の生態学的研究. 日衛誌 1999;54:526-33.
- 3) 中平浩人, 山本正治: 肝内胆管癌の疫学. 肝・胆・膵フロンティア 基礎から臨床まで, 診断と治療社, 東京, 1999.
- 4) Hori Y, Nakamura K, Yamamoto M, et al. Determination of free fatty acids in human bile by high-performance liquid chromatography. *Ann Clin Biochem* 1998;35:279-83.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書
組織発生母地にみた胆嚢がんの遺伝子異常に関する研究

分担研究者 渡辺 英伸 新潟大学医学部
第一病理学教室 教授

研究要旨

膵管・胆管合流異常症例に発生する胆嚢がんの遺伝子異常を発生母地的に検討する目的で、通常発生胆嚢がんと比較検討した。その結果、合流異常に随伴して発生する胆嚢がんは膵がんと同じように、K-ras変異とp53異常が大きく関与していた。また慢性胆嚢炎に由来するde novo発生がん、腺腫に由来するがんもそれぞれ遺伝子異常が異なっており、胆嚢がんの発生の検討に有効な手がかりを与えてくれる。

A. 研究目的

胆嚢がんの発生母地として、慢性胆嚢炎（特に、胃化生性胆嚢炎）、腺腫（胃幽門腺型＝胃型腺腫が93%を占め、腸型は7%）、膵管・胆管合流異常の粘膜過形成が挙げられている。慢性胆嚢炎に由来するがんは一般にde novoがんと呼ばれている。それぞれの母地から発生したがんの間で、APC変異、K-ras変異とp53異常の頻度を検討した。

B. 研究方法

51個の腺腫、16個の腺腫内がん、164個のde novoがん、合流異常に随伴する17個のがんを対象とした。APC、K-ras変異の検索には、パラフィン包埋ブロックから10 mmの薄切切片を3枚作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色後に目的とする部位からmicrodissectionを行った。対照として、担がん例の非腫瘍性胆嚢粘膜（de novoがん例と合流異常例）を用いた。

p53異常検索にはp53免疫染色（マウス

モノクローナル抗体Pab1801, Ab-2, OncogenScience Inc., Manhasset, NY, USA)を用いた。p53蛋白の過剰発現をもってp53異常とした。すなわち、p53陽性細胞が腫瘍内で30個以上の小集団で散在性に認められるもの、またはびまん性に多数認められるものをp53異常とした（Y. Oohashi, H. Watanabe, Y. Ajioka et al. *Pathol International* 45:58-65, 1995）。

C. 研究結果

1) 非腫瘍性胆嚢粘膜では、K-ras変異はみられず（de novoがん例で0/12, 合流異常例で0/6）、p53蛋白過剰発現もなかった（de novoがん例で0/32, 合流異常例で0/6）。

2) 胃型腺腫では、APC変異はなく（わずか1個のみの検索）、K-ras変異も陰性（0/14）で、p53蛋白過剰発現もみられなかった（0/47）。腸型腺腫でもK-ras変異はなく（0/2）、p53蛋白過剰発現もみられなかった（0/4）。

3) 腺腫由来がんである胃型腺腫内がんを腺腫部とがん部とに分けて検討すると、腺腫部ではK-ras変異とp53蛋白過剰発現は、それぞれ、0/6, 0/16と陰性であった。がん部でもK-ras変異は陰性(0/6), p53蛋白過剰発現はわずか6%(1/16)で陽性であった。

4) 合流異常を伴わないde novoがんでは、APC変異はみられず(0/16), K-ras変異は10%(4/40)と低率であった, p53蛋白過剰発現は64%(105/164)が高かった。

5) 合流異常を伴わないがんに比べて、合流異常を伴う胆嚢がんではK-ras変異は有意に高かったが(41%, 7/17), p53蛋白過剰発現(47%, 8/17)には有意差がなかった(p=0.072)。

D. 考察

以上から、膵・胆管合流異常に随伴する胆嚢がんの発生には、膵がんと同じように、k-ras変異とp53異常が大きく関与していた。これに対し、膵・胆管合流異常を伴わないde novo胆嚢がんは主にp53異常で発生していた。de novoがんでは責任遺伝子異常が明確であるのに対し、腺腫由来がんでは具体的な遺伝子異常が今回の分析では指摘できなかった。今後、P16, DPC4, DCCなどのがん抑制遺伝子を分析する必要がある。

膵がんでは、K-ras変異は胃化生型の非腫瘍性上皮(粘液細胞過形成, ないし胃化生上皮)に高率にみられるが、膵固有上皮では陰性である。合流異常に伴う胆嚢では固有上皮過形成が主体と考えられてきた。しかし、この過形成が本当に固有上皮の過形成か、それとも胃化生上皮の過形成かを再検討する必要がある。

E. 結論

発生母地別にみた胆嚢がんの遺伝子異常は、慢性胆嚢炎に由来するがん、膵管・胆管合流異常に由来するがん、腺腫に由来するがんの3者で異なることが明かにされた。

F. 研究発表

- 1) Watanabe H, Date K, Itoi T, Matsubayashi H, Yokoyama N, Yamano M, Ajioka Y, Nishikura K. Histological and genetic changes in malignant transformation of gallbladder adenoma. *Ann Oncol* 10 (suppl.4): S136-S139, 1999.
- 2) Itoi T, Takei K, Shinohara Y, Takeda K, Nakamura K, Horibe T, Sanada A, Ohno H, Matsubayashi H, Saito T, Watanabe H. K-ras codon 12 and p53 mutations in biopsy specimens and bile from biliary tract cancers. *Pathol International* 49:30-37, 1999.
- 3) Date K, Watanabe H, Ajioka Y, Shirai Y, Yoshikawa T, Kasuya K, Koyanagi Y, Hatakeyama K. p53 mutation in gallbladder carcinoma with an anomalous junction of pancreaticobiliary duct. *Cancer Res* 1999(submitted)
- 4) 渡辺英伸. 胆嚢・肝外胆管. In 外科病理学(編集; 石川栄世, 遠城寺宗知), 第3版, 文光堂, 1999, pp549-566.
- 5) 横山直行, 白井良夫, 畠山勝義, 味岡洋一, 渡辺英伸. 胆嚢癌における分子生物学的診断と治療の現状. *消化器外科* 22: 101-104, 1999.

- 6) 江畑智希, 渡辺英伸, 味岡洋一,
西倉健, 伊達和俊, 山野三紀,
高木智史. 肝外胆道癌の肉眼型分類
とその進展様式. 消化器画像 1 (2)
: 165-172, 1999.
- 7) Matsubayashi H, Watanabe H,
Yamaguchi T, Ajioka Y, Kijima H,
Saito T. Multiple K-ras mutations
in hyperplasia and carcinoma in
cases of human pancreatic
carcinoma. Jpn J Cancer Res 90
(8):841-848, 1999.
- 8) Matsubayashi H, Watanabe H,
Ajioka Y, Nishikura K, Yamano M,
Seki T, Saito T. Different
amounts of k-ras mutant
epithelial cells in pancreatic
carcinoma and mass-forming
pancreatitis. Pancreas, 1999
(accepted)
- 9) Miki Yamano, Hiroaki Fujii,
Hidenubu Watanabe, Syunnichi
Shirai. Genetic Progression and
Divergence in Pancreatic
Carcinoma. Am J Pathol 1999
(accepted).
- 10) 松林宏行, 渡辺英伸. 関 知之,
斎藤利彦, 味岡洋一, 西倉健,
前島威人, 山野三紀, 山口敏和.
腫瘍形成性膵炎と膵癌における
K-ras遺伝子変異. 胆と膵 20 (4):
277-284, 1999.
- 11) 山野三紀, 安田敦美, 渡辺英伸,
高木智史, 伊達和俊, 江畑智希,
橋立英樹, 西倉 健, 味岡洋一,
白井良夫, 佐藤一弘. 病理から見た
膵癌の進展度診断—肉眼的進
展度と組織学的進展度の対比. 消化
器画像 1 (3):319-330, 1999.