

文 献

- 1) Yamashita N, Yanagisawa J, Nakayama F, *et al.*: Composition of intrahepatic calculi-etioloical significance. *Dig Dis Sci* 1988; **33**: 449-453.
- 2) Shoda J, Tanaka N, He B, *et al.*: Alterations of bile acid composition in gallstones, bile, and liver of patients with hepatolithiasis, and their etioloical significance. *Dig Dis Sci* 1993; **38**: 2130-2141.
- 3) Shoda J, He B, Tanaka N, *et al.*: Primary dual defect of cholesterol and bile acid metabolism in liver of patients with intrahepatic calculi. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1534-1546.
- 4) Heuman DM, Vlahcevic ZR, Bailey ML, *et al.*: Regulation of bile acid synthesis. II. Effect of bile acid feeding on enzymes regulatiing hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *Hepatology* 1988; **8**: 892-897.
- 5) Xu G, Salen G, Sheffer S, *et al.*: Different feedback regulation of hepatic cholesterol and bile acid synthesis by glycodeoxycholic acid in rabbits. *Gastroenterology* 1993; **105**: 112-1199.
- 6) Pandak WM, Vlahcevic ZR, Heuman DM, *et al.*: Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *Hepatology* 1994; **19**: 941-947.
- 7) Gielen J, Cantfort JV, Robaye B, *et al.*: Rat liver cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. New results about its circadian rhythm. *Eur J Biochem* 1975; **55**: 41-48.
- 8) Noshiro M, Nishimoto M, Okuda K, *et al.*: Rat liver cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. Pretranslational regulation for circadian rhythm. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10036-10041.
- 9) Kai MH, Eto TA, Kondo KH, *et al.*: Synchronous circadian rhythms of mRNA levels and activities of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase in the rabbit and rat. *J Lipid Res* 1995; **36**: 367-374.
- 10) Clarke CF, Fogelman AM, Edwards PA: Diurnal rhythm of rat liver mRNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Correlation of functional and total mRNA levels with enzyme activity and protein. *J Biol Chem* 1984; **259**: 10439-10447.
- 11) Yoshida T, Honda A, Tanaka N, *et al.*: Determination of 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one level in plasma using isotope-dilution mass spectrometry and monitoring its circadian rhythm in human as an index of bile acid biosynthesis. *J Chromatogr B* 1994; **655**: 179-187.

# Differential Displayによる肝内結石症における患側と健常側の肝臓での遺伝子発現の差の検出

愛媛大学第一外科

研究協力者 本田 和男

共同研究者 大谷 広美, 小林 展章

## はじめに

肝内結石症は家系内発症の例がほとんどみとめられず、以前より行われている同一家系内での連鎖解析 (Linkage analysis) による原因遺伝子の特定は極めて困難である。また、種々の動物を用いて肝内結石自然発生モデル作成の努力が長年にわたって行われているにもかかわらず、いまだ肝内胆管に結石を生じる動物実験モデルは存在せず、疾患モデル動物の原因遺伝子解析を手がかりとしたヒトの原因遺伝子へのアプローチも不可能である。しかし、近年国内外で推進されているヒトゲノムプロジェクトなどにより、急速にヒトの遺伝子情報が解明されてきて、その一部は次々とインターネット上で公開されている。従来は単離された未知の塩基配列の意味するものを解析することはきわめて困難であったが、これらの情報公開により細胞や器官で発現しているある遺伝子の塩基配列を同定してから公開されているデータベースを利用してホモロジーサーチを行い、その遺伝子の発現している場所で何がおこっているかを理解することが可能となってきた。

肝内結石症で特徴的なことは、lateralityの存在である。肝内結石症の病型分類によれば肝内胆管の左側あるいは右側にのみ結石を生じていた患者が、全体の71.1%を占める<sup>1)</sup>。この偏側発生の現象を解明するために結石の存在側の胆汁成分と結石非存在側の胆汁成分の分析などが行われたが、この左右差についての明確な知見はほとんど得られていない。Differential Display法は異なる環境下での遺伝子の

発現の差を検出する方法として、主に培養細胞などのシンプルな実験系で活用され大きな成果をあげている。我々はこの方法を同一個体の結石存在部位と結石非存在部位の肝臓での遺伝子発現の差異を検出するため、臨床摘出組織標本に応用した。

Differential Display法では左右の肝臓で発現の差のある遺伝子をスクリーニングすること自体は比較的容易な作業であるが、ポリアクリルアミドゲル上で一本のバンドとして観察されても必ずしも単一の塩基配列により構成されているとは限らず、これをそれぞれ単離してクローニングしシーケンシング可能とすることが極めて困難である。我々は切り出したDNA断片をHA-YellowまたはHA-Redを含むアガロースゲル上で分離し、更にPCRで増幅して再びHA-YellowまたはHA-Redを含むアガロースゲル上で分離することを4回繰り返すして、実際に発現が多くなっているDNA断片をクローニングしシーケンシングすることに成功したので報告する。

## 対象と方法

当初はItoらの方法<sup>2)</sup>に準じてOperon社のDifferential Display用任意プライマーセット (20種類) を用いていたが、再現性が悪く、また切り出したゲルからの再度のPCRによる目的のDNA断片の増幅が不安定なため、現在はTakara社のFluorescence Differential Display Kit<sup>TM</sup>を使用し、若干の条件の変更を加えて実験を行っている。

肝内結石症患者の肝切除標本の結石存在部位の肝臓と結石非存在部位の肝臓のサンプル各々約1gを開腹後直ちに採取し、液体窒素にて凍結保存した。凍結標本の一部よりQuickPrep<sup>®</sup> mRNA purification kit (Pharmacia) を用いてmRNAを抽出した。mRNAに蛍光Down stream primer (表1:キット付属の9種類のうちの1種類)を加えReverse transcriptaseにて逆転写反応を行ないこのDown stream primerに対応する蛍光標識されたcDNAを作成した。このcDNA溶液2 $\mu$ lと5 $\mu$ lにUpstream primer (表2:24種類のうちの1種類)と最初を選択した同じ蛍光Down stream primerを加えて、アニーリング温度38 $^{\circ}$ Cで28回のPCR反応を行った。反応液をLong Ranger gel solutionで作成したゲルでバイオクラフト社の無蛍光ガラスプレートを用い電気泳動

表1 ダウンストリームプライマーの塩基配列 (Takara)

No.1	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTAA
No.2	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTAC
No.3	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTAG
No.4	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTCA
No.5	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTCC
No.6	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTCG
No.7	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTGA
No.8	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTGC
No.9	FITC-TTTTFTTTTTTTTTTTTGG

表2 アップストリーム任意プライマーの塩基配列 (Takara)

No.1	GATCATAGCC	No.2	CTGCTTGATG
No.3	GATCCAGTAC	No.4	GATCGCATTG
No.5	CTTGATTGCC	No.6	AGGTGACCGT
No.7	GATCATGGTC	No.8	TTTTGGCTCC
No.9	GTTTTCGCAG	No.10	GTTGCGATCC
No.11	GATCTGACAC	No.12	CTGATCCATG
No.13	TGGATTGGTC	No.14	GGAACCAATC
No.15	GATCAATCGC	No.16	TCGGTCATAG
No.17	GATCTGACTG	No.18	TCGATACAGG
No.19	TACAACGAGG	No.20	GATCAAGTCC
No.21	GATCTCAGAC	No.22	AGCCAGCGAA
No.23	CAAACGTCGG	No.24	CTTTCTACCCG

槽で40W (約1200から1300V)で、45分間泳動してFluorImager SIで読み取りを行うゲルを1枚、電気泳動開始後2時間目に読み取りを行うゲルを1枚作成した。それぞれの結果をプリントアウトしてゲルをそのうえに重ね、濃度の差を認めるバンドの部分を切り出した。切り出したゲル断片より94 $^{\circ}$ Cで3分間熱抽出を行い、この液をtemplateとして再び同じ条件で、バンドの濃さに応じて14回から20回のPCRを行った。HA-Yellow添加3%アガロースゲルとHA-Red添加3%アガロースゲルにて電気泳動して、同じ長さのDNA断片の塩基配列内のA-C、G-T含有量の差によりさらに分離し、FluorImager SIで読みとって対照と差のあるバンドを切り出した。同様の操作を3回反復し、最終的にシーケンスのため、キット付属のシーケンス用蛍光プライマーでアニーリング温度58 $^{\circ}$ Cで34回のPCR反応を行い、HA-Yellow添加3%アガロースゲルにて電気泳動し1本のバンドであることを確認して切り出し、Gel Extraction Kit (Qiagen)で抽出して精製した。このDNA断片を、TaKaRa Taq<sup>TM</sup> Cycle Sequencing Kit (Takara)を用いてシーケンシング反応を行い、バイオクラフト社の無蛍光ガラスプレートを用いた電気泳動槽で40Wで45分間泳動して、FluorImager SIで1回目の読みとりを行い、電気泳動槽に再度セットしてさらに泳動を続け開始後2時間に2回目の読みとりを行い塩基配列を判定した。

## 結 果

図1は症例1の結石側と非結石側の肝臓より抽出したmRNAをDownstream primer 1を用いて最後のpoly Aの直前がTTとなるmRNAのみを選択的に蛍光標識cDNAとし、さらに1から12までのUpstream primerを用いて行ったDifferential Displayである。図2は同様に13から24までのUpstream primerを用いて行ったDifferential Displayである。右の二つのレーンが結石側のcDNA溶液5 $\mu$ lと2 $\mu$ l、その次が非結石側cDNAの5 $\mu$ lと2 $\mu$ lで、一つのUpstream

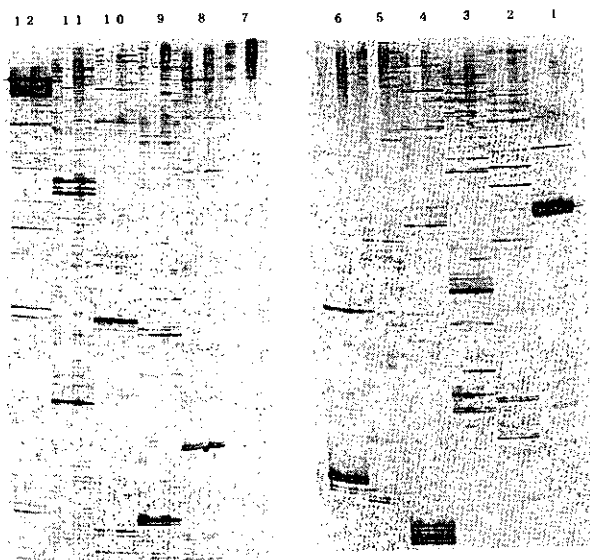


図1 症例1のDownstream primer 1とUpstream primer 1から12までを用いて行ったDifferential Display

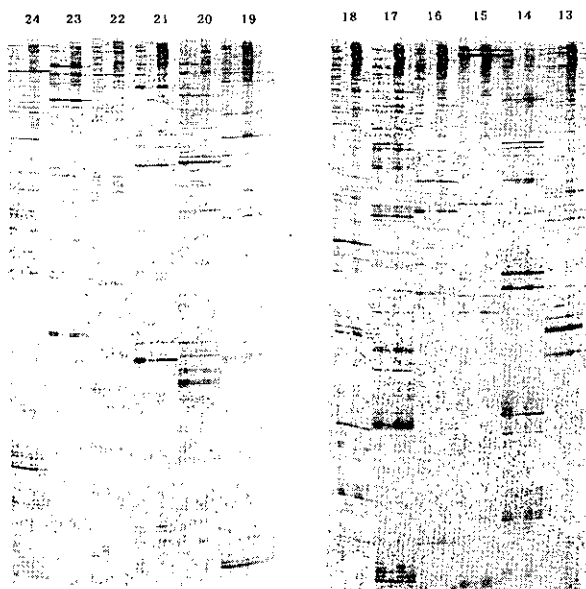


図2 症例1のDownstream primer 1とUpstream primer 13から24までを用いて行ったDifferential Display

primerに対して4本のレーンの右2本と左2本を比較する。非常に多くのバンドが検出されるが、大部分のバンドについては結石側と非結石側で濃度の差異を認めなかった。図3は症例1と症例2に共通して非結石側で濃いバンドを認める例である。図4は症例1と症例2に共通して結石側で濃いバンドを認める例であるが、全体に非結石側で濃いバンドを認めることが多く結石側で発現が増加しているバンドは少なかった。

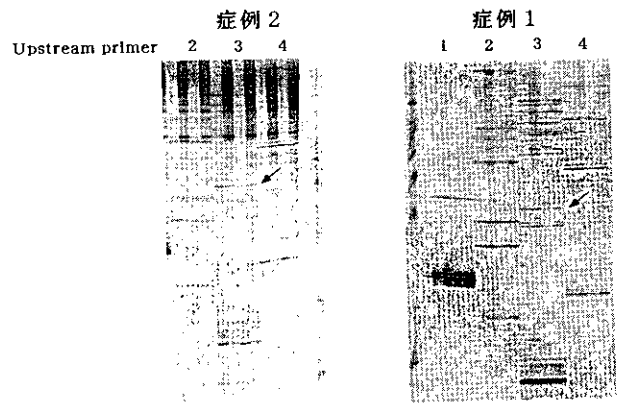


図3 非結石側により強い発現を認めるバンドの例

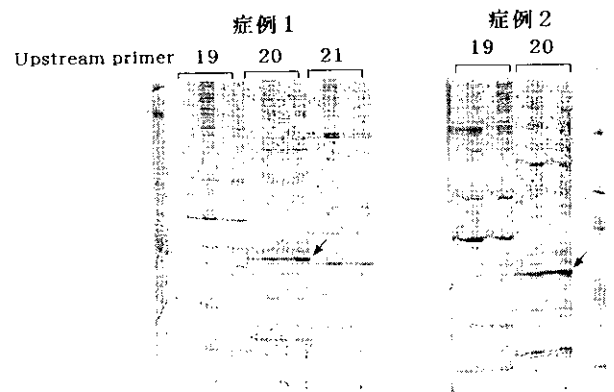


図4 結石側により強い発現を認めるバンドの例

アクリルアミドゲル上で一見1本にみえるバンドも、長さがほんのわずかわ違うものや、長さは同じでも塩基配列が異なる複数のバンドが重なっていて、これを切り出し単純にPCRで増幅してもモノクローナルになっていないのでシーケンスができない。Takaraの使用説明書にはHA-Yellow添加3%アガロースゲルとHA-Red添加3%アガロースゲルにて電気泳動して、塩基配列のA-T、G-Cの量によって分離後シーケンシングをするよう指示されているが、それでもcontaminationのためなかなかシーケンスが成功せず、我々は図5のように切り出しとPCRを反復することによりクローニングを行い確実にシーケンシングすることに成功した。図6は2回目のPCR後3%アガロースゲルとHA-Yellow添加3%アガロースゲルとHA-Red添加3%アガロースゲルにて電気泳動した像である。アガロースゲルでは正常側(N)で濃いバンドが認められるが、HA-

## Cloning of the DNA fragment with H.A.-Yellow and H.A.-Red

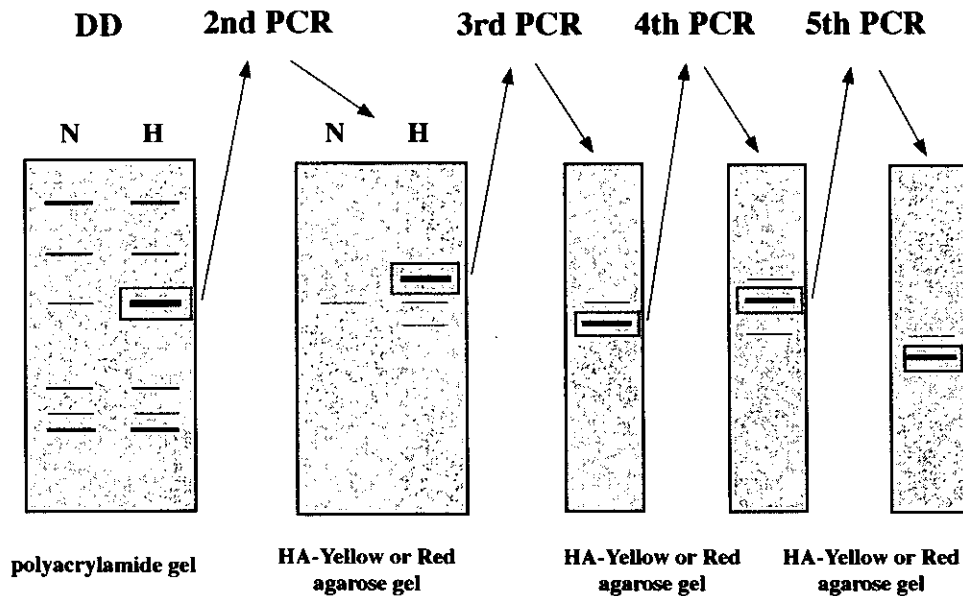


図5 HA-YellowとHA-Redを用いたDNA断片のクローニング

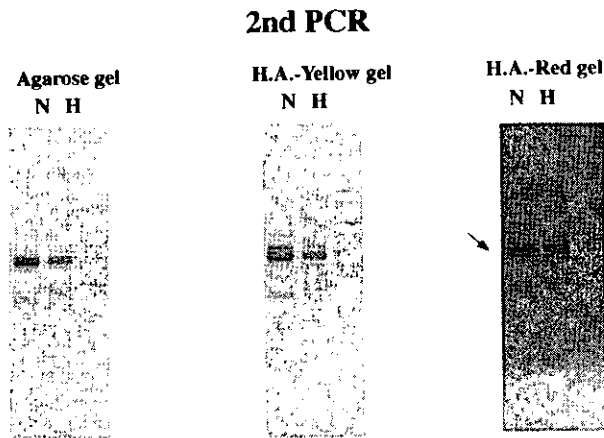


図6 アガロースゲルとHA-YellowまたはHA-Red添加アガロースゲルの分離の差

Yellow、HA-Redではこれが複数のバンドに分離される。この例では明らかに差があるHA-Redで分離されたバンドを切り出し再度PCRを行った。同様に3回目、4回目（図7）、5回目のPCRを行い濃い単一のバンドをシーケンシングに用いた（図8）。

正常側の発現が強く分離が容易であったバンドが多かったため、現在までにシーケンス可能であった5つのDNA断片の塩基配列について、インターネット上のNCBIのEntrezにアクセスしてホモロ

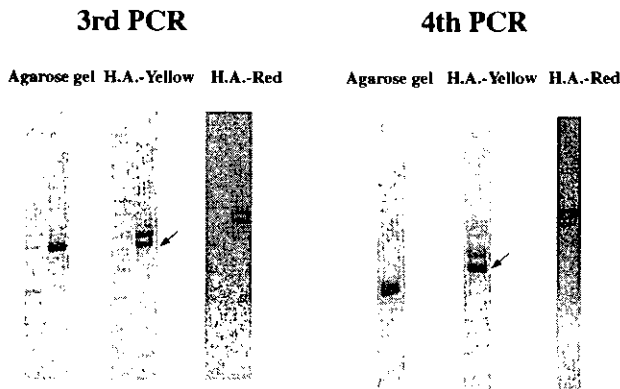


図7 3回目と4回目のPCR後のバンドの回収

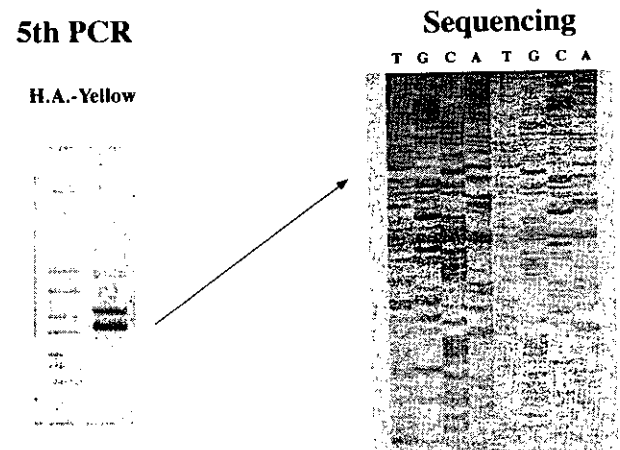


図8 5回目のPCRとシーケンシング

表3 シークエンシングされた塩基配列

1) CRP	149 bp	ttgccacatggagagagactatgaggacagaagccaaactggaagtggaggagccaaggggtgcaacacagagccttgaccacgtggagtctctgatcagctctctggaccagatctcactggctgccagtcctatagcataget
2) Guanylate-binding protein 1 (GBP-1)	385 bp	tacaggctgaagagattctgcagacatacttgaatccaaggagtctatgactgatgcaattcttcagacagaccagactctcacagaaaaagaaaggagattgaagtggaactgtgatagctgagctgcacaggcttcagcaaaattgttcaggaatgcaagaagatggcagtgacagaaggagaggagtttcaggaacttgaacaactgactgagaagatggagatcgacagggtcatacctgaagagcaagagaggacctcgttaactcaggacagagcactactaaaggaggattcaaaagaagcagataatgaaatgagatacaggatctccagacgaatagacgacgaaggcattattagctaagc
3) Heterogenous nuclear ribonucleoprotein D	66 bp	ggaagtatgacgttgggtccctctgaagttaattctgagttctcattaa
4) 不明1	218 bp	gatacaggcatacaaggtgtaataatcacatcagggtaaatgaggtattcatgatctctagcattatactttgtttgtttacaacaatccaattatcccttttatataaattgtgcaataaatttactttgactatagtcacctgttgctatcaatacagatgtattatctatctactatattgttctcattaatatactctctct
5) 不明2	216 bp	atagctggaggaattgtttggacaactaactatgtaatttatgtcttagttttattgcagctcttctaagtaaaataagctttgtatctactttttattaaagtgaaatttagcaatagtaataattaggtgacataaaataaacatccagactagtgagtttaagtacaagatctctctaaaataaacagatgaaatctatcccatatcgt

ジーサーチを行ったところ、表3のような結果が得られた。結石側に発現が強かったDNA断片については現在検討中である。

## 考 察

Differential Display法はcell lineなどの純粋な実験系で、細胞の条件が異なる場合に発現する遺伝子を検索する手法として発達してきたが、最近では癌組織と正常組織との比較など生体試料にも応用されるようになってきている。我々はこの方法を利用して、結石を生じている患側の肝臓と正常肝で発現している遺伝子のmRNAの量的差異を検出することにより、肝内結石症の病態、病因に関係する遺伝子の検索を行っている。

従来より、肝内結石症の病変部位の様々なパラメーターを計測する際に常に指摘を受けるのは、実際に検出された異常が肝内結石の原因なのか、あるいは肝内結石が存在するために起こった二次的な結果なのかという点である。たとえば、胆汁成分の異常が結石側に認められる場合、胆汁成分の異常があるから結石が形成されたのか、それとも結石の存在

が炎症や感染などの原因となって胆汁成分の異常がおこっているのかという議論である。今回の我々の検討で、結石側と非結石側と両方に発現しているが非結石側に明らかに強い発現を認めたのはCRPの遺伝子であった。これは結石側の肝臓は萎縮性的変化により繊維化が進み、CRPの発現が少なかったものと考えられる。

次に検出されたのはGuanylate-binding protein 1 (GBP-1)であった。GBP-1の遺伝子は第一染色体にあり11のエクソンを持つ2880 bpで<sup>3)</sup>、検出した385塩基対のDNA断片の配列が99%以上一致した。GBP-1の機能についての報告はまだ少なく、GTP-binding proteinの一種<sup>4)</sup>でinterferon-gammaにより誘導され抗ウイルス活性を示すとの報告<sup>5)</sup>もあるがその働きは不明な点が多い。Heterogenous nuclear ribonucleoprotein D (hnRNP D) の遺伝子はChromosome 4q21に存在する8つのエクソンを持つ1065 bpで<sup>6)</sup>、シークエンシングで読みとれた66bpは100%一致した。Heterogenous nuclear ribonucleoprotein Dは肝臓、脳、精巣で多く発現していて<sup>7)</sup>、核と細胞質を行き来してmRNAの代謝(主に分解)に関与している<sup>8)</sup>との報告があるが、これもその機能

については未知の部分が多い。今回のホモロジーサーチでは同定できなかった2つのDNA断片についても、今後ヒトゲノムプロジェクトのデータベースの公開がすすめば遺伝子を特定できる可能性がある。

Differential Displayでは非常に多くのバンドが検出されるが、正常標本と異常部位を比較すると差を認めるものはきわめてわずかであった。これはどちらの肝臓でも同じ遺伝子は同じ程度の量発現して生体の機能を維持していて、患側と正常側では肝実質に関する限り分子生物的にはきわめてわずかの差しかないということかも知れない。しかしこのDifferential Displayのキットは、Down stream primerが9種類、Upstream primerが24種類含まれており、理論的には同一患者について $9 \times 24 = 216$ 通りの組み合わせについて比較しなければすべてを比較したとは言えない。また、現在は標本採取の都合上、肝組織について比較しているが、結石の生成の原因により直接的にせまるのなら、やはり病変部と正常部の胆管を直接比較するのが望ましい。いずれにしても苦勞の末、様々な条件の変更と工夫により塩基配列の決定からホモロジーサーチ、遺伝子の同定にまで至ることができたので、さらに多くのプライマーについて検討し、差のある遺伝子については複数の患者について共通の現象であるのかを検討してゆくことが必要と考える。

## 文 献

- 1) 小澤和恵, 小林展章, 本田和男: 肝内結石症に関する全国調査報告. 肝内結石症調査研究班平成3年度研究報告書, 11-22.
- 2) T Ito, K Kito, N Adati, *et al.*: Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated sequencer. *FEBS-Lett* 1994; **351**(5): 231-6.
- 3) Strehlow I, Lohmann-Mathes ML, Decker T: The interferon-inducible GBP1 gene: structure and mapping to human chromosome 1. *Gene* 1994; **8**: 144 (2): 295-9.
- 4) Prakash B, Praefcke GJ, Renault L, Wittinghofer A, Herrmann C: Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* 2000. **3**: 403(6769): 567-71.
- 5) Anderson SL, Carton JM, Lon J, Xing L, Rubin BY: Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 1999; **30**: 256(1): 8-14.
- 6) Dempsey LA, Li MJ, DePace A, Bray-Ward P, Maizels N: *Genomics* 1998; **1**: 49(3): 378-84.
- 7) Faura M, Renau-Piqueras J, Bachs O, Bosser R: *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; **14**: 217(2): 554-60.
- 8) Loflin P, Chen CY, Shyu AB: Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the *in vivo* mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev* 1999; **15**: 13(14): 1884-97.

# 肝内結石症におけるビリルビンおよび胆汁酸輸送にかかわる肝胆道系輸送蛋白の発現とその異常

筑波大学 臨床医学系消化器内科<sup>1)</sup>

東京大学 薬学部製剤教室<sup>2)</sup>

新潟薬科大学<sup>3)</sup>

名古屋大学 第一外科<sup>4)</sup>

研究協力者 正田 純一<sup>1)</sup>

共同研究者 加納 雅仁<sup>1)</sup>, 松崎 靖司<sup>1)</sup>,  
田中 直見<sup>1)</sup>, 鈴木 洋史<sup>2)</sup>,  
杉山 雄一<sup>2)</sup>, 宮崎 浩<sup>3)</sup>,  
小田 高司<sup>4)</sup>, 神谷 順一<sup>4)</sup>,  
二村 雄次<sup>4)</sup>

## はじめに

肝内結石症は良性疾患でありながら、遺残結石や結石再発のために難治性となりやすく、その治療ならびに再発防止のためには、結石の成因解明が待たれる状況である。本症の成因として従来より胆道感染や胆管狭窄による胆汁うっ滞が推測されているが、いまだ解明には至っていない。肝内結石症は肉眼分類上、ビリルビンカルシウム石に属するものが殆どであるが、胆嚢あるいは肝外胆管原発のビリルビンカルシウム石に比較してコレステロール含有量の多いことが報告されている<sup>1,2)</sup>。これに関連して最近我々は、肝内結石症患者の肝においてはコレステロール合成は亢進しており、一方胆汁酸合成は抑圧されていることを見出し、これらの異常はコレステロール過飽和胆汁の生成に重要であることを報告した<sup>3)</sup>。さらに胆汁酸代謝の面においては、肝内結石症患者における結石ならびに胆汁中胆汁酸濃度は低値であり、肝組織胆汁酸濃度は高値であることより、肝内結石症では肝全体にわたる胆汁うっ滞が存在することが推測された<sup>4)</sup>。これらのことより、肝

内結石症における異常胆汁の生成には肝脂質合成の異常に加えて脂質分子の胆汁分泌過程においても異常が存在する可能性が示唆される。

近年では肝細胞における胆管側膜の透過機構を評価する方法論が確立され、肝より胆汁への分泌機構に関する知見が集積されてきた。肝においては肝細胞の血管側膜および胆管側膜上に発現される輸送蛋白により生体内物質の肝胆系移行が支配される(図1)<sup>5)</sup>。前回に続いて今回は、肝内結石症における異常胆汁の生成機序を明らかにする目的で、肝内結石症患者の肝組織における胆管側膜輸送蛋白ならびに肝内輸送蛋白の発現異常について、遺伝子発現および免疫組織学的発現の点より解析をおこなった。

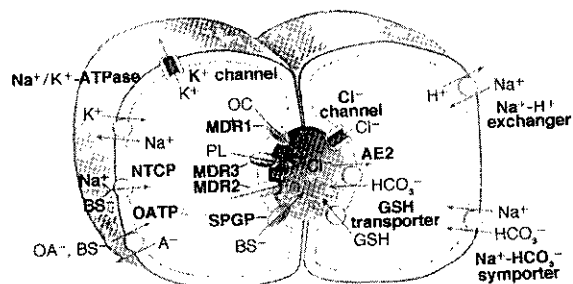


図1. 肝細胞における輸送蛋白の発現



## 対象と方法

肝内結石症26例（すべて片葉型）、胆嚢コレステロール結石症20例より胆管胆汁を、またこれらの症例のうち肝内結石症10例、胆嚢コレステロール結石症5例と肝胆道疾患をみとめない対照13例より肝組織を採取して、それぞれコレステロール、リン脂質、胆汁酸の胆汁脂質組成、RT-PCR法による胆管側膜担送蛋白（MDR1<sup>6)</sup>、MDR3<sup>7)</sup>、MRP2<sup>8)</sup>、BSEP<sup>9)</sup>）、肝内輸送蛋白（SCP2<sup>10)</sup>、PCTP<sup>11)</sup>、HBAB<sup>12)</sup>）のmRNA発現量の解析をおこなった。またMDR3、MRP2、BSEPの特異抗体を用いてそれら胆管側膜輸送蛋白の免疫組織学的発現について解析した。

## 成 績

### 1. 胆汁脂質組成

肝内結石症における肝胆汁の脂質組成を胆嚢コレステロール結石症と比較すると（表）、その結石側および非結石側の両者において、リン脂質、総胆汁酸濃度が胆嚢コレステロール結石症に比較して有意に低値であり、結石側は非結石側に比較してさらに低値であった。一方コレステロールは結石側のみにおいて低値であった。これらのことより肝内結石症においては、結石側のみならず非結石側においてもリン脂質ならびに胆汁酸の胆汁排出が障害されていることが推測された。

表 胆汁脂質組成

Subjects	n	Cholesterol		Phospholipid		Bile acid	
		mM	molar%	mM	molar%	mM	molar%
Controls	13	1.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2	10.0 ± 0.4	23.7 ± 0.6	30.7 ± 1.0	72.7 ± 0.7
Patients with							
GSS	20	2.3 ± 0.2**	5.4 ± 0.5	10.8 ± 0.8	24.1 ± 1.2	32.3 ± 2.5	70.5 ± 1.3
IHC <sup>+</sup>	16	1.5 ± 0.3	11.9 ± 1.5**	2.2 ± 0.2**	17.5 ± 1.0**	8.6 ± 0.9**	70.7 ± 1.7
IHC <sup>-</sup>	26	1.9 ± 0.1	8.1 ± 0.4**	4.7 ± 0.2**	19.0 ± 0.5**	17.2 ± 0.9**	72.3 ± 0.8

Values represent means ± SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, significantly different from controls. +, bile specimens from the affected bile ducts. -, bile specimens from the unaffected bile ducts.

### 2. 胆管側膜担送蛋白の発現

抗癌剤あるいは脂溶性物質の胆汁中への排出にかかわる輸送蛋白であるMDR1は、肝内結石症ではその結石ならびに非結石部位の肝組織において、対照

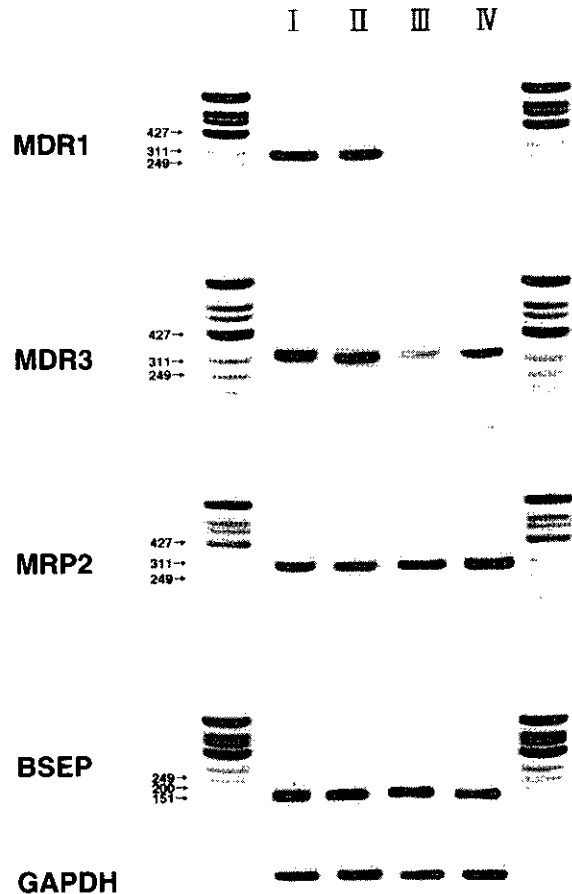


図2. 肝細胞の胆管側膜上に発現する輸送蛋白のmRNAの発現

Lane I, a control subject; Lane II, a gallbladder stone patient; Lane III, the affected hepatic segment of an intrahepatic stone patient; Lane IV, the unaffected segment of an intrahepatic stone patient

および胆嚢コレステロール結石症に比較してそのmRNA発現は低下していた（図2）。リン脂質の排出にかかわるMDR3は、MDR1同様に肝内結石症ではその結石ならびに非結石部位の肝組織において、対照および胆嚢結石症に比較してそのmRNA発現は低下していた（図2）。ビリルビングルクロナイドに代表される抱合型代謝物の排出にかかわるMRP2は、肝内結石症ではその結石ならびに非結石部位において、対照および胆嚢結石症に比較してそのmRNA発現には差を認めなかった（図2）。胆汁酸の排出にかかわるBSEPは、肝内結石症ではその結石ならびに非結石部位において、対照および胆嚢結石症に比較してそのmRNA発現には差を認めなかつ

た(図2)。肝内結石症の疾病肝では、MDR1、MDR3はその結石ならびに非結石部位において低下していることが明らかとなった。一方、MRP2およびBSEPは対照同様に遺伝子発現量が保持されていることが明らかとなった。

免疫組織学的発現の解析では、MDR3(図3)は対照肝では胆管側膜に肝全体にdiffuseに、また胆管側膜にtightにその発現が認められるのに対して、肝内結石症の結石葉ではheterogeneousになっており、その発現が欠落している部分も観察された。本所見は本症におけるMDR3 mRNA発現量の低下を反映するものと考えられた。MRP2およびBSEPはMDR3に比して肝内結石症の結石葉においても、肝全体にdiffuseな発現を認めた。共焦点レーザー顕微鏡を用いたBSEPの蛍光免疫染色(図4)では、対照肝のdiffuseで胆管側膜にtightな発現に対して、本症の結石葉ではその局在が変化しており、不規則かつ毛羽立ち状であり、胆管側膜より細胞質内へのト

ランスロケーションが生じていると推測された。本所見は本症におけるBSEPの機能異常、すなわち胆汁酸の排泄障害を示唆するものと考えられた。また本症の非結石葉においても軽度ではあるが同様な変化を観察した。

最近高ビリルビン血症ラット、胆管結紮ラットより発見された胆汁うっ滞の病態において発現が誘導される輸送蛋白であるMRP3は、特異抗体による免疫染色の結果、胆管側膜に発現しているMRP2、BSEPとは対照的にその発現部位は肝内胆管上皮が主体であった(図5)。また一部MRP3は、増生偽胆管、門脈周囲肝細胞においても発現が観察された。MRP3の細胞内局在は図5に示めすように血管側膜が主体であった。肝内結石症においても、結石葉の胆汁うっ滞を呈する肝区域では肝内胆管上皮におけるMRP3の発現の増強が観察された(図6)。

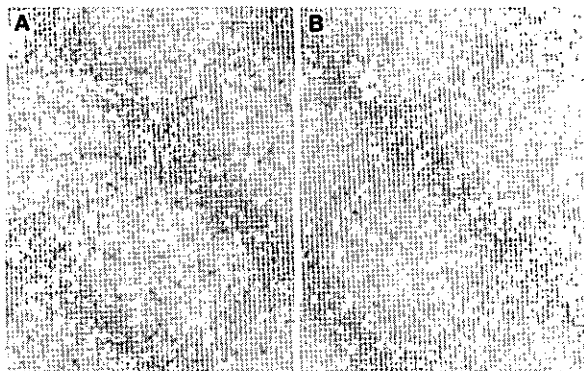


図3. MDR3P-糖蛋白の免疫染色  
(A) 対照肝、(B) 肝内結石症

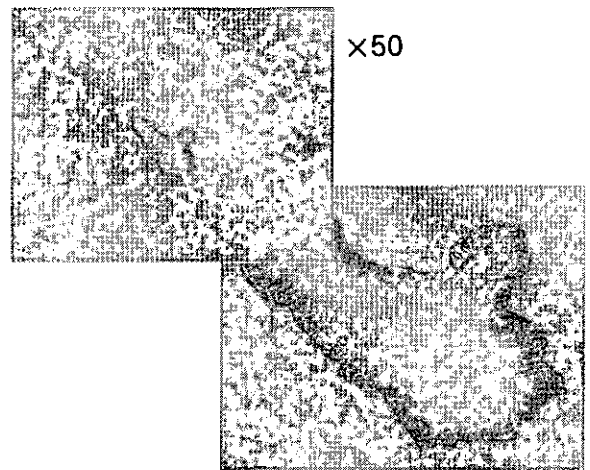


図5. MRP3の免疫染色 (I)

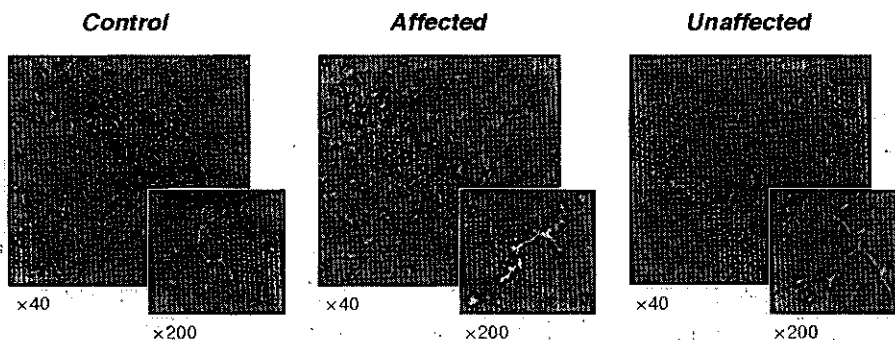


図4. BSEPの蛍光免疫染色

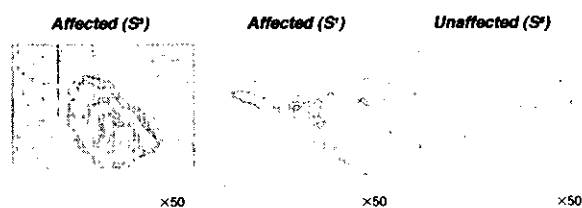


図6. MRP3の免疫染色 (II)

### 3. 肝内輸送蛋白の発現

脂質分子の肝内輸送蛋白であるSCP2、PCTP、HBABのそれらの遺伝子発現量についてRT-PCR法にて解析をおこなったところ (図7)、コレステロールの輸送にかかわるSCP2は、肝内結石症ではその結石ならびに非結石葉において、対照および胆嚢結石症に比べてmRNA発現には差を認めなかった。リン脂質の輸送にかかわるPCTPは、本症の結石ならびに非結石葉において、対照および胆嚢結石症に比較してそのmRNAおよび蛋白発現は低下していた。胆汁酸の輸送にかかわるHBABは、肝内結石症ではその結石ならびに非結石部位において、対照

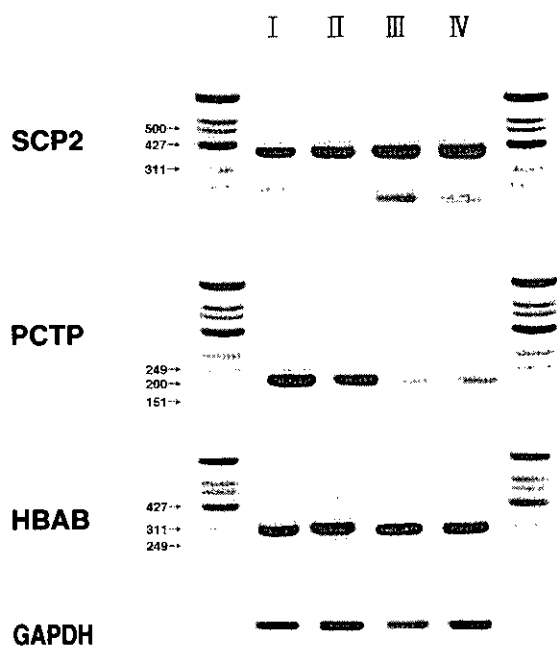


図7. 肝細胞における肝内輸送蛋白のmRNAの発現

Lane I, a control subject; Lane II, a gallbladder stone patient; Lane III, the affected hepatic segment of an intrahepatic stone patient; Lane IV, the unaffected segment of an intrahepatic stone patient.

および胆嚢結石症に比較してそのmRNA発現には差を認めなかった。これらのことより、肝内結石症においてはリン脂質輸送担体のPCTPの発現がその結石ならびに非結石部位において低下していたが、コレステロールの輸送担体のSCP2、胆汁酸の輸送担体のHBABは対照同様に発現が保持されていることが明らかとなった。

### 考 察

肝内結石症における肝胆汁の脂質組成は胆嚢コレステロール結石症の肝胆汁に比較して、その結石側のみならず非結石側においても、リン脂質ならびに総胆汁酸濃度が低値であり、リン脂質および胆汁酸の胆汁分泌が低下している可能性が示唆された。一方胆汁中コレステロール濃度は軽度の低下にとどまり、コレステロールの胆汁分泌は相対的に保持されていると考えられた。これら異常肝胆汁の生成は結石側のみならず非結石側においても認められた点より考えて、結石存在部位の肝における局所的な障害ではなく、むしろ肝全体にわたる障害を考える必要性を示唆するものである。本症における胆汁脂質組成の変化により、肝胆汁のコレステロール/リン脂質比 (表) は胆嚢コレステロール結石症に比して本症では有意に高値となり、コレステロール分子の胆汁中における不安化を生じてことにより、コレステロール結晶析出を容易とし、コレステロール成分の多い結石形成を引き起こしているものと考えられた。さらに本症におけるリン脂質/胆汁酸比の低下は (表)、ミセル形成が不十分となることより胆汁酸による胆管上皮の可溶化を引き起こし、胆管上皮の障害を進展するものと考えられた。

本症における異常肝胆汁生成の病態因子として、肝における胆管側膜輸送蛋白ならびに肝細胞内輸送蛋白の発現状況を解析したところ、それらの発現には対照ならびに胆嚢コレステロール結石症と比較して幾多の相違点を認めた。それら胆管側膜輸送蛋白ならびに肝細胞内輸送蛋白の発現状況より考えて、

本症の疾病肝においては、1) コレステロールの肝内輸送は保持されていること、2) リン脂質の肝内輸送ならびに胆汁排泄は低下していること、3) 胆汁酸の肝内輸送は保持されているが胆汁排泄は低下していることが推測された。肝コレステロール生合成の亢進ならびに胆汁酸生合成の低下に加えて、肝胆汁におけるコレステロール飽和度の著明な上昇ならびにコレステロール成分に富んだ結石形成を引き起こしている重要な病態因子であると推測された。またこれら胆管側膜輸送蛋白ならびに肝細胞内輸送蛋白の発現異常は結石葉にみならず非結石葉にも認められたことより、肝全体にわたる異常である可能性が示唆された。

今回の解析結果より、肝内結石症では肝コレステロール・胆汁酸生合成の異常に加えて、リン脂質、胆汁酸の肝内輸送ならびに胆汁排泄機構にかかわる輸送蛋白の発現にも異常を生じていることが明らかとなった。特に重要と思われる点は、輸送蛋白の発現異常には遺伝子発現量の変化のみならず、輸送蛋白のtranslocationあるいはmiss sortingによる細胞内局在の変化が胆汁排泄機能に影響を及ぼしている可能性が得られたことである。またさらには、MRP3の発現の主座が肝内胆管上皮であったことより、胆汁うっ滞の病態においては胆管上皮と胆汁酸がinteractionを行い、胆汁酸の能動輸送機構が存在する可能性が示唆されたことである。これらの成績に関しては、今後の研究課題として解析を進めていきたい。

## 文 献

- 1) Yamashita N, Yanagisawa J, Nakayama F: Composition of intrahepatic calculi — etiological significance. *Dig Dis Sci* 1988; **33**: 449-453.
- 2) Shoda J, Tanaka N, Matsuzaki Y, *et al.*: Microanalysis of bile acid composition in intrahepatic calculi and its etiological significance. *Gastroenterology* 1991; **101**: 821-830.
- 3) Shoda J, He B, Tanaka N, *et al.*: Primary dual defect of cholesterol and bile acid metabolism in liver of patients with intrahepatic calculi. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1534-1546.
- 4) Shoda J, Tanaka N, He B, *et al.*: Alterations of bile acid composition in gallstones, bile, and liver of patients with hepatolithiasis, and their etiological significance. *Dig Dis Sci* 1993; **38**: 2130-2141.
- 5) Trauner M, Meier PJ, Boyer JL: Molecular pathogenesis of cholestasis. *NEJM* 1998; **339**: 1217-1227.
- 6) Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, *et al.*: Expression of full-length cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 3004-3008.
- 7) Gros P, Neriah YB, Croop JIM, *et al.*: Isolation and expression of cDNA (mdr) that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; **323**: 248.
- 8) Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, *et al.*: Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein genes. *Science* 1996; **271**: 1126-1128.
- 9) Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, *et al.*: The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salts export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10046-10050.
- 10) Yamamoto R, Kallen CB, Babalola GO, *et al.*: Cloning and expression of a cDNA encoding human sterol carrier protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 463-467.
- 11) Geijtenbeek TBH, Westerman J, Heerma W, *et al.*: Phosphatidylcholine transfer protein from bovine liver contains highly unsaturated phosphatidylcholine species. *FEBS Lett* 1996; **391**: 333-335.
- 12) Hara A, Matsuura K, Tamada Y, *et al.*: Relationship of human liver dihydrodiol dehydrogenases to hepatic bile acid-acid-binding protein and an oxidoreductase of human colon cells. *Biochem J* 1996; **313**: 373-376.
- 13) Kool M, van der Linden M, de Hass M, *et al.*: MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6914-6919.
- 14) Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y: Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 1999; **274**: 15181-15185.

# 肝内結石症における非腫瘍性上皮の細胞形質

新潟大学 第一病理

研究協力者 味岡 洋一

共同研究者 江畑 智希, 渡辺 英伸

## はじめに

ヒトの癌は、多段階の遺伝子変異の蓄積により発生・進展することが解明されてきた。しかし、癌の発生・進展に関与する遺伝子の種類は臓器によって一様ではない。また、同一臓器の癌であっても、その組織発生 (*de novo* 発生か過形成・腺腫などの状態を経て発生するか) により、発癌に関わる遺伝子変異も異なる可能性がある。更に私たちは、癌の細胞形質と遺伝子変異との間にも関連があることを、膵癌<sup>1)</sup>、乳頭部癌<sup>2)</sup>、胃癌<sup>3)</sup>、大腸癌<sup>4)</sup>、で示してきた。

肝内胆管癌の発生母地としては、1) 正常肝、2) 慢性肝炎、3) 持続する胆管炎 (肝吸虫症、肝内結石症)、の3つが想定されている。その遺伝子変異については、正常肝由来の肝内胆管癌ではK-ras遺伝子変異の頻度が比較的高く (50-82%)<sup>5) 6)</sup>、胆管炎を母地とするものでは低い (0-8%)<sup>7) 8)</sup>との報告があるが、組織発生、細胞形質、遺伝子変異の関連についての系統的研究はなされてきていない。

本研究班で私たちは、肝内結石症を背景として発生する胆管癌に焦点を当て、「肝内結石症合併胆管癌発生母地の組織形態と細胞形質、およびそれらと遺伝子異常との関連」の解明を研究課題とした。本年度はまず、肝内結石症による胆管上皮の組織形態と形質変化について検討した。

## 材料と方法

胆管癌非合併肝内結石症肝切除例30例を対象とした。1症例当たり2~4個の代表切片を選び、HE

染色の他、形質分類のために以下の特殊染色を施行した。( ) 内は各種染色の認識物質である。MUC2 (杯細胞型粘液のcore protein)、MUC5AC (胃腺窩上皮型分泌粘液)、ConA III (胃幽門腺型分泌粘液)、HID (sulfomucin)、CA19-9 (sialyl Lewis 抗原)、CD10 (吸収上皮刷子縁)。

胆管上皮を、固有上皮、化生上皮、乳頭状過形成に組織分類し、表1に示す判定法で細胞形質を固有型、腸型、胃型に分類した。複数の細胞形質が混在する病変では、面積的に優勢な型順に併記した (例：胃腸型)。

表1 細胞形質判定法

細胞形質	MUC2	MUC5AC/ ConA III	CD10	HID	CA19-9
固有型	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
腸型	(+)	(-)	{ (+)	(-)	{ (+)
胃型	(-)	(+)	(-)	{ (+)	{ (+)

複数の細胞形質が混在する場合は、優勢の順に記載する (例：胃型>腸型の場合は、胃腸型)

## 結 果

### 1. 胆管上皮の組織構成

単一の組織のみから構成されていた症例は12例で、7例が固有上皮、3例が乳頭状過形成、2例が化生上皮からなっていた。残りの18例は複数の組織が混在しており、固有上皮+化生上皮：11例、固有上皮+乳頭状過形成：2例、化生上皮+乳頭状過形

成：1例、固有上皮+化生上皮+乳頭状過形成：4例であった。

各組織分類別に頻度をみると、30例中、固有上皮は73% (22例)、化生上皮は63% (19例)、乳頭状過形成は33% (10例) に認められた。

## 2. 胆管上皮の形質別頻度

固有型単独が8例、胃型単独が5例であり、腸型単独例はなかった。残りの17例は固有型+胃型：13例、固有型+胃型+腸型：4例であった。腸型+固有型または胃型の組み合わせはなかった。

各形質別の頻度は、30例中、固有型が83% (25例)、胃型が73% (22例)、腸型が13% (4例) に認められた。

## 3. 胆管上皮の組織分類と細胞形質との関係

表2に、胆管上皮の組織分類と細胞形質との関係を示す。化生上皮は全例が胃型形質のみ、もしくは胃型優位の形質を示した。一方乳頭状過形成では、固有型3例、胃型5例、胃腸型2例と、多彩な細胞形質を示していた。

表2 肝内結石症における胆管上皮の組織像と細胞形質との関係

	固有型	胃型	胃腸型
化生上皮	—	16	3
乳頭状過形成	3	5	2

## 結 語

胆管癌非合併肝内結石症の肝内胆管上皮では60% (18/30) に化生上皮または乳頭状過形成が出現していた。それらの細胞形質は、化生上皮では、胃型もしくは胃型優位の胃腸型形質であったのに対し、乳頭状過形成は多彩な細胞形質を呈した。これら組織形態変化および細胞形質転換は、肝内結石の存在による持続性慢性炎症刺激に起因するものと考えられるが、そのいずれが胆管癌発生源となるのか、今後肝内結石合併胆管癌の組織および細胞形質の検討を行う予定である。

## 文 献

- 1) Matsubayashi H, Watanabe H, Nishikura K, Ajioka Y, Kijima H, Saito T: Determination of pancreatic ductal carcinoma histogenesis by analysis of mucous quality and K-ras mutation. *Cancer* **82**: 651-660, 1998.
- 2) Matsubayashi H, Watanabe H, Yamaguchi T, Ajioka Y, Nishikura K, Kijima H, Saito T: Differences in mucus and K-ras mutation in relation to phenotypes of tumors of the papilla of Vater. *Cancer* **86**: 596-607, 1999.
- 3) Endo Y, Tamura G, Watanabe H, Ajioka Y, Motoyama T: The common 18-base pair deletion at codons 418-423 of the E-cadherin gene in differentiated-type adenocarcinomas and intramucosal precancerous lesions of the stomach with the features of gastric foveolar epithelium. *Journal of Pathology* **189**: 201-206, 1999.
- 4) Biemer-Huttman AE, MaGuckin MA, Ajioka Y, Watanabe H, Leggett BA, Jass JR: Immunohistochemical staining patterns of MUC1, MUC2, MUC4 and MUC5AC mucins in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and traditional adenoma of the colorectum. *J Histochem Cytochem* **47**: 1039-1048, 1999.
- 5) Furubo S, Harada K, Shimonishi T, Kayayanagi K, Tsui W, Nakamura Y: Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* **35**: 230-240, 1999.
- 6) Tada M, Omata M, Ohto M: High incidence of ras gene mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer* **69**: 1115-1118, 1992.
- 7) Tsuda H, Satarug S, Ghudhisawasdi V, Kihana T, Sugimura T, Hirohashi S: Cholangiocarcinomas in Japanese and Thai Patients: Difference in etiology and incidence of point mutation of the c-Ki-ras proto-oncogene. *Molecular Carcinogenesis* **6**: 266-269, 1992.
- 8) Kiba T, Tsuda H, Pairojkul C, Inoue S, Sugimura T, Hirohashi S: Mutations of the p53 tumor suppressor gene and the ras gene family in intrahepatic cholangiocellular carcinomas in Japan and Thailand. *Molecular Carcinogenesis* **8**: 312-318, 1993.

# 肝内結石症と肝内胆管癌における中心体過剰複製

九州大学大学院 臨床・腫瘍外科 医学研究院

研究協力者 田中 雅夫

共同研究者 水元 一博, 千々岩一男,  
清水 周次, 横畑 和紀,  
森崎 隆

## はじめに

肝内結石症では、慢性炎症に伴って増殖性胆管炎が発生し、これを母地として肝内胆管癌の発生にいたる発癌過程が想定されている<sup>1)</sup>。近年、発癌機構に関連する多くの責任遺伝子が同定されてきたが、肝内結石症から肝内胆管癌が発生する過程に特異的に関係する分子異常は特定されていない。

中心体は、細胞の微小管形成の中心として細胞の骨格を形成し、細胞の極性の維持に重要な役割を果たしている。また、細胞分裂期には2つに複製されて紡錘体極となり、染色体の均等な分離を司っている<sup>2)</sup>。最近、この中心体機能の異常に伴っておこる染色体の分離異常や遺伝子不安定性がいくつかの組織の発癌過程に共通して見られることが報告され注目されている<sup>3,4)</sup>。我々は、ごく最近膵癌における中心体の異常が膵発癌の進展に深く関与する全く新しい分子異常であることを報告した<sup>5)</sup>。すなわち、膵癌では85%に中心体の過剰複製があり、また、腺腫病変でも一部に同様の変化が見られている。このことから、中心体異常は発癌の比較的早い段階から関与している可能性がある。

今回の研究では、肝内結石症と肝内胆管癌を対象として、肝内胆管癌の発生過程における中心体の機能異常について検討を加えることとした。

## 材料と方法

外科的に切除した肝内結石症16例と肝内胆管癌19例を対象とした。肝内胆管癌のうち、肝内結石症合併例が11例、非合併例が8例であった。胆管癌の臨床病期分類はTNM国際分類<sup>6)</sup>を用いた。切除組織をホルリン固定パラフィンに包埋し、定法により3 $\mu$ mの厚さの薄切標本を作成したものをHE染色と中心体蛍光免疫染色に用いた。中心体は、 $\gamma$ チューブリン抗体 (GTU-88; Sigma, St Louis, MO) とペリセントリン抗体 (BabCo, Richmond, CA) を用いて蛍光免疫染色<sup>5)</sup>した。同時に核をヨウ化プロピディウムによって対比染色し、蛍光レーザー顕微鏡 (LSM-GB200 system; Olympus, Tokyo, Japan) によって観察した。中心体は、それぞれの切片において1000個以上の細胞について観察し、1つの核に対し、3個以上の中心体を有するものを異常とした。また、正常の細胞線維芽細胞や上皮細胞の中心体よりも2倍以上の直径を有する中心体も過剰複製された異常中心体と判定した。さらに、中心体異常の程度を以下の4群に分類した。陰性; 異常中心体を認めないもの。1<sup>+</sup>; 異常中心体が10%以下のもの。2<sup>+</sup>; 10%から30%。3<sup>+</sup>; 30%以上。統計学的解析はFisher検定によって行い、P<0.05を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 肝内結石症における中心体異常：

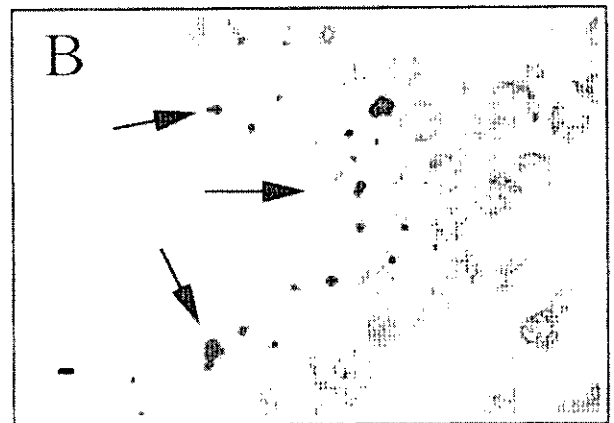
肝内結石症は、病理組織学的にはグリソン領域の線維化を伴った胆管上皮の増殖病変（増殖性胆管炎）として認められる。HE染色によって増殖性胆管病変を確認した後に、同部位の中心体の蛍光免疫染色を行った。検索した16検体のうち、15検体では中心体は核の近傍に1つの小さな円形のdotとして観察され、直径は $2\mu\text{m}$ 以内であった（図1A）。分裂期にあると思われる非腫瘍性細胞のなかには2つのdotとして見られるものが一部にあり、このdotは紡錘体の両極に位置していた。しかしながら、肝内結石症の1つの検体では $\gamma$ チューブリン抗体に反応するdotが明らかに増加しており（図1B）、同じ標本に対しペリセントリン抗体を用いて染色してsuper imposeすると両者の発現は完全に一致しており、中心体の過剰複製であることが確認できた。

### 2. 肝内胆管癌における中心体異常：

肝内胆管癌症例19例のうち、11例（57.9%）では $\gamma$ チューブリン抗体で染色される極めて多くのdotが観察された。強拡大で検鏡すると、このdotは胆管癌細胞の細胞質に不規則で大きな塊として見られ、正常細胞の3倍から5倍の大きさを示していた（図1C）。また、1つの核に対する中心体の数は1個から10個まで様々であった。ペリセントリン抗体でも同様の染色結果であり、 $\gamma$ チューブリンによるdotとペリセントリンによるdotとは細胞内の発現が完全に一致していた。肝内胆管癌症例のうち、肝内結石を伴わない8例の中心体異常は5例62.5%で、肝内結石症に合併して発症した肝内胆管癌11例では6例54.5%が陽性であった。即ち、肝内結石症合併の有無と肝内胆管癌における中心体異常の発現には差がなかった（表1）。胆管癌の組織学的分化度別では中心体異常の発現に差が見られなかった。つぎに、臨床病期別に検討すると、I期およびII期の早期症例5例では、1例20%のみが陽性であったのに対し、III期およびIV期の進行癌症例14例では10例71.4



A：肝内結石症における胆管上皮細胞の多くは、核の近傍に1つの小さな円形のdotとして描出される。



B：肝内結石症の1症例では中心体の数が明らかに増加していた。



C：胆管癌細胞では、中心体は正常細胞の3倍から5倍の大きさを示し、1つの核に対する中心体の数も2個以上に増加している細胞が多く見られた。

図1 肝内結石症と肝内胆管癌の切除組織における中心体の蛍光免疫染色。 $\gamma$ チューブリンに対する抗体を用いた。各組織における中心体は矢印で示した。



%が陽性であり、有意に進行癌症例での陽性率が高かった(表2)。

表1. 肝内結石症と肝内胆管癌における中心体異常出現頻度

	症例数	陽性例	陽性頻度
肝内結石症	16	1	6.3%
肝内胆管癌	19	11	57.9%
肝内結石合併	11	6	54.5%
肝内結石非合併	8	5	62.5%

表2. 肝内胆管癌の進行度による中心体異常出現頻度

	症例数	陽性例	陽性頻度
早期例 (I, II)	5	1	20.0%
進行例 (III, IV)	14	10	71.4%

## 考 察

今回の検討結果から、肝内結石症の大部分では中心体の過剰複製は見られず、肝内胆管癌の半数異常の症例で異常な中心体が多数出現することが明らかになった。従って、中心体の異常は肝内胆管癌の発生に重要な役割を担っていると思われる。さらに、1例の肝内結石症胆管上皮において中心体は過剰に複製されていた。中心体の過剰の複製は異常な細胞分裂を誘導し、染色体不安定性の大きな原因となる<sup>7)</sup>。このことは、更なる遺伝子異常を蓄積させることとなり、胆管癌発生へ進展する要因となり得る。従って、肝内結石症から胆管癌が高頻度に出現してくる要因の1つとして中心体過剰複製が寄与していると思われる。しかしながら、今回の検討では肝内結石症に合併する肝内胆管癌と肝内結石症のない胆管癌では中心体異常の出現に差が見られなかった。従って、中心体異常は胆管癌の発生に共通してみられる異常であり、肝内結石症を基盤とした胆管癌発生にも大きく関与していると思われる。

今回の検討では、胆管癌早期の症例では中心体異常の頻度は比較的低率であったのに対し、進行癌では70%以上と極めて高率であった。すなわち、中心体異常は胆管癌の発生早期における関与に加えて、

胆管癌が早期癌から進行癌へ進展する過程において更なる重要な役割を担っていると考えられる。

中心体異常の検出は胆管癌の術前診断として臨床応用できる可能性がある。遺伝子異常に基づく胆管癌診断を目的の1つとして、これまで*p53*<sup>8,9)</sup>、*K-ras*<sup>10,11)</sup>、テロメラーゼ<sup>12)</sup>などが検討されてきた。すなわち、これらの遺伝子異常を胆汁中の剥離細胞や胆管上皮の生検組織を用いることで、胆管癌の危険群の判定あるいは術前の悪性度診断に応用することができる。我々は、胆管癌患者の生検材料中のテロメラーゼ活性を測定すると、生検病理診断よりも高率に癌の診断が可能であることを示した<sup>12)</sup>。今回の中心体異常は胆管癌全体としてはあまり高率ではないものの、非常に少ない癌細胞での診断が可能であると思われ、従来の遺伝子異常の解析と併用することで胆管癌の臨床診断に寄与できる可能性がある。

中心体異常と他の癌遺伝子または癌抑制遺伝子との関連性に関する報告はまだ少ない。Carrollらは、*p53*遺伝子変異や*Mdm2*の過剰発現が中心体過剰複製が良く相関することを報告している<sup>13)</sup>。また、*p53*を不活性化すると異常な中心体が増幅され、染色体の異常分離がおこることを知られている<sup>14)</sup>。すなわち、*p53*や他の遺伝子異常の蓄積の結果中心体複製の異常がおこり、更なる遺伝子異常をもたらしていると考えられる。今回の研究において進行胆管癌ほど多くの中心体異常がみられたことは進行胆管癌における多くの遺伝子異常の蓄積を反映していると想定される。

## 結 語

中心体過剰複製は肝内結石症の6.3%に観察され、胆管癌の発生、進展とともに陽性率が増加した。このことから、中心体過剰複製は肝内結石症における胆管癌発生の1つの要因となっていると想定され、また早期胆管癌から進行癌に進展していく過程において重要な役割を担っていると思われた。

文 献

- 1) Nakanuma Y, Terada T, Tanaka Y, Ohta G: Are hepatolithiasis and cholangiocarcinoma aetiologically related? A morphological study of 12 cases of hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *Virchows Arch [A]* **406**: 45-58, 1985.
- 2) Kellog DR, Moritz M, Alberts BM: The centrosome and cellular organization. *Annu Rev Biochem* **63**: 639-674, 1994.
- 3) Lingle WL, Lutz, WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL: Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 2950-2955, 1998.
- 4) Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ: Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* **58**: 3974-3985, 1998.
- 5) Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Nakamura K, Kusumoto M, Niiyama H, Ogawa T, Tanaka M: Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin Cancer Res* **5**: 963-970, 1999.
- 6) Sobin LH, Wittekind CH: UICC (International Union Against Cancer) TNM classification of malignant tumors. 5th edition, New York: Wiley Liss, Inc., 1997.
- 7) Doxsey S: The centrosome — a tiny organelle with big potential. *Nat Genet* **20**: 104-106, 1998.
- 8) Washington K, Gottfried MR: Expression of *p53* in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver* **16**: 99-104, 1996.
- 9) Lee CS, Pirdas A: *p53* protein immunoreactivity in cancers of the gallbladder, extrahepatic bile ducts and ampulla of Vater. *Pathology* **27**: 117-120, 1995.
- 10) Saetta A, Lazaris AC, Davaris PS: Detection of ras oncogene point mutations and simultaneous proliferative fraction estimation in gallbladder cancer. *Pathol Res Pract* **192**: 532-540, 1996.
- 11) Tanno S, Obara T, Fujii T, Mizukami Y, Shudo R, Nishino N, Ura H. *et al.*: Proliferative potential and K-ras mutation in epithelial hyperplasia of the gallbladder in patients with anomalous pancreaticobiliary ductal union. *Cancer* **83**: 267-275, 1998.
- 12) Niiyama H, Mizumoto K, Kusumoto M, Ogawa T, Suehara N, Shimura H, Tanaka M: Activation of telomerase and its diagnostic application in biopsy specimens from biliary tract neoplasms. *Cancer* **85**: 2138-2143, 1999.
- 13) Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ. *et al.*: Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by *p53* mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* **18**: 1935-1944, 1999.
- 14) Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Wound GF: Abnormal centrosome amplification in the absence of *p53*. *Science* **271**: 1744-1747, 1996.

# 先天性胆道拡張症に対する拡張胆管切除・胆管空腸吻合術後に発症した肝内結石症の検討

名古屋大学第1外科

研究協力者 二村 雄次

共同研究者 北川 雄一、神谷 順一

## はじめに

先天性胆道拡張症では、肝外胆管の拡張のみならず、肝内胆管に拡張や狭窄を認める症例があり、肝内結石を合併する症例もまれではない。今回、先天性胆道拡張症に対する拡張胆管切除・胆管空腸吻合術後に発症した肝内結石症につき検討を行った。

## 対 象

1982年から98年までに教室で治療した肝内結石症は116例である。このうち7例(6.0%)が先天性胆道拡張症に対する拡張胆管切除・胆管空腸吻合術の既往歴を有しており、この7例を対象とした。同一期間中に教室で経験した先天性胆道拡張症は91例であり、その7.7%に相当した。また、91例のうち当科で拡張胆管切除・胆管空腸吻合術を施行したのは41例であり、うち4例(9.8%)が肝内結石を発症した。一方、同一期間に胆道拡張症以外の疾患124例に対して、教室で胆管切除・胆管空腸吻合術を施行しているが、肝内結石を発症した症例は1例(0.8%)のみであり、肝内結石症は先天性胆道拡張症の術後に有意に高率に発生していた( $p=0.025$ )。

## 結 果

先天性胆道拡張症治療時の年齢は26~56歳(平均45.7歳)で、肝内結石症治療時には39~60歳(平均

51.1歳)であった。性別は男性1例・女性6例で、結石の種類は全例ともビリルビンカルシウム石であった。また、2例がイレウス、1例が慢性便秘の既往歴を有していた。

教室における先天性胆道拡張症の種類は、Alonso-Lej・戸谷分類<sup>1)</sup>のI-a型25例・I-b型3例・I-c型22例・IV-a型38例であり、不明は3例であった。このうち肝内結石症を認めたのは、I-a型の1例と、IV-a型の6例で、それぞれI-a型の4%、IV-a型の15.8%に相当した(図1)。

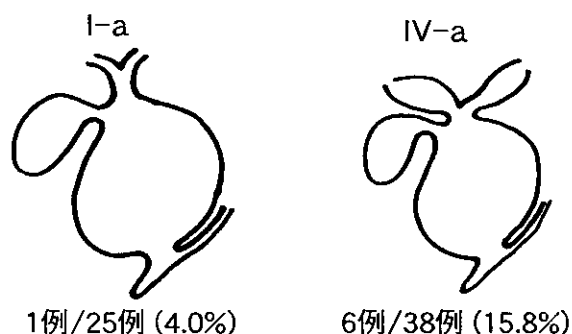


図1 先天性胆道拡張症の形態

先天性胆道拡張症に対する治療は全例が拡張胆管切除・胆管空腸吻合術であったが、1例では胆嚢癌を合併していたため肝床切除を追加した。肝内結石症診断までの期間は3~18年(平均8年)であった(表1)。

結石存在部位は両葉型4例・左葉型2例・右葉型1例で、左葉型の1例では尾状葉にも結石を認めた。また結石が両葉にびまん性にみられたのは1例

表1 症例の概要(1)

症例	CBDの手術	結石診断までの期間
1	拡張胆管切除・胆管空腸吻合	7年
2	拡張胆管切除・胆管空腸吻合	4年
3	拡張胆管切除・胆管空腸吻合	13年
4	拡張胆管切除・胆管空腸吻合	3年
5	拡張胆管切除・胆管空腸吻合	18年
6	拡張胆管切除・肝床切除・胆管空腸吻合	7年
7	拡張胆管切除・胆管空腸吻合	4年

のみであった。検討症例中に、吻合部狭窄あるいは肝内胆管狭窄(絶対的狭窄)は認めなかった。治療は、6例で経皮経肝胆道鏡(PTCS)を用いた切石術を施行し、1例で左葉切除を行った。8ヶ月~9年4月(平均4年)の経過観察を行ったが、びまん性の1例で遺残・再燃がみられるほかは無再発であった(表2)。

IV-a型6例の肝内胆管拡張部位と結石存在部位を比較すると、全例で肝内胆管拡張部を中心に結石が形成されていた(表3)。



図2 経皮経肝胆道造影(PTC)像:総胆管及び左右肝管の拡張を認める。

表2 症例の概要(2)

症例	結石存在部位	形態	治療	治療後経過(観察期間)
1	左葉	IV-a	PTCS	無再発(9年4月)
2	両葉	IV-a	PTCS	無再発(4年2月)
3	両葉	IV-a	PTCS	無再発(1年11月)
4	両葉	IV-a	PTCS	遺残、再燃(3年4月)
5	両葉	I-a	PTCS	無再発(8月)
6	左葉+尾状葉	IV-a	外側区域切除	無再発(5年1月)
7	右葉	IV-a	PTCS	無再発(3年11月)

PTCS:経皮経肝胆道鏡

表3 肝内胆管拡張と結石存在部位

症例	CBDの形態	肝内胆道拡張部位	結石存在部位
1	IV-a	2, 3, A, L	2, 3
2	IV-a	2, 3, 4, 6, 8, A, L, R	2, 3, 8, LHD
3	IV-a	2, 3, 5, 6, 8, P, L, R	P, LHD
4	IV-a	両葉びまん*	両葉びまん
5	I-a	—	5, LHD, RHD
6	IV-a	L*, R	II, 3
7	IV-a	2, 3, A, P, R	P

\*;囊状拡張、A;右前枝、P;右後枝、L;左肝管、R;右肝管、I;尾状葉。

## 症 例

症例を2例呈示する。

症例2は、60歳・女性で、主訴は発熱・腹痛である。1990年、56歳時に先天性胆道拡張症と診断され、拡張胆管切除・胆管空腸吻合術を受けていた。1994年6月はじめから発熱・腹痛があり、当科を受診した。

先天性胆道拡張症治療前の経皮経肝胆道造影(PTC)像では、総胆管及び左右肝内胆管の拡張を認め、IV-a型胆道拡張症と診断した(図2)。この時の胆管像では、左外側後枝(B2)・左外側前枝(B3)・左内側枝(B4)・右後下枝(B6)・右前上枝(B8)・前区域枝・左肝管・右肝管に紡錘状の胆管拡張を認