

表7 現在の状態

	治癒	改善	不変	悪化	死亡
男性	82(40.0%)	40(19.5%)	69(33.7%)	2(1.0%)	12(5.9%)
女性	82(34.0%)	63(26.1%)	77(32.0%)	5(2.1%)	14(5.8%)
合計	164(36.8%)	103(23.1%)	146(32.7%)	7(1.6%)	26(5.6%)

表8 死亡原因

	肝内胆管癌	肝外胆管癌	その他の癌	胆管炎・肝膿瘍	肝硬変	その他
男性	2(16.7%)	1(8.3%)	2(16.7%)	1(8.3%)	1(8.3%)	5(41.7%)
女性	8(57.1%)	0(0%)	1(7.1%)	3(21.4%)	0(0%)	2(14.3%)
全体	10(38.5%)	1(3.8%)	3(11.5%)	4(15.4%)	1(3.8%)	7(26.9%)

表9 死亡を目的変数とした多重ロジスティック回帰分析の結果

変数	Odds ratio (95%CI)
年齢*	1.06 (1.01-1.11)
診断年	1.01 (0.91-1.10)
性	0.85 (0.33-2.18)
疼痛	0.63 (0.22-1.79)
発熱	1.17 (0.43-3.16)
黄疸	1.10 (0.37-3.22)
無症状	0.40 (0.07-2.44)
肝内と肝外	0.99 (0.38-2.61)
左葉	0.88 (0.29-2.67)
右葉	1.68 (0.53-5.35)
尾状葉*	5.73 (1.36-24.05)
結石遺残	0.84 (0.26-2.67)
胆管狭窄	2.60 (0.74-9.15)
胆管拡張	0.60 (0.07-5.41)

ック回帰分析を行った。

C. 研究結果

表1に性、年齢分布を示した。男性が205名(46.1%)、女性が445名(53.9%)であった。50歳未満が54名(12.1%)、50歳代が105名(23.6%)、60歳代が128名(28.8%)、70歳以上が158名(35.5%)であった。1名が無記入であった。年齢構成に性差は認められなかった。

表2に初診時の症状を示した。疼痛が258名(57.8%)、発熱が172名(38.6%)、黄疸が93名(20.9%)、無症状が84名(18.8%)、その他が48名(10.8%)であった。性差は認められなかった。

表3に結石の種類を示した。ビリルビン石灰石が

224名(48.5%)、コレステロール結石が27名(5.8%)、その他が8名(1.7%)、不明が203名(43.9%)であった。

表4に結石存在部位を示した。肝内のみが274名(58.8%)、肝内と肝外が192名(41.2%)であった。

表5に結石存在葉を示した。右葉が277名(58.6%)、左葉が276名(58.4%)、尾状葉が23名(4.9%)であった。結石の種類、結石存在葉には性差は認められなかったが、結石存在部位は男性が女性に比べ、肝内のみが多い傾向があった。

表6に初回治療後の問題を示した。結石遺残が87名(18.4%)、胆管狭窄が35名(7.4%)、胆管拡張が24名(5.1%)、胆管消化管吻合部狭窄が5名(0.5%)、その他が23名(4.9%)であった。

表10 胆管癌を目的変数とした多重ロジスティック回帰分析結果

変数	Odds ratio (95%CI)
年齢*	1.03 (0.96-1.10)
診断年	0.94 (0.84-1.04)
性	1.21 (0.25-5.87)
疼痛	1.02 (0.17-6.11)
発熱	0.40 (0.07-2.23)
黄疸	0.40 (0.38-4.02)
無症状	0.00 (0.00-0.00)
肝内と肝外	1.10 (0.25-4.91)
左葉	1.88 (0.30-12.16)
右葉	1.61 (0.30-8.74)
尾状葉*	2.69 (0.24-30.49)
結石遺残	0.51 (0.06-4.77)
胆管狭窄	3.15 (0.51-19.36)
胆管拡張	0.00 (0.00-0.00)

表7に現在の状態を示した。治癒が164名(36.8%)、改善が103名(23.1%)、不変が146名(32.7%)、悪化が7名(1.6%)、死亡が26名(5.6%)であった。

表8に死因を示した。肝内胆管癌が10名(38.5%)、肝外胆管が1名(3.8%)、その他の癌が3名(11.5%)、胆管炎・肝膿瘍4名(15.4%)、肝硬変が1名(3.8%)、その他が7名(26.9%)であった。

表9に死亡を目的とした、表10は肝内胆管癌、肝外胆管癌を目的変数とした多重ロジスティック回帰分析の結果を示した。

死亡を目的とした解析で有意であった変数は、年齢と「結石存在葉が尾状葉」であり、それぞれのOdds ratio (95%CI) は、1.06 (1.01-1.11)、5.73 (1.36-24.05) であった。「初回治療後の問題が胆管狭窄」のOdds ratio (95%CI) は、2.60 (0.74-9.15) であり有意差は認められなかった。肝内胆管癌、肝外胆管癌を目的変数とした解析では有意な変数を認めなかった。Odds ratioの高かったものは、「結石存在葉が尾状葉」と「初回治療後の問題が胆管狭窄」であった。

D. 考案

1. 第4期調査

第4期調査は、第1次調査と第2次調査からなった。第1次調査の目的は1998年中の肝内結石症の全

国受療患者数を推計することであり、第2次調査の目的は1998年中に肝内結石症で受診した症例の臨床疫学的な特性を把握することであった。第1次調査では過去1年間(1998年1月1日から12月31日まで)に受療した患者数の報告を依頼したものであった。対象科は内科、消化器科、外科、消化器外科であった。第2次調査では症例のある施設に対し、患者の属性、受療状況、臨床所見の報告を依頼したものであった。

第4期調査の結果はすでに報告されているが、以前の調査に比べ軽症の症例や、また、結石の存在部位も肝内型が増加しており、その原因としては、CT、US等により、無症状の肝内結石症が見つかる機会が増加していることが原因となっていると考えられている。

2. 今回の横断研究の結果

今回の横断研究では、死亡を目的とした解析では、年齢以外で有意であった変数は、「結石存在葉が尾状葉」のみであった。また、有意差は認められなかったものの、「初回治療後の問題が胆管狭窄」のOdds ratioは、2.60と高かった。胆管癌を目的変数とした解析では有意な変数は認められなかったが、「結石存在葉が尾状葉」である場合のOdds ratioは2.69、「初回治療後の問題が胆管狭窄」である場合のOdds ratioは3.15と高い傾向にあった。

調査時点では死亡症例は26例(胆管癌11例)と、

サンプルサイズが少なかったために有意差が認められた変数は限られていたが、今後追跡調査を行うことによって死亡症例が増加すれば、肝内結石症の予後に関係する要因を明らかにできる可能性は高いと考えられる。

第4期調査によるデータでは、重症度に関係する要因は、「結石の存在部位が肝内外型」、「結石の存在部位が尾状葉」であることが示唆されている。肝内結石症の重症度分類は、grade1: 無症状、grade2: 腹痛のみ、grade3: 一過性の黄疸、grade4: 持続性の黄疸、敗血症、胆管癌とされているが、肝内結石症の重症度分類は入院時に診断するものであり、必ずしも長期的予後を示すのではない。「結石の存在部位が尾状葉」であることは、今回の研究でもリスクとなっていたが、「結石の存在部位が肝内外型」であることは今回の研究からはリスクとしては認められなかった。

3. コホート研究を行うにあたって検討すべき仮説

第4期調査の対象者は1998年に病院を入院していた肝内結石症の患者である。しかし、対象者の多くの発症はこれよりもずいぶん以前であると考えられ、1998年以前に亡くなった人については解析できない。したがって、第4期調査の対象者をコホートとした研究は、1998年までsurviveした人に関する予後研究であるという限界はある。しかしながら、現存する患者に関してどのような要因が予後に影響を与えるかを明らかにすることは重要である。

第3期調査では、初回治療を受けて10年以上経過した303例についての報告している。そのなかで91例の死亡症例があり、死亡原因は、胆管癌が23例(25.3%)、肝不全が18例(19.8%)、胆管炎が11例(12.1%)、食道静脈瘤破裂が5例(5.5%)、術死が2例(2.2%)、他の癌が14例(15.4%)、その他が18例(19.8%)であった。これらの結果は、肝内結石症の長期予後に影響を与える原因は、胆管癌、肝不全、胆管炎が重要な原因であることを示している。なお、第3期調査では肝内結石症に1791例に胆道癌が92例(5.2%)が合併していたことが報告されている。これらの症例の90%以上が肝内結石症の存在部位に一致して癌を合併している。これらの結果から、結石残存が患者

の予後、とりわけ胆道癌発生に関係していないかどうかの検証が必要である。

肝内結石症の治療別短期予後も谷村らが報告している。退院別の有症状率、社会復帰率、結石再発率、死亡率のいずれも、肝切除術が胆管空腸吻合術や総胆管切開・切石T-tube挿入術に比べて良好であったと報告している。この原因としては、病変部位と結石を同時に切除しているためであると考察されている。また、初回手術時に胆管癌を認めなかったものの経過観察中に癌が発生した症例は9例であり、うち6例に遺残結石があり、3例が不明であったことも報告されている。これらの結果は、遺残結石を切除することが肝内結石症の患者の予後に影響を与えることを示唆するものである。

肝内結石症の治療方法としては、手術的治療法は第2期調査では84.0%、第3期調査では78.6%、第4期調査では54.5%であり、年代を追うごとに観血的治療法は減少しており、逆に内視鏡などによる非観血的治療法が増加している。観血的治療法では、肝切除が第2期調査では44.0%、第4期調査では54.5%に増加していた。一方、胆管消化管吻合は第2期では26.7%、第4期では17.4%であり、減少する傾向を認めた。胆管切開切石は第2期が54.9%であったが、第4期では20.5%と半減した。これらの治療法の違いが患者の予後にどのような影響を与えるかを検討することも重要な課題である。

4. 肝内結石症の予後に関するコホート研究のモデル

第4期調査の症例を対象とした、肝内結石症の予後に関するコホート研究においては、診断年月日を追跡のstart point、死亡あるいは胆管癌の発生をendpointするsurvival analysisを行わなければならない。したがって、診断時に胆管癌の診断がついているものは対象から除外する必要がある。説明変数は、今までの調査結果から検討すれば、性、年齢、初診時症状、肝内結石存在部位、結石存在葉、既往胆道手術、初回治療内容、初回治療後の問題点とすることが妥当である。Modelはproportional hazard modelを用いる。

研究の時期であるが、研究の精度を高めるためには死亡者は多い方が良い。したがって、2003年度は

第4期調査を詳細に再分析するpilot studyを行い、2004年度に全国調査を行う方が望ましいと考えられる。新たに調査する内容は、施設の負担を考慮して調査対象者の現在の状況、胆管癌発生の有無、診断年月日、死亡していれば死亡年月日、死因、剖検の有無などが必要である。また、第4期調査では基本的な項目の未記載が、少なからず存在した。追跡調査でこの問題をクリアーすることも大きな目的になる。

E. 結論

第4期調査で得られているデータを基に肝内結石症の予後に関する横断研究を行った。その結果、死亡、胆管癌に影響を与える要因として、「結石存在葉が尾状葉」、「初期治療の問題点が胆管狭窄」である

ことが示唆された。これらの症例を対象とした予後に関するコホート研究を行うことは、意義があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

肝内結石症に対する新しい画像診断法

分担研究者 永井 秀雄

自治医科大学消化器一般外科 教授

研究要旨

ERC、PTC (S) など従来から肝内結石にもちいられてきた画像診断法は完全ではなく、従来当科では術中超音波検査の有用性を強調してきた。肝内結石診断には責任胆管の評価とともに、他胆管病変の検索が重要である。近年出現した新しい画像診断法であるMRCおよびMD-CTによるDIC-CTの肝内結石に対する診断法の評価は未だ定まっていない。今回胆管結石症例においてERCとDIC-CTの診断能を比較した。

【症例】55歳、男性。1975年胆嚢結石指摘され胆嚢切開採石術、1982年開腹胆嚢摘出術をうけた。2000年総胆管結石・肝内結石指摘され、ESTにて胆管結石のみ採石された。その後胆管炎症状を発症し、2002年12月ERCによる採石を試みたが不能のため、2003年1月当科入院となった。

2002年12月に施行されたERCは、バルーンカテーテルおよびガイドワイヤーを用いて病変胆管であるB3を描出することが出来た。しかし採石は困難で、右枝などその他の胆管の描出は十分ではなかった。それに対し2003年1月施行したDIC-CTでは、胆管内に空気が介在し、ENBDチューブが挿入されていることが、作像には欠点となっていたが、正常胆管の描出能には優れていた。またvolume rendering法にて3D画像が作成できるなど、視覚的に優れた作像が可能であった。しかし責任胆管であるB3には、空気が入っていること、肝萎縮により肝機能が低下もしくは廃絶していることから、描出されなかった。またMIP (maximum intensity projection) 法により結石の描出を試みたが、この症例では結石のカルシウム成分が低いため、十分に描出されなかった。

今回MD-CTを用いたDIC-CTにて胆管結石症例の胆管増描出、結石検索を試みたが、病変評価には十分ではなかった。今後 (1) air densityをvolume renderingする。(2) windowレベルを調整することにより、カルシウム成分の低い結石を描出する。(3) volume rendering法により胆管内腔像を作像する。などの工夫により、診断能向上が期待できるものと考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症の診断において重要なことは、肝内結石の存在診断である。すなわちどの胆管分枝には存在して、どの胆管分枝には存在しないかを正確に把握することである。従来から用いられてきた腹部超音波検査、腹部CT検査や、ERC、PTC(S) などの画像診断法は完全ではなく、以前より当科では術中超音波検査の重要性を強調してきた (表1)。

近年肝内結石症に対する腹部画像診断は飛躍的に発展した。核磁気共鳴法によるintensityの違いをvolume

renderingするMRIを応用し、T2 intensity画像を作像するMRCの出現は胆道画像に革命的な変換をもたらした。また1998年に4基の探触子を備えたかたち

表1 各種検査法による肝内結石描出率
(1995年 自治医科大学消化器一般外科)

体外US検査	86.1%
腹部CT検査	81.5%
ERC	59.4%
PTC	90.0%
術中US検査	98.0%

図 1



で製品化されたmultidetector row CT (MD-CT) は、現在16基の探触子を持つものが臨床に供されている。現在約40秒で200-400枚の画像作成が可能で、造影剤などでコントラストをつけることで血管などを3D表示することが可能である。経静脈的に胆道排泄性造影剤を投与後、胆管像を作像するDIC-CT法は、時にMRCよりも詳細な胆道像を得ることが可能である。

実際の胆管結石症例において、これらの新しい検査法と従来からの検査法を比較し、肝内結石の診断能について考察する。

B. 研究方法

実際の臨床例で、来の造影法であるERCと、新しい検査法のDIC-CTにより得られた術前画像と、術中所見を比較検討し、その診断能について考察する。

【症例】55歳、男性。1975年胆嚢結石指摘され胆嚢切開採石術、1982年開腹胆嚢摘出術をうけた。2000年総胆管結石・肝内結石指摘され、ESTにて胆管結石のみ採石された。その後胆管炎症状を発症し、2002年12月採石試みるため当院入院となった。2002年12月ERC、2003年1月DIC-CT施行した。内視鏡的採

図 2



石不能で、1月28日開腹手術施行した。

C. 研究結果

2002年12月に施行されたERCは、通常の造影では責任病変を十分に造影することが出来なかった(図1)が、バルーンカテーテルおよびガイドワイヤを用いて病変胆管であるB3を描出することが可能であった(図2)。しかし採石は困難で、右枝などその他の胆管の描出は十分ではなかった。それに対し2003年1月施行したDIC-CTでは、胆管内に空気が介在し、ENBDチューブが挿入されていることが、作像には欠点となっていたが、volume rendering法により、胆管像が3D画像として描出され、正常胆管の描出には優れていた。また3D画像を5°ずらして平行に焼き付けることにより、立体視できる3D画像を作成し得た(図3)。しかし責任胆管であるB3には、空気が入っていること、肝萎縮により肝機能が低下もしくは廃絶していることから、volume rendering法では描出されなかった。またMIP(maximum intensity projection)法により結石の描出を試みたが、この症例では結石のカルシウム成分が低いため、十分に描出されなかった(図4)。

図 3

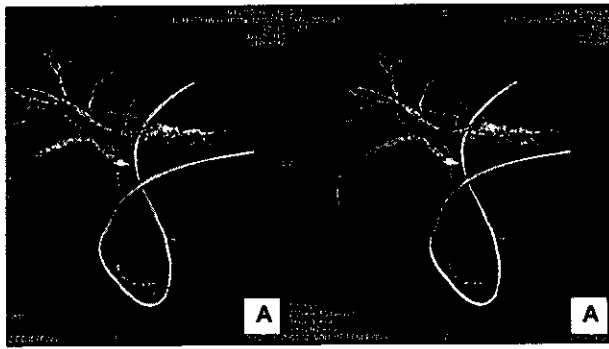
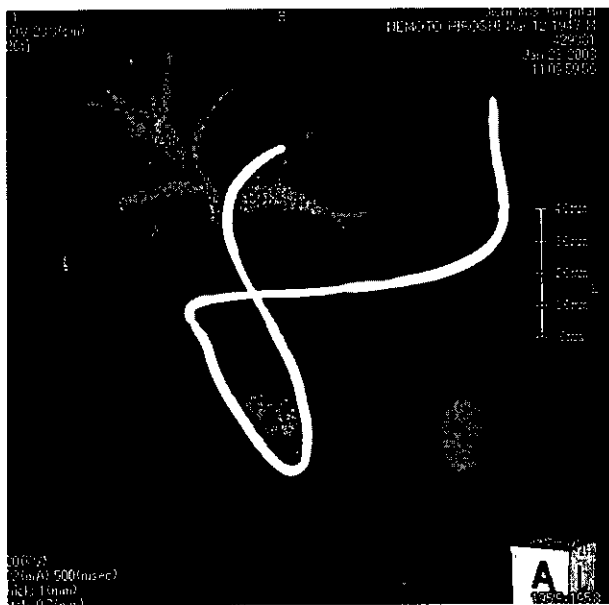


図 4



1月28日に開腹手術が施行された。術中US検査では、術前のERC、DIC-CTでは描出されていなかった、B 6にも結石が認められ、S 6およびS 3の亜区域切除をそれぞれ施行した。

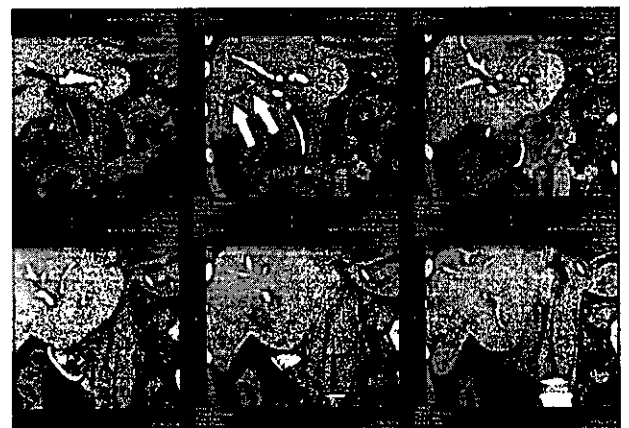
D. 考案

肝内結石症の治療には未だ議論がある。ERC (S) およびPTC (S) による採石が第1選択として推奨されるが、治療が不完全に終わる可能性、結石生成の原因となる狭窄胆管が温存されること、長期的にみた発癌の可能性などから、積極的に手術を推奨する意見も多い。内視鏡的に容易に採石されない症例、胆管炎を繰り返す症例は手術適応となる。通常肝内結石がある亜区域は、肝実質の萎縮がみられ、責任胆

図 5



図 6



管を切除するための肝切除術は切除量が通常よりはかなり少ないことが一般的である。そのため当科では積極的に肝切除術を施行している。

従来ERCによる責任胆管描出率はそれほど高くない。当科での描出率は約60%にとどまっているが、guidewireやballoon catheterを使用することで、描出率は向上する。この症例では当初の責任病変と考えられたB 3の病変は十分に描出することが出来たが、B 6にあった結石に関しては全く所見を得ることが出来なかった。

それに対し当初DIC-CTでは責任胆管のB 3は描出することが出来なかったが、正常胆管の描出には優れていた。しかし肝機能が廃絶した亜区域の胆管をhigh density領域として描出することは出来ず、更なる工夫が必要であると考えられた。この症例ではEST

が施行されており、胆管内の空気介在が描出能低下の一因であり、通常の胆管像とは別に、胆管内の空気densityをrenderingして造影剤をrenderingした像と合成すると、B3胆管の描出が可能であった(図5)。またmultiple planner reconstruction(MPR)法による前額面thin sliceにて、B6内の結石の描出も可能であった(図6、矢印)。DIC-CT検査の撮影は約1分で終了する。また診療報酬点数も約1000点とMRCやERCの半分程度で、経済的にも肉体的にも負担の少ない検査である。撮影後はworkstationにより様々な画像処理が可能であり、今回の症例でも術前確認されなかったB6内の結石をMPR法により確認することが出来た。今後肝内結石症例に対しては、詳細に検討を加えることにより、その診断能は向上するものと考えられた。

E. 結論

今回MD-CTを用いたDIC-CTにて胆管結石症例の胆管増描出、結石検索を試みたが、病変評価には十分ではなかった。今後(1) air densityをvolume renderingする。(2) windowレベルを調整することにより、カルシウム成分の低い結石を描出する。(3) volume rendering法により胆管内腔像を作像する。などの工夫により、診断能向上が期待できるものと考えられた。

今後MRCによる胆管像との比較検討を行い、従来の造影法も考慮に入れた肝内結石診断のための画像診断フローチャート作成を行いたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

佐田尚宏、大木準、永井秀雄：腹腔鏡下手術の基本手技気腹法と吊り上げ法。外科治療 86：623-629、2002

佐田尚宏、大平猛、永井秀雄：消化器手術におけるnavigation surgeryの臨床応用。消化器外科 25：467-473、2002

佐田尚宏、大木準、永井秀雄：目から学ぶ内視鏡手術のすべて A総論—腹腔鏡下手術の基本手技—気腹法と吊り上げ法。外科治療 86：623-629、2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

胆道閉鎖症に合併する肝内結石

研究協力者 安藤 久實

名古屋大学小児外科 教授

研究要旨

胆道閉鎖症に合併する肝内結石は文献的には21例の報告をみるのみで、極めてまれな病態と考えられている。しかし、胆道閉鎖症に対する葛西手術後に肝移植となった症例で高頻度に肝内結石を経験したので報告する。当施設において胆道閉鎖症に対する葛西手術後に11症例で生体部分肝移植を施行した。摘出肝の検索により11例中5例に肝内結石を認めた。全例がビリルビンカルシウム石であった。結石の存在部位は3例がbile lakeに認め、他2例はそれぞれ左肝管、右肝管に存在した。Bile lakeは11例中6例で形成されていた。今回の検討により、胆道閉鎖症術後にも高頻度で肝内結石が合併していることが予想された。

A. 研究目的

胆道閉鎖症は新生児期ないし乳児早期に閉塞性黄疸で発症し、放置すれば胆汁性肝硬変から死に至る

疾患である。1959年に報告された葛西手術により、大多数が救命され、多くの症例で長期生存が可能となった。この術式では腸管を直接肝門部に縫合するため、しばしば上行性胆管炎の発生がみられる。胆

表1. 胆道閉鎖症術後に発生した肝内結石の報告例

No	発表年	報告者	報告施設	性	年齢	胆管結石	結石部位	胆管	肝内結石発生年齢	拡張 or bile lake	
1	1974	Berenson1)	USA	F	12w	I	H-D	25y	ビ石	左肝管	左肝管
2	1984	山田亮二2)	?	?	59	III	肝門部空腸吻合	14y	?	右肝管	?
3	1989	Ishii K3)	九大	F	62	?	肝門部空腸吻合	12y	混合石	肝門部	Bile lake
4	1987	矢加部茂4)	九大	F	43	?	肝門部空腸吻合	4y	胆砂	左肝管	左肝管
5	1988	市川徹5)	広島大	?	65	III	肝門部空腸吻合	6m	?	肝門部	?
6	1988	市川徹5)	広島大	?	45	III	肝門部空腸吻合	4m	?	肝門部	?
7	1989	Day6)	USA	?	?	?	肝門部空腸吻合	?	?	拡張胆管	拡張胆管
8	1990	Desmond7)	Australia	F	42	?	肝門部空腸吻合	10y	?	肝門部	?
9	1992	Enriquez8)	Spain	?	67	?	肝門部空腸吻合	1y	?	?	?
10	1992	Enriquez8)	Spain	?	106	?	肝門部空腸吻合	1y	?	?	?
11	1992	Enriquez8)	Spain	?	32	?	肝門部空腸吻合	3y	?	?	?
12	1992	Enriquez8)	Spain	?	72	?	肝門部空腸吻合	2y	?	?	?
13	1992	千葉庸夫9)	東北大	M	104	Icyst	肝管腸吻合	19y	ビ石	左右肝管	左右肝管
14	1992	千葉庸夫9)	東北大	M	72	II	肝門部空腸吻合	26y	?	左右肝管	?
15	1997	Nio10)	東北大	F	?	?	?	30y	?	?	?
16	1992	浜田弘巳11)	北大	F	95	Icyst	総肝管空腸吻合	18y	ビ石	左肝管	Bile lake
17	1994	Matsui12)	自治医大	F	59	III	肝門部空腸吻合	2y	?	B6	無し
18	1997	根津賢司13)	愛媛大	F	86	I	H-D	31y	ビ石	左右肝管	左右肝管
19	1997	西寿治14)	神奈川こども病院	M	59	III	肝門部空腸吻合	14y	?	?	?
20	1997	西寿治14)	神奈川こども病院	F	54	III	肝門部空腸吻合	16y	?	?	?

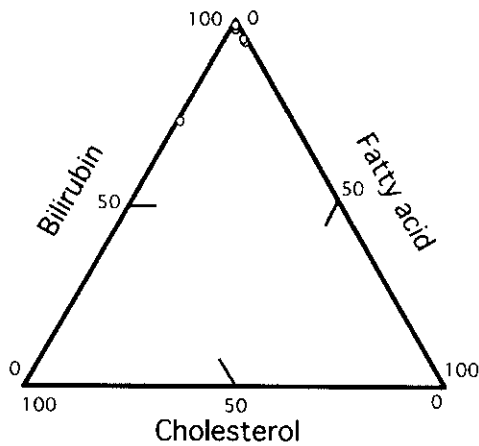
H-D、 総肝管十二指腸吻合

表2. 胆道閉鎖症術後肝移植例における肝内結石

No	移植年	性	移植年齢	胆道閉塞型	移植時年齢	移植前総ビリルビン値(μmol/L)	肝内結石	結石種類	結核嚢	Bile lake	胆汁細菌検査
1	1999	F	63	III	11	8.4	有り	ピ石	右肝管	無し	?
2	2001	M	67	III	6	2.5	有り	ピ石	Bile lake	左,右	Enterococcus faecalis
3	2001	F	61	III	5	1.8	有り	ピ石	Bile lake	左,右	Klebsiella pneumoniae
4	2001	M	60	III	9	32.3	有り	ピ石	左肝管	無し	Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii
5	2002	M	98	III	1	1.3	有り	ピ石	Bile lake	左	Pseudomonas aeruginosa
6	2003	F	73	III	6	1.6	有り	ピ石	Bile lake	左	培養されず
7	1998	F	54	I	8	9.4	無し	—	—	無し	?
8	1999	M	96	III	15	5.6	無し	—	—	左	?
9	2000	M	126	III	4	13.5	無し	—	—	無し	Enterococcus sp.
10	2000	M	209	III	1	18.9	無し	—	—	右	?
11	2001	F	72	III	1	3.6	無し	—	—	左,右	培養されず
12	2002	M	72	III	1	3.7	無し	—	—	無し	Klebsiella pneumoniae

下線はβグルクロニダーゼ産生菌

図1. 胆道閉鎖症術後に発生した肝内結石の成分分析



道感染が慢性的に生じることから、先天性胆道拡張症の根治手術後と同様に、胆道閉鎖症の術後にも高頻度に二次性肝内結石の発生が予想される。しかし、文献的には胆道閉鎖症術後に発生した肝内結石は20例の報告をみるのみであり、現在のところ極めてまれな病態と考えられている(表1)。そこで今回、生体部分肝移植時に全摘された肝臓を検索することにより、自験例での胆道閉鎖症術後の肝内結石発生状況を検討した。

B. 研究方法

名古屋大学小児外科において1981年から2002年ま

図2. 6歳男児例. Bile lake内に発生した肝内結石



図3. 6歳男児例. Bile lakeに対するPTCD (図2と同一症例)



で59例の胆道閉鎖症に対し葛西手術を行い、術後に20例で生体部分肝移植が実施された。このうち当施設で肝移植を実施した12症例を対象とした。

C. 研究結果

摘出肝の検索により12例中6例に肝内結石を認められた(表2)。全例がビリルビンカルシウム石であった。成分分析では6例中5例がほぼビリルビンカルシウムのみで形成されていた(図1)。結石の存在部位は、4例は肝内に形成されたbile lakeに、他2例はそれぞれ拡張した左肝管、右肝管に存在した(図2)。Bile lakeは12例中7例で形成されていた。肝内胆管の胆汁細菌培養が実施された8例中6例で細菌が検出された。結石形成例では5例中4例で細菌が培養された。

D. 考案およびE. 結論

今回の検討は肝移植を必要とした胆汁性肝硬変例のみの対象ではあるが、先天性胆道拡張症術後と同様に、胆道閉鎖症術後にも高頻度で肝内結石が合併していることが判明した。先天性胆道拡張症と同様、胆道閉鎖症における肝内結石も結石の種類はビリルビンカルシウム石であるが、その成分分析では、胆道拡張症術後の結石と異なり、脂肪酸やコレステロールの成分はほとんど存在しない特徴があった。結石の成因としては、胆道拡張症術後の肝内結石と同様に、胆汁うっ滞と細菌感染が関与するようである。しかし、細菌感染に関しては、結石形成例でも細菌が検出されなかった例があること、胆汁中に検出された菌もβ-glucuronidase産生菌の割合が低いなど、胆道拡張症術後における肝内結石の形成ほどは、細菌感染が関与していない可能性が高い。

胆汁うっ滞の原因として肝内で形成されたbile lakeが注目された。Bile lakeとは胆道閉鎖症の肝実質内に胆汁が貯留したもので[15]、単にintrahepatic cyst [16,17]とも呼ばれている。Bile lakeは肝に不可逆性の障害が生じた場合にみられるものとされていたが[15]、現在では経過良好例でもみられることが知られている[17, 18, 19]。Bile lakeはまれなものではなく、自験例では59例の葛西手術後に15例(25%)

で発生し、他の施設でもTakahashiら[19]は28例中6例(21%)に、Nakamaら[20]は24例中6例(25%)に、Betzら[21]は44例中8例(18%)にみられたと報告している。発生部位としては左葉では門脈臍部付近に、右葉では門脈後区域枝分岐部付近に多くみられる。Bile lakeに対しPTCDを施行すると、施行時には胆管との交通はみられないが、一定期間ドレナージすると肝内胆管との交通がみられ、その胆管には多くの狭窄がみられることが多い(図3)。このような所見からbile lakeの発生機序として、胆管炎などにより狭窄部が閉塞し、胆道内圧が上昇して胆管が破綻して形成されたものと考えられる[18]。今回検討した肝内結石のうち6例中4例がこのbile lakeに結石が存在した。Bile lakeによる胆汁うっ滞のみが結石生成に関与するのか、bile lakeに結石に関与する他の要因が存在するか今後の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

小児科診療マニュアル、p412-414、胆道閉鎖症、安藤久實、名古屋大学出版会(名古屋)2002、堀部敬三、梶田光春 編集

胆道外科の要点と盲点、p321-331、先天性胆道拡張症の診断と手術のKnack&Pitfalls、安藤久實、分光堂(東京)2002、幕内雅敏、二村雄次 編集
膵胆管合流異常—診断・治療の最近の進歩、p77-92、金子健一郎、安藤久實、へるす出版(東京)2002、二村雄次 編集

小児肝胆道疾患の画像診断、安藤久實、小児外科、34(3)、(289-300)、2002

膵胆管合流異常・最近の話題、診断(1)小児、篠原剛、安藤久實、臨床消化器内科、17(10)、(1435-1443)、2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

肝内結石症における結石再発および 結石種類別の胆管癌合併についての検討

分担研究者 千々岩 一男

宮崎医科大学第一外科 教授

研究要旨

肝内結石症はその病因および病態が複雑であり、症例数の減少傾向はみられるものの治療に難渋することも少なくない。再発症例も多く、また経過中に胆道癌を合併する症例もみられる。また先天性胆道拡張症あるいはその術後経過中に肝内結石を発症する症例があり、その診断、治療に難渋することがある。今回、自験例95例について検討をおこなった。とくに再発症例、胆道再建術後の肝内結石症例について検討した。

1980年から2002年までの間に経験した肝内結石症例は95例で、男性43例、女性52例であった。病型はI型が36例（37.9%）、IE型が59例（62.1%）で、結石部位はL型が42例、R型16例、LR型36例、不明1例であった。結石の種類は判明した68例中、ピ系石が54例（79.4%）、コ系石が11例（16.2%）、黒色石が3例（4.4%）であった。胆管癌の合併が11例、胆嚢癌が2例で胆道癌の合併は計13例（13.7%）であった。先天性胆道拡張症で肝内結石を合併した症例あるいはその術後経過中に肝内結石を合併した症例は11例（11.6%）で、これは同期間の先天性胆道拡張症56例のうち19.6%にあたる。

肝内結石症での初回治療後の再発症例は除外症例を除いた77例中16例（21%）であった。再発症例16例の初回治療の内訳は胆道再建併施例が8例、総胆管切開による採石が5例、肝切除のみが2例、十二指腸乳頭括約筋形成術が1例であった。肝内結石症の初回治療で胆道再建が併施された症例28例で、再発は8例（28.6%）、肝切除のみがなされた症例28例で再発は2例（7.1%）で有意に胆道再建例の再発率が高かった。また肝内結石症および胆道拡張症に対して一次的または二期的に胆道再建がなされた症例35例で胆道再建後に結石を形成した症例は肝内結石症で8例、胆道拡張症で6例の計14例（43.3%）であった。胆道再建後の結石にコ系石は認めなかった。

肝内結石症に対する胆道再建の併施は胆汁うっ滞や逆行性胆管炎から再発の誘因になる可能性が示唆された。また胆道拡張症に対する胆道再建も肝内結石発症の危険因子と考えられ、長期的な経過観察が必要である。胆道再建術後の肝内結石は診断、治療のアプローチが限定され、また外科的治療は比較的侵襲をとまう。MDCTやMRCPなどを用いて正確な病態の把握が必要で、また治療としては多次手術をさけるためESWLやPTCSLなどの低侵襲的で、かつ繰り返しおこなえる治療法を選択していくべきであろう。

A. 研究目的

肝内結石症はその病因および病型が複雑であるため確かな診断と病態の把握が重要である。しかし再発症例や多次手術症例もあり、病態の把握や治療法の選択に苦慮することがある。また先天性胆道拡張症あるいはその術後経過中に肝内結石を発症する症

例があり、その診断および治療は困難で長期経過観察における問題点となっている。さらに肝内結石症の初回治療時あるいは経過中に胆道癌を合併する症例もみられ、その存在診断や進展度診断の困難さから胆道癌合併例の治療成績はきわめて不良である。

今回はまず肝内結石の再発症例を中心にとくに胆道再建術後の結石形成について検討した。肝内結石

肝内結石症（1980年—2002年）*			
性		男性 43例	女性 52例
平均年齢（初回治療時）		57.5才	54.8才
病型と結石部位			
I type	36例 (37.9%)	IE type	59例 (62.1%)
L	20例	L	22例
LR	9例	LR	27例
R	7例	R	9例
結石の種類（判明例68例中）			
ビリルビン石灰石	54例 (79.4%)		
コレステロール石	11例 (16.2%)		
黒色石	3例 (4.4%)		
不明，手術なし	27例		
癌の合併		13例 (13.7%)	胆管癌 11例 胆嚢癌 2例

*：宮崎医科大学第1外科

表1 肝内結石症例

症の治療法としては肝切除術、胆道再建術、PTCSLやESWLがあるが、治療には結石の完全除去のみならず慢性的な胆汁鬱滞や持続する胆管炎の防止が必要であり、理想的には結石形成部位の肝切除が根治的である。しかし、結石が肝両葉に広汎に存在する症例や残存肝予備能が不良である症例などは、低侵襲性や再発の予防という面から自然排石を期待して胆道再建が選択されることもあった。また先天性胆道拡張症で、胆道再建術後に肝内結石を発症する症例があり、胆道再建が肝内結石発症の誘因になっている可能性が指摘されている。今回、胆道再建術が結石再発に及ぼす影響について検討した。

次いで、結石の種類別に胆管癌の発生頻度を検討した。肝内結石症における胆管癌の合併は4.0%-8.8%と報告されており、肝内結石症の患者は明らかに胆管癌のhigh risk groupである。肝内結石症に対する近年の診断および治療法の進歩にともない治療成績が向上し、そのため長期生存例が増加し、経過中に胆管癌を発症する症例が報告されるようになってきたためと思われる。結石の種類別では、従来から肝内のコレステロール結石（コ石）に胆管癌を合併することはまれであるとされてきた。近年、肝内コ石が増加してきており、また肝内コ石の場合は無症状例が多く、そのため経過観察となる症例が多い。さらに肝内コ石の場合、胆道感染や高度の胆管狭窄などの胆管の荒廃が少ないためPTCSLやESWLで治療される症例が多い。長期経過観察例の胆管癌発症は今後重要な問題となることが予想される。したがって肝内コ石の場合胆管癌発生の危険性が本当に少な

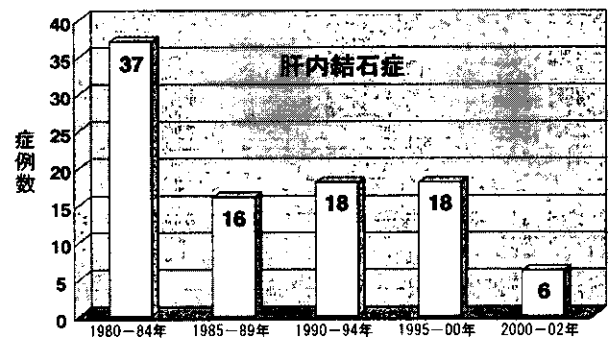


図1 肝内結石症の年次別症例数の推移

いのかどうかを検証するため結石の種類別に胆管癌の発生頻度を検討した。

B. 研究方法

胆道再建術後の結石形成については宮崎医科大学第1外科における過去20年間の肝内結石症95例を用いて検討した。結石種類別の胆管癌合併の検討は九州大学第1外科における過去25年間の肝内結石症139例を用いて検討した。結石の種類は剖面と、前者では赤外分光分析で後者では化学分析で検討した。胆管癌は病理組織学的にPTCS下生検、切除標本、剖検の組織で確認した。

C. 研究結果

宮崎医科大学第1外科において1980年から2002年までの間の肝内結石症例（表1）は95例で、男性43例、女性52例であった。初回治療時の平均年齢は男性57.5才、女性54.8であった。病型はI型が36例（37.9%）、IE型が59例（62.1%）で、結石部位はL型が42例、R型16例、LR型36例、不明1例であった。結石の種類は判明した68例中、ビリルビン石灰石（ピ石）が54例（79.4%）、コ石が11例（16.2%）、黒色石が3例（4.4%）であった。胆管癌の合併が11例、胆嚢癌が2例で胆道癌の合併は計13例（13.7%）であった。肝内結石症新規症例数（図1）は1980年代の前半以降明らかに減少したが、その後は年間3例から4例で推移している。先天性胆道拡張症で肝内結石を合併した症

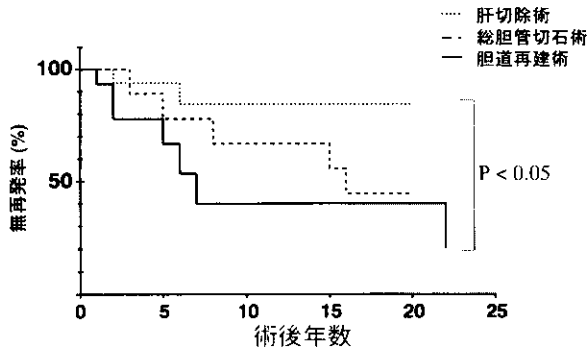


図2 治療法別再発曲線

先天性胆道拡張症 (1980年-2002年) *		56例
性	男性	16例
	女性	40例
肝内結石合併例		11例 (19.6%)
初診時肝内結石合併例		5例
術後経過中肝内結石合併例		6例
吻合部狭窄あり		3例
吻合部狭窄なし		3例
手術から肝内結石発症までの期間		3-24年 (中間値10年)

*: 宮崎医科大学第1外科

表2 先天性胆道拡張症と肝内結石症

初回治療法	症例数 (%)	病型		結石部位		
		I	IE	L	LR	R
肝切除のみ	28 (35.4%)	16	12	23	4	1
胆道再建例	28 (35.4%)	7	21	8	16	4
総胆管切石+胆道鏡	18 (22.8%)	3	15	6	9	3
総胆管切石+乳頭形成	3 (3.8%)	1	2	2	1	1
ESWL	2 (2.5%)		2		2	1

表3 初回治療および病型、結石部位

例あるいはその術後経過中に肝内結石を合併した症例は11例 (11.6%) で、これは同期間の先天性胆道拡張症56例のうち19.6%にあたる。肝内結石を合併した胆道拡張症11例のうち初診時に肝内結石を合併していた症例は5例、術後経過中に肝内結石を合併した症例は6例であった。この6例で明らかに吻合部狭窄を認めた症例は3例であった (表2)。

初回治療法は肝切除のみが28例 (35.4%)、胆道再建併施例が28例 (35.4%) であった。肝切除のみの例は病型は、I型が多く結石部位は左葉とくに外側区域に局限した例が多かった。胆道再建併施例は、IE型が多く結石部位は両葉型が多かった (表3)。肝内結石症での初回治療後の再発症例は77例中16例 (21%) であった。再発症例16例の初回治療の内訳は、胆道再建併施例が8例、総胆管切開による採石が5例、肝切除のみが2例、十二指腸乳頭括約筋形成術が1

初回治療法	症例数	病型		結石部位			初回治療後再発例
		I	IE	L	LR	R	
肝切除のみ	28	16 (2)*	12	23 (2)	4	1	2 (7.1)**
胆道再建例	28	7 (3)	21 (5)	8 (2)	16 (5)	4 (1)	8 (28.6%)
総胆管切石+胆道鏡	18	3 (1)	15 (4)	6 (2)	9 (3)	3	5 (27.8%)
総胆管切石+乳頭形成	3	1 (1)	2		2	1 (1)	1 (33.3%)
		7	9	6	8	2	16

*: 再発例数
**: 再発率

表4 初回治療後再発例の治療法別再発率、病型、結石部位例であった。再発症例において病型や結石部位につ

胆道再建症例 *		35例
胆道再建術後肝内結石合併症例		14例 (40%)
肝内結石症 (再発)		8例
胆道拡張症 (術後)		6例
結石の種類	ビリルビン石灰石	6例
	黒色石	1例
	不明	5例

*: 先天性胆道拡張症の術後経過例をふくむ

表5 胆道再建術後肝内結石合併例

いては明らかな傾向は認めなかった。肝内結石症の初回治療で胆道再建が併施された症例28例で、再発は8例 (28.6%)、肝切除のみがなされた症例28例で再発は2例 (7.1%) で有意に胆道再建例の再発率が高かった (表4、図2)。また肝内結石症および胆道拡張症に対して一期的または二期的に胆道再建がなされた症例35例で胆道再建後に結石を形成した症例は、肝内結石症で8例、胆道拡張症で6例の計14例 (43.3%) であった。胆道再建後の結石にコ石は認めなかった (表5)。再発症例に対しては様々な治療がおこなわれているが、PTCSLやESWLあるいはその組み合わせなど低侵襲で繰り返し治療可能な治療が主体となっている。しかし、再発治療後、経過良好な症例は16例中6例のみで、再々発や結石遺残が7例にみられている (表6)。

九州大学第1外科で過去25年間の肝内結石症139例を対象に胆管癌合併例と非合併例に分類し、臨床的特徴と結石の種類を検討した (表7)。139例中胆管癌を合併した症例は8例 (5.8%) であった。胆管癌非合併例の平均年齢は55.3才、合併例は54.5才で違いを認めなかった。病型はI型が54例、IE型が85例で、I型の9.3%、IE型の3.5%に胆管癌の合併がみられ、

治療法	症例数	再発治療後の経過			
		経過良好	再々発	結石遺残	不明
PTCSL, ESWL	6	3	1	2	
吻合部再建	3	1	1	1	
胆道再建	2	1			1
肝切除+胆道再建	1			1	
総胆管切石	1		1		
無治療, 経過観察	1	1			
治療の詳細不明	2				2
	16	6	3	4	3

表6 再発症例に対する治療

	胆管癌 非合併例(%)	胆管癌 合併例(%)	全症例
症例数*	131	8 (5.8%)	139
年齢(mean ± SD)	55.3±13.8	54.5±11.1	55.3±13.6
性別(男/女)	58/73	3/5	61/78
病型と結石部位			
I型	49	5 (9.3%)	54
L	23	3 (11.5%)	26
LR	15	1 (6.3%)	16
R	11	1 (8.3%)	12
IE型	82	3 (3.5%)	85
L	30	2 (6.3%)	32
LR	42	1 (2.3%)	43
R	10	0	10

*:九州大学第1外科

表7 肝内結石症における胆管癌合併例と非合併例の比較

I型に2倍以上の頻度で認められた。病型と結石の種類別に胆管癌の発生頻度を検討した(表8)。I型54例中ピ石は39例、コ石は3例であった。I型で胆管癌の合併はピ石39例中1例(2.6%)、コ石3例中2例(66.7%)であった。IE型85例中ピ石は67例、コ石は7例であった。IE型で胆管癌の合併はピ石67例中2例(3.0%)、コ石7例中1例(14.3%)であった。全体としてはピ石106例中3例(2.8%)、コ石10例中3例(30%)に胆管癌の合併をみた。胆管癌を合併した肝内結石症8例の内訳は、男性3例、女性5例で、結石の種類はピ石3例、コ石3例、脂肪酸石灰石1例、不明1例であった。8例中5年生存が得られたのは1例のみで、ほとんどは根治切除不能の進行癌であった。5年生存が得られている症例も肝左葉切除後に偶然発見されたもので術前診断はできなかった(表9)。

D. 考案およびE. 結論

I型における結石の種類	胆管癌 非合併例(%)	胆管癌 合併例(%)	全症例
	ピリルビン石灰石	38	
コレステロール石	1	2 (66.7%)	3
黒色石	1	0	1
脂肪酸石灰石	0	1	1
不明	9	1	10
IE型における結石の種類			全症例
ピリルビン石灰石	65	2 (3.0%)	67
コレステロール石	6	1 (14.3%)	7
黒色石	3	0	3
不明	8	0	8

表8 肝内結石症における胆管癌合併例と非合併例の比較

症例番号 性別	結石種類 硬さ, 部位	癌の存在部位	治療法	予後
79-213 女	脂肪酸石灰石 I, LR	肝門部	肝門部胆管切除	死亡(2ヵ月)
81-482 女	ピリルビン石灰石 IE, L	外側区域	外側区域切除	死亡(3ヵ月)
81-279 男	ピリルビン石灰石 I, L	内側区域	無治療	死亡(4ヵ月)
84-025 男	ピリルビン石灰石 IE, LR	後区域	総胆管切開	死亡(4ヵ月)
85-126 女	コレステロール石 I, L	外側区域	外側区域切除	死亡(6ヵ月)
86-106 女	コレステロール石 IE, L	外側, 内側区域	PTCD, 放射線治療	死亡(4ヵ月)
92-012 女	不明 I, R	肝門部 後区域	PTCD	死亡(1ヵ月)
96-452 男	コレステロール石 I, L	外側区域	左葉切除	生存(5年)

表9 胆管癌合併8症例の治療および予後(平均年齢:55歳、男女比:3/5)

肝内結石症の治療において適切な初回治療法の選択による再発の防止および胆管癌合併症例に対する早期診断や治療による予後の改善はきわめて重要な問題である。

肝内結石症に対する肝切除術は、病変胆管を含む肝内結石を完全に除去できれば再発もなく経過も良好である。また萎縮肝葉は胆管癌の発生母地となる可能性が高く、萎縮肝葉切除は合理的な治療法である。しかし、両葉型や萎縮のない右葉型あるいは高齢者や全身状態不良例では、根治的肝切除術の選択が困難な症例もあり治療法の選択に苦慮するところである。今回の検討結果から肝内結石症に対する胆道再建の併施は胆汁鬱滞や逆行性胆管炎から再発の誘因になる可能性が示唆された。したがって、胆道再建の併施は避けるべきと考える。また胆道拡張症に対する胆道再建も肝内結石発症の危険因子と考えられ、長期的な経過観察が必要である。胆道再建術後の肝内結石は診断および治療のアプローチが限定

され、また外科的治療は比較的侵襲をとまなう。MDCTやMRCPなど近年急速に性能の向上をみている高次元画像解析装置を用いて正確な病態の把握が必要である。難治例や再発例に対しての治療としては多次手術をさけるためESWLやPTCSLなどの低侵襲的で、かつ繰り返しおこなえる治療法を積極的に選択していくべきであろう。

肝内結石症に合併する胆管癌は胆汁鬱滞や逆行性胆管炎に起因する慢性増殖性胆管炎を背景に発生すると考えられている。肝内結石症における胆管癌の合併は4.0%–8.8%と報告されている。宮崎医科大学第1外科では95例中11例(11.5%)、九州大学第1外科では139例中8例(5.8%)に胆管癌の合併を認めた。肝内結石をとまなう胆管癌は結石による胆管の炎症性変化の修飾もあり、術前の存在診断が困難である。また正確な進展度診断はさらに困難で適正な肝切除範囲の設定に難渋することがある。術前診断率の低さは治療成績の不良につながっている。川原田らは術前または剖検例95例の検討において半数近くが胆管癌の合併を見落とししていたと報告している。Suらは肝内結石症に合併した胆管癌において胆管癌の術前診断率は42%で、胆管癌単独の場合72%であったとして、肝内結石の存在により胆管癌の診断率は低下すると報告している。肝内結石症に合併した肝膿瘍と誤診される症例が多く報告されている。明らかな進行癌の合併以外は現在でも術前に診断される割合は低い。

結石の種類別の胆管癌発生頻度について内山らは胆管癌合併の肝内結石93例中ピ石が75例(81%)、コ石が6例(6.5%)、黒色石12例(12.9%)と報告している。また北川らは肝内結石症145例のうち胆管癌を合併したのは8例で全てピ石であったと報告している。従来、胆管の荒廃が少なく増殖性胆管炎を示さないコ石では胆管癌の発生頻度は低いとされてきた。今回の検討結果では、ピ石106例中3例(2.8%)、コ石10例中3例(30%)に胆管癌の合併を認めており、

肝内結石がコ石であっても胆管癌の合併に注意すべきであるということが示された。とくに無症状で経過観察する症例あるいはPTCSLやESWLなどで結石除去した後、経過観察する症例については結石の再発のみならず胆管癌の合併も考慮して注意深く経過観察していくべきである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Chijiwa K, Otani K, Noshiro K, Yamasaki T, Shimizu S, Yamaguchi K, Tanaka M. : Cholangiocellular Carcinoma Depending on the Kind of Intrahepatic Calculi in Patients with Hepatolithiasis. *Hepato-Gastroenterol* 49 : 96-99 (2002)

Mizuta A, Chijiwa K, Saiki S, Kuroki S, Nakamura K, Tanaka M. Differences in biliary lipid excretion after major hepatectomy in obstructive jaundiced rats with preoperative internal, external, or no biliary drainage. *Eur J Surg Res* 34 : 291-299, 2002

Chijiwa K, Mizuta A, Ueda J, Takamatsu Y, Nakamura K, Watanabe M, Kuroki S, Tanaka M. Relation of biliary bile acid output to hepatic adenosine triphosphate level and biliary indocyanine green excretion in humans. *World J. Surg.* 26 : 457-461, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

肝内結石症での粘液産生の分子機構 —Protein kinase Cの関与について—

分担研究者 中沼 安二

金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 教授

研究要旨

肝内結石症の結石形成過程において、胆管上皮からのムチンコア蛋白（MUC2、MUC5）の発現亢進が重要と考えられている。今回、MUC2、MUC5ACの発現亢進過程におけるprotein kinase C（PKC）の関与について検討した。

BALB/Cマウス由来の培養肝内胆管上皮を用いてlipopolysaccharide（LPS）刺激群、TNF- α 刺激群、LPS刺激+PKC阻害群（LPS+calphostinC）、TNF- α 刺激+PKC阻害群（TNF- α +calphostin C）を作成し、MUC2、MUC5の発現変化を検討した。また、細胞内PKC活性も測定した。得られた結果は以下のごとく要約される。

LPS刺激、TNF- α 刺激によりMUC2、MUC5ACの発現亢進が確認された。LPS刺激、TNF- α 刺激で誘導されたMUC2、MUC5ACの発現亢進はPKC阻害により抑制された。LPS刺激、TNF- α 刺激により細胞内PKC活性の亢進が確認された。

LPS刺激による胆管上皮のMUC2、MUC5ACの発現亢進過程における細胞内シグナルではPKCの活性化が関与していると考えられた。生体内でも同様の機序により経胆管的な細菌感染により胆管上皮からのMUC2、MUC5ACの発現が亢進し、肝内結石の結石形成に関与していると考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症の結石の多くはビリルビンカルシウム石であり、粘液はビリルビンカルシウム石の主要な構成成分であるとされ、胆管上皮からの粘液の分泌亢進が結石形成に重要と考えられている。粘液はムチンコア蛋白（mucin core protein, MUC）と、それに結合する糖鎖からなる。今日までに14種類のMUCが同定され、それぞれ組織特異的もしくは疾患特異的に発現している。胆管系では6種のMUC（MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6）の発現が報告されている。肝内結石症では胆管上皮においてMUC2、MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6の発現が亢進しており、特にポリマー形成能を有するMUC2、MUC5ACの発現亢進が、結石形成に重要と考えられている。

平成11年度の本班会議にて、グラム陰性菌の菌体

成分であるリポポリサッカライドでマウス培養胆管上皮を刺激するとMUC2、MUC3、MUC5ACの発現が亢進することを報告し、細菌感染と胆管上皮におけるMUC発現との関連性を明らかにした。今回我々は同様のマウス培養胆管上皮を用いて、MUC（特にMUC2、MUC5AC）の発現亢進過程における、TNF- α とprotein kinase C（PKC）の関与について検討した。

B. 研究方法

8週齢のBALB/Cマウスから肝内胆管上皮を分離培養した。培養胆管上皮はコラーゲンゲル上で単層培養した。TNF- α 中和抗体やPKC阻害剤であるcalphostin C（0.1 μ M）を添加したTNF- α 阻害群、PKC阻害群を作成した。それぞれの細胞群の培地中にLPS（100 μ g/ml, Escherichia coli由来）やTNF- α

図 1

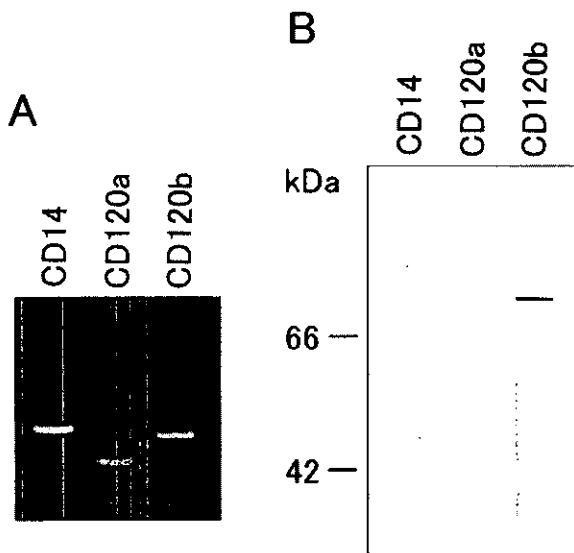


図 3

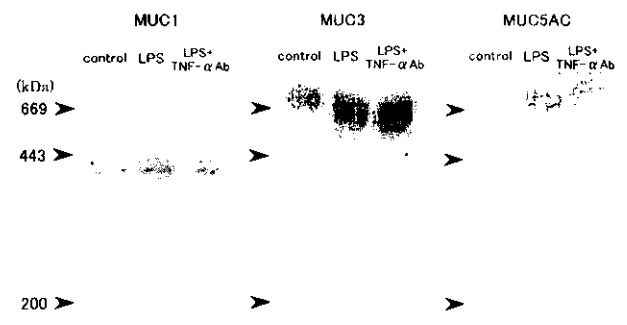
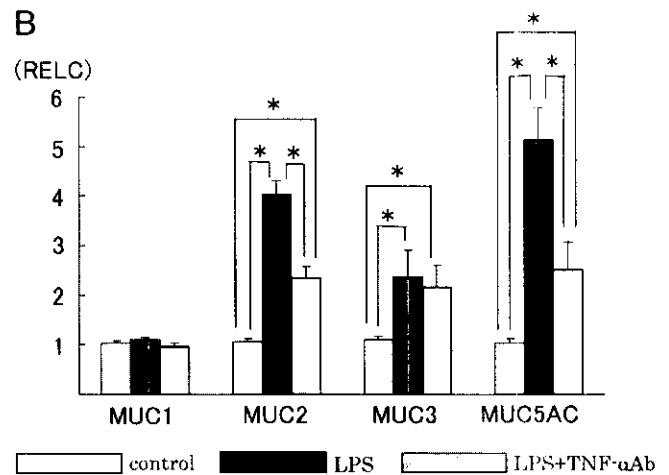
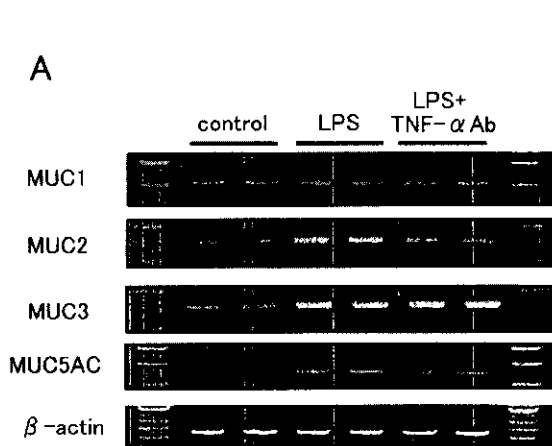


図 2



(0.1, 1.0, 10.0ng/ml)を添加した。刺激後、4、6、12、24、48時間で培養細胞と培地を回収した。

培養胆管上皮からRNAを抽出し、RT-PCRとノーザンブロットを行った。MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、INF- γ 、CD14、CD120a、CD120b、 β -actinに対してRT-PCRを行った。MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β の発現変化は内部コントロールである β -actinの発現量との比を測定し半定量的に解析した。また、MUC2、MUC5AC mRNAに対するノーザンブロット解析をAlkPhos DIRECT (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて行った。

培養胆管上皮から蛋白を抽出し、ウェスタンブロ

ットとPKC活性測定に用いた。50 μ gの蛋白をウェスタンブロットに用い、10 μ gの蛋白をPKC活性測定に用いた。MUC1、MUC3、MUC5ACのウェスタンブロットは4%SDS-PAGEゲルを用いて行い、CD14、CD120a、CD120b蛋白の発現は10%SDS PAGEゲルを用いた。なお、マウスMUC2に対する抗体はない為、MUC2蛋白の発現は検討できなかった。また、細胞内PKC活性の測定をPk-Select Protein Kinase C Assay Kit (Exalpa Biologicals, Inc., Boston, MA)を用い使用方法に沿って行った。

培地内のTNF- α 濃度の変化をELISAにて検討した。23.4pg/mlから1.5ng/ml TNF- α のスタンダードカーブを作成し、各々の培地内TNF- α 濃度を定量的に測定した。

図 4

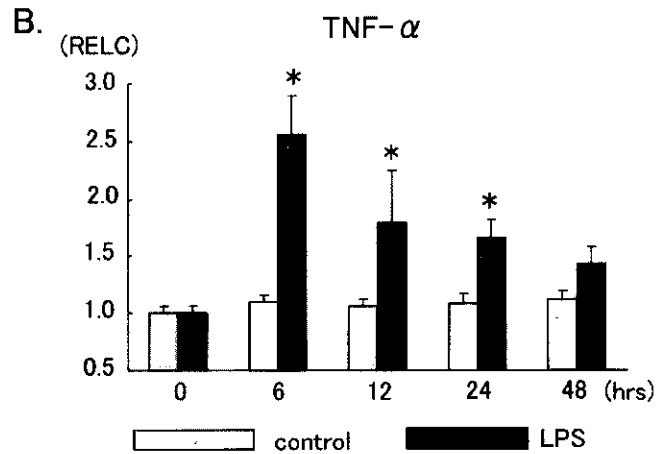
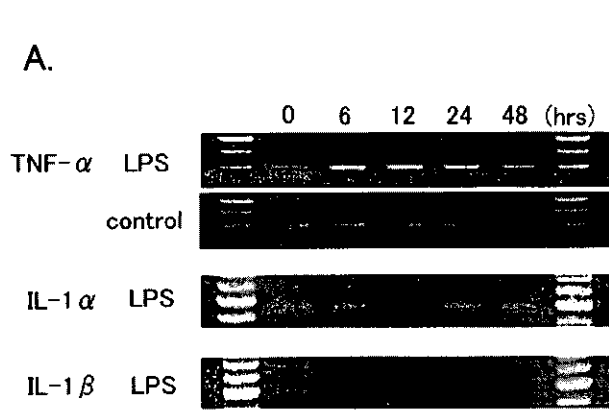
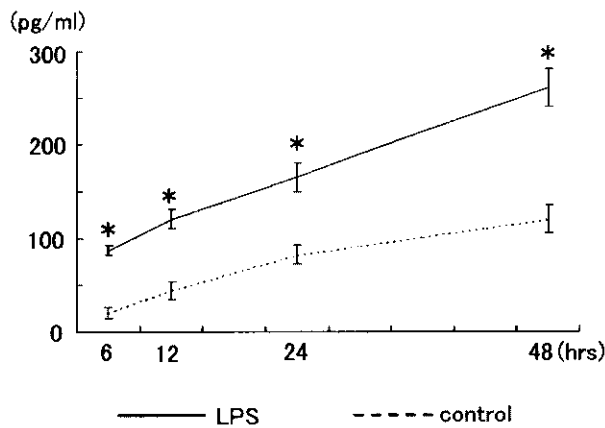


図 5



測定値は平均+標準誤差で表示し、2群間の有意差検定はMann-Whitney U testを用いた。多群間の検定はScheffe's testを用いて検討した。なお、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

C. 研究結果

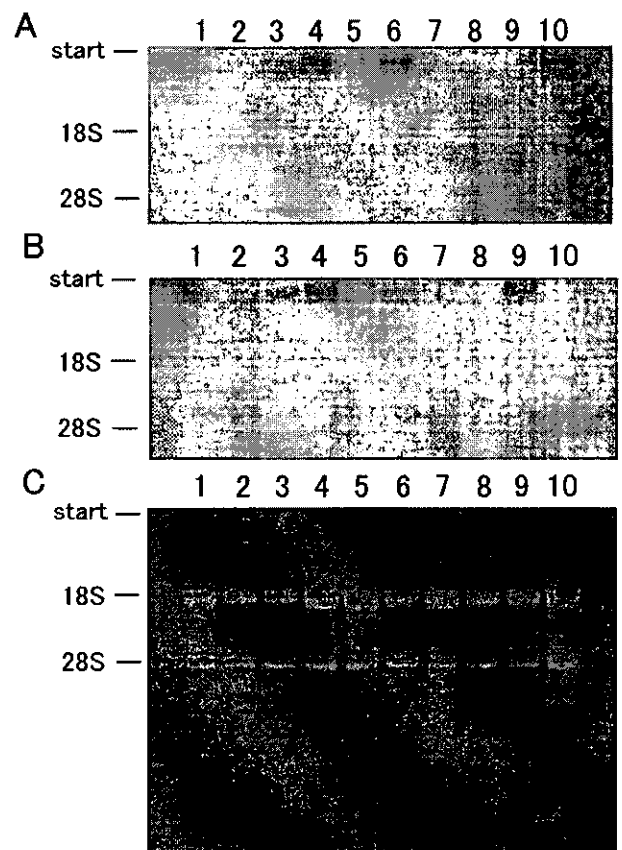
培養胆管上皮におけるCD14、CD120a、CD120bの発現

RT-PCRとウェスタンブロットによりLPSのレセプターであるCD14と、TNFレセプターであるCD120a、CD120bのmRNAと蛋白の発現が確認された(図1)。

LPS刺激によるMUC発現の変化

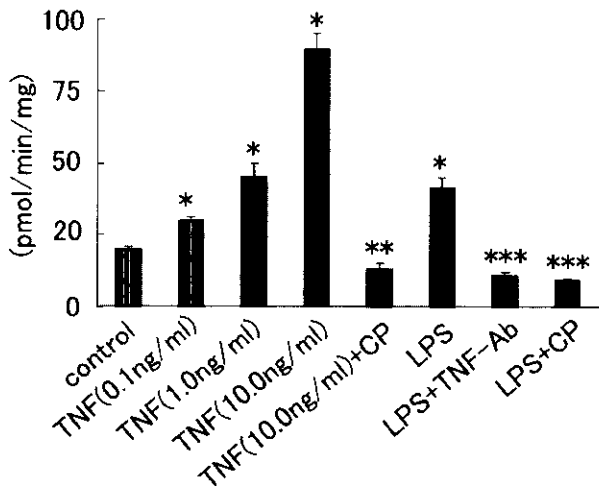
MUCのRT-PCRの結果を図2に示す。通常培地で培養した胆管上皮にMUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC mRNAの発現が確認された。LPS刺激によりMUC

図 6



2、MUC3、MUC5AC mRNAの発現亢進が誘導され、特にMUC2、MUC5ACの発現亢進が著明であった。LPS刺激群のMUC2、MUC5AC発現は非刺激群に比して4倍、5倍に亢進した。LPS刺激でMUC1 mRNAの発現変化は見られなかった。また、TNF- α 阻害により、LPS刺激で誘導されたMUC2、MUC5AC mRNAの発現亢進は有意に抑制された。しかしながらその抑制は完全なものではなく、TNF- α 阻害群でも非刺

図 7



激群と比べるとMUC2、MUC5ACの発現は有意に亢進していた。一方、LPS刺激で誘導されたMUC3の発現亢進はTNF- α 阻害で抑制されなかった。これらの結果よりLPSが誘導するMUC2、MUC5ACの発現亢進はTNF- α を介していると考えられた。

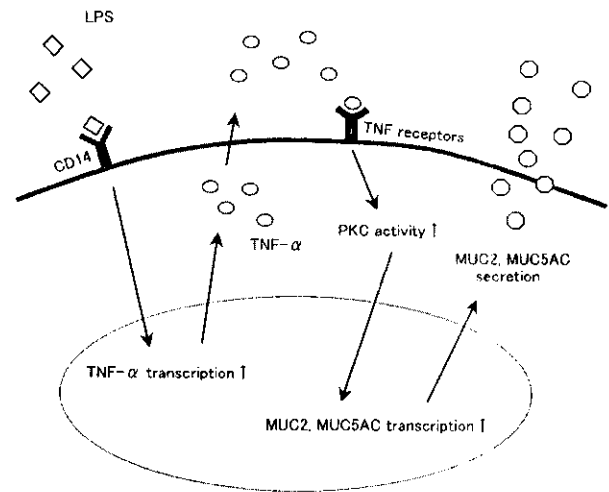
MUC1、MUC3、MUC5ACのウェスタンブロットの結果を図3に示す。LPS刺激によるMUC3、MUC5ACの発現亢進が確認された。一方MUC1の発現に変化は見られなかった。LPS刺激で誘導されたMUC5ACの発現亢進はTNF- α 阻害で抑制されたが、MUC3の発現亢進は抑制されなかった。

LPS刺激によるTNF- α 発現の変化

RT-PCRにより、非刺激群の培養胆管上皮において、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β mRNAの発現が見られた(図4A)。一方、IL-6、IFN- γ mRNAの発現は認められなかった。LPS刺激によりTNF- α mRNAの発現亢進が認められ、経時的に観察したところ、刺激後6時間で最も発現が亢進し、その後発現は減弱した。刺激後6時間、12時間、24時間での発現亢進は、非刺激群に比して有意なものであった(図4B)。IL-1 α 、IL-1 β の発現はLPS刺激により変化しなかった。

ELISA法を用いて、培地内TNF- α 濃度を刺激後6時間から48時間まで経時的に測定したところ、TNF- α 濃度は刺激後6時間から有意に高く、経時的にその濃度はより高くなった。刺激後48時間では非刺激群が120.31+15.32pg/mlであるのに対しLPS刺激群

図 8



では260.52+21.35pg/mlと約2.5倍に濃度が高くなった(図5)。

MUC2、MUC5AC発現亢進過程におけるPKCの関与

MUC2、MUC5ACのノーザンブロットの結果を図6に示す。ノーザンブロットでは、非刺激群、TNF- α (0.1ng/ml) 刺激群でMUC2、MUC5AC mRNAの発現は認められなかったが、TNF- α (1.0ng/ml、10.0ng/ml) ではMUC2、MUC5ACの発現亢進が認められ、TNF- α (10.0ng/ml) でより発現が亢進した。つまり、TNF- α 刺激により濃度依存的にMUC2、MUC5ACの発現が亢進すると考えられた。TNF- α (10.0ng/ml) 刺激にPKC阻害を加えると、TNF- α 刺激で誘導されたMUC2、MUC5ACの発現亢進は抑制された。LPS(100 μ g/ml) 刺激でもMUC2、MUC5AC mRNAの発現亢進が認められ、その発現亢進はTNF- α 阻害、PKC阻害で抑制された。

LPS刺激、TNF- α 刺激によるPKC活性の変化

細胞内PKCアッセイの結果を図7に示す。非刺激群のPKC活性は20.1+0.8pmol/min/mgで、TNF- α 刺激群ではTNF- α (0.1ng/ml) で29.2+1.2pmol/min/mg、TNF- α (1.0 ng/ml) で45.3+4.3pmol/min/mg、TNF- α (10.0ng/ml) で89.9+5.3pmol/min/mgと濃度依存的にPKC活性が有意に亢進した。また、LPS刺激群でもPKC活性は41.4+3.6pmol/min/mgと有意に亢進した。LPS刺激にTNF- α 阻害、PKC阻害を加えると、LPS刺激で誘導されたPKC活性は有意に抑制された。