

D. 考案およびE. 結論

今回の実験より得られた結果をまとめると以下のように要約できる(図8)。培地内に添加されたLPSは培養胆管上皮とCD14を介して反応し、細胞内シグナルを介してTNF- α の転写活性を促し、更にはTNF- α の細胞外分泌が亢進する。培地内に分泌されたTNF- α はautocrine、paracrine的な作用により、培養胆管上皮とTNFレセプタ(CD120a、CD120b)を介して反応する。その後、細胞内PKCの活性化を介して、MUC2、MUC5ACの転写活性が誘導されると考えられた。これらの結果より、生体内においても、胆汁中のLPSが胆管上皮と反応し、TNF- α 産生、PKCの活性化を経て胆管上皮のMUC2、MUC5ACの発現亢進がする可能性が示唆された。この機序が、胆道細菌感染から肝内結石が形成される過程に重要であると考えられた。

細菌感染と、MUC2、MUC5ACの発現亢進は、cystic fibrosis、気管支喘息、滲出性中耳炎の病態形成にも重要と考えられている。更にこれらの疾患ではTNF- α 、PKCもその病態形成に重要と考えられている。気道上皮、鼻道上皮、杯細胞を用いたin vitroの実験では、菌体成分やTNF- α がMUC2、MUC5ACの発現を誘導することが報告され、その過程におけるPKCの関与も報告されている。これらの結果より、気道、鼻道、胆道系の上皮には共通したシグナル伝達経路が存在していると考えられる。

興味深いことに、MUC2とMUC5ACは同様の発現変化のパターンを示した。一方、MUC1、MUC3の発現変化のパターンは異なっていた。近年、MUC2とMUC5ACの遺伝子は染色体11p15.5の400kdの領域に近接して存在することが明らかにされた。また、この領域にはMUC5B、MUC6遺伝子も共存している。更にこれらの遺伝子にはかなりの相同性が確認されている。これら4つのMUCの発現パターンは一致しないが、MUC2とMUC5ACの2つに限れば類似した変化を示すことが知られている。例えば、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)はMUC2、MUC5ACの発現亢進を誘導するが、MUC5B、MUC6の発現は誘導しない。また、PMAやTNF- α でMUC2とMUC

5ACの発現が誘導される過程で、PKCが関与していることも共通している。これらのことより、MUC2、MUC5ACの発現は共通の細胞内シグナルで制御されている可能性が考えられる。

LPS刺激、TNF- α 刺激でMUC2とMUC5ACの発現が誘導される過程で、どのような転写因子が関与しているのかは興味を持たれる。それを推察する上で鍵を握ると思われる配列が、MUC2のpromoter領域に見つかっている。MUC2遺伝子の上流には κ B結合部位が存在する。つまりNF- κ Bによる転写制御を受けている可能性がある。P. aeruginosaによるMUC2の転写亢進はNF- κ Bを介していることが報告されている。今回の実験ではLPSがMUC2の発現を誘導する過程でTNF- α とPKCの関与が考えられたが、TNF- α がNF- κ Bを誘導することはよく知られており、その前段階でPKCが活性化する経路も指摘されている。これらの報告をもとにすると、NF- κ BがMUC2の転写調節因子の1つである可能性が示唆される。また、MUC2遺伝子のpromoter領域にはSp-1を含むSpファミリーの転写因子との結合部位が存在する。ヒトグリオーマ細胞や、ヒト肝細胞癌細胞において、TNF- α 、PKCとSp-1の関係が指摘されている。胆管上皮においてそのようなシグナル経路は刺激されていないが、Sp-1もMUC2の転写調節因子の候補の1つと考えられる。一方、MUC5ACに関しては、その調節因子はいまだ見つかっておらず今後の研究が待たれる。

今回の実験により、グラム陰性菌の菌体成分であるLPSにより培養胆管上皮におけるMUC2、MUC5ACの発現が亢進することが明らかとなった。また、その過程で、TNF- α 産生、細胞内のPKC活性化が関与していると考えられた。この機序が胆道細菌感染と粘液組成の変化を関連づけ、更には肝内結石の形成に重要な役割を担っていると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

JY.Bae, YN.Park, Y.Nakanuma, WJ.Lee, JY.Kim, C.Park

Intestinal type cholangiocarcinoma of intrahepatic large bile duct associated with hepatolithiasis - A new histologic subtype for further investigation. Hepato-Gastroenterology 49(45) : 628-630 2002

T.Shimonishi, Y.Zen, TC.Chen, MF.Chen, YY.Jan, TS. Yeh, Y.Nimura, Y.Nakanuma. Increasing expression of gastrointestinal phenotypes and P53 along histologic progression of intraductal papillary neoplasia of the liver. Hum Pathol 33 (5) : 503-511 2002

Y.Nakanuma, M.Sasaki, A.Ishikawa, W.Tsui, TC.Chen, SF.Hung

Biliary papillary neoplasm of the liver. Histol

Histopathol 17 (3) : 851-861 2002

Y.Zen, K.Harada, M.Sasaki, K.Tsuneyama, K.Katayanagi, Y.Yamamoto, Y.Nakanuma
Lipopolysaccharide induces indces overexpression of MUC2 and MUC5AC in cultured biliary epithelial cells : possible key phenomenon in hepatolithiasis. Am J Pathol 161 (4) : 1475-1484, 2002

T.Kokuryo, T.Yamato, K.Oda, J.Kamiya, Y.Nimura, T.Senga, Y.Yasuda, Y.Ohno, Y.Nakanuma, MF.Chen, YY.Jan, YS.Yeh, CT.Chin, LL.Hsieh, M.Hamaguchi. Profiling of geneexpression associatedwithhepatolithiasisby complementaryDNA expression array. Int J Oncol 22 (1) : 175-179, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

肝内胆管の、肝内結石合併の有無および粘液形質別にみた K-ras遺伝子変異

分担研究者 味岡 洋一

新潟大学細胞機能講座 助教授

研究要旨

肝内胆管癌のK-ras遺伝子変異率が、肝内結石症の有無や癌の粘液形質との関連性を有するかを台湾Chang Gung Memorial Hospitalより供与された肝内結石合併肝内胆管13例と、非合併肝内胆管12例を用い検討した。癌の細胞形質をmucin core protein（MUC2、MUC5AC）および吸収上皮brush borderのmarkerであるCD10を用い免疫染色を行い、固有型（MUC2（-）/CD10（+））、胃（化生）型（MUC5AC（+）/MUC2（-））、腸（化生）型（MUC2+/MUC5AC（-））の3型に分類した。結石の有無別の比較では、肝内胆管癌K-ras遺伝子変異に有意差はなかった。純粋胃型の化生形質を持つものはK-ras遺伝子変異率が低い傾向にあった。癌の化生形質とK-rasを含めた遺伝子異常との関連について、今後の検討が必要と思われた。

A. 研究目的

肝内胆管癌のK-ras遺伝子変異率が、肝内結石症の有無、癌の粘液形質別に異なるかどうかを比較検討した。

する免疫染色を行い、癌の細胞形質を以下の3型に分類した。

- ①固有型：MUC2（-）/CD10（+）
- ②胃（化生）型：MUC5AC（+）/MUC2（-）
- ③腸（化生）型：MUC2+/MUC5AC（-）

B. 研究方法

1) 材料

台湾Chang Gung Memorial Hospitalより名古屋大学第一外科を通じて供与された、肝内結石合併肝内胆管が13例と、非合併肝内胆管が12例。

2) K-ras遺伝子変異の検索

癌を粘液形質（固有型、胃型、腸型、胃・腸型）別に領域分けした。それぞれの領域からmicrodissection法でDNAを抽出し、PCR-RFLP法でK-ras codon 12の変異を検索した。遺伝子変異のintratumoral heterogeneityを考慮し、同一領域でも2カ所以上から別個にDNAを抽出した。

3) 粘液形質分類

mucin core protein（MUC2、MUC5AC）および吸収上皮brush borderのmarkerであるCD10に対

C. 研究結果

1) 結石の有無別のK-ras変異率

結石（+）で31%（4/13）、（-）で50%（6/12）であり、有意差はなかった。

2) 粘液形質別のK-ras変異率

- ①固有上皮型で50%（3/6）、化生上皮型で37%（7/19）であり、有意差はなかった。
- ②固有+胃型で2/2（100%）、純粋胃型で2/11（18%）、胃型+腸型で3/6（50%）であり、3者間で有意差はなかったが、純粋胃型で変異率が低い傾向があった。

D. 考案およびE. 結論

結石の有無別の比較では、肝内胆管癌K-ras遺伝子

変異に有意差はなく、肝内結石の存在による持続性慢性炎症刺激が、K-ras変異と同等の影響を与えている可能性は否定的と考えられる。他方、癌の粘液形質別でもK-ras変異率に有意差は認められなかったが、純粋胃型の化生形質を持つものはK-ras遺伝子変異率が低い傾向にあった。癌の化生形質とK-rasを含めた遺伝子異常との関連について、今後の検討が必要と思われた。

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。

慢性増殖性胆管炎 —新しい病態因子の解析とそれらの治療への応用

分担研究者 田中 直見

筑波大学臨床医学系消化器内科 教授

研究要旨

原発性肝内結石症は東南アジアに多発する難治性疾患である。本症における慢性増殖性胆管炎は肝内胆管癌の病因として重要である。実験的胆汁うっ滞におけるPGE2投与は、慢性増殖性胆管炎類似の変化をきたすことより、アラキドン酸カスケードの活性化によるPGE2産生の増加、PGE2のEP受容体を介する情報伝達は、慢性増殖性胆管炎の病態に重要であると考えられる。本症の胆管炎組織におけるPGE2濃度、COX-2およびEP受容体の発現について解析した。また胆嚢上皮細胞を用いて、PGE2およびEP受容体アゴニスト・アンタゴニストの細胞増殖・機能に与える変化について検討した。臨床標本におけるPGE2濃度はRIA、COX-2は免疫組織化学、EP受容体サブタイプはRT-PCRおよびISHにて解析した。胆嚢上皮細胞（Mz-chA-2）に、PGE2、EP2-4アゴニスト、EP4アンタゴニストを添加して、コロニー形成数、DNA合成、ムチン分泌、増殖関連遺伝子であるc-fos発現に与える影響について解析した。慢性増殖性胆管炎の胆管では、正常胆管に比して、PGE2濃度は有意に高値であった。その過形成上皮および増殖付属腺（粘液腺含む）にCOX-2の強い発現を認めた。同部位においてEP受容体のうちEP2-4サブタイプの発現を認めた。胆嚢上皮細胞におけるPGE2産生はCOX-2発現に依存적であった。またMz-chA-2に対して、PGE2同様にEP4アゴニストは用量依存性に細胞コロニー数、DNA合成、ムチン分泌、c-fos mRNAを増加させた。EP2、3アゴニストでは有意な変化を認めなかった。一方EP4アンタゴニストは、PGE2の効果を用量依存性に抑制した。本症の慢性増殖性胆管炎部位の胆管において、COX-2発現はPGE2産生の増加を引き起こし、PGE2はEP4受容体を介すると考えられる胆管上皮・付属腺の細胞増殖能およびムチン分泌能を促進することより、本症の進展（結石の増大・増加）ならびに肝内胆管癌の発生に深く関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患でありながら、手術後においても遺残結石や結石再発のため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。

慢性増殖性胆管炎は原発性肝内結石症では病理学的に必発の所見であり、同部位においては胆管内外で付属腺（特に粘液腺）が著しく増生し、粘液糖蛋白（ムチン）が大量に分泌される。これら胆管炎ならびにそれに関連した胆道上皮からのムチン過分泌は、肝内結石症の成因に重要な役割を演じていると

考えられる。また一方、厚生省労働省特定疾患「肝内結石症調査研究班」による疫学調査においては、本症の主たる死因は肝内胆管癌であり、本症の約5%に肝内胆管癌が合併していた。本症は肝内胆管癌のハイリスク病変であると考えらる。肝内胆管癌の発生・進展には慢性活動性の胆管炎の反復により、胆管上皮の変性、脱落、再生、そして過形成、発癌へとつながる過程が考えられる。

肝内胆管癌は、今後における本症の重要な予後規定因子になることが予想されることより、慢性増殖性胆管炎の病態因子の解析ならびにこれら因子を標的とした薬物治療は重要であると考えられる。

我々はこれまでの研究において本症における慢性増殖性胆管炎の病態因子として、プロスタグランジンE₂ (PGE₂) とアラキドン酸代謝の活性化因子である分泌型低分子ホスホリパーゼA₂ (以下sPLA₂)の重要性を指摘してきた。今回は、本症の慢性増殖性胆管炎部位の胆管におけるシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)およびプロスタグランジンE受容体(EP)のについても解析を加え、さらに胆道上皮細胞を用いて、PGE₂、選択的COX-2阻害剤、ならびにEPアゴニストまたはアンタゴニストによる生物学的効果について検討をおこなった。

B. 研究方法

対象は原発性肝内結石症14例（男性6例、女性8例）について検討した。

結石近傍の慢性増殖性胆管炎を呈する肝内胆管枝および結石を有さない肝内胆管枝、さらに転移性肝腫瘍症例より得られた正常肝内胆管について、sPLA₂、COX-1、COX-2およびEPサブタイプのmRNAの発

現はRT-PCR法にて解析した。さらにCOX-2およびEPサブタイプについては組織内分布を明らかにする目的にて免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーション法にて解析を行った。組織内PGE₂濃度はRIA法にて測定した。胆道上皮細胞 (Mz-ChA-1・Mz-ChA-2)を用いてCOX-2およびEPサブタイプの発現を解析し、PGE₂、選択的COX-2阻害剤 (celecoxib) ならびにEPアゴニスト (EP2アゴニスト、ONO-AE1-259；EP3アゴニスト、ONO-AE-248；EP4アゴニスト、ONO-AE1-329；EP4アンタゴニスト、ONO-AE3-208；小野薬品株式会社研究所 丸山隆幸博士より提供) による細胞のコロニー形成数、DNA合成、ムチン分泌能に対する影響について解析した。

C. 研究結果

慢性増殖性胆管炎における分泌型低分子ホスホリパーゼA₂、シクロオキシゲナーゼ-2およびプロスタグランジンE受容体の発現

図1は本症の慢性増殖性胆管炎部位の胆管におけ

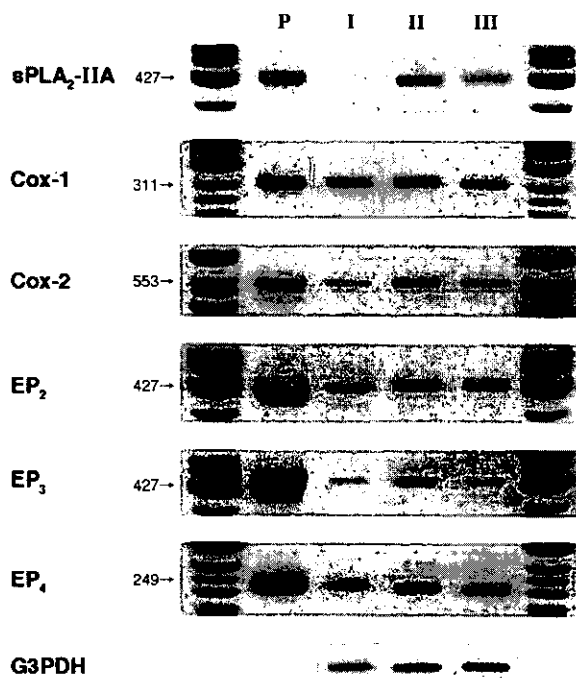


図1

PCR-assisted amplifications of mRNAs of secretory-type group IIA phospholipase A₂ (sPLA₂-IIA), cyclooxygenase (COX) -1, COX-2, prostaglandin E-receptor 2 (EP2), EP3, and EP4 in bile duct tissues. Plasmid vectors into which each objective coding region of human COX-1, COX-2, sPLA₂-IIA, EP2, EP3 and EP4, had already been inserted were used as positive controls. Lane P, positive controls; lane I, a specimen of normal bile duct; lane II, a specimen of bile duct affected by intrahepatic stones; lane III, a specimen of unaffected bile duct. The abundance of G3PDH mRNA was determined as an internal standard. The PCR products were 449 bp in size for sPLA₂-IIA, 309 bp for COX-1, 531 bp for COX-2, 392 bp for EP2, 416 bp for EP3, 212 bp for EP4, and 311 bp for G3PDH.

るsPLA2、COX-1、COX-2、EP受容体サブタイプのmRNAの発現について解析したものである。同部位胆管ではアラキドン酸カスケードの活性化を反映して、sPLA2-IIA-に加えて、誘導型シクロオキシゲナーゼであるCOX-2のmRNAの発現を認め、対照あるいは結石非存在部位の胆管に比して著しく増加していた。

プロスタグランジンE受容体(EP)にはEP1、EP2、EP3およびEP4の4種類のサブタイプが存在することが明らかとなっている。図1に示すように、本症の

慢性増殖性胆管炎部位の胆管におけるEP受容体サブタイプの発現は、EP1を除くEP2、EP3およびEP4のmRNAの発現を認めた。またそれらの発現はsPLA2-IIA、COX-2同様に、対照あるいは結石非存在部位の胆管に比して著しく増加していた。

慢性増殖性胆管炎におけるシクロオキシゲナーゼ-2の免疫組織学的発現

慢性増殖性胆管炎部位の胆管におけるCOX-2蛋白の局在を特異抗体を用いて免疫染色にて解析したところ、その組織内分布は増生した付属腺の腺管上皮

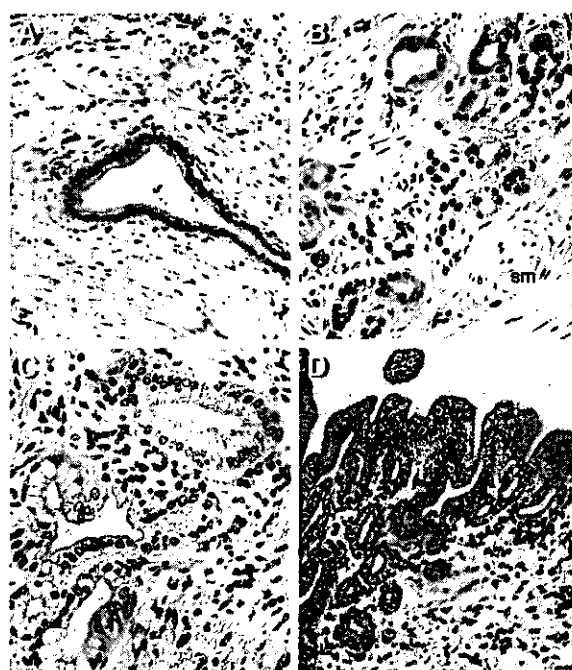


図2

Immunostaining of cyclooxygenase-2(COX-2)in bile ducts.(A) A normal intrahepatic bile duct(original magnification x66).(B) Proliferated intramural glands of the bile duct affected by intrahepatic stones (original magnification x 66). (C) Proliferated intramural glands including mucus of the bile duct affected by intrahepatic stones (original magnification x 132). (D) Hyperplastic epithelia of the bile duct affected by intrahepatic stones (original magnification x 66).

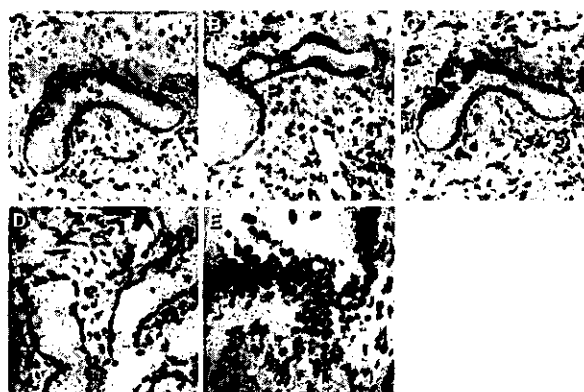


図3

In situ hybridization of prostaglandin E-receptor subtypes (EP2-4) in the bile duct affected by intrahepatic stones in a specimen of resected liver segments from a case of hepatolithiasis. The mRNAs of EP2 (A), EP3 (B), and EP4 (C) subtypes are diffusely expressed in the epithelia of proliferated intramural glands (original magnification x 200). The mRNA of EP4 is also diffusely expressed in the lining epithelia with hyperplastic change (original magnification x 200).

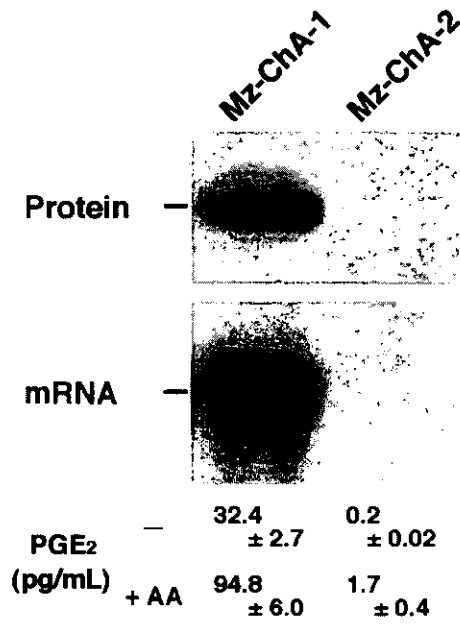


图 4

Expression levels of COX-2 in the Mz-ChA-1 and Mz-ChA-2 cells. COX-2 protein and mRNA were expressed strongly in the Mz-ChA-1 cells but were hardly detectable in the Mz-ChA-2 cells. The Mz-ChA-1 cells were observed to produce significant amounts of PGE₂ in response to treatment with 10 mM of arachidonate, while the Mz-ChA-2 cells were observed to produce only trace amounts. The results are expressed as means \pm SEM, and the experiment was performed in triplicate.

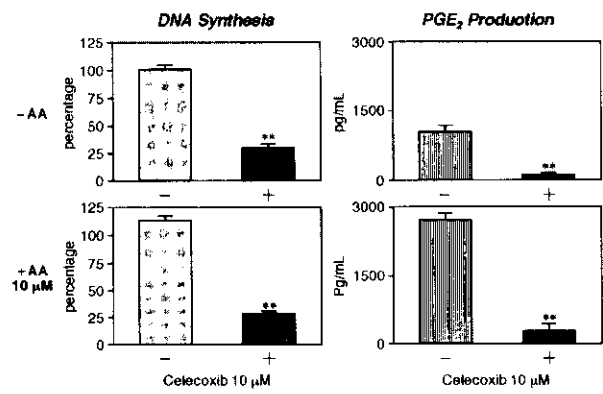


图 5 ** P<0.01

Effect of a selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on DNA synthesis and PGE₂ production in Mz-ChA-1 cells

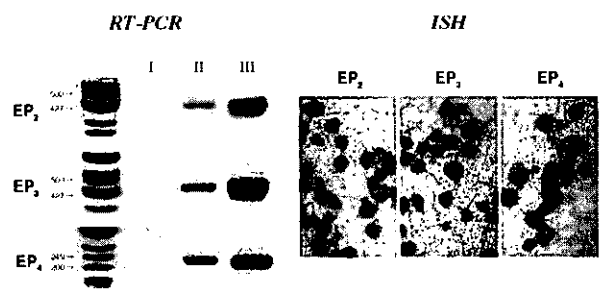


图 6

RT-PCR and in situ hybridization of EP2-4 mRNAs in the Mz-ChA-2 cells. In the RT-PCR, the mRNAs of EP₂, EP₃, and EP₄ are amplified in the cells. Lane I in each panel shows RT-negative controls. Lane II in each panel shows the PCR products of expected size from Mz-ChA-2 mRNA. Lane III in each panel shows the PCR products from positive control cDNAs. In the in situ hybridization, EP₂, EP₃, and EP₄ mRNAs were diffusely and strongly expressed in the cells.

(図2 B)、増生した粘液腺の腺管上皮(図2 C)ならびに胆管の過形成上皮(図2 D)が主体であった。また慢性増殖性胆管炎部位の胆管におけるCOX-2蛋白の染色強度は、正常肝にける胆管上皮に比して有意に増加していた(図2 A)。

慢性増殖性胆管炎におけるプロスタグランジンE受容体の発現 (in situ hybridization)

慢性増殖性胆管炎部位の胆管におけるEP受容体の発現について、EP2、EP3、EP4 mRNAの局在をin situ hybridization法にて解析した。本症の胆管ではEP1を除くEP2、EP3およびEP4のmRNAの発現を認めた。図3はその結果を示したものである。細胞増殖ならびにムチン分泌に重要な役割を演じていると考えられているEPサブタイプの発現は、in situ hybridizationによる解析の結果、慢性増殖性胆管炎においては付属腺の腺管上皮や過形成上皮に一致してEP2、EP3、EP4のmRNAのシグナルを認めた。重要なことはEPサブタイプのmRNA発現はCOX-2と同様に増生粘液腺の腺管上皮および過形成上皮において認められた点であった。

胆道上皮細胞におけるシクロオキシゲナーゼ-2発現と選択的COX-2阻害剤の効果

慢性増殖性胆管炎の胆管において、アラキドン酸カスケードの活性化により産生されるPGE₂が胆管に発現するなどのEPサブタイプと結合し、炎症の進展あるいはムチン過分泌にかかわる情報伝達の経路を形成しているかを同定することは重要である。そこで胆嚢培養細胞におけるCOX-2 mRNAおよび蛋白の発現、PGE₂の産生能について検討した。また慢性増殖性胆管炎における選択的COX-2阻害剤投与の可能性について検討する目的にて、本剤を添加することによるCOX-2活性の抑制が胆嚢細胞増殖におよぼす影響について検討をおこなった。

培養胆嚢上皮細胞(Mz-ChA-1・Mz-ChA-2)について解析したところ(図4)、Mz-ChA-1においてはCOX-2 mRNAおよび蛋白の発現が強度に認められ、それを反映してアラキドン酸添加後の培養液中のPGE₂濃度は高値を呈していた。一方、Mz-ChA-2においてはCOX-2 mRNAおよび蛋白の発現はほとんど認められず、培養液中のPGE₂濃度も低値であった(図4)。

Mz-ChA-1細胞にCOX-2阻害剤として10 mMのcelecoxibを添加したところ、本細胞におけるDNA合成ならびにPGE₂は、アラキドン酸存在下および非存在下の両状況下において有意に抑制された(図5)。

表1

Effect of EP_{2,4}-Selective Agonists and a EP₄-Selective Antagonist on DNA Synthesis, Colony Formation and Mucin Secretion in Biliary Epithelial Cells

	μM	DNA synthesis (% of nontreated cells)	Colony number	Mucin secretion (% of nontreated cells)
No treatment	—	1.00 ± 0.08*	211 ± 12	100 ± 5
PGE ₂	1	2.21 ± 0.19 [†]	390 ± 15 [†]	176 ± 18 [†]
ONO-AE1-259 (EP ₂ -selective agonist)	0.01	1.02 ± 0.09	227 ± 13	106 ± 11
	0.1	1.14 ± 0.12	232 ± 18	105 ± 6
	1	1.15 ± 0.11	237 ± 15	113 ± 10
	10	0.99 ± 0.08	222 ± 10	98 ± 9
ONO-AE-248 (EP ₃ -selective agonist)	0.01	1.09 ± 0.12	228 ± 17	96 ± 5
	0.1	1.02 ± 0.10	216 ± 14	95 ± 8
	1	0.95 ± 0.07	222 ± 11	97 ± 10
	10	0.89 ± 0.11	212 ± 15	89 ± 7
ONO-AE1-329 (EP ₄ -selective agonist)	0.01	1.23 ± 0.13	260 ± 13 [†]	107 ± 6
	0.1	1.68 ± 0.18 [†]	356 ± 16 [†]	125 ± 10 [†]
	1	1.93 ± 0.19 [†]	407 ± 18 [†]	155 ± 18 [†]
	10	1.12 ± 0.14	283 ± 12 [†]	104 ± 7
PGE ₂ (1 μM) + ONO-AE3-208 (EP ₄ -selective antagonist)	0.01	1.79 ± 0.18 ^{††}	180 ± 16 [†]	100 ± 8 [†]
	0.1	1.36 ± 0.13 ^{††}	161 ± 17 ^{††}	85 ± 13 [†]
	1	1.31 ± 0.15 ^{††}	141 ± 12 ^{††}	69 ± 10 ^{††}
	10	1.33 ± 0.13 ^{††}	143 ± 13 ^{††}	75 ± 12 [†]

*Values represent means ± SEM of quadruplicate wells.
[†]P < 0.05 significantly different from nontreated cells.
^{††}P < 0.01 significantly different from nontreated cells.
[‡]P < 0.01 significantly different from PGE₂-treated cells.

胆道上皮細胞におけるプロスタグランジンE受容体の発現と受容体アゴニスト、アンタゴニストの効果

EPアゴニストまたはアンタゴニストの生物学的効果についてMz-ChA-2細胞を用いて検討をおこなった。Mz-ChA-2細胞は内因性のPGE2の発現がほとんど認められないため、内因性に高いPGE2発現が認められるMz-ChA-1細胞と比較した場合、添加したPGE2あるいは各アゴニストの効果がより正確に反映されるものと考えられた。図6はMz-ChA-2における各EPmRNAの発現をRT-PCRおよびin situ hybridization法にて解析した結果である。胆嚢癌組織同様にEP2、EP3、EP4mRNAの発現が認められたが、いずれも同程度の発現であった。EP1 mRNAの発現は認められなかった。in situ hybridizationにおいてもEP2、EP3、EP4mRNAが癌細胞にびまん性に認められた(図6)。

Mz-ChA-2細胞におけるPGE2、EP2、EP3、EP4アゴニスト、EP4アンタゴニスト添加による生物学的効果について、コロニー形成数、DNA合成およびムチン分泌能の点より検討した。

培地にPGE2 1 μ Mを14日間添加することにより、Mz-ChA-2細胞のコロニー数、DNA合成、ムチン分泌能は、コントロールと比較して有意に増加した(表1)。また培地にEP2、EP3、EP4アゴニストを14日間添加したところ、EP4アゴニストにおいてのみMz-ChA-2細胞のコロニー数、DNA合成、ムチン分泌能の増加が認められた。これらの変化は1 μ M添加まで用量依存性であった(表1)。一方PGE2およびEP4アンタゴニスト添加をおこなったところ、Mz-ChA-2細胞におけるコロニー数、DNA合成、ムチン分泌能はコントロールと比較して1 μ M添加まで用量依存性に減少した(表1)。これらの実験結果より、胆嚢上皮細胞におけるPGE2の生物学的効果はEP4を介することが強く示唆された。

D. 考案

今回の解析結果より、本症の結石存在部位(慢性増殖性胆管炎)の胆管では、アラキドン酸代謝の活性化に重要であるsPLA2-IIAおよびCOX-2の発現誘

導認められ、また産生されたPGE2の情報伝達に重要であるEPサブタイプのEP2、EP3、EP4の発現も胆管上皮および付属腺や粘液腺上皮において発現が増加していることが明らかとなった。これらの因子の活性化はいずれも慢性増殖性胆管炎の発生および進展に重要であり、胆管上皮の増殖性変化、あるいはムチン過剰分泌の病態因子であると推測された。

本症の胆管上皮では誘導発現されたsPLA2-IIAを始めとする分泌型低分子PLA2が胆汁中に分泌され、胆汁中リン脂質を加水分解し、遊離アラキドン酸を産生する。遊離したアラキドン酸は胆管上皮に吸収され、PGE2合成のためのCOX-2の基質となる。このようにして産生されたPGE2は胆管上皮の炎症機転に関与し、さらに胆管上皮に発現するEPサブタイプを介する情報伝達により、胆管上皮の増殖機転やムチン産生の増加と分泌を引き起こすものと推測された。

本研究において得られた重要な所見は、培養胆嚢上皮細胞を用いてPGE2のEP2、EP3、EP4を介した生物学的効果について考察した点である。一般にプロスタノイドが生体反応を起こすためには個々のプロスタノイドが細胞膜上に存在する特異的な受容体への結合が必要である。PGE2の受容体に関しては、現在までにEP1~EP4までの4種類がクローニングされている。PGE2が細胞の生物学的活性の変化(増殖促進、アポトーシスの抑制、炎症性細胞活性化の抑制による免疫能低下、増殖因子の誘導など)に関与しているならば、標的細胞の表面にいずれかのEPの存在が不可欠であると考えられる。今回の研究成績からは、慢性増殖性胆管炎における胆管上皮あるいは付属腺上皮では、sPLA2-IIAおよびCOX-2を介して産生されたPGE2がEP4の活性化を介して情報伝達をおこない、胆管上皮の増殖性変化、あるいはムチン過剰分泌を引き起こし本病態を引き起こしている可能性が示唆されたことである。PGE2のコロニー数、DNA合成、ムチン分泌能の増加がEP4アンタゴニストにより抑制されたことは、本剤が慢性増殖性胆管炎の治療薬として有用性が示唆され興味深い。選択的COX-2阻害剤の胆嚢上皮細胞におけるDNA合成およびPGE2産生能の抑制効果を考えると、選択的COX-

2阻害剤とEP4アンタゴニスの併用は、本症の慢性増殖性胆管炎に対する有用な治療薬になる可能性が示唆される。

慢性増殖性胆管炎に関連した肝内胆管癌発生の問題に言及すると、PGE2またはEP4アンタゴニストによる胆嚢上皮細胞の増殖能亢進の背景には、転写因子複合体であるAP-1を構成する蛋白遺伝子が誘導され、細胞増殖が起こるものと考えられている。我々の成績においても、このAP-1を構成する蛋白遺伝子の一つであるc-fos遺伝子の発現亢進が、PGE2のEP4を介した胆嚢上皮細胞の増殖機転の一機序であると推測される。EP4の活性化は核内におけるc-fos遺伝子の転写活性を上昇させ、このc-fos遺伝子の発現亢進が胆嚢上皮細胞のコロニー数の増加を起こしたものと考えらる。慢性増殖性胆管炎の慢性炎症に関連する胆道発癌においても、選択的COX-2阻害剤やEP4アンタゴニスが抑止的に働くものと予想される。

慢性増殖性胆管炎に対する新しい分子標的治療を視野に入れた今後の研究の発展に期待したい。

E. 結論

原発性肝内結石症における慢性増殖性胆管炎の病態因子には、分泌型低分子ホスホリパーゼA 2 (sPLA2-IIA)、シクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) およびプロスタグランジンE受容体サブタイプ (特にEP4) が重要であると考えられた。将来的に選択的COX-2阻害ならびにEP4アンタゴニストは、本症の病態因子を標的にした治療薬として有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

田中直見、正田純一：肝内結石症の成立機序、Annual Review 消化器2003、戸田剛太郎、税所宏光、寺野彰、幕内雅敏編集、p50-55、2003、中外医学社（東京）

田中直見、安部井誠人：胆嚢疾患（胆石症・胆嚢炎）、病気と薬のガイド2003、薬局 54(1)：1001-1007、2003
田中直見、吉田正：生活習慣病としての胆道疾患、消化器セミナー89、生活習慣病としての消化器疾患—最近の趨勢とその予防、p185-191、2002、へるす出版（東京）

川本徹、正田純一、田中直見：胆石症・胆嚢炎と Helicobacter species (spp.)、肝胆膵 45(1)：15-19、2002

田中直見：胆嚢炎・胆管炎（原発性硬化性胆管炎を含む）、検査値から読む病態と診断計画、臨床医 28；1394-1395、2002

田中直見：胆嚢結石、外来診療のすべて、高久史磨総監修、p452-453、2003、medical View（東京）

田中直見：胆石症、内科学、第8版、p1176-1179、2003、杉本恒明、小俣政男、水野美邦総編集、朝倉書店（東京）

田中直見：胆道系の炎症（胆嚢炎、胆管炎、原発性硬化性胆管炎）、内科学書、島田馨責任編集、p1929-1932、2002、中山書店（東京）

田中直見：胆汁酸と胆石溶解薬、内科-100年のあゆみ（消化器）、日本内科学会雑誌91(2)：552-555、2002

田中直見：胆道疾患、内科学レビュー2003、酒井紀、早川弘一、西崎統、小林祥泰、福井次矢監修、p120-125、2003、総合医学社（東京）

田中直見：X線透過性胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p225、2003、医学書院（東京）

田中直見：含気性胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p440、2003、医学書院（東京）

田中直見：嵌頓胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p486、2003、医学書院（東京）

田中直見：原発性総胆管結石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p758、2003、医学書院（東京）

田中直見：合流部結石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p844、2003、医

学書院（東京）

田中直見：黒色石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p856、2003、医学書院（東京）

田中直見：コレステロール胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p901-902、2003、医学書院（東京）

田中直見：混合石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p906、2003、医学書院（東京）

田中直見：再発結石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p928、2003、医学書院（東京）

田中直見：色素胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1000、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆汁漏出、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1588、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆石症、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1593、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆石溶解療法、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1593、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆道感染、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1597、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆道細胞診、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1597、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆道内圧測定法、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1597-1598、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆道内視鏡検査、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1598、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆道内視鏡超音波検査、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1598、

2003、医学書院（東京）

田中直見：胆嚢炎、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1599、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆嚢コレステローシス、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1599、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆嚢胆管結石症、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1600、2003、医学書院（東京）

田中直見：胆嚢捻転、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1600、2003、医学書院（東京）

田中直見：チフス性胆嚢炎、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1619、2003、医学書院（東京）

田中直見：デブリ、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p1713、2003、医学書院（東京）

田中直見：ビリルビンカルシウム石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p2095、2003、医学書院（東京）

田中直見：浮遊胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p2161、2003、医学書院（東京）

田中直見：無症状胆石1、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p2381、2003、医学書院（東京）

田中直見：迷入胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p2389、2003、医学書院（東京）

田中直見：陽性胆石、医学書院医学大事典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨総編集、p2472、2003、医学書院（東京）

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許取得：申請中
2. 実用新案登録 特になし

酸性ムチンによる結石の生成

研究協力者 佐々木 睦男

弘前大学第二外科 教授

研究要旨

これまでわれわれは肝内結石症の成因として胆汁中高分子ムチンすなわち分子量20-50万の α -グリコシド糖鎖を有するムチン型酸性糖タンパク質の存在が結石形成に大きな影響を与えていると考えた。すでに以前の予備実験では肝内結石症胆汁にこの精製ムチンを添加しカルシウム存在下に38°C、48hインキュベートすると黒褐色の色調の胆砂様胆汁が多量に発生する。この物質の赤外吸収分析ではビリルビンの吸収が認められた。この事実から胆汁中高分子ムチンが結石形成に深く関わっていることが知られた。今回同じ高分子酸性ムチンであるブタ胃ムチンを用い結石形成の有無を検討した。

高分子酸性ムチンとしてブタ胃ムチンを10mg、肝内結石症胆汁を45ml、 β グルクロニダーゼ10U、塩化カルシウム10mg/dl（最終濃度）を混合し38°C 48hインキュベートした。その後3500rpmで10分にて遠心後、上清を廃棄し再び胆汁、 β グルクロニダーゼ塩化カルシウムを加えて再びインキュベートした。この操作を3回繰り返し生成物を観察した。黄褐色の沈殿が生成された。色調はインキュベートの回数にしたがい濃度が増加していった。この沈殿生成はタンパク分解酵素、酸、アルカリ、メルカプトエタノールにより抑制された。またカルシウム濃度に依存して増加する傾向があったがそれ以上では沈殿量は一定となる。胆汁中の酸性ムチンとブタの胃粘膜ムチンはその性状や糖鎖の長さが異なり全く同一とはいえない。しかし、実験の結果からは胆汁中酸性ムチンと同様の胆砂様物質の生成が認められた。したがって、結石の生成には酸性ムチンが重要な役割をしていると考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症は数次にわたる治療にもかかわらず長期間にわたり再発を繰り返す難治性疾患である。この肝内結石症発生の病態を明らかにすることは治療法を開発する上できわめて重要であると考えられる。これまで、われわれは肝内結石症患者胆汁中にはきわめて多量の酸性ムチン型糖タンパク質が含まれており、この酸性ムチンがビリルビンカルシウム結石形成にきわめて重要になることを報告してきた。今回はこのムチン糖タンパク質と構造が類似するウシ胃酸性ムチンが肝内結石症胆汁中で凝集力を持つかどうかを検討した。

B. 研究方法

酸性ムチン糖タンパク質としてはその構造が類似するウシ胃ムチン糖タンパク質を用いた。また胆汁は肝内結石症患者の胆汁を用いた。胆汁45mlに対しムチン糖タンパク質10mgを混合、最終カルシウム濃度10~100mg/lとなるように調整し38°C48時間インキュベートし沈殿、結石の有無を検討した。また、生成物に対し赤外吸収分析をおこなった。さらに、結石生成過程で酸、アルカリ、還元剤、蛋白分解酵素を加えこれらの結石生成への影響を観察した。すなわち、酸としては塩酸を最終的にpH 2となるように添加した。アルカリは水酸化ナトリウムを最終pH 12となるように添加調整した。還元剤としては1%、

2-メルカプトエタノールを用い還元した。蛋白分解酵素としてはアクチナーゼEを用いた。

C. 研究結果

胆砂状の茶褐色の沈殿が形成された(図1)。沈殿量はカルシウム濃度に依存し増加した(図2)。しかし、一定濃度以上では沈殿量に変化はなかった。赤

図1. 沈殿物の冷凍乾燥

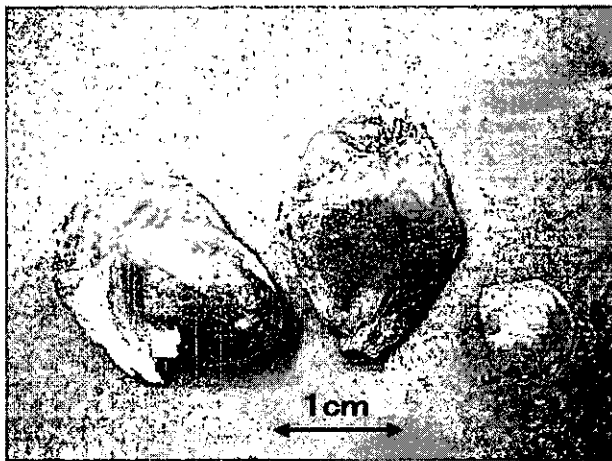
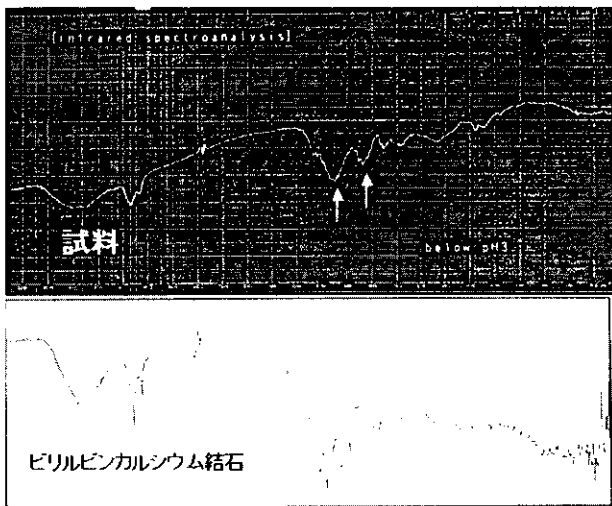


図3. ムチン糖タンパク質沈殿物の赤外吸収分析



外吸収分析ではビリルビンカルシウムに吸収が認められた(図3)。沈殿は酸性、アルカリ環境、還元剤、蛋白分解酵素で抑制された(図4、5)。

D. 考案およびE. 結論

酸性ムチン型糖タンパク質は胆汁中できわめて強い凝集力を発揮し胆砂様沈殿を生じさせた。また生

図2. 沈殿量とカルシウム濃度 (1)

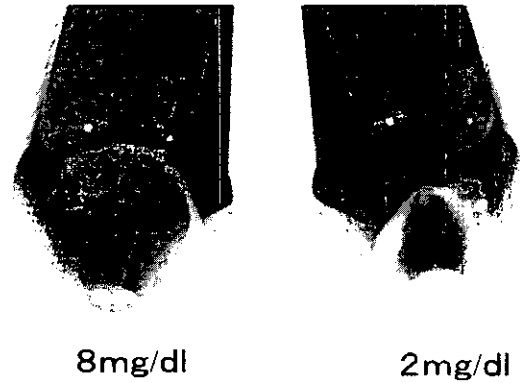


図4. 酸・アルカリの凝集に対する影響

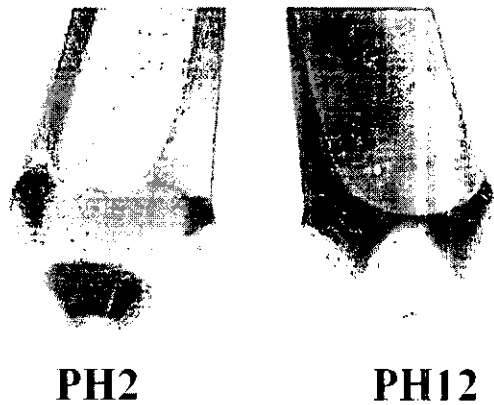


図5. 沈殿とタンパク分解酵素



成された沈殿はビリルビンカルシウム石と類似した赤外吸収を有していた。肝内結石症の結石生成にはこの酸性ムチン糖タンパク質がきわめて重要な役割を担っていると考えられた。また結石形成の中心がこの酸性ムチン糖タンパク質であることから結石の抑制を考えた場合、この糖タンパク質を分解並びにその高次構造の変化させることで胆石生成を抑制されうると考えられた。これらの薬剤として塩酸、水酸化ナトリウム、2-メルカプトエタノール、アクチナーゼEを用いてこの酸性ムチン糖タンパク質の分解を試みた。その結果、胆石生成抑制として酸、アルカリ、還元剤、蛋白分解酵素によるムチンの分解が有効である可能性が高いと考えられた。今後はこれらの薬剤のうち生体にとって無害のものを検定していくことが重要となってくると思われた。

F. 研究発表

佐々木睦男、吉原 秀一、袴田 健一、鳴海 俊治
胆道拡張症に対する肝外胆道切除 手術 56巻1279/
1284、2002

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 plasmapheretic cross circulation using a high performance semipermeable membrane. *Hirosaki Med J* 53 : 104-110, 2002

佐々木睦男 胆道・胆嚢機能検査 今日の消化器疾患治療指針第2版、多賀須幸男、他（編）、医学書院、東京、819-820頁、2002年

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

肝内コレステロール結石の生成抑制効果の実験的検討

主任研究者 跡見 裕
杏林大学医学部第一外科 教授

研究要旨

肝内コレステロール結石の生成に対する選択的COX2阻害剤（JTE-522）の効果について検討した。実験動物を2群に分けた。コントロール群（n=6）は高コレステロール食を5週間連続投与した。一方、JTE-522群（n=6）では高コレステロール食を5週間連続投与すると同時に選択的COX2阻害剤を連日経口投与した。以後、屠殺して全肝胆道組織、胆嚢を鏡検し、胆汁と血液は生化学的に検査した。

コントロール群では全例で肝内コレステロール結石が観察されたが、JTE-522群では1/6（17%）と、有意に検出率が低い結果となった。コントロール群では胆管内の粘液網が全例に観察され、JTE-522では5/6（83%）に認めた。両群において胆汁中コレステロール値に差はなかった。血液生化学的検査の結果、コントロール群では高コレステロール食の投与後にリン脂質、総コレステロール値、ホスホリパーゼA2値が有意に高値を呈したが、JTE-522群では投与前後に有意差はなかった。胆嚢内結石はコントロール群では全例に観察され、JTE-522群では1/6（17%）であった。一方、胆嚢胆汁を位相差顕微鏡で観察したところ、コントロール群では全例に、JTE-522群では4/6（66%）にコレステロール結晶が観察された。高コレステロール食と同時に選択的COX2阻害剤を投与することによって、肝内コレステロール結石生成が有意に抑制された結果となった。また、選択的COX2阻害剤は胆汁や脂質代謝に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。

A. 研究目的

最近、食生活の欧米化、高カロリー・高コレステロール化によって胆道感染とは関連のない肝内コレステロール結石の存在が注目されている。特に近年はその罹患率の増加が指摘され、注目度が高まりつつある。この疾患は従来から代謝異常の関連性が指摘されている。われわれはプレリードッグを用いた肝内コレステロール結石の実験モデルを確立した。われわれは、高コレステロール食を投与することで初期の段階から結石形成に先立って胆管上皮の粘液産生細胞増加および著明な粘液産生亢進が認められ、結石形成に大きく関与していることを証明した。粘液と結石形成の関連については以前から胆嚢コレステロール結石実験モデルで指摘されている。その機序のひとつとして、コレステロール食によって胆管

胆汁内のホスホリパーゼA2活性が増加し肝細胞膜上でのリン脂質代謝異常によりリン脂質から脂肪酸（アラキドン酸、リノール酸）が遊離されるためにプロスタグランジンE2（PGE2）が増加し、さらにPGE2を介して胆嚢上皮での粘液合成・分泌が亢進し、胆嚢コレステロール結石の生成が促進される、というものがある。これら一連の流れは、非ステロイド系消炎鎮痛剤（NSAIDs）のアスピリンやインドメサシンによってPGE2の産生を抑制することで胆嚢コレステロール結石の生成が抑制されると報告されている。また、PGE2の産生抑制についての最近のトピックスとして、NSAIDsの一種である選択的COX-2（cyclooxygenase2）阻害剤の役割が注目されている。本研究では、肝内コレステロール結石モデルを用いて、選択的COX2阻害剤を投与することで胆管内での粘液産生抑制、肝内および胆嚢内のコレステロ

ール結石の生成抑制があるか否かを比較検討することが目的である。

B. 研究方法

1. 動物モデル作成

プレリードッグ12頭を6頭ごとに2群に分けた。

1) コントロール群（コレステロール単投与群）の作成方法

高コレステロール飼料(1.2%重量のコレステロールを含有)を5週間にわたって投与した後、ケタミン麻酔下で開腹し、屠殺して肝胆道系を一括摘出して実験に供した。

2) JTE-522（選択的COX2阻害剤）投与群の作成方法

選択的COX2阻害剤はJTE-522(日本たばこ産業株式会社)を使用した。

JTE-522群は、コントロール群と同様に高コレステロール飼料を5週間投与すると同時に、連日JTE-522を30mg/kg経口強制投与後、屠殺して肝胆道系を一括摘出して実験に供した。

全肝胆道組織、胆嚢を鏡検し、胆汁と血液は生化学的に検査した。

2. 標本の評価

1) 結石形成、粘液網形成

標本は10%ホルマリン固定後パラフィンで包埋し全肝組織を切片にした。HE染色の他、コロイド鉄染色(粘液染色)を行なった。両群において、肝組織内の肝内コレステロール結石および粘液網の総数と、これらが観察された動物数とを比較検討した。

2) 胆嚢結石の形成および胆嚢胆汁分析

胆嚢内のコレステロール結石形成の有無や胆嚢胆汁内のコレステリン結晶の析出の有無について検討した。また、屠殺と同時に胆汁を採取し胆汁中の総ビリルビン値、総コレステロール値、リパーゼ値、トリプシン値、アミラーゼ値について測定した。

3) 血液データの検討

両群のコレステロール食投与前およびコレステロール投与後(屠殺直前)に採血し、両群における、血中の総ビリルビン値、総コレステロール値、中性

脂肪値、リン脂質値、ホスホリパーゼA2値、PGE2値を検討した。

C. 研究結果

1. 肝内結石の生成

コントロール群では6頭中6頭に計294個の肝内コレステロール結石が観察された。一方、JTE-522群では6頭中1頭(17%)にのみ23個の肝内コレステロール結石が観察され、JTE-522群で有意に肝内結石形成が抑制された($p=0.015$)。

2. 粘液網の形成

コロイド鉄染色の結果、粘液産生細胞数の増加にともない胆管内の粘液量も増加していた。これらの粘液は網状の粘液網を形成していた。コントロール群では6頭中6頭に計104個、またJTE-522群では6頭中5頭(83%)に計27個の粘液網が観察された。

3. 胆嚢結石の形成

コントロール群では6頭中6頭に1から3mm大の黄色の胆嚢内コレステロール結石が多数形成された。一方、JTE-522投与群では6頭中1頭(17%)にのみ胆嚢内コレステロール結石が形成され、有意に結石形成が少ない結果となった($p=0.015$)。

4. 胆嚢胆汁中のコレステリン結晶析出

胆嚢胆汁を位相差顕微鏡にて観察したところ、両群において胆汁中のコレステリン結晶の析出を認めた。コントロール群では6頭中6頭に、またJTE-522群では6頭中4頭(67%)にコレステリン結晶が観察された。

5. 胆嚢胆汁分析

胆嚢胆汁の総ビリルビン値、総コレステロール値、リパーゼ値、トリプシン値、アミラーゼ値について測定したが、両群間に差は認めなかった。

6. 血液生化学的検討

コレステロール食投与前と投与後の血液生化学データについてみると、コントロール群では、血中リン脂質値、総コレステロール値、ホスホリパーゼA2値が投与後で有意な上昇を認めた。一方JTE-522群では、全項目に関してコレステロール食投与前と投与後有意差はなかった。両群における投与後のデータ

を比較すると、コントロール群では血中リン脂質値、総コレステロール値、ホスホリパーゼA2値がJTE-522群に比して有意に高い結果となった。

D. 考案およびE. 結論

高コレステロール食と同時に選択的COX2阻害剤を投与することによって、肝内コレステロール結石生成が有意に抑制された結果となった。両群において、

粘液網が形成された動物数には有意差はなかったが、観察された粘液網の総数はコントロール群よりもJTE-522群の方が少ない結果となった。この結果から、JTE-522群を投与することで粘液産生が抑制され、結石形成が抑制されたものと考えられた。

胆嚢胆汁内のコレステリン結晶が析出した動物数については、両群間で有意差はなかったが、JTE-522群では結石形成率が低い結果となった。両群間での胆汁内コレステロール値に差がなかったことから、

表 1 :

	コントロール群 (n=6)	JTE-522 群 (n=6)	Fisher 検定
肝内コレステロール結石	6 / 6 (294 個)	1 / 6 (23 個)	p=0.015
粘液網	6 / 6 (104 個)	5 / 6 (27 個)	p=0.5
胆嚢結石	6 / 6	1 / 6	p=0.015
胆汁コレステリン結晶	6 / 6	4 / 6	p=0.455

表 2 : 胆嚢胆汁分析

	コントロール群	JTE-522 群	T 検定
総ビリルビン(mg/dl)	5.2 ± 3.6	19.6 ± 20.2	n.s.
総コレステロール(mg/dl)	313 ± 92	322 ± 80	n.s.
リパーゼ(IU/l)	20 ± 15	5 ± 3	n.s.
トリブシン(ng/ml)	111 ± 77	191 ± 206	n.s.
アミラーゼ(IU/l)	88 ± 55	134 ± 81	n.s.

表 3 : 血液生化学的検討(t 検定)

		コントロール群	JTE-522	コントロール 群の前後比較	両群間の比較
総ビリルビン (mg/dl)	Pre	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.4		
	Post	0.3 ± 0.1	1.0 ± 1.9		
中性脂肪 (mg/dl)	Pre	107 ± 86	267 ± 359		
	Post	146 ± 65	258 ± 405		
リン脂質 (mg/dl)	Pre	308 ± 131	334 ± 126	p=0.028	p=0.005
	Post	810 ± 158	513 ± 132		
総コレステロール (mg/dl)	Pre	168 ± 75	205 ± 106	p=0.0001	p=0.004
	Post	786 ± 187	402 ± 172		
ホスホリパーゼ A2 (ng/dl)	Pre	64 ± 9	62 ± 19	p=0.024	p=0.032
	Post	89 ± 21	60 ± 19		
プロスタグランジ ン E2 (pg/ml)	Pre	55 ± 11	20 ± 19	p=0.043	p=0.0001
	Post	26 ± 9	16 ± 6		

胆汁中のコレステロールは抑制されてはおらず、胆汁内にコレステリン結晶が析出されるものの、胆汁内の粘液産生が抑制されていたために結石形成に至っていない可能性が考えられた。

コントロール群では高コレステロール食投与によって血中リン脂質値、総コレステロール値、ホスホリパーゼA2値が有意に高値を示したが、JTE-522群ではコントロール群に比べて高コレステロール食投与の影響が弱いことから、JTE-522が胆汁や脂質代謝に何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられた。現在、さらに検討中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

杉山政則、泉里友文、阿部展次、正木忠彦、森俊幸、跡見裕
胆管結石症の治療：急性膵炎を合併した総胆管結石の治療
外科64：910-915、2002

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし

経口胆道鏡による肝内胆石症の治療と長期予後

研究協力者 露口 利夫

千葉大学大学院腫瘍内科学 助手

研究要旨

経口胆道鏡による肝内胆石症の治療成績および長期予後を検討し、臨床的有用性を明らかにする。1987年8月から1998年7月までに当教室にて経口胆道鏡による治療を行った肝内胆石症36例。長期予後の検討は治療後の経過追跡が得られた34例を対象とした。内視鏡はOLYMPUS社製親子方式経口胆道鏡を用いた。砕石には主にEHLを使用し、内視鏡下に砕石困難な症例に対してはESWLを使用した。胆道鏡通過困難な狭窄に対してバルーンカテーテルによる拡張術を施行した。再発症は胆石の再発もしくは発熱、黄疸、腹痛といった胆管炎症状の出現を認めた場合とした。完全截石率は63.9%だった。完全截石症例における再発症率は21.7%であった。経過中2例（5.9%）に肝内胆管癌の発生を認めた。非侵襲的かつ繰り返し治療の行える経口胆道鏡は肝内胆石症の治療に有用であると考えられた。

A. 研究目的

肝内胆石症は西欧諸国に比べ、わが国を含めた東アジアにおいて罹患率の高い疾患であり、全胆石症患者の1.7%から53.5%に認められるとの報告がある。本症は未だ成因が解明されておらず、その複雑な病態から治療法も多岐にわたっている。肝内胆石症の治療は今なお肝切除術をはじめとする外科的治療が主体となっている。しかし胆石が肝両葉や多区域にまたがり存在する場合には肝切除のみでは対処できず、また高齢者や合併症を有するため耐術不能な症例も少なくなく、現在では術後胆道鏡や経皮経肝胆道鏡を応用し、可能な限り侵襲度の低い治療を行う方向にある。当科では1987年より肝内胆石症に対し経口胆道鏡による治療を主として行っている。そこでその治療成績と長期予後について述べる。

B. 研究方法

1987年8月から1998年7月までに内科的治療を希望し当科を受診した肝内胆石症患者36例を対象とし

た。男性20名、女性16名、平均年齢は59歳、平均観察期間は93ヶ月であった。病型分類規約による結石所在部位の内訳は肝内外型（IE）24例、肝内型（I）12例、両葉型（LR）17例、左葉型（L）10例、右葉型（R）9例であった。当教室では肝内胆石症を診断上の難易や臨床像の相違から左右肝管を肝内胆管第一次分枝として、肝内胆管第一次～第二次分枝に胆石が存在する主肝管型、肝内胆管第三次分枝あるいはそれ以上の末梢分枝に胆石が存在する末梢肝管型の二型に分類している。対象36例中、主肝管型が31例、末梢肝管型が5例であった（表1・図1）。

図1. 当科における胆石所在部位における分類



主肝管型



末梢肝管型