

表 1. 対象

男女比	20:16
平均年齢	59.1 歳 (33-81)
平均観察期間	93 ヶ月 (14-164)
胆石存在部位	IE 24 例 I 12 例 LR 17 例 L 10 例 R 9 例 主肝管型 31 例 末梢肝管型 5 例

表 2. 胆道鏡 (子スコープ) の仕様

機種	全長	有効長	外径	鉗子口径	最大彎曲角	視野角
CHF-B20	2190mm	1870mm	4.5mm	1.7mm	UP160° DOWN110°	75°
CHF-BP30	2190mm	1870mm	3.4mm	1.2mm	UP160° DOWN130°	90°

胆道系手術の既往を22例で認めた。胆嚢摘出術20例、胆管切開術7例、乳頭形成術3例、肝切除術1例、胆管十二指腸吻合術1例であった。

胆道鏡の通過が困難な胆管狭窄を11例に認め、このうち6例に胆道系手術の既往を認めた。

乳頭形成術が行われている場合を除き、あらかじめ内視鏡的乳頭切開術を施行した。切開範囲は当教室において胆管胆石に対して行っている小切開法を基本とし、十二指腸粘膜下層までにとどめた。内視鏡はオリンパス社製親子方式経口胆道鏡を使用した。胆道鏡は1992年まではCHF-B20を、1993年からは現在のCHF-BP30を使用した。親スコープは胆道鏡外径に合わせTJF-M20、TJF10をそれぞれ使用した(表2)。すべての症例で消化管蠕動抑制のためN-ブチルスコポラミン20mgもしくはグルカゴン0.5mgの投与、鎮静剤としてジアゼパム5mgを用いた。また胆管炎予防目的にて抗生剤の投与を行うとともに症例によっては終了後6Frないしは7.2FrのNBtubeを適宜胆管内に留置した。

◆胆管狭窄部の治療

胆道鏡の通過困難な胆管狭窄に対し、2種類のバルーンカテーテルを用いた拡張術を施行した。径6mm長さ4cmのDotter balloon (Wilson-Cook社製)と径7mmもしくは10mm、長さ4cmのOlbertカテーテ

ル (Boston Scientific社製) をガイドワイヤー誘導下に用い、4~6気圧で3分間の拡張を行った。胆道鏡の通過をもって拡張成功とした。

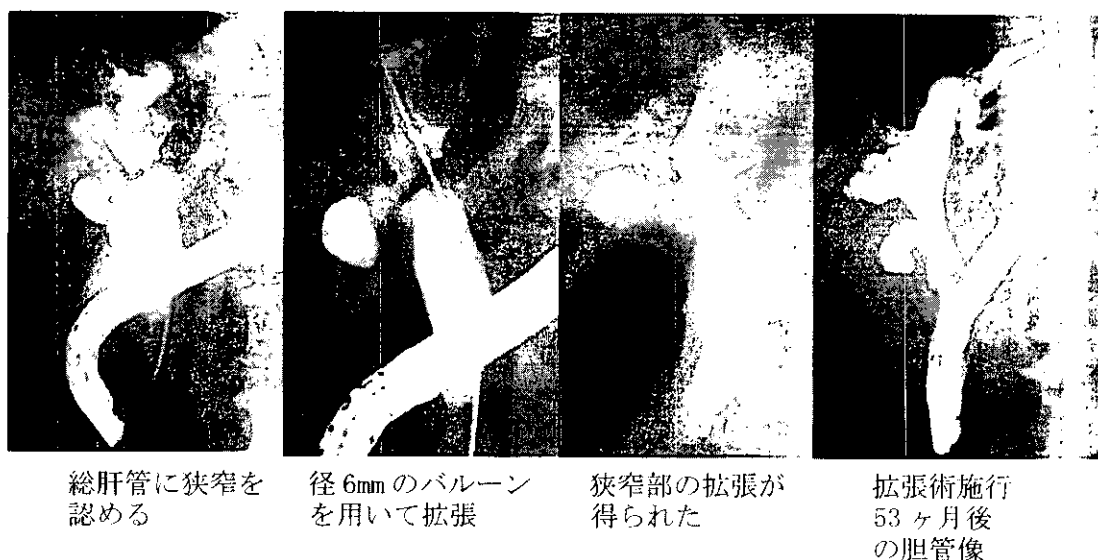
◆碎石術

胆道鏡下碎石にはEHLを主に使用した。Northgate社製SD-1を用い、3Frプローブにより、通電条件55~70V、0.5秒反復照射とした。1996年からは同じくNorthgate社製AUTOLITHを用い、1.9Frプローブにより、出力0.53~0.57Jで1.0秒反復照射とした。Nd:YAG laserは1症例のみに使用した。F-P dyelaserは3症例に用いたがクォーツファイバーの操作性が悪く肝内二次分枝での碎石は不十分であり、EHLを併用した。内視鏡的に碎石困難な症例に対してはESWLを利用した。碎石装置にはEDAP社製ピエゾ効果方式装置LT-01を使用した。

◆予後調査

経口胆道鏡、選択的胆管造影、CT、腹部超音波にて治療効果判定を行った。外来通院可能な症例においては3ヶ月から6ヶ月毎の超音波検査と血液生化学検査を行った。遠隔地在住のため来院できない症例に対しては外来主治医に電話で問い合わせるか、患者に直接手紙を送付しアンケート調査を行った。再発症は上腹部痛、白血球上昇を伴う発熱、黄疸などの胆管炎症状を呈したもの、もしくは胆石の再発

図 2. 経乳頭的バルーン拡張術



を以て定義した。

◆統計学的手法

データはStatview for Windows Ver.5.0 (SAS Institute Inc) を用い解析した。累積非再発症率はKaplan-Meier法を用い、Log-rankテストにて $p < 0.05$ を以て統計学的に有意と判定した。

C. 研究結果

肝内胆石症36例に対し延べ161回の経口胆道鏡治療を行った。平均治療回数は4.5回であった。

◆碎石結果

30例で碎石術を必要とした。内訳はEHL単独15例、ESWL単独が4例、Nd:YAG laserが1例、EHL+ESWLが7例、EHL+F-P dye laserが2例、EHL+ESWL+F-P dye laserが1例であった。いずれもバスケットによる除去や自然排出に十分な碎石効果が得られたが、プローブやクォーツファイバーの耐久性や操作性において改善の余地があった。

◆截石結果

経口胆道鏡治療を行った36例中23例 (63.9%) において完全截石に成功した。少なくとも主肝管部の胆石除去に成功した部分截石例は4例 (11%) であった。截石不成功であった9例のうち、6例は右後区域枝や左外側区域 (特にB3) という胆道鏡の挿入が困難な部位に胆石を有するため主肝管部胆石の除

去が出来なかった症例であり、残りの3例は高度な狭窄のため拡張術が行えなかった症例であった (表3、4)

◆狭窄拡張結果

胆道鏡通過困難な狭窄を認めた11例に対し、拡張術を施行した。8例において平均2.4回の手技にて拡張に成功した (図2)。不成功に終わった3例はいずれも狭窄を正面視することができず拡張術を行うことができなかった。

◆合併症

1例 (2.8%) においてEHL施行時に胆管粘膜損傷に伴う胆道出血を認めたが、出血は少量であり保存的治療で軽快した。胆管穿孔や輸血を要するような出血などの重篤な合併症は認めなかった。

◆長期成績

POCSにより截石が不成功に終わりPTCSLによる截石を行った1例と転居のため経過を追うことの出来なかった1例を除く34例における長期経過を検討した。(平均観察期間93ヶ月)完全截石の得られた患者の78%で再発症を認めなかった。再発症を認めた5例のうち結石再発を認めなかった1例は抗生剤投与による保存的治療で改善した。結石の再発を認めた4例はいずれも総胆管胆石であり、3例はbasketにて排石したが、1例は肝内胆管癌の合併を認めたため外科転科の上肝切除術を施行した。完全截石例における累積再発症率は164ヶ月で21.7%であった。

表 3. 截石結果

Results	Subtype		Total	
	主肝管型	末梢肝管型	No.	%
完全截石	20	3	23	63.9
部分截石	4	0	4	11.1
截石不成功	7	2	9	25.0
Total	31	5	36	100

表 4. 截石不成功例 9 例の検討

胆石存在部位	胆管狭窄	狭窄部位	程度	拡張回数	結果
左肝管・右後区域	あり	左肝管	S2		不成功
左肝管	あり	左肝管	S2		不成功
右後区域	あり	右後区域	S1		不成功
右葉全体	あり	総肝管	S1	1	成功
両葉全体	なし				
左外側・右後区域	なし				
左外側・右前後区域	なし				
左外側・右後区域	なし				
左外側区域	なし				

部分截石に終わった4例のうち1例は総胆管胆石再発による胆管炎を認めたが、残りの3例は再発症を認めなかった。部分截石例における累積再発症率は120ヶ月で25%であった。

截石不成功に終わった7例は140ヶ月経過時点で全例再発症を認め、完全截石例に比べ統計学的に有意に高率であった(表5・図3)。経過中2例(5.9%)で肝内胆管癌の発生を認めた。症例はいずれも主肝管型であり、完全截石が得られた1例は1年後に、部分截石に終わった1例も無症状で経過していたが6年後に癌の発生を認めた(表6)。

D. 考案

肝内胆石症に対する治療の主たる目的は胆石の完全排石と再発防止のための胆汁鬱滞解除にある。そ

のため狭窄部胆管を含んだ肝切除をはじめとする外科的治療が今なお主体となっている。しかし、肝切除は侵襲が大きく、基礎疾患を有する患者や胆石が多区域にまたがっている症例では対処できない場合もあり、現在では術後胆道鏡や経皮経肝胆道鏡などを応用し、可能な限り切除範囲を縮小する傾向にある。

肝外胆石に対する経口胆道鏡の有用性はこれまでも述べられているが肝内胆石における有用性の報告はほとんどない。経口胆道鏡治療は侵襲度も低く、さしたる合併症もなく安全な治療法である。今回の検討でも治療に伴う合併症は2.8%であり、経皮胆道鏡治療に比べ明らかに低い結果であった。また、

内視鏡的乳頭切開術により一度経乳頭的ルートが確立されれば、繰り返し長期にわたり治療を行うことができ、胆石が再発した場合でも容易に截石が可

図3. POCS 治療後累積非再発症率

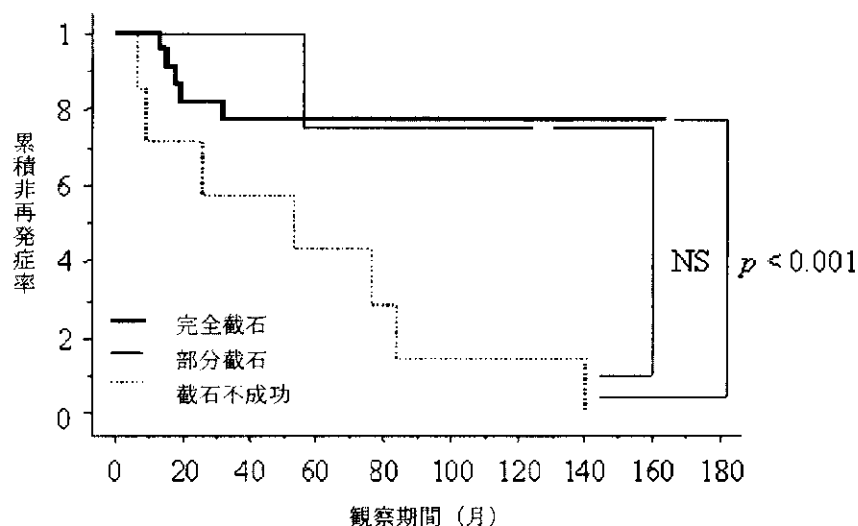


表5. 長期成績

	完全截石 (n=23)	部分截石 (n=4)	截石不成功 (n=7)
長期成績			
胆管炎症状なし・結石再発なし	18 (78.3)	3 (75)	0
胆管炎症状あり・結石再発なし	1 (4.3)	0	1 (14.3)
胆管炎症状なし・結石再発あり	4 (17.4)	0	2 (28.6)
胆管炎症状あり・結石再発あり	0	1 (25)	4 (57.1)
肝内胆管癌	1	1	0
死亡	4	2	2
平均観察期間 (月)	95.9	79.7	92.3

表6. 肝内胆管癌発症症例

	胆石存在部位	截石結果	肝葉萎縮	発生までの期間
症例1	主肝管型 両葉型	完全截石	なし	1年後
症例2	主肝管型 左葉型	部分截石	なし	6年後

表 7. PTCSL 長期成績

	症例数	完全截石率 (%)	合併症率 (%)	再発率 (%)	観察期間 (月)
Jan YY, et al.	48	83.3	14.5	40.0	84
Yeh YH, et al.	165	80.0	28.5	32.6	72
Otani K, et al.	28	96.4	21.4	54.3	120
Lee SK, et al.	92	80.0	10.9	22.0	60

能であるとともに微細な胆石の自然排石が可能となり、再発症の予防もできるという利点がある。経口胆道鏡は肝内2次分枝までは比較的容易に挿入可能であるものの、解剖学的に分岐角度が急峻な右後区域枝や左外側下区域枝への挿入は困難な場合が多い。截石不成功例9例のうち6例は同部位に胆石の存在する症例であった。今回の検討で完全截石率は64%であった。完全截石率では経皮胆道鏡に劣るものの再発症率は164ヶ月で21.7%であり、経皮胆道鏡の成績に遜色のないものであった(表7)。当科では以前、肝内胆石症に対する自然経過例における長期遠隔成績の検討で、末梢型肝内胆石症の予後は良好であり、主肝管型に比べ再発症も少なかったと報告した。しかしながら今回の検討で主肝管部胆石除去に成功した部分截石例(末梢肝管に胆石遺残)は截石不成功例に比べ再発症率は低い傾向にはあったが、明らかな有意差は認めなかった。

経過中34例中2例(5.9%)で肝内胆管癌の発生を認めた。2例はいずれも主肝管型の症例であり、治療中、US、CT、胆管造影、狭窄部における生検、ブラシ細胞診のいずれにおいても肝内胆管癌の合併を示唆する所見は得られなかった。肝内胆石症患者における肝内胆管癌の発生頻度は2.4~10%と報告されているが、確定診断が困難な場合も多く、原因不明な貧血や体重減少などの臨床症状を含め、CT、MRIなどの各種modalityを駆使した嚴重な経過観察が必要と考えられる。

E. 結論

肝内胆石症に対する経乳頭的治療は、乳頭切開による逆行性胆管炎に対する危惧などから、経皮的治療に比べほとんど行われていないのが現状である。しかし今回の我々の長期にわたる検討において、経口胆道鏡治療は截石率では劣るものの、完全截石に成功した症例では良好な予後が得られており、非侵襲的かつ長期にわたり繰り返し治療できるという利点からも肝内胆石症に対する治療法として有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

露口利夫、税所宏光：胆嚢炎、胆管炎。Annual Review 消化器2002。341-345。戸田剛太郎、税所宏光、寺野彰、幕内雅敏編集、中外医学社

露口利夫、税所宏光：碎石術(EHL・レーザーを中心に)。胆膵内視鏡治療の実際—より安全な処置法を目指して—。73-80。田尻久雄、藤田直孝編集、日本メディカルセンター。

露口利夫、税所宏光：親子方式経口胆道鏡によるEHLおよびレーザー碎石。最新消化器内視鏡治療：187-190、先端医療技術研究所、2002

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし

当科における肝内結石症の病型・ 術式の時代変遷と治療法の検討

研究協力者 海野 倫明
東北大学大学院 消化器外科学分野 講師

研究要旨

肝内結石症は病態が複雑で治療に難渋し、良性疾患のため臨床経過が長く、近年の診断・治療法の進歩により長期予後と比較し難い。今回過去40年間の自験193例（肝切84例、非肝切109例）について病型と術式の時代変遷を考察し、現在の治療適応を検討した。近年の症例は診断技術の向上により、発症早期に発見される症例が多く、片葉型、肝内狭窄型の割合が増え肝切除術で根治し得る症例が増加した。さらに両葉型であっても拡大胆管切石術に頼らざるを得なかった時代から内視鏡的切石術の進歩に伴い遺残結石の頻度も大幅に減少していた。以上より本症の長期予後改善には、切石と積極的な肝切除による胆汁鬱滞肝の除去が必要不可欠であることが示唆された。本症の治療には結石の除去と胆汁鬱滞の解除を目指した肝切除を積極的に考慮し、各症例の病態に即した最適な治療法を選択することが最も重要である。

A. 研究目的

肝内結石症（本症）は稀な疾患であるが、その病態は複雑でありしばしば再発・再燃を繰り返すためその治療には難渋する難治性の疾患である。本症における結石の種類は色素結石、特にビリルビンカルシウム石（ピ石）が多いことから、その成因には胆汁うっ滞と細菌感染が関係していると考えられている。このため本症の治療にあたっては、その病因、病態に即した適切な治療法を選択することが再発・再燃の予防につながると考える。

脂肪酸カルシウム石3例（1.6%）であった。本症においてはピ石がほとんどであることは、その成因に細菌感染を伴った胆汁うっ滞が密接に関与していることを示唆する。

また本症では胆管の拡張・狭窄や分岐異常などの複雑な胆管形態を認めることが多いが、実際には正常胆管より拡張しているものの通過障害を思わせるような“見かけ上”の狭窄部つまり相対的狭窄を認

B. 研究方法および C. 研究結果

本稿では肝内結石症の手術術式の時代変遷ならびに現在における外科治療特に肝切除術の適応について述べる。

1. 肝内結石症の病態と病型分類

当科で1961年から2001年までに経験した肝内結石症例は193例であり、その結石種類を見るとピ石が174例（90.2%）、黒色石7例（3.6%）、混合石9例（4.7%）、

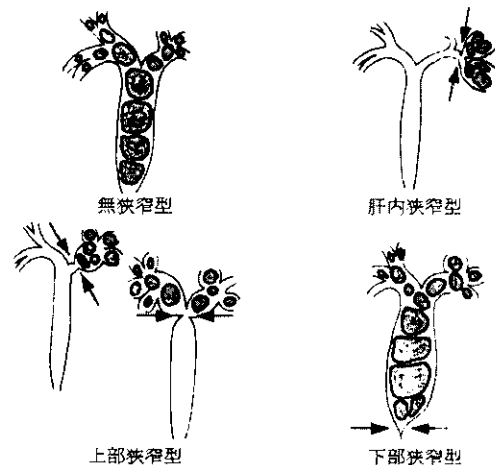


図1 当科における肝内結石症の病型分類
矢印は狭窄部位を示す。

めることもある。この状況は胆汁の流れに大きな影響を及ぼすことから、われわれは真の狭窄と同様に考えている。本症は上記の如き複雑な病態を示すため、適切な治療を行うためにはいくつかの病型に分類した方が病態の把握の上で有用である。一般的には結石の所在部位別にみたLR病型（肝葉左右型）やIE型（肝内外型）が用いられるが、われわれはさらに狭窄の有無による分類を加えて分類している（図1）。すなわち肝内にも肝外にも狭窄は見あらず、瀰漫性に胆管が拡張した無狭窄型、肝内胆管内に狭窄があり、その末梢が限局性に拡張している肝内狭窄型、左右いずれかの肝管もしくは総肝管に狭窄があり、一側の肝内胆管あるいは両側の肝内胆管が瀰漫性に拡張している上部狭窄型、下部胆管特に膵内胆管および十二指腸乳頭部に狭窄がある下部狭窄型の4型である。

2. 病型および術式の時代変遷

本症の長期予後をみる上で特に問題になることは、良性疾患であるために、その臨床経過は長く、さらに近年の診断法や治療法の進歩がめざましいため、すべての症例を同一の条件で比較することが非常に困難であるということである。そこでわれわれは当教室における本症の病型と術式の時代変遷を検討した。

対象は前述した如く1961年から2001年までに経験した本症手術例193例である。そのうち肝切除例（肝切除例）は84例、肝切除術非施行例（非肝切除例）は109例であった。教室における本症の手術方法としては、

表1 肝内結石症の基本手術

1. 主術式（結石の摘出・除去）
1) 拡大胆管切開による切石術 （症例により内視鏡的切石術併施）
2) 肝切除術
2. 付加手術
1) T-チューブドレナージ術
2) 十二指腸乳頭括約筋形成術
3) 胆管消化管吻合術
4) 胆道再建術

結石の摘出・除去のための「主術式」として拡大胆管切開による切石術および肝切除術に大別され、胆汁うっ滞を解除するための「付加手術」としてT-チューブドレナージ術、胆道再建術、胆管消化管吻合術、十二指腸乳頭括約筋形成術が行われている（表1）。

病型の時代変遷の特徴は、無狭窄型や下部狭窄型などのいわゆる積み上げ型の肝内結石症症例が1960年代には78.4%、70年代には51%と多くを占めていたが最近では著明に減少したことである。一方、肝内狭窄型、上部狭窄型は1970年代からそれぞれ25.5%、23.7%を占めていたが、1980年代にはそれぞれ31.4%、31.4%と増加した。特に1991年以降では肝内狭窄型が56.3%を占めている（表2）。

表2 病型の時代変遷

年代	病型	無狭窄型	肝内狭窄型	上部狭窄型	下部狭窄型	計
1961~1970		25 (49.0)	3 (5.9)	8 (15.7)	15 (29.4)	51
1971~1980		17 (28.6)	15 (25.5)	14 (23.7)	13 (22.0)	59
1981~1990		12 (23.5)	16 (31.4)	16 (31.4)	7 (13.7)	51
1991~2001		4 (12.5)	18 (56.3)	6 (18.8)	4 (12.5)	32
計		58	52	44	36	193

(): %

これを結石所在部位別にみると、1960年代には肝内外型（IE）が84.3%を占めたが1970年代からは肝内型（I）が増加し1980年代には49.0%、1990年代には62.5%を占めるに至った。また肝外に結石が多数存在するIE型、IE型は年代ごとに減少の一途をたど

表3 結石所在部位の時代変遷（肝内外型）

年代	病型	I	IE	IE	IE	計
1961~1970		8 (15.7)	19 (37.2)	11 (21.6)	13 (25.5)	51
1971~1980		18 (30.5)	19 (32.2)	16 (27.1)	6 (10.2)	59
1981~1990		25 (49.0)	16 (31.4)	9 (17.6)	1 (2.0)	51
1991~2001		20 (62.5)	1 (3.1)	8 (25.0)	3 (9.4)	32
計		71	55	44	23	193

(): %

り、1990年代にはわずか4例のみとなった(表3)。

肝葉左右型でみると1960年代は左右両葉型(LR)が37.3%を占めたが1970年代以降では左葉型(L)が44.1%と著明に増加し、1980年代には56.8%、1990年代には40.6%となった。L型とR型の片葉型は1960年代には31.3%、1970年代には52.6%、1980年代には78.4%、1991年以降では62.5%と増加を示した(表4)。

表4 結石所在部位の時代変遷(肝葉左右型)

年代	病型					計
	L	R	LR	LR	LR	
1961~1970	9 (17.6)	7 (13.7)	19 (37.3)	11 (21.6)	5 (9.8)	51
1971~1980	26 (44.1)	5 (8.5)	18 (30.5)	7 (11.8)	3 (5.1)	59
1981~1990	29 (56.8)	11 (21.6)	8 (15.7)	2 (3.9)	1 (2.0)	51
1991~2001	13 (40.6)	7 (21.9)	6 (18.8)	6 (18.8)	0 (0)	32
計	58	49	46	45	38	193

(): %

術式の時代変遷についてみると、肝切除例は1960年代には9例(17.6%)であったのに対し1970年代では26例(44.1%)、1980年代では28例(54.9%)、1990年代では21例(65.6%)と著明に増加した(表5)。

表5 肝切除例の病型の時代変遷

年代	病型				計
	無狭窄型	肝内狭窄型	上部狭窄型	下部狭窄型	
1961~1970	3/25 (12.0)	1/3 (33.3)	3/6 (37.5)	2/15 (13.3)	9/51 (17.6)
1971~1980	1/17 (5.9)	14/15 (93.3)	10/14 (71.4)	1/13 (7.7)	26/59 (44.1)
1981~1990	4/12 (33.3)	15/16 (93.8)	7/16 (43.8)	2/7 (28.6)	28/51 (54.9)
1991~2001	2/4 (50.0)	14/18 (77.8)	3/6 (50.0)	2/4 (50.0)	21/32 (65.6)
計	10/58	44/52	23/44	7/38	94/193

肝切除例/全症例

肝切除術の内訳をみると外側区域切除術が42例と最も多く、次いで左葉切除が31例に施行され、右葉切除と後区域切除はそれぞれ8例、3例に行われた。すなわち肝切除術は左葉に関連したものが73例(86.9%)と大部分を占めた。これらの結果は時代とともに片葉型あるいは肝内狭窄型が増加していることを反映していると思われる。

一方、肝切除術の増加と逆相関して拡大胆管切開による切石術は減少傾向を示しているが、これには肝切除を必要としない症例においては、内視鏡的切石術が多用されるようになってきたことも一因と考えられる。また、1970年代は上部狭窄型に対し14例中10例(71.4%)に肝切除術が施行されてきたが、1980年代は16例中7例(43.8%)で、その比率は1970年代比して減少の傾向にあり、積極的に肝温存を図った結果であると考えられた(表6)。

表6 主術式の推移

年代	病型	肝切除術				胆管狭窄型による切石	その他	計
		右葉切除	後区域切除	左葉切除	外側区域切除			
1961~1970		0 (0)	0 (0)	5 (9.6)	4 (7.8)	40 (82.4)	0 (0)	51
1971~1980		3 (5.1)	0 (0)	12 (20.3)	11 (18.7)	33 (51.9)	0 (0)	59
1981~1990		1 (2.0)	2 (3.9)	10 (19.6)	15 (29.4)	23 (45.1)	0 (0)	51
1991~2001		4 (12.5)	1 (3.1)	4 (12.5)	12 (37.5)	5 (24.6)	3 (9.4)	32
計		8	3	31	42	106	3	193

(): %

肝切除術施行例における退院時の遺残結石の推移をみると、時代とともに遺残結石の頻度は減少しており、1991年以降はわずかに2例(9.5%)にみられたのみであった(表7)。これは片葉型や肝内狭窄型の増加のみならず、診断技術あるいは内視鏡的切石術などの治療法の進歩によるところが大きい。

表7 退院時遺残結石の推移および結石所在部位(肝切除例)

年代	遺残あり	結石所在部位				
		L	LR	LR	LR	R
1961~1970 (n=9)	5 (55.6)	1 (11.1)	2 (22.2)	2 (22.2)	0 (0)	0 (0)
1971~1980 (n=26)	6 (23.0)	0 (0)	3 (11.5)	2 (7.7)	0 (0)	1 (3.8)
1981~1990 (n=28)	7 (25.0)	4 (14.3)	2 (7.1)	1 (3.6)	0 (0)	0 (0)
1991~2001 (n=21)	2 (9.5)	1 (4.8)	1 (4.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	20	6	8	5	0	1

数字: 症例数, (): %

3. 肝内結石症の遠隔成績

当科で手術を行った本症症例に対し遠隔成績の調査を行ったところ、121例(肝切除例54例、非肝切除例67

例) から回答が得られた。遠隔時死亡例は肝切例で16例 (21.9%)、非肝切例で30例 (30.0%) であった。死因は肝切例では肝癌5例、肝硬変3例、胆管癌2例、その他6例であった。非肝切例の死因は胆管癌が5例と最も多く、次いで肝癌、肝硬変、食道静脈瘤破裂、肝膿瘍、肝不全がおのおの2例、化膿性胆管炎1例、その他14例であった。肝切例での肝癌による死亡例5例はいずれも手術時に輸血を受けていた。また、肝切例では胆管癌の合併が非肝切例より少ない傾向にあった。いずれにしても肝胆道系疾患による死因が60%程度を占めていた。

遠隔時の自覚症状では、肝切例では生存38例中微熱を4例 (10.5%)、腹痛1例 (2.6%) に認めたが黄疸は認めなかった。その他、難治性瘻孔、肝膿瘍、創部感染を各1例ずつに認めた。一方、非肝切例では生存37例中微熱1例 (2.7%)、腹痛2例 (5.4%) にみられ、黄疸はみられなかった。日常生活面から遠隔成績を検討すると、肝切例では遠隔成績良好例は30例 (78.9%)、やや良好が8例 (21.1%) であり不良は認めなかった。一方非肝切例では良好例は34例 (91.9%)、やや良好が3例 (8.1%) であり不良例は認めなかった。

D. 考案

近年の治療法の進歩により本症に対する治療は多岐にわたっており、適切な治療法の選択には時として難渋することがある。本症の再発率は約23%であり、本症に多く合併する肝内胆管癌の合併頻度は約5%である。

本症における遠隔時の死亡例をみると癌以外の胆道系疾患に起因する死亡例のほとんどは、肝硬変あるいはそれに伴う肝不全によるものと推察されるが、それらの症例の80%以上は1970年代以前の症例であ

った。この時代は両葉型が多いため、拡大胆管切開切石術に頼らざるを得ず、その結果遺残結石や十分な切石と胆汁うっ滞の解除が充分ではなかった可能性があり、本症の長期予後の改善の獲得には、切石と胆汁うっ滞の解除が必要不可欠であることを示している。近年の症例は診断技術の向上により、発症早期に発見される症例が多く、片葉型、肝内狭窄型の割合が増え肝切除術で根治し得る症例が増加した。さらに両葉型であっても内視鏡的切石術の進歩に伴い遺残結石の頻度も大幅に減少している。

E. 結論

本症の治療に際しては結石の除去と胆汁うっ滞の解除を目指して、個々の症例の病態に即した最適な治療法を選択することが最も重要である。

F. 研究発表

小野川徹、鈴木正徳、海野倫明、片寄 友、竹内丙午、松野正紀：肝内結石症の治療-肝切除を伴う外科治療の適応。肝胆膵；45 (2)：269-273、2002
海野倫明、近藤典子、阿部高明、小野川徹、藤原耕、安達尚宣、鈴木正徳、松野正紀：胆汁酸トランスポーター機構の変化—LST/OATPファミリーの機能と転写調節。肝胆膵；43 (6)：1021-1027、2002
海野倫明、藤原 耕、佐藤武揚、大塚英郎、安達尚宣、近藤典子、小野川徹、鈴木正徳、松野正紀：胆汁酸の腸肝循環を担う有機アニオントランスポーターの発現と機能。消化と吸収；24 (1)：52-57、2002

G. 知的財産権の出願登録状況

特になし

ラット胆管上皮に対する アデノウイルスベクターを用いたp53遺伝子導入

研究協力者 本田 和男

愛媛大学医学部外科学第一 助教授

研究要旨

ラット胆管炎モデルにアデノウイルスベクターを用いてp53遺伝子を発現させ胆管上皮の増殖性変化を比較検討した。まずラットの十二指腸を切開し経乳頭的に5-0ナイロン糸を胆管に挿入、留置することにより、ラットの胆管炎モデルを作成した。ラット胆管炎モデル作成時にアデノウイルスベクター（AxCAp53、AxCALacZ）を 3×10^8 P.F.U.投与した。投与後3、7日目にラットを犠牲死させ胆管組織を採取し非投与群と比較検討した。結果 外来遺伝子の発現を確認するため、抗ヒトp53マウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。AxCAp53投与群では胆管上皮の細胞質にp53蛋白の発現が認められた。HE染色では胆管炎モデル群と比較してAxCAp53投与群では胆管壁の肥厚や胆管上皮増殖が抑制されていると思われた。アデノウイルスベクターを用いて胆管上皮に選択的にp53遺伝子を発現させることが可能であった。発現したp53遺伝子によりラット胆管炎モデルにおいて胆管壁の肥厚や胆管上皮の増殖を抑制している可能性が示唆された。発現したp53遺伝子の生理機能や、胆管上皮の増殖抑制効果の定量的な解析については、今後の研究が必要である。

A. 研究目的

肝内結石症における増殖性胆管炎により胆管壁が肥厚し結石周囲において相対的に胆管が狭窄し、慢性の胆汁うっ滞や胆道の細菌感染が持続している場合は、胆管上皮細胞のDNAが傷害され胆管上皮が変性し、増殖が起こり、さらには発癌へとつながる可能性が示唆されている。実際厚生省の特定疾患「肝内結石症調査研究班」において肝内結石症患者の肝内胆管癌の合併頻度は約5%と報告されていて健常人に比して著しく高率であり、主たる死因となっている。

癌抑制遺伝子として知られているp53は正常細胞においてはその存在する量はごく微量であるが、DNAに損傷、ウイルス感染、サイトカイン刺激、低酸素状態などの各種の生体ストレスにさらされた場合には、転写活性をもつようになり、ある場合にはp21などの発現を誘導してRBのリン酸化を阻害することにより細胞をG1期に止め、別の場合にはアポトーシ

スを誘導して細胞死をおこす。

アデノウイルスベクターは血中に投与された場合には肝細胞に親和性が高く、特にマウスでは発現の95%以上は肝臓で起こり、他の臓器での発現はほとんどみられない。肝細胞への遺伝子導入報告は多いが、遺伝子導入のためベクターを直接胆管に投与した報告は、我々が以前に活性型のRb遺伝子を組み込んだAdRbベクターを使用した例を認めるのみで非常に少ない。

我々は、肝内結石症の治療抵抗因子である増殖性胆管炎に対してラットの胆管炎モデルを作製し、アデノウイルスベクターを用いてラット胆管へヒトp53遺伝子が選択的に発現させることができるか。そして、p53のもつG1停止やアポトーシス誘導能という生理機能がラット胆管炎モデルの胆管上皮において胆管の増殖抑制効果を示すかどうかを定量的に解析することを目的とした。

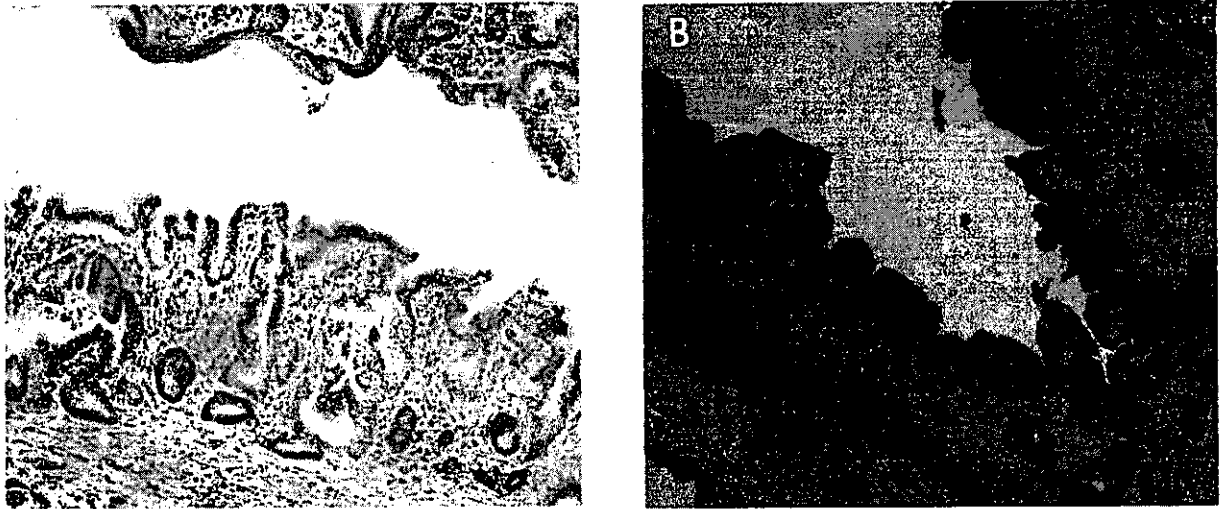


図1 Immunohistochemistry of human p53 protein in rats (x100)

(A) Cholangitis model (生理食塩水投与群) (B) AxCAp53投与群

B. 研究方法

1. ラット胆管炎モデルの作製

体重230～250グラムの雄のWistarラットを使用した。ラットの十二指腸に小切開をおき、経乳頭的に5-0ナイロン糸を胆管に挿入し、このナイロン糸をガイドとして胆管にチューブを挿入した。その後、ナイロン糸を再度挿入しチューブを抜去、ナイロン糸の片方を十二指腸壁に固定し胆管内にナイロン糸を留置した。その結果、異物の物理的刺激と乳頭の機能不全のため、胆管壁の肥厚と腺の増生を示す組織像をもつ胆管炎モデルが作製された。

2. アデノウイルスベクターによる遺伝子の導入と発現

本実験で使用したアデノウイルスベクターはCOS-TPC法により作製されたAxCAp53、AxCALacZの2種類を使用した。

AxCAp53はアデノウイルス5型のウィルスゲノムのE1A、E1B、E3の遺伝子領域を削除しCAGプロモーターとヒトのcDNAよりつくられたp53遺伝子を組み込んであり、一方AxCALacZはp53遺伝子の代わりにBeta-galactosidaseを組み込んでありコントロールとして使用した。AxCAp53は札幌医科大学医学部分子医学研究部門の濱田洋文教授、AxCALacZは

東京大学医科学研究所の斎藤泉教授より供与を受け、理化学研究所遺伝子材料開発室より分譲された。

このウィルスを大量調整し、RCA混入が無いことを確認、精製、力価を測定し使用した。

3. p53遺伝子導入による胆管壁増殖抑制効果の検討

AxCAp53投与群、AxCALacZ投与群は、ラット胆管炎モデル作製時に十二指腸から胆管内にアデノウイルスベクター (AxCAp53, AxCALacZ) を 3×10^8 P.F.U. 注入後15分間静置し、再びナイロン糸を挿入、留置して作製した。

投与後3、7日目にラットを犠牲死させ肝臓と総胆管を採取しHE染色を行い、生理食塩水投与群と比較検討した。

4. p53の免疫組織学的検討

p53蛋白が発現されていることを確認するため、胆管炎モデル群、AxCAp53投与群、AxCALacZ投与群のラット胆管を術後7日目に採取し抗ヒトp53抗体 (Mouse Monoclonal, DAKO) を用い、ダコLSAB法を用いて免疫染色を施行した。

C. 研究結果

1. p53の免疫組織学的検討

免疫組織化学的染色によるp53の発現は、(図1)



図2 生理食塩水投与後7日目のHE染色 (x100)



図4 AxCALacZ投与後7日目のHE染色 (x100)



図3 sham operation後7日目のHE染色 (x100)



図5 AxCAp53投与後7日目のHE染色 (x100)

に示すようにAxCAp53投与群では胆管上皮ならびに増生粘液腺の腺上皮の細胞質にp53の発現が認められた。Cholangitis model群、AxCALacZ群ではp53の発現は認められなかった。

2. p53遺伝子導入による胆管壁増殖抑制効果の検討

生理食塩水投与後1週間ナイロン糸を留置されたラットの胆管(図2)の上皮は粘液腺と胆管付属腺の著しい増生をきたし、一方胆管壁自体も非留置群の胆管(図3)に比較して繊維芽細胞の増殖により著しい肥厚を来していた。

AxCAp53投与群(図5)では生理食塩水投与群、AxCALacZ投与群(図4)と比較して胆管上皮の増

殖が抑制され増生粘液腺が減少していると思われた。

D. 考案

外来遺伝子を発現させるためにアデノウィルスベクターを用いる利点は、以下のとおりである。(i) 高力価のウィルスを調製でき、in vivoでの遺伝子導入が可能で目的細胞への高い導入効率が実現できる。

(ii) 外来遺伝子を発現させるために標的細胞の分裂増殖を必要とせず、増殖細胞だけでなく静止期の細胞にも導入できる。(iii) ウィルスゲノムはほとんどが染色体外に存在するため、外来遺伝子の発現は

一時的である。(iv)CAGプロモーター等の適切なプロモーターを用いて高い発現量を得られる。

今回我々は胆管の増殖性変化の抑制を目的として、アデノウィルスベクター (AxCAp53) を経乳頭的に胆管に注入し、ヒトp53をラット胆管上皮に選択的に発現させることができた。p53は癌抑制遺伝子であり多くの癌で変異が認められており、Cholangiocarcinomaでも多くの場合変異が認められる。胆管に選択的にp53を発現させることにより炎症性の再狭窄の防止のみならず、癌などの悪性狭窄に対する治療の可能性も示唆された。

胆管壁増殖抑制効果の検討であるが、HE染色による組織所見ではAxCAp53投与による細胞増殖抑制効果示しているように思える。

E. 結論

アデノウィルスベクターを用いて胆管上皮に選択的にp53遺伝子を発現させることが可能であった。発

現したp53遺伝子によりラット胆管炎モデルにおいて胆管壁の肥厚や胆管上皮の増殖を抑制している可能性が示唆された。

発現したp53遺伝子の生理機能や、胆管上皮の増殖抑制効果の定量的な解析等については、今後の研究が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし。

肝内結石症における発癌への炎症性サイトカインの関与に関する研究 —TNF α による胆管癌細胞株の浸潤転移能活性化機構の検討—

分担研究者 二村 雄次

名古屋大学医学系大学院器官調節外科 教授

研究要旨

肝内結石症は胆管癌の前癌病変と考えられている。われわれはこれまでのcDNAarray法による研究で肝内結石症に合併した胆管癌TNF関連遺伝子発現の亢進を認めており、肝内結石症における胆管癌発生と慢性炎症・サイトカインの関連に着目してきた。第1回班会議では、胆管癌細胞株CCKS1において炎症性サイトカインの一つであるTNF α 刺激によりMMP-9が分泌されることを認め、またin vitroの浸潤試験にてTNF α 刺激により浸潤能が増加することを報告した。TNF α が胆管癌細胞株の浸潤転移能を増加させる機序を解析することにより、肝内結石症における胆管癌発生へのサイトカインを介した慢性炎症の関与を解明することを目的とする。1. ヒト胆管癌細胞株CCKS1を用いてrecombinant human TNF α 刺激時のMMP-9分泌と、antiTNF R1中和抗体によるその抑制についてゼラチンザイモグラムにて調べた。2. anti phosph Akt抗体、anti phosph MAPK抗体、manumycin A (Ras阻害剤)、U0126 (MEK阻害剤)、PD98059 (MEK阻害剤)、GF10923X (PKC阻害剤)、LY294002 (PI3K阻害剤)を用い、TNF α のシグナル伝達経路の活性化と阻害剤による抑制について、ウェスタンブロッティングにより評価した。3. ボイデンチャンパー法にてTNF α 投与後の浸潤能の変化を調べた。4. cDNAarray法によりTNF α 投与前と投与後の遺伝子発現の差を検討した。TNF R1中和抗体を投与時のTNF α 刺激に対するMMP-9分泌の変化をみたが、中和抗体による抑制効果はみられなかった。TNF α のシグナル伝達経路の活性化と、阻害剤による抑制効果を調べたところ以下の知見を得た。TNF α 処理30分後phosph MAPK、phosph Aktの上昇がみられ、phosph MAPKの上昇はPD98059により抑制された。3. cDNAarray法によるTNF α 処理前と処理2時間後のmRNAレベルでの遺伝子発現の差は確認できなかった。

A. 研究目的

肝内結石症の死亡原因の1つである胆管癌の発生・進展には、慢性持続性炎症が促進的に関与すると考えられている。われわれはこれまでのcDNAarray法による研究で、肝内結石症に合併した胆管癌組織でTNF (tumor necrosis factor) 関連遺伝子発現の亢進を認めている。そこで、今回の班研究では、炎症性サイトカインであるTNF α に注目して、TNF α による胆管癌細胞株の浸潤・転移能活性化とその機構について調べ、肝内結石症における胆管癌発生・進展への慢性持続性炎症の関与について検討した。

TNF α 処理による胆管癌細胞株の浸潤・転移能の

増加の有無、その機序を解析し、肝内結石症における胆管癌発生への慢性炎症の関与の機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1. ウェスタンブロッティング法

- 1) ヒト胆管癌細胞株CCKS1(金沢大学第2病理学教室にて樹立)、TFK-1、HuCCT1、HuH-28について抗TNFR-1抗体を用いたウェスタンブロッティング法によりTNFR-1の発現を調べた。
- 2) 抗 phosph-Akt 抗体、抗 phosph MAPK 抗体、PD98059 (MEK阻害剤)を用い、CCKS1に

においてTNF α (recombinant human, 10ng/ml) 処理後のシグナル伝達経路活性化の経時的変化と、阻害剤によるその抑制について調べた。

2. ゼラチンザイモグラム

CCKS1についてTNF α 処理後の無血清細胞培養液を採取し、以下の項目についてゼラチンザイモグラムで調べた。

- 1) TNF α 処理濃度変化 (10ng/ml, 20ng/ml, 40 ng/ml) によるMMP-9の分泌の変化。
- 2) シグナル伝達経路阻害剤manumycin A (Ras阻害剤)、U0126 (MEK阻害剤)、PD98059 (MEK阻害剤)、GF10923X (PKC阻害剤)、LY294002 (PI3K阻害剤)を用いてTNF α 処理(10ng/ml) 時のMMP-9分泌の変化。

3. In vitro 浸潤試験

トランスウェルチャンバーを用い、ボイデンチャンバー法による浸潤試験を施行した。CCKS1をウェルに培養し、TNF α 処理 (10ng/ml) 群、未処理群の4.5時間後及び6時間後における1視野あたりの孔(直径8 μ)を通過した細胞数の平均値で浸潤能を評価した。

4. cDNA array法

TNF α 未処理と、処理(10ng/ml) 2時間後のCCKS1のmRNAを採取し、cDNA macro array法で遺伝子発現の変化を調べた。

C. 研究結果

1. 管癌細胞株のTNFR-1の発現

ヒト胆管癌細胞株CCKS1、TFK-1、HuCCT1、HuH-28について抗TNFR-1抗体を用いたウエスタンブロッティング法によりTNFR-1の発現を調べた結果、CCKS1、TFK1でTNFR1陽性であった。(図1)



図1 胆管癌細胞株におけるTNFR-1発現

2. 胆管癌細胞株のTNF α 処理によるMMP-9分泌

- 1) ヒト胆管癌細胞株CCKS1、TFK-1、HuCCT1、HuH-28についてTNF α 処理 (10ng/ml) によりMMP-9分泌を認めたのは、CCKS1のみであった。
- 2) ゼラチンザイモグラムで、CCKS1においてTNF α 処理により濃度依存的にMMP-9の分泌亢進を認めた。(図2)

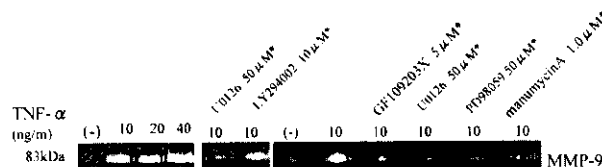


図2 CCKS1でのTNF- α 処理によるMMP-9分泌

またmanumycin A (Ras阻害剤)、U0126 (MEK阻害剤)、PD98059 (MEK阻害剤)、GF10923X (PKC阻害剤)、LY294002 (PI3K阻害剤)を用いてTNF α (10ng/ml) 処理すると、MMP-9分泌が抑制された。(図2)

3. TNF α の細胞内シグナル伝達経路

CCKS1において、TNF α 処理30分後 phosph MAPK、phosph Aktの上昇がみられ、phosph MAPKの上昇はMEK阻害剤である、PD98059により抑制された。(図3 a、b、c)

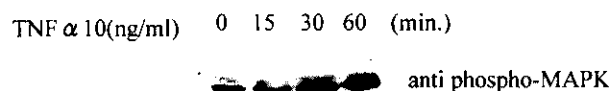


図3a TNF α 処理によるMAPKリン酸化の経時的変化

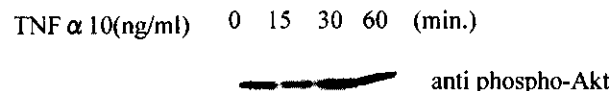


図3b TNF α 処理によるAktリン酸化の経時的変化

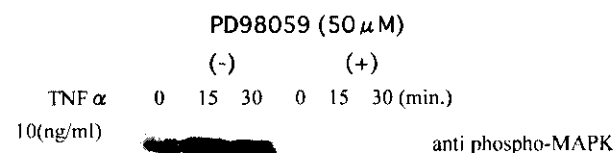


図3c PD98059によるTNF α 処理時のMAPKリン酸化抑制

4. ボイデンチャンパー法による浸潤試験

CCKS1での、ボイデンチャンパー法による浸潤試験では、TNF α 処理（10ng/ml）後4.5時間、6時間とともにTNF α 処理（10ng/ml）群で孔を通過した細胞数はTNF α 未処理群に比し有意（ $p=0.05$ ）に多かった。（図4）

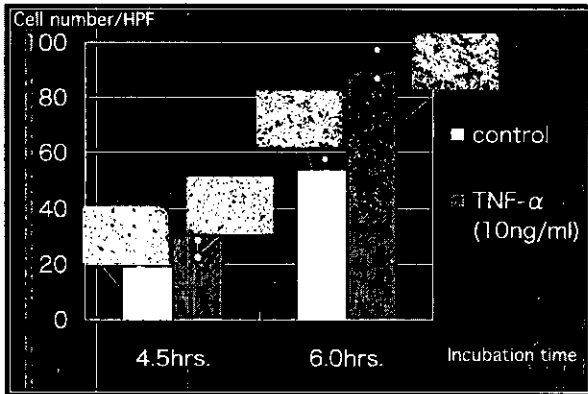


図4 TNF α 処理時のCCKS1 浸潤試験

5. cDNA macro array法でのTNF α 処理による遺伝子発現の変化

CCKS1でTNF α 未処理と、処理（10ng/ml）2時間後の、cDNA macro array法によるmRNAレベルの遺伝子発現について検討したが、明らかな差は認められなかった。

D. 考案

以前より、炎症は癌の増殖、進展を促進するとされており、肝内結石症に発生する胆管癌においても、炎症が胆管癌の発生・進展に関与することが推測されてきた。これまでの研究で、肝内結石症に合併した胆管癌組織でTNF関連遺伝子発現の亢進を認めたことから、今回の研究では、TNF α 処理による胆管癌の浸潤・転移能活性化について、胆管癌細胞株を用いて検討した。

TNF α は、その受容体であるTNFR-1、TNFR-2と結合し多様な細胞に作用することが知られている。また、腫瘍組織でTNF α は、high doseで局所に作用する場合は強い組織血管破壊作用を示すが、low doseでは腫瘍の進展に働く。

本研究では癌細胞の浸潤・転移能の指標の1つとし

てMMP（matrix metalloproteinase）9に着目し、胆管癌細胞株におけるその分泌を調べた。MMPは、細胞外マトリックスの構築と破壊に関わる蛋白分解酵素で、活性中心に亜鉛を有し、一次構造と基質特異性により20以上のfamilyにわかれるが、MMP-9は、それらのうちのひとつで、血管基底膜成分であるタイプIVコラーゲンの分解をし、間質組織の再構築により、がん細胞の浸潤・転移能を増強する。臨床的にも、肝内胆管癌切除標本における免疫組織化学的研究によりMMP-9の発現と予後との相関が報告されている。

本研究で胆管癌細胞株CCKS1を用いて実験を行ったところ、TNF α 処理によりMMP-9分泌が亢進し、浸潤試験でも浸潤能の亢進がみられた。またTNF α 処理による細胞内シグナル伝達経路活性化についての解析や阻害実験により、胆管癌細胞株においてはTNF α 処理によってRas-MAPK経路、PI3K-Akt経路、PKCに関わる経路が活性化されてMMP-9が分泌されることが示唆された。

これらの結果は、サイトカインTNF α が胆管癌の浸潤・転移能活性化に促進的に作用していることを示唆しており、肝内結石症に並存する胆管癌において慢性炎症が癌の発生・進展に関与することを示す知見と考えられた。

E. 結論

肝内結石症の死亡原因の1つである胆管癌の発生・進展に促進的に関与すると考えられている慢性炎症に関連して、炎症性サイトカインであるTNF α による胆管癌細胞株の浸潤・転移能活性化とその機序について調べたところ、肝内結石症に合併する胆管癌においてTNF α は癌の発生・進展に促進的に働いていると考えられた。また、その機序として、Ras-MAPK等の細胞内シグナル伝達経路が機能してい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

Murata T, Nagasaka T, Kamiya J, Nimura Y, Wakai K, Yoshida K, Nakashima N : p53 labeling index in cholangioscopic biopsies is useful for determining spread of bile duct carcinomas. *Gastrointest Endosc* 56 : 688-695, 2002
Ebata T, Watanabe H, Ajioka Y, Oda K, Nimura Y : Pathological appraisal of lines of resection for bile duct carcinoma. *Br J Surg* 89 : 1260-1267, 2002
Ozden I, Kamiya J, Nagino M, Uesaka K, Sano T, Nimura Y : Clinical anatomical study on the infraportal bile ducts of segment 3. *World J Surg* 26 : 1441-1445, 2002

Nimura Y : Extended surgery in bilio-pancreatic cancer : The Japanese Experience. *Seminars in Oncology* 29 : 17-22, 2002

Kokuryo T, Yamamoto T, Oda K, Kamiya J, Nimura Y, Senga T, Yasuda Y, Ohno Y, Nakanuma Y, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Chiu CT, Hsieh LL, Hamaguchi M : Profiling of gene expression associated with hepatolithiasis by complementary DNA expression array. *Int J Oncol* 22 : 175-179, 2003

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

執著者氏名	論文題名	雑誌名 (巻、頁、年)
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
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)	病氣と薬のガイド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)

執著者氏名	論文題名	雑誌名 (巻、頁、年)
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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、p1597、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、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、高久史麿総編集、p2472、2003、医学書院 (東京)