

また、Superose 6 columnを用いたカラムクロマトグラフィー法にて胆汁上清中のベジクル・ミセルを分離し脂質分布を評価した。

C. 研究結果

1. 混合胆汁における酵素的ビリルビン脱抱合

β -グルクロニダーゼにより混合胆汁中ビリルビンは経時的に脱抱合を受けた。ビリルビンの存在しないコレステロール過飽和人工胆汁では、 β -グルクロニダーゼの添加自体ではコレステロール結晶析出現象への影響は認められなかった。一方、抱合型ビリルビンが存在する混合胆汁では、 β -グルクロニダーゼの添加によりコレステロール結晶析出およびその成長過程は有意に抑制された(図1)。

2. 混合胆汁中コレステロール存在様式の評価

さらに、胆汁沈殿層の形成が β -グルクロニダーゼにより促進されたが(図2)、その結果として非ミセル層のコレステロール含有量が低下して脂質担送体間でのコレステロール再分布が認められた(表1)。

D. 考察

混合胆汁において β -glucuronidase存在下で認められた以下の現象について各々考察した。

1. 胆汁中非抱合型ビリルビンは経時的に増加した。従って、本実験系では酵素的ビリルビン脱抱合が生じていたものと考えられた。

2. コレステロール結晶析出速度は遅延し、結晶析出量も低下した。人工胆汁そのものへの酵素単独添加では変化が認められなかったことから、本現象はビリルビン脱抱合に伴うものと考えられた。

3. その一方で、非結晶成分を主体とする胆汁沈殿層(precipitate)が経時的に増加し、それに伴って上清(supernatant)中脂質担送体コレステロール含量は低下した。

即ち、 β -glucuronidaseによる非抱合型ビリルビンの増加はコレステロールとともに非結晶性沈殿層を形成し、胆汁液層中のコレステロール含量の相対的低下を惹起して、コレステロール結晶析出を抑制することが推定された。

E. 結論

ビリルビン代謝は色素胆石のみならず、コレステロール胆石形成過程にも深く関与することが明らかとなり、胆汁内の様々な状況に応じて、ビリルビンの脱抱合過程においてコレステロール結晶化を抑制するとともに色素石の形成を促進させることが判明した。肝内結石にコレステロール含有量が比較的豊富であることは、ビリルビン脱抱合による胆汁中コレステロール担送体間でのコレステロール再分布による影響と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

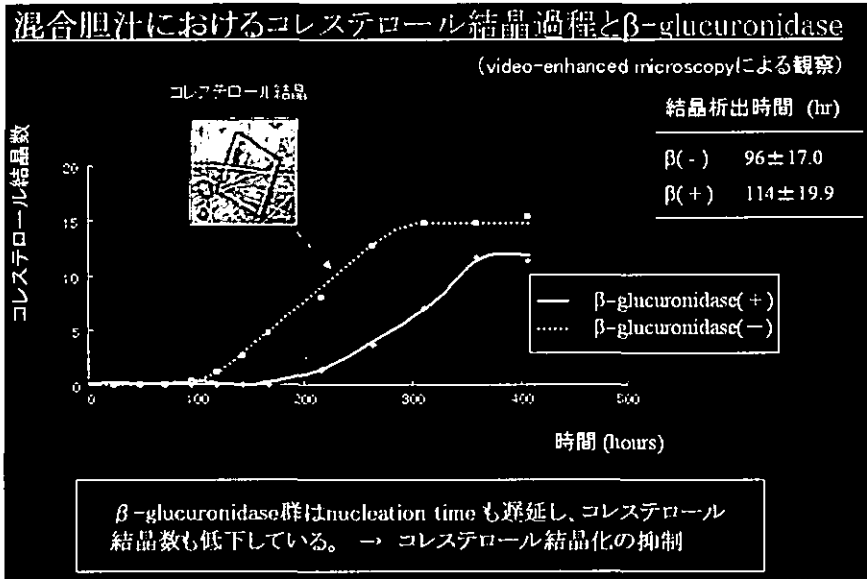


表 1

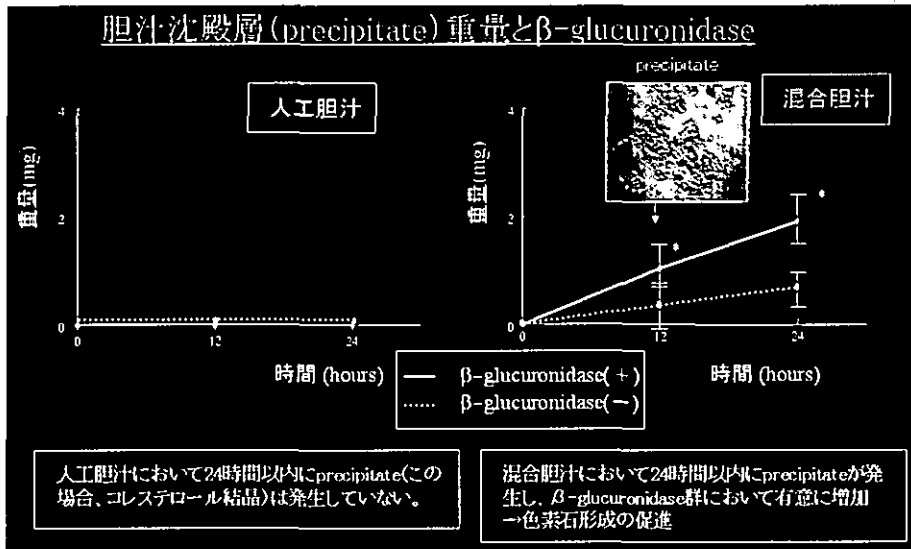


表 2

胆汁中脂質担送体への脂質分布動態と β -glucuronidase

	vesicle		micelle	
	(mM)			
β -glucuronidase(+)	CHO	0.003 (0.07%)	PL	0.20 (2.2%)
	CHO	4.04 (99.3%)	PL	8.69 (97.8%)
β -glucuronidase(-)	CHO	0.061 (1.4%)	PL	0.25 (2.8%)
	CHO	4.23 (98.6%)	PL	8.82 (97.2%)

β -glucuronidase群において、コントロール群に比べベジクル分画のコレステロール濃度が低下している。

表 3

ムチン分解による結石生成の抑制

研究協力者 佐々木睦男
弘前大学医学部第二外科

研究要旨

肝内結石症ではその胆汁中に多量のムチンが生成されることが知られた。このムチンはムチン型糖鎖を有していた。実際、この酸性糖タンパク質と肝内結石症患者胆汁およびカルシウムイオン、エンドβグルクロニダーゼ存在下にこれらを混合するとビリルビンカルシウム成分を含む沈殿が生成されることを確認している。今回この酸性糖タンパク質を分解することにより、ビリルビンカルシウム成分を含む沈殿が抑制されるかどうかを観察した。この構造の分解法として糖鎖の分解は多糖類分解酵素、タンパク質はタンパク分解酵素、S-S結合開裂剤などが考えられた。本研究に用いる薬剤は臨床応用されている薬剤から数種類を選択して行った。方法はムチンとしてウシ胃ムチン糖タンパク質を用い、胆汁は肝内結石症患者の肝胆汁を用いた。胆汁に対しムチンとエンドβグルクロニダーゼを混合、インキュベートし沈殿、結石の有無を検討した。このとき①S-S結合開裂剤とアセチルシステイン溶液②多糖類分解酵素として塩化リゾチーム③タンパク分解酵素としてセラペプチダーゼを同時に混合し沈殿生成物の乾燥重量を測定した。

結果はすべての系で沈殿の抑制が認められた。

A. 研究目的

肝内結石症は難治性の疾患であり数回の治療にもかかわらず再発を繰り返す。その治療法を考える上でその病態を明らかにすることはきわめて重要な要素となる。これまで、われわれは動物実験モデルで肝内結石症の病態として肝内胆汁うっ滞と胆道内細菌感染がその成因としてきわめて重要であるとの結論を得た。しかしながら肝内胆汁うっ滞と胆道内細菌感染を根本的に解決することは現段階では非常に難しいと考えられる。ところで、この肝内胆汁うっ滞と胆道内細菌感染を負荷した肝内結石症発症モデルではその胆汁中にきわめて多量のムチンが生成されることが知られた。このムチンはムチン型糖鎖を有しその非還元末端に硫酸、シアル酸を配する糖タンパク質である事が知られた。また、臨床的にも肝内結石症患者胆汁中にはこのムチン型酸性糖タンパク質がきわめて多量に存在することが確認されてい

る。実際、この酸性糖タンパク質と肝内結石症患者胆汁およびカルシウムイオン、エンドβグルクロニダーゼ存在下にこれらを混合するとビリルビンカルシウム成分を含む沈殿が生成されることを確認している。したがって、この酸性糖タンパク質は結石生成にきわめて重要な要素と考えられた。

今回の目的はこの酸性糖タンパク質を分解することにより、ビリルビンカルシウム成分を含む沈殿が抑制されるかどうかを観察した。この糖タンパク質を分解するにはその構造上から糖鎖を分解する方法、タンパク質を分解する方法、その高次構造を構築するS-S結合を開裂する方法などが考えられた。しかし、これらの方法は生体に対し安全な方法でなければならない。したがって、本研究に用いる薬剤はすでに長期にわたって臨床応用されている薬剤から数種類を選択して行った。

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肝胆汁を用いた。胆汁4.5mlに対しムチン糖タンパク質10mgとエンドβグルクロニダーゼを混合、最終カルシウム濃度20mg/l 1000 U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。この際①S-S結合開裂剤としてシステイン系薬剤としてアセチルシステイン溶液(20%)を10~200 μ L、②多糖類分解酵素として塩化リゾチームを50~200mg、③タンパク分解酵素としてセラペプチダーゼを50~200mgを同時に混合し沈殿生成物の乾燥重量を測定した。

C. 研究結果



図1 S-S結合開裂剤(還元剤)

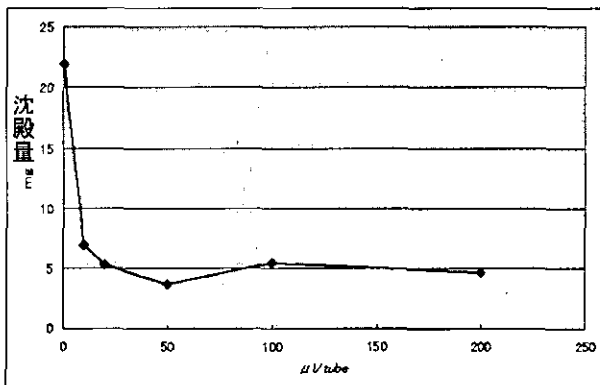


図2 S-S結合開裂剤の効果(定量)

アセチルシステイン溶液では10 μ L以上で著明に沈殿が抑制されるとともに上清のビリルビン濃度の希釈が認められた(図1)、また定量ではコントロールに比べ82%沈殿抑制効果が見られた(図2)。塩化リゾチームでも沈殿の抑制と上清のビリルビン濃度の希薄化が見られた(図3)、定量では200mgの投与で60%の沈殿抑制効果が見られた(図4)。セラペプチダーゼでは沈殿の抑制のみが認められた(図5)、定量では100mg以上の濃度で80%の沈殿抑制が見られた(図6)。

D. 考察 E. 結論

今回の研究より肝内結石生成要素として重要な役割を担う酸性糖タンパク質を分解することにより沈殿形成が著明に抑制されることより、酸性糖タンパク質の存在は結石生成にきわめて重要であることが

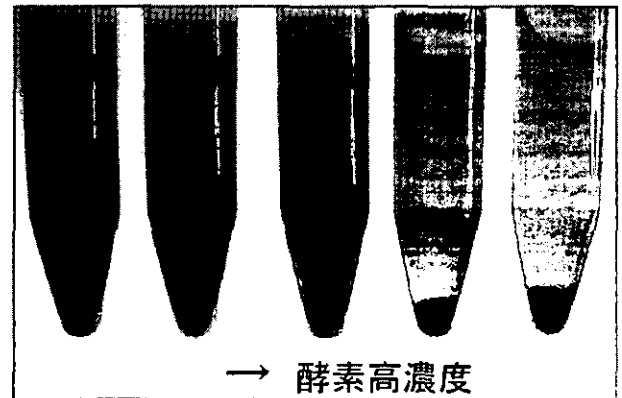


図3 多糖類分解酵素の効果

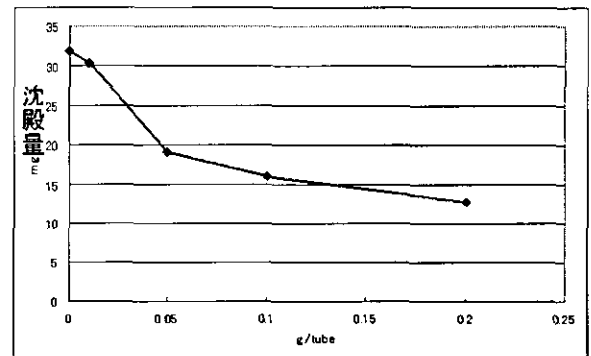


図4 多糖類分解酵素の効果(定量)

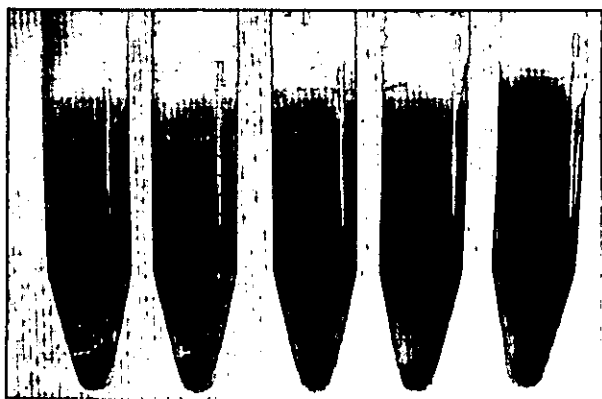


図5 蛋白分解酵素の効果

確認された。また、酸性糖タンパク質を分解するにはS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素が有効でこれらにより沈殿は著明に抑制された。また、これらの薬剤はすでに数十年にわたり臨床応用されておりその安全性は確認済みであり、これらの方法はすぐに臨床応用可能であると考えられる。

しかし、問題点としては、今回確認された結果は胆汁への直接投与に相当するものであり具体的には胆道内直接投与で胆道内遺残結石の洗い出しや胆道内粘液の洗浄効果を想定したものである。しかし肝内結石症患者にとって最も有益なのはこれら薬剤の内服により、肝内結石やその再発が予防できることであるが、これら薬剤の血中及び胆汁中濃度の資料は乏しく、これらが胆汁中で有効血中濃度に達し効果を表すかどうかは今後早急に確認を要する事項となる。

F. 健康危険情報

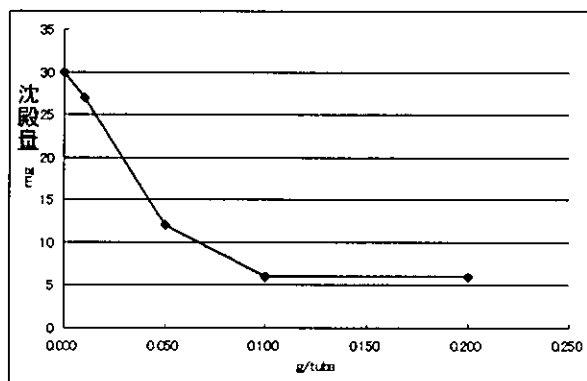


図6 蛋白分解酵素の効果(定量)

特になし

G. 研究発表

- 1) 張 同輝, 袴田健一, 石澤義也, 梅原実, 豊木嘉一, 十束英志, 鳴海俊治, 佐々木睦男. 大量肝切除後肝再生時におけるビリルビン排泄蛋白 multidrug Resistance Protein (Mrp) 2, Mrp 3 発現量・局在の検討. 薬理と治療 2003; 31: S133-135.
- 2) Nozaki T, Eishi T, Takiguchi M, Atsushi Y, Sasaki M. Attenuation of Canine Hepatic Warm Ischemia/Reperfusion Injury by Nitric Oxide Donor (FK409). Hirosaki Med J 2003; 54 (3 - 4): 105-16.

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MUC2, MUC5ACの発現プロセスの解析 －人体例および培養系を用いた検討－

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

研究要旨

肝内結石症では肝内胆管上皮でのMUC2, MUC5ACの発現亢進が重要である。

今回、マウス肝内胆管上皮細胞を用いてTNF- α 刺激によるMUC2, MUC5ACの発現亢進におけるCOX-2の関与を検討した。TNF- α で刺激した細胞ではMUC2, MUC5ACのmRNAの発現はいずれも亢進していた。TNF- α と同時にCOX-2阻害薬を添加した群ではMUC2, MUC5ACの発現は抑制された。蛋白レベルでもMUC2の発現はCOX-2阻害薬にて抑制された。マウス培養胆管上皮細胞におけるMUC2, MUC5ACの発現亢進にCOX-2が関与することが示唆された。

肝内結石症組織切片におけるCDX2およびMUC2の発現を検討した。CDX2とMUC2は正の相関をもって腸上皮化生および過形成性上皮に発現していた。CDX2は核に発現しており、MUC2の転写因子である可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝内結石症の結石形成には肝内胆管上皮からのムチンの過分泌が重要であることが知られており、ムチンコア蛋白（mucin core protein, MUC）に関しては、肝内結石症では正常肝ではみられないMUC2およびMUC5ACの発現亢進がある。MUC2, MUC5ACはいずれもゲル形成能を有することから、これらの過剰分泌は結石形成に関与している可能性がある。また、MUC2は腸型ムチン、MUC5ACは胃型ムチンとして知られており、肝内結石症大型胆管上皮で認められる腸上皮化生および胃上皮化生粘膜にそれぞれ発現がみられる。

Kimらは気道上皮細胞においてIL-1 β がMUC2, MUC5ACを誘導し、その過程においてCOX-2が関与していることを報告している。我々はこれまでの班研究において、マウス培養胆管上皮細胞を用いてグラム陰性菌の壁構成成分であるlipopolysaccharide刺激によりTNF- α の産生が亢進し、MUC2,

MUC5ACが誘導されることを報告している。今回、我々はTNF- α によるMUC2, MUC5ACの発現亢進におけるCOX-2の関与を培養系を用いて検討した。また、肝内結石症組織におけるTNF- α およびCOX-2の発現を調べた。

CDX2(caudal-related homeobox protein)は腸特異的転写因子であり、腸上皮化生を示す上皮に発現する。さらにMUC2の転写因子であると考えられている。今回、我々は肝内結石症におけるCDX2の発現を調べ、MUC2発現への関与も検討した。

B. 研究方法

培養実験にはマウス胆管上皮細胞を用いた。細胞をコラーゲンゲル上で単層培養し、培地にTNF- α (10ng/ml) 単独、あるいはTNF- α + NS398 (COX-2阻害薬, 100mM) を添加した。刺激後8時間で細胞を回収し、RNAを抽出、RT-PCR法にてMUC2, MUC5ACのmRNAの発現を調べた。細胞

をコラーゲンゲル内で三次元培養した。囊胞を形成した細胞を培地内にTNF- α (10ng/ml) 単独、あるいはTNF- α +NS398 (COX-2 阻害薬, 100mM) を添加することで刺激し、MUC2の免疫染色を行った。肝内結石症組織切片を用いてTNF- α およびCOX-2の免疫染色を行った。

組織切片を用いてCDX2およびMUC2の免疫染色を行った。材料は肝内結石症19例、閉塞性黄疸8例、正常肝6例を用いた。

C. 研究結果

肝内結石症の肝内胆管上皮におけるTNF- α およびCOX-2の発現

結石を有する肝内結石症大型胆管では胆管上皮および付属腺にTNF- α の発現を認めた (図1A)。COX-2についても同様に胆管上皮と付属腺上皮に



図1A

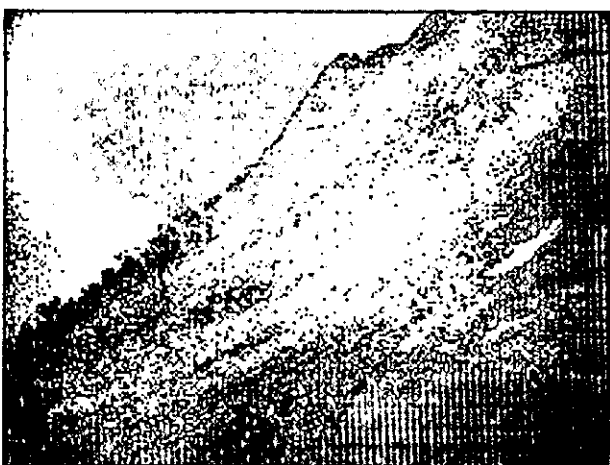


図1B

その発現がみられた (図1B)。

培養胆管上皮細胞におけるTNF- α 刺激によるMUC2, MUC5ACの発現亢進とCOX-2の関与

培養細胞をTNF- α で刺激するとMUC2, MUC5ACのmRNAの発現亢進がみられた。TNF- α とCOX-2阻害薬を添加した群ではMUC2, MUC5ACのmRNAの発現は抑制された (図2)。

三次元培養における粘液染色およびMUC2免疫染色

マウス胆管上皮細胞を三次元培養した囊胞においてMUC2の免疫染色ではTNF- α で刺激した囊胞はMUC2の発現がみられたが、COX-2阻害薬を添加した群では蛋白レベルの発現は抑制された (図3)。

肝内結石症の肝内胆管上皮におけるCDX2の発現

肝内結石症におけるCDX2の発現はMUC2の発現にはほぼ一致しており、goblet cell metaplasiaを呈す

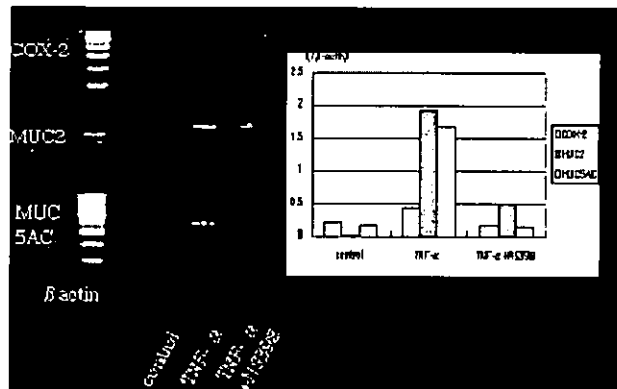


図2

マウス胆管上皮三次元培養; MUC2免疫染色

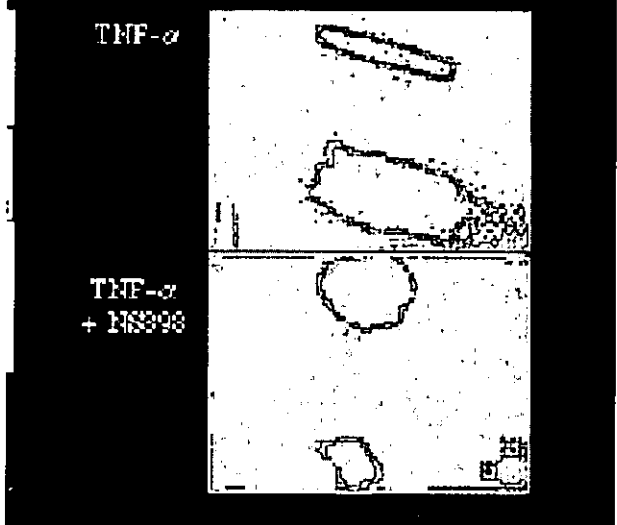


図3

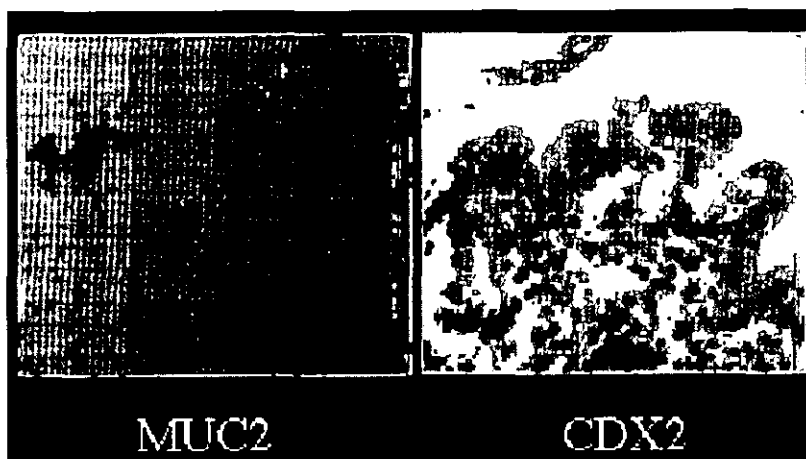


図 4 A

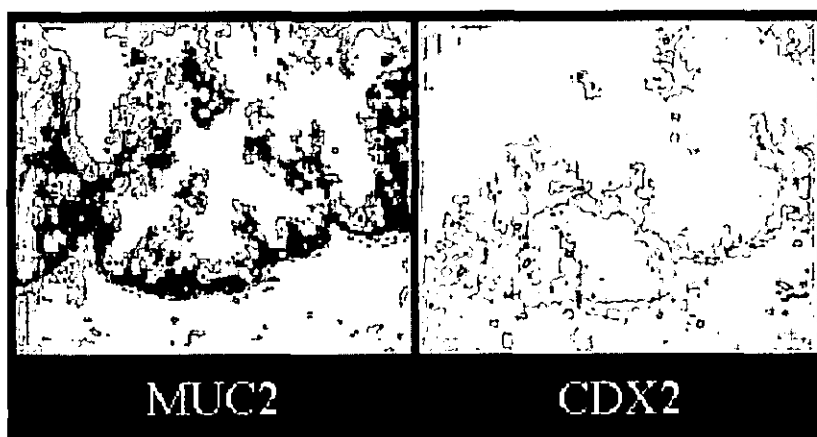


図 4 B

る胆管上皮において核内にその発現を認めた (図 4 A)。また、MUC2の発現がみられる乳頭状過形成性上皮においてもCDX2の核での発現が認められた (図 4 B)。CDX2およびMUC2の発現は肝内結石症ではそれぞれ16%、42%であった。対象肝でこれらの発現は明らかではなかった (表 1)。また、肝内結石症におけるCDX2とMUC2の発現の関与は統計学的有意差をもって正の相関を認めた (表 2)。

D. 考察 E. 結論

今回の培養系を用いた実験ではマウス胆管上皮細胞においてTNF- α によるMUC2, MUC5ACの発現亢進にはCOX-2が関与している可能性が示唆された。肝内結石症胆管上皮におけるTNF- α およびCOX-2の発現を組織切片にて確認できたことから、生体内でも同様の機序が働いている可能性が推察さ

れる。COX-2阻害薬は臨床で使用されており、COX-2の影響をさらに詳しく調べることにより、COX-2阻害薬が肝内結石症の新たな治療薬として利用できる可能性がある。

培養系を用いた研究はサイトカインを介した急性炎症に関するものである。肝内結石症は胆管上皮に化生性変化をみる慢性疾患であり、慢性炎症性変化を念頭に置いて研究を行う必要がある。今回、腸上皮化生の観点から肝内結石症におけるMUC2とCDX2の発現を調べた。これらの発現は組織学的変化とよく相関しており、腸上皮化生を示す胆管上皮で発現がみられた。過形成性上皮での発現に関しては、形態学的には認めることができない胆管上皮の腸上皮への分化があるのかもしれない。Almeidaらは胃癌の組織型 (腸型) とCDX2の発現は相関しないことを示し、腫瘍細胞の表現型と性質は異なると考察している。肝内結石症における過形成性上皮の

	MUC2	CDX2
肝内結石症 (n=19)	8(42%)	3(16%)
閉塞性黄疸 (n=4)	0*	0*
正常肝 (n=6)	0	0

* = 一部陽性

表 1

腫瘍性性格の有無を含め、CDX2の発現の意義は今後の課題である。

今回、肝内結石症胆管上皮においてMUC2は胞体内に、CDX2は核内に発現がみられ、MUC2とCDX2の発現には正の相関が得られたことから、CDX2がMUC2の転写因子となっている可能性が示唆された。したがってCDX2を誘導する因子はMUC2の発現亢進プロセスの一つである可能性が高い。今後、培養胆管上皮細胞を用いたCDX2の誘導因子に関する検討が重要であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishikawa A, Sasaki M, Ohira S, Ohta T, Oda K, Nimura Y, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Nakanuma Y

Aberrant expression of CDX2 is closely related to the intestinal metaplasia

and MUC2 expression in intraductal papillary neoplasm of the liver in hepatolithiasis

Lab Invest 2004 (in press)

Sasaki M, Tsuneyama K, Nakanuma Y.

Aberrant expression of trefoil factor family 1 in biliary epithelium in hepatolithiasis and cholangiocar-

	MUC2(+)	MUC2(-)
CDX2(+)	3(16%)	0
CDX2(-)	5(26%)	11(58%)

表 2

cinoma.

Lab Invest. 2003, 83(10) : 1403-13.

Sasaki M, Huang SF, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Ishikawa A, Mollenhauer J, Poustka A, Tsuneyama K, Nimura Y, Oda K, Nakanuma Y.

Decrease of deleted in malignant brain tumour-1 (DMBT-1) expression is a crucial late event in intrahepatic cholangiocarcinoma.

Histopathology. 2003 ; 43 (4) : 340-6.

Sasaki M, Huang SF, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Ishikawa A, Mollenhauer J, Poustka A, Tsuneyama K, Nimura Y, Oda K, Nakanuma Y.

Expression of deleted in malignant brain tumor-1 (DMBT1) molecule in biliary epithelium is augmented in hepatolithiasis : possible participation in lithogenesis.

Dig Dis Sci. 2003;48 (7) :1234-40.

2. 学会発表

石川玲 他：粘液産生肝内胆管癌の検討-大腸、膵の粘液産生腫瘍との比較検討-. DDW-Japan 2003.

佐々木素子 他：肝内胆管癌の発癌・進展過程におけるliver-intestine cadherin発現. DDW-Japan 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

原発性肝内結石症におけるMDR3 P-糖蛋白の発現異常と ベザフィブラートによる治療の可能性

分担研究者 田中 直見

筑波大学臨床医学系消化器内科

研究要旨

原発性肝内結石症は日本を含む東南アジアに多発する難治性疾患である。本症の成因には従来より胆道感染や胆管狭窄による胆汁うっ滞が重要であると推測されてきたが、いまだ解明には至っていない。本症の結石は肉眼分類上ビリルビンカルシウム結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結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^{1,2}。我々は本症における結石形成には、コレステロール過飽和胆汁生成の病態が重要な役割を演じていると推測し、本症の疾病肝にはコレステロール・胆汁酸合成の異常³に加えて、リン脂質の胆汁分泌の低下⁴が存在することを報告してきた。リン脂質の胆汁排泄に支障が生じるとコレステロール分子は安定に存在できなくなり、コレステロール胆石へとつながることが予想される。

近年では肝細胞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。肝細胞毛細胆管膜上に発現する輸送担体（トランスポーター）のうち多剤耐性P糖蛋白3（MDR3あるいはABCB4）はリン脂質の胆汁排泄を担当する⁵。ノックアウトマウスの解析より、MDR3の発現および機能の低下した病態ではコレステロール胆石のリスクが上昇することが明らかとなっている⁶。また最近ではMDR3の発現および機能の低下により引き起こされる疾病には、進行性家族性胆汁うっ滞症3型（PFIC-3）⁷、妊娠性胆汁うっ滞症⁸、低リン脂質排泄量関連胆石症⁹、原発性肝内結石症¹⁰が報告されている。このようにMDR3の発現および機能の異常は胆嚢あるいは肝内コレステロール胆石のリスクファクターとして解釈することが出来る。しかしながら本症に対する薬物治療に関しては未だ有効な治療薬は見出されてはいない。最近の論文では、胆汁酸製剤のウルソデオキシコール酸¹¹、脂質代謝改善剤のフィブラート系薬剤¹²やスタチン系薬剤¹³が肝MDR3の発現や機能を増加させることが報告されている。

そこで今回は原発性肝内結石症におけるMDR3の発現および機能の低下のメカニズムを解明する目的にて本症におけるMDR3遺伝子の変異解析を行った。またフィブラート系薬剤（ベザフィブラート）のヒト肝細胞におけるMDR3の発現や機能に与える影響について検討を行った。

A. 研究目的 B. 研究方法

MDR3 遺伝子の変異解析

対象は原発性肝内結石症16例（男性6例、女性10例）について解析を行った。手術時に得られた結石存在部位の肝組織よりtotal RNAを抽出し、逆転写反応にてcDNAを得た。MDR3 mRNAの塩基配列

の全長4463塩基のうち、その転写領域をすべてカバーするセンスおよびアンチセンスプライマーを設計し、収率をあげるためにnested PCRにてPCR断片の増幅を行いdirect sequencingにて塩基配列を決定した。

MDR3 転写および蛋白発現レベルの解析：MDR3

の遺伝子変異が肝MDR3転写および蛋白発現レベルに与える影響を検討するために、本症16例についてMDR3転写レベルをreal-time PCRにて、また蛋白発現レベルをウエスタンブロットおよび免疫染色にて解析した。

ベザフィブラートのヒト肝細胞におけるMDR3の発現や機能に与える影響：本症におけるベザフィブラートの治療効果を検討する目的で、ヒト培養肝細胞 (HepG2) を用いて、ベザフィブラート投与のMDR3の発現レベルに与える効果について検討し、さらに蛍光標識フォスファチジルコリン (NBD-C6-PC) を用いてその機能賦活に関する解析を行った。方法としてHepG2細胞にベザフィブラート100、300 μ Mを投与して、最大48時間後まで経時的にMDR3の発現を、mRNA (real-time

PCR)、蛋白 (ウエスタンブロット) および免疫組織化学 (共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫染色) の点より解析した。またNBD-C6-PCを用いてMDR3の機能解析を行った。

C. 研究結果

1. MDR3 遺伝子の変異解析

図1は本症におけるMDR3遺伝子の変異解析の結果を示したものである。全16例のうち1例においては、エクソン7、10、22-23における膜通過領域に、それぞれ77bp、1bp、241bpの塩基の欠失を認めるheterozygous mutationsを認め、別の1例ではエクソン7における膜通過領域の77bpの塩基の欠失のみを認めた。しかしながら他の14例では変異は認めなかった。

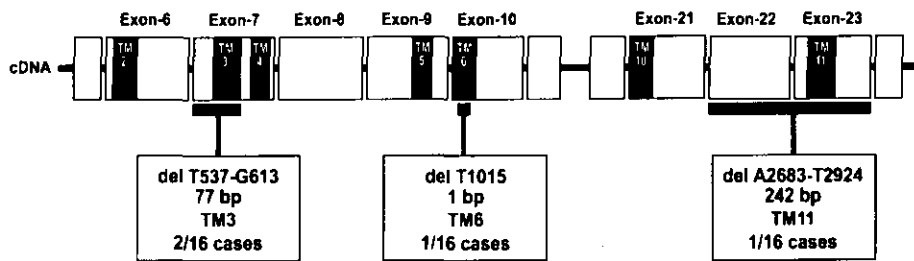


図1

Localization of mutations on *MDR3* cDNA. Exons 6-12 and 25-28 are represented by boxes. Black boxes represent the transmembrane domains (TM 6-11). The different *MDR3* mutations are localized on the cDNA by bars.

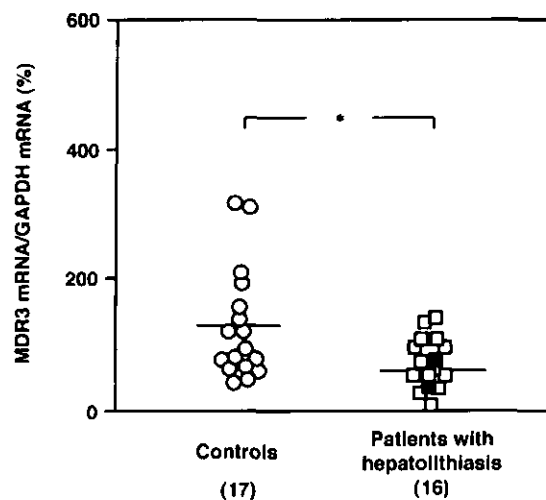


図2

Real-time PCR of *MDR3* mRNAs in liver specimens from control subjects (O) and patients with primary HL (n, with the gene mutations; o, without the gene mutations). The abundance of *GAPDH* mRNA was determined as an internal standard. PCR was performed in triplicate. The data are expressed as averaged percentages of the amounts of *GAPDH* mRNA present in specimens. ** $P < 0.05$, significantly different from control subjects.

2. MDR3転写および蛋白発現レベルの解析

図2は肝MDR3の転写レベルを本症16例と肝胆道疾患を有しない対照症例を比較したものである。本症におけるMDR3転写レベルは対照に比して有意に低値であった。しかしながら、本症16例のうち、遺伝子変異を認めた2例と変異を認めなかった14例についてはその転写レベルに有意な差を認めなかった。免疫組織化学において、MDR3発現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、本症の結石葉ではMDR3の胆管膜における発現が低下しており、さらにその発現が欠落している部分も観察されheterogeneousな発現を示していた(図3)。また遺伝子変異を認めた2例と変異を認めなかった14例については、MDR3の免疫組織学的発現には明らかな差異を認めなかった(図3)。

3. ベザフィブラートのヒト肝細胞におけるMDR3の発現や機能に与える影響

ベザフィブラートの投与によりHepG2細胞では、MDR3 mRNAは対照の最大150% ($P < 0.05$)

まで増加が認められが、肝細胞膜分画における蛋白発現レベルには有意な差異を認めなかった(最大105%)(図4)。しかしながら、共焦点レーザー顕微鏡による発現局在に関する解析では、本細胞の偽胆管膜におけるMDR3蛋白のdensityが増加しており、MDR3/CD26比は有意に高値であった(対照1.4; ベザフィブラート2.1; $P < 0.05$)(図5)。本細胞におけるNBD-CP6の偽胆管腔への輸送分泌動態において、ベザフィブラートは分MDR3の転写レベルを亢進させるよりはむしろ、MDR3蛋白の毛細胆管膜へのredistributionを促進することより、胆汁中へのリン脂質分泌を促進すると考えられた(図6)。

D. 考察

今回の解析結果より、原発性肝内結石症における肝MDR3の発現低下のメカニズムはMDR3遺伝子の転写領域における変異によるものではないことが明らかとなった。プロモーター領域を含む非転写領域の遺伝子変異あるいはMDR3の転写を制御する未知

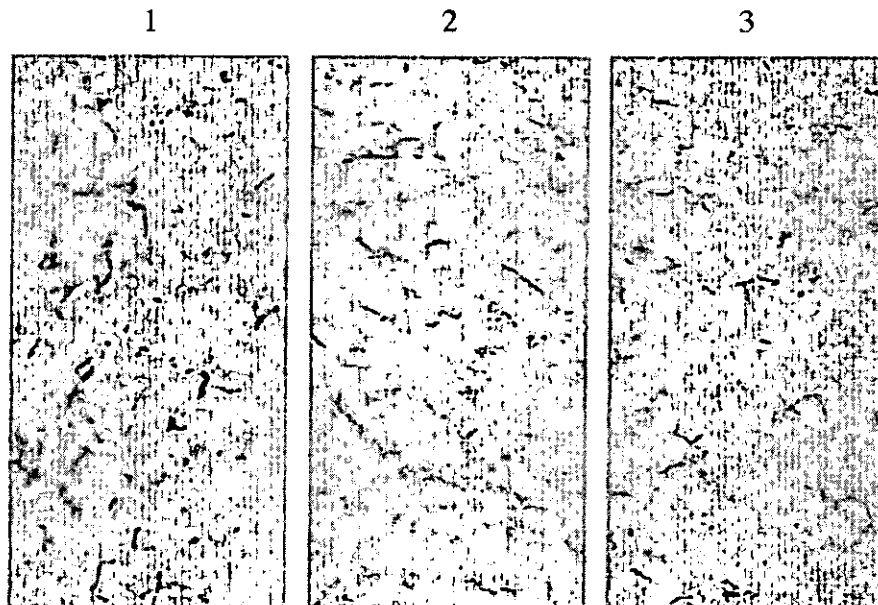


図3

Immunohistochemical localizations of *MDR3* in the livers. Immunostaining of *MDR3* shows a diffuse and linear pattern outlining the canalicular membrane domain of the liver section from a control subject (1: original magnification x 60). However, in sections of the livers from an HL patient with the *MDR3* gene mutations (2: original magnification x 60) and an HL patient without the mutations (3: original magnification x 60), the staining pattern of *MDR3* outlines the canalicular membrane domain but is less defined and focally absent. No significant difference was found between hepatic localization of *MDR3* in the HL patients with and those without the *MDR3* gene mutations.

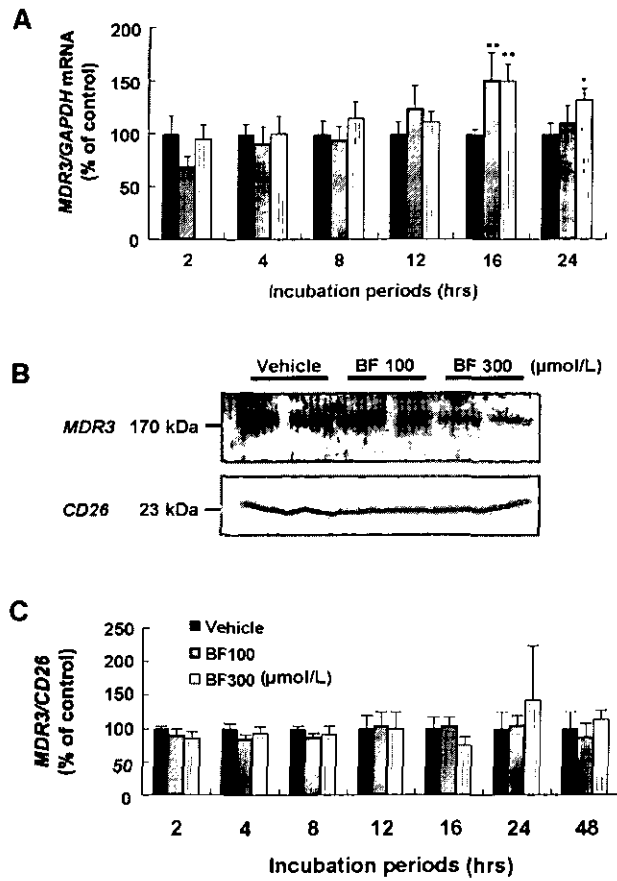


Fig 4

Effects of bezafibrate on expression levels of *MDR3*. (A) Steady-state mRNA levels of *MDR3* in HepG2 cells treated with vehicle or bezafibrate. The mRNA levels were quantified by real-time quantitative PCR using specific primers and double-dye probes. *MDR3* mRNA levels were significantly increased in the cells treated with bezafibrate (100 or 300 $\mu\text{mol/L}$) for 16 and 24 hours. Data are presented as means \pm SEM of 4-6 experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. vehicle-treated cells. (B) Representative bands of *MDR3* and *CD26* proteins in immunoblot analysis of the lysates of HepG2 cells treated with vehicle or bezafibrate for 24 hours. (C) Densitometrical analysis of *MDR3*/*CD26* ratios in HepG2 cells treated with vehicle or bezafibrate for 24 hours. Data are presented as means \pm SEM of 4 experiments. bezafibrate treatment had no effect on the protein levels of *MDR3* in HepG2 cells.

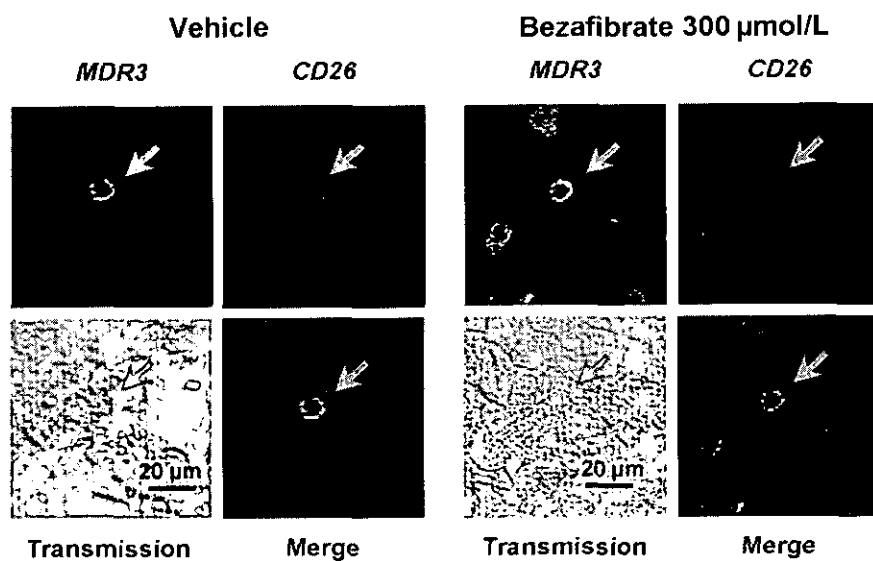


Fig 5

Effects of bezafibrate on redistribution of *MDR3* in HepG2 cells. Immunofluorescent images by CLSM of *MDR3* and *CD26* in HepG2 cells treated with vehicle or 300 $\mu\text{mol/L}$ of bezafibrate for 24 hours. The treatment increased the immunostaining intensity of *MDR3* in pseudocanalliculi of the cells.

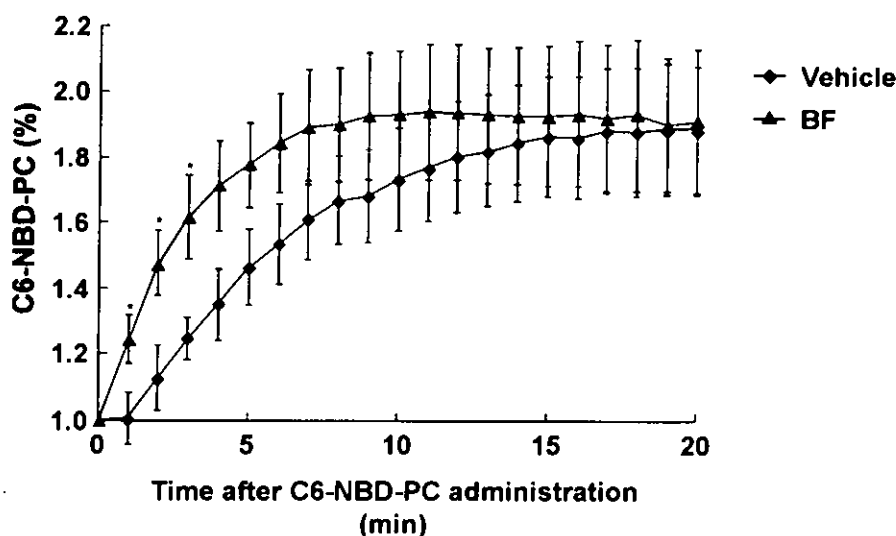


図 6

Accumulation of NBD-labeled PC (C6-NBD-PC) in pseudocanaliculi of HepG2 cells. (B) Effects of bezafibrate on time-dependent changes in C6-NBD-PC accumulation in pseudocanaliculi. HepG2 cells were treated with vehicle or 300 mmol/L of bezafibrate for 24 hours. C6-NBD-PC was added to the cells (at a final concentration of 1 mmol/L). Fluorescence images were obtained using CLSM every 1 minute over a period of 20 minutes. The fluorescence intensity of C6-NBD-PC in pseudocanaliculi was determined by calculating the ratio of [fluorescence of pseudocanaliculi]/[fluorescence of visual field]. Time course of changes in the fluorescence intensity in pseudocanaliculi was monitored. The fluorescence intensities of C6-NBD-PC at 1, 2 and 3 minutes were significantly increased in bezafibrate-treated cells compared to those in vehicle-treated cells. Data are presented as means \pm SEM of 6 experiments.

の遺伝子の存在、蛋白への翻訳を含む蛋白合成系の異常などが関与する可能性が示唆されました。またベザフィブラートはヒト肝細胞において、MDR3の転写および蛋白合成を増加させるよりはむしろMDR3蛋白の胆管膜へのredistributionを増加することより、胆汁中へのリン脂質分泌促進すると考えられました。本症では肝MDR3の発現低下によるリン脂質の肝内輸送ならびに胆汁排泄機構にかかわる異常が存在することが明らかとなっている⁴。胆汁中へのリン脂質の分泌増加は胆汁酸とのミセル形成を安定化し、疎水性胆汁酸による胆管上皮細胞の障害を軽減し、胆管炎の病態を改善しうるものと考えられた。

E. 結論

原発性肝内結石症における肝MDR3の発現低下はMDR3遺伝子の転写領域における変異によるものではないと考えられた。また本症の分子標的薬物治療としてベザフィブラートは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

1. Todoroki, T., Koike, N., Kawamoto, T., Kashiwagi, H., Shoda, J., Takahashi, H., Fukuda, Y. Patterns and predictors of failure after curative resections of carcinoma of the ampullary of Vater. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 1176-1183.
2. Shoda, J., Tanaka, N., Osuga, T.: The molecular basis of gallstone pathogenesis and its potential therapy. *Hepatolithiasis—Epidemiology and pathogenesis update. Frontiers in Bioscience* 2003; 8: e398-409.
3. Unno, R., Matsuzaki, Y., Itoh, S., Doy, M., Shoda, J., Tanaka, N.: Progression of autoimmune-mediated hepatic lesions in a murine graft-versus-host reaction by neutralizing IL-10. *Hepatology Research* 2003; 25: 423-434.

4. Shoda, J. Suzuki, H., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Hirouchi, T., Utsunomiya, H., Oda, K., Tanaka, N.: Novel mutations identified in the human multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology Research* 2003 ; 27 : 322-325.
5. Shoda, J., Ueda, T., Kawamoto T., Todoroki, T., Asano, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Maruyama, T., Nimura, Y., Tanaka, N.: Involvement of prostaglandin E₂ and its specific receptor subtype EP₄ in chronic proliferative cholangitis in the bile ducts of patients with hepatolithiasis. *Clin Gastroenterol & Hepatol* 2003 ; 1 : 285-296.
6. Shoda, J., Miura, T., Yamamoto, M., Akita, H., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Utsunomiya, H., Oda, K., Kano, M., Tanaka, N.: Genipin, an active metabolite of a herbal medicine Inchinko-To, enhances multidrug resistance-associated protein 2-mediated bile formation in rats. *Hepatology* 2004 ; 39 : 167-178.
7. Miyahara, N., Shoda, J., Kawamoto, T., Furukawa, M., Ueda, T., Todoroki, T., Tanaka, N., Matsuo, K., Yamada, Y., Kohno, K., Irimura, T.: Expression of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine-polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase isozyme 3 in the subserosal layer correlates with post-surgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *Clin Cancer Res* 2004 ; In press.
8. Kawamoto, T., Shoda, J., Todoroki, T., Suzuki, H., Miyahara, M., Furukawa, M., Tanaka, N., Irimura, T.: Expression of MUC1 mucins recognized by a monoclonal antibody MY.1E12 is a useful biomarker for tumor aggressiveness of carcinoma of the gallbladder. *Clin Exp Metastasis* 2004 ; In press.

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治療法の選択

研究協力者 山上裕機
和歌山県立医科大学 外科学第2講座

研究要旨

当施設におけるこの33年間に経験した胆石症は2,460例で、そのうち肝内結石症は94例で3.8%を占めた。肝内結石症の罹患年齢は平均56.9歳と総胆管結石症に比較すると若かったが、男女差はなかった。肝内結石症に対する治療法は、従来は胆管消化管吻合が多く、遺残結石率も60%前後あったが、最近5年では肝切除に加えてPTCSLなどの非観血的治療が増加し、遺残結石率も4.2%にまで減少した。現在の治療方針としては、原則としてL型は肝切除を、R型とLR型にはPTCSLを第一選択としているが、LR型であっても、完全に切石が可能な症例には積極的に肝切除を施行している。PTCSLによる砕石にはホルミウムYAGレーザーを用い良い成績を上げている。しかし、非観血的治療を施行する際には常に胆管癌の合併の可能性を念頭におき、胆管壁の生検などを積極的にする必要がありと考えている。

A. 研究目的

近年、USやCTscanの普及により肝内結石の存在部位のみならず質的診断も可能となった。とくにMRCPやHelical CTにより、胆管の走行も立体的な表現が可能となり、肝内結石症の診断能力は大きく向上した。医療技術の進歩も著しく、肝切除などの手術療法の成績も向上し、percutaneous transhepatic cholangioscopic lithotripsy (PTCSL) やperoral cholangioscope (POS) などの非観血的治療法も確立した。

しかし、現在もこれらの治療後の結石遺残率や再発率が20%前後存在するのも事実である。これらを改善するには、肝内結石症の複雑な病態を正確に診断し、その個々の病型に最も適した治療法を最初から実行することが肝要と考えている。

B. 研究方法

1971年から2003年の33年間に経験した胆石症は2,460例で、そのうち胆嚢結石症が78.7%を占め、肝内

結石症は94例で3.8%であった。平均年齢では総胆管結石症で高齢者が多い傾向にあったが、肝内結石症

表1. 当科における胆石症例 (1971-2003)

	胆嚢結石症	総胆管結石症	肝内結石症	計
患者数	1,937 (78.7%)	429 (17.4%)	94 (3.8%)	2,460
年齢(mean±SD)	50.5±14.5	64.4±13.9*	56.9±10.9	54.8±15.2
性別:男/女	895/1042	214/215	44/50	1,021/1,083
胆道手術歴あり/なし	411/1,526	111/308	73/21**	466/1,638

* p<0.01 vs 胆嚢結石症, 肝内結石症

** p<0.01 vs 胆嚢結石症, 総胆管結石症

表2. 肝内結石症の病型

I/E type	I/E (肝内外型)		計
	I (肝内型)	E (肝内外型)	
1971-1985	12	30	42
1986-2003	26	26	52

L/R type	L/R (両葉型)		計
	L (左葉) or R (右葉)*	LR (両葉型)	
1971-1985	17 (L:13, R:4)	25	42
1986-2003	35 (L:25, R:10)	17	52

* p<0.05 vs LR

では平均56.9歳と比較的若く、男女差はなかった(表1)。

これらの症例を1985年までを前期、その後の18年間を後期とすると、総胆管結石症例と同様に肝内結石症例も減少傾向にあった。しかしこれは、近年、胆嚢摘出に対して腹腔鏡下胆嚢摘出術が普及したため症例数が増加し、相対的に減少した可能性もある。以下に当科における肝内結石症94例の病型分類別に治療法の変遷を述べるとともに、その病型に最も適した治療法を考察した。

C. 研究結果

肝内結石の病型分類の変遷を示す。IE(肝内肝内外型)分類では前期はIE type(肝内外型)が70%以上を占めたが、後期ではI type(肝内型)が急増した。LR(左葉、右葉型)分類では、前期ではLR type(両葉型)が44%を占めていたが、後期になって著しく減少し、LtypeかRtypeの片葉型が増加しつつある(表2)。

肝内結石症に対する手術術式の変遷を示す(表

3)。従来は術中可及的に碎石し、遺残結石に対しては胆管と空腸吻合を行ってきたが、18年前からは肝切除術が60%を占め、この5年間はPTCSLなどに代表される非観血的治療が多くなった。PTCSLの碎石法も従来は機械的碎石や電気水圧による破砕法を用いていたが、5年前よりDye laserを3年前よりHolmium YAG laserを用いることによって遺残結石も急激に減少した。

肝内結石に対する病型別治療法を示す。肝切除術は圧倒的にL型に多く適応され、遺残結石がないと判断できれば、LR型にも積極的に適応している。胆管消化管吻合やPTCSLの適応は難治性とされるLR型が最も多く、したがってLR型ではどうしても遺残結石が多かった(表4)。

術後合併症の種類と頻度を示す(表5)。術後肝障害、胆汁漏出、創感染などが主なものであるが、術式別では肝切除術後には胆管消化管吻合やT-tube挿入術に比較して合併症がむしろ少なく、合併症の多かった1例を除いて平均すると、術後入院期間も他の術式に比較して短かった(表6)。

表3. 肝内結石症に対する治療法

	治療法				
	肝切除	胆管消化管吻合	T-tube	PTCSL	計
1971-1985	9 (0)	25 (14)**	8 (3)	0 (0)	42 (17)
1986-2003	28 (0)	14 (4)	4 (0)	9 (1)	52 (5)*
	37 (0)	39 (18)	12 (3)	9 (1)	94 (22)

() 遺残結石症例数

* p<0.05 vs 肝切除の遺残結石症例数

** p<0.05 vs 1971-1985の遺残結石症例数

表4. 肝内結石の存在部位別治療法

治療法	結石の存在部位	結石の存在部位		
		L	LR	R
肝切除 (n=37)		32 (0)	3 (0)	2 (0)
胆管消化管吻合 (n=36)		4 (1)	25 (14)	8 (3)
T-tube drainage (n=12)		2 (0)	7 (2)	3 (1)
PTCSL (n=9)		0 (0)	8 (1)	1 (0)
		35 (1)*	42 (17)	14 (4)

() 遺残結石症例数

* p<0.01 vs LR, R型の遺残結石症例数

表5. 術後合併症

	肝切除 (n=37)	胆管消化管吻合 (n=39)	T-tube drainage (n=12)
死亡	0	0	0
肝不全	0	0	0
腎不全	0	0	0
肝機能障害	4	3	3
胆汁漏	3	2	2
創感染	2	3	2
腹腔内膿瘍	2	1	0
腸閉塞	0	2	0
肺炎	1	0	0
その他	1*	1**	1***
計	8 (21.6%)	9 (23.1%)	4 (33.3%)

* 腹腔内出血 ** AGML *** 急性肺炎

表6. 術中所見と入院期間

	肝切除 (n=37)	胆管消化管吻合 (n=39)	T-tube (n=12)
手術時間 (min)	256 ± 102*	236 ± 146	186 ± 90
術中出血 (ml)	962 ± 364**	542 ± 182	486 ± 144
入院期間 (day)	29 ± 22	38 ± 28	36 ± 30

* p<0.05 vs T-tube

** p<0.01 vs 胆管消化管吻合, T-tube

D. 考察

近年、肝切除術が安全に施行できるようになって、肝内結石症に対しても積極的に肝切除術が適応されるようになった。肝内結石症に対する肝切除術の最大の利点は、切除対象の肝内に充満している結石のすべてとともに、その病変肝の病的胆管（胆管癌を含めて）を一塊として除去できるため、結石の再発の可能性が少ないことにある。特に最も適応され易いL型の肝内結石症は、結石と病的胆管が同時に除去できる肝左葉切除、または外側区域切除のよい適応とされている。とくに、日本における近年の肝内結石症にはI型、L型が増加していることもあり、全国調査からみても肝切除術がその治療の過半数を占めるようになった。

しかし、胆石症そのものは良性疾患であるとの立場からはその適応には一定の制約がある。すなわち、①肝内結石が片葉に局限している。②肝内胆管に結石とともに著明な狭窄や拡張が存在する。③肝内胆管癌が併存している。④肝膿瘍や肝萎縮などの肝病変を伴う症例などが適応の原則とされている。

肝切除術の適応となる病型は、この症例のようにL型が圧倒的に多く、R型に対する肝切除の適応はまだ少ない。特に両葉型に対して肝切除を施行できる機会は少なく、肝膿瘍や肝萎縮など高度な肝病変を合併する部位の肝切除を行った後、残存側の肝内胆管と挙上した空腸を端側吻合して、たとえ小さな結石を残しても、結石の自然落下を期待する方法をとることもある。

肝切除術の適応とならない肝内結石症に対して、従来は肝管空腸吻合術が広く用いられてきた。適応と問題点は以下の2つとされる。①肝門部より下部胆管に狭窄を認めるが肝内には狭窄のない症例。肝内に狭窄があると、術後重篤な肝内胆管炎を併発することがあり、注意が必要とされる。②両葉型で術中の可及的切石にもかかわらず、遺残結石が予想される場合。術後の自然排石を期待して、術後切石ルート確保のため総胆管にT-tubeを留置したり、遺残結石が存在する胆管内にRTBDtubeを挿入しておくことが多い。従来から頻用されてきたRoux-en Y

空腸脚の盲端に空腸外瘻を造設することもある。いずれの場合にも下部消化管に通過障害のないことが必須の条件とされる。

肝内結石症の治療方針の決定は、その複雑な病態を正確に診断することから始まる。肝内胆管の走行状態、結石の所在部位、胆管の狭窄や拡張部位とその程度などを知るために、たとえ最終的には他の治療法を選択するにしても、その前に必ずPTCSを施行しておくよう努力すべきである。特に肝内結石症に多次手術が多い理由の1つとして、初回治療時に不適切な術式が選択され、遺残結石や再発結石によりさらに病態が複雑になってしまうことが考えられ、その意味でまずPTCSにて肝内胆管構築を理解しておくべきと考える。

PTCSLの適応症例は、全国調査からみても肝管空腸吻合術と同様にLR型やR型の難治例が多く、言い換えれば肝切除ができない症例ということになる。したがって、遺残結石もまだ19.6%と少なくない。また再発結石も多いが、これはたとえ初回治療で完全砕石できても胆管構築そのものには変化がないためと考えられる。しかし、PTCSは患者への負担が少なく、比較的容易に施行できることから、日本の全国調査からみても従来、肝管空腸吻合術が行われていた症例は徐々にPTCSL治療に置き変わってきている。

PTCSは原則的にUSガイド下に経皮的に左肝管を穿刺し、その瘻孔を徐々に拡大、最終的に18Frの太さにして経皮経肝的に胆道内視鏡を挿入する。われわれは外径4.9mmのオリンパス社製CHF-P20を用いている。やや太めではあるが鉗子口も大きく、吸引装置がある最小径の胆道鏡で、非常に操作性に優れている。結石破碎器具としては、従来はバスケット鉗子などによる機械的碎石法（mechanical lithotripsy）と電気水圧衝撃波（electrohydraulic lithotripsy）による碎石が一般的であった⁶⁾。しかし、最近ではレーザーを用いて良い成績を上げている。われわれの施設においても5年前からDye laserを導入し結石破碎に用いている。2-3年前からは、泌尿器科領域でよく使用されるようになったHolmium YAG laserを使用している。肝内結石症例へ

の応用例はまだ報告されていないが、我々は碎石条件を0.8joules,20puls, 16wattとしている。しかし、この条件で1cm角の結石ならば10秒ほどの照射で細かく破碎できる。また、板状に張り付いた結石に対しても胆管壁から出血させることなく強い結石破碎力を示した。

なお、肝外胆管優位のIE型は、総胆管結石からの積み上げ型肝内結石症のことが多く、EST後に機械的結石破碎法 (biliary mechanical lithotripter ; BML) を用いて総胆管結石を碎石し、バスケット鉗子にて採石することにより、肝内結石も総胆管内に落下することが多い。最近、PTCSよりさらに非侵襲的な経口胆道鏡 (peroral cholangioscope ; POC) が治療に用いられ始めた。われわれは左右肝管分岐部付近より十二指腸側の肝内結石症は経口胆道鏡で十分碎石可能と考えている。しかし、肝内結石症の4-7%には肝内胆管癌を合併することがあり、PTCS治療時には胆管壁の硬化や色調異常、拡張や狭窄などは炎症性のものか癌性のものか、胆管のbiopsyなどによって十分に判別しておく必要があると考える。

E. 結論

1. 肝内結石症に対する手術術式は、従来は胆管消化管吻合が多く、遺残結石率も60%前後あったが、最近5年では肝切除に加えてPTCSLなどの非観血的治療が増加し、遺残結石率も4.2%にまで減少した。
2. 現在の治療方針としては、原則としてL型は肝切除を、R型とLR型にはPTCSLを第一選択としている。PTCSによる碎石にはホルミウムYAGレーザーを用い良い成績を上げている。しかし、たとえLR型であっても、完全に切石が可能な症例には積

極的に肝切除を施行している。

3. 非観血的治療を施行する際には、常に胆管癌の合併の可能性を念頭におく必要がある。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1) Uchiyama K, Onishi H, Tani M, Kinoshita H, Ueno M, Yamaue H. Indication and procedure for treatment of hepatolithiasis. Arch Surg 137 (2) : 149-153. 2002

2) Uchiyama K, Nakai T, Tani M, Onishi H, Kinoshita H, Kawai M, Ueno M, Yamaue H. Indications for extended hepatectomy in the management of stage IV hilar cholangiocarcinoma. Arch Surg. 138 (9) : 1012-1016. 2003

3) Uchiyama K, Onishi H, Tani M, Kinoshita H, Kawai M, Ueno M, Yamaue H. Long-term prognosis after treatment of patients with choledocholithiasis. Ann Surg. 238 (1) : 97-102. 2003

4) Uchiyama K, Kawai M, Onishi H, Tani M, Kinoshita H, Ueno M, Yamaue H. Preoperative antimicrobial administration for prevention of postoperative infection in patients with laparoscopic cholecystectomy. Dig Dis Sci. 48 (10) : 1955-1959. 2003

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし