

表 5 生活環境

		症例 (n=30)	対照 (n=30)	オッズ比 (95%CI)	P値
生家の職業	第1次産業	14	10	1.750(0.616-4.973)	0.43
	その他	16	20		
生家の飲料水	井戸水	13	13	1.000(0.360-2.777)	1.000
	その他	17	17		
生家のトイレ	汲み取り	21	22	0.848(0.276-2.612)	1.000
	その他	9	8		

表 6 食生活・嗜好品

		症例 (n=30)	対照 (n=30)	オッズ比 (95%CI)	P値
食生活					
ごはん (米飯)	毎日食べる	19	19	1.000(0.350-2.858)	1.000
	時々・食べない	11	11		
パン	毎日食べる	6	8	0.688(0.206-2.297)	0.761
	時々・食べない	24	22		
魚 (イカ、エビを含む)	毎日食べる	14	14	1.000(0.363-2.758)	1.000
	時々・食べない	16	16		
肉類 (牛、豚、鶏肉など)	毎日食べる	6	8	0.688(0.206-2.297)	0.761
	時々・食べない	24	22		
嗜好品					
飲酒	飲む	15	12	1.500(0.539-4.171)	0.604
	飲まない	15	18		
たばこ	吸う	11	5	2.895(0.860-9.745)	0.143
	すわない	18	25		

症状を有して通院している症例は30例中7例であった。

C. 成績

1. 生活環境 (表5)

生家の職業では、肝内結石症例群における農漁業を中心とする第1次産業者の割合が対照群よりも高い傾向が認められ、オッズ比は1.750であったが有意差は認められなかった。その他、生家の飲料水は、井戸水と水道水などその他の飲料水に差はなく、また、トイレも汲み取りと水洗などとの間に差異はみ

られなかった。

2. 食生活・嗜好品 (表6)

米飯、パン、魚、肉類について、毎日摂取するかどうかについて調査したが、症例群と対照群で全く差異はなかった。嗜好品では、肝内結石症例群におけるアルコール摂取者の割合が対照群よりも高い傾向が認められ、オッズ比は1.500であったが有意差は認められなかった。また、肝内結石症例群における喫煙者の割合が対照群よりも高い傾向が認められ、オッズ比は2.895とであったが有意差は認められなかった。

3. 回虫感染 (表7)

表 7 回虫感染について

		症例 (n=30)	対照 (n=30)	オッズ比	P値
回虫症の既往	あり	6	4	1.652(0.408-6.469)	0.731
	なし	24	26		
回虫 特異的IGE抗体	陽性	5	3	1.800(0.389-8.323)	0.706
	陰性	25	27		

表 8 感染症

		症例 (n=25)	対照 (n=30)	オッズ比	P値
HBs抗原	陽性	1	2	0.583(0.050-6.839)	1.000
	陰性	24	28		
HBs抗体	陽性	4	4	1.238(0.276-5.551)	1.000
	陰性	21	26		

		症例 (n=30)	対照 (n=30)	オッズ比	P値
HCV抗体	陽性	5	1	5.800(0.635-53.021)	0.195
	陰性	25	29		
HTLV-1抗体	陽性	3	1	3.222(0.316-32.889)	0.612
	陰性	27	29		
抗H-Pylori IGE抗体	陽性	15	19	0.579(0.206-1.624)	0.435
	陰性	15	11		

		症例 (n=30)	対照 (n=30)	オッズ比	P値
輸血歴	あり	8	0	-	0.005
	なし	22	30		

回虫症の既往のある者がオッズ比1.652、回虫特異的IGE抗体の陽性率のオッズ比は1.800と症例群に多くみられたが、何れも有意差はみられなかった。

4. その他の感染症 (表8)

症例群の対照群に対するHCV抗体の陽性率のオッズ比は5.800と高かったが、有意差はなかった。また、症例群の対照群に対するHTLV-1抗体陽性率もオッズ比も3.222と高かったが、HCV抗体陽性率と同様有意差はなかった。しかし、輸血歴を有する者は、症例群では8人、対照群では0人であり、症例で有意に多かった ($p=0.005$)。なお、抗H-Pylori IGE抗体の陽性率に差はみられなかった。

D. 考察

肝内結石症多発地区である長崎県上五島地区における肝内結石症の成因に関する疫学調査²⁾では、食生活の関与はないようであったが、肝内結石症患者で、世帯主の職業が農漁業で、生家の飲料水が井戸水や河川水であるものが多く、生活環境要因の関与が疑われた。また、感染症として、症例でATLV抗体の陽性者が多く、ATLVウイルス感染の関与が示唆されたが、回虫感染については、既往歴では回虫症を認めたものが多いものの、回虫の特異的IgE抗体価は差がなく、成因の一つとして感染の関与

についてはさらなる検討が必要とされた。

そこで、今回、肝内結石症の発症要因を明らかにするために、1) 環境の衛生状態が成因として関与している可能性がある。2) 食生活(栄養状態)が成因として関与している可能性がある。3) HTLV-1、HCV、回虫感染が成因として関与している可能性がある、の3つを作業仮説として、全国に分布する本研究班に所属する施設において症例対照研究を行ない、長崎県上五島地区の成績と比較した。

その結果、長崎県上五島地区では、肝内結石症症例の生家の飲料水に井戸水や河川の水を利用しているものなど上水道の完備していないものが有意に多かった²⁾が、今回の調査では水道水の利用と井戸水などの利用に差はみられなかった。また、生家のトイレも汲み取り式と水洗式など下水道の利用にも差がなかった。しかし、生家の職業では、肝内結石症例群における農漁業を中心とする第1次産業者の割合が対照群よりも高い傾向が認められ、有意差は認められなかったがオッズ比は1.750であった。全国調査においても環境の衛生状態が成因として関与している可能性は否定できないと考えられる。

食生活に関しては、主食としての米飯食、パン食、副食として魚類、肉類の摂取状況を毎日摂取する者と、時々摂取するか全く摂取しない者に分けて検討したが、何れも肝内結石症例と対照に差異はみられず、食生活の関与も否定的であった。

ところで、肝内結石症の成因として寄生虫特に回虫症の関与が報告され^{3, 4)}、最近でも台湾における疫学調査でもその関与が報告された⁵⁾。今回の調査でも、回虫症の既往のある者がオッズ比1.652、回虫特異的IGE抗体の陽性率のオッズ比は1.800と症例に多くみられたが、何れも有意差はみられなかった。これは、今回の調査における症例数が少なかったことや、長崎県上五島地区の肝内結石がすべてピ系石であったの対し、今回の全国調査の症例では、結石の成因が異なるピ系石とコ系石が含まれている(表2)ことによるものとも考えられ、今後さらに症例を増やし、ピ系石とコ系石に分けて検討する必要があると思われた。

その他の感染症に関する検討では、HBs抗原、HBs抗体の陽性率に差は認めなかったが、HCV抗体の陽性率は、有意差はなかったもののオッズ比は5.8と高かった。これは輸血の既往歴が肝内結石症例に多かったことも関与しているものとも考えられた。また、長崎県上五島地区はATLの多発地区でもあるが、ATLウイルス抗体陽性例が肝内結石症例に有意に多く認められ²⁾、今回の全国調査でもオッズ比が3.222と高かった。統計学的に有意差はなかったが、興味あることで、HCV感染とともに、さらに、症例数を増やして検討する必要があるだろう。

E. 結語

1) 環境の衛生状態が成因として関与している可能性がある。2) 食生活(栄養状態)が成因として関与している可能性がある。3) HTLV-1、HCV、回虫感染が成因として関与している可能性がある、の3つを作業仮説として、全国に分布する本研究班に所属する施設において症例対照研究を行った。環境の衛生状態、食生活が成因として関与している可能性は明かでなかったが、HTLV-1、HCV、回虫感染が成因として関与している可能性が示唆され、さらに、症例数を増やして検討する必要があると思われる。

稿を終わるにあたり、調査に協力して頂いた各施設の担当者に深謝申し上げます。

協力施設：弘前大学(担当者：佐々木睦男、吉原秀一)、筑波大学(田中直見、正田純一)、自治医科大学(永井秀夫、佐田尚宏)、千葉大学(露口利夫)、杏林大学(跡見 裕、佐々木秀雄)、名古屋大学小児外科(安藤久實)、和歌山県立医科大学(山上裕機、内山和久)、広島大学(田妻 進)、宮崎大学(千々岩一男、甲斐真弘)

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

研究要旨

【目的】肝内結石症では肝内大型胆管の胆管上皮に上皮内異型病変をしばしば伴い、肝内胆管癌の前癌状態と考えられている。これまでに、胆管上皮内異型病変の診断基準は作成されておらず、各診断者が独自の診断基準を用いてきた。今回我々は診断一致率の向上を目的とし、胆管上皮内異型病変の診断基準を作成し、その有用性を検討した。【方法】肝内結石症に合併した胆管上皮内異型病変30病変の組織写真をデジタル撮影し、10名の病理医に配布し、各病変を診断してもらった。第1回診断は独自の診断基準で診断してもらい、第2回診断は我々の作成した診断基準に沿って診断してもらった。胆管上皮の上皮内腫瘍をbiliary intraepithelial neoplasia (BilIN) と称し、各病変を過形成・再生異型、低異型度上皮内腫瘍 (BilIN-1)、高異型度上皮内腫瘍 (BilIN-2)、上皮内癌 (BilIN-3) の4段階に診断してもらった。第1回診断、第2回診断のinterobserver agreement (異なる診断者が同一病変を診断する際の診断一致度)、intraobserver agreement (同一診断者が同一病変を診断する際の診断再現性) について解析した。【結果】第1回診断ではinterobserver agreement 58.4% (κ 値0.44)、intraobserver agreement 87.3% (0.82)、第2回診断ではinterobserver agreement 63.4% (0.49)、intraobserver agreement 87.3% (0.82) となり、第1回診断と比較して第2回診断ではinterobserver agreementが向上した。特に、過形成・再生異型とBilIN-1との区別、BilIN-2とBilIN-3との区別におけるinterobserver agreementが向上した。【結語】今回作成した胆管上皮内異型病変の診断基準によりinterobserver agreementが向上し、この診断基準が今後の胆管上皮異型病変の病態解析における形態的指標となりえる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝内結石症では5-10%の症例が肝内胆管癌を合併し、肝内胆管癌を合併すると予後が著しく低下する^{1,2}。肝内結石症では肝内大型胆管に上皮内異型病変をしばしば伴い、肝内胆管癌の前癌状態と考えられている³⁻⁶。これまでに胆管上皮内異型病変の診断基準は作成されておらず、各診断者が独自の診断基準に沿って診断しているのが現状である。膵臓や子宮などの他臓器でも上皮内異型病変は前癌状態として注目され、その診断基準の統一化が、日常診

療のみならず発癌研究の分野においても必要不可欠と考えられている⁷⁻⁹。

これまでに、膵臓や前立腺などの臓器で上皮内異型病変の診断基準が作成されてきた^{7-8,10}。それらの診断基準は異型病変の組織形態にもつづいて分類されている。さらに、p53、p16などの癌関連物質やKi-67などの細胞増殖マーカーの免疫染色を併用することで、診断一致率を向上させる試みもなされている^{11,12}。

今回我々は胆管上皮内異型病変の診断基準を作成しその有用性を検討した。また、胆管上皮内異型病

変診断におけるp53免疫染色の有用性について検討した。

B. 研究方法

胆管上皮内異型病変の診断一致度の検討

診断者は10名の病理医で、相島慎一、九州大学；味岡洋一、新潟大学；鹿毛正義、久留米大学；近藤福雄、社会保険病院船橋病院；坂本亨宇、慶応義塾大学；佐々木素子、金沢大学；島松一秀、公立八女総合病院；原武讓二、済生会八幡総合病院；若狭研一、大阪市立大学；Young Nyun Park、韓国Yonsei大学からなる。

材料は肝内結石症に合併した胆管上皮内異型病変30例で、各病変弱拡大（100倍）と強拡大（400倍）の2枚の組織写真をデジタル撮影した。同一の30病変を用いて、病変の配列の異なるファイルを2つ作成し、CD-ROMにて診断者に配布した。まず、1つ目のファイルの30例を診断し、少し期間をあけた後に2つ目のファイルの30例を診断してもらった。つまり、同一病変を異時性に2回診断してもらった。胆管上皮の上皮内腫瘍をbiliary intraepithelial neoplasia (BilIN) と称し、各病変を過形成・再生異型、軽異型度上皮内腫瘍 (BilIN-1)、高異型度上皮内腫瘍 (BilIN-2)、上皮内癌 (BilIN-3) の4段階で診断してもらった。これらの診断行為を2回行ってもらい、第1回診断は独自の診断基準で、第2回診断は作成した診断基準に沿って診断してもらった。

第1回診断、第2回診断の診断結果について、interobserver agreement (異なる診断者が同一病変を診断する際の診断一致度)、intraobserver agreement (同一診断者が同一病変を診断する際の診断再現性) を解析した。Interobserver agreementに関しては、30病変全てを対象とした診断一致度と、各異型度別の診断一致度を測定した。Interobserver agreementとintraobserver agreementは一致率(%)と一致度(κ 値)で評価した。 κ 値の評価は以前の報告に準じた(0.20以下、“悪い”；0.21-0.40、“少し悪い”；0.41-0.60、“中等度”；0.61-0.80、“良い”；0.80-1.00、“非常に良い”)¹³。

第1回、第2回の診断結果を解析した後、診断者が一同に集まり、今回作成した診断基準の問題点、改善点を議論した。

異なる施設で染色されたp53免疫染色の再現性の検討

肝内結石症に合併した胆管上皮内異型病変20例(平均年齢55.8歳、男女比5:15)のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。症例は過形成・再生異型、BilIN-1、BilIN-2、BilIN-3の各5症例。20例の同一部位の組織切片を5施設(金沢大学大学院形態機能病理学、金沢大学附属病院病理部、金沢医科大学附属病院病理部、福井県済生会病院病理部、厚生連高岡病院病理部)に配布し、各施設で日常使用されている方法で、p53の免疫染色を施行してもらった。染色標本を回収し、各症例の同一病変部で200-1000細胞に対する陽性細胞率を測定し、陽性細胞率を、0%、1-10%、11-20%、21-30%、31-40%、41-50%、51-60%、61-70%、71-80%、81-90%、91-100%の11段階に分類し、各施設で染色された組織切片の陽性細胞率を比較検討した。

胆管上皮内異型病変におけるp53発現の検討

肝内結石症に合併した胆管上皮内異型病変78例(平均年齢54.5歳、男女比45:33)のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。症例は過形成・再生異型20例、BilIN-1 20例、BilIN-2 25例、BilIN-3 13例。用いた抗体は抗ヒトp53マウスモノクローナル抗体(DO-7、Dako Cytomation、Glostrup、Denmark)で、EnVision+ (Dako)を用いて染色した。抗原賦活処理はマイクロウェーブ(20分、クエン酸バッファー)にて行った。各病変で200-1000細胞に対する陽性細胞率を測定し、陽性細胞率を、0%、1-10%、11-50%、51%以上の4段階で評価した。

C. 研究成果

診断基準の作成

構造異型、細胞極性の乱れ、細胞・核異型の3点

表1. 胆管上皮内異型病変の診断基準

BiIN-3*

乳頭状病変

- ・明らかに悪性といえる細胞異型を伴う
- ・悪性といえるほどの細胞異型はなく、び漫性もしくは部分的に細胞極性の乱れあり

低乳頭状・平坦病変

- ・明らかに悪性といえる細胞異型を伴う
- ・悪性といえるほどの細胞異型はなく、び漫性に細胞極性の乱れあり

BiIN-2

乳頭状病変

- ・明確な核形不整があるが悪性といえるほどの細胞異型はなく、細胞極性の乱れは軽い

低乳頭状・平坦病変

- ・明確な核形不整があるが悪性といえるほどの細胞異型はなく、部分的に細胞極性の乱れを伴う

BiIN-1

乳頭状病変

- ・腫瘍性の細胞異型があるがその程度は軽く、細胞極性の乱れは軽い

低乳頭状・平坦病変

- ・腫瘍性の細胞異型があるが悪性といえるほどの細胞異型はなく、細胞極性の乱れは軽い

過形成・再生異型 (hyperplasia or regenerative change)

乳頭状病変

- ・細胞密度の増加が主体の病変で、明らかな腫瘍性の細胞異型はない

低乳頭状・平坦病変

- ・細胞密度の増加が主体の病変で、明らかな腫瘍性の細胞異型はない
-

*BiIN, biliary intraepithelial neoplasia

注意点

1. この基準は肝内結石症における顕微鏡レベルの肝内大型胆管病変を対象とし、いわゆる胆管内乳頭状腫瘍 (intraductal papillary neoplasm) や胆管付属腺に見られる異型病変は対象としない。
2. 乳頭状病変は管腔内に明確な線維性芯を有して乳頭状に増生する病変とし、線維性芯が不明確なものは低乳頭状病変とする (図1)。

3. 細胞極性の乱れとは隣接細胞に比して突然の細胞極性の乱れがあり、挙上した核が細胞上端1/3に達するものとする。隣接細胞と連続性に核が偽重積するものは適応としない(図2)。
4. 腫瘍性増生の判断が行えない病変に対して indefinite for neoplasia の項を設ける。
5. 上皮内腫瘍および上皮内癌では化生性変化を認めることが多い。
6. 好中球が上皮内に浸潤するような炎症の強い病変では、異型度の評価を慎重にする。
7. 上皮内病変の付属腺導管内進展と浸潤像を区別する。
8. 上皮内腫瘍の一部には上皮内癌が含まれている可能性は否定できない。

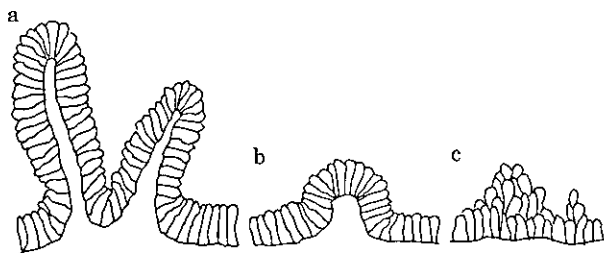


図1 胆管上皮内異型病変に見られる構造異型のシェーマ図。明確な線維性芯を有する乳頭状増生を乳頭状病変として扱う (a)、線維性芯が明確でないものは低乳頭状・平坦病変とする (b、c)。(文献14より引用)

に注目し診断基準を作成した(表1)¹⁴。構造異型は、乳頭状病変と低乳頭状・平坦病変の2群に分類した。乳頭状病変は管腔内に明確な線維性芯を有して乳頭状に増生する病変と定義した(図1)。細胞極性の乱れは細胞極性の乱れを示す領域により3段階に分類した。細胞極性の乱れとは隣り合う細胞に比して突然に核が挙上し、核が細胞質の上端1/3に達するものと定義した(図2)。細胞・核異型も3段階に分類した。これらの所見を組み合わせ、診断基準を作成した。各異型度に関して乳頭状病変と、低乳頭状・平坦病変の2群に分けて記載した。各異型度の代表的な組織写真を図3に示す¹⁴。

胆管上皮内異型病変の診断一致度の検討

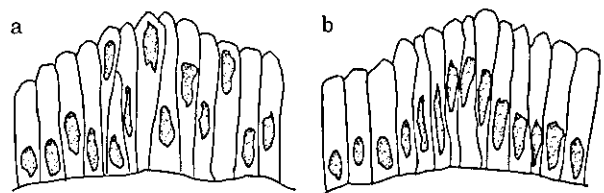


図2 胆管上皮内異型病変に見られる細胞極性の乱れのシェーマ図。隣り合う細胞に比して核が突然に挙上し、細胞質の上端1/3に達するものを細胞極性の乱れとする(a)、なだらかな核の偽重積は適応外とする(b)。(文献14より引用)

第1回診断、第2回診断のinterobserver agreement、intraobserver agreementの結果を表2に示す。独自の診断基準で診断された第1回診断に比して、作成した診断基準を用いた第2回診断ではinterobserver agreementが向上した。異型度別のinterobserver agreementでは、過形成・再生異型とBilIN-1との区別、BilIN-2とBilIN-3との区別において一致度が向上した。一方、BilIN-1とBilIN-2との区別における一致度は低下した(表3)。Intraobserver agreementは第1回診断、第2回診断ともに高い一致度を示した(表2)。

各病変別に見ると第1回診断に比して第2回診断で診断一致度が向上した病変は18病変、低下した病変は4病変、同程度だった病変は8病変だった。

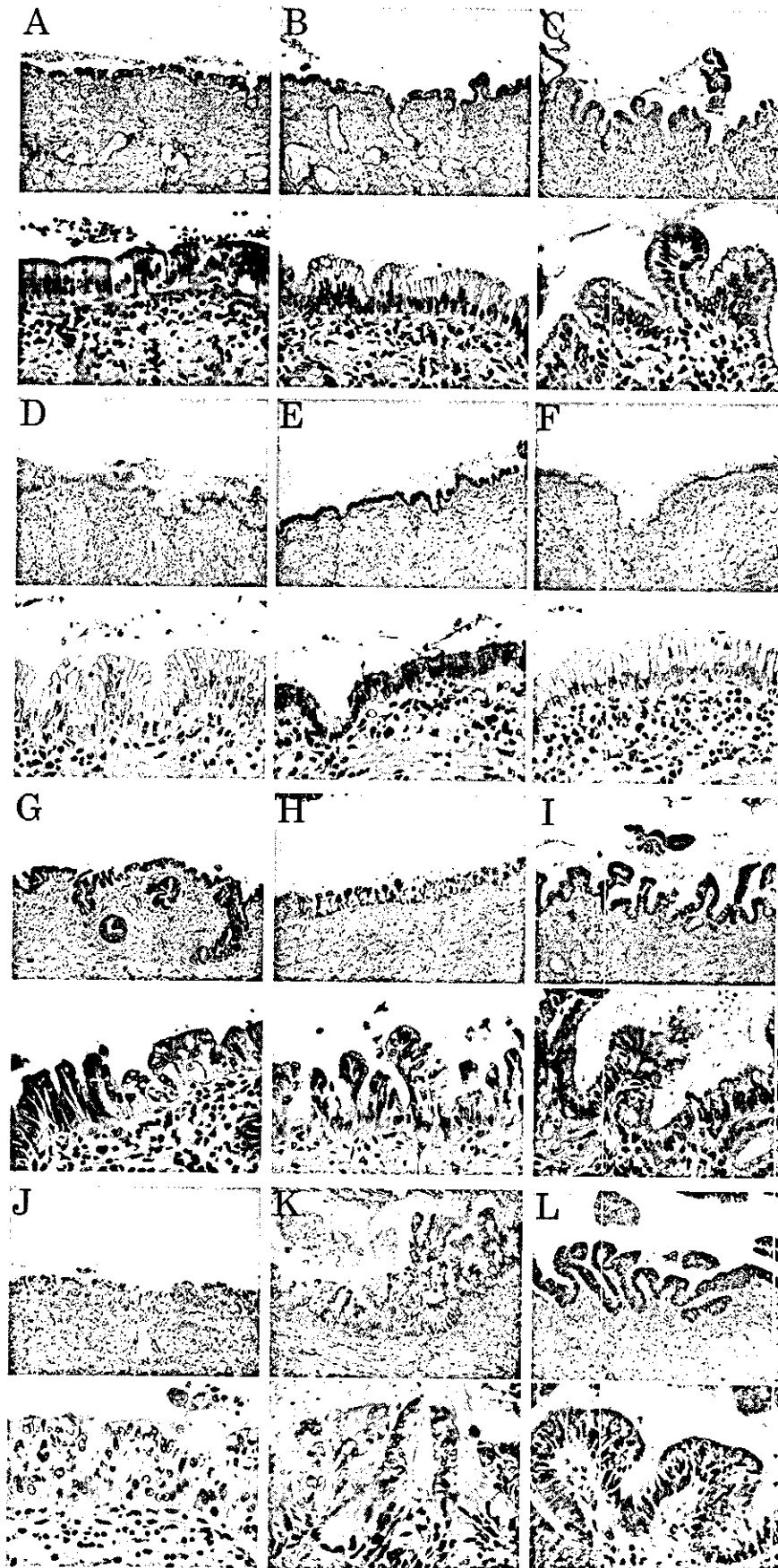


図3 肝内結石症に合併した胆管上皮過形成・再生異型 (A-C)、Biliary intraepithelial neoplasia-1 (BilIN-1) (D-F)、BilIN-2 (G-I)、BilIN-3 (J-L) の代表的組織像。(HE染色、上段 100倍、下段 400倍) (文献 14より引用)

表 2. 第 1 回診断と第 2 回診断における interobserver agreement と intraobserver agreement

	第 1 回診断	第 2 回診断
Interobserver agreement		
一致率 (%)	58.4 ± 1.6%	63.4 ± 2.0%
一致度 (κ値)	0.44 ± 0.02	0.49 ± 0.02
Intraobserver agreement		
一致率 (%)	87.3 ± 3.6%	87.3 ± 3.9%
一致度 (κ値)	0.82 ± 0.04	0.82 ± 0.44

表 3. 第 1 回診断と第 2 回診断における異型度別の interobserver agreement (κ値)

	第 1 回診断	第 2 回診断
過形成・再生異型と BiIIN-1*との区別	0.235	0.295
BiIIN-1 と BiIIN-2 との区別	0.489	0.443
BiIIN-2 と BiIIN-3 との区別	0.427	0.545

*BiIIN, biliary intraepithelial neoplasia

診断者が集まって今回作成した診断基準に関して議論したところ、実際の運用に際していくつかの注意点が指摘され、それらを診断基準の脚注に記載した (表 1)。

異なる施設で染色された p53 免疫染色の再現性の検討

5 施設の染色方法を表 4 に示す。2 施設は用手法で染色され、3 施設は自動染色装置が使用された。用いた抗体は 4 施設が DO-7 を使用し、1 施設が

表 4. 各施設の p53 免疫染色方法

	染色方法	抗体	抗原賦活法
施設 1	用手法	D0-7	オートクレーブ
施設 2	用手法	D0-7	マイクロウェーブ
施設 3	自動染色装置*	BP53-12	染色装置の熱処理
施設 4	自動染色装置*	D0-7	染色装置の熱処理
施設 5	自動染色装置*	D0-7	染色装置の熱処理

*, HX System Benchmark (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)

表 5. 胆管上皮異型病変における p53 免疫染色結果

	症例数	陽性細胞率			
		0%	<10%	11-50%	50%<
過形成・再生異型	20	20 (100%)	0	0	0
BilIN-1*	20	7 (95%)	1 (5%)	0	0
BilIN-2†	25	20 (80%)	4 (16%)	1 (4%)	0
BilIN-3‡	13	8 (62%)	4 (30%)	0	1 (8%)

*, BilIN, biliary intraepithelial neoplasia; †, p<0.05 vs 過形成・再生

異型; ‡, p<0.05 vs 過形成・再生異型, BilIN-1

BP53-12を使用していた。これら 2 つの抗体はヒト wild type p53 に対するマウスモノクローナル抗体である。抗原賦活法は施設によってその方法は異なるが、いずれの施設でも熱処理が行われていた。

5 施設で染色された p53 免疫染色標本を比較する

と、20 例中 17 例の染色結果は 5 施設で一致していた。過形成・再生異型の 5 例、BilIN-1 の 2 例、BilIN-2 の 4 例、BilIN-3 の 3 例は全施設一致して陰性だった。BilIN-1 の 2 例と BilIN-3 の 1 例はいずれの施設の染色でも 1-10% の陽性細胞率だった。残りの 3

例では施設間で染色結果に差が見られた。BiIIN-3の1例では陽性細胞率が55-78%と陽性細胞率に差が見られた。ただし、いずれの施設でも50%以上の高陽性率だった。BiIIN-1の1例では2施設が陰性、3施設が1-10%の陽性率だった。これらの施設間の染色方法を比較すると、陰性だった2施設は用手法で染色されており、陽性だった3施設は自動染色装置で染色されていた。また、BiIIN-2の1例では4施設が1-10%の低陽性細胞率だったが、1施設は20%の陽性率を示した。これらの2群間では用いた抗体が異なっていた。1-10%の陽性率だった4施設はDO-7を用い、20%の陽性率だった1施設ではBP53-12を使用していた。

胆管上皮内異型病変におけるp53発現の検討

胆管上皮内異型病変におけるp53の免疫染色の結果を表5に示す。過形成・再生異型では全例p53陰性だった。BiIIN-1の5%、BiIIN-2の20%、BiIIN-3の38%でp53発現が認められた。免疫染色にてp53陽性だった11例中9例は1-10%の陽性細胞率だったが、BiIIN-2の1例は1-50%の陽性率を、またBiIIN-3の1例は50%以上の高陽性細胞率を示した(図4)。



図4 Biliary intraepithelial neoplasia-3におけるp53免疫染色。50%以上の細胞にp53発現が認められる(100倍)。

D. 考察

近年の分子生物学的手法や分子免疫学的手法を用

いた研究により、胆管上皮内異型病変は肝内胆管癌の前癌病変であることが指摘されている³⁻⁶。胆管上皮内異型病変の診断基準はこれまで作成されたことがなく、各診断者が独自の診断基準で診断してきたため、診断者間の診断再現性は低いと考えられてきた。今回の検討で、独自の診断基準で診断した場合、intraobserver agreementは高かったが、interobserver agreementは58.4% (κ 値0.44)と診断者間の診断一致度が低いことがわかった。今回我々が作成した診断基準を用いると、高いintraobserver agreementは維持され、一方、interobserver agreementは僅かであるが向上した。ただし、共通の診断基準を用いた診断でもinterobserver agreementは κ 値0.49と中等度の一致度であり、更なる向上が望まれる。今回の診断者がこの診断基準を使用したのは今回が初めてであり、今後この基準に慣れることで更なる診断者間の診断一致度の向上が期待される。

今回作成した診断基準により過形成・再生異型とBiIIN-1との区別、BiIIN-2とBiIIN-3の区別におけるinterobserver agreementが改善された点は興味深い。日常診療においては、非腫瘍性病変と腫瘍性病変との区別や、上皮内癌か否かの判断が重要になることが多く、これらの評価に際し診断者間の診断再現性が向上した点は重要と思われる。

今回作成した診断基準は肝内結石症に伴って発生する上皮内異型病変を対象とした。原発性硬化性胆管炎や膵管胆管合流異常症などでも胆道系に異型病変が発生することが知られており、今回作成した基準が他の疾患に合併した胆管上皮内異型病変にも使用できるのか検討する必要があると思われる¹。また、今回の基準は肝内大型胆管の異型病変を対象としたが、肝外胆管や胆嚢など他の胆道系の異型病変についてもその利用性を検討する必要があると思われる。

異なる施設で染色されたp53免疫染色標本を比較したところ、20例中17例は染色結果が一致しており、p53免疫染色の再現性は比較的高いと考えられた。一方、染色結果に差のあった3例中2例では、染色方法や用いた抗体に違いがあった。これらの染色方

法や用いた抗体の違いが染色結果に直接影響したのかどうかは現時点では確定できないが、このように施設間で染色結果が異なる症例があることには注意する必要と思われる。

他臓器の上皮内異型病変の診断においても、免疫染色の有用性が示唆されている^{11,12}。今回の検討で過形成・再生異型は全例陰性であり、p53陽性例は過形成・再生異型とBiINとの鑑別にp53免疫染色は有用であると考えられた。また、50%以上の高陽性細胞率を示す症例はBiIN-3にしか認められず、50%以上の高陽性細胞率の症例ではBiIN-3が示唆されることが考えられた。一方、胆管上皮内異型病変の異型度が増すにつれp53陽性症例の頻度が高くなったが、その多くの症例は1-10%の陽性細胞率であり、1-10%の陽性率の症例においては、p53免疫染色はBiIN-1、BiIN-2、BiIN-3の鑑別には有用ではないと考えられた。このようにBiINと過形成・再生異型との鑑別や、p53高陽性症例でのBiIN-3診断におけるp53免疫染色の有用性が示唆されたが、施設間で染色結果に差がある症例もあり、免疫染色

はあくまでも補助的に利用する必要があると考えられる。

E. 結論

今回我々が作成した胆管上皮異型病変の診断基準により、診断者間の診断一致率が向上した。この診断基準が今後の胆管上皮異型病変の研究における形態的指標になりえ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

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Ⅲ 分担研究報告書

自然経過より見た肝内結石症と肝内胆管癌の関連 －発癌に寄与する臨床疫学的因子の検討－

分担研究者 古川正人

西諫早病院 消化器病センター

A. はじめに

我々は肝内結石症多発地域である長崎県上五島地区において無症候性の症例を含め多数の肝内結石症を経験し、これまで最長24年にわたって経過観察してきた¹⁾が、これらの中には経過中に肝内胆管癌を合併する症例が少なからず認められた。

今回、当院初回診断時に癌合併のないことが確認された肝内結石症例を対象として、肝内胆管癌の発生に寄与する因子をについて検討を行ったので報告する。

B. 対象と方法

1980年11月より2004年11月までに長崎県離島医療圏組合上五島病院で診断された肝内結石症240例のうち、診断時に癌に合併のないことが確認され、経過観察が可能であった218例を対象とした。

性別は男性96例、女性122例、年齢は12才から81

才（平均57.7歳）で、診断後の観察期間は0.5～24年（平均14.0年）であった。肝内胆管癌の発生は、14例（6.4%）に認められた。厚生省肝内結石症調査研究班による病型分類では、I型169例、IEおよびIE型49例、結石存在部位は、L型96例、R型95例、LR型27例であり、肝葉萎縮は101例（46.3%）に認められた。（表1）

これらの症例につき、Kaplan-Meier法を用いて累積発癌率を解析し、診断時年齢、性別、症状、病型、結石存在部位、肝葉萎縮、治療の有無、術式について検討し、発癌に寄与する因子を明らかにした。

検定は、Logrank testを行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

C. 成績

1) 肝内胆管癌累積発癌率（図1）

肝内結石症における肝内胆管癌の累積発癌率をみると、10年4.8%、20年8.3%であり、およそ年率

表1. 患者背景

症例数	218
男:女	96 : 122
結石診断時年齢	12～81（平均57.7歳）
診断後観察期間	0.5～24年（平均14.0年）
肝内胆管癌の発生	14例（6.4%）
病型 I: IE or IE	169:49
部位 L: R: LR	96:95:27
肝葉萎縮(+): (-)	101:107

図1. 肝内胆管癌累積発癌率

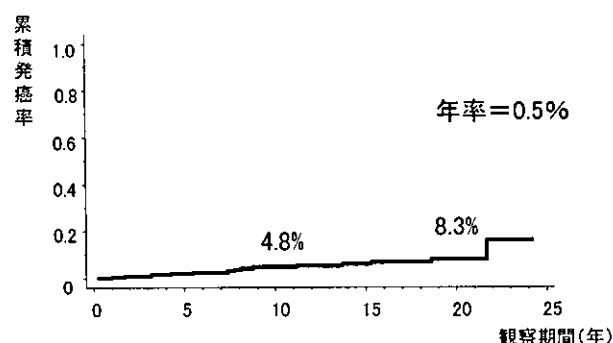


図2. 性別の累積発癌率

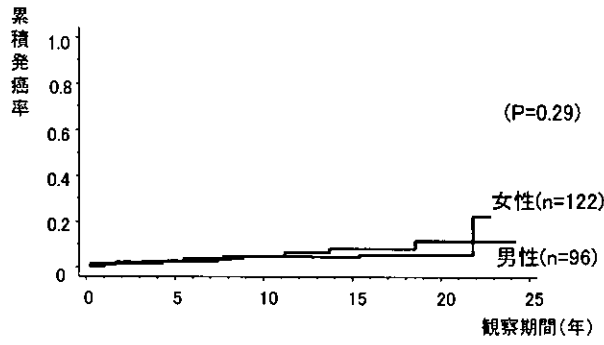


図3. 結石診断時年齢別の累積発癌率

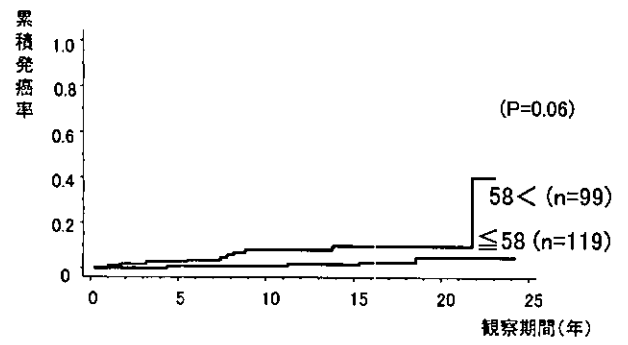


図4. 症状別の累積発癌率

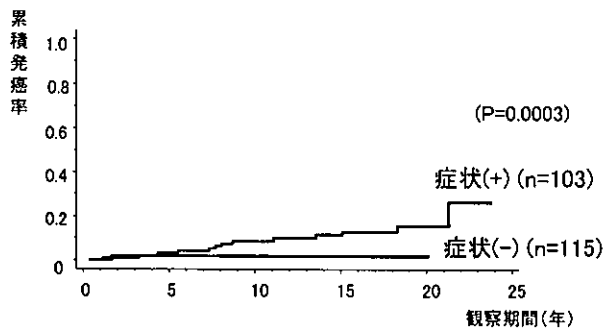


図5. 病型別の累積発癌率

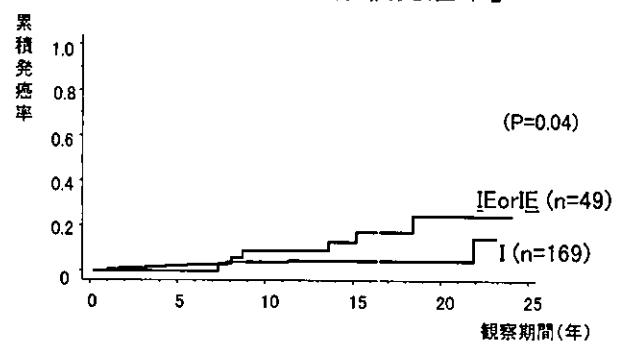


図6. 結石部位別の累積発癌率

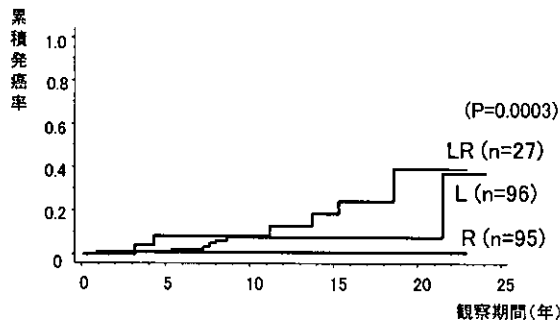


図7. 肝葉萎縮別の累積発癌率

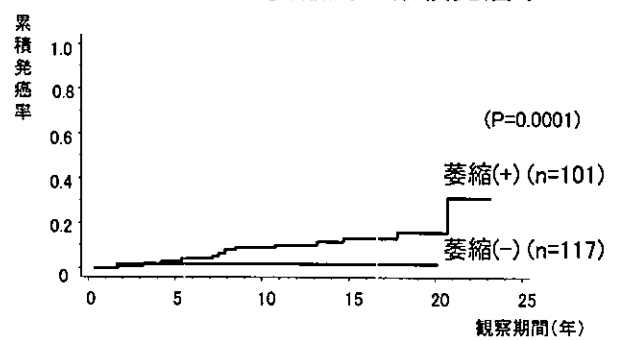


図8. 治療の有無別の累積発癌率

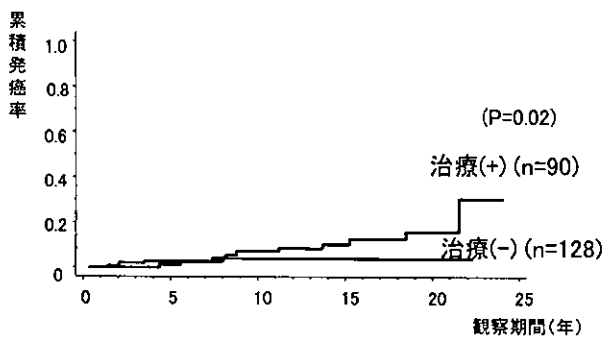
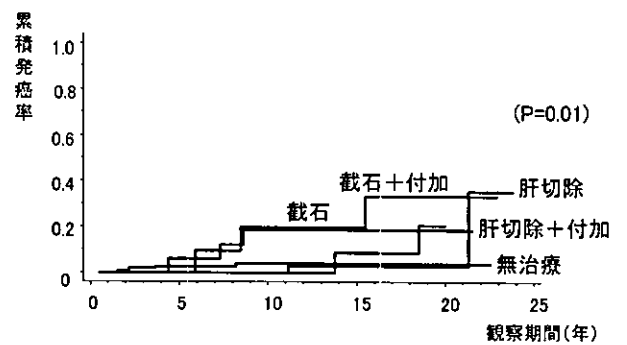


図9. 治療の術式別の累積発癌率



0.5%であった。

2) 性別の累積発癌率 (図2)

男性 (n=96例) は10年4.9%、20年11.6%、女性 (n=122) は10年4.6%、20年5.8%であり、性差はみられなかった。

3) 診断時年齢別の累積発癌率 (図3)

診断時年齢を58歳で2群に分けると、59歳以上 (n=99) では10年8.3%、20年9.8%、58歳以下 (n=119) では10年1.1%、20年6.1%であり、若い時に診断される場合には、発癌率が低い傾向にあった。

4) 症状別の累積発癌率 (図4)

上五島地区では検診により多くの無症状肝内結石を発見しており、無症状のまま経過観察している症例も多い。そこで症状の有無について累積発癌率を検討した。症状のある群 (n=103) では20年28.8%、症状のない群 (n=115) では20年1.0%であり、有症状の群で有意に発癌率が高かった。

5) 病型別の累積発癌率 (図5)

肝内型 (I型、169例) では、10年3.9%、20年4.7%であったが、肝内外型 (IEおよびIE型、n=49) では10年8.0%、20年22.0%であり、肝内外型で有意に発癌率が高かった。

6) 結石存在部位別の累積発癌率 (図6)

結石存在部位は、右葉型 (R型)、左葉型 (L型)、両葉型 (LR型) に分けられ、R型 (n=95) では10年1.1%、20年1.1%、L型 (n=96) では10年7.9%、20年7.9%、LR型 (n=27) では、10年8.5%、20年39.8%であった。両葉型は右葉型に比べ有意に発癌率が高かった。

7) 肝葉萎縮別の累積発癌率 (図7)

肝葉萎縮のある群 (n=101) では20年17.6%、肝葉萎縮のない群 (n=117) では20年0.9%であり、肝葉萎縮群で有意に発癌率が高かった。

8) 治療の有無別の累積発癌率 (図8)

治療がされている群 (n=92) では20年15.1%、治療がされていない群 (n=126) では20年3.5%であり、治療がされている群で有意に発癌率が高かった。

9) 治療の術式別の累積発癌率 (図9)

治療法を肝切除術、肝切除術+付加手術、截石術、截石術+付加手術の4群に分けると、肝切除術群 (n=42) は10年0%、20年3.1%、肝切除術+付加手術群 (n=16) は10年0%、20年22.1%、截石術群 (n=20) は10年19.6%、20年19.6%、截石術+付加手術群 (n=12) は10年19.2%、20年32.7%であった。

截石術群全体では、肝切除術群全体に比べて、有意に発癌率が高かった。

D. 考察

肝内結石症は病態が複雑で、治療を行っても結石の遺残や再発、逆行性胆管炎の反復から、肝硬変、肝不全への進展や肝内胆管癌の合併など不幸な転帰をとる例も少なくない。肝内結石症の多発地域である上五島地区でもこのような症例がみられ¹⁾、最近では患者の高齢化もあって、肝内胆管癌を合併する例が散見される。文献的には、肝内結石症の5~10%に癌の合併を認めるとの報告がある^{2,3,4)}が、症例数が少ないことから、癌発症の機序や危険因子については未だ明らかとはなっていない。当地域では、1980年から最長24年にわたり無症候性を含めた肝内結石症のフォローアップを行ってきたが、これまでに14例の肝内胆管癌を経験しており、今回癌発症の危険因子について検討した。

我々は、これまでも肝葉萎縮が胆管癌発生のハイリスクグループであることを報告してきた^{5,6)}が、今回の検討でも、有症状で肝葉萎縮がある症例では有意に発癌率が高く、病型では肝内型に比べて肝内外型、右葉型に比べて両葉型で発癌率が高かった。これらの症例の共通点は、病期期間が長く、胆管炎を反復し、治療も数回行われているものであり、反復性の慢性炎症から胆管上皮に過形成や異形成をきたし、腫瘍発症の下地になっていく可能性が考えられた。

また、治療群が無治療群より発癌率が高かったが、この無治療群の中には無症候性のものが多く含まれ、治療群のほとんどが有症状で肝葉萎縮を有する症例であることから、肝葉萎縮が関与したものと推測された。

治療法別の発癌率については、肝切除術群では10年0%、20年3.1%、肝切除術+付加手術群では10年0%、20年22.1%、截石術群では10年19.6%、20年19.6%、截石術+付加手術群では10年19.2%、20年32.7%であり、肝切除術群では截石術群に比べ、有意に発癌率が低くなっていた。すなわち、肝切除術により、特に肝萎縮を含めた病変部を除去することで、癌の発生を抑制したことが示唆された。

以上のことから、特に有症状で肝葉萎縮を伴う症例では将来的に肝内胆管癌発症の高危険例と考えられ、肝切除による治療を第一の選択にすべきであろうと思われた。

E. 結語

1. 初回診断時に癌合併のないことが確認され、経過観察が可能であった肝内胆管癌218例の肝内胆管癌累積発癌率は10年4.8%、20年8.3%であった。
2. 病型では肝内型に比べて肝内外型、右葉型に比べて両葉型で発癌率が高かった。

3. 症状が発現し治療を必要とする症例は、無症候性のものより発癌率が高かった。また肝葉萎縮例で有意に発癌率が高かった。
4. 治療法では、肝切除術群が截石術群に比べ有意に発癌率が低くなっていた。
5. 肝葉萎縮を伴う肝内結石症例では、20年で約18%の肝内胆管癌の累積発癌率を認めるため、截石術や付加手術を避け、適切な肝切除を行うことが必要である。

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

肝内結石症の予後に影響を与える要因 －比例ハザードモデルによる検証－

研究協力者 馬場園 明
九州大学健康科学センター

研究趣旨

1999年に行われた第4期調査の第2次調査対象者である肝内結石症の症例473例を対象としてコホート調査を行った。473例のうち26例が死亡例であったため、447例が当初追跡対象者となった。2大学から60例が胆管石灰化例であるとの報告があったため、追跡対象者は387例となった。最終的に299例の回答があり、回答率は77.3%であった。これらの299例については1999年度の調査情報に新たな情報を加え、回答がなかった88例と1999年度の調査時点で死亡した26例については1999年度の調査のみの情報でデータベースを作成した。このなかで生年月日の不明な1名と診断年月日の不明の8例は分析対象から除外し、404名を分析対象者とした。診断年月日を追跡のstart pointとして死亡あるいは胆管癌の発生をendpointするsurvival analysisを行った。Modelはproportional hazard modelを用いた。予後に影響を与える要因としては、初診時症状、結石種類、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、重症度を検討した。まず、死亡、胆管癌の発生を目的変数として、性、年齢を共変量として、予後に影響を与える要因を明らかにした。次に、この解析で有意であった要因をすべて説明変数として解析を行った。最後に、手術例を対象として、死亡、胆管癌の発生を目的変数として、性、年齢、重症度を共変量として、手術内容が予後に影響を与えるかどうかを検討した。その結果、次のような結論が得られた。

- 1、死亡に影響を与えた要因は持続する黄疸であり、オッズ比（95% C I）は2.78（0.98－10.92）であった。
- 2、胆管癌の発生に影響を与えた要因は胆道狭窄であり、オッズ比（95% C I）は3.65（1.24－10.75）であった。
- 3、重症度による分類では、重症度1、重症度2、重症度3の間に予後における違いは認められなかったが、重症度4の死亡に対するオッズ比（95% C I）は4.54（1.97－10.48）、胆管癌の発生に対するオッズ比（95% C I）は7.51（1.92－29.33）であった。
- 4、肝切除は予後には影響を与えていなかった。

A. 研究目的

肝内結石症の疫学に関する全国調査は今までに4回行われており、患者が高齢化していることや重症度が軽症化している傾向にあることなどが報告されている^{1)~5)}。また、肝内結石症の多発地区である長崎県上五島地区においては今まで多くの疫学調査が

行われてきており、環境的な要因としては、生家で井戸水や河川水の飲用や汲取り式トイレの使用が多い、回虫、HTLV-I、C型肝炎の感染率が高いことなどが明らかとなっている^{6)~14)}。

しかしながら、これまでコホート調査を行って、予後に関連する要因を明らかにした研究はほとんどない。

そこで、「肝内結石症調査に関する調査研究」班では、肝内結石症の予後に関するコホート研究について検討を行った。肝内結石症の症例は少なく、新規にコホート研究を立ち上げるのは困難であり、詳しい情報が得られている1999年の第4期調査の第2次調査対象者をコホートとして追跡することが最も効率的であるとの合意が得られた。

予後に影響を与える要因としては、第4期調査で得られている情報である初診時症状、結石種類、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、重症度を検討することにした。

B. 研究方法

1999年に行われた第4期調査の第2次調査対象者である肝内結石症の症例473例を対象としてコホート調査を行った。調査した項目は、最終受診年月日、肝内胆管癌、肝外胆管癌の有無、癌の診断年月日、死亡の年月日、死因とした。473例のうち26例が死亡例であったため、447例が当初追跡対象者となった。2大学から60例が胆管石灰化例であるとの報告があったため、追跡対象者は387例となった。8月の末に調査票を郵送したが、締め切り日の9月末までに回答があった症例は半数にみたなかったため、10月の初めに再度調査票を送り督促を行った。最終的に299例の回答があり、回答率は77.3%であった。これらの299例については1999年度の調査情報に新たな情報を加え、回答がなかった88例と1999年度の調査時点で死亡した26例については1999年度の調査

のみの情報でデータベースを作成した。このなかで生年月日の不明な1名と診断年月日の不明の8例は分析対象から除外し、404名を分析対象者とした。診断年月日を追跡のstart pointとして死亡あるいは胆管癌の発生をendpointするsurvival analysisを行った。Modelはproportional hazard modelを用いた。予後に影響を与える要因としては、初診時症状、結石種類、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、重症度を検討した。まず、死亡、胆管癌の発生を目的変数として、性、年齢を共変量として、予後に影響を与える要因を明らかにした。次に、この解析で有意であった要因をすべて説明変数として解析を行った。最後に、手術例を対象として、死亡、胆管癌の発生を目的変数として、性、年齢、重症度を共変量として、手術内容が予後に影響を与えるかどうかを検討した。なお、重症度分類は、Grade 1；無症状、Grade 2；腹痛発作、Grade 3；小項目（胆道系治療の既往、胆管炎、一過性の黄疸）を一つ以上みえず、Grade 4；大項目（1週間以上持続する黄疸、敗血症、肝内胆管癌）を一つ以上みたとした¹⁵⁾。年齢は1998年12月31日現在のものを用いた。

C. 研究成果

表1に対象者の性・年齢分布を示した。男性が189名(46.8%)、女性が215名(53.2%)、50歳未満が43名(10.7%)、50歳代が100名(24.8%)、60歳代が114名(28.2%)、70歳代が111名(27.5%)、80歳以上が36名(8.9%)であった。

表1 性・年齢分布

年齢	50歳未満	50歳代	60歳代	70歳代	80歳以上	合計
男性	19 (8.0%)	50 (26.5%)	55 (29.1%)	52 (27.5%)	13 (6.9%)	189 (46.8%)
女性	24 (11.3%)	50 (23.3%)	59 (27.4%)	59 (27.4%)	23 (10.7%)	215 (53.2%)
合計	43 (10.7%)	100 (24.8%)	114 (28.2%)	111 (27.5%)	36 (8.9%)	404 (100%)

表2に死亡数(発生率)を示した。全体で55名(13.6%)、男性が26名(13.8%)、女性が29名(13.6%)、50歳未満が2名(4.7%)、50歳代が5名

(5.0%)、60歳代が15名(13.2%)、70歳代が25名(22.5%)、80歳以上が8名(22.2%)であった。