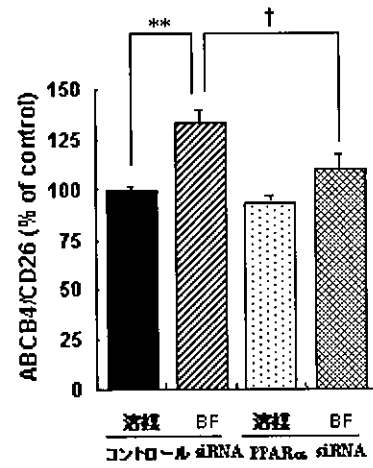
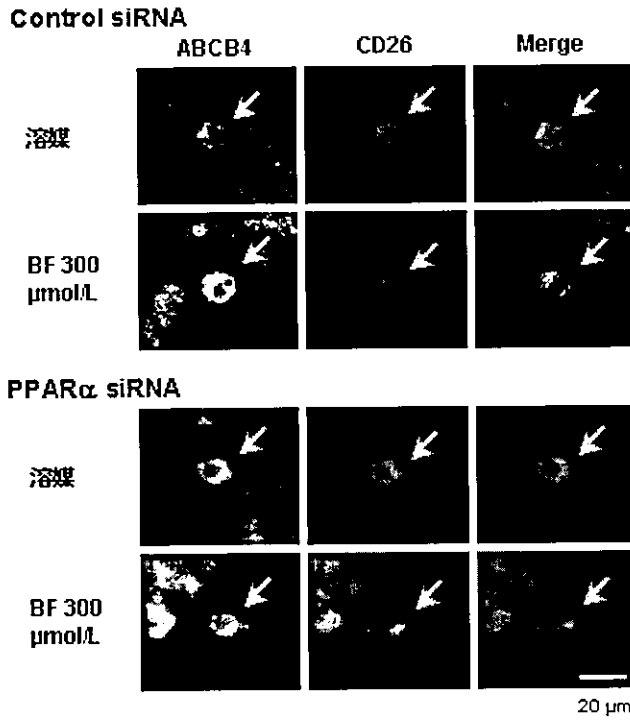


A



B

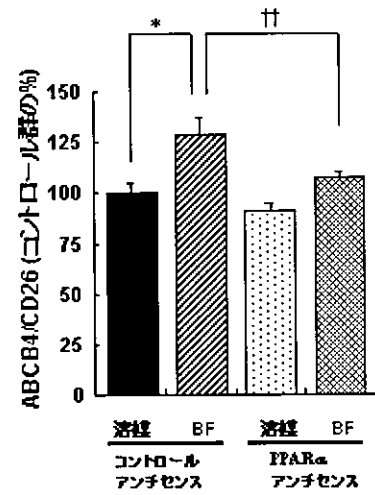
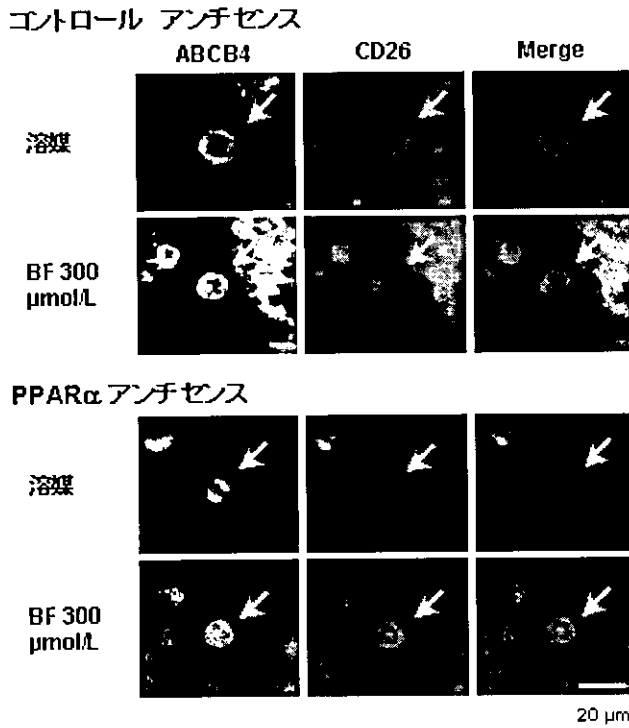


図6

PPAR α の発現を抑制した肝細胞におけるベザフィブラートの効果

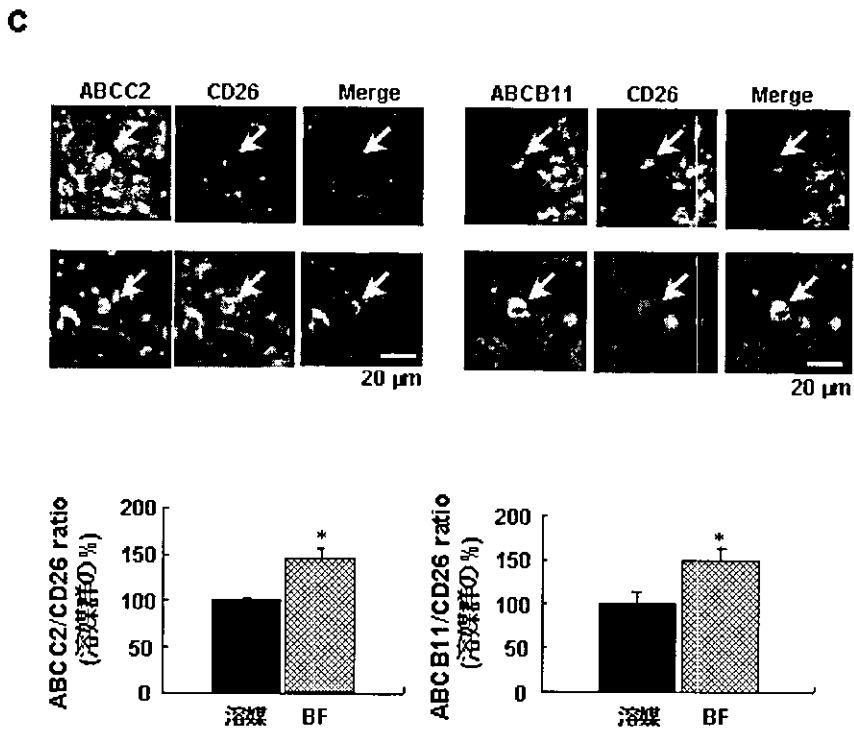
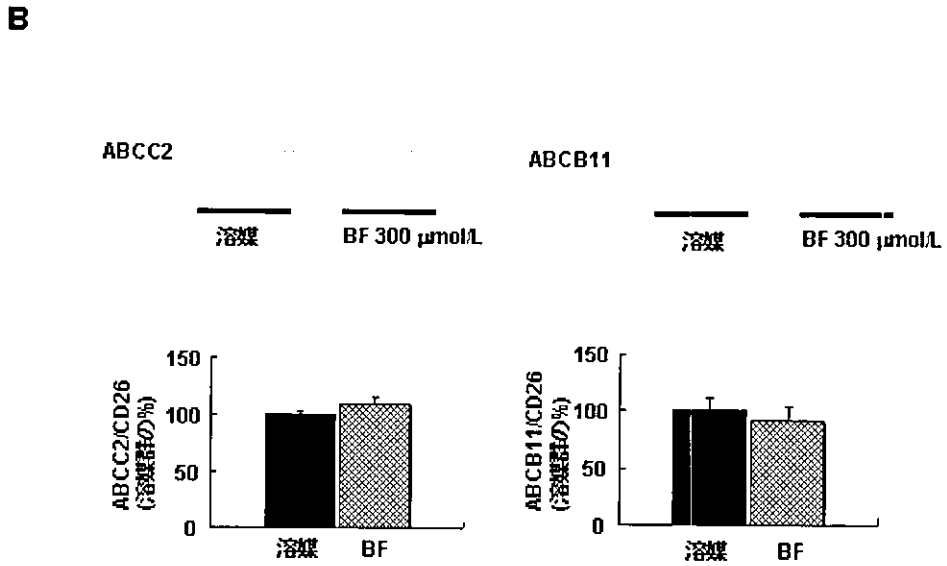
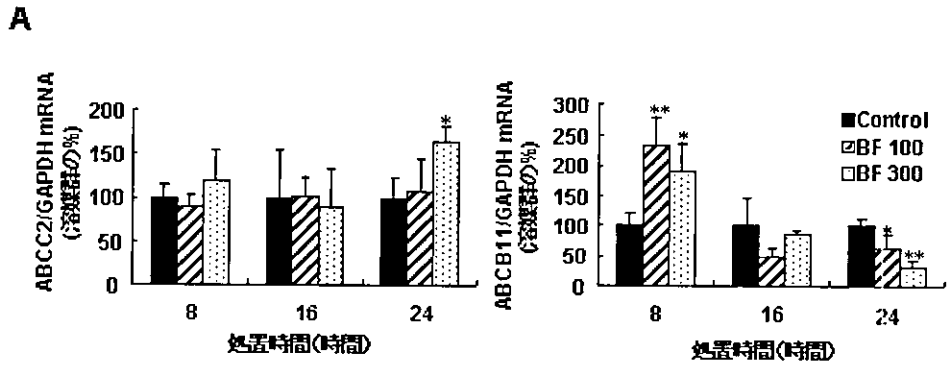


図7
ベザフィブラートによる肝細胞におけるABCC2とABCB11の変化

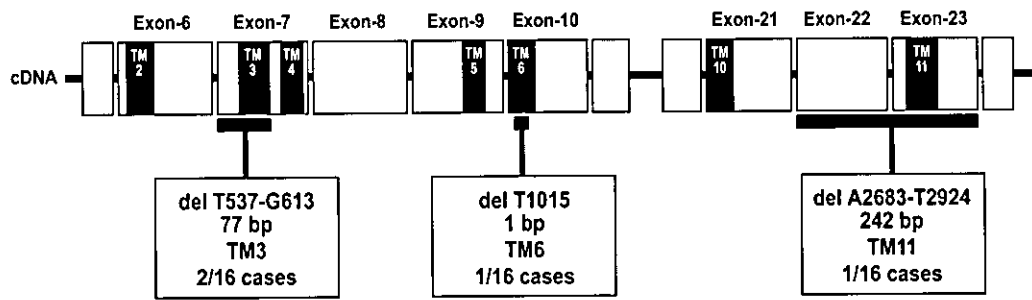


図8
原発性肝内結石症におけるABCB4の遺伝子変異

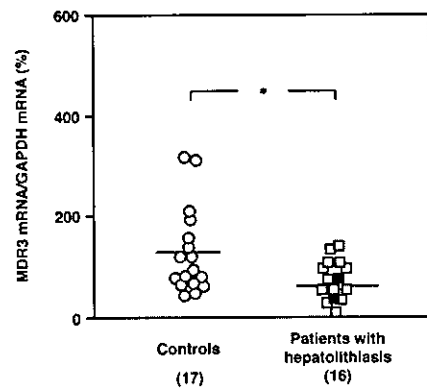


図9
原発性肝内結石症におけるABCB4遺伝子の発現量
■ ABCB4の遺伝子変異あり, □ ABCB4の遺伝子変異なし



図10
原発性肝内結石症の肝臓におけるABCB4の免疫染色
1 対照肝, 2 本症の疾病肝 (ABCB4の遺伝子変異あり), 3 本症の疾病肝 (ABCB4の遺伝子変異なし)

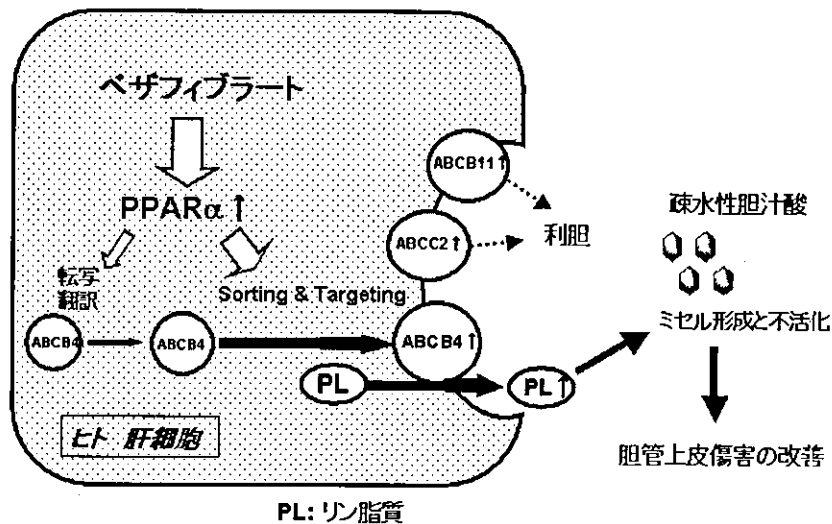


図11
ベザフィブラートのPPAR α を介在したヒト肝細胞に対する効果

本症の結石薬ではABCB4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10)。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、ABCB4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10)。

本症における肝ABCB4の発現低下のメカニズムはABCB4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ABCB4の転写を制御する未知の遺伝子の存在、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た。またベザフィブラートはヒト肝細胞において、ABCB4の転写および蛋白合成を増加させるよりはむしろABCB4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た。本症では肝ABCB4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(32)。本症におけるベザフィブラートの使用は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。

D. 結論

ベザフィブラートはABCB4の毛細胆管膜への再配分を促すことにより、ヒトの肝細胞における胆汁中へのPCの分泌を促進することが示唆された(図11)。さらに、この作用は核内受容体であるPPAR α を介した作用であることも判明した。ベザフィブラートは毛細胆管膜のABCB4の発現とその機能を賦活化することで胆汁中へのリン脂質の分泌を促進し、肝内結石症を含む種々のタイプの胆汁うっ滞性肝胆道疾患の有用な治療薬となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究業績

- Ishida, H., Togayachi, A., Sakai, T., Iwai, T., Hiruma, T., Sato, T., Okubo, R., Kudo, T., Gotoh, M., Shoda, J., Tanaka, N., Narimatsu, H.: A novel b1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (b3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetyllactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. FEBS Lett 2004; In press.

2. Nabetani, T., Tabuse, Y., Tsugita, A., Shoda, J.: Proteomic analysis of livers of patients with primary hepatolithiasis. *Proteomics* 2004; In press.
 3. Kawamoto, T., Shoda, J., Todoroki, T., Suzuki, H., Miyahara, M., Furukawa, M., Tanaka, N., Irimura, T.: Expression of MUC1 recognized by a monoclonal antibody MY.1E12 is a useful biomarker for tumor aggressiveness of carcinoma of the gallbladder. *Clin Exp Metastasis* 21:353-362, 2004.
 4. Shinozaki, E., Adachi, S., Shoda, J., Kawamoto, T., Suzuki, H., Tanaka, N., Ohkochi, N., Irimura, T.: Aberrant expression of MUC1 recognized with monoclonal antibody MY.1E12 correlates with poorer postsurgical survivals in advanced differentiated-type gastric carcinoma. *Int J Oncol* 25:1257-1265, 2004.
 5. Kano, M., Shoda, J., Oda, K., Nimura, Y., Tanaka, N.: Mutations identified in the human multidrug resistance P-glycoprotein 3 (ABCB4) gene in patients with primary hepatolithiasis. *Hepatology Res* 29:160-166, 2004.
 6. 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-a-D-galactosamine-polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase isozyme 3 in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *Clin Cancer Res* 10:2090-2099, 2004.
 7. Suzuki, H., Shoda, J., Kawamoto, T., Miyahara, N., Shinozaki, E., Hotta, S., Iizuka, Y., Nakahara, A., Yanaka, A., Tanaka, N., Irimura, T.: Expression of MUC1 recognized by monoclonal antibody MY.1E12 is a useful biomarker for tumor aggressiveness of advanced colon carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 21:321-329, 2004.
 8. Shoda, J., Inada, Y., Tsuji, A., Kusama, H., Ueda, T., Kano, M., Ikegami, T., Tanaka, N.: Bezafibrate stimulates transport and secretion of phosphatidylcholine in human HepG2 cells by a novel mechanism of redistribution of multidrug-resistance 3 P-glycoprotein in the bile canaliculi. *J Lipid Res* 45:1813-1825, 2004.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 特になし

胆嚢結石の種類と胆石内菌種の関連性に関する臨床的研究

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

胆石の中心の細菌は、陳旧性感染巣のため培養は困難である。そのうえ、胆嚢摘出時の胆汁中細菌培養は胆石形成の初期の段階の細菌と異なる可能性がある。今回、胆嚢結石症にて手術を施行した93例（ビリルビンカルシウム石30、黒色石27、純コレステロール石21、混合石15）について、PCRによって胆石内細菌の存在を証明し、PCR産物に対してシーケンスを行い、胆石内の菌種の同定を行った。胆石内細菌のPCRの結果、純コレステロール石にも胆石内細菌が57%も存在することを初めて明らかにした。PCR産物のシーケンスの結果、ビリルビンカルシウム石内細菌はグラム陰性桿菌および嫌気性菌を62%認めたが、純コレステロール石内細菌ではグラム陽性球菌を76%も認めた。コレステロール胆石の形成機序にも細菌が関与していると考えられるが、それはビリルビンカルシウム石におけるグラム陰性桿菌や嫌気性菌が多く産生する細菌性 β -glucuronidaseによるものとは異なった機序を考えるべきことを示唆している。

A. 研究目的

胆嚢結石の成因は、胆石の種類によって大きく異なる。ビリルビンカルシウム石は、胆道感染と密接に関係し、*E. coli*や*K. pneumoniae*の細菌性 β -glucuronidaseによって抱合型ビリルビンが非抱合型に分解され、これがカルシウムイオンと結合して難溶性のビリルビンカルシウムになるとされている。黒色石は、色素胆石が主体ではあるが胆道感染と関係はなく、胆汁色素と銅との錯体あるいは重合であるといわれている。一方、コレステロール胆石は、胆汁中コレステロール過飽和によるコレステロール結晶の析出によるもので、胆道感染と関係はないと信じられてきた。

胆石形成時における細菌の関与は、胆石内の細菌の存在を明らかにすることによって初めて推測できる。しかし、従来の培養法では極少量の細菌あるいは死菌は検出不可能である。しかも、胆嚢摘出時の胆汁培養では、胆石形成の初期段階の細菌と異なる可能性もある。最近、分子生物学的手法の発達によ

り、培養では検出不可能であった極少量の細菌の検出が可能となり、黒色石やコレステロール胆石の成因にも細菌が関与するのではないかと推測されるようになった。欧米ではコレステロール含有率70～90%の混合石からの胆石PCR陽性率は90%であったという報告があるが、コレステロール含有率90%以上のコレステロール胆石から胆石内細菌の存在の証明をしたものはない。

本研究では、胆石内細菌を従来の培養法ではなく胆汁や胆石内から細菌のchr-DNAを抽出し、polymerase chain reaction (PCR) とシーケンスを駆使して、胆石内細菌の存在を証明するとともに、細菌の種類をも同定することによって、胆石の種類と胆石形成機序を新しい観点から考察することを目的とした。

B. 研究目的

1. 胆嚢結石の分類

胆嚢結石症のため胆嚢摘出術を施行した93例（ビ

表1. 胆石結石の分類

剖面 (肉眼的特徴)		IR分析 (%)	
ビリルビンカルシウム石 (n=30)	断面は茶褐色で層状または無構造	Bil. Ca コレステロール 脂肪酸 リン酸 Ca 炭酸 Ca	28~75% 21~57% 0~31% 0~21% 0~40%
黒色石 (n=27)	外見、断面ともに一律に黒色で無構造	胆汁色素 コレステロール リン酸 Ca 炭酸 Ca	0~100% 0~15% 0~68% 0~86%
純コレステロール石 (n=21)	断面はコレステロール結晶による放射状構造	コレステロール	100%
混合石 (n=15)	断面はコレステロール結晶主体の放射状構造と層状構造が混在	コレステロール Bil. Ca リン酸 Ca	82~95% 5~18% 0~5%

ビリルビンカルシウム石30、黒色石27、純コレステロール石21、混合石15)の胆汁および胆石を対象とした。胆嚢結石は、日本消化器病学会による肉眼分類およびIR分析によって、ビリルビンカルシウム石、黒色石、純コレステロール石、混合石に分類した(表1)

2. 胆嚢結石および胆汁からのDNA抽出法

無菌下に採取した胆嚢結石を胆汁からの汚染防止のため、粉碎した胆嚢結石に生理食塩水を加え、12,000rpmにて10分間遠沈を3回行った。その後、DNA抽出剤であるSepa-Gene(三光純薬)にて粉碎した胆嚢結石からDNAを抽出した。胆汁は12,000rpmにて10分間遠沈を3回行い、胆汁中の細菌を沈澱させた後、Sepa-Gene(三光純薬)にて胆汁中からDNAを抽出した。

3. PCR法による胆石内細菌の存在証明

採取した胆汁および胆石から抽出したDNAをPCR法に使用した。また、プライマーの設定は、細菌固有に存在する16SrRNAには全ての細菌に共通する9箇所の保存領域が認められるが、この保存領域から2つの領域を選び、Universal primer(16SRR-Iと16SRR-II)とした(Hoshina et al., 1990)。PCRの条件は、94℃にて4分の後、94℃にて1分、59℃にて2分、72℃にて3分を30サイクル行い、最後に74℃にて4分行った。

4. シークエンス法を用いた16S rRNA塩基配列決定による菌種同定

胆石PCR陽性であったビリルビンカルシウム石26、黒色石6、純コレステロール石12、混合石9に対し

て、PCR産物である16S rRNA中の保存領域I~IIの塩基配列408bpの決定を行うことによって菌種を同定した。

16S rRNA中の保存領域I~IIが増幅されたPCR産物をagarose gelから抽出し、精製した後、サブクローニングを行う方法を試行した。精製したPCR産物をplasmid VectorであるpCRIIにライゲーションを行い、competent cellであるE. coli DH5αに形質転換を行う。その後、LB培地にて形質転換したE. coli DH5αを37℃、16時間培養する。生成したmono cloneである多数のコロニーからblue-white selectionよりwhite colony 5個を任意に採取し、それぞれTB brothにて37℃、12時間振盪培養した後、plasmid DNAの精製を行った。それぞれのコロニーについて、Dye Terminator法によってシーケンス反応を行った後、オートシーケンサーABI PRISM 310(ABI社)によって塩基配列408bpを解析した。

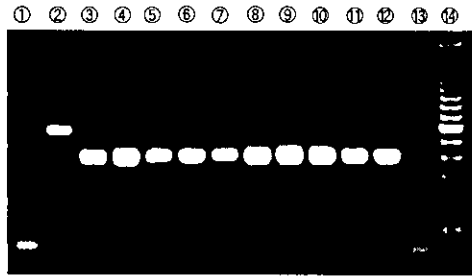
サンプルから得られた塩基配列の解析結果は、日本DNAデータバンク(DDBJ: DNA data bank of Japhan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)の既存遺伝子情報との一致部位を比較して菌種決定した。

C. 研究結果

1. PCR法を用いた胆石内細菌の証明

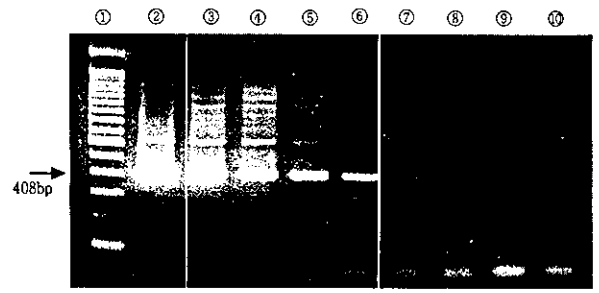
Universal primerを用いた結果、胆道感染の起炎菌として過去に高頻度に検出されたことのあるE. coli, Enterococcus spp., Enterobacter spp., K. pneumonia spp., Pseudomonas spp., S. aureus, Salmonella spp., B. fragilis, P. acnesが検出可能であった(図1)。その検出限界はE. coli懸濁生理食塩液を段階的に10倍希釈することによって検出したところ10cfu/mlまで可能であることを確認した(図2)。

胆石の種類と胆石のPCR陽性率は、その胆石生成に細菌性β-glucuronidaseが関与しているとされるビリルビンカルシウム石では87%であった。一方、その成因として胆汁色素代謝異常が強調され、細菌の関与は否定的であった黒色石にも22%、さらにコレステロール代謝異常と言われている純コレステロ



- ① human DNA
- ② *Candida albicans*
- ③ *E. avium*
- ④ *E. faecalis*
- ⑤ *P. acnes*
- ⑥ *S. aureus*
- ⑦ *S. mitis*
- ⑧ *E. coli*
- ⑨ *E. cloacae*
- ⑩ *K. pneumoniae*
- ⑪ *P. aeruginosa*
- ⑫ *B. fragilis*
- ⑬ negative control
- ⑭ 100bp ladder

図1. Universal primerを用いた各種細菌の検出



- ① 10⁷cfu
- ② 10⁶cfu
- ③ 10⁵cfu
- ④ 10⁴cfu
- ⑤ 10³cfu
- ⑥ 10²cfu
- ⑦ 10¹cfu
- ⑧ 10⁰cfu
- ⑨ 10⁻¹cfu
- ⑩ 100bp ladder

図2. *E. coli* (ATCC11775) 希釈液に対するPCR 検出限界

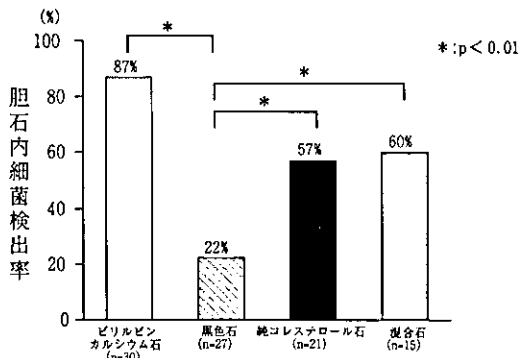


図3. 胆石の種類と胆石内細菌検出

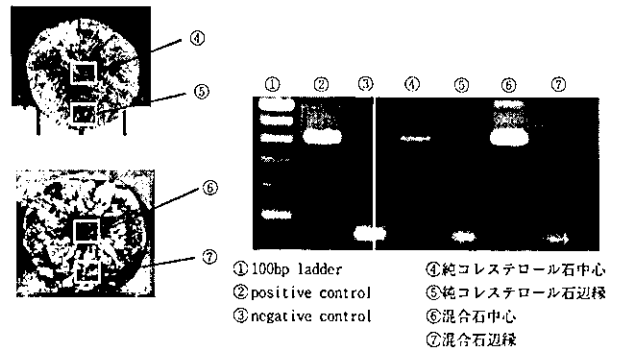


図4. 胆石内細菌の存在部位

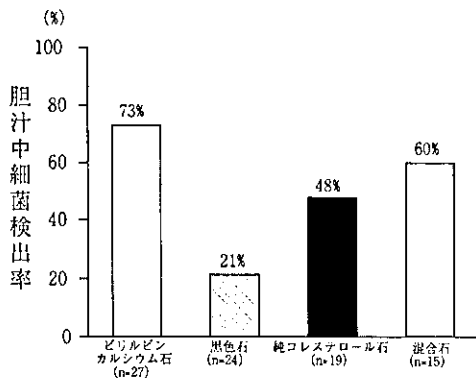


図5. 胆石の種類と胆汁中細菌検出

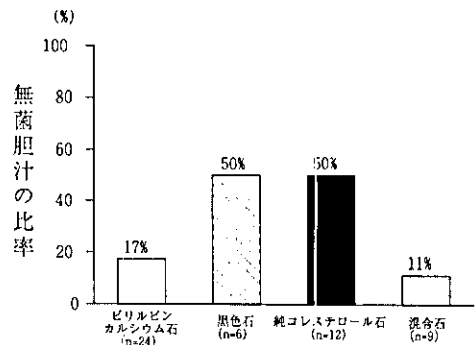


図6. 胆石 PCR 陽性例における無菌胆汁の比率

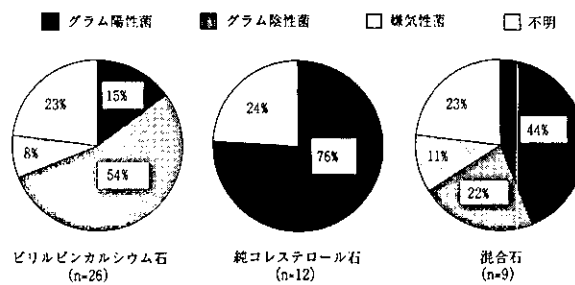


図7. 胆石の種類と胆石内細菌の菌種同定

表2. 胆汁の培養検査による分離菌 (n=85)

	ビリルビン カルシウム石	黒色石	純コ石	混合石
<i>Staphylococcus</i> spp.			1	1
<i>Streptococcus</i> spp.	1	1	1	
<i>G. morbillorum</i>			1	
<i>E. faecalis</i>	2		1	2
<i>E. faecium</i>	2			
<i>E. coli</i>	5			1
<i>K. pneumoniae</i>	2			
<i>E. cloacae</i>	2			
<i>Citrobacter</i> spp.	2			
<i>Candida</i> spp.			1	1

ール石や混合石でも、それぞれ57%および60%もあることが初めて明らかになった(図3)。

胆石内細菌の存在部位を検討するために、純コレステロール石および混合石の中心部と辺縁から別々に採取し、PCRを施行した結果、胆石の中心部にのみ細菌が存在する症例を認めた(図4)。

胆石の種類と胆汁のPCR陽性率は、常に感染を伴うとされるビリルビンカルシウム石では73%であった。一方、胆汁培養にて細菌の検出率が低かった黒色石では21%、純コレステロール石では48%(混合石は60%)と、胆石の成因に細菌説が否定されてきた症例においても、胆嚢胆汁の20~60%に細菌が検出された(図5)。

また、胆汁の細菌培養の結果、細菌の種類としてはビリルビンカルシウム石はグラム陰性桿菌、純コレステロール石はグラム陽性球菌が多く存在する傾向があった(表2)。

胆石形成時の有菌胆汁の状態を反映していると考えられる胆石PCR陽性例における無菌胆汁の比率を検討した結果、ビリルビンカルシウム石では17%、黒色石では50%、純コレステロール石では50%、混合石では11%に胆石内にのみ細菌の存在を認めた(図6)。

2. シークエンス法を用いた胆石内細菌の菌種同定

ビリルビンカルシウム石内の細菌は*E. coli* 35%、*K. pneumoniae* 8%、嫌気性菌 8%などグラム陰性桿菌と嫌気性菌を62%に認めた。一方、純コレステロール石の中心部分からは*Streptococcus* spp. 42%、*Staphylococcus* spp. 17%、*Enterococcus* spp. 17%などグラム陽性球菌を76%に認めた。

表3. オートシーケンスによる胆石内細菌の菌種同定

	ビリルビン カルシウム石 (n=26)	黒色石 (n=6)	純コレステロール石 (n=12)	混合石 (n=9)
<i>Staphylococcus</i> spp.			2	1
<i>Streptococcus</i> spp.	1	1	5	1
<i>Enterococcus</i> spp.	3		2	2
<i>E. coli</i>	9			1
<i>K. pneumoniae</i>	2			1
<i>Pseudomonas</i> spp.		2		
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1		
<i>Acinetobacter</i> spp.	1			
<i>Citrobacter</i> spp.	1			
<i>Helicobacter</i> spp.		1		
<i>B. fragilis</i>	1			
<i>C. perfringens</i>	1			
<i>V. parvula</i>				1
その他・不明	6	1	3	2

しかし、同じコレステロール胆石に属する混合石において色素成分が存在する中心部分からは、グラム陽性球菌は44%、グラム陰性桿菌も22%検出されることが明らかになった(表3、図7)。

D. 考察

極少量の菌量や死菌でも検出可能なPCRは、そのような部位に存在する細菌でも検出することが可能であることから、胆石内細菌をPCRを用いて検出することは胆石の成因を考えるうえで有用であると考えた。コレステロール胆石の成因に細菌は関与していないと長い間信じられ、細菌はビリルビンカルシウム石の成因にのみ関与しているとされてきた。

1995年、SwidsinskiはPCRを用いて、コレステロール含有率70~90%のコレステロール胆石内に細菌DNAを検出したと報告した。1999年、Leeもコレステロール含有率95%までのコレステロール胆石の88%に細菌DNAを検出したという。しかし、コレステロール含有率100%の純コレステロール胆石内に細菌の存在を認めたという報告はまだない。今回、純コレステロール石内にも細菌が存在するという発見は、細菌はビリルビンカルシウム石の成因だけでなく、コレステロール胆石の成因にも関与している可能性を示唆している。

とはいえ、細菌の胆石の成因における関与は、ビリルビンカルシウム石と純コレステロール石では異なる。今回のPCR産物の塩基配列のシーケンス検索の結果、ビリルビンカルシウム石内細菌はグラム陰性桿菌や嫌気性菌を多く認めたが、純コレステロ

ール石内にはグラム陽性球菌が多く存在し、グラム陰性桿菌や嫌気性菌は認めなかった。細菌性 β -glucuronidaseはビリルビンカルシウム石の成因の重要な因子であるが、この酵素はE. coli, B. fragilis, K. pneumoniaeなどグラム陰性桿菌および嫌気性菌から分泌され、StreptococcusやStaphylococcusのグラム陽性球菌からは酵素活性を認めない。PCR産物の塩基配列のシーケンス検索は、既存遺伝子情報との一致率が低いほど実際は他の細菌である可能性が否定できないが、今回のシーケンスの一致率は97.5~100%であったことから、胆石内に実際に存在した細菌であることは間違いないと考える。

胆石の種類によって胆石内の菌種の違いが明らかになったが、PCRの結果を評価するうえで注意しなければならない問題として、コンタミネーションの問題がある。今回のような研究では特に胆汁によるコンタミネーションが問題となる。したがって、胆汁中細菌のコンタミネーションではないことを証明するために、手術中に採取した胆石から胆汁を除去するため十分に洗浄し生理食塩水に浸した後、PCRによってその洗浄食塩水中に細菌DNAが存在しないことを確認しておいた。また、胆石の中心部のみに細菌が存在したという結果は、胆石形成時に存在した細菌は時間経過によって胆汁中より消失した可能性もあると同時に、検出された胆石内細菌が胆汁中細菌のコンタミネーションではないことの証明にもなるといえる。

一方、胃癌にて合併切除した胆嚢から採取した正常胆汁15例の中には、細菌DNAは存在しなかった。事実、胆汁は本来は無菌であるとされていることから、胆石内に存在した細菌はどのような経路で胆汁中に侵入したのかを考えなければならない。胆道には細菌感染に対する防御機構があるが、これらの防御機構が障害を受けた時、細菌は十二指腸からの上行性移行あるいは腸管粘膜からの門脈内移行から胆汁中に侵入してくると考えられる。60歳以上になると胆石内細菌が高率に存在することから、加齢による十二指腸Vater乳頭の機能低下、腸管粘膜のバリアー機能の低下も考えられる。

コレステロール過飽和胆汁はコレステロール胆石

の成因にとって必要条件ではあるが、コレステロール過飽和胆汁を持った人全員が、胆嚢内にコレステロール胆石を形成するとは限らない。コレステロール胆石の形成は、1) コレステロール過飽和胆汁の肝からの分泌、2) コレステロール結晶の析出亢進、3) 胆嚢排泄能低下による多因子および多段階を経なければならない。ムチン・aminopeptidase N・免疫グロブリンA,G,M・ α 1-acid glycoprotein・phospholipase A 2・phospholipase C、2次胆汁酸などの胆汁蛋白は、コレステロール結晶析出の促進因子として作用するとされている。ムチンは、胆嚢上皮から分泌される高分子糖蛋白であるが、胆汁感染による胆汁中phospholipase A 2の増加や2次胆汁酸の増加によって過剰分泌が起こる。ムチンの過剰分泌は、胆汁中コレステロールのnucleation timeの短縮によりコレステロール結晶の析出亢進、および胆嚢上皮のムチン層形成による胆嚢排泄能低下によるコレステロール結晶の成長を惹起する。また、コレステロール結晶の出現の前にムチン過剰分泌が起こるとの報告もある。細菌と胆汁蛋白の分泌の関係は明らかではないが、この分野の研究がさらに発展し、胆石の種類によりその成因に関わる細菌の種類が異なることが判明すれば、胆嚢結石症の患者により適切な治療法を選択することが可能となる。

E. 結論

1. 胆嚢摘出術時には無菌胆汁であっても、胆石形成時には有菌胆汁の状態であったと考えられる胆石PCR陽性例における無菌胆汁の比率が、11~50%も存在することを初めて明らかにした。すなわち、PCRを用いて胆石および胆汁の細菌検出を行うことは、胆石形成を考える上で有用な手段と考える。
2. コレステロール過飽和説が唱えられてきたコレステロール胆石（純コレステロール石、混合石）にも、胆石内に細菌の存在を約60%認めることを明らかにした。特に、いまだ報告例がない純コレステロール石にも胆石内細菌が57%も存在することを初めて明らかにした。

3. 純コレステロール石の中心部分からはStreptococcus spp. 42%、Staphylococcus spp. 17%、Enterococcus spp. 17%とグラム陽性球菌を76%も認めた。この事実は、ビリルビンカルシウム石の中心部分に多く認められたE. coli, K. pneumoniae, Enterobacter spp., Clostridium spp., Bacteroides spp. などのグラム陰性桿菌や嫌気性菌とは大きく傾向が異なることを明らかにした。

以上より、コレステロール胆石の形成機序にも細菌が関与していると考えられるが、それはビリルビンカルシウム石におけるグラム陰性桿菌や嫌気性菌が多く産生する細菌性 β -glucuronidaseによるものは異なった機序を考えるべきことを示唆している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Kawai M, Iwahashi M, Uchiyama K, Ochiai M, Tanimura H, Yamaue H. Gram-positive cocci are associated with the formation of completely pure cholesterol stones. Am J Gastroenterol 2002; 97: 83-88.

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MRCP撮像の工夫 ーデヒドロコール酸投与による描出能向上についてー

研究協力者 露口利夫

千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学

研究要旨

近年のMRCPは胆道疾患のスクリーニング検査の一翼を担うに至っている。しかし画像解像度では従来の直接造影法を凌駕するに至らず、肝内結石症における診断能もあきらかにされていない。そこで、今回我々は撮像時に強力な胆汁分泌促進能を有するデヒドロコール酸を投与し肝内結石症におけるMRCP描出能の向上を検討した。対象は肝内結石症患者6例である。平均50.3歳。強力な利胆作用を有するデヒドロコール酸1000mgと50% Glu10mlを混ぜ緩徐に静注し、その前後（30分後）でMRCPを撮像し、胆道描出能と肝内結石描出能の変化を観察した。得られた画像データをAZEMOTO社のVirtual place advanceにより解析し、デヒドロコール酸投与前後の胆道領域の体積を比較した。その結果6例中5例で胆汁分泌（胆道領域の体積）が増加し、肝内結石描出能も向上した。また、胆道付加手術を施行した患者は吻合部からの胆汁の流出状態を確認でき、吻合部狭窄の評価も可能であった。デヒドロコール酸負荷MRCPは非侵襲的であり肝内結石の存在及び局在診断に有用と考えられた。

A. 研究目的

肝内結石は再発を来することが多くまた、胆道癌との関連が示唆されており定期的な画像診断が重要となっている。腹部超音波検査は非侵襲的であり定期的なスクリーニング検査としては第一選択であるが、胆道付加手術を施行した患者では吻合部の存在によるpneumobiliaが結石の存在診断を妨げることが多い。CTは石灰化を伴わない結石の評価が行えないことやレントゲン被曝の問題もあり頻回に施行することは困難である。ERCPは胆道付加手術の患者では施行不可能であることが多く、PTCはスクリーニング検査には適さない。一方、MRCPは非侵襲的であり結石のスクリーニング検査としては腹部超音波同様に施行可能な検査である。しかし肝内胆管枝の描出は不良なことが多く現状では結石再発の診断に十分な画像とは言えない。そこでMRCP撮影時にデヒドロコール酸を投与し、胆汁分泌量を増加させ

ることで胆道、吻合部、肝内結石の描出能が改善されるか臨床的に検討した。

B. 研究方法

対象は肝内結石患者6例。男性2例、女性4例。平均50.3歳であった。強力な利胆作用を有するデヒドロコール酸1000mgと50% Glu10mlを混ぜ緩徐に静注し、その前後（30分後）でMRCPを撮像し、胆道描出能と肝内結石描出能の変化を観察した。撮像方法は、Fast spin echo法（TR15000msec TE150msec）を用い40sliceを撮像し、MIPを形成した。撮影後AZEMOTO社のVirtual place advanceを使用し、デヒドロコール酸投与前後の胆道領域の体積を比較した。デヒドロコール酸とはコール酸の酸化により製する化合物で、直接肝細胞に作用して肝臓の胆汁分泌機能を亢進する。催胆作用は強力で注射後急速に胆汁分泌量が増加する。

C. 研究結果

肝内結石患者6症例中5症例で胆道、吻合部、結石が視覚的に明瞭化し胆道領域の体積の向上を認めた(表2)。しかし、胆汁酸肝硬変の患者(症例3)では胆汁分泌能が低下しており画像の向上は得られなかった。デヒドロコール酸投与による有害事象は認めなかった。

症例1:22歳、女性

昭和59年4歳時に先天性胆道拡張症に対し、胆管囊腫切除術、肝門部空腸吻合術を施行。平成10年肝内結石にて経皮的胆道鏡下採石術(PTCSL)

にて完全採石後外来にて経過観察。平成15年2月に腹部超音波検査施行するも結石とpneumobiliaとの鑑別が困難であったため、同年3月にMRCP施行した。B6に透亮像を認めも吻合部は描出不良であり狭窄の有無は評価できなかった。デヒドロコール酸投与後肝内胆管および吻合部は明瞭化し、肝内結石の描出も改善された。吻合部から空腸への胆汁流出も良好であることが確認された。胆道領域の体積も56.9cm³から73.6cm³と29.3%の増加を認めた。

本例ではその後PTCSLにて再切石したが、術前のMRCPの所見通り吻合部狭窄は認めなかった。

表1 対象

	名前	性	年齢	疾患	術式
1	N.S	F	22	肝内結石再発(Roux-Y後)	肝門部空腸吻合(S59.4才)
2	U.Y	F	40	肝内結石再発(Roux-Y後)	胆管空腸吻合(S42.)
3	K.T	F	56	肝内結石再発(Roux-Y後)	肝門部空腸吻合(S38.16才)
4	T.H	M	70	肝内結石	手術なし
5	K.T	F	40	肝内結石	腹腔鏡下胆嚢摘出
6	M.T	M	72	肝内結石	胆嚢切除歴あり

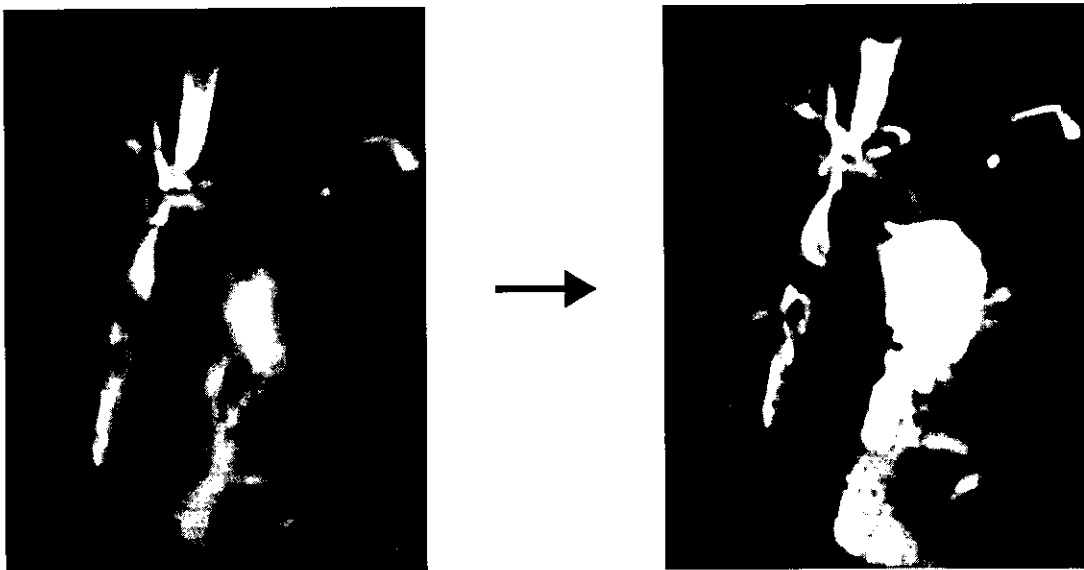


図1 平成15年3月のMRCP

右図はデヒドロコール酸投与30分である。胆管全体の辺縁や吻合部が明瞭化し肝内結石の描出が改善されている。吻合部から排出された胆汁が空腸に移行しており胆汁排出が良好であることが画像から確認できる。胆道領域の体積も56.9cm³から73.6cm³と29.3%の増加を認めている。

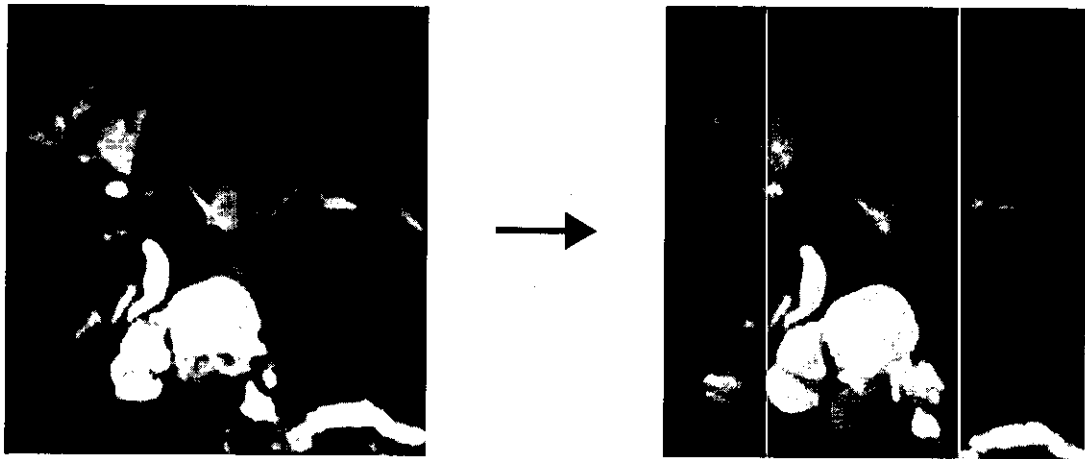


図2 平成15年12月のMRCP MIP

右図はデヒドロコール酸投与30分後である。デヒドロコール酸を投与しても胆汁分泌量は増加せず肝内胆管の描出能は改善せず、吻合部および消化管液も増加していない。胆道領域の体積は78.5cm³から75.3cm³と9.6%減少した。

表2 対象

	名前	性	年齢	デヒドロコール酸投与前 体積 (cm ³)	投与後体積	増加率 (%)
1	N.S	F	22	56.9	73.6	29.4
2	U.Y	F	40	83.5	103.5	30.6
3	K.T	F	56	78.8	75.3	-9.6
4	T.H	M	70	99.0	129.3	30.6
5	K.T	F	40	83.5	103.5	19.3
6	M.T	M	72	73.5	75.3	2.4

症例3：56歳、女性

昭和38年16才時に胆管嚢腫切除術、肝門部空腸吻合術を施行。平成3年肝内結石に対し他院にて手術施行（詳細不明）。平成7年頃より黄疸出現。平成13年3月精査加療目的で当院入院。2次性胆汁性肝硬変、肝門部空腸吻合部狭窄、肝内結石の診断となり、PTCSLにより切石および狭窄部の治療を施行した。PTCSL後も黄疸高値（T-Bil、9-14mg/dl）は持続しており、非代償期肝硬変によるものと考えられた。経過観察目的に平成15年12月のMRCP（図2）施行したが、肝硬変のた

めデヒドロコール酸を投与しても胆汁分泌量は増えず肝内胆管および吻合部の描出能は改善しなかった。胆道領域の体積も78.5cm³から75.3cm³へ9.6%の減少を認めた。

D. 考案

肝内結石症は切石治療後の再発が多だけでなく胆管癌を合併することが知られており、画像診断による定期的な経過観察が必要である。腹部超音波検査は非侵襲的であり定期的なスクリーニング検査に

好都合であるが、周囲肝と結石のエコーレベルに差がない場合やpneumobiliaを合併する場合には肝内結石の存在診断は困難なものとなる。同様に非侵襲的な画像診断であるMRCPは胆管結石症や胆管癌の画像診断に有用であるが、肝内結石の局在および存在診断能における臨床的評価は明らかにされていない。その理由として肝内2次分枝以上の末梢胆管の描出が困難であること、うっ滞した胆汁は低信号を呈するため結石描出が難しいことなどがあげられる。また、pneumobiliaを合併する場合にはCTとの併用などが必要となってくる。そこで我々はMRCPの描出能を改善する目的で強力な利胆作用を有するデヒドロコール酸を用いた。デヒドロコール酸はコール酸の酸化により製する化合物で、注射後急速に胆汁分泌量が増加する。投与後のMRCPでは肝内結石の透亮像が明瞭となり、肝内胆管および吻合部の描出能も向上した。胆汁分泌量の増加は前後の画像の比較だけでなく、画像解析装置による体積測定によって確認された。体積増加を認めない、すなわち胆汁分泌が全く増加しなかったと考えられた症例3は非代償期胆汁性肝硬変例であった。このことは利胆作用の出現の有無で肝機能評価が可能になることを示唆しており、薬物負荷による生理機能検査としても将来的に有用な方法となることが期待された。

E. 結論

デヒドロコール酸を投与することでMRCPの描出能が向上し、肝内結石の局在および存在診断に有用である可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

露口利夫、税所宏光：原発性硬化性胆管炎の画像診断. 消化器科, 39 (1): 58-63, 2004.

露口利夫、税所宏光：胆石症. 診断と治療, 疾患別臨床検査パーフェクトガイド-EBMとDRG/PPSを念頭に-vol.92/Suppl.: 227-231, 2004.

露口利夫、税所宏光：胆道感染症（急性胆嚢炎、胆管炎）. EBM内科処方指針: 478-484. 黒川清、寺本民生編、2004年4月、東京、中外医学社.

露口利夫、税所宏光：肝内結石 経乳頭的結石除去術. 胆道・膵疾患のインターベンション治療: 172-177. 藤田直孝編、2004年3月、東京、メジカルビュー社

露口利夫、黒田泰久、税所宏光：EST後出血にヒータープローブが有用. 消化器内視鏡のトラブル防止マニュアル: 226. 鈴木博昭 監修、幕内博康、熊井浩一郎、澤田俊夫、峰徹哉、藤盛孝博編、2004年10月30日、東京、日本メディカルセンター

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

肝内結石症を背景とした胆管癌の検討

主任研究者 跡見 裕

杏林大学医学部第1外科

研究要旨

肝内結石症は長期経過にて胆管癌を合併する頻度が高いことが知られており、予後規定の重要な因子となっている。肝内結石症に伴う胆管の炎症、これに伴う胆管上皮の化生性変化など、本症における慢性増殖性胆管炎は、肝内胆管癌の発生・進展に慢性持続性炎症が促進的に関与すると考えられている。しかしながら、肝内結石症を背景とした発癌のメカニズムについては解明されていない。われわれは前回までに、粘液形質や細胞修復、細胞回転などの各パラメーター：MUC 2、MUC 5 AC、MUC 6、TFF 1 (pS2)、MIB-1 (Ki-67)、CA19-9、p53、HighMobilityGroupA= (HMGA 1、HMGA 2) を免疫染色にて組織学的性質や発現時期の同定、Malignant Transformationの獲得時期について検討した。これらの結果よりHMGA 1の発現が胆管上皮の異型性変化がみられるころより徐々に発現がみられ、過形成から異型性へのMalignant Transformationに関与していると推定された。

今回われわれは、肝内結石症に合併した胆管上皮異型病変を用いて、免疫染色にてHMGA 1および各パラメーターの発現時期についてさらに詳細に検討した。胆管上皮内異型病変の診断基準の作成の際に使用した胆管上皮異型病変のうち、過形成5例、軽度異型5例、高度異型5例、上皮内癌5例、肝内胆管癌5例を金沢大学病理学 中沼安二教授、金陽先生より御協力・提供して戴き計23症例を対象として各症例での切除肝標本を用いてH&E診断と各パラメーター発現の関連性を比較検討した。

HMGA 1は胆管上皮の過形成～軽度異型と比べ、高度異型～肝内胆管癌では有意 ($p=0.0397$) に発現がみられた。悪性形質の獲得時期とHMGA 1発現が同時期にみられることより、HMGA 1免疫染色は胆管上皮異型度診断の一助となり、Malignant Transformationの指標として重要な役割を持つと考えられる。本症での胆管癌合併における手術の際、胆管切除範囲の決定にHMGA 1免疫染色による評価が合理的な根拠を与える可能性が示唆され、このことよりHMGA 1免疫染色は胆管上皮異型度診断の一助となり、HMGA 1の発現は肝内結石症でのMalignant Transformationの獲得時期の指標として重要な役割を持つと考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症は長期経過にて胆管癌を合併する頻度が高いことが知られており、予後規定の重要な因子となっている。肝内結石症に伴う胆管の炎症、これに伴う胆管上皮の化生性変化など、本症における慢性増殖性胆管炎は、肝内胆管癌の発生・進展に慢性持続性炎症が促進的に関与すると考えられている。しかしながら、肝内結石症を背景とした発癌のメカ

ニズムについては解明されていない。

われわれは当科での肝内結石症症例および肝内結石症治療後に発症した胆管癌症例での肝切除標本を用いて、粘液形質や細胞修復、細胞回転などの諸因子を免疫組織学的染色にて組織学的性質や発現時期を検索しMalignant Transformationの獲得時期について検討し、HMGA 1の発現は肝内結石症でのMalignant Transformationの獲得時期の指標として重要な役割を持つと考えられた。今回われわれは、金

沢大学病理学 中沼安二教授、全陽先生より御協力提供して戴いた胆管上皮内異型病変の診断基準の作成の際に使用した肝内結石症に合併した胆管上皮異型病変を用いて、免疫染色にてHMGA 1 および各マーカーの発現時期についてさらに詳細に検討した。

B. 研究方法

胆管上皮内異型病変の診断基準の作成の際に使用した胆管上皮異型病変の内過形成 5 例、軽度異型 5 例、高度異型 5 例、上皮内癌 5 例、肝内胆管癌 5 例を金沢大学病理学 中沼安二教授、全陽先生より御協力・提供して戴き、計 23 症例を対象として各症例での切除肝標本のパラフィン包埋切片を用いて、下記免疫染色を行い、H&E 診断と各マーカー発現の関連性を比較検討した。検討事項：HMGA 1、CA19-9、MIB-1 (Ki-67)、p53

C. 研究結果

HMGA 1 の発現は過形成 2 例、軽度異型 1 例、高度異型 4 例、上皮内癌 3 例、肝内胆管癌 3 例が陽性であった。CA19-9 は過形成 4 例、軽度異型 4 例、高度異型 3 例、上皮内癌 3 例、肝内胆管癌 4 例が発現陽性であった。CA19-9 同様、MIB-1 (Ki-67)、p53 については発癌研究ワーキンググループの結果と同様に各異型度別に発現に明確な差がみられなかった。HMGA 1 は胆管上皮の過形成～軽度異型と比べ、高度異型～肝内胆管癌では有意 ($p=0.0397$) に発現がみられた。

D. 考案

HMGA 1 の発現は胆管上皮の高度異型性病変よ

り有意に発現がみられ、悪性形質獲得の時期に一致して発現していると考えられる。このことは、肝内結石症症例における手術の際、胆管切除範囲の決定に HMGA 1 免疫染色による評価が合理的な根拠を与える可能性がある。E. 結論 肝内結石症での HMGA 1 の発現頻度は、胆管上皮の過形成～軽度異型性に比し、高度異型～肝内胆管癌で有意に高い。悪性形質の獲得時期と HMGA 1 発現が同時期にみられる。このことより HMGA 1 免疫染色は胆管上皮異型度診断の一助となり、Malignant Transformation の指標として重要な役割を持つと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

2 学会発表

佐々木秀雄, 森俊幸, 跡見裕 他: 肝内結石症を背景とした胆管癌の検討. 第 59 回 日本消化器外科学会 2004. 佐々木秀雄, 森俊幸, 跡見裕 他: 肝内結石症を背景とした肝内胆管癌の検討. 第 40 回 胆道学会 2004. 佐々木秀雄, 森俊幸 他: 肝内結石症を背景とした発癌の免疫染色による発現時期の検討. 第 33 回 杏林医学会 2004.

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし

肝内胆管癌の発生に関わる遺伝子変異の検討 －肝内結石合併、非合併例の比較－

研究協力者 味岡 洋一
新潟大学医歯学総合研究科 助教授

研究要旨

肝内結石合併および非合併肝内胆管癌の発生にreplication error pathwayが関与しているかどうかを、MSI (microsatellite instability) の検索から検討した。結石合併例6例、非合併例9例で、MSI-H (high) を示したものはなく、MSI-L (low) がそれぞれ1/6 (16.7%)と1/9 (11.1%)であった。肝内胆管癌の発生にreplication error pathwayが関与している可能性は低いと推定された。

A. 研究目的

肝内胆管癌の発生にミスマッチ修復遺伝子の異常 (replication error pathway) が関与しているかどうかを、肝内結石合併の有無別に検討した。

B. 研究方法

外科切除ホルマリン固定材料の肝内結石合併肝内胆管癌7例、結石非合併肝内胆管癌13例を対象とした。

ホルマリン固定パラフィン切片よりmicrodissection法でDNAを抽出し、BAT25、BAT26、D17S250、D5S346、D2S123の5つのmicrosatellite markerを用いて、MSI (microsatellite instability) の有無を検索した。

5つのmarkerのうち、2個以上にMSIがみられたものをMSI-H (high)、1個にみられたものをMSI-L (low)、いずれのmarkerにもMSIがなかったものを、MSS (microsatellite stable) とした。

なお、個人識別情報秘守のため、対象症例は全て通し番号として表記した。また対象は外科切除標本であり、本研究により対象者の健康および生命に対

する危険性は全くない。

C. 研究結果

20例中15例（結石合併例6例、非合併例9例）で結果が得られた。MSI-Hは結石合併・非合併を問わず1例もなく、MSI-Lが結石合併例の1/6 (16.7%)、非合併例の1/9 (11.1%)に認められた。

D. 考察

肝内結石合併による慢性持続性炎症を背景に発生する肝内胆管癌には、結石非合併例とは異なる遺伝子異常が関与していることが推定される。

これまでの本研究結果では、(検討症例数が少数なため統計的有意差は得られなかったものの)、結石非合併肝内胆管癌の発生にはAPC-Wnt signaling pathwayとK-ras変異が関与している可能性が示唆されたのに対し、結石合併例ではそれらの関与はきわめて低いこと、一方免疫組織学的検討では、ミスマッチ修復遺伝子hMSH2異常は両者に共通して関与している可能性が示唆された。しかしMSIを

検索した今回の結果では、結石合併の有無に関わらずMSIを示したものは10%前後に過ぎず、肝内胆管癌の発生には（結石合併の有無を問わず）replication error pathwayの関与はきわめて低いという結果が得られた。

免疫染色による蛋白レベルの結果と、遺伝子検索結果とが乖離した際には、後者を優先すべきであり、今回の検討結果がreplication errorに関しての本研究の結論となるものであるが、免疫染色を用いた遺伝子異常の検索は、多数例の評価と同時に、組織形態像との対比が可能であるという優れた点がある。今後免疫染色結果と遺伝子検索結果の乖離の原因や、免疫染色態度の評価法などについての検討が必要と考えられる。

E. 結論

MSIの検索結果から、肝内結石合併・非合併に関わらず、肝内胆管癌の発生にはミスマッチ修復遺伝子異常の関与はきわめて少ないと考えられた。

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

当科における肝内結石症193例の病型・術式の時代変遷と治療成績

分担研究者 海野倫明

東北大学病院 肝胆臓外科

研究要旨

当科における1961年から2004年までの44年間で経験した肝内結石症193症例の結石種類、病型、術式、遠隔成績を検討した。約90%はビリルビンカルシウム石であり胆道感染がその成因であると考えられた。1960年代、1970年代には、両葉および肝内外型の、いわゆる「積み上げ型」の肝内結石症例が多数を占めたが、近年は、肝内狭窄型あるいは上部狭窄型に分類される症例が多く、その結果、肝内結石の局在部位も肝内型、片葉型の頻度が上昇した。このような病型の変化に伴い外科治療法も肝切除術が増加した。遠隔成績をみると、胆道癌や肝細胞癌合併例が多く、また肝硬変の関連疾患により死亡する症例が多く見られた。胆汁性肝硬変や胆管炎を回避するため完全切石と、発癌母地となる萎縮肝組織を積極的に切除することが重要であると考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患であるが、その病態は複雑でしばしば再発・再燃を繰り返し治療に難渋することが多い。さらに近年の画像診断法や治療法の進歩は目覚ましく、1960年代と現在では治療方針は大きく異なり、全ての症例の長期予後を同一条件で比較することには困難である。今回、我々は当科における肝内結石症の病型と術式の時代変遷を年代別に振り分けて検討し、遠隔成績を明らかにしたので報告する。

B. 研究方法

東北大学肝胆臓外科（旧：第一外科）において1961年から2004年までの過去44年間に経験した肝内結石症症例は193例であった。過去の病歴から病型・手術術式を調査し検討した。また、全症例に対し遠隔調査を施行し、121例（63%）の有効回答が得られ、死亡原因について検討した。

C. 研究結果

1. 肝内結石症症例の年次推移

当科で経験した193例を、10年ごとに症例数の変化を見ると、表1に示したように、1961年から1970年の10年間には51例、1971年から1980年には59例が、1981年から1990年は51例、とほぼ横ばいの状態であったが、1991年から現在（2004年）までは32例と、症例の減少が見られた。

2. 結石の種類

全193例の結石の種類を分類すると、174例（90.2%）がビリルビンカルシウム石であり、次いで混合石9例（4.7%）、次いで黒色石7例（3.6%）、脂肪酸カルシウム石3例（1.6%）であった（図1）。このことは、肝内結石症の約90%がビリルビンカルシウム石であり、その成因として細菌感染を伴った胆汁うっ滞が関与していることを強く示唆している。

3. 病型分類

肝内結石の病型分類は、一般的には結石の存在部位別にみたLR型（肝葉左右型）、およびIE型（肝内