

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

肝内結石症に関する調査研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 跡見 裕

平成18(2006)年3月

目 次

班員名簿

I 総括研究報告書	1
	跡見 裕
II ワーキンググループ研究報告書	
疫学調査ワーキンググループA	
肝内結石症の成因に関する疫学調査 Case-Control Study	13
	八坂貴宏、佐々木睦夫、正田純一、跡見 裕
疫学調査ワーキンググループB	
肝内結石症疫学全国アンケート調査	15
	森 俊幸、永井秀雄、二村雄次、田妻 進、佐々木睦男、 八坂貴宏、藤田直孝、山上裕機、跡見 裕
病型分類・画像診断ワーキンググループ	
病型分類・画像診断WGの今後の活動方針	18
	永井秀雄、二村雄次、税所宏光、千々岩一男、田妻 進、跡見 裕
発癌研究ワーキンググループ	
結石症からの発癌プロセスとその病理基盤 ー多施設研究ー	24
	中沼安二、二村雄次、本田和男、味岡洋一、海野倫明、跡見 裕
III 分担研究報告書	
肝内結石症の重症度と予後の検討	27
	八坂貴宏
multi detector row CTを用いた肝内結石症の画像診断 ー新しいpost-processing法による診断algorithmの確立ー	32
	永井秀雄
MRCによる胆管サイズの測定に関する基礎実験 ー測定誤差の評価のためのファントムの開発ー	36
	二村雄次
肝内結石症に対する治療後の遺残・再発結石の検討	39
	山上裕機
肝内結石症胆管粘膜における腸上皮化生の発生機序 ー細菌感染とホメオボックス遺伝子CDX2の関与を中心にー	42
	中沼安二
肝内結石症に合併した肝内胆管癌の検討	45
	税所宏光
肝内結石症100例の長期予後の検討と肝内胆管癌合併肝内結石症の検討	49
	千々岩一男
肝内結石症を背景とした発癌の検討	55
	森 俊幸
肝内結石症発癌症例のトランスポーター等発現の変化に関して	57
	海野倫明
肝内結石症に対するフィブラートによる新しい分子標的治療	61
	正田純一
ムチン分解による結石治療の可能性	66
	佐々木睦男
二つの自殺遺伝子を組み込んだ腫瘍選択的増殖型アデノウイルスによる胆管癌の遺伝子治療	69
	本田和男
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	77

肝内結石症に関する調査研究班名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	跡見 裕	杏林大学医学部外科	教 授
分担研究者	二村 雄次	名古屋大学大学院器官調節外科	教 授
	税所 宏光	千葉大学大学院腫瘍内科学	教 授
	永井 秀雄	自治医科大学消化器一般外科	教 授
	中沼 安二	金沢大学大学院形態機能病理学	教 授
	田妻 進	広島大学総合診療部病態薬物治療学	教 授
	八坂 貴宏	長崎県離島医療圏組合上五島病院外科	副院長
	森 俊幸	杏林大学医学部外科	助教授
研究協力者	安藤 久實	名古屋大学大学院病態外科学小児外科学	教 授
	海野 倫明	東北大学大学院消化器外科	教 授
	佐々木 睦男	弘前大学医学部第二外科	教 授
	味岡 洋一	新潟大学大学院細胞機能講座	教 授
	本田 和男	愛媛大学外科学第一	助教授
	千々岩 一男	宮崎大学第一外科	教 授
	藤田 直孝	仙台市医療センター仙台オープン病院	副院長
	正田 純一	筑波大学臨床医学系消化器内科	講 師
	山上 裕機	和歌山県立医科大学第二外科	教 授
事務局	佐々木 秀雄 大島 かずみ	杏林大学医学部外科 〒181-8611 三鷹市新川 6 -20- 2	

I 総括研究報告書

肝内結石症に関する調査研究

主任研究者 跡見 裕

杏林大学 医学部 外科 教授

報告要旨

肝内結石症調査研究班の研究目的を以下に列挙する。(1) 肝内結石症の診療に関する全国調査をおこない、診断治療の現状を把握する。(2) 厳密な症例対照研究の検討を行い、生活習慣病としての肝内結石症の可能性を検討する。(3) 基礎的、臨床的に肝内結石および肝内胆管癌の発生機序、治療法、予防法を検討する。(4) 新しい低侵襲的な診断法を含めた費用効果の良い診断体系を確立する。(5) 以上に結果をもとに、肝内結石症に関する新たな診療指針を改訂する。上述の目的を達成するため、従来の6つのワーキンググループを下記のような5つのワーキンググループに再編した。即ち、1) 疫学ワーキンググループ (A: Case Control Study、B: 全国疫学アンケート調査)、2) 画像診断・病型分類ワーキンググループ 3) 発癌研究ワーキンググループ 4) 治療法検討ワーキンググループ 5) 診療指針作成ワーキンググループ を編成し個々の課題を検討した。さらに個別研究により様々な課題を検討した。

1. 疫学調査 症例対照研究 (A: Case Control Study) (症例30例、対照30例) では、肝内結石症発症の危険因子のうちオッズ比の高いものとして、生活環境: 生家の職業が第1次産業、オッズ比1.750 (P=0.43)、嗜好品: タバコ、オッズ比2.895 (P=0.413)、感染症: 特異的回虫IgE抗体、オッズ比1.800 (P=0.706)、HCV抗体、オッズ比5.800 (P=0.195)、HTLV-I抗体、オッズ比3.222 (P=0.612)、輸血歴、オッズ比(-) (P=0.005) が見いだされた。また全国疫学アンケート調査グループ (B: 全国疫学アンケート調査) では、次年度の肝内結石症疫学全国アンケート調査に向け、調査法の調整、調査票の作成、調査実施に当たって倫理審査を行った。肝内結石症の全国疫学調査は過去に5回行われており、初回の1975-79年調査から第5回 (1998年) 調査までの結果と今回の調査結果を比較検討することにより、肝内結石症の発生頻度ばかりでなく、治療法の進歩による治療成績の影響などの推定も可能となろう。1998年の症例調査と過去4回の疫学調査を比較すると1) 新規発症が減少し、有病者の高齢化が認められる2) 男女比はおおむね一定である3) 肝内型が時代とともに増加しており、1975-1979年ではI型は20.6%であったのに対し1998年では57.9%となっている。4) コレステロール結石は過去3回の調査でいずれも5-10%程度であり必ずしも増加しているとはいえず、結石の主体は現在もビリルビンカルシウム石である。5) 治療後の結石遺残・再発率は過去3回の調査では何れも20%程度であり、必ずしも治療成績は向上していない。6) 癌合併は2.5-5%程度であり、90%以上の胆道癌は結石存在部位にあることが示された。また胆道癌の発生率と結石の種類には関連がないことが示された。

2. 効率的な画像診断体系の確立 病型分類の改訂にむけては、画像診断・病型分類ワーキンググループによる検討と個別研究を行った。画像診断・病型分類ワーキンググループは、昨年度までに、拾い上げ診断としてのMRCP、また詳細診断としてのDICを併用したMDCTの有用性が示された。またMRCPにおける胆管径を策定した。本年度は肝内結石症における画像診断としてのMRCPの役割、特にこれまで周囲胆管に比較して相対的な狭窄や拡張が記載されていたものを、具体的な数値として表現できるよう、診断基準を改定した。昨年度までに、一定の手順でPost Processingを行うことがDIC-MDCTの診断能を向上させることが示された。これ

を受け、個別研究では、DIC-MDCTの画像データをPost Processingすることにより、詳細なグリソン診断が可能となることが示された。この結果をうけ、DIC-MDCTのデータをDICOMフォーマットで集積し、画像診断グループによるPost Processing、評価をおこなう画像データ共用プログラムを発足させた。MR Cによる胆管サイズの測定に関する基礎実験では測定誤差の評価のためのファントムを開発した。この研究結果から、異なったMR機種、測定ソフトを用いても直径11～3 mmの範囲では、ファントム径・面積の計測が、比較的正確に計測できることを確認した。今回用いた作像法、測定法では、臨床応用可能な計測値の下限は直径3 mmであり、MR Cは、肝内胆管の拡張の診断には使用可能であるが、直径3 mm以下の胆管狭窄の存在診断、部位診断には使用が困難と考えられた。今後、直径3 mm以下の小さな管腔の計測が可能なMR作像法、胆管サイズの計測方法の検討が必要と考えた。

3. 肝内結石症に伴う肝内胆管癌の成因と治療法の検討

本疾患の予後を規定する合併症である肝内胆管癌について、形態学的・分子生物学的・遺伝子学的側面から検討を行った。発癌ワーキンググループでは2002年度～2004年度に作成した胆管上皮層内異型病変（Biliary intraepithelial neoplasm=BilIN）とそのgrading（BilIN 1-3）のさらなる妥当性を検討した。すなわち、前回参加医師とは異なる病理医に本分類と概念とgradingの妥当性の検討を依頼した。本邦で3名、国外で22名の病理医に、これまでのコンセンサス研究で得られたBilINの写真と論文（Zen Y, et al: Pathol Int. 2005 Apr;55（4）:180-8）を配布し評価を依頼した。その結果、計11名の病理医から返答を得た。BilINは一般的には、これら病理医の施設では胆管上皮ディスプラジア（低異型度、高異型度）あるいは胆管上皮異型病変と呼称されている事が明らかとなった。さらに、BilINの呼称やそのgradingに関しては時代に適応しているとの回答を得た。各個研究においては、肝内結石症100例の長期予後の検討と肝内胆管癌合併肝内結石症の検討が行われた。胆道癌の合併は計17例（17%）で、肝内胆管癌が10例、肝門部胆管癌が5例、胆嚢癌が2例で、その多くが進行癌で根治切除例は4例のみであった。肝内胆管癌10例のうち肝萎縮を5例に認めた。全例が結石葉に癌を合併していた。切除例は3例のみで、いずれもリンパ節転移をとまなうstage IVb症例であった。肝内胆管癌のうち肝内結石症の初診時に癌を合併していた症例は7例、経過中に癌を合併した症例は3例であった。肝内結石を合併しない肝内胆管癌と比較すると、肝内結石を合併した肝内胆管癌は有意に予後不良であった。また肝内結石合併肝内胆管癌は切除例でも肝内結石合併あるいは非合併肝内胆管癌の非切除例と比較しても予後に差を認めずきわめて予後不良であった。また他の施設の主に非観血的治療を中心におこなった肝内結石症例115例中、胆管癌を合併した7例についての検討では、男性5例、女性2例。肝内結石診断時年齢50.1歳。主肝管型6例、末梢肝管型1例。胆管癌は腫瘤形成型5例、胆管浸潤型1例、粘液産生胆管癌1例であった。腫瘤形成型1例は手術施行されたが、その他は、発見時手術不能状態であった。腫瘤形成型でも診断後8ヶ月以上の生存例はなかった。胆管浸潤型、粘液産生胆管癌はそれぞれ術後2年、2年6ヶ月現在生存中である。いずれの症例も定期的な腹部エコーによる外来経過観察をしていたが癌合併を早期診断することはできなかった。今後画像診断、腫瘍マーカーのチェックの組み合わせによる胆管癌合併例の早期診断体系の確立が望まれる。胆管癌発生のメカニズムの検討では、胆管上皮が異形性を獲得する時期に一致して、HMGA 1が発現することが示された。Ki67やLATなどの増殖能や代謝の亢進を示す指標は、発癌以前にすでにUpregulationされていることが示された。またアミノ酸トランスポーターの関与を示唆する実験結果が得られた。

4. 成因、病態研究

これまで本研究班では肝内結石症の成因、病態を基礎的、臨床的検討から検討し、特に肝内結石症における胆汁酸移送タンパク分析など通じ病的な脂質動態を明らかにしてきた。

肝内結石症に対する治療後の遺残・再発結石の検討のでは、治療後の再発率は22.7%であったが、肝切除術

後は13.6%と少なかったものの、PTCSL後は50%と多く、PTCSLは根治術になりにくいことが示唆された。肝切除術後の再発部位はB₄が多く、L型に対しては外側区域切除で結石が除去できても術式として不十分であり、胆汁うっ滞の残るB₄を切除する左葉切除を選択すべきと結論した。肝内結石症胆管粘膜における腸上皮化生の発生機序を細菌感染とホメオボックス遺伝子CDX 2の関与を中心に検討した報告もなされた。慢性胆管炎モデルであるPCKラットでは加齢に伴って化膿性胆管炎、慢性炎症、腸上皮化生とCDX 2依存性のMUC 2発現が出現する。このメカニズム解明のため、細菌感染、自然免疫に重要な役割を持つToll-like receptor (TLR) とCDX 2の関与を中心に腸上皮化生の発生機序を検討した。培養ラット胆管上皮を用いた検討では、TLR 2、TLR 4のリガンドである細菌菌体成分LTA、LPSなどによりCDX 2、MUC 2 ムチン発現亢進を認めた。この発現亢進は、抗TLR 2、TLR 4抗体、NF- κ B阻害剤により抑制された。また、siRNAを用いてCDX 2発現を抑制したところ、LPS刺激によるCDX 2、MUC 2発現亢進はおこらなかった。これらの結果から、今までに報告したサイトカインの影響に加えて、細菌感染が直接、CDX 2、MUC 2発現亢進を誘導する事、この誘導はTLR 2、TLR 4、NF- κ Bを介する事が示された。

5. 新しい治療法の開発 MDR3 P-糖蛋白に着目したフィブラート系薬剤による結石形成に及ぼす効果やムチン分解を促進することによる結石生成抑制効果を検討し、肝内結石の新たな治療法を検討した。

ベザフィブラートはABCB 4の肝発現レベルを増加させ、また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。ベザフィブラートは毛細胆管膜のABCB 4を標的分子として、そ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示された。主に去痰剤として使用されるムチン分解薬は、臨床例に於いてS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素は酸性糖タンパク質を有効に分解することが知られている。これまでの実験的検討でも、これら製剤により肝内および総胆管結石は縮小、脆弱化した。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、すぐに臨床応用可能であると考えられる。胆道誘導チューブからの直接投与、すなわち胆道内遺残結石の洗い出しや胆道内粘液の洗浄では良好な効果が確認された。また薬剤の内服投与では、胆汁中のタンパク質濃度が低下することより有効性を発揮する可能性も示唆された。また癌治療においても新たな試みが発表された。二つの自殺遺伝子を組み込んだ腫瘍選択的増殖型アデノウイルスによる胆管癌の遺伝子治療の報告ではヒト胆管癌細胞株HuCCCT 1に対して、大腸菌のuracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 遺伝子とHerpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターAxCAUTを作製し、5-fluorouracil (5-FU)、ganciclovir (GCV)の抗腫瘍効果を培養細胞系と動物モデルで検討した。さらにE1B-55kDを欠損した腫瘍選択的増殖型ウイルスに、両遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いて抗腫瘍効果を検討した。培養胆管癌細胞において、5-FU、GCVの薬剤感受性は、アデノウイルスAxCAUTのmultiplicity of infection (MOI) 数が増加するに伴い増強していた。さらに5-FU、GCVは単独投与よりも併用投与で、より薬剤感受性が増加していた。腫瘍選択的増殖型ウイルスAxE1CAUTはMOI数の増加に伴い抗腫瘍効果を示した。アデノウイルスAxCAUTを投与したマウス皮下担癌モデルにおいても、5-FU、GCVは単独投与群と比較して併用投与で抗腫瘍効果を示した。さらに腹膜播種モデルにおいて、AxE1CAUT投与群はAxCAUT投与群に比ベ有意に生存率を延長させた。胆管癌に対する自殺遺伝子療法は、UPRT/5-FU、HSVtk/GCVを組み合わせることにより、より有効な治療となる可能性が示された。さらに腫瘍選択的増殖型アデノウイルスベクターに2種類の自殺遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いると、ウイルス自体の腫瘍融解作用に加えて、薬剤感受性遺伝子を発現させることにより強力な抗腫瘍効果を示した。

A. 背景

肝内結石症は、良性疾患でありながら複雑な病態を示し、完治が難しく再発を繰り返すことが少なくない。このため肝内結石症は難治性疾患として取り扱われており、本調査研究班が疫学調査、成因や病態の解明、画像診断や診療指針、本疾患を背景とする胆管癌発生のメカニズムや治療法の解明に果たしてきた役割は少なくない。本疾患は日本や中国、韓国を中心としたアジア地域に多いことから、遺伝的素因や食生活を中心とした生活様式の関与が推測される。しかしながら類似した人種的背景を持つ場合でも大きな地域差が認められるのも特徴であり、生活習慣病としての側面を持つ可能性も否定できない。肝内結石症における結石は、総胆管に存在する結石と、組成が異なることが知られている。すなわち、肝内結石は、総胆管結石に比しコレステロールの成分比率が高く、胆汁酸の比率が少ない。また肝内純コレステロール結石の報告も散見されることから、肝内結石症は、肝における脂質代謝障害とみることもできる。申請者らは、独自に開発した肝内コレステロール結石モデルを用い、高コレステロール食と肝内胆管障害が結石生成の重要な因子であることを明らかとした。これは生活習慣と先天的要因が肝内結石症の発生に結びつく要因となることを示唆するものであるが、これらに関しては疫学的見地からも未だ十分検討されておらず、また臨床的、基礎的研究も一定の成果は得られているものの、残念ながら成因解明には至っていないのが現状である。核磁気を利用した画像診断や検知器を多数有する高速CTなど近年の画像診断法の進歩には刮目すべきものがある。これらの新しい画像診断法も肝内結石症診療に応用され良好な診断成績が報告されている。しかしながら、一方ではさまざまな検査法を漫然と施行する施設も少なくないことから、肝内結石症に対する費用効果を考慮した診断体系の提示が求められている。治療法に関しても以前、調査班で提唱した治療指針は、進歩が著しい低侵襲的治療に関する部分が少ないことから、これの全面的な改定も必要となる。さらに肝内結石症を背景とする発癌は予後に大

きな影響を与えているが、その発生メカニズムや診断法、治療法など解決すべき問題が山積している。本研究班では、多段階発癌仮説に基づき、胆道上皮の異形性の獲得に関する病理学的な定義、班員以外の病理医による評価や、観察者間の合意形成、さらには欧米諸国への診断基準の提示を行ってきた。この提示に対する欧米病理学者の評価は高く、近く海外からの演者も招き、討論会の開催が予定されている。さらに胆管癌の遺伝子異常をターゲットとした遺伝子治療の可能性を示唆する報告も散見されるようになった。

B. 目的

本研究の目的を列挙する。(1) 肝内結石症の診療に関する全国調査をおこない、診断治療の現状を把握する。(2) 厳密な症例対照研究の検討を行い、生活習慣病としても肝内結石症の可能性を検討する。(3) 基礎的、臨床的に肝内結石および肝内胆管癌の発生機序、治療法、予防法を検討する。(4) 新しい低侵襲的な診断法を含めた費用効果の良い診断体系を確立する。(5) 以上に結果を基に、肝内結石症に関する新たな診療指針を確定する。

C. 方法

疫学調査A (Case Control Study) では、分担研究、協力研究施設に肝内結石症にて通院中の患者のうち調査協力に同意が得られたものを対象とした。対照は、症例と同じ施設に通院しており、性、年齢(±3才)が一致し、仮説となる要因と独立な疾患(肝胆道系疾患を除外)を持ち、研究に同意した患者とした。診察時に面接による聞き取り調査と血清学的検査を行った。聞き取り調査は調査票(症例:A、対照症例:B)に記入し、血清の測定はSRL社に依頼した。解析はConditional logistic regression analysisを用いた。調査項目は、1) 対象の年齢、身長、体重など、2) 発育状況、健康状態、3) 居住・職業歴、4) 婚姻歴、出産歴、5) 既往歴、家族歴、6) 生活環境、7) 食事・嗜好に関するもの、

8) HTLV-I抗体、HCV抗体、HBS抗原・抗体、HP IgG抗体、特異的回虫IgE抗体とした。疫学調査B(全国アンケート調査)では、アンケート票の作成、倫理的審査に加え、肝内結石症全国アンケート調査地域責任者(北海道:佐々木陸男、東北:海野倫明、関東:永井秀雄、中部:二村雄次、近畿:山上裕機、中国・四国:田妻進、九州:八坂貴宏)とし統括責任者:跡見裕、事務局:森俊幸で調査に当たることとした。画像診断・診断基準ワーキンググループでは2回のミーティングを開催し、肝内結石症画像診断指針の確立、MRCによる胆管のサイズ測定の基本実験、肝内結石症CT診断プログラムが検討された。DIC-CTの有用性の各研究では、腹部CT検査は16列の検出器を持つMD-CT(Siemens社製SOMATON Sensation 16)にて撮影した。まずDIC法にて、胆管像を撮影(phase 1)、つづいて経静脈的ヨード造影剤投与をdynamic法にて行い、早期動脈相(phase 2)および平衡相(肝実質相、phase 3)の撮影を行った。得られたdataを再構成厚1mmスライスのDICOM dataとしてワークステーション(ZIOSOFT M900 QUADRA)に転送し、様々な方法のpost-processing法を用いて画像解析を行った。検討したpost-processing法は、axial画像 multi planner reformation (MPR) 法、curved planner reformation (CPR) 法、virtual endoscopy (VE) 法、multi phase fusion reconstruction (MPFR) 法などであった。画像解析にあたり、患者よりinformed consentを得た上で、DICOMデータから解析時には個人データを抹消するなど、個人情報保護、倫理面へ十分に配慮した。MRCPによる胆管径測定の精度管理を目的としたファントム作成の各研究では、これまでの研究で報告した胆管径・面積とMR Hydrographyの空間判別能を考慮し、1mmから11mm径の円形溝をアクリル板に掘り、内部に水を封入して作製した。撮像、作図、測定は、昨年度にMRによる胆管サイズの計測を行った施設(T病院)に加え、1.5テスラー高磁場装置を有する追加の2施設で行った。これら3施設における撮像および作像は各施設1名の経験を有する放射線技術師により行った。また計測は各施

設の装置に付属した計測ソフトを使用した。実際の計測は施設により半自動計測またはハンドトレースにより、医師・放射線技術師各1名により行なった。撮影条件は、これまでの計測研究に使用したものと同一条件、すなわちT2 Haste(機種によりT2強調ターボ・スピネコー法)、3D再構成(Target MIP)、TE=160(機種により600)、TR=3000、画像マトリックス・サイズ307x320・画素サイズ1.0x1.0x1.0mm(機種によりマトリックス・サイズ352x352・画素サイズ0.9x0.9x1.0mm)とした。

肝内結石症の成因に関する胆管粘膜における腸上皮化生の発生機序を細菌感染とホメオボックス遺伝子CDX2の関与を中心に検討した。慢性胆管炎モデル:Polycystic kidney (PCK)ラット胆管における腸上皮化生の検討では、胎生18日~10ヶ月齢の肝組織を用いて慢性胆管炎と腸上皮化生の出現状況の病理組織学的検討、粘液組織化学とCDX2、MUC2、TLR2、TLR4の免疫組織化学的検討を行った。また、定時的に採取した肝組織を用いてWestern blot法にてCDX2蛋白発現を検討した。In situ hybridization (ISH)法を用いてCDX2、MUC2 mRNA発現を検討した。さらに培養ラット胆管細胞におけるCDX2、MUC2発現誘導分子機構の検討では、ラット由来の胆管細胞株を検討に用いた。胆管細胞をコラーゲンゲル上でセミコンフルエントに培養して、TLR2リガンドであるLTA、PGN、合成ポリペプチドPam3Cys、TLR4リガンドLPSによる刺激を行い、MUC2、CDX2の発現を検討した。また、抗TLR2、TLR4抗体、TLRシグナル伝達系に関与すると考えられるNF- κ Bの阻害剤を同時に投与して影響を検討した。また、MUC2誘導におけるCDX2の関与をより明確にする目的で、siRNAを用いてCDX2発現の抑制を試みた。さらに、ラットCDX2発現ベクターをトランスフェクトして、MUC2発現を検討した。発癌標準ワーキンググループでは、2002年度~2004年度に作成した胆管上皮層内異型病変(Biliary intraepithelial neoplasm=BillIN)とそのgrading (BillIN1-3)のさらなる妥当性を検討した。すなわち、前回参加の医師とは異なる病理医に本分類と概念と

gradingの妥当性の検討を依頼した。わが国で3名、国外で22名の病理医に、前回のコンセンサス研究で得られたBiIINの写真と前回公表したBiIINに関する論文 (Zen Y, et al: Pathol Int. 2005 Apr;55 (4) :180-8) を配布した。その結果、計11名の病理から返答を得た。肝内結石症の長期予後の検討の各個研究では長崎県離島医療圏組合五島病院で1981年1月より2005年12月までに診断された肝内結石症245例のうち、全臨床経過が評価できた213例を対象とした。診断時年齢は12才から82才 (平均58.1歳)、性別は男性97例、女性116例で、診断後の観察期間は0.5~24年 (平均14.2年) であった。厚生省肝内結石症調査研究班による病型分類では、I型162例、IE型51例、結石存在部位は、L型92例、R型94例、LR型27例であった。これらの症例につき、診断時に重症度を判定、経過観察あるいは治療後の再判定を1年ごとに行い、重症度の経時的変化を調査した。(1年ごとの重症度判定は1年間でもっとも悪いものをその年の重症度とした。) また、重症度が悪化する要因として、病型、結石存在部位、肝葉萎縮、手術の既往、治療方法について検討した。他の臨床研究では1971年から2005年の35年間に経験した肝内結石症97例 (同時期胆石症総称例数2,460例の3.6%) が検討された。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、肝内結石症では平均56.9歳と比較的若く、男女差はなかった。また他施設からの後ろ向き症例検討では、1980年1月から2005年12月までの間の肝内結石症例100例 (男性44例、女性56例) について、初回治療法や結石再発、再発に対する治療、胆道癌の合併、長期予後が報告された。また胆道癌を合併した症例についてはその病態と予後について検討した。結石の種類は断面と赤外分光分析で検討した。胆管の狭窄は径3 mm以下を狭窄とした。さらに1975年より主に非観血的治療を受けた115例症例のうち、中胆管癌を合併した7例の臨床的特徴が調査分析された。これらの症例は、男性5例、女性2例、肝内結石診断時年齢50.1歳であった。肝内結石における発癌関連因子と考えられている肝胆道系手術歴、結石再発、胆管炎、肝膿瘍合併の有無等に加え、発癌後の経過について調査が行わ

れた。肝内結石症における慢性炎症を背景とした多段階発癌の検討では、手術治療された肝内結石症切除肝全割標本を作製し、胆管異型上皮の有無およびHMGA 1免疫染色の発現分布を検討した。また培養細胞を用いた実験系の確率を目的として、細胞肝内胆管癌培養細胞2種類 (HuCCT1, HuH28) の標本を用いHMGA 1およびhLAT1, 4F2hcの免疫染色を行い発現の有無を検討した。肝内結石症発癌症例のトランスポーター等発現の変化に関する検討では、1. 肝内結石症症例と肝内胆管癌合併肝内結石症のLST-2、COX-2の免疫染色 2. gefinitibの胆管癌細胞株 (TFK-1, HuCCT1) に対する感受性をMTSアッセイにて検討 3. gefinitibによるTFK-1に対するアポトーシスをTUNELにて検討 4. gefinitibによるTFK-1におけるp27, Jab1の変化をWestern blotにて検討 5. 肝内結石症症例と肝内胆管癌合併肝内結石症のLST-2, COX-2, p27, Jab1の免疫染色を行った。治療法の検討においては、肝内結石症に対するフィブラート系薬剤 (ベザフィブラート) の有用性について検討を行うために、培養ヒト肝細胞 (HepG2) ならびにヒト肝細胞キメラマウスを用いて本剤がABC4の発現や機能に与える影響についても解析を行った。またムチン分解酵素製剤の肝内結石症に対する応用研究では、ピソルボン液、プロナーゼ、塩化リゾチームなどを直接胆管内に投与しその効果を検討した。胆管癌に対する遺伝子治療の検討では、ヒト胆管癌細胞株HuCCT1に対して、大腸菌のuracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 遺伝子とHerpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター AxCAUTを作製し、5-fluorouracil (5-FU)、ganciclovir (GCV) の抗腫瘍効果を培養細胞系と動物モデルで検討した。さらにE1B-55kDを欠損した腫瘍選択的増殖型ウイルスに、両遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いて抗腫瘍効果を検討した。

D. 結果

1. 疫学的検討

疫学ワーキンググループ (A Case Control Study) 症例対照研究 (症例30例、対照30例) では、肝内結石症発症の危険因子のうちオッズ比の高いものとして、生活環境：生家の職業が第1次産業、オッズ比1.750 (P=0.43)、嗜好品：タバコ、オッズ比2.895 (P=0.413)、感染症：特異的回虫IgE抗体、オッズ比1.800 (P=0.706)、HCV抗体、オッズ比5.800 (P=0.195)、HTLV-I抗体、オッズ比3.222 (P=0.612)、輸血歴、オッズ比 (-) (P=0.005) が見いだされた。

疫学ワーキンググループ (B 全国アンケート調査)

本年度は、次年度の肝内結石症疫学全国アンケート調査に向け、調査法の調整、調査票の作成、調査実施に当たって倫理審査を行った。肝内結石症の全国疫学調査は過去に5回行われており、初回の1975-79年調査から第5回 (1998年) 調査までの結果と今回の調査結果を比較検討することにより、肝内結石症の発生頻度ばかりでなく、治療法の進歩による治療成績の影響などの推定も可能となろう。1998年の症例調査と過去4回の疫学調査を比較すると1) 新規発症が減少し、有病者の高齢化が認められる2) 男女比はおおむね一定である3) 肝内型が時代とともに増加しており、1975-1979年ではI型は20.6%であったのに対し1998年では57.9%となっている。4) コレステロール結石は過去3回の調査でいずれも5-10%程度であり必ずしも増加しているとはいえず、結石の主体は現在もビリルビンカルシウム石である。5) 治療後の結石遺残・再発率は過去3回の調査では何れも20%程度であり、必ずしも治療成績は向上していない。6) 癌合併は2.5-5%程度であり、90%以上の胆道癌は結石存在部位にあることが示された。また胆道癌の発生率と結石の種類には関連がないことが示された。

効率的な画像診断体系の確立 病型分類の改訂

画像診断・病型分類ワーキンググループ

昨年度までに、拾い上げ診断としてのMRCP、また詳細診断としてのDICを併用したMDCTの有用性が示された。またMRCPにおける胆管径を策定した。本年度は肝内結石症における画像診断としての

MRCPの役割、特にこれまで周囲胆管に比較して相対的な狭窄や拡張が記載されていたものを、具体的な数値として表現できるよう、診断基準を改定した。昨年度までに、一定の手順でPost Processingを行うことにより、DIC-MDCTの診断能向上が得られた。

個別研究では、DIC-MDCTの画像データをPost Processingすることにより、詳細なグリソン診断が可能となることが示された。この結果を受け、DIC-MDCTのデータをDICOMフォーマットで集積し、画像診断グループによるPost Processing、評価をおこなう画像データ共用プログラムを発足させた。

MRCによる胆管サイズの測定に関する基礎実験では測定誤差の評価のためのファントムを開発した。この研究結果から、異なったMR機種、測定ソフトを用いても直径11~3mmの範囲では、ファントム径・面積の計測が、比較的正確に計測できることが確認された。今回用いた作像法、測定法では、臨床応用可能な計測値の下限は直径3mmであったので、MRCは、肝内胆管の拡張の診断には使用可能であるが、直径3mm以下の胆管狭窄の存在診断、部位診断には使用が困難と考えられた。今後、直径3mm以下の小さな管腔の計測が可能な、MR作像法、胆管サイズの計測方法の検討が必要と考えられた。

3. 肝内結石症に伴う肝内胆管癌の成因と治療法の検討

本疾患の重大な合併症である肝内胆管癌について、形態学的・分子生物学的・遺伝子学的側面から検討を行った。

発癌ワーキンググループ

2002年度~2004年度に作成した胆管上皮層内異型病変 (Biliary intraepithelial neoplasm=BilIN) とそのgrading (BilIN 1-3) のさらなる妥当性を検討した。すなわち、前回参加医師とは異なる病理医に本分類と概念とgradingの妥当性の検討を依頼した。わが国で3名、国外で22名の病理医に、前回のコンセンサス研究で得られたBilINの写真と前回公表したBilINに関する論文 (Zen Y, et al: Pathol Int. 2005 Apr;55 (4):180-8) を配布した。その結果、計11名の病理医から返答を得た。BilINは、一般的に

は、これら病理医の施設では胆管上皮ディスプラジア（低異型度、高異型度）あるいは胆管上皮異型病変と呼称されている事が明らかとなった。さらに、BillINとの呼称やそのgradingに関しては時代に適応しているとの回答を得た。

各個研究においては、肝内結石症100例の長期予後の検討と肝内胆管癌合併肝内結石症の検討が行われた。胆道癌の合併は計17例（17%）で、肝内胆管癌が10例、肝門部胆管癌が5例、胆嚢癌が2例で、その多くが進行癌で根治切除例は4例のみであった。肝内胆管癌10例のうち肝萎縮を5例に認めた。全例が結石葉に癌を合併していた。切除例は3例のみで、いずれもリンパ節転移をとまなうstage IVb症例であった。肝内胆管癌のうち肝内結石症の初診時に癌を合併していた症例は7例、経過中に癌を合併した症例は3例であった。肝内結石を合併しない肝内胆管癌と比較すると、肝内結石を合併した肝内胆管癌は有意に予後不良であった。また肝内結石合併肝内胆管癌は切除例でも肝内結石合併あるいは非合併肝内胆管癌の非切除例と比較しても予後に差を認めずきわめて予後不良であった。また他施設の主に非観血的治療を中心におこなった115例中胆管癌を合併した7例についての検討では、男性5例、女性2例。肝内結石診断時年齢50.1歳。主肝管型6例、末梢肝管型1例。胆管癌は腫瘍形成型5例、胆管浸潤型1例、粘液産生胆管癌1例であった。腫瘍形成型1例は手術施行されたが、その他は、発見時手術不能状態であった。腫瘍形成型は診断後8ヶ月以上の生存例は認めなかった。胆管浸潤型、粘液産生胆管癌はそれぞれ術後2年、2年6ヶ月現在生存中である。いずれの症例も定期的な腹部エコーによる外来経過観察をしていたが癌合併を早期診断することはできなかった。今後画像診断、腫瘍マーカーのチェックの組み合わせによる胆管癌合併例の早期診断体系の確立が望まれる。

胆管癌発生のメカニズムの検討では、胆管上皮が異形性を獲得する時期に一致して、HMGA1が発現することが示された。Ki67やLATなどの増殖能や代謝の亢進を示す指標は、発癌以前にすでにUpregulationされていることが示された。またア

ミノ酸トランスポーターの関与を示唆する実験結果が得られた。

4. 成因、病態研究

基礎的、臨床的検討から、肝内結石症の発生機序を解明する。特に肝内結石症における胆汁酸移送タンパク分析など通じ病的な脂質動態を明らかにしてきた。

肝内結石症に対する治療後の遺残・再発結石の検討では、治療後の再発率は22.7%であったが、肝切除術後は13.6%と少なかったものの、PTCSL後は50%と多く、PTCSLは根治術になりにくいことが示唆された。肝切除術後の再発部位はB₄が多く、L型に対しては外側区域切除で結石が除去できても術式として不十分であり、胆汁うっ滞の残るB₄を切除する左葉切除を選択すべきと結論した。肝内結石症胆管粘膜における腸上皮化生の発生機序を細菌感染とホメオボックス遺伝子CDX2の関与を中心に検討した報告もされた。慢性胆管炎モデルであるPCKラットでは加齢に伴って化膿性胆管炎、慢性炎症、腸上皮化生とCDX2依存性のMUC2発現が出現する。このメカニズム解明のため、細菌感染、自然免疫に重要な役割を持つToll-like receptor (TLR)とCDX2の関与を中心に腸上皮化生の発生機序を検討した。培養ラット胆管上皮を用いた検討では、TLR2、TLR4のリガンドである細菌菌体成分LTA、LPSなどによりCDX2、MUC2ムチン発現亢進を認めた。この発現亢進は、抗TLR2、TLR4抗体、NF- κ B阻害剤により抑制された。また、siRNAを用いてCDX2発現を抑制したところ、LPS刺激によるCDX2、MUC2発現亢進はおこらなかった。これらの結果から、今までに報告したサイトカインの影響に加えて、細菌感染が直接、CDX2、MUC2発現亢進を誘導する事、この誘導はTLR2、TLR4、NF- κ Bを介する事が示された。

5.新しい治療法の開発

MDR3P-糖蛋白に着目したフィブレート系薬剤による結石形成に及ぼす効果やムチン分解を促進することによる結石生成抑制効果を検討し、肝内結石の新たな治療法を検討した。ベザフィブレートはABCB4の肝発現レベルを増加

させ、また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。ペザフィブラートは毛細胆管膜のABCB4を分子標的として、そ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と考えられた。

主に去痰剤と使用される、ムチン分解薬は、臨床例に於いてS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素は酸性糖タンパク質を有効に分解することが知られている。これまでの実験的検討でも、これら製剤により肝内および総胆管結石は縮小、脆弱化した。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、すぐに臨床応用可能であると考えられる。胆道誘導チューブからの直接投与、すなわち胆道内遺残結石の洗い出しや胆道内粘液の洗浄では良好な効果が確認された。また薬剤の内服投与では、胆汁中のタンパク質濃度が低下することにより有効性を発揮する可能性も示唆された。

また癌治療においても新たな試みが発表された。二つの自殺遺伝子を組み込んだ腫瘍選択的増殖型アデノウイルスによる胆管癌の遺伝子治療の報告ではヒト胆管癌細胞株HuCCT1に対して、大腸菌のuracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 遺伝子と Herpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター AxCAUT を作製し、5-fluorouracil (5-FU)、ganciclovir 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター AxCAUT を作製し、5-fluorouracil (5-FU)、ganciclovir (GCV) の抗腫瘍効果を培養細胞系と動物モデルで検討した。さらにE1B-55kDを欠損した腫瘍選択的増殖型ウイルスに、両遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いて抗腫瘍効果を検討した。培養胆管癌細胞において、5-FU、GCVの薬剤感受性は、アデノウイルスAxCAUTのmultiplicity of infection (MOI) 数が増加するに伴い増強していた。さらに5-FU、GCVは単独投与よりも併用投与で、より薬剤感受性が増加していた。腫瘍選

択的増殖型ウイルスAxE1CAUTはMOI数の増加に伴い抗腫瘍効果を示した。

アデノウイルスAxCAUTを投与されたマウス皮下担癌モデルにおいても、5-FU、GCVは単独投与群と比較して併用投与で抗腫瘍効果を示した。さらに腹膜播種モデルにおいて、AxE1CAUT投与群はAxCAUT投与群に比べ有意に生存率を延長させた。胆管癌に対する自殺遺伝子療法は、胆管癌に対する自殺遺伝子療法は、UPRT/5-FU、HSVtk/GCVを組み合わせることにより、より有効な治療となる可能性が示された。さらに腫瘍選択的増殖型アデノウイルスベクターに2種類の自殺遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いると、ウイルス自体の腫瘍融解作用に加えて、薬剤感受性遺伝子を発現させることにより強力な抗腫瘍効果を示した。

E. 考察

本疾患は日本や中国、韓国を中心としたアジア地域に多いことから、遺伝的素因や食生活を中心とした生活様式の関与が推測される。しかしながら類似した人種的背景を持つ場合でも大きな地域差が認められるのも特徴であり、生活習慣病としての側面を持つ可能性も否定できない。本邦においても過去5回の疫学調査が行われているが、初回の1975-79年調査から第5回(1998年)調査までの年代推移を見ると、1) 新規発症が減少し、有病者の高齢化が認められる2) 男女比はおおむね一定である3) 肝内型が時代とともに増加しており、1975-1979年ではI型は20.6%であったのに対し1998年では57.9%となっている。4) コレステロール結石は過去3回の調査でいずれも5-10%程度であり必ずしも増加しているとはいえ、結石の主体は現在もビリルビンカルシウム石である。5) 治療後の結石遺残・再発率は過去3回の調査では何れも20%程度であり、必ずしも治療成績は向上していない。6) 癌合併は2.5-5%程度であり、90%以上の胆道癌は結石存在部位にあることが示された。また胆道癌の発生率と結石の種類には関連がないことが示された。これらのトレンドが最終調査から8年経過した現在、どの

ように推移しているか興味を持たれる。

肝内結石症における結石は、ピリルピンカルシウム石であっても、総胆管に存在する結石と、組成が異なることが知られている。すなわち、肝内結石は、総胆管結石に比しコレステロールの成分比率が高く、胆汁酸の比率が少ない。また肝内純コレステロール結石の報告も散見されることから、肝内結石症は、肝における脂質代謝障害とみることもできる。またこのような側面から肝内結石症は生活習慣病としての側面を有する可能性もある。今後の疫学調査はこのような視点からも計画していく必要があると考えている。

これまでの肝内結石症の診療指針には、診断法としてMRI検査が含まれていなかった。また近年の高速MDCTも肝内結石症診断に応用されている。これまでに本研究班でも、拾い上げ診断としてのMRCP、また詳細診断としてのDICを併用したMDCTの有用性が示してきた。これまでの診療指針では、胆管の狭窄、拡張は、周囲胆管との相対関係で記載することとなっており、MRCPを診断に用いる場合の、胆管狭窄・拡張の定義はこれまでになかった。本班会議では昨年度までに、健常者の胆管径をMRCPにて計測し、胆管径正常値を策定してきた。本年度は胆管径計測の精度管理を目的とし、胆管ファントムを開発した。この研究結果から、異なったMR機種、測定ソフトを用いても直径11～3mmの範囲では、ファントム径・面積の計測が、比較的正確に計測できることが確認された。今回用いた作像法、測定法では、臨床応用可能な計測値の下限は直径3mmであったので、MRCは、肝内胆管の拡張の診断には使用可能であるが、直径3mm以下の胆管狭窄の存在診断、部位診断には使用が困難と考えられた。今後、直径3mm以下の小さな管腔の計測が可能な、MR作像法、胆管サイズの計測方法の検討が必要と考えられた。昨年度までに、一定の手順でPost Processingを行うことにより、DIC-MDCTの診断能向上が得られ、詳細なグリソン診断が可能となることが示された。この結果をうけ、DIC-MDCTのデータをDICOMフォーマットで集積し、画像診断グループによるPost Processing、評

価をおこなう画像データ共用プログラムを発足させた。今後データの集積により、更なる診断能の向上が期待される。

肝内結石症診断ではさまざまな検査法を漫然と施行する施設も少なくないことから、肝内結石症に対する費用効果を考慮した診断体系の提示が求められている。画像診断ワーキンググループを中心とし効率の良い画像診断体系を提言していきたい。

本疾患の重大な合併症である肝内胆管癌について、形態学的・分子生物学的・遺伝子学的側面から検討を行った。2002年度～2004年度に作成した胆管上皮層内異型病変(Biliary intraepithelial neoplasm=BiIN)とそのgrading (BiIN 1 - 3)のさらなる妥当性を検討した。すなわち、前回参加医師とは異なる病理医に本分類と概念とgradingの妥当性の検討を依頼した。わが国で3名、国外で22名の病理医に、前回のコンセンサス研究で得られたBiINの写真と前回公表したBiINに関する論文(Zen Y, et al: Pathol Int. 2005 Apr;55 (4) :180-8)を配布した。その結果、計11名の病理医から返答を得た。BiINは、一般的には、これら病理医の施設では胆管上皮ディスプラジア(低異型度、高異型度)あるいは胆管上皮異型病変と呼称されている事が明らかとなった。さらに、BiINとの呼称やそのgradingに関しては時代に適応しているとの回答を得た。

各施設における後ろ向き症例調査の報告では、各個研究においては、肝内結石症100例の長期予後の検討と肝内胆管癌合併肝内結石症の検討が行われた。胆道癌の合併は計17例(17%)で、肝内胆管癌が10例、肝門部胆管癌が5例、胆嚢癌が2例で、その多くが進行癌で根治切除例は4例のみであった。肝内胆管癌10例のうち肝萎縮を5例に認めた。全例が結石葉に癌を合併していた。切除例は3例のみで、いずれもリンパ節転移をとまなうstage IVb症例であった。肝内胆管癌のうち肝内結石症の初診時に癌を合併していた症例は7例、経過中に癌を合併した症例は3例であった。肝内結石を合併しない肝内胆管癌と比較すると、肝内結石を合併した肝内胆管癌は有意に予後不良であった。また肝内結石合併肝内胆管癌は切除例でも肝内結石合併あるいは非合併肝内

胆管癌の非切除例と比較しても予後に差を認めずきわめて予後不良であった。また他施設の主に非観血的治療を中心におこなった115例中胆管癌を合併した7例についての検討では、男性5例、女性2例。肝内結石診断時年齢50.1歳。主肝管型6例、末梢肝管型1例。胆管癌は腫瘤形成型5例、胆管浸潤型1例、粘液産生胆管癌1例であった。腫瘤形成型1例は手術施行されたが、その他は、発見時手術不能状態であった。腫瘤形成型は診断後8ヶ月以上の生存例は認めなかった。胆管浸潤型、粘液産生胆管癌はそれぞれ術後2年、2年6ヶ月現在生存中である。いずれの症例も定期的な腹部エコーによる外来経過観察をしていたが癌合併を早期診断することはできなかった。これらの報告にもあるように肝内結石症は依然として難治性疾患であり、綿密なフォローアップによっても、胆管癌の発見は容易ではない。今後画像診断、腫瘍マーカーのチェックの組み合わせによる胆管癌合併例の早期診断体系の確立が望まれる。また肝内結石症に対する治療後の遺残・再発結石の検討では、治療後の再発率は22.7%であったが、肝切除術後は13.6%と少なかったものの、PTCSL後は50%と多く、PTCSLは根治術になりにくいことが示唆された。肝切除術後の再発部位はB4が多く、L型に対しては外側区域切除で結石が除去できても術式として不十分であり、胆汁うっ滞の残るB₄を切除する左葉切除を選択すべきである結論を得た。

肝内結石症胆管粘膜における腸上皮化生の発生機序を細菌感染とホメオボックス遺伝子CDX2の関与を中心に検討した報告もされた。慢性胆管炎モデルであるPCKラットでは加齢に伴って化膿性胆管炎、慢性炎症、腸上皮化生とCDX2依存性のMUC2発現が出現する。このメカニズム解明のため、細菌感染、自然免疫に重要な役割を持つToll-like receptor (TLR) とCDX2の関与を中心に腸上皮化生の発生機序を検討した。培養ラット胆管上皮を用いた検討では、TLR2、TLR4のリガンドである細菌菌体成分LTA、LPSなどによりCDX2、MUC2ムチン発現亢進を認めた。この発現亢進は、抗TLR2、TLR4抗体、NF- κ B阻害剤により抑制

された。また、siRNAを用いてCDX2発現を抑制したところ、LPS刺激によるCDX2、MUC2発現亢進はおこらなかった。これらの結果から、今までに報告したサイトカインの影響に加えて、細菌感染が直接、CDX2、MUC2発現亢進を誘導する事、この誘導はTLR2、TLR4、NF- κ Bを介する事が示された。

5. 新しい治療法の開発

MDR3P-糖蛋白に着目したフィブラート系薬剤による結石形成に及ぼす効果やムチン分解を促進することによる結石生成抑制効果を検討し、肝内結石の新たな治療法を検討した。ベザフィブラートはABCB4の肝発現レベルを増加させ、また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。ベザフィブラートは毛細胆管膜のABCB4を分子標的として、そ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と考えられた。またムチン分解酵素も臨床例に於いてS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素は酸性糖タンパク質を有効に分解することが知られている。これまでの実験的検討でも、これら製剤により肝内および総胆管結石は縮小、脆弱化した。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、すぐに臨床応用可能であると考えられる。胆道誘導チューブからの直接投与、すなわち胆道内遺残結石の洗い出しや胆道内粘液の洗浄では良好な効果が確認された。また薬剤の内服投与では、胆汁中のタンパク質濃度が低下することより有効性を発揮する可能性も示唆された。

二つの自殺遺伝子を組み込んだ腫瘍選択的増殖型アデノウイルスによる胆管癌の遺伝子治療の報告ではヒト胆管癌細胞株HuCCT1に対して、大腸菌のuracil phosphoribosyltransferase (UPRT) 遺伝子とHerpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターAxCAUTを作製し、5-fluorouracil (5-FU)、ganciclovir遺伝子を組み込んだアデノウイルスベク

ター AxCAUTを作製し、5-fluorouracil (5-FU)、ganciclovir (GCV) の抗腫瘍効果を培養細胞系と動物モデルで検討した。さらにE1B-55kDを欠損した腫瘍選択的増殖型ウイルスに、両遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いて抗腫瘍効果を検討した。

また培養胆管癌細胞において、5-FU、GCVの薬剤感受性を増強する目的での遺伝子治療では、アデノウイルスAxCAUTのmultiplicity of infection (MOI) 数が増加するに伴い薬剤感受性が増強していた。さらに5-FU、GCVは単独投与よりも併用投与で、より薬剤感受性が増加していた。腫瘍選択的増殖型ウイルスAxE1CAUTはMOI数の増加に伴い抗腫瘍効果を示した。

アデノウイルスAxCAUTを投与されたマウス皮下担癌モデルにおいても、5-FU、GCVは単独投与群と比較して併用投与で抗腫瘍効果を示した。さらに腹膜播種モデルにおいて、AxE1CAUT投与群はAxCAUT投与群に比べ有意に生存率を延長させた。胆管癌に対する自殺遺伝子療法は、胆管癌に対する自殺遺伝子療法は、UPRT/5-FU、HSVtk/GCVを組み合わせることにより、より有効

な治療となる可能性が示された。さらに腫瘍選択的増殖型アデノウイルスベクターに2種類の自殺遺伝子を組み込んだAxE1CAUTを用いると、ウイルス自体の腫瘍融解作用に加えて、薬剤感受性遺伝子を発現させることにより強力な抗腫瘍効果を示した。

今後はこれらの研究結果を反映させた新しい低侵襲的な診断法を含めた費用効果の高い診断体系を確立し、肝内結石症に関する診療指針を改訂する予定である。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

一覧表添付

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Ⅱ ワーキンググループ研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

肝内結石症の成因に関する疫学調査

Case-Control Study

ワーキンググループ研究報告書

疫学調査ワーキンググループA

八坂貴宏、佐々木睦夫、正田純一、跡見裕

A. はじめに

肝内結石症の成因を明らかにするために、1) HTLV-I、HCV、回虫感染が成因として関与している可能性がある。2) 食生活が成因として関与している可能性がある。3) 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。の3つを作業仮説として、症例対照研究を行う。

B. 対象と方法

対象とする症例は協力の得られる分担研究、協力研究施設に肝内結石症にて通院中の患者とする。対照は、症例と同じ施設に通院しており、性、年齢（±3才）が一致し、仮説となる要因と独立な疾患（肝胆道系疾患を除外）を持ち、研究に同意した患者とする。

方法は、診察時に面接による聞き取り調査と血清

学的検査を行う。聞き取り調査は調査票（症例：A、対照症例：B）に記入し、血清の測定はSRL社に依頼する。解析はConditional logistic regression Analysisを用いる。

調査項目は、1) 対象の年齢、身長、体重など、2) 発育状況、健康状態、3) 居住・職業歴、4) 婚姻歴、出産歴、5) 既往歴、家族歴、6) 生活環境、7) 食事・嗜好に関するもの、8) HTLV-I抗体、HCV抗体、HBS抗原・抗体、HP IgG抗体、特異的回虫IgE抗体である。

C. 結果（表1）

これまでの研究（症例30例、対照30例）では、オッズ比の高いものとして、生活環境：生家の職業が第1次産業、オッズ比1.750 (P=0.43)、嗜好品：タバコ、オッズ比2.895 (P=0.413)、感染症：特異的回虫IgE抗体、オッズ比1.800 (P=0.706)、HCV抗体、オッズ比5.800 (P=0.195)、HTLV-I抗体、オッ

表1. 平成16年度までの解析結果
(症例30例、対照30例)

生活環境：		
生家の職業が第1次産業	オッズ比1.750	P=0.43
嗜好品：		
タバコ	オッズ比2.895	P=0.413
感染症：		
特異的IgE抗体	オッズ比1.800	P=0.706
HCV抗体	オッズ比5.800	P=0.195
HTLV-I抗体	オッズ比3.222	P=0.612
輸血歴	オッズ比(-)	P=0.005

表2. 平成16年度までの登録数

施設	症例	対照
弘前大学	2	4
自治医科大学	2	4
筑波大学	6	8
千葉大学	9	7
杏林大学	9	12
名古屋大学小児外科	11	0
和歌山医科大学	2	4
広島大学	5	8
宮崎大学	5	11
計	51	58

ズ比3.222 (P=0.612)、輸血歴、オッズ比(-)
(P=0.005)があげられる。

されている。(表2) 平成17年度末までに症例4例、
対照24例を、平成18年度末までにさらに症例6例、
対照25例の追加登録を行う予定である。

D. 今後の研究計画

現在までに、症例51例、対照58例のデータが収集

肝内結石症全国疫学アンケート調査

疫学ワーキンググループB

森俊幸、永井秀雄、二村雄次、田妻進、佐々木陸男、八坂貴宏、
藤田直孝、山上裕機、跡見裕

要旨

肝内結石症は現在も難治性疾患であり、本研究班を中心に、多方面からの調査研究が行ってきた。本研究班では過去5回の全国疫学調査をおこなっており1998年調査が最後となっている。1998年の症例調査と過去4回の疫学調査を比較すると1) 新規発症が減少し、有病者の高齢化が認められる2) 男女比はおおむね一定である3) 肝内型が時代とともに増加しており、1975-1979年ではI型は20.6%であったのに対し1998年では57.9%となっている。4) コレステロール結石は過去3回の調査でいずれも5-10%程度であり必ずしも増加しているとはいえず、結石の主体は現在もビリルビンカルシウム石である。5) 治療後の結石遺残・再発率は過去3回の調査では何れも20%程度であり、必ずしも治療成績は向上していない。6) 癌合併は2.5-5%程度であり、90%以上の胆道癌は結石存在部位にあることが示された。また胆道癌の発生率と結石の種類には関連がないことが示された。1998年調査より8年が経過し、病態の理解や画像診断の進歩も著しい。我々はこれまでに、2006年度の全国アンケート調査施行を目指し、個人情報保護や新たな画像診断、治療法を勘案した調査用紙の作成、倫理委員会による審査などの準備を行ってきた。

A. 病像の変遷

1998年度の症例調査を班研究による過去4回の疫学調査の結果と比較する。1998年度調査では肝内結石症有病者の平均年齢は63.3歳であり1970-77年調査の平均51.3歳に比し12歳高齢化している。この平均年齢は有病者のものであり、高齢化は新規症例の減少も意味している。過去30年間にわたり男女比に変化は認められない。肝内結石症が全胆石症に占める割合は、肝内結石症調査研究班による過去4回の疫学調査結果で、1970-1977年で4.1% (1,590/38,606)、1975-1984年で3.0% (4381/148,017)、1985-1988年で2.3% (1,813/79,052)、1989-1992年で2.2% (2,353/105,062)、1993-1995年で1.7%と年代を追って減少傾向が認められる。時期を同じくして、胆嚢コレステロール結石症の罹患率は上昇しており、肝内結石症の頻度の減少に分母の増大として

寄与している可能性もあるが、同様の減少傾向は台湾や韓国においても報告されている。

病型をみると、1998年調査では肝内限局型が57.9%と多数を占めるようになった。肝内型は1975～1984年の集計では20.6%であり時代とともに肝内型の割合が急速に増大している。結石存在葉は何れの調査でも左右約60%ずつであり、時代的変遷はない。またL型は何れの調査でも45%程度である（図1）。

従来肝内にはコレステロール石は形成されないと考えられてきたが、1985-1988調査で8.5%、1989-1992年調査で13.1%の肝内結石がコレステロール胆石と報告された。平成11年度の集計では5.8%がコレステロール石であったとも報告されているが、両者とも調査票による症例調査であり。直接の比較は困難である。しかしながら、依然として肝内結石症ではビリルビンカルシウム石が主体である。