

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

劇症化の予知と阻止

研究協力者 与芝 真彰 昭和大学藤が丘病院 消化器内科教授

研究要旨: 2002年から2006年の間にプロトロンビン時間 (PT) 60%以下となった重症肝炎例 (肝硬変は除外) 119例のうち入院時既に劇症化していた45例を除く74例を対象に平成9年度報告書掲載の劇症化予知式 (予知式 = $-0.89+1.74$ (原因: A型肝炎ウイルスとB型肝炎ウイルスの急性感染が1点, HBVキャリアの急性増悪, C型, 薬剤性, 自己免疫性, 成因不明が2点) $+0.56 \times$ 総ビリルビン $-0.014 \times$ コリンエステラーゼ値 (正常値 $135U/l-413U/l$)) に基づく劇症化予知と阻止の有効性を prospective に検証した。予知式陽性34例のうち13例 (38%) が肝炎進展阻止治療 (抗ウイルス剤+免疫抑制剤) にも関わらず劇症化したが, 7例重急性, 6例 LOHF であるにもかかわらず10例 (77%) が救命され, 非劇症化例22例のうち21例が生存し, 予知式陽性例の合計の生存率は30/34 (88%) であり, 予知式陰性を含めた74例全体の生存率は69/74 (93%) であった。我々の作成した予知式とそれに基づく阻止治療は重症肝炎の生存率の向上に有用と考えられる。

共同研究者

井上和明 昭和大学藤が丘病院消化器内科 准教授
渡邊綱正 昭和大学藤が丘病院消化器内科 助教

A. 研究目的

我が国で言う劇症肝炎重急性型や遅発性肝不全 (LOHF) の予後は依然として不良であり, 肝移植のみが唯一信頼し得る治療とされる。我が国では脳死肝移植が普及せず, また劇症肝炎は救急疾患であり, 早急に移植の決断を必要とする事も相俟って, ほぼ全員が生体肝移植により治療されているのが現状である。然し, 生体肝移植はドナーを必要とし, しかもドナーに対して多大な精神的, 肉体的負担を与える事になり, その普及は限られている。本来肝は巨大な再生力と予備力に富む臓器であり, それ故に生体肝移植という治療が成立している。そのような再生力に富む臓器の治療に何故他人の臓器に依存する治療を行うのか? ここに生体肝移植治療の根本的矛盾がある。

むしろ, 肝の再生力を生かすのであれば, 劇症化する危険のある症例を劇症化前に見出し, 肝細胞破壊の進展を防止する事が可能であれば, 劇症化を阻止するか, 例え劇症化しても救命率が向上するはずである。

今回我々は2002年から2009年の間に当院に入院したプロトロンビン時間 $<60\%$ の症例を対象に既に平成9年度に報告した予知式を使用して劇症化の予知と阻止を試みた。

B. 研究方法

2002年から2008年までに昭和大学藤が丘病院に入院したPT $<60\%$ の症例は119例であった (慢性肝炎例を含み, 肝硬変例は除外した)。このうち45例は既に入院時劇症化しており (PT $<40\%$, 脳症II度以上), 残りの74例を今回の研究対象とした。原因別内訳は, A型急性肝炎3例, B型急性感染11例, HBVキャリア, 又はB型慢性肝炎の増悪23例, C型慢性肝炎の増悪8例, 薬剤性肝炎1例, 非A非B非C型28例であった。劇症化予知式としては既に平成8年の厚生省特定疾

患難治性監視感調査研究班に発表した予知式:

$Z = -0.89+1.74$ (原因: A型肝炎ウイルスとB型肝炎ウイルスの急性感染が1点, HBVキャリアの急性増悪, C型, 薬剤性, 自己免疫性, 成因不明が2点) $+0.56 \times$ 総ビリルビン $-0.014 \times$ コリンエステラーゼ値 (正常値 $135U/l-413U/l$)

を使用した。この場合Z値 >0 の場合, 劇症化の予知陽性とした。上記74例をZ値 >0 の劇症化予知陽性群とZ値 <0 の劇症化予知陰性群に分類し, 両群の劇症化率, 生存率, 劇症化陽性群についてはその治療内容を検討した。

C. 研究結果

- ①74例中予知式陽性者は34例 (46%), 陰性者は40例 (54%) であった。
 - ②予知式陽性者のうち13例 (38%) が劇症化した。病型は重急性が7例, LOHFが6例であった。このうち, 10例 (77%) が生存した。22例 (62%) は劇症化せず, うち21例 (95%) は生存した。この群の合計の生存率は30/34 (88%) であった。
 - ③予知式陽性者の死亡例 (4例) は全例 LOHF で, 1例は73才男性でアルコール多飲歴があり, 1例は11才女性で肝不全回復後のカテーテルトラブルによる肺塞栓, 1例はRAによる長期のステロイド使用による肺アスペルギルス症であり, 肝機能非改善例は成因不明の69才女性の1例のみであった。
 - ④予知式陰性者のうち, 4例が劇症化したが, 4例とも急性型であり, 全例生存した。残りの36例は劇症化せず, 35例が生存した。この群の生存率は39/40 (98%) であった。死亡の1例は悪性リンパ腫の治療中のB型慢性肝炎の急性増悪例であったが, 肺炎と消化管出血で死亡した。
 - ⑤以上により74例合計の生存率は69/74 (93%) であった。
- 以上の結果を図1にまとめ, 治療内容を表1にまとめた。

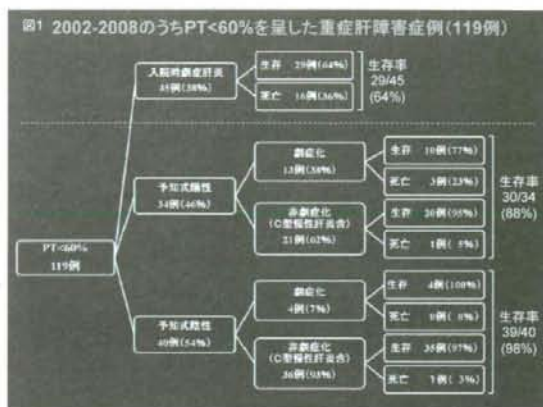


表1 PT<60%を呈し重症肝障害症例(74例)のうちZ値陽性例(34例)の治療内容および生存率

原因	治療	症例数*	生存例*	生存率	原因別生存率	全例生存率
HBVキャリア (544%)	ALS+LAM+IFN+PSL+C/A	2(1)	1(1)	2/2(100)	14/15 (93)	30/34 (88)
	ALS+LAM+PSL+C/A	1(1)	1(1)	2/2(100)		
	ALS+LAM+PSL	1(1)	1(1)	1/1(100)		
	LAM+ETV+IFN+PSL+C/A	1	1	1/1(100)		
	LAM+ETV+IFN+PSL	1	1	1/1(100)		
	LAM+ETV+IFN+PSL	4	4	4/4(100)		
	LAM+IFN+PSL+C/A	1	1	1/1(100)		
	LAM+IFN+C/A	2	2	2/2(100)		
	LAM					
NANHC (1441%)	ALS+IFN+PSL+C/A	1(0)	2(0)	7/9(78)	11/14 (79)	
	ALS+IFN+PSL	2(1)	1(1)	1/2(50)		
	PSL+C/A	2	2	2/2(100)		
	PSL	1	1	1/1(100)		
C型慢性肝炎 (31%)	ALS+IFN+C/A	1	1	1/1(100)	3/3(100)	
	IFN+C/A	4	4	4/4(100)		

*0内は劇症化症例

D. 考察

我々の予知式は当初40%までPTが低下した症例を対象に作成したものであったが、その後HBVキャリアを対象に予知式を検討したところ、60%の時点で予知を行っても40%の場合と感度、特異度等が大きく変わらないことが判明したこと、40%でも肝細胞破壊の高度進展例も存在することから今回は60%以下を対象とした。岩手医科大学では80%から予知作業を開始しているが、PT値を高く設定すれば予知の感度は上昇するものの特異度が低下する事は当然である。感度、特異度共に高い予知式が作れば理想的である。しかし、以前、特異度を高くする目的で武藤の改変式や登録の式が作られたが、実際の症例現場で特異度を高めると予知陽性時点から劇症化までの時点までの期間が短くなり、極端な例では登録の式の陽性化した次の日に劇症化する例も存在し、早期の予知と阻止治療による劇症化阻止と救命率の向上という本来の目的が見失われる事になる。

今回の研究ではPT60%以下の症例74例において34例(46%)が予知され、阻止治療にも拘わらず、13例(予知例の38%)が劇症化した。阻止治療を行っている事を考慮すれば特異度もそれ程、低くはないと考える。劇症化例の生存率は77%であったが、全員が亜急性型かLOHFであることを考えれば高い救命率であり、阻止治療の有効性が示唆される。治療自体が無効

と考えられた例は成因不明の高度肝萎縮の69才の女性例1例のみであり、その他は合併死である事を考慮すれば、阻止治療の方向性は正しいものと考えられた。

E. 結論

我々の作成した予知式に基づく劇症化予知と予知例に対する抗ウイルス療法と免疫抑制療法は劇症化阻止、劇症化後の救命率の向上に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表 なし
- 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 特許取得 なし
- 実用新案登録 なし
- その他 なし

研究要旨：劇症肝不全に関して、高齢者の劇症肝不全では数種類の薬物歴あり、臨床的経験と薬物の種類による肝機能障害の頻度で判断する 경우가多く、確証が得にくい。心疾患、脳疾患の劇症肝不全では抗凝固剤の使用によるPTの判定無効例が多数あり、抗凝固剤（パナルジン、バイアスピリンなど）による薬剤性肝障害の増加も合わせて、特徴的であった。その他、悪性リンパ腫や胃内分泌癌の肝浸潤の劇症肝不全の存在もあった。一方、移植成績に関する問題点として脳死肝移植と生体肝移植で急性肝不全に対する移植成績が大きく異なる点が判明した。症例数の違いで明確な対比は困難であるが、脳死肝移植症例の詳細な検討が必要と考えられた。成因、脳死肝移植と生体肝移植の相違、待機期間の相違やその他の要因の関連性を検討すべきと考えられた。

A. 研究目的

劇症肝炎と劇症肝不全の症例を蓄積し、その病態の相違点を検討することを第一の目的とした。さらに、班会議以外の劇症肝不全の情報として、肝移植関連の劇症肝不全情報を収集することとした。このことにより、肝移植の適応と実際の脳死肝移植、生体肝移植の劇症肝不全に対する成績を比較検討することが可能となり、さらに適応基準の整合性に関して検討することも可能となり、班研究として実践的と考えられた。

B. 研究方法

当院で過去5年間の劇症肝炎、劇症肝不全の症例頻度を検討した。そして、脳死肝移植適応評価委員会に移植適応として登録された劇症肝不全の情報と臓器移植ネットワークの移植後の転帰、ならびに劇症肝不全の肝移植前後の病態と生存率に焦点を当てて検討した。また、日本肝移植研究会の登録症例における劇症肝炎の生体肝移植の移植成績と併せて検討した。

C. 研究結果

当院における劇症肝不全では循環不全に伴う劇症肝不全がもっとも多く（20例）、ついで悪性腫瘍の肝浸潤による劇症肝不全（5例）が続いた。劇症肝炎では大半がウイルス性（6例）と薬剤性肝炎（8例）であった。

一方、脳死肝移植適応評価委員会で評価された症例の肝臓移植緊急度別生存率ならびに生着率を検討した。その中で医学的緊急度9点は、予後余命一ヶ月と判断される場合で多くは劇症肝不全であるが、個人情報観点から詳細な病名は不明確である。今日まで13例の緊急度9点の症例が脳死肝移植を受けている。この生存曲線は10例で検討した（日本臓器移植ネットワークの芦刈淳太郎、小中節子氏より提供されたものである）（図1）。

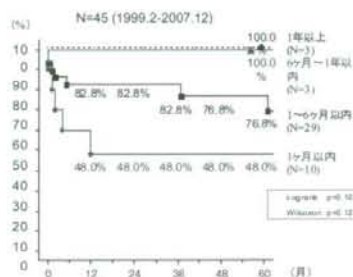


図1 緊急度別肝移植後（予後余命別）の生存曲線

その結果、劇症肝不全が大半を占める医学的緊急度9点の生存率は1年から5年で48%であることが判明した。一方、日本肝移植研究会の症例登録からの検討では

一年生存率、3年生存率、5年生存率は489例の検討で73.9%、70.4%、68.6%であった。

次に、脳死肝移植適応評価委員会へ提出された劇症肝炎の最近の症例を検討し、班会議の報告と比較検討することとした。すなわち、脳死肝移植適応評価委員会への登録症例の特徴は、すでに内科的治療がなされている症例で、必ずしも奏効していない症例の蓄積と考えられた。最近の登録症例26例をまとめると、平均年齢47.19歳±15.54歳で脳症発現までの平均日数は22.62日±20.52日で脳症発現までの期間が11日未満は7例、11日以降は19例で、亜急性劇症肝不全が多かった。特徴的な検査所見ではPT%23.15±8.82%、T.Bil15.89mg/dl±11.36mg/dl、CRP1.28±2.45mg/dl、Creatinine1.63±2.45mg/dlで合併する腎不全傾向は軽微で、感染症も少ないと考えられた。

一方、肝移植登録までの先行治療はステロイドパルス10例、PE26例、CHDF15例、抗ウイルス剤5例、GI療法1例であった。

D. 考察

脳死肝移植と生体肝移植で急性肝不全に対する移植成績が大きく異なる点が判明した。症例数の違いによ

り明確な対比は困難であるが、傾向として脳死肝移植の成績が少し劣るような成績である。しかし、これらは必ずしもすべて劇症肝不全でなく、肝移植後の再移植例なども含まれるために、脳死肝移植症例の詳細な検討が必要とされる。もちろん、劇症肝不全の要因、脳死肝移植と生体肝移植の相違、待機期間の相違、Acute on chronic 症例の関与なお、さらにその他の要因を検索しなければならないと考えられた。

脳死肝移植適応評価委員会への登録希望の劇症肝不全はその肝移植適応を考慮して亜急性型劇症肝不全が多くを占めていた。年齢は若年者が多く、腎不全、感染症は比較的よく制御されている症例の集積であった。それにもかかわらず、必ずしも全例が劇症肝不全ではないが医学的緊急度9点の予後余命1ヶ月の症例の脳死肝移植の成績が生体肝移植より少し低いことは、今後の脳死肝移植症例の適応に大きな問題点を提供することとなる。さらに肝移植に適応される症例を詳細に検討し、果たして、脳死ドナーが年間4-5例のわが国のける脳死肝移植でこの種の症例が適応として妥当性を有するか再検討をするきっかけになるものと考ええる。

E. 結論

劇症肝炎では薬剤性、ウイルス性の成因が、劇症肝不全では循環不全と悪性腫瘍の肝浸潤がその成因で特徴的であった。

一方、劇症肝炎の肝移植では脳死肝移植が生体肝移植に比して少し生存率が低率と考えられたが、症例数や背景の詳細な検討が必要で、早急な結論は出しえない。しかし、脳死ドナーが少ないわが国の現状を考えると、脳死ドナーの有効利用を違う観点から再考することも必要になるかもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 市田隆文編集：劇症肝炎、肝不全と治療、第三回伊豆肝臓カンファレンス記録、アークメディア、東京、2008年
- 2) 市田隆文、玄田拓哉、成田諭隆、肝移植後の肝炎再発予防、肝疾患 Review2008-2009、小俣政男監修、河田純男、横須賀収、工藤正俊、榎本信幸編集、日本メディカルセンター、東京、2008年 pp149-155.
- 3) 市田隆文、上野義之、池上俊彦、橋本俊：肝移植 Crossfire (座談会)、肝胆膵2008; 56(4): 467-487.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

3. その他

研究要旨: 卵円形細胞 oval cell は肝障害後に出現し、肝細胞と胆管細胞の前駆細胞と考えられている。肝細胞特異的転写因子である HNF-4は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、標的遺伝子の転写を活性化する。肝に組織特異的に発現する遺伝子の発現制御に重要と考えられている。以前より我々は、HNF4を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクターを用い、肝癌由来細胞株及び初代培養肝細胞に遺伝子導入することで、各種の肝特異的機能が亢進することを報告してきた。そこでラット2-AAF 投与後部分肝切除モデルにおいて HNF-4遺伝子導入による oval cell の肝細胞分化誘導を検討した。

共同研究者

永木 正仁 岐阜大学大学院消化器病態学
 小木曾富生 岐阜大学大学院消化器病態学

A. 研究目的

重篤な肝細胞障害あるいは肝再生が抑制されているときに、失った肝重量を回復できる幹細胞が肝に存在し、肝再生において重要な役割を果たすと考えられている。肝再生において、休止状態にあった幹細胞は oval cell へと分化すると考えられている。この oval cell は肝細胞と胆管上皮細胞の両方に分化する可能性をもち、肝幹細胞である可能性が示唆されている。oval cell を誘導する動物モデルとしてラット2-acetylaminofluorene (AAF) 投与後部分肝切除モデル (modified Solt-Farber model) が知られている。

哺乳類細胞の分化は主として転写レベルで制御される遺伝子発現の変化に関連している。組織特有の遺伝子の転写は、それらの標的遺伝子のシスエレメントの認識に基づいて規制されており、組織分布を制限した転写調節因子によって完遂される。肝細胞特異的遺伝子の発現は hepatocyte nuclear factor (HNF) -1, -3, -4 α , -6といった肝に豊富な転写調節因子と器官発生における前駆細胞や成熟肝細胞において肝の遺伝子発現を調節する CCAAT/エンハンサー結合タンパク (C/EBP) ファミリーの複合的な反応によって支配されている。これら転写因子の中でも HNF-4 α が肝細胞分化を引き起こす転写因子カスケードで最も上流にある重要な遺伝子と考えられている。発生段階においても、HNF-4が胚盤胞の原始の内胚葉に最初に認められ、HNF-1に先行して、卵黄嚢の胎児の内胚葉で発現が持続される。HNF-1 α -/-マウスは出生できるが、HNF-4 α -/-マウスは胚形成期に死んでしまう。これらのことは HNF-1が肝組織の形成のための絶対条件でないことを示している。また、HNF-4は HNF-1の発現を制御し、活性化する。

そこで今回、我々は HNF-4 α 2遺伝子を組み込んだ HNF4アデノウイルスベクター (AdHNF-4) を、ラット2-AAF 投与後部分肝切除モデルに投与し、oval cell に対する HNF-4遺伝子の導入の効果について検討した。

B. 研究方法

Wistar ラットに2-AAF (2-acetylaminofluorene) を皮下投与し、1週間後に70%部分肝切除後、AdHNF-4 (2.0×10^9 PFU/body) またはコントロールとして AdLac-Z を尾静注した。3, 7, 9, 14日後に、HE染色にて門脈周囲 $0.25 \times 0.25 \text{mm}^2$ の oval cell をカウントした。また、PCNA染色を用いて細胞増殖を検討した。さらに、real time PCRを用いて遺伝子発現を検討し、肝細胞分化について検討した。

C. 研究結果

・HNF-4遺伝子導入による oval cell 数、肝細胞増殖、肝機能の解析

HE染色にて門脈周囲 $0.25 \times 0.25 \text{mm}^2$ の oval cell を計測した。oval cell は、7日目をピークに徐々に増加した。肝内の oval cell 数は、Day 4, 7では両マウス間に大きな差はなかったが、Day 9, 14において、コントロール群と比較して oval cell は HNF-4マウスで有意に減少していた (図1)。

oval cell の増殖を評価するために、PCNA染色を行った。Day 9にコントロール群に比較して HNF-4マウスにおいて oval cell の増殖が抑制された。

HNF-4マウスにおいて、day 7にASTとALTは減少し、総コレステロールは増加し、グルコースは減少していた。アルブミンは day14で有意に増加した。

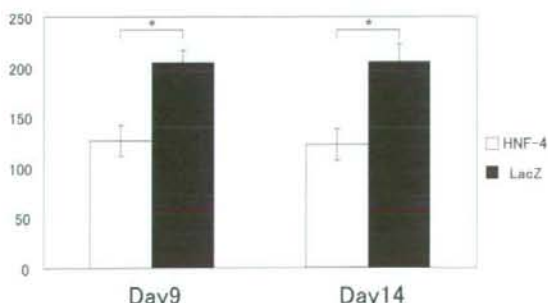


図1. HNF-4遺伝子導入による oval cell 数

・HNF-4遺伝子導入による肝細胞特異遺伝子および胆管上皮細胞特異遺伝子のmRNAの発現

real time PCR法を用いて肝細胞関連遺伝子および胆管上皮細胞関連遺伝子mRNAの発現を検討した(図2)。HNF-4マウスにおいて肝細胞分化マーカーであるHNF-4, ApoCIII, TAT, Albumin 遺伝子発現の経時的な増加を認め、胆管細胞マーカーであるCK-19は逆に抑制されていた。これらの結果は、HNF-4a 遺伝子導入が oval cell の分化を肝細胞へ誘導したことを示している。

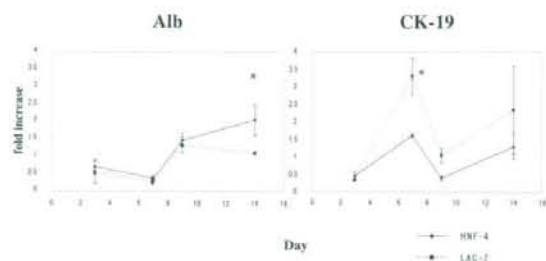


図2. HNF-4遺伝子導入によるmRNAの発現

D. 考察

組織特有の幹細胞の識別と分化機構の解明は分子生物学研究の分野において重要である。幹細胞は、現在、再生医療と遺伝子療法における貴重な原料と考えられている。肝幹細胞と考えられている oval cell は肝再生に関与することが証明されている。また、oval cell は、成熟肝細胞と胆管上皮細胞への両方向への分化の可能性をもっている。しかしながら、oval cell が増殖し、肝細胞に分化促進する機序は、いまだ不明である。いくつかの研究が oval cell の増殖に関して報告されている。肝への肝細胞成長因子(HGF)遺伝子導入は oval cell の増殖を促進する。Granulocyte colony stimulating factor(G-CSF)は、肝に骨髓幹細胞を誘導し、肝再生を容易にするとの報告もある。β-cateninノックアウトマウスにおいて oval cell の活性が抑制されるとの報告もあるが、oval cell がどのように肝細胞に分化するかは不明である。

この研究により、肝へのHNF-4遺伝子導入が oval cell の増殖を抑制し、細胞分化を肝細胞に誘導する可能性を示した。Nagyらは、HNF-1, HNF-3, HNF-4, C/EBP, およびDBPを含む肝細胞転写調節因子が oval cell の増殖と分化において役割を果たすのを示した。その上、彼らはHNF-4により oval cell が肝細胞に分化し、肝実質を形成する可能性を示した。また、肝癌細胞株Huh-7細胞において、HNF-4遺伝子導入が代謝に関する遺伝子、特に脂質代謝関連遺伝子に関連する遺伝子を始めとして多くの肝細胞特異的遺伝子を誘導することを我々は証明している。さらに、HNF-4遺伝子の変異が糖尿病において原因であると報告されている。これらの研究は肝機能のマーカーであるアルブミン、トリグリセリド、およびコレステ

ロールがHNF-4a 遺伝子導入により改善されたという今回の研究でみられた研究結果を支持している。

今回の研究において、ラット2-AAF投与後部分肝切除モデルにおける肝へのHNF-4a 遺伝子導入により早期に oval cell の数を減少し、胆管上皮細胞よりむしろ肝細胞に分化を促進することが示された。HNF-4a 導入は肝再生を促進する可能性が示唆された。

E. 結論

HNF-4遺伝子導入は、oval cellの肝細胞への分化誘導を促進し、肝再生不全を改善す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

1. 論文発表

- 1) Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Differentiation of mouse hepatic progenitor cells induced by hepatocyte nuclear factor-4 and cell transplantation in mice with liver fibrosis Transplantation 2008;86:1178-1186.
- 2) Kimura K, Nagaki M, Kakimi K, Saio M, Saeki T, Okuda Y, Kuwata K, Moriwaki H. Critical role of CD44 in hepatotoxin-mediated liver injury. J Hepatol 2008;48:952-961

2. 学会発表

- 1) JDDW2008 (第12回日本肝臓学会大会) 2007年10月18日 神戸
ラット2-AAF投与後部分肝切除モデル(modified Solt-Farber model)におけるHNF-4遺伝子導入における肝細胞分化誘導の検討
小木曾富生, 永木正仁, 塚田良彦, 末次淳, 大澤陽介, 森脇久隆

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

脂肪組織由来間葉系(幹)細胞(ADSC)を用いた肝再生療法開発に向けた検討

研究協力者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

研究要旨: 末期肝疾患患者の治療法として肝移植が行われているが深刻なドナー不足のため多くの患者は移植できずに亡くなっている。そこで臓器移植に代わる新たな治療法の開発が望まれている。最近、骨髄由来の間葉系幹細胞が肝臓をはじめ様々な細胞へと分化することが明らかとなっている。我々はマウスの骨髄細胞を *in vitro* で培養し、肝細胞系細胞へと分化しうることを見だし、様々な growth factor の中でも basic fibroblast growth factor (bFGF) が最も骨髄細胞の肝細胞系細胞への分化を促進することを報告した (Saji Y. et al. J Hepatol 2004)。近年、脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞-ADSC (Adipose tissue derived stromal cell) は骨髄間葉系幹細胞類似の細胞として知られ、筋細胞、軟骨細胞などへ分化誘導可能なことが報告されている。ADSC は簡便な方法で採取可能であり、細胞移植治療の供給源として期待されている。我々は肝再生療法の移植細胞供給源としての ADSC の有効性を検討した。*in vitro* で ADSC は bFGF の存在下で肝細胞系細胞へと分化誘導可能であった。また *in vivo* で四塩化炭素による肝障害モデルマウスへ bFGF で前処置した ADSC を移植したところ肝機能と肝線維化の改善を認め、bFGF 前処置 ADSC は新たな細胞移植治療の供給源となりうることを示唆された。

共同研究者

鎌田佳宏 大阪大学 消化器内科学
木曾真一 大阪大学 消化器内科学

A. 研究目的

近年、本邦においても B 型、C 型肝炎などの終末像である末期肝疾患患者が増加している。様々な肝支持療法でも治療困難な末期肝疾患患者に対して現在我が国では肝移植療法が行われている。しかし深刻なドナー不足などからまだまだ障害が多い。そこで臓器移植に代わる新たな治療法の開発が望まれている。骨髄細胞が肝細胞系細胞へと分化することを私どもも既に報告している (Saji Y. et al. J Hepatol 41: 545-550, 2004)。また骨髄細胞移植により末期肝疾患患者に対する細胞移植治療の試みも近年報告されつつある。一方、脂肪組織中に骨髄間葉系幹細胞類似の細胞群-ADSC (Adipose tissue derived stromal cell) が存在することが知られている。ADSC 採取は骨髄採取に比べより簡便で低侵襲に施行可能であり、末期肝疾患患者に対しても安全に採取可能であると考えられる。我々は肝再生療法の移植細胞供給源としての ADSC の有効性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. *in vitro* の系で ADSC が肝細胞へと分化誘導可能か否かについて検討を行った。雄の 12 週齢の C57BL/6 マウスの皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ法により ADSC を分離した。分離した ADSC は一旦プラスチックディッシュ上で培養し、1 度継代したものを分化誘導実験に使用した。骨髄細胞を用いた肝細胞への分化誘導実験で我々は既に bFGF が有効であることを確認している (J Hepatol 2004)。また近年ヒト ADSC が hepatocyte growth factor (HGF) と oncostatin M (OSM), dimethyl

sulfoxide (DMSO) の組み合わせにより肝細胞様細胞へと分化誘導可能であることが報告された (Seo MJ et al. BBRC 2005)。よって増殖因子なし群と bFGF 添加群、HGF+OSM+DMSO 添加群の 3 群で ADSC の肝細胞への分化誘導能を比較検討した。検討項目は肝細胞特異的遺伝子発現を RT-PCR 法で、肝細胞特異的蛋白発現を免疫染色法で、肝細胞特異的機能についてはアルブミン合成能、尿素分泌能、LDL 取り込み能について検討した。

2. ADSC による細胞移植治療モデルとして四塩化炭素による肝障害モデルマウスへの ADSC 移植を試みた。GFP トランスジェニックマウスより GFP 陽性 ADSC を採取し、プラスチックディッシュ上で培養後 1 度継代したものを bFGF 添加の有無で 1 週間培養した ADSC を準備した [bFGF(+) ADSC, bFGF(-) ADSC]。雄 C57BL/6 マウスに四塩化炭素を 0.5ml/kg 週 2 回腹腔内投与し、4 週後に bFGF(+) ADSC あるいは bFGF(-) ADSC を脾臓から注射した [bFGF(+) 群, bFGF(-) 群]。さらに 4 週間 CCl₄ を投与し、コントロール群との 3 群間で比較検討した。

C. 研究結果

1. *in vitro* の検討で、bFGF 添加群は、培養 2 週の時点ですでに肝分化マーカー遺伝子 (alpha-fetoprotein, albumin, cytokeratin 18, phosphoenolpyruvate carboxykinase) の発現を認めた。培養 4 週ではさらに後期肝細胞分化マーカーとして知られる transthyretin の発現まで認めた。HGF+OSM+DMSO 添加群では 2 週では肝細胞特異的遺伝子発現を認めず、4 週で bFGF 添加群と同様の遺伝子発現を認めた。また免疫染色にて bFGF 添加培養 ADSC が albumin, cytokeratin 18 蛋白を発現していることが分かった。さらに尿素分泌能、

グリコーゲン貯留能、LDL取り込み能の肝細胞特異的機能が誘導されていた。以上よりbFGF添加培養にてマウスADSCが肝細胞様細胞へと分化誘導可能であり、しかもHGF+OSM+DMSO添加群より早く分化誘導可能であることが明らかとなった。

2. in vivoの検討で、ADSC投与群ではいずれも肝臓にGFP陽性細胞が生着しており、bFGF(+)群でより生着細胞数が増加していた。また血清albumin値の改善がbFGF(-)ADSC投与群で認められたが、bFGF(+)ADSC投与群ではさらに改善していた。肝線維化はコントロール群に比べbFGF(-)ADSC投与群では増悪していたが、bFGF(+)ADSC投与群ではコントロール群に比べて改善を認めた。以上より肝障害モデルマウスに対するADSC細胞移植療法は有効であり、移植前にbFGF添加培養したADSCはさらにその有効性を上昇させることが明らかとなった。

D. 考察

骨髄間葉系幹細胞と比べADSCはより簡便に採取可能である。脂肪組織は局所麻酔下で採取可能であり、肝代謝能の低下した末期肝疾患患者に対しても採取時の安全性はより高いものと思われる。近年は美容整形の分野で安全な脂肪吸引法が開発され、吸引した脂肪組織からADSCの採取が可能であり、さらに採取したADSCが様々な細胞へと分化誘導可能であることも報告されている。今回我々はマウスを用いた検討によりADSCは肝再生療法の移植細胞供給源として有効であることを明らかにした。bFGFによる前処置はADSC細胞移植療法の効果をさらに高めることは重要な発見であった。今後はヒトへの応用へ向けてさらにADSC投与方法(どこから投与するのか?)、前処置方法(bFGFと他のgrowth factorとの併用療法)について検討をすすめていく必要がある。特に投与経路については重要な問題である。プラスチックディッシュ上で培養したADSCはその細胞径が数 μm になり、経静脈的投与では肺の毛細血管床にトラップされてしまう。そのため経静脈的投与のためにはNO供与薬(ニトロ製剤)などで肺の毛細血管床を広げる試みがすでに報告されている。今回のマウスでの投与方法のごとく経脾臓投与、あるいは経門脈投与などが経静脈的投与以外の投与方法として現実性が高いものと考えられる。前処置法についてはbFGF以外のgrowth factor(HGF, OSM, FGF-4など)との組み合わせや培養濃度の調節などにより肝臓への生着率の向上が期待される。bFGFについてはすでにGood Manufacturing Practice(GMP)グレードの科研製薬株式会社より発売されている。今後ヒトへの臨床応用に向けてより有効性が高く、安全性の高い治療法となるべく検討をすすめていく必要がある。

E. 結論

脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)が肝再生療法

の新たな移植細胞供給源となりうることがわかった。bFGF添加培養による前処置を行うことがADSC移植療法の有効性を高めることは非常に重要な発見であった。今後ADSC移植による肝臓再生療法をヒトへと臨床応用していくためにさらなる研究をすすめていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kamada Y, Yoshida Y, Saji Y, Juichi Fukushima, Shinji Tamura, Shinichi Kiso, Norio Hayashi: Transplantation of basic fibroblast growth factor-pretreated adipose tissue-derived stromal cells enhances regression of liver fibrosis in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (2009) in press

2. 学会発表

1) Kamada Y, Yoshida Y, Saji Y, et al: Transplantation of basic fibroblast growth factor-pretreated adipose tissue-derived stromal cells enhances regression of liver fibrosis and restores hepatic functions in mice. The 59th Annual Meeting of AASLD, San Francisco, 2008.11.

2) 鎌田佳宏, 吉田雄一, 佐治雪子, 他: adipose tissue derived stromal cell (ADSC)を用いた肝再生療法開発へ向けた検討. 第94回日本消化器病学会総会, 福岡, 2008. 5. 9.

3) 鎌田佳宏, 木曾真一, 林紀夫: Adipose tissue derived stromal cell (ADSC)を用いた肝再生療法開発へ向けた検討. 第44回日本肝臓学会総会, ワークショップ, 松山, 2008. 6. 5.

4) 鎌田佳宏, 木曾真一, 林紀夫: 脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)を用いた肝再生療法開発へ向けた検討-bFGF前処置ADSCの有用性について. JDDW 2008, ワークショップ, 東京, 2008.10.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己骨髄細胞による肝硬変治療～脾摘の効果について～

研究協力者 坂井田 功 山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学 教授

研究要旨：【目的】臨床研究「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法（ABMi療法）」の検討により、ABMi療法前に脾臓摘出術を受けた患者において、より高い肝機能改善効果が得られることが分かってきた。このメカニズムを解析するため、我々が行ってきた臨床研究結果、及び基礎研究として解析してきたGFP/CCl4モデルを用いて脾臓摘出術が骨髄投与に与える影響について検討した。

【方法】A) 臨床研究は脾臓摘出群と非摘出群に分けて検討した。B) 基礎研究としてC57/BL6 mouseに4週間の四塩化炭素による肝障害を加えた後、脾臓摘出、又はSham手術を行った。GFPTg mouseより採取した骨髄細胞を尾静脈より投与し、(1)脾臓摘出+骨髄投与群、(2)Sham+骨髄投与群、(3)脾臓摘出群、(4)Sham群の4群に分け、1～4週後の肝臓組織、および血清データを検討した。肝線維化についてはMMP9の発現、シリウスレッド染色で検討した。

【成績】A) 骨髄投与24週の時点で血清アルブミン値 ($3.4 \pm 0.4 \text{g/dl}$ vs. $2.9 \pm 0.3 \text{g/dl}$)、プロトロンビン時間 ($75.0 \pm 7.5\%$ vs. $65.7 \pm 8.6\%$) は脾臓摘出群で有意に上昇しており、またChild-Pughスコア、P3P値は脾臓摘出群で低下していた。B) GFP抗体による免疫染色GFP陽性細胞の肝臓への定着率は脾臓摘出群において非脾臓摘出群と比較し約67±25%増加していた。血清アルブミン値も脾臓摘出群で高く、骨髄細胞投与後3.4週目の時点では有意差が認められた ($2.7 \pm 0.5 \text{g/dl}$ vs. $2.3 \pm 0.3 \text{g/dl}$, $P < 0.05$; $2.7 \pm 0.5 \text{g/dl}$ vs. $2.3 \pm 0.2 \text{g/dl}$, $P < 0.01$; $4W$)。また、シリウスレッド染色にて脾臓摘出群では非脾臓摘出群と比較して肝組織の線維化面積において改善が認められた ($1.70 \pm 0.44\%$ vs. $3.52 \pm 1.15\%$, $P < 0.01$)。MMP9の発現も同様の結果であり、脾臓摘出と骨髄投与を組み合わせるにより、線維化をより改善させることが示された。**【考案】**GFP/CCL4モデルでのGFP陽性骨髄細胞は投与後24時間から1週間後までに肺、脾臓で多くトラップされていた。また、脾臓摘出を行った群で肺へのトラップは増加せず、脾臓摘出により、肝臓への骨髄細胞の定着率が上昇し、肝機能や線維化が改善することが明らかになった。

共同研究者

寺井崇二 山口大学大学院 医学系研究科
消化器病態内科学 講師
岩本拓也 山口大学大学院 医学系研究科
消化器病態内科学

療法を行なった患者3症例を比較したところ摘脾術を受けていない患者と比べより効果的に肝機能改善効果があることが明らかになり、さらに脾臓摘出併用モデルにおける効果も明らかになった。またその効果メカニズムについても基礎的に検討した。

A. 研究目的

肝硬変症は慢性肝疾患の末期状態で、現在根治的治療としては、肝移植等が行われている。しかし、ドナーの問題、手術侵襲、医療費が問題となる。血液疾患患者に対する骨髄移植及び末梢血幹細胞移植施行例（女性患者（XX）に男性（XY）より移植した症例）の剖検において、FISHによる解析の結果、慢性炎症環境下にあった肝臓及び消化管組織内にY染色体の存在が確認され、骨髄細胞中に多分化能を有する幹細胞の存在が示唆された。我々は2003年11月より臨床研究「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法」を開始した。今までに施行した9例の肝硬変症患者に対するABMi療法については、肝機能の改善効果を確認し報告した（Stem cells 2006）。一方でABMi療法の適応は血小板5万以上とされているが著明な脾腫がある場合、血小板値が著明に低下しており適応を満たせない場合がある。肝硬変症患者は著明な脾腫を伴い、そのため末梢から投与する細胞が肝障害部に行かずに肝機能の改善効果が少ないことが危惧されていた。ABMi療法以前に摘脾術を受け、血小板値が増加し、ABMi

B. 研究方法

A) 臨床研究は脾臓摘出群と非摘出群に分けて検討した。骨髄投与前のデータ、骨髄投与4週間後、24週間後のデータの変化平均値、標準誤差で評価し、分散分析を行い評価した。

B) ABMi療法に脾臓摘出術を併用した場合の効果を検討するため、我々はin vivoモデルを用いた解析を行った。我々の開発したCCl4を持続投与下マウスにおけるGFP陽性細胞の骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル（GFP/CCl4モデル）を基本に脾臓摘出術の併用、非併用で検討した。6週齢のC57 BL/6マウス（♀）、C57 BL/6 GFPトランスジェニックマウス（♂）を用いた。1.0ml/kgのCCl4を週に2回尾静脈より投与し、持続肝障害を起こさせた。4週間のCCl4投与後、sham手術または摘脾術を行った。術後2週間はCCl4投与を中止し、7週目から投与を再開し、以降CCl4を持続投与した。手術後4週目にマウスの尾静脈より 1×10^5 個のGFP陽性骨髄細胞を投与し、(1)脾臓摘出+骨髄投与群、(2)Sham+骨髄投与群、(3)脾臓摘出群、(4)Sham群の4群に分け、

1~4週後の肝臓組織、および血清データを検討した。肝線維化についてはMMP9の発現、シロウスレッド染色で検討した。

C. 研究結果

1. 臨床研究での解析

脾臓摘出群と非摘脾臓摘出群間で年齢や性別での有意差は認められなかった。骨髄投与後の平均血清アルブミン値は骨髄投与4週後の時点で $32 \pm 0.3 \text{g/dl}$ vs. $28 \pm 0.3 \text{g/dl}$ 、24週の時点で $34 \pm 0.4 \text{g/dl}$ vs. $29 \pm 0.3 \text{g/dl}$ と摘脾群で有意に上昇していた。また、骨髄投与後の週数で検討してみると、骨髄投与後4週頃より血清アルブミン値が上昇していた。プロトロンビン時間(%)も同様に骨髄投与4週後の時点で $71.7 \pm 7.1\%$ vs. $65.1 \pm 8.1\%$ 、24週の時点で $75.0 \pm 7.5\%$ vs. $65.7 \pm 8.6\%$ と摘脾群で有意に上昇していた。Child-Pughスコアは脾臓摘出群でより改善していた。type III procollagen-N-peptideは脾臓摘出群で低く、骨髄投与24週の時点では有意差を持って低下していた。HGF値は脾臓摘出群で高い傾向にあった。

2. マウスモデルでの解析

脾臓摘出を行った群では、血小板値が他と比較して有意に増加していた($p < 0.01$)。血清アルブミン値は(1)脾臓摘出+骨髄投与群で最も高く、また(2)Sham+骨髄投与群と比較しても有意に高かった($p < 0.05$)。また、(1)と(2)の2群を比較すると骨髄投与後3.4Wから(1)で血清アルブミン値が有意に上昇していた($p < 0.05$, $p < 0.01$)。また、脾臓摘出のみを行った(3)脾臓摘出群ではコントロール群の(4)Sham群と比較してややアルブミン値が高い傾向にあったが、両群間で有意差をみとめなかった。GFP、PCNA、MMP9の発現は免疫染色を用いて検討した。MetamorphによるLabeling IndexにてGFPの発現面積は(1)が(2)より高く、脾臓摘出を行うことで投与骨髄細胞がより肝臓に生着する結果を得た($p < 0.05$)。PCNAの陽性細胞数も(1)が(2)より高く、脾臓摘出と骨髄細胞投与を組み合わせることによって、肝再生がより誘導される可能性が示された($p < 0.05$)。肝臓の線維化をシロウスレッド染色で評価したが、肝臓の線維の面積は(1)で最も少なく、(2)と比較しても有意に少なかった($P < 0.0001$)。(3),(4)群間では有意差を認めなかった。MMP9の発現も同様の結果であり、脾臓摘出と骨髄投与を組み合わせることにより、線維化をより改善させることが示された。

D. 考察

GFP/CCL4モデルでのGFP陽性骨髄細胞は投与後24時間から1週間後までに肺、脾臓で多くトラップされていた。また、脾臓摘出を行った群で肺へのトラップは増加せず、脾臓摘出により、肝臓への骨髄細胞の定着率が上昇し、肝機能や線維化が改善することが明らかになった。

E. 結論

脾臓摘出を併用することにより、肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法が、より効果的な肝機能の改善が誘導するメカニズムが明らかになった。現在、肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた臨床研究は我々を含めて7カ国で報告がされており、世界的にもその効果に注目が集まっている。積極的に血小板値の低下している患者に対して脾臓摘出術を併用しABMi療法を行なうことは、今後ABMi療法の適応拡大の面においても意味があるし、さらに効果の増強も期待できる。肝硬変患者に対する脾臓摘出+ABMi療法は今後積極的に考慮できる治療法になりうると考える。

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

- (1) (日本再生医療学会総会 平成20年3月13日ポスター) 脾臓摘出術併用による骨髄細胞投与による肝機能改善の検討
発表者: 岩本拓也, 寺井崇二, 佐伯一成, 水永裕子, 山本直樹, 坂井田功
- (2) (日本肝臓学会総会 平成20年6月5日 ワークショップ) 脾臓摘出術併用骨髄細胞投与による肝硬変の改善の検討
発表者: 岩本拓也, 寺井崇二, 佐伯一成, 水永裕子, 山本直樹, 坂井田功
- (3) (JDDW 平成20年10月1日 ワークショップ) 脾臓摘出による自己骨髄細胞投与療法の効果増強に対する基礎的検討
発表者: 岩本拓也, 寺井崇二, 坂井田功
- (4) (AASLD 平成20年11月1日 ポスター)
ABMi therapy combined with splenectomy is an effective for liver cirrhosis.
発表者: Takuya Iwamoto, Shuji Terai, Issei saeki, Yuko Mizunaga, Naoki Yamamoto, Isao Sakaida

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

劇症肝炎に対する生体部分肝移植

研究分担者 國土 典宏 東京大学大学院医学系研究科臓器病態外科学 教授

研究要旨: 東京大学にて施行した劇症肝炎に対する生体部分肝移植の適応と成績について検討した。対象は劇症肝炎症例37例で、男性20例、女性17例、年齢は8-64歳であった。適応の参考として、1. King's College Hospitalの基準(1989年)、2. 肝移植研究会基準(1990年)、3. 高橋らによる予測式(1994年)、4. 武藤らによる予測式(1994年)、5. 日本急性肝不全研究会基準(1996年)、6. 与芝らの基準(1995年)、7. 千葉大学基準(1999年)の基準を用い予後予測を行った。肝移植施行例では死亡の判定となることが多かった。脳症発現までの期間では急性型13例、亜急性型24例、LOHF例はなかった。原因としては原因不明が24例、B型肝炎が11例、自己免疫性肝炎1例、Wilson病が1例であった。十分なインフォームドコンセントと迅速なドナー評価の後肝移植手術を実施した。グラフトは右葉グラフト19例、左葉グラフト16例、後区域グラフト2例で、ドナーは全例軽快退院している。平均観察期間50ヶ月現在、33例が生存中であり、累積生存率は89%である。右葉グラフトの導入により、成人に対しても、移植可能であり、当科において、劇症肝炎の移植成績は良好であった。しかしながら、ドナーがいなかったため救命しえなかった群も存在し、脳死移植のシステム拡充が課題と考えられた。

A. 研究目的

劇症肝炎に対する肝移植は、慢性に経過する肝硬変・肝不全に比べ病状の進展が急速である一方で、頻度は低いものの内科的加療が奏功した場合、ほぼ完全な回復の可能性がある、生体肝移植での生体ドナーの負担や終生免疫抑制剤を内服することによる不利益等を生じずに済む。しかしながら脳症が進展し全身状態が極めて悪化した状態では耐術に困難が生じ、肝移植を施行し得ても回復は望めず、さらには、救命の機会を逸するのみならずドナーの善意や家族の負担が報われずに徒労に終わる可能性がある。現場ではまず移植を回避できる症例、移植が必要な症例、そして救命し得ない症例の見極めが問題となる。そこで東京大学における劇症肝炎に対する肝移植について検討した。

B. 研究対象と方法

東京大学では1996年1月より2008年12月までに422例426回の生体部分肝移植を施行した。成人例(18歳以上)353例、小児例73例で、今回成人例中34例、小児例中3例の劇症肝炎に対して肝移植の行われた症例を対象とした。症例の内訳は男性20例、女性17例で、年齢は8-64歳(平均値41歳)、体重は32-84kg(56kg)であった。脳症発現までの日数で見ると急性13例、亜急性24例、LOHF例はなかった。脳症の程度としては、脳症I 5例、II 16例、III 10例、IV 6例であった。劇症肝炎に至る原因別では、原因不詳24例、HBV11例、Wilson病1例、自己免疫性肝炎1例であった。紹介のあった時点でレシピエント側の評価として以下の基準により術前の予後予測を判定した。すなわち、1. King's College Hospitalの基準(1989年)、2. 肝移植研究会基準(1990年)、3. 高橋らによる予測式(1994年)、4. 武藤らによる予測式(1994年)、5. 日本急性肝不全研究会基準(1996年)、6. 与芝らの基準(1995年)、7. 千葉大学基準(1999年)により術

前に予後予測を判定した。

肝移植はグラフトがあって初めて可能となる。2008年中、移植施行例をふくめ25例の劇症肝炎症例の紹介を頂いたが、24例(96%)は生体肝移植の対象としなかった。8例は軽症で回復の見込みありと判断され内科治療を継続し回復生存、4例は既に多臓器不全もしくは脳症V度と診断され移植を断念、1例はアルコール依存症の合併が確認され適応外と判断、そして11例はドナー候補なく生体移植を断念した。内科的加療にて回復をみた8例以外の16例中、脳死肝移植を施行し得た1例以外は全例短期間に死亡している。

肝移植を施行した症例の血清学的データは以下の通り。総ビリルビン2.4-43.1mg/dl(14.2mg/dl)、アルブミン2.6-3.8g/l(3.2g/l)、プロトロンビン時間11.9-28.6秒(16.9秒)。

ドナーの内訳は男性18例、女性19例で、年齢は18-57歳(平均値37歳)、体重は45-82kg(58kg)であった。患者との関係では、兄弟が13例と最も多く、ついで、子供11例、配偶者7例、父母6例であった。

ドナー候補の迅速な評価および十分なインフォームドコンセントを行い、必要に応じて当院倫理委員会にて検討した上で生体部分肝移植を実施した。

C. 研究結果

術前の予後予測では、37例中30例は予測基準の過半数以上で死亡または肝移植適応と判定された。残り7例については、補助療法にて脳症もしくは肝萎縮の改善を認めなかったため、肝移植の適応と判断した。3例には、APOLT(Auxiliary partial orthotopic liver transplantation)を採用した。

グラフトは、1999年以前は全例、左葉もしくは尾状葉加左葉であり、2000年以降は、右葉グラフトを採用しており、左葉グラフトでレシピエント標準肝容積の40%に満たず、かつ右葉切除の後にドナー肝の残肝

が35%以上見込める場合、右葉グラフトを採取した。実際移植に用いられたグラフトは、拡大右葉グラフトを含めた右葉グラフトが最も多く19例で、以下左葉グラフト（尾状葉を含む）16例、後区域グラフト2例であった。グラフト重量は276-777g (530g)で、これは患者およびドナーの標準肝容積の各々、25%-71% (47%)、28%-56% (46%)に相当した。レシピエントの手術時間は550-970 (815)分、体重あたりの出血量は36.0-17.9 (71.3) g/kgであった。

生体肝移植を施行した劇症肝炎症例37例中1例を除き退院した。在院日数は21-218 (65)日であった。観察期間3-115 (平均49)ヶ月で、30例が現在生存中である。43歳男性の1例を、一旦退院の後敗血症、肺梗塞で失った。甲状腺アスペルギルス症、胆管炎で1例を、移植後de novo悪性腫瘍で2例失った。

合併症は36例中20例 (56%)に認めており、1例PNF (Primary Non Function)で、1例動脈閉塞にて再移植を必要とした。急性拒絶反応が12例 (33%)で合併症としてはもっとも多く見られた。全例ステロイドパルス療法で軽快し、OKT3を必要とする症例はいなかった。急性拒絶反応の発症率は他の疾患症例と差を認めなかった。

血管合併症として門脈血栓症2例 (6%)、動脈血栓症4例 (11%)、1例肝静脈吻合部の狭窄でいずれも再手術を要した。胆管系の合併症率は未だ高く、胆汁瘻は6例 (17%)、胆管吻合部狭窄は8例 (22%)に経験した。胆管吻合部狭窄の症例は内視鏡的拡張や再手術を必要とした。移植手術時の入院日数は24-218日 (平均55日)であった。

D. 考察

劇症肝炎に対する生体肝移植は1992年 Matsunamiらにより、小児例に対し父親をドナーとし左葉グラフトを用い初めて行われた。以降信州大学では1999年のMiwaらの報告によれば14例劇症肝炎に対し生体肝移植を施行し、13例 (93%)生存と良好な累積生存を得ている。

1990年代は左葉グラフトが中心であったため、成人劇症肝炎への適応は限定されていたが、1994年 Yamaokaらが右葉グラフトを用いての生体肝移植を報告以来、症例によっては右葉グラフトでも十分安全に施行されることが確認され、右葉グラフトを用いることで成人劇症肝炎への生体肝移植の適応が拡大してきた。2000年 Uemotoらの報告によると京都大学では成人を含め34例の劇症肝炎に対し生体肝移植を施行し、19例 (56%)の累積生存を得ている。

近年の血漿交換、血液持続濾過透析技術の発展により、特に急性型に対する内科的治療による救命率は向上しているものの、急速に脳症の進行を見る場合、奏功の程度を見極めるのは極めて困難である。脳症V度は不可逆的と考えられ、肝移植の適応は無い。生体肝移植はレシピエント側の感染症・悪性腫瘍合併の有無、心機能等を含めた耐術の可能性についての精査、生体ドナー側の社会的・医学的精査と合併症などに関

する十分なインフォームドコンセントに時間を要する。短期間での決断を要するが、ドナー精査に当たっては、標準化された手順にのっとり精査を施行するとともに、肝移植研究会による生体肝移植ドナーに関する調査報告書を必ず手渡し、理解を深めるよう配慮する必要がある。

脳死肝移植は劇症肝炎を含め、末期的肝不全に対し極めて有効な治療法として主に欧米で確立された。しかしながらドナー出現までの期間は予想がつかず、待機中の死亡が問題となる。本邦では普及しておらず、対人口当たりの脳死下の臓器提供数は台湾、香港、韓国に比しさらに少ない。韓国では2008年中に250例の脳死肝移植が施行されている。一方、日本臓器移植ネットワークによれば、同期間中の脳死肝移植は全国で12例が施行されたにすぎない。登録日から移植日までの平均待機期間は471日 (約1年4ヶ月)と報告されている。

数字の上では、劇症肝炎に対する脳死肝移植が現実的な選択としては困難であることは痛切に感じられるが、臓器配分を優先的に進めるよう医学的緊急度を考慮するなど工夫がなされており、上述のように我々の施設に於いても脳死肝移植症例の8例中3例は劇症肝炎に対する移植であった。生体ドナーの判断がつかない場合、脳死肝移植も考慮の対象とすべきである。

E. 結論

劇症肝炎に対する生体肝移植の成績は良好であり、確立された治療法である。治療開始後早期より肝移植が必要となる可能性を考慮に入れた内科管理が望まれ、脳症出現時点で肝移植可能な施設との連携を取ることが望ましい。また、短期間で決断を下す必要のある生体肝移植でのドナーの負担は決して小さいものではなく、脳死移植のシステム拡充が課題と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue Y, Sugawara Y, Tamura S, Makuuchi M. Intraoperative ultrasound guided portal venous thrombectomy in living donor liver transplantation recipient surgery. *Transpl Int*. 2008 May;21 (5) :A28-33. Epub 2008 Jan 9.
- 2) Tamura S, Kokudo N. Donor evaluation and hepatectomy for living donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. Review. 2008;15 (2) :79-91. Epub 2008 Apr 6.
- 3) Matsui Y, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Tamura S, Togashi J, Makuuchi M, Kokudo N. Living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Hepatol Res*. 2008 Oct;38 (10) :987-96. Epub 2008 Jun 28.

- 4) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Makuuchi M. Bloodstream infection after living donor liver transplantation. *Scand J Infect Dis.* 2008;40 (6) :509-16.
- 5) Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Togashi J, Matsui Y, Makuuchi M. Heparin-induced thrombocytopenia after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2008 Jun;40 (5) :1518-21.
- 6) Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Portal vein complications after adult-to-adult living donor liver transplantation. *Transpl Int.* 2008 Dec; 21 (12) :1136-44. Epub 2008 Sep 1.
- 7) Tamura S, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Systematic Grading of Morbidity After Living Donation for Liver Transplantation. *Gastroenterology.* 2008 Nov;135 (5) :1804. Epub 2008 Oct 7.
- 8) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Colonization and/or infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after living donor liver transplantation: a case control study. *BMC Infectious Diseases* 2008 Nov 11;8:155.
2. 学会発表
- 1) 松井郁一, 菅原寧彦, 金子順一, 田村純人, 幕内雅敏, 國土典宏「東大病院における劇症肝炎に対する生体肝移植」シンポジウム 急性肝不全における内科治療と肝移植の進歩 第44回腹部救急医学会総会 2008.3.14.
- 2) 松井郁一, 菅原寧彦, 金子順一, 田村純人, 富樫順一, 幕内雅敏, 國土典宏「劇症肝炎に対する肝移植」パネルディスカッション 劇症肝炎に対する肝移植適応と施行時期 第26回肝移植研究会 2008.6.19.
- 3) 田村純人, 國土典宏, 菅原寧彦, 金子順一, 山數宣代, 野尻佳代, 幕内雅敏「生体移植ドナーの術後 QOL」ラウンドテーブルディスカッション 第33回日本外科系連合学会2008. 6.12-6.13
- 4) Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Kaneko J, Kokudo N. Biliary complications in adult to adult living donor liver transplantation. 2008.7.10-12. The International Liver Transplantation Society (ILTS) 14th Annual Congress, Paris, France.
- 5) 田村純人, 山數宣代, 野尻佳代, 松井郁一, 金子順一, 菅原寧彦, 國土典宏「脳死肝移植: リスティングとドロップアウト~登録施設の苦渋」シンポジウム 脳死肝移植適応評価の現状と展望 第44回日本移植学会総会 2008.9.21
- 6) 山數宣代, 田村純人, 野尻佳代, 松井郁一, 金子順一, 菅原寧彦, 國土典宏「脳死肝移植適応評
- 価の現状 - 東京大学臓器移植医療部の経験」第44回日本移植学会総会 2008.9.21
- 7) 野尻佳代, 菅原寧彦, 山數宣代, 田村純人, 遠藤美代子, 國土典宏「肝移植におけるレシピエント移植コーディネーターの役割 - 脳死肝移植待機患者の管理 -」シンポジウム レシピエント移植コーディネーターの役割 - 移植待機患者の管理 第44回日本移植学会総会 2008.9.21
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

IV-4. 肝内結石症分科会

36. 肝内結石症の検討（疫学）-胆管癌危険因子の解析-.....
杏林大学医学部 外科 森 俊幸
37. 上五島地区における肝内結石発症の地域分布調査.....
長崎県離島医療圏組合上五島病院 八坂 貫広
38. 肝内結石症の病理学的機序：胆管上皮異型病変と HSP の発現
金沢大学医薬保健研究域医学系 形態機能病理学 中沼 安二
39. 肝内結石症に発生する胆道癌の発生機序と、診断治療に関する基礎的臨床的研究
名古屋大学大学院 腫瘍外科学 椰野 正人
40. 肝内胆管癌における新規腫瘍マーカー候補遺伝子の同定.....
金沢大学医薬保健研究域医学系 先端医療技術学講座 本多 政夫
41. 肝内結石症の長期予後-予後危険因子について-.....
千葉大学医学部 腫瘍内科学 露口 利夫
42. 肝内胆管障害の発症メカニズム～治療開発に向けて～.....
広島大学病院 総合診療科 田妻 進
43. 肝内胆管癌に対する分子標的治療-IL-4受容体標的サイトトキシンの有用性について
筑波大学大学院人間総合科学研究科 消化器病態医学 正田 純一

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

肝内結石症の検討 (疫学) - 胆管癌危険因子の解析 -

研究協力者 森 俊幸 杏林大学 医学部 外科 教授

研究要旨: 肝内結石症の診療において、胆管癌の合併は予後や治療成績に大きく影響し、臨床上的大きな問題点である。今回、2006年に行われた第6期全国調査で登録された肝内結石症334例を対象に、胆管癌合併の危険因子を解析した。単変量解析・多変量解析において、胆管癌の危険因子は胆道再建の既往例 (オッズ比3.800)、肝萎縮例 (オッズ比4.585) であった。胆道再建既往例については、吻合法 (胆管十二指腸吻合 vs 胆管空腸吻合、側側吻合) と胆管癌合併との相関は認めなかった。一方、肝萎縮を認める胆管癌合併例を検討すると87.5%に萎縮肝と胆管癌発生部位が一致した。これより、萎縮肝は可能な限り切除すべきと考えられた。本研究により、肝内結石症において胆道再建の既往と肝萎縮例が胆管癌合併の危険因子として抽出された。しかしながら、肝内結石症の長期成績を改善させるためには胆管癌発生前に適切な治療を施す必要があり、コホート研究などによる時間的要素を加えた前向き研究を行う必要があると思われた。

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患でありながら完治が難しく、再発を繰り返すことが少なくない。また、胆管癌を高率に発生する。胆管癌の合併は予後や治療成績に大きく影響し、臨床上的大きな問題点のひとつである。本研究の目的は、肝内結石症における胆管癌合併の危険因子を解析することを目的とする。

B. 研究方法

2006年に行われた、第6期全国調査の登録症例336例中、性別不明の2例を除いた334例が対象として研究を行った。

方法は胆管癌合併例 (23例、性別: 男性11例、女性12例、年齢: 65±10歳 (37~81歳)) と胆管癌非合併例 (311例、性別: 男性161例、女性150例、年齢: 63±15歳 (2~98歳)) の臨床病理像を統計学的に解析した。まず、年齢、性別、合併症、病期期間、胆道疾患の治療歴、胆道再建の既往、臨床症状、病型分類 (IE分類、RL分類)、結石分類、胆管狭窄、胆管拡張、肝萎縮、結石遺残、UDCA内服、治療後の症状、結石再発の全項目について χ^2 検定を施行した。P<0.25となった項目に対してロジスティック回帰分析 (ステップワイズ法) を行い、胆管癌合併の危険因子を抽出した。

C. 研究結果

1. 単変量解析

χ^2 検定では、他の悪性腫瘍の合併、胆道再建の既往、胆管拡張、肝萎縮、UDCA内服、治療後の症状の6項目がp<0.25であった (表1)。

2. 多変量解析

単変量解析にてp<0.25となった6項目に対し、ロジスティック回帰分析 (ステップワイズ法) を行った。多変量解析では、胆道再建の既往例と肝萎縮例の2項目が有意な胆管癌合併の危険因子として抽出され、オッズ比はそれぞれ3.800と4.585であった (表2)。

表1. 胆管癌合併の危険因子 (単変量解析) () = %

	胆管癌合併 (23例)	胆管癌非合併 (311例)	pValue
性別	男性 11(48)	161(52)	0.83
	女性 12(52)	150(48)	
年齢 (歳)	65±10 (37-81)	63±15 (2-98)	0.807
病期期間 (月)	48±120 (0-480)	38±76 (0-564)	0.767
他の悪性腫瘍の合併	0(0)	26(8)	0.237
胆道疾患の治療歴	16(70)	196(63)	0.656
胆道再建の既往	10(44)	71(23)	0.04
合併症			
肝炎	0(0)	13(4)	0.611
肝硬変	0(0)	13(4)	0.611
糖尿病	3(13)	32(10)	0.721
膵胆管合流異常症	2(9)	19(6)	0.647
心疾患	2(9)	32(10)	1
高血圧	0(0)	22(7)	0.383
合計	14(61)	177(57)	0.828
臨床症状			
腹痛	13(57)	172(55)	1
発熱	11(48)	135(43)	0.828
黄疸	5(22)	53(17)	0.569
嘔気・嘔吐	1(4)	9(3)	0.515
合計	19(83)	240(77)	0.796
IE分類	肝内型 14(61)	167(54)	0.526
	肝内外型 9(39)	139(45)	0.668
RL分類	右葉 6(26)	66(21)	0.601
	左葉 9(39)	150(48)	0.517
	両葉 8(35)	86(28)	0.475
結石分類			
ビリルビン結石	12(52)	136(44)	0.516
コレステロール結石	1(4)	20(6)	1
黒色石	4(17)	32(10)	0.292
混合石	0(0)	14(5)	0.61
混成石	0(0)	3(1)	1
胆管狭窄	5(22)	69(22)	1
胆管拡張	9(39)	84(27)	0.231
肝萎縮	8(35)	46(15)	0.019
結石遺残	3(13)	39(13)	1
UDCA内服	15(65)	156(50)	0.197
治療後の症状	6(26)	40(13)	0.108
結石再発	2(9)	28(9)	1

表2. 胆管癌合併の危険因子 (多変量解析)

	有意確率	オッズ比	95% 信頼区間
胆道再建の既往例	0.006	3.8	1.464-9.860
肝萎縮例	0.003	4.585	1.678-12.525

D. 考察

肝内結石症は高率に胆管癌を合併する。胆管癌の合併はその長期成績に大きく影響するため、肝内結石症の診療における胆管癌合併の診断は、臨床上大きな意義を有する。本研究では、2006年に研究班で施行された全国調査のデータを用いて、肝内結石症における胆管癌合併の危険因子を解析した。

単変量・多変量解析において胆管癌合併の危険因子として、胆道再建の既往例 (オッズ比3.800)、肝萎縮例 (オッズ比4.585) が抽出された。

次に、胆管再建既往例を対象に、吻合腸管 (胆管 (肝管) 空腸吻合 vs 胆管 (肝管) 十二指腸吻合)、吻合法 (端側吻合 vs 側側吻合) の各再建法における胆管癌発生の頻度を検討した。吻合腸管別では胆管 (肝管) 空腸吻合と胆管 (肝管) 十二指腸吻合の両者に有意な差は認めなかった (表3)。また、吻合法別でも端側吻合と側側吻合との間でも有意差は認めなかった (表4)。

表3. 再建法と胆管癌 (吻合腸管別) ()=%

		吻合腸管		p value
		十二指腸 (12例)	空腸 (69例)	
胆管癌	合併例	9(75)	62(90)	0.163
	非合併例	3(25)	7(10)	

表4. 再建法と胆管癌 (吻合法別) ()=%





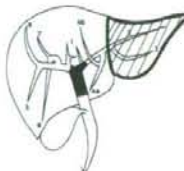



		吻合法		p value
		側側 (10例)	端側 (37例)	
胆管癌	合併例	8(80)	34(92)	0.285
	非合併例	2(20)	3(8)	

吻合法不明例: 34例

吻合法に依らず、胆道再建により胆管粘膜は常に腸液にさらされ、胆管粘膜の炎症性変化から過形成、胆管癌発生に進展している可能性が示唆された。

萎縮肝の部位と胆管癌発生部位との検討では、肝萎縮を伴った胆管癌症例8例のうち、7例(87.5%)に肝萎縮部位と胆管癌発生部位が一致した (表5)。これより、萎縮肝は可能な限り切除すべきと考えられた。

表5. 萎縮肝と胆管癌発生部位

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4
				
萎縮肝	外側区域	前区域	外側区域	S6
胆管癌発生部位	外側区域	前区域・後区域	外側区域	B6
	症例 5	症例 6	症例 7	症例 8
				
萎縮肝	外側区域	外側区域	外側区域	外側区域
胆管癌発生部位	肝門部~上部胆管	B3	外側区域	B3

E. 結論

本研究により、肝内結石症において胆道再建の既往と肝萎縮例が胆管癌合併の危険因子として抽出された。しかしながら、肝内結石症の長期成績を改善させるためには胆管癌発生前に適切な治療を施す必要がある。コホート研究などによる時間的要素を加えた前向き研究を行う必要があると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

上五島地区における肝内結石発症の地域分布調査

研究協力者 八坂 貴宏 長崎県離島医療圏組合上五島病院 外科 院長

研究要旨: 上五島地区 (旧上五島町) における肝内結石症発症の地域分布調査を行い、地域別の発生頻度、生活状況、肝内結石症の特徴について比較検討を行った。肝内結石症の新上五島町全人口に占める割合は0.8%であり、検診の進んでいる上五島地区では1.3%と高く、町内分布をみると、中部に2%以上の結石多発地域が認められた。この地域は、農業中心の半農半漁の集落が点在し、簡易水道の敷設は1961年以降と遅れていた。病型では、I E型、L型の頻度が高く、肝萎縮症例も多く、肝切除を中心とした治療が多くの症例で行われていた。典型的な肝内結石症 (肝葉萎縮を伴うI E型のピ系石症例) に、生活の衛生状態の関与が改めて示唆された。当地域で生年が1970年以降の住民には肝内結石発症が確認されていないことから、衛生状態の改善が発症率減少をもたらしていると考えて良いであろう。

A. 研究目的

長崎県上五島は肝内結石症の多発地域として知られ、その成因究明のために様々な疫学的調査を行ってきた。その結果、肝内結石の発症に生活環境の衛生状態が関与している可能性、回虫感染、HTLV-1感染が関与している可能性が指摘されている。

ところで上五島地区では、点在する集落において、肝内結石発症の頻度に差があることが知られており、生活環境の衛生状態、回虫感染が関与しているのであれば、地域の地理的特性、環境関連のインフラ整備、生活環境の違いにより発症率に差がある可能性がある。

そこで、上五島地区における肝内結石症発症の地域分布調査を行い、地域別の肝内結石症の特徴、生活状況の比較検討を行った。

B. 研究方法

長崎県上五島において、1982年4月から2001年3月に上五島病院を受診あるいは検診で来院し、腹部エコー、CT等の検査により、肝内結石症と診断され、当地域が本籍で幼少時より生活しているもの228例を対象とした。

診断時年齢は12~82歳、平均59.2歳、性別は男性102例、女性126例であった。病型はI型177例、IE型51例、結石存在部位はL型113例、R型88例、LR27例であった。

調査は、受診時の問診や理学所見、画像所見など診療データから必要な項目を取り出し、幼少時から成人になるまで生活していた本籍地を主に発症の地域とした。そして上五島地区 (旧上五島町) においては、集落別の人口、患者数から発生頻度を計算し、その地域の産業特性、生活環境、上下水道の整備時期、肝内結石の特徴 (年齢、性差、病型、症状の有無、肝葉萎縮、治療法) について検討した。

C. 研究結果

1) 肝内結石の生年別発症数

肝内結石症の発症を、10年区切りで生年別に検討す

ると、1900~1909年37例 (15.5%)、1910~1919年64例 (26.9%)、1920~1929年69例 (23.9%)、1930~1939年40例 (16.8%)、1940~1949年21例 (8.8%)、1950~1959年5 (2.1%)、1960~1969年2 (8%)であった。1970年以降の発症は認めなかった。(図1)

2) 肝内結石症の地域分布

上五島は、2004年8月5つの町の合併により新上五島町となった。肝内結石症の発症率は、全体で0.8%であり、各地区 (旧町) 別の肝内結石症発症率は、上五島地区1.3%、有川地区0.7%、新魚目地区0.9%、若松地区0.4%、奈良尾地区0.8%であった。(図2)

3) 上五島地区の肝内結石症の地域分布

2000年時点での上五島地区 (旧上五島町) での集落別人口、肝内結石発症数を調査、発生率を計算した。北部の青砂、奈摩、網上、冷水では、1.08~1.89であったが、これと比較すると中部の青方は0.8、大曾は1.02と低かった。また、同じ中部でも船崎、相河、跡次、桂山、小浜、浜の浦は、2.10~4.76と高かった。南部は、道土井1.18、飯の瀬戸1.22と低く、その他の地区では症例を認めなかった。(図3)

4) 上五島地区の産業構造、生活環境

北部の青砂、奈摩、網上、冷水は、漁業が主の半農半漁の地域であった。これに対して、中部の青方は行政の中心地で商業地域であり、大曾は漁業が主で、まき網船団の基地となっていた。また、船崎は農業が主の半農半漁の地域で、うどんの産地であり、相河、跡次、三日の浦、小浜、浜の浦、今里は農業が主の半農半漁の地域、桂山は内陸で農林業の地域であった。南部の猪浦、飯の瀬戸、焼崎、青木、道土井、真手の浦は主に漁業の地域で、養殖業も行われていた。(図4)

以上のことから、商業地域や漁業が主の地域では発症率が低く、農業の比重が大きい地域ほど、発症率が高い傾向にあった。

5) 簡易水道の敷設状況

上五島地区の簡易水道敷設状況を調査すると、中部の青方、大曾、船崎に1954年に初めて敷設され、その後南部中心地の道土井、真手の浦に1956年に、北部の奈摩、網上、冷水に1957年に敷設されていた。中部の肝

内結石発症率の高い地域には、1961年以降となっており、簡易水道の設置が遅いほど、肝内結石発症率が高い傾向にあった。(図5)

6) 地区別肝内結石症の特徴

中部多発地域、北部、中部青方地区、南部少数地域と発症率が高い順に、肝内結石症の特徴を調査した。

診断年齢、性別では、南部地域で高齢、女性が多くなっていたが、他の地域では変わらなかった。病型は、中部多発地域、北部では、IE型、L型が多く、中部青方地区、南部少数地域ではI型、R型が多い傾向にあった。(図6)

症状出現については、差はなかったが、肝葉萎縮は中部多発地域、北部で多く、治療の行われた症例も中部多発地域、北部で多く、肝切除術が実施されていた。(図7)

D. 考察

我々は長崎県上五島において、その成因究明のために疫学的調査(症例対照研究)を行ったが、その結果、肝内結石の発症に生活環境の衛生状態が関与している可能性、回虫感染、HTLV-1感染が関与している可能性が示唆された。生活環境の衛生状態、回虫感染が関与しているのであれば、地域の地理的特性、環境関連のインフラ整備、生活環境の違いにより発症率に差がある可能性があると考えられ、上五島地域における肝内結石発症の地域分布調査を行い、地域別の発生頻度、生活状況、肝内結石症の特徴について比較検討を行った。

肝内結石症の全人口に占める割合は、0.8%であり、エコー検診の進んでいる上五島地区では1.3%と高く、上五島地区(旧上五島町)での町内分布をみると、中部に2%以上の結石多発地域が認められた。この地域は、農業中心の半農半漁の集落が点在し、簡易水道の敷設は1961年以降で、簡易水洗トイレの設置も遅れ、生活の衛生状態改善が他の地域より遅れていることが示されている。また、中部の多発地域および北部の肝内結石症は、IE型、L型の頻度が高く、肝萎縮症例も多く、肝切除を中心とした治療が多くの症例で行われていた。いわゆる典型的な肝内結石症(肝葉萎縮を伴うIE型のピ系石症例)に、生活の衛生状態の関与が改めて疑われた。

最近当地域でも肝内結石症の発症は減少してきており、生年が1970年以降の住民には発症が確認されていないことから、衛生状態の改善が発症率減少をもたらしていると考えて良いであろう。

E. 結論

上五島地域における肝内結石症発症の地域分布調査を行ない、肝内結石発症に関する生活の衛生状態の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況(予定を含む)

特になし

肝内結石症の病理学的機序：胆管上皮異型病変と HSP の発現

研究分担者 中沼 安二 金沢大学医薬保健研究域医学系 形態機能病理学 教授

研究要旨：肝内結石症からの発癌機序を明らかにする目的で、肝内結石症に合併した胆管上皮異型病変 (biliary intraepithelial neoplasia, BiIN) と胆管癌における heat shock protein 27 (HSP27) の発現を免疫染色で検討した。正常肝の胆管上皮 (大型胆管, 小型胆管) や胆管付属腺上皮での HSP27 発現はないかあってもわずかであり、肝細胞も HSP27 陰性であった。BiIN と胆管癌 (浸潤癌) では半数以上が HSP27 陽性を示し、また、肝内結石症 (BiIN, 胆管癌非合併例) の大型胆管上皮も約半数が HSP27 陽性であった。免疫染色結果を半定量的に評価した結果、BiIN, 胆管癌と肝内結石症 (BiIN, 胆管癌非合併例) の大型胆管上皮では、正常肝と比較して HSP27 の有意な発現亢進を認めた。さらに、BiIN では肝内結石症 (BiIN, 胆管癌非合併例) より HSP27 発現が有意に亢進していた。以上の結果から、肝内結石症の大型胆管上皮における HSP27 の発現誘導は、発癌に関連した早期の現象であることが示唆された。

A. 研究目的

Heat shock protein (HSP) は熱ショックや活性酸素などのストレスに応答して発現が誘導される蛋白質である。その機能として、分子シャペロンとして新生蛋白質の folding や assembly に関与するだけでなく、蛋白質の細胞内輸送や細胞骨格構築、細胞内シグナル伝達など多彩な役割を有することが知られている。HSP はその分子量により大きく 6 つのファミリーに分類されるが、低分子量 HSP の 1 つである HSP27 は抗アポトーシス効果を有し、HSP27 の過剰発現は発癌と関連することが報告されている。

HSP27 の過剰発現がある癌として乳癌や卵巣癌、前立腺癌、胃癌、胆管癌、膀胱などがあり、肝内胆管癌に関してはその過剰発現は予後不良因子であると報告されている。また、HSP27 は分泌蛋白であることから血中腫瘍マーカーとしての意義が検討されており、実際に膀胱癌の腫瘍マーカーとしての有用性が報告されている。

本研究は、肝内結石症に合併した胆管上皮異型病変 (biliary intraepithelial neoplasia, BiIN) と胆管癌における HSP27 の発現を免疫染色で検討し、肝内結石症における発癌と HSP27 との関連性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象は肝内結石症 49 例の外科的切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片。対象症例 49 例中、34 例は BiIN もしくは胆管癌 (浸潤癌) 合併例、15 例は BiIN と胆管癌の非合併例。これらの肝組織切片に対し抗 HSP27 抗体を用いた免疫染色を行い、胆管上皮における HSP27 の発現強度を 3+, 2+, 1+, 0 の 4 段階で半定量的に評価した。対照として組織学的正常肝 (13 例) を使用した。統計学的検討は Spearman's rank correlation によった。

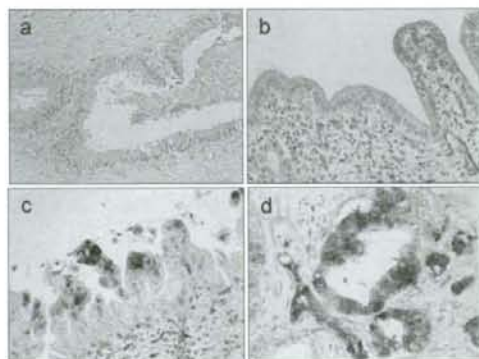


図1 肝内結石症における HSP27 の発現
a. 正常肝: b. 肝内結石症: c. BiIN-3: d. 浸潤癌

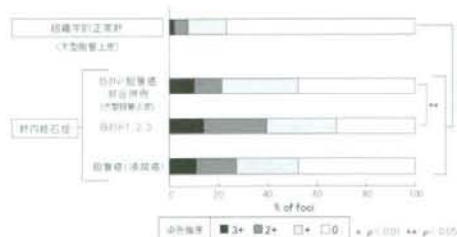


図2 HSP27免疫染色・半定量的評価結果

C. 研究結果

正常肝：

正常肝の胆管上皮 (大型胆管, 小型胆管) や胆管付属腺上皮での HSP27 発現はないかあってもわずかであり、肝細胞も HSP27 陰性であった (図 1 a)。正常肝では肝門部や門脈域の血管平滑筋と神経線維が恒常的に HSP27 陽性を示した。

肝内結石症 (BiIN, 胆管癌非合併例)：

肝内結石症 (BiIN, 胆管癌非合併例) では、大型胆管上皮および胆管付属腺上皮において、所々に