

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

肝細胞死と肝再生・肝線維化連携機構におけるクッパー細胞の役割

研究協力者 森脇 久隆 岐阜大学大学院 消化器病態学 教授

研究要旨：クッパー細胞は種々の肝障害に対して促進的および抑制的に作用するという相反する報告がみられる。そこで、肝障害ならびにその後の肝再生と肝線維化における Kupffer 細胞の役割を検討した。胆管結紮によるマウス胆汁鬱滞肝障害モデルにおいて、クッパー細胞を消去すると肝障害と肝細胞のアポトーシス感受性が増加し、肝再生ならびに肝線維化は減少した。この際、肝細胞の AKT 活性化抑制が認められ、また AKT の不活化は肝細胞のアポトーシス感受性を増加し肝再生を抑制した。慢性肝障害の状態にある肝臓ではクッパー細胞には、生存する肝細胞に対して AKT 活性化を介した抗アポトーシス状態獲得および肝再生誘導による保護的な作用が存在することを明らかにした。

共同研究者

永木 正仁 岐阜大学大学院消化器病態学
大澤 陽介 岐阜大学大学院病態情報解析医学

A. 研究目的

慢性肝障害の病態は、持続的な肝細胞死と炎症、その後生じる肝再生ならびに肝線維化によって特徴づけられる。クッパー細胞は肝臓土着のマクロファージであり、肝臓における免疫反応に関与している。マクロファージは種々の炎症性サイトカインを分泌するため臓器障害に対して促進的に働くと考えられており、炎症性疾患に対しマクロファージあるいは炎症性サイトカインを標的とし、その機能を抑制することによる治療の試みがなされている。しかしながらクッパー細胞については、肝障害に対し促進および抑制的に作用するという両者の報告が存在する。

胆汁鬱滞は多くの肝疾患の病態に関与しており、また、胆管結紮によるマウス胆汁鬱滞肝障害モデルは肝障害と肝星細胞活性化による肝線維化を誘導し、ヒトの肝障害に類似するため、慢性肝障害モデルとして用いられている。今回我々は、肝障害におけるクッパー細胞の役割を検討するためアレンドロネートリポソームの投与によりクッパー細胞を消去したマウスを作製し、胆管結紮によって誘導される肝障害ならびにその後のアポトーシス感受性、肝再生と肝線維化に対する影響を検討した。

B. 研究方法

C57BL/6J マウスの左肝管を結紮し（部分的胆管結紮術）、慢性肝障害を肝左葉にのみ誘導した。アレンドロネートリポソームの投与によりクッパー細胞を消去したマウスを作製し、胆管結紮による肝障害、肝再生、腫瘍壊死因子（TNF）誘導アポトーシス感受性および肝線維化についてクッパー細胞消去による影響を検討した。次に、代表的な生存シグナルである AKT について活性化の有無を検討し、さらに肝臓にアデノウイルスベクターを用いて非活性型 AKT を強制発現させたマウスで同様の実験を行った。

C. 研究結果

・クッパー細胞の肝障害における役割

アレンドロネートリポソームの投与によって、肝臓組織中の F4/80陽性細胞は消失し、クッパー細胞を消去できたと考えられた。胆管結紮後10日目の障害範囲および血清 ALT 値は、クッパー細胞の消去により増加した。一方、術後24時間では両者ともクッパー細胞消去の影響はなかった。このことから、クッパー細胞は胆管結紮直後の胆汁酸による肝細胞の直接障害に対しては影響しないが、それに引き続き誘導される2次的な免疫反応による肝障害に対して抑制的に作用することが示唆された。

・クッパー細胞の肝細胞アポトーシス感受性における役割

部分的胆管結紮術を施行したマウスに少量のガラクトサミンを併用して TNF を投与すると、無処置の右葉には TUNEL 陽性細胞が出現するが、胆管結紮された左葉には認められなかった。このことから慢性肝障害の状態の肝臓では、肝細胞は抗アポトーシス状態を獲得していることが示唆された。一方クッパー細胞を消去すると、胆管結紮による抗アポトーシス効果は減弱した。慢性肝障害の状態の肝臓において、生存している肝細胞は、クッパー細胞からの作用により抗アポトーシス状態を獲得していることが示唆された。

・クッパー細胞の肝再生における役割

胆管結紮術後の肝臓では、PCNA および Ki67陽性細胞数が増加し、cyclin E のタンパク発現の増加が認められた。このことから肝再生が誘導されていることが示唆された。一方クッパー細胞を消去すると、肝再生は減弱することから、クッパー細胞は肝再生に促進的に働くと考えられた。

・クッパー細胞の肝線維化における役割

胆管結紮術後の肝臓では、silius red 染色域、ハイドロキシプロリン量、alphaSMA・desmin タンパク発現、およびコラーゲン mRNA 発現が増加し、肝線維化が誘導されることが示唆された。一方クッパー細胞

胞を消去すると肝線維化は減弱され肝線維化にクッパー細胞は促進的に働くと考えられた。

・ AKT 活性化のアポトーシス感受性および肝再生における役割

胆管結紮術後の肝臓では肝組織中の AKT のリン酸化が認められ、一方クッパー細胞の消去はリン酸化を抑制した。リン酸化型 AKT は免疫染色にて主に肝細胞に発現しており、このことからクッパー細胞が肝細胞の AKT を活性化させることが示唆された。不活性化型 AKT を発現するアデノウイルスを投与することにより胆管結紮術後の AKT 活性化は抑制され、さらに抗アポトーシス獲得や肝再生誘導が抑制された。このことから、クッパー細胞の活性化は肝細胞の AKT 活性化を介して抗アポトーシスと肝再生を誘導することが示唆された。

D. 考 察

胆管結紮後、肝細胞は高濃度の胆汁酸に暴露され、肝細胞死が誘導される。この初期障害は引き続いて免疫反応を誘導し、さらなる肝障害と肝線維化を誘導する。クッパー細胞は壊死に陥った細胞を貪食し活性化され、種々のサイトカインなどを分泌すると考えられているが、今回の検討によりクッパー細胞は後期の免疫反応による肝障害に対して抑制的な作用を有することが示唆された。クッパー細胞の消去による肝障害の増加は、障害組織の貪食および肝細胞保護作用の欠如によるものと考えられる。クッパー細胞の肝細胞保護作用として肝細胞の AKT 活性化を介した抗アポトーシス獲得と肝再生促進作用を明らかにした。しかしながら今回の検討では、クッパー細胞からのどのような因子が肝細胞の AKT を活性化させているかについては明らかにできず、今後の検討課題といえる。さらに、クッパー細胞には肝線維化に対して促進的に働き、組織修復を促す効果が存在する。クッパー細胞は肝細胞の保護作用と組織修復作用を有することが明らかとなったが、過度の肝細胞 AKT 活性化やコラーゲン産生は肝細胞癌発症や肝硬変への進展の原因となり、これらの病態にもクッパー細胞が関与している可能性がある。肝疾患におけるクッパー細胞の役割については、さらなる検討課題である。

E. 結 論

クッパー細胞は胆管結紮による肝障害を抑制し、肝再生、肝細胞の抗アポトーシス状態獲得、肝線維化を誘導することが示唆された。Kupffer 細胞による肝再生および肝細胞の抗アポトーシス獲得には肝細胞の AKT 活性化が重要であることが示唆された (図 1)。

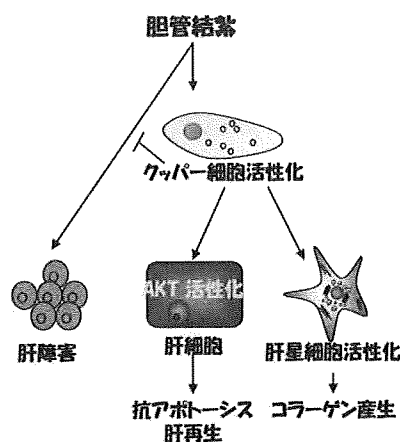


図 1 胆管結紮誘導肝障害におけるクッパー細胞の役割

G. 研究発表

1. 論文発表

Osawa, Y., Seki, E., Adachi, M., Suetsugu, A., Ito, H., Moriwaki, H., Seishima, M., and Nagaki, M.: Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. *Hepatology*. 51, 237-45, 2010.

2. 学会発表

- 1) Digestive Disease Week (DDW)2009 2009年5月31日 シカゴ Anti-apoptotic effects against TNF-alpha treatment in bile duct ligated mouse liver. Osawa Y, Nagaki M, Ito H, Seishima M, Moriwaki H.
- 2) 第13回日本肝臓学会大会2009年10月14日 京都 ワークショップ3「免疫担当細胞異常からみた肝疾患の動態」胆管結紮誘導性慢性肝障害マウスモデルにおける Kupffer 細胞の役割. 大澤陽介 永木正仁 森脇久隆
- 3) 第45回日本肝臓学会総会 2009年6月4日 神戸 胆管結紮誘導性慢性肝障害モデルにおける肝細胞抗アポトーシス獲得機序の検討 大澤陽介 永木正仁 伊藤弘康 清島 満 森脇久隆
- 4) 第4回スフィンゴテラピー研究会 2009年7月17日 鳥取 胆管結紮誘導性慢性肝障害モデルにおける肝細胞抗アポトーシス獲得機序の検討 大澤陽介 永木正仁 坂野喜子 中島 茂 森脇久隆 清島 満

G. 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

肝再生過程における Gab ファミリー蛋白の関与について

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：肝再生過程においては、IL-6,HGF,HB-EGF に代表される様々なサイトカイン、増殖因子が誘導される。また、これまでの遺伝子欠損マウスの解析から、IL-6受容体、HGF 受容体及び EGF 受容体を介するシグナルがマウス肝再生過程に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。一方で、Gab (Grb2 associated binder) ファミリー蛋白はこれら受容体の下流で共通に機能するアダプター蛋白である。Gab ファミリー蛋白には、構造的に類似した Gab1と Gab2が存在し、肝再生過程においても、機能している可能性が予想される。そこで今回、我々は、肝特異的 Gab1欠損マウスを作製し、Gab1の部分肝切除後の肝再生における役割について検討した。さらに、Gab2欠損マウスとの交配により、Gab1/2欠損マウス (GabDKO) も作成し、同様の検討を行った。この結果、野生型マウスに比し、肝特異的 Gab1欠損マウスでは部分肝切除後の肝再生が著明に障害を受けていることが明らかとなった。さらに GabDKO で肝再生障害が顕著となったことから、Gab ファミリー蛋白を介したシグナルが肝再生過程に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今回得られた実験結果は、肝不全患者の肝再生不全の分子機構の一端を明らかにしただけでなく、将来的に本アダプター分子群をターゲットにした新規肝再生療法の開発にもつながると考えられた。

共同研究者

木曾 真一 大阪大学消化器内科学
医学系研究科講師

吉田 雄一 大阪大学消化器内科学 助教

A. 研究目的

私たちは、これまで IL-6や HGF さらに HB-EGF に代表される肝再生因子の研究を行ってきた。その過程で、これら肝再生因子の下流で共通に機能するアダプター分子 Gab ファミリー蛋白 (Gab1及び Gab2) の同定、遺伝子クローニングに成功した。そこで、今回の研究では、本分子に着目し、肝特異的遺伝子欠損マウス作成、機能解析を通して、肝再生過程の分子機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) Gab1欠損マウスは、心臓、胎盤、皮膚等の構造異常を呈し、胎生致死であったため、生体肝における Gab1の役割を解析することができなかった。このため、臓器特異的 Cre-loxP システムを用いて、肝特異的 Gab1floxed; AlbCre マウス (Gab1LCKO) を作製した。一方で Gab2欠損マウスは、肥満細胞の発生に異常を認めるものの正常に発育する。このため、さらに、肝特異的 Gab1欠損マウスと Gab2KO マウスとの交配により、Gab1floxed; Gab2^{-/-}; AlbCre マウス (GabDKO) も作製した。対照として Gab1floxed; Gab2^{+/+} マウス (WT) 及び Gab2KO を用いた。2) Gab1LCKO, Gab2KO, GabDKO マウスおよび WT マウスにおいて、マウス70% 部分肝切除術後24, 48, 72, 96時間後における再生の評価 (肝重量, BrdU labeling index, Mitosis index) を検討した。3) 再生肝における ERK1/2や AKT1の活性を、Western blot 法にて検討した。

C. 研究結果

1) 肝重量 / 体重比は、部分肝切除72時間後以降において WT マウスに比し Gab1LCKO マウスでは有意に低下していた。その差は、Gab2をさらに欠損させた GabDKO マウスにおいて顕著となった。また、興味深いことに、Gab1LCKO マウスおよび GabDKO マウスにおいては、術後1ヶ月後においても肝重量 / 体重比が WT マウスに比し有意に低下しており肝再生がキャッチアップできていないことが明らかとなり、本分子群が肝再生過程に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。2) Mitosis index を PH3 抗体による免疫染色にて評価したところ、部分肝切除48時間後において WT マウスに比し Gab1LCKO, Gab2KO, GabDKO マウスでは、有意に低下していた。特に Gab2KO, GabDKO マウスにおいて低下が顕著であった。3) BrdU labeling index は、部分肝切除48時間後において control マウスに比し Gab1LCKO, Gab2KO, GabDKO マウスでは、有意に低下していた。特に Gab1LCKO, GabDKO マウスにおいて低下が著明であった。4) 再生肝におけるシグナル伝達を解析する目的で、ERK1/2と AKT1の活性をウエスタンブロット法にて解析した。この結果、ERK1/2活性は、Gab1LCKO, GabDKO マウスにおいて低下が著明であった。また、AKT1の活性は、Gab2KO マウスにおいて低下が著明であった。以上より、これらのシグナルの異常が肝再生障害の原因であると考えられた。

D. 考察

本邦において、肝疾患関連死亡者数は年々増加傾向をたどっている。特に慢性肝炎から肝硬変さらに肝癌を基盤とする肝不全死は、その多くを占める。また、劇症肝炎は急激かつ高度の肝障害を引き起こし、最終的に肝性脳症をはじめとする肝不全症状を来す予後不良の疾患である。末期の肝不全症状に陥った患者を救

う究極の方法は、生体肝移植や脳死肝移植をはじめとする肝移植療法である。しかしながら、本治療法は本邦においては慢性的なドナー不足や高額な医療費、さらには移植後の拒絶反応など多くの問題を抱えている。一方で肝臓は、優れた予備能力と再生能力を有したユニークな臓器であり、実際肝全体の70%程度以上が傷害を受けない限り、患者は日常生活を送ることが可能である。従って、肝不全の原因に関わらず、本来肝臓の持つ高い再生能力を最大限に引き出す真の“肝再生療法”の開発が期待される。今回の遺伝子欠損マウスを用いた検討から、Gabファミリー蛋白が肝再生過程に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後、肝硬変や肝炎例の生検肝組織におけるGabファミリー蛋白の発現やリン酸化を検討していくことにより、ヒト肝不全における本分子群の関与について検討し、臨床的意義について検討を加えていく予定である。また、近年、蛋白間結合をターゲットとした新規分子標的治療薬の開発が全世界で試みられているが、Gab1/2は、脱リン酸化酵素 SHP-2と会合分子として発見されたアダプター分子群である。従って、今回の実験結果より、Gabファミリー蛋白をターゲットとした蛋白質間相互作用を利用した新規肝再生療法開発の可能性についても検討していく予定である。

E. 結 論

Gabファミリー蛋白、特にGab1がマウス肝再生過程において重要な働きを担っていることが明らかとなった。今後、本分子群をターゲットにした新規肝再生療法の開発をすすめていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

1) Yoshida Y, Saji Y, Takemura Y, Ezaki H, Fukushima J, Kamada Y, Kiso S, Hayashi N. Gab family scaffolding adaptor proteins mediate signals required for liver regeneration through MAPK/ERK activation. (AASLD 2009 Boston, 平成21年11月、口頭発表)

2) 吉田雄一, 佐治雪子, 竹村貴代, 江崎久男, 福島寿一, 松本仁, 鎌田佳宏, 井倉 技, 筒井秀作, 木曾真一, 林紀夫 Gabファミリーアダプター蛋白のマウス肝再生過程における役割の解析 (第45回日本肝臓学会総会 平成21年6月 口頭発表)

3) 吉田雄一, 佐治雪子, 鎌田佳宏, 竹村貴代, 江崎久男, 福島寿一, 松本 仁, 木曾真一, 林 紀夫 肝再生及び肝不全におけるアダプター蛋白 Gab1の役割 (第13回日本肝臓学会大会 平成21年10月 ポスター)

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慢性肝不全治療

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】我々は肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法（ABMi療法）が有効であることを明らかにしてきた。ABMi療法は骨髄採取時に全身麻酔が必要であり、非代償性肝硬変患者において施行できない症例が多い。この問題を解決するために、局所麻酔下に採取した少量自己骨髄液から骨髄由来細胞を培養増殖させる技術を開発し、その培養骨髄細胞を用いた新規の肝修復再生療法の実現に向けた基礎研究を行った。また、使用する培地についてはヒトへの臨床応用を考え、無血清培地でありかつGMPグレード対応のシステムを用いて検討した。

【方法】C57 BL6 GFPTgマウス大腿骨より 1×10^7 個の骨髄細胞を採取し、無血清培地（GIBCO, StemPro® MSC-SFM, Cell start®, GMPグレード対応製品）にて培養を行った。2週間の培養後、得られた紡錘形のGFP陽性細胞（CD45（-）、CD44（+）、CD34（+）、CD11b（-）、Thy1.2（+）、Sca-1（+）、SSEA-4（+））を、CCl4投与による肝硬変マウスの尾静脈より投与（ 1×10^4 /個体）した（A群）。比較対象としてGFP陽性非培養骨髄細胞投与群（B群）、コントロールとしてCCl4単独群（C群）を用い、骨髄投与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】血清アルブミン値はA群、B群でコントロールと比較し有意に上昇しており（A: 2.27 ± 0.35 , B: 2.33 ± 0.29 , C: 2.16 ± 0.39 ）、A、B両群間には有意差を認めなかった。GFP免疫染色にてA、B両群とも門脈域にGFP陽性細胞を認めた。Azan, Sirius-red染色ではA群、B群でコントロールと比較し有意に線維化面積の減少を認めた（ $P < 0.01$ ）。また、A群、B群でMMP9の発現増加を確認した（ $P < 0.01$ ）。

【考案】我々はマウスGFP陽性骨髄細胞を無血清培地でも効率よく培養させる培養方法を開発した。さらに骨髄由来の培養細胞を用いた検討で、我々が開発したGFP/CCL4モデルで非培養骨髄細胞投与時と同等の肝機能、肝線維化の改善効果が得られることが明らかになった。

【結語】骨髄由来肝臓修復（LR）細胞投与法は、次世代型の非代償性肝硬変に対する新規治療法となり得ると考えられる。

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
山本 直樹 山口大学大学院 医学系研究科
消化器病態内科学 助教
高見 太郎 山口大学医学部附属病院 検査部
助教
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

B. 研究方法

C57 BL6 GFPTgマウス大腿骨より 1×10^7 個の骨髄細胞を採取し、無血清培地（GIBCO, StemPro® MSC-SFM, Cell start®, GMPグレード対応製品）にて培養を行った。1週間の培養後、得られた紡錘形のGFP陽性細胞（CD45（-）、CD44（+）、CD34（+）、CD11b（-）、Thy1.2（+）、Sca-1（+）、SSEA-4（+））を、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）の尾静脈より投与（ 1×10^4 /個体）した群（1群）とGFP陽性非培養骨髄細胞投与群（2群）、コントロールとしてCCl4単独群（3群）を用い、骨髄投与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。

C. 研究結果

血清アルブミン値は1群、2群でコントロールと比較し有意に上昇しており（ 2.27 ± 0.35 , 2.33 ± 0.29 , 2.16 ± 0.39 ）、1、2両群間には有意差を認めなかった。GFP免疫染色にて1、2両群とも門脈域にGFP陽性細胞を認めた。MetamorphによるLabeling Indexにて肝臓の線維化をアザン、シリウスレッド染色で評価したところ、1群、2群でコントロールと比較し有意に線維化面積の減少を認めた（ $P < 0.01$ ）。また、1群、

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が、ドナーの問題、手術侵襲、医療費が問題となる。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（Stem cells 2006）。しかし我々が施行してきたABMi療法は骨髄採取時に全身麻酔が必要であり、非代償性肝硬変患者において施行できない症例がある。今回我々はこの問題を解決するために、局所麻酔下に採取した少量自己骨髄液から培養骨髄細胞を培養増殖させる技術を開発し、その細胞を用いた新規の肝修復再生療法の実現に向けマウスを使用した基礎研究を行った。使用する培地についてはヒトへの臨床応用を考え、無血清培地でありかつGMPグレード対応のシステムを用いて検討した。

2群でMMP9の発現増加を確認した (P<0.01)。

D. 考 察

マウス GFP 陽性骨髄細胞を無血清培地でも効率よく培養させ、それらの細胞集団は非培養骨髄細胞の場合と同様に肝機能や線維化を改善させる効果があることが明らかになった。

E. 結 論

マウス GFP 陽性骨髄細胞を無血清培地でも効率よく培養させる培養方法の開発に成功し、これらの骨髄由来培養細胞を用いて我々が開発した GFP/CCL4モデルでの検討では、全骨髄細胞投与の場合と同等の肝機能、肝線維化の改善効果が得られることが明らかになった。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。この研究により今後 ABMi 療法の適応拡大の面においても意味があるし、さらに効果の持続面でも期待できる。骨髄由来培養自己骨髄細胞投与法は、次世代型の非代償性肝硬変に対する新規治療法となり得ると考えられる

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) (肝細胞研究会 平成年21年6月26日 ポスター) High density 法による骨髄由来細胞培養と予期的老化骨髄細胞分離法の開発
- 2) (AASLD 平成21年11月1日 ポスター) Mesenchymal cells derived from bone marrow cell reduce liver fibrosis and improved liver function in CCl4-treated cirrhosis mice
- 3) (UEGW/WCOG Gastro2009 平成21年11月24日 ポスター) Development of systems for culturing murine bone marrow-derived cells using the high-density method and isolating senescent bone marrow cells
- 4) (日本肝臓学会西部会 平成21年12月4日 パネルディスカッション) 非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の現状と今後の展開

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：当院において2009年までに実施した生体肝移植441例の内劇症肝炎は39例で、その5年生存率は85.4%と良好であった。脳症発現時のデータに基づき新肝移植適応ガイドラインのスコアを算出すると、5点以上は33例（86%）であり、今後移植適応を判断する上で有用である可能性が示唆された。一方、肝移植目的で当院紹介となった患者32例中9例（28%）が生体肝移植を受け、9例（28%）が脳死肝移植を希望されたが実際に脳死肝移植に至った症例は2例（6%）であった。今後脳死肝移植希望症例の増加が見込まれるため、脳症が出現した時点でなるべく早急に、移植可能施設と綿密な連携を取ることが望ましい。

A. 研究目的

劇症肝炎は内科的治療に抵抗性の場合、その予後は極めて不良である。2008年度全国調査集計結果によれば、劇症肝炎に対する非移植例での救命率は急性型、亜急性型でそれぞれ42.3%、20.8%であるのに対し、肝移植による救命率は100%、87.5%であった。

したがって、急性肝炎重症型、あるいは劇症肝炎症例では積極的に内科的治療を行いつつ、II度以上の脳症を認めた際に早急に、移植可能施設と綿密な連携を取ることが望ましい。

現在日本では1996年に作成された日本急性肝不全研究会の肝移植適応ガイドラインが主に用いられるが、急性型・亜急性型における正診率は67%、78%でありその有用性が問われていた。2008年に本研究班にて作成された新ガイドラインは、昏睡II度出現時に6つの指標をスコア化しその合計点によって死亡率を予測するものである。今回の検討では、①劇症肝炎に対する生体肝移植自験例において、新ガイドラインをあてはめその有効性について検討した。

また、②劇症肝炎で肝移植適応について紹介された場合、どれだけの割合で移植を受けたかを検討した。

B. 研究方法

検討①

対象は、1996年1月より2009年12月までに東大病院にて施行された441症例445回（再移植4回を含む）の生体肝移植である。内、劇症肝炎に対する生体肝移植を39例経験した。移植適応の判断には、King's College Hospitalの基準、本邦で用いられている急性肝不全研究会基準、高橋らによる予測式、武藤らによる予測式、与芝らの基準、千葉大学基準の予後方式を用いた。予後予測において生存もしくは移植非適応と判定された場合でも、臨床経過から内科的治療に抵抗性である場合には移植適応と判断した。

劇症肝炎39例に対する生体肝移植症例の内訳は男性21例、女性19例。年齢は8歳～64歳（中央値43歳）、18歳以上の症例は36例であった。病型別に、急性9例、亜急性29例、LOHF 1例であった。成因別では、成因不明（自己免疫性肝炎疑診3例を含む）が21例と最も多く、B型肝炎12例、薬物性5例、自己免疫性肝炎

1例であった。

検討②

2006年4月、脳死肝移植が保険適用となって以降の紹介患者を対象とした。2006年4月から2009年12月までに当科に肝移植適応について紹介のあった449例中、劇症肝炎は32例（7%）であった。成因はB型肝炎が15例と最も多く、次いで成因不明12例、自己免疫性肝炎（疑診）3例、薬物性2例であった。

C. 研究結果

検討①

生体肝移植実施39例の術全予後予測式について検討した。死亡もしくは移植適応と判断されたのはKing's Collage hospitalの基準で23例（59%）、高橋らの式29例（74%）、武藤らの式36例（92%）、日本急性肝不全研究会34例（87%）、千葉大学の基準39例（100%）、与芝らの適応基準19例（49%）であった。劇症肝炎に対する新肝移植適応ガイドラインでは、5点以上の症例は33例（85%）であった。新ガイドラインの死亡予測と他の予測式の判定が完全に一致した症例は10例で、全例亜急性型であった。

新ガイドラインにて生存と判定された6症例の年齢（17～48歳）、成因分類（薬物性2、B型肝炎1、成因不明3）、病型（急性2、亜急性4）に一定の傾向は無かった。脳症発現日と移植時のデータを比較すると新ガイドラインの各指標の内、PT（%）および総ビリルビン（mg/dl）は時間経過で有意な変化を認めていないが、D/T比低下によりスコア1ポイント増加が4例、血小板数低下によりスコア1ポイント増加4例、2ポイント増加1例を認めており、各指標を経時的に観察することで内科的治療抵抗性の指標として応用できる可能性が示唆された。

紹介元病院から当院紹介までの期間は、脳症発現日から中央値2日（前日～42日）であった。また生体肝移植実施までの期間は、脳症発現日から中央値6日（2～47日）で、また当院に転院してから2日（当日～28日）であった。

手術であるが、ドナーは男性17例、女性23例であり、レシピエントとの関係では兄弟が15例と最も多く、次いで子が11例、配偶者7例、父母6例であった。ド

ナーの年齢は18～57歳（平均37歳）であった。右肝グラフトの選択が最も多く19例であり、左肝グラフトを17例（APOLT3例を含む）、後区域グラフトを3例で選択した。生体肝移植後の観察期間は中央値5.9年（0.2～12.5年）で、1年および5年生存率はそれぞれ97.3%、85.4%であった。グラフト不全を2例で経験し、1例は術後38日目に脳死肝移植を、もう1例は術後46日目に生体部分肝移植を施行した。死亡症例は5例で、死因は感染症1例、肺塞栓1例、悪性新生物3例であった。

検討②

紹介患者32例中、6例は紹介の段階で移植適応なしと判断した。理由は昏睡度V度3例、真菌感染症2例、脳出血1例であった。4例は生体ドナー候補者無く、また脳死肝移植も希望されなかった。4例は内科的治療により肝機能改善した。9例（28%）が生体肝移植を受けた。また9例（28%）が脳死肝移植登録を希望したが、6例が登録に至り、内2例が脳死肝移植を受けた。一方で、登録後に4例、登録作業中に2例が死亡した。

D. 考 察

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。一方で肝移植による救命率は良好であるが、すべての症例が受けられる治療法ではない。生体肝移植で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。また生体ドナーも短期間で臓器提供の意思を明らかにせねばならず、そのためには限られた時間の中で、標準化された手順の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等により理解を深めるよう配慮する必要がある。脳死肝移植の場合にも、作業開始から登録完了まで中央値6.5日（3～20日）要しているため、時間的猶予が必要である。従って、内科的加療が奏功せず、脳症の進展を認める場合、躊躇せず肝移植可能な施設との連携を考慮し、行動をとるべきである。

今回予後予測式の検討は生体肝移植実施済みの症例のみを対象とした。新ガイドラインにて死亡と予測された症例は85%と概ね良好であった。生存と予測された症例でも、昏睡度IV度の症例では内科的治療の反応を見て肝移植実施の決断をしている。またその他の症例でも経時的にはD/T比の低下、血小板数の経過を認めるため、脳症発現時のみならず経時的データで対応可能と考えられた。

今後は移植非実施症例も含めた前向き検討を行い、肝移植適応検討のタイミングについてより詳細な解析結果を示したい。

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、本邦に於ける脳死肝移植のさらなる発展が待たれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Kokudo N, Makuuchi M. Left liver with right paramedian sector--can it be an option in living donor liver transplantation? *Transplantation*. 2009 Oct 15;88(7):952.
- 2) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Ohki T, Yoshida H, Omata M, Makuuchi M, Kokudo N. Noninvasive estimation of hepatic steatosis in living liver donors: usefulness of visceral fat area measurement. *Transplantation*. 2009 Aug 27;88(4):575-81.
- 3) Inoue Y, Sugawara Y, Tamura S, Ohtsu H, Taguri M, Makuuchi M, Kokudo N. Validity and feasibility of transient elastography for the transplanted liver in the peritransplantation period. *Transplantation*. 2009 Jul 15;88(1):103-9.
- 4) Masuzaki R, Yamashiki N, Sugawara Y, Yoshida H, Tateishi R, Tamura S, Kaneko J, Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Omata M. Assessment of liver stiffness in patients after living donor liver transplantation by transient elastography. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(9):1115-20.
- 5) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. Pseudomonas aeruginosa infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis*. 2009 Feb;11(1):11-9. Epub 2008 Sep 21.
- 6) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Kokudo N, Omata M, Makuuchi M. Double-dose double-phase use of second generation hepatitis B virus vaccine in patients after living donor liver transplantation: Not an effective measure in transplant recipients. *Hepatol Res*. 2009 Jan;39(1):7-13. Epub 2008 Aug 28.
- 7) Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Togashi J, Matsui Y, Makuuchi M. Antithrombin effect on

coagulation and fibrinolytic profiles after living donor liver transplantation: a pilot study. Int J Lab Hematol. 2009 Feb;31(1):81-6. Epub 2008 Dec 8.

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

Ⅲ-4. 肝内結石症分科会

【ワーキンググループ (WG) 研究報告】

1. 疫学予後 WG

杏林大学医学部 消化器一般外科学 森 俊幸

2. 診断治療 WG

広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進

3. 画像 WG 肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断

自治医科大学 消化器一般外科 佐田 尚宏

4. 発癌 WG 肝内結石症における発癌予測バイオマーカーの探索

金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 中沼 安二

【分担研究報告】

1. 肝内結石症のコホート調査 (追加調査)

杏林大学医学部 消化器一般外科 森 俊幸

2. 上五島地域における肝内結石症の長期予後調査

長崎県上五島病院 八坂 貴広

3. 胆汁中 heat shock protein (HSP) 27の胆管癌の腫瘍マーカーとしての有用性

金沢大学医学系研究科 形態機能病理学 中沼 安二

4. 胆道再建既往を有する肝内結石症の治療成績

名古屋大学大学院医学研究科 腫瘍外科 柳野 正人

5. 胆汁中の遺伝子発現解析と胆道系悪性腫瘍における発現プロファイルの検討

金沢大学大学院 先端医療技術学講座 本多 政夫

6. 先天性胆道拡張症術後に肝内結石を合併した症例の検討

千葉大学大学院医学研究院 腫瘍内科学 露口 利夫

7. 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 総合内科・総合診療科 田妻 進

8. 肝内胆管癌に対する分子標的治療-マルチターゲット阻害剤 Sorafenib の有用性

筑波大学大学院人間総合科学研究科 スポーツ医学 正田 純一

9. 肝内結石症に対する外科治療

和歌山県立医科大学 第二外科 山上 裕機

10. 肝内結石症の外科治療 ～先天性胆道拡張症術後肝内結石について～

東北大学大学院医学系研究科 肝胆膵外科 海野 倫明

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

肝内結石分科会
分担研究報告書
疫学WG報告

研究協力者 森 俊幸 杏林大学 医学部 消化器一般外科 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、第6期全国調査（2006年度）334例を対象に、胆管癌合併の危険因子を解析した（横断調査）。さらに第5期全国調査（1998年度）の登録症例に対しコホート調査（258例）を行い胆管癌発生に影響を与える因子を抽出した。横断調査では単変量解析・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。また、コホート調査では発癌リスクを上げる因子として治療としての切石のみ（ハザード比2.482）が抽出され、発癌リスクを下げる因子としてUDCA内服（ハザード比0.257）が抽出された。初発例（143例）を対象にすると左葉例（ハザード比11.830）は発癌リスクを上げ、肝切除術（ハザード比0.077）は有意に発癌のリスクを下げる因子であった。発癌からみた肝内結石症の取扱いとしては、肝切除は肝萎縮例には積極的に行い、胆道再建は可能な限り避けるべきと考えられた。

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く、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し、発癌および胆管癌合併からみた肝内結石症の取扱いについて検討することを目的とする。

B. 研究方法

〔研究①〕

2006年度に行われた、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。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。

〔研究②〕

1998年度に行われた第5期全国調査の登録症例473例に対しコホート調査を行い、26項目の臨床病理学的因子（性別、年齢、臨床症状、結石種類、結石存在部位、結石存在葉、既往胆道手術、治療内容、退院時間問題点、経過中間問題点、結石再発、UDCA内服）のすべてに回答を得た258例を対象。年齢はROC解析にてCut-Off値を60歳と設定。まず、Kaplan-Meier法にて単変量解析を行いp<0.2となった項目に対しCox回帰分析（ステップワイズ法）を行い、胆管癌発生に影響を与える因子を抽出した。

C. 研究結果

〔研究①〕

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）。これらに対する多変量解析では、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）

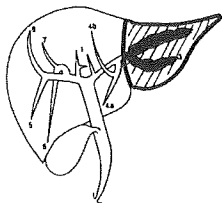
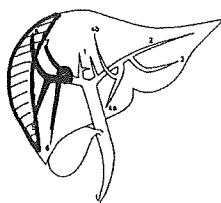
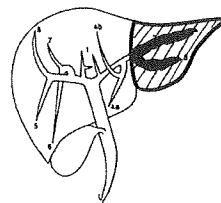
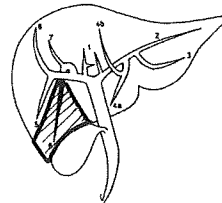
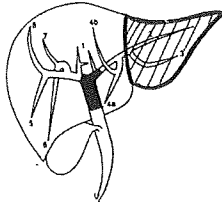
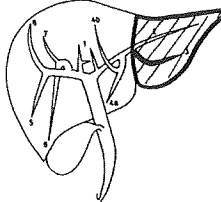
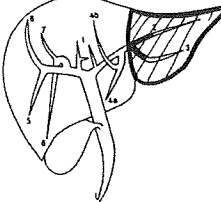
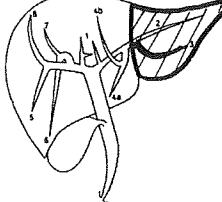
() = %

	胆管癌合併 (23例)	胆管癌非合併 (311例)	p Value
他の悪性腫瘍の合併	0 (0)	26 (8)	0.237
胆道再建の既往	10 (44)	71 (23)	0.040
胆管拡張	9 (39)	84 (27)	0.231
肝萎縮	8 (35)	46 (15)	0.019
UDCA内服	15 (65)	156 (50)	0.197
治療後の症状	6 (26)	40 (13)	0.108

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	3.800	1.464 – 9.860
肝萎縮例	0.003	4.585	1.678 – 12.525

表3. 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

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 3)。
〔研究②〕

全症例 (258 例) を対象に解析すると Kaplan-Meier 法で切石のみ、UDCA 内服、年齢、症状の有無、肝機能障害、退院時胆道狭窄、退院時胆道拡張、経過中の胆管炎が $p < 0.2$ であった。これらに対し Cox 回帰分析を行うと治療が切石のみが発癌のリスクを上げる因子として抽出され、UDCA 内服が発癌のリスクを下げる因子として抽出された (表 4)。

また、胆道手術の既往がない症例 (143 例) を初発例として同様に解析した。左葉、肝切除術、退院時胆道拡張、症状の有無、疼痛、発熱、肝機能障害、結石存在部位 (肝内 vs. 肝内外)、複数葉、切石のみ (治療)、退院時結石遺残、経過中の胆道狭窄、UDCA 内服が $p < 0.2$ であった。これらに対し Cox 回帰分析を行うと左葉症例が発癌のリスクを上げる因子として抽出され、肝切除術が発癌のリスクを下げる因子として抽出された (表 5)。

表4. 胆管癌発生に影響を与える因子 (全症例)

	有意確率	ハザード比	95%信頼区間
治療:切石のみ	0.023	2.482	1.131 – 5.446
UDCA 内服	0.028	0.257	0.076 – 0.865

表5. 胆管癌発生に影響を与える因子 (初発例)

	有意確率	ハザード比	95%信頼区間
左葉例	0.018	11.830	1.520 – 92.068
治療:肝切除術	0.014	0.077	0.010 – 0.599

D. 考 察

今回の検討において、肝内結石症における胆管癌合併の危険因子と発癌に影響を与える因子を統計学的に解析した。

肝萎縮は胆管癌合併の危険因子であり、萎縮肝と胆管癌発生部位は87.5%に一致した。また、肝切除術は有意に胆管癌発生のリスクを下げるため、萎縮肝に対しては積極的に肝切除術を施行すべきと考えられた。また、胆道再建は胆管癌合併の有意な危険因子であった。そのため、経皮経肝ルートを利用した内瘻化や内視鏡的ドレナージなどを優先させ、胆道再建は可能な限り避けるべきと考えられた。

今回の検討でさらなる検討を要すると思われるのは左葉症例の取扱いである。左葉症例はコホート調査で、発癌のリスクを上げる因子として抽出された。胆管狭窄例や胆管拡張例、有症状例などは肝切除術の適応としてよいと思われるが、無症状例に対する取扱いは追加の検討が必要と思われた。

E. 結 論

今回の検討による、発癌からみた肝内結石症の取扱いとしては、肝切除は肝萎縮例には積極的に行い、胆道再建は可能な限り避けるべきと考えられた。左葉症例の取扱いについては、さらに検討の追加が必要と思われた。

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 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）

肝内結石分科会

分担研究報告書

診断治療WG報告

研究協力者 田妻 進 広島大学 総合内科・総合診療科 教授

研究要旨：肝内結石症の診療は診断 modality の変遷や治療選択肢の拡充により変革しつつある。そこで本WGとしては、本症の診断と治療成績の向上を目的として、前年度に以下の作業工程を立案してその実践に向けた取り組みを推進した。特に、2009年11月に日本消化器病学会から胆石症診療ガイドラインが作成されたことを受けて、実態調査を中心に肝内結石症診療指針の策定に向けて作業を進めた。

1. わが国の肝内結石症診療の現状把握
2. その問題点の拾い上げと診療指針の立案～学会診療ガイドラインとのすり合わせ～
3. 新規の診断 modality と治療発掘・開発～多施設研究によるエビデンス創り～

A. 研究目的

肝内結石の診断や治療の現状を検証して、新たな診療指針をガイドラインとして提案するとともに、新規の診断 modality や治療手法の他施設研究による有用性の検証とその推奨を目的とした。

B. 研究方法

1. わが国の肝内結石症の診断・治療の現状の把握

わが国の主たる施設における肝内結石症治療の実態調査結果をもとに、診断・治療の現状把握を目的として調査を立案した。

- (1) 調査依頼施設の抽出
- (2) 具体的手法（対象症例数（原発性・二次性）、診断手法、治療の実際、予後
- (3) 従来との調査との比較と今後の継続調査の在り方

2. 診療ガイドラインの作成と提案

- (1) 日本消化器病学会が作成する診療ガイドラインとの調整
- (2) 肝内胆管障害とそれに基づく発癌に着目した診療指針の立案

3. 新規の診断 modality や研究班独自治療開発（予防治療も含めた）に向けた取り組み

- (1) 国内・国外の肝内結石症診断・治療に関する論文発表や学会発表を検索し、科学的なエビデンスの裏付けを検証した。さらに、その実践的な臨床応用を展望した。
- (2) 国内の有数の施設における多施設研究

今年度は日本消化器病学会・胆石症診療ガイドラインの『肝内結石治療』のフローチャートをもとに診療現場での実態をアンケート調査した（図1）。調査対象を、①ガイドライン作成・評価委員施設、②本WGメンバー施設、③胆道感染症 Study・Group (BTI) として、期間を2008～2009年の2年間とした。その調査結果をもとに、本疾患の診療ガイドラインの立案を考察することとした。

C. 研究結果

手稲溪仁会病院消化器病センター、東北大学病院肝胆膵外科、仙台市医療センター消化器内科、自治医科大学消化器一般外科、茨城県立中央病院、筑波大学消化器内科、千葉大学病院消化器内科、化学療法研究所附属病院、東邦大学医療センター大森病院、東海大学病院消化器内科、名古屋市立大学病院肝胆膵内科、愛知県がんセンター、広島大学病院総合内科・総合診療科、広島大学消化器・代謝内科、広島赤十字・原爆病院消化器科、JA 広島総合病院消化器科、広島県立安芸津病院、愛媛大学病院肝胆膵・移植外科、山口大学病院消化器内科、産業医科大学第一外科、宮崎医科大学消化器外科、長崎県上五島病院、杏林大学消化器外科から回答を得て、151例が集計された。症状の有無、胆管手術の既往の有無、診断方法を図2に、治療のModality を図3に示す。これらは前回調査（跡見班、2005～2007年）と比較して症例数は必ずしも大きな変動を示すものではなかった（図4）。

今回のアンケート結果から以下のように要点と問題点を整理した。

- (1) 治療症例は減少していない（特に積極治療例）
- (2) 内科治療例が増加している（経乳頭の内視鏡治療）
- (3) 再発、肝内胆管癌合併への配慮

D. 考 察

診療ガイドラインの作成が進められる時代の到来によって、肝内結石症の診療も新たな展開を迎えようとしている。しかし、診断と治療の原則は、1) 診断 modality を駆使した病態の把握、2) 結石自体の治療と病態治療、3) 予後改善（合併症予防、発癌リスクの軽減）である。今回の調査結果と跡見班での疫学調査の結果をもとに、診療現場実状に即した肝内結石症に対する診療ガイドライン作成を次年度に向けて試みる必要性が示された。ただ、そこには、新しいModality に関する評価、保険診療、費用効率を踏まえた診療費用試算も求められる。広島大学病院での診療実績を参考に示す（図5）。

肝内結石症の診療 modality は多彩である。しかし、その有効性は未確定であり、選択は臨床病態に基づいて行われなければならない。各治療 modality に対して十分なエビデンスがまだ乏しい事実から、推奨されるべき治療指針を提案するためのエビデンスづくりが望まれる。診療ガイドライン策定を目指して、有効性や安全性を十分に考慮した新たな治療法の開発や、すでに着手されている新規・分子標的治療について速やかに臨床応用を進めて、本領域の診療の新展開に繋げていくことを本班で推進したい。

E. 結 論

肝内結石症の診療実態をアンケート調査から確認した。本 WG では、本症の診断と治療成績の向上を目的として、実践的な診療ガイドライン策定を目指しているが、1) 肝内結石症診療の現状把握、2) その問題点の拾い上げと診療指針の立案、を踏まえ、次年度には、3) 新規の診断 modality と治療発掘・開発を、多施設研究により推進する。

表1 研究協力者 (敬称略)

手稲溪仁会病院消化器病センター・真口宏介, 東北大学病院肝胆膵外科・大塚英郎, 海野倫明, 仙台市医療センター消化器内科・藤田直孝, 洞口 淳, 自治医科大学消化器一般外科・佐田尚宏, 茨城県立中央病院・永井秀雄, 筑波大学消化器内科・正田純一, 千葉大学病院消化器内科・露口利夫, 化学療法研究所附属病院・税所宏光, 東邦大学医療センター大森病院・五十嵐良典, 東海大学病院消化器内科・峯 徹哉, 名古屋市立大学病院肝胆膵内科・大原弘隆, 愛知県がんセンター・二村雄次, 広島大学病院総合内科・総合診療科・菅野啓司, 松田聡介, 岸川暢介, 広島大学消化器・代謝内科・佐々木民人, 広島赤十字・原爆病院消化器科・古川善也, JA 広島総合病院消化器科・徳毛宏則, 広島県立安芸津病院・小道大輔, 中国労災病院消化器内科・大屋敏秀, 愛媛大学病院肝胆膵・移植外科・本田和男, 山口大学病院消化器内科・良沢昭銘, 産業医科大学第一外科・皆川紀剛, 山口幸二, 宮崎医科大学消化器外科・千々岩一男, 甲斐 真弘, 長崎県上五島病院・八坂貴宏, 杏林大学消化器外科・森 俊幸,

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tazuma S, Igarashi Y, Tsuyuguchi T, Ohara H, Inui K, Ohya T, On behalf of the BTI Therapy Research Group : Clinical efficacy of intravenous ciprofloxacin in patients with biliary tract infection: a randomized controlled trial with carbapenem as comparator. J Gastroenterol ; 44 (7) 781-792, 2009
- 2) Hyogo H, Yamagishi S, Tazuma S : Serum

Advanced Glycation End Products Associated with NASH and Other Liver Diseases Endogenous Toxins ; 2 (2) 577-593, 2009

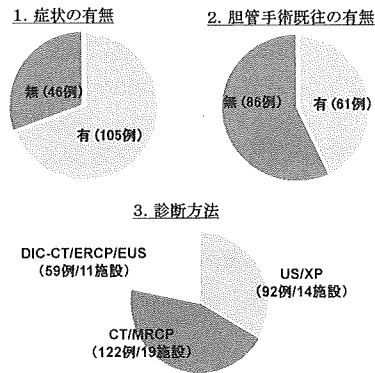
- 3) Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K : Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. J Hepatol ; 50 (6) 1226-1235, 2009
- 4) Shimatani T, Hirokawa S, Tawara Y, Hamai K, Matsumoto M, Tazuma S, Inoue M : "Comparing the acid-suppressive effects of three brands of generic lansoprazole with the original: pharmacokinetic bioequivalence tests do not necessarily guarantee pharmacodynamic equivalence" Dig Dis Sci ; 54 (11) 2385-2390, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Q1. 2008-2009年の肝内結石の診療件数()例
 Q2. 症状あり()例、症状なし()例
 Q3. 胆管手術の既往なし()例、既往あり()例
 Q4. 診断方法
 (1)US and/or 腹部X線単純写真()例
 (2)CT and/or MRCP()例
 (3)DIC-CT and/or ERCP and/or EUS()例
 Q5. 治療
 (1)肝切除()例
 (2)PTCS()例
 (3)POCS()例
 (4)ESWL単独()例、PTCSとの併用()例
 (5)肝移植()例
 (6)経過観察()例
 (7)薬物治療()例→(薬物名:)

図1. WGによる肝内結石治療に関する実態調査(2008-2009)
(アンケート調査票)



協力施設
 ・手稲区仁倉病院消化器病センター
 ・東北大学病院肝胆膵外科
 ・仙台市医療センター消化器内科
 ・自治医科大学消化器一般外科
 ・茨城県立中央病院
 ・筑波大学消化器内科
 ・千葉大学病院消化器内科
 ・化学療法研究所附属病院
 ・東邦大学医療センター大森病院
 ・東海大学病院消化器内科
 ・名古屋市立大学病院肝胆膵内科
 ・愛知県がんセンター
 ・広島大学病院総合診療科
 ・広島大学病院消化器・代謝内科
 ・広島赤十字・原爆病院消化器科
 ・JA広島総合病院消化器科
 ・広島県立安芸津病院
 ・愛媛大学病院肝胆膵・移植外科
 ・山口大学病院消化器内科
 ・産業医科大学第一外科
 ・宮崎医科大学消化器外科
 ・長崎県立五島病院

図2. WGによる肝内結石治療に関する実態調査
(n=151/22施設)

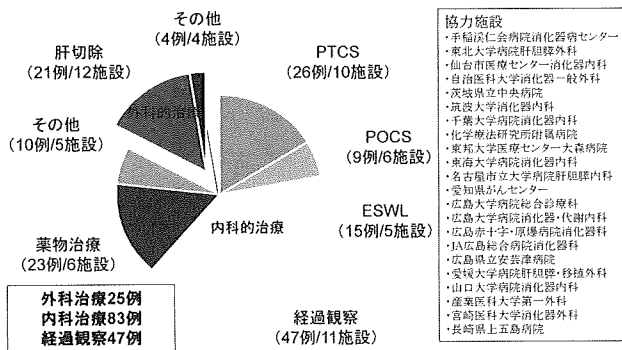


図3. WGによる肝内結石治療に関する実態調査
(n=158/22施設)

調査	2005-2007	2008-2009
回答施設	18	22
症例数	235 (78/年)	158 (74/年)
外科治療	43	25
内科治療	59	83
経過観察	132	47

図4. 診断治療ワーキンググループ(坪内班)
-第二次調査(2008~2009年)と第一次調査(2005~2007年, 跡見班)との比較-

患者の受療パターン	入院		外来		年間総診療費	患者比率
	1回当たり診療費	年間回数	1回当たり診療費	年間回数		
入院メイン	154万円(52~191)	1.2回(1~2)	-	-	182万円(52~383)	50%(4/8)
外来メイン	-	-	1.8万円(0.3~1.0)	3回(1~6)	2.4万円(0.3~5.9)	37.5%(3/8)
両方	104万円	1回	0.6万円	13回	333万円	12.5%(1/8)

※広島大学病院・平成20年4月~平成21年3月末集積

患者の受療パターン	入院		外来		年間総診療費	患者比率
	1回当たり診療費	年間回数	1回当たり診療費	年間回数		
入院メイン	105万円(42~224)	2回(1~3)	-	-	281万円(58~703)	37.5%(3/8)
外来メイン	-	-	1.1万円(0.8~1.5)	7.8回(5~11)	8.8万円(3.8~14.1)	63.5%(5/8)
両方	105万円(42~224)	2回(1~3)	0.8万円(0.8~1.0)	21回(11~25)	244万円(58~703)	37.5%(3/8)

※広島大学病院・平成20年4月~平成21年3月末集積(入院メインの対患者の外来総診療回数が多い。両方と入院メインの対患者は同一)

図5. 肝内結石診療費用の実状
(広島大学病院2008年4月~2009年3月)
~PSC診療との比較~

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

肝内結石分科会

分担研究報告書

画像WG報告

－肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断－

研究協力者 佐田 尚宏 自治医科大学 消化器・一般外科 鏡視下手術部 教授

研究要旨：1990-2009年本研究班参加施設を対象に、肝内結石症に合併する肝内胆管癌 Profile 調査を行った。全施設合計で肝内結石症症例は696例、そのうち肝内胆管癌合併症例は37例（5.3%）であった。肝内胆管癌合併症例の肝内結石症罹患期間は、従来から特徴的とされる肝内結石罹患歴10年以上の症例が37%と最多であったが、肝内結石症とほぼ同時に発見された0-6か月の症例が36%とほぼ同数認められ、その頻度は2000年以降増加していた。肝内結石症に合併する肝内胆管癌の治療成績は不良で、過半数の症例が腫瘍を指摘された後に治療が開始され、その切除率は低かった。診断法に関しても従来の直接造影法（ERC, PTC）もしくは胆管内内視鏡（PTCS, 経口胆道鏡）による細胞診、生検が主で、新たな診断手段の評価は困難であった。今後さらに症例を集積し、MD-CT, MRI, FDG-PETなどの新たな Modality を含め肝内胆管癌早期発見のための診断方法についての検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症の死因として、胆管炎からの敗血症と並んで肝内胆管癌発症は重要な要素で、肝内結石症の4.0-8.8%に合併すると報告されている。しかし、肝内胆管癌の診断は困難で、発見時には高度進行している切除不能例が多く、切除例の予後も不良である。2002-2007年の難治性疾患克服事業「肝内結石症に関する調査研究班（以下、肝内結石班会議）」において、画像診断ワーキング・グループ（2005-2007年は画像診断・病型分類ワーキング・グループ）が主体となり、「肝内結石症の病型分類・画像診断指針2008」を作成した。その中で、肝内胆管癌の診断に関しては、「その存在診断は背景に存在する結石、炎症、pneumobilia などのためしばしば困難で、術中に偶然発見されることもまれではない。合併する肝内胆管癌の診断には、直接造影法における胆汁細胞診・胆管生検、MRI 検査の拡散強調画像、CT 検査の super delay phase、胆汁中 CEA 値、PET 検査などが有用であるとする報告もあるが、確立した画像診断法はなく、今後の更なる検討が必要である。」と記載されるに留まり、肝内胆管癌診断は、今後解決されなければならない課題である。

そのため、2008年以降難治性疾患克服事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」肝内結石分科会（以下、肝内結石分科会）画像ワーキング・グループでは、肝内結石に合併する肝内胆管癌をいかに診断するかを最重要課題として検討を行っている。今年度は、肝内胆管癌診断の現状を明らかにすることを目的に、肝内結石に合併する肝内胆管癌の Profile 調査を企画した。

B. 研究方法

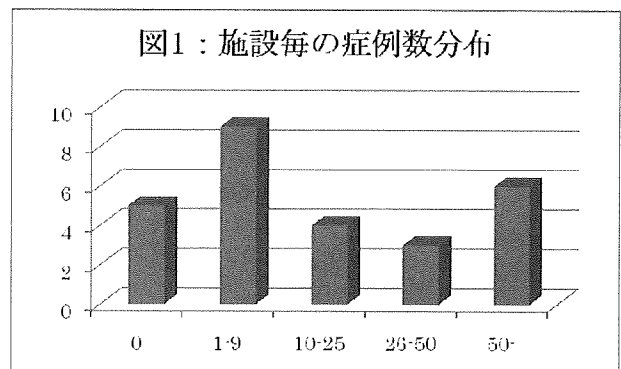
本研究班参加施設を対象とし、1990-2009年に経験した肝内結石症症例数および肝内胆管癌合併症例数の

第1次調査、肝内胆管癌合併例のみを対象とした用紙記入の第2次調査からなる肝内結石症に合併する肝内胆管癌 Profile 調査を行った。

本調査は、2009年7月自治医科大学疫学倫理委員会で疫学調査として承認を受けた。8月第1次調査票を発送、肝内胆管癌合併症例があると回答した施設に対し、9月第2次調査票を発送した。

C. 研究結果

第1次調査は39施設に調査票を発送し、26施設から回答を得た（回答率：66.7%）。全施設合計で肝内結石症症例は696例、そのうち肝内胆管癌合併症例は37例（5.3%）であった。各施設の症例数は、20年間の症例数1-9例が8施設と最も多く、50例以上の施設が6施設あり、症例数の偏在がみられた（図1）。肝内胆管癌合併症例37例は、肝内結石症を50例以上経験した施設で30例、それ以下の症例数の施設で7例であった。

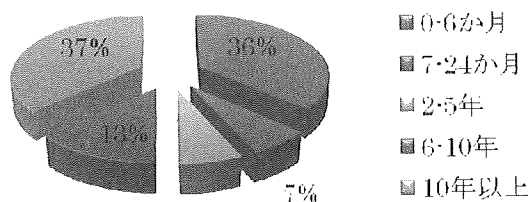


第2次調査対象37例中、調査票が返送された症例が30例（回答率：81.1%）あり、この30例（男性18例、女性12例、平均年齢67.2歳）を解析対象とした。

肝内胆管癌合併症例の成因は、胆管空腸吻合術後1例を除き、29例は原発性であった。肝内結石分類では、

I型53%, IE型47%, 左右別ではL型47%, R型20%, LR型33%であった。飲酒率17%, 喫煙率33%, 目立った既往歴として, 胆摘術を受けた症例が13例(43%)あった。

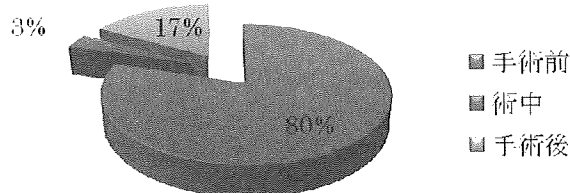
図2: 肝内胆管癌発症までの肝内結石症罹患期間



肝内胆管癌合併症例の肝内結石症罹患期間は, 従来から特徴的とされる肝内結石罹患歴10年以上の症例が37%と最多であったが, 肝内結石症とほぼ同時に発見された0-6か月の症例が36%とほぼ同数認められた(図2)。これを年代別にみると, 1990-1994年の症例7例中6年以上経過例が6例と過半数を占めているのに対し, 2005-2009年は8例中6例が0-6か月と肝内結石と肝内胆管癌がほぼ同時に診断された症例が過半数を占めていた。

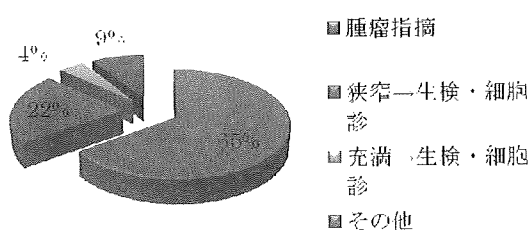
肝内胆管癌診断と手術時期の関係では, 術前に発見された症例が80%であったが, 手術後の病理標本で確認された症例も17%に認められた(図3)。

図3: 肝内胆管癌診断と手術



肝内胆管癌の発見動機は, 腫瘍指摘が最も多く65%を占め, 肝内胆管狭窄に対する精査(生検・細胞診)が22%, 充満結石に対する精査が4%, その他が17%であった(図4)。発見動機別の切除率をみると, 狭窄精査では80%が切除されていたが, 腫瘍指摘例での切除率は31%に留まっていた。

図4: 肝内胆管癌の発見動機

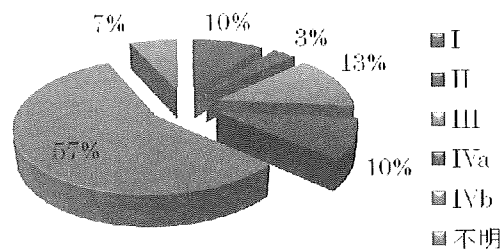


肝内胆管癌診断に有効であった診断 modality は, 腫瘍指摘例ではCT, USが有用とされているが, 狭窄精査など腫瘍が指摘できないその他の例では, CT, US, MRIの有効率は低く, PTC, ERCなどの直接造

影法による生検, 細胞診, 経口胆道鏡, PTCSなど内視鏡による精査により診断されていた。診断された肝内胆管癌は高度進行例が多く, Stage IVbが57%と過半数を占めていた(図5)。

肝内胆管癌の予後は, Stage I, IIでは再発例はなく, 長期生存例がみられたが, Stage IIIの4例中3例は切除術後18か月以内に原病死しており, Stage IVaの3例も全例原病死(3年2か月, 1年3か月, 9か月), Stage IVb 17例では, 切除例が6例(35%)のみで, 1年以内原病死例が3例と, 非切除例(11例中7例が1年以内死亡)とほぼ同等の治療成績であった。

図5: 肝内胆管癌のStage



D. 考 察

今回実施した調査では, 26施設で696例の肝内結石症例, そのうち37例(5.3%)に肝内胆管癌合併があり, 4.0-8.8%に肝内胆管癌が合併するとされている従来の頻度とほぼ同様であった。年齢・性別等は, 従来の調査と大きな差はなかったが, 43%に胆摘術の既往があったことは注目された。

従来, 肝内結石症に合併する肝内胆管癌は, 長年にわたり胆管炎を繰り返した後に発症し, 診断が困難で, 診断時点では治療切除が困難な症例が多いと報告されている。今回の調査では, 従来型の5年以上の肝内結石および胆管炎罹患例が50%を占めていたが, 2000年以降はこのタイプの発症形式が減少し, 肝内結石と同時に肝内胆管癌が発見される同時発見型の頻度が増加していた。2005-2009年に限れば同時発見型が過半数を占めており, 肝内結石症自体の発症頻度の減少とともに, 新たな病型タイプとして同時発見型にも今後注目する必要があると考えられた。

今回の調査の主目的は, 肝内結石症の重要な予後因子である肝内胆管癌をいかに早期に発見するか, その方法について知見を得ることにあつた。肝内胆管癌の発見動機の過半数は腫瘍指摘であったが, その切除率は31%程度に留まっており, 治療成績も不良で, 切除例でも過半数は1年以内に原病死しており, 腫瘍形成以前の発見手段が治療成績の向上のためにも必要である。狭窄精査症例, 充満結石精査症例で, 比較的早期の肝内胆管癌が発見されているが, その診断法は従来から行われている直接造影法(ERC, PTC)もしくは胆管内内視鏡(PTCS, 経口胆道鏡)による細胞診, 生検が主で, 2000年以降飛躍的に発展したMD-CT, MRI, FDG-PETなどのModalityに関しては施行している症例がなく, 評価することができなかつ

た。当科で2009年経験した76歳男性の肝内胆管癌合併肝内結石症症例で施行したFDG-PETでは、炎症部と癌部のSUV値に明瞭な差があり、今後の症例の集積で、新たな診断modalityとなりえる可能性が示唆された。今後症例を集積し、MD-CT, MRI, FDG-PETなどの新たなModalityを含め、肝内胆管癌早期発見のための診断方法についての更なる検討が必要であると考えられた。

E. 結 論

肝内結石症に合併する肝内胆管癌の治療成績は不良で、過半数の症例が腫瘤を指摘された後に治療が開始されていた。診断法に関しても従来の直接造影法(ERC, PTC)もしくは胆管内内視鏡(PTCS, 経口胆道鏡)による細胞診, 生検が主で、新たな診断手段の評価は困難であった。

従来型の長期肝内結石, 胆管炎罹患症例の割合が減少し, 2000年以降は肝内結石と肝内胆管癌が同時に発見される例が増加していた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

佐田 尚宏. 胆管内視鏡のトラブルシューティング
c.胆道鏡 1. PTBD 施行のトラブル. 消化器内視鏡
21(12):1912-1913,2009

2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

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）

肝内結石分科会

分担研究報告書

発癌 WG 報告

肝内結石症における発癌予測バイオマーカーの探索

研究分担者 中沼 安二 金沢大学医学系研究科 形態機能病理学 教授

研究要旨：肝内結石症における胆管癌の早期発見に有効な分子マーカーを同定することを目的とした検討を行った。肝内結石症に合併した BilIN と胆管癌（浸潤癌）では、免疫組織化学的に heat shock protein 27（HSP27）の発現が高率にみられるが、今回、肝内結石症患者の血清 HSP27濃度の測定を行った。肝内結石症（非癌症例）での HSP27は 2.93 ± 2.77 ng/ml (n=41) であり、健常人 (0.55 ± 0.49 ng/ml, n=16) より有意に高かった。癌合併例の肝内結石症での定量値は 4.43 ± 3.33 ng/ml (n=5)（術前値）であり、肝内結石症の非癌症例や健常人より高い傾向にあった。次いで、胆汁中の microRNA を解析した結果、胆管癌で異常を示すいくつかの候補が同定された。これらのマーカーは肝内結石症からの発癌予測バイオマーカーとなる可能性を有し、レクチン糖鎖を含む複数のマーカーを組み合わせることで、肝内結石症からの発癌マーカーとしての精度が高まると考えられた。なお、本研究班から発信した BilIN 分類ならびに IPNB 分類は、本年中に改訂予定の WHO Classification（WHO blue book）に採用されることが決定した。

A. 研究目的

肝内結石症では5-10%の症例に肝内胆管癌が発生し、発癌の有無が本症患者の最も重要な生命予後規定因子である。肝内結石症からの発癌の多くは胆管炎を背景として、前癌病変である胆管上皮層内異型病変から上皮内癌、そして浸潤癌へと進行する多段階発癌の過程を経る。

これまでに発癌ワーキンググループでは、肝内結石症にみられる前癌病変および初期病変を biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) と呼び、その異型度により BilIN-1, BilIN-2, BilIN-3の3段階に分類できることを示した。また、肝内結石症の一部の症例に認められる胆管内乳頭状腫瘍を intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB) と呼び、その臨床病理学的特徴を明らかにした。

本研究班から発信したこれら BilIN 分類ならびに IPNB 分類は、肝内結石症に限らず肝胆道系一般に適用可能な腫瘍分類として、本年中に改訂予定の WHO Classification（WHO blue book）に採用されることが決定した。

本症の日常診療においては、肝内胆管癌の早期発見と早期治療が重要な課題である。通常、BilIN は画像検査では発見できない病変であるため、その診断のためには鋭敏な分子マーカーの同定、あるいはそれに関連して癌進展に関連する分子を同定し、それを新規のマーカーとして用いることが一つの有効な方策となる。これらの分子はそれを標的とした新たな治療方法の開発、あるいは治療効果判定のための分子マーカーとなる可能性も有している。

発癌ワーキンググループでは、肝内結石症における胆管癌の早期発見に有効な分子マーカーを同定することを主な目的とし、多施設共同研究を行う。

B. 研究方法

昨年度の本班会議で、肝内結石症に合併した BilIN と胆管癌（浸潤癌）では、免疫組織化学的に heat shock protein 27（HSP27）の発現が高率にみられることを報告した。本年度は肝内結石症患者の血清 HSP27濃度を測定した。対象は肝内結石症46例、健常人16例。肝内結石症は非癌症例が41例、癌合併例が5例で、癌合併例の内訳は通常型胆管癌が4例、IPNBが1例。癌合併例は術前と術後の HSP27濃度も比較検討した。HSP27濃度は ELISA 法（Hsp27 ELISA kit, Stressgen）で測定した。

C. 研究結果

血清 HSP27濃度の測定結果を図1に示す。健常人の血清中にも検出可能な低レベルの HSP27が含まれていた (0.55 ± 0.49 ng/ml, n=16)。肝内結石症（非癌症例）での測定値 (2.93 ± 2.77 ng/ml, n=41) は健常人より有意に高値を示した。癌合併例の肝内結石症（術前）での定量値は 4.43 ± 3.33 ng/ml (n=5) であり、健常人や肝内結石症の非癌症例より高い傾向にあったが、統計学的有意差はなかった。

癌合併例5例についての術前と術後の測定値の比較を図2に示す。術後の血清サンプルは術後6~18年という長期の経過を経たものを使用している。通常型胆管癌症例 (n=4) では3例で術後に低下、1例で術後に上昇していた。なお、これら4症例の術後血清採取時の担癌状態はまだ確認できていない。また、IPNB (n=4) は術前、術後ともほぼ同様の値であった。

正田研究協力者からは、従来より行っている胆管癌の診断マーカーとなりうるレクチン糖鎖の解析の進展状況が報告された。

本多研究協力者は胆汁中の microRNA に着目し、胆管癌症例と対照群との間で比較検討を行い、胆管癌