

図1. 血清 HSP27濃度

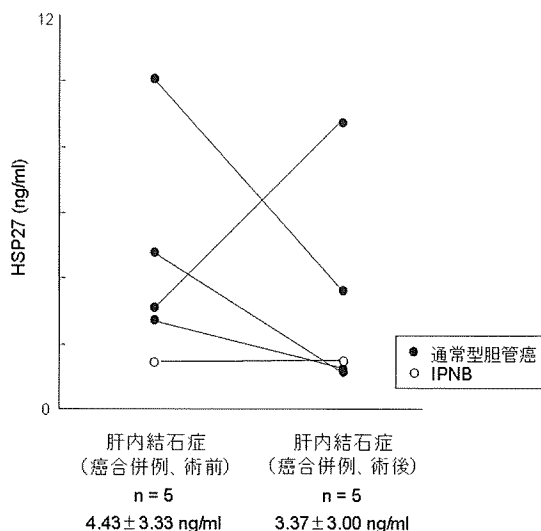


図2. 血清 HSP27濃度 - 癌合併症の術前・術後値

で異常を示すいくつかの候補を同定した。

D. 考察

胆管癌を合併した肝内結石症での血清 HSP27濃度は、非癌症例の肝内結石症より平均値では高値を示したが、癌合併例は症例数が少ないこともあり統計学的な有意差はなかった。今回、個別研究において PTCD 胆汁の HSP27濃度は胆管癌において胆石症より有意に高値であることを報告したが、血清よりは胆汁の HSP27がより鋭敏な胆管癌のマーカーとなる可能性が示唆される。

非癌症例の肝内結石症の血中 HSP27は健常人より有意に高値を示したことから、HSP27は炎症反応により誘導される分子である可能性がある。また、非癌症例の肝内結石症の中に HSP27がかなり高値を示す症例もあったが、これら症例の中に Billin が含まれている可能性は否定できないと考えられる。

レクチン糖鎖や microRNA, HSP27など複数のマーカーを組み合わせることで、肝内結石症の血清や胆汁サンプルから発癌の診断マーカーとしての精度がより高まると考えられる。なお、肝内結石症の新規症例は近年減少傾向にあり、研究サンプルの収集がより困難な状況にある。これまでの研究で、肝内結石症からの発癌機序と通常の肝門部～肝外胆管癌の発癌機序はかなり共通していることが明らかになりつつあることから、今後は肝内結石症に限らず通常の胆管癌も研究対象とし、その結果を肝内結石症に応用するという方法も考えられる。

E. 結論

肝内結石症からの発癌を予測しうる数種の候補分子が同定された。今後、臨床現場で実用可能な診断マーカーの確立を目指した研究を展開したい。

謝辞：肝内結石症の血清サンプルを供与して下さいま

した長崎県上五島病院 八坂貴宏先生に深謝いたします。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itatsu K, Sasaki M, Nakanuma Y et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear translocation of nuclear factor- κ B are involved in upregulation of matrix metalloproteinase-9 by tumor necrosis factor- α . *Liver Int* 29:291-8, 2009
- 2) Itatsu K, Sasaki M, Nakanuma Y et al. Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor- α . *Am J Pathol* 174:829-41, 2009
- 3) Nakanishi Y, Zen Y, Nakanuma Y et al. Intraductal oncocytic papillary neoplasm of the bile duct: the first case of peribiliary gland origin. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16:869-73, 2009
- 4) Nakanishi Y, Kondo S, Nakanuma Y et al. Impact of residual in situ carcinoma on postoperative survival in 125 patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009 (Epub ahead of print)
- 5) Nakanuma Y, Zen Y, Harada K et al. Tumorigenesis and phenotypic characteristics of mucin-producing bile duct tumors: an immunohistochemical approach. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009 (Epub ahead of print)
- 6) Sasaki M, Yamaguchi J, Nakanuma Y et al. Polycomb group protein Bmi1 is overexpressed

- and essential in anchorage-independent colony formation, cell proliferation and repression of cellular senescence in cholangiocarcinoma Tissue and culture studies. Hum Pathol 40;1723-30, 2009
- 7) Onodera M, Zen Y, Nakanuma Y et al. Fascin is involved in tumor necrosis factor-alpha-dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma. Lab Invest 89;1261-74, 2009
- 8) Nakanuma Y, Sasaki M, Sato Y et al. Multistep carcinogenesis of perihilar cholangiocarcinoma arising in the intrahepatic large bile ducts. World J Hepatol 15;35-42, 2009
- 9) 中沼安二. 胆道癌病態解明への新たな一歩. 肝胆膵 58;705-7, 2009
- 10) 全陽, 中沼安二. 胆管上皮内腫瘍に関する話題: 胆管上皮腫瘍/前がん病変の分類. 肝胆膵 58;709-14, 2009
- 11) 上田和彦, 角谷眞澄, 中沼安二他. 胆管上皮内腫瘍に関する話題: 粘液産生性胆管腫瘍の画像所見. 肝胆膵 58;809-15, 2009
- 12) 全陽, 中沼安二. 膵・胆道系腫瘍のトピックス - 粘液産生性腫瘍を中心に - 胆道粘液産生性腫瘍の病理診断. 病理と臨床 27;546-53, 2009
- 13) 中沼安二, 原田憲一, 木村康他. 胆道癌の病理診断. 消化器外科 32;1715-25, 2009
- 14) 中沼安二, 佐々木素子, 佐藤保則他. 肝, 胆管発癌における cancer stem cell の役割. 肝胆膵 59;639-47, 2009

2. 学会発表

- 1) Harada K, Nakanuma Y. A case of extrahepatic cholangiocarcinoma mimicking IgG4-related sclerosing cholangitis -cholangiocarcinoma and IgG4 reaction- Showa Pathology Seminar for Pancreatobiliary disease 2009
- 2) 佐々木素子, 山口淳平, 中沼安二他. 肝内胆管癌におけるポリコーム群蛋白 Bmi1 の発現とその意義. 第98回日本病理学会総会
- 3) 佐藤保則, 下村修治, 中沼安二他. 胆管癌の浸潤・転移機構における上皮-間葉転換 (EMT) の関与. 第45回日本肝臓学会総会
- 4) 松原厚志, 久野敦, 中沼安二他. レクチンマイクロアレイシステムを用いた胆管癌新規糖タンパク質腫瘍マーカー開発. 糖質学会年報
- 5) 松原厚志, 久野敦, 中沼安二他. 新規肝内胆管癌糖タンパク質マーカーの開発. 分子腫瘍マーカー研究会
- 6) 佐々木素子, 中沼安二. 嚢胞形成性肝内胆管腫瘍の臨床病理学的検討. 第45回日本胆道学会学術集会
- 7) 佐藤保則, 中沼安二. 肝内結石症からの発癌過程における HSP27 の発現と腫瘍マーカーとしての意義. 第45回日本胆道学会学術集会
- 8) 木村康, 原田憲一, 中沼安二他. 高度な IgG4

- 陽性形質細胞の浸潤を伴った肝外胆管癌の1例. 第45回日本胆道学会学術集会
- 9) 五十嵐紗耶, 原田憲一, 中沼安二他. 肝内胆管癌および前癌病変における幹細胞マーカーの発現. 第38回日本肝臓学会西部会

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

肝内結石症のコホート調査（追加調査）

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。我々は第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、肝切除術やUDCA内服は有意に発癌のリスクを下げる因子であり、切石のみや左葉症例は発癌のリスクを上げる因子であった。発癌からみた肝内結石症の取扱いとしては、肝切除とUDCA内服を推奨すべきと考えられる一方、左葉症例、とくに無症状例に対する取扱いが問題となった。そのため、追加調査の必要性が示された。今回、未回収例167例を含む350例に対し追加調査を行い、Cox回帰分析（ステップワイズ法）による多変量解析によって発癌に影響を与える因子を解析し、発癌から見た肝内結石症の取扱いについて検討する。

A. 研究目的

2007年度、第5期全国調査（1998年度）の登録症例を対象にコホート調査を施行した。今回、疫学ワーキングにおいて、このコホート調査のデータを用いCox回帰分析によって、発癌に影響を与える因子を解析した。その結果、全症例（258例）を対象にした解析では治療における切石のみは胆管癌発生のリスクを上げ（ハザード比2.482）、UDCA内服は発癌のリスクを下げる因子として抽出された（ハザード比0.257）。また、胆道手術の既往がない症例（143例）を対象に解析すると、左葉症例は発癌のリスクを上げる因子であり（ハザード比11.830）、肝切除術は発癌のリスクを下げる因子として抽出された（ハザード比0.077）。これより発癌からみた肝内結石症の取扱いとしては、肝切除術とUDCA内服を推奨する結果となったが、左葉症例、特に無症状の左葉症例に対する取扱いが問題となり、さらなる検討が必要と考えられた。そこで、コホート調査の対象症例を考えると167例の未回収例があった（図1）。より精度の高い解析を行うためには標本数を増やすべきであり、未回収例の取扱いが問題となる。そのため、追加調査が必要と考えられた。

研究の目的は、肝内結石症の長期成績（生存分析、胆管癌発生、結石再発）を統計学的アプローチによって解析することである。特に、発癌に注目し、病像や治療の介入、臨床経過がどの程度発癌に影響するかを解析することがを主たる目的である。

B. 研究方法

〔調査対象〕

第5期全国調査（1998年度）登録症例473例のうち、1998年時死亡例26例、2006年時死亡例49例、Drop Out48例を除いた350例（図1）。

これらに対し、経過中の問題点、合併症の有無・内容、転帰に関する調査票（図2）を作成、送付し解析する。

〔解析方法〕

まず、性別、年齢、臨床症状（疼痛、発熱、黄疸、肝機能障害）、結石種類（ビリルビン結石、コレステ

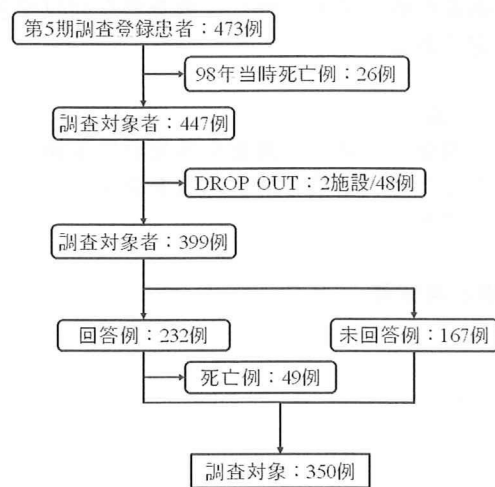


図1. 調査対象

The survey form is titled '肝内結石症個人調査票' (Liver Stone Disease Individual Survey Form). It includes fields for patient name, sex, date of birth, and facility name. It also has checkboxes for various symptoms and treatments, such as '胆管癌の有無' (Presence of cholangiocarcinoma), '胆管炎の有無' (Presence of cholangitis), and '胆管手術の有無' (Presence of biliary surgery). There are sections for '合併症' (Comorbidities) and '現在の状況' (Current status), with options for '生存' (Alive), '死亡' (Deceased), and '不明' (Unknown). The form is designed to collect detailed clinical and outcome data for each patient.

図2. 調査票

ロール結石)、結石存在部位（肝内のみ、肝内外）、結石存在葉（右葉、左葉、尾状葉、単数葉 vs. 複数葉）、既往胆道手術（肝切除術、胆道再建、切石のみ）、治療内容（肝切除（肝内胆管病変切除）、胆道再建、切石のみ（胆管切開切石、内視鏡治療、PTCSL含む（肝内胆管病変切除（-）+胆道再建（-））、退院時間問題

点（結石遺残，胆道狭窄，胆道拡張），経過中問題点（胆管炎，一過性黄疸，一週間以上持続する黄疸，敗血症，胆道狭窄），結石再発，UDCA 内服を検討項目として，胆管癌発生を目的変数として Kaplan-Meier 法にて単変量解析を行う。年齢は ROC 解析にて Cut-Off 値を設定する。単変量解析にて $p < 0.2$ となった項目に対して，Cox 回帰分析（ステップワイズ法）を行い，発癌に影響を与えと思われる因子を抽出する。

C. 研究結果

現在，調査票を発送し調査を各施設に依頼している段階であるため，結果の解析は調査票を回収でき次第行う予定である。

D. 考 察

現在，調査票を発送し調査を各施設に依頼している段階であるため，結果の解析は調査票を回収でき次第行う予定である。

E. 結 論

現在，調査票を発送し調査を各施設に依頼している段階であるため，結果の解析は調査票を回収でき次第行う予定である。

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）

分担研究報告書

上五島地域における肝内結石症の長期予後調査

研究協力者 八坂 貴宏 長崎県上五島病院 外科 院長

研究要旨：長崎県上五島地域において原発性肝内結石症220例の長期予後を検討した。生存例146例では、118例（80.8%）で良好な経過が得られていた。死亡例74例のうち、肝内胆管癌13例（5.9%）、胆管炎、敗血症、肝不全死6例（2.7%）を認め、肝内結石症に起因すると思われる関連死亡は19例（8.6%）であった。治療後経過不良例や肝内胆管癌併発例は、肝葉萎縮のある左葉あるいは両葉型が多く、遺残・再発結石や既往手術としての胆道再建術が高頻度に認められた。

治療にあたっては、肝葉萎縮や結石存在部位の診断を的確に行い、肝切除術やPTCSLなどによる萎縮肝切除や完全截石を目指し、不容易な胆道再建手術は慎むべきであると考えられた。また、肝葉萎縮を伴わない末梢型肝内結石症は、長期に無症状で経過することが分かっており、積極的な経過観察が推奨されると考えられた。

A. 研究目的

肝内結石症は難治性で不適切な治療により胆管炎症状を繰り返す症例が見られるが、一方無症状で良好に経過するものや治療後軽快あるいは治癒する症例も多く、その臨床経過は一定ではない。また、最近では患者の高齢化にともない肝内胆管癌の併発例が増えており、予後を規定する因子となりつつある。

今回、長崎県上五島地域における肝内結石症の長期予後を調査し、肝内結石症に起因すると思われる死亡例について検討し、治療法の評価を行った。

B. 研究方法

長崎県上五島地域において、1981年～2009年に上五島病院で診断・治療された肝内結石症で全臨床経過が評価できた220例を対象とした。

診断時年齢は12～86歳、平均58.8歳、性別は男性97例、女性116例で、観察期間は0.5～29年、平均16.8年であった。

病型は、IL型70例、IR型84例、ILR型14例、IE,L型30例、IE,R 9例、IE,LR型13例であった。

調査は、肝内結石症の長期予後を生存例と死亡例に分けて行い、生存例については診断後あるいは治療後の状態を、①入院治療を要する、②外来治療を要する、③良好に経過に分類、死亡例は①肝内胆管癌、②胆管炎、敗血症、肝不全、③その他に分類した。また、これらの症例に関して、肝葉萎縮の有無、病型、治療方法、遺残・再発結石の有無などについての検討し、治療法の適否を評価した。

C. 研究結果

1) 肝内結石症の長期予後

生存例は146例で、入院治療を要するもの22例、外来治療を要するもの6例、経過良好118例（80.8%）であり、おおむね良好な結果が得られていた。

死亡例は74例で、死因は肝内胆管癌13例（5.9%）、肝臓癌5例（2.3%）、胆嚢・胆管癌3例、その他の癌6例（2.7%）、胆管炎、敗血症、肝不全6例（2.7%）、

その他の病死39例（17.6%）であった。肝内胆管癌+胆管炎、敗血症、肝不全を肝内結石症の関連死亡とすると、 $19/220=8.6\%$ が関連死であった。（表1）

表1. 肝内結石症の長期予後

予後	予後の詳細	症例数
生存例	入院治療を要する	22
	外来治療を要する	6
	良好	118
	合計	146
死亡例	肝内胆管癌	13
	肝臓癌	5
	胆嚢癌、胆管癌	3
	その他の癌	8
	胆管炎、敗血症、肝不全	6
	その他	39

表2. 肝内結石症の長期予後

予後	肝葉萎縮	病型	治療	遺残再発
入院治療を要する(22)	有18 無4	IL4,LR3,R6 IE:L7,LR2	肝切除+再建10,肝切除2, 截石+再建4,截石4,無1	有17 無5
外来治療を要する(6)	有6	IL3,LR1,R1 IE:LR1	肝切除+再建1,肝切除5	有3 無3
経過良好(118)	有28 無90	IL38,LR4,R58 IE:L9,LR2,R7	肝切除+再建1,肝切除24 截石+再建1,截石6,無86	

3) 肝内結石症関連死亡例に関する検討

肝内結石症の関連死亡例19例について、肝葉萎縮の有無、病型、既往手術、最終の治療方法、遺残・再発結石の有無を調査した。

肝内胆管癌症例では、肝葉萎縮が12例（92.3%）に認められ、病型はIL型5例、IR型3例、IE,L型2例、IE,LR型3例であった。既往手術は10例にあり、その術式は、肝切除+胆道再建術3例、截石+胆道再建

術3例で、計6例(46.2%)に胆道再建術が行われていた。また、10例(76.9%)に遺残・再発結石を認めた。

胆管炎、敗血症、肝不全症例では、肝葉萎縮が5例(83.3%)に認められ、病型はIL型2例、IE,L型2例、IE,LR型2例であった。既往手術は5例にあり、その術式は、截石+胆道再建術3例、截石のみ2例で、肝切除は行われていなかった。また、全例に遺残・再発結石を認めた。(表3)

表3. 死亡例の病型, 既往手術, 治療法, 遺残・再発結石

死因	肝葉萎縮	病型	既往手術	最終の治療	遺残再発
肝内胆管癌(13)	有12 無1	IL5,LR3 IE,L2,LR3	有10,初発3 肝切除+再建3, 肝切除2 截石+再建3, 截石2	肝切除5 治療不可8	有10
胆管炎, 敗血症, 肝不全(6)	有5 無1	IL2 IE,L2,LR2	有5 截石+再建3, 截石2	ドレナージ4 保存的2	有6

D. 考 察

肝内結石症は病態が複雑で、治療を行っても結石の遺残や再発、逆行性胆管炎、敗血症をきたし肝不全に至る例や肝内胆管癌の併発により不幸な転帰をとる例が少なくない。しかし、一方では上五島地域で多数発見されている無症候性肝内結石症は長期に無症状で経過することが知られており、個々の症例の臨床経過、予後は一定ではない。

そこで、今回、長崎県上五島地域における肝内結石症の長期予後を調査し、生存例および肝内結石症に起因すると思われる死亡例について、肝葉萎縮の有無、病型、治療方法、遺残・再発結石の有無等についての検討し、治療法の適否を評価した。

生存例は146例では、経過良好な症例が118例(80.8%)であり、治療や経過観察によりおおむね良好な結果が得られていた。死亡例74例のうち、肝内胆管癌13例(5.9%)、胆管炎、敗血症、肝不全6例(2.7%)を認め、肝内結石症に起因すると思われる関連死亡は8.6%であった。

生存例のうち、入院あるいは外来治療を要する症例では、肝葉萎縮が24例(85.7%)に認められ、病型ではL型14例(50%)、IE型10例(35.7%)で、萎縮のある左葉型が多く、肝内外型の頻度も経過良好群に比べて高かった。治療は肝切除+胆道再建術11例、截石+胆道再建術4例で、53.6%に胆道再建術が行われており、また20例(71.4%)に遺残・再発結石を認めた。結石の残った例に胆道再建術式が選ばれたものと考えられ、これがかえって予後を悪化する要因となることが示唆される。初診時における的確な結石存在部位診断、萎縮部位の切除、完全截石が重要であり、胆道再建術は原則行うべきではないと考える。また、肝葉萎縮を伴わない末梢型肝内結石症は、長期に無症状で経過することが分かり、積極的な経過観察が推奨されると考えられた。

肝内胆管癌症例では、肝葉萎縮が12例(92.3%)に認められ、病型はL型7例(53.8%)、LR型6例(46.2%)、IE型5例(38.5%)であった。これも、生存予後不良例と類似して、萎縮のある左葉あるいは両葉型が多かった。既往手術は10例にあり、その術式は、肝切除+胆道再建術3例、截石+胆道再建術3例、肝切除術2例、截石術2例であり、6例(46.2%)に胆道再建術が行われ、萎縮があるにもかかわらず肝切除が行われていない症例が5例(38.5%)認められた。また、10例(76.9%)に遺残・再発結石を認めた。萎縮部位の温存、遺残・再発結石や胆道再建術による逆行性感染繰り返しが肝内胆管癌発生の要因になっている可能性が示唆された。

胆管炎、敗血症、肝不全症例では、肝葉萎縮が5例(83.3%)に認められ、病型はL型4例(66.7%)、LR型2例(33.3%)、IE型5例(83.3%)であった。既往手術は5例すべてが截石術であり、胆道再建術も3例に行われていた。また、全例に遺残・再発結石を認めた。これらの症例でも、萎縮部位の温存、遺残・再発結石や胆道再建術に伴う胆管炎から敗血症、肝不全への移行が推察された。

以上のことから、肝葉萎縮の残存(結石発赤母地の残存)、遺残・再発結石、不容易な胆道再建手術は、難治例や肝内胆管癌併発の原因になる可能性が考えられ、初診時に的確な診断、肝切除術やPTCSLなどの確な治療を行う必要があると思われる。

E. 結 論

1. 肝内結石症220例の長期予後を検討した。
2. 肝内結石に関連する死亡は、肝内胆管癌13例、胆管炎・敗血症、肝不全6例の19例で、全体の8.6%であった。
3. 治療後の症例で、肝葉萎縮の残存、截石術のみでの遺残、再発結石、胆道再建術を行っている症例は、胆管炎、敗血症および肝内胆管癌を高率に合併し、不幸な転帰をとる症例が認められ、初回治療の重要性が示唆された。
4. 肝葉萎縮症例には肝切除術、萎縮のない症例には結石の完全截石を行うことが重要である。
5. 肝葉萎縮を伴わない末梢型肝内結石症は、治療を行わず、積極的な経過観察が推奨されると考えられた。

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

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

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

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：昨年度の本学会議で、我々は肝内結石症に合併した biliary intraepithelial neoplasia (BiIN) と胆管癌では、免疫組織化学的に heat shock protein (HSP) 27の発現が高率にみられることを報告した。今回、胆汁中 HSP27の胆管癌の腫瘍マーカーとしての有用性を検証した。胆石症（胆嚢・総胆管結石）12症例と肝門部～肝外胆管癌（肝内結石非合併例）13症例の PTCD 胆汁中の HSP27濃度を測定した結果、胆石症での HSP27濃度は 1.61 ± 2.25 ng/ml、胆管癌は 7.04 ± 8.36 ng/ml であり、胆管癌において有意に高値を示した ($p = 0.041$)。カットオフ値を2.0ng/mlとした場合、胆管癌の腫瘍マーカーとしての感度は90.9%、特異度は78.6%であった。また、免疫組織化学による検討で、HSP27の発現は胆石胆嚢炎の胆嚢上皮で正常胆嚢上皮より高率にみられ、さらに胆管癌（肝内結石非合併例）でより高率であった。今回の解析対象に肝内結石症は含まれていないが、以上の結果から PTCD 胆汁中の HSP27を測定することが、肝内結石症においても胆管癌を診断する上で補助診断の一つとなる可能性が示唆された。特に現在、BiIN は画像的に検出できない病変であり、胆汁中 HSP27の定量が BiIN の発見に貢献しうる検査方法の候補の一つと考えられた。

A. 研究目的

Heat shock protein (HSP) は熱ショックなどに対するストレス応答蛋白であり、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。低分子量 HSP の一つである HSP27は抗アポトーシス効果を有し、胆管癌や膵癌で過剰に発現していることが報告されている。膵癌では血中 HSP27が上昇し、これが膵癌の腫瘍マーカーとなりうるとの報告がある。

昨年度の本学会議で、我々は肝内結石症に合併した biliary intraepithelial neoplasia (BiIN) と胆管癌では、免疫組織化学的に HSP27の発現が肝内結石症 (BiIN・胆管癌非合併例) より高率にみられることを報告した。また、HSP27は分泌蛋白であることから、特に胆汁中の HSP27が肝内結石症からの鋭敏な発癌予測バイオマーカーとなりうる可能性を指摘した。

今回、胆汁中 HSP27の胆管癌の腫瘍マーカーとしての有用性を検証した。

B. 研究方法

胆石症（胆嚢・総胆管結石症）および胆管癌（肝門部～肝外胆管癌；肝内結石症の合併なし）を対象疾患とした。肝内結石症は十分な症例数の胆汁サンプルを収集できなかったことから、今回は解析対象としない。

(1) HSP27免疫組織化学：

外科的切除材料のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対し、抗 HSP27抗体を用いた免疫染色を行った。対象症例は正常胆嚢（胃癌手術時の胆摘）13例、胆石胆嚢炎11例、胆管癌12例。胆嚢上皮および癌細胞における HSP27の発現強度を 2+, 1+, 0 の3段階で評価した。統計学的検討は Spearman's rank correlation による。

(2) 胆汁中 HSP27濃度の測定：

胆汁は PTCD により採取されたものを使用した。対象症例は胆石症12例、胆管癌13例。HSP27濃度は

ELISA kit (Stressgen) を用いて測定した。統計学的検討は t 検定による。

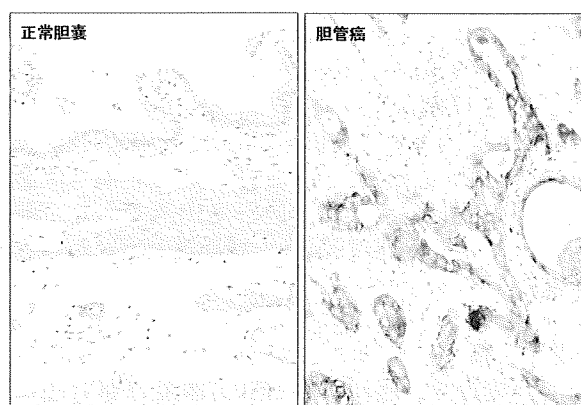


図1 HSP27免疫染色

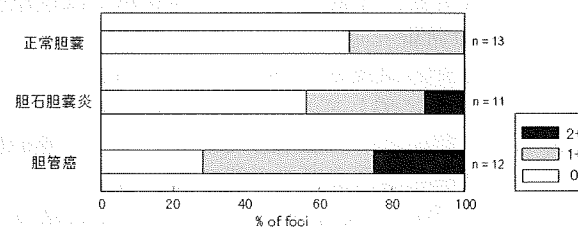


図2 HSP27免疫染色の半定量的評価結果

C. 研究結果

(1) HSP27免疫組織化学：

正常の胆嚢上皮における HSP27の発現はないかあってもわずかであったが、胆石胆嚢炎や胆管癌では様々な程度に陽性所見を認めた (図1)。免疫染色の結果を半定量的に評価したところ、HSP27の発現は正常胆嚢 < 胆石胆嚢炎 < 胆管癌の順に強くなり、この

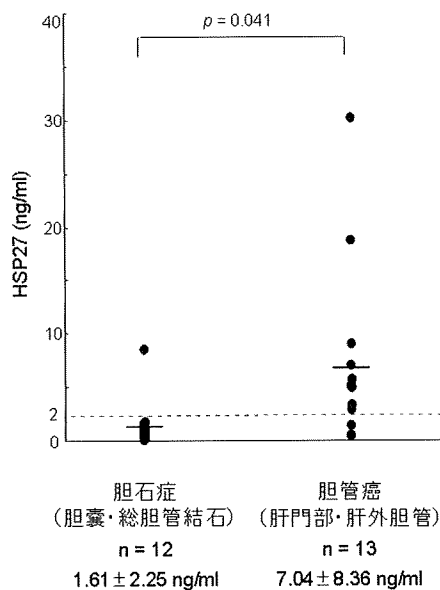


図3 PTCD胆汁中のHSP27濃度

3群間に統計学的有意差 ($p < 0.01$) を認めた (図2)。(2) 胆汁中 HSP27濃度:

PTCD 胆汁中の HSP27濃度を測定した結果を図3に示す。胆石症での HSP27濃度は $1.61 \pm 2.25 \text{ ng/ml}$ ($n=12$)、胆管癌は $7.04 \pm 8.36 \text{ ng/ml}$ ($n=13$) であり、胆管癌において有意に高値を示した ($p=0.041$)。カットオフ値を 2.0 ng/ml とした場合、カットオフ値をこえる症例数は胆石症 1 例、胆管癌 10 例であり、腫瘍マーカーとしての感度 90.9% 、特異度 78.6% という結果を得た。

D. 考 察

今回の検討で、胆汁中の HSP27濃度は胆管癌において胆石症よりも有意に高いことが明らかとなった。組織切片を用いた免疫染色による検討でも、胆管癌における HSP27の発現は、正常胆嚢や胆石胆嚢炎の胆管上皮よりも有意に亢進していた。胆管癌では癌細胞での HSP27の発現亢進があり、これが胆汁中に分泌され胆汁中 HSP27濃度が上昇していると考えられる。

胆汁サンプルに関して、今回は PTCD 胆汁のみを解析対象とした。データは示していないが、予備的検討において良性胆道系疾患の手術の際、術中にサンプリングされた胆汁 (数症例) を用いて HSP27濃度を測定したところ、いずれも予測される値の 5 倍前後の高い測定値が得られた。PTCD 胆汁と術中胆汁では水分含量などの組成が異なるために生じた結果と思われるが、術中胆汁の HSP27濃度やその評価に関してはさらなる検討が必要と思われる。

我々は昨年度の本班会議で、肝内結石症に合併した BilIN や胆管癌では、免疫組織化学的に HSP27の発現が高率にみられることを報告した。今回の検討結果をふまえると、BilIN や胆管癌を合併した肝内結石症においても、PTCD 胆汁中の HSP27濃度が上昇してい

る可能性が充分考えられる。このことは PTCD 胆汁中の HSP27を測定することが、肝内結石症においても胆管癌を診断する上で補助診断の一つとなる可能性を示唆している。特に現時点では BilIN は画像的に検出できない病変であることから、胆汁中 HSP27の定量が BilIN の発見に貢献しうる検査方法の有力な候補の一つと言える。

E. 結 論

胆汁中 HSP27は胆管癌の腫瘍マーカーとして有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itatsu K, Sasaki M, Nakanuma Y et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear translocation of nuclear factor- κ B are involved in upregulation of matrix metalloproteinase-9 by tumour necrosis factor- α . *Liver Int* 29;291-8, 2009
- 2) Itatsu K, Sasaki M, Nakanuma Y et al. Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 174;829-41, 2009
- 3) Nakanishi Y, Zen Y, Nakanuma Y et al. Intraductal oncocytic papillary neoplasm of the bile duct: the first case of peribiliary gland origin. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16;869-73, 2009
- 4) Nakanishi Y, Kondo S, Nakanuma Y et al. Impact of residual in situ carcinoma on postoperative survival in 125 patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009 (Epub ahead of print)
- 5) Nakanuma Y, Zen Y, Harada K et al. Tumorigenesis and phenotypic characteristics of mucin-producing bile duct tumors: an immunohistochemical approach. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009 (Epub ahead of print)
- 6) Sasaki M, Yamaguchi J, Nakanuma Y et al. Polycomb group protein Bmi1 is overexpressed and essential in anchorage-independent colony formation, cell proliferation and repression of cellular senescence in cholangiocarcinoma Tissue and culture studies. *Hum Pathol* 40;1723-30, 2009
- 7) Onodera M, Zen Y, Nakanuma Y et al. Fascin is involved in tumor necrosis factor-alpha-dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma. *Lab Invest* 89;1261-74, 2009
- 8) Nakanuma Y, Sasaki M, Sato Y et al. Multistep

carcinogenesis of perihilar cholangiocarcinoma arising in the intrahepatic large bile ducts. World J Hepatol 15;35-42, 2009

- 9) 中沼安二. 胆道癌病態解明への新たな一歩. 肝胆膵 58;705-7, 2009
- 10) 全陽, 中沼安二. 胆管上皮内腫瘍に関する話題: 胆管上皮腫瘍/前がん病変の分類. 肝胆膵 58;709-14, 2009
- 11) 上田和彦, 角谷眞澄, 中沼安二他. 胆管上皮内腫瘍に関する話題: 粘液産生性胆管腫瘍の画像所見. 肝胆膵 58;809-15, 2009
- 12) 全陽, 中沼安二. 膵・胆道系腫瘍のトピックス - 粘液産生性腫瘍を中心に - 胆道粘液産生性腫瘍の病理診断. 病理と臨床 27;546-53, 2009
- 13) 中沼安二, 原田憲一, 木村康他. 胆道癌の病理診断. 消化器外科 32;1715-25, 2009
- 14) 中沼安二, 佐々木素子, 佐藤保則他. 肝、胆管発癌における cancer stem cell の役割. 肝胆膵 59;639-47, 2009

2. 学会発表

- 1) Harada K, Nakanuma Y. A case of extrahepatic cholangiocarcinoma mimicking IgG4-related sclerosing cholangitis -cholangiocarcinoma and IgG4 reaction- Showa Pathology Seminar for Pancreatobiliary disease 2009
- 2) 佐々木素子, 山口淳平, 中沼安二他. 肝内胆管癌におけるポリコム群蛋白 Bmi1 の発現とその意義. 第98回日本病理学会総会
- 3) 佐藤保則, 下村修治, 中沼安二他. 胆管癌の浸潤・転移機構における上皮-間葉転換 (EMT) の関与. 第45回日本肝臓学会総会
- 4) 松原厚志, 久野敦, 中沼安二他. レクチンマイクロアレイシステムを用いた胆管癌新規糖タンパク質腫瘍マーカー開発. 糖質学会年報
- 5) 松原厚志, 久野敦, 中沼安二他. 新規肝内胆管癌糖タンパク質マーカーの開発. 分子腫瘍マーカー研究会
- 6) 佐々木素子, 中沼安二. 嚢胞形成性肝内胆管腫瘍の臨床病理学的検討. 第45回日本胆道学会学術集会
- 7) 佐藤保則, 中沼安二. 肝内結石症からの発癌過程における HSP27 の発現と腫瘍マーカーとしての意義. 第45回日本胆道学会学術集会
- 8) 木村康, 原田憲一, 中沼安二他. 高度な IgG4 陽性形質細胞の浸潤を伴った肝外胆管癌の1例. 第45回日本胆道学会学術集会
- 9) 五十嵐紗耶, 原田憲一, 中沼安二他. 肝内胆管癌および前癌病変における幹細胞マーカーの発現. 第38回日本肝臓学会西部会

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

胆道再建既往を有する肝内結石症の治療成績

研究協力者 椰野 正人 名古屋大学大学院医学研究科 腫瘍外科 教授

研究要旨：当科で過去10年間に治療経験のある肝内結石症60例のうち、20例（33.3%）が胆道再建の既往を有しており、その治療成績を検討し報告する。男性3例、女性17例、平均年齢51歳であった。胆道再建が施行された原疾患は先天性胆道拡張症が12例を占めていた。20例中3例に肝内胆管癌が併発していた。治療法はPTCSによる切石9例、小腸内視鏡を用いて切石を試みた症例1例、肝切除5例、胆管空腸吻合部切除+胆道再建1例、経過観察1例、胆管癌併発3例に癌の進展に応じた肝切除を施行した。肝内胆管癌を併発していた症例が1例癌死したが、他の19例は肝内結石症の再発なく健在である。

共同研究者

菅原 元 名古屋大学大学院医学研究科 腫瘍外科

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患であるが、治療後も再発を繰り返すことが少なくない難治性疾患である。最近では生活環境の衛生状態や、回虫、HTLV-1が関与するいわゆる一次性肝内結石症の新規発症例は減少し、代わって過去に胆道系の手術既往を有する二次性肝内結石症の発症が増加している。肝内胆管癌は肝内結石症の重大な合併症であり、肝内結石症患者の重要な生命予後規定因子として位置づけられている。これは肝内結石症に胆管癌が発生した場合の予後が極めて不良なためである。これらのことより肝内胆管癌の早期発見のために、肝内結石症を発症する可能性がある症例を把握して、経過を追跡しておく必要があると考えられる。過去に胆道再建術が施行されている症例は、肝内結石症を発症する可能性が高いことが知られている。今回われわれは当科で経験した胆道再建術の既往を有する肝内結石症の治療成績を検討しその問題点を考察した。

A. 研究方法

2000年1月より2009年12月までの期間に当科で新規に経験した肝内結石症は60例であった。初診時の年齢は25～81歳（平均59歳）で男性23例、女性37例であった。このうち肝内胆管癌を併発した症例は14例（23.3%）であった。肝内結石症60例中、過去に胆道再建術の既往を有するものは20例（33.3%）であり、これら20例の治療成績について検討を行った。

B. 研究結果

過去に胆道再建術の既往を有する肝内結石症20例の結石症発症時の年齢は25～81歳（平均51歳）、男性3例、女性17例であった。20例中、肝内結石の存在部位は、肝内型が19例、肝内外型が1例（当該症例は右肝管後枝空腸吻合術施行）であり、右葉型が4例、左葉型が8例、両葉型が8例であった。

胆道再建を施行された際の原疾患は先天性胆道拡張症 12例、総胆管結石 2例、以下 肝内結石症、胆

石症、膵炎、膵SPT、膵癌、胆管癌が各々1例ずつである。術式は、先天性胆道拡張症 12例に対し肝外胆管切除+胆管空腸吻合、総胆管結石 2例に対し肝外胆管切除+胆管空腸吻合、肝内結石症に対し肝外側区域切除+胆管空腸吻合、胆石症に対し胆嚢摘出術+右肝管後枝空腸吻合術、膵炎に対しPuestow手術+乳頭形成が施行され、さらにその後胆管十二指腸吻合が施行された。膵SPT、膵癌、胆管癌に対して膵頭十二指腸切除が施行された。胆道再建が施行されてから当科に紹介されるまでの期間は、1～26年（平均13年）であった。前医よりの紹介状で肝内結石症に対しPTCSを施行している症例が少なくとも5例あるもので、実際の胆道再建から初回の肝内結石症に対する治療を開始するまでの期間はさらに短くなる。当科での治療開始時に肝内胆管癌を併発していたものは3例である（うち1例は先天性胆道拡張症手術時に胆管癌を合併していた症例で、当科受診時には胆管癌再発を認めた）。癌を併発していない17例に対する治療はPTCSによる切石 9例、小腸内視鏡を用いて切石を試みた症例 1例、肝右葉切除+胆管空腸吻合 2例、肝左葉切除+胆管空腸吻合 2例、吻合部を温存した肝左葉切除 1例、胆管空腸吻合部を切除し再吻合施行 1例、経過観察している症例が1例である。癌を併発した3例に対しては、それぞれ癌の進展度に応じ、肝右葉切除+胆管空腸吻合 1例、肝左3区域切除+門脈動脈合併切除再建 1例、肝左3区域切除+膵頭十二指腸切除+門脈動脈合併切除再建 1例、をそれぞれ施行した。治療終了後は平均観察期間4年（0～10年）、肝内結石症の再発を認めない（胆管癌併発1例が術後1年で癌死している）。

C. 考察

過去10年間に当科で新規に経験した肝内結石症60例のうち、20例で過去に胆道再建の既往を有することが判明した。胆道再建の既往を有する症例で肝内結石症の発症が比較的多い原因として、①吻合部狭窄、②肝内胆管の拡張と胆汁うっ滞、③胆汁うっ滞に伴う持続する胆管炎の存在、が考えられる。胆道再建施行により、ある程度の胆管炎の存在はほぼ必発であるので、胆道再建後は常に肝内結石症の発症に注意して経過観

察する必要がある。術後に胆管炎を頻回に発症する場合は、吻合部狭窄の可能性も念頭に置いて対処すべきである。必要があれば経皮経肝胆道ドレナージ(PTBD)を施行し、吻合部狭窄に対する治療を開始すべきである。胆道再建後に縫合不全を発症すると、縫合不全の治癒過程で吻合部狭窄を発症する可能性が高く、より注意深く経過観察する必要があると考えられた。

胆道再建後に肝内結石症を発症した20例の原疾患で、先天性胆道拡張症が12例を占めている事実も興味深い。胆道再建が必要な疾患に占める先天性胆道拡張症の割合より明らかに高いと考えられる。胆道再建を施行することで肝内結石症を誘発している可能性もあるが、先天性胆道拡張症の肝内胆管に肝内結石症を発症しやすい原因が存在するのかもしれない。今後の研究成果が待たれるところである。

胆道再建が施行されてから当科に紹介されるまでの期間は、1～26年(平均13年)であった。胆道再建が他施設で行われている症例が19例であり、胆道再建から当科での治療を開始するまでの期間の治療や経過が必ずしも明らかではない症例も多い。故に肝内結石症発症までの期間とその病態との関係については、今回は詳細な検討を行うことができなかった。

治療は、胆道再建がしてあるために内視鏡的アプローチが難しいことが多く、PTBDを適切に行うことが治療の第一歩となる。当科ではMDCTの所見を参考に、PTCSが行いやすい胆管を想定して、映像下直達式でPTBDを留置している。PTBD瘻孔がその後の肝内結石の治療の鍵を握るといっても過言ではないので、適切なルートを選択する必要がある。

切石完了後、PTBD tube挿入により吻合部狭窄が改善され、かつ肝萎縮がなければ経過観察が可能である。PTBD tube挿入により吻合部狭窄が改善されない場合は、胆管空腸吻合部切除および胆道再建もしくは、肝切除+胆道再建が適応となる。さらに肝萎縮が明らかである場合には、萎縮肝の切除が望ましい。肝内結石症による萎縮肝葉は胆管癌の発生母地となる可能性が高いため、萎縮肝葉切除は合理的な治療法と考えられる。MDCTで腫瘍性病変が認められる場合、およびPTCS終了後の胆管生検で悪性病変が検出された場合には、悪性病変の進展度に応じ適切な肝切除を施行する必要がある。

先天性胆道拡張症術後の肝内結石症1例に対し、小腸内視鏡を用いて内視鏡的切石を試みた。小腸内視鏡と経乳頭切石の技術を組み合わせる必要があるのですが、すべての施設で可能な手技ではないが、今後発展していく可能性がある技術と考えられる。

2007年のコホート調査では肝内結石症の5.4%に胆道癌の発生を認めている。その他の本邦報告例では肝内結石症に肝内胆管癌が発生する頻度は4%から12.5%程度とされている。当科では過去10年間の肝内結石症の23.3%に胆管癌の発生を認め、胆道再建の既往を有する症例では15%の症例で胆管癌の発生を認めた。胆道再建の既往があり肝内結石症を発症する可能

性が高い症例では、肝内胆管癌の発生を念頭に経過観察する必要がある。

今回の検討で取り上げた胆道再建の既往がある20例中、先天性胆道拡張症および膵SPT、膵癌、胆管癌に対する胆道再建15例は、胆道再建が必要な術式である。しかし胆石症、総胆管結石、肝内結石および膵炎に対する胆道再建は、自然落石を期待して安易に胆道再建が施行された可能性がある。肝内結石症ひいては肝内胆管癌の発生を予防するためには、このような安易な胆道再建は治療手段の第一選択とはすべきではないと考える。

E. 結 論

当科で過去10年間に経験した肝内結石症60例中、20例に過去胆道再建術が施行されていた。胆道再建の既往を有する症例の経過観察では、肝内結石症および癌の発生を念頭においた注意深い経過観察による早期診断が重要であるとともに、その診断の精度を向上させる取り組みも必要である。

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）

分担研究報告書

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

研究協力者 本多 政夫 金沢大学大学院 先端医療技術学講座 教授

研究要旨：肝内結石症は肝内胆管癌の高危険群であるが早期発見に有用な診断法はない。今回胆汁における遺伝子発現解析を試みたところ、total RNA 抽出は困難であったが microRNA (miRNA) は抽出及び発現解析が可能であった。そこで胆道系悪性腫瘍群 5 例、非腫瘍群 3 例の胆汁を用いて miRNA を抽出し、miRNA 380 種につき発現を比較検討したところ、悪性腫瘍群で発現が変化する miRNA 9 種を同定可能であった。今後症例を蓄積することでマーカー候補となる miRNA を抽出できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝内胆管結石は悪性腫瘍、特に肝内胆管癌の高危険群として認知されている。そのため嚴重な経過観察がなされるが、近年進歩の著しい各種画像診断法によっても早期診断が困難なため、早期発見が難しく進行した状態で発見される症例も多い。従来、腫瘍マーカーとなる蛋白や遺伝子発現の解析には血液もしくは組織サンプルが用いられてきたが、前者には特異的なマーカーが存在せず、後者は採取に侵襲を伴うため汎用可能とは言い難い。肝内胆管癌は肝内胆管より発生する悪性腫瘍であり、胆管に露出していると考えられることから、胆汁に影響を与える可能性が高い。今回我々は胆汁における遺伝子発現プロファイルを解析するための手法を確立すべく検討を行った。

B. 研究方法

まず胆汁から total RNA の抽出を試みた。今後の多施設共同研究を念頭に置いて、市販の total RNA 抽出キット (RiboPure™-Blood kit 及び RNAqueous®-Micro kit, いずれも Ambion, Inc.) を用いた。

同時に胆汁の至適保存方法について検討した。新鮮胆汁、その遠心後上清及び沈殿、更には検体中の RNA を安定化し崩壊を防ぐとされる RNAlater® (Ambion, Inc.) の添加も試みた。また凍結保存された胆汁についても検討した。

その結果を踏まえ、遺伝子翻訳を阻害すると考えられ最近注目されている microRNA (miRNA) に着目し、胆汁より抽出を試みた。凍結保存されていた胆汁を遠心後得られた上清より、mirVana™ PARIS™ (Ambion, Inc.) を用いて miRNA を抽出し、代表的な miRNA (RNU6B, miR-16, miR-24, miR-26b, miR-92, miR-374) について RT-PCR を行い、発現を確認した。

その上で、肝内胆管癌を含む胆道系悪性腫瘍 5 例 (腫瘍群)、良性疾患 3 例 (非腫瘍群) より得られた胆汁サンプルを用いて miRNA を抽出し、Megaplex™ Primer Pools (Ambion, Inc.) による逆転写・増幅後、TaqMan™ MicroRNA Array (同) を用いて 380 種の miRNA に関し発現解析を行い、両群を比較することで胆道系悪性腫瘍における miRNA の発現変化を検討した。

C. 研究結果

まず total RNA は胆汁サンプルの保存法によらず、いずれの方法によっても抽出不能であった。

そのため、種々の条件においても安定と報告されている miRNA に注目し、前述の方法により抽出及び RT-PCR を行ったところ、解析した 6 種の miRNA 全てにおいて発現が確認された。以上より胆汁上清からの miRNA 抽出と発現解析は可能と判断した。

そこで腫瘍群、非腫瘍群において、380 種の miRNA を一期的に発現解析した。両群を比較検討したところ、腫瘍群において発現亢進する miRNA を 3 種、発現減弱するものを 6 種同定可能であった。発現亢進する miRNA には、PTEN 癌抑制遺伝子を阻害する機能を有するものや、免疫応答や癌の進行に関連する NF- κ B 遺伝子を抑制するものが含まれていた。

D. 考察

胆汁は血液や体組織とは pH や組成が大きく異なり、また析出物も多く、通常の total RNA は胆汁中に流出した時点で速やかに崩壊するものと考えられた。これに対し、miRNA は通常の total RNA とは異なり非常に短い塩基配列を有する non-coding RNA であり、通常は崩壊するような環境下においても安定し存在しうるとされている。今回、凍結保存された胆汁からも抽出及び発現確認が可能であり比較的安定であった。

胆道系悪性腫瘍合併症例より得られた胆汁を解析し、非腫瘍群の発現プロファイルと比較したところ、興味深い発現変化が確認された。特に腫瘍群で発現が亢進する miRNA には、癌抑制遺伝子を阻害するなど、腫瘍マーカーとなりうる候補 miRNA が含まれており、今後更に症例を蓄積して検討する必要があると考えられた。

E. 結論

胆汁からの total RNA 抽出は困難であるが、microRNA は適切な保存と抽出用キットを用いることで発現解析が可能であった。

悪性腫瘍群と非腫瘍群を比較検討することで、胆道系悪性疾患に特異的な発現プロファイルを同定し、腫瘍マーカー候補を抽出できる可能性が示唆された。

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）

分担研究報告書

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

研究協力者 露口 利夫 千葉大学大学院医学研究院 腫瘍内科学 講師

研究要旨：【目的】先天性胆道拡張症術後に肝内結石を合併し胆管炎を併発する例は、しばしば治療に難渋することがある。先天性胆道拡張症術後で当院にて経過観察中に肝内結石を合併した症例について検討し、当院における治療方針について考察した。

【対象と方法】1996年1月から2010年1月まで当院を入院していた先天性胆道拡張症術後に肝内結石を発症した10例を対象とした。男女比は2対8。分流手術時の年齢は平均16.8歳（5か月～34歳）、初回結石診断時の年齢は平均32.5歳（14歳～56歳）、戸谷分類ではIa型が1例、IV-A型が9例であった。観察期間内における結石の再発や治療状況、発癌例について検討した。

【結果】初回切石術後からの観察期間は平均12.4年（4～30年）であったが、10例中6例で再発を認めた。平均再発回数は2.2回（1回～5回）であった。全22回の治療を施行したが、その内訳は経皮経肝胆道鏡下碎石術（PTCSL）単独：10回、PTCSL+ESWL：5回、ESWL単独：3回、ESWL+狭窄部バルン拡張：1回、肝切除術：3回と、PTCSLによる治療が約7割を占めていた。発癌例は2例あり、1例は胆汁性肝硬変から肝細胞癌を発症した例、もう1例は胆管癌を発症した例で、いずれも肝機能が悪く手術ができずに死亡された。

【結論】先天性胆道拡張症術後に肝内結石を合併した症例は再発例が多くみられた。PTCSLはあくまで一時的な治療であり、再発予防には可能な限り肝切除を行うことが望ましいと考えられた。肝切除が困難で肝予備能が悪い症例には、肝移植が考慮されうる病態である。

A. 研究目的

近年我が国における原発性肝内結石の発生は減少していると言われるが、先天性胆道拡張症においては肝内結石の発生が増加しており注目を集めている。これら先天性胆道拡張症に合併する肝内結石は根治術前に発生する例は少なく、ほとんどが肝外拡張胆管を切除して胆道再建を行った後に発生する。

先天性胆道拡張症術後の肝内結石の発生率は、約10年の経過で7～9%の症例で認められる。術後肝内結石症の成因は、①肝内胆管の拡張による胆汁のうっ滞、②再建術後の吻合部狭窄、③うっ滞した肝内胆汁への逆行性感染とされる。

以前より我々は胆道拡張症術後の肝内結石合併症例について報告してきた。今回は、新たな症例を追加し検討することで、当科としての治療方針について考察した。

B. 研究方法

1996年1月から2010年1月まで当院にて経過観察を受けていた先天性胆道拡張症術後に肝内結石を発症した10例を対象とした（表1）。男女比は2対8。分流手術時の年齢は平均16.8歳（5か月～34歳）、初回結石診断時の年齢は平均32.5歳（14歳～56歳）、結石発症までの観察期間は平均15.5年（4年～29年）、戸谷分類ではIa型が1例、IV-A型が9例であった。

観察期間内における再発状況や再発回数、および治療状況について検討するとともに、発癌症例についても検討を加えた。

C. 研究結果

初回切石術後からの観察期間は平均12.4年（4～30

年）であったが、10例中6例で再発を認めた。平均再発回数は2.2回（1回～5回）であった。全22回の治療を施行したが、その内訳は経皮経肝胆道鏡下碎石術（PTCSL）単独：10回、PTCSL+体外衝撃波結石破碎術（ESWL）：5回、ESWL単独：3回、ESWL+狭窄部バルン拡張：1回、肝切除術：3回と、PTCSLによる治療が約7割を占めていた。発癌例は2例あり、1例は胆汁性肝硬変から肝細胞癌を発症した例、もう1例は胆管癌を発症した例で、いずれも肝機能が悪く手術ができずに死亡した（表2）。

D. 考察

肝内結石症の治療としては肝切除術、PTCSL、胆道再建術、ESWLなどがあり、個々の症例の病態に応じた治療法の選択が必要である。先天性胆道拡張症術後の肝内結石の治療としては、胆管空腸吻合部形成術や再吻合術では結石の遺残や再発が少なくなく、PTCSLおよび肝切除術の有効性が報告されている。当科においてはPTCSLによる治療が約7割を占め中心的な治療となっているが、約12年間の間に半数以上の6例に再発を認めている。結石の完全除去が得られた症例においても再発がみられており、PTCSLはあくまでも一時的な治療として位置づけられ、再発することを念頭においた長期的な観点で治療法を考える必要がある。そこで、当科における先天性胆道拡張症術後の肝内結石の治療方針として図1のようなチャートを作成した。すなわち、初回の結石治療においては再発しない例もあることから、PTCSLを第一選択とし、再発を起こした2回目以降の治療においては、片葉の結石または肝萎縮または吻合部狭窄がある症例では、手術が可能なら根治が期待できる肝切除を選択する。

両葉の結石例や吻合部狭窄のない症例においては、肝切除による根治が望めないため PTCSL による治療を選択する。その際に PTCSL を行いにくい部位の結石に対しては適宜 ESWL を追加するものとする。肝切除の条件を満たすものの、基礎疾患などにより手術ができない症例はやはり PTCSL の適応とする。PTCSL は結石の一時的な除去しか望めないものであるため、その後胆管炎と共に再発を繰り返し肝機能障害が進行し非代償性肝硬変に進展した例においては、肝移植を視野に入れる必要がある。

E. 結 論

先天性胆道拡張症術後の症例は若年であることが多く、結石発生や再発、また発癌の可能性を踏まえて経過観察をより長期に継続的に行う必要がある。一度発生した結石は難治性で PTCSL は一時的な結石除去を目的とする治療であり、現在のところ根治が望める治

療は肝切除であると考えられる。肝予備能が悪く肝切除を行えない症例には、肝移植も考慮すべき病態である。

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

表 1：先天性胆道拡張症術後に肝内結石を合併した症例の一覧

患者	分流手術時 年齢	結石診断時 年齢	肝内結石診断 までの期間	性	戸谷分類	部位	吻合部 狭窄
症例 1	4 歳	31 歳	術後 27 年	F	IV -A	両葉	-
症例 2	5 か月	14 歳	術後 14 年	F	IV -A	両葉	-
症例 3	16 歳	44 歳	術後 28 年	F	IV -A	片葉	-
症例 4	15 歳	22 歳	術後 6 年	M	I a	両葉	-
症例 5	3 歳	16 歳	術後 13 年	F	IV -A	片葉	-
症例 6	18 歳	56 歳	術後 29 年	F	IV -A	両葉	-
症例 7	33 歳	52 歳	術後 19 年	F	IV -A	両葉	-
症例 8	34 歳	39 歳	術後 5 年	F	IV -A	両葉	+
症例 9	28 歳	32 歳	術後 4 年	M	IV -A	両葉	+
症例 10	17 歳	27 歳	術後 10 年	F	IV -A	片葉	-

表 2. 研究結果まとめ

分流手術時年齢	16.8 歳（5 か月～34 歳）
結石発症までの観察期間	15.5 歳（4 歳～29 歳）
初回切石術後の観察期間	12.4（4 年～30 年）
肝内結石の再発例	6 例 / 10 例
平均再発回数	2.2 回（1 回～5 回）
治療内容	
PTCSL 単独	10 回
PTCSL+ESWL	5 回
ESWL 単独	3 回
ESWL+狭窄部バルン拡張術	1 回
肝切除術	3 回
発癌症例（2 例）	肝細胞癌：1 例 胆管癌：1 例
その他	胆汁性肝硬変：1 例

初回治療:PTCSL

2回目以降の治療:

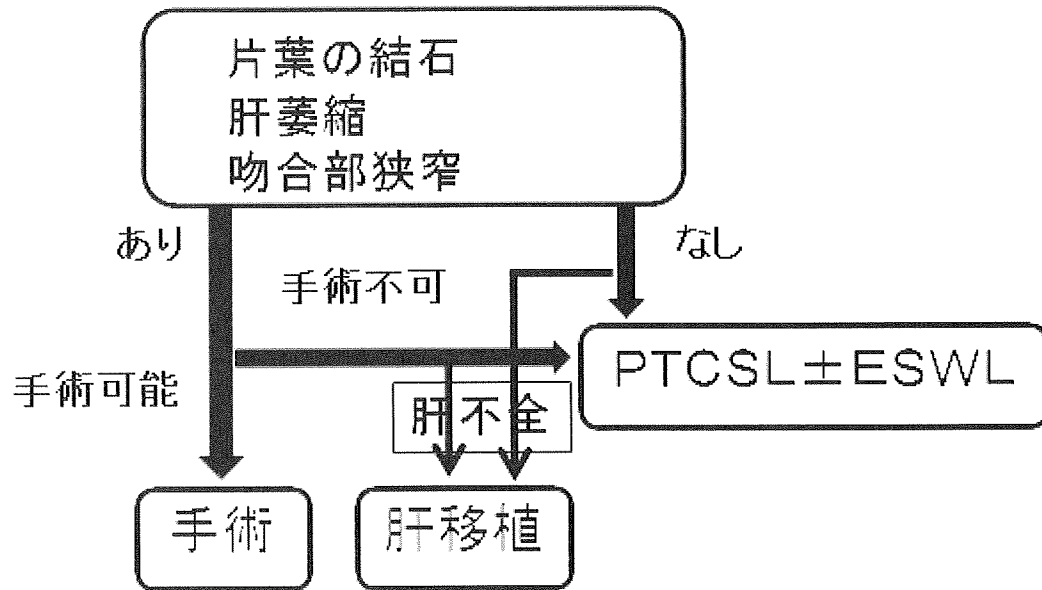


図1. 当科における先天性胆道拡張症術後の肝内結石の治療方針

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

肝内胆管障害の発症メカニズム ～治療開発に向けて～

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：肝内結石症や原発性硬化性胆管炎，さらに膵胆管合流異常では胆管癌併発のリスクが高い。そのメカニズムは不明であるが，本研究班の活動の中で胆汁酸（特に疎水性胆汁酸）の長期間曝露が肝内胆管障害（炎症や線維化）とそれに引き続く発癌を惹起することを推定してきた。今年度はその他の直接的な誘導物質として胆汁成分中のリン脂質に焦点をあてて，その胆管上皮細胞の増殖動態への影響を検討した。その結果，膵胆管合流異常においてリン脂質の分解産物として胆汁中に増加するリゾ・リン脂質が疎水性胆汁酸と同様にアポトーシスを惹起すること，さらにそのメカニズムとしてGPCRの発現増強が示唆された。

A. 研究目的

肝内結石症の病態は胆管炎と胆汁うっ滞が主体である。本症は経過中の胆管発癌リスクが重要な臨床的問題として注目されている。教室では胆汁酸が胆管上皮細胞アポトーシスを惹起することを報告してきた。一方，胆管発癌の背景疾患として膵胆管合流異常が古くから知られている。そこで，本研究では，肝内結石症における胆汁うっ滞とそれに伴う胆汁成分異常が惹起する胆管障害の類縁病態として，膵胆管合流異常に伴う胆汁リン脂質の加水分解産物として細胞毒性が推定されるリゾ・リン脂質による胆管傷害性ならびに発癌リスクへの関与を検討した。

B. 研究方法

ヒト肝内胆管癌細胞 HuCCT1を用い，リゾレシチン（LPC）による細胞傷害性についてアポトーシス誘導を指標として評価した。

- (1) 細胞増殖態度は MTT assay
- (2) アポトーシスは AnnexinV-FITC/PI 染色によるフローサイトメトリー法
さらにそのメカニズムの検討として，
- (3) アポトーシス関連遺伝子（FAS, BAX, BCL2）の遺伝子発現について，RT-PCR 法にて評価した。
- (4) さらにメカニズムに関する検討として，LPC をリガンドとする G-protein coupled receptors (図 1) についても，その遺伝子発現への影響を RT-PCR 法にて評価した。

C. 研究結果

- (1) LPC による細胞増殖態度への影響
図 2 示すように，MTT assay では LPC 濃度依存性 (50, 100, 200, 400uM)
ならびに時間依存性 (0, 2, 5時間) に生存細胞数が減少した (n=5)。
- (2) LPC によるアポトーシス
AnnexinV-FITC/PI 染色によるフローサイトメトリーにて評価されたアポトーシス細胞数は，LPC100mM で固定して行った添加実験において時間依存性に増加した (図 3)。

(3) LPC によるアポトーシス関連遺伝子発現への影響

アポトーシス関連遺伝子（FAS, BAX, BCL2）の発現について，RT-PCR 法にて評価した結果，LPC 添加により FAS 遺伝子発現の増強傾向を認めたが，BAX, BCL2 遺伝子には明らかな変化を認めなかった (図 4-1～3)。

(4) LPC をリガンドとする G2A 遺伝子発現への影響

LPC 添加によるアポトーシス誘導メカニズムにおいて関与が推定される G タンパク共役型受容体 GPCR の中で，LPC をリガンドとする G2A の遺伝子発現の変化を検討したところ，8～10倍の発現増強を認めた (図 4-4)。

D. 考 察

胆汁うっ滞や胆道感染，あるいは胆管合流異常では胆汁の上向感染や胆汁内膵液逆流により，胆汁中リン脂質の分解される結果，リゾ・リン脂質と遊離脂肪酸が生成される。そのリゾ・リン脂質（LPC）により胆管細胞のアポトーシスが誘導された。そのメカニズムとして，LPC をリガンドとする GPCR の発現増強とそれに引き続く，アポトーシス関連遺伝子発現の増強が推定された。教室では従来，肝内結石において胆汁中リゾ・リン脂質が増加することを報告しており，今回の成績は肝内結石においてもリゾ・リン脂質による胆管細胞傷害が惹起される可能性が示唆される。今後，リン脂質分子種や脂肪酸構成，遊離脂肪酸の分子種による影響を検討するとともに，リガンドを活用した予防治療の可能性を追求する。

E. 結 論

以上から，胆汁うっ滞を呈する病態を惹起する肝内結石症や持続性胆管炎（例えば，原発性硬化性胆管炎）では胆汁成分中の疎水性胆汁酸の増加のみならずリン脂質の質的变化が胆管上皮を恒常的に傷害することが示唆された。そのメカニズムとして，GPCR の発現増強とそれに引き続く，アポトーシス関連遺伝子発現増強が推定された。

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

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

リガンド	受容体	受容体の機能
LPA	LPA1	細胞遊走亢進 脳神経系の発達
	LPA2	
	LPA4/GPR23	
	PLA3	
SIP	SP1~5	血管形成 リンパ球遊走 細胞遊走抑制
	GPR3/6/12/63	
LPC	G2A	
	GPR4	
脂肪酸	GPR40 GPR41 GPR43	膵からのインスリン分泌 脂肪細胞からのレプチン放出 好中球遊走亢進
PGD2	DP	Th2サイトカイン産生など
PGE2	EP1~4	癌化、疼痛の伝達など
胆汁酸	TGR5	マクロファージ活性化の抑制

LPA, lysophosphatidic acid; SIP, sphingosine 1-phosphate; LPC, Isophosphatidylcholine; PG, prostaglandin

図1. Lipid Mediators と G-protein coupled receptors (GPCR)

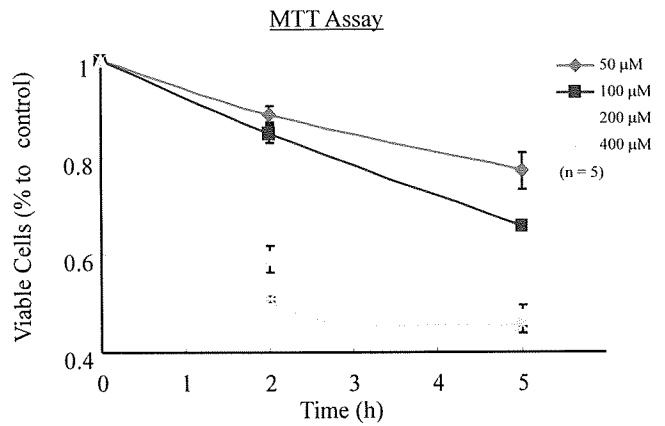


図2. LPCによるヒト胆管上皮細胞 (HuCCCT1) の Viability への影響

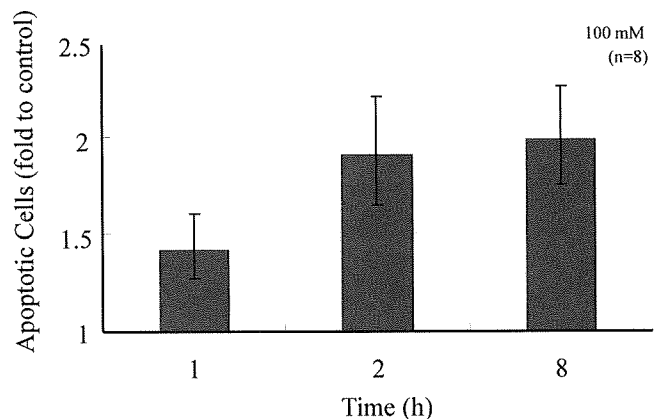


図3. LPCによるヒト胆管上皮細胞 (HuCCCT1) の Apoptosis

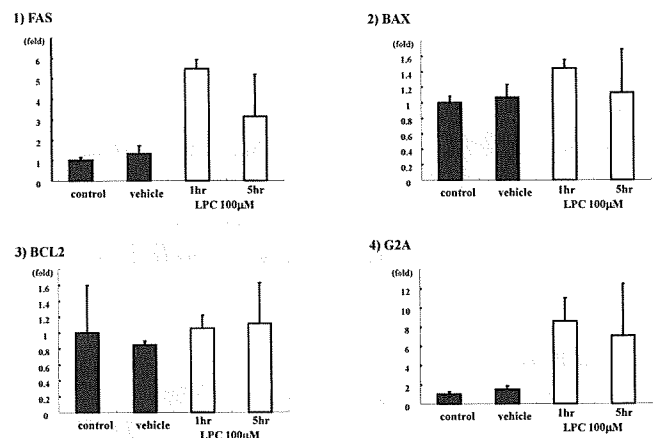


図4. LPCによるヒト胆管上皮細胞 (HuCCCT1) の Apoptosis 関連遺伝子発現の変化

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

研究協力者 正田 純一 筑波大学大学院人間総合科学研究科 スポーツ医学 教授

研究要旨：肝内胆管癌細胞に対する Sorafenib の有用性を検討したところ、用量依存性に細胞増殖を抑制し、その効果は肝細胞癌細胞と同等であった。また、細胞シグナル分子の MEK および MAPK の活性化を抑制した。細胞周期および cyclinD1 の発現レベルには有意な変化は認められなかったが、用量依存性にアポトーシスを誘導し、アポトーシス抑制因子の mcl-1 の発現が低下していた。Sorafenib は肝内胆管癌に対する新しい治療薬として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、本邦ならびに欧米諸国では肝内胆管癌が増加している。また、B型やC型の慢性肝疾患に末梢型肝内胆管癌の発生することもしばしば報告されるようになった。本腫瘍は早期発見が困難であり、また、進行癌では化学療法や放射線療法に対して抵抗性を示す難治性の消化器癌と位置付けられている。その治療成績の向上には、新しい有効な治療手段の開発していく必要がある。分子標的薬剤である Sorafenib は血管新生を促す受容体型チロシンキナーゼと細胞増殖を促す Raf キナーゼを阻害するユニークな性質を併せ持つマルチターゲット阻害剤である。最近、肝細胞癌に対する有用性が報告されているが、肝内胆管癌でも少数例ながら臨床試験が行われている。そこで今回は、肝内胆管癌に対する本剤の有用性を検討するために、培養細胞株を用いて抗腫瘍効果について解析した。

B. 研究方法

ヒト肝内胆管癌細胞株を用いて Sorafenib による抗腫瘍効果について、増殖抑制 (WST assay), apoptosis の誘導 (Tunnel assay および flow cytometry), 細胞周期の変化 (flow cytometry) の点より測定を行った。さらに、細胞増殖のシグナル伝達は各シグナル分子の特異抗体とリン酸化抗体を用いたウエスタン解析にて解析した。

C. 研究結果

Sorafenib は用量依存性に肝内胆管癌細胞 8 種類の増殖を抑制し (IC50 3.8-10.3 mM), その効果は肝細胞癌細胞 (PLC/RPF/5, 7.0 mM) と同等であった。また、同細胞 8 種類において用量依存性に細胞シグナル分子の MEK および MAPK の活性化を抑制した。Sorafenib により引き起こされる細胞周期および cyclinD1 の発現レベルには有意な変化は認められなかった。同細胞 8 種類において用量依存性にアポトーシスを誘導し、アポトーシス抑制因子である mcl-1 の発現が濃度依存性に低下していた。肝内胆管癌細胞に対する Sorafenib の抗腫瘍効果は肝細胞癌細胞とほぼ同等であった。

D. 考察

ヒト肝内胆管癌細胞に対して Sorafenib は肝細胞癌細胞と同レベルに細胞障害性を示した。その作用機序として、細胞周期には有意な変化を与えないことより、mcl-1 の発現抑制を介するアポトーシスの誘導が重要であると考えられた。現在、IL-6/Stat3 の細胞シグナル伝達経路に対する影響、皮下腫瘍モデルにおける血管新生の抑制効果について検討を行っている。

E. 結論

分子標的薬の Sorafenib は肝内胆管癌に対する新しい治療薬として有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda, A., Kuno, A., Kawamoto, K., Matsuzaki, H., Irimura, T., Ikehara, Y., Zen, Y., Nakanuma, Y., Yamamoto, M., Ohkohchi, N., Shoda, J., Hirabayashi, J., Narimatsu, H.: WFA-Positive Sialylated MUC1 is a High-Sensitivity Biliary Marker for Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2010, In press.
- 2) Sugahara, S., Nakayama, H., Fukuda, K., Mizumoto, M., Tokita, M., Abei, M., Shoda, J., Matsuzaki, Y., Thono, E., Tsuboi, K., Tokuyue, K.: Proton Beam Therapy for Hepatocellular Carcinoma Associated with Portal Vein Tumor Thrombosis. *Strahlenther Onkol* 2010, In press.
- 3) Sugahara, S., Oshiro, Y., Nakayama, H., Fukuda, K., Mizumoto, M., Abei, M., Shoda, J., Matsuzaki, Y., Tohno, E., Tokita, M., Tsuboi, K., Tokue, K.: Proton beam therapy for large hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010, In press.
- 4) Sugimoto, H., Okada, K., Shoda, J., Warabi, E., Ishige, K., Ueda, T., Taguchi, K., Yanagawa, T., Nakahara, A., Hyodo, I., Ishii, T., Yamamoto, M.: Deletion of Nuclear Factor-E2-Related Factor-2

Leads to Rapid Onset and Progression of Nutritional Steatohepatitis in Mice. *Am J Physiol* 298:G283-294, 2010.

- 5) Okada, K., Shoda, J., Taguchi, K., Maher, J.M., Ishizaki, K., Inoue, Y., Ohtsuki, M., Goto, N., Sugimoto, H., Utsunomiya, H., Oda, K., Warabi, E., Ishii, T., Yamamoto, M.: Nrf2 Counteracts Cholestatic Liver Injury via Stimulation of Hepatic Defense Systems. *Biochem Biophys Res Commun* 389:431-436, 2009.
 - 6) 安部井誠人, 福田邦明, 正田純一, 兵頭一之介: 重症肝炎における劇症化予知式に基づいた早期抗ウイルス・抗免疫療法の有効性の検証. 特集: 急性肝不全における内科治療と肝移植の進歩. *日本腹部救急医学会雑誌* 29:597-600, 2009.
 - 7) Nakayama, H., Sugahara, S., Tokita, M., Fukuda, K., Mizumoto, M., Abei, M., Shoda, J., Sakurai, H., Tsuboi, K., Tokuyue, K.: Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma: the University of Tsukuba Experience. *Cancer* 115:5499-506, 2009.
 - 8) Ito, H., Kuno, A., Sawaki, H., Sogabe, M., Ozaki, H., Tanaka, Y., Mizogami, M., Shoda, J., Angata, T., Sato, T., Hirabayashi, J., Ikehara, Y., Narimatsu, H.: Strategy for glycoproteomics: identification of glyco-alteration using multiple glycan profiling tools. *J Proteome Res* 8:1358-67, 2009.
 - 9) Okada, K., Yanagawa, T., Warabi, E., Yamastu, K., Uwayama, J., Takeda, K., Utsunomiya, H., Yoshida, H., Shoda, J., Ishii, T.: Acarbose, an a-glucosidase inhibitor, prevents obesity and hepatic steatosis in SQSTM1/A170/p62-deficient mice. *Hepatology Res* 39:490-500, 2009.
 - 10) Fukumitsu, N., Sugahara, S., Nakayama, H., Fukuda, K., Mizumoto, M., Abei, M., Shoda, J., Thono, E., Tsuboi, K., Tokuyue, K.: A prospective study of hypofractionated proton beam therapy for patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39:247-255, 2009.
 - 11) Watanabe, S., Yokoyama, Y., Oda, K., Kokuryo, T., Shoda, J., Okada, K., Utsunomiya, H., Nagino, M.: Choleretic effect of Inchikoto on the cholestatic livers of patients with biliary obstruction due to biliary tract carcinoma: A randomized controlled study. *Hepatology Res* 39:247-255, 2009.
- ## 2. 学会発表
- 1) 小貫健一郎, 川本 徹, 山本雅一, 杉山弘明, 石毛和紀, 三善英知, 谷口直之, 正田純一: 漿膜下浸潤 (pT2) 胆嚢癌における糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) 発現とその臨床的意義. 日本外科学会第109回定期学術集会 (福岡), 2009.
 - 2) 杉山弘明, 石毛和紀, 小貫健一郎, 川本 徹, 山本雅一, 三善英知, 谷口直之, 正田純一: 肝胆道系悪性腫瘍における糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) 発現とその臨床的意義. 第95回日本消化器病学会総会 (札幌), 2009.
 - 3) 岡田浩介, 正田純一, 山本雅浩: インチンコウ湯は肝 Mrp2/MRP2の発現増加と毛細胆管膜への集積により胆汁酸非依存性の胆汁分泌を誘発する. 第95回日本消化器病学会総会 (札幌), 2009.
 - 4) 岡田浩介, 正田純一, 山本雅之: 転写因子 Nrf2はコリンメチオニン欠乏食 (MCDD) 誘発非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を防御する. 第95回日本消化器病学会総会 (札幌), 2009.
 - 5) 杉本浩一, 岡田浩介, 正田純一, 藤 栄治, 柳川 徹, 田口恵子, 兵頭一之介, 石井哲郎, 山本雅之: 転写因子 Nrf2はコリンメチオニン欠乏食 (MCDD) 誘発非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を防御する. 第45回日本肝臓学会総会.
 - 6) 川本 徹, 鈴木英雄, 石毛和紀, 正田純一, 兵頭一之介, 遠藤隆志, 山本雅一, Melanie Thomas: 胆道癌における IGFR と Raf-1の発現と臨床病理学的因子との関連性. 第45回日本胆道学会学術集会 (千葉), 2009.
 - 7) 小貫健一郎, 川本 徹, 山本雅一, 杉山弘明, 石毛和紀, 遠藤隆志, 三善英知, 谷口直之, 正田純一: 漿膜下浸潤 (pT2) 胆嚢癌における糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) 発現とその臨床的意義. 第45回日本胆道学会学術集会 (千葉), 2009.
 - 8) 小貫健一郎, 川本 徹, 山本雅一, 杉山弘明, 石毛和紀, 三善英知, 谷口直之, 正田純一: 漿膜下浸潤 (pT2) 胆嚢癌における糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) 発現とその腫瘍生物学的意義. 第51回日本消化器病学会大会 (京都), 2009.
 - 9) 杉山弘明, 石毛和紀, 小貫健一郎, 馬場伸枝, 上田哲也, 兵頭一之介, 正田純一: 肝内胆管癌に対するマルチターゲット阻害剤 Sorafenib (SOR) の有用性に関する検討. 第51回日本消化器病学会大会 (京都), 2009.
 - 10) 杉本浩一, 岡田浩介, 正田純一, 兵頭一之介, 藤 栄治, 柳川 徹, 石井哲郎, 田口恵子, 山本雅之: 転写因子 Nrf2はコリンメチオニン欠乏食 (MCDD) 誘発非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を防御する. 第13回日本肝臓学会大会 (京都), 2009.
 - 11) 松田厚志, 久野敦, 川本 徹, 松崎英樹, 入村達郎, 池原 譲, 成松 久, 中沼安二, 山本雅一, 大河内信弘, 正田純一, 平林淳: レクチンマイクロアレイシステムを用いた胆管癌新規糖タンパク質腫瘍マーカー開発. 第29回日本糖質学会総会 (岐阜), 2009.