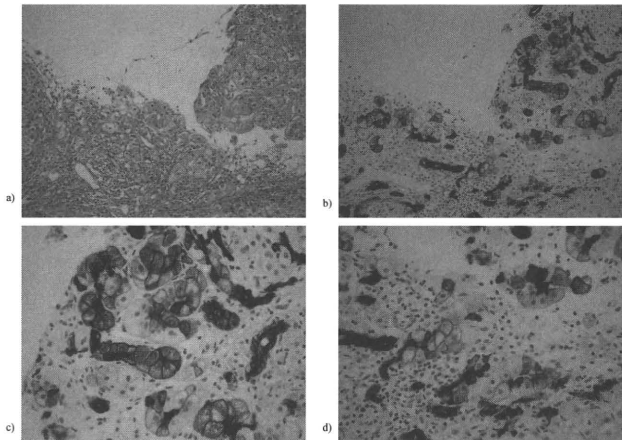


を認めなかった。

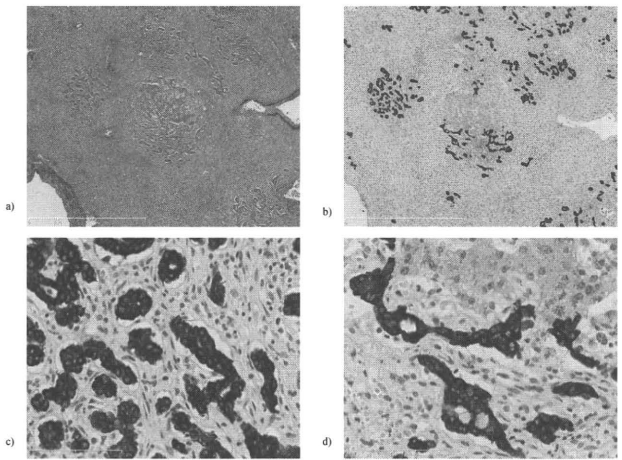
②27例（非重症14例，重症7例，劇症6例）について肝再生の過程（ductular reaction）をスコア化して検討すると，非重症例・治療反応例・回復例では，重症／劇症例・治療不応例・死亡例と比較して，progenitor cell から mature hepatocyte への分化過程の細胞（intermediate hepatocyte）が有意に多く，また bile duct への分化過程の細胞（ductular reaction）が有意に少なかった（図2-5）。

図2 CK7染色（非重症例）



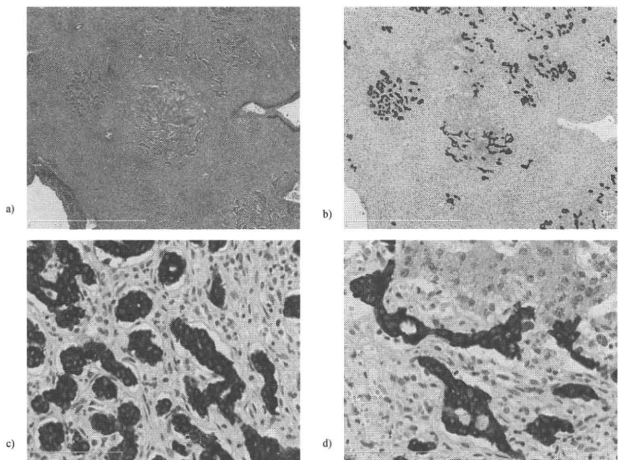
(Fujiwara et al. Histopathology 2011 in press)

図3 CK7染色（劇症例）



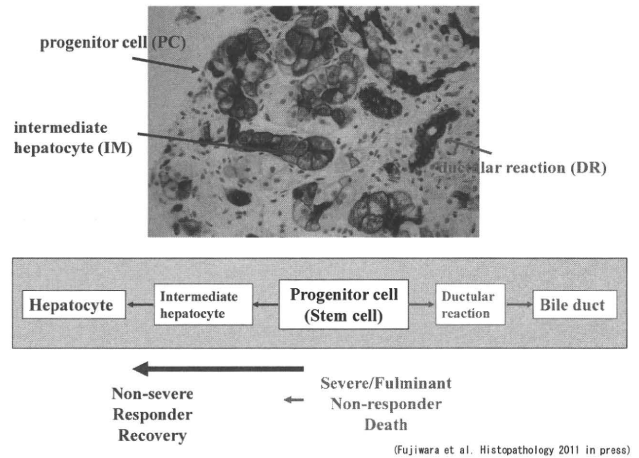
(Fujiwara et al. Histopathology 2011 in press)

図4 CK7染色（重症例）



(Fujiwara et al. Histopathology 2011 in press)

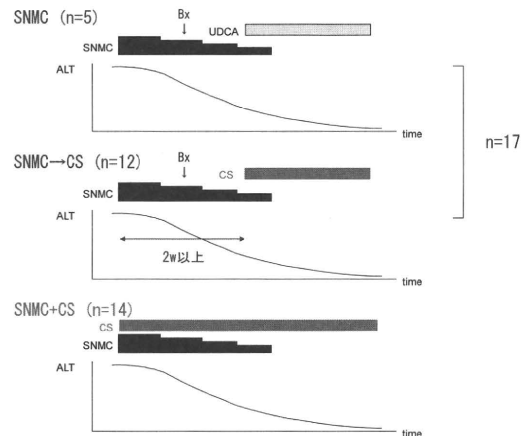
図5 CK7染色と病態



(Fujiwara et al. Histopathology 2011 in press)

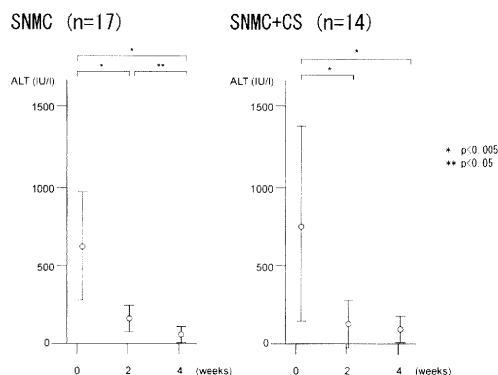
③31例（非重症13例，重症9例，劇症9例）に対して早期段階でSNMCの投与を行なった。治療開始時進展例にはCSを併用した。治療開始から十分量のSNMCを2週間以上単独投与できた17例をSNMC群，CSと併用投与した14例をSNMC+CS群とした（図6）。

図6



ALTは各群ともに開始2週間，4週間で有意な改善を示した（図7）。両群間で改善に有意差を認めなかった。T-BIL，PTは各群で開始4週間で有意な変化を認めなかった。IgGはSNMC+CS群で4週間で有意な改善を認めた（ $p < 0.005$ ）。

図7 治療後のALTの変化



D. 考 察

- ①急性発症型 AIH の発症進展様式は個々の症例で様々であった。
- ②急性発症型 AIH のような激しい centrilobular necrosis, massive/submassive necrosis を起こす病態においては, intermediate hepatocyte が肝再生の指標として重要と考えられた。重症・劇症例では progenitor cell から hepatocyte への分化が障害され, 特に治療不応例で著明であった。
- ③病早期において, SNMC は SNMC+CS と比較して有意差なく ALT 低下効果を示した。

E. 結 論

急性発症型 AIH は臨床的, 画像的, 病理組織学的に heterogeneity が特徴であり, 個々の症例で様々な経過をたどる。治療反応性は発症からの経過時間ではなく, 組織学的進展度に依存する。

予後不良の自己免疫性急性肝不全の救命率を改善するには, 重症化・劇症化する前に (肝再生不全に陥る前に) 免疫抑制療法を開始することが必要である。病初期に診断が確定せず, 免疫抑制薬を投与しづらい場合には何らかの方法で ALT のコントロールをすべきである。我々は十分量の SNMC を投与して ALT を低下させつつ肝生検を施行して鑑別・除外診断を行なうことを提案した。少なくともある程度の進展抑制, ステロイドを投与するまでの bridge use にはなると思われる。

また, 我々は昨年度の報告で, 臨床・病理 (centrilobular necrosis/collapse) ・画像的特徴 (plain CT での heterogeneous hypoattenuation) を総合的にとらえることで, 急性発症型 AIH を診断することができることを示したが, 何より日本におけるその診断基準・重症化基準のコンセンサス作成が急務であることには変わりはない。

最後に, 昨今見直しが進められている劇症肝炎の成因の定義についてふれたい (文責: 藤原)。日本の定義は諸外国と異なるため, 国際学会や国際誌で劇症肝炎の成因を論じるときにしばしば問題となる。海外では急性肝不全の成因におけるアセトアミノフェンの占める割合が大きい。しかし, 「日本における」日々の

診療において, 日本の定義は優れたものであることを実感できる。なぜなら成因が, 肝原発の「肝炎に対する治療が必要なもの」に限定されているからである。特殊な代謝性のものを除き, 二次的な肝炎以外の成因は区別されている。つまり, hepatologist が第一に治療すべき疾患かどうか (肝炎の治療をすれば改善する疾患かどうか) を明瞭化しているのである。我々は先見の明をもった日本の先輩 hepatologists の作成した定義を誇るべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiwara K, Nakano M, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Advanced histology and impaired liver regeneration are associated with disease severity in acute onset autoimmune hepatitis. *Histopathology* 2011 in press.
- 2) Fujiwara K, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Oda S, Yokosuka O. The requirement of sufficient period of corticosteroid treatment in combination with nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2010; 45: 1255-62.
- 3) Yasui S, Fujiwara K, Yonemitsu Y, Oda S, Nakano M, Yokosuka O. Clinicopathological features of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol* 2011 in press. 2010 Sep 7. [Epub ahead of print]
- 4) Fujiwara K, Kojima H, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Omata M, Yokosuka O. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. *J Med Virol* 2011; 83: 201-7.
- 5) Fujiwara K, Toriyabe T, Fukuda Y, Yokosuka O.
Clinical and histological recovery from "life-threatening" severe acute alcoholic hepatic failure with complete hepatofugal portal blood flow. *Clin J Gastroenterol* 2011; 4: 39-42.
- 6) Fujiwara K, Yasui S, Tawada A, Okitsu K, Yonemitsu Y, Chiba T, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Nakano M, Oda S, Yokosuka O. Autoimmune fulminant liver failure in adults: Experience in a Japanese center. *Hepato Res* 2011; 41: 133-41.
- 7) Kanda T, Jeong SH, Imazeki F, Fujiwara K, Yokosuka O. Analysis of 5' nontranslated region of hepatitis a viral RNA genotype I from South Korea: comparison with disease severities. *PLoS One*. 2010; 5: e15139.
- 8) Yang L, Kiyohara T, Kanda T, Imazeki F, Fujiwara K, Gauss-Müller V, Ishii K, Wakita T.

Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virol J* 2010; 7: 212.

- 9) Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Okitsu K, Fujiwara K, Yokosuka O. Internal ribosomal entry-site activities of clinical isolate-derived hepatitis A virus and inhibitory effects of amantadine. *Hepato Res* 2010; 40: 415-23.
- 10) Kanda T, Gauss-Müller V, Cordes S, Tamura R, Okitsu K, Shuang W, Nakamoto S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. *J Viral Hepat* 2010; 17: 618-23.
- 11) 藤原慶一, 横須賀収. 劇症肝炎. 今日の消化器疾患治療指針 第3版. (医学書院) 570-4, 2010.
- 12) 横須賀収. 急性肝炎. 今日の治療指針2011. (医学書院) 印刷中.
- 13) 藤原慶一, 多田素久, 横須賀収. 原発性胆汁性肝硬変. 内科. 105: 1001-5, 2010.
- 14) 藤原慶一, 横須賀収. A型肝炎ウイルスマーカー. 肝胆膵. 60: 613-23, 2010.
- 15) 藤原慶一, 横須賀収. A型肝炎ウイルス抗体および核酸検査. 日本臨床. 68: 435-8, 2010.

2. 学会発表

- 1) Fujiwara K, Nakano M, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Advanced histology and impaired liver regeneration are associated with disease severity in acute onset autoimmune hepatitis. The 20th conference of the asian pacific association for the study of the liver. 2010.3.25.
- 2) 藤原慶一, 安井 伸, 横須賀収. B型慢性肝炎・急性増悪重症化例に対するヌクレオシドアナログ＋ステロイド早期併用療法：ステロイド投与期間に関する検討. 第36回日本急性肝不全研究会 (山形) 2010.5.26.
- 3) 藤原慶一, 安井 伸, 沖津恒一郎, 米満 裕, 千葉哲博, 新井誠人, 神田達郎, 今関文夫, 横須賀収. 当院における劇症肝炎の成因の変遷：急性発症型の自己免疫性肝炎の診断の前後で. 第46回日本肝臓学会総会 (山形) 2010.5.27.
- 4) 安井 伸, 藤原慶一, 沖津恒一郎, 米満 裕, 千葉哲博, 新井誠人, 神田達郎, 深井健一, 今関文夫, 大塚将之, 宮崎 勝, 横須賀収. 慢性C型肝炎に対するインターフェロン・リバビリン併用療法中に発症した急性発症型自己免疫性肝炎劇症型の一例. 第46回日本肝臓学会総会 (山形) 2010.5.27.
- 8) 藤原慶一, 安井 伸, 横須賀収. 急性発症型の自己免疫性肝炎の診断基準の作成を目指した検

討. 第14回日本肝臓学会大会 (横浜) シンポジウム. 2010.10.13.

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

急性肝不全における ADAMTS13の動態

研究協力者 福井 博 奈良県立医科大学第3内科 教授

研究要旨：血小板の過剰凝集は臓器、組織の微小循環障害の原因となり、肝炎重症化、合併症の発現に大きくかかわる可能性がある。急性肝不全症例において血漿 ADAMTS13活性を VWF マルチマー、エンドトキシン、IL-6、IL-8、好中球エラスターゼとの関連のもとに検討し、これらの上昇が ADAMTS13活性の低下につながることを示唆する成績を得た。実験的にはガラクトサミン+LPS 急性肝不全モデルにおいて血漿 ADAMTS13活性の著減、超高分子量 VWF マルチマーの出現、消失とそれに続く肝内血管内、壊死組織周辺への VWF の沈着を認め、ADAMTS13活性の低下が肝微小循環障害にかかわっていることが示唆された。

共同研究者

植村 正人 奈良県立医科大学第3内科准教授
藤本 正 奈良県立医科大学第3内科講師
高谷 章広 奈良県立医科大学第3内科
石川 正之 奈良県立医科大学第3内科
森岡 智恵 奈良県立医科大学第3内科
野々村昭孝 奈良県立医科大学病理診断学教授

さらに、24時間の時点で肝内の VWF 染色を試みた。

A. 研究目的

劇症肝炎の予後予測因子として血小板数の意義が注目されているが、血小板の過剰凝集は臓器、組織の微小循環障害の原因となり、肝炎重症化、合併症の発現に大きくかかわる可能性がある。ADAMTS13は血管内皮細胞が分泌する超高分子量 VWF マルチマーの切断酵素でその欠損は血栓性血小板減少性紫斑病を惹起する。われわれはこれまで重症アルコール性肝炎、非代償性肝硬変、重症急性膵炎などで血中の本酵素活性が著減し、合併症の発現にかかわっている可能性を指摘してきたが、本研究では急性肝不全症例において血漿 ADAMTS13、VWF、エンドトキシン (Et) を測定して、これらと合併症との関連について検討する。

B. 研究方法

1) 臨床的研究

対象は、急性肝炎26例（B型8例、C型5例、非B非C型4例、薬物4例、自己免疫3例、その他2例）と急性肝不全11例（B型2例、非B非C型4例（B型2例、非B非C型4例、薬物1例、その他4例；9例死亡、2例生存）。前回報告した血漿 ADAMTS13活性、血漿 VWF 抗原、超高分子量 VWF マルチマー、血漿 Et の測定に加えて、今回は血漿 ADAMTS13インヒビター活性、IL-6、IL-8濃度、好中球エラスターゼ濃度を測定し、臨床像と対比検討した。

2) 実験的研究

体重200gの Wistar 系雄性ラットに D-ガラクトサミン (GalN : 700mg/kg 体重) および E. coli O55:B5 LPS (50 μ g/kg 体重) を投与して致死的な急性肝不全モデルを作成し、経時的に血漿 ADAMTS13活性、VWF マルチマーを測定した。

C. 研究結果

1) 臨床的研究

入院時の ADAMTS13活性は急性肝炎では高低幅広く分布したが、平均は正常値60%前後であったのに対し、急性肝不全では全例50%以下で、平均して20%前後であった。一方、VWF 抗原量については健常人100%に比し、急性肝炎では平均250%、急性肝不全では800%と著明に上昇していた。急性肝炎では血漿 ADAMTS13に対するインヒビターが22.2% (6/27例) に検出され、その力価は平均0.7 (0.6~0.8) であったのに対し、急性肝不全では72.7% (8/11例) に検出され、その力価は平均1.2 (0.6~2.4) であった。急性肝不全では血漿 IL-6が100pg/ml 以上の高値をとることが多く、このような IL-6高値例では血漿 ADAMTS13活性が著減し、VWF 抗原が著増していた。一方、血漿 IL-8も急性肝不全では上昇していることが多く、IL-8上昇例では血漿 ADAMTS13活性が著減し、VWF 抗原が増加していた。さらに、血漿 Et 濃度は ADAMTS13活性と負の相関傾向を示し、急性肝不全では Et20pg 以上の群は以下の群に比し、ADAMTS13活性が低値 ($p<0.001$) を示した。

急性肝炎および急性肝不全の血清好中球エラスターゼ濃度を100pg/mlを境に2群に分けた時、100pg/ml以上の群では100pg/ml未満の群より血漿 ADAMTS13活性が低値 ($p<0.02$) で VWF 抗原量が高値 ($p<0.02$) であった。

2) 実験的研究

急性肝不全ラットの生存率は12時間で40%、24時間で20%であったが、血漿 ADAMTS13活性は12時間で25%、24時間生存個体で0.5%未満であった。また超高分子量 VWF マルチマーは15~20時間で出現し、24時間にかけて VWF は血中からむしろ分解消失する傾向にあった。24時間生存個体の肝組織の免疫染色において壊死部周辺や血管内 VWF の沈着を認めた。

D. 考 察

障害をうけた血管内皮細胞では超高分子量 VWF マルチマーが産生される。これが毛細血管内に移行すると、high shear stress を受け、伸張構造をとるようになるが、ADAMTS13はこの進展した超高分子量 VWF マルチマーを切断する酵素である。ADAMTS13が十分量存在すると、超高分子量 VWF マルチマーは適当な大きさの VWF マルチマーに切断されるが、この酵素が不足すると、超高分子量 VWF マルチマーが切断されず、血小板と反応して血小板血栓が形成され、微小循環障害が惹起される。われわれはこれまで血漿 ADAMTS13活性が多臓器不全を合併する重症アルコール性肝炎、非代償性肝硬変、重症急性膵炎などで著減するとともに、血漿 VWF が著増し、超高分子量 VWF マルチマーもしばしば出現することを報告¹⁻³してきた。さらに昨年⁴の班研究において急性肝不全とりわけ多臓器不全合併例でも同様の血漿 ADAMTS13活性の著減がみられ、血小板の過剰凝集と微小循環障害を招き、全身諸臓器の虚血性障害に陥る可能性を指摘してきた。

この流れを阻止して新規治療をめざすためには、ADAMTS13活性低下の機序と肝微小循環の病態の解明が必要である。今回は臨床的研究においてまず血漿 ADAMTS13活性に対するインヒビターを測定したが、急性肝不全では急性肝炎より明らかにインヒビターが高頻度でかつ高力価に存在していた。このインヒビターの本態は明らかでないが、最近 IL-6が ADAMTS13活性を阻害する一方で、IL-8や TNF- α は用量依存性に超高分子量 VWF マルチマーの分泌を促進することが報告されている⁴。われわれはアルコール性肝障害において IL-6、IL-8と ADAMTS13活性、VWF 抗原が同様の関係にあることをすでに報告しており⁵、これらサイトカインが ADAMTS13活性を直接阻害するのか、これらに影響を与える共通の原因が存在するのか、培養肝星細胞を用いた研究に期待がかけられる。さらに、ADAMTS13を分解するプロテアーゼとしてプラスミン、トロンピン、好中球エラスターゼが知られているが、血清好中球エラスターゼの高値例で ADAMTS13活性が低値をとったことから好中球エラスターゼも ADAMTS13活性低下の一因になっている可能性がある。

次に ADAMTS13活性の低下が肝不全における肝微小循環障害の原因になる可能性について、GalN+LPS ラット急性肝不全モデルで検討した結果、24時間生存個体の肝組織において壊死部周辺や血管内に VWF が存在しており、血中から消失した VWF が血小板を巻き込んで肝に沈着し、肝微小循環障害を惹起している可能性が考えられる。今後、ADAMTS13の局在、血小板の局在との関係を二重染色などで検討する必要がある。

劇症肝炎の臨床例において ADAMTS13活性の低下と微小循環障害の関係を明らかにするのは容易でないが、最近われわれは HBV キャリアに発症した late-onset hepatic failure (LOHF) において ADAMTS13

の著減、VWF の著増に伴い、中心静脈、亜小葉静脈の閉塞 (obliterative venopathy) を伴った亜広範性肝細胞壊死像を観察した。この循環障害が抗ウイルス薬の効果の減弱につながった可能性もあると考えている。

E. 結 論

劇症肝炎の発症、進展に ADAMTS13活性の著減と超高分子量 VWF の増加、さらに血小板過剰凝集による微小循環障害が深くかかわっている可能性がある。ADAMTS13活性に影響を及ぼしうる因子としては、Et, IL-6, IL-8, 好中球エラスターゼなどが考えられるが、ADAMTS13の産生・分泌機構はいまだ解明されておらず、急性肝不全における ADAMTS13調節系の破綻については引き続き検討を要する。

文 献

1. Uemura M, et al. Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:264S-71S.
2. Morioka C, et al. Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1387-96.
3. Uemura M, et al. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 2008;99:1019-29.
4. Bernardo A, et al. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 2004;104:100-6.
5. Ishikawa M, et al. Potential role of enhanced cytokinemia and plasma inhibitor on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis: relationship to endotoxemia. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34 Suppl 1:S25-33.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Uemura M, Fujimura Y, Matsuyama T, Matsumoto M, Ishikawa M, Ishizashi H, Kato S, Tsujimoto T, Fujimoto M, Yoshiji H, Morioka C, Fukui H. Potential role of ADAMTS13 in the progression of alcoholic hepatitis. *Curr Drug Abuse Rev* 2008;1:188-96.
 - 2) Ishikawa M, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Morioka C, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Tsujimoto T, Takimura C, Fujimura Y, Fukui H. Potential role

of enhanced cytokinemia and plasma inhibitor on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis: relationship to endotoxemia. Alcohol Clin Exp Res 2010;34 Suppl 1:S25-33.

3) Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Pivotal role of ADAMTS13 function in liver diseases. Int J Hematol 2010;91:20-9.

2. 学会発表

1) 高谷広章, 植村正人, 松本雅則, 森岡千恵, 藤本正男, 豊原眞久, 山崎正晴, 辻本達寛, 瓦谷英人, 山尾純一, 石指宏通, 藤村吉博, 福井 博. 肝硬変における ADAMT13活性と予後に関する検討 Child score, MELD score との対比. 第14回日本肝臓学会大会 2010.10.13

2) 藤本正男, 植村正人, 石川昌利, 松山友美, 森岡千恵, 辻本達寛, 瓦谷英人, 松本雅則, 石指宏通, 藤村吉博, 福井 博. 急性肝不全における顆粒球エラスターゼと血漿 ADAMTS13活性との関連. 第14回日本肝臓学会大会 2010.10.13

3) 高谷広章, 植村正人, 藤本正男, 松山友美, 森岡千恵, 石川昌利, 辻本達寛, 瓦谷英人, 松本雅則, 藤村吉博, 福井 博. 肝不全における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態. 第16回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2010.11.13

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

肝再生過程におけるアダプター蛋白質 Gab 1 の肝幹 / 前駆細胞への関与について

研究協力者 竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 准教授

研究要旨：肝臓は強い再生能力を有した臓器であり、肝炎ウイルスや薬物摂取等により惹起される組織障害に対して、急速な修復と再生が引き起こされる。一方で、肝臓には、元来わずかに存在する oval 細胞に代表されるいわゆる肝幹 / 前駆細胞が存在し、肝障害時にそれらの細胞が増殖分化し、組織修復や再生に寄与していると考えられているが、その実態はいまだ不明である。また、肝幹 / 前駆細胞は、肝再生医療の新たなターゲットとして注目されるが、その詳細な制御機構は明らかではない。私どもは、これまでアダプター蛋白質 Grb2 associated binder-1 (Gab1) が、マウス部分肝切除後の肝再生過程に重要な役割を果たしていることを報告してきた。また、一方で Gab1 は、神経幹 / 前駆細胞の増殖・分化を制御するシグナル分子であることも報告されている。そこで、今回我々は Gab1 に着目して、肝幹 / 前駆細胞を介した肝再生過程の分子機構を検討した。

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

林 紀夫 関西労災病院

A. 研究目的

末期肝硬変や劇症肝炎に伴う急性肝不全は、極めて予後が悪いことが知られている。現在、我が国では、これらの末期肝不全患者に対して、肝移植療法が施行されているが、深刻なドナー不足のため、治療に対するハードルは大きい。一方で、広範囲の肝細胞壊死を伴う劇症肝炎では、肝細胞自体の再生は障害されており、かわって肝幹 / 前駆細胞が出現し、肝再生や組織修復に関与していると考えられている。従って、これらの肝幹 / 前駆細胞の制御機構の理解が、肝再生医療に対して、新たな知見を与えることが期待される。

私どもは、これまで肝再生の分子機構の解析を行ってきた。この過程で、アダプター蛋白質 Grb2 associated binder-1 (Gab1) を発見し、部分肝切除後の肝再生における役割について検討してきた。Gab1 は、神経幹 / 前駆細胞の EGF 依存性の増殖に深く関与していることが知られている。そこで、今回、本分子に着目して、肝幹 / 前駆細胞の増殖分化の分子機構を解析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、臓器特異的 Cre-loxP システムを用いて、肝特異的 Gab1flox;AlbCre マウス (KO) を作製した。対照として Gab1flox マウス (WT) を用いた。

2) KO マウス及び対照 (WT マウス) に対し、肝幹 / 前駆細胞誘導法として 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine (DDC) 含有食餌を投与し、投与後 2 - 4 週後における肝重量 / 体重比及び PCNA 蛋白発現により肝再生を評価した。また、同時に投与後 6 週までの生存率も検討した。

3) DDC 食投与 2 週後及び 4 週後の障害肝組織における肝幹 / 前駆細胞を HE 染色及び CK19 免疫染色にて検討した。また、幹細胞関連分子 (CD133 / Prominin1 及び EpCAM) の遺伝子発現を定量的 real time RT-PCR 法にて検討した。

4) DDC 障害肝より分離された EpCAM 陽性肝幹 / 前駆細胞 (東京大学分子細胞生物学研究所宮島篤先生より供与) を用い、Gab1 に対する siRNA を用いたノックダウン法や adenovirus を用いた過剰発現系により、Gab1 の肝幹 / 前駆細胞の増殖に対する影響を WST 法により検討した。

C. 研究結果

1) DDC 食投与により、WT マウス肝では、投与前に比し投与 4 週後において約 45% 肥大したが、KO マウス肝では、肥大は投与 4 週後において約 3% と有意に抑制された。また、KO マウスにおける PCNA 蛋白発現は、WT マウスに比し投与後 2 週、4 週ともに抑制されていた。さらに、6 週までの KO マウスの生存率は、WT マウスに比し約 15% と有意に低下した。

2) DDC 食投与後 KO マウスの障害肝組織においては、WT マウスに比し CK19 陽性の肝幹 / 前駆細胞の誘導は有意に抑制され、CD133 / Prominin1 及び EpCAM の遺伝子発現も有意に低下していた。

3) Gab1 ノックダウン肝幹 / 前駆細胞の増殖は、対照に比し有意に抑制された。逆に、Gab1 過剰発現は、その増殖を有意に増加させた。

D. 考察

劇症肝炎に代表される重篤な肝障害時には、外科的肝切除後の肝再生と異なり、残存する成熟肝細胞自体の増殖は障害され、かわって肝幹 / 前駆細胞が出現し、その後肝再生や修復に寄与していると考えられている。しかしながら、その詳細な制御機構は明らかではない。

一方で、本邦において、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、肝疾患患者の死亡原因の多くを占める。特に、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。現在、これらの末期肝不全患者を救命する究極の治療法は、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、肝移植療法は、高額な医療費やドナー不足等、多くの問題を抱えている。従って、病態に特化した新規肝再生療法の開発が期待される。そこで、今回私たちは、肝幹／前駆細胞に着目し、その制御分子機構を詳細に解析することにより、新規肝再生療法開発への基礎的検討を行った。

アダプター蛋白 Grb2 associated binder-1 (Gab1) は、HB-EGF や HGF 等に代表される受容体型チロシンキナーゼの下流で機能するドッキング蛋白である。私たちは、これまで、肝特異的欠損マウスの作成及び解析を通じて、本分子がマウス70%部分肝切除術後の肝再生に重要な役割をはたしていることを明らかにしてきた。一方で、Gab1は、胎盤、皮膚、心臓、肝臓といった様々な臓器の発生過程で重要な役割を担っていることが、その遺伝子欠損マウスの解析から明らかになっている。さらに、神経幹／前駆細胞の初代培養実験系における解析より、Gab1がEGF依存性のマウス神経幹／前駆細胞の増殖を制御していることも証明されている。以上より、Gab1が様々な臓器の発生、再生を制御している可能性が示唆されたが、肝幹／前駆細胞の制御機構における関与は明らかではない。

今回の検討で、Gab1がマウス肝幹／前駆細胞を介した肝再生を制御していることが、肝特異的欠損マウスの解析より明らかになった。さらに、マウス肝幹／前駆細胞株を用いた検討により、Gab1が実際にその増殖を制御していることを証明した。実際に、肝幹／前駆細胞において、Gab1を介した増殖シグナルが深く関与していたことより、本分子が重篤な急性肝障害における肝再生療法の新規ターゲット分子になる可能性が示唆された。今後、臨床サンプルを用いた検討により、本分子の関与をさらに確認するとともに、本分子を特異的に活性化させる液性因子の同定を行い、臨床応用を目指した検討を行っていく予定である。

E. 結 論

Gab1がマウス肝再生過程において、肝幹／前駆細胞の増殖を制御していることが明らかになった。本研究は、肝幹／前駆細胞の肝再生におけるGab1の意義を明らかにしただけでなく、本分子をターゲットとした新規肝再生療法の可能性を切り開くものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) Yoshida Y, Kizu T, Tsubakio M, Chatani N, Hamano M, Takemura T, Ezaki H, Kamada Y, Kiso S, Hayashi N. Gab1 scaffolding adaptor protein is required for stem/progenitor cell mediated liver regeneration in mice. (AASLD 2010 Boston, 平成22年11月, Parallel session 口頭発表)
 - 2) 吉田雄一, 木曾真一, 林紀夫 アダプター蛋白 Gab1は、肝再生過程における肝幹／前駆細胞の増殖分化に関与する (第14回日本肝臓学会大会 平成22年10月 ワークショップ16: 肝胆膵疾患と組織幹細胞/progenitor cell: 病態解析と治療戦略 口頭発表)
 - 3) 吉田雄一, 木曾真一, 林紀夫 肝再生における肝幹／前駆細胞の関与: アダプター蛋白 Gab1の重要性について (第46回日本肝臓学会総会 平成22年5月 移植・再生医療ワークショップ2 肝再生医学—臨床応用を目指した研究の新展開 口頭発表)
 - 4) 吉田雄一, 木曾真一, 林紀夫 肝幹／前駆細胞を介した肝再生におけるアダプター蛋白質 Gab1の意義 (第96回日本消化器病学会総会 平成22年4月 ワークショップ6 消化器幹細胞研究の進歩—病態から治療へ 口頭発表)

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

感染培養系を用いた劇症 E 型肝炎ウイルス株の解析

研究協力者 岡本 宏明 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門 教授

研究要旨：E型肝炎ウイルス（HEV）感染の多くは不顕性であるが、肝炎を発症し、重症化・劇症化し不幸な転帰をとる症例の存在は看過できない。わが国では遺伝子型3型、あるいは4型のHEVによる散発性E型肝炎が見られるが、3型HEVに比べて4型HEVが肝炎の重症化・劇症化と密接な関連があることがこれまでの疫学調査によって明らかにされている。HEVの感染培養系を用い、急性肝炎患者由来の3型HEV（JE03-1760F）株と劇症肝炎患者由来の4型HEV（HE-JF5/15F）株の増殖能を比較した結果、4型HEVの方が明瞭に活発な増殖パターンを示した。また、HE-JF5/15F株の感染性cDNAクローン、および非劇症型の4型HEVに認められる3148番目の塩基がC（3148C）や5907番目の塩基がA（5907A）、あるいはT（5907T）に置換された変異cDNAクローンを作製し培養細胞（PLC/PRF/5およびA549細胞）での増殖能を比較した結果、これらの変異が増殖効率に影響していることが示された。したがって、ゲノム変異によるウイルス増殖能の亢進が4型HEVによる肝炎の重症化に関与している可能性が考えられる。

研究協力者

高橋 雅春 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門
長嶋 茂雄 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門
田中 利典 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門
吉林 台 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門
西澤 勉 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門
井上 淳 東北大学大学院医学系研究科
消化器病態学

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス（HEV）は1型から4型までの4種類の遺伝子型に分類されている。1型と2型のHEVは発展途上国での流行性肝炎に関係し、3型と4型のHEVはブタや野生イノシシなどを宿主とし、ヒトでの動物由来感染症の一つとして、先進国での散発性E型肝炎の原因となっている。わが国では3型HEV、あるいは4型HEVによるE型肝炎が中高年男性を中心に発生しており、3型HEVに比べて4型HEVが肝炎の重症化・劇症化と密接な関連があることが疫学研究によって明らかになっている（J Med Virol 76:341-349, 2005）。しかし、その機序は不明である。

本研究では、E型劇症肝炎患者に由来する4型HEV株の細胞培養系を確立し、ゲノム変異とウイルス増殖能との関連性について検討することを目的とする。

B. 研究方法

1. 接種材料

国内感染のE型急性肝炎患者由来のHEV（JE03-1760F [3型]）、およびE型劇症肝炎患者由来のHEV（HE-JF5/15F [4型]）を含有する10%糞便浮遊液を用いた。

2. 細胞培養

PLC/PRF/5細胞、あるいはA549細胞のmonolayerを作製し、HEVを接種した。細胞培養

は既報（J Gen Virol 88:903-911, 2007）に準拠して行った。また、子ウイルスを含む培養上清をポアサイズ0.22mmのフィルターを通し、cell-freeとしたのち、新たな細胞monolayerに接種し、継代培養を行った。

3. HEV RNAの定量測定

QuantiTect Probe RT-PCRキット（Qiagen）を用い、保存性の高いORF3領域を標的領域としてTaqMan（real-time RT-PCR）法によりHEV RNAの定量測定を行った。

4. 感染性HEV cDNAクローンの作製

JE03-1760F株の感染性cDNAクローンを作製した方法（J Gen Virol 90:457-462, 2009）に準拠し、HE-JF5/15F株のゲノムRNAを鋳型にして、RT-PCR法によりゲノム全長をカバーするcDNA断片を増幅した。そのcDNA断片をT7プロモーターとpoly（A）配列との間に挿入したゲノムプラスミド（pHE-JF5/15F_wt）を構築した。In vitro transcription法により全長RNAを合成し、5'末端にキャップを付加したのち、TransIT-mRNA transfectionキット（Mirus Bio社）を用いてPLC/PRF/5細胞に導入した。また、3148番目の塩基をTからCに置換したクローン（3148C）、5907番目のCをA（5907A）、あるいはT（5907T）に置換したクローンを作製した。さらに、4719番目と4722番目の2つの塩基をCに置換し、ORF1のRNAポリメラーゼの活性部位GDD（Glycine-Aspartic acid-Aspartic acid）をGAA（Glycine-Alanine-Alanine）に変異させ、増殖能を欠いたnegative controlとしてΔORF1も作製し、PLC/PRF/5細胞へのtransfection、および培養上清中ウイルスの新たな細胞への接種実験を行った。

倫理面への配慮：研究用糞便検体の採取に際して、インフォームドコンセントが得られている。そして、検体提供者は匿名化されているため、個人のプ

ライバシーを侵害することはない、人権上の問題は生じない。

C. 研究結果

1. 4型劇症肝炎 HEV (HE-JF5/15F) 株による細胞培養系の確立

E型劇症肝炎患者から得られた糞便浮遊液を PLC/PRF/5細胞および A549細胞に接種することにより、4型 HEV (HE-JF5/15F) 株の培養系を確立することができた。既報の3型の急性肝炎患者由来 JE03-1760F 株 (J Gen Virol 88:903-911, 2007) と同様に、培養上清を用いた cell-free virus の継代培養が可能であり、5代目の継代培養において、接種後2日目に培養上清中で子ウイルスの出現が確認され、12日目に107 copies/ml に達した。3型 JE03-1760F 株に比べてより活発な増殖パターンを示した。

2. HE-JF5/15F 株の感染性 cDNA クローンの作製

In vitro で合成したゲノム RNA を PLC/PRF/5細胞に導入したところ、 Δ ORF1では子ウイルスの産生が認められなかったのに対して、野生株 pHE-JF5/15_wt では培養上清中に108 copies/ml に達する高いレベルの HEV の産生が認められた。この cDNA 由来 HEV は PLC/PRF/5細胞や A549細胞で継代可能であり、それぞれの細胞において糞便由来野生株 HE-JF5/15F とほぼ同等の増殖性を示すことが分かった。

3. 変異 HE-JF5/15F クローンの評価

3148番目の塩基に関して、劇症型の T に比べ、非劇症型の C に変異することにより、接種後2日から30日までの期間、培養上清中の HEV RNA titer は約4分の1になった。また、5907番目の塩基に関して、劇症型の C から非劇症型の A (5907A) あるいは T (5907T) に置換することにより、培養上清中の HEV RNA titer は4分の1ないし10分の1に低下した。

D. 考 察

急性肝炎患者に由来する3型 HEV (JE03-1760F) よりも劇症肝炎患者に由来する4型 HEV (HE-JF5/15F) がより活発な増殖能を示したことは、今後複数の HEV 株での再現性の確認が必要であるが、劇症肝炎発症にウイルス増殖能が重要な役割を演じていることを示唆している。また、劇症肝炎患者および非劇症肝炎患者から分離された4型 HEV の全塩基配列を比較することによって見出された劇症肝炎関連塩基 (3148, 5907) (J Med Virol 78:476-484, 2006; Tohoku J Exp Med 218:279-284, 2009) はともにアミノ酸置換を伴わないが、劇症型から非劇症型の塩基に置換することにより、増殖効率が4分の1ないし10分の1に低下したことは、このような同義置換であってもウイルスの増殖能に影響していることを示すものであり、また複数の変異が複合的に影響している可能性が考えられる。3148

番目と5907番目の塩基での同義変異について、RNA の2次構造の変化が影響しているのか、その他の原因が関係しているのか、今後その機序を明らかにする必要がある。

E. 結 論

本研究により、ゲノム変異によるウイルス増殖能の亢進が4型 HEV 感染による肝炎の重症化に関与してい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. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuo H, Okamoto H. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. J Clin Microbiol 47:1906-1910, 2009.
2. Inoue J, Takahashi M, Mizuo H, Suzuki K, Aikawa T, Shimosegawa T, Okamoto H. Nucleotide substitutions of hepatitis E virus genomes associated with fulminant hepatitis and disease severity. Tohoku J Exp Med 218:279-284, 2009.
3. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. J Clin Microbiol 48:1112-25, 2010.
4. Okamoto H. Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood. Rev Med Virol, 2011, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許申請 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

劇症肝炎における Toll-like receptor を介した免疫応答に関する研究

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：Toll-like receptor (TLR) は、ヒトでは10種類存在し、それぞれ異なる病原体構成成分を認識し自然免疫に関与する遺伝子を誘導することが知られている。今回、肝障害誘導における各 TLR の役割について研究した。wild type マウスおよび腫瘍壊死因子 α (TNF α) ノックアウトマウスに、D-ガラクトサミンおよびそれぞれの TLR に対するリガンドを腹腔内投与し、血清 ALT 値および TNF α 値、肝組織像の変化と相違について検討した。結果、TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9 において、TNF α の増加とともに著明な肝障害が認められたことより、これらの TLR が肝炎の進展に重要な役割を果たしており、さらに肝障害誘導には TNF α を介した免疫応答が重要である事が明らかにされた。

共同研究者

永木 正仁 岐阜大学大学院消化器病態学
塚田 良彦 岐阜大学大学院消化器病態学

A. 研究目的

マクロファージや樹状細胞上に発現する Toll-like receptor (TLR) が、細菌、真菌、ウイルスなどの病原体構成成分を認識することにより自然免疫に関与する遺伝子の活性化を介して炎症性サイトカインを誘導することが明らかになってきた。また、TLR はヒトの場合10種類が報告されているが、各 TLR はそれぞれ異なる病原体構成成分を特異的に認識することも報告されている。しかしながら、肝における自然免疫において、肝障害誘導について、いずれの TLR が特に重要な因子となり得るかは不明な点があるため、今回は D-ガラクトサミンおよび各 TLR リガンドを C57BL/6J マウスおよび TNF α ノックアウトマウスの腹腔内に投与することで、肝障害誘導におけるそれぞれの TLR を介したシグナル伝達機構の相違について検討することを目的とした。

B. 研究方法

C57BL/6J マウス (wild type マウス) および TNF α -ノックアウトマウスの腹腔内に D-ガラクトサミン 10mg を投与したのち、TLR に対するリガンドを腹腔内投与した。リガンドには、TLR1/2: Lipoteichoic acid (LTA) 100 μ g, TLR2/6: Peptidoglycan (PGN) 200 μ g, TLR3: poly (I:C) 100 μ g, TLR4: Lipopolysaccharide (LPS) 10 μ g, TLR5: Flagellin 40 μ g, TLR7/8: R848 200 μ g, TLR9: CpG-ODN 50 μ g を使用し、リガンド投与後 2 時間および 8 時間の血清中の ALT 値、TNF α 値を測定した。また肝組織像について HE 染色および TUNEL 染色を行い、肝障害について組織学的相違の有無を調べた。

C. 研究結果

・Wild type マウスにおける血清 ALT 値および TNF α レベルの変化

wild type マウスにおいて、TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9 に対するリガンド投与後 8 時間の血清 ALT 値 (IU/L) はそれぞれ 2978, 2689, 3331, 2865 と高度に上昇したが、TLR2/6, TLR5, TLR7/8 に対するリガンド投与では ALT 値の上昇を認めなかった (図 1)。

一方、リガンド投与後 2 時間の血清 TNF α 値および肝組織中の messenger RNA 発現量も血清 ALT 値と同様に TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9 では高値となったが、TLR2/6, TLR5, TLR7/8 では上昇を認めなかった。

この結果より、TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9 が肝自然免疫による肝障害におけるパターン認識受容体として重要な役割を有しており、それには TNF α を介した免疫応答が関与している可能性が示唆された。

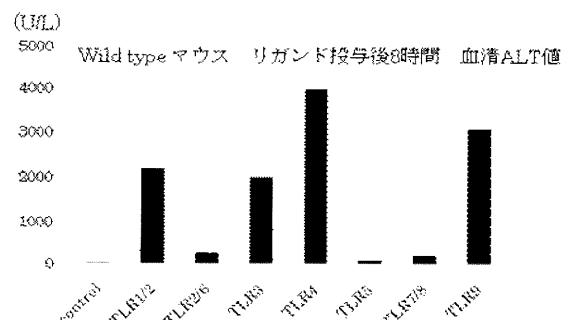


図 1 Wild type マウスにおけるリガンド投与後 8 時間の血清 ALT 値

・TNF α ノックアウトマウスにおける血清 ALT 値および TNF α レベルの変化

TNF α ノックアウトマウスでは、いずれのリガンド投与群においても投与後 8 時間の血清 ALT 値 (IU/L) および投与後 2 時間の血清 TNF α 値および肝組織中の messenger RNA 発現量に変化は認めなかった。この結果より、肝における自然免疫には TNF α の関与が不可欠であることが示された。

・リガンド投与後の肝組織像における変化の相違

肝組織像においてリガンド投与 2 時間後は、HE,

TUNEL ともにいずれのリガンド投与群においても変化はみられなかったが、TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9に対するリガンド投与8時間後において、wild type マウスではHE染色にて、高度の炎症性細胞の浸潤や出血を認め、TUNEL陽性細胞の増加がみられた(図2)。なお、それぞれのリガンド投与群間に組織学的相違は認めなかった。一方、TLR2/6, TLR5, TLR7/8に対するリガンド投与8時間後において、wild type マウスでは肝組織像の変化を認めなかった。TNF α -KO マウスではいずれのリガンド投与の場合も肝組織の変化は認めなかった。これらの結果より、肝においてはTLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9からの免疫応答によりTNF α を介したアポトーシスが誘導されることが示唆された。

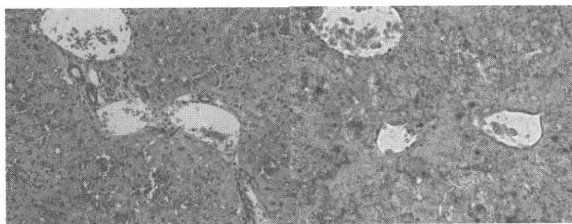


図2 Wild type マウスにおけるLipopolysaccharide投与後8時間の肝組織像(左: HE染色, 右: TUNEL染色)

D. 考 察

肝臓は様々なTLRを発現する実質細胞および非実質細胞のネットワークを保有し、肝細胞はすべてのTLRを発現すると報告されている。今回の実験では、GalNとTLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9に対するリガンドを投与した群において強い肝障害を生じており、これらのTLRが侵入病原体に対するパターン認識受容体として重要な役割を果たしており、さらに致死性肝障害を惹起する免疫応答に関与している可能性が示唆された。また、これらの肝障害誘導にはTNF α を介した免疫応答が重要である事が示された。

今回の研究では、肝のいずれの細胞に発現するTLRが主要な免疫応答に関与しているかは検討していないが、クッパー細胞が門脈を經由した消化管由来の病原体構成成分が最初に遭遇する細胞であるため、肝自然免疫において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。クッパー細胞を始めとした肝を構成する細胞それぞれの役割、IL-12, IL-6などTNF α 以外の炎症誘発性サイトカインの関与、線維化や発癌との関連については、さらなる検討課題である。

E. 結 論

肝臓の自然免疫においては、TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR9が重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、これらの免疫応答には、TNF α の関与が不可欠であることが示唆された。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Moriwaki H., Shiraki M, Iwasa J, Terakura Y: Hepatic encephalopathy as a complication of liver cirrhosis: an Asian perspective. J Gastroenterol Hepatol 25, 858-63, 2010.

2. 学会発表

第46回肝臓学会総会 2010年5月27日 山形 一般口演「肝障害誘導におけるToll-like receptorの関与」塚田良彦 永木正仁 末次 淳 大澤陽介 木村公則 森脇久隆

The 18th United European Gastroenterology Week 2010年10月25日 バルセロナ

Basic science workshop「Pattern recognition receptor signalling」

Toll-like receptor induce lethalhepatic inflammation in D-galactosamine-sensitized mice.

Tsukada Y, Nagaki M, Suetsugu A, Osawa Y, Kimura K, Moriwaki H.

The 18th United European Gastroenterology Week 2010年10月26日 バルセロナ

Free paper session「Basic aspects of inflammation and fibrosis in the liver and pancreas」

Toll-like receptor induce lethalhepatic inflammation in D-galactosamine-sensitized mice.

Tsukada Y, Nagaki M, Suetsugu A, Osawa Y, Kimura K, Moriwaki H.

G. 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 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

HGF による骨髄造血前駆細胞の肝臓へのホーミング促進作用

研究協力者 汐田 剛史 鳥取大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：劇症肝炎などの重症肝障害で骨髄細胞が肝臓へホーミングするが、ホーミングする細胞とその機序を検討した。その結果、HGF は量依存性に末梢血への動員を促進した。ホーミング細胞は、Lin-c-kit+Sca-1+CD34+ 細胞であり、造血前駆細胞であった。この作用に MMP-9 は関与せず、HGF による SCF 誘導作用であることが明らかになった。HGF による肝臓へのホーミングは、HGF 誘導群では G-CSF 群に比較し、1 ヶ月では有意に増加したが、2 ヶ月後では同程度であった。

A. 研究目的

劇症肝炎などの重症肝障害で骨髄細胞が肝臓へホーミングし、肝再生に寄与することが報告されているが、ホーミングする細胞種とその機序は不明である。劇症肝炎での病態を検討する意味でこの点を明らかにすることが重要であり、ホーミングする細胞種とその機序について検討した。

B. 研究方法

1. HGF 発現トランスジェニックマウス群、HGF 発現アデノウイルスベクター投与マウス群、リコンビナント HGF 投与マウス群で、末梢血 CD34 陽性細胞、コロニーアッセイを行った。2. コンジェニックマウスを用い、HGF 投与後の末梢血幹細胞移植マウスでのドナー由来細胞数、ドナー由来の幹細胞分画 (Lin-c-kit+Sca-1+CD34+ 細胞) を検討した。3. 雄性 MMP-9 KO マウスに HGF 投与後に末梢血幹細胞を雌性マウスへ骨髄移植し、2 ヶ月後の骨髄細胞での sry 遺伝子の存在を検討した。4. GFP 陽性マウスで、HGF、G-CSF、PBS にて骨髄細胞を誘導し、末梢血幹細胞移植した後、1 ヶ月後、2 ヶ月後の肝臓での GFP 陽性細胞をカウントした。5. マウス骨髄間質細胞 MR5 を用い、HGF 添加後の c-met のりん酸化、SCF mRNA、SCF 蛋白、培養上清 SCF を測定した。SDF-1、CXCR4、VCAM の mRNA 発現も検討した。

C. 研究結果

1. HGF 発現トランスジェニックマウス群、HGF 発現アデノウイルスベクター投与マウス群、リコンビナント HGF 投与マウス群で、末梢血 CD34 陽性細胞数、コロニー形成数有意に増加していた。2. HGF により骨髄より末梢血に増員される細胞は Lin-c-kit+Sca-1+CD34+ 細胞であり、造血幹細胞であった。3. MMP-9 KO マウスでも HGF による動員が行われていた。4. 肝臓への骨髄細胞のリクルートは、1 ヶ月後には HGF で誘導される細胞数は G-CSF で誘導される細胞数に比較し有意に増加し、2 ヶ月には同様であったが、PBS 投与群に比べ有意に増加していた。5. HGF 投与により、c-met のりん酸化が起り、SCF mRNA 及び蛋白の発現量の増加、SCF 蛋白の細胞外分泌量が増加した。SDF-1、CXCR4、VCAM の

mRNA 発現の変化は無かった。

D. 考察

HGF により誘導される細胞は Lin-c-kit+Sca-1+CD34+ 細胞であった。すなわち、造血幹細胞のマーカを持つ細胞であった。また、この機序には、従来報告されている MMP-9 の関与は認めなかった。

E. 結論

劇症肝炎などの重症肝炎で、骨髄より末梢へ動員される細胞は、Lin-c-kit+Sca-1+CD34+ の造血幹細胞である。この機序には、HGF が SCF を誘導し、骨髄間質細胞から造血幹細胞を遊離させる作用を促すことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tajima F, et al. Hepatocyte growth factor mobilizes and recruits hematopoietic progenitor cells into liver through a stem cell factor-mediated mechanism, *Hepatology* 40,711-719,2010

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

急性肝障害マウスモデルにおける骨髄細胞投与の検討

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：急性肝障害に対する自己骨髄細胞投与の治療効果を、「四塩化炭素誘発急性肝障害マウスへの GFP 陽性骨髄細胞投与モデル」で評価した。結果、投与骨髄細胞の肝内での生着は一時的で、明らかな肝障害抑制効果や肝細胞増殖促進作用は認められなかった。しかしながら骨髄細胞投与肝ではオートファジー（自食作用）が亢進しており、これが肝障害で蓄積した不要な蛋白質処理や、肝再生に必要なアミノ酸供給に関与し、肝再生には促進的に作用している可能性が示唆された。

研究協力者

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 准教授
高見 太郎 山口大学医学部附属病院検査部 助教

day5において BMi 群でやや高い傾向を認めたものの有意な差ではなかった。さらに Autophagy を LC3B 発現により組織学的に評価したところ、BMi 群において陽性細胞を多く認めた。

A. 研究目的

我々はこれまで非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与の肝線維化・肝機能改善効果を明らかにしてきた。しかし急性肝障害に対する自己骨髄細胞投与の有用性については明らかではない。そこで今回、急性肝障害に対する骨髄細胞投与の治療効果をマウスモデル系で検討評価する。

B. 研究方法

生後 6 週 C57BL/6 マウス腹腔内に四塩化炭素を単回投与（2.0ml/Kg body; 25% v/v in corn oil）し、これを急性肝障害モデルとした。四塩化炭素投与 24 時間後（day1）に同種同系 GFP 陽性骨髄細胞を尾静脈投与（ 1×10^6 個 / 匹）し、day2, 5, 8 における生存率、血液生化学検査成績（ALT, AST, LDH）および肝組織学所見（H&E, GFP, Ki67, LC3B 発現）を解析評価した。

（倫理面への配慮）全ての動物実験は山口大学医学部動物実験委員会の審査を受け許可を得ており、「山口大学医学部動物実験指針」、「動物の保護及び保管に関する法律」（法律第105号）及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」（総理府告示第6号）の規制に基づいて行った。

C. 研究結果

生存率は day8 で骨髄細胞非投与群（Ctrl; n=15）80%、骨髄細胞投与群（BMi; n=15）100%であったが有意差は認めなかった。血清 ALT, AST, LDH 値にも両群間に差を認めなかった。H&E 染色で評価した壊死面積は、両群とも day2 で中心静脈周囲に広範な壊死を形成したが面積に有意差はなく、day8 には両群とも壊死はほぼ消失した。

また投与骨髄細胞を GFP 免疫染色により評価したところ、day2, 5 では肝内にその生着を認めたが、day8 では確認されなかった（図 2、矢印が GFP 陽性細胞）。Ki67 陽性細胞数で評価した肝細胞増殖は、

D. 考 察

今回の急性肝障害モデル系では、これまでの慢性持続肝障害マウスモデル（GFP/CCl₄モデル）とは異なり投与骨髄細胞は肝内に生着したものの一時的であった。また投与骨髄細胞の肝障害抑制効果や肝細胞増殖促進作用を評価したが、今回の条件では有意な効果・作用は認めなかった。一方で骨髄細胞投与が Autophagy を亢進させる可能性が示唆された。この Autophagy は肝障害で蓄積した不要な蛋白質処理や、肝再生に必要なアミノ酸供給に関与している可能性があるため、肝再生過程には利する変化であると考えられた。

E. 結 論

骨髄細胞投与の急性肝障害に対する明らかな治療効果を認めるには至らなかったが、骨髄細胞投与が急性肝障害における Autophagy を亢進させる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

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

血漿交換と血液濾過透析を組み合わせた人工肝補助療法の除去能力

研究協力者 井上 和明 昭和大学藤が丘病院 消化器内科 准教授

研究要旨：劇症肝炎の病態形成にサイトカインストームが関与していることは、かねてより指摘されているが、血液濾過透析のサイトカインを除去能力についてこれまで詳細な検討はなかった。今回成因不明の劇症肝炎患者を対象にして、血液濾過透析を行いその廃液中のサイトカインの除去量を検討したところ、1セッションの血液浄化で数百 μ グラムのサイトカインを除去しうることが明らかになった。サイトカインストームの改善には血液浄化に加え免疫抑制が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

血漿交換と血液濾過透析を組み合わせた血液浄化療法は劇症肝炎治療において内科集中治療の必須のアイテムとなっている。血漿交換の目的は欠乏する血漿タンパクの補充と体内分布の小さいタンパク結合性物質の除去である。血液濾過透析の目的は体内分布の大きな水溶性の毒性物質を除去で、その結果脳浮腫を予防し、患者を昏睡から覚醒させることにある。

血液浄化療法の有効性に関する研究は、エンドポイントを患者の生死に置いた研究が大半で、その他の指標としても生死の代替指標である28日生存率や対症療法としての評価である覚醒率などの臨床上の指標で、直接的に物質の除去効率を詳細に検討した研究は、筆者が昨年報告したグルタミン等の除去効率の検討だけである。前回の研究は小分子が対象であったが、今回は中分子から大分子に属するサイトカインの除去について検討する。劇症肝炎はサイトカインストームが病態形成に重要な役割を演じていると考えられているが、血液濾過透析のサイトカインの除去能力は未だに検討されていないので、除去能の検討は今後の治療戦略上の重要な基礎データになると考えられる。

B. 研究方法

対象は劇症肝炎亜急性型5例と急性型2例である。年齢は42才（32-69才）男性が4例女性3例で全例が成因不明例である。昏睡はIII度1例 IV度5例 V度1例であった。全例血漿交換とonline-HDFを組み合わせた血液浄化療法と免疫抑制療法および抗ウイルス療法を行い、7例中4例が生存した。人工肝補助の回数は20回（4-29回）であり、人工肝補助療法施行中に廃液を1%ずつ集めた。

廃液は1時間ごとに回収して、測定までマイナス80℃に保存した。

血液濾過透析の廃液中のサイトカインを、bioplexを用いて測定した。測定したサイトカインは表1に示したとおりである。

C. 研究結果

すべてのサイトカインがonline HDFにより効率よく除去されていることが明らかになった。

サイトカインの中でもTh1/Th17系がactivateされて、この系統のサイトカインが効率よく除去されたことがわかった。代表的なサイトカインの除去量を図1に示す。

D. 考 察

血液濾過透析はサイトカインストームの状態にある劇症肝炎において、効率よくサイトカインを除去することがわかった。サイトカインは極めて大量に産生されるので、血中濃度を下げるには大量の除去と免疫学的なトリガーポイントを抑制する必要がある。

E. 結 論

オンラインHDFは大量のサイトカインの除去を可能にした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue K, Watanabe T, Hirasawa H, Yoshiba M. Liver support systems as perioperative care in liver transplantation - historical perspective and recent progress in Japan. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010; 56: 345-353

Inoue K, Watanabe T. Japanese style intensive medical care solves the shortage of organ donor and improves perioperative care of liver transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42: 4109-4112

2. 学会発表

井上和明, 与芝真彰. 急性肝不全患者の肝移植術前の人工肝補助療法に求められるもの. 第36回日本急性肝不全研究会, 山形.

Inoue K, Yamamura E, Watanabe T, Yoshiba M. Prediction and early intervention improved the survival rate of patients with fulminant hepatic failure. *Digestive Disease Week 2010 (DDW 2010, New Orleans, U.S.A.)*

Inoue K, Yamamura E, Watanabe T, Yoshiba M.

Originally developed intensive medical care for fulminant hepatic failure improved patients' survival rate and also safely bridge patients to liver transplantation. Digestive Disease Week 2010 (DDW 2010, New Orleans, U.S.A.)

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

劇症肝炎に対する肝移植：本邦の経験

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：難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班が行ってきた全国施設を対象とした調査により、劇症肝炎および遅発性肝不全（LOHF: late onset hepatic failure）の患者背景、臨床像、予後および治療法が報告されている。しかし、それらのうち肝移植実施症例における予後の詳細な臨床像は不明である。本研究では、当該データベースに含まれる肝移植実施症例について、その移植術後の成績を調査した。移植術後の成績については肝移植研究会のデータベースから抽出した。調査の対象となったのは226例で、うち212症例について肝移植研究会のデータベースとから同一症例が抽出された。肝移植後の1年・5年・10年生存率は80%、73%、72%と良好であった。劇症肝炎の病型、成因分類、患者年齢、ドナー年齢による生存率の有意差は認めなかった。今後は抽出したデータの再現性について検証し、肝移植の予後に関与する術前因子についての検討を進展させたい。

共同研究者

菅原 寧彦 東京大学医学部 人工臓器移植外科
田村 純人 東京大学医学部 人工臓器移植外科
山敷 宣代 東京大学医学部 臓器移植医療部
坪内 博仁 鹿児島大学 消化器・生活習慣病
桶谷 真 鹿児島大学 消化器・生活習慣病
持田 智 埼玉医科大学 消化器内科
中山 伸朗 埼玉医科大学 消化器内科
梅下 浩司 大阪大学医学部 消化器外科
上本 伸二 京都大学医学部 肝胆膵・移植外科

A. 研究目的

難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班が行ってきた全国施設を対象とした調査により、劇症肝炎および遅発性肝不全（LOHF: late onset hepatic failure）の患者背景、臨床像、予後および治療法が報告されている。しかし、それらのうち肝移植実施症例における予後の詳細な臨床像は不明である。日本における主要な肝臓移植プログラムでの肝移植の成績をまとめ報告する。

B. 研究方法

【対象】

難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班の劇症肝炎分科会において調査が既に終了している移植症例を対象とした。

対象期間：1998年～2008年

疾患：劇症肝炎、LOHF

【方法】

- 1) 難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班の劇症肝炎分科会において調査が既に終了している移植症例のデータを分担研究者に依頼して入手。
- 2) 難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班のデータベース（以下研究班 DB）と一致する症例について、肝移植研究会の「肝移植症例登録」データベース（以下肝移植研究会 DB）から抽出。照合する項目として移植実施施設・移植実施日・年齢・性別を

用い、同一と考えられる症例について以下の項目を入手する；観察期間、生死、ドナー性別、年齢、グラフトタイプ、グラフトサイズ、移植時診断。

3) 研究班 DB と肝移植研究会 DB の不一致項目について、調査票に戻り確認する。

4) 病型分類、成因分類、年齢、性別、ドナー年齢、性別、肝移植適応ガイドライン（新）スコアについて分析する。生存に関わる予後規定因子を解析する。

【エンドポイント】

Primary endpoint: 移植後の生存。

Secondary endpoint:

生存にかかわる予後規定因子

劇症肝炎、LOHF の肝移植適応ガイドライン（新）の、移植症例におけるスコア

C. 研究結果

研究班 DB から、移植症例226例が抽出された。

226例について肝移植研究会 DB に合致する症例の生存データを依頼したところ、221例の合致例について回答を得た。残る5例中4例は重複、1例は海外渡航症例であった。次に221例中9例を対象から除外した。この9例は肝移植研究会 DB データ上劇症肝炎の診断名ではなく、自己免疫性肝炎（3）、肝硬変（4）、アルコール性肝硬変（1）、ウイルソン病（1）となっていた。

最終的に212例を本解析の対象とした。年齢は中央値40（2-70）歳、18歳以上193例（91%）、男性83例（39%）であった。病型別では急性型71例（34%）、亜急性型126例（59%）、LOHF15例（7%）であった。

全肝（脳死肝移植）3例、生体部分肝移植209例で、グラフト種類別では左葉99例、外側区1例、右葉106例、後区域3例であった。血液型は一致または適合197（93%）、不適合13（6%）で不明が2例（1%）であった。生体ドナーの年齢は中央値38（19-60）歳で、男性123例（58%）であった。

成因別での分布を表1に示す。成因不明のものは

100例 (47.1%) と最も多く、次いで B 型肝炎による 59例 (27.8%) であった。

研究班 DB の詳細な調査に基づいた成因分類を有効としたが、肝移植研究会 DB の成因分類と一致しないものも認めた。肝移植研究会 DB に登録された成因分類と一致していた症例は 169例 (79%) であった。

肝性脳症発現時の所見に基づき、肝移植適応ガイドライン (新) のスコアを計算した。データ欠損の無い 177例を検討した。急性型 (n=58)、亜急性型 (n=108)、LOHF (n=11) におけるスコアの分布はそれぞれ 3.8 ± 1.6 , 6.3 ± 1.3 , 6.9 ± 2.1 であった。

生存

212例の観察期間は 5.6 (0.1-12.2) 年で、54例が死亡していた。肝移植術後の累積生存率は 1 年 80%、5 年 73%、10 年 72% であった。

血液型適合または一致の症例と不適合症例での生存率には有意な差を認めた ($p=0.046$)。病型別では急性型、亜急性型、LOHF の 5 年生存率はそれぞれ 73%、73%、86% で有意差は無かった ($p=0.485$)。

レシピエントの年齢が高くなるにつれ生存率が低い傾向があったが有意差は無かった ($p=0.079$)。ドナーの年齢別では生存率に有意差はなかった ($p=0.465$)。成因分類別でも移植後の生存率に有意差を認めなかった ($p=0.168$)。

表 1. 成因分類別の頻度

成因分類	成人	小児
A 型肝炎	3	0
HBV (急性感染)	37	0
HBV キャリア	13	1
HBV 判定不能	8	0
C 型肝炎	2	0
E 型肝炎	1	0
薬物性	21	0
自己免疫性	17	2
成因不明	87	13
分類不能	4	0
その他のウイルス	0	3
計	193	19

D. 考 察

本研究では、研究班 DB に既に蓄積されている劇症肝炎症例のうち肝移植を受けた症例について肝移植研究会 DB から抽出したデータを統合し調査した。日本における肝移植実施例については日本肝移植研究会が毎年登録業務を実施し報告されている。それによると本邦における 2008 年までの急性肝不全に対する初回生体肝移植症例は 527 例で、今回の調査ではその 40% (209/527) に該当する症例についてデータベースの統合が可能であった。

同一症例の抽出に当たり、診断や劇症肝炎の成因分類が異なる症例を認めた。研究班 DB は該当症例につ

いては三次調査まで実施され、その成因分類が明らかになるよう詳細に調査されている。一方肝移植を実施した後は摘出肝の病理学的な診断が可能であり、背景に慢性肝疾患が存在したかどうかを判明する可能性がある。今回の検討では、研究班 DB において劇症肝炎または LOHF として登録していた症例の内 9 例において肝移植研究会 DB の診断と一致しなかった。肝移植研究会 DB の診断名が肝硬変を含む慢性肝疾患の病名であったことから、術前劇症肝炎と考えられていたが手術により診断が変更された可能性も残る。

本邦の劇症肝炎の概念は欧米における急性肝不全 (Acute liver failure) の概念よりも狭い。また急性肝不全と診断された場合にその成因によっては肝移植の適応外とされる病態も存在する。

そういう意味では今回の検討はあくまで「肝移植を実施した劇症肝炎症例の検討」とされ、それが全体像をどこまで再現しているかが今後の検討課題となる。肝移植研究会からは急性肝不全症例として 527 例が報告されており、うち 18 歳 ≤ は 358 例 (67.9%)、成因不明例は 334 例 (63.3%) である。一方今回研究班 DB から抽出した 212 例については成人例が多く、成因不明例は 47.1% と少ない。さらに、肝移植研究会からの報告と比較し、本研究で対象とした期間はより最近に限定されていた。肝移植研究会 DB 母集団と本研究の対象となった症例に偏りがあるかの検討を要する。

今回の対象症例の中で脳死肝移植症例は極めて少数であった。法改正に伴う脳死移植の増加に伴い、生体ドナーの負担を伴わない脳死肝移植の占める位置付けの変化が予想され、本研究班として注意深く見守るべきであると思われる。

E. 結 論

劇症肝炎に対する肝移植は救急医、肝臓専門医、そして、コーディネータを含む移植医療者の連携の下に成立する。本邦において、肝移植を施行し得た劇症肝炎の成績は良好であることが確認された。一方、劇症肝炎の病型、成因分類による成績の差は今回の検討では明らかではなく、標準的な肝移植前の治療方法や理想的な肝移植のタイミングの検討を含め、さらに研究を深める必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Tateishi R, Yoshida H, Kaneko J, Matsui Y, et al. Postoperative surveillance with monthly serum tumor markers after living-donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2010;40:278-286.
- 2) Togashi J, Sugawara Y, Tamura S, Yamashiki N, Kaneko J, Aoki T, Hasegawa K, et al. Donor

- quality of life after living donor liver transplantation: a prospective study. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2010.
- 3) Tamura S, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Pre-emptive antiviral therapy in living donor liver transplantation for hepatitis C: observation based on a single-center experience. Transpl Int 2010;23:580-588.
 - 4) Sugawara Y, Tamura S, Kokudo N. Antiviral treatment for hepatitis C virus infection after liver transplantation. Hepat Res Treat 2010;2010:475-746.
 - 5) Shindoh J, Mise Y, Satou S, Sugawara Y, Kokudo N. The intersegmental plane of the liver is not always flat-tricks for anatomical liver resection. Ann Surg 2010;251:917-922.
 - 6) Sakata H, Tamura S, Sugawara Y, Kokudo N. Cost analysis of adult-adult living donor liver transplantation in Tokyo University Hospital. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2010.
 - 7) Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, et al. Incidence and management of biliary complications after adult-to-adult living donor liver transplantation. Clin Transplant 2010;24:535-542.
 - 8) Kishi Y, Imamura H, Sugawara Y, Sano K, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Evaluation of donor vasculobiliary anatomic variations in liver graft procurements. Surgery 2010;147:30-39.
 - 9) Kaneko J, Sugawara Y, Togashi J, Tamura S, Motoi R, Fukayama M, Kokudo N. Sarcomatous change of hepatocellular carcinoma in a patient undergoing living donor liver transplantation. Biosci Trends 2010;4:279-282.

日本語論文

- 1) 菅原寧彦. 劇症肝炎患者への肝移植適応 外科の立場から. 今日の移植. 2010;23: 320-322.
2. 学会発表
 - 1) 山敷宣代, 菅原寧彦, 田村純人, 金子順一, 野尻佳代, 青木琢, 長谷川潔, 別宮好文, 國土典宏. 東大病院における肝移植適応からみた, 移植施設紹介のタイミング. 第46回日本移植学会総会 2010年10月 一般口演.
 - 2) 菅原寧彦, 國土典宏. 生体ドナーの意思決定にどのようにかわるか生体ドナーの意思決定にどのようにかわるか? 「自発的意思」をめぐって移植医の立場から. 第46回日本移植学会総会 2010年10月 ワークショップ.
 - 3) 田村純人, 山敷宣代, 野尻佳代, et al. 脳死肝移植実施における現状と問題点 脳死肝移植実施における現状と問題点. 第46回日本移植学会総会 2010年10月 ワークショップ.
 - 4) 山敷宣代, 菅原寧彦, 國土典宏. 成人間生体肝移植後の長期予後に寄与する因子. 第18回日本消

化器関連学会週間 平成22年10月 ワークショップ.

- 5) 山敷宣代, 菅原寧彦, 國土典宏. 末期肝疾患と劇症肝炎における移植適応と移植施設紹介のタイミング. 肝臓学会東部会 平成22年12月 パネルディスカッション.

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 - 肝内結石症のコホート調査 -
杏林大学医学部 消化器一般外科学 森 俊幸
2. ①診断治療 WG
②硬化性胆管炎・診断基準 (案) WG
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
3. 発癌 WG
自治医科大学 消化器一般外科 鏡視下手術部 佐田 尚宏
4. 画像 WG - 肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断 -
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. 肝内結石における肝切除術後の手術部位感染症 (SSI) の発生頻度と要因について
和歌山県立医科大学 第二外科 山上 裕機
2. 無症状肝内結石症の自然経過
長崎県上五島病院 外科 八坂 貴宏
3. 肝内結石症からの発癌に関する病理学的研究：上皮内癌の出現様式に関する病理組織学的検討
金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 中沼 安二
4. 発癌から見た肝内結石症の取扱い - コホート調査の検討 -
杏林大学医学部 消化器一般外科学 森 俊幸
5. 肝内結石症の外科治療について
東北大学大学院医学系研究科 消化器外科 海野 倫明
6. 肝内結石症に対する肝切除症例の治療成績
名古屋大学大学院医学研究科 腫瘍外科学 榎野 正人
7. 原発性硬化性胆管炎に肝内結石症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
8. 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
金沢大学医薬保健研究域医学系 先端医療技術学講座 本多 政夫
9. 肝内胆管障害の発症メカニズム～胆汁成分、特にリゾ・リン脂質に着目して～
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
10. 肝内胆管癌に対する分子標的治療
一マルチターゲット阻害剤 Sorafenib の *In Vivo* モデルにおける有用性の検討
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