

Table3. Preoperative blood examination data of the hepatectomy patients

	Hepatolithiasis ^{a)} (n=42)	HCC ^{b)} (n=193)	Metastatic ca. ^{c)} (n=73)	P-value a) vs b) , a) vs c), b) vs c)
Plt (10 ⁹ /μl)	21.1 ± 8.8	17.1 ± 7.9	24.1 ± 9.4	P=0.004, N.D, p<0.001
PT(%) [*]	86.2 ± 15.7	84.7 ± 13.5	85.2 ± 13.7	N.D, N.D, N.D
AST(U/ml)	53.4 ± 18.3	57.1 ± 29.4	30.2 ± 9.3	N.D, p<0.001, p<0.001
ALT(U/ml)	50.5 ± 21.6	51.7 ± 32.8	31.4 ± 8.4	N.D, p<0.001, p<0.001
Total bilirubin (mg/dl)	1.3 ± 0.7	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.4	P<0.001, p<0.001, p<0.001
Albumin (g/dl)	3.9 ± 0.4	3.7 ± 0.5	4.0 ± 0.5	p=0.007, N.D, p<0.001
ICG-K value	0.15 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.04	p=0.004, N.D, p<0.001
HbA1c(%)	5.3 ± 0.3	6.0 ± 0.5	5.6 ± 0.4	p<0.001, N.D, p<0.001
WBC (#/μl)	11,100 ± 2,280	6,960 ± 1,820	7,650 ± 1,570	p<0.001, p<0.001, N.D
CRP (mg/dl)	0.9 ± 0.6	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	p<0.001, p<0.001, N.D

All data were shown with the means ± standard deviation

* Prothrombin time

Table4. Early-stage complications following hepatectomy

	Hepatolithiasis n=42	HCC n=193	Metastatic ca. n=73
Death	0	4 (2.2%)	1 (1.4%)
Surgical site infections	10 (23.8%) [*]	22 (11.3%) ^{**}	2 (2.7)
Remote site infections	2 (4.8)	8 (4.1)	3 (4.1)
Bile leakage	2 (4.8)	7 (3.6)	1 (1.4)
Flu	1 (2.4)	5 (2.6)	2 (2.7)
Disturbance of liver function	4 (9.5)	8 (4.1)	4 (5.5)
Pancreatitis	3 (7.1)	5 (2.6)	2 (2.7)
Gastro-intestinal bleeding	1 (2.4)	5 (2.6)	1 (1.4)
Intractable ascites	1 (2.4)	10 (5.2)	0
Intractable pleural effusion	1 (2.4)	11 (5.7)	1 (1.4)
Intra-abdominal bleeding	1 (2.4)	1 (0.5)	0
others	2 (4.8)	6 (3.1)	3 (4.1)

* p=0.034 compared with HCC, p<0.001 compared with Metastatic ca.

** p=0.044 compared Metastatic ca.

術後の感染性合併症を示す (Table5)。肝内結石症では Superficial or deep incisional SSI が 11.9%, Organ/Space SSI も 11.9% 合わせて 23.8% と HCC や 転移性肝癌に比較して有意に高頻度であった。しかしながら、呼吸器感染や尿路感染、カテーテル感染などの遠隔感染症には差は無かった。

Table5. Incidence of surgical site infections after hepatectomy

	Hepatolithiasis ^{a)} (n=42)	HCC ^{b)} (n=193)	Metastatic ca. ^{c)} (n=73)	P-value a) vs b) , a) vs c), b) vs c)
Surgical site infections (SSIs)				
Superficial or deep incisional SSIs	5 (11.9%)	15 (7.8%)	1 (1.4%)	N.D, p<0.001, p=0.050
Organ/space SSIs	5 (11.9%)	7 (3.6%)	1 (1.4%)	p=0.029, p<0.001, N.D
Remote site infections				
Respiratory infections	1 (2.4%)	3 (1.6%)	2 (2.7%)	N.D, N.D, N.D
Urinary tract infections	0	1 (0.5%)	0	N.D, N.D, N.D
Catheter-related infections	1 (2.4%)	4 (2.1%)	1 (1.4%)	N.D, N.D, N.D

肝内結石症例で SSI が高頻度である原因を探るために、胆管胆汁中細菌を検討した (Table6)。HCC では 7.8%, 転移性肝癌で 10.0% の陽性率に留まったのに対して、肝内結石症では 83.3% と有意に高く、さらに複数菌の感染率も高かった。つまり胆汁中細菌検出率の高いことが SSI の発生頻度に関与する可能性が示唆された。

Table6. Distribution of bacterial strains isolated from bile during the hepatectomy

	Hepatolithiasis (n=42)	HCC (n=51)	Metastatic ca (n=20)
No. of patients with positive culture (%)	35 (83.3%) [*]	4 (7.8%)	2 (10.0%)
Bacterial flora (mono / poly)	22 / 13	4 / 0	2 / 0

* p<0.001 compared with HCC or Metastatic carcinoma

肝内結石症例における胆汁中分離細菌、および SSI からの分離細菌を比較検討した (Table7)。胆汁中、SSI とともにグラム陽性菌では腸球菌がともに 19.2%, 31.4% と最も多く、グラム陰性菌では大腸菌がそれぞれ 21.2%, 21.4% と最も多く検出され、次いで肺炎桿菌が 13.5%, 14.4% と多かった。

肝内結石症の同一症例において、分離菌を比較してみると、10 例中 8 例で大腸菌、肺炎桿菌、腸球菌、緑膿菌などの同一菌が検出された。つまり胆汁中の分離菌が術後の SSI に反映することが確認され、肝内結石症で極端に SSI が多い原因と考えられた。

Table7. Relationship between isolated bacteria from bile during the operation for hepatolithiasis and those detected from SSIs

	Isolated bacterial species in the bile	Isolated bacterial species from SSIs
Gram-positive cocci	<i>MRSA</i>	0
	<i>MRSA</i>	1
	<i>S. epidermidis</i>	1
	<i>ONS</i>	0
	<i>Staphylococcus sp.</i>	2
	<i>Enterococcus sp.</i>	10 (19.2%)
	Others	2
Total	17 (32.7%)	6 (42.9%)
Gram-negative bacilli	<i>E. coli</i>	11 (21.2%)
	<i>Klebsiella sp.</i>	7 (13.5%)
	<i>Enterobacter sp.</i>	3
	<i>Pseudomonas sp.</i>	5
	<i>Serratia sp.</i>	2
	<i>Bacteroides sp.</i>	3
	Others	3
Total	34 (64.4%)	8 (57.1%)
None	<i>Candida sp.</i>	1
Total (bacteria + fungi) (Number of strains)	52	14

Table8. Case-specific data of SSI-positive patients following hepatectomy for hepatolithiasis

Patients	Hepatectomy procedures	Bacterial species in bile during hepatectomy	Bacterial species from SSI	Type of SSI [*]
1 61 F	Left hepatectomy	<i>E. coli</i> , <i>Bacteroides sp.</i>	<i>E. coli</i>	O
2 51 M	Left hepatectomy	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>MRSA</i>	O
3 42 M	Lateral sectionectomy	<i>Klebsiella sp.</i> , <i>Bacteroides sp.</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	O
4 54 M	Lateral sectionectomy	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter sp.</i> , <i>MRSA</i>	O
5 65 F	Right hepatectomy	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	O
6 46 F	Lateral sectionectomy	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>E. coli</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	S
7 55 F	Lateral sectionectomy	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i>	S
8 67 F	Right hepatectomy	<i>Serratia sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	S
9 72 M	Left hepatectomy	<i>E. coli</i> , <i>Bacteroides sp.</i>	<i>E. coli</i>	S
10 69 F	Left hepatectomy	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	S

* O: organ/space SSI

S: superficial or deep SSI

D. 考 察

今回の検討結果より肝内結石症における肝切除術後には、肝癌の肝切除に比較して、極端に SSI の頻度が高いことが判明したが、これらを防止するために2005年より以下の対策をとっている。

まず術前管理については、1. 最低30日以上禁煙期間をとっておく。2. 糖尿病患者は予め教育入院させ、血糖管理を行っておく。3. 除毛は必要時のみ、術直前に施行する。剃刀は使用せず、クリッパーをも用いる。

術中管理としては、1. 創縁保護のためにリングドレープを用いる。2. 当然ながら肝切除にあたっては出血量を最小限に抑え、3mm以上のグリソンは胆汁漏を起こさないように必ず結紮しておく。3. 予防的抗菌薬はセフェム系第1世代を選択し、術直前1回と長時間の手術は3時間毎に抗菌薬を再投与する。術後は分離菌の耐性化を予防するため、1日のみの投与にとどめる。4. 創縁は生理食塩水500mlで十分に洗浄し、dead spaceを作らないように皮下をよせる。5. ドレーンを挿入する場合は胆汁漏の無いことを確認後術翌日に抜去する。7. 創管理はガーゼを用いず、ドレッシング材を5日間用いる。

以上のような術前・術後の管理を徹底することによって、肝内結石症の肝切除術後も SSI の発生を予防することが可能となってきた。

E. 結 論

1. 肝内結石症の肝切除術後には胆道再建術を付加していなくても術後には感染性合併症が多かった。
2. その原因として胆汁中の細菌検出頻度が高いことが考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 内山和久, 山上裕機, 他. 肝切除の術前における肝予備能判定式の確立とその評価. *外科治療*, 102, 85-91, 2010
- 2) 内山和久, 山上裕機. 胆管結石に対する胆管十二指腸(端側)吻合術の適応とその長期成績. *胆と膵*, 31, 309-313, 2010
- 3) Uchiyama K, Yamaue H, et al. Combined use of contrast-enhanced intraoperative ultrasonography and a fluorescence navigation system for identifying hepatic metastases. *World J Surg*, 34, 2953-2959, 2010
- 4) Uchiyama K, Yamaue H, et al. Risk factors for postoperative infectious complications after hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 18, 67-73, 2011

2. 学会発表

- 1) (特別講演) 内山和久, 山上裕機: Surgical

Site Infection 防止にドレーン挿入は必要か? 第21回富山難治性感染症研究会, 富山, 2010. 3

2) (ビデオワークショップ) 内山和久, 山上裕機, 他: 血管支配域に基づいた系統的肝切除を正確に施行するための工夫. 第110回日本外科学会, 名古屋, 2010. 4

3) (シンポジウム) 内山和久, 山上裕機, 他: 拡大肝切除の術前評価と肝不全予防 拡大肝切除における術前肝予備能評価式. 第22回日本肝胆膵外科学会, 仙台, 2010. 5

4) (パネルディスカッション) 内山和久, 山上裕機, 他: 術中造影エコーおよび赤外線カメラシステムを併用した肝切除術. 第65回日本消化器外科学会総会, 山口, 2010. 7

5) (主題関連) 内山和久, 山上裕機, 他: ドレーンを留置しない肝切除術. 第72回日本臨床外科学会総会, 横浜, 2010. 11

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

無症状肝内結石症の自然経過

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診断時無症状であった肝内結石症128例を対象として、その自然経過を観察した。経過中に症状が出現した症例は16例（12.5%）であり、その発症様式は、胆管炎（単独）5例、落下結石（胆管炎併発も含む）6例、肝膿瘍3例、肝内胆管癌併発2例であった。症状出現例は無症状例に比べて、IE型、L型の頻度が高く、肝葉萎縮例が有意に多かった。また、肝内結石症に関連する死亡は、症状出現例で肝内胆管癌死3例、肝不全死1例の計4例であったが、無症状例には見られなかった。

肝葉萎縮が症状出現の危険因子であることが示唆され、肝葉萎縮を重視して治療方針を決定することが重要であると考えられた。

A. 研究目的

我々は肝内結石症多発地域である長崎県上五島地区において多数の無症候性肝内結石症を経験し、これまで最長28年にわたってその経過を観察してきた。これらの中には、経過中に無症状で良好に経過するものから、肝内胆管癌を合併するものまであり、その経過は一様ではない。今回、診断時無症状で経過観察とされた原発性肝内結石症例を対象として、その自然経過を調査し、症状出現の要因について検討した。

B. 研究方法

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例のうち、診断時無症状であった128例を対象とした。

診断時年齢は12～82歳、平均56.9歳、性別は男性54例、女性74例で、観察期間は0.7～28年、平均18.6年であった。病型は、IL型43例、IR型73例、ILR型6例、IE,L型3例、IE,R型1例、IE,LR型2例であった。

これらの症例を、経過中に症状の出現した16例（症状出現例）と無症状のまま経過した112例（無症状例）に分けて、症状出現例の発症様式、年齢、性別、病型・結石存在部位、肝葉萎縮の有無、治療方法、予後について調査した。

C. 研究結果

1) 症状出現例の発症様式

診断時無症状であった肝内結石症128例のうち、経過中に症状が出現した症例は16例（12.5%）であり、その発症様式は、胆管炎（単独）5例、落下結石（胆管炎併発も含む）6例、肝膿瘍3例、肝内胆管癌併発2例であった（表1）。なお、症状出現までの観察期間は、8～89カ月（平均40.7カ月）であった。

表1 症状出現例の発症様式

発症様式	例数
胆管炎（単独）	5（31.2%）
落下結石（胆管炎併発も含む）	6（37.5%）
肝膿瘍	3（18.8%）
肝内胆管癌	2（12.5%）
合計	16（100%）

2) 年齢、性別

症状出現例は、男性7例、女性9例、平均年齢57.3歳、無症状例は男性48例、女性64例、平均年齢56.8歳で特に差を認めなかった。

3) 病型・結石存在部位

病型は、症状出現例では、I型13例、IE型3例、無症状例では、I型105例、IE型7例で、症状出現例でIE型の頻度が高かった（表2）。また、結石存在部位は、症状出現例では、L型8例、R型7例、LR型1例、無症状例では、L型38例、R型68例、LR型6例で、症状出現例でL型、無症状例でR型の頻度が高かった（表3）。

表2 病型

	I	IE	例数
症状出現例	13	3	16
	-81.30%	-18.70%	
無症状例	105	7	112
	-93.80%	-6.20%	

表3 結石存在部位

	L	R	LR	例数
症状出現例	8	7	1	16
	-50.00%	-43.80%	-6.20%	
無症状例	38	68	6	112
	-33.90%	-60.70%	-5.40%	

4) 肝葉萎縮

肝葉萎縮との関係を検討すると、症状出現例では15例（93.8%）、無症状例では20例（17.8%）に肝葉萎縮を認め、症状出現例で肝葉萎縮の頻度が有意に高かった。（表4）。

表4 結石存在部位

	肝萎縮 (+)	肝萎縮 (-)	例数
症状出現例	15	1	16
	-93.80%	-6.20%	
無症状例	20	92	112
	-17.80%	-82.20%	

5) 治療方法

症状出現例16例のうち、14例に治療を行い、その術式は肝切除術12例、胆管切石術2例であった。無治療2例は、1例が落下結石の自然消失例、1例が肝不全による治療不能例であった。無症状例でも、肝葉萎縮のある症例は、インフォームドコンセントの後、治療の対象としているが、11例で肝切除、1例で截石術が行われていた。(表5)。

表5 治療方法

	治療 (+)	治療 (-)	例数
症状出現例	14	2	16
無症状例	12	100	112

6) 予後

症状出現例は、生存8例、死亡8例で、肝内結石症に関連する死亡例を4例認めた。その内訳は肝内胆管癌による癌死3例、肝内結石に起因すると思われる肝不全死1例であった。無症状例は、生存89例、死亡23例であったが、多病死を除くと肝内結石症に起因する死亡例は認められなかった。

表6 予後

	生存		死亡	
	良好	要治療	関連死	他病死
症状出現例	5	3	4	4
無症状例	83	6	0	23

D. 考 察

肝内結石症は病態が複雑で、治療を行っても結石再発や逆行性胆管炎、敗血症から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。一方、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。今回、診断時無症状で経過観察とされた原発性肝内結石症例128例を対象として、その自然経過を調査し、症状出現の要因について検討した。

経過中16例に症状が出現し、その発症形式は、肝胆管炎(単独)5例、落下結石(胆管炎併発も含む)6例、肝膿瘍3例、肝内胆管癌併発2例で、症状出現までの観察期間は8~89カ月(平均40.7カ月)であった。症状出現例と無症状例の比較では年齢、性差は認めなかったが、症状出現例でIE型、L型の頻度が高く、肝葉萎縮が15例、93.8%に認められ、有意に多かった。治療は、症状出現例の14例、無症状例の12例に行われたが、無症状であっても肝葉萎縮例は治療の対象とし

ているため、このような結果になったものと考えられた。予後は、無症状例では概ね良好に経過しているが、症状出現例では、3例(18.7%)が再治療を必要とし、3例(18.7%)の肝内胆管癌死、1例(6.35%)の肝不全死を認め、無症状例と比較して不良であった。

これらのことから、肝内結石症は落下結石、胆管炎等の発作を繰り返しながら進行していく事が推測され、肝葉萎縮が症状出現の危険因子であることが示唆された。症状出現、肝内胆管癌の併発からみて、症状の有無にかかわらず肝葉萎縮を重視して治療方針を決定することが重要であると考えられた。

E. 結 論

診断時無症状であった肝内結石症128例のうち、経過中に症状が出現した症例は16例(12.5%)であった。このうち、15例(93.8%)に肝葉萎縮を認め、3例(18.7%)に肝内胆管癌の合併を認めた。肝葉萎縮が症状出現の危険因子であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

研究分担者 中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 教授

研究要旨：肝内結石症における上皮内癌の出現様式を病理組織学的に検討した。肝内結石症の外科的切除材料の組織プレパラートを観察し、上皮内癌を正常胆管上皮への顕微鏡的な移行形態に基づき、BilIN-3（多段階発癌の過程が推測される上皮内病変）と intraepithelial carcinoma（IEC；正常胆管上皮との間に明瞭なフロントを形成する病変で、癌の表層進展や de novo の発癌病変が含まれる）の2つに分類した。BilIN-3は浸潤癌合併例のはほぼ全例に出現し、大型胆管で非連続性に多発する傾向があった。IECの出現頻度は浸潤癌合併例の約40%、BilIN-3と比較して大型胆管での多発傾向は低く、限局した局面を形成する傾向にあった。IECはときに広範囲に認められ、隔壁胆管や細胆管までIECを認める症例もあった。また、IECは浸潤部に粘液癌の組織型を有する症例で出現する頻度が低く、免疫染色でp53の発現が高率であった。以上より肝内結石症で出現する上皮内癌の多くは多段階発癌に由来するBilIN-3と考えられたが、それとは異なる上皮内癌（IEC）の出現様式が存在し、両者はいくつかの異なる病理組織学的特徴を有することが示された。

A. 研究目的

肝内結石症からの発癌の多くは、胆管炎に伴う慢性胆管上皮障害を背景として、biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) から浸潤癌（腺癌）が発生する多段階の過程を経るとされる。BilINは肝門部・大型胆管や肝外胆管に発生する顕微鏡的な前癌・早期癌病変であり、通常、末梢側胆管には観察されない。

近年、胆管癌では上皮内癌、特に癌の表層進展が目目されており、表層進展と術後再発や予後との関連から検討がなされている。また、従来からBilINは大型胆管の病変と認識されているが、C型肝硬変やアルコール性肝硬変では、末梢の小葉間胆管や細胆管までBilINが広範囲にみられる症例がまれに存在することが報告されている。

膵においては、膵管内に観察される上皮内癌は概念的に pancreatic intraepithelial neoplasia 3 (PanIN-3) と cancerization とに大別され、それらの臨床病理学的特徴が検討されているが、肝内結石症におけるBilIN-3や癌の表層進展を含めた上皮内癌の特徴はこれまで十分に検討されていない。

今回、肝内結石症における上皮内癌の出現様式を病理組織学的に検討した。

B. 研究方法

対象は肝内結石症の外科的切除材料64例（浸潤癌合併18例、浸潤癌非合併46例；症例の一部は東北大 海野研究協力者、和歌山医大 山上研究協力者より供与）。ホルマリン固定パラフィン包埋組織の肝門部胆管を含む代表的な部位の組織プレパラートを観察し、大型胆管にみられる上皮内癌を正常胆管上皮への顕微鏡的な移行形態に基づき、BilIN-3と intraepithelial carcinoma (IEC) の2つに分類した。BilIN-3は多段階発癌の過程が推測される上皮内病変で、組織学的に上皮内癌であるBilIN-3からBilIN-2、BilIN-1、正常胆管上皮へと徐々に移行するものとした（図1）。IECは上皮内癌と正常胆管上皮との明瞭なフロント

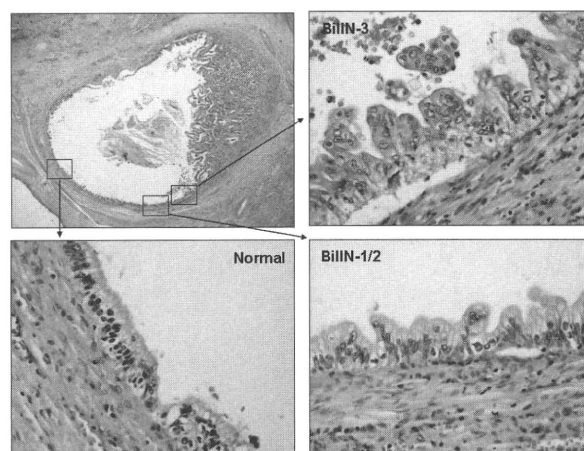


図1 上皮内癌 - Biliary intraepithelial neoplasia, grade 3 (BilIN-3)

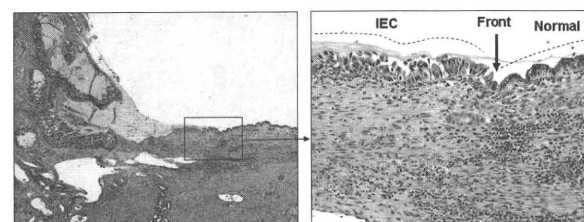


図2 上皮内癌 - Intraepithelial carcinoma (IEC)

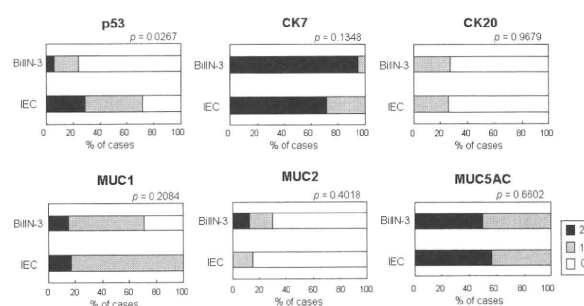


図3 免疫組織化学的検討結果

表1 肝内結石症の大型胆管における上皮内癌の出現頻度

	n	BilIN-1	BilIN-2	Carcinoma in situ	
				BilIN-3	IEC
浸潤癌合併	18	17 (94%)	17 (94%)	17 (94%)	7 (39%)
浸潤癌非合併	46	14 (30%)	3 (7%)	0 (0%)	0 (0%)

表2 肝内結石症（浸潤癌合併18例）における上皮内癌の病理組織学的出現様式

	BilIN-3	Intraepithelial carcinoma
出現頻度	ほぼ100%	約40%
大型胆管での出現様式	非連続性の多発傾向あり	限局性ときに広範囲進展
末梢側胆管での出現	まれ	ときにあり
顕微鏡的形態	flat = pseudopapillary > micropapillary	flat > pseudopapillary >> micropapillary
化生	gastric > intestinal	gastric > intestinal
浸潤部の組織型	well, mod > muc, por	well, mod >> por (mucは少ない)
p53発現	約20%	約70%

(abrupt transition) を形成する病変とした (図2)。IECには癌の表層進展や de novo の発癌病変が含まれる。この BilIN-3 と IEC の2つの上皮内癌の形態学的分類に基づき、(1) それぞれの大型胆管での出現頻度、(2) 大型胆管での多発傾向、(3) 末梢側胆管での出現頻度、(4) 顕微鏡的形態、(5) 化生を伴う頻度、(6) 浸潤部の組織型、(7) 免疫組織化学の7項目について病理組織学的に検討した。

C. 研究結果

(1) 大型胆管での出現頻度

大型胆管における上皮内癌の出現頻度を表1に示す。浸潤癌合併例では18例中17例(94%)に BilIN-3 を認め、これらの症例では切片上で BilIN-1 と BilIN-2 も認めた。IEC は浸潤癌合併18例中7例(39%)に観察された。浸潤癌合併18例は全例に BilIN-3 もしくは IEC を認めたが、その内訳は BilIN-3 のみが11例、BilIN-3 と IEC の両方を認めた症例が6例、IEC のみが1例であった。浸潤癌非合併例(46例)で BilIN-3 もしくは IEC の上皮内癌を認める症例はなかった。以下の検討は BilIN-3 を認めた17例と IEC を認めた7例の2群間で比較した。

(2) 大型胆管での多発傾向

多発(multiple lesion)は、1枚の切片上で連続性が確認できない上皮内癌病変を3ヶ所以上に認めるものと定義した。上皮内癌の多発を認めた症例は BilIN-3 は17例中11例(65%)、IEC は7例中3例(45%)であった。顕微鏡下で観察すると、BilIN-3 は非連続性に多発する傾向が強く、IEC は多発よりは限局した局面を形成する傾向があると思われたが、多発の頻度に関してこの2群間に統計学的有意差はなかった。また、IEC では大型胆管で上皮内癌が広範囲に進展を示

す症例が1例あった。

(3) 末梢側胆管での出現頻度

上皮内癌を末梢側胆管(隔壁胆管、小葉間胆管、細胆管)に認める頻度は BilIN-3 は0例(0%)、IEC は2例(29%)であり、IEC の2例中1例は隔壁胆管まで、1例は細胆管まで上皮内癌を認めた。なお、細胆管まで IEC を認めた1例は HCV 陽性かつ肝硬変合併例であった。また、末梢側胆管に BilIN-3 は認めなかったが、BilIN-3 の17例中2例は隔壁胆管まで BilIN-1/2 を認めた。

(4) 顕微鏡的形態

上皮内癌の顕微鏡的形態のパターンを flat, pseudopapillary, micropapillary の3つに分けて評価した。BilIN-3 は flat 15例(88%)、pseudopapillary 14例(82%)、micropapillary 10例(59%)で、IEC は flat 7例(100%)、pseudopapillary 5例(71%)、micropapillary 1例(14%)であった。症例により複数の形態が混在していたが、micropapillary パターンは IEC において BilIN-3 より有意に頻度が低かった。

(5) 化生

上皮内癌において gastric もしくは intestinal metaplasia を伴う頻度は、BilIN-3 が gastric 13例(76%)、intestinal 3例(18%)、IEC は gastric 4例(57%)、intestinal 1例(14%)であり、2群における化生の出現頻度はほぼ同様であった。

(6) 浸潤部の組織型

浸潤部の腺癌の組織型を well/mod, mod/por, muc/mod の3つに分けて評価した結果、BilIN-3 は well/mod 9例(53%)、mod/por 3例(18%)、muc/mod 5例(29%)であり、IEC は well/mod 6例(86%)、mod/por 1例(14%)、muc/mod 0例(0%)であった。統計学的有意差はなかったが、IEC の浸潤部の組織型は分化度の高い腺癌が多く、かつ粘液癌の成分を認める頻度が低い傾向にあった。

(7) 免疫組織化学

p53, CK7, CK20, MUC1, MUC2, MUC5AC について免疫染色を行い、染色結果を2+, 1+, 0の3段階で評価した。p53発現は IEC において BilIN-3 より有意に高率であった(図3)。その他の分子については BilIN-3 と IEC で統計学的有意差はなかった。

以上の検討で得られた結果を表2にまとめた。

D. 考察

従来から言われている通り、肝内結石症でみられる上皮内癌の多くは多段階発癌に由来する BilIN-3 であったが、今回の検討結果から BilIN-3 に加えて癌の表層進展や de novo の発癌病変の可能性を有する上皮内癌(IEC)の出現様式が存在することが明らかとなった。

BilIN-3 は肝門部の大型胆管において非連続性に多発する傾向がみられた。このことは肝内結石症からの発癌における field carcinogenesis、すなわち肝内結石症の一部の症例は大型胆管での発癌が生じやすい微小環境にあり、多中心性に BilIN が発生することを示唆

している。

IECはBilIN-3ほど多発する傾向はないと思われたが、大型胆管で広範囲に進展する症例や末梢側胆管まで病変を認める症例もあった。末梢側胆管にみられるIECは、癌の上皮内進展か多中心性の発癌病変なのかは今回の検討結果からは不明確である。なお、文献的にC型肝硬変では小葉間胆管や細胆管まで広範囲にBilINを認める症例があることが報告されているが、今回の検討で細胆管までIECを認めた症例はHCV陽性であり、かつ肝硬変を合併した症例であった。

近年、胆管癌における癌の表層進展と術後再発や予後との関連が注目されており、外科的切除断端に上皮内癌が存在しても予後には有意な影響を与えないとされている。今後、同様の臨床病理学的な検討を肝内結石症についても行う必要があると考えられる。

E. 結 論

肝内結石症で出現する上皮内癌の多くは多段階発癌に由来するBilIN-3であるが、それに加えて癌の表層進展やde novoの発癌病変の可能性を有する上皮内癌(IEC)の出現様式が存在し、両者はいくつかの異なる病理組織学的特徴を有する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanuma Y, Curabo MP, Franceschi S et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System; World Health Organization of Tumours (4th edition, eds. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND). IARC, Lyon, 2010, pp.217-224
- 2) Theise ND, Nakashima O, Park YN, Nakanuma Y. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System; World Health Organization of Tumours (4th edition, eds. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND). IARC, Lyon, 2010, pp.225-227
- 3) Yamaguchi J, Sasaki M, Sato Y et al. Histone deacetylase inhibitor (SAHA) and repression of EZH2 synergistically inhibit proliferation of gallbladder carcinoma. *Cancer Sci* 2010 101:355-62
- 4) Nakanishi Y, Kondo S, Zen Y et al. Impact of residual in situ carcinoma on postoperative survival in 125 patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010 17:166-73
- 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 Sci* 2010 17:211-22

- 6) Nakanuma Y. A novel approach to biliary tract pathology based on similarities to pancreatic counterparts: Is the biliary tract an incomplete pancreas? *Pathol Int* 2010 60:419-29
 - 7) Sato Y, Harada K, Itatsu K et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2010 177:141-52
 - 8) Sato Y, Osaka K, Harada K et al. Intraductal tubular neoplasm of the common bile duct. *Pathol Int* 2010 60:516-9
 - 9) Matsuda A, Kuno A, Kawamoto T et al. Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2010 52:174-82
 - 10) Nakanuma Y. Intraductal papillary neoplasm of bile duct and its progression. *The Korean Journal of Pancreas and Biliary Tract* 2010 15:337-8
 - 11) Nakanuma Y, Sato Y, Harada K et al. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol* 2010 2:419-27
 - 12) 中沼安二. 肝内胆管癌. 腫瘍病理鑑別診断アトラス 肝癌 (中沼安二, 坂元亨宇編), 文光堂, 東京, 2010,63-78
 - 13) 中沼安二, 原田憲一, 木村康他. 肝内結石症と肝内胆管癌 - 実態と発癌の病理学的検討 -. *胆と膵* 2010;31: 185-92
 - 14) 中沼安二. 胆道の病理 - 胆道と膵臓の潜在的可塑性から観察 -. *胆道* 2010;24:73-81
 - 15) 中沼安二, 原田憲一, 佐々木素子他. 胆道癌の分子生物学的特性. *胆と膵* 2010;31:379-86
 - 16) 中沼安二, 佐々木素子, 佐藤保則他. 肝内胆管癌 (胆管細胞癌). *肝胆膵画像* 2010;12:514-21
- ### 2. 学会発表
- 1) Nakanuma Y. New concept of cholangiocarcinoma: imaging pathology correlations. Samsung Conference (Seoul, Korea)
 - 2) Nakanuma Y. New concept of cholangiocarcinoma: imaging correlation. KSAR-GE Healthcare Grand Symposium (Seoul, Korea)
 - 3) Nakanuma Y. Cholangiocarcinoma arising in chronic biliary disease: its pathology and pathogenesis. SMC Symposium on Cholangiocarcinoma (Seoul, Korea)
 - 4) Nakanuma Y. Spectrum of biliary neoplasm arising in chronic advanced liver disease. Laennec Liver Pathology Summer Meeting 2010 (Seoul, Korea)

- 5) Nakanuma Y. Intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB) and its progression. Korean Association of Pancreatobiliary diseases (Seoul, Korea)
- 6) Nakanuma Y, Xu J, Harada K et al. Pathological spectrum of intrahepatic cholangiocarcinoma arising in non-biliary, chronic advanced liver diseases. AASLD (Boston, USA)
- 7) Sato Y, Harada K, Sasaki M et al. Heat shock protein 27 is induced during cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis: Implications as a potential biomarker of cholangiocarcinoma and its precursor lesion. AASLD (Boston, USA)
- 8) Hsu M, Igarashi S, Sasaki M et al. K-RAS mutation and P53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia (BILIN), peribiliary glands, and cholangiocarcinomas. AASLD (Boston, USA)
- 9) 中沼安二. 胆道嚢胞性疾患の病理：WHO 新分類を中心に. 第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会
- 10) 中沼安二. 胆道の臨床病理 - BilIN を中心として -. 第46回日本胆道学会学術集会
- 11) 中沼安二. 肝内胆管癌 WHO 新病理分類. 第110回日本外科学会定期学術集会
- 12) 佐藤保則, 中沼安二, 大井章史. B型肝硬変に胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB) と肝細胞癌を合併した1例. 第46回日本胆道学会学術集会
- 13) 佐々木素子, 米田憲秀, 中沼安二. 画像と病理の対比からみた嚢胞形成性内胆管腫瘍の臨床病理学的検討. 第14回日本肝臓学会大会
- 14) 佐々木素子, 山口淳平, 中沼安二. 胆道癌多段階発癌過程における細胞老化機構の制御異常. 第14回日本肝臓学会大会
- 15) 佐藤保則, 中沼安二. 肝内結石症におけるHSP27の発癌予測バイオマーカーとしての有用性. 第14回日本肝臓学会大会

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

発癌から見た肝内結石症の取扱い－コホート調査の検討－

研究協力者 森 俊幸 杏林大学 医学部消化器一般外科学 教授

研究要旨：1998年に行われた第5期調査登録症例を対象にコホート調査を行った。31の臨床病理学的項目すべてに回答を得、かつ5年以上の経過を追跡できた261例に対して、比例ハザード分析を行い、肝内胆管癌の危険因子を①胆道手術既往例、②胆道手術既往がない症例、③胆道手術既往なし・胆管狭窄なし・無症状例の3通りに分けて解析した。胆道手術既往例には切石のみでなく、狭窄の解除が重要である。また、胆道手術既往がない症例、とくに左葉例に対しては肝切除が良い適応であると思われた。胆道手術既往なし・胆管狭窄なし・無症状例には経過観察が妥当であると思われた。肝内結石の病態は多彩であり、各病態により適切な治療を選択すべきである。

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例の未回答例があった（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、未回答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

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。

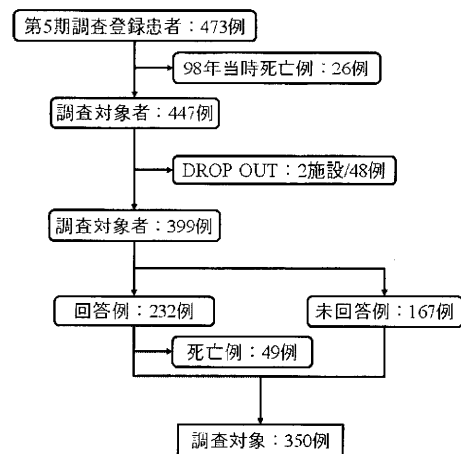


図1 調査対象

厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」肝内結石症分科会
肝内結石症個人調査票

施設名： _____ 部署名： _____ 患者番号： _____

患者イニシャル(姓,名)： _____ 性別： _____ 施設設カルテ番号： _____

記載年月日： _____ 年 _____ 月 _____ 日

経過中の問題点： 痛み 黄疸 不明 胆管炎 一週間以上持続する黄疸 一過性黄疸 その他 _____

胆道狭窄： あり なし 不明 胆管炎 胆管癌 その他 _____

結石再発： あり なし 不明 胆管炎 胆管癌 その他 _____

合併症 あり なし 不明

(合併症の内訳(発症日))

肝内胆管癌(年/月/日) (_____)

胆外胆管癌(年/月/日) (_____)

その他の癌腫(年/月/日) (_____)

胆管炎・肝膿瘍(年/月/日) (_____)

肝硬変(年/月/日) (_____)

その他(内訳・年/月/日) (_____)

現在の状況 生存 死亡 不明

最終確認日(年/月/日(死亡の場合は死亡日)) (_____)

[死因] 肝内胆管癌 胆外胆管癌 肝臓癌 胆管炎・肝膿瘍 肝硬変 その他 _____

その他の内訳 (_____)

図2 調査票

Start point を肝内結石診断日、End point を肝内胆管癌診断日として設定した。検討項目を性別、年齢（65歳以上、65歳未満）、臨床症状（疼痛、発熱、黄疸、Charcot3徴、肝機能障害）、結石種類（ビリルビン結石、コレステロール結石）、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 内服としてこれらすべてに回答を得、かつ5年の経過を追跡できた261例を対象に、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。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、発癌に影響を与えると思われる因子を抽出する。

この解析を、①胆道手術既往例、②胆道手術既往がない症例、③胆道手術既往なし・胆管狭窄なし・無症状例の3通りに分けて解析した。

C. 研究結果

全症例を対象に解析すると、前述・疫学ワーキングの報告より、65歳以上の高齢者と治療における切石のみが発癌の有意な危険因子として抽出された。また、有意ではないが、UDCA が発癌のリスクを下げる因子として抽出された。

①胆道手術既往例（116例）

Kaplan-Meier 法では $p<0.05$ であったのは年齢、退

院時胆道狭窄であり、 $p<0.2$ であったのは左葉例、複数葉、治療における胆道再建、切石のみ、UDCA 内服、経過中の胆管炎・肝膿瘍、経過中の胆道狭窄であった（表1）。これらに対し比例ハザード分析を行うと、65歳以上がハザード比8.033、経過中の胆道狭窄がハザード比4.615と有意な肝内胆管癌の危険因子として抽出された（表2）。

②胆道手術既往なし（145例）

Kaplan-Meier 法では $p<0.05$ であったのは結石再発、肝切除術、治療における切石のみ、退院時の胆道拡張、経過中の胆道拡張であり、 $p<0.2$ であったのは肝内 vs 肝内外、左葉例、複数葉、経過中の胆管炎・肝膿瘍、であった（表3）。これらに対し比例ハザード分析を行うと、左葉例がハザード比5.678、結石再発がハザード比6.264と有意な肝内胆管癌の危険因子として、肝切除術はハザード比0.066と有意に肝内胆管癌のリスクを下げる因子として抽出された（表4）。

③胆道手術既往なし・無症状・胆道狭窄なし（36例）

Kaplan-Meier 法では $p<0.05$ であった項目は該当なく、 $p<0.2$ であったのは性別、結石再発、左葉例、治療の有無であった（表5）。これらに対し比例ハザード分析を行うと、発癌に影響する有意な因子は抽出されなかった。

表1 肝内胆管癌合併と肝内結石症（胆道手術既往例） - Kaplan Meier 法（Log Rank test）

$p<0.05$	年齢、退院時:胆道狭窄
$p<0.2$	左葉、複数葉、治療:胆道再建、治療:切石のみ、UDCA 内服、経過中:胆管炎・肝膿瘍、経過中:胆道狭窄

表2 肝内胆管癌合併の危険因子（胆道手術既往例） - 比例ハザード分析

	有意確率	ハザード比	95%信頼区間
65歳以上	0.008	8.033	1.733-37.233
経過中:胆道狭窄	0.016	4.615	1.335-15.952

表3 肝内胆管癌合併と肝内結石症（胆道手術既往なし） - Kaplan Meier 法（Log Rank test）

$p<0.05$	結石再発、肝切除術、治療:切石のみ、退院時:胆道拡張、経過中:胆道拡張
$p<0.2$	肝内 vs 肝内外、左葉例、複数葉、経過中:胆管炎・肝膿瘍

表4 肝内胆管癌合併の危険因子（胆道手術既往なし） - 比例ハザード分析

	有意確率	ハザード比	95%信頼区間
肝切除術	0.010	0.066	0.008-0.521
左葉	0.028	5.678	1.207-26.721
結石再発	0.002	6.264	1.921-20.421

表5 肝内胆管癌合併と肝内結石症（胆道手術既往なし・無症状・胆道狭窄なし）

- Kaplan Meier 法（Log Rank test）

$p<0.05$	該当なし
$p<0.2$	性別、結石再発、左葉例、治療の有無

D. 考 察

本研究は、肝内結石症の予後を決定する重要な因子である肝内結石症の合併に影響を与える因子を統計学的に解析したものである。

全症例を対象にした検討では65歳以上の高齢者と治療における切石のみが発癌の有意な危険因子として抽出された。また、有意ではないが、UDCAが発癌のリスクを下げる因子として抽出された。高齢者は癌全般において発癌の危険が高く、発癌の危険因子としては妥当である。また、肝内結石症においては結石近傍の胆管上皮に過形成変化を認め、将来の癌化に影響するという報告もある。そのため、切石のみでは結石近傍の胆管病変の切除がなされず、発癌の危険因子になりうる。

UDCA内服による胆汁うっ滞の解消や肝細胞障害の抑制などが、発癌抑制に作用する可能性が示唆された。

胆道手術既往例においては、高齢者と経過中の胆道狭窄が危険因子として抽出されたが、治療内容による発癌の差は認めなかった。そのため、胆道手術後の肝内結石症に対しては結石除去のみでなく、狭窄解除が必要であると思われた。

胆道手術の既往がない症例に対しては左葉例、結石再発例が有意に肝内胆管癌合併のリスクとなり、肝切除術が発癌リスクを下げる因子として抽出された。そのため、初発の左葉例に対しては肝切除術の良い適応となると思われた。

胆道手術の既往がなく胆道狭窄がない無症状例については多変量解析で有意に発癌に影響を与える因子は認めなかった。これより、このような症例に対する取扱いとしては、経過観察が妥当であると思われた。

E. 結 論

今回、3通りに分けて肝内胆管癌発生の危険因子を解析した。胆道手術既往例には切石のみでなく、狭窄の解除が重要である。また、胆道手術既往がない症例、とくに左葉例に対しては肝切除が良い適応であると思われた。胆道手術既往なし・胆管狭窄なし・無症状例には経過観察が妥当であると思われた。肝内結石の病態は多彩であり、各病態により適切な治療を選択すべきである。

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

鈴木 裕, 森 俊幸, 杉山政則, 跡見 裕: 発癌から見た肝内結石症の取扱い—コホート調査の検討—, 第52回日本消化器病学会大会 (JDDW2010), ワークショップ・慢性胆管障害からの発癌・早期治療を目指して, 平成22年10月13日, 横浜.

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

肝内結石症の外科治療について

研究協力者 海野 倫明 東北大学大学院医学系研究科消化器外科 教授

研究要旨：近年、肝内結石症の治療法として、外科的切除術が再発のリスクを下げ、予後を改善することが明らかとなり、片葉限局型では肝切除術が標準治療として定着しつつある。肝内結石症はその病因・病態が複雑である場合が多く、その治療方針の決定、手術術式の選択に難渋することが少なくない。経験した肝内結石症治療例から「肝外側区域切除術後に残肝再発をきたし肝右葉切除を施行した症例」「胆道癌との鑑別に苦慮した肝内結石症の2症例」でその治療方針に関する検討をおこなった。

A. 研究目的

近年、肝内結石症の治療法として、外科的切除術が再発のリスクを下げ、予後を改善することが明らかとなり、片葉限局型では肝切除術が、また両葉型ではPTCSLが標準治療として定着しつつある。肝内結石症はその病因・病態が複雑である場合が多く、外科的切除術が最も推奨される今日においても、その治療方針の決定に難渋することが少なくない。そこで今回我々は、経験した肝内結石症治療例から、「肝外側区域切除術後に残肝再発をきたし肝右葉切除を施行した症例」「胆道癌との鑑別に苦慮した肝内結石症の2症例」について報告しその治療方針に関する検討をおこなった。

B. 研究方法

当科で経験した肝内結石症治療例のなかで、その治療方針、手術術式の選択上問題となった症例についてその術前画像、肝機能などを検討し、その治療の妥当性について検討をおこなった。

C. 研究結果

1. 肝外側区域切除術後に残肝再発をきたし肝右葉切除を施行した症例

症例は、52歳 男性。13年前に、前医にて肝内結石症に対して肝外側区域切除術を施行された。約10年前頃より、繰り返す発熱、腹痛あり。残肝右葉に肝内結石を指摘されていたが、その都度、保存的治療により軽快していた。今回、胆管炎に伴う敗血症発症。保存的治療により軽快したが、肝右葉の著明な萎縮を認めることから、保存的治療の限界と考えられ、外科的治療目的に当科紹介となった。

CT、超音波などの画像所見上、肝右葉は前区域、後区域とも肝内胆管の拡張を認め、胆管内には結石の充満が認められた。また、肝右葉は著明に萎縮し、内側区域および尾状葉の肥大が認められた。

術前画像上、肝右葉切除術を施行しても切除容量は少なく内側区域+尾状葉の残肝容量が十分保たれると予想されること、術前ICG検査も正常範囲内であり、肝予備能も十分であると考えられたことから、肝右葉切除術を施行した。術後経過は良好であり、術後肝不全などの術後合併症をみることなく経過した。術後3

年を経過した現在、肝内結石の再発を認めていない。
2. 画像上肝内胆管癌との鑑別が困難であり、肝拡大左葉切除術を施行した症例

症例は68歳 女性。既往歴・家族歴に特記事項なし。心窩部から右肩にかけての疼痛あり、近医受診。腹部超音波検査、CTにて肝腫瘍を指摘され、精査。左葉、尾状葉を主座とする肝内胆管癌の疑いとして当科に紹介された。

CT、超音波などの画像所見上、肝尾状葉から左葉門脈臍部へと広がる造影効果を伴う腫瘍性病変を認め、ERCP上、左肝管から末梢の不正な狭窄像とさらに末梢側胆管の拡張を認めた。腫瘍性病変はFDG-PETでも集積が認められた。胆管の擦過細胞診はClass IIIであったが、画像上肝内胆管癌との鑑別が困難であり、肝拡大左葉切除術を施行した。切除標本上左肝管に肝内結石の充満を認め、さらに周囲に高度な炎症を伴った膿瘍の形成を認めた。病理組織学的にも炎症性偽腫瘍であり、悪性の所見は認められなかった。

3. 画像上肝門部胆管癌との鑑別が困難であり、肝拡大右葉切除術を施行した症例

症例は77歳 女性。既往歴・家族歴に特記事項なし。肺癌術後のフォローアップ中に施行されたPET-CTにて肝門部に異常集積を指摘された。精査にて肝門部胆管癌を指摘、当科に紹介された。

CT、ERCP上、右肝管から前後分岐部にかけて胆管壁の肥厚と狭窄を認め、さらに末梢側胆管の拡張を認めた。

胆管の擦過細胞診はClass IIIであったが、画像上右肝管を主座とした肝門部胆管癌と考えられ、肝拡大右葉切除術を施行した。

切除標本にて、拡張した右肝管にビリルビン結石を認め、胆管壁は炎症性に肥厚。組織学的に悪性所見は認められなかった。

D. 考察

(症例1について)

肝内結石症はその病因・病態が複雑である場合が多く、治療後に結石再発をきたし治療に難渋することは少なくない。

治療法としては、従来、肝切除術、胆道再建術、総

胆管切開切石術などが行われてきたが、近年では、片葉限局型では肝切除術が、また、両葉型ではPTCSLが標準治療として定着しつつある。

再発結石の発生が少ないとされる肝切除術においても、肝切除術後に再発を来すことがあり、繰り返す胆管炎による肝機能障害、残肝容量の減少などから、その治療法の選択に難渋する場合も少なくない。本症例は、肝内結石症外側区域切除術術後3年目に右葉に結石再発をきたし、繰り返す胆管炎のために、13年後に肝右葉切除術を施行した症例ある。長期にわたる繰り返す胆管炎により右葉の萎縮と、代償性に内側区域、尾状葉の著明な肥大、また肝機能が良好に保たれていたことにより、右葉切除が可能であった。結石が左葉に限局する(L型)症例では、外側区域切除術、あるいは左葉切除術による良好な治療成績が報告されるが本症例のように再発をきたした場合、治療は困難となる。肝切除術後の再発結石症例においても、本症例のようにICG検査をはじめとする各種肝機能検査、残肝容量などの詳細な検討により、再度肝切除術の施行も可能となると考えられた。

(症例2について)

胆道狭窄の原因としては、悪性疾患によるものが大部分を占めるが、良性疾患による胆道狭窄も存在し、画像上、良性・悪性の鑑別が困難であることも少なくない。良性胆道狭窄の原因として、術後胆道狭窄、原発性硬化性胆管炎、IgG4関連硬化性胆管炎などのほか、肝内結石症も重要である。術前画像診断において胆道狭窄を認めるが胆道癌との鑑別が困難で切除術を施行し、切除標本にて肝内結石症と診断された2例について症例を提示した。

過去の報告例をまとめると、術前画像診断にて胆道癌が疑われ切除術が施行された症例で、組織学的に良性胆道狭窄と診断される頻度は、約8～15%とされる。

胆道狭窄で、良悪性の鑑別上問題になるポイントとしては、「胆管狭窄部に一致して胆管壁が造影され壁肥厚を認める場合」や「胆汁細胞診で陽性または疑陽性と診断される場合」などが挙げられる。肝内結石症に伴う胆道狭窄では随伴する肝内胆管癌の可能性にも十分注意を払うべきである。悪性化が明らかでなくとも、hyperplasiaを前癌病変とする報告もあることから経過観察を行うかの判断も難しい場合がある。その一方で、今回提示した2症例については術後経過も良好で特に合併症をみることなく経過したが、胆管癌に対する肝外胆管切除+拡大葉切除術は高度侵襲を伴い術後合併症の多い手術であり、その手術適応については十分な検討が必要である。今後、肝内結石症、およびそれに伴う良性胆道狭窄に関する術前画像診断、生検等の精度を高め、良悪性の鑑別を確実に進めるようになることが強く望まれる。

E. 結 論

肝内結石症自験例の中から、治療方針の決定に難渋した「肝外側区域切除術後に残肝再発をきたし肝右葉

切除を施行した症例」「胆道癌との鑑別に苦慮した肝内結石症の2症例」について検討を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝内結石症に対する肝切除症例の治療成績

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21年間に治療した肝内結石症117例のうち、60例（51.2%）に対し肝切除術を施行しており、その治療成績について検討し報告する。男性33例、女性27例、平均年齢60歳であった。結石存在部位は肝内型52例、肝内外型8例、右葉型14例、左葉型37例、両葉型9例であった。16例が胆管癌を、1例が肝細胞癌を併発していた。14例で過去に胆道系の手術既往を有していた。肝切除の術式は外側区域切除15例、左葉切除21例、左3区域切除9例、右葉切除11例、右3区域切除2例、その他2例であった。胆道再建は26例で施行されていた。SSIを60例中7例（11.6%）に認めたが、在院死はなく術後平均在院日数は28日であった。術後2例で肝内結石が再発し、PTCSにより切石した。肝内結石症に対する治療法として肝切除術は適切であると考えられる。

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助教

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患であるが、治療後に再発を繰り返すことが少なくない難治性疾患である。手術手技、周術期管理の向上で肝切除術が安全に施行できるようになった現在、肝内結石症に対する治療法として肝切除術の適応も広がりつつある。肝切除術の最大の利点は、結石の再発の可能性が少ないことである。肝切除術の治療成績を検討することで、肝内結石症に対する治療法としての肝切除術の妥当性を評価した。

B. 研究方法

1990年1月から2010年12月までの21年間に当科で経験した肝内結石症は117例であった。男性60例、女性57例であり、初診時の平均年齢は59歳（21-81歳）で、術後の平均観察期間は5年（1-20年）であった。117例中、治療法として肝切除術を施行したものは60例（51.2%）であり、これらの症例の詳細や、肝切除術式、治療後の経過について検討した。

C. 研究結果

肝内結石症に対し肝切除術を施行した60例の平均年齢は60歳（21-81歳）、男性33例、女性27例であった。16例（26.6%）に胆管癌が、1例（1.6%）に肝細胞癌が合併した。60例中、肝内結石の存在部位は、肝内型52例、肝内外型8例、右葉型14例、左葉型37例、両葉型9例であった。

60例中14例で過去に、胆道系の手術が施行されていた。胆嚢摘出術5例、胆嚢空腸吻合術1例、胆管十二指腸吻合術1例、胆管空腸吻合術7例（1例は胆管癌合併）である。

60例中28例で術前胆道ドレナージが施行されていた。ドレナージの手段はPTBD25例、ENBD3例で、ドレナージ施行28例中、20例で胆汁細菌培養の結果を確認することができた。20例中14例（70%）で術前胆汁細菌培養が陽性であり、検出菌を表1に示した（1

例から複数菌が同定されることもあるので重複を含んでいる）。

施行術式（表2）は、S2切除を1例施行した以外は、すべて区域切除以上であった。左側肝切除46例、右側肝切除14例と、左側肝切除が多い傾向を認めた。肝外胆管切除、胆道再建術を26例に併施した。胆管癌16例、肝細胞癌1例に対して、左葉切除9例、左3区域切除3例、右葉切除5例を施行した。

術後SSIを7例（11.6%）に認めた。内訳は創感染6例（10%）、腹腔内膿瘍2例（3.3%）である。敗血症を2例（3.3%）に認めた。在院死亡はなく60例の術後平均在院日数は28日であった。

術後経過観察期間中、2例（3.3%）に肝内結石症が再発したが、PTCSにより切石した。

D. 考 察

肝切除の安全性が確立し、肝内結石症に対する治療手段として肝切除術の適応となる症例が増えている。肝内結石症に対する肝切除術は結石生成の原因となる病変の確実な除去が主目的であり、その結果、肝内結石症の再発が少ないことが最大の利点である。

胆管癌を併発する肝内結石症は、根治切除が可能であれば、絶対的に肝切除の適応である。良性疾患である肝内結石症に対する手術適応は、①肝内胆管に結石とともに著明な狭窄や拡張が存在する、②肝膿瘍や肝萎縮など肝病変を伴う場合、と考えられる。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である。肝両葉に結石が存在しても、術前に残存予定肝葉の切石を行うことで、上記の①②の適応を満たせば、手術適応である。肝切除に際しては、原発区域および萎縮肝区域の確実な切除を心がけ、結石、狭窄部および拡張胆管を遺残させないことが重要である。ただし術中操作により、結石が残存肝葉に移動する可能性もあるので、必要があれば術後に切石を予定する。

肝内結石症に対する肝切除術後は、胆汁中細菌検出率が高いことから、術後SSIの発生が多いとする報告もある。当科の症例でも胆汁中細菌の検出率は70%で

あったが、適切な周術期管理を施行することで SSI の発生を許容範囲内に収めることが可能となり、安全に施行可能であった。術前に胆道ドレナージが施行されている場合には、胆汁監視培養を施行することで感受性のある抗菌薬を選定し、術中に予防投与する。

術後の経過観察にあたっては、肝内結石の再発と胆管癌の発生を念頭に置いて観察すべきである。自験例の肝内結石再発例は2例ともに胆道再建を併施したので、PTCS による切石を施行した。胆道再建を施行しない肝切除例では経乳頭的な切石も可能である。小腸内視鏡の発達により、今後は胆道再建施行例でも内視鏡的なアプローチが可能になるのではと期待している。

E. 結 論

肝内結石症に対する治療手段としての肝切除術は、術後 SSI の発症が11%、治療後の肝内結石の再発が3%と、安全で適切な治療法であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 術前胆汁培養陽性例 (n=20)

Gram-positive bacteria	11
Enterococcus species	8
Staphylococcus species	2
Others	1
Gram-negative bacteria	25
Klebsiella species	8
Escherichia species	6
Pseudomonas species	3
Enterobacter species	2
Citrobacter species	2
Others	4

表2 肝内結石症に対する肝切除術式

肝切除術式	症例数 (n=60)	胆道再建例 (n=26)
S2切除	1	
外側区域切除	15	
左葉切除	21	9
左3区域切除	9	7
後区域切除	1	
右葉切除	11	8
右3区域切除	2	2

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

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：【背景と目的】 原発性硬化性胆管炎は経過観察中に肝内結石を合併する症例があり、その対処には注意が必要である。当科におけるPSC症例をretrospectiveに検討し、肝内結石を合併症例の背景や危険因子を考察する。**【対象と方法】** 対象は1991年1月から2010年12月までに当科で最終診断されたPSC症例30例。PSCの診断はERC像を基本とし、非典型例は手術／剖検所見や1年以上の経過観察により最終診断とした。観察期間内に、5例に肝内結石症を合併した。肝内結石合併症例と非合併症例について比較し、カイ2乗検定、Mann-Whitneyの検定による解析を行った。**【結果】** 肝内結石合併症例は非合併例に比べ比較的高齢（60-70代）であった。高度多発狭窄と末梢肝内胆管のびまん性の拡張を合併しており、左右両葉に複数個の結石を生じていた。5例中3例で重症胆管炎を発症した。肝内結石合併症例と非合併症例を比較し統計学的検討を行ったところ、入院を要する胆管炎の発症や乳頭切開の有無、内視鏡的治療の介入の有無については有意差を認めなかった。肝内結石合併症例で有意に胆管結石の合併が多く（全5症例に合併、 $p=0.006$ ）、重症胆管炎の合併も有意に多くみられた（ $p=0.022$ ）。**【結論】** PSCの経過観察中、胆管炎や内視鏡的治療の有無にかかわらず肝内結石の合併を認める症例がある。肝内結石を合併しない症例と比べ有意に重症胆管炎の合併が多く、急性胆管炎のリスクが高いことを念頭に慎重に対応する必要がある。

A. 研究目的

近年我が国においては原発性肝内結石の発生は減少していると言われるが、原発性硬化性胆管炎の症例の中には稀に肝内結石を合併する症例がある。元来稀な疾患である上に、発癌のリスクや治療を考えるとその対処には慎重な対応が必要となる。今回、当科におけるPSC症例をretrospectiveに検討し、肝内結石を合併した症例の背景や危険因子を明らかにし、その治療方針について検討したい。

B. 研究方法

対象は1991年1月から2010年12月までに当科で最終診断されたPSC症例30例。PSCの診断はERC像を基本とし、非典型例は手術／剖検所見や1年以上の経過観察により最終診断とした。観察期間内における胆管結石の合併、胆管炎による入院回数、発見前の乳頭切開の有無、内視鏡的治療の介入の有無、重症胆管炎の発症について、他のPSC症例と比較検討した。

C. 研究結果

肝内結石合併症例は5例、非合併症例は25例（表1）。胆管結石の合併は肝内結石症例5例中5例（100%）に、非合併症例では25例中7例（28%）に認められ、有意に肝内結石合併症例で多かった（ $p=0.006$ ）。乳頭切開の有無や内視鏡的治療の介入については有意差を認めなかった。入院を要する中等症以上の胆管炎の回数にも有意な差はなかったが、重症胆管炎の発症は胆管結石の合併症例においては12例中4例（33%、 $p=0.128$ ）、肝内結石合併症例においては5例中3例（60%、 $p=0.022$ ）で認められ、有意に肝内結石合併症例で多かった。（表2）

重症胆管炎を起こす要因として胆管像が影響するかをみるために、胆道造影像をMajoieらの分類

（AJR157：495-497, 1991）を基に肝内胆管を3型（I-1：多発性狭窄；胆管拡張なし、I-2：多発性狭窄；狭窄と拡張が併存、I-3：枯れ枝様）に分けて統計学的に検討したが、これには有意な差はみられなかった。

D. 考察

PSCにおける肝内結石の合併について言及した報告は今までにみられず、成因についての分析は行われていない。今回、我々は①胆管結石の合併②胆管炎の発症とその程度③内視鏡的治療の介入について主に検討したが、結石の合併と重症胆管炎については有意差を認めた。肝内結石を合併したのは比較的高齢、すなわち60代後半から70代でPSCと当院を紹介されPSCと診断された症例が多く、全例で高度多発狭窄を合併していた。肝内結石の成因は肝内胆管の狭窄による胆汁うっ滞により末梢側の拡張胆管に胆泥生じたものと推測された。そこで肝内胆管の形態にも着目して検討したが、有意な差を認めるには至らなかった。重症胆管炎を起こすか否かという観点からみると、胆管結石のみを合併した症例よりも肝内結石合併例において有意に重症胆管炎を発症する症例が多かった。

PSCにおいて肝内結石や総胆管結石を認める際には2次性の硬化性変化との鑑別診断が必要である。PSCに合併する肝内結石は胆汁うっ滞により生じた結石であり、特徴的な胆管像である“繰り返す拡張と狭窄”をとらえることで診断可能である。肝内結石の治療には多発狭窄を解除しなくてはならないが、PSCに伴う肝内胆管狭窄は内視鏡的にも経皮経肝的にも治療を完遂することは困難である。このため若年者ではコントロール不能な胆管炎を繰り返す場合に肝移植を検討することが妥当である。しかし、移植適応のない高齢者では適宜内視鏡的ドレナージや狭窄拡張術を行

うことで対症的に治療を行わざるを得ない。

E. 結 論

PSC に肝内結石の合併を来した症例では重症胆管炎を発症することが多かった。肝内多発胆管狭窄の治療は困難であり、若年者であればコントロール不能な胆管炎に対して肝移植を考慮する。高齢者では重篤な胆管炎発症時には適切なドレナージを行うことができるよう慎重な経過観察が必要である。

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

表1 肝内結石合併例と非合併例の比較

	肝内結石 合併症例 (n=5)	肝内結石 非合併症例 (n=25)
年齢	65±18	47±19
胆管結石の合併	5 (100%)	7 (28%)
胆管炎での入院歴	3 (60%)	13 (52%)
重症胆管炎	3 (60%)	2 (8%)
乳頭切開の有無	1 (20%)	15 (60%)
内視鏡的治療の介入	3 (60%)	13 (52%)

表2 胆管結石合併と重症胆管炎発症例

		胆管結石		合計
		なし	あり	
重症胆管炎	なし	17	8	25
	あり	1	4	5
合計		18	12	30

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 金沢大学医薬保健研究域医学系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。胆汁における microRNA (miRNA) に着目し、腫瘍マーカーとしての可能性を検討した。腫瘍群13例、非腫瘍群11例の胆汁中における380種の miRNA を TaqMan-PCR 法を用いて測定した。クラスター解析により、腫瘍群と非腫瘍群で概ね群別され、胆汁中における miRNA 発現が腫瘍群と非腫瘍群で異なることが明らかとなった。更に、有意変動の大きい miRNA から腫瘍群と非腫瘍群を分ける15個の miRNA が同定できた。以上より、胆道系腫瘍に特異的な miRNA 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。

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。そのため厳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、胆汁中に有用なマーカーが存在する可能性がある。そこで血液中でも安定とされる microRNA (miRNA) に着目し、胆汁中の miRNA の遺伝子発現を解析した。

B. 研究方法

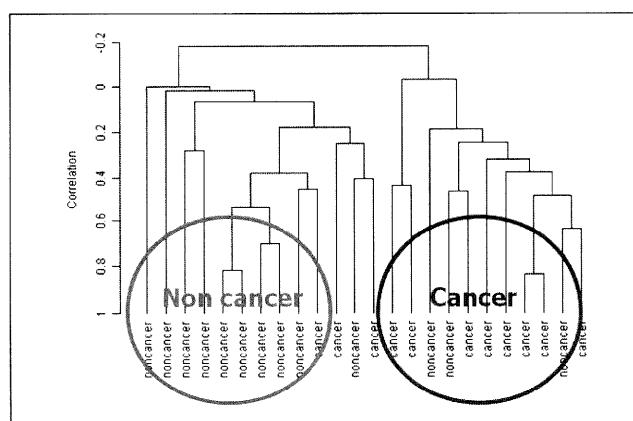
凍結保存されていた胆汁を遠心後得られた上清より、mirVana™ PARIS™ (Ambion, Inc.) を用いて miRNA を抽出した。代表的な miRNA (RNU6B, miR-16, miR-24, miR-26b, miR-92, miR-374) について TaqMan RT-PCR を行い、発現を確認した。

さらに、肝内胆管癌を含む胆道系悪性腫瘍13例（腫瘍群）、良性疾患11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った。両群を比較することで胆道系悪性腫瘍における miRNA の発現を検討した。

C. 研究結果

まず、予備的に解析した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考え、腫瘍群13例、非腫瘍群11例において、380種の miRNA を一期的に発現解析した。380種の miRNA のうち半数以上の症例で発現が認められた miRNA は204個であった。そのうち各症例間で、5倍以上の発現変動を認める miRNA は90個であった。これらの miRNA を用いて

クラスター解析を行うと腫瘍群と非腫瘍群で概ね群別され、胆汁中における miRNA 発現が腫瘍群と非腫瘍群で異なることが明らかとなった。更に、有意変動の大きい miRNA から腫瘍群と非腫瘍群を分ける15個の miRNA が同定できた。うち7個の miRNA が非腫瘍群で増加し、8個の miRNA が腫瘍群で増加していた。



これらの miRNA の中には既報の報告より胆管癌で上昇する miRNA をはじめ、他の癌腫で増加する miRNA 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る。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、腫瘍群と非腫瘍群で miRNA の発現が異なることが明らかとなった。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

悪性腫瘍群と非腫瘍群の miRNA を比較検討することで、胆道系悪性疾患に特異的な miRNA 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

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～

研究協力者 田妻 進 広島大学病院 総合内科・総合診療科 教授

研究要旨：肝内結石症は、原発性硬化性胆管炎や膵胆管合流異常とともに胆管癌合併リスクが高い。そのメカニズム解明を目的として、胆汁脂質成分変化に伴う肝内胆管障害からの発癌プロセスの可能性を検討した。リン脂質の分解産物であるリゾ・リン脂質は胆管上皮細胞のアポトーシスを誘導した。そのメカニズムとして GPCR (G2A) 発現増強が関与していたことから、PLA2および G2A を標的とした治療戦略の可能性が示唆された。

研究協力者

菅野 啓司
生田 卓也
松田 聡介
岸川 暢介
大歳 加純
藤田 啓子

A. 研究目的

肝内結石症は胆管炎と胆汁うっ滞を繰り返して胆汁性肝硬変へ進展するとともに、経過中に胆管発癌を伴うリスクが高い。胆管炎や胆汁うっ滞では内在する PLA2と細菌性 PLA1による胆汁リン脂質がリゾ・リン脂質と遊離脂肪酸に加水分解される（図1A）。本研究ではそのリゾ・リン脂質による胆管傷害性とそのメカニズムを検討した。

B. 研究方法

ヒト肝内胆管癌細胞 HuCCT1ならびにヒト正常胆管上皮細胞（金沢大学中沼安二教授供与）を用いて、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から評価するために以下を検討した。

1. 細胞増殖態度：MTT assay
2. アポトーシス：AnnexinV-FITC/PI 染色による FACS 法と Caspase-9, -8, -3活性
3. アポトーシス関連遺伝子発現：RT-PCR 法
4. LPCをリガンドとする G-protein coupled receptors (G2A) の遺伝子発現：RT-PCR 法

C. 研究結果

1. LPCによる細胞増殖動態の変化

図1Bに示すように、LPCは濃度依存性（50, 100, 200, 400uM）かつ時間依存性（0, 2, 5時間）に生存細胞数を減少させた（n=5）。

2. LPCによるアポトーシス誘導

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、対照（Vehicle）が22.45%であったのに対して、LPC100 mM添加実験において46.97%と明らかに増加した。また、その変化は時間依存性であった（図2）。一

方、FAS mRNA 発現および Caspase 活性も LPC 添加により有意に増加した（図3）。

3. LPCによる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リガンドと考えられている GPR132 (G2A) の遺伝子発現の変化を検討したところ、約5倍の発現増強を認めた（図4）。その強度は添加直後（1h）から5時間まで positive controlと同程度に維持されていた。また、非癌細胞にも発現が認められた。

D. 考察

上記の結果から、1) LPCは胆管上皮細胞アポトーシスを誘導し、2) LPC誘導アポトーシス情報伝達経路はデスレセプター依存性、ミトコンドリア依存性の両者と考えられること、3) アポトーシス誘導にG蛋白共役型受容体G2Aの発現が関与することが推定された。

これら結果から、胆汁うっ滞や細菌感染、膵液逆流などの病態下において胆汁中PLA2が誘導され、胆汁中や細胞膜に存在するPC由来LPCが胆管上皮細胞傷害をきたし、発癌に寄与する可能性が示唆された。このメカニズムとして、LPCのFas系やG2A受容体を介したアポトーシス誘導が重要な役割を果たしているものと考えられた。近年、酸化遊離脂肪酸がG2Aに対し強いアゴニスト作用を有するとの報告がある。本研究においてLPCがG2Aの発現上昇を認めたことから、LPCと酸化遊離脂肪酸の相加・相乗作用について検討することが今後の検討課題として浮上した。

E. 結論

胆汁うっ滞を呈する病態を惹起する肝内結石症や原発性硬化性胆管炎において、胆汁脂質の質的变化が胆管上皮アポトーシスは誘導することが示唆された。そのメカニズムとして、GPCRが関与することが推定された。

F. 健康危険情報

なし