

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

テトラサイクリン応答性 HNF3 β 導入マウス iPS 細胞による肝細胞分化誘導の試み

研究協力者 汐田 剛史 鳥取大学大学院遺伝子医療学 教授

研究要旨：肝再生医療の開発・充実を目指し、iPS 細胞へ肝細胞分化誘導システムを導入することを目的に、内胚葉発生に重要な転写因子である HNF3 β をテトラサイクリン応答性に発現し、iPS 細胞への遺伝子導入において重大な障壁となるサイレンシングを受けない Rosa26 領域へのノックインベクターを作製し、マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng20D-17) へ安定導入した。本細胞は、単独では肝細胞への誘導能を強力に推進できなかったが、サイトカインと併用することで、肝細胞分化誘導能を向上させる傾向を認めた。

A. 研究目的

肝細胞癌による死亡者数は年間30,000以上に上り、新たな対策を講ずる必要がある。肝細胞癌の治療において、基礎疾患である肝硬変の肝機能強化が重要な課題であり、本研究は肝再生医療の開発・充実を目指し、iPS 細胞へ肝細胞分化誘導システムを導入することを目的に施行した。

B. 研究方法

内胚葉発生に重要な転写因子である HNF3 β をテトラサイクリン応答性に発現する遺伝子発現系の構築を試みた。一方、iPS 細胞への遺伝子導入においてサイレンシングが重大な障壁となっている。そこで、サイレンシングを受けない Rosa26 領域へのノックインベクターを構築し、マウス iPS 細胞へ導入した。

C. 研究結果

- ① Rosa26 の相同領域を両端にもち、EGFP 発現カセット、Tet(-) 応答性 HNF3 β /DsRed 発現カセットと、LoxP により挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を有する Rosa26 遺伝子ターゲッティングベクターを作製した。本プラスミドは、大阪大学宮崎純一先生からいただいたプラスミドを改変し、作製した。
- ② 上記ベクターをマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng20D-17) へ安定導入し、G418 により選択し、安定導入クローンを得、Cre リコンビナーゼ処理により Tet (-) 誘導性 HNF3 β /DsRed 発現 iPS 細胞を樹立した。
- ③ Tet (-) とサイトカインにより、本細胞は、単独では肝細胞への誘導を強力に推進できなかったが、サイトカインと併用することで強く誘導する傾向を認めた。

D. 考察

iPS 細胞の HNF3 β 単独の薬剤誘導性システムでは、肝細胞分化を強力に誘導できないが、サイトカインと併用することで、肝細胞分化を向上させる傾向を認めた。HNF3 β 誘導細胞能を強力に維持するシステムの改善が今後の課題である。

E. 結論

Rosa26 遺伝子座にノックインされた Tet (-) 誘導性 HNF3 β 発現 iPS 細胞を樹立した。

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. 星川淑子, 手塚祐太, 汐田剛史, テトラサイクリン応答性 HNF3 β 発現マウス iPS 細胞の樹立, 第15回日本肝臓学会大会ワークショップ, 2011年10月21日, 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己骨髄細胞による肝硬変治療～脾摘の効果について～

研究協力者 坂井田 功 山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学 教授

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

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

【成績】 A) 骨髄投与24週の時点で血清アルブミン値 ($3.4 \pm 0.4\text{g/dl}$ vs. $2.9 \pm 0.3\text{g/dl}$)，プロトロンビン時間 ($75.0 \pm 7.5\%$ vs. $65.7 \pm 8.6\%$) は脾臓摘出群で有意に上昇しており，またChild-Pughスコア，P3P値は脾臓摘出群で低下していた。B) GFP抗体による免疫染色GFP陽性細胞の肝臓への定着率は脾臓摘出群において非脾臓摘出群と比較し約 $67 \pm 25\%$ 増加していた。血清アルブミン値も脾臓摘出群で高く，骨髄細胞投与後3,4週目の時点では有意差が認められた ($2.7 \pm 0.5\text{g/dl}$ vs. $2.3 \pm 0.3\text{g/dl}$, $P < 0.05$; 3W , $2.7 \pm 0.5\text{g/dl}$ vs. $2.3 \pm 0.2\text{g/dl}$, $P < 0.01$; 4W)。また，シリウスレッド染色にて脾臓摘出群では非脾臓摘出群と比較して肝組織の線維化面積において改善が認められた ($1.70 \pm 0.44\%$ vs. $3.52 \pm 1.15\%$, $P < 0.01$)。MMP9の発現も同様の結果であり，脾臓摘出と骨髄投与を組み合わせることにより，線維化をより改善させることが示された。**【考案】** GFP/CCL₄モデルでのGFP陽性骨髄細胞は投与後24時間から1週間後までに肺，脾臓で多くトラップされていた。また，脾臓摘出を行った群で肺へのトラップは増加せず，脾臓摘出により，肝臓への骨髄細胞の定着率が上昇し，肝機能や線維化が改善することが明らかになった。

共同研究者

寺井 崇二 山口大学大学院 医学系研究科 消化器病態内科学 講師

岩本 拓也 山口大学大学院 医学系研究科消化器病態内科学

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

出群, (4) Sham 群の 4 群に分け, 1~4 週後の肝臓組織, および血清データを検討した。肝線維化については MMP9 の発現, シリウスレッド染色で検討した。

C. 研究結果

1. 臨床研究での解析

脾臓摘出群と非摘脾臓摘出群間で年齢や性別での有意差は認められなかった。骨髄投与後の平均血清アルブミン値は骨髄投与 4 週後の時点で $3.2 \pm 0.3 \text{g/dl}$ vs. $2.8 \pm 0.3 \text{g/dl}$, 24 週の時点で $3.4 \pm 0.4 \text{g/dl}$ vs. $2.9 \pm 0.3 \text{g/dl}$ と摘脾群で有意に上昇していた。また, 骨髄投与後の週数で検討してみると, 骨髄投与後 4 週頃より血清アルブミン値が上昇していた。プロトロンビン時間 (%) も同様に骨髄投与 4 週後の時点で $71.7 \pm 7.1\%$ vs. $65.1 \pm 8.1\%$, 24 週の時点で $75.0 \pm 7.5\%$ vs. $65.7 \pm 8.6\%$ と摘脾群で有意に上昇していた。Child-Pugh スコアは脾臓摘出群でより改善していた。type III procollagen-N-peptide は脾臓摘出群で低く, 骨髄投与 24 週の時点では有意差を持って低下していた。HGF 値は脾臓摘出群で高い傾向にあった。

2. マウスモデルでの解析

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

(日本再生医療学会総会 平成20年3月13日 ポスター) 脾臓摘出術併用による骨髄細胞投与による肝機能改善の検討

(日本肝臓学会総会 平成20年6月5日 ワークショップ) 脾臓摘出術併用骨髄細胞投与による肝硬変の改善の検討

(JDDW 平成20年10月1日 ワークショップ) 脾臓摘出による自己骨髄細胞投与療法の効果増強に対する基礎的検討

(AASLD 平成20年11月1日 ポスター)

ABMi therapy combined with splenectomy is an effective for liver cirrhosis.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

人工肝補助療法から見てきたもの

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：これまでは肝移植すら難しかった劇症肝炎超急性型も人工肝補助療法が進歩することで、肝移植による治療を行えるようになった。人工肝には Kupffer 細胞機能は無いので、重度の肝障害では時間がたつほど、感染も起こりやすくなる。劇症肝炎超急性型では、免疫抑制などの内科治療は短期間に集中し、反応が乏しければ移植に可及的速やかに踏み切る必要がある。周術期の感染対策も肝不全の重症度に応じて再考する必要がある。

A. 研究目的

数日間で肝機能が廃絶してしまう劇症肝炎超急性型は、人工肝補助能力が不十分であれば生命を維持することが難しく、早急に生体肝移植を施行する以外に救命方法はなかった。今日効率のいい人工肝補助療法として大量の緩衝液を使用する online 血液濾過透析が新たな標準治療として広まりつつある。

この方法の利点は大量の緩衝液で血液を浄化することにより、体内分布容積の大きな水溶性物質の除去が可能である。たとえば脳浮腫に関連する物質のグルタミンであれば血漿相当量として30-50Lは除去することが可能である。また各種の炎症性サイトカインも一回の治療で数百マイクログラム除去することが可能である。

この優れた物質除去能力に基づいた解毒能力により肝機能の廃絶した患者でも覚醒させることが可能となり、レシピエントにICを行って移植治療を行うことが可能となった。今日の人工肝は血液を浄化することにより解毒能を代償して患者を覚醒させることができるようになったが、Kupffer cell 機能を代行する機能が備わっていないため、感染防御に対してきわめて脆弱である。とくに劇症肝炎超急性型のような肝機能廃絶例では、肝移植による救命が現実のものとなった今日では術後の感染の機会を減らすためにも、免疫抑制の方法を再考する必要がある。

B. 研究方法

対象となった症例は過去一年半に経験した劇症肝炎超急性型の3症例である（症例1；56才男性 genotype C, 症例2；30才女性 genotype B, 症例3；30才女性 genotype C）。これらの症例はいずれもHBVの急性感染であり、発症後5日以内に深昏睡に陥りウレアサイクル機能も高度に傷害されBUNの値も感度以下まで低下した。

これらの症例に対して当院入院直後より血漿交換と血液濾過透析を組み合わせた血液浄化療法を施行した。血漿交換は膜型血漿分離器を用いて、血液濾過透析は症例1と2は通常の血液濾過透析を施行し、症例3はONLINE法を施行した。これの3症例に対して治療としてステロイドパルスとその漸減を全例に、またシクロスポリンの持続投与を症例2に対して行っ

た。これらの症例の臨床経過を昏睡からの意識覚醒と、感染症の合併サイトカインから見たDISEASE CONTROLを中心に解析を行った。

C. 研究結果

3例ともBUNが感度以下になるほど、高度にウレアサイクル機能が障害されていた。特に症例1はアンモニアの値も900 μ g/dlと著明に増加し、アミノグラムでもグルタミンの値が5000nmol/mlを超えており、入院第三病日には皮質の脳波はflatになった。さらにカンジダによる肺炎の合併もあり、意識が回復するまでに12回の血液浄化を必要とした。一方で症例2は8回目で症例3は6回目で意識がほぼクリアになった。肝機能が全く廃絶した症例1では発症から10日目には真菌による肺炎が見られた。また症例2は特に合併症もなく、人工肝により覚醒して生体肝移植を施行することが出来たが、術後感染を繰り返し、再移植となった。症例3は大きな合併症を併発することなく順調に回復した。

	Age	Sex	Methyl-PSL	PSL	CsA
1	56	M	3000mg	0	0
2	30	F	5750mg	0	75mg
3	30	F	6175mg	125mg	0

使用した免疫抑制剤の量は合併症を起こした症例1,2でむしろ少なかった。サイトカインはbioplexを用いて網羅的に測定した。3例とも高度のサイトカインストームが見られ、症例1,2では治療による改善が乏しかった。

D. 考察

肝移植が劇症肝炎の治療法として確立した今日では、データから判断すると免疫抑制剤の量よりはむしろ肝不全の重症度と治療期間が感染のリスクと関連するように思われた。合併症を避ける上でも免疫抑制療法を再考すべき時事である。劇症肝炎超急性型は内科的救命が難しいので、初期の3日くらいに集中した治療を行い、反応が乏しければ早期に肝移植に踏み切るべきである。肝機能廃絶例では肝移植まで時間がかかればそれだけ感染のリスクも増加するので、遅くとも

一週間以内に移植を完了できるように、諸制度の整備も必要である。

E. 結 論

劇症肝炎超急性型は短期間に肝機能が廃絶し術後の感染のリスクも大きいので、免疫抑制は短期間に集中し、肝移植も特別枠を設けて、早急に行う必要がある。周術期の感染対策も内科と外科が共同で見直す必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inoue K, Kohara M. Reply to "Significance of a Single-Nucleotide Primer Mismatch in Hepatitis B Virus Real-Time PCR Diagnostic Assays". *J Clin Microbiol* 2011; 49 (12): 4420

2. 学会発表

- 1) 井上和明, 渡邊綱正, 与芝真彰. 強力な人工肝補助療法から見える肝移植にあるべきチーム医療の風景. 第97回日本消化器病学会総会, 東京, 2011
- 2) 井上和明, 塗谷秀子, 小原道法. PCRとin situ hybridizationを組み合わせたHCVとHBVのウイルスゲノム存在様式可視化の試み. 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011
- 3) 井上和明, 小原道法. PCRとin situ hybridizationを組み合わせたHBVとHCVのウイルスゲノム存在様式可視の試み. 第7回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム, 広島, 2011
- 4) 佐藤亜希子, 賀古 眞, 井上和明. 長期肝補助療法にて救命しえた腎不全合併急性肝不全の一例. 第47回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011
- 5) 菅波由有, 合田真海, 川島彰人, 北川 泉, 賀古 眞, 井上和明. 塩化リゾチームによる劇症肝炎と考えられた68歳男性の一症例. 第47回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011
- 6) 井上和明, 与芝真彰. 人工肝補助療法からみた近未来のあるべき劇症肝炎治療. 47回日本腹部救急医学会総会, 福岡, 2011
- 7) 井上和明, 先山あゆみ, 五味邦代, 吉本和仁, 高橋 寛, 加藤直也, 与芝真彰. 高度の黄疸が遷延し亜急性の経過をとった薬剤性劇症肝炎の一例. 第316回日本消化器病学会関東支部例会, 東京, 2011
- 8) 平田雄一, 井上和明, 小原道法. ヒト肝細胞での自然免疫応答におけるIFN- λ の重要性とその誘導メカニズム. 第53回日本消化器病学会大会, 福岡, 2011
- 9) 兼坂 茂, 井上和明. 劇症肝不全に対する血液浄化療法の課題. 第22回日本急性血液浄化学会, 久留米, 2011

10) Inoue K. Appropriate Liver Support Systems as Perioperative Care in Liver Transplantation Improves Survival. *Liver Transpl* 2011; 17(6, Suppl. 1): S119-S120.

11) Inoue K, Yoshiba M. An Artificial Liver Support System Using Huge Buffer Volumes Can Prevent Brain Edema and Is an Ideal Bridge for Liver Transplantation in Fulminant Hepatic Failure. *Liver Transpl* 2011; 17(6, Suppl. 1): S120.

12) Inoue K, Yoshiba M, Kohara M. Sophisticated in situ PCR and immunohistochemistry is helpful to understand pathogenesis of chronic hepatitis and fulminant hepatitis. *Hepatology* 2011; 54 (4): 1099A

13) Inoue K, Yoshiba M, Kohara M. Localization and distribution of viral genomes and proteins are helpful to understand pathogenesis of hepatitis. *Global Antiviral Journal* 2011; 7 (Suppl. 1): 99

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・予後調査 WG 肝内結石症全国調査－新規横断調査－
杏林大学医学部 外科 森 俊幸
2. 診断治療 WG
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
3. 発癌 WG 肝内結石症からの発癌－病理学的, 生化学的アプローチ－
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. 発癌予知 WG 肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断－
自治医科大学 消化器一般外科・鏡視下手術部 佐田 尚宏

【分担研究報告】

1. 肝内結石症全国調査－肝内胆管癌の危険因子について－
杏林大学医学部 外科 森 俊幸
2. 肝内結石症と胆道癌のリスク～集団ベースの追跡研究～
長崎県上五島病院 外科 八坂 貫宏
3. 肝門部胆管癌との鑑別が困難であった肝内結石症の検討
名古屋大学大学院医学研究科 腫瘍外科 椰野 正人
4. 原発性硬化性胆管炎類似の画像を呈した肝内結石症－新たな成因による肝内結石症の可能性について－
千葉大学医学研究院 腫瘍内科学 露口 利夫
5. 肝内結石における胆管狭窄部位別の手術治療とその遠隔成績
大阪医科大学 一般・消化器外科 内山 和久
6. 肝内結石症からの発癌過程における S100ファミリータンパク質の発現動態
金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 中沼 安二
7. 胆汁中の遺伝子発現解析と胆道系悪性腫瘍における発現プロファイルの検討
金沢大学大学院 先端医療技術学講座 本多 政夫
8. LC-MS/MS を用いた肝細胞トランスポーター発現の解析
東北大学 消化器外科 海野 倫明
9. 肝内胆管障害と G タンパク共役型受容体
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
10. 胆管癌を標的とするハイブリッドペプチドによる新しいバイオ療法の開発
筑波大学医学医療系 スポーツ医学 正田 純一

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

疫学・予後調査 WG

肝内結石症全国調査－新規横断調査－

研究協力者 森 俊幸 杏林大学医学部外科 教授

研究要旨：肝内結石症は良性疾患でありながら完治が難しく、再発を繰り返すことが多い。そのため、原因・病態の解明や治療法の確立を目的に研究班によって6回の全国調査が行われている。今回、前回調査より5年が過ぎ、肝内結石症診療の現状と過去の結果との異同を把握し解析することを目的に新規の多施設全国調査（横断調査）を行うこととなった。調査は多施設による診療録ベースの retrospective study である。まず、1次調査にて肝内結石症例の有無、胆嚢結石症・肝外胆管結石症例数を調査する。引き続き2次調査として患者背景、肝内結石の病状、合併症、肝内胆管癌の有無、治療内容、転帰など詳細な症例調査を行う。倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。次年度は、早々に1次調査票を発送し、来年度中には2次調査の中間報告を行える見込みである。

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患でありながら完治が難しく、再発を繰り返すことが多い。また、反復する胆管炎や、それに続く敗血症、胆管癌の合併など、臨床経過において大きな問題があるも、その取扱いについてはいまだ一定のコンセンサスが得られていなく、施設間で異なる場合が多いのが現状である。そのため、原因・病態の解明や治療法の確立を目的に厚生労働省の調査研究班が組織され、研究班によって行われた6回の全国調査などからも、肝内結石症の病像が徐々に明らかになってきた。全国調査では肝内外型の減少・肝内型の増加が特徴である。結石遺残・再発率と胆管癌合併は依然高値であり治療成績の著しい向上は現状では認められていない。

前回調査（第6回・2006年）より5年が経過しているため、新規の多施設全国調査（横断調査）によって肝内結石症診療の現状と過去の結果との異同を把握し解析することが本研究の目的である。本研究により肝内結石症の臨床病理像を解明することによって、肝内結石症の治療成績改善に大きく寄与する可能性が見込まれる。

B. 研究方法

本研究は多施設による診療録ベースの retrospective study である。

対象施設：日本消化器病学会認定・関連施設、日本消化器外科学会認定・関連施設。

対象症例：肝内結石症の診断で通院歴、入院歴のある症例（新規症例、フォローアップ症例問わず）。

対象期間：2011年1月1日～2011年12月31日とする。調査は施設を対象にする1次調査と、詳細な症例調査である2次調査よりなる。

① 1次調査

対象施設に、調査協力の可否、2011年1月1日から12月31日の期間に通院もしくは入院された肝内結石症例の有無および症例数、同期間の胆嚢結石症・肝外胆管結石症例の総数について調査をする。

肝内結石症全国疫学アンケート調査に
参加する 参加しない

対象期間（2011年1月1日から2011年12月31日）における以下の症例数につきお答えください。

- 肝内結石症 _____ 例
- 胆嚢結石症 _____ 例
- 肝外胆管結石症 _____ 例

施設名 _____

担当責任者氏名 _____

ご協力ありがとうございました。

図1. 一次調査票

② 2次調査

1次調査で肝内結石症例があると回答があった施設に対し、肝内結石症例の詳細な臨床病理像に関する個別調査を行う。調査項目は、患者背景（年齢、性別、居住地、嗜好、既往歴）、肝内結石の病状（診断日、臨床症状、分類（IE分類、LR分類）、胆管狭窄・拡張、肝萎縮の部位、結石種類）、合併症、肝内胆管癌の有無、治療内容、治療後の症状、転帰。（図2）

③ 研究における倫理的配慮について

本研究に関連するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言（日本医師会：<http://www.med.or.jp/wma/>）および、臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日改正 <http://www.jsvs.org/ja/info/shinshin.pdf>）に従って本研究を実施する。

各施設から返送された調査票はファイリングしたう

えで、鍵のかかるキャビネット内で個人識別情報分担管理者が保管する。また、コンピュータに入力されたデータは個人情報を保護し情報漏洩を絶対的に避けなければならないという観点から、患者氏名ではなく通し番号による匿名化に加え、ファイルもパスワードによる暗号化という二重のブロックで管理する。さらに、コンピュータは本研究専用とし、他のデータは入力しない。また、指紋認証装置を導入し、特定された個人しか起動できないようにする。ネット環境など外部環境への接続をしない、などの嚴重な配慮を行う。

なお、本研究は杏林大学医学部倫理委員会によって審査され、承認済みである（審査番号244番）。

C. 研究結果

現在、倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。

D. 考察

現在、倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。今後の計画としては、来年度早々に1次調査票を発送し、来年度中には2次調査の中間報告を行える見込みである。

E. 結論

現在、倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。今後の計画としては、来年度早々に1次調査票を発送し、来年度中には2次調査の中間報告を行える見込みである。

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

厚生労働省難治性疾患克服事業 難治性肝・胆道疾病に関する調査研究
肝内結石症分科会

施設番号 - 患者番号

対象期間：2011年1月1日～2011年12月31日

施設名： _____ 診療科： _____

記載者氏名 _____ 記載年月日 年 月 日

【患者背景】

患者イニシャル：姓 名 _____ 性別：男・女 _____ 治療時年齢： 歳 _____ 入院年月日： 年 月 日 _____

職業： _____ 喫煙：1.なし 2.あり (本× 年) _____ 飲酒：1.非飲酒 2.機会飲酒 3.習慣的

出生地：都道府県 () / 1.都市部 2.農村 3.漁村 4.山村 _____

主な居住地：都道府県 () / 1.都市部 2.農村 3.漁村 4.山村 _____

併存疾患：1.肥満 2.糖尿病 3.心疾患 4.肺炎 5.肝炎 6.肝硬変 7.貧血 8.悪性腫瘍 (癌) _____
9.脾臓管流異常 10.その他 () _____

胆道疾患の治療歴：1.なし 2.あり (回) _____

1回目 【病名】 1.胆嚢結石 2.総胆管結石 3.肝内結石 4.胆嚢癌 5.肝内胆管癌 6.肝外胆管癌 7.その他 () _____

【治療】 1.胆嚢摘出術 2.総胆管切開術 3.乳頭切開術 4.胆(肝)管十二指腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) _____
5.胆(肝)管空腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) 6.肝切除術 (切除範囲 _____)
7.内視鏡治療 (a.POCS b.ERCP c.PTCS) 8.ESWL 9.その他 () _____

2回目 【病名】 1.胆嚢結石 2.総胆管結石 3.肝内結石 4.胆嚢癌 5.肝内胆管癌 6.肝外胆管癌 7.その他 () _____

【治療】 1.胆嚢摘出術 2.総胆管切開術 3.乳頭切開術 4.胆(肝)管十二指腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) _____
5.胆(肝)管空腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) 6.肝切除術 (切除範囲 _____)
7.内視鏡治療 (a.POCS b.ERCP c.PTCS) 8.ESWL 9.その他 () _____

3回目 【病名】 1.胆嚢結石 2.総胆管結石 3.肝内結石 4.胆嚢癌 5.肝内胆管癌 6.肝外胆管癌 7.その他 () _____

【治療】 1.胆嚢摘出術 2.総胆管切開術 3.乳頭切開術 4.胆(肝)管十二指腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) _____
5.胆(肝)管空腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) 6.肝切除術 (切除範囲 _____)
7.内視鏡治療 (a.POCS b.ERCP c.PTCS) 8.ESWL 9.その他 () _____

胆道疾患の家族歴： _____

【父親】 1.胆嚢結石 2.総胆管結石 3.肝内結石 4.胆嚢癌 5.肝内胆管癌 6.肝外胆管癌 7.その他 () _____

【母親】 1.胆嚢結石 2.総胆管結石 3.肝内結石 4.胆嚢癌 5.肝内胆管癌 6.肝外胆管癌 7.その他 () _____

【兄弟】 1.胆嚢結石 2.総胆管結石 3.肝内結石 4.胆嚢癌 5.肝内胆管癌 6.肝外胆管癌 7.その他 () _____

【肝内結石症について】

初回診断：昭和平成 年 月 病歴期間： 年 ヶ月 _____

症状：1.なし 2.腹痛 3.発熱 4.黄疸 5.不定愁訴 6.その他 () _____

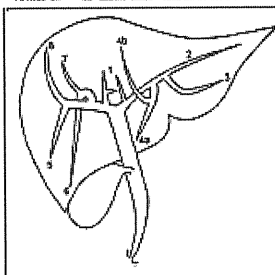
IE分類：1.I 2.IE 3.IE 4.IE 5.不明 _____ RL分類：1.R 2.L 3.RL 4.RL 5.RL 6.不明 _____

診断根拠：1.aUS b.CT c.MRI d.MRCP e.PTC f.ERC g.POCS h.PTCS i.術中所見 j.その他 () _____

胆汁培養検査：1.不施行 2.施行 (a.腸性 b.検出菌： _____) b.陰性 _____

肝硬変の程度：1.Z0 2.Z1 3.Z2 4.Z3 _____

※結石の存在部位、胆管拡張、胆管狭窄、肝嚢腫の部位を下図と下表に記入してください



	部位 (S1~S8)	個数	結石径(mm)	結石種類
肝内胆管				
肝外胆管				
胆嚢				

【今回 (2010/1/1~12/31) の治療】

治療の有無：1.なし 2.あり (⇒下記の治療内容の質問にお答えください)

手術的治療 手術年月日： 年 月 日 _____

1.胆嚢摘出術 2.総胆管切開術 (simple closure) 3.総胆管切開術+Tチューブ留置 _____
4.乳頭形成術 5.胆(肝)管十二指腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) _____
6.胆(肝)管空腸吻合術 (a.端側吻合 b.側側吻合) 7.肝切除術 (切除範囲 _____)
8.その他 () _____

非手術的 治療終了日： 年 月 日 _____

1.ESWL 2.PTCSL 3.POCS 4.術後胆嚢鏡 5.UDCA内服 _____
6.UDCA以外の薬物療法 (薬物名 _____) 7.その他 () _____

退院時結石遺残：1.なし 2.あり (結石存在部位： _____)

退院時胆道狭窄：1.なし 2.あり (部位： _____)

退院時胆道拡張：1.なし 2.あり (部位： _____)

退院日： 年 月 日 _____

【退院後の経過】

転帰：1.生存 2.死亡 最終確認日 (死亡の場合は死亡日)： 年 月 日 _____

治療後の症状：1.なし 2.あり (a.疼痛 b.発熱 c.黄疸 d.その他 () _____)

経過中胆道狭窄：1.なし 2.あり (部位： _____)

経過中胆道拡張：1.なし 2.あり (部位： _____)

退院後の投薬：1.なし 2.あり (a.UDCA b.その他 _____)

胆嚢癌の合併：1.なし 2.あり (a.同時性 b.異時性 (診断日 年 月 日) 3.不明 _____)

↳ 部位：1.肝内胆管癌 2.肝外胆管癌 3.胆嚢癌 _____

結石再発：1.なし 2.あり (部位 _____ ・再発日 年 月 日) 3.不明 _____

日常生活の支障：1.なし 2.あり 3.不明 _____ 社会復帰：1.なし 2.あり 3.不明 _____

ご協力、誠にありがとうございました。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

肝内結石症分科会

分担研究報告書

診断治療 WG

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：肝内結石症の診断と治療に関する modality は多彩である。本WGでは2007年に跡見班・画像診断WGで提案された診断 modality ならびに2009年に日本消化器病学会から提唱された胆石症診療ガイドラインの妥当性を検討した。全国実態調査からは内視鏡治療を主体とした非手術的治療の選択が増加していることが判明したが、疫学調査に基づく肝内胆管癌リスクの検討から、UDCA 治療と肝切除の優位性を考慮する改訂の必要性が浮上した。

研究協力者

真口 宏介 手稲溪仁会病院消化器病センター
佐田 尚宏 自治医科大学消化器一般外科
永井 秀雄 茨城県立中央病院
露口 利夫 千葉大学病院消化器内科
税所 宏光 化学療法研究所附属病院
五十嵐良典 東邦大学医療センター大森病院
二村 雄次 愛知県がんセンター
菅野 啓司 広島大学病院総合内科・総合診療科
佐々木民人 広島大学消化器・代謝内科
古川 善也 広島赤十字・原爆病院消化器科
小道 大輔 広島県立広島病院
大屋 敏秀 中国労災病院消化器内科
良沢 昭銘 昭和大学
山口 幸二 産業医科大学第一外科
千々岩一男 宮崎医科大学消化器外科
甲斐 真弘 宮崎医科大学消化器外科
八坂 貴宏 長崎県上五島病院
森 俊幸 杏林大学消化器外科
鈴木 裕 杏林大学消化器外科
田中 雅夫 九州大学第一外科
宮崎 勝 千葉大学臓器制御外科学
糸井 隆夫 東京医科大学消化器内科
乾 和郎 藤田保健衛生大学内科
田端 正巳 三重大学肝胆膵・移植外科
山下 裕一 福岡大学消化器外科
内山 和久 大阪医科大学
花田 敬士 J A尾道総合病院
木村 理 山形大学第一外科
神澤 輝美 東京都立駒込病院
棚野 正人 名古屋大学腫瘍外科
菅原 元 名古屋大学腫瘍外科

A. 研究目的

肝内結石の診断や治療の現状を検証して、新たな診療指針の提唱と今後の臨床研究のあり方を提案することを目的とした。

B. 研究方法

1. 肝内結石症の診断・治療の実態調査

High Volume center を中心に肝内結石症診療の実態を、日本消化器病学会胆石症診療ガイドラインにおける診断フローと肝内結石症治療フローに照らして調査した。

2. 診療ガイドラインの評価

(1) 診断 modality の選択実態

(2) 治療 modality の選択実態

から各々の選択に関する優位性を評価した。さらに、疫学 WG 結果から肝内胆管癌リスクを踏まえた診療フローの問題点と課題を考察した。

C. 研究結果

実態調査は、1) 日本消化器病学会・胆石症診療ガイドライン作成・評価委員施設、2) 本WGメンバー施設、3) 胆道感染症 Study・Group (BTI) 施設（後述の研究発表1, 2）における2009年の受療者とした。協力施設は図1に示す25施設で210例を集計した。有症状は128例（61%）、胆管手術の既往例も128例（61%）であった。診断方法については、High volume center からのデータ集計であったものの、日本消化器病学会・胆石症診療ガイドライン・診断フローが推奨する拾い上げ検査（US, XP）35.9%、二次精査（CT/MRCP）44.1%、三次精査（ERCP/EUS）19.7%であった（図2）。一方、治療 modality では、積極的な治療介入は146例（70%）であった（図3）。そのうち内科的治療（内視鏡治療, ESWL, 薬物治療）が138例、外科的治療（肝切除ほか）28例であったが一部重複も含まれた。合併症は50例（23.8%）、肝内胆管癌を5例に認めた（図4）。これらは過去2回の調査に比較して症例総数は減少しておらず、積極的な治療介入は増加していた。中でも、内視鏡治療を主体とする内科的治療の選択が明らかに増加していた。

D. 考 察

本調査結果から以下のように要点と問題点を整理した。

(1) 肝内結石治療症例は増加傾向にあった。

(2) 内視鏡治療を主体とする内科治療例も増加していた。

一方、長期予後として、肝内胆管癌の発生が2.5%認められ、そのフォローが肝要と考えられた。

E. 結論

肝内結石症の診療実態調査と本会議の疫学WG調査結果から、本症診療の実情と診断治療フローならびに予後観察のあり方に新たな指針を設ける必要性を確認した。

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

図1. WGによる肝内結石治療に関する実態調査(2010-2011)

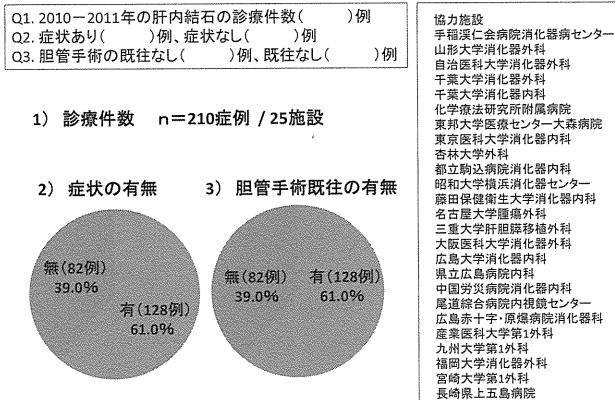


図2. WGによる肝内結石治療に関する実態調査(2010-2011)

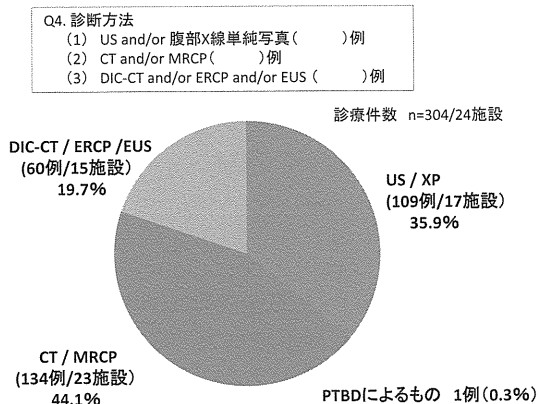


図3. WGによる肝内結石治療に関する実態調査(2010-2011)

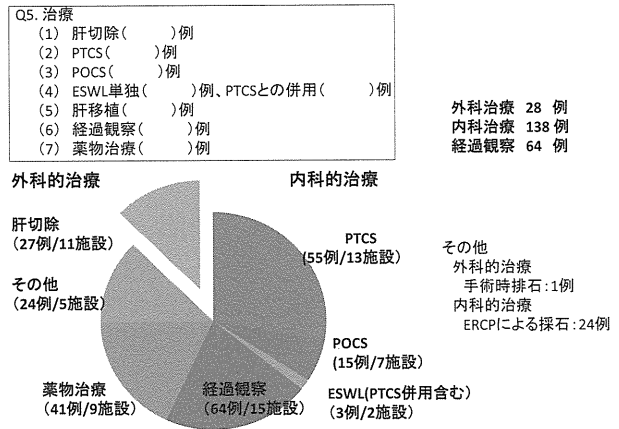


図4. WGによる肝内結石治療に関する実態調査(2010-2011)

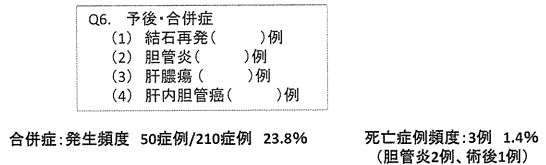


表1. WGによる肝内結石治療に関する実態調査(2010-2011) 前回調査(2009)・前々回(2007)と今回調査(2011)の比較

調査	2005-2007	2008-2009	2010-2011
回答施設	18	22	25
症例数	235	158	210
外科治療	43	25	28
内科治療	59	83	138
経過観察	132	47	64

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

肝内結石症分科会

分担研究報告書

発癌 WG

肝内結石症からの発癌－病理学的，生化学的アプローチ－

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：発癌 WG では肝内結石症からの発癌に関する病理学的，生化学的アプローチを継続して行う。病理学的アプローチとして，病理検体を用いた胆管癌や前癌病変の診断に関する検討，ならびに病理診断マニュアルの作成を目指す。生化学的アプローチとして，胆管癌診断のバイオマーカーの商品化の実現を目指し，胆汁と血清を用いた新規バイオマーカーの探索を引き続き行う。本年度の病理学的検討として，病理解剖症例の肝門部組織プレパラートを観察した結果，胆管周囲付属腺に顕微鏡的な上皮の増殖性病変を認める症例が少なからず存在することが明らかとなり，胆管周囲付属腺が胆管癌あるいは IPNB の発生母地となりうる可能性が示唆された。生化学的検討では，WFA-MY.1E12（レクチン-抗体）による簡易サンドイッチアッセイ系を構築し，肝内胆管癌，肝外胆管癌と胆道系良性疾患より得られた胆管胆汁と血清における WFA-MUC1 を測定し数値解析したところ，従来の胆管癌マーカーである CA19-9 と比較して感度の面で優れていることが示された。次年度は簡易測定キットを用いて，多数の胆管癌症例の胆汁と血清による WFA-MUC1 のバリデーションを実施する予定である。

A. 研究目的

(1) 病理学的アプローチ（研究背景）：

肝内結石症からの発癌に対する病理学的アプローチとして，発癌 WG ではこれまでに胆管癌の前癌/早期癌病変である胆管内乳頭状腫瘍 (intraductal papillary neoplasm of the bile duct, IPNB) と胆管上皮層内腫瘍 (biliary intraepithelial neoplasia, BilIN) の臨床病理学的特徴を明らかにしてきた。

IPNB と BilIN は各々，膵臓における IPMN と PanIN との対比を想定した概念である。これまで検討してきた IPNB は大型胆管に発生する病変で，膵臓との対比では主膵管型 IPMN に相当する。最近，胆管周囲付属腺に由来する IPNB が報告されており，これは膵臓の分枝型 IPMN に相同性を示す病変である可能性がある。

肝内結石症では，胆管周囲付属腺の増生を伴う慢性増殖性胆管炎が認められる。肝内結石症からの上皮性腫瘍の発生や発癌において，胆管周囲付属腺がその発生母地の一つである可能性があるが，胆管周囲付属腺の上皮層内増殖性病変に関する検討はこれまで十分に行われていない。

BilIN の概念は，現在，外科病理学の領域で広く浸透しつつある。BilIN は上皮の異型性の程度により BilIN-1, -2, -3 の 3 段階にグレード分類され，このグレード分類は HE 染色組織標本で行われるが，実際は HE 染色標本のみではしばしば分類困難な病変が存在することから，BilIN 分類の客観的な指標（診断基準）の作成が望まれている。

(2) 生化学的アプローチ（研究背景）：

肝内胆管癌 (IHCC) は高頻度に肝内結石症に合併し，完全治癒の期待出来ない難治性の癌腫である。その治療成績の向上には，早期診断のための鋭敏な分子

マーカーの探索が急務である。肝内結石症からの発癌に関する生化学的アプローチとして，これまでに正田研究協力者はグライコプロテオームによる肝内胆管癌の糖蛋白質マーカーの開発を目指した研究を展開している。その成果として，*Wisteria floribunda* agglutinin (WFA)-sialylated MUC1 を新規胆管癌マーカーとして同定し，胆汁をサンプルとした解析で鋭敏な胆管癌マーカーとなる可能性を報告した (Hepatology 2010;52:174-182)。また，本 WG は胆汁の heat shock proteins が新規胆管癌マーカーとなりうることも報告した (Am J Pathol 2012;180:123-30)。

発癌 WG では今後，肝内結石症からの発癌に関する病理学的，生化学的アプローチとして以下の検討を行う。

(1) 病理学的アプローチ：

- ・病理検体を用いた胆管癌，前癌病変の診断
- ・病理診断マニュアル作成

(2) 生化学的アプローチ：

- ・胆管癌診断のバイオマーカーの商品化
- ・胆汁，血清を用いた検討

B. 研究方法

(1) 病理学的アプローチ：

胆管周囲付属腺の上皮層内増殖性病変の検討を行う予定としている。病理解剖症例（背景疾患は問わない）の肝門部組織プレパラート約1000症例を観察し，胆管周囲付属腺に上皮の増生病変がある症例，もしくは胆管周囲付属腺に嚢状拡張がある症例を抽出する。抽出した症例に対して，HE 染色標本上の形態学的特徴や免疫染色による検討，背景因子との関連性を検討し，胆管周囲付属腺に出現する上皮層内増殖性病変を病理

学的に特徴付ける。一連の検討を通して、肝内結石症からの発癌における胆管周囲付属腺の関与を明らかにする。

(2) 生化学的アプローチ：

新エネルギー・産業技術総合開発機能 (NEDO) の「糖鎖機能活用技術開発プロジェクト」のもと、グライコプロテオームによる IHCC の特異的糖蛋白質マーカーの探索とその高感度検出システムの構築を行った。

C. 研究結果

(1) 病理学的アプローチ：

約1000例の病理解剖症例の肝門部組織プレパラートのうち現在、200症例を観察した。肉眼的に胆管周囲付属腺に増殖性病変を確認できる症例はなかったが、顕微鏡的に胆管周囲付属腺や導管に乳頭状・偽乳頭状の上皮の増生を認める症例が10例（5%）あった。また、径1mm以上の拡張を嚢状拡張とした場合、この嚢状拡張は18例（9%）に認められた。胆管周囲付属腺の上皮の増生病変と嚢状拡張はしばしば併存していた。

上皮の増生病変の程度や性状は症例により様々で、拡張した胆管周囲付属腺内に粘液産生性の上皮からなる乳頭状の増殖病変がみられ、膵臓の分枝型 IPMN に類似するような顕微鏡的な病変（図1）や、粘液産生があまり目立たない乳頭状の上皮が付属腺の導管、あるいは胆管内へと進展している症例もあった。また、膵臓の PanIN-1 に類似した病変を認める症例もあった（図2）

(2) 生化学的アプローチ：

組織標本の癌および非癌部領域の双方についてレクチンアレイによる比較糖鎖プロファイリングを行った結果、癌部で有意にシグナルが上昇するレクチン種 (WFA) が見出された。本レクチン種の陽性率は IHCC 88%, 混合型肝癌 CC 部分80%/HCC 部分0%, HCC 0%, 正常肝内胆管32%であった。また、免疫沈降反応あるいは蛍光免疫染色にて、WFA は MY.1E12 抗体で認識される mucin core polypeptide 1 (MUC1) と会合していた。WFA-MY.1E12の胆管癌の検出に向けた有用性の検証のために、WFA-MY.1E12 (レクチン-抗体) による簡易サンドイッチアッセイ系の構築した。本アッセイ系を用いて、肝内胆管癌、肝外胆管癌と胆道系良性疾患より得られた胆管胆汁と血清における WFA-MUC1を測定し数値解析したところ、従来の胆管癌マーカーである CA19-9と比較して感度の面で優れていることが示された。

D. 考 察

現時点での病理学的検討結果では、胆管周囲付属腺に顕微鏡的な上皮の増殖性病変を認める症例が少なからず存在することが明らかとなった。肝内結石症のみられる慢性増殖性胆管炎は胆管周囲付属腺の著明な増生を伴うが、この胆管周囲付属腺が胆管癌や IPNB の発生源となりうる可能性を示唆する結果と考えられた。

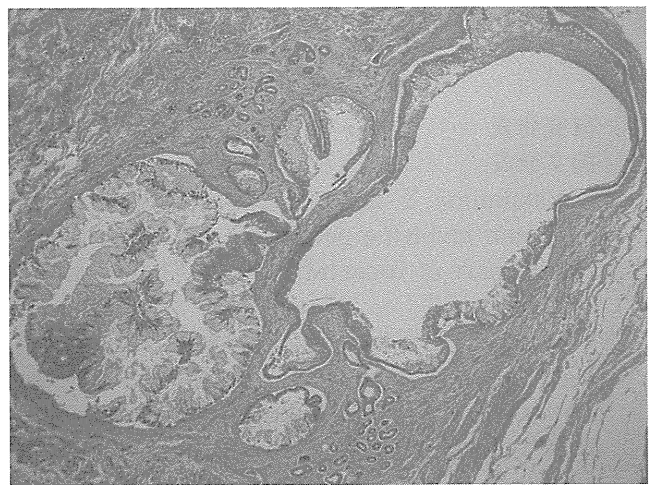


図1 胆管周囲付属腺の上皮層内増殖性病変、膵臓の分枝型IPMNに類似する。

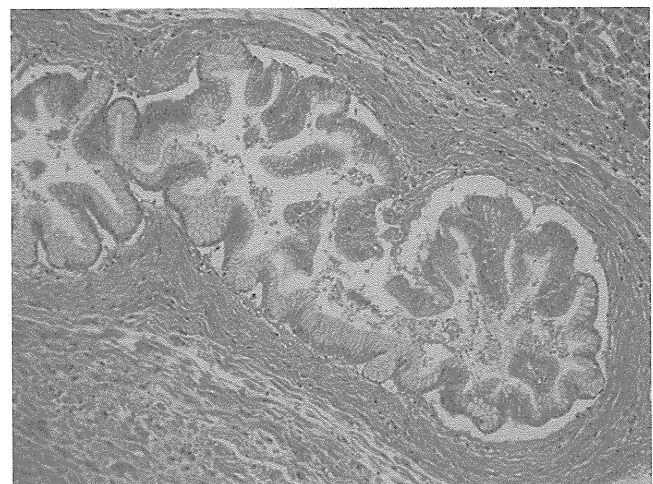


図2 胆管周囲付属腺の上皮層内増殖性病変、膵臓のPanIN-1に類似する。

また、これまでにわれわれは、肝内結石症からの発癌過程において、BiIINの異型度の増加とともに上皮における p16の発現が低下し、それに相反して EZH2の発現が亢進することを報告している。この結果も加えて、今後、BiIINの組織学的な診断基準を作成したいと考えている。

生化学的検討で、本年度はグライコプロテオームにより肝内および肝外胆管癌に関する新しい糖蛋白質マーカーを見出すことが出来た。次年度は簡易測定キットを用いて、多数の胆管癌症例の胆汁と血清による WFA-MUC1のバリデーションを実施する予定である。

E. 結 論

1. 病理解剖症例を用いた病理学的検討で、肝門部の胆管周囲付属腺に顕微鏡的な上皮の増殖性病変を認める症例が少なからず存在した。
2. WFA-MY.1E12 (レクチン-抗体) による簡易サンドイッチアッセイ系の構築し、肝内胆管癌、肝外胆管癌と胆道系良性疾患より得られた胆管胆汁と血清における WFA-MUC1を測定し数値解析したところ、従来の胆管癌マーカーである CA19-9と比較して感度の面で優れていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanuma Y, Sato Y. Cystic and papillary neoplasm involving peribiliary glands: A biliary counterpart of branch-type IPMN? *Hepatology* 2012 (in press)
 - 2) Harada K, Shimoda S, Kimura Y et al. Significance of IgG4-positive cells in extrahepatic cholangiocarcinoma: Molecular mechanism of IgG4 reaction in cancer tissue. *Hepatology* 2012 (in press)
 - 3) Sato Y, Harada K, Sasaki M et al. Heat shock proteins 27 and 70 are potential biliary markers for the detection of cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2012;180:123-30
 - 4) Sugiyama H, Onuki K, Ishige K et al. Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 2011;46:779-89
 - 5) Xu J, Sato Y, Harada K et al. Intraductal papillary neoplasm of the bile duct in liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011;17:1923-6
 - 6) Nakanuma Y, Xu J, Harada K et al. Pathological spectrum of intrahepatic cholangiocarcinoma arising in non-biliary chronic advanced liver diseases. *Pathol Int* 2011;61:298-305
 - 7) Lim JH, Zen Y, Jang KT et al. Cyst-forming intraductal papillary neoplasm of the bile ducts: description of imaging and pathologic aspects. *AJR Am J Roentgenol* 2011;197:1111-20
 - 8) Nakanishi Y, Nakanuma Y, Ohara M et al. Intraductal papillary neoplasm arising from peribiliary glands connecting with the inferior branch of the bile duct of the anterior segment of the liver. *Pathol Int* 2011;61:773-7
 - 9) Xu J, Sasaki M, Harada K et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in chronic advanced liver disease and the cholangiocarcinomatous component of hepatocellular carcinoma share common phenotypes and cholangiocarcinogenesis. *Histopathology* 2011;59:1090-9
 - 10) Yamaguchi J, Sasaki M, Nakanuma Y. The role of histone deacetylase (HDAC) and EZH2 in oncogenesis: epigenetic silencing of tumor suppressors. In: *Cancer, etiology, diagnosis and treatments*. Nova Science Publishers, Inc. New York 2011, PP. 1-27
 - 11) 中沼安二, Marylee Hsu, 佐々木素子. 肝内胆管, 胆道, 膵の腫瘍分類: WHO の新たな試みを含めて. 病理・発癌の観点から. *肝胆膵* 2011;62:17-28
 - 12) 中西喜嗣, 近藤哲, 中沼安二. 胆管周囲付属腺と胆管腫瘍発生 - 胆管内乳頭状腫瘍の発生に注目して -. *肝胆膵* 2011;62:127-31
 - 13) 中沼安二, Hsu Marylee, 佐々木素子ほか. 胆道の病理 (胆嚢を除く) - 膵カウンターパートとの比較を中心に -. *画像診断* 2011;31:266-77
 - 14) 中沼安二. 胆道の臨床病理 - BiIN を中心として -. *胆道* 2011;25:31-42
 - 15) 中沼安二, 山口淳平, 佐々木素子ほか. 胆嚢発癌と病理 (合流異常を含む). *外科* 2011;73:473-8
 - 16) 中沼安二, 佐々木素子, 佐藤保則ほか. 肝門部 ~ 肝内胆管癌の病理. *臨床消化器内科* 2011;26:1691-7
- ### 2. 学会発表
- 1) Nakanuma Y. Intraductal papillary neoplasia of bile duct. The 7th Asian Pacific IAP Congress
 - 2) Harada K, Nakanuma Y. Cholangiocarcinoma and IgG4 reaction. The 7th Asian Pacific IAP Congress
 - 3) Nakanuma Y. Intraductal papillary neoplasia of bile duct. Hong Kong IAP
 - 4) Nakanuma Y. New classification of intrahepatic cholangiocarcinoma. APASL-STC
 - 5) Nakanuma Y, Xu J, Harada K et al. Characteristics of intrahepatic cholangiocarcinoma arising in chronic advanced liver disease and cholangiocarcinoma of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. USCAP
 - 6) Igarashi S, Hsu M, Sasaki M et al. Aberrant expression of pancreatic stem cell markers in the biliary tree relates to intrahepatic cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis. USCAP
 - 7) Hsu M, Sasaki M, Harada K et al. Sonic hedgehog (SHH) expression in biliary intraepithelial neoplasia (BiIN), peribiliary glands, and intrahepatic cholangiocarcinomas. USCAP
 - 8) Harada K, Igarashi S, Hsu M et al. Expression of embryonic development-related molecules and stem cell markers in the biliary intraepithelial neoplasm (BiIN). AASLD
 - 9) 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子ほか. 肝内結石症の肝門部・肝内胆管における上皮内癌の出現様式に関する検討. 第100回日本病理学会総会
 - 10) 池田博子, 原田憲一, 佐藤保則ほか. 表層進展を示す胆管癌の病理組織学的検討. 第100回日本病理学会総会
 - 11) 正田純一, 川本徹, 中沼安二ほか. 糖鎖プロファイリング解析による肝内胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発. 第47回日本肝臓学会総会

- 12) 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子ほか. 肝内結石症の肝門部・肝内胆管における上皮内癌の出現様式に関する病理学的検討. 第47回日本肝臓学会総会
- 13) 佐々木素子, 松原崇史, 中沼安二. 粘液産生からみた胆管内乳頭状腫瘍の臨床病理学的検討. 第47回日本胆道学会学術集会
- 14) 五十嵐紗耶, Maylee Hsu, 佐々木素子ほか. BiIIN における胎児期関連因子, 幹細胞関連マーカーの発現. 第47回日本胆道学会学術集会
- 15) 佐藤保則, 佐々木素子, 原田憲一ほか. 肝内結石症の肝門部・肝内胆管での上皮内癌の出現様式に関する病理組織学的検討. 第47回日本胆道学会学術集会
- 16) 中西喜嗣, 中沼安二, 大原正範ほか. 肝前区域上行枝と下行枝合流部門脈域内の胆管壁外付属腺から発生した胆管内乳頭状腫瘍の一例. 第47回日本胆道学会学術集会
- 17) 五十嵐紗耶, Maylee Hsu, 佐々木素子ほか. 胆管癌, BiIIN における変異型 p53 の発現と K-RAS 遺伝子変異. 第47回日本胆道学会学術集会
- 18) 佐々木素子, 中沼安二. 胆管癌早期診断へのアプローチ. 第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会
- 19) 佐々木素子, 松原崇史, 中沼安二. 画像と病理の対比からみた嚢胞形成性胆管内乳頭状腫瘍の臨床病理学的検討. 第39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）

肝内結石症分科会

分担研究報告書

発癌予知 WG

－肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断－

研究協力者 佐田 尚宏 自治医科大学消化器・一般外科 鏡視下手術部 教授

研究要旨：肝内胆管癌合併肝内結石症の予後は不良で、その原因は診断される症例の過半数が Stage IVb で発見され、早期発見する手段が確立されていないことにある。昨年度までの検討で、従来型の診断 modality (ERC, PTC(S)) は肝内胆管癌早期発見に有効ではなく、FDG-PET, Diffusion MRI, Perfusion CT などの新たな modality の有効性もいまだ確立していない。今年度以降の3年間で、実臨床に寄与する鑑別診断情報を提供すべく、肝内胆管癌合併肝内結石症および肝内胆管癌非合併肝内結石症のアトラス作成を行う。

A. 研究目的

肝内結石症の4.0-8.8%に肝内胆管癌は合併すると報告されている¹⁾。肝内胆管癌は胆管炎からの敗血症と並んで肝内結石症の主要な死因であるが、その早期診断は困難で、発見時には高度進行した切除不能であることが多く、切除例の予後も不良である。

2002-2007年の難治性疾患克服事業「肝内結石症に関する調査研究班（以下、肝内結石班会議）」において、画像診断ワーキング・グループ（2005-2007年は画像診断・病型分類ワーキング・グループ）が主体となり、「肝内結石症の病型分類・画像診断指針2008」を作成した。その中で、肝内胆管癌の診断に関しては、「その存在診断は背景に存在する結石、炎症、pneumobilia などのためしばしば困難で、術中に偶然発見されることもまれではない。合併する肝内胆管癌の診断には、直接造影法における胆汁細胞診・胆管生検、MRI 検査の拡散強調画像、CT 検査の super delay phase、胆汁中 CEA 値、PET 検査などが有用であるとする報告もあるが、確立した画像診断法はなく、今後の更なる検討が必要である。」と記載されるに留まり、肝内結石症に合併する肝内胆管癌診断は、今後解決されなければならない課題である²⁾。

肝内結石症に合併する肝内胆管癌診断の現状を把握する目的で、2009-2011年難治性疾患克服事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」肝内結石症分科会（以下、肝内結石分科会）画像ワーキング・グループでは、1990-2009年の20年間を対象に、肝内結石に合併する肝内胆管癌の Profile 調査、および肝内胆管癌症例の FDG-PET, Diffusion MRI の診断能に焦点を当てた第2回目の Profile 調査を行った。この2回の Profile 調査で以下の点が明らかになった。

- ①肝内胆管癌合併肝内結石症の過半数（57%）が Stage IVb で発見され、予後不良であった。
- ②2種類の亜型（長期間炎症後発症型、同時発見型）の存在が示唆された。
- ③発見動機は、結石充満精査、狭窄精査、腫瘍指摘、その他、に分類され、腫瘍指摘例の予後は悪かった。
- ④非腫瘍形成例では ERC, PTC 造影および胆管内視

鏡検査で肝内胆管癌が診断されていた。

- ⑤ FDG-PET, Diffusion MRI 実施例はごく少数で、その診断能を十分に評価できなかった。

肝内胆管癌早期治療には、腫瘍指摘以前の発見が必要であり、そのために使用されていた従来の診断 Modality は造影検査、胆管内視鏡検査などの侵襲的検査が主体で、2000年以降飛躍的に進歩した FDG-PET, Diffusion MRI, Perfusion CT などの診断能は第2回目の Profile 調査でも明らかではなかった。

B. 研究方法

肝内結石症に合併する肝内胆管癌の Profile を Cohort として確定することは困難であり、肝内胆管癌合併肝内結石症例および肝内胆管癌非合併肝内結石症例、それぞれの詳細な検討を行うことで、その鑑別診断について実地の臨床家に情報提供することを企図した。本研究班参加施設を対象とし、2001-2010年に経験した肝内結石症のうち、肝内胆管癌合併症例および肝内胆管癌非合併症例それぞれ10例の CT, MRI, FDG-PET 等の画像所見を詳細に提示したアトラスを作成する。

C. 研究結果

自験例（76歳、男性、肝内胆管癌合併症例）の CT 所見（図1）および FDG-PET 所見（図2）を詳細に検討した。この症例は B6, 7に肝内結石があり、右肝管に肝内胆管癌が認められる症例で、CT 所見では B6, 7の肝内胆管拡張と胆汁とほぼ同等の吸収値を示す肝内結石が描出され、肝内胆管癌は比較的造影効果の高い腫瘍像として描出された。FDG-PET 所見では肝内胆管癌の SUV 値は6.56→8.44と高度の集積および上昇を認めたが、肝内結石部は3.99→4.01と中等度の集積およびフラットな変化を示した。

D. 考察

近年の画像診断 modality の進歩は目覚ましく、特に2000年以降には、MD-CT の空間解像度および時間解像度の飛躍的進歩、FDG-PET および Diffusion

MRI という新たな視点の modality が登場し、術前診断能は向上した。しかし、昨年度までの検討では肝内胆管癌合併肝内結石症例は頻度が低く、近年の進歩した診断 modality の profile を確定することは困難であった。昨年度までの検討で、肝内胆管癌合併症例の過半数（57%）が Stage IVb で発見され、発見動機が腫瘍形成の例は予後不良であることが明らかになった。そのため、腫瘍形成以前の発見が予後改善には不可欠と考えられるが、従来行われている ERC, PTC (S) 等の modality では早期発見が困難で、新たな視点からの診断 (break through) が必要であり、その候補として FDG-PET および Diffusion MRI が有力である。肝内結石症における肝内胆管癌合併症例早期診断能向上には、1 例 1 例を詳細に検討することが、現状唯一の方法であり、今後 3 年間で実地臨床家に寄与するアトラス作成を目指す。現時点では、肝内胆管癌合併肝内結石症診断に有効と考えられる診断 modality はなく、微小病変の検出、炎症との鑑別などの観点から、FDG-PET および Diffusion MRI の診断能を検討することは有意義と考えられた。今後、更なる症例の集積で、肝内胆管癌合併肝内結石症診断における評価を行うことが必要である。

E. 結 論

肝内胆管癌合併肝内結石症および肝内胆管癌非合併肝内結石症を対象としたアトラス作成を行い、実臨床に寄与する情報提供を行う事を計画した。

参考文献

1. 厚生労働省難治性肝・胆道疾患に関する調査研究班編集. 肝内結石症の診療ガイド 文光堂 東京 2011
2. 佐田尚宏. 画像 WG 報告 - 肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断 -. 厚生労働科学研究費補助金 (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 平成22年度総括・分担研究報告書. 162-163, 2011

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

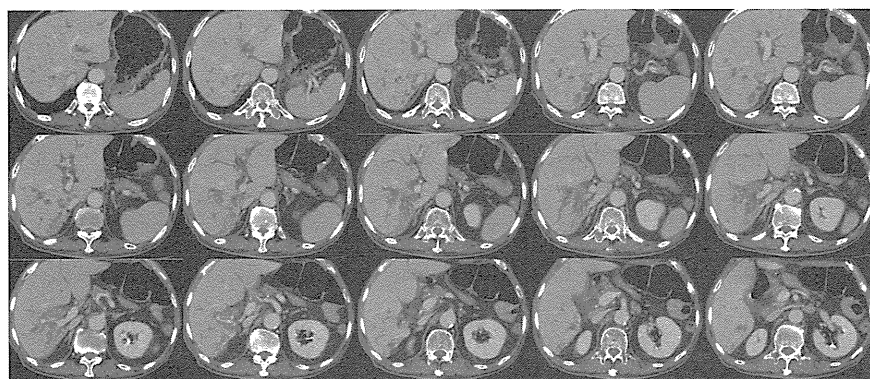


図1：自験例の造影 CT 所見

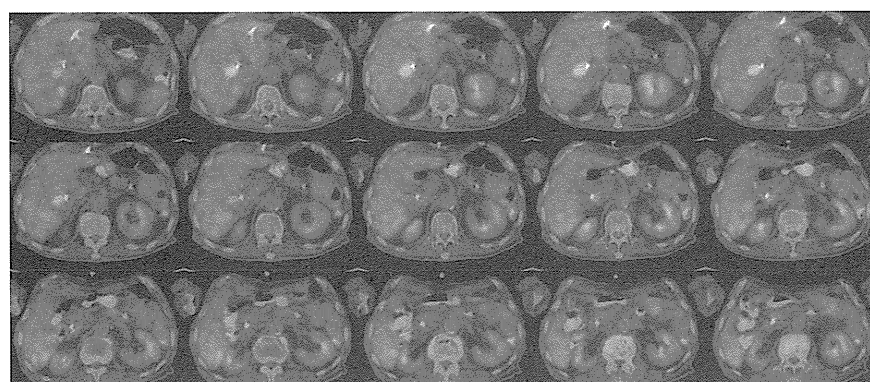


図2：自験例の FDG-PET 所見

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

肝内結石症全国調査－肝内胆管癌の危険因子について－

研究協力者 森 俊幸 杏林大学医学部外科 教授

研究要旨：肝内結石症は良性疾患でありながら完治が難しく、再発を繰り返すことが多い。そのため、原因・病態の解明や治療法の確立を目的に研究班によって6回の全国調査が行われている。肝内胆管癌の危険因子については、前回調査（第6期）およびコホート調査（1998年度調査登録例を対象）において過去に検討が行われている。今回、新規の多施設全国調査（横断調査）を行うことによって肝内結石症における胆管癌合併の危険因子を解析し、発癌および胆管癌合併からみた肝内結石症の取扱いについて検討することを目的とする。調査は多施設による診療録ベースのretrospective studyである。まず、1次調査にて肝内結石症例の有無、胆嚢結石症・肝外胆管結石症例数を調査する。引き続き2次調査として患者背景、肝内結石の病状、合併症、肝内胆管癌の有無、治療内容、転帰など詳細な症例調査を行う。倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。次年度は、早々に1次調査票を発送し、来年度中には2次調査の中間報告を行える見込みである。

A. 研究目的

肝内結石症は良性疾患でありながら完治が難しく、再発を繰り返すことが多い。また、反復する胆管炎や、それに続く敗血症、胆管癌の合併など、臨床経過において大きな問題があるも、その取扱いについてはいまだ一定のコンセンサスが得られていなく、施設間で異なる場合が多いのが現状である。とくに、胆管癌の合併は予後や治療成績に大きく影響し、臨床上の大きな問題点のひとつである。そのため、原因・病態の解明や治療法の確立を目的に本研究班によって6回の全国調査が行われている。この調査においても、胆道癌の合併はいずれも5%前後と高値であり治療成績の著しい向上は現状では認めていない。

肝内胆管癌の危険因子については、研究班調査で過去に行われており、前回調査（第6期）では多変量解析において肝萎縮例と胆道再建既往例が肝内胆管癌合併の危険因子として抽出されている。また、1998年調査（第5期）登録例に対して行われたコホート調査も行われている。

前回調査（第6回・2006年）より5年が経過しているため、新規の多施設全国調査（横断調査）によって肝内結石症における胆管癌合併の危険因子を解析し、発癌および胆管癌合併からみた肝内結石症の取扱いについて検討することを目的とする。本研究により肝内結石症の臨床病理像を解明することによって、肝内結石症の治療成績改善に大きく寄与する可能性が見込まれる。

B. 研究方法

本研究は多施設による診療録ベースのretrospective studyである。

対象施設：日本消化器病学会認定・関連施設、日本消化器外科学会認定・関連施設。

対象症例：肝内結石症の診断で通院歴、入院歴のある症例（新規症例、フォローアップ症例問わず）。

対象期間：2011年1月1日～2011年12月31日とする。

調査は施設を対象にする1次調査と、詳細な症例調査

である2次調査よりなる。

① 1次調査

対象施設に、調査協力の可否、2011年1月1日から12月31日の期間に通院もしくは入院された肝内結石症例の有無および症例数、同期間の胆嚢結石症・肝外胆管結石症例の総数について調査をする。

肝内結石症全国疫学アンケート調査に	
参加する	参加しない
対象期間（2011年1月1日から2011年12月31日）における以下の症例数につきお答えください。	
● 肝内結石症_____例	
● 胆嚢結石症_____例	
● 肝外胆管結石症_____例	
施設名_____	
担当責任者氏名_____	
ご協力ありがとうございました。	

図1 一次調査票

② 2次調査

1次調査で肝内結石症例があると回答があった施設に対し、肝内結石症例の詳細な臨床病理像に関する個別調査を行う。調査項目は、患者背景（年齢、性別、居住地、嗜好、既往歴）、肝内結石の病状（診断日、臨床症状、分類（IE分類、LR分類）、胆管狭窄・拡張、肝萎縮の部位、結石種類）、合併症、肝内胆管癌の有無、治療内容、治療後の症状、転帰。

本研究は発癌に焦点を絞り統計学的にアプローチする。

③研究における倫理的配慮について

本研究に関連するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言（日本医師会：<http://www.med.or.jp/wma/>）および、臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日改正 <http://www.jsvs.org/ja/info/shinshin.pdf>）に従って本研究を実施する。

各施設から返送された調査票はファイリングしたうえで、鍵のかかるキャビネット内で個人識別情報分担管理者が保管する。また、コンピュータに入力されたデータは個人情報を保護し情報漏洩を絶対的に避けなければならないという観点から、患者氏名ではなく通し番号による匿名化に加え、ファイルもパスワードによる暗号化という二重のブロックで管理する。さらに、コンピュータは本研究専用とし、他のデータは入力しない。また、指紋認証装置を導入し、特定された個人しか起動できないようにする。ネット環境など外部環境への接続をしない、などの嚴重な配慮を行う。

なお、本研究は杏林大学医学部倫理委員会によって審査され、承認済みである（審査番号244番）。

C. 研究結果

現在、倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。

D. 考察

現在、倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。今後の計画としては、来年度早々に1次調査票を発送し、来年度中には2次調査の中間報告を行える見込みである。

E. 結論

現在、倫理審査を通過し、1次調査の発送準備中である。今後の計画としては、来年度早々に1次調査票を発送し、来年度中には2次調査の中間報告を行える見込みである。

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

肝内結石症と胆道癌のリスク ～集団ベースの追跡研究～

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：10年前に実施した肝内結石症の症例対照研究の登録例を対象にコホート調査を行った。登録例を研究コホート（症例）、比較コホート（対照）として、両群間の死因を調べ、肝内胆管癌をはじめとした消化器系癌の発生率を検討した。両群の10年生存率は症例で短い傾向にあったが、有意差は認めなかった。胆道癌、肝内胆管癌の発生率が症例で有意に高く、消化器癌についてはほぼ等しかった。肝内結石症の診療に当たっては、肝内胆管癌のみならず、全胆道癌の合併のリスクも念頭において、治療、フォローアップを行うべき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2001年～2002年に肝内結石症の成因究明のための症例対照研究を実施した。これらの症例、対照は、その後10年間追跡調査を行ってきたが、肝内結石症患者には肝内胆管癌をはじめとした胆道癌合併例が多く、その予後を規定する因子となっていた。

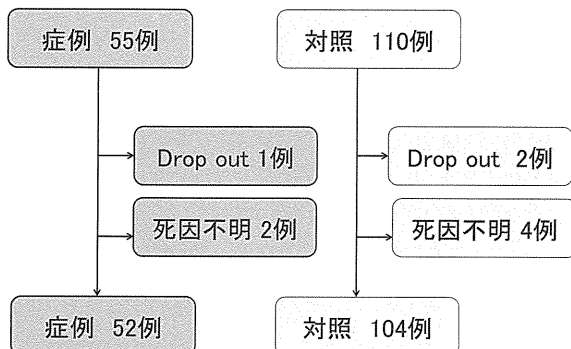
今回、この症例、対照を、研究コホート、比較コホートとして、両群間の死因を調べ、肝内胆管癌をはじめとした消化器系癌の発生率を検討した。

B. 研究方法

研究コホートとして、2001年～2002年に上五島病院で診断、治療された肝内結石症患者55名のうち、経過中に Drop out した1例、死因不明の2例を除く52例を、比較コホートとして、同時期に当院を受診した胆石を保有しない患者で、性、年齢（±3才）のマッチした者110名のうち、経過中に Drop out した2例、死因不明の4例を除く104例を、対象とした。（図1）

各コホートを、指標となる来院日から約10年間追跡

図1 調査対象



し、Kaplan-Meier 法を用いて、10年間の生存率、胆道癌等の消化器系癌の累積発生率を算出した。また、Cox 比例ハザード回帰分析を行って、補正後の10年間の胆道癌の発生リスクを算出した。

C. 研究結果

1) 死亡率と死因の詳細

症例では、52例中22例が死亡しており、死亡率は42.3%であった。死因は、肝内胆管癌3例、肝門部胆管癌2例、下部胆管癌1例、胆嚢癌1例、肝臓癌3例で、肝胆道癌の頻度が高かった。また、結石に関連する胆汁性肝硬変1例、胆管炎・敗血症1例を認めた。

対照では、104例中32例が死亡しており、死亡率は30.8%であった。死因は、肝内胆管癌0例、肝門部胆管癌1例、肝臓癌1例、肺癌6例であった。また、半数は良性疾患による死亡であった。（図2）

図2 死因の詳細

研究コホート（症例）		比較コホート（対照）	
死亡例22例	（死亡率42.3%）	死亡例32例	（死亡率30.8%）
死因	肝内胆管癌 3	死因	肝門部胆管癌 1
	肝門部胆管癌 2		肝細胞癌 1
	下部胆管癌 1		胃癌 2
	胆嚢癌 1		大腸癌 2
	肝細胞癌 3		膵臓癌 1
	膵頭部癌 1		肺癌 6
	胃癌 2		白血病、リンパ腫 2
	肺癌 1		乳癌、皮膚癌 2
	肝硬変 1		心不全 9
	胆管炎、敗血症 1		肝硬変 2
	心不全、心筋梗塞 4		肺炎 2
	解離性大動脈瘤 1		くも膜下出血 1
	パーキンソン病 1		老衰 1

2) 累積生存率

10年後の累積生存率は、症例59.2%、対照68.5%であった。症例で生存率が低い傾向にあったが、有意差は認めなかった。（図3）

3) 胆道癌の累積発生率

胆道癌の10年累積発生率は、症例19.8%、対照0.9%であった。症例で有意に高かった。（図4）

4) 肝内胆管癌の累積発生率

肝内胆管癌の10年累積発生率は、症例8.9%、対照0%であった。症例で有意に高かった。（図5）

5) 肝細胞癌の累積発生率

肝臓癌の10年累積発生率は、症例7.8%、対照0.9%であった。症例で有意に高かった。（図6）

6) 消化管癌の累積発生率

消化管癌の10年累積発生率は、症例8.8%、対照8.6%