

C. 研究結果

1. 急性肝障害モデルにおける肝マクロファージの解析

- (1) F4/80を用いた免疫染色では、肝障害誘導48時間後の肝組織において、マクロファージは障害部位周囲に集積していた。
- (2) 肝障害誘導48時間後の肝臓から単核球を単離しFACS解析を行ったところ、浸潤したマクロファージ(F4/80陽性)のほぼ全てがCD68またはCD11b陽性であり、CD68陽性細胞はその95%を占めていた。
- (3) CD68陽性マクロファージはCD11b陽性マクロファージに比して有意に高い貪食能を示した。
- (4) マクロファージ欠損マウスではCD68陽性マクロファージの浸潤が消失し、四塩化炭素投与4日後および6日後においても壊死巣が残存しており、血清ALT値は有意に上昇していた。

2. 急性肝障害モデルにおけるGpnmbの発現とGpnmb陽性マクロファージの機能解析

- (1) 四塩化炭素投与2日目の血清ALT上昇のピークに遅れ、4～6日目の肝組織においてGpnmbの強い発現が認められた。また蛍光二重染色ではCD68陽性マクロファージの一部にGpnmbの発現が認められた。
- (2) CD68陽性マクロファージにおいてGpnmb陽性あるいは陰性マクロファージの貪食能を検討したところ、CD68+Gpnmb+マクロファージはCD68+Gpnmb-マクロファージに比して有意に高い貪食能を示した。

3. Gpnmb変異型マウスを用いた検討

- (1) Gpnmb変異型および野生型マウスにおいて血清ALT値および肝組織学的所見に明らかな差異は認めなかった。
- (2) Gpnmb変異型マウスにおいて、四塩化炭素投与4日目のTGF- β 発現、8日後のMMP9発現および6日後のMMP13の発現が有意に低下していた。
- (3) α SMAの免疫組織化学染色ではGpnmb変異型マウスにおいて α SMA陽性領域が有意に縮小し、 α SMAおよびKi-67の蛍光二重染色ではGpnmb変異型マウスにおいて α SMA陽性の活性化星細胞の増殖が有意に抑制されていた。

D. 考察

障害肝に浸潤するマクロファージにはサイトカイン産生を主体とするCD11b陽性マクロファージと、高い貪食能を有するCD68陽性マクロファージが浸潤することが報告されている。本研究では、まず障害肝の修復過程におけるマクロファージの役割を検討した。四塩化炭素肝障害モデルにおいて、肝障害誘導96時間後の肝組織において障害部位周囲にCD68陽性マクロファージの集積が認められた。さらに肝障害誘導後の修復過程においてマクロファージを欠損させると、障害肝の再生・修復が遷延化したことから、障害部位周囲にCD68陽性マクロファージが障害肝の再生・修復に重要な役割を果たしていることが推測された。一方、Gpnmbは四塩化炭素肝障害誘導後、肝障害のピー

クに遅れてその48～96時間後に発現増強し、障害部位周囲に浸潤したCD68陽性マクロファージにおいて発現していた。さらにGpnmb発現細胞は高い貪食能を有していた。さらにGpnmb変異型マウスではGpnmb陽性マクロファージが欠損しており、このマウスに四塩化炭素肝障害を誘導すると肝障害の程度には差異を認めなかったが、活性化星細胞の増殖が抑制された。障害直後のTGF- β の発現が抑制され、それに引き続くMMP9およびMMP13の発現が抑制された。以上の結果から、肝障害の修復過程で障害部位周囲に浸潤する高い貪食能を有するマクロファージはその再生・修復に重要で、その中でも貪食能の高いGpnmb陽性マクロファージは障害肝組織の修復過程において線維形成のみならずその吸収に重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

肝障害の極期に遅れて、障害部位周囲に浸潤するCD68陽性またはGpnmb陽性マクロファージが障害肝の再生・修復過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、Gpnmb陽性マクロファージはより高い貪食能を有しており、傷害組織の再生に必要な線維形成とその吸収に重要な役割を果たしていることが推測された。さらにGpnmbは炎症の調節(抗炎症)にも重要な役割を果たしていることも報告されており、広範な肝細胞壊死に引き続く肝再生・修復のみならず、急性肝不全にみられる過剰な免疫亢進状態による肝細胞障害を取り巻く微小環境にも深く関与していることが推測される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, Mochida S, Ohnishi S, Tsubouchi H; Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepato Res.* 2013; 43: 97-105
- 2) Oketani M, Ido A, Uto H, Tsubouchi H. Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy. *Hepato Res* 2012; 42: 627-636.

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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

ヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導に関する研究

研究協力者 汐田 剛史 鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子医療学 教授

研究要旨: iPS 細胞を用いた肝再生医療の実現には、iPS 細胞から肝細胞への効率的分化誘導と肝細胞の成熟化が必要である。本研究の目標として、ヒト iPS 細胞より成熟した肝細胞への分化誘導のアプローチとして、ミトコンドリア生合成の誘導の意義を検討する。そこで、ミトコンドリア生合成を促進する因子として PGC-1 α 遺伝子に着目し、本遺伝子を効率よく発現するアデノウイルスベクターを作製し、成熟肝細胞誘導における意義を明らかにする。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞を成熟した肝細胞への分化誘導するため、ミトコンドリア生合成を誘導する因子である PGC-1 α に着目し、ミトコンドリアバイोजェネシスの誘導を行うで iPS 細胞の肝細胞成熟化へ及ぼす意義を検討する。この際、導入に使用するアデノウイルスベクターを作製する。

B. 研究方法

PGC-1 α 遺伝子を効率よく、ヒト iPS 細胞で発現させる目的で、ファイバーをモディファイしたアデノウイルスベクターによる発現系を構築する。PGC-1 α と同時に EGFP を発現するプラスミドを構築し、その後、ファイバーをモディファイしたアデノウイルスベクターへ導入するストラテジーを用いた。

C. 研究結果

ヒト PGC-1 α のクローニングとシークエンス、EGFP 遺伝子のシークエンスを行い、CAG プロモーター制御下にヒト PGC-1 α と EGFP が発現する pHMCAG-PGC1 α -F-IRES-EGFP の構築を行っている。次の段階のファイバーをモディファイしたアデノウイルスベクターを準備している。

D. 考察

PGC-1 α の遺伝子発現がミトコンドリアのバイोजェネシスを促進することは、筋肉細胞などは報告されているが、肝細胞系では報告がなく、今後の進展は興味深い。

E. 結論

ヒト iPS 細胞より成熟した肝細胞への分化誘導のアプローチとして、PGC-1 α 遺伝子に着目し、本遺伝子を効率よく発現するアデノウイルスベクターを作製を目指している。

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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

肝不全、肝硬変症に対する骨髄由来マクロファージ投与療法の可能性

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：【背景および目的】我々は肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (ABMi療法) が有効であることを明らかにしてきた。ABMi療法は骨髄採取時に全身麻酔が必要であり、非代償性肝硬変患者において施行できない症例が多い。この問題を解決するために、局所麻酔下に採取した少量自己骨髄液から骨髄由来細胞を培養増殖させる技術を開発し、その細胞を用いた新規の肝修復再生療法の実現に向けた基礎研究を行った。また、使用する培地についてはヒトへの臨床応用を考え、無血清培地でありかつGMPグレード対応のシステムを用いて検討した。**【方法】**C57 BL/6 GFP⁺マウス大腿骨より 1×10^7 個の骨髄細胞を採取し、無血清培地 (GIBCO, StemPro[®] MSC-SFM, Cell start[®], GMPグレード対応製品) にて培養を行った。2週間の培養後、得られた紡錘形のGFP陽性細胞 (キャラクターに関してはCD45, CD11b, CD90について解析した) を、CCl₄投与による肝硬変マウスの尾静脈より投与 (1×10^4 /個体) した (A群)。比較対象としてGFP陽性非培養骨髄細胞投与群 (B群)、コントロールとしてCCl₄単独群 (C群) を用い、骨髄投与4週後の肝臓組織、および血清データを検討した。**【成績】**血清アルブミン値はA群、およびB群でコントロールと比較し有意に上昇しており (A: 2.27 ± 0.35 , B: 2.33 ± 0.29 , C: 2.16 ± 0.39)、A, B両群間には有意差を認めなかった。GFP免疫染色にてA, B両群とも門脈域にGFP陽性細胞を認めた。Sirius-red染色ではA群、およびB群でコントロールと比較し有意に線維化面積の減少を認めた ($P < 0.01$)。また、A群、およびB群でMMP9の発現増加を確認した ($P < 0.01$)。また、A群においてGFP陽性の生着細胞はF4/80を発現しており、マクロファージを含む細胞分画が生着したことが示唆された。**【考案】**我々はマウスGFP陽性骨髄細胞を無血清培地でも効率よく培養させる培養方法を開発した。さらに骨髄由来の培養細胞を用いた検討で、我々が開発したGFP/CCL4モデルと同等の肝機能、肝線維化の改善効果が得られることが明らかになった。**【結語】**骨髄由来培養細胞投与法は、次世代型の非代償性肝硬変に対する新規治療法となり得ると考えられ報告する。

共同研究者

寺井 崇二 山口大学大学院 医学系研究科
消化器病態内科学 准教授
高見 太郎 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 助教

A. 研究目的

肝硬変症は肝臓病の終末期状態であり、かつその治療は非常に困難である。その数少ない治療法として肝移植があげられるが、ドナー不足、手術の侵襲性、コストの問題が残っている。一方、自己の幹細胞を用いた細胞与療法は、免疫拒絶反応もなく患者の生体組織に適応した新たな臓器再生法として期待されている。我々は、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床応用を進めるための基盤モデルとして、骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル (GFP/CCl₄モデル) を開発し、このモデルを中心とした解析において、骨髄細胞投与により肝機能と生存率の回復、また肝線維化の改善を発見した。これらの基礎実験に基づいて、我々は2003年11月から、腸骨から採取した自己骨髄細胞を用いた「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法; Autologous Bone Marrow cell infusion (ABMi) therapy」の臨床研究を開始しており、これは現在まで安全に施行でき、かつ基礎研究と同様に、骨髄細胞投与によって非代償性肝硬変症患者の肝機能が改善する

ことを明らかにしてきた。また韓国でも同様な治療が実施され有効性が明らかになっている。ABMi療法の問題点として、ABMi療法は骨髄液を約400mL採取する際に全身麻酔が必要であるため肝機能上の制約がある。また、安全に採取するために血小板5万以上という制約を設けているが、非代償性肝硬変患者において適応とならない症例が多い。この問題を解決するために、局所麻酔下に採取した少量自己骨髄液から骨髄由来培養細胞を増殖させる技術を開発し、その細胞を用いた新規の肝修復再生療法の実現に向けた基礎研究を行った。また、使用する培地についてはヒトへの臨床応用を考え、無血清培地でありかつGMPグレード対応のシステムを用いて検討した。今回は、骨髄由来培養細胞投与による肝機能の改善効果について報告する。

B. 研究方法

(使用動物) 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。マウスは山口大学大学院の動物実験施設で、特定病原体フリーケージにて管理された。実験プロトコルの承認を得た後、山口大学医学部の動物の倫理的扱いを求める要件に応じて世話をした骨髄細胞はマウス大腿骨より麻酔下に採取し、PBSでの洗浄、濃縮を行った。細胞のキャラクターに関してはフローサイトメトリーで解析した。
(細胞培養) 今までの報告では通常細胞培養では 1×10^5 /mLの密度で細胞を播種していることが多い

が、GFP トランスジェニックマウスにおいては通常マウスよりも培養細胞の増加速度が遅く、我々は有効な細胞数を得るため採取した骨髄細胞を 1×10^7 /mL の密度で dish に播種した。無血清培地 (GIBCO, StemPro[®] MSC-SFM, Cell start[®], GMP グレード対応製品) にて培養し、1日ごとに培地交換を行った。

(プロトコル) 1.0ml/kg の CCl₄ を週に 2 回 C57 BL/6 マウス (♀) の尾静脈より投与し、持続肝障害を起こさせた。4 週間の CCl₄ 投与後、マウスの尾静脈より 1×10^4 個の培養細胞を投与した A 群、 1×10^5 個の GFP 陽性骨髄細胞を投与した B 群、生理食塩水を投与したコントロール C 群の 3 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

血清アルブミン値は 1×10^4 個の培養細胞を投与した A 群、 1×10^5 個の GFP 陽性骨髄細胞を投与した B 群でコントロールと比較し有意に上昇しており (A: 2.27 ± 0.35 , B: 2.33 ± 0.29 , C: 2.16 ± 0.39)、A、B の両群間には有意差を認めなかった。投与細胞が肝に生着していることを確認するため、GFP 免疫染色を行ったところ A、B 両群とも門脈域に GFP 陽性細胞を認め、コントロールの C 群では肝内に GFP 陽性細胞を認めなかった。肝線維化について Sirius-red 染色で評価を行ったが、A 群、および B 群でコントロールと比較し有意に線維化面積の減少を認めた ($P < 0.01$)。また、A 群、および B 群で MMP9 の発現増加を確認でき ($P < 0.01$)、投与細胞が肝内に生着し、さらに MMP9 の発現を介して肝線維化を改善させた可能性が示唆された。生着した細胞のキャラクターを解析するため、免疫 2 重染色でまた、A 群において GFP 陽性の生着細胞は F4/80 を発現しており、マクロファージを含む細胞分画が主に生着したことが示唆された。また、B 群では F4/80 を発現する GFP 陽性細胞はほとんど認められなかった。A、B 両群で GFP と α -SMA の共陽性細胞は認められなかった。また、A 群では Vimentin と GFP の共陽性細胞も少数確認されたため、間葉系細胞も肝内に生着している可能性が示唆された

D. 考察

我々が今まで報告してきた GFP/CCl₄ モデルを用いて培養骨髄細胞投与の効果について検討を行うため、まず効果的に細胞を得る培養法を新たに考案した。通常の培養プロトコルでは骨髄細胞を $1 \times 10^{5-6}$ 個 /mL で播種するが、初代培養の際に用いる細胞密度を 1×10^7 個 /mL へ増加させることにより、効率よく細胞を増殖させることができた。また、一般的には培地には血清や FGF の添加を行うが、臨床応用への可能性を考慮し、無血清培地かつ GMP グレード対応品を用いた。2 週間の培養後、十分な細胞数を得ることができた。さらに GFP トランスジェニックマウス骨髄由

来の培養細胞投与によって、肝内で GFP 陽性細胞を確認し、さらに今まで我々が報告してきた GFP/CCl₄ モデルと同様に血清アルブミン値の上昇や、肝線維化の改善について確認できた。また、その改善効果については、投与細胞量は従来の 10 分の 1 量の 1×10^4 個 / 個体であったが、従来の骨髄投与と比較して遜色のない結果であった。さらに、肝内の GFP 陽性細胞に関してその性状を免疫 2 重染色にて評価したところ、今まで我々が報告してきたのと同様に MMP-9 との共発現が認められ、一方、 α -SMA との共発現細胞は認められなかった。培養細胞のフローサイトメトリーや免疫染色などの結果からマクロファージを含む培養細胞分画の肝再生効果が示唆された。

E. 結論

マウスにおいては、骨髄細胞の無血清培地を用いた培養によって効率のマクロファージ系細胞の誘導が可能であり、通常の骨髄細胞に比べ 10 分の 1 の量で、骨髄細胞と同様な肝線維化改善効果を認めた。投与した培養骨髄細胞は肝臓においてマクロファージの定着の増加、MMP9 の増加を認めた。今後人データとの比較検討が必要であるが、骨髄由来培養細胞投与法は、次世代型の非代償性肝硬変に対する新規治療法となり得ると考えられ報告する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takuya Iwamoto, Shuji Terai, Takuro Hisanaga, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Shoko Watanabe and Isao Sakaida. Bone marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon tetrachloride-treated cirrhotic mice. Cell and Tissue Research. 2012 Nov 27. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

(日本再生医療学会総会 平成 21 年 3 月 19 日 ポスター) 骨髄由来培養細胞による肝線維化、肝機能改善効果についての検討

(日本肝臓学会総会 平成 21 年 6 月 5 日 ワークショップ) 無血清培地を用いた骨髄由来肝臓修復細胞の開発

(AASLD 平成 21 年 10 月 26 日 ポスター)

Mesenchymal cells derived from bone marrow cell reduce liver fibrosis and improved liver function in CCL4-treated cirrhosis mice.

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

劇症肝炎成因不明例の免疫応答の解析

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：劇症肝炎の成因不明例は亜急性の経過を取ることが多く、有効な治療法が開発されていないために、予後不良であった。また今日広く行われている、ステロイドパルスの効果も不十分である。今回成因不明の劇症肝炎亜急性型の透析濾液と血清を解析することにより、IL-17, IL-12p40, IFN- γ , IL-23, IL-6などの産生の亢進が示唆された。これらの結果より Th17と Th1が相互に作用して、成因不明の劇症肝炎亜急性型の病態形成に関与していることが示唆された。

これらの特異的阻害剤が新たな免疫抑制治療となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

劇症肝炎の成因不明例は、成因がわからないために有効な治療法が確立されずにきた。臨床の場ではサイトカインストームを抑制するために、ステロイドパルス療法が広く行われているが、この type の劇症肝炎に対する効果は十分とはいえない。劇症肝炎発症の病態メカニズムの一つとしては過剰な免疫応答の存在が推定されているが、実際に免疫応答は病型により大いに異なっており、成因不明例では多くの症例が亜急性の経過をとり、急性型で見られる一過性の過大な免疫応答よりむしろ、免疫応答が持続して肝細胞破壊が進行することが臨床経過より推定される。さらに一部では自己免疫現象の関与も想定されている。今回の検討は新たな免疫抑制治療を構築する上での基礎となるデータを構築することを目的に行った。

B. 研究方法

対象は成因不明の劇症肝炎亜急性型例である。対照群は検診で病歴上および採血データと病歴上の上異常の認められなかった50名である。

劇症肝炎の診断は犬山シンポジウムの診断基準に従った。サイトカインはBio-Rad社のBio-plex systemsを用いて測定した。測定対象のサイトカインは1) Hu-IL-1 α , 2) Hu-IL-2Ra, 3) Hu-IL-3, 4) Hu-IL-12p40, 5) Hu-IL-16, 6) Hu-IL-18, 7) Hu-CTACK, 8) Hu-GRO α , 9) Hu-HGF, 10) Hu-IFN- α 2, 11) Hu-LIF, 12) Hu-MCP-3, 13) Hu-M-CSF, 14) Hu-MIF, 15) Hu-MIG, 16) Hu-b-NGF, 17) Hu-SCF, 18) Hu-SCGF- β , 19) Hu-SDF-1 α , 20) Hu-TNF- β , 21) Hu-TRAIL, 22) Hu-PDGF-bb, 23) Hu-IL-1 β , 24) Hu-IL-1ra, 25) Hu-IL-2, 26) Hu-IL-4, 27) Hu-IL-5, 28) Hu-IL-6, 29) Hu-IL-7, 30) Hu-IL-8, 31) Hu-IL-9, 32) Hu-IL-10, 33) Hu-IL-12(p70), 34) Hu-IL-13, 35) Hu-IL-15, 36) Hu-IL-17, 37) Hu-Eotaxin, 38) Hu-FGF-basic, 39) Hu-G-CSF, 40) Hu-GM-CSF, 41) Hu-IFN-g, 42) Hu-IP-10, 43) Hu-MCP-1(MCAF), 44) Hu-MIP-1a, 45) Hu-MIP-1b, 46) Hu-RANTES, 47) Hu-TNF- α ,

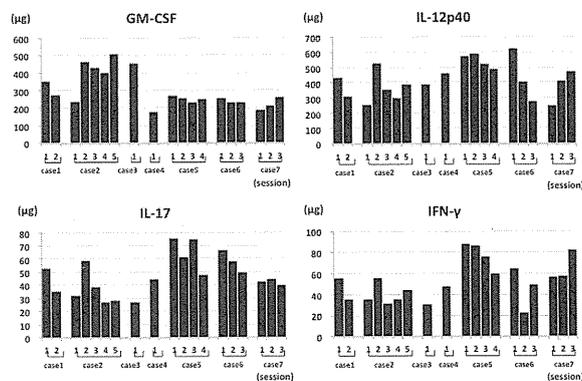
48) Hu-VEGF, 49) Eotaxin-2, 50) MCP-2, 51) BCA-1, 52) MCP-4, 53) I-309, 54) IL-16, 55) TARC, 56) 6CKine, 56) Eotaxin-3, 57) LIF, 58) TPO, 59) SCF, 60) TSLP, 61) IL-33, 62) IL-20, 63) IL-21, 64) IL-23, 65) TRAIL, 66) CTACK, 67) SDF-1 alpha & beta, 68) ENA-78, 69) MIP-1d, 70) IL-28Aである。

血清中のサイトカインは正常上限の何倍かで表記した。また劇症肝炎成因不明例のうち7例では透析濾液を経時的に回収して濾液中のサイトカインも同時に測定した(サイトカイン1-48まで)。濾液中のサイトカインは1 sessionあたりに除去されたサイトカインの総量で示した。

C. 研究結果

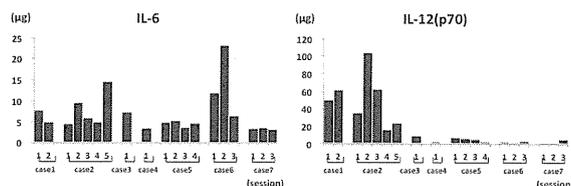
劇症肝炎患者の入院時の血中のサイトカインは、70項目中57項目は正常上限の10倍から1000倍の間に分布した。サイトカインは局所で産生され、一過性の変動を示すものも多いので、病態との関連を検討するために、一部の症例で透析濾液の解析により、ある時間内に up regulate されているサイトカインと down regulate されているサイト間を判別した。その結果 Th-17の誘導に関与するサイトカインが大量に透析濾液に除去されていることが判明した。

Removed cytokine by ALS (μ g)



産生が亢進していることが示唆されたのは、IL-17ばかりではなく、そのプライミングや反応の増強に関与するサイトカインであるIL-6, IL-12p40, IFN- γ , GM-CSFの上昇も認められた。この系における重要なサイトカインであるIL-23は直接測定していないがIL-12p40が大量に除去される一方でIL-12p70の除去量が低いことより、IL-23の産生が亢進していると考えた。

Removed cytokine by ALS (μ g)



血中においてもこれらのサイトカインは正常上限の数十倍から数百倍前後の誘導がかかっていることが明らかになった (IL-12p40 346倍, IL-6 310倍, IL-17 34倍, IL-23 55倍)。

D. 考察

劇症肝炎・亜急性型・成因不明例は治療の開始が遅れるために、予後不良であった。臨床的には一部自己免疫性肝炎の関与も考えられているものの、その詳細は不明であるが、今回の検討より成因不明の劇症肝炎の一部に明らかにTh-17系の免疫応答の亢進が関与していることが示唆された。ヘルパーT細胞分化に関わるサイトカインネットワークの動きは非常に複雑で近年様々な知見が明らかにされており、本研究でinterferon γ の産生亢進から示唆されるようにTh1系とも密接にlinkしていると考えられる。

Th17とTh1をとともにより特異的に押さえる新たな免疫抑制療法ができれば、新たな有効な治療法となる可能性が考えられた。GM-CSFの作用を阻害することが、今後の免疫抑制療法の一つの選択肢となる可能性がある。

現在検討中の症例も含めると、劇症肝炎は病因、病型により誘導されるサイトカインも異なり、それぞれに特異的な治療が必要ではないかと筆者らは考えている。

E. 結論

成因不明の劇症肝炎亜急性型の病態形成にTh-17系の亢進の関与が示唆され、さらにTh1系の関与も示唆された。今後より特異的で有効な免疫抑制療法を開発する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 井上和明, 渡邊綱正. 急性肝炎におけるEBVとCMV. わが国における急性肝炎の現状 全国調査2008-2011. 2012; p46-51.
- 井上和明, 与芝真彰. 血漿交換と免疫抑制剤による肝再生の誘導. 再生医療叢書5 代謝系臓器. 2012. 133-140.
- Inoue K. Hepatic encephalopathy. Advances in Medicine and Biology. 2012; p59-81.
- 井上和明, 五味邦代, 与芝真彰. 劇症肝炎. 検査と技術. 2012; 40 (10, 増刊号): 884-890.
- 井上和明. 劇症肝不全. ICUとCCU. 2013; 37: 59-67.
- 井上和明. 肝細胞癌の個別化医療: 腫瘍の個数とサイズを超えて. 肝臓. 2012; 53 (Suppl.1): 42.
- 井上和明. サイクロフィリンインヒビターの今後の展開について. 肝臓. 2012; 53 (Suppl.1): A148.
- 井上和明. 劇症肝炎成因不明例における肝細胞破壊機序の免疫学的検討. 肝臓. 2012; 53 (Suppl.1): A311
- 井上和明, 与芝真彰. 劇症肝炎成因不明例の検討. 肝臓. 2012; 53 (7): 447-448.
- 井上和明, 五味邦代, 与芝真彰. 劇症肝炎超急性型から考える内科治療の意義と肝移植の時期とシステムの問題点. 肝臓. 2012; 53 (7): 451.
- 藤原慶一, 横須賀 收, 織田成人, 荒田慎寿, 井上和明, 滝川康裕, 井戸章雄, 持田 智, 坪内博仁. 急性肝不全に対する血液浄化療法の有効性評価: 急性肝不全に対する人工肝補助療法の現状に関するアンケート調査報告. 肝臓. 2012; 53 (8): 530-533.
- 井上和明, 与芝真彰. 成因から考える治療 移植医療との連携. 肝臓. 2012; 53 (Suppl.2): A624.
- 五味邦代, 井上和明, 与芝真彰. 超急性の経過をとるB型劇症肝炎の検討. 肝臓. 2012; 53 (Suppl.3): A822.
- 猪 聡志, 井上和明, 与芝真彰. 劇症肝炎 成因不明例の検討. 肝臓. 2012; 53 (Suppl.3): A829.
- 黒田高明, 田上 靖, 下田浩輝, 中野利香, 笹平直樹, 前川久登, 与芝真彰, 井上和明. 我々の経験したde novo B型肝炎の2例. 肝臓. 2012; 53 (Suppl.3): A884.
- 井上和明, 与芝真彰. 急性肝不全治療の進歩. 人工臓器. 2012; 41 (2): S88.
- 渡邊綱正, 井上和明, 田中靖人. 血小板低値のC型肝炎治療. 消化器の臨床. 2012; 15 (3): 303-308.
- 井上和明, 与芝真彰. 臓器移植法改正後の急性肝不全治療の実態と問題点. 日腹部救急医学会誌. 2012; 33 (2): 316.

19. Inoue K, Yoshiba M. Online Hemodiafiltration Is a Promising Method To Give a Greater Chance of Undergoing Transplantation. Liver Transpl. 2012; 18(Suppl.1): S245-S246.
20. Inoue K. Intensive artificial liver support systems as periooperative care in liver transplantation improves survival. Transplantation 2012; 94(10S): 566.
21. Inoue K. Immune-modulatory role of artificial liver support system using huge volume of buffers. Transplantation 2012; 94(10S): 40
2. 学会発表
(発表誌名巻号・発行年も記入)
1. 井上和明. 肝細胞癌の個別化医療：腫瘍の個数とサイズを超えて. 肝臓. 2012 ; 53 (Suppl.1) : 42.
 2. 井上和明. サイクロフィリンインヒビターの今後の展開について. 肝臓. 2012 ; 53 (Suppl.1) : A148.
 3. 井上和明. 劇症肝炎成因不明例における肝細胞破壊機序の免疫学的検討. 肝臓. 2012 ; 53 (Suppl.1) : A311
 4. 井上和明, 与芝真彰. 劇症肝炎成因不明例の検討. 肝臓. 2012 ; 53 (7) : 447-448.
 5. 井上和明, 五味邦代, 与芝真彰. 劇症肝炎超急性型から考える内科治療の意義と肝移植の時期とシステムの問題点. 肝臓. 2012 ; 53 (7) : 451.
 6. 藤原慶一, 横須賀 収, 織田成人, 荒田慎寿, 井上和明, 滝川康裕, 井戸章雄, 持田 智, 坪内博仁. 急性肝不全に対する血液浄化療法の有効性評価：急性肝不全に対する人工肝補助療法の現状に関するアンケート調査報告. 肝臓. 2012 ; 53 (8) : 530-533.
 7. 井上和明, 与芝真彰. 成因から考える治療 移植医療との連携. 肝臓. 2012 ; 53 (Suppl.2) : A624.
 8. 五味邦代, 井上和明, 与芝真彰. 超急性の経過をとるB型劇症肝炎の検討. 肝臓. 2012 ; 53 (Suppl.3) : A822.
 9. 猪 聡志, 井上和明, 与芝真彰. 劇症肝炎 成因不明例の検討. 肝臓. 2012 ; 53 (Suppl.3) : A829.
 10. 黒田高明, 田上 靖, 下田浩輝, 中野利香, 笹平直樹, 前川久登, 与芝真彰, 井上和明. 我々の経験した de novo B 型肝炎の 2 例. 肝臓. 2012 ; 53 (Suppl.3) : A884.
 11. 井上和明, 与芝真彰. 急性肝不全治療の進歩. 人工臓器. 2012 ; 41 (2) S88.
 12. Inoue K, Yoshiba M. Online Hemodiafiltration Is a Promising Method To Give a Greater Chance of Undergoing Transplantation. Liver Transpl. 2012; 18: S245-S246.
 13. Inoue K. Intensive artificial liver support systems as periooperative care in liver transplantation improves survival. Transplantation 2012; 94(10S): 566.
 14. Inoue K. Immune-modulatory role of artificial liver support system using huge volume of buffers. Transplantation 2012; 94(10S): 40
 15. 井上和明, 与芝真彰. 臓器移植法改正後の急性肝不全治療の実態と問題点. 日腹部救急医学会誌. 2012; 37(1): 316.
- 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 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

急性肝不全に対する on-line HDF の有用性

研究協力者 荒田 慎寿 横浜市立大学 特任准教授

研究要旨: 急性肝不全に対して on-line HDF を臨床応用し、集積された全28例の脳症改善率、生存率、移植治療ブリッジユーズ、合併症、血液生化学検査等について再評価した。手技関連の合併症はなく、 4.2 ± 0.5 (mean \pm SD) 回の治療後に25例 (89.3%) が脳症から回復し、覚醒までに必要な治療回数は開始時の意識状態と相関した ($P < 0.001$)。救命率は40%で、治療開始後の PT, DT ratio, 血清アンモニア値は予後予測に有用と考えられた。

A. 研究目的

On-line HDF の肝代償効果を検証する

急性肝不全に対する on-line HDF を用いた人工肝補助療法の確立 肝臓 2012; 53: 7-17

B. 研究方法

症例集積検討

2. 学会発表

なし

C. 研究結果

集積された全28例において手技関連の合併症はなく、 4.2 ± 0.5 (mean \pm SD) 回の治療後に25例 (89.3%) が脳症から完全に回復し、覚醒までに必要な治療回数は開始時の意識状態と相関した ($P < 0.001$)。転帰は、生存10例、肝外疾患死亡6例で、4例は移植治療を受け、ドナーが確保されなかった5例は最終的に肝不全で死亡された (救命率40%)。治療開始後の PT, DT 比, 血清アンモニア値の推移が予後予測に有用と考えられた。

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

D. 考察

本法の優れた点として1) 大量の置換液を用いることで肝性脳症の原因とされる中分子量物質の除去効率が極めて高いこと, 2) 透析液から置換液を作成することでコストが抑えられること, 3) 前希釈法を用いることで、ダイアライザー劣化や血液凝固による治療中の回路交換の頻度が低く、施行手技が簡便となったこと, が挙げられ、本法は急性肝不全症例に安全に施行可能で、肝再生あるいは移植治療までのブリッジユーズとして有用であった。

E. 結論

On-line HDF を用いた人工肝補助療法は急性肝不全時の脳症改善の第一選択肢に成り得ると考えられた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

荒田慎寿, 森脇義弘, 高山和久, 森本 学, 沼田和司, 田栗正隆, 森田智視, 今成秀則, 田中克明.

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三内科 教授

研究要旨：急性肝不全における ADAMTS13の動態をガラクトサミン + LPS 投与ラット肝不全モデルで検討し、肝不全の進行と共に血漿 ADAMTS13活性、VWF 抗原は減少するが、VWF 抗原 /ADAMTS13活性比は増加し、肝内 ADAMTS13-mRNA は増加傾向、VWF 抗原は減少傾向を示すこと、障害肝では中心静脈周囲、類洞内、肝壊死部に VWF の沈着を認めることを明らかにした。血漿 ADAMTS13著減の機序についてはなお検討を要するが、VWF 抗原 /ADAMTS13活性比の低下は血小板血栓と微小循環障害を惹起し、肝障害の進展を助長している可能性がある。

共同研究者

植村 正人 奈良県立医科大学第3内科准教授
高谷 広章 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

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 (UL-VWFM) 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、重症急性膵炎症例に続き、劇症肝炎症例においても、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肝障害の進展や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における ADAMTS13の動態を詳しく解析するために実験的急性肝不全モデルにおいて血漿 ADAMTS13活性、VWF 抗原、UL-VWFM、全肝 ADAMTS13、VWF 抗原発現量を測定する。

B. 研究方法

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) を腹腔内に同時投与して致死的な急性肝不全モデルを作成した。GalN + LPS 投与前、12時間、20時間、24時間後にラットを犠死させ、血漿 ADAMTS13活性、VWF 抗原を ELISA で測定した。また、VWFM パターンは SDS-0.9% アガロースゲル電気泳動で解析した。全肝 ADAMTS13 mRNA、VWF mRNA 発現量は real-time PCR で測定した。さらに、24時間の時点で肝内の VWF 染色を加えた。

C. 研究結果

急性肝不全ラットでは血清 AST、ALT、総ビリルビン、LDH、BUN、クレアチニンは肝障害が進展す

るにつれて上昇し、血小板数は減少した血漿 ADAMTS13活性は12時間後で GalN + LPS 投与前値の39%、20時間後、24時間後で前値の0.5%未満と検出感度以下にまで著減した。VWF 抗原は12時間後前値の55%、20時間後55%、24時間後32%と12時間後以後減少した。20時間、24時間の血漿 ADAMTS13活性を0.5%として計算すると VWF 抗原 /ADAMTS13活性比は12時間後には前値の133%、20時間後には800%、24時間後には400%と著増を示した。UL-VWFM は12時間に出現し、その後マルチマーパターンは degraded pattern を示した。血漿 ADAMTS13活性は血清総ビリルビン、BUN と負の相関関係、VWF とは正の相関関係にあり、血小板数とは正の相関傾向を示した。24時間後の肝組織 HE 染色像では肝細胞に広範な出血凝固壊死を認め、VWF 染色では中心静脈周囲、類洞内、肝壊死部に VWF の沈着を認めた。全肝で real-time PCR を行ったところ、ADAMTS13-mRNA は肝障害が進展するにつれて増加傾向を示し、VWF-mRNA は低下した。なお肝組織内 ADAMTS13-mRNA と血清総ビリルビン、クレアチニンの間には正の相関関係が認められた。

D. 考察

障害をうけた血管内皮細胞では UL-VWFM 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、伸展構造をとるようになるが、ADAMTS13はこの進展した UL-VWFM を切断する酵素である。ADAMTS13が十分量存在すると、UL-VWFM 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これが切断されず、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、UL-VWFM の出現をみることを報告¹⁻³してきた。さらにこれまでの本研究班の個別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、全身臓器の虚血性障害に陥る可能性を指摘してきた。

今回は急性肝不全における ADAMTS13 活性の動態を詳細に解析する目的で GalN + LPS 投与急性肝不全ラットにおいて血漿 ADAMTS13 活性, VWF 抗原, UL-VWFM, 全肝 ADAMTS13 活性, VWF 抗原発現量を経時的に測定し, 肝障害の進展との関連性を検討した。その結果, 血漿 ADAMTS13 活性および VWF 抗原は肝不全の進行と共に低下し, VWF 抗原 / ADAMTS13 活性比は増加すること, 肝内 ADAMTS13-mRNA は肝不全の進行に伴い増加傾向, VWF 抗原は減少傾向を示すこと, 肝内 ADAMTS13-mRNA は黄疸, 腎機能障害が高度になるに従い増加することなどを明らかにした。

血漿 ADAMTS13 活性と肝内 ADAMTS13-mRNA の動態が解離した原因は明らかではないが, 過剰に産生された VWF を切断するための本酵素の消費亢進, あるいは肝星細胞における本酵素の産生・分泌不全などがかかわっているのではないかと考える。今後さらに肝内の ADAMTS13 蛋白量の測定に加えてより早期 (GAL+LPS 投与 3 ~ 9 時間) の肝内 ADAMTS13 蛋白, m-RNA の分布・発現動態を VWF 抗原との関連のもとに検討していく必要がある。

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.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Determination of ADAMTS13 and its clinical significance for ADAMTS13 supplementation therapy to improve the survival of patients with decompensated liver cirrhosis. *Int J Hepatol* 2011; 11-12: 759047(電子出版).
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.
4. 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.
5. Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Matsuyama T, Isonishi A, Ishikawa M, Yagita M, Morioka C, Yoshiji H, Tsujimoto T, Kurumatani N, Fukui H. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 1019-29.

2. 学会発表

1. 高谷広章, 植村正人, 森岡千恵, 松本雅則, 松山友美, 石川昌利, 藤本正男, 辻本達寛, 瓦谷英人, 石指宏通, 早川正樹, 藤村吉博, 福井博. 門脈血栓合併肝硬変における ADAMTS13 関連マーカーの動態. 第47回日本肝臓学会総会 2011. 6. 2
2. 森岡千恵, 植村正人, 福本江梨, 高谷広章, 沢井正佳, 吉田太之, 美登路昭, 山尾純一, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 重症肝・脾疾患における微小循環障害に伴う多臓器不全の病態解析 ADAMTS13 を中心に 第97回消化器病学会総会 2011. 5. 15
3. 高谷広章, 植村正人, 松本雅則, 森岡千恵, 藤本正男, 豊原真久, 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 ADAMTS13 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
4. 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
5. 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

Ⅲ-4. 肝内結石症分科会

【ワーキンググループ研究報告】

1. 疫学・予後調査ワーキング グループ 肝内結石症全国調査－新規横断調査－
杏林大学医学部 消化器・一般外科学 森 俊幸
2. 診断治療ワーキング
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
3. 発癌ワーキング
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. 発癌予知ワーキング 肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断
自治医科大学 消化器一般外科 佐田 尚宏

【分担研究報告】

1. 肝内結石に対する腹腔鏡下肝切除術
大阪医科大学 一般・消化器外科 内山 和久
2. 胆石症の手術既往を有する肝内結石症の検討
名古屋大学大学院医学研究科 腫瘍外科学 柳野 正人
3. 肝内胆管癌を併発した肝内結石症例の検討
長崎上五島病院 外科 八坂 貴宏
4. 肝内胆管癌偽陽性症例の調査研究
杏林大学医学部 消化器・一般外科学 森 俊幸
5. 無症状肝内結石症
千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 露口 利夫
6. 胆管周囲付属腺の上皮層内増殖性病変に関する病理学的研討
金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 中沼 安二
7. 胆汁中 lysophosphatidylcholine の胆管上皮細胞に与える細胞障害とそのメカニズムの解明
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
8. 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医療科学 正田 純一
9. 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
金沢大学大学院病態検査学講座 本多 政夫

10. 胆汁酸投与マウス肝における細胞膜トランスポーターおよび代謝酵素の蛋白発現解析

東北大学大学院医学系研究科 消化器外科学 海野 倫明

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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
疫学・予後調査ワーキング

肝内結石症全国調査－新規横断調査－

研究協力者 森 俊幸 杏林大学消化器・一般外科学 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）を行った。肝内結石症の患者背景は過去の調査と同様で、大きな変化は見られなかった。さらに高齢化がすすみ、ビリルビン結石は減少した。主な居住地は九州が最多であり、都市部・農村・漁村・山村に差は認めなかった。多くは日常生活の支障なく、社会復帰を果たしていた。本研究で、過去との大きな差を認めたのは治療法である。手術的治療が減少し、非手術的治療が増加しているが、とくに非手術的治療において、経乳頭的な内視鏡治療の増加が著明であった。しかし、ERCPは他の治療に比べ、結石遺残や再発が多く、胆道狭窄や胆道拡張に対する治療効果も高くない。さらに、乳頭切開などの乳頭機能と成績の相関も今後検討を要する重要な課題である。

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おらず、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6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、本研究班班員所属施設、日本胆道学会評議員所属施設：2639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、対象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

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

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（図1）。

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と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、本研究専用の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、などの厳重な配慮を行う。

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

①1次調査

2639施設に調査票を送付し、587施設（22%）に回答を得た。結果、231施設（8.7%）に参加の回答をいただき、603例の肝内結石症の登録が得られた。

②2次調査

78施設（51%）／245例（41%）の回答をいただき、データ入力し解析可能であった63施設（41%）／165例（27%）について解析した。

診療科別にみると、内科33施設（52%）に対し、外科30施設（48%）とほぼ同等であった。

性別では男性84例（51%）、女性79例（48%）、不明2例（1%）と男女差はなく、平均年齢は66歳であった。結石遺残例は38例で、遺残を除く再発例は8例であった。肝内胆管癌合併は3例に認めた。

結石の占拠部位別にみると、IE分類では、肝内型がと肝内外型よりも多い結果であった（52.1% vs 29.7%）（図3）。また、LR分類では左葉が33.3%と右葉の28.5%、両葉の15.8%に比べ多い結果であった（図4）。



図3 IE分類の変遷



図4 LR分類の変遷

結石成分別にみると、ビリルビン結石が33.9%と最多であったが、前回に比べ減少傾向であった（図5）。

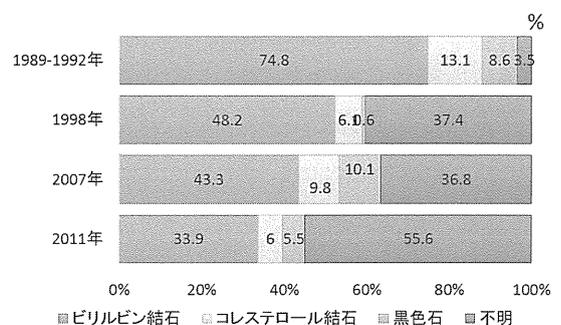


図5 結石成分の変遷

出生地・居住地ではいずれも都市部が多く、これも前回と同様の結果であった。さらに居住地を地方別にみると、九州地方が42例（28.6%）と最多であった。

遺残・再発率は18.8%と、前回と同様であり、胆道癌の合併は1.8%と前回より減少していた（表1）。

表1 結石遺残・再発と胆道癌合併

調査回数	遺残・再発率	胆道癌合併
第3期	23.5%	-
第4期	21.9%	4.8%
第5期	18.4%	2.5%
第6期	18.6%	5.9%
第7期	18.8%	1.8%

治療内容別にみると、手術的治療のみが30%、非手術的治療のみが64%、両方が6%と、非手術的治療が最多であった。手術的治療では肝切除術が最多であったが、前回から比べると約半数に減少していた。また、非手術的治療では、ERCPが26%と最多であった。

しかし、ERCPは退院時の結石遺残・胆道狭窄・胆道拡張、経過中の胆道狭窄・胆道拡張、結石再発が多い傾向であった。

また、ERCPの成績を乳頭処置の内容別に見ると、乳頭処置なし、EPBDよりもESTの方に胆道癌合併

が多い傾向であった。

D. 考 察

肝内結石症の全国調査は1970年より継続して行われている。最終の調査（2006年）から6年が経過し、本研究は新たに第7期として行われた横断調査である。

肝内結石症の患者背景は過去の調査と同様で、大きな変化は見られなかった。さらに高齢化がすすみ、ビリルビン結石は減少した。主な居住地は依然九州が最多であり、都市部・農村・漁村・山村に差は認めなかった。多くは日常生活の支障なく、社会復帰を果たしている。

本研究で、過去との大きな差を認めたのは治療法である。手術的治療が減少し、非手術的治療が増加しているのは変わらないが、その内容、とくに非手術的治療において、経乳頭的な内視鏡治療の増加が著しい。しかし、ERCPは他の治療に比べ、結石遺残や再発が多く、胆道狭窄や胆道拡張に対する治療効果も高くない。さらに、乳頭切開などの乳頭機能と成績の相関も今後検討を要する重要な課題である。

E. 結 論

肝内結石症の患者背景は過去の調査と同様な結果であった。非手術的治療が増加しており、なかでも経乳頭的な内視鏡治療が多くを占めた。しかし、ERCPは決して良好な成績とはいえず、今後の詳細な検討が必要である。

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

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
 対象期間：2011年1月1日～2011年12月31日

施設番号 - 患者番号

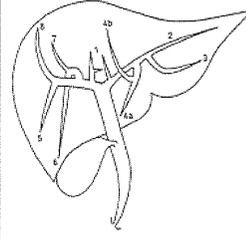
施設名： _____ 診療科： _____

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.膽管管合流異常 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()			

※結石の存在部位、胆管径、胆管狭窄、肝内胆管の部位を下記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(2011/1/1~12/31)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.術後胆道鏡 5.ERCP 6.UDCA内服
	7.UDCA以外の薬物療法(薬物名) 8.その他()
ERCPの場合	乳頭処置の有無：1.なし 2.あり(a.EST b.EPBD)
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)	
胆道癌の合併：1.なし 2.あり(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 難治性疾患等克服研究事業 (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

診断治療ワーキング

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: 肝内結石症に対する診療指針を策定するとともに、本疾患のデータベース化を目指して、学会主導の診療ガイドラインと本学会議から提唱している診断手順をもとに診療実態を調査してその整合性を評価した。現状では肝内結石症に関する modality は多様化しており、特に胆道再建術後の二次性発症の増加に伴い、バルーン内視鏡を用いた新規 modality による治療例が増加していた。2009年に日本消化器病学会から発表された胆石症診療ガイドラインも改訂作業に入っており、内視鏡治療を含む診療アルゴリズムの刷新が必要と考えられた。

担当: 田妻 進 (広島大学), 露口利夫 (千葉大学), 佐田尚宏 (自治医科大学), 森 俊幸 (杏林大学), 内山和久 (大阪医科大学), 八坂貴宏 (長崎県上五島病院), 正田純一 (筑波大学), 中沼安二 (金沢大学), 坪内博仁 (鹿児島大学)

共同研究者

真口 宏介 手稲溪仁会病院消化器病センター
木村 理 山形大学消化器外科
佐田 尚宏 自治医科大学消化器一般外科
宮崎 勝 千葉大学消化器外科
露口 利夫 千葉大学消化器内科
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
糸井 隆夫 東京医科大学消化器内科
森 俊幸 杏林大学外科
神澤 輝美 東京都立駒込病院消化器内科
良沢 昭銘 昭和大学横浜消化器センター
乾 和郎 藤田保健衛生大学消化器内科
棚野 正人 名古屋大学腫瘍外科
田端 正巳 三重大学肝胆膵移植外科
内山 和久 大阪医科大学消化器外科
島谷 昌明 関西医科大学消化器肝臓内科
菅野 啓司 広島大学病院総合内科・総合診療科
岸川 暢介 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
徳毛 宏則 JA 広島総合病院消化器科
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
皆川 紀剛 産業医科大学第一外科
山口 幸二 産業医科大学第一外科
田中 雅夫 九州大学第一外科
山下 裕一 福岡大学消化器外科
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

A. 研究目的

肝内結石症に対する診療指針を策定するとともに、本疾患のデータベースを構築するために、現行の肝内

結石診療ガイドラインの実地診療現場における実態との整合性を検証して、実状に則った新たな診療指針の提唱することを目的とした。

すなわち、先行するガイドラインの肝内結石に関連するクリニカルクエスチョンを踏まえて (表1), 1) 肝内結石症に対する診療指針策定, 2) 胆石症診療ガイドラインの診療実態における問題点とそれに基づく改訂, 3) 肝内結石診療のデータベース作成を目指すこととした。

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実態について、日本消化器病学会胆石症診療ガイドラインの診断・治療アルゴリズムと本学会議 (跡見班, 坪内班) が提唱した画像診断フローをもとに調査票 (図1) への回答を依頼した。その回答集計から診療指針の整合性を検証し、今後の改訂に向けて過去2回の調査を含めた診療実態の変遷を評価した。

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

から診療ガイドラインの課題と問題点を検証し、アルゴリズムの改訂を検討した。

3. 肝内結石診療のデータベース

実態調査を踏まえて診療現場実状の変遷に伴う診療指針の即応的改訂に向けたデータベース作成システムを考案することを検討した。

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) 胆道感染症多施設共同研究グループ (BTI施設) における2010-2011年の受療者を対象とした。手稲溪仁会病院消化器病センター, 山形大学消化器外

科, 自治医科大学消化器外科, 千葉大学消化器外科, 千葉大学消化器内科, 化学療法研究所附属病院, 東邦大学医療センター大森病院, 東京医科大学消化器内科, 杏林大学外科, 都立駒込病院消化器内科, 昭和大学横浜消化器センター, 藤田保健衛生大学消化器内科, 名古屋大学腫瘍外科, 三重大学肝胆膵移植外科, 大阪医科大学消化器外科, 関西医科大学消化器肝臓内科, 広島大学病院消化器代謝内科, 県立広島病院内科, 中国労災病院消化器内科, 尾道総合病院内視鏡センター, 広島赤十字・原爆病院消化器科, 産業医科大学第1外科, 九州大学第1外科, 福岡大学消化器外科, 宮崎大学第1外科, 長崎県上五島病院, 広島大学病院総合内科・総合診療科の27施設から回答を得て, 210例が集計された。

有症状は128例(61.0%), 胆管手術の既往は128例(61.0%)であった(図2-1)。診断方法については, 一次検査(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2-2)。治療は外科治療28例, 内科治療138例, 経過観察64例であった(図2-3)。内科的治療のうちERCPによる採石24例にはバルーン内視鏡による8例が含まれていた。外科的治療28例中, 肝切除27例であった。治療後の再発22例を含む合併症50例(23.8%)の中で肝内胆管癌5例, 肝膿瘍8例, 胆管炎15例など発癌と感染症が主体であった(図2-4)。

今回の調査結果は2006年前々回調査(跡見班), 2009年前回調査(坪内班)と比較して有症条例の増加, 胆管手術既往例の増加, 内視鏡を中心とした内科治療例の増加, 特にバルーン内視鏡による採石など新規のmodalityが増加する傾向を示すものであった(図3-1~3)。

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) 内視鏡治療の増加が主体であり, バルーン内視鏡による新規modalityが増加した。
- (3) 外科的治療は肝切除が主体であった。

以上より, 先行するガイドラインについて診療現場の実状に合った改訂を検討する必要がある。また, データベースの作成を構築して診療実態をリアルタイムに把握して迅速な診療指針の修正・改訂を行うことが必要と考えられた。例えば, 既存のガイドラインにおけるアルゴリズムの中で, PTCSは実績も減少しており, その一方でERCPによる排石, 特に胆管手術後の症例に対するバルーン内視鏡治療件数は増加傾向にあり, 新規modalityとして組み入れることが必要と考えられた(図4)。

E. 結 論

肝内結石症の診療実態調査から本症の診療フロー, 特に治療指針改訂の必要性が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

田妻進ほか: 2次性硬化性胆管炎. 胆と膵33; 475-478. 2012

田妻進ほか: 検診における胆道疾患の取り扱い〜胆石症診療ガイドラインに基づく胆道がんへの取り組み〜.

日本消化器がん検診学会雑誌50: 415-420. 2012

大屋敏秀, 田妻進: 胆石症.

消化器疾患診療のすべて. Vol. 141. 特別号2. 284-287. 2012

菅野啓司, 田妻進: 胆嚢・胆管結石 a 非観血的治療. 消化器疾患最新の治療2013-2014, 385-388, 2012

Ikegami T, Hyogo, Honda A, Miyazaki T, Y. Matsuzaki, Tazuma S: Increased serum liver X receptor ligand oxysterols in patients with non-alcoholic fatty liver disease.

J Gastroenterology, 47: 11. 1257-1266. 2012

Yokobayashi K, Matsushima M, Fujimura Y, Tazuma S: Retrospective cohort study of the incidence and risk of fever in elderly people living at home: A pragmatic aspect of home medical management in Japan.

Geriatr Gerontol Int. in press 2012

Ohara H, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Kawa S, Kamisawa T, Tazuma S, Uchida K, Hirano K, Yoshida H, Nishino T, Ko SB, Mizuno N, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Nakazawa T, Nakamura Y, Takikawa H: Clinical diagnostic criteria of IgG4-related sclerosing cholangitis 2012.

J Hepatobiliary Pancreat Sci 19, 536-542. 2012

2. 学会発表

田妻進: 胆管細胞癌の現状と展開

第48回日本肝臓学会総会, 2012/6/7, ワークショップ6, 金沢市

田妻進: 肝内結石症診療の現状と問題点〜胆石症診療ガイドラインの検証〜

第48回日本胆道学会学術集会, 2012/9/21 東京都

Tazuma S: Nutritional Factors(Nutritional Aspects) in Biliary disorders: Bile Acid and Lipid Metabolism in Gallstone diseases and Pancreaticobiliary Maljunction,

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. 胆石症診療ガイドライン・肝内結石関連
クリニカルクエスチョン(日本消化器病学会2009年版)

- 疫学・病態
 1. わが国の胆石保有率は増加しているか？
 2. 肝内結石症の成因は？
 3. 肝内結石症は肝内胆管癌の危険因子か？
- 診断
 1. 病歴聴取、身体所見は胆石症の診断に有用か？
 2. 腹痛は胆石症に必発か？
 3. 胆石症の診断に肝機能検査は有用か？
 4. 胆石症の診断に有用な画像診断は何か(US、DIC、CT、MRI・MRCP、ERCP、EUS・IDUS、胆道シンチ)？
- 治療と予後・合併症
 1. 胆汁酸製剤は有効か？
 2. 経皮内視鏡治療の適応と限界は？
 3. 肝切除術の適応とは？
 4. 経乳頭的内視鏡治療の適応と限界は？
 5. 胆道再建術後の肝内結石症に対する治療法は？
 6. 肝内結石治療後の長期合併症は？

図1. 日本消化器病学会ガイドラインに基づく
肝内結石診療実態調査票

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

図2-1. 肝内結石治療に関する実態調査(2010-2011)

- Q1. 2010-2011年の肝内結石の診療件数()例
- Q2. 症状あり()例、症状なし()例
- Q3. 胆管手術の既往なし()例、既往なし()例

1) 診療件数 n=210症例 / 27施設

2) 症状の有無 3) 胆管手術既往の有無

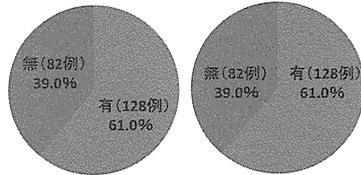


図2-2. 肝内結石治療に関する実態調査(2010-2011)

- Q4. 診断方法
 - (1) US and/or 腹部X線単純写真()例
 - (2) CT and/or MRCP()例
 - (3) DIC-CT and/or ERCP and/or EUS()例

