

Fig. 1 Cellular characterization of uncultured bone marrow cells (BMCs) by flow cytometric analysis (FITC fluorescein isothiocyanate, PE phycocerythrin, iso isotype). Representative flow cytometric

analyses for CD11b, CD45 and CD90 antigens in BMCs. **a** Control. **b** Expression of CD45. **c** Expression of CD11b. **d** Expression of CD45 and CD90

assay (Agata et al. 2009). At 24 h after seeding, floating cells were removed and the medium was replaced with a fresh medium. Thereafter, the medium was replaced every other day. After incubation for 14 days, cultured bone-marrow-derived cells that had attached to the dish were removed by using trypsin-EDTA (Life Technologies).

Detached cells were collected in 15-ml centrifuge tubes and were then washed with cold 3% FBS (Life Technologies) in PBS. After centrifugation at 300g for 3 min, the cell pellet was recovered. Following further centrifugation, the supernatant was removed and the cells were resuspended to give a suspension of 1.0×10^5 GFP-

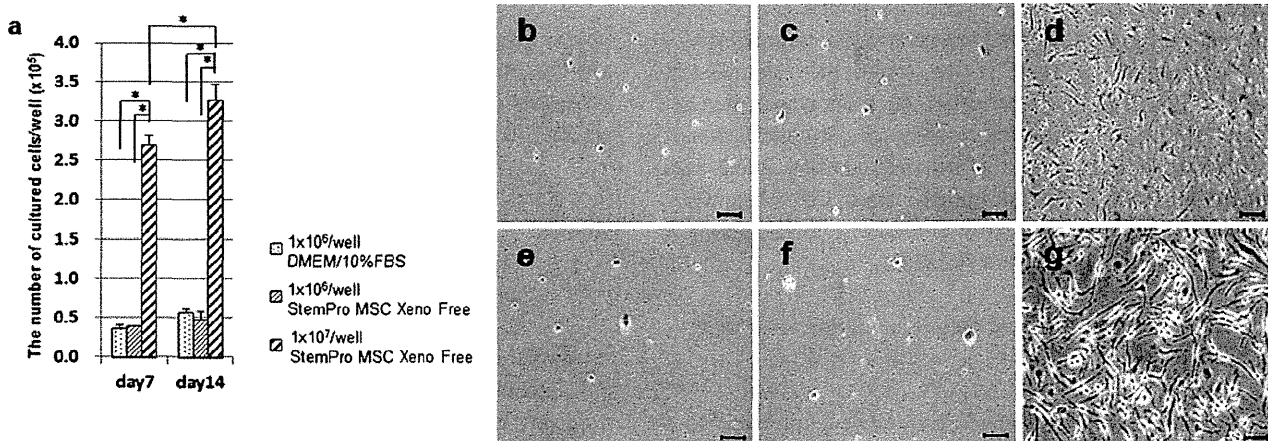


Fig. 2 Proliferation of green fluorescent protein (GFP)-transgenic murine bone-marrow-derived cells. **a** Number of cultured bone-marrow-derived cells (error bars SD). $*P < 0.001$, $n = 6$ each. **b–g** Morphology of cultured cells. Magnification $\times 100$. **b–d** Cells at day 7. **e–g** Cells at day 14. **b, e** Cells seeded at 1.0×10^6 /well (9.6 cm^2) on a non-coated dish with Dulbecco’s modified Eagle’s

medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS). **c, f** Cells seeded at 1.0×10^6 /well on a CELL-start-coated dish with StemPro MSC Xeno Free medium with 2 mL-glutamine and StemPro LipoMax supplement. **d, g** Cells seeded at 1.0×10^7 /well on a CELL-start-coated dish in StemPro MSC Xeno Free medium with 2 mL-glutamine and StemPro LipoMax supplement. Bars 100 μm (**b–g**)

positive cultured BMC per milliliter. Cellular characterization was performed by flow cytometric analysis.

Cellular characterization by flow cytometric analysis

For flow cytometric analysis, we isolated BMCs from male C57 BL/6 mice without expressing GFP (aged 6 weeks). We analyzed both uncultured and cultured BMCs. After incubation for 14 days, cultured bone-marrow-derived cells attached to the dish were trypsinized by using trypsin-EDTA (Life Technologies) and washed with cold PBS. After centrifugation at 300g for 3 min, the cell pellet was resuspended in cold PBS. Cells were incubated with mouse FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec., Tokyo, Japan) for 20 min on ice to reduce nonspecific binding. Then, cells were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat anti-mouse CD45, phycoerythrin (PE)-rat anti-mouse CD11b, or allophycocyanin (APC)-rat anti-mouse CD90 (Beckman Coulter). For the isotype control, cells were labeled with FITC-rat IgG isotype control, PE-rat IgG isotype control, or APC-rat IgG isotype control (Beckman Coulter). Dead cells were stained with propidium iodide (PI). After 20 min of incubation, cells were washed with cold PBS and measured by a Gallios flowcytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed with Flowjo software (Tree Star, Ashland, Ore., USA).

Experimental protocol

In 6-week-old female C57 BL/6 mice, CCl₄ at a concentration 1.0 ml/kg was repeatedly administered into the peritoneal cavity, twice weekly, for 4 weeks, in order to induce chronic liver injury. At 4 weeks after starting CCl₄ treatment, cultured cells (1×10^4 cells/animal) were administered, via the caudal vein, into the treated animals (cultured BMCs + CCl₄: group C; $n=7$). CCl₄ was continuously administrated for 4 more weeks, after which the mice were killed and blood and tissue samples were collected. As control groups, CCl₄-treated mice were administered, via the caudal vein, uncultured BMCs (1×10^5 /animal) from C57 BL/6 GFP-transgenic mice (bone marrow infusion + CCl₄: group B; $n=12$) or PBS (CCl₄: group A; $n=11$).

Immunohistochemistry and double-immunofluorescence examination

In all experiments, 5- μ m-thick sections were prepared from the right lobe of mouse livers, fixed in 10% formalin for 24 h, embedded in paraffin, stained with Azan and Sirius red and processed for immunohistochemical analysis. For immunohistochemical analysis, the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA) with anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) antibody (an indicator of stellate cell

activation; Dako, Glostrup, Denmark), anti-matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) antibody (a collagenase to improve liver fibrosis; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA), anti-GFP antibody (Santa Cruz Biotechnology) and anti F4/80 antibody (a marker of macrophages; Abcam, Cambridge, Mass., USA) were used according to the avidin-biotin-peroxidase complex method, as described previously (Jin et al. 2007). To estimate the Sirius-red- or MMP-9-positive areas, a computerized image analysis system utilizing MetaMorph software (Universal Imaging, Downingtown, Pa., USA) was used at $\times 40$ magnification. Seven randomly selected areas per specimen were analyzed. Positive areas were expressed as a percentage of the total area of the specimen.

For fluorescence immunohistochemistry, tissues were incubated with Alexa Fluor R 488 and 568 donkey anti-goat IgG (H+L) conjugate, Alexa Fluor R488 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate and Alexa Fluor R 568 goat anti-rat IgG (H+L) conjugate (Molecular Probes, Eugene, Ore., USA) as secondary antibodies. Positive cells in the liver were quantified by using a Provis microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a charge-coupled device camera, followed by computer-assisted image analysis with MetaMorph software (Universal Imaging).

Serum albumin level analysis

Serum samples were obtained from the abdominal aorta. Serum albumin levels after 4 weeks of cell infusion were analyzed by using the SPOTCHEM EZ SP-4430 dry chemical system (Arkay, Kyoto, Japan).

Statistical analysis

Values are shown as means \pm SD. Data were analyzed by analysis of variance with Fisher's projected least significant difference test. A P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Flow cytometric analysis of BMC and cultured BMC

As shown in Fig. 1, CD45- and CD11b-positive cells were included in the uncultured whole BMCs, showing that a macrophage fraction existed in uncultured BMCs. However, CD45-negative and CD90-positive cells indicating a mesenchymal fraction in whole BMCs were rare. The proliferation rate and character of BMCs cultured by StemPro MSC Xeno Free medium (Life Technologies) are shown in Fig. 2. Flow cytometric analysis demonstrated that the cultured BMCs from male C57 BL/6 mice were strongly

positive for CD11b and negative for CD90 (Fig. 3b, d). Only 0.047% of cultured cells were CD-90-positive and CD-45-negative, consistent with MSC characteristics (Fig. 3d). Flow cytometric analysis showed that mainly macrophage fractions were increased in the cultured system; these cells were subsequently used in our study.

Improvement in serum albumin after BMC and cultured BMC infusion

Serum albumin was lower in the CCl₄ injury group (group A) but was significantly higher in the BMC-treatment group (group B) and the cultured cell-treatment group (group C). No significant differences were apparent between groups B and C (Fig. 4). These results showed that the improvement of liver function was similar between primary BMC and 1/10 the amount of cultured BMC. Except for the serum albumin levels, no significant differences were observed in other blood data (e.g., alanine aminotransferase, total bilirubin; data not shown) between the three groups.

Improvement in liver fibrosis after BMC and cultured BMC infusion

Liver fibrosis was evaluated by Sirius-red staining. As compared with the CCl₄ injury group (group A), the fibrosis area

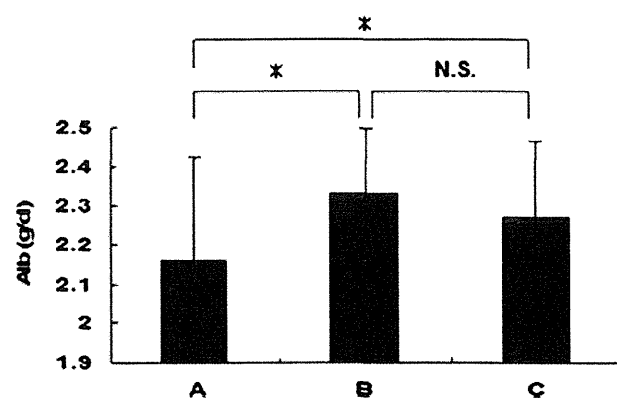


Fig. 4 Serum albumin (*Alb*). After 8 weeks of treatment with CCl₄ (4 weeks after BMC/cultured cell administration), mouse blood was collected and analyzed. CCl₄ group (A), CCl₄ + BMC group (B), and CCl₄ + cultured cell group (C). **P*<0.05 (N.S. not significant)

was smaller in the BMC-treatment group and cultured-cell-treatment group (Fig. 5a-d). In groups B and C, GFP-positive cells were mainly observed in the portal region (Fig. 5e-h). In addition, MMP-9 expression was significantly elevated in groups B and C (Fig. 5i-l). Immunohistochemical analysis showed a few F4/80-positive cells around the liver in groups A and B (Fig. 6a, b). On the other hand, in group C, many F4/80-positive cells were mainly observed in the portal region (Fig. 6c). Double-immunostaining revealed that a few F4/80/

Fig. 3 Cellular characterization of cultured BMCs by flow cytometric analysis. Representative flow cytometric analyses for CD11b, CD45 and CD90 antigens in bone-marrow-derived cultured cells. **a** Isotype (*Iso*) control for phycoerythrin (*PE*)- and fluorescein isothiocyanate (*FITC*)-conjugated antibodies. **b** Expression of CD11b (*x*-axis) and CD45 (*y*-axis). **c** Isotype control for allophycocyanin (*APC*)- and fluorescein isothiocyanate (*FITC*)-conjugated antibodies. **d** Expression of CD90 (*x*-axis) and CD45 (*y*-axis)

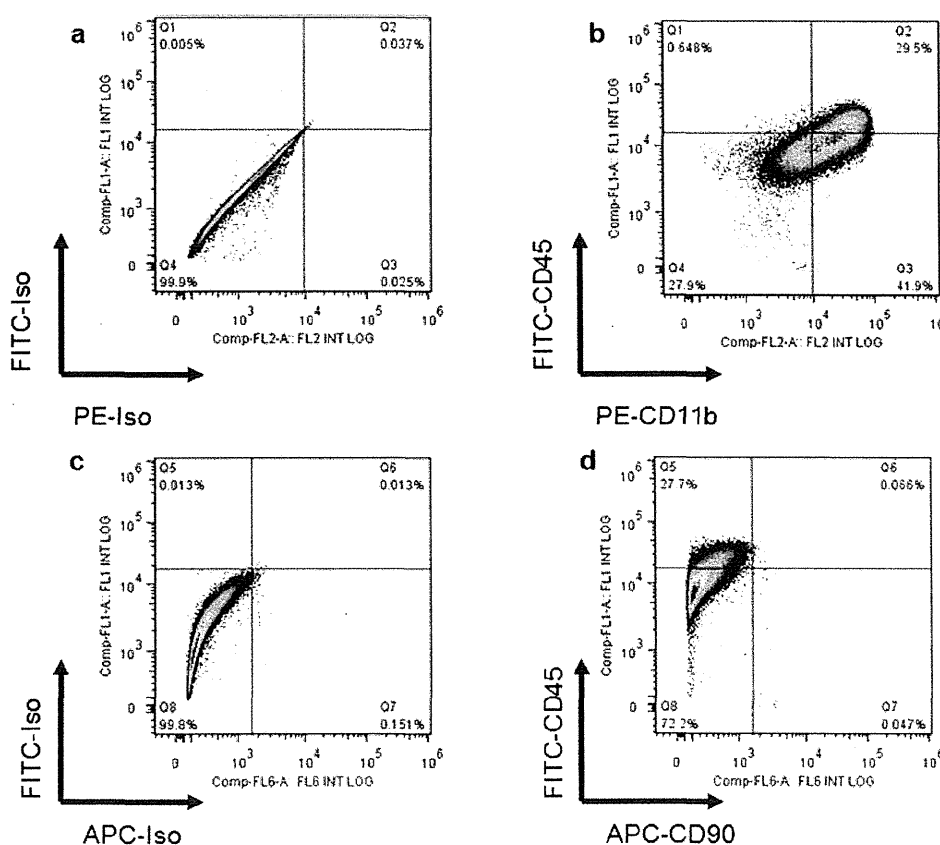


Fig. 5 Sirius-red staining; immunohistochemical analysis of GFP and metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in liver. After 8 weeks of treatment with CCl₄ (4 weeks after BMC/cultured cell administration), livers from all mice were resected. **a-d** Sirius-red staining. **a** CCl₄ group. **b** CCl₄ + BMC group. **c** CCl₄ + cultured cell group. Magnification ×40. **d** Image analysis of the Sirius red-positive area. CCl₄ group (A), CCl₄ + BMC group (B), CCl₄ + cultured cell group (C). **P*<0.05 (N.S. not significant). **e-h** Immunostaining for GFP. **e** CCl₄ + BMC group. Magnification ×100. **f** Magnified view of **e**. Magnification ×200. **g** CCl₄ + cultured cell group. Magnification ×100. **h** Magnified view of **g**. Magnification ×200. **i-l** Immunostaining for MMP-9. **i** CCl₄ group. **j** CCl₄ + BMC group. **k** CCl₄ + cultured cell group. Magnification ×200. **l** Image analysis of the MMP-9-positive area (A–C as in **d**). **P*<0.05 (N.S. not significant). Bars 100 μm (a–c, e–k)

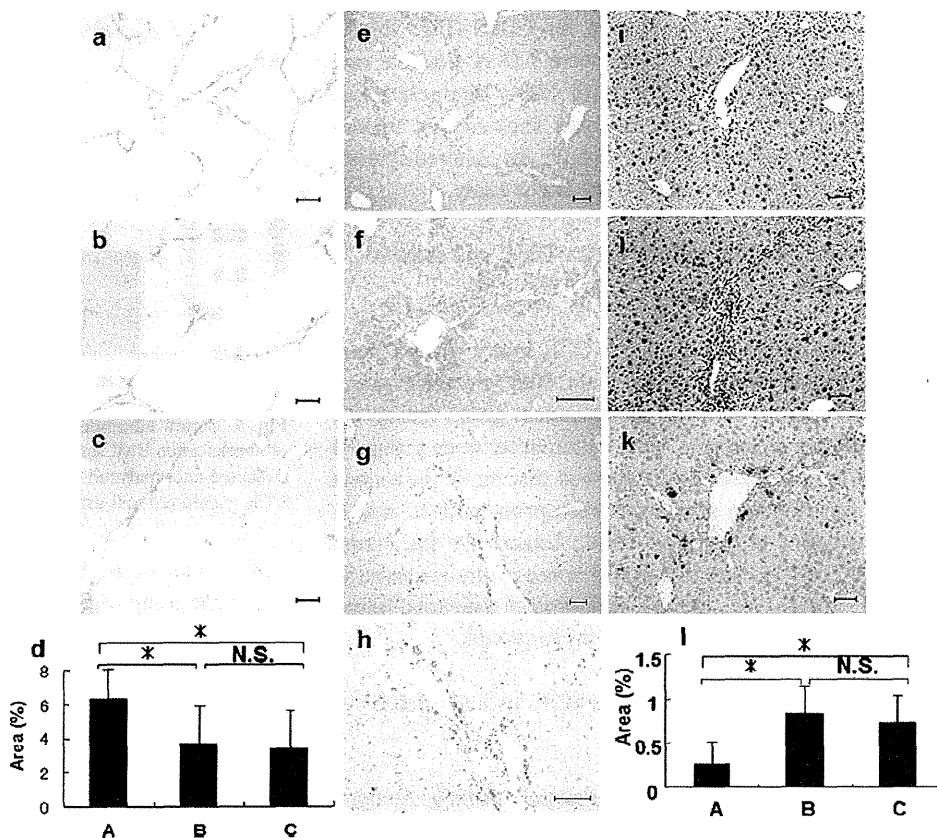
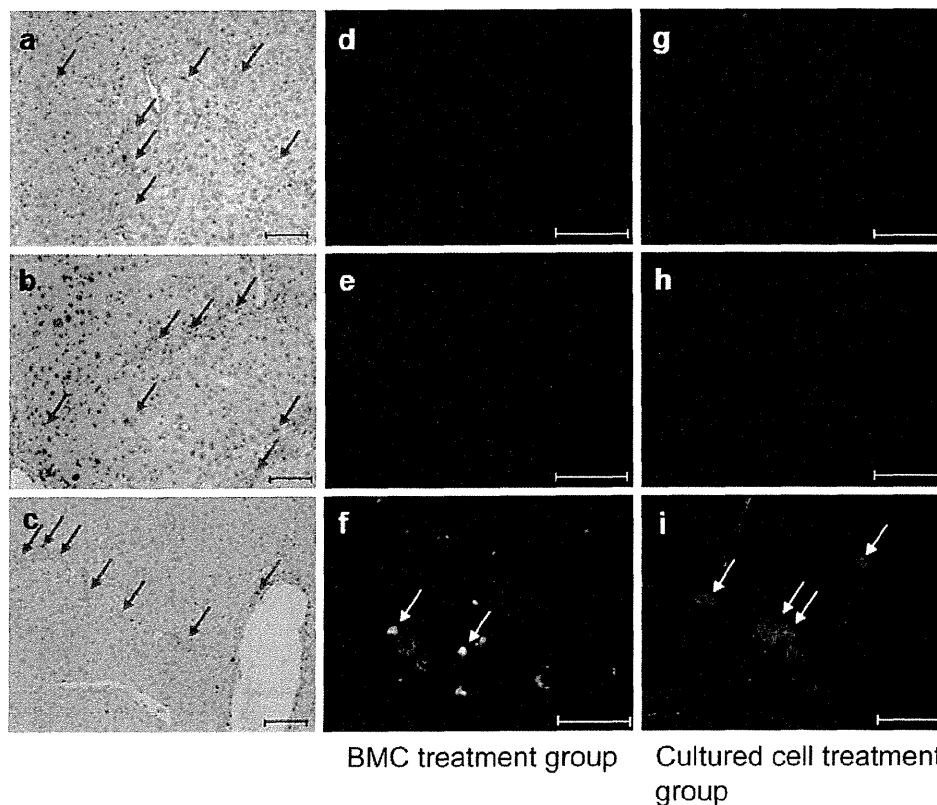


Fig. 6 Immunohistochemical analysis of F4/80 expression in liver. After 8 weeks of treatment with CCl₄ (4 weeks after BMC/cultured cell administration), the livers from all mice were resected. **a-c** Immunostaining for F4/80 (red arrows F4/80-positive cells). **a** CCl₄ group. **b** CCl₄ + BMC group. **c** CCl₄ + cultured cell group. Magnification ×100. **d-f** BMC-treatment group (BMC treatment group). **d** GFP (green). **e** F4/80 (red). **f** GFP (green), F4/80 (red), GFP and F4/80 (yellow). Note the GFP/F4/80 double-positive cells (white arrows). Magnification ×200. **g-i** Cultured-cell-treatment group (Cultured cell treatment group). **g** GFP (green). **h** F4/80 (red). **i** GFP and F4/80 (yellow). Note the GFP/F4/80 double-positive cells (white arrows). Magnification ×200. Bars 100 μm (a–c), 50 μm (d–i)



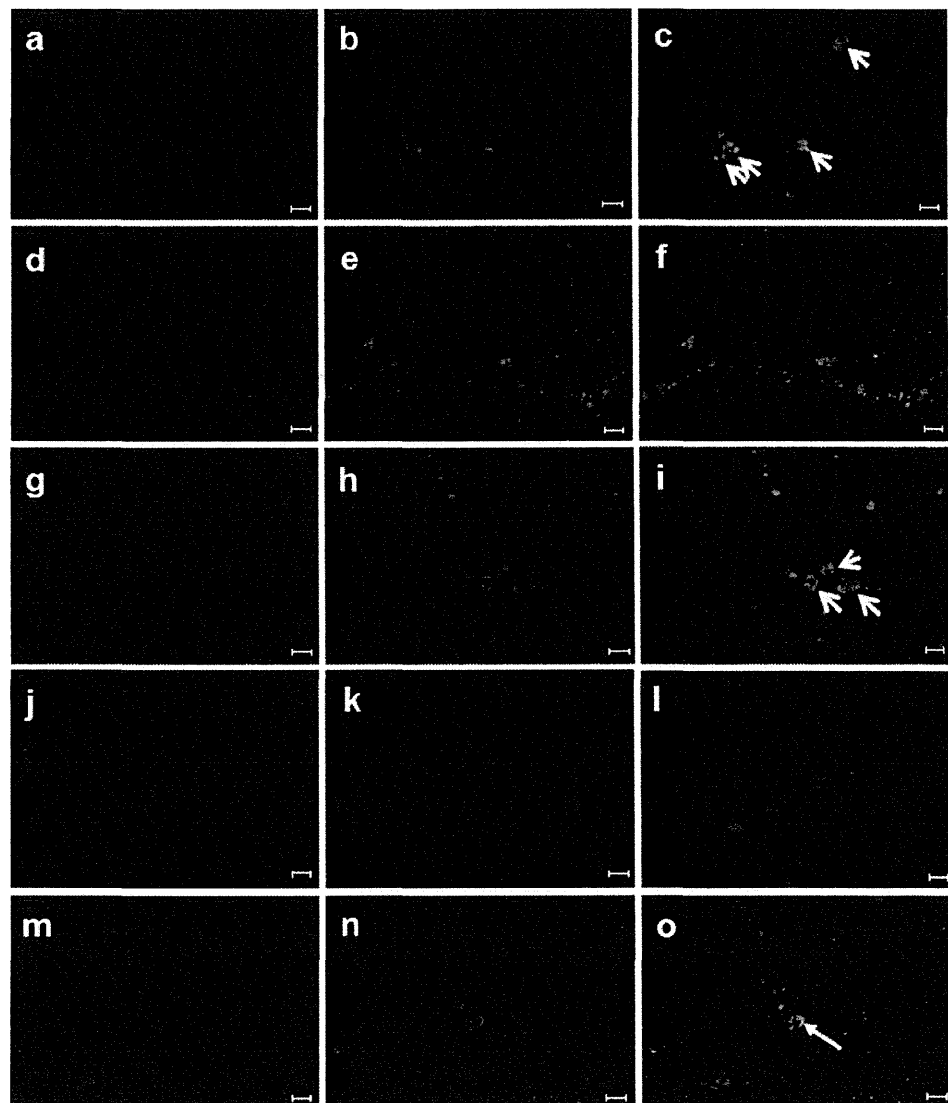
GFP double-positive cells were present in group B, whereas numerous F4/80/GFP-positive cells were observed in group C (Fig. 6d-i). These results showed that a higher number of F4/F80 cells had repopulated into the cirrhosis liver after cultured BMC infusion.

In order to characterize GFP-positive cells in the liver, we performed double-immunostaining. In the BMC-treatment group, numerous cells with co-positivity for GFP and MMP-9 were seen (Fig. 7a-c) but cells with co-positivity for GFP and α -SMA were not observed (Fig. 7d-f). In the cultured-cell-treatment group, the results were similar (Fig. 7g-l). These findings suggest that MMP-9 was mainly secreted from the migrating infused GFP-positive cultured cells. In addition, a few cells were co-positive for vimentin and GFP, thus indicating graft survival of mesenchymal cells in the liver (Fig. 7m-o).

Discussion

In this study, we cultured bone-marrow-derived cells by using serum-free medium and analyzed their ability to improve liver cirrhosis. Several studies of cultured bone-marrow-derived cells have been reported (Wu et al. 2005; Zheng et al. 2006; Fang et al. 2004; Zhao et al. 2005; Oyagi et al. 2006) but the culture of bone-marrow-derived cells from GFP-transgenic mice has been difficult, because of their decreased proliferation potential (Peister et al. 2004). In addition, in a previous study conducted with cultured murine BMCs, numerous macrophages were reported (Tropel et al. 2004). Employing a previously reported GFP/ CCl_4 model, we first improved the culture methods to obtain cultured cells efficiently. In standard culture protocols, BMCs are seeded at a density of 1×10^5 - 6 /ml but the proliferation rate is insufficient (Soleimani and Nadri 2009).

Fig. 7 Double-immunostaining (BMC group vs. cultured cell group). After 8 weeks of treatment with CCl_4 (4 weeks after BMC/cultured cell administration), the livers from all mice were resected. **a–f** BMC treatment group. **a** MMP-9 (red). **b** GFP (green). **c** MMP-9 (red)/GFP (green)/GFP and MMP-9 (yellow). Note the co-positive cells (short white arrows). **d** α -SMA (red). **e** GFP (green). **f** α -SMA (red)/GFP (green). Magnification $\times 100$. **g–o** Cultured-cell-treatment group. **g** MMP-9 (red). **h** GFP (green). **i** MMP-9 (red)/GFP (green)/GFP and MMP-9 (yellow). Note the co-positive cells (short white arrows). **j** α -SMA (red). **k** GFP (green). **l** α -SMA (red)/GFP (green)/ α -SMA and GFP (yellow). **m** Vimentin (red). **n** GFP (green). **o** Vimentin (red)/GFP (green)/vimentin and GFP (yellow). Note the co-positive cells (long white arrow). Magnification $\times 100$. Bars 50 μm (a–o)



By increasing the cell density for primary culture to 1×10^7 /ml, we found that BMCs could be grown more efficiently. Serum and fibroblast growth factor are usually added to the medium (Zheng et al. 2006) but because of the possibility of clinical application, we used serum-free medium and GMP-grade reagents (Agata et al. 2009). As shown in Fig. 2, by 2 weeks after cultivation, a sufficient number of cells was obtained. Moreover, the administered fraction had a high percentage of cells positive for CD11b and CD45 (Fig. 3).

Our macrophage fractions taken from mouse bone marrow increased by simply seeding them onto plastic in the presence of serum-free medium and GMP-grade reagents. With the administration of GFP-transgenic mice bone-marrow-derived cultured cells, we confirmed GFP-positive cells in the liver and like the GFP/ CCl_4 model that we had previously reported, serum albumin increased and fibrosis improved in the treated mice (Figs. 4, 5a-d). Moreover, for this improvement effect, the number of administered cells was 1×10^4 cells/body, i.e., only 1/10 the usual amount, whereas the effects, as compared with conventional bone marrow administration, were not inferior.

In addition, double-immunostaining was performed to characterize the GFP-positive cells in the liver. Similarly, as we have earlier reported, there was co-expression of MMP-9 but cells co-expressing α -SMA were not observed (Fig. 6a-l; Sakaida et al. 2004; Higashiyama et al. 2007). The presence of GFP-positive cells co-expressing F4/80 was confirmed (Fig. 6) and, whereas GFP-positive cells co-expressing vimentin were also found, their number was low (Fig. 7m-o; Fang et al. 2004). These findings suggest that numerous cultured macrophages and some MSCs had repopulated the liver. As shown in Fig. 3, we infused mainly a macrophage fraction from our culturing system. Hence, we consider it reasonable that more F4/80/GFP-positive cells were found in the cultured BMC group than the primary BMC culture groups. In this mice study, we believe that the macrophage fraction mainly improved liver fibrosis. However, we need to examine which of the fractions are more effective for liver regeneration therapy.

We used a StemPro MSC Xeno Free medium to expand the mouse BMCs. Under these conditions, many macrophages were obtained and these macrophages contributed to the observed liver regeneration. On the other hand, in humans, MSCs are expanded under similar conditions. The reason for this might be attributable to species differences. Further studies will be required to understand the mechanism of this difference.

In the present study, bone-marrow-derived cells cultured with a serum-free medium clearly had an effect on repairing liver fibrosis. These results are important for translational research on cultured bone-marrow-derived cell therapy for liver cirrhosis. Issues for further investigation include an examination of the most effective cell fraction for improving

liver fibrosis and whether the present system can reliably yield cultured cells from human BMCs. Studies analyzing the possibility of using human BMCs for cell therapy in liver cirrhosis are urgently needed.

Acknowledgments We are grateful to Ms. Mariko Yamada, Ms. Ihoko Fujimoto and Ms. Yoko Fukuzumi for assistance with cell culture, immunohistochemical analysis and animal care.

References

- Agata H, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H (2009) Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 382:353–358
- Fang LJ, Fu XB, Cheng B, Sun TZ, Li JF, Cao R, Wang YX (2004) Study on the potentiation of bone marrow mesenchymal stem cells involved in sebaceous duct formation. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 42:1136–1138
- Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF (1982) Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 10:217–227
- Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I (2007) Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45:213–222
- Jin H, Yamamoto N, Uchida K, Terai S, Sakaida I (2007) Telmisartan prevents hepatic fibrosis and enzyme-altered lesions in liver cirrhosis rat induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* 364:801–807
- Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY et al (2010) Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant* 19:1237–1246
- Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K (2006) Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl_4 -injured rats. *J Hepatol* 44:742–748
- Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103:1662–1668
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147
- Saito T, Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, Okada A, Ikeda M, Togashi H, Ishikawa T, Terai S, Sakaida I, Kawata S (2011) Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev* 20:1503–1510
- Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K (2004) Transplantation of bone marrow cells reduces CCl_4 -induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40:1304–1311
- Soleimani M, Nadri S (2009) A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc* 4:102–106

- Terai S, Sakaida I (2011) Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18:23–25
- Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K (2003) An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 134:551–558
- Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K (2005) Lesson from the GFP/CCl₄ model—translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12:203–207
- Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I (2006) Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 24:2292–2298
- Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, Robson AJ, Gordon-Walker TT, Hartland S, Ramachandran P, Van Deemter M, Hume DA, Iredale JP, Forbes SJ (2011) Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology* 53:2003–2015
- Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F (2004) Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 295:395–406
- Wu LM, Li LD, Liu H, Ning KY, Li YK (2005) Effects of Guiyuanfang and autologous transplantation of bone marrow stem cells on rats with liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 11:1155–1160
- Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P (2005) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 11:3431–3440
- Zheng JF, Liang LJ, Wu CX, Chen JS, Zhang ZS (2006) Transplantation of fetal liver epithelial progenitor cells ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 12:7292–7298

肝内結石症診療の現況

全国調査からみた肝内結石症の現況

鈴木 裕¹⁾・森 俊幸¹⁾・横山 政明¹⁾・中里 徹矢¹⁾
阿部 展次¹⁾・杉山 政則¹⁾

要約：肝内結石症の調査研究班の報告を中心に、国内外の報告を加え肝内結石症を取り巻く現状・診断・治療について概説した。厚生（労働）省調査研究班の調査から見た36年間の肝内結石症の病像・診療の変遷は、新規症例の減少と有病者の高齢化、肝内型の増加と肝内外型の減少があげられた。結石遺残・再発率、胆管癌合併は依然高値であり治療成績は向上していなかった。診断では1975年当初多かったpercutaneous transhepatic cholangiography (PTC) や endoscopic retrograde cholangiography (ERC), drip infusion cholangiography (DIC) は年々減少し、現在はultrasonography (US) や computed tomography (CT), magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP) が中心となっている。治療については、手術的治療の減少と、非手術的治療の増加が著明であり、低侵襲化が進んでいる。とくにERCによる切石の増加が著しく増加しているが、結石遺残や再発が多く短期成績は不良である。手術的治療においては、肝内結石根治を目的とした胆管消化管吻合術は将来的に発癌の可能性もあり、推奨はしがたいと思われる。また、胆道手術の既往がある場合、結石除去のみではなく、胆道狭窄の解除も併せて行うことが必要である。胆道手術の既往がない場合、左葉例であれば積極的に肝切除術を検討すべきである。しかし、胆管狭窄や拡張がない場合や無症状例に対して肝切除をすべきかどうかは、まだまだ検討すべき問題はある。UDCAについては補助的に内服させることにより、将来的に肝内胆管癌発生を抑える可能性があり、推奨された。

Key words：肝内結石症，調査研究班，全国多施設調査，肝内胆管癌

はじめに

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、それに続き敗血症、肝膿瘍を併発する。さらに肝内胆管癌の合併が多く、これらは臨床経過において大きな問題となり、大きな予後規定因子となる。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ている。本稿では、近年の肝内結石症の調査研究班の報告

を中心に、肝内結石症を取り巻く現状・診断・治療について概説する。

I. 全国調査から見た肝内結石症の病像の変遷

1. 肝内結石症の病像の変遷

肝内結石症の調査研究班では過去6回の大規模な全国多施設調査(表1)が行われ、肝内結石症の病像が解析された¹⁻⁷⁾。今回、過去6回の全国調査と現在行われている第7期調査の結果から、肝内結石の病像の変遷を解析する。

新規症例の減少に伴って患者の高齢化と新規症例も進み、この7回の調査で約10歳も高齢化が進んでいる。男女比や前胆石症における肝内結石の比率は過去

Current Status of Hepatolithiasis

Yutaka Suzuki et al

1) 杏林大学医学部外科 (〒181-8611 三鷹市新川6-20-2)

表 1 肝内結石症全国調査

対象期間	対象施設数	肝内結石保有施設数	症例数	平均年齢	男女比	肝内結石症比率	結石遺残・再発率	胆道癌合併
第1期	1975~84	2,201	380	4,191	55	1:1.2	3.0%	—
第2期	1985~88	870	286	1,813	58	1:1.16	2.3%	23.5%
第3期	1989~92	2,749	1,437	1,841	59	1:1.3	2.2%	21.9%
第4期	1993~95	1,437	224	467	60	1:1.2	1.7%	19.9%
第5期	1998	2,793	1,516	473	63	1:1.16	1.7%	21.0%
第6期	2006	2,592	319	336	63	1:0.95	0.6%	18.6%
第7期	2011	2,639	94	299	64	1:0.91	1.8	29.8%

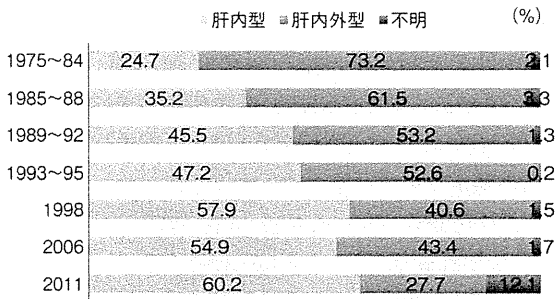


図 1 病型分類—肝内型と肝内外型
肝内外型の減少と肝内型の増加を認める。

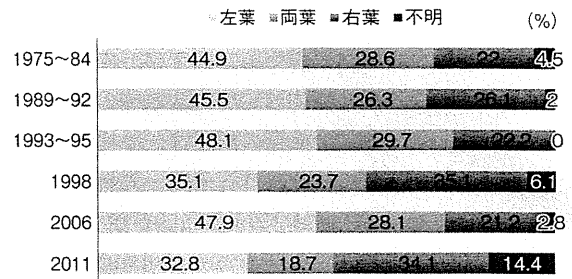


図 2 病型分類—左右別
1975年から1995年までは左葉優位であったが、近年は左右同等である。

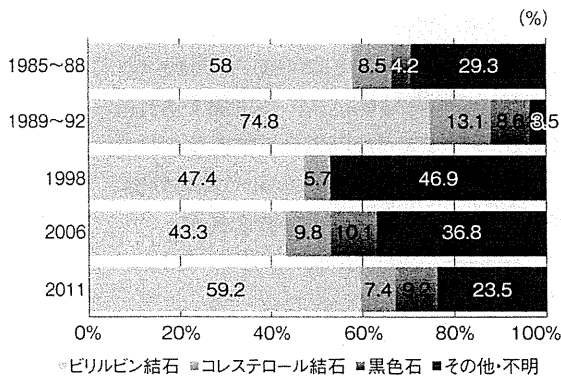


図 3 結石成分分類
ビリルビン結石が最多で4から7割である。コレステロール結石は1割前後である。

7回に変化はない。結石遺残・再発率は20%前後、胆道癌合併も2~5%といずれも変化を認めず成績不良である(表1)。

病型分類をみると、肝内型の増加と肝内外型の減少がめざましい(図1)。これは、総胆管結石に対する安全な内視鏡的治療の確立によっていわゆる積み上げ型の肝内結石の減少が影響していると思われる。左右別にみると、左葉型が多く右葉型が少ない傾向で、第6期までの調査は同様の傾向であったが、第7期調査は右葉型が増加し左葉型は減少していた(図2)。結石成分別にみると、第3期調査をピークにビリルビン結石

の減少が続いていたが、第7期調査ではビリルビン結石の再増加がみられた(図3)。

2. 診断の変遷

診断モダリティの変遷をみる(図4)。1970年代はPTC、ERC、DICなどの直接胆道造影が多く、1980年に入ると、USやCTの発達により、これらが増加していた。USやCTは侵襲も低く、その後の増加が著明であり、USは1986年には70%を越え、CTも1990年代には70%を越えた。さらにCTは2000年に入りMPR像など多彩な撮像が可能になり、第6期調査ではUSを上回っている。また、第7期調査にはMRI/MRCPが30~40%と、多くの症例に用いられるようになった。MRI/MRCPは低侵襲に胆管像を得ることができ、スクリーニング検査に有用であるが、空間解像度が低く、あくまで補助的なモダリティとしての位置づけのようであり、肝内結石の診断はCTやUSが中心であると思われる。

3. 治療の変遷

治療について1970年代は術式別にみると胆嚢摘出術+総胆管切開切石+T-tube留置を基本術式とし、基本手術に対する付加手術として肝切除術や胆管消化管吻合術が行われた。これらの術式を付加しても完全切石しえなかった症例や術後に遺残結石を発見した場合はT-tubeを利用して、生理食塩水やヘキサメチリン酸ソーダによる洗浄が最も多く行われ、ほかにも

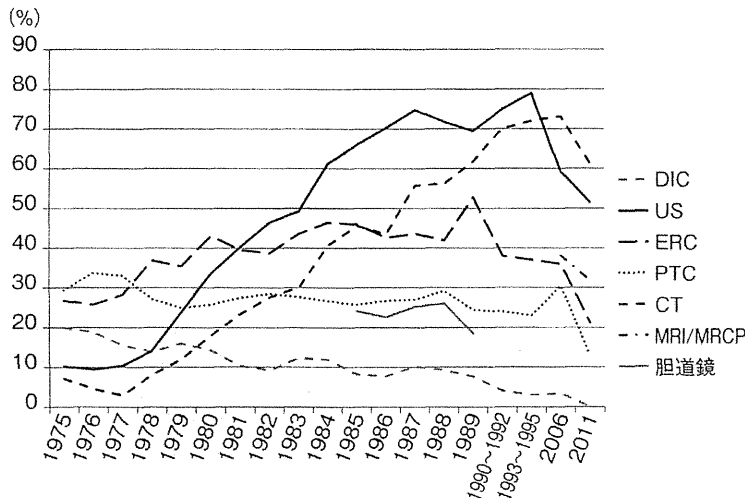


図4 診断モダリティ
1975年当時多かったPTC, ERC, DICは徐々に減少し、現在はCT, US, MRI/MRCPが診断の中心となっている。

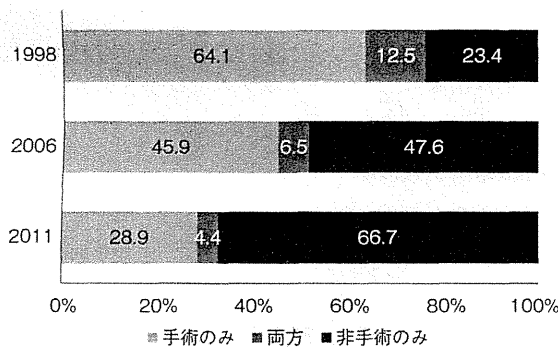


図5 治療内容の変遷
1998年は70%以上に手術が行われていたが、2011年には70%に非手術的治療が選択された。

フォガティカテーテルやバスケットカテーテル、胆道鏡による切石が試みられたが、完全切石は43%に過ぎなかった⁸⁾。肝内結石の治療は手術的治療が主流であり、平成10年の第5期では7割以上に手術が行われた。しかし、以降手術的治療は徐々に減少し、平成18年(2006年)では約50%、平成23年(2011年)には約30%と、非手術的治療が第一選択となってきた(図5)。そこには、手術的治療の中心であった総胆管切開切石+T-tube留置や胆管消化管吻合術の減少と、内視鏡技術の進歩によりERCの増加やダブルバルーン内視鏡の出現などが大きな理由であると思われる。実際、全国調査でも、肝切除術は手術的治療で最も多いが年々減少傾向にあり、ERCはここ最近2回の調査でPTCSLを追い越す勢いで増加している(表2)。

肝切除術(52例)とPTCSL(149例)を比較検討したCheungら⁹⁾の報告でも、結石完全除去率が98.0%

vs 70.5%、胆管炎発生率も13.3% vs 29.3%といずれも肝切除術の方が優れていた。PTCSLに際し、清家ら¹⁰⁾は胆管の屈曲角度と狭窄を克服することが治療成績の向上のために重要と述べている。可能な限り結石存在胆管の対側胆管からPTCDを留置し、下流の胆管枝よりアプローチすることによって胆道鏡の挿入が容易になると報告している。しかし、今後は内視鏡的治療がますます増えていくことが予想されるが、ERCやダブルバルーン内視鏡は多数例の集積調査がなされておらず、その長期成績は不明な部分が多い。また、退院時の結石遺残や再発率が他の治療より高いなどの短期成績も決して良好とはいえない(図6)。そのため、狭窄がないか軽度な症例や、結石を両葉に認める症例、末梢分枝胆管に結石のない症例、高齢者やハイリスク症例などの耐術不能例など、適応を慎重に判断し、画像による術後のフォローを厳重に行う必要があると思われる。高度な狭窄がある場合やERC不成功例はPTCSLや肝切除術など、躊躇せず他の治療を選択すべきと思われた。

しかし、退院後の経過はおおむね良好である。80%前後は日常生活に支障なく生活でき、70%前後は社会復帰を果たしている(図7)。

II. 肝内胆管癌の合併

肝内結石症の大きな予後規定因子として、肝内胆管癌の合併があげられる。これは、研究班では跡見班と坪内班で中心に解析された。まず、第6期全国調査の検討で胆道再建の既往と肝萎縮例が肝内胆管癌合併の

表 2 治療法の変遷

	第2期 (1,180例)	第3期 (1,571例)	第4期 (422例)	第5期 (473例)	第6期 (307例)	第7期 (299例)
手術的						
肝切除術	519 (44.0%)	787 (50.1%)	213 (50.5%)	141 (29.6%)	111 (36.2%)	43 (14.4%)
胆管消化管吻合術	316 (26.8%)	342 (21.8%)	110 (26.1%)	78 (9.5%)	24 (7.8%)	13 (4.3%)
総胆管切開切石術 (T-tube留置含む)	592 (50.2%)	694 (44.2%)	146 (34.6%)	90 (11.2%)	24 (7.8%)	3 (1.0%)
乳頭形成術	56 (4.7%)	39 (2.5%)		3 (0.6%)		
非手術的						
PTCSL	102 (8.6%)	232 (14.8%)	96 (22.7%)	73 (15.9%)	66 (21.4%)	35 (11.7%)
ESWL	20 (1.7%)	42 (2.7%)	16 (3.8%)	1 (0.2%)	19 (6.2%)	4 (1.3%)
経口胆道鏡	—	32 (2.0%)	7 (1.7%)	6 (2.1%)	15 (4.8%)	4 (1.3%)
ERC	—	—	—	1 (0.2%)	18 (5.8%)	68 (22.7%)
術後胆道鏡	—	—	40 (9.5%)	35 (3.6%)	6 (2.0%)	1 (0.3%)
UDCA内服	—	—	—	—	23 (7.5%)	126 (42.1%)

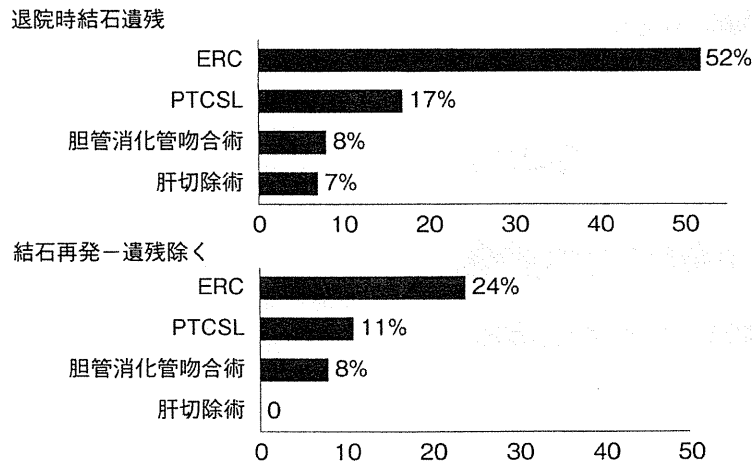


図 6 治療法別短期成績—第7期調査より
ERCは退院時結石遺残も結石再発も多く、短期成績は決して良いとは言えない。

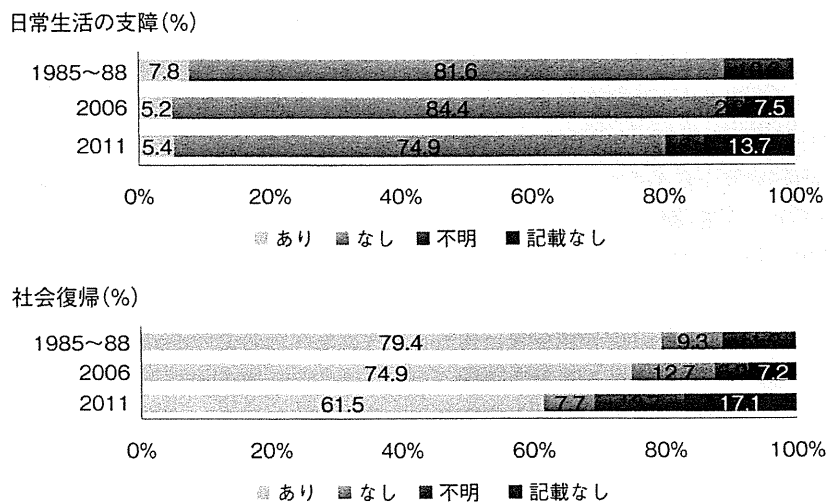


図 7 退院後経過
多くは日常生活に支障なく生活し社会復帰を果たしている。

表 3 肝内胆管癌合併の危険因子 (第 6 期全国調査より)

	有意確率	オッズ比	95%信頼区間
胆道再建の既往例	0.007	3.718	1.431~9.659
肝萎縮例	0.004	4.424	1.618~12.095

表 5 肝内胆管癌発生の危険因子—胆道手術既往例 (平成 22 年コホート調査より)

	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

有意な危険因子として抽出された (表 3)¹¹⁾。さらに、平成 22 年のコホート調査¹²⁾では 65 歳以上、治療としての切石のみが危険因子として抽出された。また、有意ではないが UDCA 内服は肝内胆管癌発生を抑制する可能性が示唆された (表 4)。肝内結石は胆道手術の既往の有無で発生機序が異なるために、胆道手術の既往の有無により分けて検討すると、胆道手術既往例では 65 歳以上、経過中に胆道狭窄を有する症例が危険因子であった (表 5)。一方、胆道手術の既往がない症例では左葉例、結石再発例が危険因子として抽出された。また、肝切除術はハザード比 0.066 と有意に発癌を抑制する因子であった (表 6)。Ohta ら¹³⁾の病理組織学的検討では結石周囲の胆管粘膜には増殖性胆管炎と粘膜過形成を認め、発癌のリスクとなると報告している。そのため、結石除去のみならず結石周囲の胆管病変の切除が重要と思われる。逆流性胆管炎や吻合部狭窄が危惧される胆管消化管吻合は結石再発や胆管炎を繰り返す、ひいては胆管癌の発生が危惧されるため肝内結石症の根治術としては推奨されず、近年減少している大きな理由であると思われる。

大規模な多施設調査ではないが、坪内班の画像診断ワーキンググループで佐田らによって行われた班員所属施設を対象にした多施設調査では 696 例の肝内結石症のうち 37 例 (5.3%) に肝内胆管癌を合併し、その 80% は術前診断可能であったが、3% は術中に診断され 17% は術後病理標本で診断された。発見動機は腫瘤指摘が 65%、生検や細胞診などによる胆管狭窄の精査が 22% と多く認めたが、発見動機別の切除率をみると、狭窄精査例が切除率 80% と良好であったのに対し、腫瘤指摘例は 31% と不良であった。さらに、診断時はその 57% が Stage IV b と高度進行例が過半数であった。これらより、従来のモダリティのみでなく、MDCT や FDG-PET などの新たなモダリティを含め

表 4 肝内胆管癌発生の危険因子 (平成 22 年コホート調査より)

	有意確率	ハザード比	95%信頼区間
65 歳以上	0.017	3.029	1.222~7.508
治療:切石のみ	0.012	2.873	1.258~6.563
UDCA 内服	0.064	0.253	0.059~1.084

表 6 肝内胆管癌発生の危険因子—胆道手術既往ない症例 (平成 22 年コホート調査より)

	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

た診断法の検討が必要としている¹⁴⁾。

III. 全国調査の結果から見た肝内結石症の取扱い

全国調査から見た肝内結石症の取扱いとして、肝内結石根治を目的とした胆管消化管吻合術は将来的に発癌の可能性もあり、推奨はしがたいと思われる。また、胆道手術の既往がある場合、結石除去のみではなく、胆道狭窄の解除も併せて行うことが必要である。胆道手術の既往がない場合、左葉例であれば積極的に肝切除術を検討するべきである。しかし、胆管狭窄や拡張がない場合や無症状例に対して肝切除をすべきかどうかは、まだまだ検討すべき問題はあろう。UDCA については発癌抑制効果の可能性が示唆された。しかし、期間や容量などさらに検討すべき点もある。ただ、いずれの治療を選択するにしても、補助的に UDCA を内服させることは、将来的に肝内胆管癌発生を抑える可能性があり、推奨される。

おわりに

調査研究班の全国調査を中心に、肝内結石症の診断と治療について概説した。肝内結石症の病態は複雑であり、おのおのの病態に見合った最適な診断・治療法の選択が重要である。診断面における胆管癌早期発見のための新規モダリティを加えた診断体系の検討、治療面においては、近年増加している ERC やダブルバルーン内視鏡などの内視鏡治療の適応など、残された課題も多く、今後の精度の高い研究報告が期待される。

参考文献

- 1) 佐藤寿雄：昭和54年度 肝内胆管障害研究班 予防分科会報告. 厚生省特定疾患対策 昭和54年度 肝内胆管障害研究班報告書(班長 草間 悟). 5, 1979.
- 2) 中山文夫：疫学分科会報告. 厚生省特定疾患対策 昭和60年度 肝内結石症調査研究班報告書(班長 中山文夫). 7-24, 1985.
- 3) 小澤和恵, 小林展章, 高林有道, ほか：肝内結石症に関する全国調査報告. 厚生省特定疾患対策 肝内結石症調査研究班 平成元年度 研究報告書(班長 小澤和恵). 11-39, 1989.
- 4) 永井正規, 内山和久, 石本喜和男, ほか：肝内結石症全国調査集計. 厚生省特定疾患 肝内結石症調査研究班 平成5年度 研究報告書(班長 谷村 弘). 13-27, 1993.
- 5) 谷村 弘, 内山和久, 石本喜和男：肝内結石症の全国疫学調査(Ⅱ)―最近の動向と10年後のQOLについて―. 厚生省特定疾患 肝内結石症調査研究班 平成7年度研究報告書(班長 谷村 弘). 11-19, 1995.
- 6) 馬場園明, 林 櫻松, 玉腰暁子, ほか：肝内結石症の全国受療患者の推計と臨床疫学的特性. 厚生省特定疾患 消化器系疾患調査研究班 肝内結石症分科会 平成11年度研究報告書(分科会長 二村雄次). 9-14, 1999.
- 7) 森 俊幸：肝内結石症全国調査. 厚生労働省科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 肝内結石症に関する調査研究 平成18年度総括・分担研究報告書(班長 跡見 裕). 2006.
- 8) 安富 徹, 田代真一, 岡本美穂二, ほか：国立病院29施設に対する肝内結石症のアンケート調査. 昭和54年度 肝内胆管障害研究班 予防分科会報告. 厚生省特定疾患対策 肝内胆管障害研究班報告書(班長 草間悟). 71-73, 1980.
- 9) Cheung MT, Kwok PC : Liver resection for intrahepatic stones. Arch Surg 140 : 993-997, 2005.
- 10) 清家正弘, 前谷 容, 浮田雄生, ほか：肝内結石症に対する経皮経肝胆道鏡下截石術. 消化器科 43 : 560-565, 2006.
- 11) Suzuki Y, Mori T, Abe N, et al. : Predictive factors for cholangiocarcinoma associated with hepatolithiasis determined on the basis of Japanese multicenter study. Hepatol Res 42 : 166-170, 2012.
- 12) 森 俊幸：肝内結石症のコホート調査. 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 平成21年度総括・分担研究報告書(班長 坪内博仁).
- 13) Ohta T, Nagakawa T, Ueda N, et al. : Mucosal dysplasia of the liver and the intraductal variant of peripheral cholangiocarcinoma in hepatolithiasis. Cancer 68 : 2217-2223, 1991.
- 14) 佐田尚宏：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. 平成21年度総括・分担研究報告書(班長 坪内博仁). 145-147, 2009.

* * *

胆管癌のリスクファクター

肝内結石症の全国調査からみた肝内胆管癌のリスク

佐田 尚宏¹⁾・遠藤 和洋¹⁾・小泉 大¹⁾・笹沼 英紀¹⁾・安田 是和¹⁾

要約：肝内結石症に合併する肝内胆管癌は、重要な予後規定因子であるが、診断法の進歩した現在でも診断は困難で予後は不良である。2007年難治性疾患克服事業「肝内結石症に関する調査研究班」で第6次肝内結石症全国疫学調査および第5次全国疫学調査のコホート調査が行われ、「胆道再建の既往」、「肝萎縮」および「治療が切石のみ」が肝内胆管癌発症のリスク因子として抽出された。2009年「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」肝内結石分科会で行った「肝内結石症に合併する肝内胆管癌プロファイル調査」では、肝内胆管癌の発見動機は腫瘤形成が最も多かったが、腫瘤形成例では切除率が低く、予後も極めて不良であった。2000年以降は従来型の肝内結石長期罹患による発症例は減少しており、肝内結石症と同時に発見される肝内胆管癌症例が過半数を占めていた。肝内胆管癌早期発見のための画像診断法は確立されておらず、今後の重要な検討課題である。

Key words：肝内結石症，肝内胆管癌，全国疫学調査

はじめに

肝内結石症は厚生労働省が指定する難治性疾患の一つで、難治性疾患克服研究事業調査研究班が組織されて調査・研究が進められている。肝内結石症では胆管炎からの敗血症と肝内胆管癌の合併が、予後規定因子として重要で、今後克服すべき課題である。肝内胆管癌は、肝内結石症の4.0~8.8%に合併すると報告されている¹⁾。肝内胆管癌の診断は困難で、発見時には高度進行している切除不能例が多く、切除例の予後も不良とされている。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(肝内結石症班会議)」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」が作成され、「肝内結石症の診療ガイド」として出版された^{1,2)}。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、今後のさらなる検討が必要である。」と記載されるに留まり¹⁾、肝内結石症における肝内胆管癌早期診断は今後解決されなければならない大きな臨床的課題である。

I. 肝内結石症の全国疫学調査

肝内結石症の全国疫学調査は、肝内結石症班会議が中心となり1970年以降合計6回実施されている(表1)。2006年度の通院加療症例を対象に実施された第6次調査は、全国2,592医療機関に予備調査票を配付し、合計326症例の肝内結石症が集積された。有病者数は経年的に減少傾向にあり、胆石症全体に占める肝内結石症の割合も低下傾向で第6次調査では0.6%と推定されている。肝内結石症の病型では、1970年代では20.6%に過ぎなかった肝内型が、第5次調査(1998年)では57.9%、第6次調査では54.9%と増加傾向にある。

Risk Factors of Intra-hepatic Bile Duct Carcinoma in Hepatolithiasis from National Survey in Japan
Naohiro Sata et al

1) 自治医科大学消化器・一般外科(〒329-0498 下野市薬師寺3311-1)

表 1 肝内結石症に対する全国疫学調査

	対象年	参加施設数	登録症例数
第1次	1970～1977	29	135
第2次	1975～1984	380	4,191
第3次	1985～1988	286	1,813
第4次	1989～1992	1,394	3,760
第5次	1998	1,516	1,124
第6次	2006	2,592	336

結石存在部位は、左葉が47.9%で左葉優位型が過半数を占めていた^{3,4)}。

第6次調査では全肝内結石症336例中、胆管癌は18例(5.5%)に合併していた⁵⁾。第5次調査における肝内胆管癌合併率は4.3%と報告されており、やや増加の傾向がみられる^{6,7)}。それに加えて第6次調査では肝臓癌の合併が12%に、消化器癌全体の合併が16%の症例にみられた。第6次調査で調査実施した全項目で χ^2 検定を行い、ステップワイズ法によるロジスティクス回帰分析を行ったところ、「胆道再建の既往」と「肝萎縮」の2項目が有意な胆管癌合併因子として抽出され、それぞれのオッズ比は3.800と4.585であった⁸⁾。肝萎縮部位と胆管癌発生部位についても検討されており、肝萎縮を伴った胆管癌症例8例中7例で、肝萎縮部位と胆管癌発生部位が一致していた。

また、肝内結石症班会議疫学ワーキング・グループでは、第5次全国調査で登録された症例のうち473例に対するコホート調査も同時に行い、回答を得た258例に対してコックス回帰分析を行い、胆管癌発生に影響を与えた因子について検討した。その結果、「治療が切石のみ」が発癌リスクを上げる因子として、「UDCA内服」が発癌リスクを下げる因子として抽出された⁸⁾。

II. 肝内結石症に合併する肝内胆管癌のプロファイル

肝内結石症に合併する肝内胆管癌は、発見時すでに高度進行癌であることが多く、予後不良である。しかし、「肝内結石症に合併する肝内胆管癌」のまとまった報告はなく、その実態は不明な部分が多い。そのため、2008年以降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(肝内結石分科会)画像ワーキング・グループでは、肝内結石に合併する肝内胆管癌をいかに診断するかを最重要課題として検討し、調査研究班に参加している施設を対象に「肝内結石に合併する肝内胆管癌のプロファイル調査」を行った^{9,10)}。このプロファイル調査では39施設

から1990～2009年に経験した肝内結石症例696例、そのうち肝内胆管癌合併症例37例(5.3%)を集積し、このうち2次調査に回答があった30例(男性18例、女性12例、平均年齢67.2歳)について解析を行った。肝内胆管癌合併症例の成因は、胆管空腸吻合術後1例を除き、29例は原発性であった。肝内結石症の病型では肝内型が53%、存在部位では左葉が47%、第5次および第6次全国疫学調査と同様の傾向を示した。飲酒率は17%、喫煙率は33%、胆摘術を受けた症例が13例(43%)であった^{9,10)}。

肝内胆管癌合併症例の肝内結石症罹患期間は、従来から特徴的とされる肝内結石罹患歴10年以上の症例が37%と最多であったが、肝内結石症とほぼ同時に発見された0～6ヵ月の症例も36%とほぼ同数認められた。これを5年毎の年代別にみると、1990～1994年の症例7例中6年以上経過例が6例と過半数を占めているのに対し、2005～2009年は8例中6例が0～6ヵ月と肝内結石と肝内胆管癌がほぼ同時に診断された症例が過半数を占めていた。肝内胆管癌診断と手術時期の関係では、術前に発見された症例が80%であったが、手術後に確認された症例も17%に認められた。肝内胆管癌の発見動機は、腫瘍指摘が最も多く65%を占め、肝内胆管狭窄に対する精査(生検・細胞診)が22%、充満結石に対する精査が4%、その他が17%であった。発見動機別の切除率をみると、狭窄精査では80%が切除されていたが、腫瘍指摘例での切除率は31%に留まっていた^{9,10)}。

肝内胆管癌診断に有効であった診断modalityとしては、腫瘍指摘例ではCT、USが有用とされているが、狭窄精査など腫瘍が指摘できないその他の例では、CT、US、MRIの有効率は低く、PTC、ERCなどの直接造影法による生検、細胞診、経口胆道鏡、PTCSなど内視鏡による精査により診断されていた。診断された肝内胆管癌は高度進行例が多く、Stage IVbが57%と過半数を占めていた。発見された肝内胆管癌の予後は、Stage I、IIでは再発例はなく、長期生存例がみられた。一方、Stage IIIの4例中3例は切除術後18ヵ月以内に原病死しており、Stage IVaの3例も全例原病死(3年2ヵ月、1年3ヵ月、9ヵ月)、Stage IVb 17例では、切除例が6例(35%)のみで、1年以内原病死例が3例と、非切除例(11例中7例が1年以内死亡)とほぼ同等の治療成績であった^{9,10)}。

板倉らが報告した1983～1999年における肝内結石に合併する肝内胆管癌10例(男性2例、女性8例、平均年齢66.5歳)の検討では、左葉症例、Stage IV以上の症例が過半数を占め、全国疫学調査、プロファイル



図1 肝内胆管癌を合併する肝内結石症症例のFDG-PET所見
 a：肝内胆管癌の存在する肝門部のSUV値6.56→8.44。
 b：慢性炎症の存在するB7のSUV値3.99→4.01。

調査とほぼ同様の傾向であった⁷⁾。異時性に肝内胆管癌が発見された症例は2例のみで、全例に胆管狭窄を認め、組織学的に胆管内発育を示す症例が3例認められた。予後はやはり不良で、生存1例、転帰不明2例を除き、全例原病死した⁷⁾。

Ⅲ. 考 察

従来、肝内結石症における肝内胆管癌発症は、長年にわたる肝内結石の存在による慢性炎症が主要因と考えられてきた¹¹⁾。厚生労働省の難治性疾患克服研究事業調査研究班が主体となり、2007年まで6回の肝内結石症全国疫学調査が行われた。この全国疫学調査では、肝内結石症有病率の低下、全胆石症に占める割合の低下が明らかとなり、肝内結石症の病態も以前とは変化していると考えられる。肝内結石症は、何らかの原因による肝内胆管の狭窄に起因する原発性の肝内結石症と、胆管空腸吻合術後にみられる続発性の肝内結石症に分類され、近年は原発性の肝内結石症新規症例が減少し、続発性の肝内結石症が増加している傾向がみられる。原発性の肝内結石症における肝内胆管癌が、従来知られている病態であるが、続発性の肝内結石症で同様の発癌機序、発癌頻度がみられるかについて、現時点では明らかではない。

原発性の肝内結石症に合併する肝内胆管癌の特徴は、腫瘤形成が少なく、胆管内進展が高頻度に見られ、そのため肝内結石症に対する切除術後に偶然発見される症例もある一定の割合存在する。また、腫瘤形成の頻度が低いことから、経過観察中に切除不能な肝内胆管癌として発見されることも臨床的にはときに経験される。第6次全国疫学調査および第5次全国疫学調査のコホート調査で、「胆道再建の既往」と「肝萎

縮」「治療が切石のみ」の3項目が肝内胆管癌発症のリスク因子として抽出されたことは大変興味深い。現在の胆石症の診療ガイドラインでは、胆管手術のある症例ではPTCSが肝内結石症治療フローチャートの第一選択として記載されているが¹²⁾、肝内胆管癌発見の困難性、予後不良を考慮すると、胆管手術のある症例でも肝萎縮のみられる症例については、積極的に肝切除の適応があると考えられる。また肝内結石分科会で行ったプロフィール調査では、肝内胆管癌と同時に肝内結石症が発見される症例が2000年以降増加し、2005年以降では過半数を占めていた。従来の「肝内結石症→慢性炎症→肝内胆管癌発症」という発癌機序だけでなく、「肝内胆管癌による胆管狭窄→肝内結石発症」という機序による肝内胆管癌と肝内結石症の併存症例の存在について、その有無を含めて今後病態を明らかにしていく必要がある。

肝内結石分科会で行ったプロフィール調査では、肝内胆管癌の発見動機の過半数は腫瘤指摘であったが、その切除率は30%程度に留まっており、治療成績も不良で、切除例でも過半数は1年以内に原病死していた。肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断では、腫瘤形成以前に発見する手段が治療成績の向上のためにも必要である。狭窄精査症例、充満結石精査症例では、比較的早期の肝内胆管癌が発見されていたが、その診断法は従来から行われている直接造影法(ERC, PTC)もしくは胆管内内視鏡(PTCS, 経口胆道鏡)による細胞診、生検が主で、2000年以降飛躍的に発展したMD-CT, MRI, FDG-PETなどのmodalityに関しては実施症例が少なく、評価できなかった。当科で経験した76歳男性の肝内胆管癌合併肝内結石症症例で施行したFDG-PETでは、炎症部と癌部のSUV値に明瞭な差があり(図1)、今後の症例の集積で、新たな診

断 modality となりえる可能性が示唆された。今後症例を集積し、MD-CT, MRI, FDG-PET などの新たな modality を含め、肝内胆管癌早期発見のための診断方法についてはさらなる検討が必要である。

おわりに

肝内結石症に合併する肝内胆管癌の治療成績はいまだ不良である。第6次全国疫学調査および第5次全国疫学調査のデータから、「胆道再建の既往」, 「肝萎縮」および「治療が切石のみ」が肝内胆管癌発症のリスク因子として抽出された。肝内結石分科会で行ったプロフィール調査では、肝内胆管癌診断に使用される modality は従来の直接造影法 (ERC, PTC) もしくは胆管内内視鏡 (PTCS, 経口胆道鏡) による細胞診, 生検が主で、MD-CT, MRI, FDG-PET など, 新たな診断 modality の評価は困難であった。2000年以降は、従来型の肝内結石・胆管炎長期罹患症例の割合が減少し、肝内結石と肝内胆管癌が同時に発見される例が増加し、新たな診断 entity の可能性が示唆された。

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：肝内結石症の診療ガイド。文光堂，2011。
- 2) 佐田尚宏，小泉 大，安田是和，ほか：肝内結石症の新しい画像診断指針。胆と膵 28：501-504, 2007。
- 3) 森 俊幸：疫学予後ワーキング・グループ報告。厚生

- 労働省難治性疾患難治性疾患克服事業肝内結石症に関する調査研究班平成18年度研究報告書，22-26, 2007。
- 4) 森 俊幸，鈴木 裕，阿部展次，ほか：わが国における肝内結石症の変遷。胆と膵 28：479-482, 2007。
- 5) 森 俊幸。疫学予後ワーキング・グループ報告。厚生労働省難治性疾患難治性疾患克服事業肝内結石症に関する調査研究班平成19年度研究報告書，21-23, 2008。
- 6) 谷村 弘，内山和久，石本喜和男：肝内結石の全国疫学調査（Ⅱ）—最近の動向と10年後のQOLについて—。厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班，平成7年度研究報告書，11-19, 1997。
- 7) 板倉 淳，三浦和夫，藤井秀樹，ほか：肝内結石症と肝内胆管癌。肝内結石に併存する肝内胆管癌の特徴。肝胆膵 40：601-608, 2000。
- 8) 森 俊幸：疫学予後ワーキング・グループ報告。厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）肝内結石分科会，平成20年度分担研究報告書，139-141, 2009。
- 9) 佐田尚宏：肝内結石分科会画像ワーキング・グループ報告—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）肝内結石分科会，平成21年度分担研究報告書，2010。
- 10) 佐田尚宏，小泉 大，笹沼英紀：胆道癌のリスクファクター 肝内胆管癌合併肝内結石症のProfile調査。胆道 26：67, 2012。
- 11) 佐田尚宏，小泉 大，安田是和，ほか：【消化器の炎症からの腫瘍】胆嚢・胆管 肝内結石症と肝内胆管癌における慢性炎症の関与。臨消内科 22：983-989, 2007。
- 12) 日本消化器病学会編：胆石症治療ガイドライン。南江堂，2009。

* * *

肝内結石症診療の現況

肝内結石症の画像診断

佐田 尚宏¹⁾・遠藤 和洋¹⁾・小泉 大¹⁾・笹沼 英紀¹⁾・安田 是和¹⁾

要約：肝内結石症の画像診断は、肝内胆管に結石が確実に存在するという存在診断と、肝内胆管全枝における結石の有無を見極める部位診断から成る。肝内結石症例の多くは胆管炎、肝内胆管癌の併存のため、正確な部位診断が困難である。厚生労働省難治性肝・胆道疾患に関する調査研究班により作成された「肝内結石症の診療ガイド」の肝内結石診断フローチャートでは、画像診断法をスクリーニングで肝内結石症の存在診断を行う1次検査法、詳細な部位診断、肝内胆管癌の有無、手術適応を判断する非侵襲的な2次検査法、治療を前提とした侵襲的3次検査法に分類している。今後肝内結石症に合併する肝内胆管癌の予後を改善するためにも、従来の超音波検査、CT、MRC (MRI)、ERC、PTC だけではなく FDG-PET, diffusion MRI, perfusion CT など新たな modality を含む画像診断能の向上が望まれる。

Key words：肝内結石症, 肝内胆管癌, 画像診断

はじめに

肝内結石症は厚生労働省が指定する難治性疾患のひとつで、難治性疾患克服研究事業調査研究班が組織されて調査・研究が進められている。肝内結石症の画像診断は、肝内胆管に結石が確実に存在するという存在診断と、肝内胆管全枝における結石の有無を見極める部位診断から成る。両者の診断は一般に並行して行われるが、併存する胆管炎、肝内胆管癌などにより病態が修飾されるため、部位診断はときに困難である。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（肝内結石症班会議）」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」が作成され、その後「肝内結石症の診療ガイド」として出版された^{1,2)}。その中で併存する肝内胆管癌の診断については、「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、diffusion MRI、CT 検査の super delay phase、胆汁中 CEA 値、FDG-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、今後のさらなる検討が必要である。」と記載されるに留まっております。肝内結石症の4.0~8.8%に合併すると報告されている肝内胆管癌を如何に診断するかが肝内結石症画像診断における大きな臨床的課題である。

肝内結石症の画像診断の指針としては、肝内結石症の診療ガイドの作成したフローチャート²⁾ (図1) と、日本消化器病学会が作成した胆石症診療ガイドライン³⁾の診断フローチャート (図2) がある。この両者は独立して作成された経緯があり、また後者が胆石症全体を対象としたフローチャートであることから微妙に相違がある⁴⁾。

肝内結石症は胆石症の中でも診断が困難で、治療法も肝切除術、PTCS など、高度な技術が必要な手技が含まれるため、胆嚢結石症・胆管結石症とは異なり、基幹病院での治療が想定される。治療を踏まえて画像診断を段階的に行うという発想で、肝内結石症の診療ガイドのフローチャートは画像診断法を1次検査法、2次検査法、3次検査法の3段階に分類している。本稿では肝内結石症の診療ガイドのフローチャートに沿っ

Image Diagnosis of Hepatolithiasis

Naohiro Sata et al

1) 自治医科大学消化器・一般外科 (〒329-0498 下野市薬師寺 3311-1)

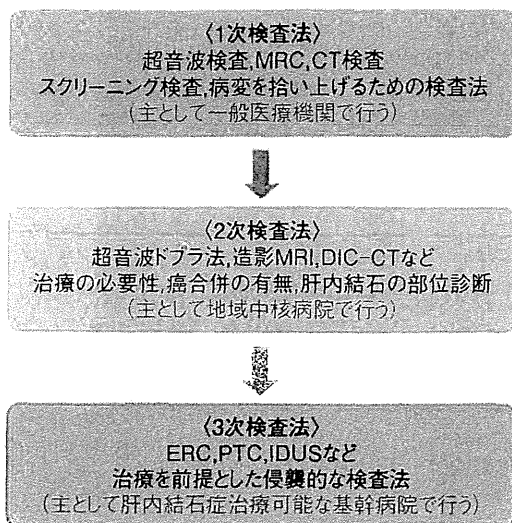
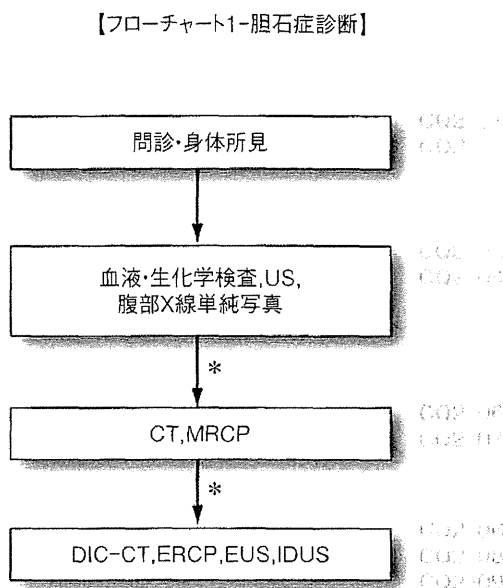


図 1 肝内結石症の診療ガイドにおける肝内結石症画像診断フローチャート (文献2より引用)



*: 診断が不確実な場合や病態に応じていずれかを選択する。

図 2 胆石症診療ガイドラインにおける診断フローチャート (文献3より引用)

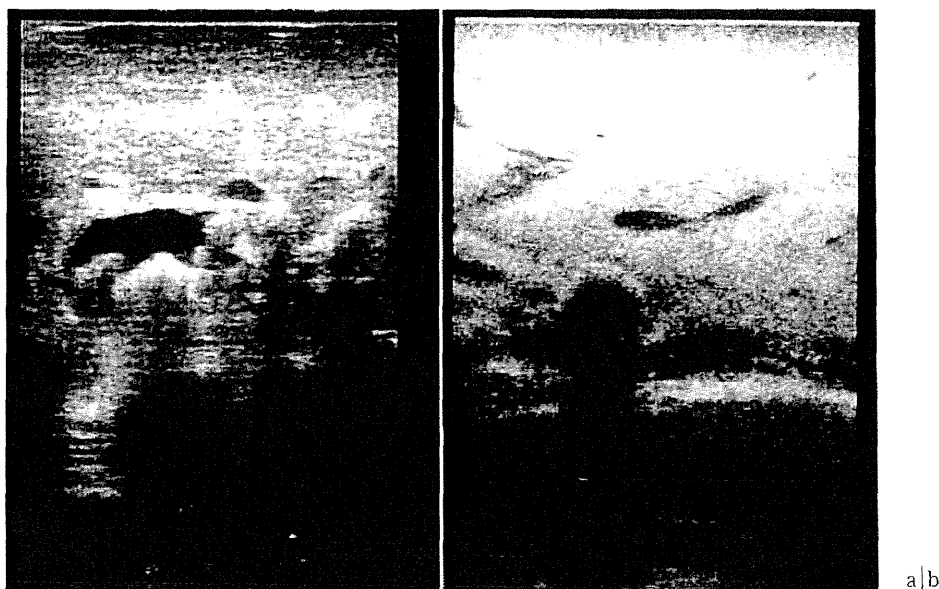


図 3 肝内結石症の超音波所見 (術中超音波検査)
a: 拡張した胆管内の音響陰影を伴う肝内結石。
b: 肝内胆管に充満する肝内結石。

て肝内結石症の画像診断について解説する。

I. 肝内結石症の1次検査法

肝内結石症診療ガイドでは、一般医療機関で行える超音波検査 (図3), MRCP (図4), CT検査を1次検査法と位置づけている²⁾。1次検査法は、臨床症状、検査

所見などから肝内結石症が疑われる症例を対象に、肝内結石症画像診断の first step として肝内結石の存在診断を行う。検査の実施方法として、腹部超音波検査では「体位変換を行いつつ、肝臓全体を区域ごとに観察する。」ことで、肝内胆管内の結石の証明を確診所見とし、肝内胆管の拡張・狭窄、肝区域の萎縮、肝区域内の血流低下・低灌流域、肝内石灰化像の4項目を参

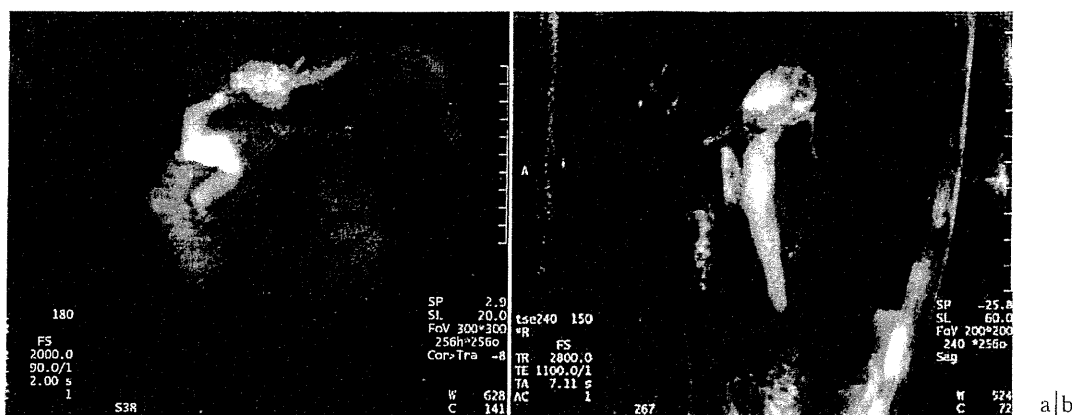


図 4 肝内結石症のMRC所見
肝左葉の肝内胆管拡張と肝内結石。

考にすべき所見としている。また、診断上の注意点として以下の4項目をあげている。

- ①結石は必ずしも音響陰影を伴わない。
- ②結石の存在する胆管に拡張像があり、結石周囲に胆汁が存在すれば描出は容易であるが、胆管に結石が充満し、結石があたかも肝実質と同じエコーレベルとなると、描出は極めて困難である。
- ③肝内石灰化はしばしばスクリーニングで観察される所見であるが、大多数の例では肝内結石ではないので、それ以外の所見を含めて検討する。
- ④Pneumobiliaは胆管内に音響陰影を伴う高エコー域として観察されるので、肝内結石との鑑別には注意が必要である。

1次検査法としての腹部CT撮像法は、「単純CTおよび造影CTを撮影し、5~7mm程度のスライス幅で、軸状断を通常のフィルムにて読影する。」こととしている。診断所見、参考にするべき所見は腹部超音波検査と同様で、診断上の注意点として、以下の2項目をあげている。

- ①肝内石灰化はしばしばスクリーニングで観察される所見であるが、大多数の例では肝内結石ではないので、それ以外の所見を含めて検討する。
- ②肝内胆管内の陰影欠損、胆管狭窄の診断に際しては、pneumobiliaや腫瘍との鑑別が必要である。

近年、肝内結石でもコレステロール結石の頻度が増加傾向で、肝内結石症班会議で行われた全国疫学調査の第5次調査(1998年)では5.8%、第6次調査(2006年)では16.8%がコレステロール石であったと報告されている^{5~7)}。依然として肝内結石症ではビリルビン結石の頻度が高いが、レントゲン陰性結石の存在を念頭に検査することは重要で、腹部CT検査ではコレステロール結石の画素値は胆汁とほぼ同等であることを

認識して読影する必要がある。

MRCについては、撮像法を「2Dのシングルショット高速SE法を用い、少なくとも3方向の多方向撮像を行う。」としており、「このほかに、軸位断のT2強調画像、T1強調画像、冠状断のT2強調画像を撮影する。」ことを推奨している。診断所見は、「肝内胆管内のpneumobiliaを否定した陰影欠損の証明」で、参考にするべき所見として、「肝内胆管の拡張・狭窄」をあげている。MRCではpneumobiliaと肝内結石とは、ともに陰影欠損像として描出される点に注意が必要である。また胆汁うっ帯が存在するときは、胆汁が濃縮し低信号を呈するため、結石が診断できないばかりでなく胆管自体が描出されない場合がある。MRCでは一般に1次分枝はすべて描出されるため、描出されない胆管枝の有無を確認することも重要である。

II. 肝内結石症の2次検査法

1次検査法で肝内結石症の存在診断がついた症例では、正確な部位診断(どの胆管分枝に結石が存在し、どの胆管分枝に結石が存在しないか)を行い、肝内胆管癌合併の有無を精査し、治療の必要性を判断することが次のstepとなる。肝内結石症の診療ガイドでは、2次検査法はdoppler US、造影MRI、DIC-CTなどの非侵襲的精査法と位置づけ、地域中核病院で行うことを推奨している。

Doppler USでは、カラードプラ法で門脈および併走する動脈を流速情報から同定、門脈・動脈の走行から肝区域の同定、門脈血流の減少している部位(区域)の検索を行う。カラードプラ画像とBモード画像が二つ同時に表示される装置では、血流の観察と同時に胆管も同時に観察され、診断に有用である。さらに超音