

- 15 Bassotti G, Chistolini F, Sietchiping-Nzepa F, Roberto G, Morelli A. Empirical antibiotic treatment with piperacillin-tazobactam in patients with microbiologically-documented biliary tract infections. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2281-3.
- 16 Melzer M, Toner R, Lacey S, Bettany E, Rait G. Biliary tract infection and bacteremia: presentation, structural abnormalities, causative organisms and clinical outcomes. *Postgrad Med J* 2007; 83: 773-6.

## APPENDIX I

THE BTI THERAPY Research Group consists of the following physicians and their institutions: Susumu Tazuma, Department of General Internal Medicine, Hiroshima University Graduate School of Medical Science, Programs of Applied Medicine, Clinical Pharmacotherapy; Toshihide Ohya, Department of Gastroenterology, Chugoku Rosai General Hospital; Yoshihiro Hattori and Koichiro Nakashima, Department of Internal Medicine, Syoubara Red Cross Hospital; Yoshinari Furukawa, Department of Gastroenterology, Hiroshima Red Cross Hospital and Atomic-bomb Survivors Hospital; Hironori Tokumo, Yasumasa Asamoto and Takashi Nakahara, Department of Gastroenterology and Hepatology, Hiroshima General Hospital; Shigeyuki Kushihata, Department of Internal Medicine, Medical Corporation Koujinkai Kajikawa Hospital; Kazushi Teramen, Department of Internal Medicine, Mitsubishi Mihara Hospital; Atsushi Yamaguchi, Department of Gastroenterology, National Hospital Organization,

Kure Medical Center; Tetsuya Watanabe, Department of Internal Medicine, Otagawa Hospital; Masaki Inoue and Daisuke Komichi, Department of Gastroenterology, Akitsu Prefectural Hospital; Yoshinori Igarashi, Naoki Okano, Ken Ito and Takahiko Mimura, Division of Gastroenterology and Hepatology, Toho University Omori Medical Center; Kazuo Inui, Yuuta Nakamura, Kunihito Shiota and Nobuyuki Hattori, Department of Internal Medicine, Second Teaching Hospital, Fujita Health University School of Medicine; Hirotaka Ohara, Department of Community-based Medicine Education, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences; Takahiro Nakazawa, Tomoaki Andoh, Kagetsu Hayashi, Itaru Naitoh, Fumihiko Okumura and Takashi Joh, Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences; Hajime Tanaka and Haruki Nakao, Department of Gastroenterology, Aichi Medical University School of Medicine; Toshio Tsuyuguchi, Hiroyuki Ishibashi, Kouichiro Okitsu, Daisuke Maruoka, Takao Nishikawa, Rei Tamura, Takayuki Kondo, Seiko Togo, Arata Oyamada, Syouko Minemura, Sadahiro Itoh, Hidehiro Kamezaki and Kazuhiko Ohnishi, Department of Medicine and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Chiba University; Shomei Ryozaawa, Hirotooshi Iwano, Noriko Ishigaki and Kumiko Taba, Department of Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine; Miyuki Kaino, Fumie Kurokawa, Takeshi Iida, Noriyoshi Kusano and Yumiko Harima, Department of Gastroenterology, Yamaguchi Rosai Hospital.

# Bach1 gene ablation reduces steatohepatitis in mouse MCD diet model

Motoki Inoue,<sup>1</sup> Susumu Tazuma,<sup>2</sup> Keishi Kanno,<sup>2,\*</sup> Hideyuki Hyogo,<sup>1</sup> Kazuhiko Igarashi<sup>3</sup> and Kazuaki Chayama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

<sup>2</sup>Department of General Internal Medicine, Hiroshima University Hospital, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Tohoku University School of Medicine, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

(Received 21 December, 2009; Accepted 11 February, 2010; Published online 10 April, 2010)

Bach1 is a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 (HO-1, a.k.a. HSP-32), which is an inducible enzyme and has anti-oxidation/anti-inflammatory properties shown in various models of organ injuries. Since oxidative stress plays a pivotal role in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH), HO-1 induction would be expected to prevent the development of NASH. In this study, we investigated the influence of Bach1 ablation in mice on the progression of NASH in methionine-choline deficient (MCD) diet model. Bach1 ablation resulted in significant induction of HO-1 mRNA and its activity in the liver. When fed MCD diet, Bach1<sup>-/-</sup> mice exhibited negligible hepatic steatosis compared to pronounced steatohepatitis in wild type mice with 6-fold increase in hepatic triglyceride content. Whereas feeding of MCD diet decreased mRNA expressions of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) in wild type mice, there were no change in Bach1<sup>-/-</sup> mice. In addition, hepatic concentration of malondialdehyde (MDA), a biomarker for oxidative stress as well as plasma alanine aminotransferase (ALT) was significantly lower in Bach1<sup>-/-</sup> mice. These findings suggest that Bach1 ablation exerts hepatoprotective effect against steatohepatitis presumably via HO-1 induction and may be a potential therapeutic target.

**Key Words:** oxidative stress, steatohepatitis, nonalcoholic fatty liver disease, heme oxygenase-1, peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most major liver dysfunction in the world and its prevalence is increasing with epidemics of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. NAFLD includes wide-ranging liver disorder from simple steatosis through steatohepatitis to cirrhosis and possibly hepatocellular carcinoma.<sup>(1,2)</sup> About one-third of NAFLD is regarded as non-alcoholic steatohepatitis (NASH) which shows activity of steatohepatitis with the potential for a lethal outcome. In the development of NASH, “two hit theory” is assumed to be required, with the first hit being lipid accumulation in hepatocytes increasing the sensitivity of the liver to the second hit such as oxidative stress.<sup>(3)</sup> In this setting, emerging animal studies have demonstrated the protective effects of antioxidant (e.g., vitamin E, 1-aminobenzotriazole, curcumin, N-acetylcysteine, angiotensin II type I receptor blockers) in experimental models of NASH.<sup>(4-7)</sup> In human, small clinical trials have revealed potential usefulness of vitamin E in the treatment of NASH.<sup>(8-10)</sup> Interestingly, administration of fermented green tea extract which exerts antioxidant activity reduced hepatic triglyceride content in addition to necro/inflammation and fibrosis in rat NASH model.<sup>(11)</sup> These suggest that oxidative stress plays a pivotal role in the pathogenesis of NASH and expected to be one of the promising targets in the treatment of this disease.

Heme oxygenase (HO) is the rate limiting enzyme in the

catabolism of heme, to yield biliverdin, carbon monoxide (CO), and free iron. HO exhibits antioxidant properties derived from the elimination of prooxidant heme as well as from biological activities of its reaction products, CO, biliverdin, bilirubin, and iron.<sup>(12)</sup> In mammals three isoforms, designated as HO-1, HO-2 and HO-3 have been identified in the liver. Among these HO isoforms, HO-3 is considered as processed pseudogenes derived from HO-2 transcripts.<sup>(13)</sup> While HO-2 is constitutively expressed mainly in parenchymal cells, HO-1 is prominent in Kupffer cells and is markedly induced in hepatocytes in the response to various stimuli. Interestingly, it has been reported that HO-1 expression was significantly increased in the liver from NASH patients and the increase reflected the severity of the disease.<sup>(14)</sup> These suggest that HO-1 functions as a defense system against oxidative stress in the liver. In fact, accumulating evidences have demonstrated hepatoprotective effects of HO-1. The induction HO-1 by cobalt protoporphyrin (CoPP) protects human hepatocytes from ethanol-induced cytotoxicity.<sup>(15)</sup> *Ginkgo biloba* extract, a naturally occurring HO-1 inducer has been proved to ameliorate ethanol-induced sustained damage and redox imbalance on rat liver.<sup>(16)</sup> In addition, curcumin which has a beneficial effect on NASH has been recently proved to be an HO-1 inducer.<sup>(5,17)</sup>

In addition to cytoprotective properties of HO-1, the regulatory mechanisms of this gene have been revealed. A heme-binding factor Bach1 functions as a transcriptional repressor of the gene encoding HO-1 (*Hmox1*). Bach1 forms complexes with small Maf proteins and competes against NF-E2 related factor (Nrf2), the major transcriptional activator of *Hmox1*, for binding at the Maf recognition elements (MAREs) of *Hmox1* enhancer. Consistently, mice lacking Bach1 exhibited constitutively high level of HO-1 expression in many tissues including the liver.<sup>(18)</sup> Further studies of Bach1<sup>-/-</sup> mice have revealed a hepatoprotective role of Bach1 ablation in LPS-induced liver injury.<sup>(19)</sup>

In the current study, we investigated the influence of Bach1 disruption in animal NASH model. Accompanied with marked up-regulation of HO-1 in the liver, we observed reduced hepatic steatosis in Bach1<sup>-/-</sup> mice with altered expressions of key genes that regulate hepatic lipid metabolism. Consistent with these findings, the absence of Bach1 also exhibited hepatoprotection confirmed by serum liver enzyme and hepatic malondialdehyde (MDA) concentration. Collectively, these data suggest Bach1 as a potential target in the treatment of NASH presumably via induction of HO-1.

## Materials and Methods

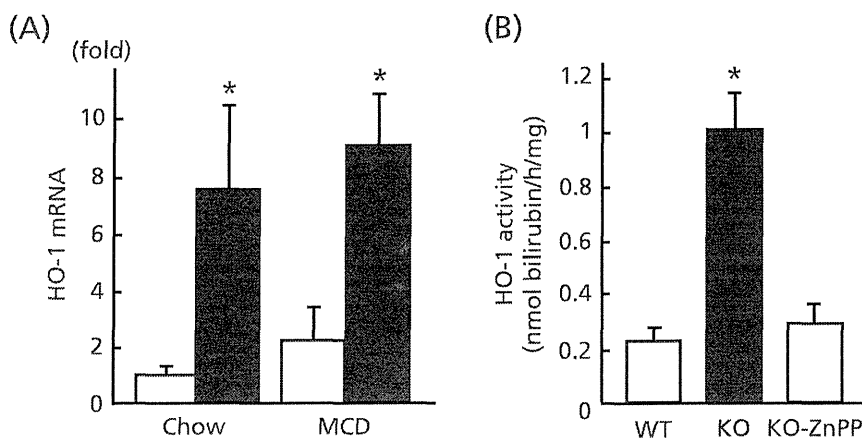
### Animals and experimental protocol. Male C57BL/6 mice

\*To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: kanno@hiroshima-u.ac.jp

**Table 1.** Primer used for quantitative real-time PCR

Gene	Forward	Reverse
HO-1	acatcgacagcccccacgaagtcaa	ctgacgaagtgcgcatctgtgag
PPAR $\alpha$	tgcaacttggaactgaacg	tgatgtcacagaacgcttc
MTP	catgtcagcctcctgtttg	ctcgcgataccacagactga
$\alpha$ SMA	tcctcctggagaagagctac	tataggtggttctgtggatgc
TGF- $\beta$	tgcgcttgacagattaataa	ctgcggtacaactccagtga
GAPDH	agaacatcatcctcgatcc	ttgtcattgagagcaatgcc

HO-1, heme oxygenase-1; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor alpha; MTP, microsomal triglyceride transfer protein;  $\alpha$ SMA, alpha smooth muscle actin; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



**Fig. 1.** Hepatic HO-1 expression and its activity in the absence of Bach1. (A) Wild type mice (open bar) and Bach1<sup>-/-</sup> mice (closed bar) were fed either regular chow or MCD diet for 8 w prior to quantification of hepatic expression of HO-1 mRNA by real-time PCR ( $n = 5$ /each group). (B) HO-1 activity in the liver from wild type (WT) or Bach1<sup>-/-</sup> (KO) mice were determined with standardized of protein concentration ( $n = 5$ /each group). ZnPP was utilized as a HO-1 inhibitor for negative control. \* $p < 0.05$ , wild type vs Bach1<sup>-/-</sup> mice.

were obtained from Charles River Laboratories (Yokohama, Japan). The generation of Bach1<sup>-/-</sup> mice on C57BL/6 background was described previously.<sup>(18)</sup> These mice at 10 weeks of age (5 mice per each group) were fed either methionine-choline deficient (MCD) diet (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) or standard chow for 4 or 8 weeks with free access to drinking water. All animal protocols and studies were performed according to the guidelines of Institute of Laboratory Animal Science, Hiroshima University.

**Histological studies.** Liver samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and sliced into 4  $\mu$ m thick. These were subjected to standard procedure of hematoxylin and eosin (HE) staining or Azan-Mallory staining.

**Biochemical assays.** Serum alanine aminotransferase (ALT) levels were measured enzymatically. Hepatic triglyceride content was determined using Wako *E* test triglyceride kit (Wako chemical, Osaka, Japan) following lipid extraction.<sup>(20)</sup> Hepatic MDA levels were quantified using Lipid Peroxidation Assay Kit (Calbiochem, Gibbstown, NJ) with standardization of tissue protein concentrations.

**HO activity.** HO activity in the liver was determined as previously described.<sup>(21,22)</sup> In brief, microsome fraction isolated by ultracentrifugation was reacted with hemin as substrate, and bilirubin formation was measured using Beckman DU640 spectrophotometer (450 nm; Beckman Coulter, Fullerton, CA). The activity was expressed as nmol bilirubin formed per hour per mg of protein. To inhibit HO activity for a negative control, zinc protoporphyrin (ZnPP) in phosphate buffer was injected intraperitoneally at a dose of 7.5 mg/kg once a week for 8 weeks.

**Quantitative real-time PCR.** RNA was extracted from frozen liver tissues using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Complementary DNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA

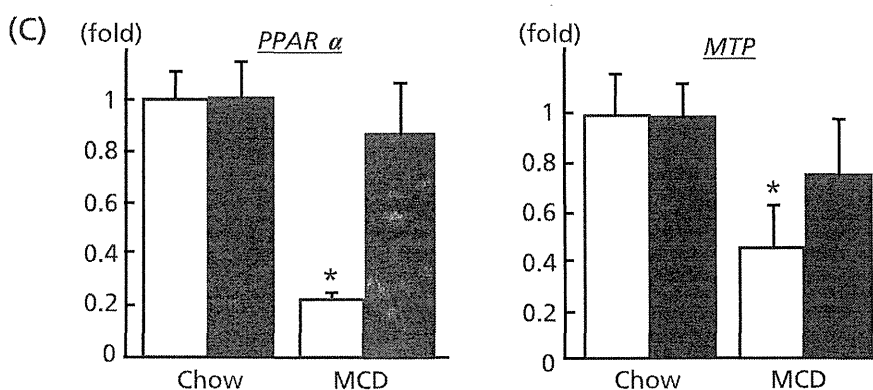
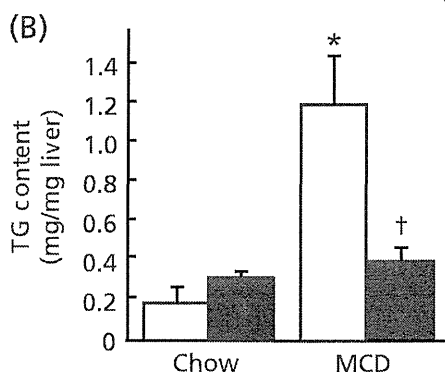
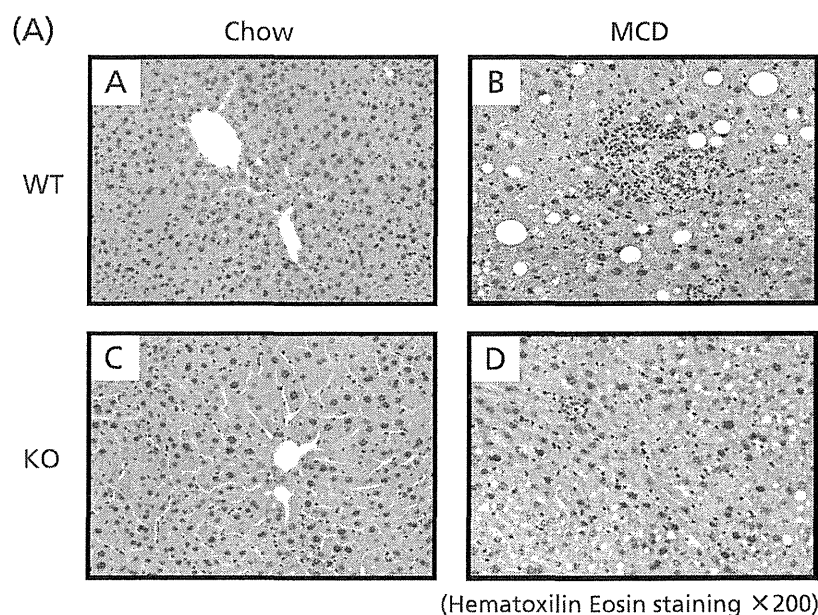
with GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Specific primers (Table 1) were designed using Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) on the basis of nucleotide sequences from Genbank. Quantitative real-time PCR was performed on Light Cycler system using Light Cycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). The mRNA expressions were normalized to the housekeeping gene, GAPDH as an internal control.

**Statistical analysis.** The results are expressed as the means  $\pm$  SE. The statistical analysis was performed using Student's *t* test and differences were considered statistically significant when *p* was less than 0.05.

## Results

**Hepatic HO-1 expression and its activity in the absence of Bach1.** Fig. 1 demonstrates the regulation of HO-1 expression and its activity by Bach1. As shown in Fig. 1A, real-time PCR quantified a 8-fold up-regulation of HO-1 mRNA in Bach1<sup>-/-</sup> mice on chow diet. Despite not being statistically significant, there was 2-fold up-regulation of mRNA by MCD diet in wild type mice. Consistent with these changes in mRNA expressions, Fig. 1B demonstrates 5-fold increase in hepatic HO-1 activity in the absence of Bach1, which was entirely repressed by intraperitoneal injection of ZnPP, an HO-1 inhibitor.

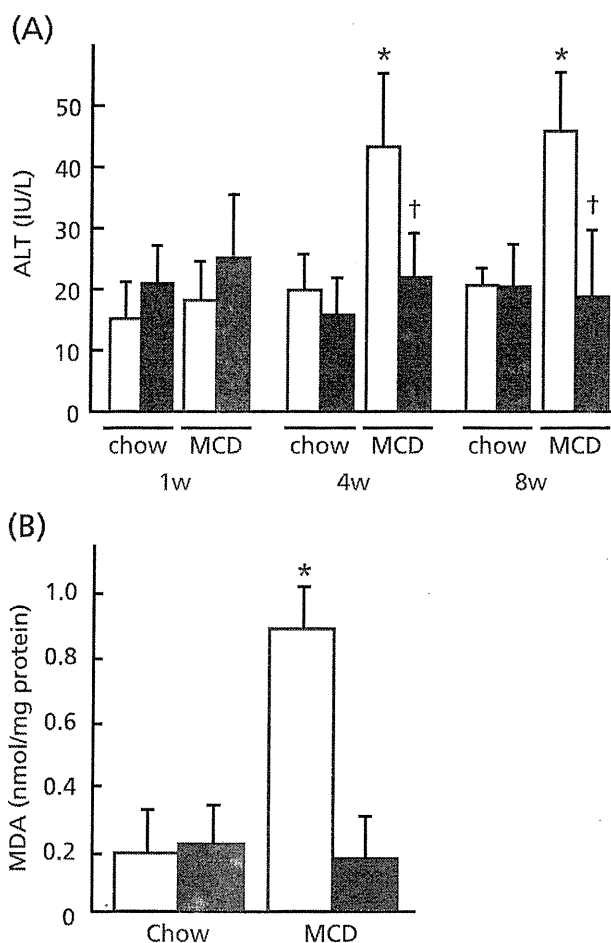
**Influence of Bach1 ablation on hepatic lipid metabolism.** Eight weeks feeding of MCD diet induced moderate infiltration of inflammatory cells with macrovesicular steatosis in the liver of wild type mice as depicted in Fig. 2A (A, B). In contrast to wild type mice, Bach1<sup>-/-</sup> mice appeared devoid of hepatic steatosis (C, D). In keeping with these morphological changes, hepatic



**Fig. 2.** Influence of Bach1 ablation on hepatic lipid metabolism. (A) Liver sections from wild type (A and B) and Bach1<sup>-/-</sup> mice (C and D) fed either regular chow (left panels) or MCD diet (right panels) were processed for haematoxylin & eosin (HE) staining. (original magnification 200×). (B) Hepatic triglyceride concentrations in wild type (open bars) and Bach1<sup>-/-</sup> (closed bars) mice (n = 5/each group) were determined after feeding either regular chow or MCD diet. (C) Hepatic mRNA expressions of PPAR $\alpha$  and MTP were quantified (n = 5/each group) by quantitative real-time PCR. \**p*<0.05, regular chow vs MCD diet. †*p*<0.05, wild type vs Bach1<sup>-/-</sup> mice.

triglyceride content increased by 6-fold in wild type mice following MCD diet feeding whereas values remained unchanged in Bach1<sup>-/-</sup> mice. To further explore the effect of Bach1 ablation, mRNA expressions of key genes involving in hepatic lipid metabolism were investigated. This revealed marked down-regulation of PPAR $\alpha$  and MTP in wild type mice whereas there were no significant changes in Bach1<sup>-/-</sup> mice, suggesting that fatty acid utilization and excretion were preserved in Bach1<sup>-/-</sup> mice on MCD diet.

**Protective effect of Bach1 ablation on MCD diet-induced liver injury.** Feeding of MCD diet increased serum ALT levels in wild type mice at 4 and 8 weeks whereas it remained the basal level in Bach1<sup>-/-</sup> mice, implying protective effect of Bach1 ablation against liver injury (Fig. 3A). Consistent with these findings, hepatic MDA concentration which reflects oxidative damage elicited by lipid peroxidation in the liver remained unchanged in Bach1<sup>-/-</sup> mice following MCD diet (Fig. 3B). This was in marked



**Fig. 3.** Protective effect of Bach1 ablation on MCD diet-induced liver injury. (A) Serum ALT levels were determined at indicated time points by 8 w in wild type mice and Bach1<sup>-/-</sup> mice fed either regular chow or MCD diet (*n* = 5/each group). (B) Hepatic MDA concentration was assessed with standardization of protein concentration in wild type (open bar) and Bach1<sup>-/-</sup> (closed bar) mice (*n* = 5/each group). \**p* < 0.05, regular chow vs MCD diet. <sup>†</sup>*p* < 0.05, wild type vs Bach1<sup>-/-</sup> mice.

contrast to 4-fold increase in MDA level in wild type mice on MCD diet.

#### Influence of Bach1<sup>-/-</sup> ablation on hepatic fibrogenesis.

As previously reported,<sup>(23)</sup> rodents fed MCD diet develops steatohepatitis mimicking human NASH. Fig. 4A depicts mild pericellular fibrosis with fat deposition in the liver from wild type mice fed MCD diet (upper panel). In contrast, Bach1<sup>-/-</sup> mice displayed no significant change in the liver (lower panel). Consistent with these morphological changes, hepatic mRNA expression of  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) which is predominantly expressed in activated stellate cells was up-regulated in the liver of wild type mice on MCD diet while it remained unchanged in Bach1<sup>-/-</sup> mice.

#### Discussion

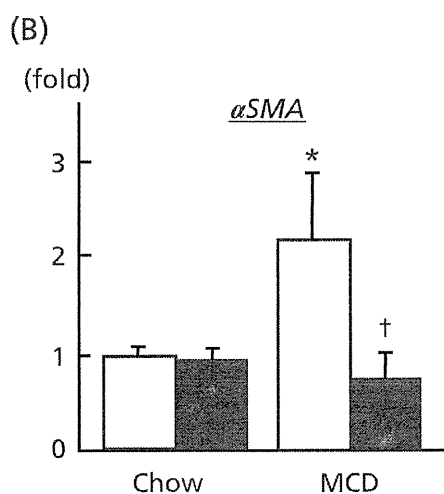
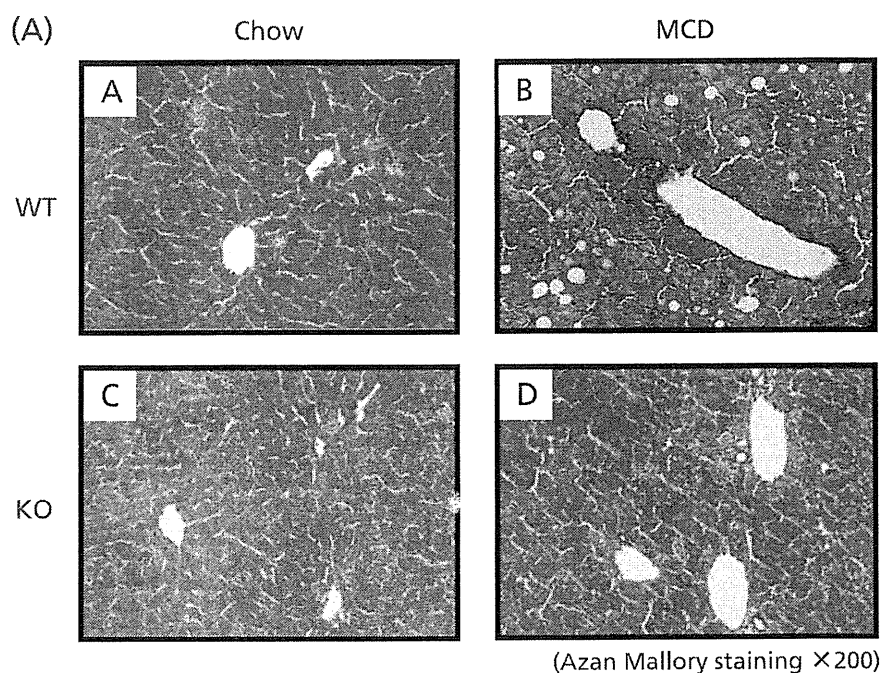
The aim of this study was to explore the influence of Bach1 ablation in the development of NASH. As demonstrated in Fig. 1, Bach1 ablation in mice leads to significant up-regulation of HO-1 mRNA as well as its activity. This was in keeping with previous data that hepatic expressions of HO-1 mRNA and protein were constitutively high in the absence of Bach1.<sup>(18)</sup> To date, HO-1,  $\beta$ -globin, ferritin, thioredoxin reductase1 and NADP(H) quinone (oxido) reductase have been identified as a target genes of Bach1,

but other downstream genes of Bach1 have not been fully understood.<sup>(24)</sup> HO-1 has been reported to have cytoprotective, anti-inflammatory and anti-oxidative properties. Emerging reports have suggested protective roles of HO-1 in experimental-induced hepatic damage including lipopolysaccharide-induced injury, immune liver fibrosis model, and hepatic ischemia-reperfusion injury.<sup>(12,19,25-27)</sup> In addition, pathophysiological importance of HO-1 has also been suggested by previous findings that HO-1 is induced under various etiological conditions including human NASH.<sup>(14)</sup>

The pathogenesis of NASH is widely recognized as two hit theory, in which the first hit is an initial metabolic disturbance causes steatosis and second pathogenic stimulus such as free radical and cytokines triggers necro/inflammation leading to the progression of steatohepatitis. The current study was undertaken on the basis of our initial hypothesis that HO-1 induction by Bach1 ablation may ameliorate oxidative stress and inflammation, the second hit in NASH pathogenesis and may repress the transition from bland steatosis to steatohepatitis. Surprisingly, in addition to reduction in hepatic damage, Bach1 ablation significantly diminished hepatic steatosis following MCD feeding. This was explained by the finding in this study that hepatic expression of PPAR $\alpha$  and MTP, that are involved in hepatic fatty acid oxidation and hepatic secretion of triglyceride-rich VLDL, remained unchanged in MCD diet-fed Bach1<sup>-/-</sup> mice in comparison to significant reduction in wild type mice. These changes were inversely paralleled with hepatic MDA concentrations, suggesting the possibility that relief from oxidative damage in Bach1<sup>-/-</sup> mice conserved hepatic lipid metabolism. Along a similar line, the previous study of ob/ob mice fed MCD diet has revealed that YHK, a naturally derived herbal medicine that is reported to reduce reactive oxygen species declined hepatic steatosis via induction of hepatic mRNAs of PPAR $\alpha$  and MTP.<sup>(28,29)</sup> This suggests a potential mechanism of the previous findings that antioxidant agents have beneficial effects not only on hepatic necro/inflammation but also on hepatic steatosis.<sup>(4,28)</sup> Since mice assigned to high fat diet or dietary choline restriction exhibited mitochondrial dysfunction which negatively affects the bioenergetics of liver, antioxidative status observed in Bach<sup>-/-</sup> mice might preserve the integrity of the mitochondria from oxidative damage and help to maintain cellular functions including hepatic lipid metabolism.<sup>(30,31)</sup> However, the current study lacks the direct evidence that hepatoprotective property against NASH in Bach1<sup>-/-</sup> mice was due to reduction in oxidative stress attributed to HO-1 induction, and further investigations are needed.

As shown in Fig. 4, MCD diet caused modest pericellular fibrosis with significant induction of  $\alpha$ SMA mRNA in wild type mice whereas Bach1<sup>-/-</sup> mice exhibited almost normal in liver histology as well as  $\alpha$ SMA expression. Reduction in hepatic fibrosis is likely to be elicited by relief of hepatic damage and inflammation in Bach1<sup>-/-</sup> mice. However, previous report has demonstrated that HO-1 is expressed in human hepatic myofibroblast and induction of HO-1 leads to inhibition of collagen synthesis and to reduction in proliferation of myofibroblast.<sup>(32)</sup> This suggests direct role for HO-1 induction against the development of hepatic fibrosis and might be a possible explanation for our finding.

In the current study, MCD dietary model was utilized as a NASH animal model. Although this model is widely used on the basis that morphological changes of the liver resembles human NASH with induction of oxidative stress, this does not entirely reflect the etiological background of human NASH such as obesity and insulin resistance. Alternative dietary models for NASH include high fat diet, which develops obesity and insulin resistance but not remarkable steatohepatitis as seen in MCD diet model.<sup>(33)</sup> Interestingly, recent study has reported that feeding rats with choline-deficient fat-rich diet for 8 w lead to marked steatohepatitis.<sup>(34)</sup>



**Fig. 4.** Influence of *Bach1*<sup>-/-</sup> ablation on hepatic fibrogenesis. (A) Liver sections from wild type (A and B) and *Bach1*<sup>-/-</sup> mice (C and D) fed either regular chow (left panels) or MCD diet (right panels) were processed for Azan-Mallory staining. (original magnification 200 $\times$ ). (B) Following 4 w of either regular chow or MCD diet, hepatic mRNA expressions of  $\alpha$ SMA were quantified ( $n = 5$ /each group) by quantitative real-time PCR. \* $p < 0.05$ , regular chow vs MCD diet. † $p < 0.05$ , wild type (open bar) vs *Bach1*<sup>-/-</sup> mice (closed bar).

In conclusion, *Bach1*<sup>-/-</sup> mice are resistant to the development of hepatic steatohepatitis with concomitant induction of HO-1 in MCD diet-induced NASH model. Reduced steatosis in *Bach1*<sup>-/-</sup> mice following MCD diet might be attributable to preserved expressions of PPAR $\alpha$  and MTP that play an important role in hepatic fatty acid oxidation and triglyceride secretion respectively. Hepatic levels of MDA, a biomarker of oxidative stress, as well as serum ALT, an indicator of liver injury were significantly decreased in *Bach1*<sup>-/-</sup> mice compared to wild type mice, suggesting anti-oxidative effect of HO-1 induction in the absence of *Bach1*. Since oxidative stress, the second hit in NASH pathogenesis causes impairment of cellular bioenergetics leading to further disruption of hepatic lipid metabolism, abatement of oxidative stress by *Bach1* inhibition might be one of therapeutic strategies for the treatment of NASH/NAFLD.

### Acknowledgment

This study was supported by a Grant-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan to S. Tazuma (Grant number: H20-Nanchi-Ippan-025).

### Abbreviations

HO	heme oxygenase
NASH	nonalcoholic steatohepatitis
MCD diet	methionine-choline deficient diet
PPAR $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
MDA	malondialdehyde
ALT	alanine aminotransferase
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
CO	carbon monoxide

CoPP cobalt protoporphyrin  
 Nrf2 NF-E2 related factor  
 MAREs Maf recognition elements

HE hematoxylin and eosin  
 ZnPP zinc protoporphyrin  
 $\alpha$ SMA alpha smooth muscle actin

## References

- Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; **49**: 306–317.
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; **43**: S99–S112.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; **114**: 842–845.
- Nan YM, Wu WJ, Fu N, and *et al.* Antioxidants vitamin E and l-aminobenzotriazole prevent experimental non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol* 2009; **15**: 1–11.
- Ramirez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, Mesa MD, Granados S, Gil A, Quiles JL. Curcumin ameliorates rabbits’ steatohepatitis via respiratory chain, oxidative stress, and TNF-alpha. *Free Radic Biol Med* 2009; **47**: 924–931.
- Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Albano E, Badger TM, Ronis MJ. N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr* 2008; **138**: 1872–1879.
- Hirose A, Ono M, Saibara T, and *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; **45**: 1375–1381.
- Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; **15**: 1667–1672.
- Dufour JF, Oneta CM, Gonvers JJ, and *et al.* Swiss Association for the Study of the Liver: Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin e in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; **4**: 1537–1543.
- Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; **98**: 2485–2490.
- Nakamoto K, Takayama F, Mankura M, and *et al.* Beneficial effects of fermented green tea extract in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Biochem Nutr* 2009; **44**: 239–246.
- Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H, and *et al.* Heme oxygenase-1 is an essential cytoprotective component in oxidative tissue injury induced by hemorrhagic shock. *J Clin Biochem Nutr* 2009; **44**: 28–40.
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, and *et al.* Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004; **336**: 241–250.
- Malaguarnera L, Madeddu R, Palio E, Arena N, Malaguarnera M. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Hepatol* 2005; **42**: 585–591.
- Liu LG, Yan H, Zhang W, and *et al.* Induction of heme oxygenase-1 in human hepatocytes to protect them from ethanol-induced cytotoxicity. *Biomed Environ Sci* 2004; **17**: 315–326.
- Yao P, Li K, Song F, and *et al.* Heme oxygenase-1 upregulated by Ginkgo biloba extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. *Food Chem Toxicol* 2007; **45**: 1333–1342.
- McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ. Curcumin induces heme oxygenase-1 in hepatocytes and is protective in simulated cold preservation and warm reperfusion injury. *Transplantation* 2006; **81**: 623–626.
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, and *et al.* Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 2002; **21**: 5216–5224.
- Iida A, Inagaki K, Miyazaki A, Yonemori F, Ito E, Igarashi K. Bach1 deficiency ameliorates hepatic injury in a mouse model. *Tohoku J Exp Med* 2009; **217**: 223–229.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; **37**: 911–917.
- Yano Y, Ozono R, Oishi Y, and *et al.* Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. *Genes Cells* 2006; **11**: 791–803.
- Yoshida T, Kikuchi G. Reaction of the microsomal heme oxygenase with cobaltic protoporphyrin IX, and extremely poor substrate. *J Biol Chem* 1978; **253**: 8479–8482.
- Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K. Deletion of angiotensin II type 1 receptor reduces hepatic steatosis. *J Hepatol* 2009; **50**: 1226–1235.
- Hintze KJ, Katoh Y, Igarashi K, Theil EC. Bach1 repression of ferritin and thioredoxin reductase1 is heme-sensitive in cells and *in vitro* and coordinates expression with heme oxygenase1, beta-globin, and NADP(H) quinone (oxido) reductase1. *J Biol Chem* 2007; **282**: 34365–34371.
- Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 2006; **39**: 479–491.
- Wang F, Duan ZJ, Sun YJ. Influence of heme oxygenase-1 expression on immune liver fibrosis induced by cobalt protoporphyrin in rats. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 3009–3014.
- Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, and *et al.* Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg* 2007; **245**: 931–942.
- de Lima VM, de Oliveira CP, Sawada LY, and *et al.* Yo jyo hen shi ko, a novel Chinese herbal, prevents nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice fed a high fat or methionine-choline-deficient diet. *Liver Int* 2007; **27**: 227–234.
- Stefano JT, de Oliveira CP, Corrêa-Giannella ML, and *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in ob/ob mice treated with yo jyo hen shi ko (YHK): effects on peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 3448–3454.
- Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, and *et al.* High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function *in vivo*. *Biochem J* 2009; **417**: 183–193.
- Hensley K, Kotake Y, Sang H, and *et al.* Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H(2)O(2) generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 983–989.
- Li L, Grenard P, Nhieu JT, and *et al.* Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* 2003; **125**: 460–469.
- Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; **81**: 243–248.
- Takayama F, Egashira T, Kawasaki H, and *et al.* A novel animal model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH): hypoxemia enhances the development of NASH. *J Clin Biochem Nutr* 2009; **45**: 335–340.



&lt;原 著&gt;

## Lysophosphatidylcholine によるヒト胆管上皮癌細胞株での アポトーシス誘導機構

大年 加純<sup>1)</sup> 藤田 啓子<sup>2)</sup> 埜越 崇範<sup>2)</sup> 木村 康浩<sup>2)</sup> 木平 健治<sup>2)</sup>  
 岸川 暢介<sup>3)</sup> 松田 聡介<sup>3)</sup> 生田 卓也<sup>3)</sup> 菅野 啓司<sup>3)</sup> 田妻 進<sup>3)</sup>

要旨：脂質メディエーターとして注目される lysophosphatidylcholine (LPC) は、様々な細胞に対しアポトーシスを誘導することが報告されている。一方、胆道癌を高率に合併する膵胆管合流異常症や肝内結石症において、胆汁中 LPC 濃度が高いことが報告されている。今回我々は、胆管上皮癌細胞株 HuCCT-1 を用い LPC の影響について検討を行った。LPC は HuCCT-1 のアポトーシスを誘導し細胞障害作用を認めた。形態学的な検討でも、LPC の添加でアポトーシスに特異的な変化を認めた。さらに、アポトーシス伝達経路において Fas 受容体の発現上昇と caspase-3, 8, 9 の有意な活性化を認めた。LPC 関連受容体である G 蛋白共役型受容体 G2A の発現が LPC の添加で有意に誘導され、その関与が推測された。以上より、胆汁中 LPC の上昇は胆管上皮障害に関与し、発癌機構に関与している可能性が考えられた。

索引用語： lysophosphatidylcholine phospholipase A<sub>2</sub> 膵胆管合流異常 アポトーシス G2A (G protein-coupled receptor 132)

### 序 論

肝内結石症や原発性硬化性胆管炎などの胆汁うっ滞性肝疾患や膵胆管合流異常症において、胆管癌・胆嚢癌併発のリスクが高い<sup>1)~3)</sup>。この胆道癌の発生メカニズムとして、胆汁中への膵由来の phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) 逆流や、胆管局所の慢性炎症が発癌に寄与しているものと推測されている。膵胆管合流異常症においては、患者胆汁および膵液そのものは変異原性を示さないが、胆汁と膵液を混和し変異原性を解析すると 60% 以上が変異原性陽性であったと報告されている<sup>4)</sup>。胆管上皮細胞は常に胆汁に暴露されているため、これらの胆汁組成の変化が胆管上皮障害や発癌に大きく寄与しているものと推測される<sup>5)</sup>。

リン脂質は細胞膜の主要構成成分であると共に、胆汁中にも豊富に存在する。リン脂質の中でも大部分を

占める phosphatidylcholine (PC) は、PLA<sub>2</sub>により sn-2 の脂肪酸エステル結合が加水分解され、リゾリン脂質である lysophosphatidylcholine (LPC) と遊離脂肪酸が生成される(図 1)。LPC は物理化学的に界面活性作用を有しているばかりでなく、様々な生理活性を持っていることが解明されつつあり、血管拡張阻害作用を有しアテローム性疾患に関与していることや<sup>6)7)</sup>、種々の細胞に対しアポトーシス誘導作用<sup>7)~10)</sup>を示すことが報告されている。これらの LPC の脂質メディエーターとしての生理活性に G 蛋白共役型受容体 G2A (G protein-coupled receptor 132) が関与しているとの報告があり<sup>10)11)</sup>、LPC は G2A 受容体のリガンドとしては機能しないものの<sup>12)~15)</sup>、G2A 受容体の発現を誘導し、アポトーシスと密接に関連していることが報告されている<sup>10)11)</sup>。

本研究では、胆汁中の主要構成成分である PC を基質として PLA<sub>2</sub>により生成される LPC の胆管上皮細胞に与える影響について検討する目的で、胆管上皮癌細胞株 HuCCT-1 に LPC を添加し細胞障害性やアポトーシス誘導とそのメカニズム、さらに G2A 受容体の関与について解析を行った。

<sup>1)</sup> 広島大学医歯薬学総合研究科

<sup>2)</sup> 広島大学病院薬剤部

<sup>3)</sup> 広島大学病院総合内科・総合診療科

受付日：平成 23 年 2 月 24 日

採用日：平成 23 年 4 月 26 日



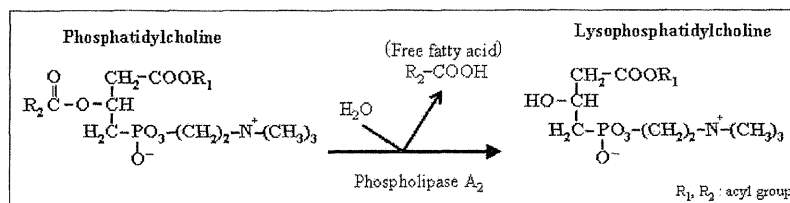


図1 Lysophosphatidylcholine (LPC) の生成経路

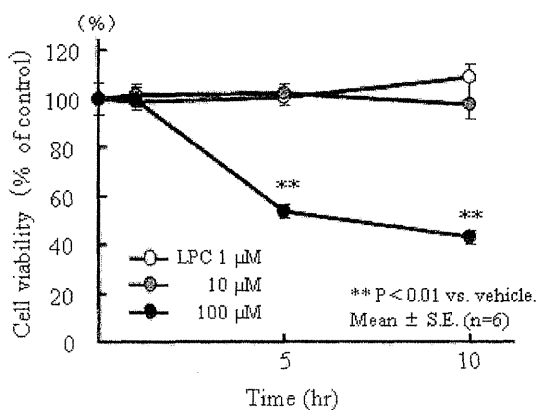


図2 LPCによる細胞障害作用

## 実験方法

### 1. 細胞培養

肝内胆管癌由来の細胞株 HuCCT-1 (Health Science Research Resources Bank, Japan) を用い、10% fetal bovine serum, 1% HEPES, 1% penicillin, 1% streptomycin (Gibco), を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した<sup>12)13)</sup>. 薬物添加は 70~80% の pre-confluent な状態で行った.

### 2. 薬物調製

LPC (Sigma-Aldrich Co) は ethanol を溶媒として 10 mM 溶液を作成し、適宜細胞培養液を用いて濃度調製を行った. なお、添加時における溶媒の ethanol 最終濃度は 2.0% 以下になるように調製した.

### 3. 検討項目

①細胞障害作用: 細胞増殖アッセイキット (Tetra-Color ONE, Seikagaku Biobusiness Co, Japan) を用いて評価した. LPC 1, 10, 100μM の各濃度で 1, 5, 10 時間曝露し、波長 450nm の吸光度を測定した.

②アポトーシス: LPC によるアポトーシス誘導作用

は MEBCYTOR<sup>®</sup> Apoptosis Kit (Medical and Biological Laboratories Co, Japan) を用い、FITC 標識 Annexin V と PI で 2 重染色した細胞をフローサイトメトリーにより検出した. アポトーシス細胞の形態学的変化は、DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 色素 (Roche) で染色後に共焦点レーザー顕微鏡 (励起: 360nm, 蛍光: 460nm) で観察した.

③アポトーシスシグナル伝達経路: Caspase-3, 8, 9 活性は APOPCYTO caspase-3, 8, 9 colorimetric Assay Kit (Medical and Biological Laboratories Co, Japan) を用い、波長 405nm で pNA の吸光度を測定することにより caspase 活性を求めた.

④アポトーシス関連分子の発現は real-time PCR (Fas, G2A) と western blot 法 (G2A) により検討した. real-time PCR は、Genbank のデータベースの塩基配列をもとに、primer3 version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) にてプライマーを作成し (FAS F: caagggttggaattgagga, R: tggaagaaaatggcctttg, G2A F: ctctctccatcatcgccctc, R: gctttgacgaggagaccag), LightCycler 1.5 system (Roche) を用いて行った. western blot では、rabbit anti-human GPR132 polyclonal antibody (ProteinTech Group, Inc, IL, USA) を一次抗体として使用した.

### 4. 統計解析

測定値は平均値 ± 標準誤差で表した. 統計学的な検討は Dunnett test により行い、p < 0.05 を有意差有りとした.

## 結 果

### 1. LPC による細胞障害作用

HuCCT-1 細胞に対する LPC の細胞障害作用を検討した (方法①). LPC 100μM 添加後 1 時間では細胞障害作用は認められなかったが、5, 10 時間経過すると細胞障害が認められた. 一方、LPC 1, 10μM の低濃度添加群は細胞障害作用を示さなかった (図 2).

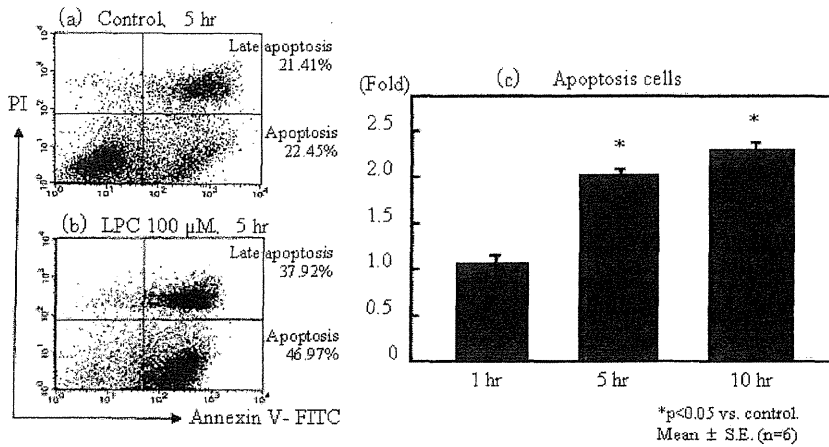


図3 LPCによるアポトーシス誘導作用

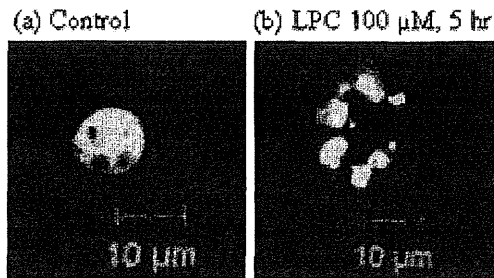


図4 LPC曝露による核の形態学的変化

2. LPC誘導性アポトーシス

HuCCT-1細胞に対するLPCの細胞障害において、アポトーシス誘導が関与しているかを検討した(方法②)。LPC 100μMを5, 10時間曝露したところ、図3a, bのサイトグラムで右下カラムに示されるアポトーシス細胞数が増加した。これを定量したところ2倍以上に有意に増加していた(図3c)。DAPI染色にて形態学的変化を検討したところ、LPC 100μM, 5時間曝露によってアポトーシス細胞に特徴的な核の断片化が観察された(図4)。

3. アポトーシスシグナル伝達経路

デスレプターであるFas受容体のmRNA発現量をreal-time PCRで検討したところ、LPC 100μM, 1および5時間曝露で約7倍まで上昇した(図5)。Caspase活性の検討(方法③)では、LPC 100μMで5時間曝露することにより、caspase-3, 8, 9(図6a-c)が有意に活性化された。一方、低濃度LPC(10, 50μM)では、caspase-3, 8, 9は活性化されずLPC誘導細胞障害の結

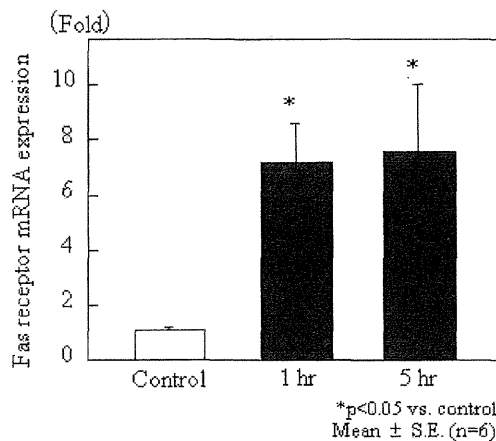


図5 LPCによるFas受容体の発現誘導

果と一致していた。

4. LPC誘導性アポトーシス関連受容体G2Aの検討

LPC誘導性アポトーシスに関与するG2A受容体の発現についてreal-time PCRおよびwestern blot法にて検討した。LPC 100μM, 1および5時間の曝露でG2A受容体mRNAの発現は約5倍に著増した。これは、G2A高発現臓器である脾臓やBリンパ腫細胞株RajiにおけるG2A受容体mRNA発現量と同程度であった(図7a)。蛋白レベルにおいてもLPC濃度依存的に発現量の増加を認めた(図7b)。

考 察

本研究において、LPCはHuCC-T1細胞に対しアポトーシスを誘導し、細胞障害を引き起こすことが証明され

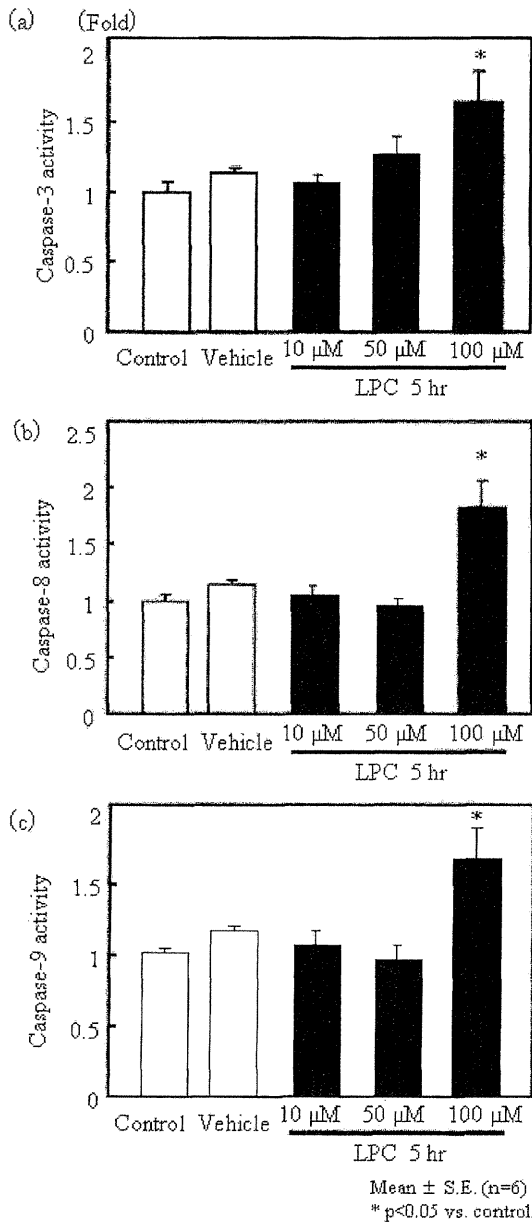


図6 LPCによるcaspase-3 (a), 8 (b), 9 (c) 活性

た。アポトーシスシグナル伝達経路の検討では、デスレセプターである Fas 受容体の発現誘導と caspase-8 の活性化を認めると共に、ミトコンドリア依存性 caspase-9 の活性化を認め、デスレセプターを介した経路とミトコンドリアを介した経路の両者がアポトーシス実行因子 caspase-3 を活性化し、アポトーシスが実行されてい

るものと考えられた。

LPC は物理化学的に界面活性作用を示すのに加え、最近では脂質メディエーターとして生体内で機能していることが解明されつつある。正常ヒト乳腺上皮細胞に対し、高濃度 LPC ( $\geq 100\mu\text{M}$ ) はアポトーシスを惹起し、低濃度 LPC ( $\leq 20\mu\text{M}$ ) はアポトーシスシグナルに関与する分子の mRNA 発現を誘導することが報告されている<sup>14)</sup>。さらに、ラット膵細胞やヒト臍帯静脈内細胞において caspase-3 を介して<sup>8)15)</sup>、ラット海馬細胞においてはデスレセプターを介して caspase-3, 8 を活性化させ<sup>10)</sup>、アポトーシスを誘導させることが報告されている。これらの報告はいずれも *in vitro* の解析であり、生体内における病態生理での LPC の役割については更なる検討が必要と思われるが、全身に普遍的に存在する PC を基質として PLA<sub>2</sub> により産生される LPC が脂質メディエーターとして機能することを裏付ける点で重要である。

血液、腹水における LPC 濃度は、アルブミンやその他の蛋白質と結合して存在するものも含め 10-150 $\mu\text{M}$  とされているが<sup>16)</sup>、正常の胆汁中には微量しか存在しないといわれている<sup>17)</sup>。一方、サンプル数は少ないものの、総胆管結石症、膵胆管合流異常症、肝内結石症において胆汁中 LPC 濃度の上昇を認めており、特に、胆管合流異常患者における LPC 濃度は対照群の約 10 倍まで上昇しているという報告がある<sup>18)</sup>。さらに、肝内結石症患者の胆汁を用いた詳細な検討では、胆石側胆管胆汁での LPC が非胆石側胆管胆汁に比較して有意に高く、この変化は炎症性 PLA<sub>2</sub> として知られる sPLA<sub>2</sub>-IIA の胆汁中の濃度とほぼ相関していた<sup>19)</sup>。胆汁中には PLA<sub>2</sub> の基質となるリン脂質が豊富に存在することから、膵胆管合流異常症では膵由来の sPLA<sub>2</sub>-IB が、肝内結石症においては炎症性 sPLA<sub>2</sub>-IIA が LPC 産生に寄与し、胆道癌の高リスク疾患として認知される両疾患の胆管細胞障害を惹起していることが想定される。

胆汁中にはリン脂質やコレステロールなどの脂質成分に加え、各種胆汁酸を高濃度に含有している<sup>9)</sup>。このため、胆汁中の胆汁酸組成の変化が LPC 誘導アポトーシスを修飾する可能性が考えられる。当研究室におけるマウス不死化胆管上皮細胞株を用いた検討において、疎水性胆汁酸である GCDC は酸化ストレスの産生を介して細胞障害をきたす一方で、TUDC は細胞保護的に働くことを認めた。一方で、肝細胞株を用いた検討で、疎水性胆汁酸の中でも CDCA は核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) の活性化を介してアポトーシスを抑

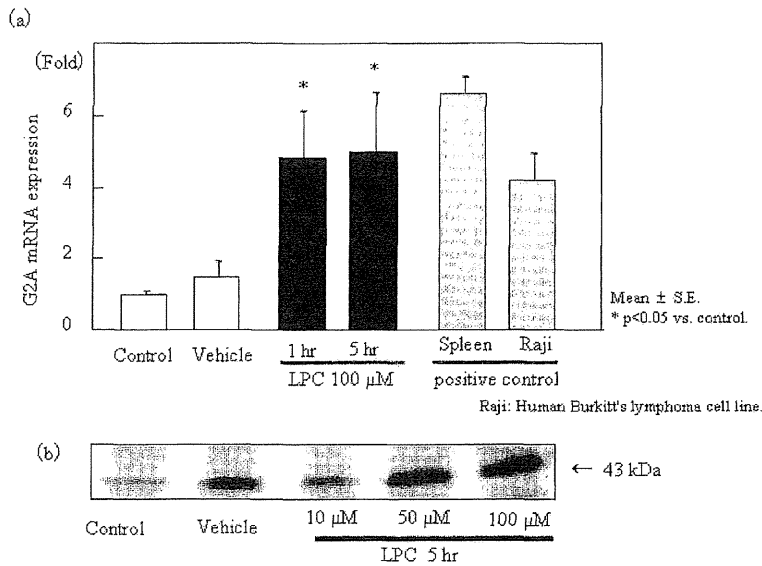


図7 LPCによるG2A受容体の発現変動

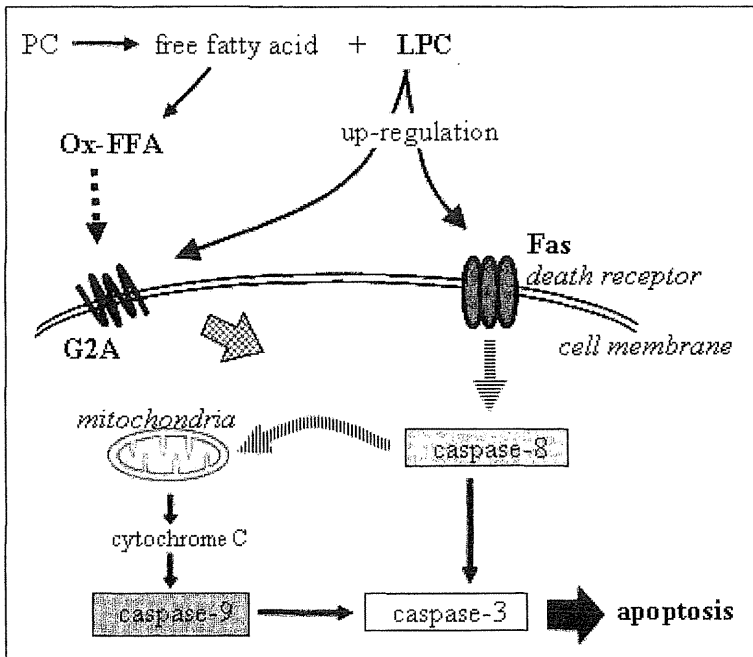


図8 HuCCT-1細胞におけるLPC誘導性アポトーシスシグナル伝達経路(仮説)

胆汁中に豊富に存在するPCはPLA2により加水分解され、LPCと遊離脂肪酸が生成される。遊離脂肪酸は酸化され酸化遊離脂肪酸(Ox-FFA)としてG2Aのリガンドとして機能する。一方、LPCはG2A受容体の発現を上昇させ、G2Aシグナルトランスダクションの増幅に寄与し、アポトーシス誘導に寄与する。

制したとの報告もある<sup>22)</sup>。胆管上皮細胞は、常に胆汁に暴露された特殊な環境下で生理機能を発揮していることを考慮すると、LPC とその他の胆汁成分と相互作用の検討が重要と思われる。

G2A 受容体は末梢リンパ球において細胞増殖を制御する G 蛋白共役型受容体として初めて単離同定され<sup>23)</sup>、当初 LPC がそのリガンドとして考えられていた<sup>24)</sup>。その後、酸化脂肪酸が G2A 受容体に対し強いリガンド活性を持ち、LPC 自体は G2A 受容体のリガンドとしては作用しないことが報告された<sup>25)</sup>。一方で、LPC は G2A 受容体の発現を誘導し、アポトーシスを誘導することが他の細胞種で報告されている<sup>10)11)</sup>。また、Hela 細胞に G2A を強制発現することでアポトーシスが誘導され、さらに LPC を添加することでアポトーシスが増強されたという報告もある<sup>26)</sup>。本研究においても、LPC 添加により G2A 受容体の発現は転写および蛋白レベルで有意な上昇を認めた。以上の結果から、胆管上皮細胞の LPC 誘導アポトーシスにおける G2A 受容体の役割について、図 8 の仮説が推論される。すなわち、胆汁中 PC は局所の炎症または膵液由来の PLA<sub>2</sub> により加水分解され、LPC と遊離脂肪酸が生成される。遊離脂肪酸は局所の炎症などに起因する酸化ストレスにより酸化遊離脂肪酸 (Ox-FFA) となり G2A のリガンドとして機能する。一方 LPC は、本研究の結果で G2A 受容体の発現を誘導したことから、リガンドに対する感受性を増幅することにより間接的にアポトーシスに関与していることが推測される。胆道疾患における G2A の役割については、現時点でほとんど知見を認めないものの、切除肝組織から単離した胆管上皮細胞における G2A の蛋白発現を western blot で検討したところ、原疾患により発現に顕著な差を認めた(データ供覧なし)。今後、G2A 受容体の下流シグナルの解析とともに、各種胆道疾患における G2A の発現量とパターンについて知見の集積が望まれる。

#### おわりに

本研究により、LPC は胆管上皮細胞に対しアポトーシスを主体とする細胞障害性をもつことが証明され、胆道癌の発症に関与している可能性が示唆された。これまで我々は、胆汁組成成分の中で各種胆道疾患の病態生理を理解する上で、胆汁組成の変化が重要であることを証明してきた<sup>20)21)</sup>。本研究もそれを支持する結果であり、胆道疾患における臨床的な胆汁サンプルの網羅的な解析が重要であると考えられる。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり御協力を戴いた広島大学病院薬剤部 永田圭耶氏、齋藤美希氏、広島大学病院総合内科・総合診療科 中島美香氏に感謝致します。なお、本研究は第 46 回日本胆道学会(広島)において発表をした。

#### 文 献

- 1) 田中 篤, 坪内博仁, 滝川 一. 本邦の原発性硬化性胆管炎患者における胆管癌の頻度—全国調査の結果から—。胆道 2009 ; 23 : 421
- 2) Nakanuma Y, Terada T, Tanaka Y, et al. Are hepatolithiasis and cholangiocarcinoma aetiologically related? A morphological study of 12 cases of hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 406: 45—58
- 3) Ohta T, Nagakawa T, Konishi I, et al. Clinical experience of intrahepatic cholangiocarcinoma associated with hepatolithiasis. *Jpn J Surg* 1988; 18: 47—53
- 4) 高尾尊身, 新地洋之, 前村公成, ほか. 膵胆管合流異常と発癌の関係の今. *外科治療* 2006 ; 94 : 823—829
- 5) Hay DW, Carey MC. Pathophysiology and pathogenesis of cholesterol gallstone formation. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 159—170
- 6) Schmitz G, Ruebsaamen K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2009; 208: 10—18
- 7) Takahashi M, Okazaki H, Ogata Y, et al. Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 2002; 161: 387—394
- 8) Masamune A, Sakai Y, Satoh A, et al. Lysophosphatidylcholine Induces Apoptosis in AR42J Cells. *Pancreas* 2001; 22: 75—83
- 9) Han MS, Park SY, Shinzawa K, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res* 2008; 49: 84—97
- 10) Sun Y, Lee JH, Kim NH, et al. Lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in H19-7 hippocampal progenitor cells is enhanced by the upregulation of Fas Ligand. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 61—68
- 11) Yang LV, Radu CG, Wang L, et al. Gi-independent macrophage chemotaxis to lysophosphatidylcholine via the immunoregulatory GPCR G2A.

- Blood 2005; 105: 1127—1134
- 12) Miyagiwa M, Ichida T, Tokiwa T, et al. A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25: 503—510
  - 13) Kobuke T, Tazuma S, Hyogo H, et al. A ligand for proliferator-activated receptor gamma inhibits human cholangiocarcinoma cell growth; potential molecular targeting strategy for cholangioma. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1650—1657
  - 14) Samadi N, Gaetano C, Goping IS, et al. Autotaxin protects MCF-7 breast cancer and MDA-MB-435 melanoma cells against Taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 2009; 28: 1028—1039
  - 15) Matsubara M, Yao K, Hasegawa K. Benidipine, a dihydropyridine-calcium channel blocker, inhibits lysophosphatidylcholine-induced endothelial injury via stimulation of nitric oxide release. *Pharmacol Res* 2006; 53: 35—43
  - 16) Croset M, Brossard N, Polette A, et al. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J* 2000; 345 (Pt 1): 61—67
  - 17) Shimada K, Yanagisawa J, Nakayama F. Increased lysophosphatidylcholine and pancreatic enzyme content in bile of patients with anomalous pancreaticobiliary ductal junction. *Hepatology* 1991; 13: 438—444
  - 18) 伊藤正樹. 総胆管結石, 膵胆管合流異常, 肝内結石, 胆管癌における胆汁中リプレシチンの検討. *胆道* 1993 ; 7 : 491—498
  - 19) Shoda J, Kano M, Asano T, et al. Secretory low-molecular-weight phospholipases A2 and their specific receptor in bile ducts of patients with intrahepatic calculi: factors of chronic proliferative cholangitis. *Hepatology* 1999; 29: 1026—1036
  - 20) Komichi D, Tazuma S, Nishioka T, et al. Unique Inhibition of Salt-Induced Apoptosis by Lecithins and Cytoprotective Bile Salts in Immortalized Mouse Cholangiocytes. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2315—2322
  - 21) Komichi D, Tazuma S, Nishioka T, et al. Glycchenodeoxycholate plays a carcinogenic role in immortalized mouse cholangiocyte via oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1418—1427
  - 22) Wang YD, Yang F, Chen WD, et al. Farnesoid X receptor protects liver cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and fasting in vivo. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 1622—1632
  - 23) Weng Z, Fluckiger AC, Nisitani S, et al. A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 12334—12339
  - 24) Kabarowski JH, Zhu K, Le LQ, et al. Lysophosphatidylcholine as a Ligand for the Immunoregulatory Receptor G2A. *Science* 2001; 293: 702—705.
  - 25) Obinata H, Hattori T, Nakane S, et al. Identification of 9-Hydroxyoctadecadienoic Acid and Other Oxidized Free Fatty Acids as Ligands of the G Protein coupled Receptor G2A. *J Biol Chem* 2005; 280: 40676—40683
  - 26) Lin P, Ye RD. The lysophospholipid receptor G2A activates a specific combination of G proteins and promotes apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 14379—14386

## Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human bile duct carcinoma cell HuCCT-1

Kasumi Ohtoshi<sup>1)</sup>, Keiko Fujita<sup>2)</sup>, Takanori Taogoshi<sup>2)</sup>, Yasuhiro Kimura<sup>2)</sup>,  
Kenji Kihira<sup>2)</sup>, Nobusuke Kishikawa<sup>3)</sup>, Sousuke Matuda<sup>3)</sup>, Takuya Ikuta<sup>3)</sup>,  
Keishi Kanno<sup>3)</sup>, Susumu Tazuma<sup>3)</sup>

Lysophosphatidylcholine (LPC), recently recognized as a lipid mediator, has been reported to induce apoptosis in several different cells, and to be increased in the bile of patients with anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct and intrahepatic cholelithiasis, both of which are well-known risk factors for biliary tract cancers. Since biliary epithelial cells (BECs) are exposed to bile, an increase in biliary LPC concentration is suggested to be involved in BECs injury and carcinogenesis. This study aimed to examine the biological effects of LPC on BECs and its underlying mechanism using human bile duct carcinoma cell line HuCCT-1. LPC at 100 $\mu$ M concentration induced significant cytotoxicity and apoptosis in HuCCT-1 in time-dependent manner as determined by MTT assay and Annexin V-FITC/PI staining flow cytometric analysis. Fluorescent microscopic analysis of LPC-treated cells stained with DAPI also depicted the typical morphological changes seen in apoptotic cells such as the condensed chromatin gathering. These changes were paralleled with the significant activation of caspase 3, 8, and 9, as well as up-regulation of Fas receptor mRNA. Interestingly, LPC induced the expression of LPC-related receptor G2A at mRNA and protein levels. These data suggests that LPC plays an important role in BECs injury and carcinogenesis.

*JJBA* 2011; 25: 637—644

<sup>1)</sup> Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University (Hiroshima)

<sup>2)</sup> Department of Pharmaceutical Service, Hiroshima University Hospital (Hiroshima)

<sup>3)</sup> Department of General Internal Medicine, Hiroshima University Hospital (Hiroshima)

**Key Words:** lysophosphatidylcholine, phospholipase A<sub>2</sub>, anomalous arrangement of the pancreaticobiliary ducts, apoptosis, G2A (G protein-coupled receptor 132)



# 胆石症治療方針の概要

Summary of treatment strategy for gallstone disease

正田 純一\*  
Junichi Shoda

●要旨●近年のわが国では、人口の高齢化や食生活の欧米化などにより、成人の胆石保有率は増加傾向にある。さらに腹部超音波法が人間ドックや集団健診において導入され、無症状胆石が発見される機会が多くなってきている。胆嚢結石症の治療法は、開腹の胆嚢摘出術より飛躍的に進歩を遂げており、胆嚢温存療法として経口溶解療法ならびに体外衝撃波碎石療法、さらに、腹腔鏡下胆嚢摘出術までその選択肢が広がっている。胆嚢結石症の治療の選択にあたっては、患者の社会的背景、胆石に関する情報とその評価、患者の希望などの点を考慮し、同時に無症状胆石の転帰、胆嚢存在の生理的意義ならびに胆石症の胆嚢温存療法の適応と限界を理解し、安易に腹腔鏡下胆嚢摘出術を選択するべきではない。

● key words : 胆石症, 治療方針, 自然史, 合併症, 診療ガイドライン

## はじめに

近年のわが国では、人口の高齢化や食生活の欧米化などにより成人の胆石保有率は増加し、さらに、腹部超音波法が人間ドックや集団健診、あるいは一般外来におけるスクリーニング検査に導入されたことより、胆石が発見される機会が多くなってきている。このように発見された胆石の大部分は無症候性胆石である。胆石は肉眼的にコレステロール胆石と色素石(ピリルビンカルシウム石・黒色石)、その他に大別される。日本人の胆石症の頻度・種類は欧米並となり、胆嚢結石ではコレステロール胆石が60%程度を占めるようになり、また若年者を中心に黒色石が急増している。一方、胆石症と胆嚢癌の関連性については以前より何度となく繰り返し議論がなされてきた。無症候性胆石の自然史(転帰)、胆石の保有と胆嚢癌の発生に関するエビデンスを十分に理解し、無症候性胆石を含む胆石症への日常臨床における対応手順について検討することは重要である。本稿では、胆石症の自然史、合併症としての胆嚢癌、胆石症に対する非観血的治療(胆

嚢温存療法)の対応手順について解説する。

## 胆石症の自然史

胆石症の自然史に関しては、『胆石症診療ガイドライン』<sup>1)</sup>におけるクリニカルクエストンにおいて掲載されている。すなわち、胆嚢結石症患者の転帰は、無治療にて追跡調査をしていくと、追跡調査前の1年間に胆道疝痛を経験した有症状患者では、調査前に胆道疝痛を経験しなかった無症状患者に比較して、より高頻度に症状が出現する<sup>2)3)</sup>。有症状患者がその後重篤な症状を呈して手術を受ける確率は経年的に減少すると報告されている<sup>4)5)</sup>。

無症候性胆石の転帰に関するエビデンスについて代表的な論文<sup>2)4)6)~9)</sup>を表1<sup>10)</sup>に示す。無症候性胆石の転帰について、重症合併症(急性胆嚢炎、急性胆管炎、高度黄疸、膵炎など)の発生頻度は数%である<sup>5)</sup>。しかし、無症候性胆石における合併症の発生頻度は、糖尿病などの背景疾患の有無、地理的あるいは人種的に差異を生じている<sup>3)11)12)</sup>。合併症の発生は、男性よりも女性に<sup>4)</sup>、やせた患者よりも肥満した患者に多い<sup>4)13)</sup>。無症候性胆石の有症状化率は最初の1~3年がもっとも高く、経過観察期間が長期にわたるほど合併症の発生頻度は低下してくる<sup>4)5)</sup>。また、観察期間

\* 筑波大学・医学医療系・スポーツ医学、筑波大学附属病院消化器内科教授

表1 無症候性胆石の転帰に関するエビデンス

報告者 (年度)	対象	症例数	観察期間 (年)	急性胆嚢炎	重篤な合併症 (%)			
					顕著な黄疸	胆管炎	肺炎	胆嚢癌
Comfort <sup>6)</sup> (1948)	無症状胆石	112	15	0	0	0	0	0
Lund <sup>7)</sup> (1960)	無症状胆石	95	13	?	1	0	0	0
Gracie <sup>8)</sup> (1982)	無症状胆石	123	11	2	0	0	1	0
McSherry <sup>9)</sup> (1985)	無症状胆石	135	5	3	0	0	0	0
Friedman <sup>4)</sup> (1989)	無症状胆石	123	7	4	2	2	0	0
Thistle <sup>2)</sup> (1984)	無症状胆石 有症状胆石	305	2	3	0	0	0	0

[文献10)より引用・一部改変]

中に胆嚢癌の発生を認めた症例はなかったと報告されている<sup>4)</sup>。

無症候性胆石に対する対応手順として推奨されるのは、原則的に、内科的・外科的な介入により得られる利益は乏しく、無治療にて経過観察を行う<sup>2)~5)9)14)</sup>。以上より、胆嚢結石の自然史は、そのごく少数例(年間1~3%)に重篤な症状、あるいは合併症を発症する。合併症のうちもっとも頻度の高いものは急性胆嚢炎である。

## 合併症

### 1. 急性胆嚢炎

胆嚢結石に伴う急性胆嚢炎は、胆石が胆嚢管に嵌頓して閉塞をきたすことによって発生する。胆嚢内胆汁のうっ滞が生じ、胆嚢粘膜の傷害とそれに引き続き炎症性メディエーターの活性化が引き起こされる。

対応手順として、『科学的根拠に基づく急性胆管炎・胆嚢炎の診療ガイドライン』<sup>15)</sup>に従い、急性胆嚢炎の場合は原則として胆嚢摘出術を前提とした初期治療(全身状態の改善と感染症治療)を行う。

### 2. 胆嚢癌

#### 1) 疫学

以前より胆石症と胆嚢癌には関連性が指摘されてきたことより、日常臨床において無症候性胆石は経過観察でよいかどうか、方針に迷う場面は少なからず存在する。胆嚢癌は他の癌腫と比較して発生数が少ないこ

とより、その疫学研究はあまり進んでおらず、要因の解明も不十分である。胆石症と胆嚢癌との関連性について、海外より報告された疫学研究の meta-analysis の解析結果と、本邦で行われた大規模住民集団の追跡研究である「多目的コホート研究」の検討結果を紹介する。

Randiら<sup>16)</sup>は胆嚢癌の危険因子に関する meta-analysis の結果を報告している。胆石症から発症する胆嚢癌に関する randomized control trial (RCT) は存在せず、cohort study や case-control study が存在するのみである。3つの cohort study<sup>17)~19)</sup>と7つの case-control study<sup>20)~26)</sup>より meta-analysis がなされている(表2)<sup>27)</sup>。meta-analysis の結果より、主要な危険因子には、胆石症、良性胆嚢疾患の既往歴(主に胆石症)、良性胆嚢疾患の家族歴、肥満、多産婦、胆嚢の慢性感染症(チフス菌、パラチフス菌、ヘリコバクター属)が含まれている。meta-analysis の結果を総括すると、胆嚢癌の発生に至る経路は広範囲にわたるが、主たる経路は胆石形成とその結果生じる胆嚢炎であるとしている。さらに本発癌経路は男性よりは女性において作用すると考えられている。

本邦における胆道癌の疫学調査では、国立がんセンター(現、国立がん研究センター)が施行した日本人の大規模住民集団の前向き追跡研究である「多目的コホート研究(Japan Public Health Center-Based Prospective Study)」における報告が利用できる<sup>28)</sup>。JPHC Study の中では、胆道癌のリスク要因を、胆石症の既往歴と肥満指数(BMI)に焦点を当てて解析

表2 胆嚢胆石症と胆嚢癌発症の関連性に関するエビデンス

報告者 (年)	研究デザイン	対象と症例数	追跡または 調査期間	発癌の相対危険度 (95% CI)
Maringhini <sup>17)</sup> (1987)	cohort study	胆嚢結石2,583例	20年間	2.8 (0.9-6.6) 男性 8.3 (1.0-30.0) 女性 2.0 (0.4-5.7)
Chow <sup>18)</sup> (1999)	cohort study	胆嚢結石温存17,715例 胆摘後42,461例 合計60,176例	4~16年間	3.6 (2.6-4.9)
Yagyu <sup>19)</sup> (2004)	cohort study	胆嚢結石113,394例	11年間	男性 1.2 (0.3-4.7) 女性 1.1 (0.4-2.9)
Lowenfels <sup>20)</sup> (1985)	case-control study	胆嚢癌131例, 非胆嚢癌2,399例	6~20年間	non-Indians 4.4 (2.6-7.3) Indians 20.9 (8.1-54.0)
Nervi <sup>21)</sup> (1988)	case-control study	14,768例の剖検例	9年間	7.0 (5.9-8.3)
WHO <sup>22)</sup> (1989)	case-control study	胆嚢癌58例, 非胆嚢癌355例	7年間	2.3 (1.2-4.4)
Kato <sup>23)</sup> (1989)	case-control study	胆嚢癌109例, 胆管癌84例 対照386例	4年間	34.4 (4.5-266.0)
Zatonski <sup>24)</sup> (1997)	case-control study	胆嚢癌196例, 非胆嚢癌1,515例	5年間	4.4 (2.6-7.5)
Okamoto <sup>25)</sup> (1999)	case-control study	胆嚢結石7,985例, 対照194,767例	7年間	10.8 (4.1-28.4)
Khan <sup>26)</sup> (1999)	case-control study	胆道癌69例, 対照138例	14年間	26.6 (7.0-101.4) 女性 28.9 (4.7-173.0)

[文献27)より引用・一部改変]

している。すなわち、研究開始時に施行した身長、体重、既往歴、喫煙や飲酒、食生活、運動などの生活習慣についてのアンケート調査の結果を用いて、胆石の既往の有無によるグループ分けを行い、胆嚢癌の発生リスクとの関連性を調べている。今回の解析結果より、胆石の既往のあるグループでは、既往のないグループに比較して、胆嚢癌のリスクが3.1倍であった。男女別にも、男性も女性のどちらも関連がみられた。本研究の成果により、胆石の既往が胆道癌のリスクとなることが確認されている。

## 2) 対応手順

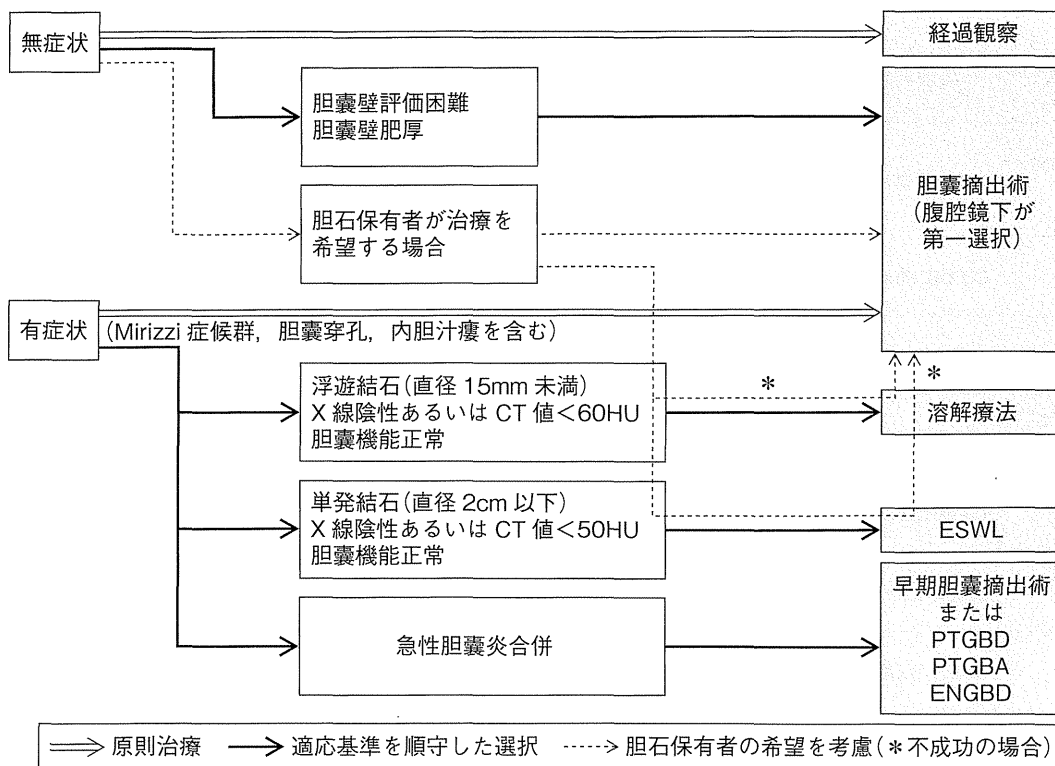
胆嚢癌の疫学、無症候性胆石の転帰に関するエビデンスレベルの高い臨床研究を参照しながら、『胆道癌診療ガイドライン』<sup>29)</sup>と『胆石診療ガイドライン』<sup>1)</sup>の2つの診療ガイドラインにおいて、無症候性胆石における胆嚢癌発症の対応手順が示されている。いずれのガイドラインにおいても、無症候性胆石に対して胆嚢摘出術を勧める根拠は不十分であるとして、胆嚢癌発症に対応するための予防的胆嚢摘出術は推奨されない。無症候性胆石は十分に胆嚢を評価できる状況下で

は肝機能障害の発生、胆嚢癌合併の可能性を考慮した検査をしながら経過観察することが推奨されている。

無症候性胆石の胆嚢癌の発生頻度はきわめて低いこと、また、decision analysis modelを用いた検討<sup>30)</sup>において、無症候性胆石に対する予防的な胆嚢摘出術を施行することは胆嚢癌による死亡を含めたうえで生命予後の改善は認められていないことより、現在のところ、外科的介入による胆嚢癌の予防効果は得られないと結論されている。

## 胆嚢存在の生理的意義

胆嚢は胆汁を貯留し、胆汁を濃縮する機能を有している臓器である。胆嚢において、肝胆汁中の電解質と水の約90%が吸収され、胆嚢胆汁は肝胆汁の5~10倍に濃縮される。胆汁中の胆汁酸はコレステロールおよびリン脂質と混合ミセルを形成することで小腸における食事性脂質の消化吸収に必須である。胆嚢摘出により十分な濃縮された胆汁が排泄されない状況に陥り、胆汁酸の空腸内濃度が混合ミセルを形成するのに



〔文献1〕より許諾を得て転載〕

図1 胆嚢結石症治療のフローチャート

必要な臨界ミセル濃度には達せず、脂肪の消化吸収が円滑に行えなくなる状況になる。

胆嚢摘出術施行患者の消化器症状出現(腹部膨満感、胸やけ、便秘、下痢)の病態は、胆嚢のリザーバー機能の喪失による胆汁酸の腸肝循環の増加に起因すると考えられている。腸肝循環の増加に伴い、腸管内で産生される二次胆汁酸の比率が増加することで胆汁酸プールの疎水性強度が上昇し、胆嚢摘出後に生じる胆汁の胃・十二指腸への逆流が生じた際には胆汁により胃粘膜が刺激されることで、術後消化器症状の惹起を促進する。

## 治療の適応

胆嚢結石症の治療法は、従来からの開腹の胆嚢摘出術より飛躍的に進歩を遂げており、胆嚢温存療法として経口溶解療法ならびに体外衝撃波碎石療法、さらに最近の腹腔鏡下胆嚢摘出術までその選択肢が幅広くなっている。胆嚢結石症の治療の選択にあたっては、患者の社会的背景、胆石に関する情報(胆石の局在、症状の有無、合併症の有無)とその評価、患者の希望などの点を考慮し、同時に無症候性胆石の転帰、胆嚢存在の生理的意義ならびに胆石症の胆嚢温存療法

の適応と限界を理解し、安易に腹腔鏡下胆嚢摘出術を選択すべきではない。図1に『胆石症診療ガイドライン』<sup>1)</sup>における胆嚢結石のマネジメントを示す。

### 1. 無症候性胆石

前述したように、無症候性胆石の転帰としては、無症状に経過する例が多いこと、胆嚢癌の合併が少ないこと、有症状化した場合でも手術成績は良好であることなどから、基本的には経過観察でよいと考えられる<sup>7)8)</sup>。胆嚢壁が十分評価できる無症候性胆石例では、経過観察を年に1~2回行うことである。注意すべき点は、充満胆石例で胆嚢壁の評価が十分にできないもの、糖尿病合併例、高齢者で胆嚢壁の肥厚や変形を認めるものは胆嚢摘出術を考慮する。さらに膵胆管合流異常症、陶器様胆嚢、大胆石(3cm以上)あるいは石灰化胆汁などの合併症例は、胆嚢癌のハイリスクグループであることより、胆嚢摘出術の適応となる。また、無症候性胆石における胆石溶解薬の使用に関する有効性はいまだ証明されていない<sup>11)</sup>。

### 2. 有症状胆石

胆石による疼痛は可及的にかつ速やかに除去することが肝要である。疼痛発作時には対症薬物療法を施行

する。また、痙攣発作を反復する場合には胆嚢温存療法または胆嚢摘出術の根治治療を施行する。

胆嚢温存療法には、胆汁酸製薬を用いた経口胆石溶解療法と結石を物理的に細かく破碎して消失させる体外衝撃波破碎療法 (ESWL) がある。ESWL については、欧米にて再発率が高率であることや、費用対効果の面より腹腔鏡下胆嚢摘出術に比して劣ることよりその適応は慎重になっている。

### 3. 有合併症胆石

種々合併症 (急性胆嚢炎, 急性膵炎, 胆嚢癌など) を有する胆石症では予後が不良となる場合があることより、原則的に合併症の治療と同時に胆嚢摘出術を考慮する。

急性胆嚢炎 (詳細は他項を参照) の合併に際しては、発症初期ではまず保存的治療 (絶食, 補液, 鎮痛薬, 抗菌薬) を開始するが, 24~48時間経過しても症状や炎症所見の改善がない場合には早期手術の適応となる。合併症や高齢のために手術が施行できない症例に対しては経皮経肝胆嚢ドレナージを行い, 鎮痛薬, 抗菌薬の投与を行う。抗菌薬の選択にあたっては, 起炎菌としてグラム陰性桿菌を目標に広域スペクトラムで胆汁移行性のよいものを選択する。

注意点は, 薬物療法の適応症例は有症状胆石および有合併症胆石である。開始のタイミングは, 胆石に関する情報 (胆石の局在, 症状の有無, 合併症の有無) とその評価, 患者の希望などの点を考慮して判断する。

#### 文 献

- 1) 日本消化器病学会編: 胆石症診療ガイドライン, 南江堂, 東京, 2009.
- 2) Thistle, J. L., Cleary, P. A., Lachin, J. M., Tyor, M. P. and Hersh, T.: The natural history of cholelithiasis: The National Cooperative Gallstone Study. *Ann. Intern. Med.*, 101: 171~175, 1984.
- 3) Del Favero, G., Caroli, A., Meggiato, T., Volpi, A., Scalon, P., Puglisi, A. and Di Mario, F.: Natural history of gallstones in non-insulin-dependent diabetes mellitus: A prospective 5-year follow-up. *Dig. Dis. Sci.*, 39: 1704~1707, 1994.
- 4) Friedman, G. D., Raviola, C. A. and Fireman, B.: Prognosis of gallstones with mild or no symptoms: 25 years of follow-up in a health maintenance organization. *J. Clin. Epidemiol.*, 42: 127~136, 1989.
- 5) Friedman, G. D.: Natural history of asymptomatic and symptomatic gallstones. *Am. J. Surg.*, 165: 399~404, 1993.
- 6) Comfort, M. W., Gray, H. K. and Wilson, J. M.: The

silent gallstone: A ten to twenty year follow-up study of 112 cases. *Ann. Surg.*, 128: 931~937, 1948.

- 7) Lund, J.: Surgical indications in cholelithiasis: Prophylactic cholecystectomy elucidated on the basis of long-term follow up on 526 nonoperated cases. *Ann. Surg.*, 151: 153~161, 1960.
- 8) Gracie, W. A. and Ransohoff, D. F.: The natural history of silent gallstones: The innocent gallstone is not a myth. *N. Engl. J. Med.*, 302: 798~800, 1982.
- 9) McSherry, C. K., Ferstenberg, H., Calhoun, W. F., Lahman, E. and Virshup, M.: The natural history of diagnosed gallstone disease in symptomatic and asymptomatic patients. *Ann. Surg.*, 202: 59~63, 1985.
- 10) 正田純一: 無症候性結石 (silent stone) は経過観察でよいとするエビデンスはあるのか? 胆石溶解剤を服用する意義はあるか? 跡見裕, 上村直実, 白鳥敬子, 正木尚彦編, 臨床に直結する肝・胆・膵疾患治療のエビデンス, 文光堂, 東京, 2007, p. 174~176.
- 11) Attili, A. F., De Santis, A., Capri, R., Repice, A. M. and Maselli, S.: The natural history of gallstones: The GREPCO experience. The GREPCO Group. *Hepatology*, 21: 655~660, 1995.
- 12) 杉浦信之, 阿部朝美, 税所宏光: 胆嚢結石症における胆嚢温存療法の意義. *胆道*, 18: 114~118, 2004.
- 13) Angelico, F., Del Ben, M., Barbato, A., Conti, R. and Urbinati, G.: Ten-year incidence and natural history of gallstone disease in a rural population of women in central Italy. The Rome Group for the Epidemiology and Prevention of Cholelithiasis (GREPCO). *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 29: 249~254, 1997.
- 14) Sakorafas, G. H., Milingos, D., Peros, G.: Asymptomatic cholelithiasis: Is cholecystectomy really needed? A critical reappraisal 15 years after the introduction of laparoscopic cholecystectomy. *Dig. Dis. Sci.*, 52: 1313~1325, 2007.
- 15) 急性胆道炎の診療ガイドライン作成出版委員会編: 科学的根拠に基づく急性胆管炎・胆嚢炎の診療ガイドライン, 医学図書出版, 東京, 2005.
- 16) Randi, G., Franceschi, S., Vecchia, C. L.: Gallbladder cancer world wide: Geographical distribution and risk factors. *Int. J. Cancer*, 118: 1591~1602, 2006.
- 17) Maringhini, A., Moreau, J. A., Melton, L. J. 3rd, Hench, V. S., Zinsmeister, A. R. and DiMagno, E. P.: Gallstones, gallbladder cancer, and other gastrointestinal malignancies: An epidemiologic study in Rochester, Minnesota. *Ann. Intern. Med.*, 107: 30~35, 1987.
- 18) Chow, W. H., Johansen, C., Gridley, G., Mellemejaer, L., Olsen, J. H. and Fraumeni, J. F. Jr.: Gallstones, cholecystectomy and risk of cancers of the liver, biliary tract and pancreas. *Br. J. Cancer*, 79: 640~644, 1999.
- 19) Yagyu, K., Lin, Y., Obata, Y., Kikuchi, S., Ishibashi, T., Kurosawa, M., Inaba, Y. and Tamakoshi, A.: JACC Study Group: Bowel movement frequency, medical history and the risk of gallbladder cancer death: A cohort study in Japan. *Cancer Sci.*, 95: 674~678, 2004.