

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592054

研究課題名（和文） 膵胆管合流異常の症状発現機序に基づく新治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new treatment for pancreaticobiliary maljunction based on the mechanism causing symptoms

研究代表者

金子 健一郎 (KANEKO KENITIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90335042

研究成果の概要：過去の研究により、膵胆管合流異常の症状は lithostathine 蛋白栓による膵胆管の閉塞により生じることが明らかとなった。本研究では、発症時に蛋白栓の閉塞を内視鏡的に解除する臨床応用と、蛋白栓を溶解する基礎実験を実施した。臨床応用は内視鏡的胆管ステントチューブ留置を10名に実施し、速やかな症状改善をみた。体外に出ない点で小児に有用であった。基礎実験で、蛋白栓は有機酸などの酸性および塩基性溶液に溶解することが判明した。有機酸の臨床応用が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患，膵胆管合流異常，先天性胆道拡張症，lithostathine，蛋白栓

1. 研究開始当初の背景

膵胆管合流異常は十二指腸壁外で膵管と胆管が合流して長い共通管を形成する先天奇形である。本奇形では膵管と胆管の合流部まで乳頭括約筋作用が及ばないため、膵液と胆汁が容易に逆流し、膵胆道系へ様々な障害を生じると推定されている。特に、本奇形には胆道癌が高頻度で合併し、成人消化器病分野では高い関心を集めている。一方、小児では膵胆管合流異常は先天性胆道拡張症に合併する奇形として認識され、この奇形による膵液・胆汁の交互逆流によって症状が生じると

考えられてきた。しかし、先天性胆道拡張症の腹痛・嘔吐・黄疸という症状は小児期のある時点で突然発症し、数日で軽快するが、繰り返す特徴をもつため、常時生じている膵液・胆汁の逆流現象のみでこの特徴を説明するのは困難である。われわれは多数の臨床例を検討し、膵胆管合流異常病態下では protein plug (タンパク栓) の形成が生じやすく、このタンパク栓が共通管に詰まることにより、胆管・膵管の内圧が上昇して症状を発現することを報告した (Am J Gastroenterol 1997;92:1018-21)。さらに、

平成 17-18 年度の科学研究費による研究により、このタンパク栓の形成機序の解明に成功した(Dig Dis Sci 2004;49:1953-6, Dig Dis Sci 2005 in press)。すなわち、膵胆管合流異常により、膵液が胆管へ逆流して、胆汁中で膵のタンパク分解酵素が活性化される。膵臓からは可溶性の lithostathine S2 が豊富に膵液中に分泌されており、これが胆汁中へ逆流する。拡張胆管内ないし胆嚢内でこの S2 に対してタンパク分解酵素が働いて S2 が分解され、不溶性の S1 が形成される。S1 は self-assembly して原線維 protofibril を形成し、これが線維を形成し、さらにこの線維が凝集することによりタンパク栓が形成される。

2. 研究の目的

本研究では、背景で述べたこれまでの研究成果をふまえて新しい治療法を確立することを目標とする。従来、膵胆管合流異常症例の症状発現時、特に高アマラーゼ血症が存在して膵炎が疑われるときには、内視鏡的胆道膵管造影(ERCP)を施行することは禁忌とされてきた。しかし、タンパク栓による閉塞機転により発症することより、むしろ発症時に内視鏡的にタンパク栓を除去すること(発症機序の最終段階での介入)により、症状の早期解除が可能であると予想される。この新しい治療法は、成人における胆石性急性膵炎で緊急内視鏡的胆石除去が保存的治療より良好な成績であることが randomized controlled trial で示された事実(Acosta JM ら Ann Surg 2006;243:33-40, Ayub K ら Cochrane Database Syst Rev 2004, Issue 3, CD003630)から、同様の効果が期待される。一方、症状発現時の基礎的観点からは、タンパク栓形成過程の各機序をそれぞれ阻害する方法があれば、症状を防止する保存的治療法の開発となる。特にタンパク栓形成の最終過程である lithostathine 線維の凝集を阻害する薬品がみつければ、内視鏡的治療での早期応用が期待できる。Lithostathine は、膵臓疾患のみならず、アルツハイマー病などの中樞神経変性疾患における病態にも関与し(Gregoire ら EMBO J 2001;20:3313-21 など)、その凝集予防薬が模索されている。既に、一部の薬品が lithostathine 線維を原線維に分解することが報告され(Laurine ら J Biol Chem 2003; 278:51770-8)、これら薬品の利用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 臨床例による内視鏡的治療法の開発

先天性胆道拡張症・膵胆管合流異常の症状を発症した患児に対し、その保護者に文書で

の同意を得た上で、発症後できるだけ早期に内視鏡的逆行性胆道膵管造影を行う。乳児から 5-6 歳までには細径十二指腸ファイバー(PJF-7.5, Olympus)を用いる。5-6 歳以上からは成人用十二指腸ビデオスコープが使用可能となる。造影にて、共通管、膵管、胆管内の陰影欠損を証明し、タンパク栓の存在証明をまず行う。一般的に陰影欠損は小児で 20%以下の頻度とされる(2004 年膵胆管合流異常研究会集計データ)が、これは症状時には造影が禁忌とされ、症状が消失してから造影するためタンパク栓が自然流出しているからと考えられる。今回の研究により症状時に造影を行うことで、さらなる陰影欠損率の上昇を実証する。共通管ないし胆管下部の狭小部にタンパク栓が充満している場合は、5Fr 5-7cm のステントチューブを留置して内視鏡的胆道ドレナージ(EBD)を行う。これにより、すみやかな症状消失が得られれば、タンパク栓により症状が発現するという学説がさらに裏付けできることとなる。留置された EBD チューブは胆管切除時に抜去する。

(2) 超深度デジタル実体マイクロスコープによるタンパク栓の観察と溶解実験

事前に文書で同意の得られた膵胆管合流異常患者から実際に採取されたタンパク栓を用いて、超深度デジタル実体マイクロスコープ(VH システム, 株式会社キーエンス)により、20 倍から 1000 倍まで拡大して観察を行う。合流異常の 2 患児(5,6 歳女児)の総胆管から得られた protein plug を対象とした。検体は赤外線吸光分析により蛋白であることを確認した。約 2mm 径の protein plug を選び、クエン酸、酒石酸、dimethadione、bromhexine 塩酸、クエン酸ナトリウム溶液、水酸化ナトリウム溶液にそれぞれ浸し、デジタルマイクロスコープ(VH-5910, キーエンス)で 100 倍に拡大して観察し、録画した。各種溶液は pH メーターで pH を測定した。

4. 研究成果

(1) 臨床例による内視鏡的治療法の開発

期間中に 30 名で内視鏡的膵管胆管造影が実施され、18 名(60%)で陰影欠損が確認された。これは一般的に報告される小児での頻度(20%以下)を大きく上回った。10 名で陰影欠損(蛋白栓)が、共通管に詰まっていると判断し、EBD チューブ 5Fr 5cm を留置を試みた。1 名は挿入困難で断念したが、9 名で実施できた。9 名とも速やかに臨床症状は改善された。また、チューブ留置が困難であった 1 例でも、内視鏡からの操作で、蛋白栓は破壊され、ほとんどが除去され、臨床症状も改善し

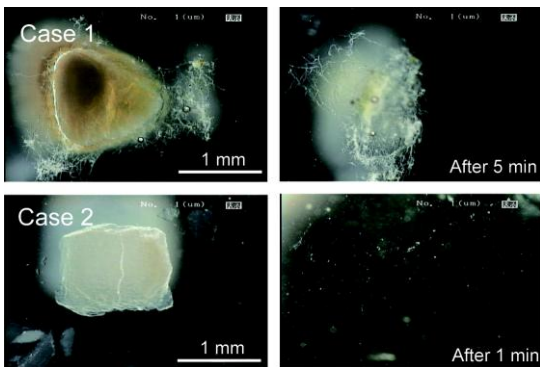
た。9名で留置されたチューブは手術中に8名で回収された。1名は手術までに逸脱していた。

【考察】この結果は、我々の蛋白栓による症状発現という学説を強く支持している。治療結果も満足のもの、特に小児において体の外にチューブがない点で、管理上有用性が高かった。本治療は、理論に基づく治療法という点でも独創性が高い。

(2) タンパク栓の溶解実験

蛋白栓はクエン酸(75mM, pH 1.97; 5.2mM, pH 2.64), 酒石酸(75mM, pH 1.91; 6.7mM, pH2.51), dimethadione(75mM, pH3.70), 塩酸(75mM, pH1.26; 7.5mM, pH 2.02; 0.5mM, pH3.13), 水酸化ナトリウム(75mM, pH12.75)溶液に溶解した。Dimethadione(7.5mM, pH4.31), bromhexine(0.1%, pH4.68), デヒドロコール酸(5%, pH 7.45), クエン酸ナトリウム(75mM, pH7.23)溶液には溶解しなかった。

クエン酸(75mM)による溶解



【考察】合流異常に合併する蛋白栓は酸性および塩基性溶液に溶解することが判明した。蛋白栓は lithostathine の四量体が縦方向に電氣的に結合する(片側に酸性アミノ酸残基 $-COO^-$ が、反対側に塩基性アミノ酸残基 $-NH_3^+$ が存在する)ことで形成されているので、酸・塩基はその作用を打ち消すことで溶解させると考えられる。すなわち、酸性溶液では酸性アミノ酸残基($-COO^-$)はその負電荷を失い($-COOH$)、塩基性溶液では塩基性アミノ酸残基($-NH_3^+$)がその陽電荷を失うことで結合力が消失して、溶解する。この作用は膵石の溶解作用とは明らかに異なる機序である。Lithostathine 蛋白栓の溶解について報告はなく、独創性の高い研究結果となった。

臨床応用としては胆管ドレナージチューブからの有機酸の投与が考えられる。溶解作用が強い点から、内視鏡的アプローチによる蛋白栓溶解も、安全性が確認されれば可能と思われる。残念ながら、今回の結果からは経口や経静脈でのこれらの薬品は、作用機序から考えて不可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計9件)

- ①. K. Kaneko, Y. Ono, T. Tainaka, W. Sumida, H. Ando. Acidic and basic solutions dissolve protein plugs made of lithostathine complicating choledochal cyst/pancreaticobiliary maljunction. Dig Dis Sci (in press) 2009 査読あり
- ②. W. Sumida, K. Kaneko, Y. Ono, T. Tainaka, H. Ando. Different polyunsaturated fatty acid profiles in patients with biliary atresia after successful Kasai operation and liver transplantation. Pediatr Surg Int (in press) 2009 査読あり
- ③. K. Kaneko, Y. Ono, T. Tainaka, W. Sumida, H. Ando. Fatty acid calcium stones in patients with pancreaticobiliary maljunction/choledochal cyst as another cause of obstructive symptoms besides protein plugs. J Pediatr Surg 43: 564-7, 2008 査読あり
- ④. T. Tainaka, K. Kaneko, S. Nakamura, Y. Ono, W. Sumida, H. Ando. Histological assessment of bile lake formation after hepatic portoenterostomy for biliary atresia. Pediatr Surg Int 24: 268-9, 2008 査読あり
- ⑤. Y. Ono, K. Kaneko, T. Tainaka, W. Sumida, H. Ando. Pancreaticobiliary maljunction without bile duct dilatation in children: Distinction from choledochal cyst. J Pediatr Gastroenterol Nutr 46: 555-60, 2008 査読あり
- ⑥. Y. Ono, Y. Ito, K. Kaneko, Y. Shibata-Watanabe, T. Tainaka, W. Sumida, T. Nakamura, H. Kamei, T. Kiuchi, H. Ando, H. Kimura. Simultaneous monitoring by real-time polymerase chain reaction of epstein-barr virus, human cytomegalovirus, and human herpesvirus-6 in juvenile and adult liver transplant recipients. Transplant Proc 40: 3578-82, 2008 査読あり
- ⑦. T. Tainaka, K. Kaneko, T. Seo, Y. Ono, W. Sumida, H. Ando. Intrahepatic cystic lesions after hepatic portoenterostomy for biliary atresia

with bile lake and dilated bile ducts.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 44:104-7,
2007 査読あり

- ⑧. W. Sumida, K. Kaneko, T. Tainaka, Y. Ono,
T. Kiuchi, H. Ando. Liver
transplantation for multiple liver
metastases from solid
pseudopapillary tumor of the pancreas.
J Pediatr Surg 42 (12): E27-31, 2007
査読あり
- ⑨. K. Kaneko, H. Ando, T. Seo, Y. Ono,
T. Tainaka, W. Sumida. Proteomic
analysis of protein plugs: causative
agent of symptoms in patients with
choledochal cyst. Dig Dis Sci 52:
1979-86, 2007 査読あり

[学会発表] (計6件)

- ① 金子健一郎, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互, 安藤久實. 膵胆管合流異常に合併する protein plug のピソルボンによる溶解, 第31回日本膵胆管胆道合流異常研究会, 2008/09/27, 京都
- ② 金子健一郎, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互, 安藤久實. 膵胆管合流異常に合併する脂肪酸カルシウム石: protein plug とは異なる閉塞原因について, 第31回日本膵胆管胆道合流異常研究会, 2008/09/27, 京都
- ③ 金子健一郎, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互. 先天性胆道拡張症・膵胆管合流異常に合併する protein plug の溶解実験. 第45回日本小児外科学会総会, 2008/05/31, 筑波
- ④ 金子健一郎, 澤井潤, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互, 安藤久實. 胆汁のプロテオーム解析からみた小児膵胆管合流異常の病態. 第108回日本外科学会総会, 2008/05/15, 長崎
- ⑤ 金子健一郎, 安藤久實, 瀬尾孝彦, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互. 膵・胆管合流異常に合併する protein plug のプロテオーム解析. 第30回日本膵胆管胆道合流異常研究会, 2007/09/22, 鹿児島
- ⑥ 金子健一郎, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互. 先天性胆道拡張症に合併する脂肪酸カルシウム石: 蛋白栓とは異なる閉塞原因について, 第44回日本小児外科学会総会, 2007/05/31, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 健一郎 (KANEKO KENITIRO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90335042

(2) 研究分担者

小野 靖之 (ONO YASUYUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10378193
田井中 貴久 (TAINAKA TAKAHISA)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助手
研究者番号: 30378195