

菌体成分刺激による培養肝内胆管上皮での ムチン産生の変化

金沢大学医学部第二病理

研究協力者 中沼 安二

共同研究者 全 陽, 片柳 和義,
原田 憲一

はじめに

ムチンは肝内結石、特にビリルビンカルシウム石の重要な構成成分であり、胆管上皮により分泌されるムチンの量的、質的変化が肝内結石症の発生、進展に深く関係する。ムチンはムチンコア蛋白（アポムチン）と多量の糖鎖から構成され、現在10種類のアポムチンが知られている¹⁾。これらアポムチンは臓器特異的、細胞特異的な発現を示し、胆道系では6種類（MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6）のアポムチンの発現が指摘されている²⁾。現在、各種の炎症性、腫瘍性疾患でのアポムチンの発現の変動が解明されつつあり、肝内結石症ではMUC2、MUC3、MUC5AC、MUC5B、MUC6の発現亢進が指摘されている^{3,4)}。特に、ゲル形成能を持った、粘性の高いMUC2、MUC5ACの発現亢進が、結石形成過程に重要と考えられている。また、従来より肝内結石症及び、各種胆道系結石症での結石形成に細菌感染が重要と推測されている⁵⁾。昨年の本会議で我々は、特に*Campylobacter*属の細菌感染が肝内結石症で高率であることを報告した⁶⁾。グラム陰性菌の壁構成成分であるリポポリサッカライド（LPS）や胆汁酸が胆管上皮に作用して、粘液産生亢進作用及び細胞増殖作用を呈することも報告されている^{7,8)}。今回我々は、結石形成過程における細菌感染の関与についてより詳細に理解するため、マウス培養胆管上皮を各種菌体成分及び胆汁酸で刺激

し、胆管上皮のムチンプロフィールにどのような変化が生じるのかを検討したので報告する。

方 法

1. マウス胆管上皮細胞の培養

野生型マウス（BALB/C）の8週齢老齢雌マウスの肝内末梢胆管上皮を片柳らの方法⁹⁾により単離、培養した。上記の過程により樹立した培養胆管細胞株から、 1×10^5 個の胆管上皮細胞をIA型コラーゲンで覆われたウェル上で、37°C、5% CO₂の条件下で2週間培養した。これらの細胞はゲル上で単層かつシート状に発育した。また、片柳らの方法より胆管上皮のコラーゲン内で3次元培養を行なった^{9,10)}。すなわち 1×10^6 個/cm³の胆管上皮細胞をIA型コラーゲンに混和、ウェル内に注入し37°C、5% CO₂の条件下で5日間培養した。これらの増殖細胞は3次元的に成長し、細胞極性を有する嚢胞を形成した。

2. 菌体成分及び胆汁酸による刺激

Lipopolysaccharide（以下LPS、from *Escherichia coli*, serotype O55 : B5, Sigma Chemical Co.）を100µg/mlの濃度で、Lipoteichoic acid（以下LTA、from *Streptococcus faecalis*, Sigma Chemical Co.）を50µg/mlの濃度で、またGlycochenodeoxycholic acid（以下GCDCA、Sigma Chemical Co.）を1 mMの濃度でそれぞれ培地内に混和し、胆管上皮細胞株

(単層培養および3次元培養)を37°C、5%CO₂の条件下で6時間(LPS、GCDCA刺激群のみ)、12時間、24時間、48時間培養した。なお、刺激物を添加しない群を対照とした。

3. 免疫組織学的検討

1) 組織切片の作製

肝内胆管細胞を培養した各ウェル内に10%中性緩衝ホルマリンを入れ2日間固定後、培養細胞を含んだコラーゲンゲルを剥離しパラフィン包埋ブロックを作成した。これらから3μm厚の切片を作成しルーチンの染色に加え以下の免疫染色に使用した。

2) 免疫染色

MUC1、MUC3の免疫染色をアビジン-ビオチン複合体(avidin-biotin complex、ABC)法で¹¹⁾、MUC5AC、Sialyl LewisXの免疫染色をEnvisionシステム(DAKO)で行った。なお、MUC1の免疫染色は、切片をマイクロウェーブ処理後に行った。1次抗体は、ヤギ抗マウスMUC1ポリクローナル抗体(sc-6828、100倍希釈、Santa Cruz Biotechnology Inc.、Santa Cruz、CA、USA)、ウサギ抗マウスMUC3モノクローナル抗体(MBEC1-4、20倍、当教室で樹立)、マウス抗ヒトMUC5ACモノクローナル抗体(マウスと交差性あり、200倍希釈)、マウス抗Sialyl LewisXモノクローナル抗体(KM-93、マウスと交差性あり、20倍)を用いた。

4. mRNAの検出

1) RT-PCR

刺激物を添加した培養細胞を6時間、12時間、24時間、48時間と経時的回収し、グアニジニウムチオサイネート-フェノール-クロロホルム法¹²⁾にてRNAの抽出を行った。RNA試料0.8μgにMgCl₂ 5 mM、dNTP 1 mM、RNase inhibitor 20単位、Oligo dTプライマー 0.125μM、添付RT緩衝溶液 2μl、逆転写酵素 5 単位(上記いずれも宝酒造、東京)を加え、さらにRNaseを失活化した滅菌蒸留水を加え全量を20μlとした。42°Cで60分間逆転写反応を行いcDNAを合成し、その後99°C、5分間で酵素を失活化させ、反応を停止させた。続いてMUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、TNF-α、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CFTRのPCRを以下の方法で行なった。cDNA溶液1μlに、dNTP 0.2mM、センスおよびアンチセンスプライマー(各1μM、表1)、添付PCR緩衝溶液、Taq DNAポリメラーゼ 1.25単位(宝酒造、東京)および滅菌蒸留水を加え全量を50μlに調整した。これをPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM、MODEL PC707(アステック株式会社、福岡)でPCR反応を行った。熱変性、アニーリング、DNA伸張を1サイクルとしてそれぞれのプライマーに対して表1に示すサイクル数でPCR反応を行なった。熱変性は94°C 1分間、

表1.

	センス/アンチセンス	シークエンス	アニーリング温度	サイクル数
MUC1	センス	ccccagttgtctgttggggtc	65°C	25
	アンチセンス	ggattctaccaccagagcc		
MUC2	センス	acgatgcctacaccaaggctc	60°C	45
	アンチセンス	tgatcttctgcatgttccca		
MUC3	センス	aaagtttgtcactggggc	64°C	40
	アンチセンス	ccaagtccatacaccagct...		
MUC5AC	センス	ggaccaagtgttgcactgac	50°C	35
	アンチセンス	cctcatagttgaggcacatcccag		
TNF-α	センス	ggcaggctacttggagtcattgc	60°C	30
	アンチセンス	acattcgaggctccagtgaattcgg		
CFTR	センス	gactctggacacttcgagcc	50°C	35
	アンチセンス	attctcatttgaaccagcg		
β-actin	センス	gctatgctctcctcagccat	60°C	25
	アンチセンス	acgcagctcagtaacagtcgcg		

アニーリングは表1の温度で1分間、DNA伸張は72°C 2分間で行なった。反応終了後、5 μlのPCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムにて染色後、紫外線下で可視化した。

2) 増幅PCR産物の半定量化

β-アクチン、MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、TNF-α及びCFTRに対応するPCR産物のバンド濃度をNIHイメージで数値化した。そしてハウスキーピング遺伝子であるβ-アクチンの発現量を内部対照とし、β-アクチンに対する比率でmRNA量の半定量化を行った。MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、TNF-αに関しては、それぞれの時間で、刺激群PCR産物半定量値の非刺激群に対する比率を計算し、その経時的变化を見た。CFTRに関しては菌体成分刺激群のみを対象とし、刺激後24時間でのmRNA発現量を評価した。なお、定量性を示す最適なPCRサイクル数は、PCR産物濃度のプロテイング曲線を作成し、サイクル数と濃度が直線性を示す範囲内で決定した。

結 果

1. 免疫組織学的検討

刺激群および、非刺激群いずれにおいてもMUC-1、MUC3、Sialyl LewisXの発現が見られたが、MUC5ACの発現は見られなかった (図1)。MUC1

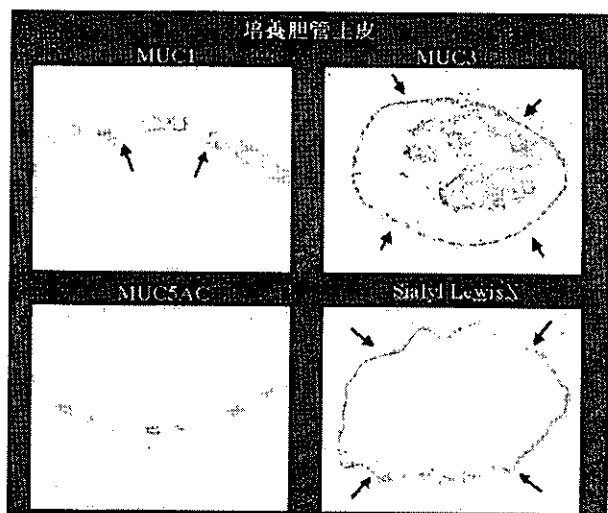


図1

は一部の胆管上皮の内腔側に沿って陽性となった。刺激群、非刺激群間にMUC1、MUC3、Sialyl LewisXの発現強度に差は見られなかった。

2. mRNAの検出

図2、3にRT-PCRの結果を示す。非刺激群、いずれの刺激群ともにMUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、TNF-α、CFTR mRNAが恒常的に発現していた。

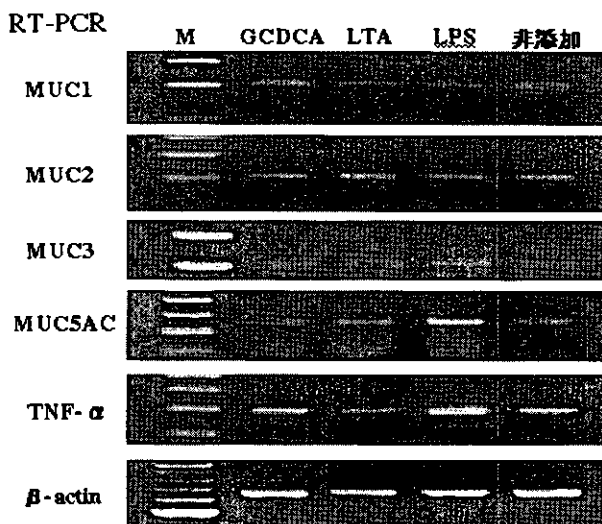


図2

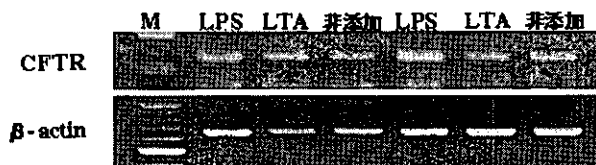


図3

1) ムチンコア蛋白mRNA

図4に菌体成分刺激によるMUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC mRNA発現量の経時的变化を非刺激群に対する比率として示した。菌体成分刺激によりMUC1 mRNA発現に有意な変化は見られなかった。MUC2ではLPS、LTA刺激群ともに刺激後より発現が亢進し、刺激後約24時間でピークとなった。ピーク時で、非刺激群に比べ、約1.8倍にまで発現が亢進した。MUC3もLPS、LTA刺激群ともに刺激後より発現が亢進したものの、ピーク時で非刺激群の1.3倍程度と亢進の程度がMUC2に比べると低かった。MUC5ACはMUC2とほぼ同様の推移を示

菌体成分刺激による培養肝内胆管上皮でのムチン産生の変化

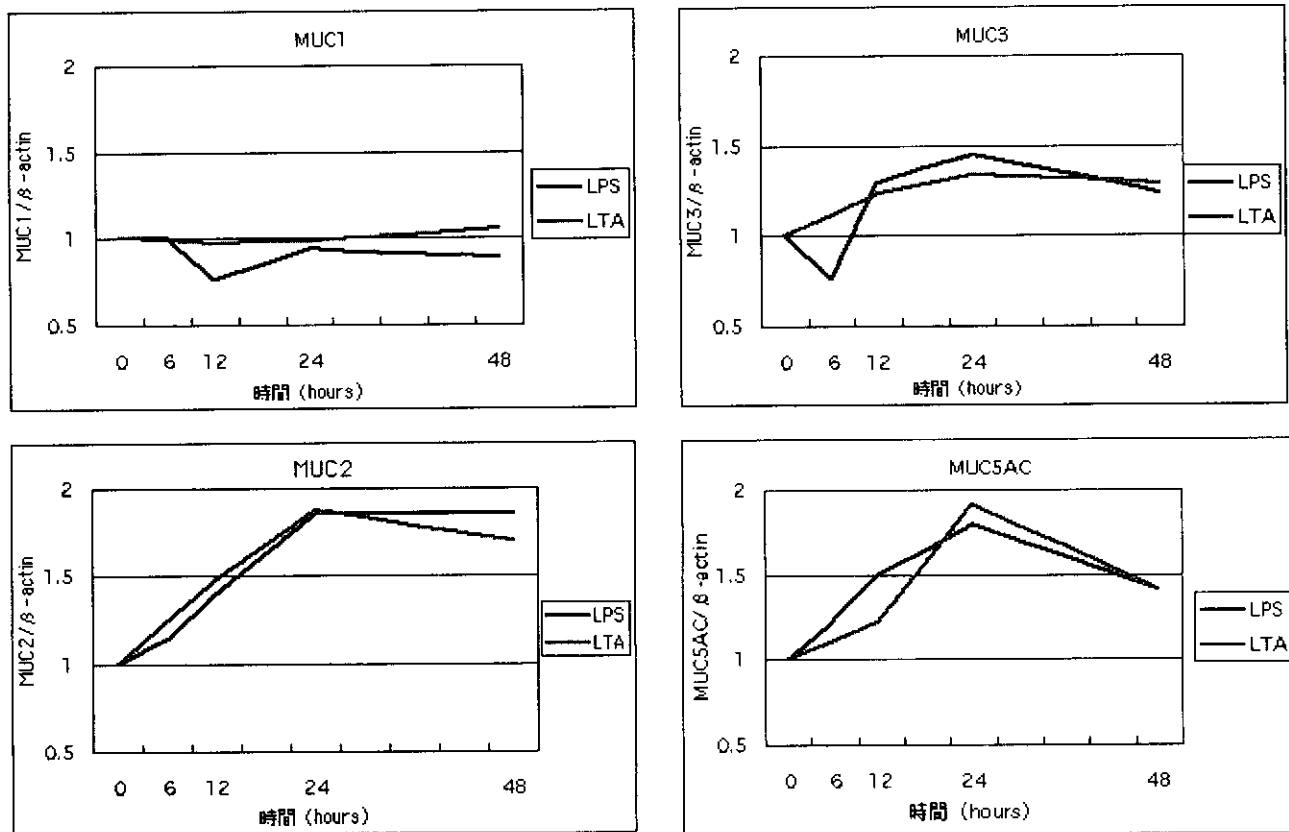


図 4

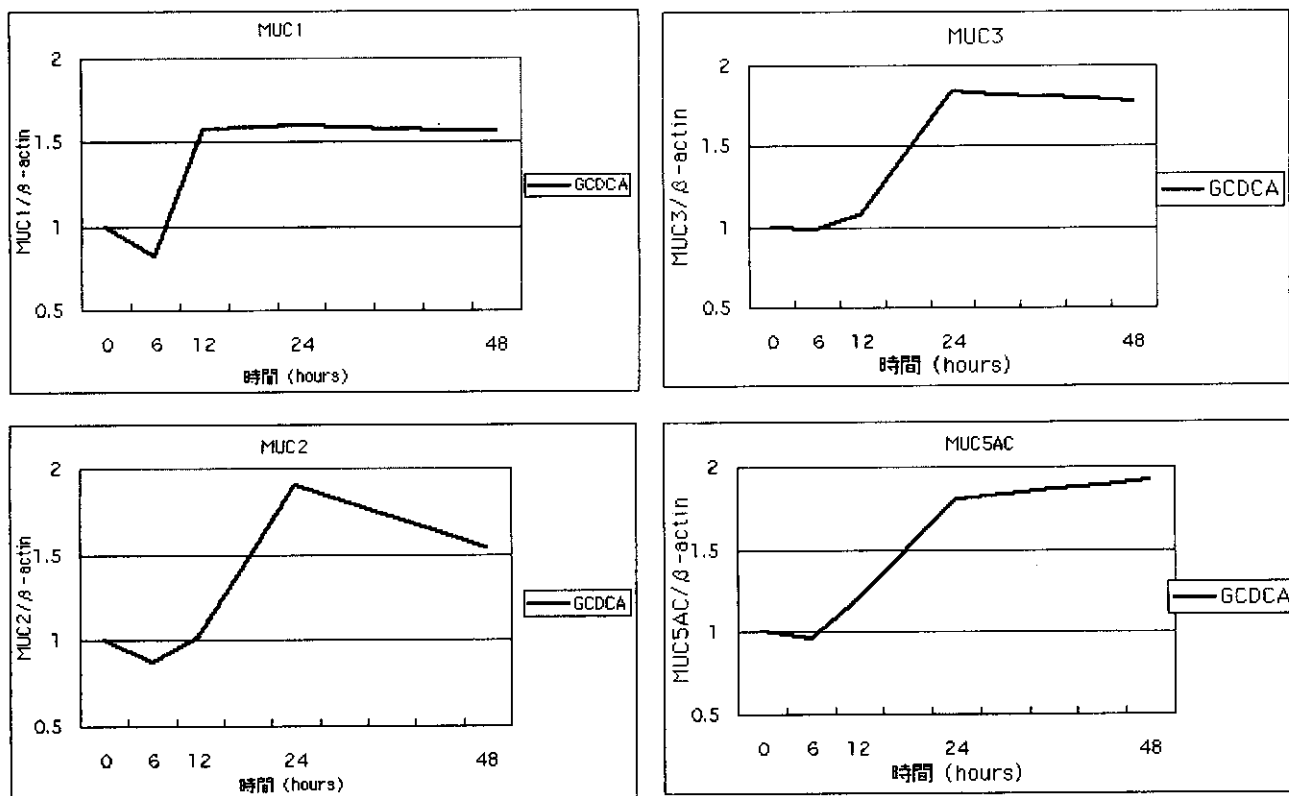


図 5

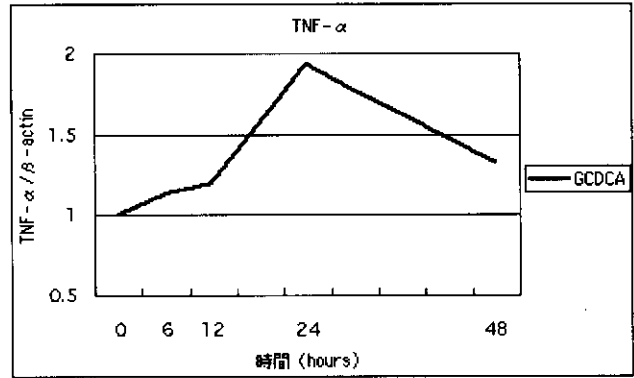
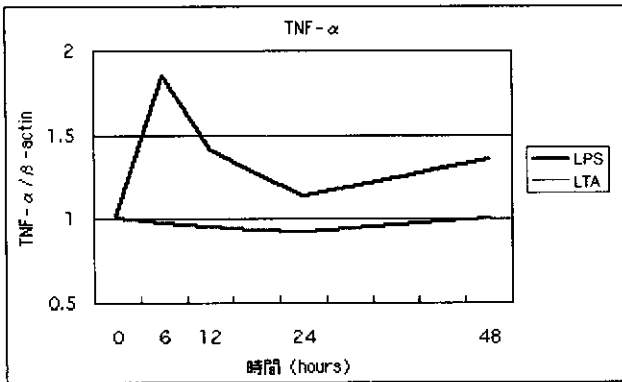


図 6

し刺激後24時間で非刺激群の約1.8倍にまで発現が亢進した。

図5にはGCDCA刺激によるMUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC mRNA発現量の経時的变化を示した。GCDCA刺激によりMUC1、MUC2、MUC3、MUC5ACいずれのmRNA発現も経時的に亢進した。ややMUC1の発現の亢進が早期から見られたものの、いずれの発現もほぼ同様の推移を示し、刺激後24時間でピークとなり、非刺激群に比べ約1.8倍程度に亢進した。

2) TNF-α mRNA

図6に菌体成分刺激および、GCDCA刺激によるTNF-α mRNAの発現の経時的变化を示した。菌体成分のうち、LPS刺激群では発現が亢進したが、LTA刺激群では発現の亢進は見られなかった。特にLPS刺激群では刺激直後より急激に発現が亢進し、刺激後6時間をピークとして一過性の発現亢進を示した。TNF-α mRNAの発現亢進はムチンコア蛋白mRNAの発現亢進に先立って見られた。GCDCA刺激群では、刺激後より次第に発現が亢進し、24時間でピークとなり、各種MUCの発現亢進パターンとほぼ同様の推移を示した。

3) CFTR mRNA

図7には刺激後24時間における菌体成分刺激群および、非刺激群でのCFTR mRNAの発現量を示した。LPS刺激群では非刺激群に比べてCFTR mRNAの発現の亢進が見られた。LTA刺激群では非刺激群とほぼ同程度の発現量だった。

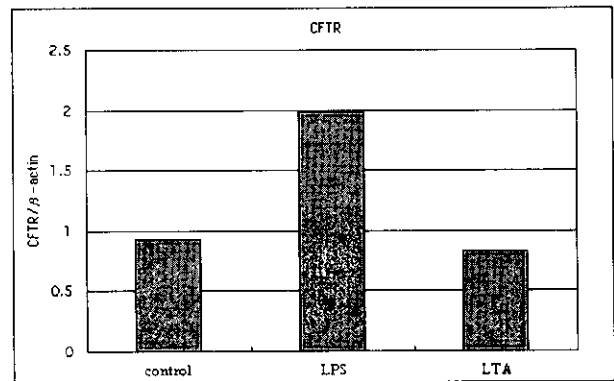


図 7

考 察

肝内結石症では肝内胆管上皮でのMUC2、MUC3、MUC5AC、MUC6の発現が亢進していることが知られている。このうち粘性が高いMUC2、MUC5ACの胆汁中濃度の上昇が胆道系結石形成に重要と考えられる。表2に従来報告されている免疫組織学的検討結果と今回の成績を示す。上段の肝内結石症(生体)の成績は、佐々木らが報告した成績である。肝内結石症ではMUC1、MUC2、MUC5AC陽性胆管上皮が増えているが、特にMUC2、MUC5AC陽性細胞が広汎に見られたとしている。Sialyl LewisXの発現亢進も指摘されている。表2の下段に今回の培養細胞でのこれら蛋白の発現結果を示す。MUC1は部分的に陽性、MUC3陽性、MUC5AC陰性、Sialyl LewisX陽性となった。いずれも、刺激群と非刺激群の間に明らかな差は見られなかった。表3にShodaらが報告した肝内結石症におけるムチンコア蛋白mRNAの変化^{3,4)}と、今回得られた各刺激群で

表 2.

	MUC				Sialyl LewisX
	1	2	3	5AC	
肝内結石症 (生 体)	↑	↑↑	→	↑↑	↑
L P S 刺激 (培 養)	→	ND	→	→	→
L T A 刺激 (培 養)	→	ND	→	→	→
GCDCA 刺激 (培 養)	→	ND	→	→	→

のムチンコア蛋白mRNAの変化を示す。菌体成分刺激群で見られたムチンコア蛋白mRNAの変化は肝内結石症で見られる変化と類似した。つまり、MUC-2、MUC3、MUC5ACの発現が亢進するが、特にゲル形成能の高いMUC2、MUC5ACの発現亢進が目立った。これは菌体成分が胆管上皮に作用し、ムチンコア蛋白の変化をきたすことで、結石形成に関与している可能性を示唆する。また、LPS刺激群ではムチンコア蛋白mRNAの発現亢進に先立ってTNF- α mRNAの発現も亢進していた。これはLPSが粘液産生亢進や、ムチンコア蛋白の変化だけでなく、TNF- α の細胞増殖作用を介して慢性増殖性胆管炎の病態形成に関与している可能性を示唆する。さらに、LPS刺激群ではCFTR mRNAの発現も亢進しており、肝内結石症で見られる変化により類似した変化を示した⁴⁾。

一方、GCDCA 刺激群では、検索したいずれのムチンコア蛋白mRNAも、非刺激群に比べ約1.8倍と

表 3.

	MUC				TNF- α	CFTR
	1	2	3	5AC		
肝内結石症 (生 体)	→	↑↑	↑	↑↑	ND	↑↑
L P S 刺激 (培 養)	→	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
L T A 刺激 (培 養)	→	↑↑	↑	↑↑	→	→
GCDCA 刺激 (培 養)	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	ND

高度に亢進した。これはGCDCAが胆管上皮での、ムチンコア蛋白の発現を亢進し、粘液産生を増加させることで、結石形成に関与している可能性を示唆する。また、いずれのムチンコア蛋白mRNAも同程度に亢進し、各ムチンコア蛋白の間で有意な差はなかった。これにより、GCDCA刺激により産生される粘液内の各種ムチンコア蛋白の割合に大きな変化は見られないと考えられる。また、GCDCA刺激群では、TNF- α mRNAの持続的な発現の亢進が見られた。持続的なTNF- α の作用により、GCDCAが、胆管上皮において粘液産生亢進や細胞増殖作用を示すと推測される。このことはGCDCAが慢性増殖性胆管炎の病態形成に関与している可能性を示唆する。

結 語

1. 菌体成分刺激により肝内結石症と類似したムチンコア蛋白mRNAの発現が見られた。しかし、蛋白の発現は明らかでなかった。
2. LPS刺激により、胆管上皮のCFTR mRNAの発現が亢進し、肝内結石症とより類似した変化が見られた。
3. 胆汁酸刺激により、MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、TNF- α mRNAの発現が亢進した。
4. 菌体成分であるLPS、LTAおよび胆汁酸であるGCDCAが胆管上皮に作用し、胆管上皮での粘液プロフィールの変化をきたし、結石形成に関与していると推測された。

文 献

- 1) Kim YS, *et al.*: Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconjugate J* 1996; **13**: 693-707.
- 2) Vandenhoute B, *et al.*: Mucin gene expression in biliary epithelial cells. *J Hepatol* 1997; **27**: 1057-1066.
- 3) Sasaki, *et al.*: Expression of apomucin in intrahepatic biliary tree in hepatolithiasis differs from that in normal liver and extrahepatic biliary obstruction. *Hepatology* 1998; **27**: 46-53.

- 4) Shoda, *et al.*: Secretory low-molecular-weight phospholipase A₂ and their specific receptor in bile ducts of patients with intrahepatic calculi: Factors of chronic proliferative cholangitis. *Hepatology* 1999; **29**: 1026-1036.
- 5) Swidsinski A, *et al.*: Molecular genetic evidence of bacterial colonization of cholesterol gallstone. *Gastroenterology* 1995; **108**: 860-864.
- 6) 中沼安二, 原田憲一: 肝内結石症における *Helicobacter* 属菌および近縁属菌の分子生物学的検討. 厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班平成10年度研究報告書.
- 7) Choi J, *et al.*: Lipopolysaccharide from *Escherichia Coli* stimulates mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells. *Hepatology* 1999; **29**: 1352-1357.
- 8) Klinkspoor JH, *et al.*: Bile salts stimulate mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells independent of their detergent effect. *Biochim. J.* 1998; **332**: 257-262.
- 9) Katayanagi K, *et al.*: Isolation, culture and characterization of biliary epithelial cells from different anatomical levels of the intrahepatic and extrahepatic biliary tree from a mouse. *Liver* 1998; **18**: 90-98.
- 10) Kawamura Y: Primary culture of rabbit gallbladder epithelial cells in collagen gel matrix. *Lab Invest* 1989; **61**: 350-356.
- 11) Hsu SM, *et al.*: Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; **29**: 1349-1353.
- 12) Chomczynski P, *et al.*: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156-159.

肝内結石症におけるヒアルロン酸の動向

弘前大学 第二外科

研究協力者 佐々木睦男

共同研究者 吉原 秀一, 石戸圭之輔,
松谷 英樹

はじめに

肝内結石症の病態の中で、粘液腺の増殖を伴う増殖性胆管炎は最も特徴的な所見として認識されている。またこの所見を裏付けるように肝内結石症の肝胆汁は粘稠であることがよく知られている。またこの増殖性胆管炎の増生している粘液腺の中には多量のムチンが含まれている。したがって、胆汁の粘稠度とムチンの増加は密接に関連していることが予想される。これまでに、われわれはこの胆汁中のムチン成分を調べる目的で胆汁より糖タンパク質を分離精製し、酸性糖タンパク質すなわち硫酸化糖タンパク質、シアル化糖タンパク質の増加を証明してき

た。今回、ムチンと同様に胆汁中で粘性を持つ物質としてグリコサミノグリカンについて注目した。その中でも、グリコサミノグリカンの一つであるヒアルロン酸は肝障害時には肝類洞での分解が障害され血清中で高値を取ることがすでに知られていて肝機能障害の指標として臨床応用されている。また、肝内結石症では進行すると高度の肝障害を伴うことが多くヒアルロン酸は高値をとることが予想される。そこで肝内結石症におけるグリコサミノグリカンの一つであるヒアルロン酸の動態を解明するために、肝内結石症肝胆汁中および肝内結石中のヒアルロン酸を測定し正常および他の胆道結石群と比較検討した。

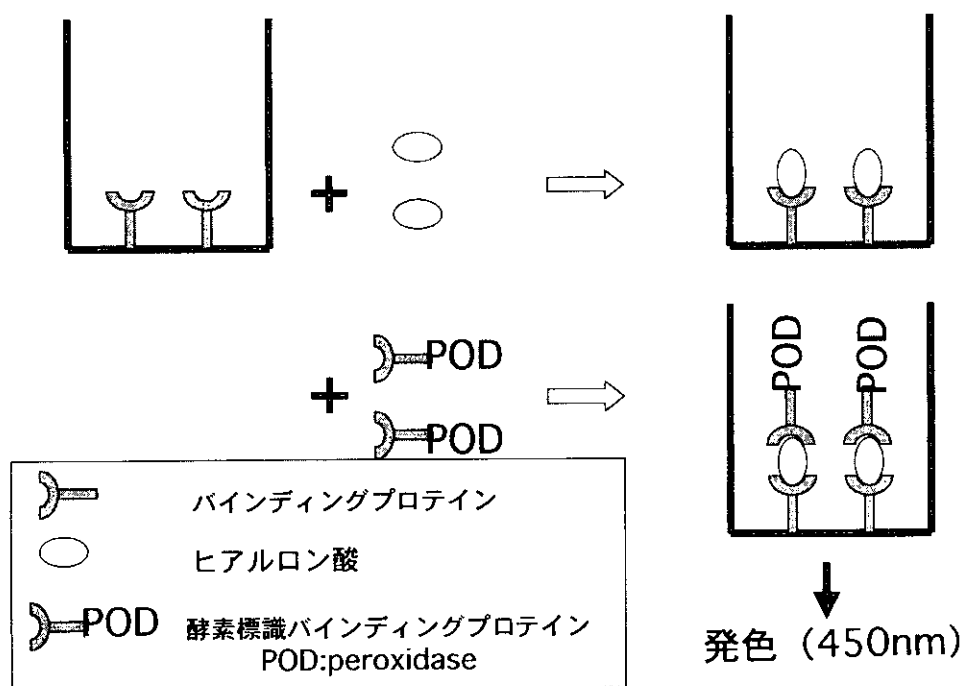


図1 Sandwich binding protein assay法

方 法

1. 胆汁中複合糖質の1次元セルロースアセテート膜電気泳動

胆汁にアセトン・エーテルを用いて脱脂脱色後蛋白分解酵素にて除蛋白に続くセチルピリジニウムクロリドによる分画法から酸性複合糖質画分を得た。これを試料にして電気泳動を行った。泳動は0.1Mピリジン - 0.47Mギ酸 (pH3.0) 溶液で1 mA/cm、1時間の泳動を行い、染色は0.1%アルシアンブルー - 70%エタノールで行った。

2. 胆汁中複合糖質の2次元セルロースアセテート膜電気泳動

1) で得た試料をセルロースアセテート膜に添加し1次元は1)と同様に0.1Mピリジン - 0.47Mギ酸 (pH3.0) で泳動を行い、2次元は0.1M酢酸バリウム (pH8.0) 1 mA/cm 4時間で行った。染色はアルシアンブルーで行った。

3. 胆汁中ヒアルロン酸濃度の測定

用いた胆汁は肝内結石症肝胆汁、総胆管結石症肝胆汁、正常(非結石症)胆汁で、胆汁中ヒアルロン酸濃度測定はヒアルロン酸結合タンパク質を用いたSandwich binding protein assay法(図1)(中外製薬社製、東京)で測定した。

4. 結石中ヒアルロン酸濃度の測定

結石の試料としては肝内結石(ビリルビンカルシウム石)、総胆管結石(ビリルビンカルシウム石)、胆嚢結石(純コレステロール結石、混合石、黒色石)を用いた。これら結石を粉碎したものに4Mグアニジウム塩酸溶液を重量比1000倍量加え複合糖質成分を抽出した。この抽出成分をヒアルロン酸測定キットを用いて測定した。

結 果

1. 胆汁中複合糖質の1次元セルロースアセテート膜電気泳動(図2)

胆汁中より抽出した複合糖質は図2のごとく肝内結石症胆汁でヒアルロン酸と同じ位置とそれより低

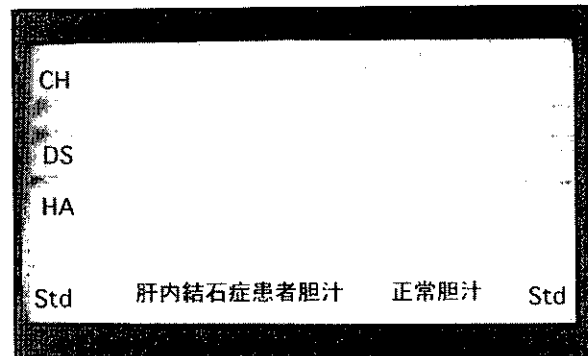


図2 胆汁中複合糖質のセルロースアセテート膜一次元電気泳動
CH:コンドロイチン硫酸 DS:デルマトン硫酸
HA:ヒアルロン酸

い位置に幅広い染色が認められた。正常胆汁でも同様の部位に染色が認められたがその濃度は極めて低いものであった。すなわち、肝内結石症胆汁中には正常胆汁に比して多くのヒアルロン酸と酸性糖ペプチドが存在していた。

2. 胆汁中複合糖質の2次元セルロースアセテート膜電気泳動(図3)

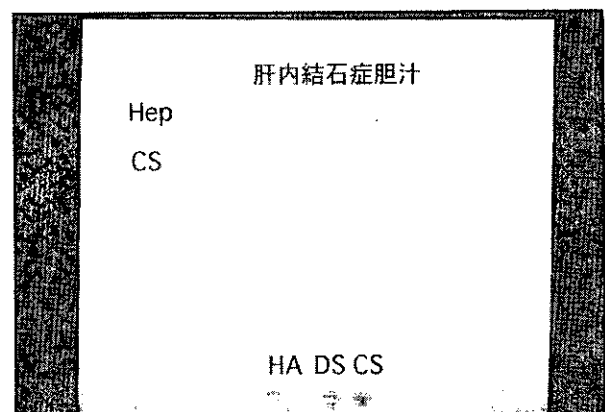
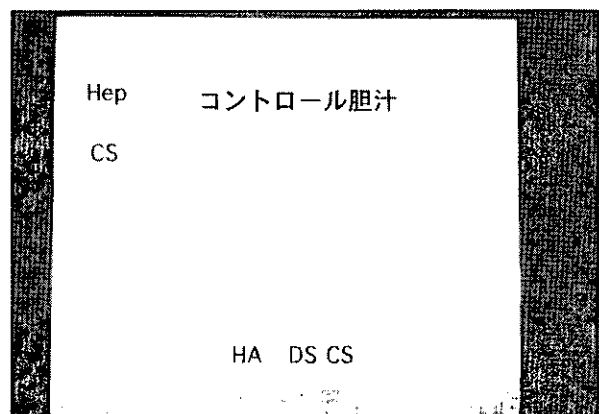


図3 2次元セルロースアセテート膜電気泳動
Hep:ヘパリン CS:コンドロイチン硫酸 HA:
ヒアルロン酸 DS:デルマトン硫酸

1次元セルロースアセテート膜電気泳動の結果と同様にヒアルロン酸と酸性糖ペプチドの著明な増加が肝内結石症胆汁に認められた。

3. 胆汁中ヒアルロン酸濃度

図4は実際の測定プレートで肝内結石症胆汁中には強く反応するものが多かった。これを定量したのが図5で正常胆汁の平均49ng/mlに対し肝内結石症胆汁の平均は162ng/mlで統計的にも有意差をもって高かった。

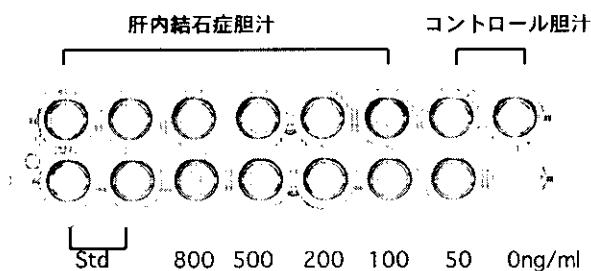


図4 ヒアルロン酸測定プレート



図5 胆汁中ヒアルロン酸濃度

4. 結石中ヒアルロン酸濃度

図6は結石中のヒアルロン酸を測定した結果である。肝内結石で異常に高値をとるものが多いがばらつきが多かった。コレステロール結石中にはヒアルロン酸はほとんど認められなかった。色素石と非肝内結石のビリルビンカルシウム石では100-700ng/g認められた。

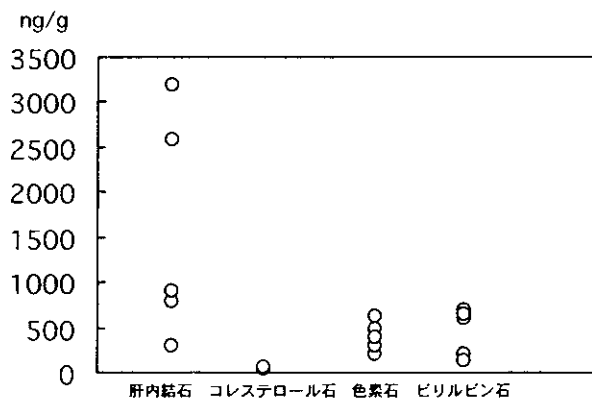


図6 結石中ヒアルロン酸濃度

考 察

これまでも肝内結石症患者胆汁中には酸性糖タンパク質が増加することは報告されてきたが、これまで同じ複合糖質の一部であるグリコサミノグリカンについては言及されることはなかった。しかし、近年グリコサミノグリカン特に血中ヒアルロン酸が肝機能障害時に上昇するという事実が明らかとなりすでに臨床応用されている。しかしこの事実と肝実質細胞や肝内胆汁とどのように関わりを持つかは検討されていなかった。また肝内結石症は重症化すると肝機能障害をきたすことが多く重症時の血中ヒアルロン酸の増加は当然予想されることであった。以上から肝内結石症胆汁と結石中のヒアルロン酸を測定したが、ヒアルロン酸の増加は著明であった。しかしヒアルロン酸の上昇にはばらつきが多く、ヒアルロン酸の上昇と肝内結石症の成因との関連を考察した場合、ヒアルロン酸の上昇は肝内結石症の成立に必須の要因であるとは考えにくい。本来、ヒアルロン酸は生体内で水分子を含み巨大分子化する。それに伴いその溶液の粘度を増加させる作用があるため胆汁中ではその粘調度を増加させ胆汁うっ滞状態を進行させるものと思われる。

以上からヒアルロン酸は肝内結石症の成因として必須のものではないがヒアルロン酸の増加は肝内結石症の病態の進行に強く関与しているものと考えられた。

肝内コレステロール胆石の実験生成

杏林大学第一外科

研究協力者 杉山 政則

共同研究者 森 俊幸, 下位 洋史,

跡見 裕

はじめに

肝内結石症は、胆石全体の4～8%を占めるにすぎない¹⁾が、治療成績の向上がめざましい胆石症の中で、その難治性の故にますます強い関心を集めている。肝内結石には、通常の胆管胆石にみられるビリルビンカルシウム石とは異なり、コレステロールや脂肪酸を主成分とする結石が少なからず存在し、コレステロールを50重量%以上含有する結石が約3割を占めるとも指摘されている²⁾。また、近年原発性肝内コレステロール結石症ともいふべき症例報告も少なくなく^{3,4)}、従来の肝内結石症の成因仮説胆道感染を基盤にしたビリルビンカルシウム石の発生⁵⁻⁹⁾についても再検討が必要となってきた。

胆嚢コレステロール結石については、確立した実験モデルとしてプレーリードッグが用いられ、その胆汁酸組成がヒトと類似していること¹⁾、高コレステロール飼料投与により、比較的容易に胆嚢内にコレステロール結石を生じるなどの点から、1970年代より精力的な実験的検討が行なわれてきた¹¹⁻¹³⁾。肝内コレステロール結石についても、コレステロール結晶の析出や、その成長に関しては、胆嚢結石と大きく異なるものと考えられる。すなわち、胆汁コレステロールの増加やコレステロール析出時間の短縮といった胆汁側の要因に加え、胆汁嚢滯が結石の生成に寄与するものと考えられる。われわれは、高コレステロール食飼育プレーリードッグを用い、肝管結紮を付加し、肝内コレステロール結石モデルの確立をめざし、加えて同モデルにおける肝を中心とした脂質代謝を検討した。

方 法

プレーリードッグ18頭(平均体重 1.32kg)を6頭ずつA、B、C 3群に分けた。A群は精製飼料を8週間以上投与後、ケタミン50mg/kg筋注麻酔下に左肝管を結紮した。B群は、同様の左肝管結紮と同日に高コレステロール食を開始¹⁴⁾、C群は予め3週間高コレステロール食を投与後同様に左肝管を結紮し、以後も同一食を継続した。いずれの群においても左肝管結紮後、2週目に屠殺し検体を以後の実験に供した。

1. 血中脂質代謝の検討

A、B群では屠殺時、C群では左肝管結紮時ならびに屠殺時に採血し直ちに氷冷、1時間以内に3000rpm 20分間遠沈、血清に分離、-80℃で凍結保存した。凍結後30日以内に、保存血清の総ビリルビン、総コレステロール、中性脂肪、燐脂質、リポ蛋白分画、アポリポ蛋白を測定した。測定はそれぞれ、ビリルビン；アルカリアゾビリルビン法、総コレステロール；酵素法、中性脂肪；酵素法遊離グリセロール消去法、燐脂質；酵素法、リポ蛋白；アガロースゲル電気泳動法¹⁵⁾、アポリポ蛋白；SRID法で行なった¹⁶⁾。

2. 肝脂質代謝の検討

1) 肝ミクロソームの調整

各群とも屠殺時に肝両葉より約1gの組織片を採取、直ちに液体窒素にて凍結し、80℃で保存し、8週以内に以下の方法でミクロソームを調整した。すなわち、保存肝組織片の重量を測定後、各組織片を9:1 (v/w) の50mMトリス塩酸緩衝液 (w/0.3

mM Sucrose、10mM EDTA、10mM Dithiothreitol; DTT、以下Buffer A) 中でホモジェナイズ後、20,000 × g、15分遠心、上清を採取、100,000 × gで1時間超遠心しマイクロソーム分画を得た。同分画をBuffer Aで再懸濁し、再び100,000 × g、1時間の超遠心を行った。このマイクロソーム分画を0.1M 磷酸カリウム緩衝液 (w/1mM EDTA、以下Buffer B) に懸濁し以後の測定に供した。

2) Cholesterol 7 α -hydroxylase活性の測定¹⁷⁾

1) で調整した肝マイクロソーム100 μ lに、Buffer B 150 μ lを加え、37 $^{\circ}$ C 恒温槽中で60分間incubation、さらにNADPH溶液 (21.5mg/ml in Buffer B) 25 μ lを添加後20分間incubationした後、5% コール酸溶液を30 μ l加えCholesterol 7 α -hydroxylaseの反応を停止させた。さらにUV detectorによる検出を可能にするためコレステロール酸化酵素溶液 (東洋醸造) 20 μ lを添加、10分間incubationし、Sterol骨格の3位の炭素を酸化後、0.3mlのmethanolを加えすべての反応を停止させた。上記の試料に内部標準物質として7 α 、12 α -dihydroxy-4-cholesten-3-on溶液10 μ lを添加し、石油エーテルで2回抽出、乾固を繰り返した後n-Hexane-Isopropanol (82:18) を100 μ l加え、その20 μ lを用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるCholesterol 7 α -hydroxylaseの測定を行なった。HPLCのカラムは、日本分光Finepak SIL (4.6 \times 250mm) を用い、n-Hexane-Isopropanol (82:18) を移動相とし、240nmの波長で検出を行なった。Cholesterol 7 α -hydroxylase活性は蛋白質1 mgを含むマイクロソーム画分が単位時間に生成した7 α -hydroxycholesterol量で表示した。なお蛋白濃度はCoomasie Brilliantblue変法 (プロテインアッセイ、和光純薬) にて測定した。

3) 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl Coenzyme-A Reductase (HMG-CoA R) 活性の測定¹⁸⁾

HMG-CoA R活性の測定はBrown等の方法により行なった。2) と同様にマイクロソーム蛋白濃度を測定後、蛋白量20~150mgのマイクロソームに20mM imidazole/chloride (pH 7.4) + 5 mM DTT溶液を

加え90 μ lとした。これを37 $^{\circ}$ C 60分間incubationし、0.2Mの磷酸緩衝液 (pH 7.4) + (40mM glucose-6-phosphate, 5mM TPN, 0.7 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase (Boeringer Mannheim社)、20mM EDTA、10mM DTT) 100 μ lを加え、さらに基質としてDL-[3-¹⁴C]-HMG-CoA (23,000cpm/nmol、New England Nuclear社) を添加、総量200 μ lとし、37 $^{\circ}$ C 30分間incubationを行なった。回収率補正のための[³H]メバロン酸を内部標準として加え、上記反応で生成された[³H]メバロン酸を薄層クロマトグラフィーで分離した。酵素活性はマイクロソーム蛋白1 mgにより単位時間に生成された[³H]メバロン酸量 (pmol) で表示した。

3. 病理組織学的検討

肝胆道を摘出し、10%ホルマリンで固定、HE染色標本を作成し病理組織学的検討を行なった。

4. 統計

統計学的処理は、unpaired Student *t* test、 χ^2 検定、Fisher直接確率法を用い、統計的有意水準はp値0.05未満とした。

結 果

1. 血中脂質代謝 (表1-3)

総コレステロールは、A群に比しB群691.8 \pm 131.1mg/dl、C群526.6 \pm 132.7mg/dlと両群とも有意 (p<0.05) の高値を示した。また中性脂肪もB群312.3 \pm 99.0mg/dl、C群407.2 \pm 132.7mg/dlとA群に比し有意 (P<0.01) の高値を示した。磷脂質はB、C群とも軽度高値を示したが、A群との間に有意差は認められなかった。血清総ビリルビン値は各群とも変動を示さなかった。リポ蛋白分画では、 α リポ蛋白はA、B群間に有意差なく、C群はA群に比し有意 (P<0.05) に低値を示した。pre β リポ蛋白はA群に比し、B、C両群とも有意の変化を呈さなかった。 β リポ蛋白はA群に比しC群で有意 (p<0.05) の高値を示した。カイロミクロンならびにテーリングは各群間に有意差を認めなかった。アポ

表1 血清脂質

	A群	B群	C群	C群結紮前
総ビリルビン (mg/dl)	0.6 ± 0.33	0.42 ± 0.07	0.38 ± 0.09	0.42 ± 0.02
総コレステロール (mg/dl)	363 ± 46.3	691.8 ± 131.1 ^a	526.6 ± 132.7 ^b	847.0 ± 240.1 ^b
中性脂肪 (mg/dl)	159.8 ± 57.1	312.3 ± 99.0 ^b	407.2 ± 132.7 ^b	202.2 ± 541.1
磷脂質 (mg/dl)	54.8 ± 10.9	135.8 ± 40.0 ^b	85.5 ± 92.5	—

a: A群に比しp<0.05、b: A群に比しp<0.01

表2 血清リポ蛋白分画

%	A群	B群	C群	C群結紮前
カイロミク	2.1 ± 0.3	3.6 ± 1.0	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.4
αリポ蛋白	49.2 ± 5.1	36.4 ± 3.5	28.4 ± 4.0 ^a	35.0 ± 3.1 ^a
preβリポ蛋白	23.8 ± 9.1 ^c	15.8 ± 3.7 ^c	14.5 ± 3.1 ^c	35.0 ± 9.7
βリポ蛋白	32.5 ± 2.7	38.3 ± 4.1	^a 43.3 ± 5.0 ^a	35.3 ± 7.8
テーリング	5.4 ± 0.6	5.9 ± 1.0	11.8 ± 5.1	6.8 ± 2.2

a: A群に比しp<0.05、b: A群に比しp<0.01、c: C群3週に比しp<0.05

表3 血清アポリポ蛋白

mg/dl	A群	B群	C群	C群結紮前
A-I	50.8 ± 5.6	72.4 ± 17.7 ^a	61.8 ± 5.2	153.7 ± 17.5 ^c
A-II	2.0 ± 0.2	7.8 ± 3.6 ^b	4.9 ± 1.6 ^b	4.6 ± 0.6 ^b
B	5.8 ± 0.5	14.6 ± 6.9 ^c	8.2 ± 1.8 ^a	13.3 ± 5.3 ^b
C-II	0.32 ± 0.07	0.53 ± 0.13	0.4 ± 0.05	0.7 ± 0.17 ^a
C-III	0.9 ± 0.09	1.05 ± 0.21	0.65 ± 0.23	2.11 ± 1.03
E	1.7 ± 0.4	3.7 ± 1.2 ^a	3.2 ± 0.9	6.7 ± 2.1 ^a

a: A群に比しp<0.05、b: A群に比しp<0.01、c: A群に比しp<0.001

リポ蛋白では、アポA-IはA群に比し、B群は有意 (p<0.05) の高値を示したが、C群では有意差を認めなかった。アポA-IIは、A群に比し、B、C両群とも有意 (P<0.01) の高値を示し、アポBもA群に比しB群 (p<0.001)、C群 (p<0.01) とも有意の高値を示した。アポBもA群に比しB群で有意 (p<0.05) の高値を示したが、C群では有意差を認めなかった。アポC-II、C-IIIは各群間に有意差を認めなかった。

2. 肝ミクロソーム酵素

1) Cholesterol 7α-hydroxylase活性 (図1)

A群とB、C両群間には有意差を認めなかったが、B群0.027 ± 0.059、C群0.078 ± 0.002mol/min/mg Prot.と両群間に有意差を認めた。各群とも肝両葉間に有意差は認められなかった。

2) HMG-CoA R活性 (図2)

A群に比し、B群 8.1 ± 8.3pmol/min/mg Prot、C群 6.3 ± 7.5pmol/min/mg Prot.と有意 (p<0.01) に低値を示した。各群とも結紮側において非結紮側に比しHMG-CoA R活性の有意の高値 (A群 P<0.05、B、C群P<0.01) の高値が認められた。

3. 病理組織学的検討

C群の肝管結紮側肝内胆管内にのみ、6頭中2頭に径400μmのコレステロール結石の存在を認めた。同部の胆管上皮は高円柱化し、一部には軽度ながら乳頭状増生像も認められた。しかし胆管壁には、炎症性細胞浸潤や壁内腺の増生所見はみられなかった。結石存在部の組織像は肝内コレステロール結石臨床例における結石存在部の組織像に近似する所見であった。A、B両群の肝内胆管には、両葉とも結

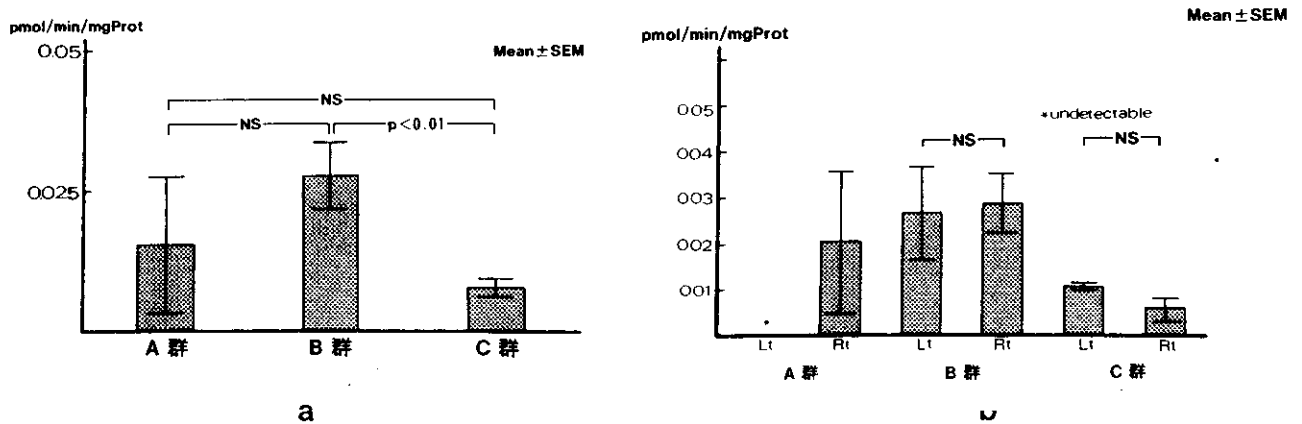


図1 a: 肝ミクロソームCholesterol 7α-hydroxylase活性
b: 肝両葉のCholesterol 7α-hydroxylase活性

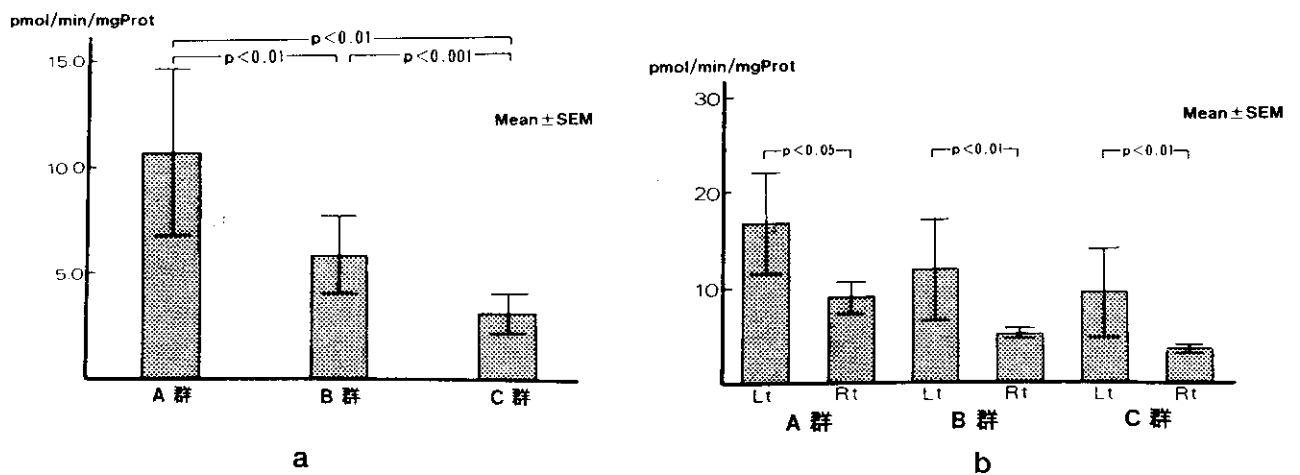


図2 a: 肝ミクロソームHMGCo-A R活性。高コレステロール食投与によりHMGCo-A R活性は有意の低下を示した。
b: 肝両葉のHMGCo-A R活性。結紮側 (Lt) で有意に非結紮側 (Rt) より高い活性を示した。

石を認めなかった。また各群とも肝は肉眼的に黄色調を呈し、組織学的にはfoamy cellの出現、肝細胞の空胞変性を認め、またperiportal areaに軽度の単核球の浸潤が認められた。

考 察

原発性肝内結石症の生成機序については、もっぱら臨床例からの分析が行われ、肝内胆管の形成異常や、それを背景に発生した胆汁鬱滞、胆道感染、あるいは増殖性胆管炎による、過剰な粘液産生などの因子が関与するピルルピンカルシウム石生成説が広く採用されてきた。また実験的には、同一の視点から作成されたモデルについて、いくつかの検討がみ

られるのみで、臨床例にみられるコレステロール成分に富む結石や総コレステロール結石など、原発性肝内コレステロール結石の特性を備えたモデルは存在しない。

われわれはプレーリードッグ胆嚢コレステロール結石モデルを検討し、コレステロール微小結晶の生成、その成長、胆嚢運動機能異常やそれによる胆嚢内胆汁鬱滞を認めたが、同時に行った肝内コレステロール結石モデルの予備実験では、8週間の高コレステロール食投与にても、肝内結石の発生を認めなかった。これらの結果より、著者らは、同一モデルに片側の肝管結紮を加え、肝内コレステロール結石の作成を試み、さらにその生成機序に関して肝および血中脂質代謝の面より検討した。その結果、高コ

コレステロール食投与十肝管結紮プレーリードッグの結紮側肝内胆管内にのみ、径400 μ mのコレステロール結石を作成しえた。また、結石存在部位の胆管上皮細胞には高円柱化を認めた。このことより、本モデルにおける肝内コレステロール結石の生成過程は、コレステロール胆嚢結石のそれと大きく異なるもの、すなわち、肝より分泌されたlithogenic bile内でのコレステロール微小結晶の析出に続き、胆汁鬱滞と胆管上皮由来の粘液が関与する過程¹⁹⁾が加わり、結晶の成長から結石の生成へと進展するものと考えられた。さらに、血中および肝脂質代謝の面より検討すると、高コレステロール食投与により血中コレステロール、中性脂肪、磷脂質はともに増加し、 α リポ蛋白の減少ならびに β リポ蛋白の増加を認めた。その結果血清コレステロールの上昇は主にLDLコレステロールの増加によるものと考えられた。

肝ミクロソーム酵素に関する検討では、Cholesterol 7 α -hydroxylase活性は一定の傾向を示さなかったが、HMG-CoA Rは、高コレステロール食投与により有意の活性低下を示した。また結紮側では、非結紮側に比し軽度の低下に留まっていた。コレステロール過飽和胆汁の生成には、コレステロールの摂取過剰、肝HMG-CoA Rの活性の亢進によるコレステロールの過剰合成^{20),21)}、Cholesterol 7 α -hydroxylase活性の減弱による胆汁酸への異化低下^{22,23)}、あるいは胆汁酸プールの減少など²⁴⁾、様々な要因の関与が推測されており、lithogenic bileの生成には、肝内におけるコレステロール合成の増加と異化の減弱が関与するとの見解もある。しかし胆汁中コレステロールの起源は肝内合成が約30%にとどまり、他は血中リポ蛋白に由来するとされ²⁵⁻²⁷⁾、lithogenic bileの産生を肝内でのコレステロール合成の亢進のみに帰することはできないことが指摘されている。いずれにしても本モデルにおけるlithogenic bileの生成には、血中LDLコレステロールの増加がより多く寄与しているとみなすべきであろう。

HMG-CoA Rの活性低下は、血中LDL上昇による、肝LDLレセプターの減少を介する抑制機構²⁸⁾によって生じたものと考えられるが、肝管結紮側では非結紮側よりもHMG-CoA Rの活性低下が軽度にとどまっていたことより、肝管結紮側では、何らかの機序によって、上述の抑制機構の発動が減弱し、肝でのコレステロール合成が相対的に高まり、それがコレステロール過飽和胆汁の生成に与った可能性も推測されよう。

文 献

- 1) 中山文夫, 古沢悌二, 志賀俊明, ほか: 肝内結石症の病態について. 昭和53年度厚生省特定疾患対策肝内胆管障害研究班報告書, 17-20, 1979.
- 2) 谷村 弘, 小林展章, 吉田圭介, ほか: 結石の成分分析よりみた日本人肝内結石症. *日本臨床* 45: 1564-1572, 1987.
- 3) 松代 隆, 佐々木幸則, 増田高行: 原発性コレステロール肝内結石症の1例. *胃と腸* 19: 445-448, 1984.
- 4) 佐藤 裕, 松村 潔, 森崎 隆, ほか: 原発性肝内コレステロール結石症の1例. *胆と膵* 8: 1341-1348, 1987.
- 5) 羽生富士夫, 高田忠敬, 内山勝弘, ほか: 肝内結石症における肝内胆管像と肝組織像の対比. 昭和55年度肝内胆管障害研究班報告書, 37-41, 1981.
- 6) 古味信彦: 胆道形成異常からみた肝内結石症. *肝胆膵* 4: 343-348, 1982.
- 7) 後藤明彦, 鬼束惇義, 林 勝知, ほか: 肝内胆石症と β -Glucuronidase. *外科Mook* 26 肝内胆石症: 39-46, 1982.
- 8) 中沼安二, ほか: 肝内結石症の病理形態像. *日消誌* 78: 874-882, 1981.
- 9) 山本賢輔, 土屋涼一: 肝内結石症の成因と病理. *胆と膵* 1: 1429-1436, 1980.
- 10) DenBensten L, Safaie-Shirazi S, Conner E, et al.: Early changes in bile composition and gallstone formation induced by a high cholesterol diet in prairie dogs. *Gastroenterology* 66: 1036-1045, 1974.
- 11) Holzbach RT, Corbusier C, Marsh M, et al.: The process of cholesterol cholelithiasis induced by diet

- in the prairie dogs: a physicochemical characterization. *J Lab Clin Med* **87**: 987-988, 1976.
- 12) Strichartz SD, Abedin MZ, Abdou MS, *et al.*: Increased biliary calcium in cholesterol gallstone formation. *Am J Surg* **155**: 131-137, 1988.
 - 13) Doty JE, Pitt HA, Kuchenbecker SL, *et al.*: Impaired gallbladder emptying before gallstone formation in the prairie dog. *Gastroenterology* **85**: 168-174, 1973.
 - 14) Chung SH, Ho KJ, Taylor B: Cholesterol gallstone formation and its regression in prairie dogs. *Arch Pathol* **96**: 417-426, 1973.
 - 15) 大島寿美子, 中野栄二, 土屋俊夫: リポ蛋白の電気泳動法と免疫学的定量法. *臨床検査* **20**: 129-134, 1976.
 - 16) 村瀬敏郎, 赤沼安夫: アポ蛋白の正常値と測定の意義. *Prob Med* **4**: 1955-1958, 1984.
 - 17) Noshiro M, Ishida H, Hayashi S, *et al.*: Assay for cholesterol 7 α -hydroxylase and 12 α -hydroxylase using high performance liquid chromatography. *Steroids* **45**: 539-550, 1985.
 - 18) Brown MS, Goldstein JL, Dietschy JM: Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in the liver of the rat. *J Biol Chem* **254**: 5144-5149, 1979.
 - 19) LaMont JT, Smith BF, Moore JRL: Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Hepatology* **4**: 51s-56s, 1984.
 - 20) Carey MC, Mazer NA: Biliary lipid secretion in health and in cholesterol gallstone disease. *Hepatology* **4**: 31s-37s, 1984.
 - 21) Nicoleau G, *et al.*: Determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in man. *J Lipid Res* **15**: 94-98, 1974.
 - 22) Carulli N, Lpria P, Bertolot M, *et al.*: Effect of acute changes of bile acid pool composition on biliary lipid secretion. *J Clin Invest* **74**: 614-624, 1984.
 - 23) Nicoleau G, Shafer S, Salen G, *et al.*: Determination of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase activity in man. *J Lipid Res* **15**: 146-151, 1974.
 - 24) Carey MC: Increased biliary lithogenicity through cholesterol supersaturation. *Gallstone Disease: Pathophysiology and therapeutic approaches*, (Swobodnik W, Ditschuneit H), 310, Springer, Heidelberg, 1990.
 - 25) Schwartz CC, *et al.*: Preferential utilization of free cholesterol from high density lipoprotein for biliary cholesterol secretion in man. *Science* **200**: 62-64, 1978.
 - 26) Schwartz CC, *et al.*: Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man — Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursors sites. *J Clin Invest* **61**: 408-423, 1978.
 - 27) Robins SJ, Brunengraber H: Origin of biliary cholesterol and lecithin in the rat. Contribution of new synthesis and preformed hepatic stones. *J Lipid Res* **23**: 604-608, 1982.
 - 28) Brown MS, Goldstein JL: A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**: 34-47, 1986.

肝内結石症 1 症例の臨床経過およびHMG-CoA reductase とcholesterol 7 α -hydroxylaseのmRNAレベルの検討

宮崎医科大学 第一外科

研究協力者 瀬戸口敏明

共同研究者 甲斐 真弘, 山田 学,
永友 淳司, 前田 資雄,
東 秀史

はじめに

肝内結石症の成因の一つには、コレステロールおよび胆汁酸の代謝異常の関与が考えられる。とくにそれぞれの代謝過程での律速酵素であるHMG-CoA reductaseとcholesterol 7 α -hydroxylaseの調節機構の解明は結石生成の成因解明につながる。近年、肝内結石がコレステロール含有量の多いことが報告され^{1,2)}、さらにその背景の一つとして肝内結石症におけるHMG-CoA reductaseの上昇とcholesterol 7 α -hydroxylaseの低下に起因するコレステロール過飽和胆汁の存在が報告されている³⁾。しかし、従来、両酵素の調節はparallelに制御されるという報告が圧倒的に多く⁴⁻⁶⁾、両酵素のfeedback regulationのmechanismsを考えた場合、検討が必要である。実験動物を用いて両酵素の調節機構の基礎実験をすすめるとともに、さらに症例を追加して追試する必要がある。今回経験した肝外側区域に集簇した肝内結石症症例の手術時に結石葉と非結石葉から組織を採取して、特に両酵素のmRNAレベルを中心に検討した。

症 例

症 例：66才女性。長崎県下五島地区の出身で、12才から宮崎市内で生活している。

主 訴：心窩部痛。

家族歴：昭和31年に父親が肝腫瘍で死亡しているが、詳細は不明。9人兄弟で他の兄弟に肝内結石症はいない。

既往歴：昭和52年に胆嚢結石症（小指頭大、卵形、1個）で胆嚢摘除術を受けている。

現病歴：平成11年9月28日の深夜に激しい心窩部痛が出現し、その後、発熱、嘔気、嘔吐をともなった。近医を受診したところ、心窩部に著明な圧痛を認め、血液生化学検査で炎症所見と胆道系酵素の高値を認めた。腹部CTおよび超音波検査で肝左葉外側区域胆管（B2、B3）起始部に集簇する結石を認めた。保存的治療で炎症が消退した後、肝内結石症の診断で当科に紹介され入院した。

検査所見：ERCPで、外側区域胆管（B3）の起始部に結石による陰影欠損を認め、さらに末梢のB3胆管枝は不整に拡張し、内腔に小結石陰影を認めた。

腹部CT（図1）では肝左葉外側区域の萎縮と外側区域胆管、B2、B3の拡張を認めた。B2、B3の起始部に集簇する結石陰影を認め、結石のCT値は約100程度で石灰化の程度は弱かった。またCTAPでS3の辺縁に限局して不整形のperfusion defect areaを認めた。

血管造影では外側区域への動脈血流は保たれていたが、門脈像でP2、P3が狭小化しており、門脈血流低下が認められた。

手術所見（図2）：開腹時、肝左葉外側区域は全体

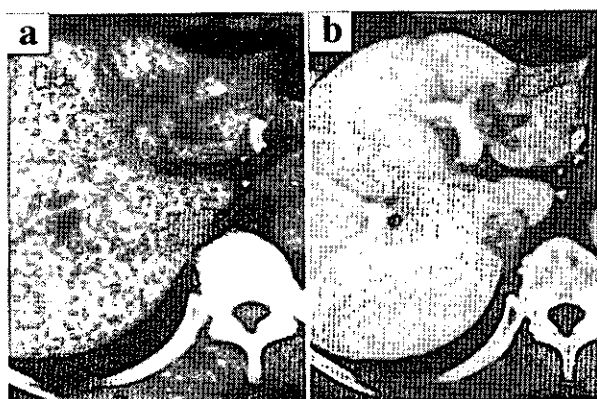


図1 Abdominal computed tomography
a: Plain, b: Computed tomography during arterial portography

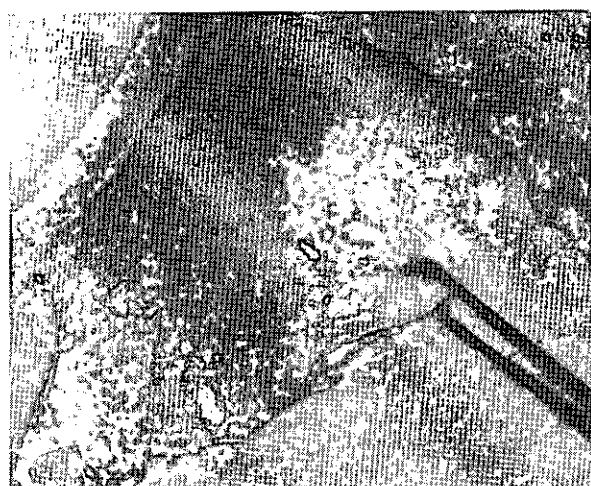


図2 Operative photography
肝左葉外側区域を示す。全体的に萎縮し、とくにS3辺縁に局限して著明な萎縮と線維化を認めた。

的に萎縮していた。とくにS3辺縁に局限して不整形の萎縮および線維化が認められた。肝右葉には異常を認めなかった。開腹後、時間を置かず組織採取をおこなった。組織採取は血行遮断せずに鋭的に切除し、できるだけ短時間でおこなった。採取部位は、結石葉では萎縮および線維化が著明なS3の肝下縁およびこれらの変化を認めないS2の外側縁とS3の内側縁の3カ所、非結石葉はS5の肝下縁から1カ所であった。採取後、ただちにRNAの調整をおこなった。肝内胆汁は採取できなかった。

手術は肝左葉外側区域切除をおこなった。中枢側胆管に明らかな狭窄を認めなかった。結石は、一部鑄型状にB3起始部に認めた。その他、B3の末梢に

かけて多数認め、多くは3mmから5～6mm程度の大きさであった。表面は黒色調でやや光沢があり、断面は黒褐色を呈していた。

肉眼所見：摘出標本とその断面では、拡張したB3胆管の周囲に線維化が著明で、末梢の肝縁近くでは高度の萎縮を認めた。線維化および萎縮を認める部分は限局性で周囲の肝実質にはあまり変化を認めなかった。

病理組織学的所見：S3肝下縁の萎縮の著明な部分では、高度の線維化および肝細胞の著明な減少を認めた。またリンパ球主体の軽度の炎症性細胞浸潤を認めた。萎縮を認めない部分では、肝細胞に特に変化を認めなかったが、胆管周囲にはリンパ球を中心とした高度の炎症性細胞浸潤を認めた。

結 果

結石分析：日本分光社のFT-IR型赤外分光光度計を用いた分析で、結石の主成分はビリルビンカルシウムであった（図3）。結石中のコレステロール含量はクロロホルム・メタノールで抽出した後、HPLCで定量し、4.5w/w%であった。二つの結果から、結石はコレステロール含量の少ないblack pigment stoneであった。

Northern blot hybridization（図4）：コントロールの2症例を含めてNorthern blot hybridizationをおこなった。コントロール症例のうち1症例目は79才女性。軽度の肝硬変をとともなう肝細胞癌で、S7、8の亜区域切除術をおこなった。2症例目は65才男性。直腸癌からの転移性肝腫瘍でS6の亜区域切除術をおこなった。組織採取はいずれも本症例と同様に血行遮断せずにできるだけ迅速におこなった。採取時間は午前10時から11時の間におこなった。また本症例も含めて脂質代謝異常を認めず、術前の食事摂取も同じ条件とした。

Northern blot hybridizationはtotal RNA 20 μ gを用いた。Image analyzerのBAS2000で定量化した後、GAPDHで補正した（図5）。HMG-CoA reduc-

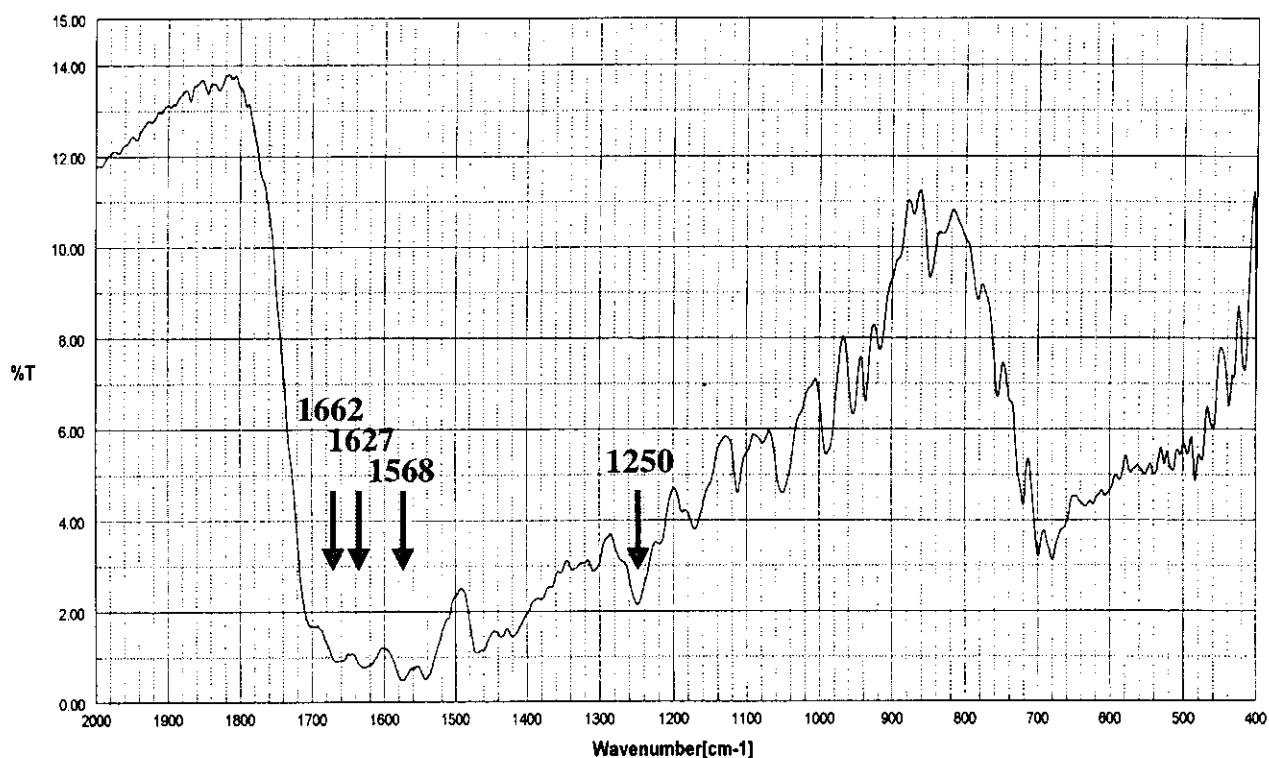


図 3 Analysis of intrahepatic calculi by infrared spectrometry

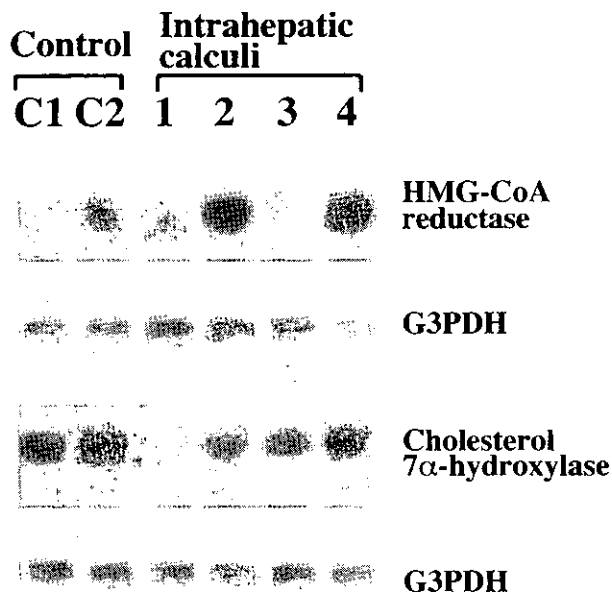


図 4 Northern blot hybridization analysis

C1, C2はコントロール症例。1から4は本症例の非結石葉、結石葉から採取。1は非結石葉のS5下縁、2、3、4はそれぞれ結石葉のS3内側縁、萎縮の著明なS3下縁、S2外側縁。

taseのmRNAレベルは同じ結石葉でも線維化の著明な部位はそうでない部位に比べて明らかにmRNAの発現が弱かった。結石葉と非結石葉との比較では、結石葉の方がより強く発現していた。コントロール症例と結石葉の線維化のない部位のmRNAレベルを比較すると、結石葉の方が発現が強かった。Cholesterol 7 α -hydroxylaseのmRNAレベルは、同じ結石葉ではやはりHMG-CoA reductaseのmRNAレベルと同様に線維化の著明な部位はそうでない部位に比べてmRNAの発現が弱かった。結石葉と非結石葉との比較では、やはり結石葉の方がより強く発現していた。しかしコントロール症例と結石葉との比較では、HMG-CoA reductaseのmRNAと異なりほとんど差を認めなかった。

次に、HMG-CoA reductaseのmRNAレベルをcholesterol 7 α -hydroxylaseのmRNAレベルで割った値は、コントロール症例に比べて肝内結石症例は萎縮部分を除いて高い数値を示した。

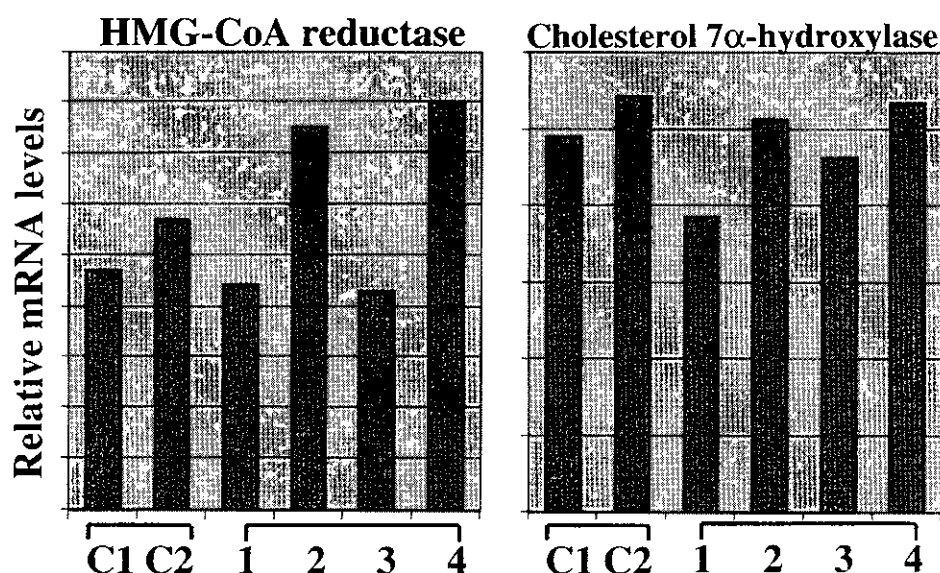


図5 Relative mRNA levels of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase

考 察

肝内結石症の臨床例検討に際しては、組織採取をおこなう際、いくつかの問題がある。まずHMG-CoA reductaseとcholesterol 7 α -hydroxylaseの日内変動の存在である。両酵素には、ラット、マウス、ウサギ等でmRNAレベル、酵素活性のいずれにも強い日内変動が確認されている⁷⁻¹⁰⁾。ヒトにおける日内変動は間接的な証明しかなされていないが¹¹⁾、個々の症例における採取時間の違いは、測定結果に日内変動の要素が反映される可能性がある。ヒトにおいて採取時間を均一に設定することは困難であるが、できるだけ同一時間帯に採取するべきである。我々は組織採取を午前10時から11時の間におこなっている。

次に組織採取部位の問題である。とくに結石葉は限局性に線維化をとまなう萎縮などの変化を認めることがあり、肉眼的にも病理組織学的にも均一ではない。したがって結石葉でも病態を反映する部位と炎症等にとまなう2次的変化の修飾が関与している部位が存在すると思われる。実際、今回我々が解析した症例でも結石葉から3カ所組織採取したが、萎縮および線維化の著明な部位はそうでない部位に比べて両酵素ともmRNAレベルが低値であった。To-

tal RNAの取量も少なく、病理組織学的にも線維性変化が高度で肝細胞の著明な減少が認められた。したがって萎縮や線維化が著明な部位は炎症による2次的変化の修飾が関与している可能性があり、組織採取部位としては適切ではない。以上のようなことから組織採取の点で採取時間と採取部位には留意すべきである。

本症例のようにコレステロール含有量が少ないblack pigment stoneでもHMG-CoA reductaseのmRNAレベルの変化が認められる可能性がある。すなわち結石のコレステロール含有量に関わらず、コレステロール過飽和胆汁が存在する可能性が否定できない。したがって、最近注目されている肝内コレステロール結石、コレステロール含有量の多いbrown pigment stoneとともに本症例のようなコレステロール含有量の少ないblack pigment stoneもその代謝上の背景をコレステロール代謝の面から解析していくことによって、より詳細な成因解明の糸口がつかめると想定している。したがって、今後、肝内結石症以外のコントロール症例の蓄積、肝内結石症症例の蓄積も当然であるが、結石のコレステロール含有量と両酵素のmRNAレベルの関係なども含めて検討していく。