

# ラットを用いた肝内結石症実験モデルの作成

九州大学大学院 臨床・腫瘍外科

研究協力者 田中 雅夫

共同協力者 能城 浩和, 水田 篤

千々岩一男

## はじめに

肝内結石症の成因解明に動物モデルの作成は有用と考えられる。現在、雑種成犬を用いたモデルで上行性胆道感染と門脈血流遮断によって肝内結石が形成されたとの報告があるのみである。しかし雑種成犬などの大動物は取り扱いが容易でなく、結果の均一性に問題があることより、小動物であるラットによるモデル作成を試みた。今回は耐術性、ヒト肝内結石症に見られるような肝胆道系の諸変化、結石の有無を調べた。

## 方 法

雄性Wister Rat 5 週齢を用いた。エーテル麻酔下に開腹し、まず上行性の胆道感染を作成するために総胆管と十二指腸をPE-50 tubeで内瘻した。次に図1に示すように肝右葉門脈枝を胆管等を温存してそれのみ結紮して血流障害とした。これらの再開腹を

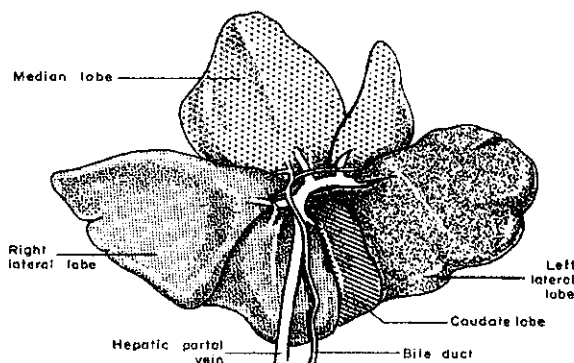


図1. Right portal vein ligation

6ヶ月以降で行い、肝右葉の委縮、胆管拡張および結石あるいは腫瘍の有無等を調べた。形成された結石の化学分析は過去に報告したとおり有機溶媒であるDMSOで抽出してビリルビン、脂肪酸、胆汁酸、コレステロールとカルシウムを各々測定し、乾燥重量に対する比率で表示した<sup>1)</sup>。

## 結 果

表1に示すように14匹のモデルを作成した。そのうち2匹が死亡した。再開腹時には胆管十二指腸内瘻チューブは腸管内へ逸脱して存在せず、その後胆管十二指腸瘻孔が形成されていた。12匹のうち11匹は門脈結紮領域の肝葉が萎縮して(図2)、11匹は両葉肝内胆管の壁肥厚と著明な拡張が見られ(図3)、10匹で両所見を認めた。萎縮葉肝内胆管に層構造を有する1cm以上の結石を2匹に(図4)、残

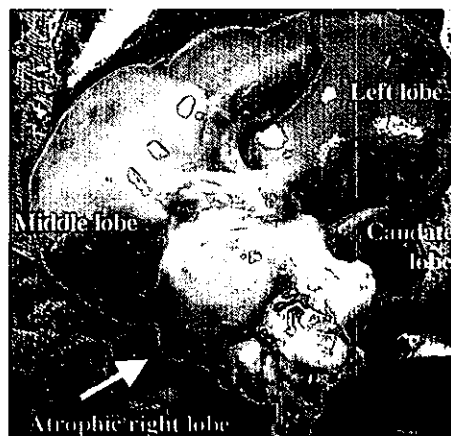


図2. Atrophy of ligated hepatic lobe

表 1. 結 果

Case	Outcome	Sacrifice (month)	Jaundice	Hepato-lithiasis	Debris	Hepatic right lobe atrophy	Biliary dilatation	Bilioduodenal fistula
1		9	—	+	+	+	+	+
2		9	—	—	+	+	+	+
3		9	—	—	—	+	+	+
4	death	7						
5		6	—	+	+	+	+	+
6		6	—	—	+	—	+	+
7		6	—	—	—	+	—	—
8	death	4						
9		10	—	—	—	+	+	+
10		10	—	—	—	+	+	+
11		7	—	—	—	+	+	+
12		7	—	—	+	+	+	+
13		7	—	—	+	+	+	+
14		7	—	—	—	+	+	+

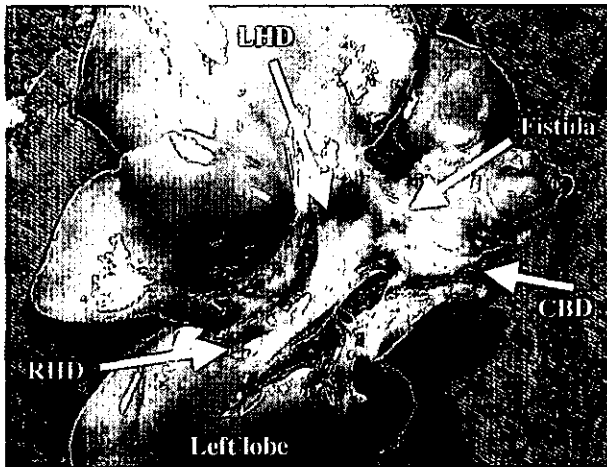


図 3. Biliary dilatation



図 4. Cut surface of calculus

りの10匹中4匹にも泥状の沈殿物を認めた。肉眼型は茶黄色で比較的にもろく、層構造が明確でヒトでのビリルビンカルシウム石と思われたが、結石の化学組成分析ではビリルビンは重量比で1%以下、カルシウム3%と含有量が少なく、またおよびコレステロールも2%でヒトに見られる結石分類のものとは多少異なっていた(表2)。不溶性残渣は19%であり、総回収率は29%であった。

表 2. 結石の化学組成分析結果

Bilirubin	0.16%
Free fat acid	5.00
Cholesterol	1.67
Calcium	3.11
Insolved residue	19.25

### 考 察

肝内結石症患者では胆道感染はほぼ必発であり、その感染経路は十二指腸からの上行性胆道感染が最も多いと思われる。それによる細菌感染でビリルビンの脱抱合や脂肪酸の遊離は結石形成の直接の一因と考えられている。しかし我々のラットモデルでは形成された結石の脂肪酸の含有量は5%認めら

れたがビリルビン含有量が極端に少なくヒトの肝内結石と異なる結果であった。我々の分析系では測定されていないが70%は炭水化物かタンパク質であると考えられる。増殖性胆管炎が肝内結石症患者で認められ、結石形成への関与が示唆されているが本モデルでも高度の胆管拡張と胆管壁の肥厚が高率に認められ今後の病理組織検索を行う予定である。また肝内結石症の成因か結果かは明らかにされていないが肝血流障害のため肝萎縮がみられる事が多いため、右門脈枝結紮による肝血流障害を作成した。結果として阻血肝葉は著しく萎縮して、結石形成は萎

縮葉の肝内胆管内だけにできていたことを特記したい。今後、全結石の組成分析の詳細、上行性胆道感染や肝葉萎縮の経時的変化、肝胆道系の病理組織学的検査および生化学的変化を研究していく予定である。

#### 文 献

- 1) Noshiro H, Hotokezaka M, Higashijima H, *et al.* Gallstone formation and gallbladder bile composition after colectomy in dogs. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2423-2432

# プレリードッグによる実験的肝内 コレステロール結石における粘液との関連

杏林大学医学部 第一外科

研究協力者 杉山 政則

共同研究者 泉里 友文, 森 俊幸

跡見 裕

## はじめに

肝内結石症は、胆石全体の4～8%を占めるに過ぎない<sup>1)</sup>が、その中でも原発性肝内コレステロール結石症ともいべき症例<sup>2) 3)</sup>が増加傾向にある。その結石生成には従来の胆道感染を基盤にしたビリルビンカルシウム石<sup>4)~8)</sup>とは異なり胆汁のコレステロール代謝異常が関与していることが考えられている。コレステロール過飽和胆汁の生成には、1. コレステロールの過剰摂取、2. 肝HMG-CoA reductaseの活性の亢進によるコレステロールの過剰合成<sup>9) 10)</sup>、3. cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase活性の減弱による胆汁酸への異化低下<sup>11) 12)</sup>、4. 胆汁酸プールの減少<sup>13)</sup>など胆汁のlithogenicityを示唆する様々な代謝異常要因の関与が指摘されている。コレステロール結石症では、組織学的には胆管炎の関与は少なく増殖性変化が軽度であるものの肝内胆汁の粘性が高いことや付属腺導管や末梢の小型胆管腔内にコレステロールの結晶やコレステロール肉芽腫が見られるのが特徴的であるとされている。

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<sup>14)</sup>、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<sup>15)~17)</sup>。

既に報告してきたように、我々はプレリードッグを用いて実験的肝内コレステロール結石生成モデルを確立した<sup>18)</sup>。すなわち、高コレステロール飼料負荷下の条件で、肝管結紮を加えることで肝管結紮側の胆管内にコレステロール結石を形成させることに成功している。今回は、この実験モデルの肝胆道組織にHE染色および種々の粘液染色を行ない、肝管結紮側と非結紮側を比較し、肝内コレステロール結石の成因に粘液が関与しているか否かを検討した。

## 方 法

プレリードッグ12頭（体重800–1200g、平均体重850g）を高コレステロール食群6頭とコントロール群6頭に分けた。高コレステロール食群はあらかじめ3週間高コレステロール食（1.2%重量コレステロール含有）を投与後ケタミン50mg/kg筋注麻酔下に左肝管を結紮した。コントロール群は精製飼料を投与後同様に左肝管結紮し、以後も同一食を継続した。両群とも左肝管結紮後、2週間後犠牲解剖した。（表1）

### 1. 血液学的検討

実験食投与前と屠殺時に採血し、直ちに血清の総ビリルビン、総コレステロール、中性脂肪、リン脂質、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>、プロスタグランジンE<sub>2</sub>の数値を測定した。

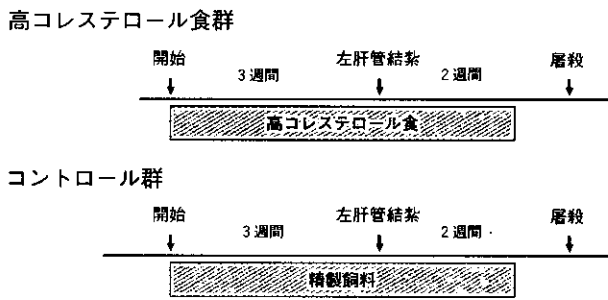


表1. 実験プロトコール

2. 病理組織学的検討

1) HE染色、粘液染色

全肝組織と胆道系を一括摘出し、10%ホルマリンで固定、全組織標本を4μmの連続切片にした後、HE染色の他、コロイド鉄染色、HID-alcian blue pH 2.5重染色、PAS染色などの粘液染色を施行した。

高コレステロール食群とコントロール群における左肝管結紮側と非結紮側の肝内大型胆管上皮組織、肝内胆管付属腺上皮組織、グリソン鞘、肝小葉組織を比較した。このほか、胆嚢上皮組織についても同様の染色を行ない比較した。

2) 肝内結石の析出

上記のHEおよび粘液染色下で肝組織片内における肝内結石析出の有無について検討した。

3) 胆嚢内胆汁の結石の析出

屠殺時に採取した胆汁を直ちに位相差顕微鏡で観察し、コレステロール石または結晶の析出の有無を観察した。

結果

1. 血液学データの検討

屠殺時における血液学的データを検討した結果、コントロール群に比べて高コレステロール食投与群の総コレステロール値とリン脂質が有意に高値を呈した。(p<0.05) (表2)

2. 肝内結石の生成

高コレステロール食群の6頭中5頭において左肝管結紮側の肝内大型胆管内にコレステロール結石が観察された。(図1)

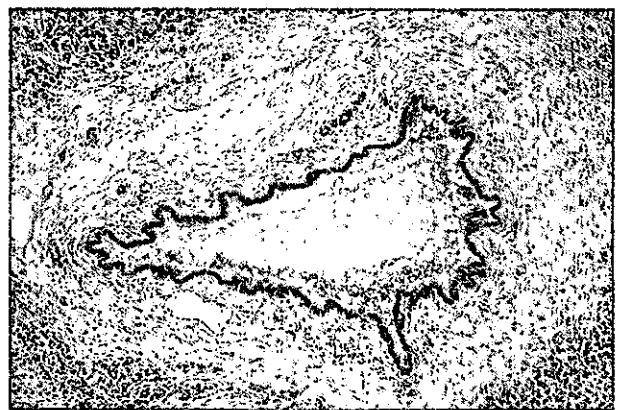


図1. 高コレステロール食群の左肝管結紮側。  
HE染色：大型胆管内にみられたコレステロール結石

一方、高コレステロール食群の非結紮側、コントロール群の両側の肝管内には結石が観察されなかった。

3. HE染色における肝内胆管上皮の変化

結石形成部より肝門側にかけて胆管上皮の高円柱化、乳頭状増生、重層化、粘液産生細胞数の増加な

表2. 血液学的データの分析

	高コレステロール食群	コントロール群	p 値
総ビリルビン (mg/dl)	0.58 ± 0.49	0.58 ± 0.56	有意差無し
中性脂肪 (mg/dl)	80.8 ± 62.0	228.5 ± 253.4	有意差無し
総コレステロール (mg/dl)	638.0 ± 328.2	125.5 ± 33.5	0.003
リン脂質 (mg/dl)	631.8 ± 193.0	250.2 ± 94.3	0.001
ホスホリパーゼA <sub>2</sub> (ng/dl)	85.5 ± 44.3	60.7 ± 14.7	有意差無し
プロスタグランジンE <sub>2</sub> (pg/ml)	84.2 ± 27.9	—	—

どの所見や胆管壁肥厚を認めた。これらの変化が胆管内腔の狭小化を来す原因になっているものと考えられた。また、肝組織において、細胆管増生が顕著に認められた。以上の変化は、結紮側では全例に認められたが、非結紮側やコントロール群の両側肝組織では認められなかった。(表3)(図2、3)

表3. HE染色による組織学的検討

	高コレステロール食群 (n=6)		コントロール群 (n=6)	
	結紮側	非結紮側	結紮側	非結紮側
粘液産生細胞の増加	6	0	0	0
高円柱上皮化	6	0	0	0
乳頭状増生	6	0	0	0
胆管壁肥厚	6	0	0	0
細胆管増生	6	0	0	0
グリソン鞘線維化	6	0	0	0
肝細胞変性	6	0	0	0

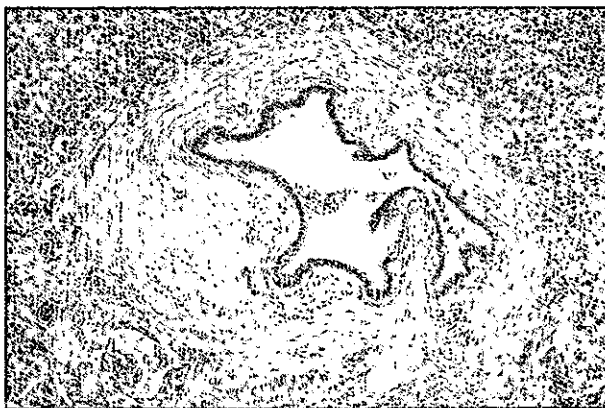


図2. 高コレステロール食群の左肝管結紮側。  
HE染色：胆管壁肥厚、乳頭状増生像

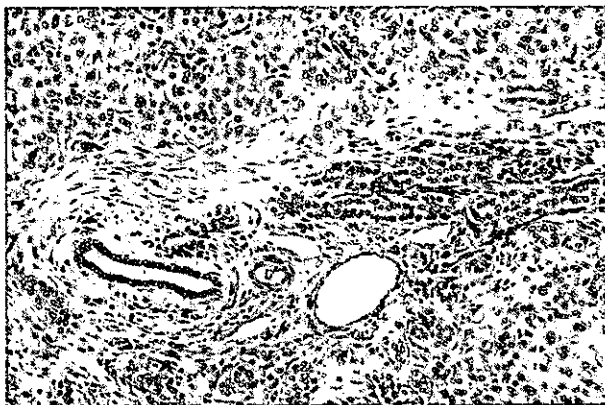


図3. 高コレステロール食群の左肝管結紮側。  
HE染色：細胆管増生像

#### 4. HE染色におけるグリソン鞘、肝小葉組織の変化

高コレステロール食群の結紮側のグリソン鞘では線維化、門脈周囲の線維化が認められた。肝小葉では肝細胞の二核化や好酸性変性が混在して認められ、肝細胞の再生やアポトーシスが示唆された。この結果、肝小葉の構築変化が認められた。(図4)

これらの変化は、結紮側では全例に認められたが、非結紮側やコントロール群の両側肝組織では認められなかった。

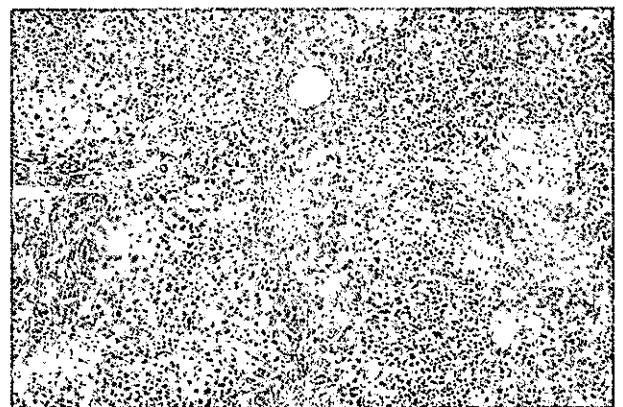


図4. 高コレステロール食群の左肝管結紮側。  
HE染色：グリソン鞘の線維化像

#### 5. コロイド鉄染色

コロイド鉄染色は青染することで粘液およびヒアルロン酸の存在を証明できるとされる。高コレステロール食群では、結紮側と非結紮側の胆管内腔に上皮表層に沿って染色性が認められたが、結紮側で有意に染色性が亢進しており、肝門部や結石部に近づくにつれて粘液の染色性が高まった。また、結紮側では円柱上皮化した胆管上皮は染色性を示さなかったものの、やや大型で円形の粘液産生細胞がコロイド染色で陽性を呈した。(表4)(図5)

コントロール群では、染色性が低下しており、大型、中型胆管上皮の表層にわずかに青染が認められた。

#### 6. HID-alcian blue pH2.5重染色

High iron diamin-alcian blue pH2.5重染色ではシアロムチンとスルホムチンを染め分けられる。シアロムチンは青染され、スルホムチンは黒染される。結果、高コレステロール食群の結紮側の大型胆管内

表 4. コロイド鉄染色による組織学的検討

染色性陽性	高コレステロール食群 (n=6)		コントロール群 (n=6)	
	結紮側	非結紮側	結紮側	非結紮側
結 石	6	0	0	0
細胆管内腔	4	2	0	0
中型胆管内腔	6	4	0	0
大型胆管内腔	6	3	0	0
粘液産生細胞 (胆管上皮)	3	0	0	0

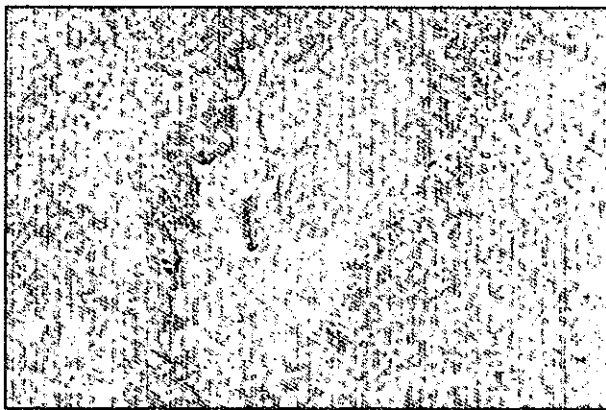


図 5. 高コレステロール食群の左肝管結紮側。  
コロイド鉄染色：中央にあるのは結石

の粘液および胆管上皮の粘液産生細胞が優位に青染され、これらがシアロムチンを含有していることが示唆された。また、両側の肝門部胆管内にシアロムチンの存在が観察された。(表 5) (図 6)

コントロール群では、高コレステロール食群の結紮側に比べて染色性が低下しており、大型、中型胆管上皮の表層にわずかに青染が認められるのみであった。

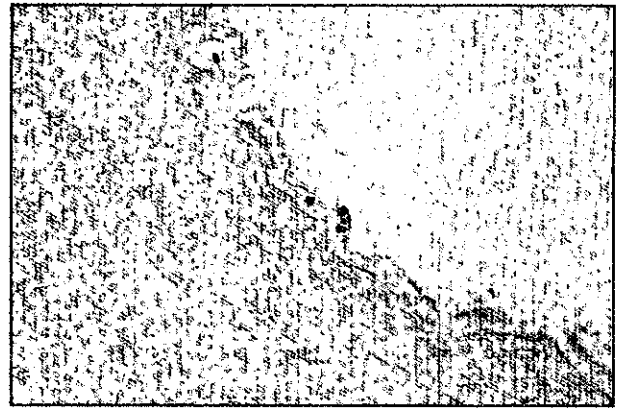


図 6. 高コレステロール食群の左肝管結紮側。  
HID-AB pH2.5重染色：胆管上皮内の粘液産生細胞が青染されている。

### 7. PAS染色 (消化試験法)

PAS染色ではグリコーゲンと中性ムチンが赤染されるが、グリコーゲン消化試験を行なうことでグリコーゲンが消化されて中性ムチンのみが赤染して残る。PAS染色の結果では正常肝細胞と結紮側の胆管の粘液産生細胞が染色された。さらにグリコーゲン消化試験を行なうと、結紮側の大型胆管粘液産生細胞と胆管上皮細胞質に赤染物質が残存していたことから、粘液産生細胞と胆管上皮内において中性ムチンの存在が示唆された。(表 6)

高コレステロール食群の非結紮側では胆管上皮で染色される粘液産生細胞の数が明らかに少なく、また染色性も低下していた。コントロール群でも同様の結果であった。

### 8. 胆嚢・胆汁の結石析出

胆嚢組織自体は正常胆嚢と差異は認められなかった。コントロール群では胆嚢内の結石の析出を認め

表 5. HID-alcian blue pH2.5重染色による組織学的検討

染色性陽性	高コレステロール食群 (n=6)				コントロール群 (n=6)			
	結 紮 側		非結紮側		結 紮 側		非結紮側	
	シアロ	スルホ	シアロ	スルホ	シアロ	スルホ	シアロ	スルホ
結 石	6	1 <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
細胆管内腔	4	0	0	0	0	0	0	0
中型胆管内腔	6	1 <sup>+</sup>	1	0	0	0	0	0
大型胆管内腔	6	1 <sup>+</sup>	2	0	0	0	0	0
粘液産生細胞 (胆管上皮)	5	1 <sup>+</sup>	0	0	1 <sup>+</sup>	0	0	0

<sup>+</sup>：染色性軽度

表6. PAS染色（消化試験法）による組織学的検討

染色性陽性	高コレステロール食群 (n=6)		コントロール群 (n=6)	
	結紮側	非結紮側	結紮側	非結紮側
結石	2	1 <sup>+</sup>	0	0
細胆管上皮細胞質	3	0	0	0
中型胆管上皮細胞質	3	1 <sup>+</sup>	0	0
大型胆管上皮細胞質	4	0	1 <sup>+</sup>	0
粘液産生細胞（胆管上皮）	6	0	1 <sup>+</sup>	0

<sup>+</sup>：染色性軽度

表7. 胆嚢胆汁の分析

	高コレステロール食群	コントロール群	p 値
総ビリルビン (mg/dl)	8.2 ± 10.3	7.0 ± 4.5	有意差なし
総コレステロール (mg/dl)	154.3 ± 127.5	110.3 ± 73.3	有意差なし
リパーゼ (IU/l)	18.8 ± 26.3	26.7 ± 38.4	有意差なし
トリプシン (ng/ml)	58.5 ± 13.1	50.0 ± 0.0	有意差なし
アミラーゼ (IU/l)	28.3 ± 20.6	53.3 ± 61.3	有意差なし

た例はなかったが、高コレステロール食群では2/6で胆嚢内に最大3mmまでのコレステロール結晶が認められた。残りの4頭中1頭に胆嚢内のdebrisを認めた。コントロール群では結石やdebrisは認められなかった。

胆嚢胆汁中の総ビリルビン、総コレステロール、リパーゼ、トリプシン、アミラーゼを分析したが両群には有意差はなかった。(表7)

## 考 察

われわれの用いたプレリードッグ肝内コレステロール結石モデル（高コレステロール食投与+左肝管結紮）で、6頭中5頭に肝内コレステロール結石が形成された。肝胆道組織の粘液染色による検討では、コレステロール結石が形成された胆管上皮では粘液産生細胞が著明に増加し、その粘液はシアロムチンと中性ムチンであった。この粘液産生細胞の増加にともなって胆管内の粘液量も増加していることが観察され、胆管内の粘液はシアロムチン優位であった。

これらの変化は胆管非結紮側やコントロール群では認められなかった。

このことから肝内コレステロール結石の形成に粘液産生が関与していることが示唆された。

## 文 献

- 1) 中山文夫, 古沢梯二, 志賀俊明, 他: 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 1979; 17-20
- 2) 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 1984; 19: 445-448
- 3) 佐藤 裕, 松村 潔, 森崎 隆, 他: 原発性肝内コレステロール結石症の1例. 胆と脾 1987; 8: 1341-1348
- 4) 羽生富士夫, 高田忠敬, 内山勝弘, 他: 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 1981; 37-41
- 5) 古味信彦: 胆道形成異常からみた肝内結石症. 肝胆脾 1982; 4: 343-348
- 6) 後藤明彦, 鬼束惇義, 林 勝知, 他: 肝内結石症とβ-Glucuronidase. 外科Mook 26 肝内胆石症 1982; 39-46



- 7) 中沼安二, 他: 肝内結石症の病理形態像. *日消誌* 1981; **78**: 874-882
- 8) 山本賢輔, 土屋涼一: 肝内結石症の成因と病理. *胆と膵* 1980; **1**: 1429-1436
- 9) Carey MC, Mazer NA: Biliary lipid secretion in health and in cholesterol gallstone disease. *Hepatology* 1984; **4**: 31-37
- 10) Nicoleau G, *et al*: Determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in man. *J Lipid Res* 1974; **15**: 94-98
- 11) Carulli N, Lpria P, Bertolotti M, *et al*: Effect of acute changes of bile acid pool composition on biliary lipid secretion. *J Clin Invest* 1984; **74**: 614-624
- 12) Nicoleau G, Shafer S, Salen G, *et al*: Determination of hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity in man. *J Lipid Res* 1974; **15**: 164-151
- 13) Carey MC: Increased biliary lithogenicity through cholesterol supersaturation. Gallstone Disease: Pathophysiology and therapeutic approaches, (Swobodnik W, Ditschuneit H), Springer, Heiderverg, 1990; 3-10
- 14) 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* 1974; **66**: 1036-1045
- 15) 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* 1976; **87**: 987-988
- 16) Strichartz SD, Abedin MZ, Abdou MS, *et al*: Increased biliary calcium in cholesterol gallstone formation. *Am J Surg* 1988; **155**: 131-137
- 17) Doty JE, Pitt HA, Kuchenbecker SL, *et al*: Impaired gallbladder emptying before gallstone formation in the prairie dog. *Gastroenterology* 1973; **85**: 168-174
- 18) 森 俊幸, 跡見 裕, 黒田 慧, 他: 肝内コレステロール胆石の実験生成—肝内コレステロール胆石の成因とその特徴. *胆と膵* 1996; **17**: 645-651

# 肝内結石症実験モデルの作成

弘前大学医学部 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

工藤 大輔, 一戸 和成

## 目 的

肝内結石症は良性疾患でありながら再発を繰り返す難治性の疾患で最近では胆道癌の合併も問題となってきた。本症の病因に関しては未知の部分が多いが、本疾患の病態は持続する増殖性胆管炎が最も特徴的とされる。すなわち、増殖性胆管炎の粘膜から分泌されるムチン成分を大量に含んだ粘液の分泌は結石の成長、増加や、碎石後の結石再発に大きな影響を与えている<sup>1)</sup>。また前癌状態としての増殖性胆管炎の存在も現在大きな問題となりつつある<sup>2)</sup>。これらの病態が明らかになるにつれ、本症を再現可能な動物実験モデルの作成が必要とされるようになってきた。これまで、われわれは雑種成犬を用い肝内胆汁うっ滞と経門脈的胆道感染を負荷し肝内結石の生成と増殖性胆管炎の発生を確認しえた。しかしながら、このモデルは結石の生成まで18か月を要し、また胆道細菌感染を負荷するため感染症による実験途中での死亡も多く18か月の期間に約40%という死亡率であった。このようにこのモデルは病態解明を進める上で決して効率的なモデルではなかった。本症の病態を明らかにし、診断や治療法を開発する上でより確実に簡便な実験モデルが求められている。そこで本研究では肝内結石症を短期間で確実に発症できるモデルの開発を本研究の目的とした。

## 方 法

6頭の雑種成犬(8-12kg)を全身麻酔下に開腹し胆嚢摘出後、総胆管を2カ所切開しその間に総胆管径より細い径である5Frシリコンコーティングチューブを間置した(図1、2)。この状態で通常飼育し、3か月後に犠牲死させ直ちに肝をホルマリンにて還流固定し肝内結石発生の有無と増殖性胆管炎の有無を観察した。またその際、得られた胆汁をSDSで処理し定量的にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い分子量の観察を行った。また、胆汁をアセトン・エーテルで脱脂し高速液体クロマトグラフィー(ゲルろ過型:Shodex KB804)にて分子量分布を観察した<sup>3)</sup>。

## 結 果

肉眼的所見では肝内胆管および肝外胆管に著明な拡張が認められた(図3)。肝の形状および大きさ、色調に大きな変化は認められなかった。また、6頭中のいずれにも肝内、肝外胆管に結石の形成は認められなかった。しかし、胆管内には胆泥状のものを認めた。組織学的には胆管の一部に胆管上皮の乳頭状増殖と粘液腺の増生が認められた(図4)。PAS-Alcian blue染色ではPAS陽性の中性粘液の増加とAB陽性の酸性粘液の増加が特徴的であった。また肝細胞はほぼ正常な形態を保っていたが、なかには胆汁栓を含むものもあり、胆汁うっ滞の所見が

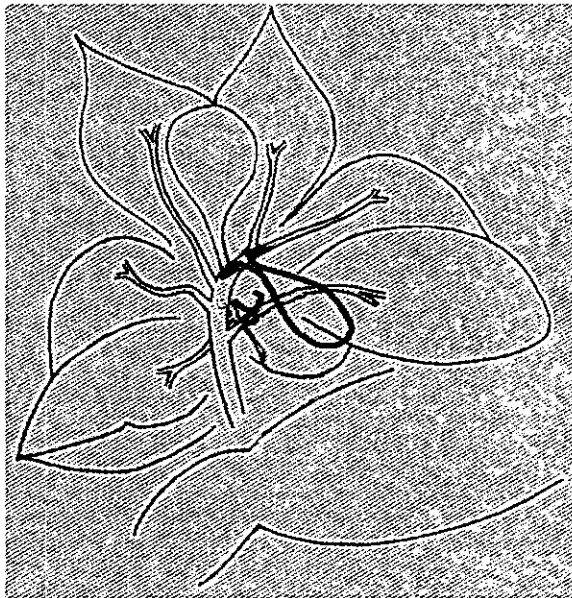


図1. 実験モデルの改良

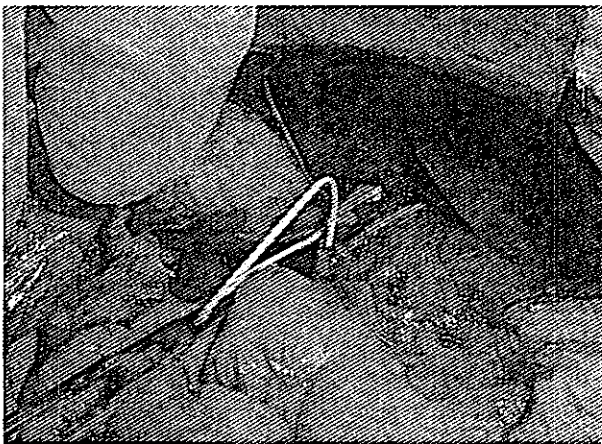


図2. 実際の作成手術



図3. 作成後90日の胆管像(著明拡張例)

見られた。SDSポリアクリルアミド電気泳動では胆汁うっ滞群がコントロール群に比べ全体に染色濃度が濃く、胆汁うっ滞群でタンパクの増加が認められた(図4)。また、高速液体クロマトグラフィーによる組成分析では胆汁うっ滞群では全体的にピークの増高が見られ、特に $V_0$ 付近の高分子領域の増加が著明であった(図5)。以上から、本実験では明らかな結石の生成は認められなかったが、肝内結石症に特徴的な増殖性胆管炎の所見が一部の胆管壁に認められた。また、胆汁の生化学分析では高分子糖タンパク質の軽度の増加が認められた。

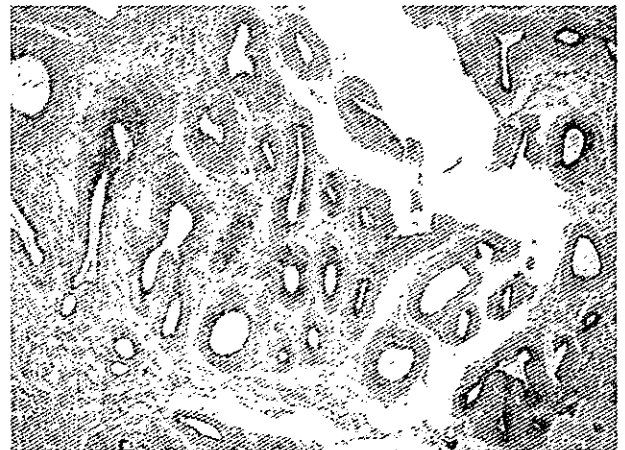


図4. 胆管壁の組織像(PAS-AB)

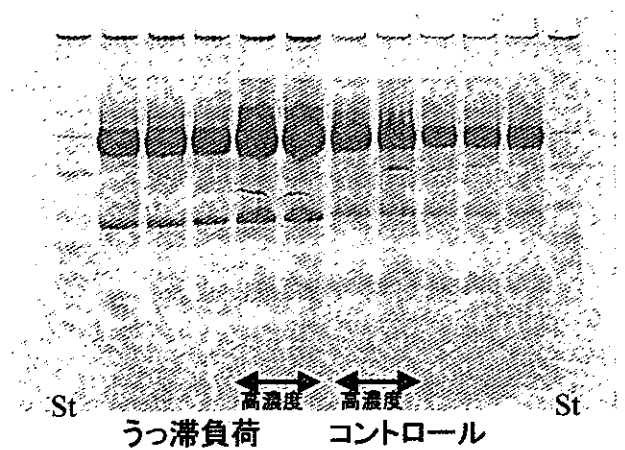


図5. 胆汁のSDS-PAGEによる比較

### 考 察

この実験モデルの当初の目的であるより簡便、確実に肝内結石症を発症する実験モデルを作成すると

いう意味では、本実験モデルはその目的を達成していない。しかし、簡便に作成するという点に関して本実験モデルは作成が簡単で、術後の肝膿瘍発生、多次手術による手術関連死がなく当初の目的の一つを果たしていると思われる。また、肝内結石の発生に関してはわずかに胆砂のみしか発生しなかった。このことはもっと時間をかければ結石へと成長するのかあるいは胆砂のままなのかここでは結論づけられない。しかし、組織学的には増殖性胆管炎の所見が一部の胆管壁に認められ、肝内結石症の病像をよく表現しているものと思われた。また、増殖性胆管炎の特徴である粘液腺の増加の結果、胆汁内には酸性ムチンが分泌されていることになるが生化学分析の結果は確かに高分子酸性糖タンパク質が増加していることが確認された。したがって、この実験モデルを作成後3か月の状態は肝内結石症発症の初期段階と考えることも良いと思われた。今後この実験モデルを真の肝内結石症実験モデルとして完成させるには以下の方法が考えられる。一つにはこのままの方法で期間を長くすることである。その期間は6か月が良いのか12か月が良いのかは現時点で判断することは難しい。しかし、実験期間が12か月を超えると実験動物の管理のうえで問題点が多く実用的ではなくなる。もう一つの方法は胆汁うっ滞と同時に胆管上皮に損傷を与えることである。すなわち、細菌胆道感染を負荷するか、物理的、化学的に胆管粘膜を損傷させることである(図6)。細菌感染に関しては

以前のモデルでわれわれが用いた方法であるが、感染の管理は難しく感染による死亡率も高く実際的でない。したがって、より簡便な化学的あるいは物理的な粘膜損傷がより実際的な方法と考えられる。

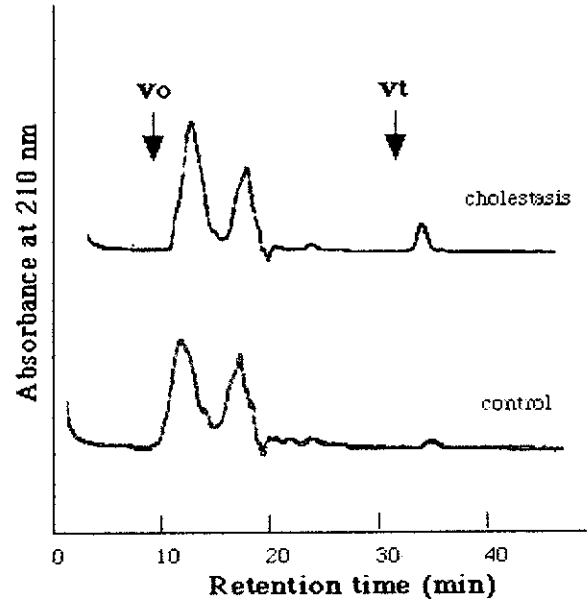


図6. HPLCによる胆汁中糖蛋白質の分子量の検討 (Shodex KB804)

文 献

- 1) Akaishi S, *et al*: Possible role of hepatic bile mucus glycoprotein in development of intrahepatic gallstones. *J Gastroenterol* 1995; **30**: 758-763
- 2) 佐々木睦男, 他: 経十二指腸乳頭形成術. *臨外* 2001; **56**: 371-376
- 3) 佐々木睦男, 他: 肝内結石症モデル犬の胆汁中糖蛋白質の変化. *日消外会誌* 1989; **22**: 2887

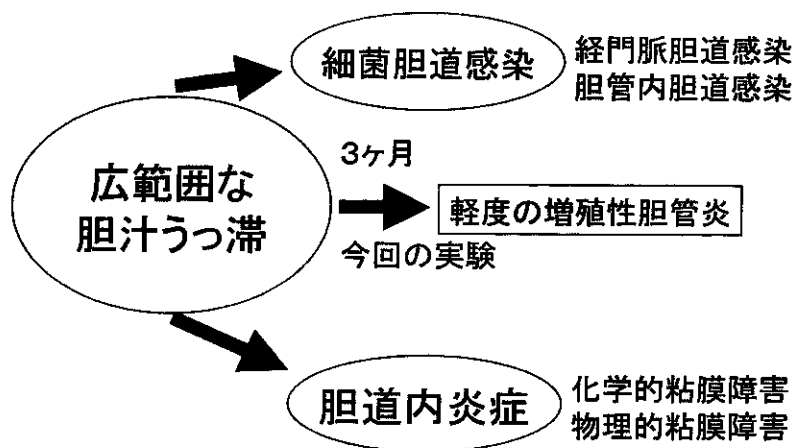


図7. 今後の方針

# 肝内結石症における慢性増殖性胆管炎ならびに ムチン過分泌の病態因子の検討 —シクロオキシゲナーゼ-2 および プロスタグランジン E 受容体の解析より—

筑波大学 臨床医学系消化器内科<sup>1)</sup>

京都大学 薬学系大学院<sup>2)</sup>

名古屋大学大学院 器官調節外科<sup>3)</sup>

研究協力者 田中 直見<sup>1)</sup>

共同研究者 正田 純一<sup>1)</sup>, 浅野 徹<sup>1)</sup>

加納 雅仁<sup>1)</sup>, 松崎 靖司<sup>1)</sup>

杉本 幸彦<sup>2)</sup>, 市川 厚<sup>2)</sup>

二村 雄次<sup>3)</sup>, 神谷 順一<sup>3)</sup>

## はじめに

肝内結石症は良性疾患でありながら、遺残結石や結石再発のため難治性となりやすく、その治療ならびに再発防止のためには結石の成因解明が待たれる状況である。

肝内結石症の成因においては、従来より胆汁うっ滞と細菌感染が結石形成の重要な因子であるとされてきた<sup>1)</sup>。しかし最近ではその他の病態因子として、コレステロール過飽和胆汁生成をきたす肝コレステロール・胆汁酸生合成の異常 (*Gastroenterology* 108: 1534-46, 1995)<sup>2)</sup>、リン脂質の肝内輸送および胆汁分泌機構の異常 (*Hepatology*, 2001, in press)<sup>3)</sup>、胆管炎<sup>4)</sup>とそれに関連した胆管上皮からの高分子粘液糖蛋白 (ムチン) の過剰分泌<sup>5)</sup>が結石形成、増大に重要であることが明らかとなりつつある (図1)。従来より胆管上皮におけるプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生の増加は、胆管上皮の炎症とムチン過分泌を引き起こすことが知られてきたが、我々は本班研究を通じて、分泌型低分子ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (以下PLA<sub>2</sub>) が本症に見られる慢性増

殖性胆管炎の増悪因子として、またムチンコア蛋白遺伝子の発現異常がムチン分子の物理・化学的変化を引き起こすことで、肝内結石症の成因論の立場より重要であることを報告した (*Hepatology* 29: 1026, 1999)<sup>6)</sup>。

本症の胆管上皮におけるムチン過剰分泌の病態には、このようにPLA<sub>2</sub>の誘導発現によるアラキドン酸カスケードの活性化が重要であることが判明してきたが、アラキドン酸カスケードの活性化にかかわる諸因子、特にシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)

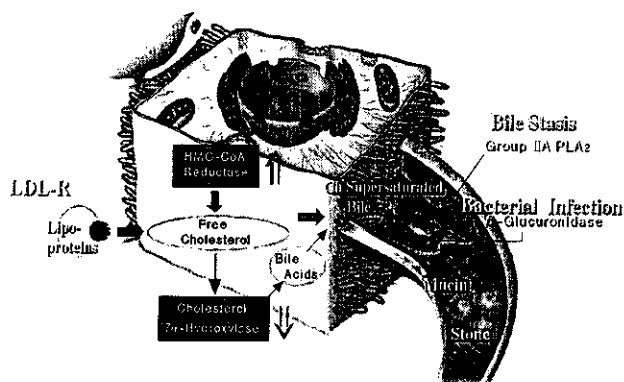


図1. 肝内結石症の生成機序

の誘導、またプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の産生増加とムチン分泌にかかわるPGE<sub>2</sub>の情報伝達機構について詳細なる検討は未だなされていない。PGE<sub>2</sub>は半減期の非常に短いオートコイドであり、その情報伝達には標的細胞の細胞膜におけるプロスタグランジンE受容体 (EP) が介在することが知られるようになってきた。<sup>7,8</sup> そこで今回は本症の成因に重要である慢性増殖性胆管炎とムチン過剰分泌の病態因子の解明のため、本症の胆管におけるPLA<sub>2</sub>、COX-2、EPサブタイプの発現様式について免疫組織化学ならびに*in situ*ハイブリダイゼーション法にて解析を行った。

### 対象と方法

肝内結石20例 (ビリルビンカルシウム石20例)、総胆管結石17例、胆嚢結石24例を対象とし、手術時に得られた胆管胆汁および胆管組織 (慢性増殖性胆管炎を呈する結石存在部位および結石非存在部位) について解析した。

胆管胆汁では、分泌型低分子PLA<sub>2</sub>であるIIA型PLA<sub>2</sub>に着目して、胆汁中IIA型PLA<sub>2</sub>濃度を抗ヒトIIA型PLA<sub>2</sub>モノクローナル抗体を用いたRIA法<sup>9</sup>にて測定した。さらに胆汁中PLA<sub>2</sub>活性、総ムチン濃度、リゾホスファチジルコリン濃度、ならびにPGE<sub>2</sub>濃度の測定をおこなった。

胆管組織では、IIA型PLA<sub>2</sub>を含むPLA<sub>2</sub>アイソフォームのmRNAの発現は既報<sup>6</sup>にもとづきRT-PCR法にて解析した。COX-2およびEPサブタイプのmRNAの発現についても同様に解析をおこなった。さらにCOX-2については免疫染色を、またEPサブタイプについては組織内分布を明らかにする目的にて*in situ*ハイブリダイゼーション法にて解析を行った。

### 成績

#### 1. 胆汁中IIA型PLA<sub>2</sub>濃度および胆汁組成の変化

表1は本症、総胆管結石症および胆嚢結石症の胆管胆汁における胆汁中IIA型PLA<sub>2</sub>濃度、PLA<sub>2</sub>活性、PGE<sub>2</sub>濃度、リゾホスファチジルコリン (lysoPC) 濃度および総ムチン濃度を示したものである。本症および総胆管結石症における胆汁中IIA型PLA<sub>2</sub>濃度は結石を認めない胆嚢結石症に比して有意に高値であった。また本症においては、肝胆汁であってもまた総胆管胆汁であっても、結石側における胆汁中IIA型PLA<sub>2</sub>濃度は非結石側に比して有意に高値であった。

胆汁中PLA<sub>2</sub>活性の増加を反映して胆汁中lysoPC濃度は本症では高値であり、胆管壁におけるアラキドン酸カスケードの活性化を反映してPGE<sub>2</sub>の胆汁濃度も本症の結石側の胆汁で顕著に増加した。また

表1. Comparison of Ductal Bile of Patients with Gallbladder Stones, Those with Common Bile Duct Stones, and Those with Intrahepatic Calculi

		Gallbladder Stones CBD <sup>-</sup> (n=24)	Common Bile duct Stones CBD <sup>+</sup> (n=17)	Intrahepatic Calculi	
				IHBD <sup>+</sup> (n=20)	IHBD <sup>-</sup> (n=19)
sPLA <sub>2</sub> -IIA conc.	(ng/dL)	22 ± 2	100 ± 19*	281 ± 42*	78 ± 20 <sup>†</sup>
sPLA <sub>2</sub> activity	(nmol/min/mL)	2.3 ± 0.1	9.2 ± 0.9*	15.7 ± 3.0*	ND
PGE <sub>2</sub> conc.	(pg/mL)	663 ± 61	2,225 ± 420*	3,347 ± 405*	ND
LysoPC	(nmol/mL)	21 ± 3	83 ± 9*	142 ± 16*	67 ± 12
Total mucin conc.	(mg/mL)	0.10 ± 0.01	0.31 ± 0.04*	0.43 ± 0.04*	0.17 ± 0.01 <sup>†</sup>

NOTE. Values are given as means ± SEM.

Abbreviations; LysoPC, lysophosphatidylcholine; CBD, bile from common bile ducts; IHBD, bile from intrahepatic bile ducts; +, affected by gallstones; -, inaffected; ND, not determined.

\*P < .01. Significantly different from control subjects.

<sup>†</sup>P < .05. Significantly different from control subjects.

PGE<sub>2</sub>のムチン分泌促進効果を反映して、胆汁中総ムチン濃度は本症の結石側の胆汁で顕著に増加していた。

### 2. 胆管におけるPLA<sub>2</sub>アイソフォームmRNAの発現

図2は本症の胆管組織におけるPLA<sub>2</sub>アイソフォームのmRNAの発現について示したものである。胆汁中IIA型PLA<sub>2</sub>濃度の増加を反映して、本症の胆管組織におけるIIA型PLA<sub>2</sub>のmRNA発現は図2に示すように、結石存在部位の胆管では対照あるいは結石非存在部位の胆管に比して著しく増加していた。また興味深いことに、V型PLA<sub>2</sub>およびX型PLA<sub>2</sub>は結石存在部位の胆管のみにそれらのmRNAの発現を認めた。

### 3. 胆管におけるCOX-2の発現

図3は本症の胆管組織におけるCOX-1およびCOX-2のmRNAの発現について示したものである。本症の胆管ではアラキドン酸カスケードの活性化を反映して、IIA型PLA<sub>2</sub>に加えて、誘導型シクロオキシゲナーゼであるCOX-2のmRNAの発現を認めた。

図4は本症の胆管組織におけるCOX-2の免疫染色の結果を示したものである。慢性増殖性胆管炎を呈する結石存在部位胆管におけるCOX-2蛋白の組織内分布は胆管上皮(図4A)ならびに増生粘液腺の腺管上皮(図4B)が主体であった。

### 4. 胆管におけるEPサブタイプの発現

図5に示すようにプロスタグランジンE受容体(EP)にはEP1、EP2、EP3およびEP4の4種類のサ

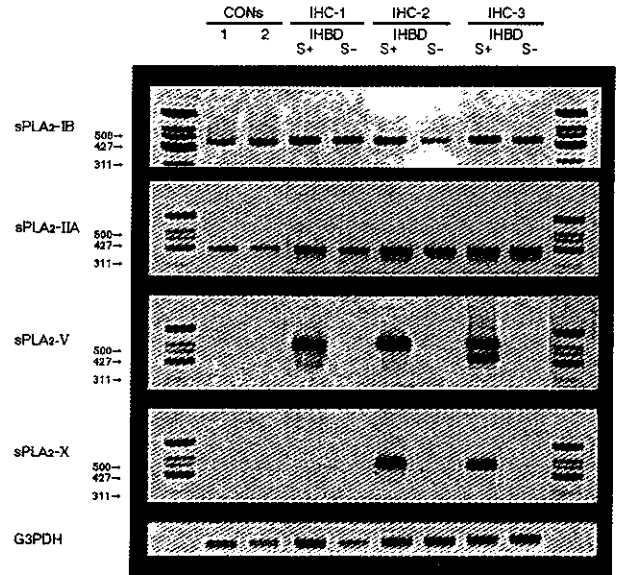


図2. 肝内結石症の胆管における分泌型PLA<sub>2</sub>アイソフォームmRNAの発現

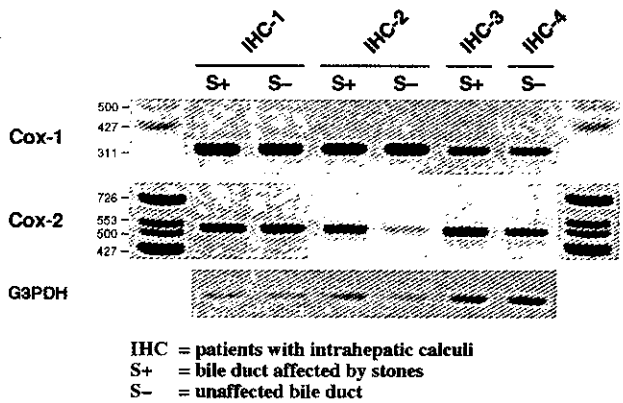


図3. 肝内結石症の胆管におけるCOX-1およびCOX-2 mRNAの発現



図4. 肝内結石症の胆管におけるCOX-2の発現

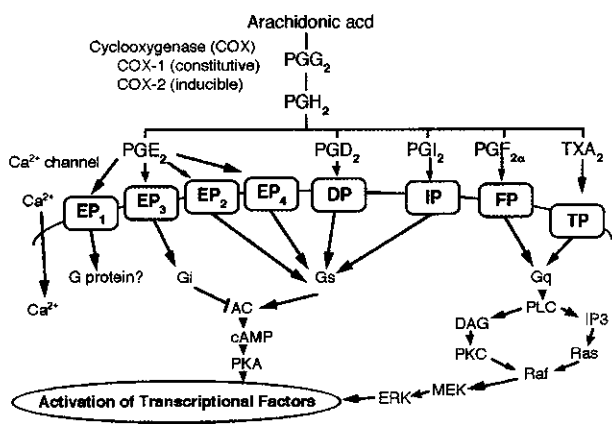


図5. アラキドン酸カスケードとプロスタグランジンE受容体

ブタイプが存在することが明らかとなっている。EPサブタイプはそれぞれ異なるG蛋白質と連関することで情報伝達を行うことが明らかとなっており、EP1の情報伝達はG蛋白質を介するCa<sup>2+</sup>イオンの動員系、EP2、EP3、EP4の情報伝達はG蛋白質を介するアデニルシクラーゼ活性系、すなわちcAMPの産生系である。

図6は本症の胆管組織におけるEPサブタイプのmRNAの発現について示したものである。本症の胆管ではEP1を除くEP2、EP3およびEP4のmRNAの発現を認めた。EP2、EP3およびEP4の組織内分布を検討するために、EPサブタイプのmRNAの発現について*in situ*ハイブリダイゼーション法にて解析を行った。図7はその結果を示したものである。ムチン分泌に重要な役割を演じていると考えられているEPサブタイプの発現は、*in situ* hybridizationによる解析の結果、慢性増殖性胆管炎においては腺管上皮に一致してEP2、EP3、EP4のmRNAのシグナルを認めた。重要なことはEPサブタイプのmRNA発現はCOX-2と同様に増生粘液腺の腺管上皮において認められた点であった。

### 考 察

慢性増殖性胆管炎は原発性肝内結石症では病理学的に必発の所見であり<sup>3</sup>、同部位においては胆管内外で付属腺、特に粘液腺が著しく増生し、シアロム

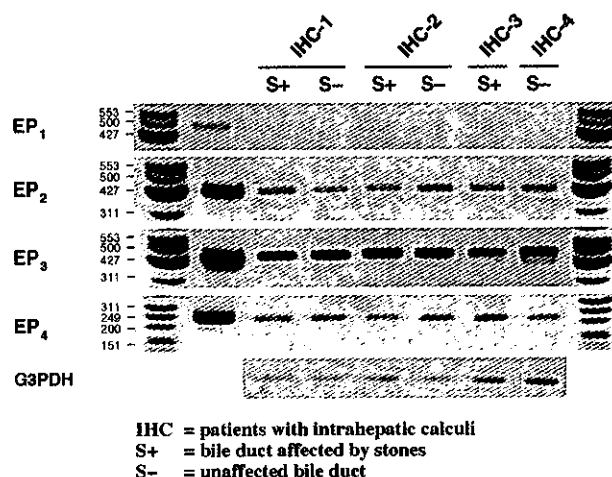


図6. 肝内結石症の胆管におけるプロスタグランジンE受容体mRNAの発現 (I)



図7. 肝内結石症の胆管におけるプロスタグランジンE受容体mRNAの発現 (II)

チンあるいは硫酸ムチンの酸性ムチンが大量に染色される<sup>4</sup>。胆管炎ならびにそれに関連した胆道上皮からのムチン過剰分泌は、肝内結石症の成因に重要な役割を演じていると考えられる。本症の成因解明のためには、胆管炎ならびにムチン過剰分泌にかかわる病態因子の解析が必須であると考えられる。

今回の解析結果より、本症の結石存在部位の胆管(慢性増殖性胆管炎)では、アラキドン酸代謝の活性化により炎症の進展ならびにPGE<sub>2</sub>産生に重要な役割を演じていると考えられているIIA型PLA<sub>2</sub>およびCOX-2の発現誘導認められ、またEPサブタイプのEP2、EP3、EP4の発現が腺管上皮において認められた。これらの変化は慢性増殖性胆管炎の重要な病態因子でありまたムチン過剰分泌の促進因子であると考えられ、本症の胆管胆汁におけるPGE<sub>2</sub>ならびに総ムチン濃度の顕著な増加を説明づけるものであった。

本症では胆汁うっ滞、細菌感染、異常肝胆汁の生成(コレステロール過飽和胆汁)の病態において、



胆管上皮では誘導発現されたIIA型PLA<sub>2</sub>を始めとする分泌型低分子PLA<sub>2</sub>が胆汁中に分泌され、胆汁中リン脂質を加水分解し、遊離アラキドン酸を産生する。遊離したアラキドン酸は胆管上皮に吸収され、PGE<sub>2</sub>合成のための基質となる。このようにして産生されたPGE<sub>2</sub>は胆管上皮の炎症機転に関与し、さらに胆管上皮に発現するEPサブタイプを紹介する情報伝達により、ムチン産生の増加とその分泌を引き起こすものと推測された。

## 結 語

肝内結石症の胆管上皮や増生粘液腺の腺管上皮では胆管炎の増悪因子と考えられる分泌型低分子PLA<sub>2</sub>およびシクロオキシゲナーゼ-2の発現誘導が生じており、さらにPGE<sub>2</sub>に対するプロスタグランジンE受容体の発現が確認された。これらの異常は本症の発生、進展に深く関与する炎症ならびにムチン過剰分泌の病態因子として重要であると考えられた。

## 文 献

- 1) Maki T: Pathogenesis of calcium bilirubinate stone: role of *E. coli*,  $\beta$ -glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. *Ann Surg* 1966; **164**: 90-100.
- 2) Shoda J, He B-F, Tanaka N, *et al*: Primary dual defect of cholesterol and bile acid metabolism in liver of patients with intrahepatic calculi. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1534-1546.
- 3) Shoda J, Oda K, Suzuki H, *et al*: Metabolic defects of cholesterol, phospholipid, and bile acid in the liver of patients with intrahepatic calculi, and etiological significance. *Hepatology* 2001, In press.
- 4) Nakanuma Y, Terada T, Nagakawa T, *et al*: Pathologic features of hepatolithiasis in Japan. *Human Pathol* 1988; **9**: 1181-1186.
- 5) Terada T, Nakanuma Y: Morphological examination of intrahepatic bile ducts in hepatolithiasis. *Virchow Archiv A* 1988; **414**: 167-176.
- 6) Shoda J, Ueda T, Ikegami T, *et al*: Increased biliary group II phospholipase A<sub>2</sub> and altered gallbladder bile in patients with multiple cholesterol stones. *Gastroenterology* 1997; **112**: 2036-2047.
- 7) Ding M, Kinoshita Y, Kishi K, *et al*: Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins* 1997; **53**: 199-216.
- 8) Moromoto K, Sugimoto Y, Katsuyama M, *et al*: Cellular localization of mRNAs for prostaglandin E receptor subtypes in mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1997; **272**: G681-G687.
- 9) Ueda A, Misaki A, Yamauchi A, *et al*: Immunoradiometric assay for group II phospholipase A<sub>2</sub>. *Jpn J Clin Chem* 1993; **22**: 180-184.

# 肝内結石症の結石形成におけるオステオポンチンの関与

金沢大学大学院 形態機能病理

研究協力者 中沼 安二

共同研究者 原田 憲一, 全 陽

## はじめに

オステオポンチン (OPN) は、骨形成や尿路結石などの生理的および病的石灰化に関与していると考えられている。ヒトOPNは約300アミノ酸からなり、2カ所のカルシウム結合部位とヘパリン結合部位、また、細胞接着能を有するアルギニン、グリシン、アスパラギン配列 (RGD配列) が存在する。さらに、N末端には分泌蛋白特有のシグナル配列を有する。OPNは、リン酸化、高次構造、側鎖のシアル酸の有無によってカルシウム結合能が変化し、周囲の微小環境に応じて石灰化を制御していると考えられている。

多発性嚢胞腎ラット (PCKラット) は、Sprague-Dawleyラット (SDラット) から見いだされた常染色体劣性遺伝形式を示すラットである。我々は、PCKラットの肝内に胆管の分節状拡張による多発性嚢胞状病変が見られ、ヒトカロリ病に類似する動物モデルとして報告した<sup>1)</sup>。また、我々は、PCKラットに自然発症的に肝内結石を合併することを見だし、ヒト肝内結石症の病態解析に有用なモデルとして注目している。

今回、我々は肝内結石症の結石形成機序を解明するため、ヒト肝内結石症とPCKラットを対象とし、結石形成におけるOPNの関与について検討した。

## 対象と方法

### 1. ヒト肝組織におけるOPN発現の検討

Reverse Transcription-polymerase chain reaction

(RT-PCR): 外科的切除にて得られた肝内結石症11例の新鮮凍結材料を対象に、肝組織から全RNA抽出後、ランダムプライマーにて逆転写反応を行いcDNAを得た。これらcDNAを鋳型として、ヒトOPN mRNAに特異的なプライマー (Forward, 5'-TATGATGGCCGAGGTGATAGTG-3'; Reverse, 5'-TGAACATAGACATAACCCTGAAGC-3') にてPCRを施行し、OPN mRNAを検出した。

*in situ* hybridization (ISH): 肝内結石症の凍結肝組織切片を対象に、ジゴキシゲニン (DIG) 標識したcRNAプローブを用いてISHを行い、胆管上皮におけるOPN mRNAの発現を検討した。

免疫組織化学的検討: 対象は、肝内結石症30例と対照疾患として原発性硬化性胆管炎3例 (すべて肝硬変期)、C型慢性肝炎4例、肝外閉塞性黄疸4例、組織学的正常肝11例。すべて肝門部大型胆管を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片。抗OPN抗体 (クローンMPIIB10, University of Iowa, Iowa, USA) を用い、ダコENVISION法にて免疫組織化学的染色を施行した。

ウエスタンブロット法: 対象は、肝内結石症3例の総胆管胆汁と、正常胆汁として胃癌患者の摘出胆嚢胆汁2例。胆汁をポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) で展開後、ニトロセルロース膜に転写し、抗OPN抗体にてOPN蛋白を検出した。

### 2. PCKラットにおけるOPN発現の検討

対象は、生後~月齢15ヶ月のPCKラットおよびコントロールとしてSDラット。肝内結石合併の有無、石灰沈着に関する組織学的検討の他、細菌の分

子生物学的同定、免疫組織化学的染色によるOPN蛋白の検出を行った。

## 結 果

### 1. ヒト肝組織中のOPN発現

RT-PCRにて肝内結石症全例にOPN mRNAが検出され、また、ISHにて肝内結石症の胆管上皮にOPN mRNAの発現が見られた。

免疫組織化学的染色によるOPN蛋白の発現は、主に大型胆管、胆管付属腺と浸潤単核細胞に種々の程度に見られ、肝実質や末梢小型胆管でのOPN発現は認めなかった。特に肝内結石症では、結石非含有胆管と胆管付属腺での強発現が目立った。(図1) 結石原基と思われる顕微鏡的微小結石を含有する胆管上皮ではOPNの発現を認めたが、大型結石を含有する残存胆管(多くは脱落している)でのOPN発現は弱陽性から陰性であった。(図2) また、結石内の粘液層と思われる層にもOPN蛋白が認められ、同部には軽度の石灰沈着(コッサ染色による)を伴っていた。対照疾患として用いた原発性硬化性胆管炎でもOPN陽性大型胆管が散見されたが、C型慢性肝炎や組織学的正常肝の大型胆管は陰性～弱陰性であった。(表1)

ウエスタンブロット法にて、肝内結石症の総胆管胆汁ならびに正常胆嚢胆汁全例で、40～70kDa付近に2本、30kDa前後に1本のバンドを認めた。



図1

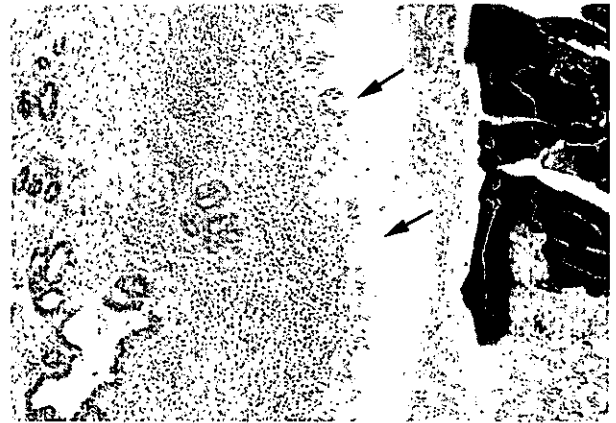


図2

表1. ヒト肝組織におけるオステオポンチンの発現

症 例	大型胆管	胆管付属腺
肝内結石症	++～+*	++
原発性硬化性胆管炎	+～-	++
ウイルス性慢性肝炎	-～+	-～+
組織学的正常肝	-～+	-～+

\*: 結石含有胆管上皮

### 2. PCKラットでのOPN発現

PCKラットにおける肝内結石の合併は、9ヶ月頃から見られ、9ヶ月～15ヶ月齢の7%(41匹中3匹)の頻度であった。結石は肉眼的に黒色調であるが、顕微鏡的にHE染色による染色性は乏しかった。しかし、コッサ染色陽性の石灰様沈着物が結石辺縁に見られ、偏光にて結石内に針状の沈着物が見られた。(図3) また、結石周囲にグラム陽性および陰性の細菌塊が見られ、分子生物学的同定にて *Corynebacterium* 属菌(グラム陽性、腸内細菌)、*Enterococcus faecalis*(グラム陽性、腸内細菌)、*Pasteurella pneumotropica*(グラム陰性、ラット口腔、咽頭の常在菌)が検出された。

OPN蛋白の発現は、PCKラットの肝内胆管、胆管付属腺および結石内にもみられた。(図4)(図5) 胆管におけるOPN発現は、主に結石非含有胆管に見られ、結石を容れる拡張胆管でのOPN発現は乏しかった。対照であるSDラットでのOPN発現は、胆管付属腺のみであった。

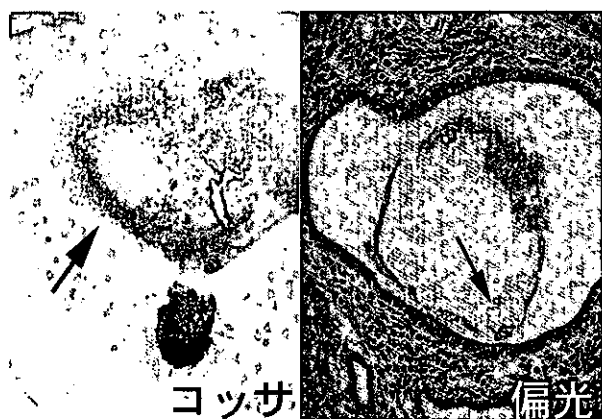


図 3

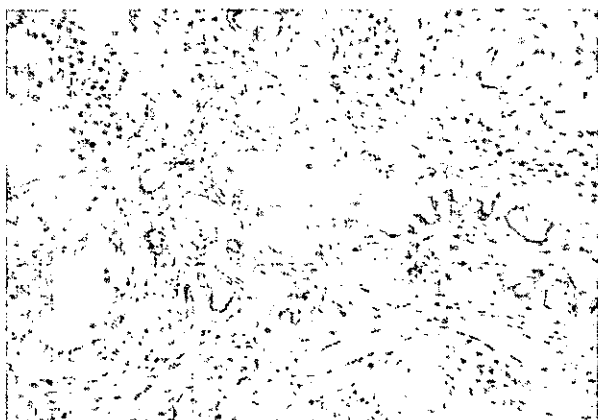


図 4

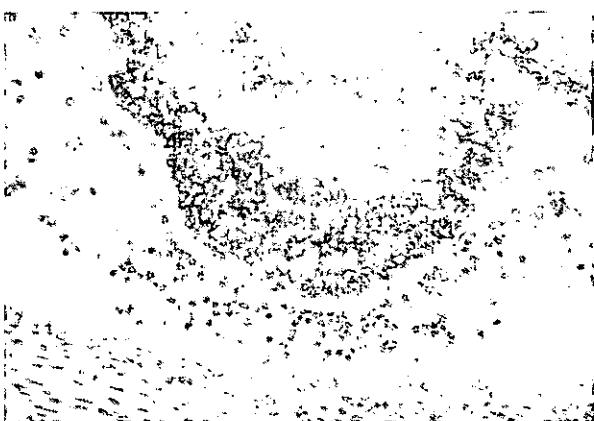


図 5

### 考 察

OPNは、当初、骨を形成する糖蛋白として同定、命名され<sup>2)</sup>、その後、生理的石灰化のみならず病的石灰化（腎結石、癌細胞の石灰化、動脈硬化）での役割も明らかにされつつある。OPNは、アミノ酸構

造上、カルシウムイオンに親和性をもつアスパラギン酸、グルタミン酸が全体の50%以上を占めており、強いカルシウム結合能を有する。また、組織内での石灰沈着部とOPN沈着部との類似性があることから、OPNは石灰化の促進因子と考えられていた。しかし、尿路結石におけるOPNの研究が進み、結石形成の促進のみならず抑制としても作用していることがわかってきた。たとえば、OPNが高次構造をとって存在する場合や側鎖であるシアル酸で修飾されている場合、結石形成を抑制することが示されており<sup>3)</sup>、*in vivo*では抑制因子（または促進作用の低下）として作用していることが推測される。また、結石形成におけるOPNの細胞接着作用の重要性も指摘されている。すなわち、溶液中にOPNがフリーの状態で存在すると蓆酸カルシウム結晶の成長を抑制するが、OPNが尿細管細胞などに接着した状態では、その表面に蓆酸カルシウム結晶が成長していくことが示されており<sup>4)</sup>、さらに、トロンピンによりOPNの細胞接着能が阻止されると結石形成の抑制として作用することも報告されている<sup>5)</sup>。したがって、OPNは自らの構造の変化や細胞との接着によって、溶液中のカルシウムを放出または蓄積する二面性を有しており、微小環境に応じて石灰化（結石形成）を制御しているものと推測される。

今回の検討より、肝内大型胆管と胆管付属腺の上皮にOPN産生能が証明され、また、胆汁中にもOPNが存在していたことから、胆管上皮からOPNが胆汁中に分泌されていることが示唆された。特に、肝内結石症ではOPNの発現亢進が見られ、結石内でのOPN沈着部と石灰沈着部との類似性が見られたことから、結石形成におけるOPNの関与が強く示唆された。しかし、胆管上皮におけるOPN発現亢進の意義と機序については不明である。意義の一つの可能性として、OPNが抗結石作用として発現亢進し、胆汁中に存在するカルシウムのwash out的作用を演じているのかもしれない。尿路系の研究にて、尿路感染でOPNの発現亢進が示されており<sup>6)</sup>、肝内結石症においても胆道系感染を含めた胆管炎が胆管