

表 2 Odds Ratios (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) for Intrahepatic Stone by Selected Lifestyle Factors

	Males				Females			
	Cases	Controls	OR	95% CI	Cases	Controls	OR	95% CI
Smoking								
Never	16	45	1.00	0.82–3.79	98	199	1.00	0.46–6.73
Ex- or current smokers	33	54	1.77		4	4	1.76	
Alcohol drinking								
Never	28	60	1.00	0.44–2.12	99	197	1.00	0.33–5.98
Ex- or current drinkers	18	39	0.97		3	6	1.41	
Tea								
Never	21	42	1.00	0.42–1.82	75	132	1.00	0.41–1.20
Ex- or current consumers	26	57	0.88		28	71	0.70	
Coffee								
Never	42	85	1.00	0.19–2.38	95	177	1.00	0.21–1.52
Ex- or current consumers	4	14	0.68		6	26	0.57	
Binrou								
Never	37	92	1.00	0.74–8.04	101	199	1.00	0.13–32.00
Ex- or current users	7	7	2.45		1	1	2.00	

表 3 Odds Ratios (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) for Intrahepatic Stone by Number of Raised Children and Education Level^a

	Males				Females			
	Cases	Controls	OR	95% CI	Cases	Controls	OR	95% CI
Number of raised children								
0–2	7	18	1.00	0.62–5.72 trend p=0.02	20	57	1.00	0.94–3.64 trend p=0.05
3–5	30	67	1.89		64	119	1.85	
6–	9	7	20.7		13	20	2.54	
Highest formal education								
None	6	6	1.00	0.06–1.96 0.07–3.58 0.02–1.19 0.01–0.49 trend p=0.006	37	34	1.00	0.19–0.83 0.04–0.41 0.05–0.51 0.002–0.15 trend p=0.0001
Elementary school	22	35	0.33		46	79	0.39	
Junior high school	10	12	0.50		8	30	0.13	
High school	6	19	0.15		11	30	0.16	
College, university or higher	4	27	0.05		2	31	0.02	

^aAdjusted for residence

表 4 Odds Ratios (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) for Intrahepatic Stone by Number of Raised Children and Education Level: Analysis with Population Controls and Hospital Controls

	Cases	Population controls		Hospital controls			
	N	N	OR ^a	95% CI	N	OR ^a	95% CI
Number of raised children							
0–2	27	28	1.00	0.73–2.75 1.31–11.9 trend p=0.024	47	1.00	1.21–4.01 1.89–13.3 trend p=0.001
3–5	94	87	1.41		99	2.20	
6–	22	10	3.94		17	5.01	
Highest formal education							
None	43	15	1.00	0.11–0.58 0.02–0.23 0.02–0.30 0.01–0.12 trend p=0.0001	25	1.00	0.14–0.58 0.06–0.52 0.03–0.26 0.01–0.21 trend p=0.0001
Elementary school	59	43	0.25		71	0.29	
Junior high school	12	23	0.07		15	0.18	
High school	9	15	0.08		26	0.09	
College, university or higher	3	19	0.02		15	0.05	

^aAdjusted for sex and age

2人を基準とした場合、6人以上では男性で20.7、女性で2.54となった。養育児童数が増加するほどオッズ比は上昇しており、多い養育児童数は肝内結石症発症のリスクファクターであった。

教育レベルを未就学、小学校、中学校、高校、大学以上の5段階に分けて検討した。その結果、高学歴になるほどオッズ比が低下する傾向を認めた(男性 trend $p=0.006$ 、女性 trend $p < 0.0001$)。

対照の設定で、住民対照を病院職員の家族およびその知人としたため、住民対照がやや高学歴に偏る可能性があった。そのために表4は、養育児童数と

教育レベルについて対照を住民対照と病院対照に分けて検討した。結果として住民対照と病院対照に分けた検討でも養育児童数と教育レベルは同様の傾向を示した。

4. 特定食品の摂取状況 (表5)

特定食品の摂取状況と肝内結石症オッズ比の検討を表5に示した。日本における過去の症例対照研究では、煮魚をよく食べる、緑黄色野菜を食べない、種実類を食べない、マーガリン・バターを食べないなどが肝内結石症のリスクファクターとして報告されていた⁴⁾。そのため食品の中で特に、緑黄色野菜

表5 Odds Ratios (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) for Intrahepatic Stone by Intake Frequency of Selected Foods

	Males				Females			
	Cases	Controls	OR	95% CI	Cases	Controls	OR	95% CI
Spinach								
< 1/month	10	10	1.00		21	12	1.00	
1-3/month	14	15	0.73	0.22-2.40	18	38	0.27	0.10-0.76
1/week	10	29	0.35	0.11-1.09	31	55	0.28	0.10-0.74
2-/week	15	44	0.34	0.12-0.98	32	98	0.19	0.07-0.50
				trend $p=0.02$				trend $p=0.01$
Peanut								
None	8	15	1.00		23	38	1.00	
< 1/month	9	22	0.76	0.23-2.52	23	52	0.75	0.35-1.59
1/month	15	23	1.23	0.39-3.87	19	68	0.49	0.23-1.04
1-/week	17	38	0.86	0.28-2.64	38	46	1.47	0.73-2.96
				trend $p=1.00$				trend $p=0.34$
Rawfish								
None	23	35	1.00		75	126	1.00	
Yes	26	63	0.69	0.35-1.38	28	78	0.73	0.41-1.31
Butter								
None	33	78	1.00		87	170	1.00	
Yes	16	20	2.36	1.00-5.57	16	34	1.04	0.50-2.15
Margarine								
None	33	71	1.00		83	160	1.00	
< 1/month	9	6	3.72	1.06-13.0	6	9	1.58	0.53-4.72
1-/month	7	21	0.94	0.35-2.55	14	35	0.87	0.41-1.84
				trend $p=0.90$				trend $p=0.84$
Lard								
None	20	52	1.00		54	116	1.00	
< 1/month	9	8	3.45	1.06-11.2	9	16	1.30	0.48-3.51
1-/month	20	38	1.41	0.67-3.00	40	72	1.27	0.76-2.12
				trend $p=0.33$				trend $p=0.36$
Vegetable oil								
None	40	83	1.00		89	168	1.00	
Yes	9	15	1.17	0.48-2.86	14	36	0.94	0.47-1.84

としてほうれん草、種実類として落花生、魚類として生魚、油脂類として動物性バター、植物性バター、豚脂 (lard) および植物油を詳細に検討し、摂取頻度別のオッズ比を算出した。

ほうれん草では1ヶ月に1回未満の頻度を基準として検討した。その結果、男女ともに摂取頻度が上昇するほどオッズ比は低下する傾向にあり (男性 trend $p=0.01$ 、女性 trend $p=0.02$)、週2回以上の摂取群では男性でオッズ比 0.34 (95%信頼区間 0.12–0.98)、女性でオッズ比 0.19 (95%信頼区間 0.09–0.59) であった。しかしその他の食品に関しては明らかな関連は認めなかった。また対照を住民対照と病院対照に分けた検討でも同様の傾向を示した。

5. 飲用水の水源 (表6)

表6は飲用水の水源と肝内結石症オッズ比を検討した結果である。これまでの疫学的調査では、汚染

された水源が肝内結石症に関係することが示唆されてきた⁴⁾。そのため今回の調査でも、各々の水源の種類と使用年数を検討した。飲用水の供給源を上水道、浅井戸 (9 m未満)、深井戸 (9 m以上)、河川水、混合水 (上水道、井戸水および河川水の2つ以上の併用)、の5種類に分類した。その結果、有意ではないが河川水を使用した年数が長い女性症例に肝内結石症が多い傾向を認めた (trend $p=0.06$)。逆に混合水の使用年数は男女ともにリスク低下と関連した (男性 trend $p=0.04$ 、女性 trend $p=0.03$)。

考 察

今回の調査は台湾における最初の肝内結石症の症例対照研究と思われる。今回の調査で、低身長、低体重、低BMI、低い教育レベル、多い養育児童数、河川水の使用は肝内結石症のリスクファクターであ

表6 Odds Ratios (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) for Intrahepatic Stone by Source of Drinking Water

	Males				Females			
	Cases	Controls	OR	95% CI	Cases	Controls	OR	95% CI
Tap Water (years)								
0–9	7	21	1.00		18	43	1.00	
10–29	21	33	2.13	0.74–6.10	50	66	2.55	1.20–5.42
30–	21	45	1.45	0.51–4.14	34	93	1.21	0.60–2.46
				trend $p=0.68$				trend $p=0.92$
Shallow wells (<9m) (years)								
0–9	29	68	1.00		68	146	1.00	
10–29	9	20	1.14	0.45–2.91	19	38	1.03	0.54–1.95
30–	10	12	1.88	0.66–5.32	16	20	1.41	0.69–2.88
				trend $p=0.26$				trend $p=0.40$
Deep wells (>=9m)(years)								
0–9	43	86	1.00		85	165	1.00	
10–29	3	7	0.78	0.20–3.08	14	19	1.45	0.65–3.21
30–	3	7	0.81	0.21–3.16	5	20	0.44	0.16–1.22
				trend $p=0.68$				trend $p=0.28$
Surface water (years)								
0–9	45	82	1.00		88	187	1.00	
10–29	1	12	0.17	0.02–1.27	11	13	2.04	0.82–5.07
30–	3	6	0.96	0.24–3.87	5	4	2.52	0.59–10.7
				trend $p=0.29$				trend $p=0.06$
Mixed water (years) ^a								
0–9	45	75	1.00		88	159	1.00	
10–29	2	13	0.25	0.05–1.17	9	18	0.95	0.39–2.29
30–	2	12	0.26	0.05–1.44	7	27	0.31	0.12–0.82
				trend $p=0.04$				trend $p=0.03$

^aMixed water : combinations of tap water, surface water and wells

ることが明らかになった。

今回の症例対照研究では問題点が一つあった。住民対照は病院関係者から選択したため、台湾における一般の住民を反映していない可能性があった。しかし養育児童数や教育レベル、飲用水の水源を検討した際に、対照を住民対照と病院対照に分けて検討した結果、同様の傾向が得られた。このことは環境因子と肝内結石症のリスクファクターの検討において、対象の選択にバイアスがないことを示していると思われた。

まず身長（女性においてのみ）、体重、BMIが対照よりも有意に低かった。これは対照を住民対照と病院対照に分けてもほぼ同様の傾向であった。調査時点でのデータであるため体重とBMIは比較の対象にはなりにくい、身長は成長期の栄養状態をよく反映する⁸⁾。したがって今回の結果は、成長期の栄養状態が肝内結石症患者で不良であったことを示唆すると思われた。また成長期に既に肝内結石症が発症していた可能性も考えられた。実際に、大坪らの調査では上五島地区の中学生に肝内結石症や肝内石灰化を認めている⁹⁾。

生活習慣の中では喫煙、飲酒、コーヒー、中国茶の飲用は、肝内結石症発生とほとんど関連を示さなかった。また、ビンロウの使用経験がある者はオッズ比が男性2.45、女性2.00と上昇を認めた。びんろうとはヤシ科の常緑高木で、熱帯地方では未熟な種子と石灰をキンマの葉に包んで噛む習慣がある。ビンロウの科学的な機序は不明だが、現地を調査した時に、ビンロウを販売する店がdown townに多く認められたことから、ビンロウの使用は社会経済状態を反映する可能性があると思われた。

教育レベルの検討では、症例対照間に明らかな有意差が認められた。教育レベルが上昇するほど肝内結石症のオッズ比は低下した。また養育児童数の検討では子どもの数が増加するほど、オッズ比は上昇の傾向を示した。この傾向は住民対照、病院対照のいずれの対照を用いた検討でも同様であった。児童数や学歴は社会経済状態の一種の指標と思われる。

今回の調査では年取等の資料はないが、社会経済状態が良くない状況で肝内結石症のリスクが上昇する傾向を認めると考えられた。不良な経済状態は不十分な衛生状態の背景となるかもしれない。

特定食品の摂取状況では、ほうれん草の摂取頻度が高くなるほどオッズ比は低下した。以前の調査では緑黄色野菜を食べる群に肝内結石症発生のリスクが高いと報告されており⁴⁾、今回の調査では反対の結果が得られた。

有意ではなかったが飲用水の検討では女性において河川水の使用年数が長いほどオッズ比が高い傾向を認めた（オッズ比2.52、95%信頼区間0.59–10.71、trend p=0.06）。中山らの行った症例対照研究⁴⁾でも生下時の飲料水として井戸水を使用していた者で肝内結石症のリスクが有意に高く、今回の結果は同様の傾向が台湾でも認められたことになる。また混合水源の使用が肝内結石症のリスクの減少に関与していた。この理由として、多種類の水源を使用できる人は経済的に恵まれ十分な衛生状態が保たれている可能性がある。

中山らは調査の中では、汲み取り式トイレを使用する患者の中に回虫症の既往が多いことを報告している⁴⁾。また古川らは1989年、回虫卵が成因と考えられる肝内結石症の一例を報告している¹⁰⁾。くみ取り式のトイレと生下時の井戸水の使用、寄生虫疾患の既往歴との関連から古川らは回虫症に注目し、1999年に回虫感染症について上五島地区において詳細な調査を行った¹¹⁾。その結果、50～70歳代の回虫特異的IgE抗体陽性率は対照が17.8%であったのに対し、肝内結石症症例では52.3%と高値を示した。回虫症と肝内結石症の関係は未だに明らかではないが、いくつかの研究が肝内結石症の発症に回虫症が重要な役割を果たす可能性を報告している^{12, 13, 14, 15)}。また八坂らは上五島地区の調査で、肝内結石症患者の成人T細胞白血病ウイルス抗体陽性率と回虫抗体陽性率が高いことを報告している¹⁶⁾。

今回、我々は血液などのサンプルは採取しなかったが、今後の研究では、肝胆道寄生虫疾患の特異的

IgE抗体や成人T細胞白血病ウイルス抗体等の評価が重要と思われた。また、発症時期が比較的若いことが想定されるため、飲水状況を含めた生家の衛生状態の評価が必要と思われる。

結 語

今回、我々が台湾で行った調査では浅井戸の水や河川水を多用し、養育児童数が多く、低学歴の者に肝内結石症のリスクが高かった。この結果は上五島地区での調査結果と共通点が多いと思われた。現時点では回虫症の関与が強く疑われているが発症機序は不明である。このため、まず肝臓、胆道に寄生する寄生虫の特異的抗体を調査することが望まれる。今回我々は血液等の検体を採取しなかったが、今後は回虫特異的IgE抗体等の測定、生家の状況や生下時の飲用水の調査などが台湾においても重要と思われた。

文 献

- 1) Arim Pausawadi, Parasit Watanapa: Hepatolithiasis: Epidemiology and Classification. *Hepato-Gastroenterology* 1997; **44**: 314-316
- 2) Chung-Chieh Wen, Hsin-Chao Lee: Intrahepatic stone: A Clinical Study. *Annals of Surgery* 1972; **175**: 166-177
- 3) Nakayama F, Koga A, Ichimiya H, Todo, Kui Shen, Ren-Xuan Guo, Xian-Jiu Zeng, Zehn-Huan Zhang: Hepatolithiasis in East Asia: Comparison Between Japan and China. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1991; **6**: 155-158
- 4) 中山文夫, 一宮 仁, 広田裕一: 我が国における肝内結石症の疫学. 厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班; 昭和61年度報告書, 1987; 11-44
- 5) 馬場園明, 林 櫻松, 玉腰暁子: 肝内結石症の全国受療患者の推計と臨床疫学的特性. 厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班; 平成11年度報告書, 2000; 9-14
- 6) Nakayama F, Roger D. Soloway, Nakama T, *et al*: Hepatolithiasis in East Asia: Retrospective study. *Digestive Disease and Science* 1986; **31**: 21-26
- 7) Cheng-His Su, Wing-Yiu Lui, Fang-Ku P'eng: Relative Prevalence of Gallstone Diseases in Taiwan, A Nationwide Cooperative Study. *Digestive Disease and Science* 1992; **37**: 764-768
- 8) Richard E. Behrman, Robert M. Kleigman, Hal B. Jenson: Nutrition, Textbook of Pediatrics, 16TH Editon, 138-188
- 9) 大坪光次, 藤尾俊之, 白浜 敏: 肝内結石症多発地区である長崎県上五島地区における肝内結石症の疫学的研究. *日消誌* 1989; **86**: 208-213
- 10) 古川正人, 山田隆平, 中田俊則: 回虫卵が成因と考えられた肝内結石症の1例. *胆道* 1989; **3**: 484-488
- 11) 古川正人, 八坂貴宏, 佐々木誠: 上五島地区における肝内結石症と回虫感染症. 厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班; 平成11年度報告書, 2000; 15-18
- 12) Mohammad Sultan Khuroo, Showkat Ali Zargar, Rakesh Mahajan: Hepatobiliary and pancreatic ascariasis in India. *The Lancet* 1990; **23**: 1503-1506
- 13) Joseph W. Leung, Andy S Yu: Hepatolithiasis and Biliary parasites. *Baillieres Clinical Gastroenterol* 1997; **11**: 681-706
- 14) A. Schulman: Intrahepatic biliary stones: imaging features and a possible relationship with ascaris lumbricoides. *clinical radiology* 1993; **47**: 325-332
- 15) Schulman A: Non-western patterns of biliary stones and the roles of ascariasis. *Radiology* 1987; **162**: 425-430
- 16) 古川正人, 八坂貴宏, 馬場園明: 上五島地区における肝内結石症の成因に関する疫学調査. 厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班; 平成12年度報告書, 2001; 14-21

肝内結石症実験モデルの作成

弘前大学医学部 外科学第2

研究協力者 佐々木 睦男

共同研究者 吉原 秀一, 豊木 嘉一

石戸圭之輔, 工藤 大輔

はじめに

肝内結石症は成因や治療法を研究する上で、肝内結石症を安定して発症する動物モデルの開発が極めて重要になる。しかもその作成は簡便でなければその動物モデルの普及は難しいものとなる。これまで、人の肝内結石症の病因として肝内胆汁うっ滞と胆道内細菌感染が非常に重要な役割を果たしていることが知られてきたことから、われわれは雑種成犬を用いこれに狭窄のない肝内胆汁うっ滞と経門脈の胆道感染を負荷し、慢性増殖性胆管炎の発生とビリルビンカルシウム成分を有する肝内結石の生成に成功している¹⁾。この動物モデルは人の肝内結石症と近似した病態を呈し理想的モデルと考えられたが、一方で結石形成までの期間が約18ヶ月と長期にわたり管理運営の面で問題が多く広く用いられることはなかった。その後、早期に肝内結石症を発症するべくこの動物モデルに改良を加えた。すなわち肝内の広範な胆管に対し胆汁うっ滞を負荷しさらに複雑で致死率の高い門脈内細菌感染を省略した。また、実験期間も3ヶ月とより短期に設定した。このモデルでは3ヶ月後の肝内結石形成は認められなかった。しかし胆管の一部には軽度の増殖性胆管炎の所見が認められた²⁾。これらの結果から本研究ではこれまでの胆道内細菌感染による胆道内炎症を他のより安全な方法に変更することで、より短期間で確実に肝内結石症を発症できる実験モデルの開発を試みた(図1)。

実験モデルの簡便化、短期化

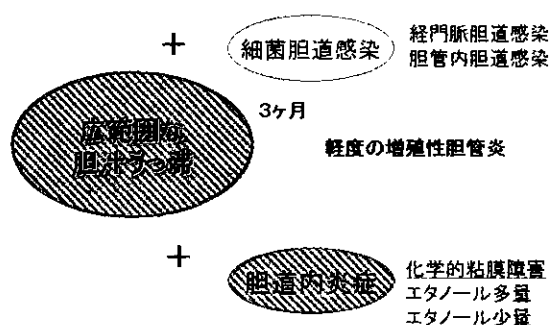


図1：今回の実験モデル

対象と方法

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2)。同時に、このシリコンチューブより無水エタノールを肝内に5ml(大量投与群:5頭)と0.5ml(少量投与群:5頭)に分け投与し

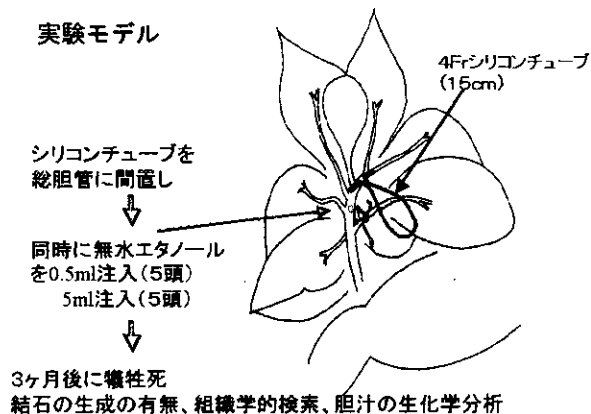


図2：実験モデルのシェーマ

その後自然流出させた。この後通常飼育し、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。

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、5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、エタノール少量投与群では胆砂や胆泥状のものを認めた。組織学的に胆管壁は繊維性に肥厚している部分が多く特にエタノール大量投与群では繊維化が著明に見られた(図4)。両群、特にエタノール少量投与群で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5)。また、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6)。以上から、本実験では

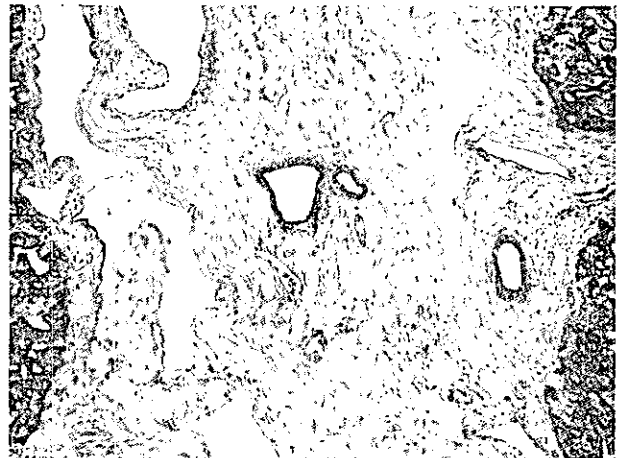


図4：組織所見 (PAS-AB 150倍)



図5：組織所見 (PAS-AB 300倍)

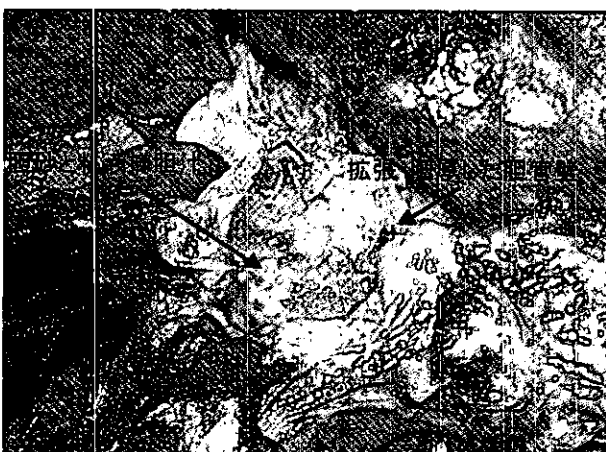


図3：3ヶ月後の肉眼所見

胆汁中糖蛋白質のSDSゲル電気泳動

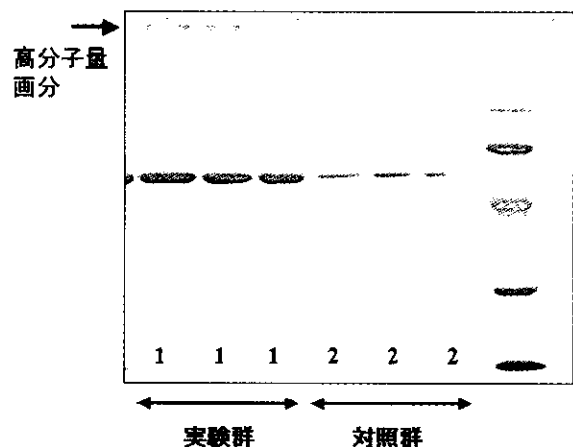


図6：胆汁中糖蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動

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。

考 察

われわれは肝内結石症の成因を探るにあたり本症の成因として肝内胆汁うっ滞と胆道内細菌感染の2つを大きな要因として想定して実験を進めた^{3), 4)}。これまでもこれらの要因を雑種成犬に対し負荷し、人の肝内結石症に極めて類似したモデルの完成を見ている。しかしこのモデルは作成上の困難さや死亡率の高さなど種々の要因から広く普及するには至らなかった。本研究はこの点を克服したモデルを完成させそれを広く普及させることにある。すなわち本研究では胆汁うっ滞をより広範囲に高度に負荷するとともに、胆道内細菌感染を再現する目的で種々の量のエタノールを胆管内に注入した。これまでも本研究で用いた胆汁うっ滞法のみでも軽度の増殖性胆管炎と胆泥の形成は認められたが、それらの変化は軽度なもので本来の肝内結石の形成まではさらなる経過観察が必要と考えられた。そこで今回エタノールによる胆管障害を加えることでより早期での肝内結石生成を試みた。エタノールによる胆管障害はこれまでも報告されているが^{5), 6)}、この障害の主なものは胆管壁の繊維化と肝実質細胞の萎縮が主な変化であった。本研究ではこのエタノールの胆管障害を種々の量のエタノールを用いることで、胆道細菌感染による胆管障害と同様の障害を起こすことを目的とした。結果的には高濃度のエタノールでは胆管壁に強い繊維化が起こり感染による変化とは異なる病像を呈した。また低濃度のエタノールでは繊維化

の程度はやや減少し増殖性胆管炎の病像を呈する割合が比較的多くを占めるようになった。しかし、肝内結石症の広範な増殖性胆管炎とはいまだ異なっていた。また増殖性胆管炎の分布も同様ではなく、これは胆管内にエタノールを注入した場合その濃度は部位により一定ではなかったことを示唆していると考えられた。本研究ではエタノールによる胆管障害はその濃度コントロールの難しさ、高濃度エタノールの強い繊維化作用により細菌感染と同様の胆道障害を起こすことは難しいものと考えられた。しかし、結果的には3ヶ月で増殖性胆管炎と胆砂の形成を確認した。したがって、方向性としてはよいモデルと考えられるがエタノールによる胆管障害に代わる効果的な方法が開発できればもっと効率的に肝内結石症を再現できる動物モデルを短期に作成することが可能となる。

文 献

- 1) 佐々木陸男, 他: ビリルビンカルシウム胆石生成と胆汁中糖蛋白質. 肝内結石症調査研究班; 平成元年度報告書, 1989; 124-130
- 2) 佐々木陸男, 他: 肝内結石症実験モデルの作成. 消化器系疾患調査研究班; 肝内結石症分科会, 平成12年度報告書, 2000; 48-50
- 3) Akaishi S, *et al*: Possible role of hepatic bile mucus glycoprotein in development of intrahepatic gallstones. *J Gastroenterol* 1995; **30**: 758-763
- 4) 佐々木陸男, 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
- 5) Kyoukane T, *et al*: An experimental study of selective intrahepatic biliary ablation with ethanol. *J Surg Res* 2001; **96**: 188-196
- 6) 清野景好, 他: 胆管内エタノール注入による実験的イヌ肝硬変症作製. *弘前医学* 1996; **47**: 101-108

実験的肝内コレステロール結石生成と粘液との関連

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

藤岡 保範, 跡見 裕

はじめに

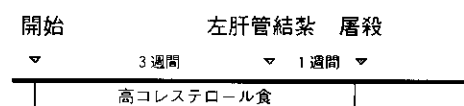
我々はプレリードッグを用いて実験的肝内コレステロール結石生成モデルを確立した¹⁾。すなわち、高コレステロール飼料を負荷し、肝管結紮を加えることで肝管結紮側の胆管内にコレステロール結石を形成（6頭中5頭）させることに成功している。肝胆道組織の粘液染色による検討では、コレステロール結石が形成された胆管上皮での粘液産生細胞が著明に増加し、これに伴い胆管内の粘液量も増加していることが観察された。粘液産生細胞内と胆管内の粘液にシアロムチンと中性ムチンを含んでいた。このような粘液産生細胞や粘液量の増加は胆管非結紮側やコントロール群では認められなかった。しかし、結石の存在によって胆管上皮への刺激が加わることで粘液産生が亢進する可能性もあり、その相関性はいまだ不明である。今回は、結紮後から屠殺までの期間を短縮したモデルを作成し、結石形成する前の胆管内の状況を観察した。

対象と方法

1. 動物モデル作成

プレリードッグ12頭を6頭ごとに2群に分けた。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)を投与後に左肝管を結紮し、その後も同一食を継続した。両群とも左肝管結紮後から1週間(高コ食1週間群)または2週間(高コ食2週間群)後に犠牲解剖した。

高コ食1週間群 (n=6)



高コ食2週間群 (n=6)

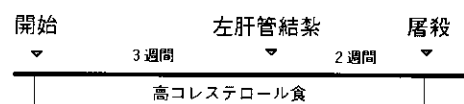


表1：実験プロトコール

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3 μ mの連続切片にした。これらの切片に対し、HE染色および粘液染色(コロイド鉄染色、HID-alcian blue pH2.5重染色、PAS反応)を施行した。高コ食1週間群と高コ食2週間群における左肝管結紮側と非結紮側の肝内胆管上皮、肝外胆管上皮、グリソン鞘、肝小葉の組織を比較した。

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。

結 果

1. 肝内結石の生成

高コ食1週間群の6頭中3頭の結紮側と非結紮側の肝内胆管内にコレステロール結石がコレステリン

結晶の抜け落ち像として観察された（図1）。高コ食2週間群の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。この群の非結紮側においても6頭中1頭にコレステロール結石が観察されたが、現在詳細を再検討中である。

2. 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の胆管上皮での高円柱化、乳頭状増生、重層化、粘液産生細胞数の増加や胆管壁肥厚などの所見を認めた。また、肝組織では、細胆管増生、グリソン鞘の繊維化、肝小葉の構築変化が顕著に認められた。これらの所見は、両群の結紮



図1：高コ食1週間群の左肝管結紮側。
HE染色（×100）：大型胆管内にみられたコレステリン結晶の抜け落ち像

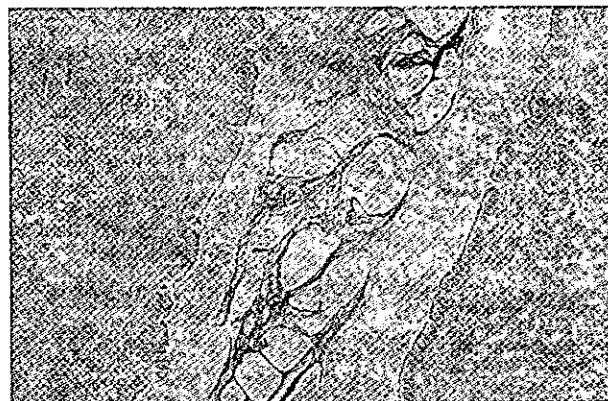


図2：粘液網。
コロイド鉄染色（×50）。

側では全例に認められたが、非結紮側の肝組織では認められなかった。また、高コ食1週間群よりも高コ食2週間群の組織学的変化がより顕著であった。

3. 粘液染色

コロイド鉄染色、HID-alcian blue pH2.5重染色、PAS染色（消化試験法）の各粘液染色を行なった結果、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、これに伴って胆管内の粘液量も増加していた。これらの粘液は網状の粘液網を形成しており、高コ食1週間群の結紮側（4/6）と非結紮側（3/6）の肝内胆管に観察された（図2）。高コ食2週間群については、現在検討中である。高コ食1週間群よりも高コ食2週間群の方が粘液産生細胞数も多く、大きく、粘液量もやや多い傾向にあった。粘液産生細胞内と胆管内の粘液にシアロムチンと中性ムチンを含んでいた。

考 察

高コ食両群の結紮側は非結紮側よりも肝内胆管粘液量の増加を認めた。さらにその粘液量は高コ食1週間よりも高コ食2週間の方が多い傾向にあった。高コ食1週間は高コ食2週間よりも結石形成の割合は少なかったものの、多くのモデルにおいて、両側に粘液網が観察されたことから、結石形成の前段階でこの粘液網が結石の骨格の役割を果たしていることが考えられた。

以上の結果から、肝内コレステロール結石形成率に差はあるが、両群の両側肝内胆管内に形成されたことから、その成因には高コレステロール環境と粘液増生が関与していることが示唆された。

文 献

- 1) 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

ウサギとラットにおける胆管結紮モデルの Cholesterol 7 α -hydroxylase の活性および mRNA レベルの変動について

宮崎医科大学 外科学第1

研究協力者 甲斐 真弘

共同研究者 前田 資雄, 田中 俊一

永友 淳司, 東 秀史

はじめに

肝内結石症の成因として、肝内のコレステロールおよび胆汁酸の代謝異常の関与、慢性的な胆汁うっ滞、胆道感染、血行障害等が指摘されている。あるいはそれらが複合的に組み合わせられて結石生成に寄与していると考えられるが、いまだその成因は解明されていない。近年、肝内結石症症例は全国的に減少傾向にあり、まとまった臨床例の解析が比較的困難となっている。したがって、肝内結石症の成因解明には動物実験モデルの作成はきわめて有用かつ不可欠と考えられる。現在までラット¹⁾、プレーリードッグ²⁾、雑種成犬³⁾らを用いたモデルが作成され解析されてきたが、いずれも一長一短あり、確立されたモデルとはなっていない。原発性の肝内結石症例あるいは肝内結石治療後の再発例において胆管狭窄と末梢胆管の拡張をともなう症例が多い。したがって、胆管狭窄にともなう胆汁うっ滞は、肝内のコレステロールおよび胆汁酸代謝異常とともに結石の生成に極めて重要な成因となっていると考える。われわれはウサギが肝内結石症の至適な動物実験モデルとなりうる可能性を考え、まず胆管結紮による肝内の胆汁酸代謝の変化をラットと比較して調べた。

対象と方法

雄の New Zealand white rabbit を 10 羽 (体重 2.5–3.0kg)、雄の Wistar rat を 12 匹 (250–300g) を用

いて、それぞれ半数ずつを胆管結紮群 (bile duct ligated group; BDL) と単開腹群 (Sham operated group; Sham) に分けた。いずれの群も精製飼料を投与して 1 週間飼育した後、エーテル麻酔下に BDL 群は総胆管を結紮切離し、Sham 群は単開腹をおこなった。手術から 5 日目に犠牲死させ肝臓および血液を採取した。Cholesterol 7 α -hydroxylase の活性と mRNA レベルを測定した。また血清中の総胆汁酸、総コレステロール値、総ビリルビン値を測定した。(表 1)

表 1 Experimental design

	Sham operation	Bile duct ligation
Male New Zealand white rabbit (n=10)	5	5
Male Wistar rat (n=12)	6	6

- Harvest the livers and blood samples on day 5 after operation. Preparation of microsomes and total RNA.
- Determination of the activities and mRNA levels of cholesterol 7 α -hydroxylase.
- Determination of the serum levels of total bile acids, total cholesterol and total bilirubin.

Cholesterol 7 α -hydroxylase の活性は、Ogishima らの方法で測定した⁴⁾。Microsomes に含まれるコレステロールを基質にして酵素反応をさせ、終了後 microsomes にコール酸を加えてその膜を壊して可溶化し、膜酵素である本酵素の反応を停止させる。次いで、反応液に cholesterol oxidase を加えて 3 位の水酸基を酸化し、基質やプロダクトの $\Delta 5$ -3 β -ol 構

造を $\Delta 4$ -3-one構造に変換する。生成した α 、 β 不飽和ケトンに基づく240nmの強い吸収をHPLCでモニターした。蛋白質量はBSAをstandardとしてLowryらの方法で測定した。mRNAレベルはnorthern blot hybridizationで調べた。まず各サンプル20 μ gのtotal RNAをglyoxal法でdenatureし、1% agarose gelで電気泳動した。次いでvacuum blotting systemを用いてnylon membraneにtransferした後に、120mJの紫外線照射をおこないRNAをmembraneへ固定した。Prehybridizationは37 $^{\circ}$ Cで2時間、hybridizationは37 $^{\circ}$ C、overnightでおこなった。プローブはウサギおよびラットのCholesterol 7 α -hydroxylaseのfull lengthのcDNAをrandom primer法でlabellingして用いた。Membraneの洗浄後、-70 $^{\circ}$ Cで2日間のautoradiographyをおこなった。Laser densitometerで定量した後、G3PDHで補正した。

結 果

1. 血液学的検討 (図1)

血清中の総胆汁酸値、総コレステロール値、総ビリルビン値のいずれもラットおよびウサギにおいてSham群に比較してBDL群は有意に高値を示した。

2. Cholesterol 7 α -hydroxylaseの活性およびmRNAレベルの検討 (図2)

Cholesterol 7 α -hydroxylaseの活性は、ウサギにおいてBDL群はSham群に比較して約30%の低値を示した (BDL ; 0.3 ± 0.1 pmol/min/mg protein、Sham ; 0.9 ± 0.5 pmol/min/mg protein)。逆にラットにおいてはBDL群はSham群に比較して約3倍の高値を示した (BDL ; 84.9 ± 19.8 pmol/min/mg protein、Sham ; 27.7 ± 8.2 pmol/min/mg protein)。Cholesterol 7 α -hydroxylaseのmRNAレベルは、ウサギにおいてBDL群はSham群に比較して約65%の低値を示したが、ラットにおいては約30%の高値を示し、いずれも有意な変化を認めた。

考 察

肝内結石症の成因解明のためには本症を再現可能な動物実験モデルの作成が必要である。今回、われわれは胆管結紮にともなう胆汁うっ滞が胆汁酸代謝の律速酵素であるCholesterol 7 α -hydroxylaseに対してどのような影響を及ぼすかをウサギとラットを用いて調べた。ウサギはヒトの胆汁酸代謝過程を研究するための実験動物として、適していると考えられる。その理由として、まず第1にヒトと同様の胆汁

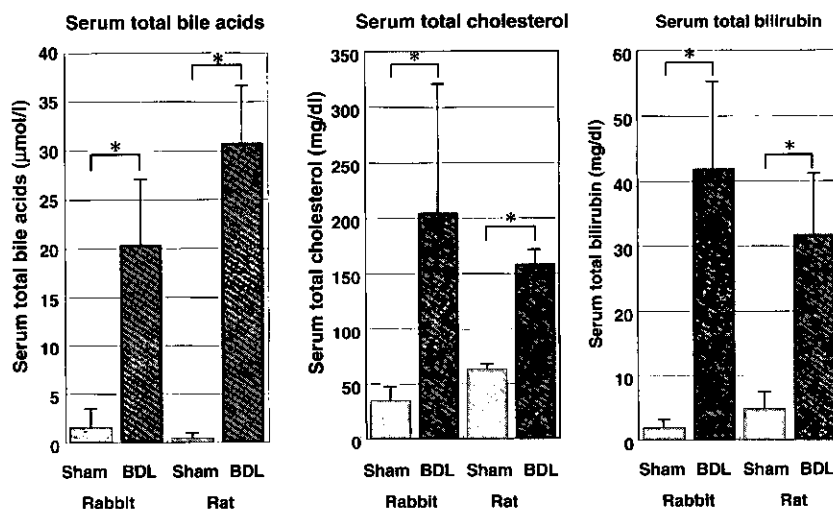


図1 Serum levels of total bile acids, total cholesterol and total bilirubin of the rabbit and rat. The results are given as means \pm standard deviations (vertical bar) of means. (* $p < 0.01$) Sham operated group; Sham. Bile duct ligated group; BDL.

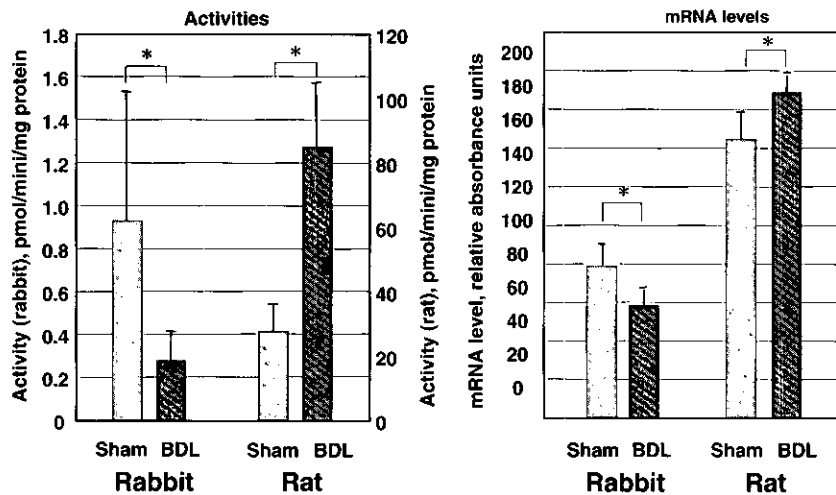


図2 Activities and mRNA levels of Cholesterol 7 α -hydroxylase in the rabbit and rat. The results are given as means \pm standard deviations (vertical bar) of means. (* p <0.05) Sham operated group; Sham. Bile duct ligated group; BDL.

酸を有すること。第2にラットやマウスでは胆汁酸の6位および7位の水酸化反応が起こるが、ヒトやウサギではその反応は起こらない。第3にヒト、マウスおよびウサギは胆嚢を有するが、ラットは胆嚢を有さない。

胆管結紮による胆汁うっ滞によって、ウサギにおいてはCholesterol 7 α -hydroxylaseの抑制効果、ラットにおいては逆にCholesterol 7 α -hydroxylaseの増強効果が認められた。本酵素に対する胆管結紮による胆汁うっ滞の影響については、ラット^{5, 6)}においては増強されるとする報告があり、サル⁷⁾およびヒト⁸⁾においては抑制される、またハムスター⁹⁾においては変化無しと報告されている。胆管結紮による胆汁うっ滞時の胆汁酸代謝の変化には著明な種差があり、留意すべき点である。胆管結紮時の胆汁酸代謝の変化は、胆汁酸組成およびその律速酵素の挙動から判断するとラットよりもウサギの方がよりヒトに近く、肝内結石症の動物実験モデルとして適している可能性が示唆された。今後、肝の片側葉の胆管結紮モデルの作成、Cholesterol 7 α -hydroxylaseとともにHMG-CoA reductaseの解析をおこなう予定である。

肝内結石症の成因に肝内のコレステロールおよび胆汁酸代謝異常がどのように関わっているのかの詳細はいまだ明らかではないが、コレステロールおよ

び胆汁酸代謝の律速酵素であると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^{10, 11)}、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¹²⁾。しかし、肝内結石症4症例について7例のコントロール症例と比較したわれわれの検討では、肝内結石症例におけるHMG-CoA reductaseの上昇とCholesterol 7 α -hydroxylaseの低下という傾向は認められなかった¹³⁾。従来、両酵素の調節はparallelに制御されるという報告が多く¹⁴⁻¹⁶⁾、両酵素のfeedback regulationのmechanismを考えた場合、さらに症例を重ねた検討が必要であろう。また、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¹⁷⁻²¹⁾。ヒトにおける日内変動は間接的な証明しかなく²²⁾、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り、留意すべきである。

今後、実験動物を用いた解析とともに肝内結石症の代謝上の背景をコレステロール、胆汁酸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。

文 献

- 1) 田中雅夫, 能城浩和, 水田 篤, 他: ラットを用いた肝内結石症実験モデルの作成. 厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班; 肝内結石症分科会, 平成12年度研究報告書, 2001; 39-41
- 2) 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
- 3) 佐々木睦男, 吉原秀一, 石戸圭之輔, 他: 肝内結石症実験モデルの作成. 厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班; 肝内結石症分科会, 平成12年度研究報告書, 2001; 48-50
- 4) Ogishima T, Okuda K: An improved method for assay of Cholesterol 7 α -hydroxylase activity. *Anal Biochem* 1986; **158**: 228-232
- 5) Danielsson H: Effect of biliary obstruction on formation and metabolism of bile acids in rat. *Steroids* 1973; **22**: 567-579
- 6) Dueland S, Reichen J, Everson GT, *et al*: Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis in bile-obstructed rats. *Biochem J* 1991; **280**: 373-377
- 7) Redinger RN, Strasberg SM, and Small DM: Primary biliary physiology. IX. Effects of acute biliary obstruction on biliary lipid metabolism in the monkey. *Am J Physiol* 1974; **226**: 776-783
- 8) Salen G, Nicolau, Shefer S, *et al*: Hepatic cholesterol metabolism in patients with gallstones. *Gastroenterol* 1975; **69**: 676-
- 9) Spady DK, Cuthbert JA, Willard MN, *et al*: Feedback regulation of hepatic Cholesterol 7 α -hydroxylase expression by bile salts in the hamster. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18623-18631
- 10) Yamashita N, Yanagisawa J, Nakayama F, *et al*: Composition of intrahepatic calculi—etiological significance. *Dig Dis Sci* 1988; **33**: 449-453
- 11) Shoda J, Tanaka N, He B, *et al*: Alterations of bile acid composition in gallstones, bile, and liver of patients with hepatolithiasis, and their etiological significance. *Dig Dis Sci* 1993; **38**: 2130-2141
- 12) Shoda J, He B, 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
- 13) 瀬戸口敏明, 甲斐真弘, 山田 学, 他: 肝内結石症4症例におけるHMG-CoA reductaseとcholesterol 7 α -hydroxylaseのmRNAレベルの検討: 結石葉, 非結石葉との対比およびコントロール症例との比較. 厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班; 肝内結石症分科会, 平成12年度研究報告書, 2001; 60-63
- 14) Heuman DM, Vlahcevic ZR, Bailey ML, *et al*: Regulation of bile acid synthesis. II. Effect of bile acid feeding on enzymes regulating hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *Hepatology* 1988; **8**: 892-897
- 15) Xu G, Salen G, Sheffer S, *et al*: Different feedback regulation of hepatic cholesterol and bile acid synthesis by glycodeoxycholic acid in rabbits. *Gastroenterology* 1993; **105**: 112-1199
- 16) Pandak WM, Vlahcevic ZR, Heuman DM, *et al*: Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of Cholesterol 7 α -hydroxylase. *Hepatology* 1994; **19**: 941-947
- 17) Gielen J, Cantfort JV, Robaye B, *et al*: Rat liver Cholesterol 7 α -hydroxylase. New results about its circadian rhythm. *Eur J Biochem* 1975; **55**: 41-48
- 18) Noshiro M, Nishimoto M, Okuda K, *et al*: Rat liver Cholesterol 7 α -hydroxylase. Pretranslational regulation for circadian rhythm. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10036-10041
- 19) Kai MH, Eto TA, Kondo KH, *et al*: Synchronous circadian rhythms of mRNA levels and activities of Cholesterol 7 α -hydroxylase in the rabbit and rat. *J Lipid Res* 1995; **36**: 367-374
- 20) Clarke CF, Fogelman AM, Edwards PA: Diurnal rhythm of rat liver mRNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Correlation of functional and total mRNA levels with enzyme activity and protein. *J Biol Chem* 1984; **259**: 10439-10447
- 21) Yamada M, Nagatomo J, Setoguchi Y, *et al*: Circadian rhythms of sterol 12 α -hydroxylase, Cholesterol 7 α -hydroxylase and DBP involved in rat cholesterol catabolism. *Biol Chem* 2000; **381**: 1149-1153
- 22) Yoshida T, Honda A, Tanaka N, *et al*: Determination of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one level in plasma using isotope-dilution mass spectrometry and monitoring its circadian rhythm in human as an index of bile acid biosynthesis. *J Chromatogr B* 1994; **655**: 179-187

肝内結石症の肝内胆管系における自然免疫機能

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

はじめに

近年、微生物に対する生体防御機構（自然免疫）の分子機構が明らかとなり、Toll-like receptor (TLR) による菌体成分認識機構が解明されつつある。これらの機構はマクロファージや好中球などの免疫担当細胞のみならず上皮細胞も有しており、臓器特異的な生体防御機構を形成する。現在まで TLR1～10 が同定され、そのうち TLR-2、-3、-4、-5、-9 は機能的解析が進んでおり、菌体を構成するペプチドや核酸を認識することが明らかとなっている¹⁾。TLR の活性化は NF- κ B の活性化と核内への移行をもたらし、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカイン発現を誘導する¹⁾。

また、自然免疫の一端として、抗菌ペプチドによる感染防御機構がある。近年、defensin と総称される新たな抗菌ペプチドが同定され、そのうち β -defensin-1 と -2 は上皮細胞から産生され、細菌のみならず真菌、ウイルスに対しても広範囲に抗菌作用を示すことが明らかとなってきた。 β -defensin-1 の発現は恒常的にみられるのに対して、 β -defensin-2 は細菌感染や炎症性サイトカイン刺激によって発現誘導される特徴を有し、また、TLR を介した NF- κ B の活性化により発現誘導される²⁾³⁾。また、カルプロテクチンは、オステオポンチンに類似したカルシウム結合による結石形成能の他、抗菌作用などの生物学的役割も有し、好中球、マクロファージ、一部の上皮細胞から産生されることが報告されている⁴⁾。

肝内結石症ではしばしば胆道感染症を合併することから、胆道感染症が結石形成の一因となっていることが推測されている。本研究では、肝内結石症の胆道系における感染防御機構（自然免疫機構）を解明し、これらの免疫応答が肝内結石症の肝病態形成にどのように加担しているかを検討した。

対象と方法

1. TLR および β -defensin-2 の分子生物学的検出

対象は、肝内結石症 4 例（外科的切除肝）と対照疾患として原発性硬化性胆管炎 4 例（肝硬変期、肝移植時摘出肝）と組織学的正常肝（転移性肝癌の外科的切除肝で非癌部正常肝を使用）5 例。新鮮凍結肝組織から全 RNA 抽出後、Reverse Transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて、TLR-2、-3、-4、-5 および β -defensin-2 の mRNA を特異的に検出した。

2. TLR および β -defensin-2 の免疫組織化学的検討

対象は、肝内結石症 11 例（外科的切除肝）、非結石性胆道閉塞 4 例（剖検肝）、原発性硬化性胆管炎 4 例（移植時摘出肝、肝硬変期）、組織学的正常肝 6 例（剖検肝）で、すべて大型胆管を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片。抗 TLR-2、-3、-4、-5 抗体（polyclonal、Santa Cruz 社）および抗ヒト β -defensin-2 抗体（polyclonal、長崎大学熱帯医学研究所平山教授より供与）を用い、ダコ ENVISION 法にて免疫組織化学的染色を施行した。

3. カルプロテクチンの免疫組織化学的検討

対象は、肝内結石症18例（外科的切除肝）と微小結石合併した原発性硬化性胆管炎3例（肝移植時摘出肝、肝硬変期）で、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。抗カルプロテクチン抗体（clone MAC387、Biomed社）を用い、ダコENVISION法にて免疫組織化学的染色を施行した。また、一部の検体では、蛍光標識2次抗体（Alexa Fluor、Molecular Probes社）を用いて、カルプロテクチンとオステオポンチンの2重染色を施行した。

結 果

1. TLRおよび defensin の分子生物学的検出

RT-PCRにて、正常肝、原発性硬化性胆管炎および肝内結石症の全症例にTLR-2、-3、-4、-5が検出された。 β defensin-2は、正常肝では検出されなかったが、原発性硬化性胆管炎では4例中1例（25%）に弱い発現を認め、肝内結石症では4例中3例（75%）で強い発現を認めた（図-1）。

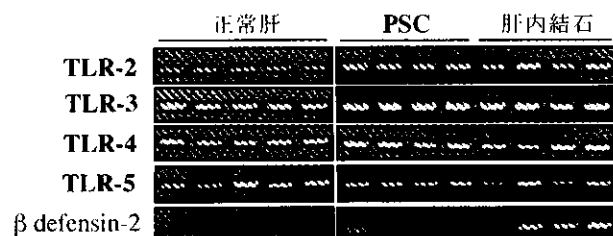


図1 TLRおよび defensin mRNAのRT-PCRによる検出
正常肝、原発性硬化性胆管炎（PSC）および肝内結石症の全ての症例にTLR-2、-3、-4、-5の発現を認める。 β -defensin-2は原発性硬化性胆管炎の1例で弱い発現を認め、肝内結石症では3例に強い発現を認める。

2. 大型胆管におけるTLRの発現

肝内におけるTLR-2の発現は、全ての症例の細胆管に強くかつ恒常的にみられた。また、大型胆管および胆管付属腺にもTLR-2の発現を認めたが、細胆管での発現と比較すると非常に弱いものであり、症例および部位により陰性の大型胆管も散見された（図-2）（図-3）。TLR-3、-4、-5は、正常肝の胆管

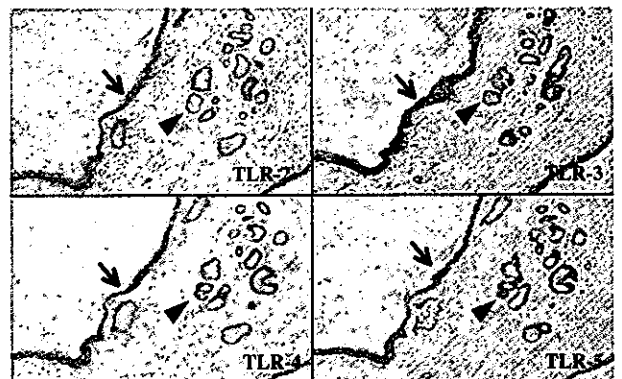


図2 正常肝の大型胆管におけるTLRの発現

肝門部の大型胆管炎（矢印）および胆管付属腺（矢頭）にTLRの発現を認めるが、TLR-2の発現は他のTLRに較べ弱い。

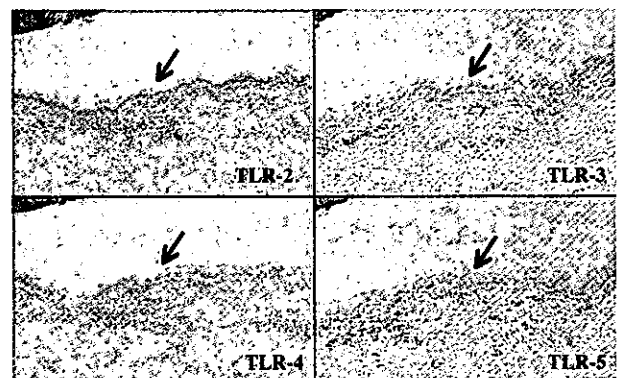


図3 肝内結石症の結石含有大型胆管におけるTLRの発現

TLR陽性単核細胞の浸潤を認めるが、大型胆管上皮（矢印）に明らかなTLRの発現を認めない。

付属腺を含め細胆管から大型胆管にかけてびまん性かつ高度に発現していた（図-2）。原発性硬化性胆管炎や非結石性胆道閉塞の大型胆管でも恒常的に発現していたが、肝内結石症ではTLR-3、-4、-5発現を欠損または減弱した結石含有胆管や慢性胆管炎が散見された（図-3）。また、大型胆管においてびまん性にTLR発現を認めた症例の比率を各群毎に検討したところ、肝内結石症では他群と比較して低率であった（図-4）。

3. 肝組織中の β defensin-2発現

肝内における β defensin-2の発現は、非結石性胆道閉塞および肝内結石症の大型胆管にのみ認められた（図-5）。しかし、非結石性胆道閉塞では4例中全例（100%）に β defensin-2の発現を認めたが、肝

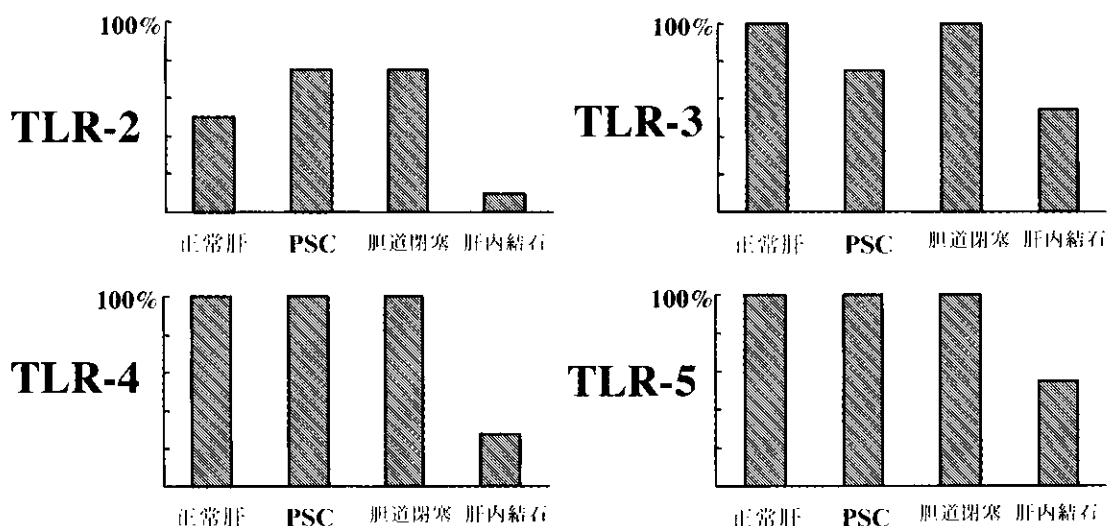


図4 大型胆管におけるTLRの発現（全ての胆管に発現を認めた症例の場合）

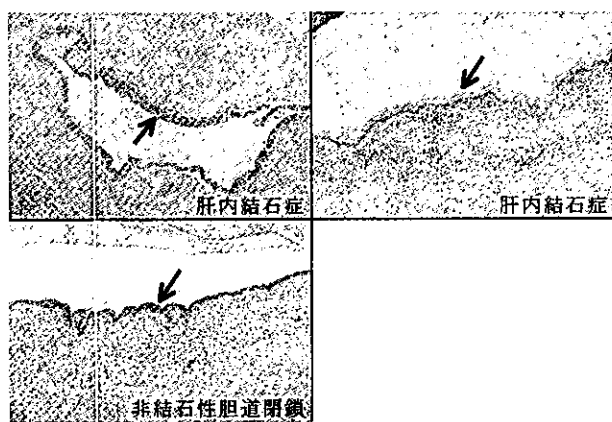


図5 大型胆管におけるβ defensin-2の発現

肝内結石症（左上）および非結石性胆道閉鎖症（左下）にみられたβ defensin-2陽性の大型胆管（矢印）。右上は、肝内結石症の結石を含有する胆管（矢印）で、明らかなβ defensin-2の発現は認めない。

内結石症では11例中6例（55%）のみであった。なお、正常肝や原発性硬化性胆管炎には明らかなβ defensin-2の発現は認めなかった。

4. 肝組織中のカルプロテクチン発現

肝内結石症では、結石内にカルプロテクチンの層状沈着を認め、また、胆泥内および胆管壁内に多数のカルプロテクチン陽性浸潤単核細胞（形態的に好中球とマクロファージ）が多数認められた。原発性硬化性胆管炎では、結石内にカルプロテクチン沈着はほとんど見られず、胆管周囲に陽性浸潤単核細胞を散見するのみであった。なお、胆管付属腺を含め

胆管上皮にカルプロテクチンの発現は認めなかった。カルプロテクチンとオステオポンチンの2重染色にて、結石内での両者の沈着は概ね一致していた（図-6）。

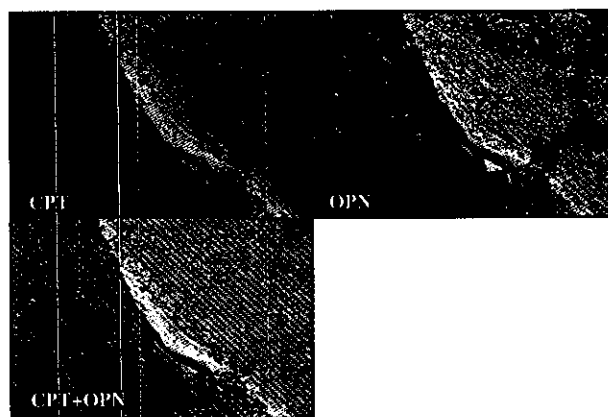


図6 肝内結石症におけるカルプロテクチンとオステオポンチンの発現

カルプロテクチン（CPT）とオステオポンチン（OPN）の蛍光抗体染色で、結石内で層状に沈着しており、2重染色にて両者の沈着部位（黄色）がよく一致している。

考 察

自然免疫は、すべての生物に存在する病原体の認識排除機構であり、適応免疫とは異なりリンパ球のクローン増殖のステップを必要としない。このため、自然免疫によって急な病原体の侵入にも素早く

対応することができ、感染防御の最前線を担う重要な役割を果たしている。近年、自然免疫における侵入微生物と自己を区別する認識メカニズムが明らかとなり、ヒト TLR ファミリーによる菌体認識機構が明らかとなってきた。現在までヒト TLR-1～-10 が同定されており、特に TLR-2、-4、-9 の機能解析が進んでいる。すなわち、TLR-2 は細菌由来のリポタンパク質やペプチドグリカン、TLR-4 はグラム陰性菌および陽性菌の主要細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) やリポタイコ酸 (LTA)、TLR-9 は細菌由来非メチル化 CpG モチーフを有する DNA (CpG DNA) を認識する¹⁾。また、TLR の下流に存在するシグナル伝達機構も明らかとなりつつあり、TLR の活性化により TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインが発現誘導される。これらの TLR は主としてマクロファージなどの免疫担当細胞にて発現しているが、いくつかの上皮細胞も TLR を発現していることが報告されている。例えば、腸管上皮では TLR-3 と TLR-5 を恒常的に発現しており、クローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患では TLR-4 の異常発現がみられ、またクローン病では TLR-3 の発現低下がみられることが報告されており、炎症性腸疾患の病態形成に TLR を介した自然免疫の変化および異常が関与しているものと推測されている⁵⁾。今回の検討より、肝内胆管系に TLR-2、-3、-4、-5 が発現していることが明らかとなり、胆管上皮細胞は TLR を介した菌体成分認識機構を有していることが示唆された。特に TLR-3、-4、-5 は、肝内胆管系においてびまん性かつ高度に発現していたが、肝内結石症の結石含有胆管や慢性胆管炎の胆管上皮では、これら TLR の発現低下または消失が散見された。しかし、このような TLR の発現低下や消失した胆管周囲には、TLR 陽性浸潤単核細胞を認めることから、肝内結石症の胆管上皮に特異的な変化と考えられ、肝内結石症の病態生理、特に慢性胆管炎の持続に関与していることが推測された。今後、TLR 発現消失の機序について検討する必要がある。

defensin はグラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌、エンベロープウイルスに対して、広く抗微生物活性をもつ塩基性ペプチド群である。ヒト defensin は α 型と β 型に分類され、また、 β 型は defensin-1～-3 が同定されている。 β defensin-1 の発現は恒常的にみられるのに対して、 β defensin-2 は細菌感染や炎症性サイトカイン刺激によって発現誘導される。現在まで、皮膚、気管上皮、胃粘膜等の上皮細胞に β defensin-2 の発現が報告されている³⁾が、胆道系上皮における発現は不明である。今回我々は、肝内胆管系における β defensin-2 の発現を検討したところ、非結石性胆道閉鎖や肝内結石症の大型胆管上皮で β defensin-2 の異常発現を認めた。これは、 β -defensin-2 が胆道系の抗菌物質として局所的な感染防御に関与していると考えられ、胆道系に侵入してきた微生物に対して抗菌的に作用していることが推測された。しかし、肝内結石症では化膿性炎症を伴い、また肝内結石症患者のすべての胆汁中から培養可能な細菌が検出される⁶⁾にもかかわらず、非結石性胆道閉鎖症例に比べ肝内結石症では β defensin-2 の発現している症例は低率であることから、肝内結石症の胆道系では不完全な感染防御状態と考えられた。また、 β defensin-2 は、TLR を介した NF- κ B の活性化により発現誘導されることが報告されている²⁾ことから、TLR 発現低下に基づく β defensin-2 の発現誘導不全を示しているものと推測された。

結石は無機物質を主成分とするが、少量の有機物質 (結石マトリックス) も含まれており、このマトリックス成分が結石形成機序において重要な役割を担っている。オステオポンチンとカルプロテクチンは、分泌型糖蛋白で強いカルシウム結合能を有する。我々は昨年の本会で、肝内結石症の胆管上皮から産生され胆汁中に分泌されたオステオポンチンが、結石のマトリックス成分となっていることを報告した⁷⁾。カルプロテクチンは、カルシウム結合による結石形成能の他、細菌繁殖を抑制する作用 (抗菌作用) や炎症調節作用などの生物学的役割も有し、好中球、マクロファージ、一部の上皮細胞から

産生されることが報告されている^{4,8)}。今回の検討にて、カルプロテクチンも肝内結石症の結石を構成するマトリックスであることが示され、また、オステオポンチンとの結石内局在が類似していた。したがって、肝内結石のマトリックス成分としてオステオポンチンのみならずカルプロテクチンも存在しており、両者とも結石形成過程の結石化において重要な因子と考えられた。また、胆泥内および胆管上皮内にカルプロテクチン陽性の好中球やマクロファージが多数認められたことより、結石に沈着しているカルプロテクチンは胆管に浸潤してきた炎症細胞由来と考えられた。これらの所見より、化膿性胆管炎は肝内結石症の2次的な合併症のみならず、結石形成に積極的に関与していることを示唆しており、胆管粘膜の自然免疫機構の異常に伴う慢性胆管炎および細菌感染症の遷延化が結石形成にも関与しているものと考えられた。

結 語

肝内胆管系と細菌感染との関連性を自然免疫の観点から検討し、肝内結石症における生体防御機構の解析を行った。その結果、肝内結石症の大型胆管上皮は、自然免疫であるTLRを介した細菌認識機構と β defensin-2による抗菌作用が減弱あるいは消失していることが示唆され、慢性胆管炎および細菌感染症の遷延化、さらにカルプロテクチン陽性細胞浸潤の持続をもたらし、結石形成に関与しているものと考えられた。

文 献

- 1) Takeda K, *et al*: Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 2001; **6**: 733-742
- 2) Becker MN, *et al*: CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 2000; **275**: 29731-29736
- 3) Hamanaka Y, *et al*: Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001; **49**: 481-487
- 4) Tawada T, *et al*: Distribution of osteopontin and calprotectin as matrix protein in calcium-containing stone. *Urol Res* 1999; **27**: 238-242
- 5) Cario E, *et al*: Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; **68**: 7010-7017
- 6) Sheen-Chen S, *et al*: Bacteriology and antimicrobial choice in hepatolithiasis. *Am J Infect Control* 2000; **28**: 298-301
- 7) 中沼安二, 他: 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. 平成12年度厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班; 肝内結石症分科会研究報告書, 2000; 56-59
- 8) John B, *et al*: Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997; **50**: 113-123

肝内胆管癌の発生・進展にかかわる慢性増殖性胆管炎の役割

—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¹⁾

京都大学薬学系大学院²⁾

名古屋大学大学院 器官調節外科³⁾

研究協力者 田中 直見¹⁾

共同協力者 正田 純一¹⁾, 浅野 徹¹⁾

加納 雅仁¹⁾, 杉本 幸彦²⁾

市川 厚²⁾, 二村 雄次³⁾

神谷 順一³⁾

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。厚生省特定疾患「肝内結石症調査研究班」による疫学調査において本症の主たる死因は肝内胆管癌であり、本症の約5%に肝内胆管癌が合併していた¹⁾。また初回手術時には癌合併がなく、術後経過中に肝内胆管癌を発症した症例も少なくない。肝内結石症は肝内胆管癌のハイリスク病変であると考えられ、今後においても肝内結石症の重要な予後規定因子になることが予想される。

本症に合併した肝内胆管癌の臨床像には、結石存在部位と胆管癌の占拠部位が近似する、結石存在部位およびその近傍上皮、癌部に近接した上皮には異型性を有する過形成病変を高頻度に認めること、癌を合併した本症は合併しない本症に比して胆管炎症状が強く病期も長いこと、また本症では加齢とともに肝内胆管癌の発生頻度が増大することが挙げられる²⁾。このことより、肝内胆管癌の発生・進展には慢性活動性の胆管炎の反復により、胆管上皮の

変性、脱落、再生、そして過形成、発癌へとつながる過程が考えられる²⁾。慢性炎症と発癌については、潰瘍性大腸炎における大腸癌³⁾、*H.pylori*陽性の萎縮性胃炎における胃癌⁴⁾、慢性肝炎から肝硬変を介した肝細胞癌⁵⁾、また胆道系では胆嚢結石症⁶⁾、膵胆管合流異常症における胆嚢癌⁷⁾が報告されている。しかしながら、慢性炎症と発癌の立場より、これら消化器癌の発生・進展にかかわるメカニズムの詳細な検討はなされていない。

我々はこれまでの班研究活動において本症における慢性増殖性胆管炎の病態因子として、プロスタグランジンE₂ (PGE₂) とアラキドン酸代謝の活性化因子である分泌型低分子ホスホリパーゼA₂ (以下sPLA₂)、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) およびプロスタグランジンE受容体 (EP) の重要性を指摘してきた⁸⁾⁹⁾。肝内胆管癌は手術による切除可能な症例が少なく、また本症を合併している肝内胆管癌はごく少数である。よって今回は胆道発癌に果たす慢性炎症の役割を明らかにするために、胆嚢癌組織におけるこれらの指標を解析し、また胆嚢癌細胞を用いてPGE₂ならびにEPアゴニストによる腫瘍細胞の増殖効果について検討した。