

常化が観察された。

当院における新生児胆汁うっ滞 37 例のうち、新生児肝炎の 1 例には周産期異常はなかった。一方、肝内胆管減少症（低形成）の 13 例の多くが周産期異常や先天異常を伴っていた。さらに、13 例全例において回復期に  $\gamma$ -GTP の一過性上昇が認められ、胆汁うっ滞性肝障害は生後 1 年までに軽快しており、肝組織所見を除けば Jacquemin ら<sup>8)</sup>の症例と酷似している。周産期異常による肝内胆汁うっ滞は新生児肝炎に限ったことではなく、非症候性肝内胆管減少症を含めた新生児肝内胆汁うっ滞に共通する主要な要因なのか、あるいは新生児肝炎も 13 例の肝内胆管減少症（低形成）も「一過性の新生児胆汁うっ滞」とよぶべきなのか、今後検討を要する。

## ■ おわりに

35 年前には新生児胆汁うっ滞の半数以上を占め、病因の不明な疾患群の総称であった「新生児肝炎」から、PFIC や NICCD をはじめとした種々の遺伝性・代謝性疾患が同定・解明され、その結果“特発性”新生児肝炎の割合は減少している。今後も研究の進展に伴い、新生児肝炎の定義や概念が変わっていくことが予想される。

## 文 献

- 1) 松井 陽：新生児肝炎は減少したか？ 小児内科 **36**：1254-1255, 2004
- 2) 白木和夫, 新沢 毅：新生児肝炎と乳児肝内胆汁うっ滞。小児内科 **19**：1779-1783, 1987
- 3) Tazawa Y, Nishinomiya F, Abukawa D, et al : Relationship of feeding modality to clinical fea-

## Key Points

- ① かつては新生児肝炎と診断されていた原因不明の肝内胆汁うっ滞のなかから、種々の遺伝性・代謝性疾患が同定・解明され、その結果新生児肝炎の割合が減少した。
- ② 他の要因として、ウイルス検索や診断技術の進歩、環境の改善、母乳保育の推進なども推測されている。
- ③ 新生児肝内胆汁うっ滞の病因として、胆汁分泌の未熟性に加えて、新生児仮死による肝虚血や敗血症など、慢性もしくは急性の周産期異常が重要視されている。
- ④ 新生児肝内胆汁うっ滞では、肝内胆管減少（低形成）、回復期の  $\gamma$ -GTP の一過性上昇がしばしばみられる。

tures in Japanese infants with idiopathic neonatal hepatitis of the non-familial form. Acta Paediatr Jpn **38** : 328-333, 1996

- 4) 田澤雄作：新生児胆汁うっ滞—新生児肝炎及びシトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞の臨床を中心として。日小児会誌 **111** : 1493-1514, 2007
- 5) 宝珠山厚生, 藤沢卓爾, 鹿毛政義, 他：乳児胆汁うっ滞症：自験 106 例の臨床・病理学的検討。日本小児栄養消化器肝臓学会誌 **13** : 120-125, 1999
- 6) Balistreri WF, Bezerra JA : Whatever happened to “neonatal hepatitis”? Clin Liver Dis **10** : 27-53, 2006
- 7) Vajro P, Amelio A, Stagni A, et al : Cholestasis in newborn infants with perinatal asphyxia. Acta Paediatr **86** : 895-898, 1997
- 8) Jacquemin E, Lykavieris P, Chaoui N, et al : Transient neonatal cholestasis : origin and outcome. J Pediatr **133** : 563-567, 1998

\* \* \*

# 新生児肝炎

あぶかわ だい き  
 虻川 大樹\*

## 要旨

かつては新生児から乳児早期における肝内胆汁うっ滞の代表であった新生児肝炎の疾患概念が、ここ数十年で大きく変容している。原因不明の肝内胆汁うっ滞として“特発性”新生児肝炎と診断されていた疾患群の中から、家族性肝内胆汁うっ滞症やシトリン欠損症をはじめとした種々の遺伝性・代謝性疾患が同定・解明され、その結果新生児肝炎の割合は減少している。また、新生児肝内胆汁うっ滞の病因として、胆汁分泌の未熟性に加えて、新生児仮死による肝虚血や敗血症など、慢性もしくは急性の周産期異常が重要視されている。今後も研究の進展に伴い、新生児肝炎の定義や概念が変わっていくと思われる。

## はじめに

新生児から乳児早期に胆汁うっ滞性肝障害を呈した場合、胆道閉鎖症を第一に疑う必要がある。胆道閉鎖症と鑑別すべき肝内胆汁うっ滞の代表として、従来より新生児肝炎があげられてきた。しかし、新生児肝炎という疾患概念そのものがここ数十年で大きく変容している。

本稿では、新生児肝炎に関するいくつかの疑問をあげ、その答えとして現時点での知見について概説する。

## I 新生児肝炎の定義は？

わが国において新生児肝炎は、①新生児期に発症したと思われるもので、多くは生後2カ月以内に発見された肝内胆汁うっ滞で、顕性黄疸は1カ月以上持続し、多くは6カ月以内に消退し、灰白色便（または淡黄色便）および濃黄色

尿を伴う、②組織学的には巨細胞性肝炎の像をみることが多い、③ただし、尿路感染症、敗血症、梅毒その他の全身性感染症あるいは全身性代謝性疾患（ガラクトース血症、チロシン血症など）などに伴った二次性のものを除く、と定義されてきた（厚生省特定疾患「難治性肝炎」「肝内胆汁うっ滞」調査研究班、1975年）。

一方欧米では、生後2カ月以内に発見された肝内胆汁うっ滞のうち、胆管傷害（肝内胆管低形成/減少）を除外した肝細胞傷害に起因する群を、広義的に新生児肝炎症候群（neonatal hepatitis syndrome）としている。そのうち既知のウイルス性肝障害（TORCH感染症など）もしくは代謝性肝障害（ガラクトース血症、チロシン血症など）が否定されたものが“特発性”新生児肝炎（“idiopathic” neonatal hepatitis）とよばれる（図1<sup>1)</sup>）。“特発性”新生児肝炎は、わが国で使用される「新生児肝炎」とほぼ同義語である。

\* 宮城県立こども病院総合診療科  
 〒989-3126 宮城県仙台市青葉区落合 4-3-17

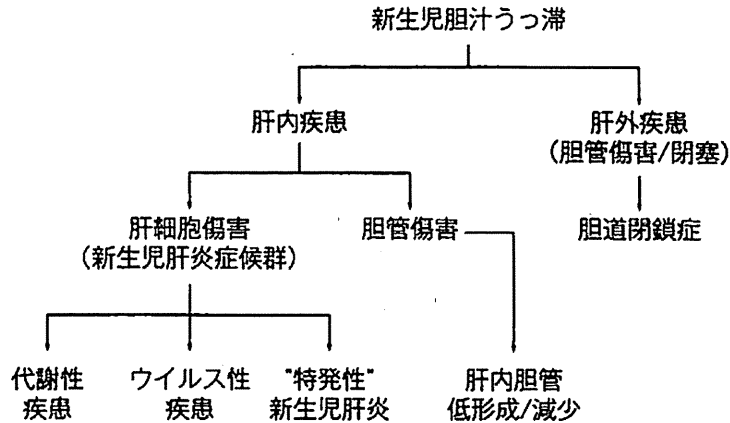


図1 新生児胆汁うっ滞に対するアプローチ (A-Kader HH et al, 2004<sup>1)</sup>より改変)

## Ⅱ 新生児肝炎は減少したか？

胆道閉鎖症の罹患率はわが国では出生1万人に1人といわれてきた。松井<sup>2)</sup>は、栃木県における胆道閉鎖症のマスクリーニングの結果から、その罹患率は出生約9,000人に1人であり、現在も著明な変化はないと推定している。一方、白木ら<sup>3)</sup>は1987年の総説において、かつては胆道閉鎖症とほぼ同じ頻度でみられた新生児肝炎、なかでも胆道閉鎖症との鑑別に難渋するような症例が最近では減少したと述べている。Tazawaら<sup>4)</sup>は、1975～1983年の前期と1984～1992年の後期に分けて解析した結果、胆道閉鎖症に比較して新生児肝炎は33%の減少が認められ、医療技術の進歩、環境の改善、母乳保育の推進などをその因子として推測している<sup>4)5)</sup>。ただし、松井<sup>2)</sup>が同様の検討をしたところ、新生児肝炎が著明に減少したという結果は得られなかった。

宝珠山ら<sup>6)</sup>は、1976～1998年の23年間に経験した新生児・乳児胆汁うっ滞症106例について検討した結果、上位3疾患は胆道閉鎖症26例(24%)、新生児肝炎16例(15%)、サイトメガロウイルス(CMV)肝炎12例(11%)であった。胆道閉鎖症の年次推移は変わらなかったが、新生児肝炎は減少しCMV肝炎は増加して

いた。この変化は、ウイルス検索の診断技術の進歩によるものと考察している。

海外からも、新生児肝炎が減少したという意見が聞かれる。Balistreriら<sup>7)</sup>によれば、1970年代前半に自施設で経験した新生児胆汁うっ滞のうち、65%が“特発性”新生児肝炎、25%が胆道閉鎖症、3%がTORCH症候群などのウイルス感染症と診断され、残りの7%にガラクトース血症、チロシン血症、腭嚢胞性線維症など当時知られていた遺伝性・代謝性疾患が含まれていた。しかし、その後の30年間で遺伝性肝疾患の解明が飛躍的に進んだ結果、2004年には“特発性”新生児肝炎は15%にまで減少し、代わって進行性家族性肝内胆汁うっ滞症、Alagille症候群、胆汁酸代謝異常症などの遺伝性肝内胆汁うっ滞が25%を占めるようになった。胆道閉鎖症は25%、ウイルス感染症は5%で1970年代前半とかわりなく、他に $\alpha_1$ -アンチトリプシン欠損症10%、その他の代謝性疾患20%という割合であった。Balistreriら<sup>7)</sup>は、新生児肝炎に関連する疾患を散発性と家族性(遺伝性)に大きく分類し、現在ではとくに後者にきわめて多様な疾患が含まれていることを示している(表1)。

宮城県立こども病院において、2003年の開院以降7年間に入院のうえ精査・加療を要した新生児胆汁うっ滞36例の内訳を表2に示す。胆

表1 新生児肝炎に関連する疾患の鑑別疾患

<p>I. 散発性新生児肝炎</p> <p>A. 感染症に伴う胆汁うっ滞</p> <p>1. 細菌性</p> <p>a. 敗血症（尿路感染症など）</p> <p>b. リステリア症</p> <p>c. 梅毒</p> <p>d. その他</p> <p>2. ウイルス性（先天性ウイルス感染症）</p> <p>a. サイトメガロウイルス</p> <p>b. 単純ヘルペスウイルス（HHV-6を含む）</p> <p>c. エコーウイルス</p> <p>d. B型肝炎/HIV</p> <p>e. パルボウイルス B19</p> <p>f. その他</p> <p>B. 中毒</p> <p>1. 経静脈栄養に伴う胆汁うっ滞</p> <p>2. 薬剤性</p> <p>C. 低酸素/低灌流</p> <p>D. その他</p> <p>1. 血球貪食性リンパ組織球症</p> <p>2. 新生児ループス</p> <p>E. 特発性</p> <p>II. 家族性（遺伝性）新生児肝炎</p> <p>A. 遺伝性肝内胆汁うっ滞</p> <p>1. 膜輸送・分泌障害</p> <p>a. 毛細胆管分泌障害</p> <p>1. 胆汁酸輸送；BSEP 欠損症</p> <p>i. 持続性，進行性（PFIC 2）</p> <p>ii. 反復性，良性（BRIC 2）</p> <p>2. リン脂質輸送；MDR3 欠損症（PFIC 3）</p> <p>3. イオン輸送；腭嚢胞性線維症（CFTR）</p> <p>b. 複合/多臓器障害</p> <p>1. FIC1 欠損症</p> <p>i. 持続性，進行性（PFIC 1, Byler 病）</p> <p>ii. 反復性，良性（BRIC 1）</p> <p>2. 新生児魚鱗癬-硬化性胆管炎症候群</p> <p>3. 関節拘縮-腎機能異常-胆汁うっ滞症候群</p> <p>4. リンパ浮腫-胆汁うっ滞症候群（Aagaens 症候群）</p> <p>5. <math>\alpha_1</math>-アンチトリプシン欠損症</p>	<p>2. 胆汁酸合成・抱合障害</p> <p>a. 3-oxo-<math>\Delta^4</math>-steroid 5<math>\beta</math>-reductase 欠損症</p> <p>b. 3<math>\beta</math>-hydroxy-<math>\Delta^5</math>-C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症</p> <p>c. BAAT 欠損症（familial hypercholanemia）</p> <p>d. Oxysterol 7<math>\alpha</math>-hydroxyase 欠損症</p> <p>e. 二次性障害（ペルオキシゾーム病） ・ Zellweger 症候群</p> <p>3. 発生異常</p> <p>a. Alagille 症候群（Jagged 1 欠損，症候性肝内胆管減少症）</p> <p>b. Ductal plate malformation（ARPKD, ADPKD, Caroli 病）</p> <p>4. 分類不能</p> <p>a. McCune-Albright 症候群</p> <p>b. North American indian childhood cirrhosis</p> <p>c. Villin 機能異常</p> <p>B. 代謝性疾患</p> <p>1. 尿素サイクル異常症</p> <p>a. シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞</p> <p>b. アルギニン血症</p> <p>2. 金属代謝異常</p> <p>a. 新生児ヘモクロマトーシス</p> <p>b. 乳児期の銅過剰摂取（非 Wilson 病性）</p> <p>3. 脂質代謝異常</p> <p>a. Niemann-Pick 病 C 型</p> <p>b. コレステロールエステル蓄積症</p> <p>c. Wolman 病</p> <p>4. 糖質代謝異常</p> <p>a. ガラクトース血症</p> <p>b. 果糖不耐症</p> <p>c. 糖原病 IV 型</p> <p>5. アミノ酸代謝異常 チロシン血症</p> <p>6. その他の代謝異常 ミトコンドリア肝炎</p> <p>C. 内分泌/遺伝性</p> <p>1. 甲状腺機能低下症</p> <p>2. 下垂体機能低下症</p> <p>3. Down 症候群（およびその他のトリソミー症候群）</p> <p>D. 特発性</p>
---	---

ADPKD：常染色体優性多発性嚢胞腎（肝のみに嚢胞），ARPKD：常染色体劣性多発性嚢胞腎（肝・腎に嚢胞），BAAT：bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase, BRIC：良性反復性肝内胆汁うっ滞症，BSEP：bile salt export pump, CFTR：cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, MDR3：multi-drug resistance protein 3, PFIC：家族性進行性肝内胆汁うっ滞症（Balistreri WF et al, 2006<sup>7)</sup>）

道閉鎖症が13例(36%)であったのに対して、肝生検にて他の疾患・病態が否定され、新生児肝炎と診断されたのは1例(3%)のみであった(図2)。1施設における入院症例の集計のためバイアスがかかっていることを前提としても、宮城県内の重症新生児胆汁うっ滞症例のほとんどが当院に転送される実情を考慮すれば、巨細胞性肝炎の肝組織像を呈する古典的な(いわゆる特発性)新生児肝炎が減少していることは間違いない。

ただしここで問題なのは、臨床症状と肝生検により非症候性肝内胆管減少症(低形成)と診

断された症例が13例(36%)存在していることである。これらの症例では、小葉間胆管はわずかに散見されるもののほとんどは不明瞭であり、サイトケラチンによる免疫染色では、未熟な胆管成分が門脈域辺縁を縁取るような形で配列しているのが確認される。当院ではこの肝組織所見を呈する症例を小葉間胆管減少症もしくは低形成(小葉間胆管の未発達)と診断していたが、この診断名が適切かどうか、後ほど改めて言及する。

### Ⅲ 新生児肝炎における肝生検の意義と特徴的な肝組織所見は？

表2 当院で経験した新生児胆汁うっ滞の内訳(2003年11月~2010年10月)

最終診断名	症例数(%)
胆道閉鎖症	13 (36)
新生児肝炎	1 (3)
非症候性肝内胆管減少症(低形成)	13 (36)
Alagille 症候群	3 (8)
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型	1 (3)
シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞	2 (6)
脂肪肝を伴う肝内胆汁うっ滞症(姉妹例)*1	2 (6)
重症先天性肝内胆汁うっ滞症*2	1 (3)
合計	36

\*1: SLC25A13 遺伝子解析では変異を認めなかった。

\*2: 肝不全により生後7カ月に死亡した。

肝生検は近年の画像診断と比較しても、新生児肝炎と胆道閉鎖症との鑑別においてもっとも信頼性が高い検査法である<sup>8)</sup>。複数の項目によるスコアリング<sup>9)</sup>や、免疫染色による細胆管増生および胆管上皮細胞の増殖能の定量的評価<sup>10)</sup>が両者の鑑別に有用であったという報告もある。鑑別に迷う場合はエコーガイド下経皮的針生検で積極的に肝生検を行うことが望ましいが、すでに日齢60前後で胆道閉鎖症が強く疑われる場合は、経皮的肝生検を省略して開腹もしくは腹腔鏡下胆道造影を施行し、同時に楔状

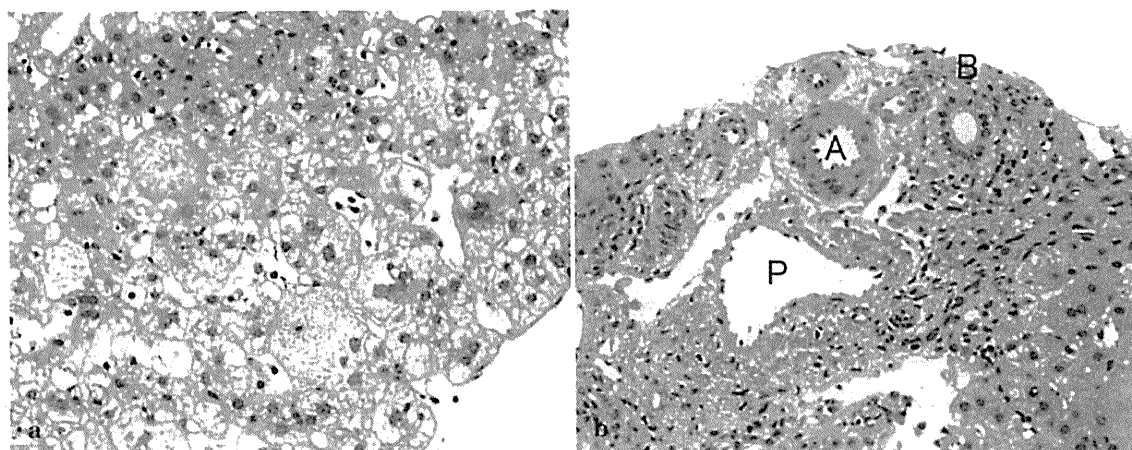


図2 新生児肝炎の肝組織像(2カ月、女児)

a: 多核巨細胞変性を呈する。b: 門脈域に正常な小葉間胆管(B)を認める。門脈域の線維化と偽胆管増生はみられない。(Hematoxylin-Eosin 染色, 強拡大。A: 肝動脈, P: 門脈)

肝生検を行う。胆道閉鎖症の可能性が低い症例でも、肝内胆管減少症やシトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞 (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: NICCD) など他の肝内胆汁うっ滞の診断にも有用なため、できる限り肝生検を施行したい。

新生児肝炎は組織学的に胆汁うっ滞に加えて巨細胞性肝炎の像 (多核巨細胞の出現) を呈することが多いが特異的な所見ではなく、他の胆汁うっ滞症でもしばしば認められる。門脈域の線維化と偽胆管増生は通常みられない (図 2)。

1996年時点での Nishinomiya らによる非家族性特発性新生児肝炎の肝組織学的検討では、典型的な巨細胞性肝炎像を示す症例は全体の約 1/3 に過ぎなかった<sup>11)</sup>。非巨細胞性肝炎群の大部分の組織像は胆汁うっ滞あるいは肝炎の所見を示すが、脂肪肝の組織像を示す症例が約 10% に認められた。後年、この脂肪肝を示す症例の多くが NICCD であることが明らかにされた。

Bellomo-Brandao ら<sup>12)</sup>は、新生児肝内胆汁うっ滞 86 例 (感染性 18 例、遺伝性・内分泌性・代謝性 18 例、特発性新生児肝炎 50 例) において肝生検を施行し、赤血球新生が感染性群において有意に強くみられたことを報告した。その他の所見 (胆汁うっ滞、好酸球増多、巨細胞変性、鉄沈着、門脈域の線維化、隔壁形成) は 3 群間で有意差はなかった。

肝組織所見から予後を予測する試みもなされている。Okçu-Heper ら<sup>13)</sup>は、新生児の非閉塞性 (すなわち肝内) 胆汁うっ滞 (新生児肝炎 18 例、非症候性肝内胆管減少症 10 例) において、肝組織所見 (線維化、壊死・炎症、巨細胞変性、髓外造血) により肝組織障害スコアを作成し、臨床経過の重症度と比較した。その結果、肝組織障害スコアの合計点数および細胞周囲線維化が臨床経過の重症度との負の相関を認めたと報告している。

## IV 新生児肝炎の病因は？

新生児肝炎の病因は不明であるとされてきたが、その病因は単一ではなく、未知の代謝性もしくはウイルス性肝障害が混在していると考えられてきた。事実、かつては原因不明の肝内胆汁うっ滞として新生児肝炎と診断されていた疾患群の中から、NICCD をはじめとした種々の遺伝性・代謝性疾患が同定・解明され、その結果 Balistreri ら<sup>7)</sup>が述べているように“特発性”新生児肝炎の割合は減少している。特発性新生児肝炎を含めた新生児肝内胆汁うっ滞の病因として、現在では周産期異常が重要視されている。

Vajro ら<sup>14)</sup>は、新生児仮死後に胆汁うっ滞性黄疸の臨床像を呈した 4 例を報告し、新生児仮死は早期発症の新生児肝内胆汁うっ滞の一因であると報告した。そのうちの 1 例では肝組織学的検査が施行され、巨細胞性肝炎の像が観察されている。

Jacquemin ら<sup>15)</sup>は、一過性に肝内胆汁うっ滞を呈した新生児 92 例のうち、81 例 (89%) において新生児仮死や敗血症などの慢性もしくは急性の周産期異常を認めたことから、胆汁うっ滞の原因としては下記の複合要因によるものと提唱した。

- ① 胆汁分泌の未熟性 (生理的胆汁うっ滞)
- ② 肝虚血 (子宮内発育不全、仮死などによる周産期の低酸素および再灌流傷害)
- ③ 細菌感染症 (敗血症)
- ④ 経口栄養開始の遅延 (新生児壊死性腸炎、経静脈栄養など)

新生児仮死は多様な臓器へ傷害を与えるが、肝臓では低酸素による肝壊死による虚血性肝炎 (ischemic hepatitis) を引き起こされる。周産期の肝虚血あるいは乏血傷害が起こる状況では、肝臓をバイパスする静脈管を介して臍帯血が増加し、肝血流の減少と再分布が起こりうると考えられる。その結果、胆汁分泌は減少し、

さらに血流の再開に伴う虚血、乏血肝への酸素の再供給は再灌流傷害 (ischemic-reperfusion injury) を引き起こし、その傷害を増幅するものと考えられている<sup>5)15)</sup>。さらに、敗血症に伴うエンドトキシン血症により、門脈域の炎症と肝細胞の胆汁酸輸送の障害が惹起され、胆汁うっ滞が生じると考えられる<sup>5)</sup>。

Jacquemin ら<sup>15)</sup>は、92 例のうち 70 例で肝生検を施行した結果、63 例 (90%) で肝細胞の巨細胞性変化を、また 17 例 (24%) で脂肪変性を認め、さらに 68 例 (97%) では小葉間胆管が明瞭に認められた。これらの所見は前述の特発性新生児肝炎の肝組織学的特徴に合致するものであり、胆汁うっ滞も予後良好な経過をとったことから、Jacquemin ら<sup>15)</sup>が検討対象とした症例の多くは、従来特発性新生児肝炎といわれていた疾患群に含まれるものと考えられる。

当院における新生児胆汁うっ滞 36 例 (前述) のうち、新生児肝炎の 1 例には周産期異常はなかった。一方で非症候性肝内胆管減少症と診断された 13 例のうち、仮死や低血糖など何らかの周産期異常を有する症例が 8 例おり、そのうちの 6 例が染色体異常や合併奇形などの先天異常を伴っていた。周産期異常は新生児肝炎に限ったことではなく、非症候性肝内胆管減少症を含めた新生児肝内胆汁うっ滞に共通する主要な要因なのか、それともこの 13 例の肝内胆管減少症 (低形成) との診断自体を見直して、Jacquemin ら<sup>15)</sup>の症例と同様に「一過性の新生児胆汁うっ滞」とよぶべきなのか、今後検討を要する。

## V 回復期における $\gamma$ -GTP の一過性上昇が意味するものは？

Jacquemin ら<sup>15)</sup>は、前述の報告において、51 例中 41 例 (80%) で血清  $\gamma$ -GTP が回復期に一過性に上昇する現象を認めたと述べている。血清総ビリルビンの低下 (生後 1~2 カ月) と同時に血清  $\gamma$ -GTP が上昇し (生後 2~3 カ月)、以

降は低下・正常化が観察された。

Wang ら<sup>16)</sup>も、特発性新生児肝炎 103 例における血清  $\gamma$ -GTP の検討の中で、総ビリルビンと AST の低下がみられた後に  $\gamma$ -GTP が一過性に上昇する症例を多く経験している。 $\gamma$ -GTP が 100 U/L 未満の低値例では、100 U/L 以上の高値例に比べて肝障害の程度や肝組織所見がより高度だったが、後から  $\gamma$ -GTP が上昇する症例の予後は良好であり、胆汁うっ滞の遷延化や再燃はなかった。血清  $\gamma$ -GTP 上昇の機序として、胆管の虚血性傷害、あるいは肝細胞 ATP の枯渇による胆汁分泌の減少が考えられている<sup>5)</sup>が、回復期の上昇を説明するには不十分のように思われる。

当院にて非症候性肝内胆管減少症 (低形成) と診断された 13 例全例において、回復期に  $\gamma$ -GTP の一過性上昇が認められている。筆者はこれを回復期における胆管上皮細胞の増生によるものと推測していたが、本来肝内胆管に異常はないはずの新生児肝炎でも同様の変動がみられることから、別の機序を考察する必要がある。

## おわりに

35 年前には新生児胆汁うっ滞の半数以上を占め、病因の不明な疾患群の総称であった「新生児肝炎」から、NICCD をはじめ新しい疾患概念が次々と独立してきた。今後も基礎および臨床研究の進展に伴い、新生児肝炎の概念が変わっていくことが予想される。いずれは、わが国における新生児肝炎の定義や用語そのものを見直すべき時期が来ると思われる。

## 文献

- 1) A-Kader HH, Balistireli WF: Cholestasis. In: Nelson Textbook of Pediatrics 17th ed, WB Saunders, 2004: 1314-1319
- 2) 松井 陽: 新生児肝炎は減少したか? 小児内科 2004; 36: 1254-1255
- 3) 白木和夫ほか: 新生児肝炎と乳児肝内胆汁うっ滞. 小児内科 1987; 19: 1779-1783

- 4) Tazawa Y et al : Relationship of feeding modality of to clinical features in Japanese infants with idiopathic neonatal hepatitis of the non-familial form. *Acta Paediatr Jpn* 1996 ; 38 : 328-333
- 5) 田澤雄作 : 新生児胆汁うっ滞—新生児肝炎及びシトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞の臨床を中心として. *日本小児科学会雑誌* 2007 ; 111 : 1493-1514
- 6) 宝珠山厚生ほか : 乳児胆汁うっ滞症 : 自験 106 例の臨床・病理学的検討. *日本小児栄養消化器肝臓学会誌* 1999 ; 13 : 120-125
- 7) Balistreri WF et al : Whatever happened to “neonatal hepatitis”? *Clin Liver Dis* 2006 ; 10 : 27-35
- 8) Yang JG et al : Comparison of different diagnostic methods for differentiating biliary atresia from idiopathic neonatal hepatitis. *Clin Imaging* 2009 ; 33 : 439-446
- 9) Lee WS et al : Usefulness of a scoring system in the interpretation of histology in neonatal cholestasis. *World J Gastroenterol* 2009 ; 15 : 5326-5333
- 10) Aktas S et al : Quantitative analysis of ductus proliferation, proliferative activity, Kupffer cell proliferation and angiogenesis in differential diagnosis of biliary atresia and neonatal hepatitis. *Hepato-Gastroenterology* 2003 ; 50 : 1811-1813
- 11) Nishinomiya F et al : Relationships between clinical and histological profiles of non-familial idiopathic neonatal hepatitis. *Acta Paediatr Jpn* 1996 ; 38 : 242-247
- 12) Bellomo-Brandao MA et al : Analysis of the histologic features in the differential diagnosis of intrahepatic neonatal cholestasis. *World J Gastroenterol* 2009 ; 15 : 478-483
- 13) Okçu-Heper A et al : Nonobstructive neonatal cholestasis : clinical outcome and scoring of the histopathological changes in liver biopsies. *Pediatr Dev Pathol* 2006 ; 9 : 44-51
- 14) Vajro P et al : Cholestasis in newborn infants with perinatal asphyxia. *Acta Paediatr* 1997 ; 86 : 895-898
- 15) Jacquemin E et al : Transient neonatal cholestasis : origin and outcome. *J Pediatr* 1998 ; 133 : 563-567
- 16) Wang JS et al : Significance of low or normal serum gamma glutamyl transferase level in infants with idiopathic neonatal hepatitis. *Eur J Pediatr* 2006 ; 165 : 795-801



## The herbal medicine Inchinko-to reduces hepatic fibrosis in cholestatic rats

Takahiro Asakawa · Minoru Yagi · Yoshiaki Tanaka ·  
Kimio Asagiri · Hidefumi Kobayashi ·  
Hideaki Egami · Ken Tanikawa · Masayoshi Kage

Accepted: 5 September 2011  
© Springer-Verlag 2011

### Abstract

**Purpose** Several studies have reported the herbal medicine Inchinko-to (ICKT) to have an antifibrotic effect which thus leads to an improvement of hepatic injury. However, there are still few reports of its use in the treatment of cholestatic liver disorder. The aim of this study was to clarify whether the administration of ICKT will ameliorate hepatic fibrosis and injury in cholestatic rats.

**Materials and methods** We performed bile duct ligation on 7-week-old male cholestatic Wistar rats and assigned them to one of three groups according to the method of treatment: (1) the SHAM group, (2) the NT-group (non-treatment group), and (3) the T-group (treatment-group). Rats in the T-group were orally administered ICKT (TJ-135) at a dose of 1 g/kg/day and were killed on the 17th postoperative day. We subsequently investigated the levels of fibrosis and various clinical markers through measurement of the following: serum levels of AST and ALT; tissue transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1); tissue inhibitor metalloprotease-1 mRNA (TIMP-1 mRNA) through real-time PCR analysis; and Azan staining and

immunohistochemical staining of alfa-smooth muscle actin (alfa-SMA) to evaluate the degree of fibrosis.

**Results** The levels of serum AST, serum ALT, and TGF-beta1 in the T-Group were significantly lower than those in the NT-Group. In addition, staining of Azan and alfa-SMA in the T-Group was significantly lower than those in the NT-Group.

**Conclusion** ICKT may help reduce hepatic fibrosis and injury by controlling stellate cell activation.

**Keywords** Inchinko-to · Antifibrotic effect · Hepatic fibrosis · Cholestasis · Biliary atresia

### Background

Many patients with biliary atresia (BA) continue to suffer from postoperative liver dysfunction, even after undergoing Kasai's hepatic portoenterostomy. Such patients can experience chronic inflammation with or without jaundice. The prevention of progressive liver fibrosis has, therefore, become an important factor to achieve favorable long-term results. For this purpose, a combination of medications that have hepatocyte protective activity has been used routinely in post-operative patients with BA. The herbal medicine Inchinko-to (ICKT) has been commonly used in Japan as an anti-inflammatory, antipyretic, choleric, and diuretic agent for liver disorders and jaundice [1–3]. Recently, ICKT has been reported to have a potent inhibitory effect on hepatocyte apoptosis, induced by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1), and it inhibits the production of inflammatory cytokines in concanavalin A-induced hepatitis [4, 5]. Furthermore, ICKT has been reported to directly suppress liver fibrosis in vivo [6, 7]. Clinical reports in Japan also suggest that

T. Asakawa (✉) · M. Yagi · Y. Tanaka · K. Asagiri ·  
H. Kobayashi

Department of Pediatric Surgery, Kurume University School of  
Medicine, 67 Asahimachi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan  
e-mail: monmon@ka3.so-net.ne.jp

H. Egami  
Department of Innovative Kampo Medicine, Kurume University  
School of Medicine, Kurume, Japan

K. Tanikawa · M. Kage  
Department of Pathology, Kurume University School of  
Medicine, 67 Asahimachi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan

ICKT might be beneficial for the treatment of hepatobiliary diseases in adults [7]. These models in vivo had made by the injection of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) or pig-serum. However, those reports have not been validate in cholestatic liver disorders [6–8].

The pathologic mechanism of the progression from cholestasis to fibrosis might be summarized as an extra-cellular matrix chemical imbalance caused by the activation of transcription factors and hepatic stellate cells. Continuous inflammation increases the expression of adhesion factors, which results in the accumulation of immune cells in the liver. The subsequent accumulation of hydrophobic bile acid leads to the activation of Kupffer cells, as well as the excessive production of active-oxygen species and consequent lipoperoxidation [9–11].

The aim of this study was to clarify whether the administration of ICKT can reduce hepatic fibrosis and injury in cholestatic rats.

## Materials and methods

We utilized 7-week-old male Wistar rats weighing 250–300 g. Three days before the operation, we initiated intragastric administration of ICKT at a dose of 1 g/kg/day. We decided the applied dose of ICKT referring from Yamashiki et al. and Imanishi et al. [5, 12] reports. We prescribed pure extract ICKT (TJ-135). ICKT is manufactured by Tsumura Co., Ltd. (Tokyo, Japan) and has been approved as an ethical drug by the Ministry of Health and Welfare of Japan. The daily amount of ICKT is 7.5 g/day in adults. Seven and one-half grams of this product contain 1.5 g of dried extract obtained from mixed raw herbs in the following ratio: 4.0 g of Inchinko (*Artemisia Capillaries Spike*), 3.0 g of San-shishi (*JP Gardenia Fruit*), and 1.0 g of Daio (*JP Rhubarb Rhizome*) [5–8].

Under ether anesthesia, bile duct ligation and SHAM operation were carried out on the rats. After median incision laparotomy, the bile duct was doubly ligated. The SHAM operation involved only an abdominal laparotomy. There were three study groups with eight rats in each. The groups consisted of: (1) SHAM group ( $n = 8$ ), (2) NT-group (no treatment after bile duct ligation) ( $n = 8$ ), and (3) T-group (ICKT treatment group) ( $n = 8$ ). All rats were killed on the 17th postoperative day. Blood was drawn from the inferior vena cava under ether anesthesia, and the livers were removed after ligation of the portal veins, coronary arteries, and inferior vena cava. The livers were fixed in formalin and prepared as specimens, with the exception of about 2.0 g of tissue that was stored frozen at  $-150^{\circ}$  of centigrade in liquid nitrogen immediately after extraction.

The serum AST and ALT levels were measured by a biochemical analysis. Furthermore, the levels of hepatic TGF-beta1 were measured by ELISA method. Immunohistochemical staining of TGF-beta1 in hepatic tissues was performed using mouse anti-human TGF-beta1 monoclonal antibody (Cosmo Bio Co., LTD, Japan) by the ABC method (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in order to evaluate the activation of stellate cells. For each specimen, the staining rate was defined as the average TGF-beta1 staining in 5 fields at 400 $\times$  magnification. The measurements were based on a DI-Ruler (Harada Industry, 1018 Kamimaruko, Ueda-city, Nagano Japan) referring to Kobayashi's method [13].

Real-time PCR (RT-PCR) was performed to evaluate the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). The expression level of TIMP-1 was observed to be directly related to the suppression of matrix metalloproteinase [13]. According to Broide, Britton, Lee, and Kobayashi's reports, the expression level of TIMP-1 is endogenous inhibiting factor of MMP group [9–11, 13, 14]. The probes and primers for RT-PCR were obtained from TaqMan™ Gene Expression Assays Realtime TIMP-1 (TIMP-1: Applied Biosystems).

Azan staining and immunohistochemical staining of alfa-smooth muscle actin (alfa-SMA) was performed to evaluate the degree of fibrosis in rats. For each specimen, the staining rate of the positive cells was defined as the average Azan staining in 5 fields at 40 $\times$  and the average alfa-SMA staining at 100 $\times$  magnification. The measurements were based on a DI-Ruler.

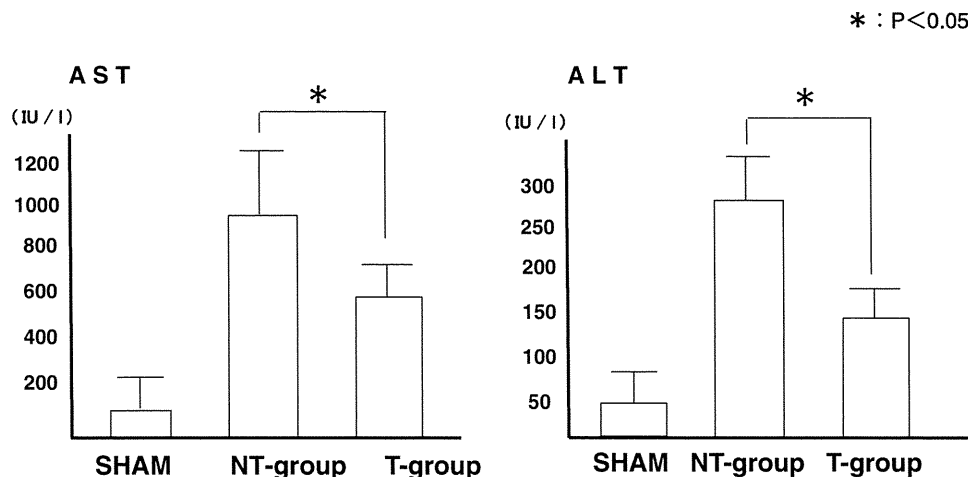
This animal experimental protocol was approved by the Animal Experiments Committee of Kurume University (No. 2026). The measurements are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation, and comparisons between two groups were performed with the Mann-Whitney *U* test. *p* values below 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

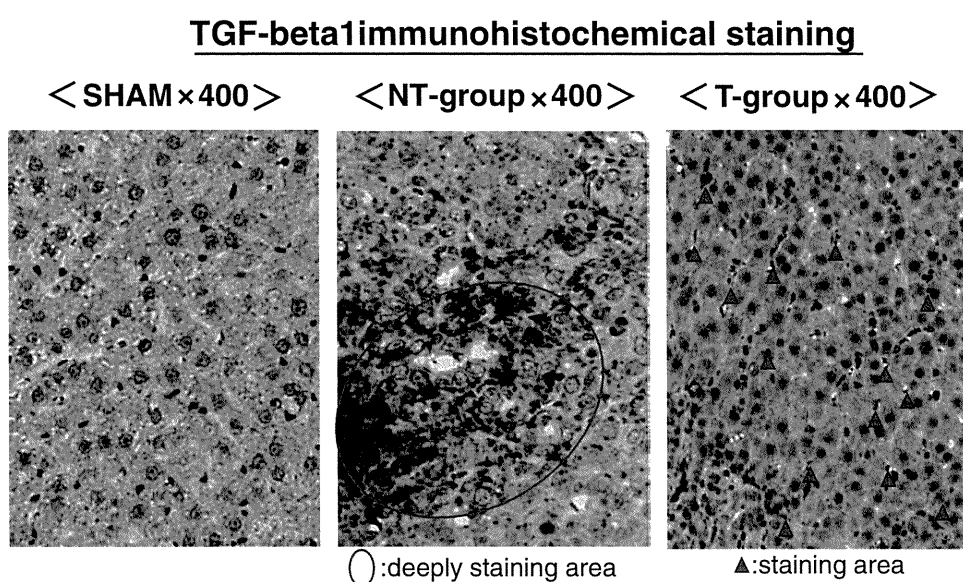
In the blood biochemical analysis, serum AST was  $973.3 \pm 212.9$  and  $579.3 \pm 174.3$  IU/l in the NT-group and T-group, respectively. The serum ALT was in  $279.3 \pm 85.2$  and  $141.2 \pm 49.3$  IU/l in the NT-group and T-group, respectively. The serum AST and ALT levels in the NT-group were significantly higher than those in the T-group (AST:  $p = 0.048$ , ALT:  $p = 0.046$ ). Therefore, the administration of ICKT significantly reduced both serum values (Fig. 1).

In TGF-beta1 immunohistochemical staining, the percentages of stained cytoplasm were  $22.06 \pm 5.4$  and

**Fig. 1** Serum AST and ALT levels in rats. Serum AST and ALT levels in the NT-group were significantly higher than those in the T-group ( $p < 0.05$ )



**Fig. 2** Immunohistochemical staining of TGF-beta1. The percentages of positive cells were  $22.06 \pm 5.4$  and  $0.97 \pm 1.45\%$  in the NT-group and T-group, respectively. Staining of TGF-beta1 in the T-group was significantly lower than that in the NT-group ( $p < 0.05$ )

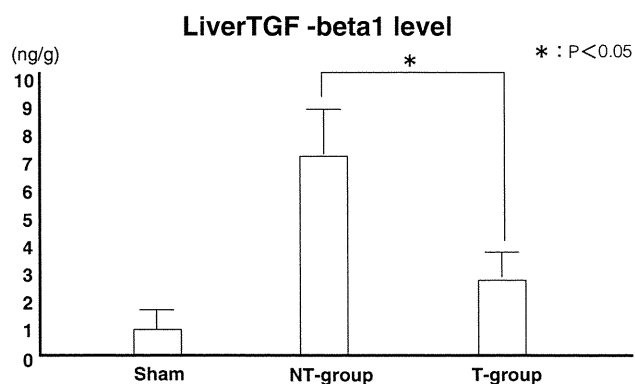


$0.97 \pm 1.45\%$  in the NT-group and T-group, respectively ( $p = 0.009$ , Fig. 2).

Hepatic TGF-beta1 levels were  $7.14 \pm 1.37$  and  $2.89 \pm 0.79$  IU/l in the NT-group and T-group, respectively ( $p = 0.008$ , Fig. 3).

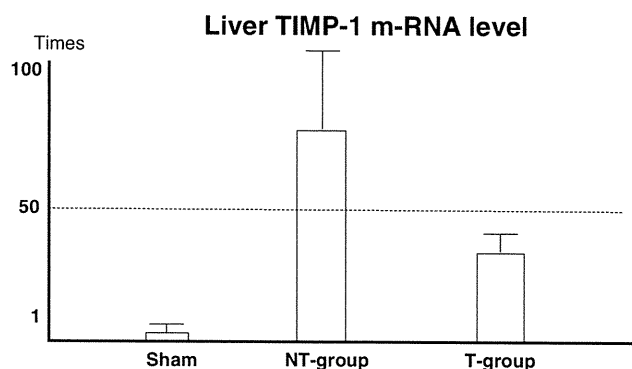
The relative levels of TIMP-1 m-RNA, indicating the suppression of matrix metalloproteinase, were  $76.8 \pm 29.5$  and  $32.7 \pm 18.3$  times in the NT-group and T-group, respectively, compared to the SHAM group (Fig. 4). Although the relative level of TIMP-1 m-RNA in the T-group was lower than that in the NT-group, there was no significant difference between the two groups.

For alpha-SMA staining, the percentages of positive cells were  $47.5 \pm 16.4$  and  $12.4 \pm 4.34\%$  in the NT-group and T-group, respectively ( $p = 0.009$ , Fig. 5). Likewise, Azan staining revealed, fibrotic areas of  $33.2 \pm 8.5$  and  $17.3 \pm 7.1\%$  in the NT-group and T-group, respectively ( $p = 0.0283$ ). In spite of a high grade of bridging fibrosis



**Fig. 3** Hepatic TGF-beta1 levels. The level of hepatic TGF-beta1 in the NT-group was significantly higher than that in the T-group ( $p < 0.05$ )

in the NT-group, no bridging fibrosis was seen in the T-group (Fig. 6).

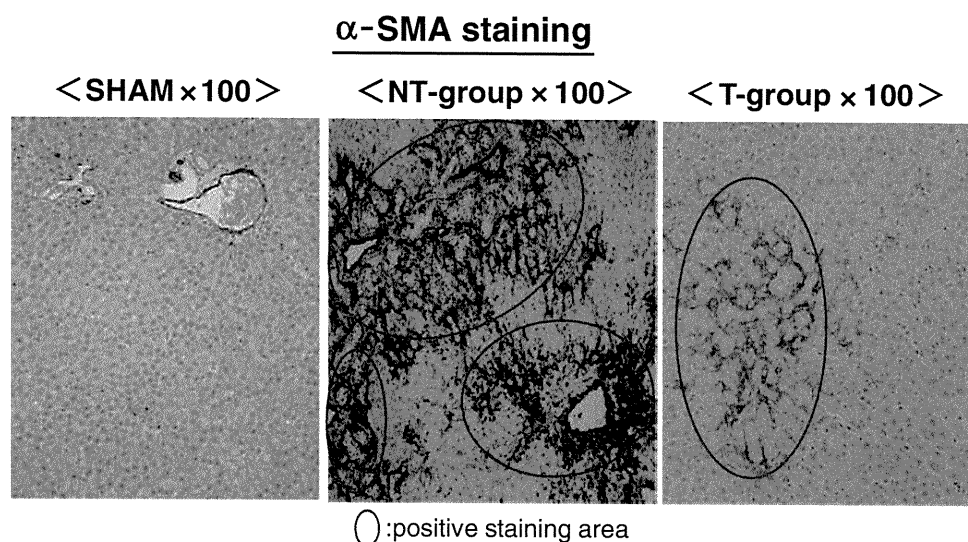


**Fig. 4** Hepatic TIMP-1 m-RNA levels. Although the relative quantification of hepatic TIMP-1 m-RNA in the T-group was lower than that in the NT-group, there was no significant difference between them

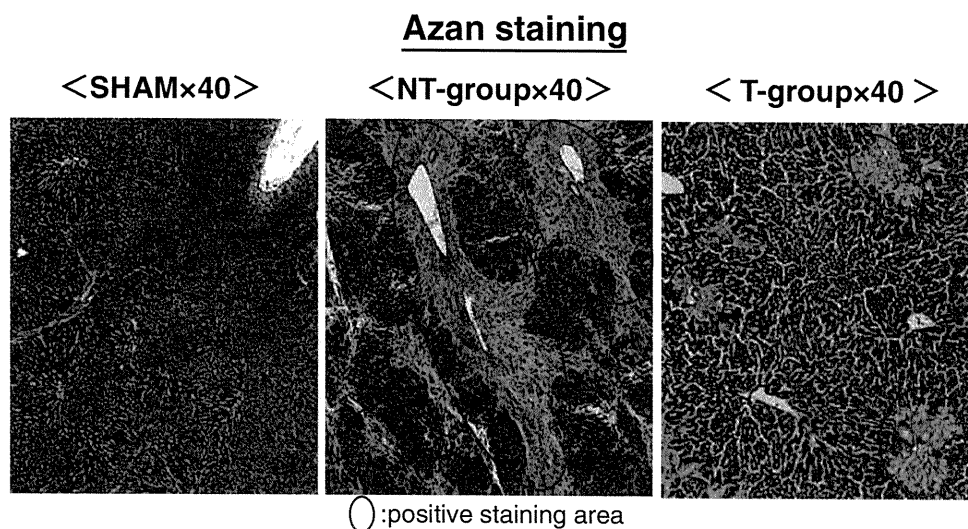
**Fig. 5** Immunohistochemical staining of alpha-SMA. The rates of positive cells were  $47.5 \pm 16.4$  and  $8.4 \pm 4.3\%$  in the NT-group and T-group, respectively. Staining of alpha-SMA in the T-group was significantly lower than that in the NT-group ( $p < 0.05$ )

### Discussion

Experimental studies have shown that ICKT protects against the hepatic injury induced by various agents in vitro, including alpha-naphthylisothiocyanate, galactosamine, and carbontetrahydrochloride [7]. In addition, recent clinical reports in Japan suggest that ICKT also may be beneficial for the treatment of hepatobiliary diseases such as BA [7, 15]. Several studies have reported ICKT to have an antifibrotic effect, while also improving hepatic injury [6–8, 15, 16]. The models in these reports originate from cholestatic liver disorder, but as a result of injection of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), pig-serum, or choline-deficient L-amino acid-deficient diet [6, 8]. We performed bile duct ligation in rats to serve as a model of cholestatic liver disorder, similar to that seen in patients with BA. The aims



**Fig. 6** Azan staining. The percentages of fibrotic areas were  $33.2 \pm 8.5$  and  $11.3 \pm 7.1\%$  in the NT-group and T-group, respectively. Staining of Azan in the T-group was significantly lower than that in the NT-group ( $p < 0.05$ ). In spite of the high grade of bridging fibrosis in the NT-group, no bridging fibrosis was seen in the T-group



of our study were to confirm both an antifibrotic effect and improvement of hepatic injury by administration of ICKT in cholestatic rats, and to clarify the pharmacodynamic action of ICKT.

By administration of ICKT, we confirmed significant reduction in the serum levels of AST and ALT in cholestatic rats, similar to previous reports [6–8, 15, 16]. The data in these reports confirmed that ICKT also has hepatocyte protective activity in BA patients.

Broide, Britton, and Lee reported that the mechanism of advancing hepatic fibrosis involves activation of stellate cells as a result of continuous inflammation of the liver, which in turn promotes the production of TGF-beta1 and consequently disrupts the balance between production and reduction in the extracellular matrix [9–11]. The pathologic mechanism of the progression from cholestasis to fibrosis might originate from a chemical imbalance in the extracellular matrix caused by the activation of transcription factors and hepatic stellate cells. Continuous inflammation increases the expression of adhesion factors, which results in the accumulation of immune cells in the liver. The subsequent accumulation of hydrophobic bile acid leads to the activation of Kupffer cells [9–11, 14].

Recently, ICKT also has been reported to ameliorate concanavalin A-induced hepatitis by inhibiting the production of inflammatory cytokines [5], through the inhibition of liver cell apoptosis induced by Fas-mediated lethal liver injury [17] and TGF-beta1 [4]. TGF-beta1 is regarded as an undesirable factor in various liver disorders, because this cytokine induces fibrosis in liver tissue and the growth suppression of hepatocytes, which may worsen liver function. Furthermore, the inhibition of TGF-beta1 intervention has been reported to be therapeutic in already-established liver fibrosis, not only by suppressing fibrosis, but also by facilitating hepatocyte regeneration [18]. The reason for the progression of liver fibrosis in many BA patients despite successful surgical treatment remains unclear, but TGF-beta1 has been reported to promote hepatic fibrogenesis via the activation of hepatic stellate cells in BA patients [19].

In our study, there was a significant reduction in hepatic fibrosis in rats given ICKT, as seen both in alfa-SMA staining and Azan staining, compared to the NT-group. To evaluate the hepatic fibrotic mechanism, we investigated the antifibrotic effects by ICKT. In this study, we have shown reduced levels of TGF-beta1 and hepatic TIMP-1 in rats given ICKT.

Yamamoto et al. [4] reported that ICKT reduces the apoptosis of hepatocytes. The significant reductions observed in the serum AST and ALT levels in this study might thus be considered to be hepatocyte protective effects through the prevention of apoptosis by ICKT. However, hepatocytes might instead be protected by the

inhibition of TGF-beta1 production due to reduction of hepatic TGF-beta1 levels. ICKT is an aqueous mixture of three herbal extracts: Inchinko (*Artemisia Capillaries Spike*), San-shishi (JP *Gardenia Fruit*), Daio (JP *Rhubarb Rhizome*) in a ratio of 4:3:1 by weight [5–8]. Inchinko and San-shishi are effective for liver disease, and Daio is a laxative and anti-inflammatory agents. Inchinko contains the choleric agent capillarisin. San-shishi contains genipin, an aglycone converted in the gut from geniposide which has been proven to suppress Fas-induced liver injury in mice [16]. Hepatic fibrosis may have been inhibited due to a reduction of the hepatic TIMP-1 levels, as a marker of the suppression of matrix metalloproteinase, and thus led to reduction of TGF-beta1 levels. In this study, we have not yet investigated the transcription factors in the mechanism of hepatic fibrosis. Therefore, further experiments may be necessary to clarify these points.

The excessive production of active-oxygen species might be related to the onset and advancement of hepatic injury, related to continuous intrahepatic inflammation [20]. We have previously reported that postoperative patients with BA were under severe oxidative stress, even with mild liver dysfunction without jaundice [13, 21]. Oxidative stress results in the progression of cholestatic disease, while antioxidant therapy reduces cholestasis [13]. Recently, Nrf2-mediated antioxidant action was reported in cholestatic diseases by administration of ICKT [22]. Therefore, it may be necessary to investigate the effects of ICKT on oxidative stresses from the view point of stress markers in the near future.

In conclusion, the herbal medicine ICKT might protect hepatocytes and reduce fibrosis by suppressing hepatic stellate cell activation and expression level of TIMP-1 in a cholestatic rat model.

## References

1. Kiso Y, Ogasawara Y, Hirota K et al (1984) Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds. *Planta Med* 1:81–85234
2. Takeda S, Endo T, Aburada M (1981) Pharmacological studies on iridoid compounds. The choleric mechanism of iridoid compounds. *J Pharmacobiodyn* 4:612–623
3. Okuno I, Uchida K, Nakamura M et al (1988) Studies on choleric constituents in *Artemisia capillaris* THUMB. *Chem Pharmacol Bull* 36:769–775
4. Yamamoto M, Ogawa K, Morita M et al (1996) The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. *Hepatology* 23:552–559
5. Yamashiki M, Mase A, Arai I et al (2000) Effect of the Japanese herbal medicine Inchinko-to (TJ-135) on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Clin Sci* 99:421–431
6. Inao M, Mochida S, Matsui A et al (2004) Japanese herbal medicine Inchinko-to as a therapeutic drug for liver fibrosis. *J Hepatol* 41:584–591

7. Iinuma Y, Kubota M, Yagi M et al (2003) Effects of the herbal medicine Inchin-ko-to on liver function in postoperative patients with biliary atresia—a pilot study. *J Pediatr Surg* 38:1607–1611
8. Sakaida I, Tsuchiya M, Kawaguchi K et al (2003) Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol* 38:762–769
9. Broide E, Klinowski E, Koukoulis G et al (2000) Superoxide dismutase activity in children with chronic liver diseases. *J Hepatol* 32:188–192
10. Britton RS, Bacon BR (1994) Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatology* 19:343–348
11. Lee KS, Buck M, Houghum K et al (1995) Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 96:2461–2468
12. Imanishi T, Maeda N, Otagawa K et al (2004) Herb medicine Inchin-ko-to (TJ-135) regulates PDGF-BB-dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats. *J Hepatol* 41:242–250
13. Kobayashi H, Tanaka Y, Asagiri K et al (2010) The antioxidant effect of green tea catechin ameliorates experimental liver injury. *Phytomedicine* 17:197–202
14. Wells RG (2000) Fibrosis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:845–850
15. Kobayashi H, Horikoshi K, Yamataka A et al (2001) Beneficial effect of a traditional herbal medicine (inchin-ko-to) in postoperative biliary atresia patients. *Pediatr Surg Int* 17:386–389
16. Tamura T, Kobayashi H, Yamataka A et al (2007) Inchin-ko-to prevents medium-term liver fibrosis in postoperative biliary atresia patients. *Pediatr Surg Int* 23:343–347
17. Yamamoto M, Miura N, Ohtake N et al (2000) Genipin, a metabolic derived from the herbal medicine Inchin-ko-to and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Gastroenterology* 118:380–389
18. Nakamura T, Sakata R, Ueno T et al (2000) Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 32:247–255
19. Ramm GA, Nair VG, Bridle KR et al (1998) Contribution of hepatic parenchymal and non parenchymal cells to hepatic fibrosis in biliary atresia. *Am J Pathol* 153:527–535
20. Baskol G, Baskol M, Kocer D (2007) Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem* 40:776–780
21. Asakawa T, Tanaka Y, Asagiri K et al (2009) Oxidative stress profile in the post-operative patients with biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 25:93–97
22. Okada K, Shoda J, Kano M et al (2007) Inchinkoto, a herbal medicine, and its ingredients dually exert Mrp2/MRP2-mediated cholestasis and Nrf2-mediated antioxidative action in rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:1450–1463

## 胆汁うっ滞の病理

谷川 健\* 鹿毛政義 八木 実\*\*

### はじめに

新生児あるいは乳児期に胆汁うっ滞を呈する疾患は多種多様である。かつては、その代表的疾患は新生児肝炎 (neonatal hepatitis : NH) であったが、最近ではほとんど経験されなくなった。その理由の一つは診断技術の進歩があげられる。NHはいわゆる新生児肝炎症候群といわれてきたように、複数の疾患や病態を包括した概念である。その疾患の病因や成因については不明な点が多かった。しかし、分子病理学的研究が進み、これらの症例のなかから、新たに疾患が発見されたり、既知の疾患の責任遺伝子が同定されるようになった。これらには、後述する Alagille syndrome, progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC), neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD), 胆汁酸代謝異常症などが含まれる。これら新たな疾患の確定診断は遺伝子解析によることが多いが、新生児期および乳児期胆汁うっ滞症すべてに遺伝子解析を施行するのは非現実的である。肝病理組織所見で疾患の推定ができれば、遺伝子解析適応の判断に有用である。

本稿では、新生児および乳児期胆汁うっ滞症のうち、代表的疾患の病理組織所見を、鑑別疾患をあげながら述べる。各疾患の概念、病態生理などについては他稿にゆずる。

Tanikawa Ken Kage Masayoshi Yagi Minoru

\* 久留米大学医学部病理学講座

[〒830-0011 久留米市旭町 67]

TEL 0942-31-7546 FAX 0942-32-0905

E-mail : tanitaka@med.kurume-u.ac.jp

\*\* 久留米大学医学部外科学講座小児外科部門

### I 特発性新生児肝炎

前述のように、NH は複数の病因・病態をもつ疾患群である。最近では、原因不明の症例に対して診断されている。新たに疾患が確立されると、今後、特発性新生児肝炎 (idiopathic neonatal hepatitis : INH) と診断される症例はさらに少なくなると思われる。INH の特徴とされている組織所見は、胆汁うっ滞を伴う著明な肝細胞巨細胞性変化であるが、特異的变化はない。門脈域の線維性拡大や細胆管増生はないか、あっても軽度である。肝硬変に進行する症例もある。

### II 胆道閉鎖症

#### 1. 病理組織所見<sup>1)</sup>

臨床的に胆道閉鎖症 (biliary atresia : BA) の診断は困難ではないが、診断困難な場合、肝生検が施行される。肝組織は胆汁性の線維化が生じ、不規則な門脈域線維性拡大が起こる。その後、線維性架橋が形成され、小葉構築は改変し、胆汁性肝硬変の像を呈する。肝小葉には著明な胆汁うっ滞がみられる。とくに中心帯領域に高度である。肝細胞は多核巨細胞性変化を呈する。多核巨細胞は中心帯領域に目立つことが多いが、肝小葉全体にみられる症例もある。類洞内にはさまざまな程度の髓外造血がみられる。門脈域にはさまざまな程度のリンパ球浸潤がみられ、ときには好中球浸潤を伴う。門脈域周囲には細胆管増生が著明である。増生した細胆管は拡張し、しばしば管腔内に胆汁栓がみられる。胆汁うっ滞、門脈域周囲線維化の進行とともに、小葉間胆管は傷害を伴う。初期の小葉間胆管傷害は胆管上皮配列の乱れであ

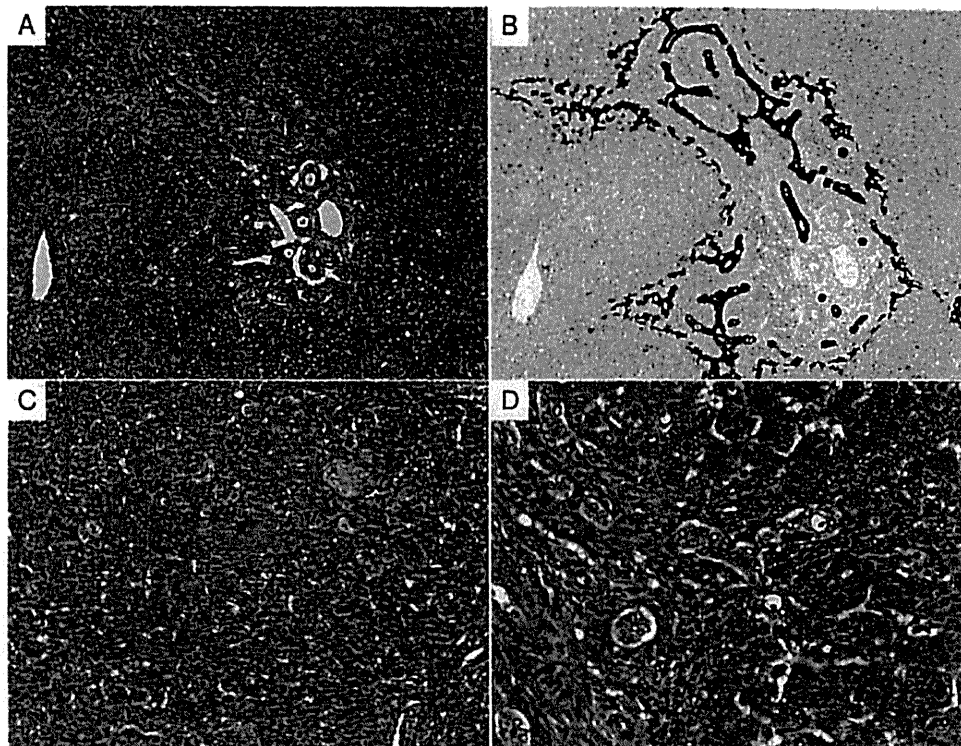


図 1 BA (A, C, D: HE 染色, B: 抗 CK7 抗体による免疫組織化学)

A, B: 門脈域は線維性拡大, 細胆管増生が目立つ。DPM がみられる。C: 肝小葉は胆汁うっ滞を伴い, 肝細胞巨細胞変化がみられる。D: 増生した細胆管腔内には胆汁栓を伴っている。

り, さらに胆管上皮に空胞形成, 核濃縮, 核萎縮, 炎症細胞浸潤がみられる。病変が進行すると, 徐々に胆管基底膜肥厚が起こる。しばしば, 胆管周囲線維化を伴い, 胆管上皮の萎縮あるいは消失が進行する。最終的に, 小葉間胆管は完全に消失する。また, 脈管の異常もみられ, 小葉間動脈は壁が肥厚し, 小葉間門脈は狭小化する。症例のなかには, ductal plate malformation (DPM) がみられることがある。DPM は線維性に拡大した門脈域の辺縁部に沿って, 円形～楕円形, あるいは不規則な形に配列する胆管である。BA の 20~40% にみられ, DPM を伴う症例では病態発生の発端が胎生期にあり, DPM を伴わない症例よりも病態が進行している可能性があるといわれている<sup>2)</sup>(図 1)。

## 2. 鑑別疾患

BA の診断は胆道造影などで, 臨床的に診断が確定されることが多く, 病理組織診断に頼ることは少ない。

BA の鑑別疾患は, 肝細胞巨細胞性変化の所見

から, 肝内胆管減少症 (paucity of intralobular bile duct: PILBD) があげられる。鑑別のポイントは小葉間胆管が消失することである。BA でも小葉間胆管が消失することがあるが, 通常, 進行した BA すなわち肝硬変でみられる所見である。肝細胞巨細胞変化は両者に共通するが, PILBD では門脈域の線維性拡大はほとんどみられない。

## III 肝内胆管減少症

症候性と非症候性に分けられる。

### 1. 病理組織所見<sup>1)</sup>

#### 1) 症候性 (Alagille syndrome)

肝内胆管がさまざまな程度で減少, あるいは完全に消失する (小葉間胆管数・門脈域数比 < 0.6, 正常 0.9~1.8)。細胆管増生がみられることがある。肝小葉には肝細胞巨細胞性変化, 胆汁うっ滞がみられる。進行すると, 肝小葉の肝細胞巨細胞性変化は減少する。さまざまな程度の門脈域周囲線維化が起こる (図 2)。



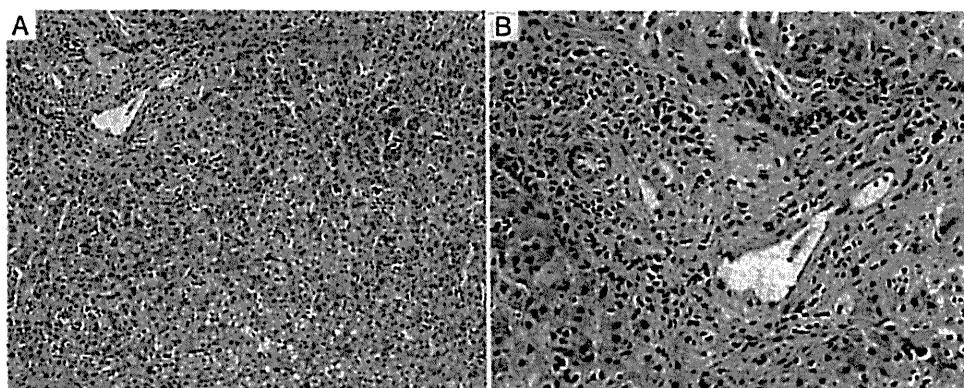


図 2 PILBD (Alagille 症候群) (A, B : HE 染色)

(症例は琉球大学病理学講座 青山肇先生, 加藤誠也先生のご厚意による)

A : 肝小葉に炎症細胞浸潤はごく軽度であり, 髓外造血が散在性にみられる。少量の肝細胞巨細胞性変化が認められる。B : 門脈域には明瞭な小葉間胆管が認められず, 細胆管が軽度増生している。門脈域に炎症細胞浸潤は軽度である。

## 2) 非症候性

肝内胆管の減少は小型あるいは中型の門脈域で見られる (小葉間胆管数・門脈域数比 $<0.6$ )。残存する胆管には壊死炎症性破壊の所見がみられることがある。肝小葉には肝細胞巨細胞性変化, 胆汁うっ滞, 髓外造血, 類洞周囲線維化がみられる。時間の経過とともに, 肝小葉の変化は軽減するが, 胆管減少の状態は持続する。門脈域周囲線維化は進行する。

## 2. 鑑別疾患

PILBD は肝細胞巨細胞性変化を呈することから, BA が鑑別にあげられる。前述のように, BA は著しい細胆管増生, しばしば胆汁栓を伴う。さらに, BA では線維化は急速に進行するが, PILBD では進行は緩徐である。

## IV PFIC

PFIC は, 原因遺伝子によって, PFIC1, PFIC2, PFIC3 の 3 型に分類され, それぞれ組織所見が異なる。

### 1. 病理組織所見

#### 1) PFIC1<sup>3,4)</sup> (図 3)

本疾患初期では, 門脈域の線維性拡大は軽度, 門脈域および肝小葉内の炎症はごく軽度である。肝細胞索は乱れ, 肝細胞はやや小型化, 敷石状に

配列している。また, 肝細胞は腺房様配列を呈し, 腺房様配列内に胆汁栓を伴うこともある。巨細胞性変化は乳児期にしばしばみられ, 加齢とともに消退する。初期では胆管傷害は軽度であるが, 進行するとより著明になり, 胆管減少症の状態となる。病変が進行すると, 肝小葉には線維性隔壁が形成され, 門脈域辺縁に細胆管増生がみられる。線維性隔壁は BA や後述の PFIC2 に比して細い。進行は緩徐だが, 最終的に肝硬変にいたる。

電子顕微鏡の所見では, 毛細胆管内に高い電子密度の粗顆粒状の胆汁 (Byler's bile) が観察される。

#### 2) PFIC2<sup>3,4)</sup> (図 4)

肝小葉には, 線維性隔壁が形成される。肝小葉全体にわたる著明な巨細胞性変化がみられる。巨細胞間には炎症細胞浸潤, 胆汁栓を伴う胆汁うっ滞がみられる。肝小葉の胆汁うっ滞を伴った肝細胞巨細胞変化は乳児期を過ぎても残存する。肝細胞胞体に Mallory 小体がみられることがある。門脈域には線維性拡大がみられ, 好中球を含み, リンパ球を中心とする軽度~中等度の炎症細胞浸潤がみられる。小葉間胆管は門脈域によっては不明瞭で, 細胆管の軽度の増生がみられる。進行すると, 胆汁性肝線維化を経て胆汁性肝硬変にいたる。

電子顕微鏡では, 絨毛が目立たず, 毛細胆管拡張がみられる。毛細胆管内に細顆粒状, あるいは

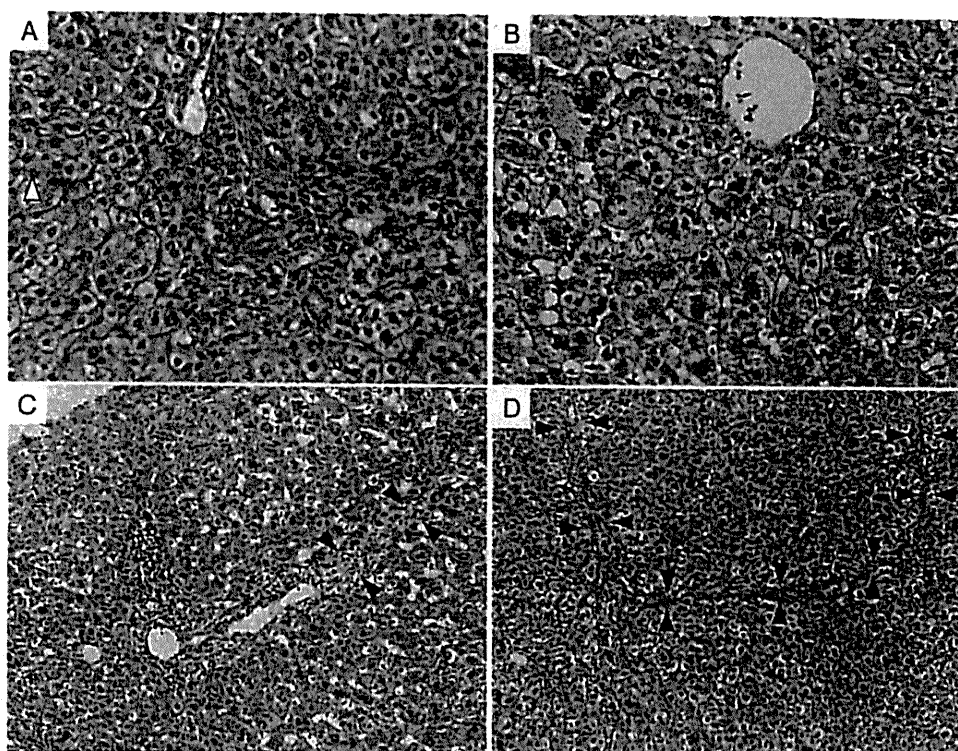


図 3 PFIC1 (A~D: HE 染色)

A: 門脈域。線維性拡大は軽度で、小葉間胆管は不明瞭。門脈域周囲は肝細胞索が乱れ、肝細胞は小型化、敷石状配列を呈している。少数であるが、胆汁栓を伴う胆汁うっ滞がみられる(△)。B: 中心帯領域。多核巨細胞化した肝細胞が散在する。肝小葉内の炎症はごく軽度である。C (42 生日時): 門脈域の線維性拡大および壊死炎症反応は軽度である。門脈域から細い線維性隔壁が伸展している。小葉には巨細胞性変化がみられる。D (1 歳時): 門脈域の線維性拡大および壊死炎症反応は軽度であり、C と比して大きく変化していない。細い線維性隔壁はあまり厚くならず、伸展しており、C よりも隔壁は長くなっている(▲)。(C, D は同一症例、同倍率)

フィラメント様胆汁を含む。

### 3) PFIC3<sup>3,5)</sup>

十分に明らかにされていない。Deleuze らの報告によると、門脈域の炎症細胞浸潤、細胆管の増生などが特徴とされる。初期に細胆管増生および炎症細胞浸潤が認められ、胆汁性肝硬変に進行する。軽度の肝細胞巨細胞性変化、肝細胞好酸体を伴う胆汁うっ滞も認められる。

PFIC3 と確認された症例での電子顕微鏡所見の報告はない。

## 2. 鑑別疾患

### 1) PFIC1

巨細胞性変化を伴う疾患があげられる。PILBD では肝細胞の敷石状配列はみられない。PFIC2 では肝細胞巨細胞性変化が高度で、巨細胞の間に炎症細胞浸潤が目立つ。

### 2) PFIC2

巨細胞性変化を伴う疾患が鑑別にあげられる。BA は肝小葉で、巨細胞性変化および胆汁うっ滞ともに高度、太い線維性隔壁が形成され、肝小葉の所見は PFIC2 と類似する。しかし、BA は門脈域に細胆管増生、線維性拡大が高度であるが、PFIC2 では軽度である。PFIC1 では肝細胞巨細胞性変化が軽度で、巨細胞間の炎症細胞浸潤は目立たず、線維化も細い隔壁を形成する。

### 3) PFIC3

巨細胞性肝炎をきたす疾患が鑑別の対象となる。

## V NICCD (図 5)

### 1. 病理組織所見<sup>6,7)</sup>

脂肪肝と胆汁うっ滞が重要な所見であり、多く

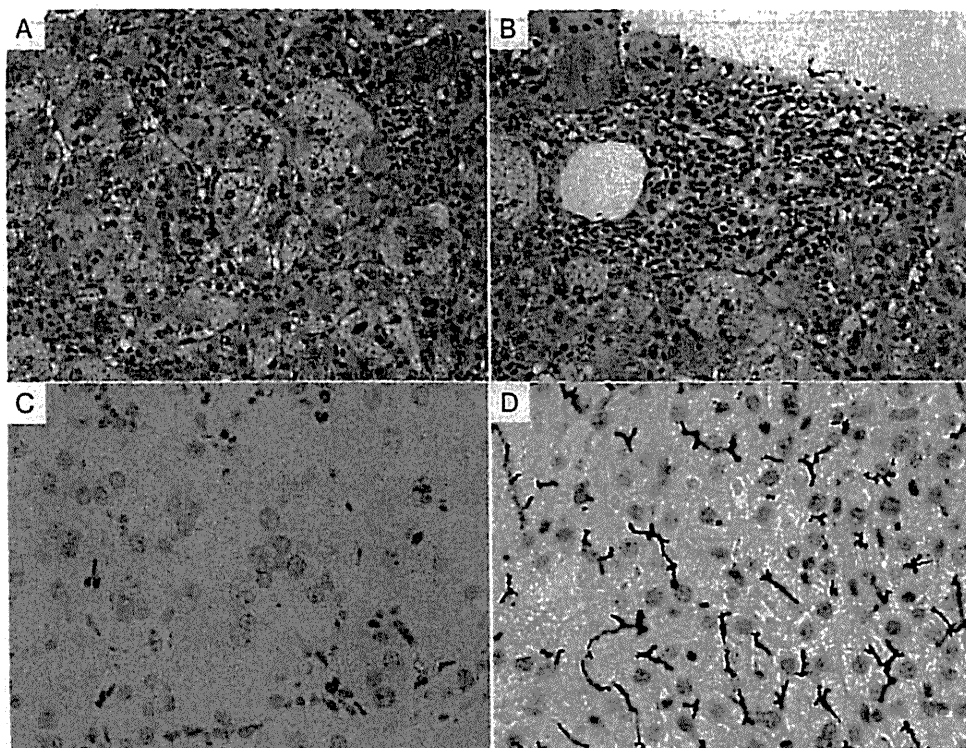


図 4 PFIC2 (A, B: HE 染色, C, D: 抗 BSEP 抗体による免疫組織化学)

(症例は国立成育医療研究センター病理診断部 中澤温子先生のご厚意による)

- A: 肝小葉。肝細胞巨細胞性変化が著明である。巨細胞間には線維化、炎症細胞浸潤、胆汁栓を伴う胆汁うっ滞がみられる。B: 門脈域。軽度の線維性拡大がみられ、リンパ球を中心とする軽度～中等度の炎症細胞浸潤を伴う。小葉間胆管は一部不明瞭、細胆管の増生が軽度みられる。C: 毛細胆管に BSEP の発現が認められない。D: 対照症例の BA では、毛細胆管に BSEP の発現が認められる。

の症例は 1 歳以内に所見が軽減するが、まれに線維化が進行し、肝硬変にいたる症例もある。線維化の程度はさまざまである。線維化は門脈域から伸展し、線維性架橋を形成し、肝小葉構築を改変し、肝硬変に進展する。炎症所見もさまざまであり、多くの症例は中等度～高度の炎症反応がみられる。炎症細胞は門脈域に浸潤し、piecemeal necrosis を伴う。門脈域に浸潤している主な炎症細胞はリンパ球である。実質域に巣状壊死および好酸体がみられる。類洞にはごく少数の好中球、Kupffer 細胞を伴い、単核球浸潤がみられる。ほとんどの症例が脂肪肝を呈する。約 7 割の症例は高度の脂肪肝を示し、大脂肪滴と中心核性微小脂肪滴の混在がみられる。脂肪性肝炎の所見を示す症例もみられる。胆汁うっ滞は約 8 割の症例にみられ、その約 6 割は胆汁栓を伴う高度の胆汁うっ滞を呈する。高度の胆汁うっ滞を伴う症例では、胆汁栓を容れる肝細胞の腺房様構造がみ

れる。約半数の症例で、門脈域周囲の肝細胞および門脈域内のマクロファージに軽度のヘモジデリン沈着が観察される。脂肪肝、胆汁うっ滞、炎症反応、鉄沈着はいずれも特異的所見ではないが、これらの所見が同一肝にみられ、しかも大脂肪滴と中心核性微小脂肪滴が混在する脂肪肝はまれである。NICCD は特徴ある肝病理組織像を呈する疾患と考えられる。

## 2. 鑑別疾患

脂肪沈着の所見から、薬剤性肝障害、nonalcoholic steatohepatitis (NASH) があげられる。薬剤性肝障害では、メトトレキサートなどで大脂肪滴性、バルプロ酸などで小脂肪滴性の脂肪沈着がみられる。薬剤性肝障害による脂肪沈着は肝小葉中心性に起こることが多い。NICCD の脂肪肝は肝小葉全体にわたる。NICCD は NASH と脂肪沈着と炎症の点で類似するが、NICCD では肝細胞の

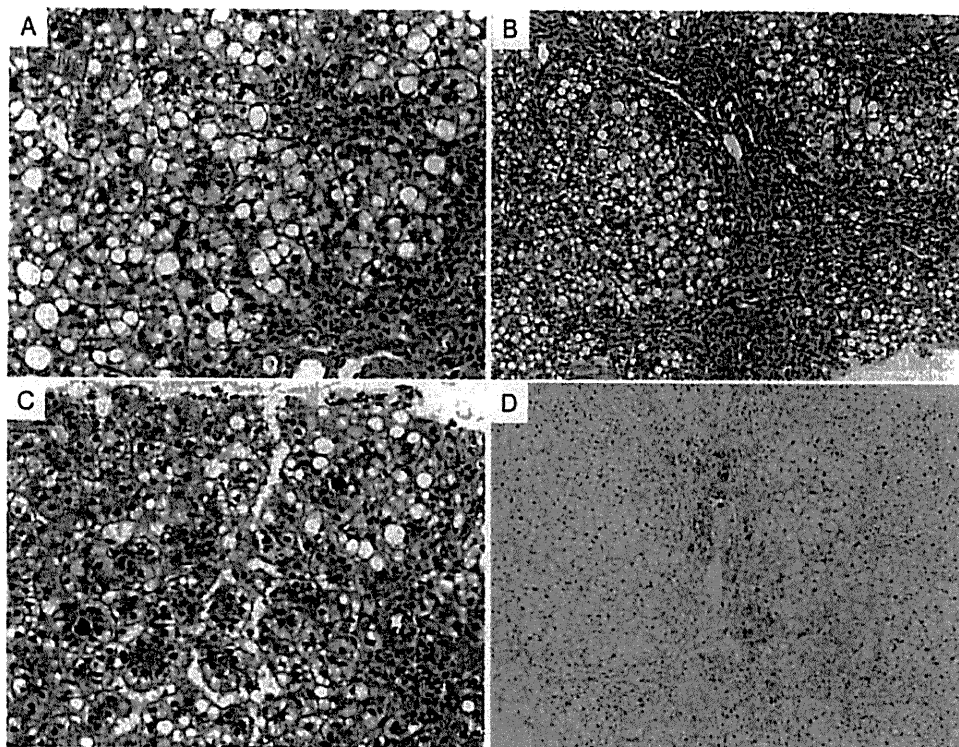


図 5 NICCD (A~C: HE 染色, D: 鉄染色)

A: 肝小葉は高度の脂肪肝を呈している。大脂肪滴, 小脂肪滴が混在している。B: 門脈域にはリンパ球を中心とする炎症細胞浸潤がみられる。C: 肝細胞が腺房様構造を示し, 内部に胆汁栓を伴っている。肝細胞巨細胞性変化もみられる。D: 門脈域周囲を中心にヘモジデリンが沈着している。

ballooning は目立たず, 線維化は門脈域から伸展し, NASH にみられる zone 3 を中心とした線維化はみない。

## Ⅵ 胆汁酸代謝異常症 (図 6)

胆汁酸代謝異常症は非常にまれな疾患であり, 筆者らの施設でも経験が非常に少ない。欠損する酵素によって多数の欠損症がある。そのうち代表的な欠損症は,  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ - $C_{27}$ -steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症 ( $3\beta$ -HSD 欠損症),  $3$ -oxo- $\Delta^4$ -steroid  $5\beta$ -reductase 欠損症 ( $5\beta$ -reductase 欠損症), oxysterol  $7\alpha$ -hydroxylase 欠損症 (oxysterol  $7\alpha$  欠損症) である。

胆汁酸代謝異常症症例を集めた文献<sup>8)</sup>があるが, 各欠損症での特徴的な所見は明らかにされていないようである。

### 1. 病理組織所見<sup>8,9)</sup>

#### 1) $3\beta$ -HSD 欠損症

初期には巨細胞性肝炎を示し, 肝硬変へ進行する。炎症所見は軽度である。門脈域では, 限界板に沿って細胆管増生がみられる。多くは小葉間胆管の減少および消失はみられない。

#### 2) $5\beta$ -reductase 欠損症

肝小葉では, 胆汁うっ滞と肝細胞巨細胞性変化がみられる。肝細胞の水腫様腫大, 類洞内髓外造血が肝小葉内に不規則に分布する。炎症所見は軽度である。小葉間胆管は保たれていることが多い。限局性に軽度の細胆管増生および胆管炎の所見がみられることがある。

#### 3) oxysterol $7\alpha$ 欠損症

肝細胞巨細胞性変化を伴い, 肝小葉に高度の胆汁うっ滞がみられる。炎症は高度であり, 炎症細胞は好中球が中心で, リンパ球, 好酸球が混在する。肝硬変へ急速に進行する。小葉間胆管は保たれるが, しばしば細胆管増生がみられる。