

学位論文題名

多包性肝エキノコックス症における遠隔転移の機序

学位論文内容の要旨

緒言

多包性肝エキノコックス症は肝病巣の発育は緩慢であるが肝内のみならず周囲臓器へ浸潤性に増殖する。また、腹膜播種の他、リンパ節転移を来たすのみならず進行例では肺、脳、骨などの遠隔転移をみることも少なくない。しかし本症における遠隔転移の機序は未だ解明されていない。肝内に限局した病巣の構成成分が肝内脈管に侵入し移動、着床することが遠隔転移の必須条件となるが、どの成分が要因であるか尚不明である。そこで病巣を構成するいくつかの成分に分画し、本症の好的宿主であるスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) の静脈より注入して、遠隔転移巣形成の有無を比較検討した。

研究方法

成分分画の作成：コットンラット (*Sigmoid hispidus*) の腹腔内に継代培養している多包性肝エキノコックス (アラスカ株) シスト塊をホモジナイズ後、濾過、遠心分離して原頭節、囊包、胚層細胞の分画を採取した。これらの分画は、それぞれ再度、コットンラットの腹腔内に投与し8週後病巣が形成されることを確認した。

経鼠径静脈注入：7週齢のスナネズミの左鼠径静脈より原頭節、囊包、胚層細胞の3分画をそれぞれ500個、50個、 2×10^7 個、0.2mlの等張緩衝液(PBS)の浮遊液として投与した。8週後、犠牲死させ肝、脾、肺、腎、脳を肉眼的、病理組織学的に比較検討した(n=各10)。

経腸間膜静脈注入：分画の採取過程において遠心分離を加えない分画(未遠心分離分画：原頭節50個を含む)を加えた4分画を腸間膜静脈からそれぞれ投与し、8週後犠牲死させた(n=各5)。また、これとは別に胚層細胞群では2,4,6週に犠牲死させた群を作成し、肝、肺を病理組織学的に検討した。肺についてはペルオキシダーゼ標識抗エキノコックスポリクローナル抗体を用いた免疫染色を行なった(n=各3)。

結果

経鼠径静脈注入例では、肉眼的に胚層細胞群の1匹に、肺、両側副腎、脳、大動脈周囲リンパ節、左鼠径部リンパ節に病巣を認めた。また囊包群の1匹に肺に病巣を認めた。病理組織学的にすべての病巣に本症に特徴的なクチクラ層、胚層を認め、その周囲にはリンパ球、好酸球の浸潤を認めたが、石灰化および原頭節を認めなかった。囊包群では肉眼的に病巣を認めない個体においても肺動脈中樞側にPAS陽性な硝子様構造物が確認された。また原頭節群では、肉眼的、病理組織学的に病巣を認めなかった。

経腸間膜静脈注入例では、肉眼的に胚層細胞群の4個体および未遠心分離分画群の5個

体で肝に病巣を認めた。このうち胚層細胞群では3個体、未遠心分離分画群では5個体に肺転移巣を認めた。嚢包群では5個体に肝病巣を認めたが肺転移巣を認めなかった。病理組織学的に、すべての病巣が本症に特徴的な所見を呈していたが、原頭節、石灰化を認めなかった。また原頭節群では、肉眼的、病理組織学的に病巣を認めなかった。

胚層細胞群を経時的に観察した結果、6週後の1個体に肝、肺に病巣を認め、病理組織学的にも本症に特徴的な所見を呈していた。その他の個体では肉眼的および病理組織学的に病巣が認められなかったが、肺動脈周囲の炎症が高度になって行く所見が確認され、肺に免疫染色により陽性を呈する細胞が確認された。

考察

本症では、自然中間宿主が経口的に感染すると、2-4ヵ月で原頭節を伴った肝病巣が形成される。静脈注入を行なった本実験では犠牲死までの期間を病巣形成に十分と考えられる8週に設定した。

経鼠径静脈注入例において胚層細胞群の肉眼的に病巣を認めない個体では、病理組織学的にも、肺に病巣や硝子様構造物を認めなかった。このことは投与した胚層細胞が嚢包形成に至る以前の比較的早期に消失したことを示すと考えられた。嚢包群で認められた肺の硝子様構造物の大きさは投与した嚢包の大きさにほぼ近く、肺動脈内に存在しており、塞栓した嚢包が消退する過程と考えられた。以上のことから嚢包から遊離した胚層細胞が肉眼的病巣を形成した可能性を否定できないものの、少なくとも遠隔転移の過程において胚層細胞に着床する能力が存在することが確認された。

経腸間膜静脈注入例では胚層細胞群、未遠心分離分画群で肝病巣に加え肺転移巣を認めた。また嚢包群ではすべての個体に肝病巣を認めたが肺転移巣を認めなかった。このことから、嚢包から遊離した胚層細胞が遠隔転移の要因の一つと考えられた。

肺転移巣を形成した群の肝病巣に原頭節が認められなかったことから、原頭節が形成される以前の段階でも遠隔転移が起こり得るものと考えられた。

嚢包群に肺転移巣を認めなかった理由として、抗体に対し不透過性を持つと言われるククラ層を抗体よりも大きい胚層細胞が通過できない可能性が推測された。

経時的に観察した胚層細胞群で、肝および肺に病巣が認められない個体でも肺の炎症所見が次第に高度になっていたことから、肝病巣が形成される以前に胚層細胞が肺に何らかの影響を与えていた可能性が推測された。免疫染色で胚層細胞と思われる細胞が確認されたが、その個数は少なく、門脈-肝静脈間のシャントの存在した可能性が大きいと思われた。しかし胚層細胞が極めて強い転移性を持つ可能性も否定し得なかった。

注入経路により肺転移巣の形成に大きな違いを認めた。経鼠径静脈注入では胚層細胞が、より多くより速やかに肺に到達するため経腸間膜静脈注入より肺病巣形成が高度に認められると予想された。しかし実際に肺病巣を発現した個体数の割合は前者で低く、肝を経由する、あるいは肝からの遠隔転移が成立しやすいことが予測された。

原頭節注入で転移病巣が成立しなかったのは、分画を取り出す過程で原頭節の活性が低下したか、*in vitro*で原頭節の排除能力を有することが報告されている宿主補体系が作用したことが推測された。

結語

肝内病巣内の胚層細胞が、何らかの機転で遊離して肝内脈管へ侵入すると血管内を移動し、着床し、病巣を形成することが判明した。しかし胚層細胞以外の分画が遠隔転移の要

因となり得る可能性は否定できない。また肝を経由することが着床、病巣の発現に意義を持つことが示唆された。肝に存在する胚層細胞が他の病巣構成成分が存在しない段階で肺に何らかの影響を与えていることが実験的に示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 宮 坂 和 男

学 位 論 文 題 名

多包性肝エキノコックス症における遠隔転移の機序

多包性肝エキノコックス症における遠隔転移の機序は未だ解明されていない。本実験では、病巣を構成するいくつかの成分に分画し、本症の好的宿主であるスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) の静脈より注入して、遠隔転移巣形成の有無を比較検討した。

コットンラット (*Sigmoid hispidus*) の腹腔内に継代培養している多包性肝エキノコックス、シスト塊から原頭節、囊包、胚層細胞の分画を採取した。まず分画の着床能および遠隔臓器における病巣形成能を検索するため鼠径静脈より、原頭節、囊包、胚層細胞の3分画をそれぞれ500個、50個、 2×10^7 個、0.2mlのリン酸緩衝液(PBS)の浮遊液として投与した。8週後、犠牲死させ肝、脾、肺、腎、脳を肉眼的、病理組織学的に比較検討した。さらに分画の肝内脈管侵入能を検索するため腸間膜静脈より上記3分画、分画の採取過程において遠心分離を加えない分画(未遠心分離分画: 原頭節50個を含む)を加えた4分画を投与し、8週後犠牲死させた。また、これとは別に胚層細胞群では2, 4, 6週に犠牲死させた群を作成し、肝、肺を病理組織学的に、肺についてはペルオキシダーゼ標識抗エキノコックスポリクローナル抗体を用いた免疫染色を行ない検討した。経鼠径静脈注入実験では、肉眼的に胚層細胞群の1匹に、肺、両側副腎、脳、大動脈周囲リンパ節、左鼠径部リンパ節に病巣を認め、囊包群の1匹に肺に病巣を認めた。経腸間膜静脈注入実験では、肉眼的に胚層細胞群の4個体および未遠心分離分画群の5個体で肝に病巣を認めた。このうち胚層細胞群では3個体、未遠心分離分画群では5個体に肺転移巣を認めた。囊包群では5個体に肝病巣を認めたが肺転移巣を認めなかった。いずれの注入実験においても病理組織学的に、すべての病巣が本症に特徴的な所見を呈していたが、原頭節、石灰化を認めなかった。また原頭節群では、肉眼的、病理組織学的に病巣を認めなかった。胚層細胞群を経時的に観察した結果、肺動脈周囲の炎症が高度になって行く所見が確認され、肺に免疫染色により胚層細胞が確認された。

経鼠径静脈注入実験の結果から、少なくとも遠隔転移の過程において胚層細胞に着床する能力が存在することが確認され、経腸間膜静脈注入実験の結果から、囊包の内部から遊離した胚層細胞が侵入の要因の一つと考えられた。注入経路により肺病巣の形成率に違いを認め、肝を経由する、あるいは肝からの遠隔転移が成立しやすいことが予測された。

原頭節注入で転移病巣が成立しなかったのは、分画を取り出す過程で原頭節の活性が低下したか、原頭節の排除能力を有することが報告されている宿主補体系が作用したことが推測された。本症の遠隔転移の機序として肝内病巣内の胚層細胞が、囊包の内部から遊離

して肝内脈管へ侵入の後、血管内を移動し、着床後、病巣を形成することが判明した。

以上の発表内容に関する質問に対し発表者は以下の様に回答した。実験動物をスナネズミとした根拠は、諸家の報告に基づき最も病巣の形成されやすい種であるため選択した。鼠径静脈注入実験において遠隔病巣が形成された個体数は少ないが、本実験においては分画の着床、病巣形成能を検索するのが目的であり、分画投与により必ず病巣が形成されるのではなく自然消退という宿主の要因が存在すると推測される。脳に病巣を形成した経路は、肺病巣が拡大するにしたがい2次的なシャントが肺内に形成されたと推測される。経腸間膜静脈注入実験に関し、嚢包で覆われた肝病巣から胚層細胞が肝内脈管に侵入する機序は、病巣が拡大するにしたがい周囲の脈管が病巣内に取り込まれる事に起因すると推測される。肝に病巣を形成することで分画の活性が高度になったか、全身的な影響の違いにより肺転移巣が高率に形成されたと推測する。腹腔内播種巣に関しては、その臨床報告例では、全例が肝病巣が巨大であり嚢包の状態の主病巣より脱落するか、嚢包が破綻し胚層細胞が遊離するいずれの場合でも生ずると推測されるとの見解を示した。実験動物における経口的虫卵感染による転移巣形成率は過去に報告が無く、本研究の予備実験としても検索されていなかった。

宿主個体間の感染防御機構の差を解明するため血清学的検索を含めたさらなる研究が期待された。

本症の転移要因は、以前より原頭節であると推測されてきたが、本実験では病巣の最も幼若な成分である胚層細胞でも転移要因と成り得ることを証明したものであり、臨床的にも貴重な報告である。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。