

学位論文題名

胆道系発癌における増殖性胆管炎の役割に関する
実験的検討

学位論文内容の要旨

I. 目 的

ビリルビン肝内結石症では胆道系癌が高率に合併することが知られており、その基本病態である増殖性胆管炎と発癌との関連が強く疑われている。しかし臨床例ではそのほとんどが進行癌であり、臨床的に胆管癌の発生機序を解明することは困難なのが現状である。我々は以前より家兎、ラットを用い胆汁のうっ滞と逆行感染をおこす乳頭機能不全モデルを作製し、臨床例の増殖性胆管炎に酷似した組織像が得られることを明らかにした。今回はこのモデルをハムスターに応用し、増殖性胆管炎様病変が発癌の誘因となりうるかを検討した。

II. 研究方法

1. 動物：7～8週齢(体重100～120gr)の雌のシリアン・ゴールデン・ハムスターを用いた。
2. 実験モデル作製(乳頭機能不全モデル)：開腹にて十二指腸乳頭対側の十二指腸を26G針にて穿刺後、5-0 ナイロン糸を経十二指腸的に乳頭より胆道内に挿入・留置した。
3. 化学発癌：発癌物質n-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(以下BOP)の70ppm水溶液をII、III群に投与した。

4. 実験群：I群：乳頭機能不全モデル群(n=各6)、II群：単開腹+BOP投与群(n=各12)、III群：乳頭機能不全モデル+BOP投与群(n=各12)の3群と、対照群：無処置群(n=6)の4群とした。I、II、III群を4, 8, 12週後に犠牲死させ、以下の項目を検索した。尚その1時間前に5'-Bromo-2'-Deoxy-Uridine(以下BrdU)100mg/kgを腹腔内注入した。

1) 組織学的検索：肝臓、肝外胆管、脾臓を一塊に摘出し、10%緩衝ホルマリン固定した。それぞれの標本はヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色、Periodic acid Schiff-Alcian-Blue, pH2.5(PAS-AB2.5)重染色、抗BrdU免疫染色(ABC法)を行い、組織化学的に検討した。①各群における発癌率 ②肝外胆管内腔面積・壁厚の測定：H-E染色標本にて、OLYMPUS VIDEO MICROMETTE R MODEL VM-30を使用して測定した。③粘液産生能：PAS-AB2.5重染色にて中性ムチンと酸性ムチンの鑑別をした。④BrdU Labeling Index(以下BrdU L.I.)：同VM-30で1標本中1,000個の細胞を観察し、陽性細胞数の平均を算出しパーセントで表現した。

2) 胆汁の細菌検査：I、III群の肝外胆管胆汁を採取し、普通寒天培地で培養・同定した。

3) 統計学的処理：測定数値は平均値±標準偏差値(Mean±S.D.)で表した。各週における各群間の発癌率の比較はFisherの直接確立計算法に、各群間の測定値の比較は分散分析法(Scheffeの方法)によった。

III. 結 果

1. 発癌成績：I群では胆管炎からの自然発癌はみられなかった。肝外胆管ではIII群の12週(n=12)でのみ41.7%に癌を認めた。肝内胆管ではII群の12週(n=12)で25.0%、III群の8週(n=12)で50.0%、12週(n=12)で91.7%に発癌がみられた。III群の発癌率はII群に比し有意に高率で

あった ($p < 0.05-0.01$)。

2. 肝外胆管拡張変化 1) 肝外胆管内腔面積 ($\times 10^{-2} \text{mm}^2$) : 対照群の 4.55 ± 1.77 に対し、I、III群では4週より拡張を認め、以後経時的に増強した。III群ではBOP投与により拡張の程度はさらに増強し、12週で 280.49 ± 97.59 であった。II群は拡張軽度であり、I・II群間 ($p < 0.05$)、II・III群間 ($p < 0.01$) において有意差を認めた。

2) 肝外胆管壁の肥厚 ($\times 10^{-2} \text{mm}$) : 対照群の 3.82 ± 0.74 に対し、I、III群は線維性肥厚により経時的に増強し、III群の12週では 19.64 ± 5.31 であった。II群は壁肥厚をほとんど認めず、I・II群間およびII・III群間において有意差を認めた ($p < 0.01$)。

3. 胆管の形態変化 1) 肝外胆管変化 : I群では乳頭状過形成、壁線維性肥厚を認めたが、付属腺の増生はみられなかった。II群では乳頭状過形成を認めるのみだった。III群では4週で増殖性胆管炎の三徴である乳頭状増殖、壁線維性肥厚、付属腺増生の所見を呈しており、12週で5例に付属腺からの発癌を認め、うち1例に胆管上皮の乳頭状腺癌もみられた。

2) 肝内胆管変化 : I群では12週で1例に腺管の増生を認めた。II群では12週で全例過形成以上の変化を認め、発癌が16.7%にみられた。III群では8週で50.0%、12週では91.7%の高率に発癌を認めた。癌の組織形態は①腺管増生型②腺上皮細胞増殖型③間質増生型に分類できた。II群の微小癌に比しIII群は多結節および塊状型等の高度進行癌が多かった。

4. 粘液産生能 1) 肝外胆管 : 対照群は極少量のAB染色細胞を認めるのみであるが、III群では乳頭状過形成部で重染色細胞が、付属腺でAB染色細胞が優位にみられた。

2) 肝内胆管 : 対照群ではAB染色細胞が極少数散在する程度であるが、III群では染色性が増強し、AB染色細胞とPAS-AB重染色細胞が半々にみられ、癌化した腺管の内腔に重染色あるいはAB染色性の粘液の貯留を認めた。

5. BrdU L.I. 1) 肝外胆管 : 対照群のL.I.は 2.47 ± 0.71 であった。III群では乳頭状過形成底部、増生した付属腺でBrdU陽性細胞が多数認められ、L.I.は4週の過形成部で 14.59 ± 2.50 、8週の異形成部で 13.23 ± 2.63 、12週の癌腫部で 14.98 ± 2.39 と細胞回転亢進部の移行がみられた。

2) 肝内胆管 : 対照群ではBrdU陽性細胞はほとんどみられなかった。III群の8週において変化(一)→過形成→異形成→癌腫の順でL.I.はそれぞれ 3.11 ± 0.93 、 6.20 ± 1.03 、 9.87 ± 1.55 、 11.61 ± 2.32 と段階的に増加していた。12週の腺管増生癌は 11.87 ± 1.35 と細胞回転の亢進がみられたが、腺上皮細胞増殖癌では 4.08 ± 0.69 と有意に低値であり、組織型による差がみられた。 ($p < 0.01$)。

6. 胆汁の培養検査 I、III群の5例中全例に *Esch. coli* がみられ、同時に *Bac. distasonis*、*Bac. caccae*、*Bac. ovatus* を各1例に認め、逆行感染が確認された。

IV. 考 察

本モデルと同様の処置を施したウィスター・ラットの実験でも、総胆管末端部抵抗値が対照群に比べ有意に低値であり、胆汁中に全例に細菌を認め、このモデルの基本病態は乳頭機能不全であると考えられた。肝外胆管ではIII群の如く乳頭機能不全状態のハムスターにBOPを経口投与することにより、早期より付属腺の増生がおこり、増殖性胆管炎の組織像を確認したことから、BOPの直接刺激あるいは胆汁酸組成の変化などの関与が考えられた。粘液産生能でもヒト増殖性胆管炎に類似した傾向を示すものと考えられた。本モデルの肝外胆管癌は、この増生した付属腺に癌が発生するのが特徴であり、BrdU L.I. からも付属腺が発癌の母地となる可能性が示唆された。ヒト胆管癌でも胆管内腔に腫瘍が認められず、壁内に広く進展する癌が少数あり、その病態の解明に有用と考えられた。肝内胆管では肝外よりも早期に過形成・異形成変化を示し、種々の組織像の癌化がみられた。BrdU L.I. は過形成→異形成→癌腫と進展する過程で段階的に増加し、過形成および異形成は前癌状態であると考えられた。以上より乳頭機能不全下に化学発癌物質を負荷したハムスターモデルはヒト増殖性胆管炎に類似した組織像を呈し、かつ発癌が促進されたことより、増殖性胆管炎を基本病態とする肝内結石に合併する胆道系癌の発生過程の解明に有用と考えられた。

V. 結 語

乳頭機能不全下にBOP投与した群(Ⅲ群)において以下の結果を得た。

1. 肝外胆管に早期よりヒトに類似した増殖性胆管炎の発現を認めた。
2. 肝外胆管では12週で41.7% (n=12)に増生した付属腺を発生母地とする癌を認め、うち1例に胆管上皮の乳頭状腺癌の合併をみた。
3. 肝内胆管では早期に異形成・癌腫への進展がみられ、8週で50.0% (n=12)・12週で91.7% (n=12)に癌を認めた。組織学上、腺管増生型・腺上皮細胞増殖型・間質増生型に分類できた。4. BrdU L.I.値から肝外胆管の乳頭状過形成底部および増生付属腺が発癌の母地となる可能性が示唆された。
5. 肝内胆管でのL.I.値の推移より過形成→異形成→癌腫への進展過程が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

胆道系発癌における増殖性胆管炎の役割に関する 実験的検討

増殖性胆管炎と胆道発癌との関連が強く疑われているが、臨床例ではそのほとんどが進行癌であり、胆道癌の発生機序を解明することは困難である。そこで申請者は胆汁のうっ滞と逆行感染をおこす乳頭機能不全モデルをハムスターに応用し、増殖性胆管炎病変が発癌の母地となり得るかを検討した。

7～8週齢の雌のシリアン・ハムスターを用い、5-0ナイロン糸を経十二指腸的に乳頭より胆道内に挿入、留置し、乳頭機能不全モデルを作製した。発癌物質n-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(以下BOP)の70ppm水溶液を1週間に25mg/kg体重の割合で群別に投与した。実験群はⅠ群：乳頭機能不全群(各観察期間毎6匹)、Ⅱ群：単開腹+BOP投与群(同各12匹)、Ⅲ群：乳頭機能不全+BOP投与群(同各12匹)の3群と、対照群：無処置群(初回6匹)の4群とし、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ群を4, 8, 12週後に犠牲死させ、組織化学的に検討した。

その結果、1.発癌成績と胆管組織学所見は1)肝外胆管では、Ⅰ群での増殖性胆管炎はみられず、またⅠ、Ⅱ群での発癌はなかった。しかしⅢ群では4週で増殖性胆管炎を確認し、12週では増生した付属腺からの発癌を5例に認めた。2)肝内胆管では、Ⅰ群の自然発癌はなかった。発癌はⅡ群の12週で25.0%に対し、Ⅲ群では8週で50.0%、12週で91.7%と高率に認めた。癌の組織形態は“腺管増生型、腺上皮細胞増殖型、間質増生型”に分類された。2.肝外胆管拡張および壁肥厚は、本モデルを作製したⅠ、Ⅲ群において有意に増強がみられた。3.粘液産生能でもヒト増殖性胆管炎に類似した態度を示した。4.BrdU Labeling Index(L.I.)より1)肝外胆管では付属腺が発癌の母地となる可能性が示唆された。2)肝内胆管では変化(→)過形成→異形成→癌腫の順で、L.I.の段階的な増加がみられた。

以上より乳頭機能不全に化学発癌物質を負荷した本モデルは、ヒト増殖性胆管炎に類似した組織像を呈し、かつ発癌が促進されたことより、増殖性胆管炎に合併する胆道系癌の発生過程の解明に有用と考えた。

審査にあたって、副査の細川教授より 1.本実験モデルにハムスターを使用した理由、2.ハムスターで本モデルを作製したのは申請者が最初であるのかの確認、3.本モデル単独での増殖性胆管炎発生の有無とその組織所見、4.観察期間延長で本モデル単独での発癌の可能性についての質疑があった。申請者は 1.ハムスターは胆嚢を有し、胆汁組成がヒトに近く、かつ胆道系腫瘍の自然発生が2.5%にみられる。2.ハムスター使用および発癌実験は

最初である。3.ハムスター乳頭機能不全モデル単独では増殖性胆管炎はみられず、BOP負荷にて初めて増殖性胆管炎が確認され、その後発癌がみられた。4.本ハムスターモデルを6ヵ月、12ヵ月観察したが癌を認めなかった。と回答した。

副査の長嶋教授より 5.他臓器での発癌の有無、6.肝内胆管での増殖性胆管炎と発生母地の関係、7.抗CEA、抗CA19-9染色での検討、8.癌抑制遺伝子p53に関する検討、9.粘液産生腫瘍との関係について質疑があった。申請者は 5.BOP経口投与は胆道系に特異的に作用するため、膵臓等の他臓器に癌はみられなかった。6.肝内胆管では付属腺の確認はできなかった。癌発生母地は胆管上皮と考えた。7.8.今回は検討していないが、それぞれの特性につき文献的考察を述べた。9.明らかに粘液産生腫瘍と関係する所見はなかった。と回答した。

加藤(紘)教授より 10.本モデルでの胆汁うっ滞と感染の関係、11.付属腺増生におけるBOPの作用についての質疑があった。申請者は 10.胆汁うっ滞と感染の相互作用と考える。11.胆汁酸組成を検討していないため断定はできないが、胆管壁に化学作用が働いたと考える。と回答した。

藤岡助教授より 12.増殖性胆管炎での炎症細胞浸潤の有無、13.BOP投与単独と本モデル+BOP投与での肉眼的・組織学的発癌形態の差の有無、14.胆嚢の組織変化についての質疑があった。申請者は 12.早期には炎症細胞浸潤が著明であるが、8週以降徐々に消退していた。13.BOP投与単独では微小癌であったのに対し、本モデル+BOP投与では進行癌であった。14.胆嚢に癌は認めず、他の報告でも胆嚢での発癌は低率であった。と回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、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者と判断した。