

学位論文題名

増殖性胆管炎の早期病変に関する実験的研究

学位論文内容の要旨

I. 目的

肝内結石症は難病の1つとして指定され、厚生省研究班が作られその成因・治療法などについて検討されているが尚不明な点が多い。肝内結石症の成因としてその構成要素である粘液が重要な役割を担っていることが推測されている。その主成分である複合糖質は炎症によって変化することが知られている。しかしながら、臨床材料では炎症が繰り返されており、胆管付属腺と粘液糖蛋白の変化から病変発生の機序を経時的にとらえることは困難である。教室ではこれまでに胆管付属腺が、胆汁のうっ滞と感染により後天的に増生してくることを実験的に明らかにしてきた。そこで著者は胆管付属腺の増生機転と、胆管付属腺から多量に分泌される粘液の特性を特に複合糖質に注目して組織化学的に検索し、肝内結石の成因との関連について検討した。

II. 研究方法

1. 実験材料 実験動物として雄性家兔(体重2kg前後)を用いた。
2. 実験群 経十二指腸的に胆管にポリエチレンチューブを挿入し胆汁のうっ滞と感染を付加した。術後1日、3日、7日、10日、14日、28日に犠牲死させ、肝外胆管を摘出した。正常対照として無処置家兔を用いた。(各群n=5)
3. 組織学的検索 それぞれの動物の肝臓、胆管、十二指腸を一塊に摘出し、10%ホルマリン固定した。標本は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、Periodic acid Schiff-Alcian-Blue pH2.5(PAS-ABpH2.5)、ABpH1.0を行い粘液について検討した。
4. レクチン染色 ビオチン化レクチンは、糖特異性の判明しているwheat germ agglutinin (WGA), Ricinus communis agglutinin (RCA), concanavalin A (conA), Dolichos biflorus agglutinin (DBA), Ulex europeus agglutinin (UEA-1) の7種類 (Vector Laboratories inc., USA)を用いた。染色法は、avidin-biotin peroxidase complex (ABC)法によった。また、0.2M Hapten糖添加の対照実験も行った。

III. 結果

1. 組織学的所見 1) HE染色 増殖性胆管炎の三徴である①腺管の増生②壁の肥厚③炎症性細胞浸潤に注目して観察すると、3日群ですでに増殖性胆管炎の三徴が認められ上皮の侵入は7日群までに多く、壁の肥厚・肺細胞・腺管の増生・炎症性細胞浸潤等は時間と共に増強する傾向を認めた。
- 2) PAS-ABpH2.5染色 対照群では、PAS-AB両方に染まる粘液をわずかに認めた。実験群では、7日群をピークにAB優位となり、その後再びPASに染まる粘液が増えかつ胆管上皮近傍ではPAS優位で、腺底部では、AB優位となる傾向が認められた。
- 3) ABpH1.0 対照群では、一部の動物で胆管上皮と付属腺にわずかに陽性粘液を認めたが、

ほとんど染まらなかった。実験群では徐々に胆管上皮と付属腺に可染性の粘液が増し、28日群では、乳頭状に増殖した腺管の底部に大量の可染性の粘液を認めた。この染色部はPAS-AB pH2.5染色でAB優位の部分に一致していた。

4) レクチン染色 1) conA 対照群では胆管上皮の刷子縁に染色性を認め3日群より一部胆管上皮や腺管の細胞質にも染まりを認めたがその後大きな変化は認められなかった。2) UEA-1 全期間にわたり胆管上皮と付属腺に染色を認めなかった。3) PNA 対照群ではほとんど染色性を認めなかったがごく一部に付属腺に顆粒状の染まりを認めた。実験群では3日群までは変化なく7日群以降で付属腺の染まりが出現し28日群では胆管上皮の核上部に顆粒状の染まりを認め、乳頭状に増殖した腺管の底部にも強い染色性を認めた。4) RCA 対照群では胆管上皮にわずかに染色性を認めるのみであった。実験群では付属腺の染まりが徐々に強くなり、28日群では腺管の底部に強い染色性を認めた。5) SBA 対照群では胆管上皮の刷子縁と細胞質の一部に染色性を認めた。実験群ではそのほかに付属腺が7日群より徐々に染色性が強くなり28日群では細胞質と粘液部分がよく染まり付属腺の中でも特に胆管上皮に近いところに染色性が高かった。6) DBA 対照群では胆管上皮の刷子縁に染色を認めた。実験群では付属腺に7日群より染まりを認め28日群では細胞質と粘液部分に染色性を認めた。SBAでは微かに染まったスルフォムチン優位の部分 (ABpH1.0に染まる) には染色性を認めなかった。また、対照実験では染色性を認めなかった。

#### IV. 考察

粘液腺色では、対処群に比較して実験群にスルフォムチンの経時的増加を認めたが、28日群ではさらに中性粘液とシアロムチンの増加を認めた。各レクチンの染色性をみるとUEA-1は対照群から28日群で染色性を認めなかった。このレクチンは、増殖性胆管炎によって影響を受けないことが示唆された。すなわち $\alpha$ -フコースの糖鎖はこの病態に関与していないことが推測された。一方WGAとconAは各実験群で染色性に大きな変化はなかった。これらは臨床例では腺上皮に比べ粘液分泌の少ない胆管上皮にみられ、直接結石の生成に関与している可能性は低いと考えられ炎症による糖鎖の変化の多様性を示していると考えられた。

RCAとPNAは共通の糖残基がD-ガラクトースであり、ABpH1.0によく染まる酸性粘液部分に染色性が認められた。また、DBAとSBAは共に7日群より付属腺に染色性が認められたが、28日群ではPAS-ABpH2.5にて中性粘液部分に相当する部分に染色性が認められた。これらのレクチンに共通の糖鎖はNアセチルガラクトサミンであった。

これらの結果より、肝内結石症は単一の粘液によって形成されることは考えにくく、その糖鎖の構成が正常とは異なる酸性粘液と中性粘液が相互に作用し、結石が形成される可能性が示唆された。中性粘液はより胆管上皮に近い部分に、酸性粘液はより深部の完成した付属腺上皮に認められた。活発な分泌活動は上皮に近い腺管で行われていると考えられるので、胆管上皮に近い部分の腺管上皮に結合性を持つNアセチルガラクトサミン糖鎖が重要な役割を持っているのではないかと考えられた。

#### V. 結語

1. 家兎における増殖性胆管炎の早期病変としてまずスルフォムチンの増生がみられ、その後中性粘液やシアロムチンの相対的増生がみられた。これは、肝内結石症に特有の粘液分泌パターンであった。
2. レクチン染色によって、胆管上皮にL-フコースを認められなかったが、D-マンノース・Nアセチルグルコサミンは常に胆管上皮に存在し、実験群で変化を認めなかった。D-ガラクトースとNアセチルガラクトサミン糖鎖の増生が認められたが、同時期の同部位の胆管が中性粘液を産生していることから、これらの糖鎖が肝内結石症の発生機転に重要な役割を持っていることが示唆された。

## 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 石 橋 輝 雄

学位論文題名

### 増殖性胆管炎の早期病変に関する実験的研究

増殖性胆管炎では、胆管付属腺から分泌される粘液がその病態に重要な役割を担っていると考えられている。申請者らのグループは増殖性胆管炎モデルを使って胆管付属腺がうっ滞と感染により増殖してくることを実験的に明らかにしてきた。今回は増殖性胆管炎モデルの早期病変における粘液の変化を特に複合糖質に注目して、組織化学的に検討した。経十二指腸乳頭的に胆管にポリエチレンチューブを挿入し胆汁のうっ滞と感染を付加し、術後1日、3日、7日、10日、14日、28日に犠牲死させ、肝外胆管を摘出した。(各群n=5) 10%ホルマリン固定し、HE染色、PAS-ABpH2.5染色、ABpH1.0染色を行い粘液について検討した。また、糖特異性の判明している7種類のレクチンを用い胆管上皮と付属腺の糖鎖の検索と、0.2M Hapten糖添加の対照実験を行った。

審査に当たって、長嶋教授より①チューブを挿入し増殖性胆管炎のおこるメカニズム②付属腺のムチンが染まっているが胆管内の胆汁のムチンはどうか③スルフォムチンが核となって石ができていのか④N-アセチルガラクトサミン糖鎖を含む糖蛋白の陽性所見とムチン組成との関係についての質疑があった。申請者は、①今回検討した時期では乳頭の機能不全による主にうっ滞でこのような所見が得られた可能性が高いこと②胆汁内ムチンは測定していないが、臨床例の報告では、その時点での結石と胆汁の組成は一致しないこと③他家の報告で硫酸基と非抱合型ビリルビンとの反応で結石ができるという報告があること④レクチン染色で見た糖鎖と粘液染色で見たムチンとはパラレルではない旨の解答を行った。石橋教授からは、①このモデルが胆管結石のモデルといえる根拠②いずれ石はできるのか③このモデルでうっ滞が主なのか逆流が主なのか④血清ビリルビン値はあがるのかとの質疑があった。申請者は、①肝内結石症例の組織型とほぼ同じこと、またムチンの染色態度も同じであること②石はできないが、その前物質と考えられるビリルビンカルシウムと考えられる結晶が析出していたこと③今回の観察時点ではうっ滞が主であると考えられること④測定はしていないが黄疸は来さないこと等を解答した。加藤教授からは、①タイトルには増殖性胆管炎となっているのに目的・結語では肝内結石症との関連を検討したとしていることについて指摘があったが、これは単なるスペキュレーションであったので変更することにした。また②肝内結石の成因としてムチンの糖鎖の変化が結石の成因と考えるかとの質疑に対して申請者は、付属腺より分泌される糖蛋白の変化が関与しているとの解答を行った。藤岡助教授より、①うっ滞と感染の根源は何か②肝内結石症では、先天的なものは考えられないのか③動物で肝内結石症ができたモデルはあるかとの質疑が

あった。申請者は①乳頭機能不全による胆道内圧の変化や逆流によるもの②後天的な変化を示しているが先天的なものを否定するものではないこと③犬でできた報告があるとの解答を行った。

増殖性胆管炎は肝内結石症に随伴する病変と共通する病変であるが、その粘液酸性について検索はなく、またさらに、長期の観察により肝内結石の産生が期待され意義深い研究と考えられた。

審査員一同は、本研究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ると認め、申請者が、博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。