

ビリルビン結石の成因に関する実験的・臨床的研究

(I) 胆管拡張について

京都大学第2外科

高橋 裕, 小林 展章, 谷村 弘, 日笠 頼則

〔原稿受付: 昭和58年7月11日〕

Mechanism of the formation of bilirubin stones

(I) Studies on bile duct dilatation and stone formation

HIROSHI TAKAHASHI, HIROSHI TANIMURA, NOBUAKI KOBAYASHI
and YORINORI HIKASA

The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

To make an animal model of bilirubin stones, Wistar and Sprague-Dawley (SD) rats, 2-10 days of age, were submitted subsequently to experimental bile duct obstruction with Weck Hemoclip, 8% low protein diet with casein, and hemolysis (SD rats) caused by elemental diet using amino acids for protein source. Although many rats died with jaundice 7-10 days after bile duct obstruction, 36 rats (8 Wistar rats and 28 SD rats) survived more than one month and were fed 8% low protein diet with casein for 28 days and 8% low protein diet with amino acids for the next 28 days. Among the 36 rats, 11 rats (2 Wistar rats and 9 SD rats) showed the bile duct dilatation more than 2 mm in diameter. The maximum size of the dilatation reached to 30 mm found in a SD rat with pregnancy. There was no dilatation of intrahepatic ducts in all rats. Although anemia were observed in SD rats on 8% low protein diet with amino acids, serum bilirubin levels remained within normal limits. Stones were not found in all rats. Pathological findings of the rat livers revealed the marked proliferation of bile canaliculi after 90 days of obstruction. But, with longer duration of the bile duct obstruction (130 days), the proliferated bile canaliculi underwent vacuolar degeneration and no bile plug was observed in the liver specimens. These results suggested that rats might adapted themselves to the bile duct obstruction by the excretion of bilirubin other than from the liver and the secretion of bile from the liver would stop after the obstruction with longer duration.

Key words: Bilirubin stone, Bile duct dilatation, Unconjugated bilirubin, β -glucuronidase, Low-protein diet.

索引語: ビリルビン結石, 胆管拡張, 非抱合型ビリルビン, β -グルクロニダーゼ, 低蛋白食.

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan.

コレステロール結石の疾患動物モデルは、ハムスターを lithogenic diet にて飼育する方法によってほぼ完成し、その胆嚢胆汁成分の物理化学的解析結果と臨床像が良く一致し、この胆石の治療や予防方法の研究に役立っている¹⁾。一方、いわゆる「ビリルビンカルシウム石」と呼ばれて来たビリルビンを主成分とするビリルビン結石の成因は、胆汁うっ滞と細菌感染の関与が提唱されてはいる²⁾ものの、未だその理論に基づく実験的ビリルビン結石の形成には成功していない。すなわち、胆汁中で、大腸菌が産生する酵素 β -グルクロニダーゼにより、水溶性の抱合型ビリルビンが脱抱合されて水に不溶の非抱合型（遊離）ビリルビンが増加し、これがカルシウムと反応してビリルビンカルシウムとなり、析出沈澱してビリルビン結石を作ると推測されているが、胆汁中のビリルビンやカルシウムイオンの測定などによる物理化学的裏付けはなされていない。

胆嚢よりも、肝内や肝外の胆管に好発するビリルビン結石の成因に、胆管における胆汁うっ滞が必要条件であることは容易に理解され得る。しかし、細菌感染がビリルビン結石の原因なのか結果なのかは、未だ結論が得られていない。最近の、ヒトやラットの胆汁中のビリルビン分析結果から、感染の無い胆嚢胆汁中にも非抱合型ビリルビンが溶存することが指摘され³⁾、われわれの測定結果⁴⁾からも、非抱合型ビリルビンの増加に必ずしも感染を必要としないと考えられる。臨床例で見れば、溶血性貧血症患者の胆汁中非抱合型ビリルビン濃度の増加⁵⁾は、従来は全くないとされていた肝臓からの直接分泌によるものと考えられ、ビリルビン結石の成因に、このような肝臓からの非抱合型ビリルビンの直接分泌の増減という代謝性因子が関与している可能性も充分考えられる⁶⁾。

また、食餌因子の関与も指摘され、近年、日本における食餌内容の欧米化に伴うビリルビン結石症例の急速な減少、および、現在でもなお、農漁村においては都市地域に比べれば、その発生頻度が高いことから、従来の米食を主体とした低蛋白食餌が、この種の胆石の原因の1つとしてあげられるようになって来た⁷⁾。

そこで、このように臨床的にビリルビン結石の成因に関与すると考えられる諸因子のうち、1) 胆汁うっ滞状態の作製として、胆管閉塞、2) 食餌性因子として、低蛋白食、さらに、3) 胆汁中非抱合型ビリルビン濃度の増加を目的として、溶血⁸⁾の3条件をラットに負荷し、ビリルビン結石形成の疾患モデルとなり得るかを

かを検討した。

方 法

I) 実験動物

実験動物として、ラットを使用した。その理由は、ラットが、1) 解剖学的に胆嚢がないという特徴を持つため、臨床的に肝内や肝外の胆管に好発するビリルビン結石の成因を考察する上で、胆嚢の影響を考慮する必要がなく、極めて好都合であり、2) 胆嚢を有し、かつ、胆石形成モデルとしてよく用いられるハムスターよりも、ラットの胆管胆汁中総ビリルビン濃度は高く、ヒト胆管胆汁中濃度に近い濃度を示すこと、また、3) その胆汁中ビリルビン抱合体は、ヒトと同様、グルクロン酸抱合体 (bilirubin diglucuronide および bilirubin monoglucuronide) が主なるものであること⁹⁾、4) 自然発生胆石は見られず、胆石形成の誘因は実験の負荷条件のみで考察し得ること、さらに、5) アミノ酸を蛋白源とした低蛋白食摂取により、溶血を惹起せしめ得る種 (Sprague-Dawley 系ラット) が存在する¹⁰⁾こと、など、ビリルビン結石形成実験に適する条件を備えていると考えたからである。

II) 実験方法

対照として Wistar 系ラットおよび実験系として Sprague-Dawley 系ラット (SD 系ラット) の妊娠ラット計24匹を購入し、出生して来たラットのうち、哺乳中で生後7—10日の、組織弾性が高いと考えられる幼若期のものに、胆管閉塞手術を施行した。ネブタール麻酔では、充分な筋弛緩が得られず手術が困難なことと、覚醒が遅延するため、麻酔深度が深く、かつ、覚醒の早い GOF・マスク麻酔 (笑気 2 l/min, 酸素 1 l/min, フローセン 1 %) を用いて開腹した。胆管閉塞の方法は、結紮法では、絹糸が胆管内に露出して核となり結石を生じた経験から、また、組織反応の強い物質は胆管の癒痕形成が進み、ヒトの胆石症とは異った病態を呈することから、今回の実験では、組織反応が少ない金属性ヘモクリップ (Weck Hemoclip, small) を使用して、無菌的にその肝外胆管を完全閉塞した。胆管を閉塞する部位は、胆汁の逆流をきたさないように、肝管合流部直下とし、手術用顕微鏡を用いて、胆管の下側を並走する門脈を損傷しないように細心の注意を払って clipping を行った。腹壁は二層の連続縫合にて閉鎖し、麻酔覚醒とともに母ラットとは別のケージに戻し、2—3匹づつ飼育した。胆管閉塞手術直後は、

表1 Experimental Diet

	(w/w%)	
	casein	amino acids
glucose	72.0 %	75.5 %
casein	8.0	—
amino acids	—	8.0
C. M. C.*	3.5	—
salt mixture**	5.0	5.0
vitamins	1.0	1.0
choline	0.5	0.5
butter	10.0	10.0
* C. M. C.— sodium carboxymethyl cellulose		
** salt mixture		
	NaCl	4.5 %
	NaH ₂ PO ₄	9.2
	K ₂ HPO ₄	25.3
	Ca (H ₂ PO ₄) ₂	14.3
	Ca lactate	37.0
	MgSO ₄	7.0
	KI	2.6

一般飼育用固形食を粉末にして与え、その後生後3週までに同固形食に変更した。

胆管閉塞手術後60日間生存したラットに対し、低蛋白食餌負荷を施行した。その蛋白量は、食餌中の蛋白必要量、ヒト20%、動物16%から考えて、その含有量を低蛋白食として8%に抑え、最初の28日間は8%カゼイン食、次の28日間は、8%アミノ酸食として、計56日間 ad libitum に摂取させた。その食餌組成を表1に示す。SD系ラットでは、アミノ酸食餌 (Levenson のいうJ2食)⁹⁾にて溶血性貧血を惹起することを用い、J2食に類似したアミノ酸組成を有する Elental 用アミノ酸組成食餌 (表2)を用いて、溶血の有無を検討した。

実験食にて飼育期間中に死亡したラットはその都度剖検し、胆管拡張の有無、胆石形成の有無を検索し、また一部、肝臓の病理組織標本 (H-E 染色, Azan 染色, Van Gieson 染色) を作製して、胆管閉塞の影響による肝組織の病理学的変化を観察した。低蛋白食投与後、56日間生存例12匹は、ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下に開腹して、肝胆道系の精査を行うとともに、脱血・屠殺し、血液検査をあわせて行った。実際の全経過を図1に示す。

成 績

1) ラットは胆管閉塞術後7—10日目に黄疸を発現

表2 蛋白質成分のアミノ酸組成比

	(w/w%)		
	Casein	J2 diet	Elental
tryptophan	— %	1.22 %	1.07 %
lysine	7.97	9.63	6.30
histidine	2.97	2.76	3.55
arginine	3.76	8.90	7.98
asparagine	—	3.22	6.16
aspartic acid	6.02	1.88	7.35
threonine	3.65	4.08	3.71
serine	4.73	1.88	8.22
glutamic acid	18.57	22.82	13.71
proline	8.87	1.88	4.47
glycine	1.66	11.38	3.58
alanine	2.63	1.88	6.38
cystine	0.35	1.98	—
valine	5.05	4.49	4.97
methionine	2.45	4.40	4.60
isoleucine	4.82	4.49	4.56
leucine	8.58	5.96	5.89
tyrosine	5.29	2.56	0.78
phenylalanine	4.68	7.63	6.18

し、死亡するものが多く、1カ月以上の生存例は、Wistar 系ラット83匹中8匹 (9.6%)、SD 系ラット107匹中28匹 (26.2%)、計36匹 (18.9%)であった。生存例36匹に対し、低蛋白食投与を施行し、まず28日間カゼイン食飼育では生存例、Wistar 系ラット3匹、SD 系ラット21匹、計24匹であり、引き続きこの24匹に、28日間アミノ酸食を投与したところ、Wistar 系ラット2匹、SD 系ラット10匹が生存した。この12匹は、屠殺・剖検した。

2) 1カ月以上生存例36匹中、2mm以上の胆管拡張を認めたものは、Wistar 系ラット8匹中2匹 (25%)、SD 系ラット28匹中9匹 (32%)であった (表3)。拡張した胆管径の最高値は30mmに達し (Fig. 1)、この囊腫様拡張を認めたSD系ラットは、妊娠ラットであった。一方、胆管拡張を認めなかったラット17匹では、胆管を結紮・離断する方法とは異なり、本実験ではヘモクリップによる閉塞が不十分であった可能性も考えられ、胆管の拡張の程度と、ラットの種差や低蛋白食餌の期間などとの関連は考察できなかった。

3) 拡張胆管の形態は、Wistar 系ラット市販固形食群では囊腫様、SD 系ラット低蛋白食群ではびまん

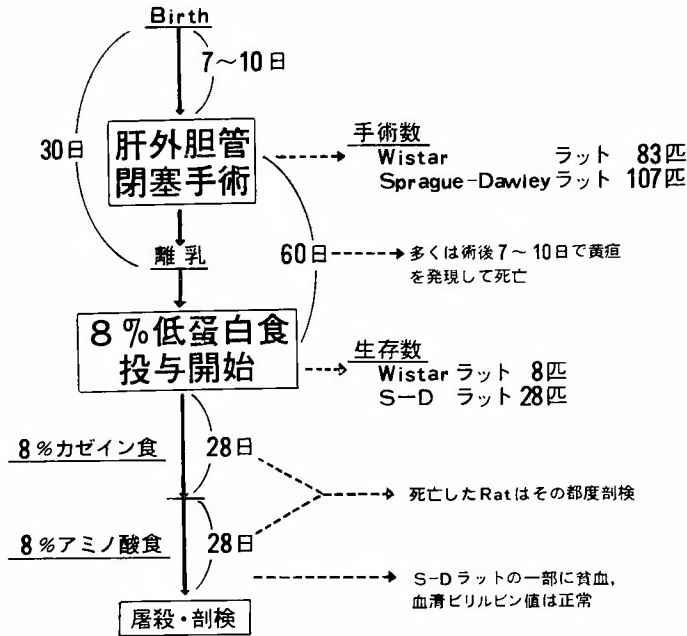


図 1

性拡張を示した。

4) 全例、肝内および肝外胆管内に肉眼で判別可能な胆石形成は認めなかった。

5) 胆管拡張例の肝組織像は、術後90日目では、先天性胆道閉鎖症 I 期類似の著明な細胆管増殖を示した

が (Fig. 2), 術後130日目の組織では、増殖細胆管はすべて空胞化し、胆汁のうっ滞を示す“bile plug”が全く見られなかったことが特徴的であった (Fig. 3)。肝内胆管の拡張は、どの時期のラット肝にも認められなかった。

6) 術後90日目に屠殺・剖検した2匹の Wistar 系ラットの血清総ビリルビン濃度は、8.1mg/dl および 8.5mg/dl (直接型ビリルビン濃度 5.8mg/dl, 4.4mg/dl) と中等度の黄疸を呈したが、術後130日目の SD 系ラットでは、ほぼ正常の値である 0.2-0.3 mg/dl (正常値 0.12 ± 0.04 mg/dl) を示した。

7) アミノ酸食投与により、SD 系ラットでは全身毛髪が赤褐色に染まる現象が見られ、ヘモグロビン尿

表3 胆管拡張ラット

No.	系	解剖時日令 日	胆管径 mm	拡張形態
1	W	83	2.5	囊腫様
2	W	98	2.5	
3	SD	98	30.0	囊腫様
4	SD	101	3.5	びまん性
5	SD	107	2.5	
6	SD	115	6.0	
7	SD	121	2.0	
8	SD	128	4.0	
9	SD	129	2.0	
10	SD	130	3.0	
11	SD	130	3.0	

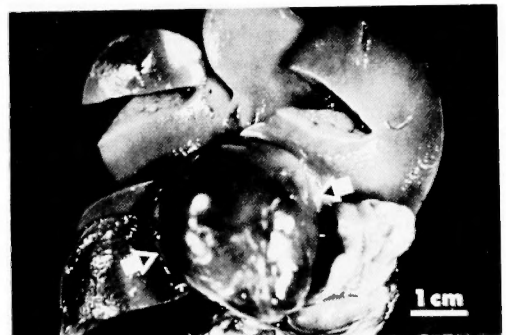


Fig. 1.

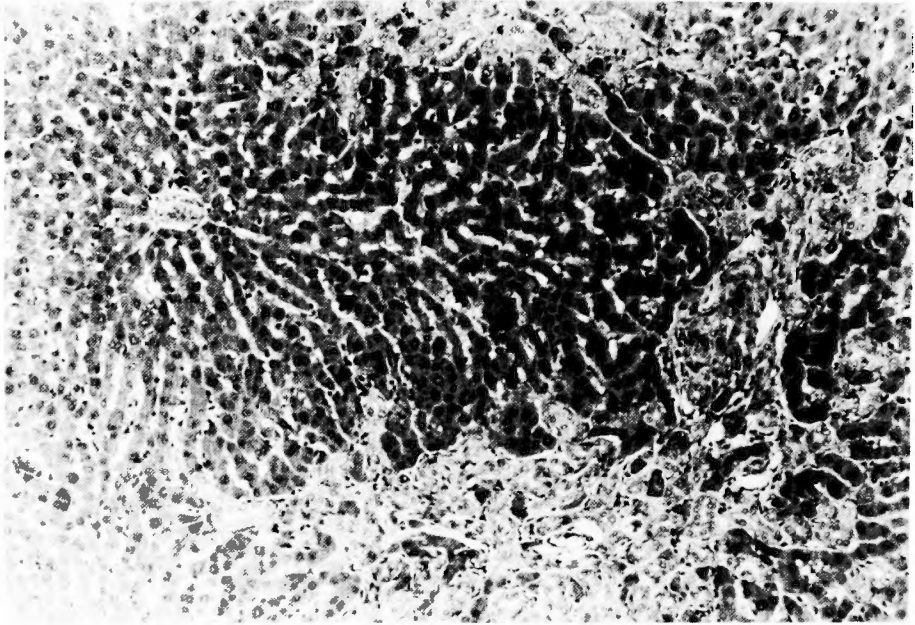


Fig. 2.

による飼育ケージ内での尿汚染と考えられた。血液検査にて、SD 系ラットの一部に貧血を認めたが、血清ビリルビン値はほぼ正常であった (表4)。解剖の際、腎臓も摘出したが、その大きさは正常範囲内であり、

肥大を認めず、色調は赤褐色で特に外観上に黄染は見られなかった。

8) 胆汁の細菌培養は行わなかったが、腹腔内所見は、2匹のラットにおいて、clipping の部位に膿汁が

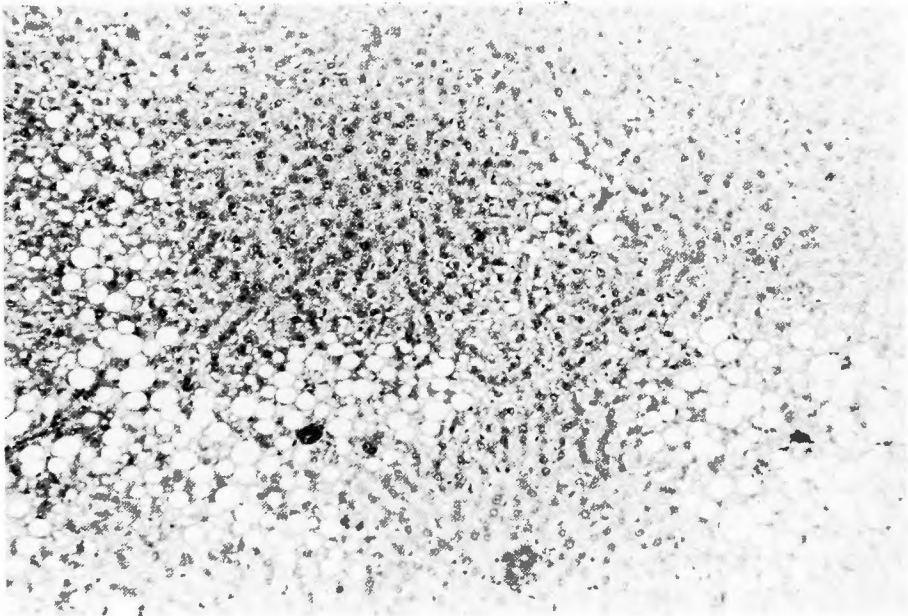


Fig. 3.

表4 8%アミノ酸食飼育後のSD系ラット血液諸検査データ

	貧血群 (n=3)	正常群 (n=7)	正常範囲
赤血球数 $10^4/\text{mm}^3$	662 ± 26.2	829 ± 48.3	720-960
血色素量 g/dl	11.1 ± 0.6	13.7 ± 1.1	12.0-17.5
ヘマトクリット %	34.0 ± 2.2	42.5 ± 2.6	39.0-53.0
ビリルビン濃度 mg/dl			
総ビリルビン	0.3 ± 0.0	0.26 ± 0.05	0.12 ± 0.04
直接ビリルビン	0.2 ± 0.0	0.16 ± 0.16	---

Mean $\pm$ SEM

認めた他は、癒着のみであった。肉眼的に、胆管内に胆汁が認められるラットは無かった。

考 察

胆石は、コレステロール結石にしてもビリルビン結石にしても、胆汁うっ滞を必要条件として形成されることが考えられる。コレステロール結石の疾患モデルとして、Dam の示した lithogenic diet によりハムスターを飼育する実験¹⁰⁾では、コレステロール結石およびその結晶がハムスターの胆嚢内だけでなく、一部、胆管内にもみられるが、このモデルを用いて、1959年、Dam と Linden¹¹⁾ は、ハムスターの胆嚢を摘出した後に lithogenic diet を与えた場合には、胆管内にコレステロール結石はもとより、顕微鏡的なコレステロール結晶をも生じないことを示した。この結果は、胆管内に lithogenic bile が流れていても、胆汁うっ滞がなければ、胆管結石を生じないことを示唆しているものと解釈できる。このように、胆管結石は従来から "stasis stone" と呼ばれてきたように、胆管の閉塞あるいは拡張による胆汁うっ滞を基礎として発生すると考えられている。故に、胆管閉塞による胆管結石の形成実験は数多く行われてきたが、本邦において胆管結石の臨床上也最も重要な、ビリルビン結石の疾患モデルとなり得るものは、未だ報告されていない。

こうした実験のうち、比較的最近の報告を考察すると、1957年、Imamoglu ら¹²⁾ は、イヌ、ウサギ、およびサルに総胆管末端部を cellophane tape と dicetyl sodium phosphate を用いて部分閉塞せしめ、各動物の一部に胆管結石の形成を認めたが、その分析結果では結石にカルシウムが含まれていなかったと報告した。1959年、Pikula ら¹³⁾ は、Imamoglu と同じ方法によ

り、イヌにおいて結石の発生をみたが、胆石は主に胆嚢内に形成され、また、その肝臓の病理組織像はむしろ cholangiolitic hepatitis あるいは primary biliary cirrhosis の像であり、合併症のないヒトにおけるビリルビン胆石症とは全く異なる病態であったと指摘している。1965年、Linderof¹⁴⁾ は、Imamoglu や Pikula らの用いたイヌ、ウサギ、サルなどには自然発生胆石が比較的高率に認められることから、初めてコントロール群の検討を行ない、chow diet 飼育下のウサギにおいて、Imamoglu と同じ方法により胆管を閉塞した群とコントロール群とで胆嚢内の胆石様物質の発生率に差がないこと、さらに、Borgstroem ら¹⁵⁾ の用いた、dihydrocholesterol 0.75%とオリーブ油12%とを chow diet に添加した lithogenic diet にて飼育中のウサギに、胆嚢収縮剤であるコレシストキニンを反復注射し胆汁流出を促進しても、胆石発生率は変化せず、むしろコレシストキニン投与群でコントロール群に比し、胆嚢胆石が有意に大きかったと報告し、さらに、Dam の lithogenic diet 飼育下のハムスターに、コレシストキニンを同様に反復注射した実験においても、ウサギの場合と同じ結果を得て、これらの動物における胆石形成に対する胆汁うっ滞の役割に疑問を投げ、胆汁うっ滞を基礎とする胆管結石のモデルとは成り難いことを示唆している。さらに、1978年、教室の向原ら¹⁶⁾ は、Imamoglu らの cellophane tape と dicetyl sodium phosphate とを用いる方法によって、ハムスターの総胆管を閉塞する実験を追試し、胆管拡張 (Fig. 4) およびその拡張胆管内に泥状物質の発生を認めたが、閉塞した部位を精査したところ、cellophane tape が胆管内に露出している状態を見出し、この胆管閉塞方法では異物結石の発生を否定できないことを指摘した。



Fig. 4.

いわゆる「ビリルビンカルシウム石」の原因として、胆汁うっ滞と細菌感染の関与が広く信じられてきたが、うっ滞と感染を負荷したモデルとして、1968年の(Chou¹⁷⁾らの報告がある。彼らは、Wistar 系ラットの胆管を結紮し、同時に cecal vein から門脈系へ大腸菌を静注し、胆管結紮後28日目に解剖した4匹のラットの胆管が再開通していることを確認した上、術後3ヶ月で14匹中3匹、6ヶ月で9匹全てのラットに、3-6 mm 径の黄色ないし濃緑色の結石を胆管内に発生せしめている。しかし、結石の化学的分析はなされておらず、また、その断面に alcian blue や colloidal-iron 染色陽性物質を認めていることから、この胆管結石は彼らも気付いているように、胆汁うっ滞と門脈血行性感染により発症した化膿性胆管炎に起因する胆管上皮の脱落細胞が、その他の炎症性壊死物質などと共に凝塊を形成したものと考えられる。1978年、鈴木¹⁸⁾は、体重 50 g 前後の Wistar 系雄性ラットの総胆管に電気焼灼を加えて、胆管の狭窄ないし閉塞を作製し、さらに低蛋白食餌を負荷して結石形成の有無やその種類を検討している。この方法により、コントロール群に比べ、低蛋白食群で胆管拡張の発生頻度 (86%) とその程度が有意に高く、胆汁培養陽性率 (66%) も高か

ったとし、ビリルビン結石の成因として胆汁うっ滞と感染および低蛋白食餌の関与を強調しているものの、低蛋白食の影響は、電気焼灼した部位の創傷治癒不全に基づく胆管炎の持続および胆管上皮の再生不全とも考えられ、さらに、胆管結石の発生率が15%と低く、かつ、その結石の赤外線分析からは、ビリルビンの含有量は少なく、胆汁酸を多く含む結石であったことなど、胆道感染により遊離の非抱合型ビリルビンが増加してビリルビンカルシウム石を形成するとの臨床における通説とは一致せず、従って、この実験もまたビリルビン結石の疾患モデルとは言い難い。

食餌因子だけで、ラットの胆管結石を形成した報告も、幾つか見られる。1950年、Hamre¹⁹⁾ は、ビタミン A 欠乏食飼育 6 週間で、22匹のラット中19匹 (86%) に、肝内および肝外胆管拡張と黄疸を認め、全てのラットの胆管内に肉眼で判別し得る 2 mm 以上の白色の結石あるいは結石様物質の存在を観察しているが、この胆石はビタミン A 欠乏により胆管粘膜が metaplasia をきたし、上皮が脱落、凝塊を形成して胆汁うっ滞を引き起し、胆管拡張と黄疸を生じたものであり、胆管内に見られた「結石」は脱落細胞の塊りであり、ビリルビンをほとんど含んでいなかった。1966年、Palmer²⁰⁾ は、1% リトコール酸添加-8% 低蛋白食餌 (蛋白源 カゼイン) にて SD 系ラット15匹を4ヶ月間飼育し、15匹全部のラットの胆管内に結石を認めているが、結石の化学的分析から、その主成分はリトコール酸そのものであり、この胆管結石は、低蛋白食餌の影響により、ラットにおいてその胆汁酸抱合に必要なタウリンが欠乏し、リトコール酸がタウリン抱合を受けずに遊離のまま多量に胆汁中へ排泄されることが原因と考えられるものであった。

J 2 食の検討は、1976年、教室の谷村ら²¹⁾ が、ハムスターを J 2 食と同じアミノ酸組成とした胆石形成化学的成分栄養食 (lithogenic, chemically defined, liquid diet) を作製して飼育し、対照とした胆石形成固形食 (谷村食)²²⁾ 群のコレステロール発生率70%に対し、この液体食群では、肉眼的に黒褐色を呈する、ヒトの黒色石と極めて類似した胆石を形成し、しかも90%の高率に認めたことから、こうした化学的成分食による医原性胆石発生の危険性を指摘しているが、結石は胆嚢内だけに限られ、また、ハムスターでは J 2 食による溶血は発生せず、ビリルビン結石の形成はなかったと報告した。

ビリルビン結石の主成分となる非抱合ビリルビンが、

細菌感染によって胆汁中で増加しビリルビン結石を生ずるとされてきたが、Trotman ら²³⁾は、細菌感染ではなく溶血によっても胆汁中非抱合型ビリルビンが増加することに着目して、マウスの WB, Re と C57BL/6J 株をかけ合わせてできる, WBB6F, +/+ and nb/nb genotypes の、先天性溶血性貧血の疾患モデルであるマウスを用いて検討を行っている。彼らは、このマウスに高率に「ビリルビンカルシウム石」が合併し、かつ、胆石形成群の肝胆汁中総ビリルビン濃度および非抱合型ビリルビン濃度が、胆石非形成群とコントロール群に比べ、有意に高ったと発表した。この報告の結石の記載を見ると、その種類は、ヒトの黒色石であって、わが国において臨床的に呼ばれているいわゆる「ビリルビンカルシウム石」ではない。従って、このモデルからは、むしろ、肝臓からのビリルビンの大量排泄だけでは、やはりビリルビン結石は生じない²⁴⁾ことが示されているものと考えられる。一方、1979年、Ho ら²⁵⁾は、ラットの胆汁中に、肝臓や胆嚢粘膜で産生される内因性 β -グルクロニダーゼが多量に検出されるが、その酵素活性は、胆汁の高い pH (= 8 付近) と胆汁酸の存在によって通常は抑制されている状態であることを指摘し、胆汁うっ滞と細菌感染によって、胆汁の pH が酵素の至適 pH (= 6 付近) まで低下すれば、この内因性 β -グルクロニダーゼ活性が亢進して胆汁中非抱合型ビリルビンが増加し、容易にビリルビン結石を形成し得ると推測した。あわせて、胆汁酸の種類による抑制効果の相違を測定し、コール酸よりもデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、また、タウリン抱合体よりもグリシン抱合体の方が、この内因性 β -グルクロニダーゼを強く阻害することを明らかにした。この結果と、教室の丸山が1982年に報告した²⁶⁾、ビリルビン結石症例の胆嚢胆汁中では、総胆汁酸およびグリシン抱合型胆汁酸が有意に減少している事実を考えあわせると、低蛋白食餌によりグリシンが不足し、胆汁中のグリシン抱合型胆汁酸が減少して β -グルクロニダーゼの活性が発揮され易い環境を作っているといえよう。

ここで、いわば、自然から与えられた拡張先行型の1つの実験モデルとも考え得る、先天性胆管拡張症と胆石の関連について考察すると、最近、日本においては、本症が胆汁うっ滞と細菌感染から、ビリルビン結石を30%から70%もの高率に合併する疾患であると見なされるようになってきた。しかし、従来、特に欧米において本症は、胆石が合併することは稀れであると

とがその特徴の1つであるとされてきた病態であり、われわれが行った調査²⁷⁾でも、本邦報告例における先天性胆管拡張症の胆石合併率は、1949年から1966年の18年間、119例中6例(5%)に対し、1967年から1980年の14年間、412例中110例(26.7%)と、5倍にも急激に増加していた。近年、ビリルビン結石症が激減している状況のもとで、本症にのみ特異的にビリルビン結石がこのように急増し、しかもその胆石形成因子を、従来から変化のない本症の主な病態である胆汁うっ滞と細菌感染から説明することは困難であると思われる。この胆石合併率の増加は、胆石が存在する胆管の拡張を、先天性と判定する根拠の曖昧さに問題があると考えられ、むしろ、本症が意味するところは、先天的に胆管拡張が存在しながら、長年に亘り胆石の形成されない症例も少なからず認められることから、胆管拡張、すなわち、胆汁うっ滞のみでは胆石は形成されない事実であるといえる。

さて、今回の実験におけるラットの肝組織像から、胆管閉塞による cholestasis の程度を観察すると、術後90日目では肝細胞の一部までが細胆管細胞へ分化し、細胆管が著明に増殖しているのが認められ(Fig. 2)、先天性胆道閉鎖症の初期像と同様の bile stasis の状態を示した。しかしながら、術後130日以上長期生存例のラットでは増殖細胆管はすべて空胞化し、肝内胆汁うっ滞の存在を示す bile plug は全く見られず(Fig. 3)、肝臓からのビリルビンを含めた胆汁そのものの胆管への排出が停止してしまったものと考えられた。ラットでは、腎臓²⁸⁾や小腸壁²⁹⁾にもビリルビン抱合酵素(UDP glucuronyl transferase)活性のあることが知られており、De Vos ら³⁰⁾は、胆管結紮を施行したラットの腎臓を胆管閉塞後12時間から25日まで観察し、10—25日後には近位尿細管細胞に、肝臓における cholestasis と全く同じ変化 (renal cholestasis) が生ずることを報告しており、肝臓から胆汁への排泄が停止したと推察されるビリルビンは、腎臓でグルクロン酸抱合を受けてビリルビングルクロナイドとして尿中へ排泄されていたものと解釈できる。本実験において、胆管結紮後のラットの毛髪が一時期強く黄染していること、および、SD 系ラットの一部にアミノ酸食による貧血が惹起されたにも拘らず、血清ビリルビン値が上昇しなかった理由も、腎臓からの排泄が有効に働いたためと考え得る(図2)。前述の、Ho の予測²⁵⁾に反し、これまでいくつも行われたラットの胆管閉塞実験で、容易にはビリルビン結石が生じなかった理由の一つに、

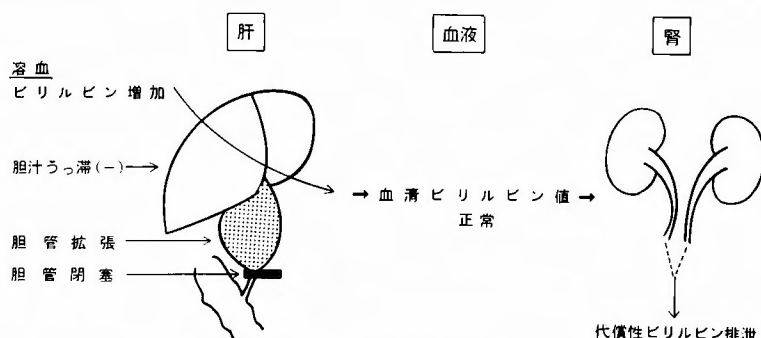


図2 胆管閉塞ラットのビリルビン代謝

このような、ラットの特異的な順応反応によるビリルビン代謝の変化が介在していた可能性が考慮される。

低蛋白食の影響として、組織の弾力性欠損による胆管のびまん性拡張を生じ得ると推測して実験を行ったが、ヘモクリップによる胆管閉塞が不充分であった可能性や胆汁の分泌が停止したと考えられる事実からも、今回の実験成績からのみでは、低蛋白食と胆管拡張との関連性は解明できなかった。また、ラットの胆汁酸は主にタウリン抱合を受ける³¹⁾ため、低蛋白食餌によるグリシン抱合体の減少の有無は、考察不可能であった。

以上、本実験は、先天性総胆管拡張症に酷似した嚢腫様拡張を、特に妊娠したラットに認めたことから、胆管拡張の目的には有意義であったと言えるが、ビリルビン石形成のモデルとは為し得ず、その目的のためには実験動物の順応反応も十分に考慮したうえで最適な負荷条件を設定して実験を行う必要性のあることが示唆された。

結 語

1. Wistar 系および Sprague-Dawley 系ラットの胆管を完全閉塞すると、肝臓からのビリルビンを含めた胆汁そのものの胆管への分泌が停止した状態で、順応する現象が観察された。

2. 胆管閉塞により一部のラットに胆管拡張を認め、特に、SD 系妊娠ラットで、先天性総胆管拡張症に酷似した嚢腫様拡張が見られ、本実験は胆管拡張の目的には有意義であった。

3. ラットに、胆管閉塞、低蛋白食、溶血という3条件を負荷しても、ビリルビン結石は形成されず、その目的のためには、実験動物の順応反応を十分考慮した上で最適な負荷条件を設定する必要のあることが示唆された。

本論文の要旨の一部は、第19回日本消化器外科学会にて報告した。

本研究は、厚生省肝内結石症調査研究班からの研究費の補助を受けたので、謝意を表します。

文 献

- 1) 谷村 弘：実験的胆石。胆と膵 2: 663-669, 1981.
- 2) Maki T: Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: Role of *E. coli*, beta-glucuronidase and coagulation by agitation. *Ann Surg* 164: 90-100, 1966.
- 3) Boonyapisit ST, Trorman BW, Ostrow JD: Unconjugated bilirubin, and the hydrolysis of conjugated bilirubin, in gallbladder bile of patients with cholelithiasis. *Gastroenterol* 74: 70-74, 1978.
- 4) Takahashi H, Tanimura H, et al: The direct measurement by high-pressure liquid chromatography of unconjugated bilirubin in human bile as an initiating factor on pigment gallstone formation. The 7th world congress of gastroenterology abstract book p. 137, 1982.
- 5) 高橋 裕：未発表データ
- 6) Tritapepe R, Padova C, Rovagnati P: Are pigmented gall stones caused by a 'metabolic' liver defects? *Brit Med J* 22: 832, 1980.
- 7) Hikasa Y, Nagase M, Soloway RD, et al: Gallstones in Western Japan -Epidemiologic factors affecting the type and location of gallstones. *Arch Jpn Chir* 50: 277-288, 1981.
- 8) Fevery J, Damme B, et al: Bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in the liver disease. *J Clin Invest* 51: 2483-2492, 1972.
- 9) Levenson SM, Kan D, et al: Hemolytic anemia and pancreatic acinar atrophy and fibrosis conditioned by "elemental" liquid diets and the ordinary intestinal microflora. *Ann Surg* 174: 496-508, 1971.

- 10) Dam H, Christensen F: Alimentary production of gallstones in hamsters. *Acta Pathol Microbiol Scand* **30**: 236-242, 1952.
- 11) Van der Linden, Christensen F, Dam H: Cholecystectomy and gallstone formation in the golden hamster. *Acta Chir Scand* **118**: 113-116, 1959.
- 12) Imamoglu K, Perry JF, Wangenstein OH: Experimental production of gallstones by incomplete stricture of the terminal common bile duct. *Surg* **42**: 623-630, 1957.
- 13) Pikula JV, Dunphy JE: Some effects of stenosis of the terminal common bile duct on the biliary tract and liver. *New Eng J Med* **260**: 315-318, 1959.
- 14) Lindeloef G, Van der Linden W: The role of stasis in experimental gallstone formation. *Acta Chir Scand* **130**: 494-498, 1965.
- 15) Borgstroem S, Fajers CM, et al: On gallstone formation in rabbits induced by dihydrocholesterol. *Acta Chir Scand* **126**: 329-332, 1963.
- 16) 向原純雄, 谷村 弘, 他: 先天性総胆管嚢腫と胆石について. *日外会誌* **80**: 594, 1979.
- 17) Chou ST, Gibson JB: Experimental cholangitis and cholelithiasis. *Brit J Exp Path* **49**: 565-573, 1968.
- 18) 鈴木 彰: ビリルビン系胆石の成因に関する実験的研究—特に食餌因子の影響について—. *日消病誌* **76**: 2220-2213, 1978.
- 19) Hamre CJ: Dilatation of the bile ducts and intrahepatic lesions with obstructive jaundice in rats fed diets deficient in vitamin A. *Am J Med Sci* **220**: 183-193, 1950.
- 20) Palmer RH, Hruban Z: Production of bile duct hyperplasia and gallstones by lithocholic acid. *J Clin Invest* **45**: 1255-1267, 1966.
- 21) 谷村 弘, 瀬戸山元一, 他: 胆石形成から見た化学的成分食. *日外宝函* **45**: 471-482, 1976.
- 22) 谷村 弘, 塩田隆三, 他: 胆石症—とりわけコレステロール系結石の成因. *日本臨床* **31**: 2085-2094, 1973.
- 23) Trotman BW, Bernstein SE, et al: Hemolysis-induced gallstones in mice: increased unconjugated bilirubin in hepatic bile predisposes to gallstone formation. *Gastroenterol* **81**: 232-236, 1981.
- 24) 高橋 裕, 谷村 弘, 他: 胆汁成分からみた総胆管結石の成因. *胆と膵* **4**: 589-597, 1983.
- 25) Ho KJ, Ho LHC, Kruger OR: Characterization and determination of the activity of biliary β -glucuronidase in rats. *J Lab Clin Med* **93**: 916-925, 1979.
- 26) Maruyama K: Analysis of conjugated bile acids in bile by high-pressure liquid chromatography. II. Clinical application in bile of patients with gallstones. *Arch Jpn Chir* **51**: 14-43, 1982.
- 27) 谷村 弘, 高橋 裕, 他: 先天性胆管拡張症と胆石の関連について. *胆と膵* **3**: 343-350, 1982.
- 28) Fevery J, et al: Comparison in different species of biliary bilirubin-IX alpha conjugates with the activities of hepatic and renal bilirubin IX alpha-uridine diphosphate glycosyltransferase. *Biochem J* **164**: 7737-746, 1977.
- 29) Hartmann F, Bissell DM: Metabolism of heme and bilirubin in rat and human small intestinal mucosa. *J Clin Invest* **70**: 23-29, 1982.
- 30) De Vos R, Peeters CDW, Desmet V: Electron microscopy of the tubular cells of rat kidney after experimental bile duct ligation. *Exp Mol Path* **16**: 353-361, 1972.
- 31) Vessey DA: The biological basis for the conjugation of bile acids with either glycine or taurine. *Biochem J* **174**: 621-626, 1978.