

閉塞性黄疸の病態におよぼす腸内細菌の影響

—とくに無菌動物を使用して—

日本医科大学第1外科学教室(主任教授:代田明郎)

大学院生 田代真一

THE EFFECT OF INTESTINAL BACTERIA ON OBSTRUCTIVE JAUNDICE —WITH SPECIAL REFERENCE TO GERMFREE ANIMAL—

Shinichi TASHIRO

The First Department of Surgery, Nippon Medical School

無菌ラットを2群に分ち、1群は対照無菌群とし、ほかの1群は大腸菌0-26を単独汚染させて、この両群の総胆管を結紮し、閉塞性黄疸の病態に腸管内細菌のおよぼす影響について、主に細菌学的研究と諸臓器の組織形態学的、組織化学的变化を中心に研究し、腸管内細菌由来の endotoxin が門脈血中に流入、肝の endotoxin 処理能力の低下とあいまって、ついに systemic endotoxemia へと発展して行く事実を明らかにし得た。

索引用語: 無菌動物, 閉塞性黄疸, 腸内細菌, Endotoxin, 酵素抗体法。

I 緒言

閉塞性黄疸の最も重篤な合併症の1つとして肝胆道系への感染が挙げられるが、その病態については未だ充分解明されているとは言い難い。

代田らは長年にわたり胆道感染と腸内細菌叢の関連性を追求し、閉塞性黄疸の際、その腸内細菌叢はいわゆる Dysbakterie の状態にあり、大腸菌を中心とする腸管内細菌の小腸上部はもとより十二指腸さらには胃に至るまでの上行がみられることを臨床的ならびに実験的に立証報告している^{1)~9)}。

ところで、近年、細菌の全く欠如している無菌動物の研究開発に伴い、本症の病態におよぼす腸管内細菌の影響を解明する手段の1つとしてこの無菌動物を使用することは最もユニークな研究方法と考えられる。

そこで今回著者は無菌動物を使用して、実験的に閉塞性黄疸を作製し、腸管内細菌の有無が本病態にどのような影響を与えるかを追究したので報告する。

II 実験材料及方法

1. 実験材料

実験動物中央研究所より入手した JCL-SD 系無菌ラ

ットを自家繁殖させ生後8~10週齢、平均体重230g前後のラット100匹を雌雄の別なく実験に用いた。なお飼料は日本クレア製 CL-2 固型飼料を123°C、25分間高圧蒸気滅菌したものを、また飲料水は同様の方法で滅菌した水道水を自由に摂取させた。

2. 実験方法

無菌ラットを2群に分ち1群は対照無菌群(以下無菌群と略す)とし、ほかの1群は E. coli O-26菌液(10⁹/ml) 0.5ml を金属性ゾンデを用い経口投与し、投与1週間後、本菌の腸管内定着したものを大腸菌単独汚染群(以下単独汚染群と略す)として実験に供した。

ケタラル麻酔下でラットを上腹部正中切開により開腹、総胆管を Cameron¹⁰⁾ の方法に準じ2号絹糸を用いて周囲血管および膵管を損傷しないように二重結紮後切離した。

総胆管結紮後2日、3日、5日、7日および14日目と経日的に再開腹し、門脈および腹部大動脈より採血後、それぞれ屠殺し、以下の実験に供した。なお、これら全ての操作は手術用ビニールアイソレーター内で行われた。

1) 腸管内大腸菌数の変動

単独汚染群の経日的腸管内大腸菌数の変動を追究するため小腸上部として総胆管開口部より5cm 肛門側の空腸と、小腸下部として回盲部より5cm 口側の回腸を、小腸中部としてそれらの中間部回腸を、さらに大腸として肛門より5cm 口側の腸管をそれぞれ約1.5cm 採取し、重量測定後その腸管重量の10倍の滅菌生理食塩水を加えてhomogenizeし、そのhomogenateをHeart infusion 寒天培地(栄研)を用いて培養後腸管1gあたりの菌数を算定した。

なお、無菌群においては偶発的細菌汚染を検査するため連日チオグリコロート培地(栄研)を用いて糞便無菌テストを施行し実験期間中全く無菌であることを確認した。

2) 血中 Endotoxin の検索

屠殺時、血液1mlに対しヘパリン75単位になるように注射器で採取した門脈血および大動脈血を3,000r.p.m. 40秒間遠心沈殿後その上清のplatelet rich plasmaを滅菌生理食塩水で3倍に希釈し、100°C、10分間煮沸しinhibitorの除去を行った。さらにその上清を同じく滅菌生理食塩水で48倍まで倍数希釈し、それぞれについてlimulus test¹¹⁾を施行した。LysateはPre-Gel(帝国臓器製)を使用し、判定はアンプルを45度の角度に傾けゲル形成および粘稠度増大の有無により決定した。

(卅):完全なゲル化で傾けてもゲルの形が崩れないもの、(卍):ゲルを形成しているが傾けると一塊となって動くもの、(+):著しい粘稠度の増大および顆粒状ゲルを形成しているもの、(±):軽度粘稠度の増大しているもの、(-):液状のまま変化しないものとし、(+)(卍)(卅)のものをendotoxin陽性、(±)および(-)は陰性とした。

3) 血液、胆汁および肝組織中の大腸菌の検索

単独汚染群においては屠殺後直ちに肝組織片を採取し、重量測定後、その重量の10倍の滅菌生理食塩水を加えてhomogenizeした。

胆汁は拡張した胆管より直接穿刺により採取した。肝homogenateおよび胆汁のそれぞれ0.1mlをHeart infusion 寒天培地に塗抹培養し、肝は1gあたり、胆汁は1mlあたりの菌数を算定した。血液はlimulus testを施行すると同時に門脈血、大動脈血のそれぞれ0.1mlについて同様に検索した。

4) 肝機能

肝機能検査としては屠殺時採取した大動脈血より血清

を分離し glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol, および total bilirubin 値について日立自動分析装置716型を用いて測定した。

5) 諸臓器の組織形態学的観察

屠殺後採取した肺、肝、腎および小腸下部(回盲部より約7cm 口側の回腸)の組織片を直ちに10%中性ホルマリンに固定し、型の如く系列アルコールにて脱水、パラフィンに包埋した。包埋した組織はJoung型Sliding Microtomeにて1~3μの切片を作製し、H-E, PAM, MASSON染色を施し光学顕微鏡で観察した。

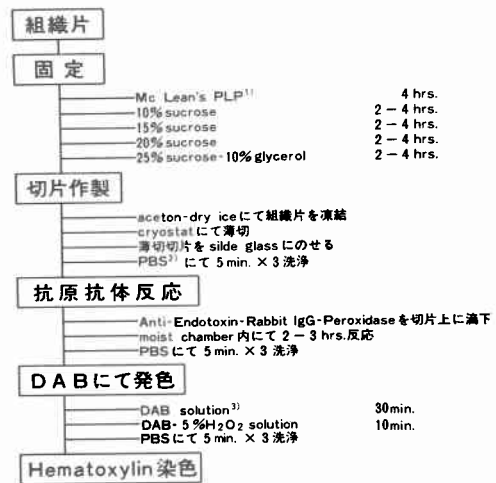
6) 肝および腎組織内の Endotoxin の局在

endotoxinの局在の検索にはanti-endotoxin rabbit IgG peroxidaseを用いた酵素抗体法を行った。

まず、Lipopolysaccharide B, E. coli 0-26:B6(Difco製)でウサギを感作し、その抗体価が2,048倍以上であることを確認後日本抗体研究所でanti-endotoxin rabbit IgG peroxidaseを作製した。

屠殺時採取した肝および腎組織片をMcLean's PLP(periodate-lysine-paraformaldehyde)¹²⁾で固定して、型の如く各濃度のsucroseに浸透し、aceton-dry iceで凍結させたのち、Cryostat(MILES社製)で切片を作製した。つぎにanti-endotoxin rabbit IgG peroxidaseで組織

表1 Anti-Endotoxin-Rabbit IgG-Peroxidaseを用いた組織内 Endotoxin 検出法



1) periodate-lysine-paraformaldehyde
 2) 0.01M sodium phosphate buffered saline, pH7.2
 3) i) Dissolve 20mg of 3,3'-diaminobenzidine:4 HCl (Sigma) in 75ml of 0.05M Tris-HCl buffer pH7.6.
 ii) Readjust to pH7.6 with 0.05M Tris base.
 iii) Make up to 100ml with 0.05M Tris-HCl buffer pH7.6.

内の endotoxin と反応させ、DAB-5% H₂O₂ solution で反応部位を発色させた。さらに周囲組織との関係を明らかにするために Hematoxylin 単染色を施し光学顕微鏡で観察した(表1)。

III 結果

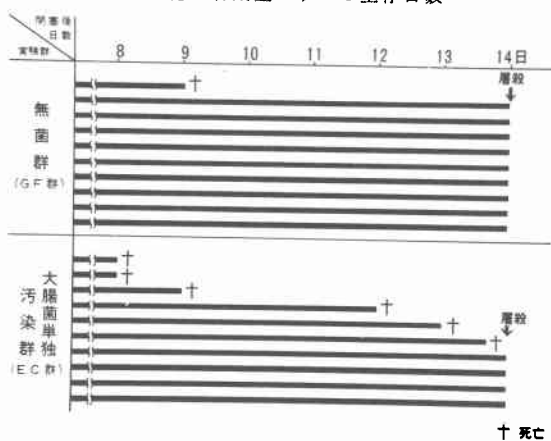
1. 胆道閉塞ラットの生存日数とその生存率

無菌群, 単独汚染群いずれにおいても総胆管結紮後7日までは死亡するものは全くなく, 無菌群10匹では9日後わずかに1匹が死亡したのみでその生存率は実に90%であった。

ところが単独汚染群では8日後2匹が死亡し, 以後時間の経過とともに死亡数が増加して14日後にはすでに6匹までが死亡し, その生存率はわずかに40%であった (p<0.05) (図1)。

2. 腸管内大腸菌数の変動

図1 総胆管閉塞ラットの生存日数



単独汚染群においては小腸上部および中部では総胆管結紮前その菌数はいずれも 10⁶ order 以下であったが, 結紮後は小腸上部では5日目, 小腸中部では2日目より次第に増加し, 5~7日目以降はほぼ full growth の状態を示した。小腸下部および大腸では結紮前よりほぼ full growth の状態で結紮後も全く同様であった(図2)。

3. 血液, 肝組織および胆汁中の大腸菌の消長

単独汚染群における門脈血, 大動脈血および胆汁中からは実験全期間にわたり大腸菌の検出はみられなかったが, 肝組織では結紮後3日, 5日, 7日および14日目におのおの1例ずつ最高 10⁴ order の大腸菌が検出された(表2)。

4. 血中 Endotoxin の消長

単独汚染群では総胆管結紮前すでに門脈血において5例中2例が limulus test 陽性を示したが, 大動脈血ではその2例を含め全例陰性であった。

結紮後は門脈血, 大動脈血のいずれにおいても limulus test 陽性を示すものが多くなり, とくに採血可能であった門脈血では5日目以降は全例が陽性を示した。

これに対し, 大動脈血では結紮後2日目および3日目ではおのおの5例中2例, 5日目では採血可能であった4例中4例が, また7日目および14日目ではおのおの5例中3例が陽性を示した。なお, 無菌群では結紮前後を通じて全例陰性であった(表2)。また結紮前後における limulus test 陽性率は門脈血, 大動脈血ともに統計学的有意差を認めた (p<0.05)。

5. 肝機能の消長

GOT, GPT 値は両群ともに総胆管結紮後2日目を peak として上昇, その後7日目まで漸次減少傾向を示し

図2 総胆管閉塞による腸管内細菌の変動。大腸菌単独汚染群 (n=5)

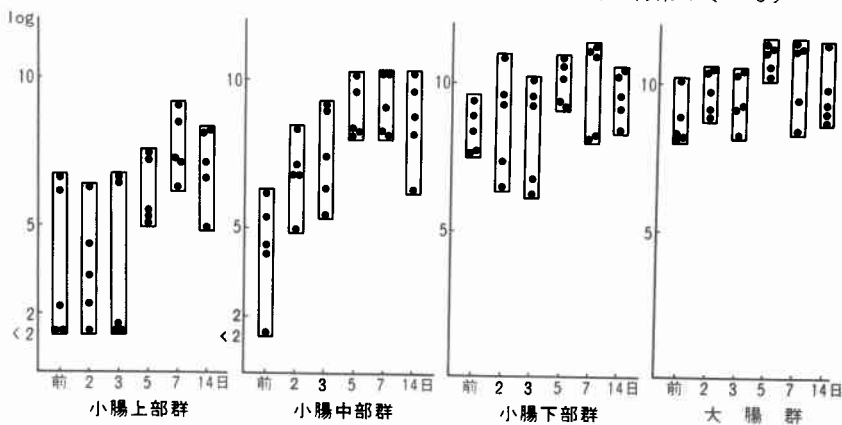


表2 総胆管閉塞ラットの Limulus test 及び細菌検索 (大腸菌単独汚染群)

項目 検査 日数	Limulus test		細菌検索			
	門脈血	大動脈血	門脈血	大動脈血	肝臓	胆汁
前	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
2日	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3日	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5日	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
7日	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
14日	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

表3 総胆管閉塞ラットの病理学所見

病理学所見		GF 群			EC 群		
		3日	7日	14日	3日	7日	14日
肺	無気肺	±~+	+	+~++	+	++	++
	肺動脈・気管支周囲の浮腫	-	+	+	+	+	++
	肺動脈・気管支周囲の繊維化	-	±~+	+	-	+	+
	肺動脈・気管支周囲の細胞浸潤	-	-	+	+	++	++
	血管周囲の浮腫	+	+	+	+	+	+
肝臓	脂肪変性	±~+	±~+	+~++	+~++	+~++	+~++
	好酸性壊死	±~+	+	+~++	+~++	+~++	++
	黒状壊死	-	±~+	+~++	+	+~++	++
	Kupffer細胞の腫大・増生	-	±~+	±~+	+	+~++	+~++
	グリーゼ細胞の拡張・増生	+	+	++	+	+~++	++~+++
膵臓	膵細胞浸潤	+	+	+	+~++	+~++	+~++
	膵管の拡張	+	+	++	+~++	+~++	+~++
	膵管周囲炎	-	+	++	+~++	+~++	+~++
	膵管系	±~+	+	+	±~+	++	+~++
	フィブリン析出	-	-	+	-	+	+~++
腎臓	糸球体	±~+	+~++	++	+	++	++
	虚脱	-	±~+	+	-	+	+
	基底膜の肥厚	-	+	+	-	+~++	++
	内皮細胞の腫大	-	+	+	+	+	++
	原細管	-	+	+	+	+	+~++
尿管	PAM陽性顆粒変性	-	+	+	+	+	+~++
	破壊像	-	+	+	-	+~++	+~++
	尿管上皮の胆汁色素沈着	-	±~+	+	-	+	+
	尿管系	-	-	+	±~+	±~+	+
	尿管周囲の浮腫	-	+	+	±~+	++	++~+++
小腸	フィブリン析出	-	±~+	+	-	++	++~+++
	粘膜上皮の過形成	-	-	+	±~+	±~+	+~++
	胚細胞の増加	-	-	+	±~+	+	+~++
	粘膜下細胞浸潤	-	-	+	+	+	++
	血管腔の拡張	-	-	±~+	-	+	++
腸	血管内皮細胞の腫大	-	-	+	-	-	++~+++
	閉塞性血管炎	-	-	+	-	-	++
	リンパ管の拡張	-	-	±~+	-	+	+~++

た. total cholesterol 値は2日目ないし3日目を, また total bilirubin 値は3日目ないし5日目をそれぞれ peak として増加, その後は漸次減少傾向を示した. ALP 値は単独汚染群ではほとんど変化を示さなかったが無菌群では軽度の上昇が認められた.

以上, 肝機能値の結果からは統計学的にも両群間に有

意差を認めなかった (図3).

6. 諸臓器の組織形態学的所見 (表3)

1) 肺

i) 無菌群: 総胆管結紮後3日目では軽度ながら無気肺の所見が散在性に認められ, 7日目, 14日目と経日的

図3 総胆管閉塞ラットの肝機能値の変動

○—○ 無菌群 (n=5)
●..... 大腸菌単独汚染群 (n=5)

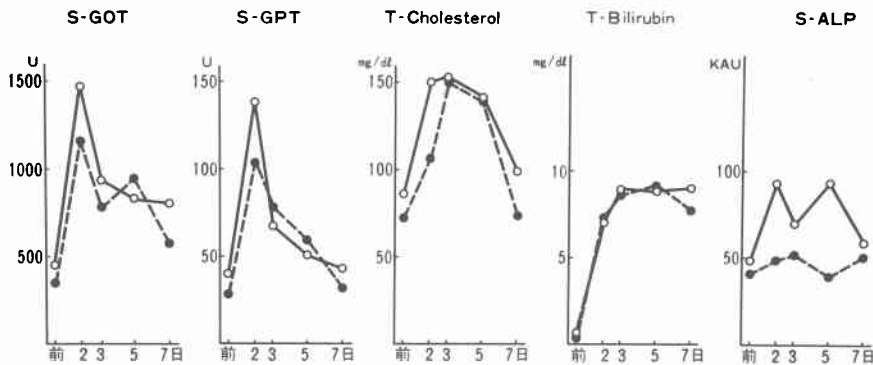
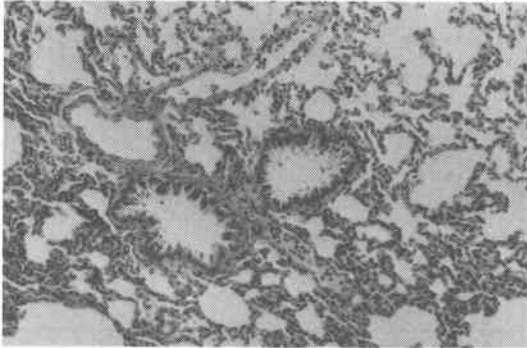


写真1 無菌群総胆管結紮後14日目。肺：無気肺および気管支周囲の軽度線維化を認める。H-E × 100

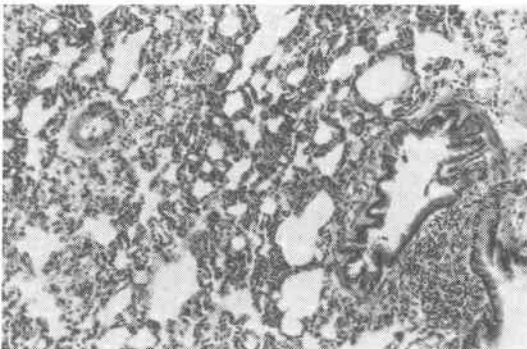


にその所見は増強した。

結紮後7日目からは気管支周囲の線維化が観察されたが、明らかな急性炎症反応は認められなかった(写真1)。

ii) 単独汚染群：総胆管結紮後3日目では無菌群と同様の所見を認めたが、その程度は単独汚染群の方がより強く、結紮後7日目では無気肺の所見はさらに強まり、肺胞壁および気管支周囲の炎症像も観察された。14日目ではさらに血管周囲性の浮腫が著明に認められ、一部には血管炎の所見も観察された(写真2)。

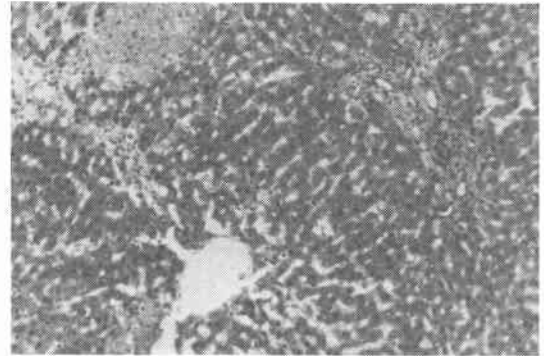
写真2 単独汚染群総胆管結紮後14日目。肺：無菌群(写真1)に比して著明な無気肺と気管支周囲の細胞浸潤を認める。H-E × 100



2) 肝

i) 無菌群：総胆管結紮後3日目ではグリソン氏鞘を中心として胆管の拡張、増生、線維化および円形細胞浸潤が、肝小葉においては軽度の好酸性壊死および脂肪変性の所見が観察された。結紮後7日目では上記所見はさらに強まり、中心静脈の拡張も出現(写真3)、結紮後14

写真3 無菌群総胆管結紮後7日目。肝：胆管の拡張、増生、線維化および好酸性壊死等の所見が認められる。H-E × 100



日目になると巣状壊死がきわめて顕著になり広範囲な壊死巣として認められた。

ii) 単独汚染群：総胆管結紮後3日目では胆管の拡張、増生および線維化の程度は無菌群とはほぼ同程度であったが、円形細胞浸潤はグリソン氏鞘ばかりでなく肝小葉におよび、好酸性壊死、脂肪変性などの所見は無菌群に比してきわめて強く、Kupffer細胞の腫大、増生の所見も観察された。結紮後7日目では上記所見はさらに増強したほかフィブリン析出や血管周囲炎の所見が認められた(写真4)。14日目には無菌群の諸所見に比べてはるかに強い変化を示した。

3) 腎

i) 無菌群：総胆管結紮後3日目では糸球体内のうっ血および軽度の細胞数増加が認められた。結紮後7日目では糸球体の虚脱、細胞数増加、基底膜の肥厚ならびに

写真4 単独汚染群総胆管結紮後7日目。肝：無菌群(写真3)に比べ、胆管の拡張や線維化が著明で、中心静脈の拡張も認められる。H-E × 100

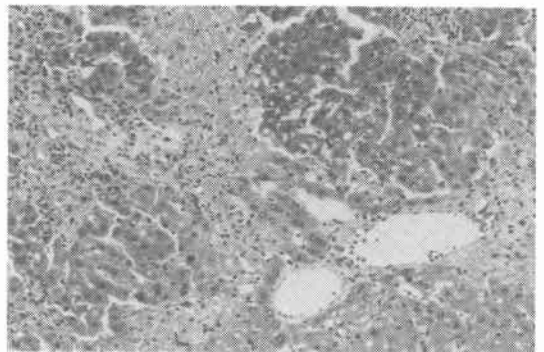
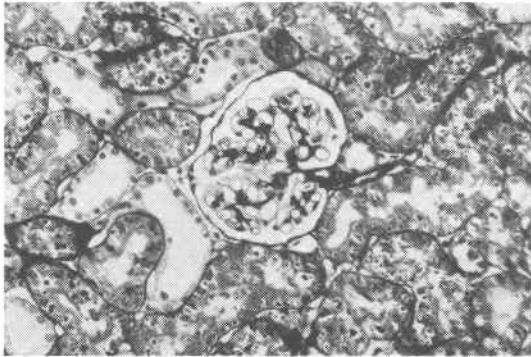


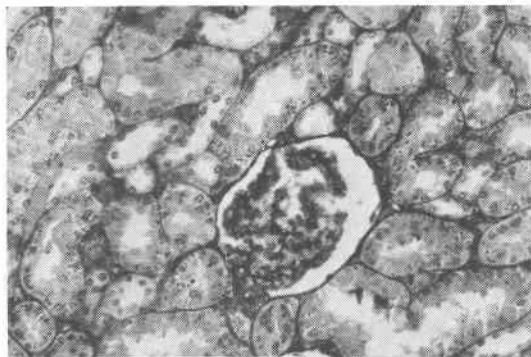
写真5 無菌群総胆管結紮後14日目。腎：糸球体の細胞数の増加，PAM 陽性顆粒および尿細管の軽度変性を認める。PAM × 100



近位尿細管においては PAM 陽性顆粒の出現および軽度の変性，破壊像が認められた。14日目では7日目とほぼ同じ所見を観察したが，そのほかに尿細管上皮の胆汁色素沈着，血管周囲の浮腫，フィブリン析出さらに間質におけるリンパ管の拡張所見も軽度ながら認められた（写真5）。

ii) 単独汚染群：総胆管結紮後3日目では顕著な充血および間質における円形細胞浸潤，つまり間質性腎炎の所見を呈した。結紮後7日目では糸球体の炎症性変化は無菌群に比べて強く，基底膜の肥厚，mesangium の肥厚なども強く観察された。14日目では明らかな炎症細胞の増加およびフィブリン析出を観察，さらに内皮細胞の腫大，近位尿細管における PAM 陽性顆粒の増加，胆汁色素沈着および変性，破壊像が著明に認められた（写

写真6 単独汚染群総胆管結紮後14日目。腎：基底膜および内皮細胞の腫大を認め，無菌群(写真5)に比し，尿細管の破壊像や血管周囲の浮腫およびフィブリン析出を認めた。PAM × 100

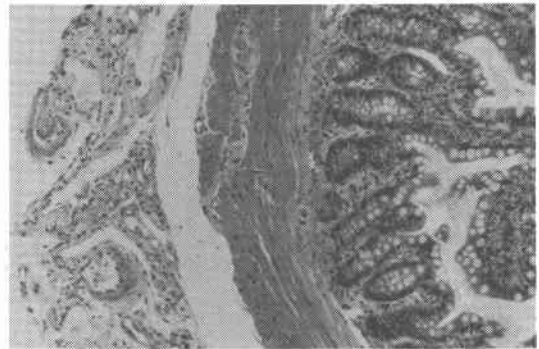


真6)。

4) 小腸

i) 無菌群：総胆管結紮後3日目および7日目ではとくに変化は認めなかったが，結紮後14日目になると腸管に付着した脂肪組織の中に形質細胞やリンパ球を中心とした細胞浸潤および小動脈の内皮細胞の腫大が認められた。また粘膜上皮では軽度な腫大と胚細胞の増加を，粘膜下層では細胞浸潤，浮腫および血管の軽度拡張を認めた（写真7）。

写真7 無菌群総胆管結紮後14日目。小腸：脂肪組織の中の細胞浸潤や胚細胞の軽度増加を認める。H-E × 100



ii) 単独汚染群：総胆管結紮後3日目では粘膜上皮の胚細胞の軽度増加のほか間質の円形細胞浸潤や腸管に付着した脂肪組織の中にも急性の充血および軽度の細胞浸潤を認めた。

14日目になると上記所見はさらに増強し，あらたに筋層の線維化および漿膜側の血管内皮細胞の腫大，血管壁のフィブリノイド変性などの血管炎の所見がきわめて特徴的に観察された（写真8）。

7. 肝および腎組織内の Endotoxin の局在

i) 肝：対照の無菌無処置ラットの肝組織における peroxidase 活性は sinusoidal lining あるいは Kupffer 細胞に沿ってきわめて微量ながら散在性に認められたが，これはその動物の性質上 endotoxin とは考えられず，おそらく内因性の peroxidase と考えられる（写真9）。また無菌総胆管結紮ラットおよび単独汚染無処置ラットの肝組織における活性は無菌無処置ラットのそれとほとんど差は認められなかった。

単独汚染群総胆管結紮後3日目では胆管周辺部の間葉系細胞の細胞質に顕著な酵素活性を認め，Kupffer 細胞，

写真8 単独汚染群総胆管結紮後14日目。小腸：筋層の線維化および漿膜側の血管内皮細胞の腫大、閉塞性血管炎の所見を認める。H-E × 100

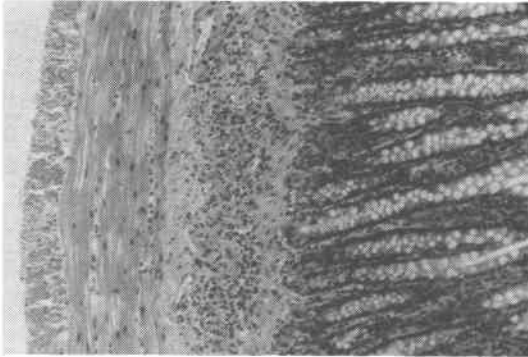


写真9 無菌群無処置ラット。肝：Kupffer細胞に沿って微量の Peroxidase 活性を認める。Hematoxylin × 400

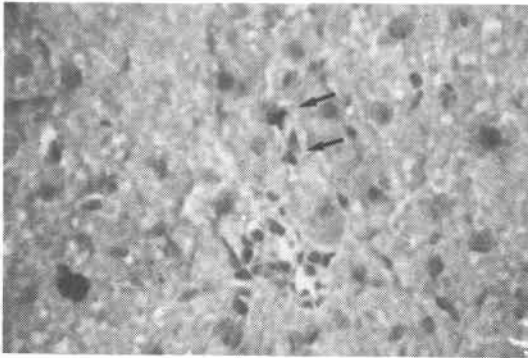
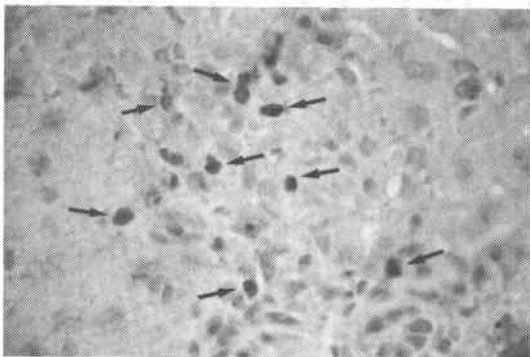


写真10 単独汚染群総胆管結紮後3日目。肝：Kupffer細胞, sinusoidal lining cell, または一部肝細胞の中にも著明な Peroxidase 活性を認める。Hematoxylin × 400



sinusoidal lining cell あるいはまた一部肝細胞の内部にも酵素活性を認めた(写真10)。結紮後7日目では酵素活性は必ずしも増強していないが、軽度ながら Kupffer細胞の中に活性が観察された。14日目では Disse 氏腔の lining ならびに Kupffer 細胞に沿って比較的慢性に酵素活性を認めた。

ii) 腎：無菌群および単独汚染無処置ラットでは酵素活性はほとんど観察されなかった(写真11)。また無菌群

写真11 無菌群無処置ラット。腎：Peroxidase 活性は認めない。Hematoxylin × 400

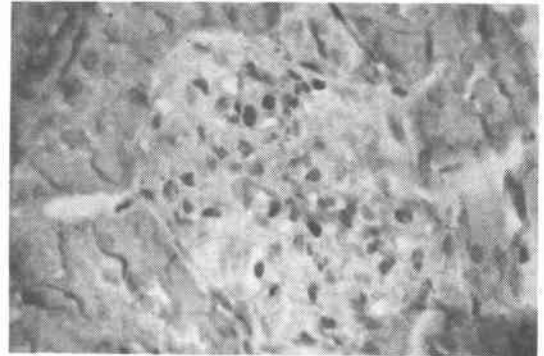
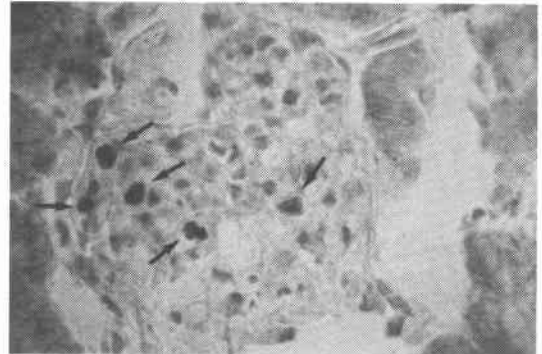


写真12 単独汚染群総胆管結紮後7日目。腎：腫大した上皮細胞や内皮細胞あるいは尿細管上皮に Peroxidase 活性を認める。Hematoxylin × 400



総胆管結紮ラットでも全く同様に酵素活性はほとんど観察されなかった。

これに対し、単独汚染群では総胆管結紮後3日目には腫大した内皮細胞の一部に、また膨化した上皮細胞の細胞体内に、さらにまた一部には mesangium 細胞の中や尿細管上皮の brush border に一致して活性の出現が認められた。結紮後7日目では腫大した上皮細胞や内皮細

胞に、あるいはまた mesangial 領域における細胞に酵素活性がきわめて明瞭に出現して来ることが観察された(写真12)。14日目では活性は内皮細胞および上皮細胞に認められたが、結紮後3日目、7日目に比して軽微にとどまった。

すなわち、単独汚染群総胆管結紮ラットの組織内 peroxidase 活性は肝においては結紮後3日目に活性の増強がみられ、腎においては結紮後7日目に増強していることが観察された。

IV 考 察

すでに述べた様に閉塞性黄疸の最も重篤な合併症の1つとして肝胆道系への感染が挙げられるが、この感染経路としては腸内細菌が十二指腸乳頭部を越えて胆管を上行する上行感染説、腸内細菌が経門脈的に肝臓を経て下行するとする下行感染説およびリンパ行性説などがある^{13)~16)}。

代田らは長年にわたり胆道閉塞の際の腸内細菌叢の変動を臨床的ならびに実験的に追究し、腸管内への胆汁の流出障害により腸内細菌叢はいわゆる *Dysbakterie* の状態を呈し、大腸菌を中心とする腸管内細菌の上行がみられ、胆汁中胆汁酸濃度の低下とあいまって細菌の胆道への感染が発生するものと述べている^{17)~19)}。

ところで近年、細菌の全く欠如している無菌動物の研究、開発に伴って、このような細菌と疾患の病態ないしは死因との関連性を追究するうえで本無菌動物を使用することは最もユニークな手段の1つと考えられる。

そこで今回著者は SD 系無菌ラットを2群に分ち、1群は対照無菌群とし、ほかの1群は *E. coli* O-26 により単独汚染させ、この2群の総胆管を二重結紮後切離し、十二指腸乳頭部を介する上行感染の機会を遮断し、閉塞性黄疸に対する主として経門脈的な細菌性因子のおよぼす影響について研究した。

その研究結果の詳細はすでに述べた通りであるが、今回の研究でまず第1に注目されたのは無菌群と単独汚染群の生存率の著しい差異で、無菌群では生存率90%であったが、単独汚染群では時間の経過とともに次第に死亡数が増加し、総胆管結紮後14日目には生存率はわずか40%にすぎなかった。このような著しい生存率の差異は環境、飼料などが全く同一条件であるため、腸管内の細菌の有無によるものと判断せざるを得ない。

そこでまず、胆管結紮後の単独汚染群における腸管内大腸菌数を追究してその変動をみると、大腸菌の腸管上行がみられたばかりでなく、小腸下部はもちろん小腸

中部では2日目より、小腸上部でも5日目にはすでに full growth の状態を呈していることが確認された。

この際、同時に施行した門脈血、大動脈血、胆汁および血液よりは細菌は全く検出されなかったが、肝組織よりは総胆管結紮後すでに3日目より少数例ではあるが大腸菌 *E. coli* O-26 が検出された。

この事実は屠殺時いずれの実験動物も総胆管の再疎通¹⁷⁾¹⁸⁾が全くみられなかったことより少なくとも乳頭部を介しての上行感染とは到底考え難く、今回の実験ではリンパ行性の感染については検索し得なかったが、腸管内大腸菌の経門脈性感染を充分示唆するものと考えられる。

それでは門脈血中に何故大腸菌が検出され得なかったかの理由を考えてみると、まず第一に実験動物が小動物であるために細菌培養を行った門脈血量が 0.1ml というきわめて少量であったこと、第二には門脈血中の菌数がそれ程大量ではなくておそらくごく少量の菌が流動性をもって血中に流出することなどが挙げられ、従来、肝は腎とともに生体内における濾過器と言われているようにまさに肝で濾過されたためと思われる。

事実、1972年 Kune¹⁹⁾ を始めとして門脈血中の細菌に関する臨床的ならびに実験的研究で門脈血中に細菌の出現をみると報告も少なくない^{20)~25)}。

他方、カプトガニの amebocyte を用いた limulus generation test による endotoxin の検出法は Levin¹¹⁾ らにより開発、発表されて以来、その特異的な鋭敏度と操作の簡便性により今日広く endotoxemia の診断に用いられている。

また、門脈血中への endotoxin の出現に関しても玉熊²⁶⁾、嶋田²⁷⁾らにより多くの報告があるが、Jacob²⁸⁾らは各種疾患により開腹術を受けた患者の門脈血を手術中に採取し、細菌学的検索を行うと同時に limulus test をもあわせ行ったところ、細菌は11例中1例に *E. coli* を証明したのみであったが、limulus test は33例中32例が陽性を示し、systemic endotoxemia 30例中4例に比べて著しく高頻度であり、各種の文献的考察よりこれら limulus test 陽性例は false positive の可能性はまったく無く、すべて portal endotoxemia であると結論し、これらの endotoxin は肝機能が正常に保たれておれば肝の Kupffer 細胞で全て処理されると述べている。

このことは著者の実験結果において、総胆管結紮前の単独汚染群の門脈血ですでに5例中2例が limulus test 陽性を示し、本反応の結紮後の推移をみても大多数が陽

性を示しており、結紮前全く陰性であった大動脈血でも結紮後高頻度に limulus test 陽性を示した事実とよく一致している。

ところで、腸管内細菌由来の endotoxin が経門脈的に肝に移送された時、その処理器官として肝の細網内皮系が重要視されていることはすでに前述した通りであるが、細網内皮系での処理能力を上まわる程大量の endotoxin が一時に送り込まれた時に、大循環系へ漏出し systemic endotoxemia を引き起こすことは容易に想像できるところである。

事実、Bailey²⁹⁾ (1976) は肝の細網内皮系を酢酸鉛で block することにより block 前はまったく出現しなかった portal endotoxemia からの systemic endotoxemia への移行がすみやかに成立し、死亡率が著しく上昇することを実験的に立証報告している。同様の細網内皮系を重視した論文は、Wilkinson³⁰⁾, Olcay³¹⁾, Leiber³²⁾, Triger²⁹⁾, ら以外にも数多くの報告がある。

そこで総胆管結紮後の肝機能の推移を追究すると、無菌群、単独汚染群いずれにおいても GOT, GPT, total cholesterol, total bilirubin 値は結紮後直ちに著しく増強ないしは増加し、2~3日を peak とし、以後時間の経過とともに減弱ないしは減少して7日後にはほぼ結紮前の値を示し、total bilirubin 値はその後もほぼ同じ値を持続し、明らかに肝機能の障害されていることが確認されたが、この両群の間にはほとんど差異が認められなかった。

すなわち、胆管結紮後、腸管内細菌の有無にかかわらず肝機能は早期より障害され、そのため単独汚染群においては肝の endotoxin 処理能力の低下を来して portal endotoxemia が systemic endotoxemia に移行したものと考えられる。

そこで次に肝を中心として、肺、腎、小腸などの諸臓器の組織形態学的変化を追究し、この両群を比較検討した。

肝では胆管の増生、拡張および線維化などの胆管結紮によると思われる所見は経日的に高度となる傾向を示したが、無菌群、単独汚染群の間には差異はほとんど認められなかった。ところがグリソン氏鞘を中心とする円形細胞浸潤、肝全般におよぶ好酸性壊死および脂肪変性の所見は単独汚染群では無菌群に比べきわめて顕著に認められたばかりでなく、無菌群では全く観察されなかったフィブリン析出や血管周囲炎の所見が観察された。このほか単独汚染群では無菌群と異なり、肺胞壁および気管

支を中心とする炎症像とともに血管周囲性の浮腫が著明に認められたばかりでなく腎においても間質性腎炎や炎症細胞の増加などの所見が、さらにまた小腸では血管内皮細胞の腫大や閉塞性血管炎の所見も認められた。

このような両群における諸臓器の組織形態学的所見の相異は portal endotoxemia から systemic endotoxemia へと発展した結果を示唆するものと考えられる。

そこでさらに肝、腎組織における endotoxin の局在を直接証明するために anti-endotoxin rabbit IgG peroxidase を用いた組織酵素抗体法を行って検索した結果、肝においては腫大した Kupffer 細胞に endotoxin が取り込まれている所見が、また腎においても腫大した内皮細胞や上皮細胞あるいは mesangial 領域における細胞内に明瞭に endotoxin が取り込まれている所見が確認された。

以上の一連の諸研究成績は、大腸菌単独汚染ラットの総胆管を結紮して閉塞性黄疸を起こすと、腸管内容中の endotoxine が門脈血内に流入し、肝における endotoxin の処理能力の低下とあいまって、この portal endotoxemia がついに systemic endotoxemia へと発展して行く事実の一端を無菌動物を用いて明らかになし得たものと考えられる。

V 結 論

著者は、JCL-SD 系無菌ラットを2群に分ち、1群は対照群とし、ほかの1群は大腸菌 0-26を単独汚染させて、この両群の総胆管を結紮し、閉塞性黄疸の病態に腸管内細菌のおよぼす影響について主に細菌学的研究と諸臓器の組織形態学的、組織化学的变化を中心に研究し、大要つぎの成績を得た。

1. 無菌群の生存率は90%であったが、単独汚染群では総胆管結紮後、時間の経過とともに次第に死亡し、14日後にはその生存率はわずかに40%であった。

2. 無菌群の腸管内容総胆管結紮後ももちろんまったく無菌であったが、単独汚染群では総胆管結紮後、小腸上部に至るまで大腸菌の full growth の状態が認められた。

3. 無菌群、単独汚染群ともに総胆管結紮後いずれの時期においても門脈血、大動脈血および胆汁中からは大腸菌はまったく検出されなかった。また総胆管結紮前の両群の肝組織および結紮後の無菌群の肝組織はいずれもまったく無菌であったが、単独汚染群の総胆管結紮後の肝組織からは3日目以降各時期においてそれぞれ5例中1例ずつ大腸菌が最高 10^4 order で検出された。

4. 単独汚染群では総胆管結紮前すでに門脈血において5例中2例に *limulus test* 陽性を示したが、大動脈血ではいずれも陰性であった。

結紮後は、門脈血では5日目以降いずれも *limulus test* 陽性を示したが、大動脈血では陰性を示すものもあり portal endotoxemia から systemic endotoxemia へと発展して行くことが確認された。

5. 無菌群、単独汚染群の肝機能障害はいずれも同様に総胆管結紮後2日ないし5日目を peak として増加が認められたことより、胆道閉塞時の肝機能障害は、腸管内細菌の有無よりは胆道閉塞因子の方が強い影響を与えていることが認められた。

6. 組織学的検索により無菌群では経日的に増強する無気肺の所見が、肝ではグリソン氏鞘を中心とする胆管の拡張、増生、線維化および円形細胞浸潤や好酸性壊死、脂肪変性などの所見が、腎では糸球体の虚脱、細胞数の増加、近位尿管管の拡張、基底膜の肥厚などの所見が、さらに小腸では粘膜上皮の過形成、胚細胞の増加の所見が観察された。

単独汚染群においてはこれらの所見以外に、肺胞壁および気管支を中心とする炎症像、血管周囲性の浮腫が、肝では血管周囲炎の所見やフィブリン析出が、さらに腎では間質性腎炎の所見が、小腸では閉塞性血管炎の所見が観察された。

7. anti-endotoxin rabbit IgG peroxidase を用いた酵素抗体法により単独汚染群では肝および腎組織内の endotoxin の局在を組織学的に直接証明することができた。

稿を終るにあたり、終始ご懇篤なご指導、ご校閲を賜った本学第1外科学教室代田明郎教授ならびに本学公衆衛生学教室乗木秀夫教授に深謝する。また本研究に終始直接にご指導をいただいた本学第1外科足立憲治医博に深甚なる謝意を表すとともに、ご助言とご協力を賜った本学第一病理学教室相原 薫助教授ならびに本学第1外科森山雄吉医博に感謝の意を表する。

本論文の要旨は、第11回ならびに第12回日本無菌生物ノートバイメロジ学会総会(1978. 1), (1979, 1) および第13回日本消化器外科学会総会(1979. 2)に発表した。

文 献

- 1) 代田明郎：胆石及び胆嚢炎の発生病理(胆石及び胆嚢炎の発生機序に対する一考察)。診断と治療, 48: 1552—1557, 1960.
- 2) 代田明郎：胆石及び胆嚢炎発生と腸内細菌叢。日消誌, 58: 1149—1166, 1961.
- 3) 代田明郎ほか：胆道外科に於ける胆汁の新しい意義。外科治療, 5: 524—534, 1961.
- 4) Shirota, A.: The development of cholelithiasis and cholecystitis in relation to the intestinal bacterial flora. Japanese Journal of Gastroenterology, 139—159, 1961.
- 5) 代田明郎ほか：胆石症の研究。日外会誌, 63: 974—975, 1962.
- 6) 代田明郎ほか：腸内細菌叢の胆道感染に関する臨床的並びに実験的研究。日消誌, 59: 830—832, 1962.
- 7) 代田明郎ほか：胆石症の研究。日消誌, 60: 848, 1963.
- 8) 代田明郎ほか：胆石及び胆嚢炎の発生機序に関する一考察。特に大腸菌体成分を抗原抗体系とする胆嚢の Allergy 反応の発来性。アレルギー, 13: 559—578, 1964.
- 9) 代田明郎ほか：Gram 陰性桿菌感染症—胆道疾患。とくに胆石症を中心として。今日の臨床外科, 2: 73—91, 1976.
- 10) Cameron, G.R., et al.: Ligation of the common bile duct. J. Path. Bact., 35: 769—798, 1932.
- 11) Levin, J., et al.: The roll of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp., 115: 265, 1964.
- 12) Ian W. McLean, et al.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. J. Histo. Cyto., 22: 1077—1083, 1974.
- 13) 三宅 博：胆石症, 金原出版, 東京, 1970.
- 14) 榎 哲夫：肝・胆道・脾疾患の外科。金原出版, 東京, 1974.
- 15) 佐藤寿雄ほか：胆石症と腸内細菌, 胆道感染症。最新医学, 33: 2034—2037, 1978.
- 16) Scott, A.J.: Bacteria and disease of the biliary tract. Gut, 12: 487—492, 1971.
- 17) Cameron, G.R., et al.: Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. J. Path. Bact., 66: 333—349, 1958.
- 18) 岩月 淳ほか：ラットでの肝外閉塞性黄疸の実験モデルに関する研究。日消外会誌, 11: 178—182, 1978.
- 19) Kune, G.A.: Current practice of biliary surgery. Little, Brown and company, Boston, 1972.
- 20) Schatten, W.E., et al.: A bacteriologic study of portal vein blood in man. A.M.A. Arch. Surg., 71: 404—409, 1955.
- 21) Coblentz, A., et al.: Microbiologic study of the portal and hepatic venous blood in man. American J. Med. Science., 228: 298—300,

- 1954.
- 22) Taylor, F.W.: Blood culture studies of the portal vein. *Arch. Surg.*, **72**: 889—892, 1956.
- 23) Orloff, M.J., et al.: A bacteriologic study of human portal blood: Implications regarding hepatic ischemia in man. *Ann. Surg.*, **148**: 738—746, 1958.
- 24) Dineen, P.: The importance of the route of infection in experimental biliary tract obstruction. *Surg. Gynec. & Obst.*, **119**: 1001—1008, 1964.
- 25) Triger, D.R., et al.: Portal and systemic bacteria and endotoxaemia in liver disease. *Gut*, **19**: 935—939, 1978.
- 26) 玉熊正悦: Refractory shock と肝・門脈系の役割. *臨床外科*, **24**: 13—20, 1969.
- 27) 嶋田 紘: 門脈 endotoxin 血症とその意義. *医学のあゆみ*, **105**: 20—22, 1978.
- 28) Jacob, A.J., et al.: Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology*, **72**: 1268—1270, 1977.
- 29) Bailey, M.F.: Endotoxin, bile salts and renal function in obstructive jaundice. *Br. J. Surg.*, **63**: 774—778, 1976.
- 30) Wilkinson, S.P., et al.: Relation of renal impairment and hemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure. *Lancet*, **30**: 521—524, 1974.
- 31) Olcay, I.: Reticuloendothelial function: Determinant for survival following hepatic ischemia in the baboon. *Surgery*, **76**: 643—653, 1976.
- 32) Leiber, H., et al.: Endotoxin-induced liver necrosis and coagulation in rats enhanced by portacaval collateral circulation. *Gut*, **16**: 429—436, 1975.