

胆汁性腹膜炎の病態におよぼす細菌性因子に関する研究

日本医科大学第1外科学(主任:代田明郎教授)

大学院生 和田英理

THE EFFECT OF INTESTINAL BACTERIAL FACTORS ON BILE PERITONITIS

Eiri WADA

The First Department of Surgery, Nippon Medical School

(Director: Prof. Akiro SHIROTA)

胆汁性腹膜炎の死因ないしは病態におよぼす細菌性因子, とくに腸管内細菌の果たす役割りを主として血中 endotoxin を中心に無菌, 大腸菌 0-26 単独汚染および普通マウスを使用し, 腹腔内にヒトの無菌胆嚢胆汁を注入し胆汁性腹膜炎を惹起せしめ 6, 12 および 24 時間と経時的に検索した. その結果無菌群では全例 endotoxin 陰性であったが, 単独汚染群では 15 例中 14 例 (93%), 普通群では 15 例中 12 例 (80%) の陽性例を得た. これは腸管内細菌由来の endotoxin が胆汁の作用により障害された小腸粘膜側より門脈内に流入し, 同時に障害をうけている肝の endotoxin 処理能力の低下とあいまって, ついには systemic endotoxemia へと発展して行く経路の一端を解明したものと考える.

引用用語: 胆汁性腹膜炎, 腸管内細菌, 内因性 endotoxin, 無菌動物, リムルステスト

I. 緒言

急性汎発性腹膜炎のうちでもとくに重篤な胆汁性腹膜炎の死因としては, 従来より胆汁そのものの毒性や腹腔内への大量の血漿漏出に基づく体液の喪失, さらには感染胆汁の腹腔内流出による細菌性因子など種々あげられているが, いずれにおいてもいまだ充分解明されているとはいえない。

ところで教室の恩田, 滝沢¹⁾らは, 急性汎発性腹膜炎手術患者 69 例の血液リムルステストを施行し, 陽性を示したものは 28 例, 40.6% で, 同期間中に手術された外科的諸疾患患者のうちで最も高率を示したが, なかでも大腸穿孔による糞便性腹膜炎患者 4 例全例が陽性を示したのについて, 胆嚢穿孔による胆汁性腹膜炎患者では 20 例中 13 例, 65% という高い陽性率を示し, これらほとんどの症例の腹腔液中より大腸菌を中心とするグラム陰性桿菌が大量に検出された事実と照合して, 胆汁性腹膜炎の死因ないしは病態においては細菌性因子, とくにグラム陰性桿菌由来の endotoxin が血中へ出現することが 1 つの大きな役割りを演じているものと考えられると述べている。

一方, 教室の足立, 田代, 鄭^{2)~4)}らは, 近年著しく研究開発された無菌動物を用いて大腸菌による急性閉塞性化膿性胆管炎を作成し, 胆管由来のみの細菌性因子, とくに血中 endotoxin について再検討するとともに, さらに無菌動物に大腸菌を経口投与, 単独汚染させたのち, 胆道閉塞を実験的に設置し, 閉塞性黄疸の病態におよぼす腸管由来の経門脈の細菌性因子について研究し, これらの研究成果を総合考察して急性閉塞性化膿性胆管炎のさい, しばしば遭遇する重篤なショックの発来には, 胆管由来の細菌性因子に, さらに腸管由来の細菌性因子が加わり, 高度の肝障害と相俟って血中に endotoxin が出現, 増量し, この endotoxin が本ショックの発来に 1 つの大きな役割りを演じているものと考えられると述べている。

そこで今回著者は, 上述の諸観点から胆汁性腹膜炎の死因ないしは病態におよぼす細菌性因子, とくに腸管内細菌の果たす役割りを主として血中 endotoxin を中心に無菌動物と普通動物を用いて研究したので, その成績を報告する。

II. 実験材料と方法

1. 実験材料

1) 実験動物

実験動物中央研究所より入手した JCL:ICR 系無菌マウスをビニールアイソレーター内で自家繁殖させ、生後8~12週齢に達した体重25~40gのものを雌雄の別なく実験に用いた。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、水は水道水を用いて飼料と同様に滅菌してそれぞれ自由に経口摂取させた。普通マウスは自然環境下で日本クレア製 CE-7 固型飼料を用いて飼育した。

2) ヒト胆嚢胆汁

手術時採取したヒト胆嚢胆汁を3人分、計100mlをプールし、BHI Brothにて無菌であることを確認するとともに、リムステスト(以下 L.G.T. と略す)にて1,536倍稀釈まで陰性であることも併せ確認した。

また、同時にガスクロマトグラフィー(島津)で含有各胆汁酸量も測定した。この胆汁中には、コール酸:64.7mg/ml, ケノデオキシコール酸:44.0mg/ml, デオキシコール酸:15.0mg/ml, リトコール酸:1.5mg/ml, ウルソデオキシコール酸:1.2mg/ml で総胆汁酸量として126.4mg/ml 含まれていることを確認した。

2. 実験方法

無菌マウスを2群に分ち、1群は対照無菌群(以下無菌群と略す)、ほかの1群はヒト糞便由来の E. coli 0-26菌液(10⁹/ml) 0.5mlを金属性ゾンデを用いて経口投与、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)とした。

また、同時に普通環境下で飼育された普通マウス群(以下普通群と略す)も併せ使用した。

まず基礎的実験として、上述3群(各群5匹)の腹腔内に胆汁原液1mlを注入すると、各群ともに全例30分~2時間以内に死亡したので、つぎに胆汁10倍稀釈液、1.0mlを腹腔内に注入すると各群、5匹ともに24時間以内に死亡するものは皆無であった。そこで、注入後6、12および24時間と経時的に心臓穿刺により採血、しかる後屠殺し、以下の実験に供した。なお無菌群および単独汚染群については、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) 血中の細菌検索

単独汚染群においては、DHL 寒天培地(栄研)、普通群においては、HEART INFUSION 血液寒天培地(栄研)、PEA 血液寒天培地(栄研)、DHL 寒天培地(栄研)、POTATO DEXTROSE 寒天培地(栄研)、LBS 培

地(栄研)、GAM 寒天培地(日水)、BACTEROIDES 培地(日水)、変法 FM 培地(日水)、CW 寒天基礎培地(日水)を用いて、心臓穿刺血0.1mlを上記平板培地に塗抹し、好気性菌用培地は37°Cのふ卵器で24時間、嫌気性菌用培地は Anaerobic glove box(平沢製作所)で48時間培養後、血液1ml中の菌数を算定した。

2) 腹腔洗浄液中の細菌検索

血中の細菌検索と同様の培地を用い、腹腔洗浄液0.1mlを平板培地に塗抹し、同様に培養し、腹腔洗浄液1ml中の菌数を算定した。

3) 血中 endotoxin の検索

屠殺時無菌的にヘパリン(血液1ml当り75単位)を含む注射器により採血した心臓穿刺血を3,000r.p.m., 40秒間遠心沈澱し、上清の多血小板血漿を阻害物質除去のため滅菌生理食塩水で3倍稀釈し、10分間煮沸した。煮沸後2,500r.p.m., 10分間遠心沈澱し、その上清の0.1mlを192倍まで倍数稀釈したものについて L.G.T. を施行した。Lysate は Pre-Gel(帝国臓器)を使用した。判定は45度にアンプルを傾けゲル形成および粘度増大の有無により決定した。(卍):完全なゲル化で傾けてもゲルの形が崩れないもの、(卅):ゲルを形成しているが傾けると一塊となって動くもの、(十):著しい粘度の増大および顆粒状ゲルを形成しているもの、(±):軽度粘度の増大しているもの、(-):液状のまま変化しないものとし、この内(卍)~(十)を endotoxin 陽性、(±)および(-)を陰性とした。

4) 腹腔洗浄液中 endotoxin の検索

屠殺後無菌的に開腹し、滅菌生理食塩水1mlにて腹腔内を洗浄し、阻害物質除去のため滅菌生理食塩水で3倍に稀釈し、10分間煮沸し、以後の操作は血液と同様に行った。

5) 血液生化学値

屠殺時採取した大循環血より血清を分離し、serum glutamic oxaloacetic transaminase (S-GOT), serum glutamic pyruvic transaminase (S-GPT) および blood urea nitrogen (BUN) 値について日立716自動分析装置を用いて測定した。

6) 主要諸臓器の組織形態学的観察

屠殺直後採取した小腸、肝、肺および腎を10%ホルマリンに固定した後、型の如く系列アルコールにて脱水し、パラフィンに包埋した。包埋した組織は Jung 型 Sliding microtome にて1~3μの切片を作製し、H-E, MassonおよびPAM染色を施し光学顕微鏡にて観察した。

表1. 腹腔洗浄液および血中の細菌検索(普通群)

実験	マウス No.	腹腔洗浄液	血液
前	121	(-)	(-)
	122	(-)	(-)
	123	(-)	(-)
	124	(-)	(-)
	125	(-)	(-)
6時間後	278	(-)	(-)
	279	(-)	(-)
	280	(-)	(-)
	281	(-)	(-)
282	(-)	(-)	
12時間後	293	(+) micrococcus 1 × 10 ¹	(+) S. faecalis 1 × 10 ¹
	294	(+) S. faecalis 2.8 × 10 ⁹	(-)
	295	(+) S. faecalis 2.9 × 10 ²	(+) ^G (-) 好気性球菌 4 × 10 ¹ C. perfringens 2 × 10 ¹
	296	(+) micrococcus 2 × 10 ¹	(+) micrococcus 2 × 10 ¹
	297	(-)	(-)
24時間後	303	(-)	(-)
	304	(-)	(-)
	305	(-)	(+) C. perfringens 2 × 10 ¹
	306	(-)	(-)
307	(-)	(-)	

(菌数/ml)

III. 研究成績

1. 腹腔洗浄液および血中の細菌検索(表1)

無菌および単独汚染群の腹腔洗浄液および血中からは

実験前, 後の全期間を通じて菌は全く検出されなかった。

普通群の腹腔洗浄液中からは実験前および実験6時間後の各5例では菌は全く検出されなかったが, 12時間後の5例では4例に球菌を証明した。しかし, 24時間後の5例では菌は全く検出されなかった。

血中からは実験前および6時間後では菌は全く検出されなかったが, 12時間後の5例では3例に細菌を認め, 24時間後では5例中1例に検出された。

しかし, 血中と腹腔洗浄液中の検出細菌を比較してみると同一菌種の検出されたものは僅かに1例のみであった。

2. 腹腔洗浄液および血中 endotoxin の検索(表2)

無菌群では当然のことながら実験前, 後の全期間を通じて腹腔洗浄液および血液 L.G.T. はいずれも陰性を示した。

単独汚染群の腹腔洗浄液では実験前および6時間後, 12時間後の各5例のいずれのものでも L.G.T. は全く陰性であったが, 24時間後の5例中2例が L.G.T. 陽性を示した。

これに対し, 血液 L.G.T. は実験前, すべて陰性を示したが, 6時間後では5例中4例, 12時間後と24時間後

表2. 腹腔洗浄液および血中 endotoxin の検索

実験	リ ム ル ス テ ス ト																	
	無菌群				単独汚染群				普通群									
	マウス No	腹腔洗浄液	血液	マウス No	腹腔洗浄液	血液	マウス No	腹腔洗浄液	血液	マウス No	腹腔洗浄液	血液	マウス No	腹腔洗浄液	血液			
前	61	-	-	-	-	111	-	-	-	-	-	-	121	-	-	-	-	-
	62	-	-	-	-	112	-	-	-	-	-	-	122	-	-	-	-	-
	63	-	-	-	-	113	-	-	-	-	-	-	123	-	-	-	-	-
	64	-	-	-	-	114	-	-	-	-	-	-	124	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	115	-	-	-	-	-	-	125	-	-	-	-	-
6時間後	201	-	-	-	-	273	-	-	-	-	-	-	278	-	-	-	-	-
	202	-	-	-	-	274	-	-	-	++	+	-	279	-	-	+	-	-
	203	-	-	-	-	275	-	-	-	+	-	-	280	-	-	++	+	-
	204	-	-	-	-	276	-	-	-	+	-	-	281	-	-	+	-	-
	205	-	-	-	-	277	-	-	-	++	+	-	282	-	-	+	-	-
12時間後	206	-	-	-	-	288	-	-	-	##	++	+	293	-	-	++	+	+
	207	-	-	-	-	289	-	-	-	+	-	-	294	+	-	-	-	-
	208	-	-	-	-	290	-	-	-	++	+	-	295	-	-	++	+	-
	209	-	-	-	-	291	-	-	-	##	+	-	296	-	-	++	+	-
	210	-	-	-	-	292	-	-	-	##	+	-	297	-	-	++	+	-
24時間後	211	-	-	-	-	298	-	-	-	##	++	+	303	-	-	+	-	-
	212	-	-	-	-	299	-	-	-	##	+	-	304	-	-	++	+	-
	213	-	-	-	-	300	++	+	-	##	+	-	305	-	-	++	+	-
	214	-	-	-	-	301	++	+	-	++	+	-	306	-	-	+	-	-
	215	-	-	-	-	302	-	-	-	+	-	-	307	-	-	-	-	-

では各5例全例が L.G.T. 陽性を示した。

普通群の腹腔洗浄液では、12時間後の5例中1例が L.G.T. 陽性を示したのみで、実験前および6時間後、24時間後の各5例は全例 L.G.T. 陰性を示した。

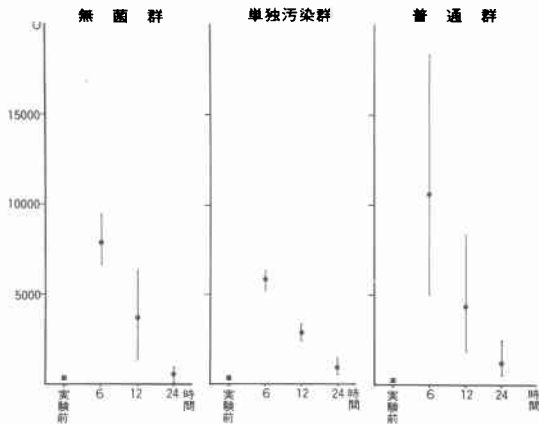
これに対し、血液 L.G.T. は実験前、すべて陰性を示したが、6時間後では5例中4例、12時間後では5例全例、24時間後では5例中4例までが L.G.T. 陽性を示した。

3. 血液生化学値の変動

1) S-GOT (図1)

無菌群の S-GOT 値は 198~412U (平均 296U) であったが、6時間後では 6640~9500U (平均 7865U) と著しい上昇を示し、その後12時間では 1368~6400U (平均 3646U)、24時間後では 100~928U (平均 557U) としだいに下降したが、24時間後では実験前と比べ、やや高値の傾向が認められた (Student's t-test にて、6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p > 0.1$)。

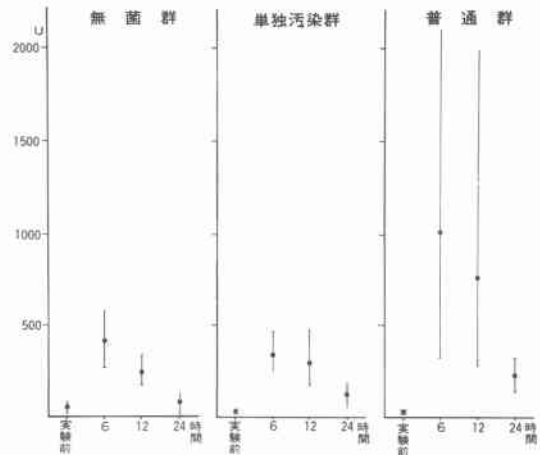
図1 人胆嚢胆汁10倍稀釈液腹腔内注入による S-GOT 値の変動



単独汚染群においても無菌群と同様に実験前102~166U (平均 132U) であったものが、6時間後では 5250~6370U (平均 5834U) と著しい高値を示し、その後12時間では 2420~3392U (平均 2878U)、24時間では 570~1520U (平均 970U) としだいに下降したが、24時間後でも実験前に比べると有意に高値を示していた (6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p < 0.01$)。

普通群においても、実験前 118~324U (平均 212U) であったものが、6時間後では 5040~18270U (平均 10600U) と著しい高値を示したが、12時間後 1816~8440U (平均 4277U) と時間の経過にしたがって下降し

図2. 人胆嚢胆汁10倍稀釈液腹腔内注入による S-GPT 値の変動



たが、24時間後でも 529~2430U (平均 1183U) と実験前に比べて明らかに高値を示した (6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p < 0.01$)。

2) S-GPT (図2)

前述の S-GOT 値の変動とその傾向は全く同様であった。

すなわち、無菌群では実験前 26~84U (平均 48U) であったが、6時間後では 270~584U (平均 409U) と著しく上昇し、その後12時間では 177~332U (平均 240U)、24時間後では 20~130U (平均 80.6U) としだいに下降し、24時間後では実験前とほぼ同じ値を示した (6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p > 0.1$)。

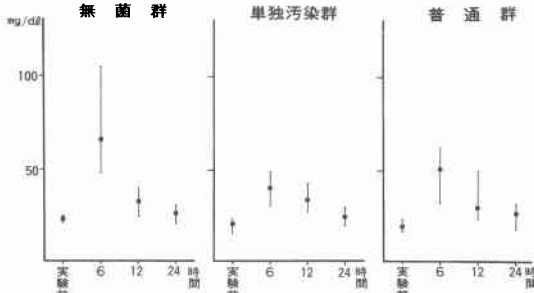
単独汚染群でも実験前 11~14U (平均 12U) であったが、6時間後では 252~469U (平均 328U) と高い値を示し、12時間後では 175~477U (平均 290U)、24時間後では 60~185U (平均 122U) と下降し、24時間後は実験前に比して有意差をもって高値を持続していた (6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p < 0.01$)。

普通群においても実験前 22~28U (平均 25U) であったものが、6時間後では 325~2093U (平均 1005U) と著しく高い値を示し、12時間後 280~1984U (平均 761U)、24時間後 146~326U (平均 230U) と著しく下降したが、24時間後は実験前に比して高い値を示した (6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p < 0.01$)。

3) BUN (図3)

BUN 値においてもその変動は前述 S-GOT 値、S-GPT 値と同様の傾向を示した。

図3. 人胆嚢胆汁10倍稀釈液腹腔内注入によるBUN値の変動



すなわち、無菌群では実験前 22~23mg/dl (平均22.6 mg/dl) であったが、6時間後の 48~105mg/dl (平均 66 mg/dl) と著しい値を示し、12時間後では 24~40mg/dl (平均 32mg/dl), 24時間後では 20~30mg/dl (平均 26mg/dl) としだいに下降し、24時間値では実験前との間には有意差は認められなかった(6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p > 0.1$)。

単独汚染群においては実験前 15~23mg/dl (平均 20.4 mg/dl) であったが、6時間後 30~49mg/dl (平均 39.8 mg/dl) と軽度上昇し、12時間後 27~43mg/dl (平均33.8 mg/dl), 24時間後 20~30mg/dl (平均 24.5mg/dl) と下降し、24時間後では実験前とほぼ同じ値を示した(6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.01$, 24時間: $p > 0.1$)。

普通群においても実験前17~24mg/dl (平均19.8mg/dl) であったものが、6時間後 32~63mg/dl (平均 51mg/dl) と高い値を示し、12時間後 24~50mg/dl (平均 30mg/dl), 24時間後 18~33mg/dl (平均 26.8mg/dl) と下降し、24時間値では実験前との間に有意差が認められた(6時間: $p < 0.01$, 12時間: $p < 0.05$, 24時間: $p < 0.01$)。

4. 主要諸臓器の組織形態学的所見 (表3)

1) 小腸

i) 無菌群: 6時間後では粘膜上皮の腫大, 粘膜固有層および粘膜下層の浮腫, 細胞浸潤が認められる。同様な所見は漿膜側にも認められ, 炎症性反応が見られた(写真1)。12時間後では前述所見が増強する傾向が見られたが, 24時間後にいたると変化は幾分軽減された。

ii) 単独汚染群: 無菌群とほぼ同様な傾向を示し, 12時間後で粘膜下層の血管炎性変化が認められるのが特徴で, 一部血管周囲の線維化も認められた。24時間後では粘膜下層の毛細血管の拡張および内皮細胞の腫大が認められた。漿膜側には線維素性物質の析出が認められた

表3. 組織形態学的変化

実験群	無菌群			単独汚染群			普通群		
	6	12	24	6	12	24	6	12	24
病理所見	観察時間								
小腸	粘膜上皮細胞腫大	+	+	+	+	+	+	+	+
	粘膜上皮細胞壊死	-	-	-	±	±	-	-	-
	杯細胞増加	±	+	+	±	+	±	+	+
	粘膜固有層細胞浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+
	粘膜固有層急性充血	+	+	+	+	+	+	+	+
	粘膜固有層浮腫	+	+	+	+	+	+	+	+
	粘膜固有層浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+
	漿膜面細胞浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+
	漿膜面浮腫	+	+	+	+	+	+	+	+
	線維素性物質析出	-	±	+	+	+	+	+	+
	血管拡張	+	+	+	+	+	+	+	+
	血管内皮細胞腫大	+	+	+	+	+	+	+	+
	血管炎性変化	+	+	+	+	+	+	+	+
	リンパ管拡張	+	+	+	+	+	+	+	+
	肝	肝細胞空胞化	+	+	+	+	+	+	+
好酸性壊死		+	+	+	+	+	+	+	+
臍状壊死		+	+	+	+	+	+	+	+
Kupffer細胞腫大, 増生		+	+	+	+	+	+	+	+
胆管炎		±	±	±	±	±	±	±	±
クリソソ氏細胞浸潤		+	+	+	+	+	+	+	+
胆管の拡張, 増生		+	+	+	+	+	+	+	+
中心静脈拡張		+	+	+	+	+	+	+	+
中心静脈壊死		+	+	+	+	+	+	+	+
血管周囲炎		+	+	+	+	+	+	+	+
肺	無気腫	+	+	+	+	+	+	+	+
	肺動脈・気管支周囲浮腫	+	+	+	+	+	+	+	+
	肺動脈・気管支周囲線維化	+	+	+	+	+	+	+	+
	肺動脈・気管支周囲細胞浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+
	血管周囲浮腫	+	+	+	+	+	+	+	+
腎	糸球体細胞数増加	+	+	+	+	+	+	+	+
	糸球体虚脱	+	+	+	+	+	+	+	+
	糸球体基膜肥厚	+	+	+	+	+	+	+	+
	糸球体内皮細胞腫大	+	+	+	+	+	+	+	+
	尿管管変性	+	+	+	+	+	+	+	+
	尿管管破壊	+	+	+	+	+	+	+	+
血管中膜肥厚空胞化	+	+	+	+	+	+	+	+	
血管周囲の浮腫	+	+	+	+	+	+	+	+	
フィブリン析出	+	+	+	+	+	+	+	+	

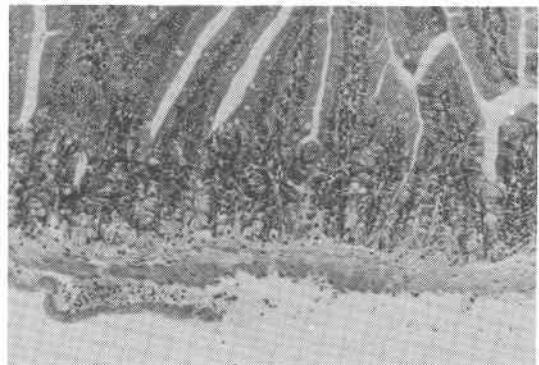
(写真2)。

iii) 普通群: 前述2群とはほぼ同様な傾向を示し, 12時間後では粘膜先端がやや壊死に落ちり, 粘膜固有層は細胞浸潤が顕著であり, 粘膜下層の浮腫および細胞浸潤が強く認められた(写真3)。

2) 肝

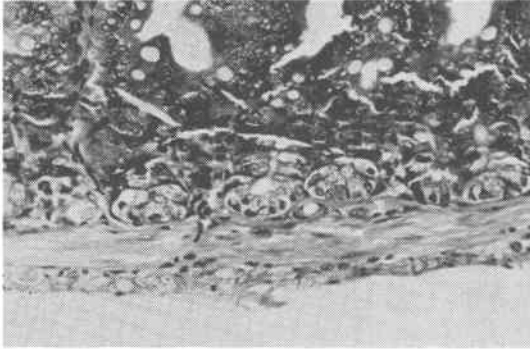
i) 無菌群: 6時間後では肝細胞素において肝細胞の核の大小不同性, 細胞質の空胞化ならびに顆粒状変性が比較的顕著であった。sinusoidal lining および Kupffer細胞の腫大が軽度認められた。12時間後では変化は6時

写真1. 無菌群ヒト胆嚢胆汁注入6時間後,



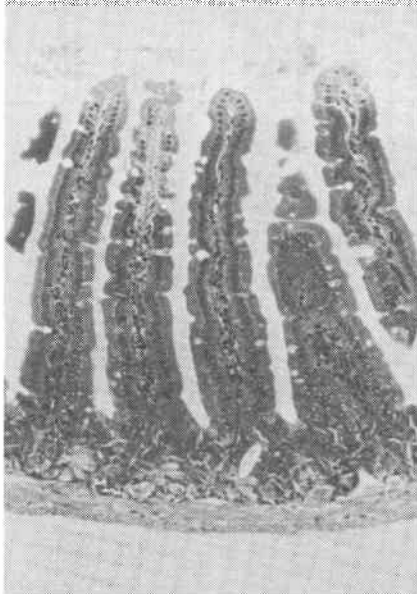
小腸: 粘膜上皮細胞の腫大, 粘膜固有層, 粘膜下層および漿膜側に炎症性反応を認める。H-E × 100

写真2. 単独汚染群ヒト胆嚢胆汁注入24時間後.



小腸：粘膜下層の毛細血管の拡張および内皮細胞の腫大が認められ、漿膜側には線維素性物質の析出を認める。H-E × 200

写真3. 普通群ヒト胆嚢胆汁注入12時間後.

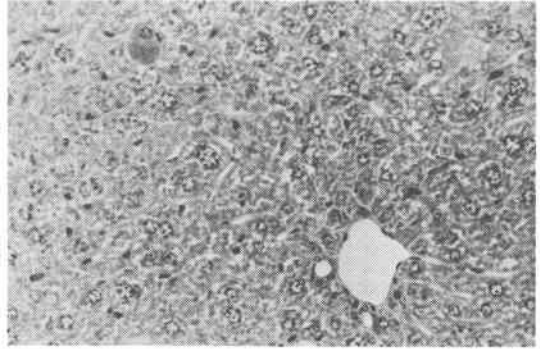


小腸：粘膜固有層および粘膜下層の浮腫，細胞浸潤が強く，粘膜先端に壊死を認める。H-E × 100

間後に比べ増強し，拡張した毛細胆管周辺部の細胞浸潤が中等度に認められた（写真4）。24時間後では脂肪変性を認め，12時間後に比べ変化は軽微にとどまっていた。

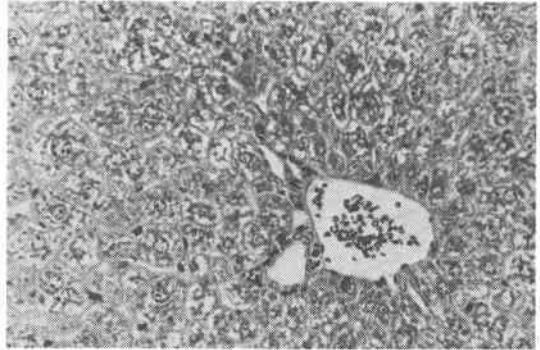
ii) 単独汚染群：無菌群とほぼ同様な傾向を示し，6時間後では肝細胞索の中等度の乱れを認め，中心静脈のうっ血および拡張の所見を認めた（写真5）。12時間後では中心静脈の虚脱，sinusoidal lining および Kupfer

写真4. 無菌群ヒト胆嚢胆汁注入12時間後.



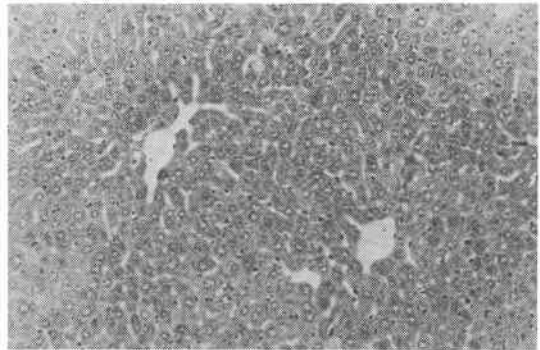
肝：6時間後に比して肝細胞核の大小不同性，細胞質の空胞化ならびに顆粒状変性が強く，拡張した毛細胆管周辺部の細胞浸潤を認める。H-E × 200

写真5. 単独汚染群ヒト胆嚢胆汁注入6時間後.



肝：肝細胞核の大小不同性，細胞質の空胞化ならびに顆粒状変性を認め，中心静脈のうっ血および拡張の所見が認められる。H-E × 200

写真6. 普通群ヒト胆嚢胆汁注入24時間後.



肝：中心静脈の拡張が目立つが，inusoid では Kupfer 細胞の腫大，細胞浸潤は軽度にとどまっている。H-E × 100

細胞の腫大が著しかった。

iii) 普通群：前述2群とはほぼ同様な傾向を示し、12時間後では中心静脈の虚脱がきわめて顕著に認められ、肝細胞索の好酸性壊死、顆粒状変性、核の空胞化も比較的顕著な変化として認められた。24時間後では中心静脈の拡張が目立ち、肝小葉に一部グリコーゲンの減少を示唆する所見を認めた。sinusoid では Kupffer 細胞の腫大は軽度にとどまり、細胞浸潤も軽度見られるにすぎなかった(写真6)。

3) 肺

i) 無菌群：6時間後より無気肺、細胞浸潤、急性うっ血の所見が比較的顕著であった。静脈壁の lining cell の腫大および筋層の線維素様壊死がみられ、急性静脈炎の所見が認められるのが特徴であった。12時間後ではさらに肺胞壁の細胞浸潤、肥厚および線維化が強く認められ focal alveolitis の所見が観察された。また、気管枝の杯細胞の腫大、気管支周囲の浮腫、線維化も認められた。24時間後では幾分程度は軽度となるが focal alveolitis の所見は継続され、血管腔内に蛋白様滲出物が増加し、macrophage の増殖が観察された。

ii) 単独汚染群：6時間後は無菌群に比べ変化は比較的軽度であったが、12時間後ではやはり focal alveolitis を認め、毛細血管の線維素様壊死も認められた。24時間後では12時間後の所見に比べ差異はあまり認められなかったが、一部硝子膜様症の所見が観察され、急性血管炎ならびに急性肺炎の所見も認められた。

iii) 普通群：6時間後では単独汚染群と同様変化は軽度であったが、12時間後では変化は増強し、線維素性物質の析出が見られ、硝子膜様症の所見が観察された。24時間後では血管周囲の線維化、細胞浸潤、肺胞壁の肥厚、細胞浸潤の増加も見られたが明らかな差異は認められなかった。

4) 腎

i) 無菌群：実験6時間後では糸球体は比較的顕著な浮腫、充血および細胞数の増加を示した。尿管管では上皮細胞の顆粒状変性および hyaline cast の形成が認められた。腎盂に円形細胞の浸潤が特徴的であった。12時間後では6時間後と明らかな変化は認められなかったが、細動脈の内皮細胞の腫大、内皮細胞直下の浮腫、中膜細胞の膨化、空胞変性が認められ、血管炎性変化が観察された。24時間後では幾分軽度となるが、変化は継続して観察された。

ii) 単独汚染群：6時間後では無菌群に比べ糸球体、

尿管管の変化は軽度であったが、腎盂腎炎の所見が観察された。12時間後では糸球体の浮腫、急性充血、細胞数の増加が強くなり、尿管管の顆粒状変性、細胞浸潤も比較的顕著であった。24時間後では細動脈の血管炎性変化が比較的顕著であったが、12時間後とは明らかな差異は認められなかった。

iii) 普通群：6時間後では糸球体に好中球を中心とする急性炎症性反応が比較的顕著に認められた。尿管管の虚脱、リンパ管腔の拡張も比較的顕著に認められた。12時間後では更に尿管管の変性、髄質の血管の拡張、血管周囲の線維化、細胞浸潤がやや顕著に認められた。24時間後では12時間後に比べ幾分程度は弱くなっているものの変化は継続して認められた。

IV. 考 察

急性汎発性腹膜炎のうちでも、胆汁性腹膜炎は抗生物質の著しく研究開発された今日、いまだ死亡率の高い代表的疾患の1つである。

この胆汁性腹膜炎の病態ないしは死因については、1772年 MacLurg が報告して以来、数多くの検討が行われ、本症の死因は以下に述べる3つに大別されている。

すなわち、第1に、Wangensteen⁵⁾ により胆汁そのものによる毒性効果が追求されて以来 Buckwalter, Horrall, Blalock, Miles^{6)~9)} らにより各種の動物を使つての実験結果が報告された。

Johnson¹⁰⁾ は本疾病の病態には胆汁の構成成分の1つである胆汁酸塩が強く関与していると提唱した。

また、Horrall¹¹⁾ によると、胆汁酸塩は細胞膜の透過性を変化させる結果、細胞代謝は強く障害されると述べている。この結果は Hautchen technique¹²⁾ を使用して胆汁と胆汁酸塩の腹膜に対する影響を研究した Walker¹³⁾ らの報告に一致する。

これら多くの胆汁の毒性に関する研究¹⁴⁾¹⁵⁾ に対して、第2の死因として、胆汁性腹膜炎の際には腹腔内に多量の血漿が漏出し、その体液喪失が直接の死因であると Harkins, Moon, Manson, Thoren, Trusler^{16)~21)} らは報告し、血漿成分補液の重要性を強調した。

また、葛西²²⁾ らも体液移動とそれに伴う2次感染が主因であるとした。

ところで、第3の死因である細菌性因子の重要性は Manson¹⁹⁾ らにより報告されて以来、Cohn²³⁾ らは実験的胆汁性腹膜炎に対する抗生物質治療の有効性を示唆し、Rewbridge^{24)~26)} らは無菌胆汁酸塩の腹腔内への注入により組織障害をもたらす、腹水培養により Clostri-

dium perfringens が出現したと報告している。そして Cohn, Schweinburg²⁷⁾²⁸⁾ らは穿孔のない腸管壁であっても細菌が通過しえると述べているが、Cohn²⁹⁾ はこの細菌の出現は、胆汁による腸管の漿膜面への刺激程度では生ぜず、腸管壁全体におよぶ障害が必要であると述べている。

ところで、近年、腸管内に細菌の全く欠除せる無菌動物の研究開発に伴い、本症の病態におよぼす細菌、とくに腸管内細菌の影響を解明する手段としては、本動物が容易に任意の細菌を腸内に定着させることが可能であるため、今日、最もユニークな研究方法と考えられる。

そこで今回、著者は無菌マウス、大腸菌単独汚染マウスおよび同系の普通マウスを用いて、主として胆汁性腹膜炎におよぼす細菌性因子を解明するために無菌ヒト胆嚢胆汁を腹腔内に注入し、腸管内細菌の有無による影響を経時的に観察した。

その研究結果の詳細はすでに述べた通りであるが、マウスに対するヒト胆嚢胆汁の直接毒性は Wangenstein らの述べている如く非常に強く、基礎的実験において腸管内細菌の有無にかかわらず0.5～2時間以内に全て死亡した。

すなわち、腹腔内に注入した 1ml の胆汁中に含まれる 126.4mg の胆汁酸はたとえその胆汁中に細菌が含まれていなくとも、早期に腹膜より吸収され、本マウスを死亡せしめたものと考えられ、この結果は Wangenstein らの述べている胆汁性腹膜炎による実験動物の早期死亡は Cholemia によるとの説と一致した。

そこで本胆汁を10倍に稀釈して注入してみると、胆汁の直接毒性によると思われる死亡は皆無であった。

その際の普通群の腹水および血中の細菌を検索してみると注入12時間後では腹腔洗浄液中より5例中4例に球菌類を証明しえた。

これは Rewbridge, Cohn らの穿孔とは無関係に障害された腸管壁を通過しようという研究結果に一致しているが、その際の血中の検索においては1例を除き異なる菌種が検出された。

ところで、従来、胆汁性腹膜炎に付随する重篤な敗血症は穿孔部または腸管壁より進出した細菌が腹膜より吸収され発生すると考えられていたが、上述の結果より腸管内に常在する細菌は胆汁により障害された腸管壁を通過して腹腔内に出現する一方、腸管壁より直接門脈へ侵入して、経門脈的感染も併せ発生するものと考えられる。

しかしながら、単独汚染群では、腹腔洗浄液、血中と

もに大腸菌を検出することはできなかった。この理由を正確に述べることは不可能であるが、普通群においては、腹腔洗浄液、血中ともに検出細菌は球菌が多い事より、大腸菌の如き桿菌は侵入しがたいとも考えられ、この点についてはなお研究を用するものと考えられる。

ところで、L.G.T.を用いた *endotoxin* の検索はその鋭敏度と操作の簡便性から、今日、広く用いられている。

事実、われわれの教室においても *endotoxin* 血症を疑わせる患者については同法を用いた *endotoxin* の検索を routine に行っているが、その結果、*endotoxin* 血症陽性率は胆汁性腹膜炎患者では20例中13例、65%と同期間中に検索した汎発性腹膜炎患者69例中28例、40.6%に比して著しく高率であった。

そこで今回の実験においても、L.G.T.を腹腔洗浄液、血液で施行した結果、普通群、単独汚染群ともに腹腔洗浄液においては1～2の例外を除き、全期間ともに陰性であったが、血中よりは逆に胆汁注入前、全く陰性であったものがほぼ全例陽性を示した。

磯山³⁰⁾によると、同法のゲル化を胆汁酸が阻止する可能性を示唆し、その *false negative* を除去するには高倍稀釈液を用いて同法を施行する以外ないと述べている。

そこで今回の実験においても、192倍まで高倍稀釈で行ったが陽性例は全て3～12倍で出現している。しかしながら血液中でみられたごとく完全ゲル化した例が全くない事実より *false negative* 例が含まれている可能性は完全には否定できないが、いずれにしても実地臨床で、胆汁性腹膜炎患者において高頻度にみられる *endotoxin* 血症の発来は実験的にも確認しえた。

このような腸管内細菌由来の *endotoxin* 血症の発来には、前述の菌血症の発来におけると同様に、腸管壁より直接門脈を経由しての発症経路を推定するのが妥当であろうと考える。

すなわち、正常時には腸管から腸内常在菌に由来する微量の *endotoxin* がたとえ経門脈的に吸収されても、肝の細網内皮系の旺盛なる処理能力によって *endotoxin* が完全に処理され、*systemic endotoxemia* は起こらないといわれている^{31)~33)}。

ところが、イレウスなどによる腸粘膜血流障害³⁴⁾や胆道閉塞による胆汁の腸管内流出障害³⁵⁾などのある場合には、腸管内の *mucosal barrier* が崩壊し、腸内常在菌に由来する大量の *endotoxin* が容易に腸粘膜を通過し、門脈を経て肝に達すると推察されている。

さらにまた、その量が細網内皮系の処理能力をはるかに上回るほどに大量であるか、肝障害^{31)36)~38)}などで細網内皮系の機能が低下しているさいには少量でも肝を通り systemic endotoxemia が生ずると考えられている。

そこで、経時的屠殺時採取した主要臓器を組織学的に検索してみると、腸管壁ならびに肝組織ともに腸管内細菌の有無にかかわらず、注入早期より強く障害されていた。

すなわち、腹腔内に注入された胆汁は、腸管の漿膜、筋層のみでなく粘膜まで障害して居り、前述の mucosal barrier の破壊をまねき、腸管内に常に存在する内因性 endotoxin は容易に門脈内に流入しえるものと思われる。

また、同時に肝組織では注入早期より障害をうけているばかりでなく、S-GOT, S-GPT 値も著しい高値をとっていたことより、流入 endotoxin を肝で捕捉しえず、遂には systemic endotoxemia に発展せしめたものとする。

また、同時施行した BUN 値の測定および腎、肺組織の検索においても、各群ともに障害をうけていた事実も併せ考えると、胆汁性腹膜炎時には、胆汁による直接障害や体液の喪失のみでなく、腸管内細菌、とくに、その endotoxin により生体は著しく障害されるものと考えられる。

V. 結 論

著者は、JCL:ICR 系無菌および普通マウスを用い、無菌マウスをさらに2群に分ち、1群は対照無菌群、ほかの1群を大腸菌単独汚染群とし、この3群の腹腔内にヒトの無菌胆嚢胆汁10倍稀釈液を1.0ml 注入して胆汁性腹膜炎を惹起せしめ、本症の病態におよぼす腸管内細菌の影響を明らかにするために、主として細菌学的、病理組織形態学的研究を行って比較検討し、大要つぎの成績をえた。

1. 1) 無菌群はもちろんであるが、単独汚染群においても、胆汁性腹膜炎24時間後まで、腹腔洗浄液および血液からは細菌は全く検出されなかった。

普通群、6時間後の腹腔洗浄液および血液からは同様に細菌は全く検出されなかったが、12時間後の腹腔洗浄液5例からは4例に細菌 (Micrococcus 2例, Streptococcus faecalis 2例) が検出され、血液5例からは3例に細菌 (Micrococcus 1例, Streptococcus faecalis 1例, グラム陰性好気性球菌と Clostridium perfringens 1例) が検出された。24時間後の腹腔洗浄液5例からは細菌は全く検出されなかったが、血液5例では1例に

Clostridium perfringens が検出された。

2) 無菌群の腹腔洗浄液および血液は腹膜炎24時間後まで L.G.T. 陰性を示した。

単独汚染群の腹腔洗浄液は24時間後にいたって5例中2例が L.G.T. 陽性を示したにすぎなかった。ところが血液では6時間後早くも5例中4例が L.G.T. 陽性を示し、12時間および24時間後では各5例全例が陽性を示した。

普通群の腹腔洗浄液は12時間後の5例中1例が L.G.T. 陽性を示したのみで、6時間および24時間後の各5例は全例陰性を示した。ところが血液では6時間後5例中4例が、12時間後では5例中全例が、また、24時間後では5例中4例が L.G.T. 陽性を示した。

2. 上述3群の S-GOT, S-GPT および BUN 値は腹膜炎6時間後では増強ないしは上昇し、以後は漸次減弱ないしは下降し、肝および腎機能障害は6時間後を最高として、以後は改善される傾向を示した。

3. 上述3群の小腸、肝、肺および腎など臓器組織の形態学的変化は、いずれの群においても腹膜炎6時間後にして早くも認められ、12時間後これらの諸変化はさらに増強するが24時間後ではこれとほぼ同程度か、あるいは幾分軽減される傾向が認められた。

これら臓器のうちでもとくに注目されたのは、小腸で、6時間後すでに漿筋層のみでなく粘膜側にまで炎症性変化が認められ、これらの変化は12時間後ではさらに増強、とくに普通群では粘膜先端の壊死と粘膜固有層の細胞浸潤が認められたことは同群で、ほぼ全例内因性 endotoxin 血症を発生していた事実を照し、興味深い所見であった。

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栗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外科足立憲治博士に深甚なる謝意を表するとともに、ご助言とご協力を賜った本学第1病理学教室相原薫助教授に感謝の意を表する。

また、実験にご協力いただいた第1外科無菌生物研究室、第1および第2病理学教室各位に感謝する。

本論文の要旨は、第13回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会(1980. 1)、第15回日本消化器外科学会総会(1980. 2)に発表した。

文 献

- 1) 滝沢隆雄：外科的腹部疾患のリムルステストの検討。エンドトキシンの基礎と臨床、第1回エ

- ンドトキシン臨床研究会記録, 羊土社, 東京, 129—134, 1979.
- 2) 足立憲治: 閉塞性黄疸に及ぼす腸管内細菌とくにその endotoxin の影響について—無菌動物を使用した実験的研究—, エンドトキシンの基礎と臨床, 第2回 エンドトキシン臨床研究会記録, 羊土社, 東京, 89—99, 1980.
 - 3) 田代真一: 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—, 日消外会誌, **12** (9): 618—628, 1979.
 - 4) 鄭 淳: 急性閉塞性化膿性胆管炎におけるショックの発来と細菌性因子に関する研究—とくに無菌動物を使用して—, 日外会誌, **81**: 133—146, 1980.
 - 5) Wangenstein, O.H.: On the significance of the escape of sterile bile into the peritoneal cavity. *Ann. Surg.*, **84**: 691—702, 1926.
 - 6) Buckwalter, J.A., et al.: Intravenous auto-genous bile in dogs. *Surgical Forum*, **2**: 167—172, 1951.
 - 7) Horral, O.H.: Experimental bile peritonitis and its treatment in the dog. *Arch. Int. Med.*, **43**: 114—128, 1929.
 - 8) Blalock, A.: Experimental studies on the effects of the perforation of peptic ulcers. *Surg. Gynec. & Obst.*, **61**: 20—26, 1953.
 - 9) Miles, R.M., et al.: Observations on experimental bile peritonitis. *Surgery*, **34**: 445—456, 1953.
 - 10) Jonson, J.R.: The role of concentration of bile in toxicity. *Surgical forum*, **2**: 184—187, 1951.
 - 11) Horral, O.H., et al.: The toxic factor in bile. *Am. J. Physiol.*, **85**: 591—606, 1928.
 - 12) Raftery, A.T.: Regeneration of parietal and visceral peritoneum. *British Journal of Surgery*, **60**: 293—299, 1973.
 - 13) Walker, E.M., et al.: Relationship of the constituents of bile to biliary peritonitis in the rat. *Gut*, **19**: 827—830, 1978.
 - 14) Still, E.U.: On the Toxicity of purified bile preparations. *Am. J. Physiol.*, **88**: 729—736, 1929.
 - 15) Horral, O.H.: The toxicity of bile. *Physiol. Rev.*, **11**: 122—142, 1931.
 - 16) Harkins, H.N., et al.: Lethal factors in bile peritonitis. *Arch. Surg.*, **33**: 576—608, 1936.
 - 17) Harkins, H.N., et al.: Peritonitis due to bile and liver autolysis. *J.A.M.A.*, **107**: 948—953, 1936.
 - 18) Moon, V.H., et al.: Shock in bile peritonitis. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **34**: 743—747, 1936.
 - 19) Manson, M.H., et al.: The cause of death in bile peritonitis. *Surgery*, **4**: 392—404, 1938.
 - 20) Thoren, L.: Experimentla biliary peritonitis. *Acta Chir. Scandinav.*, **113**: 494—496, 1957.
 - 21) Trusler, H.M., et al.: Significance of anaerobic organisms in peritonitis due to liver autolysis. *Arch. Surg.*, **30**: 371—393, 1935.
 - 22) 葛西森夫, 他: 急性汎発性腹膜炎の臨床と実験 (I) —糞便性腹膜炎を中心に病態生理について—, 外科, **31** (3): 270—276, 1969.
 - 23) Cohn, I., et al.: Technique for collection of sterile bile from experimental animals. *A.M.A. Arch. Surg.*, **75**: 1003—1005, 1957.
 - 24) Andrews, E., et al.: Causation of bacillus welchii infections in dogs by injection of sterile liver extracts or bile salts. *Surg. Gynec. & Obst.*, **53**: 176—181, 1931.
 - 25) Rewbridge, A.G.: The etiological role of gas-forming bacilli in experimental bile peritonitis. *Surg. Gynec. & Obst.*, **52**: 205—211, 1931.
 - 26) Rewbridge, A.G., et al.: The etiological role of bacteria in bile peritonitis. An experimental study in dogs. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **27**: 528—529, 1929.
 - 27) Cohn, I. Jr.: Strangulation obstruction. *Intemat. Abstr. of Surg.*, **103**: 105—137, 1956.
 - 28) Schweinburg, F. et al.: Effect of chemical irritation of the peritoneum on transmural migration of intestinal organisms. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **71**: 146—150, 1949.
 - 29) Cohn, I. Jr., et al.: Bile peritonitis. *Ann. Surg.*, **152**: 827—835, 1960.
 - 30) 磯山徹他: 胆汁のエンドトキシン含量と Cholangiovenous Reflux. 医学のあゆみ, **97**: 805—807, 1976.
 - 31) Nolan, J.P.: The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology*, **69**: 1346—1356, 1975.
 - 32) Buchanan, B.J., et al.: Bioassay of endotoxin clearance in vivo and by perfused rat liver. *Am. J. Physiol.*, **231**: 258—264, 1976.
 - 33) Jacob, A.J., et al.: Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology*, **72**: 1268—1270, 1977.
 - 34) 田井千秋: 術後癒着性イレウスの重篤化因子について. 手術, **31**: 705—713, 1977.
 - 35) Bailey, M.E.: Endotoxin, bile salts and renal function in obstructive jaundice. *Br. J. Surg.*, **63**: 774—778, 1976.
 - 36) Caridis, D.T., et al.: Endotoxin in man. *Lancet*, **24**: 1381—1386, 1972.
 - 37) Clemente, C., et al.: Functional renal failure and hemorrhagic gastritis associated with endotoxaemia in cirrhosis. *Gut*, **18**: 556—560, 1977.
 - 38) Tarao, K., et al.: Detection of endotoxin in plasma and ascitic fluid of patients with cirrhosis: Its Clinical significance. *Gastroenterology*, **73**: 539—542, 1977.