

# 膵・胆管合流異常症例における胆道上皮の細胞動態 —Bromodeoxyuridine (BrdU) モノクローナル 抗体を利用した解析—

山梨医科大学第1外科学教室 (指導: 山梨医科大学副学長 菅原 克彦)  
東京医科大学外科学教室教授 早田 義博)

野 口 明 宏

## CELL KINETIC STUDIES ON MUCOSA OF THE GALLBLADDER BY USING ANTI BROMODEOXYURIDINE MONOCLONAL ANTIBODY IN PATIENTS WITH ANOMALOUS ARRANGEMENT OF THE PANCREATICO-BILIARY DUCTAL SYSTEM

Akihiro NOGUCHI

The First Department of Surgery, Yamanashi University Medical School  
(Director: Vicepresident Katuhiko Sugahara and Prof. Yoshihiro Hayata)

膵・胆管合流異常(合流異常)と胆道癌との因果関係解明の一段階として、胆嚢上皮の細胞動態を比較検討した。A群:正常胆嚢症例19例, B群:胆嚢結石症18例, C群:胆道癌8例, D群:合流異常15例に対して bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体を用いて, *in vitro* BrdU 標識法にて DNA 合成期(S期)細胞を標識し, 免疫組織化学的に検討した。標識細胞数/胆嚢粘膜上皮細胞比より求めた標識率は A 群:  $0.31 \pm 0.36\%$  (Mean  $\pm$  SD), B 群:  $0.54 \pm 0.60\%$ , C 群:  $6.50 \pm 3.38\%$ , D 群:  $3.57 \pm 4.56\%$  で合流異常例では A 群, B 群に比べて有意に高く, その値は胆道癌の癌部と近似した値を示し, 合流異常の胆嚢粘膜上皮の S 期細胞は胆道癌の癌部と同様に, 正常例の胆嚢粘膜上皮よりも増加している症例が多いという成績を得た。

索引用語: 膵・胆管合流異常, 胆嚢癌, 抗 BrdU モノクローナル抗体, Cell kinetics

### I. 緒 言

Irwin and Morison<sup>1)</sup> (1944年) によって先天性総胆管拡張症(以下拡張症と略)の拡張部胆管上皮から扁平上皮癌の発生例が報告され, その後, 戸谷ら<sup>2)</sup>によって拡張症と胆管癌の因果関係を示唆する報告がなされて以来, 拡張症は胆管癌発生への高危険状態として, その関係が広く注目されるに至った。その後拡張症には膵・胆管合流異常<sup>3)</sup> (以下合流異常と略) と呼ばれる病態が高率に併存することが知られるようになり, この方面の研究は主にわが国の研究者によって精力的に進められてきた。

拡張症や合流異常と呼ばれる病態は胆管癌のみなら

ず胆嚢癌にも高頻度に認められることが報告されている<sup>4)</sup>。しかし, 拡張症と合流異常は, いずれも先天性の形成異常であろうとみる点では異論がないものの, それぞれの定義, 診断基準にはいまだ確定したものはない。したがって, その形態や病態が典型的な症例では問題はないものの, 正常例との境界線付近の症例では, 研究者によって診断が一致せず, 施設により症例数には大きな差がみられる。そのため, これら形成異常症例の実数は明らかでなく, 統計的な面からは正確な発癌率を算出することはできない。それゆえ現時点では拡張症と合流異常が胆道癌の背景因子であろうということは印象としてとらえられているにすぎない。さらに胆管癌は拡張症のうちでも嚢胞状の胆管拡張を示す症例の嚢胞壁からの発癌例が大部分であるのに対し, 胆嚢癌は円筒型または茸状を示す症例, または全く胆

<1987年10月14日受理> 別刷請求先: 野口 明宏  
〒409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110 山梨医科大学第1外科

管拡張を示さない合流異常例に認められることが多い事実も指摘されている。そこでこれらの胆道癌の発生に合流異常や拡張症が特別な関係を持つとすれば、両者のいずれが主役であるのか、または相互作用によるものであるのかは全く不明であるが、極めて興味のあるところであり、かつ重要な課題である。

以上の観点から本研究では胆道癌と合流異常、拡張症との関係を知るための一段階として、胆嚢粘膜上皮のDNA合成細胞を標識し、合流異常例の胆嚢粘膜上皮の細胞動態を検索し若干の知見を得たので報告する。

## II. 対象症例および方法

### 1. 対象症例

1986年10月から1987年6月までに山梨医科大学第1外科で施行した胆道系の手術症例のうち、合流異常を伴う胆道疾患は19例、胆道癌12例(うち合流異常、拡張症を伴わないもの8例)、主としてコレステロール胆嚢結石で合流異常を伴わない症例は23例で、これらの症例の中から胆嚢の病理組織学的検索が可能であった以下のB群、C群、D群の41例を本研究の対象症例として検索した。また対照群(A群)として正常な胆嚢粘膜を用いた。

A群: 正常胆嚢症例19例

B群: 胆嚢結石症18例

C群: 胆道癌8例

D群: 合流異常15例

### 2. 対象症例の臨床的検索

#### (1) 膵・胆管合流異常の診断基準

日本膵管胆道合流異常研究会の診断基準(案)に従って診断した。すなわち、合流異常は解剖学的に膵管と胆管が十二指腸乳頭開口部より上流の十二指腸壁外で合流するもの、あるいは膵管と胆管が異常な形で合流する先天性の奇形と考えられる。その診断基準は、1) X線学的診断として、内視鏡的逆行性膵・胆管造影(ERCP)、経皮経肝的胆道造影(PTC)、術中胆道造影などの直接的胆道造影法で、膵管と胆管が、(A): 異常に長い共通管をもって合流する。あるいは(B): 異常な形で合流する。2) 解剖学的診断として、手術または剖検などで膵・胆管合流部が十二指腸壁外に存在するか、または膵管と胆管が異常な形態で合流する。さらに補助診断法として、1) 胆嚢、胆管内に高いアマラーゼ活性を証明すること、または、2) 肝外胆管拡張が認められる場合である。

#### (2) 先天性総胆管拡張症の診断基準

拡張症は胆管内腔の形成期(胎生6週~10週)における形成不全と考えられ、その内腔形成は胆管末端部から始まり肝門部におよぶことから、必ず総胆管の拡張を伴うところの胆管の限局性拡張を示すものである<sup>6)</sup>。またその拡張が、総胆管を越え総肝管より肝側におよぶ症例では、胆嚢管は総胆管との合流部で、その一部の限局性拡張を伴うこと<sup>7)</sup>から、この所見は総肝管より上部胆管に拡張が及ぶ症例の有力な診断根拠とした。そして総胆管、総肝管の限局性拡張例は小児期での発症が多いことから小児型、さらに拡張が左・右肝管・肝内胆管におよぶ症例は成人での発症が多いことから成人型として分類した<sup>7)</sup>。

#### (3) 臨床診断と症例の背景

胆道のX線診断はすべてERCP、PTCおよび術中胆道造影による直接的胆道造影法によって行った。さらに<sup>99m</sup>Tc-HIDAによる胆道シンチグラムは、黄疸の無い症例のうちA群10例、B群18例、C群0例、D群11例に施行した。そしてそれぞれの時間放射能曲線(time activity curve)から十二指腸乳頭部を核種が通過するに要する時間(passing time: P.T.と略)として、核種を静注後、十二指腸第2部への核種の出現開始時間から総胆管末端部への核種の出現開始時間を差引いた値とした<sup>8)</sup>。A群の正常胆嚢粘膜は肝細胞癌の手術症例で、術後に肝動脈塞栓術(TAE)を予定し、胆嚢壊死を防ぐために予防的に胆嚢摘出術を行った16例、および膵癌で膵頭十二指腸切除術を施行した3例の胆嚢で、合流異常は認められず、また胆道系に結石もなく肉眼的に正常な胆嚢を用いた。B群の胆嚢結石症の18例はERCPまたは術中胆道造影によって拡張症および合流異常の存在が否定された症例であり、コレステリン系の胆嚢結石15例、黒色石3例で胆嚢粘膜には組織学的に慢性炎症所見を認めた症例である。C群の胆道癌8例はすべて合流異常および拡張症を伴わない症例で、下部胆管癌2例、中部胆管癌1例、上部胆管癌1例、左肝管癌1例、および胆嚢癌3例である。すべて肝外閉塞性黄疸を伴っていたため2例は減黄処置が施行された後で根治手術が行なわれ、組織診断の確立した症例である。D群の合流異常症例の15例における手術時診断は肝内結石3例、胆管結石5例、胆嚢結石3例、拡張症10例、胆嚢癌4例で、いずれも急性胆嚢炎の所見なく、2例に黄疸を認め、全例待機手術が施行された症例である。

#### 3. 摘出標本の検索

##### (1) BromodeoxyuridineによるDNA合成期細胞

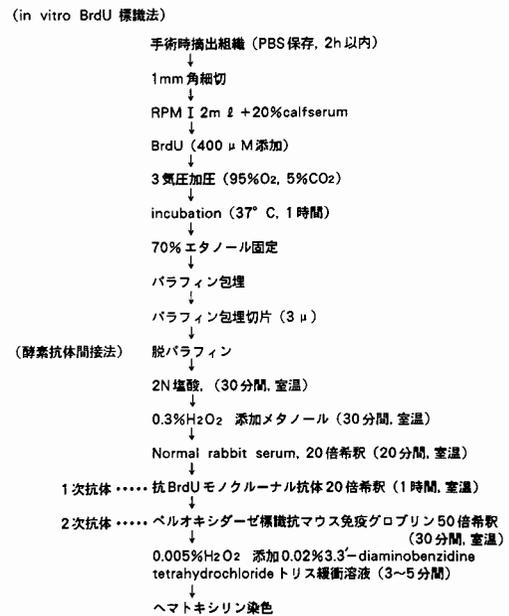
### の標識法の原理とその方法

分裂増殖を繰り返している細胞群の核の DNA を構成する thymidine の analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) を与えると、DNA 合成期 (S 期) にある細胞は新たに合成される DNA 内に BrdU を取り込む。その後これらの細胞の DNA を単鎖にするため、塩酸処理を行い、露出した BrdU と抗 BrdU モノクローナル抗体<sup>9)</sup>を作用させると DNA 内にて特異的に結合する。さらに免疫組織化学的方法を用いて S 期にある細胞、すなわち標識細胞を明瞭に同定しようとするものである<sup>10)11)</sup>。

手術時に摘出された胆嚢、総胆管および胆道癌の新鮮組織を 4℃ に冷却した 0.01M phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) に保存した。2 時間以内に胆嚢、総胆管は、①胆嚢底部、②胆嚢体部、③胆嚢頸部、④総胆管の 4 箇所から、胆道癌では、①癌部、②癌隣接部、③肉眼的正常部の 3 箇所から粘膜を含む組織片を 3~4 個採取し 1mm 角に細切した。この細切片を BrdU (SIGMA 社) を濃度 400 $\mu$ M となるように添加した RPMI 培養液 (GIBCO 社) 2ml に、20% fetal calf serum (Filtron 社) を加えた容量 5ml の小バイアル瓶に移し、密閉後 3 気圧に加圧したガス (95%O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) を 27G 注射針を用いて注入した。37℃ 1 時間 incubation 施行後、バイアル瓶内の気圧低下の無いことを確認して、細切片を PBS で洗浄後 70% エタノールで 2 時間固定し通常のパラフィン包埋を施行した<sup>12)</sup>。3 $\mu$  の薄切切片を作成し、免疫組織化学的方法として抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた酵素抗体間接法<sup>10)11)</sup>を以下の順序で施行した。

脱パラフィン後、2 規定の塩酸に室温にて 30 分間浸して PBS で洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するため、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノールで 30 分間室温処理した後、5% 正常家兎血清で処理した。一次抗体は 20 倍希釈抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton Dickinson 社) を用い、室温で 1 時間反応させた。ついで二次抗体として 50 倍希釈 peroxidase 標識抗マウス IgG (Cappel 社) を用い、室温で 30 分間反応させた後、0.005% 過酸化水素添加 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) トリス緩衝溶液に 5~10 分間浸して発色させた。最後に Mayer の Hematoxylin 染色を行い、全細胞核を淡染した。陰性対照として抗 BrdU 抗体の代わりに正常マウス血清を用い、陽性対照として大腸上皮染色陽性のものを用いた。各処理間は PBS にて洗浄し抗体希釈は 0.1% 仔

図 1 in vitro BrdU 標識法および免疫染色法



牛血清アルブミン加 PBS で行った (図 1)。

#### (2) 標識率 (labeling index: L.I.)

1,000 個以上の胆嚢粘膜の上皮細胞を算出し、その中に含まれる黄褐色の反応色を呈した標識細胞 (S 期細胞) の割合を labeling index % (L.I.%) とし、各視野中最も高い L.I. をもってその部位の L.I. とした。

#### 4. 胆嚢および総胆管壁の病理組織学的検討

免疫染色に使用した切片の 3 $\mu$  の連続薄切切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施行し、合流異常症例の胆嚢粘膜の慢性炎症の程度、化生性変化を中心に病理組織学的に観察し、また BrdU 標識細胞との比較検討を行った。

#### 5. 胆汁中アマラーゼ値の測定

胆嚢内および胆管内胆汁を開腹後速やかに採取し、それぞれ G-5 基質法にてアマラーゼ活性を測定した。

#### 6. 統計学的処理

平均値 ± 標準偏差 (M ± SD) で表現し、n は症例数を表し、統計処理は Kruskal-Wallis 検定ならびに Mann-Whitney 検定によって行い、有意水準は 5% とした。

### III. 成 績

#### 1. 症例の臨床検査成績

##### (1) A 群

正常胆嚢症例 19 例は男性 12 例、女性 7 例で 44 歳から 78 歳、平均 59.7 ± 7.6 歳で、原発性肝癌 8 例、転移性肝

癌 8例ですべて黄疸は認められなかったが、臍頭部癌 3例はいずれも黄疸があり、2例は減黄処置後に手術が施行された。胆道シンチグラムが行われた肝癌10例ではP.T.の平均 $1.2 \pm 1.4$ 分であった。胆嚢中アミラーゼ値はすべて血清中の正常値の上限以下であった。

(2) B群

胆嚢結石18例は男性6例、女性12例で、年齢は35歳から81歳まで、平均 $56.9 \pm 13.2$ 歳であった。胆道シンチグラムによるP.T.は $2.5 \pm 1.4$ 分でA群との間には有意差は認められなかった。胆嚢中のアミラーゼはいずれも血清の正常値の上限以下であった。

(3) C群

8例の胆道癌症例の手術時の所見と切除標本の所見を表1に示した。男性4例、女性4例で56歳から75歳まで平均 $64.8 \pm 5.4$ 歳である。胆石は症例1, 2の胆嚢癌症例の胆嚢内にコレステリン系石が、胆管癌では症例4, 6の胆管内にビリルビンカルシウム石が認められた。

表1 胆道癌 (C群) の病理所見

症例	年齢	性別	腫瘍の占拠部位	胆嚢の肉眼的所見	腫瘍の肉眼型	腫瘍径 (cm)	組織型と分化度	L1 (%)	L2 (%)
(1)	7-9	F	Gf cir	慢性炎症型	浸潤型	4.5×2.8	por	6.2	0
(2)	9-4	M	Gb cir	慢性炎症型	結節浸潤型	5.3×2.4	pap	1.4	0.5
(3)	6-9	F	Gb hep post	慢性炎症型	結節型	4.4×2.7	pap	8.5	3.8
(4)	0-4	F	Bi cir	慢性炎症型	乳頭浸潤型	4.0×2.0	tub 1	8.6	0.8
(5)	1-7	F	Bm cir	慢性炎症型	結節浸潤型	3.3×2.0	tub 1	12.4	—
(6)	2-1	M	Bi cir	慢性炎症型	乳頭型	1.5×1.0	pap	3.7	—
(7)	9-8	M	Bsmc cir	慢性炎症型	結節浸潤型	4.0×3.5	tub 1	4.9	0.1
(8)	8-2	M	Bl cir	慢性炎症型	乳頭型	1.8×1.3	tub 2	6.3	0.3

(胆道癌取扱い規約による)

表2 合流異常症例 (D群) (1986, 10~1987, 6)

症例	年齢	性別	病期	拡張症の分類と胆管径(mm)	脾炎の合併	胆石の有無	合併症	胆道シンチグラム P.T.(分)
(1)	6-8	F	8年	成人型 18	-	コ石 (GB) (H) (CBD)	-	30
(2)	5-9	F	-	成人型 13	-	ビ石 (CBD) (H)	-	1.7
(3)	0-0	M	6年	成人型 18	+	炭酸Ca (GB) (CBD) コ石 (CBD)	-	34
(4)	1-8	F	1年	無	+	コ石 (GB)	-	5.6
(5)	0-1	F	4年	成人型 60	-	—	-	63
(6)	9-2	F	2年	無	-	コ石 (GB)	-	-
(7)	3-2	F	-	小児型 25	-	—	+ (GB)	9.6
(8)	0-1	F	-	成人型 25	-	—	+ (GB)	-
(9)	0-1	F	20年	成人型 17	-	コ石 (GB)	-	-
(10)	0-1	F	50年	成人型 27	-	—	-	-
(11)	7-4	F	-	無	-	—	+ (GB)	6.1
(12)	5-7	F	9ヶ月	無	-	—	+ (GB)	93
(13)	8-8	M	2ヶ月	成人型 25	-	コ石 (GB) (CBD)	-	63
(14)	0-8	M	-	成人型 17	-	ビ石 (CBD) (H)	-	8.1
(15)	1-9	F	2年	無	-	コ石 (GB)	-	4.2

コ石 コレステロール胆石 G B: 胆嚢 P.T.: <sup>99m</sup>Tc-HIDA 静注後の十二指腸  
 ビ石 色素胆石 CBD: 総胆管 乳頭部核種出現開始時間と総胆管末梢部核種出現開始時間の差  
 H: 肝内

(4) D群

合流異常症例15例の臨床成績を表2に示した。男女比は1対4で女性に多く、女性の手術時の平均年齢は $50.3 \pm 19.8$ 歳、男性は $63.0 \pm 6.4$ 歳である。拡張症との併存は10例 (小児型1例, 成人型9例)で、他の5例の胆管径は正常であった。その他の胆道系の併存病変として、肝内結石2例 (いずれも拡張症成人型併存)、胆管結石5例 (拡張症成人型)、胆嚢癌4例 (拡張症成人型1例, 拡張症小児型1例, 結石なし2例, 図2),

図2 合流異常を伴う胆嚢癌(D群, 症例4)の ERCP 像 (矢印は癌部)

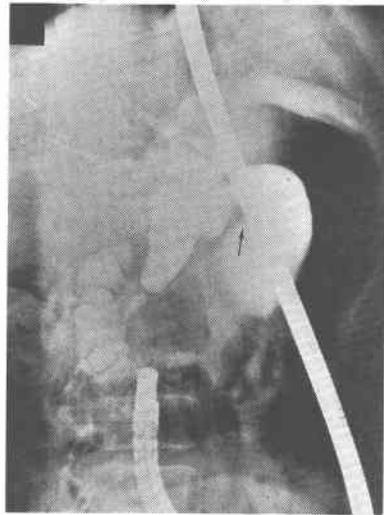
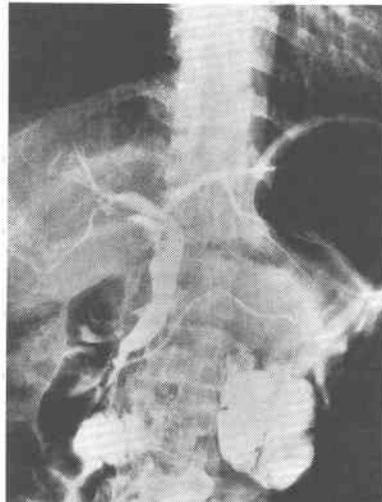


図3 胆嚢結石を伴う合流異常症例 (D群, 症例5) の ERCP 像



胆嚢結石4例(拡張症成人型1例, 非拡張型3例, 図3)である。入院時の主な症状は、胆管結石, 肝内結石および胆嚢結石の併存例では、いずれも胆石による症状であり、2例の拡張症は合流異常によると思われる腹痛と肝外閉塞性黄疸によって訪医し診断された。その他肝内結石の2例と胆嚢癌の3例はいずれも無症状で経過し、いずれも「人間ドック」で発見され精査を受け手術に至ったものである。術前急性膵炎は2例に認められたが症例3では胆石膵炎の診断で経皮経肝的胆道ドレナージ(PTCD)が施行され、症例4では腹痛と血清アマラーゼ値の上昇が一過性に認められたもので、2例とも急性膵炎の症状が消失した後手術が施行された。

胆道シンチグラムの成績では測定した11例のうち拡張症(n=7)のP.T.は $29.9 \pm 25.1$ 分, 非拡張症(n=4)は $6.4 \pm 3.4$ 分で有意の差が認められるが、拡張症のうち胆管炎や肝外閉塞性黄疸を繰り返した症例1, 3, 5, 13のP.T.は $47.5 \pm 18.0$ 分で著しく遅延するが、それ以外の7例のP.T.は $6.4 \pm 2.9$ 分でA群, B群のP.T.に比べ軽度遅延していた。したがってP.T.は拡張症よりも胆道の十二指腸乳頭部通過不良による臨床症状と強い関係を示した。

## 2. 胆道上皮の細胞動態学的検索

### (1) A群(正常胆嚢症例, n=19)

胆嚢粘膜は一層の円柱上皮に被われており、いずれも炎症所見は乏しく、標識細胞の数は胆嚢底部, 体部, 頸部のいずれでも極めて少なく、L.I.は $0 \sim 1.3\%$  ( $0.31 \pm 0.36\%$ )と低値を示した。1%以上のL.I.を示したのは2例あり、1例は膵頭部癌症例で肝外閉塞性黄疸を伴いL.I.は1.3%、他の1例はS状結腸癌の肝転移症例でL.I.は1.0%で、組織学的には2例とも胆嚢粘膜には軽度の慢性炎症が存在したが、他には特記する所見は認めなかった。

### (2) B群(胆嚢結石症例, n=18)

主としてコレステロール胆石を持つ胆嚢結石症例の胆嚢壁には、すべて組織学的にリンパ球浸潤、あるいは形質細胞浸潤、fibrosisなどの慢性炎症所見が認められた。胆嚢粘膜上皮の標識細胞の数は胆嚢のいずれの部位でも少なく、 $0 \sim 2\%$  ( $0.54 \pm 0.60\%$ )であった(図4)。そして1%以上のL.I.を示したのは3例あり、黒色石の1例と、コ系石の2例に認められ、そのうちの1例に石灰乳胆汁が認められた。

### (3) C群(胆道癌症例, n=8)

表1に示すように胆嚢癌3例と胆管癌5例の癌部の

標識率はいずれの症例でも1%以上の値を示し、1.4%から12.4%までの値( $6.50 \pm 3.38\%$ )であった(図5)。なおこれら8例の胆嚢の非癌部の粘膜上皮のL.I.は症例3の胆嚢癌症例で3.8%を示したが、その他の5例(症例5は20年前に胆摘, 症例6は胆嚢粘膜が大部分剝脱していたため標識不能)はすべて1%以下であり、正常胆管形態の胆嚢癌と胆管癌との間で胆嚢粘膜のL.I.に差は認められなかった。また胆道癌の組織型はすべて乳頭状・管状腺癌であったが、組織型および分化度と標識細胞の割合との間には相関を認めなかった。

### (4) D群(合流異常症例, n=15)

15例の合流異常例の胆嚢の底部, 体部および頸部の粘膜上皮のL.I.を表3に示した。同一症例では各部位のL.I.の値は種々で差が認められ、必ずしも胆嚢全体のL.I.の値が同一傾向を示すものではないことが明らかとなった。しかし症例5, 9, 10のL.I.は底部, 体部, 頸部ともにA群, B群の平均値より高い値を示す症例も認められた(図6)。胆嚢癌併存の4例を除いた11例の各部位におけるL.I.の平均値を比較すると、底部は $3.0 \pm 4.9\%$ 、体部は $1.3 \pm 2.1\%$ および頸部 $1.2 \pm 1.6\%$ で、いずれの部位の平均値もA群, B群の平均値より高値を示したが、各部位では有意差は認められなかった。一方、各症例の底部, 体部, 頸部のL.I.のうち最も高い値をその症例のL.I.とすると、D群のL.I.の平均値は $3.57 \pm 4.56\%$ でA群( $p < 0.05$ )、およびB群( $p < 0.05$ )よりも有意に高い値であった。図7に各群のそれぞれの症例の最高値を示した。

この図7にみられるように1%以上の標識率を示したのはA群では2例(10.5%)、B群3例(16.7%)、C群の非癌部胆嚢粘膜では1例(12.5%)であり、D群は9例(60%)と多く合流異常症例では胆嚢粘膜上皮のS期細胞の数が増加している傾向が示唆された。

またD群の胆嚢癌併存例の癌部ならびに非癌部胆嚢粘膜上皮のL.I.をC群の非合流異常胆道癌の癌部および胆嚢粘膜上皮のL.I.と比較すると、C群の癌部平均値は $6.50 \pm 3.38\%$ 、D群の癌部は $8.50 \pm 1.27\%$ で差は認められなかった。非癌部胆嚢粘膜を比較するとC群 $0.92 \pm 1.44\%$ であるのに対してD群では $3.33 \pm 2.96\%$ と有意( $p < 0.05$ )に高く、同じ胆道癌でも合流異常症例の非癌部の胆嚢粘膜ではS期細胞の増加が認められた。

## 3. 胆汁中アマラーゼ値

術中採取しえた胆嚢内胆汁中アマラーゼ値はA群

図4 42歳, 女性, 胆嚢結石(B群), 胆嚢粘膜上皮は単層の円柱上皮に覆れており, 標識細胞(矢印)の数は極めてわずかである, L.I.は0.7%, 抗 BrdU 免疫染色, ×200

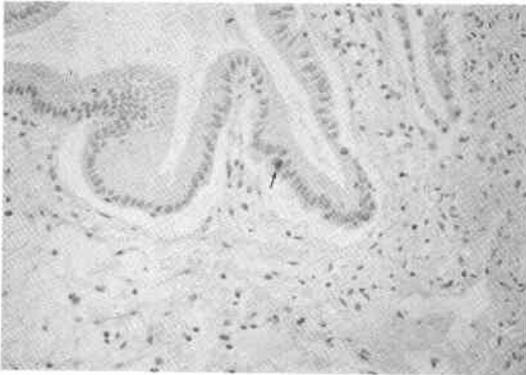


図5 45歳男性, 胆嚢癌(C群, 症例3)よく分化した乳頭管状腺癌における標識細胞の数は著明に増加している, L.I.は8.5%, 抗 BrdU 免疫染色, ×200

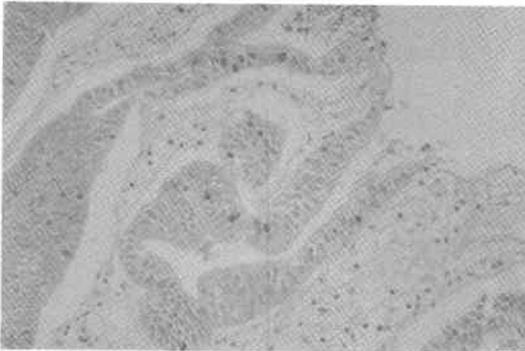


図6 9歳女性, 合流異常(D群, 症例5)胆嚢粘膜上皮に多数の標識細胞が散在性に認められる, L.I.は5.5%, 抗 BrdU 免疫染色, ×200

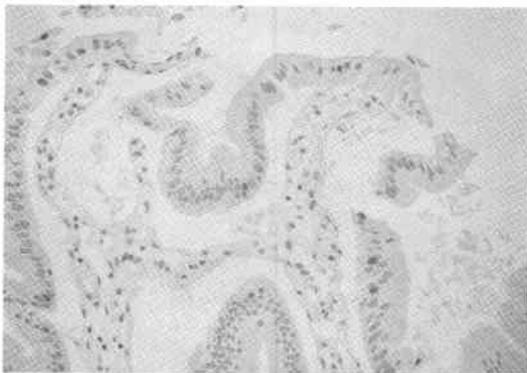
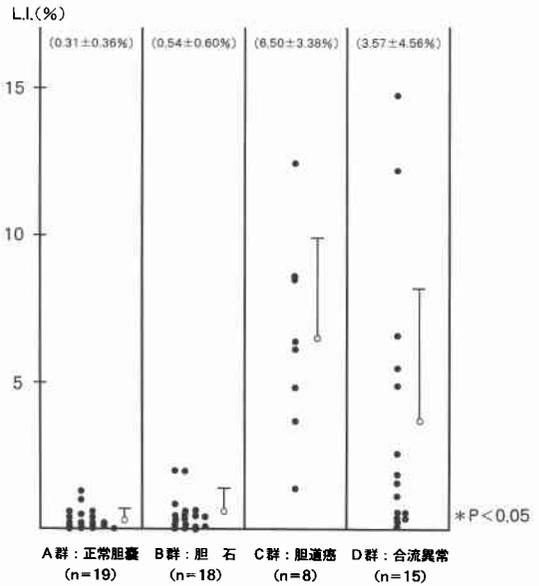


図7 胆道上皮の標識率



の10例では6~43(27±10)Somogyi unit/dlで, B群15例では8~164(65±47)Somogyi unit/dlであった。一方合流異常例では表3のように14例中8例は245~98,400Somogyi unit/dlと高値を示し, 全体として30~98,400(25,666±35,907)Somogyi unit/dlと, A群およびB群に比べ有意に高値であった。術中採取した胆嚢の胆汁アミラーゼ値とL.I.の値の間には特に相関は認められなかったが, 拡張症と併存している症例に胆汁中アミラーゼの高い値を示す傾向が認められた。

4. 合流異常症例の胆嚢粘膜の組織学的所見

D群の合流異常症例の非癌部胆嚢粘膜の病理組織学的所見を表3に示した。いずれも種々の程度の慢性胆嚢炎の所見が認められた。慢性胆嚢炎に伴う過形成変化, 異型性, および化生性変化についてみると, 過形成の変化を示す症例は認められず, 異型性は癌併存例の1例に認められた。化生性変化について検討すると15例中8例(53.3%)に偽幽門腺が, 4例(26.7%)に杯細胞が, 1例(6.7%)にPaneth細胞が認められたが扁平上皮化生は認められなかった。BrdU標識細胞との対比を施行したが, 偽幽門腺, 杯細胞, Paneth細胞にはBrdUの取り込みが認められず, 化生性変化と標識率とは相関が認められなかった(図8)。

IV. 考 察

第8回日本膵管胆道合流異常研究会(1985年, 名古

図8 32歳女性, 合流異常 (D群, 症例9)

A: 偽幽門化生を示す。(矢印)HE, ×200, B: 同部位には BrdU の取り込みが認められない。抗 BrdU 免疫染色×200

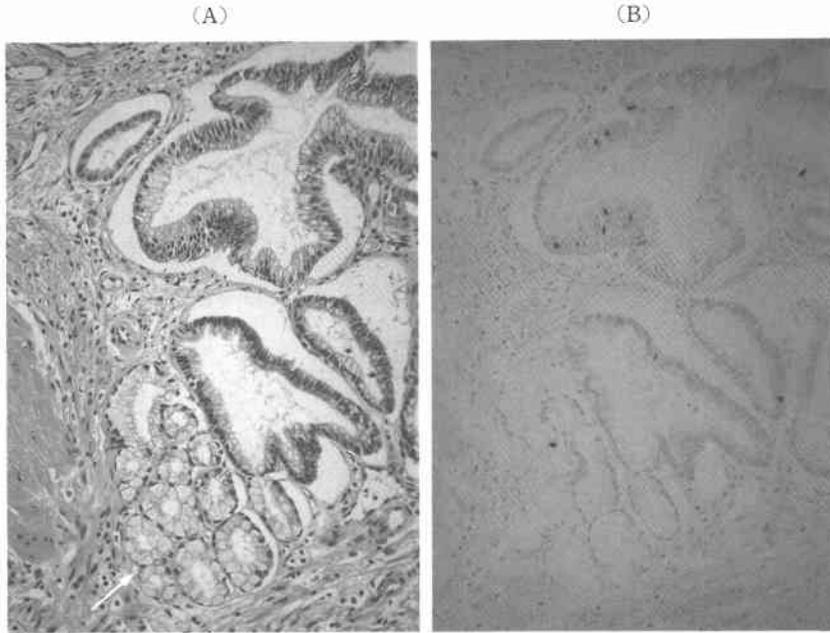


表3 合流異常症例 (D群) の胆嚢粘膜の組織学的所見, 胆汁アミラーゼ値および Labeling Index

症例	年齢	性別	胆汁アミラーゼ値 (Somogyi unit)		BrdU Labeling Index (%)				慢性胆嚢炎	過形成	異型性	化生性変化				
			GB	CBD	底部	体部	頸部	癌部				杯細胞	Paneth細胞	扁平上皮	偽幽門腺	
(1)	6-8-2	38	F	30	10	14.8	0.2	0		+	-	-	-	+	-	-
(2)	5-9-3	37	F	46	26	0	0.6	0.2		卅	-	-	-	-	-	+
(3)	0-0-0	58	M	-	245	0.3	0.1	2.6		卅	-	-	+	-	-	+
(4)	1-8-7	49	F	64	-	-	0	0.3		+	-	-	-	-	-	-
(5)	0-1-1	9	F	45160	39950	1.3	4.5	5.5		+	-	-	-	-	-	-
(6)	9-2-3	44	F	124	22	1.6	0.1	0.2		+	-	-	-	-	-	-
(7)	3-2-3	67	F	49215	206000	4.9	-	-	10.1	卅	-	-	+	-	-	+
(8)	0-1-2	74	F	14300	11900	-	6.7	-	7.0	卅	-	-	-	-	-	+
(9)	0-1-3	32	F	98400	1002000	12.2	1.6	2.8		+	-	-	卅	-	-	+
(10)	0-1-4	61	F	56641	56148	0.5	1.8	0.9		+	-	-	-	-	-	卅
(11)	7-4-4	74	F	14	-	-	-	1.1	8.3	+	-	+	-	-	-	-
(12)	5-7-0	77	F	48	25	0.6	-	-	8.6	卅	-	-	-	-	-	-
(13)	8-8-0	72	M	12	16	0	0	0		卅	-	-	-	-	-	+
(14)	0-8-2	59	M	1237	544	0.5	0	0		+	-	-	-	-	-	-
(15)	1-9-2	41	F	248	-	0	0	0.4		卅	-	-	+	-	-	+

慢性胆嚢炎 +: リンパ球, 形質細胞浸潤, および fibrosis  
 卅: "  
 卅: "

軽度 GB: 胆嚢  
 中等度 CBD: 総胆管  
 高度

屋)において, わが国における膵・胆管合流異常と胆道癌の関係に関する全国集計が行われ, その結果を「膵管胆道合流異常症例における胆道癌に関するアンケート調査」(以下「集計報告」と略)として報告された。すなわち, 全国の主要50施設において1955年から1959年までの5年間に各施設の独自の診断基準で診断され

た569例の合流異常症例が集計された。そのうち胆道癌の併存は131例(胆嚢癌93例, 胆管癌31例, 原発不明7例)である。同時に集計された同期間内の合流異常を伴わない胆嚢癌は1,402例(胆嚢癌689例, 胆管癌703例, 原発不明胆道癌10例)であり, すべての合流異常症に占める胆道癌の割合を単純に計算すると23.0%とな

る。この集計で合流異常を伴わない胆道癌は同期間内における胆道系手術例の非合流異常症例に占める割合として求めると11.7%であることから、合流異常を伴う胆道癌の割合が高いことが示されている。

また合流異常症例のうち拡張症が併存する症例と胆道癌との関係についての集計結果では、拡張症の併存例は569例の合流異常症例のうち477例(不明12例)で、さらに胆道癌を伴うのは71例(胆嚢癌45例、胆管癌26例、拡張症の併存の有無が不明5例)である。すなわち、拡張症を伴う合流異常例では胆管癌と胆嚢癌が、ともに正常な胆道形態例よりも高い頻度を示しているが、拡張症を伴わない合流異常例では胆管癌は5%と低いのに対して、胆嚢癌は52%と異常に高い値が報告されている。この報告結果は、胆道癌と合流異常ならびに拡張症との因果関係を検索するうえで、極めて重要な問題を提起したものである。

しかし合流異常と拡張症は先天的な胆道の形成異常であろうとみなす点では異論がないものの、これら胆道の形成異常を持つ症例がすべて臨床症状を発現するものではなく、無症状に数十年を経過している症例が多く存在することも明らかになってきた<sup>13)</sup>。したがって、これら胆道形成異常の実数を把握することは不可能であり、今回の「集計報告」における合流異常例は何らかの病識を持った症例であり、この集計報告における合流異常例の母数は実数を示すものではない。したがって合流異常に併存する胆道癌の割合は実態よりもかなり高頻度となっていることは容易に推定されることである。しかし合流異常と拡張症が示す特異な胆道形態と癌の併存は、臨床上極めて印象的であるため、その因果関係について検討されるのは自然のなりゆきであろう。

まず Irwin<sup>1)</sup>や戸谷<sup>2)</sup>によって報告された拡張症に併存した胆管癌は、すべて拡張胆管壁からの発癌例であり、拡張胆管の底部と主幹管との間の細い胆管様の導管やいわゆる共通管からの発癌例の報告は1例もない。したがって癌が周囲臓器に浸潤し、腫瘤形成、疼痛、黄疸などの症状が出て初めて発見された症例が大部分であり、根治切除例は極めて少ない。一方「集計報告」でみられるように、胆嚢癌で合流異常を伴うものは、拡張症を伴わない症例が多いことが示されている。また自験例でも、非拡張症例および円筒形や茸状を示す形の多い成人型拡張症に多い結果となっている。以上のことは胆管癌では拡張症が、胆嚢癌では合流異常が前面に出ている印象を受ける。ところで拡張

症と合流異常は発生学的には異なった機序で生じたものと推定されている<sup>13)~16)</sup>。しかし、拡張症の大部分は合流異常を伴っているが、合流異常のなかには拡張症を伴わない症例がかなりを占めることも知られてきた。そこで拡張症、合流異常と胆道癌の因果関係を論ずる場合、胆汁、膵液の流れや停滞の状態とともに拡張症においては、その胆管壁と胆嚢壁側の因子の関与をも考慮する必要がある。

Babbitt<sup>3)</sup>は合流異常を胆管拡張の原因と考え、その機序として合流異常では Oddi 括約筋作用が合流部におよばないと考え総胆管内へ膵液の逆流が容易に起こり、活性化膵液によって胆管壁が障害を受けるものと推定した。現在ではこの活性化膵液の胆管壁への影響は胆道癌の発生の重要因子とみなす方向に考え方が移ってきた。すなわち実験的にも合流異常のモデルでは、胆汁中にトリプシンやエラスターゼの活性化が証明されており<sup>17)</sup>、さらに膵液中の phospholipase A<sub>2</sub>によって胆汁中の lecithin が強力な細胞毒である lysolecithin に分解されたり<sup>18)</sup>、胆汁による phospholipase A<sub>2</sub>の活性化<sup>19)</sup>が明らかとなり、それらの胆道癌発生への関与が示唆されている。また臨床的にも合流異常を伴った拡張症の胆管胆汁中の胆汁酸分画の分析から deoxychol 酸分画の増加が認められ、拡張胆管内での胆汁うっ滞の結果、二次胆汁酸への移行が起こったものと考え、deoxychol 酸による発癌の可能性が想定されている<sup>20)</sup>。一方、慢性胆嚢炎の手術例の全割による組織学的検索で、胆嚢癌との関係を胆嚢上皮の変化からとらえようとする研究も盛んである。すなわち化生性変化を胆嚢癌の背景因子として重要視する報告<sup>21)22)</sup>として、胃と同様に胆嚢上皮の粘液腺化生、杯細胞化生および Paneth 様細胞の出現などが指摘されている。しかしながらこのような胆嚢の粘膜上皮の化生性変化は加齢による一過程とする意見も<sup>23)</sup>存在する。またこの化生性変化とともに幼犬を用いた実験例でも認められるのは胆道粘膜の過形成性変化とさらに最近では異型性の所見である<sup>24)</sup>。そしてこれらの所見を合流異常、拡張症にもとづく特徴的な変化と考え、hyperplasia → atypical hyperplasia → carcinoma への過程を推定している。以上のような研究が合流異常ならびに拡張症と胆道癌の因果関係を論じた報告の主なものと考えられる。しかしこれらの研究結果は胆道粘膜の癌化に直接つながってくるものではなく、いずれも発癌への過程は推論の域を出るものではない。本研究ではこれらの研究とは少しく視点をかえ、合流異常症

例と合流異常が認められない症例について、その胆嚢粘膜上皮のS期細胞を標識し、その標識率を比較検討して、胆嚢癌への過程を細胞動態の面から解析しようとするものである。

一般に一個の細胞は、分裂後休止期( $G_1$ 期)→DNA合成期(S期)→分裂前休止期( $G_2$ 期)→分裂期(M期)→ $G_1$ 期へという周期をもって細胞回転が行なわれていると考えられている。そしてこの細胞周期は成長解析学の面からとらえることは可能で $^3H$ -thymidineを用いてS期細胞を標識し、その標識率を求めることはその細胞の増殖能を表す一つの方法である<sup>25)</sup>。しかしthymidineはその取扱いが繁雑であることとラジオ・オートグラフを用いる不便さから、近年thymidineのanalogueであるBrdUが繁用されるようになった<sup>26)</sup>。BrdUはすでに脳腫瘍や頸部腫瘍ではその治療方針の決定の有力な手段となっているために、全身投与が許されているが、胆道癌に対する今回の研究目的からは、胆嚢への局所投与またはin vitroでの標識法のみが許されるものと考えられる。現在in vitroでの方法が既に確立されているため<sup>27)</sup>に本研究結果はBrdUの標識はすべてin vitroで行ったものである。

正常な胆嚢粘膜(A群)では胆嚢の底部、体部および頸部のいずれでもその標識率は低く、そのうち最も高い部位のL.I.の平均値は $0.31 \pm 0.36\%$ と低値を示した。また同様にG群の胆嚢結石をもつ慢性胆嚢炎症例の胆嚢粘膜でも $0.54 \pm 0.60$ と1%以下の低値を示し、A群とB群の間に有意の差はみられなかった。ただB群の胆嚢結石群では18例中3例に1%以上の高値を示す症例が含まれていたのは、胆嚢結石と胆嚢癌の因果関係を示唆するものかも知れない。

一方D群の合流異常例では胆嚢粘膜のL.I.の平均値は $3.57 \pm 4.56\%$ で、A群およびB群に比べて極めて高い値であり、この値は胆嚢癌および胆管癌の癌部の平均値に近い標識率であった。また合流異常症例の胆嚢粘膜は底部、体部および頸部のいずれの部位でも一様にL.I.が高いわけではなく、部分的に高値を示す症例が多いことが示されたが、その部位には一定の傾向は認めなかった。しかし合流異常を伴う4例の胆嚢癌症例の非癌部胆嚢粘膜のL.I.は、C群の合流異常を伴わない胆道癌の非癌部胆嚢粘膜のL.I.よりも高値を示す傾向がみられたことは興味深い。すなわち、DNA合成期(S期)にある細胞は合流異常例の胆嚢粘膜上皮では非合流異常例よりは増加しているのみならず、さらにS期細胞の極めて多い部位が胆嚢のいずれかの部

位に集中して存在することが示された。そしてその高いL.I.の平均値は癌部のL.I.に近い値を示すところから、この部位では細胞回転が異常に亢進している可能性が推測される<sup>28)</sup>。

次に合流異常症例の胆嚢粘膜上皮のS期細胞の増加をきたす因子について考察する。年齢構成はA群、B群およびD群はいずれも平均年齢は50歳台で差を認めないがD群の胆道癌症例は64歳であるものの非癌部胆嚢粘膜のL.I.の比較から、年齢は胆嚢粘膜のS期細胞の値には影響ないものと考えられた。拡張症の併存の有無とL.I.の関係をみるとD群の15例中10例に拡張症を伴っており、その胆嚢粘膜のL.I.の平均値は $4.9 \pm 5.1\%$ であるのに対して、拡張症を伴わない5症例のL.I.の平均値は $0.8 \pm 0.5\%$ で拡張症の胆嚢粘膜標識率が高い傾向が認められた。しかし少数例のため有意差はない。また胆嚢粘膜の病理組織学的所見では両者に著しい差異は認められていない。ただ拡張症の場合、胆汁の胆管内長期停滞が胆道シンチグラムのうえて観察<sup>8)</sup>されているので、胆嚢内でも同様の状態が存在することが推測される。そしてこの胆汁中には膵液の逆流による高いアマラーゼ活性も証明されていることから、胆道内胆汁うっ滞状態は胆嚢粘膜上皮の細胞動態に影響を及ぼす因子である可能性は否定し得ない。次に胆汁の胆管から十二指腸への通過状態を観察した胆道シンチグラムのP.T.の値とL.I.の最高値との間には特に相関を認めなかったが、P.T.は臨床症状と関係を示した。

また胆嚢内アマラーゼ値についてみると、A群、B群ではいずれもその全例に血清アマラーゼの正常値を越える値は認められなかったが、D群の合流異常例では15例中8例に高いアマラーゼ活性が術中採取胆汁に認められている。しかし他の7例では術中の胆汁中に証明されなかったが、これら合流異常の機構上の問題が関連していることもあり得るであろう。胆汁中の高いアマラーゼ活性はD群に特異的な因子であり、胆嚢粘膜上皮のDNA合成期細胞の増加に大きな役割を果たしている可能性がある。

一方、胆嚢粘膜の病理組織所見は、他の報告と同様、杯細胞やPaneth細胞そして偽幽門腺などの化生性変化が認められたが、過形成や異型性を示す所見は少なく、特に4例の癌併存例の非癌部は他の症例の胆嚢粘膜の所見と特に差は認められなかった。また図7に示したように化生性変化を示す細胞にBrdUが取り込まれている所見は認められなかった。しかし胆嚢の化

生性変化が胃における癌との関係のように、胆嚢癌の背景と考えるか、加齢による変化と考えるかその解明は重要な課題である。イヌを用いた合流異常の実験モデルで、これら化生性変化や過形成変化が得られている<sup>29)</sup>ことや50日程度の短期間では胆嚢粘膜のS期細胞は極めて少ないが3年、5年と長期になれば高い標識率を示すことが報告<sup>30)</sup>されている。これらの基礎研究から発癌に関与するとみられる因子の規定のうえで重要な結果が得られつつある。

合流異常という病態が胆嚢癌の背景因子と考える根拠が幾つか提示されてきたが、発癌機構に関与する因子は単一でも、また単純なものでもない。著者は今回細胞レベルでの解析で合流異常と胆嚢癌発癌の関係を推定するうえで興味ある結果が得られたので報告した。

## V. 結 語

1) 15例の合流異常症例の胆嚢粘膜上皮におけるDNA合成期細胞(S期細胞)をBrdU抗体によって標識し、その標識率を正常例の胆嚢粘膜、および主にコレステロール胆石を持つ胆嚢結石症の値と比較した。

2) 合流異常の胆嚢粘膜ではS期細胞の標識率(3.57±4.56%)が正常例などの対照群の値(0.31±0.34%)より増加し、胆嚢癌の値(6.50±3.38%)に近い値を示した。

3) これは合流異常症例の胆嚢粘膜上皮の細胞回転が亢進している可能性を示唆するものと考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を頂いた山梨医科大学菅原克彦副学長ならびに東京医科大学外科早田義博教授に深甚なる謝意を捧げる。また、直接御指導を賜った山梨医科大学第1外科松本由朗助教授、同病理須田耕一助教授に深謝するとともに御協力を頂いた諸先生方に心から感謝いたします。この研究は厚生省がん研究助成金、胆嚢・胆管がんの集学的治療に関する研究班の助成費によった。

本論文の要旨は第30回日本消化器外科学会総会(1987年7月東京)において発表した。

## 文 献

- 1) Irwin ST, Morison JE: Congenital cyst of the common bile duct containing stone and undergo cancerous change. *Br J Surg* 32: 319-321, 1944
- 2) Todai T, Tabuchi K, Watanabe Y et al: Carcinoma arising in the wall of congenital bile duct cysts. *Cancer* 44: 1134-1141, 1979
- 3) Babbitt DP, Starshak RJ, Clemett AR: Choledochal cyst: A concept of etiology. *AJR* 119: 57-62, 1973
- 4) Kinoshita H, Nagata E, Hirohashi K: Carcinoma of the gallbladder with an anomalous connection between the choledochus and the pancreatic duct-report of 10 cases and review of the literature in Japan. *Cancer* 54: 762-769, 1984
- 5) 日本膵管胆道合流異常研究会: 膵・胆管合流異常の診断基準(案). *胆と膵* 8: 115-118, 1987
- 6) Alonso-Lej F, Rever WB, Pessagno DJ: Congenital choledochal cyst with a report of 2 an analysis of 94 cases. *Int Abstracts Surg* 108: 1-28, 1959
- 7) Matsumoto Y, Uchida K, Honjo I et al: Clinicopathologic classification of congenital cystic dilatation of the common bile duct. *Am J Surg* 134: 569-574, 1977
- 8) 藤井秀樹, 松本由朗, 菅原克彦ほか: 肝・胆道シンチグラフィによる十二指腸乳頭部機能の解析. *日本胆・膵生理機能研究会誌* 2: 9-15, 1986
- 9) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475, 1982
- 10) Dolbear F, Gratzner H, Pallavicini MG et al: Flowcytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci* 80: 5573-5577, 1983
- 11) Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T et al: Bromodeoxyuridine in tumor and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 72: 1844-1850, 1983
- 12) Sasaki K, Takahashi M: Preservation of cell cycle characteristics in solis tumor in vitro. *Cancer Res* 40: 4810-4812, 1980
- 13) 松本由朗: 胆道の形成異常とその臨床. *日消外会誌* 19: 614-623, 1986
- 14) Akin JT: Extrahepatic biliary ducts and the gallbladder Edited by Gray SW, Skandalakis JE: Embryology for Surgeons. Firstt edition. Saunders, Philadelphia, 1972, p229-262
- 15) 大井 至: 発生学的背景. 古味信彦編. 膵管胆道合流異常. 消化器病セミナー. 27, へるす出版, 東京, 1987, p15-26
- 16) 松本由朗, 藤井秀樹, 菅原克彦ほか: 膵管胆道合流異常の定義と診断基準に関する検討. *日消病会誌* 82: 270-276, 1985
- 17) 大川治夫, 澤口重徳, 山崎洋次: 膵管胆管合流異常モデルの研究 II. 胆汁内逆流膵蛋白分解酵素の活性化について. *日小児外会誌* 18: 185-191, 1982
- 18) Neiderhiser DH, Morningster WA, Roth HP: Absorption of lecithin and klysolecithin by the gallbladder. *J Lab Clin Med* 82: 891-897, 1973

- 19) 小倉嘉文：膵液胆道内逆流の実験的研究—特に胆道系に及ぼす効果について。日外会誌 84：141—150, 1983
- 20) 船曳孝彦, 杉上勝美, 落合正宏ほか：膵管胆道合流異常における胆汁中胆汁酸分画の検討—発癌との関連を中心として—。胆道 1：77—83, 1987
- 21) 平井貞朗：摘出胆嚢における化生の臨床病理学的検討—特に腸嚢癌組織発生の背景として。日消外会誌 13：35—44, 1980
- 22) 松峯敬夫：胆嚢癌の発生母地—特に胆嚢粘膜上皮化生に関連して。胆と膵 2：1607—1614, 1981
- 23) Kozuka S, Hachiska K： Incidence by age and sex of intestinal metaplasia in the gallbladder. Hum Pathol 15：779—784, 1984
- 24) 鈴木不二彦, 松本道男, 須田耕一ほか：先天性総胆管, 胆嚢の病理組織学的検討—特に前癌病変との関連について。胆道 1：69—76, 1987
- 25) Johnson HA, Haymaker WE, Rubin JR et al： A radioautographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after the in vivo uptake of tritiated thymidine. Cancer 13：636—642, 1960
- 26) 長島 正, 星野孝夫：脳腫瘍成長解析のあゆみと展望, 特にBromouridine単クローン抗体による迅速解析法について。脳神外科 12：1007—1018, 1984
- 27) 多田利彦, 児玉哲郎, 渡辺 昌ほか：Brd U (Bromodeoxyuridine)モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用。医のあゆみ 135：510—513, 1984
- 28) Johnson HA： Some problems associated with the histological study of cell proliferation kinetics. Cytologica Tokyo 26：32—41, 1961
- 29) Miyano T, Sururuga K, Shimomura H et al： Choledochopancreatic elongated common channel disorders. J Pediatr Surg 19：165—170, 1984
- 30) 須田耕一, 徳丸忠昭, 小山敏雄ほか：Brd U (Bromodeoxyuridine)モノクローナル抗体を利用した膵胆管合流異常における胆道上皮の細胞動態解析。日消病会誌 83：131, 1986