

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
竹下 篤	主査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 勝 健 一 副査 教授 森 浩 志
主論文題名 Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis (胆汁鬱滞およびその回復期の肝臓のリモデリングにおける肥満細胞の役割:アポトーシスの関与について)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>肝臓では、肥満細胞は種々の mediator を分泌し、線維芽細胞および星細胞による細胞外マトリックスの産生を促進することによって線維化と関係していると考えられている。肥満細胞の増加はアルコール性肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、肝内胆汁鬱滞を引き起こす疾患などの際にみられ、肥満細胞数と線維化の程度との間には正の相関が認められるという報告もある。一方、胆管結紮あるいは四塩化炭素投与による肝の線維化は肥満細胞欠損ラットにおいても発生し、その線維化の程度は正常ラットよりも強いという報告もあり、肥満細胞は線維化と関係していないと最近では考えられるようになってきている。しかし、種々の肝疾患において肥満細胞が肝内に集簇しているのは事実であり、その役割は依然不明である。そこで、肝臓における肥満細胞集簇の意義を明らかにするために、胆汁鬱滞とその回復期における肥満細胞の集簇と胆管、胆管上皮細胞のアポトーシス、および膠原線維の増減との関係をラットを用いて検討した。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>225 匹のウイスター系雄性ラット(100g)を用いた。エーテル麻酔下に上腹部を切開し、総胆管結紮群 200 匹は総胆管を絹糸で一重結紮した。対照群 25 匹には絹糸を胆管周囲に一旦は通し、結紮せずに引き抜いた。術後尿中ビリルビン値を毎日測定し、再開通時期を決定した(術後約 14 日目に約 10%のラットに総胆管の自然再開通が認められた)。再開通群は再開通後 3、4、7、14 日目に、非再開通群は術後 4、10、14、21、28 日目に再開腹し(各群 5 匹)、下大静脈より採血後肝臓を摘出した。</p> <p>摘出した肝臓は、10%緩衝ホルマリンで 18 時間固定した後、パラフィン包埋し、HE 染色、鍍銀染色、アザン染色およびトルイジンブルー染色を行った。なお、肝臓の一部から電子顕微鏡観察用標本も作製した。肥満細胞は 200 倍拡大で 50 視野中の数を計測し、単位肝組織および門脈域当たりの肥満細胞数を算出した。門脈域/肝組織比はポイントカウンティング法(40 倍拡大で 50 視野、計 6050 ポイント)を用いて算出した。</p> <p>アポトーシスは Apop Tag キット(Oncor 社)を用いて TUNEL 法にて検出した。胆管上皮細胞のアポトーシスは、門脈域を 400 倍拡大で 50 ヶ所計測し、門脈域 1 mm²当たりの胆管上皮細胞のアポトーシス数を算出した。</p>	

《成績》

対照群では、ごく少量の結合織が門脈域内の門脈枝、肝動脈枝および胆管の周囲と肝静脈枝の周囲に認められた。肥満細胞は中型から大型の門脈域の結合織内に少数認められたが、小さな門脈域にはみられなかった。胆管上皮細胞のアポトーシスはほとんど認められなかった。

胆管結紮群では、肝門部の胆管の拡張、黄疸および褐色尿が認められた。肝重量／体重比は胆管結紮 10 日後まで徐々に増加し、それ以後は変化なかった。血清総ビリルビン値は胆管結紮後急激に上昇し、高値を維持した。組織学的には、門脈域は胆管の増生と疎な膠原線維の増加によって拡大し続けた。肥満細胞は既存の胆管周囲、特に毛細血管網周囲に集簇して認められたが、新生胆管周囲には少量の肥満細胞しかみられなかった。肝組織 1mm² 当たりの肥満細胞数は、胆管結紮後 4 日目まではあまり増加せず、4～14 日目では著明に増加したが、14 日目以降は増加しなくなった。門脈域 1 mm² 当たりの肥満細胞数は 28 日目まで増加は認められなかった。門脈域 1 mm² 当たりのアポトーシスに陥った胆管上皮細胞数は胆管結紮後徐々に増加した。

胆管再開通後、肝内胆汁鬱滞、黄疸および褐色尿は速やかに改善し、肝重量／体重比は徐々に減少した。血清総ビリルビン値は著減した。組織学的には、増生していた胆管は速やかに消失し、増生胆管周囲にあった疎な膠原線維は密に束ねられ、再開通後 14 日目には拡大していた門脈域はほぼ結紮前の大きさにまで縮小した。肥満細胞は胆管周囲、特に毛細血管網周囲にみられた。肝組織および門脈域 1 mm² 当たりの肥満細胞数は著増し、再開通後 4 日目にピークに達した後急速に減少した。門脈域 1 mm² 当たりのアポトーシスに陥った胆管上皮細胞数は再開通後一過性に著増し、再開通後 4 日目にピークに達した後急速に減少した。この変動は肥満細胞のそれと平行していた。

《考察と結論》

本実験は以下のことを明らかにした。

- (1) 胆管結紮後、その初期においては、門脈域に胆管増生に伴う膠原線維の増加がみられたが、肥満細胞は増加していなかった。胆管結紮後 14 日目以降も門脈域は胆管増生および膠原線維の増加を伴って拡大し続けたが、門脈域の単位面積当たりの肥満細胞は増加しなかった。
- (2) 総胆管再開通後、増生胆管および膠原線維は急速に減少したにもかかわらず、肥満細胞は一過性に急激に増加した。
- (3) 胆管上皮細胞のアポトーシスは肥満細胞の増減と平行しており、特に胆管再開通後では増生胆管の胆管上皮細胞のアポトーシスと肥満細胞とが一致して一過性に著増した。
- (4) 肥満細胞の集簇は胆管周囲、特に毛細血管網周囲に認められた。

これらの事実は、胆汁鬱滞性肝疾患における門脈域の膠原線維の増減は胆管の増減に伴うものであり、胆管周囲に集簇している肥満細胞は膠原線維の増減と直接的な関係にはなく、胆管の増減と関係していることを示唆している。また、胆管周囲の毛細血管網周囲に集簇した肥満細胞は、ヒスタミンやエイコサノイドなど種々の血管作動因子を分泌することによって、増生した胆管への血流を阻害して胆管上皮細胞を低酸素状態に陥れ、胆管上皮細胞のアポトーシスを惹起すると考えられる。本研究は、胆汁鬱滞性肝疾患では、門脈域に集簇した肥満細胞は胆管上皮細胞のアポトーシスを介する増生胆管の消失および膠原線維の減少にかかわっていることを示唆している。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	竹 下 篤
論文審査担当者		主 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 森 浩 志	
主論文題名 Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis (胆汁鬱滞およびその回復期の肝臓のリモデリングにおける肥満細胞の役割: アポトーシスの関与 について)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は、種々の肝疾患における肥満細胞の肝内集簇の意義を明らかにするために、胆管結紮ラットを用いて、胆汁鬱滞とその回復期における肥満細胞の集簇と胆管、胆管上皮細胞のアポトーシスおよび膠原線維の増減との関係を検討し、以下の知見を得ている。</p> <p>(1) 胆管結紮後、その初期においては、門脈域に胆管増生に伴う膠原線維の増加がみられたが、肥満細胞は増加していなかった。胆管結紮後 14 日目以降も門脈域は胆管増生および膠原線維の増加を伴って拡大し続けたが、門脈域の単位面積当りの肥満細胞は増加しなかった。</p> <p>(2) 総胆管再開通後、増生胆管および膠原線維は急速に減少したにもかかわらず、肥満細胞は一過性に急激に増加した。</p> <p>(3) 胆管上皮細胞のアポトーシスは肥満細胞の増減と平行しており、特に胆管再開通後では増生胆管の胆管上皮細胞のアポトーシスと肥満細胞とが一致して一過性に著増した。</p> <p>(4) 肥満細胞の集簇は胆管周囲、特に毛細血管網周囲に認められた。</p> <p>本研究は、胆汁鬱滞性肝疾患において、門脈域に集簇した肥満細胞が胆管上皮細胞のアポトーシスを介して増生胆管の消失および膠原線維の減少にかかわっていることを示唆している。これは肝臓に出現する肥満細胞の意義を解明する上で重要な知見であると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Experimental and Toxicologic Pathology 56(4-5): 273-280, 2005</p>			