

p<0.05) このことから OPN 濃度は supersaturation level よりも、結晶の増大あるいは凝集に関与し抑制効果をもつ可能性が示唆された。臨床的には、OPN 濃度は尿中結晶が準安定領域から成長・凝集していく飽和領域になっていくリスクを予測する因子の一つとなり得るのではないかと結論できた。

以上より主査と副主査は規定の各種審査試験、ならびに博士学位論文公聴会（平成 19 年 6 月 18 日）を実施し、慎重に審査した結果、本論文は博士（医学）学位論文に十分値すると判断された。

氏 名	なか い あき ひろ 中 井 昭 宏
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 9 7 2 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	An immunohistochemical study of Osteopontin in hepatolithiasis formation (肝内結石症形成におけるオステオポンチン発現 の免疫組織化学的研究)
論文審査委員 (主 査)	教 授 大 柳 治 正
(副主査)	教 授 工 藤 正 俊
(副主査)	教 授 東 野 英 明

論文内容の要旨

【研究の背景と目的】

肝内結石症では肝内胆管上皮や胆管壁内外の胆管附属腺が分泌する Mucin glycoprotein が結石の核やマトリックスとして働くと考えられている。一方 osteopontin (OPN) は noncollagenous acidic bone matrix glycoprotein でカルシウム結合能を持つ。本研究は肝内結石形成における肝内胆管上皮や胆管壁内外の胆管附属腺が分泌する OPN の役割について検討した。

【方法】

21 人の肝切除を受けた肝内結石症患者の切除標本を用いて EnVisionTM 法を用いた免疫組織化学的染色を行った。

【結果】

免疫組織化学的染色の結果 OPN は肝内結石症を持つ肝内胆管上皮や胆管壁内外の胆管附属腺のみならず肝内結石にも高度に発現していた。肝内胆管上皮内に浸潤するマクロファージにも OPN の発現が高度に認められた。また肝内胆管内や胆管上皮近傍に存在する変性した胆管上皮にも OPN の発現が認められた。肝内結石には低倍率では lamellar pattern に、また高倍率では reticular pattern の OPN の発現が認められた。肝内結石の中心部分には large nestlike membranous structure が観察された。

【考察】

これらの結果より肝内胆管上皮のみならず胆管壁内外の胆管附属腺が分泌する OPN は肝内結石形成の初期には core protein としてまた後期には matrix protein として働いていると考えられた。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2008 年 11 月 日 公表予定	出版物名
	公 表 内 容	Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery
	全 文	2008 年 11 月 日 発行予定

論文審査結果の要旨

研究の背景と目的

肝内結石症の全胆石症における頻度が各国から報告されており、地域による著しい差異を認める。肝内結石症は、日本を含む東アジアに頻度が高く、類似した人種的背景を持つ場合でも大きな地域差が認められるのも特徴である。台湾では全胆石症例の 20%以上に肝内結石を認めるのに対し、韓国では 10.8%、香港では 3.1%、シンガポールでは 1.7%と報告されている。中国国内でも北京では 9.2%なのに対し北西部の沈陽では 21.2%と報告されている。西欧諸国ではその頻度は 1%以下であり、殆どはアジアからの移民症例と推定されている。ラテンアメリカでは 2-7%と比較的高頻度とも報告されている。その治療には肝切除術を含む外科的治療や経皮経肝胆道鏡 (PTCS) が施行されている。その 5 年以内結石再発率は、肝切除術 5.3%、PTCS 9.6%と比較的高く、治療には難渋し難病(特定疾患)にも指定されている。

肝内結石の成因には先天性・遺伝性因子よりはむしろ食事内容や衛生環境といった後天性因子が関与している可能性が高いと考えられている。これまでビリルビンカルシウム石では、胆道感染、ムチン、胆汁成分あるいは胆管の病理形態学的変化などが検討の対象となってきた。成因の 1 つとされているムチンは肝内胆管上皮や胆管壁内外の胆管附属腺から分泌され、この Mucin glycoprotein が結石の核やマトリックスとして働くと考えられている。

一方同じ glycoprotein の一種である osteopontin(OPN)は、トロンビン切断部位の N 末端側にはヒドロキシアパタイトと結合するアスパラギン酸に富む領域があり、C 末端側にはカルシウム結合部位が存在する。また、シアル酸化、リン酸化されており、トロンビン切断部位の近傍にアルギニン、グリシン、アスパラギン酸からなる RGD 細胞接着配列を有する糖タンパク質でもある。その働きは細胞接着や細胞内情報伝達など多岐にわたる。正常組織における OPN の発現は Brown らにより報告されているが、

肝胆系では胆道上皮ならびに胆嚢上皮に発現が認められる。

OPN と肝疾患の関連については Seth らが肝臓癌、肝炎、肝硬変で OPN 血中濃度が上昇する、また Nakanuma らは肝臓の線維化にも関与する可能性や、原発性胆汁性肝硬変症で胆汁中の OPN 分泌増加を指摘している。癌関連では Oates らは胆管炎と胆管癌で胆汁中 OPN 濃度が上昇すると報告されている。しかし、結石症と OPN の関連について論じたものはない。従って本研究では肝内結石形成における OPN の役割を肝内胆管上皮や胆管壁内外の胆管附属腺、また胆管上皮に浸潤するマクロファージに着目し検討した。

#### 対象と方法

当科で経験した肝内結石症患者の中で肝切除を受けた 21 症例を対象とした。コントロール症例としては肝細胞癌で肝切除が施行された症例の中で結石をはじめ肝炎、肝硬変等の疾患がない 9 症例の非癌領域の肝細胞を使用した。

症例の外科的切除標本である肝臓と結石に対して抗 OPN 抗体を用いて EnVision™ 法に従った免疫組織化学的染色を行った。発色は DAB を用いた。抗 OPN 抗体は 1000 倍希釈で使用し、結石の染色は Nakamura らの方法に準じた。肝内結石は通常の薄切より厚い 8 μm に薄切し、その後 EDTA でビリルビンの脱色を行った。脱色後の手法は EnVision™ 法に従って行った。

#### 結果

免疫組織化学的染色の結果 OPN は肝内結石症を持つ肝内胆管上皮や胆管壁内外の胆管附属腺のみならず肝内結石にも高度に発現していた。胆管上皮や胆管壁内外の胆管附属腺では主に管腔側にコントロール症例と比較して高度に発現が認められた。また肝内胆管上皮内に浸潤するマクロファージにも OPN の発現が認められた。胆管細胞 100 個辺りに浸潤する OPN 陽性マクロファ

ージカウントしたところ、コントロール症例と比較して有意に対数のマクロファージの浸潤が肝内結石症症例では観察された。

また肝内胆管内や胆管上皮近傍に存在する変性した胆管上皮にも OPN の発現が認められた。肝内結石には低倍率では年輪状の構造にまた高倍率では網状の膜様構造の OPN の発現が認められた。肝内結石の中心部分には変性剥離した胆管上皮に認められるような large nestlike membranous structure が観察された。

#### 考察

得られた結果より肝内結石成因を経時的に推察すると、なんらかの原因で、肝内胆管の管腔内に存在する変性・剥離した OPN 陽性上皮細胞が結石の core となる。これに感染等の要因が加わることにより胆管上皮細胞から分泌される OPN が、core の周囲でマトリックスとしての役割を果たし、結石が増大する。結石が増大することにより、本来肝内結石症のもう一つの物理的要因である肝内胆管の局所的な狭窄と相俟って胆管の閉塞をきたし、胆汁の鬱滞ならびに更なる感染を引き起こす。繰り返す感染の消退は胆管上皮ならびに壁内外の胆管腺の増殖ならびに胆管上皮へのマクロファージの浸潤を引き起こす。これらの増殖した腺上皮ならびにマクロファージから分泌される OPN が更に結石の増大を引き起こすと考えた。つまり肝内胆管上皮のみならず胆管壁内外の胆管附属腺が分泌する OPN は肝内結石形成の初期には core protein としてまた後期には matrix protein として働いていると考えられた。

従って本研究は肝内結石症成因に Osteopontin が大きな役割を占めることを明らかにした学問的に価値の高い仕事であり、また今後の治療法開発方向を示唆する臨床的にも意義深いものであり、学位論文に値すると考えられる。