

The presence and distribution of plasma proteins in the intrahepatic biliary duct epithelium and periductal glandular epithelium in a variety of liver diseases, and their significance
-immunohistochemical and immunoelectron microscopical study of albumin, fibrinogen, α 1-antitrypsin, secretory component, IgG, IgA, IgM, and joining chain- Plasma proteins in the intrahepatic biliary duct and periductal glandular epithelium

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
URL	所属:
	http://hdl.handle.net/2297/7896

肝疾患における肝内胆管上皮および肝内胆管付属腺 上皮における各種血漿蛋白の動向とその意義

—albumin, fibrinogen, α_1 -antitrypsin, secretory component,
IgG, IgA, IgM, J鎖の光顕・電顕による免疫組織化学的観察—

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任: 太田五六教授)

杉 浦 仁

(昭和61年9月3日受付)

肝内胆管および付属腺上皮の機能を明らかにする目的で、これらの上皮における各種血漿蛋白の局在を、光顕・電顕による免疫組織化学的方法により検討した。対象は、各種肝疾患患者の生検肝である。peroxidase-antiperoxidase法により、secretory component (SC) は、正常および疾患肝の殆どすべての症例の胆管において、そのすべての上皮の細胞質に陽性に染色された。免疫電顕法により、SCは、basolateralの細胞膜、核膜、粗面小胞体、Golgi装置、小空胞に局在しており、胆管上皮による産生像と考えられた。IgA, IgM, joining chain (J鎖) も胆管上皮にかなりの頻度に陽性で、電顕的には、basolateralの細胞膜と小空胞に局在を認めた。従って、polymerのIgA, IgMは、胆管上皮の細胞膜においてSCと結合し、胆汁中へ輸送・分泌されると考えられた。albumin, fibrinogen, α_1 -antitrypsin (AAT) は、肝内結石症、肝外閉塞性黄疸、原発性胆汁性肝硬変の85~100%の症例の胆管上皮に、飛び石状に染色されたが、正常肝では33~47%の陽性率であった。これらの蛋白は、電顕的に、胆管上皮の細胞質にびまん性に認められた。胆道系疾患において、胆管上皮の透過性が亢進した結果、これらの血漿蛋白が胆汁より吸収されたものと考えられた。胆管付属腺上皮の光顕・電顕的免疫染色による検索でも、胆管上皮と同様の結果であった: SCは、結石肝・正常肝の殆ど全例に陽性、IgA, IgM, J鎖もかなりの症例に陽性で、上皮内の局在も胆管上皮におけるのと同様であった。従って、胆管付属腺上皮もまたSCを産生し、IgA, IgMを胆汁中へ分泌し、胆管閉塞性疾患群における胆道感染に対する局所免疫能の発現に、大きく寄与していると考えられた。

Key words 肝内胆管, 胆管付属腺, secretory component, 血漿蛋白, 酵素抗体法

ヒト胆汁中には、albumin, α_1 -antitrypsin (AAT), IgG, IgA などの血漿蛋白が存在し^{1)~8)}、IgA に関しては、肝細胞または細胞管を介して胆汁中に排泄されることが、示唆されている^{9)~15)}。しかし、より太い胆管上皮にも IgA の排泄能があるのかという点については未知であり、また、他の血漿蛋白の胆管上皮内出現についての報告もない。ところで、太い胆管には生理的に付属腺が存在し、少数の壁内粘液腺と多数の壁外漿液腺・粘液腺から、ムチンと、いわゆる漿液とが分泌

されることがわかっている¹⁶⁾。そして肝内結石症(HL)では、これらの付属腺組織の著しい増生がおこり、多量の分泌液が胆汁中に排泄されることもわかってきた¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、いわゆる漿液とは何かについては、全く不明である。そこで本研究では、肝内胆管と付属腺の上皮の機能を明らかにする目的で、肝疾患患者の生検肝における各種血漿蛋白の局在を検討した。この結果、分泌される漿液の一部について新しい知見が得られ、また胆管閉塞性疾患群において、これら上皮の胆

Abbreviations: AAT, α_1 -antitrypsin; AH, acute viral hepatitis; CAH, chronic active hepatitis; CIH, chronic inactive hepatitis; EHC, extrahepatic cholestasis; Fab', antigen-binding fragment; HL, hepatolithiasis; HRP, horseradish peroxidase; NL, normal liver;

汁成分吸収能を示唆する新知見が得られたので、報告する。

材料および方法

I. 材 料

材料としてヒト生検肝 125 例を用いた。針または外科的生検肝で、臨床および病理組織学的に急性ウイルス性肝炎 (AH) と診断された 10 例、慢性非活動性肝炎 (CIH) 15 例、慢性活動性肝炎 (CAH) 16 例、肝硬変 (LC) 15 例、HL 13 例、肝外閉塞性黄疸 (EHC) 11 例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 30 例を用い、対照として 15 例の正常肝 (NL) を用いた。また、上記の HL 13 例と死後 1 時間以内の正常ヒト剖検肝 6 例の肝門部について、肝内胆管付属腺上皮の各種染色を行った。

以上の肝組織は、採取後直ちに、氷冷した periodate-lysine-paraformaldehyde 液¹⁸⁾ (PLP 液) または 10% ホルマリン液にて 4~12 時間固定後、パラフィン包埋切片とした。また PLP 液固定した症例の一部は、免疫電顕用とした¹⁹⁾。すなわち、固定後 10%, 15%, 20% のショ糖加 PBS と 5% グリセリン加 PBS にてそれぞれ洗浄した後、OCT コンパウンド (Lab-Tek products, Naperville, IL) に包埋、 -80°C の n-ヘキサン中で急速に凍結し、クリオスタット (Bright 社) で切片を作製した。また剖検肝の一部は、型の如くグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで二重固定の後エボン包埋し、付属腺について電顕的に観察した。

II. 方 法

1. 光顕的酵素抗体法

抗ヒト secretory component (SC) ウサギ血清、抗ヒト AAT ウサギ血清 (以上 Behring 社)、抗ヒト albumin-, fibrinogen-, IgG-, IgA, IgM ウサギ血清 (以上 DAKO 社)、抗ヒト joining chain (J 鎖) ウサギ血清 (Nordic 社) を 1 次抗体として用いた。2 次抗体には抗ウサギ IgG ブタ血清を、またウサギにて作製した peroxidase-antiperoxidase complex (PAP complex) (以上 DAKO 社) を、ヒト正常肝のアセトン粉末で吸収して用いた。対照として、正常家兎血清と正常ブタ血清 (以上 DAKO 社) を用いた。

1) PAP 法

PAP 法は、Sternberger ら²⁰⁾、Taylor ら²¹⁾の方法に従った。すなわち、脱パラフィン切片の内因性ペルオ

キシダーゼ活性を阻止し²²⁾²³⁾、10% ブタ血清で処理してから、1 次抗体 (50~400 倍希釈) を 1 時間、2 次抗体 (40 倍希釈) を 30 分間、PAP complex (100 倍希釈) を 30 分間、順次室温で反応させた。その後、0.005% 過酸化水素加 3, 3'-ジアミノベンチジン溶液中で発色させ²⁴⁾、ヘマトキシリンで核染色した。反応特異性は、1 次抗体、2 次抗体、PAP complex の各々を PBS で置換、または、1 次抗体を 50 倍希釈した正常家兎血清で置換することにより確認した。そして、明らかな褐色調を呈する細胞を反応陽性とした。なお、J 鎖の染色においては、6M 尿素を含む 0.1M グリシン・塩酸緩衝液 (pH 3.2) にて 4°C 、12 時間処理した後に、抗体と反応させた²⁵⁾²⁶⁾。

2) 二重染色法²⁷⁾

上記 PAP 法を 1 回施行後、0.1M グリシン・塩酸緩衝液 (pH 2.2) で充分洗浄し、再び 1 次抗体、2 次抗体、PAP complex を反応させ、4-Cl-I-ナフトールにて紫色に発色させ、2 種類の抗原の局在を検討した。

3) 蛍光抗体法²⁸⁾²⁹⁾

脱パラフィン切片を 0.1% プロナーゼ溶液で 10 分間処理し、次に 1 次抗体を 30 分間、蛍光色素標識 2 次抗体を 30 分間、 37°C で反応させ、蛍光顕微鏡 (Zeiss, 標準型) で検鏡した。

2. 免疫電顕法³⁰⁾

上記の 1 次抗体を pepsin 消化し、2-メルカプトエタノールとヨードアセトアミドを反応させて、antigen-binding fragment (Fab') を得た³¹⁾。次に Wilson ら³²⁾に従い、horseradish peroxidase (Sigma 社) を標識した。PLP 液固定の凍結切片を、上記抗体と 4°C 、12~24 時間反応後、2% グルタルアルデヒド液にて 4°C 、15 分間再固定し、incomplete Graham-Karnovsky 液に 4°C 、30 分間浸漬後、過酸化水素水を加えて発色した。次に 2% 四酸化オスミウム液にて後固定し、エボン包埋した。その超薄切片を、無染色にて日本電子 JEM100B 型または日立 H-300 型電子顕微鏡にて観察した。

また通常の電顕用超薄切片を、黒住ら³³⁾によるメテナミン銀染色を用いて粘液多糖体の glycol 基を染色し、電顕的粘液染色とした。

3. 統計学的検定法

各血漿蛋白の陽性率は、 χ^2 テストおよび Fisher の直接確率計算法を用いて推計学的に検討し、危険率 5% 以下を有意差ありと判断した。

J chain, joining chain; LC, liver cirrhosis; PAP, peroxidase-antiperoxidase; PBC, primary biliary cirrhosis; PBS, phosphate buffered saline; PLP, periodate-lysine-paraformaldehyde; SC, secretory component.

成 績

I. 肝内胆管上皮の光顕免疫組織化学的観察

主として小葉間胆管における各種血漿蛋白の染色パターンには、次の3型がみられた：1. 全体型(図1)、ひとつの小葉間胆管において、すべての上皮の細胞質がびまん性に染まるもの、2. 飛び石型(図2)、ひと

つの小葉間胆管において、飛び石状にいくつかの上皮のみ、その細胞質がびまん性に陽性のもの、3. 混合型(図3)、ひとつの小葉間胆管において、すべての上皮の細胞質が陽性で、そのうちのいくつかが飛び石状にさらに強く染まる型。そして1症例において、この3型のうちで最も優位を占める型をもって、その症例の染色型とした。なお蛍光抗体法では、混合型と全体型

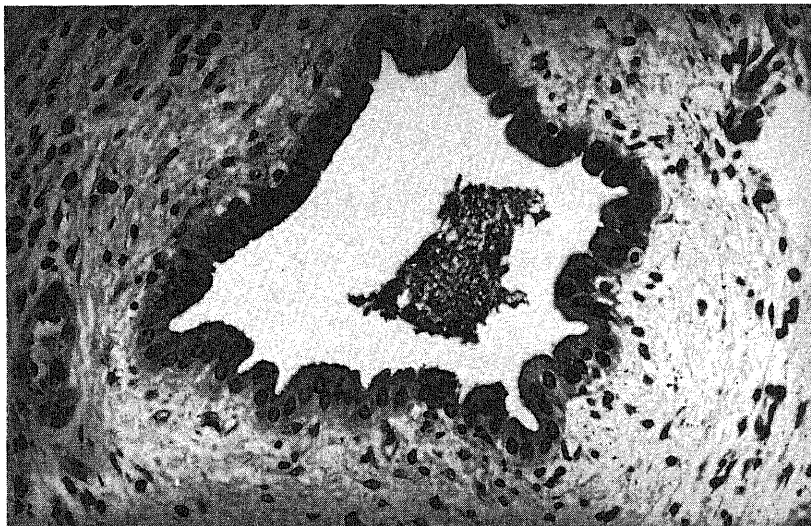


Fig. 1. Interlobular bile duct of liver with hepatolithiasis. All of the epithelial cells show positive staining for secretory component (all cell-positive type). Peroxidase-antiperoxidase counterstained with hematoxylin, $\times 300$.

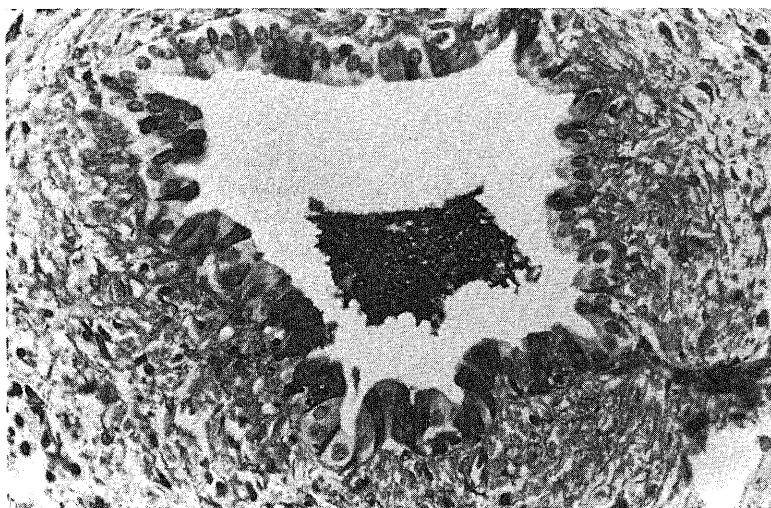


Fig. 2. Serial section of the same case as shown on Fig. 1. Many of the epithelial cells show positive staining for albumin (many cell-positive type). Peroxidase-antiperoxidase counterstained with hematoxylin, $\times 300$.

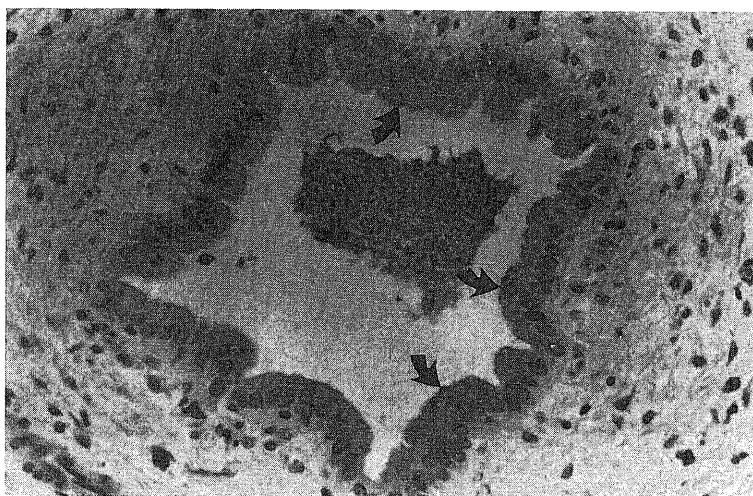


Fig. 3. Serial section of the same case as shown on Fig. 1. All of the epithelial cells show positive staining for IgA, and some of them (↓) are more preferential in staining intensity (mixed type). Peroxidase-anti-peroxidase counterstained with hematoxylin, $\times 300$.

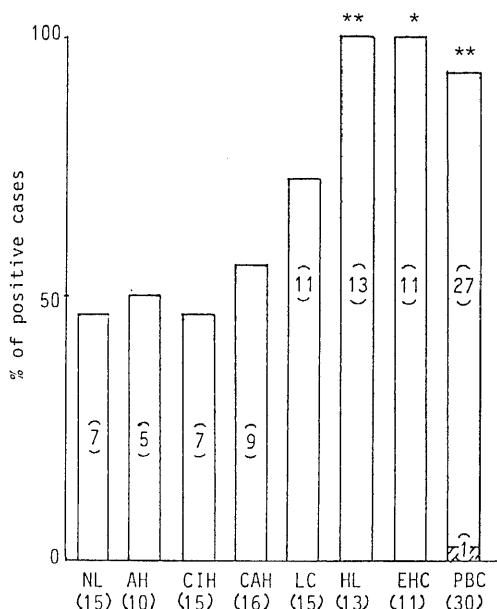


Fig. 4. Incidence of positive cases and types of staining pattern of albumin in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers. Staining pattern: $\square$, many cell-positive type; |||| , all cell-positive type.

Abbreviations: NL, normal liver; AH, acute viral hepatitis; CIH, chronic inactive hepatitis; CAH, chronic active hepatitis; LC, liver cirrhosis; HL, hepatolithiasis; EHC, extrahepatic cholestasis; PBC, primary biliary cirrhosis.

(): Number of cases examined. $\circ$: Number of positive cases. *, $0.01 < P < 0.05$, **, $0.001 < P < 0.01$ vs. NL.

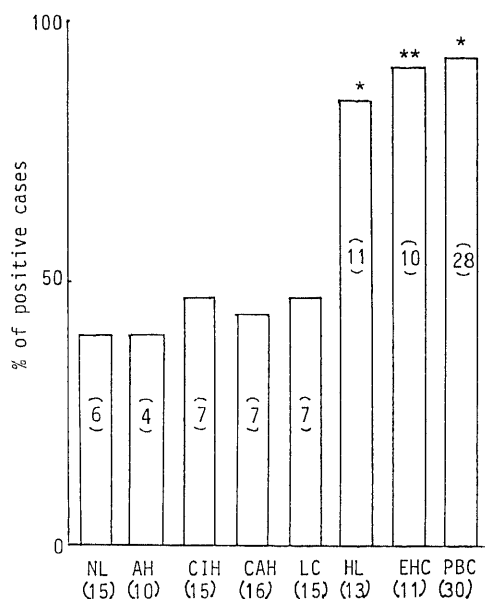


Fig. 5. Incidence of positive cases and types of staining pattern of fibrinogen in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers. Staining pattern: $\square$, many cell-positive type. Abbreviations: The same as illustrated on Fig. 4. *, $0.01 < P < 0.05$, **, $P < 0.001$ vs. NL.

との区別をなしえなかった。

1. 肝疾患別の血漿蛋白陽性頻度と染色型

1) albumin, fibrinogen, AAT, IgG

小葉間胆管上皮における albumin 陽性症例の頻度は、NL 47%, AH 50%, CIH 47%, CAH 56%, LC 73%, HL 100%, EHC 100%, PBC 90%であった(図4)。つまり、HL, EHC, PBCの肝に高率であり、NLとの間にそれぞれ有意差が認められた。その染色型は、PBCの1例を除き、すべての症例で飛び石型優位であった。

fibrinogen, AAT も、albumin と同様の陽性頻度を示した(図5, 6)。すなわち、HL と EHC, PBC に高率で、いずれも NL との間に有意差が認められた。染色型も、AAT の少数例を除く大部分の症例で、飛び石型優位であった。

これに反して IgG は、対象の 47~69%の症例に陽性で、対照と各疾患群の間に有意差はなかった(図7)。しかし染色型は、飛び石型優位の症例が殆どであった。

2) SC, IgA, IgM, J 鎖

小葉間胆管において、SC は、NL を含めて 75~100%の症例に陽性で、NL と各疾患群との間に有

意差はなかった(図8)。染色型は全体型優位の症例が殆どで、染色性も強かった(図1)。

IgA は、同じく NL を含めて各疾患群とも 67~100%の症例に陽性で、各群の間に有意差はなかった(図9)。その染色型は、各疾患ごとに飛び石型、全体型、混合型が種々の割合にみられた。

IgM は 47~77%, J 鎖は 40~73%の症例に陽性で、IgA と同様、各群の間に有意差はなく、またその染色型は 3 型ともみられるものが多く、一定の傾向を認めなかった(図10, 11)。つまり IgA, IgM, J 鎖の染色パターンは、全体として多様である点に特色があった。

3) 同一細胞における複数抗原の検出

EHC の 8 例について連続切片を作製し、二重染色を行ない、飛び石型に染まった胆管において、陽性細胞総数に対する複数抗原陽性細胞数の比を求めた。albumin と fibrinogen が同時に陽性の細胞は、陽性細胞総数の 25%、albumin と AAT では 21%、albumin と IgG では 22%、albumin と IgA では 17%と、いずれも低値であった。つまり飛び石型を示す胆管では、複数蛋白陽性細胞がみられたが、単一蛋白陽性細胞数よりもはるかに低率であった。

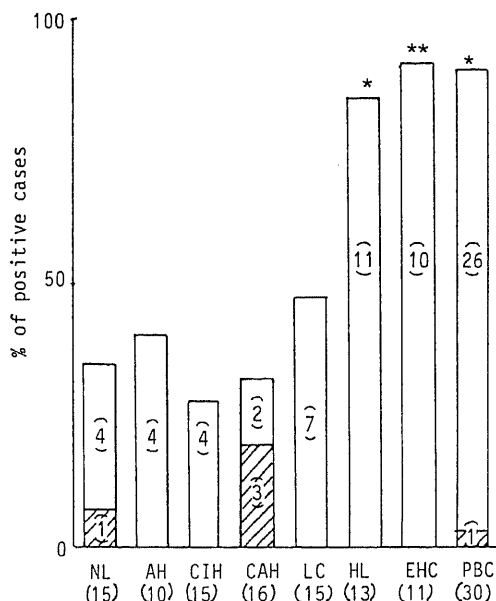


Fig. 6. Incidence of positive cases and types of staining pattern of α_1 -antitrypsin in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers.

Staining pattern: $\square$, many cell-positive type; hatched , all cell-positive type.

Abbreviations: The same as illustrated on Fig. 4.

4. *, $0.01 < P < 0.05$, **, $P < 0.001$ vs. NL.

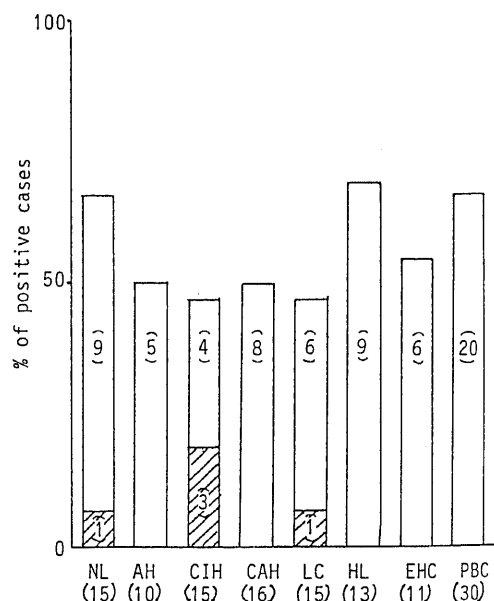


Fig. 7. Incidence of positive cases and types of staining pattern of IgG in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers.

Staining pattern: $\square$, many cell-positive type; hatched , all cell-positive type.

Abbreviations: The same as illustrated on Fig. 4.

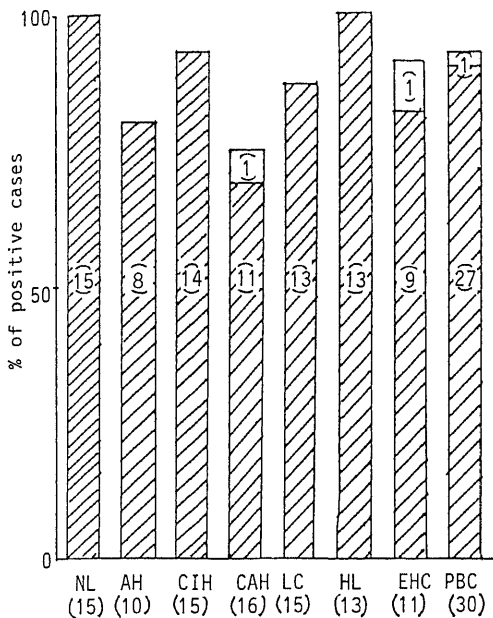


Fig. 8. Incidence of positive cases and types of staining pattern of secretory component in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers.

Staining pattern: □, many cell-positive type; ▨, mixed type; ▩, all cell-positive type.

Abbreviations: The same as illustrated on Fig. 4.

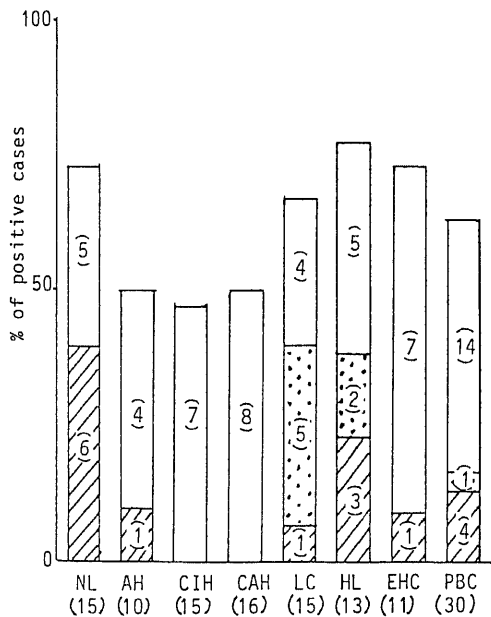


Fig. 10. Incidence of positive cases and types of staining pattern of IgM in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers.

Staining pattern: □, many cell-positive type; ▨, mixed type; ▩, all cell-positive type.

Abbreviations: The same as illustrated on Fig. 4.

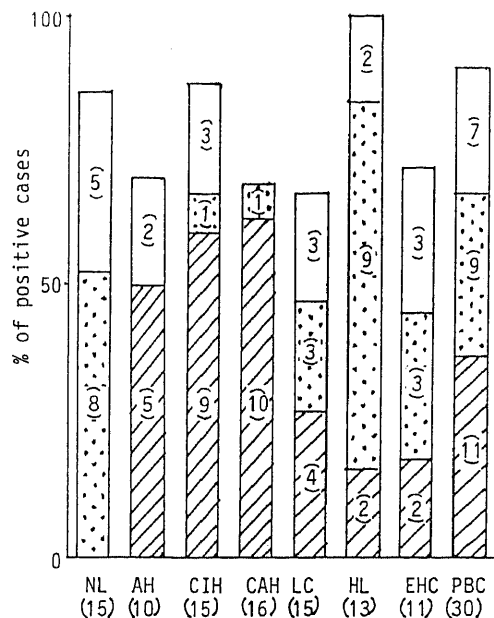


Fig. 9. Incidence of positive cases and types of staining pattern of IgA in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers.

Staining pattern: □, many cell-positive type; ▨, mixed type; ▩, all cell-positive type.

Abbreviations: The same as illustrated on Fig. 4.

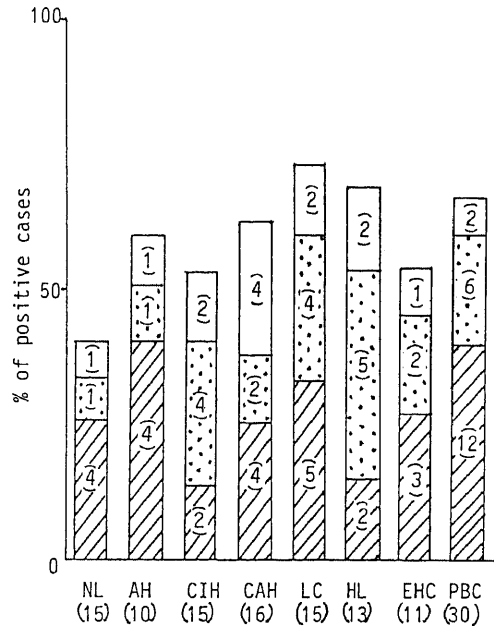


Fig. 11. Incidence of positive cases and types of staining pattern of joining chain in the intrahepatic biliary epithelium in normal and diseased livers.

Staining pattern: □, many cell-positive type; ▨, mixed type; ▩, all cell-positive type.

Abbreviations: The same as illustrated on Fig. 4.

II. 肝内胆管上皮の電顕的免疫組織化学的観察

免疫電顕法により小葉間胆管上皮における各種血漿蛋白の局在をみると、次の3型に分類された：1. 膜型(図12)、胆管上皮の、主として細胞膜に反応陽性物質が局在するもの、2. 細胞質型(図13, 14)、胆管上

皮のミトコンドリア、小胞体、Golgi装置を除く細胞質に、反応陽性物質がびまん性に認められるもので、細胞膜や核膜は陰性のもの、3. 膜・細胞質型(図15)、胆管上皮の細胞膜と上述の細胞質とが、同時に陽性となるもの。そしてこれら3型のうちで最も優位を占め

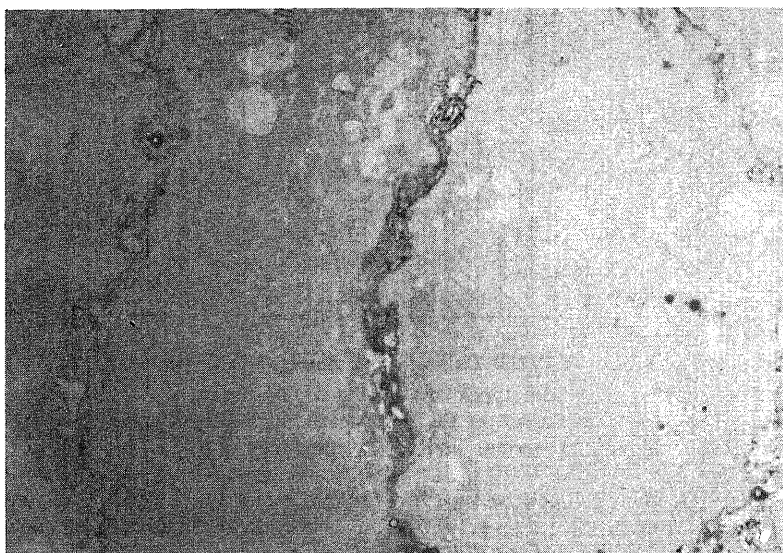


Fig. 12. Interlobular biliary epithelium of normal liver. The basolateral plasma membranes and the small vesicles of the epithelial cells are positive for IgA (membranous type). Immunoelectron microscopy, $\times 7,800$.

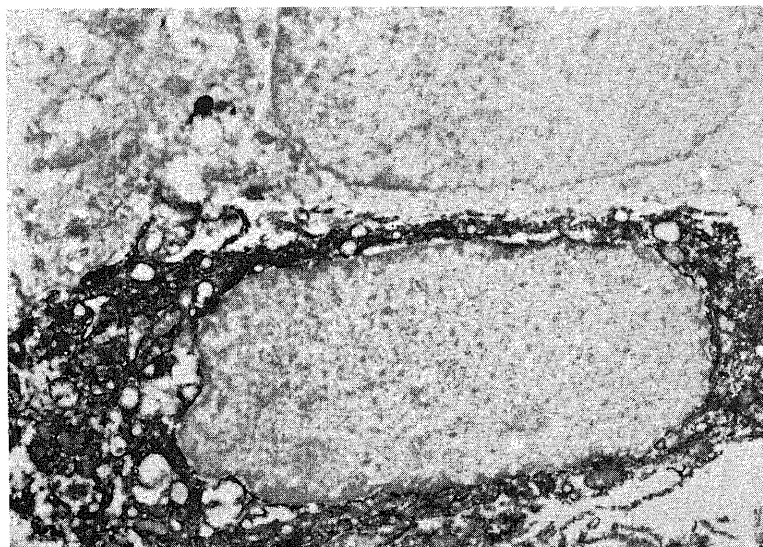


Fig. 13. Interlobular biliary epithelium in the same case as shown on Fig. 12. The cytoplasm of an epithelial cell is positive for IgG (intracytoplasmic type). Immunoelectron microscopy, $\times 7,200$.

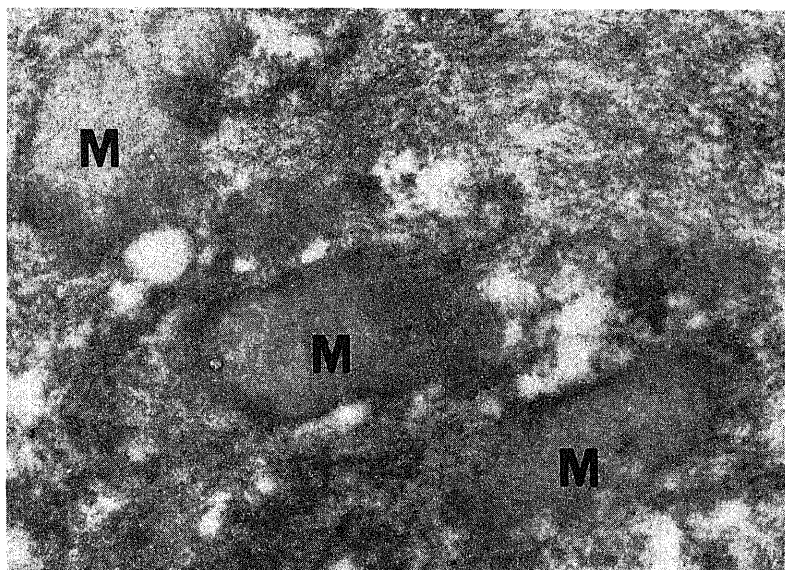


Fig. 14. Higher magnification of a portion of Fig. 13, showing a positive reaction for IgG in the extramitochondrial areas of the cytoplasm. M, mitochondria. Immunoelectron microscopy, $\times 45,000$.

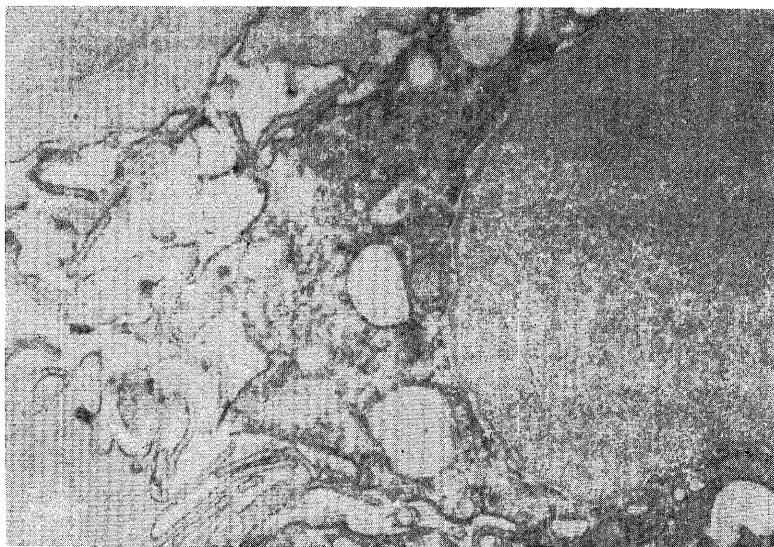


Fig. 15. Interlobular biliary epithelium in the same case as shown on Fig. 12. The basolateral plasma membranes and the extramitochondrial areas of the cytoplasm of the epithelial cell are positive for IgA (membrane-cytoplasmic type). Left upper and lower cells show membranous type. Immunoelectron microscopy, $\times 15,000$.

る型をもって、その症例の染色型とした。

固定状態の良好であった NL 7 例の小葉間胆管上皮の成績は、表 1 の如くであった。すなわち albumin, fibrinogen, AAT, IgG は全例細胞質型, SC は膜型, IgA, IgM, J 鎖は 3 型ともみられるものが多かった。また IgA, IgM, J 鎖の膜型は, basolateral の細胞膜と径約 100 nm の小空胞のみ陽性であるのに対し, SC は, それらのほかに, 核膜, Golgi 装置, 粗面小胞体も陽性であった (図 12, 16~18)。

III. 肝内胆管付属腺上皮の電顕像

付属腺は太い肝内胆管に生理的に分布しており、寺

田¹⁹⁾によると、生理的には、管状粘液腺であるごく少数の壁内腺と、分岐管状の混合腺である多数の壁外腺に分類され、壁外腺はさらに粘液腺房と漿液腺房とに分類される。これを電顕にて観察すると、壁外腺における粘液腺細胞の細胞質には、低電子密度の均等な物質を入れる粘液顆粒と、単位膜を有するメテナミン銀染色陽性の粘液顆粒とが一致し、それぞれの標本で多数認められた (図 19, 20)。その核は基底膜側に位置するものが多く、細胞質内小器官に乏しかった。

一方漿液腺細胞は、粘液腺細胞よりも細胞質内小器官に富み、また内腔に電子密度中等度の物質を含んだ

Table 1. Types of staining pattern of plasma proteins and their incidence in the interlobular biliary epithelium of normal liver under immunoelectron microscopy.

Staining pattern	albumin	fibrinogen	α_1 -anti-trypsin	IgG	secretory component	IgA	IgM	joining chain
Membranous type	0	0	0	0	3	5	2	2
Intracytoplasmic type	4	3	1	1	0	4	1	1
Membrane-cytoplasmic type	0	0	0	0	0	3	2	2
No. of cases studied	4	3	1	1	3	7	2	3

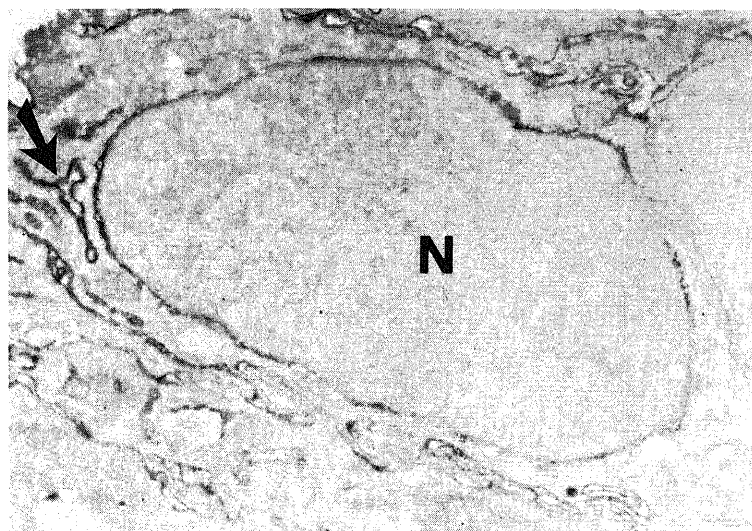


Fig. 16. Interlobular biliary epithelium of normal liver. The basolateral plasma membranes, the nuclear membrane, rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes (↑) and the small vesicles of the epithelial cells are positive for secretory component (membranous type). N, nucleus. Immunoelectron microscopy, $\times 12,000$.

拡張した粗面小胞体を多数認め、細胞質のほぼ中心に核が位置することが多かった。また漿液腺房には、粘液顆粒と拡張した粗面小胞体の両者を共に有する、粘液細胞と漿液細胞の中間型の細胞も多数認められた (図 21)。

IV. 肝内胆管付属腺上皮の血漿蛋白の免疫組織化学的観察

肝内胆管付属腺における各種血漿蛋白の染色型も、小葉間胆管におけるのと同様、次の3型に分類された：1. 全体型，2. 飛び石型，3. 混合型である。

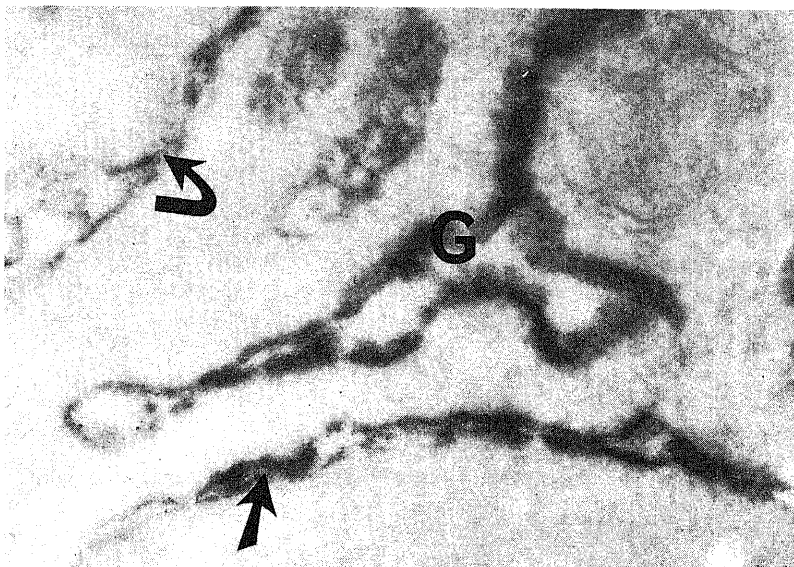


Fig.17. Higher magnification of a portion of Fig.16, showing positive reaction for secretory component on the basolateral plasma membranes (↷), Golgi complexes (G) and the nuclear membrane (↑). Immunoelectron microscopy, $\times 78,000$.

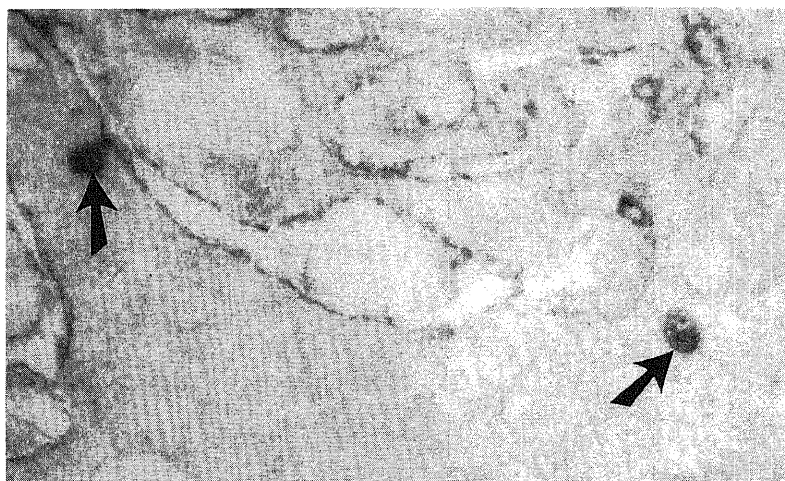


Fig.18. Higher magnification of a portion of Fig.16, showing positive reactions for secretory component in the small vesicles of the lateral interdigitating plasma membranes (↑). Immunoelectron microscopy, $\times 40,000$.

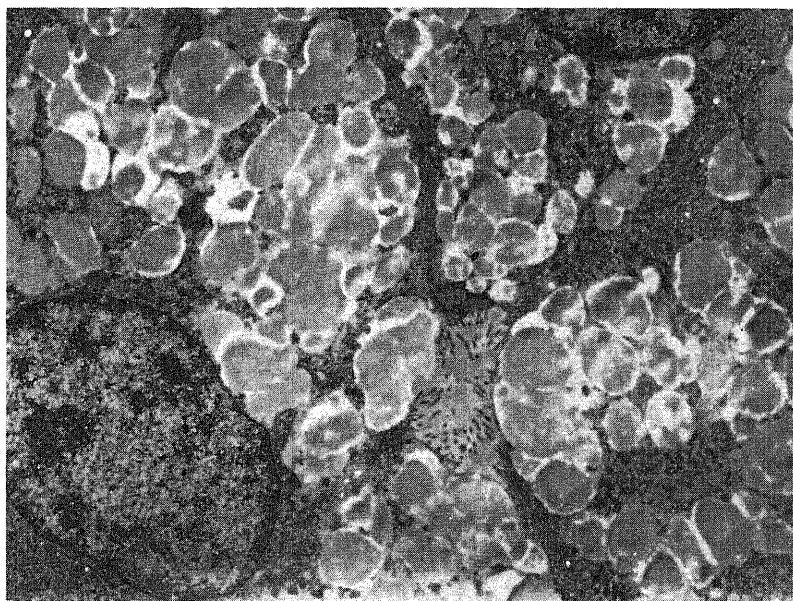


Fig. 19. Mucous cells of the periductal extramural mucous gland of normal liver. They contain many granules with low electron density and are poor in the intracellular organella. The nuclei locate in the bottom of the cells. Electron microscopy, $\times 6,000$.

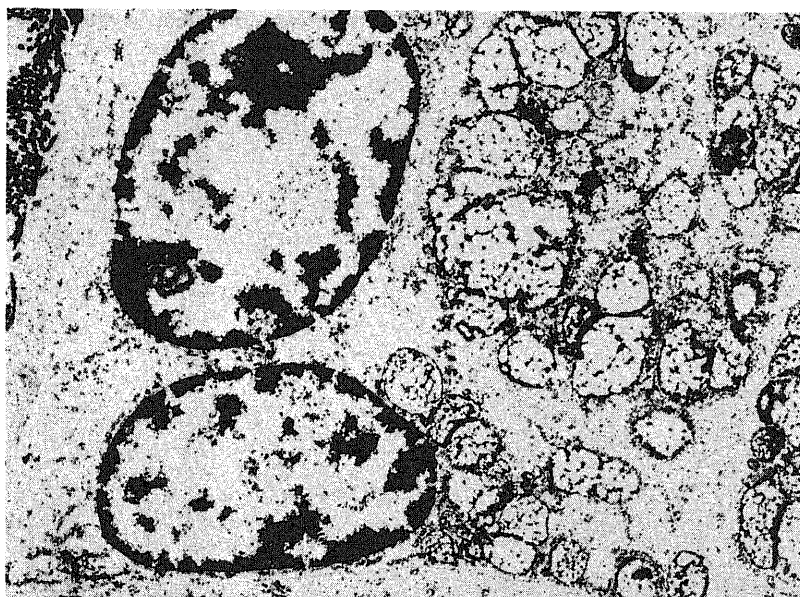


Fig. 20. Mucous cells of the periductal extramural mucous gland in the same case as shown on Fig. 19. The mucous granules in the right side of the cells show positive reaction products by methenamin-silver stain. Electron microscopy, $\times 6,000$.

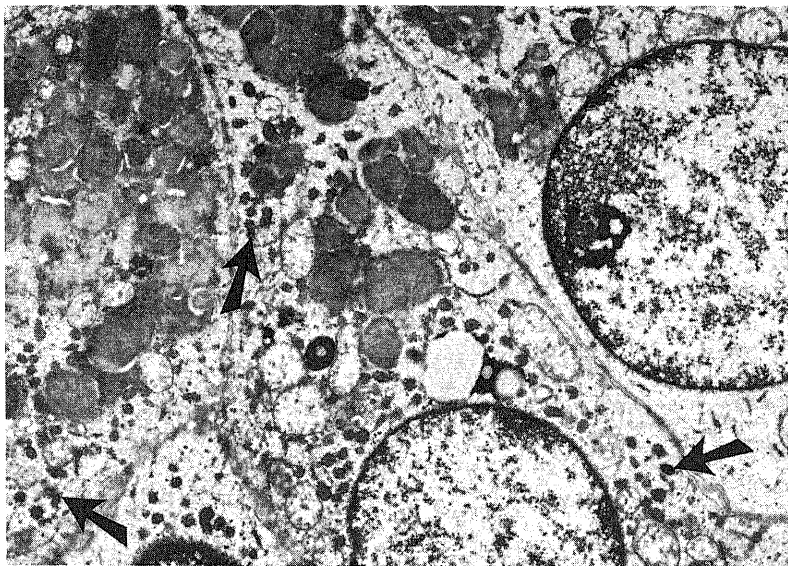


Fig. 21. Intermediate cells of the periductal extramural serous gland in the same case as shown on Fig. 19. They contain both mucous granules and dilated rough endoplasmic reticulum (↑). Electron microscopy, $\times 6,000$.

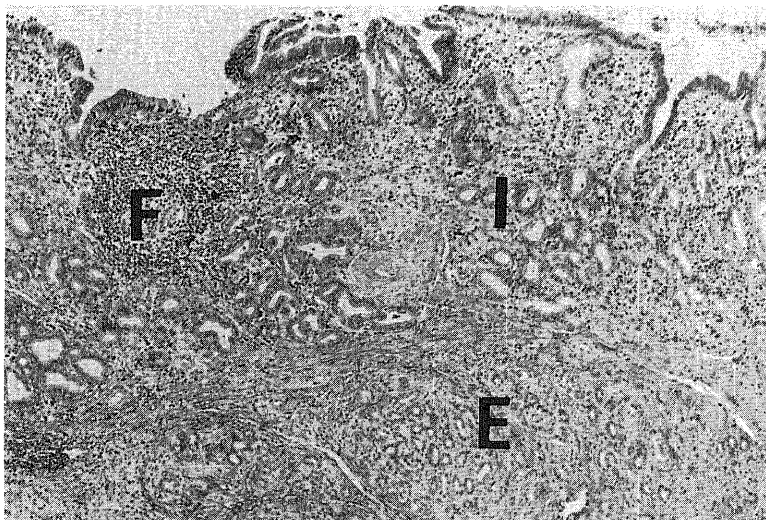


Fig. 22. Proliferative cholangitis of the large intrahepatic bile duct containing gall stones. The surface biliary epithelium, intramural glands (I) and extramural glands (E) of the bile duct show a marked proliferation. The stroma shows chronic inflammatory changes with lymph follicle formation (F). Hematoxylin and eosin, $\times 60$.

1 症例において、この 3 型のうちで最も優位を占める型をもって、その症例の染色型とした。これらの染色パターンは、NL、HL とともに同一の基本像から成っていた。なお HL 13 例のいずれも、中沼らの慢性増殖性胆管炎¹⁷⁾の像を示した。すなわち、結石部の胆管壁は著しく肥厚し、胆管表層上皮の乳頭状増生と胆管壁内外の付属腺組織の増生が強かった (図 22)。

1. albumin, fibrinogen, AAT, IgG

検索した NL 6 例の付属腺には、本来稀な壁内腺を認めなかった。壁外腺における albumin, fibrinogen, AAT, IgG の陽性頻度は、それぞれ、漿液腺では 67%, 50%, 50%, 67%, 粘液腺では 50%, 33%, 33%, 50% の症例に陽性で、漿液腺・粘液腺の陽性頻度の間に有意差を認めなかった (図 23)。HL ではこれらの血漿蛋白は 54~92% の症例に陽性となり、NL の付属腺より

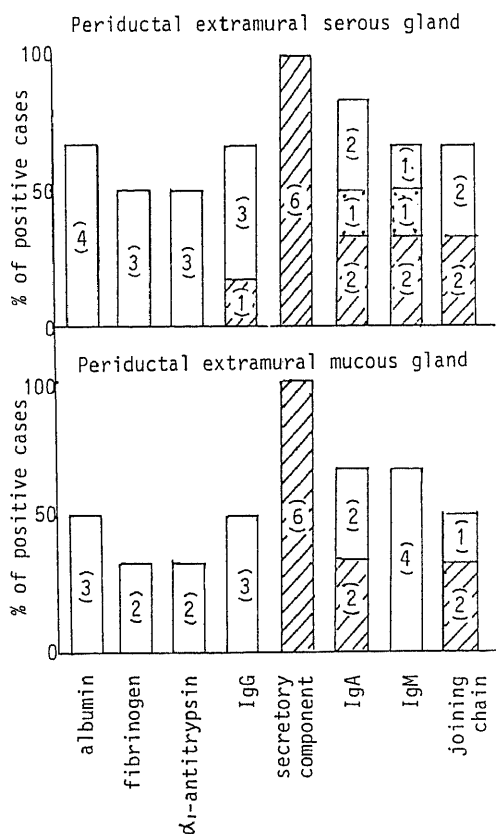


Fig. 23. Incidence of positive cases and types of staining pattern of plasma proteins in the periductal glandular epithelium in 6 cases of normal liver.

Staining pattern: □, many cell-positive type; ▨, mixed type; ▩, all cell-positive type.
○: Number of positive cases.

も陽性頻度が高い傾向にあったが、有意差はなかった (図 24)。HL の付属腺ごとの陽性頻度は、壁外漿液腺 > 壁内腺 ≥ 壁外粘液腺の順であった。その染色型は、ごく一部の症例を除いて、どの血漿蛋白も飛び石型優位であった。

2. SC, IgA, IgM, J 鎖

SC は、NL・HL の殆どすべての症例の付属腺上皮に陽性であり、その染色型は肝内胆管上皮と同様、全体型優位であった (図 23~25)。

IgA, IgM, J 鎖は、NL の付属腺では 50~83% に陽性で、漿液腺・粘液腺の陽性頻度の間に有意差はなかつ

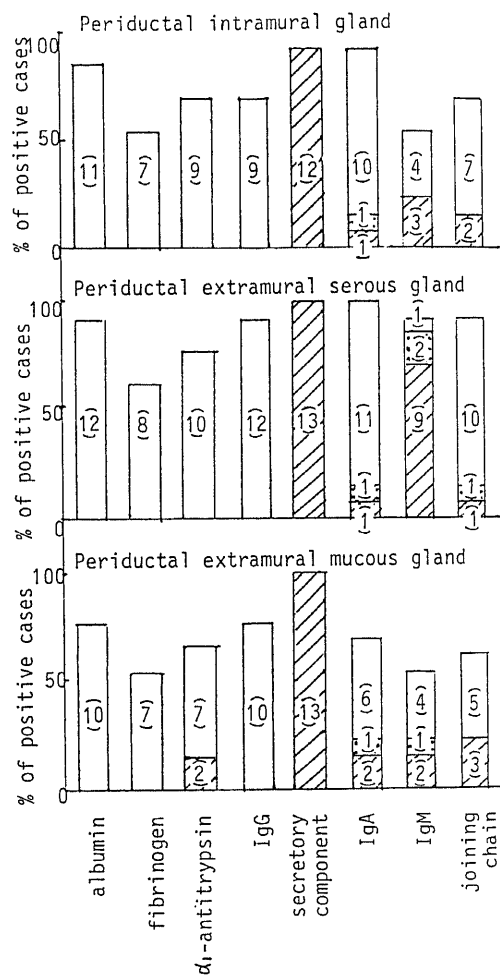


Fig. 24. Incidence of positive cases and types of staining pattern of plasma proteins in the periductal glandular epithelium in 13 cases of hepatolithiasis.

Staining pattern: □, many cell-positive type; ▨, mixed type; ▩, all cell-positive type.
○: Number of positive cases.

た。HL では、これらの血漿蛋白は 54~100% に陽性で、NL との間に有意差は認めなかった。付属腺ごとの陽性頻度は壁外漿液腺>壁内腺>壁外粘液腺の順であった。その染色型は、NL・HL とともに胆管上皮におけるのと同様種々の型が混在し、また 1 例中に 3 つの染色型がみられる頻度も高かった (図 23, 24)。

V. 肝内胆管付属腺の血漿蛋白の免疫電顕的観察

各種血漿蛋白の電顕的局在型は、肝内胆管上皮におけるのと同様、1. 膜型、2. 細胞質型、3. 膜・細胞質型の 3 つに分類され、これら 3 型のうちで最も優位を占める型をもって、その症例の染色型とした。

固定の良好であった正常ヒト剖検肝 2 例について、albumin, SC, IgA, IgM, J 鎖の局在を検討した (表 2)。albumin は細胞質型、SC は膜型を示したが、IgA, IgM, J 鎖は、胆管上皮におけるのと同様、さまざまな染色型を示した。また IgA, IgM, J 鎖の膜型では、basolateral の細胞膜と小空胞が陽性であるのに対し、SC はこれらのほか、核膜、Golgi 装置、粗面小胞体の一部も、胆管上皮におけるのと同様、陽性であった。

考 察

ヒト胆汁中には各種の血漿蛋白が存在することが知

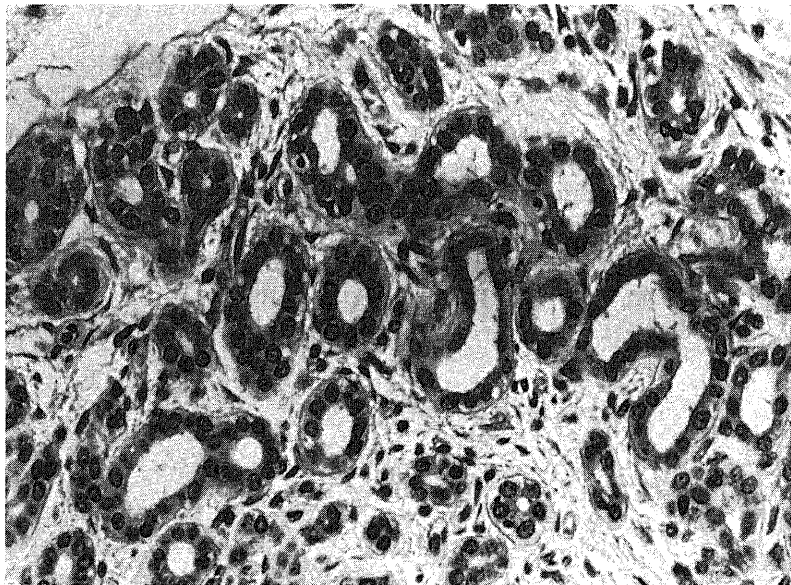


Fig. 25. Periductal extramural serous glands of liver with hepatolithiasis. All of the epithelial cells show positive staining for secretory component (all cell-positive type). Peroxidase-antiperoxidase counterstained with hematoxylin, $\times 350$.

Table 2. Types of staining pattern of plasma proteins and their incidence in the periductal glandular epithelium of normal liver under immunoelectron microscopy.

Staining pattern	albumin	secretory component	IgA	IgM	joining chain
Membranous type	0	2	1	1	1
Intracytoplasmic type	1	0	1	1	1
Membrane-cytoplasmic type	0	0	1	1	1
No. of cases studied	1	2	2	2	1

られており, albumin, AAT, transferrin, ceruloplasmin, haptoglobin, 免疫グロブリンなどが, 免疫電気泳動やその他の生化学的方法により同定されている¹¹⁻⁹⁾. これらの血漿蛋白の胆汁内出現機構に関して, 血漿蛋白が肝細胞または細胆管上皮を介して胆汁中に排泄されることが示唆されている⁹⁾⁻¹⁵⁾. また太い肝内胆管には, 生理的に付属腺が存在し, 少数の壁内粘液腺と多数の壁外漿液腺・粘液腺からムチンと, いわゆる漿液とが分泌されることがわかっている¹⁶⁾. しかし胆管および付属腺上皮の機能については, 不明の点が多い. そこで本研究では, これらの上皮の機能を明らかにする目的で, 肝疾患患者の生検肝における各種血漿蛋白の局在を検討した.

I. 肝内胆管上皮の血漿蛋白の吸収・分泌能

本実験により, albumin, fibrinogen, AAT が, 生理的には少量, 病的にはより多量, 肝内胆管上皮内に出現することが明らかとなった. しかしこれらの血漿蛋白を, 肝内胆管上皮が産生している所見は, 免疫電顕的には得られなかった. 疾患別では HL, EHC, PBC において, これらの蛋白の細胞質内出現が有意に高率であった. これら3種の疾患は, 胆管内圧の亢進と, 結果的には急性または慢性の胆管炎を伴う疾患群である. このような異常状態下では胆管上皮の透過性が亢進し, 胆汁成分が上皮下に滲み出す可能性が強く示唆され, 上述の所見はそれを支持している. PBC ではとくにそれが胆管炎発生のひとつの要因とされてきた³⁴⁾. 電顕的に中沼ら³⁵⁾は, PBC と EHC では胆管上皮の細胞間隙が開大し, そこにオスミウム好性の胆汁成分類似物質が存在し, また基底膜面の細胞膜に胆汁成分を含む exocytosis があり, 多層化した基底膜間にも同様の物質を多量に含むのを観察している. これらは, 胆汁成分の上皮内吸収と上皮下への排泄, つまり透過性亢進を示す像と考えている. また McFarlane ら³⁶⁾は, PBC や胆管硬化像を示す EHC の症例において, 胆汁中に存在する胆汁特異蛋白に対し感作状態にあることを, migration inhibition test により証明している. つまり胆汁中の胆汁特異蛋白が, PBC と EHC で容易に胆管外へ漏出し, これに対し細胞性免疫過敏の状態が発生すると考えられている.

albumin, fibrinogen, AAT の染色型は, 光顕的に飛び石型優位の症例が大部分であり, 電顕的には細胞質型を示した. この飛び石型・細胞質型の染色に対して, pre-fixation diffusion artifact³⁷⁾³⁸⁾, つまり固定が不十分な細胞質内へ, その周囲に存在する血漿蛋白がしみ込むことによる人工産物であるという考えがある. しかしもしそうだとすれば, 同一細胞に複数の蛋白がしみ込む頻度が高くなり, また各血漿蛋白の陽性

頻度と分子量との間に逆相関が認められるはずである³⁷⁾. ところが二重染色の結果, 同一細胞に複数抗原が認められる細胞は, それぞれの陽性細胞総数の 17~25% と低値であった. また分子量が約 340,000 の fibrinogen と分子量 47,000 の AAT の染色において, その陽性頻度の間に差は認められなかった. 従って飛び石型・細胞質型の陽性像は, 単なる人工像とは考えられない.

次に IgG の生理的な染色型が, albumin と同様, 光顕的に飛び石型, 電顕的に細胞質型が優位であったが, 胆管閉塞性の肝疾患群に染色の増強が認められず, この点で albumin 等と異なっていた. IgG は albumin や IgA に比べて, 生理的な胆汁内濃度が著しく低いためかと思われるが, 明らかではない.

SC は, 正常および各種肝疾患群のいずれにおいても, 疾患とは関係なく胆管上皮にほぼ 100% に陽性で, albumin や IgG 等とは異なっていた. その染色型も, 光顕的には全体型, 電顕的には膜型であり, また膜型でも IgA 等とは異なり, basolateral の細胞膜, 径約 100 nm の小空胞のほか, 核膜, 粗面小胞体, Golgi 装置に陽性であった. これは Nagura ら¹³⁾¹⁴⁾の細胆管上皮にみられた成績と一致するものであった. つまり, 核膜周辺の粗面小胞体で SC が産生され, Golgi 装置を経て basolateral の細胞膜へ運ばれ, そこで J 鎖の結合した polymer の IgA および IgM の receptor として働き, それらを細胞質内へ取込み, 分泌すると考えるのが妥当だと思われた. ちなみに IgA, IgM, J 鎖の染色で電顕的に膜型を呈した症例は, 胆管上皮の basolateral の細胞膜に receptor として存在する SC と結合した所見であろう. また小空胞の陽性像には coated vesicle のパターンがみられ, IgA, IgM, J 鎖の SC を介する vesicular transport を示すものと考えられた. 従って, 腸管上皮において既に報告されている局所免疫機構¹⁹⁾が, 胆管上皮にも広く存在することを示している. HL や EHC における細菌感染の高い頻度を考慮すると, この局所防禦作用の果たす役割は大きい. そして胆管周辺部でリンパ球・形質細胞系の産生している IgA や IgM が, SC を介して上皮内に吸収され, 胆汁中に排泄されているものとする. このように胆管上皮には, 一方において IgA や IgM の能動的な胆汁への分泌能があり, 他方胆汁成分の逆吸収能が胆管閉塞性疾患群において増強するという, 相反する2つの極性を持つと考えられる. このことは, 腸管上皮における両極性にきわめて近似している.

II. 肝内胆管付属腺上皮の血漿蛋白の吸収・分泌能

付属腺の作用は, 粘液といわゆる漿液の分泌であり, HL ではその著しい亢進がある¹⁶⁾. NL と HL の付属

腺上皮において、SCは光顕的に92~100%の肝において陽性に染色され、かつ殆どすべての付属腺に陽性で、全例全体型を示した。電顕的観察では胆管上皮におけるのと同様、basolateralの細胞膜と小空胞のほか、核膜、粗面小胞体、Golgi装置に陽性で、付属腺上皮もまたSCを産生しているものと考えられた。そしてIgA, IgM, J鎖の電顕的所見や光顕的所見が胆管上皮に近似していたことから、付属腺上皮においても胆管上皮と同様、胆管周囲外液中のIgAとIgMをSCを介するvesicular transportにより胆汁中へ輸送・分泌し、胆道系の局所免疫機構に大きな役割を果たしていると考えられた。胆管付属腺におけるこれらの所見と機能については、まったく報告がない。HLにおける細菌感染の高い頻度と著しい付属腺増生とを考慮すると、この免疫的防禦作用の役割は大きく、付属腺の方が胆管上皮よりもはるかに重要であると推測された。

albumin, fibrinogen, AAT, IgGの染色パターンは、NLおよびHLともに、肝内胆管上皮におけるのと同様、飛び石型優位で染色され、電顕的には細胞質型を示した。しかしこれらの蛋白を、付属腺上皮がその外周から摂取し分泌する機構については未知であり、また逆に胆汁から吸収すると思われる証拠もない。付属腺、なかでも壁外腺は、胆管腔との間に長い屈曲した導管を有しているので、胆汁成分の付属腺への逆流は考えにくく、これらの血漿蛋白の由来については不明である。

結 論

正常および各種疾患肝を用いて、肝内胆管上皮および胆管付属腺上皮に出現する各種血漿蛋白の局在を調べ、その意義を検討した。

1. 肝内胆管上皮内のalbumin, fibrinogen, AATは、HL, EHC, PBCにおいて増強し、NLに比べて有意に高率に検出され、殆どの症例において飛び石型優位であった。これらは胆汁よりの吸収像、すなわち上皮の透過性亢進の結果を示すものと推定された。

2. SCは、NLおよび各種疾患肝の胆管上皮にほぼ100%近く認められ、光顕的には全体型優位に、電顕的には膜型に染色され、細胞質内産生が示唆された。

3. IgA, IgM, J鎖は、NL・疾患肝の区別なく、SCよりやや低率に胆管上皮に認められ、光電的・電顕的染色型も多様であったが、電顕的にSCの細胞内局在と一部共通する所見がみられた。従って胆管上皮は、SCを介してpolymerのIgA・IgMを取り込み、胆汁中へ排泄して、局所免疫能の発現の役割を果たしていると考えられた。

4. 胆管付属腺においても、胆管上皮におけるのと

同様、上述の血漿蛋白が認められ、とくにSCの産生と、SCを介するIgA, IgMの分泌能が示唆された。そして肝内結石症におけるこの局所免疫発現の重要性が指摘された。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました、恩師太田五六教授に深く感謝の意を表すると共に、御協力いただいた野々村昭孝助教授、中沼安二講師はじめ、第2病理学教室の諸先生方に、心から感謝いたします。

また、絶大な御協力を賜った下記の機関に深謝いたします。国立金沢病院内科、同外科、同病理、石川県立中央病院病理、福井県立病院病理、黒部市民病院内科、同外科、同病理、金沢大学第1内科、同第2外科、同中央検査部病理。

なお、本論文の一部は、第68回日本消化器病学会総会、第18回日本肝臓学会西部会、第74回日本病理学会総会、第21回日本肝臓学会総会で発表した。

文 献

- 1) Thureborn, E.: Human hepatic bile. Composition changes due to altered enterohepatic circulation. *Acta Chirurg. Scandina.*, Supple. **33**, 1-63 (1962).
- 2) Chodirker, W. B. & Tomasi, T. B. Jr.: Gamma-globulins: Quantitative relationships in human serum and nonvascular fluids. *Science*, **142**, 1080-1081 (1963).
- 3) Russell, I. S., Fleck, A. & Burnett, W.: The protein content of human bile. *Clin. Chim. Acta*, **10**, 210-213 (1964).
- 4) Russell, I. S. & Burnett, W.: The proteins of human bile. *Gastroenterol.*, **45**, 730-739 (1963).
- 5) Rosenthal, W. S., Kubo, K., Dolinski, M., Marino, J., Mersheimer, W. L. & Jerzy Glass, G. B.: The passage of serum albumin into bile in man. *Am. J. Digest. Dis.*, **10**, 271-283 (1965).
- 6) Yoon, D. S., Shim, B. S. & Kil, T. S.: Bile-specific protein components in human hepatic bile. *J. Lab. Clin. Med.*, **67**, 640-649 (1966).
- 7) Wheeler, H. O.: Secretion of bile, p84-102, *In* L. Schiff (ed.), *Diseases of the liver*, 3rd ed. Lippincott Co., Philadelphia, 1969.
- 8) Dive, C. & Heremans, J. F.: Nature and origin of the proteins of bile. I. A comparative analysis of serum and bile proteins in man. *Europ. J. Clin. Invest.*, **4**, 235-239 (1974).
- 9) Socken, D. J., Jeejeebhoy, K. N., Bazin, H. & Underdown, B. J.: Identification of secre-

tory component as an IgA receptor on rat hepatocytes. *J. Exp. Med.*, **150**, 1538-1548 (1979).

10) **Wilson, I. D., Wong, M. & Erlandsen, S. L.** : Immunohistochemical localization of IgA and secretory component in rat liver. *Gastroenterol.*, **79**, 924-930 (1980).

11) **Gebhardt, R.** : Primary cultures of rat hepatocytes as a model system of canalicular development, biliary secretion, and intrahepatic cholestasis. *Gastroenterol.*, **84**, 1462-1470 (1983).

12) **Delacroix, D. L., Denef, A. M., Acosta, G. A., Montgomery, P. C. & Vaerman, J. P.** : Immunoglobulins in rabbit hepatic bile: Selective secretion of IgA and IgM and active plasma-to-bile transfer of polymeric IgA. *Scand. J. Immunol.*, **16** 343-350 (1982).

13) **Nagura, H., Smith, P. D., Nakane, P. K. & Brown, W. R.** : IgA in human bile and liver. *J. Immunol.*, **126**, 587-595 (1981).

14) 名倉 宏・渡辺慶一・長谷川英章・杉本栄一: 肝・胆道系における免疫グロブリンならびに secretory component の局在とその病理学的意義. *消化器と免疫*, **4**, 117-122 (1980).

15) **Hsu, S. M. & Hsu, P. L.** : Demonstration of IgA and secretory component in human hepatocytes. *Gut*, **21**, 985-989 (1980).

16) 寺田忠史: ヒト正常肝, 肝内結石症肝および肝内胆管拡張症肝における肝内胆管付属腺組織の形態学的研究. *十全医会誌*, **93**, 599-619 (1984).

17) 中沼安二・太田五六・永川宅和・松原藤継: 肝内結石症肝の病理形態像. *日消誌*, **78**, 874-882 (1981).

18) **McLean, I. W. & Nakane, P. K.** : Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1077-1083 (1974).

19) **Brown, W. R., Isobe, Y. & Nakane, P. K.** : Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. II. Immunoelectron-microscopic localization of immunoglobulins and secretory component in human intestinal mucosa. *Gastroenterol.*, **71**, 985-995 (1976).

20) **Sternberger, L. A., Hardy, P. H. Jr., Cuculis, J. J. & Meyer, H. G.** : The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J.*

Histochem. Cytochem., **18**, 315-333 (1970).

21) **Taylor, C. R., Kurman, R. J. & Warner, N. E.** : The potential value of immunohistologic techniques in the classification of ovarian and testicular tumors. *Human Pathol.*, **9**, 417-427 (1978).

22) **Streefkerk, J. G.** : Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 829-831 (1972).

23) **Isobe, Y., Chen, S. T., Nakane, P. K. & Brown, W. B.** : Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. I. Improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta Histochem. Cytochem.*, **10**, 161-171 (1977).

24) **Graham, R. C. Jr. & Karnovsky, M. J.** : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291-302 (1966).

25) **Brandtzaeg, P.** : Immunochemical studies on free and bound J chain of human IgA and IgM. *Scand. J. Immunol.*, **4**, 439-450 (1975).

26) **Brandtzaeg, P.** : Studies on J chain and binding site for secretory component in circulating human B cells. I. The surface membrane. *Clin. Exp. Immunol.*, **25**, 50-58 (1976).

27) **Nakane, P. K.** : Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: A study on pituitary glands of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 557-560 (1968).

28) **Huang, S. N.** : Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. *Lab. Invest.*, **33**, 88-95 (1975).

29) **Finley, J. C. W., Grossman, G. H., Diemo, P. & Petrusz, P.** : Somatostatin-containing neurons in the rat brain: Widespread distribution revealed by immunocytochemistry after pretreatment with pronase. *Am. J. Anat.*, **153**, 483-488 (1978).

30) **Nakane, P. K.** : Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 929-931 (1966).

- 31) Nisonoff, A., Wissler, F. C., Lipman, L. N. & Woernley, D. L.: Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **89**, 230-244 (1960).
- 32) Wilson, M. B. & Nakane, P. K.: Recent developments in the peroxidase method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies, p215-224. *In* W. Knapp, K. Holubar & G. Wick (ed.), *Immunofluorescence and related staining techniques*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978.
- 33) 黒住一昌・井上金治: 糖蛋白分泌腺の電子顕微鏡的組織化学と分泌機構. *細胞*, **13**, 374-384 (1981).
- 34) 中沼安二・宮村 肇・太田五六: 原発性胆汁性肝硬変の肝内胆管系の初発病変. *肝臓*, **20**, 1131-1140 (1979).
- 35) 中沼安二・河野尚子・太田五六: 原発性胆汁性肝硬変の肝内胆管崩壊—その病理発生. *消化器と免疫*, **3**, 102-106 (1979).
- 36) McFarlane, I. G., Wojcicka, B. M., Tsantoulas, D. C., Portmann, B. C., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R.: Leukocyte migration inhibition in response to biliary antigens in primary biliary cirrhosis, sclerosing cholangitis, and other chronic liver diseases. *Gastroenterol.*, **76**, 1333-1340 (1979).
- 37) Mason, D. Y. & Biberfeld, P.: Technical aspects of lymphoma immunology. *J. Histochem. Cytochem.*, **28**, 731-745 (1980).
- 38) Brandtzaeg, P.: Tissue preparation methods for immunohistochemistry; II. Pre-fixation diffusion artifacts, p18-24. *In* G. R. Bullock & P. Petrusz (ed.), *Techniques in immunology*, vol. 1. Academic Press, New York, 1982.

The presence and distribution of plasma proteins in the intrahepatic biliary duct epithelium and periductal glandular epithelium in a variety of liver diseases, and their significance —immunohistochemical and immunoelectron microscopical study of albumin, fibrinogen, α_1 -antitrypsin, secretory component, IgG, IgA, IgM, and joining chain— Plasma proteins in the intrahepatic biliary duct and periductal glandular epithelium Hitoshi Sugiura, Second Department of Pathology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **95**, 758—776 (1986)

Key words: intrahepatic bile duct, periductal gland, plasma proteins, secretory component, immunohistochemistry.

Abstract

The presence and distribution of plasma proteins in the intrahepatic biliary duct epithelium and periductal glandular epithelium were studied by immunohistochemistry and immunoelectron microscopy to learn the function of these epithelial cells. The materials consisted mainly of biopsied livers with a variety of liver diseases. Immunohistochemically, secretory component (SC) was demonstrated in the cytoplasm of the all biliary epithelium in almost all livers, both normal and diseased. Using immunoelectron microscopical technique, it was found that SC was localized in the basolateral plasma membranes, nuclear membranes, rough endoplasmic reticuli, Golgi complexes and small vesicles. This suggests that the biliary epithelium has the ability to synthesize SC. IgA, IgM, and joining chain (J chain) were also detected in a similar, but not identical, manner; for example, IgA was found only in the basolateral plasma membranes and vesicles. Thus, it would appear that SC links polymeric IgA and/or IgM on the duct epithelial membrane, and subsequent intracellular transport and excretion of the complexes into the bile occur. Albumin, fibrinogen and α_1 -antitrypsin (AAT) were demonstrated in the cytoplasm of some, but not all, of the intrahepatic biliary epithelium in 85 to 100% of hepatolithiasis, extrahepatic cholestasis, and primary biliary cirrhosis, while only in 33 to 47% of

normal livers. Under immunoelectron microscope, their cytoplasms showed a diffuse stain of these proteins. The data imply cytoplasmic absorption of the biliary substances, including the three proteins, from the bile as a result of the increasing permeability of the biliary epithelium in the biliary diseases. Immunohistochemical observations of the periductal glandular epithelium showed findings approximately similar to those of the ductal epithelium: SC was found in nearly 100% of livers with hepatolithiasis and of normal livers. IgA, IgM, and J chain were also positively stained with different incidences in many of the livers of both diseased and normal. The prevalence of the livers with positively stained glandular epithelium for each protein, mentioned above, did not differ significantly from that of the livers with positively stained biliary epithelium. Thus, the results obtained lead to the concept that the periductal glandular epithelium is also capable of synthesizing SC, and secreting IgA and IgM, and contributes largely to give rise to a local immunologic state against biliary infection in the duct obstructive diseases.