

肝内胆管周囲に分布する肥満細胞の意義： 胆管周囲血管叢の血行調節機能に注目して

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: 香田, 渉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9462

肝内胆管周囲に分布する肥満細胞の意義： 胆管周囲血管叢の血行調節機能に注目して

金沢大学医学部放射線医学講座 (主任：松井 修教授)

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任：中沼安二教授)

香 田 渉

肥満細胞は種々の臓器の粘膜層、結合織内に分布し、これら臓器における微小環境の維持に重要な役割を果たしている。肝臓では肝内大型胆管周囲および隔壁胆管周囲にトリプターゼ陽性肥満細胞 (胆管周囲肥満細胞) が生理的に規則正しく分布し、病的肝ではこれらの細胞の数と分布が変動することが知られている。しかし、これら胆管周囲肥満細胞の意義については不明な点が多い。本研究では肝内胆管周囲肥満細胞の肝内胆管系の微小循環に果たす役割に注目し、血管作動性物質の発現を中心に検討した。対象は正常肝71例 (剖検60例, 外科的切除1例, 楔状生検10例), 慢性肝炎24例 (剖検11例, 外科的切除1例, 楔状生検12例), 肝硬変45例 (剖検42例, 外科的切除0例, 楔状生検3例)。まず、肝内胆管系に分布する肥満細胞を肥満細胞特異的トリプターゼの免疫組織化学的検討 (エンビジョン法) により調べた。次に、肝内胆管を中心に血管作動性物質、すなわち一酸化窒素を産生する誘導型一酸化窒素合成酵素および内皮型一酸化窒素合成酵素、エンドセリン1およびその受容体であるエンドセリンA受容体およびエンドセリンB受容体、ヒスタミン、キマーゼの発現を免疫組織化学的 (エンビジョン法およびストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法) に検討した。肥満細胞は肝内胆管、特に胆管周囲血管叢の微小血管に近接して分布し、しばしばこれら血管の周皮細胞に隣接していた。肝硬変では胆管周囲血管叢の微小血管は正常肝より増加、拡張し、胆管周囲肥満細胞数も正常肝 ($39.4 \pm 20.8/\text{mm}^2$) に比べ肝硬変 ($59.0 \pm 29.9/\text{mm}^2$) で有意に増加していた ($p < 0.05$)。慢性肝炎 ($46.6 \pm 28.3/\text{mm}^2$) では正常肝と肝硬変の中間値を示した。胆管周囲肥満細胞はエンドセリン1が陽性であり、ヒスタミン、キマーゼ、誘導型一酸化窒素合成酵素、エンドセリンA受容体およびエンドセリンB受容体の発現もみられた。胆管周囲血管叢の周皮細胞はエンドセリン1、誘導型一酸化窒素合成酵素、エンドセリンA受容体およびエンドセリンB受容体を発現していた。胆管周囲血管叢の血管内皮細胞は内皮型一酸化窒素合成酵素とエンドセリン1を恒常的に発現し、エンドセリンA受容体およびエンドセリンB受容体、それに誘導型一酸化窒素合成酵素を種々の程度に発現していた。胆管上皮細胞も誘導型一酸化窒素合成酵素、エンドセリン1、エンドセリンA受容体およびエンドセリンB受容体を種々の程度に発現していた。正常肝と比較して肝硬変では肥満細胞、血管内皮細胞、周皮細胞、それに胆管上皮でのこれら血管作動性物質の発現が強くみられ、慢性肝炎では中間的であった。これらの血管作動性物質がパラクリンあるいはオートクリンの機序により、胆管周囲の微小循環系に関与していると考えられた。特に、胆管周囲肥満細胞が正常肝の胆管周囲血管叢の血行動態を調節し、さらに胆管系周囲の肥満細胞を含む種々の細胞成分から分泌される血管作動性物質が、肝硬変における胆管周囲血管叢の血管数および異常な血行動態に関連していることが示唆された。これらの知見は臨床の場において、各種肝疾患の病態の理解に必要であり、CT, MRI, 血管造影などの各種画像診断や肝動脈塞栓術をはじめとするインターベンショナルラジオロジーの解釈や開発に重要な意義を有するものと考えられた。

Key words Mast cells, intrahepatic biliary tree, immunohistochemistry, biliary microcirculation, peribiliary vascular plexus

肝臓は消化管で吸収された栄養成分を代謝するとともに、薬物、毒性物質、微生物などの除去も行っている¹⁾。そして、肝臓の多種、多様な機能の発現と恒常性は肝に分布する特異な血行に依存している。肝内へ流入する血流として肝動脈、門脈があり、肝は二重の血行支配を受けている。門脈は門脈域内を

肝動脈、胆管と伴に走行、分岐し、終末門脈枝に至り、直接あるいは終末肝動脈枝と吻合後類洞へ流入する²⁾。一方、肝動脈は同じく門脈域を走行、分岐しながら終末肝動脈枝に至るが、その間に多くの分枝が派生し、胆管を含めた門脈域内の構成成分を栄養する^{3,4)}。肝内胆管系に関しては、肝動脈の分枝が胆

平成11年11月22日受付, 平成12年1月7日受理

Abbreviations : AMeX, acetone, methyl benzoate, and xylene; ASMA, α -smooth muscle actin; AT, angiotensin; b-FGF, basic fibroblast growth factor; ET, endothelin; LPS, lipopolysaccharide; MC^T, tryptase positive, chymase negative mast cells; MC^{TC}, tryptase positive, chymase positive mast cells; iNOS, inducible NO synthase; eNOS,

管周囲に密な微小な毛細血管叢 (peribiliary vascular plexus, PVP) を形成し胆管を栄養し, PVP の輸出血管は肝類洞に直接流入するか, あるいは終末門脈枝と吻合し, その後肝類洞に注ぐ⁵⁾. そして, 各種肝疾患の病態の発生と進行に伴い, PVP を含む肝微小循環系の血行動態が変化することが知られている. PVP の微小循環系の変化や調節機構を理解することが各肝疾患における病態の理解, 診断, 治療に必要である.

さて, 従来, 肝内微小循環⁶⁾の血流調節に関する多くの検討は類洞レベルで行われており^{7,8)}, 終末門脈枝の周皮細胞や類洞の類洞壁細胞と血管内皮細胞の類洞血流調節における役割が検討されている⁹⁾. 肝内微小循環の調節因子として, 血管収縮物質であるエンドセリン (endothelin, ET)¹⁰⁾, それに血管拡張物質である NO¹¹⁾が中心的な役割を果たしていることが示され, これらの調節物質による内皮細胞-類洞壁細胞の相互作用に関して多くの研究¹²⁾⁻¹⁷⁾がなされている. しかし, 肝内胆管周囲での微小血行動態に注目した研究はほとんどなされていない.

さて, 肝内胆管周囲には肝動脈に由来する PVP が発達しており, 胆管上皮の生理や肝内血行動態に重要な役割を果たしている^{3,4)}. 肝硬変ではこの PVP の小血管が増加し, 拡張することが知られており^{4,18)}, 肝硬変などで肝内血流障害あるいは代償機構としての血行動態に種々の役割を果たしていると考えられる. 我々は最近, 肥満細胞が肝内胆管の胆管上皮直下に規則的に密に分布することを報告した¹⁹⁾. 肥満細胞は種々の臓器で粘膜層あるいは結合織内に局在し, その細胞質内に多くの生理活性物質を内包している. そしてこれらの物質を介して臓器や組織の生理機能, 免疫, 炎症, 微小循環など微小環境の形成や維持に関連している²⁰⁾⁻²³⁾. 例えば呼吸器や消化器では肥満細胞は粘膜層に局在し²⁴⁾⁻²⁶⁾, 粘膜上皮のイオン輸送などのこれらの臓器の粘膜機能, アレルギー反応, 感染防御などの生体防御機構に大きな影響を与える²⁷⁾⁻²⁹⁾. 微小循環の制御に関する肥満細胞の役割もいくつかの臓器で研究されている. 例えば, Feldman ら³⁰⁾は肥満細胞が食道粘膜血流の調節に働いていることを示している. Wallace ら³¹⁾はカプサイシンに対する胃粘膜の充血反応が肥満細胞の安定剤である doxantrazole により減弱し, 肥満細胞が血管内皮細胞の NO 合成に関与していることを明らかにしている. 肥満細胞が産生する塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) やトリプターゼが血管新生に働くことも示されており, 様々な炎症性疾患や腫瘍性疾患において病変部に肥満細胞が集積し, これらの疾患で肥満細胞が血流調節や血管新生に関与していることも示されている³²⁾⁻³⁶⁾. また, 肥満細胞が産生するキマーゼにより誘導されるアンギオテンシン (angiotensin, AT) II が血管収縮物質として, 血管のリモデリング因子としても関与していることが示されている^{37,38)}. 肝内肥満細胞については細胞外基質の分解や線維芽細胞の増生などを介して肝線維化そして胆管線維化の過程に関連するとの報告はあるが^{19,39,40)}, 肝内胆管系の局所血流におけるこれら肥満細胞の役割に関する報告はない.

本研究ではまず肥満細胞に特異的なトリプターゼ³⁹⁾の免疫染色により, 肝内胆管系に分布する肥満細胞を正常肝, 慢性肝炎, 肝硬変で検索し, 次いで代表的な血管作動性物質の発現を免疫組織化学的に検討し, 肝内胆管系の微小循環におけるこれら物

質の役割を肥満細胞を中心に検討した.

材料および方法

I. 肝内胆管系および胆管周囲血管叢の分類

1. 肝内胆管系

肝内胆管系を左右肝管, 区域胆管 (肝管の1次分枝), 領域胆管 (区域胆管の1次分枝: 区域胆管の前後分枝), およびこれら胆管の分枝に分類した³⁾. 左右肝管, 区域胆管, そして領域胆管およびそれらの1次分枝はまとめて“肝内大型胆管”とした. これらの胆管は肉眼的に同定可能である. 肝内大型胆管は線維成分よりなる固有の胆管壁を有し, これらの胆管系には胆管周囲付属腺が分布する. 胆管周囲付属腺は壁内および壁外腺よりなり, 前者は胆管壁内にみられ, 後者は胆管周囲組織内にみられる. 隔壁胆管は外径が100 μ m以上で門脈域で肝実質と離れてみられる. 小葉間胆管は20~100 μ mの内腔を有する門脈域末梢域の管状構造で, 中等大小葉間胆管 (内腔: 40~80 μ m) および小型小葉間胆管 (内腔: 20~40 μ m) に亜分類される. 細胆管は内腔20 μ m以下で門脈域末梢域で肝実質に接してみられる.

2. 胆管周囲血管叢

肝内大型胆管と隔壁胆管周囲には発達した PVP がみられ, 内層, 中間層および外層に分類される⁴⁾. 内層は胆管上皮直下でチェーン状の毛細血管網としてみられ, 外層は胆管周囲結合組織内に, 中間層は胆管壁内にみられ, いずれも毛細血管, 小動脈および細静脈としてみられる. さらに, 肝内胆管付属腺, 特に壁外腺の内部および周囲にも多くの小動脈や毛細血管が存在し, PVP の一部を構成している.

3. 門脈域の分類

小型小葉間胆管を含む門脈域を小型門脈域, 中等大小葉間胆管を含むものを中等大門脈域, 隔壁胆管および肝内大型胆管を含むものを大型門脈域とした. なお, 肝門部結合組織も大型門脈域に含めた.

II. 材 料

金沢大学医学部第二病理学教室に保存されている正常肝および慢性肝疾患 (肝硬変を含む) の剖検, 外科的切除肝および楔状生検組織を用いた (表1). 全て10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋肝であり, 小型, 中等大, 大型門脈域を含んでいる. 71例の正常肝は軽度の非特異的变化を示すものを含んでいる. 慢性肝炎は24例 (C型肝炎ウイルス関連19例, B型肝炎ウイルス関連5例) で, 肝硬変は45例 (C型肝炎ウイルス関連31例, B型肝炎ウイルス関連9例, アルコール性5例) である.

さらに, 正常肝5例および肝硬変4例ではホルマリン固定標本に加えてアセトン・メチルベンゾエート・キシレン (acetone, methyl benzoate, and xylene, AMeX)⁴¹⁾で固定後の標本を用いた. すなわち, 肝組織標本をアセトンで-20°Cで一晩固定し, メチルベンゾエートおよびキシレンで処理し, 引き続きパラフィンで包埋した. AMeX固定は蛋白, 核酸の抗原性の保存に優れており, 免疫染色に適しており, 組織および細胞構造もよく保存される.

III. 組織学的, 免疫組織化学的研究

1. 組織学的検討

ホルマリン固定および AMeX 固定後のパラフィンブロックよ

り20枚以上の4 μ m切片を薄切し、その内3枚を用いHE染色、鍍銀染色およびアザン染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。残りの切片は以下の免疫組織化学的検討に使用した。

2. 免疫組織化学的検討 (免疫染色)

肥満細胞に含有されているプロテアーゼであるトリプターゼおよびキマーゼ、血管作動性物質としてヒスタミン、NOを合成する内皮型NO合成酵素 (endothelial NO synthase, eNOS) および誘導型NO合成酵素 (inducible NO synthase, iNOS), ET-1およびその受容体であるETA受容体およびETB受容体、血管内皮細胞マーカーであるCD34の検出を行った。なお、肥満細胞は中性プロテアーゼの一種であるキマーゼの有無により大きく2つの型に分けられる。すなわちMCT^T (トリプターゼ陽性、キマーゼ陰性肥満細胞) とMCT^C (トリプターゼ陽性、キマーゼ陽性肥満細胞) である²⁵⁾。

使用した1次抗体、2次抗体および最適希釈倍率を表2に示す。免疫染色は通常のストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (streptavidin-biotin-peroxidase complex, strept ABC) 法あるいはマウスあるいはウサギ用エンビジョン+ (EnVision+, mouse or rabbit) 法 (DAKO, Glostrup, Denmark) を用いて行った。まず、脱パラフィン切片を0.3%過酸化水素加メタノール液中に30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。なお、キマーゼの染色に関してはAMeX固定の切片を用いた。10%非免疫血清で30分間処理した後、肥満細胞トリプターゼ、肥満細胞キマーゼ、CD34、ET-1および

eNOSに対するマウスモノクローナル1次抗体、ヒスタミン、iNOSに対するウサギポリクローナル1次抗体およびETAおよびETB受容体に対する羊ポリクローナル1次抗体で4℃で一晩反応させた。PBSで洗浄後、ETAおよびETB受容体に関しては切片を室温で45分間抗羊IgGビオチン化ウサギ2次抗体で反応させ、その後strept ABC (DAKO) で室温で45分間反応させた。その他の抗体に関しては、切片を各々マウス用あるいはウサギ用のエンビジョン+ (DAKO) で処理をした。ベンジジン反応により、褐色に発色し、核はヘマトキシリンで弱く染色した。なお、免疫染色の陰性コントロールは1次抗体の代わりに非免疫血清を使って行い、染色が陰性化することにより確認した。

3. 二重免疫染色による検討

肝内胆管周囲のトリプターゼ陽性肥満細胞とPVPの周皮細胞との関連性、トリプターゼ陽性肥満細胞でのiNOSおよびET-1の発現を検討するため、トリプターゼとアルファ平滑筋アクチン (α -smooth muscle actin, ASMA), iNOS, ET-1の二重免疫染色を5例 [正常肝2例, 慢性肝炎 (C型肝炎ウイルス関連) 1例, 肝硬変 (C型肝炎ウイルス関連) 2例] を用い検討した。ASMAは血管平滑筋細胞のみならず周皮細胞にも局在することが知られている⁴²⁾。

すなわち、ASMA, iNOS, ET-1をペルオキシダーゼ-ベンジジン反応により褐色に染め、その後トリプターゼをベクターブルー (Vector Laboratories, Burlingame, USA) により青色に染めた。まず、脱パラフィン切片の内因性ペルオキシダーゼを失

Table 1. Main clinical features of the patients and their liver specimens

Hepatic diseases (number of cases examined)	Sex (F : M)	Age ($\bar{X} \pm SD$, years)	Liver specimens		
			Autopsy	Surgical resection	Wedge biopsy
Normal liver (71)	28 : 43	62.9 \pm 16.2	60	1	10
Chronic hepatitis (24)	14 : 10	64.9 \pm 13.0	11	1	12
Liver cirrhosis (45)	17 : 28	62.7 \pm 11.1	42	0	3

F, female; M, male.

Table 2. Antibodies used in this study

Antibodies used	Source	Animals immunized	Type of antibodies	Optimal dilution
Primary antibodies against				
CD34	IMMUNOTECH, Marceille, France	Mouse	Monoclonal	1 : 200
Mast cell tryptase, AA1	DAKO, Glostrup, Denmark	Mouse	Monoclonal	1 : 200
Mast cell chymase	BIOGENESIS, England, UK	Mouse	Monoclonal	1 : 5000
Histamine	ICN Pharmaceuticals, Aurora, OH, USA	Rabbit	Polyclonal	1 : 200
Endothelin-1	AFFINITY BIOREAGENTS, Golden, CO, USA	Mouse	Monoclonal	1 : 500
Endothelin A Receptor	ALEXIS, San Diego, CA, USA	Sheep	Polyclonal	1 : 400
Endothelin B Receptor	ALEXIS, San Diego, CA, USA	Sheep	Polyclonal	1 : 40
Inducible Nitric Oxide Synthase	AFFINITY BIOREAGENTS, Golden, CO, USA	Rabbit	Polyclonal	1 : 500
Endothelial Nitric Oxide Synthase	TRANSDUCTION LABORATORIES, Lexington, KY, USA	Mouse	Monoclonal	1 : 200
Biotinylated secondary antibodies against				
Sheep IgG	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	Rabbit	Polyclonal	1 : 200
EnVision+				
Mouse	DAKO, Carpinteria, CA, USA	Goat	Polyclonal	no dilution
Rabbit	DAKO, Carpinteria, CA, USA	Goat	Polyclonal	no dilution

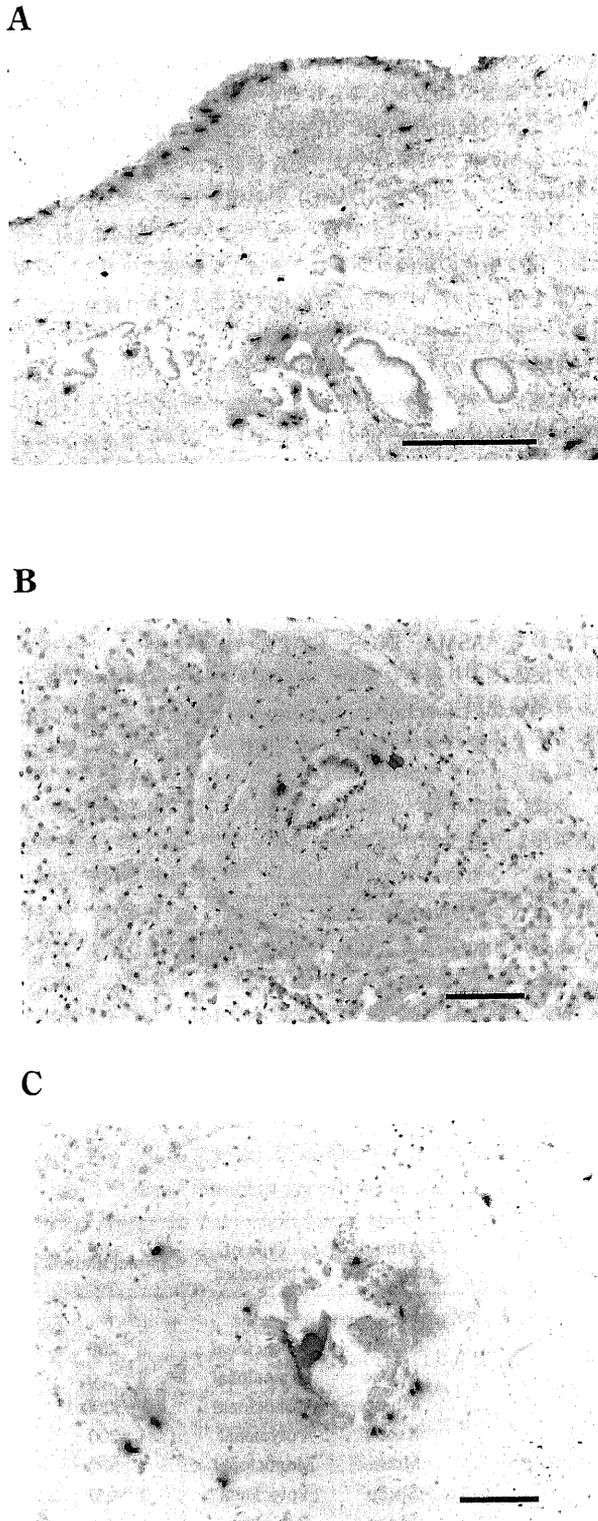


Fig. 1. Immunohistochemical staining of tryptase. (A) Tryptase-positive mast cells (brown) are regularly distributed along the duct lumen and sparsely scattered in the duct wall and periductal tissue. Scale bar indicates 100 μ m. (B) Some tryptase-positive mast cells (brown) are seen around the septal bile duct in normal liver. Scale bar indicates 100 μ m. (C) Many tryptase-positive mast cells (brown) are seen around the septal bile duct in cirrhotic liver. Scale bar indicates 100 μ m.

Table 3. Number of peribiliary mast cells in normal liver, chronic hepatitis and liver cirrhosis

Hepatic diseases (number of cases examined)	Number of mast cells around septal bile ducts ($\bar{X} \pm SD, /mm^2$)
Normal liver (71)	39.4 \pm 20.8
Chronic hepatitis (24)	46.6 \pm 28.3
Liver cirrhosis (45)	59.0 \pm 29.9

*

* $p < 0.05$

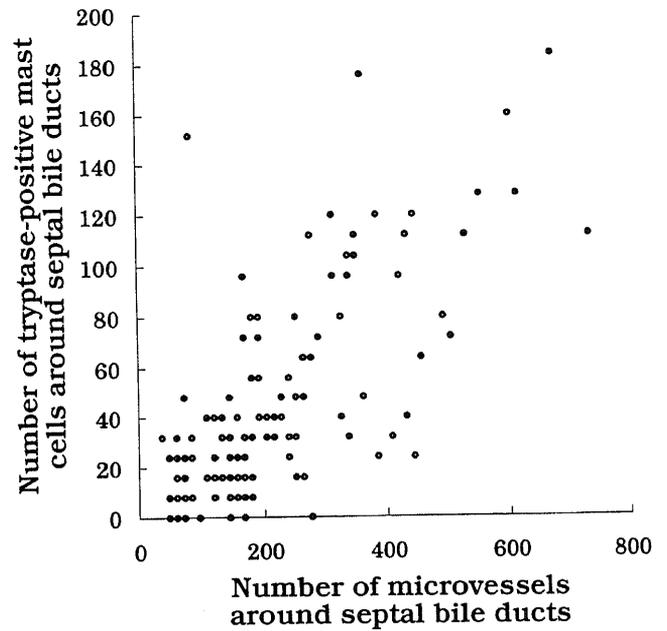


Fig. 2. Correlation between the numbers of peribiliary microvessels and peribiliary mast cells. The peribiliary mast cells and the vessels of peribiliary vascular plexus are parallel in their numbers in normal and cirrhotic livers. $r = 0.713$. \circ , normal liver; \bullet , liver cirrhosis.

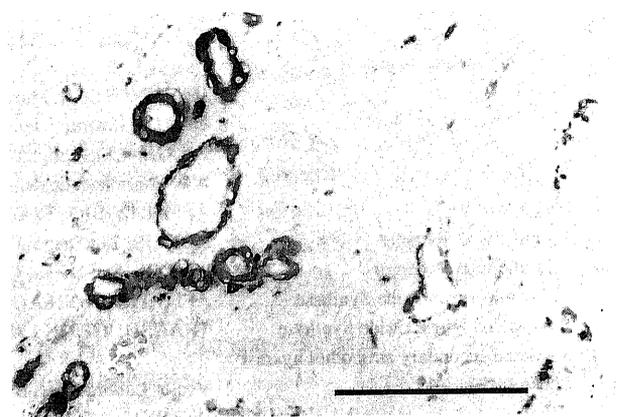


Fig. 3. Double-immunostaining of tryptase and α -smooth muscle actin. Some of tryptase-positive mast cells (blue) are located close to the α -smooth muscle actin-positive pericytes (brown) in cirrhotic livers. Scale bar indicates 100 μ m.

活させ、10%非免疫ヤギ血清で処理した。次いで、抗CD34、ASMA、ET-1マウスモノクローナル1次抗体あるいは抗iNOSウサギポリクローナル1次抗体で4℃で一晩反応させた。PBSで洗浄後、室温で45分間マウス用あるいはウサギ用エンビジ

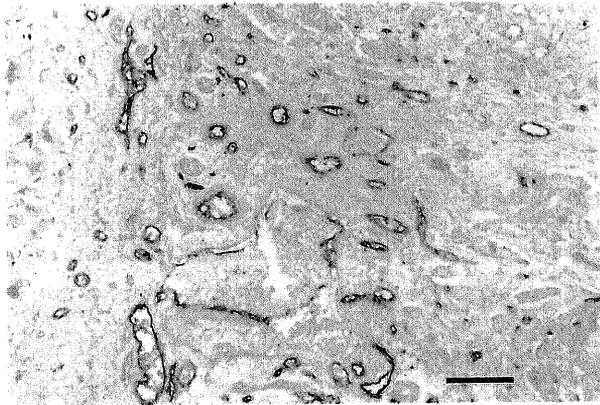


Fig. 4. Double-immunostaining of endothelial nitric oxide synthase and CD34. Majority of vascular endothelial cells is double positive (dark brown) for endothelial nitric oxide synthase (brown) and CD34 (blue) in cirrhotic liver. Scale bar indicates 100 μ m.

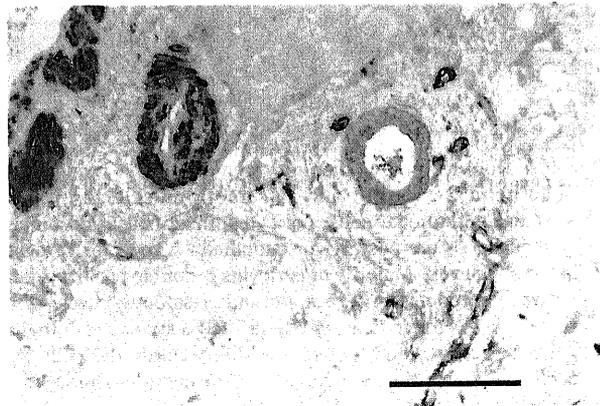


Fig. 5. Double-immunostaining of inducible nitric oxide synthase and α -smooth muscle actin. Vascular endothelial cells, pericytes, mast cells, and biliary epithelial cells are positive for inducible nitric oxide synthase (brown) in cirrhotic liver. Majority of pericytes is double positive (dark brown) for inducible nitric oxide synthase and α -smooth muscle actin (blue). Scale bar indicates 100 μ m.

ョン+で処理し、ベンジジン反応にて褐色に発色した。それから流水にて洗浄後、PBSで98℃で10分間処理した。次いで抗ヒト肥満細胞トリプターゼマウスモノクローナル1次抗体を反応させた後、エンビジョン/AP (EnVision/AP) (DAKO) で反

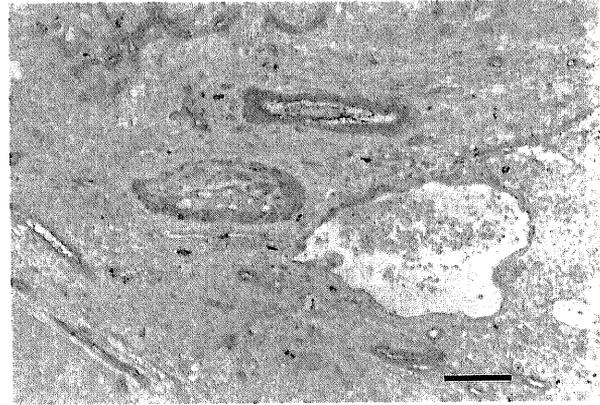


Fig. 6. Double-immunostaining of inducible nitric oxide synthase and tryptase. Some mast cells are double positive (dark brown) for inducible nitric oxide synthase (brown) and tryptase (blue) in cirrhotic liver. Scale bar indicates 100 μ m.

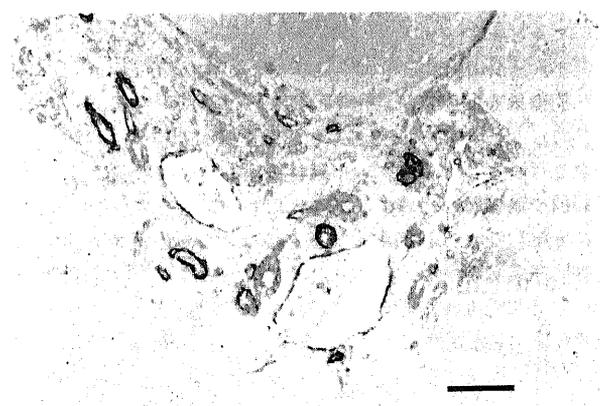


Fig. 7. Double-immunostaining of endothelin 1 and α -smooth muscle actin. Vascular endothelial cells, pericytes, mast cells, and biliary epithelial cells are positive for endothelin 1 (brown) in cirrhotic liver. Majority of pericytes is double positive (dark brown) for endothelin 1 and α -smooth muscle actin (blue). Scale bar indicates 100 μ m.

Table 4. Immunohistochemical results on vasoactive mediators around bile ducts in normal and cirrhotic livers

Vasoactive mediators	Vascular endothelium of PVP		Pericytes of PVP		Peribiliary mast cells		Biliary lining epithelium	
	Normal	Cirrhotic	Normal	Cirrhotic	Normal	Cirrhotic	Normal	Cirrhotic
Inducible nitric oxide synthase	--+	+~++	--+	+~++	--+	--++	--++	+~+++
Endothelial nitric oxide synthase	+~++	++~+++	--	--	--	--	--	--
Endothelin-1	+~++	+~+++	--+	--++	+~++	++~+++	+~++	++~+++
Endothelin A receptor	--+	+~++	--+	+~++	--+	--+	--++	+~+++
Endothelin B receptor	--+	+~++	--+	+~++	--+	--+	+~++	++~+++
Histamine	--±	--±	--±	--±	+	+~++	--	--

PVP, peribiliary vascular plexus; -, negative staining; ±, questionable staining; +, focal and weak staining; ++, between + and +++; +++, diffuse and strong staining.

応させた。アルカリフォスファターゼ活性は alkaline phosphatase substrate kit 3 (Vector Laboratories) で青色に発色した。

コントロールは1次抗体の代わりに非免疫血清を用い、反応が陰性化することにより確認した。

4. 肥満細胞数およびPVP血管数の計測

CD34, トリプターゼ, 血管作動性物質の免疫染色標本(連続切片)を用い、顕微鏡用デジタルカメラDIGITAL CAMERA HC-300(富士フィルム, 東京)で像をマイクロコンピュータに取り込み、画像解析ソフトであるNIH IMAGE (National Institutes of Health, Bethesda, USA)を用いて解析した。それぞれの切片で3~5ヶ所の隔壁胆管周囲および1~3ヶ所の肝内大型胆管周囲を選択し、トリプターゼおよび血管作動性物質を発現している肥満細胞数, およびCD34を発現している血管内皮細胞を同定することにより血管数を胆管周囲領域に限定して数えた。この胆管周囲領域の面積をNIH IMAGEで測定し、胆管周囲の単位面積当たりの肥満細胞密度を算出した。

5. 統計学的検討

正常肝および各種病的肝における胆管周囲肥満細胞数の平均値およびキマーゼ陽性肥満細胞の比率の差をt検定で検討した。胆管周囲肥満細胞数とPVP血管数の関連については相関係数をもとめ、ピアソンの相関係数を用いて検定した。

成 績

I. 正常肝, 慢性肝炎および肝硬変における肥満細胞の分布と局在

1. 肥満細胞の分布

肥満細胞は免疫組織化学的にトリプターゼ強陽性を示した(図1)。トリプターゼ陽性単核細胞を肥満細胞とし、以下の検討を行った。トリプターゼ陽性肥満細胞は肝内胆管付属腺の周囲や隔壁胆管, および肝内大型胆管に沿って規則的かつ密に分布していた(図1A)。本研究ではこれらの肥満細胞を“胆管周囲肥満細胞”と呼ぶ。トリプターゼ陽性の胆管周囲肥満細胞は胆管上皮細胞の直下では密に規則正しく分布するが、胆管壁や胆管周囲組織では散在性に分布していた(図1A)。肥満細胞は小葉間胆管, あるいは細胆管の周囲では散見される

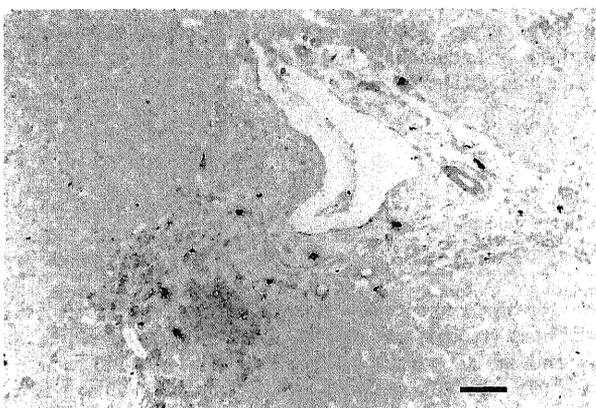
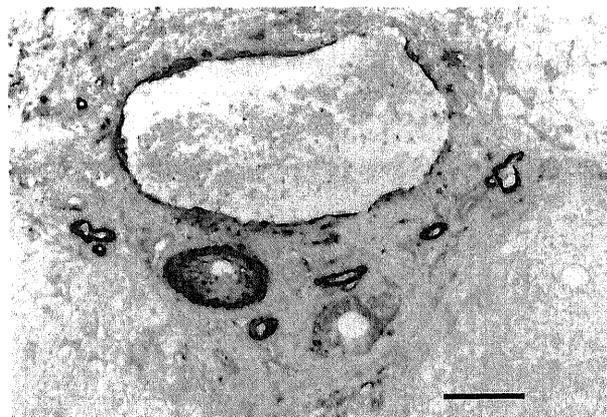


Fig. 8. Double-immunostaining of endothelin 1 and tryptase. Majority of mast cells is double positive (dark brown) for endothelin 1 (brown) and tryptase (blue) in cirrhotic liver. Scale bar indicates 100 μ m.

A



B

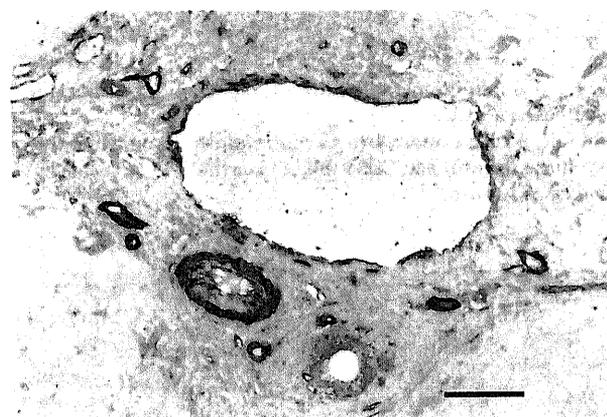


Fig. 9. Double-immunostaining of endothelin A receptor or endothelin B receptor and α -smooth muscle actin. (A) Vascular endothelial cells, pericytes, mast cells, and biliary epithelial cells are positive for endothelin A receptor (brown) in cirrhotic liver. Majority of pericytes is double positive (dark brown) for endothelin A receptor and α -smooth muscle actin (blue). Scale bar indicates 100 μ m. (B) Vascular endothelial cells, pericytes, mast cells, and biliary epithelial cells are positive for endothelin B receptor (brown) in cirrhotic liver. Scale bar indicates 100 μ m.

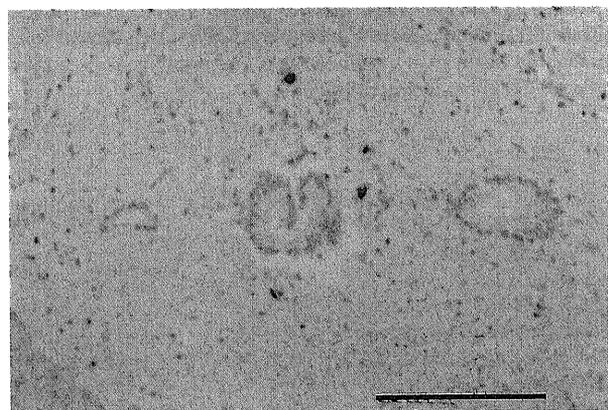


Fig. 10. Immunostaining of histamine. Some histamine-positive mast cells (brown) are seen around the septal bile duct in cirrhotic liver. Scale bar indicates 100 μ m.

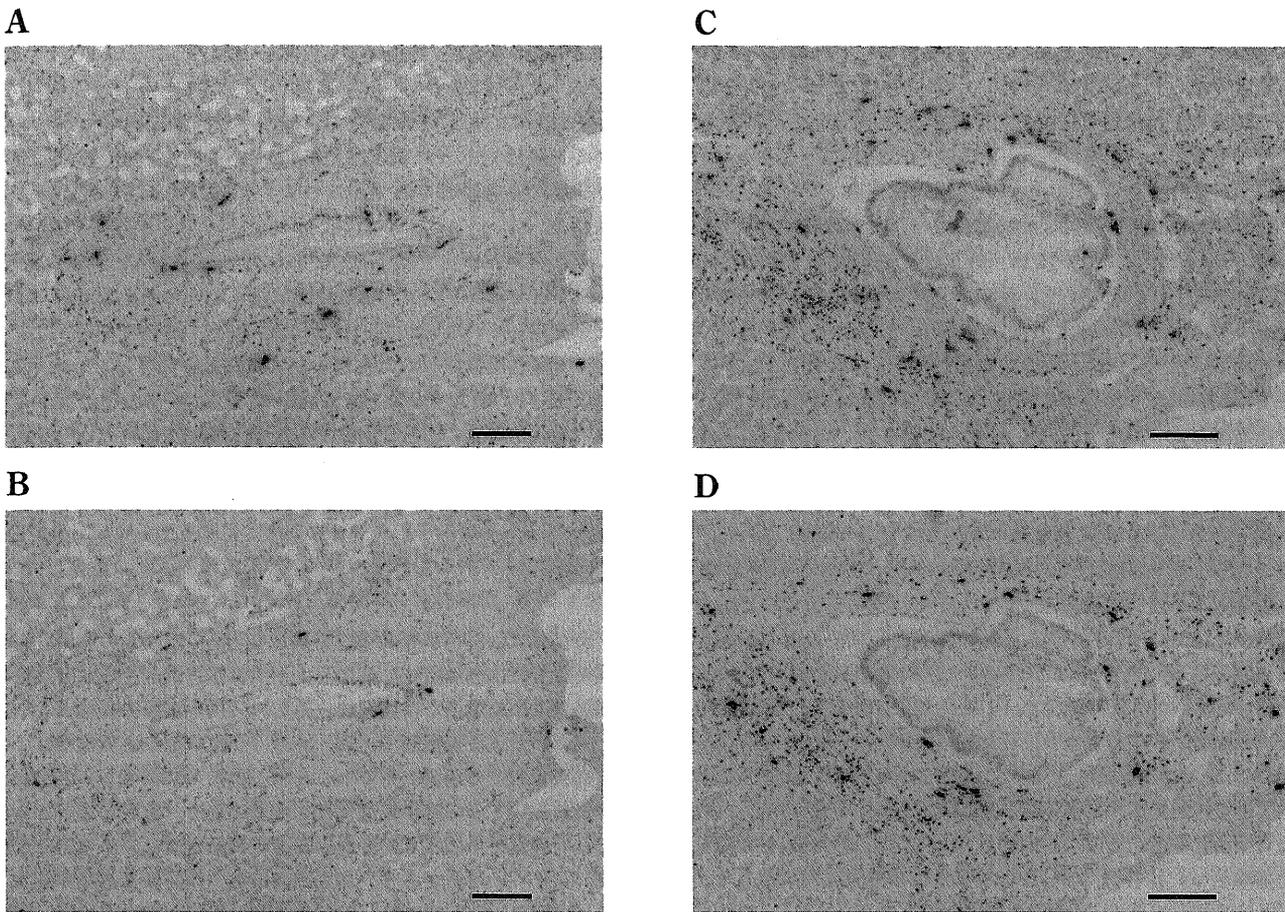


Fig. 11. Immunostaining of tryptase and chymase. (A) Some tryptase-positive mast cells (brown) are seen around the septal bile duct in normal liver. Scale bar indicates $100\ \mu\text{m}$. (B) Only a few chymase-positive mast cells (brown) are seen on an adjacent section to A. Scale bar indicates $100\ \mu\text{m}$. (C) Many tryptase-positive mast cells are seen around the septal bile ducts in cirrhotic liver. Scale bar indicates $100\ \mu\text{m}$. (D) Many chymase-positive mast cells are also seen on an adjacent section to C. Scale bar indicates $100\ \mu\text{m}$.

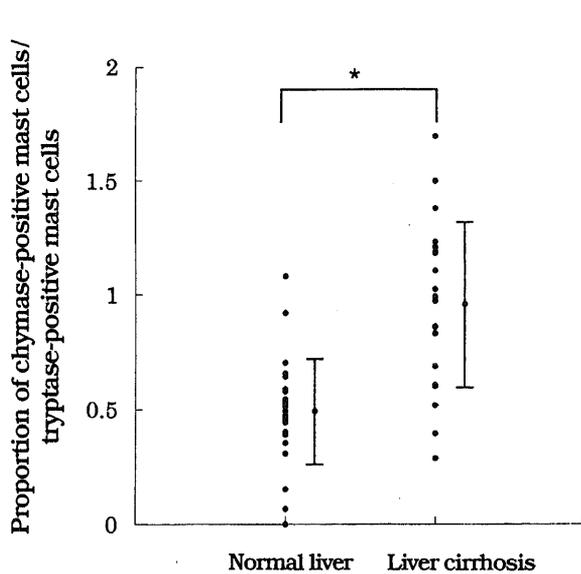


Fig. 12. Proportion of mast cells with respect to immunohistochemical positivity of chymase and tryptase. About half of peribiliary mast cells in normal livers are tryptase-positive, chymase-negative mast cells and the remaining tryptase-positive, chymase-positive mast cells, while majorities of peribiliary mast cells in cirrhotic livers are tryptase-positive, chymase-positive mast cells. * $P < 0.01$.

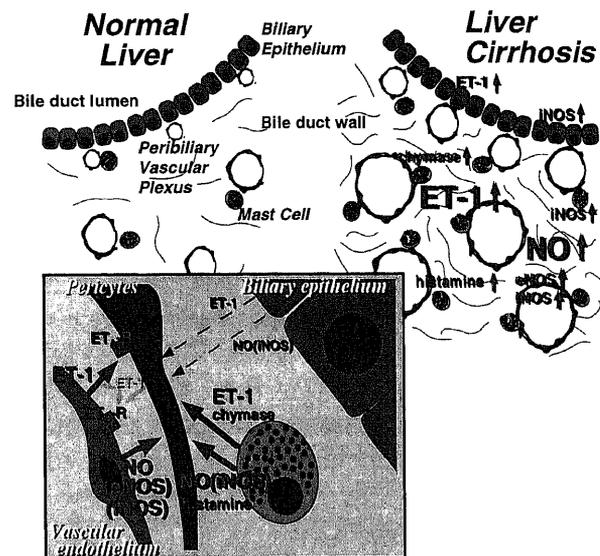


Fig. 13. Mechanism for regulation on blood flow in peribiliary vascular plexus. Microvessels of peribiliary vascular plexus are increased and dilated in liver cirrhosis. Vasoactive substances secreted locally from the cell components including mast cells around the biliary tree are involved in the hemodynamic regulation of peribiliary vascular plexus in normal liver and in the vascular and hyperdynamic changes of peribiliary vascular plexus in cirrhosis.

のみであった。肝被膜には多数の肥満細胞が認められたが、肝実質内の類洞やその他の肝臓の部位では極く少数散見される程度であった。正常肝(図1B)に比べ肝硬変では肝内胆管周囲の肥満細胞は増加しており(図1C)、慢性肝炎でも正常肝より増加していた。

2. 定量的検討

正常肝の隔壁胆管周囲の肥満細胞数は $39.4 \pm 20.8/\text{mm}^2$ であった。肝硬変では $59.0 \pm 29.9/\text{mm}^2$ で正常肝に比べ増加していた($p < 0.05$) (表3)。慢性肝炎での胆管周囲肥満細胞の数は $46.6 \pm 28.3/\text{mm}^2$ で正常と肝硬変の間であった(表3)。なお、肝硬変では胆管周囲肥満細胞は胆管上皮直下、胆管壁内および胆管周囲組織で増加し(図1C)、肝内胆管付属腺の周囲や内部でも増加していた。

3. 胆管周囲肥満細胞とPVPの関連性

正常肝、慢性肝炎および肝硬変において、胆管上皮直下の肥満細胞の多くがPVPの内層の小血管に密接していた(図1A)、肝硬変では正常肝に比べてPVP血管数は増加し、PVPの血管腔も拡張していた。連続切片を用いたトリプターゼおよびCD34の免疫染色でいずれの染色も良好であった正常肝40例(隔壁胆管周囲領域87ヶ所)、および肝硬変25例(隔壁胆管周囲領域58ヶ所)を用いた定量的研究で、正常肝および肝硬変で胆管周囲肥満細胞数とPVPの血管数は正の相関関係を示した($r = 0.713$) (図2)。トリプターゼとASMAの免疫二重染色では正常肝において半数の胆管周囲肥満細胞がASMA陽性周皮細胞、あるいは血管平滑筋細胞に密接して認められた(図3)。残りの胆管周囲肥満細胞は、胆管壁内および胆管壁周囲の結合織内に散在し、まれに胆管上皮層内にも認められた。

II. 肝内胆管および胆管周囲組織成分(肥満細胞を含む)における血管作動性物質の発現

1. NOS

1). eNOS

eNOSは正常肝においてPVPの内皮細胞に検出されるが、慢性肝炎および肝硬変で増加および拡張したPVPの内皮では発現が増強していた(図4, 表4)。他の細胞成分には明らかなeNOSの発現はみられなかった。

2). iNOS

正常肝においてiNOSはPVPの血管内皮細胞および周皮細胞で陰性、あるいは極く一部で検出された。胆管周囲肥満細胞は散在性にiNOS陽性であった。胆管上皮細胞と肝内胆管付属腺はiNOSを弱く発現していた。

一方、肝硬変においてはPVPの血管内皮細胞および周皮細胞に明瞭に、そして広範にiNOSの発現がみられた(図5, 表4)。肝硬変ではiNOSを発現している肥満細胞の数および比率が増加していた(図6, 表4)。肝硬変では胆管上皮および胆管周囲付属腺でのiNOSの発現はより広範でかつ強く染色された(図5, 表4)。

2. ET-1, ETAおよびETB受容体

ET-1は正常肝および肝硬変のPVPの血管内皮細胞、周皮細胞、胆管周囲肥満細胞と胆管上皮細胞および肝内胆管付属腺に検出された(図7, 表4)。ET-1とトリプターゼの免疫二重染色ではトリプターゼ陽性胆管周囲肥満細胞の多くがET-1を同時に発現していた(図8, 表4)。胆管周囲肥満細胞を含め、ET-1を発現している細胞成分の比率、数および染色強度は、正常肝より肝硬変で増加していた(表4)。ETAおよびETB受容体は

PVPの血管内皮細胞、周皮細胞、胆管上皮細胞に検出され、肥満細胞にも散在性に検出された(図9, 表4)。

3. ヒスタミン

正常および肝硬変において一部の胆管周囲肥満細胞がヒスタミン陽性であった(図10, 表4)。さらに、肝内胆管付属腺や胆管の基底膜にもわずかにヒスタミンの免疫反応性が確認された。

4. キマーゼ

正常肝ではトリプターゼ陽性肥満細胞のうち約半数がキマーゼを発現していた(図11A, B, 図12)。一方、肝硬変ではトリプターゼ陽性肥満細胞のほとんどがキマーゼも発現していた(図11C, D, 図12)。すなわち、正常肝では主に胆管上皮の直下や肝内胆管付属腺の周囲に位置する胆管周囲肥満細胞のうち、約半数がMCTで残りがMCT^cであるのに対し、肝硬変では胆管上皮直下や胆管壁内のものも含めて胆管周囲肥満細胞の多くがMCT^cであった。

考 察

肝循環では、門脈枝および肝動脈枝の2つの輸入血管が肝類洞を経て終末肝静脈枝に流出し、下大静脈に流入する。特に肝類洞の微小循環系では類洞内皮細胞の外周を類洞壁細胞が取り囲んでいる点特徴的である。肝臓の多種多様な生理作用はこの肝実質内での類洞を中心とした微小循環系に依存し、各種疾病肝においてこの微小循環変化が病態の発生、進展に重要である。肝実質を中心とした肝微小循環の調節機構についてはこれまでに多くの研究があり、血管内皮細胞-類洞壁細胞間の相互作用の重要性が指摘され、特に生体顕微鏡の観察で血管収縮物質に対する反応が終末門脈枝で最も強く⁷⁾、終末門脈枝の役割が注目されている。これらの領域で血管内皮細胞が産生するET-1は類洞壁細胞のETA受容体に作用し、これを収縮させる一方、自らのETB受容体に作用し、eNOSを活性化させる⁴³⁾⁴⁴⁾。そしてNOを産生、遊離し、類洞壁細胞を弛緩させると考えられ、こうした終末門脈枝の血管緊張の調節により類洞血流が調節されているとされている。

さて、肝循環における肝動脈系の役割、特に肝類洞に注ぐ以前の影響についての研究は少ない。類洞血流はその80%が門脈血流によるもので肝実質の機能は肝動脈血流には直接依存しないとされているが⁴⁵⁾、ヒトの肝移植において肝動脈再建と動脈血流維持が必須である。肝動脈枝の主経路の一つとして胆管周囲にPVPと呼ばれる密な微小血管叢が形成されており、PVPからの輸出血管は直接類洞に流入するか、あるいは終末門脈枝と吻合しその後肝類洞に注ぐ²⁵⁾。PVPは肝内胆管系の微小循環系であり⁴⁾、胆管系を栄養し、胆管系の生理作用に重要な役割を演ずる。さらに、各種胆道系疾患においてその分布と数が変動し、その病態の形成や維持に関連することが知られている⁴⁾。肝動脈塞栓術により注入された塞栓物質が末梢門脈枝まで流入しこれを塞栓するという事実、さらに門脈血流異常を伴う肝硬変において肝動脈由来のPVPが拡張、増生するという病理組織学的観察結果などから、肝動脈系、特にPVPは肝微小循環に果たす役割の観点からも注目に値すると考えられる。しかしながら、PVPの血行動態が正常および病的状態でのどのような機序で調節されているのかに関して不明点が多い。

最近、我々は肥満細胞が肝内胆管上皮直下に特異的に密に規則正しく分布することを明らかにした。肥満細胞は多種多様な

生理作用を有するが、最近、血流調節や血管新生への関与が注目されている^{46)~49)}。種々の臓器で微小循環における肥満細胞の役割は研究されているが³⁰⁾³¹⁾、肝内胆管系の微小循環(特にPVP)の制御機構、特に正常肝と肝硬変でのPVPと胆管周囲肥満細胞との関係についてはこれまでに研究されていない。そこで、今回、PVPの血行動態調節における肥満細胞の役割に注目し、血管作動性物質との関連性で検討した。

肥満細胞の分布を肥満細胞特異的トリプターゼの免疫染色で検討すると、肥満細胞は肝内胆管付属腺の周囲や隔壁胆管および肝内大型胆管に沿って、特に胆管上皮直下で規則正しく密に分布していた(図1A)。これらの所見は正常肝胆道系において胆管周囲肥満細胞が常在細胞であることを示唆している。Murataら⁵⁰⁾は大型門脈域において肥満細胞が比較的密に分布することを述べているが、胆管系との関連性には触れていない。なお、胆管周囲肥満細胞の分布パターンは消化管および呼吸器の粘膜における肥満細胞の分布パターンに類似している^{24)~26)}。このような胆管周囲肥満細胞の特徴的分布はこれらの肥満細胞が胆管上皮細胞あるいは付属腺上皮細胞の生理機能、胆汁の流速やその組成の変化などの胆管系の機能の調整あるいは局所防御に関与していることを示唆する⁵¹⁾⁵²⁾。胆管系への血流の調節もこれら胆管周囲肥満細胞が担っていると考えられる。

今回の研究により、胆管周囲肥満細胞の数は肝硬変では正常肝に比較して有意に増加しており、慢性肝炎では中間値を示すことが明らかとなった(表3)。肥満細胞はトリプターゼ、b-FGF、ヒスタミンなどを産生し、これらが線維芽細胞の増生、さらに線維増生に関連することが知られている¹⁹⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。この胆管周囲肥満細胞の増加は肝硬変における線維化の進行過程を反映しているものと思われるが、さらに胆管周囲での血流調節にも関係している可能性がある。

本研究で、正常肝、慢性肝炎、それに肝硬変において胆管上皮直下の肥満細胞の多くがPVPの内層を含む小血管に密着していた。特にトリプターゼおよびASMAの免疫二重染色でこれらの肥満細胞がASMA陽性周皮細胞に接していることが示された(図3)。周皮細胞は収縮能を持ち、血管径の調節に関連していることが示されている⁵³⁾。肝硬変ではこのPVPの小血管が増加し拡張する⁴⁾ことが知られているが、今回の定量的研究で正常肝、慢性肝炎および肝硬変において胆管周囲肥満細胞数とPVPの血管数が正の相関関係にあることが示された(図2)。胆管周囲肥満細胞とPVP小血管の数的および組織学的な密接な関連性、特に肥満細胞と周皮細胞との密着した配置は、胆管周囲肥満細胞がオートクリン、パラクリンあるいはジャクスタクリンを介してPVPの血管を調節していることを示唆する。最近、肥満細胞がb-FGFやトリプターゼを発現し細胞外基質の分解や血管内皮細胞の増生などに作用し、血管新生に関与することが報告されている^{19)34)46)~49)}。正常肝および肝硬変における肥満細胞数の増加とPVP血管の増生の有意な関連性は肥満細胞の血管新生作用を示しているのかもしれない。なお、真皮において肥満細胞数と血管密度の間に同様な数的相関が報告されている⁵⁴⁾。

次に、胆管周囲肥満細胞がPVPの血行動態調節にどの様に関与しているかを血管作動性物質の発現を調べ検討した。血管作動性物質として、ヒスタミン、ET-1、ETAおよびETB受容体、キマーゼ、iNOSそしてeNOSを選び、隔壁胆管および肝内大型胆管の周囲で胆管周囲肥満細胞、PVP、そして胆管上皮での発現を中心に免疫組織化学的に調べた。

NOは強力かつ重要な血管拡張物質として知られている。現在、NOの微小循環における役割は種々の臓器において検討されている。本研究ではNOの産生に関連する酵素であるeNOSとiNOSの発現を検討した。eNOSは正常肝では普遍的にPVPの内皮細胞に検出され、肝硬変でその発現が増強していた(図4、表4)。iNOSは正常肝では陰性あるいは胆管周囲肥満細胞、PVPの内皮細胞および周皮細胞にわずかに検出される程度であった。肝硬変ではiNOSを発現している肥満細胞の数と比率が増加し(図6、表4)、PVPの内皮細胞、周皮細胞でも明瞭かつ広範に発現していた(図5、表4)。正常肝では胆管上皮細胞と肝内胆管付属腺にiNOSの弱陽性像がみられたが、肝硬変ではより広範に、かつ強く発現していた(図5、表4)。これらの所見は肝硬変では肝内胆管およびその周囲の構成成分がiNOSとeNOSを強くかつ広範に発現していることを示している。iNOSはeNOSより10倍強いNO産生能をもつとされる⁵⁵⁾⁵⁶⁾。胆管周囲の環境でのiNOSとeNOSの発現増強はNOの産生と周囲組織への拡散を誘導し⁵⁷⁾、それは周皮細胞の緊張に影響を及ぼすと考えられる⁵⁸⁾。その結果、肝硬変において特にPVPでの血管拡張と循環亢進⁴⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾を引き起こす可能性が高い。リポポリサッカライド(lipopolysaccharide, LPS)、腫瘍壊死因子アルファ(tumor necrosis factor α , TNF- α)やインターフェロンガンマがiNOSの誘導に関係しているのかもしれない。これらはいずれも肝硬変で増加することが知られている。さらに、ヒスタミンやサイトカインのような肥満細胞由来の物質もiNOSの発現増強を起こしている原因となっている可能性がある。このような状況で、胆管周囲肥満細胞が直接NOSを発現し、さらに間接的に肝内胆管周囲の他の組織成分にNOS発現を誘導し、さらにはPVP小血管の拡張を引き起こし、それによりPVPの血流が増加すると考えられる。

ET-1の主な機能はETA受容体に優先的に結合し、血管平滑筋の収縮により局所の血管緊張を調節することである。内皮細胞は主にETB受容体をもつことが知られており、これを介してNOSを産生、放出し血管拡張を引き起こすと考えられている。肝では、ET-1は強力な血管収縮剤であり、類洞内でも類洞外でもオートクリンあるいはパラクリンにより機能する⁴⁴⁾⁶¹⁾。本研究で、ET-1は正常肝および肝硬変のPVPの内皮細胞、周皮細胞、さらにほとんど全ての胆管周囲肥満細胞と胆管上皮細胞、および肝内胆管付属腺に検出され(図7、8)、さらにET-1を発現している細胞成分の比率と数および染色強度は、正常肝に較べ肝硬変で増加していた。さらにETAおよびETB受容体はPVPの内皮細胞、周皮細胞、胆管上皮細胞に検出され、少数の肥満細胞にも検出された(図9)。肝硬変の肝内胆管上皮細胞におけるET-1とそのmRNAの発現についてはすでにPinzaniら⁶²⁾が報告している。また、ヒト胆管上皮細胞の初代培養よりET-1の分泌が示されている⁶³⁾。ET-1はセクレチン分泌など胆管上皮細胞機能に関与する⁶⁴⁾ほか、肝硬変ではその分泌が亢進し、門脈圧亢進症の発生の原因のひとつとされており⁶⁵⁾、ET-1の発現増強は形質転換成長因子ベータ、インターロイキン1、TNF- α 、エンドトキシン、低酸素状態などが関与するとされている。これらの報告および今回の検討よりPVPにおいてもET-1はオートクリンあるいはパラクリンにより周皮細胞に働き、PVPの収縮に作用していると考えられる。さらに、内皮細胞はET-1とその受容体との結合によりNO産生を誘導し、PVPの血管拡張に関連している可能性もある。ET-1を発現している

胆管周囲肥満細胞は、隣接するPVPの周皮細胞や内皮細胞に働き血管の緊張性の調節に寄与していると考えられる。

ヒスタミンは強力な血管拡張作用を示し、さらにその透過性を亢進させる⁶⁵⁾。また、血管内皮細胞からのNO放出を誘導する⁶⁶⁾。Feldmanら³⁰⁾は食道内の酸に対する食道微小循環の血管拡張性反応において肥満細胞由来のヒスタミンがNO依存性機構を介してその中心的役割を果たし、その結果生じた食道の充血が食道粘膜を保護することを明らかにしている。すなわち、粘膜での血流増加が食道あるいは他の消化管における粘膜保護に寄与することを証明した。本研究では、正常および肝硬変で胆管周囲肥満細胞の一部はヒスタミン陽性であった(図10)。肝内胆管系周囲では肥満細胞から放出されたヒスタミンが直接的に血管に働いたり、また間接的に内皮細胞のeNOSの誘導を介して働き⁶⁷⁾、その結果PVPの血管の拡張が起こると考えられている。食道と同じ様に肥満細胞由来ヒスタミンによるNO依存性の血流増加機構を介した動的機序が肝内胆管系に沿って作用しており、粘膜保護に寄与している可能性も考えられる³⁰⁾。最近、RotheとMaass-Moreno⁶⁸⁾はウサギではヒスタミンが肝亜小葉静脈のレベルで肝静脈抵抗を引き起こしていると報告しているが、この効果についてはヒトでは不明である。

さて、キマーゼは血管平滑筋細胞に血管収縮剤として働くことが知られている⁶⁹⁾。また、血管収縮因子で血圧を上昇させたり平滑筋細胞の増殖を誘導するAT-II産生酵素としても知られている⁷⁰⁾。肥満細胞はキマーゼの存在により、MC^T(トリプターゼ陽性、キマーゼ陰性肥満細胞)とMC^{TC}(トリプターゼ陽性、キマーゼ陽性肥満細胞)の大きく2つのタイプに分けられる²⁵⁾。2つのタイプはその構造と病態生理学的役割が違っており⁷¹⁾、MC^{TC}の主要成分の一つがキマーゼである⁶⁹⁾。今回の研究により正常肝では胆管上皮の直下や肝内胆管付属腺の周囲に位置する胆管周囲肥満細胞の約半数がMC^Tで残りがMC^{TC}であるのに対し、肝硬変では胆管上皮直下や胆管壁内のもも含め胆管周囲肥満細胞の多くはMC^{TC}タイプであることが明らかとなった(図12)。この結果から肝硬変では正常肝に比べて脱顆粒に際してより多くのキマーゼが分泌されているということが示唆された。胆管周囲肥満細胞から分泌されたキマーゼは細胞外基質の分解などの組織の再構築や炎症性サイトカインの活性化などに関与するとともに、肝硬変では正常肝より胆管系周囲の血行動態に強く関与することが示唆された。

PVPでは表4に示した様な血管作動性物質の発現がみられた。肝内胆管系周囲の環境に分泌された血管作動物質は上述したオートクリンあるいはパラクリンによりPVPに影響を及ぼすものと考えられる。そしてこれらの血管作動性物質の作用、あるいはその機序を図13に図解的に示した。血管内皮細胞および胆管周囲肥満細胞から産生、拡散されるNO、および肥満細胞が分泌するヒスタミンは周皮細胞に作用し、血管拡張へと作用する。血管内皮細胞および肥満細胞より分泌されたET-1は周皮細胞のETA受容体に作用し血管収縮性に作用する。一方、血管内皮細胞および肥満細胞より分泌されたET-1は血管内皮細胞のETB受容体に作用し、NO産生を誘導し血管の緊張性の調節をする。さらに、肥満細胞の分泌するキマーゼも直接あるいはAT-IIを介して間接的に血管収縮に作用している可能性がある。また、胆管上皮細胞が産生するNOやET-1もPVPに何らかの影響を及ぼしている可能性が高い。肝硬変では正常肝に比べてPVPが拡張、増生するとともに胆管周囲肥満細胞も増加

している。種々の血管作動性物質の発現も増強し、肝硬変でのPVPの拡張、増生などの病態形成に関与していると考えられる。肝小葉では肥満細胞は極く少数しか存在せず、内皮細胞や類洞壁細胞が主要な効果細胞であるが、胆管周囲では胆管周囲肥満細胞が恒常的に分布し、肝小葉とは異なると思われる。

肝硬変の合併症の一つとして知られる門脈圧亢進症は、内臓血管床での末梢血管拡張により生ずる循環過剰状態に関連し⁷²⁾、この循環過剰状態は腹水や門脈圧亢進症性胃粘膜障害などの肝硬変の合併症を引き起こすと思われる。今回の研究により、肝硬変ではPVPの血管が増加し、拡張していることが明らかになった。そしておそらく肝硬変における末梢血管拡張と循環過剰状態を反映していると思われる。最近の研究では循環過剰状態の病因について局所で作用する内皮非依存性、および内皮依存性の強力な血管拡張剤の産生増加、特に血管壁でのNOの過剰合成の役割が注目されている⁷³⁾。本研究で明らかとなった肝硬変における胆管系の微小環境でのNOSの発現増強は肝硬変におけるPVPの変化に寄与していると考えられる。しかし、正確な相互関係やPVPにおける主要な化学伝達物質は不明である。肝硬変では肝内胆管系に分布するPVPでの末梢血管拡張と血流増加の合併症として動脈-門脈短絡が代表的である。

PVPでの胆管周囲肥満細胞が発現しているiNOS、ET-1、キマーゼ、ヒスタミンなどの生物活性物質はPVPの内皮細胞あるいは周皮細胞に影響を与えていると考えられる。肥満細胞の細胞質顆粒に活性型として蓄積されているヒスタミンやキマーゼの様な血管作動性物質は細胞外に分泌されると、細胞外基質にあるヘパラン硫酸と結合し、比較的安定な状態を保つと考えられ⁶⁹⁾、PVPの血管成分に長期にわたって効果を及ぼしていると予想される。本研究で肝内胆管付属腺、および胆管壁の基底膜に同定されたヒスタミンの免疫反応性は基底膜成分に結合したヒスタミンを示しているものかもしれない。そしてヒスタミンもまた長期間にわたって作用する化学伝達物質のひとつと考えられる。

正常および病的肝において、胆管周囲肥満細胞がどのような生物活性を示すかはその物質の産生、分泌を調節する機構に依存していると考えられる。例えば、肝硬変において循環中で増加しているLPSやTNF- α は肥満細胞のiNOS発現増強に関係しているかもしれない⁷⁴⁾。Foreman⁷⁵⁾は神経単位と肥満細胞の比率が局所血流量の調節のような一連の生理作用に関与していることや、軸索反射により末梢神経から放出される神経伝達物質が肥満細胞からのヒスタミン分泌に影響していることを示している。最近Akiyoshiら⁷⁶⁾は肝臓において神経線維が肥満細胞に近接して存在することを報告している。Uchidaら⁷⁷⁾はET-1が肥満細胞を刺激し、生物活性物質を放出させると報告し、肥満細胞上にETAおよびETB受容体を証明している。肝臓で産生されるサブスタンスPも肥満細胞の脱顆粒を引き起こすとされる⁷⁸⁾。これらの成績より、胆管周囲肥満細胞は肝内自律神経線維および肝内局所で放出される液性因子により調節されていると思われる。最近、胆管上皮細胞が肥満細胞を活性化し集積させる幹細胞因子を発現していることが報告されている⁷⁹⁾。ヒトの疾患と動物モデルを使った胆管周囲肥満細胞のさらなる詳細で包括的な分析により、正常肝および肝胆道疾患におけるPVPの調節の複雑なネットワークが明らかになるとと思われる。今回の検討では、PVPの血流調節への肥満細胞の関与が示唆されたが、こうしたPVPの血流調節機序を明らかにすることは、各種

肝疾患におけるCT, MRI, 血管造影などの画像診断や肝動脈塞栓術をはじめとするインターベンショナルラジオロジーの解釈や開発などに応用でき、重要な臨床的意義を有するものと考えられる。

結 論

正常肝および肝硬変での肝内胆管周囲における微小血管の変動, 肥満細胞の分布および血管作動性物質の発現を免疫組織化学的に検討し, 以下の結論を得た。

1. 肥満細胞は隔壁胆管および肝内大型胆管の胆管上皮直下に規則正しく密に分布し, 特にPVP微小血管の周皮細胞と解剖学的に近接していた。

2. 正常肝と比較して肝硬変ではPVPの微小血管は拡張, 増生し, 胆管周囲肥満細胞もこれに平行して増加していた。

3. 胆管周囲肥満細胞の多くはET-1を発現し, 様々な頻度でヒスタミン, キマーゼ, iNOS, ETAおよびETB受容体を発現していた。PVPの周皮細胞はET-1, iNOS, ETAおよびETB受容体を発現していた。PVPの血管内皮細胞はeNOSとET-1を恒常的に発現し, iNOS, ETAおよびETB受容体は様々な頻度で発現していた。胆管上皮細胞はET-1, iNOS, ETAおよびETB受容体を様々な頻度で発現していた。

4. 正常肝と比較して肝硬変では各種の血管作動性物質の発現は強く, これらの物質を発現している胆管周囲肥満細胞数も増加していた。

以上の結果より, 胆管周囲肥満細胞を含むPVPの構成細胞要素が産生する血管作動性物質がパラクリンあるいはオートクリンの機序を介してPVP微小循環の調節に協調的に働いていると考えられた。また, これら胆管周囲肥満細胞を含む細胞要素から局所的に分泌される血管作動性物質が肝硬変におけるPVP血管の変動および血行動態変化に関連していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学医学部放射線医学講座松井 修教授ならびに終始直接御指導, 御校閲いただきました金沢大学医学部病理学第二講座中沼安二教授に深甚なる謝意を捧げます。また, 本研究の遂行に際し, 貴重な御指導, 御協力をいただきました金沢大学医学部病理学第二講座原田憲一講師, 常山幸一助手ならびに教室の諸先生, 技師の皆様に感謝いたします。

なお, 本研究の一部を第34回日本肝臓学会総会(1998年, 横浜), 第5回日本門脈圧亢進症学会総会(1998年, 福岡)にて発表した。

文 献

- 1) 児玉龍彦, 高橋 潔, 渋谷正史. 血管生物学, 第1版, 160-163頁, 講談社, 東京, 1997
- 2) Oda M, Nakamura M, Watanabe N. *In* M Tsuchiya, H Wayland, M Oda (eds). *Intravital Observation of Organ Microcirculation*, 1st ed, p105-138, Excerpta Medica, Amsterdam, 1983
- 3) Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 38: 552-570, 1997
- 4) Kobayashi S, Nakanuma Y, Matsui O. Intrahepatic peribiliary vascular plexus in various hepatobiliary diseases: a histological survey. *Hum Pathol* 25: 940-946, 1994
- 5) Rappaport AM. *In* L Schiff, ER Schiff (eds). *Diseases of the Liver*, 5th ed, p1-57, Lippincott, Philadelphia, Toronto, 1982
- 6) Rappaport AM. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 6: 212-228, 1973
- 7) Oda M, Azuma T and Watanabe N. Regulatory mechanisms of the hepatic microcirculation - Involvement of the contraction and dilatation of sinusoids and sinusoidal endothelial fenestrae. *Prog Appl Microcirc* 17: 103-128, 1990
- 8) McCuskey RS, Reilly FD. Hepatic microvasculature: dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis* 13: 1-12, 1993
- 9) Oda M, Kaneko H, Suematsu M. A new aspect of the hepatic microvasculature: electron microscopic evidence for the presence of Ito cells around portal and hepatic venules as pericytes. *Prog Appl Microcirc* 19: 25-39, 1993
- 10) Yanagisawa M. The endothelin system. A new target for therapeutic intervention. *Circulation* 89: 1320-1322, 1994
- 11) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993
- 12) Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 213: 815-823, 1993
- 13) Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Am J Physiol* 271: G260-267, 1996
- 14) Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 95: 1199-1206, 1995
- 15) Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 24: 233-240, 1996
- 16) Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 25: 2-5, 1997
- 17) Rockey DC, Fouassier L, Chung JJ, Carayon A, Vallee P, Rey C, Housset C. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells. *Hepatology* 27: 472-480, 1998
- 18) Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology* 111: 1118-1124, 1996
- 19) Yamashiro M, Kouda W, Kono N, Tsuneyama K, Matsui O, Nakanuma Y. Distribution of intrahepatic mast cells in various hepatobiliary disorders. An immunohistochemical study. *Virchows Arch* 433: 471-479, 1998
- 20) Wilson LM, Baldwin AL. Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa. *Microcirculation* 6: 189-198, 1999
- 21) Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol*

- Rev 77: 1033-1079, 1997
- 22) Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346: 274-276, 1990
- 23) Marone G, Casolaro V, Patella V, Florio G, Triggiani M. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 207-217, 1997
- 24) Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 328: 257-265, 1993
- 25) Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 37: 1509-1515, 1989
- 26) Weidner N, Austen KF. Evidence for morphologic diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab Invest* 63: 63-72, 1990
- 27) Perdue MH, Marshall J, Masson S. Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum. Involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* 98: 561-567, 1990
- 28) Crowe SE, Luthra GK, Perdue MH. Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut* 41: 785-792, 1997
- 29) Theodorou V, Eutamene H, Fioramonti J, Junien JL, Bueno L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: involvement of mast cells and prostaglandins. *Gastroenterology* 106: 1493-1500, 1994
- 30) Feldman MJ, Morris GP, Dinda PK, Paterson WG. Mast cells mediate acid-induced augmentation of opossum esophageal blood flow via histamine and nitric oxide. *Gastroenterology* 110: 121-128, 1996
- 31) Wallace JL, McKnight GW, Befus AD. Capsaicin-induced hyperemia in the stomach: possible contribution of mast cells. *Am J Physiol* 263: G209-214, 1992
- 32) Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13: 1382-1397, 1999
- 33) Meininger CJ, Zetter BR. Mast cells and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 3: 73-79, 1992
- 34) Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol* 147: 564-573, 1995
- 35) Dethlefsen SM, Matsuura N, Zetter BR. Mast cell accumulation at sites of murine tumor implantation: implications for angiogenesis and tumor metastasis. *Invasion Metastasis* 14: 395-408, 1994
- 36) Roche WR. Mast cells and tumour angiogenesis: the tumor-mediated release of an endothelial growth factor from mast cells. *Int J Cancer* 36: 721-728, 1985
- 37) Shiota N, Okunishi H, Takai S, Mikoshiba I, Sakonjo H, Shibata N and Miyazaki M. Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointima formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation* 99: 1084-1090, 1999
- 38) Takai S, Jin D, Sakaguchi M and Miyazaki M. Chymase-dependent angiotensin II formation in human vascular tissue. *Circulation* 100: 654-658, 1999
- 39) Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 22: 1175-1181, 1995
- 40) Rioux KP, Sharkey KA, Wallace JL, Swain MG. Hepatic mucosal mast cell hyperplasia in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 23: 888-895, 1996
- 41) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, Goto M, Shimosato Y. The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol* 125: 431-435, 1986
- 42) Park F, Mattson DL, Roberts LA, Cowley AW, Jr.. Evidence for the presence of smooth muscle alpha-actin within pericytes of the renal medulla. *Am J Physiol* 273: R1742-1748, 1997
- 43) Gondo K, Ueno T, Sakamoto M, Sakisaka S, Sata M, Tanikawa K. The endothelin-1 binding site in rat liver tissue: light- and electron- microscopic autoradiographic studies. *Gastroenterology* 104: 1745-1749, 1993
- 44) Leivas A, Jimenez W, Bruix J, Boix L, Bosch J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Gene expression of endothelin-1 and ET(A) and ET(B) receptors in human cirrhosis: relationship with hepatic hemodynamics. *J Vasc Res* 35: 186-193, 1998
- 45) 織田正也, 塚田信廣, 渡辺勲史. 肝微小循環の調節機構—生体顕微鏡ならびに超微形態学的立場から—. *脈管学* 24: 33-44, 1984
- 46) Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli SJ. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med* 188: 1135-1145, 1998
- 47) Cairns JA, Walls AF. Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol* 156: 275-283, 1996
- 48) Compton SJ, Cairns JA, Holgate ST, Walls AF. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 161: 1939-1946, 1998
- 49) Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG, Gruber BL. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest* 99: 2691-2700, 1997
- 50) Murata K, Okudaira M, Akashio K. Mast cells in human liver tissue. Increased mast cell number in relation to the components of connective tissue in the cirrhotic process. *Acta Derm Venereol Suppl* 73: 157-165, 1973

- 51) Orlando RC. Esophageal epithelial defenses against acid injury. *Am J Gastroenterol* 89: S48-52, 1994
- 52) Quist RG, Ton-Nu HT, Lillienau J, Hofmann AF, Barrett KE. Activation of mast cells by bile acids. *Gastroenterology* 101: 446-456, 1991
- 53) Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D. Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol* 104: 483-490, 1987
- 54) Eady RA, Cowen T, Marshall TF, Plummer V, Greaves MW. Mast cell population density, blood vessel density and histamine content in normal human skin. *Br J Dermatol* 100: 623-633, 1979
- 55) Lewis RS, Tamir S, Tannenbaum SR, Deen WM. Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro. *J Biol Chem* 270: 29350-29355, 1995
- 56) Reilly FD, Dimlich RV, Cilento EV, McCuskey RS. Hepatic microvascular regulatory mechanisms. III. Aminergic mechanisms as related to mast cells. *Int J Microcirc Clin Exp* 2: 61-73, 1983
- 57) Lancaster JR, Jr. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8137-8141, 1994
- 58) Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 78: 919-925, 1994
- 59) Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 8: 1151-1157, 1988
- 60) Sogni P, Moreau R, Gadano A, Lebrec D. The role of nitric oxide in the hyperdynamic circulatory syndrome associated with portal hypertension. *J Hepatol* 23: 218-224, 1995
- 61) Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. *Am J Physiol* 267: G143-149, 1994
- 62) Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 110: 534-548, 1996
- 63) Housset C, Carayon A, Housset B, Legendre C, Hannoun L, Poupon R. Endothelin-1 secretion by human gallbladder epithelial cells in primary culture. *Lab Invest* 69: 750-755, 1993
- 64) Caligiuri A, Glaser S, Rodgers RE, Phinizy JL, Robertson W, Papa E, Pinzani M, Alpini G. Endothelin-1 inhibits secretin-stimulated ductal secretion by interacting with ETA receptors on large cholangiocytes. *Am J Physiol* 275: G835-846, 1998
- 65) Befus D, Fujimaki H, Lee TD, Swieter M. Mast cell polymorphisms. Present concepts, future directions. *Dig Dis Sci* 33: 16S-24S, 1988
- 66) Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* 14: 376-390, 1998
- 67) Shibayama Y. In G Toda, M Oda, K Kiyosawa, H Tsubouchi, Y Nakanuma (eds), *Hepatology. Basic Science*, 1st ed, p349-355, Igaku Shoin, Tokyo, 1998
- 68) Rothe CF, Maass-Moreno R. Hepatic venular resistance responses to norepinephrine, isoproterenol, adenosine, histamine, and ACh in rabbits. *Am J Physiol* 274: H777-785, 1998
- 69) Sayama S, Iozzo RV, Lazarus GS, Schechter NM. Human skin chymotrypsin-like proteinase chymase. Subcellular localization to mast cell granules and interaction with heparin and other glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 262: 6808-6815, 1987
- 70) Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 2: 277-284, 1984
- 71) Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 58: 682-691, 1988
- 72) Michielsen PP, Pelckmans PA. Haemodynamic changes in portal hypertension: new insights in the pathogenesis and clinical implications. *Acta Gastroenterol Belg* 57: 194-205, 1994
- 73) Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 23: 1616-1621, 1996
- 74) Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?. *Lancet* 337: 776-778, 1991
- 75) Foreman JC. Neuropeptides and the pathogenesis of allergy. *Allergy* 42: 1-11, 1987
- 76) Akiyoshi H, Terada T. Mast cell, myofibroblast and nerve terminal complexes in carbon tetrachloride-induced cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 29: 112-119, 1998
- 77) Uchida Y, Ninomiya H, Sakamoto T, Lee JY, Endo T, Nomura A, Hasegawa S, Hirata F. ET-1 released histamine from guinea pig pulmonary but not peritoneal mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1196-1201, 1992
- 78) Suzuki H, Miura S, Liu YY, Tsuchiya M, Ishii H. Substance P induces degranulation of mast cells and leukocyte adhesion to venular endothelium. *Peptides* 16: 1447-1452, 1995
- 79) Omori M, Omori N, Everts RP, Teramoto T, Thorgeirsson SS. Coexpression of flt-3 ligand/flt-3 and SCF/c-kit signal transduction system in bile-duct-ligated SI and W mice. *Am J Pathol* 150: 1179-1187, 1997

Roles of Mast Cells in Hemodynamic Regulation of Peribiliary Vascular Plexus in Normal and Cirrhotic Livers: An Immunohistochemical Study Wataru Koda, Department of Radiology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **109**, 11 — 24 (2000)

Key words Mast cells, intrahepatic biliary tree, immunohistochemistry, biliary microcirculation, peribiliary vascular plexus

Abstract

Our pilot study disclosed that tryptase-positive mast cells were regularly distributed around the septal and intrahepatic large bile ducts (peribiliary mast cells). In this study, the pathophysiology of the mast cells was examined with respect to the microcirculation of the intrahepatic biliary tree in normal (n=71) and chronic liver disease (n=69) cases, which included cirrhotic livers. Mast cells were found close to the microvessels of the peribiliary vascular plexus (PVP) supplying the intrahepatic biliary tree, and were frequently adjacent to vascular smooth muscle cells including the pericytes of these vessels. In cirrhosis, the numbers of PVP microvessels and peribiliary mast cells increased in parallel. Expression of vasoactive substances was examined using immunohistochemistry. Peribiliary mast cells were frequently positive for endothelin 1 (ET-1), and were variably positive for histamine, chymase, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and endothelin A and B (ETA and ETB) receptors. Pericytes of PVP expressed ETA and ETB receptors in addition to ET-1 and iNOS. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and ET-1 were constantly present, and ETA and ETB receptors and iNOS were variably expressed on the vascular endothelial cells of the PVP. The biliary epithelial cells also expressed iNOS, ET-1, and ET_A and ET_B receptors focally. In comparison with normal livers these vasoactive substances were more strongly expressed and the numbers of mast cells expressing these substances was also found to be increased in cases involving cirrhosis. It seems plausible that these substances have a cooperative influence on the microcirculation via paracrine and autocrine effects. These results suggest that peribiliary mast cells play a role in the hemodynamic regulation of PVP in normal livers, and that vasoactive substances secreted locally from the cell components including mast cells around the biliary tree are involved in the vascular and hyperdynamic changes of PVP found in cases of cirrhosis.