

Roles of Mast Cells in Pathogenesis of Various Hepatobiliary Diseases, An Histopathological and Immunohistochemical Study

| | |
|-------|---|
| 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: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/9301 |

肝・胆管病変の発生・進展に果たす肝内肥満細胞の役割： 病理組織学的，免疫組織化学的研究

金沢大学医学部医学科放射線医学講座（主任：高島 力教授）
金沢大学医学部医学科病理学第二講座（主任：中沼安二教授）

山 城 正 司

肥満細胞は結合織，粘膜固有層に常在する細胞であり，多くの生物学的活性因子を含んでおり，種々の臓器での生理的，病的微小環境の形成，維持に重要とされ，その表現型から，結合織型と粘膜型に分けられる。肝内にも生理的に肥満細胞が存在し，種々の肝胆道系疾患でその分布や数に変動することが知られている。しかし，肥満細胞が肝胆道系の生理や病態形成に具体的にどの様な役割を果たしているかに関して十分な検索はなされていない。今回，成人正常肝11例及び各種肝胆道系疾患176例の肝内での肥満細胞の分布と数と表現型を検討し，その生理的意義，肝・胆管病変の発生，進展に果たす役割を検討した。肥満細胞に特徴的で，かつ検出感度の高い中性蛋白分解酵素の一つであるトリプターゼの免疫染色により，肝内での肥満細胞の分布を検討した。正常肝では肥満細胞は小型門脈域内（門脈域型肥満細胞），肝類洞内（類洞型肥満細胞）に疎に分布し，肝内大型胆管と隔壁胆管周囲や胆管付属腺周囲に比較的密に認められた（胆管周囲型肥満細胞）。これらの肥満細胞は小静脈や毛細血管に関連して出現するものが多く，特に，胆管周囲の胆管上皮直下にみられるものは，胆管周囲血管叢の内層と密接に関連していた。透過型電子顕微鏡を用いた検討でも，毛細血管に近接して特徴的な顆粒を持つ肥満細胞がみられた。トリプターゼおよびカイマーゼの免疫染色により肝内にみられる肥満細胞の表現型を検討した結果，胆管周囲型，特に胆管上皮直下に分布する肥満細胞はトリプターゼ陽性，カイマーゼ陰性の粘膜型肥満細胞の表現型を呈するものが多く，胆管壁内や胆管周囲結合織に存在する胆管周囲型肥満細胞や類洞型，門脈域型の肥満細胞はトリプターゼ陽性，カイマーゼ陽性の結合織型肥満細胞の表現型を示した。次に各種肝胆道系疾患肝での肥満細胞の分布と数の変化を検討した。慢性進行性肝疾患では正常肝に較べ門脈域型の肥満細胞が増加した。しかし，肝実質では肥満細胞の増加は明らかではなかった。原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎などの慢性胆汁うっ滞性疾患では，肥満細胞は線維性に拡大した小型門脈域や線維性隔壁内に多数みられた。また，原発性硬化性胆管炎や肝内結石症，肝外閉塞性黄疸例では肥満細胞は大型門脈域や肝内大型胆管や隔壁胆管周囲線維化部にも密に分布し，胆管の線維化に関係することが示唆された。これらの病的肝で増加を示す肥満細胞の表現型は結合織型肥満細胞であった。トリプターゼ陽性の肥満細胞には塩基性線維芽細胞増殖因子やヒスタミンが同時に染色されるものがあり，これらの媒介物質が肝の線維化，あるいは胆管の線維化に関連することが示唆された。肥満細胞のこれらの分布や数の変動は肝胆道系疾患の病理学的解析のみならず，臨床の現場での胆道造影や血管造影などの解釈に重要であり，インターベンショナル・ラジオロジーへの応用も可能と思われた。

Key words mast cell, intrahepatic biliary tree, tryptase, chymase, basic fibroblast growth factor

肥満細胞は多くの臓器の間質結合織内に存在し，多くの生理学的活性物質を持っており，臓器や組織での微小環境の形成維持に重要である^{1)~4)}。特に肺や胃腸管の粘膜，および皮膚の真皮は，外界の環境と生体内部との境界部位と考えられ，これらの部位で密に存在する肥満細胞は，生体防御，局所での微小循環，免疫，炎症などの発生，進展に深く係っていることを示している^{5)~8)}。最近，肥満細胞に含まれる蛋白分解酵素の発現パターンにより肥満細胞が大きく2分され，体内の各部位や病変部に出現，分布する肥満細胞にその表現型の違いがある^{9)~14)}。

肺実質や腸管粘膜で主にみられる肥満細胞は，肥満細胞に特徴的な蛋白分解酵素であるトリプターゼを免疫組織化学的に検出し得るが，カイマーゼやカルボキシペプチダーゼを持っていない型であり^{12)~14)}，免疫組織学的にMC_T型肥満細胞あるいは粘膜型肥満細胞と呼ばれ，電顕的に多くの完全な渦形を持つ顆粒を有する。もう1型は皮膚，乳腺，リンパ節，腸管の粘膜下組織に主にみられ，免疫組織学的に検出し得るカイマーゼ，トリプターゼ，カルボキシペプチダーゼを持っており，MC_{TC}型肥満細胞あるいは結合織型肥満細胞と呼ばれる¹²⁾¹⁴⁾。電顕的に辺

平成9年11月28日受付，平成10年3月2日受理

Abbreviations : ABC, Avidin-biotin-peroxidase complex; APAAP, alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase; AMeX, acetone-methyl benzoate-xylene; b-FGF, basic fibroblast growth factor; DAB, diaminobenzidine tetrahydrochloride; EBO, extrahepatic biliary obstruction; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; NO, nitric oxide; NPY, neuropeptide tyrosine; PBC, primary biliary cirrhosis; PBS, phosphate-buffered saline; PSC, primary

縁部に平行に配列する層を持つ顆粒を持つ肥満細胞である。さらにその置かれた環境で表現型が変化する、或いは特定の環境には特定の表現型を持つ肥満細胞の分布することも知られている¹¹⁾。

さて肝内でも肥満細胞が存在し、各種の病的肝で肥満細胞の数が変動し、肥満細胞の表現型やその生理機能、各種病態下での変動に関して2, 3の報告がなされている。すなわち、Bardadinら¹⁵⁾、Celasunら¹⁶⁾は、急性肝炎や肉芽腫性肝疾患における肥満細胞の病的な役割に注目しており、Farrellら¹⁷⁾はヒトのアルコール性肝障害と原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) を検索し、線維化に関連して肥満細胞が増加することを報告し、肝線維化と関連すると述べており、特にPBCで明瞭であったとしている。従来、皮膚や肺での肥満細胞には線維芽細胞の増殖に関連する塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) が証明され、線維増生や血管増生との関連性が注目されている¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに、肥満細胞から分泌される種々の生物学的活性因子、特に一酸化窒素 (nitric oxide, NO) やヒスタミンが肝内の微小循環に果たす役割も注目されている²⁰⁾。しかし、肝の病態生理に果たす肥満細胞の詳細な役割に関しては不明な点が多く残されている。

今回、正常肝の肝内での肥満細胞の分布を肥満細胞に特異的かつ高率に検出されるトリプターゼの免疫染色により検討し、さらに各種のヒト疾病肝での肥満細胞の分布、変動、さらに表現型の変化を検討した。そして、肝内肥満細胞のもつ生理的、病理学的意義を検討しようと試みた。

なお、HE染色での肥満細胞の同定、検討は困難であり、トルイジンブルー染色標本でのメタクロマジーを用いた肥満細胞の同定も知られているが²¹⁾、顆粒の程度や固定法により一定していない。

材料および方法

I. 肝内胆管系、胆管周囲血管叢および門脈域の解剖学的分類

ヒト肝内胆管系をNakanumaら²²⁾²³⁾に従い、肝内大型胆管と肝内小型胆管に大きく2分した。肝内大型胆管とは、左右肝管、区域胆管、領域胆管、およびその1, 2次分枝であり、肉眼的に同定が可能である。一方、肝内小型胆管は、肝内大型胆管の分枝であり、その組織像により隔壁胆管 (外径が100 μ m以上)、中等大および小型小葉間胆管 (外径がそれぞれ20~40 μ mと50~100 μ m)、細胆管 (外径が20 μ m以下) に分類した。肝内大型胆管と隔壁胆管では一層の円柱上皮下に、線維性で細胞成分に乏しい固有の胆管壁がみられ、さらにその周囲には疎な結合織 (胆管周囲結合織) が存在する。細胆管は正常肝では門脈域辺縁部にあり、各種の肝胆道系疾患時に種々の程度に増生する²⁴⁾²⁵⁾。肝内大型胆管周囲には付属腺が分布しており、胆管壁内にあるものを壁内腺、胆管壁外にあるものは壁外腺 (主に小葉状の形態を示し、複合小葉からなり、導管を介して肝内大型胆管腔と連絡する) に分けた²⁶⁾²⁷⁾。

肝内胆管系の分類に対応して、門脈域を小型門脈域、中等大門脈域、および大型門脈域に分類した。つまり、小型門脈域とは、小型小葉間胆管が分布する門脈域であり、中等大門脈域とは中等大小葉間胆管が分布する門脈域であり、大型門脈域とは隔壁胆管や肝内大型胆管が分布する門脈域である。

肝内胆管系は肝動脈により栄養されており、特に肝内大型胆管や隔壁胆管には肝動脈に由来する胆管周囲血管叢 (peribiliary vascular plexus, PVP) が分布する²⁸⁾。このPVPをKobayashiら²⁸⁾に従い、内層、中間層、外層に分けた。内層は、胆管上皮直下にみられるチェーン状の毛細血管叢であり、外層

Table 1. Main clinical features of formaline fixed and paraffin-embedded liver tissue specimens used in this study

| Hepatobiliary diseases | Number of cases | | | | Age ($\bar{X} \pm SD$, years) | Sex | |
|-----------------------------|-----------------|--|---------------|-------|------------------------------------|------|--------|
| | Needle biopsy | Wedge biopsy and surgical resected liver | Autopsy liver | Total | | Male | Female |
| PBC | | | | | | | |
| Total | 1 | 28 | 2 | 31 | 60.7 \pm 11.3 | 6 | 25 |
| Stage 1 | 0 | 10 | 0 | 10 | 57.6 \pm 8.2 | 1 | 9 |
| Stage 2 | 0 | 10 | 0 | 10 | 56.7 \pm 13.1 | 1 | 9 |
| Stage 3 | 1 | 6 | 0 | 7 | 65.7 \pm 10.8 | 3 | 4 |
| Stage 4 | 0 | 2 | 2 | 4 | 70.0 \pm 8.5 | 1 | 3 |
| PSC | 10 | 5 | 1 | 16 | 67.2 \pm 8.7 | 8 | 8 |
| EBO | 0 | 5 | 3 | 8 | 68.5 \pm 7.5 | 5 | 3 |
| Hepatolithiasis | 0 | 8 | 0 | 8 | 63.0 \pm 11.0 | 3 | 5 |
| Chronic viral hepatitis | 21 | 1 | 11 | 33 | 61.3 \pm 10.9 | 17 | 16 |
| Alcoholic liver disease | 12 | 0 | 0 | 12 | 53.1 \pm 12.5 | 12 | 0 |
| Autoimmune hepatitis | 7 | 0 | 0 | 7 | 61.3 \pm 9.7 | 2 | 5 |
| Drug-induced hepatitis | 15 | 0 | 0 | 15 | 55.3 \pm 17.3 | 10 | 5 |
| Acute viral hepatitis | 19 | 0 | 0 | 19 | 39.2 \pm 12.5 | 9 | 10 |
| Liver cirrhosis | 9 | 0 | 7 | 16 | 64.5 \pm 11.2 | 9 | 7 |
| Histologically normal liver | 0 | 2 | 9 | 11 | 74.4 \pm 5.9 | 8 | 3 |

PBC, primary biliary cirrhosis; PSC, primary sclerosing cholangitis; EBO, extrahepatic biliary obstruction.

sclerosing cholangitis; PVP, peribiliary vascular plexus; Strept ABC/AP, streptavidine-biotin complex with alkaline phosphatase; UEA-I, *Ulex europaeus* agglutinin I; 透過電顕, 透過型電子顕微鏡

は主に胆管周囲結合織内に分布する小動脈, 小静脈, 毛細血管であり, 中間層とは胆管壁と貫通している血管であり, 内層の輸出入血管に相当する. 肝内胆管付属腺にも, 毛細血管網が密に分布する²⁹⁾. なお, 小型および中等大門脈域では毛細血管や小動脈, 小静脈が認められたが, 特に胆管周囲に密に分布する血管網は組織レベルでは明らかではなかった.

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各種肝胆道系疾患の肝を対象とした. これらの肝は針生検, 外科的生検, 外科的手術および剖検時に得られたものである(外科的切除肝と剖検肝では, 肝実質および肝門部大型胆管の両方から標本を採取した). その内訳と症例数を表1および2に示す. 表1には, 10%中性緩衝ホルマリンで一昼夜以上固定され, パラフィンに包埋された症例を示した. 表2にはアセトン・メチルベンゾエート・キシレン (acetone-methyl benzoate-xylene, AMeX) 固定で固定されパラフィン包埋された症例を示す. なお, AMeX固定はSatoら³⁰⁾により開発された固定法であり, 蛋白, 核酸の抗原性や構造の保存に優れており, 凍結切片での使用が可能なモノクローナル抗体も応用可能である.

今回検討したホルマリン固定標本の症例は大きく, 以下の4群に分けることが可能であった.

1. 組織学的正常肝

11例を検討した. 死後変化の少ない剖検例や, 転移性肝癌の非腫瘍部肝や腹部外傷時に外科的に切除された組織学的正常肝

である. なお, 門脈域での軽度の線維増生や炎症細胞浸潤を示すもの, 軽度の脂肪沈着例や鉄沈着例, またクーパー細胞腫大を示す例も正常肝に含めた.

2. 急性肝疾患

急性ウイルス性肝炎19例 (A型4例, B型11例, C型4例), 急性薬物性肝炎15例, および急性のうっ血肝1例を用いた. なお, 急性薬物性肝炎はいずれも急性ウイルス性肝炎像を呈した.

3. 慢性肝胆道系疾患

アルコール性肝疾患の内訳はアルコール性脂肪肝 (3例), アルコール性肝線維症 (6例), アルコール性肝炎 (2例), アルコール性肝硬変 (1例) である. 慢性ウイルス性肝炎は, Desmetら³¹⁾により提唱された国際肝臓学会の線維化 (病期) 分類に従い, F1 (16例), F2 (7例), F3 (10例), F4 (16例) に分けた (F4は肝硬変に相当する). 病因としてB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) 関連が6例, C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) 関連が43例であった. なお, 慢性うっ血肝では種々の中心静脈周囲性の線維化がみられ, 急性うっ血肝では種々の程度の肝細胞の脱落がみられた. PBCの病期分類はScheuer³²⁾に従い, 組織学的にI~IV期に分類し, I期10例, II期10例, III期7例, IV期4例であった.

4. 肝内大型胆管疾患

肝内結石症, 肝外閉塞性黄疸 (extrahepatic biliary obstruction, EBO), 原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC) を検討した. これらの疾患, 特にPSCとEBOでは, 肝実質にも種々の胆汁うっ滞性病変がみられた. PSCの病期分類はLudwigら³³⁾に従い, I期6例, II期4例, III期4例, IV期2例に分類した.

また, AMeX固定標本は全例剖検例でありその内訳は, 組織学的正常肝28例, アルコール性肝疾患4例 (脂肪肝1例, 肝線維症2例, 肝硬変1例), 慢性ウイルス性肝炎24例 (F1が2例, F2が4例, F3が2例, F4すなわち肝硬変が16例, 病因としてHBV関連が3例, HCV関連が21例), EBO18例であった.

なお, 肥満細胞が豊富に存在している神経線維腫の1例 (65歳, 男性, 腹部皮下腫瘍) と剖検時あるいは外科手術時の肝, 皮膚, 胃腸管の凍結切片を以下の組織化学や免疫組織化学的検

Table 2. Main clinical features of AMeX fixed and paraffin-embedded liver tissue specimens used in this study

| Hepatobiliary diseases | Number of autopsy cases | Age ($\bar{X} \pm SD$, years) | Sex | |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------|------|--------|
| | | | Male | Female |
| EBO | 18 | 62.7 ± 13.2 | 9 | 9 |
| Chronic viral hepatitis | 8 | 72.9 ± 10.7 | 3 | 5 |
| Alcoholic liver disease | 4 | 62.5 ± 14.0 | 3 | 1 |
| Liver cirrhosis | 16 | 61.6 ± 10.8 | 14 | 2 |
| Histologically normal liver | 28 | 65.0 ± 16.5 | 15 | 13 |

AMeX, acetone-methyl benzoate-xylene; EBO, extrahepatic biliary obstruction.

Table 3. Primary and secondary antibodies used in this study and their optimal dilution

| Antibodies against | Source | Animals immunized | Type of antibodies | Suitable fixation | Optimal dilution |
|---|---|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| Primary antibodies | | | | | |
| Mast cell tryptase (AA1) | DAKO, Glostrup, Denmark | Mouse | Mono | F, A, L | 1:200 |
| Mast cell chymase | Chemicon, Temecula, CA, USA | Mouse | Mono | A, L | 1:200 |
| Bovine basic fibroblast growth factor type II | Upstate biotechnology, Lake Placid, NY, USA | Rabbit | Poly | F, A, L | 1:200 |
| Histamine | Chemicon, Temecula, CA, USA | Rabbit | Poly | F, A, L | 1:200 |
| Neuropeptide tyrosine (NPY) | Affiniti, Exeter, UK | Rabbit | Poly | F, A, L | 1:1000 |
| S100 protein | DAKO, Glostrup, Denmark | Rabbit | Poly | F, A, L | 1:400 |
| Biotinylated secondary antibodies | | | | | |
| Rabbit IgG | Vector, Burlingame, CA, USA | Goat | | | 1:200 |
| Mouse IgG | Vector, Burlingame, CA, USA | Horse | | | 1:200 |
| Rat IgG | Vector, Burlingame, CA, USA | Rabbit | | | 1:200 |
| Biotinylated lectin | | | | | |
| <i>Ulex europaeus</i> agglutinin I | Vector, Burlingame, CA, USA | | | | 1:200 |

mono, monoclonal antibody; poly, polyclonal antibody; F, formalin fixation; A, AMeX fixation; L, live tissue.

討の陽性対照に用いた。

Ⅲ. 病理組織学的, 免疫組織化学的検討

1. 病理組織学的検討

ホルマリン固定およびAMeX固定後パラフィンブロックより4 μ mの厚さのパラフィン薄切片を各々のブロックより20枚以上作製し, その内5~6枚をキシレン系列で型の如く脱パラフィンを行い, HE染色とアザン染色, ゴモリの鍍銀染色を行い, 光学顕微鏡的に観察し, 肝および肝内胆管系の病理組織学的検討, 肝線維化の程度の検討を行った。なお, 残りの切片は, 以下の免疫組織化学的検討に用いた。

2. 透過型電子顕微鏡による肥満細胞の観察

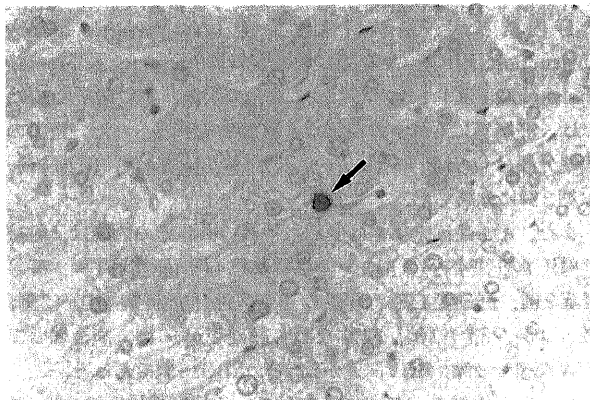
摘出した肝臓および肝門部の大型胆管の一部を冷2%グルタルアルデヒド(0.1M, カコジル酸緩衝液, pH7.4)内で細切後, 直ちに同液内で3時間固定した。0.1Mカコジル酸緩衝液で3回洗浄後, 2%オスミウム酸でさらに60分間, 後固定を行った。0.1Mカコジル酸緩衝液で3回洗浄した後, 型の如くエタノール系列で脱水し, エポン包埋し, 1 μ m切片を作製し, トリイジンブルー染色を行い, 観察に適したブロックを抽出した。トリミング後, 超薄切片を作製し, 続いて酢酸ウランとクエン酸鉛

の2重染色を行い, 透過型電子顕微鏡(透過電顕)(H300型, 日立製作所, 東京)で観察を行った。

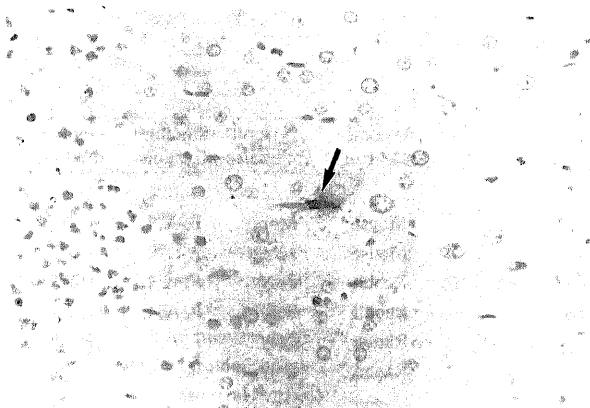
3. 免疫組織化学的検討

アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(avidin-biotin-peroxidase complex, ABC)法およびアルカリフォスファターゼ抗アルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase, APAAP)法により, 肥満細胞に特徴的に含有されているトリプターゼ, カイマーゼ, それにb-FGF, ヒスタミンの検出も行った。さらに神経ペプチドであるS-100と神経ペプチドチロシン(neuropeptide tyrosine, NPY)の検出も試みた。検出に用いた1次抗体, 2次抗体, および実際の染色に用いた最適希釈倍率を表3に示す。固定法による1次抗体の適応や応用性も表3に示す。なお, 最適希釈倍率は, 予備的検討により決定した。

ABC法による抗原性物質の検出はホルマリン固定およびAMeX固定パラフィン包埋切片を型の如くキシレン系列で脱パラフィン後に行った。つまり, 0.3%過酸化水素(H₂O₂)加メタ

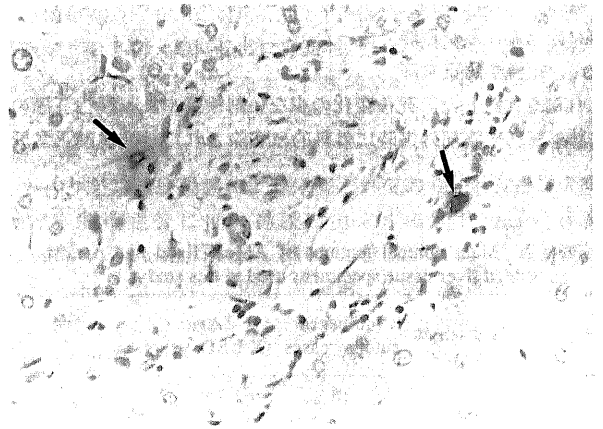


A

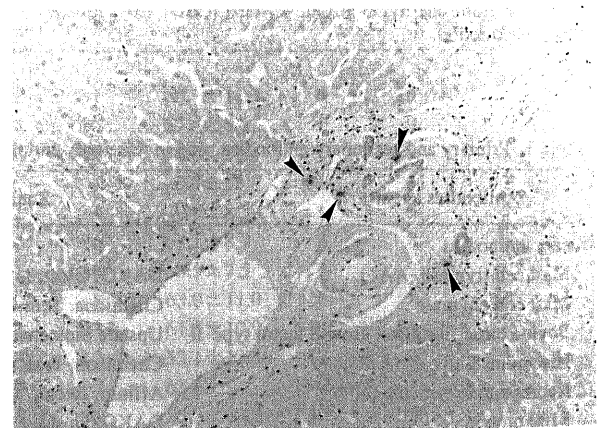


B

Fig. 1. One mast cell in hepatic sinusoid in normal liver. (A) Round shaped mast cell in hepatic sinusoid (arrow). (B) Spindle shaped mast cell in hepatic sinusoid (arrow). (A) and (B), immunostaining for tryptase (ABC method) and hematoxylin, $\times 400$.



A



B

Fig. 2. Mast cells in small portal tract in normal liver. (A) There are two tryptase-positive mast cells (arrows) adjacent to the limiting plate. (B) Mast cells (arrowheads) are present around bile ductule and small portal vein. (A) and (B), immunostaining for tryptase (ABC method) and hematoxylin, $\times 260$.

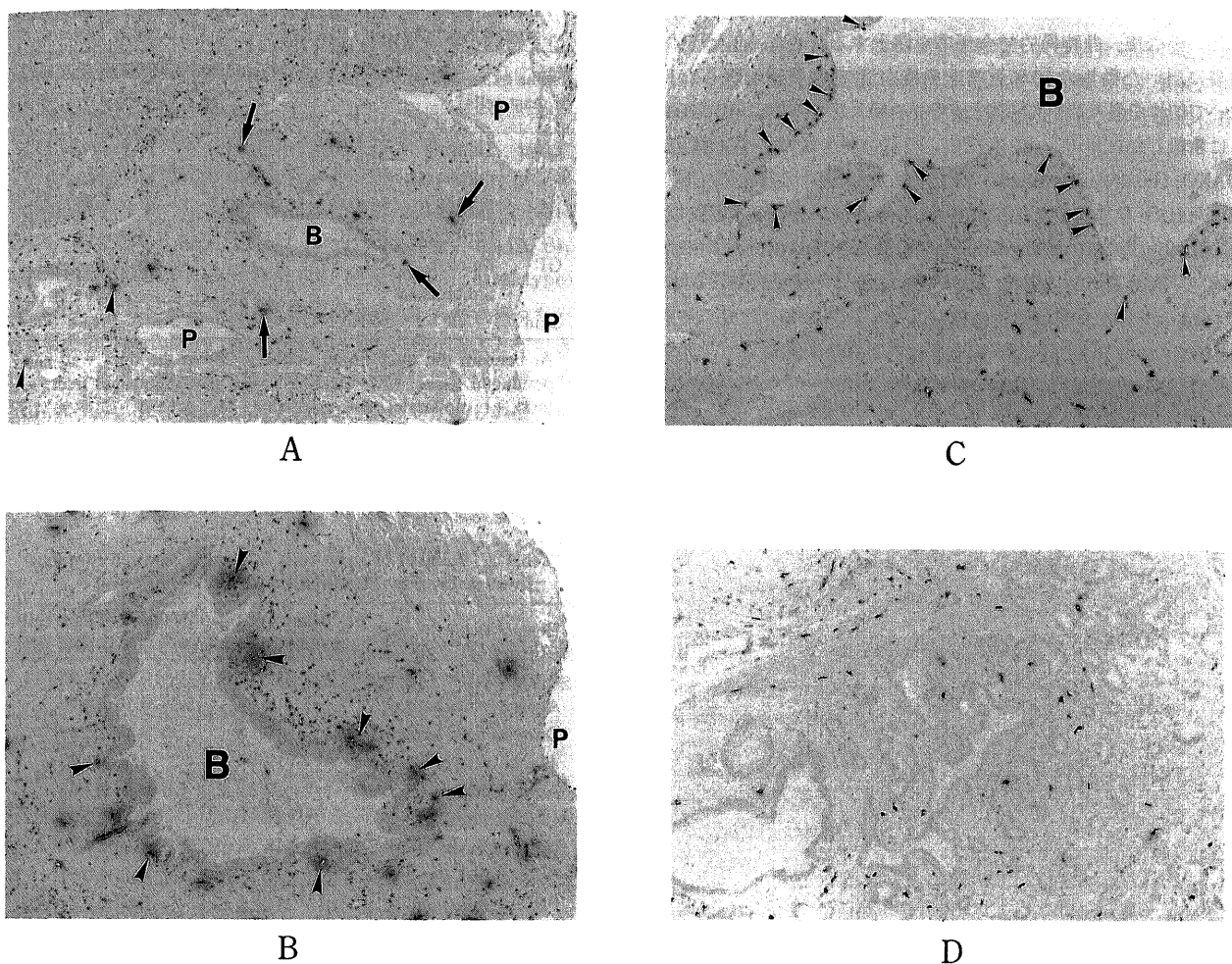


Fig. 3. Mast cells in medium-sized and large portal tracts and surrounding peribiliary glands in normal liver. (A) Medium-sized portal tract. Mast cells (arrows) are present in connective tissue around the bile duct. Some of mast cells are located close to the capillary vessels (arrowheads). (B) and (C) Large bile duct. Mast cells beneath biliary epithelium around the large bile duct were closely related to inner layer of peribiliary vascular plexus (arrowheads). In bile duct wall and periductal connective tissue many mast cells are also seen. (D) Peribiliary glands. Many mast cells are shown around and within the peribiliary glands (A), (B), (C) and (D), immunostaining for tryptase (ABC method) and hematoxylin; (A) and (B), $\times 100$; (C), $\times 40$; (D) $\times 130$. B, bile duct lumen; P, portal vein.

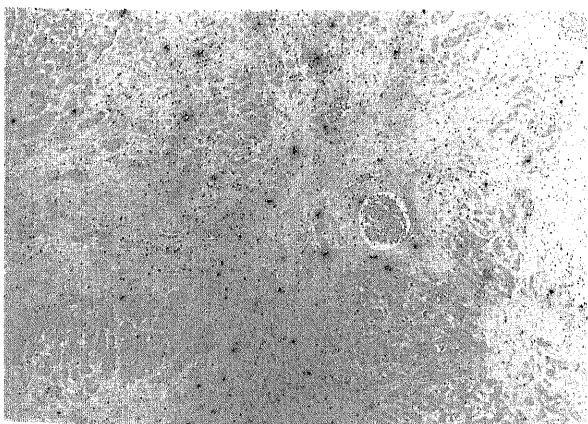


Fig. 4. Mast cells in fibrous septa in cirrhotic liver. There are many mast cells in fibrous septa. Immunostaining for tryptase (ABC method) and hematoxylin, $\times 80$.

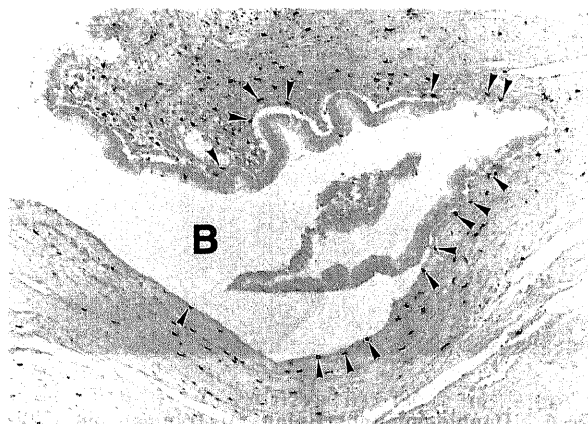
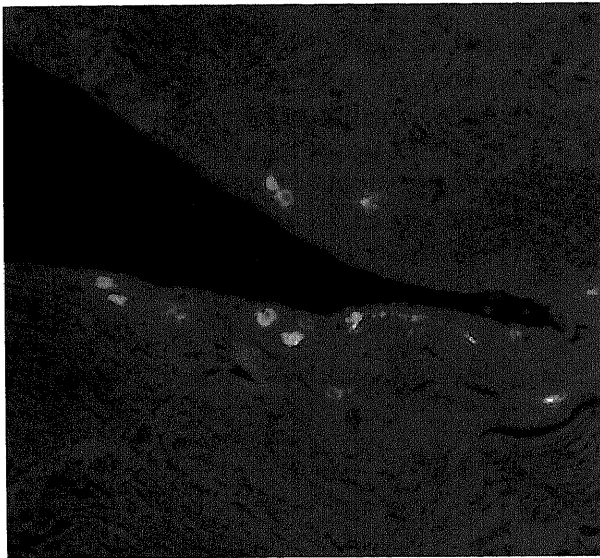
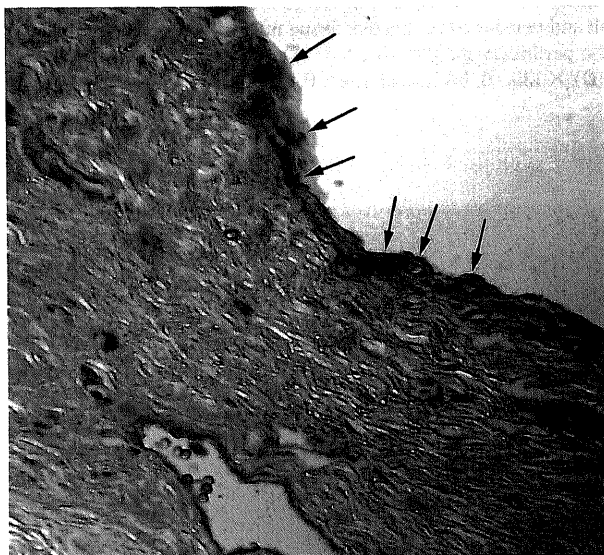


Fig. 5. Mast cells surrounding large bile duct. Mast cells are stand in a line directly under biliary epithelium (arrowheads). These mast cells surround venules of the peribiliary vascular plexus. In bile duct wall many mast cells are also seen. Liver cirrhosis. B, bile duct lumen. Immunostaining for tryptase (ABC method) and hematoxylin, $\times 100$.

ノール液中に30分間置き、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。その後、非特異的結合反応を防止するために、2次抗体作製に用いた動物の10%正常非免疫血清で30分間処理した。次いで切片を各々の1次抗体と4℃で一晩反応させた。次に200倍に希釈したビオチン化2次抗体、それに引き続いてABC溶液(DAKO, Glostrup, Denmark)内で室温で30分間反応させた後、0.03% H₂O₂を加えた0.2% 3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩(diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (Sigma, St. Louis, USA)で発色させた。なお、各々の反応はリン酸緩衝生理食塩



A



B

Fig. 6. Double-immunostaining for tryptase and *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) of the same specimen. (A) Bright yellow cells are tryptase-positive mast cells. These mast cells surround peribiliary vascular plexus. (B) Red cells are tryptase-positive mast cells. Black shadows (arrows) show UEA-I-positive small venules. B, bile duct lumen. Normal liver. Comforcal laser microscopic observation, $\times 520$.

Table 4. Phenotypes of mast cells in the liver, gastrointestinal mucosa and skin

| Tissue examined and location of mast cells | | Immunohistochemical expression of | |
|--|------------------|-----------------------------------|----------|
| | | Tryptase | Chymase |
| Liver | Sinusoid | +++ | +~++ |
| | Portal tract | +++ | ++ |
| | Peribiliary A MC | +++ | + |
| | Peribiliary B MC | +++ | ++ |
| GI | Mucosa | +++ | Very few |
| | Submucosa | +++ | ++ |
| Skin | | +++ | +++ |

A, beneath the duct lining epithelia; B, in the duct wall and periductal tissue; MC, mast cells; GI, gastrointestinal tract; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Table 5. Number of mast cells in hepatic sinusoid in normal livers and various hepatobiliary diseases

| Hepatobiliary diseases | Number of cases examined | Number of mast cells ($\bar{X} \pm SD$) |
|-------------------------|--------------------------|---|
| Normal liver | 11 | 0.55 \pm 0.55 |
| Acute viral hepatitis | 19 | 0.52 \pm 0.59 |
| Drug induced hepatitis | 15 | 0.44 \pm 0.27 |
| Alcoholic liver disease | 12 | 1.00 \pm 1.23 |
| Autoimmune hepatitis | 7 | 0.54 \pm 0.68 |
| Chronic hepatitis | 33 | 0.39 \pm 0.18 |
| Liver cirrhosis | 16 | 0.39 \pm 0.33 |
| PBC (stages 1 and 2) | 20 | 0.48 \pm 0.22 |
| PBC (stages 3 and 4) | 11 | 0.69 \pm 0.29 |
| PSC | 16 | 0.61 \pm 1.13 |
| Hepatolithiasis | 8 | 1.35 \pm 1.30 |
| EBO | 8 | 0.35 \pm 0.22 |

PBC, primary biliary cirrhosis; PSC, primary sclerosing cholangitis; EBO, extrahepatic biliary obstruction.

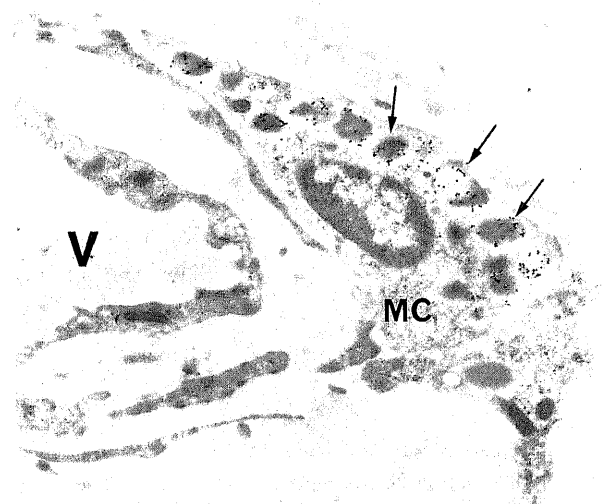


Fig. 7. Immunoelectronmicroscopy of mast cells. Mast cell is adjacent to mesenchymal cell surrounding small venule. Mast cell have many tryptase-positive granules (arrows). Normal liver. MC, mast cell; V, small venule. $\times 14000$.

水 (phosphate-buffered saline, PBS) で十分に洗浄した後に行った。次いで、ヘマトキシリンで核染後、脱水封入し、鏡検した。これらの染色の特異性は、1次抗体をPBSで置換し、反応が陰性化することで確認した。

1) 肝内での肥満細胞の分布と半定量的な評価

トリプターゼの免疫染色により以下の如く行った。トリプターゼ染色標本を用いた予備的検討で肥満細胞は肝実質内 (特に類洞内) に分布するもの (類洞型, sinusoidal type) (図1A, B), 小型門脈域に散在性にみられるもの (門脈域型, portal type) (図2A, B), それに胆管周囲 (胆管壁内を含む) にみられるもの (胆管周囲型, peribiliary type) (図3A~D) に分けることができた。なお、各種の慢性進行性肝胆道系疾患では門脈域は種々の程度に線維性、炎症細胞性に拡大し、門脈域間、あるいは門脈域と中心静脈域間の線維性隔壁形成がみられ、肝硬変例もみられた。肥満細胞は本来の門脈域のみならず、線維性隔壁部にもみられた (図4) が、これらを総称して門脈域型肥満細胞と呼ぶことにした。そこで、各々の部位における肥満細胞の数を定量的、半定量的に求めるため以下の計測を行った。

i. 類洞型

肝実質内で200倍の倍率下で無作為に各例毎に10視野を選び、1視野ごとのトリプターゼ陽性細胞数を数え、平均値を求め、各症例の類洞内肥満細胞数とした。

ii. 門脈域型

外科的手術例、剖検例や外科的生検例では小型門脈域と中等大門脈域をそれぞれ無作為に10カ所選び、1門脈域内の肥満細胞数を計測し、平均値を求め、各症例の門脈域内肥満細胞数とした。標本の小さな外科的生検例や針生検標本では小型門脈域の数が6ヶ以上の標本を対象とし、計測可能な門脈域全てについて肥満細胞数を計測した。なお、切片の端にあり、分断されている門脈域は測定箇所を含めなかった (なお、中等大門脈域では門脈域が横断面で切れているものに限定した)。

iii. 胆管周囲型

胆管上皮の直下にみられる肥満細胞と大型胆管周囲の結合織内にみられる肥満細胞に区別し、正常肝と比較して、著減、減少、不変、軽度増加、中等度増加、著増に分け、半定量的に評価した。

2) 肥満細胞の表現型

トリプターゼ、カイマーゼの発現により検討した。なお、トリプターゼはホルマリン固定後のパラフィン包埋切片およびAMeX固定後のパラフィン包埋切片で検出が可能であったが、カイマーゼはホルマリン固定後の切片では検出されず、AMeXやカルノア固定後の肝切片および凍結切片で良好な染色結果が得られたので、AMeX固定標本で類洞内、門脈域内、大型胆管

Table 6. Number of mast cells in small portal tract in normal livers and various hepatobiliary diseases

| Hepatobiliary diseases | Number of cases examined | Number of mast cells (X±SD) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Normal liver | 11 | 1.19±0.49 |
| Acute viral hepatitis | 19 | 1.26±0.58 |
| Drug induced hepatitis | 15 | 1.36±0.56 |
| Alcoholic liver disease | 12 | 3.42±4.91 |
| Autoimmune hepatitis | 7 | 4.93±4.05 |
| Chronic hepatitis | 33 | 2.27±1.09* |
| Liver cirrhosis | 16 | 2.83±1.21* |
| PBC (stages 1 and 2) | 20 | 4.93±3.85** |
| PBC (stages 3 and 4) | 11 | 8.13±3.11** |
| PSC | 16 | 3.23±1.55** |
| Hepatolithiasis | 8 | 5.08±2.00* |
| EBO | 8 | 2.49±1.00* |

PBC, primary biliary cirrhosis; PSC, primary sclerosing cholangitis; EBO, extrahepatic biliary obstruction. *significant difference from normal liver, P<0.05; **, P<0.05

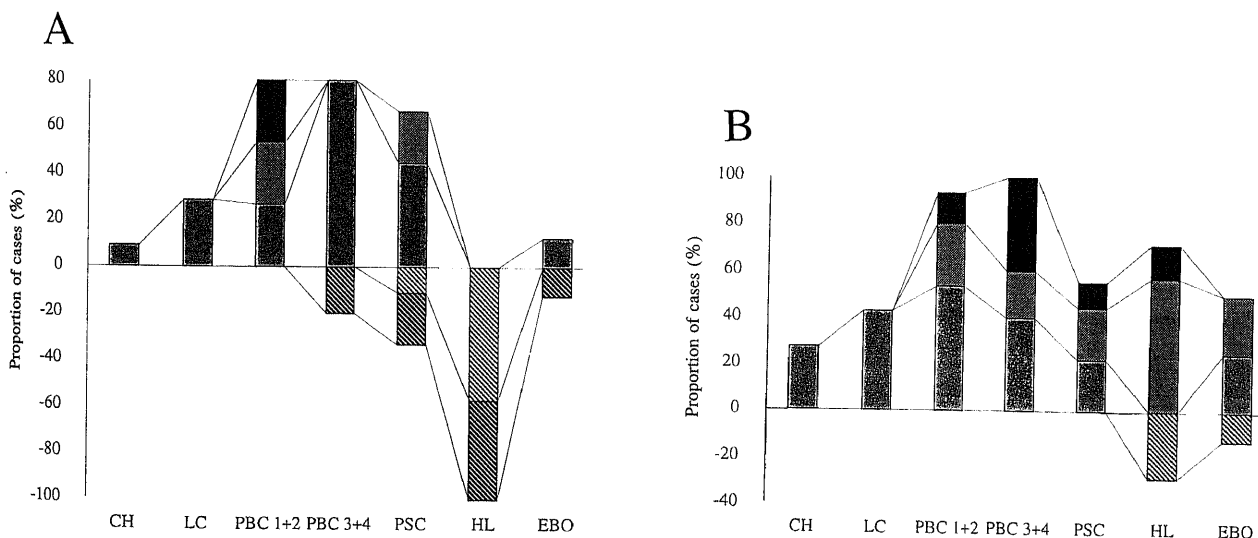


Fig. 8. Quantification of mast cells around the large bile ducts, compared to normal livers. The graphs show the proportion (%) of cases with individual categories in individual hepatobiliary diseases. (A) Mast cells beneath biliary epithelium. (B) Mast cells in bile duct wall and periductal connective tissue of large bile duct. CH, chronic viral hepatitis (n=11); LC, liver cirrhosis (viral) (n=7); PBC1+2, primary biliary cirrhosis (stages 1 and 2) (n=18); PBC3+4, primary biliary cirrhosis (stages 3 and 4) (n=5); PSC, primary sclerosing cholangitis (n=9); HL, hepatolithiasis (n=7); EBO, extrahepatic biliary obstruction (n=8), ■, marked increased; ■, increased; ■, slightly increased; □, slightly decreased; □, decreased.

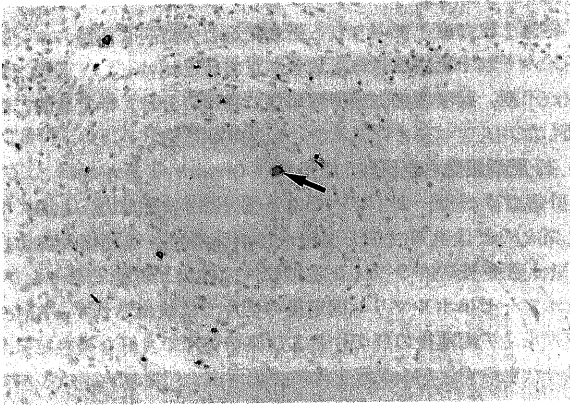
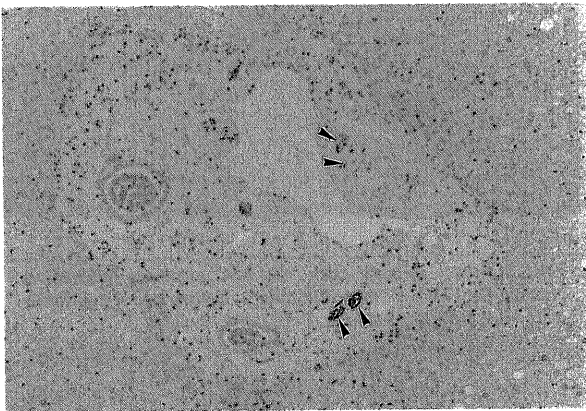
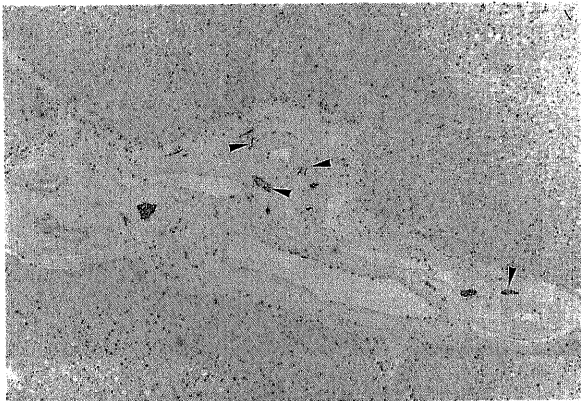


Fig. 9. Mast cell infiltrating into biliary epithelium. Mast cell (arrow) infiltrates into biliary epithelium. Primary biliary cirrhosis. Immunostaining of tryptase (ABC method) and hematoxylin, $\times 100$.



A



B

Fig. 10. Nerve fibers in portal tracts. (A, B) Many S-100-positive nerve fibers surround artery and portal vein (arrowheads). But no nerve fibers are shown around bile ducts. Normal liver. Immunostaining of S-100 (ABC method) and hematoxylin, $\times 100$.

上皮直下, 大型胆管壁および胆管周囲結合織内における肥満細胞の表現型の検討を行った。

Weidnerら¹¹⁾¹⁴⁾に従い, 肥満細胞を免疫組織化学的にMC_T型(トリプターゼ陽性, カイマーゼ陰性)とMC_{TC}型(トリプターゼ陽性, カイマーゼ陽性)とに亜分類した。なお, 剖検時および手術時に採取したヒト皮膚, 腸管それに肝の一部の凍結切片での検討では, 腸管粘膜上皮の肥満細胞はトリプターゼが陽性であったがカイマーゼが陰性であり, 粘膜型(MC_T型)の表現型を示した。皮膚の肥満細胞はトリプターゼ, カイマーゼの両方が陽性であり, 結合織型(MC_{TC}型)の表現型を示した(表4)。

3) 二重免疫染色

i. トリプターゼ免疫染色とハリエニシダ凝集素Iレクチン(*Ulex europaeus* agglutinin I, UEA-I)レクチン染色

予備的検討により, 肥満細胞は毛細血管, 特に胆管上皮直下の毛細血管叢に深く関連して出現していた。そこで, 肥満細胞をトリプターゼで免疫染色し, 毛細血管をUEA-Iでレクチン染色し, 両者の関連性を2重染色により検討した。なお, UEA-Iレセプターは血管内皮に存在することが知られており, UEA-Iを用いたレクチン染色でUEA-Iレセプターの検出ができる^{34)~36)}。

つまり, 脱パラフィン後の切片を, 0.3% H₂O₂添加メチルアルコール液中に30分間置き, 内因性ペルオキシダーゼを失活させた後, 10%正常非免疫血清で30分間処理した。次いで切片をビオチン化UEA-Iと4℃で一晩反応させた。次にABC溶液と室温で30分間反応させた後, 0.03% H₂O₂を加えたDAB液で発色させた。反応陽性物は茶褐色に発色する。次いで, 十分に洗浄後, 抗トリプターゼと4℃で一晩反応させ, ウマ抗マウス2次抗体, アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン・ビオチン・複合体(streptavidine-biotin complex with alkaline phosphatase, Strept ABC/AP)(DAKO, Glostrup, Denmark)とそれぞれ30分間反応させた後, ファーストレッドで赤色に発色させ, 脱水封入し, 鏡検した。

また, 光顕で観察後, 同一部位を共焦点レーザー顕微鏡下で観察し(後述), 血管内皮と肥満細胞との関係をさらに検討した。

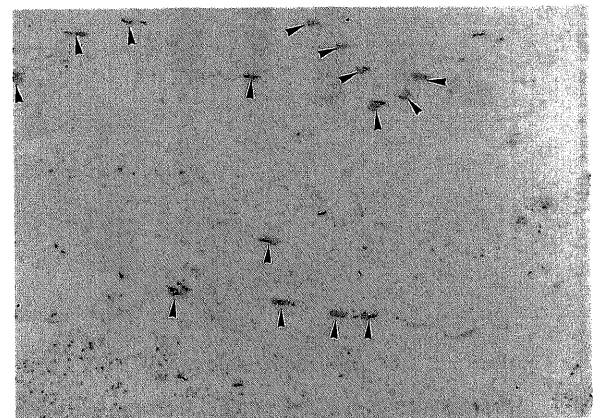


Fig. 11. Basic fibroblast growth factor (b-FGF)-positive mast cells (arrowheads) in fibrous connective tissue surrounding large bile duct in hepatic hilum. Liver cirrhosis. Immunostaining for b-FGF (ABC method) and hematoxylin, $\times 130$.

なお、ファーストレッドは赤色の蛍光を発することが知られている。

ii. トリプターゼとb-FGFの2重免疫染色

従来、皮膚や肺での肥満細胞には線維芽細胞の増殖や血管新生に関連するb-FGFが証明され、線維増生や血管増生との関連性が注目されている¹⁸⁾¹⁹⁾。そこで、肝内での肥満細胞をトリプターゼとb-FGFで2重免疫染色し、トリプターゼ陽性細胞にb-FGFの発現があるかどうかを検討した。b-FGFの検出には抗ウシb-FGFモノクローナル抗体(Upstate Biotechnology, NY, USA)を用いた。この抗体はウシのみならず、ヒト、ラット及びマウスのb-FGFと反応することが知られている³⁷⁾。また、抗ウシb-FGFモノクローナル抗体はホルマリン固定標本で用いる場合はヒアルロン酸処理が前処置として必要になるが¹⁹⁾、予備的検討でAMeX固定標本では特に前処置を必要とせず良好な染色結果が得られたので、今回の検討にはAMeX固定標本を用いた。今回、トリプターゼとb-FGFの検出に用いた抗体はいずれもマウスで作成されており、2重免疫染色では最初の反応に用いた抗マウス2次抗体を失活させる必要があり、青木ら³⁸⁾の方法に従って温熱処理を併用した。

つまり、脱パラフィン後の切片を、0.3% H₂O₂添加メチルアルコール液中に30分間置き、内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、10%正常非免疫血清で30分間処理した。次いで切片を抗b-FGFと4℃で一晩反応させた。次にウサギ抗マウス2次抗体、APAAP溶液とそれぞれ室温で60分間反応させた後、ファーストレッドで発色させた(赤色)。その後切片を90~95℃で10分間温熱処理し、ウサギ抗マウス2次抗体を失活させた。次いで、10%正常非免疫血清で30分間処理し、抗トリプターゼと4℃で一晩反応させ、ウマ抗マウス2次抗体、ABC溶液と室温で30分間反応させた後、0.03% H₂O₂を加えたDAB液で発色させ(褐色)、脱水封入し、鏡検した。

4) トリプターゼ陽性肥満細胞の分布と神経線維との関連性の検討

S-100, NPYに対するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体(表3)を用い、免疫組織学的にこれら抗原成分の検出を行い、門脈域およびその他の肝の構成成分と神経線維の分布や密度との関連性、肥満細胞との位置的関連性の検討を行った。

5) 肥満細胞のb-FGFおよびヒスタミンの発現

抗b-FGF抗体、抗ヒスタミン抗体(Chemicon, Temecula, USA)を用い、肥満細胞のb-FGFおよびヒスタミンの発現を検討した。今回の検討ではAMeX固定標本を用いた。予備的検討ではb-FGFやヒスタミンは大型胆管周囲結合織に多くみられたので、この部位での各種疾患におけるb-FGFあるいはヒスタミン陽性の肥満細胞の出現率を陰性、弱陽性、陽性、強陽性にわけて半定量的に評価した。

6) 共焦点レーザー顕微鏡による観察

酵素抗体法でAPAAP法で染色された標本では、ファーストレッドを発色系に用いた。ファーストレッドはローダミンと同波長の蛍光を発するので、染色標本を共焦点レーザー顕微鏡(LSM410, Carl Zeiss, Gottingen, Germany)下で観察することによりファーストレッド、つまり標識物の局在をデジタル化し画像で検討した。レーザー光は514nmのアルゴンレーザーを使用し、スキャン速度は8.65秒とし、ピンホールサイズ値は20とし、画像サイズは768×576ピクセルとした。画像平均化は8回として画像を得た。

7) 免疫電顕による肥満細胞内トリプターゼの検討

トリプターゼ陽性の細胞が肥満細胞であることを電子顕微鏡的に確認した。まず、摘出した肝組織を4%パラホルムアルデヒド(0.1M, リン酸緩衝液, pH7.4)内で4時間固定後、PBSで洗浄した。次に30%ショ糖溶液内に一晩置き、浸透圧の調整を行った後、肝組織を切片作製用至適温度化合物(optimal

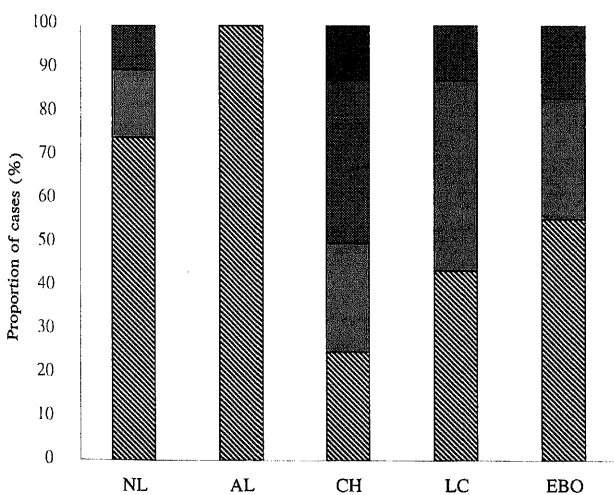


Fig. 12. Proportion of b-FGF-positive mast cells in all tryptase-positive mast cells in various hepatobiliary diseases. The graph shows proportion of cases in individual categories. NL, normal liver (n=28); AL, alcoholic liver disease (n=4); CH, chronic viral hepatitis (n=8); LC, liver cirrhosis (n=16); EBO, extrahepatic biliary obstruction (n=18); □, negative for b-FGF; ▨, weakly positive; ▩, positive; ▤, strongly positive.

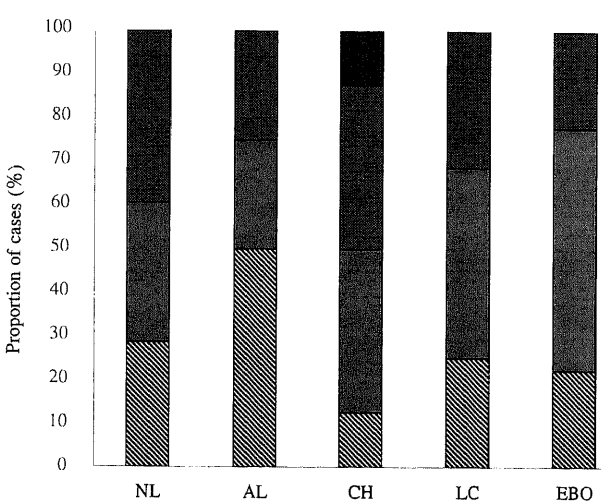


Fig. 13. Proportion of histamine-positive mast cells in all tryptase-positive mast cells in various hepatobiliary diseases. The graph shows proportion of cases in individual categories. NL, normal liver (n=28); AL, alcoholic liver disease (n=4); CH, chronic viral hepatitis (n=8); LC, liver cirrhosis (n=16); EBO, extrahepatic biliary obstruction (n=18); □, negative for histamine; ▨, weakly positive; ▩, positive; ▤, strongly positive.

cutting temperature compound) (Miles, Elkhart, USA) に包埋して凍結し、クリオスタット (Tissue Tek, Miles) で4 μ mの凍結切片を作成し、トリプターゼの免疫染色 (ABC法)を行った。免疫染色後の切片をグルタルアルデヒドおよびオスミウム酸にて固定を施し、1%酢酸ウラニウムでブロック染色を施した後、脱水、エポン包埋 (応研商事, 東京) を行い、超薄切片を作成後、無染色で透過電顕 H300型で観察を行った。

成 績

I. 正常肝での肥満細胞の分布

トリプターゼ陽性細胞は比較的大型の単核細胞で、高度の陽性像を呈し、細胞全体が顆粒状～びまん性に陽性であり、細胞の微細構造が認められない程度であった。円形、楕円形、扁平型のもの他、さらに短い1～2ヶの細胞質突起を有する樹枝状のものもみられた。なお、やや小型のトリプターゼ陽性細胞もみられた。肥満細胞は、連続切片を用いたHE染色では大型の単核細胞であり、胞体は両染色性であり、微細顆粒状を呈するものもみられた。胞体の量は種々であり、トリプターゼ陽性細胞周囲の結合組織にトリプターゼの漏出像もみられた。なお、上述した3ヶ所以外に肝被膜部やその直下にも肥満細胞が比較的に認められたが、今回の検索対象とはしなかった。

1. 類洞型 (図1A, B)

肝実質の類洞に、ごく少数のトリプターゼ陽性の肥満細胞が散在性にみられた。正常肝では、大体、1～3ヶの肝小葉内に1個程度の肥満細胞がみられた (平均0.55個)。大型のものと小型のものがあり、大型のものには細胞質突起がみられた。

2. 門脈域型 (図2A, B)

1個の小型門脈域に1～2個程度のトリプターゼ陽性の肥満細胞が認められた (平均1.19個)。中等大の門脈域では5～15個でばらつきが多かった。なお、正常肝の小型～中等大の門脈域では肥満細胞と門脈域内での組織成分、例えば血管や神経線維、門脈域辺縁部の肝細胞と特定の位置的な関連性はみられなかった。

3. 胆管周囲型 (図3A～D)

肝内大型胆管や隔壁胆管では、胆管壁、特に胆管上皮直下のPVP内層の分布に一致してトリプターゼ陽性肥満細胞が密に分布していた (図3B, C, 図5)。毛細血管に接してみられる傾向があり、UEA-Iとトリプターゼの2重染色で両者の関係が明瞭に示された (図6A, B)。胆管上皮直下に存在する肥満細胞をA型胆管周囲肥満細胞と呼ぶ。稀に隔壁胆管や肝内大型胆管の胆管上皮層内にもトリプターゼ陽性の肥満細胞が認められた。次に、胆管壁内、特にその外側や胆管壁周囲の結合織内にもトリプターゼ陽性の肥満細胞がみられた。これをB型胆管周囲肥満細胞と呼ぶ (図5)。UEA-Iとトリプターゼの2重染色を用いた検討により、B型細胞の約半数は小血管や毛細血管に接して認められたが、血管と関連性のないB型肥満細胞もみられた。

また、肝内大型胆管の周囲に存在する胆管周囲付属腺でも、トリプターゼ陽性肥満細胞が、付属腺腺房間や周囲の結合織内に多数みられた (図3-D)。これをC型胆管周囲肥満細胞と呼ぶ。UEA-Iとトリプターゼの2重染色によりC型肥満細胞の約半数は毛細血管に接して分布していた。残りの細胞は血管系との関連性がみられなかった。

II. 透過電顕、免疫電顕による肥満細胞の検討

電顕的検討では、小血管壁を囲む間葉系細胞に接して特徴的

な顆粒を含む肥満細胞がみられた。免疫電顕による検討で、トリプターゼは肥満細胞のこれらの顆粒上に金粒子としてみられた (図7)。

Ⅲ. 各種肝胆道系疾患での肝内肥満細胞の分布

肝類洞型、門脈域型、胆管周囲型の肥満細胞は各々の肝胆道系疾患の病態に関連して特徴的な分布を示した (表5, 6, 図8A, B)。

1. 類洞型肥満細胞

類洞型の肥満細胞は正常肝と同様に肝実質内に散在性にみられた。多くの疾病肝で正常肝と比較して類洞型の肥満細胞の有意な増加はみられなかった。しかし、慢性ウイルス性肝炎、PBC症例の中には、限界板あるいはこれに接した肝実質内の類洞に肥満細胞がやや増加している例もみられた。慢性の胆汁うっ滞性肝疾患やアルコール性肝疾患では肝実質内での肥満細胞の軽度の増加傾向がみられた。これらの肥満細胞数を表5に示す。

2. 門脈域型肥満細胞

次に門脈域型の肥満細胞について述べる (表6)。急性ウイルス性肝炎、薬剤性肝障害、自己免疫性肝炎などの急性肝疾患では門脈域内の肥満細胞は正常肝と比較して有意な増加を認めなかった。しかし、薬剤性肝障害と考えられる1例では、門脈域に肥満細胞の増加がみられ、同例では好酸球の増加もみられた。慢性肝疾患ではアルコール性肝線維症および胆汁うっ滞性肝疾患では門脈域及び線維性隔壁での肥満細胞の数は不変かやや増加の傾向がある程度であった。慢性ウイルス性肝炎やウイルス性肝硬変では正常肝と比較して門脈域内肥満細胞の有意な増加を認めた。なお、増加例では肥満細胞は線維化巣や線維性隔壁部に散在性にみられ、一部の肥満細胞は小血管に接してみられた。しかし、特定の組織成分との間に位置的な関連性を示さない肥満細胞も多くみられた。

PBC, PSC, EBOやその他の胆汁うっ滞性肝疾患や胆道系疾患では門脈域型肥満細胞が種々の程度に増加していた。拡大した門脈域に肥満細胞が増加していたが、線維化の進展した例や肝硬変、特に活発な細胆管増生や炎症反応を伴う例では肝限界板付近での増加が目立ち、限界板の類洞内にも肥満細胞の増加をみる例があった。血管と位置的な親和性を示すものもみられたが、関係のない肥満細胞も多くみられた。なおPBCのI期の例では、小型門脈域内で肥満細胞が増加する例と、殆ど増加しない例があった。なお、PBCやPSC, C型慢性肝炎で小型小葉間胆管に種々の程度の炎症を示す例がみられ、慢性肝炎やPBCの一部の症例で炎症の強い部に著明な肥満細胞の増加を認めたが、全体的にはこれらの胆管障害と増生した肥満細胞の間には一定の関連性はみられなかった。しかし、PBCやPSC, またEBOの隔壁胆管レベルや一部の中等大小小葉間胆管では障害胆管に関連して肥満細胞 (特にB型) の増加が認められた。なお、PBCの障害胆管、特に隔壁胆管に病変の及んでいる例で、胆管上皮層内での肥満細胞がやや目立つ傾向があった (図9)。

3. 隔壁胆管、肝内大型胆管、付属腺での分布

胆管周囲型肥満細胞に関しては、急性肝疾患や、慢性肝疾患でもアルコール性肝硬変や慢性ウイルス性肝炎、慢性胆汁うっ滞性肝疾患などの肝実質型障害例ではほぼ正常肝と同じ分布パターンや密度がみられた。主に肝内大型胆管や隔壁胆管に病変を認めるPSCや肝内結石、またEBOでは、肥満細胞の分布と密度は胆管病変の新旧や種類に関連して変動した。A型およびB型の肥

満細胞が種々の割合で変化した。一般的にはA型の肥満細胞は胆管病変により種々の変動を示したが、B型は殆どの例で増加した(図8A, B)。

まず、肝内結石症では、胆管の硬化した症例が多く、これらの硬化性の胆管では、A型肥満細胞は明らかに減少し、また、線維性に肥厚した胆管壁の内側でも肥満細胞の減少がみられた。なお、胆管壁が浮腫性のものでも、胆管上皮層直下のA型肥満細胞が減少する傾向があった。B型肥満細胞は線維化部に多くみられた。B型は胆管の線維化および大型門脈域全体での線維化に関連して出現していた。また、肝内結石症では結石含有胆管付属腺の増生が種々の程度にみられるが、これらの部位で肥満細胞の増加がみられた。特に、病変が比較的幼若で肉芽性の部位で肥満細胞が高度に増加していた。しかし、硬化性の部分では肥満細胞が疎らになっている症例も多くみられた。

次に、PSCを含めた硬化性胆管炎やEBOでは、胆管炎を有する部位、特にリンパ球、形質細胞などの炎症性細胞浸潤の目立つ活動性胆管炎を示す胆管では、A型肥満細胞が上皮直下で増生していた。なお、硬化性の変化を示す胆管ではA型肥満細胞が減少或いは消失していた。EBOで、胆管が浮腫性の変化を示す例でも、A型細胞は減少した。PSC、EBOでは、A型肥満細胞の増減に関係なくB型肥満細胞は病変の種類に関係なく種々の程度に増加していた。なお、これらの疾病肝でみられる増生したA型肥満細胞は、正常肝にみられる大型のもののみならず、小型の肥満細胞も含まれており、また染色性も弱く、正常の大型胆管上皮直下のA型肥満細胞とはやや異なっていた。

これらの胆道系疾患では、疾患に関係なく、増生した胆管付属腺に関連してC型肥満細胞の増生がみられた。

IV. カイマーゼの染色結果

肥満細胞のトリプターゼ、カイマーゼの発現をトリプターゼ染色およびカイマーゼ染色により検討し、その染色結果を表4に示す。肥満細胞のマーカー酵素であるカイマーゼは、類洞型と門脈域型ではトリプターゼとほぼ同じ染色性と分布を示した。しかし、胆管周囲型に関しては、上皮直下に分布するA型はトリプターゼは陽性だが、カイマーゼ陰性のことが多く、B型に関してはカイマーゼの染色性は一定しなかった。

V. 門脈域での肥満細胞と神経線維との関連性

肝内神経線維を主に神経ペプチド(NPY)と神経鞘糖(S-100)の免疫染色により検討し、肥満細胞の分布との関連性を検討した。

まず、胆管周囲型の肥満細胞との関連性で、正常肝では、肝内大型胆管壁外に種々の太さの神経線維束や珠状にみえるバリコシティを示す細線維が認められた。しかし、A型の肥満細胞が分布する上皮直下には神経線維は殆ど認められなかった(わずかに細い神経線維が上皮直下にみられたが、バリコシティは認めなかった)。また、門脈域全体を観察すると神経線維やバリコシティは門脈周囲や動脈周囲に豊富にみられたが、小型胆管周囲では比較的少なかった(図10A, B)。これら神経線維の分布とトリプターゼ陽性肥満細胞との位置的な関連性は正常肝および各種の病的状態では明らかでなかった。肝類洞にもS-100陽性の神経線維が散在しており、部位により密在していた(表7)。しかし、トリプターゼ陽性肥満細胞との位置的な関連性はみられなかった。さらに、S-100陽性神経は付属腺内にもみられた。

Table 7. Distribution of S-100-positive nerve fibers

| Location | Presence of S-100-positive nerve fibers |
|---|---|
| Beneath biliary epithelium of large bile duct | ± |
| Around the large bile duct | +~++ |
| Around the large vessel | +++ |
| Around the small bile duct | ±~+ |
| Around the small vessel | ++ |
| Hepatic sinusoid | ±~++ |
| Peribiliary gland | +~++ |

±, very few; +, a few; ++, many; +++, marked.

VI. 肥満細胞でのb-FGF、ヒスタミンの発現と肝線維化との関連性

次に肥満細胞と線維増殖との関連性をb-FGF、ヒスタミンの発現を中心に免疫組織学的に検討した。

正常肝の小型の門脈域では、b-FGF陽性細胞は殆どみられなかった。各種の病的肝では、一部の症例で線維性に拡大した門脈域や大型胆管周囲の結合織内にb-FGF陽性細胞がみられた(図11)。b-FGF陽性細胞の分布および形態はトリプターゼ陽性の肥満細胞と類似していた。なお、数量的には、トリプターゼ陽性細胞の方がb-FGF陽性細胞より多くみられた。トリプターゼとb-FGFの2重免疫染色ではトリプターゼ陽性の肥満細胞の一部にb-FGFの発現がみられた。疾患別にみると慢性ウイルス性肝炎、肝硬変ではb-FGFが陽性となる症例が比較的多くみられた。EBOではb-FGFの陽性率は若干低かった。アルコール性肝障害においては今回検討した症例ではb-FGF陽性の肥満細胞は認められなかった(図12)。

ヒスタミン陽性肥満細胞は正常肝でもしばしば認められた。病的肝では、慢性ウイルス性肝炎でやや陽性率が高く、アルコール性肝疾患で少ない傾向があった(図13)。しかし、疾患による陽性率の差は有意ではなかった。

考 察

肝は肝細胞、血管および胆管系およびこれらを維持する支持結合組織から構成されている。そして、これらの構成成分は各々の部位で微小環境を形成し、肝の生理機能に深く関係している³⁹⁾。病的肝、特に慢性の病的肝では、これらの構成成分に種々の変化がみられ、破壊、再生、増生あるいは線維化と密接に関連して変動する。これら肝の構成成分の変化あるいは病的現象の発生、進展、終焉には微小環境の変化と維持、修復が重要である。そして、近年、この微小環境の変化や維持に肥満細胞が深く係っていることが、皮膚、気道、胃腸管で指摘されている^{40)~42)}。

今回、肥満細胞が肝の生理病態にどの様に関連しているかを免疫組織化学的に検討した。まず、正常肝ではトリプターゼ陽性の肥満細胞には大きく3つの分布パターンがみられた。まず、門脈域に分布する門脈域型と肝小葉内に分布するものがみられた。この2つの型は以前より報告されている¹⁷⁾。トリプターゼ、カイマーゼの免疫染色の結果、この2つの型の肥満細胞の表現型は結合織型(MC_{TC}型)の肥満細胞であった。第3の胆管周囲型は、今回の検索でその詳細が明らかとなった肥満細胞であり、類洞型、門脈域型に較べ、密にかつ規則正しく分布していた。

今回の研究で肝内大型胆管、隔壁胆管、胆管付属腺周囲には豊富な肥満細胞が分布していた。肝で、外界に最も近い、あるいは外界の変化にさらされやすい部位として胆道系と門脈系が挙げられ、胆管系は肥満細胞が豊富に分布することが知られている胃腸管と直接連続している。特に、胆管上皮直下に肥満細胞が密に分布し、UEA-I とトリプターゼの2重染色により、Kobayashi ら²⁸⁾が以前報告した、上皮直下のチェーン状毛細血管に接して存在していた。その表現型はトリプターゼとカイマーゼの免疫染色の結果、粘膜型 (MC_T型) であり、胃腸管の粘膜に主に存在する肥満細胞の表現型であった。従って、肝内大型胆管や隔壁胆管の胆管上皮直下の毛細血管内層に一致して分布していた肥満細胞は他の胃腸管や気道などと同じく、外界と肝との接点に位置している点の特異と考えられ、生体防御に深く関連していると思われる。肝内の太いレベルの胆管は、肝外胆管や腸管粘膜に近い状況にあることが推察される。なお、正常肝の胆管壁やその周囲にも少数の肥満細胞がみられたが、これらはMC_{TC}型の表現型を呈した。

さて肥満細胞は、多くの生物学的活性物質を合成、分泌することが知られており、最近、その中でNOやヒスタミン、セロトニンなどの血管作動性アミンの産生、分泌が注目されている²⁰⁾。NOは現在、種々の臓器の微小循環系の調節に最も重要な生物学的活性物質とされている⁴³⁾⁴⁴⁾。たとえば、Feldman ら²⁰⁾は最近、食道粘膜の血流調節に肥満細胞が深く関係していると報告し、特にNOの役割に注目している。

さて、肝は肝動脈と門脈の2重血行支配を受けており、門脈は肝内の門脈域で細く枝分かれして、肝類洞へと注ぐことが知られている。一方、肝動脈は門脈域内で周囲に微小な枝を出しながら分岐を繰り返し、胆管、門脈および肝動脈自身を含めた門脈域内の組織構成成分を栄養し、最終的に肝類洞へと注ぐ。特に胆管周囲では毛細血管叢を形成し、胆管の生理、病態に深く関係している。今回の研究で、胆管上皮直下や胆管付属腺に多くの肥満細胞が分布することが明らかとなり、これらの組織での毛細血管の調節にはこれらの肥満細胞が深く関与すると考えられた。つまり、今回の免疫組織学的検討の結果から大型胆管周囲での微小循環系の調節は主に、この肥満細胞の多数の媒介物質、特にヒスタミンとNOが関与している可能性が注目された。なお、今回の検討で正常肝のこれら胆管上皮直下の毛細血管叢には神経線維は殆どみられず、この部の微小循環系には神経線維は深く関与していないと思われる。

一方、肝動脈周囲や門脈周囲、さらに小型門脈域や肝類洞では、肥満細胞は乏しかったが、これらの部位では豊富な神経線維がみられ、かつバリコシティも多く、これらの部での微小循環系の調節には肥満細胞より神経あるいは神経から分泌される媒介物質が深く関連していると思われる⁴⁵⁾。

次に、各種胆道系疾患での肥満細胞の変動とその病的意義について述べる。つまり、種々の病的肝では微小環境が変化することが知られているが、今回は肥満細胞の数がどの様に変化するのかを中心に検討した。

まず、今回の検討で、各種の慢性肝胆道系疾患の門脈域で肥満細胞が増加していた。特に、線維化の進展した例や肝硬変例でこれらの肥満細胞の増加が目立ち、肝実質に接した部位(限界板、門脈域や線維性隔壁に接した肝類洞)にも目立ち、細胆管増生部や炎症性変化の強い例では特に目立った。これらの増生した肥満細胞はMC_{TC}であり、結合織型肥満細胞であった。

これらの肥満細胞の増生は、PBCやPSC、EBO、肝内結石症などの胆道系あるいは胆汁うっ滞性疾患で特に増加が目立った。しかし、早期のPBC例では、門脈域型の肥満細胞の増加する例と増加しない例があった。PBCの初期例では肝線維化は乏しく、また胆汁うっ滞の発生が不完全あるいは不規則であり、従って肥満細胞の増加していない例では胆汁のうっ滞がまだ生じていないのかも知れない。胆汁うっ滞性肝疾患や胆道系疾患で肥満細胞が増加する機序として肝組織内での胆汁酸の貯留がFarrell ら¹⁷⁾により提唱されている。なお、肝内結石症やPSCで門脈域が硬化している部位や炎症反応を認めない部位では肥満細胞は殆どみられなかった。肝線維化が陳旧化した場合、肥満細胞が減少することが示唆される。

肝の門脈域の線維増生、線維性の隔壁形成、それに胆管及びその周囲の線維化と肥満細胞との関連性が強く示唆されたので、肥満細胞と線維化進展との関連性について述べる。肥満細胞は炎症や線維化や血管増生の病的プロセスで重要とされており⁴⁶⁾⁴⁷⁾、特に肥満細胞から分泌される線維増生に関連する生物学的活性物質、特にb-FGF、トリプターゼ、ヒスタミンの果たす役割が注目されている¹⁹⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾。皮膚や肺では、肥満細胞がb-FGFを分泌するとされており、臓器での線維化に関連することが知られている¹⁸⁾¹⁹⁾。

一方、慢性進行性の肝疾患では、門脈域にトリプターゼ陽性の肥満細胞の増加があり、特に線維化の進展した例で明瞭であった。さらに、胆汁うっ滞性の肝疾患、特に進行したPBCやPSCでは、門脈域周辺部の肝実質で肥満細胞の増加が他の慢性進行性肝疾患より多くみられた。さらに、これらの疾患では拡大した門脈域周囲や隔壁周囲、さらにこれに接する肝類洞にもトリプターゼ陽性の肥満細胞の増生がみられた。慢性の胆汁うっ滞性の疾患では細胆管、肝細胞周囲性に線維化のみられることが知られており、この線維増生に肥満細胞が関連している可能性が考えられる。

今回、トリプターゼとb-FGFの連続切片を用いた免疫染色、および2重の免疫染色の結果より、肝内で増加する肥満細胞にb-FGFの産生がみられた。このことは肝内で増生した肥満細胞が肝での線維芽細胞の増生、そして線維増生に深く関連していることを示すものである。また、トリプターゼも線維芽細胞を増生させることが知られており、ヒスタミンにも線維増生や線維芽細胞増殖の作用機序のあることが知られている。これらの線維増生因子が、別々に、また共同して肝線維化の発生、進展に深く関連しているものと思われる。

肝内結石、PSC、EBOでは、胆管系の種々の病的変化、特に線維化や炎症性変化や線維増生とともに肥満細胞に種々の変化がみられた。つまり、肝内結石症、PSCやEBOなどの慢性胆管炎では肥満細胞の増加することが示された。線維性に肥厚した胆管壁や胆管周囲で増加した線維性結合織に肥満細胞が増加していた。これらの増生した肥満細胞の表現型の殆どはMC_{TC}型であり、結合織型であった。なお、これらの疾患では同一症例あるいは同一胆管でも、病変の多様性に対応して肥満細胞の分布と密度に違いがみられた。一般的には慢性の炎症性細胞の浸潤が同時にみられる胆管や、胃の偽幽門腺化生のみられる胆管では、胆管上皮直下に分布する肥満細胞が増加していた。同様にこの部位にはPVP内層の増加することがKobayashi ら²⁸⁾により既に報告されている。つまり、この増加した肥満細胞は小血管の増生に関連して出現したものかも知れない。しかし、一

方教室のSasakiら⁵⁰⁾はこれらの胆管粘膜上皮は胃或いは腸管としての表現型を示していると述べていることから、これらの肥満細胞は胆管粘膜の胃腸管粘膜への化生性変化に付随して出現し、化生的一部分像を形成している可能性もあるかもしれない。また、病的な肝内胆管壁内および周囲で増生したトリプターゼ陽性の肥満細胞にもb-FGFが発現しており、胆管壁で増生している肥満細胞も胆管壁及び胆管周囲の線維化に深く関係していることを示している。

なお、硬化した胆管や硬化した部位においては、胆管粘膜上皮直下の肥満細胞が著減していた。このような硬化性の胆管ではPVPの内層も減少しており²⁸⁾、このことが粘膜上皮直下の肥満細胞の減少に深く関連していると思われる。

さて、肝線維化の生ずる代表的部位の1つとして、肝実質内の肝細胞周囲性線維化(中心静脈周囲を含む)が知られている。従来、肝実質内での線維化に関連して伊東細胞がb-FGFを産生する細胞として知られている⁵¹⁾。今回の検討では、慢性ウイルス性肝炎や慢性うっ血肝、アルコール性肝線維症などの慢性の肝実質性疾患では、肝実質内の線維化と肥満細胞との間に関連性はみられなかった。胆汁うっ滞性疾患でも症例による多少のばらつきはみられたが、定量的検討では有意の増加がみられなかった。このことは、類洞型肥満細胞が肝線維化には関連していないことを意味している。

今回の検討で、正常の肝胆道系、特に肝内大型胆管の微小循環系に肥満細胞が深く関連することを明らかにすることができた。さらに、胆道系疾患、あるいは胆汁うっ滞性疾患での肝線維化や胆管の線維化にも深く関連し、具体的にb-FGFを分泌することも明らかとなった。HE染色では同定困難なこの肥満細胞が、肝胆道系の生理、病態に深く関係していることが次第に明らかとなり、その多様、多量の生物学的活性物質の存在故に、肥満細胞が今後の肝胆道系の研究において重要な細胞になることが予想され、インターベンショナル・ラジオロジーを含めた臨床検査の解釈にも重要な細胞と考えている。

結 論

正常肝および各種肝胆道系疾患での肝内肥満細胞の分布を主としてトリプターゼの免疫染色により検討し、以下の結論を得た。

1. 正常肝では肥満細胞は、肝類洞内、門脈域内、それに肝内大型胆管および隔壁胆管周囲に分布していた。このうち、胆管周囲に分布するものは密で規則正しく出現し、生理的に存在する肥満細胞と考えられた。

2. 正常肝の胆管周囲型の肥満細胞(特に胆管上皮直下に出現するものや胆管周囲付属腺に関連して出現するもの)は胆管周囲血管叢と密接な関連性を示し、その殆どはカイマーゼ陰性であり、粘膜型の肥満細胞と考えられた。電顕による観察でもこの両者の関連性が示され、これらの肥満細胞が肝内胆道系の微小循環生理機能に深く係っていることが示された。

3. 肥満細胞は慢性びまん性肝実質疾患(ウイルス性、アルコール性、自己免疫性、代謝性、うっ血性)の多くの症例で、門脈域を中心とした肝線維化では軽度の増加を示し、また肝実質内の肝細胞周囲性線維化とは関連性がなかった。なお、少数例では門脈域辺縁部の肝類洞で肥満細胞の増生を認めた。

4. 肥満細胞はPBCやPSCなどの慢性の胆汁うっ滞性肝疾患および肝内結石症などの胆管系疾患では大型門脈域の線維

化、胆管周囲の線維化、それに胆汁うっ滞に伴う線維化に関連した線維性病変内で増加していた。これらの肥満細胞はカイマーゼ陽性であり、結合織型の肥満細胞であり、肥満細胞を介した線維化機序が示された。

5. PBCやPSCなどの自己免疫性疾患では、肝内肥満細胞の増加が強く、肥満細胞がこれらの病態形成に自己免疫機序を含め関与していることが示された。

6. 線維増生を示す門脈域や線維性隔壁、胆管周囲線維化部で増生する肥満細胞の一部にb-FGFが証明され、線維増生に積極的に関連すると思われる。

7. 急性肝炎や急性肝うっ血では肥満細胞の増生はなく、また慢性進行性肝疾患でも肝小葉内線維化と肥満細胞との関連性は明確ではなかった。

8. 肥満細胞と各種胆道系疾患の発生・進展に深く関係するその他の微小環境成分、特に神経線維やリンパ球の浸潤との間に明らかな関連性はなかった。しかし、血管成分との関連性が明確であった。

以上のことから、肥満細胞は肝内の微小環境を構成する重要な細胞成分であり、肝・胆管系の微小循環系、また胆汁うっ滞に関連した肝線維化や自己免疫性肝胆道系疾患の病態に深く関連していることが示された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、御指導を賜りました恩師金沢大学医学部放射線医学講座高島力教授、ならびに直接御指導を頂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謝いたします。さらに、本研究に御協力して頂きました病理学第二講座佐々木素子講師ならびに教室の諸先生、技師の方々に感謝いたします。

なお、本研究の一部を第32回日本肝臓学会総会(神戸、1996)および第1回日本肝臓学会大会(盛岡、1997)で発表した。

文 献

- 1) Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 339: 64-67, 1989
- 2) Wodnar Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* 33: 150-152, 1989
- 3) Gordon JR, Burd PR, Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 11: 458-464, 1990
- 4) Gordon JR, Galli SJ. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* 174: 103-107, 1991
- 5) Cowen T, Trigg P, Eady RA. Distribution of mast cells in human dermis: development of a mapping technique. *Br J Dermatol* 100: 635-640, 1979
- 6) Lee TD, Sterk A, Ishizaka T, Bienenstock J, Befus AD. Number and affinity of receptors for IgE on enriched populations of isolated rat intestinal mast cells. *Immunology* 55: 363-366, 1985
- 7) Eggleston PA, Kagey Sobotka A, Lichtenstein LM. A

comparison of the osmotic activation of basophils and human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 135: 1043-1048, 1987

- 8) Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol* 81: 590-597, 1988
- 9) Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 5: 682-691, 1988
- 10) 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
- 11) Weidner N, Horan RF, Austen KF. Mast-cell phenotype in indolent forms of mastocytosis. Ultrastructural features, fluorescence detection of avidin binding, and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase. *Am J Pathol* 140: 847-857, 1992
- 12) Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4464-4468, 1986
- 13) 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
- 14) Weidner N, Austen KF. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of normal mast cells at multiple body sites. *J Invest Dermatol* 96: 26-30, 1991
- 15) Bardadin KA, Scheuer PJ. Mast cells in acute hepatitis. *J Pathol* 149: 315-325, 1986
- 16) Celasun B, Crow J, Scheuer PJ. Mast cells in granulomatous liver disease. *Pathol Res Pract* 188: 97-100, 1992
- 17) Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 22: 1175-1181, 1995
- 18) 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
- 19) Inoue Y, King TE, Jr., Tinkle SS, Dockstader K, Newman LS. Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders. *Am J Pathol* 149: 2037-2054, 1996
- 20) 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
- 21) Kruger PG, Bloom GD. Structural features of histamine release in rat peritoneal mast cells. A study with toluidine blue. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 46: 740-752, 1974
- 22) Nakanuma Y, Ohta G. Histometric and serial section observations of the intrahepatic bile ducts in primary biliary

cirrhosis. *Gastroenterology* 76: 1326-1332, 1979

- 23) Nakanuma Y, Sasaki M. Expression of blood group-related antigens in the intrahepatic biliary tree and hepatocytes in normal livers and various hepatobiliary diseases. *Hepatology* 10: 174-178, 1989
- 24) Nakanuma Y, Ohta G. Immunohistochemical study on bile ductular proliferation in various hepatobiliary diseases. *Liver* 6: 205-211, 1986
- 25) Harada K, Terada T, Nakanuma Y. Detection of transforming growth factor- α protein and messenger RNA in hepatobiliary diseases by immunohistochemical and in situ hybridization techniques. *Hum Pathol* 27: 787-792, 1996
- 26) Nakanuma Y, Katayanagi K, Terada T, Saito K. Intrahepatic peribiliary glands in humans. I. Anatomy, development and presumed functions. *J Gastroenterol Hepatol* 9: 75-79, 1994
- 27) Nakanuma Y, Sasaki M, Terada T, Harada K. Intrahepatic peribiliary glands in humans. II. Pathological spectrum. *J Gastroenterol Hepatol* 9: 80-96, 1994
- 28) Kobayashi K, Nakanuma Y, Matsui O. Intrahepatic peribiliary vascular plexus in various hepatobiliary diseases: A histological study. *Hum Pathol* 25: 940-946, 1994
- 29) Terada T, Nakanuma Y. Vascular plexus around intrahepatic bile ducts in normal livers and portal hypertension. *J Hepatol* 8: 139-149, 1989
- 30) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, Goto M, Shimasato 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
- 31) Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19: 1513-1520, 1994
- 32) Scheuer PJ. *Liver biopsy interpretation*, 5th ed, p51-58, Saunders, London, 1994
- 33) Ludwig J, LaRusso NF, Wiesner RH. Primary sclerosing cholangitis. In Peters RL, Craig JR (eds), *Liver pathology, contemporary issues in surgical pathology*, vol 8, p193-213, Churchill Livingstone, New York, 1986
- 34) Ninomiya T, Yosimura H, Mori M. Identification of vascular system in experimental carcinoma for cryosurgery-histochemical observations of lectin UEA-1 and alkaline phosphatase activity in vascular endothelium. *Cryobiology* 22: 331-335, 1985
- 35) Hosaka M, Murase N, Orito T, Mori M. Immunohistochemical evaluation of factor VIII related antigen, filament proteins and lectin binding in haemangiomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 407: 237-247, 1985
- 36) Stephenson TJ, Griffiths DW, Mills PM. Comparison of *Ulex europaeus* I lectin binding and factor VIII-related antigen as markers of vascular endothelium in follicular carcinoma of the thyroid. *Histopathology* 10: 251-260, 1986
- 37) Matsuzaki K, Yoshitake Y, Matuo Y, Sasaki H, Nishikawa K. Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/basic fibroblast growth factor that block its biological activity:

- invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9911-9915, 1989
- 38) 青木 潤, 難波紘二, 山本津由子, 佐々木なおみ, 谷山清己. 熱湯処理による多重免疫染色法. *病理と臨床* 14: 1533-1536, 1996
- 39) Gerber MA, Thung SN. *Histology of the liver*. *Am J Surg Pathol* 11: 709-722, 1987
- 40) 米井嘉一, 織田正也, 中村正彦. 大腸粘膜微小循環動態におよぼす肥満細胞脱顆粒の影響と mast cell stabilizer (tranilast) の効果—基礎的研究. *日消誌* 83: 56-65, 1986
- 41) Barr RM, Koro O, Francis DM, Black AK, Numata T, Greaves MW. The release of prostaglandin D2 from human skin in vivo and in vitro during immediate allergic reactions. *Br J Pharmacol* 94: 773-780, 1988
- 42) Koshino T, Arai Y, Miyamoto Y, Sano Y, Takaishi T, Hirai K, Ito K, Morita Y. Mast cell and basophil number in the airway correlate with the bronchial responsiveness of asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 378-379, 1995
- 43) Aaronson PI, McKinnon W, Poston L. Mechanism of butyrate-induced vasorelaxation of rat mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol* 117: 365-371, 1996
- 44) Abrams J. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 79: 2-9, 1997
- 45) 小泉博志. ラット肝における細胆管増生及びオパール細胞増生と神経支配. *十全医会誌* 105: 363-381, 1996
- 46) Bienenstock J, Tomioka M, Stead R, Ernst P, Jordana M, Gauldie J, Dolovich J, Denburg J. Mast cell involvement in various inflammatory processes. *Am Rev Respir Dis* 135: S5-8, 1987
- 47) Broide DH, Smith CM, Wasserman SI. Mast cells and pulmonary fibrosis. Identification of a histamine releasing factor in bronchoalveolar lavage fluid. *J Immunol* 145: 1838-1844, 1990
- 48) Umezu K, Yuasa S, Sudoh A. Change of hepatic histamine content during hepatic fibrosis. *Biochem Pharmacol* 34: 2007-2011, 1985
- 49) Pesci A, Majori M, Piccoli ML, Casalini A, Curti A, Franchini D, Gabrielli M. Mast cells in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. Mast cell hyperplasia and evidence for extracellular release of tryptase. *Chest* 110: 383-391, 1996
- 50) Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS. Expression of apomucins in the intrahepatic biliary tree in hepatolithiasis differs from that in normal liver and extrahepatic biliary obstruction. *Hepatology* 27: in press, 1998
- 51) Hioki O, Minemura M, Shimizu Y, Kasii Y, Nishimori H, Takahara T, Higuchi K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Watanabe A. Expression and localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the repair process of rat liver injury. *J Hepatol* 24: 217-224, 1996

Roles of Mast Cells in Pathogenesis of Various Hepatobiliary Diseases, An Histopathological and Immunohistochemical Study Masashi Yamashiro, Department of Radiology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 107, 129 — 143 (1998)

Key words mast cell, intrahepatic biliary tree, tryptase, chymase, basic fibroblast growth factor

Abstract

Mast cells (MCs) are present in connective tissue or mucosa in many organs, and they contain many biological active substances. In several organs, MCs are known to play an important role in the development and maintenance of microenvironment in normal and pathologic states. MCs are divisible into connective tissue type and mucosal type. Although MCs are known to be present in the normal and pathological livers, their exact roles remain unclear. In this study, distribution, number and phenotype of MCs were studied histopathologically and immunohistochemically in the 11 normal and 176 pathological livers. Tryptase-positive MCs were found sparsely in small portal tracts (portal MC) and hepatic sinusoids (sinusoidal MC), while they were densely and regularly distributed in large portal tracts and around the intrahepatic biliary tree and peribiliary glands. In the latter, MCs were present around small portal and capillary vessels. MCs beneath biliary epithelium of the intrahepatic large bile duct (peribiliary MC) were closely related to the inner layer of peribiliary vascular plexus. Ultrastructurally, MCs were related to capillary vessels and had characteristic cytoplasmic granules. Immunohistochemically, most of the MCs beneath the biliary epithelial layer were positive for tryptase and negative for chymase, suggesting that they were of the mucosal type. Most of the MCs in other sites were of connective tissue type. In chronic liver diseases, particularly chronic cholestatic diseases such as primary biliary cirrhosis, portal MCs were increased considerably, while sinusoidal MCs were not increased. In primary sclerosing cholangitis, hepatolithiasis and extrahepatic biliary obstruction, many MCs were found around the damaged intrahepatic large bile duct. Almost all MCs in these diseased liver were of connective tissue type. Some populations of these increased MCs were also positive for basic fibroblast growth factor and/or histamine, suggesting that MCs play a role in fibrous enlargement of the portal tract, fibrous septa formation and fibrosis of bile ducts. The knowledge of such changes of distribution and number of MCs in normal and pathologic livers are important not only for pathological analysis, but also for interpretation of cholangiography and angiography and also for application in interventional radiology.