

肝内コレステロール結石の発生機序に関する
実験的検討

森 俊 幸

①

肝内コレステロール結石の発生機序に関する 実験的検討

森 俊幸

緒言

本邦における胆石症は、近年の食事習慣の欧米化などに伴い疾病構造が大きく変貌し、コレステロール系石が著しい増加を示し、胆嚢結石症では、ビリルビンカルシウム結石との比率は逆転したと言われている¹⁾²⁾。同時に胆石保有率もこの半世紀で2倍以上に増加し、罹患率も16.4%に達すると言³⁾。

肝内結石症は胆石症全体の4~8%を占めるに過ぎない⁴⁾が治療成績の向上がめざましい胆石症の中で、その難治性の故にますます強い関心を集めつつある。肝内結石には、通常の胆管胆石症にみられるビリルビンカルシウム石とは異なり、コレステロールや脂肪酸を主成分とする結石が少なからず存在し、コレステロールを50重量%以上含有する結石が約3割を占めるとも指摘されている⁵⁾。また原発性肝内純コレステロール結石も言うべき症例もあり⁶⁾⁷⁾肝内結石症の特異性を示す証拠として注目を集めている。

これらの肝内結石症の特徴は、従来の成因に関する仮説—胆道感染を基盤にしたビリルビンカルシウム石の発生⁸⁾¹²⁾—についても見直しをせまるものである。

肝内結石症の成因を解明し治療法を確立する上で、適切な動物モデルの用いた検討が必要であることは言を待たないが、現在までにコレステロール系石の発生機序を考慮したモデルは存在せず、その確立は急を要する課題である。

胆嚢コレステロール結石については、確立した実験モデルとしてプレーリードッグが用いられ、その胆汁酸組成がヒトと類似していること¹³⁾、高コレステロール飼料投与により、比較的容易に胆嚢内にコレステロール結石を生じるなどの点から、1970年代より精力的な実験的検討が行われてきた¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾が、未だ検討を要する課題も少なくない。

そこで、本研究は肝内コレステロール結石モデルを作成しその成因を解明する為に、高コレステロール食飼育プレーリードッグを用い検討を行なった。実験1、2では胆嚢コレステロール結石の生成過程における、血中ならびに胆汁中脂質の変動、胆汁中コレステロール結晶の出現・成長、胆嚢運動機能の変容などについて検索を行い、コレステロール系石の成因を多角的に検討し、結石形成に至る諸条件を解明し、さらに、肝内コレステロール結石も胆嚢結石と大きくは異ならない機序で形成されると考えられる為、実験3では、実験1、2で胆嚢結石の形成過程で認められた諸変化を肝内胆管に再現すべく、同様の高コレステロール食飼育プレーリードッグを用い、肝管結紮を付加し、肝内コレステロール結石モデルの確立をめざし、加えて同モデルにおける、肝を中心とした脂質代謝を検討した。

A. 実験1：胆嚢コレステロール結石に関する検討（1）

I 目的

プレーリードッグの胆嚢コレステロール結石モデルを用い、結石形成過程ならびにその過程における胆嚢収縮機能異常の果たす役割を解明する目的で以下の検討を行った。併せて肝機能、血清脂質の経時的変動も観察した。

<予備実験>

セルレイン（Cholecystokinin analog）を投与し、プレーリードッグの胆嚢収縮能を評価するための至適条件を検討した。

a)方法：プレーリードッグ (*Cynomys ludovicianus*) 19匹 (平均体重1.16kg) を精製飼料で飼育し、塩酸ケタミン50mg/kg麻酔下に7.5MHzの探触子 (東芝SSA-50) の体外走査による超音波 (US) 画像で胆道系の観察を行った。0.5~0.7mlの生食で希釈したセルレイン (セオスニン、協和発酵) を0.1, 0.25, 0.5, 1.0および5.0 μ g/kg筋肉内投与後、80分まで10分毎にUS画像で3軸方向の胆嚢径を測定し、胆嚢を回転楕円体として容積を算出した。また生食0.5mlを同様に投与した動物をコントロールとした。

b)結果：US画像では、胆嚢は長径約1cmの回転楕円体の形状を示した (図1)。セルレインによる胆嚢収縮試験では、0.25 μ g/kg以上の投与群では何れも20分から30分で最大収縮に達し、以後漸次拡張を示した。このうち0.25 μ g/kg, 0.5 μ g/kgの投与群では、80分以内に投与前の大きさに回復したが、1.0g/kg, 5.0 μ g/kgの投与群では回復しなかった (図2)。以上より、以後の実験ではセルレインの投与量を0.25 μ g/kgに設定した。

II 方法

1) US画像による胆嚢収縮機能検査、胆嚢内容の観察：

19頭のプレーリードッグを6群に分け、うちコントロール3頭には、従来の精製飼料を投与し、高コレステロール各群には、Chang¹⁷⁾らに準拠し1.2重量%のコレステロール飼料 (船橋農場) を投与した (表1)。高コレステロール食開始 4 0時間後(n=3)、5日後(n=3)、1 0日後(n=3)、1 4日後(n=3)および2 1日後(n=4)に、1 2時間の絶食後、予備実験と同様に、セルレイン0.25 μ g/kg投与による胆嚢収縮試験を行い、さらにUS画像により胆嚢内容の変化を観察した。

2) 血清脂質の測定および肝機能検査：

上記収縮試験時に大腿静脈より採血、3000rpm・20分で血清を分離し、-20℃の冷凍庫で凍結保存、血清総ビリルビン、直接ビリルビン、GOT、GPT、アルカリフォスファターゼLDH、LAP、 γ GTP、総コレステロール、トリグリセライド、燐脂質を測定した。

測定は総ビリルビン、直接ビリルビンはアルカリアゾビリルビン法¹³⁾、総コレステロールは酵素法¹⁴⁾、トリグリセライドは酵素法・遊離グリセロール消去法¹⁵⁾、リン脂質は酵素法¹⁶⁾、GOT、GPTはUV法²²⁾、アルカリフォスファターゼはKing-King法²³⁾、LDHはUV法²⁴⁾、LAPはL-Leucine-CPA法²⁵⁾、 γ GTPは γ -glutamyl-CPA法²⁶⁾で行った。有意差の検定はStudent t testで行った。

III 結果

1) 胆嚢収縮能および胆嚢内容の変化：

高コレステロール食開始5日後迄は、胆嚢の最大収縮率および収縮よりの回復ともコントロール群と有意差は認められなかった。1 0日後には、最大収縮率はコントロール群と有意差はなかったが、収縮よりの回復遅延が認められ、1 4日及び2 1日後には胆嚢はセルレインに対して殆ど反応を示さなかった (図3)。US画像による観察では、高コレステロール食開始1 0日後には、胆嚢内に浮遊する点状の高エコー (図4 a) がみられ、2 1日後では多数の斑状高エコー (図4 b) または後方エコーを伴う高エコーのSludge像 (図4 c) が見られた。

2) 血清脂質ならびに一般検査 (表2)：

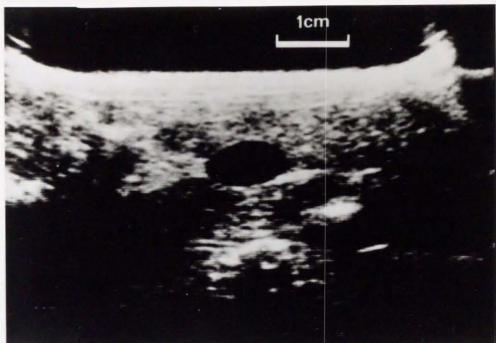


図1 7.5MHz超音波プローブによるブレイリードッグ胆嚢像。
胆嚢は何れも長径1cmの回転楕円体として観察された。

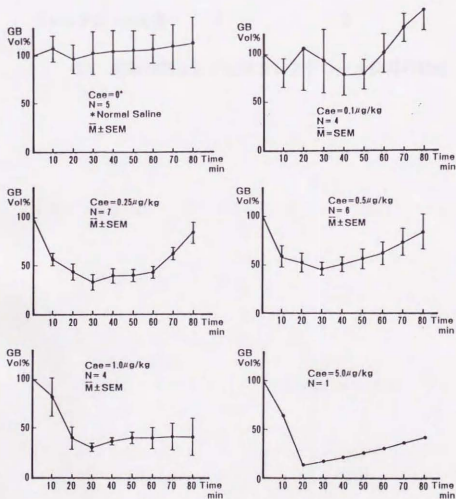


図2 セルレイン投与による胆嚢収縮試験

Cae:Caerulein

	精製飼料	高コレステロール飼料
	W t %	
コーンスターチ	38.0	27.0
αデンプン	7.0	10.0
セルロースパウダー	8.0	8.0
グラニュー糖	5.0	4.0
カゼイン	25.0	9.0
ビタミン	2.0	2.0
ミネラル	6.0	6.0
リノールサラダ油	6.0	0
卵黄粉末		36.6
(コレステロール)		(0.8)
結晶コレステロール		0.40
コレステロール含量	0	1.2

表1 精製飼料ならびに高コレステロール飼料の組成

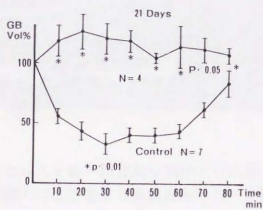
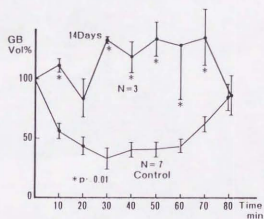
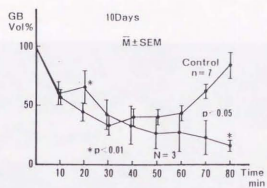


図3 高コレステロール食投与プレーリードッグの
 胆嚢収縮試験
 上段；高コレステロール食開始10日後
 中段；同14日後
 下段；同21日後

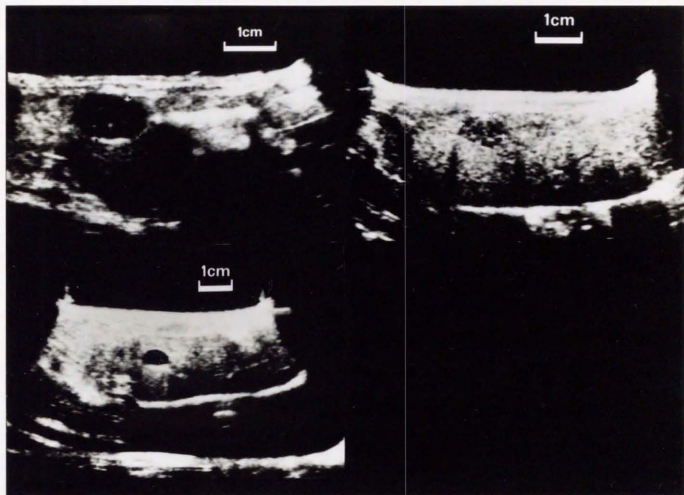


図 4a	4b
4c	

図 4 a;高コレステロール食投与開始 10 日後 US 画像

胆嚢内には浮遊する点状の高エコーを認めた

4 b; 2 1 日後 US 画像

胆嚢内に多発する斑状の高エコーを認めた

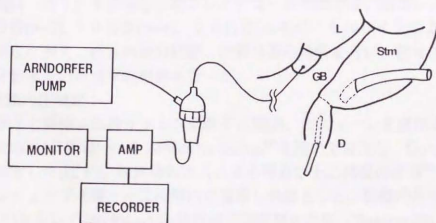
4 c; 2 1 日後 US 画像

後方エコーを伴う高エコー-Sludge を認めた。

	Control	40hrs	5 days	10 days	21 days
T-bil (mg/dℓ)	0.45±0.05	0.43±0.08	0.63±0.13	0.45±0.09	0.4±0.06
D-bil (mg/dℓ)	0.45±0.05	0.3±0.1	0.5±0.12	0.35±0.09	0.3±0.1
T-ch (mg/dℓ)	209.7±66.5	405.3±94.7	893±172.6	1220±159.7*	1011.6±161*
TG (mg/dℓ)	132±62	80±6.1	99.3±6.8	46±9.4	49.4±8.6
PL (mg/dℓ)	433±78	458.3±78.4	871±148.2	952.5±105.5	800.4±119.5
GOT (IU/L)	35.5±6.5	68±21.6	180.3±52.8	63.5±20.6	107.4±47.1
GPT (IU/L)	13.5±6.5	9.3±3.9	54±21.3	20.5±7.5	33.8±16.3
ALP (IU/L)	18.6±2.6	9±3.8	11.6±3.4	7.0±2.1	6.2±2.0
LAP (IU/L)	4421.5±302.5	4423±381.0	3516.3±165.1	4343.3±438.8	3695.8±195.0
LDH (IU/L)	3031±39	2226±457.8	3550±410.1	1668.8±101.4	2295±268.6
GGTP (IU/L)	5.5±1.5	2.3±0.3	3.3±0.25	1.5±0.65	4.4±2.7

*p<0.05

表 2 血清脂質、肝機能検査



胆嚢内圧測定系

図 5 胆嚢内圧はConstant infusion法で行い
灌流にはArndorfer pumpを用いた。

コレステロールは、40時間後より上昇し、10日目には $1220 \pm 159.7 \text{ mg/dl}$ と有意 ($p < 0.05$)の上昇を示し、以後はプラトーとなった。トリグリセライドは減少傾向、磷脂質は増加傾向を示したが共に有意ではなかった。肝機能検査には有意の変動を認めなかった。

IV 小括

<予備実験> U S画像により、プレーリードッグの胆嚢は明瞭に観察され、胆嚢収縮試験におけるセルレインの至適投与量は $0.25 \mu\text{g/kg}$ であることが確認された。

1) 高コレステロール食投与開始後、胆嚢はセルレインに対して10日目に胆嚢は一過性に過剰反応を示したが、14日目より持続的な反応低下を示した。

2) U S画像による観察では、胆嚢内に14日後点状高エコー像が出現し、20日目には、多数の斑状高エコー像、後方エコーを伴う高エコーSludge像を認め、コレステロール結晶・結石の存在を推測させた。

B. 実験2：胆嚢コレステロール結石に関する検討(2)

I 目的

実験1のプレーリードッグモデルで、胆嚢結石の生成過程において一過性の収縮亢進後に持続的な胆嚢収縮能の低下が生ずることが観察されたので、実験2では胆嚢収縮能の変化を圧変動の面から検討することとした。さらに胆嚢、肝胆汁中のコレステロール結晶・結石および胆嚢胆汁の脂質分画の検討に加え、肝胆道系の病理学的検索を行い、実験1のU S画像から推測されたコレステロール結晶・結石の形成過程を分析することとした。

II 方法

プレーリードッグ14頭(平均体重 1.28 kg)を4群に分け、コントロール4頭には精製飼料(表1)を投与し、高コレステロール食群では、高コレステロール食投与開始後5日目($n=2$)、10日目($n=4$)、20日目($n=4$)に、セルレインによる胆嚢収縮時の胆嚢内圧測定に加え、胆汁内容の観察、脂質分画の検索を行い、併せて経胆嚢の胆嚢造影および肝胆道系の病理学的検討も行った。

1) 胆嚢内圧測定：

実験1と同様に塩酸ケタミン麻酔下に開腹、カニューレを底部より胆嚢内に挿入、生理的食塩水 0.12 ml/min をArndorfer pump²⁷⁾を用いて灌流し、Constant infusion法で内圧を測定した(図5)。灌流液の流入による胃及び十二指腸の拡張²⁸⁾を除くためにポリエチレンチューブを胃・十二指腸内に留置し外瘻とした。胆嚢内圧の指標として、図6の様に、1)セルレイン $0.25 \mu\text{g/kg}$ 投与前の胆嚢静止内圧(Resting GB pressure)、2)投与後の胆嚢内圧上昇までの潜時(Latency Period)、3)最大胆嚢内圧(Maximum GB Pressure)、4)胆嚢内圧上昇持続時間(Duration)を検討した。さらに、内圧測定カニューレ挿入時に、胆嚢および肝胆汁を採取し以後の検索に供した。

2) 胆嚢および肝胆汁の検索：

1)で採取した胆汁の一部を直ちに位相差顕微鏡(Olympus社)で鏡検し、コレステロ

ール結晶・結石の析出・生成状況を検討した。

3)胆嚢胆汁の脂質分画の測定：

1)で採取した新鮮胆汁⁵⁾の総コレステロール、磷脂質、総胆汁酸を測定した。残りの胆汁を直ちに2000rpm・5分間遠沈、上清を-20℃で保存した。この保存胆汁を37℃の温浴槽で再溶解した後に、2000rpm・5分間遠沈し、上清の胆汁酸分画を測定した。総コレステロール、磷脂質、総胆汁酸の測定はRhodesらの方法²⁹⁾³⁰⁾に従い、胆汁酸分画の測定はIvy, DenBenstenらの方法³¹⁾に従い行った。

4)胆道造影：

胆嚢内圧測定後に留置されている、胆嚢内カテーテルを利用し、60%ウログラフィンを注入し、胆道造影を行った。

5)病理学的検討：

胆道造影終了後実験動物を屠殺、肝及び胆嚢、総胆管を摘出し、10%ホルマリンで固定後H E標本を作成し、光顕的に検討した。

III 結果

1)胆嚢内圧の変化：

静止胆嚢内圧は、高コレステロール食投与後も有意の変動を示さなかった。一方セルレン投与時の最大胆嚢内圧は10日目では平均38cmH₂Oと有意(p<0.01)に高値を示したが、20日目にはコントロールと有意の差を示さなかった。胆嚢収縮迄の潜時は各群で差はなく、内圧上昇持続時間は10日目には50分と有意(p<0.05)の延長を示したが、20日目にはコントロールと有意の差を示さなかった(図6)。

2)位相差顕微鏡による胆汁の検鏡：

胆嚢胆汁中には、5日目に最大10μm迄の方形のコレステロール結晶(図7a)、10日目には大小様々の重層するコレステロール結晶(図7b)をそれぞれ認めた。更に20日目には、粘液を混じたSludge中に多数のコレステロール結晶とともに、径0.1mmの小結石(図7c)を認めた。20日目に胆管より直接採取した肝胆汁中には、僅かながら方形の微小コレステロール結晶(図7d)を認めた。

3)胆嚢胆汁の脂質分画変化：

表3aの如く、コレステロールは高コレステロール食開始後5日目8.0±0.7%、10日目8.2±0.5%、20日目8.6±0.6%と有意(p<0.001)の増加を示した。磷脂質は5日目に7.6±0.9%と有意(p<0.05)に低下したが、10日目15.6±0.7%、20日目14.8±0.7%と有意(p<0.01)の増加を示した。また総胆汁酸は、10日目76.2±0.6%、20日目77.8±0.6%と有意(p<0.01)の低下を示した。Lithogenic index³²⁾は5日目にすでに1.1となっており、Lithogenic bile³³⁾の発生を確認した。

胆汁酸分画(表3b)では、コール酸は5日目65.9±4.2%*、10日目61.2±3.5%*、20日目55.8±3.6%**と有意(*p<0.01, **p<0.001)に低下した。ケノデオキシコール酸は、5日目27.3±3.6%*、10日目31.0±2.6%*、20日目37.9±2.4%**と有意(*p<0.01, **p<0.001)の増加を示した。デオキシコール酸とリトコール酸は、10日目のみ有意の増加を示した。

4)胆道造影所見：

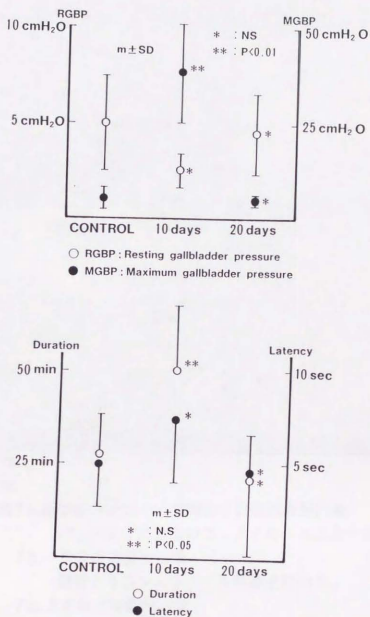


図6 胆嚢内圧測定結果

上段: 静止胆嚢内圧, セルレイン投与時の最高胆嚢内圧

下段: セルレイン投与後胆嚢内圧上昇までの潜時

および内圧上昇持続時間

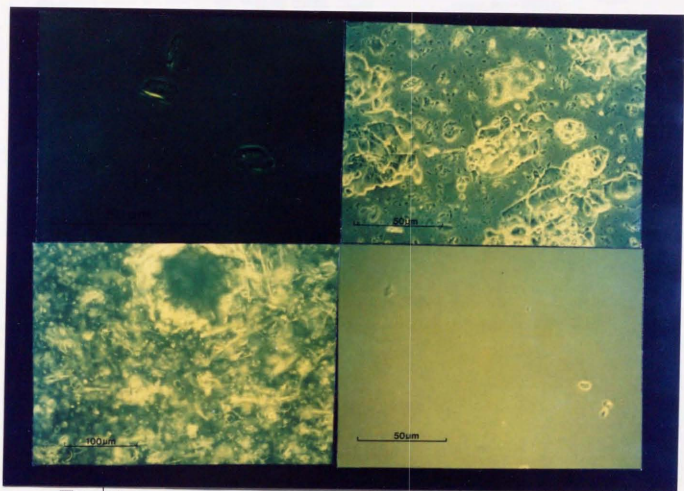


図7a	7b
7c	7d

- 図7 a;高コレステロール食開始5日後胆嚢胆汁像
 10 μ mまでの方形のコレステロール結晶を認めた
- 7 b;10日後胆嚢胆汁像
 重層するコレステロール結晶を認めた。
- 7 c;20日後胆嚢胆汁像
 Sludge中に多数のコレステロール結晶と共に径
 0.1mmの小結石を認めた。
- 7 d;20日後の肝胆胆汁像
 肝胆汁中にも方形のコレステロール結晶が存在
 していた。

		胆汁脂質分画 (%)		mean±SEM	
飼育期間	頭数	コレステロール	磷脂質	総胆汁酸	Lithogenic Index
Control	4	2.3±0.35	9.1±1.5	88.7±1.7	0.4
5日	2	8.0±0.7 ^a	7.6±0.9 ^c	90.1±0.8 ^d	1.1
10日	4	8.2±0.5 ^a	15.6±0.7 ^b	76.2±0.6 ^b	1.2
20日	4	8.6±0.6 ^a	14.8±0.7 ^b	77.8±0.6 ^b	1.2

		胆汁酸分画 (%)			
飼育期間	頭数	Cholic Acid	Chenodeoxycholic Acid	Deoxycholic Acid	Lithocholic Acid
Control	4	85.1±2.8	12.5±2.5	1.4±0.8	0.7±0.4
5日	2	65.9±4.2 ^b	27.3±3.6 ^b	4.0±1.6 ^d	1.7±0.3 ^d
10日	4	61.2±3.5 ^b	31.0±2.6 ^b	4.8±1.8 ^c	3.1±0.7 ^b
20日	4	55.8±3.6 ^a	37.9±2.4 ^a	5.0±2.3 ^d	2.8±2.2 ^d

a; p<0.001, b; p<0.01, c; p<0.05 comparing with control group d; not significant

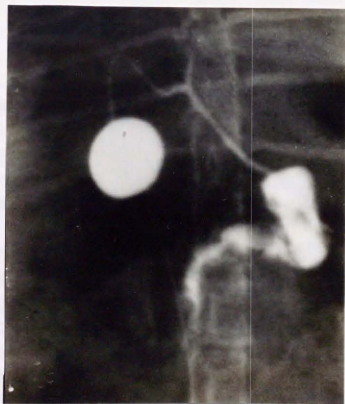


図 8 ;胆道造影

胆嚢管ならびに乳頭の通過は良好であった

何れの群においても、胆嚢管および乳頭の通過は良好であることが確認された(図8)。

5)肝胆道の病理学的所見:

高コレステロール食投与開始後10日目には、肝は肉眼的に黄色調を呈し、組織学的にはfoamy cellの出現、肝細胞の空胞変性を認め、またperiportal areaに軽度の単核球の浸潤を認めた。また20日目にはそれらの変化がより顕著となり、脂肪肝の組織像が認められた。肝内胆管内にはコレステロール結石の存在は証明されなかった。

IV小括

1)胆嚢内圧の検討では、高コレステロール食投与後、セルレインに対する最高胆嚢内圧、および内圧上昇持続時間は、10日目には有意の増大を認めたが、20日目にはコントロールと有意差を認めなかった。

2)胆嚢胆汁の脂質分画の検討では、コレステロールは5日後有意の増加を示し、5日後にlithogenic bileの発生が確認された。胆汁酸分画では、コール酸の減少、デオキシコール酸の増加を認めた。

3)位相差顕微鏡による胆嚢胆汁の検索では、経時的に、コレステロール結晶の析出(5日)、集簇(10日)、Sludge内での小結石形成(20日)へと進展する過程が確認された。また20日目には、肝胆汁中にも微小コレステロール結晶の存在が確認された。

4)病理学的には脂肪肝がみられたが、肝内胆管内には結石は証明されなかった。

C. 実験3:肝内コレステロール結石に関する検討。

I 目的

上記のブレイリードッグモデルでは、胆嚢結石の形成には、lithogenic bileの発生に加え、胆嚢の収縮不全・胆汁鬱滞が関与する可能性が示唆された。肝内コレステロール結石においても結石の生成過程は、胆嚢結石と大きくは異ならないと考えられるため、同一モデルに片側肝管結紮を付加することにより肝内胆管内に胆汁を鬱滞させ、肝内コレステロール結石モデルの作成を試みると共に、その生成機序を解明するために肝脂質代謝を中心とした検討を加えた。

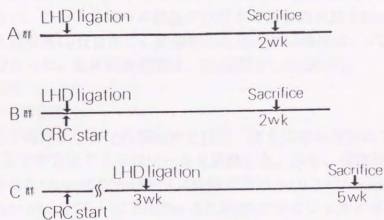
II 方法

ブレイリードッグ18頭(平均体重1.32kg)を6頭ずつA、B、C3群に分けた(図9)。A群は精製飼料を8週以上投与後、ケタミン50mg/kg筋注麻酔下に左肝管を結紮した。B群は、同様の左肝管結紮と同日に高コレステロール食投与を開始、C群は予め3週間高コレステロール食投与後同様に左肝管を結紮し、以後も同一食を継続した。何れの群も左肝管結紮後2週目に屠殺し検体を採取し以後の実験に供した。

1)血中脂質代謝の検討:

A、B群では屠殺時、C群では左肝管結紮時ならびに屠殺時に採血し直ちに氷冷、1時間以内に3000rpm20分間遠沈、血清に分離、-80℃で凍結保存した。凍結後30日以内に保存血清の総ビリルビン、総コレステロール、中性脂肪、燐脂質、LCAT、リポ蛋白分画、アポ蛋白を測定した。総ビリルビン、総コレステロール、中性脂肪、リン脂質

Experimental Protocol



LHD: Left Hepatic Duct
 CRC: Cholesterol Rich Chow

図9 実験3

NUCLEATION TIME

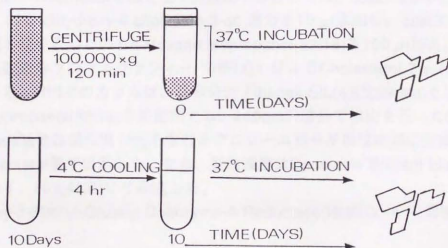


図10 Nucleation Time計測法

は実験1と同様に測し、LCATは自己基質法³⁴⁾、リポ蛋白分画はアガロースゲル電気泳動法³⁵⁾、アポ蛋白はSRID法で測定した³⁶⁾。

2)胆嚢胆汁の Nucleation Time (結晶析出時間) :

Nucleation Time の測定は、Holtzbach³⁷⁾等の方法に準拠し、屠殺時に採取した胆嚢胆汁を100,000×g,2時間遠心後、その中間層を採取、37°CでIncubateし、位相差顕微鏡にて連日観察を行ない、コレステロール結晶が出現するまでの日数をNucleation Timeとした。Incubation開始後10日目までに結晶析出を認めない検体は、4°Cで4時間冷却後引き続き観察を行なった。最長観察期間は、20日間とした(図10)。

3)肝脂質代謝の検討

a)肝ミクロソームの調整 :

各群とも屠殺時に肝兩葉より約1gの組織片を採取、直ちに液体窒素にて凍結、-80°Cで保存、8週以内に以下の方法でミクロソームを調整した。即ち、保存肝組織片の重量を測定後、各組織片を9:1(v/w)の50mMトリス塩酸緩衝液(w/ 0.3mM Sucrose, 10mM EDTA, 10mM Dithiothreitol:DTT、以下Buffer-Aと略)中でホモジェナイズ後20000g,15分遠心、上清を採取、100,000×gで1時間超遠心しミクロソーム分画を得た。同分画をBuffer-Aで再懸濁し、再び100,000×g,1時間の超遠心を行なった。このミクロソーム分画を0.1Mの磷酸カリウム緩衝液(w/ 1mM EDTA、以下 Buffer-Bと略)に懸濁し以後の測定に供した(図11)。ミクロソーム調整の為の組織片採取後、肝胆道系を摘出し10%ホルマリンで固定しHE染色標本を作成、組織学的検討を行なった。

b)Cholesterol 7 α -hydroxylase活性の測定³⁸⁾(図12) :

a)で調整した肝ミクロソーム100 μ lに、Buffer-B 150 μ lを加え、37°Cの恒温槽中で60分間preincubation、さらにNADPH溶液(21.5mg/ml of Buffer-B) 25 μ lを添加後20分間incubationした後、5%コール酸溶液を30 μ l加え、Cholesterol 7 α -hydroxylaseの反応を停止させた。さらにUV Detectorによる検出を可能とするために、コレステロール酸化酵素溶液(東洋醸造) 20 μ lを添加、10分間incubationし、Sterol骨格の3位の炭素を酸化後、0.3mlのmethanolを加え全ての反応を停止させた。上記の試料に内部標準物質として7 α ,12 α -dihydroxy-4-cholesten-3-on 溶液を10 μ l添加し、石油エーテルで2回抽出、乾固を繰り返したのちn-Hexane:Isopropanol(82:18)を100 μ l加え、その20 μ lをもちいて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるCholesterol 7 α Hydroxylaseの測定を行った。HPLCのカラムは、日本分光 Finepak SIL(4.6*250mm)を用いn-Hexane:Isopropanol(82:18)を移動相とし、240nmの波長で検出を行ったCholesterol 7 α hydroxylase活性は蛋白質1mgを含むミクロソーム画分が単位時間に生成した7 α -hydroxycholesterol量で表示した。なお、蛋白濃度はCoomasie Brilliant blue変法(プロテインアッセイ、和光純薬)にて測定した。

c)3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl Coenzyme-A Reductase(HMGCo-A R)活性の測定(図13) :

HMG Co-A Rの測定はBrownらの方法³⁹⁾により行った。b)と同様にミクロソーム蛋白濃度を測定後、蛋白量20~150mgのミクロソームに20mM imidazole/chloride(pH7.4)+5mM DTT溶液を加え90 μ lとした。これを37°C60分間incubationし、0.2Mの磷酸緩衝液

Preparation of Microsome

- 1) Liver is weighed and placed into 9:1 (v/w) cold buffer A
- 2) After homogenization, centrifugation at 20,000g for 15 min.
- 3) Supernatant is centrifuged at 100,000g for 1hr.
- 4) Microsomal pellet is resuspended in the homogenizing medium (20% of 1)) and recentrifuged at 100,000g for 1hr.
- 5) The resulting microsomal fraction is suspended in 1ml of buffer B/g of liver tissue.

Buffer A: 50mM Tris-HCl buffer pH7.4 containing 0.3M sucrose, 10mM EDTA, 10mM DTT.

Buffer B: 0.1M potassium-phosphate buffer, pH 7.4 containing 1mM EDTA.

図1 1 肝ミクロソーム調整法

Assay of Hepatic Microsomal 7α Hydroxylase activity by HPLC

- 1) Preincubation for 60 min.
- 2) Addition of 2.2mM NADPH
- 3) Addition of 5% cholic acid
- 4) Incubation with cholesterol oxidase solution for 10 min.
- 5) Addition of methanol.
- 6) Extraction with petroleum ether and evaporation 2 times.
- 7) Addition of n-Hexane:isopropanol(82:18) and sonification for 15 min.
- 8) HPLC

HPLC column Finepeak SIL
UV detector 240nm

図1 2 H P L C によるCholesterol 7α Hydroxylase測定法

Assay of HMG-CoA reductase Activity

- 1) preincubation for 60 min.
- 2) Addition of DL[3- 14 C]-HMG-CoA
- 3) Incubation for 30 min at 37°C.
- 4) Addition of [3 H]-mevalonate.
(To correct for incomplete recovery)
- 5) Isolation of mevalonate.
(by thin layer chromatography)

図1 3 HMG-CoA reductase測定法

(pH7.4)+(40mM glucose-6-phosphate, 5mM TPN, 0.7 unit of glucose 6-phosphate dehydrogenase(Boeinger Mann-heim社), 20mM EDTA, 10mM DTT)100 μ lを加え、さらに基質としてDL-[3-¹⁴C]-HMG CoA (23000cpm/nmol, New England Nuclear社)を添加、総量200 μ lとし、37°C30分間incubationを行った。回収率補正の為の[³H]メバロン酸を内部標準として加え、上記反応で生成された[¹⁴C]メバロン酸を薄層クロマトグラフィーで分離した。酵素活性は、ミクロソーム蛋白1mgにより単位時間に生成された[¹⁴C]メバロン酸量(pmol)で表示した。

4)病理組織学的検討:

肝胆道を摘出し、10%ホルマリンで固定、H E染色標本を作製し病理組織学的検討を行った。

III 結果

1)血中脂質代謝:

総コレステロールは、A群に比しB群691.8 \pm 131.1mg/dl、C群526.6 \pm 59.3mg/dlと両群とも有意(p<0.05)の高値を示した。また中性脂肪も、B群312.3 \pm 99.0mg/dl、C群407.2 \pm 132.7mg/dlとA群に比し有意(p<0.01)の高値を示した。燐脂質はB、C群とも軽度の高値を示したが、A群との間に有意差は認められなかった(表4a)。LCATも軽度の上昇傾向を呈したが各群間に有意差を認めなかった。血清総ビリルビンは、各群とも変動を示さなかった。

リポ蛋白分画(表4b)では、 α リポ蛋白はA、B群間に有意差なく、C群はA群に比し有意(p<0.05)に低値を示した。pre β リポ蛋白はA群に比し、B群、C群とも有意差を認めなかった。 β リポ蛋白はA群に比しC群では有意(p<0.05)の高値を示した。カイロミクロンならびにテーリングは、各群間に有意差を認めなかった。

アポリポ蛋白(表4c)では、アポA-IはA群に比しB群は有意(p<0.05)の高値を示したが、C群は有意差を示さなかった。アポA-IIはA群に比しB、C両群とも有意(p<0.01)の高値を示し、アポBもA群に比しB*、C**両群とも有意(*p<0.01, **p<0.001)の高値を示した。アポEもA群に比しB群で有意(p<0.05)の高値を示したが、C群では有意差を認めなかった。アポC-II、C-IIIは各群間に有意差を認めなかった。

2)胆嚢胆汁のNucleation Time:

A群では観察期間中(20日)コレステロール結晶の析出を認めなかった。B群では11.8 \pm 2.8日、C群では8.8 \pm 3.5日目にコレステロール結晶が析出し、Nucleation Timeの短縮を認めた。

3)肝Cholesterol 7 α Hydroxylase活性(図14a, b):

A群とB、C両群間には有意差を認めなかったがB群0.027 \pm 0.059、C群0.078 \pm 0.002mol/min/mgProtと両者間に有意差(p<0.01)を認めた。各群とも肝両葉間に有意差は認められなかった。

4)HMGCo-A R活性(図15a, b):

A群に比しB群8.1 \pm 8.3pmol/mg/min、C群6.3 \pm 7.5pmol/mg/minと有意(p<0.01)に低値を示した。各群とも結紮側において非結紮側に比しHMG-CoA reductase活性の有意(A群p<0.05, BC群p<0.01)の高値が認められた。

表4 a 血清生化学検査

Mean±SEM

	A群	B群	C群	C群結紮前
総ビリルビン (mg/dl)	0.6±0.33	0.42±0.07	0.38±0.09	0.42±0.02
総コレステロール (mg/dl)	363±46.3	691.8±131.1 ^a	526.6±132.7 ^b	847.0±240.1 ^b
中性脂肪 (mg/dl)	159.8±57.1	312.3±99.0 ^b	407.2±132.7 ^b	202.2±54.1
磷脂質 (mg/dl)	545.4±57.1	731.0±114.9	697.4±91.6	767.8±132.0
LCAT (nmol/ml)	54.8±10.9	135.8±40.0 ^b	85.5±29.5	—

a means p<0.05 comparing with group A

b means p<0.01 comparing with group A

表4 b 血清リポ蛋白分画

%	A群	B群	C群	C群結紮前
カイロミクロン	2.1±0.3	3.6±1.0	2.0±0.5	2.0±0.4
αリポ蛋白	49.2±5.1	36.4±3.5	28.4±4.0 ^a	35.0±3.1 ^a
pre βリポ蛋白	23.8±9.1 ^c	15.8±3.7 ^c	14.5±3.1 ^c	35.0±9.7
βリポ蛋白	32.5±2.7	38.3±4.1	43.3±5.0 ^a	35.3±7.8
テーリング	5.4±0.6	5.9±1.0	11.8±5.1	6.8±2.2

a means p<0.05 comparing with group A

b means p<0.01 comparing with group A

c means p<0.05 comparing with group C 3wks

表4 c アポリポ蛋白分画

アポリポ蛋白	A群	B群	C群	C群結紮前
A-I (mg/dl)	50.8±5.6	72.4±17.7 ^a	61.8±5.2	153.7±17.5 ^c
A-II (mg/dl)	2.0±0.2	7.8±3.6 ^b	4.9±1.6 ^b	4.6±0.6 ^b
B (mg/dl)	5.8±0.5	14.6±6.9 ^b	8.2±1.8 ^a	13.3±5.3 ^b
C-II (mg/dl)	0.32±0.07	0.53±0.13	0.4±0.05	0.7±0.17 ^a
C-III (mg/dl)	0.9±0.09	1.05±0.21	0.65±0.23	2.11±1.03
E (mg/dl)	1.7±0.4	3.7±1.2 ^a	3.2±0.9	6.7±2.1 ^a

a means p<0.05 comparing with group A

b means p<0.01 comparing with group A

c means p<0.0015 comparing with group A

CHOLESTEROL 7 α -HYDROXYLASE

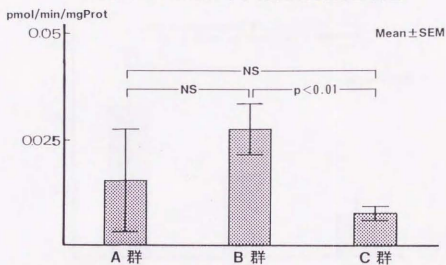


図 1 4 a; 肝ミクロソームCholesterol 7 α Hydroxylase活性

CHOLESTEROL 7 α -HYDROXYLASE

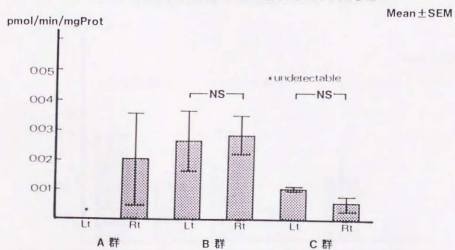


図 1 4 b; 肝両葉のCholesterol 7 α Hydroxylase活性

HMG-CoA Reductase Activity

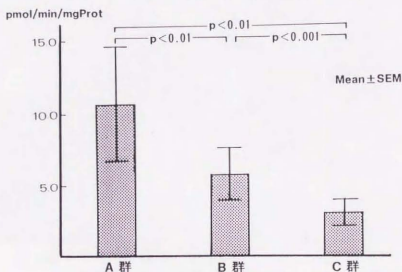


図1 5 a;肝ミクロソームHMG-CoA reductase活性
高コレステロール食投与によりHMG-CoA reductase
活性は有意の低下を示した。

HMG-CoA Reductase Activity

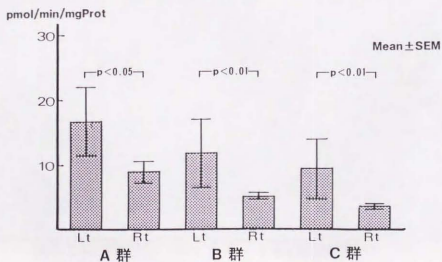


図1 5 b;肝両葉のHMG-CoA reductase活性
結紮側 (Lt) で有意に非結紮側 (Rt) より高い活性
を示した。



図16a;H E 染色 ×40

胆管内にコレステロール結晶による肉芽種性
変化を認めた。



図16b;H E 染色 ×150 16aの強拡大像
結石存在部の胆管上皮は高円柱化していた

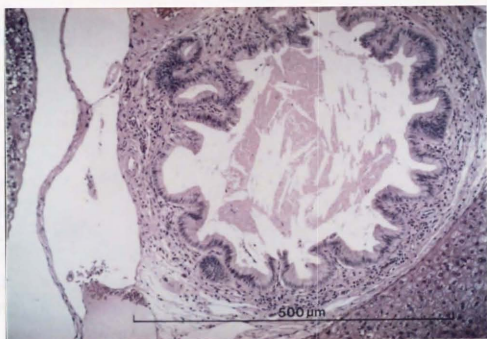


図16c;H E 染色 ×150

結石存在部の上皮は、軽度ながら乳頭状増殖を示した。

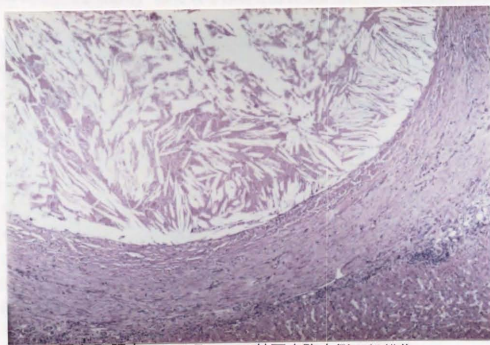


図17;肝内コレステロール結石症臨床例の組織像

症例は47才女性、腹痛を主訴に来院

肝内にコレステロール結石を認めた。

コレステロール結晶による肉芽腫性変化を認めた

H E 染色 ×100

5) 病理組織学的検討:

C群の肝管結紮側肝内胆管のみ、6頭中2頭に、径400 μ mのコレステロール結石の存在を認め(図16a,b,c)た。同部の胆管上皮は高円柱化し、一部には軽度ながら乳頭状増生像も認められた。しかし胆管壁には、炎症性細胞浸潤や壁内腺の増生所見は見られなかった。結石存在部の組織像は肝内コレステロール結石臨床例における結石存在部の組織像(図17)に近似する所見であった⁴⁰⁾。なお肝組織は、実験2のそれと著差はなかった。A B両群の肝内胆管には、両葉とも結石を認めなかった。

IV 小括

高コレステロール食投与および片側肝管結紮により

- 1) 結紮側肝内胆管内に臨床例と酷似するコレステロール結石の発生を認めた。
- 2) 胆嚢胆汁のNucleation Timeの短縮を認めた。
- 3) 血中LDLコレステロールおよびアポリポ蛋白B、A-IIの増加がみられた。
- 4) 肝ミクロソームのHMG-CoA reductase活性は低下を示したが、結紮側は非結紮側に比しHMG-CoA reductase活性の低下は軽度にとどまった。
- 5) Cholesterol 7 α -Hydroxylase活性は、有意の変化を示さなかった。

考察

1. 胆嚢コレステロール結石の生成機序について

胆嚢コレステロール結石の生成機序には、多くの因子が関与することが臨床的、実験的に証明されている。Carey⁴¹⁾はそれらの中でも1)コレステロール過飽和胆汁の生成、2)胆汁よりのコレステロール結晶の核出、3)胆嚢の運動能低下が重要な役割を演じているとしている。従来は、これらのうちコレステロール過飽和肝胆汁の分泌が特に重視され、Admirand, Smallの限界ミセル濃度仮説⁴²⁾広く採用されてきた。しかし臨床例の胆汁のlithogenic indexはコレステロール結石保有例、非保有例間に必ずしも差は認められない⁴³⁾などの点より、結石生成機序に関しては、コレステロール結晶の析出時間(Nucleation time)³⁷⁾の短縮や胆嚢内での胆汁貯留時間(Retention time)の延長⁴⁴⁾、あるいは胆嚢機能異常⁴⁵⁾など、他の要因の関与が注目されるようになった。また胆嚢壁より分泌されるムチンの役割も重視されるようになった⁴⁶⁾。

ブレイリードッグ (Cynomys ludovicianus) を用いた胆嚢コレステロール結石モデルに関しては、1970年代より種々の検討が行われ、高コレステロール食投与後、胆嚢胆汁は、1)コレステロール過飽和状態になり⁶⁾、2)総胆汁酸濃度の変動は生じないものの、胆汁酸分画ではコール酸の減少及びケノデオキシコール酸、デオキシコール酸およびリトコール酸が増加しミセル形成能が高まる5)、さらに、3)胆汁酸プールは減少⁴⁷⁾し、4)胆嚢壁よりのムチン分泌が増加⁴⁸⁾⁴⁹⁾し、5)胆嚢運動機能の異常が生ずる⁵⁰⁾、6)高コレステロール食開始後14日には、70%に胆嚢結石の形成がみられる⁵¹⁾、などの知見が報告されている。

本研究においても、高コレステロール食開始5日後には、ブレイリードッグ胆嚢胆汁中コレステロール分画は著増し、lithogenic bileの発生が確認された。胆汁酸分画についても、コール酸の減少、デオキシコール酸の増加など、従来の報告と同様の所見が

認められた。

予備実験でUSにより胆嚢が明瞭に描出されることが確認されたので、本研究においては、胆嚢運動機能をUS画像で検討することとした。実験1におけるセルレインによる胆嚢収縮能の検討では、高コレステロール食投与10日後に一過性の過剰反応を示した後、14日目より収縮反応は持続的な低下を示した。実験2の胆嚢内圧に関する検討では、セルレインに対して10日目には、一過性に最高胆嚢内圧の亢進および、内圧上昇持続時間の延長を認めたが、20日目にはコントロールと同様の圧変動を示した。このように内圧変動は、20日目には見かけ上正常の反応を示したが、画像による観察では、14日後以降セルレインに対する胆嚢収縮反応が全く見られず、胆嚢内容の排出という本来の胆嚢機能の上では、収縮不全とみなすべき状態にあることが推測された。

同一モデルにおける胆嚢運動機能の変化については、放射性同位元素⁵²⁾を用いた検討で、一過性の胆嚢運動能亢進の時期を経て、高コレステロール食投与開始2週間後に、胆嚢内容の排泄遅延が生ずることが報告されている。この胆嚢運動能の変化が生起する機序は、現在のところ不明といわざるを得ないが、Friedhandler⁵³⁾は、Richardsonリスコレステロール結石モデルでは、胆嚢運動能の低下は、CCK受容体を介する機序ではなく胆嚢平滑筋の収縮性そのものの変容によると報告している。また、ブレイリードッグモデルを用いた追試でも⁵⁴⁾同様な所見が得られており、これらの運動能の変容は、コレステロール過飽和胆汁の存在により惹起される可能性も指摘⁵⁵⁾されている。

US画像による観察では、10日目に浮遊する点状の高エコー、20日目に斑状高エコーおよびSludge像を認め、位相差顕微鏡による胆汁の観察では、高コレステロール食開始5日後には胆嚢内に方形のコレステロール結晶、10日後には重層するコレステロール結晶、20日後には粘液を混じたSludgeの中に多数のコレステロール結晶とともに径0.1mmの小結石を認めた。また20日後には肝胆汁中にも、同様の微小結晶を認めた。

ブレイリードッグモデルでは、著者の如く胆嚢胆汁中の結石形成・成長過程を直接観察した報告はないが、リスザルを用いた胆嚢コレステロール結石モデルおよび、臨床例から採取した胆嚢胆汁を走査電子顕微鏡で観察した報告では⁵⁶⁾、まず、方形のコレステロール結晶が析出し、次いでそれが平板状に成長、さらに重層、または不規則に集簇し、胆石へと成長することが認められている。

著者の実験では20日後に、胆嚢内に粘液の貯留を認めたが、Lee等は同一のブレイリードッグモデルで、胆嚢におけるムチン分泌の亢進を認めている⁴⁶⁾⁴⁹⁾。

さらに著者らは、胆嚢胆汁のNucleation Timeは、高コレステロール食投与14日後より短縮し、35日目には短縮はより著明となることを確認した。ブレイリードッグモデルについては、Nucleation Timeを検討した報告はないが、臨床例では、正常胆嚢胆汁のNucleation timeは約15日であるのに対し、胆嚢結石症の胆嚢胆汁では、約3日と明かな短縮が認められている³⁷⁾。

以上のブレイリードッグモデルにおける著者の検索結果、および諸家の成績から胆嚢コレステロール結石の生成過程・機序については、以下の如き推論が成り立つと考えられた。

即ち、高コレステロール食投与により36時間後、胆嚢胆汁中のコレステロール濃度が上昇する。これに伴って、溶存能を維持するようにC D C Aの増加、C Aの減少生ずるが、5日目にはコレステロールは限界ミセル濃度を越え、Lithogenic Index³²⁾は1.0以上となり、Lithogenic bileが発生する。位相差顕微鏡による検索では、この時点で、既に胆嚢胆汁中に微小コレステロール結晶がみられたが、胆嚢の収縮能には異常は認められなかった。従って、少なくともこの段階の微小コレステロール結晶の発生には、胆嚢運動機能異常の関与は少ないと推測され、むしろ、コレステロール・磷脂質ベジクルからの胆嚢上皮粘液層内での結晶析出⁵⁷⁾といった機転が関与する生ずる可能性が考えられる。10日目には、コレステロール結晶の重層化がみられ、同時期にUS画像および内圧変動上、胆嚢収縮能の亢進を認めたが、結晶の重層化と胆嚢収縮能亢進との因果関係は、明らかにし得なかった。14日目より、持続的に胆嚢収縮能・排泄能の低下、及び実験3では、Nucleation timeの短縮がみられ、20日目には、胆嚢内に粘液を混じたSludgeとその中に多数のコレステロール結晶とともに小結晶が認められた。コレステロール結晶の成長には、胆嚢粘膜から分泌される粘液糖蛋白⁴⁸⁾が関与し、また胆嚢内容の排泄遅延は、胆嚢内のムチン貯留をもたらし、結晶の成長を促進⁴⁶⁾するとの見解もあるが、著者らの成績もそれを支持すると考えられた。また、Nucleation Timeの短縮に関与する因子については、未だ十分な解明がなされていないが、上記の様なプロセスによる結晶生成を表現する端的なパラメーターであると考えられた。

2. 肝内コレステロール結石のモデルの作成とその生成機序について

原発性肝内結石症の生成機序については、もっぱら臨床例からの分析が行われ、肝内胆管の形成異常⁹⁾や、それを背景に発生した胆汁鬱滞⁹⁾、胆道感染¹⁰⁾、あるいは増殖性胆管炎¹¹⁾による過剰な粘液産生¹²⁾、などの因子が関与するビリルビンカルシウム結石生成説が広く採用されてきた。また、実験的には、同一の視点から作成されたモデルについての2、3の検討がみられるのみで、臨床例にみられる、コレステロール成分に富む結石や純コレステロール結石など、原発性肝内コレステロール結石症の特性を備えたモデルはいまだ存在せず、その生成機転の解明に大きな隘路となっている。

実験1、2のプレーリードッグモデルをもちいた胆嚢コレステロール結石に関する検討から、コレステロール結石生成には1)肝よりのLithogenic bileの分泌に加えて、2)胆汁の排出遅延・鬱滞を基盤にした、いくつかの要素が関与していることが推測されたので、著者は、同一モデルに片側の肝管結紮を加え、肝内コレステロール結石の作成を試み、さらにその生成機序に関して肝および血中脂質代謝の面より検討した。その結果、高コレステロール食投与+肝管結紮プレーリードッグの結紮側肝内胆管内にのみ、径400 μ mのコレステロール結石を作成し得た。また結石存在部位の胆管上皮細胞には高円柱化を認めた。

この肝内コレステロール結石の生成過程については、同モデルによるコレステロール胆嚢結石のそれと殆ど異ならない機序、即ち、肝より分泌されたLithogenic bile内でのコレステロール微小結晶の析出に続き、胆管結紮による胆汁鬱滞と胆管上皮由来の粘液が関与する過程が加わり、結晶の成長から結石の生成へと進展するものと考えられた。

さらに血中および肝脂質代謝の面より検討すると、高コレステロール食投与により血清コレステロール、中性脂肪、燐脂質はともに増加し、 α リポ蛋白の減少ならびに β リポ蛋白の増加を認めた。その結果血清コレステロールの上昇は主にLDLコレステロールの増加によるものと考えられた。

肝ミクロソーム酵素に関する検討では、Cholesterol 7 α -Hydroxylase活性は一定の傾向を示さなかったが、HMG-CoA reductaseは、高コレステロール食投与により有意の活性低下を示した。また、結紮側では、非結紮側に比し軽度の低下に留まっていた。

コレステロール過飽和胆汁生成には、コレステロール摂取過剰、肝HMGCo-A R活性の亢進によるコレステロールの過剰合成⁵⁸⁾⁵⁹⁾、Cholesterol 7 α -hydroxylase活性の減弱による胆汁酸への異化低下⁶⁰⁾⁶¹⁾、あるいは胆汁酸プールの減少⁶²⁾など、様々な要因の関与が推測されており、lithogenic bileの生成には肝内におけるコレステロール合成の増加と異化の減弱が関与するとの見解もある。

しかし胆汁中のコレステロールの起源は肝内合成由来が約30%にとどまり、他は血中リポ蛋白に由来するされ⁶³⁾⁶⁴⁾⁶⁵⁾、lithogenic bileの産生を肝内でのコレステロール合成の亢進にのみ帰することはできないことが指摘されている。何れにしても著者のモデルにおける胆汁中のコレステロール増加には、血中LDLコレステロールの増加がより多く寄与していると思ふべきであろう。

HMG-CoA reductaseの活性低下は、血中LDL上昇による肝LDL receptorの減少を介する抑制機構⁶⁶⁾によって生じたものと考えられるが、肝管結紮側では非結紮側よりもHMG-CoA reductaseの活性の低下が軽度にとどまっていたことより、肝管結紮側では、何らかの機構によって、上述の抑制機構の発動が減弱し、肝でのコレステロール合成が相対的に高まり、それがコレステロール過飽和肝胆汁の生成に与った可能性も推測されよう。

結語

高コレステロール食投与ブレイリードッグを用い、胆嚢コレステロール結石の生成機序、ならびに肝内コレステロール結石の作成とその生成機序に関して検討を行った。

1) コレステロール胆嚢結石については、高コレステロール食投与により肝よりのlithogenic bileが分泌され、まず微小コレステロール結晶の析出が生じ、次いで胆嚢の収縮不全とそれに起因するコレステロール結晶や粘液の胆嚢内停滞が加わって結晶の成長が助長され、結石形成にまで至るものと考えられた。

2) 高コレステロール食飼育ブレイリードッグに肝管結紮を加えることにより、ヒトの原発性肝内コレステロール結石症に酷似する肝内コレステロール結石モデルを作成し得た。

3) 本モデルにおける肝内コレステロール結石の生成機序についても、胆嚢コレステロール結石と同様、コレステロール過飽和肝胆汁の分泌、胆汁鬱滞に、胆管上皮由来の粘液の関与が加わって、結晶の生成・成長から結石生成へ至る過程が推測された。また本モデルにおける過飽和胆汁の生成・分泌には、肝胆汁鬱滞下で生ずる、高LDL血症によるHMG-CoA reductase抑制機構の発動減弱が、何らかの役割を果た

している可能性も推測されたが、その詳細については、本モデルを用いた更なる検討が必要と考えられる。

文献

- 1)坂下修、蒲田英信、相良安信他：電子走査型超音波診断装置による胆石の集団検診. 医学のあゆみ 109:571-573,1979
- 2)山田耕三、古沢英紀、志賀俊明他：無症状胆石の実態. 胆と膵 5:1221-1228,1984
- 3)亀田治男：本邦胆道疾患—診療の進歩と変遷. 治療 66:979-984,1984
- 4)中山文夫、古沢悌二、中間輝次：肝内結石症の病態について. 昭和53年度厚生省特定疾患対策肝内胆管障害研究班報告書 17-20,1979
- 5)谷村弘、小林展章、吉田圭介、小沢和恵：結石の成分分析よりみた日本人肝内結石症. 日本臨床 45:1564-1572,1987
- 6)松代隆、佐々木幸則、増田高行：原発性コレステロール肝内結石症の1例. 胃と腸 19:445-448,1984
- 7)佐藤裕、松村潔、森崎隆、岸川英樹、武田成彰、松本伸二、山口幸二、中村賢二郎：. 原発性肝内コレステロール結石症の1例. 胆と膵 8:1341-1348,1987
- 8)羽生富士夫、高田忠敬、内山勝弘、佐藤祐一：肝内結石症における肝内胆管像と肝組織像の対比. 昭和55年度肝内胆管障害研究班 報告書:37-41,1981
- 9)古味信彦：胆道形成異常からみた肝内結石症. 肝胆膵 4:343-348,1982
- 10)後藤明彦、鬼束惇義、林勝知他：肝内結石症と β -Glucuronidase. 外科Month 26 肝内結石症:39-46,1982
- 11)中沼安二、他：肝内結石症の病理形態像. 日本消化器病学会雑誌78:874-882,1981
- 12)山本賢輔、土屋涼一：肝内結石症の成因と病理. 胆と膵 1:1429-1436,1980
- 13)DenBensten L., Safaie-Shirazi S., Conner E., Bell S.: Early changes in bile composition and gallstone formation induced by a high cholesterol diet in prairie dogs. Gastroenterology66:1036-1045,1974
- 14)Holzbach RT., Corbusier C., Marsh M., Naito K.:The process of cholesterol cholelithiasis induced by diet in the prairie dogs; a physicochemical characteriza-

tion. J.Lab.Clin.Med. 87:987-998,1976

- 15) Strichartz S.D., Abedin M.Z., Abdou M.S., Roslyn : Increased Biliary Calcium in Cholesterol Gallstone Formation. Am.J.Surg. 155:131-137,1988
- 16) Doty J.E., Pitt H.A., Kuchenbecker S.L., DenBensten L.: Impaired Gallbladder Emptying Before Gallstone Formation in the Prairie Dog. Gastroenterology 85:168-174,1983
- 17) Chung S.H., Ho K.J., Taylor B.: Cholesterol gallstone formation and its regression in prairie dog. Arch.Pathol.96:417-426,1973.
- 18) 北村元仕 : 実践臨床化学 (増補版) :289-304,1982. 医歯薬出版.東京
- 19) Richmond W.: Preparation and Properties of a Cholesterol Oxidase from *Nocardia* sp. and Its Application to the Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum. Clin Chem. 19:1350-1356,1973.
- 20) 益田喜信、広田啓子、米田孝司、他 : 遊離グリセロールを差し引く血清トリグリセライドの自動分析法. 生物試料分析.5:87-91,1982
- 21) Takayama M., Itoh S., Nagasaki T., Tanimizu I.: A new enzymatic method for determination of serum choline containing phospholipids. Clin.Chim.Acta. 79:93-98,1977.
- 22) Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld A.W.: Optimization of methods for Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase. Clin.Chem.24:58-73,1978
- 23) Kind P.R.N., King E.J.: Estimation of Plasma Phosphatase by Determination of Hydrolysed Phenol with Amino Antipyrine. J.Clin.Path.7:322-326,1954
- 24) Wroblewski F., LaDue J.: Lactic Dehydrogenase Activity in Blood. Proc. Soc. Exptl.Biol.Med.90:210-213,1955
- 25) 柳瀬典男、露口文章、大木英也 : 新合成基質を用いたLAP測定法. 臨床化学シンポジウム.20:134,1980
- 26) Orlowski M., Meister A.: γ Glutamyl-p-nitroanilide; A new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ Glutamyl transpeptidase activities.

Biochem.Biophys.Acta.73:679-681,1963

- 27)Arndorfer RC.,Dodds SJJ.:Improved infusion system for intraluminal esophageal manometry. Gastroenteology 73:23-27,1977.
- 28)Debas HT.,Yamagishi T.:Evidence for a pyrolo-cholecystic reflex for gallbladder contraction. Ann.Surg.190:170-175,1979.
- 29)Iwata T.,Yamasaki K.:Enzymatic determination and thin layer chromatography of bile acids in blood. J.Biochem.(Tokyo)56:424-431,1964.
- 30)Rhodes J.,Bernardo DE.,Phillips SF.:Increased reflux of bile into the stomach in patient with gastric ulcer. Gastroenterology 57:241-252,1969.
- 31)Ivey KJ.,DenBensten L.,Clifton JA.:Effects of bile salt on ionic movement across the human gastric mucosa. Gastroenterology 59:683-690,1970.
- 32)Metzger AL.,Heymsfield S. : The lithogenic index-A numerical expression for the lithogenicity of bile. Gastroenterology 62:499-501,1972
- 33)Portman OW.,Osuga T.,Tanaka N.:Biliary lipids and cholesterol gallstone formation. Advances in Lipid Reseach 13:135-194,1975
- 34)井上弘幸 : L C A T 測定法の検討.衛生検査 27:1003-1007,1978.
- 35)大島寿美子,中野栄二、土屋俊夫;リボタンバクの電気泳動法と免疫学的 定量法 臨床検査 20:129-134,1976.
- 36)村勢敏郎、赤沼安夫;アポ蛋白の正常値と測定の意義、Prog Med 4:1955-1958, 1984.
- 37)Holan KR,Holzbach RT,Hermann RE,et al:Nucleation time; a key factor in the pathogenesis of the cholesterol gallstone disease.Gastroenterology77:611-617, 1979.
- 38)Noshiro M.,Ishida H., Hayashi S.,Okuda K.:Assay for cholesterol 7 α -hydroxylase and 12 α -hydroxylase using high performance liquid chromatography.Steroids, 45:539-550,1985

- 39)Brown M.S.,Goldstein J.L.,Dietschy J.M.:Active and Inactive Forms of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Co-enzyme A Reductase in the Liver of the Rat. *J. Biol.Chem.* 254:5144-5149,1979.
- 40)秋山高儀,永川宅和,萱原正都,神野正博,上野桂一,東野義信,広瀬和郎,浅野栄一,太田哲生: 肝内コレステロール結石症の臨床・病理学的検討. *胆と膵* 8:651-657,1987.
- 41)Carey MC.:Formation of cholesterol gallstones:the new paradigms,In: Paumgartner,G.,Stiehl A.,Gerok W.(eds.) *Trends in bile acid research.* Kluwer,Dordrecht(1989)259-281
- 42)Admirand WH.,Small DM.:The Physicochemical Basis of Cholesterol Gallstone Formation in Man. *J.Clin.Invest.* 47:1043-1052,1968
- 43)Holtzbach RT.,Marsh M.,Olszewski N.,Holan K.:Cholesterol solubility in bile; evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man.*J.Clin.Invest.* 52:1467-1479,1973.
- 44)Mok HYL.,Von Bergmann K.,Grundy SM.: Kinetics of the entero-hepatic circulation during fasting;biliary lipid secretion and gallbladder storage. *Gastroenterology* 78:1023-1033,1980.
- 45)Forges IC.:Pathogenesis of cholesterol gallstone disease:The motility defect /In: Northfield TR.,Jazrawi R.,Zentler-Munro(eds.)*Bile acids in health and disease.*Kluwer, Dordrecht (1988)135-153
- 46)LaMont JT.,Smith BF., Moore JRL.:Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Hepatology* 4:51s-56s,1984
- 47)Meyer PD., DenBensten L., Gurll NJ.:Effects of cholesterol gallstone induction on gallbladder function and bile salt pool size in the prairie dog model. *Surgery* 83:599-604,1978.
- 48)Lee SP.,LaMont JT.,Carey MC.:Role of gallbladder mucus hypersecretion of cholesterol gallstones. Studies in the prairie dog. *J.Clin.Invest.*67:1712-1723,1981.
- 49)Lee SP.,Carey MC.,LaMont JT.:Aspirin prevention of cholesterol gallstone formation in prairie dogs. *Science* 211:1429-1431,1981.

- 50) Li YF., Weisbrodt NM., Moody FG. et al: Calcium-induced contraction and contractile protein content of gallbladder smooth muscle after high-cholesterol feeding of prairie dog. *Gastroenterology* 92:746-50, 1987
- 51) Brennen DE., Connor WE., Forker EL., DenBesten L.: Diet-induced cholesterol gallstones in prairie dogs. *J. Lab. Clin. Med.* 76:1006-1007, 1970.
- 52) Pellegrini CA., Ryan T., Broderick W., Way LW.: Gallbladder filling and emptying during cholesterol gallstone formation in the prairie dog. *Gastroenterology* 90:143-149, 1986.
- 53) Friedhandler TM., Davidson JS., Shaffer EA.: Defective gallbladder contractility in the ground squirrel and prairie dog during early stages of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology* 85:830-836, 1983
- 54) Li YF., Moody FG., Weisbrodt NW. et al : Gallbladder contractility and mucus secretion after cholesterol feeding in the prairie dog. *Surgery* 100:900-904, 1986
- 55) Behar J., Lee KW., Thompson W., Biancani P. : Gallbladder smooth muscle contraction in patient with pigment and cholesterol stones. *Gastroenterology* 95:856(Abstr), 1988
- 56) Osuga T., Mitamura K., Miyasawa S., et al: A scanning electron microscope study of gallstone development in man. *Lab. Invest.* 31:696-704, 1975.
- 57) Carey MC., Cahalane MJ.: Whither biliary sludge? *Gastroenterology* 95: 508-523, 1988
- 58) Carey M.C., Mazer N.A.: Biliary lipid secretion in health and in cholesterol gallstone disease. *Hepatology* 4:31s-37s, 1984
- 59) Nicolau G. et al: Determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in man. *J. Lipid Res* 15:94-98, 1974
- 60) Carulli N., Loria P., Bertolotti M. et al: Effects of acute changes of bile acid pool composition on biliary lipid secretion. *J. Clin. Invest.* 74:614-624, 1984
- 61) Nicolau G., Shafer S., Salen G. et al: Determination of hepatic cholesterol

7 α -hydroxylase activity in man. *J.Lipid Res* 15:146-151 1974

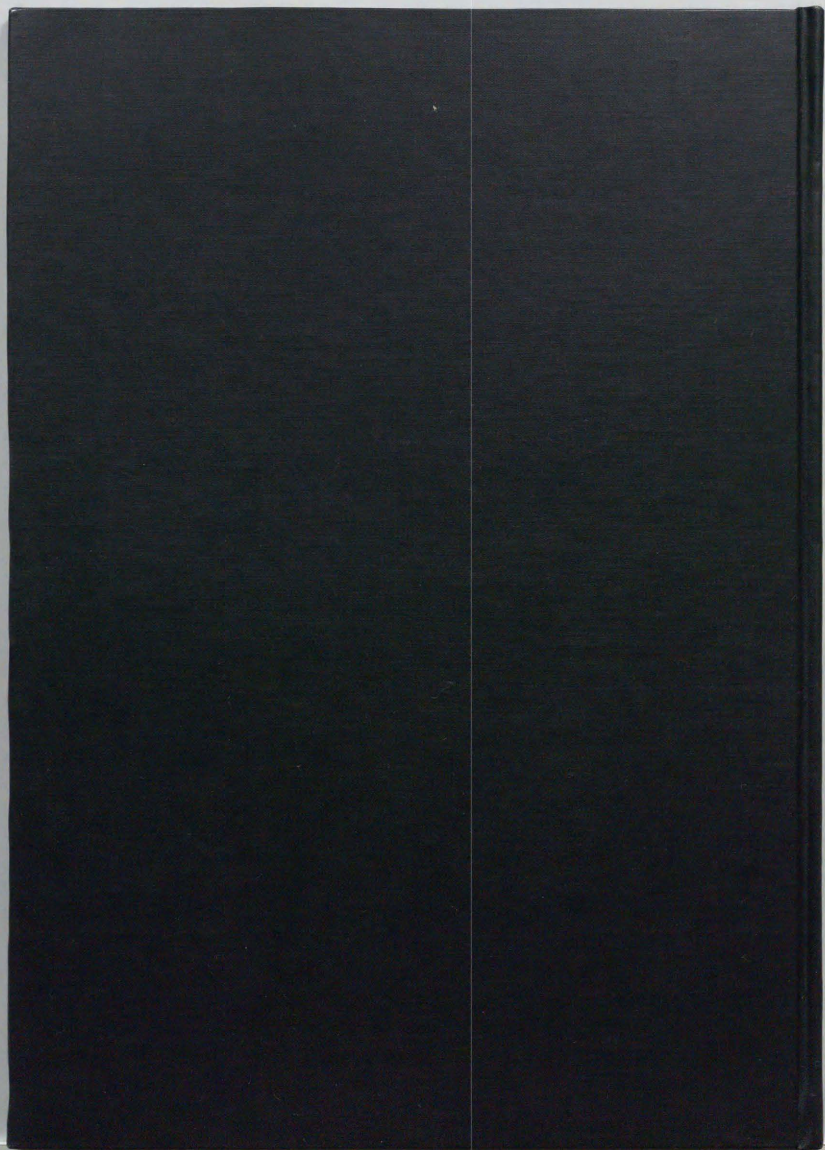
62) Carey MC.: Increased biliary lithogenicity through cholesterol supersaturation. In: Swobodnik W., Ditschuneit H. (eds) *Gallstone Disease: Pathophysiology and therapeutic approaches*. Springer, Heidelberg (1990) 3-10

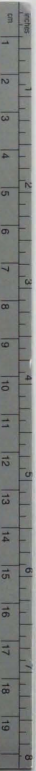
63) Schwartz CC. et al: Preferential utilization of free cholesterol from high density lipoprotein for biliary cholesterol secretion in man. *Science* 200:62-64, 1978

64) Schwartz CC. et al: Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man- Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursor sites. *J. Clin. Invest.* 61:408-423, 1978.

65) Robins S.J., Brunengraber H.: Origin of biliary cholesterol and lecithin in the rat- Contribution of new synthesis and preformed hepatic stores. *J.Lipid Res.* 23:604-608, 1982

66) Brown, MS., Goldstein JL.: A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47, 1986.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Blue patch]	[Cyan patch]	[Green patch]	[Yellow patch]	[Red patch]	[Magenta patch]	[White patch]	[3/Color patch]	[Black patch]

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

