

胆嚢粘膜における表層粘液ゲル層および 粘膜化生の粘液組織化学的研究

中 村 学

飯山赤十字病院外科

(主任: 天野 純教授)

Mucin Histochemical Study of Surface Mucous Gel Layer and Mucosal Metaplasia in Gallbladder Mucosa

Manabu NAKAMURA

Department of Surgery, Iiyama Red Cross Hospital

(Director: Prof. Jun AMANO)

Surgically removed human gallbladders without stones (15 cases), with stones (41 cases) and with gallbladder cancer (2 cases) fixed in Carnoy's solution, were examined by a battery of mucin histochemical techniques in paraffin sections to identify antral mucosal metaplasia and the surface mucous gel layer (SMGL) covering the gallbladder surface. The SMGL on gallbladders without stones (3 cases) and with stones (5 cases) was also examined in unfixed frozen sections. The continuous SMGL which consisted of mucin secreted from the mucosa was visualized. In the gallbladders with stones, the developed SMGL was formed by mucous cell metaplasia in the mucosal epithelium and partially showed a laminated structure with histochemical staining. The ordinary SMGL was significantly thicker in cases with symptomatic stones than in cases with asymptomatic stones ($P < 0.01$). The pyloric gland metaplasia containing only neutral mucin shown with paradoxical Concanavalin A staining, and the gastric surface mucous cell metaplasia containing only neutral mucin stained intensely with galactose oxidase-cold thionin Schiff, were histochemically identical with the mucous cell metaplasia frequently found in the gallbladder mucosa with stones. This study suggests that the gallbladder mucosa may change to mucous cell metaplasia, because the SMGL may play the role of a barrier in protecting the mucosa from stones. *Shinshu Med J* 45: 495-508, 1997

(Received for publication June 27, 1997)

Key words: gallbladder mucosa, mucin histochemistry, surface mucous gel layer, pyloric gland metaplasia, gastric surface mucous cell metaplasia

胆嚢粘膜, 粘液組織化学, 表層粘液ゲル層, 幽門腺化生, 胃表層粘液細胞化生

I 緒 言

慢性胆嚢炎では、胆嚢粘膜に杯細胞や Paneth 細胞の出現を伴う腸上皮化生がみられるほか、幽門腺に類

似した粘液腺が新生する¹⁾⁻³⁾。最近、粘液染色の進歩により、消化管の粘液細胞が産生するムチンが組織化学的に細分されるようになり、その結果、胆嚢粘膜に新生する粘液腺が幽門腺と同様な特徴的糖鎖を有するムチンを産生していることが確認され⁴⁾⁻⁶⁾、同時に腺上皮だけでなく、粘膜上皮も胃粘膜型の粘膜上皮、すなわち表層粘液細胞へ化生することが証明された⁷⁾。

別刷請求先: 中村 学

〒389-22 飯山市大字飯山226の1

飯山赤十字病院外科

したがって、慢性炎症を伴う胆嚢粘膜では、腸上皮化生とともに胃幽門粘膜への化生が生じていることになる。しかし、幽門粘膜化生がもつ生物学的な意義はまったく明らかにされていない。

最近、Ota と Katsuyama⁸⁾はヒトの切除胃で、いわゆる surface mucous gel layer (SMGL) を光顕レベルで観察する方法を報告した。著者は彼らの方法をヒト胆嚢の切除例に応用し、胆嚢粘膜における表層粘液ゲル層 (SMGL) の存在の有無を観察するとともに、その粘液組織化学的な検討を行った。その結果、胆嚢粘膜上には連続した SMGL が存在し、粘膜化生が著しい部位では発達した SMGL が形成されていた。この SMGL は胆石から粘膜面を物理的に保護しているものと考えられた。さらに、SMGL を観察する固定法は、胆嚢のように自家融解が急速に進行する組織では、粘膜の組織学的な観察に適していることも明らかになった。今回の研究では、粘液組織化学的に胃幽門粘膜化生の存在についても検討を加えたので報告する。

II 対象および方法

飯山赤十字病院および信州大学第2外科で開腹手術により切除された胆嚢73例を対象とした。切除された理由は、胆嚢結石53例、胆嚢コレステロールポリープ1例、胆嚢癌2例、さらには胆嚢以外に病変があり、さまざまな理由から切除されたもの17例である。検討例は無石胆嚢15例、有石胆嚢41例、胆嚢癌2例の3つに大別される。無石胆嚢には、組織学的に正常な胆嚢

3例、慢性胆嚢炎や粘膜上皮の化生を認める胆嚢11例、およびコレステロールポリープの存在した胆嚢1例が含まれている。なお化生を、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により杯細胞化生、幽門腺化生、および、核上部の胞体が明るくぬけて豊富にムチンを含む円柱状の化生細胞からなる胃表層粘液細胞化生に分類して検討した。

切除標本の固定は、SMGL の存在を検索するために以下の3つの方法で行った。

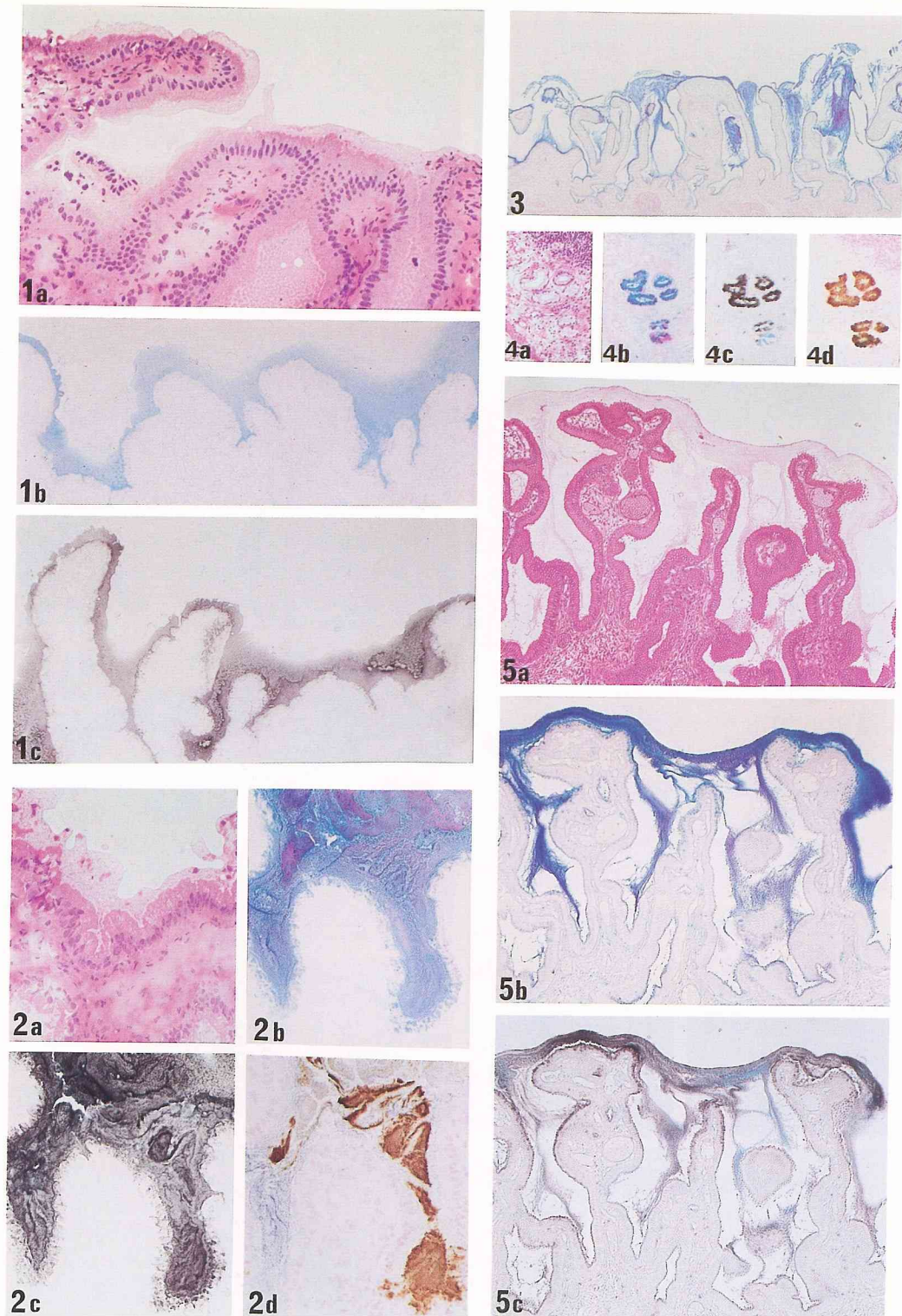
A 凍結切片による固定

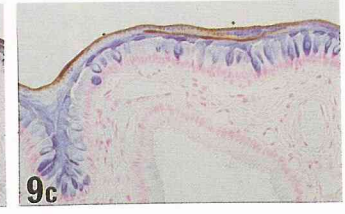
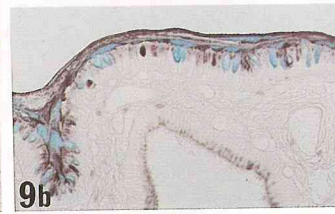
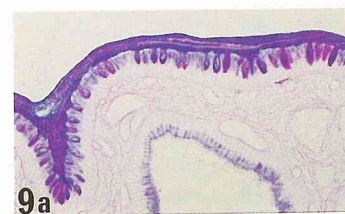
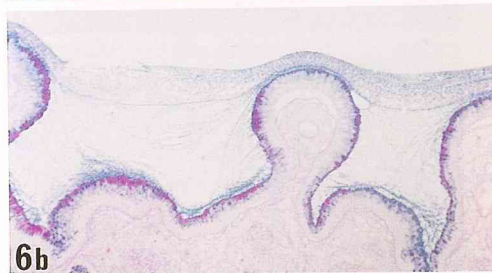
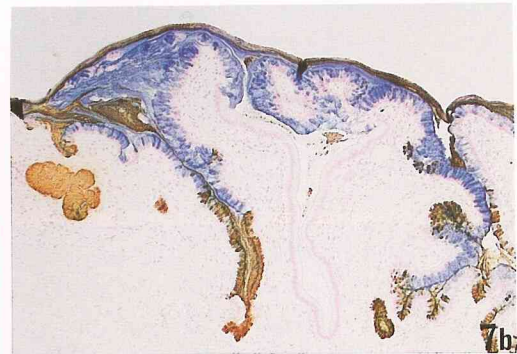
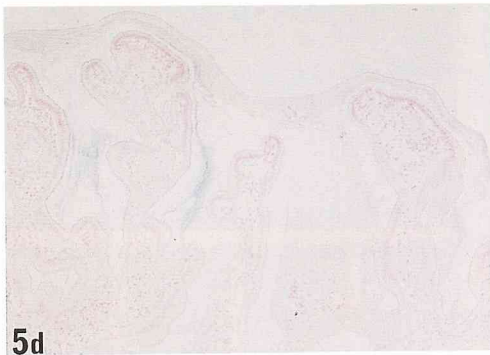
無石胆嚢3例と有石胆嚢5例については、凍結切片により観察をした。胆嚢を切除後、直ちに長軸方向に切開し、胆嚢の底部または体部より大きき1.0×0.5 cmの胆嚢壁を切除した。これを OCT embedding medium (Miles Laboratories, Naperville, IL, USA) 内へ包埋後、液体窒素で固定し、厚さ約6 μmに薄切して、室温で乾燥させた。続いて、SzentkutiとEggers⁹⁾の方法に従い、0.2% Celloidin液で mucus gel を固定してから、粘液染色を行った。

B Carnoy 液による固定

無石胆嚢15例 (女性6例、男性9例、平均年齢62歳)、有石胆嚢41例 (女性25例、男性16例、平均年齢65歳)、胆嚢癌2例 (女性1例、男性1例、平均年齢62歳) では、摘出後直ちに胆嚢を長軸方向に切開し、胆石を含む場合もできる限りそのままの状態で発泡スチロール上に粘膜面を上にして虫ピンで張り付け、Ota と Katsuyama⁸⁾の方法に従いあらかじめ4℃に冷

- Fig. 1 無石胆嚢、凍結切片。a: HE 染色、粘膜上皮を淡い好酸性の SMGL が覆っている。(×146) b: AB-PAS 染色、AB 陽性のムチンが粘膜上皮と SMGL に認められる。(×73) c: HID-AB 染色、スルフォムチンを主体としたムチンが粘膜上皮と SMGL に認められる。(×73)
- Fig. 2 有石胆嚢、凍結切片。a: HE 染色、淡い好酸性の SMGL が認められる。(×146) b: AB-PAS 染色、酸性ムチンと中性ムチンからなる SMGL が存在し、粘膜上皮にも中性ムチンが存在している。(×146) c: HID-AB 染色、スルフォムチンを主体としたムチンが粘膜上皮と SMGL に認められる。(×146) d: GOCTS-PCS 染色、GOCTS に弱く反応するムチンと PCS 陽性のムチンが粘膜上皮と SMGL に存在している。(×146)
- Fig. 3 有石胆嚢、Carnoy 固定、AB-PAS 染色。胆嚢を輪切りにした標本で、SMGL が粘膜上皮より剥離している。(×73)
- Fig. 4 無石胆嚢の頸部腺、Carnoy 固定。頸部腺は幽門腺化生とほぼ同様な組織化学的反応を示している。a: HE 染色。(×73) b: AB-PAS 染色。(×73) c: HID-AB 染色。d: GOCTS-PCS 染色。(×73)
- Fig. 5 組織学的に正常な無石胆嚢、Carnoy 固定。a: HE 染色、粘膜上皮が連続した微細顆粒からなる淡い好酸性の SMGL により覆われている。(×73) b: AB-PAS 染色、粘膜上皮と SMGL には酸性ムチンが認められる。(×73) c: HID-AB 染色、粘膜上皮内には主としてスルフォムチンが存在し、粘膜嚢の基部付近には僅かにシアロムチンが存在している。SMGL にはスルフォムチンとシアロムチンが認められる。(×73)





却してあった Carnoy 液に浸漬して、4°Cで2時間固定した。これらの症例のうち、無石胆嚢2例と有石胆嚢6例では、SMGLが本来粘膜上に存在していたものであり、胆汁内のムチンが沈澱して粘膜上に付着したものではないことを確認する目的で、発泡スチロールに張り付けた直後に、数分間標本をほぼ垂直に傾けた状態としてから、粘膜面を上にして Carnoy 液で固定した。また、有石胆嚢1例は、同じ目的で発泡スチロールへ張り付けた後、粘膜面を下にして、Carnoy 液に浸漬した。他の症例はすべて、粘膜面を上にして Carnoy 液に浸漬した。

Carnoy 液で固定後、胆嚢の長軸方向に沿って全面を5mm幅で全割してから100%エチルアルコールで脱水、キシロールで透徹し、型のごとくパラフィンへ包埋した。3μmで薄切した後、HE染色を行い、化生とSMGLの状態を観察した後、無石胆嚢では1例につき2~5個(平均2.8個)、また有石胆嚢では2~5個(平均2.9個)のブロックをさらに検索するために選びだした。HE染色で化生を認めたブロックは、必ずこれらの中に含まれるようにした。これらのブロックから、厚さ3μmの連続切片をあらためて作製して組織化学的染色を行った。胆嚢癌の2例は、全割標本を用いて検討した。

また、別の有石胆嚢2例については、胆嚢を約1cm幅に輪切りとし、そのまま Carnoy 液の中へ入れて固定した。その後は長軸方向切開例と同様の手順でブロックを作成し、連続切片を得た。

C ホルマリン液による固定

有石胆嚢5例については、Carnoy 液に固定した材料と同様に切り開いた後、4°Cに冷却してあった10%ホルマリン液で固定し、続いて型のように脱水、包埋した。各症例から1ブロックを選び連続切片を作製して、Carnoy 液に固定した材料と比較した。

上記の方法で作成した連続切片に、HE染色以外に、次の染色を行った。すなわち、ムチンの一般的な検出法として alcian blue pH2.5-PAS (AB-PAS) 染色、酸性ムチンをスルフォムチンとシアロムチンに分類するために high iron diamine-alcian blue pH2.5 (HID-AB) 染色^{10,11)}、さらに胃の表層粘液細胞型ムチンを同定するための galactose oxidase-cold thionin Schiff (GOCTS) 反応¹²⁾と幽門腺型のムチンを検出するための paradoxical Concanavalin A 染色(PCS)¹³⁾との連続染色¹²⁾ (GOCTS-PCS)を行った。GOCTS-PCSの連続染色を行う際には、コントロールとして胆嚢と同様に Carnoy 液で固定した胃の幽門粘膜を使用した。なお galactose oxidase (type V)、Concanavalin A (type V)、および horseradish peroxidase (type VI)は、Sigma (St. Louis, Missouri, U.S.A.)の製品を使用した。

また、今回の検討では胆嚢粘膜嚢の頂点を覆うSMGLの厚さを測定した。凍結切片例では、1例ごとに任意に選んだ10カ所で厚さを測定し、Carnoy 液固定例では1例ごとに胆嚢頸部、体部、底部でそれぞれ任意に10カ所ずつ計30カ所で厚さを測定した。症例ごとに測定した値の平均値を、その症例のSMGLの厚さとした。結果に記載したSMGLの厚さの値は平

Fig. 5 d : GOCTS-PCS 染色, 粘膜上皮に GOCTS に僅かに反応するムチンが存在し, SMGL には GOCTS に弱く反応するムチンが存在している。PCS 陽性のムチンは認められない。(×73)

Fig. 6 粘膜上皮が萎縮した無石胆嚢, Carnoy 固定。SMGL は正常な胆嚢と比較し大きな顆粒からなり、一部網状を呈している。a : HE 染色。(×73) b : AB-PAS 染色。(×73)

Fig. 7 有石胆嚢, Carnoy 固定。粘液染色で SMGL が層状構造を呈している。a : HE 染色, 粘膜上皮には杯細胞化生 (矢印), 幽門腺化生 (*) および胃表層粘液細胞化生 (三角) が認められ, その表面はより密な好酸性の SMGL に覆われている。(×73) b : GOCTS-PCS 染色, 胃表層粘液細胞化生と SMGL に GOCTS に強く反応するムチンが認められ, 幽門腺化生と粘膜上皮内には PCS 陽性のムチンが認められる。(×73) c : AB-PAS 染色, 幽門腺化生の一部は中性ムチンのみを含むが, 他の化生細胞には酸性ムチンも含まれている。SMGL に中性ムチンも認められる。(×73) d : HID-AB 染色, 化生細胞と SMGL にシアロムチンが認められる。(×73)

Fig. 8 有石胆嚢, Carnoy 固定。杯細胞化生には GOCTS にやや強く反応するムチンが存在している。a : HE 染色。(×146) b : GOCTS-PCS 染色。(×146)

Fig. 9 有石胆嚢, Carnoy 固定。杯細胞化生より分泌されたムチンが, SMGL を形成している。SMGL の一部が層状構造を呈している。a : AB-PAS 染色。(×146) b : HID-AB 染色。(×146) c : GOCTS-PCS 染色。(×146)

均値±標準偏差として表した。統計学的検討は、F検定で2群間の母分散に差があるかどうかを判定したのうち、Student's t検定を用いて5%以下を有意差があると判定した。

III 結 果

A 凍結切片による固定標本

凍結切片では、均一な構造のSMGLの存在が確認されたが、SMGLの表面が波状に歪むことが多かった。その厚さは、無石胆嚢例 $40.2 \pm 6.3 \mu\text{m}$ 、有石胆嚢例 $99.0 \pm 17.1 \mu\text{m}$ であった。全例SMGLは主として酸性ムチンからなり、スルフォムチンが主体であった(Fig. 1)。GOCTS-PCSでは有石例の一部で、胆嚢粘膜上皮とSMGLにGOCTSにより弱く反応するムチンと、PCSで染まるムチンが認められた(Fig. 2)。

B Carnoy液による固定標本

Carnoy液で急速に固定された標本を組織学的に観察すると、連続したSMGLが保たれているだけではなく自家融解が抑えられており、粘膜面の組織学的な観察に適していた。一方、ホルマリン固定した材料では、自家融解は少ないがSMGLはわずかに残っているか、あるいはほとんど観察されなかった。SMGLの観察は、方法Bで述べたCarnoy液に固定した材料で最も安定した結果が得られたので、以下の観察および検討は、この方法で固定した無石胆嚢15例、有石胆嚢41例、胆嚢癌2例について行った。なお、固定前に垂直状態で固定したり、粘膜面を下にして固定した材料、さらには輪切りにした材料においてもSMGLは胆嚢粘膜上を連続して覆っていた。ただ、輪切りにした標本ではSMGLが粘膜面より剥がれており、これは標本作製中の操作によるものと考えられた(Fig.

3)。

1 無石胆嚢の粘膜とSMGLについて

組織学的に胆嚢上皮は立方状ないし低円柱状で、円形の核は中央よりもやや基底よりに位置していた。胞体は好酸性で胞体上部に明瞭な粘液顆粒はみられなかった。HE染色により、化生は15例中幽門腺化生9例、杯細胞化生1例で認められ、胃表層粘液細胞化生は認められなかった。粘液組織化学的には、胆嚢粘膜上皮は胞体の上部に少量の主としてスルフォムチンを含んでいたが、組織学的に胆嚢が正常な2例では粘膜嚢の基部付近に、また他の症例では化生上皮内にシアロムチンも認められた。なお、幽門腺化生を示す上皮には中性ムチンからスルフォムチンまで様々な酸性度を示すムチンが含まれていた。GOCTS反応では、全例に粘膜細胞内にGOCTSにごく弱く反応するムチンが認められたが胃の表層粘液細胞のように強い反応性を示す症例はなかった。PCS陽性を示したのは幽門腺化生のある9例の化生上皮で、そのような症例の中では固有の粘膜上皮の間にも化生の芽ともいえるPCS陽性の粘液を含む細胞が孤立性に、あるいは少数の細胞からなる小集団として存在した。なお、15例中9例に頸部腺を確認できたが、組織学的に幽門腺と同様の形態をとるところでは、その上皮は幽門腺化生を示す上皮とほぼ同様な組織化学的反応性を示し、その他の上皮は必ずしもPCS陽性の粘液を含まなかった(Fig. 4)。

無石胆嚢のSMGLをHE染色で観察すると、組織学的に正常な胆嚢では粘膜嚢の間を埋める淡い好酸性を示し、高倍率では微細顆粒状の構造物として観察され(Fig. 5)、粘膜の萎縮した胆嚢では網状にみえることもあった(Fig. 6)。無石胆嚢のSMGLの厚さは

Fig. 10 有石胆嚢, Carnoy 固定。胃表層粘液細胞化生は GOCTS に比較的弱く反応し、シアロムチンを主体とした酸性ムチンを含んでいる。a : HE 染色。(×73) b : GOCTS-PCS 染色。(×73) c : AB-PAS 染色。(×73) d : HID-AB 染色。(×73)

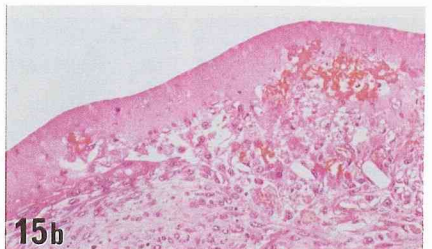
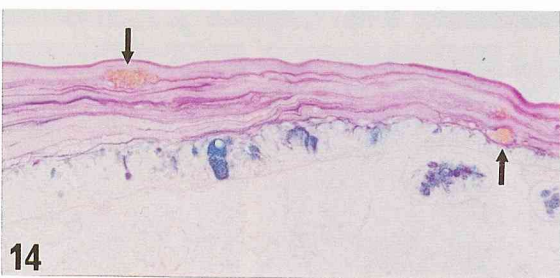
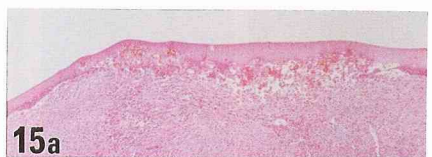
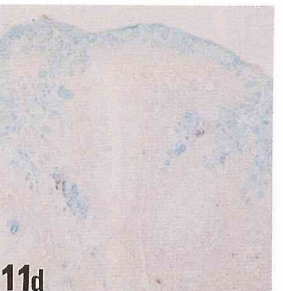
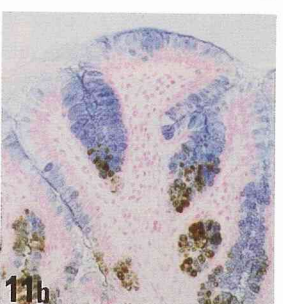
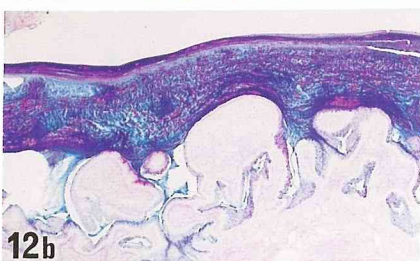
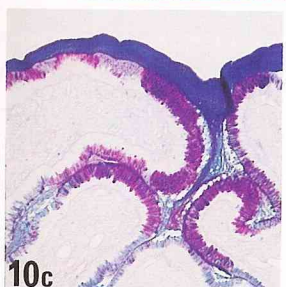
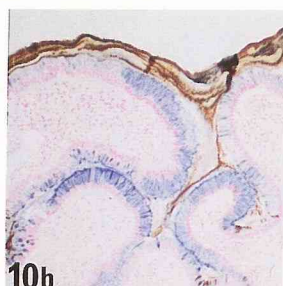
Fig. 11 有石胆嚢, Carnoy 固定。胃表層粘液細胞化生は GOCTS に強く反応するムチンと、中性ムチンのみを含む。a : HE 染色。(×146) b : GOCTS-PCS 染色。(×146) c : AB-PAS 染色。(×146) d : HID-AB 染色。(×146)

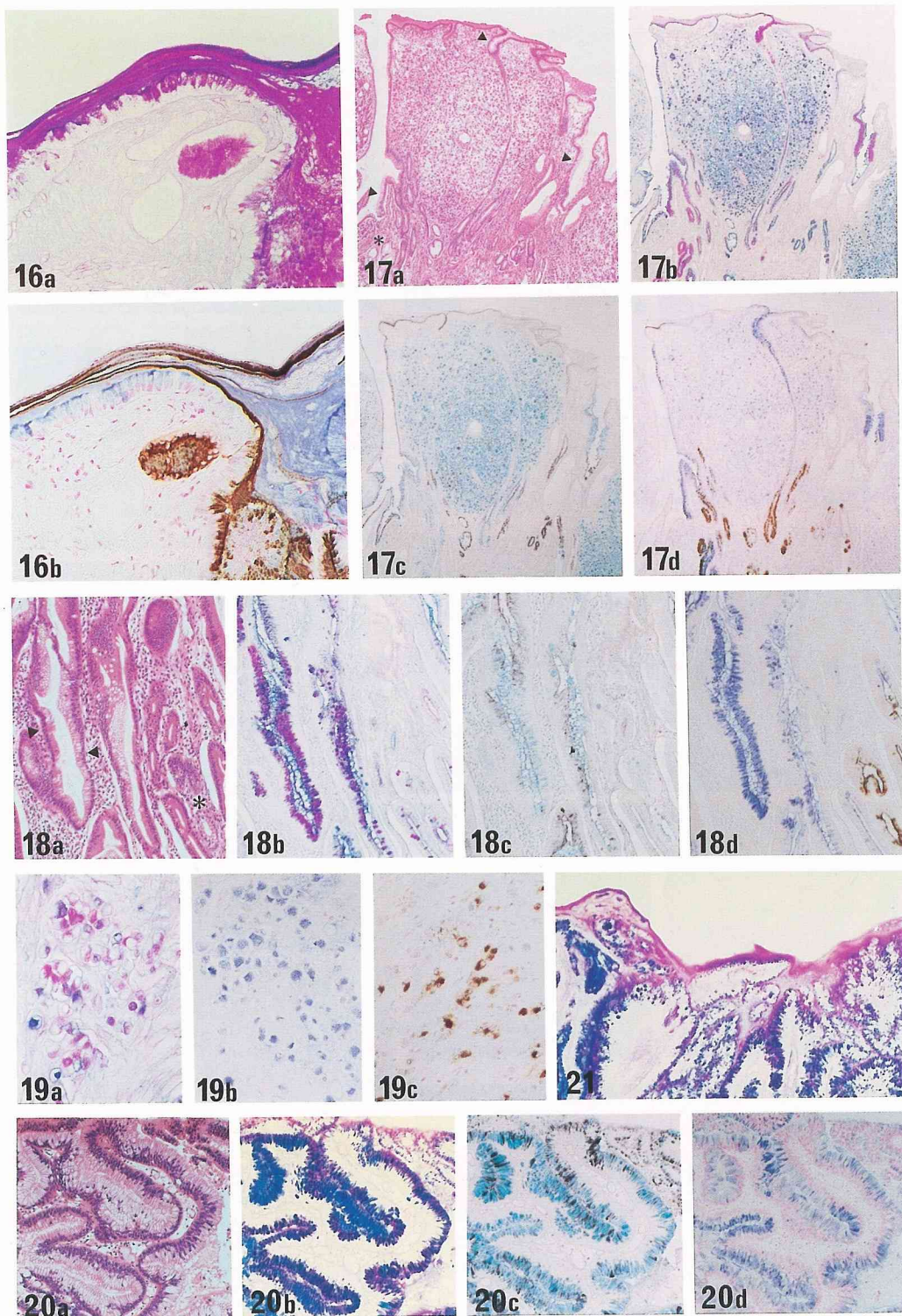
Fig. 12 有石胆嚢, Carnoy 固定。急性胆嚢炎の症例では、厚い SMGL が認められる。a : AB-PAS 染色。(×29) b : AB-PAS 染色。(×29)

Fig. 13 有石胆嚢, Carnoy 固定, HE 染色。胆石と粘膜上皮の間に SMGL が存在している。(×29)

Fig. 14 有石胆嚢, Carnoy 固定, AB-PAS 染色。SMGL 内に微小結石が認められ(矢印), SMGL が層状構造を呈している。(×146)

Fig. 15 有石胆嚢, Carnoy 固定。萎縮した粘膜に糜爛を認め、糜爛を覆う SMGL 内に好中球や組織球が遊走している。a : HE 染色。(×29) b : HE 染色。(×146)





18.8±8.5μmであった。粘液染色では、スルフォムチンを主体にした酸性ムチンからなっており、シアロムチンは組織学的に正常な胆嚢では粘膜嚢の間に少量存在したが、他の症例では粘膜化生部を覆う SMGL 内に僅かに認めたにすぎなかった。また、全例に GOCTS に淡く反応するムチンが存在し、PCS 陽性を示すムチンは7例において幽門腺化生のある部位と、胆嚢頸部に僅かに認めた。頸部にある PCS 陽性の粘液は、頸部腺に由来していると考えられた。すなわち、SMGL を形成しているムチンは、SMGL が覆っている部位の胆嚢粘膜で産生しているムチンと同じ性格であった。また、無石胆嚢では SMGL 内に粘液染色態度の異なるムチンが存在しても、それらのムチンが層状構造をとることはなかった。

2 有石胆嚢の粘膜と SMGL について

有石胆嚢では粘膜が萎縮していることが多く、HE 染色により41例中杯細胞化生は29例 (70%)、幽門腺化生は40例 (97%)、胃表層粘液細胞化生は26例 (63%) に認められた。胃表層粘液細胞化生の近くには幽門腺化生がしばしば存在していた (Fig. 7)。杯細胞化生を示す細胞はシアロムチンを主とする酸性ムチンを含み、GOCTS 反応では淡く反応するものからやや強く反応するものまで認められた (Fig. 8, 9)。PCS に反応するムチンは存在しなかった。また、杯細胞化

生から分泌されたムチンが SMGL を構成しているのが観察された (Fig. 9)。幽門腺化生を示す細胞は酸性ないし中性ムチンを含み、酸性ムチンはシアロムチンを主としていた。PCS では全例が陽性を示し、無石胆嚢と同様に胆嚢粘膜上皮間には孤立性にまたは小集団を形成して PCS 陽性のムチンを含む細胞が存在した (Fig. 7)。幽門腺化生のない1例では Rokitsky-Aschoff sinus に PCS 陽性の粘液細胞が存在した。胃表層粘液細胞化生は、AB-PAS 染色と HID-AB 染色では化生細胞のほとんどが色々な酸性度を示すムチンを含み、中性ムチンのみを含んでいたのは2例の化生細胞の一部に過ぎなかった。GOCTS 反応に対しては多くが弱く反応し (Fig. 10)、本来の胃表層粘液細胞と同様な強い反応は、26例中8例 (30%) にみられた (Fig. 7, 11)。中性ムチンのみを含んでいた化生細胞は GOCTS 反応に対しても強い反応を示した (Fig. 11)。PCS に反応するムチンは含まれていなかった。また、はっきりと胆嚢頸部腺が確認できた症例は15例で、そのうち14例が PCS 陽性の粘液を含み、その染色態度は無石胆嚢の頸部腺と同じであった。

有石胆嚢の SMGL の厚さを、厚さの測定が困難であった急性胆嚢炎を併発した1例を除いた40例で測定した。その成績は Table 1 のごとく 29.3±25.0μm で、無石胆嚢よりも有意 ($p<0.05$) に高値を示した。有

Fig.16 有石胆嚢, Carnoy 固定。SMGL がきれいな層状構造を呈している。a : AB-PAS 染色。(×146) b : GOCTS-PCS 染色。(×146)

Fig.17 印環細胞癌例, Carnoy 固定。a : HE 染色, 幽門腺化生 (*) と胃表層粘液細胞化生 (三角) が認められる。(×29) b : AB-PAS 染色, 幽門腺化生と胃表層粘液細胞化生は様々な酸性度を示すムチンを含んでいる。癌細胞は主として酸性ムチンを含んでいる。(×29) c : HID-AB 染色, 化生細胞と癌細胞は主としてシアロムチンを含んでいる。(×29) d : GOCTS-PCS 染色, 幽門腺化生は PCS 陽性のムチンを含み, 胃表層粘液細胞化生の一部は GOCTS に強く反応している。癌細胞は GOCTS に弱く反応している。(×29)

Fig.18 乳頭状腺管癌例, Carnoy 固定。a : HE 染色, 幽門腺化生 (*) と胃表層粘液細胞化生 (三角) が認められる。(×73) b : AB-PAS 染色, 幽門腺化生と胃表層粘液細胞化生には酸性ムチンと中性ムチンが認められる。(×73) c : HID-AB 染色, 化生細胞には主としてシアロムチンが含まれている。(×73) d : GOCTS-PCS 染色, 胃表層粘液細胞化生は GOCTS に強く反応し, 幽門腺化生は PCS 陽性のムチンを含んでいる。(×73)

Fig.19 印環細胞癌例, Carnoy 固定。a : AB-PAS 染色, 癌細胞の一部は中性ムチンのみを含んでいる。(×292) b : GOCTS-PCS 染色, 癌細胞の一部が GOCTS にやや強く反応している。(×292) c : GOCTS-PCS 染色, 癌細胞は PCS 陽性のムチンを含んでいる。(×292)

Fig.20 乳頭状腺管癌例, Carnoy 固定。a : HE 染色, 癌細胞は円柱状で核上部の胞体が明るく抜けている。(×73) b : AB-PAS 染色, 癌細胞は主として酸性ムチンを含んでいる。(×73) c : HID-AB 染色, 癌細胞は主としてシアロムチンを含んでいる。(×73) d : GOCTS-PCS 染色, 癌細胞の一部が GOCTS に強く反応し, PCS には反応していない。(×73)

Fig.21 乳頭状腺管癌例, Carnoy 固定, AB-PAS 染色。癌細胞由来のムチンが SMGL を形成している。(×73)

Table 1 胆嚢の SMGL の厚さ (Carnoy 液固定標本)

検 索 胆 嚢	例数	SMGL の厚さ (μm)
無石胆嚢	15	18.8 \pm 8.5
有石胆嚢	40	29.3 \pm 25.0
胆嚢結石・有症状	25	39.2 \pm 26.8
急性胆嚢炎合併	6	45.4 \pm 25.4
急性胆嚢炎非合併	19	36.7 \pm 25.4
胆嚢結石・無症状	9	13.1 \pm 8.5
胆嚢結石+総胆管結石	6	14.3 \pm 7.9

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

石胆嚢40例から総胆管結石合併例6例を除外した胆嚢結石単独例34例について検討をすると、胆石による症状を認めた有症状例25例のSMGLの厚さは $39.2 \pm 26.8 \mu\text{m}$ と無石胆嚢より有意 ($p < 0.01$) に厚く、かつ無症状の9例の $13.1 \pm 8.5 \mu\text{m}$ に比較しても有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。一方、無石胆嚢のSMGLは有石胆嚢の無症状例より厚い傾向がみられた。また、急性胆嚢炎を合併した症例では特に厚いSMGLが観察されたが (Fig. 12)、有症状25例を急性胆嚢炎合併例と非合併例に分けて検討すると Table 1のごとく、前者がやや高値であったが、有意差は認められなかった。

化生の強い部位ではSMGLが薄くてもより密な微細顆粒状の構造物として観察された (Fig. 7-10)。結石と一緒に固定できた標本では、結石と粘膜の間にSMGLが存在し、結石が直接胆嚢粘膜に接していないことが示された (Fig. 13)。また、SMGL内に微小結石が浮遊している所見も観察された (Fig. 14)。糜爛を伴う症例では、その粘膜面を覆う浸出物内に好中球や組織球を中心とした細胞浸潤を認め、それらの細胞がSMGLの中まで遊走しているのが観察された (Fig. 15)。

粘液組織化学的にSMGLは、それが覆っている胆嚢粘膜内に含まれるムチンからなっていた。すなわち、SMGLは主としてスルフォムチンからなる酸性ムチンで形成されているが、化生の強いところでは中性ムチンやシアロムチンも含まれていた。GOCTS-PCSでは、ほとんどの症例でGOCTSに弱くまたは比較的強く反応する粘液や、PCS陽性の粘液が観察された。さらに、約半数の症例では粘膜の3分の2以上をPCS陽性のムチンを含むSMGLが覆っていた。また、

化生の強い症例では、発達したSMGLが形成され、ときには粘液染色の態度の異なるムチンが層状構造を呈していた。すなわち、AB-PAS染色やHID-AB染色により、これらの染色に対する反応の違いから層状構造がはっきりとし (Fig. 7, 9, 14)、またGOCTS-PCSでは、GOCTSに弱くまたは強く反応するムチンとPCS陽性のムチンが層状構造を成していた (Fig. 16)。

3 胆嚢癌症例について

胆嚢癌症例は2例で、両者ともに進行癌であり結石を含んでいた。1例はscirrhous typeの印環細胞癌で (Fig. 17)、もう1例は乳頭状腺管癌であった (Fig. 18)。両者ともに非癌部胆嚢粘膜には、PCS陽性のムチンを含む幽門腺化生と、GOCTS反応に強く反応しかつ様々な酸性度のムチンを含む胃表層粘液細胞化生が存在していた。

印環細胞癌症例では、癌組織中に中性ムチンを含む癌細胞や、GOCTS反応に比較的強く反応したりPCS陽性のムチンを含む癌細胞が存在した (Fig. 19)。乳頭状腺管癌症例では、癌組織表層に円柱状で胞体が明るく胃表層粘液細胞に類似した癌細胞を認め、GOCTS反応に対して強くないしは弱く反応するムチンが含まれていたが (Fig. 20)、これらの癌細胞はすべて酸性ムチンを含んでいた。

胆嚢粘膜上皮で覆われている部位でのSMGLの性状は、有石胆嚢のそれと同様であった。癌組織が露出しているところでのSMGLは、乳頭状腺管癌では、癌細胞の分泌したムチンがSMGLを構成していたが (Fig. 21)、印環細胞癌では隣接の胆嚢粘膜上皮に由来すると考えられるムチンが薄く癌組織表面を覆っていた。

IV 考 察

新鮮な胆嚢の切除標本の粘膜面を観察すると透明な粘液が付着しているのに気づく。しかし、通常の固定方法ではそのほとんどが失われてしまうために、形態学的あるいは組織化学的検討は困難であった。文献的には Womack ら¹⁴⁾は1961年に、人の胆嚢粘膜の組織化学的研究で粘膜上に粘液層の存在する可能性にふれている。以前より、胆石形成の動物実験において、新鮮胆嚢標本の表面を無固定の状態で肉眼的または偏光顕微鏡で観察することにより、胆嚢粘膜上に出現する粘液層内で胆石が形成される可能性が指摘されてきた¹⁵⁻¹⁷⁾。しかし、胆嚢粘膜上の粘液層は、通常の固定方法ではほとんど失われてしまうために、これらの報告では粘液層の粘液組織化学的検討やその厚さ、由来、連続性などについてはふれていない。最近、Ota と Katsuyama⁹⁾は、表層粘液ゲル層 (SMGL) の固定方法を発展させた。すなわち、彼らはいままでその存在自身が肉眼的な観察や生化学的な分析から既定の事実とされていながら、組織学的には実証できなかった SMGL を、顕微鏡標本上において確かに存在することを証明し、その構造を粘液組織化学的に検討した。

今回著者は、彼らの方法を胆嚢に用いることにより、胆嚢粘膜上に連続した SMGL が存在していることを確認することができた。Carnoy 液で固定した標本の HE 染色では、無石および有石胆嚢ともに SMGL は基本的に好酸性の細粒状の構造物であった。一方、広範に化生を伴う有石胆嚢では、より緻密な細粒状を呈していた。凍結切片による観察では SMGL は一様な構造物であったので、Carnoy 液によって固定した標本では脱水による変化が加わっていると考えられた。

今回の研究では粘液染色を用いてムチンの組織化学的な性格を検討したが、まずその代表的な2つの方法の信頼性について検討しておきたい。GOCTS 反応は、galactose oxidase-Schiff 反応から発達した方法で、糖鎖末端の β Gal と β GalNAC に高い特異性を有している。Katsuyama ら¹⁸⁾によるとヒトをはじめとする脊椎動物の組織では、胃の表層粘液細胞のムチンが他の粘液細胞と比べて際だって強い反応性を示す。したがって、今まで表層粘液細胞型のムチンの同定にしばしば使用されてきた^{9,19)}。一般に杯細胞はまったく反応しないか、あるいは淡い反応を示すのみであるが、今回の研究では化生によって出現した杯細胞にやや強い反応がみられた。同様に胃粘膜でも化生粘膜の杯細胞

は稀ならず、やや強い反応を示し、小腸や大腸の杯細胞とは異なった糖鎖を有する可能性があるという (太田、私信)。胆嚢の化生粘膜にみられる杯細胞もその意味で胃の化生細胞とよく似た性格を示すといえる。なお、胆嚢にみられる表層粘液細胞型の化生細胞は膵管上皮のそれ²⁰⁾と異なり、必ずしも強い GOCTS 反応を示さなかったが、これは化生上皮の分泌するムチンが胆嚢の場合高い酸性度を有するためと考えられる。すなわち、糖鎖の末端にシアル酸を有するように変化したり、あるいはガラクトース残基に硫酸基を有するようになると、ガラクトースオキシダーゼによる酸化を受け難くなると推測される。一方、PCS は胃の腺粘液細胞、Brunner 腺細胞、胆管系の附属腺細胞の分泌するムチンのみを特異的に染色するので、腺粘液細胞を同定する唯一の方法として用いられてきた¹⁹⁾。今回の検討でもその特異性の高さから、シアル化あるいは硫酸化された腺粘液細胞型粘液もまったく問題なく染色され、あらためてその有用性が実証された。胆嚢の粘液の研究には不可欠な方法といえる。

このような粘液染色を用いて、胆嚢粘膜表面を覆う SMGL のムチンの主体は、胆嚢粘膜に由来していることが明らかにされた。すなわち、胆嚢粘膜表面の SMGL に含まれるムチンは、その被覆している粘膜で産生されているムチンの性状と一致しているからである。正常粘膜の SMGL のムチンは主としてスルフォムチンからなり、これは正常粘膜上皮によるスルフォムチンの産生に対応する。また、化生に富む粘膜では、スルフォムチンに加えて中性ムチン、シアロムチン、PCS 陽性のムチンが証明され、これらは化生上皮から産生されるムチンに一致する。

有石胆嚢に多い化生の意義は明らかではなかったが、今回の研究で胆嚢の化生の意義をその一部とはいえ明確にすることができたと考えられ、さらに化生の出現とともに SMGL を構成するムチンやその構造が変化することが明らかにされた。すなわち、有石胆嚢では杯細胞化生、幽門腺化生、胃表層粘液細胞化生からなる粘膜化生が高頻度出現するが、この3種類の化生がいずれも粘液細胞であることに注目したい。その化生部を覆う SMGL はより発達したものとなり、特に無石胆嚢の約半数の症例で SMGL 内に僅かに認めたにすぎない PCS 陽性のムチンが、逆に有石胆嚢では幽門腺化生が発達するために、約半数の症例で SMGL 内に広範囲に存在していた。さらに、有石胆嚢で粘膜化生の強い症例の SMGL では、粘液染色態

度の異なる粘液が層状構造を示し、特に GOCTS 反応と PCS による連続染色では、Ota と Katsuyama⁹⁾が報告しているような胃の SMGL と同様の層構造を示している部位もあった。このような胆嚢の SMGL を構成するムチンとその構造について述べた報告は、著者の知る限り今までにまったくみられない。また、胆石と粘膜の間には SMGL が介在していたことより、SMGL が胆石による上皮細胞の損傷をうけにくくしていると考えられ、胆石による直接刺激から粘膜を保護するためには、胆嚢粘膜上皮が粘液細胞に化生して、より発達した SMGL で覆われていたほうが有利であることは容易に予想できる。そして、この SMGL が層状構造をとること、また PCS 陽性のムチンの存在がバリアーとしての SMGL をより丈夫なものとしていると推測される。

今回の研究では SMGL の厚さを測定したが、SMGL の測定値を標本作製条件で比較すると、Carnoy 液固定標本では、凍結切片より SMGL の厚さが約 1/2～1/3 に薄くなっているが、これは脱水によるものと考えられた。Ota と Katsuyama⁹⁾は、胃において Carnoy 液固定直後と染色後の SMGL の厚さを比較し、染色終了後までに約 5% 薄くなると述べているが、凍結切片と比較した数値は記載していない。

胆嚢粘膜上皮を覆う SMGL の厚さは、胆石による刺激や炎症が加わると厚くなることが確認できた。すなわち、Carnoy 液固定標本では、総胆管結石を伴わない胆嚢結石例のうち、有症状例は無症状例に比較して有意に SMGL は厚く、さらに急性胆嚢炎合併例は非合併例に比較してやや厚い傾向が認められた。有石胆嚢では、粘膜上皮の萎縮を伴うことが多く、相対的に粘膜上皮から分泌されるムチンが減少し、SMGL が薄くなると考えられるが、胆石による刺激や炎症により胆嚢粘膜上皮からのムチン分泌が亢進して、より厚い SMGL が形成され粘膜上皮を覆っていると考えられる。Lee と Nicholls²¹⁾は、症状のあった sludge や胆石を含む胆嚢において、胆嚢内胆汁のムチンが正常胆嚢よりも増加していると述べている。彼らが分析した「ムチン」が可溶性成分のみを対象としているのか、それとも SMGL を含んでいたのか明らかでないが、彼らの得た所見は、sludge や胆石による刺激で胆嚢粘膜からのムチン産生が亢進していることを示しており、今回の SMGL の厚さの変化は、Lee と Nicholls の報告を裏付けている。

今回の研究では、胆嚢上皮の化生、特に胃幽門腺化

生と胃表層粘液細胞化生について検討を加え、有石胆嚢において粘液組織化学的に胃幽門粘膜への化生が生じていることを確認できた。以前より胃幽門粘膜への化生の存在が報告されているが³⁰⁾、Laitio²⁾は、有石胆嚢において杯細胞化生、幽門腺化生および胃表層粘液細胞化生がそれぞれ 90%、57%、37% に認められたと報告し、Haekkinen と Laitio⁷⁾は、胃表層粘液細胞と同じ粘液が含まれていることを、免疫組織学的に証明したとしている。幽門腺化生には、PCS 陽性の粘液を含み、Pepsinogen を含むものもある²²⁾。一方著者の研究では有石胆嚢での HE 染色による化生の頻度は、幽門腺化生 97%、杯細胞化生 70%、胃表層粘液細胞化生 63% の順であった。著者の経験でもこれらが粘液細胞への化生であることは明らかであっても、いずれのタイプかは組織化学的な所見を参照してはじめてわかる場合も多いため、胃表層粘液細胞型ムチンと幽門腺型ムチンをそれぞれ特異的に染色する GOCTS 反応と PCS を行った。その結果、HE 染色で幽門腺化生を示した粘液細胞は、全例 PCS 陽性の粘液を含んでいたが必ずしも中性ムチンのみを含まず、一方 HE 染色で胃表層粘液細胞化生とした粘液細胞のごく一部しか粘液組織化学的に胃表層粘液細胞と同様の態度を示さないことが判明した。また、幽門腺化生の存在している胆嚢粘膜上皮内に化生の芽ともいえる PCS 陽性の粘液を含む細胞が存在したことは興味のある所見であった。

今回の研究で、胃表層粘液細胞型のムチンに対して強く反応する GOCTS 反応により、胃表層粘液細胞化生の中に強い反応を示すムチンを含む化生細胞が存在することを証明でき、また杯細胞化生がやや強く反応することもわかった。今まで、人の消化管では強い GOCTS 反応を示す細胞は胃の表層粘液細胞に限られ、杯細胞は小腸型、大腸型に限らず、反応は弱いあるいは陰性とされてきた。したがって、胆嚢にみられる杯細胞型の化生細胞は、小腸や大腸の通常の杯細胞とは異なる糖鎖を有する可能性がある。Iida ら²³⁾は、胃で腸上皮化が進行する際に生ずる表層粘液細胞と杯細胞あるいは吸収上皮の中間的な細胞について記載している。同様な上皮は、しばしば GOCTS にやや強く反応するという（太田、私信）。胆嚢における化生性の杯細胞が胃の化生細胞と同様な GOCTS 反応性を示すという今回の結果はその意味で興味深い。

今回経験した胆嚢癌は 2 例であるが、胆嚢粘膜の胃幽門粘膜への化生と癌の発生を考えるうえで興味ある

所見を得た。2例ともHE染色で非癌部粘膜には幽門腺化生と胃表層粘液細胞化生が存在し、それぞれPCS陽性とGOCTS反応に強く反応するムチンを含んでいた。印環細胞癌例では、癌細胞内にPCS陽性のムチンやGOCTS反応にやや強い反応を示すムチンがみられ、乳頭状腺癌では、癌部表層には形態的に胃表層粘液細胞に類似し、酸性ムチンを含むがGOCTS反応陽性のムチンが存在した。胆嚢癌の発生と腸上皮化生および幽門腺化生との関連についてはすでに報告されており⁵⁾⁶⁾²⁴⁾²⁵⁾、印環細胞癌例の所見は胃の印環細胞癌の中にgalactose oxidase-Schiff反応に強く反応するsurface mucous cell-typeとPCSに対して陽性を示すmucous neck cell-pyloric gland cell-typeがあるというAkamatsuとKatsuyama¹⁹⁾の研究結果と一致している部分があった。また、胆嚢粘膜面に癌組織が露出している部位を覆うSMGLは、癌細胞の粘液分泌が盛んな場合には、癌細胞に由来する粘液がSMGLを構成することが確認された。

V 結 語

胆嚢粘膜を覆う表層粘液ゲル層(SMGL)と胆嚢粘膜の胃幽門粘膜化生について粘液組織化学的に検討し、以下の結果を得た。

- 1 胆嚢粘膜上に胆嚢粘膜上皮より分泌されたムチンより形成された連続したSMGLが存在していることが証明され、有石胆嚢では粘膜上皮の化生によりSMGLを構成する粘液やその構造が変化していくことがわかった。
- 2 SMGLの厚さは、有石胆嚢で無症状例より有症

状例で有意に厚くなっていることがわかった。

- 3 有石胆嚢には高頻度に粘膜上皮の化生が生じ、それにより発達したSMGLが形成され粘膜上皮が覆われることは、胆石による刺激から粘膜を保護するには有利と推測された。
- 4 HE染色で分類した幽門腺化生、胃表層粘液細胞化生の中にそれぞれ中性ムチンのみを含み、かつPCS陽性ないし強いGOCTS反応を示すムチンを含む化生細胞が存在したことより、胆嚢粘膜上皮において胃幽門粘膜への化生が起こり得ることを粘液組織化学的に証明できた。
- 5 胃幽門腺化生はすべてPCS陽性を示したが、GOCTS反応に対しては胃表層粘液細胞化生の一部が強い反応を示し、さらに杯細胞化生にはやや強い反応が見られた。
- 6 粘液組織化学的に胆嚢癌の発生と胆嚢粘膜上皮の胃幽門粘膜化生との関連が推測された。

本論文の一部は、第32回日本消化器病学会大会(1990年10月、奈良)で発表した。

稿を終えるに当たりご指導、ご校閲を賜りました信州大学臨床検査医学教室勝山 努教授、前信州大学第2外科学教室教授飯田 太先生、信州大学第2外科学教室天野 純教授、飯山赤十字病院院長中藤晴義先生、ならびに直接のご教示、ご助言をいただいた信州大学臨床検査医学教室太田浩良先生、飯山赤十字病院外科石坂克彦先生に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Jarvi O, Lauren P: Intestinal metaplasia in the mucosa of the gallbladder and common bile duct. *Ann Med Exp Biol Fenn* 45: 213-223, 1967
- 2) Laitio M: Goblet cells, enterochromaffin cells, superficial gastric-type epithelium and antral-type glands in the gallbladder. *Beitr Pathol* 156: 343-358, 1975
- 3) Laitio M: Intestinal, gastric body-and antral-type mucosal metaplasia in the gallbladder. *Beitr Pathol* 159: 271-279, 1976
- 4) 堤 寛, 名倉 宏, 長村義之, 渡辺慶一, 矢内原昇: 胆嚢粘膜における化生性病変の免疫組織化学的観察. *消化器と免疫* 9: 78-84, 1982
- 5) 稲田章夫, 小西二三男, 山道 昇, 伊藤 博: 胆嚢癌の組織発生一特に胆嚢粘膜の化生性変化, および上皮性粘液, CEA等の分布の特徴について. *日外会誌* 90: 894-906, 1989
- 6) Tatematsu M, Ichinose M, Miki K, Tatematsu K, Kishikawa H, Ito N: Gastric phenotypic expression in human gallbladder cancers revealed by pepsinogen immunohistochemistry and mucin histochemistry. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 413: 25-32, 1988

- 7) Haekkinen I, Laitio M: Epithelial glycoproteins of human gallbladder. *Arch Pathol* 90: 137-142, 1970
- 8) Ota H, Katsuyama T: Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *Histochem J* 24: 86-92, 1992
- 9) Szentkuti L, Eggers A: Stabilization of preepithelial mucous gel in cryostat sections from rat colon with celloidin. *Stain Technol* 65: 179-181, 1990
- 10) Spicer SS, Horn RG, Leppi TJ: Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In: Wagner BM, Smith DE (eds), *The connective tissue*, pp 251-303, Williams and Wilkins, Baltimore, 1967
- 11) Spicer SS: Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem* 13: 211-234, 1965
- 12) Ota H, Katsuyama T, Ishii K, Nakayama J, Shiozawa T, Tsukahara Y: A dual staining method for indentifying mucins of different gastric epithelial mucous cells. *Histochem J* 23: 22-28, 1991
- 13) Katsuyama T, Spicer SS: Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the concanavalin A-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 26: 233-250, 1978
- 14) Womack NA, Zeppa R, Irvin GL: The anatomy of gallstones. *Ann Surg* 157: 670-686, 1963
- 15) Malet PF, Deng S-Q, Soloway RD: Gallbladder mucin and cholesterol and pigment gallstone formation in hamsters. *Scand J Gastroenterol* 24: 1055-1060, 1989
- 16) Lee SP, LaMont JT, Carey MC: Role of gallbladder mucous hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones: studies in the prairie dog. *J Clin Invest* 67: 1712-1723, 1981
- 17) LaMont JT, Smith BF, Moore JR: Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Hepatology* 4: 51s-56s, 1984
- 18) Katsuyama T, Ono K, Nakayama J, Kanai M: Recent advances in mucosubstance histochemistry. In: Kawai K (ed), *Gastric mucus and mucus secreting cells*, pp 3-18 Excerpta Medica, Amsterdam, 1985
- 19) Akamatsu T, Katsuyama T: Histochemical demonstration mucins in the intramucosal laminated structure of human gastric signet ring cell carcinoma and its relation to submucosal invasion. *Histochem J* 22: 416-417, 1990
- 20) Matsuzawa K, Akamatsu T, Katsuyama T: Mucin histochemistry of pancreatic duct cell carcinoma, with special reference to organoid differentiation simulating gastric pyloric mucosa. *Hum Pathol* 23: 925-933, 1992
- 21) Lee SP, Nicholls JF: Nature and composition of biliary sludge. *Gastroenterology* 90: 677-686, 1986
- 22) Tatematsu M, Furihata C, Miki K, Ichinose M, Shirai T, Tatematsu K, Ito N: Complete and incomplete pyloric gland metaplasia of human gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 37: 39-46, 1987
- 23) Iida F, Murata F, Nagata T: Histochemical studies of mucosubstances in metaplastic epithelium of the stomach, with special reference to the development of intestinal metaplasia. *Histochemistry* 56: 229-237, 1978
- 24) Yamamoto M, Nakajo S, Tahara E: Endocrine cells and lysozyme immunoreactivity in the gallbladder. *Arch Pathol Lab Med* 110: 920-927, 1986
- 25) Yamagiwa H, Tomiyama H: Intestinal metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 36: 989-997, 1986

(9. 6. 27 受稿)