

閉塞性黄疸におけるエンドトキシンの門脈 血中への移行に関する実験的研究

宮 川 眞 一
信州大学医学部第1外科学教室
(指導: 幕内 雅敏教授)

Appearance of Endotoxin in the Rat Portal Vein during Obstructive Jaundice

Shinichi MIYAGAWA
Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Masatoshi MAKUUCHI)

In order to study endotoxin transference during obstructive jaundice, portal endotoxin level, serum albumin concentration, vascular permeability of the intestine, intestinal bacterial flora and mucosal secretory immunoglobulin A (s-IgA) were examined in male Wistar rats, which were divided into 6 groups: obstructive jaundice, external biliary drainage, hypoprotein and respective control groups. The following results were obtained:

1. Portal endotoxin level of the jaundice group elevated significantly, although hypoalbuminemia alone increased portal endotoxin level.
2. A negative correlation was observed between serum albumin concentration and endotoxin level.
3. Vascular permeability increased significantly in both the small and large intestines of the obstructive jaundice, while it increased only in the small intestine of rats with external biliary drainage.
4. Intestinal bacterial flora did not change in the external biliary drainage group, while *B. fragilis* appeared frequently in the small intestine of the jaundice group.
5. Colonic mucosal s-IgA of the jaundice group stained more densely than that of the control, but no difference was observed in the staining of the small intestine between the two groups.

These results suggest that immutability of s-IgA in the small intestine causes translocation of the small intestinal bacterial flora and the increased vascular permeability facilitates the immigration of endotoxin from the small intestine as well as the colon during obstructive jaundice. Hypoalbuminemia is considered to be a factor which promotes the immigration of endotoxin.
Shinshu Med. J., 38: 457-470, 1990

(Received for publication February 2, 1990)

Key words: obstructive jaundice, endotoxin, albumin, vascular permeability, s-IgA
閉塞性黄疸, エンドトキシン, アルブミン, 血管透過性, s-IgA

I はじめに

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁を構成するリポ多糖類 (LPS) であり, LPS の分子量は数100

万¹⁾²⁾と非常に大きい, そのサブユニットのリピッド A の分子量は数万である^{3)~5)}。また, 腸管の毛細血管は有窓性で糖類など, 血清アルブミン (分子量: 69,000) より小さい分子は比較的容易に通過すること

ができる⁶⁾⁻¹¹⁾。一方、これよりも大きな分子量を持つ物質はほとんど毛細血管を通過することができないと言われている。このため正常な腸管では、分子量の大きいエンドトキシンが門脈血中に移行することはほとんど認められない¹²⁾。しかしながら、閉塞性黄疸時には門脈血中にエンドトキシンが出現することが報告されている¹³⁾。このようにエンドトキシンが門脈血中に出現するには、エンドトキシンが腸管内腔から腸管粘膜、さらに血管壁を通過することが必要である。リピッド A の分子量は小さいために、腸管粘膜の防御機構の破綻に加え、胆汁酸などによってエンドトキシンの結合が壊れた場合や¹⁴⁾⁻¹⁶⁾、さらにアルブミンなど、分子量の大きい物質に対する血管透過性が亢進した場合などにはエンドトキシンが血管内に流入する^{17) 18)}可能性がある。そのため本研究では、ウイスター系雄性ラットを用いて閉塞性黄疸を作製することによって、腸管粘膜の変化、腸管の血管透過性の変化さらに門脈血中エンドトキシン濃度の変化について検討した。また、閉塞性黄疸を来した場合には栄養状態も悪化するために、栄養状態の低下が腸管粘膜からのエンドトキシンの門脈内流入の一因になることが推測される¹⁹⁾⁻²¹⁾。このような可能性を検討するために、本研究では、低蛋白食で飼育したラットを用いて低蛋白血症と門脈血中エンドトキシン濃度の上昇の有無についても検討を加えた。さらに閉塞性黄疸時に門脈血中にエンドトキシンが増加する因子として、エンドトキシンの発生源である腸内細菌叢の変化がおこっている可能性が否定できないために、腸内細菌叢の変化についても検討した。またその腸内細菌叢に影響を与える可能性のある因子の1つとして、閉塞性黄疸時には腸管内に胆汁が欠如する点を考慮して、腸管内胆汁の有無、ならびに腸管粘膜の防御機構を担っている腸管粘膜の分泌型 IgA の変化についても検討を加え、閉塞性黄疸時に併発する門脈エンドトキシン血症の病因に関する総括的機序を解明することを本研究の目的とした。

II 対象および方法

A 実験動物

1 閉塞性黄疸群：24時間絶食にした8週齢のウイスター系雄性ラット (n=25) を用い、ペントバルビタール (25mg/kg) を筋肉内に注射し麻酔状態を得た。開腹ののち、総胆管を2重結紮した。また開腹のみの群 (単開腹群：n=25) を対照群として作製した。両群とも閉腹し、麻酔から覚醒ののち4週間後に、2

4時間絶食にし、ペントバルビタール麻酔下で実験を行った。

2 低蛋白食群：低蛋白ラットの作製のために4週齢のウイスター系雄性ラット (n=25) に5%の蛋白質を含んだ飼料 (日本クレア、東京) を10日間摂取させた。対象群には、標準飼料 (24%の蛋白を含む飼料) を10日間摂取させた (標準蛋白食群：n=25)。両群とも24時間絶食後ペントバルビタール麻酔下で開腹し実験を行った。

3 外胆汁瘻群：24時間絶食にした8週齢のウイスター系雄性ラット (n=25) を用い、ペントバルビタール麻酔下で開腹し、総胆管を露出切開した。硬膜外チューブ (17G) を総胆管の切開部から挿入し、胆汁の流出が良好であることを確認したのち、総胆管とチューブを絹糸で固定し、さらに総胆管を完全に閉塞するために総胆管の十二指腸側を結紮した。この外瘻用のチューブを、皮下トンネルを通して、体外へ誘導した。体外に誘導した外瘻用のチューブを皮膚に固定し、胆汁をラットの左側背腹部より体外へ自然流出させた。また、対象として8週齢のウイスター系雄性ラットを用いて、外瘻群と同様の操作で開腹した。この群では総胆管切開を加えずに、約5cmの長さの硬膜外チューブを腹腔内に留置するにとどめ、このチューブを皮下に誘導しただけのチューブ留置群 (n=25) を作製した。両群とも手術後5日目に24時間絶食ののちペントバルビタール麻酔下で実験を行った。それぞれのラット群 (n=25) において、11匹のラットで総蛋白濃度、アルブミン濃度、総ビリルビン濃度、門脈血中エンドトキシン濃度の測定を行い、14匹のラットで腸管の血管透過性の測定を行った。

B 生化学的検査

上記のすべてのラット群において、腎静脈の高さの下大静脈から21Gの注射針を穿刺することによって採血した。採血した血液を遠心機 (3,000 rpm) で血清に分離したのち、自動分析機 (日本電子工業株式会社：JEOL, JAC-VX1000) を用いて、総蛋白濃度、アルブミン濃度およびビリルビン濃度を測定した。総蛋白濃度の測定はビウレット法²²⁾で、アルブミン濃度の測定はBCG法²³⁾で、総ビリルビン濃度の測定は安定化ジアゾ法²⁴⁾によってそれぞれ測定した。

C エンドトキシン濃度の測定

門脈血の採血には24Gの注射針を直接門脈に穿刺することによって採血した。採血した血液を遠心機で血清に分離したのち、門脈血中のエンドトキシン濃度

をトキシカラー法²⁵⁾によって定量した。

D 腸管の血管透過性の測定

Katayama ら²⁶⁾の方法に準じて、エバンスブルー(和光純薬, 大阪) (50mg/kg)²⁷⁾⁻²⁹⁾を下大静脈から注入した。注入後約30分経過した時点で、ラットを脱血によって屠殺した。小腸ならびに大腸のほぼ中央部でそれぞれの腸管を切除したのち、腸間膜から腸管に流入、流出する血管をできるかぎり取り除くとともに、腸内容物も除去した。この腸管を0.5g切除し、直ちにこの切除腸管を1mlのKCL(1N)溶液で満たし、37°Cの条件下で24時間加温した。次いでアセトン6.5ml, 0.6N 磷酸溶液2.5mlを加え3,000rpmのスピードで15分間遠心分離することによって腸管組織内に含まれているエバンスブルーを抽出した。腸管組織内から抽出したエバンスブルーの濃度の検出は日立200-20型ダブルビーム分光光度計で吸光度を測定し、あらかじめ求めておいた標準曲線からエバンスブルー濃度を算出した。

E 腸内細菌叢の同定

小腸内の腸内細菌叢の同定には、回腸末端より口側約20cmの位置で腸管を切離し、また大腸内の腸内細菌叢の同定には、横行結腸で腸管を切離し腸内溶液を滅菌綿棒で採取した。この腸内溶液の付着した綿棒を、3mlのGAM broth(日水製薬, 東京)に入れ、十分に混和して綿棒に付着している細菌を遊離させた。好気性菌用培地としては、CLED培地(関東化学工業, 東京)をブドウ球菌や腸球菌の培養に、マニット食塩培地(日水)をブドウ球菌の培養に、さらにEF培地(日水)を腸球菌の培養に用い、35°Cで48時間培養したのちに、細菌種を同定した。また嫌気性菌用培地としては、LBS培地(日本ベクトン・ディッキンソン, 東京)を乳酸菌の培養に、BBE培地(極東製薬, 東京)をバクテロイデスの培養に、BL培地(栄研化学工業, 東京)を大腸菌の培養に用い、35°Cで72時間培養したのちに細菌種を同定した。

F 免疫組織化学的観察

回腸末端より口側約20cmの部位の小腸を長さ約2cmにわたって切除した。また横行結腸を長さ約2cmにわたって切除し、それぞれの腸管片を4%パラフォルムアルデヒドで48時間固定したのち、パラフィン包埋し3μmの厚さに薄切して間接酵素抗体法を行った³⁰⁾。腸管粘膜の分泌型IgAの存在を検討するために、一次抗体としてはヤギ抗ラット分泌型IgA抗体(secretory IgA: s-IgA)(ICN Biomedicals, Inc. Lisle,

Illinois)を、二次抗体としてはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgG抗体(Jackson Immunoresearch Lab. Inc. Baltimore, Maryland)を用いた。また腸管粘膜のIgAの存在を検討するため一次抗体としてはウサギ抗ラットIgAα鎖抗体(Bethyl Lab. Inc. Montgomery, Alabama), 二次抗体としてはペルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギIgG抗体(Dakopatts, Copenhagen, Denmark)を用いた。またfree secretory component(FSC)の存在を検討するため一次抗体としてヒツジ抗ヒトセクレタリーコンポーネント(SC)抗体(Binding Site Ltd. Birmingham, England), 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒツジIgG抗体(Dakopatts, Copenhagen, Denmark)を用いた。固定薄切標本をキシレンで脱パラフィンを行ったのち、100%アルコール, 70%アルコール, 水洗の順に脱キシレンを行った。0.01Mリン酸緩衝液(PBS, pH7.2)を用いて5分間の洗浄を3回繰り返した。次に37°Cにて1時間トリプシン処理を行い内因性ペルオキシダーゼ阻止のため0.3%過酸化水素水, 100%メタノール液で30分間処理した。さらにPBSで5分間の洗浄を3回繰り返し、それぞれヤギ抗ラットs-IgA抗体(4,000倍), ウサギ抗ラットIgAα鎖抗体(1,000倍), ヒツジ抗ヒトSC抗体(400倍)(各抗体は1%ウシ血清アルブミン添加PBSで希釈)と4°Cで24時間反応させた。これをPBSで10分間の洗浄を3回繰り返し、それぞれペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させた。さらにPBSで5分間の洗浄を3回繰り返し、次にDAB反応(0.05M, トリス-HCl Buffer, pH7.2, 100ml + 3.3'ジアミノベンチジン, 20mg, これにH₂O₂を加えて0.005%とする)を行った。これを10分間水洗後、メチルグリーンにて核染色を行った。これを水洗しアルコールにて脱水, キシレンにて封入を行い鏡検した。さらに腸管ならびに肝臓の性状を比較検討するためにヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

G 統計学的処理

血清中の総蛋白, アルブミン, 総ビリルビン濃度, エンドトキシン濃度, 血管透過性の変化の統計学的有意差の有無の検定, ならびに相関係数の有意性の検定にはunpaired Student's t-testを用いた。またそれぞれの実験群間の比較には, 分散分析一元配置法を用いた。細菌叢の変化の検定には χ^2 検定を用いた。それぞれ $p < 0.05$ で統計学的に有意な差があると判定した。

Table 1 Concentration of total protein, albumin, total bilirubin and endotoxin in portal blood and vascular permeability of the small intestine and the colon in the jaundice group and the simple laparotomy group

	T.P	Alb	T. bil	Enbdotoxin level	Permeability	
	(g/dl)	(g/dl)	(mg/dl)	in portal blood (pg/ml)	s.intest. (μ g/0.5g wet tissue)	colon
Jaundice group	6.6 ± 0.5^a (n=11)	2.8 ± 0.3^c (n=11)	13.9 ± 1.9^c (n=11)	23.8 ± 8.6^b (n=8)	27.2 ± 11.0^a (n=10)	33.9 ± 10.2^b (n=13)
Simp. lap. group	6.1 ± 0.4^a (n=11)	3.7 ± 0.2^c (n=11)	0.5 ± 0.2^c (n=11)	6.4 ± 5.4^b (n=8)	18.6 ± 2.5^a (n=10)	20.9 ± 10.8^b (n=13)

Simp. lap. group : simple laparotomy group, T.P : total protein, Alb : albumin, T. bil : total bilirubin, s.intest. : vascular permeability of the small intestine, colon : vascular permeability of the colon, a <0.05, b <0.01, c <0.001

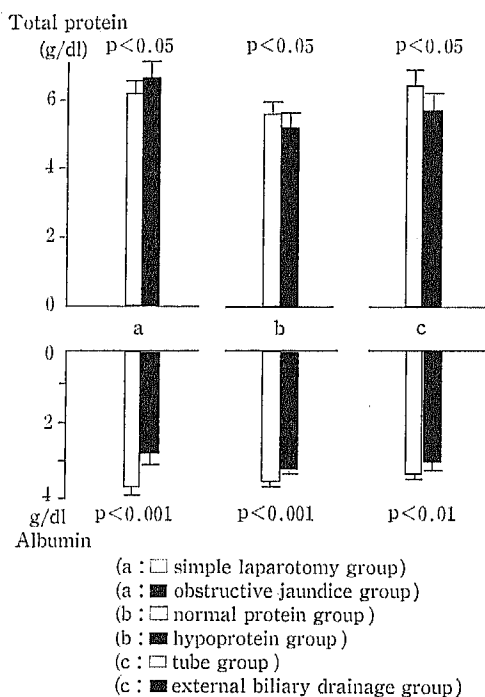


Fig. 1 Total protein and albumin levels of serum in each group. There is statistical significance between the obstructive jaundice and hypoprotein groups ($p < 0.01$), but not between the hypoprotein and external biliary drainage groups in total protein level of serum. No statistical significance is found among obstructive jaundice, hypoprotein and external drainage groups in serum albumin level.

III 結 果

A 門脈血中エンドトキシン濃度と腸管の血管透過性

Table 1 に示すように、閉塞性黄疸群の総蛋白濃度は 6.6 ± 0.5 g/dl (Fig. 1a), 総ビリルビン濃度は 13.9 ± 1.9 mg/dl, 門脈中エンドトキシン濃度は 23.8 ± 8.6 pg/ml (Fig. 2a) と単開腹群と比べて有意な上昇を示した。また小腸ならびに大腸の血管透過性は単開腹群と比べてそれぞれ有意に亢進していた (Fig. 3a)。しかしながら、アルブミン濃度は単開腹群に比べて閉塞性黄疸群では有意に低い値を示した (Fig. 1a) さらに血中アルブミン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には $r = -0.8$, $y = 67.6 - 15.9x$ の有意の負の相関関係が認められた (Fig. 4)。また総蛋白濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には $r = 0.5$, $y = -80.5 + 14.9x$ の有意の正の相関関係が認められた。さらに、閉塞性黄疸群のグロブリン濃度は単開腹群に比べ有意な上昇を示した。また、グロブリン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には、 $r = -0.9$, $y = -27.6 + 13.6x$ の有意の負の相関関係が認められた。

Table 2 に示すように、低蛋白食群の総蛋白濃度は 5.2 ± 0.4 g/dl, アルブミン濃度は 3.2 ± 0.1 g/dl (Fig. 1b), 門脈血中エンドトキシン濃度は 11.9 ± 2.6 pg/ml (Fig. 2b) と標準蛋白食群に比べて有意に低い値を示した。大腸の血管透過性は標準蛋白食群に比べて有意に上昇していた。一方、小腸の血管透過性は、両群間で有意差は認められなかった (Fig. 3b)。さらに血中アルブミン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には $r = -0.8$, $y = 40.7 - 9.3x$ の有意の負

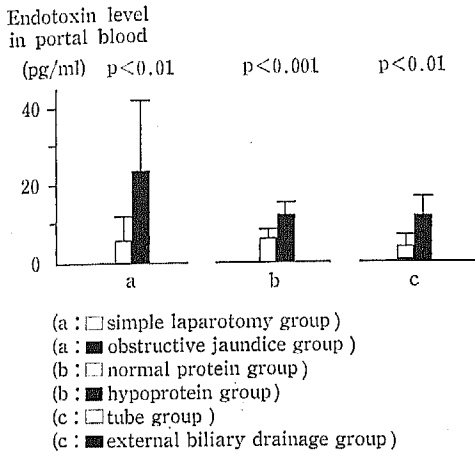


Fig. 2 Endotoxin levels in the portal vein in each group. There is statistical significance between the obstructive jaundice and hypoprotein groups ($p<0.05$), as well as between the obstructive jaundice and the external biliary drainage groups ($p<0.01$). No significant difference is found between the hypoprotein and the external biliary drainage groups.

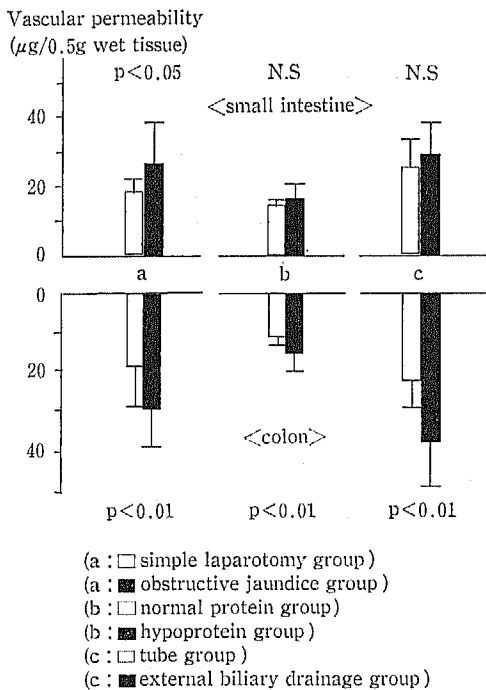


Fig. 3 Vascular permeability of the small intestine and the colon in each group.

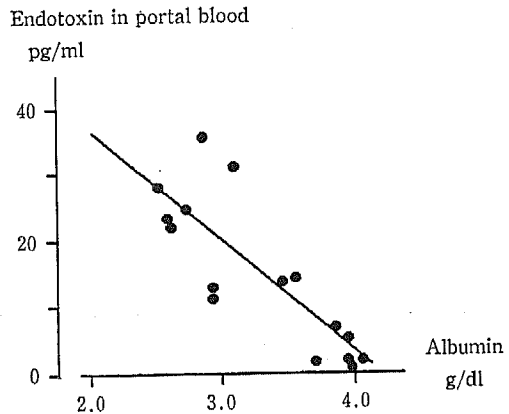


Fig. 4 Significant linear correlation ($r=-0.8$, $Y=67.6-15.9X$) is observed between serum albumin and endotoxin level in portal blood in the obstructive jaundice and simple laparotomy groups.

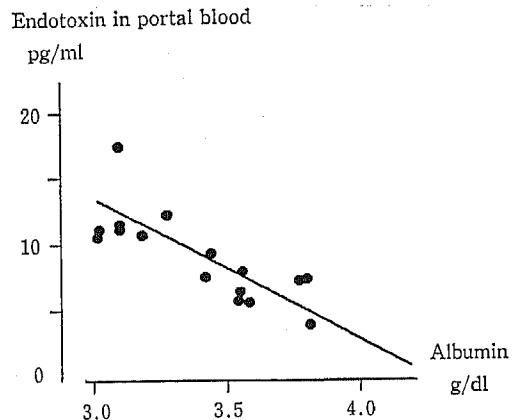


Fig. 5 Significant linear correlation ($r=-0.8$, $Y=40.7-9.3X$) is observed between serum albumin and endotoxin level in portal blood in the hypoprotein and normal protein groups.

の相関関係が認められた (Fig. 5)。また総蛋白濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間にも $r=-0.7$, $y=38.7-5.4x$ の有意の負の相関関係が認められた。しかし、グロブリン濃度に関しては低蛋白食群と標準蛋白食群の間に有意差は認められなかった。

Table 2 Concentration of total protein, albumin, total bilirubin and endotoxin in portal blood and vascular permeability of the small intestine and the colon in the hypo-protein group and the normal protein group

	T.P (g/dl)	Alb (g/dl)	T. bil (mg/dl)	Endotoxin level in portal blood (pg/ml)	Permeability	
					s.intest. (μ g/0.5g wet tissue)	colon (μ g/0.5g wet tissue)
Hypoprotein group	5.2 \pm 0.4 ^a (n=11)	3.2 \pm 0.1 ^c (n=11)	0.6 \pm 0.2 ^b (n=11)	11.9 \pm 2.6 ^c (n=8)	16.8 \pm 4.8 (n=10)	17.9 \pm 3.8 ^b (n=14)
N. protein group	5.6 \pm 0.3 ^a (n=11)	3.6 \pm 0.1 ^c (n=11)	0.3 \pm 0.1 ^b (n=11)	6.6 \pm 1.4 ^c (n=8)	13.9 \pm 2.3 (n=10)	12.6 \pm 2.8 ^b (n=14)

T.P : total protein, Alb : albumin, T. bil : total bilirubin, s.intest. : vascular permeability of the small intestine, colon : vascular permeability of the colon, N. protein group : normal protein group, a <0.05, b<0.01, c<0.001

Table 3 Concentration of total protein, albumin, total bilirubin and endotoxin in portal blood and vascular permeability of the small intestine and the colon in the external biliary drainage group and the tube group

	T.P (g/dl)	Alb (g/dl)	T. bil (mg/dl)	Endotoxin level in portal blood (pg/ml)	Permeability	
					s.intest. (μ g/0.5g wet tissue)	colon (μ g/0.5g wet tissue)
Exter. D group	5.7 \pm 0.4 ^a (n=10)	3.0 \pm 0.3 ^b (n=10)	0.6 \pm 0.4 (n=10)	11.7 \pm 5.2 ^b (n=8)	29.6 \pm 8.0 (n=9)	43.1 \pm 12.1 ^b (n=9)
Tube group	6.4 \pm 0.4 ^a (n=10)	3.3 \pm 0.1 ^b (n=10)	0.4 \pm 0.1 (n=10)	3.5 \pm 2.2 ^b (n=8)	24.7 \pm 8.2 (n=9)	26.3 \pm 6.1 ^b (n=9)

T.P : total protein, Alb : albumin, T. bil : total bilirubin, s.intest. : vascular permeability of the small intestine, colon : vascular permeability of the colon, Exter. D : external biliary drainage group, a<0.05, b<0.01, c<0.001

Table 3 に示すように、外胆汁瘻群の総蛋白濃度は 5.7 \pm 0.4 g/dl、アルブミン濃度は 3.0 \pm 0.3 g/dl (Fig. 1 c) とチューブ留置群と比べてそれぞれ有意に低下していた。一方、門脈血中のエンドトキシン濃度 (Fig. 2 c)、大腸の血管透過性はチューブ留置群と比べて有意に高い値を示した (Fig. 3 c)。しかしながら、小腸の血管透過性に関しては両群間で有意差は認められなかった (Fig. 3 c)。また、血中アルブミン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には $r = -0.7$, $y = 53.8 - 15.0x$ の有意の負の相関関係が認められた。しかし、総蛋白濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には相関関係が認められなかった。外胆汁

瘻群のグロブリン濃度はチューブ留置群と比べ有意な上昇を示した。また、グロブリン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には $r = 0.6$, $y = -11.6 + 8.0x$ の有意の正の相関関係が認められた。

B 腸内細菌叢の変化

閉塞性黄疸群では単開腹群に比較して、大腸に通常多く認められる *Bacteroides fragilis* が小腸にも出現した。*B. fragilis* の小腸での出現頻度は有意に増加していた。一方、*Morganella morganii* の大腸での出現頻度は、閉塞性黄疸時に有意に減少していたが、小腸ならびに大腸での *Escherichia coli* をはじめとするグラム陰性菌の出現頻度には閉塞性黄疸群と単開

Table 4 Intestinal bacterial flora in the simple laparotomy group and the jaundice group

	Small intestine		Colon	
	Sim. lap.	Jaundice	Sim. lap.	Jaundice
	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
<i>Escherichia coli</i>	4/5(80%)	3/5(60%)	4/5(80%)	4/5(80%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)
<i>Cagulase (-) staphylococcus</i>	2/5(40%)	3/5(60%)	2/5(40%)	1/5(20%)
<i>Lactobacillus</i>	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1/5(20%)	0/5(0%)	1/5(20%)	0/5(0%)
<i>Morganella morganii</i>	2/5(40%)	0/5(0%)	3/5(60%)*	0/5(0%)*
<i>Bacteroides fragilis</i>	0/5(0%)*	3/5(60%)*	5/5(100%)	5/5(100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/5(0%)	2/5(40%)	1/5(20%)	4/5(80%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			1/5(20%)	0/5(0%)
<i>Providencia rettgeri</i>			0/5(0%)	1/5(0%)
<i>Proteus vulgaris</i>			0/5(0%)	1/5(20%)

Sim. lap. : simple laparotomy group, Jaundice : jaundice group, *p<0.05

Table 5 Intestinal bacterial flora in the tube group and the external biliary drainage group

	Small intestine		Colon	
	Tube	Ext. D.	Tube	Ext. D.
	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
<i>Escherichia coli</i>	1/5(20%)	3/5(60%)	2/5(40%)	3/5(60%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	3/5(60%)	0/5(0%)	5/5(100%)	5/5(100%)
<i>Cagulase (-) staphylococcus</i>			2/5(40%)	4/5(80%)
<i>Lactobacillus</i>	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)	5/5(100%)
<i>Morganella morganii</i>			1/5(20%)	0/5(0%)
<i>Bacteroides fragilis</i>			5/5(100%)	5/5(100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/5(0%)	1/5(20%)	3/5(60%)	2/5(40%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			0/5(0%)	1/5(20%)
<i>Providencia rettgeri</i>	0/5(0%)	2/5(40%)	1/5(20%)	0/5(0%)
<i>Proteus vulgaris</i>	0/5(0%)	1/5(20%)	0/5(0%)	1/5(20%)

Tube : tube group, Ext. D. : external biliary drainage group

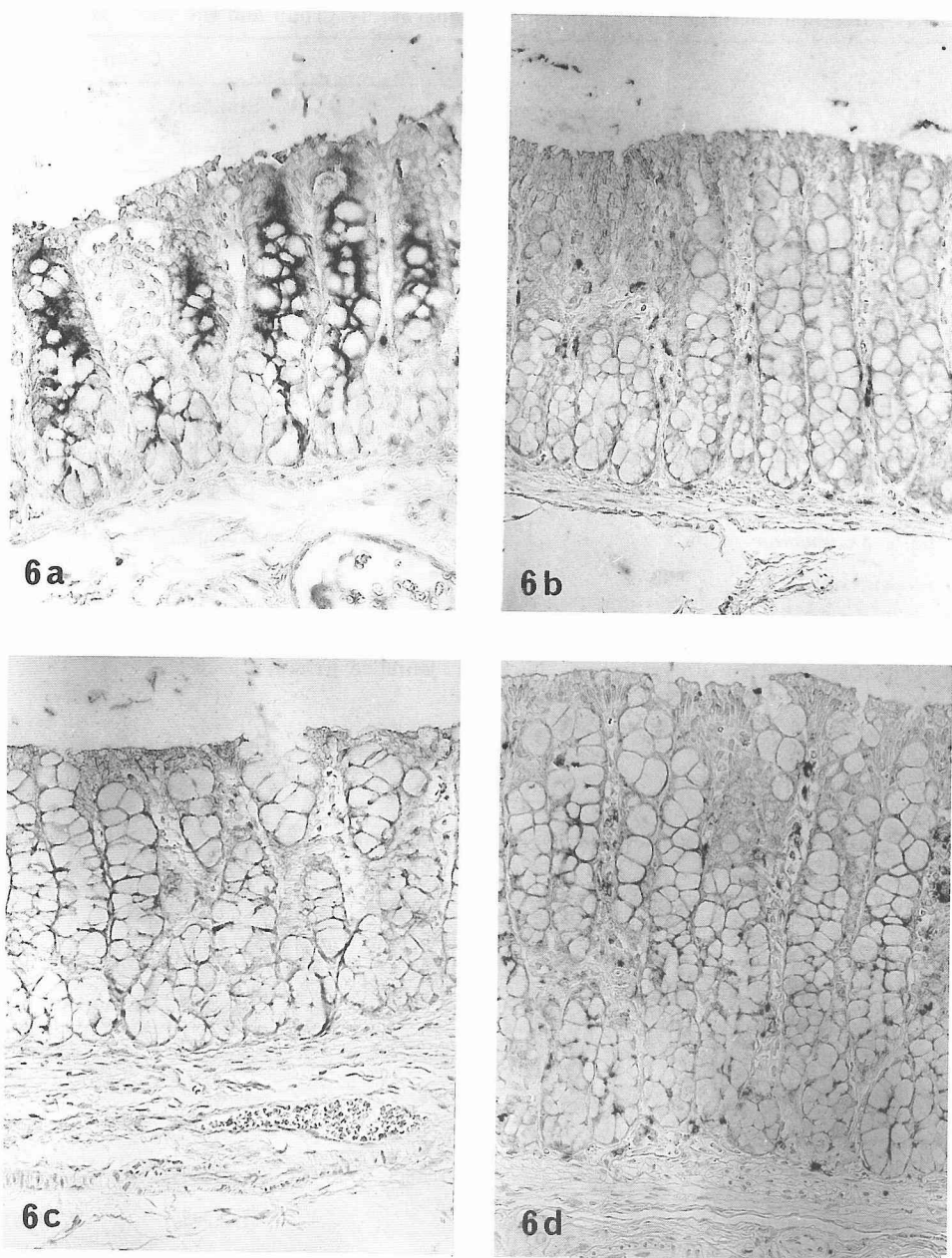


Fig. 6 Immunoperoxidase light micrographs of the intestine. Reaction products to rat s-IgA are seen on the luminal surface of the intestinal epithelium. $\times 100$

- a The colon of obstructive jaundice rat.(12 weeks) S-IgA are stained more dense than those of simple laparotomy rats.
- b The colon of simple laparotomy rat.(12 weeks)
- c The colon of external biliary drainage rat.(9 weeks) S-IgA are stained as same as those of tube rats.
- d The colon of tube rat.(9 weeks)

腹群の間で有意な変化は認められなかった (Table 4)。外胆汁瘻群とチューブ留置群を比較すると、大腸ならびに小腸での腸内細菌叢に有意な変化は認められなかった (Table 5)。

C 形態学的検索

1 ヘマトキシリン-エオジン染色

a 腸管の絨毛ならびに陰窩の構造に差は認められなかった。形態学的に腸管の血管透過性の亢進を示す所見は得られなかった。また閉塞性黄疸群でも腸管の毛細血管の増生やうっ血を示す所見は認められなかった。

b 肝臓には偽小葉形成など肝硬変を示唆する所見は認められず、また門脈周囲の線維化など門脈圧亢進を疑わせる所見は閉塞性黄疸群でも認められなかった。

2 免疫組織学的染色

a s-IgA の陽性像は小腸ならびに大腸ともに、粘膜固有層の形質細胞ならびに絨毛と陰窩の腺腔面に認められた。

b 閉塞性黄疸群の大腸では腺腔面での s-IgA の陽性像は強かったが (Fig. 6a, 6b)、小腸ではほとんど差は認められなかった。これに対して外胆汁瘻群では小腸ならびに大腸での腺腔面の s-IgA の陽性像には、ほとんど差は認められなかった (Fig. 6c, 6d)。

c コントロール群ならびにチューブ留置群の小腸と大腸の s-IgA の陽性像を比較すると、小腸のほうが s-IgA の陽性像が強かった。

d IgA の陽性像は粘膜固有層の形質細胞ならびに絨毛と陰窩の腺腔面に認められた。

e SC の陽性像は小腸粘膜の上皮細胞の核上部に認められた。

IV 考 察

閉塞性黄疸ラット群では低アルブミン血症、門脈血中エンドトキシン濃度の上昇、小腸ならびに大腸の血管透過性の亢進が見られるうに、血中アルブミン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間に有意の負の相関が認められた。このような成績は、閉塞性黄疸ラット群では大腸ならびに小腸から門脈血中へエンドトキシンが移行することができることを示唆しており、また血中アルブミン濃度が低いほど門脈血中へエンドトキシンが移行しやすくなることを示唆していると思われる。

このように閉塞性黄疸ラット群で認められた低アルブミン血症が、門脈血中エンドトキシン濃度の上昇や

腸管の血管透過性の亢進に対してどのように関与しているかを検討するために、閉塞性黄疸を伴わない低アルブミン血症のラットを作製して検討した。低アルブミン状態のみでも門脈血中エンドトキシン濃度の上昇や、大腸の血管透過性の亢進が認められ、さらに閉塞性黄疸状態と同じ様に血中アルブミン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間には有意の負の相関が認められた。この成績は低アルブミン状態のみでも門脈血中エンドトキシン濃度が有意に上昇することを示しており、閉塞性黄疸時に認められた、門脈血中エンドトキシン濃度の上昇の1因子として、低アルブミン状態が関与していることが推測される。しかしながら、前述のように門脈血中エンドトキシン濃度の上昇の機序に低アルブミン状態が関与しているとしても、本研究では閉塞性黄疸ラット群と低アルブミンラット群の間には門脈血中エンドトキシン濃度に有意差が出現した。このように両群間で門脈血中エンドトキシン濃度に有意差が出現した成績から、閉塞性黄疸ラット群で認められた門脈血中でのエンドトキシン濃度の著しい上昇の原因としては、単に低アルブミン状態だけでは説明することは困難である。

閉塞性黄疸時には、胆管の閉塞により肝臓内に胆汁鬱滞を来し、その結果この胆汁成分の一部は血中に逆流し、また腸管内には胆汁が存在しなくなる。そこで本研究では、閉塞性黄疸ラット群で認められた門脈血中でのエンドトキシン濃度の著しい上昇の原因として、腸管内の胆汁の有無がどのように関与しているかを検討するために、外胆汁瘻ラットを作製した。外胆汁瘻ラット群においても低アルブミン血症が出現し、門脈血中エンドトキシン濃度も有意に上昇するとともに、大腸の血管透過性の亢進が出現した。外胆汁瘻ラット群と低アルブミンラット群の間で血中アルブミン濃度に有意差は認められないので、腸管内の無胆汁状態により門脈血中エンドトキシン濃度が上昇するならば、外胆汁瘻ラット群の門脈血中エンドトキシン濃度は低アルブミンラット群よりも有意に上昇することが推測される。しかし、門脈血中エンドトキシン濃度に関しては低アルブミンラット群と外胆汁瘻ラット群の間で有意差が認められなかった。この成績は、外胆汁瘻ラット群で見られた門脈血中エンドトキシン濃度の上昇は低アルブミン状態に依存したものであることを示唆しており、腸管内の無胆汁状態が関係した結果と推測することは困難である。また、閉塞性黄疸ラット群と比較すると外胆汁瘻ラット群では門脈血中エンドトキ

シン濃度が有意に低下していた点より、門脈血中にエンドトキシンが上昇する因子として、前述した低アルブミン血症や腸管内の無胆汁状態以外の別の因子が関与している可能性が推測される。

閉塞性黄疸ラット群では総蛋白濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間に正の相関関係が認められ、さらに低蛋白ラット群では負の相関関係が認められる一方外胆汁瘻ラット群では有意な相関関係は認められなかった。このように3群で、総蛋白濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間に一定の関係が認められなかった原因として、これら3群の血中グロブリン濃度の変動様式に差が出現したためと思われる。すなわち閉塞性黄疸ラット群、外胆汁瘻ラット群の血中グロブリン濃度は上昇していたが、低蛋白ラット群の血中グロブリン濃度に有意差は認められなかった。さらにこれら3群のグロブリン濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間に一定の関係が認められなかった。このような結果は、総蛋白濃度と門脈血中エンドトキシン濃度の間に一定の関係がなかったためと思われる。

本研究において、エンドトキシンの測定に用いられたトキシカラートテスト法は、(1-3)- β -D-glucan によっても反応し、さらにエンドトキシンは、生体内ではトランスフェリンなどのエンドトキシン結合蛋白と結合すると言われている。トランスフェリンはグロブリン分画に属しているが、本研究ではグロブリン分画の測定を行っておらず、またこの蛋白結合時のトキシカラートテスト法によるエンドトキシンの測定感度に関しては疑問の点もある³¹⁾。しかしながら、今回のエンドトキシンの測定値は絶対的なものではないにしても、各群を相対的に比較検討することにおいては妥当性があると思われる。

外胆汁瘻ラット群の大腸の血管透過性は閉塞性黄疸ラット群と比べ有意に上昇しており、また開腹操作を加えた群と非開腹群の血管透過性には有意差が認められた。本研究での血管透過性の測定法は開腹操作による癒着、炎症反応などにより影響される³²⁾ので、このような有意差が出現した原因として、開腹操作からの日時が外胆汁瘻ラット群では短く、開腹操作の影響を反映したものと推測される。

本研究では Katayama ら²⁶⁾の方法に準じて血管透過性の測定を行っており、その際に組織内に血液の残留がないように組織を圧迫して肉眼的には血液が残っていない状態で血管透過性の測定を行っている。しかしながら閉塞性黄疸時に毛細血管の増生や門脈圧の

亢進などが起こった場合は測定に誤差が生じることが推測される。本研究の形態学的検索では、閉塞性黄疸ラット群の腸管組織での毛細血管の増生は認められず、また肝臓では門脈圧亢進を示唆する門脈周囲の線維化³³⁾などの所見も認められなかった。また閉塞性黄疸時には細胞外液、間質液、循環血液量が減少するとの報告³⁴⁾もあり、本研究で形態学的に腸管のうっ血などの所見が認められなかった点と一致すると思われる。したがって閉塞性黄疸ラット群でもエバンスブルーの静脈内投与により腸管の血管透過性を評価した本研究成績は妥当なものと推測される。

エンドトキシンの腸管粘膜側から漿膜側への移行機序は方向性の拡散機序に従う上に、濃度非依存性であるとされている。また移行速度はエンドトキシンが腸管粘膜と接触後約2時間でプラトーに達すると報告されている²⁾。したがって本研究で、閉塞性黄疸ラット群で認められた門脈血中エンドトキシン濃度の上昇の可能性として、腸管表面とエンドトキシンとの接触時間の延長あるいは、接触面積の拡大が推測される。本研究で用いた外胆汁瘻ラット群は5日間であり、閉塞性黄疸ラット群では4週間であったことを考えると閉塞性黄疸ラット群で門脈血中エンドトキシン濃度が上昇した一因として接触時間の延長の可能性も否定することはできない。またエンドトキシンは腸内細菌叢に由来することが知られており³⁵⁾、健康状態では腸内細菌は上部小腸に近づくほど少なく、また大腸と小腸を比較すると大腸にははるかに多く分布している。そこで閉塞性黄疸時に小腸上部から中部にかけて通常常在しないグラム陰性菌の増加がおこれば、エンドトキシンと腸管表面との接触面積が拡大することが推測される。また先に示したように閉塞性黄疸ラット群では、低蛋白ラット群や外胆汁瘻ラット群と異なり、小腸でも血管透過性が亢進している観察結果を考慮すると門脈血中エンドトキシンが多量に移行することが推察されるために、本研究では閉塞性黄疸ラット群と外胆汁瘻ラット群において腸内細菌叢の変化を検討した。通常は上部、中部小腸ではほとんど認められない³⁶⁾ *B. fragilis* の出現頻度が閉塞性黄疸ラット群では小腸で増加していた。この成績は閉塞性黄疸時に大腸の常細菌叢が小腸にも拡大していることを示唆するものである。また *B. fragilis* は heptose と 2-keto-3-deoxyoctonate を欠くりポ多糖類 (LPS) であり、その LPS の生物活性は *E. coli* などのグラム陰性菌の LPS よりも弱いとされている。本研究においては、

閉塞性黄疸ラット群で門脈血中エンドトキシン濃度の上昇が認められたが、*E. coli* などのグラム陰性菌の腸内分布に変化が認められなかった成績を考慮すると、本研究での門脈血中エンドトキシン濃度の上昇は *B. fragilis* に起因する LPS が上昇した可能性も否定できない。

閉塞性黄疸ラット群では小腸ならびに大腸で腸内細菌叢の変化が認められたのに対し、外胆汁瘻ラット群では小腸ならびに大腸での細菌叢に明かな変化は認められなかった。これら2群は、腸管内に胆汁が欠如した状態は同じであるが、腸内細菌叢の変化に差が出現している。この原因として、胆汁そのものの影響、たとえば胆汁中に含まれる胆汁酸や、無胆汁のために生じる腸管内の pH の変化などよりも、むしろ腸管側の因子の関与が推測される。そこで、本研究では腸管自体の因子として、腸管の局所防御機構である腸管粘膜の s-IgA³⁷⁾³⁸⁾ の変化を免疫組織化学的に検討した。

今回使用したヤギ抗ラット s-IgA 抗体はラットの胆汁から分離した s-IgA に対する抗体であるが、s-IgA のみならず IgA, free secretory component (FSC) とも反応する。したがってこの抗体で反応させた場合、標識されている抗原として IgA, s-IgA, FSC の3種類の可能性がある。そこで実際に反応している抗原がなんであるかを検討するために、それぞれ IgA, SC の染色も行った。またこのヒツジ抗ヒト SC 抗体はヒトセクレタリーコンポーネントに対する抗体であるが動物の FSC ならびに bound secretory component と結合すると言われている³⁹⁾⁴²⁾。

s-IgA は腸管粘膜で食餌性抗原や腸内微生物であるウイルス、あるいは細菌に対し産生され腸管粘膜の SC と結合し、管腔内に分泌されるとともに、門脈血中にも移行し、肝臓において胆管上皮で産生される SC と結合し胆汁中に分泌される。また細菌などの抗原と結合した s-IgA の免疫複合体は門脈血中を経て肝臓の Kupffer 細胞で処理される⁴³⁾⁴⁵⁾。本研究で小腸と大腸とで s-IgA の陽性像に差が認められた原因として、腸内細菌との共存関係の維持が推測される。閉塞性黄疸ラット群の大腸で s-IgA の陽性像が強かった原因として胆管の閉塞の結果、腸管で産生された s-IgA が門脈から胆汁中へ移行できず、腸管内腔へ逆流した可能性があげられる。しかしながら、もし s-IgA が腸管内腔へ逆流したとすると小腸において

も s-IgA の陽性像が強くなることが予想されるが、本研究では小腸の s-IgA の陽性像は単開腹群と比べて差が認められなかった。この結果は、閉塞性黄疸ラット群の大腸で認められた s-IgA の増加は単に胆管の閉塞による受動的な腸管内への s-IgA の逆流ではなく、大腸内での能動的な s-IgA の分泌の増加を示唆するものである。外来抗原に対して腸管粘膜の s-IgA が産生され、s-IgA と腸内細菌叢との相対的なバランスの結果が s-IgA の陽性像として現れるとすると、外胆汁瘻ラット群では小腸ならびに大腸ともに腸内細菌叢の変化は認められず、また腸管粘膜の s-IgA 像にも差は認められなかった。一方、閉塞性黄疸ラット群の大腸では *M. morganii* が減少したにもかかわらず腸管粘膜の s-IgA は増加していた。これに対して小腸では *B. fragilis* の出現頻度の増加が見られたが、小腸の s-IgA の増加は認められなかった。先に述べたように外来抗原とのバランスの結果、腸管粘膜の s-IgA の陽性像の強度が決まるとすると、小腸での *B. fragilis* の増殖に対して小腸では s-IgA の増加がおこり、大腸では *M. morganii* の減少に対して s-IgA の産生が低下し、腸内細菌叢の変化が緩和されると予想されるが、何等かの原因で大腸では s-IgA が増加し、小腸では s-IgA の増加がおこらずそのため小腸に *B. fragilis* が広がったと推測される。すなわち閉塞性黄疸群では腸内細菌叢の変化に対する腸管の局所免疫機構が変化し、そのため大腸の細菌叢が小腸に広がったと推測される。このことに関しては血中異常胆汁酸の増加や、不飽和脂肪酸を含む脂肪の吸収障害による免疫系への影響や、また正常状態では胆汁酸などのように小腸に多く存在するが、大腸にはほとんど存在しない物質が存在しなくなった場合の影響は小腸に著しいであろうと推測され、今後の課題である。

V 結 語

ラットに閉塞性黄疸、低蛋白、外胆汁瘻を作製し血中のアルブミン濃度、門脈血中のエンドトキシン濃度、腸管の血管透過性、腸内細菌叢、腸管の s-IgA, IgA, SC を測定して以下の結果を得た。

- 1 閉塞性黄疸時における門脈血中へのエンドトキシンの移行には、低アルブミン状態が増強因子となる可能性が推察された。
- 2 閉塞性黄疸時には、小腸の血管透過性が亢進し小腸からも門脈血中へのエンドトキシンの流入が可能

となり高度のエンドトキシン血症を来することが示唆された。

3 閉塞性黄疸時には大腸内細菌叢の小腸への拡大が窺われた。

4 大腸は小腸に比べて、腸管の局所防御機構である s-IgA は少なかった。

以上の成績より、閉塞性黄疸時には大腸の細菌叢が小腸に上行し、さらに小腸の血管透過性が亢進していることも影響し、大腸だけでなく小腸からもエンドトキシンが門脈血中へ移行することが推測される。その際、低アルブミン血症状態が、門脈血中へのエンドトキシン移行の増強因子となっていることが示唆される。

また大腸の細菌叢の小腸への上行には腸管の局所防御機構である s-IgA が関与している可能性が推測される。

本論文の主旨は第89回日本外科学会(1989年3月, 東京), 第26回日本外科学会栄養代謝学会(1989年7月, 千葉), 第90回日本外科学会(1990年5月, 札幌), で発表した。

稿を終るにあたり懇親なる御指導を賜りました, 幕内雅敏教授, ならびに市川英幸講師に深甚なる謝意を表します。本論文の御校閲を賜りました信州大学医学部第1病理学教室重松秀一教授, 第2生理学教室小山省三教授に深謝します。

文 献

- 1) 川田十三夫: エンドトキシンの形態学的構造. 最新医学, 35: 455-459, 1980
- 2) Nolan, J. P., Hare, D. K., McDevit, J. J. and Ali, M. V.: *In vivo* studies of intestinal endotoxin absorption. *Gastroenterology*, 72: 434-439, 1977
- 3) 河西信彦: リポ多糖の化学構造と生物活性. 蛋白質核酸酵素, 21 [Suppl]: 199-217, 1976
- 4) 川田十三夫, 久恒和仁: グラム陰性菌の表層構造とリポ多糖. 蛋白質核酸酵素, 21 [Suppl]: 229-243, 1976
- 5) Ribi, E. R., Anacker, R. L., Brown, R., Haskins, W. T., Malmgren, B., Milner, K. C. and Rudbach, J. A.: Reaction of endotoxin and surfactants. *J Bacteriol*, 92: 1493-1509, 1966
- 6) Renkin, E. M.: Multiple pathways of capillary permeability. *Circ Res*, 41: 735-743, 1977
- 7) Granger, D. N. and Tarlor, A. E.: Permeability of intestinal capillaries to endogenous macromolecules. *Am J Physiol*, 238: 457-464, 1980
- 8) Simionescu, N., Simionescu, M. and Palade, G. E.: Permeability of intestinal capillaries. *J Cell Biol*, 53: 365-392, 1972
- 9) Casley-Smith, J. R., O'Donoghue, P. J. and Crocker, K. W. J.: The quantitative relationship between fenestrae in jejunal capillaries and connective tissue channels: Proof of "Tunnel-Capillaries". *Microvasc Res*, 9: 78-100, 1975
- 10) Mayerson, H. S., Wolfram, C. G., Shirley, H. H., Jr. and Wasserman, K.: Regional differences in capillary permeability. *Am J Physiol*, 198: 155-160, 1960
- 11) Granger, D. N., Granger, J. P., Brace, R. A., Paker, R. E. and Taylor, A. E.: Analysis of the permeability characteristics of cat intestinal capillaries. *Circ Res*, 44: 335-344, 1979
- 12) 本間遜: エンドトキシンの基礎. 織田敏次, 山本祐夫(監), エンドトキシンの基礎と臨床, pp. 9-21, 羊土社, 東京, 1979
- 13) Allan, I. J., Philip, K., Goldberg, B. S., Norman, B., George, A. D. and Philip, J. K.: Endotoxin and bacteremia in portal blood. *Gastroenterology*, 72: 1260-1270, 1977
- 14) Beeken, W. L., Roessner, K. D. and Krawitt, E. L.: Effect of deoxycholate, indole and endotoxin on organ cultures of rabbit jejunum. *Gastroenterology*, 66: 998-1004, 1974
- 15) Kocsar, L. T., Bertok, L. and Varteresz, V.: Effect of bile acids on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *J Bacteriol*, 100: 220-223, 1969
- 16) Roughneen, P. T., Kumar, S. C., Pellis, N. R. and Rowlands, B. J.: Endotoxemia and cholestasis. *Surg Gynecol Obstet*, 167: 205-210, 1988
- 17) 代田明朝, 森山雄吉, 足立憲治, 田代真一, 鄭淳, 相原薫: エンドトキシン血症の発来について. 最新医学, 35: 485-496, 1980
- 18) Gans, H. and Matsumoto, K.: The escape of endotoxin from the intestine. *Surg Gynecol*

- Obstet, 39 : 395-402, 1974
- 19) Deitch, E. A., Winterton, J. and Berg, R.: The gut as a portal of entry for bacteremia. *Ann Surg*, 205 : 681-692, 1987
- 20) Deitch, E. A., Berg, R. and Specian, R.: Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg*, 122 : 185-190, 1987
- 21) Katz, S., Grosfeld, J. L., Gross, K., Plager, D. A., Ross, D., Rosenthal, R. S., Hull, M. and Weber, T. R.: Impaired bacterial clearance and trapping in obstructive jaundice. *Ann Surg*, 199 : 14-20, 1984
- 22) 金井泉, 金井正光 : 血清総蛋白定量法, Biuret 法. 臨床検査法提要, 第29版, pp. 407-409, 金原出版, 東京, 1983
- 23) 金井泉, 金井正光 : BCG によるアルブミン定量法. 臨床検査法提要, 第29版, pp. 410-413, 金原出版, 東京, 1983
- 24) 金井泉, 金井正光 : 血清ビリルビン. 臨床検査法提要, 第29版, pp. 722-728, 金原出版, 東京, 1983
- 25) 岩崎至利, 田口重仁, 渋谷裕史, 福田定男, 吉益均, 児島辰也, 吉田友彦, 斉藤利彦, 芦沢真六 : 合成発色基質法による血中 Endotoxin の定量. 織田敏次 (監), エンドトキシン臨床研究の新しい展開, pp. 33-39, 羊土社, 東京, 1987
- 26) Katayama, S., Shionoya, H. and Ohtake, S.: A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol Immunol*, 22 : 89-101, 1978
- 27) Leveen, H. H. and Fishman, W. H.: Combination of evans blue with plasma protein: Its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. *Am J Physiol*, 151 : 26-33, 1974
- 28) Rawson, R. A.: The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. *Am J Physiol*, 138 : 708-717, 1942
- 29) Freedman, F. B. and Johnson, J. A.: Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. *Am J Physiol*, 216 : 675-681, 1969
- 30) 山口博 : 実験的肝繊維症における腎糸球体 IgA 沈着. 信州医誌, 35 : 91-106, 1987
- 31) 吉田昌男, 平田陸正, 稲田捷也, 鈴木美幸, 遠藤重厚 : エンドトキシン—最近の話題. 感染症, 20 : 1-12, 1990
- 32) Ueno, A., Tanaka, K., Katori, M., Hayashi, M. and Arai, Y.: Species difference in increased vascular permeability by synthetic leukotrien C₄ and D₄. *Prostaglandins*, 21 : 637-648, 1981
- 33) Hadojis, N. S. and Blumgart, L. H.: Role of liver atrophy, hepatic resection and hepatocyte hyperplasia in the development of portal hypertension in biliary disease. *Gut*, 28 : 1022-1028, 1987
- 34) Martinez-Rodenas, F., Oms, L. M., Carulla, X., Segura, M., Sancho, J. J., Piera, C., Fernandez-Espina, M. R. and Sitges-Serra, A.: Measurement of body water compartments after ligation of the common bile duct in the rabbit. *Br J Surg*, 76 : 461-464, 1989
- 35) 多羅尾和朗 : 腸内細菌とエンドトキシン. 肝胆脾, 12 : 587-593, 1986
- 36) Yoshiyuki, M. and Komei, M.: Effects of age and starvation on the gastrointestinal microflora and the heatresistance of fecal bacteria in rats. *Microbiol Immunol*, 23 : 455-470, 1979
- 37) 名倉宏 : 免疫グロブリン 1, 局所免疫と IgA. 病理と臨床, 4 : 275-284, 1986
- 38) 名倉宏, 福田吉秀 : IgA の腸管循環からみた腸, 肝臓器相関. 肝胆脾, 14 : 227-234, 1987
- 39) 小林邦彦 : IgA 分子構造とその特性. 病理と臨床, 580-588, 1986
- 40) Underson, B. J. and Socken, D. J.: A comparison of secretory component-immunoglobulin interactions amongst different species. *Adv Exp Med Biol*, 107 : 503-511, 1978
- 41) Allen, W. D. and Porter, P.: The relative distribution of IgM and IgA cells in intestinal mucosa and lymphoid tissues of the young unweaned pig and their significance in ontogenesis of secretory immunity. *Immunology*, 24 : 493-501, 1973

- 42) Mach, J. P.: *In vitro* combination of human and bovine free secretory component with IgA of various species. *Nature*, 228 : 1278-1282, 1970
- 43) Kleinman, R. E., Harmatz, P. R. and Walker, W. A.: The liver: An integral part of the enteric mucosal immune system. *Hepatology*, 2 : 379-384, 1982
- 44) Russell, M. W., Brown, T. A. and Mesteck, Y. J.: Role of serum IgA. *J Exp Med*, 153 : 968-976, 1981
- 45) Delacroix, D. L., Hodgson, H. J. F., McPherson, A., Dive, C. and Vaerman, J. P.: Selective transport of polymeric immunoglobulin A in bile. *J Clin Invest*, 70 : 230-241, 1982

(2. 2. 2 受稿)
