

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22年 5月 1日現在

研究種目： 基盤研究(C)
研究期間： 2007 ～ 2009
課題番号： 19591584
研究課題名(和文) 先天性胆道拡張症の胆管組織における神経構造ならびに神経伝達物質の研究
研究課題名(英文) The nervous system structure of the bile duct in patients with choledochal cyst and a study of the neurotransmitter.
研究代表者
安藤 久實 (ANDO HISAMI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 60184321

研究成果の概要(和文)：先天性胆道拡張症(以下CBD)における胆管拡張の原因を検索する事を目的に、CBD 8例と胆嚢に異常のみられない7例の小児計15例の胆嚢を用いて神経組織を検索した。胆嚢壁の血管網はCBD群において有意に減少し、血管表面に神経叢が描出された割合もCBD群において有意に低下していた。神経節細胞数に有意差は認められなかった。CBDでは血管床の減少に伴う胆嚢壁内の血流低下によって、胆管や胆嚢の収縮不全と拡張を来すと共に、血管周囲神経叢が減少して壁内動脈の収縮を抑制し、血流減少を代償していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study analyzed the bile duct walls of patients with choledochal cyst (CBD) as to whether the nerve fibers and nerve cells in the wall are abnormal or not. Bile ducts obtained from eight patients with choledochal cyst and seven normal bile ducts without dilatation were studied. The intramural vascularity in the gallbladders of the CBD group was significantly lower than that in the control group. The rate of perivascular plexuses on the surface of intramural vessels was also significantly lower in the CBD group than in the controls. There may be a mechanism in CBD causing contractile failure and dilatation of the biliary tract as a result of decreased intramural blood flow that accompanies the diminished vascularity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：先天性胆道拡張症、胆管拡張機序、胆嚢壁神経叢、血管周囲神経叢

1. 研究開始当初の背景

先天性胆道拡張症（以下本症）の胆管拡張がいかんして生じるかという点で研究を重ねてきた結果を集約すると、1) 膵液の胆道内逆流は胆管の拡張をもたらすものではない。2) 胆管の拡張はベルヌーイの法則にのっとり胆管下部狭窄部の長さに比例している。3) 本症の胆管壁の線維筋層には、正常な胆管壁にはほとんど認められない平滑筋組織が異常に増加している、などである。これらの結果は、胆管の拡張が単に胆管の狭窄のみによるものではなく、胆管壁自体にも先天的な異常が存在し、両者が相まって拡張するというを示唆するものであった。また、4) 本症の胆管壁の神経の発達が著しく乏しく、ヒルシュスプルング病類縁疾患における腸管壁神経の所見と類似しており、神経の異常に伴う腸管拡張と同様の病態が本症の胆管に生じているという可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 「本症の胆管壁は何らかの原因で胆管壁の神経節細胞数や形態に異常を生じ、その結果、胆汁の能動的流れに障害を来たして胆道内圧に抗しきれずに拡張が生じた」との推論を、本症における胆管壁の神経支配と正常胆管との神経支配を比較する事により実証する。

(2) 本症胆管壁の whole-mount 標本を作製して胆管壁神経線維の3次元構築を行い、胆管の神経分布を明らかにする結果、ヒルシュスプルング病類縁疾患にみられるような発達の極めて乏しい神経線維、ならびにその結果生じる平滑筋組織の異常増加、という所見が得られること。

3. 研究の方法

(1) 本症の手術で得られた胆嚢を CBD 群とし、手術あるいは剖検により得られた胆管に異常のない小児例の胆嚢を対照群とする。

(2) 摘出された胆嚢に Zamboni 液を注入して拡張させ、4℃に保存後、頸部、体部、底部から切片を採取し、実体顕微鏡下に粘膜層と漿膜層を剥離・除去して神経線維が含まれる線維筋層を露出する。

(3) 切片を 0.3% トリトン X 添加リン酸緩衝液 (PBS) 中に 4℃で保存し、これを 0.03% 過酸化水素添加メタノールに 15 分間浸けた後、PBS で洗浄する。5-10 倍正常ヤギ血清を 1 時間反応させた後、10,000 倍希釈ウサギ抗 Protein Gene Product 9.5 抗体と 1,000 倍希釈 200kDa 抗 Neurofilament 抗体を 1 次抗体として各々半日反応させる。PBS で洗浄後、PGP9.5 の切片にはビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG を、Neurofilament の切片にはビオチン化ヤギ抗マウス IgG を二次抗体として 1 時間反応させる。

(4) 切片を PBS で洗浄し、avidin-biotin 化酵素複合体を 1 時間反応させた後、さらに PBS で洗浄し、diaminobenzidine 溶液で発色させて乾燥後、光学顕微鏡にて観察する。

(5) 神経ネットワークについては、神経線維の太さ、密度、方向を検討する。血管分布に関しては、辺縁が PGP9.5 陽性の全ての分枝数を切片全域にわたってカウントし、1 cm²あたりの分枝数を算出する。更に、その中で血管表面に傍血管神経叢が認められる分枝の割合を算出する。

(6) 有意差検定は Mann-Whitney 検定、Friedman 検定を用い、危険率 0.05 未満を有意差ありとする。

4. 研究成果

(1) 両群に共通して神経線維の走行に規則性は認められず、胆嚢の各部位において神経ネットワーク密度の差異は認められなかった。

(2) 神経の最終分枝は血管表面で傍血管神経叢を形成していた。

(3) 神経線維の血管分布は、CBD 群 $5.5 \pm 1.9/\text{cm}^2$ 、対照群 $27.6 \pm 14.4/\text{cm}^2$ で、CBD 群において有意に減少していた ($p=0.011$)。 (図 1)

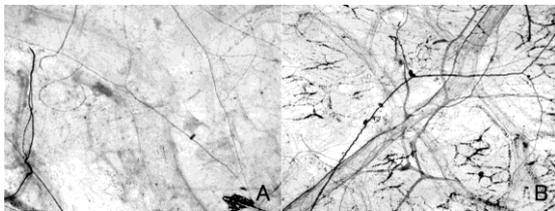


図 1 胆嚢壁の血管分布

(A の CBD 群は B の対照群に比べて血管分布が減少している。)

(4) 傍血管神経叢が認められる割合は、CBD 群 $37.7 \pm 18.1\%$ 、対照群 $80.2 \pm 17.4\%$ で、CBD 群において有意な低下が認められた ($p=0.018$)。 (図 2)

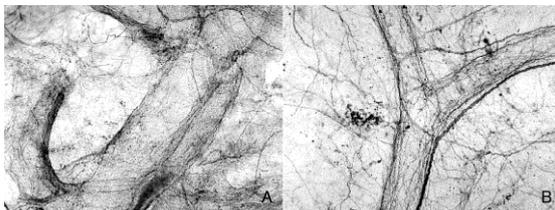


図 2 胆嚢壁の傍血管神経叢

(A の CBD 群は B の対照群に比べて傍血管神経叢の発達が不良である。)

(5) 神経節細胞数や神経節細胞の大きさについては両群間に有意差は認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① J. Yamaguchi, M. Sasaki, K. Harada, Y. Zen, Y. Sato, H. Ikeda, K. Itatsu, Y. Yokoyama, H. Ando, T. Ohta, A. Kubota, K. Shimizu, Y. Nimura, M. Nagino, Y. Nakanuma: Papillary hyperplasia of the gallbladder in pancreaticobiliary maljunction represents a senescence-related lesion induced by lysolecithin. *Laboratory Investigation*, 89, 1018-1031, 2009, 査読有

② S. Katsuno, H. Ando, Y. Watanabe, T. Harada, T. Seo, K. Kaneko: Hypogenesis of intramural vascularity and perivascular plexuses of gallbladder in patients with congenital biliary dilatation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 16, 339-345, 2009, 査読有

③ Kaneko K, Ono Y, Tainaka T, Sumida W, Ando H: Acidic and Basic Solutions Dissolve Protein Plugs Made of Lithostathine Complicating Choledochal Cyst/Pancreaticobiliary Maljunction. *Digest Dis Sci*, 54, 339-345, 2009, 査読有

④ 安藤久實: 先天性胆道拡張症ではどうして胆管が拡張するの? *小児外科*, 41, 1353-1356, 2009, 査読無

⑤ Y. Ono, K. Kaneko, T. Tainaka, W. Sumida, H. Ando: Pancreaticobiliary maljunction without bile duct dilatation in children: Distinction from choledochal cyst. *J Pediatr Gastr Nutr*, 46, 555-560, 2008, 査読有

⑥ K. Kaneko, Y Ono, T. Tainaka, W. Sumida, H. Ando: Fatty acid calcium stones in patients with pancreaticobiliary maljunction/choledochal cyst as another cause of obstructive symptoms besides protein plugs. *J Pediatr Surg*, 43, 564-567, 2008, 査読有

⑦ 安藤久實、金子健一朗、小野靖之、田井中貴久、住田 瓦: 小児科医が見逃したくない外科系疾患-先天性胆道拡張症、膵・胆管合流異常-, *小児科診療*, 71, 663-668, 2008, 査読無

⑧ 安藤久實: 膵・胆管合流異常-その現状一、胆道, 22, 175-180, 2008, 査読無

⑨ K. Kaneko, H. Ando, T. Seo, Y Ono, T. Tainaka, W. Sumida: Proteomic analysis of protein plugs: causative agent of symptoms in patients with choledochal cyst. *Digest Dis Sci*, 52, 1979-1986, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

- ①金子健一郎, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互: 膵胆管合流異常に合併する蛋白栓の溶解実験、第 46 回日本小児外科学会学術集会、2009 年 6 月 1 日-3 日、大阪
- ②金子健一郎, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 河合悠介: 膵胆管合流異常に合併する蛋白栓の溶解実験、第 32 回日本膵・胆管合流異常研究会、2009 年 8 月 29 日、東京
- ③金子健一郎, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互, 安藤久實: 膵胆管合流異常に合併する protein plug のビソルボンによる溶解、第 31 回日本膵・胆管合流異常研究会、2008 年 9 月 27 日、京都
- ④金子健一郎, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互, 安藤久實: 膵胆管合流異常に合併する脂肪酸カルシウム石: protein plug とは異なる閉塞原因について、第 31 回日本膵・胆管合流異常研究会、2008 年 9 月 27 日、京都
- ⑤金子健一郎, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互: 先天性胆道拡張症・膵胆管合流異常に合併する protein plug の溶解実験、第 45 回日本小児外科学会総会、2008 年 5 月 28 日-30 日、筑波
- ⑥金子健一郎, 澤井潤, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互, 安藤久實: 胆汁のプロテオーム解析からみた小児膵胆管合流異常の病態、第 108 回日本外科学会総会、2008 年 5 月 15 日-18 日、長崎
- ⑦H. Ando: New clues of pancreatobiliary maljunction, The 8th World Congress of IHPBA, 2008. 2. 26-3. 1, Mumbai
- ⑧安藤久實: 先天性胆道拡張症患者の QOL, 難病教育講演会, 2007 年 10 月 31 日, 名古屋
- ⑨金子健一郎, 安藤久實, 瀬尾孝彦, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互: 膵・胆管合流異常に合併する protein plug のプロテオーム解析、第 30 回日本膵・胆管合流異常研究会、2007 年 9 月 22 日, 鹿児島
- ⑩金子健一郎, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互: 先天性胆道拡張症に合併する脂肪酸カルシウム石: 蛋白栓とは異なる閉塞原因について、第 44 回日本小児外科学会総会、2007 年 5 月 31 日-6 月 2 日、東京
- ⑪K. Kaneko, H. Ando, T. Seo: Protein plugs complicate choledochal cysts/pancreaticobiliary maljunction. The 40th Annual Meeting of Pacific Meeting of Pacific Pediatric Surgeons, 2007. 4. 15-19, Queenstown, New Zealand
- ⑫金子健一郎, 安藤久實, 瀬尾孝彦, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互: 先天性胆道拡張症に合併する protein plug のプロテオーム解析、第 107 回日本外科学会総会、2007 年 4 月 12 日-14 日, 大阪

〔図書〕(計 5 件)

- ①安藤久實: 先天性胆道拡張症の病型分類のポイント、文光堂、胆道外科の要点と盲点、2009, 378-380.
- ②安藤久實: 先天性胆道拡張症の結石合併例に対する治療のポイント、文光堂、胆道外科の要点と盲点、2009, 383-389.
- ③安藤久實: 先天性胆道拡張症の結石合併例に対する手術のコツ、文光堂、胆道外科の要点と盲点、2009, 386-389.
- ④安藤久實: 肝・胆・膵、医学書院、標準小児外科学、2007, 184-190.
- ⑤Ando Hisami, Takada Tadahiro: Saunders, Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract. 2007, 1552-1559.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/hospital/202/c20229f.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 久實 (ANDO HISAMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60184321

(2) 研究分担者

小野 靖之 (ONO YASUYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10378193

田井中 貴久 (TAINAKA TAKAHISA)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 30378195