

สาเหตุและกลไกการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี: ปฐมบทความสัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับ

บรรจบ ศรีภา¹ พวงรัตน์ ยงวนิชย์² ชวลิต ไพโรจน์กุล¹

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา ²ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Etiology and Pathogenesis of Cholangiocarcinoma: Introduction to the Association with Liver Fluke Infection

Banchob Sripa¹, Puangrat Yongvanit², Chawalit Pairojkul¹

¹Department of Pathology and ²Biochemistry, Faculty of Medicine; Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Khon Kaen University

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะที่เดียวกันในภูมิภาคนี้ก็มีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) สูงเช่นเดียวกัน อุบัติการณ์ของมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีในประชากรในภูมิภาคนี้โดยเฉพาะจังหวัดขอนแก่นมีมากถึง 39.0 และ 97.8 คน ต่อ ประชากร 100,000 คน ในผู้หญิงและผู้ชายตามลำดับ¹ ในขณะที่อุบัติการณ์ของมะเร็งชนิดนี้ในประเทศตะวันตกมีเพียง 0.5-2 คน ต่อประชากร 100,000 คน² ความแตกต่างระหว่างอุบัติการณ์มะเร็งชนิดต่างๆ ในโลกนี้มีปัจจัยหลายอย่าง เช่น สิ่งแวดล้อม ฝุ่นพิษ และปัจจัยเสี่ยงต่อมะเร็ง เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยจากหลักฐานทั้งทางระบาดวิทยาและการศึกษาในสัตว์ทดลองสนับสนุนการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และการได้รับสารก่อมะเร็ง โดยเฉพาะกลุ่ม *N*-nitroso compounds ทั้งในอาหารและ nitrosamine และ reactive O₂ free radical ที่เกิดจากการ

อักเสบจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับน่าจะเป็นสาเหตุที่สำคัญในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี^{3,4} อย่างไรก็ตามมะเร็งท่อน้ำดีก็อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ดังนั้นในบทความนี้จึงจะกล่าวถึงความมาและสาเหตุของมะเร็งท่อน้ำดีในภาพรวมและการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทั้งในผู้ป่วยและในสัตว์ทดลองโดยย่อ เพื่อนำไปสู่งานศึกษาปัจจัยและกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในรายละเอียด ต่อไป

สาเหตุ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่พบทั่วโลกประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ของมะเร็งตับทั้งหมด สาเหตุส่วนใหญ่ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่ปัจจัยเสี่ยงที่นำไปสู่มะเร็งชนิดนี้มีด้วยกันหลายอย่าง ดังแสดงในตาราง ที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี

Strongly associated	Possibly associated
Caroli's disease	Asbestos
Choledocal cyst	Isoniazid
Liver fluke infection	Methyldopa
Gallstones & hepatolithiasis	Oral contraceptive
Sclerosing cholangitis	Polychlorinated biphenyls
Thorotrast	
Ulcerative colitis	

ดัดแปลงจาก Yeo et al.⁵

จากตารางที่ 1 จะพบว่าปัจจัยต่างๆ เหล่านี้มีกลไกพยาธิวิทยาคล้ายกัน 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) และการบาดเจ็บเรื้อรังของเยื่อหุ้มผิวทางเดินน้ำดี (chronic injury) Primary sclerosing cholangitis เป็นโรคที่พบบ่อยในวัยผู้ใหญ่ โรคนี้มีการตีบแคบ (stricture) และหนาตัว (fibrosis) ของท่อน้ำดีพร้อม ๆ กับการอักเสบรอบท่อ และโรคนี้มักมีความสัมพันธ์กับโรคแผลอักเสบของลำไส้ใหญ่เรื้อรัง (ulcerative colitis) ผู้ป่วยโรค Primary sclerosing cholangitis ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์มีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีในอนาคต⁶ ส่วนอุบัติการณ์มะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วย ulcerative colitis พบได้ประมาณ 0.4-1.4 เปอร์เซ็นต์⁷ ผู้ป่วยทั้งสองโรคนี้มักพบในช่วงอายุ 40-45 ปี ซึ่งเป็นช่วงอายุที่เร็วกว่าปกติประมาณ 20 ปี ดังนั้นในประเทศตะวันตกจึงถือว่า sclerosing cholangitis เป็นรอยโรคเริ่มต้นของมะเร็งท่อน้ำดี และควรจะมีการเฝ้าระวังหรือติดตามผู้ป่วยสม่ำเสมอ ส่วนโรคในกลุ่มที่มีความผิดปกติของการพัฒนาการของท่อน้ำดีทำให้มีการขยายตัวเป็นถุงน้ำ (cyst) คือ choledocal cyst และ Caroli's disease มีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งท่อน้ำดีสูงเช่นกัน กล่าวคือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบอาการของโรคนี้ก่อนอายุ 10 ขวบ มีโอกาสเสี่ยงเป็นมะเร็งท่อน้ำดี 0.7 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าผู้ป่วยมีอาการของโรคในช่วงอายุ 10-20 ปี หรือมากกว่า 20 ปี พบว่ามีโอกาสเสี่ยงเป็นมะเร็งชนิดนี้สูงถึง 6.8 เปอร์เซ็นต์ และ 14.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กลไกการเกิดโรคนี้ก็เชื่อว่าเกิดจากการอักเสบเรื้อรังเช่นกันนอกเหนือจากสาเหตุ bile stasis, stone formation และ pancreatic exocrine secretion reflux⁵

สำหรับ Thorotrast เป็นสารรังสีที่ใช้ในด้านรังสีวิทยาในรูปของ thorium dioxide ซึ่งจะให้พลังงานในรูป alpha particle เริ่มใช้งานตั้งแต่ปี พ.ศ.2471 (ค.ศ. 1928) เมื่อฉีดสารนี้เข้าไปมันจะอยู่ในระบบ reticuloendothelial system โดยเฉพาะในตับและรอบ ๆ ท่อน้ำดีกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของ dose ที่ให้ และสามารถอยู่ในร่างกายคนเราตลอดชีวิตและมีอายุครึ่งชีวิต (half life) นานถึง 200-400 ปี⁵ ผู้ป่วยที่ได้รับสารนี้มีโอกาสเป็นมะเร็งตับและท่อน้ำดีได้สูงกว่าคนปกติที่ไม่ได้รับสารนี้มากกว่า 10 เท่า หลังจากที่สัมผัสประมาณ 20-35 ปี ปัจจุบัน Thorotrast ได้ถูกยกเลิกการใช้งานไปแล้ว กลไกการเกิด

มะเร็งเชื่อว่าเกิดจากการทำลายเยื่อหุ้มท่อน้ำดีเรื้อรัง ในลักษณะคล้ายๆ กัน นิวโรลิธัส (hepatolithiasis) ซึ่งพบบ่อยในคนญี่ปุ่นก็มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีร่วมกับการอักเสบ ส่วนนิ่วในถุงน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งถุงน้ำดีมากกว่ามะเร็งท่อน้ำดี⁵

ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และ มะเร็งท่อน้ำดี มีรายงานในผู้ป่วยในซีกโลกตะวันออกมากกว่าศตวรรษ ในปี ค.ศ. 1900 Katsurada เป็นผู้รายงานครั้งแรกถึงมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *Clonorchis sinensis* และหลังจากนั้นก็มียางานอีกมาก โดยเฉพาะรายงานของ Hou⁷ ซึ่งถือเป็นรายงานชุดแรกที่มีข้อมูลสมบูรณ์ ในรายงานชุดต่อมา Gibson and Sun⁸ รายงานการตรวจศพจำนวน 1,484 รายในฮ่องกงพบมีพยาธิ *C. sinensis* 29 เปอร์เซ็นต์ ในผู้ป่วยมะเร็งเซลล์ตับ (hepatoma) จำนวน 89 ราย และพบพยาธิใบไม้ตับในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 17 ราย สูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพยาธิใบไม้ตับชนิด *O. viverrini* ซึ่งมีแหล่งระบาดใหญ่ในประเทศไทย และลาว ก็มีรายงานความสัมพันธ์นี้เช่นกัน และมีข้อมูลอันเชื่อได้ว่าเป็นสาเหตุของมะเร็งท่อน้ำดีมากกว่า *C. sinensis*³ ดังจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในกลุ่มนี้จัดอยู่ในกระบวนการอักเสบเรื้อรัง

มะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย

การศึกษาในคน

ความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งท่อน้ำดี และการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกจากการศึกษาในรายงานการตรวจศพจำนวน 2 ราย ที่เป็น papillary adenocarcinoma ของตับ และ adenocarcinoma ของท่อน้ำดีร่วมกับการตรวจพบพยาธิใบไม้ตับ⁹ หลังจากนั้นก็มีการรายงานการตรวจชิ้นเนื้อผู้ป่วยหรือตรวจศพอีกหลายรายงานที่แสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์ที่พบมะเร็งท่อน้ำดีมีมากกว่ามะเร็งเซลล์ตับในผู้ป่วยที่มีหลักฐานว่าอาศัยอยู่ในเขตระบาดของพยาธิใบไม้ตับในภาคอีสาน หรือมีการตรวจพบไข้พยาธิใบไม้ตับ ดังแสดงรายละเอียดใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงรายงานผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

References	Patients specified as coming from endemic area	Period of study	Cases				
			Method of ascertainment	Type	Number	OV infection	
						No.	%
Bhamarapravati & Viranuvatti ¹⁰	No	1960-62	Liver biopsy	HCC	251	5	2
				CCA	61	11	18
			Autopsy	HCC	33	0	0
				CCA	14	11	79
Chainuvati et al. ¹¹	Yes	NR	NR	CAcystic	4	3 ^a	75
Koompaichana et al. ¹²	No	1954-74	Autopsy	HCC	266 ^b	9	3.4
				CCA	108 ^b	67	62
Sonakul et al. ¹³	No	17 years	Autopsy	HCC	9	From case	
				CCA	67	series with OV	
	Yes	3 years	Autopsy	HCC	3	3	100
				CCA	8	8	100
				CCA	11	11	100
Stitnimankarn et al. ¹⁴	Yes	NR	Liver biopsy	CCA	11	11	100

NR = not reported; HCC = hepatocellular carcinoma; CCA = cholangiocarcinoma; CAcystic = adenocarcinoma of the cystic duct

^aBy stool examination; all were found to have infection when the ducts were examined histologically.

^bCombining cases reported to have *O. viverrini* infection and those reported to be without the fluke. (Modified from IARC, 1994)

นอกจากรายงานชุดผู้ป่วยดังกล่าวมาแล้ว ยังมี case-control study ทั้ง hospital-based study เช่น Kurathong et al.¹⁵, Parkin et al.¹⁶ และ population-based study เช่น Haswell-Elkins et al.¹⁷, Elkins et al.¹⁸, Sriamporn et al.¹⁹ และอีกจำนวน มากที่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

การศึกษาในสัตว์ทดลอง

จากหลักฐานต่างๆ ที่พบในผู้ป่วยและ population-based study ดังกล่าวแล้ว ชี้ชัดว่ามะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ อย่างไรก็ตามปัจจัยอื่นๆ ในภูมิภาค ตะวันออกเฉียงเหนือที่น่าจะมีบทบาท คือ สารก่อมะเร็งต่างๆ ในอาหารประจำวัน เช่น ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาจ่อม และอาหารหมักดองอื่นๆ ซึ่งมีรายงานการปนเปื้อนของสารก่อมะเร็งโดยเฉพาะกลุ่ม N-nitroso compounds หรือ precursors^{20,21} นอกจากนี้หลักฐานจากการศึกษาในสัตว์ทดลองว่าสารก่อ

มะเร็งกลุ่มนี้สามารถชักนำให้เกิดมะเร็งเซลล์ตับและมะเร็งท่อน้ำดีได้²² จากข้อมูลดังกล่าวในขณะนั้นทำให้นักวิทยาศาสตร์ตั้งสมมติฐานว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่พบอุบัติการณ์สูงในภาคอีสาน น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับปัจจัยทั้งสองอย่างนี้ และนำไปสู่การทดสอบสมมติฐานนี้ในสัตว์ทดลอง นักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ทำการบุกเบิกศึกษาและสมควรที่จะได้รับการเกียรติ กล่าวถึงในการศึกษาทั่วโลกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับคือ ศาสตราจารย์ นพ. ญัฐ ภมรประวัติ²³ และ ศาสตราจารย์ นสพ. วิทยา ธรรมวิทย์²⁴ คณะผู้วิจัยได้ให้สารก่อมะเร็ง dimethylnitrosamine ขนาด 25 ppm ในน้ำดื่มร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 100 metacercariae ในหนูแฮมสเตอร์ และพบว่าสามารถชักนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบในกลุ่มที่ให้พยาธิใบไม้ตับ หรือสารก่อมะเร็ง อย่างเดียว หลังจากรายงานนี้แล้วก็มีการศึกษาในทำนองเดียวกันมากมายเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ดังรายละเอียดสรุปในตารางที่ 3-4

ตารางที่ 3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและ NDMA ในสัตว์ทดลอง

References	Dose of OV infection	Dose of NDMA	No. of animals	Duration(weeks)	Cholangio-fibrosis (%)	CCA (%)
Thamavit et al. ²⁴	100	25 ppm in water, 30 days p.i. for 10 weeks	21	23	21 (100)	21(100)
Flavell & Lucas ²⁵	50	1.6 mg single dose p.o., 41 days p.i.	50	Total 70	NR	5 (10)
Flavell & Lucas ²⁶	50	1.6 mg, single dose p.o. 96 hr before infection.	46	Total 490 days	NR	9 (20)
		1.6 mg single dose p.o., 41 days p.i.	50	Total 490 days	NR	5(10)
Thamavit et al. ²⁷	100	12.5 ppm*	15	40	15(100)	14(93)
	100	6.25 ppm*	19	40	19(100)	16(84)
	100	3.25 ppm*	15	40	10(67)	3(20)
	50	12.5 ppm*	17	40	15(88)	10(50)
	50	6.25 ppm*	15	40	9(60)	8(53)
	25	12.5 ppm*	19	40	15(78)	13(68)
	25	6.25 ppm*	15	40	9(60)	9(60)
	12	12.5 ppm*	10	40	7(70)	7(70)
	12	6.25 ppm*	10	40	4(40)	4(40)
Thamavit et al. ²⁸	80	20 mg/kg i.p. 19 days before infection	43**	45	40(93)	19(44)

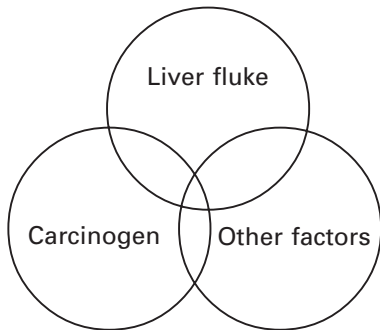
NDMA = *N*-nitrosodimethylamine; NR = Not reported; p.i. = post infection; p.o. = per oral; i.p. = intraperitoneal injection
 *NDMA in drinking water, 2 weeks p.i. for 10 weeks. **15(34.9%) also developed mucinous cystadenoma and 2(4.7%) developed hepatocellular carcinoma. Data modified from the original articles.

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและสารก่อมะเร็งอื่นๆ ในสัตว์ทดลอง

References	Dose of OV infection	Carcinogens	No. of animals	Duration (weeks)	Cholangio-fibrosis (%)	CCA (%)
Thamavit et al. ²⁹	100	0.1% sodium nitrite +0.1% aminopyrine in water, 30 days i.p. for 8-10 weeks	20	Total 24	7(35)	3(15) HCD2(10)
Thamavit et al. ²⁷	60	NDEA in drinking water for 12 weeks - 20 mg/L - 40 mg/L	20-30	32	OK	HCD 12/19 23/25
Thamavit et al. ³⁰	50,100	NDEA 150 mg/kg i.p., single	95	41	NR	HCD 4.3, 6.8 nodules/ animal
Thamavit et al. ²⁹	100	NDHDPA 1000 mg/kg body weight, i.p.	75	22	18/19	9/19 HCD (19/19)
Moore et al. ³¹	80	NDHDPA 500 mg/kg body weight, 3 i.p. injection at week 16,17,18	100	52	OK	8/16 HCD (16/16)

NR = Not reported; p.i. = post infection; p.o. = per oral, OK = presence, NDEA = *N*-nitrosodiethylamine
 NDHDPA = *N*-nitrosodihydroxy-n-propylamine, HCD = hepatocellular nodule
 Data modified from the original articles.

จากหลักฐานทั้งของรายงานผู้ป่วย การศึกษาทางระบาดวิทยาและการทดลองในสัตว์ทดลองดังกล่าว ประมวลเบื้องต้นว่าปัจจัยสำคัญในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคอีสาน น่าจะมีสาเหตุมาจาก 1) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และ 2) การได้รับสารก่อมะเร็ง อย่างไรก็ตามในการเกิดมะเร็งมีปัจจัยอื่นอีกหลายอย่างที่เกี่ยวข้อและที่ยังไม่ทราบ ดังนั้นปัจจัย 3 ห่วง ดังแสดงในรูปที่ 1 จึงน่าจะเป็นปัจจัยที่ครอบคลุมและในบทความนี้จะได้กล่าวถึงปัจจัยต่างๆ และกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในรายละเอียด รวมทั้งแนวทางการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อนำไปสู่การควบคุม ป้องกัน และการรักษามะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย



รูปที่ 1 ปัจจัยสามห่วงในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย

ปัจจัยด้านตัวพยาธิ (Parasite factors)

การที่จะทำความเข้าใจในกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเข้าใจองค์ประกอบในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องอย่างละเอียด ดังนั้นในส่วนปัจจัยของตัวพยาธิจึงควรทราบ 1) องค์ประกอบของตัวพยาธิ 2) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และ 3) พยาธิสภาพและกลไกการเกิดพยาธิสภาพ ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

องค์ประกอบของตัวพยาธิ

พยาธิใบไม้ตับจัดอยู่ในกลุ่ม Trematode มีโครงสร้างซับซ้อนตั้งแต่ภายนอก คือ tegument และอวัยวะภายในต่างๆ เช่น gut, reproductive system เป็นต้น โครงสร้างทางกายภาพเหล่านี้มีการศึกษากันพอสมควรทั้งในระดับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยเฉพาะการศึกษาโครงสร้างของ tegument³²⁻³⁵ พบว่าประกอบด้วย syncytium

เป็นส่วนของ cell process ของ tegument cells ซึ่งอยู่ได้ชั้นกล้ามเนื้อลงไป syncytium นี้ปกคลุมด้วย trilaminar outer membrane ซึ่งก่อตัวเป็น microvilli และ glycocalyx บาง ๆ ปกคลุมทับอีกชั้น ส่วนด้านล่างของ syncytium เป็น inner membrane และชั้นกล้ามเนื้อ ใน syncytium ประกอบด้วย secretory granules และ mitochondria เป็นจำนวนมาก ส่วน tegument cells ทั้งในระยะตัวอ่อน (immature fluke, 1 week) และพยาธิตัวแก่มีลักษณะที่ active มาก กล่าวคือ มีนิวคลีโอลัสใหญ่ rough endoplasmic reticulum มาก Golgi complexes พัฒนาดี และมี secretory granule หลากหลายชนิดเป็นจำนวนมาก เชื่อว่า granule เหล่านี้จะถูกขนถ่ายออกมาด้านนอกผ่านทาง microtubule มาที่ syncytium เพื่อสร้างเป็น outer membrane และ glycocalyx ต่อไป ในส่วนของ glycocalyx ซึ่งเป็นด้านนอกสุดประกอบด้วยสารเคมีที่เป็น negative charges และเมื่อศึกษาทาง lectin cytochemistry แล้วพบว่า มีปฏิกิริยากับเลคติน ชนิด Con A, WGA และ RCA แต่ไม่พบปฏิกิริยากับ DBA แสดงว่า glycocalyx ของพยาธิใบไม้ตับประกอบด้วย D-mannose/D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine/sialic acid, D-galactose และ D-mannose/D-galactosamine³⁶

องค์ประกอบของพยาธิใบไม้ตับทางด้านโปรตีนมีการศึกษาค่อนข้างน้อย Wongratanacheewin et al.³⁷ และ Akai et al.³⁸ ได้ศึกษาโปรตีนของพยาธินี้ทั้งตัว (somatic extract) โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กัน ตั้งแต่ 14-219 KDa และโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในรูปไกลโคโปรตีนเมื่อทำการศึกษาด้วย Con A blotting³⁸ ส่วน secretory products ของพยาธิประกอบโปรตีนส่วนใหญ่ในช่วง 89 KDa³⁷ และยังพบว่าโปรตีนส่วนนี้มีคุณสมบัติที่เป็นแอนติเจนที่ดีและนำไปใช้ในการวินิจฉัย หรือการศึกษาทางอิมมูโนวิทยา ในเวลาต่อมา^{39,40} เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานการศึกษาโปรตีนของพยาธิใบไม้ตับในระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัยด้วยเทคนิค Proteomics ซึ่งสามารถตรวจโปรตีนจำนวนมากได้ในครั้งเดียว พบว่ามีความแตกต่างของโปรตีนที่ชัดเจน⁴¹ องค์ประกอบต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นข้อมูลพื้นฐานของตัวสาเหตุของโรคที่จะช่วยในการอธิบายการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และกลไกในการเกิดโรคต่อไป เนื่องจากหากมีองค์ประกอบเหล่านี้มีโอกาสที่จะทำอันตรายและ/หรือกระตุ้นเนื้อเยื่อของโฮสต์ก็เป็นไปได้สูง ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนจากการศึกษาในประชากรในภาคอีสานที่พบว่าพยาธิสภาพในตับและท่อน้ำดีรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับปริมาณการติดเชื้อ (worm burden/ egg per gram)^{18,42,46} อย่างไรก็ตามองค์ประกอบอื่น ๆ ของพยาธิใบไม้ตับโดยเฉพาะด้านเอนไซม์หรือโมเลกุลที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพ หรือ มะเร็ง น่าจะมีการศึกษาในระดับลึกอีกมาก

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิใบไม้ตับ

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งระบบ humoral และ cellular immune response มีการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลอง การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันนี้อาจเป็นตัวนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีดังที่ได้กล่าวต่อไป

Humoral immune response

การศึกษาการตอบสนองต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับด้วยการสร้างแอนติบอดีที่มีการศึกษาครั้งแรกในแฮมสเตอร์โดย Janechaiwat et al.⁴⁴ หลังจากนั้นก็รายงานทั้งจากการศึกษาในผู้ป่วยในโรงพยาบาล^{39,45,46} การศึกษาในประชากรที่อยู่ในเขตระบาดของพยาธิใบไม้ตับ^{43,47} และในสัตว์ทดลอง⁴⁸⁻⁵⁰ การตอบสนองทางแอนติบอดีนี้มีทั้งชนิด IgG, IgA, IgM และ IgE เมื่อศึกษาทาง immunocytochemistry แล้วพบว่าแอนติบอดีส่วนใหญ่สร้างต่อ tegument, reproductive organs, gut และ secretory products ของพยาธิ^{51,52} ส่วนปริมาณของแอนติบอดีในซีรัมส่วนใหญ่แปรผันตามปริมาณของการติดเชื้อหรือปริมาณไข่พยาธิที่ตรวจพบ^{43,50} และระยะเวลาที่สามารถตรวจพบแอนติบอดี (latent period) ขึ้นกับปริมาณของการติดเชื้อ^{49,50} นอกจากนี้ปริมาณของแอนติบอดีโดยเฉพาะชนิด IgG ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่พบในระบบท่อน้ำดี คือ periductal fibrosis⁴³ ระดับหรือปริมาณของแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับในซีรัมยังขึ้นสูงในผู้ที่สงสัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีจากการตรวจด้วยอัลตราซาวด์⁴³ หรือเป็นมะเร็งท่อน้ำดีที่มีผลวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่เป็น benign hepatobiliary diseases อื่นๆ⁵³ ข้อมูลที่มีขณะนี้เชื่อได้ว่าในผู้ที่มีแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับสูง หรือในทางกลับกันผู้ที่มีปริมาณการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสูง หรือมีโอกาสที่จะมีพยาธิสภาพในตับและท่อน้ำดีสูงมากกว่าผู้ที่มีปัจจัยดังกล่าวน้อยกว่า

Cellular immune response

การศึกษาด้าน cellular immune response ต่อพยาธิใบไม้ตับมีค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาด้าน humoral immune response ดังที่กล่าวมา Bhamarapravati et al.²³ พบว่าในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในระยะแรกมีการตอบสนองของเซลล์อักเสบรอบๆ ท่อน้ำดี ทั้งในท่อขนาดเล็กซึ่งไม่มีตัวพยาธิและขนาดใหญ่ และ periportal area มากมาย โดยเฉพาะ eosinophil, neutrophil และ mononuclear cells หลังจากนั้นก็มี lymphocyte และ plasma cell เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังอาจพบ granulomatous inflammation รอบ ๆ ไข่พยาธิ ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นปฏิกิริยาของ cell-mediated immune response Sripa & Kaewkes⁵⁴ ได้แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองด้านเซลล์อักเสบต่าง ๆ เป็นการตอบสนองต่อ

แอนติเจนของพยาธิ โดยตัวพยาธิจะปล่อยแอนติเจนไปรื้อฟื้นผ่านเยื่อบุผิวท่อน้ำดีและกระตุ้นการตอบสนองแบบฟิงเซลล์ การตอบสนองทางเซลล์หรือการอักเสบในระยะแรกหรือระยะเฉียบพลัน (acute inflammation) มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีเป็นอย่างมากดังจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป อย่างไรก็ตามในการติดเชื้อเรื้อรัง (chronic infection) ในเดือนที่ 5-6 พบว่าพยาธิสภาพของตับมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น⁵⁴ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wongratanacheewin et al.⁵⁵ ซึ่งพบมี immunodepression ในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเรื้อรัง

สำหรับการศึกษากการตอบสนองด้านเซลล์ในผู้ป่วยซึ่งศึกษาโดยคณะผู้เขียน (Sripa et al., unpublished) ในผนังถุงน้ำดีจากผู้ป่วยที่มีไข่พยาธิใบไม้ตับในน้ำดี/อุจจาระพบว่ามีความจำนวนของ T cell, T helper cells, macrophage และ mast cell ในชั้น lamina propria ของ mucosa มากกว่าของผู้ป่วยที่ไม่มีไข่พยาธิใบไม้ตับอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของเซลล์อักเสบดังกล่าวยังมีความสัมพันธ์ กับพยาธิสภาพของถุงน้ำดีที่เด่นชัด คือ fibrosis⁵⁶ จากข้อมูลของการศึกษาด้าน cellular immune response ต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับก็เชื่อได้ว่ามีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีส่วนบทบาทหรือกลไกในรายละเอียดจะนำเสนอในตอนต่อไป

พยาธิวิทยาโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

พยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับพบได้ทั้งในตับ ท่อน้ำดี และถุงน้ำดี ซึ่งได้มีการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลอง^{12,23,57-59} ความรุนแรงของพยาธิสภาพนี้ขึ้นอยู่กับทั้งปริมาณการติดเชื้อและระยะเวลาของการติดเชื้อ^{23,54,58,60}

พยาธิวิทยาในคน

พยาธิสภาพของตับที่มีการติดเชื้อจำนวนมากจะมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากขึ้น บางครั้งอาจถึงสองเท่าของน้ำหนักปกติ (3,000-3,500 กรัม หรือ มากกว่า)⁵⁷ ท่อน้ำดีที่อยู่ใต้ชั้นเยื่อหุ้มตับมีการขยายมากพร้อมกับมีผนังพังผืดหนา^{59,61} พยาธิสภาพของตับที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่พบในท่อน้ำดี โดยเฉพาะท่อน้ำดีขนาดใหญ่และขนาดกลางที่มีพยาธิอาศัยอยู่⁵⁹ ในระยะแรกของการติดเชื้อหรือการติดเชื้อที่มีปริมาณน้อย Tansurat⁵⁷ ไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงในเยื่อและผนังท่อน้ำดีในการศึกษาจากการตรวจศพ 70 ราย อย่างไรก็ตามในการติดเชื้อเรื้อรังพบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อต่อมเมือก และมีการหนาตัวของผนังท่อน้ำดี Riganti et al.⁵⁹ ได้รายงานลักษณะพยาธิสภาพที่พบบ่อย คือ desquamation of the

biliary epithelium, epithelial hyperplasia, bile duct hyperplasia และ periductal fibrosis ส่วนเซลล์อักเสบที่แทรกเข้าไปส่วนใหญ่เป็นชนิด lymphocytes, monocytes, eosinophils และ plasma cells การอักเสบชนิดแกรนูโลมา (granulomatous inflammation) พบได้น้อยและถ้าพบมักจะพบในบริเวณที่มีการหลุดของไข่พยาธิเข้าไปในเนื้อเยื่อ^{59,62} พยาธิสภาพทั้งที่ดูด้วยตาเปล่าและจากกล้องจุลทรรศน์ไม่แตกต่างกันระหว่างเด็กและผู้ใหญ่ แต่ถุงน้ำดีโต ถุงน้ำดีอักเสบเรื้อรัง และมะเร็งท่อน้ำดี พบได้เฉพาะในผู้ใหญ่⁵⁹

พยาธิวิทยาในสัตว์ทดลอง

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในสัตว์ทดลองโดยเฉพาะในแฮมสเตอร์มีความคล้ายคลึงกับที่เกิดในคน Bhamarapravati et al.²³ ได้อธิบายพยาธิสภาพในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับไว้ดังนี้ ในระยะแรกของการติดเชื้อมีการอักเสบแบบเฉียบพลันใน second-order bile ducts และ portal connective tissue มีการตายของเนื้อเยื่อตับเป็นหย่อม ๆ (focal hemorrhagic and coagulation necrosis) เซลล์อักเสบที่แทรกเข้ามามี eosinophils, neutrophils และ mononuclear cells การตอบสนองของเซลล์อักเสบเหล่านี้ได้มีการพิสูจน์แล้วว่า มีต่อแอนติเจนของพยาธิที่ปล่อยออกมาและกระจายผ่านเยื่อเมือกท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อข้างเคียงโดยเฉพาะบริเวณที่อยู่ใกล้ตัวพยาธิ⁵⁴ ส่วนท่อน้ำดีจะขยายใหญ่ขึ้นพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของเยื่อเมือก และ goblet cells ในระยะที่สองของการติดเชื้อประมาณหนึ่งเดือนจะมี epithelial hyperplasia และ adenomatous formation ของท่อน้ำดี ส่วน granulomatous responses ต่อตัวพยาธิและไข่ที่พบได้บ่อยเช่นกันและเชื่อว่าการหาย (resolution) ของ granulomas นี้นำไปสู่การเกิด periductal และ periportal scarring ในระยะติดเชื้อเรื้อรังเป็นเวลานาน พยาธิสภาพในตับที่เด่นมี periportal และ periductal fibrosis ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานที่มีการพบปริมาณของ type I และ type III collagen มากขึ้นในแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเรื้อรัง^{63,64} ส่วนเซลล์อักเสบที่แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อรอบๆ ท่อน้ำดีประกอบด้วย lymphocytes, monocytes, macrophages, eosinophils และ plasma cells^{23,54} พยาธิสภาพของถุงน้ำดีในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพบว่าการหนาตัวของผนังถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับ เมื่อศึกษาทาง histopathology พบว่ามีเซลล์อักเสบจำนวนมากทั้งชนิด eosinophil, neutrophil mononuclear cell และ mast cell นอกจากนี้ยังพบ fibrosis ในผนังของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับด้วยเช่นกัน⁶⁰ ตัวอย่างพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 พยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีของหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ A) แสดงพยาธิใบไม้ตับในท่อน้ำดีทำให้ท่อน้ำดีขยาย เซลล์เยื่อเมือกท่อน้ำดีมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นและมีการอักเสบรอบๆ ท่อน้ำดีส่วนใหญ่เป็นเซลล์ชนิด mononuclear cells B) แสดงการอักเสบแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับในตัวพยาธิและในเซลล์เยื่อเมือกท่อน้ำดี รอบท่อน้ำดีมีเซลล์อักเสบมาชุมนุมเป็นจำนวนมาก

กลไกการเกิดพยาธิสภาพในโรคพยาธิใบไม้ตับ

จากข้อมูลทั้งส่วนประกอบของตัวพยาธิ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และพยาธิสภาพที่พบ ทำให้สามารถประมวลกลไกการเกิดพยาธิสภาพในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ในระดับหนึ่งโดยในส่วนของการทำงานเยื่อเมือกท่อน้ำดี เช่น มี epithelial desquamation เชื่อว่าอาจเกิดจากการเสียดสีทางกายภาพระหว่างตัวพยาธิกับเนื้อเยื่อของท่อน้ำดี (mechanical irritation) และการดูดกัดของ sucker พยาธิ /หรืออาจเกิดจาก metabolic products ที่พยาธิใบไม้ตับขับถ่ายออกมา^{57,58,62} อย่างไรก็ตามมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้

อธิบายว่า ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดโรค^{23,43,54,65} โดยมีหลักฐานหลายอย่าง เช่น มี lymphocytes, mast cells, eosinophils และ macrophages infiltration รอบ ๆ periportal area ซึ่งตอบสนองต่อแอนติเจนพยาธิที่แพร่ผ่านเยื่อบุผิวท่อน้ำดีดังกล่าวมาแล้วและเชื่อว่าการทำลายเนื้อเยื่อในระยะเฉียบพลันเกิดจากกระบวนการอักเสบที่มีมากนั่นเอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงเรื้อรังโดยเฉพาะที่มีการติดเชื่อเป็นเวลานาน พยาธิสภาพโดยเฉพาะการอักเสบลดลง มี immunodepression และ immunomodulation กลไกเหล่านี้เป็น immunopathologic mechanisms^{23,54} นอกจากนี้จากการศึกษาของ Haswell-Elkins et al.⁴³ พบว่าความผิดปกติของถุงน้ำดี เช่น การหนาตัวของผนังถุงน้ำดี ในผู้ที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับระดับของ parasite-specific IgG ในซีรัม และมีความสัมพันธ์มากกว่าความรุนแรงของการติดเชื่อ

เมื่อเร็วๆ นี้ คณะผู้วิจัยจากคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รายงานว่ สารที่ปล่อยจากตัวพยาธิ (excretory-secretory products) สามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี⁶⁶ และเซลล์ NIH-3T3 normal mouse fibroblast⁶⁷ มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นจากการศึกษาในหลอดทดลองจากรายงานทั้งสองนำไปสู่ทฤษฎีใหม่ว่าสารที่หลั่งจากตัวพยาธิใบไม้ตับอย่างเดียวยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวได้นอกเหนือจากกลไกจากการตอบสนองของโฮสต์ สามารถนำไปอธิบายกลไกการเกิด biliary cell hyperplasia ในคนและสัตว์ทดลองที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับได้ นักวิจัยเหล่านี้กำลังศึกษาในรายละเอียดกลไกการเกิดโรคซึ่งอาจจะนำไปสู่การค้นพบโมเลกุลก่อมะเร็ง (oncogenic molecules) ในตัวพยาธิใบไม้ตับก็เป็นไปได้

ปัจจัยด้านสารก่อมะเร็ง (Carcinogens)

Exogenous carcinogens

สารก่อมะเร็งหรือสารก่อมะเร็งตั้งต้น (precursor) ชนิดต่าง ๆ ที่มนุษย์ได้รับเข้าไป (exogenous carcinogens) ซึ่งอาจจะโดยการกิน การสูดดม หรือการสัมผัส มีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดมะเร็งในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้และมีรายงานสนับสนุนในสัตว์ทดลอง ในส่วนของมะเร็งท่อน้ำดีมีความเชื่อกันว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการได้รับสารก่อมะเร็งจากอาหารหมักดองต่างๆ เช่น ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาเค็ม เป็นต้น สารก่อมะเร็งในกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากคือ N-nitroso compounds ซึ่งมีหลักฐานสนับสนุนชัดเจนว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีในสัตว์ทดลองได้เมื่อให้ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับดังได้กล่าวมาในตอนต้น

สารก่อมะเร็งในกลุ่ม N-nitroso compounds หรือไนโตรซามีน ในอาหารอาจเกิดได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง nitrite และสารประกอบ amines ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดอ่อน ๆ อาหารประเภทเนื้อที่มีการใส่สารถนอมอาหารในการหมักหรือเพิ่มสีสรร เช่น ดินประสีว (sodium nitrite) มีโอกาสที่จะมีการเกิดสารก่อมะเร็งกลุ่มนี้ได้ หรือสารประกอบเหล่านี้ในรูปแบบสารประกอบตั้งต้น เช่น nitrite สามารถทำปฏิกิริยากับ amine ในกระเพาะอาหารเกิดเป็น dimethylnitrosamine ได้ ดังนั้นในหลายประเทศจึงกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของ sodium nitrite ในอาหาร เช่น ประเทศญี่ปุ่นไม่เกิน 50 ppm ส่วนอเมริกากำหนดไม่เกิน 200 ppm ในประเทศไทยเคยมีรายงานการตรวจหาปริมาณ nitrate และ nitrite ในอาหารชนิดต่างๆ ในภาคอีสานพบว่ามีความสูง²¹ ดังแสดงในตารางที่ 5 แต่ตรวจไม่พบไนโตรซามีนซึ่งอาจจะเนื่องมาจากเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดไม่มีความไวเพียงพอ (ใช้เทคนิค thin layer chromatography) เนื่องจากไนโตรซามีนกว่าร้อยละ 80 เป็น volatile nitrosamine ซึ่งระเหยไปหมด อย่างไรก็ตามเมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานการตรวจ volatile nitrosamine ในอาหารประเภทหมักดองและอาหารต่างๆ ในประเทศไทยกว่า 1,800 ตัวอย่าง ด้วยวิธี gas chromatography และ thermal energy analyzer พบว่ามีปริมาณ N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosopiperidine (NPIP) และ N-nitrosopyrrolidine (NPYR) ค่อนข้างสูงในปลาสดตากแห้ง นอกจากนี้ยังพบในปลาร้าและปลาแห้งอื่นๆ ตั้งแต่ปริมาณเล็กน้อยจนถึง 66.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง นอกจากนี้ยังตรวจพบ NDMA และ NPYR ในผักต่าง ๆ ตั้งแต่ 1-95.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่าง⁶⁸ นอกจากนี้สาร nitrate ยังสามารถตรวจพบในแหล่งน้ำต่าง ๆ ด้วยเพราะมีการใช้สารเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยทางการเกษตร และปนเปื้อนมาในน้ำดื่ม ซึ่งนำไปสู่สมมติฐานว่าประชากรในภาคอีสานรับประทานอาหารทั้งอาหารปลาหมักและผักต่างๆ เป็นประจำอาจได้รับสารก่อมะเร็ง หรือสารก่อมะเร็งตั้งต้นสะสมเป็นจำนวนมากและนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับสารก่อมะเร็งจากภายนอกและการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคอีสานก็ยังไม่มียาขงานหรือข้อมูลในคนที่แน่ชัด

Endogenous agents

ในปี 1994 Ohshima et al.⁶⁹ ได้ตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคมะเร็งอันเนื่องมาจากภาวะติดเชื่อหรือภาวะอักเสบเรื้อรังว่าสาร nitric oxide (NO) และ อนุมูลอิสระของธาตุออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ที่ถูกสร้างขึ้นเนื่องจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายชนิดที่เซลล์นั้นสามารถไปทำลาย DNA ได้ (โปรดดูบท กลไกการ

เกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการติดพยาธิใบไม้ตับโดยผ่านทางอนุมูลอิสระ) นอกจากนี้เมแทบอลิท์อันเกิดจากสาร NO ตัวสำคัญอีกตัวหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นจากปฏิกิริยา nitrosation ในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบหรือติดเชื้อในเวลาต่อมาคือสาร N-nitrosodimethylamine (NDMA) ก็จัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งตัวสำคัญที่มีบทบาทเป็นอยู่สูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดี ทั้งนี้มีหลักฐานที่ชัดเจนแสดงไว้ในสัตว์ทดลอง

โรคมะเร็งท่อน้ำดีอันเกิดจากพยาธิใบไม้ตับจัดว่าเป็นรูปแบบ (model) ที่สำคัญที่จะพิสูจน์ถึงสมมุติฐานนี้ในคนได้ดี เนื่องจากสามารถตรวจวัดระดับของการสร้าง NO ได้จากระดับสารไนเตรตใน พลาสมาหรือในปัสสาวะรวมทั้งระดับไนไตรต์ในน้ำลาย หรืออาจวัดปฏิกิริยา nitrosation ที่เกิดขึ้นในร่างกายโดยให้ผู้ถูกทดลองรับประทานตัวทดสอบ (probe) ซึ่งเป็นสารเอมีนที่ไม่มีอันตรายนั้นคือกรดอะมิโน proline ได้ ในบุคคลคนเดียวกันทั้งในภาวะเมื่อมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและภาวะที่ขับพยาธิออกไปได้ด้วยยา praziquantel โดยมีดัชนีวัดที่เชื่อถือได้ว่าไม่มีหรือมีการติดเชื้อมากน้อยเพียงใด ด้วยการตรวจนับไข่พยาธิในอุจจาระ (egg) การวิจัยดังกล่าวได้ทำที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถึงการเหนี่ยวนำให้สร้าง NO ในกลุ่มประชากรเพศชายที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ระดับต่าง ๆ จาก 14 หมู่บ้านใน เขต 2 อำเภอของจังหวัดขอนแก่น Haswell-Elkins et al.⁷⁰ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับไนไตรต์ในน้ำลายรวมทั้งระดับไนเตรตในปัสสาวะ และ พลาสมาในกลุ่มที่มีการติดเชื้อ พยาธิใบไม้ตับ ทั้งระดับปานกลาง (1000-6000 epg) และระดับสูง (> 6000 epg) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 epg) โดยระดับของสารต่าง ๆ ดังกล่าวได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อตรวจอีกครั้งหนึ่ง หลังจาก 4 เดือน เมื่อได้ถ่ายพยาธิออกไปแล้ว ทั้งนี้ได้มีการควบคุมให้อาสาสมัครทั้งหมดรับประทานอาหารที่มีระดับไนเตรตในปริมาณที่ต่ำมาก ๆ จึงสรุปได้ว่าระดับไนเตรต/ไนไตรต์ที่เพิ่มขึ้นเป็นการบ่งชี้ถึงการสร้าง NO ที่เพิ่มขึ้นในร่างกายขณะที่มีการติดเชื้อ Satarug et al.⁷¹ ได้รายงานต่อมาถึงผล

กระทบของการสังเคราะห์ NO ที่เพิ่มขึ้นนี้ได้นำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา nitrosation ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อเหล่านี้ โดยพบว่าระดับ N-nitrosoproline ในปัสสาวะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือเมื่อเวลา 4 เดือนหลังจากถ่ายพยาธิ โดยปฏิกิริยานี้จะถูกยับยั้งได้ในกลุ่มผู้ติดเชื้อหากได้รับประทานวิตามินซีร่วมกับ proline จากการวิเคราะห์ทางสถิติ (multivariate statistical model) ได้แสดงให้เห็นด้วยว่าระดับของ thiocyanate ในน้ำลาย ซึ่งเป็นสารกระตุ้นปฏิกิริยา nitrosation และสามารถเป็นตัวบ่งชี้ตัวอีกตัวหนึ่งของปฏิกิริยา nitrosation นั้นมีความสำคัญเฉพาะในกลุ่มควบคุมเท่านั้น ซึ่งเป็นการเสนอแนะว่าการสร้างสาร nitrosating agent จาก NO ในกลุ่มผู้ติดเชื้อน่าจะเกิดจากสารตั้งต้น คือ กรดอะมิโน arginine โดยมีเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) เร่งปฏิกิริยา ซึ่งแสดงให้เห็นโดยทางอ้อมว่าปฏิกิริยา endogenous nitrosation ที่เกิดในกลุ่มผู้ติดเชื้อไม่ได้เกิดในกระเพาะอาหารแต่เกิดในตำแหน่งที่เนื้อเยื่อมีการอักเสบเป็นสำคัญ

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาต่อไปถึงระดับของสารก่อมะเร็ง NDMA ในปัสสาวะของผู้ถูกทดลองกลุ่มเดิม⁷² ในภาพรวมไม่พบความแตกต่างของ ระดับ NDMA ในกลุ่มผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าระดับ NDMA มีความสัมพันธ์อย่างมากกับระดับไนเตรตในกลุ่มผู้ติดเชื้อ และยังมี ความสัมพันธ์แบบผกผันกับการเจริญของ lymphocyte ของผู้ติดเชื้อที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในหลอดทดลอง แม้จะไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างระดับ NDMA ที่เพิ่มขึ้นในผู้ติดเชื้อเมื่อเทียบกับตัวชี้วัดอื่น ๆ ของปฏิกิริยา endogenous nitrosation ซึ่งอาจเป็นเพราะ NDMA มีปริมาณที่น้อยมากในร่างกายประการหนึ่ง และอีกประการหนึ่งคือ NDMA จะถูกเมแทบอลิส์ด้วยเอนไซม์ CYP2E1 และ 2A6 ที่ตีบให้เป็น DNA methylating agent โดยการจับกับ DNA กลายเป็น DNA adduct ซึ่งมีผลต่อการแปลรหัสโปรตีนและนำไปสู่กระบวนการเกิดมะเร็งในที่สุด ดังนั้นหลักฐานทางอ้อมที่น่าจะช่วยยืนยันว่าผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีการสร้าง

ตารางที่ 5 ปริมาณ nitrates และ nitrites ในอาหารชนิดต่าง ๆ ของภาคอีสาน²¹

Food	No. of species	No. of samples	Nitrate (ppm)	Nitrite (ppm)
Vegetables	77	235	0-30,999	0-33
Preserved vegetables	5	14	119-21,289	0.6-82
Fruit	9	12	0-177	0.2-2
Preserved protein food	14	165	0-27,078	0.03-194
Cooked food (food on plate)	79	156	0-25,861	0-86

NDMA สูงขึ้นจริงคือมีการเหนี่ยวนำในการทำงานของ CYP2E1 และ 2A6 ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นได้ทั้งจากกลุ่มติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทั้งในคนและสัตว์ทดลอง หรือจากตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี กล่าวคือสำหรับในคนได้มีการศึกษาการทำงานของ CYP2A6 แบบ in vivo โดยให้กลุ่มผู้ถูกทดลองทั้งชายและหญิงที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และกลุ่มควบคุมรับประทานยา coumarin ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงอย่างจำเพาะโดยเอนไซม์ CYP2A6 ได้เมแทบอไลต์ 7-hydroxycoumarin (7-HC) พบในปีสภาวะ จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ติดเชื้อมีการขับ 7-HC ออกมามากกว่ากลุ่มไม่ติดเชื้อ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และความแตกต่างนี้สามารถเห็นได้ชัดเจนถ้ากลุ่มผู้ติดเชื้อมีภาวะ biliary fibrosis ซึ่งตรวจได้จากภาพถ่ายอัลตราซาวด์เมื่อเทียบกับกลุ่มไม่ติดเชื้อ นอกจากนี้เมื่อตรวจดูระดับ 7-HC อีกครั้งหนึ่งหลังจาก 2 เดือนที่ให้กลุ่มติดเชื้อถ่ายพยาธิออกไปแล้ว พบว่ามีระดับของ 7-HC ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁷³ การศึกษานี้จึงเป็นการบ่งชี้ว่าการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP2A6 ในกลุ่มที่มี fibrosis ของท่อน้ำดีอันบ่งบอกถึงภาวะการติดเชื้อ พยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรัง สำหรับการศึกษานี้ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ เพื่อดูการทำงานของเอนไซม์ 2A8/9 (CYP2A6 ในคน) และ CYP2E174 พบว่าการทำงานของทั้ง CYP2A8/9 และ CYP2E1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาเหล่านี้สอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ผ่านมา^{69,75}

กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

กลไกในการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีพอสรุปโดยสังเขปดังนี้ เมื่อมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของตับและท่อน้ำดี 2 ด้านใหญ่ ๆ คือ มีการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดี จากนั้นก็มีการสร้างเซลล์เยื่อบุผิวขึ้นมาทดแทนใหม่ และส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นจากสารคัดหลั่งจากพยาธิโดยตรง เกิด epithelial hyperplasia, goblet cell metaplasia และ adenomatous hyperplasia และในขณะเดียวกันการติดเชื้อพยาธิก็ทำให้เกิดการอักเสบมากขึ้นรอบๆ ท่อน้ำดี เซลล์อักเสบที่เข้ามาชุมนุมมีทั้ง macrophages, neutrophils, eosinophils, mast cells, lymphocyte และ plasma cells เซลล์อักเสบเหล่านี้สามารถสร้างสารเคมีต่าง ๆ โดยเฉพาะในสามชนิดแรกมีรายงานการสร้าง nitric oxide และ oxygen free radicals สามารถทำลายสารพันธุกรรมของเซลล์ได้โดยตรง หรือเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารก่อมะเร็ง N-nitroso compounds โดยกระบวนการ endogenous nitrosation ผ่านเอนไซม์ iNOS สารก่อมะเร็งเหล่านี้จะถูกเมแทบอไลต์ให้

กลายเป็น ultimate carcinogen โดยเอนไซม์ P450 (CYP) ในตับ โดยเฉพาะชนิด CYP 2E1 และ CYP 2A6 (CYP จัดเป็น Phase I drug metabolizing enzyme) สารก่อมะเร็งนี้จะสามารถไปทำให้เกิด DNA adduct ในเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีที่กำลังมีการแบ่งเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมและพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในที่สุด ลำดับเหตุการณ์การเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดีเชื่อว่าเป็นแบบ “dysplasia-carcinoma sequence”⁷⁶ เนื่องจากมีการพบรอยโรคเช่นนี้ในเยื่อบุท่อน้ำดีในตับบริเวณที่ไม่ได้เป็นมะเร็งและส่วนที่อยู่ใกล้บริเวณที่เริ่มเป็นมะเร็ง รายละเอียดของกลไก โปรดดูในบทความถัดไป

ปัจจัยอื่น ๆ (Other factors)

ปัจจัยอื่น ๆ ที่น่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการศึกษาน้อยมาก และขอสรุปปัจจัยที่น่าสนใจดังนี้

ปัจจัยด้านบุคคล (Host factors) ที่สำคัญ คือ

- Host immune responses เช่น HLA type, susceptibility gene ต่อ การติดเชื้อ
- Xenobiotic metabolism เช่น Xenobiotic polymorphism
- Familial/genetic susceptibility

ปัจจัยอื่น ๆ (Miscellaneous) เช่น การสูบบุหรี่⁷⁷ สิ่งแวดล้อม เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการศึกษาในด้านต่างๆ เหล่านี้ยังมีน้อย ยังไม่อาจสรุปความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้

Future Research

การวิจัยที่ควรมีการศึกษามากขึ้น คือ ด้านปัจจัยด้านตัวบุคคลที่มีความไวในการเป็นโรค และกลไกการเกิดโรคในระดับโมเลกุล

เอกสารอ้างอิง

1. Parkin DM, Whelan J, Ferlay J, Raymond L, Young J. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. VII, Scientific Publications No. 143. International Agency of Research on Cancer, Lyon, 1997.
2. Anderson BB, Ukah F, Tette A, Villaflo SG, Koh D, Seton P. Primary tumors of the liver. J Natl Med Assoc. 1992; 84: 129-35.
3. IARC. Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monog Eval Carcinog Risks Hum 1994; 61: 121-175.
4. Vatanasapt V, Sripa B, Sithithaworn P, Mairiang P. Liver flukes and liver cancer. Cancer Surv. 1999; 33: 313-43.

5. Yeo CJ, Pitt HA, Cameron JL. Cholangiocarcinoma. Surg Clin North Am. 1990; 70:1429-47.
6. Chainuvati T, Paosawadhi A, Sripranoth M, Manasatith S, Viranuvatti V. Carcinoma of the cystic duct associated with opisthorchiasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1976; 7: 482-6.
6. Chapman RW. Risk factors for biliary tract carcinogenesis Ann Oncol. 1999;10 (Suppl) 4:308-11.
7. Hou PC. The relationship between primary carcinoma of the liver and infestation with *Clonorchis sinensis*. J Pathol Bacteriol. 1956; 72: 239-46.
8. Gibson JB, Sun T. Clonorchiasis. In: Marcial-Rojas, ed., Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases. Baltimore: Williams and Wilkins, 1971, pp. 546-66.
9. Viranuvatti V, Mettiyawongse S. Observations on two cases of opisthorchiasis in Thailand. Ann Trop Med Parasitol 1953; 47: 291-3.
10. Bhamarapravati N, Viranuvatti W. Liver diseases in Thailand. Analysis of liver biopsies. Am J Gastroenterol. 1966; 45: 267-76.
11. Boonpucknavig S, Kurathong S, Thamavit W. Detection of antibodies in sera from patients with opisthorchiasis. J Clin Lab Immunol. 1986; 19: 135-7.
12. Koopairochana V, Sonakul S, Chinda K, Stitnimankarn T. Opisthorchiasis: a clinicopathologic study of 154 cases. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1978; 9: 60-4.
13. Sonakul D, Koopairochana C, Chinda K, Stitnimankarn T. Hepatic carcinoma with opisthorchiasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1978; 9: 215-9.
14. Stitnimankarn T, Thagerngpol K, Damrongsak C, Chinapak O, Sindhvananda K. Ultrastructure of cholangiocarcinoma associated with opisthorchiasis. Southeast Asian J Trop Med Pub Health. 1978; 9: 558-67.
15. Kurathong S, Lerdverasirikul P, Wongpaitoon V, Pramoolsinsap C, Kanjanapitak A, Varavithya W, Phuapradit P, Bunyaratvej S, Upatham ES, Brockelman WY. *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma. A prospective, case-controlled study. Gastroenterology. 1985; 89: 151-6.
16. Parkin DM, Srivatanakul P, Khlai M, Chenvidhya D, Chotiwan P, Insiripong S, L'Abbe KA, Wild CP. Liver cancer in Thailand. I. A case-control study of cholangiocarcinoma. Int J Cancer. 1991 30; 48: 323-8.
17. Haswell Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P et al. Cross-sectional study of *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast Thailand. Int J Cancer. 1994; 59: 505-9.
18. Elkins DB, Mairiang E, Sithithaworn P, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Haswell-Elkins MR. Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor conditions of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* infection in humans. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55: 295-301.
19. Sriamporn S, Pisani P, Pipitgool V, Suwanrungruang K, Kamsa-ard S, Parkin DM. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. Trop Med Int Health. 2004; 9: 588-94.
20. Migasena P, Changbumrung S. The role of nitrosamines in the cause of primary carcinoma. J Med Assoc Thai. 1974; 57: 175-8.
21. Migasena P, Reaunsuwan W, Changbumrung S. Nitrates and nitrites in local Thai preserved protein foods. J Med Asso Thai. 1980; 63: 500-5.
22. Herrold KM. Histogenesis of malignant liver tumors induced by dimethylnitrosamine. An experimental study in Syrian hamsters. J Natl Cancer Inst. 1967; 39:1099-111.
23. Bhamarapravati N, Thamavit W, Vajrasthira S. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. Am J Med Hyg. 1978; 27: 787-94.
24. Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S Effects of dimethylnitrosamine on induction of CCA in *Opisthorchis viverrini* infected Syrian golden hamsters. Cancer Res. 1978; 38: 4634-9.
25. Flavell DJ, Lucas SB. Potentiation by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, of the carcinogenic action of *N*-nitrosodimethylamine upon the biliary epithelium of the hamster. Br J Cancer. 1982; 46: 985-9.
26. Flavell DJ, Lucas SB. Promotion of *N*-nitrosodimethylamine-initiated bile duct carcinogenesis in the hamster by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. Carcinogenesis 1983; 4: 927-30.
27. Thamavit W, Kongkanuntn R, Tiwawech D, Moore MA. Level of *Opisthorchis* infestation and carcinogen dose-dependence of cholangiocarcinoma induction in Syrian golden hamsters. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1987; 54: 52-8.
28. Thamavit W, Pairojkul C, Tiwawech D, Shirai T, Ito N. Strong promoting effect of *Opisthorchis viverrini* infection on dimethylnitrosamine-initiated hamster liver. Cancer Lett. 1994; 78: 121-5.
29. Thamavit W, Moore MA, Hiasa Y, Ito N. Generation of high yields of Syrian hamster cholangiocellular carcinomas and hepatocellular nodules by combined nitrite and aminopyrine administration and *Opisthorchis viverrini* infection. Jpn J Cancer Res. 1988; 79: 909-16.
30. Thamavit W, Boonpucknavig V, Boonpucknavig S, Moore MA, Ito N. Secondary enhancing effect of *Opisthorchis viverrini* infection on the development of hepatocellular nodules in Syrian golden hamsters initiated with diethylnitrosamine. Thai J Toxicol. 1992; 8: 35-40.

31. Moore MA, Thamavit W, Tiwawech D, Ito N. Cell death and proliferation in *Opisthorchis viverrini*-DHPN induced carcinogenesis in the Syrian hamster hepatopancreatic axis. In: Columbano et al. (eds) Chemical Carcinogenesis 2. Preum Press, New York, pp. 503-10.
32. Sobhon P, Wanichanon C, Saitongdee P, Koonchornboon T, Bubphanroj P, Upatham ES, Puengtowanakul S, Sirisinha S. Scanning electron microscopic study of *Opisthorchis viverrini* tegument and its alterations induced by amoscanate. Int J Parasitol. 1986; 16: 19-26.
33. Apinhasmit W, Sobhon P, Saitongdee P, Upatham ES. *Opisthorchis viverrini*: changes of the tegumental surface in newly excysted juvenile, first-week and adult flukes. Int J Parasitol. 1993; 23: 829-39.
34. Apinhasmit W, Sobhon P, Saitongdee P, Menayotin S, Upatham ES. *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure of the tegument of the first-week juveniles and adult flukes. Int J Parasitol. 1994; 24: 613-21.
35. Sobhon P, Apinhasmit W. *Opisthorchis viverrini*: the tegumental cytoskeleton. Int J Parasitol. 1995; 25:787-96.
36. Apinhasmit W, Sobhon P, Tarasub C, Mothong W, Saitongdee P, Sretarugsa P, Wanichanon C, Upatham ES. *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure and cytochemistry of the glycocalyx of the tegument. J Helminthol. 2000; 74:23-9.
37. Wongratanacheewin S, Chawengkirttikul R, Bunnag D, Sirisinha S. Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis. Parasitology. 1988; 96: 119-28.
38. Akai PS, Pungpak S, Kitikoon V, Chaicumpa W, Bunnag D, Befus AD. Separation and characterization of adult worm proteins and glycoproteins from the liver fluke *Opisthorchis viverrini*. J Parasitol. 1992; 78: 672-80.
39. Wongratanacheewin S, Bunnag D, Vaeusorn N, Sirisinha S. Characterization of humoral immune response in the serum and bile of patients with opisthorchiasis and its application in immunodiagnosis. Am J Trop Med Hyg. 1988; 38: 356-62.
40. Sirisinha S, Chawengkirttikul R, Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Kaewkes S, Sithithaworn P. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Opisthorchis viverrini* infection in an endemic area. Am J Trop Med Hyg. 1995; 52: 521-4.
41. Bogdan C, Rolling M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr Opin Immunol. 2000; 12: 64-76.
42. Elkins DB, Haswell-Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P, Sithithaworn P, Kaewkes S, Bhudhisawasdi V, Uttaravichien T. A high frequency of hepatobiliary disease and suspected cholangiocarcinoma associated with heavy *Opisthorchis viverrini* infection in a small community in north-east Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990; 84: 715-9.
43. Haswell-Elkins MR, Sithithaworn P, Mairiang E et al. Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. Clin Exp Immunol 1991; 84: 213-8.
44. Janechaiwat J, Tharavanij S, Vajrasthira S, Chaicumpa W. The immunological diagnosis of human opisthorchiasis and the humoral immune response to *Opisthorchis* infection in the hamster. J Med Assoc Thai. 1980; 63: 439-47.
45. Srivatanakul P, Viyanant V, Kurathong S, Tiwawech D. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Opisthorchis viverrini* infection. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1985; 16: 234-9.
46. Akai PS, Pungpak S, Chaicumpa W, Kitikoon V, Ruangunaporn Y, Bunnag D, Befus AD. Serum antibody responses in opisthorchiasis. Int J Parasitol. 1995; 25: 971-3.
47. Elkins DB, Sithithaworn P, Haswell-Elkins M, Kaewkes S, Awacharagan P, Wongratanacheewin S. *Opisthorchis viverrini*: relationships between egg counts, worms recovered and antibody levels within an endemic community in northeast Thailand. Parasitology. 1991; 102 Pt 2: 283-8.
48. Sirisinha S, Tuti S, Vichasri S, Tawatsin A. Humoral immune responses in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1983; 14: 243-51.
49. Chawengkirttikul R, Sirisinha S. Antibodies in serum and bile of hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. Int J Parasitol. 1988; 18: 721-7.
50. Sripa B, Kaewkes S. Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. Parasite Immunol. 2000; 22:139-45.
51. Boonmee S, Imtawil K, Wongkham C, Wongkham S. Comparative proteomic analysis of juvenile and adult liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. Acta Trop. 2003; 88:233-8.
52. Wongratanacheewin S, Sirisinha S. Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens: physicochemical characterization and antigen localization. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1987; 18: 511-20.
53. Itoh M, Pairojkul C, Thamawit W, Sithithaworn P, Tiwawech D, Uttaravichien T, Shirai T, Ito N. Association of antibodies to *Opisthorchis viverrini* with hepatobiliary disease in northeastern Thailand. Am J Trop Med Hyg. 1994; 51: 424-9.
54. Sripa B, Kaewkes S. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. Int J Parasitol. 2000;30:735-40.
55. Wongratanacheewin S, Rattanasiriwilai W, Priwan R, Sirisinha S. Immunodepression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. J Helminthol. 1987; 61: 151-6.

56. Sripa B, Haswell-Elkins MR, Sinawat P. Histological analysis of gallbladder diseases in relation to opisthorchiasis in endemic areas of Thailand. *Acta Trop.* 2003; 88:239-46.
57. Tansurat P. Opisthorchiasis In: Marcial-Rojas, R.A. (ed). *Pathology of protozoal and helminthic diseases*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1971; pp 536-45.
58. Harinasuta T, Riganti M, Bunnag D. *Opisthorchis viverrini* infection: pathogenesis and clinical features. *Arzneimittelforschung.* 1984; 34: 1167-9.
59. Riganti M, Pungpak S, Punpoowong B, Bunnag D, Harinasuta T. Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: a comparison of adults and children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1989; 20: 95-100.
60. Sripa B, Kaewkes S. Gall bladder and extrahepatic bile duct changes in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters. *Acta Trop.* 2002; 83: 29-36.
61. Hitanant S, Trong DT, Damrongsak C et al. Peritoneoscopic findings in 203 patients with *Opisthorchis viverrini* infection. *Gastrointestl Endos.* 1987; 33: 18-20.
62. Viranuvatti V and Stitnimankarn T. Liver fluke infection and infestation in Southeast Asia. In: Popper H and Schaffner F (eds). *Progress in Liver Diseases*, Grune and Stratton, New York, 1972, pp 537-47.
63. Hutadilok N, Ruenwongsa P. Liver collagen turnover in hamsters during infection by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol Biochem Parasitol.* 1983; 8: 71-7.
64. Chotigeat W, Ruenwongsa P. Types of collagen in *Opisthorchis viverrini* infected hamster liver. *Mol Biochem Parasitol.* 1986; 18: 377-87.
65. Flavell DJ, Flavell SU. *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. *Parasit Immunol.* 1986; 8: 455-66.
66. Sripa B. Pathobiology of opisthorchiasis: an update. *Acta Trop.* 2003; 88:209-20.
67. Thuwajit C, Thuwajit P, Kaewkes S, Sripa B, Uchida K, Miwa M, Wongkham S. Increased cell proliferation of mouse fibroblast NIH-3T3 in vitro induced by excretory/secretory product(s) from *Opisthorchis viverrini*. *Parasitology.* 2004; 129: 455-64.
68. Mitacek EJ, Brunnemann KD, Suttajit M, Martin N, Limsila T, Ohshima H, Caplan LS. Exposure to *N*-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37:297-305.
69. Ohshima H, Bandaletova TY, Brouet I et al. Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). *Carcinogenesis.* 1994; 15: 271-5.
70. Haswell-Elkins MR, Satarug S, Tsuda M. et al. Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mut Res.* 1994; 305: 241-52.
71. Satarug S, Haswell-Elkins MR, Tsuda M et al. Thiocyanate-independent nitrosation in humans with carcinogenic parasite infection. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 1075-81.
72. Satarug S, Haswell-Elkins MR, Sithithaworn P, et al. Relationships between the synthesis of *N*-nitrosodimethylamine and immune responses to chronic infection with the carcinogenic parasite, *Opisthorchis viverrini*, in men. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 485-91.
73. Satarug S, Lang MA, Yongvanit P et al. Induction of cytochrome P450 2A6 expression in humans by the carcinogenic parasite infection, *Opisthorchiasis viverrini*. *Cancer Epid Biomarkers Prev.* 1996; 5: 795-800.
74. Yongvanit P, Cha-on U, Sithithaworn P. Effect of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infection on CYP2A8/9 and CYP2E1 activities in hamsters. *FASEB Journal* 1997; 11: A1436.
75. Kirby GM, Pelkonen P, Vatanasapt V, Camus AM, Wild CP, Lang MA. Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Mol Carcinogenesis* 1994; 11: 81-9.
76. Holzinger F, Zraggen K, Buchler MW. Mechanisms of biliary carcinogenesis: a pathogenetic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol.* 1999; 10 Suppl 4:122-6.
77. Mitacek EJ, Brunnemann KD, Hoffmann D, Limsila T, Suttajit M, Martin N, Caplan LS. Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in Thailand. *Carcinogenesis.* 1999; 20:133-7.

