

化学的消化法を用いた肝の走査型電子顕微鏡的研究

— 硬変肝の観察 —

川崎医科大学附属川崎病院 内科

(指導: 小林敏成教授)

小林 和 司

(昭和60年10月31日受付)

Scanning Electron Microscopic Study of Liver Using the Chemical Digestion Method — Observation of Cirrhotic Liver —

Kazushi Kobayashi

Department of Medicine, Kawasaki Hospital
Kawasaki Medical School

(Accepted on October 31, 1985)

肝被膜を剝離し化学的に消化する方法と、短時間固定後化学的に消化する方法を利用して硬変肝を走査電顕で観察し、以下の結論をえた。

1. 肝被膜下の増生した細胆管を非自由表面から立体的に観察することができた。その走向は一部では直線状であったが、大部分が不規則に分枝しながら屈曲蛇行しており、一度細くなった後、球状にふくらんで盲端に終わっていた。

2. 再生結節の表面を立体的に観察することができ、増生した扁平な細胆管網が再生結節を被っている所があった。細胆管や小胆管の非自由表面を詳細に観察することができ、それらの断面も観察された。

3. 血管系は、今回、間質に存在する毛細血管と動脈枝のみしか観察されなかったが、肝内血管を非自由表面から三次元的に観察できる本法は、肝硬変の重要な病態の一つである肝循環障害の病態生理を形態学の面から解明するのに役立つものと考えられた。

This study describes the features of a human cirrhotic liver examined by scanning electron microscopy. The chemical digestion method was employed on the materials after mechanical stripping of the liver capsule and again after fixation of a short duration.

1. Proliferated bile ductules lying in the subcapsular space were well observed three-dimensionally. The ductules, which were mostly tortuous but straight in some parts, branched at random angles. They terminated in expanded end which looked like pouches.

2. The surfaces of cirrhotic nodules were observed three-dimensionally. The nodules were invested with a meshwork of flattened bile ductules. Proliferated bile ducts and ductules surrounded the nodules and their cross-sections were seen.

3. Only capillaries and arteries lying within the broad septa of the cirrhotic liver were noted in this study. Other vessels were not visible for some unknown reason. The advantage of this method is that the blood vessels of the liver parenchyma I can be studied from the outside.

Key Words ① Cirrhotic liver ② Scanning electron microscopy
③ Chemical digestion method

緒 言

肝硬変とは肝実質の壊死、線維化および肝細胞の再生により小葉構造の改変が生じ、肝実質の結節形成が肝全体にびまん性に生じている状態であると病理組織学的に定義されている。¹⁾ この肝硬変結節は、種々の変化を受けた血管系や、増生した細胆管あるいは偽胆管と呼ばれる胆管系などが、主として膠原線維からなる線維成分や浸潤細胞とともに存在する間質によりと

り囲まれている。

走査電子顕微鏡（以下走査電顕と略す）は細胞や組織を立体的に観察することを可能にし、肝硬変組織も、既に走査電顕で観察され報告されている。^{2)~4)} しかし、硬変肝の断面や血管鑄型による血管構築に関するもののみである。化学的消化法による走査電顕の観察では、結合組織に埋没している細胞や組織の非自由表面を三次元的に詳細に観察することができる。^{5)~8)} したがって、本法では間質の結合組織に埋没し

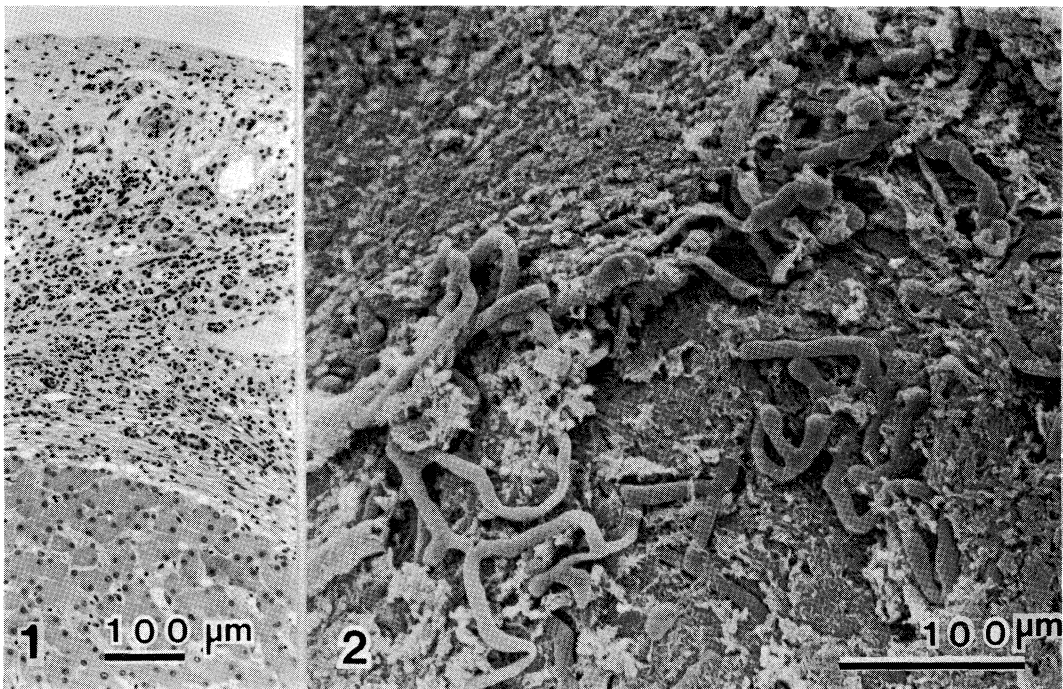


Fig. 1. (case 1) Light micrograph (LM) of the cirrhotic liver. Many proliferated bile ductules are seen in the subcapsular connective tissue. Hematoxylin and eosin staining.

Figs. 2~4. (case 1) Scanning electron micrograph (SEM) under treatment of chemical digestion after liver capsule stripping.

Fig. 2. Proliferated bile ductules are tortuous or straight branching at random angles. They are narrow proximal to their expanded ends.

て存在する血管系や胆管系のみならず、再生結節の表面も非自由表面から立体的に観察でき、それらの病理形態を、より明らかにすることができるものと思われる。

著者はこの化学的消化法を用いて、正常ラット肝の表面と正常ヒト肝の表面を走査電顕的に観察し報告してきたが、^{9),10)} 本論文では硬変肝について観察した結果を報告する。

材料および方法

材料は53歳の男性(症例1 肝硬変, 心筋梗塞で死亡)と46歳の男性(症例2 肝硬変, 肝不全で死亡)の剖検肝を使用した。

症例1では、著者が正常ヒト肝表面の走査電顕的に観察に用いた、被膜剝離後化学的消化法を利用して被膜下組織の観察をおこない、症例2では短時間固定後、化学的に消化して内部組織を観察した。

1. 症例 1

剖検肝の表面を含むシート状の小組織片(5×5×2 mm)を切り出し、2%グルタルアルデヒド加磷酸緩衝液で3—24 hr 浸漬固定した。被膜を上手剝離し、0.1M 磷酸緩衝液で洗滌後、8NのHClに60°Cで50—70 min 浸漬した。洗滌後10 mg/10 ml collagenase (worthington, type II) 加磷酸緩衝液に37°Cで6—12 hr 浸漬し消化した。洗滌後エタノール列脱水し、酢酸イソアミル浸漬、臨界点乾燥、Au-Pd スパッタ・コーティングし、走査電顕を用い、加速電圧15—20 kVで鏡検した。フロン割断法¹¹⁾で試料の断面の観察もした。

2. 症例 2

剖検肝を症例1の2倍の厚さの組織片(5×5×4 mm)に切り出し、2%グルタルアルデヒド

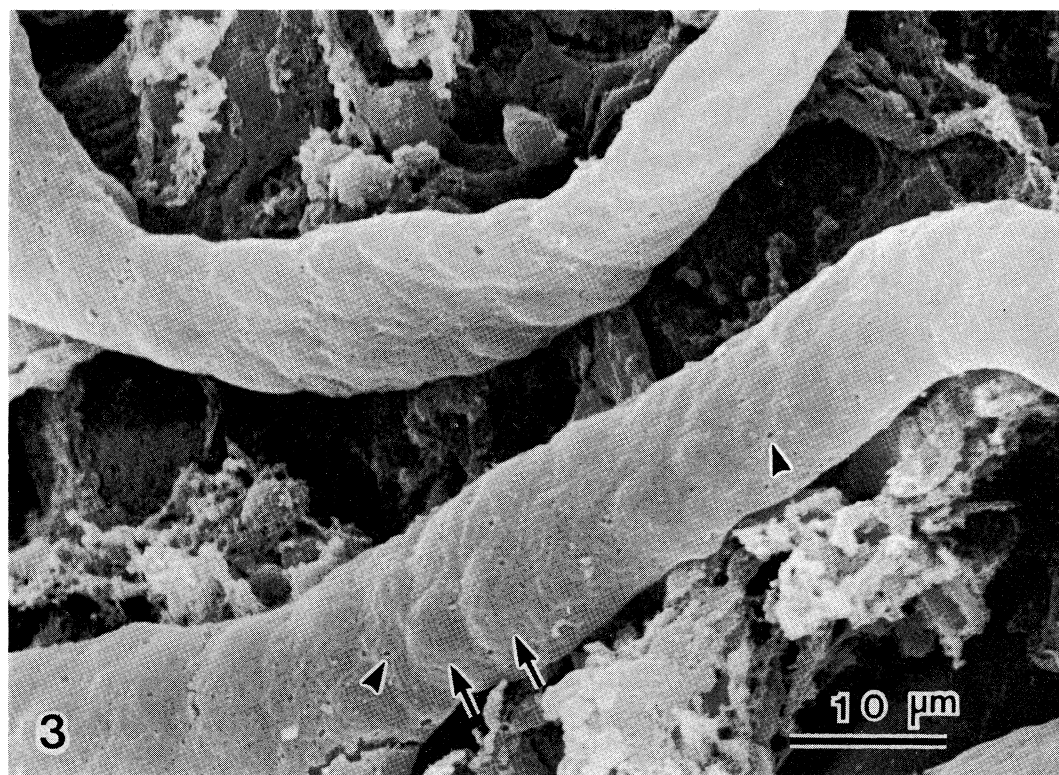


Fig. 3. The surface of bile ductules have numerous small pits (arrowheads). The mounds (arrows) which arranges in longitudinal row on the ductular surface are likely to correspond to nuclei of the cells.

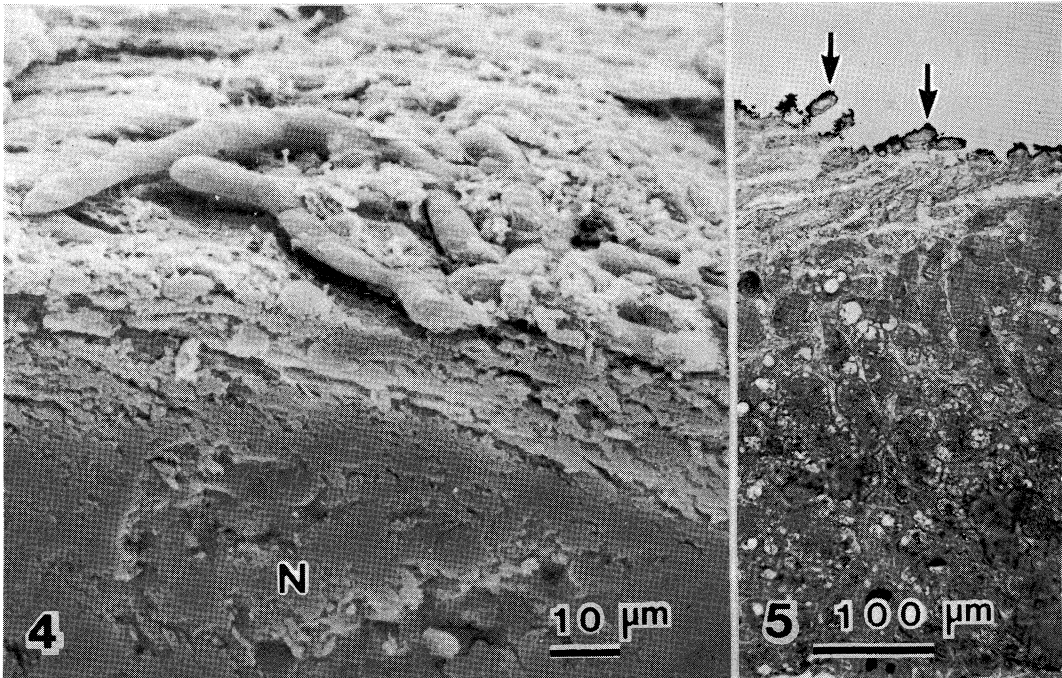


Fig. 4. The cross section of the specimen reveals that proliferated bile ductules are flattened and have their expanded ends.

Fig. 5. (case 1) Proliferated bile ductules (arrows) are found to lie on the surface of the specimen which turned black after sputter coating. Hematoxylin and eosin staining.

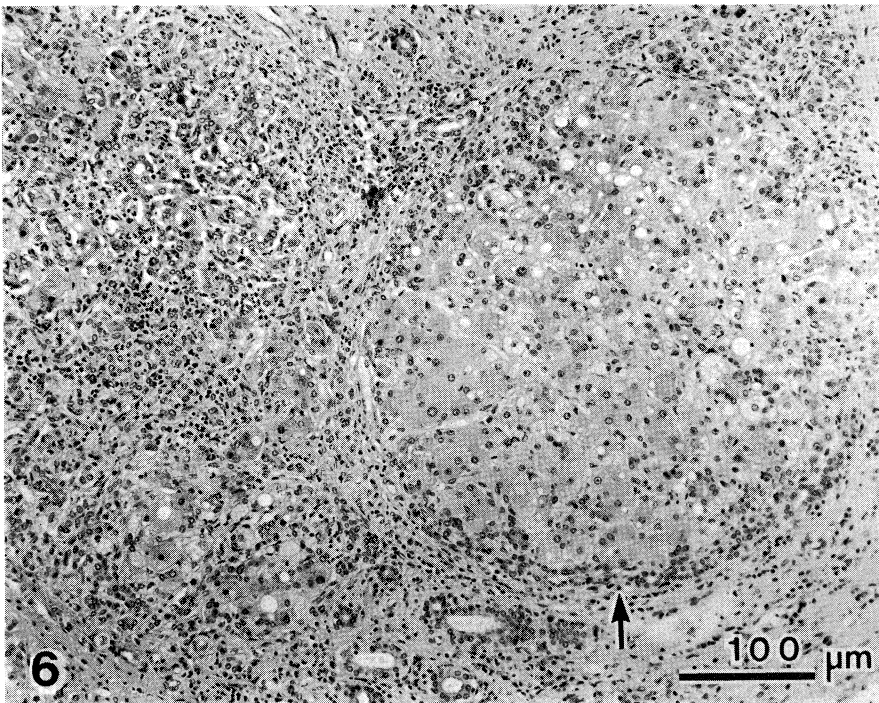


Fig. 6. (case 2) LM of the cirrhotic liver. A micronodule with proliferated bile ductules and necrosis of hepatocytes are seen. An arrow indicates proliferated bile ductules. Hematoxylin and eosin staining.

加磷酸緩衝液に約2hr 浸漬固定後、試料を5×5×2 mm のシート状の組織片に2分割した。洗滌後、症例1で利用したHCl-collagenase法に従って処理し、2分割された面を観察した。

観察対象の同定の為、症例1,2とも走査電顕で観察した試料を Ayres ら¹²⁾の方法により celloidin-paraffin 包埋し、光学顕微鏡（以下光顕と略す）標本を作製した。この標本では消化の際使用されたHClのため、核はhematoxylinに染色されなかった。未消化試料の光顕標本も作製した。

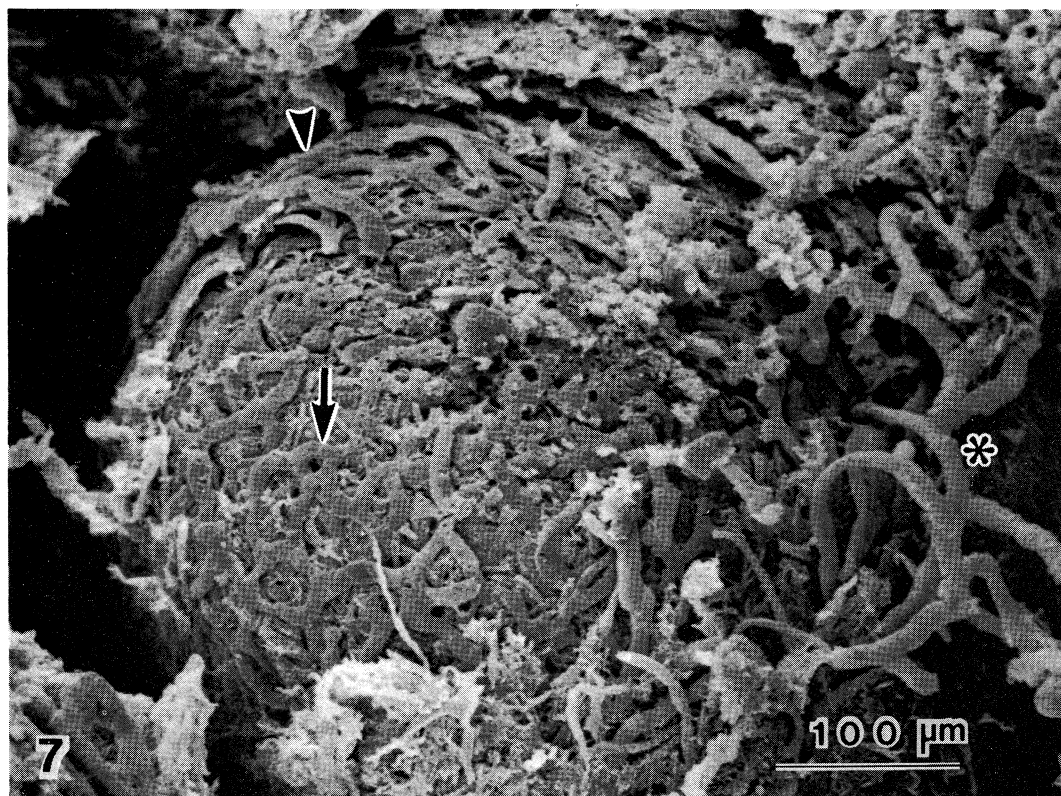
成 績

1. 症 例 1

肝被膜を含む未消化試料の光顕的観察では、被膜下の結合組織は比較的粗で、そこに増生し

た細胆管が存在していた。1 mm までの再生結節からなる比較的間質の幅の広い、一部に虚脱部が観察される micronodular liver cirrhosis であった (Fig. 1)。

被膜剥離後化学的消化法を利用した走査電顕的観察では、消化された被膜下結合組織の間に直径約10 μm で大部分屈曲蛇行し、一部直線状の管状構造物が観察された。これらの管状構造物はいろいろな角度で不規則に分枝し、末端部は一度細くなった後、球状にふくれて盲端に終わっていた (Fig. 2)。表面には0.2—0.5 μm の小陥凹が多数観察され、直径約5 μm の丘状隆起が列をなしていた (Fig. 3)。なお、小陥凹は丘状隆起の谷の部分に多かった。フロン割断をして組織の断面から観察すると (Fig. 4)、管状構造物は比較的扁平な部分が多く、結節



Figs. 7, 8, 11, 12. (case 2) SEM under use of chemical digestion after fixation a short duration.

Fig. 7. Cirrhotic nodule is covered by bile ductules which form a meshwork (arrow). Proliferated bile ductules surround the nodule (arrowhead). Proliferated bile ducts (asterisk) are seen in the outskirt of the nodules.

(Fig. 4N)の周辺部分に存在し、盲端部も明瞭にみられた。

走査電顕で観察した試料を celloidin-paraffin 包埋して作製した光顕標本では (Fig. 5), 試料の表面はスパッタ・コーティングにより黒くなり、そこに扁平な増生した細胆管 (Fig. 5 矢印) が観察された。この方法により、走査電顕で観察した上述の管状構造物が増生した細胆管であることが確認できた。

2. 症例 2

光顕的観察では、肝細胞の壊死と腺房化が著明であったが、全体的には直径 1 mm までの再生結節からなる micronodular liver cirrhosis であった。細胆管の増生も著明であった (Fig. 6)。

化学的消化法を利用した走査電顕的観察では、間質の結合組織が消化され、直径 1 mm までの球状の再生結節が三次元的に観察された。結節は網目状の扁平な管状構造物に被われ

ており (Fig. 7 矢印) その外側では、やや太い扁平な管状構造物が結節にそって、増生していた (Fig. 7 矢頭)。さらにその外側の間質部には屈曲蛇行した管状構造物が観察された (Fig. 7 星印)。Figure 8 には Figure 7 の星印に相当するような部分の拡大像を示すが、屈曲蛇行する管状構造物の 2 つの断面が観察されている。1 つは長径約 8 μm で、扁平な細胆管の断面であり (B1)、もう 1 つは径約 17 μm で円管状の小胆管のそれである (B2)。なお、細胆管と小胆管の表面の所見は症例 1 のものと同様であった。平滑筋がらせん状に並んだ径 10—15 μm の血管 (Fig. 8A) も観察された。走査電顕観察後に celloidin-paraffin 包埋した試料の光顕的観察では、症例 1 の場合と同様に試料の表面はスパッタ・コーティングにより黒くなっていたが、再生結節 (Fig. 9N) の表面には扁平な細胆管が (Fig. 9 矢頭)、そして間質には増生した細胆管と小胆管が標本の表面にみられ

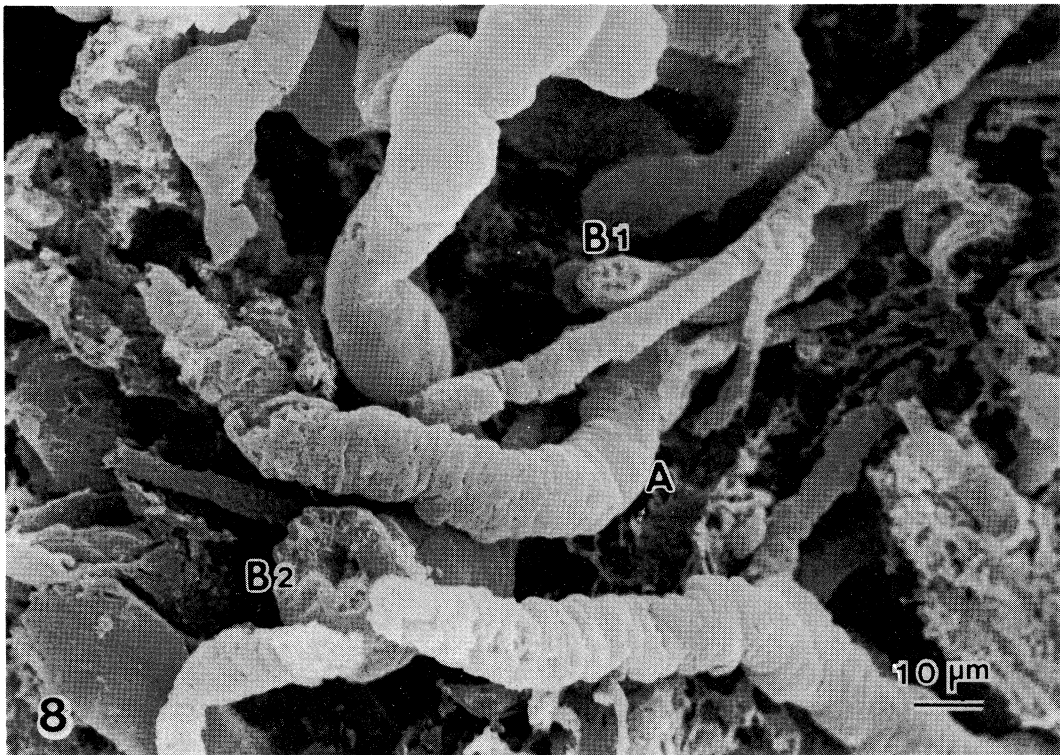
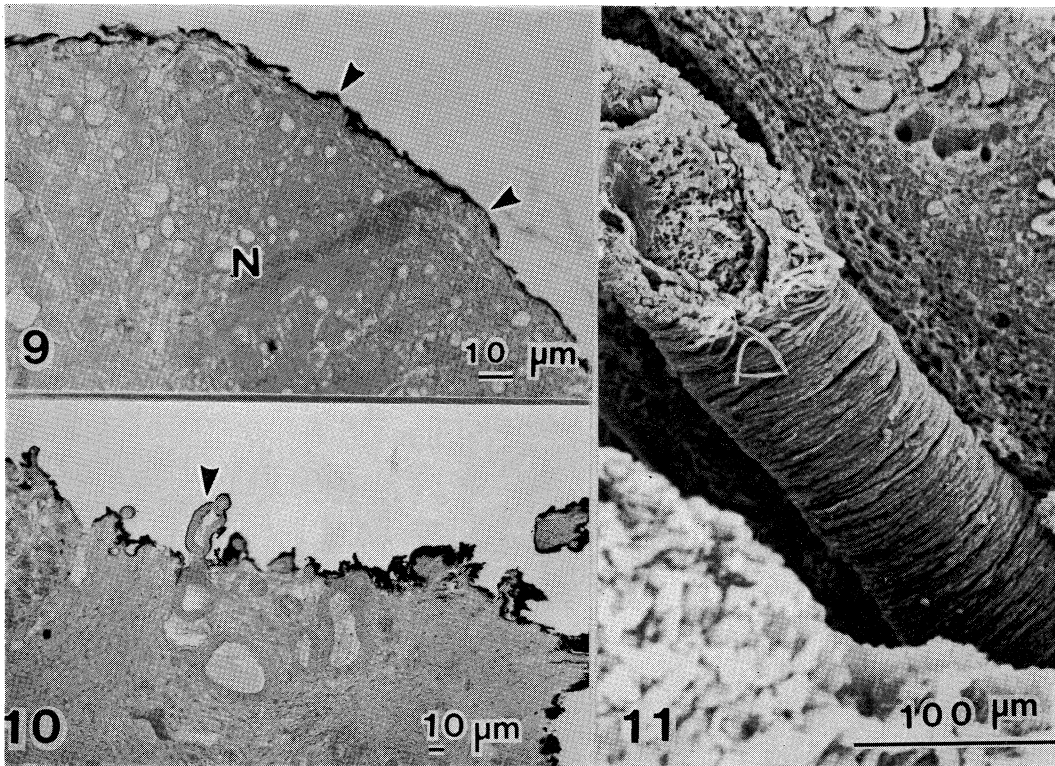


Fig. 8. High magnification of an area of outskirts of the nodule. Proliferated bile ductule (B1) and duct (B2) are cross sectioned. Small arteries are also observed.



Figs. 9, 10. (case 2) The surface of the specimen turned black after sputter coating. Hematoxylin and eosin staining.

Fig. 9. Bile ductules (arrowheads) lie on the cirrhotic nodule.

Fig. 10. Proliferated bile ductules and ducts (arrowhead) are seen in the broad septa of the cirrhotic liver.

Fig. 11. Smooth muscle cells of a branch of a hepatic artery are densely packed in a circular fashion.

た(**Fig. 10** 矢頭)。したがって、走査電顕でみられた、再生結節を被う網目状の管状構造物は細胆管であり、間質の屈曲蛇行した管状構造物は増生した細胆管や小胆管であることが確認できた。

間質には直線状に走行し、その壁には細い輪状の平滑筋細胞が密に並んでいる。径約 $110 \mu\text{m}$ の太い血管も観察できた(**Fig. 11**)。Figure 12 には Figure 11 に示した血管と同様な血管の表面に観察された毛細血管を示した。この毛細血管は太い血管の平滑筋細胞を栄養する血管と考えられ、その周皮細胞まで観察できる。

考 案

肝硬変の電子顕微鏡的研究は多くの研究者により透過型電子顕微鏡(以下透過電顕と略す)

と走査電顕を用いおこなわれている。しかし、化学的消化法を利用した走査電顕による観察は全くおこなわれていない。肝硬変の形態学的特徴は線維性隔壁である間質にとり囲まれた再生結節がびまん性に存在することであり、この間質には種々の変化を受けた血管系や、増生した細胆管あるいは偽胆管と呼ばれる胆管系の細胞などが、浸潤細胞とともに主として膠原線維からなる結合組織の中に存在している。この間質にある胆管系と血管系の病理形態を明らかにすることは、肝硬変の重要な病態である黄疸と肝循環障害の面からみても意義あることと考えられる。一方、化学的消化法を応用して生物試料を走査電顕で観察すると、結合組織中に埋没している細胞や組織の非自由表面を三次元的に詳細に観察できる。そこで、この方法を利用して

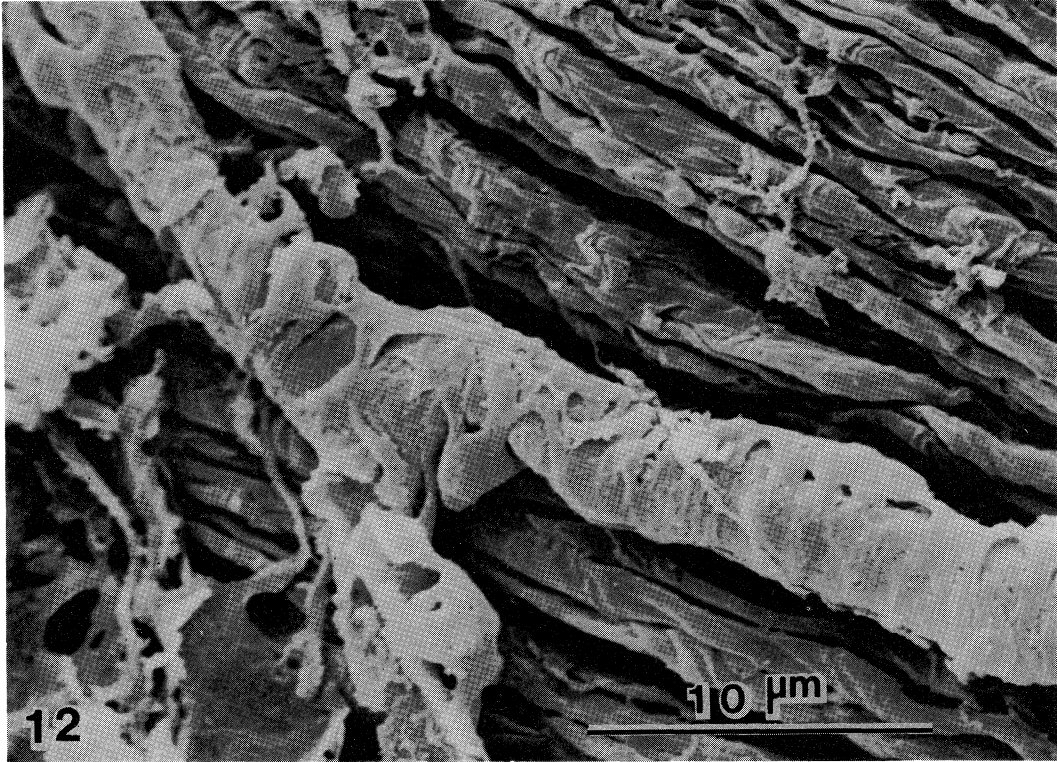


Fig. 12. High magnification of a branch of a hepatic artery. Pericytes of capillary which nourish the smooth muscle cells are observed clearly.

肝硬変の胆管系と血管系の観察を試みた。

著者は、ヒト正常肝の被膜を剝離して化学的消化法をおこない走査電顕で観察すると、肝実質表面の微細構造を三次元的に把握できることを見出し、2, 3の新知見を報告した。¹⁰⁾ 一部に虚脱部を伴う micronodular liver cirrhosis の症例1 (Fig. 1)に、この方法を応用して観察した結果、被膜下の消化された結合組織の間に、Ayres らの方法により確認できた (Fig. 4) 細胆管が増生している状態が三次元的に観察された (Fig. 2)。Masuko ら¹³⁾ は硬変肝の胆管鑄型標本と透徹標本で増生した内腔が $15 \mu\text{m}$ 以上の胆管を光顕レベルで観察し、この胆管は屈曲蛇行し、いくつにも分枝していると報告している。症例1で著者が観察したのは外径約 $10 \mu\text{m}$ の増生した細胆管であった。Figure 2のごとく肝表面から観察すると、増生した細胆管が一部では直線状であるが、大部分が不規則に分枝しながら屈曲蛇行して走行する状態や、

末端部が一度細くなった後、球状にふくらんで盲端に終ることが明らかになった。割断した標本でこのような細胆管を側面から観察すると (Fig. 4)、大部分が扁平であることが明らかになった。このように化学的消化法による走査電顕の観察では増生した細胆管の走向が三次元的に認識できるのみならず、非自由表面を詳細に観察することもできる。増生した細胆管の表面には径約 $5 \mu\text{m}$ の丘状隆起が列をなして観察された (Fig. 3) が、これは細胆管細胞の核の位置に相当すると考えられる。また、表面に多数観察された $0.2-0.5 \mu\text{m}$ の小陥凹は、佐々木¹⁴⁾ が透過電顕で増生した細胆管細胞の基底膜面に観察している pinocytic vesicle に相当するとは考え難く、丘状隆起の谷の所に多いことから、基底膜面の細胆管細胞間隙の部で、基底膜が部分的に消化されて形成されたものと考えられる。

症例1では肝表面の被膜を剝離後、被膜下組

織を消化し観察したが、症例2では肝内部の組織を化学的に消化し観察した。この症例は肝細胞の壊死が著明で、細胆管の増生も著明であった (Fig. 6)。短時間固定した試料を2分割後、HCl-collagenase 法で処理し、分割面を走査電顕で観察すると、球状の再生結節の表面およびその近くの消化をまぬがれた胆管や血管を非自由表面から観察できた。Figure 7 の再生結節は Ayres らの方法で確認できた (Fig. 9) 細胆管で網目状に被われている。このような、再生結節を被う細胆管網を観察した報告はないが、本症例が肝細胞壊死が著明な肝硬変であることによる、特殊な所見かも知れない。しかし、Figure 6 の光顕写真の矢印で示した再生結節に接して見られる細胆管の著明な増生と合わせ考え興味ある所見である。再生結節の外側には細胆管が結節にそって増生しており (Fig. 7 矢頭)、さらにその外側の間質には Ayres らの方法で確認できた (Fig. 10) 増生した細胆管と小胆管が観察された (Fig. 7 星印)。この様な所を拡大を上げて観察したものが Figure 8 であるが小胆管と細胆管は屈曲蛇行しており、その表面の所見は症例1のものと同様であった。また Figure 8 で示したように、細胆管 (B1) や小胆管 (B2) の断面が明瞭に観察されるものもあった。

症例2では間質に存在する血管の非自由表面が観察できた。上原ら¹⁵⁾は、化学的消化法を利用して血管壁の非自由表面を観察し、動脈枝で

は平滑筋細胞がよく発達して密に配列しており、静脈枝の筋層は菲薄で、長いリボン状の平滑筋細胞からなり、隣接する平滑筋細胞は数 μm の間隙で隔てられ微細な側方突起で橋渡しされていると述べている。症例2で観察された毛細血管以外の血管は、上原らの所見から考えて、動脈枝のみであった (Figs. 8, 11)。門脈枝や肝静脈枝は、その理由は明らかでないが観察することができなかった。Figure 12 には、平滑筋細胞が輪状に密に配列した太い動脈枝の壁の平滑筋細胞を栄養する毛細血管を示したが、ここではその周皮細胞まで観察されている。山本ら³⁾はヒト硬変肝の血管鋳型標本を走査電顕で観察して報告しているが、肝内血管を非自由表面から三次元的に観察できる本法をあわせおこなうと、肝硬変の重要な病態の1つである肝循環障害の病態生理を、形態学の面より明らかにすることができると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った小林敏成教授に深甚なる謝意を表します。

また、剖検肝を提供して頂き、懇切な御助言を頂いた川崎医科大学人体病理学教室伊藤慈秀教授に深謝いたします。

技術的援助を頂いた川崎医科大学組織電子顕微鏡センター、上平賢三氏、須田泰司氏、吉田陽子氏、若林かずみ氏に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第16回日本臨床電子顕微鏡学会、第19回日本肝臓学会西部会において発表した。

文 献

- 1) 森 亘, 町並陸生: 肝硬変. 飯島宗一編: 現代病理学大系13B. 東京, 中山書店. 1985, p. 3
- 2) Itoshima, T.: Scanning electron microscopic observation of liver biopsy specimens of liver cirrhosis. *J. Clin. Electron Microsc.* 9: 364-365, 1976
- 3) Yoshino, K.: Scanning electron microscopy of liver of primary biliary cirrhosis. *Scan. Electron Microsc.* III: 697-704, 1979
- 4) Yamamoto, K., Kobayashi, T. and Phillips, M. J.: Perinodular arteriolar plexus in liver cirrhosis. *Scanning electron microscopy of microvascular cast.* *Liver* 4: 50-54, 1984
- 5) Papa, C. M. and Farber B. F.: Direct scanning electron microscopy at human skin. *Arch. Dermatol.* 104: 262-270, 1971
- 6) Evan, A. P., Dail, W. G., Dammrose, D. and Palmer, C.: Scanning electron microscopy of cell surfaces following removal of extracellular material. *Anat. Rec.* 185: 433-446, 1976

- 7) Murakami, M., Sugita, A., Shimada, T. and Nakamura, K.: Surface view of pericytes on the retinal capillary in rabbits revealed by scanning electron microscopy. Arch. Histol. Jpn. 42: 297—303, 1979
- 8) 上原康生: 結合組織除去法による非遊離細胞表面の観察法. 電子顕微鏡 16: 40—46, 1981
- 9) 小林和司: 化学的消化法を用いた肝の走査型電子顕微鏡的観察—正常ラット肝表面の観察—. 日本臨床電子顕微鏡学会誌 投稿中
- 10) 小林和司: 化学的消化法を用いた肝の走査型電子顕微鏡的観察—正常ヒト肝表面の観察—. 川崎医学会誌 11(4): 434—442, 1985
- 11) 田中敬一: 第7回医学生物学走査電顕シンポジウム記録, p. 5, 1978
- 12) Ayres, A., Allen J. M. and Williams, A. E.: A method for obtaining conventional histological sections from specimens after examination by scanning electron microscopy. J. Microsc. 93: 247—251, 1971
- 13) Masuko, K., Rubin, E. and Popper, H.: Proliferation of bile ducts in cirrhosis. Arch. Pathol. 78: 421—431, 1964
- 14) 佐々木 博: 胆管系上皮細胞の微細構造—特に増殖時における形態と機能について. 最新医学 20: 695—710, 1965
- 15) 上原康生, 藤原 隆: 血管壁の構造. わかりやすい血管の話. 東京, メディカルトリビューン社. 1982, p. 29