

化学的消化法を用いた肝の走査型 電子顕微鏡的研究

—正常ヒト肝表面の観察—

川崎医科大学 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 with Use of the Chemical Digestion Method —Observation of the Surface of Normal Human Liver—

Kazushi Kobayashi

Department of Medicine, Kawasaki Hospital
Kawasaki Medical School

(Accepted on October 31, 1985)

化学的消化法 (HCl-collagenase 法) と被膜を用手剥離する方法, およびこの2方法の組合せである被膜剥離後化学的消化法を利用して, 正常ヒト肝表面を走査電顕で観察し, 次のような結論をえた.

1. ヒト肝被膜は, HCl-collagenase 法では中皮細胞と基底膜のみが消化された. 固定後肝被膜を用手剥離すると, 被膜の各層で剥離されるが, 肝実質表面は露出できなかった.
2. 被膜剥離後化学的消化法では, 肝被膜下層に存在する門脈枝, 肝動脈枝および自律神経線維や, 肝被膜と肝実質の境界部を観察することができた. 本法により類洞が集合する小葉中心部では, 一部の類洞が小孔を持たない血管として被膜下へ出現して, その直下に存在する中心静脈に流入することと, 類洞が所々で小孔を有さない壁を直接被膜下に露出していることが明らかになった.

This study reports scanning electron microscopic features of the capsule and the superficial parenchyma of normal human liver. The materials obtained in autopsy were treated with chemical digestion (HCl-collagenase method), mechanical capsule stripping and a combination of these methods.

1. In the human liver capsule, the mesothelial cells and basement membrane were digested by HCl-collagenase with the connective tissue left behind. Mechanical stripping of the capsule failed to visualize the parenchymal surface.

2. Chemical digestion after mechanical stripping of the liver capsule made it possible to observe portal veins, hepatic arteries and autonomic nerve fibers. The border between the capsule and parenchyma was well observed. It was revealed by this method that some of the sinusoids were exposed in the subcapsular space and gathered in the central part of the lobule. No fenestration was noted in any of the sinusoids in the subcapsular space of the central part of the lobule or the surface of the liver parenchyma.

Key Words ① Human ② Liver surface ③ Scanning electron microscopy
④ Chemical digestion method ⑤ Capsule stripping

緒 言

走査型電子顕微鏡（以下走査電顕と略す）による生物試料の観察は細胞や組織の詳細な三次元的構造を明らかにしてきた。しかし、体表、体腔や管腔などの遊離表面や断面の観察に限られており、結合組織中に埋没している多くの細胞や組織の表面、すなわち非自由表面は観察の対象にはされていない。近年、化学的に結合組織成分を消化し、細胞や組織の非自由表面を走査電顕で観察する試みがおこなわれ、種類の組織で非自由表面の三次元的構築に関し、新知見が得られている。^{1)~4)} 著者も化学的消化法と肝被膜を上手剥離する方法（以下被膜剥離法と呼ぶ）を利用して正常ラットの肝表面を走査電顕で観察し、いくつかの新知見を発表した。⁵⁾ 今回は正常ヒト肝表面を同様の方法で観察し、検討した結果を報告する。

肝表面は中皮細胞と基底膜からなる腹膜で被われ、それに密着して肝固有の被膜である Glisson's capsule が存在する。肝固有の被膜とその表面を被っている腹膜とを合わせて肝被膜と呼ぶのが一般であり、⁶⁾ 本論文でもこの名称を使用する。

材料および方法

材料は 36歳の男性（多発性骨髄腫）と 65歳の女性（肺炎）の剖検肝を使用した。両者とも肝機能検査では異常なく、肝は肉眼のおよび光学顕微鏡（以下光顕と略す）的にも正常であった。

方法は、著者の正常ラット肝表面に関する既

報の論文とほぼ同様であり、ここでは簡潔に記述する。剖検肝の肝表面を含むシート状の小組織片（5×5×2mm）を切り出し、ただちに 2% グルタルアルデヒド加磷酸緩衝液で 3—24hr 浸漬固定した。0.1M 磷酸緩衝液で洗滌し、以下の 4 方法で走査電顕標本を作製した。肝被膜を含む光学顕微鏡（以下光顕と略す）標本も作製した。

1. 未消化肝表面標本

洗滌した小組織片を、エタノール列で脱水し、酢酸イソアミルに浸漬後、臨界点乾燥、Au-Pd スパッタ・コーティングし、走査電顕にて、加速電圧 15—20 kV で鏡検した。

2. HCl-collagenase 法¹⁾

洗滌した小組織を 8N の HCl に 60°C で 50—70min 浸漬し、洗滌後 10mg/10ml collagenase (Worthington, type II) 加磷酸緩衝液に 37°C で 6—12 hr 浸漬した。洗滌後、エタノール列脱水し、1 と同様の方法で観察した。

3. 被膜剥離法

浸漬固定された肝の被膜を上手剥離し、1 と同様に未消化標本として観察した。

4. 被膜剥離後化学的消化法

3 の方法で被膜が剥離された小組織片を HCl-collagenase 法に従って処理した。

成 績

光顕標本の観察では、肝表面は一層の中皮細胞で被われ、その下に結合組織が存在した。平滑筋細胞が明瞭でない赤血球を含む太い静脈系

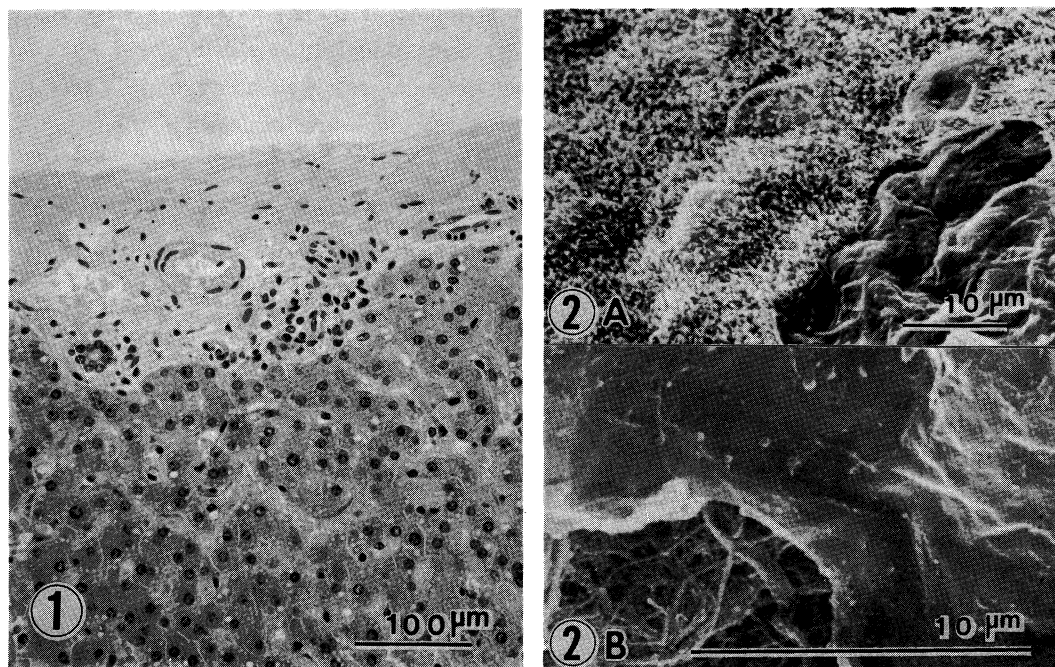


Fig. 1. Light micrograph of the normal human liver. Liver surface has two layers consisting of mesothelial cells and connective tissue respectively. Portal veins, hepatic arteries and small bile ducts gather in a depressed part of liver parenchyma. Hematoxylin and eosin staining.

Fig. 2A. Numerous microvilli project on the surface of the mesothelial cells. A part of the mesothelial lining is stripped and its basement membrane is visible.

Fig. 2B. Collagen fiber bundles are seen in some place where a part of the basement membrane is stripped.

の門脈枝と考えられる血管と肝動脈枝および小胆管は、肝実質が陥凹して観察されるところに集合して存在していた (**Fig. 1**)。

1. 未消化肝表面標本

多数の微絨毛をもつ中皮細胞が観察されたが剖検時の操作のために、一部では中皮細胞が剝離され膠原線維束を被うように基底膜が露出していた (**Fig. 2A**)。また、基底膜も剝離されて膠原線維束が露出したところもあった (**Fig. 2B**)。

2. HCl-collagenase 法

中皮細胞と基底膜が消化され、不規則な細い線維網とその下の太い膠原線維束が波状に観察された (**Fig. 3**)。写真の小球状および不定形の凝集物は消化と水洗のための人工産物と考えられる。処理時間を延長して消化をはかった

が、これ以上の消化は不可能であった。

3. 被膜剝離法

肝被膜を用手剝離して観察すると、被膜のいろいろな層で剝離されるためか、一定の構造物が観察されることは少なく、**Figure 4** に、その一部の所見を示した。不規則に走行する線維や蛇行する線維束、細く比較的直線状に走る弾性線維、そして不定形の膜状物などが観察される (**Fig. 4**)。肝細胞が直接観察されることはなかった。

4. 被膜剝離後化学的消化法

肝実質のほとんどの場所で、それを被う薄い膜状の線維層が残存し、脈管系が未消化の線維とともに観察された (**Fig. 5**)。 **Figure 5** の矢印の部分の倍率をあげて観察すると、壁が比較的平滑な径約 $25 \mu\text{m}$ の脈管と径約 $15 \mu\text{m}$ で壁

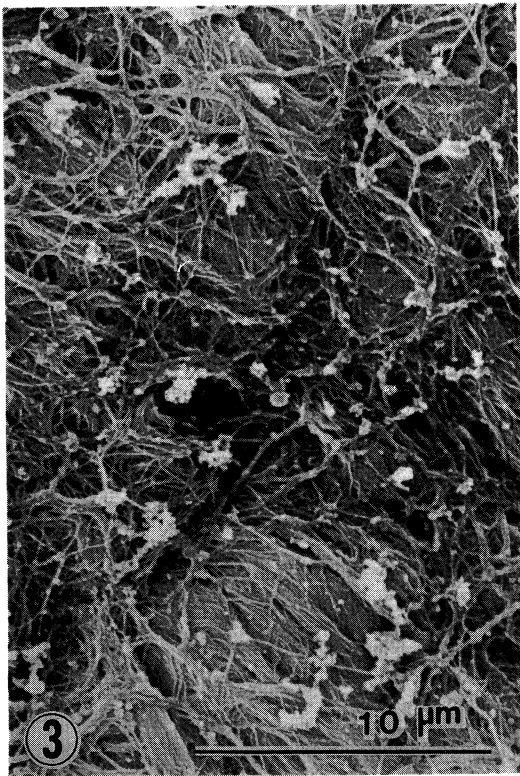


Fig. 3. Scanning electron micrograph (SEM) with use of HCl-collagenase. Mesothelial cells and basement membrane are well digested. A thin meshy layer of fine collagen fibers and a deep layer of coarse bundles of collagen are visible.

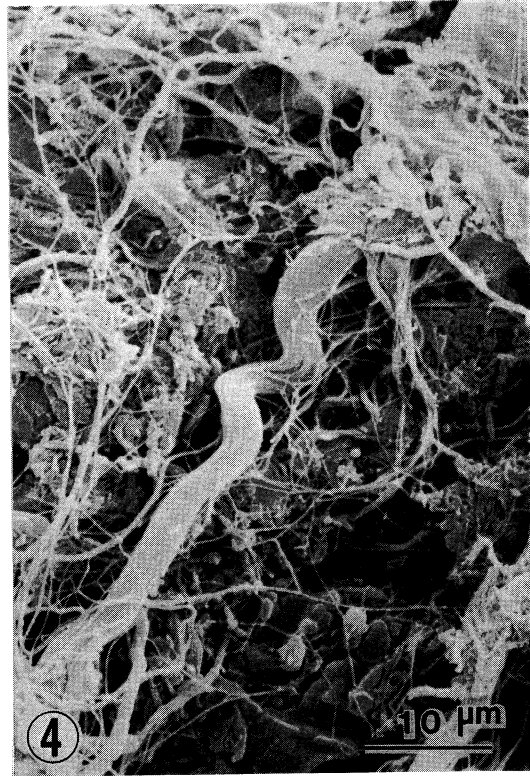


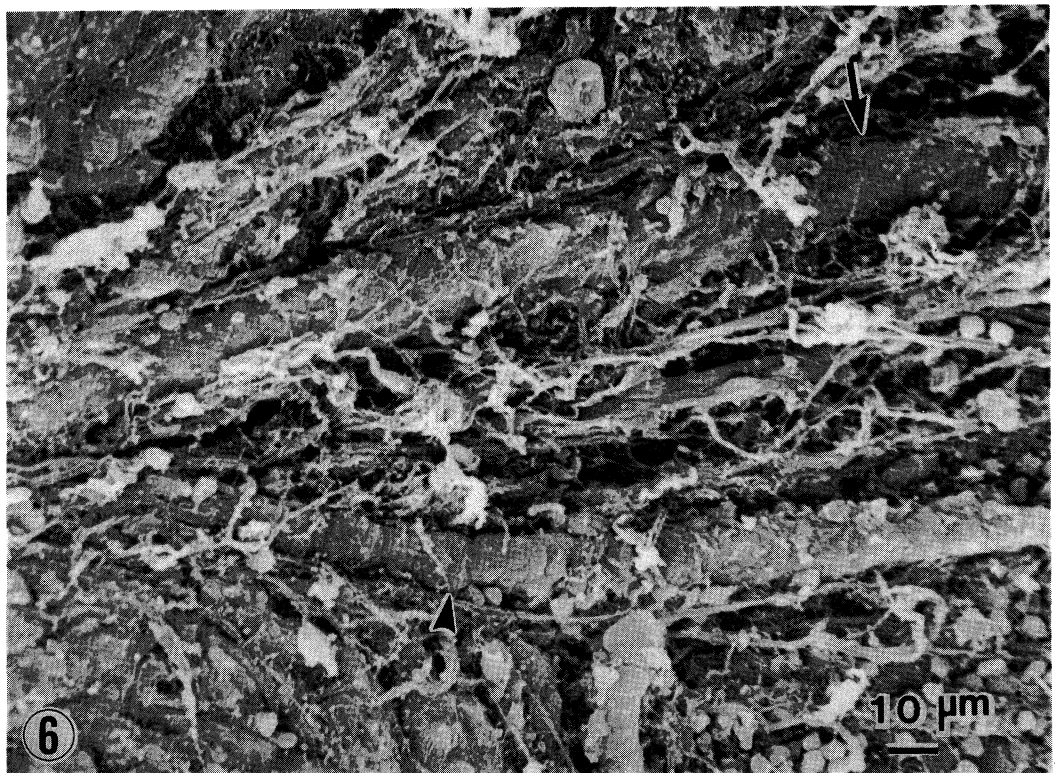
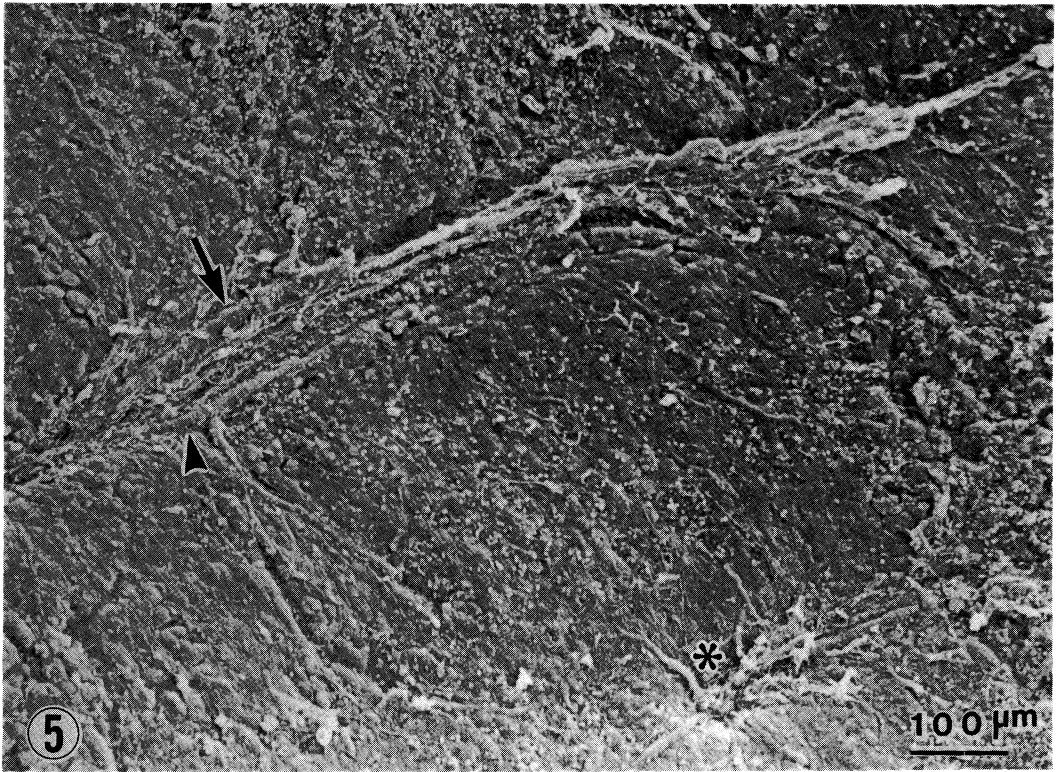
Fig. 4. SEM after mechanical stripping of the capsule. Collagen fibers and elastic fibers remain intact.

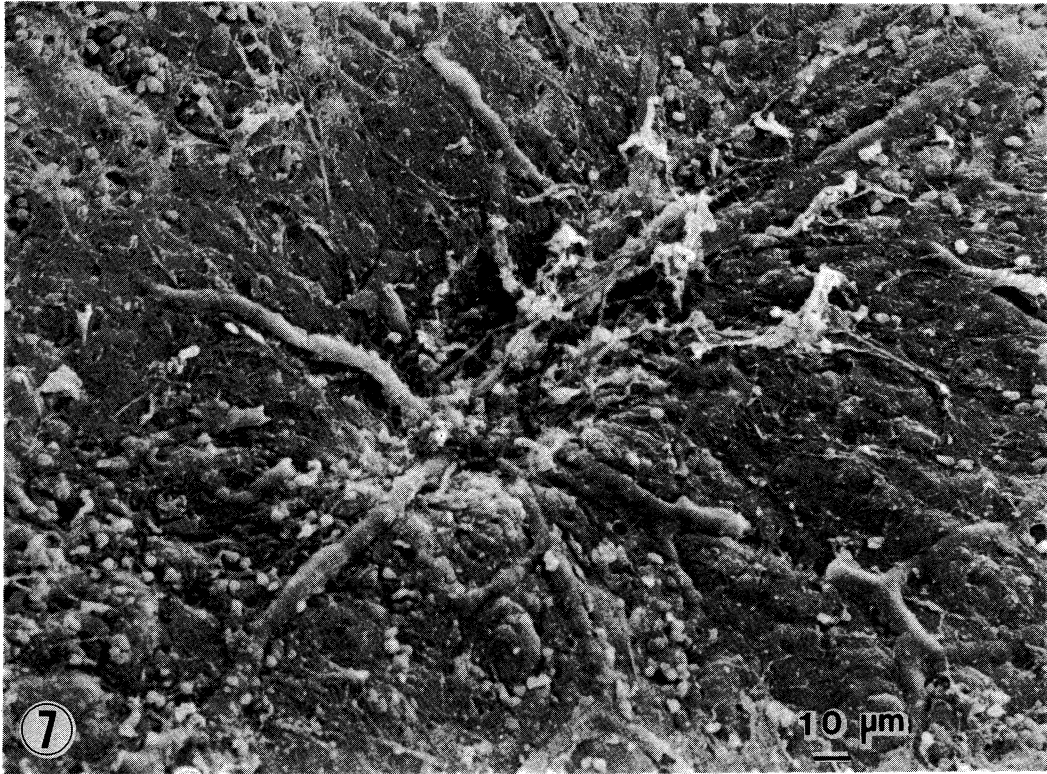
がらせん状に隆起した脈管が、残存した線維性結合組織中にみられた (Fig. 6)。Figure 5 の星印の部分と同様に倍率をあげて観察すると、薄い膜状の線維層に被われた肝実質の肝細胞索間から出現し、わずかな線維が存在する陥凹部に集中して走行する脈管が観察された。この脈管は径約 $10\mu\text{m}$ で壁が平滑であった (Fig. 7)。矢印で示した脈管系と星印で示した部分の間隔はほぼ 0.5mm であった (Fig. 5)。消化が十分で、肝細胞や肝細胞索が露出したところでは (Fig. 8)、矢印で示すように、被膜下の肝細胞索間を網目状に走行する表面平滑な径約 $10\mu\text{m}$ の脈管が観察された。脈管腔が露出したところでは、赤血球がその中に観察される。また、別の標本では、並んで走っていた径約 $30\mu\text{m}$ と径約 $15\mu\text{m}$ の脈管がともに剝離されたと考え

られる陥凹部にそって、径約 $5\mu\text{m}$ の数本の表面平滑な円柱がゆるくねじれるように集合して観察された (Fig. 9)。裸の軸索からなる自律神経線維と考えられる。

考 案

初期の化学的消化法を利用した生物試料の走査電顕による観察は、未固定材料を用いておこなわれたが、組織損傷が著しく、再現性に乏しいため汎用されなかった。^{7)~9)}しかし、1976年に Evan¹⁾らが固定をおこなってから膠原線維と基底膜をHClによる加水分解とcollagenaseによる消化によって除去する、HCl-collagenase法を開発して以来、化学的消化法の有用性が認められ、いろいろな化学的消化法を利用した生





Figs. 5~9. SEM under treatment of chemical digestion after liver capsule stripping.

Fig. 5. Thin connective tissue are still visible on most parts of superficial parenchyma. A portal vein (arrow), a hepatic artery (arrowhead) and a central part of lobule (asterisk) are seen.

Fig. 6. High magnification of the portal vein and the hepatic artery seen in Fig. 5. The portal vein (arrow) has relatively smooth adventitial surface. The hepatic artery is smaller in diameter than the portal vein and appears beads.

Fig. 7. High magnification of the central part of lobule seen in Fig. 5. Some of sinusoids are exposed in the subcapsular space and gather in the central part of lobule. No fenestration is present in these sinusoids.

物試料の走査電顕による観察がおこなわれている。^{2)~4)} 著者は,⁵⁾ 化学的消化法を用いた正常ラット肝表面の走査電顕的観察をおこない、固定後に消化をおこなう方がすぐれていることと、trypsin-HCl法より HCl-collagenase法が、より消化が十分おこなわれることを明らかにした。ヒト肝被膜はラットのものよりも厚く、組織消化が困難であると考え、消化力が強い HCl-collagenase法をおこなった。

肝表面は微絨毛を有する一層の中皮細胞で被われ、その下に基底膜が存在する (**Fig. 2AB**)。

HCl-collagenase法をおこなって観察すると不規則な細い線維網とその下の太い膠原線維束が観察されるのみで (**Fig. 3**)、長時間消化をはかっても、より深部の構造物は露出できなかった。用手による被膜剥離法では、線維や膜状構造物のみが観察され (**Fig. 4**)、本法でも肝実質近くの観察は不可能であった。そこで肝被膜剥離をおこなって、HCl-collagenase法で消化すると、肝実質近くの観察がおこなえた (**Fig. 5**)。

正常ヒト肝表面血管に関する、山本ら¹⁰⁾の

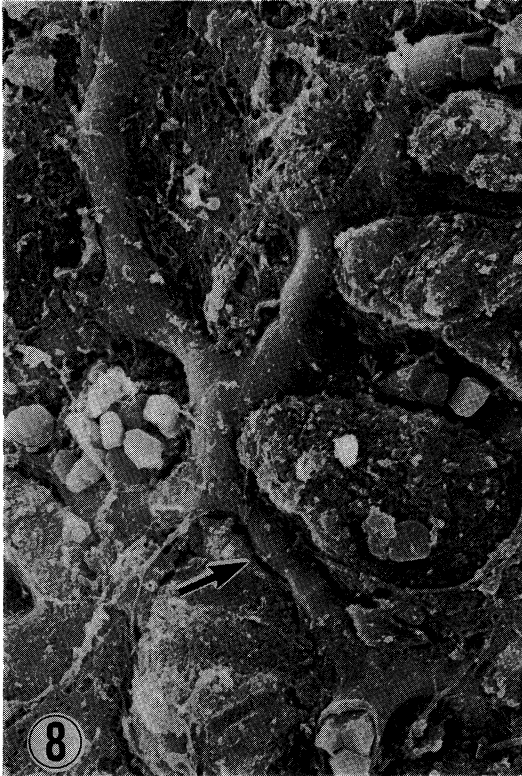


Fig. 8. Sinusoids which form a meshwork (arrow) among cell plates are exposed in the subcapsular space.



Fig. 9. Several axons of autonomic nerve fiber are observed between two depressions (arrow and arrowhead) which are produced by stripping of a portal vein and a hepatic artery.

おこなった剖検肝の門脈および肝動脈よりの色素注入標本の所見では、門脈域から肝表面に出現する門脈枝は動脈枝を伴っており、門脈枝の方が動脈枝より太いとしている。被膜を含む肝の光顕所見でも、壁が薄い門脈枝は平滑筋細胞の発達した動脈枝より太く、ともに肝実質の陥凹部に存在している (**Fig. 1**)。 **Figure 5** の矢印の部の2本の脈管で、径約 $25\mu\text{m}$ と太い方の脈管は比較的表面平滑で、それに伴走する径約 $15\mu\text{m}$ と細い方の脈管壁はらせん状に隆起しており、平滑筋細胞の発達した終末細動脈と考えられる (**Fig. 7**)。肝被膜下で実質をとり囲むように、結合組織とともに存在する、この2本の脈管は、上述の山本らの報告とあわせ考えて、門脈域から肝表面に出現する門脈枝と、それに伴走する動脈枝と断定できる。この門脈域

から約 0.5mm のところにある **Figure 5** の星印の部位はヒト肝小葉が約 1mm 大であることから、その中心部にあたる。山本らは¹⁰⁾ 肝血管鑄型標本を表面から走査電顕で観察し、肝表面の門脈枝は類洞へ注ぎ、類洞は小葉中心部に集合して表面直下の中心静脈へ注ぐことを示している。著者の観察で小葉中心の陥凹部に集中する表面平滑な脈管は、肝細胞索間から出現し、肝実質を被う薄い線維膜の上を走行しているが、その径は約 $10\mu\text{m}$ と類洞のそれに一致していた (**Fig. 7**)。 **Figure 5** の星印の部位は、山本らの示した類洞が集合する小葉中心部にあたり、小葉中心部に集合する類洞の一部のものは被膜下に露出した後、その下にある中心静脈に流入することが、本法で明らかになった。

被膜剝離後化学的消化法で肝実質を完全に露出することができた部位には、肝細胞索間を網目状に走行する血管が観察されるところがあり、この血管も径約10 μ mで類洞の径に一致していた (Fig. 8). 山本らの肝血管鋳型標本の観察でも、類洞は肝表面で網目状の走行を示すことから Figure 8 の血管は類洞であると考えられる。類洞が肝細胞に被われることなく、肝被膜下の組織間隙に直接、面して走行している部位があることは、谷川¹¹⁾ や江村¹²⁾ により透過型電子顕微鏡 (以下透過電顕と略す) で観察され報告されている。類洞が肝実質表面で露出して観察された上述の部位 (Fig. 8) が、それに相当するものと考えられる。肝実質内部の類洞は小孔を有することがその特長であるが、¹³⁾ 被膜下に露出して観察されたところでは表面平滑で小孔は見出せなかった。基底膜で被われているために観察されなかったとも考えられるが、小孔の生理的存在意義の面から考えても、被膜下の露出部分では小孔は存在しないとする

方が妥当であろう。

肝の神経系の透過電顕による観察では、^{11), 14)} 門脈域の結合組織中に数個の軸索を含む無髓の自律神経線維が報告されており、特に肝動脈枝の近くで多いとされている。著者が観察した裸の軸索を数個含む自律神経線維も、門脈と肝動脈が試料作製時に剝離脱落したためにできたと考えられる溝状陥凹部にそって観察された。

上述のように、被膜剝離後化学的消化法を応用すると、肝被膜下の肝実質表面の三次元的構造を走査電顕で観察できることが明らかになった。

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上平正子氏、増地智子氏に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第15回日本臨床電子顕微鏡学会において発表した。

文 献

- 1) Evan, A. P., Dail, W. G., Dammrose, D. and Palmer, C.: Scanning electron microscopy of cell surface following removal of extracellular material. *Anat. Rec.* 185: 433—446, 1976
- 2) 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
- 3) Canale, E., Campbell, G. R., Uehara, Y., Fujiwara, T. and Smolich, J. J.: Sheep cardiac Purkinje fibers: Configuration changes during the cardiac cycle. *Cell Tissue Res.* 232: 97—110, 1983
- 4) Baluk, P., Fujiwara, T. and Matsuda, S.: The fine structure of the ganglia of the guinea-pig trachea. *Cell Tissue Res.* 239: 51—60, 1985
- 5) 小林和司: 化学的消化法を用いた肝の走査型電子顕微鏡—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*
- 6) 鈎 スミ子: 肝リンパ系. *脈管学* 14: 489—493, 1974
- 7) Finlay, J. B., Hunter, J. A. A. and Steven, F. S.: Preparation of human skin for high-resolution scanning electron microscopy using phosphate buffered crude bacterial α -amylase. *J. Microsc.* 93: 73—76, 1970
- 8) Spencer, D. S. and Lieberman, A. P.: Scanning electron microscopy of isolated peripheral nerve fibers. *Z. Zellforsch.* 119: 534—551, 1971
- 9) Sommerlad, B. C. and Creasey, J. M.: A technique for preparing human dermal and scar specimens for scanning electron microscopy. *J. Microsc.* 103: 369—376, 1975
- 10) 山本和秀, 石川 哲, 迫田秀治, 大村晃一, 山本武彦, 有正修道, 小林敏成, 神野健二: 肝表面血管構築の検討—ヒト正常肝及びラット肝について—. *Endoscopy* 24: 251—257, 1982

- 11) Tanikawa, K.: Ultrastructural aspects of the liver and its diseases. Tokyo, Igakushoin. 1968
- 12) 江村武志: 肝表面の微細構造. 日消誌 64: 1209—1220, 1967
- 13) Wisse, E.: An electron microscopic study of the fenestrated endothelium lining of rat liver sinusoid. J. Ultrastruct. Res. 31: 125—150, 1970
- 14) Yamada, E.: Some observations on the nerve terminal on the liver parenchymal cell of the mouse as revealed by electron microscopy. Fol. Anat. Jap. 40: 663—677, 1965