

ブタの肝小葉の経時的な構造変化

美名口 順・山本 かつおる・植田 弘美*・竹花 一成

Temporal Structure Changes of Swine Hepatic Lobules

Jun A. MINAGUCHI, Kaoru YAMAMOTO, Hiromi UEDA* and Kazushige TAKEHANA
(Accepted 15 January 2013)

緒 論

肝臓は動物の体内で最大の外分泌腺で、構造的最低単位である多角形の肝小葉の集合である。肝小葉の中心には中心静脈が位置し、ここから放射状に肝細胞が配列し肝細胞板を形成する。肝細胞板の間には、洞様毛細血管（類洞）が吻合しながら走行し、肝小葉の間は小葉間結合組織によって占められ、肝小葉の頂点付近には小葉間静脈と小葉間動脈および小葉間胆管（肝三つ組）が分布する。肝臓全体を覆う被膜は肝門付近から肝実質内へと入り、小葉間結合組織に連続している^[1,8]。

しかし、重度の肝硬変ではこのような肝臓組織の基本構造が崩れ、線維性結合組織の増加と肝小葉の再編成がなされる。この際、小葉間結合組織が異常に増加し、さらには小葉中心部と小葉間を結ぶ線に沿って線維性の隔壁が形成され、あたかも肝小葉の様な形態をもつ領域（偽小葉）が作られる^[10]。

ブタは臓器の大きさや食性、代謝などがヒトと類似していることから、近年実験動物や臓器移植ドナーとして多用されている^[4]。しかし実験動物としての歴史は浅く、基本的なデータの収集や蓄積が未だ不十分である。また、ブタの肝臓はヒトに比べて小葉間結合組織が著しく発達しているという大きな特徴がある^[1]。線維性結合組織の増生の機序やその治療法を考える上で、ブタ肝臓の小葉間結合組織の発達過程を調べることは有用であると考えられる。

そこで本研究では、ヒトにおける肝線維化のモデル動物としてのブタの可能性を模索するため、ブタ肝臓の肝小葉および小葉間結合組織の形成過程を経時的に解析することを目的とした。

材料及び方法

材料は酪農学園大学中小家畜農場、八雲食肉衛生所またはかみふらの牧場から提供されたランドレース、大ヨークシャー、デュロックの三元交雑種ブタ（胎齢約50日、胎齢約60日、胎齢約90日、生後0日齢、1日齢、4日齢、8日齢、10日齢、12日齢、14日齢、23日齢、約6ヵ月齢、約24ヵ月齢）を各1~3例用いた。胎齢はMarrableの方法^[9]に従い推定した。放血殺後、直ちに開腹し、肝臓を摘出し外側左葉中央部から組織片（2×2×2 cm）を得た。組織片は切り出し後、ブアン液で48時間固定した後にアルコール脱水を行い、パラフィンで包埋してブロックを作製しミトクロームを用い厚さ4-8 μmの切片を作製した。脱パラフィン後Masson染色Gordner変法では(a)小葉間結合組織の形成の程度、(b)肝細胞の形態の変化、石井-石井式鍍銀法では類洞の走行や小葉間結合組織について、免疫組織化学染色では一次抗体として中心静脈付近の肝細胞に特異的に含まれるグルタミン合成酵素（GS）について抗グルタミン合成酵素抗体（アブカム株式会社、東京）を用いて光学顕微鏡的に観察した。

肝小葉の断面積および小葉間結合組織の幅は、ランダムに撮影した顕微鏡画像を元に画像処理ソフトウェアImageJ（ver. 1.46）を用いて計測した。

得られた測定値は平均値±標準誤差で表した。統計学的解析は危険率を $p < 0.05$ としてTukey-Kramer法を用いた。

結 果

1. 肝小葉構造の構築

胎齢90日までの胎子の肝臓では、均一な実質中の

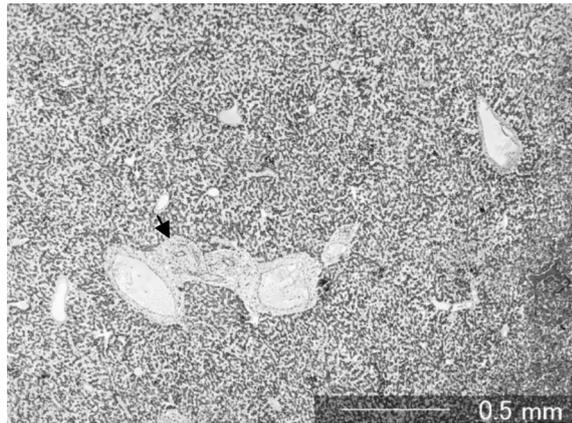


図1 胎齢50日では肝小葉構造は認められず、肝三つ組周辺のみ線維性結合組織が分布している(↑)。所々に血島が見られる。血管系の発達はよくない。Masson染色Gordner変法

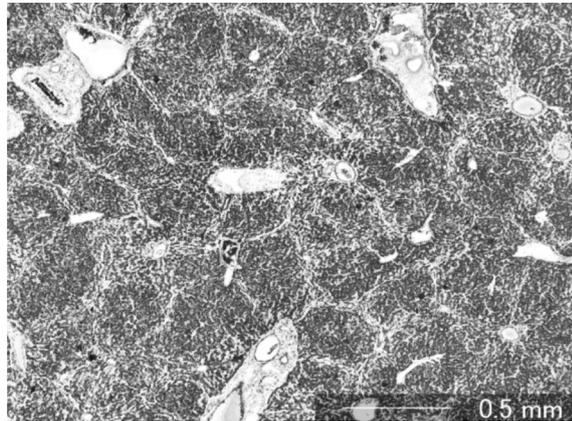


図2 10日齢では肝小葉の境界は明瞭となり、小葉間結合組織が部分的に形成されはじめ、中心静脈を持つ肝小葉は少ない。Masson染色Gordner変法

所々に血管が分布するのみで、肝細胞の配列もはっきりとせず肝小葉構造の識別も困難であった(図1)。生後0日齢で初めて肝小葉の輪郭が識別出来た。その後10日齢では、肝小葉の境界が明確になった(図2)。日齢が進むと徐々に小葉間結合組織が明瞭になり、24ヵ月齢では明瞭な小葉構造が形成されていた(図3)。

2. 肝小葉の断面積の変化

10日齢以降の肝小葉断面積は10日齢で $0.16 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ 、12日齢で $0.22 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ 、14日齢で $0.20 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ 、23日齢で $0.23 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 、6ヵ月齢で $1.37 \pm 0.49 \text{ mm}^2$ 、24ヵ月齢で $1.79 \pm 0.69 \text{ mm}^2$ となり、それぞれの間で有意に増加した(図4)。

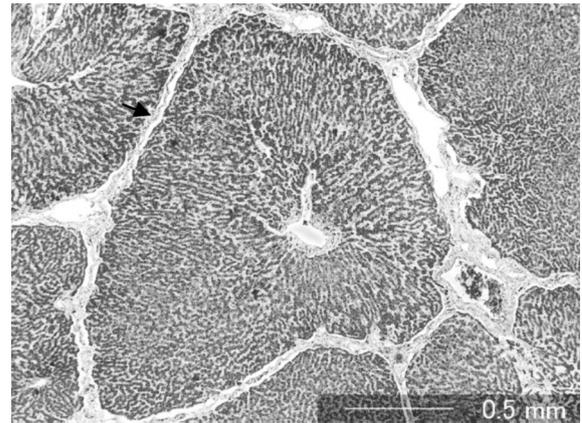


図3 24ヵ月齢の弱拵では10日齢の肝小葉に比べ、小葉間結合組織(↑)が明瞭である。Masson染色Gordner変法

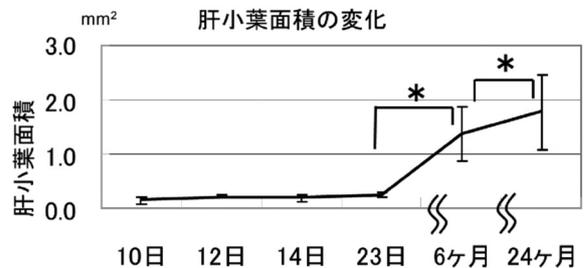


図4 肝小葉断面積の変化 (* $p < 0.05$)

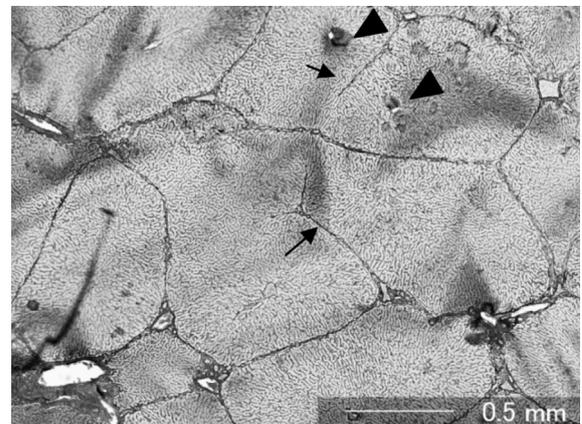


図5 24ヵ月齢、大型の肝小葉は複雑な形態を示し、複数の中心静脈(▲)と中隔(↑)を持つことが多い。石井-石井式鍍銀法

3. 複合型肝小葉の形成

6ヵ月齢や24ヵ月齢では、複数の肝小葉が結合したような大型で複雑な形をした肝小葉が多く観察された。この肝小葉は複数の中心静脈を持ち、小葉間結合組織が肝小葉内へと入り込んで中隔を形成する像も認められた(図5)。

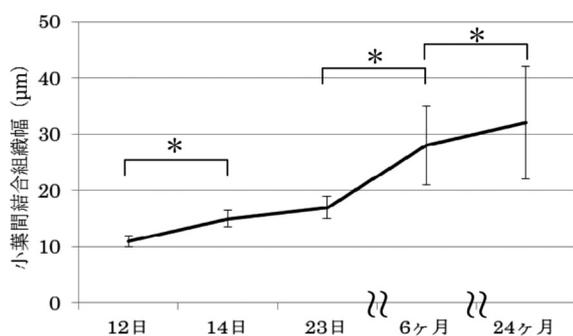


図6 小葉間結合組織幅の変化 (* $p < 0.05$)
12日から明瞭な形成が見られ、成長に伴って徐々に厚みを増した。

4. 小葉間結合組織の形成

小葉間結合組織の形成は1日齢まで認められず、肝三つ組周辺にのみ線維構造は認められた。生後10日齢において小葉間結合組織の形成が部分的に認められた(図2)。12日齢以降では明瞭な小葉間結合組織の形成が認められた(図3)。

小葉間結合組織が明瞭に観察できた12日齢以降のものについて、その幅は12日齢 $12.1 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 、14日齢 $14.6 \pm 2.5 \mu\text{m}$ 、23日齢 $16.2 \pm 2.9 \mu\text{m}$ 、6ヵ月齢 $26.8 \pm 6.4 \mu\text{m}$ 、24ヵ月齢で $32.8 \pm 9.6 \mu\text{m}$ となった(図6)。

5. 類洞走行の変化と小葉間結合組織の形成

6ヵ月齢や24ヵ月齢の小葉間結合組織には太い線維が認められた(図7)。一方小葉内では、微細な線維の網状構造によって構築された壁面をもつ類洞が、中心静脈から放射状に配列する様子が観察できた(図8)。また、約24ヵ月齢では類洞の走行によって、中心静脈と小葉間静脈との識別が可能であった。

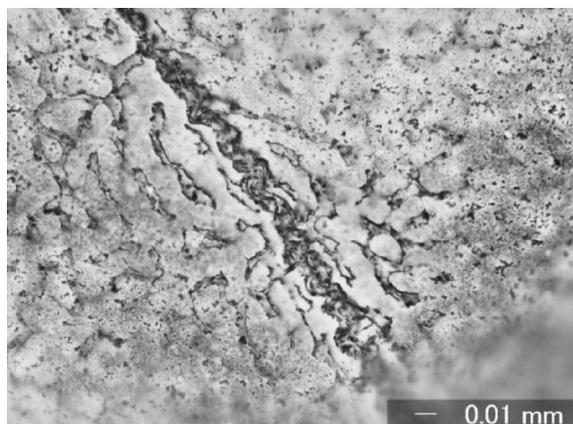


図7 6ヵ月齢 太い線維が小葉間結合組織内に形成される。石井-石井式鍍銀法

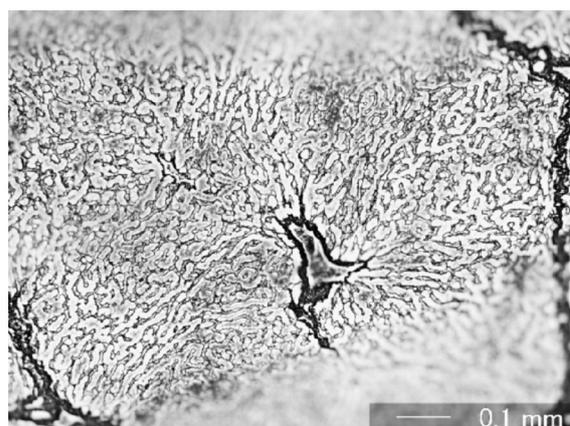


図8 6ヵ月齢 中心静脈を中心とした類洞の放射状走行が認められる。石井-石井式鍍銀法

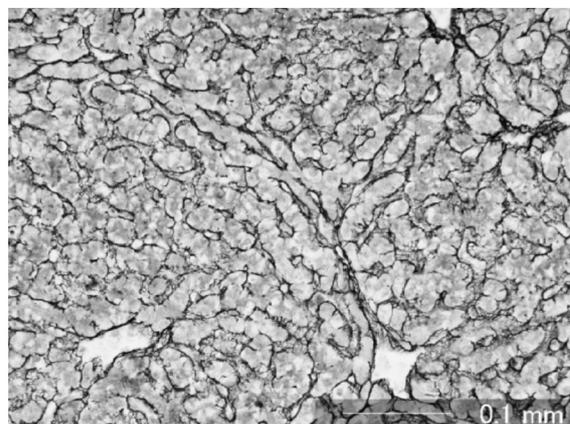


図9 4日齢 肝小葉の輪郭は識別できるが、まだ明らかな小葉間結合組織の形成は見られない。その形成部に沿うように、肝小葉の辺縁部の類洞走行が変化していた。石井-石井式鍍銀法

しかし胎子期では、類洞壁の線維が成豚に比べて不鮮明で類洞の中心静脈への走行は明確でなく、中心静脈と小葉間静脈との識別は困難であり、肝小葉の境界が判別できなかった(図1)。

その後の生後0-10日齢においては、小葉間結合組織が形成されると思われる部位に沿って類洞が平行に走行することで、肝小葉の輪郭が確認できた(図9)。また、肝三つ組周辺の結合組織が小葉間へと伸長している様子が認められた(図10)。

6. 免疫染色

1) グルタミン合成酵素(GS)は6ヵ月齢(図11)と24ヵ月齢では、中心静脈周辺の肝細胞に反応が認められた。0日齢(図12)、4日齢、10日齢も同様の場所で陽性反応が示されたが、陽性反応が約24ヵ月齢よりも明らかに多かった。一方で胎齢90日齢で

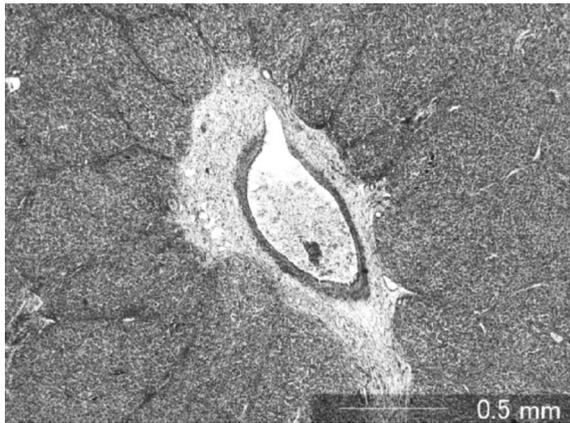


図 10 10日齢 大きな肝三つ組周囲の結合組織が小葉間へと伸長している。Masson 染色 Gordner 変法

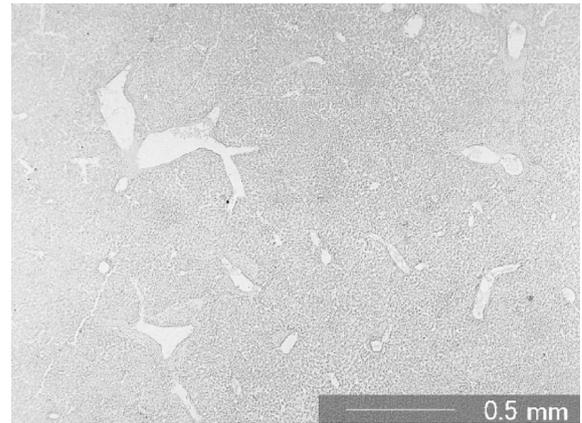


図 13 胎齢90日 陽性反応は全く見られない。抗GS免疫染色

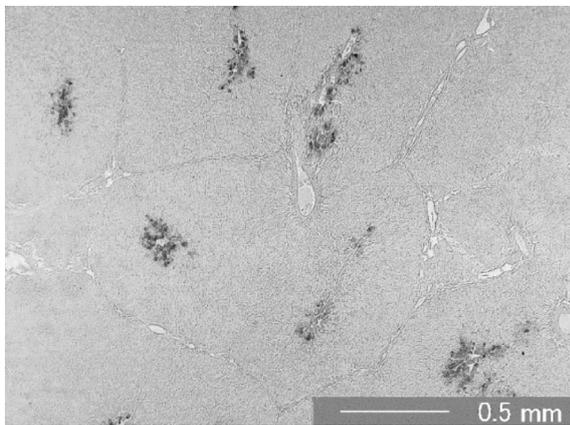


図 11 6ヵ月齢 中心静脈周囲の肝細胞に陽性反応が見られる。抗GS免疫染色

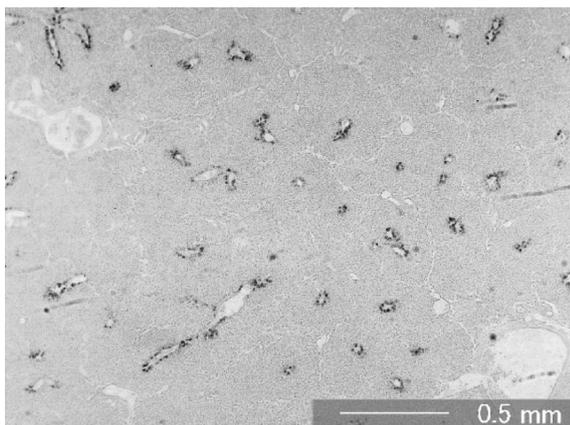


図 12 0日齢 6ヵ月と同様の部位に陽性反応が見られたが、一視野あたりの数がより多い。抗GS免疫染色

は全く反応が認められなかった (図 13)。

考 察

ブタの胎子期肝臓では小葉構造が構築されていないことが明らかとなった。小葉内の肝細胞板の形成も未発達で、極性を持たない肝細胞が無秩序に存在していると考えられる。成豚の肝臓においては中心静脈周囲の肝細胞に特異的な分布を示すグルタミン合成酵素 (GS) も、胎子期では発現はなかった。GS はミトコンドリア内に存在し、アンモニアをグルタミン酸と結合させグルタミンにすることで、神経毒であるアンモニアを無毒化させる酵素である。一方、肝小葉辺縁部の肝細胞は尿素回路によってアンモニアを尿素へと無毒化するが、この経路でとらえ切れなかったアンモニアを、肝小葉中心部の肝細胞が GS を用いて解毒する^[6,7,16]。胎子期では中心静脈と類洞の形成が未発達であり、血流の方向性が明確でないとすれば、血液は組織中に拡散するような状態であると考えられる。成豚では、肝細胞が肝小葉内のどこに位置するかによって、その肝細胞が担う働きが異なる (肝小葉の不均一性)^[10] が、胎子ではこのような役割分担がまだ確立していないことが、今回の結果につながったと考えた。おそらく出生前は主に母体に任せていた代謝を、出生後に自分で全て行うようになるため、0日齢からGSの発現が認められたと考えられる。

肝細胞板の形成が中心静脈側から始まるのは、発生過程に要因があると考えた。肝臓の発生は前腸と中腸の境での陥入から始まり^[2]、初期は一般的な外分泌腺と同様に分岐した管腔構造からなる形態をとる。模式的に考えると、進化の過程でこの複数の外分泌 (胆汁) 管が腺底を中心静脈に向け、小葉間胆

管に開口する形となる。そして、細胞（肝細胞と胆管上皮細胞の起源は同じ）が代謝を行う上で重要な血液との接触面積を最大にするため、胆汁の腺腔は細胞間の毛細胆管となり最小限の大きさを残して縮小され、一つの腺腔を覆って向かい合っていた細胞壁はついには細胞1つ分の厚さの細胞板となる^[11]。この間、中心静脈付近から腺底を誘引する何らかの因子が作用することなどにより、不規則に位置していた管腔が中心静脈側から配列を整えていくのではないかと考えた。

ブタの肝小葉の形成は胎齢90日では確認できず、生後0日齢にはじめて観察できた。胎子期では静脈管の存在によって、胎盤から心臓へ向かう血液のうち肝臓を通過する量は少なく^[14]、出生後の静脈管の閉鎖によって肝臓への血液量は増加する。出生による血流変化が、肝小葉形成の一助を担うことが示唆される。肝小葉の断面積は24ヵ月齢になるまでに10倍以上大きくなることが明らかとなった。肝小葉の数は5-7日齢以降では増加しないという報告^[16]もあることから、肝小葉の数の増加ではなく、個々の肝小葉体積が大きくなることで、肝臓全体が成長することが判明した（図14）。

このような肝小葉の拡大の結果、2つの変化が起こることが予想される。一つは肝小葉内の血液量の増加であり、もう一つは肝小葉中心部の栄養供給量の低下である。大きくなった肝小葉は血液を多量に収容することが可能となるが、代謝の場が増加したのに対し、排出先である中心静脈がそのままでは、中心静脈にかかる圧力が増し、組織中の代謝産物濃度も上昇して細胞の機能に障害を与えることになる。そのため中心静脈が分岐・発達し、排出経路を増やすことで、この問題を解消しているのではないかと考えた。一方、肝小葉の中心部付近に位置する肝細胞は、肝小葉が拡大することで、酸素などの栄

養供給源である小葉間の血管から遠ざかることになる。肝細胞は代謝が盛んであるために栄養要求性が高いが、特に肝小葉中心部の肝細胞は低酸素に抵抗性が低く、酸素欠乏状態に陥ると中心部から徐々に細胞変性することが知られている^[10]。これを防ぐためには、肝小葉の成長を妨げることなく、小葉間の供給血管を肝小葉中心部から遠ざけ過ぎない必要がある。供給血管と中心静脈との距離を維持しながらも肝小葉が大きくなるために、供給血管の間から突出する、すなわち小葉間の組織が肝小葉内へと陥入すると考えた。小葉間結合組織が小葉内へと陥入する像が見られたが、おそらくその中に供給血管を伴っていると考えられる。小葉間結合組織と共に陥入することで、大きくなった肝小葉を補強的に支持しつつ、栄養を供給していると思われる。切除後肝臓などの低酸素環境下では血管新生因子の遺伝子発現が亢進するという報告^[3,5,13]もこれを支持している。おそらく供給血管を伴う小葉間結合組織は、中心部からある一定の距離以上は離れないという可能性がある。このような変化に対応した反応の結果、肝小葉はさらなる拡大と分岐を続け、成豚で複数の中心静脈と複雑な形態をもつ肝小葉が増加したと考えられる（図15）。

小葉間結合組織は胎子期では形成されておらず、10日齢以降で形成が認められ、徐々にその厚みが増加した。すなわち10日齢未満では、肝小葉は構築されているが小葉間結合組織の形成がない状態であることが明らかとなった。この間、肝小葉辺縁では類洞あるいは肝細胞板の走行が変化することが確認され、さらに肝三つ組周辺の結合組織が小葉間へと伸長する様子が観察された。このことは小葉間結合組織が形成される前に肝小葉の境界が既に決定されており、その後、大きい血管の周囲の結合組織から伸びた太い線維が小葉間へと分布することを示唆して

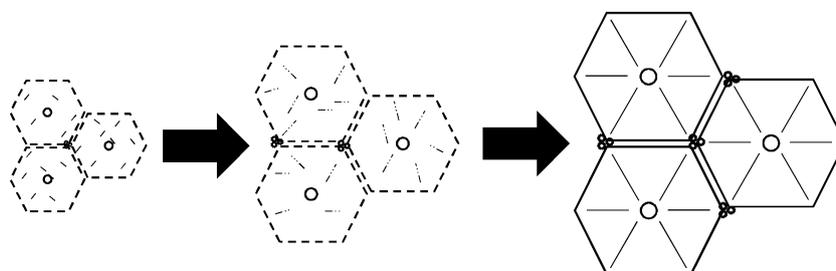


図14 胎子期から約10日齢までの肝小葉構築の模式図。胎子期の無秩序な細胞は出生前後の変化により極性を持つ。肝小葉の境界が形成されはじめる時期に中心静脈や放射状構造の構築も始まる。肝小葉は加齢に伴って拡大し、境界付近の肝細胞板（類洞）走行の変化に続いて小葉間結合組織も形成される。

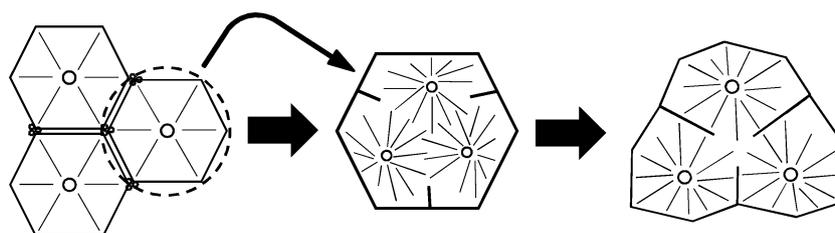


図 15 約 10 日齢から成豚期の肝小葉分岐の模式図。肝小葉の拡大に反応して、結合組織を伴った供給血管が、肝小葉の中心部との距離を保つために肝小葉内へと陥入していく。中心静脈も分岐し、排出路を確保する。結果として、複雑な形態を示す肝小葉が加齢に伴って増加する。

いる。したがって肝小葉は、類洞壁の微細な線維の形成によって枠組みとなる骨格を構築した後に、小葉間に太い線維を挿入させることで、より強固な支持力を得て、肝小葉の形態を維持していると考えた。この小葉間に分布する肝三つ組由来の太い線維の量が多いためブタで小葉間結合組織が発達する理由の一つと考えられる。

ブタ、ヤギ、ニワトリの肝臓における小葉間・小葉内のコラーゲン束の太さや密度を比較し、その差異の理由に各動物における肝臓支持方法の違いが報告されている^[12]。すなわち、各動物において小葉間および小葉内のコラーゲン網の強度に差はあるが肝臓を支持するのに十分な力を持っているはずである。よって、ブタをはじめとするこれらの動物は、肝臓の支持力を小葉間結合組織に集めている動物であることが考えられる。

これらの結果は線維性結合組織の増生の機序とその治療法の基礎的データを提示したと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、2010 年度酪農学園大学・酪農学園大学短期大学部共同研究の助成を受けたものである。材料採取に際し酪農学園大学中小家畜農場、八雲食肉衛生所またはかみふらの牧場の皆さまのご協力を得ました事を心より感謝いたします。

文 献

1. 尼崎肇 2011. 肝臓. pp. 161-163. 獣医組織学, 第 5 版(日本獣医解剖学会 編), 学窓社, 東京.
2. 浅利昌男 2003. 消化器. pp. 91-134. 獣医解剖学, 第 2 版(山内昭二, 杉村誠, 西田隆雄 監訳), 近代出版, 東京.
3. Brown, L. F., Detmar, M., Claffey, K., Nagy, J. A., Feng, D., Dvorak, A. M. and Dvorak, H. F. 1997. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*; 79: 233-269.
4. Bustad, L. K. and McClellan, R. O. 1968. Miniature swine: Development, management and utilization. *Lab. Anim. Care* 18: 280-287.
5. Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.* 18: 4-25.
6. Harper, H. A. 1975. ハーパー生化学 14 版 (三浦義彰 監訳), 丸善株式会社, 東京.
7. Horton, R. H., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn J. D. and Scrimgeour, K. G. 2005. ホートン生化学, 第 3 版 (鈴木絃一, 宗川吉汪, 笠井献一 監訳), 東京化学同人, 東京.
8. 加藤嘉太郎, 山内昭二 2011. 肝臓. pp. 260-263. 新編家畜比較解剖図説 上巻, 養賢堂, 東京.
9. Marrable, A. W. 1971. The Embryonic Pig. A Chronological Account, Pitman Medical, London.
10. 真坂敬三, 井上誠, 奈良間功, 布谷鉄夫, 安田宣紘 2008. 肝臓. pp. 237-268. 動物病理学各論(日本獣医病理学会 編), 文永堂出版, 東京.
11. 三木成夫 2005. 消化系 pp. 89-131 生命形態の自然誌 第 1 巻 解剖学論集, うぶすな書院, 東京.
12. Nishimura, S., Sagara, A., Oshima, I., Ono, Y., Iwamoto, H., Okano, K., Miyachi, H. and Tabata, S. 2009. Immunohistochemical and scanning electron microscopic comparison of the collagen network constructions between pig, goat and chicken livers. *Anim. Sci. J.* 80: 451-459.
13. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-

- initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845.
14. 津曲茂久 2007. 妊娠と分娩. pp.155-200. 獣医繁殖学 第3版 (浜名克己, 中尾敏彦, 津曲茂久 編), 文永堂出版, 東京.
 15. Voet, D., Voet, J. G. and Pratt, C. W. 2003 ヴォート基礎生化学 (田宮信雄, 村松正実, 八木達彦, 遠藤斗志也 訳) 東京化学同人, 東京.
 16. White, E. G. 1939. Some observations on the liver of the pig: the hepatic lobule and liver cell during post-natal growth. *J. Anat.* 73: 365-386.

要 約

肝臓は肝細胞が放射状に配列する肝小葉の集合体で、各肝小葉は小葉間結合組織により被われている。この小葉間結合組織は特にブタで発達しているが、その理由は未だ明らかにされていない。発達した小葉間結合組織の形成過程を明らかにすることは、肝

線維化の機序の解明や治療方法の開発の一助となる。

本研究では、ブタにおける肝小葉を経時的に観察し、小葉間結合組織の形成過程を明らかにすることを目的とした。材料として胎齢 50 日から生後 24 ヶ月齢までのブタ肝臓を光学顕微鏡で観察した。

小葉構造は胎子期では認められず生後 12 日齢から明瞭に観察され、10 日齢では肝三つ組周辺の結合組織の肝小葉間への伸長が観察された。24 ヶ月齢では小葉間結合組織の幅が 10 日齢に比べ約 3 倍に増加していた。また 6 ヶ月齢以降では小葉間結合組織中に太い線維が明瞭に確認された。

以上の結果から、ブタ肝臓は胎子期では小葉構造が明確でなく出生時期の血流変化を機に小葉構造が構築される事、およびその後の小葉の拡大に伴い小葉間結合組織の小葉内への進入と肝小葉の分岐が生じることが明らかになった。

Summary

The liver is comprised of hepatic lobules consisting of radially arranged plates of hepatocytes, and each lobule is covered by interlobular connective tissue. This interlobular connective tissue is particularly well-developed in pigs, though the reason for this is not clear. Elucidation of the mechanism by which the well-developed hepatic lobules are formed would contribute to elucidation of the mechanism underlying hepatic fibrosis and to the development of treatment methods. In this study, temporal changes in developing hepatic lobules in the pig were observed with the aim of elucidating the process by which interlobular connective tissue is formed. Livers of animals from the embryonic age of 50 days to 24 months after birth were observed by light microscopy.

A lobular structure was not seen before birth but was clearly observed from 12 days after birth. Extension of connective tissue around the hepatic triad to the hepatic lobules was observed at 10 days after birth. The width of the interlobular connective tissue at 24 months of age was about 3-times larger than that at 10 days of age. Thick fibers were clearly observed in the interlobular tissue from the age of 6 months. The results showed that the pig liver does not have a clear lobular structure in the embryonic period but develops a lobular structure after birth with change in blood flow and that interlobular connective tissue extends into the hepatic lobules when the lobules become enlarged and branching of the lobules occurs.