

肝 ATPase の 組 織 化 学 的 研 究

第 2 編

実験的肝障害時における胆毛細管および
類洞壁に分布する ATPase について

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

国 府 島 紀 之

〔昭和 41 年 9 月 29 日受稿〕

緒 言

第一編において種々の肝疾患時のヒトの肝についての adenosine triphosphatase (以下 ATPase と略す) の組織化学的検討では、その活性は類静脈洞壁 (以下類洞壁と略す) および胆毛細管にみとめられた。

これらの活性値の部位別、分布別の記述については、ヒトの肝においては疾病例を問題とするため、系統的な問題点が十分糾明し尽されたとはいえないので、本稿では動物実験によりこの点の検討を試みることにした。

研究材料および方法

1. 研究材料

体重 150 g 前後にまで飼育した純系ラット 114 匹を準備し、下記の 6 群にわけ実験的肝障害を起させ検討した。使用総数は 114 例で、その内訳は

正常例	5 例
急性中毒肝 (四塩化炭素による ¹⁾²⁾)	10 例
慢性中毒肝 (四塩化炭素による ¹⁾²⁾)	15 例
部分的肝切除術後肝 ³⁾	28 例
α -naphthyl isothiocyanate 投与肝 ⁴⁾	28 例
胆管結紮術後肝 ⁵⁾	28 例

である。すなわち

i) 正常例

ラット用固形飼料にて 150 g 前後になるまで飼育し、実験に際し鈍器にて撲殺後、直ちに使用した。

ii) 急性中毒肝

Cameron¹⁾, Popper²⁾ に準じ、10%四塩化炭素をオリーブ油にて作成、これを体重 100 g 当り 0.4 cc を 1 日 1 回、2 日間筋肉内に注射し、急性肝障害を起させ 3 日目に撲殺し、直ちに実験に供した。

iii) 慢性中毒肝

急性中毒肝の場合と同様に¹⁾²⁾に 10%四塩化炭素 0.2 cc を週 2 回、1 ケ月間筋肉内に注射し、慢性肝障害を起させ使用した。

iv) 部分的肝切除術後肝

Higgins³⁾ に従い、エーテル麻酔下にラットを開腹し、約 $\frac{2}{3}$ の肝切除を行い、術後 24, 48 時間、1, 2 週間の 4 群に分けて各々を検討した。

V) α -naphthyl isothiocyanate 投与肝

Rees⁴⁾ の方法により α -naphthyl isothiocyanate 1.0 g を片栗粉 100 g によく混ぜ、固形飼料 1.0 kg を粉末にしたものにさらに混合し、約 15~20 g 程度を 2 日分として与え、飼育 1, 2, 3, 4 週間後に撲殺実験に供した。

Vi) 胆管結紮術後肝

Cameron⁵⁾ にならい、エーテル麻酔下にラットを開腹し、総胆管を二ヶ所にわたって二重に結紮し実験的に黄疸を惹起させ、引き続いて術後 24, 48 時間、3 日、1 週間の 4 群に分ち、各々について検討した。

この際に血清ビリルビン値を測定、比較検討した。なお各々のラットについては当日は絶食させ諸種酵素活性値に変動をもたらすものは原則として避けた。

2. 研究方法

以上のラット肝について、Wachstein & Meisel の方法にならい 10%中性 cold formol Ca 8 時間固定標本において adenosine triphosphate sodium salt を基質として pH 7.2 で 1 時間 incubate⁶⁾⁷⁾⁸⁾ することによって肝組織の類洞壁および胆毛細管内に特異的に存在する ATPase を組織化学的に検討した。

研究成績

活性部位および分布

ATPase 活性の存在部位はヒトの肝と同じく主として胆毛細管、類洞壁、グリソン氏鞘、血管壁に著明であつた。又胆毛細管および類洞壁における活性にかんしては小葉中心帯、辺縁帯に分けて記載した。

I 正常例

正常例では類洞壁の ATPase 活性はヒトの肝の場合と異なり、小葉辺縁帯、中心帯共に余り差異をみとめないが、Kupffer 氏星細胞にかなり強い活性をみとめた。

一方胆毛細管の活性は中等度で繊細で一定の太さを持ち、規則正しく樹枝状に現われている。

他方グリソン氏鞘、血管壁にも活性がみとめられた。なおラット肝の重さは 6.2~8.4 g で 1 日の体重増加量は 1.0~2.0 g であつた。(Fig. 1, 2)。

II 急性中毒肝

急性中毒肝では類洞壁の活性は正常例に比し中心帯で増強しているが、一様でなく、特に肝細胞壊死部において増強しており、その部の Kupffer 氏星細胞の活性は著明であつた。その他浸潤細胞にも中等度の活性がみられた。しかし壊死部の周囲の類洞壁の活性は減弱していた。

一方胆毛細管の活性は一般に増強し、その拡張がみられたが、特に肝細胞壊死部ではその部に一致して胆毛細管の拡張、蛇行、嚢状変化等の形態学的変化がその活性から著明にみとめられた。一方その周囲の胆毛細管では断裂、拡張、蛇行、じゅず状、嚢状等の形態学的変化がみられ、特に細胞結合部に強い活性がみられた。この部では肝細胞に空胞変性がみられ胆毛細管はそれにより圧排されたかの印象を受ける。すなわちこれらの変性にもとずく胆毛細管の走行およびその形態の異常がみとめられたものといえる。

なお肝の重さは 6.0~8.0 g、体重減少 1 日当り 4.0 g 前後、死亡例 2 匹を記録した。(Fig. 3, 4)。

III 慢性中毒肝

類洞壁における活性は一般に急性中毒肝に比し低下しているが、肝細胞壊死部においては Kupffer 氏星細胞の活性増強は著明であつた。一方その部における浸潤細胞の活性には余り変化がなかつた。

胆毛細管の活性は急性中毒肝における分布と余り大差はみとめられないが、肝細胞壊死部に一致して

拡張、蛇行、嚢状変化を示すことが ATPase 活性からうかがわれた。

この実験例では肝の重さ 6.2~8.2 g、体重減少は 1 日当り 1.0~5.0 g、死亡例 2 匹であつた。(Fig. 5, 6)。

IV 部分的肝切除術後肝

部分的肝切除術後肝では、肝は非常に貧血状、灰色で、もろく、類洞壁の活性は全般に中等度で正常例に類似していた。Kupffer 氏星細胞における活性は増強しており、胆毛細管の活性も中等度で、拡張、蛇行等の形態学的変化はみとめられなかつた。この実験例において肝の重さ 3.0~7.0 g で、2 週間後には肝はもとの大きさになつていた。又本手術例では麻酔下で 2 匹死亡した。(Fig. 7, 8)。

V α -naphthyl isothiocyanate 投与肝

α -naphthyl isothiocyanate 投与肝においては類洞壁の活性は一般に小葉辺縁帯の方がより増強し肝細胞境界板に一致して潤管、胆栓、維線化の生成、増殖が著明で、その部に一致して非常に強い活性増強がみとめられた。小葉辺縁部の Kupffer 氏星細胞の活性は増強しており、その部の胆毛細管の活性も増強し、拡張、蛇行、嚢状変化等の形態学的変化がみとめられた。以上の両者の活性は時間の経過と共に遠心的に増強していた。なお肝の重さは 8.0~14.0 g、肝重量の減少は 2.0~14.0 g であつた。(Fig. 9, 10)。

VI 胆管結紮術後肝

胆管結紮術後肝においては類洞壁の活性は全般に強く、特に小葉辺縁帯の活性は増強していた。なお同時に測定した血清ビリルビン値は表 1 の通りである。

表 1 胆管結紮時の血清ビリルビン値

	24時間	48時間	3日	1週間
総ビリルビン値	2.14	3.24	4.85	12.52
直接ビリルビン値	1.87	2.48	3.14	10.35

又肝の重さは 8.0~10.5 g、体重減少は 2.0~10.0 g であつた。(Fig. 11, 12)。

一方胆毛細管の活性は著明に増強し、特に胆栓に一致して ATPase 活性の増強がみとめられ、拡張、蛇行、嚢状変化を呈し、時間の経過と共に拡張が著明で、しかもその管腔内に間隙がみとめられた。

総括ならびに考按

1. ATPase の組織化学的検出法について

ATPase の組織化学的検出にあたっては、ヒトの肝の場合と同じく固定の有無と種類、pH、鉛イオン濃度およびマグネシウムイオンやカルシウムイオン等無機イオンの種類が関係してくるが、著者はヒトの肝における方法⁸⁾をそのまま踏襲して満足すべき結果を得た。

2. 胆毛細管の ATPase 活性について

正常例の胆毛細管の活性は中等度で樹枝状の配列を示し、規則正しいが、急性中毒肝では胆毛細管の活性は中心帯で一様でなく、ヒトの急性肝炎の像と異なるが、これは四塩化炭素障害にともなう障害の結果と解される。さて壊死周辺部では細胞間結合部に強い活性をみとめ、その度合は慢性中毒肝では減少している。この所見は第一編において著者が記載した脂肪肝にみられた所見に類似しており、本実験では肝細胞の空胞変性により胆毛細管が圧排され、その走行およびその形態に異常を来したと解される所見であつた。また急性、慢性中毒肝のいずれにおいても肝細胞壊死部に一致し、胆毛細管は拡張、蛇行、囊状変化を起していることが、ATPase 活性の分布からうかがわれ、肝細胞壊死に伴う胆毛細管の歪みを明確にすることができた。このことは第一編におけるヒトの所見をより明確にするものであつた。

次に部分的肝切除術後肝については、胆毛細管の活性は中等度で形態学的にも余り変化をみとめなく、時間の経過との因果関係もみられなかつた。すなわち切除肝にみられる再生肝構造は胆毛細管の配列においても、走行においても正常のそれに変わらないとする従来の考え方を裏付ける。

α -naphthyl isothiocyanate 投与肝では潤管の増殖に伴い、胆毛細管の ATPase 活性はグリソン氏鞘の周辺より増強し、拡張、蛇行、囊状変化等の形態学的変化が次第に時間の経過と共に遠心的に増強した。

胆管結紮術後肝の胆毛細管の活性は時間の経過と共に増強し、拡張が著明でその拡張のために管腔内に間隙すらみとめられた。特にこの際胆栓に一致し、その上部に増強が著明であつた。これらの変化は胆汁うづ滞に伴う胆毛細管の形態学的変化を表示するものであつて、Armstrong⁹⁾、Maddack¹⁰⁾らが閉塞性黄疸の発生に関し推測した胆管および胆毛細管の変化を明確に証明し得た所見であつた。

3. 類洞壁における ATPase 活性

正常例では類洞壁の活性はヒトの肝の場合と異り、余り部位的差異をみとめない。

急性中毒肝では中心帯で一様でなく、H. E. 染色標本の空胞変性の部に一致して活性低下をみる。一方急性、慢性中毒肝では肝細胞壊死部に一致して類洞壁に分布する ATPase 活性は著しく増強し、特に Kupffer 氏星細胞では著明であつた。細胞浸潤にかんしては慢性の場合減弱がみられた。慢性中毒では類洞壁の活性は急性に比し一般に減弱しているが、グリソン氏鞘の活性は増強してくる。

部分的肝切除術後肝では ATPase 活性は中等度で正常肝のそれより増強しており、Kupffer 氏星細胞の活性も増強していた。Morgan¹¹⁾らはミトコンドリアの ATPase 活性は切除後28時間で最強で、48時間では正常に復することを述べているが、類洞壁に関してはこのような変化をみとめることは困難であつた。

類洞壁の ATPase 活性については細胞膜の構造、機能と関係をもつと考えられており、その分泌能の昂進、ないし障害が肝の血流障害と肝細胞の再生能の昂進と互に関連して出現する可能性は推測できるが、上記の実験結果はこれらを示唆するものと考えられよう。

Kupffer 氏星細胞における活性の増加もその機能の亢進と密接に関係あるものと考えられる。

次に α -naphthyl isothiocyanate 投与肝における類洞壁の活性は一般に小葉辺縁帯に増強し、特に肝細胞境界板に一致して潤管、胆栓、線維化の増殖、生成が著明で、その部に一致して非常に強い活性増強がみられた。ATPase が線維生成機転になんらかの因果関係をもつであろうことは第一編においても記載したが、それを推測し得る所見であつた。また Kupffer 氏星細胞の活性も同様であつた。

胆管結紮術後肝では類洞壁の ATPase 活性は一般に時間の経過と共に増強した。この活性の増加は α -naphthyl isothiocyanate 投与肝にみられた所見と同様に胆汁停滞に伴う黄疸発生と何らかの関係があるのではないかと推定され興味ある所見である。

結 論

実験的肝障害を与えたラットの肝臓の ATPase 活性を組織化学的に追求し、次の結果を得た。

1. ATPase 活性の主要部位は類洞壁および胆毛細管である、

2. 急性、慢性四塩化炭素中毒肝においては、肝細胞壊死部に一致して胆毛細管の拡張、蛇行、嚢状変化をみとめ、壊死周辺部では細胞間結合部に強い活性をみとめた。前者は肝細胞壊死に伴う胆毛細管の走行異常および変形であり、後者は肝細胞の空胞変性による胆毛細管の圧排された結果の像と解される。

3. 部分的肝切除術後肝における胆毛細管の活性および形態は正常のそれと変らない。

4. α -naphthyl isothiocyanate 投与肝および胆管結紮術後肝の胆毛細管の活性は胆汁うっ滞を表示するもので、前者では小葉の周辺より増強、遠心的であり、後者ではその活性の増強と管腔の拡大が著明で、特に胆栓に一致し、その上部に活性の増強がみられた。

5. 類洞壁の ATPase 活性は急性、慢性四塩化炭素中毒肝で、肝細胞の空胞変性部に一致し活性低下があり、肝細胞壊死部では著しく増強し、特に Ku-

pffer 氏星細胞で著明であつた。部分的肝切除術後肝では正常のそれより一般に増強している。 α -naphthyl isothiocyanate 投与肝では小葉辺縁帯に増強、胆管結紮術後肝では時間の経過と共に増強した。これら類洞壁の諸変化は肝細胞膜の構造、機能と関係があり、胆汁の分泌、うっ滞機序と関係深いものと考えた。Kupffer 氏星細胞における活性の増加もその機能の亢進と密接に関係があるものとする。

6. 慢性肝障害肝におけるグリソン氏鞘の活性化の増加、および α -naphthyl isothiocyanate 投与肝の境界板に一致して増殖した線維における強い活性化の増強は ATPase が線維生成機転に関係をもつことを示唆するものである。

稿を終るに臨み、御指導および御校閲を賜つた恩師小坂教授、太田講師に深甚なる謝意を表するとともに、島田講師、遠藤博士、小坂内科第四研究室各位の御協力を深謝する。

文 献

- 1) Cameron, G. R., and Karunaratne, W. A. E.: J. Path. & Bact., 42: 1-21, 1936.
- 2) Hans Popper, M. D. et al.: Am. J. Path., 42: 715-728, 1963.
- 3) Higgins, G. M., and Anderson, R. M.: Arch. Path. 12: 186-202, 1931.
- 4) Mac Lean, M. R., and Rees, K. R.: J. Path. & Bact., 76: 175-188, 1958.
- 5) Cameron, G. R., and Oakley, C. L.: J. Path. & Bact., 35: 769-798, 1932.
- 6) Pearse, A. G. E.: Histochemistry., P418-420, Churchill Ltd. London, 1960.
- 7) Pearse, A. G. E.: Histochemistry., P876-877, Churchill Ltd. London, 1960.
- 8) 国府島紀之: 日消会誌, 63: 263-270, 1966.
- 9) Armstrong, A. R., et al.: M. A. J., 33: 243, 1935.
- 10) Maddock, S., Federation Proc., 1: 181, 1942.
- 11) Morgan, W. S., Leon, H. A.: Exp. Molec. Path., 2: 297-302, June, 1963.

A Histochemical Study of Adenosine Triphosphatase in Liver Diseases

2. Adenosine Triphosphatase Activity of Biliary
Capillary and Lining Cells of Sinusoid in
the experimentally intoxicated Livers

By

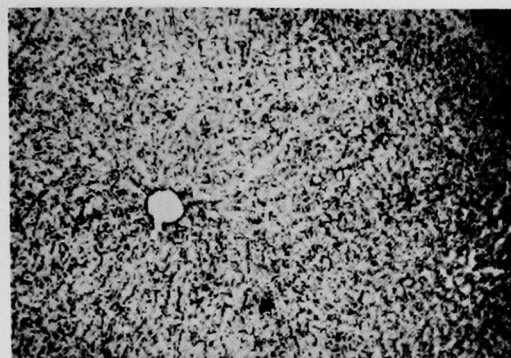
Toshiyuki Kojima

The First Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director : Professor Kiyowo Kosaka)

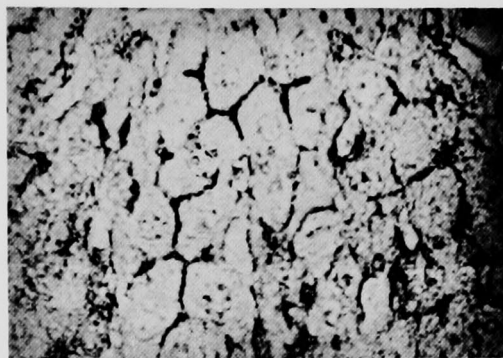
A histochemical study of ATPase activity in the experimentally intoxicated liver has been conducted and the following results were obtained.

1. ATPase was found to be mostly distributed at the sinusoid and bile capillary regions.
 2. When the liver was damaged acutely or chronically with carbon tetrachloride, necrosis of the liver cells developed. At the site of necrosis, the capillary vessels were dilated and ran irregularly and often underwent cystic transformation which were caused by the necrotic degeneration of the hepatic cells. At the intercellular spaces around the necrotic regions, a high ATPase activity was demonstrated. These changes were considered to be resulted from the compression of bile capillary vessels with hepatic cells which underwent vacuolar degeneration.
 3. No significant changes in ATPase activity at the bile capillary vessels was observed in the liver which received partial resection.
 4. The distribution of ATPase in the liver after the α -naphthyl isothiocyanate administration or the ligation of the bile duct suggested the presence of marked biliary obstruction. In the former, ATPase activity was found at the perilobular regions and increased towards the periphery. On the other hand, in the latter case a marked dilatation of the capillary vessels was observed and ATPase activity was more pronouncedly increased at the cholestasis.
 5. ATPase activity in the sinusoid wall appeared to be lowered at the regions where vacuolar degeneration occurred but markedly increased where the hepatic cells underwent necrosis. This tendency was particularly apparent in Kupffer's cells. ATPase activity in the sinusoid seemed to be increased slightly when the liver underwent partial resection. ATPase activity of the sinusoid markedly increased at the perilobular regions when intoxicated with α -naphthyl isothiocyanate and increased with the lapse of time in the case of hepatic duct ligation. These changes in ATPase activity under various experimental conditions suggest that this enzyme is involved in many aspects of hepatic functions particularly in the excretion and retention of the bile. The increase of ATPase activity in Kupffer's cells is also interpreted to indicate their intimate association to their functions.
 6. The increase of ATPase in Glisson's capsule at the time of chronic hepatic disorders and high ATPase activity in the fibers developed at the border plate after the α -naphthyl isothiocyanate administration strongly suggest that this enzyme plays an important role in the formation of the fibers.
-

国府島論文附图



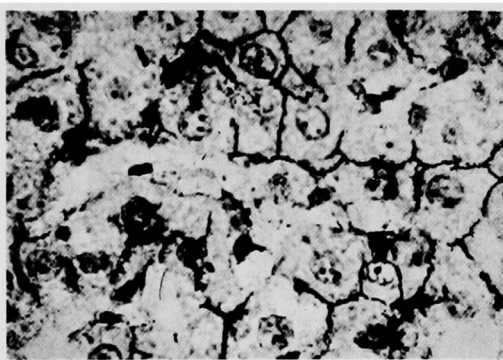
正常肝 ×40 類洞壁の活性は小葉辺縁帯中心帯共に中等度にみとめる。(Fig. 1)



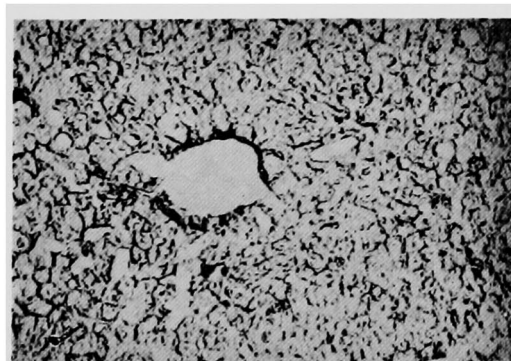
正常肝×400 胆毛細管の活性は中等度で拡張，蛇行等の形態学的異常はない。(Fig. 2)



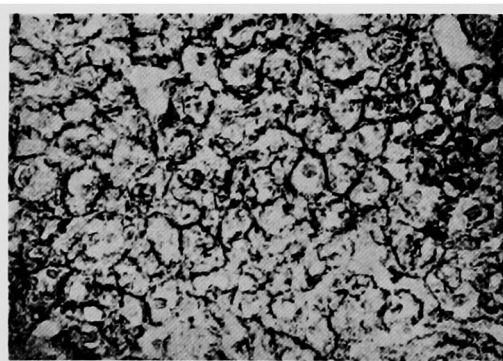
急性中毒肝 ×40 類洞壁の活性は増強し中心帯では一様でない。(Fig. 3)



急性中毒肝×400 胆毛細管の活性は増強し拡張がみられる。(Fig. 4)

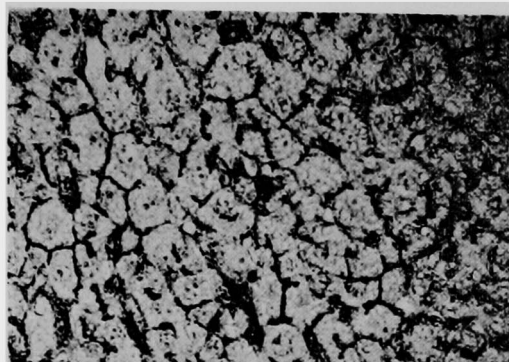


慢性中毒肝 ×40 類洞壁の活性は急性中毒肝に比し全般に活性が低下している。(Fig. 5)

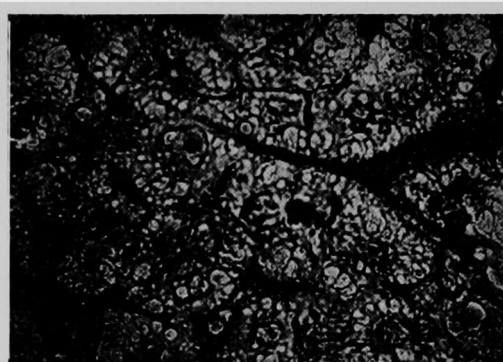


慢性中毒肝×200 胆毛細管の活性は類洞壁と同様に低下し，拡張，蛇行等の形態学的異常が軽度にとめられる。(Fig. 6)

国府島論文附図



部分的肝切除術後肝×200 Kupffer氏星細胞における活性は著明に増強している。(Fig. 7)



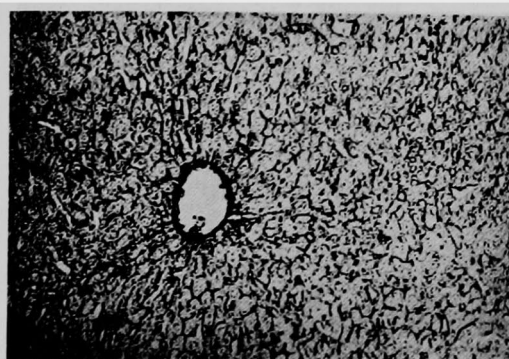
部分的肝切除術後肝×400 Kupffer氏星細胞における活性は著明に増強している。(Fig. 8)



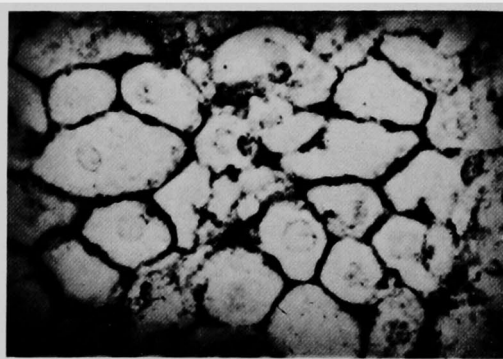
α -naphthyl isothiocyanate 投与肝×40 類洞壁の活性は全般に増強しており、特に潤管、胆栓、線維化の生成、増殖が著明で且つその部の活性は増強している。(Fig. 9)



α -naphthyl isothiocyanate 投与肝×200 胆毛細管の活性は増強し、拡張、蛇行等の形態学的異常をみとめる。(Fig. 10)



胆管結紮術後肝×40 胆栓に一致して活性は増強している。(Fig. 11)



胆管結紮術後肝×400 胆毛細管の活性は著明で特に胆栓に一致して増強がみられる。(Fig. 12)