《原 著》

生理的脂肪肝にみられる脂質排出機構を中心とした ウズラ肝の電子顕微鏡的研究*

平 塚 任**

I. はじめに

脂肪肝に関する研究として四塩化炭素、エチオニン、エタノールなど、いわゆる肝臓毒による脂肪肝の超微形態学的研究は数多くなされている¹⁻⁸⁾。しかし、ニワトリなど鳥類の産卵期の雌にみられる脂肪肝については、生化学的には、すでに古くから指摘されている事実^{9,10)}でありながら、その微細構造に関して検索を加えた研究はみられない。近年、免疫病理学的研究のための実験動物として各方面で用いられるようになったウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) にも、ニワトリと同様に、産卵期の雌では著明な脂肪肝がみられる。これはウズラが体重に比し卵が大きく、排卵回数も多く、それだけ物質代謝が活発なためと考えられるが、本研究は、そのウズラ肝を用いて肝細胞の脂肪化の過程、肝細胞の微細構造の変化、とくに肝細胞内に形成された脂肪滴の排出機構について光学顕微鏡（以下光顕と略す）ならびに電子顕微鏡（以下電顕と略す）的検索を行ったものである。

II. 材料および方法

ウズラは表1の飼料にて飼育した。飼育期間は9月下

表 1. ウズラ用配合飼料（日清製粉K.K）
成分量ならびに混入物およびその混入配合

粗 蛋 白 質	22.0%
粗 脂 肪	2.5
粗 線 維	5.0
粗 灰 分	13.0
アルファルファミール混入	3.0
炭酸カルシウム混入	6.0
磷酸カルシウム混入	2.0

* 要旨は、第60回日本病理学会総会（1971年）において発表

**A. Hiratsuka：朝日生命成人病研究所内分泌代謝科，慶応義塾大学病理学教室。

表 2.

解 化 後	No.	性	体 重 (g)	光 学 顕 微 鏡 所 見		
				細 胞 内 空 胞 量 (H-E)	脂 肪 量 (Oil red O)	脂 肪 化 びまん性 限局性
6	7	雄	95	+	±	
	8		102	±	+	
7	9	雌	88	++	++	○
	10		92	+~++	±~+	○
12	11	雄	110	+	+~++	○
	12		110	+	++	○
	13		110	+	+	○
	14		95	±	++	○
	15		98	+	+~++	○
	16		108	±	+~++	○
13	17	雌	142	+++	+++	○
	18		118	+++	+++	○
	19		142	++	+++	○
	20		120	+++	+++	○
	21		130	+	±	
	22		132	—	++	○

旬より12月下旬までの約3カ月間である。体重は表2のごとく、産卵開始前の孵化6~7週目のウズラでは雌雄差は認められなかったが、産卵開始後の孵化12~13週目の雌ウズラは雄より多かった。雌は孵化10週目に相次いで産卵開始した。産卵開始前の孵化6~7週目に雌雄各2羽ずつ（以下6~7週ウズラと記す）を、孵化12~13週目に雌雄各6羽ずつ（以下12~13週ウズラと記す）を、一晚絶食とし午前10時~10時30分にエーテル麻酔のもとに開腹し肝を取り出した。肝はただちに1mm³以下の大きさに細切し、磷酸緩衝1%オスミウム酸溶液にて2時間固定し、アルコール脱水の後、プロピレンオキシドを経てEpon 812に包埋した。ガラスナイフでPorter-Blum MT-1 Microtom および LKB

4,800 Ultrotom を用い超薄切片とし、鉛およびウランの二重染色を行った。日立 HS-7 および日本電子 JEM-100 U 型電子顕微鏡にて検鏡し、数枚ないし約 20 枚ずつ 5,000 倍、あるいは 10,000 倍の連続写真として約 950 枚の撮影を行い、2 倍の印画を作製し観察した後、さらに種々の倍率にて 320 枚の撮影を行い、これから 2 倍あるいは 3 倍の印画を作製し検討を加えた。

光顕用には肝の残りを 10% 中性ホルマリン溶液にて固定、パラフィン包埋を行い、約 3 μ 切片としてヘマトキシリンエオジン (以下 H-E と記す) 染色を行った。またホルマリン固定の一部を凍結切片とし、Oil red O による脂肪染色を行った。

III. 結 果

1. 肉眼的所見

6~7 週ウズラ肝は、表面滑沢、硬度は軟で淡赤紫色を呈し、断面血容多くなく、腫脹も認められず、小葉構造は明らかではない。これらの所見は雌雄ともほぼ同様であった。12~13 週雄ウズラ肝では、6~7 週のそれとほぼ同様な所見であったが、雌ウズラ肝は色調が帯黄白色を呈しているものが多かった。

2. 光学顕微鏡所見

H-E 染色標本ではウズラ肝は中心静脈など血管系ははっきりしているが、全体として小葉間結合組織やグリソ

図 説 明

図 1. 6~7 週雌ウズラ肝

(+)~(++) の脂肪化がびまん性にみられる (H-E, $\times 300$)。

図 2. 6~7 週雌ウズラ肝

(±)~(+) の脂肪化がびまん性にみられる (Oil red O, $\times 300$)。

図 3. 12~13 週雄ウズラ肝

(+) の脂肪化がびまん性にみられる (H-E, $\times 300$)。

図 4. 12~13 週雄ウズラ肝

(++) の脂肪化がびまん性にみられる (Oil red O, $\times 300$)。

図 5. 12~13 週雌ウズラ肝

(冊) の脂肪化が限局性にみられる。 (H-E, $\times 300$)。

図 6. 12~13 週雌ウズラ肝

(冊) の脂肪化が限局性にみられる (Oil red O, $\times 300$)。

図 7. 6~7 週雄ウズラ肝

糸粒体はやや大きく、crista が密である。脂肪滴 (L) は小さい。毛細胆管 (BC) には microvilli が豊富で周囲には dense body がある。両端には desmosome (矢印) がみられる ($\times 10,000$)。

図 8. 6~7 週雌ウズラ肝

電子密度の低い物質 (矢印) がはいつた不整形の「囊胞状間隙」がみられる。両端には desmosome を認めず、細胞間腔をたどって行くと (※印), Disse 腔 (D) にいたる。S: 類洞 ($\times 15,000$)。

図 9. 12~13 週雄ウズラ肝

6~7 週雌雄ウズラ肝の微細構造とはほぼ同様である ($\times 10,000$)。

図 10. 12~13 週雌ウズラ肝

巨大な脂肪滴がみられ、糸粒体 cristae はやや疎あるいは、ほとんどみられないものがある。糸粒体顆粒および糸粒体周囲の粗面小胞体も少ない。グリコーゲン領域はみられない。大きな脂肪滴に接して融合しつつある小さい脂肪滴 (矢印) がみられる。L: 脂肪滴, BC: 毛細胆管 ($\times 10,000$)。

図 11. 12~13 週雌ウズラ肝

脂肪滴は小さく少ない、一部はグリコーゲン領域に接してみられる。糸粒体 cristae が密にみられるものや、糸粒体顆粒が 1~4 個みられるものが多い。糸粒体周囲の粗面小胞体および遊離リボソームも豊富である。L: 脂肪滴 ($\times 10,000$)。

図 12. 12~13 週雌ウズラ肝

小さな脂肪滴 (矢印) がグリコーゲン領域内あるいはこれに接してみられる。糸粒体の cristae, 顆粒, 周囲の粗面小胞体および遊離リボソームが豊富である。BC: 毛細胆管 ($\times 20,000$)。

図 13. 12~13 週雌ウズラ肝

巨大な脂肪滴を有する肝細胞内で 2 個の脂肪滴が境界膜を介して相接している ($\times 7,500$)。

図 14. 12~13 週雌ウズラ肝

相接した脂肪滴の間の境界膜が離断し、内容の移動像がみられる ($\times 9,000$)。

図 15. 12~13 週雄ウズラ肝

脂肪滴 (L) が、「囊胞状間隙」に膨出している。間隙内には不整形の顆粒状物質 (矢印) を認める ($\times 16,000$)。

図 16. 12~13 週雄ウズラ肝

「囊胞状間隙」内には図 15 と同様の顆粒状物質 (矢印) を認める。「囊胞状間隙」に接して脂肪滴 (L) があり、これと融合しつつある小脂肪滴 (短い矢印) がみられる。グリコーゲン領域内にはいくつかの小脂肪滴および領域に接した脂肪滴もみられる ($\times 10,000$)。

図 17. 12~13 週雌ウズラ肝

微細顆粒状物質の充満した「囊胞状間隙」がみられる。さらにこれに脂肪滴 (L₁) よりその内容が流入しつつある像がみられる。また「囊胞状間隙」に膨出した脂肪滴 (L₂) もみられる。毛細胆管 (BC) と「囊胞状間隙」との連絡はない ($\times 8,000$)。

図 18. 12~13 週雌ウズラ肝

「囊胞状間隙」内に多数の顆粒状物質がみられ、同様の顆粒は肝細胞間隙および Disse 腔にもみられる (矢印)。「囊胞状間隙」は Disse 腔に直接開口することもある (太い矢印)。L: 脂肪滴, S: 類洞 ($\times 30,000$)。

ン鞘などは目立たず、小葉構造は著明ではなかった。脂肪染色による肝の脂肪化の程度を(±)～(卅)に区分を行い表2に示した。この脂肪は Oil red O 染色で可染性であることより、脂肪滴は中性脂肪であると考えられた。

1) 6～7 週ウズラ

雄ウズラ肝には(±)～(+), 雌ウズラ肝には(±)～(卅)の脂肪滴が肝小葉全体にびまん性に認められた(図1, 2)。その他の組織所見では雌雄間の差は認められなかった。

2) 12～13 週ウズラ

雄ウズラ肝には(±)～(卅)の脂肪滴が肝小葉全体にびまん性に認められたが、6～7 週ウズラ肝の所見と比較してみると、ほぼ同程度のものであった(図3, 4)。これに対し、雌では著明な変化が認められ、肝細胞内に大きな脂肪滴が密に存在するものが多く、小葉全体にびまん性に分布するものと、限局性に認められるものがあった(図5, 6)。しかし雌の一部には、No. 21, 22 のウズラ肝のごとく強い脂肪化のみられないものもあった。なお脂肪化の強い肝でも、小葉間結合組織グリソン鞘などへの小円形細胞浸潤などは認められなかった。

3. 電子顕微鏡所見

光顕上ほとんど差異の認められなかった6～7 週雌雄および12～13 週雄ウズラ肝は電顕で観察しても、肝細胞内小器官の基本微細構造については、いずれもほぼ同様の所見を示した。したがって、これらはウズラ肝細胞の基本構造と思われるので対照群とした。

1) 対照群の所見

図7は6～7 週雄ウズラ肝の電顕像で、左右および上部に3 個の肝細胞、および下部中央に1 個の肝細胞のごく一部がみられ、左端に核の一部がみられる。糸粒体は直径1.0～1.6 μ で12～13 週ウズラ肝に比してやや大きく、円形ないし類円形を呈する。糸粒体 crista は不規則な放射状、あるいは平行にやや密に配列し、糸粒体顆粒はほとんどみられない。糸粒体周囲の粗面小胞体は平行一部膨隆して配列しているが、糸粒体全周を取り囲むものは少なく、大体において短く、単層配列か、あるいはほとんどこれのみられないものもある。脂肪滴(L)は径1.4～1.6 μ 、数は少なく内部に電子密度のやや高い物質が認められる。脂肪滴には一層の限界膜が認められる。グリコーゲン顆粒は少なく、大部分は散在し、一部はわずかに集合した状態を示しているが、脂肪滴との位置的関係は密接ではない。細胞質には粗面小胞体は少

なく、滑面小胞体も散在性に少数認められる。ゴルジ野は多くなく、dense body が毛細胆管(BC)付近にみられる。毛細胆管は二つの肝細胞の間にみられ、desmosome (矢印)を認め、microvilli が豊富である。以上の所見は基本的には従来報告されている哺乳類肝の微細構造と同様の所見である。ただし次に述べるごとく哺乳類であるラット・マウスなどの肝にはみられない特異な構造が認められた。

図8は6～7 週雌ウズラ肝の電顕像で上下および右に3 個の肝細胞、右上には顆洞(S)がみられる。核、脂肪滴、グリコーゲン顆粒 microbody などは大きさ量など幾分異なる点もあるが、糸粒体、糸粒体顆粒、糸粒体周囲の粗面小胞体および他の細胞質内粗面および滑面小胞体、ゴルジ野などは図7(雄ウズラ肝)とほぼ同様である。このほか下記のごときラット・マウスなどにみられない特異な構造が認められる。すなわち上下肝細胞の間に電子密度の低い内容物を入れ、細胞膜によって境された不整形の間隙がみられる。この間隙については従来記載がないので、著者は「囊胞状間隙」(intercellular cystic space)と名づけた。内部には電子密度の低い均一な内容物のほかに、まばらに顆粒状の物質の存在が認められる(矢印)。同様の間隙は写真右側にも認められる。これら「囊胞状間隙」には microvilli は認められず、通常毛細胆管周囲に多い dense body もみられない。また desmosome もなく、「囊胞状間隙」を形成している上下肝細胞の細胞間隙を右上方へたどって行くと(※印)、これが Disse 腔(D)と連続していることがわかる。このような「囊胞状間隙」は雌ウズラのみならず雄ウズラにも同様に認め得る構造である。毛細胆管と「囊胞状間隙」との相異を表3に示したが詳細は考案で述べる。図9は雌ウズラでは産卵期に相当する12～13 週雄ウズラ

表 3.

	囊胞状間隙	毛 細 胆 管
Microvilli	—	+
Desmosome	—	+
周囲の dense body	—	+
Disse 腔への連絡	+	—
脂肪滴の接近接触	+	—
腔内顆粒状物質	+	—
内 腔	大 小 様 々	ほ ぼ 一 定
腔 の 周 囲	限界膜内は直ちに cytoplasm	均一性電子密度をもつ zone を介する

肝の電顕像であるが、微細構造では6~7週雌雄ウズラ肝とはほぼ同様の所見である。

以上のごとく肉眼的および光顕的には、6~7週雌雄および12~13週雌ウズラ肝はほぼ同様の所見を呈したが、これと同じように電顕所見でも、これらの間に差はほとんど認められなかった。したがって、この所見はウズラ肝における標準的なものと思われ、ウズラ肝の正常像と考えられるので、これを対照群とした。

この対照群の所見を哺乳類であるラットの肝細胞と比べてみると、これら肝細胞内小器官の基本微細構造については、ほとんど差が認められない。ただしウズラ肝では毛細胆管とは明確に識別し得る前述の『囊胞状間隙』のみられる点が特異的である。

2) 12~13週雌ウズラ肝の所見

12~13週雌ウズラの脂肪肝は表2に示すごとく脂肪化の著明なものとそうでないものがあるが、光顕で脂肪化が著明に認められる肝であっても電顕で観察すると巨大な脂肪滴によって満たされている肝細胞と、脂肪滴がほとんどない肝細胞とがある。後者すなわち脂肪滴の少ない細胞の電顕所見は、表2に示したNo. 21, 22のごとく、光顕でも脂肪化の少ない肝細胞の電顕所見とはほぼ同様の所見がみられ、脂肪滴によって満たされている肝細胞の電顕所見とは相異した所見がみられた。以下、脂肪滴の多いものと少ないもののそれぞれについて述べる。

図10は12~13週雌ウズラ肝で巨大な脂肪滴のみられる肝細胞である。糸粒体径は $0.8\sim 1.0\mu$ 円形ないし楕円形、糸粒体cristaは不規則放射状あるいは帯状にややまばらに配列し、一部不鮮明またはほとんど認められないものがある。糸粒体顆粒のみられるものがあるが、その数は多くない。糸粒体周囲の粗面小胞体は少なく平行、一部膨隆しているのが認められ、長さは短いものが多く、単層配列である。脂肪滴は径 $2.0\sim 8.0\mu$ に及び、ほぼ円形ないし楕円形で巨大な脂肪滴に接して融合しかかった小さい脂肪滴(矢印)がみられる。脂肪滴内には電子密度の低い均一な、あるいは電子密度のやや高い不均一な内容物を認める。細胞質は巨大な脂肪滴によってその大半を占められている。細胞質内の粗面小胞体は一部は膨隆を示し、その他滑面小胞体、ゴルジ野を認める。毛細胆管の周囲にdense bodyが認められる。グリコーゲン顆粒は少なく、領域としては認められない。遊離リボゾームも多くない。

以上を要約すると大きな脂肪滴のみられる肝細胞では、糸粒体cristaは比較的まばらで、糸粒体顆粒は認めら

れないか、あっても少数である。糸粒体周囲の粗面小胞体もまばらであり、グリコーゲン領域も減少している。遊離リボゾームも少ない。

図11は同じく12~13週雌ウズラ肝である。光顕では脂肪化の強い肝であるが、写真はそのなかで脂肪滴の少ない細胞の電顕像である。糸粒体径は $0.6\sim 1.0\mu$ 円形ないし楕円形を示し、糸粒体cristaは不規則放射状ないしは、帯状にやや密に配列するものと、不鮮明なcristaをもったものとがみられる。糸粒体顆粒はほとんどのものに1~4個みられる。糸粒体周囲の粗面小胞体は多く、多重層状に配列するものがあり、それが長く糸粒体全周に及ぶものがある。脂肪滴は径 $0.7\sim 2.1\mu$ で単層の膜をもつようにみえる。一部の脂肪滴はグリコーゲン領域に接してみられる。グリコーゲン顆粒は領域として認められる。細胞内にはやや腫大した粗面小胞体、ゴルジ野が多くみられ、そこには滑面小胞体が多い。遊離リボゾームも多く認められる。

以上を要約すると、肝全体としては脂肪化が強くても、脂肪滴の小さい肝細胞では、糸粒体cristaが密で、糸粒体顆粒、糸粒体周囲の粗面小胞体、遊離リボゾームの増加がみられ、グリコーゲン顆粒も領域として認められる。

図12は12~13週雌ウズラ肝で表2(No. 21)に示すごとく光顕で脂肪化の所見に乏しい肝である。電顕で観察しても脂肪滴は少なく、あっても小さい。糸粒体cristaは豊富で密に配列し、粗面小胞体は糸粒体を取り巻いて、あるいは細胞質に広く存在する。ほとんどが平行配列をしている。糸粒体顆粒も多い。滑面小胞体および遊離リボゾームがゴルジ野付近に認められる。グリコーゲン顆粒も領域として認められ、そのなか、およびこれに接して小さな脂肪滴(矢印)がみられる。毛細胆管の近くにdense body、他にlysosomeが認められる。このように光顕・電顕ともに脂肪化の少ない肝細胞では、糸粒体cristaが豊富で密であり、糸粒体顆粒、糸粒体周囲の粗面小胞体、遊離リボゾームなどの増加がみられ、グリコーゲン顆粒も領域として認められた。すなわち、この所見は、光顕的には同様の所見である対照群とも異なり、著明な脂肪化を示す肝のなかでも、脂肪滴の少ない肝細胞の電顕像と類似の微細構造を示している。

以上12~13週雌ウズラ肝では、脂肪滴の少ない場合でも、細胞内小器官が豊富である所見からみて旺盛な合成機転がうかがわれた。このことより、この肝細胞は脂肪化準備状態にあると考えられた。

3) 脂肪滴の出現とその排出(所見の解析を含めて)

i) 脂肪滴の出現と相互の融合について

肝細胞における脂肪滴の形成については、当然、各細胞内小器官の関与があるものと思われるが、12~13 週雄ウズラ肝の図 16 についてみると、ここではグリコーゲン領域内に小脂肪滴を認め、やや大きなものがグリコーゲン領域に接している。この所見は図 11 でも同じく認められ、電顕像からのみ推測すれば、ウズラ肝における脂肪滴の形成には、グリコーゲン領域の関与がもっとも大きいように思われる。脂肪滴が融合、その他により大きくなるとグリコーゲン領域との関係は明らかでなくなる。その原因としては、①脂肪滴が細胞内を移動するためか、②切片が薄く両者の立体的相互関係が把握できないためか、③脂肪滴の出現によりグリコーゲン顆粒が消耗されて消失するためか、などの可能性が考えられる。いずれにしても小さな脂肪滴が漸次融合増大を繰り返し、巨大な脂肪滴になっていくものと考えられる。前述のごとく図 10 では、比較的小さな脂肪滴と巨大な脂肪滴とが融合しつつある像が観察されたが、巨大な脂肪滴相互も融合するのがみられた。すなわち図 13 では 2 個の巨大な脂肪滴が相接しているが、限界膜がまだ認められるものであり、図 14 では限界膜が離断して二つの巨大な脂肪滴の融合が行われつつあると考えられる所見である。このようにして脂肪滴は漸次増大していくものと思われる。

ii) 脂肪滴の排出所見

次は脂肪滴の排出についてであるが、図 8 ではウズラ肝の特徴的な構造として「囊胞状間隙」が細胞間隙を経て Disse 腔にいたる所見を示したが、この経路が脂肪滴の排出にもっとも関係の深いものと思われた。

図 15 は 12~13 週雄ウズラ肝で「囊胞状間隙」に接し、一部をこの間隙内に膨出した脂肪滴 (L) がみられる。図 16 も同様の所見であるが、「囊胞状間隙」内には円形ないし類円形の塊が粗大顆粒状 (矢印) にみられ、その内容はほぼ均一性で明るい。これは脂肪滴が「囊胞状間隙」内に排出されて小塊状となった可能性が考えられる。この過程については考案の項で述べる。

図 17 は 12~13 週雌ウズラ肝で「囊胞状間隙」腔内に微細顆粒状物質が充満し、これにすでに膜の離断が起こり、囊胞内に流出しつつある脂肪滴 (L₁) と、「囊胞状間隙」に膨出し、まさに膜が破綻せんとしている脂肪滴 (L₂) などが認められる。なお右上には毛細胆管 (BC) がみられるが、そのなかには顆粒状物質はみられず、「囊胞状間隙」との連絡はないと思われる。このようにして大小種々の大きさの脂肪滴が「囊胞状間隙」腔へ排

出されるものと考えられる。囊胞内に出た脂肪滴は、粗大顆粒状にまばらに認められるものと (図 15, 16)、微細顆粒状を呈し、「囊胞状間隙」腔内一杯に充満するもの (図 17, 18) とがあり、前者は対照群に、後者は 12~13 週雌ウズラ肝にみられた所見である。これは 12~13 週雌ウズラ肝においては、排出された多量の脂肪滴が「囊胞状間隙」内で、対照群に比して、より大量により強く細分化作用を受けた結果ではないかと考えられる。この点に関しても考案で述べる。

iii) Disse 腔への排出について

図 18 は 12~13 週雌ウズラ肝で「囊胞状間隙」内には、前述した微細顆粒状のほぼ均一な電子密度をもった物質がみられる。同じような顆粒は、肝細胞間隙および Disse 腔内にもみられる (矢印)。「囊胞状間隙」が細胞間隙を経ずに直接 Disse 腔に開口していることもあり (太い矢印)、ここでも同様の物質が認められる。

図 15 より図 18 にいたる写真は、「囊胞状間隙」に排出されたものが肝細胞間隙を通り Disse 腔へ、あるいは「囊胞状間隙」から直接 Disse 腔にいたる所見を示すものと考えられる。

以上より肝細胞内の脂肪滴が、「囊胞状間隙」より肝細胞間隙を通り、Disse 腔にいたる経路が形態学的に認められたことになる。なおこれら粗大ないし微細顆粒状物質は、考案で述べるごとくりポ蛋白であると考えられる。

4. 所見のまとめ

1) 6~7 週雄ウズラ肝および 12~13 週雄ウズラ肝では、肉眼的あるいは光顕の所見と同様に、電顕でもほぼ同じような所見がみられた。すなわち基本的微細構造は哺乳類であるラットなどと同様である。しかし肝細胞間にみられた「囊胞状間隙」は、ラットなどにはみられない特異なものであった。

2) 12~13 週雌ウズラ肝では光顕で全体に脂肪化の認められた肝は、電顕でみると大きな脂肪滴を有する肝細胞と、小さな脂肪滴しか有しない肝細胞とがあり、前者に比し、後者では細胞内小器官が豊富で、旺盛な合成機転がうかがわれた。また光顕でも脂肪化に乏しく、電顕でも小脂肪滴しか有しなかった肝細胞についても、細胞内小器官は後者すなわち脂肪肝ではあるが、小さな脂肪滴しか有しなかった肝細胞と同様の所見が認められた (表 4)。これらの所見より 12~13 週雌ウズラ肝では、脂肪滴が少ない細胞は脂肪化準備状態にあると考えられる。

3) 脂肪滴の出現にはグリコーゲン領域がもっとも

表 4. 12~13 週雌ウズラ肝

	大きな脂肪滴 をもつ肝細胞	小さな脂肪滴 をもつ肝細胞
糸粒体 crista	疎・乏	豊富・密
糸粒体顆粒	(-)~少数	(+)~数個
糸粒体周囲粗面小胞体	疎~欠	密~長
グリコーゲン領域	消失~減少	(+)
粗・滑面小胞体	不変	増加
遊離リボソーム	少な	多い

関係が深いように思われる。

4) 肝細胞内で形成された脂肪滴は、まず「囊胞状間隙」に排出され、肝細胞間隙を経るか、あるいは直接 Disse 腔にいたるとみられる所見を得た。

IV. 考 案

1. 一般の脂肪変性との相異

産卵期の雌ウズラにみられる脂肪肝は四塩化炭素、エチオニン、エタノールなど、いわゆる肝臓毒によって発現してくる退行性変化としての脂肪肝とは異なった、いわば生理的脂肪肝である。肝臓毒による脂肪肝に関しては、生化学的、酵素学的に種々検討が加えられ、形態学的にも電顕による研究が数多くなされている。肝臓毒を投与した動物実験では、肝細胞内小器官などの変性、崩壊、消失などをみた報告が多い。

Arakawa¹⁾ はエチオニンをラットに投与すると、急性の変化として肝細胞内の粗面小胞体の断裂、リボソームおよび限界膜の消失がみられるといい、Wood⁵⁾ はラットにエチオニンによる慢性中毒を起こさせ、内に電子密度の高い物質を含む腫大した糸粒体、不明瞭、不規則な糸粒体 crista, , 封入体をもった microbody, 細胞内 filament の増加、毛細胆管の拡大、microvilli の減少および縮小を認めている。Bassi²⁾ は、ラットに四塩化炭素を用いて、細胞内小器官の初期の変化から脂肪滴出現までの過程を観察し、小胞体の消失、糸粒体の腫脹、不明瞭分節状糸粒体 crista および hydropic cell の出現などを認めている。Reynolds⁴⁾ は、四塩化炭素を用い、ラット肝で粗面小胞体の空胞化、膜消失、糸粒体の腫大、多形化などを認め、Stenger³⁾ は慢性中毒において lysosome の増加を認め、また脂肪滴を多くもつものは細胞の障害がより強いとしている。一方、Stein ら⁶⁾ はエタノール投与ラットで急性の変化として肝細胞糸粒体の“budding”様変化を認めたといひ、Bernard ら⁷⁾ はエタ

ノールを投与したヒトで肝生検を行い、滑面小胞体の増加、糸粒体の crystalline matrix を認めている。

以上のごとく、肝臓毒によって惹起される脂肪肝では、各肝細胞内小器官、すなわち小胞体、糸粒体、糸粒体 crista, その他毛細胆管、microvilli, microbody, lysosome の変性崩壊消失などの著明な変化がみられる。これに対し、産卵期雌ウズラ肝には、このような変化は観察されない。したがってこのような脂肪肝は産卵期という生理的条件下にあって、物質代謝が亢進した時にみられる「生理的脂肪肝」であると考えられる。

1937~1938 年 Lorenz ら^{9~12)} はニワトリを用い、血清および肝の脂質について詳細な検索を行っている。彼らによれば、未成熟・成熟雌ニワトリ、および未成熟雌ニワトリの間では、血清および肝組織内脂質量に差異を認めなかったのに対して、産卵中の雌ニワトリでは中性脂肪などの著明な上昇を認めている。本研究でもウズラ肝においてではあるが、本文に述べたごとく形態学的検索でまったく同様の結果を得たことになる。彼らは、また未成熟雌ニワトリに妊馬血清あるいは尿を投与し、脂質の動きを観察し、性ホルモンの差が高脂血症をもたらすことを証明している。最近ではニワトリの血清、卵黄および細胞内リボ蛋白について生化学的にさらに詳細な検討を加えた研究¹³⁾もある。

肝細胞にみられる脂肪化の度合を規定するものとしては、それにいたる機序は種々あっても、結局は肝細胞における triglyceride の合成とその消費との差によって決定される¹⁴⁾。肝における triglyceride は主として肝細胞内にて malonyl CoA 系路から得られるか、あるいは末梢脂肪組織から NEFA (non esterified fatty acids) の形で得られる脂肪酸と、解糖系により供給される glycerophosphate とにより合成されるといわれている。図 12 のごとく 12~13 週雌ウズラ肝においては、小さな脂肪滴しか有しない肝細胞は脂肪化準備状態にあると思われる所見を示したが、このことより肝細胞内においては旺盛な triglyceride の合成が行われていることがうかがわれる。また脂肪化の強い肝細胞でのグリコーゲン領域の減少消失についても、triglyceride 合成亢進のため、glycerophosphate の需要が増し、これにより glycolysis が促進される結果、このような所見として認められるのではないかと考えられる。一方、図 17 のごとく、旺盛な脂肪の排出機転もみられるので、産卵期ウズラ肝にみられる脂肪肝の成因としては、triglyceride の合成促進が考えられるが、その放出の亢進をも伴っているという

ことができる。

グリコーゲン領域に出現する脂肪滴は triglyceride と思われるが、電顕下にみ得るものは脂肪合成のかなり後の過程をみているものと考えられる。したがって対照および産卵期雌ウズラの細胞内小器官、グリコーゲン領域と関連のある小脂肪滴など、脂肪形成を示唆する所見はみられても、その正確な過程は電顕の移行像のみから判断することは困難である。Triglyceride の形成は、生化学的には解明されているが、形態学的には種々の研究¹⁵⁻¹⁸⁾がなされているものの、その詳細についてはわかっていない。現在の段階では生化学の裏づけを完全に行えるほどの電顕像は得られず、Radioautography,あるいは電顕的組織化学法などを用いた将来の検討に待たなければならない。

その他の細胞内小器官についてみると、本研究では、糸粒体径は6~7週ウズラ肝では1.2~1.6 μ と大きく、12~13週ウズラ肝では1.0~1.2 μ と小さい。また肝細胞の脂肪化につれて糸粒体周囲への粗面小胞体の接近もみられた。また、12~13週雌ウズラ肝で脂肪化準備状態にあると考えられた脂肪滴の少ない肝細胞では、糸粒体 crista の増加などがみられたが、発生途上にある chick liver では糸粒体径は孵化前に小さく、孵化時には最大の1 μ 径となり、以後ふたたび小さくなることや、粗面小胞体の糸粒体周囲への接近などを認めた報告¹⁹⁾や、ラットを寒冷に暴露すると褐色脂肪織内細胞の脂肪滴の増加に伴って糸粒体の腫大、crista の増加などをみた報告²⁰⁾もあり、ウズラは生後早期に生殖可能となり、成長が早いこと、また産卵期雌ウズラ肝では著明な脂肪化がみられることなどを考えると、上記細胞内小器官の変化は興味深い所見である。糸粒体顆粒についても肝細胞に脂肪滴が充満しているときには減少し、脂肪滴が少ない肝細胞ではこの顆粒が増加しているのがみられたが、この顆粒についても早くから顆粒内の Mg^{++} , Ca^{++} の量との関係がいわれており、最近、糸粒体顆粒の数および Mg^{++} , Ca^{++} の量について検討を加えた報告²¹⁾もある。またラット褐色脂肪織内細胞を胎児期より観察した場合に、出産時を最高として糸粒体顆粒の増大、増加がみられるところから、この顆粒は細胞がグリコーゲンおよび Lipid をたくわえようとしている時期に出現すると述べた報告²²⁾もみられ、これらの点からみて、ウズラ肝の場合にも細胞内の合成機転との密接な関係が考えられる。

2. 脂肪滴の性状について

写真でそれぞれの脂肪滴を観察すると種々な形態的な

相異が認められる。すなわち電子密度の低い均一なもののみによって占められている脂肪滴(図9, 15, 16)から、電子密度のやや高い顆粒状ないし不規則不整形のもの(図10, 13, 14, 17, 18)を種々な程度に含むものまで各様であるが、その生化学的性状に關しての意味づけは不明である。ただし、産卵期雌ウズラ肝にみられる脂肪滴は対照群の脂肪滴に比して電子密度の高い物質を多く含み、またそのような肝の『囊胞状間隙』腔内にみられる内容物も微細顆粒状物質の充満像をみるが多い。これらの所見は産卵期間中の物質代謝亢進との深い関係を示唆するものと考えられる。

3. 『囊胞状間隙』について

ラット、マウスなど哺乳類の肝については、超微形態学的に種々の研究がなされ、報告も数多くみられるのに反し、鳥類に関するものは少ない。肝細胞の正常構造についての記述もほとんどこれをみない。著者が『囊胞状間隙』と呼んだものも、これを取り上げて論じたものはない。図8, 15~18に示したごとく毛細胆管とは表3にみられるごときいろいろな点で明らかに相異している。すなわち、『囊胞状間隙』は単一の細胞膜によって区切られた腔で microvilli を欠き、腔の大きさもいろいろで、形も不整である。腔周囲への dense body の集合もみられない。Desmosome をもたず、肝細胞間隙をたどって行くと Disse 腔へ到達する。直接 Disse 腔へ開口している所見もみられる。(図18, 太い矢印)、『囊胞状間隙』は細胞膜を介して直接肝細胞質となり、周囲には細胞内小器官が接近あるいは、ほとんどこれに接触している。脂肪滴も大きさに関係なく、これに密接に接触してみられるものがあり、図15のごとき腔内に膨出している脂肪滴もある。

Schatzki²³⁾ はラット肝で lanthan 注入を行い、Disse 腔と毛細胆管腔との関係を観察し、通常の状態では交通はないが、条件によっては両者間の連絡を認めたと述べている。産卵期雌ウズラ肝では、『囊胞状間隙』と毛細胆管について観察した場合、図17にみられるごとく、『囊胞状間隙』腔内には微細顆粒状物質が充満しているが、隣接の毛細胆管内には全然このような物質を認めなかった。このことより脂肪滴の排出に当たっては、両者間の連絡はないと考えられる。

4. リポ蛋白形成の場としての『囊胞状間隙』

肝細胞内に認められる脂肪滴は triglyceride であり、これが、肝細胞より排出されて血清中に現われるときにはリポ蛋白となっているのであるから、その経路のどこ

かでアポ蛋白、磷脂質、あるいはコレステロールとの結合が行われなければならない。現在のところ、これらに関しての詳細は明らかにされていない。理論的には肝細胞内、「囊胞状間隙」内、肝細胞間隙内、Disse腔内などの可能性が考えられる。本研究ではそれが「囊胞状間隙」に違いないとの結論が得られたので以下そのことについて述べる。

Triglyceride そのものは hydrophobic であるため、肝細胞内では triglyceride よりなる droplet の接触があれば融合、合体が起こり得る。電顕像でも脂肪滴同志が、漸次その表面が接触融合し、限界膜の離断、合体する所見(図 10, 13, 14, 16~18)がみられる。一方、末梢流血血清中ではリポ蛋白の粒子同志の融合現象はみられず、血液中においてこれらが常に恒常的な形態を維持できるのは triglyceride を中心としてその周囲にアポ蛋白、磷脂質およびコレステロールなどが結合して hydrophilic な層ができ、これが保護膜としての役割を演じているからと考えられている。写真上、「囊胞状間隙」腔内には図 8, 15~18 のごとく粗大ないし微細顆粒状の物質を認める。この物質は「囊胞状間隙」腔に流入した脂肪滴が、細分化したものと考えられる。脂肪滴が「囊胞状間隙」内に流入した際、腔内に前述のアポ蛋白、磷脂質およびコレステロールなどが存在すれば、脂肪滴はこれらの作用を受け細分化されるであろう。写真上、肝細胞内に認められる脂肪滴は、常に球状を保ち、脂肪滴として融合増大の傾向を有する反面、「囊胞状間隙」腔内にみられるものは脂肪滴とは形状の変わった粗大ないし微細顆粒状を示し、大きさ約数百ないし 1,000 Å 程度に細分化されたものとなっている。肝細胞間隙、Disse腔に認められるもの(図 18)も「囊胞状間隙」腔内にみられるものとはほぼ同様のものであるところから、脂肪滴がリポ蛋白へと細分化される場所は「囊胞状間隙」腔内と考えられる。すなわち肝細胞内で脂肪滴、アポ蛋白、磷脂質、コレステロールなどの産生が行われ、これらが「囊胞状間隙」腔内にそれぞれ排出され、この間隙腔内で初めて脂肪滴とアポ蛋白、磷脂質およびコレステロールとの結合、それに続いて細分化が行われるものと考えられる。この過程は時間的には速かに反応が起こっていると思われる所見から判断して、恐らく酵素などの作用を介することなく、物理的に反応が進むものと思われる。なお肝細胞内で細分化された後、排出されるという可能性もあるが、写真上、「囊胞状間隙」腔周囲の所見からみて、これを首肯させるものは認められなかった。した

がって脂肪滴が細分化作用を受ける場所は「囊胞状間隙」腔にはかならないと考えられる。

図 17, 18 のごとく産卵期の脂肪肝にみられる「囊胞状間隙」腔内には微細顆粒状物質が充満しているのがみられるが、この所見は対照群にみられた粗大顆粒状ないし小塊状をなしているものと異なっている。これは脂肪滴を多量に処理するための排出機転の亢進によって、肝細胞より「囊胞状間隙」腔内への前記アポ蛋白、磷脂質およびコレステロールの排出増加が必然的に起こり、脂肪滴の「囊胞状間隙」内での微細顆粒化作用の増強が起こっているという相異から、産卵期と対照群の「囊胞状間隙」内容に差がみられるのではないかと考えられる。また、どのような大きさの脂肪滴が排出されるのかということについては、いろいろな大きさの脂肪滴が「囊胞状間隙」腔に接してみられるところから、大きさによって規定されるのではなく、「囊胞状間隙」腔壁に到達したものが、なんらかの作用あるいは機序により膜の開口が起こり、内容が放出され—いわゆる emiocytosis—、脂肪滴の大きさには関係はないものと考えられる。

以上を要約すると

- i) 疎水性である脂肪滴は「囊胞状間隙」腔においてアポ蛋白、磷脂質、コレステロールなどの作用を受け細分化され親水性となり Disse腔にいたる。
- ii) 対照群に比し、産卵期雌ウズラ肝では「囊胞状間隙」腔での脂肪滴細分化作用の亢進がうかがわれる。
- iii) 「囊胞状間隙」へ種々の大きさの脂肪滴が排出される。

以上電顕像を中心にウズラ肝の脂肪形成、排出について述べた。中毒による脂肪肝などと異なり、細胞内小器官の変性崩壊消失なしに脂肪滴が出現し排出される。この過程は生理的脂肪変性ということもできる。とくに「囊胞状間隙」と、これへの脂肪滴排出機転については従来記載のない興味ある所見で、ウズラ肝は広く脂質代謝の研究に応用できる好個の研究試料であると思われる。

V. 総 括

産卵期雌ニワトリでは血清および肝における中性脂肪の著明な増加がみられることは古くから指摘されていた事実でありながら、これに超微形態的検索を加えた報告はみられない。ウズラもニワトリと同様に産卵期雌では著明な脂肪肝がみられる。本研究では未成熟および成熟ウズラを用い、肝脂肪変性について光顕ならびに電顕的観察を行い次の結果を得た。

i) 未成熟雌雄および成熟雄ウズラ肝は脂肪滴少なく光顕・電顕的にはほぼ同様の所見が得られた。

ii) これに対し成熟雌ウズラ肝では著明な脂肪肝がみられた。電顕的には脂肪滴の多い肝細胞と、これの非常に少ない肝細胞とがあり、この両者の間では細胞内微細構造の相異がみられた。すなわち前者に比し、後者ではより旺盛な活動性の考えられる所見が得られ、脂肪化準備状態にあると考えられた。これらの所見は、いわゆる肝臓毒に際し認められる退行性変性としての脂肪肝とはまったく異質のもので、産卵という生理的条件下にみられる生理的脂肪肝と考えられた。

iii) 肝細胞内小器官の微細構造は基本的には哺乳類であるラット、マウスなどと同様であったが、従来いまだ指摘されたことのない特異な所見として「囊胞状間隙」があり、ここでは肝細胞内脂肪滴の排出機転が観察された。「囊胞状間隙」は肝細胞と Disse 腔との間にあり、肝細胞内において合成された脂質などの細分化を行い、これを Disse 腔にまで送る通路と考えられた。

iv) 肝細胞内に形成された中性脂肪である脂肪滴が「囊胞状間隙」内で細分化され、リポ蛋白として血清中に現われるまでにいたる過程について考察を加えた。

稿を終えるに臨み、ご指導ご校閲を賜わった小林忠義教授に深甚なる謝意を表すとともに、終始、直接ご指導をいただいた坂口弘助教授に心から感謝する。なお生化学的な面で貴重なご助言をいただいた赤沼安夫博士に深謝する。

文 献 1) Arakawa, K.: An electron microscopic observation on hepatic cells of albino rats after DL-ethionine administration; I. Changes of the rough surfaced elements of endoplasmic reticulum, *J. Electron Micro.*, **8**: 54, 1960. 2) Bassi, M.: Electron microscopy of rat liver after carbon tetrachloride poisoning, *Exp. Cell Res.*, **20**: 313, 1960. 3) Stenger, R. J.: Hepatic parenchymal cell alterations after long-term carbon tetrachloride administration, *Amer. J. Path.*, **43**: 867, 1963. 4) Reynolds, E. S.: Liver parenchymal cell injury I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride, *J. Cell Biol.*, **19**: 139, 1963. 5) Wood, R. L.: The fine structure of hepatic cells chronic ethionine poisoning and during recovery, *Amer. J. Path.*, **46**: 307, 1965.

6) Stein, O. and Stein, Y.: Fine structure of the ethanol induced fatty liver in the rat, *Israel J. Med. Sci.*, **1**: 378, 1965. 7) Lane, B. P. and Lieber, C. S.: Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets, *Amer. J. Path.*, **49**: 593, 1966. 8) Lieber, C. S. and Rubin, E.: Alcoholic fatty liver in man on a high protein and low fat diet, *Amer. J. Med.*, **44**: 200, 1968. 9) Lorenz, F. W., Entenman, C. and Chaikoff, I. L.: The influence of age, sex, and ovarian activity on the blood lipids of the domestic fowl, *J. Biol. Chem.*, **122**: 619, 1937. 10) Lorenz, F. W., Chaikoff, I. L. and Entenman, C.: Liver lipids of the laying and non-laying bird, *J. Biol. Chem.*, **123**: 577, 1938.

11) Entenman, C., Lorenz, F. W. and Chaikoff, I. L.: The endocrine control of lipid metabolism in the bird. I. The effects of pregnant mare serum upon the blood and liver lipids of the domestic fowl, *J. Biol. Chem.*, **126**: 133, 1938. 12) Lorenz, F. W., Chaikoff, I. L. and Entenman, C.: The endocrine control of lipid metabolism in the bird. II. The effects of estrin on the blood lipids of the immature domestic fowl, *J. Biol. Chem.*, **126**: 763, 1938. 13) Schjeide, O. A.: Progress in chemistry of fats and other lipid, Macmillan Co., New York, 1963, p. 251. 14) Lombardi, B.: Considerations on the pathogenesis of fatty liver, *Lab. Invest.*, **15**: 1, 1966. 15) Jones, A. L., Ruderman, N. B. and Herrera, M. G.: An electron microscopic study of lipoprotein production and release by the isolated perfused rat liver, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**: 4, 1966.

16) Hamilton, R. L., Regen, D. M., Gray, M. E. and LeQuire, V. S.: Lipid transport in liver. I. Electron microscopic identification of very low density lipoproteins in perfused rat liver, *Lab. Invest.*, **16**: 305, 1967. 17) Stein, O. and Stein, Y.: Lipid synthesis, intracellular transport, storage, and secretion. I. Electron microscopic radio-autographic study of liver after injection of tritiated palmitate or glycerol in fasted and ethanol-treated rats, *J. Cell Biol.*, **33**: 319, 1967. 18) Stein, O. and Stein, Y.: The role of the liver in the metabolism of chylomicrons, studied by electron microscopic auto-radiography, *Lab. Invest.*, **17**: 436, 1967.

- 19) Stephens, R. J. and Bilal, R. G.: Ultrastructural changes in the developing chick liver I. General cytology, J. Ultrastruct. Res., **18**: 456, 1967.
- 20) Suter, E. R.: The fine structure of brown adipose tissue I. Cold-induced changes in the rat, J. Ultrastruct. Res., **26**: 216, 1969.
- 21) Pasquali-Ronchetti, I., Greenawalt, J. W. and Carafoli, E.: On the nature of the dense matrix granules of normal mitochondria, J. Cell Biol., **40**: 565, 1969.
- 22) Suter, E. R.: The fine structure of brown adipose tissue II. Perinatal development in the rat, Lab. Invest., **21**: 246, 1969.
- 23) Schatzki, P. F.: Bile canaliculus and space of Disse. Electron microscopic relationships as delineated by lanthanum, Lab. Invest. **20**: 87, 1969.