

## マウス胎子および新生子肝臓における肝内胆道の免疫組織化学的観察ならびに超微形態学的観察

熊野 一郎

川崎医科大学解剖学, 〒701-0192 倉敷市松島577

**抄録** 胎子期から新生子期のマウス肝臓で免疫組織学ならびに超微形態観察を行い、肝臓造血終息期における造血系死細胞処理と肝内胆道系との関係を検討した。毛細胆管は径約1 $\mu$ mで内腔に微絨毛を持った細管として胎生14日に隣接する肝細胞間に形成される。胎生後期から生後早期の肝臓では、毛細胆管においてその径が1.5倍から3倍に拡張するのがしばしば観察される。生後早期の肝細胞は造血系細胞要素を食作用で取り込み、径3~5 $\mu$ mの大型封入体を形成し、その内に空胞状膜構造やミエリン像が含まれる。二次ライソゾームである大型封入体は最終的に毛細胆管壁と融合し、それによって毛細胆管が拡張、封入体の内容物が毛細胆管腔へと放出される。拡張毛細胆管壁で大型封入体由来する部分は微絨毛を欠き、毛細胆管腔壁の微絨毛の分布に局在が生じる。出生直後から生後早期の肝臓において、造血系細胞は小葉間結合組織内で、特に小葉間胆管に隣接して残存し、小葉間結合組織内の造血細胞集団にはTUNEL陽性の細胞が出現する。また、TUNEL陽性封入体は小葉間胆管上皮細胞中にも観察される。小葉間結合組織内の造血細胞集団は成熟好中球および赤芽球で構成され、好中球の中には細胞死の徴候を呈するものも含まれる。胆管上皮細胞は、細胞死に至った好中球、赤芽球および脱核赤芽球核を貪食し、TUNEL陽性封入体を形成する。骨髄造血の発達に伴い造血細胞は肝臓内より急速に消失する。その際通常は活発な食作用を示さない肝細胞や胆管上皮細胞が造血系死細胞の処理に加わる事が明らかとなり、毛細胆管をはじめとする肝内胆道が造血系死細胞の処理・排泄経路として生後早期に機能することが示された。

(平成23年3月2日受理)

キーワード：肝臓造血，毛細胆管，胆管上皮，小葉間結合組織，新生子マウス

### 緒言

周知のごとく、ヒトを含む哺乳類において、終生の造血器官は骨髄であるが、骨髄造血が成立する以前の胎生期では、造血器官は胎子の発達と共に変遷する<sup>1-3)</sup>。胎生期と出生後で大きくその機能を変える臓器である肝臓は、胎子期においては骨髄造血開始以前の主要な造血器官である<sup>4-6)</sup>。肝臓造血に先立ち、原始赤血球造

血が最も早期に卵黄囊で血管芽細胞から開始する<sup>7,8)</sup>。恒常性造血の幹細胞は卵黄囊に加え、大動脈-生殖隆起-中腎領域(AGM)と胎盤に出現し、胎子・肝臓を経て最終的に骨髄に定着する<sup>9-13)</sup>。恒常性造血幹細胞は骨髄造血発生の前に循環血液から肝臓に移住し、肝臓は胎生期最大の造血器官として発達し、赤芽球島として知られる形態的な造血環境が形成され、赤血

別刷請求先  
熊野一郎  
〒701-0192 倉敷市松島577  
川崎医科大学解剖学

電話：086(462)1111  
ファックス：086(462)1199  
Eメール：kumano@med.kawasaki-m.ac.jp

球、血小板および顆粒球が産生される<sup>14-16</sup>。骨髄で恒常性造血が始まる時、肝臓では、肝内造血細胞が急速に消失する<sup>2, 3</sup>。造血幹細胞の移行による肝造血開始に関しては多くの研究があるが<sup>12, 14, 17</sup>、肝臓造血の消退を肝組織構造の発達と関連づけて観察した報告は乏しい。本研究は、肝臓造血末期における肝内における造血系細胞処理の視点に立って、マウス胎子と新生子の肝臓を組織学的に経時的観察した。

## 材料と方法

総数68匹のICRマウス（日本クレア、東京）を使用した。本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け（No. 08-051, 10-020）、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施された。

成熟雌性マウスを一晩雄性マウスと交配し、翌日を妊娠0日とした。妊娠マウスにペントバルビタール（ネンブタール、大日本住友製薬、大阪）を過量投与し、深麻酔下にて子宮から胎子を取り出した。胎生13, 14, 15, 17, 18および19日のマウス胎子は氷で冷却麻酔した後に、生後0, 2, 3, 4, 7および9日の新生子は断頭後に肝臓を取り出した。成熟マウスの毛細胆管と小葉間胆管を観察するために、生後60日の雌性マウスにペントバルビタール過量投与し、肝臓を取り出した。動物は各日齢で4～6例を用いた。

## 光学顕微鏡観察

摘出した肝臓を4%パラフォルムアルデヒド液（0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4, 4℃）に浸漬し8時間固定し、洗浄後にエタノール系列で脱水し、パラフィンに包埋した。4 μm厚の切片を作成し、ヘマトキシリン染色、ケラチン18免疫染色および細胞死検出のためにTUNEL（TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling）染色を行った。

## ケラチン18免疫染色

抗原賦活を目的として0.05%シトラコン酸ナトリウム水溶液（イムノセイバー、日新EM、

東京）に浸漬し、圧力鍋で加熱した。内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止のため、6 mM 過ヨウ素酸中で10分処理後、リン酸緩衝液で洗浄し、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム中で30分処理した。抗ケラチン18モノクローナル抗体（1:50, Ks18.04, PROGEN, Heidelberg, Germany）に30分室温で反応させた後、二次抗体としてSimple stain MAX-PO（M）（ニチレイバイオサイエンス 東京）と反応させ、3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride（DAB, DAKO Japan, 東京）で発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。

## TUNEL 染色

アポトーシスによる死細胞の検出のため、ApoMark Apoptosis detection Kit（Exalpha biologicals, MA, USA）を使用した。断片化したDNAの3'-OH末端をterminal deoxynucleotidyl transferase（TdT）を利用してビオチン標識した。標識されたDNA断片はホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで検出し、DABを反応させて可視化した。アポトーシス陽性細胞核と正常細胞核を区別するためヘマトキシリンで核染色を行った。

## 電子顕微鏡観察

摘出した肝臓を速やかに1 mm<sup>3</sup>角に細切り、カルノフスキー液（4%パラフォルムアルデヒド-5%グルタルアルデヒド-0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4, 4℃）で4時間固定した。組織ブロックを1%四酸化オスミウム溶液で4℃、2時間後固定し、エタノール系列で脱水後エポン812に包埋した。ダイヤモンドナイフを用い、ライカウルトラカットウルトラミクローム（Leica Microsystems, Wetzlar, Germany）にて1 μm厚の準超薄連続切片を作成し、1%トルイジンブルーで染色した。効率的な超微形態観察のため、選択した準超薄切片をエポンに再包埋した後、90 nm厚の超薄切片を作成し、単孔銅グリッドに載せ、酢酸ウランならびにクエン酸鉛で電子染色し、JEM-2000 EXII（加速電圧80 kV, 日本電子、東京）とH-7100（加速

電圧75 kV, 日立, 東京) 電子顕微鏡で観察した。

## 結果

マウス肝臓において, 肝内胆道は毛細胆管に始まり, 小葉間胆管を経て左・右肝管に至る。マウスの個体発生において, 毛細胆管および小葉間胆管は胎生14日で形成され始める。成熟マウスにおいて毛細胆管は隣接する立方体状の肝細胞間に存在し, 径約1  $\mu\text{m}$  の丸い断面をもつ細胞間隙として, また, 小葉間胆管は小葉間動脈および門脈と共に小葉間結合組織中に存在する。肝内胆路が形成され始める胎子期肝臓では造血が進行し, 赤血球系を中心とする大量の造血系細胞が肝臓内に観察できた (図1)。造血細胞は胎生後期から新生子期にその数を急激に

減少し, その時期の肝内胆路である毛細胆管と小葉間胆管には, 次のような著明な組織学的変化を観察することができた。

## 毛細胆管の観察

### ケラチン18免疫染色

肝臓切片をケラチン18で免疫染色すると, 細胞膜直下に凝集するケラチン18フィラメントによって, 肝細胞はその細胞輪郭を明瞭に観察する事ができる。図2に示すように, 胎生15日の肝細胞はその断面が長径約13  $\mu\text{m}$  の小型の類円形を呈していた。

胎生15日から胎生17日において, 肝細胞は細胞質が急増し, 切片上で細胞輪郭は四角形状を呈するようになり (図2 a, b), 大きさにおい

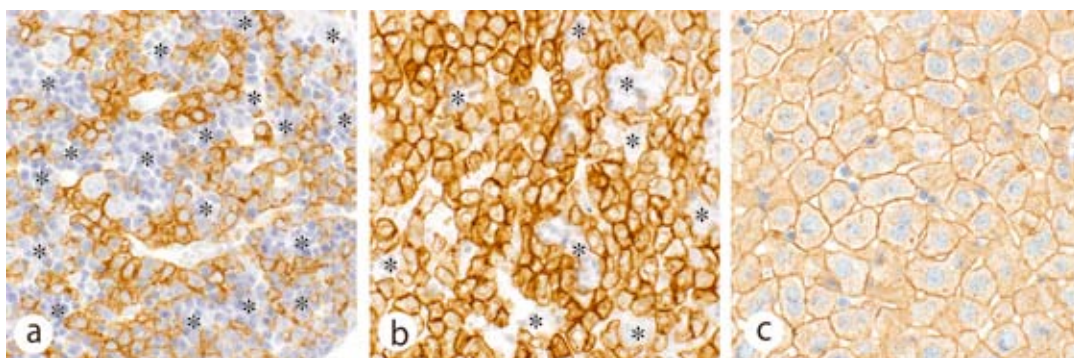


図1 胎子, 新生子および成熟マウスの肝臓。ケラチン18免疫染色とヘマトキシリン核染。x410。  
いずれの時期でも肝細胞の細胞膜直下のケラチン18フィラメントが染まり, 肝細胞の輪郭を明瞭に観察できる。  
(a) 胎生15日。ケラチン18陽性の肝細胞の間に多数の造血系細胞集団 (\*) が存在する。  
(b) 生後4日。造血系細胞の数は急減し, 肝細胞間の造血系細胞集団 (\*) はまばらとなる。  
(c) 生後60日。肝細胞は胎子, 新生子と比べて大型になり, 造血系細胞集団は肝細胞間に観察されない。

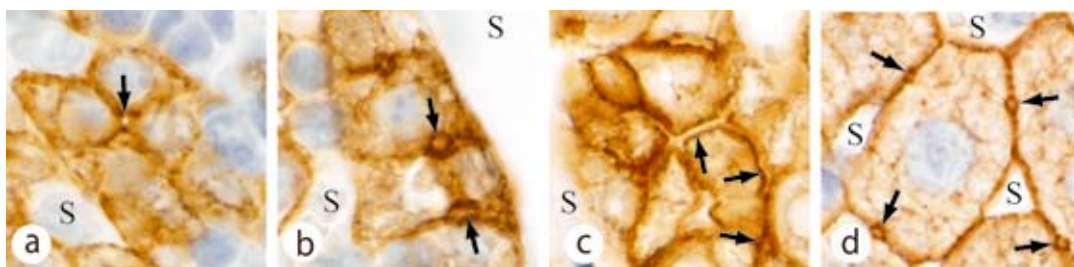


図2 胎子, 新生子および成熟マウスの肝臓の毛細胆管。ケラチン18免疫染色とヘマトキシリン核染。S: 類洞。  
x1800。  
(a) 胎生15日。4つの肝細胞で囲まれた毛細胆管 (径約1  $\mu\text{m}$ ) が観察できる (矢印)。  
(b) 胎生17日。隣接する2つの肝細胞間の拡張毛細胆管 (矢印, 径約2  $\mu\text{m}$ )。肝細胞は胎生15日に比べて大型四角形になる。  
(c) 生後4日。拡張した毛細胆管が隣接肝細胞間の間隙として観察される (矢印)。  
(d) 生後60日。肝細胞間の毛細胆管の直径はほとんどが約1  $\mu\text{m}$  で, 円形断面を呈し, 類洞とは明確に区別できる。

て胎生15日と17日の間に長径で1.5～2倍に増大していた。毛細胆管は胎生13日では不明瞭であった。胎生15日以降、隣接する肝細胞間に、ケラチン18で周囲をとり囲まれた毛細胆管腔を明瞭に観察することができた(図2a)。毛細胆管は、その形成初期である胎生15日では内径1  $\mu\text{m}$  の管状の細胞間隙であった。しかし肝細胞が大型化する胎生17日から新生子期の毛細胆管では、内径1.5～3  $\mu\text{m}$  に著しく拡張・蛇行した隣接肝細胞間隙として観察される事が少なくなかった(図2b, c)。成熟マウス肝臓において肝細胞は、出生直後に比べてさらにその大きさを増し、毛細胆管は、径約1  $\mu\text{m}$  の円形断面を持つ様に細い細胞間管状隙として観察できた(図2d)。

### 毛細胆管の超微形態

a) 胎子, 新生子および成熟マウスの毛細胆管(図3, 4)

胎生15日の肝細胞で類洞周囲腔に向かう細胞面には多数の微絨毛が存在し、隣接する肝細胞と接触する細胞側面には接着結合、デスモソーム、密着結合や細隙結合などの連結複合体が観察できた。毛細胆管は隣接する肝細胞間の円形断面を有する径約1  $\mu\text{m}$  の細胞間細隙であり、その両端が接着複合体によって閉鎖される。内

腔には肝細胞から伸展する微絨毛の断面が多数観察され、微絨毛は長さ約400nm, 太さ90～120 nmであった(図3a)。胎生17日の肝臓では、毛細胆管はその断面が円形を示す事が多いが、内腔が拡張し楕円形や不整形断面を持つ毛細胆管も観察された。

生後直後から7日では、径約3  $\mu\text{m}$  にも達する拡張した内腔を持つ毛細胆管も認められた(図3c)。拡張していない円形断面の毛細胆管では、微絨毛は管壁を作る肝細胞膜上にほぼ一様に観察できたが、拡張した毛細胆管では管壁の微絨毛の密度は疎となり、かつ微絨毛を有する管壁と微絨毛を欠く管壁が混在して観察されることがしばしばあった(図3c)。胎生後期から生後早期における拡張した毛細胆管では、その内腔が切片上で類洞周囲腔と同様の広がりを見せることがあり、低倍観察で両者を区別しづらい場合もあった。しかし図4に示すように、微絨毛の特徴などの超微形態学的特徴によって、両者を区別する事が可能であった。

生後60日の毛細胆管は、隣接肝細胞の間の径約1  $\mu\text{m}$  の円形断面の細胞間隙であった。間隙の両端は連結複合体で結合され、その管壁には90～120 nmの一定の太さの短い微絨毛が均一に分布していた(図3d)。

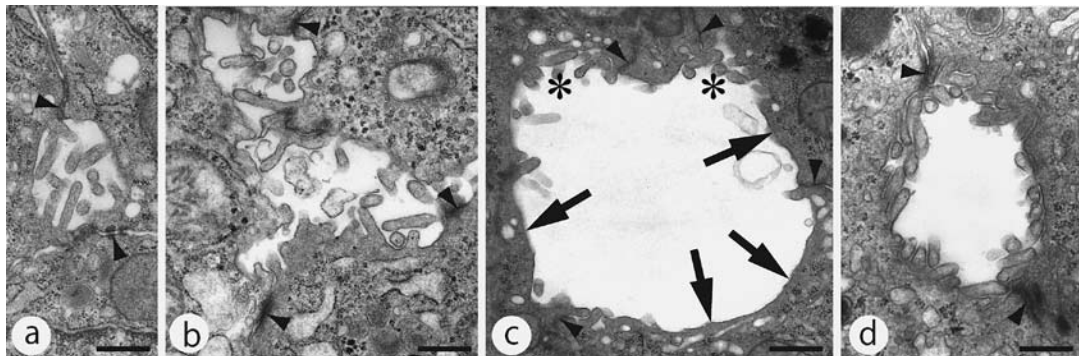


図3 胎子, 新生子および成熟マウスの毛細胆管の電顕写真。矢頭は連結複合体を示す。Bar: 0.5  $\mu\text{m}$ 。

(a) 胎生15日。隣接する細胞間の毛細胆管の両側にはデスモソーム(矢頭)が観察される。内腔は微絨毛が占める。

(b) 胎生17日。拡張毛細胆管。断面は不整形で内腔には微絨毛が観察される。

(c) 生後4日。著しく拡張した毛細胆管では微絨毛は少ない。微絨毛が密在する毛細胆管壁(\*)と微絨毛を欠く胆管壁(矢印)が混在する。

(d) 生後60日。毛細胆管壁はその全周に微絨毛が存在する。

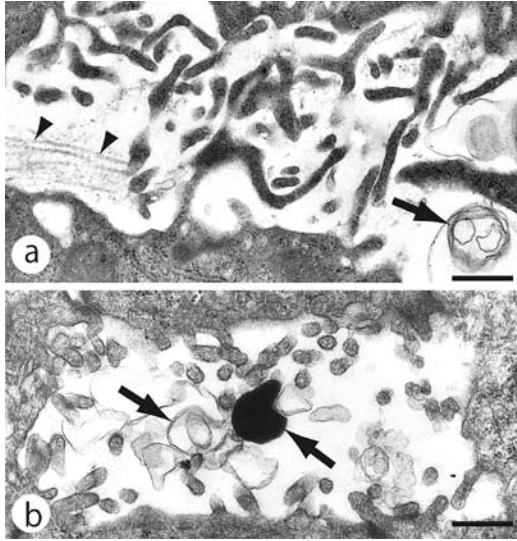


図4 類洞周囲腔と拡張毛細胆管腔の電顕写真. Bar: 0.5  $\mu$ m.

いずれの内腔にも多数の微絨毛に加え、ミエリン像や膜様構造(矢印)が含まれるが、両腔は次のような超微形態的違いによって区別できる。

- (a) 類洞周囲腔. 生後4日. 類洞周囲腔内の微絨毛は長く、様々な方向に屈曲し、太さは不均一である. 毛細胆管腔には見られない膠原線維束(矢頭)が観察される.
- (b) 拡張毛細胆管腔. 生後2日. 微絨毛の太さは均一で短い.

#### b) 拡張毛細胆管に含まれる膜状構造(図5)

生後0~9日の新生子の拡張毛細胆管腔には、色々の形状の膜状構造がしばしば含まれていた. 膜状構造はその特徴によって空胞様構造とミエリン像の2種に大別でき、空胞様構造は一層の膜状構造によって形成され、円形断面を呈する事が多かった. 径は約40~1800 nmと大小様々で、楕円状や不整多角形状を呈する事もあった(図5 a). 空胞様構造はその大きさによって、径500 nm以上の大型空胞様構造と500 nm以下の小型空胞様構造に区別することができ、小型空胞様構造が大多数で約3/4を占めていた(図5 a). 小型空胞様構造は単独で観察されることもあったが、多くは複数の小胞同士が集合して径約700~1000 nmの集合体を形成していた(図5 b). ミエリン像は重層膜状構造から形成され、オスミウム親和性の膜構造が同心円状

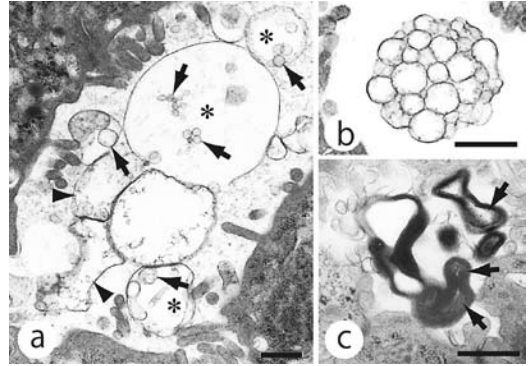


図5 拡張毛細胆管に含まれる膜様構造. Bar: 0.5  $\mu$ m

- (a) 空胞様構造. 径500 nm以下の小型膜様構造(矢印)が多数を占める. 多くは球状であるが、不整多角形状(矢頭)の空胞も見られる. \*で示すように大型空胞は小型空胞様構造を含むことがある. 生後0日.
- (b) 小型空胞様構造の集合. 生後0日.
- (c) ミエリン像. 電子密度の高い膜が同心円状に集積し、しばしば内腔を含む(矢印). 生後4日.

に重積し、内腔を含む場合も多かった(図5 c).

#### c) 新生子マウス肝細胞の封入体と拡張毛細胆管(図6)

新生子期マウス肝細胞は、しばしば赤芽球核や好中球などの造血系細胞要素を貪食し、径3~5  $\mu$ mの大型封入体を形成することが観察できた(図6 a-c). 封入体は造血細胞要素の加水分解により小型化し、その内部に大小の空胞様構造およびミエリン像が残存していた(図6 d, e). 空胞様構造やミエリン像を含有する径500~1000 nmの小型封入体は、しばしば遺残小体として隣接肝細胞近くの細胞側面や毛細胆管の近傍に観察される事があった(図6 d, e). 封入体が毛細胆管壁と癒合することにより、その内容を胆管腔へ放出する様子を観察できた. 毛細胆管と癒合した封入体膜は毛細胆管腔の一部に組み込まれ、毛細胆管は封入体の癒合によってその内腔が広がっていた. 拡張毛細胆管で封入体由来する管壁には微絨毛は存在しなかった(図6 e). 拡張毛細胆管腔に含まれる膜状構造の由来は、肝細胞の食作用によって生じた封入体の内部に残像する遺残小体の構造と一

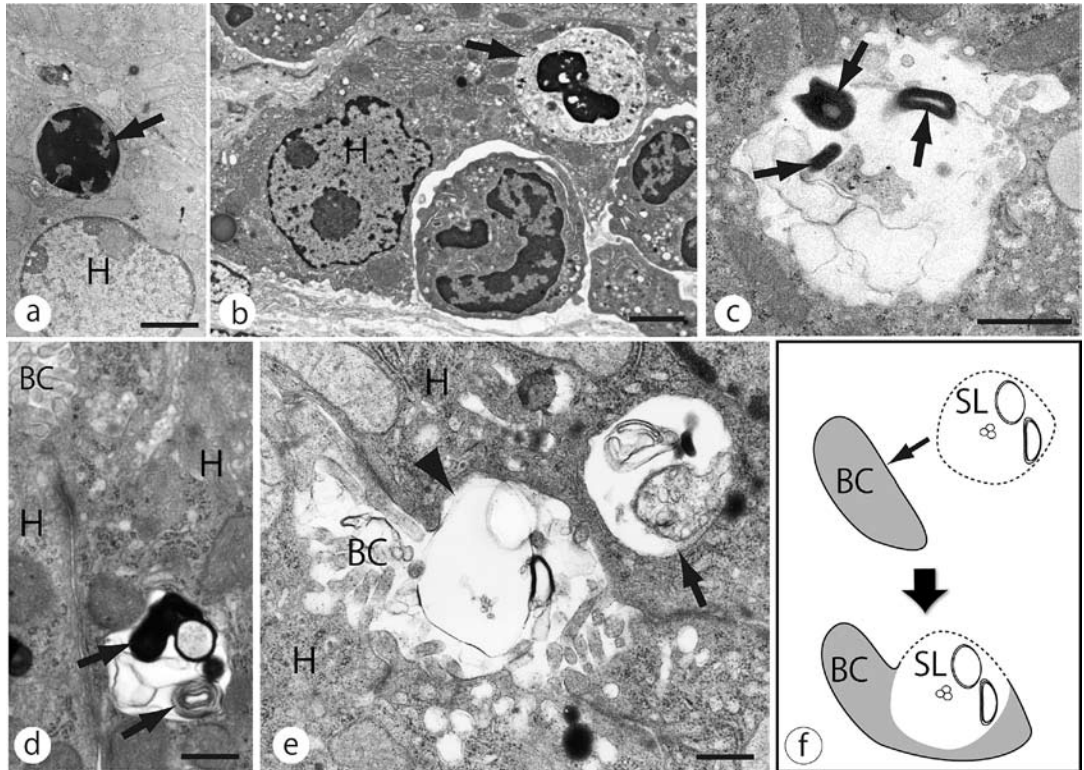


図6 新生子の肝細胞の封入体と拡張毛細胆管の電顕写真. H: 肝細胞.

- (a) 赤芽球核に由来する大型封入体 (矢印). 生後2日. Bar: 1  $\mu$ m.  
 (b) 顆粒球に由来する大型封入体 (矢印). 生後3日. Bar: 1  $\mu$ m.  
 (c) 肝細胞封入体内で消化・分解の進んだ造血系死細胞. 複数のミエリン像 (矢印) が含まれている. 生後3日. Bar: 1  $\mu$ m.  
 (d) ミエリン像 (矢印) と空胞様構造を含む封入体. 封入体は隣接肝細胞間隙近くに存在する. 生後9日. Bar: 0.5  $\mu$ m. BC: 毛細胆管.  
 (e) 毛細胆管に癒合した封入体 (矢頭). 癒合封入体に隣接して空胞様構造を含む封入体 (矢印) が存在する. 生後0日. BC: 毛細胆管. Bar: 0.5  $\mu$ m.  
 (f) 毛細胆管と封入体の癒合模式図. 写真e) における癒合により二次ライソソーム内のミエリン像および空胞様構造は毛細胆管腔内に放出される. 癒合した二次ライソソームは毛細胆管腔の一部として組み込まれ, 封入体壁に由来する部分の管壁には微絨毛が存在しない. BC: 毛細胆管. SL: 二次ライソソーム.

致した. 封入体と毛細胆管の癒合を模式図として図6fに示した.

### 生後早期の小葉間胆管の観察

胎子で造血が盛んな時期の肝臓には, 赤血球系を中心とした造血系細胞が肝組織全体にびまん性に分布していたが (図7a), 出生直後から生後早期の肝臓では, 造血系細胞の肝内分布に局在が生じていた. すなわち, 造血系細胞は小葉間結合組織内に残存し (図7b), 肝小葉内では

は著明に減少した. 小葉間結合組織の造血系細胞集団は好中球を主体とする顆粒球系細胞と赤芽球系細胞であり (図7c), 巨核球は小葉間結合組織内に観察される事はなかった. 造血系細胞は小葉間胆管の周囲を取り囲むように, または小葉間胆管と小葉間静脈の間に分布することが多く (図7d), 小葉間動脈周囲への集合は認められなかった.

新生子期肝臓の組織切片にTUNEL染色を施して観察すると, 小葉間結合組織の造血細胞集

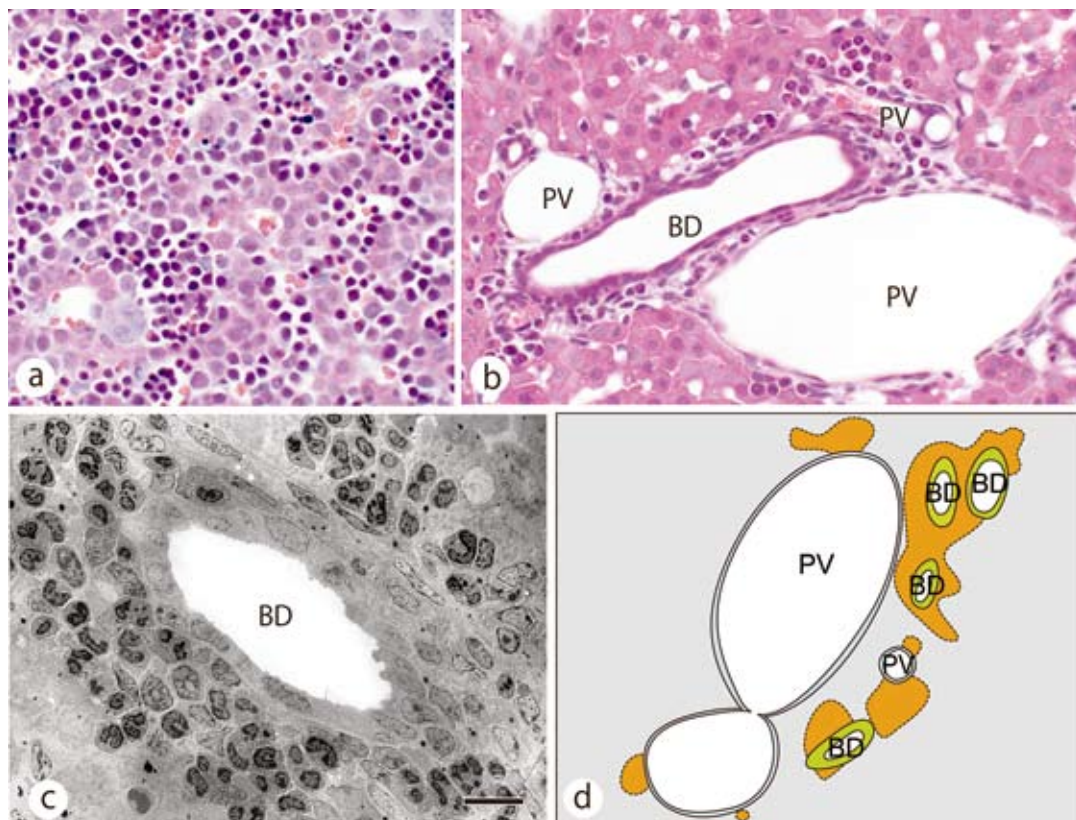


図7 胎子および新生子肝臓における造血系細胞の肝内分布。

- (a) 胎生15日. HE染色. 赤芽球系を主とした造血系細胞は肝組織全体にびまん性に分布する. x280.  
 (b) 生後9日のHE染色. 造血系細胞は肝小葉内では著明に減少するが, 小葉間結合組織内に残存する. x280. BD: 小葉間胆管. PV: 小葉間静脈.  
 (c) 生後4日. 小葉間結合組織の低倍電顕観察. 小葉間胆管 (BD) 周囲に好中球を主体とする造血系細胞の集積が観察される. Bar: 10  $\mu$ m.  
 (d) 新生子肝臓の小葉間結合組織中の造血系細胞の分布例. 造血系細胞 (橙) は主に小葉間胆管 (BD) 周囲, または小葉間胆管と小葉間静脈 (PV) の間に分布する.

団中に TUNEL 陽性細胞や小型の TUNEL 陽性封入体を含む大食細胞が観察された (図 8 a, c). TUNEL 陽性の細胞は, 小葉間結合組織間のみならず小葉間胆管上皮細胞にも観察され (図 8 a, b), 上皮細胞内に封入体として含有されていた. TUNEL 陽性封入体の多くは径約 2  $\mu$ m 以下の球形であるが, 中には径約 4  $\mu$ m の大型封入体を含む胆管上皮細胞も存在していた (図 8 b). なお, TUNEL 陽性封入体が類洞内皮細胞中に観察される事はなかった.

#### 小葉間結合組織と小葉間胆管の超微形態

##### a) 小葉間胆管周囲の死細胞

小葉間結合組織に集積する造血細胞集団は, 主に成熟好中球や種々の成熟段階の赤芽球で構成される. 造血細胞の集積中には細胞死の徴候を呈する好中球も含まれていた. 好中球では核膜槽が著しく拡大した細胞や, 細胞辺縁部の一部が断片化した細胞も観察された. 細胞死の徴候を呈する成熟好中球において, 分葉核は核染色質が高度に凝集し, 核内容が強度に萎縮して小型の小球状となった (図 9 a, b).

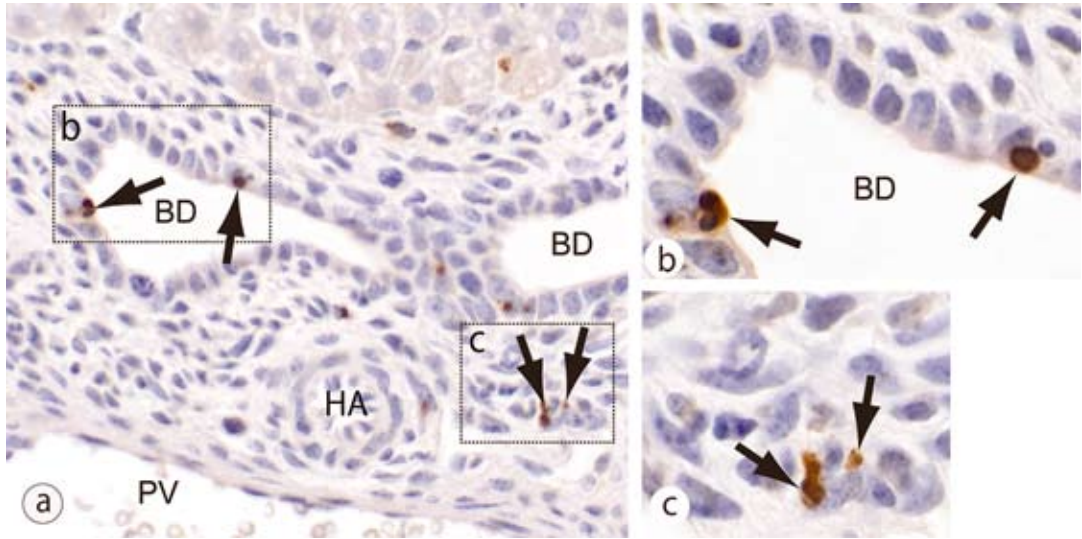


図8 肝小葉間結合組織のTUNEL染色。生後4日。BD:小葉間胆管。HA:小葉間動脈。PV:小葉間静脈。  
 (a) 低倍率光顕写真。TUNEL陽性封入体(矢印)がb,c区域に観察される。x440。  
 (b) 囲みbの強拡大光顕写真。胆管上皮細胞の細胞質にTUNEL陽性封入体が観察された(矢印)。x1100。  
 (c) 囲みcの強拡大光顕写真。小型TUNEL陽性封入体を持つ大食細胞(矢印)。x1100。

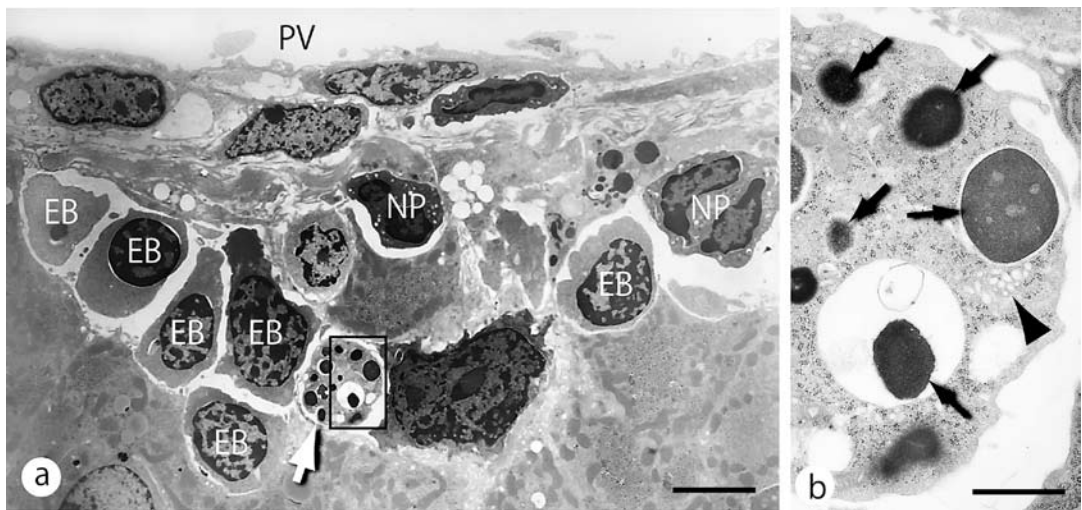


図9 小葉間結合組織の造血系細胞の電顕写真。生後3日。

(a) 低倍写真。

小葉間静脈(PV)近傍の小葉間結合組織に種々の成熟段階の赤芽球(EB)や好中球(NP)が集積する。造血系細胞の集団中には死細胞(白矢印)も見られる。Bar: 5  $\mu$ m。

(b) aの囲みの強拡大。

死細胞では核(矢印)は径0.3~1  $\mu$ mの小球状に断片化し、核周囲の核膜槽が拡大する。染色質が強度に凝集する。細胞質には小型の球状顆粒様構造(矢頭)が観察され、超微形態学的特徴から好中球系顆粒球に由来する死細胞と推定される。Bar: 1  $\mu$ m。



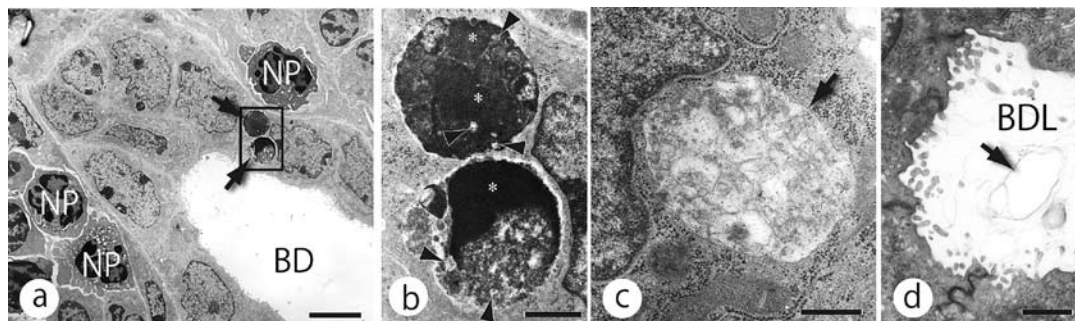


図10 新生子の小葉間胆管上皮細胞による造血系死細胞の貪食と分解.

(a) 低倍写真, 生後4日.

小葉間胆管 (BD) の上皮細胞に接し, 好中球 (NP) が多数集積する. 胆管上皮細胞の細胞質には, 食作用による造血系死細胞に由来する封入体 (矢印) が観察される. Bar: 5  $\mu\text{m}$ .

(b) a の囲みの強拡大.

胆管上皮細胞の2つの封入体の内容は, 核凝集 (\*) および多数観察される顆粒の遺残物 (矢頭) の特徴から, いずれも好中球系顆粒球に由来する死細胞と推定される. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .

(c) 胆管上皮細胞の球状封入体 (矢印), 生後4日.

取り込まれた細胞の分解が進行すると, 封入体は大小の空胞状膜構造で満たされる遺残小体となる. Bar: 0.5  $\mu\text{m}$ .

(d) 小葉間胆管腔, 生後2日.

小葉間胆管腔 (BDL) には空胞状膜構造 (矢印) が観察される. Bar: 1  $\mu\text{m}$ .

#### b) 胆管上皮細胞による死細胞の貪食と分解

小葉間胆管は単層立方形の胆管上皮細胞で構成される. 胆管上皮細胞は肝細胞に比べると小型であり, 一辺が4~8  $\mu\text{m}$  の立方上皮で, 径3~4.5  $\mu\text{m}$  の核を持ち, 内腔面には短い微絨毛を持つことが観察できた (図10a, d).

新生子期マウス肝臓の小葉間胆管上皮細胞は, 造血系死細胞に由来する封入体を含むことがあった (図10a). 封入体は径約2.2~4.1  $\mu\text{m}$  で, 胆管上皮細胞の TUNEL 染色陽性封入体の大きさとほぼ一致した. 封入体の内容は, 核濃縮を主徴とする細胞死に至った好中球と赤芽球および脱核赤芽球核で, いずれにおいても核の染色質は強度に凝集していた. 上皮細胞の封入体に最も多く見られるのは好中球系死細胞で (図10b), 封入体内で死細胞の分解は進行していた. 封入体は大小の空胞状膜構造で満たされた遺残小体となり, 上皮細胞の胆管腔に近接する細胞質に観察された (図10c). 胆管上皮細胞の遺残小体の内容は, 好中球に由来する空胞状膜構造が多く, 赤芽球核に由来する電子密度の高いミエリン像の形成は少なかった. 小葉間胆管の内腔には空胞状構造が, 少数ではあるが観察され

た (図10d).

#### 考 察

今回の観察によって, 肝臓造血の終息期における肝臓内からの造血系細胞の消失には, 肝細胞および胆管上皮細胞も重要な役割を果たしていること, さらに肝細胞の取り込み・分解の結果生じた遺残物が, 毛細胆管を経て胆路へと排出される事が明らかになった.

周知のように, 成熟動物の肝臓には活発な異物貪食作用を有する固定食細胞である肝類洞マクロファージ, すなわち Kupffer 細胞が常在し, 消化管から門脈を介して肝臓に流入する物質や病原性微生物の取り込み・分解処理にあたっている<sup>18, 19)</sup>. 一方, 肝細胞は消化管より血流を介して肝類洞周囲腔に運ばれた栄養物質を取り込み処理する. その肝細胞による取り込みの対象は Kupffer 細胞とは大きく異なり, とくに小型粒子の取り込みについてこれまで明らかにされてきた. すなわち, 240 nm 以下のラテックスビーズ<sup>20)</sup>, ウィルス感染で誘導した類洞内皮障害時のカーボン粒子<sup>21)</sup>, 直径500 nm 以下のリボソーム<sup>22, 23)</sup> の取り込みが報告されてい

る。このように肝細胞は主として1  $\mu\text{m}$  以下の小型粒子を対象として細胞内への取り込みを活発に行う事は知られているが、直径1  $\mu\text{m}$  を越える物質の生理条件下での取り込みに関する報告は少ない。大型食胞については、卵黄レシチンコート処理した径1  $\mu\text{m}$  以上のシリコン粒子<sup>24)</sup> や、Meloidosis 病原菌である *Burkholderia pseudomallei* 取り込みによる径約1~1.5  $\mu\text{m}$  の食胞の形成<sup>25)</sup>、硝酸鉛で誘導した肝臓過形成からの退縮期にアポトーシスに陥った肝細胞が、Kupffer 細胞や類洞内皮細胞によって取り込まれる<sup>26)</sup> 他に、速やかに近傍の肝細胞によって取り込まれて径約2  $\mu\text{m}$  のアポトーシス小体として観察されること<sup>27)</sup> 等、実験条件下での取り込みがわずかに報告されている。マウス新生子期の肝臓においては、多数のマクロファージが存在し、造血期肝臓では赤血球系造血細胞群の中央で赤芽球島中心マクロファージとして、脱核赤芽球核や赤血球を取り込むことが知られている<sup>15, 28)</sup>。生理的条件下の胎生期において、類洞マクロファージに加え、肝細胞そのものが赤芽球、脱核した赤芽球核、好中球などを取り込み、食胞中で死細胞の分解が進行する<sup>29)</sup>。マクロファージ以外で類洞内皮細胞も食作用を有することが Dini らによって報告されているが<sup>30)</sup>、新生子期に観察された造血系細胞の取り込みは、成績に述べたように Kupffer 細胞以外に肝細胞と胆管上皮細胞において認められ、類洞内皮細胞には観察されなかった。すなわち、マウス新生子肝臓終息期における造血細胞の消失には、固定性食細胞である Kupffer 細胞をのぞけば、胆汁を合成し細胞間分泌細管である毛細胆管に分泌する肝細胞、並びに分泌された胆汁が肝管へ流入する通路である小葉間胆管の上皮細胞、すなわちいずれも肝内胆路を構成する細胞が関与していることになる。

肝内胆路は毛細胆管から始まる。毛細胆管は隣接した肝細胞間に存在し、内腔に多数の短い微絨毛を持つ細胞間分泌細管であり、マウスおよびラットでは胎生13日から隣接肝細胞間に形成され始める<sup>31-33)</sup>。肝臓においてケラチン18

は、肝細胞および胆管上皮細胞に特異的に含有される中間径フィラメントを形成するタンパク質である<sup>34-38)</sup>。成績で示したように、ケラチン18免疫染色肝臓切片では毛細胆管周囲をフィラメント網で囲まれた細管として、毛細胆管を隣接肝細胞間に明瞭に観察することができる。胎生17日から新生子期の毛細胆管では、内径が1.5~3  $\mu\text{m}$  と通常の1.5~3 倍に拡張した毛細胆管が光顕レベルで観察できた。毛細胆管の拡張は特に新生子期で顕著であり、この時期に肝細胞の二次ライソゾームが毛細胆管と癒合し、ライソゾーム膜が毛細胆管壁の細胞膜と連続することを超微形態レベルで確認できた。その際に拡張毛細胆管腔内の大小の空胞様構造やミエリン像は、エキソサイトーシスによって肝細胞から毛細胆管へと流入する。毛細胆管は肝小葉において小葉中心部肝細胞板より周囲に向かい小葉間結合組織の小葉間胆管までの経路を有するから、毛細胆管の太さの変化は小葉全体を観察対象として広くとらえる必要がある。今回の観察は小葉内での観察部位を限定していないので、小葉内の毛細胆管すべてに普遍化することはできないが、新生子期に毛細胆管が部分的であれ、拡張することが今回の光顕・電顕レベルの観察で確認された。

ミエリン像や空胞様構造は古くから知られている電顕レベルの構造で、細胞小器官の膜に由来する脂質性成分に由来する<sup>39)</sup>。ミエリン像の形成はこれまで、7ケトコレステロールなどのオキシステロールによって誘導された血管内皮細胞のアポトーシス<sup>40)</sup> や単球芽様細胞株 U937のアポトーシス<sup>41)</sup>、血管平滑筋細胞死<sup>42)</sup>、敗血症時における肝細胞におけるミトコンドリア<sup>43)</sup> およびオートファゴソーム内に観察されている<sup>44)</sup>。また、急性胆管炎の肝細胞や Kupffer 細胞の変性時<sup>45)</sup> にも観察されている。ミエリン像は造血器官でのマクロファージにおいても形成される。マウス胎子の脾臓造血発生初期では、マクロファージは赤血球、赤芽球、放出赤芽球核および好中球を捕食し、食胞内で分解が進行する<sup>46)</sup>。すなわち、放出赤芽球を取

り込んだ食胞内では核膜に由来するミエリン像が残存し、赤血球や赤芽球を取り込んだ場合、ミエリン像に加えて、ジデロソームが残存する。一方、好中球に由来する食胞ではミエリン像の形成は見られない。すなわちマクロファージの食胞内で残存する遺残物質には取り込んだ造血細胞要素によって違いがある。これらを今回の観察と合わせ考えると、拡張毛細胆管に出現したミエリン像や空胞様構造の大部分は肝細胞に捕食された赤芽球核や赤芽球に由来すると考えられる。一方、アポトーシスに陥った好中球を捕食する胆管上皮細胞では、食胞内にミエリン像は形成されない。

肝臓造血の終息期に造血細胞は小葉間結合組織に残存し、その中にアポトーシス細胞死に至る造血細胞が存在する。死細胞はマクロファージの他に小葉間胆管上皮細胞によっても取り込まれ処理される。胆管上皮細胞のエンドサイトーシスに関して、これまでグルコースや<sup>47)</sup>胆汁酸<sup>48, 49)</sup> およびL-グルタミン酸<sup>50)</sup> が胆管腔側である細胞頂部から取り込まれることが報告されている。しかしながら、胆管上皮細胞が基底側から死細胞を取り込み、大型封入体を形成することは知られていない。胆管上皮細胞による造血死細胞の取り込みは、肝臓造血の消退期に限局した特異な現象と考えられる。

マウスにおいて胎生期後半から新生子期の肝臓は造血の終息期であり、肝臓内から造血系細胞が急速に消失する。肝臓は出生を境として栄養物が腸管・門脈を経て流入し、造血器官から消化器系付属腺へと機能転換し、急速に発達する。この時期の造血系細胞要素の処理には、類洞マクロファージに加え、通常は活発な食作用を示さない肝細胞と胆管上皮細胞も重要な役割を果たし、結果として造血系細胞は肝臓内から短時間で消失する。肝細胞は取り込んだ造血系細胞の分解産物を、形成されたばかりの毛細胆管へと放出している。すなわち胎生期に形成された直後の肝内胆道は、胎生後期から新生子期に肝臓造血で残存した造血系細胞の分解遺残物の排泄経路として機能している。今回の観察に

より胎生期における肝臓造血の終息が、胆汁の肝内分泌経路の発達と密接に関連していることを示す視点が得られた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究のご指導をいただいた川崎医科大学解剖学教室佐々木和信教授に深謝する。また技術的援助をいただいた川崎医科大学組織・電子顕微鏡センターの須田泰司主任技術員はじめセンター員各位および須田満寿美研究補助員はじめ解剖学教室員各位に心から感謝する。なお本研究の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費（16-204S, 17-205S）の援助によって行われた。

## 引用文献

- 1) Tavassoli M: Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells* 17:269-286, 1991
- 2) Dzierzak E, Speck NA: Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9:129-136, 2008
- 3) Ottersbach K, Smith A, Wood A, Gottgens B: Ontogeny of haematopoiesis: recent advances and open questions. *Br J Haematol* 148:343-355, 2010
- 4) Sorenson GD: An electron microscopic study of hematopoiesis in the liver of the fetal rabbit. *Am J Anat* 106:27-40, 1960
- 5) Jones RO: Ultrastructural analysis of hepatic haematopoiesis in the foetal mouse. *J Anat* 107:301-314, 1970
- 6) Sasaki K, Sonoda Y: Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Arch Histol Cytol* 63:137-146, 2000
- 7) Haar JL, Ackerman GA: A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec* 170:199-223, 1971
- 8) Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G: Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126:5073-5084, 1999
- 9) Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA: An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364:64-67, 1993
- 10) Medvinsky A, Dzierzak E: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86:897-

- 906, 1996
- 11) Gekas C, Dieterlen Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK: The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8:365-375, 2005
  - 12) Ottersbach K, Dzierzak E: The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8:377-387, 2005
  - 13) Lux CT, Yoshimoto M, McGrath K, Conway SJ, Palis J, Yoder MC: All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac. *Blood* 111:3435-3438, 2008
  - 14) Moore MA, Metcalf D: Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18:279-296, 1970
  - 15) Sasaki K, Iwatsuki H: Origin and fate of the central macrophages of erythroblastic islands in the fetal and neonatal mouse liver. *Microsc Res Tech* 39:398-405, 1997
  - 16) Chasis JA, Mohandas N: Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112:470-478, 2008
  - 17) Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J, Medvinsky A: Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs) : role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129:4891-4899, 2002
  - 18) Pearsall NN, Weiser RS: *The Macrophage*. Philadelphia, USA, Lea and Febiger. 1970, pp12-13
  - 19) Heale JP, Speert DP: Macrophages in bacterial infection. In *The Macrophage* 2nd edition (Burke B, Lewis CE eds) , New York, USA, Oxford University Press. 2002, pp216
  - 20) Kanai M, Murata Y, Herbert DC, Soji T: Uptake behavior of embryonic chick liver cells. *Anat Rec* 290:862-874, 2007
  - 21) Kirn A, Steffan AM, Anton M, Gendrault JL, Bingen A: Phagocytic properties displayed by mouse hepatocytes after virus induced damage of the sinusoidal lining. *Biomedicine* 29:25-28, 1978
  - 22) Rahman YE, Cerny EA, Patel KR, Lau EH, Wright BJ: Differential uptake of liposomes varying in size and lipid composition by parenchymal and kupffer cells of mouse liver. *Life Sci* 31:2061-2071, 1982
  - 23) Romero EL, Morilla MJ, Regts J, Koning GA, Scherphof GL: On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes. *FEBS Lett* 448:193-196, 1999
  - 24) Soji T, Murata Y, Ohira A, Nishizono H, Tanaka M, Herbert DC: Evidence that hepatocytes can phagocytize exogenous substances. *Anat Rec* 233:543-546, 1992
  - 25) Hoppe I, Brenneke B, Rohde M, Kreft A, Haussler S, Reganzerowski A, Steinmetz I: Characterization of a murine model of melioidosis: comparison of different strains of mice. *Infect Immun* 67:2891-2900, 1999
  - 26) Columbano A, Ledda Columbano GM, Coni PP, Faa G, Liguori C, Santa Cruz G, Pani P: Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. *Lab Invest* 52:670-675, 1985
  - 27) Dini L, Pagliara P, Carla EC: Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. *Microsc Res Tech* 57:530-540, 2002
  - 28) 園田 祐治: マウス胎子肝臓の赤芽球島中心マクロファージと類洞腔マクロファージの関連性について -免疫組織化学ならびに電子顕微鏡による形態学的観察- 川崎医学会誌 29:145-159, 2003
  - 29) Kumano I, Sonoda Y, Sasaki K: Phagocytosis exhibited by neonatal hepatocytes at the end of murine liver hematopoiesis - An ultrastructural study. *Kawasaki Med J* 32:205-210, 2006
  - 30) Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Serafino L, Vidal Vanaclocha F: Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci* 108 :967-973, 1995
  - 31) Wilson JW, Groat CS, Leduc EH: Histogenesis of the liver. *Ann N Y Acad Sci* 111:8-24, 1963
  - 32) Wood RL: An electron microscope study of developing bile canaliculi in the rat. *Anat Rec* 151:507-529, 1965
  - 33) Luzzatto AC: Hepatocyte differentiation during early fetal development in the rat. *Cell Tissue Res* 215:133-142, 1981
  - 34) Franke WW, Denk H, Kalt R, Schmid E: Biochemical and immunological identification of cytokeratin proteins present in hepatocytes of mammalian liver tissue. *Exp Cell Res* 131:299-318, 1981
  - 35) Van Eyken P, Desmet VJ: Cytokeratins and the liver. *Liver* 13:113-122, 1993
  - 36) Omary MB, Ku NO, Toivola DM: Keratins: guardians of the liver. *Hepatology* 35:251-257, 2002
  - 37) Oshima RG: Apoptosis and keratin intermediate

- filaments. *Cell Death Differ* 9:486-492, 2002
- 38) Koenig S, Krause P, Drabent B, Schaeffner I, Christ B, Schwartz P, Unthan Fechner K, Probst I: The expression of mesenchymal, neural and haematopoietic stem cell markers in adult hepatocytes proliferating in vitro. *J Hepatol* 44:1115-1124, 2006
- 39) Ghadially FN: Ultrastructural pathology of the cell and matrix 4th edition. Boston, USA, Butterworth-Heinemann. 1997, pp646-658
- 40) Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gamber P, Lagrost L: Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *J Pathol* 183:330-338, 1997
- 41) Miguet Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessede G, Lemaire Ewing S, Berthier A, Menetrier F, Neel D, Gamber P, Lizard G: Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol* 64:527-541, 2002
- 42) Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM: 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2296-2301, 2004
- 43) Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Struck J, Cook CH: Carbamoyl phosphate synthase-1: a marker of mitochondrial damage and depletion in the liver during sepsis. *Crit Care Med* 34:2439-2446, 2006
- 44) Watanabe E, Muenzer JT, Hawkins WG, Davis CG, Dixon DJ, McDunn JE, Brackett DJ, Lerner MR, Swanson PE, Hotchkiss RS: Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study. *Lab Invest* 89:549-561, 2009
- 45) Tu B, Gong JP, Feng HY, Wu CX, Shi YJ, Li XH, Peng Y, Liu CA, Li SW: Role of NF-kB in multiple organ dysfunction during acute obstructive cholangitis. *World J Gastroenterol* 9:179-183, 2003
- 46) Sasaki K, Iwatsuki H, Suda M, Itano C: Cell death and phagocytosis of haematopoietic elements at the onset of haematopoiesis in the mouse spleen: an ultrastructural study. *J Anat* 183:113-120, 1993
- 47) Lazaridis KN, Pham L, Vroman B, de Groen PC, LaRusso NF: Kinetic and molecular identification of sodium-dependent glucose transporter in normal rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 272:G1168-1174, 1997
- 48) Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinzy JL, Robertson WE, Lasater J, Caligiuri A, Tretjak Z, LeSage GD: Functional expression of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 113:1734-1740, 1997
- 49) Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF: Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 100:2714-2721, 1997
- 50) Eisenmann Tappe I, Wizigmann S, Gebhardt R: Glutamate uptake in primary cultures of biliary epithelial cells from normal rat liver. *Cell Biol Toxicol* 7:315-325, 1991

## An immunohistochemical and ultrastructural study on the intrahepatic biliary system of fetal and neonatal mouse

Ichiro KUMANO

*Department of Anatomy Kawasaki Medical School,  
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

**ABSTRACT** To clarify the relationship between the hematopoietic involution of early postnatal livers and the development of the intrahepatic biliary system, fetal and neonatal mouse

livers were examined through immunohistochemical observations and transmission electron microscopic observations. Bile canaliculi were formed between neighboring hepatocytes at 14 days of gestation, and the canaliculi often expanded their diameter around 1.5 to 3 times in the late fetal and early neonatal livers. Hepatocytes in early postnatal life often phagocytosed degenerating hematopoietic cell elements to form large inclusions, 3 to 5  $\mu\text{m}$  in diameter, and these inclusions were phagolysosomes containing vacuolar membrane structures and myelin figures. These inclusions moved in the cytoplasm to the bile canaliculi and finally fused to the canalicular wall. As a result, the canaliculi became expanded and inclusion contents were released into the canalicular lumen. Since the wall of the canaliculi derived from phagosomes had no microvilli, enlarged canaliculi showed a different localization in microvillous distribution. In neonatal and early postnatal livers, hematopoietic cells accumulated interlobular connective tissues, especially around interlobular bile ducts, and TUNEL-positive cells appeared among the hematopoietic cell accumulation. Large TUNEL-positive inclusions could also be observed in the bile duct epithelial cells of interlobular connective tissue. The hematopoietic cell accumulations consisted of mature neutrophils and erythroblasts, and the biliary epithelial cells engulfed dying neutrophils, erythroblasts and nuclei expelled from erythroblasts to form TUNEL-positive inclusions. During the involution stage of liver hematopoiesis, both hepatocytes and epithelial cells of the interlobular bile duct showed phagocytosis, and the intrahepatic biliary system appeared to have an important functional role in the removal of dying hematopoietic cell elements in the late gestational and early postnatal period.

*(Accepted on March 2, 2011)*

**Key words : Liver hematopoiesis, Bile canaliculi, Bile duct epithelium, Interlobular connective tissue,  
Neonatal mouse**

---

Corresponding author

Ichiro Kumano

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School,  
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : kumano@med.kawasaki-m.ac.jp