

## 化学的消化法を用いた肝表在毛細リンパ管の走査型電子顕微鏡的研究

徳光 誠司

肝被膜を用手剥離した後に化学的消化法 (HCl-collagenase 法) を利用する被膜剥離後化学的消化法を用いて、肝表在の毛細リンパ管を走査電顕で観察し、次のような結果を得た。

1. 本法は肝表在毛細リンパ管の立体的構築とその非自由表面を観察するのに有用な方法であった。
2. 正常肝および IPH 肝の表在毛細リンパ管の立体的構築を明らかにした。すなわち前者は網目状に走行し、後者は不規則な吻合と分枝を行いながら走行していた。
3. 非自由表面の観察では、内皮細胞間隙以外に小孔と篩板状に集簇する小孔が観察された。これらの小孔の存在を肝表在毛細リンパ管について、はじめて明らかにすることができた。IPH 肝ではこれらの小孔はより増加していた。
4. 上述の IPH 肝の表在毛細リンパ管の形態学的変化は肝リンパがより増加していることによる反応と考えられた。

(平成 3 年 2 月 27 日採用)

## Scanning Electron Microscopic Study of the Capsular Lymph Capillaries of Liver by the Chemical Digestion Method

Seiji Tokumitsu

This report describes the scanning electron microscopic features of capsular lymph capillaries of liver. The materials were obtained from three normal livers at autopsy and one surgically-biopsied liver with idiopathic portal hypertension (IPH). All of them were treated with the chemical digestion method (HCl-collagenase method) after mechanical capsule stripping.

1. This method has the advantage that the three-dimensional structures of capsular lymph capillaries of liver can be better understood from the outside.
2. In the normal liver, capsular lymph capillaries took their courses in a reticular fashion, while those in the liver with IPH had many ramifications with anastomoses at random.
3. On the external surface of capsular lymph capillaries, many pores were observed inside the endothelial cells. These pores were observed significantly more often in the liver with IPH.
4. The above-mentioned structural changes of capsular lymph capillaries in the

liver with IPH were likely to be produced by the increased lymph. (Accepted on February 27, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(1): 1-10, 1991

**Key Words** ① Liver ② Lymph capillary ③ Scanning electron microscopy  
④ Chemical digestion method

## 緒 言

肝臓はリンパ生成の盛んな臓器であり、産生されるリンパ胸管内リンパ流量の20%から50%を占めるとされている。<sup>1)</sup> そのリンパのほとんどはDisse腔からのものであり、間質の肝リンパ管を経て肝臓から排出される。<sup>2)</sup> しかし肝リンパ管に関する形態学的な記載は成書にも乏しく、<sup>3), 4)</sup> その研究はまだまだ十分ではないと考えられる。特に毛細リンパ管の形態に関する研究は透過型電子顕微鏡(以下透過電顕と略す)による検討<sup>5), 6)</sup> やリンパ管注入法による検討<sup>7)</sup> が行われているのみである。

化学的消化法を利用した生物試料の走査型電子顕微鏡(以下走査電顕と略す)の観察は、結合組織中に埋没して存在する構造物の構築や非自由表面を広範囲にわたり、立体的に観察し得る。<sup>8)</sup> 筆者は、肝表在リンパ管が肝表面に豊富に存在すること<sup>7)</sup> に注目し、肝被膜の用手剥離後に化学的消化法を利用する小林の方法<sup>9)</sup> を用いて肝表在の毛細リンパ管の立体的構築および非自由表面を観察した。

肝被膜に関しては、中皮細胞と基底膜からなる漿膜と、それに密着して存在する結合組織(Glisson's capsule)を合わせて、肝被膜と呼ぶのが一般<sup>3)</sup> である。本研究では実際に被膜を用手剥離した場合、漿膜下の結合組織の表層部分が剥離されていた。

## 材料および方法

### 1. 材 料

材料は70歳の女性(肺癌)、75歳の女性(肺癌)、65歳の女性(肺炎)の剖検肝、および特発性門脈圧亢進症(以下IPHと略す)調査研究班の診断の手引きにてIPHと確定診断された、60歳の女性の外科的生検肝の一部を使用した。剖検肝

3例は肉眼的および光学顕微鏡(以下光顕と略す)的に正常であり、IPH例は組織学的にもIPHの所見に一致していた。

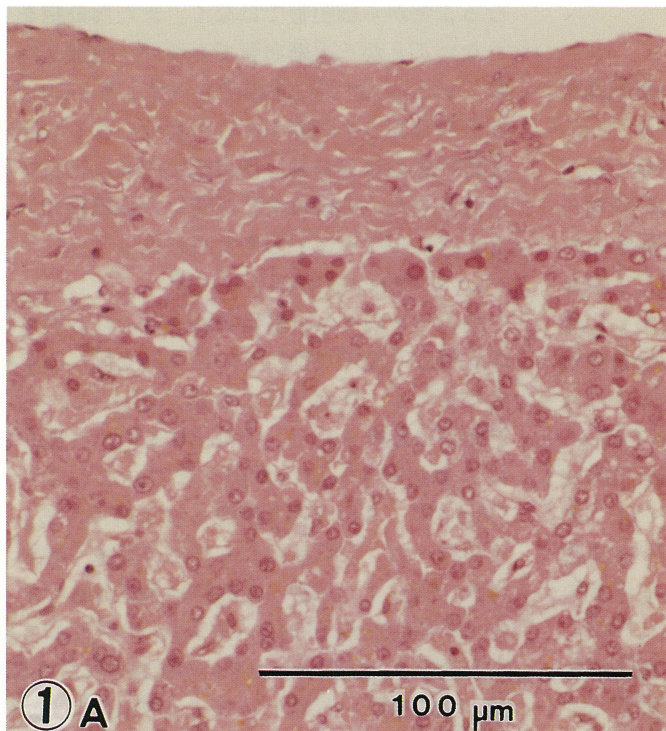
### 2. 方 法

小林の論文<sup>9)</sup> に従った。すなわち、剖検肝および生検肝を被膜を含む5×5×4 mmの小組織片に切り出し、2%グルタルアルデヒド加燐酸緩衝液で3~24時間浸漬固定した。0.1M燐酸緩衝液で洗浄し、肝被膜をピンセットを用いて用手剥離した後、8NのHClに60°Cで70分間浸漬し、さらに同緩衝液で洗浄後、10 mg/10 ml collagenase (Worthington type II) 加燐酸緩衝液に37°Cで6~12時間浸漬し消化した。蒸留水で洗浄後エタノール列脱水し、酢酸イソアミル浸漬、臨界点乾燥、Auスパッタ・コーティングし、走査電顕JSM-T300型を用いて加速電圧10~15kVで検鏡した。

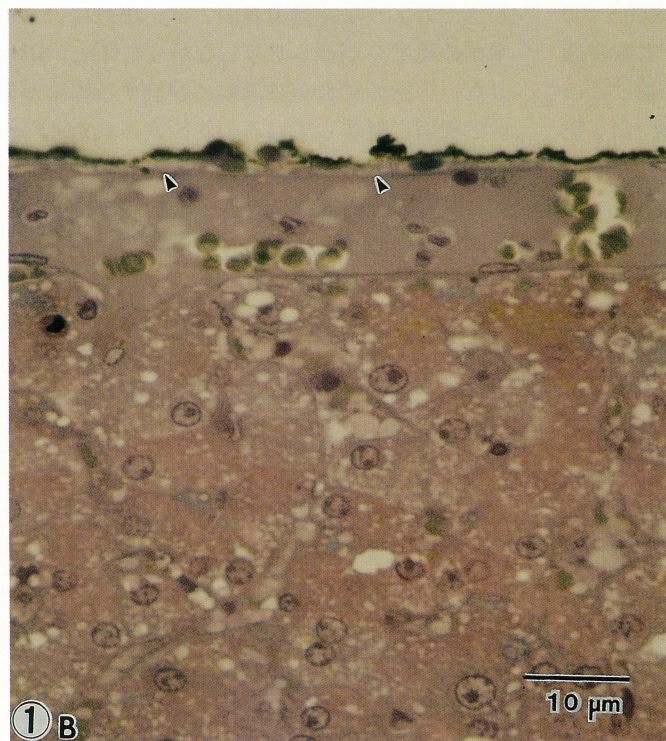
光顕標本は、10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後、薄切し、HE染色を行い検鏡した。なお、走査電顕的に観察した部位の同定は、観察後の試料をエタノール列脱水後、パラフィン包埋し、HE染色した光顕標本を作製して行った。

## 結 果

光顕標本の観察では、肝表面は一層の中皮細胞で覆われ、その下に結合組織が存在した(Fig. 1A)。走査電顕的に観察した試料の光顕的観察では、試料作製段階における消化の影響により被膜結合組織は硝子様に、そして血管内の赤血球および肝細胞の核や胞体も変色していた(Fig. 1B)。実質から10 μm付近の被膜結合組織まで消化された試料表面はスパッタ・コーティングにより黒くなっていたが、その直下には径約1~2 μmの間隙が不連続的に観察された(Fig. 1B, 矢頭)。細胆管や胆管は観察されな



**Fig. 1A.** Light micrograph of normal liver. Liver surface has two layers consisting of mesothelial cells and connective tissue respectively (Hematoxylin and eosin staining,  $\times 200$ ).



**Fig. 1B.** After scanning electron microscopic observations, the specimen was embedded in paraffin and was treated by conventional methods for light microscopy. Digestion extends to deep area of the capsular connective tissue. The discontinuous gap (arrowheads) are seen under the surface of specimen. The colour of connective tissue, red cells and hepatocytes changes due to digestion, and the surface of specimen turns black after sputter coating (Hematoxylin and eosin staining,  $\times 400$ ).

かった。

#### 1. 正常肝表在毛細リンパ管

走査電顕的には、消化をまぬがれた微細網状の結合組織線維上に露出しながら、ほぼ平面的に網目状の走行をする表面平滑な脈管構造物が観察された (Fig. 2)。その脈管構造物の周囲の結合組織には網目状の走行をする溝が観察された (Fig. 2, 白矢頭)。この溝はその走行と幅から、上述の脈管構造物が剥離脱落したあとに残された鑄型と考えられた。鑄型もあわせた脈管構造物の網目の大きさは約100~150  $\mu\text{m}$ であった。脈管構造物を拡大を上げて観察すると (Fig. 3)、径は細い部分で約7  $\mu\text{m}$ 、太い部分で約10  $\mu\text{m}$ と不均一で、周細胞は観察されなかった。非自由表面には幅約0.1~0.5  $\mu\text{m}$ の間隙や径約0.1~0.5  $\mu\text{m}$ の小孔が並んで不規則な亀甲状の配列を示す部分が観察された (白矢頭)。また、非自由表面には周囲の微細網状の結合組織線維と連続する線維 (白矢印) が付着して存在している部位があった。この線維は上述の間隙や小孔が並んでいる部分の近傍に観察された。一部が結合組織深部に斜走するような、約50~100  $\mu\text{m}$ の間隔の不規則な網目状の走行をする表面平滑な脈管構造物も観察された (Fig. 4)。このものも、拡大を上げて観察すると (Fig. 5)、径は約7~10  $\mu\text{m}$ と不均一で、周細胞は観察されなかった。非自由表面には、径約0.1~0.5  $\mu\text{m}$ の小孔が不規則な亀甲状に配列した部分が観察され (白矢頭)、その近傍には周囲の微細網状の結合組織線維に連続する線維 (白矢印) が観察された。さらに、径2~3  $\mu\text{m}$ の小孔 (黒矢印) や径約0.1~0.5  $\mu\text{m}$ で篩板状に集簇して存在する小孔 (黒矢頭) も観察された。人工的に脈管の内腔 (星印) が露出したものは、一部でのみ観察されたにすぎなかったが、管壁は薄く、一層の内皮細胞からなると考えられた。内腔面には径約0.1~0.5  $\mu\text{m}$ の小孔が観察された。

これらの脈管構造物は Figure 1B で示したスパッタ・コーティング直下の被膜結合組織深部の組織間隙状のものに相当し、その部分には細胆管は観察されず、しかも薄い扁平な内皮から

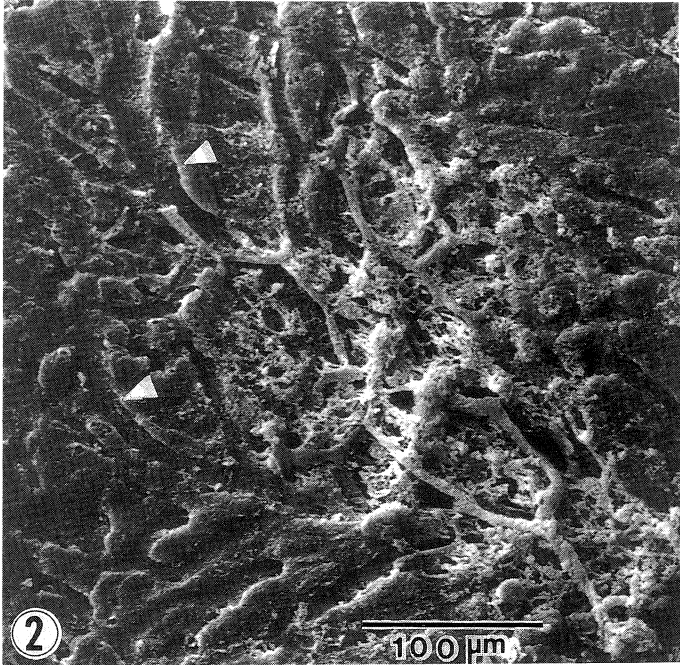
なることから細胆管ではなく、また周細胞をもたないことから毛細血管でもない。毛細リンパ管、すなわち肝表在毛細リンパ管と考えられた。非自由表面の小間隙や小孔の配列による不規則な亀甲状の縁どりは、内皮細胞間隙に相当すると考えられ、その近傍に付着した線維はアンカリングフィラメントと考えられた。

#### 2. IPH 肝表在毛細リンパ管

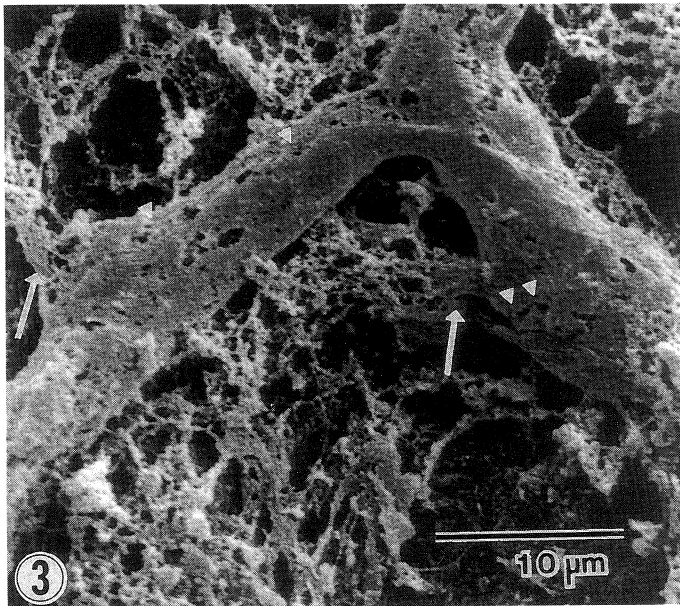
消化をまぬがれた結合組織線維上に、網目状の走行や不規則な吻合と分枝を繰り返しながら走行をする、表面平滑な脈管が露出して、走査電顕的に観察された。網目状に走行する部分では、約30~40  $\mu\text{m}$ の間隔の網目をなしていた (Fig. 6)。表面平滑な脈管の径は約10~15  $\mu\text{m}$ と不均一で、盲端に終わる分枝が数多く観察された (Fig. 7, 矢頭)。周細胞は観察されなかった。非自由表面には0.1~0.5  $\mu\text{m}$ の小孔が不規則な亀甲状の配列を示す部分が観察された (Fig. 8A, 白矢頭)。しかし、多くの部分では径約0.1~0.5  $\mu\text{m}$ で篩板状に集簇する小孔 (黒矢頭) や径約2~3  $\mu\text{m}$ の小孔 (黒矢印) が多数存在し、そのような非自由表面では、小孔による亀甲状の縁どりがはっきりしなかった (Fig. 8B)。また、周囲の結合組織線維に連続する線維が非自由表面に付着しているのが観察された (Fig. 8B, 白矢印)。これらの表面平滑な脈管も正常肝例と同様に、周細胞が存在しないことや、走行と非自由表面の所見および盲端の存在などの点から毛細リンパ管であり、表在毛細リンパ管と考えられた。正常肝のそれと同様に、非自由表面の、小孔の配列による不規則な亀甲状の縁どりは内皮細胞間隙に相当すると考えられ、付着した線維はアンカリングフィラメントと考えられた。

IPH 肝と正常肝の毛細リンパ管を比較すると、IPH 肝ではより径は拡張し、不規則な吻合や分枝、盲端の存在が目立った (Figs. 6, 7)。また非自由表面には、小孔の存在がより著明であった (Fig. 8)。

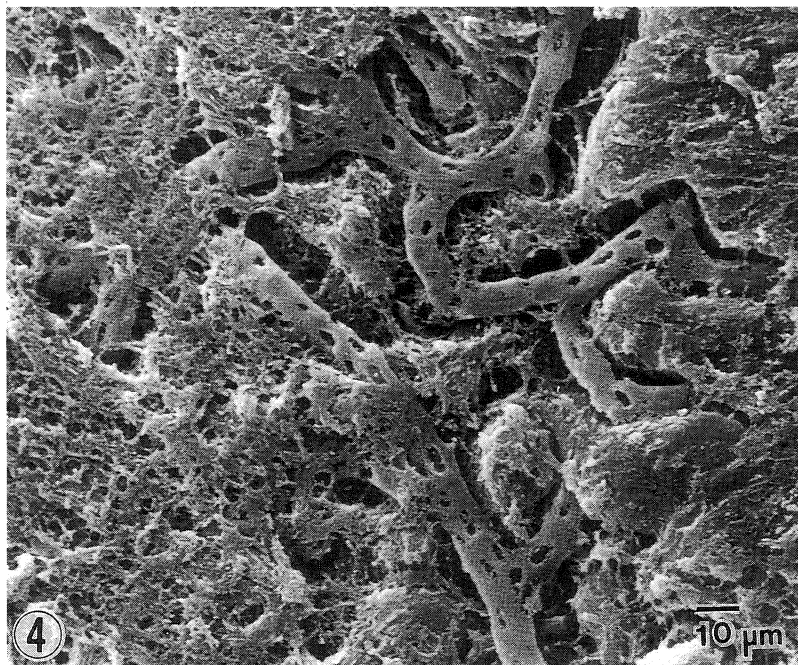




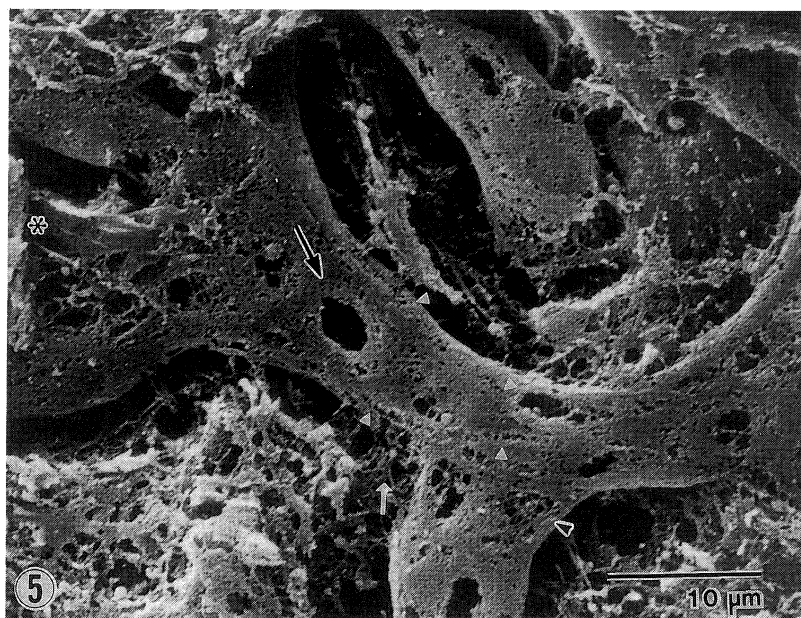
**Fig. 2.** (Normal liver) Scanning electron micrograph (SEM) under treatment of chemical digestion after liver capsule stripping. Capsular lymph capillaries which form a level meshworks are demonstrated in connective tissue. The casts (arrowheads) of lymph capillaries remain in connective tissue.



**Fig. 3.** High magnification of capsular lymph capillaries seen in Fig. 2. The external surface of capsular lymph capillaries has small pits or fissures (arrowheads). These pits or fissures correspond to intercellular spaces of epithelial cells. The fibers (arrows) connect lymph capillaries to surrounding connective tissues are seen. These fibers correspond to anchoring filaments.



**Fig. 4.** (Normal liver) SEM under treatment of chemical digestion after liver capsule stripping. Capsular lymph capillaries which form a irregular meshworks are demonstrated in connective tissue.



**Fig. 5.** High magnification of capsular lymph capillaries seen in Fig. 4. The pits (white arrowheads) and the fibers (white arrow) corresponded to intercellular spaces and anchoring filaments, respectively. Pores (arrow) and small pores (arrowhead) are observed on the external surface. The small pores gather and appear like sieve plate. The lumen of capillary is also observed (asterisk).

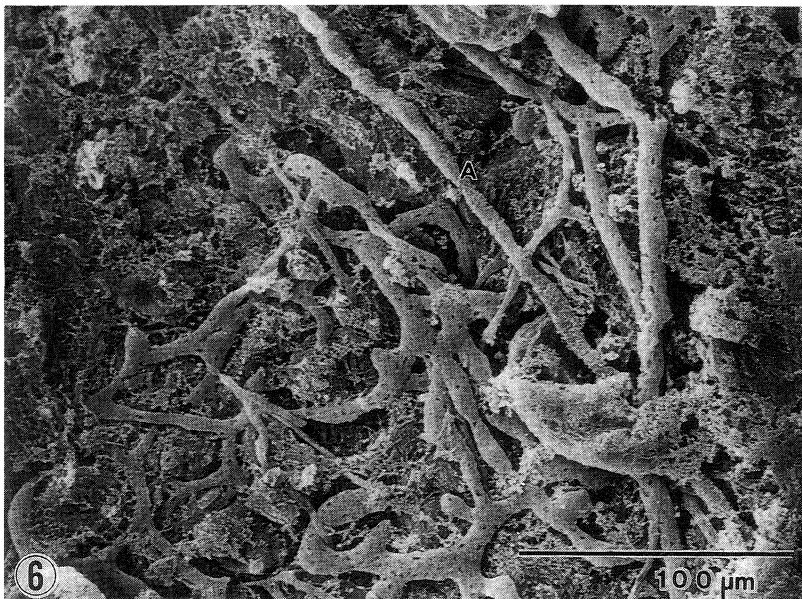


Fig. 6. (Liver with IPH) SEM under treatment of chemical digestion after liver capsule stripping. Capsular lymph capillaries which have many ramifications with anastomoses at random are demonstrated in connective tissue. A : arteriole

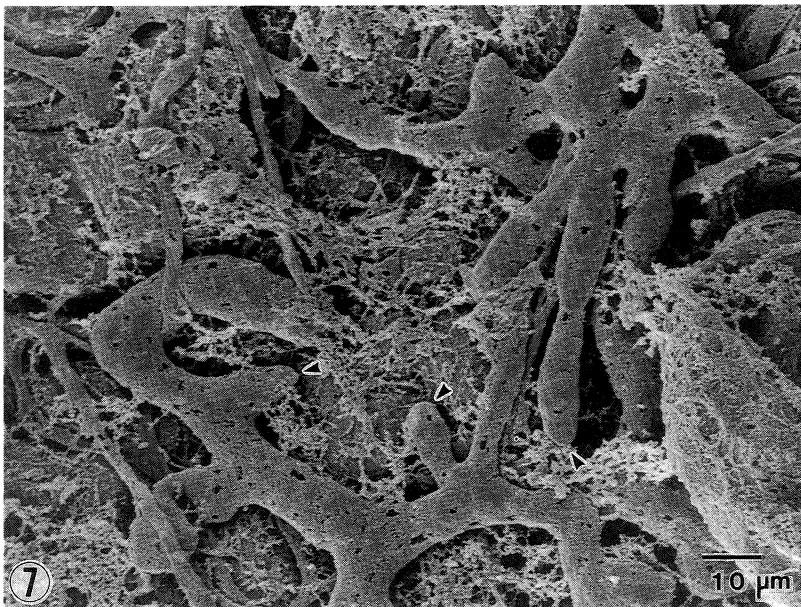
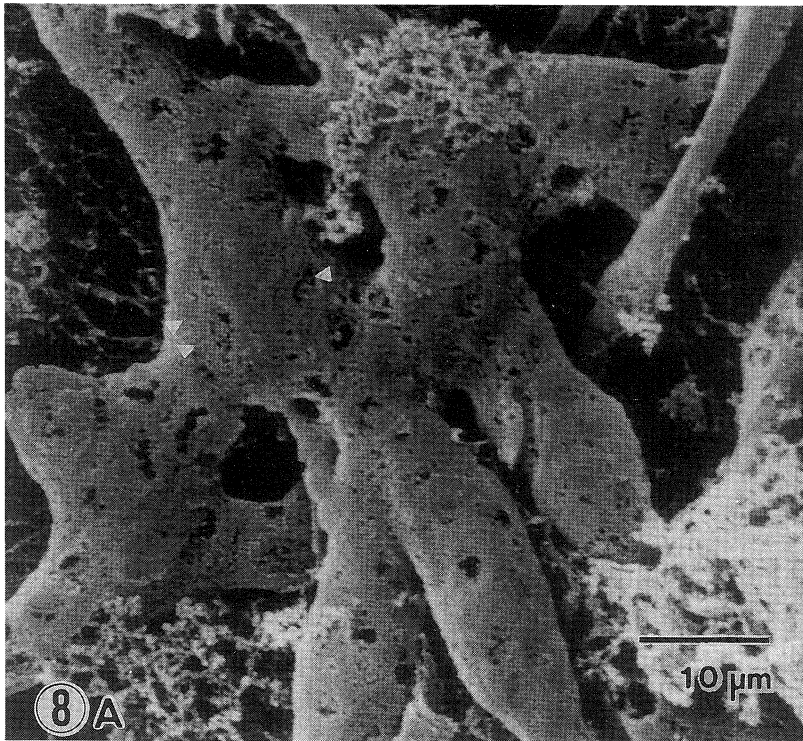
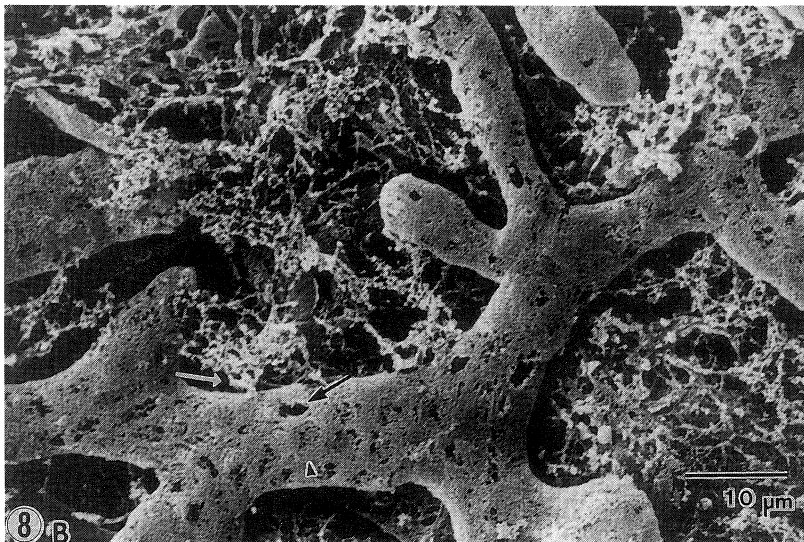


Fig. 7. High magnification of capsular lymph capillaries seen in Fig. 6. The blind-ended branches are frequently observed in these capillaries.



**Fig. 8.** Higher magnification of lymph capillaries seen in **Fig. 6**

**A :** The pits which are corresponded to intercellular spaces (arrowheads) are observed on the external surface.



**B :** Pores (arrow) and small pores (arrowhead) are demonstrated on the external surface. The small pores, which gather and appear like sieve plate. For these pores, the pits which are corresponded to intercellular spaces are unclear. The fibers which are corresponded to anchoring filaments are also demonstrated (white arrow).



## 考 察

豊富な肝リンパの最初の流入路である肝毛細リンパ管の形態と構築に関しては、透過電顕による検討<sup>5), 6)</sup> とリンパ管注入法による実体顕微鏡的検討<sup>7)</sup> が成されている。しかし、透過電顕では内皮細胞などの微細形態は観察されているが、立体的構築が観察されていない。リンパ管注入法による実体顕微鏡的観察では立体的構築や分布様式は記載されているが、微細形態や周囲組織との関係は観察されていない。リンパの吸収を利用した鋳型法による肝リンパ管の走査電顕的研究<sup>10)</sup> もあるが、毛細リンパ管の立体的構築の観察は十分ではない。そして、これらの方法は非自由表面の観察には全く無力である。

肝被膜結合組織の中央部から深部には肝表在毛細リンパ管網が存在する。<sup>7)</sup> 被膜用手剥離後に化学的消化を行うことにより、その毛細リンパ管網を露出させ走査電顕的に非自由表面から三次元的に観察できた。注入法による北爪の実体顕微鏡的観察の詳細な報告<sup>7)</sup> によれば、肝表在毛細リンパ管は径が約10  $\mu\text{m}$  で、肝小葉一個あたり数十個から百数十個の大きさの網目をなし、平面的や立体的に不規則に走行している。肝小葉の大きさは約1  $\text{mm}^2$  程度とされている<sup>3)</sup> から、この網目の間隔は密な部分では約50~100  $\mu\text{m}$  程度となる。筆者が観察した肝表在毛細リンパ管も径は約7~15  $\mu\text{m}$  と10  $\mu\text{m}$  前後で、平面的に走行したり (Fig. 2) あるいは結合組織深部に斜走する不規則な網目状 (Figs. 4, 6) 走行を示し、網目の間隔も約30~150  $\mu\text{m}$  で、上述の北爪の報告に一致していた。

現在、毛細リンパ管の形態学的特徴として、径が不均一であること、周細胞が欠如していること、盲端が存在するものがあること、アンカリングフィラメントを持つこと、リンパの吸収部位として内皮細胞間隙が存在すること、基底板がしばしば欠如していること、内皮細胞に小孔は存在していないことが挙げられている。<sup>11)</sup> 本研究で観察された肝表在毛細リンパ管も、径が不均一で、周細胞はなく盲端やアンカリングフィ

ラメント、および内皮細胞間隙が存在した。アンカリングフィラメントが消化をまぬがれた理由としては、これが主に弾性線維成分からなる線維であり、<sup>12)</sup> 筆者の用いた組織消化法は主として膠原線維を消化するもの<sup>8)</sup> であるためと考えられた。また、この線維は透過電顕的に、内皮細胞間隙近くの内皮細胞の外表面から周囲の結合組織に連続して観察されている<sup>12)</sup> が、筆者の観察結果もこの所見に一致しており、しかも、それを三次元的にとらえることができた。基底板は、本法では全く観察されなかったが、消化されたものとも考えられ、その存在は、本法では不明である。また、内皮細胞の小孔として、非自由表面に散在する小孔や篩板状に集簇して存在する小孔が観察され (Figs. 5, 6, 黒矢印, 黒矢頭)、肝表在毛細リンパ管には明らかに小孔が存在していた。肝表在毛細リンパ管の超微形態学的観察は少なく、肝内部の毛細リンパ管では、他の臓器組織の毛細リンパ管と同様にリンパの吸収は細胞間隙で行われ、内皮細胞に小孔は存在しないとされている<sup>5), 6)</sup> のが一般である。しかし、肝はリンパが豊富であり、肝内部の透過電顕的観察で毛細リンパ管の一部で細胞間隙以外に小孔が存在したという報告<sup>13)</sup> がある。筆者は肝内部のそれについては観察していないが、肝表在毛細リンパ管を非自由表面からはじめて観察した。方法論的に、本法は非自由表面を三次元的に、かつ広範囲に観察できることが特徴であり、<sup>8)</sup> 上述の小孔がはじめて観察されたものと考えられる。なお、弁構造の存在を示唆する所見はなかった。

IPH では、肝リンパは正常より増加しているとされる。<sup>14)</sup> 肝表在毛細リンパ管は正常肝のそれと比較して、網目状の走行部分はより密で、しかも不規則な吻合や分枝が目立っていた (Fig. 6)。径も正常肝のそれより拡大しており、盲端におわる分枝もしばしば観察され増加していた (Fig. 7)。これらはリンパの増加に対する病態生理学的な形態反応と考えられる。また、非自由表面の内皮細胞間隙以外に小孔も増加していた (Fig. 8)。これも増加した多量のリンパを吸

収するための合目的な反応であろう。

内皮細胞間隙以外に観察されたこれらの小孔が人工的なものでないことは次の点からも明らかと考えられた。すなわち、篩板状に集簇する小孔とそうでない小孔が形態学的に明瞭に示されたこと、リンパがより増加しているIPHでは、その反応としての小孔の増加が観察されたことなどである。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った川崎医科大学附属川崎病院内科 小林敏成教授に深甚なる謝意

を表しますとともに、本研究を始めるにあたり、いろいろと示唆をいただいた釋舎龍三博士に深謝いたします。

また、剖検肝を提供していただいた同病理部 伊藤慈秀教授に深謝いたします。

技術的援助をいただいた上平正子氏、増地智子氏に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第21回日本臨床電子顕微鏡学会、第39回日本消化器内視鏡学会総会シンポジウムⅢ「肝の腹腔鏡所見と病理組織像」で発表した。

## 文 献

- 1) Yoffey, J. M. and Courtice, F. C. : Lymphatics, lymph and lymphomyeloid complex. 1st ed. London and New York, Academic Press. 1970, pp. 229—236
- 2) Budd, G. C. : Liver physiology and biochemistry. *In* Basic and Clinical Hepatology, ed. by Motta, P. M. and Didio, L. J. A. 1st ed. Hague, Martinus Nijhoff. 1982, pp. 119—136
- 3) 藤田尚夫, 藤田恒夫 : 標準組織学. 東京, 医学書院. 1984, pp. 139—155
- 4) 金村泰輔 : 肝臓の構築. 「人体組織学4」(山本寅男, 渡辺陽之輔編), 第1版. 東京, 朝倉書店. 1987, pp. 269—279
- 5) 鈎スミ子 : 肝リンパ系. 脈管学 19 : 489—493, 1974
- 6) 鈎スミ子, 藤川和生, 西 厚生 : 肝リンパ管系の形態, 分布, 微細構造と機能—特に肝血管系, 胆管系との関係について—. 日医師会誌 83 : 1229—1236, 1980
- 7) 北爪伸仁 : ヒト肝表在リンパ管の正常構築に関する研究. 肝臓 24 : 581—590, 1983
- 8) Evan, A. P., Dail, W. G., Dammrose, D. and Paimer, C. : Scanning electron microscopy of cell surface following removal of extracellular material. *Anat. Rec.* 185 : 433—496, 1976
- 9) 小林和司 : 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—. 川崎医学会誌 11 : 434—442, 1985
- 10) Yamamoto, K. and Phillips, M. J. : Three-dimensional observation of the intrahepatic lymphatics by scanning electron microscopy of corrosion casts. *Anat. Rec.* 214 : 67—70, 1986
- 11) 森 堅志 : 末梢リンパ管の形態学的研究法. 微細構造並びに血管との位置関係. 解剖誌 54 : 1—20, 1979
- 12) Leak, L. V. and Burke, J. F. : Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. *J. Cell. Biol.* 36 : 129—149, 1968
- 13) Shatzki, P. F. : Electron microscopy of lymphatics of the porta hepatis. *Acta Anat.* 102 : 54—59, 1978
- 14) Samanta, A. K. S., Saini, V. K., Chhuttani, P. N., Patra, B. S., Vashista, S. and Datta, D. V. : Thoracic duct and hepatic lymph in idiopathic portal hypertension. *Gut* 15 : 903—906, 1974