

A Morphological Study on the Progression of Hepatic Fibrosis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7737

肝線維症の進展に関する形態学的研究

Alpha-Naphthyl-Isothiocyanate および 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene 投与ラット肝の
光学顕微鏡的並びに電子顕微鏡的観察

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

井 川 一 正

(昭和59年5月18日受付)

肝線維症の進展過程を明らかにするために、alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANIT) および 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) 投与ラット肝を光顕的並びに電顕的に観察した。ANIT 投与による肝線維症は小葉間および小葉内胆管の著しい増生に随伴し、門脈域から線維芽細胞または筋線維芽細胞が進入し膠原線維を形成することによって進行した。この肝線維症に Disse 腔の伊東細胞が関与することは少なかった。一方、3'-Me-DAB 投与による肝線維症では、まず oval cell (電顕的には小葉内再生胆管上皮細胞)の増殖が起こり、同時に、この周囲に伊東細胞が microfibril を沈着し、ついで、門脈域から線維芽細胞または筋線維芽細胞が進入して膠原線維を形成するという過程をとって進行するものと考えられた。ANIT 投与群においても、3'-Me-DAB 投与群においても、一部に centrilobular fibrosis をみることがあった。この線維症は、小葉中心域の伊東細胞のみならず中心静脈壁の筋線維芽細胞が膠原線維を形成することによって進展しているものと思われた。肝線維症に伴って類洞の capillarization をみることがあったが、その類洞内皮細胞に連続性の基底膜が形成されることはなかった。伊東細胞と細網線維との関係や、fibrous septa 内における弾性線維形成の意義について考察を加えた。

Key words alpha-naphthyl-isothiocyanate, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, hepatic fibrosis, Ito's cell, myofibroblast

肝線維症は、肝におけるコラーゲン産生とコラーゲン分解との均衡がくずれ、コラーゲン産生が優位になり、膠原線維が過剰に形成されている状態である¹⁾。膠原線維の過剰沈着は、実験動物における肝線維症の観察やヒトの肝線維化の解析から、1) グリソン鞘(門脈域)、2) 傷害肝細胞周囲、3) 増生細胆管周囲の3カ所から初発すると考えられており、それぞれ portal fibrosis, intraparenchymal fibrosis, periductular fibrosis と呼ばれている²⁾³⁾。このように肝線維症が異なった部位または領域から発症することを考えると、肝における膠原線維の過剰形成は単一の細胞種、たとえば線維芽細胞によってのみ行われるというのではなく、むしろ複数のコラーゲン産生細胞が関与している

ものと考えられる。従って、肝線維症の進展はかなり複雑であることが十分推定される。

肝線維症に関与する細胞の種類並びに線維症の進展に伴う fibrous septa の形成過程については、これまでに多くの実験的研究がなされている。1940年 Orr⁴⁾ は p-dimethyl-aminoazobenzene を投与したラット肝を観察し、肝細胞の変性脱落、胆管の増生にひきついで門脈域に形成された肉芽組織が小葉内へ伸展して線維化が進行すると述べている。その後、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) などのアゾ色素^{5)~7)}や、alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANIT) 投与⁸⁾⁹⁾による実験的肝線維症が検討され、これらにおける肝線維症は細胆管の増生や oval cell

A Morphological Study on the Progression of Hepatic Fibrosis: Light and Electron Microscopic Observations of the Livers of Rats Fed Alpha-Naphthyl-Isothiocyanate and 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene. Kazumasa Ikawa, Department of Pathology (I) (Director: Prof. I. Nakanishi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920.

の増殖に随伴して門脈域から進入する線維芽細胞がコラーゲンを産生することによって進行するという考え方が支配的になっている。このような変化は一般に cholangiofibrosis と呼ばれている⁹⁾。

一方、四塩化炭素投与によって引き起こされる肝線維症では、上記薬剤の場合と違って、小葉中心域の肝細胞が選択的に傷害され、centrilobular fibrosis と呼ばれる線維症を来す^{10)~13)}。この場合には、類洞壁の伊東細胞¹¹⁾ (fat-storing cell^{14)~16)}, lipocyte¹²⁾¹³⁾, perisinusoidal cell¹⁰⁾, adventitious connective tissue cell¹⁷⁾, 脂肪摂取細胞¹⁸⁾¹⁹⁾ がコラーゲンを産生し、線維症を引き起こすものと考えられている。また、近年、アルコール投与とヒトの肝線維症の初期像を観察した Nakao ら²⁰⁾ は、アルコール性の初期線維症は大部分中心静脈壁の筋線維芽細胞の増殖と共に起こるものであると指摘している。肝硬変症における fibrous septa 内²¹⁾²²⁾ や、日本住血吸虫症による肝の線維化病巣²³⁾ には筋線維芽細胞がしばしば同定されている。更に、肝においては、以上のような線維芽細胞、筋線維芽細胞、伊東細胞に加えて、最近では肝細胞²⁴⁾²⁵⁾ も血管内皮細胞²⁶⁾ もコラーゲン産生能をもつことが培養実験で確かめられている。従って、このような最近の知見をふまえて、従来から cholangiofibrosis であると考えられていた肝線維症を再検討する必要があるように思われる。

そこで、著者は ANIT 投与ラット肝と 3'-Me-DAB 投与ラット肝を光学顕微鏡 (光顕) 並びに電子顕微鏡 (電顕) を用いて経時的に観察し、肝線維症の進展過程を精査したのでここに報告する。

材料および方法

実験動物として Wistar 系雄ラット (体重: 約 200 g) を用いた。

1. ANIT 投与群

0.1% の割合で ANIT (Aldrich Chemical Co., USA) を混じた飼料でラットを飼育し、投与開始後 5, 7, 13, 18, 20, 25, 30, 35, 50, 65, 72 日のラットをと殺し、その肝組織を光顕並びに電顕用試料とした。また、投与後 90, 100, 120 日目のラットの肝組織は光顕の観察のみに供した。

光顕用試料作成: 肝組織の一部を 10 中性緩衝ホルマリンで固定、パラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (H-E), periodic acid-Schiff (PAS), エラスチカ・ワンギーソン (EVG), アザン、鍍銀染色を施して観察した。

電顕用試料作成: 肝組織の一部を細切し、2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4)

で 4°C, 60 分間前固定し、ついで 2% オスミウム酸 (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) で 4°C, 90 分間後固定を行った。材料をアルコール系列脱水後、エボン 812 に包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを用いてウルトラトーム (LKB 8800 型) で作製し、酢酸ウラン・鉛二重染色、並びにタンニン酸染色²⁷⁾ を施して日立 H-500 型電子顕微鏡 (75 KV) で直接倍率 900~10,000 で観察した。電顕試料観察に先立って、光顕所見と対比させるために各ブロックから 1 μ 切片を作成、1% トルイジブルーで染色を行い、光顕的に病変部をチェックした。

2. 3'-Me-DAB 投与群

0.06% 3'-Me-DAB 含有固形飼料 (オリエンタル酵母社製、東京) でラットを飼育し、投与開始後 7, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 75, 80 日目のラットの肝組織を採取し、光顕並びに電顕用試料として用いた。また、投与後 90, 100, 110, 115, 120, 150, 200 日目のラットの肝組織を光顕的に観察した。

光顕用試料作成: 採取された肝組織の一部を ANIT 投与群の場合と同様に、ホルマリン固定、パラフィン切片を作成し、各種染色を施して観察した。

電顕用試料作成: 電顕用試料も ANIT 投与群の場合と同様の方法で作成した。

成 績

I. ANIT 投与群

1. 光顕所見

ANIT 投与ラットの肝病変は投与期間とほぼ平行して進行するが、若干の個体差があるので本論文では肝線維症の進展に基いて、5 日、7 日、13 日目の病変を病期 I (Stage I, early stage), 18 日、20 日、25 日、30 日目の病変を病期 II (Stage II, intermediate stage), 35 日、50 日、65 日、72 日目の病変を病期 III (Stage III, advanced stage) と分類し、各病期毎にまとめて記載することにする。病期 I は、門脈域と門脈域との間を結ぶ細網線維または膠原線維の細い隔壁 (fibrous septa) がみられる (P-P bridge) 程度の肝線維症の病期を、病期 II は、P-P bridge のみならず、門脈域と小葉中心域との間に細網線維または膠原線維から成る fibrous septa が形成される (P-C bridge) 肝線維症の病期を、また、病期 III は、P-P bridge および P-C bridge に加えて、弾性線維が fibrous septa 内に出現する病期を示している。

1) 病期 I

門脈域には胆管上皮細胞の腫大、軽い胆管の増生および胆管周囲の線維症がみられる。しばしば、浮腫や円形細胞浸潤が認められる。小葉周辺域や Zone 1²⁸⁾ に

沿って小葉内胆管（細胆管）が増生する。細胆管を小葉中心域にみることが少ない。細胆管の増生部位には oval cell が少数混在している。細胆管や oval cell は細網線維によってとりまかれており、隣接類洞壁に比べて細網線維が増加している。一部では門脈域から隣接門脈域まで細胆管が連珠状に配列し、これに沿って P-P bridge が形成されている（図1）。また、一部の細胆管の外周には門脈域と連続する膠原線維が存在する。しばしば、細胆管周囲に単核細胞や好中球の浸潤を認めることができる。肝細胞の壊死や核分裂が散見される。変性肝細胞は小葉周辺域や細胆管に接してみ

とめられる傾向がある。単核細胞の集在小葉内に少数散見される。

2) 病期II

門脈域の胆管の増生および線維症は進行する。これに伴って門脈域は拡大し、限界板は不規則となる。門脈域には単核細胞の他に紡錘形の結合組織細胞が増加する。小葉内では細胆管の増生が著しく、小葉周辺域のみならず小葉中心域にも多数の細胆管をみる。oval cell は相対的に減少している。細胆管の増生と共に線維症は進行する。この病期では細胆管の周囲に膠原線維が増加し、同時に細胆管の走行に沿って紡錘形の細

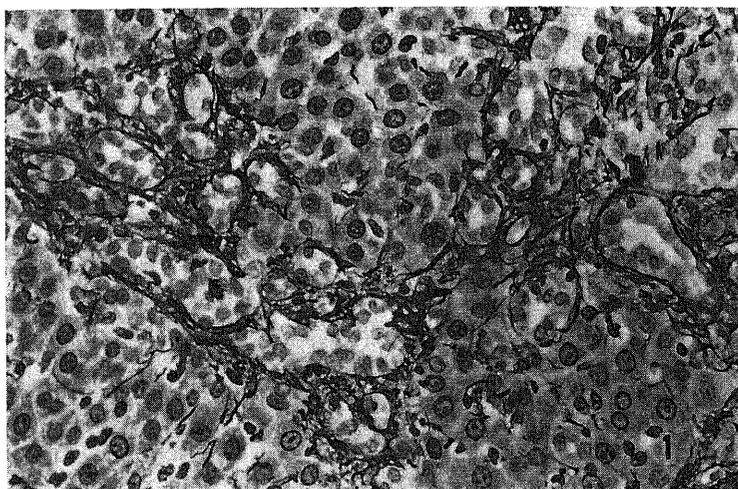


Fig. 1. Porto-Portal fibrous septa (P-P bridge) in association with proliferating ductules in the liver of rats fed α -naphthyl-isothiocyanate (ANIT) for 13 days. Silver impregnation, $\times 250$.

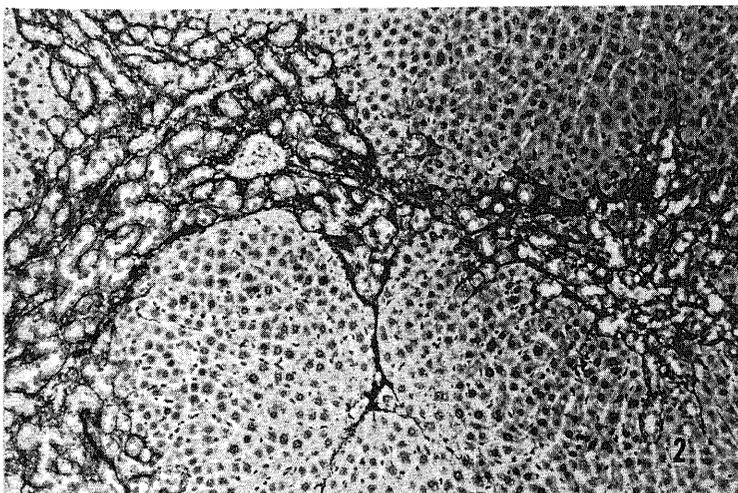


Fig. 2. P-P bridge and porto-central fibrous septa (P-C bridge) in the liver of rats fed ANIT for 25 days. Silver impregnation, $\times 100$.

胞が同定されることが多い。細網線維は細胆管外周, oval cellの周囲, 細胆管と肝細胞の間に局在している。従って, 小葉中心域では細網線維が多く, 周辺域では膠原線維が大部分を占める。細胆管が門脈域間, または門脈域と中心域との間に連らなっている場合には, 各々P-P bridge, P-C bridgeが形成される(図2)。

これらの fibrous septa 内にはまれに小血管がみられる。この時期では fibrous septa の間質には未だ弾性線維は同定されない。肝細胞の壊死, 核分裂や, 単核細胞から成る浸潤巣の程度は病期 I とほぼ同様である。

3) 病期III

門脈域の胆管の増生および線維症は更に進行し, P-P bridge および P-C bridge の fibrous septa の幅は広い。このような部位では胆管と細胆管との区別が困

難である。fibrous septa 内には血管および弾性線維が認められる(図3)。また, 膠原線維の走行に沿って紡錘形の細胞が認められる。しかし, fibrous septa 以外の部位では病期 I, II でみられたと同じような病変が散在している。まれに, 細胆管の介在なしに中心域の類洞壁に線維症(perisinusoidal fibrosis)がみられることがある。この perisinusoidal fibrosis の線維は中心静脈壁と連結している。肝細胞の変性程度は病期 II と同様である。

以上の主要な病理組織学的所見は表1に総括して示した。なお, ANIT 投与を110日, 115日, 130日間続けても cholangioma や hepatoma は発生しなかった。

2. 電顕所見

電顕所見を光顕所見と対比させるために電顕所見も光顕的に設定された病期に従ってまとめて記載し, と

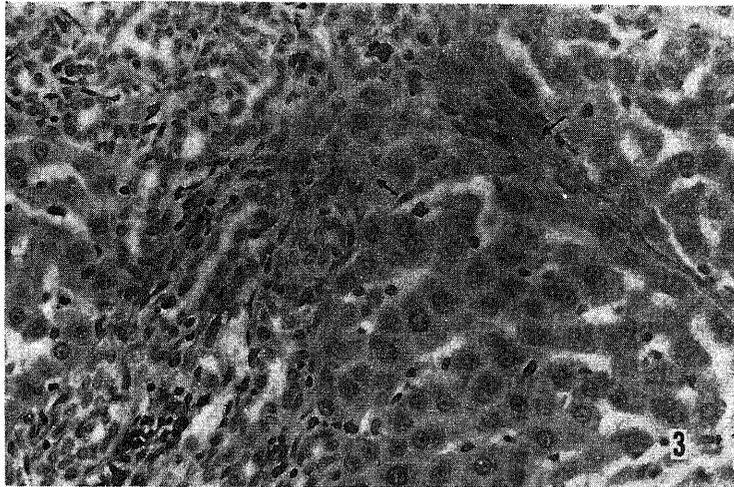


Fig. 3. Delicate elastic fibers (arrows) appearing in fibrous septa in the liver of rats fed ANIT for 72 days. Van Gieson's elastic stain, $\times 250$.

Table 1. Main histopathological changes in the liver of rats fed α -naphthyl-isothiocyanate

Progressive changes	Oval cell	Ductule	Liver cell necrosis	Liver cell mitosis	Reticular fiber	Collagen fiber	Elastic fiber
Stage I (early stage)	+	++	+	+	+	+	-
Stage II (intermediate stage)	+	+++	+	+	+	++	-
Stage III (advanced stage)	+	+++	+	+	+	+++	+

Symbols: -, absent; +, present or mildly increased; ++, moderately increased; +++, markedly increased.

くに、線維症の初期病変とこれに関与する細胞に注目して述べる。

1) 病期 I

門脈域および小葉周辺域：胆管上皮細胞は原形質が明調で線毛や微絨毛をもち、互いに細い細胞突起を伸ばして相互嵌入を営み、デスマゾーム結合で接着している。その基底面には連続性の基底膜が認められる。一部の胆管では上皮細胞間に細胞小器官の発育が乏しい未熟な上皮細胞（介在細胞, intercalated cell²⁹⁾）が介在し、このため多層性である。しばしば、胆管上皮細胞には核分裂や、腔内に突出する浮腫状の微絨毛 (cytoplasmic bleb)²⁹⁾ がみられる (図4)。門脈域にはリンパ球、大食細胞および線維芽細胞が認められる。線維芽細胞にまじって microfilament の集束と dense body を有する筋線維芽細胞がみられる (図5)。また、脂肪滴をもつ線維芽細胞をみることがある。線維芽細胞や筋線維芽細胞の周囲には microfibril が、また、細胞間や血管周囲には無定形物質の集積が認められる。門脈域の膠原線維束内に落ち込んだような形の肝細胞をみることがある。この肝細胞は暗調な原形質をもち、リソゾームが豊富であるが、未だ粗面小胞体

の発育は良好で、大型ミトコンドリアを有し、基底膜を備えていない。小葉周辺域の肝細胞間にはしばしば門脈域から伸びる線維芽細胞をみる。小葉内胆管（細胆管）は Disse 腔の類洞内皮細胞と肝細胞の間に割り込んだ形で認められる。細胆管は胆管に比べてその内腔は狭いが、基底膜によってつまれているので肝細胞や Kupffer 細胞との区別は容易である。細胆管上皮細胞の形態は胆管上皮細胞とほぼ同様であり、cytoplasmic bleb も認められる。肝細胞とデスマゾーム結合で接着している細胆管上皮細胞がみられることがある。これは duct of Hering の構造³⁰⁾ に相当するものであるが、この場合にも基底膜の有無によって両者の細胞を区別することができる。oval cell は電顕的には細胆管上皮細胞であることが知られている²⁹⁾³¹⁾³²⁾ ので、内腔の極めて狭い細胆管の上皮細胞や、duct of Hering を構成する細胆管上皮細胞が oval cell に相当するものであろう。門脈域に近い細胆管上皮細胞の基底膜直下には、少量の無定形物質、microfibril および門脈域から伸びる線維芽細胞または筋線維芽細胞を認めることが多い (図6)。また、直径約 40 nm の細い膠原線維が伴なわれていることもある。これに対して、

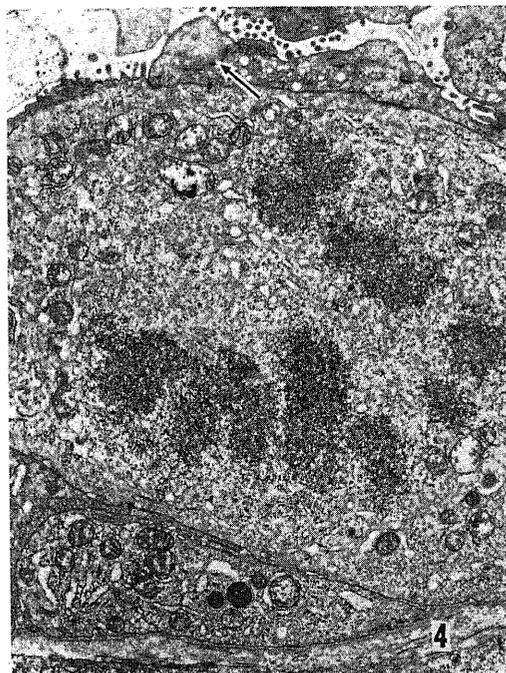


Fig. 4. Cell mitosis and cytoplasmic bleb (arrow) of epithelial cells of an interlobular duct in the liver of rats fed ANIT for 7 days. $\times 5,760$.



Fig. 5. Myofibroblast containing bundles of microfilaments with dense bodies (arrow) in the portal area close to a hepatocyte (H) in the liver of rats fed ANIT for 5 days. $\times 10,800$.

duct of Hering の細胆管上皮細胞の基底膜下には一般に少量の無定形物質の貯留をみるにすぎない。ときには伊東細胞が無定形物質と共に同定される。伊東細胞は脂肪滴を保有し、既存の膠原線維に接してその細胞突起を伸ばしているが、微細構造には著変がない。内腔の狭い細胆管に接して伊東細胞が認められる場合がある。この場合には、無定形物質と少数の microfibril が伴なわれている。Disse 腔の既存の膠原線維は直径 40 nm 以上で、小さい線維束を作って点在し、個々の線維は少量の無定形物質でつまみ込まれている。肝細胞には、トノフィラメントの増加、滑面小胞体の増加、脂肪滴、グリコゲンの減少、不正形核などの変化がみられる。

中心静脈および小葉中心域：中心静脈の内皮細胞の細胞間隙は開大する。静脈壁には非連続的な膠原線維束と、この間に分布する筋線維芽細胞がみられ、しばしば大食細胞が混在している。中心域の Disse 腔には比較的粗面小胞体の発育が良好な伊東細胞がみられるが、膠原線維の増加や microfibril はいまだ認められない。肝細胞の変化は小葉周辺域と同様である。

2) 病期 II

門脈域および小葉周辺域：胆管上皮細胞の形態学的変化は病期 I のそれと同様である。胆管周囲には線維芽細胞、または筋線維芽細胞が多い。また、膠原線維の沈着も増加している。小葉周辺域の細胆管はその内

腔が広く、外周には線維芽細胞と直径 40 nm 以上の太い膠原線維をみることが多い。伊東細胞はこのような部位ではほとんど同定されず、大食細胞、リンパ球、プラズマ細胞が認められる。また、連続性の基底膜を有する小血管をみることもある。この血管と既存の Disse 腔との間には細胆管、膠原線維や各種遊走細胞が介在し、血管と類洞が直接連結していることはない。変性肝細胞に接して大食細胞がみとめられる。細胆管と変性肝細胞の間、または伊東細胞と変性肝細胞の間には無定形物質の集積をみるが、microfibril はまれである。

中心静脈および小葉中心域：中心静脈周囲には大食細胞が目立つ。膠原線維束内には筋線維芽細胞がみとめられる。一部では開大した肝細胞間に静脈壁と連なる膠原線維と筋線維芽細胞をみる。この線維束と既存の類洞内皮細胞との間には大食細胞および無定形物質が多く、しばしば類洞内皮細胞に接して粗面小胞体の拡張した伊東細胞と microfibril をみる。

3) 病期 III

P-P bridge や P-C bridge に相当する部位では、胆管と胆管との間、または胆管と肝細胞との間に横紋の明瞭な太い膠原線維が束状に配列し、線維束間には microfibril の集束を有する筋線維芽細胞が介在している。まれに、伊東細胞が肝細胞に接して認められることがある。このような線維束内には弾性線維が出

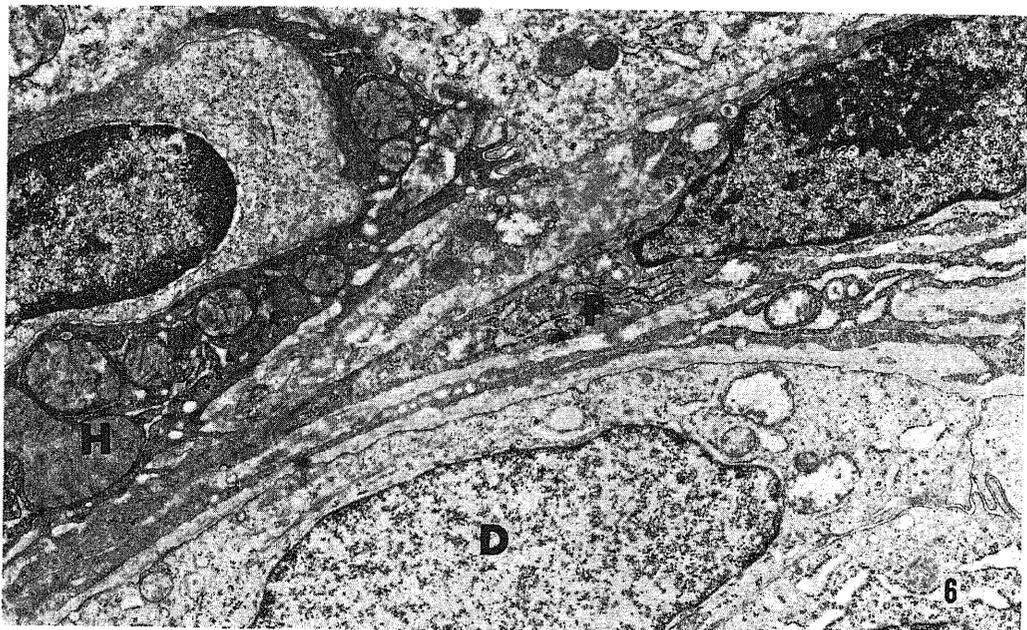


Fig. 6. Fibroblasts (F) ingrowing between a ductule (D) and hepatocytes (H) from the portal area in the liver of rats fed ANIT for 7 days. $\times 10,800$.

現している(図7)。また、毛細血管や静脈もしばしば同定される(図8)。中心静脈周囲には膠原線維が増加し、この間に筋線維芽細胞が介在している。光顕的にみとめられた中心域の perisinusoidal fibrosis は肝細胞間に分け入るように中心静脈壁から伸びる太い膠原線維と随伴する筋線維芽細胞および肝細胞によりそっている伊東細胞から成る(図9)。線維束の中央部には弾性線維が同定される(図10)。また、線維束の先端部

は既存の Disse 腔へ連結する。ここでは、類洞内皮細胞に pore はみられないが、連続性基底膜は形成されていない。

II. 3'-Me-DAB 投与群

1. 光顕所見

3'-Me-DAB 投与ラットの肝病変も ANIT 投与群の場合と同様に、肝線維症の進行程度に基いて、7日、20日、30日目の病変を病期 I (Stage I, early stage),

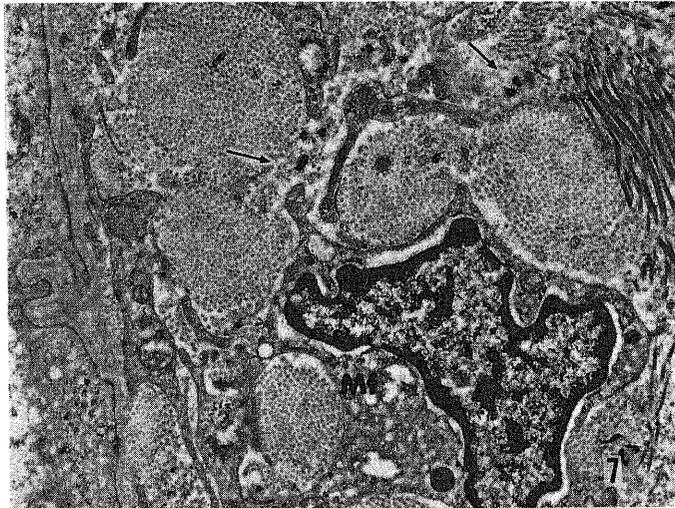


Fig. 7. Newly formed elastic fibers (arrows) in bundles of collagen fibers around cell processes of myofibroblasts (Mf) in the liver of rats fed ANIT for 50 days. Tannic acid stain, $\times 10,800$.



Fig. 8. Capillary vessel with the continuous basement membrane between hepatocytes (H) and fibrous septa in the liver of rats fed ANIT for 35 days. $\times 9,000$.

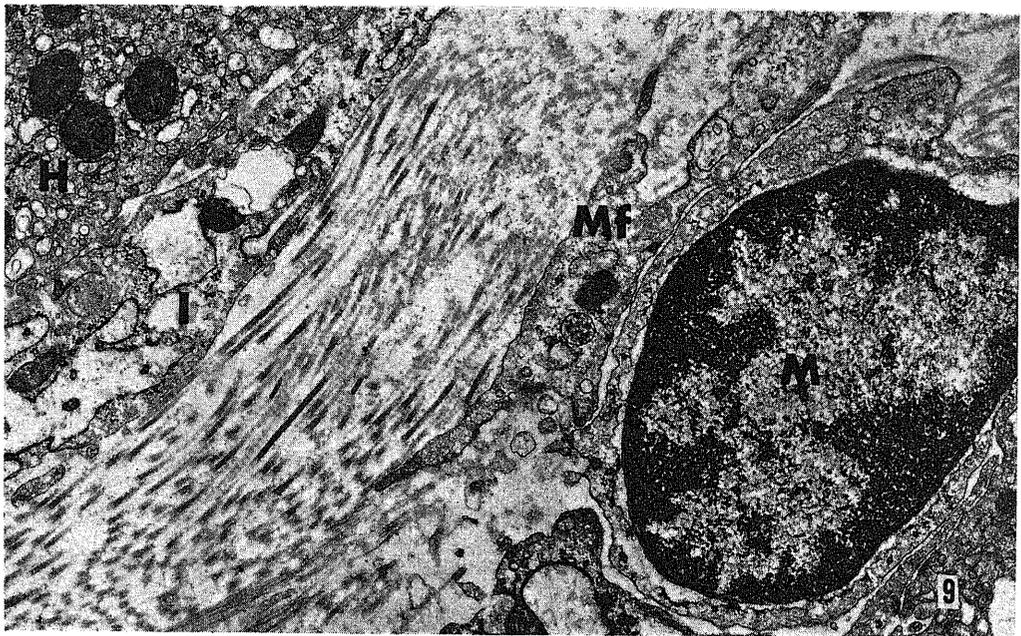


Fig. 9. Cell processes of myofibroblasts (Mf) in bundles of collagen fibers extending from the wall of the central vein in the liver of rats fed ANIT for 72 days. Ito's cells (I) and a macrophage (M) are seen adjacent to hepatocytes (H). $\times 14,400$.

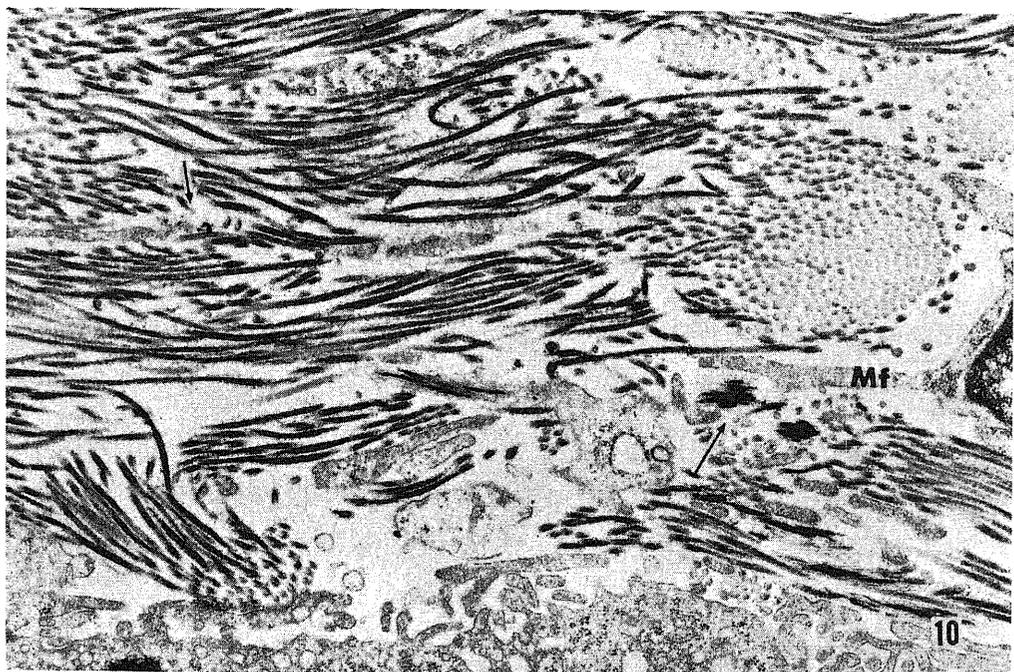


Fig. 10. Fine elastic fibers (arrows) in bundles of collagen fibers close to cell processes of myofibroblasts (Mf) of pericentral location in the liver of rats fed ANIT for 72 days. Tannic acid stain, $\times 14,400$.

40日, 45日, 50日目の病変を病期II (Stage II, intermediate stage), 60日, 75日, 80日目の病変を病期III (Stage III, advanced stage) と分類して記載する。この実験群では, 病期IはP-P bridgeもP-C bridgeも未だ認められない程度の病期を, 病期IIはP-P bridgeが形成されるがP-C bridgeは不完全である病期を, また, 病期IIIはP-P bridgeもP-C bridgeも認められるような線維症の病期を指すものである。

1) 病期I

門脈域には浮腫と単核細胞浸潤がみられるが, 胆管の増生や線維症は目立たない。小葉周辺域や Zone 1²⁰⁾

に沿う領域には, oval cell が出現している。oval cell と共に小葉内胆管(細胆管)も少数みとめられる。oval cell や細胆管の外周に沿って細網線維が増加している(図11)。膠原線維を小葉内にみることが少ない。小葉中心域には oval cell は未だみとめられない。中心静脈周囲には浮腫および軽い細網線維の増加がある。肝細胞の壊死や核分裂がかなり多く, 散在性である。とくに, 肝細胞壊死は小葉周辺域や肝静脈周囲に多い。肝細胞の脂肪変性, グリコーゲンの減少, 細胞質の granulovacuolar change も散見される。

2) 病期II

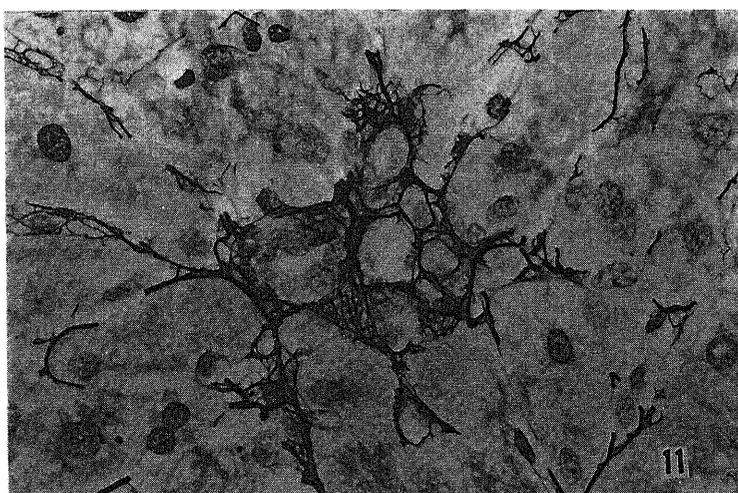


Fig. 11. Reticular fibers around oval cells in the liver of rats fed 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) for 30 days. Silver impregnation, $\times 400$.

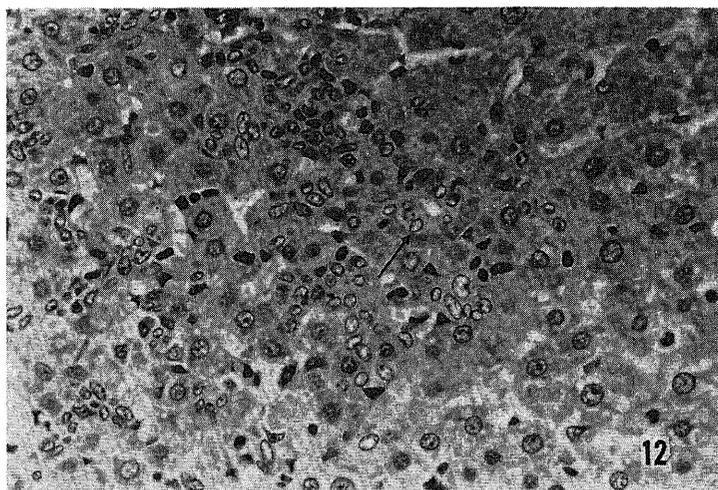


Fig. 12. Cluster of oval cells containing a small ductule (arrow) in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 50 days. Hematoxylin-eosin stain, $\times 250$.

門脈域では、胆管上皮細胞の腫大、軽度の胆管周囲性線維症、および単核細胞浸潤がある。小葉内では oval cell の増殖がかなり目立つ。これは主に小葉周辺域に多いが小葉中心域にも oval cell はみとめられる。小葉周辺域では oval cell にまじって細胆管が少数認められる(図 12)。oval cell や細胆管は細網線維によってつつまれる。部位によっては、門脈域と門脈域を結ぶように oval cell が配列し、これに伴って P-P bridge が形成される。膠原線維は門脈域に近接する細胆管周囲にみられるようになる。中心静脈周囲には部分的に細網線維のみならず、膠原線維が増加し、類洞壁に伸びていることがある。この病期では肝細胞の壊死や変性が強く、まれに異型核をもつ肝細胞が出現する。核分裂や肝細胞壊死、単核細胞集団の程度は病期 I と変わらない。

3) 病期III

門脈域は胆管の増生と線維症によって拡大する。小

葉内の oval cell の増殖は高度で、小葉周辺域から中心域にまたがって大きい細胞集団を作る。また、小集団の oval cell が小葉内に点在している。oval cell のこのような増殖帯には細胆管が混在し、その数も増す。また、細網線維に加えて、膠原線維がこれらの間質に増加する。oval cell や細胆管が門脈域間、または門脈域と中心域とにまたがる場合には、それぞれ P-P bridge, P-C bridge が形成される(図 13)。膠原線維から成る幅広い fibrous septa には血管が認められる。75 日目にはこの fibrous septa 内に弾性線維を認めることができる。肝細胞の壊死、核分裂、単核細胞小集団の程度は病期 I と変わらない。この病期では、大型不正形核と明瞭な核小体をもつ異型肝細胞が散見される。80 日目には cholangioma の小病巣が認められる。しかし、hepatoma はみられない。

以上の病理組織学的所見の総括を表 2 に示した。なお、3'-Me-DAB 投与 90 日、100 日、110 日、115 日、

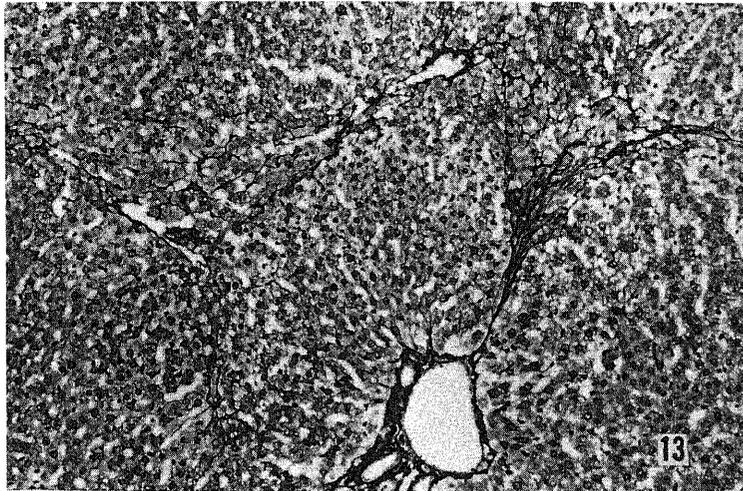


Fig. 13. P-P and P-C bridges in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 75 days. Silver impregnation, $\times 100$.

Table 2. Main histopathological changes in the liver of rats fed 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene

Progressive changes	Oval cell	Ductule	Liver cell necrosis	Liver cell mitosis	Liver cell dysplasia	Cholangioma	Reticular fiber	Collagen fiber	Elastic fiber
Stage I (early stage)	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Stage II (intermediate stage)	≡	+	≡	+	+	-	≡	+	-
Stage III (advanced stage)	≡	≡	+	+	+	+	≡	≡	+

Symbols; -, absent; +, present or mildly increased; ≡, moderately increased; ≡, markedly increased.

120日, 150日, 200日目の肝にはいずれも cholangioma も hepatoma も発生していることが確認された。

2. 電顕所見

この実験群においても光顕的に行った病期分類に沿って電顕所見を記載する。

1) 病期 I

門脈域および小葉周辺域: 胆管上皮細胞には著変がない。門脈域には線維芽細胞と筋線維芽細胞がみられる。これらの細胞周囲には microfibril をみる。大食細胞, リンパ球, 肥満細胞, プラズマ細胞が散見され, 無定形または架状物質も比較的多い。小葉周辺域には内腔の狭い細胆管が Disse 腔にはまり込んだ形でみられる(図 14)。このような細胆管と類洞内皮細胞の間には大食細胞または伊東細胞が介在し, 無定形物質と microfibril が伴われていることが多い。細胆管上皮細胞の形態およびその変化は ANIT 投与群とほぼ同様であるが, cytoplasmic bleb の形成は少ない。duct of Hering の構造をとる細胆管上皮細胞がよくみられる(図 15)。これらの細胆管上皮細胞は既に述べたように oval cell に相当するものであろう。duct of Hering の細胆管上皮細胞の基底膜下には無定形物質をみるが, 伊東細胞や microfibril が必ずしも存在するわけ

はない。伊東細胞がみられる場合には無定形物質にまじって少数の microfibril が認められる。門脈域に近接する細胆管外周や, 拡大した肝細胞間には門脈域の線維芽細胞または筋線維芽細胞がその細胞突起を伸ばして進入していることがあるがその頻度は少ない。類洞内皮細胞にはしばしば原形質水腫 (cytoplasmic edema) が, また, Kupffer 細胞には腫大, リソゾームの増加が認められる。萎縮変性を示す肝細胞に面する Disse 腔は拡張し, 無定形物質の集積と類洞内皮細胞の軽い原形質水腫が認められる(図 16)。このような部位には伊東細胞をみることが多いが microfibril や膠原線維は同定されない。大食細胞はしばしば核崩壊を示す壊死肝細胞をつつみ込んでいる。肝細胞には, 暗調な原形質, 脂肪滴の出現, リソゾームや滑面小胞体の増加, グリコーゲンの減少, 粗面小胞体の減少などの変化がみられる。

中心静脈および小葉中心域: 中心静脈壁には大食細胞および無定形物質の増加がある。中心域には類上皮細胞の形態を示す大食細胞の集団があり, この中にはリンパ球が混在し, 更に肝細胞との間には伊東細胞が介在している。この部位に膠原線維の増加はない。

2) 病期 II

門脈域および小葉周辺域: 門脈域には線維芽細胞,



Fig. 14. Small ductule (D) in the space of Disse in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 20 days. A macrophage (M) is intervened between the ductule and sinusoidal endothelial cells. $\times 9,000$.

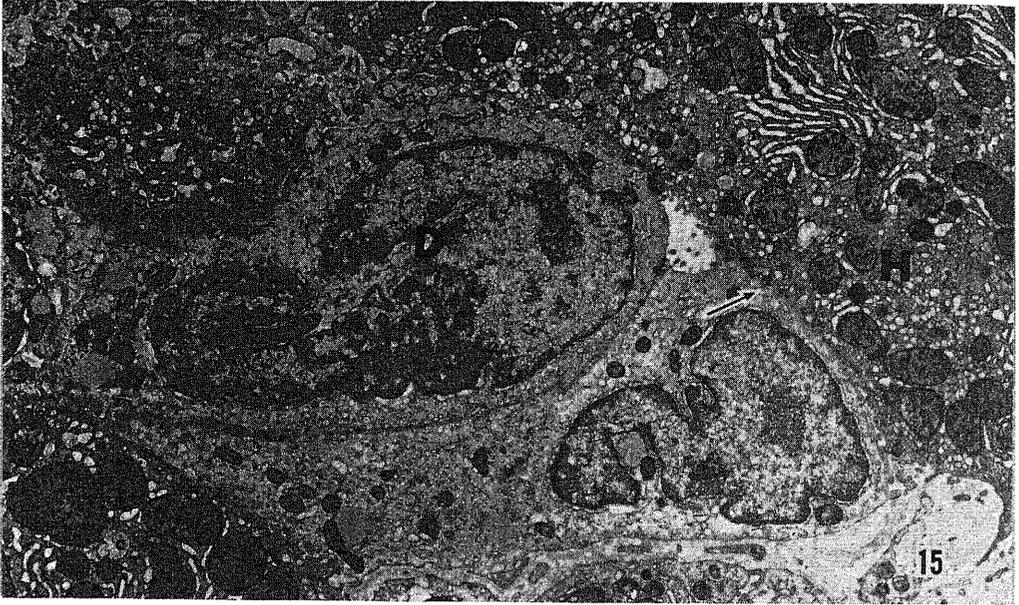


Fig. 15. Pre-ductular cells (D) contacting with hepatocytes (H) by desmosomes (arrow) in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 20 days. $\times 5,400$.

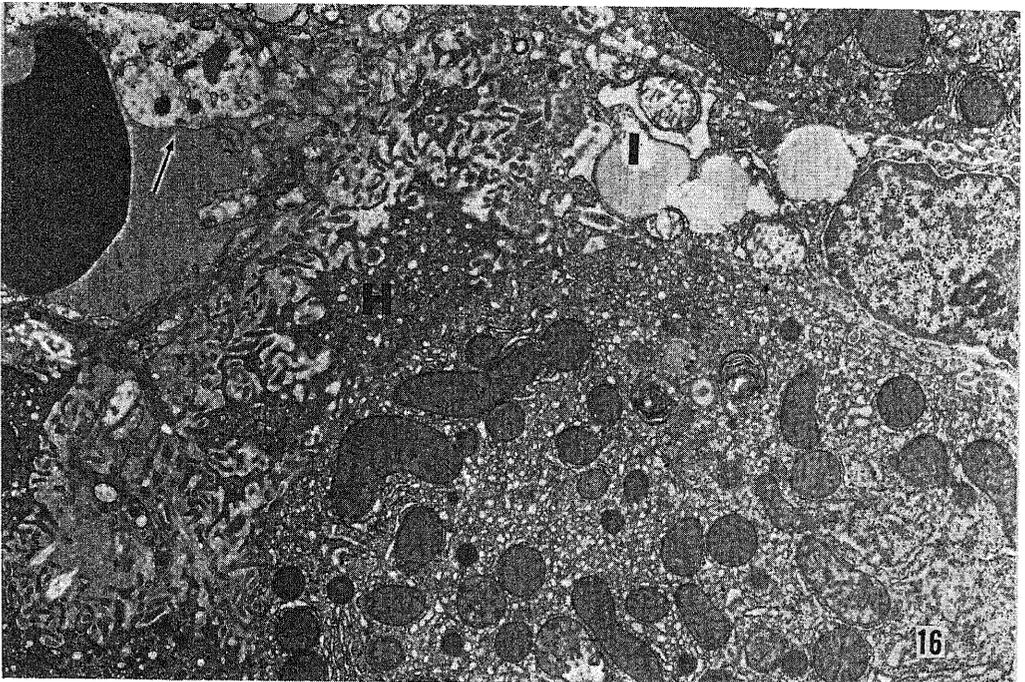


Fig. 16. Degenerating hepatocyte (H), and Ito's cells (I) in the space of Disse in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 7 days. A sinusoidal endothelial cell shows cytoplasmic edema (arrow). $\times 7,200$.

筋線維芽細胞の他に脂肪滴をもつ線維芽細胞をみることがある。小葉内には細胆管, duct of Hering が高頻度にとめられる。細胆管上皮細胞には肝細胞でみられたような滑面小胞体の増加がある。細胆管周囲の

Disse 腔には伊東細胞, リンパ球, 大食細胞が, また, これらに接して変性肝細胞がみられるのが普通である。伊東細胞は拡張する粗面小胞体を有し, その周囲には microfibril や無定形物質をみることが多い。細胆

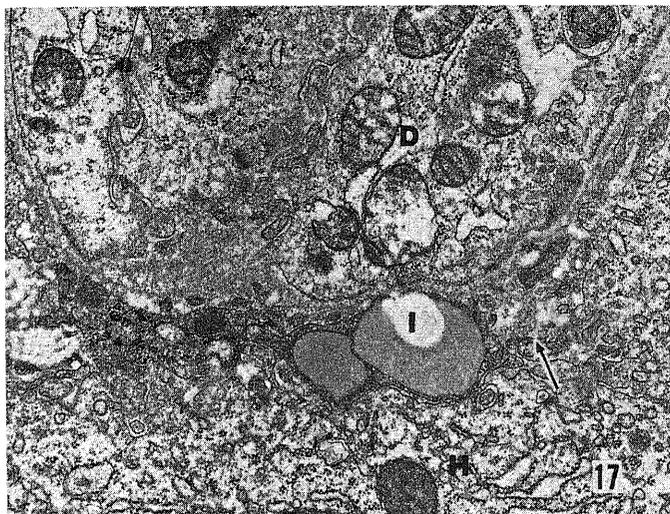


Fig. 17. Cell processes of Ito's cell (I) and microfibrils (arrow) between a ductule (D) and hepatocytes (H) in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 40 days. $\times 14,400$.

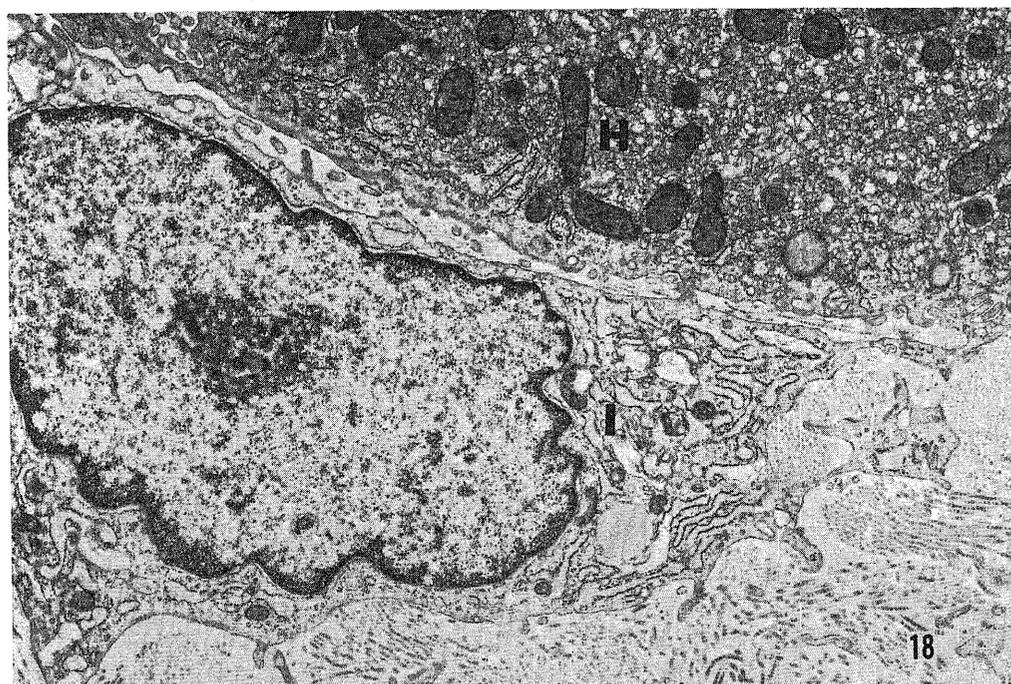


Fig. 18. Ito's cell (I) situated between hepatocytes (H) and bundles of collagen fibers in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 45 days. $\times 9,000$.



Fig. 19. Microfibrils (arrow) appearing around a Ito's cell (I) in the space of Disse in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 40 days. $\times 18,000$.

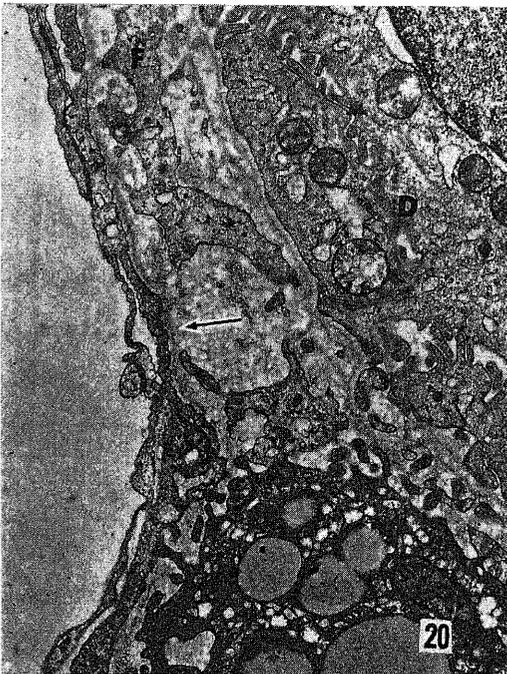


Fig. 20. Inlet vein with the continuous basement membrane (arrow) in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 45 days. There are seen cell processes of fibroblasts (F) and a ductule (D) beneath the venule. $\times 10,800$.

管の先端部や細胆管と肝細胞、その間の狭い Disse 腔には圧排されたように見える伊東細胞の突起が伸びているが、この部位においても少数の microfibril を同定することができる(図 17)。また、ANIT 投与群においてみられたように、門脈域から線維芽細胞が細胆管に沿ってまたは、広い肝細胞間隙に進入する像にも遭遇する。太い膠原線維が束をなして配列し、筋線維芽細胞または線維芽細胞をみる。まれに肝細胞とこの線維束の間に滑面小胞体の発育良好な伊東細胞がみられることがある(図 18)。一方、細胆管近傍の Disse 腔にも伊東細胞の周りに無定形物質でつまれた microfibril の増加がみられる(図 19)。肝細胞に部分的に接する拡張した血管をみることがある。この血管内皮細胞は連続性基底膜を備えており、その外周の一部には線維芽細胞の細長い細胞突起と microfibril、膠原線維から成る間質がみられる(図 20)。このような血管は門脈から分岐する inlet vein³³⁾に相当するものであろう。また、前述の膠原線維束内にも小血管が認められる。肝細胞は滑面小胞体の増加と共に明調な原形質を示すことが多い。

中心静脈および小葉中心域：中心静脈に近接して変性肝細胞が点在する。この肝細胞をとりかむように伊東細胞および中心静脈壁の筋線維芽細胞が認められる。この伊東細胞の周囲には microfibril が出現してい

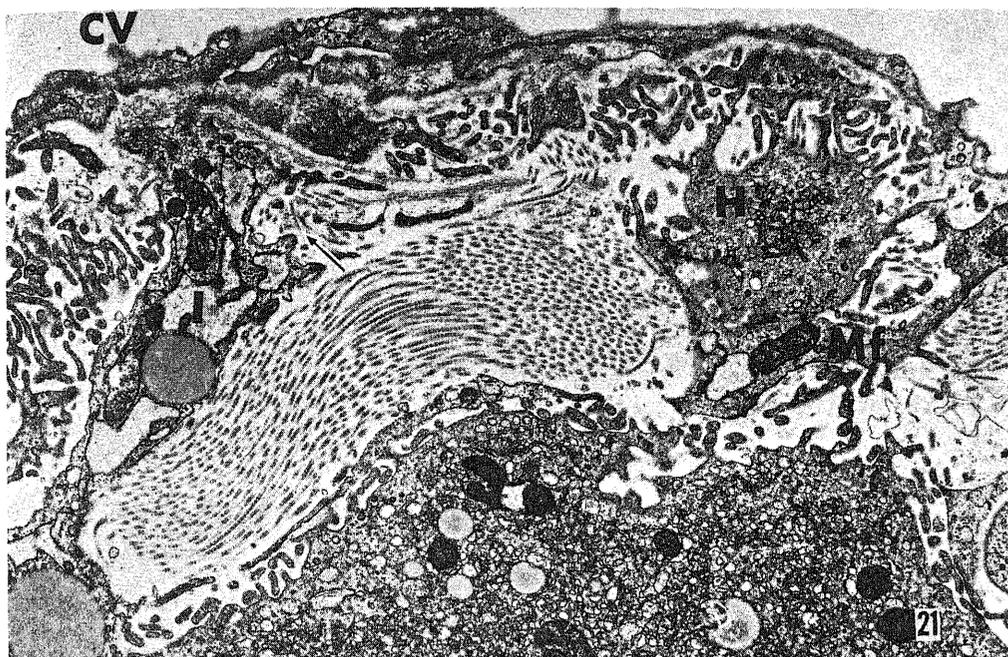


Fig. 21. Central vein (CV), and the underlying myofibroblasts (Mf) and Ito's cells (I), both of which encompassed degenerating hepatocytes (H) in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 40 days. Microfibrils (arrow) are seen close to the Ito's cells. $\times 9,000$.

る(図 21)。一部では、拡大した肝細胞間隙に沿って筋線維芽細胞と膠原線維が静脈壁から伸展しており、これに伊東細胞、大食細胞が混在していることがある。これは中心域の perisinusoidal fibrosis に相当するものである。

3) 病期III

fibrous septa は太い膠原線維の沈着と主に筋線維芽細胞から成る。この細胞は膠原線維束間に細胞突起を伸ばし、集束する microfilament をもつ。この fibrous septa 内には胆管がみられるがその内腔は広い。一部の線維束間に脂肪滴をもつ線維芽細胞をみる。また、血管および弾性線維も同定される。fibrous septa 以外の肝小葉における変化は病期II でみられたと同様である。細胆管に近接する Disse 腔には microfibril, 無定形物質, 少数の細い膠原線維が増加がみられるが、類洞内皮細胞に連続性の基底膜は形成されていない(図 22)。

考 察

1. 肝線維症における伊東細胞の関与

伊東細胞は 1951 年伊東¹⁸⁾ によってヒトの肝類洞壁に常在することが確認された脂肪滴を保有する間葉細胞である。1963 年 Nakane¹⁹⁾ は伊東細胞が脂肪滴内にビタミン A を含有していること、ほとんど貪喰能をも

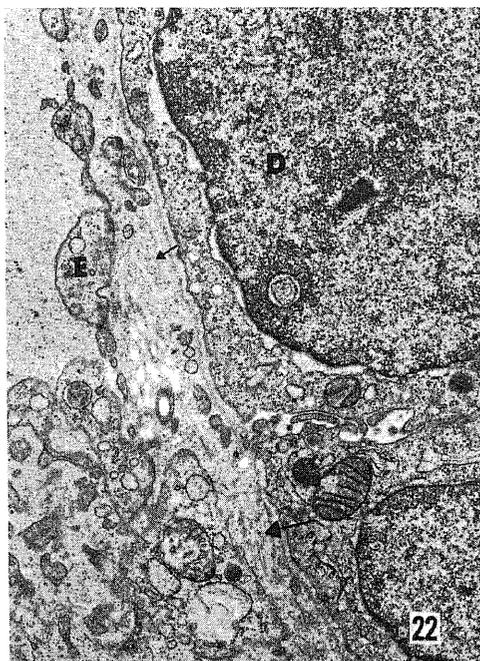


Fig. 22. Microfibrils (small arrow) and thin collagen fibers (large arrow) between sinusoidal endothelial cells (E) and a ductule (D) in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 80 days. Note no basement membrane formation of the endothelial cells. $\times 10,800$.

たないこと、小型ミトコンドリアや中等度に発育する粗面小胞体とゴルジ装置を備え細長い細胞突起を伸ばして Disse 腔内に局在し、類洞腔へは露出することはないなどの特徴をもっている細胞であることを示した。その後の広汎な研究によって、伊東細胞はビタミンを貯蔵する機能に加えて、コラーゲンを産生する潜在能力をもち合わせている細胞であり、横中隔間葉由来の特殊な分化をとげた結合組織細胞であることが明らかになってきた¹¹⁾¹²⁾¹⁶⁾¹⁹⁾³⁴⁾。この細胞は、fat-storing cell⁴⁾⁻¹⁶⁾、lipocyte¹²⁾¹³⁾、perisinusoidal cell¹⁰⁾、adventitious connective tissue cell¹⁷⁾、脂肪摂取細胞¹⁸⁾¹⁹⁾などのさまざまな名前で呼ばれているが、本論文では伊東細胞という名称を用いることにする。

伊東細胞がコラーゲンを産生し、肝線維症の進展に重要な役割をはたしているということは、ビタミン A 過剰投与³⁴⁾、ヒトのビタミン A 中毒症³⁵⁾やアルコール中毒症¹⁵⁾¹⁶⁾、四塩化炭素投与¹⁰⁾⁻¹³⁾などによる肝線維症における研究結果からほぼ間違いない事実と考えられる。本研究においても、とくに 3'-Me-DAB 投与群において、oval cell に相当する細胆管上皮細胞の周囲や、中心域の Disse 腔の一部には、拡張する粗面小胞体をもつ伊東細胞に随伴して無定形物質と microfibril の集積がみとめられた。線維芽細胞の介在はみられなかったため、この microfibril を含む間質成分は伊東細胞によって形成された可能性が高い。注目されることは、oval cell の周囲や類洞壁の線維症は光顕的には細網線維から成る細網線維症であることである。これに対し、太い膠原線維が束状に配列する fibrous septa には細網線維は少なく、伊東細胞は肝細胞に接して少数みとめられるにすぎなかった。従って、既に伊東¹⁹⁾が示唆しているように、伊東細胞は reticular fiber-forming cell であるのかもしれない。細網線維は光顕的に同定される線維状の構造物である。電顕的には、主に IV型コラーゲンとラミニンから成る基底膜や、小さい線維束を作る膠原線維または細い膠原線維や microfibril がフィブロネクチンまたは非コラーゲン性糖蛋白によってつまれた構造物に相当し、その嗜銀性は糖蛋白によるものと考えられている¹⁾³⁶⁾³⁷⁾。従って、本研究においてみとめられた類洞壁に増加する細網線維は既存の線維に加えて microfibril が無定形物質によって包埋されている構造物を、また oval cell 周囲の細網線維は細胆管上皮細胞基底膜とその外周の microfibril、無定形物質の集積から成る構造物に相当していると思われる。既に述べたように、細網線維と伊東細胞の分布は密接に関連している。しかし、細網線維は単一の構造物ではなく、コラーゲンと糖蛋白から成る複合構造物であり、そのコラーゲンは必ずしも結合組織細

胞の産物のみではない³⁸⁾。従って、伊東細胞が細網線維を形成しているというよりは、細網線維の構成成分の一つ、とくに microfibril の形成に参加していると考えべきであろう。

細網線維を構成するコラーゲンの分子種は単一ではない。例えば、基底膜コラーゲンである IV型コラーゲンもその構成成分となりうる³⁸⁾。また、microfibril や細い膠原線維は間質型コラーゲンに属している³⁸⁾。とくに、microfibril や細い膠原線維の多くは III型コラーゲンに由来するものと言われている¹⁾³⁷⁾³⁸⁾。一方、伊東細胞は、I型、III型、V型コラーゲンを産生すると言われているが³⁹⁾、III型コラーゲンを産出している場合が多い¹²⁾¹⁶⁾²²⁾。III型コラーゲンは I型コラーゲンに比べ、プロコラーゲンからコラーゲンへの転換が遅く、このため線維形成がゆっくりと進み、太い膠原線維にまで成熟することはほとんどない³⁸⁾⁴⁰⁾。また、microfibril や細い膠原線維にはプロコラーゲンが含まれており、これらはコラーゲナーゼ消化をうけやすい²²⁾³⁸⁾⁴¹⁾。四塩化炭素投与による初期の肝線維症は細網線維症であり、投与中止によって正常構築に復する¹⁾²²⁾⁴²⁾。これはコラーゲナーゼによって、おそらく III型コラーゲン由来の microfibril や細い膠原線維が容易に切断され消失することを意味している。このようなことを考えると、肝線維症の進展初期には Disse 腔や oval cell の周囲に伊東細胞が III型コラーゲンを分泌し、細網線維の骨格形成にあずかっていると推定される。

細網線維の無定形物質には糖蛋白、とくにフィブロネクチンが含まれていると思われる。フィブロネクチンと細網線維の分布はほぼ同一である³⁶⁾⁴³⁾。ことから他の結合組織細胞と同様に、伊東細胞がフィブロネクチンを産生しているのかもしれない。しかし、肝においては、肝細胞³⁷⁾⁴⁴⁾、Kupffer 細胞および大食細胞²²⁾がこの糖蛋白を産生する主なる細胞種と考えられている。ANIT 投与においても、3'-Me-DAB 投与においても、肝線維症に先立って Disse 腔内には大食細胞の侵入がみられた。フィブロネクチンは伊東細胞を刺激してコラーゲン産生を促し、更に、線維芽細胞を引きつける chemotactic factor の一つであると考えられている²²⁾³⁷⁾⁴⁵⁾。従って、肝線維症の初期においては、まず、大食細胞がフィブロネクチンを産生し、伊東細胞に III型コラーゲン産生を促し、細網線維形成へと進行する。ついで、同部にはフィブロネクチンやコラーゲンの分解産物によって遊走する線維芽細胞が間質型コラーゲン、とくに I型コラーゲンを分泌し、太い膠原線維を形成して不可逆的な線維症へ進展するという過程が最も可能性が高いと考えられる。

肝細胞が I型、III型、V型コラーゲン²⁵⁾やフィブロネクチン⁴⁴⁾を産生することは培養実験で確かめられて

いる。しかし、本研究においては肝細胞に接する Disse 腔に伊東細胞の介在なしに microfibril が増加するという所見は得られず基底膜様の無定形物質の沈着がみられるにすぎなかった。従って、肝細胞が分子状のプロコラゲンやコラゲンあるいはフィブロネクチンを分泌して肝線維症発症初期に何らかの役割を演じているのかもしれないが直接膠原線維の過剰形成に関与している可能性は低いと思われる。

2. 肝線維症の進展と線維芽細胞

1) portal fibrosis

portal fibrosis は小葉周辺域の肝細胞の脱落や細胆管の増生に伴って、門脈域の線維芽細胞が進入して膠原線維を沈着することによって起こると考えられている²³⁾。本研究においても、ANIT 投与群で示されるように、著明な小葉間および小葉内胆管の増生に引きつづき門脈域から線維芽細胞が胆管外周に伸展し線維症が進行していた。しかし、3'-Me-DAB 投与群では既に述べたように、ANIT の場合と若干異なった進行過程をとっていた。すなわち、まず oval cell に相当する細胆管上皮細胞の外周に伊東細胞が microfibril を沈着する。ついで、門脈域から線維芽細胞が入り込み膠原線維を形成して膠原線維束から成る fibrous septa を作ることである。このような差異は ANIT が胆管上皮細胞の増殖を強く促進させ⁴⁶⁾、増生細胆管に沿って門脈域から線維芽細胞が早期に進入することによるものと思われる。このことは、ANIT における線維症が極めて早く進行することの説明となるであろう。

注目されることは portal fibrosis に関する線維芽細胞の形態である。第一に、門脈域にも fibrous septa 内にも脂肪滴を保有する線維芽細胞が存在することである。伊東細胞は膠原線維形成時には脂肪滴を減少し、線維芽細胞様の形態をとることが知られている¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。従って、fibrous septa の形成に伊東細胞が関与しているのかもしれない。しかし、伊東細胞は門脈域には通常常在していない¹⁹⁾³⁴⁾。線維芽細胞は時々脂肪滴を保有することがある。また、本研究においては、伊東細胞は肝細胞に接してみとめられる傾向があり、一方、膠原線維束内にみられる線維芽細胞は明らかに門脈域から進入しているという過程を観察することができた。これらのことから、太い膠原線維束から成る fibrous septa を形成する主要細胞は伊東細胞ではなく、線維芽細胞であると考えられる。

第二は、ANIT においても 3'-Me-DAB においても、門脈域や fibrous septa 内には線維芽細胞にまじって筋線維芽細胞が認められたことである。筋線維芽細胞は、原形質内に収縮性蛋白を含む microfilament と dense body を備えた修飾型の線維芽細胞である⁴⁷⁾。こ

の細胞は線維芽細胞と同様に各種のコラゲンやフィブロネクチンを産生するので、一般的には線維芽細胞の一つの機能相を示す細胞と考えられている²²⁾⁴⁸⁾。最近、肝硬変症においては線維芽細胞よりも筋線維芽細胞がより多く出現するので、線維症の進展や再生結節の収縮に筋線維芽細胞が主要な役割をはたしているものと推定されている²¹⁾²²⁾。ANIT においても 3'-Me-DAB においても、粗面小胞体の発育良好な筋線維芽細胞は fibrous septa の形成過程に明瞭に認められ、fibrous septa の膠原線維束間には細い細胞突起内に microfilament の集束を有する筋線維芽細胞が主であった。従って、肝線維症においては、このような microfilament を多数備えた筋線維芽細胞が実質の収縮に最も関与しているものと推定される。

2) centrilobular fibrosis

四塩化炭素^{10)~13)}やアルコール中毒¹⁵⁾¹⁶⁾による肝線維症は小葉中心域に好発するので centrilobular fibrosis と呼ばれている。この型の線維症には類洞壁の伊東細胞が深くかかわっているという考え方が有力である^{10)~13)16)}。しかし、本研究において、centrilobular fibrosis の進展には、必ずしも類洞型の伊東細胞のみではなく、中心静脈壁の筋線維芽細胞の形態をとる細胞がその一胆をになっていると考えられた。centrilobular fibrosis の初期では確かに伊東細胞に接して microfibril が出現しているが、中心静脈壁の筋線維芽細胞が膠原線維を伴って広い肝細胞の間隙から Disse 腔まで進入していることを観察することができたからである。中心静脈壁の結合組織細胞は伊東細胞の一種であるのかもしれない。中心域には脂肪滴をあまり保有しない伊東細胞が常在し、この細胞が centrilobular fibrosis の主役であるという考え方がある¹⁰⁾¹⁹⁾³⁴⁾。しかし、中心静脈壁の細胞は膠原線維束内に存在しており、Disse 腔に常在する伊東細胞とは膠原線維や肝細胞との位置関係が異っている。従って、この細胞を伊東細胞の一種とするよりは筋線維芽細胞とみなすべきであろう。最近、エタノール投与による centrilobular fibrosis の初期変化は中心静脈壁の筋線維芽細胞の増殖とこれに伴う膠原線維の沈着であるという報告²⁰⁾がある。このような所見は著者の観察結果とよく合致しているものと考えられる。

3. 類洞の capillarization と弾性線維の形成

1963 年 Schaffner ら⁴⁹⁾は、Disse 腔内に膠原線維と基底膜様の無定形物質の沈着に伴い、類洞内皮細胞直下に基底膜様構造物が形成される状態を capillarization of hepatic sinusoids と呼んだ。本研究においても類洞内皮細胞には明瞭な基底膜は同定されなかったが、Disse 腔内に細い膠原線維、microfibril、無

定形物質が沈着することを観察することができた。しかし、このような類洞は線維症の進行と共に消失し、これに代って fibrous septa 内に連続性基底膜を備えた血管が出現することが注目された。もともと肝線維症に伴う capillarization という言葉は、1948年 Moschowitz⁵⁰⁾ が肝硬変症における fibrous septa に肝動脈枝又は門脈枝から発芽して伸展する新生血管が分布することを指しているものであり、これらの新生血管は既存の類洞とは連絡せず肝静脈へ短絡を形成するものである。このような血管網の存在は Traissac⁵¹⁾ による研究でも支持されている。Stenger⁵²⁾ は、既存の類洞における capillarization と新生血管による capillarization とは別個のものであり、それぞれ closed circulatory pathway を形成していると述べている。本研究における研究結果は Stenger の見解⁵²⁾ を支持している。

肝線維症における弾性線維の形成は、肝傷害の発症時期の推定、肝炎の慢性化やその線維症が不可逆的なものであるという指標となりうる点で重要である⁵³⁾⁻⁵⁵⁾。本研究においては ANIT 投与群で 35 日目、3'-Me-DAB 投与群で 75 日目の fibrous septa 内に弾性線維が形成された。弾性線維は一般に平滑筋細胞と線維芽細胞によって形成される。伊東細胞のエラスチン産生能は未だ確認されていない。本研究においては弾性線維の出現とこれに関与する細胞の関係について調べると、新生弾性線維は太い膠原線維束間で、筋線維芽細胞の細長い細胞突起に近接して出現していた。従って、門脈域から進入した結合組織細胞が膠原線維を形成した後にエラスチンを分泌するようになると思われる。興味深いのは centrilobular fibrosis においても弾性線維が出現することがあるということである。このことは centrilobular fibrosis の形成に中心静脈壁の筋線維芽細胞が関与しているという著者の考えの傍証になるように思われる。

結 論

ANIT および 3'-Me-DAB 投与によるラット肝線維症の進展過程を光顕的並びに電顕的に観察し、次の結論を得た。

1. ANIT 投与群では、肝線維症は小葉間および小葉内胆管の著しい増生に伴って進行した。小葉内の線維症は小葉内胆管の周囲に門脈域から進入する線維芽細胞または筋線維芽細胞が膠原線維を形成することによって進行した。この肝線維症に Disse 腔の伊東細胞が関与することは少なかった。

2. 3'-Me-DAB 投与群では、増殖する oval cell (電顕的には小葉内再生胆管上皮細胞) の外周に伊東

細胞が microfibril を沈着し、ついで、同部に門脈域から線維芽細胞または筋線維芽細胞が進入して膠原線維を形成することによって肝線維症が進行しているものと思われた。

3. ANIT 投与群においても、3'-Me-DAB 投与群においても、部分的に centrilobular fibrosis が認められた。この centrilobular fibrosis の形成には、伊東細胞のみならず中心静脈壁の筋線維芽細胞が重要な役割をはたしていることが示された。

4. 変性肝細胞に接する Disse 腔には無定形物質の集積をみることがあったが、伊東細胞や線維芽細胞の介在なしに膠原線維が形成されるということにはなかった。

5. 弾性線維は ANIT 投与後 35 日目、3'-Me-DAB 投与後 75 日目に膠原線維束から成る fibrous septa 内に出現した。この弾性線維は門脈域から進入した線維芽細胞または筋線維芽細胞によって形成されるものと思われた。

6. 肝線維症の進展と共に既存の類洞は消失した。Disse 腔内に少数の膠原線維、microfibril、基底膜様の無定形物質の集積がみられる場合においても類洞内皮細胞には連続性の基底膜は形成されなかった。fibrous septa 内に連続性の基底膜を備えた血管が出現したが、この血管と既存の類洞とが連結しているという所見は得られなかった。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導を賜りました梶川欽一郎名誉教授、御校閲を賜りました中西功夫教授に深甚の謝意を表します。また、研究遂行に際して御助言、御協力を戴きました第一病理学教室各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Rojkind, M. & Dunn, M. A.: Hepatic fibrosis. *Gastroenterol.*, **76**, 849-863 (1979).
- 2) Popper, H., Paronetto, F., Schaffer, F. & Perez, V.: Studies on hepatic fibrosis. *Lab. Invest.*, **10**, 265-290 (1961).
- 3) Popper, H. & Udenfriend, S.: Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Amer. J. Med.*, **49**, 707-721 (1970).
- 4) Orr, J. W.: The histology of the rat's liver during the course of carcinogenesis by butter-yellow (p-dimethylaminoazobenzene). *J. Pathol. Bact.*, **50**, 393-408 (1940).
- 5) Price, J. N., Harman, J. W., Miller, E. C. & Miller, J. A.: Progressive microscopic alterations

- in the livers of rats fed the hepatic carcinogens 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and 4'-fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, **12**, 192-200 (1952).
- 6) **Farber, E.**: Similarities of the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, **16**, 142-155 (1956).
- 7) 高橋五平: Azo 色素肝癌の発生過程における肝細胞微細構造の変化. *札幌医誌*, **23**, 1-19 (1963).
- 8) **Steiner, J. W. & Carruthers, J. S.**: Electron microscopy of hyperplastic ductular cells in α -naphthyl isothiocyanate-induced cirrhosis. *Lab. Invest.*, **12**, 471-498 (1963).
- 9) **Bhathal, P. S. & Christie, G. S.**: A fluorescence microscopic study of bile duct proliferation induced in guinea pigs by α -naphthyl isothiocyanate. *Lab. Invest.*, **20**, 480-487 (1969).
- 10) **McGee, J. O'D. & Patrick, R. S.**: The role of perisinusoidal cells in hepatic fibrogenesis. An electron microscopic study of acute carbon tetrachloride liver injury. *Lab. Invest.*, **26**, 429-440 (1972).
- 11) 山本正美: 肝臓伊東細胞 (脂肪摂取細胞) の形態と機能. *広島大医誌*, **23**, 245-274 (1975).
- 12) **Kent, G., Gay, S., Inouye, T., Bahu, B., Minick, O. T. & Popper, H.**: Vitamin A-containing lipocyte and formation of type III collagen in liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3719-3722 (1976).
- 13) **Kent, G., Inouye, T., Minick, O. T. & Bahu, R. M.**: Role of lipocytes (perisinusoidal cells) in fibrogenesis, p73-82. *In* E. Wisse & D. L. Knook (ed.), Kupffer cells and other liver sinusoidal cells, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977.
- 14) **Nakane, P. K.**: Ito's "fat-storing cell" of the mouse liver. *Anat. Rec.*, **145**, 265-266 (1963).
- 15) **Bronfenmajer, S., Schaffner, F. & Popper, H.**: Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. *Arch. Pathol.*, **82**, 447-453 (1966).
- 16) **Kobayashi, Y. & Fujiyama, S.**: Pathological study on gold impregnation of fat-storing cells in human liver. *Acta Pathol. Jpn.*, **31**, 65-74 (1981).
- 17) **Schnack, H., Stockinger, L. & Wewalka, F.**: Adventitious connective tissue cells in the space of Disse and their relation to fibre formation. *Rev. Int. Hepat.*, **17**, 855-860 (1967).
- 18) 伊東俊夫: 人のクツベル氏星細胞と肝毛細血管壁に見られる脂肪摂取細胞の研究(抄録). *解剖誌*, **26**, 42 (1951).
- 19) 伊東俊夫: 肝臓の脂肪摂取細胞の構造と機能. *解剖誌*, **53**, 393-422 (1978).
- 20) **Nakao, M. & Lieber, C. S.**: Ultrastructure of initial stages of perivenular fibrosis in alcohol-fed baboons. *Amer. J. Pathol.*, **106**, 145-155 (1982).
- 21) **Rudolph, R., McClure, W. J. & Woodward, M.**: Contractile fibroblasts in chronic alcoholic cirrhosis. *Gastroenterol.*, **76**, 704-709 (1979).
- 22) **Rojkind, M. & Pérez-Tamayo, R.**: Liver fibrosis. *Internatl. Rev. Connect. Tissue Res.*, **10**, 333-393 (1983).
- 23) **Grimaud, J. A. & Borojevic, R.**: Myofibroblasts in hepatic schistosomal fibrosis. *Experimentia*, **33**, 890-892 (1977).
- 24) **Sakakibara, K., Umeda, M., Saito, S. & Nagase, S.**: Production of collagen and acidic glycosaminoglycans by an epithelial liver cell clone in culture. *Exp. Cell Res.*, **110**, 159-165 (1977).
- 25) **Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. & Tsukada, Y.**: Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. *Biochemistry*, **19**, 169-176 (1980).
- 26) **Voss, B., Rauterberg, J. R., Pott, G., Brehmer, U., Allam, S., Lehmann, R. & Bassewitz, D. B.**: Nonparenchymal cells cultivated from explants of fibrotic liver resemble endothelial and smooth muscle cells from blood vessel walls. *Hepatology*, **2**, 19-28 (1982).
- 27) **Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. & Miwa, A.**: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J. Electron Microsc.*, **24**, 287-289 (1975).
- 28) **Rappaport, A. M.**: The microcirculatory acinar concept of normal and pathologic hepatic structure. *Beitr. Path.*, **157**, 215-243 (1976).
- 29) **Schaffner, F. & Popper, H.**: Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *Amer. J. Pathol.*, **38**, 393-410 (1961).
- 30) **Steiner, J. W. & Carruthers, J. S.**: Studies of the fine structure of the terminal branches of the biliary tree. I. The morphology of normal bile canaliculi, bile pre-ductules (ducts of Hering) and

- bile ductules. *Amer. J. Pathol.*, **38**, 639-661 (1961).
- 31) **Grisham, J. W. & Hartroff, W. S.**: Morphologic identification by electron microscopic of "oval" cells in experimental hepatic degeneration. *Lab. Invest.*, **10**, 317-332 (1961).
- 32) 水無瀬昂・小川勝洋・横山繁昭: 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene および alpha-naphthyl-isothiocyanate 投与ラット肝に増生する"oval cell"の組織化学的および電顕的組織化学的研究. *札幌医誌*, **44**, 164-183 (1975).
- 33) **Burkel, W. E. & Low, F. N.**: The fine structure of rat liver sinusoids, space of Disse and associated tissue space. *Amer. J. Anat.*, **118**, 769-784 (1966).
- 34) **Wake, K.**: Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Internat. Rev. Cytol.*, **66**, 303-353 (1980).
- 35) **Hruban, Z., Russell, R., Boyer, J. L., Glagov, S. & Bagheri, S. A.**: Ultrastructural changes in livers of two patients with hypervitaminosis A. *Amer. J. Pathol.*, **76**, 451-468 (1974).
- 36) **Linder, E., Stenman, S., Lehto, V. -P. & Vaheri, A.**: Distribution of fibronectin in human tissues and relation to other connective tissue components. *Ann. New York Acad. Sci.*, **312**, 151-159 (1978).
- 37) **Rojkind, M. & Ponce-Noyola, P.**: The extracellular matrix of the liver. *Collagen Rel. Res.*, **2**, 151-175 (1982).
- 38) **Gay, S. & Miller, E. J.**: What is collagen, what is not. *Ultrastruct. Pathol.*, **4**, 365-377 (1983).
- 39) **Yamamoto, M., Sumiyoshi, H., Nakagami, K. & Tahara, E.**: Distribution of collagen type I, III, and V in fibrotic and neoplastic human liver. *Acta Pathol. Jpn.*, **34**, 77-86 (1984).
- 40) **Nowack, H., Gay, S., Wick, G., Becker, U. & Timpl, R.**: Preparation and use in immunohistology of antibodies specific for type I and type III collagen and procollagen. *J. Immunol. Meth.*, **12**, 117-124 (1976).
- 41) **Fleischmajer, R., Timpl, R., Tuderman, L., Raisther, L., Wiestner, M., Perlsh, J. S. & Graves, P. N.**: Ultrastructural identification of extension aminopeptides of type I and III collagens in human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7360-7364 (1981).
- 42) **Montfort, I. & Pérez-Tamayo, R.**: Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *Amer. J. Pathol.*, **92**, 411-420 (1978).
- 43) **Stenman, S. & Vaheri, A.**: Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J. Exp. Med.*, **147**, 1054-1064 (1978).
- 44) **Voss, B., Allam, S., Rauterberg, J., Ullrich, K., Gieselmann, V. & Figura, K.**: Primary cultures of rat hepatocytes synthesize fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **90**, 1348-1354 (1979).
- 45) **Postlethwaite, A. E., Keski-Oja, J., Balian, G. & Kang, A. H.**: Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of the chemotactic region to a 14,000-molecular weight non-gelatin-binding fragment. *J. Exp. Med.*, **153**, 494-499 (1981).
- 46) **Lopfz, M. & Mazzanti, L.**: Experimental investigations on alpha-naphthyl-isothiocyanate as a hyperplastic agent of the biliary ducts in the rat. *J. Pathol. Bact.*, **64**, 243-250 (1955).
- 47) **Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majno, G.**: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role in wound contraction. *Experientia*, **27**, 549-550 (1971).
- 48) 梶川欽一郎: 結合組織, 36-42頁. 金原出版, 東京, 1984.
- 49) **Schaffner, F. & Popper, H.**: Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterol.*, **44**, 239-242 (1964).
- 50) **Moschcowitz, E.**: Laennec cirrhosis: Its histogenesis, with special reference to the role of angiogenesis. *Arch. Pathol.*, **45**, 187-215 (1948).
- 51) **Traissac, F. -J., Beraud, C., Bricaud, H., Perissat, J. -M. & Inquimbert, Ph.**: Les altérations vasculaires des foies cirrhotiques étudiés par la méthode d'injection-corrosion. *Presse Med.*, **72**, 201-206 (1964).
- 52) **Stenger, R. J.**: Hepatic sinusoids in carbon tetrachloride-induced cirrhosis: An electron microscopic study. *Arch. Pathol.*, **81**, 439-447 (1966).
- 53) **Scheuer, P. J. & Maggi, G.**: Hepatic fibrosis and collapse: Histological distinction by orcein staining. *Histopath.*, **4**, 487-490 (1980).
- 54) **Thung, S. N. & Gerber, M. A.**: The for-

mation of elastic fibers in livers with massive hepatic necrosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **106**, 468-469 (1982).

55) Bianchi, L.: Liver biopsy interpretation in

hepatitis. Part I. Presentation of critical morphologic features used in diagnosis (glossary). *Path. Res. Pract.*, **178**, 2-19 (1983).

A Morphological Study on the Progression of Hepatic Fibrosis : Light and Electron Microscopic Observations of the Livers of Rats Fed on Alpha-Naphthyl-Isothiocyanate and 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene Kazumasa Ikawa, Department of Pathology (I) (Director : Prof. I. Nakanishi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **93**, 513-533 (1984)

Key words: alpha-naphthyl-isothiocyanate, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, hepatic fibrosis, Ito's cell, myofibroblast

Abstract

The livers of rats fed on alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANIT) and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) were examined by light and electron microscopy, to elucidate the development of hepatic fibrosis. Those induced by ANIT proceeded with excessive formation of collagen fibers by fibroblasts and/or myofibroblasts ingrowing into the liver parenchyma from the portal area, in association with marked proliferation of interlobular and intralobular bile ducts. The role of Ito's cells was negligible in such a fibrosis. On the other hand, in the hepatic fibrosis induced by 3'-Me-DAB, oval cells (intralobular regenerating ductular cells observed by electron microscopy) proliferated, and concomitantly Ito's cells appeared to deposit microfibrils around oval cells. Subsequently, fibroblasts and/or myofibroblasts entered along the bile ductules and lay down with collagen fibers, resulting in hepatic fibrosis. In both experimental groups, there were areas of centrilobular fibrosis which developed with increase in collagen fiber formation not only by Ito's cells of centrilobular location but also by myofibroblasts situated in the wall of the central vein. Capillarization of hepatic sinusoids could be seen during the course of hepatic fibrosis. However, there was no evidence supporting the fact that sinusoidal endothelial cells came to be provided with the continuous basement membrane. A discussion was had on the relation between reticular fibers and Ito's cells, and on the significance of elastic fiber formation in the fibrous septa.