

エンドトキシン投与時におけるラット 肝病変の電子顕微鏡的研究

平 間 敏 憲

札幌医科大学外科学第一講座 (主任 早坂 滉教授)

札幌医科大学病理学第二講座 (指導 小野江為則教授)

小 川 勝 洋

札幌医科大学病理学第二講座 (主任 小野江為則教授)

An electron microscopic study on the rat liver following endotoxin administration

Toshinori HIRAMA

*Department of Surgery (Section 1) Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Hayasaka)*

*Department of Pathology (Section 2) Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Onoe)*

Katsuhiro OGAWA

*Department of Pathology (Section 2) Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Onoe)*

Summary

The ultrastructural changes produced in the rat liver following intraperitoneal injection of a single dose of endotoxin were studied for 24 hours. Perfusion fixation was used for suitable preservation of the ultrastructure of the liver, especially that of the sinusoids.

During the first 3 hours after the administration of endotoxin, hepatocytes showed a loss of glycogen accompanied by an increased prominence of smooth endoplasmic reticulum, swelling of mitochondria, disorganization of rough endoplasmic reticulum and an increase in numbers of lysosomes and lipid droplets. These changes were similar to those seen in saline injected animals and considered to be nonspecific alterations elicited by stress. In the sinusoids there was an aggregation of leukocytes, platelets and erythrocytes at 1 hour. In addition, at later intervals a considerable amount of fibrin was found.

At 4 hours hepatocytes showed a marked vacuolation and these vacuoles were bounded by a single membrane and occasionally contained fibrillar materials. Necroses of hepatocytes were seen in the periportal area. In the sinusoids there were large numbers of thrombi. Endothelial cells around the thrombi showed desquamation and fragmentation and the space of Disse was markedly distended with appearance of erythrocytes.

By 24 hours these changes appeared less prominent. The characteristic change in hepatocytes at this interval was an increase in numbers of very low density lipoprotein granules in the Golgi vesicles, endoplasmic reticulum and Disse's space and was thought to be a finding indicating recovery from the inhibition of protein synthesis.

It is concluded that thrombi formation by endotoxin plays an important role in the initiation of hepatocellular necrosis.

緒 言

細菌感染症に伴うショックの発現は、すでに19世紀後半より指摘され、1909年には Jacob¹⁾ が大腸菌によるシヨッ

クの報告をしている。1951年 Weisbrenら²⁾ がグラム陰性菌にみられるシヨックの臨床的病像をまとめ、同年 Borden and Hall³⁾ が同菌による汚染輸血にみられたシヨックが、グラム陰性菌の菌体毒素であるエンドトキシン

によって起こる可能性を示唆し、以来細菌性ショック、エンドトキシンショックといった概念が成立した。臨床的にも死亡率は50~80%と非常に高く^{4,5)}、抗生物質の汎用による耐性菌の増加と、輸血、カテーテルなどの外科的手技の発達により、重症感染症への移行、直接的細菌感染の増加がみられ、これらに伴うショックに関して多大な関心が持たれている。一方 Weil ら^{6,7)} は実験的にエンドトキシンを投与した動物から得られた所見が臨床例と類似していることから、細菌感染に伴うショックが、エンドトキシンによることを示し、以来精製エンドトキシンによるモデル実験が多数行われてきた。しかしエンドトキシンの生物学的活性は非常に多彩で、また宿主の条件によっても影響を受けることから、このショックの本態に関しては未解明な問題が数多く残されている。

エンドトキシンショックに際して障害される臓器は全身に及び肝臓もその1つである。感染巣あるいは腸管から血中に達したエンドトキシンは、肝において解毒されると共に、一方では肝細胞自身が障害されて有害代謝産物を放出し、ショックの重症化をもたらす^{8,9,10)}と一般的に考えられている。

これまでの報告ではエンドトキシンによる肝臓病変は、出血を伴う肝細胞壊死が特徴的变化であることが認められているが^{11~16)}、壊死の発生に至る過程の超微形態的研究は少く、この肝細胞壊死の成因は良く分っていない。また従来の電顕試料の固定は浸漬法によるため、類洞がつぶれ、類洞壁の変化の観察が不十分であったことから、肝細胞壊死の発生と類洞壁の変化との関係が検索し難かった。

本研究では、これらの点に着目し、肝組織の保持にすぐれている灌流固定法^{17~19)}を用いて、壊死の発生に至る肝組織の変化を経時的電顕的に検討し特に肝細胞の変化と類洞被覆細胞および類洞構造の変化との対比から、肝細胞壊死の成因の検討を試みた。

実験材料および方法

動物： Wistar 系雄ラット(体重 200 g \pm 20)を使用し、これに標準飼料(オリエンタル酵母社)と水を自由に与えた。
エンドトキシン： 大腸菌エンドトキシン(lipopolysaccharide *E. coli* 0127:B8, DIFCO LABORATORIES)を生理的食塩水に溶解し、1 ml を腹腔内投与した。

i) **予備実験：** 1, 2, 3, 5, 10, 30, 50 mg/kg のエンドトキシンを投与し、72時間の生存率を観察した。死亡した動物はその時点で組織学的に検索した。

ii) **対照群：** 生理的食塩水 1 ml を腹腔内投与し、30分、1, 2, 3, 4, 12, 24時間目に屠殺し、おのおの2匹ずつ使用した。

iii) **エンドトキシン投与群：** エンドトキシン 2 mg/kg を生理的食塩水に 1 ml になるように溶解し、これを腹腔内投与した。投与後 30分、1, 2, 3, 4, 12, 24時間目に屠殺し、おのおの5匹ずつ使用した。

灌流固定法： エーテル麻酔下で開腹し、19 G の注射針を肝門脈に挿入し、90 cm H₂O の圧で 1.25% glutaraldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) を 1~2 分間注入し、肝を固定した。

病理形態学的検索： 光顕用には灌流固定した肝の一部を 5% buffered formalin にて再固定したものをを用い、パラフィン包埋後 HE 染色、PAS 染色、PTAH 染色、Sudan 染色を行った。電顕用には灌流固定した肝を細切り、1% OsO₄ (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) で 2 時間後固定し、アルコール脱水、Epon 812 に包埋した。LKBI 型ミクロトームで超薄切片を作製し、クエン酸鉛と錯酸ウラニルとの二重染色を行い、JEM 100 C 電子顕微鏡で観察した。

実験結果

エンドトキシン 1~50 mg/kg を投与した予備実験における動物の生存率は Table 1 に示した通りである。これから 50% 致死量はほぼ 2 mg/kg であることが確かめられた。また病理組織学的観察では、上記の種々の投与量において、基本的病変に本質的差異は認められなかった。これらの予備実験の結果から、以下の実験においては投与量を 2 kg/mg に決定した。

Table 1 Survival rate after endotoxin injection

Dose of endotoxin	No. rats	Mortality		Survival of 72 hrs.
		10 hrs.	24 hrs.	
50 mg/kg	3	2	1	0
30 mg/kg	3	3	0	0
10 mg/kg	5	4	1	0
5 mg/kg	5	4	1	0
3 mg/kg	10	6	2	2
2 mg/kg	10	4	2	4
1 mg/kg	10	2	1	7

(I) 光顕所見

対照群では 1 時間目より肝細胞に微細空泡がみられた。これらは Sudan 染色陽性で、脂肪滴であることがわかった。この脂肪滴の増加は 2~3 時間でピークに達し、4 時間以降はほとんど消失した。

エンドトキシン投与後 30 分では類洞に好中球が少数出

現した。1時間目では好中球の浸潤が著明になり、1個のもの及び数個の集塊をつくるものがみられた (Fig. 1)。Kupffer 細胞は腫大し、好中球を貪食している像もみられた。肝細胞は PAS 染色で糖原の減少を示し、また脂肪滴もみられた。2時間目から3時間目にかけて小葉全体に肝細胞の脂肪滴が増加し、その程度は対照群より明らかに高度であった。類洞における好中球の浸潤は1時間目より一段と強くなり、数個の集塊をつくるものが増加した。この時期の特徴はフィブリンの析出で腫大した Kupffer 細胞、好中球と一塊となっている像がみられた (Fig. 2)。中心静脈、門脈にはうっ血像がみられ所々赤血球の凝集が著明であった。

4時間目になると肝細胞の脂肪滴はむしろ減少し、Sudan 染色陰性の大型の空胞が小葉周辺帯の肝細胞の細胞質中に多数出現した (Fig. 3)。この空胞はエオジン好性で、PAS 染色、PTAH 染色陽性であった。中には核を扁平にする程の大きさに達するものもみられ、こうした空胞を有する肝細胞の周囲には出血を伴った肝細胞の壊死巣がみられた。この肝細胞壊死は小葉周辺帯を中心に、広汎にみられた (Fig. 4)。類洞には好中球、Kupffer 細胞の凝集とフィブリンの沈着による微小血栓が、壊死巣、壊死巣周囲類洞に多数みられた。中心静脈、門脈ではうっ血が強く、好中球の margination もみられ、血栓も所々に認められた。

24時間目では肝細胞壊死は減少し、点状壊死がわずかに存在する程度であった。肝細胞のエオジン好性空胞も全く消失した。類洞においては、Kupffer 細胞の腫大、好中球の凝集はみられたが、その程度は4時間目より軽減し、微小血栓もわずかであった。中心静脈、門脈のうっ血は軽度で、血栓は認められなかった。

(II) 電顕所見

対照群は、通常の浸漬固定による標本に比べ類洞の構造がよく保持され、沿岸細胞、Disse 腔がつぶされずに観察された。この群では肝細胞の脂肪滴が増加し、軽度の糖原の減少がみられた。いずれの変化も4時間以降は正常に近い所見に戻った。エンドトキシン投与後30分では類洞における好中球の出現頻度が対照群より多く、Kupffer 細胞では空胞形成がみられた。肝細胞では糖原の減少と脂肪滴の増加が観察された。

a) 1時間目

肝細胞：最も著明な変化は糖原の激減で、相対的に滑面小胞体 (以下 SER) の肥大がみられた。リソゾームの中には糖原顆粒を含んだものがみられた。糸粒体は細胞によっては軽度の腫脹がみられた (Fig. 5)。類洞側表面には内容の空虚な空胞が多数みられ、またこの空胞が腔と交通している像もみられた (Fig. 6)。

類洞：Kupffer 細胞には空胞形成とリソゾームの増加がみられ、空胞内には絮状で微細顆粒状物質が含まれているのが観察された (Fig. 7)。類洞内皮細胞の細胞質には著変はみられず、類洞壁からの剝離も認められなかった。好中球、血小板の出現は著明で、相互の凝集像、類洞壁への粘着像もみられたが、細胞質内には著変は認められなかった。
b) 2~3時間目：変化は2時間目、3時間目に共通で、その変化の程度が3時間目においてより高度のものが多かった。

肝細胞：1時間目にみられた類洞表面の空胞はやや減少し、同じ表面に近い細胞質中に多数の大型の脂肪滴がみられた (Fig. 8, 9)。糸粒体は腫大を示すものが多くなり、基質の電子密度が減少し、クリスタ・基質内顆粒の減少も1時間目より増強した (Fig. 9, 10)。粗面小胞内 (以下 RER) は定型的層状配列がやや乱れ、糸粒体周囲に近接し、あるいはこれを取り囲む所見がみられた。リソゾームは増加し、その分布も正常の胆毛細管周囲に限らず、より周囲に分散していた。糖原はほとんど消失し、わずかに細胞質に散在している程度であった (Fig. 9, 10)。胆毛細管は軽度に拡張し、微絨毛は腫脹していた。

類洞：最も著明な変化は、フィブリン様細線維物質の析出である。この細線維状物質に axial cross striation が存在し、その周期は 200 \AA 程度であった。このフィブリン様物質は血小板、Kupffer 細胞表面に附着し (Fig. 13)、これら細胞と共に凝集塊を形成し、類洞を閉塞している像が観察された。こうした変化は小葉周辺部に多くみられた。Kupffer の空胞形成、リソゾームの増加は一段と著明になり、空胞の内容には微細顆粒状物質と 10 nm 前後の厚さをもつ C 字型に弯曲したヒモ状物質がみられた (Fig. 11)。このヒモ状物質は電子密度で濃淡濃の三層構造がみられ、恐らくエンドトキシンそのものであると考えられる。この物質は空胞内のみでなく Kupffer 細胞表面にも附着している像がみられた (Fig. 12)。ときに、Kupffer 細胞はフィブリン様物質、好中球、赤血球を貪食し (Fig. 14, 15)、類洞内腔へ膨出していた。好中球は特殊顆粒の減少が目立ち、血小板も特殊顆粒の減少と共に形態的にも腫脹・変形がみられた (Fig. 13)。

類洞内皮細胞はその細胞質内に大型の空胞が数個みられるものもあったが (Fig. 16)、これは対照群にもみられ、大部分の細胞類洞では壁からの剝離は認められなかった。ただ、類洞内腔のフィブリン様物質、血小板、Kupffer 細胞の凝集塊による閉塞部位周辺では内皮細胞の細胞質の一部が類洞壁から剝離し、この部分に面した肝細胞の微絨毛が消失していた (Fig. 17)。Disse 腔は軽度拡張し、肝細胞微絨毛は部分的に腫脹している所やその数が減少している像

がみられた。

c) 4 時間目

肝細胞: 1~3 時間目にみられた脂肪滴は減少し、この時期に特徴的な大型の空胞が細胞質中に出現した (Figs. 20, 21)。この空胞は円形あるいは楕円形で限界膜を有し、一部には限界膜の新形成を推定させる像がみられた。内容はほとんど無構造均質であるが、一部にフィブリン様細線維物質が認められた (Fig. 21)。こうした空胞は壊死肝細胞近接部の細胞に多数みられ、同時に細胞質内に赤血球の侵入を伴うものが多かった。糸粒体の腫大は強くなり、糸粒体基質の電子密度の低下、クリスタの減少、curling、基質内顆粒の減少がみられた (Fig. 22, 24)。リソゾームの増加は一段と著明になり、糸粒体を含んだ自家食空胞、二次性リソゾームが胆毛細管周囲のみでなく細胞質内に分散して多数みられた (Fig. 22)。RER の disorganization は非常に強くなり、その数が減少すると共に層状構造が乱れ、糸粒体を 1 つ 1 つ取り囲む像がみられた (Fig. 22, 24)。胆毛細管の拡張は強くなり、微絨毛は減少し、内腔は平坦化した (Fig. 24)。

類洞の微小血栓が多発している領域の肝細胞においては、核の濃縮、糸粒体の腫脹、その他の細胞内小器官の崩壊消失がみられ、また先に述べた限界膜で囲まれた空胞も存在し、細胞質内に赤血球の侵入を伴った壊死像を呈していた (Fig. 20, 25)。

類洞: Kupffer 細胞、血小板、好中球、フィブリン様物質の凝集像が小葉周辺帯を中心に著明になり、微小血栓として類洞を閉塞している像が多数認められた (Fig. 18, 19, 23, 25)。Disse 腔は著しく拡張し、この部分に面した肝細胞微絨毛の消失が目立ち、ことに先に述べた限界膜を有する空胞を持つ肝細胞ではほとんど認められなかった (Fig. 20, 21)。類洞内皮細胞は微小血栓あるいはその周辺部での剥離脱落を示す所見が多くなり (Fig. 18, 19, 26)、破壊された類洞壁より赤血球が Disse 腔、肝細胞実質内に侵入している像がみられた (Fig. 21, 25)。Kupffer 細胞はフィブリン様物質、好中球、赤血球の貪食像、空胞形成、リソゾームの増加が著しく微小血栓の著しい部位ではフィブリンに取り囲まれ、細胞質内小器官が崩壊消失し、変性・壊死像を示す所見がみられた (Fig. 23)。

d) 24 時間目

この群では上述の諸変化は軽減し、回復像を示した。すなわち壊死肝細胞は少なくなり、4 時間目の肝細胞にみられた大型の空胞は認められなかった。また糖原の減少、糸粒体の腫脹は軽度になり、RER の定型的層状構造は回復し、リソゾームも減少した。この時期の特徴は Golgi 装置、小胞体の中のオスミウム酸好性の小顆粒の出現である。こ

の顆粒の大きさは 500 Å 程度で 1 個あるいは数十個の集団でみられ、Disse 腔の中にも認められた (Fig. 27)。

類洞においては依然フィブリンの析出、好中球、血小板の浸潤はみられたが、その程度は減少し、微小血栓の形成はわずかであった。Kupffer 細胞はフィブリンの貪食、空胞形成は依然認められたが、変性・壊死像はみられなかった。類洞内皮細胞は類洞壁からの剥離はなく、細胞質の変化も認められなかった。Disse 腔、胆毛細管の拡張も軽度であった。

考 察

本実験においてエンドトキシン単独 1 回投与で肝細胞の巣状壊死が多発した。この場合の肝細胞壊死は、Margaretten ら²⁶⁾の報告にみられるように、出血性ショック²¹⁾、慢性うっ血²⁴⁾、四塩化炭素中毒^{22, 23)}、などの際の中心部壊死と異なり、周辺帯に多く存在し、子癇²⁵⁾に類似している。Cremer ら²⁷⁾、Rubenstein ら²⁸⁾の蛍光抗体法による研究では、エンドトキシンが主として周辺帯に分布することが示されている。この事と肝細胞壊死の小葉内分布が関係しているとも考えられるが、詳細については今後の研究課題と思われる。

本実験の目的はエンドトキシン投与による肝細胞壊死の成立機転を電顕的に検索することである。従来の電顕的観察の報告は、いずれも浸漬固定法によるため類洞がつぶれ、壊死の発生に至る肝細胞と類洞壁細胞、あるいは類洞内変化との関係の観察が不十分であった。

電顕試料の固定には従来より色々な方法が試みられているが、Palade²⁴⁾は電顕的検索で最も難しい問題は目的に応じた固定条件の改善であると述べている。肝組織においては通常浸漬固定がなされてきたが、Fahimi¹⁷⁾は浸漬固定法と灌流固定法による肝組織の比較で、浸漬法は固定の時間が長く、また試料の表面では良好な固定が得られても中心部での固定が著しく劣化すること、特に肝臓のように大量の血液を容れている臓器では、屠殺時の脱血によって類洞がつぶされ、類洞構造が著るしく損われると述べ、灌流固定法がすぐれていると報告している。我々の教室でも小川ら¹⁹⁾、水無瀬ら²⁰⁾が灌流固定法をとり入れ、その手技に改良を加えることによって、コンスタントに良好な肝類洞壁の所見が得られるようになった。本実験においてもエンドトキシンの肝細胞壊死の発生を追求する上で、肝細胞のみでなく類洞の変化を検索することが必須であることから、小川らによる灌流固定法を用いた。

一般に血管内皮細胞はエンドトキシンに最も強い感受性を持つといわれている³⁰⁾。Stewart らの電顕的観察の報告³¹⁾では、早期から空胞形成や基底膜からの剥離がみら

れ、エンドトキシンによる循環障害の発生に重要な役割を持つと考えられている。類洞壁を構成する細胞には現在3種類存在すると考えられているが^{18,19)}、その中の類洞内皮細胞は血管内皮細胞と極めて類似した特徴をそなえている。しかし従来電顕的報告では類洞内皮細胞の記載はほとんどなかった。上述のように本実験の固定条件では類洞壁が良く保持され、類洞内皮細胞の構造を損わずに観察することができた。

すなわちエンドトキシン投与後1~2時間では、micro-pinocytic vesicle が内皮細胞表面に沿って多数認められ、また細胞質内に数個の空胞がみられたが、これらの構造はいずれも対照群にも認められ、病的所見とはみなし難かった。また内皮細胞が類洞壁から剥離している像は認められなかった。しかし3時間目に微小血栓が形成されると、その周囲の内皮細胞に空胞が増加し、類洞を被って長く伸展している細胞質が部分的に剥離している像が目立ち、4時間目で血栓が多発すると、その周囲の内皮細胞の空胞形成の増加、腫脹・変形と共に類洞壁からの剥離脱落が著明にみられた。一方、フィブリンの析出が少い類洞や、微小血栓のみられない部分の内皮細胞には著変はみられなかった。

以上から、類洞内皮細胞の変性・類洞壁からの剥離は、微小血栓の形成による血流障害と物理的影響により二次的に生じると考えられた。

類洞壁を構成するもう1つの細胞である Kupffer 細胞はエンドトキシン投与後早期から、機能亢進がみられるといわれている^{32,33)}。本実験でも早期から Kupffer 細胞の細胞質には空胞やライソゾームが増加し、2時間目からフィブリン、白血球、血小板、赤血球の盛んな貪食像がみられた。大きな空胞の中にみられたC字型のヒモ状物質には、電子密度で濃淡濃の3層構造がみられ、その厚さは10 nm程度で、Shands³⁶⁾の精製エンドトキシンの超微構造の報告、Spielvogel³⁸⁾による血小板に付着してみられた大腸菌のエンドトキシンと同じ構造を持ち、Kupffer 細胞によるエンドトキシンの貪食像と考えられた。4時間目になると Kupffer 細胞にはときに、フィブリンの著明な析出により、血栓にまきこまれ、細胞質内小器官の崩壊消失による壊死像を示す所見がみられた。

さて肝細胞に関しては、Boler ら¹¹⁾、Levy ら¹³⁾の電顕的観察では、細胞質に出現する限界膜で囲まれた大型の空胞をエンドトキシンによる特徴的病変であると述べている。しかしこうした空胞はエンドトキシン投与時のみでなく、門脈圧の急激な亢進³⁹⁾、再生肝⁴⁰⁾、異種蛋白静注時⁴¹⁾、などにもみられることから、エンドトキシンに特異的とは考えられない。小野江⁴²⁾、木村⁴⁰⁾は再生肝の初期に肝細胞内に出現する空胞を spherical body と呼び、内腔に滲

注した horseradish peroxidase が証明されることおよび内容の一部にフィブリンを認めることから、類洞内腔の上昇とうっ血による低酸素状態により、肝細胞の原形質膜の透過性が亢進することによって、血漿成分が細胞質内に侵入し、二次的に限界膜が形成されて segregate されたものであると考えている。

本実験においても同様の空胞が4時間目に、光顕的には好酸性の硝子様封入体として出現し、電顕的には限界膜で囲まれ、内容はほとんど無構造であるが、一部にフィブリン様物質を含んだ空胞としてみられた。そしてこの空胞は類洞における微小血栓の形成と共に出現し、類洞内皮細胞が剥離・脱落した所や Disse 腔が著しく拡張した部分に面した肝細胞にみられた。このような所見から、この空胞は微小血栓の形成による類洞の血流障害と類洞壁の破壊により二次的に発生したものと考えられる。

Fig. 25 のように微小血栓の形成が著しく、そのために低酸素状態が高度になると、細胞の変性の増強と共に原形質膜の透過性が異常に亢進し、無制限に細胞質内に血漿や赤血球が侵入し、細胞壊死に至ると考えられる。

こうした肝細胞壊死は全身性 Shwartzman 反応においても同様にみられる。この際の基本的病変は肝・腎・肺・心などの微小血栓による壊死性変化であるとされている⁴³⁾。最近志賀ら⁴⁴⁾は家兎において肝臓を場とした Shwartzman 反応を成立させ、単独投与に較べて広汎な肝細胞の出血性壊死を認めているが、本実験ではエンドトキシンのただ1回投与で同様の所見を認めることができた。この理由は種属によるエンドトキシン感受性の違いによるのか、あるいは投与量の違いによる病変の程度の差であるのか明らかではない。また本実験で使用したラットはいわゆる conventional の動物で、程度の差はあれ、感作状態にあるということも考えられる。しかし Shwartzman 反応の1回投与におけるフィブリンの析出は、臓器障害を引き起こさない程度であり、2回目投与により多数の微小血栓の形成により臓器障害が成立すること、また本実験の観察で、Kupffer 細胞が活発にフィブリンを貪食しており、この貪食能が飽和状態になってフィブリンの処理が追いつかなくなると血栓が形成されるようにみえることから、網内系による処理能に関する問題である可能性も考えられた。

一方こうした微小血栓がエンドトキシンによって生ずる機作については詳細な報告がみられる^{45~49)}。すなわちエンドトキシンが補体の特に C3 proactivator に働き、alternate pathway を活性化し、これが血小板・白血球の凝集・脱顆粒を起こし、血小板第 IV 因子、組織因子の活性化などを生じて血液凝固を進めると考えられている。本実験においても、かなり早期から白血球・血小板の凝集像がみら

れ、細胞が変形・腫大するにつれ脱顆粒が著明になった。

一方、肝細胞の初期変化としては、①糸粒体の腫大変形、②RERのdisorganization、③リソゾームの増加、④糖原の減少、⑤脂肪滴の増加、⑥SERの肥大などがみられ、これらの変化がエンドトキシンによる肝細胞に対する直接的な作用によるのか否かは肝壊死の発生の原因を追求する上で重要である。こうした所見は、エンドトキシン投与時のみでなく、部分肝切除の初期⁴⁰⁾、sham operation、絶食動物⁵⁰⁾、肝臓毒⁵¹⁾、などでも共通にみられ、対照群においても認められるものである。そして対照群では4時間になると回復する。またラットやマウスにおけるエンドトキシンによる血圧の動態の報告^{52,53)}では、投与後間もなく血圧が急激に下降するが、一旦ショック前に近い血圧に戻り、4~20時間の間に再び不可逆的に下降する。こうしたことから初期にみられる変化は実験操作に対するストレスと初期の血圧低下による影響の反映と考えられた。

なおエンドトキシンの肝細胞に対する直接作用として、従来から①糸粒体の酸化的リン酸化の阻害^{54~56)}、②リソゾーム膜の脆弱化^{9,10)}、③glyconeogenesisの阻害⁵⁷⁾、glycolysisの促進⁵⁸⁾、などが言われているが、今回の研究ではこれらについては検索できなかった。

4時間目の肝細胞の細胞質は、著明な血栓形成により、前記の空胞以外に、一段と変化が強くなる。しかし糸粒体、RERの変化はこれまでの諸家の報告より軽度であり、糸粒体のherniation、myelin figure形成、形態のirregularityやRERの不規則な拡張といった所見はみられなかった。これは、Fahimiが述べている様に、従来の研究が浸漬固定によるための人工産物である可能性があると考えられる。

リソゾームに関しては、Janoffら⁹⁾、Weissmannら¹⁰⁾によりエンドトキシンがリソゾーム膜のlabilizerであることが示され、リソゾームからの水解酵素の遊出が、細胞障害の程度を更に強めるといわれている。またリソゾーム膜の解裂を示す電顕像の報告もみられる¹⁴⁾。しかし本実験では、膜の解裂像を示唆する所見はみられなかった。したがって、エンドトキシン投与による肝細胞の変性は、直接的なリソゾーム酵素の逸脱のみでなく、血栓形成による肝細胞の低酸素状態が細胞の変性を来たし、これによる細胞内pHの低下が、二次的にリソゾーム膜の脆弱化を来たして、細胞を最終的な死に至らしめるものと考えられる。

24時間目に、Disse腔、肝細胞の小胞体、Golgi装置の中にみられるオスミウム酸好性の顆粒は500Å程度の大きさでvery low density lipoprotein(以下VLDL)と考えられる。VLDLはエタノール投与⁵⁹⁾、四塩化炭素中毒⁶⁰⁾、エチオン投与⁶¹⁾、部分肝切除⁴⁰⁾などの肝細胞でも数の増

加がみられ、肝細胞内の中性脂肪の合成の亢進と、これをVLDLの形で放出する経路の亢進によると考えられている。本実験ではVLDLは1~4時間にかけてはわずかにしかみられず、この期間では肝細胞内に脂肪滴が著明である。VLDLは中性脂肪へ蛋白部分の附加をまって肝細胞から排出されると考えられており⁶²⁾、初期からみられるRERの変化と考え合わせると蛋白合成障害により中性脂肪の分泌が阻止され、脂肪滴が出現すると考えられる。致死性の障害をまぬがれ、回復像を示す24時間目の肝細胞では、VLDLが多数みられ、肝細胞の脂肪滴が消失することは、このことの裏付けとなるものと思われる。

結 論

エンドトキシン投与によるラット肝の超微形態的变化を、24時間検索した。固定法は肝組織の保持にすぐれた灌流固定法を用いた。1~3時間の肝細胞は糖原の減少、滑面小胞体肥大、糸粒体腫張、粗面小胞体変化、リソゾーム、脂肪滴の増加がみられた。これらの変化は対照群にもみられ、ストレスによる非特異的变化と考えられた。類洞には、白血球、血小板、赤血球の凝集が1時間でみられ、後にフィブリンが大量に析出した。4時間の肝細胞に限界膜で囲まれ、フィブリンを含んだ空胞がみられた。類洞では血栓が多発し、その周囲の内皮細胞は剝離脱落し、Disse腔へ赤血球の侵入がみられた。肝細胞壊死が血栓形成領域に広汎にみられた。24時間では変化は軽度で、肝細胞のGolgi装置、小胞体、Disse腔の脂蛋白顆粒の増加がみられた。これは蛋白合成障害からの回復を示す所見と考えられた。

以上より、エンドトキシンによる血栓形成が、肝細胞壊死の発生に重要な役割を持つと考えられた。

謝 辞

稿を終るに臨み御指導、御校閲をいただいた早坂滉教授ならびに小野江為則教授に深く謝意を表します。

(昭和52.2.17受付)

文 献

- 1) Jacob, L.: Über Allgemeininfektion durch Bacterium coli commune. Deut. Arch. Klin. Med. 97, 303-347 (1909).
- 2) Weisbren, B. A.: Bacteremia due to gram-negative bacilli other than the Salmonella. Arch. Internal Med. 88, 467-488 (1951).
- 3) Borden, C. W. and Hall, W. H.: Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination.

- tion of blood. *New Engl. J. Med.* **245**, 760-765 (1951).
- 4) Shubin, H. and Weil, M. H.: Bacterial shock. A serious complication in urological practice. *J. A. M. A.* **85**, 850-853 (1963).
 - 5) Naqui, J. and Tranter, D. G.: Bacteremic shock as an acute medical emergency. *The Lancet*, 1357 (1965).
 - 6) Weil, M. H. and Maclean, L. D.: Studies on the circulatory changes in the dog produced by endotoxin from Gram-negative microorganism. *J. Clin. Invest.* **35**, 1191-1198 (1956).
 - 7) Weil, M. H. and Spink, W. W.: The shock syndrome associated with bacteremia due to gram-negative bacilli. *A. M. A. Arch. Int. Med.* **101**, 184-193 (1958).
 - 8) Rangel, D. M., Stevens, G. H., Cooper, R. and Fonkalsrud, E. W.: The hepatic response to endotoxin shock; Hemodynamic and enzymatic observations. *J. Surg. Res.* **10**, 181-188 (1970).
 - 9) Janoff, A., Weissmann, G., Zweifach, B. W. and Thomas, L.: Pathogenesis of experimental shock. IV. Studies on lysosomes in normal and tolerant animals subjected to lethal trauma and endotoxemia. *J. Exptl. Med.* **116**, 451-466 (1962).
 - 10) Weissmann, G. and Thomas, L.: Studies on lysosomes. I. The effects on endotoxin, endotoxin tolerance and cortisone on the release of acid hydrolases from a granular fraction of rabbit liver. *J. Exptl. Med.* **116**, 433-450 (1962).
 - 11) Boler, R. K. and Bibighaus III, A. J.: Ultrastructural alterations of dog livers during endotoxin shock. *Lab. Invest.* **17**, 537-561 (1967).
 - 12) Levy, E., Slusser, R. J. and Rubin, B. H.: Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. Light microscopy and histochemistry. *Am. J. Path.* **51**, 269-285 (1967).
 - 13) Levy, E., Slusser, R. J. and Rubin, B. H.: Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. Electron microscopy. *Am. J. Path.* **52**, 477-502 (1967).
 - 14) Rangel, D. M., Byfielk, J. E., Adomian, Stevens, G. H. and Fonkalsrud, E. W.: Hepatic ultrastructural response to endotoxin shock. *Surgery* **68**, 503-511 (1970).
 - 15) Hoffmann, E. O. and Trejo, R. A.: Ultrastructural changes in the liver of baboons following lead and endotoxin administration. *Lab. Invest.* **30**, 311-319 (1974).
 - 16) Gursel, S., Kandemir, B., Karacaday, S. and Telatar, H.: Liver in septic shock. *Am. J. Gastroent.* **59**, 250-254 (1973).
 - 17) Fahimi, H. D.: Perfusion and immersion fixation of rat liver with glutaraldehyde. *Lab. Invest.* **16**, 736-750 (1967).
 - 18) Wisse, E.: An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* **31**, 125-150 (1970).
 - 19) Ogawa, K., Minase, T., Enomoto, K. and Onoe, T.: Ultrastructural of fenestrated cells in the sinusoidal wall of rat liver after perfusion fixation. *Tohoku J. Exp. Med.* **110**, 89-101 (1973).
 - 20) 水無瀬昂, 小川勝洋, 横山繁昭: 3'-methyl-4-dimethylaminoazo-benzen 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の組織化学的研究. *札幌医誌* **44**, 164-183 (1975).
 - 21) Holden, W. D., Depalma, R. G., Drucker, W. R. and Mackalen, A.: Ultrastructural changes in hemorrhagic shock; Electron microscopic study of liver, kidney, and striated muscle cells in rats. *Ann. Surg.* **162**, 517-534 (1965).
 - 22) Bassi, M.: Electron microscopy of rat liver after carbon tetrachloride poisoning. *Exp. Cell Res.* **20**, 313-323 (1960).
 - 23) Calvert, D. N. and Brody, T. M.: Role of the sympathetic nervous system in CCl₄ hepatotoxicity. *Am. J. Physiol.* **168**, 669-676 (1960).
 - 24) Schiff, L.: Diseases of the liver. p. 1033-1034. Lippincott, Philadelphia. Tronto (1975).
 - 25) McKay, D. G., Merrill, S. J., Weiner, A. E., Hertig, A. T. and Reid, D. E.: The pathologic anatomy of eclampsia, bilateral renal cortical necrosis, pituitary necrosis and other acute fatal complications of pregnancy and its possible relationship to the generalized Schwartzman phenomenon. *Am. J. Obst. Gynec.* **66**, 507-539 (1953).
 - 26) Margaretton, W., McKay, D. G. and Phillips, L. L.: The effect of heparin on endotoxin shock in the rat. *Am. J. Path.* **51**, 61-68 (1967).
 - 27) Cremer, N. and Watson, D. W.: Influence of stress on distribution of endotoxin in RES determined by fluorescein antibody technic. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **95**, 510-513 (1957).
 - 28) Rubenstein, H. S. and Coons, A. H.: Localization of endotoxin in the walls of the peripheral vascular system during lethal endotoxemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 458-467 (1962).

- 29) Palade, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* **95**, 285-298 (1952).
- 30) Tanaka, N., Nishimura, T. and Yoshiyuki, T.: Histochemical studies on the cellular distribution of endotoxin of *Salmonella Enteritidis* in mouse tissues. *Jap. J. Microbiol.* **3**, 191-201 (1959).
- 31) Stewart, G. T. and Anderson, M. J.: An ultrastructural study of endotoxin induced damage in rabbit mesenteric arteries. *Br. J. Exptl. Path.* **52**, 75-80 (1971).
- 32) Howard, J. G.: Activation of the reticulo-endothelial cells of the mouse liver by bacterial lipopolysaccharide. *J. Pathol. Bacteriol.* **78**, 465-470 (1959).
- 33) Thorbecke, G. J., Old, L. J., Benacerraf, B. and Clarke, D. A.: A histochemical study of acid and alkaline phosphatase in mouse livers during various conditions modifying activity of the reticuloendothelial system. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 392-399 (1961).
- 34) Petti, G., Bolis, L., Carptoni, C. and Amormino, V.: The influence of treatment with *Salmonella* Thyphi endotoxins on the behaviour of some acid hydrolases of the rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **13**, 1587-1592 (1964).
- 35) Doak, R. L. and O'Dell, B. C.: Effect of endotoxin and dietary phosphorus of liver reticuloendothelial and bone marrow cells. *Experimentia* **29**, 602-604 (1973).
- 36) Shands, Jr. J. W.: *Microbial toxins*. Vol. IV p. 127 Academic Press, New York (1971).
- 37) 本間 遜, 斎藤和久, 河西信彦, 丹羽 允: 細菌内毒素, 講談社サイエンティフィック (1973).
- 38) Spielvogel, A. R.: An ultrastructural study of the mechanisms of platelet-endotoxin interaction. *J. Exptl. Med.* **126**, 235-267 (1967).
- 39) Kerr, J. F. R.: A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Path. Bact.* **90**, 419-433 (1965).
- 40) 木村 稔: 部分的肝切除後の再生肝に関する電子顕微鏡的研究. I. 術後の早期における肝細胞の超微構造変化に関して. 札幌医誌 **35**, 265-288 (1969).
- 41) Weld, J. T., Von Glahn, W. C. and Mitchell, L. C.: Production of cytoplasmic inclusions in liver cells of rats injected with certain proteins. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **48**, 229-233 (1941).
- 42) 小野江為則: 肝臓の超微構造病理学. 日病会誌 **57**, 3-36 (1968).
- 43) Thomas, L. and Good, R. A.: Studies of generalized Shwartzman reaction. *J. Exp. Med.* **96**, 605-624 (1952).
- 44) 志賀淳治, 加藤綾子, 森 亘: シュワルツマン反応による家兎肝臓の急性出血性壊死. 肝臓, **17**, 580-588 (1976).
- 45) West, R. L., Elovits, M. J. and Hardway, R. M.: Blood coagulation factor activity in experimental endotoxemi. *Ann. Surg.* **163**, 567-572 (1966).
- 46) Brown, D. L. and Lachmann, J. P.: The behaviour of complement and platelets in lethal endotoxin shock in rabbits. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **45**, 193-206 (1973).
- 47) Mergenhagen, S. E., Snyderman, R. and Phillips, J. K.: Activation of complement by endotoxin. *J. Infect. Dis.* **128**, 86-90 (1973).
- 48) Kane, M. A., May, J. E. and Frank, M. M.: Interactions of the classical and alternate complement pathway with endotoxin lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* **52**, 370-376 (1973).
- 49) Garner, R., Chater, B. V. and Brown, D. L.: The role of complement in endotoxin shock and disseminated intravascular coagulation: Experimental observation in the dog. *Br. J. Haemat.* **28**, 393-401 (1974).
- 50) Goldschmidt, S., Vars, H. M. and Ravdin, I. S.: The influence of the food stuffs upon the susceptibility of the liver to injury by chloroform, and the probable mechanisms of their action. *J. Clin. Invest.* **18**, 277-289 (1939).
- 51) 小野江為則, 森 道夫: 中毒性肝炎成立の細胞学的考察. 日病会誌, **60** (補), 43-48 (1971).
- 52) Ross, C. A.: Cardiovascular responses of unanesthetized rats during traumatic and endotoxin shock. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **96**, 582-587 (1957).
- 53) Zweifach, B. W., Naglerand, A. L. and Thomas, L.: The role of epinephrine in the reactions produced by the endotoxins of gram-negative bacteria. *J. Exptl. Med.* **104**, 881-896 (1956).
- 54) Mager, J. and Theodor, E.: Inhibition of mitochondrial respiration and uncoupling of oxidative phosphorylation by fractions of the *Shigella paradysenteriae* type III somatic antigen. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 169-177 (1957).
- 55) Greer, G. G., Epps, N. A. and Vail, W. J.: Interaction of lipopolysaccharides with mitochondria. *J. Infect. Dis.* **127**, 551-556 (1973).
- 56) Harker, A. H., Lillo, R. S. and Hufnagel, H. V.:

- Direct influence of endotoxin on cellular respiration. *Surg. Gynecol. Obstet.* **140**, 858-860 (1975).
- 57) Berry, L. J., Smythe, D. S. and Colwell, L. J.: Inhibition of hepatic enzyme induction as a sensitive assay for endotoxin. *J. Bacteriol.* **96**, 1191-1199 (1968).
- 58) Zwadyk, P. and Snyder, I. S.: Effects of endotoxin on glycogenolytic enzyme of mouse liver. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **143**, 864-868 (1973).
- 59) Stein, O. and Stein, Y.: Fine structure of the ethanol induced fatty liver in the rat. *Israel J. Med. Sci.* **1**, 378-388 (1965).
- 60) Reynolds, E. S.: Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell. Biol.* **19**, 139-157 (1963).
- 61) Baglio, C. M. and Farber, E.: Ultrastructural consequences of biochemical lesions in the liver induced by ethionine. *Fed. Proc.* **24**, 556 (1965).
- 62) Lombardi, B.: Considerations on the pathogenesis of fatty liver. *Lab. Invest.* **15**, 1-20 (1966).

附 図 説 明

- Fig. 1** エンドトキシン投与後1時間目: 類洞内に好中球の浸潤がみられ, 多くは数個の凝集像として認められる. Kupffer 細胞は腫大している. (HE 染色)(×300)
- Fig. 2** エンドトキシン投与後3時間目: 類洞内の好中球浸潤が著明で, Kupffer 細胞と共に凝集し, 類洞を閉塞している. (HE 染色)(×300)
- Fig. 3** エンドトキシン投与後4時間目: 出血部周囲の肝細胞細胞質内に酸好性の大きな空胞が多数みられる. (HE 染色)(×300)
- Fig. 4** エンドトキシン投与後4時間目: 小葉周辺部に, 巣状壊死の多発がみられる. (HE 染色)(×300)
- Fig. 5** エンドトキシン投与後1時間目: 肝細胞糖原の減少が著明で, 相対的に滑面小胞体(SER)の肥大がみられる. リソゾームの中には糖原を含んだものがみられる(矢印↑). 核(N)(×13,200)
- Fig. 6** エンドトキシン投与後1時間目: 肝細胞類洞側表面に多数の貪飲空胞(矢印↑)がみられる. 核(N)(×10,000)
- Fig. 7** エンドトキシン投与後1時間類洞: 左右にある Kupffer 細胞(Ku)には空胞形成(V)がみられる. 好酸球(E₀)(×10,000)
- Fig. 8** エンドトキシン投与後2時間目: 肝細胞細胞質の表面に多数の脂肪滴がみられる. 類洞壁の構造は保たれている. 類洞(S)肝細胞(H)(×1,300)
- Fig. 9** エンドトキシン投与後2時間目: 肝細胞類洞側表面に大きな脂肪滴(L)がみられる. 終粒体の腫脹, 基質内顆粒, クリスタの減少を示すものがみられる. 粗面小胞体(RER)の層状構造の消失を示す(矢印↑)像もみられる.(×10,000)
- Fig. 10** エンドトキシン投与後3時間目: 肝細胞一部肝細胞の核(N)には不規則な形態がみられた. 糖原はほとんど認めない.(×10,000)
- Fig. 11** エンドトキシン投与後2時間目 Kupffer 細胞: 空胞の中には微細顆粒状の物質と10nm程度の幅をもつC字型に彎曲したヒモ状物質(矢印↑)がみられる.
- Fig. 12** 同上: 細胞表面にもヒモ状物質が付着している.(矢印↑)(×13,200)
- Fig. 13** エンドトキシン投与後3時間目: 血小板フィブリン様物質(f)と共に血小板(P)が凝集し Kupffer 細胞(Ku)に付着している. 血小板は腫大・変形し, 脱顆粒も認められる.(×13,200)
- Fig. 14** エンドトキシン投与後3時間目 Kupffer 細胞: フィブリン様物質の貪食像. ×(13,200)
- Fig. 15** 同上: Kupffer 細胞は, 好中球(Lu)を貪食し, 類洞内腔に膨出している. 肝細胞(H)×5,000
- Fig. 16** エンドトキシン投与後3時間目: 類洞内皮細胞の細胞質表面に micropinocytic vesicle がみられ, また数個の空胞(V)も存在する. しかし類洞壁からの剥離は認めない.(×10,000)
- Fig. 17** 同上: 類洞内皮細胞の部分的剥離(矢印↑)とその部の肝細胞微絨毛の消失がみられる.(×13,200)

- Fig. 18** エンドトキシン投与後4時間目：肝細胞(H)の脂肪滴は減少し、類洞(S)には微小血栓(t)がみられる。内皮細胞の類洞壁からの剥離も認められる。(×1,300)
- Fig. 19** エンドトキシン投与後4時間目：類洞 Kupffer 細胞, フィブリン, 血小板により類洞が閉塞され、類洞壁が破壊されている。(×6,600)
- Fig. 20** エンドトキシン投与後4時間目：肝細胞細胞質内に均質無構造な空胞(V)が多数みられる。Disse 腔(Ds)は拡張し、赤血球(E)の侵入がみられる。(×4,000)
- Fig. 21** 同上：肝細胞細胞質の中の大きな空胞の中に細線維状のフィブリン様物質(矢印↑)がみられる。限界膜の新形成を推定させる所見もみられる(矢印↑)。拡張した Disse 腔(Ds)に剥離した内皮細胞の間隙より赤血球(E)が侵入している。
- Fig. 22** 同上：肝細胞の糸粒体(Mt)の腫脹, クリスタ・基質顆粒の減少がみられる。リソゾーム(Ly)の増加, 糸粒体を含んだ自家貪食空胞(Av)もみられる。RERは層状構造を消失し、糸粒体を取り囲んでいる。(×13,200)
- Fig. 23** エンドトキシン投与後4時間目：類洞 Kupffer 細胞(Ku)は、赤血球と共に血栓にまきこまれ、細胞質小器官は消失し壊死に陥っている。フィブリン(f)(×6,600)
- Fig. 24** エンドトキシン投与後4時間目：肝細胞胆毛細管(B)は拡張し、微絨毛の消失がみられる。リソゾーム(Ly), 核(N)(×13,200)
- Fig. 25** 同上：血栓(t)部領域の肝細胞は壊死を示すものが多く、実質内に赤血球の侵入がみられる。壊死肝細胞にも Fig. 20 で示した空胞(v)が認められる。(×2,000)
- Fig. 26** エンドトキシン投与後4時間目：類洞 Disse 腔(Ds)は著明に拡張している。類洞内皮細胞(En)は腫脹し類洞壁から剥離している。肝細胞微絨毛はほとんど消失している。(×6,600)
- Fig. 27** エンドトキシン投与後24時間目：肝細胞500 Å程度の大きさのオスミウム酸好性の小顆粒が膜に包まれて多数みられる。Disse 腔にも認められる。(矢印↑)糸粒体(Mt)の腫脹は軽度になり、RERの層状構造の回復がみられる。糖原はほとんどみられない。類洞(S)内皮細胞(En)(×16,600)

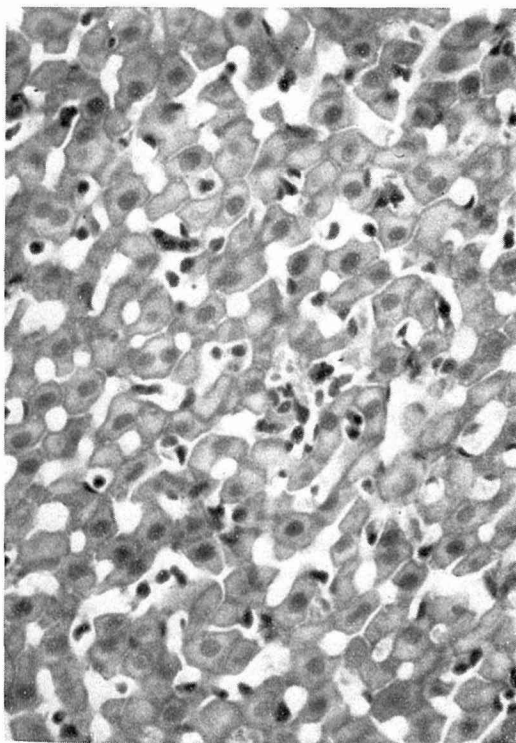


Fig. 1

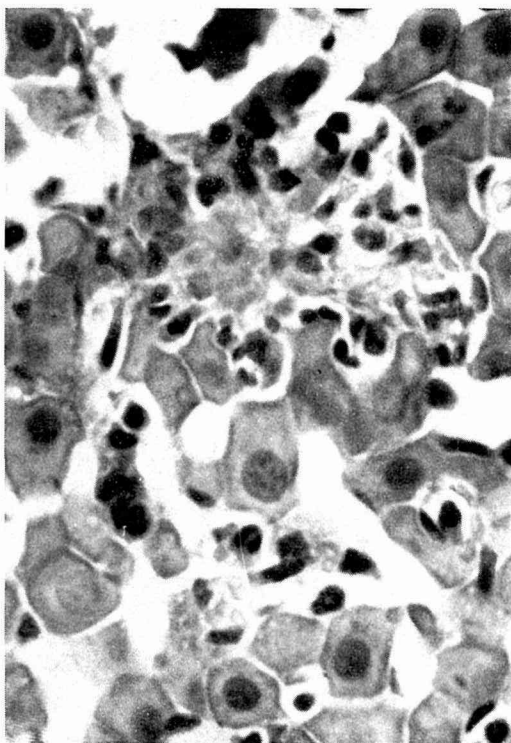


Fig. 2

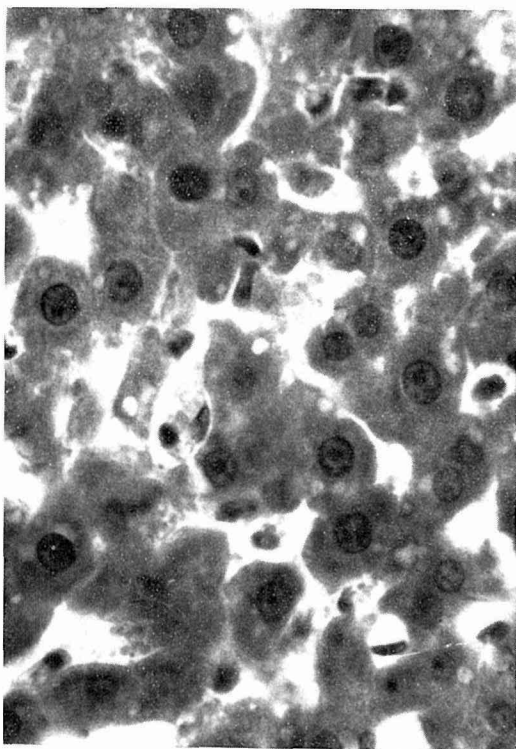


Fig. 3

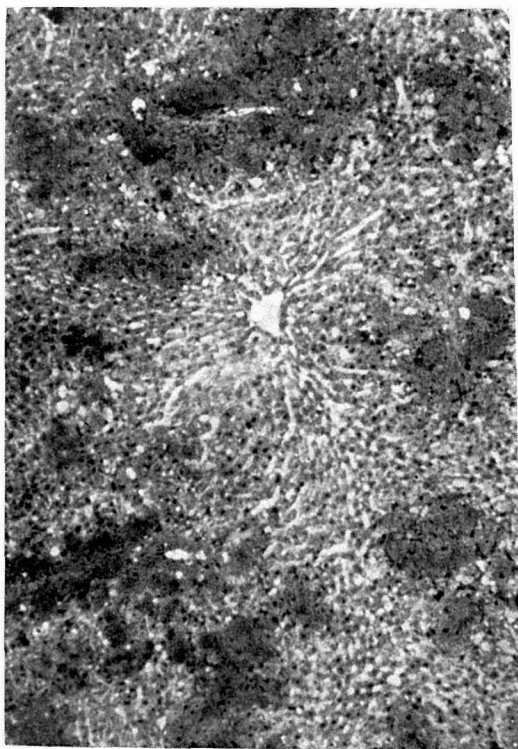


Fig. 4

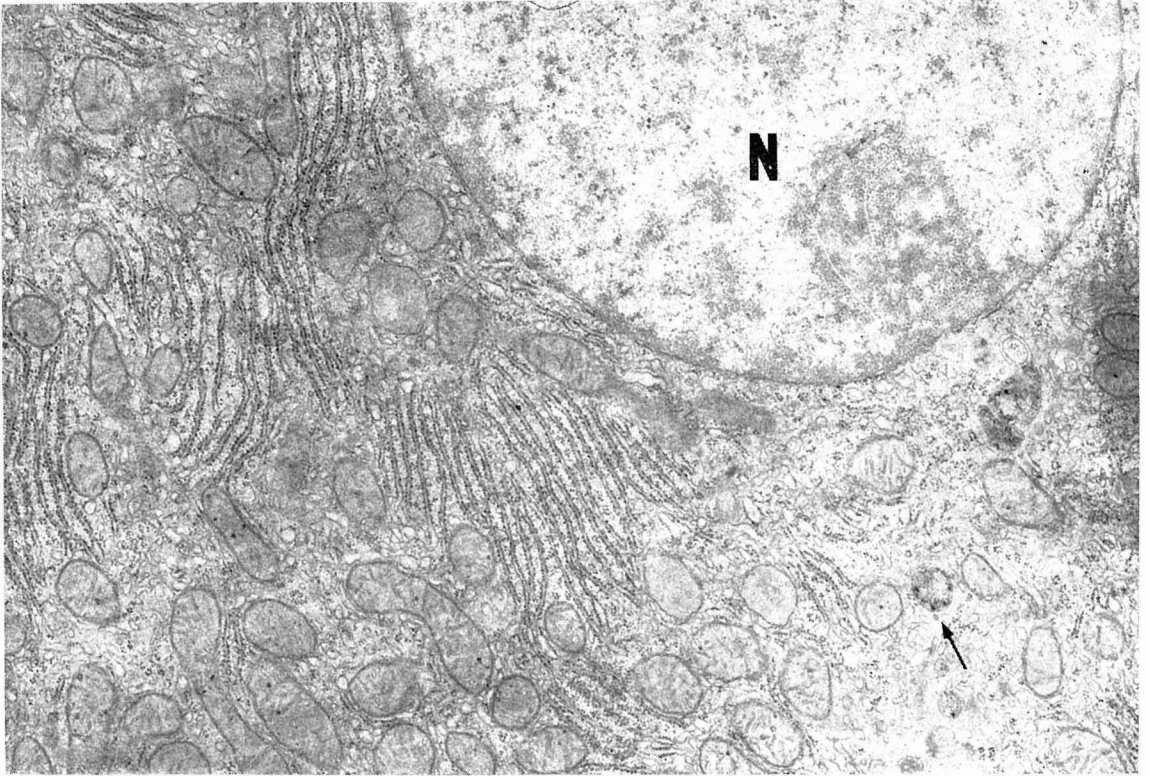


Fig. 5

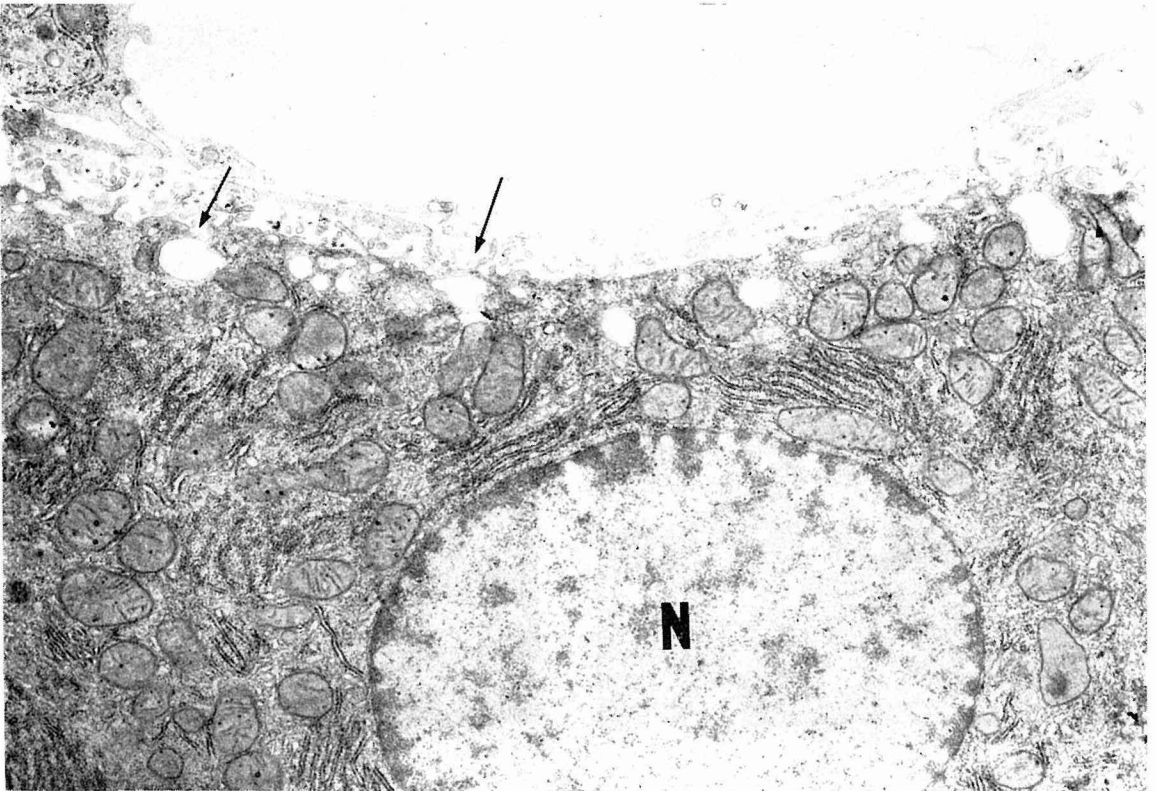


Fig. 6

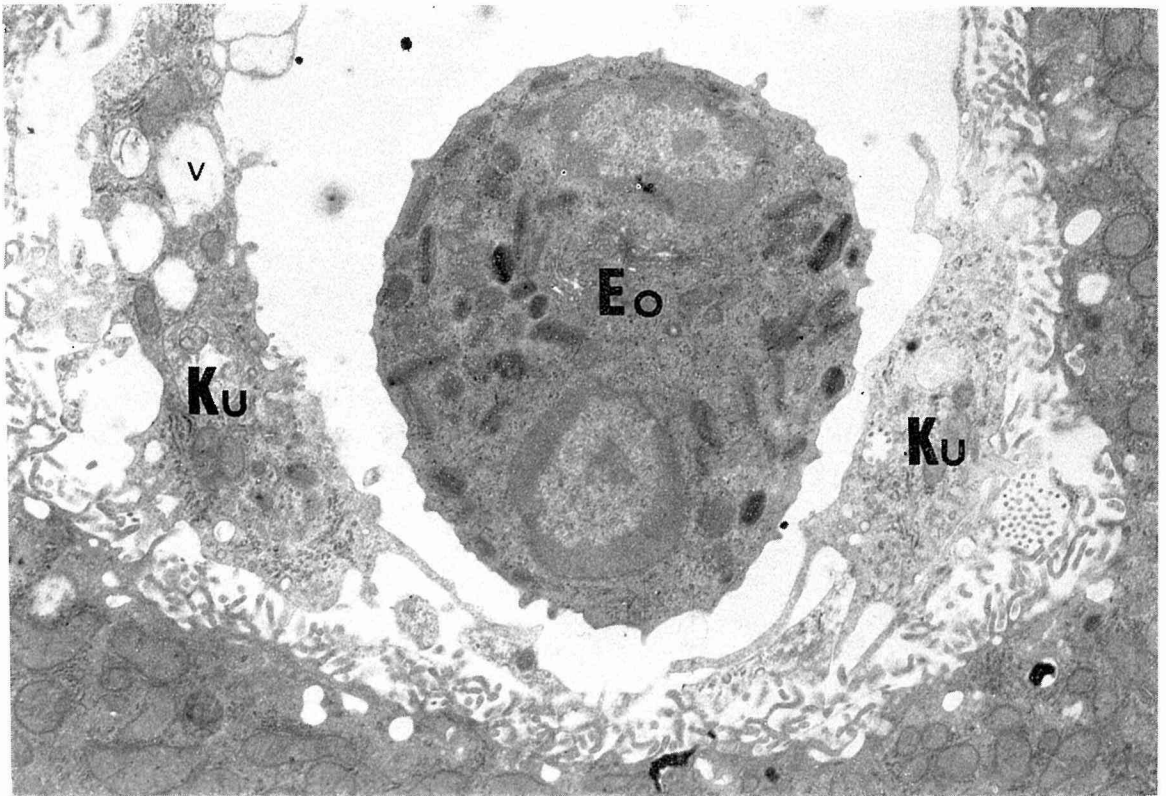


Fig. 7

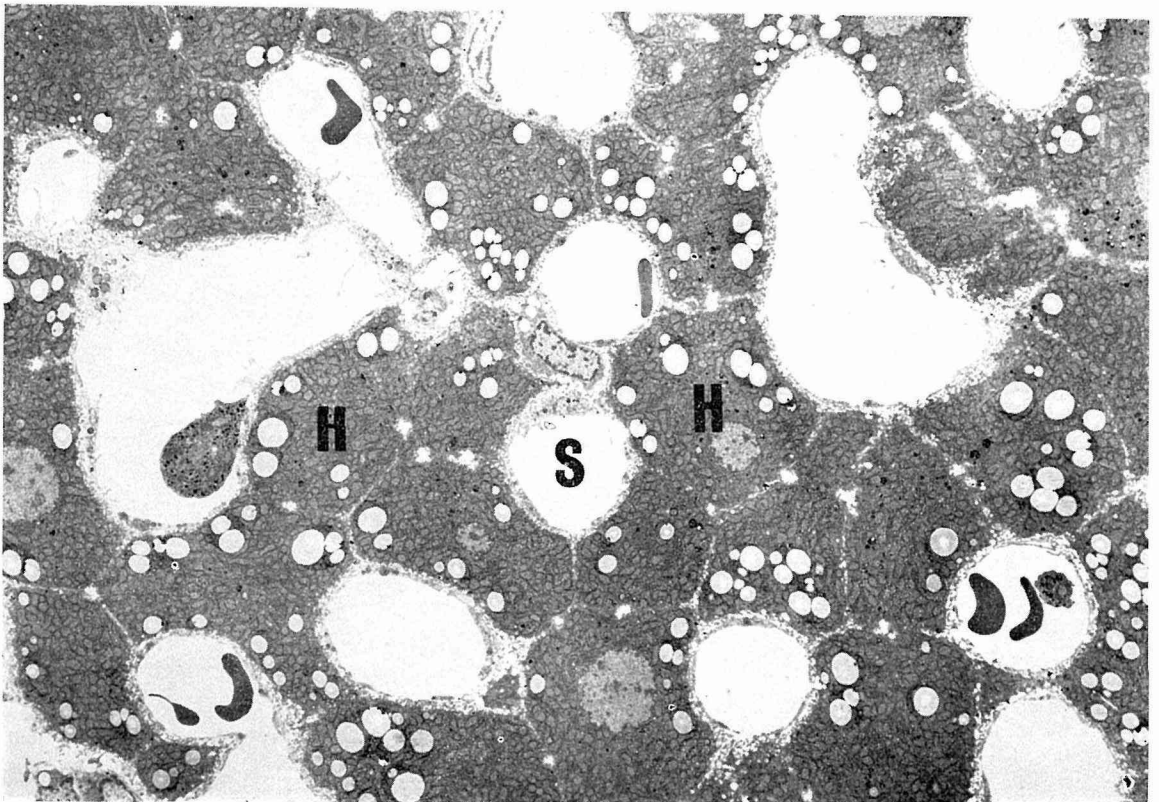


Fig. 8

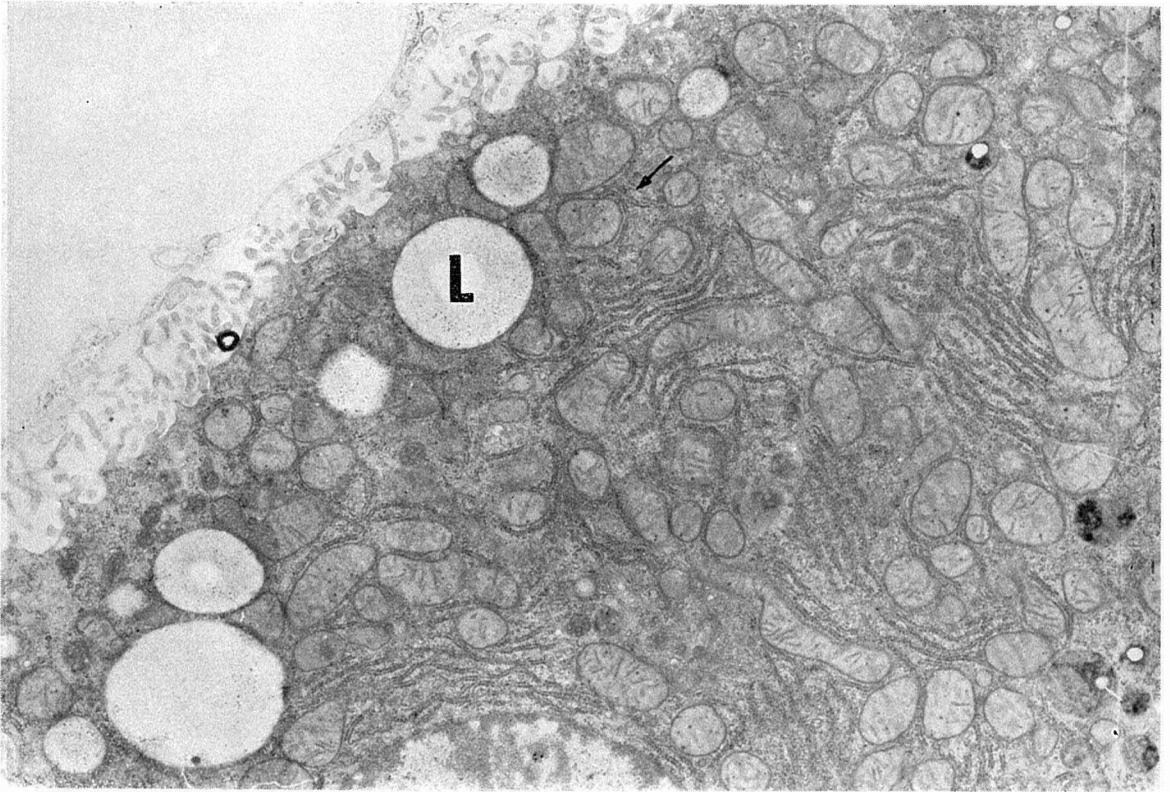


Fig. 9

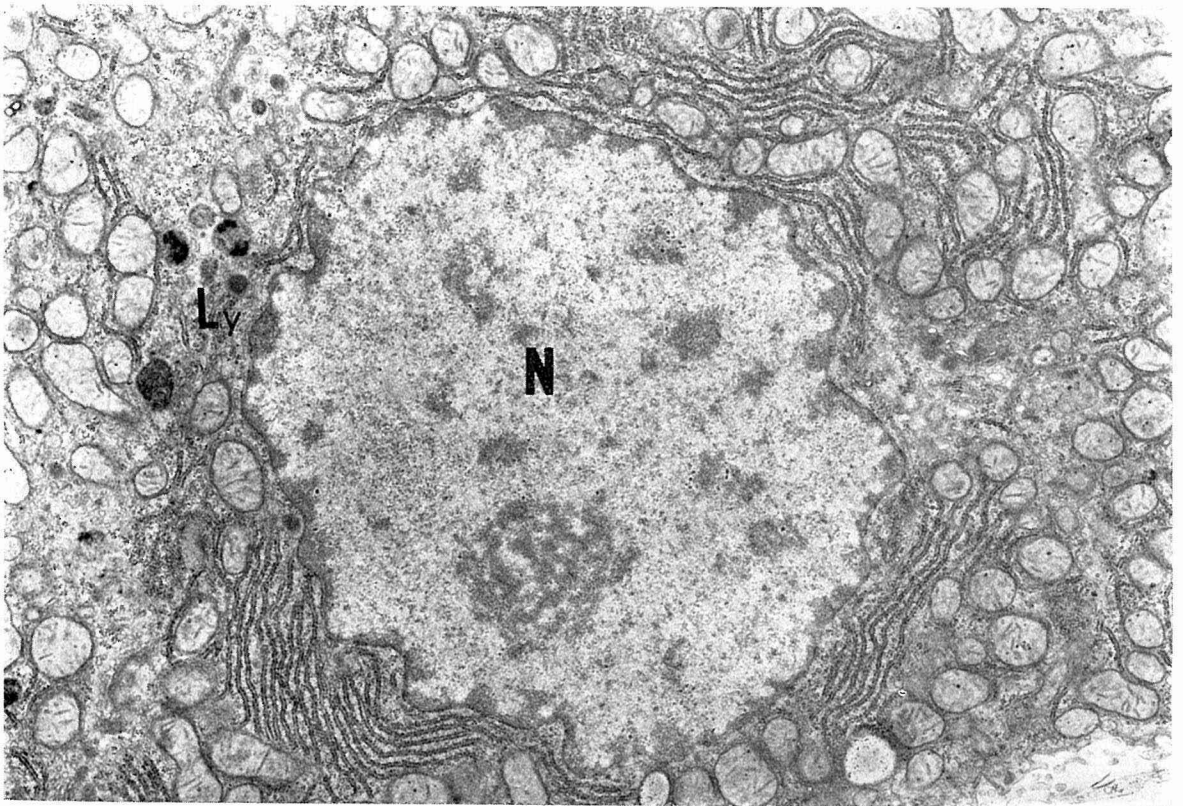


Fig. 10

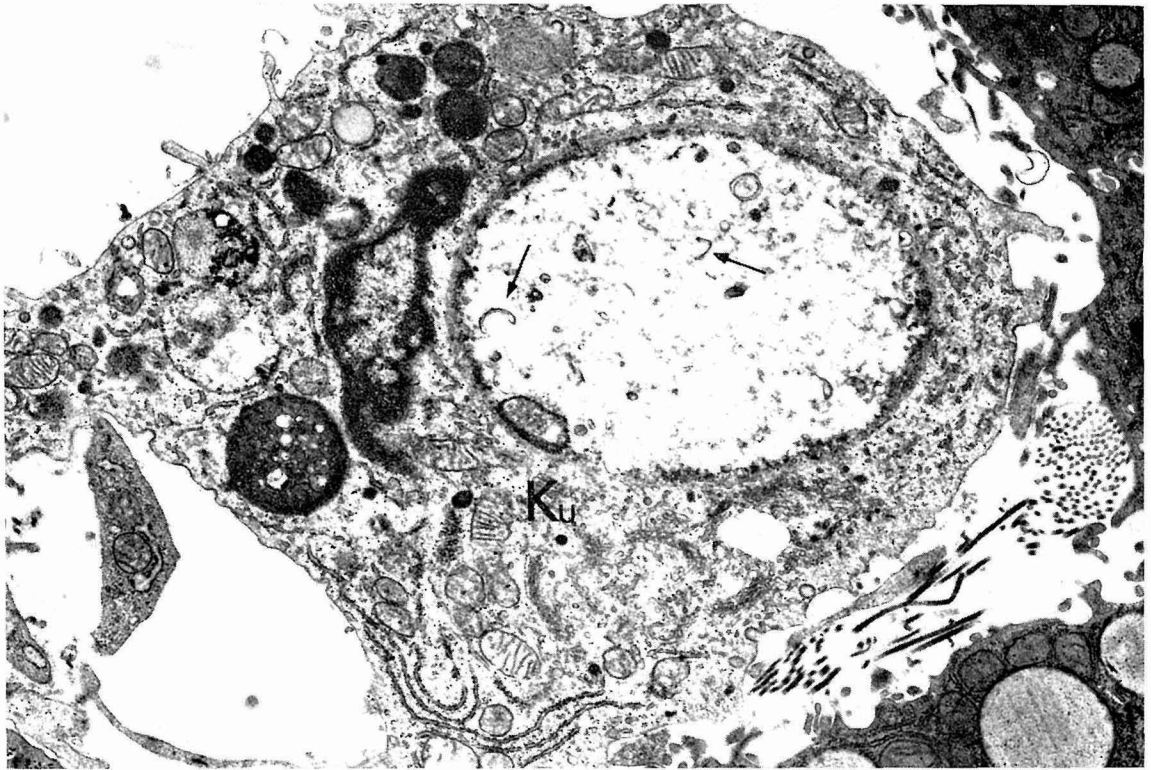


Fig. 11

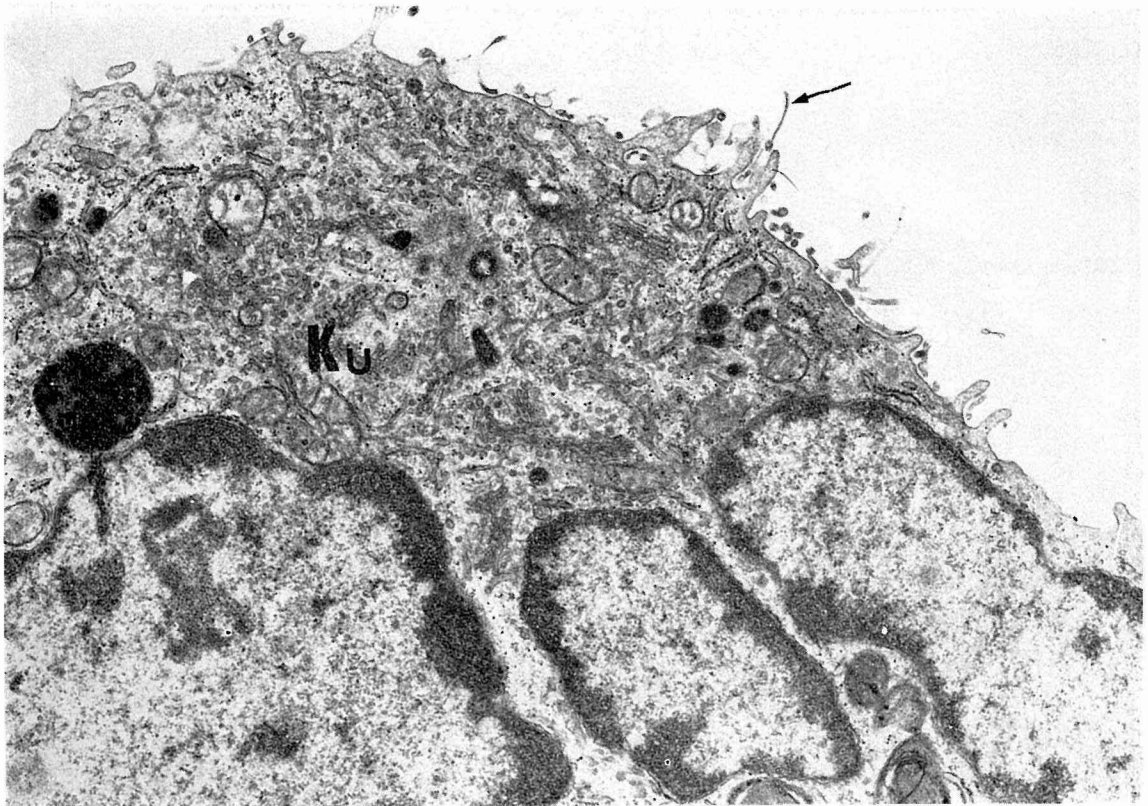


Fig. 12

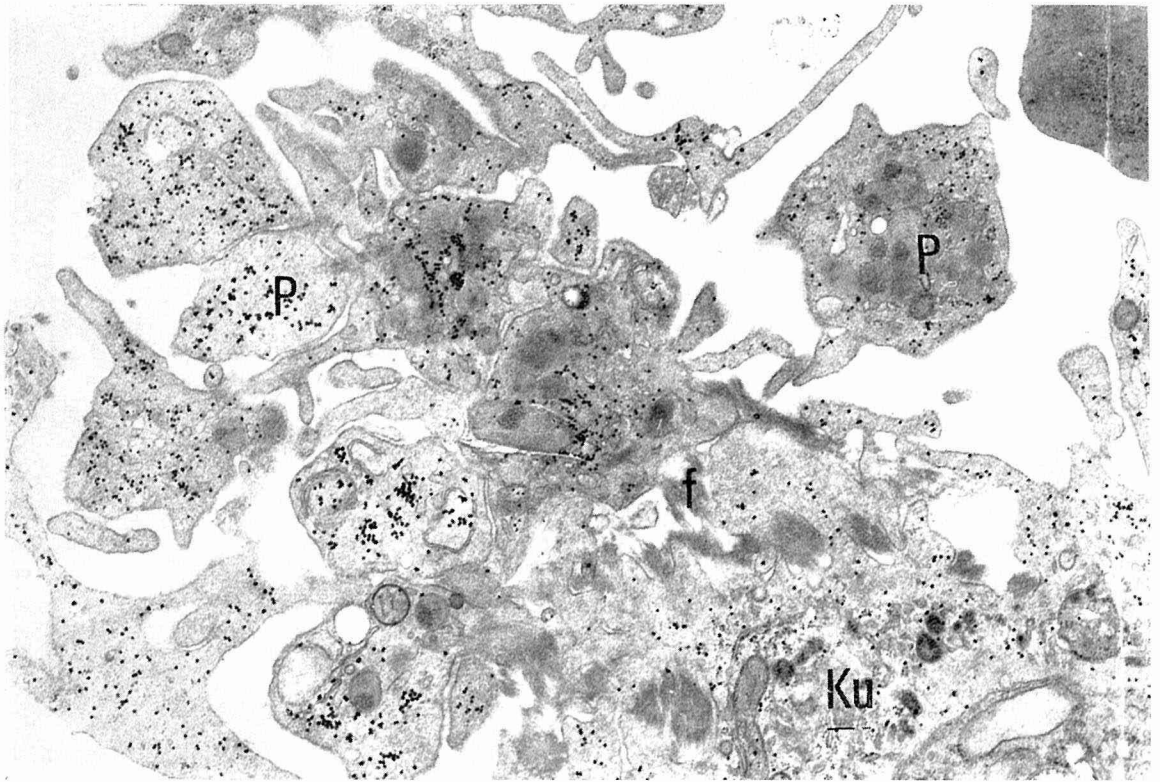


Fig. 13

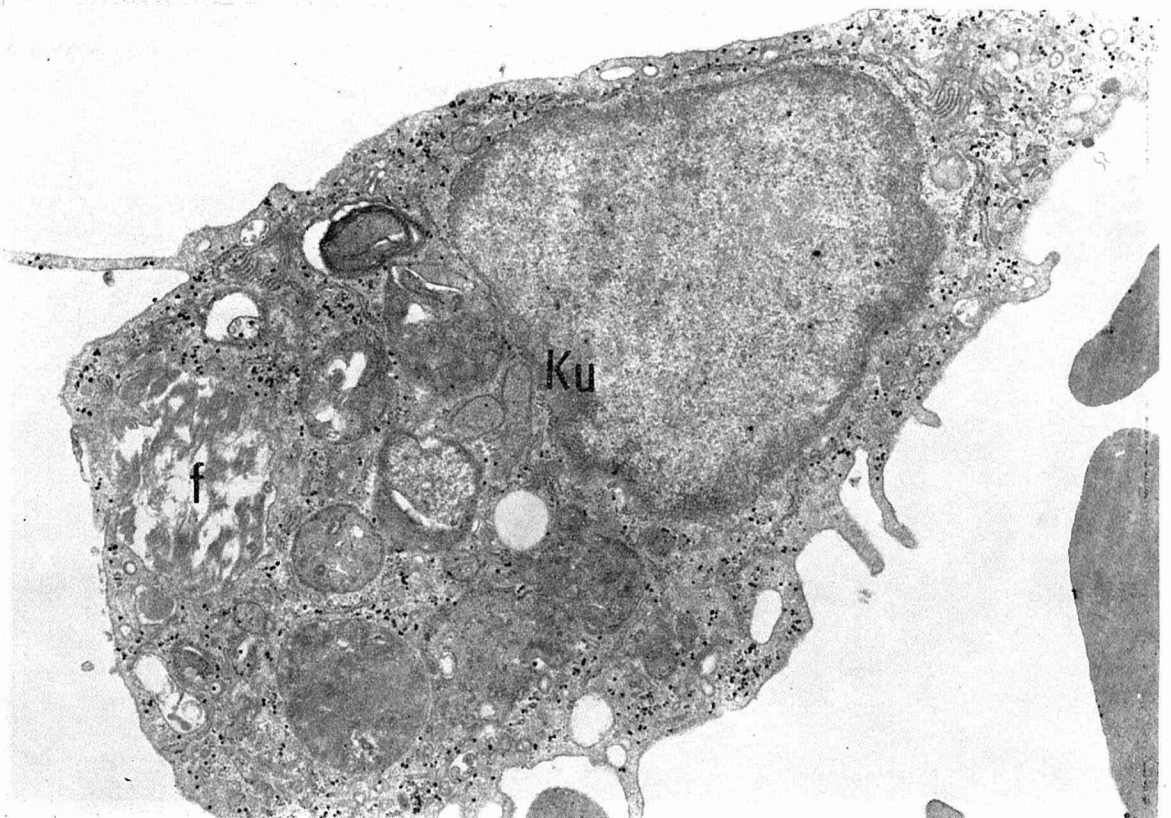


Fig. 14

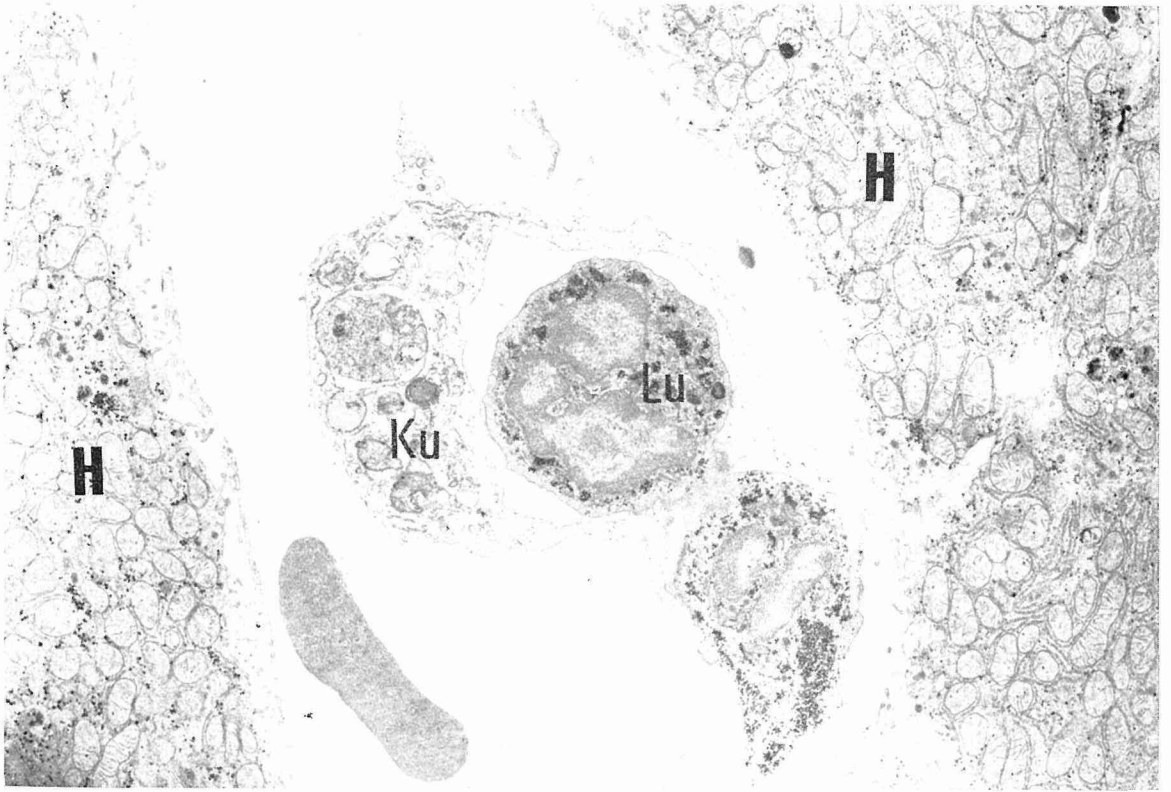


Fig. 15

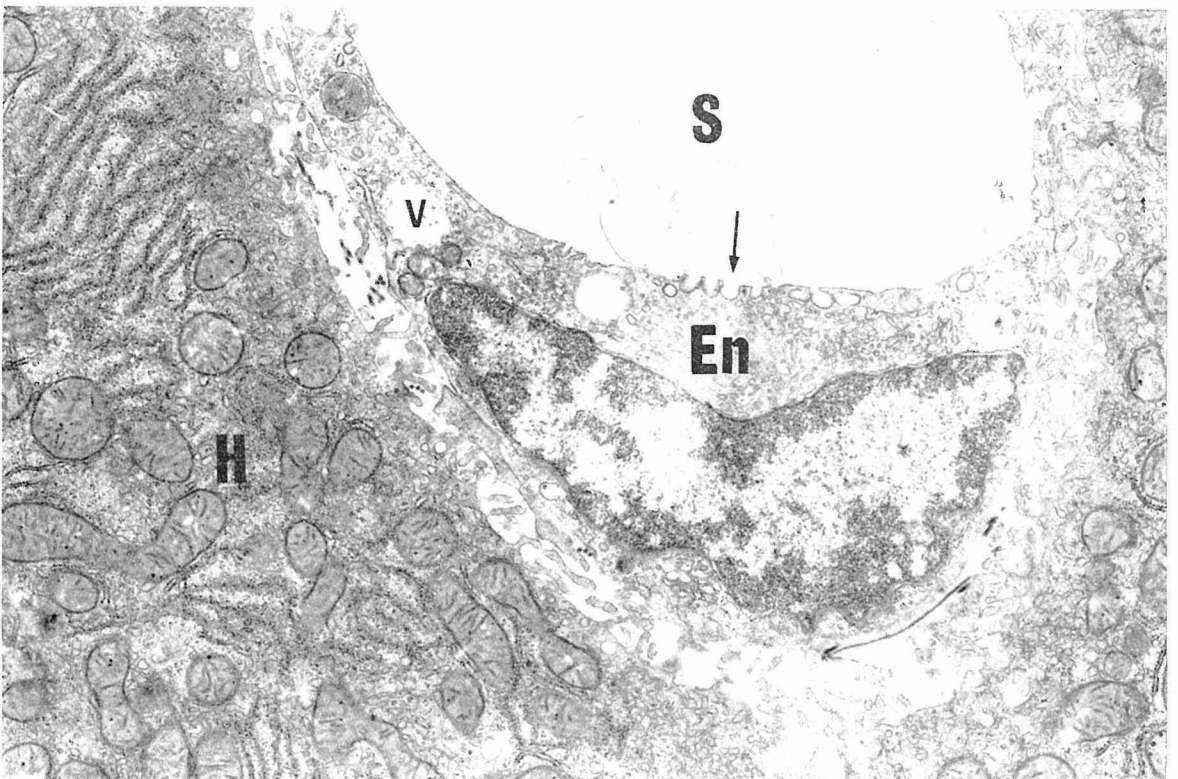


Fig. 16



Fig. 17

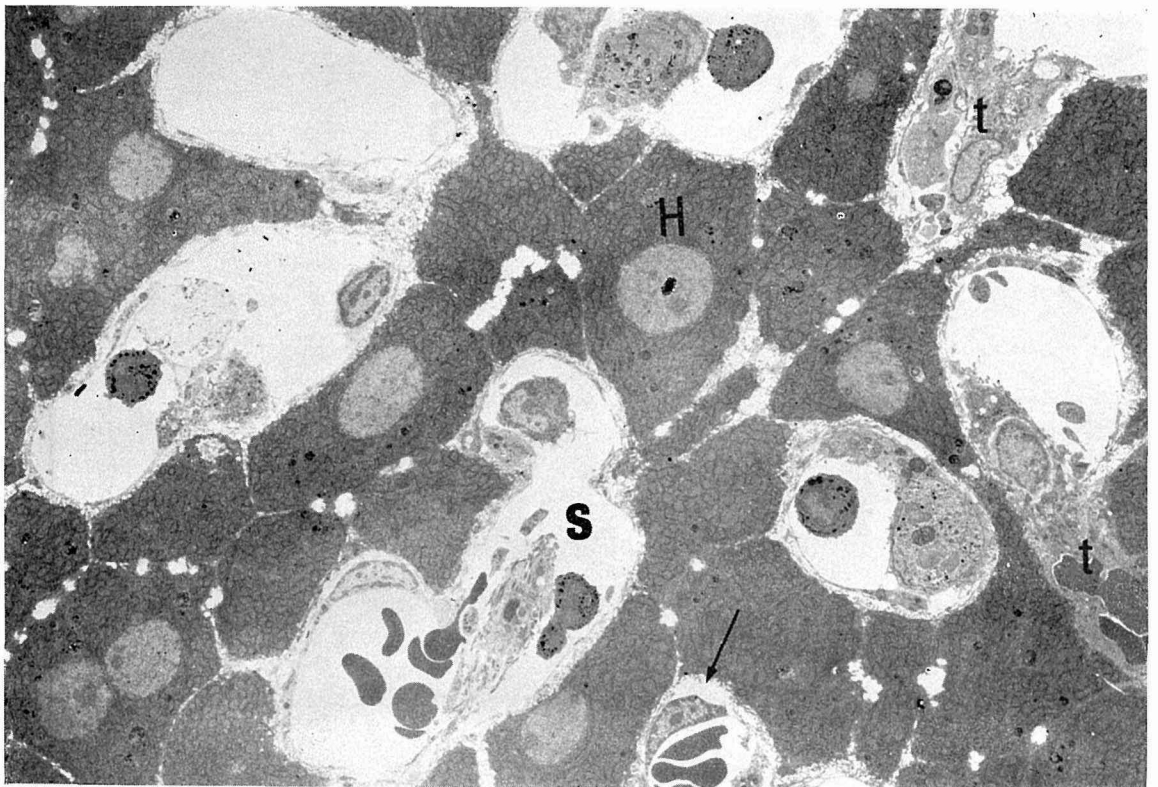


Fig. 18

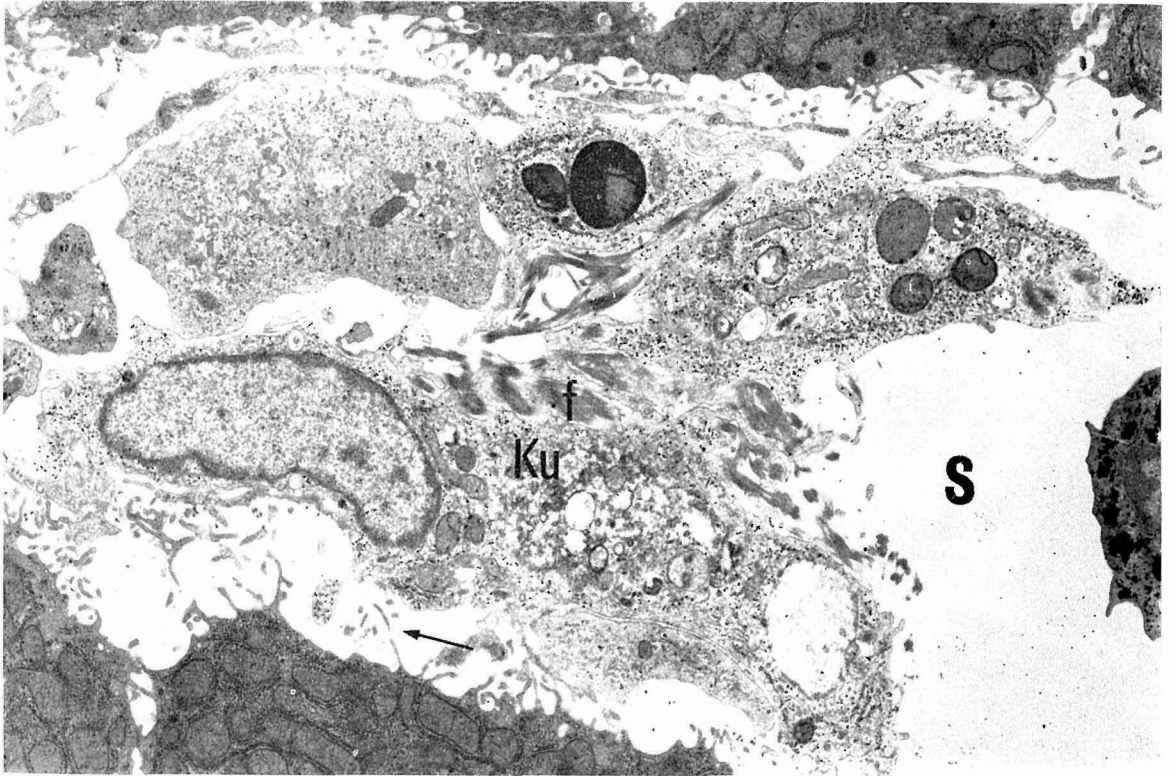


Fig. 19

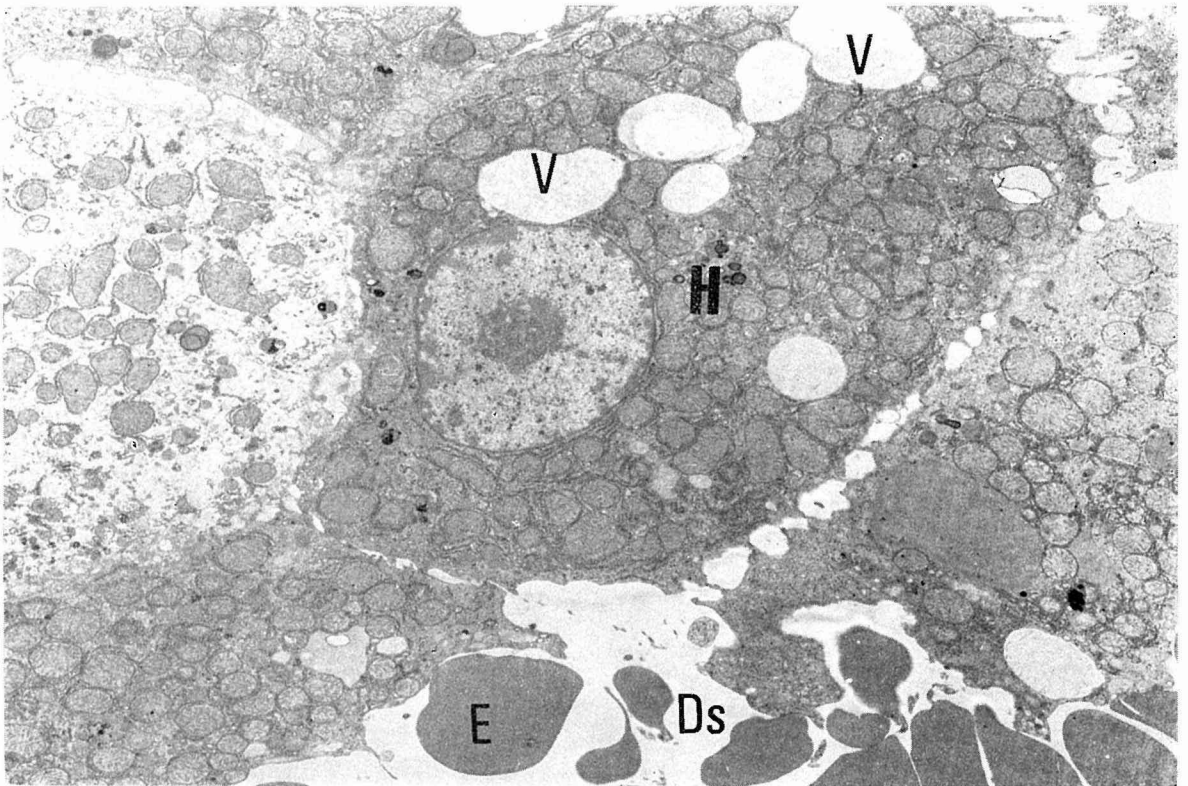


Fig. 20

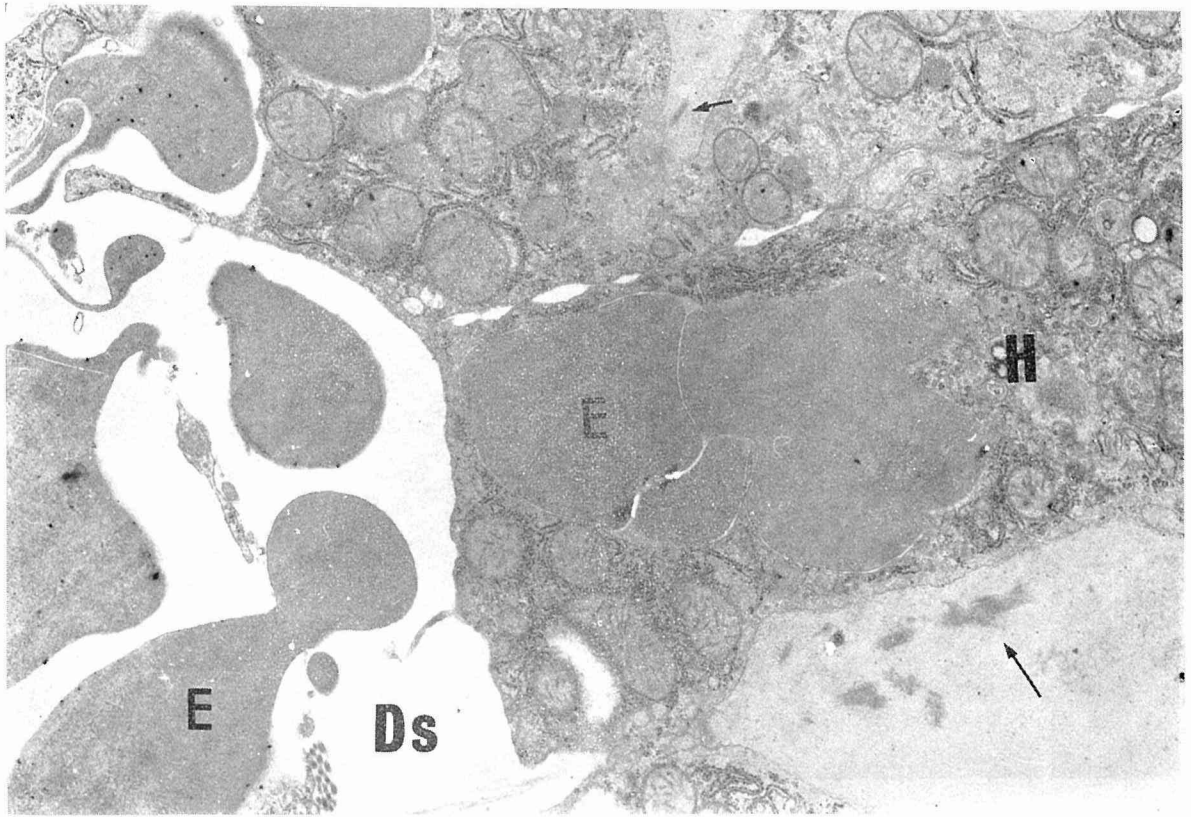


Fig. 21

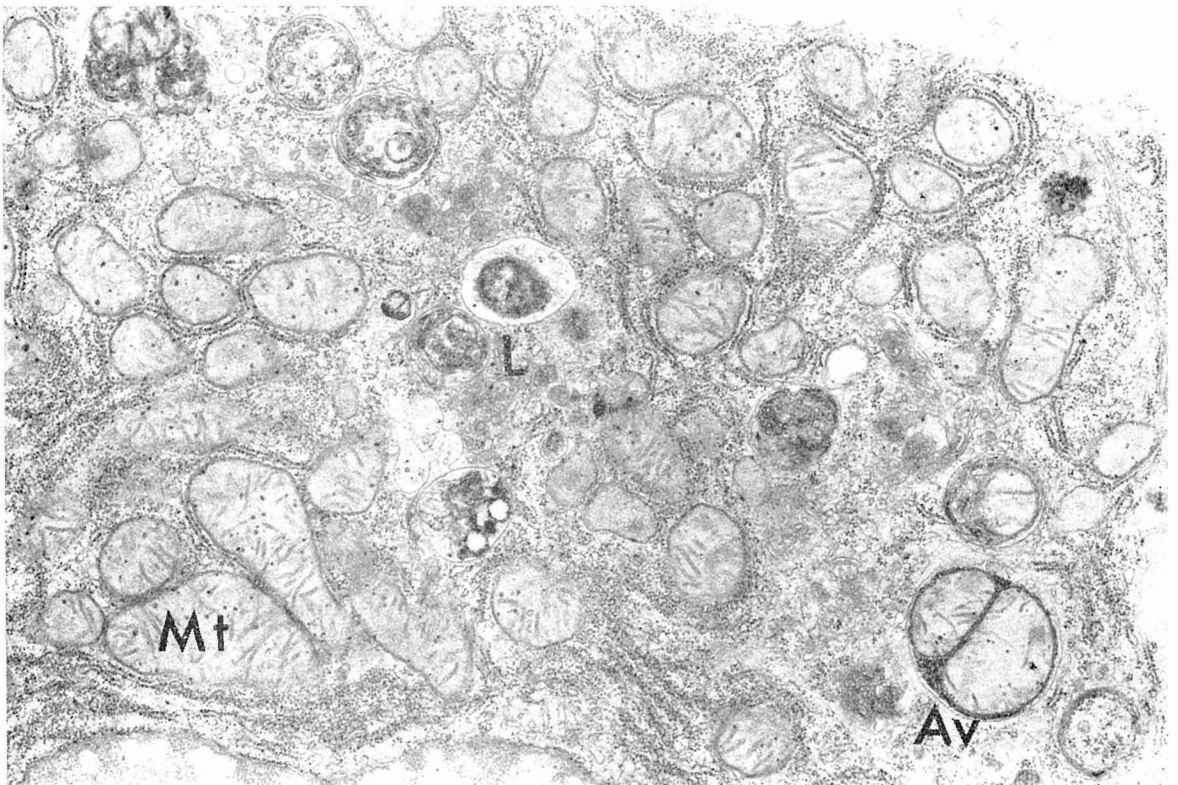


Fig. 22

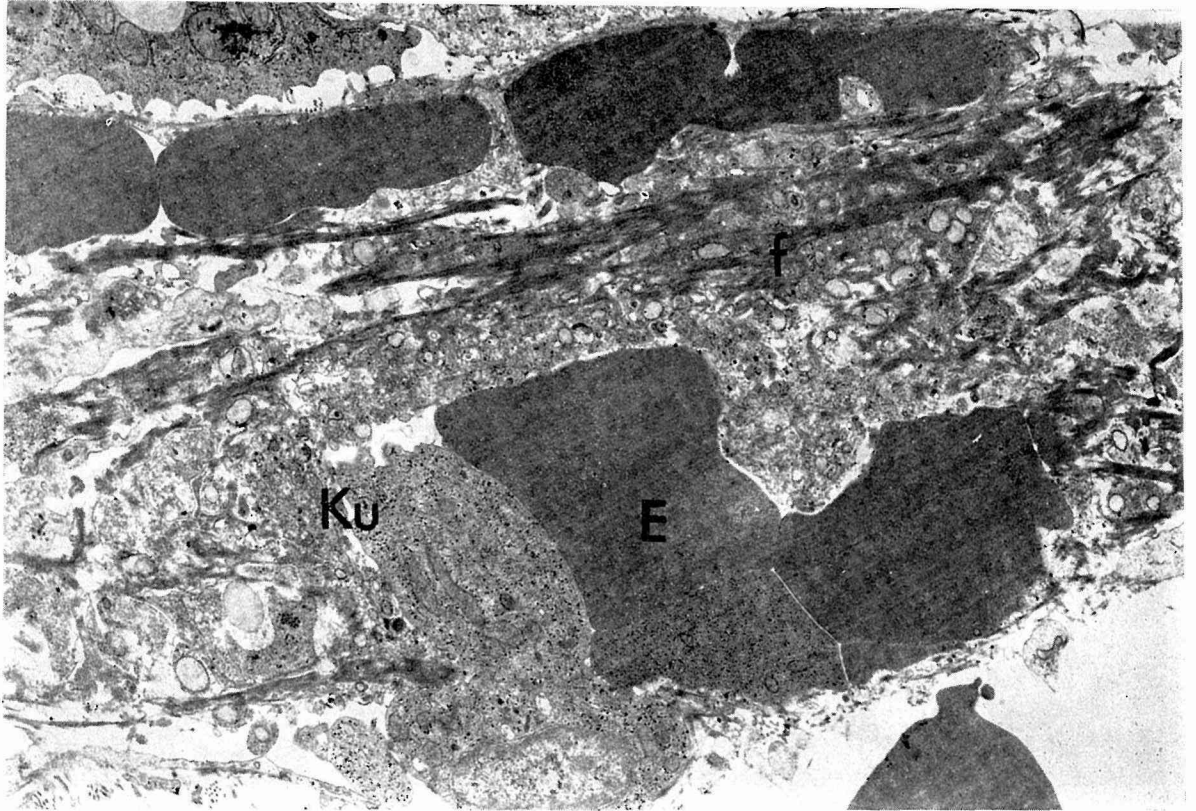


Fig. 23

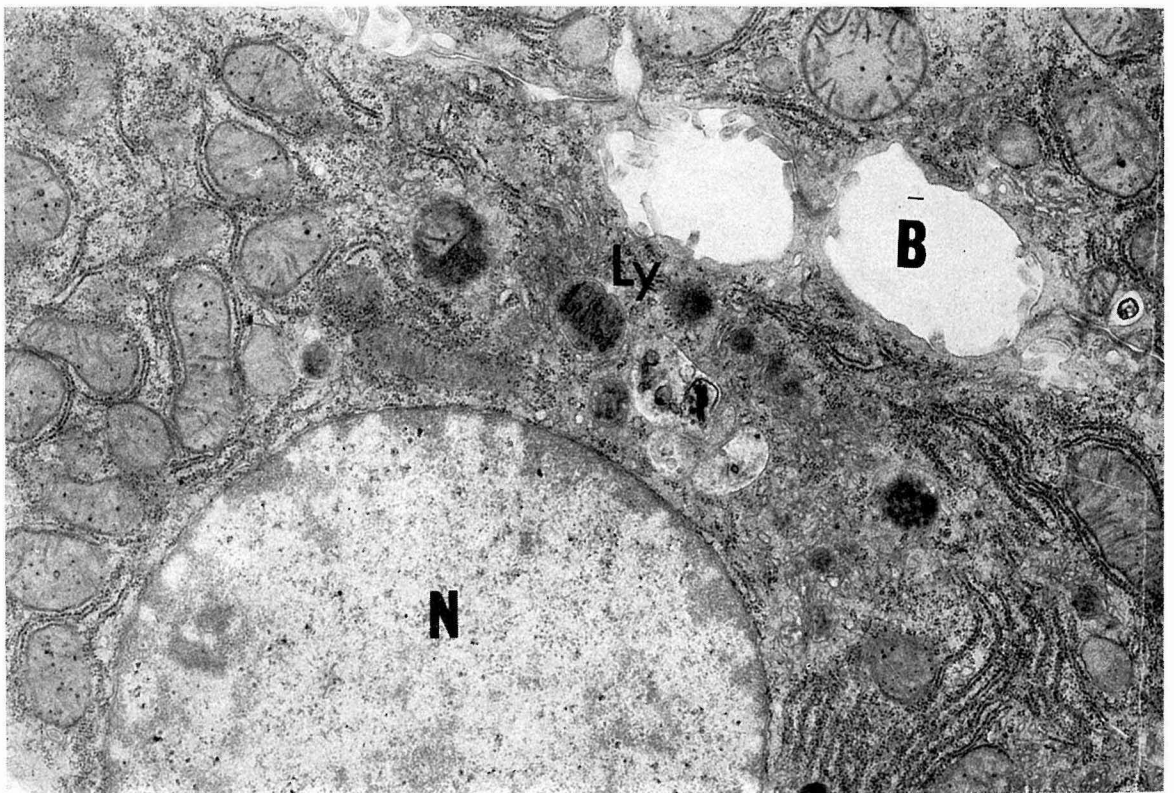


Fig. 24

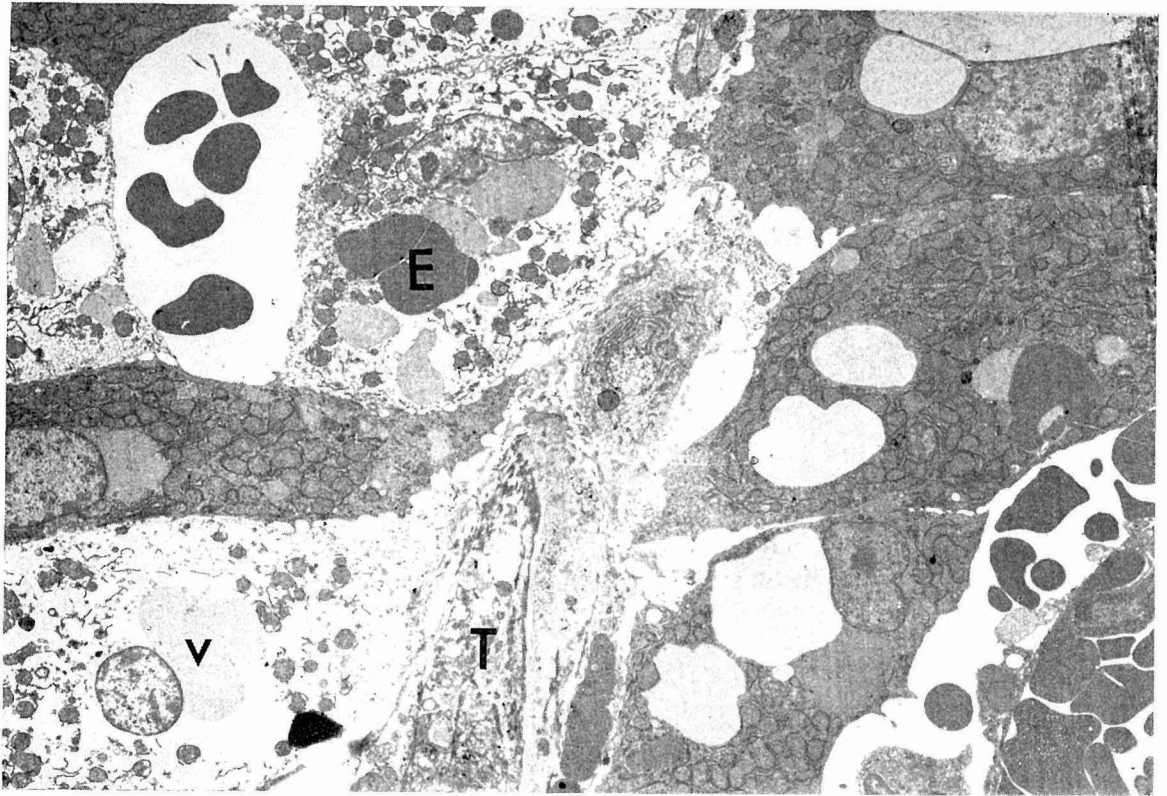


Fig. 25

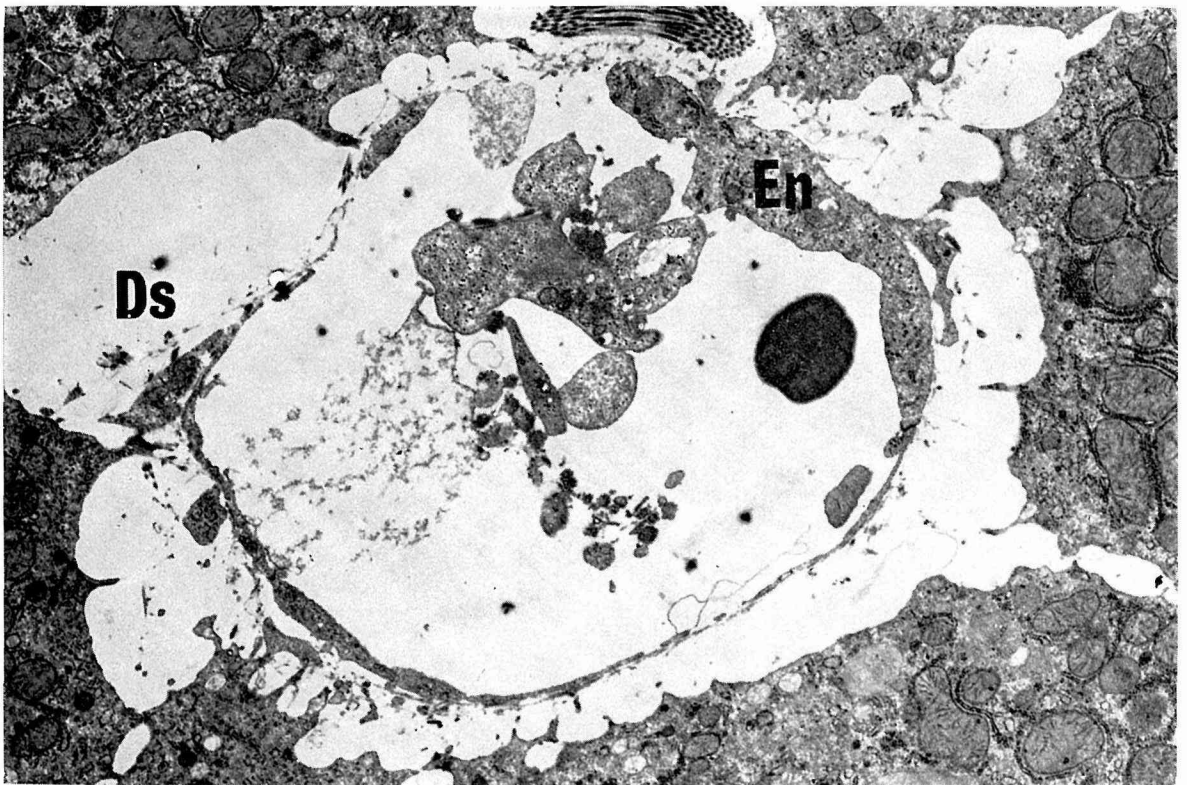


Fig. 26

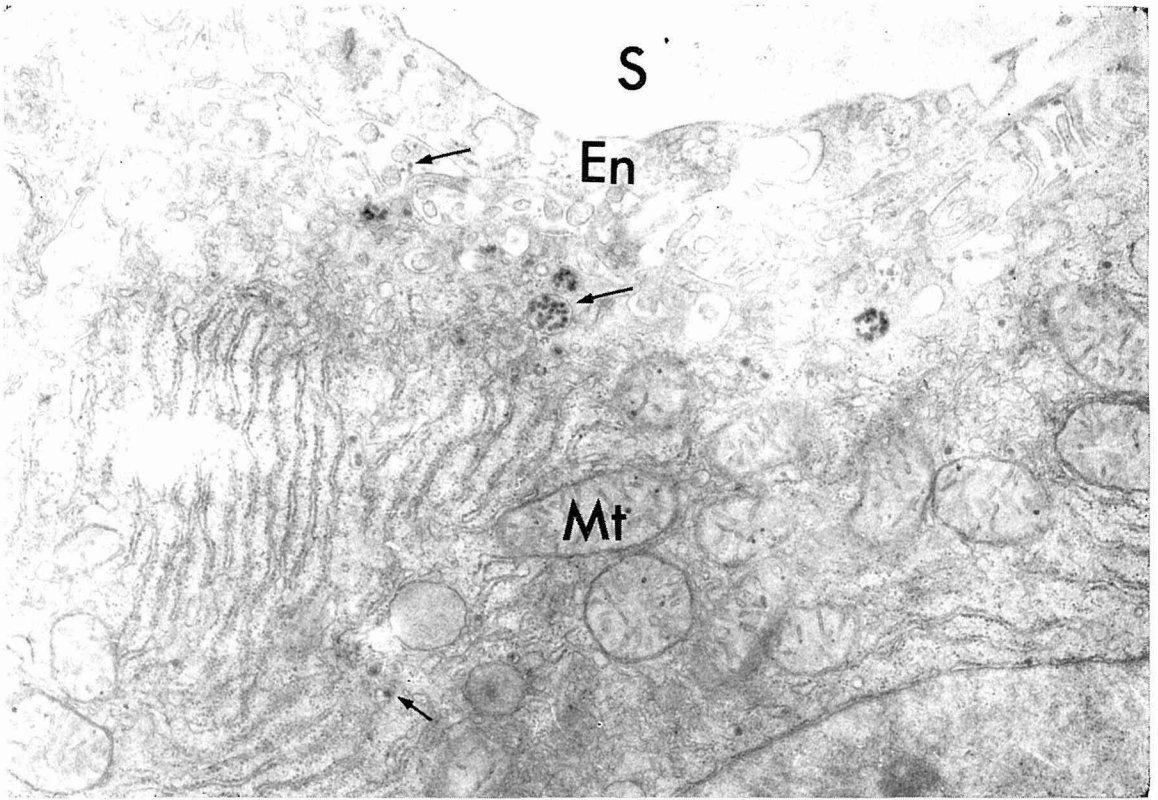


Fig. 27