

# 毛細胆管周囲性マイクロフィラメントに 関する電子顕微鏡的研究

新潟大学医学部内科学第三教室 (主任: 市田文弘教授)

川村 正

Electron Microscopic Study of Pericanalicular Microfilaments  
in the liver with Intrahepatic Cholestasis

Tadashi KAWAMURA

3rd Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine  
(Director: Prof. Fumihiko ICHIDA)

Ultrastructural observation was made in the liver of 20 patients with acute intrahepatic cholestasis and rats with cholestasis induced by Na-tauroolithocholate in order to elucidate the role of pericanalicular microfilaments on intrahepatic cholestasis. The correlation between the alterations of pericanalicular microfilaments and the alterations of bile canaliculi membranes, their surface coat (ruthenium red-positive surface coat, RRSC) and membrane specific  $Mg^{++}$ -activated adenosine triphosphatase ( $Mg^{++}$ -ATPase) activity was examined.

This study demonstrated that in acute intrahepatic cholestasis in men the shapes of pericanalicular microfilaments became shortened or granular at an early stage, and at the later stage they took the shapes of filamentous meshwork. The study also showed that in experimental cholestasis two types of bile canaliculi—one with shortened or granular pericanalicular microfilaments and the other with increased filamentous ones—were observed and RRSC and  $Mg^{++}$ -ATPase activity on both of them decreased.

These findings suggest that dysfunction of pericanalicular microfilaments disturbs contractibility of bile canaliculus and can be a possible cause of intrahepatic cholestasis.

Key words: intrahepatic cholestasis, pericanalicular microfilaments,  
肝内胆汁うっ滞, マイクロフィラメント

## はじめに

近年, 肝細胞内の線維性構造物を細胞骨格 cytoskeleton と総称し, 形態や性状を異にする三種類の線維性要素から成っていることが明らかになった<sup>1) 2)</sup>. これら三要素の中で最も細い 5~7nm の径を有するマイ

クロフィラメントは, 電顕的 heavy meromyosin (HMM) 法<sup>3)</sup>, 蛍光抗体法や酵素抗体法<sup>4-7)</sup>, HMM に蛍光物質を標識する方法<sup>8) 9)</sup>などによって g-アクチンの重合した f-アクチンであるといわれている. このアクチンフィラメントは, 肝細胞内では毛細胆管周囲に豊富に存在することから, 細胞質内から毛細胆管腔への物

Reprint requests to: Tadashi Kawamura,  
Nagaoka Red Cross Hospital, Nagaoka  
City, 940, JAPAN.

別刷請求先:

〒940 長岡市日赤町2丁目6番1号  
長岡赤十字病院 川村 正

質輸送、とくに胆汁排泄との関連を有する小器官として注目されている<sup>10)-20)</sup>。

著者は、胆汁排泄の遅延ないし停滞した状態、すなわち胆汁うっ滞時のマイクロフィラメントの形態ならびに機能的変化を知る目的で、臨床的急性肝内胆汁うっ滞および実験的肝内胆汁うっ滞の肝組織を用いて、電顕的ならびに電顕組織化学的に検討したのでその概要を報告する。

### 対象ならびに方法

#### 1. 急性肝内胆汁うっ滞例

肝生検により急性肝内胆汁うっ滞(純型、混合型)と組織診断した20例を対象とした。うち薬剤性15例、ウイルス性5例であり、年齢は19~77才、男性16例、女性4例であった。肝組織は、黄疸出現後最短5日目、最長391日目に全例とも腹腔鏡下針生検にて採取した。(Table 1) 採取した20例20生検肝組織を電顕的に観察し、その結果を黄疸出現から肝生検までの期間により20日以内をI群、21日以後50日以内をII群、50日を越える症例をIII群として検討した。

Table 1 Subjects

Cases	Etiology	T-Bil (mg/dl)		Duration from onset to Bp.(days)
		at Bp.	max.	
1. S.A. 33.M.	virus	5.7	5.7	5
2. M.T. 65.M.	drug	44.0	60.0	14
3. A.N. 38.M.	drug	5.0	12.4	15
4. I.Y. 58.F.	drug	4.3	6.5	15
5. S.Z. 77.M.	drug	13.9	13.9	19
6. H.E. 31.F.	virus	8.8	11.5	20
7. K.S. 74.M.	drug	5.4	8.7	23
8. K.K. 41.M.	virus	3.8	7.2	25
9. M.K. 56.M.	drug	2.2	3.4	27
10. Y.T. 31.F.	drug	14.4	14.4	30
11. S.I. 62.M.	drug	10.4	12.7	30
12. N.K. 24.M.	drug	10.0	21.6	42
13. S.T. 55.M.	drug	6.0	6.8	45
14. K.C. 69.M.	virus	2.0	12.0	47
15. N.T. 64.M.	drug	3.3	13.2	62
16. Y.S. 48.M.	virus	10.0	19.6	84
17. Y.T. 19.M.	drug	20.0	64.8	90
18. K.K. 42.M.	drug	7.4	9.5	120
19. S.T. 23.F.	drug	2.6	23.2	133
20. H.S. 39.M.	drug	9.5	22.0	391

#### 2. 実験的急性肝内胆汁うっ滞

Wistar 系雌性ラット(体重 150~200g)を用い、Nembutal (30mg/kg) 麻酔下に総胆管に挿入したカ

テテル(PE50)から流出する胆汁流量(control bile flow)を3時間測定した後、別に腸間膜静脈枝に挿入したカテテル(PE10)から、Na-タウロリトコール酸(Na-TLCA)を30%ヒトアルブミン、プロピレングリコール、5%ブドウ糖に溶解し、Na-TLCAを0.2μM/min/体重100gの一定速度で持続注入して肝内胆汁うっ滞を作製した。肝組織は、Na-TLCA注入の15分、30分、45分、60分、120分および180分後に、下大静脈を切離し0.15M、4°Cの食塩水で圧120mmH<sub>2</sub>O、2分間経門脈的に肝灌流後採取した。

#### 3. 電子顕微鏡的観察方法

臨床例およびラットより得た肝組織の一部を採取直後に約1mm<sup>3</sup>大に細切し、2%グルタルアルデヒド60分間、2%オスミウム酸120分間固定後アルコール系列で脱水し、Epon-812で包埋した。超薄切片作製後、ウラニール、鉛の2重染色を施してHS-9電子顕微鏡で観察した。

#### 4. Ruthenium red (RR) 染色法

臨床例およびラットから採取した肝組織の一部を約1mm<sup>3</sup>大に細切し、2~4°Cの冷蔵室内で、100mM KCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、6mM Na-phosphate 緩衝液(pH7.0)から成る標準塩溶液で希釈して50%としたグリセロール液で24時間、次いで同様に希釈した25%グリセロール液で12時間、さらに5%グリセロール液で30分間処理した後、標準塩溶液のみで30分間づつ3回洗浄した。その後Luft法<sup>21)</sup>に従ってRR染色を施した。すなわち、2%グルタルアルデヒドにRRを2,000ppmとなるように加えて肝組織を60分間固定し、次にNa-phosphate 緩衝液(pH7.0)に2,000ppmのRRを加えて90分間洗浄、さらに2,000ppmのRRを加えた2%オスミウム酸で180分間固定した。アルコール系列で脱水する際にウラニールのブロック染色を施し、Epon-812で包埋し薄切後鉛染色を施行して電顕的に観察した。

#### 5. 毛細胆管分画採取法

毛細胆管(BC)分画の採取は、通常電顕およびRR染色に用いた残りのラット肝を用い、Song法<sup>22)</sup>の変法であるFisher法<sup>23)</sup>に従って行なった。

すなわち、切離直前に0.15M、4°Cの食塩水で経門脈的に灌流したラット肝を0~4°Cに冷したビーカー内で細切後、肝組織の2倍量の1mM NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液(pH7.5)を加え、Dounce ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートに同じ緩衝液250mlを加えた後4枚の外科ガーゼで2回濾過し、濾液を500g、

5分間、さらに100g、10分間遠心し、採取したペレットに同じ緩衝液250ml加え攪拌後、1,000g、10分間遠心してペレットをつくり、ペレットに肝重量とほぼ同量(約8ml)の緩衝液を加えて軽く振盪してサスペンションを作った。このサスペンションに肝重量の5.5倍量の70.74% W/V (比重1.26)の蔗糖液を加えて、Dounceホモジナイザーで軽くホモジナイズし、このサスペンションの比重が1.22であることを確認後、その15mlをスピスコ(No. 30 rotor)用 cellulose nitrate チューブに容れ、さらに48.45% W/V (比重1.18)7ml、42.90% W/V (比重1.16)5mlの蔗糖液を重層し、66,000g、60分間超遠心した。その後、比重1.16と1.18の蔗糖液の間に集めた灰白色の分画をシリンジで採集し、その4倍量の緩衝液を加えて1,000g、5分間遠心して得られたペレットを毛細胆管分画として、RR染色ならびに以下の $Mg^{++}$ -ATPaseの電顕的細胞化学用試料とした。

#### 6. $Mg^{++}$ 依存性 Adenosine-triphosphatase

( $Mg^{++}$ -ATPase)の電子顕微鏡的染色法

ラット肝から採集したBC分画を用いて、Boyerら<sup>24)</sup>の方法に準じて $Mg^{++}$ -ATPaseを細胞化学的に

染色した。すなわち、BC分画を含んだペレットを0.06M Cacodylate 緩衝液(pH 7.4)で緩衝した1.2% グルタルアルデヒドで0°C、60分間前固定した後、0°C、0.08M Tris-maleate 緩衝液(pH 7.2)で数回洗浄し、さらに同様の緩衝液中に0°C、12時間留めてから、Wachstein-Meisel液<sup>25)</sup>に準じて調製した反応液—2mM. ATP·Na<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, 80mM. Tris-maleate 緩衝液, 10mM. MgCl<sub>2</sub>, 2mM. Lead nitrate, 234mM 蔗糖液を含む—反応液で、20°C、10分間反応させた。その後、0°C、3,000rpm、5分間遠心して生じたペレットを234mMの蔗糖を含む0.08M Tris-maleate 緩衝液で洗浄し、さらに0°C、3,000rpm、5分間遠心した。採集したペレットを小片に細切後、0.1M Cacodylate 緩衝液(pH 7.4)で緩衝した2%オスミウム酸で、0°C、60分間後固定した。アルコール系列で脱水後、Epon-812に包埋し、超薄切片に鉛染色を施して電顕的に観察した。

#### 成 績

##### 1. 急性肝内胆汁うっ滞例における成績

急性肝内胆汁うっ滞時の肝臓の電顕的変化を、黄疸出

Table 2 Summary of ultrastructural changes in human liver with acute cholestasis

Ultrastructural changes		overt cholestasis (from onset)		
		I (←→20)	II (21→→50)	III (51 days→→)
Hepatocytes	Bile canaliculi			
	Dilation	+	++	++
	Bile thrombi	+	++	++
	Microvilli			
	Shortened, Bleb			
	Loss	+	++	++
	Pericanalicular zone			
	Ectoplasm, prominent	+	++	+
	Microfilaments	+	++	+
	Golgi, prominent	+	+	+
	Lysosome, increased	++	++	++
	Cytoplasm			
	SER, increased	++	++	+
	Changes of mitochondria	++	++	+
Bile imbibition	++	++	+	
Biliary Epithelial Cells	+	+	+	

0: no change, ±: mild change +: moderate change, ++: marked change

現から肝組織採取の期間によって3群に分け一括して Table 2 に示した。すなわち、I群（5日～20日までの6例、血清総ビリルビン値は、最高値 5.7～60.0mg/dl、平均 18.3mg/dl、肝生検時 4.3～44.0mg/dl、平均 13.6mg/dl）では、毛細胆管（BC）の多くは中等度の管腔拡張を示したが、拡張がない BC も少なくなかった。BC の管腔は黄疸発現からの日数に平行して拡張する傾向を示し、微絨毛（Mv）はそれに伴って減少ないし消失した。毛細胆管周囲細胞質（Ect）は、管腔の拡張に伴い電子密度の増加と肥厚を示したが、多くは電子密度の増加を示すにとどまり、この部位で観察した毛細胆管周囲性マイクロフィラメント（BCMF）は短小化ないし顆粒状を呈し、線維状の BCMF の増加はこの時期には軽度であった（Fig. 1a）。注目された所見は、毛細胆管膜（BCM）が正常で管腔の拡張のない BC の中には、すでに Ect の電子密度の増加を示すものがあり、このような部位では BCMF は顆粒状を呈していた（Fig. 1b）。II群（23日～47日までの8例、血清総ビリルビン値は、最高値 3.4～21.6mg/dl、平均 10.9mg/dl、肝生検時 2.0～14.4mg/dl、平均 6.8mg/dl）では、BCM、BCMF ともに最も顕著な変化を示し、ほとんどの BC 管腔は高度に拡張し、Mv は完全に消失し、Ect は電子密度の増加と肥厚を示した。また BCMF は、線維状で著しく増加していた（Fig. 2a）。グリセロール処理後の RR のブロック染色では、かかる BC では RR 染色で陽性の細胞膜外葉を被う多糖体の表層物質（Ruthenium red positive surface coat, RRSC）は、隣接する肝細胞同志が接する面（lateral cell surface）から tight junction 部に至るまで陽性を示すにも拘らず、BCM の RRSC は完全に脱落していた（Fig. 2c）。また、正常の Ect には BCMF のほかに amorphous matrix だけを観察したにすぎないが、この時期の Ect には多数の pinocytic vesicles を観察し、逆 pinocytosis を示す BC も少なくなかった（Fig. 2b）。III群（62～391日までの6例、血清総ビリルビン値は、最高値 9.5～64.8mg/dl、平均 25.4mg/dl、肝生検時 2.6～20.0mg/dl 平均 8.8mg/dl）では、高度の黄疸が持続している症例における BC の変化は、II群のそれと同様な所見を呈し、BCMF は線維状でかつ増加していた。黄疸の軽減を示す回復期の症例における BC は、管腔の程度に関係なく Ect の肥厚は軽度となり、BCMF は線維状を呈していたが、長期例（症例 20）では、BCMF は線維状を示すのみならず、顆粒状あるいは束状を呈していた（Fig. 3）。この群では、BCM

の変化の割には BCMF の増加は II 群に比し軽度となる傾向があり、Ect での pinocytic vesicles も減少していた。

## 2. 実験的急性肝内胆汁うっ滞における成績

### 1) 胆汁流量の変化

Na-TLCA 投与による胆汁うっ滞時の胆汁流量は、注入前の control bile flow  $217.8 \pm 24.2$  (mg/hr/体重 100g) に対して、注入開始後15分間で 48.9% ( $106.5 \pm 17.1$ ) に減少した後、漸次胆汁流量の減少率は低下し、180分後には 6.2% ( $13.5 \pm 3.7$ ) にまで減少した（Fig. 1）。

### 2) 電子顕微鏡的所見

Na-TLCA 惹起胆汁うっ滞時の肝組織の電顕的变化を Table 3 に示す。すなわち、細胞質内では、Na-TLCA 注入 15～30分後から Golgi 複合体、ライソゾーム、滑面小胞体が増加し、BC 管腔内と細胞質内に針状構造物が出現した。一方、BCM と BCMF の変化については、Na-TLCA 注入後30分より出現し60分以後に顕著となった。観察できた BC には 2 型あり、I 型では管腔が拡張し、Mv が減少ないし消失し、Ect の肥厚は乏しく BCMF は顆粒状を呈していた（I 型 BC, Fig. 4a）。他の変化としての II 型では、BCM がタマネギ様に層状変化し、BCMF が線維状で著明に増加していた（II 型 BC, Fig. 5a）。

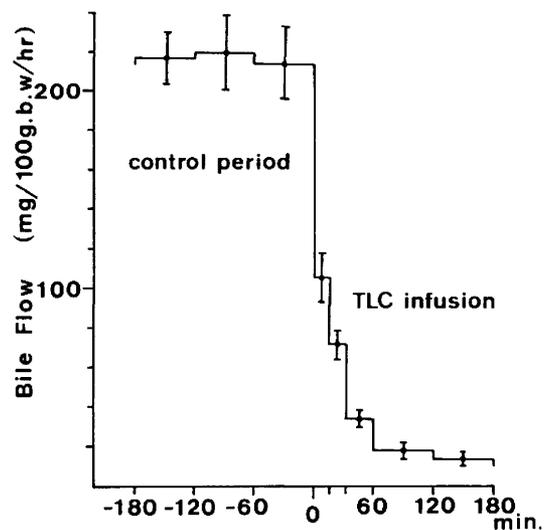


Fig. 1 Effect of tauroolithocholate on bile flow

Table 3 Summary of ultrastructural changes in rat liver with TLCA-induced cholestasis

Ultrastructural changes	Control	15min.	30min.	45min.	60min.	120min.	180min.
Bile canaliculi							
Dilation	0	0	±	±	+	++	++
Diverticula	0	0	+	+	+	+	+
Microvilli							
Loss	0	±	±	+	+	++	++
Lamellar transformation	0	0	+	++	++	+	+
Crystalline deposit	0	0	+	+	+	+	+
Pericanalicular zone							
Ectoplasm, prominent	0	0	+	++	++	+	+
Golgi, prominent	0	±	+	+	+	+	+
Lysosome, increased	0	±	+	+	+	+	+
Crystalline deposit	0	0	+	+	+	+	+
Cytoplasm							
SER, prominent	0	0	±	±	+	+	++
Crystalline deposit	0	0	±	+	+	±	±
Large clear vacuoles	0	0	0	±	+	++	++
Biliary epithelial cells	0	0	0	±	±	±	±

0: no change, ±: mild change, +: moderate change, ++: marked change.

### 3) 毛細胆管分画の電子顕微鏡的所見

ラット肝組織の BC 分画の収量は、一匹当たり平均 2.8mg (肝重量の約 0.03%) で、この BC 分画を電顕的に観察すると、内腔が円形ないし類円形を呈して拡張し、周囲に BCMF をほとんど認めない BC (Fig. 4b) と、内腔が不規則に変形し、周囲に BCMF の密なネットワークを有する BC (Fig. 5b) の 2 種類の BC を認めた。前者を I 型 BC、後者を II 型 BC に相当するものと考えた。また、BC 分画の RR 染色ならびに  $Mg^{++}$ -ATPase の細胞化学的処理後の観察では、正常の BC においては、BCM に RRSC と  $Mg^{++}$ -ATPase 活性を認め、とくに  $Mg^{++}$ -ATPase は、BCM (Mv) を縁取るように存在し、BCM 以外の部位には染色性を認めなかった (Fig. 6b)。これに比し、I 型 BC、II 型 BC ともに BCM の RRSC、 $Mg^{++}$ -ATPase 活性は明らかに低下ないし消失していた (Fig. 6c)。

### 考 察

マイクロフィラメントは、微小管、中間径 (10nm) フィラメントとともに細胞の構造形態を支持する細胞骨格の主要細胞質線維要素として存在し、ほとんどすべて

の細胞に多少を問わず見出される<sup>1) 2) 26)</sup>。マイクロフィラメントは、他の線維要素と別個に独立して存在することもあるが、多くは相互に関連して高次の構造形態を形成している。マイクロフィラメントは、筋細胞、非筋細胞を問わず動きの活発な細胞や細胞質内の一部に豊富に存在している。肝細胞のマイクロフィラメントは、細胞表層部、とくに BC 周囲に豊富に存在し、一端は BC を構成する細胞膜に<sup>27) 28)</sup>、他端は枝分かれして intermediate junction に接合している<sup>3) 4)</sup>。また、細胞質内の中間径フィラメントにも結合していることが明らかにされ<sup>29) 31)</sup>、これらの結合部位を支点として毛細胆管の収縮に関与していることが示唆されている。

一方、実験的肝内胆汁うっ滞時の BCM や BCMF の超微形態の変化や細胞化学的側面あるいは生化学的側面から検索した細胞膜酵素活性の変化の成績を通して、胆汁うっ滞の成立には、BCM や BCMF の形態ならびに機能的変化が不可欠であり、換言すれば、胆汁排泄には少なくとも BCM と BCMF が正常な形態と機能を維持する必要があることを示している<sup>32)</sup>。このように、BCMF が胆汁排泄と密接な関連を有していることは否めないが、ヒトに関しては未だ十分な検索がなされてい

るとはいえない。そこで、急性肝内胆汁うっ滞例の経時的な肝臓の電顕的变化を実験的肝内胆汁うっ滞時の電顕的ならびに細胞化学的变化と比較検討し、ヒトにおける BCMF の胆汁排泄に果たす役割を解析した。

急性肝内胆汁うっ滞の早期の症例(症例1)では、BCM (Mv) が形態的に正常でありながら、Ect の電子密度の増加と BCMF の顆粒状がみられた。この所見は、Ajmalin 起因性肝内胆汁うっ滞の2症例から再投与試験直後に得られた肝組織にも観察できた<sup>33)</sup>。すなわち、大部分の BC は、管腔の拡張、BCM の変化に乏しくほぼ正常 BC と同所見を呈していたが、Ect は随所で電子密度を増し BCMF は顆粒状を呈していた。かかる BCMF の顆粒状変化は肝内胆汁うっ滞時の最も早期に起こる変化と考えられる。黄疸発現早期の症例(I群)では Mv が減少するのに伴い BC 管腔が拡張し、Ect は電子密度を増して肥厚し、BCMF の変化も顕著となったが、BCMF は早期例ほど顆粒状のものが主体を成し、経過とともに線維状のものが増加する傾向にあった。この時期の BCMF に対応する Na-TLCA 投与後の BCMF の変化は、早期例では I 型 BC、経過とともに II 型 BC の周囲の BCMF に相当する所見と考える。また、BC 分画法を用いた観察結果では、I 型 BC、II 型 BC とともに RRSC、Mg<sup>++</sup>-ATPase 活性は著しい低下ないし消失を示した。

次に、急性肝内胆汁うっ滞のやや経過した症例(II群)では、著しく拡張した BC 周囲の Ect の肥厚は線維状に増加した BCMF で占められ、この変化はグリセロール処理によって Ect の amorphous matrix を除去することで一層明瞭に観察できた。この時期の BCMF は動物実験上の II 型 BC の周囲に観察した BCMF と対応する所見と考えた。

長期間経過した症例(III群)では、BCMF の変化は II 群に比して軽減する傾向にあった。高度な黄疸が持続している症例でも、BCM の変化が高度でありながら BCMF は II 群より減少し、一部に顆粒状の形態を示すものも混在していた。回復期の症例では、BCM、BCMF とともに変化は軽度になり、BCMF は線維状のものが主体であった。この時期の BCMF は、動物実験では主として II 型 BC の BCMF に類似点が求められる。

急性肝内胆汁うっ滞例における BCMF の変化を、黄疸の強さと黄疸発現からの期間との関連性から検討すると、Fig. 2 のように黄疸発現からの期間に大きく影響されることが明らかになった。

また、再投与試験直後から黄疸発現後 391 日目を得られた肝組織の BCMF の一連の形態変化を通して、肝内

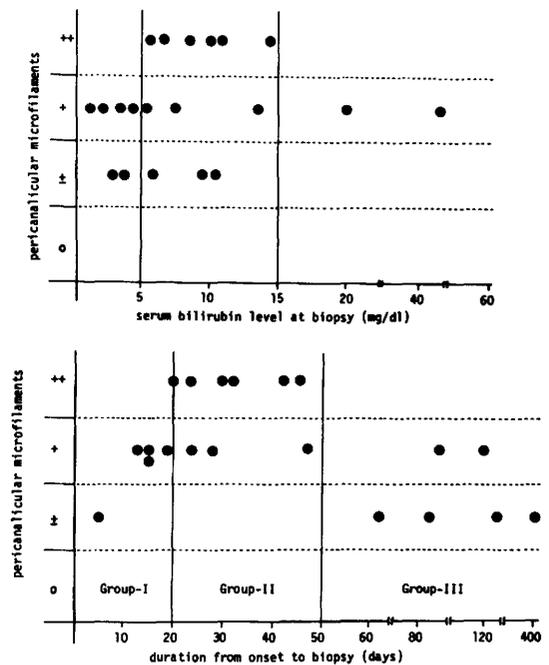


Fig. 2 Grade of changes of pericanalicular microfilaments

胆汁うっ滞と BCMF の変化との関連性について考察すると、薬剤あるいは肝炎ウイルスにより感作されたリンパ球が産生すると想定される催胆汁うっ滞因子 (lymphokines)<sup>34)-37)</sup> によって、BCMF が断裂され、胆汁の排泄障害が惹起される。つづいて、その胆汁排泄障害を回復するために BCMF が反応性が増加する。この増加した BCMF が線維状を成しているのは、アクチンが f-アクチンの状態でのみ収縮能を有すことから、合目的であると考えられる。そして BCMF の増加は、胆汁排泄のために生じたいわば生体代償反応と考えられ、増加した結果として肝内胆汁うっ滞を惹起するのではないようである。多くの症例で、その後の経過に伴って BCMF は減少し、徐々に正常化するが、長期にわたって胆汁うっ滞が遅延する症例では、再度 BCMF が断裂することによって胆汁排泄の改善も一層遅延するものと推測される。

臨床例でみられる BCMF の変化は Na-TLCA 投与時の I 型 BC、II 型 BC のそれぞれの周囲に観察した BCMF の変化に対応することは既に述べたが、このような BCMF の変化は、サイトカラシン B (CB) およびファロイジン (Pha) を用いた動物実験でも観察できる。すなわち、CB は、カビの一種の helmintho-

sporium dematioideum の代謝産物で f-アクチンを g-アクチンに切断する薬物であるが<sup>38)</sup>, CB をラットに投与すると BC は拡張し Mv は消失し胆汁流量も減少する。この際 BCMF は顆粒状を呈して観察される<sup>11)</sup>。この変化は, Na-TLCA 投与後に出現する I 型 BC 周囲の BCMF の変化, さらには臨床例における再投与試験直後ないし黄疸発現早期の BCMF の変化に極めて類似している。一方, Pha. は毒茸の Amanita phalloides から抽出した環状ペプチドで g-アクチンから f-アクチンへの重合を促進させる作用をもつが<sup>39)</sup> 40), この Pha. をラットに投与すると BC は拡張し Mv は消失し胆汁流量も減少する。Ect は著しく肥厚し BCMF は線維状の形態を成して増加する<sup>12)</sup>。この BCMF の所見は, Na-TLCA 投与後の II 型 BC や臨床例でのやや経過した時期に出現する肝内胆汁うっ滞の最も典型的な BC の周囲の BCMF の変化と酷似している。また, 分離培養肝細胞について time-lapse cine-photomicrography を用いて BC に蠕動運動が存在することが in vitro で確かめられており<sup>41)</sup>, さらに CB や Pha. によって BC の動きが減少し, BC 管腔が拡張していく動態が明らかにされている<sup>13) 14) 42)</sup>。このように CB や Pha. を用いた動物実験や in vitro の実験から得られた成績は, BCMF が胆汁排泄に密接に関与しているという確実な証拠を提供している。これらの証拠と著者による臨床的ならびに実験的肝内胆汁うっ滞から得た一連の成績を対比すると, ヒトにおいても BCMF は胆汁排泄の原動力となり, その収縮能の減退ないし消失が胆汁うっ滞の成因として重要であるといっても過言ではない。

しかし, BCMF による BC の収縮は, BCMF すなわちアクチンフィラメント単独の作用に基づくとは考え難く, 筋線維の場合と同様に肝細胞内でもアクチンとミオシンの相互作用で収縮が起こると推定される。実際, 肝細胞のミオシンは, 1976年 Brandon<sup>43)</sup>により分離されている。さらに, 分離培養肝細胞を用いた実験から, BCMF による BC の収縮運動は,  $Ca^{++}$  受容蛋白であるカルモジュリンを介してコントロールされたアクチン・ミオシンの作用 (actomyosin- $Ca^{++}$ -Calmodulin 系) によって調節されることが明らかとなっている<sup>13) 14) 44)</sup>。一般にアクチンフィラメントが機能するためには  $Ca^{++}$  が不可欠で, 細胞内  $Ca^{++}$  の出入は細胞膜に局在する  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$ -ATPase によって調節されるといわれる。この酵素は肝細胞内では BCM にもみ特異的に存在しており<sup>45)</sup>, actomyosin- $Ca^{++}$ -Calmodulin 系に作用し

て胆汁排泄に確実に関与していると考えられる。この観点から, 実験的肝内胆汁うっ滞において, BCM, BCMF の形態変化に伴って  $Mg^{++}$ -ATPase 活性が低下ないし消失したことは興味深い。 $Mg^{++}$ -ATPase 活性の低下は BCMF の変化を介して, 胆汁うっ滞の成因の重要な部分を占めていると考えた。

## 結 語

1) 急性肝内胆汁うっ滞の臨床例における BCMF の電顕による経時的観察では, BCMF は早期には断裂して顆粒状を呈し, 経過とともに増加し線維状を呈した。

2) 再投与試験直後の BCMF の変化は, 黄疸発現早期例で観察した BCMF の変化と同様に顆粒状を呈していた。

3) Na-TLCA 投与によって作製した実験的肝内胆汁うっ滞における BCMF の変化には, 顆粒状を呈するものと増加して線維状を呈するものの 2 型が観察され, 両者ともに BCM の RRSC および  $Mg^{++}$ -ATPase 活性は低下ないし消失していた。

かかる臨床例から得た成績と動物実験の成績との対比から, 毛細胆管周囲性マイクロフィラメントは胆汁排泄に関与し, マイクロフィラメントの機能障害が毛細胆管の収縮障害を惹起し, 肝内胆汁うっ滞発症の重要な要因となると考えた。

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜った恩師市田文弘教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御指導いただいた富山医科薬科大学第3内科佐々木博教授に心より謝意を表すとともに, 御協力いただいた教室の上村朝輝助教授はじめ教室員の方々に深謝致します。

なお, 本論文の要旨は, 第17回日本肝臓学会東部会, シンポジウム「肝細胞サイトスケレトンをめぐる最近の進歩」で発表した。

## 参 考 文 献

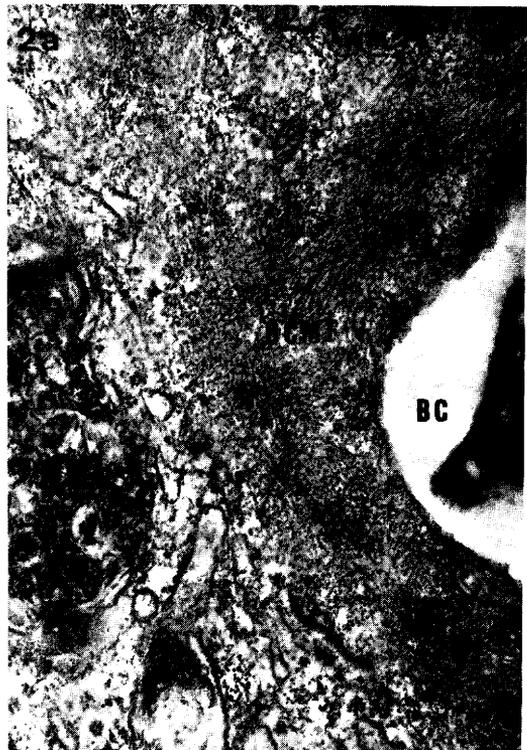
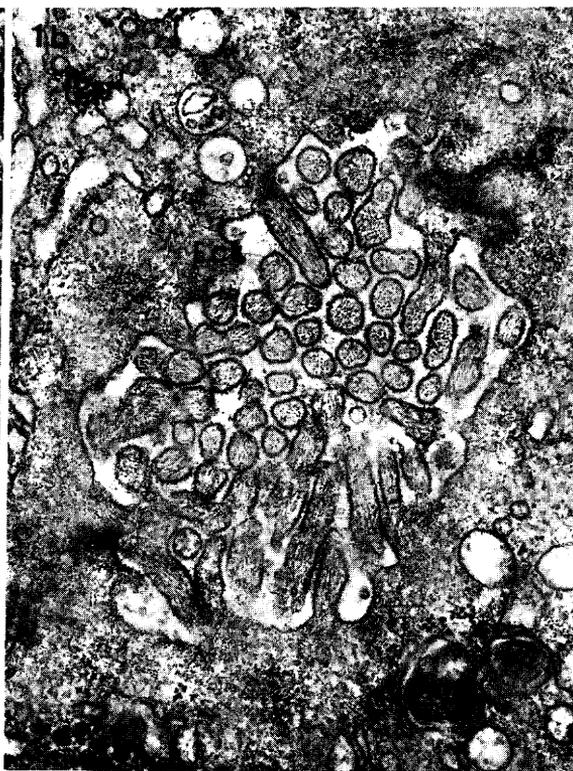
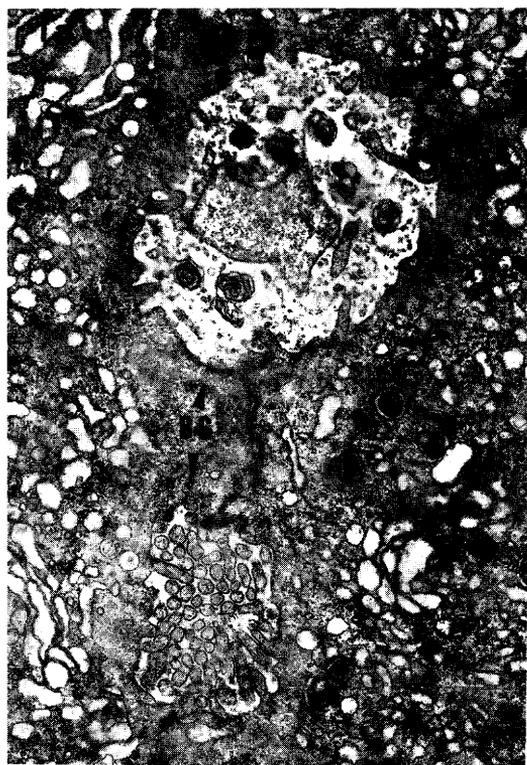
- 1) Porter, K.R., Byers, H.R. and Ellisman, M.H.: The cytoskeleton. In The Neuroscience (Schmitt FO & Worden FG, eds), pp. 703~722, The MIT Press, Cambridge Mass 1979.
- 2) 石川春律: 細胞骨格の微細構造. 蛋白質・核酸・酵素 28: 624~635, 1983.
- 3) Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H.:

- Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in variety of cell types. *J. Cell Biol.* **43**: 3121~3128, 1969.
- 4) Trenchew, P., Sneyd, P. and Hallborow, E.J.: Immunofluorescent tracing of smooth muscle contractile protein antigens in tissues other than smooth muscle. *Clin. Exp. Immunol.* **16**: 125~136, 1974.
  - 5) Farrow, L.J., Hallborow, E.J. and Brighton W.D.: Reaction of human smooth muscle antibody with liver cells. *Nature* **232**: 186~187, 1971.
  - 6) Lazarides, E. and Weber, K.: Actin antibody: The specific visualization of actin filaments in non muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 2268~2272, 1974.
  - 7) 奏野節司：アクチンの存在様式と機能。代謝 **18**: 205~213, 1981.
  - 8) Sanger, J.W.: Changing patterns of actin localization during cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**: 1913~1916, 1975.
  - 9) Namihisa, T., Tamura, K. and Saifuku, K.: Fluorescent staining of microfilaments with heavy meromyosin labeled with N-(7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl) maleimide. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 335~338, 1980.
  - 10) Jahn, W.: Similarity between the effect of experimental congestion of the isolated perfused rat liver and actin of cytochalasin B. *Naunyn-Schiederberg's Arch. Pharmacol.* **278**: 431~434, 1973.
  - 11) Phillips, M.J., Oda, M., Mak, E. and Fisher, M.M.: Microfilaments dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **69**: 48~53, 1975.
  - 12) Dubin, M., Maurice, M. and Feldman, G.: Phalloidin-induced cholestasis in the rat, Relation to changes in microfilaments. *Gastroenterology* **75**: 450~455, 1978.
  - 13) Watanabe, S. and Phillips, M.J.:  $Ca^{2+}$  causes active contraction of bile canaliculi: Direct evidence from microinjection studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6164~6168, 1984.
  - 14) 渡辺純夫, Phillips, M.J.: 毛細胆管機能よりみた胆汁の排泄機構。肝胆臓, **9**: 21~27, 1984.
  - 15) Phillips, M.J. and Oshio, C.: What is actin doing in the liver cell. *Hepatology* **3**: 433~436, 1983.
  - 16) Watanabe, S., Miyairi, M. et al.: Phalloidin alters bile canaliculi contractility in primary monolayer cultures of rat liver. *Gastroenterology* **85**: 245~253, 1983.
  - 17) 渡辺純夫, 宮崎招久, ほか: 初代培養肝細胞における Actin filament の経時的変化。肝臓, **26**: 107, 1985.
  - 18) Phillips, M.J., Oshio, C. et al.: Intrahepatic cholestasis as a canaliculi motility disorder. *Lab Invest* **48**: 205~211, 1983.
  - 19) 伴野昌厚, 渡辺純夫: Na-fluorescein を用いた初代培養肝細胞の胆汁分泌機構の解析。肝臓, **26**: 397, 1985.
  - 20) Oshio, C. and Phillips, M.J.: Contractility of bile canaliculi: Implications for liver function. *Science* **212**: 1041~1042, 1981.
  - 21) Oda, M. and Price, V.M.: Ultrastructure of bile canaliculi with special reference to the surface coat and the pericanaliculi web. *Lab Invest* **31**: 314~323, 1974.
  - 22) Song, C.S., Rubin, W. et al.: Plasma membranes of the rat liver. Isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. *J. Cell Biol.* **41**: 124~132, 1969.
  - 23) Fisher, M.M. and Bloxam, D.L.: Characterization of rat liver cell plasma membranes. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **150**: 177~184, 1975.
  - 24) Boyer, J.L. and Reno, D.: Properties of  $(Na^+-K^+)$ -activated ATPase in rat liver membranes enriched with bile canaliculi. *Biochim Biophys Acta* **401**: 59~72, 1975.
  - 25) Wachstein, M. and Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH. With special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am J Clin Pathol.* **27**: 13~23, 1957.
  - 26) Ishikawa, H.: Identification and distribution

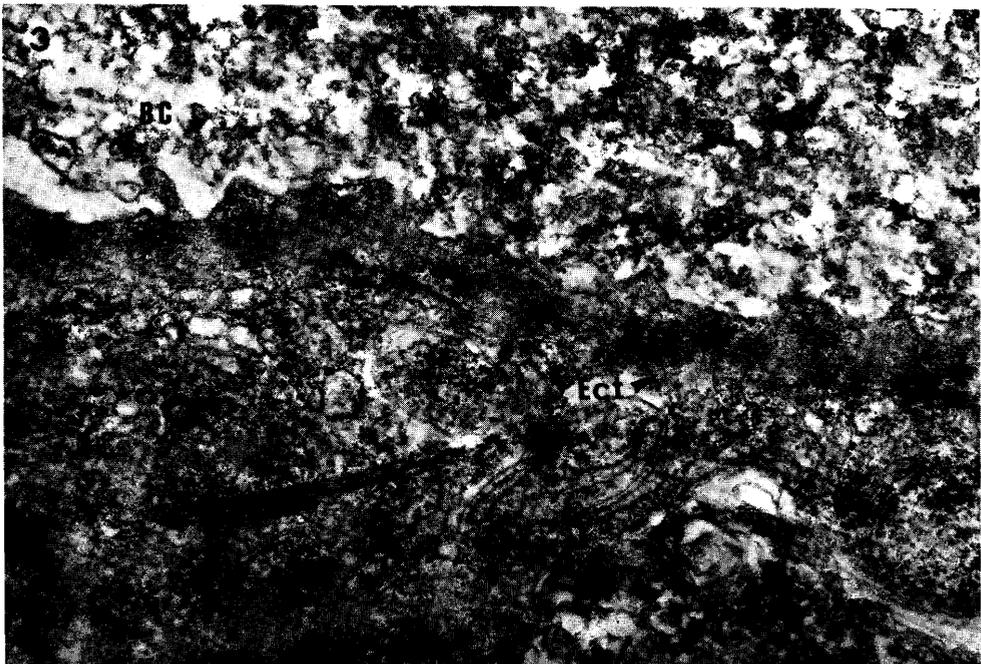
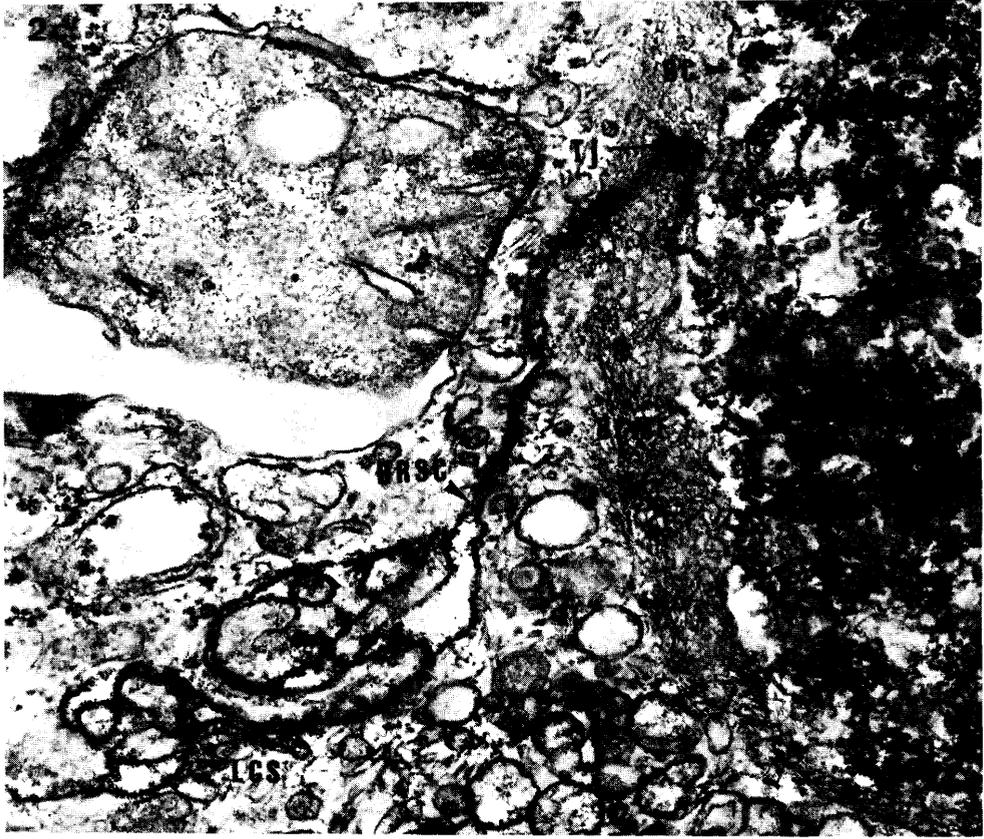
- of intracellular filaments. *Cell Motility: molecules and organization*. Univ of Tokyo Press., pp. 417~444, 1979.
- 27) Mooseker, M.S. and Tilney, L.G.: Organization of an actin filament-membrane complex. *J. Cell Biol.*, **67**: 725~743, 1975.
- 28) French, S.W. and Davies, P.L.: Ultrastructural localization of actin-like filaments in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, **68**: 765~774, 1975.
- 29) French, S.W., Kondo, I., et al.: Morphologic study of intermediate filaments in rat hepatocytes. *Hepatology*, **2**: 29~38, 1982.
- 30) 浪久利彦, 黒田博之, ほか: 薬剤過敏性胆汁うっ滞性肝炎の肝細胞内 microfilaments について. *日消会誌*, **75**: 180~186, 1978.
- 31) Okanoue, T., Ohta, M., et al.: Scanning electron microscopy of the liver cell cytoskeleton. *Hepatology*, **5**: 1~6, 1985.
- 32) 織田正也, 船津和夫: 胆汁分泌機構における毛細胆管周囲性マイクロフィラメントおよび毛細胆管膜の機能的意義. *肝臓*, **21**: 1716~1721, 1980.
- 33) Kawamura, T., Kamimura, T., Ichida, F., et al: Electron microscopic study of acute intrahepatic cholestasis in human induced by drugs—with special reference to alterations of hepatocytes immediately after challenge test. *J. Clin. Electron Microscopy*, **15**: 428, 1982.
- 34) 溝口靖紘, 桑村澄夫, ほか: 薬剤アレルギー性肝内胆汁うっ滞症の胆汁うっ滞因子 (lymphokines) について. *日消会誌*, **74**: 548~566, 1977.
- 35) 溝口靖紘, 桑村澄夫: 薬剤アレルギー性肝内胆汁うっ滞の発生機序に関する研究. *肝臓*, **20**: 673~687, 1979.
- 36) 織田正也, 森実敏夫, ほか: 薬剤過敏性肝内胆汁うっ滞の発生機序—lymphokines と microfilaments 異常との関係について.— *消化器と免疫*, **4**: 217~227, 1980.
- 37) 織田正也, 渡辺勲史: 急性ウイルス性胆汁うっ滞型肝炎における肝内胆汁うっ滞の発生機序—in vivo および in vitro における lymphokines の検討—*消化器と免疫*, **6**: 63~71, 1981.
- 38) Wrenn, J.T. and Wessels, N.K.: Cytochalasin, B: Effects upon microfilaments involved in morphogenesis of estrogen-induced glands of oviduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**: 904~908, 1970.
- 39) Gabbiani, G. and Montesano, R.: Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. *Lab. Invest.*, **33**: 562~569, 1975.
- 40) Lengsfeld, A.M., Löw, I., et al.: Interaction of phalloidin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 2803~2807, 1974.
- 41) Oshio, C. and Phillips, M.J.: Contraction of bile canaliculi as evidenced by time lapse cinemicrophotography. 31st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver diseases, November, 1980, Chicago.
- 42) Phillips, M.J. and Oshio, C.: Microfilament dysfunction as a mechanism in intrahepatic cholestasis: Evidence from time lapse cinemicrophotography. International Association for the Study of the liver. November, 1980, Chicago.
- 43) Brandon, D.L.: The identification of myosin in rabbit hepatocytes. *Eur. J. Biochem*, **65**: 136~146, 1976.
- 44) 渡辺純夫, 宮崎招久: 培養肝細胞における毛細胆管収縮機構と  $Ca^{++}$ -Calmodulin 系. *肝臓*, **26**: 1346~1350, 1985.
- 45) 織田正也, 塚田信廣, ほか: 肝内胆汁うっ滞発生機構における毛細胆管アクチン系の異常—カルシウム, カルモデュリン,  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$ -ATPase の超微形態学的局在の観点から—. *肝臓*, **27**: 1497~1501, 1986.

〔特別掲載〕(昭和62年5月29日受付)

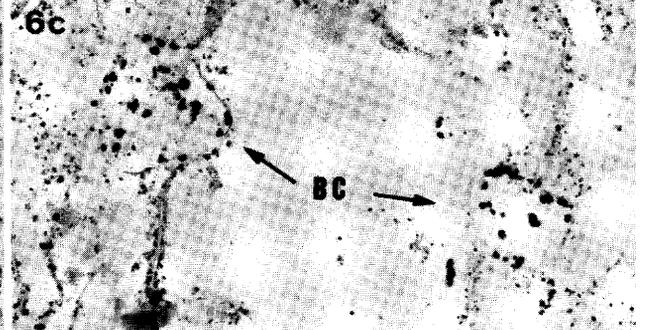
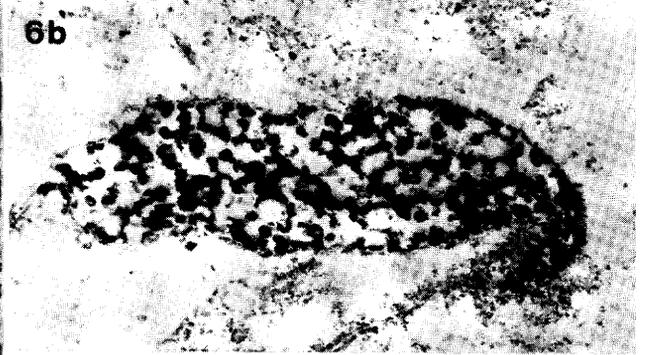
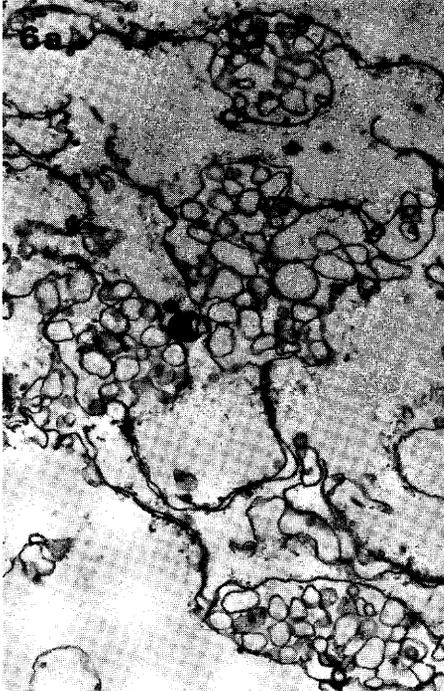
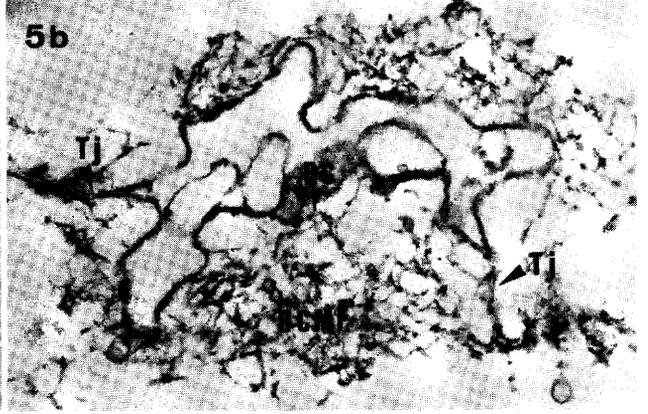
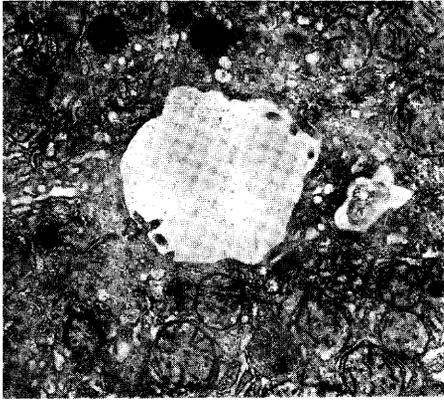
川村論文付図(I)



川村論文付図(II)



川村論文付図(Ⅲ)



### Explanation of figures

**Fig. 1~Fig. 3;** Acute intrahepatic cholestasis in men.

**Fig. 1** 5 days after the initiation of jaundice;

- 1a. Two bile canaliculi, one with loss of microvilli and the other with well preserved microvilli, are observed. Pericanalicular ectoplasm around them are already prominent. Ur-Lead stain,  $\times 15,000$ .
- 1b. Microfilaments around the bile canaliculus with intact microvilli are shortened or granular. Ur-Lead stain,  $\times 30,000$ .

**Fig. 2** 30 days after the initiation of jaundice;

- 2a. Pericanalicular microfilaments increase markedly and shape into filamentous structure. Ur-Lead stain,  $\times 45,000$ .
- 2b. In pericanalicular ectoplasm with markedly increased microfilaments, pinocytic vesicles also increase. Ur-Lead stain,  $\times 25,000$ .
- 2c. Increased filamentous pericanalicular microfilaments and lateral cell surfaces of hepatocytes outlined by RR are observed, but RRSC is not detected on the luminal surface of dilated bile canaliculus. RR-Ur-Lead stain,  $\times 45,000$ .

**Fig. 3** 391 days after the initiation of jaundice;

Pericanalicular ectoplasm is still prominent, but pericanalicular microfilaments alter shortenedly or granularly in part. Ur-Lead stain,  $\times 30,000$ .

**Fig. 4~Fig. 6;** Na-tauroolithocholate (Na-TLCA) induced intrahepatic cholestasis in rats.

- 4a. Type-I bile canaliculus is characterized by a dilated canalicular lumen with total or partial loss of microvilli and with shortened or granular pericanalicular microfilaments. Ur-Lead stain,  $\times 12,000$ .
- 4b. Bile canaliculi isolated from the Na-TLCA infused rat liver homogenate; Pericanalicular microfilaments detach completely from the dilated bile canaliculi. BC-fraction, Ur-Lead stain,  $\times 15,000$ .
- 5a. Type-II bile canaliculus is characterized by the lamellar transformed canalicular membranes with increased pericanalicular microfilaments. RR-Ur-Lead stain,  $\times 13,000$ .
- 5b. Bile canaliculus isolated from the Na-TLCA infused rat liver homogenate; Markedly increased pericanalicular microfilaments around the irregularly distorted bile canaliculus. BC-fraction, Ur-Lead stain,  $\times 12,000$ .
- 6a. Bile canaliculi isolated from the control rat liver homogenate; Pericanalicular microfilaments distribute as meshworks around bile canaliculi. BC-fraction, Ur-Lead stain,  $\times 10,000$ .
- 6b. In the bile canaliculus isolated from the control rat liver homogenate  $Mg^{++}$ -ATPase activity is present in the luminal leaflet of canalicular membrane. BC-fraction, Lead stain after the cytochemical reaction for  $Mg^{++}$ -ATPase,  $\times 20,000$ .
- 6c. Decrease of  $Mg^{++}$ -ATPase activity is observed in canalicular membrane isolated from the Na-TLCA infused rat liver homogenate. BC-fraction, Lead stain after the cytochemical reaction for  $Mg^{++}$ -ATPase,  $\times 7,500$ .

BC: bile canaliculus, BCMF: pericanalicular microfilaments, Tj: tight junction, Ect: pericanalicular ectoplasm, LCS: lateral cell surface, RRSC: ruthenium red-positive surface coat.