

日本財団補助金による

1997年度日中医学協力事業助成報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

平成10年3月30日

I. 招へい責任者 浅野 伍朗 
所属機関 日本医科大学 病理学教室 職名 主任教授
所在地 〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5 電話 03-3822-2131

招へい研究者氏名 張 晶
所属機関 中国 北京市 中日友好医院 病理部
職 名 技師長

II. 日本滞在日程

平成9年8月20日 来日.

8月24日～9月20日 研究施設の見学.
研究設備の使用法の習得.

9月22日～10月31日. 剖検標本の採取. 切出し. 標本作成

11月4日～現在. 多摩永山病院へ出向
(H10.3.30)
生検標本の採取. 固定. 標本作成.
一般染色. 特殊染色. 免疫組織学的手法
を用いて「アルコール性肝線維症ならびに肝
硬変症における細胞外基質の動態」につ
いて研究を行う.

平成10年4月16日. 第87回日本病理学会総会にて
研究成果を発表する予定.

Ⅲ. 研 究 報 告 (4000字以上で記入して下さい) 別紙可)



Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 1000000 円

交通費 12万 円 宿泊費 36万 円 食費 36万 円

雑費 10万 円 他 6万 円

研究報告

課題： アルコール性肝線維症ならびに肝硬変症における
細胞外基質の動態

内容：

目的：細胞外基質(ECM)は細胞の増殖制御因子の一つとして注目され、近年、分子生物学および分子病理学の発展と共に、その機構の解明が進められています。ここに、肝臓における線維化の進展過程における細胞外基質の動態とその役割についての解明を目的に、アルコール性肝線維症と肝硬変症における各種 ECM 成分の動態につき免疫組織化学的手法を用いて検討した。

対象と方法：早期および末期のアルコール性肝線維症とアルコール性肝硬変症患者の肝生検標本あるいは剖検標本を用いて、10%ホルマリン液で固定後、通常の方法を用いて脱水後、パラフィン包埋し、4~6 μm の厚さの標本作製した。光学顕微鏡的には H&E 染色に加えて、Masson 染色、Victoria blue and Sirius Red 染色にて I, III 型 collagen の局在を観察すると共に、免疫組織化学的手法(LsAB 法)により、肝臓における IV 型 collagen, Fibronectin(FN), Laminin(LN), Proteoglycans(PG)-C4s, Factor VIII, basic Fibroblast Growth Factor(bFGF), Transforming growth factor- β (TGF- β) および α -smooth muscle actin(α -SMA)の局在を観察した。対照として正常肝臓を使用した。免疫組織化学的に I, III, IV 型 collagen と Fibronectin については反応前に 0.1%の protease で 10~30 分間処理し、Laminin と Proteoglycans については反応前に 0.4%の pepsin で 30 分間処理を行った。使用した I, III, IV 型 collagen, FN, LN, PG-C4s, Factor VIII, α -SMA 抗体はいずれも DAKO 社製で、bFGF, TGF- β 抗体は RDS 社製の商品である。

結果：

正常肝臓内における各種 ECM 成分の局在の特徴をみると、I 型 collagen は主にグリソン鞘および大小の静脈周囲に分布していた。III 型 collagen と FN は肝類洞壁に局在し、IV 型 collagen と LN はグリソン鞘の胆管と血管の基底膜にその局在が見られた。Proteoglycans は主に血管壁と門脈域の間質

にわずかにその局在が見られた。Victoria blue and Sirurs Red 染色では肝内の弾力線維は淡明な青色を示し、不規則な配列が見られ、血管壁および血管周囲に局在し、被膜内とグリソン鞘の膠原線維と混在していた。正常な肝組織の類洞には弾力線維はなく、蛍光顕微鏡で弾力線維の蛍光は認められないが、Ⅲ型 collagen は緑色、Ⅰ型 collagen は赤黄色を呈し、粗な索状の配列を示した。そして、門脈域と中心静脈周囲の細胞外基質の成分はⅠ型 collagen が主体で、肝類洞ではⅢ型 collagen が見られた。

アルコール性肝線維症の初期では、病変は終末肝静脈と類洞の周囲から始まり、中心静脈周囲と門脈域で幅の広い線維性隔壁の形成がみられ、類洞間の肝細胞は消失していた。そして、隔壁内に多くの α -SMA 陽性細胞の増殖が見られ、活性化された伊東細胞、即ち myofibroblast が確認された。Masson 染色, Victoria blue and Sirurs Red 染色では myofibroblast の周囲に多量の弾力線維とⅠ,Ⅲ型 collagen の局在が観察された。また、Ⅰ型 collagen は赤色、Ⅲ型 collagen は緑色を呈していた。産生された大量の線維は門脈域から肝類洞に向かって伸び、弾力線維,Ⅰ・Ⅲ型 collagen, FN, LN を含む細胞外基質が含まれていた。図 6, 7 の如く線維隔壁内の毛細血管様間隙に FactorⅧ陽性の内皮細胞と内皮細胞の直下にⅣ型 collagen 陽性の基底膜の形成がみられた。また、線維隔壁には PG-C4s の沈着が見られ、肝線維化の初期には伊東細胞が活性化され盛んに増殖し線維の産生に関与していた。これらの細胞は弾力線維,Ⅰ・Ⅲ型 collagen, FN, LN を含む細胞外基質を合成し、類洞の内皮細胞の直下に基底膜を形成し、毛細血管の増生に関与していた。

また、病変の進展と共に、肝細胞が bFGF, や TGF- β などの増殖因子を産生し、autocrine や paracrine 機構を介してクッパー細胞と伊東細胞の増殖をさらに促進させ、細胞外基質も増加していた。

肝硬変症の末期では線維隔壁の線維成分の密度は高く、毛細血管様間隙の減少が認められた。また、肝類洞には多数の α -SMA 陽性細胞と多量の弾力線維、Ⅰ,Ⅲ型 collagen の局在が認められ、膠原線維の密集する部位にはⅠ型 collagen の顕著な増加を認めたが、Ⅲ型 collagen は相対的に減少していた。

考察：

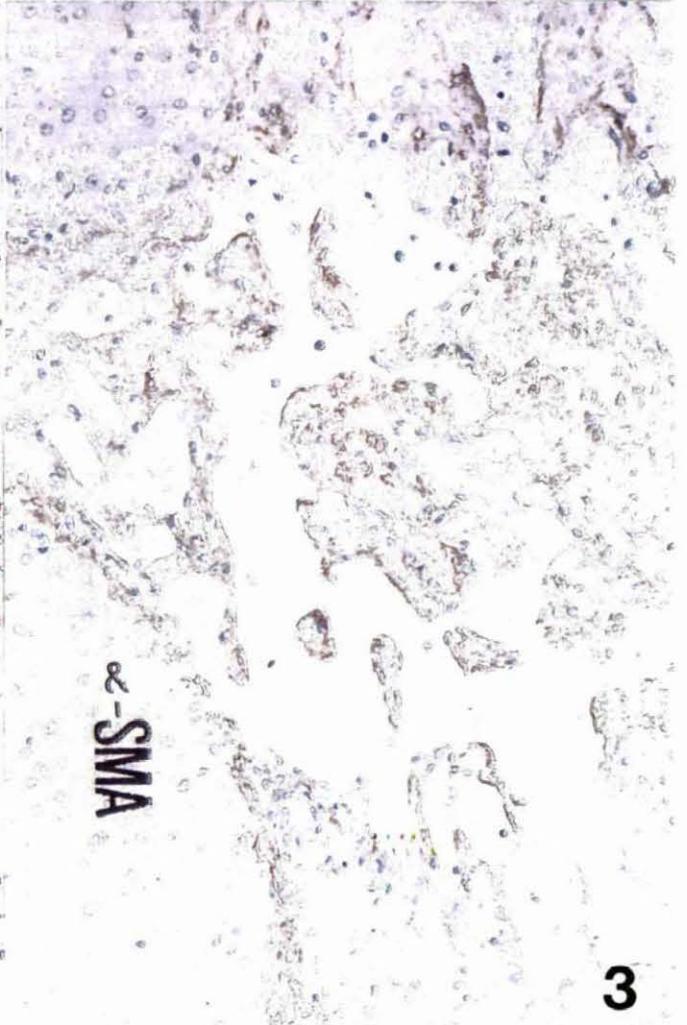
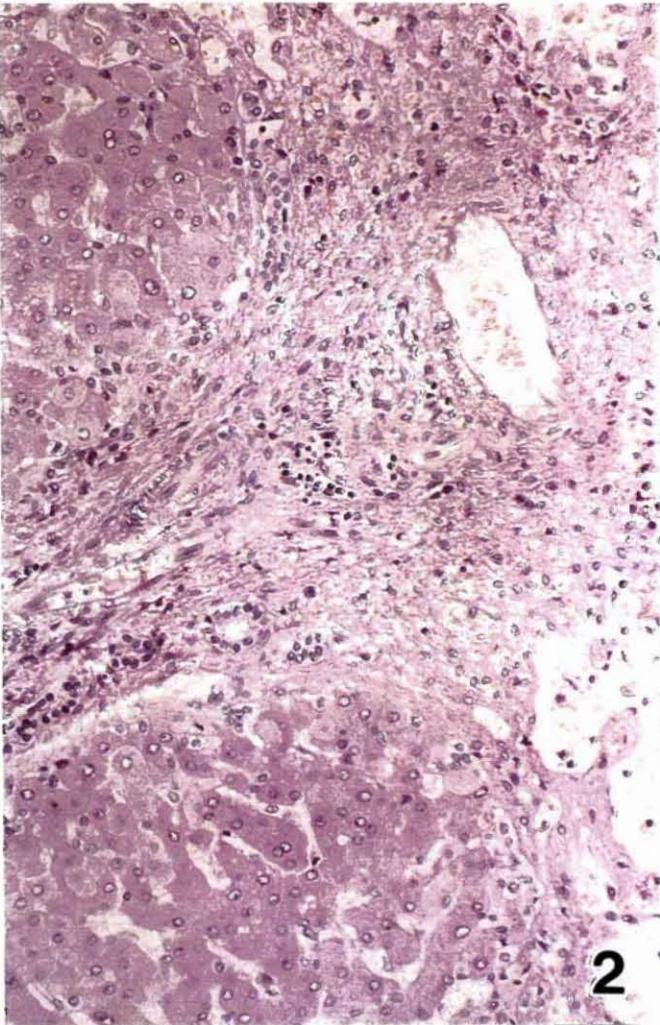
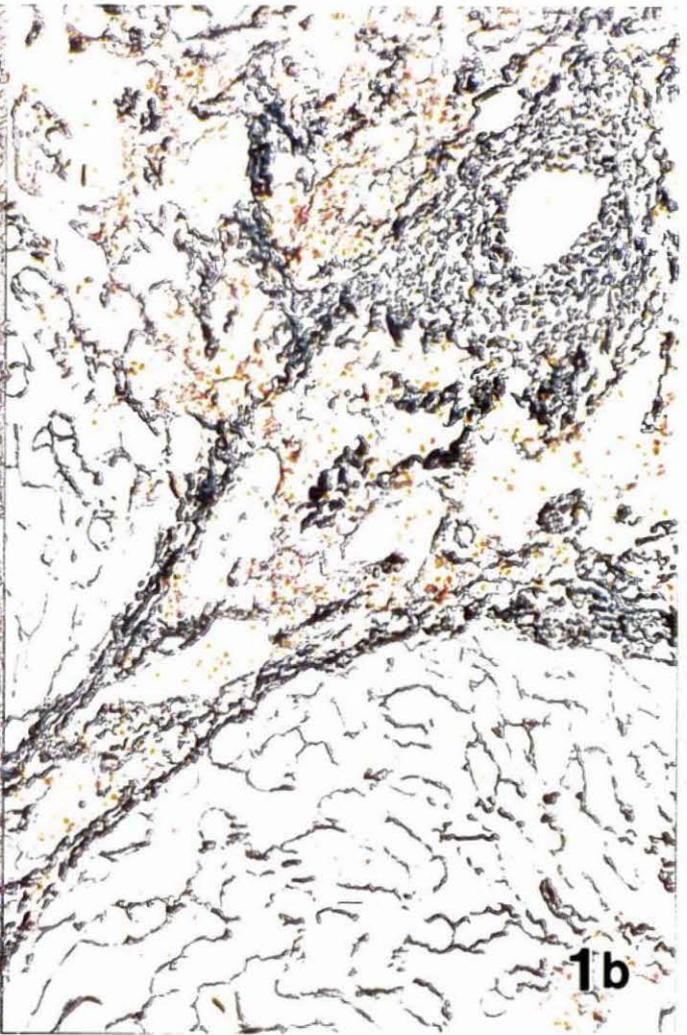
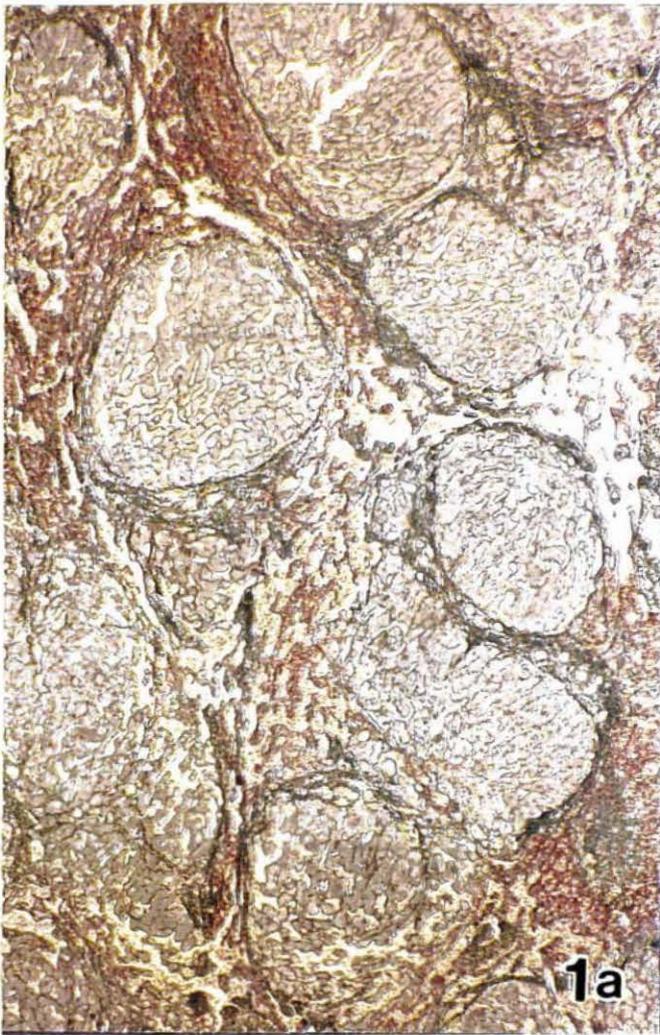
肝線維化の進展過程においては、細胞外基質の合成は亢進し、多量の細胞外基質が肝内に見られる。I型 collagen は 8~10 倍、III型 collagen は 3~4 倍、IV型 collagen は 50 倍にまで増加していた。PG-C4s、FN、LN を含む細胞外基質の合成も、2~10 倍に増加していた。正常肝組織内では細胞外基質および類洞の間隙は肝臓全体積の約 20% を占めるが、本研究によると、アルコール性肝線維症の初期には 60% にも達していた。肝線維化の進展では、細胞外基質の産生と分解の反復で進展すると思われる。

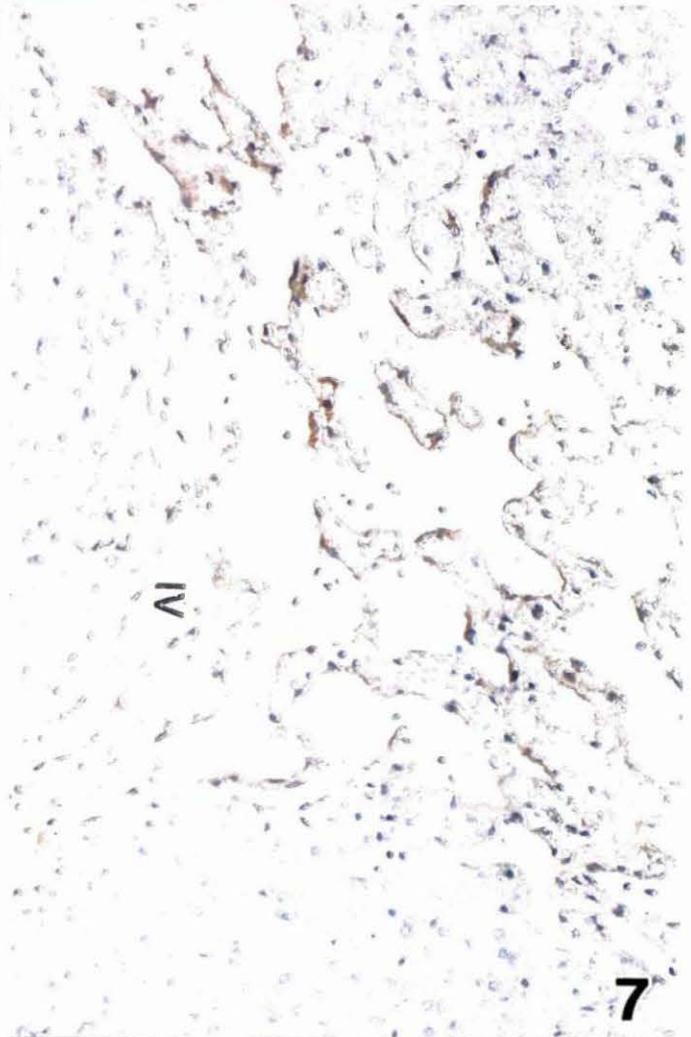
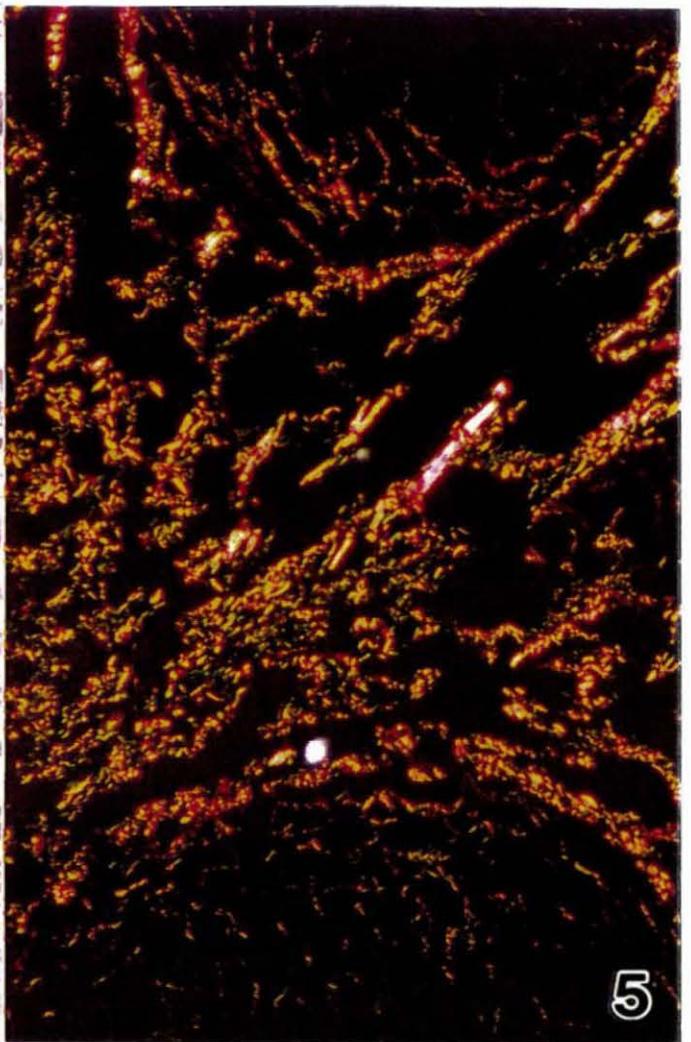
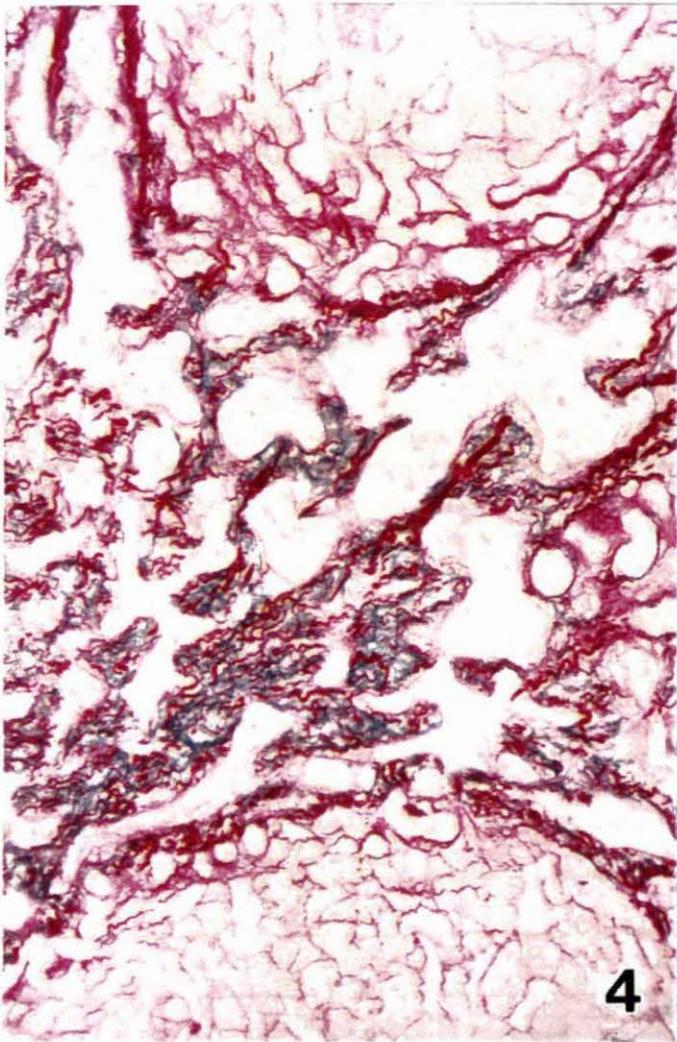
アルコール性肝線維症の初期では伊東細胞が活性化し線維細胞化し増殖する。これらの細胞より多量の細胞外基質が産生され、I、III型 collagen は基底膜を構成し、肝類洞内の毛細血管増生が肝線維症の初期変化の特徴の一つと考えられる。このように肝線維化の進展と共に、bFGF、や TGF- β などの増殖因子の産生が促進し、autocrine や paracrine 機構を介してクッパー細胞や伊東細胞の増殖を促進し、細胞外基質の産生が増加する。

肝硬変症の末期では線維隔壁内の血管様間隙が減少し、幅の広い線維隔壁が形成される。特に Masson 染色や Victoria blue and Sirius Red 染色では I、III 型 collagen の局在と共に、線維増生の時期や成分変化の比率などが観察できる。隔壁内の弾力線維と膠原線維は平行に配列し、I 型 collagen を主成分とする線維束が再生結節を囲み、典型的な肝硬変症の偽小葉が形成される。III型 collagen の局在も認められるが、相対的に減少傾向が見られる。

以上、肝線維化の進展過程においては細胞外基質の産生と分解が繰り返され、膠原線維の性状変化が見られる事が確認された。

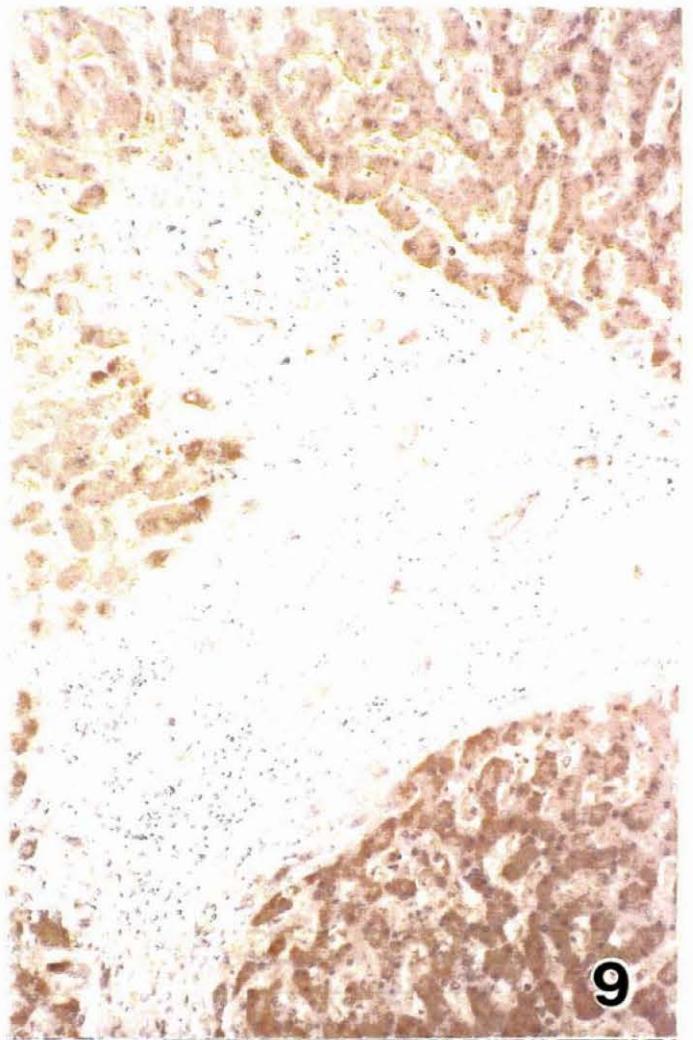
- 図 1 : アルコール性肝線維症の初期では偽小葉を囲む線維束が幅広く疎で(a)、血管様間隙が中心静脈に移行している(b)。
- 図 2 : 線維隔壁に拡張した血管様間隙が多数存在し、その周囲に多量の細胞外基質成分と細胞成分が見られる。
- 図 3 : 肝類洞内に α -SMA 陽性細胞の増殖が見られ、活性化された伊東細胞、即ち myofibroblast が確認できる。
- 図 4 : 増殖した細胞の周囲に多量の弾力線維と膠原線維が見られる。
- 図 5: 図 4 と同一切片の蛍光顕微鏡写真で、I 型 collagen は赤色、III 型 collagen は緑色で表示される。
- 図 6 : 線維隔壁内の毛細血管様間隙に Factor VIII 陽性の内皮細胞の存在がみられる。
- 図 7 : 内皮細胞の直下に IV 型 collagen 陽性の基底膜形成が見られる。
- 図 8 : 線維隔壁に PG-C4s の沈着が見られる。
- 図 9,10 : 肝硬変症の肝細胞に bFGF(9) と TGF- β (10) の発現を認めた。
正常肝組織にその発現を認めない。
- 図 11 : 末期肝硬変症では線維隔壁内の血管様間隙が減少し、幅の広い線維隔壁を作り、III 型 collagen の局在が認められる。
- 図 12 : 肝硬変症の末期では線維隔壁内の弾力線維と膠原線維が平行に配列する。
- 図 13 : I 型 collagen を主成分とする線維束が再生結節を囲み、典型的な肝硬変症の偽小葉を形成する。







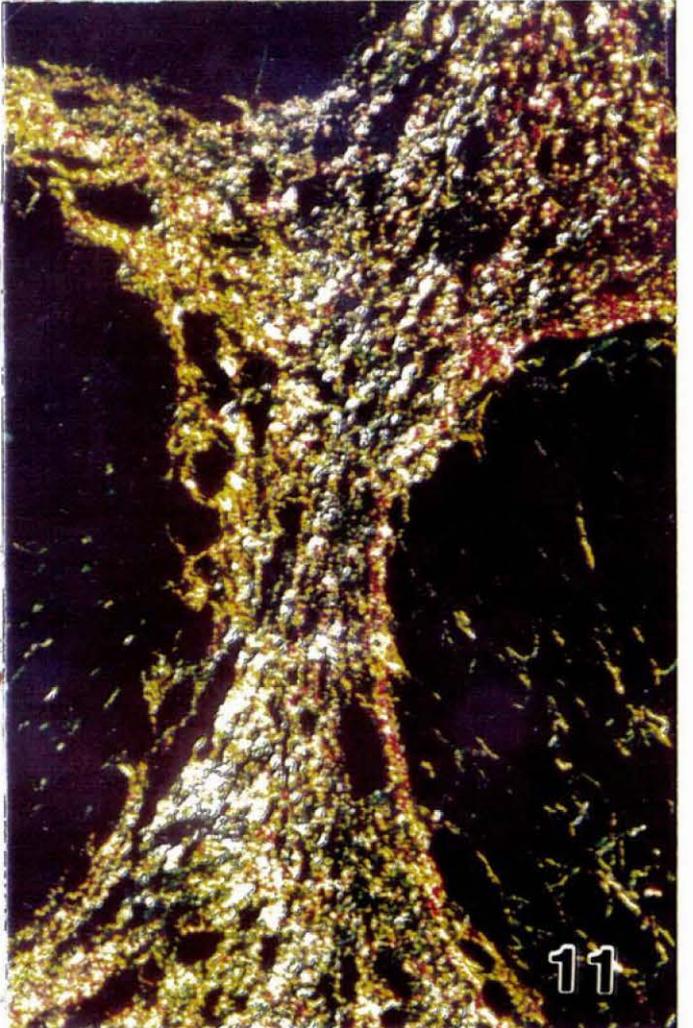
8



9



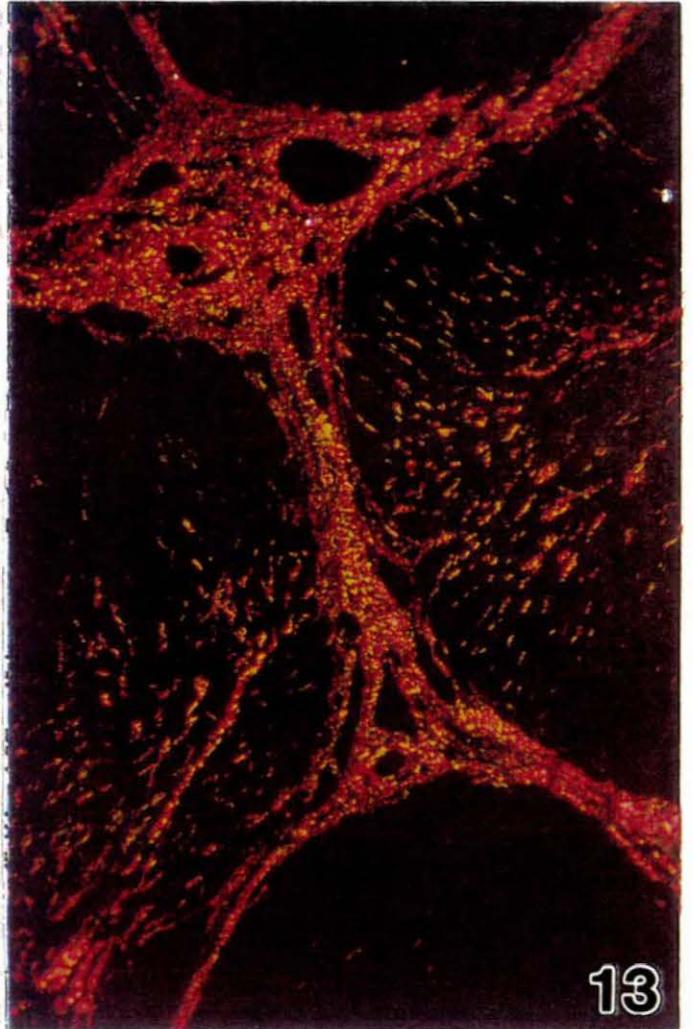
10



11



12



13

Argentation and Masson double staining

1. sections deparaffinize into the water,
2. in the 0.5% potassium permanganate solution oxidation 5 min.,
3. flowing water 5 min.,
4. 2% oxallic acid solution 2 min.,
5. washing 2 min.,
6. 2% ammonium iron alum solution 40 second,
7. DW washing 5 min.,
8. ammoniacal silver solution 5 min.,
9. DW washing 1 second,
10. 70% alcohol 1 second,
11. reducing rinses 5 min.,
12. flowing water 2min.,
13. gold chloride solution 10 min.,
14. washing 1min.,
15. oxalic acid solution 2 min.,
16. washing 2 min.,
17. sodium thiosulfate solution 5 min.,
18. washing 1 min.,
19. potassium dichromate 10 % 10 min.,
20. washing 5 min.,
21. nuclear fast red solution 2 min.,
22. washing 2 min.,
23. martius yellow and phosphotungstic acid solution 5 min.,
24. washing,
25. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
26. Masson's solution 10 min.
27. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
28. 2.5 % phosphotungstic acid solution 5 min.,
29. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
30. 2 % light green staining 5 min.,
31. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
32. alcohol dehydration,
33. xylene clearing .
34. covering.

(showing the reticular fibre and collagen)

Victoria blue and Sirius red double staining

1. sections deparaffinize into the water,
2. 0.5 % potassium permanganate solution oxidation 5 min.,
3. washing 2 min.,
4. 2 % oxalic acid solution 2 min.,
5. wash,
6. 70 % alcohol 5 -10 second ,
7. victoria blue solution stains 24h,
8. 70 % alcohol 10--20 min.,
9. sirius red stains 1 h,
10. wash
11. dehydration in the alcohol,
12. covering of the sections.

(1) Victoria blue showing the elastic.

(2) Sirius red staining show the type I and type III collagen under the polarization microscope.