

両生類における肝臓の比較組織化学的研究

誌名	島根大学生物資源科学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Life and Environmental Science Shimane University
ISSN	13433644
著者名	井上,明日香 秋吉,英雄
発行元	島根大学生物資源科学部
巻/号	8号
掲載ページ	p. 11-21
発行年月	2003年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



両生類における肝臓の比較組織化学的研究
肝臓の組織学的構築と棲息域および系統発生学的相関

井上明日香, 秋吉英雄

Comparative histochemical studies of the liver in Amphibians associated with their phylogeny
and diverged mode of living.

Asuka INOUE and Hideo AKIYOSHI

Abstract *Background/aims:* Amphibians are usually regarded as an intermediate group falling between fishes and reptiles, and have three orders: Gymnophiona, Urodela and Anura. They are widely distributed both geographically and ecologically. Their habitat ranges from water to land, and vertically from apical areas in trees to bottom layers in water. We studied on the correlation between the liver structures in the three orders of amphibians and their phylogeny or diverged mode of living. *Methods:* Forty-four species amphibians were collected from Hokkaidou to Iriomote island in Okinawa except *Typhlonectes* sp., *Bombina orientalis* and *Xenopus leavis*. Livers were fixed by perfusion with paraformaldehyde, cut paraffin sections, and observed by light microscope. The cytoskeletal components of the hepatic stellate cells were identified by immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein and α -smooth muscle actin. *Results:* Among the three orders of amphibians, Gymnophiona and Urodela were characterized both the pigmentation in hepatic lobules and the development of lymph vessels in liver capsules and Glisson's sheath. *Conclusions:* The present study indicates that there are differences in the pattern of hepatic histochemical components in the amphibians examined at this time. We discussed their phylogeny and diverged mode of living into three orders.

Key words : liver, amphibians, evolution, comparative histology, phylogeny

緒 言

脊椎動物の中ではじめて陸上に進出した両生類は、進化の過程で水中生活から陸上生活に適応するための体型の改変を行う必要があった。特に、重力環境に適応するための必須の要件である骨格系の変化はよく知られているが、その他にも生活の場が水中から陸上へと移行する事によって生じる、様々な生活環境の変化に対応した代謝、免疫等の内臓諸器官の機能や構造の改変も同時に行われた可能性が推察される (Bernd 1990, 内山ら 2000, 柏木ら 2002)。

水中と陸上の両方で生活をするようになった両生類は、それぞれの体型や生体内の機能に応じた空間的な棲息位置が決定され、水棲、水陸両棲、樹上棲と棲息域が多様化していったと想像される。一般に両生類は、幼生期は

完全な水中生活を行い、変態して陸上域で生活する生活環を持っており、この事が多様化した自然環境に最も適応する能力を持ったグループである要因なのかもしれない。しかし、生活様式における水環境への依存度は、種によって大きく異なっているが、陸上生活種であっても繁殖様式は、水から離れることは不可能な種類である。内臓がどのように進化過程に関わりを持って、多様な棲息環境に適応していったかを明らかにする上で、生物体における代謝の中心臓器である肝臓の働きを解明することは、必須の要件であると考えている。

肝臓は生体を維持する上で中心的な役割を担う臓器で、多様な代謝機能を有しており、その種類や特性は草食や動物食等の食性の違い、つまり動物が棲息する自然環境によって左右されている。従って、系統樹に沿って獲得した、より高次の代謝機能とは別に、動物の棲息環境によってもその環境に特有な代謝機能が備わっている (秋

吉ら 2001, 2002, 2003, 井上ら 2002). これらの機能を営む場である肝臓組織もまた代謝機能の相違によって構成する細胞・組織の形態が異なってくる (秋吉ら 2002). 両生類の肝臓は哺乳類の肝臓に比べて未発達であり, 肝臓内の貯蔵物質の質・量的変異は, 成長過程および繁殖, 越冬等の生活サイクルの中で変動することが知られているが (Barni et al. 1999, Giuliano et al. 2000), その変動の幅と肝臓機能との相関関係は未だよく分かっていない.

代謝機能の相違が肝臓の組織構築の形態変化として現れてくる事に注目し, 両生綱 44 種の肝臓の組織学的形態変化と, それぞれの系統関係や棲息様式とを対応させて比較検討し, 肝臓の構造と進化との関わりを考察した. 焦点は肝臓内の微小循環系である血管系, リンパ管系の発達および肝機能の単位として肝組織を構築している, 肝小葉内における肝細胞配列, 肝細胞形態, 免疫系に参与するクッパー細胞の活性, ビタミン A の貯蔵に参与する肝星細胞 (Hepatic Stellate Cell) の細胞形態に注目した.

材 料

材料は北海道北大雪, 青森県下北, 山形県新庄から島根県東部にかけての本州一帯および島根県隠岐島, 鹿児島県奄美大島, 沖縄県石垣島, 西表島で採集した個体を使用し, 以下に示した. アシナシイモリ, アフリカツメガエルおよびスズガエルについては, 研究室にて飼育した個体を用いた.

脊椎動物門 両生綱 (44 種)

無足目 (1 種)

ミズアシナシイモリ *Typhlonectes* sp.

有尾目 (13 種)

サンショウウオ科

オオイタサンショウウオ *Hynobius dunni* クロサンショウウオ *Hynobius nigrescens*
 ヒダサンショウウオ *Hynobius kimurae* オキサンショウウオ *Hynobius okiensis*
 トウホクサンショウウオ *Hynobius lichenatus* エゾサンショウウオ *Hynobius retardatus*
 プチサンショウウオ *Hynobius naevius* ベッコウサンショウウオ *Hynobius stejnegeri*
 カスミサンショウウオ *Hynobius nebulosus* ハコネサンショウウオ *Onychodactylus japonicus*

オオサンショウウオ科

オオサンショウウオ *Andrias japonicus*

イモリ科

シリケンイモリ *Cynops ensicauda* アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*

無尾目カエル亜目 (30 種)

スズガエル科

スズガエル *Bombina orientalis*

ビバ科

アフリカツメガエル *Xenopus leavi*

ヒキガエル科

ミヤコヒキガエル *Bufo gargarizans miyakonis* アズマヒキガエル *Bufo japonicus formosus*
 ニホンヒキガエル *Bufo japonicus japonicus* オオヒキガエル *Bufo marinus*

アマガエル科

ニホンアマガエル *Hyla japonica*

アカガエル科

ウシガエル *Rana catesbeiana* ツチガエル *Rana rugosa*
 ニホンアカガエル *Rana japonica* ナガレタゴガエル *Rana sakuraii*
 ヌマガエル *Rana limnocharis* オットンガエル *Rana subaspera*
 サキシマヌマガエル *Rana* sp. オオハナサキガエル *Rana supranarina*

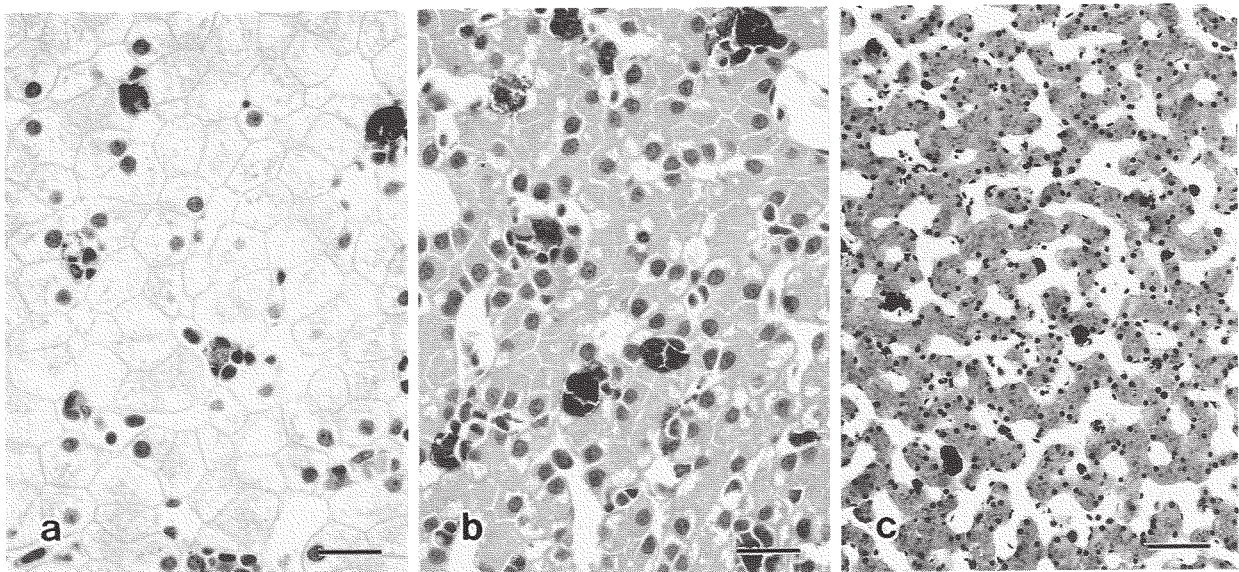


図1 肝組織中における類洞の発達度

Elias の分類によって肝臓の毛細血管網である類洞の発達を 3 段階に分類した. a) 未発達で several cell thick plate の型をとっていた. +1: プチサンショウウオ. b) 中程度で two cell thick plate 型の類洞発達であった. +2: トウホクサンショウウオ. c) 哺乳類型の明らかに発達した肝細胞索を認める one cell thick plate 型であった. +3: ヤマアカガエル. Bar=30 μ m

トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	タゴガエル	<i>Rana tagoi tagoi</i>
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	オキタゴガエル	<i>Rana tagoi okiensis</i>
エゾアカガエル	<i>Rana pirica</i>	ツシマアカガエル	<i>Rana tsushimensis</i>
ヤエヤマハラブチガエル	<i>Rana psaltes</i>	コガタハナサキガエル	<i>Rana utsunomiyaorum</i>
アオガエル科			
カジカガエル	<i>Buergeria buergeri</i>	ヤエヤマアオガエル	<i>Rhacophorus owstoni</i>
リュウキュウカジカガエル	<i>Buergeria japonica</i>	シレーゲルアオガエル	<i>Rhacophorus schlegelii</i>
モリアオガエル	<i>Rhacophorus arboreus</i>	アマミアオガエル	<i>Rhacophorus viridis amamiensis</i>
ジムグリガエル科			
ヒメアマガエル	<i>Microhyla ornata</i>		

方 法

動物は水中にて麻酔後、頸椎からピスによって脊椎を損傷した。その後速やかに開腹し、大きな個体は心臓と肝臓の門脈から、小さな個体は心臓より 4% パラホルムアルデヒド固定液 (0.1M 燐酸緩衝液, pH7.4) をペリスタポンプにて 1ml/min の灌流スピードで灌流固定した。その後、肝臓を採取し、厚さ 3mm にスライスして再度浸漬固定を行った。固定後の試料は、アルコール系列による脱水後、キシレン透徹、パラフィンに置換して通常のパラフィン包埋とし、厚さ 4 μ m の切片を作成した。作成したパラフィン切片は H・E 染色、特殊染色 (PAS 染色) および免疫染色用に供した。また、固定後の組織から、マイクロスライサーにて 30 μ m の厚切り切片を作成し、脂肪染色 (オイルレッド O 染色) 用に供した。

1. 肝小葉内における類洞の発達度

H・E 染色、免疫染色、特殊染色を施した切片を光学顕微鏡で観察し、肝小葉内における微小循環系である毛細血管網 (類洞) の発達度を観察した。類洞の発達度は Elias の分類 (Elias 1949) によって類洞は未発達で several cell thick plate の型を (+1)、中程度の類洞発達型である two cell thick plate 型を (+2)、哺乳類型の明らかに発達した肝細胞索を認める one cell thick plate 型を (+3) とした (図 1)。

2. 肝細胞内におけるグリコーゲンの検出 (PAS 染色)

肝臓のパラフィン切片 (4 μ m) は脱パラフィン後、アルコール系列にて脱水し、蒸留水にて置換した。1% 過ヨード酸液、コールドシッフ試薬にて染色後、亜硫酸水を経て流水にて水洗、脱水、キシレン透徹、封入し、検鏡・写真撮影を行った。染色後の切片は、顕微鏡による観察から、グリコーゲンの沈着度を 3 段階表示 (+1: 軽度, +2: 中等度, +3: 高度) で表した (図 2)。

3. 肝細胞内の脂肪の検出 (オイルレッド O 染色)

固定した肝組織は、マイクロスライサーにて 30 μ m の厚切り切片を作成した。切片は、リン酸緩衝液にて十分に水洗した後、イソプロピルアルコールになじませ、37 $^{\circ}$ C に加温したオイルレッド O 染色液にて染色した。染色後、イソプロピルアルコールで分別して水洗し、ヘマトキシリンにて核染色を行った後、グリセリンにて封入した。染色を行った切片は、顕微鏡で観察し、脂肪の沈着度を

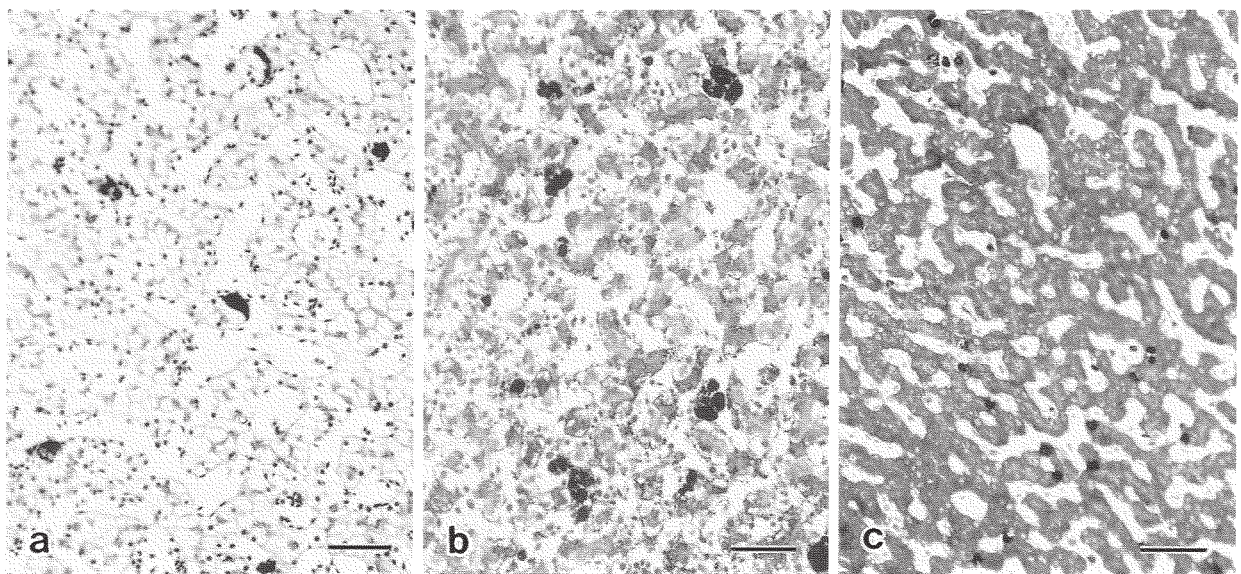


図 2 肝細胞内のグリコーゲンの貯蔵度 (PAS 染色)

a) グリコーゲンの貯蔵が少なかった。+1: アフリカツメガエル。b) 中程度のグリコーゲン貯蔵が観察された。+2: ウシガエル。c) 非常に多くグリコーゲンの貯蔵が観察された。+3: ニホンアマガエル。Bar=30 μ m

4段階表示(0:なし, +1:軽度, +2:中程度, +3:高度)で表した(図3).

4. クッパー細胞の色素沈着度

肝臓のパラフィン切片(4 μ m)は脱パラフィン後, 無染色のまま封入し, 肝組織内のクッパー細胞の色素沈着度を観察した. 肝組織内の色素の沈着度を3段階表示(+1:軽度, +2:中程度, +3:高度)で表した(図4).

5. 肝星細胞の細胞骨格の表現型(免疫組織学的染色)

肝臓のパラフィン切片(4 μ m)は脱パラフィン後, H₂O₂にて内因性ペルオキシターゼをブロックし, 15%正常馬血清処理を行った. 一次抗体には, ダコー社のウサギ抗 α 型平滑筋アクチン抗体(α -SM actin)および抗グリア繊維性酸性タンパク質抗体(GFAP)を使用し, 室温で一晩反応後, 二次抗体のアビジン-ビオチン処理を行った. DABにて抗体陽性部を発色させた後, 検鏡して写真撮影を行った. これまでの研究報告から, 抗GFAP抗体はシュワン細胞, 肝星細胞(HSC), 抗 α -SM actin抗体は両生類動脈の平滑筋細胞, 肝星細胞の筋繊維芽細胞型に対して有効であった(井上ら2002).

結 果

1. 肝臓の解剖学的形態

肝臓は全般に赤褐色から灰黒色で, 色素沈着の多い種では全般に黒色調が強かった. 肝臓の分葉は各目(order)で異なり, 無尾目は多葉, 有尾目は1葉で先端が2つに

分離, 無尾目アカガエル科は2葉で1葉の先端が2つに分離, ヒキガエル科とアオガエル科は3葉であった.

肝臓の体重に対する重量比である比肝重量(hepatosomatic index:HSI)は1~12%であったが, 各目・科内で優位な差は認めなかった. 胆嚢は全種で肝臓の近傍に認め, 球形または楕円形状で, 総胆管によって小腸に連絡していた. 有尾目では胆嚢が肝臓内に埋没して観察された. また, 肝臓, 胆嚢と密接に関わっている膵臓は, 胃側に存在している種と, 小腸側に存在している種に2分され, 有尾目では肝組織中に侵入している種(9/13)を認めた.

2. 肝臓の組織学的形態

類洞の発達, クッパー細胞の反応, グリコーゲン沈着, 脂肪沈着, 肝膵臓の有無, 肝被膜およびグリソン鞘域におけるリンパ装置の有無およびHSCの表現型を表1に示した. 無尾目, 有尾目, 無尾目間ではそれぞれ特有の肝組織像を認め, 肝小葉域とグリソン鞘域の観察においても, 組織構造に明らかな差を認めた.

肝小葉域

a) 肝細胞の配列

肝小葉内における微小循環系である毛細血管網(類洞)の発達は, Elias分類によるone cell thick plate型の, 哺乳類型の肝細胞索発達を認めるものが多数で(40/44), two cell thick plate型で中程度の発達(2/44), several cell thick plate型で, 魚類に多く見られる未発達型は有尾目の一部(2/13)で確認された.

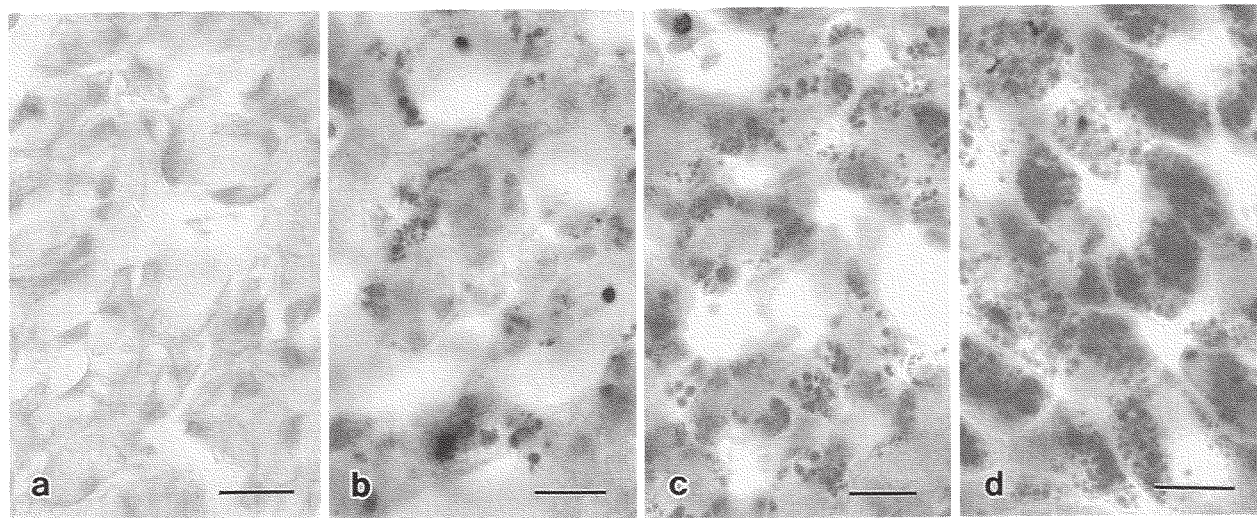


図3 肝細胞内の脂肪の貯蔵度(オイルレッドO染色)

a) 肝細胞内の脂肪の貯蔵を認めなかった. 0:ツチガエル. b) 脂肪の貯蔵が軽度認められた. +1:モリアオガエル. c) 脂肪の貯蔵が中程度認められた. +2:オキタゴガエル. d) 細胞内に多くの脂肪滴を認めた. +3:ブチサンシウウオ. Bar=20 μ m

b) 肝細胞

肝細胞は一般に、小多角形または小円形状を呈していた。核は細胞の中央に位置する種が多かったが、特に類洞が発達した種では、類洞側に位置していた。これらの肝細胞は細胞質内に小顆粒が多数見られ、HE 染色像では細胞質は淡明で、PAS 染色に陽性に反応することから、この小顆粒はグリコーゲンと思われた。強陽性の反応でグリコーゲンを豊富に貯蔵するのは有尾目で、ほとんどの種で認められた (10/13)。無尾目では中程度貯蔵が多かったが (16/30)、他は肝細胞内にグリコーゲンをほとんど認めなかった (18/44)。一方、オイルレッド O 染色に強陽性の肝細胞の細胞質内には、小型から大型の脂肪滴が観察された。

c) クッパー細胞

クッパー細胞の色素の沈着度、細胞の大きさや小葉内で結節を形成している細胞数には種差が認められた。組織内の色素の沈着度を3段階表示 (+1:軽度, +2:中程度, +3:高度) で表した (図4)。大型のクッパー細胞は、赤血球をたくさん取り込んでいる貪食像を多く認めた。色素の沈着度が高く活発な貪食像を示す+3の種 (11/44) は、無尾目と有尾目 (5/14) および無尾目アオガエル科 (4/6) に多く認められた。中程度貪食像 (+2) は有尾目 (4/13) および無尾目 (11/30)、軽度貪食像 (+1) は無尾目アカガエル科 (6/16)、ヒキガエル科 (3/4) で観察された。クッパー細胞は活発に赤血球などを貪食して細胞内に色素を多く沈着している種と、貪食はしている

が細胞内の色素沈着が少ない種が認められた (図5)。

d) リンパ装置

有尾目では、リンパ球が多数集合したリンパ装置が被膜下およびグリソン鞘内に認められたが、無尾目ではほとんど認めなかった (図6)。

e) 肝星細胞 (HSC : Hepatic Stellate Cell)

肝星細胞 (HSC) は、類洞の内皮細胞と肝細胞間であるディッセ腔に全種類で認められたが、種によって様々な形態や分布を示した。これらの HSC は抗 α 型平滑筋アクチン抗体と抗グリア繊維性酸性タンパク質抗体の両方に陽性であった。無尾目と有尾目の HSC は、共に小型で多角形の細胞を少数認めたが、無尾目アオガエル科は、大型の四角形の細胞を多く認めた (図7)。

グリソン鞘域

無尾目、有尾目は、グリソン鞘の発達は組織の中央部に大型のグリソン鞘が1個存在するのみで、全体的に発達は乏しかった。グリソン鞘の脈管系周囲に認められる結合組織の発達は、有尾目より無尾目で発達して認められた。 α 型平滑筋アクチン抗体による免疫染色の結果、類洞および胆管壁の筋層を構成する平滑筋細胞が無尾目よりも有尾目の方がよく発達していた (図7)。

肝臓

一般に硬骨魚類に多く認められ、肝臓のグリソン鞘域に脾組織が入り込む肝臓は、有尾目に認め (9/13)、無

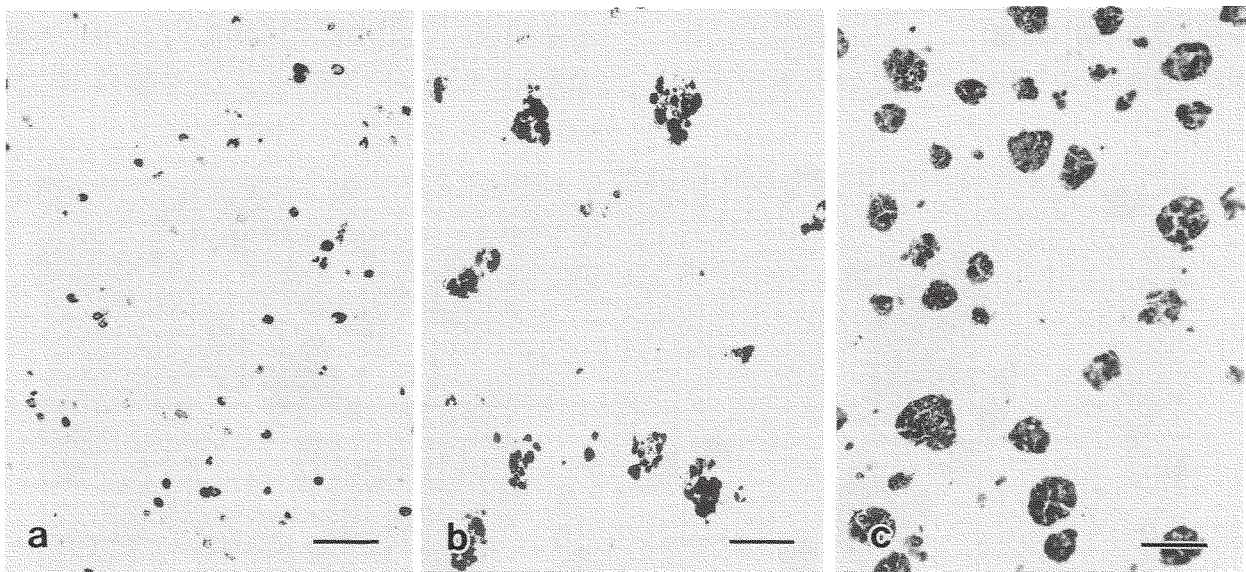


図4 肝組織中におけるクッパー細胞の色素沈着度

a) 小型のクッパー細胞が少数類洞内に観察された。+1:ニホンアマガエル。b) 比較的大型のクッパー細胞がいくつか集まり、中程度の色素の塊を作って観察された。+2:ウシガエル。c) 大型のクッパー細胞が数個で集まり、組織内に多く存在して観察された。+3:リュウキュウカジガエル。Bar=30 μ m

尾目には認めなかった。硬骨魚類に見られるような肝脾臓が肝臓の流入血管である門脈系の血管内に脾臓組織が侵入している像とは異なり、グリソン鞘内に脾臓組織が完全に入り込んだ形態像を認めた(図8)。

3. 代表的な各科の肝組織学的特徴

a) 無足目 (1種)

類洞はよく発達していた。肝被膜下およびグリソン鞘域は、リンパ球が多数認められ、小葉域にもリンパ球様のリンパ球の結節形成が観察された。クッパー細胞の細胞質内には、数個から10数個の褐色の色素を含んだ細胞塊が認められた。PAS染色では、細胞質内に多くのグリコーゲンを有し、胆管壁にも同様のグリコーゲンが認められた。エラストイカ・ゴールドナー染色では、動脈壁の弾性繊維は認めなかった。

b) 有尾目

・イモリ科 (2種)

類洞はよく発達し、中心静脈を中心とした同心円状の索状配列を認めた。グリソン鞘は未発達で、胆嚢近傍に肝脾臓を認めた。グリソン鞘を共有した脾臓組織(脾臓)が観察された。リンパ装置は被膜下でよく発達していたが、グリソン鞘域では未発達であった。比較的大型のクッパー細胞が類洞内で多数観察され、細胞質内に濃い褐色の色素を有し、結節を形成していた。PAS染色では、アカハライモリとシリケンイモリの間で染色性に差が見られた。脂肪染色では、類洞側の肝細胞内に小脂肪滴が認められた。動脈の弾性繊維は観察出来なかった。

・サンショウウオ科 (10種)

類洞の発達は種により異なっていた(+3:6/10,+2:

2/10,+1:2/10)。肝脾臓は胆嚢の近傍に、脈管系を共有して観察された(6/10)。小型のクッパー細胞が、小葉内に認められた(+3:1/10,+2:4/10,+1:5/10)。被膜下およびグリソン鞘域のリンパ装置は、全種でよく発達して観察された。PAS染色では細胞質内にグリコーゲンを認め(+3:7/10,+2:3/10)、肝細胞質内にはグリコーゲンの顆粒が多数観察された。

・オオサンショウウオ科 (1種)

肝細胞は大型で、類洞はよく発達していた。クッパー細胞は濃い褐色の色素を有し、細胞が密集した結節を類洞内に認めた。肝脾臓は、胃幽門部の胆嚢付近に、肝組織と脈管系を共有して認めた。PAS反応は陰性で、肝細胞内にはグリコーゲンをほとんど貯蔵していなかった。また、肝細胞の細胞質内には小滴が多数観察された。動脈壁の弾性繊維は明らかではなかった。

c) 無尾目

・ヒキガエル科 (4種)

類洞はよく発達し(+3:4/4)、ほとんどの種で黒色の色素を持った小型のクッパー細胞が観察された(+3:1/4,+1:3/4)。肝脾臓は認めず、グリコーゲンの染色性は種間で異なっていた(+2:2/4,+1:2/4)。肝細胞は小型で多角形をしており、リンパ装置はグリソン鞘域と肝小葉内に小さな結節を認めた。

・アカガエル科 (16種)

類洞はよく発達し(+3:16/16)、クッパー細胞の色素沈着は種によって差が認められた(+3:1/16,+2:9/16,+1:6/16)。肝細胞質内のグリコーゲン沈着度は、種差が見られた(+3:1/16,+2:6/16,+1:9/16)。肝脾臓は認められず、リンパ装置はグリソン鞘域(2/16)と肝小

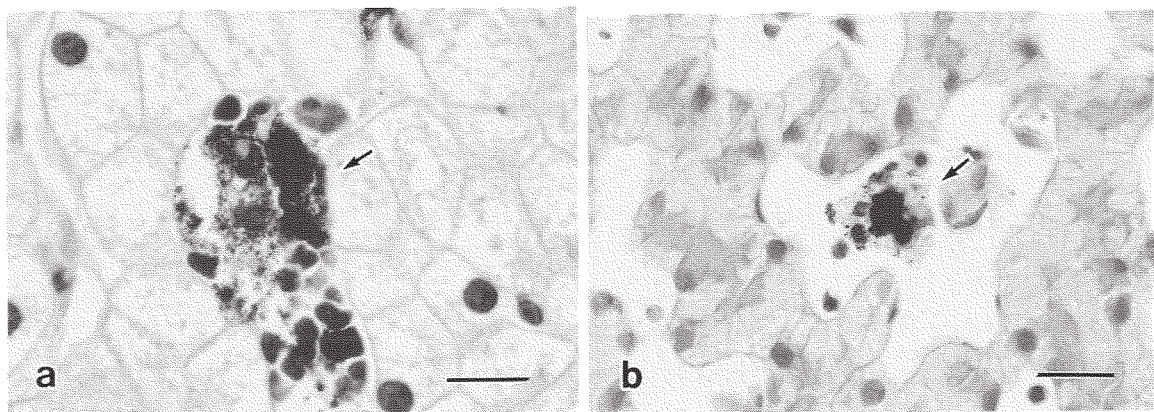


図5 クッパー細胞の貪食像

クッパー細胞の貪食能は、種により異なっていた。活発に貪食を行っている種ほど、細胞質内に黒い色素を多く沈着していた。a) 活発に貪食し、細胞質内に色素を高度に沈着して観察された(矢印)。ミズアシナシイモリ。b) 貪食像は観察されるが、軽度の色素沈着が認められた(矢印)。トノサマガエル。Bar=20 μ m

表1 両生類44種における，類洞発達，色素沈着，グリコーゲン沈着度，脂肪の貯蔵度，肝被膜およびグリソン鞘および肝小葉内のリンパ装置，HSCの表現型を示した相関表

種名	類洞発達	色素沈着	グリコーゲン	脂肪	肝臓	被膜直下のリンパ装置	G鞘のリンパ装置	肝小葉内のリンパ装置	HSCの表現形		
									SM	GFAP	
無足目											
ミズアシナシイモリ	3	3	3	2	—	+	+	+	+	+	
有尾目											
サンショウウオ科											
オオイタサンショウウオ	3	2	2	1	+	+	+	+	+	+	
ヒダサンショウウオ	3	2	2	1	—	+	+	+	+	+	
トウホクサンショウウオ	2	1	3	3	+	+	+	+	+	+	
ブチサンショウウオ	1	3	3	3	+	+	+	+	+	+	
カスミサンショウウオ	3	2	3	3	+	+	+	+	+	+	
クロサンショウウオ	3	2	3	1	+	+	+	+	+	+	
オキサンショウウオ	1	1	3		—	+	+	+	+	+	
エゾサンショウウオ	3	1	3	0	—	+	+	+	+	+	
ベッコウサンショウウオ	2	1	3		—	+	+	+	+	+	
ハコネサンショウウオ	3	1	2	2	+	+	+	+	+	+	
オオサンショウウオ科											
オオサンショウウオ	3	3	1	3	+	+	+	+	+	+	
イモリ科											
シリケンイモリ	3	3	1	3	+	+	+	+	+	+	
アカハライモリ	3	3	2	2	+	+	+	+	+	+	
無尾目											
スズガエル科											
スズガエル	3	1	1	3	—	+	+	+	+	+	
ピバ科											
アフリカツメガエル	3	1	2	2	—	+	+	+	+	+	
ヒキガエル科											
ミヤコヒキガエル	3	3	2	1	—	—	+	+	+	+	
ニホンヒキガエル	3	1	2	1	—	—	+	—	+	+	
アズマヒキガエル	3	1	1	1	—	—	—	—	+	+	
オオヒキガエル	3	1	1	2	—	—	+	+	+	+	
アマガエル科											
ニホンアマガエル	3	1	3	1	—	—	—	—	+	+	
アカガエル科											
ウシガエル	3	2	2	2	—	—	+	+	+	+	
ニホンアカガエル	3	1	1	0	—	—	—	+	+	+	
ヌマガエル	3	1	2	0	—	—	—	+	+	+	
サキシマヌマガエル	3	1	2	1	—	—	—	+	+	+	
トノサマガエル	3	1	3		—	—	—	+	+	+	
ヤマアカガエル	3	2	1	1	—	—	—	+	+	+	
エゾアカガエル	3	3	1	1	—	—	—	—	+	+	
ヤエヤマハラブチガエル	3	2	1	0	—	—	—	+	+	+	
ツチガエル	3	2	2	0	—	—	—	+	+	+	
ナガレタゴガエル	3	2	2	0	—	—	—	—	+	+	
オットンガエル	3	2	2		—	—	+	+	+	+	
オオハナサキガエル	3	2	1	2	—	—	—	—	+	+	
タゴガエル	3	1	1	0	—	—	—	+	+	+	
オキタゴガエル	3	1	1	2	—	—	—	—	+	+	
ツシマアカガエル	3	2	1	0	—	—	—	—	+	+	
コガタハナサキガエル	3	2	1		—	—	—	—	+	+	
アオガエル科											
カジガエル	3	3	1	1	—	—	—	+	+	+	
リュウキュウカジガエル	3	3	1	2	—	—	—	+	+	+	
モリアオガエル	3	3	2	1	—	—	—	+	+	+	
ヤエヤマアオガエル	3	2	1		—	—	—	+	+	+	
シュレーゲルアオガエル	3	2	2		—	—	—	—	+	+	
アマミアオガエル	3	3	1		—	—	—	—	+	+	
ジムグリガエル科											
ヒメアマガエル	3	1	2	1	—	—	—	+	+	+	

葉内 (10/16) に認められた。

・アオガエル科 (6種)

類洞は全種でよく発達しており、血管網の径は大であった (6/6)。肝細胞は四角形で、細胞質内には大型の小滴が多数観察されたが、グリコーゲンは認めなかった (+2:2/6, +1:4/6)。肝臓は認めず、グリソン鞘域に少数のリンパ装置が観察された (4/6)。

・ピパ科アフリカツメガエル

類洞は発達していたが血管径は小さく、肝細胞は大型で四角形をしていた。クッパー細胞は細胞質に黒色の色素を持つ小型の細胞が少数認められた。

・スズガエル科スズガエル

類洞は良く発達し、肝細胞は大型で PAS 染色に陰性であった。クッパー細胞は黒色の色素を持った小型の細胞が点在して認められた。

・ジムグリガエル科ヒメアマガエル

類洞は発達していた。肝細胞は小型で、グリコーゲンは中程度の染色性が観察された。黒色の色素を持ったクッパー細胞は、非常に小型で類洞内に少数認めた。

考 察

両生類は、進化の重要テーマの一つである水中生活から陸上生活へと移行した「上陸」に関して研究する上で最適なモデル動物である。「上陸」の主要テーマは、「いかにして重力に適応したか」であるが、上陸するための体の改変は、外骨格や皮膚、呼吸器、生殖方法のみならず、環境の変化に伴う食性の相異に伴った食物の消化、吸収などに関連する内臓機能の改変も同時に存在した事が推察される。しかし、消化管内臓学の立場から「上陸」に伴う内臓の改変を明らかにした研究は非常に少なく、無脊椎動物から脊椎動物の肝臓に関する系統学的な研究 (Cornelius 1985)、硬骨魚類肝臓 (秋吉ら 2001, 井上ら 2002) および甲殻類の中腸腺 (秋吉ら 2002) に関する報告と、脾臓および膵臓との関連を示した研究がある程度である (Anna et al. 2002, Sac-kwang et al. 2003)。今回、44 種の両生綱において無足目・有尾目・無尾目間において比較したところ、系統学的に明らかに肝臓の組織構築が異なる事が判明した。

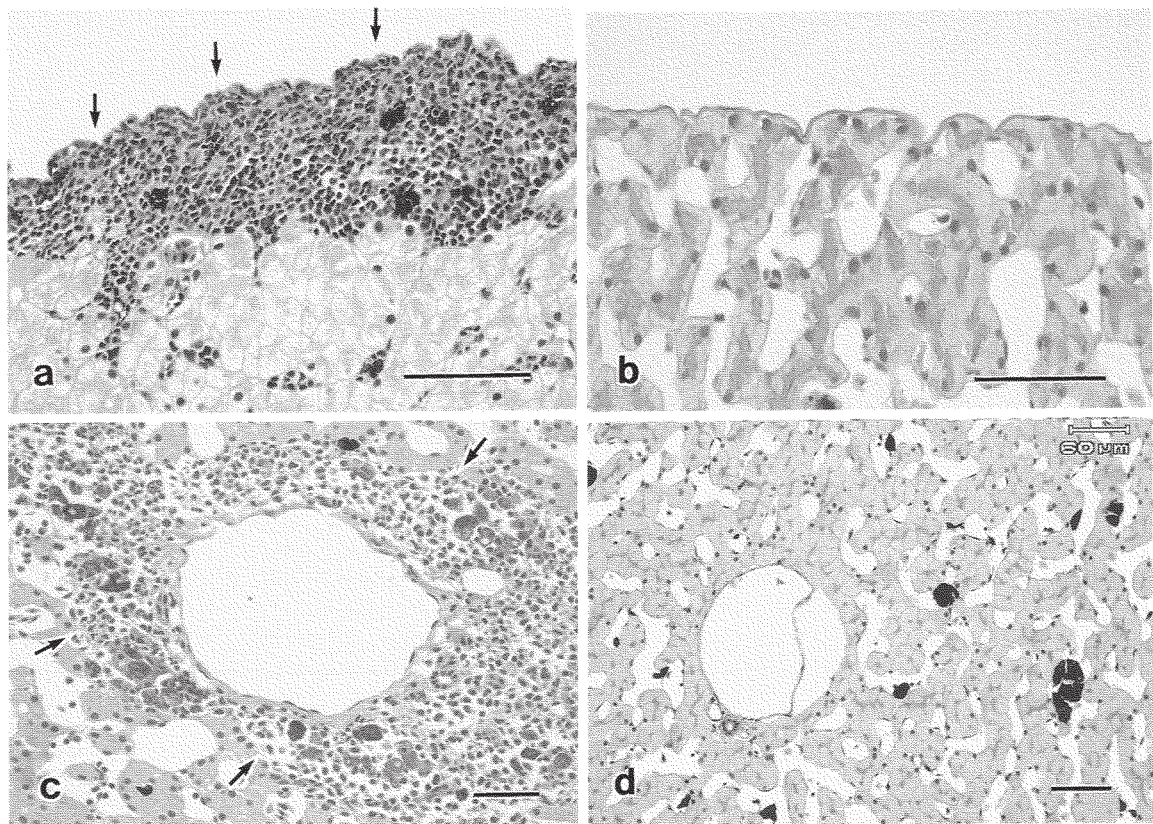


図6 被膜下、グリソン鞘域および肝小葉域に観察されたリンパ装置の組織学的特徴

a) 肝被膜下にリンパ装置が観察された (矢印)。ブチサンショウウオ。b) 肝被膜下にリンパ装置を認めなかった。トノサマガエル。c) 無足目、有尾目および無尾目の一部の種において、グリソン鞘域にリンパ装置が観察された (矢印)。ミズアシナシイモリ。d) グリソン鞘域にはリンパ装置は観察されなかった。トノサマガエル。Bar=60 μ m

解剖学的には、肝臓の肉眼形態および分葉の仕方、はっきりと種差が認められた。有尾目の肝葉は大型の1葉であるのに対し、無尾目では肝葉は分葉していた。このような違いはサンショウウオ類のような細長い体型と一般的なカエルのような扁平な体型に相応した肝臓形態をとっている事が起因していると考えられた。組織学的には、肝小葉内の毛細血管網である類洞はほとんどの種で良く発達しており、魚類に比べてかなり血管網は発達していた(秋吉ら 2001)。両生綱の中でも、系統的に下等な位置にある有尾目のサンショウウオ類は、魚類に見られるような未発達な型が存在していたが、棲息様式で比

較すると、水棲種では類洞が発達していても血管径は狭く、また、胆管壁の平滑筋層も陸上種に比べて発達傾向にあったことから、棲息する環境によって、血管系および胆管系の発達に関連性があることが明らかとなった。一般に水中生活をしている硬骨魚類では、肝臓にグリコーゲンもしくは脂肪を蓄え、エネルギーとして供給できるように適応しているという報告(秋吉ら 2001, 2003)を見るが、今回の結果からは、グリコーゲンおよび脂肪の貯蔵について系統学的な相関は明らかに出来なかった。従って、環境および季節的なエネルギー代謝の変動を念頭に入れて、研究を進めていく必要があると思われる。

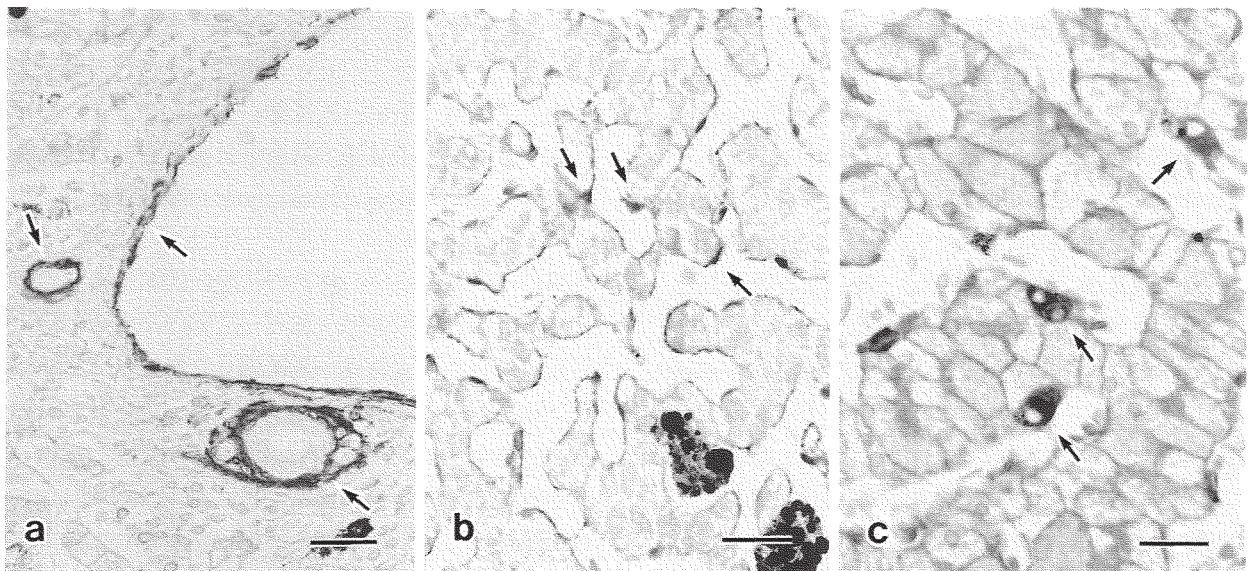


図7 肝小葉域における肝星細胞

a) グリソン鞘の血管の平滑筋細胞が抗 α 型平滑筋アクチン抗体(α -SM actin)によって陽性(矢印)に染色された。オオサンショウウオ。Bar=60 μ m。b) 肝星細胞の細胞骨格は、抗 α 型平滑筋アクチン抗体(α -SM actin)により陽性(矢印)に認められた。トノサマガエル。c) 肝星細胞の細胞骨格は、抗グリア繊維性酸性タンパク質抗体(GFAP)により陽性(矢印)に認められた。アフリカツメガエル。Bar=20 μ m

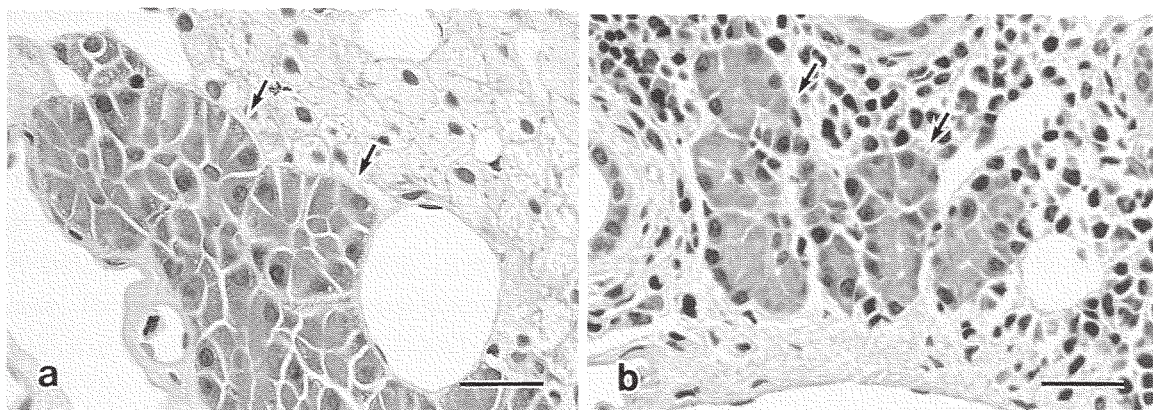


図8 肝組織中における肝星細胞

有尾目において、硬骨魚類に見られる肝星細胞がグリソン鞘域に認められた(矢印)。a) カスミサンショウウオ、b) プチサンショウウオ。Bar=20 μ m

クッパー細胞は肝臓内で食作用を有し、生体の防御機構に預かる重要な免疫系の細胞である。古い赤血球等を貪食すると、細胞質内にヘモジデリン色素を沈着し、茶色や黒色に観察される。今回の結果では、クッパー細胞による赤血球貪食能は、有尾目で最も良く発達していたが、無尾目では、系統的に高等なアオガエル科の種で良く発達 (+3:4/6, +2:2/6) していた。このようなクッパー細胞の貪食能が有尾目、無尾目でよく発達していた事は、免疫能の獲得が両生類から発達している事に関連しているものと考えられた。これまでの報告では、肝小葉内における色素沈着は、海水魚類ではほとんどの種で見られないが、淡水魚類では色素の量は少ないが一部の種において認められる事が明らかにされている (秋吉ら 2001)。進化学的には陸生動物は淡水の河川より上陸したとする説が有力である事から、免疫系の進化には、両生類有尾目で認められたクッパー細胞の活性能の増加と何らかの関連がある事が示唆された。一般に、哺乳類の肝臓は胎生期を除いて、発達したリンパ装置は認めないが、今回の研究で両生類の一部において、発達したリンパ装置の存在が明らかとなった。特に有尾目では、被膜下およびグリソン鞘内にリンパ装置が見られ、クッパー細胞の色素沈着と同様に、両生類有尾目の肝臓では脾臓機能の一部を肝臓が担っていることが推察された。一方、系統的に上位の無尾目では、その機能が脾臓に集約されていった可能性が考えられた。しかし、肝小葉内では有尾目、無尾目を問わず、リンパ球が密集して、大小様々な口胞の形態を呈していた。このことは、哺乳類に見られるように生体内へ進入した異物等に対応した反応と同様の形態学的所見が両生類肝臓でも存在する事で、両生類はすでに高度な生体防御機構が発揮されている可能性が示唆された (Corsaro et al. 2000, Sichel et al. 2002, 1997)。

細胞骨格にグリア繊維性酸性タンパク質を有し、ビタミン A 貯蔵能を有する肝星細胞 (HSC) と細胞骨格に α 型平滑筋アクチンを有し、マトリックス産生型の HSC の特別な型である筋繊維芽細胞型 (MF) は、すべての種において、両方のタイプの細胞が存在することが明らかとなった。系統的に下等な有尾目の種では HSC は小型の細胞として MF 型であったが、系統的に高等な無尾目の HSC では大型の GFAP 抗体陽性細胞として観察され、HSC はビタミン A 貯蔵能を有する型である事が判明した。特にアオガエル科の様に、樹上性で夜行性の種に著明であった事から、視覚器に関連したビタミン A 代謝に肝臓が能動的に関与している事が推察された (Akiyoshi et al. 1998, 1999)。

有尾目において肝臓のグリソン鞘域に魚類の一部に見られる肝脾臓と同じような脾組織 (秋吉ら 2001, 井上ら 2002) が確認された事はこれまでに報告がない。その存在意義については、今回の結果から明らかに出来なかったが、脾臓のリンパ装置と同様に系統的に高等な無尾目で観察されなかった事も含め、有尾目の肝臓は発達段階にある脾臓機能の補助的な役割も担っている可能性が存在するものと推察された。

今回の研究によると、系統的に無尾目よりも先に分岐したとされている有尾目では、魚類に見られる肝脾臓が観察されたが、無尾目では観察されなかった。肝臓の毛細血管網である類洞の発達是有尾目より無尾目で明らかであった事など、両生類の肝臓における組織構築の発達段階は、現在考えられている系統関係に沿って高度に発達していると思われた。また、系統的に下位に位置する種では、脾臓、膵臓、肝臓との臓器間で生体の様々な機能を連携し、機能していることが推察された。

結 語

両生類は、棲息環境への多様性に対応するために、肝臓の構造をそれぞれの環境に適応させて進化させていったと考えられた。両生綱の中でも有尾目と無尾目では明らかな組織構築像の相違が認められた。有尾目では肝臓の微小循環系である毛細血管網の血管径は狭く、十分に発達していると言えないが、対照的にリンパ管系が発達する傾向が見られた。硬骨魚類における肝脾臓が、系統的に下等な有尾目で観察された事は、有尾目と硬骨魚類の相関を考える上で、貴重な発見であると思われた。両生綱の免疫機能に関しては、肝臓が補助的に機能を担当している事が示唆された。さらに HSC の観察から、陸上で生活するうえで重要な視覚器の発達が肝臓の組織構築と密接に関連して、発達していることが示唆された。両生類有尾目は、陸上に上がるための準備として肝組織構造を、無尾目は水から離れるための準備として肝組織構造を改変して、多様な棲息域に適応させて進化していったと推察した。今研究は、両生類の進化過程と内臓との関連性を、食性や環境的要因および系統発生的に明らかにしたと考える。

謝 辞

研究の一部は東海大学沖縄地域研究センターの施設を利用して行った。採集の便宜および研究室利用に関して

大変お世話になった河野裕美氏, 崎原 健氏に深く御礼申し上げます。また, 両生類全般の食性および棲息域についてご指導およびご助言頂きました, 環境科学株式会社 立脇康嗣氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 秋吉英雄, 井上明日香, 濱名昭弘, 海水産魚類の行動と肝臓の組織生化学的相関に関する比較形態学的研究, 島根大学生物資源科学部研究報告, 6: 7-16, 2001
- 秋吉英雄, 井上明日香, 濱名昭弘, 甲殻類十脚目における中腸腺(肝臓)の系統発生および棲息様式に関連した比較形態学的研究, 島根大学生物資源科学部研究報告, 7: 1-8, 2002
- 秋吉英雄, 井上明日香, 内藤富夫, 山下雅道, 両生類における系統発生・棲息様式と組織生化学からみた肝臓の比較形態学. *Space Utilization Research*, 18: 105-108, 2002
- 秋吉英雄, 富室孝仁, 井上明日香, ハゼ科魚類の肝臓の比較組織化学的研究—肝臓の組織学的特徴と系統発生および棲息様式との関連—, ホシザキグリーン財団研究報告書, 6: 201-213, 2003
- Akiyoshi H., Gonda T. and Terada T., A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. *Liver*, 18: 352-359, 1998
- Akiyoshi H., Terada T., Centrilobular and perisinusoidal fibrosis in experimental congestive liver in the rat. *Journal of Hepatology*, 30: 433-439, 1999
- Anna Gallone, Gabriella Guida, Immacolata Maida and Rosa Cicero, Spleen and Liver Pigmented Macrophages of *Rana esculenta* L. A New Melanogenic System? *Pigment Cell Research*, 15: 32-40, 2002
- Barni S., Bertone V., Croce AC., Bottiroli G., Bernini F., Gerzeli G., Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*, 195(1): 19-25, 1999
- Bernd Fritsch, The Evolution of Metamorphosis in Amphibians. *Journal of Neurobiology*, 21(7): 1011-1021, 1990
- Cornelius C. E., Hepatic Ontogenesis. *Hepatology*, 5(6): 1213-1221, 1985
- Corsaro C., Scalia M., Leotta N., Mondio F., Sichel G., Characterisation of Kupffer cells in some Amphibia. *Journal of Anatomy*, 196(2): 249-61, 2000
- Elias H., A re-examination of the structure of the mammalian liver. I. Parenchymal architecture. *American Journal of Anatomy*, 84: 311-333, 1949
- Elias H., A re-examination of the structure of the mammalian liver. II. The hepatic lobule and its relation to the vascular and biliary systems. *American Journal of Anatomy*, 85: 379-456, 1949
- Elias H., The liver cord concept after one hundred years. *Science*, 110: 470-472, 1949
- Giuliano Frangioni, Gianfranco Borgioli, Stefano Bianchi and Serena Pillozzi, Relationships Between Hepatic Melanogenesis and Respiratory Conditions in the Newt, *Triturus cristatus*. *Journal of Experimental Zoology*, 287: 120-127, 2000
- 井上明日香, 秋吉英雄, 内藤富夫, 山下雅道, 両生類肝臓の比較形態学. 日本宇宙生物科学会第16回大会プロシーディングス, 16: 136-137, 2002
- 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 久保英夫, 新海正, 藤井博匡, 山下雅道, 無尾両生類の変態におけるアポトーシスや体の形態・機能の変化と重力. *Space Utilization Research*, 18: 109-112, 2002
- Sac-kwang Ku, Hyeung-sik Lee, Jae-kee Koh and Jae-hyun Lee, An immunohistochemical study on the neuropeptide-producing endocrine cells in the alimentary tract of wrinkled frog, *Rana rugosa* (Ranidae). *General And Comparative Endocrinology*, 131: 1-8, 2003
- Sichel G., Scalia M., Corsaro C., Amphibia Kupffer cells. *Microscopic Research Technology*, 57(6): 477-90, 2002
- Sichel G., Scalia M., Mondio F., Corsaro C., The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment Cell Research*, 10(5): 271-87, 1997
- 内山実, 上条雅, 松田恒平, 吉沢英樹, 脊椎動物における陸生適応と腎臓の多様性—両生類を中心に—, 日本宇宙生物科学会誌, 14: 22-31, 2000