

原 著

肝における脂肪乳剤の代謝に関する形態学的研究を可能とする新しい固定法と肝オートラジオグラフィーの確立*

馬 庭 芳 朗**

Yoshio MANIWA**: *New Electron Microscopic and Autoradiographic Studies on the Metabolism of Fat Emulsions in the Rat Liver**. J. Wakayama Med. Soc., 42, (4) 791-804

To clarify the hepatic metabolism of lipid emulsions for intravenous use, new staining techniques for scanning and transmission electron microscopy of artificial lipid particles and the liquid crystal emulsification method that could make the easy preparation of optional fat emulsion were devised.

MCT emulsion and radio-labelled fat emulsion which were experimentally produced with these methods were examined. Lipid particles in the hepatic tissue were observed morphologically by electromicroscopic and autoradiographic studies.

The metabolism of artificial lipid particles injected intravenously were declared as following. There was not a form of remnant but artificial lipid particles were incorporated to the hepatic parenchyma cells and intracellular transferred promptly without removing the phospholipid-layer. Intracellular metabolism of MCT emulsion in the liver was extremely fast compared to LCT emulsion. These findings were also proved morphologically and

metabolic process of artificial lipid particles could to be observed with the hepatic autoradiographic method using radio-labelled fat emulsion produced by the new method.

緒 言

現在わが国で臨床使用できる静注用脂肪乳剤は大豆油を卵黄または大豆レシチンで乳化しグリセリンで浸透圧を調整した LCT (long chain triglyceride) 乳剤であるが、最近、特に外科領域でミトコンドリアへの転送にカルニチンを必要とせず代謝の速い MCT (medium chain triglyceride) が新しい熱源として注目されている¹⁻⁵⁾。

このような内因性カイロミクロンと全く組成の異なる人工脂肪粒子の体内における代謝については、まだまだ不明な点が多く脂肪の固定が困難であったため、特に電子顕微鏡学的にはほとんど検討されていない。

一方、静注できる安定性の高い脂肪乳剤の作成には高圧ホモジナイザーを用いた煩雑な乳化法が必要であるため、任意の組成の脂肪乳剤や放射性脂肪乳剤を用いた人工脂肪粒子の体内動態に関する研究も極めて困難であった。

そこで、静注した脂肪粒子の体内における代謝に関する電子顕微鏡学的観察を可能とする新しい固定法と脂肪乳剤の作成を容易とする乳化法を開発し、MCT 乳剤と放射性脂肪乳剤を試作して透過電子顕微鏡と肝オートラジオグラフィーを用いて投与した脂肪粒子の体内における代謝を形態学的に検討した。

*平成2年7月29日受付

*Received on July 29, 1991

**和歌山県立医科大学 消化器外科学教室
(主任: 谷村 弘教授)**Department of Gastroenterological Surgery,
Wakayama Medical College.
(Director: Prof. Hiroshi Tanimura)

対象および方法

I. 静注用脂肪乳剤粒子の走査電子顕微鏡による観察法の確立

1. 固定液の選択

10% LCT 乳剤 (Intralipid[®]) および 10% tricaprilyn (MCT) 乳剤粒子の電顕用固定液として、従来から繁用されていた osmium tetroxide (OS) と gluteraldehyde (GA) に加え、脂肪乳剤の構成成分である中性脂肪・リン脂質両者に親和性の高い malachite green (MG) を新たに添加し、その濃度と組み合わせ法について最適条件を求めた。

2. 支持体の検討

脂肪乳剤粒子を保持する支持体として、paper filter 1 種 (Wattman 2 定量濾紙), membrane filter 2 種 (0.45 μ millipore filter, polystyrene, nylon) およびポリエリジン吸着ガラス板を用いその親和性を比較し最も良好な支持

体を選択した。

脱水はエタノールによる進行的脱水を行い、日立 E-102 イオンスパッターにて白金蒸着後、日立 S-2300 型走査電子顕微鏡にて観察した。

II. 肝組織内脂肪粒子の電顕的固定法の確立と LCT 乳剤静注時の肝における脂質代謝の検討

1. 肝組織における脂肪粒子の固定法の確立

Wistar 系雄性ラット (8 週齢, 体重約 200 g) 12 匹に 10% LCT 乳剤 (Intralipid) 2.5ml/kg を尾静脈より 2 分かけて静注し 5 分後犠牲死させ表 1 のごとく肝組織中の脂肪粒子の固定法を検討した。

以下、エタノールによる進行的脱水を行い酸化プロピレンにて置換しエポキシ樹脂包埋後、Potter-Blum MT-2 型 Ultra Microtome にて超薄切片を作成した。電子染色には酢酸ウラン・クエン酸鉛による二重染色を行い、日本電子製 SX 200 型透過電子顕微鏡にて肝組織の脂肪粒子の固

表 1 肝組織内脂肪粒子の電顕的固定法の検討

組み合わせ	前 固 定		リン酸緩衝液 置 換	後 固 定
	灌流固定・経路	浸 漬 固 定		
1.	—	2% GA 60分	—	2% OS・1% MG 60分
2.	2% GA 10分 (門脈)	2% GA 90分	—	2% OS・1% MG 90分
3.	2% GA 10分 (大動脈)	2% GA 90分	90分	2% OS・1% MG 3時間
4.	2% GA 10分 (大動脈)	2% GA 90分	90分	2% OS・1% MG 24時間

1. 液晶乳化法による高濃度トリチウム標識脂肪乳剤の作成

- 1) 卵黄レシチン 2.5g
蒸留水 2.5g
濃グリセリン 1.2g } にて液晶相形成
- ↓
- 2) トリオレイン, [9, 10-³H (N)] 0.4mg (10mCi)
大豆油 10 g を加え
- 液晶中油滴分散相形成
- ↓
- 3) 蒸留水 83.8g を加え O/W エマルジョン形成 (ウルトラホモミキサー) 30分
- ↓
- 4) 超音波乳化 250W 30分

2. Wistar 系雄性ラット 8 週齢 (体重 200g, n = 15) にトリチウム標識 LCT 乳剤 0.6mCi/kg 静注

- ① 静注 5, 60, 120 分後の血清・肝・肺の放射活性を測定
- ② 静注 5, 60, 120 分後の肝組織を 2% OS・1% MG 24 時間固定法にて固定、エポキシ樹脂包埋し肝オートラジオグラフィーを施行
- 1) エポック切片 (1 μ) 作成, サクラ NR-H₂ 乳剤塗布
- 2) 露出 (室温, 4 週間)
- 3) 現像・定着後、トルイジン青にて染色し光顕観察

図 1 ³H 標識脂肪乳剤による肝オートラジオグラフィー法

定状況を観察した。

2. 10% LCT 乳剤静注時の肝における代謝動態の検討
Wistar 系雄性ラット15匹に10% LCT 乳剤 (Intralipid) 2.5ml/kg を静注し、5, 60, 120 後の肝を摘出して LCT 乳剤の肝における代謝過程を経時的に透過電子顕微鏡を用いて観察した。

III. 新組成脂肪乳剤の作成法の開発と MCT 乳剤静注時の肝における脂質代謝の検討

1. 新組成脂肪乳剤の作成法の開発

MCT 乳剤および放射性脂肪乳剤を作成するため、従来の高圧ホモジナイザーを用いた乳化法に代わり、簡易でしかも安定性の高い脂肪乳剤の作成法について粗乳化・精乳化の各段階を検討した。

2. 10% MCT 乳剤静注時の肝における代謝動態の検討

10% MCT (tricaprylin) 乳剤を試作し、Wistar 系雄性ラット15匹に静注し、5, 60, 120 分後の MCT 乳剤の代謝過程を同量の LCT 乳剤と比較しその有用性を検討した。

また、MCT 乳剤静注後の血清中遊離脂肪酸・中性脂肪を酵素法で、肝中性脂肪中 tricaprylin 濃度を HPLC[®] にて測定した。

IV. 標識脂肪乳剤静注後の肝オートラジオグラフィーによる観察

高濃度³H (2.2 MBq/ml) 標識 LCT 乳剤を液晶乳化法を用いて試作し、Wistar 系雄性ラット15匹に 11 MBq/kg 静注し、5, 60, 120 分後に血清・肝・肺の放射活性を測定した。また、肝オートラジオグラフィーを用いて LCT 乳剤の肝における代謝過程を検討した (図1)。

結 果

I. 静注用脂肪乳剤粒子の走査電子顕微鏡による観察法の確立

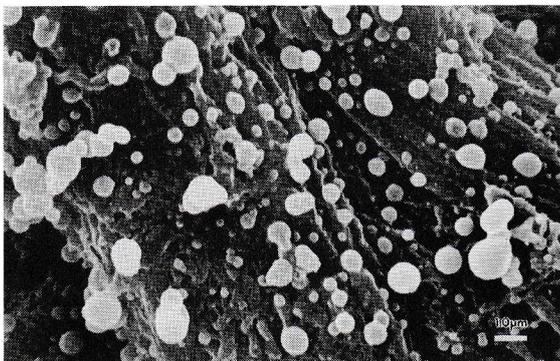
LCT 乳剤粒子の走査電顕的固定法としては、2% GA・2% OS・1% MG 3 者併用による一回固定法が最も簡便で有用であり、また支持体としては

表2 固定液および支持体の種類と LCT 乳剤粒子の走査電顕像

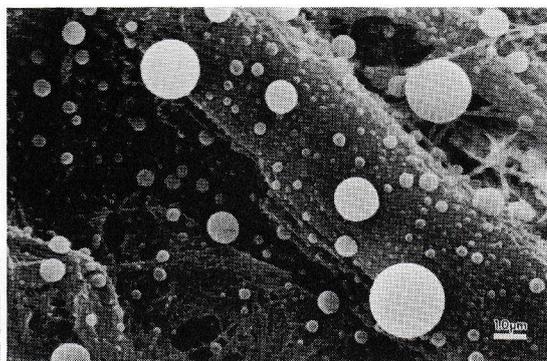
組み合わせ	固定液		支持体	脂肪粒子	
	前固定	後固定		凝集・合一	変形
1.	2% GA	2% OS	paper filter	++	++
2.	2% GA	2% OS	p-L-lysin	++	++
3.	2% GA	2% OS	membrane filter (P)	++	++
4.	2% GA・1% MG	2% OS	paper filter	-	±
5.	2% GA・1% MG	2% OS	p-L-lysin	+	+
6.	2% GA・1% MG	2% OS	membrane filter (P)	++	++
7.	2% GA・1% MG	2% OS	membrane filter (N)	+	+
8.	2% GA・1% MG・2% OS		paper filter	-	-

GA : glutaraldehyde, OS : osmium tetroxide, MG : malachite green
P : polystyrene, N : nylon

2% GA・2% OS 固定



2% GA・2% OS・1% MG 固定



GA : glutaraldehyde, OS : osmium tetroxide, MG : malachite green

図2 10% LCT (Intralipid[®]) 乳剤粒子の固定法の違いによる走査電顕像 (×6000)

paper filter が最も親和性が良好であった (表 2, 図 2)。

一方, MCT 乳剤粒子は脱水の影響が強く, 3 者併用による 24 時間固定法で初めて固定が良好となった。

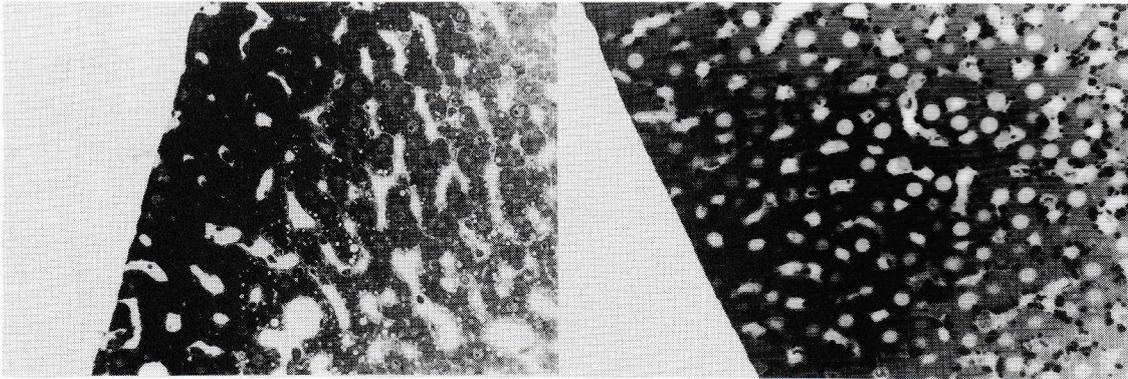
そこで, 透過電顕を用いた脂肪乳剤静注後の肝における脂質代謝の検討にも固定液 MG を使用することとした。

II. 肝組織内脂肪粒子の電顕的固定法の確立と LCT 乳剤静注時の肝における脂質代謝の検討

従来より行われていた GA・OS による浸漬固定のみでは脂肪粒子は変形・溶出し, 門脈あるいは下行大動脈より GA にて灌流前固定を行い, 後固定液に MG を添加しても, 3 時間後固定では脂肪粒子は肝の辺縁のみ固定された。しかし, 2%

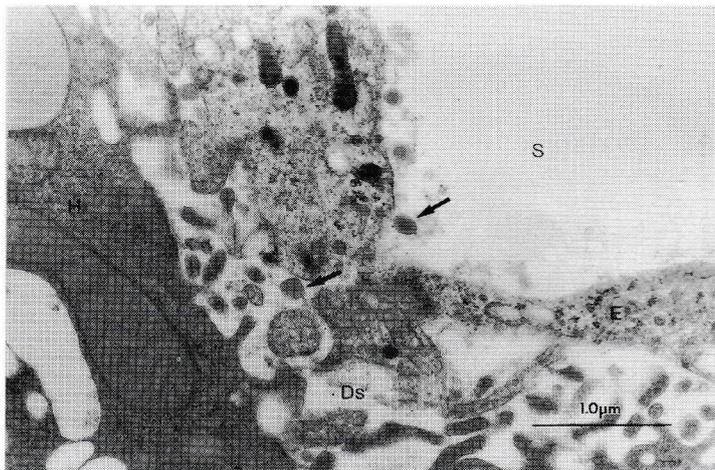
③ 2% OS・1% MG 後固定
(3時間)

2% OS・1% MG 後固定
(24時間)



* : Intralipid[®]

図 3 10% LCT* 乳剤静注 5 分後の肝組織光顕像 (×400)

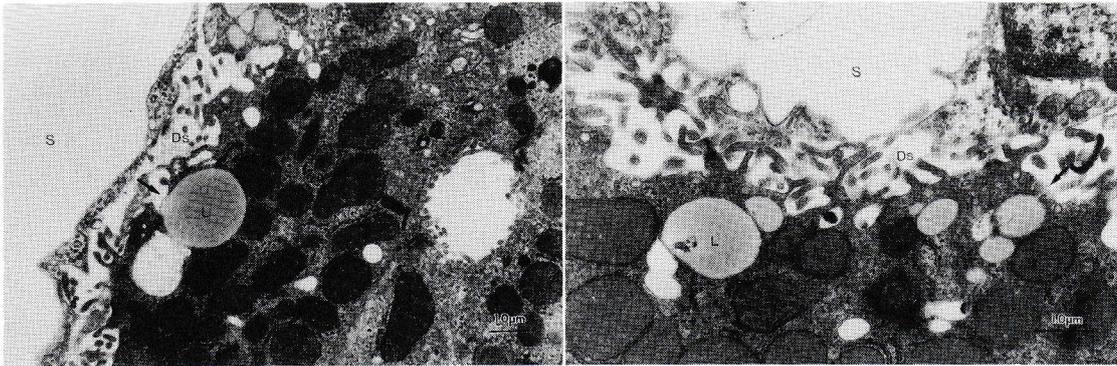


E : 内皮細胞, Ds : Disse腔, H : 肝実質細胞, S : 類洞

図 4 10% LCT 乳剤静注 5 分後の人工脂肪粒子 (×20000)
矢印のように, 静注された人工脂肪粒子はその外膜構造を保ったまま類洞から肝内皮細胞間隙を通過して Disse 腔内に認められる。

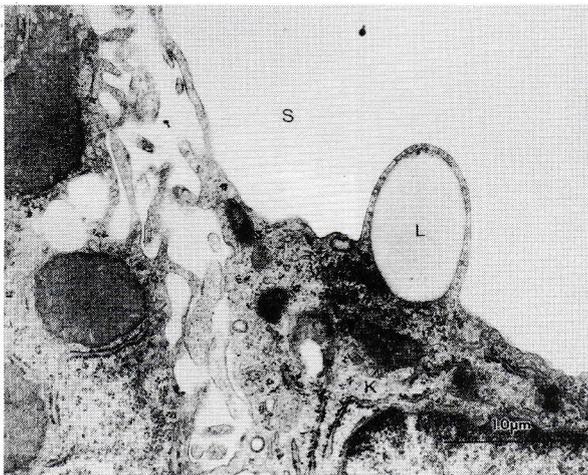
(×7000)

(×150000)



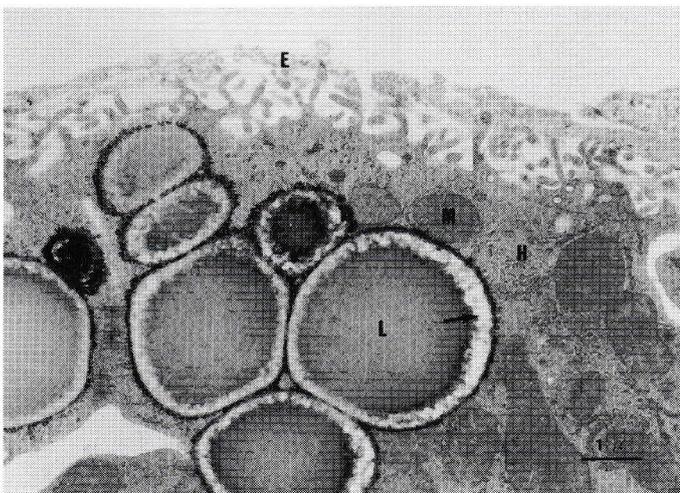
Ds : Disse腔, L : 脂肪球, S : 類洞

図5 10% LCT 乳剤静注5分後の肝実質細胞による脂肪粒子の取り込み像



K : Kupffer細胞, L : 脂肪球, S : 類洞

図6 10% LCT 乳剤静注5分後のKupffer細胞 (×15000)



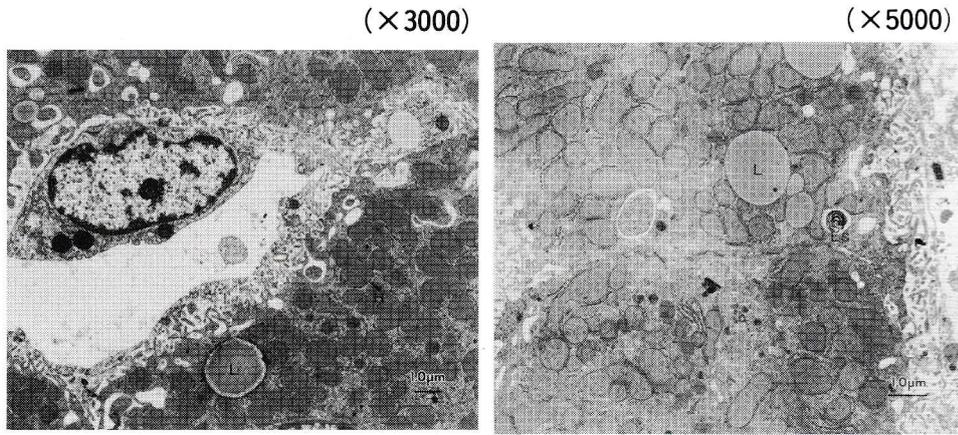
E : 内皮細胞, H : 肝実質細胞, L : 脂肪球, M : ミトコンドリア

図7 10% LCT 乳剤静注60分後の脂肪球代謝像(矢印, ×10000)

GA 前固定の後いったん 0.1 M リン酸緩衝液にて置換し、従来より過固定が懸念されていた OS を添加する24時間後固定法により光顕観察でも電顕観察でも脂肪粒子の固定は良好となった。また、脱血時間を調節することで、類洞および Disse 腔内の静注した人工脂肪粒子まで固定することがで

き、この肝における取り込み像の電顕的観察が初めて可能となった。(図3)。

LCT 乳剤粒子は、静注5分後ですでに肝内皮細胞間隙・小孔を通過し、肝実質細胞内へ容易に取り込まれることが判明した(図4)。肝実質細胞内に取り込まれた脂肪粒子にはいまだ外膜構造が



L : 脂肪球, Ls : ラメラ体

図8 10% LCT 乳剤静注120分後の肝組織像

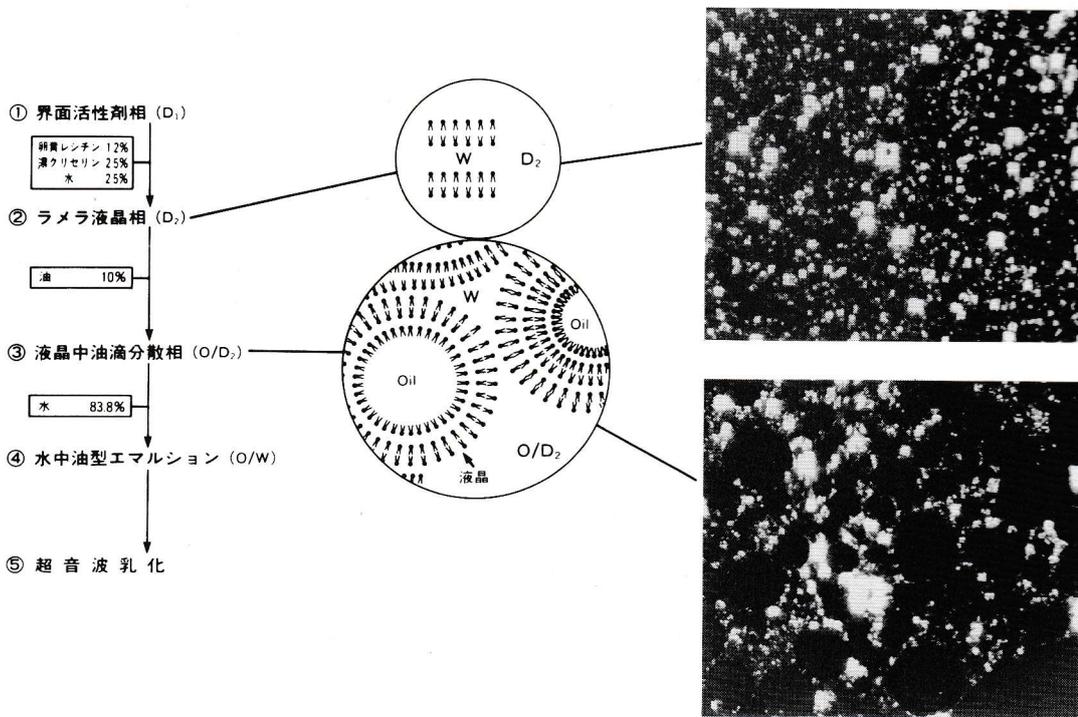


図9 液晶乳化法と粒子状態の偏光顕微鏡像

認められたが、取り込まれた後は速やかに癒合を示し、肝実質細胞表面で化学的な分解・修飾を受けていることが示唆された(図5)。

一方、Kupffer細胞も活発に脂肪粒子を貪食している像が認められたが(図6)、他の類洞壁細胞である伊東脂肪摂取細胞、内皮細胞は人工脂肪粒子の代謝にあまり関与していないことが形態学的に判明した。

静注60分後になると、肝実質細胞内に癒合している2~5 μ となった脂肪球を多数認め、辺縁より徐々に代謝されている像が観察された(図7)。静注120分後になると、いまだ辺縁より水解している像や、これを全く認めない蓄積した脂肪球のほかに、液胞内に代謝された後の像と思われるラ

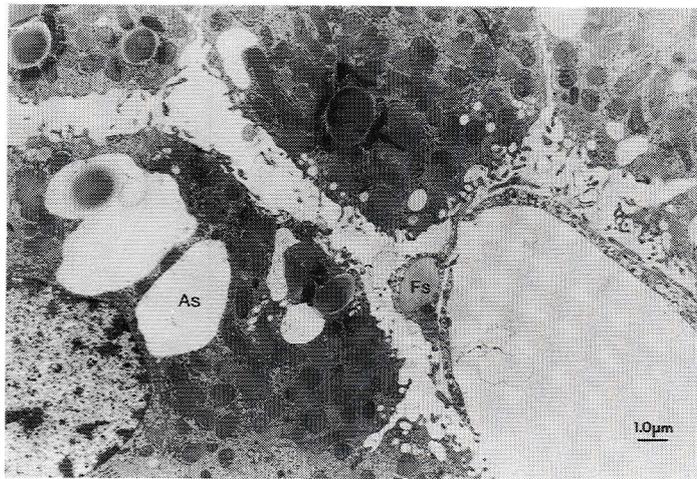
メラ体を認めた(図8)。

III. 新組成脂肪乳剤の作成法の開発と MCT 乳剤静注時の肝における脂質代謝の検討

従来は厳密な温度管理下の粗乳化の後、高圧ホモジナイザーを用いて脂肪乳剤を作成していたが、粗乳化時に液晶中油滴分散相を経由する液晶乳化法の導入により、安定性の高い脂肪乳剤が容易に卓上で作成できるようになった(図9)。

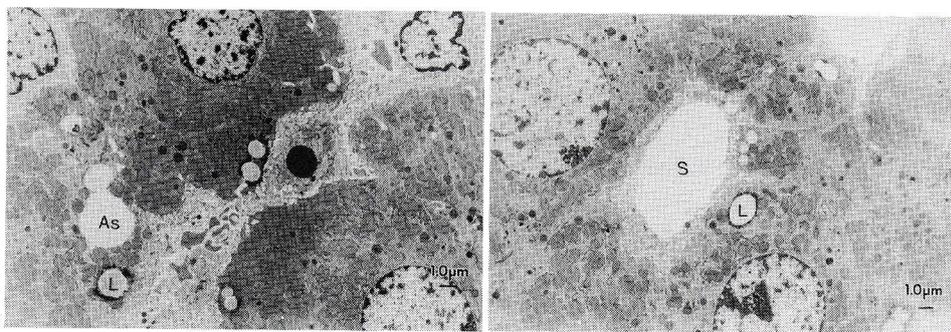
この方法を用いて10% tricaprylin (MCT)乳剤を試作し、肝における脂質代謝を形態学的に検討した。

MCT乳剤粒子の肝における代謝は迅速で、静注5分後ですでに完全に代謝された後の液胞や部分代謝像を多数認め、また、代謝過程にある脂肪



As : 液胞, Fs : 脂肪摂取細胞, L : 脂肪球

図10 10% MCT 乳剤静注5分後の肝組織像(×4000)
矢印のように代謝過程にある脂肪球周囲には強電子染色帯像とそれに一致してミトコンドリアの集積を認める。



As : 液胞, L : 脂肪球, S : 類洞

図11 10% MCT 乳剤静注60分後(左)および120分後(右)の肝組織像(×3000)

表3 10% LCT および MCT 乳剤静注後の肝における脂肪代謝像

	静注5分後	静注60分後	静注120分後
肝実質細胞内 脂肪球数	LCT : 10.7 ± 3.7 MCT : 8.7 ± 4.0	LCT : 14.7 ± 5.5 MCT : 2.7 ± 2.5	LCT : 7.9 ± 2.6 MCT : 1.3 ± 1.3
液胞数	LCT : — MCT : 6.1 ± 2.5	LCT : 0.1 ± 0.3 MCT : 1.3 ± 1.0	LCT : 0.1 ± 0.3 MCT : 0.4 ± 0.6
Kupffer細胞内 脂肪球数	LCT : 1.7 ± 1.8 MCT : —	LCT : 1.3 ± 1.7 MCT : 0.1 ± 0.5	LCT : 0.7 ± 0.8 MCT : —
ラメラ体	LCT : — MCT : 0.6 ± 0.6	LCT : 1.3 ± 0.9 MCT : 0.3 ± 0.6	LCT : 1.0 ± 1.2 MCT : —

* 任意の肝実質細胞または Kupffer細胞の平均値 (n = 20)
mean ± SD

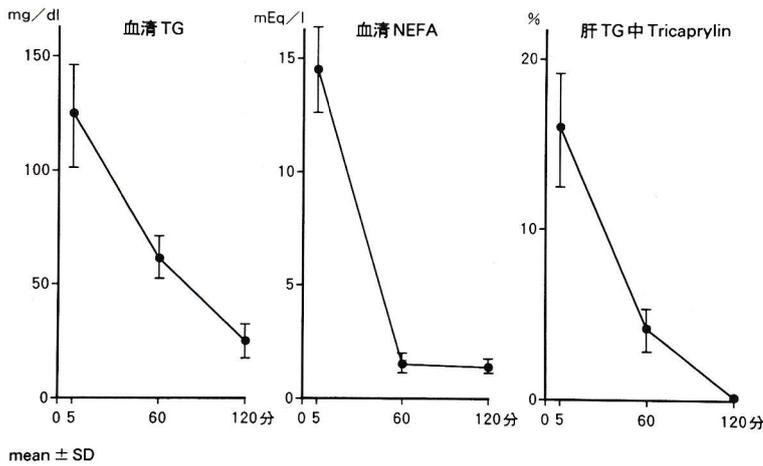


図12 10% MCT 乳剤静注後の血清・肝脂質の変動

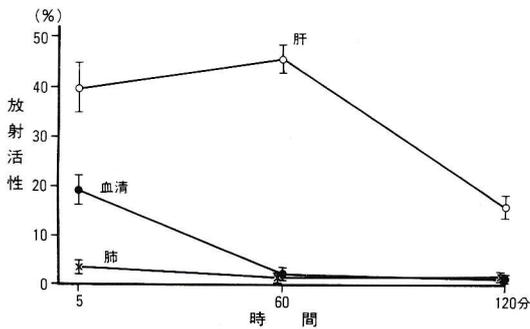


図13 血清・肺・肝における放射活性の経時的変化
(³H 標識 LCT 乳剤 11 MBq/kg 静注, n=15)

球周囲にはミトコンドリアの集積と脂肪酸の強染色帯が出現していた (図10)。

MCT 乳剤静注60分後では、肝細胞内の脂肪球

代謝像は極めて少なくなり、静注120分後では少量の脂肪球の蓄積を認めるのみとなった (図11)。

また、以上のような透過電顕を用いた脂肪粒子の代謝像を LCT・MCT 乳剤静注後と比較すると、肝実質細胞内の脂肪球数、液胞数やラメラ体の出現時期からみても MCT 乳剤粒子の肝における代謝が迅速であり、Kupffer 細胞への影響も少ないことが判明した (表3)。

一方、HPLC を用いた肝中性脂肪中脂肪酸分析にて、MCT 粒子が肝に取り込まれた後速やかに代謝されることが生化学的にも判明した (図12)。

IV. 脂肪乳剤静注後の肝オートラジオグラフィーによる観察

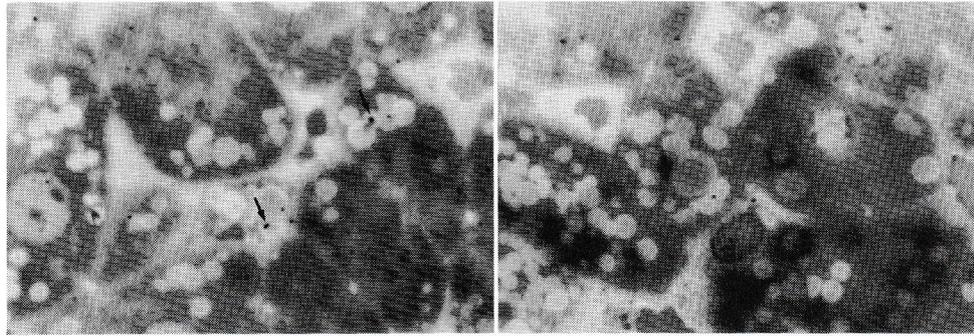


図14 ^3H 標識 LCT 乳剤静注5分後(左)および60分後(右)の肝オートグラフィー
矢印のように類洞内および肝実質細胞内の脂肪球に放射性グレインを認める。

^3H 標識 LCT 乳剤静注後 ^3H の集積は、肝に直ちに取り込まれ、60分をピークにそれ以後減少し、また血中よりの消失も速やかで肺には trap されないことも判明した(図13)。したがって、液晶乳化法で作成した放射性脂肪乳剤は電顕観察で明らかにし得た従来の静注用脂肪乳剤と同様に代謝されていることを確認した。

また、肝オートラジオグラフィーによる観察では静注5分後ですでに類洞中から肝実質細胞内へ放射性グレインの移行がみられ、静注60分後では肝実質細胞中の脂肪球中にグレインが認められた(図14)。

これは、静注された人工脂肪粒子があまり血中で分解されることなく肝実質細胞内へ取り込まれるという電顕観察の結果を追証するものである。

考 察

これまで、脂肪乳剤静注後の肝代謝に関する電子顕微鏡学的検討は散見されるが、その固定液としては OS 単独あるいは GA・OS による二重固定法のみで、脂肪粒子は変形・溶出し、その代謝を経時的に論ずるには不十分であった。そのうえ、肝での脂肪粒子の代謝の場も肝内皮細胞や Kupffer 細胞など、いわゆる肝類洞壁細胞であるという説が主流であったが、まだまだ不明な点も多い⁷⁻¹⁰⁾。また、リポ蛋白代謝の面からは、静注された人工脂肪粒子は血中で HDL からアポ CII, CIII, E を受取り、lipoprotein lipase により水解され、そのレムナントが代謝されるという説や、LpX となり肝に緩徐に取り込まれるという説が

有力であった¹¹⁻¹³⁾。

このように人工脂肪粒子の代謝動態が解明されず、その研究が困難であった背景には、電子顕微鏡学的に脂肪の固定が困難であったことと、静注できる安定性の高い脂肪乳剤の作成法が煩雑であったため、新組成の脂肪乳剤や放射性脂肪乳剤を用いた代謝研究がなかなか進まなかったことがあげられる。

そこでまず、LCT および MCT 乳剤粒子の走査電顕観察法を確立することにより、トリグリセリドをレシチンで乳化態とした 10% O/W エマルションである人工脂肪粒子の電顕的固定法を検討した。

従来より電顕観察のための固定液としては GA・OS の2重固定法が繁用されているが、GA は蛋白質のリジンなどのアミノ基やリン脂質などと結合、分子間架橋を形成し細胞を固定するものの大部分の脂質は固定しない。一方、OS は不飽和脂質の二重結合を含むジエステル結合により脂質を固定するが、その組織浸透性は緩徐で単独では組織内脂肪の固定は不十分であり、脂肪は脱水操作や樹脂包埋中に容易に溶出してしまう^{14,15)}。

このため、電顕観察のための脂肪の固定法に関しては、現在のところ確立された方法がなく、

- (1) imidazole 緩衝 OS の使用、
- (2) p-phenylenediamine によるブロック染色、
- (3) malachite green の使用などが試みられてきた¹⁶⁻¹⁹⁾。

MG はトリフェニルメタン系塩基色素の一種であり、正に荷電する第四級アミンを官能基とし

でもつため、リン脂質などの極性の化合物とイオン結合を示すほか、不飽和脂肪は OS の存在下に酸化され、イオン化された脂肪と MG が結合することにより脂肪を固定する可能性が考えられる。一方、飽和脂肪は OS では固定されないとされてきたが、OS が MG を酸化しケトン体を形成することで MG が飽和脂肪に拡散し固定性を得る可能性がある (図15)。

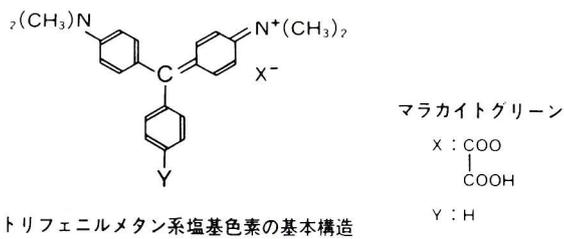
われわれは、これまで静注用脂肪乳剤粒子の走査電顕観察法としてこの MG の有用性を報告してきたが^{20,21)}、今回の検討で、脱水操作により極めて溶出しやすい MCT のような飽和脂肪まで、OS と MG を併用する24時間固定法を考案することで走査電顕でも透過電顕でも観察が可能となった。

この方法を用いて人工脂肪粒子の肝における代謝過程を経時的に透過電顕を用いて観察すると、まず、静注された人工脂肪粒子は LCT でも MCT でも静注5分後ですでに肝内皮細胞小孔を通過し Disse 腔から肝実質細胞内に取り込まれており、Disse 腔内の脂肪粒子には未だ外膜構造が認められた。

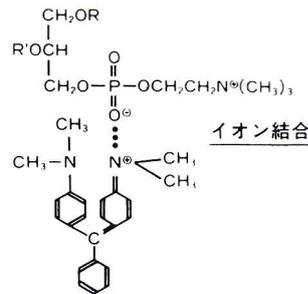
一方、³H 標識 LCT 乳剤を用いた肝オートラジオグラフィーでも静注5分後ですでに類洞中から肝実質細胞内へ放射性グレインの移動が認められた。

この事実は、静注された人工脂肪粒子が血中でたとえ部分的に水解されても、リン脂質外膜を有したまま肝実質細胞に取り込まれ、そこではじめて水解されることを示しており、人工脂肪粒子レムナントの形で肝に取り込まれるという説や Kupffer 細胞や肝内皮細胞に取り込まれ、ここで水解された後に脂肪酸が lateral movement により肝実質細胞に移動するという説とは別の代謝経路を形態学的に証明したことになる²²⁻²⁴⁾。

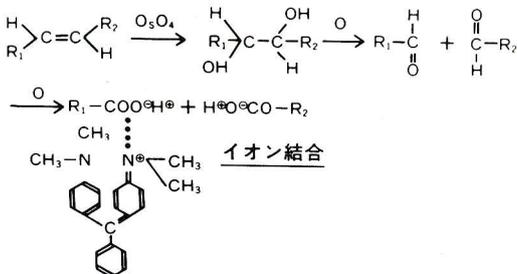
加えて、従来から脂肪乳剤の大量投与による網内系のブロックが危惧されてきたが^{25,26)}、人工脂肪粒子の粒径やその組成により Kupffer 細胞による取り込みに相違があるという報告もある²⁷⁻²⁹⁾。今回の検討でも、LCT 乳剤静注時には主に1μ以上の脂肪粒子を Kupffer 細胞が貪食している像が認められた。これに反して、MCT 乳剤静注時にはほとんど貪食像を認めなかった。このことは、人工脂肪粒子が通過する肝内皮細胞小



① ホスファチジルコリンとの結合



② 不飽和脂肪 (O₅O₄後)



③ 飽和脂肪

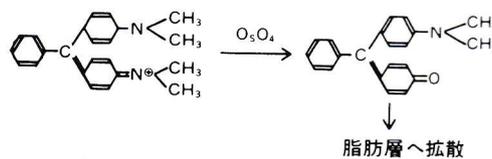


図15 Malachite Green の脂質に対する結合様式

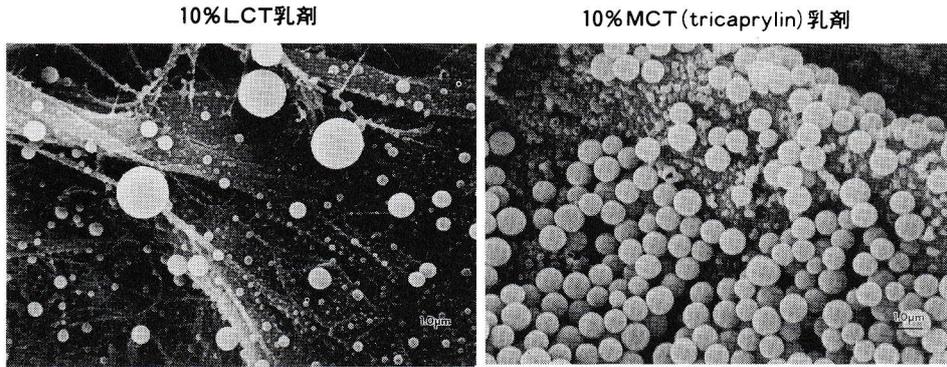


図16 液晶乳化法により作成した脂肪乳剤粒子の走査電顕像(×6000)

孔が $0.1\sim 1\mu$ であり³⁴⁾, これを通過し得ない大粒子や過剰の粒子が貧食されることは容易に理解でき, 一方で, 市販の LCT 乳剤中にいまだ 1μ 以上の大粒子が混在していることに起因しているとも思われ, 乳化剤や乳化法の改良が望まれる³¹⁻³³⁾. この点, 疎水基が短く乳化しやすい MCT 乳剤粒子は, 走査電顕観察でも 1μ 以下に均等に分散しており(図16), 加えて血中での水解も速やかであることから Kupffer 細胞への影響も軽微であった。

一方, Disse 腔まで通過した 1μ 以下の人工脂肪粒子は, 肝実質細胞内に取り込まれると容易に癒合し 2μ 以上の大粒子となり, LCT 粒子では静注 60~120 分後に辺縁より徐々に代謝された。内因性リポ蛋白の研究から, 肝実質細胞表面・coated pit にはアポ B の受容体である LDL レセプターの存在が確認されているほかに, 最近, カイロミクロンや VLDL などアポ E を含むリポ蛋白の受容体である第2のレセプター LRP (LDL receptor related protein) の存在が注目されている³⁴⁻³⁶⁾. 人工脂肪粒子の肝実質細胞における取り込みがこのようなレセプターを介したものであるかあるいは単なる pinocytosis であるかを今回の検討だけでは結論づけられないが, 肝実質細胞表面で人工脂肪粒子が修飾を受け癒合していること, リン脂質の組成を変えた脂肪乳剤粒子の肝実質細胞・Kupffer 細胞での取り込みが全く異なること³⁷⁾から, 人工脂肪粒子の肝細胞での取り込みもレセプターを介しての可能性はある。

いったん肝実質細胞に取り込まれた脂肪粒子は

その組成により代謝過程が大いに異なっていた。すなわち, LCT 粒子では今回の静注条件では, 60~120 分で辺縁より徐々に代謝されたが, MCT 乳剤粒子の代謝は迅速で静注 5 分後ですでに完全に代謝された後の液泡や部分代謝像とともに, 代謝過程にある脂肪球周囲に脂肪酸と思われる強電子染色帯像とミトコンドリアの集積を認めた。水解され遊離した脂肪酸は, OS や電子染色の際のクエン酸鉛と塩を形成し, 強電子密度帯を形成することが示唆されており³⁸⁾, MCT 乳剤粒子の肝実質細胞内での代謝が極めて迅速でその代謝におけるミトコンドリアの重要性を形態学的に初めて証明し得た。

他方, 脂肪粒子の代謝後に観察されたラメラ体は, リン脂質という説や³⁹⁾, 脂肪酸も界面活性作用をもつため同様の構造を取り得るとの説があるが⁴⁰⁾, 今回の観察では, 脂肪酸は強電子密度体となっており, その染色性からリン脂質が最も考えやすく従来より指摘されていた脂肪乳剤投与時のリン脂質の蓄積の可能性を形態学的に証明するものといえる。また, このラメラ体の出現時期から投与された脂肪粒子の代謝速度も推定できた。

今回新たに考案した卓上で任意の組成の脂肪乳剤を容易に作成できる液晶乳化法では, 粗乳化時に液晶中油滴分散相を経由することで油と界面活性剤間の界面張力が小さくなり, 攪拌により容易に微細な粒子が形成できる利点のほか, 連続相に液晶という構造体が形成されるため粒子の合一が妨げられて微細な粒子状態が維持できる利点もある⁴¹⁻⁴³⁾. この乳化法の導入で, 新組成の脂肪乳剤

の作成はもちろん、組織オートラジオグラフィーを可能とする高濃度の放射性脂肪乳剤の作成が容易となり、初めて人工脂肪粒子の代謝を肝オートラジオグラフィーを用いて観察できた。これには、もちろん、標識脂肪粒子の溶出を防ぐ OS・MG 24 時間固定法の応用も不可欠であった。今後は、さらに高濃度の放射性脂肪乳剤を作成することにより電顕オートラジオグラフィーにて肝実質細胞中の微細な代謝過程を観察できると思われる。

以上、透過電子顕微鏡と肝オートラジオグラフィーを用いて得られた知見と文献的考察により人工脂肪粒子の体内における代謝過程を推定すると次のようになる。

静注された人工脂肪粒子は、血中で HDL よりアポ蛋白の供給を受け、これを lipo-protein lipase が認識することにより部分的に水解される。この水解速度は脂肪粒子の組成や大きさにより異なり、MCT 粒子では外膜に溶存できる中性脂肪量も LCT 粒子に較べ多いため血中における水解も速やかである。

一方、肝における人工脂肪粒子の取り込みは、肝内皮細胞小孔を通過できる 1μ 以下の小粒子は速やかに肝実質細胞内に取り込まれ、Kupffer 細胞は過剰となった粒子を貪食するものと考えられる。肝実質細胞および Kupffer 細胞における取り込みがレセプターを介したのか否かは今後の課題である。

肝実質細胞内に取り込まれると脂肪粒子はその組成により代謝速度が異なり、MCT 乳剤粒子は血中のみならず肝細胞内でもその代謝は迅速であり蓄積性を示さないことから、外科領域における新しい熱源としての有用性が示唆された。もっとも、その投与量・投与速度の検討は分解された中鎖脂肪酸の過負荷・毒性の問題もあり、今後の課題である。

結 語

1. 静注用脂肪乳剤の電顕的固定法を LCT 乳剤のみならず、MCT 乳剤についても確立できた。
2. これを応用して肝組織における脂肪粒子の代謝過程を観察すると、静注された人工脂肪粒子はその外膜構造を保ったまま容易に肝内皮細胞小孔

を通過し肝実質細胞に取り込まれることを形態学的に明らかにした。

3. 任意の組み合わせの静注用脂肪乳剤を卓上で容易に作成できる液晶乳化法を開発した。
4. LCT 乳剤に較べ MCT 乳剤の肝内における代謝が極めて迅速であることを形態学的に明らかにした。
5. 標識脂肪乳剤を用いる肝オートラジオグラフィー法を確立した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った和歌山県立医科大学消化器外科谷村弘教授ならび第 2 解剖平岡純一講師に深く感謝いたします。

また、本研究に御協力をいただいた生物学平尾幸久教授をはじめ消化器外科教室医局員各位に心よりお礼申し上げます。

本研究の要旨は、第 27 回日本外科代謝栄養学会 (1990 年)、第 36 回日本消化器外科学会 (1990 年)、第 6 回日本静脈・経腸栄養研究会 (1990 年)、第 91 回日本外科学会 (1991 年) にて発表した。

文 献

- 1) Salier, D., Muller, M.: Medium chain triglyceride in parenteral nutrition. JPEN, 5: 115-119, 1981.
- 2) Bach, AC., Babayan, VK.: Medium-chain triglyceride: an update. Am. J. Clin. Nutr., 36: 950-962, 1982.
- 3) Crow, PJ., Dennison, AR., Royle, GT.: A new intravenous emulsion containing medium-chain triglyceride; Studies of its metabolic effects in the perioperative period compared with a conventional long chain triglyceride emulsion. JPEN, 7: 720-724, 1985.
- 4) Dawes, R., Royle, GT., Dennison, AR., et al: Metabolic studies of a lipid emulsion containing medium-chain triglyceride in perioperative and total parenteral nutrition infusions. World. J. Surg., 10: 38-46, 1986.
- 5) 岩佐幹恵, 岩佐正人, 小越章平: MCT を用いた脂肪乳剤. JJPEN, 12: 1115-1121, 1990.
- 6) Sato, T.: A new double HPLC method for rapid separation of fatty acids. Arch. Jpn. Chir., 53: 33-46, 1984.
- 7) Tokunaga, T.: Electron-microscopic study on the absorption and metabolism of intraportally infused fats in the liver. Kumamoto Med. J., 15: 93-111, 1962.
- 8) Hatae, T.: Electron microscopic observation on

- the mouse liver after intravenous administration of fat emulsion. Arch. histol. jap., 37: 149-163, 1974.
- 9) Okayasu, I., Hatakeyama, S., Sato, T., *et al.*: Experimental study on the drainage of so-called intravenous fat pigment from the liver. long term observation with histologic, enzyme-histochemical and electron microscopic analysis. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 29: 63-70.
 - 10) Vilaro, S., Llovera, M.: Uptake and metabolism of Intralipid by rat liver; An electron-microscopic study. J. Nutr., 118: 932-940, 1988.
 - 11) Carpentier, YA.: Intravascular metabolism of fat emulsion; The Arvid Wretling Lecture, ESPEN 1988. Clin. Nutr., 8: 115-125, 1989.
 - 12) 入山圭二: アポリポ蛋白代謝. JJPEN, 10: 109-112, 1988.
 - 13) Unrucht, SH.: Intravascular metabolism of triacylglycerols. Alterations of serum lipoproteins resulting from total parenteral nutrition with Intralipid. Biochim. Biophys. Acta., 711: 176-192, 1982.
 - 14) Litman, RB., Barrent, RJ.: The mechanisms of the fixation of tissue components by osmium tetroxide via hydrogen bonding. J. Ultrastruct. Res., 38: 63-86, 1972.
 - 15) Korn, ED., Weisman, RA.: Loss of lipids during preparation of amoebae for electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta., 116: 309-316, 1965.
 - 16) Boishier, DP., Holoway, H., Kitchin, LF.: A comparison of standard lipid staining techniques used in electron microscopic studies of mammalian tissues. Stain technol., 59: 83-89, 1984.
 - 17) Theichman, RJ., Cummius, JM., Takei, GH.: The characterization of malachite green stainable, glutaraldehyde extractable phospholipid in rabbit spermata. Biol. Reproduction, 10: 656-577, 1974.
 - 18) Angermuller, S., Fahimi, HD.: Imidazole-buffered osmium tetroxide; An excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. Histochem. J., 14: 823-831, 1982.
 - 19) Neis, WF.: Extraction of osmium-containing lipids by section staining for TEM. Histochem., 79: 245-250, 1983.
 - 20) 谷村 弘, 三木毅一郎, 日笠頼則: 脂肪乳剤の形態学的観察. JJPEN, 2: 579-584, 1980.
 - 21) Miki, K., Tanimura, H.: Scanning electron microscopic study of fat emulsion. J. Clin. Electron. Microscopy., 12: 855-856, 1979.
 - 22) Scow, RO., Blanchette-Mackie, EJ.: Why fatty acids flow in cell membranes. Prog. Lipid Res., 24: 197-241, 1985.
 - 23) Blanchette-Mackie, EJ., Scow, RO.: Continuity of intracellular channels with extracellular space in adipose tissue and liver; Demonstrated with tannic acid and lanthanum. Anat. Rec., 203: 205-219, 1982.
 - 24) Tonouchi, H., Iriyama, K., Suzuki, H.: Intravascular hydrosis of exogenous lipid and its capacity for binding apoprotein C-II in patients with cirrhosis of the liver. Surg. Res. Comm., 7: 127-134, 1990.
 - 25) Tover, JA., Mahour, GH., Miller, SW., *et al.*: Endotoxin clearance after Intralipid infusion. J. Pediatr. Surg., 11 (1): 236-132, 1976.
 - 26) Nugent, KM.: Intralipid effects on reticuloendothelial function. J. Leukocyte. Biol., 36: 123-132, 1984.
 - 27) Rahman, YE., Cerny, EA., Patel, KR., *et al.*: Differential uptake of liposomes varying in size and lipid composition by parenchymal and Kupffer cells of mouse liver. Life Science, 31: 2061-2071, 1982.
 - 28) Winter, E., Chao, Y., Haver, RJ.: Determinant of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and this remnants in the rat. J. Biol. Chem., 255 (11): 5475-5480, 1980.
 - 29) Connelly, PW., Kuksis, A.: Effect of core composition and particle size of lipid emulsion on apolipoprotein transfer of plasma lipoprotein in vivo. Biochim. Biophys. Acta., 666: 80-89, 1981.
 - 30) 織田正也, 東 俊文, 西田次郎, 他: 肝類洞内皮細胞. 代謝, 27: 701-721, 1990.
 - 31) 谷村 弘, 馬庭芳朗: 外科と栄養・輸液19. 肝不全時の栄養・輸液管理. 外科治療, 63: 571-574, 1990.
 - 32) 谷村 弘, 馬庭芳朗: 脂肪-素材の導入と展開. 癌・免疫・栄養, 3 (1): 18-23, 1989.
 - 33) 谷村 弘, 東 芳典: 最近の脂肪乳剤研究の動向. JJPEN, 10: 103-108, 1988.
 - 34) Jones, AL., Hradek, GT., Hornick, C., *et al.*: Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoprotein by rat liver. J. Lipid Res., 25: 1151-1158, 1984.
 - 35) Chao, YS., Jones, AL., Hradek, GT., *et al.*: Autoradiographic localization of the sites of uptake, cellular transport, and catabolism of low density lipoproteins in the liver of normal and estrogen-treated rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78: 597-601, 1981.
 - 36) 塚本和久, 寺元民生: 脂質と肝機能障害. The Lipid, 1: 33-45, 1990.
 - 37) 馬庭芳朗, 谷村 弘, 瀧藤克也, 他: 新組成の脂肪乳剤の開発と肝の電顕的検討からみた有用性. 日外会誌, 92: 117, 1991.
 - 38) Blanchette-Mackie, EJ., Scow, RO.: Effects of lipoprotein lipase on the structure of chylomicrons. J. Cell. Biol., 58: 689-708, 1973.
 - 39) Degott, C., Messing, B., Moreau, D., *et al.*: Liver phospholipidosis induced by parenteral nutrition:

- Histologic, histochemical, and ultrastructural investigations. *Gastroenterology*, 95: 183-191, 1988.
- 40) Wegel, MG., Scow, RO.: Lipolysis and fatty acid transport in rat heart: Electron microscopic study. *Am. J. Physiol.*, 246: 467-485, 1984.
- 41) 鈴木敏幸: 液晶乳化. *材料化学*, 23: 78-86, 1986.
- 42) 鈴木敏幸, 甲斐正信, 石田篤郎: エタノールを含有する安定な低粘度 O/W エマルションの生成機構. *油化学*, 34: 938-945, 1985.
- 43) 鷺谷広道, 服部孝雄, 鍋田一男: 界面活性剤(D)相乳化法による微細な乳化滴をもつ O/W エマルションの作成. *日化誌*, 10: 1399-1404, 1983.