

フラクタル解析から見るラット肝類洞、毛細胆管ネットワーク構造と疾患による形態変化

Three dimensional Periodic Network Patterns of Micro Structures in Rat Liver from a View of Fractal Analysis

昌子浩登¹, 佐久間省吾², 本谷秀堅², 赤星経一³, 工藤篤³

¹ 京都府立医科大学医学部物理学教室,

² 名古屋工業大学情報工学科メディア情報分野,

³ 東京医科歯科大学肝胆膵総合外科

Hiroto Shoji¹, Shogo Sakuma², Hidekata Hontani², Keiichi Akahoshi³, Atsushi Kudo³

¹ Department of Physics, Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 606-0823 JAPAN

² Department of Computer Science, Nagoya Institute Technology, Aichi 466-8555 JAPAN

³ Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Tokyo Medical and Dental University, 113-8510 JAPAN

1 はじめに

血管系の分岐構造についてフラクタル構造を有することがさまざまな調査研究から報告されてきた[1]。そして、その生体的な意義、合目的性すなわち自然環境において数理的、物理的に生きるのに適した性質という観点から定量性を導入し、形態と機能の関係についての研究がなされてきた[1]。

たとえば、Murray [2] は、図 1 (a) のような長さ L 、半径 r の血管に流量 f の血流を流すのに必要な機械的エネルギー E_1

$$E_1 = \Delta p \cdot f = \frac{8\eta L}{\pi^4} f^2 \quad \dots (1)$$

ただし、 Δp は差圧、 η : 血液の粘性係数、そして血管内の血液を維持するのに必要なエネルギー E_2

$$E_2 = b \cdot V = b\pi(r^2 L) \quad \dots (2)$$

ただし、 b は単位体積の血液維持に必要なエネルギー、 V は血管内体積) を考え、そのエネルギー和

$$E = E_1 + E_2 \quad \dots (3)$$

を評価関数とし、形態の機能性を議論した。ここで、血管の流域が占める体積がシンプルな管の体積 $V = \pi r^2 L$ の代わりに $V = \pi(r^2 L)^\gamma$ とおき、フラクタル構造をとっている場合にまで拡張している。こうして、 E を最小にする条件を最適と考えた。つまり

$$\frac{\partial E}{\partial r} = -\frac{32\eta L}{\pi^5} f^2 + 2\gamma b \pi r^{2\gamma-1} L^\gamma = 0 \quad \dots (4)$$

から、

$$f = \sqrt{\frac{\pi^2 b}{16\eta}} \cdot L^{(\gamma-1)/2} \cdot r^{\gamma+2} \quad \dots (5)$$

が得られる。式(5)を f と r の関係式としてみると、 $f \propto r^{\gamma+2}$ を表している ($\gamma=1$ のとき、つまり、血管体積 $V = \pi r^2 L$ とすると、 $f \propto r^3$ となる)。

一方で、血管が分岐する場合の形状パラメータについて考える。たとえば、図 1 (b) のように、も

との血管の流域が2つに分割される、つまり、元の血管の半径 r_0 , 流量 f_0 が各分枝半径 r_1 , r_2 流量 f_1 , f_2 に分岐するとき、式(5)の関係から $f_i = k r_i^{\gamma+2}$ ($i = 0 \sim 2$, k :パラメータ)、そして流量保存 $f_0 = f_1 + f_2$ という2つの関係から、

$$r_0^{\gamma+2} = r_1^{\gamma+2} + r_2^{\gamma+2} \quad \dots (6)$$

となる。実際に、Suwa&Takahashi[3]やMandelbrot[4]が行ったいくつかの生体臓器における血管の分岐の形態観察によると、関係式 $r_0^n = r_1^n + r_2^n$ における統計的 n の推定値は $n = 2.7$ になり、 $n = 3$ (モデル式での $\gamma = 1$ に相当) より小さくなっていった。上に述べた血管の形態が生体にとって最適な形になっているという観点からながめた数理モデルでは $f \propto r^{\gamma+2}$ が導かれたことから、 γ が0.7ということになり、モデルの仮定で述べた血管系の流域の広さと血管系そのものの体積との関係が非整次であるということを示している。すなわち、血管系のなす空間分布がフラクタル構造をなしていることを示している。

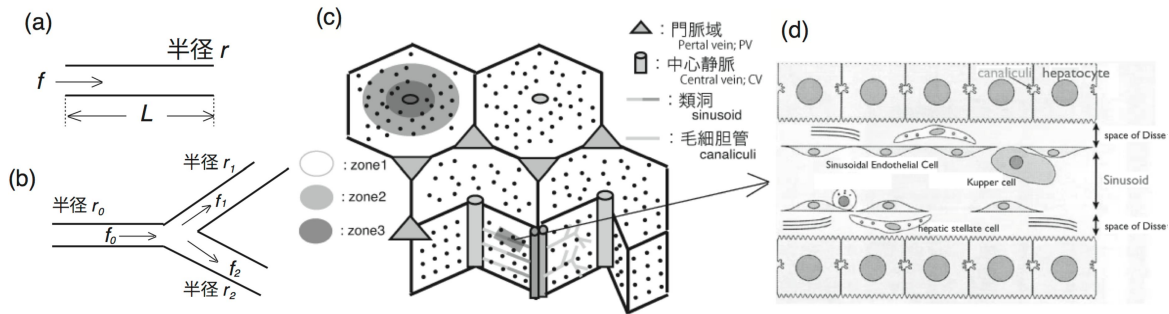


図1: (a), (b): 血管での流量等の関係図。(c):肝小葉とその他の構造の配置図。(c):(b)の灰色四角内を拡大した、2次元マイクロ構造配置図。異なる2種の管(類洞と毛細胆管)が3次元周期ネットワーク構造を作り出し、配置している。

本研究では、肝臓の最小単位である肝小葉内に張り巡らされる微細血管構造である肝類洞網と微細外分泌系である毛細胆管網の分布についてフラクタル解析を行い、その結果をもとに血液流量や形態的意義とその維持機構について議論することを目的にする。

肝小葉は、図1(c)で模式的に示されるように概念的に六角柱構造をとる。その肝小葉の内部構造をみると、中心静脈(Central Vein:CV)とよばれる静脈を中心にして、辺縁に肝動脈枝や胆管や神経を含んだ門脈域 (Portal Vein: PV) を配置する。このPVからCVに向かって図1(d)のように肝細胞が配置し、これに並行するように肝細胞に栄養分を供給する血管系である肝類洞、並びに肝細胞から出された老廃物を排出する毛細胆管が配置している。このような立体配置を持つ肝臓、特に本研究ではラット肝臓を用いて、肝小葉内の肝類洞網と毛細胆管網のフラクタル次元の測定を行う。また、近年深刻な問題になっている肥満やメタボリックシンドローム症候群に関連する疾患モデルラットの肝臓についても同様の解析を行う。そして、管網のグラフ構造や肝類洞内の血液の流量など得られているデータと比較検討し、肝類洞網と毛細胆管網の形態変化とその機能を議論する。

2. 方法

2.1 動物

業者(清水実験材料)から購入した6週齢雄のWistarラットを、ランダムに3匹ずつ、下の4グループに分けた。深刻な繊維化をともなう非アルコール性脂肪肝炎(NASH)につながる病理兆候を示すことが知られる高脂肪高コレステロール飼料(High-fat/high cholesterol, (HFC)食((株)フナバシファーム))を4週、8週連続投与するHFC4w, HFC8w群、並びにそのコントロールSP飼料食((株)フナバシファーム)を4週、8週連続投与するSP4w, SP8w群の4つ。

2.2 観察

SPならびにHFC群のラットから肝臓を摘出し、 $40\mu\text{m}$ の厚みの凍結切片に、免疫染色を施し、共焦点顕微鏡(Olympus FV1000 confocal microscope, Fluo View ver. 2.00 software)で観察した。取得した画像は、平面的に1 pixel が $0.5\mu\text{m}$ に相当するよう指定し、そして深さ方向に $0.5\mu\text{m}$ ずつ像を取得するように設定した。色調補正ならびに、類洞画像に(詳細は略すが)反応拡散系による解析手法を用いた画像補正を行い、各網分布の観察像に対して3次元立体再構築像を取得した。その3次元立体再構築像の例が、図2(a)と(b)である。それぞれ、赤色は類洞を表し、緑色は毛細胆管を示す。図を見ると、太さの異なる3次元周期ネットワーク構造が互いに交わることなく、2種の管が3次元空間上に張り巡らされていることがわかる。

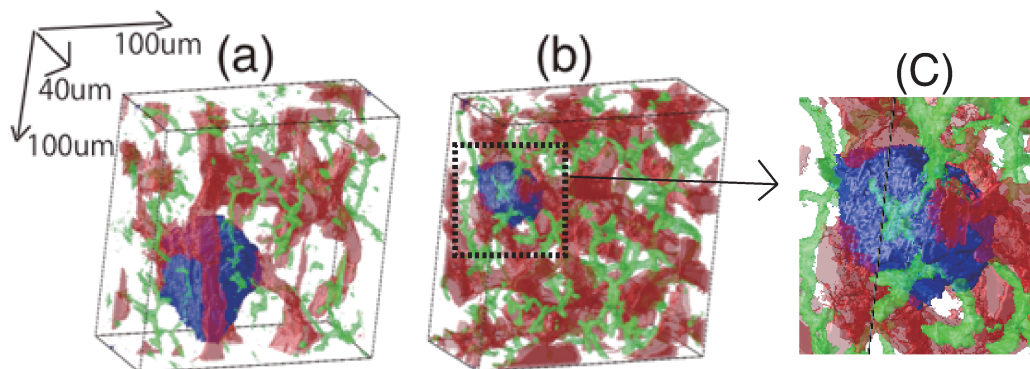


図2 ラットの肝臓マイクロ構造の観察像。画像解析により3次元再構成した肝小葉内の微細構造。緑：毛細胆管、赤：肝類洞、青：(ピックアップした)肝細胞。(a): HFC群と(b):正常ラットの肝臓片の観察像、(c):(b)の肝細胞周辺の拡大図。

2.3 フラクタル次元

フラクタル解析に用いる画像は $640\text{byte} \times 640\text{byte}$ (つまりx, y方向それぞれに $320\mu\text{m}$)の2次元蛍光画像をz方向 $0.5\mu\text{m}$ ごとに取得し、3次元再構成した像を用いて行った。3次元再構成した像に対して、それぞれボックスカウント法に従ってフラクタル次元を計算する。具体的には、以下の1から4に従ってフラクタル次元を求めた。

- 1: 探索領域を間隔 a の立方格子で分割する。
- 2: 図3(c)のように構造物の含まれる格子の数： $N(a)$ を数えるあげる。
- 3: a の値をかえて $N(a)$ を計測し、図3(d), (e)のように $N(a)$ と a の関係を両対数グラフに

プロットする。

4: $N(a) \propto a^{-D}$ の関係が成立するならば、構造物はフラクタルであり、その次元は D であると判定する。

実際に図3(a)と(b)に対して、この方法に従って両対数プロットを行った図がそれぞれ図3(d)と(e)である。それぞれ直線と見なすことができる。このため、この直線のフィットした関数のべき数からフラクタル次元 $D=2.41$ ならびに 2.04 をもつ図形と見なすことができる。

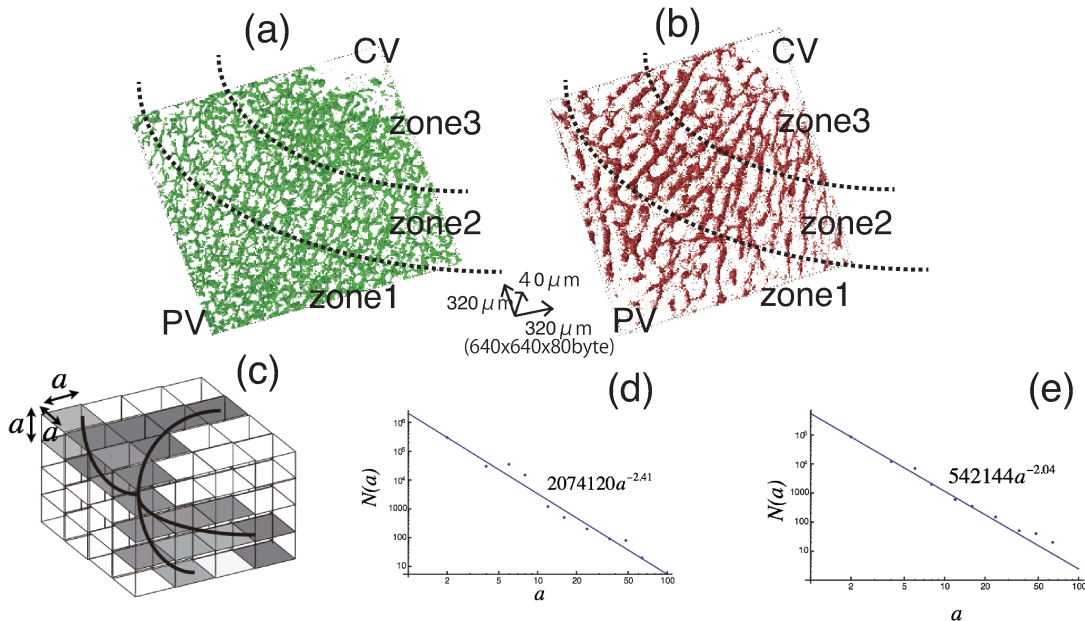


図3 (a)-(b): 640byte x 640byte x 80byte の共焦点像から、画像解析により3次元再構成した肝小葉内の微細構造。毛細胆管:(a), 類洞:(b)。 (c): 3次元ボックスカウント法でもちいる格子の概略図。 (d, e): (a), (b)の分布をボックスカウント法を用いて計測した両対数プロット。このべき数からフラクタル次元を決定する。

3. 結果

3.1 再構成像からの構成成分比

それぞれの群における各3個体について、それぞれ1か所以上から凍結切片を作成し図3(a)や(b)のような3次元再構成図を作成し、図4のように肝類洞(Sinusoid Vessel)に相当する赤色の領域、ならびに毛細胆管(Bile canaliculi (C))に相当する緑色の領域の占有体積率についてそれぞれ解析した。得られた結果をまとめたのが表1である。毛細胆管領域、類洞領域ともに、HFC4w, HFC8wとともに時間がたつにつれて減ってくるのがわかる。若干ではあるが毛細胆管の減少率が低いようにも思えるが、もう少しサンプル数が必要かと思われる。

	Sinusoid Vessel Volume (vol.) in % of tissue vol.	Bile Vessel(C) vol. in % of tissue vol.
HFC 4w	10.1 ± 2.5	2.46 ± 0.54
HFC 8w	8.1 ± 1.9	2.31 ± 0.86
SP 4w	16.2 ± 4.3	3.17 ± 0.44
SP 8w	15.6 ± 3.9	3.31 ± 0.57

表 1

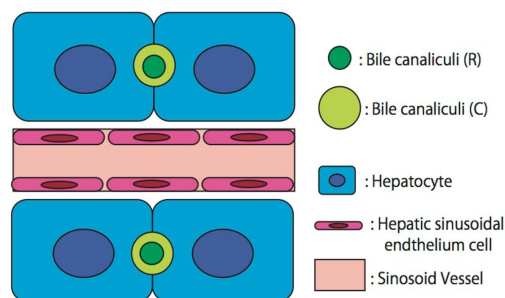


図 4 : 表 1 の計測成分模式図

3.2 フラクタル次元

前項と同様にそれぞれの群の各 3 個体について、それぞれ 1 か所以上ずつから得たサンプルを用いて、肝類洞網、毛細胆管網のフラクタル次元を計測した。結果をまとめたのが表 2 である。SP 群と比べ、肝類洞の分布のフラクタル次元は変化が見られない。が、毛細胆管の分布では、4 週、8 週と時間がたつごとにフラクタル次元が低くっている。実際、(図 2 (b) の細い管 (毛細胆管) は 3 次元ネットワーク状に複雑さに張り巡らされているが) HFC 4w、HFC 8w と高脂肪高コレステロール飼料を与える時間が長くなるにつれて、図 2 (a) の毛細胆管網のように直線的な管が見られるようになる。しかし、図 2 (a) の毛細胆管を詳細に見てみると、ネットワークをつなぎ張り巡らせようと、枝は伸ばしているようである。

	Fractal Dimensions (D) of Sinusoid vessels	Fractal D of Bile canaliculi vessels
HFC 4w	2.05 ± 0.13	2.26 ± 0.18
HFC 8w	2.01 ± 0.11	2.19 ± 0.11
SP 4w	2.11 ± 0.08	2.41 ± 0.05
SP 8w	2.13 ± 0.10	2.40 ± 0.08

表 2

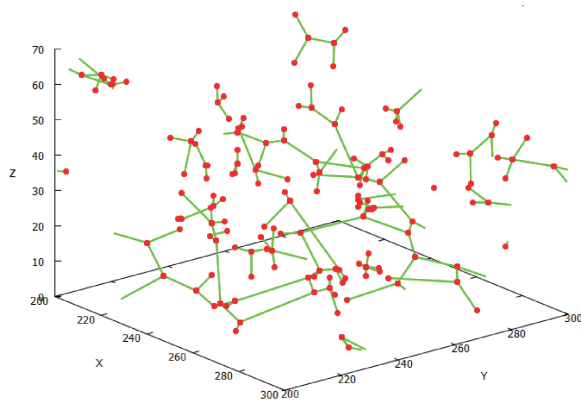
4 まとめと議論

ラット肝の微細肝類洞および毛細胆管網 3 次元構造がフラクタル構造をなしていることがわかった。また、脂肪肝ラットの肝小葉内ネットワーク構造変化の解析もあわせておこなった。疾患により、肝細胞が脂肪を取り込み、肝細胞自身が大きく膨らみ、その変化に合わせて肝類洞ネットワーク構造も形態変化するようで、類洞網の複雑さを表すフラクタル次元の変化は見られなかった。この結果はヒトの肝細胞癌における類洞フラクタル次元の変化の調査結果 [1] (フラクタル次元 $D = 2.18 \pm 0.03$ と 2.20 ± 0.07) とほぼ一致している。しかし一方で、毛細胆管網の変化をみてみると、フラクタル次元が減少することから、ネットワークの直線性が強まるようだ。しかし、図 2 (a) を詳細に見てみると、疾患前のように複雑な 3 次元ネットワークを張り巡らせようと、いろんな場所から多数枝を伸ば

しているのがみられる。これらのことから、肝細胞が膨張し、伸ばした枝が、他の枝とつながることを阻止し、つながれないような状況が作られているようである。

実際に、図5のように毛細胆管ネットワークの辺と端点の情報を抽出したグラフ構造の記述を行い、形態の解析を行った。表3のように「端点の総数」と「辺の総数」の割合を計算すると、疾患が進むにつれて“「端点の総数」/「辺の総数」”で定義した「端点の割合」が増えていくことが分かった（表3参照）。これらのことから、毛細胆管の形態変形メカニズムは肝細胞の形態変化に完全に依存するものではなく、何か別の物理的な仕組みも働いているのではないかと筆者らは考えている。

また、一方で *in vivo* で肝類洞における流速の計測を行っている。まだ、サンプル数が少ないため断定はできないが、正常ラットと脂肪肝ラットの流量計測で、各1個体のそれぞれ5地点の血液流量とその地点での肝類洞半径を計測し、それらの値から式(5)の γ の値を推定した。すると、それぞれ正常ラットならびに脂肪肝ラットの γ を推定すると $\gamma = 0.36 \pm 0.07$ と 0.58 ± 0.05 となった。共焦点像から計測したフラクタル次元は、SP群とHFC群との違いは見られなかったのに対して、流量から計測した体積計算のための指数 γ に違い生じている。このことから、疾患における肝類洞は、肝細胞とともに形を変化させながらも、しかしその血液流量などに無理な設計になっているため、肝細胞に十分に酸素などの栄養分を運ぶことができなくなっているのではないかと筆者らは類推している。脂肪肝の症状として、いったんその症状を呈すると、なかなか正常肝に戻りにくいことが言われている[7]。もちろん詳細な原因説明は必要であるが、この肝類洞網の形態変化もその一因ではないかと類推する。



	(# line)/(# edge)
HFC 4w	0.609 ± 0.008
HFC 8w	0.655 ± 0.013
SP 4w	0.533 ± 0.029
SP 8w	0.572 ± 0.016

表 3

図5：毛細胆管の輝度値分布から、線構造強調解析、交点の抽出、交点次数推定などの画像解析を行い、元3次元像の辺と頂点を抽出し、頂点同士を連結させ作製したグラフ構造。緑：辺、赤：頂点を示す。この画像例では、頂点数：170個、辺の本数：132本となった。

ところで、昨年度の本研究集会の我々の紀要[6]でも紹介したように、肝小葉内ではCV付近に存在する肝細胞と、PV付近に存在する肝細胞ではその機能や代謝が異なっていることが知られている。そこで、図1(c)や図3(a), (b)のように肝小葉内の領域をPV付近からCV付近へと3つの領域に分け、それぞれPV付近をzone1, CV付近をzone3, その中間をzone2と呼び、それぞれの機能や形態の違いなどが言われている[5]が、実際の肝細胞の3次元形態への影響や管網の形態の違いについてはほとんど

研究されていない。そこで、筆者らは（詳細は省略するが）肝類洞網のzoneごとのフラクタル次元の計測を進めている。まだサンプル数は不足してきっちりとしたことは言えないが、肝類洞分布のフラクタル次元はzoneごとに微妙に異なっているようだ。この数理的な裏付けとしてzoneごとの血液の流量計測や、zoneごとの肝類洞分岐形態に関する指数 n を計測し、ローカルな特徴と肝小葉全体での特徴の両面から形態とその数理的な形態特徴を捉えるようにしたい。そのため、共焦点画像から得られる3次元再構成肝類洞網をグラフ抽出し、類洞網分岐の端点を抽出し、この端点の位置の拘束条件のもと、数理モデルから予測される最適血管（肝類洞）の径によって構成される最適肝類洞網とラットやマウスなどの肝小葉中のパターンとを比較し、数理モデルの妥当性を比較していきたい。このようなプロセスから、六角柱構造をもつ肝小葉内のzoneごとの形態の物理的妥当性を議論し、複雑な管網構造である類洞網の形態説明が何かしらできるのではと期待している。

参考文献

- [1] 松下貢編著, “医学・生物学におけるフラクタル”, 朝倉書店, (1992).
- [2] C.D. Murray, PNAS, **12**, 207 (1926).
- [3] N. Suwa and T. Takahashi, Munich:Urban & Schwarzenberg (1971).
- [4] B. B. Mandelbrot, “The Fractal Geometry of Nature”, San Francisco:Freeman (1982).
- [5] Sheila, J. Dooley, "Diseases of the Liver and Biliary System", Willey-Blackwell (2002).
- [6] 昌子浩登, “肝小葉内の類洞と毛細胆管の形態形成数理モデル”, 京都大学数理解析学研究集会 考究録1937, pp112-119 (2015).
- [7] X. Jia *et al.*, Life Science **90**, 934-943 (2012).