

肝臓の領域化形成過程の三次元形態学的解析 —スunks肝実質細胞の不均質性とその発現—

石川 朋子*¹ 藤原 葉子*² 山下 和雄*³

Three-dimensional morphological study on formation and development of morphological hepatic zonation during pre- and postnatal periods in house musk shrews (*Suncus murinus*)

ISHIKAWA, Tomoko, FUJIWARA, Yoko and YAMASHITA, Kazuo

要旨

肝実質細胞は、形態的機能的不均質性を示し、肝小葉内に肝領域を形成する。本研究は、スunks肝実質細胞の不均質性発現と肝細胞索の形成過程を明らかにすることを目的とする。胎仔期から成獣期の樹脂包埋連続標本を作製し、二次元形態解析を行った。さらに同領域について、肝細胞索の立体再構築を行い、三次元的に検証した。肝実質細胞の体積の部位差は、生後4日から16日にかけて、門脈細胞の大型化によって顕著になった。その後、細胞の体積はさらに増大し、小葉の成長に寄与していた。形状の不均質性は造血巣の小葉内局在と関連しており、造血巣の消失後、全ての肝細胞は、成獣と同様の多面体を呈した。また肝細胞索の立体的な連続性は、胎生29日には形成されることが示された。スunks肝組織は哺乳類のなかでも比較的単純な組織構造しており、形成過程の立体的な可視化は、生物模倣の候補のひとつとして、再生医療分野等における活用が期待される。

キーワード

肝実質細胞、不均質性、発生、器官形成、形態計測

Abstract

Hepatocytes exhibit morphological and functional heterogeneity, and form regional divisions within the hepatic lobules. The aim of the present study is to clarify the development of the spatial morphological heterogeneity of hepatocytes and the process of the hepatic-cell-cord formation in *Suncus Murinus*. Two-dimensional analysis was carried out using epoxy-embedded semithin sections of livers from embryonic to adulthood. Furthermore, we performed three-dimensional reconstruction of hepatic-cell-cords and stereoscopically verification of the obtained findings. The regional heterogeneity in the volume of hepatocytes became remarkable from the 4th to 16th day after birth in portal regions. After that, the volume of hepatocytes further increased, and that was contributed to the growing of hepatic lobules. The heterogeneity in shape of hepatocytes was associated with the hematopoietic compartments, and almost all hepatocytes became polyhedral shape after disappearance of the hematopoietic cells. The spatial structure of hepatic-cell-cord was almost complete at embryonic 29th day. The hepatic spatial structure of *Suncus* was relatively simple in mammals, so the elucidation of the developmental process of the spatial structure will be useful as one of candidate of biomimicry.

Key words

Hepatocytes, Heterogeneity, Development, Organogenesis, Morphometry

はじめに

肝臓の機能単位である肝小葉において、栄養素代謝や外因性物質の解毒等に対する領域特異性があることはよく知られている^[1-3]。またRappaportら^[4]は、肝小葉とは異なる視点から、酸素やホルモンの濃度勾配に沿った機能な領域特異性に着目し、Zone 1, 2, 3からなる肝細胞を提唱している。肝炎や肝線維症^[5, 6]、虚血再灌流障害^[7]、CCl₄などの薬物誘発性肝障害^[8, 9]においても、障害の発症に領域特異性が認められる。これらもまた肝実

質細胞（以下、肝細胞）の不均質性、たとえば代謝酵素の領域特異的な分布、酸素や栄養素の濃度勾配に起因すると考えられている^[10, 11, 12]。肝細胞の不均質性を運命づける分子調節に加えて、肝細胞の正確な空間配置は肝機能に必須であり、複雑な形態形成を解き明かすことは、幾多の肝疾患治療ターゲットの開発にもつながる^[13]。マウスやラットの肝細胞では、酵素含有量の領域特異性は、胎生期および新生仔期にはみられないが、出生後、成長に伴って徐々に発現することが報告されている^[14-16]。

*1：聖徳大学人間栄養学部人間栄養学科・教授／*2：お茶の水女子大学生活科学部食物栄養学科・教授／*3：元日本医科大学医学部医学科・教授

また肝細胞の遊走や肝細胞索の形成を誘導する因子^[17, 18]や、その調節を担う要因として酸素やWntシグナルが関与することが明らかとなってきた^[19, 20]。一方、肝細胞の形態的部位差の発現については、胎生期から出生後において、門脈域と中心静脈域のいくつかの肝細胞について二次元形態計測により比較解析されてきた^[21-23]。ラット肝細胞の超微形態についての報告では、出生前^[24, 25]、周産期^[26]の二次元形態計測により、細胞小器官の数や面積の部位差は生後に発現していた。また肝細胞索と類洞の立体配置については、走査型電子顕微鏡を用いた局所的な観察の報告がある^[27]。

成熟した肝臓組織では、肝細胞は類洞走行に沿って連続的に配列した肝細胞索を形成し、血管系とともに肝小葉を構成している。1949年、Elias^[28]は、哺乳類の肝臓における肝細胞1つ分の厚みをもった肝細胞板を提唱した。肝細胞板の形成については、ヒト^[29]およびラット^[30]の組織観察により、胎生期および乳仔期では細胞が重層する多層性細胞板が優勢であるが、思春期までには1細胞性の肝細胞板になるとしている。一方で、胎生期の肝臓には、造血臓器としての重要な働きがある^[31, 32]。胎生期の肝細胞は、造血のための微小環境を形成する重要な要素であり^[33, 34]、造血巣との密接な関連が予測される。しかし、肝細胞の領域特異性の発現や肝細胞索の形成と、造血巣との形態学的関連性について三次元的な検証はほとんど行われていない。

スunksは、日本ではジャコウネズミとも呼ばれる。食虫目として初めて実験動物化に成功した^[35]が、現在ではトガリネズミ目に分類されている。トガリネズミ目は、系統発生的には霊長目の根幹に位置し、比較的原始的な哺乳類である。成獣の組織構築においても、我々はこれまでに、腭ポリペプチド分泌細胞は右葉のみに局在し^[36]、下垂体前葉細胞は種類ごとに特定の分布域をもつ^[37]など、発生段階の特徴を残すことを報告してきた。肝類洞走行も比較的単純で、ヒトでは分岐吻合を繰り返し複雑に走行するのに対し、スunksでは分岐吻合は極めて少ない^[38]。このようにスunksの各臓器は、哺乳類臓器として機能する極めて簡素な組織構造の表現型と考えられる。スunks肝臓の組織構築と成り立ちを解明することは、生物学的意義のみでなく、生物模倣を活用した人工肝臓の設計等にも有益な情報をもたらすことが期待される。我々は、スunks成獣の組織構築解明を目指して、肝細胞は大型の門脈域細胞と、小型でありながら比較的大きなミトコンドリアをもつ中心静脈域細胞とに明瞭に識別されることを報告した^[39]。さらに三次元再構築法によって、糖尿病スunksやCCl₄誘発肝障害マウスにおいて、両領域の立体構造と血管走行との関連を客観的に可視化し、中心静脈域は中心静脈を同心円状に囲む連続的な柱状構造であること、門脈域は不定形の網状構造により、残りの小葉領域を埋めていることを明らかにした^[40]。本研究は、個々

の肝細胞の形態的部位差の発現、肝細胞索の形成過程を実証し、立体構造の成り立ちを客観的に可視化、解明することを目的としている。

方法

スunks (*Suncus murinus*) は、胎生22日から29日 (E22、E24、E25、E26、E28、E29)、出生0日 (0d)、生後2から16日 (2d、4d、11d、16d) および10週齢成獣 (10W) を各3～6匹用いた。なおスunksの妊娠期間は、交配翌日を0日とし、30日前後である。動物は麻酔下で灌流固定を施した。肝組織は、電子顕微鏡試料作製法に準じて、1%オスミウム液にて後固定し、エポキシ樹脂に包埋した。準超薄連続切片 (10W:1.5 μm厚、400枚、他:1 μm厚、200枚) を作製し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡観察に供した。

各週齢において、光学顕微鏡像から、肝小葉を構成する中心静脈、小葉間静脈 (以下、門脈)、造血細胞、肝細胞を抽出し、二次元形態計測を実施した (Image J, NIH, USA)。肝葉内の位置による肝小葉の大きさの違いを排除するため、観察する肝小葉は、肝葉辺縁の末端中心静脈に分岐する直前の中心静脈^[40]を含むもの、という条件を定めた。二次元形態計測では、核を含む肝細胞を測定対象とし、1視野あたり86から285個、平均176個の肝細胞について、面積 (A)、周囲長 (P)、門脈からの距離 (DP)、中心静脈からの距離 (DC) を測定した。細胞-静脈間距離の基準点は、ソフトウェアが示す各対象物の至適楕円中心であるX-Y中心を採用した。細胞の形状の評価は、不整度合を示す2次元形状指数 (2SI) を採用し、以下の計算式にて算出した。

$$2SI = P^2 / (A \cdot 4\pi)$$

真円の2SIは1であり、2SIが高いほど不整形であることを示す。距離比 (DR=DC/DP+DC) は、肝細胞位置の指標である。門脈近くにある肝細胞は、DRが0に近く、逆に中心静脈近くの肝細胞は、DRが1に近い値を示す。

二次元形態計測で得られた所見を三次元的に可視化、検証する目的で、代表的な週齢 (E22, E29, 4d, 16d, 10W) について、連続標本を用いた三次元解析を行った。連続標本から、門脈-中心静脈間の代表的な肝類洞経路を三次元的に追跡し、1本の類洞経路と、隣接する肝細胞の輪郭情報を抽出し、ジオメトリックレンダリング法 (TRI, Ratoc, 日本) を用いた立体再構築によって可視化し、三次元的に観察した。三次元形態計測による検証では、肝細胞の体積 (V)、表面積 (SA)、門脈からの空間距離 (SDP)、および中心静脈からの空間距離 (SDC) を測定した。細胞-静脈間の空間距離基準点は、ソフトウェアが示す各対象物の骨格線の中央点を採用した。細胞の形状の評価は、不整度合を示す3D形状指数 (3SI) を採用し、以下の計算式にて算出した。

$$3SI = (SA)^3 / (V^2 \cdot 36\pi)$$

真球の3SIは1であり、3SIが高いほど不整形であることを示す。距離比 (DR=SDP/SDP+SDC) は、肝細胞位置の指標である。門脈近くにある肝細胞は、DRが0に近く、逆に中心静脈近くの肝細胞は、DRが1に近い値を示す。

本研究は、日本医科大学実験動物倫理基準に基づき、承認を得て実施した。

結果

光学顕微鏡所見

今回観察した最も初期の胎生22日において、門脈、中心静脈、肝類洞は、形態学的特徴に基づいた識別が可能であった (図1 a)。しかし、実質内に造血細胞、特に赤血球前駆細胞と巨核球が数多く分布する (図2 a) ため、類洞走行は不明瞭であった。肝細胞は小さく、不整形を呈した。胎生24、25日 (図1 b) および胎生26日では、肝細胞の形態学的特徴は胎生22日とほぼ同様であった。胎生28日では、多くの肝類洞が門脈から中心静脈へと向かう様子が切片上でも確認可能となった。胎生29日 (図1 c) では、特に門脈領域では、造血細胞の数が減少し、肝細胞索が観察された (図2 b)。多くの肝細胞は、細胞内に典型的なグリコーゲンの蓄積像を示していた (データ省略)。一方、中心静脈域では、依然として、肝細胞間に多くの造血細胞が認められた。出生時には、造血細胞は著しく減少した (図1 d)。

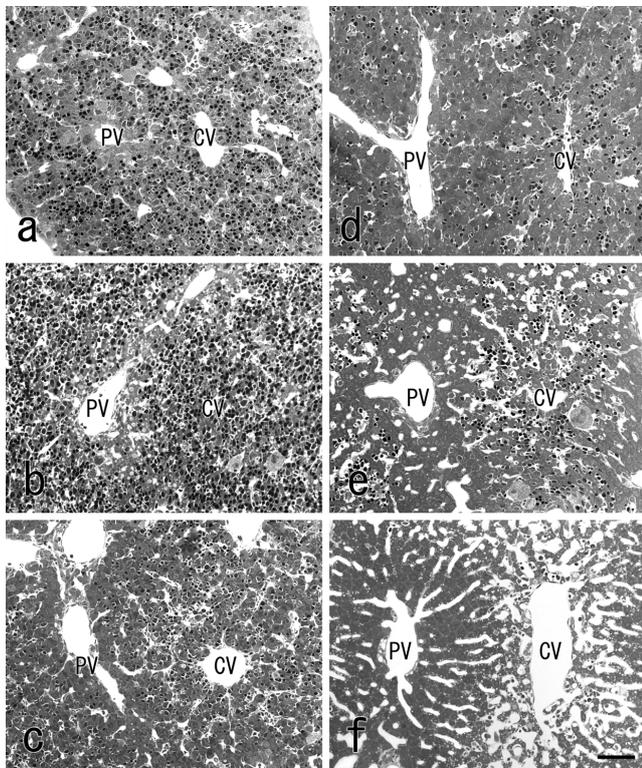


図1. スンクス肝小葉の光学顕微鏡像
a: E22; b: E25; c: E29; d: 0d; e: 4d; f: 16d.
PV: 門脈; CV: 中心静脈. トルイジンプルー染色.
Scale bar=50µm

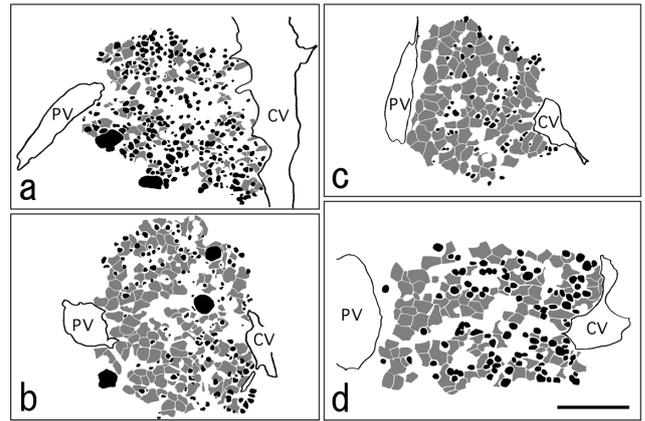


図2. 光学顕微鏡画像から抽出した肝小葉内の肝細胞と造血細胞
a: E22; b: E29; c: 0d; d: 4d. PV: 門脈; CV: 中心静脈.
灰色: 肝細胞; 黒: 造血細胞. Scale bar=50µm

肝細胞は類洞に沿って配列し、明瞭な肝細胞索を形成していた。肝細胞の大部分は多角形だが、中心静脈域ではへこみを持った不整形の肝細胞が多く認められた (図2 c)。特に大型多角形の肝細胞において、明瞭なグリコーゲン蓄積が観察された。生後2、4日 (図1 e) および生後5日では、細胞内のグリコーゲン野は消失し、細胞の大きさは小さくなっていった。特に中心静脈域の細胞は突起の多い不整形を呈し、肝細胞索は不明瞭であった。造血細胞は特に中心静脈域で観察された (図2 d)。生後11、16日 (図1 f) では、造血細胞は中心静脈域にわずかに観察されるのみであった。肝細胞索は生後16日には完全に形成され、ほとんどの肝細胞は突起のない多角形を示した。また肝細胞の大きさは中心静脈域で小さく、門脈域で大きいという領域特異性を示した。門脈域の肝細胞の多くは、二核細胞であった。肝類洞は門脈域では中心静脈に向かって直線的に走行し、中心静脈周囲でのみ分岐吻合を形成していた。成獣の肝小葉では、肝細胞は大型で、形状は生後11、16日とほぼ同様な多角形を呈した。

二次元形態計測

胎生22日から10週齢成獣までの11時点における細胞面積

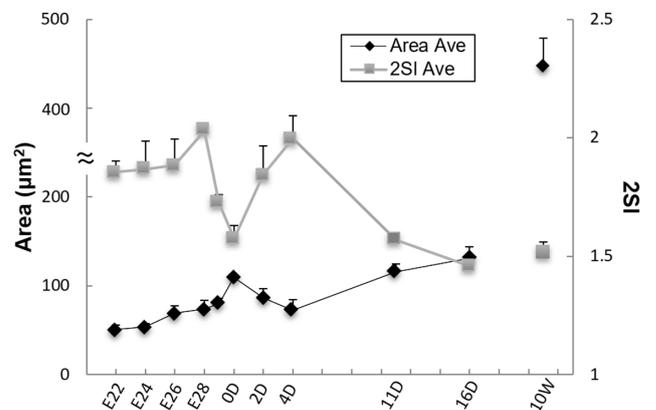


図3. 肝細胞面積と形状の二次元形態計測

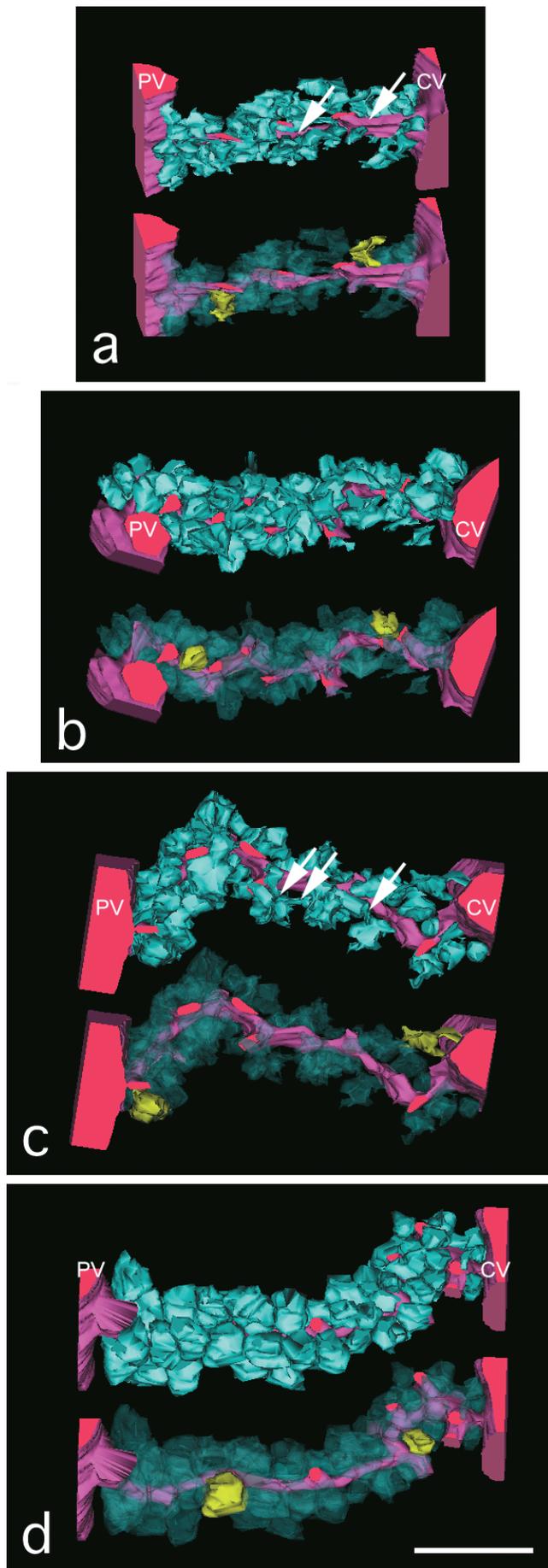


図4. 肝細胞索の形成過程における三次元再構築像

a: E22; b: E29; c: 4d; d: 16d. 下段は肝細胞を透明化表示. PV: 門脈; CV: 中心静脈. 淡桃: 血管外周; 鮮桃: 血管断面; 青: 肝細胞; 黄色: 門脈域, 中心静脈域の任意の肝細胞. 矢印a: 肝細胞索の不連続部; 矢印c: 隣接細胞との接触部位. Scale bar=50 μ m.

(Area) および二次元形状指数 (2SI) を示す (図3)。肝細胞の形態形成過程は、本研究で観察した期間において、以下の4期に分類できた。第1期 (胎生22日から28日) では、2SIの平均値は1.86、1.87、および1.88と肝細胞の形状は著しく不整形を示し、面積はわずかに増加していた。第2期 (胎生28日から出生時) には、肝細胞の面積が増加した。2SIは胎生28日をピークに、出生時の値、1.57に向かって急激に減少し、肝細胞の形状は、不整形から突起の少ない多角形へと大きく変化した。第3期 (出生時から生後4日) では、肝細胞の面積は減少傾向を示した。2SIは胎生期の最大値に近い値へと、再び急激に上昇した。第4期 (生後4日から16日) には、2SIは再び減少し、16dには成獣とほぼ同じ値となった。すなわち、細胞形状の特徴は、生後16日には成獣と同様になることが示された。一方で、肝細胞の平均面積は、生後16日に対して、成獣では3.4倍となることが明らかとなった。

三次元構造の可視化と形態計測

二次元解析結果の検証を目的として、各期間を代表する4時

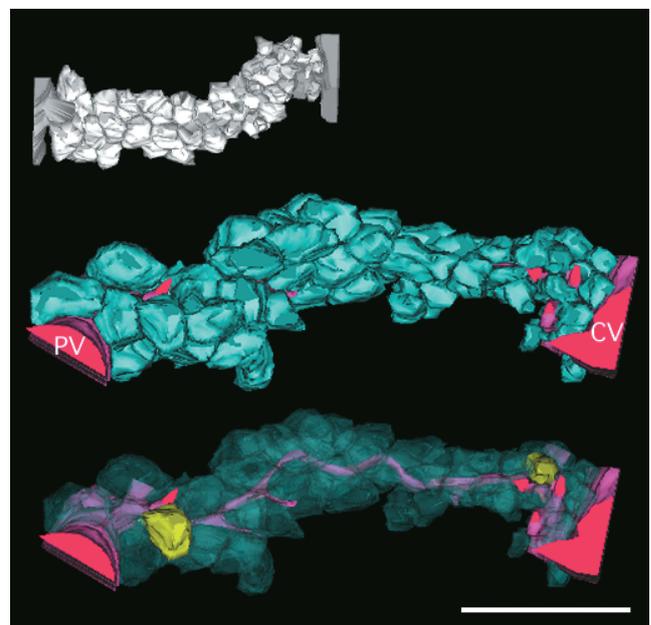


図5. 成獣肝細胞索の三次元再構築像

上段: 16d; 中段: 10W; 下段: 10w肝細胞を透明化表示. PV. 門脈; CV: 中心静脈. 淡桃: 血管外周; 鮮桃: 血管断面; 青: 肝細胞; 黄色: 門脈域, 中心静脈域の任意の肝細胞. Scale bar = 100 μ m.

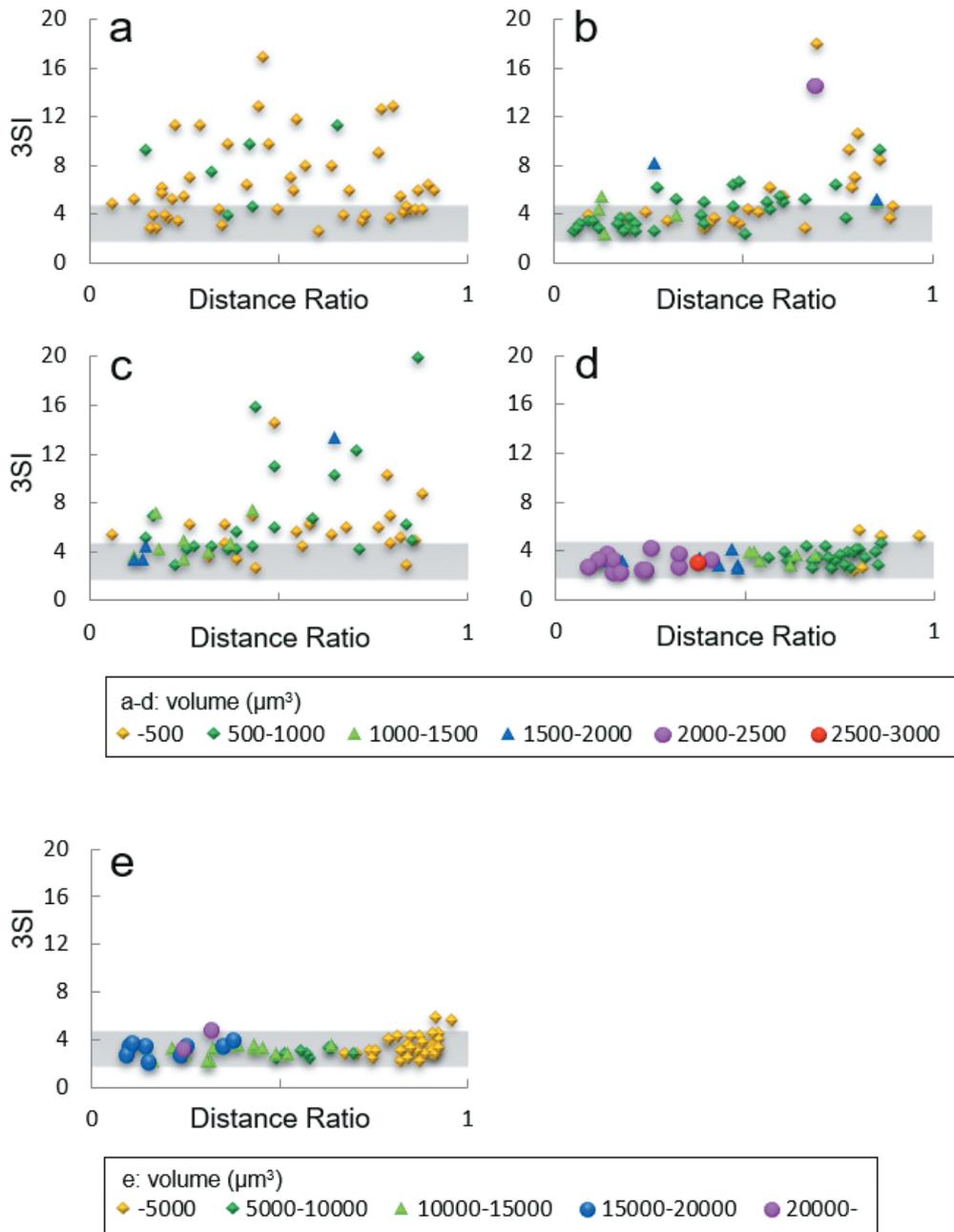


図6. 肝細胞体積と形状の三次元形態計測

a: E22 ; b: E29 ; c: 4d ; d: 16d ; e: 10W.

灰色の帯は、成獣（10W）のDSD範囲を示す。横軸のDRIは、0が門脈側、1が中心静脈側を示す。

点（胎生22、29日、生後4日、16日）に10週齢成獣を加えた5時点について、三次元構造の可視化と三次元形態計測を行った。

肝類洞走行とそれを取り巻く肝細胞索の三次元再構築像は、肝細胞索の発達過程を客観的かつ明瞭に示している（図4、5）。1本の類洞周囲に配列する肝細胞数は、胎生22日から順に54、64、62、62、66個であった。また肝小葉の半径に相当する門脈から中心静脈までの空間距離は、105、125、130、155、270 μmであった。胎生22日では、肝細胞は小型で突起のある不規則な形状を示し（図4 a黄色の細胞を参照）、肝細胞索は不連続

である（図4 a矢印）。胎生29日（図4 b）では、ほとんどの肝細胞は、多面体に近い形状である。中心静脈域にはわずかに突起を伴う肝細胞もみられるが、門脈から中心静脈までの類洞走行に沿って、ほぼ連続的な肝細胞索が形成されている。これらの所見は、二次元解析で得られた所見に一致しており、三次元的にも実証することができた。生後4日（図4 c）では、特に中心静脈域に不整形の肝細胞が数多くみられ、肝細胞索の連続性は失われているようである。しかし三次元再構築像は、各々の肝細胞が突起の先端で隣の細胞と接触することを示しており

(図4c矢印)、肝細胞索としての連続性が保たれていることを実証している。生後16日では、肝細胞は再び、突起やへこみのない多面体を呈し、類洞周囲を連続的に取り巻いている(図4d)。10週齢成獣の三次元像(図5)と比較すると、肝細胞の大きさは異なるものの、肝細胞索全体の形状はほぼ相似形を呈しており、生後16日には、成獣と同様の肝細胞索が形成されることが示された。

再構築した肝細胞索の三次元像を用いて、肝実質細胞の三次元形態計測を行った。図6は、個々の肝細胞の体積(volume)および三次元形状指数(3SI)と、肝小葉内の分布位置(Distance Ratio)の関連を示している。図6の各グラフには、成獣における $3SI \pm 2SD$ (DSD)の範囲を淡灰色の帯で示している。グラフ上で淡灰色の帯内にある肝細胞は、その形状が成獣と同様の多面体を呈することを示している。胎生22日では、3SIは2.7から16.9の範囲に広く分散しており、肝細胞の形状が不整形であることを示している(図6a)。胎生29日、生後4日では、門脈域の細胞の3SIは低く、形状の部位差が確認された(図6b,c)。生後16日では、ほとんどの肝細胞の3SIはDSD内に収まっており、肝細胞の形状は、生後16日には成獣と同様になることを示している(図6d)。一方、肝細胞の大きさについては、胎生22日では、肝細胞の88%は、体積 $500\mu\text{m}^3$ 未満の小型細胞で、肝小葉内の部位差はみられない(図6a)。胎生29日では、体積 $500\mu\text{m}^3$ 以上の肝細胞は63%、 $1,000\mu\text{m}^3$ 以上のものは21%であった。これらの大型肝細胞は門脈域に多く分布している(図6b)。生後4日では、門脈域にさらに大型の肝細胞が認められ、生後16日には、門脈域の細胞は大きく、中心静脈域の細胞は小さいという明瞭な部位差が認められる(図6c,d)。今回の三次元形態計測では、生後16日において、肝細胞の47%は体積が $1,200\mu\text{m}^3$ を超え、門脈域に分布していた。残りの53%の肝細胞の体積は $900\mu\text{m}^3$ 未満で、中心静脈域に分布していた。10週齢成獣(図6e)では、門脈域の大型肝細胞の体積は約 $6,000\sim 30,000\mu\text{m}^3$ 、中心静脈域の小型肝細胞の体積は約 $4,000\mu\text{m}^3$ 未満であった。

考察

スunks成獣の肝小葉は、形態学的特徴から中心静脈域と門脈脈域に明確に区別される^[39,40]。本研究では、肝細胞の形態的部位差の発現と肝細胞索の形成過程を二次元観察および形態計測により明らかにし、さらに三次元再構築法により客観的に可視化、実証した。

肝細胞の形態学的特徴に着目すると、本研究で観察した出生前後の期間は、胎生22日から28日(胎生の後期)、胎生28日から出生時(出生の前後)、出生時から生後4日(新生仔期)、および生後4日から16日の4期に分けられた。肝細胞の大きさは、出生直前に大きくなり、生後急激に小さくなった。この結果は、

ラット肝臓の電子顕微鏡観察および形態解析^[26,41]と同様であった。出生前後の主な肝細胞代謝にグリコーゲンの蓄積と消費がある^[42,43]。本研究においても出生直前に比較的大きい肝細胞には、顕著なグリコーゲン野^[44]が認められた。このことから出生前後の細胞体積の変化は、グリコーゲン蓄積の有無に起因するところが予測される。肝細胞の大きさの部位差は、出生直前から発現し、生後4日から16日にかけて完成し、成獣では個々の肝細胞の成長により、さらに顕著な部位差を示した。生後16日以降は、門脈域に二核の肝細胞が多数観察されており、肝細胞の大きさの部位差は、細胞の二倍体化に関連することが示唆された。一方、肝細胞の形状は、出生前後に領域特異的な変動がみられた。出生前後の特徴的な肝機能として、肝内造血がある。造血巣は、マウスでは生後1週まで報告されている^[45]が、今回、スunksでは少なくとも生後16日まで観察された。造血細胞は、胎生25日までは小葉全域に分布していたが、生後は主に中心静脈周囲に分布域を移していた。造血巣の分布域では、肝細胞は不規則な形状を呈した。特に胎生期から出生前後の肝細胞に特徴的にみられる細胞突起は、多数の造血細胞の間に伸び、類洞および他の肝細胞との接触を維持すると考えられる。肝内造血巣の消失後は、肝細胞の形状に部位差は無く、全ての肝細胞は突起やへこみのない、多面体を示した。金村らは^[22]、マウスの門脈と中心静脈からそれぞれ3層の細胞を門脈周囲細胞と中心静脈周囲細胞と定義し、肝細胞の超微形態の部位差を検討した。新生仔から成獣までの発達段階における肝細胞、細胞小器官の数と大きさ^[46]、出生後のミトコンドリアの大きさと形状^[47,48]、胎生および生後の粗面小胞体面積^[49]を二次元的に解析し、超微形態の部位差は出生時には存在せず、出生後に発現すると報告している。今回我々は、肝細胞内の超微形態の比較は行っていないが、スunksにおいても、生後の肝細胞の体積増加に伴って、細胞小器官の部位差が顕著になることが予測される。

肝細胞索の形成は、出生直前から認められた。Elias^[28]は、哺乳類の肝小葉を光学顕微鏡で詳細に観察し、肝細胞索の立体像を推定した。LeBouton^[21]は、ラット組織切片上で、門脈-中心静脈間に分布する肝細胞を数え、出生直後から出生12日にかけて36個から43個に徐々に増加すると報告している。Wagenaarら^[23]は、ブタ肝組織切片を観察し、小葉を形成する肝細胞は、新生期から成獣期にかけて16個から30個に増加すると報告している。しかしながらこれらの報告は、組織切片上の二次元情報からの計測および推測結果である。肝細胞索は類洞走行に沿って形成される連続的な構造であるため、立体として捉え、三次元的に解析することが望まれる。しかし現状の三次元組織観察および解析法は、手法の煩雑さから、数多くの視野について検証するのは困難である。本研究では、まず二次元形態解析により所見を得、代表的な時点について三次元再構築

と形態計測を実施し、検証した。

肝細胞の機能的異質性に関しては、主に免疫組織学的手法を用いて、多くの二次元解析が行われてきた。金村および浅田-久保田^[50]は、マウス新生仔には既に、四塩化炭素毒性に対する応答に小葉内部位差があることを報告している。渡辺らは、出生前後のラットの免疫組織化学により、生後7日には、チトクロームP-450発現の局所的な異質性がみられることを示した^[51]。Notenboomらは、胎生および新生仔マウスの免疫組織化学により、グルタミン合成酵素発現の小葉内異質性は、出生直前の胎生19日に現れ、出生後に徐々に顕著になることを示した^[52]。近年では三次元的な毒性予測モデルの構築が試みられる^[53]など、肝実質領域の不均一性は、様々な肝疾患の治療戦略開発においても重要視されている。

本研究では、スunks肝細胞の形態的部位差の発現と肝細胞索の形成過程を三次元的に実証した。我々は今回、スunksというやや特殊な実験動物を用いているため、特定の代謝酵素や調節因子に関する解析は行っていない。しかしながら、スunksは系統発生的には比較的原始的な哺乳類であり、その消化器官も比較的単純な組織構築からなるという特徴をもつ^[35, 39, 40]。肝臓として機能可能な、限りなく簡便な組織構造とその成り立ちを解明することは、再生医療分野の生物模倣において有用な情報となることが期待される。

引用文献

- [1] Usynin IF, Panin LE. Mechanisms determining phenotypic heterogeneity of hepatocytes. *Biochemistry*. 2008, 73 (4), 367-380. doi: 10.1134/s0006297908040019.
- [2] Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. *Biochimie*. 2014, 96, 121-129. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.007.
- [3] Wattacheril J, Seeley EH, Angel P, Chen H, Bowen BP, Lanciault C, Caprioli RM, Abumrad N, Flynn CR. Differential intrahepatic phospholipid zonation in simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013, 8 (2), e57165. doi: 10.1371/journal.pone.0057165.
- [4] Rappaport AM, Borowy ZJ, Lougheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit: Role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Rec.* 1954, 119 (1), 11-33. doi: 10.1002/ar.1091190103.
- [5] Racine-Samson L, Scoazec JY, D'Errico A, Fiorentino M, Christa L, Moreau A, Roda C, Grigioni WF, Feldman G. The metabolic organization of the adult human liver: a comparative study of normal, fibrotic, and cirrhotic liver tissue. *Hepatology*. 1996, 24 (1), 104-113. doi: 10.1002/hep.510240118.
- [6] D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, Ronchi G, Donato MF, Paradis V, Colombo M, Bedossa P. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2012, 56 (2), 532-543. doi: 10.1002/hep.25606.
- [7] Kato Y, Tanaka J, Koyama K. Intralobular heterogeneity of oxidative stress and cell death in ischemia-reperfused rat liver. *J Surg Res*. 2001, 95 (2), 99-106. doi: 10.1006/jsre.2000.5831.
- [8] Gebhardt R, Burger HJ, Heini H, Schreiber KL, Mecke D. Alterations of hepatic enzyme levels and of the acinar distribution of glutamine synthetase in response to experimental liver injury in the rat. *Hepatology*. 1988, 8 (4), 822-30. doi: 10.1002/hep.1840080421.
- [9] Schols L, Mecke D, Gebhardt R. Reestablishment of the heterogeneous distribution of hepatic glutamine synthetase during regeneration after CCl₄-intoxication. *Histochemistry*. 1990, 94 (1), 49-54. doi: 10.1007/BF00266789.
- [10] Torre C, Perret C, Colnot S. Molecular determinants of liver zonation. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010, 97, 127-50. doi: 10.1016/B978-0-12-385233-5.00005-2.
- [11] Ko S, Monga SP. Hepatic Zonation Now on Hormones! *Hepatology*. 2019, 69 (3), 1339-1342. doi: 10.1002/hep.30221.
- [12] Jungermann K, Kietzmann T. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology*. 2000, 31 (2), 255-260. doi: 10.1002/hep.510310201.
- [13] Huppert SS, Iwafuchi-Doi M. Molecular regulation of mammalian hepatic architecture. *Curr Top Dev Biol*. 2019, 132, 91-136. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.12.003.
- [14] Kanamura S. Postnatal changes in the localization of glucose 6-phosphatase activity within the liver lobule of the mouse. *Anat Rec.* 1975, 181 (3), 635-40. doi: 10.1002/ar.1091810306.
- [15] Kanai K, Watanabe J, Asaka Y, Fujimoto S, Kanamura S. Postnatal changes in sublobular distribution of NADPH-cytochrome P-450 reductase in rat liver. *Histochem J*. 1992, 24 (12), 957-63. doi: 10.1007/BF01046501.
- [16] Kirchner G, Harbers M, Bunsch A, Seitz HJ, Hoppner W. Zonation of glucokinase in rat liver changes during postnatal development. *FEBS Lett*. 1993, 328 (1-2), 119-24. doi: 10.1016/0014-5793(93)80978-4.
- [17] Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet*. 2000, 25 (3), 254-255. doi: 10.1038/76996.
- [18] Suzuki T, Kanai Y, Hara T, Sasaki J, Sasaki T, Kohara M, Maehama T, Taya C, Shitara H, Yonekawa H, Frohman MA, Yokozeki T, Kanaho Y. Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol Cell Biol*. 2006, 26 (16), 6149-56. doi: 10.1128/MCB.00298-06.
- [19] Jungermann K, Kietzmann T. *Kidney Int*. 1997, 51 (2), 402-12. doi: 10.1038/ki.1997.53.
- [20] Birchmeier W. Orchestrating Wnt signalling for metabolic liver zonation. *Nat Cell Biol*. 2016, 18 (5), 463-465. doi: 10.1038/ncb3349.
- [21] LeBouton AV. Develop Growth, mitosis and morphogenesis of the simple liver acinus in neonatal rats. *Dev Biol*. 1974, 41 (1), 22-30. doi: 10.1016/0012-1606(74)90279-6.
- [22] Kanamura S, Kanai K, Watanabe J. Fine structure and function of hepatocytes during development. *J Electron Microscop Tech*. 1990, 14 (2), 92-105. doi: 10.1002/jemt.1060140204.
- [23] Wagenaar GT, Geerts WJ, Chamuleau RA, Deutz NE, Lamers WH. Lobular patterns of expression and enzyme activities of glutamine synthase, carbamoylphosphate synthase and glutamate dehydrogenase during postnatal development of the porcine liver. *Biochim Biophys Acta*. 1994, 1200 (3), 265-270. doi: 10.1016/0304-4165(94)90166-x.
- [24] Daimon T, David H, von Zglinicki T, Marx I. Correlated ultrastructural and morphometric studies on the liver during prenatal development of rats. *Exp Pathol*. 1982, 21 (4), 237-250. doi: 10.1016/s0232-1513(82)80039-x.
- [25] Vassy J, Kraemer M, Chalumeau MT, Foucrier J. Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Differ*. 1988, 24 (1), 9-24. doi: 10.1016/0045-6039(88)90082-6.
- [26] Rohr HP, Wirz A, Henning LC, Riede UN, Bianchi L. Morphometric analysis of the rat liver cell in the perinatal period. *Lab Invest*. 1971, 24 (2), 128-139.
- [27] Wong GK, Cavey MJ. Development of the liver in the chicken embryo. I. Hepatic cords and sinusoids. *Anat Rec*. 1992, 234 (4), 555-567. doi: 10.1002/ar.1092340411.
- [28] Elias H. A re-examination of the structure of the mammalian liver I. parenchymal architecture. *Am J Anat*. 1949, 84 (2), 311-333. doi: 10.1002/aja.1000840206.
- [29] Morgan JD, Hartroft WS. Juvenile liver. Age at which one-cell-thick plates predominate in the human liver. *Arch Pathol*. 1961, 71, 86-88.
- [30] Alexander B, Guzail MA, Foster CS. Morphological changes during

- hepatocellular maturity in neonatal rats. *Anat Rec.* 1997, 248 (1), 104-109. doi: 10.1002/ (SICI) 1097-0185 (199705) 248:1<104::AID-AR12>3.0.CO;2-T.
- [31] Sasaki K, Iwatsuki H, Suda M, Itano C. Scavenger macrophages and central macrophages of erythroblastic islands in liver hemopoiesis of the fetal and early postnatal mouse: a semithin light- and electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)*. 1993, 147 (2), 75-82. doi: 10.1159/000147485.
- [32] Dzierzak E, Medvinsky A. Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet.* 1995, 11 (9), 359-66. doi: 10.1016/s0168-9525 (00) 89107-6.
- [33] Asano H, Kobayashi M, Hoshino T. The hemopoietic microenvironment in the fetal liver of mice: relationship between developing hepatocytes and erythroblasts. *J Electron Microscop (Tokyo)*. 1987, 36 (1-2), 15-25. PMID: 3625080.
- [34] Sasaki K, Sonoda Y. Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Arch Histol Cytol.* 2000, 63 (2), 137-46. doi: 10.1679/aohc.63.137.
- [35] 磯村源蔵. スンクスの生物学. 学会出版センター, 2011, 449p. ISBN-10: 4762230642.
- [36] 市川安昭, 石川朋子, 森美貴, 山下和雄. 実験動物スンクス豚島の形態学的特性. *Mebio.* 1998, 15 (12), 107-109.
- [37] Ishikawa T, Ichikawa Y, Abe Y, Kitoh J, Yamashita K. Three-dimensional distribution patterns of PRL, GH and ACTH cells in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Anat Embryol.* 2002, 205, 159-167.
- [38] 石川朋子, 森美貴, 市川安昭, 山下和雄. 肝臓血管系の三次元的観察. *Mebio.* 1998, 15 (11), 103-105.
- [39] Yamashita K, Wakabayashi T, Adachi K. Visualization of mitochondria and some other cytoplasmic structures in hematoxylin-eosin stained sections by fluorescence microscopy. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1986, 63 (5), 311-321. doi: 10.2535/ofaj1936.63.5_311.
- [40] Ishikawa T, Mori M, Ichikawa Y, Kitoh J, Yamashita K. Three-dimensional observations of spatial arrangement of hepatic zonation and vein system in mice and house musk shrews. *Anat Rec.* 2000, 260 (3), 228-237. doi: 10.1002/1097-0185 (20001101) 260:3<228::AID-AR30>3.0.CO;2-S.
- [41] Daimon T, David H, von Zglinicki T, Marx I. Morphometric study on the absolute volume of differentiating hepatocytes in rats. *Exp Pathol.* 1984, 26 (3), 141-149. doi: 10.1016/s0232-1513 (84) 80041-9.
- [42] Burton AF, Greenall RM, Turnell RW. Corticosteroid metabolism and liver glycogen in fetal and newborn mice. *Can J Biochem.* 1970, 48 (2), 178-183. doi: 10.1139/o70-028.
- [43] Dawkins MJ. Glycogen Synthesis and Breakdown in Fetal and Newborn Rat Liver. *Ann N Y Acad Sci.* 1963, 111, 203-211. doi: 10.1111/j.1749-6632.1963.tb36960.x.
- [44] Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE, Greco M. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biol Cell.* 2005, 97 (4), 277-288. doi: 10.1042/BC20040154.
- [45] Tavassoli M. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells.* 1991, 17 (2), 269-281; discussion 282-6. PMID: 1912596.
- [46] Asada-Kubota M, Kanai K, Kanamura S. Development of ultrastructural heterogeneity among hepatocytes in the mouse. *Anat Rec.* 1982, 202 (3), 395-405. doi: 10.1002/ar.1092020312.
- [47] Kanamura S, Kanai K, Oka M, Watanabe J, Asada-Kubota M. Development of morphologic heterogeneity of hepatocyte mitochondria in the mouse. *Anat Rec.* 1984, 210 (2), 315-325. doi: 10.1002/ar.1092100206.
- [48] Kanamura S, Kanai K, Watanabe J, Asada-Kubota M, Oka M. Development of structural heterogeneity of mitochondria in mouse hepatocytes. *J Anat.* 1984, 139 (Pt 2), 295-305. PMID: 6490520.
- [49] Kanai K, Kanamura S, Watanabe J. Peri- and postnatal development of heterogeneity in the amounts of endoplasmic reticulum in mouse hepatocytes. *Am J Anat.* 1986, 175 (4), 471-480. doi: 10.1002/aja.1001750406.
- [50] Kanamura S, Asada-Kubota M. The heterogeneity of hepatocytes during the postnatal development of the mouse. *Anat Embryol (Berl)*. 1980, 158 (2), 151-159. doi: 10.1007/BF00315902.
- [51] Watanabe J, Asaka Y, Kanamura S. Postnatal development and sublobular distribution of cytochrome P-450 in rat liver: a microphotometric study. *J Histochem Cytochem.* 1993, 41 (3), 397-400. doi: 10.1177/41.3.8429202.
- [52] Notenboom RG, Moorman AF, Lamers WH. Developmental appearance of ammonia-metabolizing enzymes in prenatal murine liver. *Microsc Res Tech.* 1997, 39 (5), 413-423. doi: 10.1002/1097-0029 (19971201) 39:5<413::AID-JEMT4>3.0.CO;2-H.
- [53] Ahn J, Ahn JH, Yoon 2S Nam YS, Son MY, Oh JH. Human three-dimensional in vitro model of hepatic zonation to predict zonal hepatotoxicity. *J Biol Eng.* 2019, 13, 22. doi: 10.1186/s13036-019-0148-5.