ラット肝における細胆管増生及びオバール細胞増生と神経支配　病理組織学的,免疫組織化学的検討

金沢大学十全医学会雑誌　第105巻　第2号　363－381（1996）

ラット肝における細胆管増生およびオバール細胞増生と神経支配
－病理組織学的，免疫組織化学的検討－

金沢大学医学部医学科外科学第一講座（主任：渡辺洋宇教授）
金沢大学医学部医学科病理学第二講座（主任：中沼安二教授）
小　泉　博　志

小型胆管の増生は各種肝胆道系疾患で生ずるが，その発生機序や増殖機転に関して不明な点が多い．また，これらの小型胆管増生に果たす局所の微小環境，特に神経の果たす役割も全く知られていない．今回，この小型胆管上皮の増殖性病変の病的意義を細胆管増生とオバール細胞増生のラットモデルを用い主に病理組織像，細胞動態および神経分布を中心に検討した．細胆管増生モデルは総胆管結紮ラットを作成し，オバール細胞増生は 3'-メチル-4 ジメチルアミノアゾベンゼン (3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, 3'-MDAB) の投与により作成した．総胆管結紮群および 3'-MDAB 群では，7日目より細胆管およびオバール細胞の増生が門脈域辺縁部に出現し，以後これらの増生域は徐々に拡大し，14日目以降は拡大した門脈域を架橋するように増生域の拡大がみられた．そして，42日目には，いずれのモデルでもこれらの病変のため肝実質が分断され肝硬変様の形態を示した．細胞動態を好銀性核小体形成体の数，5ブロモ-2'デオキシウリジン標識率，増殖細胞核抗原ラベリングインデックスを用いて検討した．その結果，増生細胆管とオバール細胞で，いずれの指標も7日目で最高値をとり以後経過とともに漸減したが，各指標は対照群よりも高値を示した．また，3'-MDAB 投与群の方が総胆管結紮群よりも各指数は持続的に高値を示した．次に，免疫染色で神経線維分布を検討した．プロテインジーンプロダクト 9.5 (protein gene product 9.5, PGP 9.5) 陽性神経線維およびニューロペプタイド Y (neuropeptide Y, NPY) 陽性神経線維は，対照群では，門脈域の結合組織，門脈壁，肝動脈壁，および胆管壁近傍にみられたが，総胆管結紮群では，経過とともにこれらの陽性神経線維の減少がみられ，42日目には肝内の大型門脈域のみに染色された．しかし，3'-MDAB 投与群では，PGP 9.5 および NPY 陽性神経線維の減少，消失などの変化はみられず，42日目にはオバール細胞増生域に，PGP 9.5 陽性神経線維の分布がみられた．一方，ニューロンスペシフィックエノラーゼ (neuron specific enolase, NSE) 陽性神経線維は，対照群では，門脈域の脈管周囲の結合織内にみられたが，総胆管結紮群や 3'-MDAB 投与群では，28日目以降に細胆管増生域やオバール細胞増生域に NSE 陽性神経線維の新生がみられた．S-100 陽性神経線維は，対照群では，肝内大型胆管，隔壁胆管レベルの門脈域にみられた．総胆管結紮群では，経過とともに S-100 陽性神経線維は減少し，消失した．3'-MDAB 投与群では，門脈域内では S-100 陽性神経線維の減少，消失などの変化はみられなかった．サブスタンス P (substance P, SP) 陽性神経線維は，対照群では，門脈域の脈管周囲の結合織にみられた．総胆管結紮群，3'-MDAB 投与群では，SP 陽性神経線維の経時的な変化はみられなかった．電顕的には細胆管増生巣およびオバール細胞増生巣の細胞間には7日目～42日目において無髄神経線維が認められた．以上の結果より，ラットの総胆管結紮群および 3'-MDAB 投与群では小型～大型の門脈域での神経線維の分布や抗原性に変化あるいは特異な抗原性を持つ神経線維に変動があり，さらに細胆管増生域およびオバール細胞増生域でも，その細胞動態の変動および経過に関連して支配神経線維，特にその抗原性の発現に変化がみられた．これらの所見は，これら小型胆管病変部の微小環境の形成に神経支配が何らかの関与をしていることを示すものと考えられる．今回の研究により，今後，胆管上皮の病態や肝胆道系疾患の発生進展機序の解明に，肝内局所の神経線維および神経分布を考慮する必要があると考えられた．

Key words bile ductular proliferation, oval cell, innervation, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, bile duct ligation

肝内小型胆管，特に細胆管の増生は，ヒトの種々の肝胆道系疾患で非特異的に認められる．その由来，増殖の機序，細胞動態および病理学的意義に関して，従来多くの研究報告がなされている[1)~9)]．ヒトでは，これらの増生細胆管はその形態と形質像から既存の胆管上皮の増生によるものと小葉辺縁部肝細胞のメタプラジアによるものがあると考えられている[10)]．また Rubin は[1)]，胆管結紮によって起こる胆管増生は，胆管細胞と肝細胞を接合するヘリング管に由来するのではなく，胆管上皮の増生の結果生ずると報告している．3'-メチル-4ジメチルアミノアゾベンゼン (3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, 3'-MDAB),

平成8年2月27日受付，平成8年3月19日受理
Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; AFP, alpha-fetoprotein; AgNORs, argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region; BrdU, 5-bromo-deoxyuridine; DAB, diamynobenzidine tetrahydrochloride; 3'-MDAB, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene; NPY, neuropeptide Y; NSE, neuron

1-ナフチルイソチオシアネートなどの肝発癌物質投与によって出現するオバール細胞はその細胞性状は細胆管に類似するとされており[11)~13)]，細胆管増生と同様にその発生の由来，増殖の機序，細胞動態および病理学的意義には細胆管増生と同様不明な部分が多く残されている．また，細胆管増生とオバール細胞増生の病態の違いに関しても不明な点が多く残されている．

さて最近，肝，胆道系に分布する神経の生理的役割が注目されており，肝内微小循環の調節や胆汁分泌などに深く関与している[14)~25)]．さらに肝胆道系疾患そのものの病態と神経支配の関連性も注目されており，特に，神経線維やその分泌物が増殖性変化や炎症に深く関係していることから[26)]，これらの神経支配と肝胆道疾患の発生との関連性また肝切除後の肝細胞の再生に果す役割も最近，注目されている[9)27)]．また，最近の免疫組織化学的手法の発達により，神経線維の分布と抗原性の変化が光学顕微鏡的，電子顕微鏡的に認識できるようになり，各種肝疾患での神経の分布と病態形成との関連性が研究されている[28)29)]．しかし，現在までの研究で，細胆管やオバール細胞などの肝内小型胆管上皮の増殖性病変と神経支配との関連性については，ほとんど解明されていない．

そこで今回，総胆管結紮ラットで細胆管増生を作成し，また 3'-MDAB 投与によりオバール細胞増生を作成し，これら2つの実験モデルを用い病理組織学的，免疫組織化学的および電子顕微鏡学的検討を行い，細胆管増生とオバール細胞増生の病理形態，細胞動態，それに神経支配との関連性を検索した．

対象および方法

Ⅰ．実験動物

150～200g の雄性 Sprague-Dawley ラット（日本エスエルシー，浜松）を用い，以下の全ての実験を行った．なお，実験開始までは，一定の空調室内で固形飼料 CRF-1（日本チャールズリバー，厚木）を自由摂食させ，自由飲水下に飼育した．

Ⅱ．肝内の肝内胆管および門脈域の分類

肝内胆管を Nakanuma ら[30)]の分類を多少修飾して用いた．すなわち，ラットでは肝外で総胆管が左葉，中間葉，右葉，尾状葉および方形葉枝に分岐し肝内に分布する．そこで総胆管の第一次分枝を肝内大型胆管とした．肝内大型胆管より末梢の不明瞭ながらも線維性の胆管壁がみられ肝実質から離れて分布する胆管を隔壁胆管とした．胆管壁はなく門脈域内で肝動脈枝に伴走し肝実質から離れて分布する胆管を小葉間胆管とし，肝小葉辺縁部限界板の肝細胞と門脈域内を走行する胆管壁を持たない，横断面で 5, 6 ,個の立方体の胆管上皮よりなる胆管を細胆管とした．また，各々の太さの胆管を門脈域のレベルの基準として用いた．

Ⅲ．実験方法

1．実験群の設定

1）総胆管結紮群

細胆管増生モデルであり，18匹のラットを用いた．腹部を剃毛後，ジエチルエーテル麻酔下に，イソジン（明治製菓，東京）で消毒後無菌的に開腹した．まず肝十二指腸間膜に到達しそこで総胆管を同定した．間膜を鋭的に切開し，総胆管のみを約 1cm にわたり十分に露出し遊離した．ついで下部総胆管を 5mm 以上の間隔をあけ二重結紮し，その中間を切離した．その後，2層縫合で閉腹し手術を終えた．

2） 3'-MDAB 投与群

オバール細胞増生のモデルであり，18匹のラットを用いた．固形飼料 CRF-1 の代わりに，0.06%3'-MDAB 添加固形飼料を自由摂食させた．

3）対照群

腹部を剃毛後，ジエチルエーテル麻酔下に，イソジンで消毒後無菌的に開腹した．まず肝十二指腸間膜に到達しそこで総胆管を同定した．間膜を鋭的に切開し，総胆管のみを約 1cm にわたり十分に露出し遊離した．その後直ちに2層縫合で閉腹したものを単開腹手術群（対照群）とした．18匹のラットを用いた．

2．肝組織標本の作成

実験開始後7日目，14日目，21日目，28日目，35日目，42日目に各実験群の3匹をジエチルエーテル麻酔下に屠殺した．その後直ちに4℃の 4% パラホルムアルデヒド +0.2% グルタールアルデヒド +0.2% ピクリン酸溶液で環流固定を行い，肝を取り出した．更に4℃の4%パラホルムアルデヒド +0.2% ピクリン酸溶液で4時間浸漬固定した．次いで，これらの肝の一部を型の如くパラフィン包埋し，各ブロックにつき10枚以上の 5μm 切片を作成した．残りの肝は，20%蔗糖加リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline, PBS）(pH7.4) に2日間浸透させ，Optimum cutting temperature コンパウンド（マイルス・三共，東京）に包埋後，液体窒素で直ちに凍結した．その後クライオスタット（ティシュー・テック，マイルス・三共，東京）で各ブロックより10枚以上の 20μm 凍結切片を作成し，使用時まで −80℃ で保存した．

3．組織学的検討

各実験群のパラフィン包埋切片を，型の如く脱パラフィンし，その後 HE 染色，アザン染色，過ヨウ素酸シッフ法染色（periodic acid Schiff, PAS）染色，ゴモリの鍍銀染色を行い，光学顕微鏡下に観察した．

4．細胞動態の検討

細胞動態の検討のために，好銀性核小体形成体（argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region, AgNORs）数，5ブロモ 2'デオキシウリジン（5-bromo-deoxyuridine, BrdU）標識率，増殖期細胞核抗原標識指数（proliferating cell nuclear antigen labeling index, PCNALI）を求めた．AgNORs はリボゾーマル DNA のループを形成している構造で，細胞の分裂，増殖に関与していると考えられている[31)~33)]．BrdU は DNA 合成中のS期の細胞核に取り込まれることが知られている[34)~37)]．PCNA は増殖サイクルの主に G1 後期からS期にかけて細胞核内に蓄積し，DNA ポリメラーゼδの補助因子として機能していることが知られている[38)~41)]．

1） AgNORs 数

Ploton ら[31)]の方法に従って染色した．すなわち，5μm のパラフィン切片を型の如く脱パラフィン後，蒸留水で十分に洗浄した．その後，1g/dl の蟻酸に 2g/dl のゲラチンを溶解した溶液と50%硝酸銀水溶液とを 1：2 の割合で混合した反応液中に切

---

specific enolase; PAS, periodic acid Schiff; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferatingcell nuclear antigen; PCNALI, proliferating cell nuclear antigen labeling index; PGP 9.5, anti-human protein gene product 9.5; SP, substance P

片を入れ，25分間暗室で反応させた．その後，切片を蒸留水で洗浄後，型の如く脱水封入した．200個以上の正常の細胆管および小型小葉間胆管および増生細胆管細胞またはオバール細胞を無作為に抽出し，油浸レンズを用い，光学顕微鏡下にその核内にある明瞭な褐色顆粒の数をAgNORとして数え，細胆管細胞またはオバール細胞の1個あたりのAgNORsの平均を算出し，各例および各群のAgNORs数を求めた．

2） BrdU 標識率

各実験群とも，屠殺30分前に，BrdU (Sigma Chemical Company, St.Louis, USA) 5mg/kgを尾静脈より注射した．これらの肝を上記の如く処理しパラフィン包埋し，各ブロックより5μmのパラフィン包埋切片を作成し，アビジンビオチンペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) を用いた免疫染色[42]により核内に取り込まれたBrdUの検出を以下の如く行った．

すなわち，型の如く脱パラフィン後，0.3％過酸化水素添加メチルアルコール液中に20分間静置し，組織切片中の内因性ペルオキシダーゼを失活させた．次いで染色性を高めるため37℃の0.1％トリプシン (Difco Laboratories, Detroit, USA) で，10分間処理した．次いで室温で，2規定の塩酸で30分間処理後，室温で0.07規定の水酸化ナトリウム溶液で2分間処理した．その後，2次抗体の非特異的結合を押さえるため，5％ブタ正常血清で20分間処置した．次に50倍に希釈したマウス抗ブロモデオキシウリジンモノクローナル抗体 (Sigma Chemical Company) を一晩反応させた．次いで200倍希釈のビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) を室温で1時間反応させ，ABC溶液 (Vector Laboratories) 中で室温で1時間反応させた後，0.03% 過酸化水素水を加えた0.2% 3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩 (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (Sigma Chemical Company) で発色させた．なお各々の反応は，0.01M のPBSで十分に洗浄後に行った．次いで，ヘマトキシリンで淡く核染後，脱水封入し鏡検した．

500個以上の正常細胆管，小型小葉間胆管および増生細胆管細胞，またはオバール細胞を無作為に抽出し，核が染色されたBrdU陽性細胞を数え，各例および各実験群のBrdU標識率を百分率 (%) で算出した．

3） PCNALI

肝組織標本のパラフィン包埋切片を，型の如く脱パラフィンを行い，その後内因性ペルオキシダーゼを失活させ，10％ウマ正常血清で非特異的結合反応を防止した．次いで，1次抗体として200倍希釈のマウス抗増殖期細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) モノクローナル抗体 (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, England) を一晩反応させた．次いでビオチン化ウマ抗マウス抗体を1時間反応させ，ABC溶液と1時間反応後，0.03％過酸化水素添加DABで発色させた．次いでヘマトキシリンで淡く核染後，脱水封入した．正常の細胆管および小型小葉間胆管それに増生細胆管細胞，オバール細胞500個を無作為に抽出し，その中でのPCNA陽性細胞を数え各例および各実験群でのPCNALI (%) として算出した．なお，免疫染色の反応特異性は一次抗体をPBSで置換し，反応が陰性化することで確認した．

5．神経線維の免疫染色

以下の神経線維の免疫染色を行い，その分布と密度と神経線維に珠状にみえるバリコシティを観察した．なお，神経線維そのものは通過線維とされているのに対し，バリコシティは生理活性物質の貯蔵または放出部位と考えられ神経内分泌の作用の部位として注目されている[43]．

1）神経線維に含まれることが知られているヒトプロテインジーンプロダクト9.5 (protein gene product 9.5, PGP 9.5)，ウシS-100，ニューロペプチドチロジン (neuropeptide Y, NPY)，ラットニューロンスペーシックフィックエノラーゼ (neuron specific enolase, NSE)，サブスタンスP (substance P, SP) の検出を免疫組織学的染色により以下の如く行い，神経線維の同定を試みた．用いた1次抗体，2次抗体，製造会社名と希釈濃度を表1に示す．なお，今回検索した神経線維は，一般的な神経線維マーカーとして知られているPGP 9.5陽性神経線維群とNSE陽性神経線維群，神経ペプチドと考えられているNPY陽性神経線維群とSP陽性神経線維群，それにシュワン細胞が陽性となるS-100陽性神経線維群とに分けられる．

まず，20μm凍結切片を0.3％トリトンX (和光純薬工業，大

Table 1. Primary antibodies and secondary antibodies, and their dilution and sources

Antibodies	Dilution	Source
Primary antibodies		
Anti-BrdU (clone BU-33, mouseIgG1, mono)	1 : 50	Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
Anti-PCNA (clone PC10, mouseIgG2a, mono)	1 : 200	Navocastra Laboratories, Nawcastle, England
Anti-human PGP 9.5 (rabbit IgG, mono)	1 : 1600	Ultra Clone Limited, Isleof Wight, England
Anti-rat NSE (rabbit IgG, poly)	1 : 2000	Polysciences, Inc., Warrington, USA
Anti-NPY (rabbit IgG, poly)	1 : 400	Chemical International Inc,. Temecula, USA
Anti-cow S-100 protein (rabbit IgG, poly)	1 : 5000	DAKO A/S, Glostrup, Denmark
Anti-Substance P (rabbit IgG, poly)	1 : 800	Amersham Internatinal plc, Buckinghamshire, England
Biotiny secondary antibodies		
Anti-mouse IgG (horse)	1 : 200	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-rabbit IgG (goat)	1 : 1000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Fluorescent secondry antibody		
Anti-rabbit IgG (goat)	1 : 1000	Organon Teknika Corporation, Durham, USA

Mono, monoclonal antibody; poly, polyclonal antibody; BrdU, bromodeoxyuridine; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PGP 9.5 protien gene product 9.5; NSE, neuron specific enolase; NPY, neuropeptide tyrosine.

阪）加 PBS に4日間浸漬した後，0.3%過酸化水素添加メチルアルコール液中で1時間反応させることにより内因性ペルオキシダーゼを失活させた．次いで，非特異的結合反応を防止するため，切片を10%ヤギ正常血清で処理した．次に1次抗体を4℃で2晩反応させ，1000倍希釈のビオチン標識のヤギ抗ウサギ IgG 抗体を2次抗体として使用し室温で1時間反応させ，ABC 溶液と反応後，0.03%過酸化水素添加 DAB で発色させた．各反応の前後には，切片を PBS にて十分洗浄した．ヘマトキシリンで核染後，脱水封入し，鏡検した．

なお，これらの免疫染色の特異性は1次抗体を PBS で置換し反応が陰性化することで確認した．

6．共焦点レーザー顕微鏡による検討

PGP 9.5, NSE, NPY の免疫染色を以下の如く行い，共焦点レーザー顕微鏡で観察した．つまり 20μm 凍結切片を，0.3%トリトンX加 PBS に4日間浸漬した後，非特異的結合反応を防止するため，切片を10%ヤギ正常血清で処理した．次に1次抗体を4℃で2晩反応させた．1次抗体はウサギ抗 PGP 9.5 モノクローナル抗体，ウサギ抗 NSE ポリクローナル抗体およびウサギ抗 NPY ポリクローナル抗体を用いた．次に，1000倍希釈の FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を2次抗体として使用し暗室中で1時間反応させた．その後，水性封入剤アクアテックス (Merck, Darmstadt, Germany) で封入し，共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 410, Carl Zeiss, Gottingen, Germany) 下に観察した．なお，各反応の前後には PBS で切片を十分に洗浄した．共焦点レーザー顕微鏡の条件として，レーザー光は波長が 488nm のアルゴンレーザーを使用した．スキャン速度は8.65秒とし，ピンホールサイズ値は20とした．画像サイズは 768×576 ピクセルまたは 512×512 ピクセルとした．画像アベレージングは8回として画像を得た．

7．電子顕微鏡的検討

全ての実験群で，肝の摘出時，肝組織の一部を2.5%グルタールアルデヒド内で細切し 1×1×1mm 大の組織片を作成した．次いで，この組織片を0.1%タンニン酸を加えた2.5%グルタールアルデヒド内で2時間固定した．その後，15%蔗糖溶液で24時間洗浄し，1%四酸化オスミウムで1時間固定した．次いで型の如くエタノール系列で脱水後，100%酸化プロピレンで置換し，エポン812に包埋した．包埋ブロックより作成した 1μm 切片にトルイジンブルー染色を行い，細胆管，オバール細胞あるいは神経線維の観察に適当な部位を捜した．そのブロックをトリミングし，ウルトロトーム (2128 ultrotome, LKB, Bromma, Sweden) にて超薄切切片を作成し，酢酸ウラニールと鉛の二重染色を行い，H-300 型電子顕微鏡（日立製作所，東京）で観察した．

8．免疫電子顕微鏡による検討

全ての実験群で 20μm の凍結肝切片を，0.3%過酸化水素水添加メチルアルコール液中に1時間置き内因性ペルオキシダー

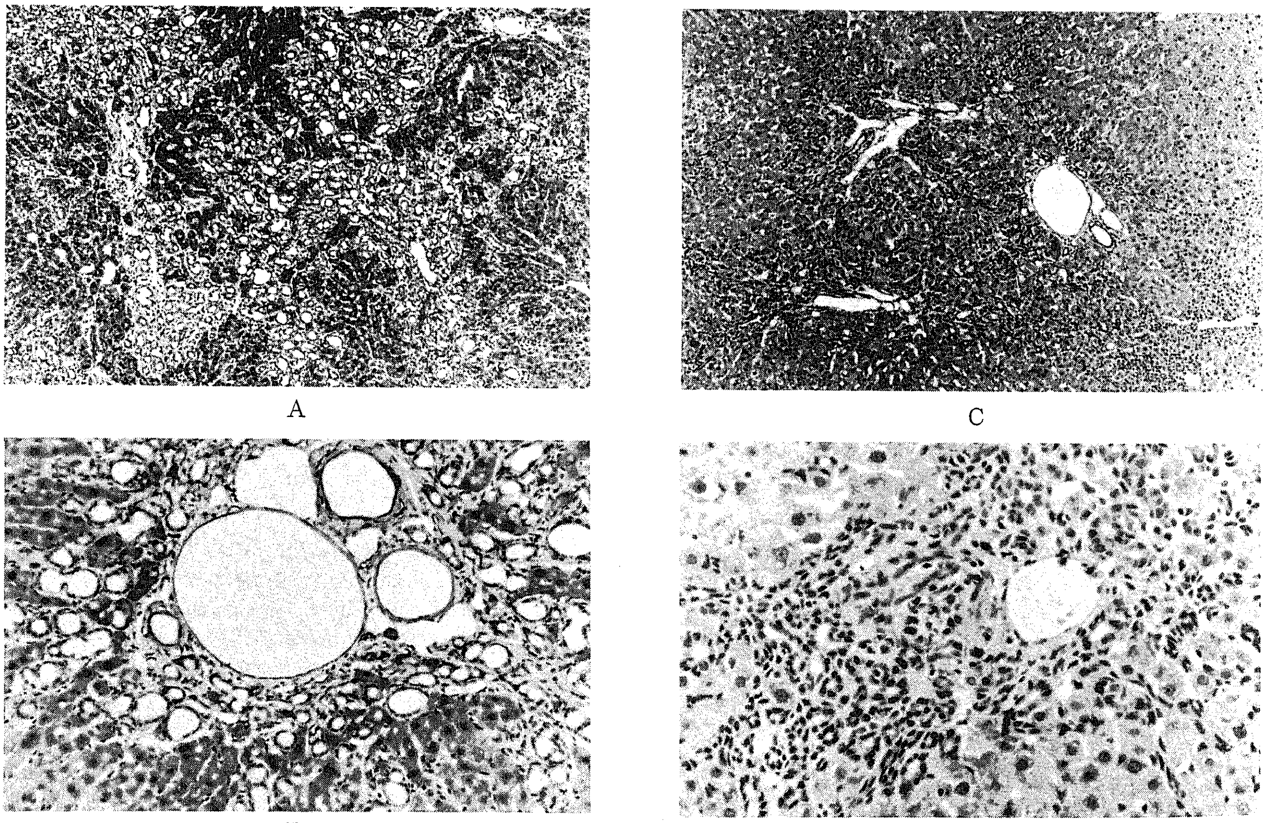


Fig. 1.　Microscopic finding of proliferative pattern of the bile ductules and oval cells. (A) Bile ductules proliferation of the liver for 42 days after common bile duct ligation. Note extensive proliferation of bile ductules and briding fibrosis-like appearence. (B) Bile ductular epitherial cells composed of cuboidal cells. (C) Oval cells proliferation of the liver for 42 days after 3'-MDAB feeding. Note extensive proliferation of oval cells and some of them show bile ductular formation. (D) Oval cells had small round or oval shape with chromatin rich nuclear. (A), ×132 (HE); (B), ×264 (HE); (C), ×100 (HE); (D), ×320 (HE).

ゼを失活させた．次いで，非特異的結合反応を防止するため10%ヤギ正常血清で１時間処置した．次いで，１次抗体としてPGP 9.5 抗体を24時間反応させた．次いで，ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体を１時間反応させ，ABC 溶液と１時間反応後，0.03%過酸化水素添加 DAB で発色させた．その後，１%四酸化オスミウムで１時間固定後，エタノールで脱水後，酸化プロピレンで置換し，エポン樹脂に包埋した．その後，1μm 切片を作成しトルイジンブルー染色を行い，PGP 9.5 陽性神経線維の観察に適切な部位をトリミングし，上述の電子顕微鏡と同じく超薄切切片を作成し，H-300 型電子顕微鏡にて観察を行った．

成　　　績

Ⅰ．病理組織学的所見

１．細胆管およびオバール細胞の増生とその形態像

１）対照群

経過観察期間中に，細胆管増生やオバール細胞の出現はみられなかった．

２）総胆管結紮群

細胆管の増生が結紮後７日目でみられた．つまり，増生細胆管は比較的小型の立方上皮よりなり，やや不整な管腔を有し，主に門脈域辺縁部に出現した．細胆管の増生域は，結紮後の経過とともに徐々に拡大し，14日目以降は細胆管増生のため拡大した門脈域が架橋するようになり，その範囲は経過と共に徐々に増大し，42日目には，肝実質は細胆管増生域のため分断され肝硬変様となった (図 1A, B)．なお，細胆管の増生にともない，その周囲には線維性結合織 (毛細血管を含む) の増生が種々の程度にみられ，経過とともにやや増加した．なお，小葉間胆管，隔壁胆管，肝内大型胆管を有する門脈域では，胆管腔の拡張，上皮の過形成性変化，門脈域の浮腫性変化，線維化がみられた．

３） 3'-MDAB 投与群

オバール細胞はクロマチンに富む核を有する，小型の円形ないし楕円形の細胞で，管腔構造が不明瞭な細胞群として観察された．3'-MDAB 投与後７日目では，門脈域周囲にごく僅かにオバール細胞が観察されるのみであった．14日目以後よりオバール細胞は小葉辺縁部で徐々に増加した．投与後21日目には，オバール細胞の増生域内に，管腔を有する細胆管の増生巣も出現するようになった．42日目には，オバール細胞増生のため拡大した門脈域が相互に架橋するようになり，肝実質を結節状に取り巻くオバール細胞の増生がみられた (図 1C, D)．増生したオバール細胞の周囲にも線維性結合織がみられたが，上述の細胆管増生領域に較べると軽度であった．なお，総胆管結紮群にみられた門脈域や胆管系の変化はみられなかった．

Ⅱ．細胆管およびオバール細胞の細胞動態

１．対照群

正常の細胆管および小型小葉間胆管において経過観察中に AgNORs 数，BrdU 標識率，PCNALI のいずれの指標の値においても有意な変動はみられなかった．つまり，AgNORs 数は，経過観察中，平均値 1.70〜1.81 の値を示した (図 2)．BrdU 標識率は，経過観察中，平均値 6.1〜6.6 の値を示した (図 3) PCNALI は，経過観察中，平均値 4.9〜5.4 の値を示した (図 4)．

２．総胆管結紮群

増生細胆管での AgNORs 数，BrdU 標識率，PCNALI はいずれの指標においても，７日目で最高値となり，以後漸減したが，対照群に比し，持続して高値を示した．つまり，AgNORs 数は，結紮後７日目に平均値2.20と最高値となり以後漸減した．なお，35日目には，平均値1.72となり，ほぼ対照群と同様の値となった (図 2)．BrdU 標識率は，結紮後７日目で平均値12.3と最高値となり以後漸減した．対照群に比較すると高値をとり続け，42日目では平均値7.7であった (図 3)．PCNALI は，結紮後７日目で平均値25.0と最高値をなり，以後漸減した．対照群と比較すると高値をとり続け，42日目では，

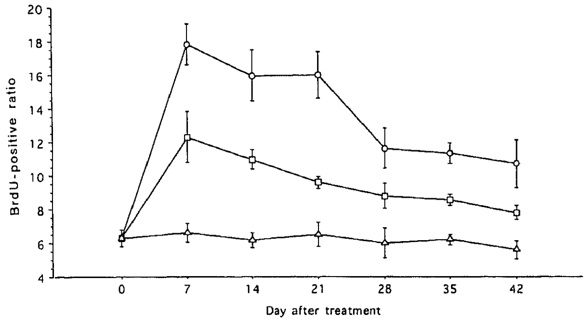


Fig. 3. Changes of BrdU-positive ratio after treatment. Values are $\bar{x} \pm SE$ (n=3). □, bile duct ligation rats group; ○, 3'-MDAB feeding rats group; △, control ratsgroup.

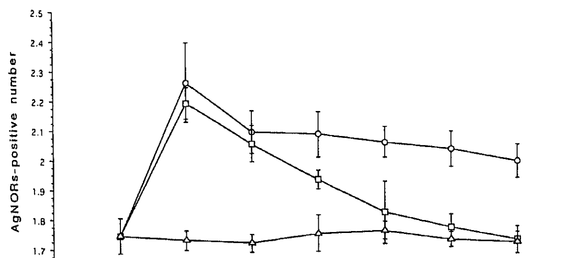


Fig. 2. Changes of AgNORs-positive number after treatment. Values are $\bar{x} \pm SE$ (n=3). □, bile duct ligation rats group; ○, 3'-MDAB feeding rats group; △, control rats group.

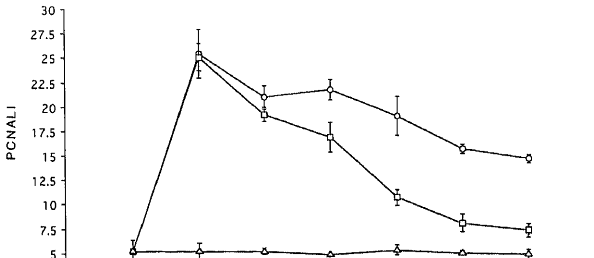


Fig. 4. Changes of PCNALI after treatment. Values are $\bar{x} \pm SE$ (n=3). □, bile duct ligation rats group; ○, 3'-MDAB feeding rats group; △, control rats group.

平均値7.4であった (図 4).

3．3'-MDAB 投与群

増生するオバール細胞では，AgNORs 数，BrdU 標識率，PCNALI のいずれの指標においても 3'-MDAB 投与後７日目で最高値となり，以後21日目まで高値をとった．28日目以後では漸減したが，対照群に比較すると持続して高値を示した．AgNORs 数は，投与後７日目で平均値2.27と最高値となり，以後やや漸減したが対照群と比較すると高値をとり続け，42日目には平均値2.00であった (図 2)．BrdU 標識率は，投与後７日目で平均値17.8と最高値となり，以後漸減したが対照群と比較すると高値をとり続け，42日目には平均値10.7であった (図 3)．PCNALI は，投与後７日目で平均値25.0と最高値となり，以後漸減したが対照群と比較すると高値をとり続け，42日目には，平均値15.1であった (図 4).

Ⅲ．神経線維の免疫染色

一般的な神経線維のマーカーとして知られている PGP 9.5 陽性神経線維と NSE 陽性神経線維の群，神経ペプチドとして認識されている NPY 陽性神経線維と SP 陽性神経線維の群，それにシュワン細胞が陽性となる S-100 陽性神経線維群とに分類し述べる.

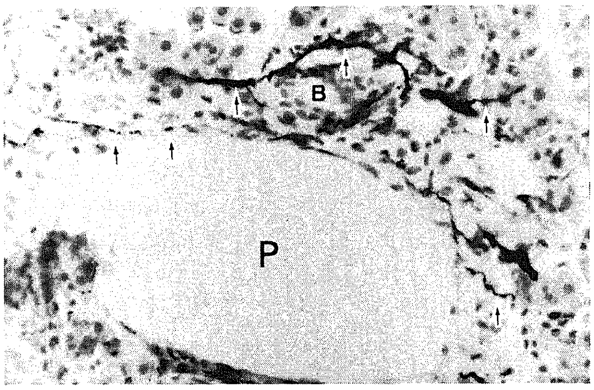
1．PGP 9.5 陽性神経線維，NSE 陽性神経線維の分布

1）PGP 9.5 陽性神経線維

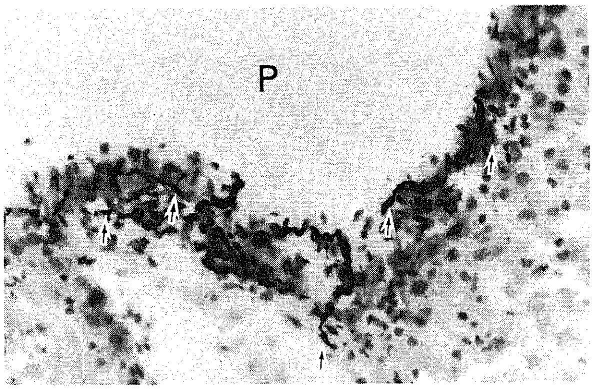
経時的変化を表２に示した.

i．対照群

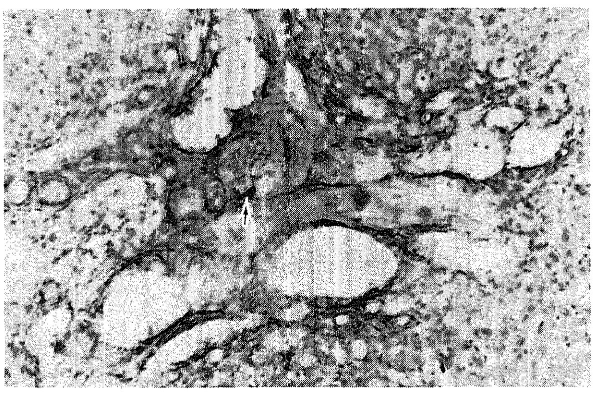
PGP 9.5 陽性の太い神経線維は，門脈域内の結合組織内に分布しており，細い神経線維は，門脈壁，肝動脈壁，胆管周囲をネットワークを形成するように分布していた．細い神経線維には連珠状のバリコシティがみられた (図 5A)．また，門脈域に



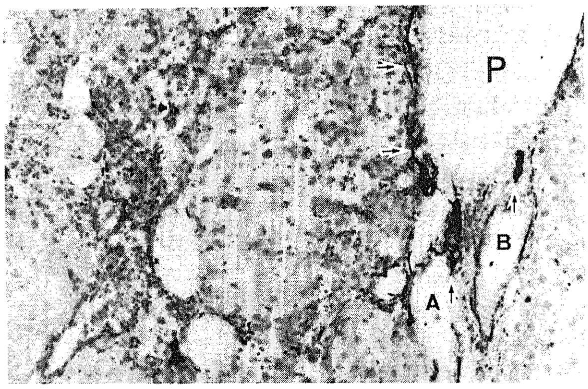
A



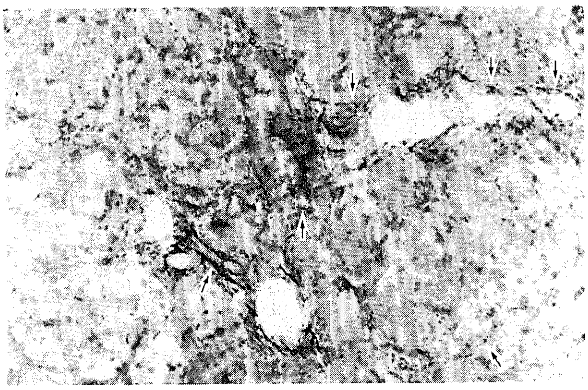
B



C



D



E

Fig. 5.　Immunohistochemical staining of PGP 9.5. (A) and (B) Liver from a control subject. (A) PGP 9.5-positive nerve fibers exist near the portal vein, hepatic artery and bile duct in the portal tract showed by arrows. (B) In the portal vein wall, PGP 9.5-positive nerve fibers exist and seemed to elongate in the hepatic parenchyma showed by arrows. (A) and (B) Note varicosities in thin fibers. (C) Liver from a bile duct ligation subject for 42 days. PGP 9.5-positive nerve fibers decrease. (D) and (E) Liver from a 3'-MDAB feeding subject for 42 days. (D) PGP 9.5-positive nerve fibers exist in the portal tracts showed by arrows, (E) and PGP 9.5-positive nerve fibers distributed in the oval cells proliferating area showed by arrows. (A) and (B), ×400 ; (C), (D) and (E), ×160. A, hepatic artery ; B, bile duct ; P, portal vein.

接する肝実質内に，神経線維が，僅かにのび出して分布する像もみられた（図 5B）．経時的な観察で神経線維の分布に変化はみられなかった．

ii．総胆管結紮群

結紮後14日目までは神経線維の分布や密度は対照群と同様であった．21日目以降は徐々に，PGP 9.5 陽性神経線維の密度および神経線維のバリコシティは減少し，42日目になると，肝内大型胆管レベルの門脈域に太い神経線維がみられるのみとなった（図 5C）．なお，細胆管増生域では，全経過を通じて PGP 9.5 陽性神経線維の分布はみられなかった．

iii．3'-MDAB 投与群

神経線維の分布や密度は対照群とほぼ同様であった．総胆管結紮群でみられた，PGP 9.5 陽性神経線維の密度や神経線維のバリコシティの減少はみられなかった（図 5D）．35～42日目のオバール細胞増生域に，細い PGP 9.5 陽性神経線維とバリコシティが分布する像を認めたが（図 5E），この像は28日目までは

Table 2. Distribution and density of PGP 9.5-positive nerve fibers

Liver tissue classified by bile duct size	Group	Density of PGP 9.5-positive nerve fibers on day 0	7	14	21	28	35	42
Portal tracts containing intrahepatic large bile duct	Control	++	++	++	++	++	++	++
	BDL	++	++	++	++	+	+	±
	3'-MDAB	++	++	++	++	++	++	++
Portal tracts containing septal bile duct	Control	++	++	++	++	++	++	++
	BDL	++	++	++	++	+	±	−
	3'-MDAB	++	++	++	++	++	++	++
Portal tracts containing intralobular bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	±	±	−	−
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Foci of bile ductules and oval cells	Control	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
	BDL	(−)	−	−	−	−	−	−
	3'-MDAB	(−)	−	−	−	−	±	+

Control, sham operated group ; BDL, common bile ligated group ; 3'-MDAB, 3'-methyl-4-diamynoazobenzene fed group.
3cases evaluated in each group. ++, fairly numerous ; +, moderate ; ±, a few ; −, missing ; (−), no available area.

Table 3. Distribution and density of NSE-positive nerve fibers

Liver tissue classified by bile duct size	Group	Density of NSE-positive nerve fibers on day 0	7	14	21	28	35	42
Portal tracts containing intrahepatic large bile duct	Control	++	++	++	++	++	++	++
	BDL	++	++	++	++	++	++	++
	3'-MDAB	++	++	++	++	++	++	++
Portal tracts containing septal bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	+	+	+	+
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Portal tracts containing intralobular bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	+	+	+	+
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Foci of bile ductules and oval cells	Control	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
	BDL	(−)	−	−	−	±	+	+
	3'-MDAB	(−)	−	−	−	−	−	−

Control, sham operated group ; BDL, common bile ligated group ; 3'-MDAB, 3'-methyl-4-diamynoazobenzene fed group.
3cases evaluated in each group. ++, fairly numerous ; +, moderate ; ±, a few ; −, missing ; (−), no available area.

認められなかった．

2）NSE 陽性神経線維

経時的変化を表 3 に示した．

i．対照群

NSE 陽性神経線維は，門脈域の脈管周囲の結合織内に分布し，僅かにバリコシティもみられた．経時的な変化はみられなかった (図 6A)．

ii．総胆管結紮群

神経線維の分布や密度は対照群とほぼ同様であった．28日目以降になると細胆管増生域内に細い NSE 陽性神経線維の分布がみられるようになった (図 6B)．なお，28日目以前には細胆管増生巣で NSE 陽性神経線維は認められなかった．

iii．3'-MDAB 投与群

NSE 陽性神経線維は，対照群と同様に門脈域の脈管周囲の結合織内に分布していたが，経時的な変化はみられなかった．なお，オバール細胞増生域内に NSE 陽性神経線維の分布はみられなかった．

2．神経ペプチド含有神経線維 (NPY および SP 陽性神経線維) の分布

1）NPY 陽性神経線維

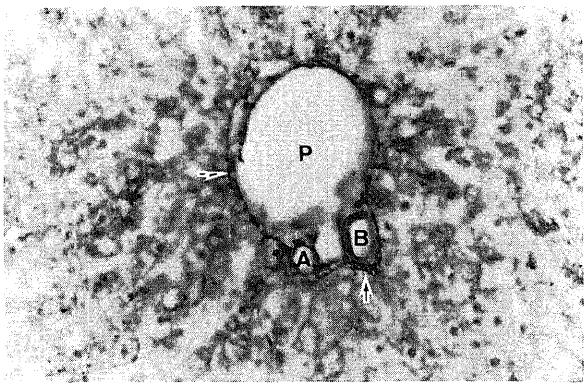
経時的変化を表 4 に示した．

i．対照群

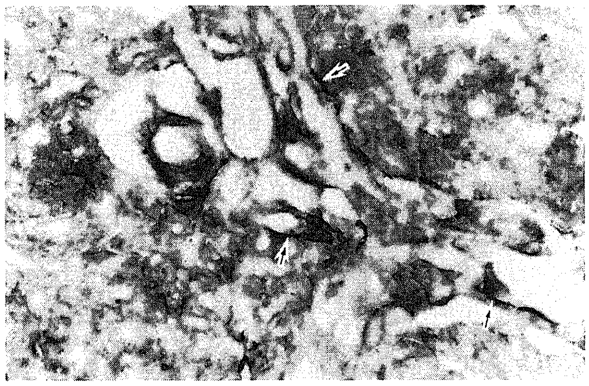
NPY 陽性の太い神経線維は，門脈域内の結合織内に分布しており，細い神経線維は，門脈壁，肝動脈壁，胆管周囲をネットワークを形成するように分布し所々で神経線維にバリコシティがみられた (図 7A)．

ii．総胆管結紮群

NPY 陽性線維は，対照群と同様に門脈域の脈管周囲の結合織内にネットワークを形成するように分布していたが，21日目以後では小葉間胆管のレベルの門脈域より神経線維やバリコシティは徐々に減少した (図 7B)．なお，細胆管増生域内には全経過を通じて NPY 陽性神経線維は認められなかった．



A



B

Fig. 6. Immunohistochemical staining of NSE. (A) Liver from a control subject. NSE-positive nerve fibers exist in the portal tracts showed by arrows. Note a few varicosities in thin fibers. (B) Liver from a bile duct ligation subject for 42 days. NSE-positive nerve fibers distributed in the bile ductules proliferating area showed by arrows. (A), ×320 ; (B), ×400. A, hepatic artery ; B, bile duct ; P, portal vein.

Table 4. Distribution and density of NPY-positive nerve fibers

Liver tissue classified by bile duct size	Group	Density of NPY-positive nerve fibers on day 0	7	14	21	28	35	42
Portal tracts containing intrahepatic large bile duct	Control	++	++	++	++	++	++	++
	BDL	++	++	++	++	+	+	+
	3'-MDAB	++	++	++	++	++	++	++
Portal tracts containing septal bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	+	±	±	±
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Portal tracts containing intralobular bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	±	±	−	−
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Foci of bile ductules and oval cells	Control	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
	BDL	(−)	−	−	−	−	−	−
	3'-MDAB	(−)	−	−	−	−	−	−

Control, sham operated group ; BDL, common bile ligated group ; 3'-MDAB, 3'-methyl-4-diamynoazobenzene fed group.
3cases evaluated in each group. ++, fairly numerous ; +, moderate ; ±, a few ; −, missing ; (−), no available area.

iii．3'-MDAB 投与群

NPY 陽性線維は，対照群と同様に門脈域の脈管周囲の結合織内にネットワークを形成するように分布していた．総胆管結紮群でみられた経時的な NPY 陽性神経線維の減少はみられなかった．なお，オバール細胞増生域内には全経過を通じて NPY 陽性神経線維は認められなかった．

2）SP 陽性神経線維

経時的変化を表5に示した．

i．対照群

SP 陽性神経線維は，門脈域内の結合組織内に散在性に分布していたが，脈管壁にネットワーク状に分布する細い神経線維やバリコシティはみられなかった（図 8）．

ii．総胆管結紮群

SP 陽性神経線維は，対照群と同様に，門脈域内の結合組織に分布していたが，経時的変化はみられなかった．なお，増生細胆管領域には全経過を通じて SP 陽性神経線維は認められなかった．

iii．3'-MDAB 投与群

SP 陽性神経線維は，対照群と同様に門脈域内の結合組織に分布していたが，経時的な変化はみられなかった．なお，オバール細胞増生域には全経過を通じて SP 陽性神経線維は認められなかった．

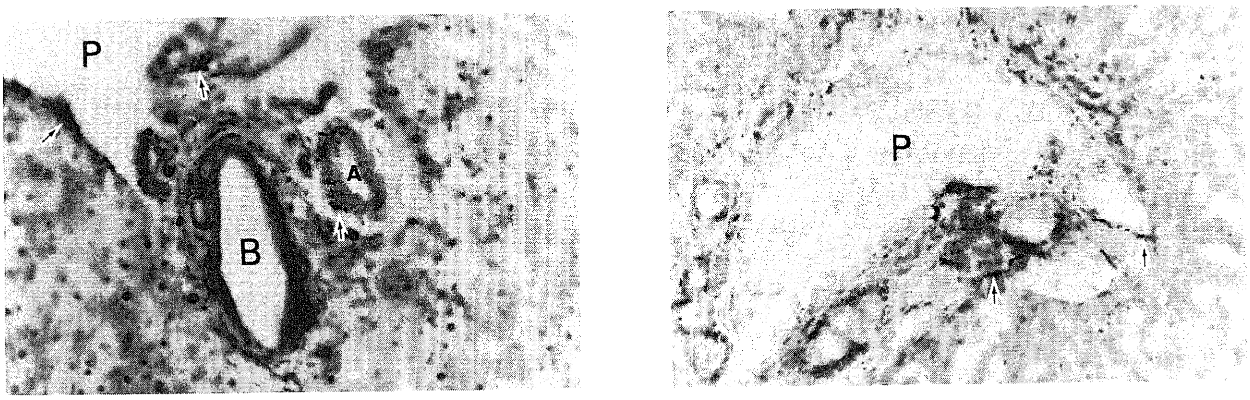
3．S-100 陽性神経線維（シュワン細胞）の分布

1）S-100 陽性神経線維

経時的変化を表 6 に示した．

i．対照群

S-100 陽性神経線維は，肝内大型胆管，隔壁胆管レベルの門脈域内の結合組織内に，太い神経線維が分布していた．しかし，門脈壁や肝動脈壁にネットワーク状に分布する細い S-100 陽性神経線維やバリコシティはみられなかった（図 9A）．



A　B

Fig. 7. Immunohistochemical staining of NPY. (A) Liver from a control suject. NPY-positive nerve fibers exist near the portal vein, hepatic artery and bile ductules in the portal tracts showed by arrows. Note varicosities in thin fibers. (B) Liver from a bile duct ligation subject for 42 days. NPY-positive nerve fibers decrease in the portal tract showed by arrows. (A), ×320; (B), ×264. A, hepaticartery; B, bile duct; P, portal vein.

Table 5. Distribution and density of SP-positive nerve fibers

Liver tissue classified by bile duct size	Group	Density of SP-positive nerve fibers on day 0	7	14	21	28	35	42
Portal tracts containing intrahepatic large bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	+	+	+	+
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Portal tracts containing septal bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	+	+	+	+
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Portal tracts containing intralobular bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	+	+	+	+
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Foci of bile ductules and oval cells	Control	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
	BDL	(−)	−	−	−	−	−	−
	3'-MDAB	(−)	−	−	−	−	−	−

Control, sham operated group; BDL, common bile ligated group; 3'-MDAB, 3'-methyl-4-diamynoazobenzene fed group.
3cases evaluated in each group. +, moderate; ±, a few; −, missing; (−), no available area.

ii．総胆管結紮群

S-100 陽性神経線維は，7日～14日目までは対照群と同様に，肝内大型胆管，隔壁胆管レベルの門脈域内の結合織内に，太い神経線維としてみられた．しかし，21日目以降の，隔壁胆管レベルの門脈域では，S-100 陽性神経線維の密度は減少し，42日目のものでは S-100 陽性神経線維は殆ど認められなかった (図 9B)．なお，細胆管増生域には全経過を通じて S-100 陽性神経線維は認められなかった．

iii．3'-MDAB 投与群

S-100 陽性神経線維は，対照群と同様に，肝内大型胆管，隔壁胆管レベルの門脈域内の結合織内に，太い神経線維としてみられた．しかし，総胆管結紮群にみられたように，経時的な S-100 陽性神経線維の減少はみられなかった (図 9C)．なお，オバール細胞増生域内には全経過を通じて S-100 陽性神経線維は認められなかった．

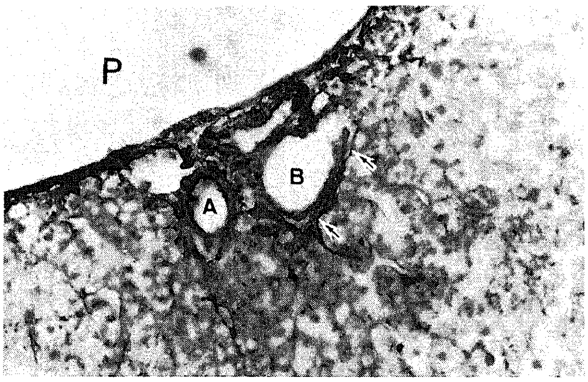


Fig. 8.　Immunohistochemical staining of SP.　Liver from a control subject.　SP-positive nerve fibers exist in the portal tracts showed by arrows.　×320.　A, hepatic artery ; B, bile duct ; P, portal vein.

Ⅳ．共焦点レーザー顕微鏡による検討

PGP 9.5, NSE, NPY 陽性神経線維の分布を，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した．いずれの神経線維に関しても，免疫染色後光学顕微鏡下で観察した場合と比較してより微細で明確な神経線維のネットワークおよび神経線維のバリコシティが観察されたが，基本的には陽性神経線維の分布と密度は，上述した免疫染色と同様であった．

1．PGP 9.5 陽性神経線維

1）対照群

PGP 9.5 陽性の太い神経線維は，門脈域内の結合組織内に分布しており，細い神経線維は，門脈壁，肝動脈壁，胆管周囲をネットワークを形成するように分布し神経線維にはバリコシティがみられた (図 10A)．PGP 9.5 陽性線維の経時的な変化はみられなかった．

2）総胆管結紮群

PGP 9.5 陽性神経線維の分布は結紮後14日目までは対照群と同様の分布がみられた．しかし，21日目以降は徐々に，PGP 9.5 陽性神経線維の密度およびバリコシティの減少がみられ，42日目になると，PGP 9.5 陽性神経線維は肝内大型胆管レベルの門脈域にみられるのみとなった (図 10B)．なお，細胆管増生域には全経過を通じて分布する PGP 9.5 陽性神経線維はみられなかった．

3）3'-MDAB 投与群

対照群と同様に，主に門脈域内に神経線維の分布がみられ，その神経線維の密度は単開腹群とほぼ同様であった．総胆管結紮群でみられたような，PGP 9.5 陽性神経線維の密度や神経線維のバリコシティの減少はみられなかった．更に，35～42日目のオバール細胞増生域に，細い PGP 9.5 陽性神経線維の分布がみられた (図 10C)．

2．NSE 陽性神経線維

1）対照群

NSE 陽性神経線維は，門脈域の脈管周囲の結合織内に分布

Table 6.　Distribution and density of S-100-positive nerve fibers

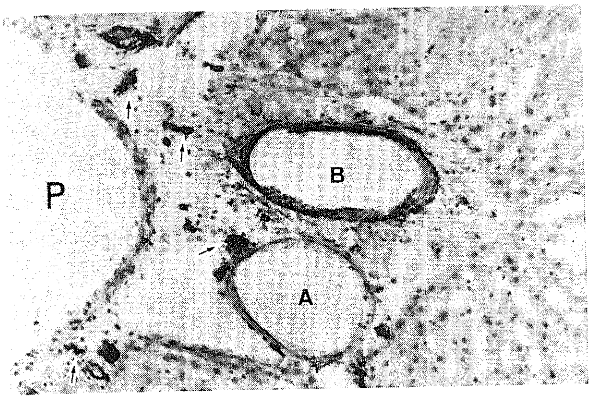
Liver tissue classified by bile duct size	Group	Density of S-100-positive nerve fibers on day 0	7	14	21	28	35	42
Portal tracts containing intrahepatic large bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	+	±	−	−
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Portal tracts containing septal bile duct	Control	+	+	+	+	+	+	+
	BDL	+	+	+	±	−	−	−
	3'-MDAB	+	+	+	+	+	+	+
Portal tracts containing intralobular bile duct	Control	−	−	−	−	−	−	−
	BDL	−	−	−	−	−	−	−
	3'-MDAB	−	−	−	−	−	−	−
Foci of bile ductules and oval cells	Control	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
	BDL	(−)	−	−	−	−	−	−
	3'-MDAB	(−)	−	−	−	−	−	−

Control, sham operated group ; BDL, common bile ligated group ; 3'-MDAB, 3'-methyl-4-diamynoazobenzene fed group.
3cases evaluated in each group.　+, moderate ; ±, a few ; −, missing ; (−), no available area.

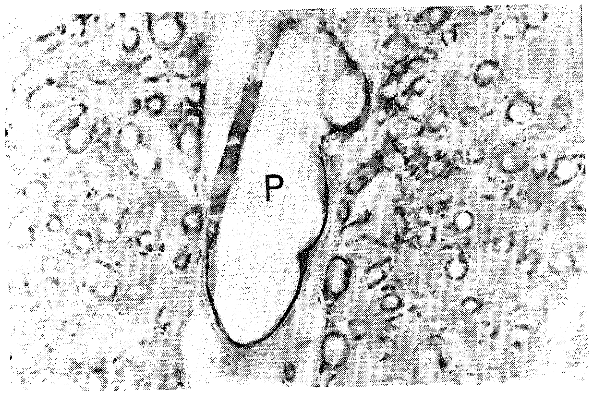
しバリコシティがみられたが，経時的な変化はみられなかった(図 11A).

2）総胆管結紮群

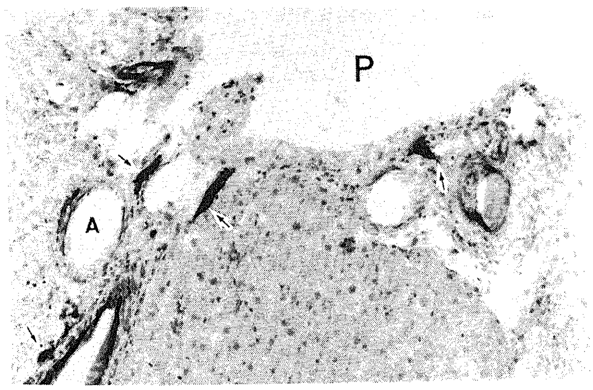
NSE 陽性神経線維は，対照群と同様に門脈域の脈管周囲の結合織内に分布していたが，28日目以降になると細胆管増生域に NSE 陽性神経線維の分布がみられるようになった (図 11B).



A



B

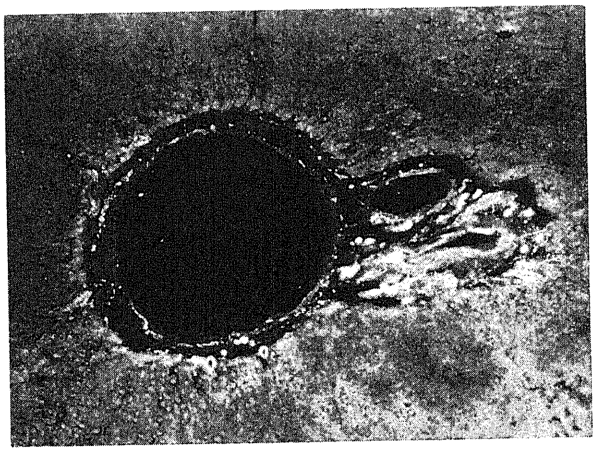


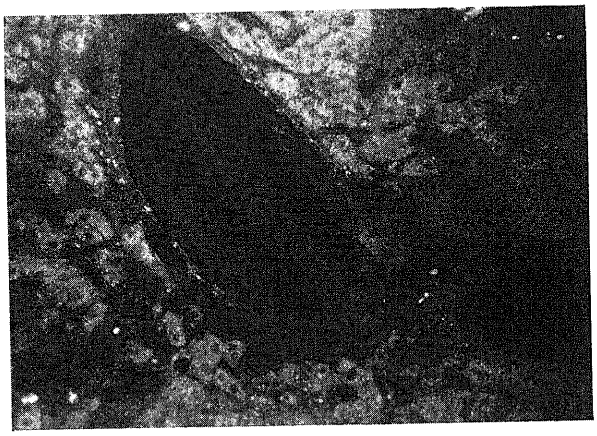
C

Fig. 9. Immunohistochemical staining of S-100. (A) Liver from a control subject. A few S-100-positive nerve fibers exist in the portal tracts showed by arrows. (B) Liver from a bile duct ligation subject for 42 days. No S-100-positive nerve fibers exist in the portal tracts. (C) Livers from a 3'-MDAB feeding subject for 42 days. A few S-100-positive nerve fibers exist in the portal tracts showed by arrows. (A), (B) and (C), ×200. A, hepatic artery; B, bile duct; P, portal vein.

3）3'-MDAB 投与群

NSE 陽性神経線維は，対照群と同様に門脈域の脈管周囲の結合織内に分布していたが，経時的な変化はみられなかった．なお，オバール細胞増生域には全経過を通じて NSE 陽性神経


A


B

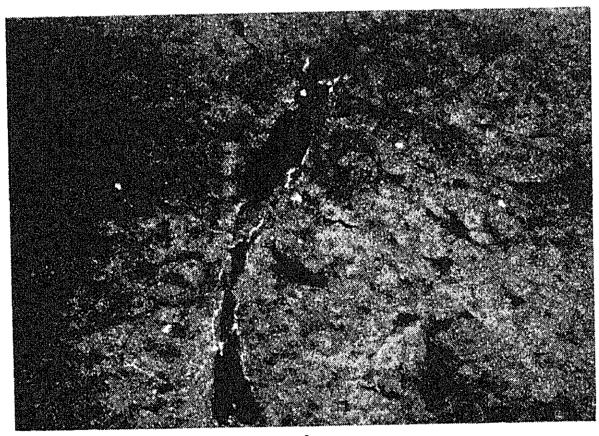

C

Fig. 10. Fluorescent immunohistochemical staining of PGP 9.5 under a confocal laser scan microscopic finding. (A) Liver from a control subject. PGP 9.5-positive nerve fibers exist near the portal vein, hepatic artery and bile ducts in the portal tracts. Note varicosities in thin fibers. (B) Liver from a bile duct ligation subject for 42 days. PGP 9.5-positive nerve fibers and number of varicosities decrease. (C) Liver from a 3'-MDAB feeding subject. PGP 9.5-positive nerve fibers distributed in the oval cells proliferating area. (A), ×160; (B) and (C), ×400.

線維の分布はみられなかった．

3．NPY 陽性神経線維

1）対照群

NPY 陽性線維は門脈域の脈管周囲の結合織内にネットワークを形成するように分布していた（図 12A）．

2）総胆管結紮群

NPY 陽性神経線維は，対照群と同様に門脈域の脈管周囲の結合織内にネットワークを形成するように分布していたが，21 日目以降小葉間胆管のレベルより神経線維およびバリコシティは徐々に減少した（図 12B）．なお，細胆管増生域には全経過を通じて NPY 陽性神経線維の分布はみられなかった．

3）3'-MDAB 投与群

NPY 陽性線維は，対照群と同様に門脈域の脈管周囲の結合織内にネットワークを形成するように分布しており，総胆管結紮群でみられたような経時的な神経線維やバリコシティの減少はみられなかった．なお，オバール細胞増生域には全経過を通じて NPY 陽性神経線維の分布はみられなかった．

V．透過電子顕微鏡所見

各実験群で，門脈域の小型胆管や細胆管，また増生細胆管や増生したオバール細胞周囲の結合織内，小血管およびその近傍の間葉系細胞の近傍に神経線維が観察された．神経線維は，無髄神経線維でシュワン細胞に囲まれて存在していた．なお，有髄神経は，今回の検索では観察されなかった．また，各実験群で，脈管内皮や胆管上皮，また肝細胞に接した周囲に神経終末を観察することができなかった．また，変性軸索も観察されなかった．（図 13A, B, C）．なお，各実験群で経時的に，神経線維の消失は観察されなかった．

VI．免疫電子顕微鏡所見

免疫電子顕微鏡にて，PGP 9.5 陽性神経線維は，神経線維そのものが電子密度が高い線維成分として観察された．この反応陽性物質は神経線維にび漫性に分布していた．陽性神経線維は，各実験群で経過を通じて門脈域の胆管周囲，脈管内皮や周皮細胞の近傍に観察され，陽性神経線維の消失は認められなかった．（図 14A）．また，オバール細胞増生巣内に陽性神経線

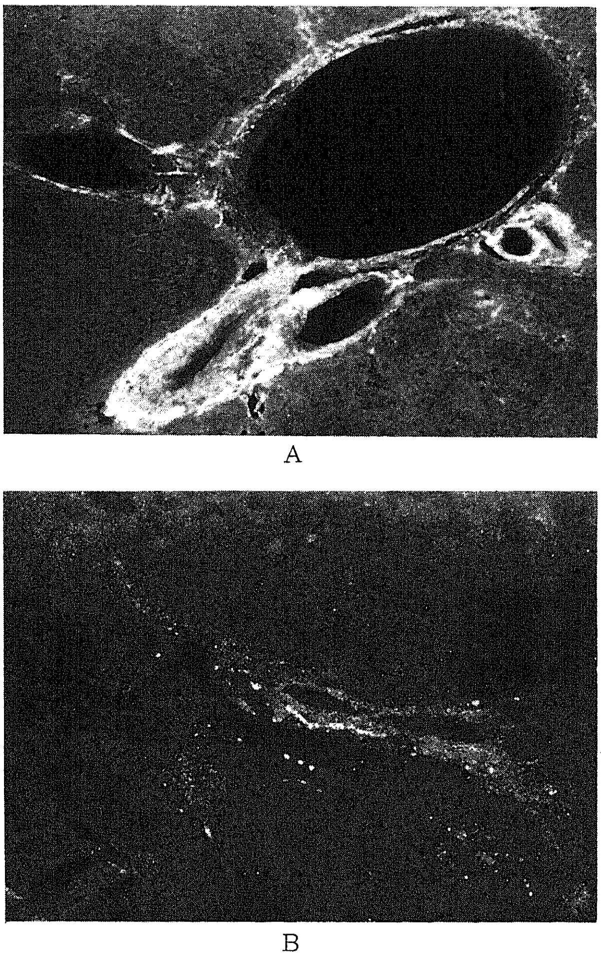


Fig. 11. Fluorescent immunohistochemical staining of NSE under a confocal laser scan microscopic finding. (A) Liver from a control subject. NSE-positive nerve fibers exist in the portal tracts. Note varicosities in thin fibers. (B) Liver from a bile duct ligation subject for 42 days. NSE-positive nerve fibers distributed in the bile ductules proliferating area. (A), ×160 ; (B), ×400.

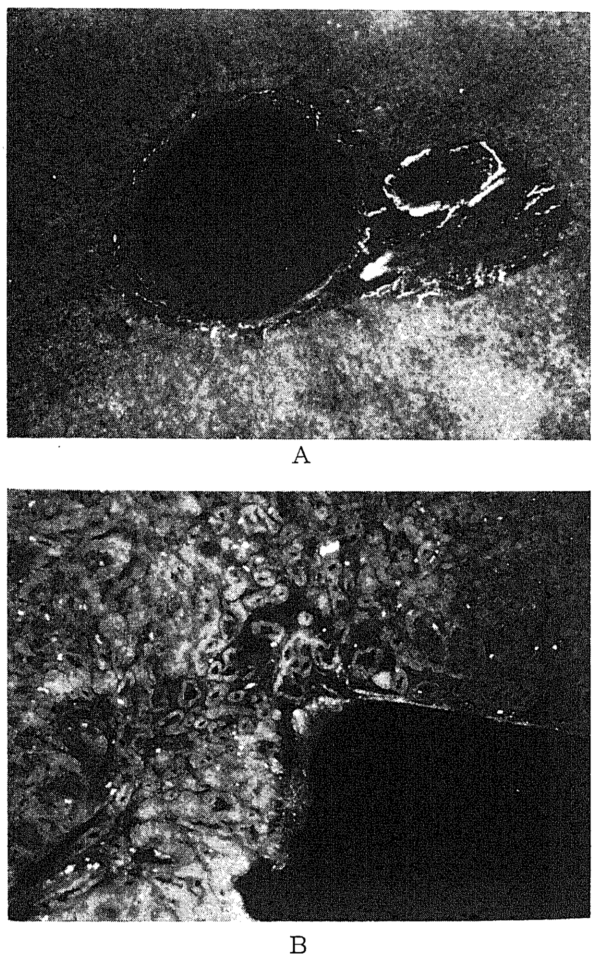
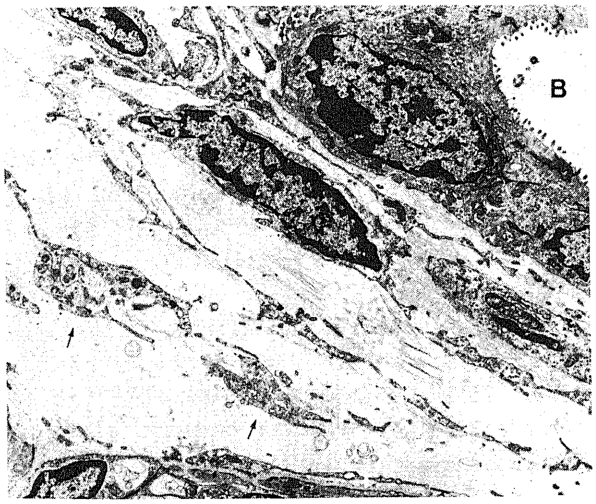


Fig. 12. Fluorescent immunohistochemical staining of NPY under a confocal laser scan microscopic finding. (A) Liver from a control subject. NPY-positive nerve fibers exist near the portal vein, hepatic artery and bile ducts in the portal tracts. Note varicosities in thin fibers. (B) Liver from a bile duct ligation subject for 42 days. NPY-positive nerve fibers and number of varicosities decrease. (A), ×160 ; (B), ×320.

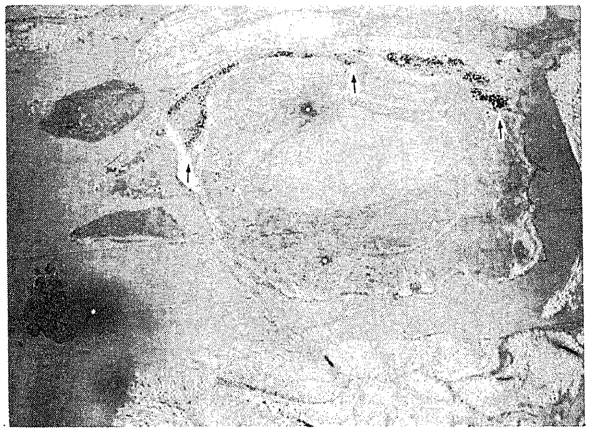
A



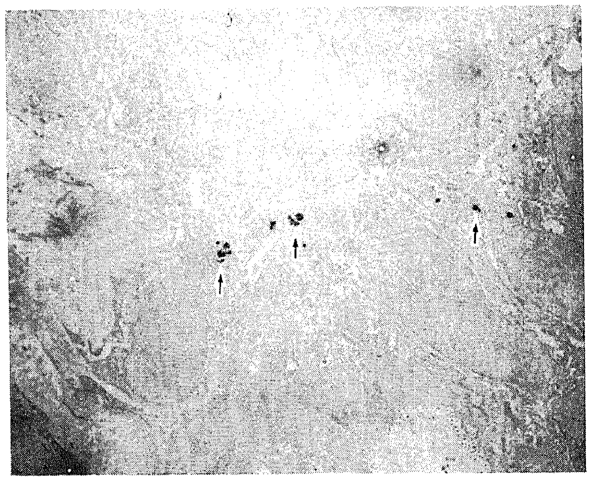
B

C

Fig. 13. Electronmicroscopic finding. (A) Liver from a control subject. (B) Liver from a bile duct ligation subject. (C) Liver from a 3'-MDAB feeding subject. Neuron fibers showed by arrows detectable during the experiment periods. (A), ×2000 ; (B), ×4000 ; (C), ×5000. B, bile duct ; P, poratl vein.



A



B

Fig. 14. Immunoelectronmicroscopic finding. (A) Liver from a control subject. (B) Liver from a 3'-MDAB feeding subject. PGP 9.5-positive nerve fibers observed by high electron density objects showed arrows. (A), ×4000 ; (B), ×2000.

維は僅かに観察されたが (図 14B)，細胆管増生巣には観察されなかった．

考　　察

種々の胆道経疾患において門脈域内およびその辺縁部に細胆管の増生が出現し，肝の病態に深く関連することが知られている．特に肝外胆管閉塞や胆管結石などの胆汁うっ滞性疾患では，経過の遷延化とともに門脈域周囲の線維化が進行し，最終的に胆汁性肝硬変に至るが，この過程で細胆管増生が重要な役割を担うとされている．この細胆管増生機序と病態を解明するために，動物を用いた種々のモデルが開発され，用いられてきた[1)~8)]．つまり Slot らは[5)]，ラット総胆管結紮モデルで，総胆管結紮後に DNA 合成に関連する重水素標識チミジンをラットに注射し，その肝細胞および胆管上皮細胞への分布をオートラジオグラフィを用いて検討し，さらに結紮した総胆管にチューブを挿入し胆道内圧を測定することによって，胆管内圧と細胆管増生との関連性を検討した．その結果，細胆管増生は，主に既

存の細胆管，小型胆管が延長したもので，胆管内圧の上昇が，胆管増生の直接の引き金になると報告した．また，増生細胆管の細胞動態に関して Tracy らは[7]，ラット総胆管結紮モデルでノーザンブロット解析を用いて mRNA の発現を検討し，総胆管結紮後24時間で H-ras, c-myc などの増殖因子の mRNA のシグナルが増加することを報告した．また，細胆管増生とその微小循環の関与に関して Nakano らは[44]，ラット総胆管結紮モデルで，免疫組織化学，透過電子顕微鏡，走査電子顕微鏡を用いて細胆管増生と傍胆管毛細血管網との関連を検討した．つまり，細胆管増生はまず門脈域辺縁部にみられ，徐々に拡大していくこと，新生した毛細血管網が既存の傍胆管毛細血管網や類洞と密に絡み合って，肝細胞と既存の胆管もしくは新生した細胆管との微小循環の形成に関連している可能性を詳細に報告した．

また，発癌物質である 3'-MDAB をラットなどの齧歯類に投与すると，肝細胞癌の発生に先行して，卵円形の形態で，明調な胞体量の少ない小型の細胞で幼弱な肝細胞の性格を部分的に合わせ持つ胆管上皮細胞であるオバール細胞の増生のみられることが古くより知られている[11)~13)]．つまり Germain らは[11]，ラットに 3'-MDAB を投与すると，肝細胞の癌胎児蛋白であるアルファフェトプロテイン (alpha-fetoprotein, AFP) が，末梢血液中に増加し，また肝組織では AFP がオバール細胞に発現すると報告した．また，Evarts らは[45]，オバール細胞が肝細胞に分化する可能性を報告した．オバール細胞は光顕的に淡明な胞体を持つ卵円形細胞と考えられているが，電顕的には胆管上皮由来と考えられている．Dempo らは[12]，オバール細胞の働きは，肝細胞の障害が高度で，肝細胞が十分に自己修復，再生できない時に，いわゆる‘幹細胞’の様な役割を果し，肝再生に関連すると考えている．特に，オバール細胞の酵素パターンが，未成熟な胎児肝細胞のものと同様であり，いわゆる‘幹細胞’である可能性を示唆していると報告している．門脈域周囲に選択的にオバール細胞がみられること，肝細胞が障害を受けていることを考慮に入れると，その起源は，肝細胞以外であることが類推される．

最近，肝内の自律神経が肝の生理病態に深く関連することが注目され，肝内の微小循環，糖代謝などの調節や胆汁分泌への関与が推測されている．また，神経線維は肝内の正常および病的微小環境の形成にも深く関連することが知られている．しかしながら，細胆管増生やオバール細胞の発生機序や増殖や病態の調節，特に周囲の微小環境の変化 (神経支配) に関しては，未だ解明されていない点が多い．そこで今回，細胆管増生とオバール細胞増生とその微小環境，特に神経支配との関連性を検討した．まず，これら細胞動態を検討し，次いで神経支配の関与に関して検討した．なお，細胞動態の検討のために，AgNORs 数と BrdU 標識率と PCNALI の検討を行った．

総胆管結紮群では組織学的所見で，細胆管増生が検索した7日目より主に門脈域の周囲あるいは周辺部にみられた．なお，細胆管増生に伴って線維性結合織の増生がみられた．これらの病変のため肝実質は14日目からは分断され，架橋する様に細胆管およびオバール細胞が増生し，42日目には肝実質が結節様となり，肝硬変様となった．総胆管結紮群では，増生細胆管細胞の AgNORs 数，BrdU 標識率，PCNALI は，胆道閉塞の実験の全経過の中で，7日目に最高値を示し，14日目以降は，漸減を示した．これは，胆管閉塞による胆管内圧の上昇などによって，細胞増殖能が，活性化されて細胆管の増生が引き起こされ，細胆管の増生が起こったために，胆管内圧上昇が軽減したために増殖活性が漸減したものと考えられる．

3'-MDAB 投与群では，増生オバール細胞の AgNORs 数，BrdU 標識率，PCNALI は，全経過の中で7日目に最高値を示し，14日目以降は漸減を示したものの，増生細胆管のそれに比し漸減の割合は緩やかなものであった．このことは，総胆管結紮群とは異なり 3'-MDAB 投与群では肝細胞が持続的に障害を受け，オバール細胞の増生が生ずると考えられる．そして 3'-MDAB 投与群の場合，肝細胞への障害は緩和されることなく継続するために，増殖能の減少は緩やかなものになると考えられた．

次に，これらの細胆管やオバール細胞増生と神経支配との関連性を検討した．まず，肝内での神経線維の分布について述べ，次いで胆管上皮病変との関連性に触れる．PGP 9.5 は，一般的で免疫組織化学的に汎用される神経内分泌マーカーと考えられている[46]．対照群では PGP 9.5 陽性神経線維は太い神経線維が門脈域内の結合織内に，細い神経線維が門脈壁，肝動脈壁および胆管周囲をネットワークを形成するように分布し，これらの細い神経線維にはバリコシティがみられた．総胆管結紮群では，時間経過とともに，PGP 9.5 陽性神経線維および神経線維のバリコシティは減少し，42日目には肝内大型胆管レベルの門脈域内に僅かにみられるのみとなった．この現象に関して次のことが考えうる．1）手術時の操作により神経を損傷したために，PGP 9.5 陽性神経線維の消失がみられた．2）総胆管結紮によって生じた生体内の変化の1つとして，PGP 9.5 陽性神経線維もしくは PGP 9.5 そのものの発現が消失した．1）については，対照群でも，総胆管への操作を加えており，手術時も総胆管のみを剝離切断していること，また次に述べるように NSE 陽性線維では減少，消失のみられないこと，透過電子顕微鏡所見より結紮後42日目の総胆管結紮群に神経線維のみられること，神経変性の像がみられないことなどから否定的である．おそらく，2）に述べたように神経線維の質的変化，つまり PGP 9.5 陽性神経単独もしくは PGP 9.5 の発現に変化を生じたと考えられる．PGP 9.5 陽性神経線維の作用は，十分には解明されてはいないが，総胆管結紮により，胆汁うっ滞，胆管内圧上昇などが生じ，そのネガティブフィードバックとして PGP 9.5 陽性神経線維が消失した可能性が考えられる．すなわち，PGP 9.5 陽性神経線維は，総胆管結紮という生体の刺激に対して，負の関与をすることが示唆される．また，一般的に神経線維そのものは通過線維とされているのに対し，バリコーシティは生理活性物質の貯蔵または放出部位と考えられている[43]．したがって，PGP 9.5 陽性神経の減少に伴って神経線維のバリコーシティの減少がみられたことは神経内分泌的なネガティブフィードバックが作用したことを裏付けるものかもしれない．一方，柿田ら[47]はヒト肝内結石症の肝組織を検討し，線維性に拡大した間質部に PGP 9.5 陽性神経線維の増加がみられたと報告している．このことは，PGP 9.5 陽性神経線維が線維化と関係している可能性を示唆している．今回検討した総胆管結紮群における変化は急性のもので，細胆管の増生や線維性結合織の拡大は肝内結石症でみられるものと異なっているためにこのような違いがみられたものと考えられる．実際，柿田ら[47]の報告によると，長期にわたり肝内結石症を罹患している患者の肝に有意に PGP 9.5 陽性神経線維が増生している．総胆管結紮モ

デルでは，42日以上の生存率は激減するため長期の観察には問題が多く長期の胆汁うっ滞モデルの確立が今後の課題と考えられる．

一方，3'-MDAB 投与群では，PGP 9.5 陽性神経線維の密度の減少や消失はみられず，細胞増生のピークが過ぎた35～42日目のオバール細胞増生域に PGP9.5 陽性神経線維の分布する像がみられた．このことは，オバール細胞の増生に，PGP9.5 陽性神経線維がいわば正の関与していることを示唆している．総胆管結紮群における細胆管増生と 3'-MDAB 投与ラットモデルにおけるオバール細胞増生は，神経分布の面から考えると全く異なった反応をすることが示された．

NSE も免疫組織化学的に汎用される神経内分泌マーカーの一つと考えられている[48]．今回の検討で，NSE 陽性線維は門脈域の脈管周囲の結合組織内に分布していた．総胆管結紮群，3'-MDAB 投与群では，門脈域での NSE 陽性神経線維の密度に経時的変化はみられなかった．しかし，総胆管結紮群では増殖のピークが過ぎた28日目から細胆管増生域に NSE 陽性神経線維の分布する像がみられ，3'-MDAB 投与群ではオバール細胞増生域には NSE 陽性神経線維が分布する像はみられなかった．このことは，ある程度の経過が進行し，増殖活性がおさまった細胆管増生領域において，NSE 陽性神経線維がその微細環境の維持に関与していることを示唆している．オバール細胞増生域では随伴する結合織の量が少なく，これが NSE 陽性神経線維が染色されないことに関係しているのかもしれない．

PGP 9.5 と NSE は，一般的な神経線維マーカーとして用いられているが，先に述べたように総胆管結紮群では，経過とともに PGP 9.5 陽性神経線維は減少し，NSE 陽性神経線維は増加がみられた．また，3'-MDA 投与群では，経過とともに PGP 9.5 陽性神経線維は増加し，一方，NSE 陽性神経線維は増加，減少はみられなかった．このことから，同じように神経線維の一般的なマーカーと考えられている PGP 9.5 陽性神経線維と NSE 陽性神経線維は，その意義が異なることを意味しているのかもしれない．

NPY は36のアミノ酸よりなるポリペプチドで，最初に Tatemoto ら[49]によりブタの脳より分離された．その生理学的な作用は，多彩で，平滑筋収縮抑制[50]，血管収縮抑制[51]，心拍数の抑制[52]および神経内分泌の調節[53]などが知られている．対照群では，NPY 陽性神経線維は太い神経線維は門脈域内の結合織内に，細い神経線維は門脈壁，肝動脈壁および胆管周囲にネットワークを形成するように分布していた．総胆管結紮群では21日目から小葉間胆管レベルの門脈域から徐々に NPY 陽性神経線維の減少がみられた．3'-MDAB 投与群では，このような NPY 陽性神経線維の減少はみられなかった．なお，オバール細胞増生域に NPY 陽性神経の分布はみられなかった．NPY 陽性神経線維は，総胆管結紮群では PGP 9.5 陽性神経線維と似たような分布を示すものの，3'-MDAB 投与群では PGP 9.5 陽性神経線維にみられたようなオバール細胞増生域への神経線維の分布はみられなかった．Miyazawa らは[29]，ヒトの慢性肝炎において，NSE 陽性神経線維や NPY 陽性神経線維が拡大する門脈域に増加するが肝実質内では減少することを報告している．今回の NPY 陽性神経線維の分布をみる限りでは，ヒトとラットとの違いを考慮する必要はあるが，総胆管結紮群，3'-MDAB 投与群では，慢性肝炎時に起こる変化とは異なっていた．このことから，肝疾患に対する神経分布は様々な形態をとることが示唆される．NPY は，血管収縮を抑制する作用があることが知られており，総胆管結紮による閉塞性肝障害に対しては，血管収縮抑制を抑制するような反応，つまり血流を減少させるような作用があると考えられた．一方，肝細胞発癌性物質である 3'-MDAB による肝障害に対しては NPY 陽性神経線維は関与しないことが示唆された．

SP は神経線維にみられるペプチドで，神経のマーカーと考えられている[54]．対照群では，SP 陽性神経線維は門脈域内の結合織内に散在性に分布していた．総胆管結紮群や 3'-MDAB 投与群でも対照群と同様の分布を示し経時的な変化はみられなかった．このことは，SP 陽性神経線維は，総胆管結紮や 3'-MDAB 投与による肝の変化には関与しないことが示唆された．

一方，S-100 陽性神経線維は肝内大型胆管，隔壁胆管レベルの門脈域内の結合組織内に分布していた．総胆管結紮群では，S-100 陽性神経線維は，21日目から減少し42日目にはほとんどみられなくなった．3'-MDAB 投与群では，S-100 陽性神経線維の経時的な減少はみられなかった．なお，オバール細胞増生域での S-100 陽性神経線維の分布する像はみられなかった．S-100 は，神経線維のシュワン細胞に陽性といわれている[55]．総胆管結紮群では，総胆管結紮によって生じた変化に対して，何らかのネガティブフィードバックによって，S-100 陽性神経線維あるいは S-100 の抗原性が変化し，消失がみられると考えられる．しかし，透過電子顕微鏡的観察では，総胆管結紮群や 3'-MDAB 投与群の両群で，各々の病変部でシュワン細胞に囲まれた無髄神経が同様に観察された．したがって，シュワン細胞を認識すると考えられている S-100 陽性神経線維は両群とも同様にみられるはずである．ところが，総胆管結紮群で S-100 陽性神経線維が減少したことを考慮すると S-100 の抗原性が変化したために減少がみられたと考えられる．一方，3'-MDAB による変化に対しては，S-100 陽性神経線維は関与しないと考えられた．すなわち，総胆管結紮という生体の刺激に対しては，S-100 陽性神経線維は負の関与を，3'-MDAB に対しては，S-100 陽性神経線維は関与しないことが示唆された．

さて，総胆管結紮群では細胆管が，3'-MDAB 投与群ではオバール細胞が増生してくることはこれまで述べてきた．この2つのモデルでは，肝に対する刺激が異なっているので，増生する細胞が異なってくるものと考えられるが，この増生細胞の違いに神経支配が関与している可能性は否定できない．実際，Wang らは[56]，肝細胞癌や胆管細胞癌などの肝原発悪性腫瘍で，PGP 9.5 や S-100 免疫染色性が正常肝とは異なり様々な染色性がみられることを報告している．総胆管結紮群と 3'-MDAB 投与群とでは神経線維の分布は経時的にみていくと異なっており，これが増生細胞の違いに関与している可能性は十分に考えられる．また，神経線維の減少は21日目～28日目からみられるが，神経線維の増加は28日目～35日目からみられる．神経線維の減少と増加には時間的なギャップがある．これは神経の成長速度によるものかもしれないが，ある程度細胆管増生やオバール細胞増生が起こってから神経線維が分布し，これらの構造の保持に関連しているのかもしれない．また，神経線維が結合織や脈管周囲にみられることより増生域での線維化がある程度形成されないと神経線維の分布が起こらないことを示唆するものかもしれない．

さて，Miyazawa らは[29]，慢性肝疾患患者の肝で，門脈域の

NSE 陽性神経線維，S-100 陽性神経線維および NPY 陽性神経線維が増加すると報告している．一方，Lee らは[16]，ヒトの肝硬変で PGP 9.5 陽性神経線維が肝実質内で減少すると報告している．このように，いくつかの肝疾患の病態下で肝内神経線維の分布や抗原性が動的に変化しえることを示唆している．今回の検討により，総胆管結紮群による細胆管増生巣と 3'-MDAB 投与群のオバール細胞増生巣とにおいて，PGP 9.5, NSE, NPY および S-100 陽性神経線維の分布は，異なる反応性を示した．このことは，肝内微小循環調節や胆汁分泌調節に関する神経線維の分布が変化している可能性を示唆している．つまり，両群の刺激に対し，神経線維の反応は全く異なることを意味し，病態形成を考えるうえで非常に興味ある現象と考えられた．しかしながら，SP 陽性神経線維の分布は両群とも同様であり，その生理的作用の解明が待たれる．神経は血管とともに，病変部での病態形成に重要である．今回の研究で，病因の異なる胆管上皮細胞の増生に神経が深く関係していることを明らかにしえた．

今回の検討によって，胆汁うっ滞や，肝発癌物質に対して，神経線維分布や抗原性が変化することが示された．このことは，様々な肝疾患の形成に関して，神経が様々な関与をしている可能性を示唆する．今後，様々な肝疾患における神経の分布を検討することで，病理学的な解明の一助となる可能性が示唆された．

結　論

総胆管結紮ラットモデル，3'-MDAB ラットモデルを用いて，細胆管増生およびオバール細胞増生の，病理組織像と細胞動態を，神経分布との関連性より検討を行い，以下の結論を得た．

1．細胆管増生域，オバール細胞増生域は経過とともに，拡大し，42日目には，肝小葉を分断し肝硬変様の形態をとった．

2．細胞動態の指標となる AgNORs 数，BrdU 標識率，PCNALI は，総胆管結紮群，3'-MDAB 投与群で7日目に最高値をとり，徐々に漸減したが，3'-MDAB 投与群では，総胆管結紮群と比較して減少率は低かった．

3．PGP 9.5 陽性神経線維は，対照群では門脈域の結合織，門脈壁，肝動脈壁，胆管壁周囲にネットワークを形成するように存在し，バリコシティがみられたが，総胆管結紮群では経過とともに減少した．一方，3'-MDAB 投与群では減少，消失はなく，28～35日目以降には，オバール細胞増生域に神経線維が分布する像がみられた．

4．NSE 陽性神経線維は，対照群では門脈域の脈管周囲の結合織に存在し，バリコシティがみられた．総胆管結紮群では28日目以降に細胆管増生域に神経線維の分布する像がみられた．一方，3'-MDAB 投与群ではオバール細胞増生域に神経線維の分布は全経過を通じてみられなかった．

5．NPY 陽性神経線維は，対照群では門脈域の結合織，門脈壁，肝動脈壁，胆管壁周囲にネットワークを形成するように存在しバリコシティがみられたが，総胆管結紮群では経過とともに減少した．一方，3'-MDAB 投与群では減少，消失はみられなかった．なお，オバール細胞増生域には全経過を通じて神経線維の分布はみられなかった．

6．SP 陽性神経線維は，対照群では門脈域の脈管周囲の結合織内に存在した．総胆管結紮群，3'-MDAB 投与群では経時的な神経線維の分布の変化はなかった．

7．S-100 陽性神経線維は，対照群では肝内大型胆管，隔壁胆管レベルの門脈域に存在し，総胆管結紮群では経過とともに減少し，42日目には消失した．一方，3'-MDAB 投与群では全経過を通じて減少，消失はみられなかった．

以上の結果から，総胆管結紮ラットモデルにみられる細胆管増生，3'-MDAB 投与ラットモデルにみられるオバール細胞増生では支配神経は異なっており，これが病態の違いに関連することが示唆された．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます．また，終始直接の御指導，御校閲を賜りました恩師中沼安二教授に深謝いたします．さらに本研究に御助力，御助言を戴きました金沢大学病理学第二教室の河野尚子博士を始め，金沢大学病理学第二教室ならびに金沢大学外科学第一教室の諸先生方と教室員各位に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) **Rubin, E.**: The origin and fate of proliferated bile ductular cells. Exp. Mol. Pathol., 3, 279-286 (1964).

2) **Sirica, A. E. & Cihla, H. P.**: Isolation and partial caracterization of oval cell and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the livers of carcinogen and noncarcinogen-treated rats. Cancer Res., **44**, 3454-3466 (1984).

3) **Alpini, G., Lenzi, R., Sarkozi, L. & Tavoloni, N.**: Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. J. Clin. Invest., 81, 569-578 (1988).

4) **Alpini, G., Lenzi, R., Zhai, W-R., Slott, P. A., Liu, M. H., Sarkozi, L. & Tavoloni, N.**: Bile secretory function of intrahepatic biliary epithelium in the rat. Am. J. Physiol., 257, G124-G133 (1989).

5) **Slott, P. A., Liu, M. H. & Tavoloni, N.**: Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstraction in the rat. Gastroentrology, **99**, 466-477 (1990).

6) **Gall, J. A. M. & Bhathal, P. S.**: Origin and involution of hyperplastic bile ductules following total biliary obstruction. Liver, **10**, 106-115 (1990).

7) **Tracy, T. F., Goerke, M. E., Bailey, P. V., Sotelo-Avila, C. & Weber, T. R.**: Growth-related gene expression in early cholestatic liver injury. Surgery, 114, 532-537 (1992).

8) **Marucci, L., Baroni, G. S., Mancini, R., Benedetti, A., Jezequel, A. M. & Orlandi, F.**: Cell proliferation following extrahepatic biliary obstruction. J. Hepatol., 17, 163-169 (1993).

9) **Polimeno, L., Azzarone, A., Zeng, Q. H., Panella, C., Subbotin, V., Carr, B., Bouzahzah, B., Francavilla, A. & Starzl, T. E.**: Cell proliferation and oncogene expression after bile duct ligation in the rat: evidence of a specific growth effect on bile duct cells. Hepatology, **21**, 1070-1078 (1995).

10) **Nakanuma, Y. & Ohta, G.**: Immunohistochemical study on bile ductular proliferation in various hepatobiliary diseases. Liver, **6**, 205-211 (1986).

11) **Germain, L., Goyette, R. & Marceau, N.:** Differential cytokeratin and α-fetoprotein expression in morphologically distinct epithelial cells emerging at early stage of rat hepatocarcinogenesis. Cancer Res., **45**, 673-681 (1985).

12) **Dempo, K., Chisaka, N., Yoshida, Y., Kaneko, A. & Onoe, T.:** Immunofluorescent study on α-fetoprotein-producing cells in the early stage of 3'-mrthyl-4-dimethylamino-azobenzene. Cancer Res., **35**, 1282-1287 (1975).

13) **Kitagawa, T., Yokochi, T. & Sugano, H.:** α-fetoprotein and hepatocarcinogenesis in rats fed 3'-methyl-4-(dimethylamino) azobenzene or n-2-fluorenylacetamide. Int. J. Cancer, **10**, 368-381 (1972).

14) **Furness, J. B. & Costa, M.:** The Enteric Nervous System, 1st ed., p55-89, Churchill Livingstone Inc., New York, 1987.

15) **Ito, Y., Magari, S. & Sakanaka, M.:** Immunoelectron -microscopic Localization of peptidergic nerve fibers around lymphatic capillaries in the rat liver. Arch. Histol. Cytol., **53**, 199-208 (1990).

16) **Lee, J. A., Ahmed, Q., Hines, J. E. & Burt, A, D.:** Disappearance of hepatic parenchymal nerves in human liver cirrhosis. Gut, **33**, 87-91 (1992).

17) **Carlei, F., Lygidakis, N. J., Speranza, V., Brummelkamp, W. H., Frcs, H., McGurrin, J. F., Pietroletti, R., Lezoche, E. & Bostwick, D. G.:** Neuroendocrine innervation of the hepatic vessels in the rat and in man. J. Surg. Res., **45**, 417-426 (1988).

18) **Ungvary, G. & Donath, T.:** Changes of the peripheral autonomic nervous system in altered internal environment. Z. Mikrosk. -Anat. Forsch., **94**, 985-998 (1980).

19) **Ding, W. G., Tooyama, I., Kitasato, H., Fujimura, M. & Kimura, H.:** Phylogenetic and ontogenetic study of neuropeptide Y-containing nerves in the liver. Histochem. J., **26**, 453-459 (1994).

20) **Ueno, T., Inuzuka, S., Torimura, T., Sakata, R., Sakamoto, M., Gondo, K., Aoki, T., Tanikawa, K. & Tutumi, V.:** Distribution of substance P and Vasoactive intestinal peptide in the human liver: light and electron immunoperoxidase methods of observation. Am. J. Gastroenterol., **86**, 1633-1637 (1991).

21) **Ungvary, G. & Donath, T.:** Neurohistochemical changes in the liver of guniea pigs following ligation of the common bile duct. Exp. Mol. Pathol., 22, 29-34 (1975).

22) **Ding, W. G., Fujimura, M., Mori, A., Tooyama, I. & Kimura, H.:** Light and electron microscopy of neuropeptide Y-containing nerves in human liver, gallbladder, and pancreas. Gastroenterology, **101**, 1054-1059 (1991).

23) **El-Salhy, M., Stenling, R. & Grimelius, L.:** Peptidergic innervation and endocrine cells in the human liver. Scand. J. Gastroenterol., **28**, 809-815 (1993).

24) **Pietroletti, R., Chamuleau, R. A. F. M., Speranza, V. & Lygidakis, N. J.:** Immunocytochemical study of the hepatic innervation in the rat after partial hepatectomy. Histochem. J., **19**, 327-332 (1987).

25) **Inoue, N., Magari, S., Ito, Y. & Sakanaka, M.:** Distribution, possible origins and fine structure of neuropeptide Y-containing nerve fibers in the rat liver. Brain Res., **493**, 87-96 (1989).

26) **Khan, I. & Collins, S. M.:** Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. Gastroenterology, **107**, 691-700 (1994).

27) **Terada, T. & Nakanuma, Y.:** Innervation of intrahepatic bile ducts and peribiliary glands in normal livers, extrahepatic biliary obstruction and hepatolithiasis: An immunohistochemical study. J. Hepatol., **9**, 141-148 (1989).

28) **Boon, A. P., Hubscher, S. G., Lee, J. A., Hines, J. E. & Burt, A. D.:** Hepatic reinervation following orthotopic liver transplantation in man. J. Pathol., **167**, 217-222 (1992).

29) **Miyazawa, Y., Fukuda, Y., Imoto, M., Koyama, Y. & Nagura, H.:** Immunohistochemical studies on the distribution of nerve fibers in chronic liver disease. Am. J. Gastroenterol., **83**, 1108-1114 (1988).

30) **Nakanuma, Y. & Sasaki, M.:** Expression of blood group- related antigens in the intrahepatic biliary tree and hepatocytes in normal livers and various hepatobiliary diseases. Hepatology, **10**, 174-178 (1989).

31) **Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himberg, G., Pigeon, F. & Adnet, J. J.:** Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem. J., **18**, 5-14 (1986).

32) **Crocker, J., Ayres, J. & McGovern, J.:** Nucleolar organiser regions in small cell carcinoma of the bronchus. Thorax, **42**, 972-975 (1987).

33) **笹野公伸，宮崎修吉，伊達文子，佐藤郁郎:** AgNORs-病理組織診断への応用．臨床と病理，**9**, 890-893 (1991).

34) **Goz, B.:** The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. Pharmacol. Rev., **29**, 249-272 (1978).

35) **Gratzner, H. G.:** Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science, **218**, 474-476 (1982).

36) **Hoshino, T., Nagashima, T., Murovic, J., Levin, E. M., Levin, V. A. & Rupp, S. M.:** Cell kinetic studies of in situ human brain tumors with bromodeoxyuridine. Cytometry, **6**, 627-632 (1985).

37) **星野孝夫:** BrdU (bromodeoxyuridine)-脳腫瘍への応用．臨床と病理，**9**, 862-867 (1991).

38) **Takasaki, Y., Deng, J. S. & Tan, E. M.:** A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation. J. Exp. Med., **154**, 1899-1909 (1981).

39) **Robbins, B. A., de la Vega, D., Ogata, K., Tan, E. M. & Nakamura, R. M.:** Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch. Pathol. Lab. Med., **111**, 841-845 (1987).

40) **Garcia, R. L., Coltrera, M. D. & Gown, A. M.:** Analysis of proliferative grade using anti PCNA/ cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Am. J.

Pathol., **4**, 733-739 (1989).

41) **松野吉宏，向井　清**：増殖細胞核抗原 (PCNA). 臨床と病理，**9**, 879-883 (1991).

42) **Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H.**: Use of avidine--biotin -peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., **29**, 577-580 (1981).

43) **Audet, M. A., Doucet, G., Olescarries, L. & Descarries, L.**: Quantified regional and laminar distribution of the noradrenaline innervation in the anterior half of the adult rat cerebral cortex. J. Comp. Neurol., **274**, 307-318 (1988).

44) **Nakano, S., Haratake, J. & Hashimoto, H.**: Alterations in bile ducts and peribiliary microcirculation in rats after common bile duct ligation. Hepatology, **21**, 1380-1386 (1995).

45) **Evarts, R. P., Nagy, P., Nakatugawa, H., Marsden, E. & Thorgeirsson, S. S.**: In vivo differenciation of rat liver oval cells into hepatocytes. Cancer Res., **49**, 1541-1547 (1989).

46) **Jackson, P., Thomson, V. M. & Thompson, R. J.**: A comparison of the evolutionary distribution of the two neuroendocrine markers, neuron-specific enolase and protein gene product 9.5. J. Neurochem., **45**, 185-190 (1985).

47) **柿田　章，田所文彦，吉田宗紀，高橋　毅，古田一徳，飯野善一郎**：肝内結石症に於ける肝内神経の病態に関する形態学的研究．厚生省特定疾患　肝内結石症調査研究班　平成６年度研究報告書，81-87 頁，1995.

48) **Marangos, P. J., Zis, A. P., Clark, R. L. & Goodwin, F. K.**: Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structual, immunological and functional comparisons. Brain Res., **150**, 117-133 (1978).

49) **Tatemoto, K., Carlquist, M. & Mutt, V.**: Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. Nature, **296**, 659-660 (1982).

50) **Lundberg, J. M., Terenius, L., Hokfelt, T., Martling, C, R., Tatemoto, K., Mutt, V., Polak, J. M., Bloom, S. R. & Goldstein, M.**: Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. Acta. Physiol. Scand., **116**, 477-480 (1982).

51) **Lundberg, J. M. & Tatemoto, K.**: Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. Acta. Physiol. Scand., **116**, 393-402 (1982).

52) **Macrae, I. M. & Reid, J. L.**: Cardiovascular significance of neuropeptide Y in the caudal ventrolateral medulla of the rat. Brain Res., **456**, 1-8 (1988).

53) **Karla, S. P. & Crowley, W. R.**: Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. Life Sci., **35**, 1173-1176 (1984).

54) **Moore, B. W.**: A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem. Biophys. Res. Commun., **19**, 739-744 (1965).

55) **Schultzberg, M., Hokfelt, T., Nilsson, L., Terenius, J. F., Rehfeld, M., Elde, R., Goldstein, M. & Said, S.**: Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine β-hydroxylase. Neurosience, **5**, 689-744 (1980).

56) **Wang, J. H., Dhillon, A. S., Sankey, E. A., Wightman, A. K., Lewin, J. F. & Scheuer, P. J.**: 'Neuroendocrine' differentiation in primary neoplasms of the liver. J. Pathol., **163**, 61-67 (1991).

Alteration of Intrahepatic Innervation in the Rat Presenting with Bile Ductular and Oval Cell Proliferation: Histopathological and Immunohistochemical Study Hiroshi Koizumi, First Department of Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **105,** 363－381 (1996)

Key words bile ductular proliferation, oval cell, innervation , 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, bile duct ligation

Abstract

Proliferation of intrahepatic small biliary elements is observed in various hepatobiliary diseases, while the pathogenesis and significance of these lesions remain unclear. The role of the microenvironment, including innervation, may be important in these processes. The aim of this study is to investigate the relationship between the intrahepatic innervation and the histopathologies and cell kinetics of bile ductular proliferation and oval cells, using common bile duct ligated (BDL) rats and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-MDAB) feeding rats. In the livers of BDL rats, proliferation of bile ductules was observed around the periphery of portal tracts at 7days and they enlarged and porto-portal bridging due to these ductular lesions appeared after 14 days. In the livers of 3'-MDAB rats, a few oval cells appeared around the periphery of the the portal tracts at 7 days and gradually enlarged around the portal tracts. In both models, hepatic parenchyma was eventually divided by these cirrhosis like lesions in both models. The number of argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region (AgNORs), positive ratio of 5-bromo-deoxyuridine (BrdU) and proliferating cell nuclear antigen labeling index (PCNALI) were used as the marker of cell proliferation. Each index showed peak value at 7 days and gradually decreased, though even at 42 days each index was high compared to the control. Each index of oval cell lesions was higher than that of proliferated bile ductules. Immunohistochemical detection of nerve fibers in the lesion were carried out using an avidin-biotin-peroxidase complex method and primary antibodies (anti-protein gene products 9.5 (PGP 9.5) antibody, anti-neuron specific enolase (NSE) antibody, anti-neuropeptide Y (NPY) antibody, anti-substance P (SP) antibody and anti-S-100 protein antibody). In control rats, PGP 9.5-positive and NPY-positive nerve fibers were distributed among the connective tissue in the portal tracts and formed a network-like structure near the portal vein wall, hepatic artery wall and bile duct wall. After 28 days or 35 days, nerve fibers were observed to decrease in the liver of the BDL rats group. On the other hand, NSE-positive nerve fibers were distributed in the portal tracts and innervated in the bile ductular proliferative areas and oval cells proliferative areas after 28 days. SP-positive nerve fibers showed no remarkable changes in either of the experimental groups. S-100-positive nerve fibers were distributed among the connective tissue in the portal tracts. After 28 days S-100-positive nerve fibers decreased in the liver of the BDL rats group. These findings were reproduced more clearly under a confocal lazer microscope. Electron microscopically nonmedullated nerve fibers were identifiable within the proliferative area of bile ductules and those of oval cells. The results imply that innervation was different among the proliferating areas of bile ductules and those of oval cells and also dependent upon the different cell kinetic phases, when the antigenecities of the nerve fibers were involued. It seems likely that innervation might take part in the formation of the microenvironment related to the proliferation of small biliary cells, including oval cells and bile ductules. This study suggests that intrahepatic innervation and its alteration must be considered in the evaluation of the pathogenetic mechanism of hepatobiliary diseases.