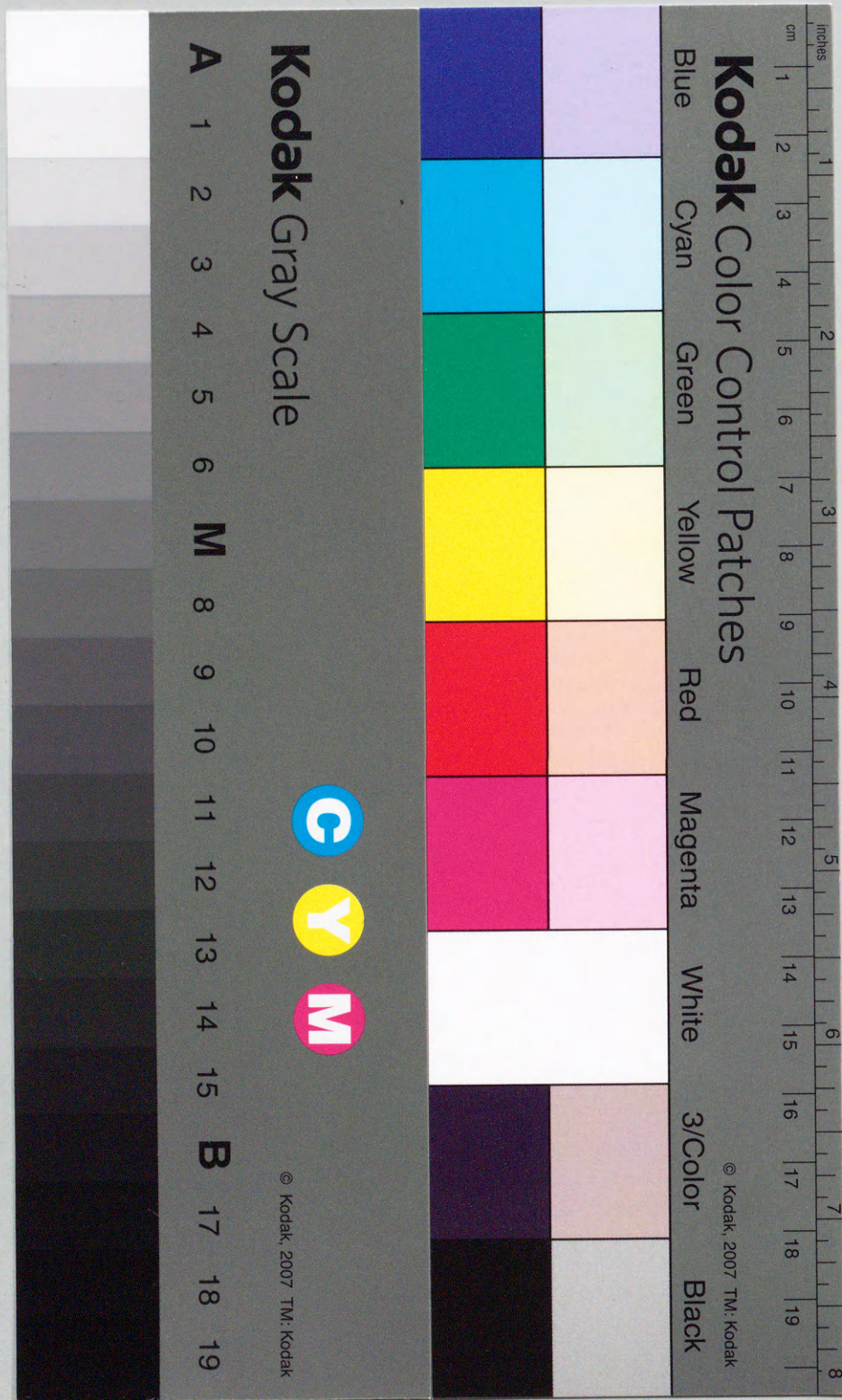


①

胆管内エタノール注入による実験的イヌ肝  
硬変作製の試み

清野 景好

弘前大学医学部第2外科学教室  
(指導 今 充教授)



## 目次

- I 緒言
- II エタノール投与量に関する予備実験
  - 1. 対象
  - 2. 麻酔および胆管造影
  - 3. 結果
- III 本実験
  - 1. 対象および方法
    - (1) 対象
      - 1) エタノール1回注入群
      - 2) エタノール3回注入群
    - (2) 前処置
    - (3) 手術手技
      - 1) 麻酔および術中輸液
      - 2) エタノール注入操作
        - ① 1回注入群
        - ② 3回注入群
    - (4) 術後管理
  - 2. 測定項目
    - (1) 血液生化学的検査
    - (2) ICG15分値の測定
    - (3) 病理組織学的検査
    - (4) PCNA免疫組織学的検査
    - (5) 門脈圧, 門脈血流量測定
  - 3. 統計学的処理
- IV 結果
  - 1. 手術成績
  - 2. 血液生化学的検査
    - (1) Albの変動
    - (2) GPTの変動
    - (3)  $\gamma$ -GTPの変動
    - (4) D-Bilの変動
  - 3. ICG15分値
  - 4. 病理組織学的検査
  - 5. PCNA免疫組織学的検査
  - 6. 門脈圧および門脈血流量
- V 考察
- VI 結語

## 略語

Alb : albumin

GPT : glutamate pyruvate  
transaminase

$\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase

D-Bil : direct bilirubin

ICG : indocyanine green

## I 緒言

これまで実験動物を用いた肝硬変作製については多数の報告がある。それらの中で carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)<sup>1) 2)</sup>, diethyl-nitrosamine (DEN)<sup>3)</sup>, dimethylnitrosamine (DMNA)<sup>4) 5)</sup>, thioacetamide (TAA)<sup>6) - 8)</sup> 等薬剤投与による方法などが知られている。しかし、これらの方法はいずれも対象となる動物種や薬剤種類、さらには投与方法、投与量、投与期間などにより一定の成績が得られていない<sup>1) 3) 5) 7)</sup>。

今回、著者はイヌを用いて胆管内にエタノールを注入することにより、従来の方法と全く違った新しい方法で実験的肝硬変モデルの作製を試み、血液生化学的变化、門脈血流動態に肝組織の経時的な病理組織学的検討を加え報告する。

## II エタノール投与量に関する予備実験

肝内、肝外胆管の総容量を検討する目的で胆管造影を施行した。

## 1. 対象

体重10kgの雑種成犬2頭を用いた。実験に先立ち術前24時間は水分のみを投与した。尚、実験に用いた雑種成犬は弘前大学医学部附属動物実験施設で飼育されていたものである。

## 2. 麻酔および胆管造影

Thiopental sodium salt 20-30mg/kg, suxamethonium chloride 0.5mg/kg を静注し, atropine sulfate 0.5mg を筋注した後, 気管内挿管を行い, 半閉鎖式麻酔器に接続し O<sub>2</sub> 2l/min を流した。麻酔の維持は上記薬剤の静注にて行った。

術中の輸液は前肢より乳酸加リンゲル液 (Hartmann PH8<sup>®</sup> ミドリ十字社) を10ml/kg/h にて施行した。

胆管造影に際して、全身麻酔下で開腹し、肝十二指腸靱帯内で総胆管を露出後、まず臍上縁にて総胆管に鉗子をかけ一時閉鎖した。胆嚢管より5Fr. 臍管チューブ (住友ベークライト社) を約1cm挿入し、造影剤として

metrizoic acid (イソペ-ク 440 82.3w/v%<sup>®</sup>  
鳥居薬品社) を注入した。注入量が1, 3, 5ml  
毎に X 線撮影した。

### 3. 結果

注入量が1, 3mlの場合, 総胆管および肝内  
の比較的太い胆管のみ造影された。注入量を  
5mlとした場合に細胆管レベルまで造影され  
た(図1)。したがって, 体重10kgの成犬の  
場合, 肝内、肝外胆管の総容量は5mlと考えら  
れ, 体重に応じエタノール注入量を5-7mlと  
した。

## Ⅲ 本実験

### 1. 対象および方法

#### (1) 対象

体重8-14kgの雑種成犬を雌雄の別なく15  
頭使用し, 以下の2群に分別, 実験に供した。

1) エタノール1回注入群: 10頭(1回注  
入群と略)

2) エタノール 2週間毎3回注入群: 5頭  
(3回注入群と略)

### (2) 前処置

手術の24時間前より絶食とし, 水分のみ投  
与した。

### (3) 手術手技

#### 1) 麻酔および術中輸液

麻酔および術中輸液は予備実験と同様に行  
った。

#### 2) エタノール 注入操作

上腹部正中切開にて開腹, 肝の状態を観察  
し, 肝硬変および肝腫瘍など異常のないこと  
を確認した。

#### ① 1回注入群

胆嚢摘除術を施行, 胆嚢管より5Fr. 臍管  
チューブを約1cm挿入, 胆汁の逆流を確認後,  
肝十二指腸靱帯内に総胆管を検索, 臍上縁を  
鉗子で一時閉鎖した。5Fr. 臍管チューブより  
99.5%エタノール(和光純薬工業社) 5mlを  
胆管内に注入した。肝表面の色調の変化を観  
察後, エタノール注入10分後に逆流のないこ  
とを確認し, 総胆管を開放した。5Fr. 臍管チ

ューブを抜去，総胆管に損傷のないことを確認後，胆嚢管を結紮し閉腹した。

## ② 3回注入群

注入操作までは1回注入群と同様に行った。その後，膵管チューブは腹腔外，皮下を通して背側に露出し，外胆汁瘻とした。術後2週，4週目に静脈麻酔下，外胆汁瘻からエタノール5mlを注入した。

## (4) 術後管理

自発呼吸出現後に抜管し，術後は5%ブドウ糖電解質液 500ml(EL3号液<sup>®</sup> 森下製薬社)を10ml/kg/hで3日間投与した。また抗生剤として，piperacillin(pentocillin<sup>®</sup> 富山化学工業社)2gを1日2回，生理食塩水100mlに溶解，3日間静脈内投与した。

## 2. 測定項目

### (1) 血液生化学的検査

Alb, GPT,  $\gamma$ -GTP, D-Bil について手術直前と術後24時間，その後3週目までは48時間毎に，3週目以降は4週，8週，12週目に測定し

た。

### (2) ICG15分値の測定

一侧の前肢静脈より前採血を行い，ICG(diagnogreen<sup>®</sup>, 第一製薬社)を0.5ml/kgの割合にて約5秒間で注入，15分後に他側の前肢静脈から採血した。採血は血液生化学検査と同様に12週目まで施行，測定は分光光度計(clinical spectrophotometer 105-50, 日立製作所社)を用いて行った。

### (3) 病理組織学的検査

開腹後エタノール注入前に左中心葉もしくは方形葉より肝組織片を採取し，これを術前コントロールとした。その後は術後2週，4週，8週，および12週目に静脈麻酔下に開腹し，肝生検により標本を採取した。なお，3回注入群ではコントロールとしてエタノール注入前，注入後12週目に静脈麻酔下に開腹し肝組織を採取した。

標本は，10%中性ホルマリンで固定後，hematoxylin eosin(H.E.)，Azanおよび鍍銀

染色（渡辺法）を行い光学顕微鏡にて観察した。

#### （４）PCNA免疫組織学的検査

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)は細胞周期S期の核内に特異的に認められる。抗PCNA抗体を用いて以下の手順で免疫組織染色を行い、肝再生像を検討した。

標本は、ホルマリン固定パラフィン包埋で得た材料を用いた。5 $\mu$ のパラフィン包埋切片を作成し、1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（和光純薬工業社）15分にて内因性ペルオキシダーゼ阻害をした。10%ウサギ血清（GIBCO社）で2,000倍希釈した抗PCNA抗体（PCNA Ab-1, オンコジーンサイエンス社）を室温、12時間作用させた。ヒストファインキット<sup>®</sup>（SAB-PO(M), ニチレイ社）を用い、次の行程を順次行った。2次抗体（ビオチン標識ウサギ抗マウス血清IgG+IgA+IgM）を室温で10分、酵素試薬（ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン）室温、5分、基質一色素混合液（発色色素 3,3'-ジアミノベン

チジン、基質緩衝液、発色試薬0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）室温、15分の順で作用させた。各段階で0.01M phosphate buffered saline (PBS) PH 7.2 にて5分間、2回洗浄した。判定は、光学顕微鏡下400倍にて、門脈域、中心静脈域に分け染色陽性細胞核の個数を計測した。各標本5視野につきそれぞれの平均を求めた。

#### （５）門脈圧、門脈血流量測定

1回注入群のうち7頭につきエタノール注入前と12週後に次の操作にて門脈圧、門脈血流量を測定した。

門脈圧の測定にはまず、腸間膜静脈の枝から静脈留置針（ベニユーラV1<sup>®</sup>・トップ社）を門脈本幹まで誘導し、観血血圧メーター（N 3048 日本電気三栄社）に接続、観血的門脈圧測定をした。

門脈血流量の測定は内径5.0 mmのプロープ（FG型 日本光電社）を脾静脈合流部より肝側の門脈本管にかけ、電磁血流計（MF27日本光電社）に接続、門脈血流量を測定した。

### 3. 統計学的処理

有意差検定には Student の  $t$  検定を用い、危険率  $P < 0.05$  をもって有意とした。

## IV 結果

### 1. 手術成績

初回エタノール注入時の肝の色調は、全症例ともアルコール注入量の増加にともなって、白色斑紋状から暗赤色へと変化していった。この状態は約5分間持続したが、徐々に退色し10分後にはエタノール注入前の状態に回復した。

1回注入群10頭中7頭は12週目に犠牲死としたが、他3頭はいずれも4週目に感染症にて死亡した。

体重減少は全例に認められ、最大3.5kgから最低で0.5kg ( $1.8 \pm 0.87$ kg 平均 $\pm$ 標準偏差)であった。肝の状態は全体に萎縮していた例6頭、直径2-3mmのmicroabscessがび慢性に認められた例1頭、著変を認めなかった例3頭であった。剖検時に計測した総胆管径はい

ずれも著しく拡張しており、通常1-2mm程度の総胆管径が最大で13mm、最小でも9mm ( $11.0 \pm 1.3$  mm) と拡張していた(表1)。

3回注入群は5頭全て12週まで生存し、12週目に犠牲死とし、肝組織を採取した。

### 2. 血液生化学的検査

#### (1) A1bの変動

術後3日目に $2.0 \pm 0.3$ g/dlと最低値を示した。5日目よりはほぼ2.5 g/dl前後を維持したが12週目でも $2.5 \pm 0.3$ g/dlと術前値に復することはなかった(図2)。

#### (2) GPTの変動

GPTは術後、翌日より有意( $P < 0.05$ )の高値となった。以降4週目頃まではほぼ1,000IU/Lを維持し、以後低下傾向を呈したが、12週目でも $447.9 \pm 299.8$  IU/Lと術前値より高値であった(図3)。

#### (3) $\gamma$ -GTPの変動

術後1日目より有意( $P < 0.05$ )の上昇を示し、術後5日目よりさらに上昇傾向が認められ、

12週目でも  $74.9 \pm 61.3$  IU/Lと術前値よりも高値を示した(図4)。

#### (4) D-Bilの変動

術直後より急激な上昇を呈し、1週目に最高値を示した ( $4.0 \pm 1.3$  mg/dl,  $P < 0.05$ )。以後2週間は高値を維持するが、3週目以降漸次減少し12週目ではほぼ術前値と同様の値  $0.14 \pm 0.1$  mg/dlであった(図5)。

#### 3. ICG15分値

術直後は60%と著明な高値を示し、以後4週間は50%台を維持していた ( $P < 0.01$ )。その後、下降傾向を認めるものの、12週目でも  $33.0 \pm 11.0$  %と術前値より高値を示した(図6)。

#### 4. 病理組織学的検査

1回注入群の術後2週目の病理組織学的変化では門脈周囲の細胞浸潤が特徴的であり、好中球、リンパ球が門脈周囲に集簇していた。また、胆管周囲の線維性の肥厚と浮腫が著明であった。この線維性肥厚の程度を判定する

試みの一つとして、胆管周囲の線維性肥厚と胆管の直径を1枚のプレパラートから任意の5ヶ所について測定しその比率を算定した。その結果、1回注入群ではエタノール注入前は  $0.25 \pm 0.10$ であったのが、2週後すでに  $0.80 \pm 0.34$ と有意 ( $P < 0.01$ )の増加を示し、この傾向は12週まで持続した。また、3回注入群ではその比率は  $1.18 \pm 0.45$ となり線維化が1回注入群より有意 ( $P < 0.05$ )に増強していることが判明した(図7)。4、8、12週目の病理組織標本では細胆管の増殖と、門脈周囲から肝実質内に延びるび慢性の線維の増生が認められた。次に、これらの線維化の程度について検討を試みた。術前に採取した肝組織を、胆管周囲の線維性肥厚のみを+ (図8a)、さらに門脈周囲から肝実質内に伸びる線維増生を++ (図8b)、門脈-門脈架橋形成を+++ (図8c)とし各病理標本について判定した。1回注入群で、++以上を呈した例は2週目では10頭中3頭、8週目で7頭中4頭、

12週目で5頭と経時的増加を示した。とくに、12週目の5頭中門脈－門脈架橋を形成していたものが1頭であった。一方、3回注入群は全例++以上で、5頭中3頭に+++を認め1回注入群の12週目の病理組織と比較して線維の増生が著明であった（表2）。

3回注入群5頭中1頭で肉眼的に結節性の腫瘤を認め、結節性腫瘤部位とその周囲組織との境界は明瞭であった。肝割面を見ると、結節部分は灰白色、やや軟で、隆起した充実性腫瘤であった（図9）。同結節の組織像は、明るい細胞質を有するやや大型の細胞で、核の異型性は認められず、再生結節の組織像であった（図10）。

#### 5. PCNA免疫組織学的検査

1回注入群のエタノール注入前に採取した組織標本において、全例ともPCNA染色陽性細胞は認められなかった。一方、術後2週目に門脈域に $13.3 \pm 5.9$ 個と有意( $P < 0.01$ )な染色陽性細胞数の増加を認めた。以後4, 8, 12週

目は、それぞれ $6.9 \pm 3.7$ 個、 $4.4 \pm 1.4$ 個、 $2.9 \pm 2.2$ 個と門脈域における陽性細胞数は低下傾向を示した。これに対し、中心静脈域では2週目の陽性細胞数 $2.0 \pm 1.4$ 個で、それ以後の標本でもほとんど変化は見られなかった。

3回注入群について検討したところ、全例にPCNA陽性細胞数の増加が認められ、門脈域 $8.1 \pm 1.2$ 個、中心静脈域 $5.0 \pm 1.0$ 個であった。とくに中心静脈域についてみると、3回注入群では1回注入群のいずれの時期よりも有意( $P < 0.05$ )の増加を示した（図11）。

#### 6. 門脈圧および門脈血流量

門脈圧は、調節呼吸時、非呼吸時それぞれ測定した。

術前の門脈圧は調節呼吸時と非呼吸時の平均値で示すと $147.2 \pm 5.9 \text{ mmHg}$ であり、術後12週目の測定にて $222.8 \pm 35.6 \text{ mmHg}$ と有意( $P < 0.01$ )に高値を示した。また、門脈血流量は術前 $381.7 \pm 69.5 \text{ ml/min}$ 、術後12週目 $125.7 \pm 18.4 \text{ ml/min}$ と有意( $P < 0.01$ )な低下を

示した(図12)。

#### V 考察

これまでイヌを用いた肝線維症および肝硬変モデルの作製には、DMNAを用いる方法が頻用されている<sup>4) 5) 9) 10)</sup>。この方法では投与開始後約6ヵ月目頃より、肝線維化や肝硬変が形成されるとしている<sup>9)</sup>。しかし、同方法は死亡率が高いことや、肝硬変の完成まで長期間を要することなど、いまだ解決されていない問題点も多い。一方、アルコールを経口投与して、肝線維症、肝硬変を作製する試みも報告されており、その中でヒヒやサルを用いた実験では、肝線維化には6ヵ月以上、肝硬変には24ヵ月以上要すると報告されている<sup>11) - 13)</sup>。その他、イヌを用いて門脈内にポリビニールアルコールを頻回に注入することにより門脈閉塞を惹起させ、門脈周囲の線維化、門脈圧亢進等のモデルの作製も試みられているが、肝線維化は約12ヵ月後に発現すると報告されている<sup>14)</sup>。いずれの方法も肝硬

変の作製には長期間を要し、またその成績も一定したものは得られていないのが現状である。

今回、著者の考案した胆管からエタノールを注入する肝硬変作製モデルは著者の渉猟した限り報告はみられず、はじめての試みであると思われる。本法による肝硬変の生成機序について検討すると、まず生化学的検査からみて、肝細胞障害性の指標となるGPTは術直後に一過性に上昇し、以後、急激に下降したが、胆道系酵素である $\gamma$ -GTPは術直後より異常高値を示し、8週目まで高値を維持した。この成績から本法によるおもな肝硬変発生機序は、胆管内エタノール注入により胆管上皮および門脈周囲肝細胞に脱水固定、壊死が起こり、肝細胞および細胆管の再生の過程で線維化が引き起こされるものと考えられた。病理組織学的検討においても、エタノール注入1週目に門脈周囲の好中球を中心とした細胞浸潤が見られ、術後2週目ではリンパ球、形

質細胞など慢性期の細胞に置き変っていた。4週目で細胆管の増生が認められたが、門脈周囲の細胞浸潤は2週目とほぼ同様かやや改善傾向を示し、以後8週、12週目の病理組織像でも細胞浸潤に関しては4週目と同様であった。

またD-Bil値の変動についてみると術後1週目で最高となり、その後徐々に低下し、12週目頃にほぼ術前値に復した。この結果はエタノールによる細胆管の破壊ないし消失により惹起された胆汁排出障害が、胆管上皮の再生および細胆管増生とともに改善されていくことを示唆するものである。病理組織学的にも、2週目の標本では比較的太い胆管内に胆管上皮の壊死組織が散見され、エタノールにより障害された胆管上皮細胞が剥離、落下し、再生された胆管上皮で被覆されたものと考えられた。また、細胆管の増生とともに、その一部には胆汁栓も認められることから、細胆管レベルでは一部、胆管閉塞が残存している

ことが示唆された。

次に、線維化について検討を加えてみると1回注入群では肝実質内の線維化は術後2週目より認められ、12週目までの観察では漸次増加傾向を示した。さらに3回注入群では12週目の線維化の程度は1回注入群に比較して高度の例が5頭中4頭に認められ、エタノール注入回数と線維化との間には相関が認められた。

一方、経口的あるいは経静脈的にアルコールを投与した場合のおもな障害部位は中心静脈周囲であり、病理組織学的に、中心静脈周囲の肝細胞内脂肪蓄積、中心静脈周囲の線維化などの所見が特徴と報告されている<sup>11) 13) 15) 16)</sup>。著者の実験では門脈周囲の線維化が主な所見であり、この相違はアルコールの投与方法の違いに起因するものと考えられた。

抗PCNA抗体は肝切除後の肝再生や肝癌、胃癌など悪性腫瘍の細胞増殖の指標として用いられており、染色陽性細胞数の増加は肝再生

の程度，悪性腫瘍の悪性度と相関するとされている<sup>17)-19)</sup>。エタノール注入前の全ての標本ではPCNA陽性細胞数は認められなかったが，1回注入群において，2週目を最高とする肝細胞再生が認められた。この再生はエタノール注入後比較的早期から認められ，また1回のエタノール注入では12週までに肝細胞の再生がほぼ終了することが確認できた。この肝細胞再生は胆管周囲に多く認められることから，胆管内に注入されたアルコールによる肝細胞壊死に起因していると考えられた。12週目では1回注入群より3回注入群において，陽性細胞数はやや多いものの有意差は認められなかった。しかし，3回注入群では中心静脈周囲にも陽性細胞数の増加が認められ，臨床例におけるアルコール性肝硬変に類似した所見であり，エタノール注入回数と期間を改良することにより肝硬変へ発展する可能性が示唆された。

次に門脈圧および門脈血流量についての検

討では門脈圧の有意 ( $P < 0.01$ ) の上昇および門脈血流量の有意 ( $P < 0.01$ ) の減少が認められた。この成績はイヌを用いたDMNA投与による肝硬変作成実験での成績とほぼ一致していた<sup>3) 4)</sup>。著者の実験結果では肝硬変の形成までは至らなかったものの，門脈周囲の炎症および線維化増生の所見が認められたことより門脈圧の上昇，門脈血流量の減少が引き起こされたものと考えられた。

以上の成績から，著者の考案した胆管内にエタノールを注入する方法は極めて簡便であり，12週までの観察で肝線維症を作成できた。その病理組織学的特徴は早期からはじまる胆管周囲の著しい線維化，肝実質内のびまん性の線維化，細胆管の増生であり，また肝機能低下の遷延，門脈圧の亢進と門脈血流量の低下も認められた。この変化は肝硬変へ発展する過程の所見と考えられ，今後さらにエタノールの投与量，回数および投与期間について検討する必要があると思われた。

## VI 結語

正常成犬において，胆管内エタノール注入による実験的肝硬変作成を試み、生化学的検査、病理組織学的検査および門脈圧，門脈血流量の測定を行って，次の結果を得た。

1. 1回のエタノール注入により，GPT，ICG15分値は術直後に急上昇し，以後下降する傾向を認めたが，術後12週目でも術前値に比し高値であった。また， $\gamma$ -GTPは術直後より急上昇し，以後高値を維持しており，1回のエタノール注入で肝障害は12週頃まで続くことが示唆された。

2. 病理組織学的検討からエタノール注入後2週目より胆管周囲に線維性の肥厚が出現し，この変化は12週後でも変らなかった。また，門脈域を中心として肝実質内に延びるび慢性の線維化が認められた。

3. 3回注入群は1回注入群に比べ有意な胆管周囲の線維性肥厚，肝実質内のび慢性の線維化を認め，エタノール注入回数と線維増

生との間に相関が示唆された。

4. 門脈圧上昇，門脈血流量の減少は，病理組織学的検討から，門脈周囲の炎症とそれに引き続いた門脈周囲の線維化が主因であると考えられた。

5. 本法は肝硬変作製の有力な一方法を示唆しているものと考えられた。

# 参考文献

- 1) Proctor, E., Chatamra, K.: Standardized micronodular cirrhosis in the rat. *Eur. Surg. Res.*, 16:182-186, 1984.
- 2) Cameron, G. R., Karunaratne, W. A. E.: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Pathol. Bacteriol.*, 42:1-21, 1936.
- 3) 林 好朗: Diethylnitrosamine 投与によるイヌ肝硬変の機能と形態に関する研究. *奈医誌*, 33:196-208, 1982.
- 4) Kreuzer, W., Schuller, E. F., Schenk, W. G.: Hemodynamic study of cirrhosis in the dog. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 135:89-93, 1972.
- 5) Testas, P., Benichou, J., Perrin, N. et al.: Comparative study of two models for experimental cirrhosis in the dog. *Eur. Surg. Res.*, 10:146-152, 1978.
- 6) Reddy, J. K., Rao, M. S., Jago, M. V.: Rapid development of hyperplastic nodules and cirrhosis in the liver of rats treated concurrently with thioacetamide and the pyrrolizidine alkaloid lasiocarpine. *Int. J. Cancer*, 17:621-625, 1976.
- 7) 菊池 淳, 小山研二, 大和田康夫 他: Thioacetamide による実験的肝硬変の機能と形態に関する研究. *肝臓*, 28:53-61, 1987.
- 8) Muller, A., Macknik, F., Zimmerman, T. et al.: Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats—usefulness and reliability of this animal model. *Exp. Pathol.*, 34:229-236, 1988.
- 9) Madden, J. W., Gertman, P. M., Peacock, E. E. Jr.: Dimethylnitrosamine—induced hepatic cirrhosis: A new canine model of an ancient human disease. *Surgery*, 68:260-268, 1970.
- 10) Moritz, E., Kreuzer, W., Schenk, W. G.: Studies in experimental canine cirrhosis: Hemodynamic alterations with emphasis on degree of spontaneous porto-systemic shunting. *Ann. Surg.*, 177:503-506, 1973.
- 11) Lieber, C. S., Decarli, L. M.: Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons. *Fed. Proc.*, 35:1232-1236, 1976.
- 12) Nakano, M., Lieber, C. S.: Ultrastructure of initial stage of perivenular fibrosis in alcohol-fed baboons. *Am. J. Pathol.*, 106:145-155, 1982.
- 13) Lieber, C. S., Decarli, L. M., Rubin, E.: Sequential production of fatty liver, hepatitis, and cirrhosis in sub-human primates fed ethanol with adequate diets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 72:437-441, 1975.
- 14) Burgener, F. A., Gutierrez, O. H., Longsdon, G. A.: Angiographic, hemodynamic, and histologic evaluation of portal hypertension and periportal fibrosis induced in the dog by intraportal polyvinyl alcohol injections. *Radiology*, 143:379-385, 1982.
- 15) Popper, H., Lieber, C. S.: Histogenesis of alcoholic fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Am. J. Pathol.*, 98:695-716, 1980.
- 16) Tukamoto, H., Towner, S. J., Ciofalo, L. M. et al.: Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology*, 6:814-822, 1986.
- 17) Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, A. L. et al.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.*, 162:285-294, 1990.

18) Van Dierendonck, J.H., Wijsman, J.H., Keijzer, R. et al.: Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies, Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. Am.J.Pathol., 138:1165-1172, 1991.

19) Kamel, O.W., LeBrun, D.P., Davis, R.E. et al.: Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/Cyclin 19A2, Correlation with Ki-67 labeling. Am.J.Pathol., 138:1471-1477, 1991.

表 1 1 回注入群の剖検所見

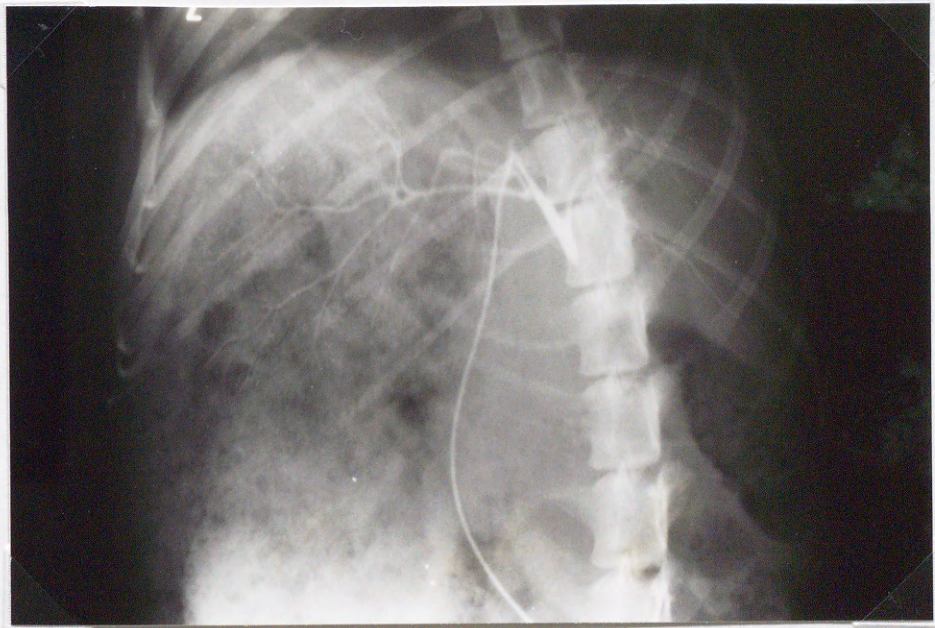
番号	観察期間 (週)	体重の変化 (kg) 術前／死亡時	死因	肝重量 (g)	肝萎縮	総胆管 直径 (mm)
1	12	9.0 7.0	犠牲死	320	++	10
2	12	13.0 10.5	犠牲死	345	+	9
3	12	13.0 12.0	犠牲死	440	—	10
4	12	12.0 11.0	犠牲死	230	+++	11
5	12	14.0 10.5	犠牲死	300	++	13
6	12	11.0 9.0	犠牲死	230	+++	12
7	12	11.5 9.0	犠牲死	320	—	12
8	4	10.0 8.0	感染死	N D	—	N D
9	4	8.0 7.5	感染死	N D	+	N D
10	4	9.5 8.5	感染死	N D	micro abcess	N D

N D : 施行せず

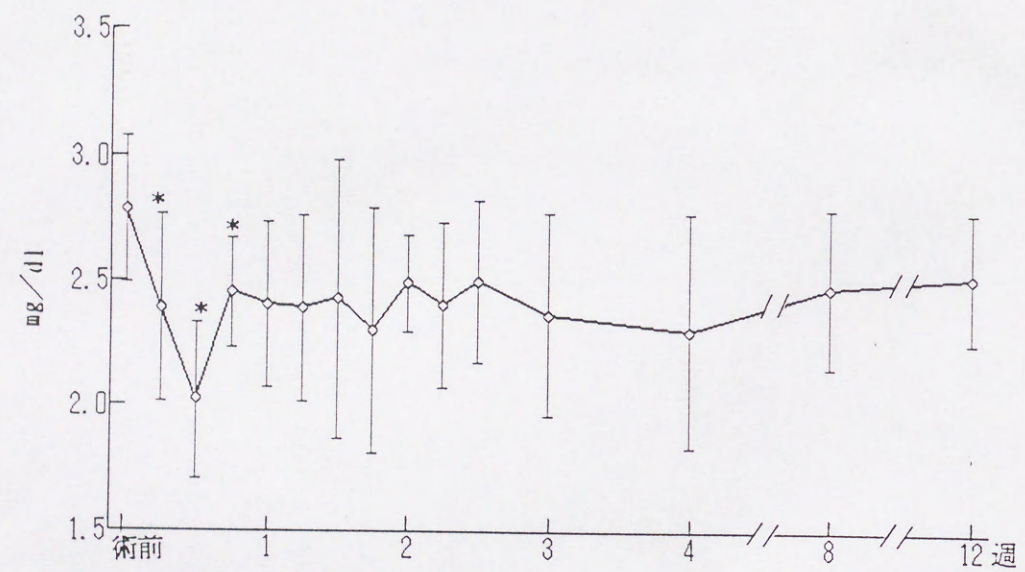
表2 肝線維化の経時的変化

	1回注入群					3回注入群
番号	術前	2週目	4週目	8週目	12週目	12週目
1	－	＋	＋	＋	＋	＋＋＋
2	－	＋	＋	＋＋	＋＋	＋＋
3	－	＋	＋	＋	＋＋	＋＋＋
4	－	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋＋	＋～＋＋
5	－	＋＋	＋	＋＋	＋＋	＋＋＋
6	－	＋	＋	＋	＋	
7	－	－～＋	＋	＋＋	＋＋	
8	－	－	＋			
9	－	＋＋	＋＋			
10	－	＋	＋			

－ 線維増生なし  
＋ 胆管周囲線維性肥厚  
＋＋ 門脈周囲からのびる線維の増生  
＋＋＋ 門脈－門脈架橋形成

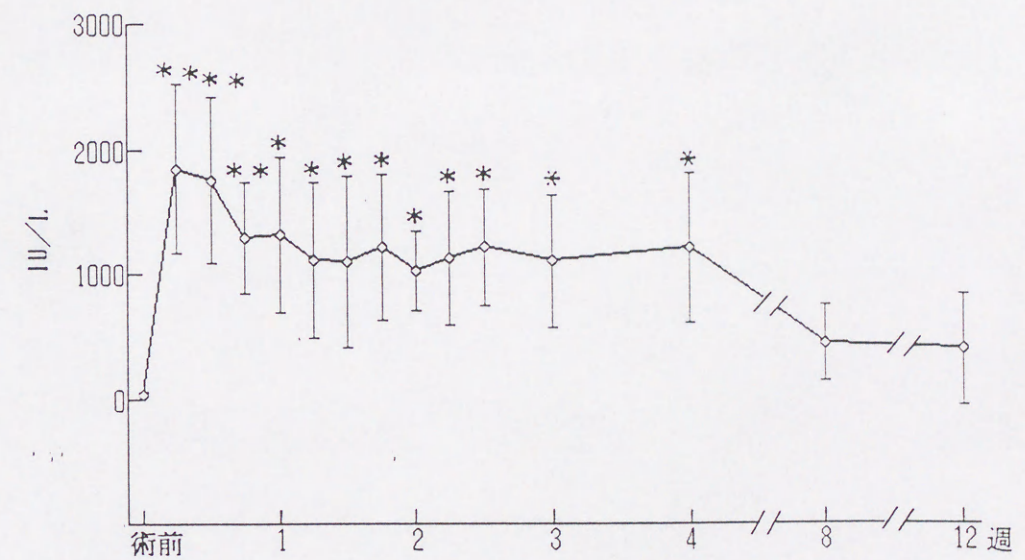


図－1 5ml注入時の胆管造影像



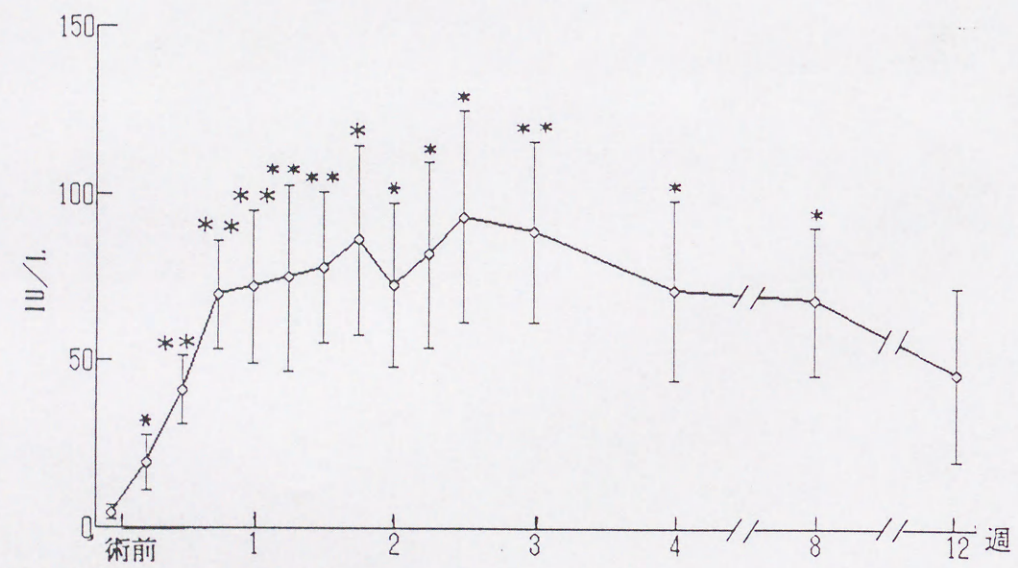
\* 術前値との比較  $P < 0.05$

図-2 血清A1b値の変動



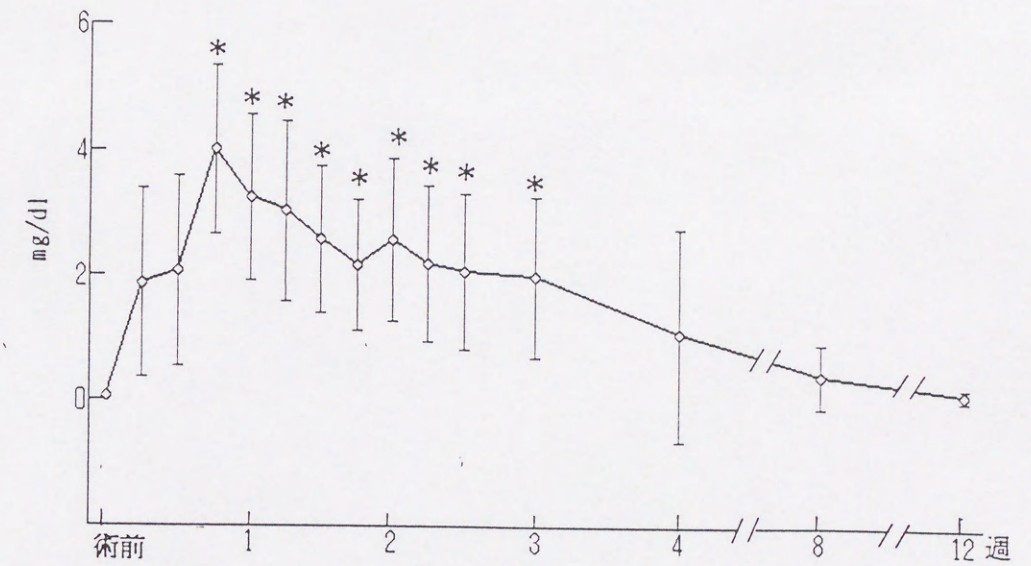
\* 術前値との比較  $P < 0.05$   
 \*\* 術前値との比較  $P < 0.01$

図-3 血清GPT値の変動



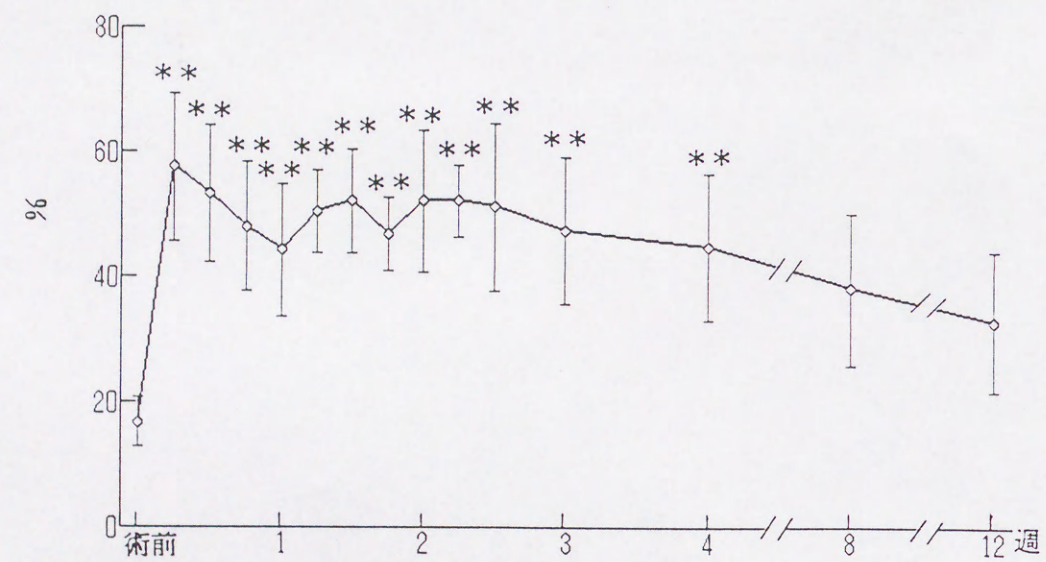
\* 術前値との比較  $P < 0.05$   
 \*\* 術前値との比較  $P < 0.01$

図-4 血清 $\gamma$ -GTP値の変動



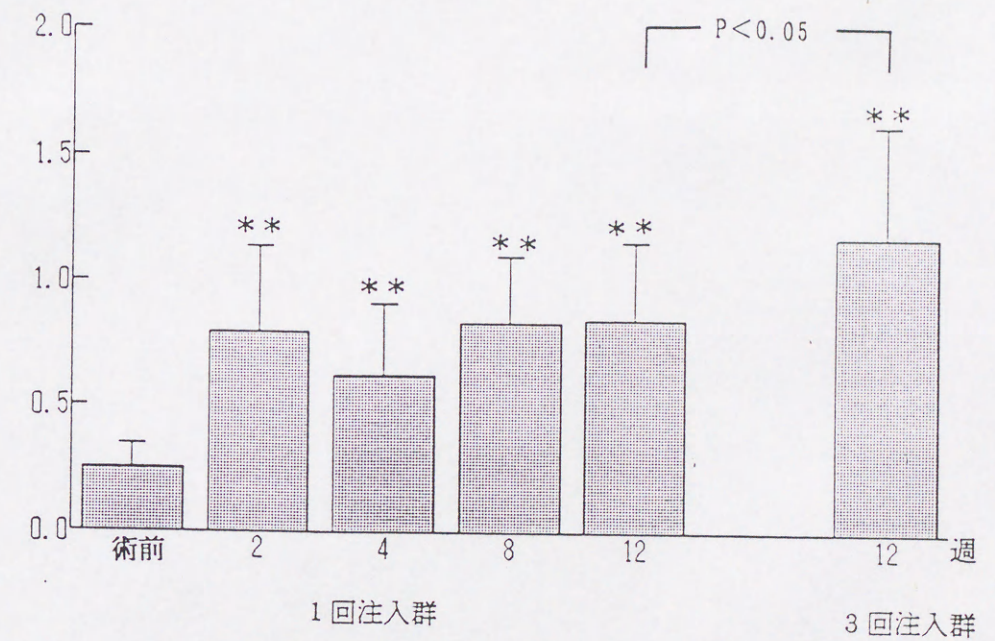
\* 術前値との比較  $P < 0.05$

図-5 血清D-Bil値の変動



\*\* 術前値との比較  $P < 0.01$

図-6 ICG15分値の変動



\*\* 術前値との比較  $P < 0.01$

図-7 胆管周囲線維性肥厚の胆管径に対する比率

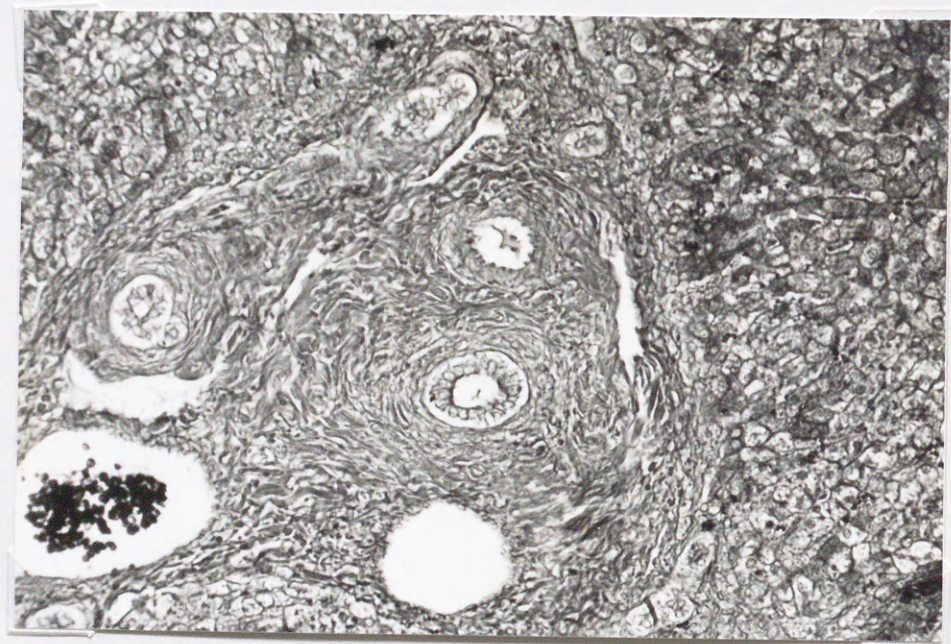


図-8 a 胆管周囲線維性肥厚（鍍銀染色  $\times 200$ ）

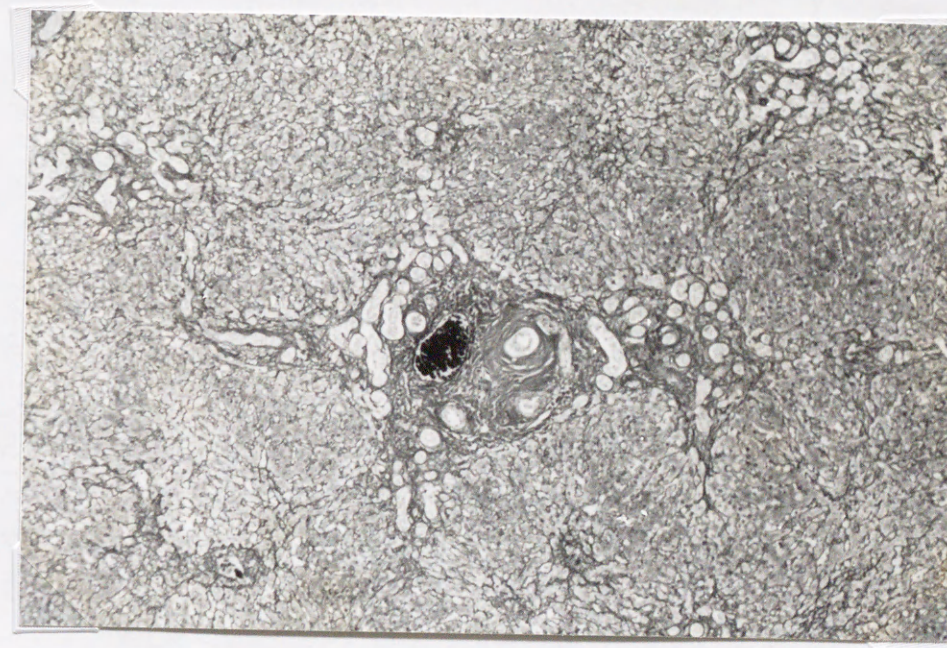


図-8 b 門脈域周囲線維化（鍍銀染色  $\times 100$ ）

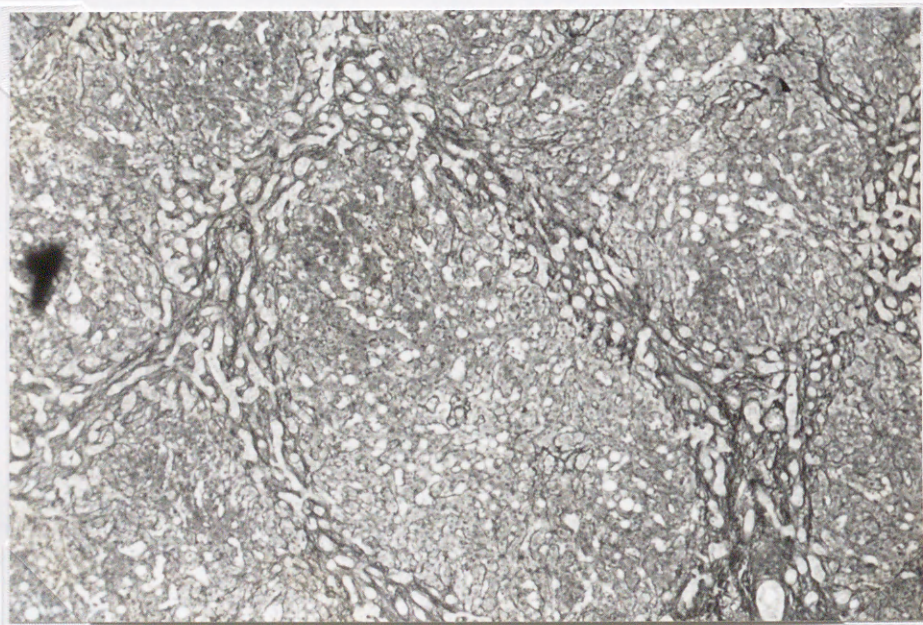


図-8c 門脈-門脈架橋形成（鍍銀染色 ×100）



図-9 結節性腫瘤肉眼所見



図-10 結節性腫瘍病理組織像 (H. E. 染色  $\times 200$ )

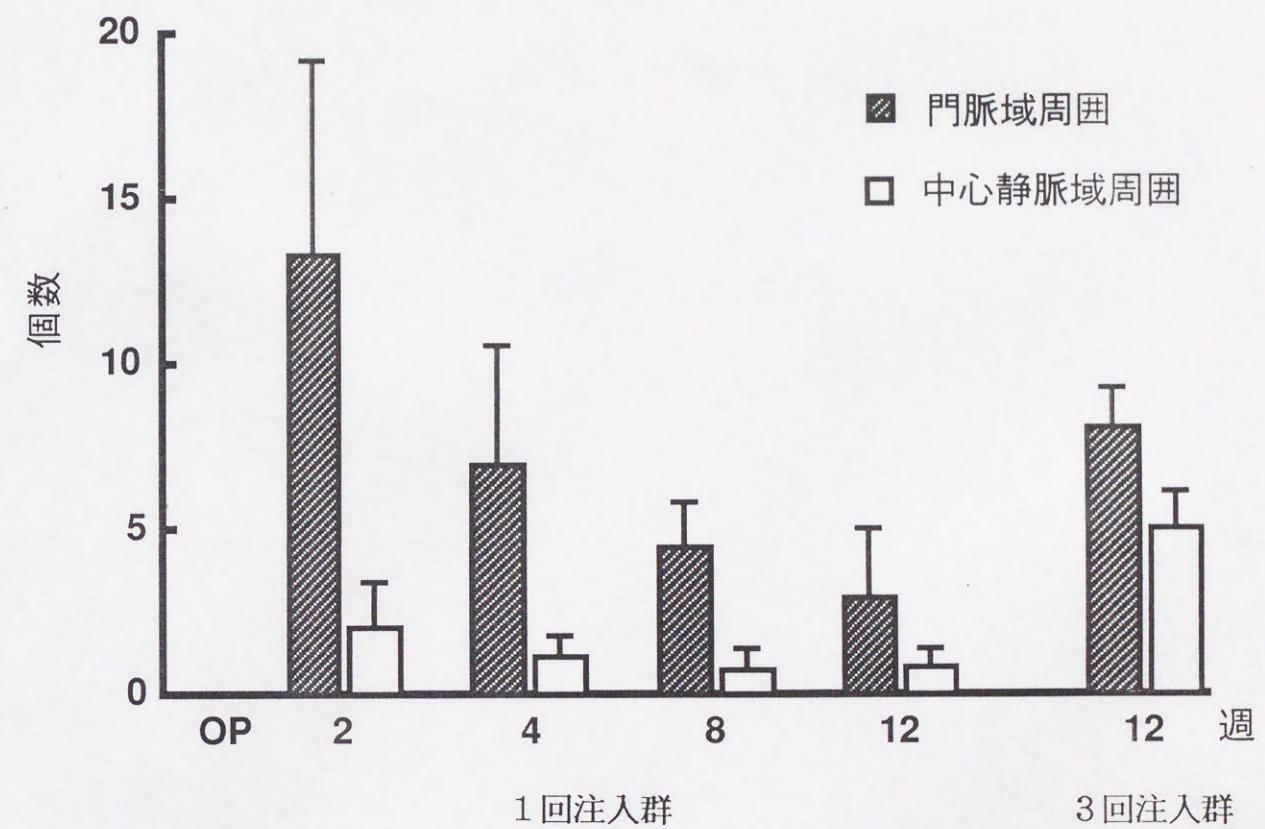


図-11 PCNA陽性細胞数の変化

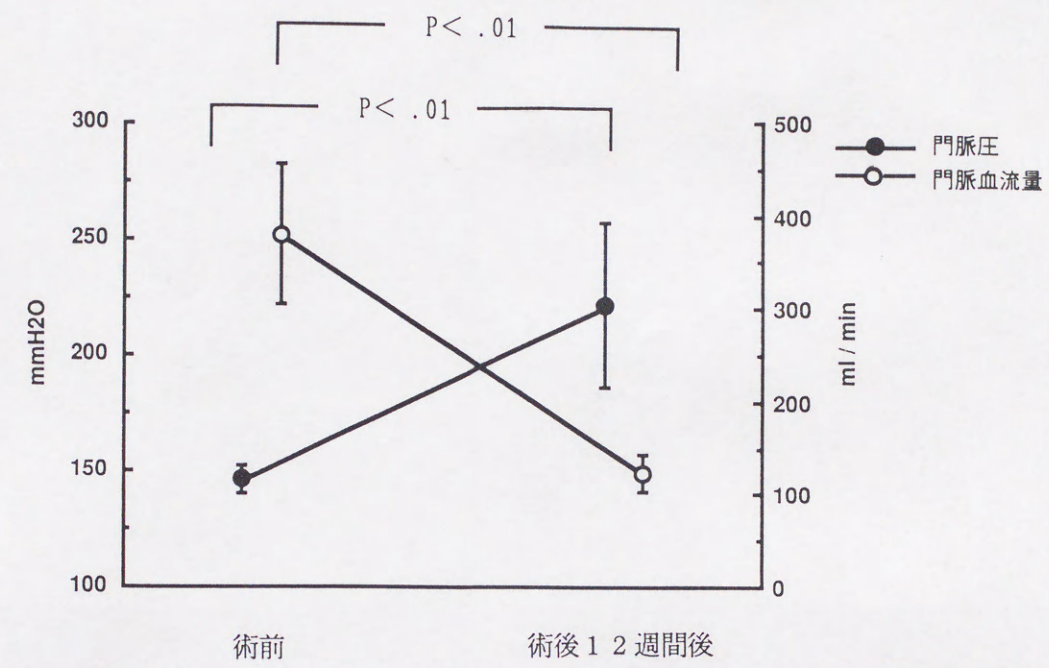


図-12 門脈圧および門脈血流量の変化