

化学的消化法を用いた肝の走査型電子顕微鏡的研究

—増生細胆管の観察—

釋舎 龍三

増生した細胆管の立体的構築および非自由表面像を明らかにする目的で、化学的消化法(HCl-collagenase 法)を用いた走査電顕的観察を行い、次のような結論を得た。

1. 本法は増生細胆管の立体的構築とその非自由表面を観察するのに有用な方法であった。
2. 明瞭な管腔を形成しながら増生する定型的細胆管と管腔形成の不明瞭な非定型的細胆管の立体的構築を明らかにした。すなわち前者は、多方向性に複雑に吻合しながら走行し、後者は連珠状の膨らみをもち、複雑な吻合を形成しながら屈曲、蛇行していた。
3. 増生した細胆管の非自由表面の観察では、基底側の上皮細胞間隙が、非定型的細胆管に比較して定型的細胆管で有意に広がった。
4. 結合組織に残された増生細胆管の鋳型面の観察では、その走行を知ることができたにとどまった。鋳型の詳細な観察には実質細胞成分を消化除去し、結合組織の線維性成分を残して観察する方法が必要と考えられた。

(平成元年2月20日採用)

Scanning Electron Microscopic Study of the Liver Using the Chemical Digestion Method —Observation of Proliferated Bile Ductules—

Ryuzou Tokiya

This report describes the scanning electron microscopic features of proliferated bile ductules. The materials obtained in autopsy were treated by the chemical digestion (HCl-collagenase) method.

1. The advantage of this method is that the three-dimensional structures of proliferated bile ductules can be better understood from the outside.
2. Proliferated bile ductules with well developed lumina coursed irregularly and showed multiple anastomotic channels, while those with poorly developed lumina showed a tortuous course and more anastomotic connections. In addition, the bile ductules appeared beaded as they expanded and bulged eccentrically or concentrically.
3. The surface of proliferated bile ductules was observed in detail. The intercellular space of the epithelial cells on the surface of the proliferated bile ductules was much wider in those with well developed lumina than in those with poorly developed lumina.

川崎医科大学附属川崎病院 内科
(指導: 小林敏成教授)
〒700 岡山市中山下2-1-80

Department of Medicine (Director: Prof. Toshinari Kobayashi), Kawasaki Hospital, Kawasaki Medical School: 2-1-80 Nakasange, Okayama, 700 Japan

4. Casts of proliferated bile ductules were molded out of connective tissues in the septa, but a detailed relief of these casts could not be obtained because the connective tissue covering the cast had been digested irregularly. In order to obtain a better relief from a cast, it should be made certain that the connective tissue along with the parenchyma is thoroughly digested. (Accepted on February 20, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15(2): 242-255, 1989

Key Words ① Scanning electron microscopy ② Chemical digestion method
③ Proliferated bile ductules

緒 言

化学的消化法を利用した生物試料の走査型電子顕微鏡（以下走査電顕と略す）的観察¹⁾には、結合組織中に埋没して存在する構造物の構築や非自由表面を広い範囲にわたり、しかも立体的に観察し得るという大きな利点がある。従来、走査電顕による肝組織の観察は、組織や細胞の自由表面や切断面の観察に限られていたが、この化学的消化法を用いた走査電顕の観察によって、結合組織中に埋没している血管系や胆管系の構築や非自由表面の詳細な観察が可能になった。²⁾

光学顕微鏡（以下光顕と略す）的に、肝組織内でしばしば観察される増生した細胆管は、その機能や病態に関して不明な点が多く、肝臓病学における一つの盲点的な存在であると考えられる。増生した細胆管の超微構造に関しては、透過型電子顕微鏡（以下透過電顕と略す）的観察によるもの³⁾⁻⁵⁾が多く、走査電顕の観察によるもの²⁾は少ない。著者は、化学的消化法を用いた走査電顕の観察を行い、増生した細胆管の立体的構築および非自由表面像を詳細に観察した。

肝内胆管系の名称は研究者によって異なっているが、本論文では、Schaffner & Popper³⁾の定義に従って、3~10個の上皮細胞により形成されるものを細胆管 (bile ductule) と呼び、細胆管の数的増加を細胆管の増生 (proliferation) とした。さらに、明瞭な管腔を形成しつつ増生するものを定型的細胆管 (typical bile ductule) 増生、明瞭な管腔を認めない場合を

非定型的細胆管 (atypical bile ductule) 増生と呼び区別⁶⁾した。

材料および方法

1. 材 料

材料は肝硬変に肝細胞癌（多結節型）を合併し、肝不全で死亡した52歳の男性（症例1）、肝硬変に肝細胞癌（融合塊状型）を合併し、肝不全で死亡した47歳の男性（症例2）、および急性肝炎として発症し、しだいに肝不全に陥り発症後60日で死亡した53歳の男性（症例3）の剖検肝を使用した。なお、症例1, 2で試料として使用された肝組織は非癌部より得られたもので、肉眼的にも光顕的にも転移巣を認めなかった。

2. 方 法

剖検肝を5×5×4 mmの小组織片に切り出し、2%グルタルアルデヒド加磷酸緩衝液で3~24 hr 浸漬固定した。固定後、消化されやすい組織面を得る目的で、さらに試料を5×5×2 mmの組織片に2分割した。0.1M 磷酸緩衝液で洗浄後、2分割された割面を8NのHClに60℃で70 min 浸漬し、さらに洗浄後、10 mg/10 ml collagenase (Worthington, type II) 加磷酸緩衝液に37℃で6~12 hr 浸漬し消化した。洗浄後エタノール列脱し、酢酸イソアミル浸漬、臨界点乾燥、Au スパッタ・コーティングし、走査電顕 JSM-T300 型を用い加速電圧 10~15 kV で鏡検した。

光顕用標本は、10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後、薄切し、HE染色を行い鏡検した。さらに、観察対象の同定のため、走査

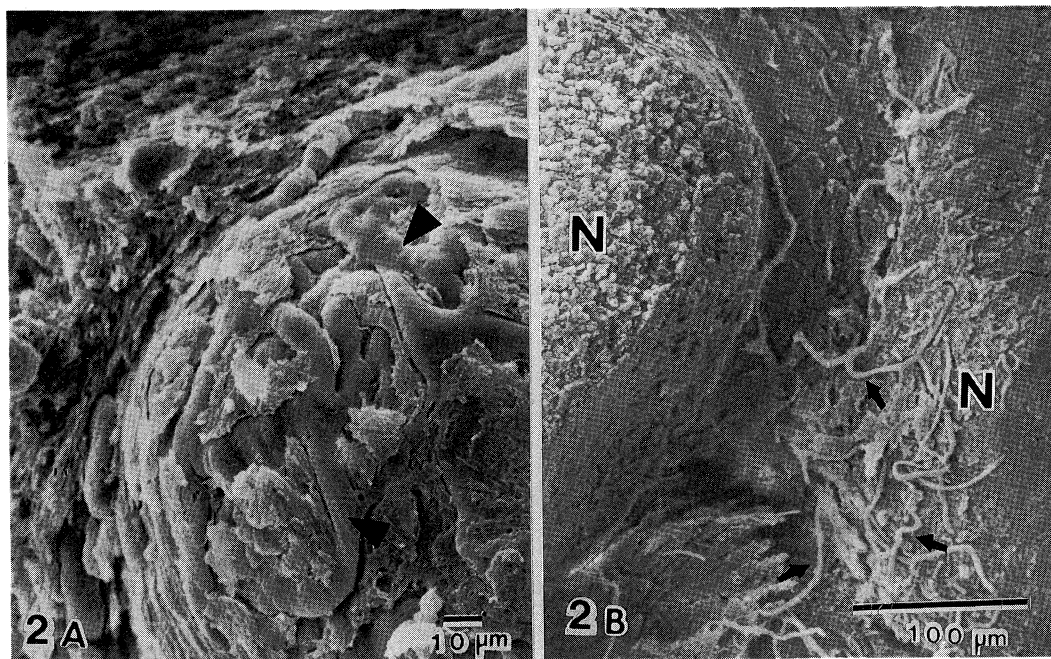


Fig. 2. (Case 1) Scanning electron micrographs (SEM) under treatment of chemical digestion

- A.** A cirrhotic nodule is covered with proliferated bile ductules which looks like a meshwork (arrowheads).
- B.** Proliferated bile ductules (arrows) are scattered in the periphery of the nodule. N: nodule

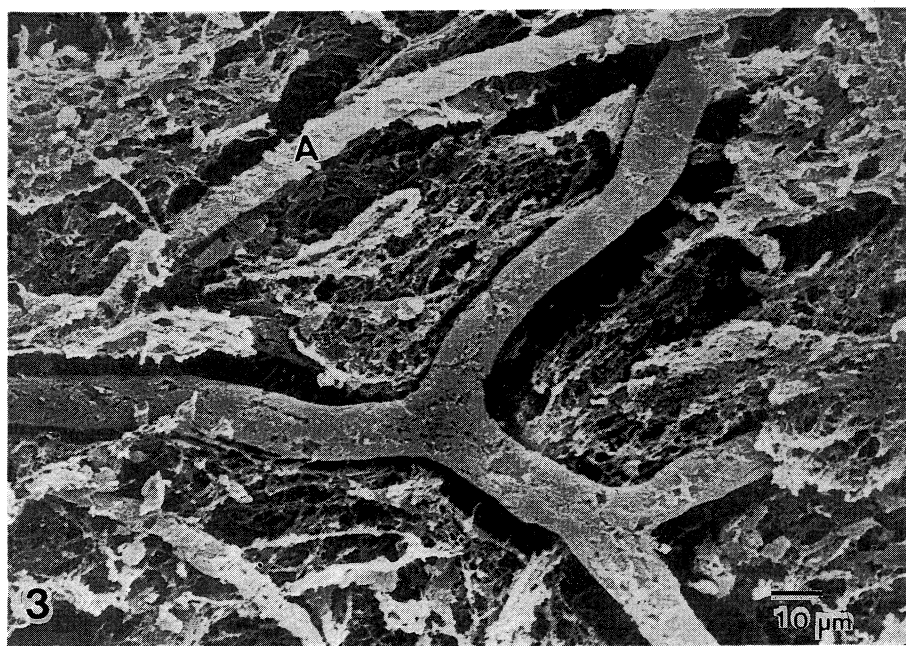


Fig. 3. (Case 1) Scanning electron micrographs (SEM) under treatment of chemical digestion. Proliferated bile ductules seen in the septa course straight and branch at random angles. A: arteriola

電顕で観察した試料をパラフィン包埋し、光顕標本を作製した。²⁾

観 察 結 果

1. 増生した細胆管の立体的構築

症例1から得た試料は、肉眼的に偽小葉の輪状構造が明瞭であった。光顕的观察では、比較の間質の幅が広い肝硬変像で、間質内には、再生結節に接して管腔の明らかな細胆管が増生し (Fig. 1A, B, 矢頭)、さらにその外側の間質内には管腔が比較的に明らかな細胆管が散在性に観察された (Fig. 1A, B, 矢印)。走査電顕的观察では、再生結節を網目状に覆う径 $10\mu\text{m}$ 前後の細胆管²⁾ (Fig. 2A, 矢頭) と間質内をゆるやかにうねりながら走行する径が約 $15\mu\text{m}$ の細胆管が観察された (Fig. 2B, 矢印)。Figure 3 は、後者の拡大像である。このような細胆管の分岐する部分は木枝状であった。

症例2では、非癌部で認められた広範壊死巣から試料を得た。光顕的观察では、不規則な配列を示す残存肝細胞集団と、それを取り囲む膠

原化のすすんでいない間質内の著しく増生した管腔の明らかな細胆管が観察された (Fig. 4)。走査電顕的观察では、多方向性に複雑に吻合しながら走行する、部分的には太いところもあるが、径約 $10\mu\text{m}$ の細胆管が多数観察された (Fig. 5)。これら細胆管の断面が観察される (Fig. 6) 試料では、光顕像 (Fig. 4) に対応しており、管腔が明らかな細胆管として観察された。

症例3では、広範壊死巣から試料を得た。光顕的观察では、ほとんどすべての肝細胞が脱落した広範な肝壊死像を呈し、膠原化していない間質内には著しい細胆管の増生を認めた。増生した細胆管の一部には胆腔が認められたが、多くのものは管腔が明らかなでなかった (Fig. 7)。走査電顕的观察では、連珠状の膨らみをもち、複雑な吻合を形成しながら屈曲・蛇行する径約 $10\mu\text{m}$ の細胆管が多数観察された (Fig. 8)。球状に膨らんだ盲端として観察される部分もあったが、細胆管は屈曲部やお互いに吻合した部分で膨らみ、その部分の径は約 $20\mu\text{m}$ であった

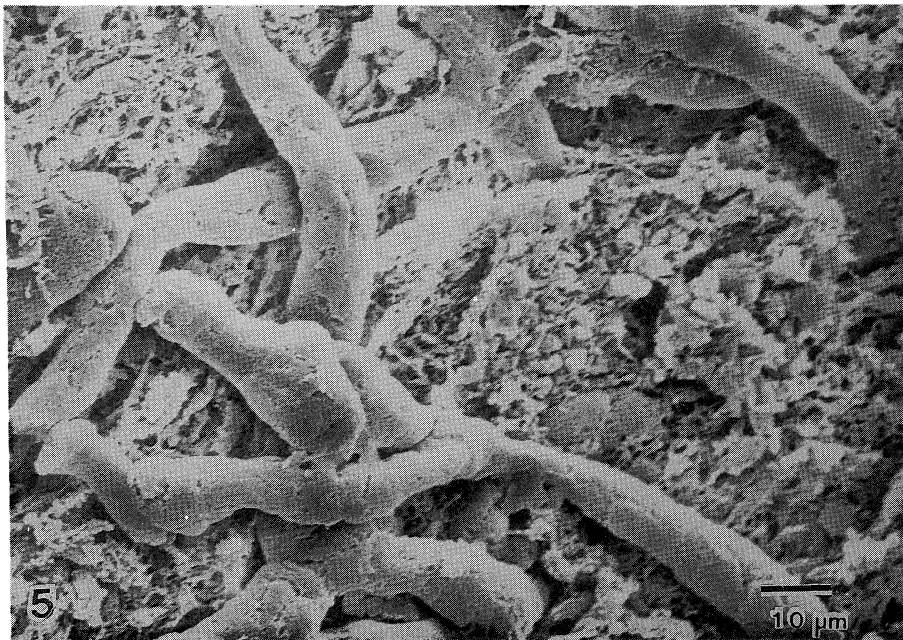


Fig. 5. (Case 2) SEM under treatment of chemical digestion. Proliferated bile ductules of with approximately $10\mu\text{m}$ in diameter course irregularly and anastomoses with each other.

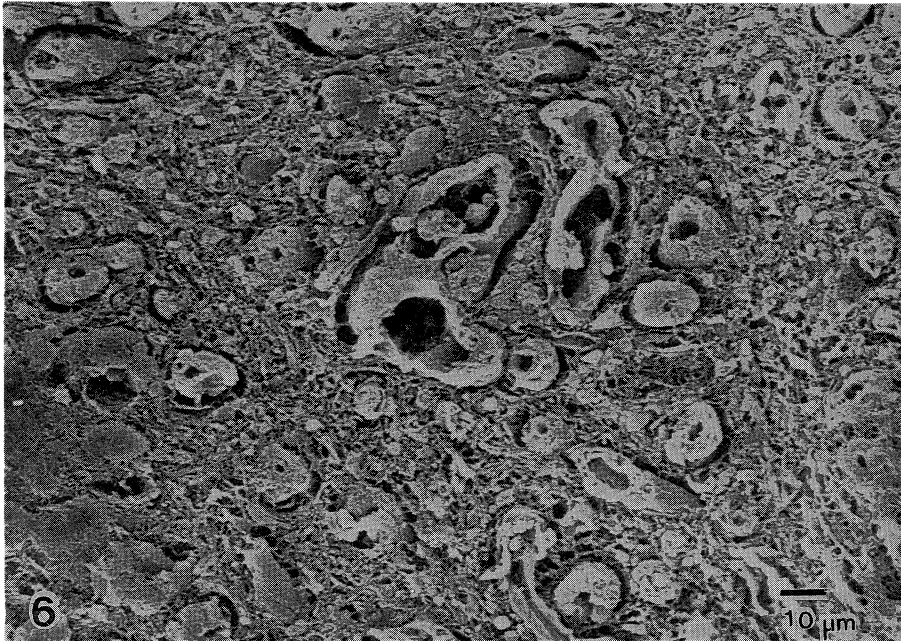


Fig. 6. (Case 2) SEM under treatment of chemical digestion. Proliferated bile ductules with well developed lumina are cross sectioned.

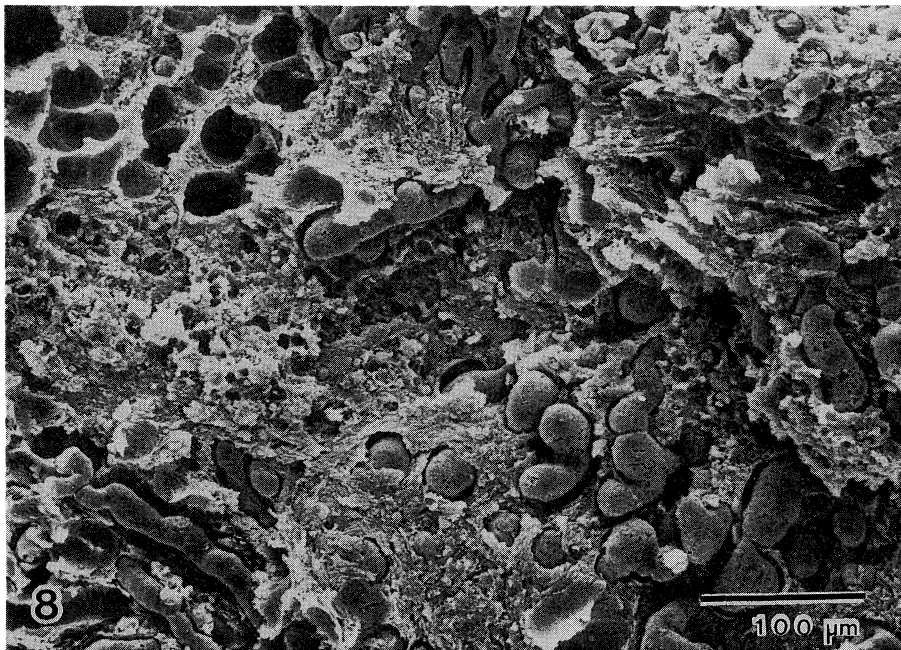


Fig. 8. (Case 3) SEM under treatment of chemical digestion. Proliferated bile ductules are tortuous and show many anastomoses. There are casts of the proliferated bile ductules (left upper quadrant).

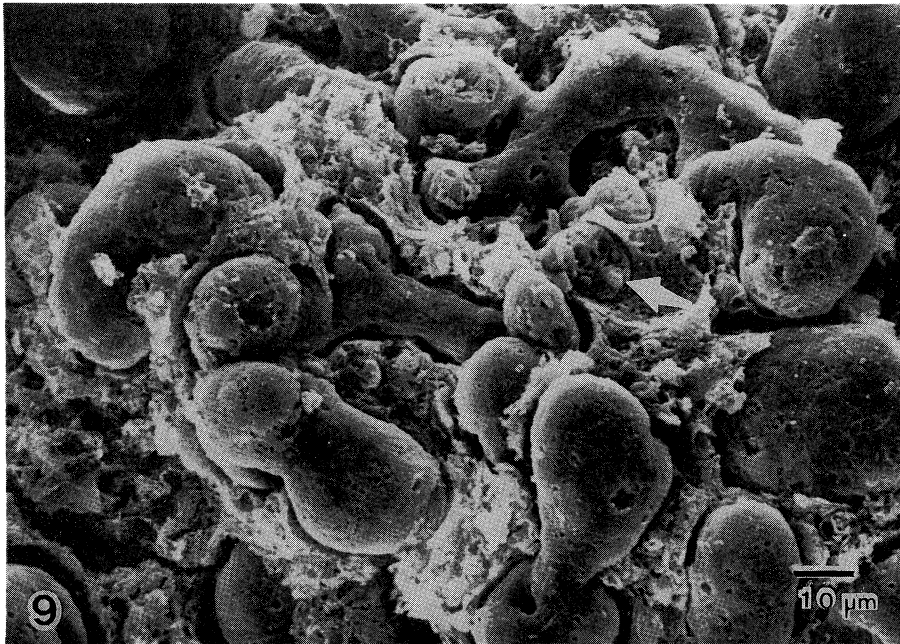


Fig. 9. (Case 3) SEM under treatment of chemical digestion. A part of the proliferated bile ductules expands like a globule. The expanded parts are 20 μ m in diameter.

Arrow: Proliferated bile ductule with a poorly developed lumen is cross sectioned.

(**Fig. 9**). これらの細胆管の切断面では、管腔が観察されなかった(**Fig. 9**, 矢印). **Figure 10**は、走査電顕で観察した試料をパラフィン包埋して作製した光顕標本の光顕写真である。消化の際使用したHClのため、核はhematoxylinに染色されていない.²⁾ 試料の表面は、スパッタ・コーティングにより黒くなっている。 **Figure 10A**は、症例2のものであり、間質内に管腔の明らかな細胆管(**Fig. 10A**, 矢頭)が存在し、試料の表面(**Fig. 10A**, 矢印)にも同様な細胆管が観察される。 **Figure 10B**は、症例3のものであり間質内にみられる管腔の明らかなでない細胆管(**Fig. 10B**, 矢頭)と同様な細胆管が試料の表面(**Fig. 10B**, 矢印)に観察される。このようにして、走査電顕で観察された細胆管が、組織学的な定型的あるいは非定型的細胆管に一致していることを確認した。

2. 増生した細胆管の非自由表面像

症例1の間質内で観察された細胆管と症例

2, 3で観察された細胆管の表面を、5,000から10,000倍率で走査電顕的に詳細に観察した。塩酸やコラゲナーゼによる消化の程度の差によるものと考えられたが、観察された細胆管の表面は、大小の小孔が不規則に存在するものから基底板が消化をまぬがれ完全に保たれているものまで種々観察された。塩酸やコラゲナーゼによる消化の時間を一定にしても、細胆管の表面に表現される消化の程度を同一にすることは、特に症例1で困難であった。 **Figure 11A**(症例2), **11B**(症例3)のごとく細胆管の表面が、幅0.1~0.8 μ mまでの小孔や裂溝で縁取られた径約5 μ mの亀甲モザイク状に観察されるものは、消化が基底膜まで進み細胆管の基底膜面が露出された状態のものと考えられた。すなわち、亀甲モザイクの一つ一つが細胆管細胞の基底膜面で、小孔や裂溝の縁取りはその細胞間隙の部分に相当する。このような表面像を呈するものは消化の程度が一定していると考え、

症例2と3においてこのように観察された細胆管については、17,000倍に拡大した写真を作製して詳細に検討した。亀甲状斑紋部のそれぞれ

100個について、細胞間隙に相当すると考えられる小孔あるいは裂溝の最も幅の広い部分を計測して、平均値と標準偏差を求めた。症例2で

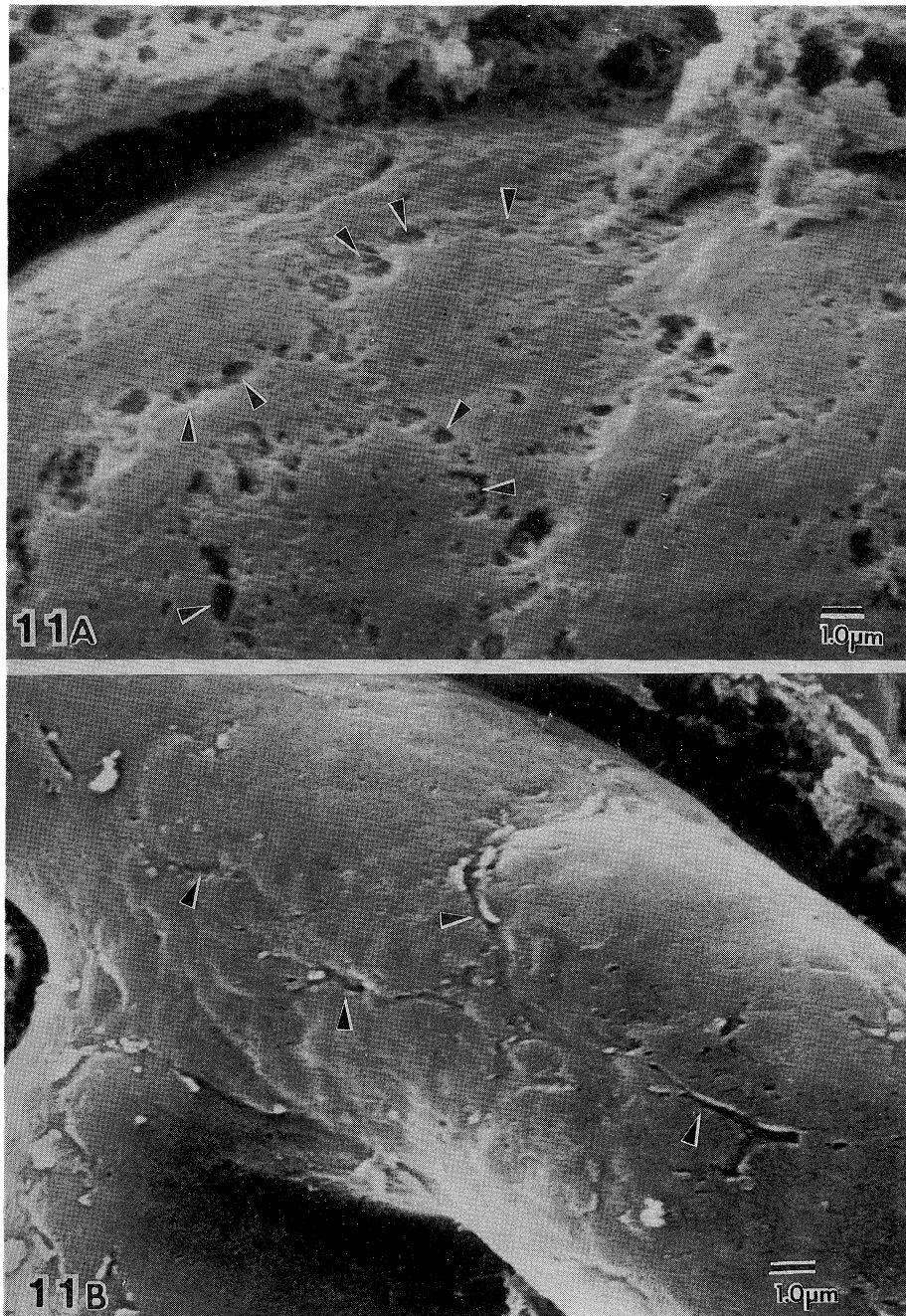


Fig. 11. (Case 3) SEM under treatment of chemical digestion. (A: Case 2, B: Case 3) Higher magnification of proliferated bile ductules. The surface of bile ductules has numerous small pits or fissures (arrowheads). The pits or fissures are likely to correspond to intercellular spaces of the epithelial cells.

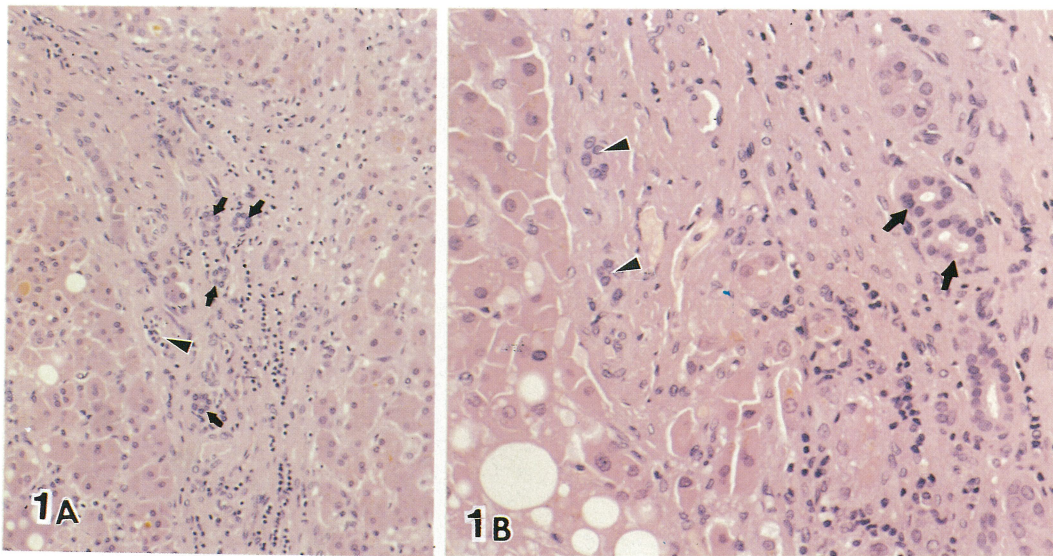


Fig. 1. (Case 1) Light micrograph (LM) of the cirrhotic liver

Arrows: Proliferated bile ductules with a well developed lumen Arrowheads: Proliferated bile ductules with a poorly developed lumen. (hematoxylin and eosin stain, **A** : $\times 100$, **B** : $\times 200$).

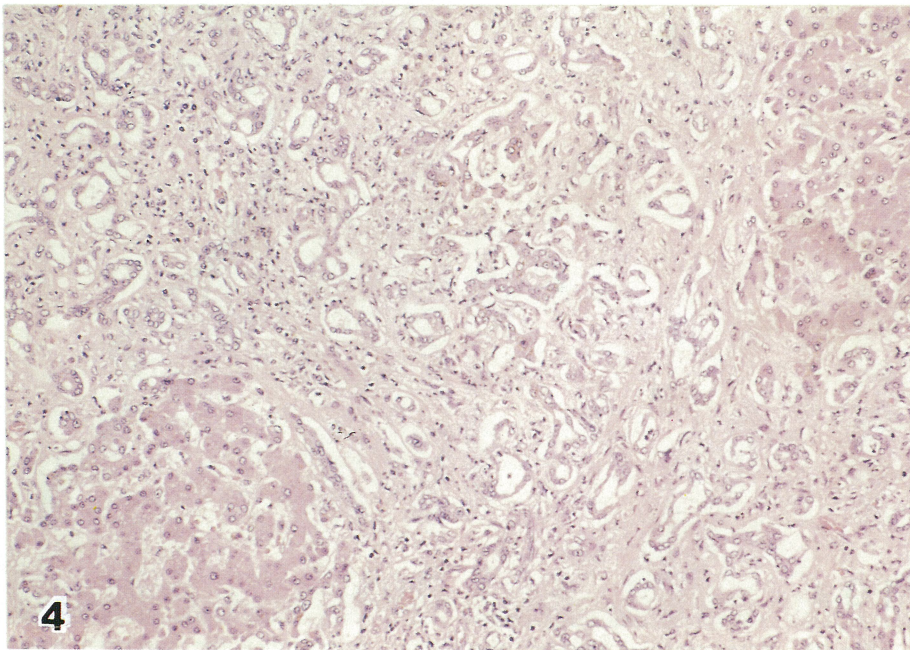


Fig. 4. (Case 2) LM of the specimen with massive hepatic necrosis. Numerous proliferated bile ductules with well developed lumina are seen in the septa (hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

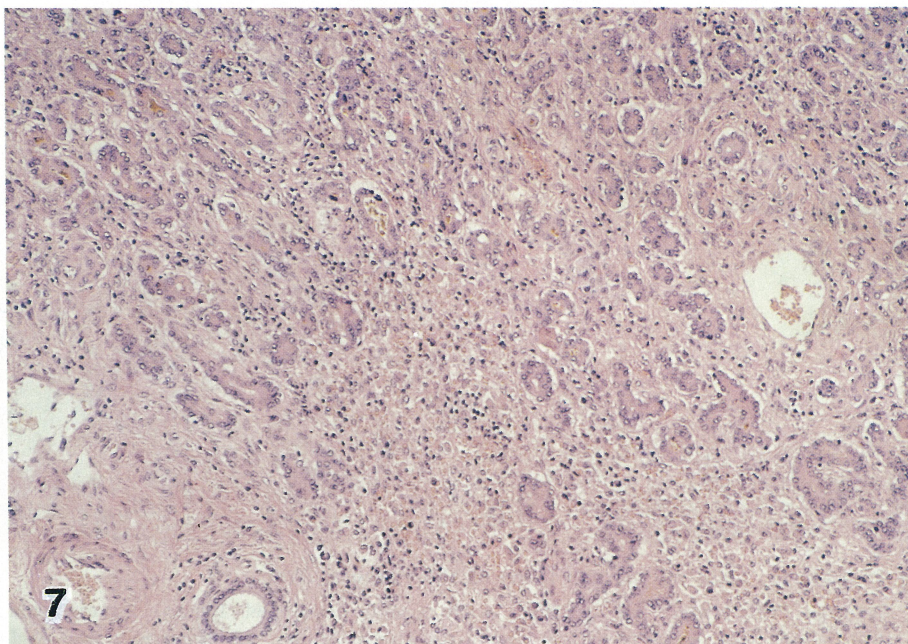


Fig. 7. (Case 3) LM of the subacute hepatitis. Numerous proliferated bile ductules with poorly developed lumina are seen in the septa (hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

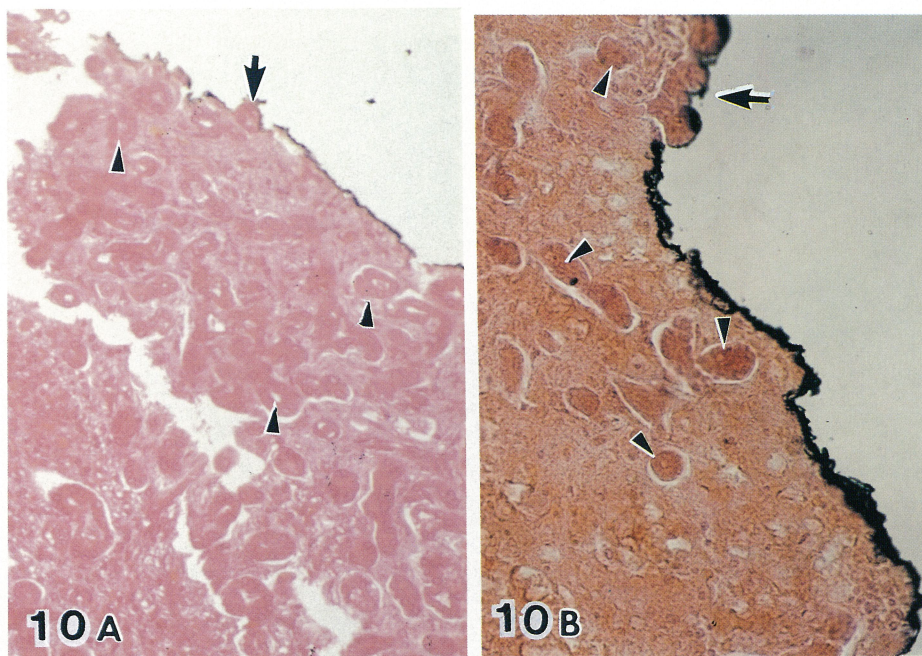


Fig. 10. After scanning electron microscopic observations, the specimen was embedded in paraffin and was treated by conventional methods for light microscopy. **A:** Proliferated bile ductules with well developed lumina (Case 2). **B:** Proliferated bile ductules with poorly developed lumina (Case 3). The bile ductules observed in the septa (arrowheads) are similar to those lying on the surface (arrow) of the specimen with turned black after sputter coating (hematoxylin and eosin stain, **A:** $\times 100$, **B:** $\times 200$).

は $0.74 \pm 0.21 \mu\text{m}$ で、症例 3 では $0.43 \pm 0.16 \mu\text{m}$ であった (Table 1)。さらに、Student's t-test を用いて統計学的有意差を検定した。定型的細胆管増生を呈した症例 2 で観察された小孔や裂溝の幅は、非定型的細胆管増生を呈した症例 3 で観察されたものに比較して有意 ($p < 0.05$) に広がった。

3. 結合組織に残された増生した細胆管の鋳型面

症例 2 の結合組織面には、幅が約 $10 \mu\text{m}$ で、不規則に走行する陥凹が多数観察される部分があった (Fig. 12A)。これらの陥凹は、その幅および走行から多方向性に複雑に吻合しながら走行する管腔をもった細胆管 (Fig. 5) の鋳型にあたると思われた。症例 3 では結合組織面に、幅が $10 \sim 20 \mu\text{m}$ の陥凹が蜂窩状に観察された (Fig. 12B, 矢印)。これらの陥凹は、そ

の幅と蜂窩状に観察されることから、球状の膨らみをもち著しく屈曲・蛇行して走行する管腔をもたない細胆管 (Fig. 9) の鋳型にあたると思われた。Figure 13 は、症例 2 で観察された鋳型面を拡大したものである。鋳型面には、線維芽ないし線維細胞の細胞質の突起や線維が不規則に走行して観察されたが、一部には、写真の下部中央で観察されるように比較的平滑で基板が残存していると考えられる部分もあった。Figure 14 は、症例 3 の管腔を認めず屈曲して走行する細胆管とその鋳型面の拡大写真である。細胆管表面では、基板が比較的良好に保たれているが、鋳型面には、 $1.0 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 幅の裂溝 (Fig. 14, 矢印) や径 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の小孔 (Fig. 14, 矢頭) が多数観察された。鋳型面では消化の程度差が著しく症例 2, 3 においても、消化がほぼ同程度と考えられる像は観察され難かった。

考 察

種々の肝疾患の際出現する胆管様構造物は、その一部が既存の細胆管の増生であるとしても、大部分は肉芽組織内に取り残された肝細胞が胆管細胞化したものとの考えから、従来より偽胆管 (pseudoductule)⁷⁾とも呼ばれてきた。最近では、このような胆管様構造物の数的増加

Table 1. Morphometric quantitation of the widths of intercellular spaces that were observed on the surface of proliferated bile ductules.

	Mean \pm SD (N=100) μm
Case 2	0.74 ± 0.21
Case 3	0.43 ± 0.16

$p < 0.05$

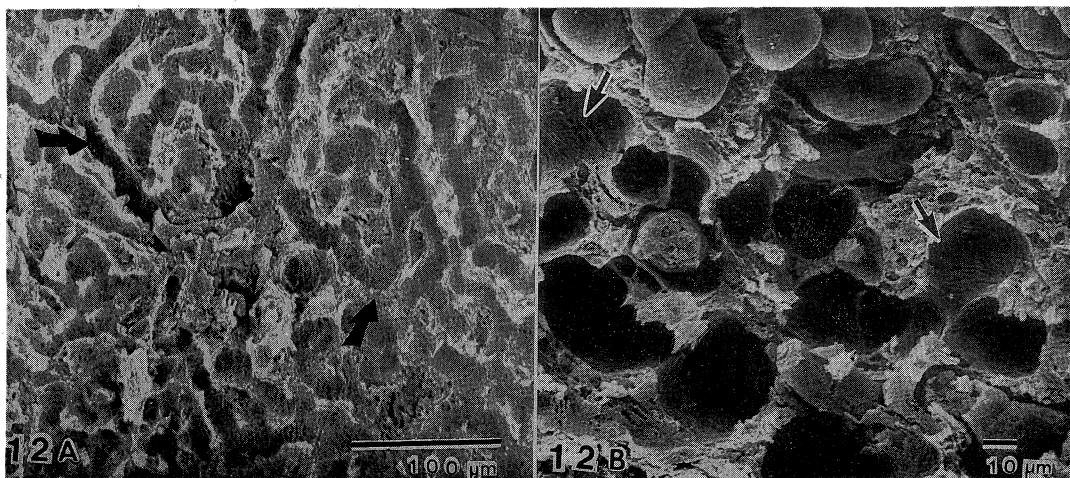


Fig. 12. SEM under treatment of chemical digestion. (A: Case 2; B: Case 3) The casts (arrows) of proliferated bile ductules remain in connective tissue.

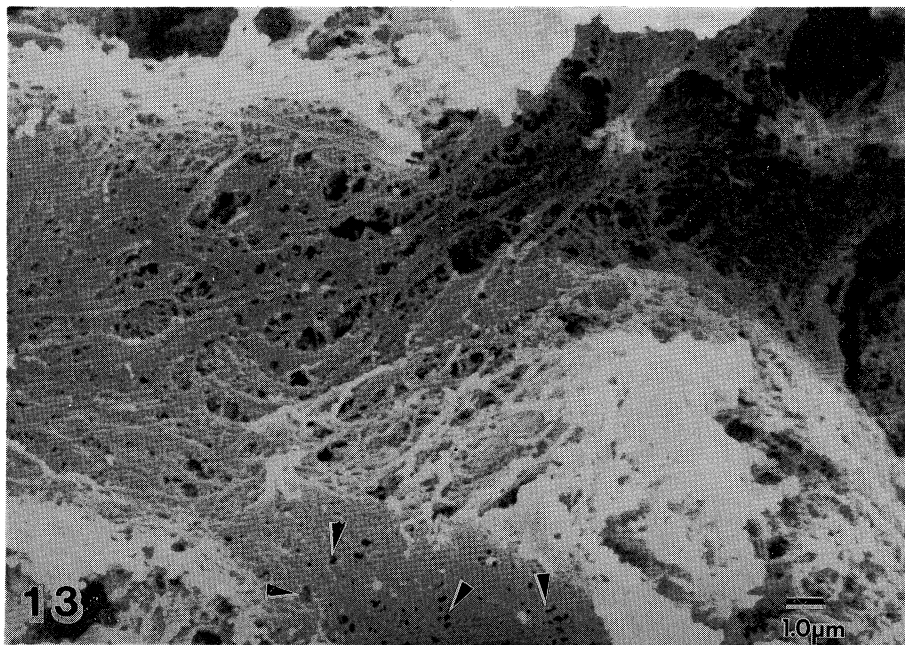


Fig. 13. (Case 2) SEM under treatment of chemical digestion. The connective tissue which has been digested irregularly is molded. On the surface, there are numerous small pits (arrowheads) and a thin meshwork-like layer of fibrocytes or fibroblasts and fine collagen fibers (upper area of the figure).

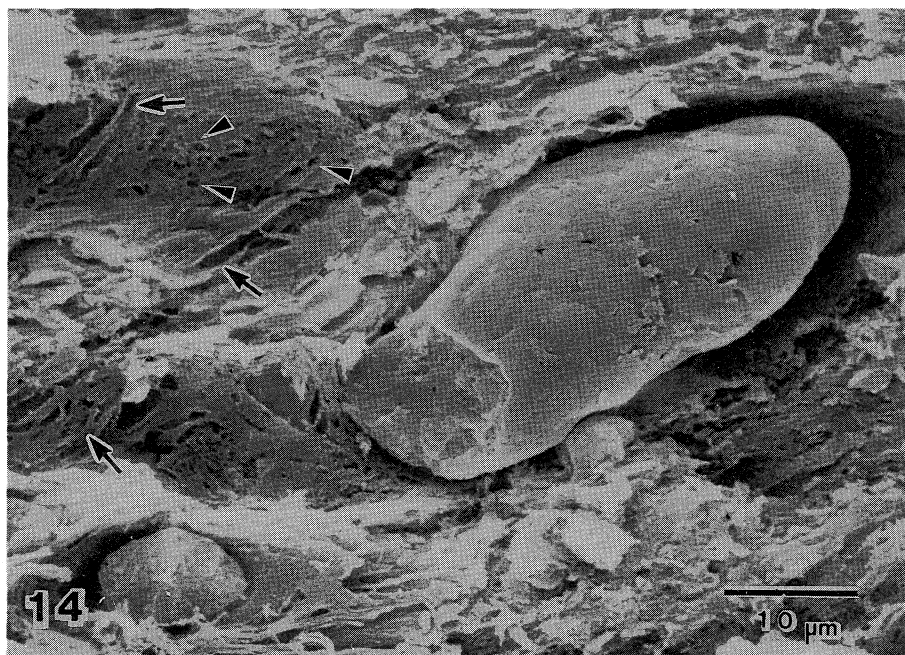


Fig. 14. (Case 3) SEM under treatment of chemical digestion. The most part of the surface of a proliferated bile ductule with a poorly developed lumen is covered with the basement lamina. There are numerous small pits (arrowheads) and fissures (arrows) on the surface of the cast.

を細胆管増生と呼び、組織学的に管腔を形成しつつ増生するものを定型的細胆管増生、そして管腔形成の不完全な場合を非定型的細胆管増生とするのが一般的である。⁶⁾ これら二つの型の細胆管増生は、病因の種類や持続期間によってさまざまな割合で混在して出現する。⁸⁾

増生した細胆管を構成する細胞の由来については、従来より胆管上皮細胞、肝細胞、さらに肝細胞と胆管上皮細胞に共通した stem cell を想定するものなどがある。^{8)~10)} 透過電顕を用いた微細構造の面からもその由来について検討されてきたが、明らかにされていない。⁴⁾ 最近、免疫組織学的研究法の進歩により、非定型的細胆管の上皮細胞には、胆管上皮細胞に存在せず肝細胞に存在する糖蛋白が認められること、¹¹⁾ ケラチンなどの酵素染色性が肝細胞に近いこと¹²⁾ などより、肝細胞の胆管上皮細胞化 (metaplasia) が強く示唆され、これを機会に増生細胆管に対する興味が強くもたれるようになった。そこで、著者は、化学的消化法を用いた走査電顕的観察という新しい方法を利用して、増生した細胆管を詳細に観察し、定型的細胆管と非定型的細胆管の相違を立体的構築およびその非自由表面像について検討した。

1. 増生した細胆管の立体的構築

増生した細胆管の超微形態は透過電顕を用いて観察されたものが多い。^{3), 4)} 不規則に屈曲・蛇行して走行している細胆管を連続切片法を用いて再構築することは多大な労力と時間を要する。鋳型法¹³⁾ では管腔を認めない細胆管の観察は不可能である。したがって、増生した細胆管の立体的構築についての詳細な観察は、本法を用いることによって初めて可能になった。²⁾ 再生結節の輪状構造が明瞭であった症例 1 では、再生結節を取り囲むように増生した細胆管と、その外側に存在する管腔の明らかな細胆管が光顕的に観察されたが、それぞれに対応する増生細胆管を本法では非自由表面から三次元的に観察することができた。得られた所見は、小林の方法²⁾ とほぼ一致していた。かかる研究における本法の重要性が確認できた。

細胆管の増生には、明瞭な管腔を形成しつつ増生する定型的細胆管増生と、明瞭な管腔を認めない非定型的細胆管増生があり、症例 2 は前者が、そして症例 3 は後者が著明な材料であった。症例 2 では明瞭な管腔を形成しながら増生する定型的細胆管の立体的構築 (Figs. 5, 6) を明らかにすることができ、症例 3 では明らかな管腔を形成しないで増生する非定型的細胆管の立体的構築 (Figs. 8, 9) を明らかにすることができた。すなわち、前者は多方向性に複雑に吻合しながら走行し、後者は連珠状の膨らみをもち、複雑な吻合を形成しながら屈曲・蛇行しており、両者間には立体的構築上にも差があることがわかった。

2. 増生した細胆管の非自由表面像

増生した細胆管の基底側や基底板の微細構造は、超薄切片法を用いた透過電顕的観察⁴⁾ によりすでに詳細に報告されている。しかし、基底膜面を非自由表面から立体的に観察した報告は、教室の小林の報告²⁾ 以外にはない。HCl-collagenase 法には、消化時間が長いと細胞の収縮と細胞の表面にあばた様の小孔が生じやすく、消化時間が短いとコラーゲンや基底板が残存して細胞表面構造を観察できないという問題点¹⁴⁾ がある。本研究でも、特に症例 1 では消化の程度を一定にすることが困難であった。しかし、症例 2 と 3 においては、同程度の消化を受けた試料が得られた。その理由は、広範肝壊死後の新しい時期のもので間質の膠原化が完成していないことによるものと考えられた。

基底膜面からみた細胆管細胞間の細胞間隙に相当する亀甲状斑紋の縁取り (Fig. 11, 矢頭) の幅は症例 2, 3 とともに広がったが、両者間での定量的解析を行った。Table 1 のごとく症例 2 の管腔構造の明瞭な細胆管の基底膜側の上皮細胞間隙は、症例 3 の管腔構造の不明瞭な細胆管の基底膜側の上皮細胞間隙より有意に幅が広がった。佐々木⁴⁾ は増殖時にある細胆管では基底側の上皮細胞間隙の拡大が認められることを透過電顕で観察し報告している。著者の観察でもそうであった。Sasaki ら¹⁵⁾ の言うごとく、

胆管上皮細胞は管腔側から細胞内を介して基底側細胞間隙へ物質を移送するという吸収機能を有している。そして、基底側の上皮細胞間隙が拡大していることは、胆管細胞の吸収機能が亢進していることを形態的に示す所見と考えられる。明瞭な管腔を形成しつつ増生する細胆管と、管腔形成の不明瞭な増生細胆管との間には、基底側の上皮細胞間隙の幅に差異があり、前者で有意に広いことを明らかにすることができた。両者間には機能的にも差異があると考えられる。

3. 結合組織に残された増生した細胆管の鋳型面

結合組織面に残された細胆管の鋳型からは、それぞれの細胆管の形状や走行が裏付けられた(Fig. 12)。Figures 13, 14で示されるような比較的消化の影響の少ない鋳型面に観察された小孔や裂溝は、線維細胞ないし線維芽細胞間の間隙と考えられたが、試料により消化の程度の

差が胆管の表面の観察の場合より大きく、一定の所見が得られなかった。したがって、明瞭な管腔を形成しながら増生する細胆管と管腔形成の不明瞭な細胆管についての鋳型面からの詳細な検討は不可能で、それらの走行の差異を知ることができたのみであった。理由は本法が、この場合の観察対象となる結合組織成分を化学的に消化して観察するという方法論によるものであり、鋳型面の詳細な検討には、細胞成分を消化除去し、結合組織の線維性要素を残存させて観察する方法¹⁶⁾が必要であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った小林敏成教授に深甚なる謝意を表します。

また、剖検肝を提供していただいた川崎医科大学人体病理学教室 伊藤慈秀教授に深謝します。

技術的援助をいただいた上平正子氏、増地智子氏に感謝します。

なお、本論文の要旨は第22回日本肝臓学会西部会においてその一部を発表した。

文 献

- 1) Evan, A. P., Daii, W. G., Dammrose, D. and Paimer, C.: Scanning electron microscopy of cell surface following removal of extracellular material. *Anat. Rec.* 185 : 433—446, 1976
- 2) Kobayashi, K., Nosaka, Y., Sudo, J., Asakura, Y. and Kobayashi, T.: Proliferated bile ductules observed by scanning electron microscopy using the chemical digestion method after liver capsule mechanical stripping. *J. Electron Microsc.* 33 : 375—377, 1984
- 3) Schaffner, F. and Popper, H.: Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *Am. J. Pathol.* 38 : 393—410, 1961
- 4) 佐々木博: 肝内胆管系上皮細胞 (Biliary epithelial cell) の微細構造. *日臨* 23 : 1439—1455, 1965
- 5) Tanikawa, K.: Ultrastructure aspects of the liver and its disorders. Tokyo, Igakushoin. 1978
- 6) 中沼安二: グリソン鞘—とくに胆管系の正常構造とその異常の形態学. *病理と臨* 5 : 642—648, 1987
- 7) 奥平雅彦: 肝の構造. 高橋忠雄編: 肝臓—構造・機能・病態生理. 東京, 医学書院. 1976, pp. 21—61
- 8) Desmet, V. J.: Intrahepatic bile ducts under the lens. *J. Hepatol.* 1 : 545—549, 1985
- 9) 森 道夫, 小川勝洋: 肝内胆道系の形態. 織田敏次編: 肝臓の研究 I. 東京, 同文書院. 1987, pp. 15—20
- 10) 古賀明俊: ヒト胎児における肝内胆管系の微細構造—2 移行部 (Hering 管)—. *肝臓* 14 : 706—710, 1973
- 11) Uchida, T. and Petters, R. L.: The nature and origin of proliferated bile ductules in alcoholic liver disease. *Am. J. clin. Pathol.* 79 : 326—333, 1983
- 12) Nakanuma, Y. and Ohta, G.: Immunohistochemical study on bile ductular proliferation in various hepatobiliary diseases. *Liver* 6 : 205—211, 1986
- 13) Yamamoto, K., Fisher, M. M. and Phillips, M. J.: Hilar biliary plexus in human liver—A com-

parative study of the intrahepatic bile ducts in man and animals—. *Lab. Invest.* 52 : 103—106, 1985

- 14) 村上正浩, 杉田 新: 塩酸・コラゲナーゼ消化法 (Evan) の SEM 生物試料への応用と検討. *細胞* 13 : 38—43, 1981
- 15) Sasaki, H., Schaffner, F. and Popper, H.: Bile ductules in cholestasis: Morphologic evidence for secretion and absorption in man. *Lab. Invest.* 16 : 84—95, 1967
- 16) Ohtani, O.: Three-dimensional organization of the connective tissue fibers of the human pancreas. A scanning electron microscopic study of NaOH treated tissues. *Arch. Histol. Jpn.* 50 : 557—566, 1987