

I 総 説

肝障害動物モデルと薬効評価

和漢薬研究所・免疫機能制御部門

徐 強

一. はじめに

肝炎はよく見られる難病の一種であり、その病原としてウイルス、薬物、アルコールおよび自己免疫反応などが挙げられる。そのうち、ウイルス性肝炎（とくにB型とC型肝炎ウイルスの感染によるもの）が多く、これらの持続感染により慢性化となり、嚴重の場合は肝硬変、肝癌まで至る。肝炎の慢性化進展における詳細なメカニズムについてはまだ解明されていないが、免疫学的機序の関与が多く報告されている。¹⁻⁶⁾ 例えば、B型肝炎はウイルス感染だけでは発症せず、T細胞を介した細胞性免疫反応、すなわち、B型肝炎ウイルス (HBV)-encoded antigen と antigen-specific T lymphocyte との反応により肝障害が発症すると考えられている。⁵⁾ このことはB型肝炎患者の血中及び肝内 lymphocyte population においてHBV-specific T細胞が存在することなどから証明される。²⁻⁴⁾ その他のウイルス性肝炎及び自己免疫性肝炎、薬物性肝炎、アルコール性肝炎などの過程にも細胞性免疫反応による機序が報告されている。⁷⁻¹⁰⁾ 一方、肝炎の慢性化進展にともなって生体免疫機能の低下もしばしば見られる。

しかし、肝炎の発症と進行における免疫学的機序は必ずしも明かではない。治療に際しては、その複雑な経過に応じて行うべきであるが、特効な治療法や治療薬は見い出されていないので、インターフェロン療法を主とする抗ウイルス療法と肝庇護療法を含む対症療法またはステロイド短期離脱療法などに頼るところが多い。従来の肝庇護剤、抗ウイルス剤、免疫調節剤およびsteroid剤の多くはある程度の症状、肝機能改善作用などを示すにすぎなく、重篤な副作用を示すものさえある。新しい肝炎治療薬を創るには動物モデルが不可欠であるが、臨床肝炎の病理過程に接近しているものが少ないので、肝炎新薬の開発は難航の状態にあるとは言いすぎではない。如何に肝炎の発症と進行過程を科学的に解明し、それに対する新しい薬効評価法

を確立することは大変重要な課題である。そこで、本文は従来の肝障害動物モデルについて若干紹介し、その上加わった新しい肝障害モデルの作成及びその性質、薬効評価への有用性、漢方方剤や生薬の影響などに関する研究について著者の研究室からのデータをまとめたい。

二. 従来の肝障害動物モデル

1. 化学物質によるもの

1) CCl₄ 肝障害: CCl₄ を動物(マウス, ラット, ウサギなど)に1回経口, 腹腔内投与, あるいは皮下注射などにより急性肝障害が発症し, 最も一般的な実験的肝障害モデルとして広く利用されている。その主な発症機序としてCCl₄が肝実質細胞内の薬物代謝酵素によりfree radical CCl₃・を生じ, 細胞内小器官の膜脂質過酸化を行うことなどが知られている。^{11, 12)} その障害過程から見ると, 肝炎ではしばしば慢性化する症例が見られるのに反してこの肝障害は短時日内にまったく正常に回復する。このようにCCl₄肝障害はきわめて急速に進展するが, 急速に消褪していくので, 薬効の検討は予防実験の型をとらざるを得ない。慢性化にするためには, CCl₄の反復投与が実行される。この場合, 血清酵素活性の持続的上昇と臨床慢性肝炎にみられる繊維増生などが再現できるが, 臨床肝炎とは異なって, 生体側の防御機構ではなく外来の化学物質により肝障害が惹起または維持されているのであろう。

2) D-galactosamine (D-GalN) 肝障害: D-GalNをラットをはじめとする実験動物に腹腔内に投与すると, 24-48時間後に病理形態学的にも病態生化学的にもヒトのウイルス肝炎に類似した肝病変を作り出すことが早くから報告された。¹³⁾ その発生機序について多数の報告は見られるが, その一つとしてUDP-sugar patternのchange, uridine phosphateのtrapping, hepatic uracil nucleotideのincreaseなどによって肝細胞の機能障害をもたらすと言われてきた。¹⁴⁾ この肝

障害モデルも主に肝庇護剤の薬効評価に用いられてきている。そのほか、lipopolysaccharide (LPS) と併用投与した炎症性急性肝障害も薬効評価に使われている。^{15,16)} また、CCl₄ の場合と同様に慢性化するためには、D-GalN の反復使用が必要となる。

CCl₄ と D-GalN 肝障害のほか、 α -naphyl isothiocyanate,¹⁷⁾ prednisolone (Pred)¹⁸⁻²⁰⁾ などによる肝障害または胆道障害なども病理学的及び薬理学的研究に使われている。以上の化学物質による肝障害モデルは hepatoprotective agents の薬効評価に対して大変有用であるが、免疫系作用薬の評価には不適であると考えられている。

2. ウイルスによるもの

ウイルス性肝障害モデルはヒトのウイルス性肝炎に対する薬効評価にとってきわめて重要である。従来の動物ウイルス性肝炎のうち、ダックの B 型肝炎モデルが *in vivo* の抗肝炎ウイルスモデルとして使われてきている。^{21,22)} しかし、ダックの免疫 system は十分分かっていないため、肝炎ウイルスに対する免疫抵抗機序の評価には不適である。また、このモデルで評価した薬物の有効性は実際の臨床効果との不一致もあると指摘されている。

ヒト肝炎ウイルスによるモデルとして、近年に HBV の transgenic mice が作成され、その病理過程を解明してきている¹⁾ が、薬効評価への応用はまだ見られていない。

3. 免疫学機序によるもの

肝障害の発症と進展に免疫学的機序の関与が認識されたため、免疫性肝障害の作成も試みられた。主に homologous antigen または heterologous anti-liver antibody を注射することにより肝障害を惹起した。²³⁻²⁶⁾ その本質は肝成分に対する抗原抗体反応であり、自己免疫性肝炎に類似した症状がみられる。これらのモデルの作成は肝障害の免疫学的機序の解明および肝炎薬物の免疫薬理学的研究に対して大きな進歩を与えたと言えよう。さらに Propionibacterium acnes や Corynebacterium parvum, Bacillus Calmette - Guerin (BCG) などで priming して LPS で eliciting したモデル、すなわち炎症性細胞浸潤を中心とする肝障害も用いられるようになった。^{26,27)}

しかし、臨床肝炎の発症及び進行にかかわる細胞性免疫反応による肝障害モデルは依然として少なく、とくに慢性肝障害モデルはほとんど報告がみられない。いままで上述のモデルを用いた肝障害の免疫学的研究のほとんどは急性の方に focus されていた。周知のとおり、肝炎に対する痛手は慢性化にあり、その慢性化進行過程に対して不明のまま薬物の作用点を選ぶことは大変困難であろう。

三. 細胞性免疫反応による肝障害モデルの作成、その性質および創薬への試み

1. picryl chloride (PCI) または sheep red blood

Table I Changes of various biochemical parameters and liver index in PCI-DTH-induced liver injury mice^a

Item	Control 1 ^b	Control 2 ^c	Treatment
ALT (Karmen unit)	30±12	32±13	429±93 ^{e,g}
AST (Karmen unit)	125±58	142±32	555±56 ^{e,g}
AP (U/l)	154±57	151±35	103±39 ^f
LDH (U/l)	1387±128	1379±88	1347±88
TP (g/dl)	4.95±0.58	4.89±0.63	4.93±0.56
Alb (g/dl)	2.61±0.16	2.65±0.42	2.50±0.28
MDA (nmol/g)	495±151	552±227	1160±680 ^{d,f}
Hyp (μg/g)	61±15	60±18	62±20
Liver index (×10 ⁻²)	5.6±0.3	5.5±0.5	5.4±0.3

^a BALB/c mice were sensitized twice and challenged in the liver with PCI. AP, alkaline phosphatase; LDH, lactic dehydrogenase; TP, total protein; Alb, albumin; MDA, molondialdehyde; Hyp, hydroxyproline; Liver index, liver weight/body weight (mg/g). Each figure indicates the mean±SD of 6-8 animals.

^b Olive oil challenge in sensitized mice.

^c Single injection of 0.2% PCI into the liver of normal mice.

^d P<0.05 and ^e P<0.01 when compared with Control 1 group.

^f P<0.05 and ^g P<0.01 when compared with Control 2 group.

cell (SRBC) による遅延型アレルギー反応 (DTH) を用いた肝障害の誘導

DTH 反応は単球やリンパ球などの浸潤を特徴とする炎症反応であり、典型的な細胞性免疫反応として知られている。われわれは臨床肝炎の細胞性免疫病理過程を模擬するために、この DTH 反応をマウスの肝臓に導入して炎症を引き起こすことを試みた。方法は以下のものである。あらかじめ剃毛したマウスの腹部に 1% PCI のエタノール溶液 0.1 ml を 5 日毎に 2 回塗布して感作し、その 5 日後に 0.2-0.5% の PCI の olive oil 溶液 10 μ l を肝内に注射して DTH 反応 (PCI-DTH) により肝障害を惹起した。24 時間後に血清中の transaminases 活性を測定すると共に肝組織病理学的検査を行った。その結果、血清 alanine transaminase (ALT) および aspartate transaminase (AST) 活性などが著しく上昇し (Table I)、広範の肝細胞壊死、炎症性細胞の浸潤などの組織像も見られ、肝障害の成立が示唆された。この肝障害は抗原感作の回数の増加または cyclophosphamide (Cy) の抗原感作前処置によって増強され、肝内における DTH 反応の強度に依存することが明らかになった。さらに興味深いこととして、本モデルの肝組織障害は肝内注射部位に限られず、より広範囲の時には肝全体まで起きている。^{28, 29)} このことは耳、足蹠で観察した従来の限局的 DTH 反応と異なって、その理由はまだ分からないが、肝障害の悪化との関連性が注目されるべきであろう。

また、マウスに 2×10^8 個の SRBC を腹腔内に 5 日間おきに 2 回注射して免疫し、その 5 日後に 10^8 個の SRBC を肝内に注射して肝障害を惹起することもできた。24 時間後に肝臓重量の増加、血清 ALT、AST 活性の上昇などが見られ、組織病理学的変化としては肝細胞の壊死、炎症性細胞の浸潤など、大体 PCI-DTH 肝障害と類似した。また、肝重量が増加すると共に、肝細胞の瀰漫性水様変性などがみられた。さらに、この肝障害も免疫反応を増強することによって強まることになった。³⁰⁾

2. PCI-DTH 肝障害の発症における細胞および分子機構

PCI で 2 回感作して 4 日後のマウス脾細胞を採取し、正常同系マウスに全身的に移入し、20 時間後に PCI で肝障害を惹起した。recipient マウスにおいて血清 ALT および AST 活性は有意に上昇したことから、免疫脾細胞によって肝障害が受身移入されたと示唆される。この脾細胞をあらかじめ anti-Thy 1.2 または anti-CD4 抗体で処理すると、ALT および AST 活性の上昇はほぼ完全に抑制されたが、anti-CD8 抗体に

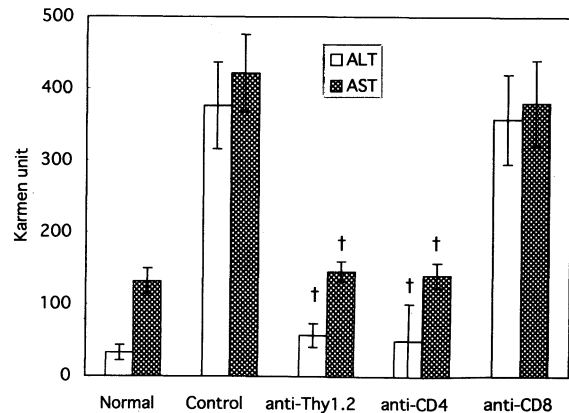


Fig. 1 Effect of various monoclonal antibodies on the ability of spleen cells from PCI-immunized BALB/c mice to adoptively transfer liver injury. Normal BALB/c mice were inoculated iv 4×10^7 spleen cells from normal mice or the mice that were twice immunized with PCI 4 days before. Twenty hours later, they were challenged with 10 μ l of 0.2% PCI in olive oil into the liver to elicit the liver injury. In the antibody-treated groups, the spleen cells were pretreated with anti-Thy 1.2, anti-CD4, and anti-CD8 antibody plus complement, respectively, before inoculation. Each column represents the mean \pm SD of 5 animals. † $p < 0.01$ vs control.

よる処理は影響を及ぼさなかった (Fig. 1)。このことから CD4⁺ T 細胞がこの肝障害の発症において重要な役割を演ずることが明らかになった。²⁹⁾

著者ら最近の研究により、この肝障害の発症において、脾リンパ球及び肝内 nonparenchymal cell (NPC) 表面 lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)、ならびに parenchymal hepatocyte (HC) 表面の intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現は有意に増加することを判明した。さらに肝障害マウス HC をその自身の脾細胞または NPC と共に培養すると、上清中に ALT 活性の上昇が認められた。すなわち、肝細胞は生体の免疫細胞により障害が与えられた。免疫細胞の肝内浸潤は肝細胞の障害と破壊を引き起こす直接な原因となることが示唆された。また、肝細胞との共同培養の前に anti-ICAM-1 抗体で HC をまたは anti-LFA-1 抗体で脾細胞や NPC を結合させることによって、免疫細胞による肝細胞への障害作用はほぼ完全に抑制された (submitted data)。これらの成績から、免疫細胞表面にある LFA-1 分子と肝細胞表面の ICAM-1 分子の結合は肝障害に導く重要なステップであることが示唆される。

3. PCI-DTH 肝障害の慢性化過程およびその免疫

調節

肝臓内に1回DTH反応を導入することにより惹起された肝組織障害は数ヶ月も続いていることを発見した。この現象はきわめてユニークであり、皮膚で起こる通常の一時的DTH反応と異なって、従来の肝障害モデルにおいても類似的な報告はほとんど見られない。そこで、この慢性化過程をBALB/c, ICRおよびKunmingの3種マウスにて連続9週間観察し、生化学、免疫学及び組織学的検討を行った。その結果、多くのパラメーターにおいて3種マウスのいずれでも類似的な変化が認められた。例えば、血清lactic dehydrogenase (LDH)とprolidase活性および肝組織hydroxyproline (Hyp)含量は有意且持続的に増加し、血清alkaline phosphatase活性、albumin含量と肝重量はBALB/cとKunmingマウスでは著明に低下した。

組織病理像は障害1日後では、肝細胞のcoagulation necrosis, inflammatory infiltrationなどは特徴的であり、その数週間にも存続した。多くのマウスではこれらの特徴は多少軽減し、かわりに肝細胞の変性とKupffer細胞の増殖、結合組織の増生、肝細胞の再生などが現れたが、一部のマウスではportal areaの拡大、さらにbridging necrosisまで至った (Fig. 2)。このことは肝臓においてone-shotなDTH反応を起こすことによって、持続的な肝障害慢性化状態になることを示唆した。³¹⁾

さらに、この慢性化状態のマウスを用いてPCIに対するDTH応答能力について検討した。この肝障害マウスにおけるDTH反応は著明に低下し、PCIに対するサプレッサー細胞の産生が示唆された。そこで、肝障害マウスの脾リンパ球をrecipientマウスに肝障害



Fig. 2 Bridging necrosis between two portal areas in the liver of BALB/c mice with PCI-DTH Liver Injury. (H & E 100-fold)

誘発と同時に移入すると、肝障害1週後のdonorによっては、recipientマウスの肝障害を有意に増強したが、3-8週後のdonorは肝障害を抑制した。これらのdonor脾細胞のT細胞subpopulationを調べたところ、CD4⁺/CD8⁺ ratioは1週後では増加したが、3週以後では著明に低下した (submitted data)。このことからT細胞は肝障害の慢性化進展において重要な調節作用を果たしていることが示唆される。

4. PCI-DTH肝障害に対する既知肝炎薬物の影響

マウスに肝障害を惹起し、PCIによる初回感作日から10日間それぞれ肝細胞底護薬のbiphenyl dimethyl-dicarboxylate (BDD), Silybin (Sil), 免疫調節薬のKrestin (PSK), および免疫抑制薬のCyおよびPredをそれぞれ投与した。BDDとCyのいずれも血清ALT活性を有意に抑制し、Silは抑制の傾向を示したが、PSKは影響を及ぼさなかった。Predは強い免疫抑制作用を示すにもかかわらず、免疫反応による肝障害をさらに増悪した。これらの薬物をPCI肝内注射の0, 5および10時間後に連続3回投与すると、PSKとCyは有意にALTを抑制したが、その他の薬物は影響を及ぼさなかった。さらに、これらをPCI肝内注射後連続4週間投与した。PSK, glycyrrhizin (Gly) およびmalotilate (Mal)は肝障害を明らかに改善した。Cyは障害後2週まで改善効果を示したが、その後は無効となった。一方、Predは肝障害をさらに悪化させ、3週内に動物を死にさせた。以上のことから、これらの薬物はこの肝障害モデルに対して各自の特徴をもって有効性を示したので、このモデルは肝炎治療薬の評価に有用であると示唆される。^{32, 33)} また、Predによる肝障害の悪化は肝細胞への直接障害作用による可能性¹⁸⁻²⁰⁾が考えられ、慢性肝炎に対するsteroidal therapyのリスクとimmunosuppressive therapyの限界も感じられる。

5. PCI-DTH肝障害に対するDTH抑制生薬の影響

DTH反応はeffector T細胞の産生誘導過程であるinduction phaseと、lymphokineの遊離及びそれによる炎症過程のeffector phaseとに大きく分けられる。また、この反応は4種のアレルギー反応のうちで、ステロイドによって最も強く抑制されることが特徴である。しかし、ステロイドには重篤な副作用や長期投与後の離脱困難など、種々の問題を抱えている。われわれはPredをDTH各段階に用いてDTH抑制作用を観察したところ、抗原感作前、感作後から惹起前までまたは惹起後のいずれの投与によってもDTH反応は著明に抑制されることを明らかにした。さらに、清熱

利湿, 解毒などの効果を持つ種々の生薬や漢方方剤を用いて検討した結果, Predの作用様式と異なったものをいくつか見出した。そのうち, 蒺藜³⁴⁾は induction phaseのみを, 龍胆³⁵⁾および二妙散³⁶⁾は両 phaseをも抑制したが, いずれも抗炎症作用は示さなかった。土茯苓³⁷⁾, 白鮮皮³⁸⁾, 苦参³⁹⁾, 地膚子³⁹⁾, 赤芍³⁹⁾は effector phaseを抑制したが, induction phaseにはほとんど影響を及ぼさなかった。また, 中国産短葶山麦冬から抽出精制した ruscogenin 1-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)] $[\beta$ -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-fucopyranoside (Rusco)は両 phaseの抑制と共に抗炎症作用を示したが, Predのような臓器への抑制は示さなかった。⁴⁰⁾そこで, これらの生薬や漢方方剤を DTH 肝障害に用いた。その結果, 蒺藜³²⁾, 龍胆⁴¹⁾および二妙散³²⁾は induction phaseに, 土茯苓³²⁾, 白鮮皮³²⁾, 苦参³²⁾は effector phaseに, Ruscoは両 phaseのいずれにも投与することによって, それぞれ肝障害の各指標を明らかに改善した。さらに, これらの薬物を同一マウスを用いてそれぞれ induction phaseおよび effector phaseに併用投与すると, 蒺藜と土茯苓, 二妙散と白鮮皮の併用は各単独投与に比して有意に血清トランスアミナーゼ低下作用を増強した。³²⁾したがって, 本研究で見出した DTH 抑制作用を有する数種生薬はこの肝障害モデルに対しても有効性を示したので, 肝疾患治療への応用が期待され, これらの生薬の組み合わせはさらに有用な治療手段になりうるものと思われる。また, これらの生薬からいくつかの有効成分をも見つけたので, 新薬開発への研究は現在続行中である。

四. 結 語

慢性肝炎は人類の健康にきわめて害する疾患の一つである。近年, 肝炎の病原病理学的には大きな進展を遂げてきているが, 理想的な治療法や治療薬については未だに見い出されていない。このような難病に対する新しい薬物の開発には疾病の病理過程の解明が必要であり, その病理過程に接近する病態モデルの作成は大変重要な一環である。本文は肝障害の病態動物モデルおよび薬効評価の現状について概説し, 病態モデルを用いた肝障害発症と進展に関するメカニズム解明の重要性を著者の観点から強調した。その努力の一つとして, 著者らが作成した細胞性免疫反応による肝障害モデルおよびその生化学, 免疫学ならびに病理学的性質は臨床に重要な参考意義を示したので, novelな肝炎治療薬の研究に重要な手段になりうるものと思われる。従来の肝障害動物モデルとともに活用し, より理想的な肝炎治療薬の発見を大いに期待する。

参考文献

1. F.V. Chisari and C. Ferrari, Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann. Rev. Immunol.* 1995 ; **13** : 29-60.
2. M. Mondelli, G.M. Vergani, A. Alberti, D. Vergani, B. Portmann, A.L.W.F. Eddleston, and R. Williams, Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection : evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J. Immunol.* 1982 ; **129** : 2773-8,
3. C. Ferrari, A. Penna, T. Giuberti, M. J. Tong, E. Ribera, F. Fiaccadori and F.V. Chisari, Introhepatic, nucleocapsid antigen-specific T cells in chronic active hepatitis B. *J. Immunol.* 1987 ; **139** : 2050-8.
4. V. Barnaba, A. Franco, A. Alberti, C. Balsano, R. Benvenuto and F. Balsano, Recognition of hepatitis B virus envelope proteins by liver-infiltrating T lymphocytes in chronic HBV infection. *J. Immunol.* 1989 ; **143** : 2650-5.
5. T. Moriyama, S. Guilhot, K. Klopchin, B. Moss, C.A. Pinkert, R.D. Palmiter, R.L. Brinster, O. Kanagawa and F.V. Chisari, Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B transgenic mice. *Science* 1990 ; **249** : 361-4.
6. M. Peters, J. Vierling, M.E. Gershwin, D. Milich, F.V. Chisari and J.H. Hoofnagle, Immunology and the liver. *Hepatology* 1991 ; **13** : 977-94.
7. U. Spengler, M. Lechmann, B. Irrgang, F.L. Dumoulin, and T. Sauerbruch, Immune responses in hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 1996 ; **24** (Suppl. 2), 20-25.
8. E.B. Martins, A.K. Graham, R.W. Chapman, and K.A. Fleming, Elevation of gamma delta T lymphocytes in peripheral blood and livers of patients with primary sclerosing cholangitis and other autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1996 ; **23**, 988-993.
9. H. Tsutsui, Y. Terano, C. Sakagami, I. Hasegawa, Y. Mizoguchi, and S. Morisawa, Drug-specific T cells derived from patients with drug-

- induced allergic hepatitis. *J. Immunol.* 1992 ; **149**, 706-716.
10. P. Burra, S.G. Hubscher, J. Shaw, E. Elias, and D.H. Adams, Is the intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function associated antigen 1 pathway of leukocyte adhesion involved in the tissue damage of alcoholic hepatitis? *Gut* 1992 ; **33**, 268-271.
 11. T.F. Slater, Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat : a speculative mechanism based on activation. *Nature* 1966 : **209**, 36-40.
 12. E. Gordis, Lipid metabolites of carbon tetrachloride. *J. Clin. Invest.* 1969 ; **48**, 203-209.
 13. D.O.R. Keppler, R. Lesch, W. Reutter, and K. Decker, Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Path.* 1968 ; **9**, 279-290.
 14. D. Keppler, J. Rudigier, E. Bischoff, and K. Decker, The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine, and 2-deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur. J. Biochem.* 1970 ; **17**, 246-253.
 15. A. Wendel, G. Tiegs, and C. Werner, Evidence for the involvement of a reperfusion injury in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 1987 ; **36**, 2637-2639.
 16. K. Hase, S. Kadoda, P. Basnet and T. Namba, Hepatoprotective effects of traditional medicines. Isolation of the active constituent from seeds of *Celosia argentea*. *Phytotherapy Res.* 1996 ; **10**, 387-392.
 17. S. Goldfarb, E. Singer, H. Popper, Experimental cholangitis due to Alpha - naphthyl - isothiocyanate (ANIT). *Amer. J. Path.* 1962 ; **40**, 685.
 18. G. Liu, G. Wang, H. Wei, T. Bao and Z. Song, A comparison of the protective actions of biphenyl dimethyl-dicarboxylate, trans-stilbene, alcoholic extracts of *Fructus schizandrae* and *Ganoderma* against experimental liver injury in mice. *Acta Pharmaceutica Sinica* 1979 ; **14** : 598-604.
 19. G. Liu, Therapeutic effects of biphenyl dimethyl dicarboxylate (DDB) on chronic viral hepatitis B. *Proc. Chin. Acad. Med. Sci. Beijing Union Med. Coll.* 1987 ; **2** : 228-233.
 20. T. Fu, and G. Liu, Protective effects of dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene diox-ybiphenyl - 2,2'-dicarboxylate on damages of isolated rat hepatocytes induced by carbon tetrachloride and D - galactosamine. *Biomed. Environ. Sci.* 1992 ; **5** : 185-194.
 21. A. Y. Howe, M. J. Robins, J. S. Wilson, and D. L. Tyrrell, Selective inhibition of the reverse transcription of duck hepatitis B virus by binding of 2',3'-dideoxyguanosine 5'-triphosphate to the viral polymerase. *Hepatology* 1996 ; **23**, 87-96.
 22. Z. Long, C. S. Sun, E. M. White, B. Horowitz, A. F. Sito, Hepatitis B viral clearance studies using duck virus model. *Dev. Biol. Stand.* 1993 ; **81**, 163-168.
 23. W. N. Bartholomaeus, H. O'Donoghue, and W. D. Reed, Thymus dependence of autoantibody responses to liver specific lipoprotein in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 1984 ; **55**, 541-545.
 24. W. N. Bartholomaeus, W. D. Reed, R. A. Joske, and K. B. Silkin, Autoantibody responses to liver-specific lipoprotein in mice. *Immunology* 1981 ; **43**, 219-226.
 25. K. H. Buschenfelde, F. K. Kossling, and P. A. Miescher, Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins. *Clin. Exp. Immunol.* 1972 ; **10**, 99-108.
 26. H. Nagai, I. Yakuo, H. Yamada, T. Shimazawa, A. Koda, K. Niu, K. Asano, T. Shimizu, and M. Kasahara, Liver injury model in mice for immunopharmacological study. *Jap. J. Pharmacol.* 1988 ; **46**, 247-254.
 27. N. Kawada, N. Ueda, Y. Mizoguchi, K. Kobayashi, T. Monna, S. Morisawa, K. Ishimura, T. Suzuki, and S. Yamamoto, Increased 5-lipoxygenase activity in massive hepatic cell necrosis in the rat correlates with neutrophil infiltration. *Hepatology* 1992 ; **16**, 462-468.
 28. 徐強, 王蓉, 徐麗華 : 遲发型變態反應机制致肝損傷動物模型的建立. *中国免疫学雜誌*, 1993 ; **9**, 287-290.
 29. Q. Xu, R. Wang, J. Jiang, F. Wu, J. Lu, P. K. Tan, and L. Xu, Liver injury model in mice induced by a cellular immunologic mechanism

- delayed-type hypersensitivity-induced liver injury to picryl chloride and phenotype of effector cell. *Cell. Immunol.* 1996; **167**, 38-43.
30. 王 蓉, 徐 強, 徐麗華, 蔣潔云, 杭秉蒨: 綿羊紅細胞誘發遲發型變態反應機制致肝損傷的動物模型。中國藥科大學學報, 1993; **25**, 293-296.
31. Q. Xu, F. Wu, B. Zhang, J. Lu, J. Cao, R. Wang, and Z. Feng, One-shot delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse liver causes a sustained liver injury to picryl chloride. *Life Sciences* 1997; **60**, 2417-2425.
32. 徐強, 蔣潔云, 王蓉: 細胞性抗体関与の肝障害モデルとこれに及ぼす生薬的影響。和漢医薬学雑誌, 1995; **12**, 277-280.
33. Q. Xu, J. Lu, R. Wang, F. Wu, J. Cao, and X. Chen, Liver injury model induced in mice by a cellular immunologic mechanism —Study for use in immunopharmacological evaluations. *Pharmacological Research* 1997; **35**, in press.
34. 徐強, 趙紅, 杭秉蒨: 蒺藜对遲發型變態反應的抑制作用。中國藥科大學學報, 1991; **22**, 12-16.
35. 徐 強, 徐麗華: 龍胆对遲發型變態反應的抑制作用。中藥藥理与臨床, 1993; **9** (5), 25-26.
36. 徐 強, 陳婷, 朱梅芬, 王蓉: 二妙散对遲發型變態反應的抑制作用。中國免疫学雜誌, 1993; **9**, 244-245.
37. 徐 強, 王 蓉, 徐麗華, 蔣潔云: 土茯苓对細胞免疫和体液免疫的影響。中國免疫学雜誌, 1993; **9**, 39-42.
38. 王 蓉, 徐 強, 徐麗華, 杭秉蒨: 白鮮皮的免疫藥理学研究 I. 对細胞免疫和体液免疫的影響。中國藥科大學學報, 1993; **23**, 234-238.
39. 徐強, 趙紅, 王蓉: 数種中藥对遲發型變態反應的影響。中藥藥理与臨床, 1993; **9** (4), 30-34.
40. 徐 強, 王 蓉, 余伯陽: 短葶山麦冬サポニン C 对遲發型變態反應及炎症反應的影響。中國藥科大學學報, 1993; **24**, 98-101.
41. 徐麗華, 徐強: 龍胆对實驗性肝損傷的影響。中藥藥理与臨床, 1994; **9** (3), 20-22.