

# 肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の新規評価手法の構築と緻密化 山手 丈至 (やまて じょうじ)

大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻獣医病理学教室 教授



1981年 3月 山口大学農学研究科獣医学専攻修士課程修了  
1981年 4月 (財)日本生物科学研究所(東京都青梅市) 入所  
1991年 9月 博士(農学)取得 (東京大学)  
1992年 4月 大阪府立大学農学部獣医学科 助手  
1995年 2月 大阪府立大学農学部獣医学科 講師  
1997年 7月 カナダグエルフ大学オンタリオ獣医学部 研究員  
2000年 4月 日本獣医学会賞(第88号) 受賞  
2000年10月 大阪府立大学農学生命科学研究科獣医学専攻 助教授  
2007年 4月 大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻 准教授  
2009年 4月 大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻 教授  
2013年 4月 大阪府立大学生命環境科学研究科 副研究科長  
2015年 4月 大阪府立大学 学長補佐・国際交流機構副機構長

日本獣医学会(理事・評議員)、日本毒性病理学会(理事・評議員)、日本獣医病理学専門家協会(副理事長)、IATP(副理事長)、医薬品医療機器総合機構(専門委員)、内閣府食品安全委員会(専門委員)

## <研究成果概要>

肝には約20%の肝固有のマクロファージが存在し、肝機能の恒常性維持に係わるとともに、その機能異常は化学物質による肝障害に一次的あるいは二次的に影響を与えている。しかし、肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の評価手法の構築や、肝毒性の発現メカニズムは解明されていない。近年、病変部位に出現するマクロファージをM1とM2に分けて評価する概念が提唱された(M1/M2分極化)。M1は、炎症初期に誘導され、高い貪食活性を示し、一方、M2は、線維化を導き組織の修復に関与する。

本研究では、化学物質誘発性肝障害を評価する新たな手法を構築する目的で、多彩な機能特性を現す肝マクロファージに着目し、その機能を見極める検出系を確立するとともに、その検出系を用いて、化学物質の肝毒性発現メカニズムを、M1/M2分極化に基づいて解明することを目的とした。

まず、肝マクロファージの基本性状を得るために、発生過程の肝マクロファージの特性を解析した。その結果、胎子では貪食活性の高いCD68 M1マクロファージが、新生子から成体では肝常在マクロファージであるCD163M2クッパー細胞が現れ、肝組織構築に係わることが分かった。次に、肝恒常性に係わるクッパー細胞の役割を解析した。リボソームを投与すると、それを貪食したCD163クッパー細胞が活性化し、ASTとALTが減少した。一方、クロドロネート投与によるクッパー細胞枯渇下では、ASTとALTは増加した。クッパー細胞は肝逸脱酵素のクリアランスに関わることが分かった。すなわち、肝毒性においてクッパー細胞の機能状態を把握しておくことの重要性が示された。

化学物質による肝障害の解析において、チオアセトアミド(TAA)投与の小葉中心性肝細胞傷害では、M1機能に関わる $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$ と、M2機能に関わる $\text{IL-4}$ の発現が、組織傷害に先立ちすでに増加しており、これに続いて、 $\text{CD68M1}$ と $\text{CD163M2}$ マクロファージが傷害部位に誘導され、同時に修復に係わる $\text{TGF-}\beta 1$ や $\text{IL-10}$ が上昇した。 $\text{CD68M1}$ は、 $\text{MHCクラスII}$ と $\text{lba1}$ を、 $\text{CD163M2}$ は、 $\text{CD204}$ と $\text{Gal-3}$ を表出することが分かった。クロドロネート前投与によるマクロファージ枯渇下でのTAA病変を解析したところ、初期では肝小葉中心部の凝固壊死の形成が遅延し、修復期では異栄養性石灰沈着が生じ、治癒が遅延した。また、 $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT)投与によるグリソン鞘の胆管上皮傷害では、 $\text{MHCクラスII}$ 発現マクロファージが病変形成に極めて重要であることが示された。クロドロネート前投与によるANIT病変では、胆管周囲の線維化が遅延した。肝毒性では小葉中心部とグリソン鞘領域の傷害において異なるマクロファージが機能することが分かった。ラットマクロファージ株HS-Pを用いた *in vitro*でのマクロファージ機能解析により、M1因子である $\text{INF-}\gamma$ 、あるいはM2因子である $\text{IL-4}$ を添加することで、*in vivo*で生じるマクロファージ機能の現象が再現できることが分かった。HS-Pは試験管内での肝毒性メカニズム解析において有用であることが示された。

マクロファージのM1/M2分極化に基づいた肝毒性病変の評価手法は、薬物誘発性病変の新たな病理発生機序の解明につながると考える。これは、また、肝毒性評価において用いられる肝機能パラメーターの緻密化と精度の高いend-pointを導くことができることから、食品健康影響評価でのより科学的なADI(一日摂取許容量)設定が可能となる。本課題で得られた成績はその基礎情報を提供する。

# 肝マクロファージの機能特性に基づいた肝毒性の 新規評価手法の構築と緻密化

「研究者からの提案に基づく研究（課題番号：1405）」

（単年度）

鋭敏に反応する肝マクロファージの多様な機能特性を一つの指標として、  
化学物質による肝毒性を、毒性病理学的（形態学的）な観点から、  
より科学的に評価する手法を構築する。

⇒ 肝毒性評価の緻密化 ⇒ メカニズム研究 ⇒ より精度の高いADI設定

2015.10.1

大阪府立大学 生命環境科学研究科 獣医病理学教室

代表研究者

・山手 丈至

分担研究者

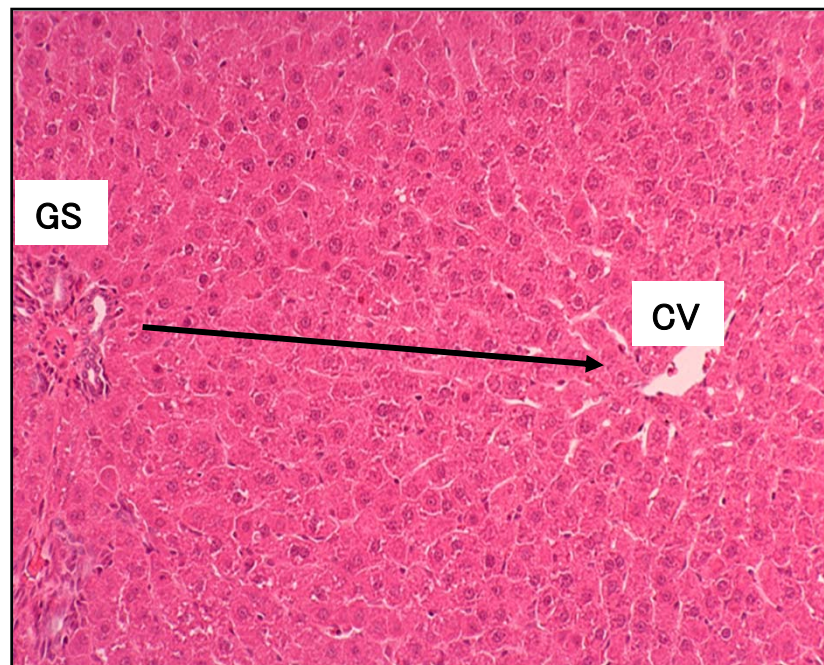
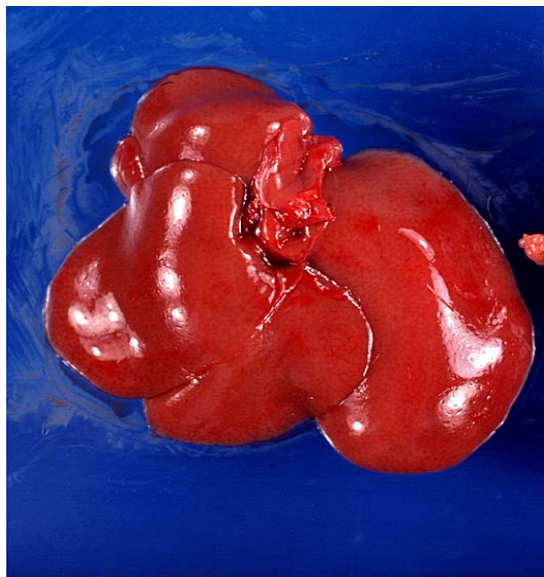
・桑村 充 ・井澤 武史



F344ラット

肝マクロファージ(クッパー細胞・樹状細胞): 約20% ⇒ 恒常性

ラットの肝臓



CV: 中心静脈; GS: グリソン鞘

門脈-肝バリアー

高い感受性

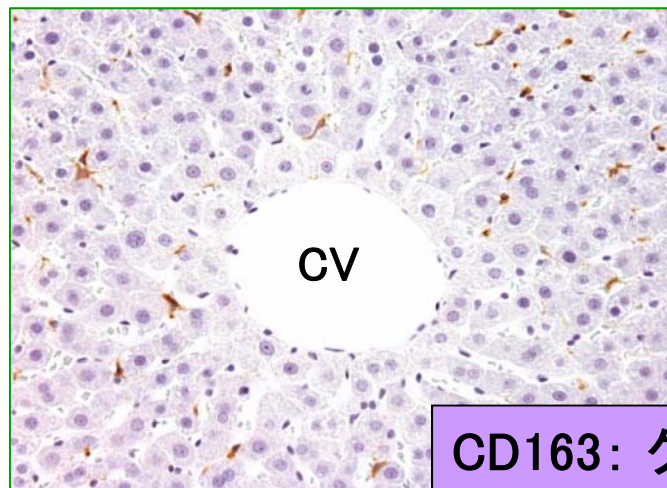


- ・異物貪食
- ・解毒
- ・免疫応答
- ・増殖因子産生

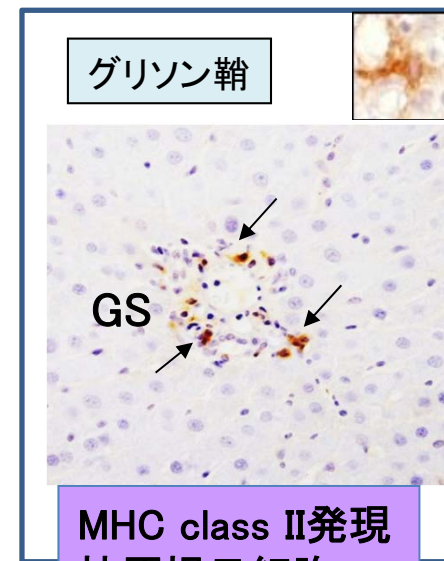
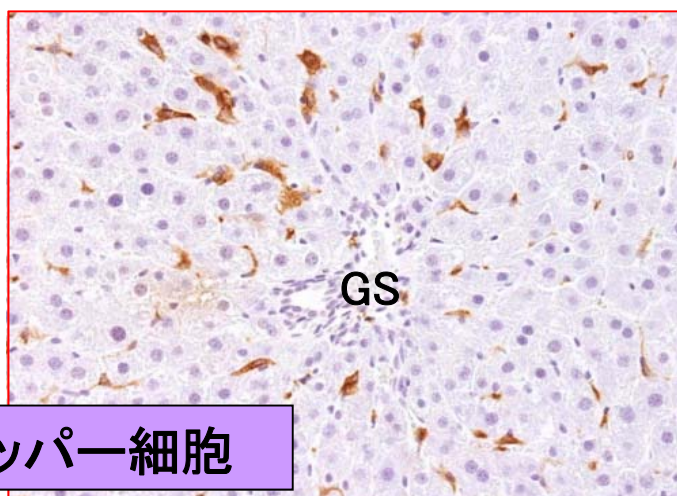


恒常性

肝マクロファージの肝毒性への係わり?



CD163: クッパー細胞



MHC class II発現  
抗原提示細胞

## 報告内容

### 1. 肝マクロファージと恒常性

1-1: 肝マクロファージ活性化実験

1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

### 2. 肝マクロファージを介した肝毒性の評価手法の構築

2-1: M1/M2マクロファージ分極化

2-2: チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験

(1) CD68 (M1マクロファージ) と CD163 (M2マクロファージ)の出現

(2) ラットマクロファージ株(HS-P)を用いたCD68/CD163発現機序

(3) MHCクラスIIとCD204発現マクロファージのM1/M2分極化

(4) Iba1とGalectin-3発現マクロファージのM1/M2分極化

(5) 肝マクロファージの初期誘導とM1/M2分極化

2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA誘発病変

### 3. まとめ

# 1. 肝マクロファージと恒常性

## 1-1: 肝マクロファージ活性化実験

F344 雄ラット, 6 週齡 (体重 150-160 g)

リポソーム (Lip) 単回投与 : 50 mg/kg 体重, 静注

リポソーム (Lip)  
単回投与

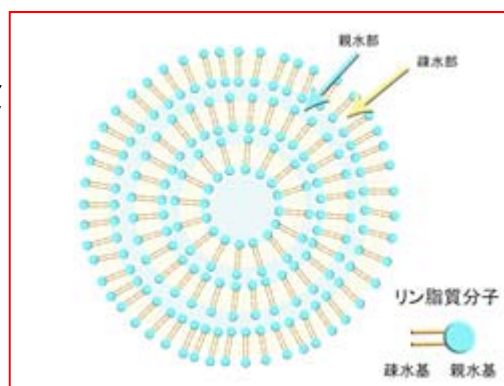


対照: PBS

1日



リン脂質膜に包まれ  
マクロファージに貪食  
されやすい。

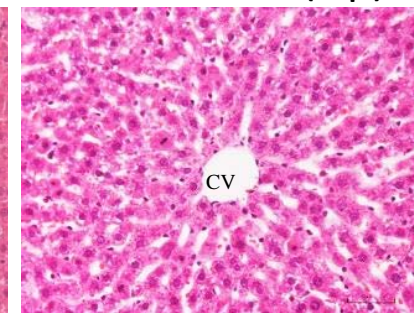


<http://www.kose.co.jp/jp/ja/research/secretstory/liposome.html>

対照



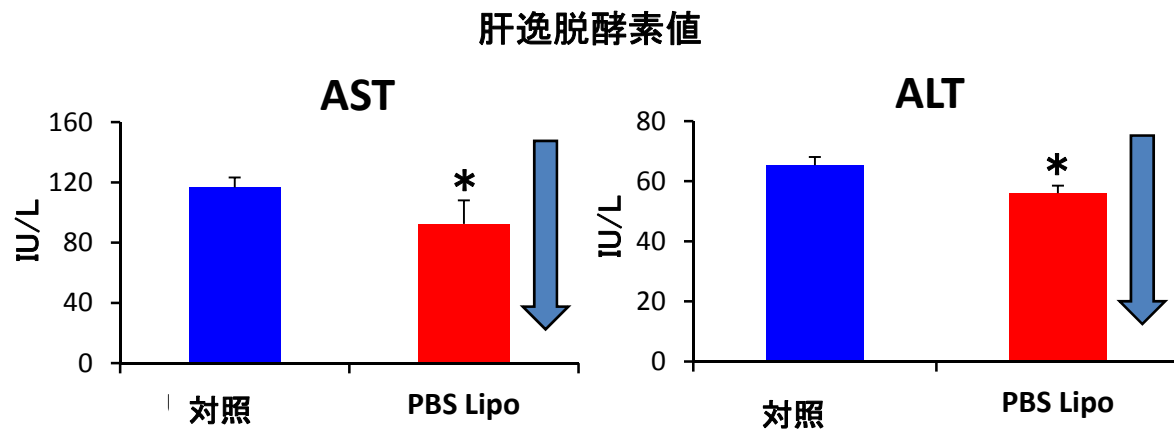
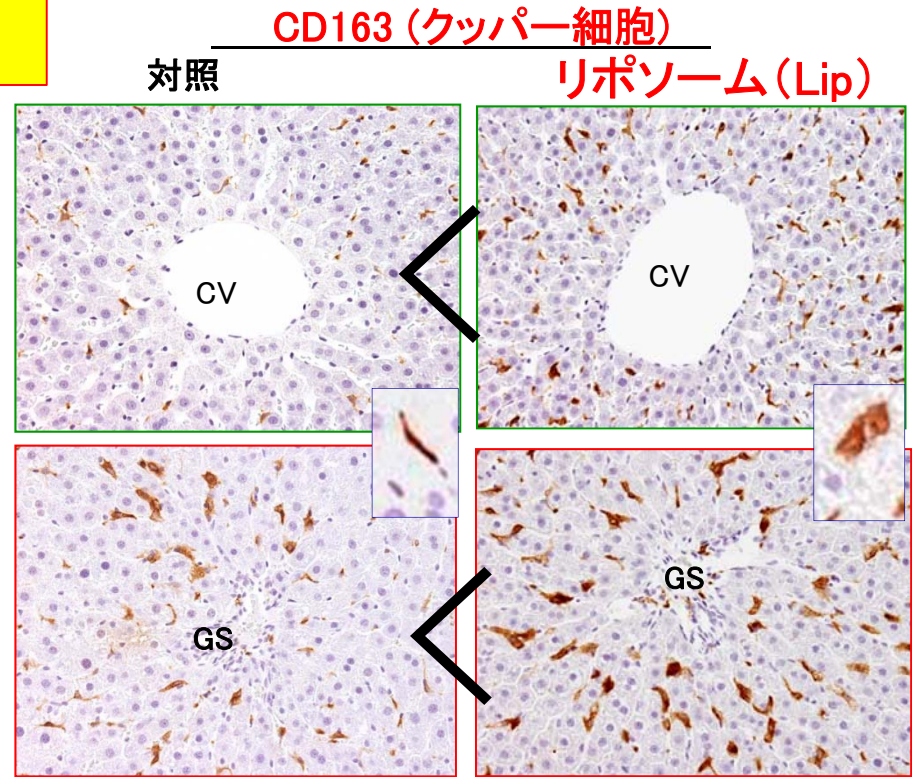
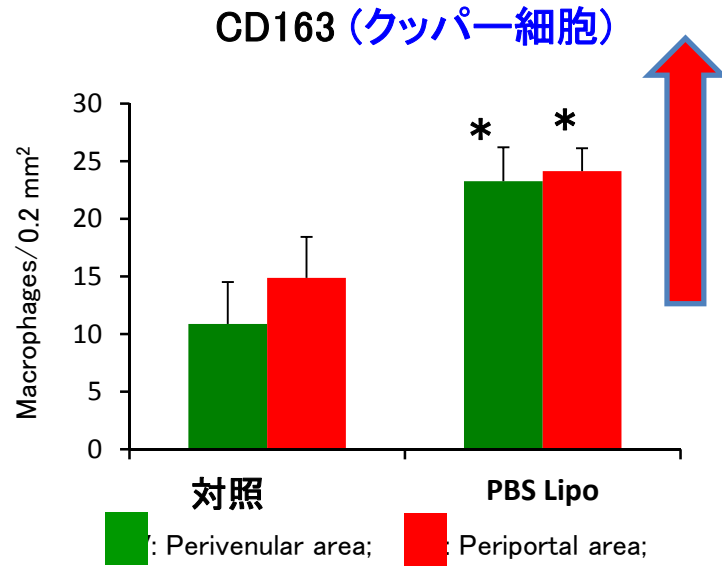
リポソーム (Lip)



組織学的な異常はみられない

CV: 中心静脈

# 1-1: 肝マクロファージ活性化実験



- ・クッパー細胞増加
- ・肝逸脱酵素値の低下

\*,  $P < 0.05$

## 例：ラットの3か月間毒性試験

用量 (mg/kg/day)	雄	雌
16	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・AST とALT低下(↓↓)</li> <li>・肝絶対・相対重量の増加</li> </ul> <p>(組織学的変化なし)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・AST とALT低下(↓↓)</li> </ul> <p>(組織学的変化なし)</p>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>・AST とALT低下(↓)</li> </ul>	著変なし
1	著変なし	

### 意義：

⇒ 毒性所見としてどう捉えるか？

⇒ 化学物質により肝マクロファージ機能が亢進していないか？

⇒ 肝マクロファージ機能特性の免疫組織化学的評価！

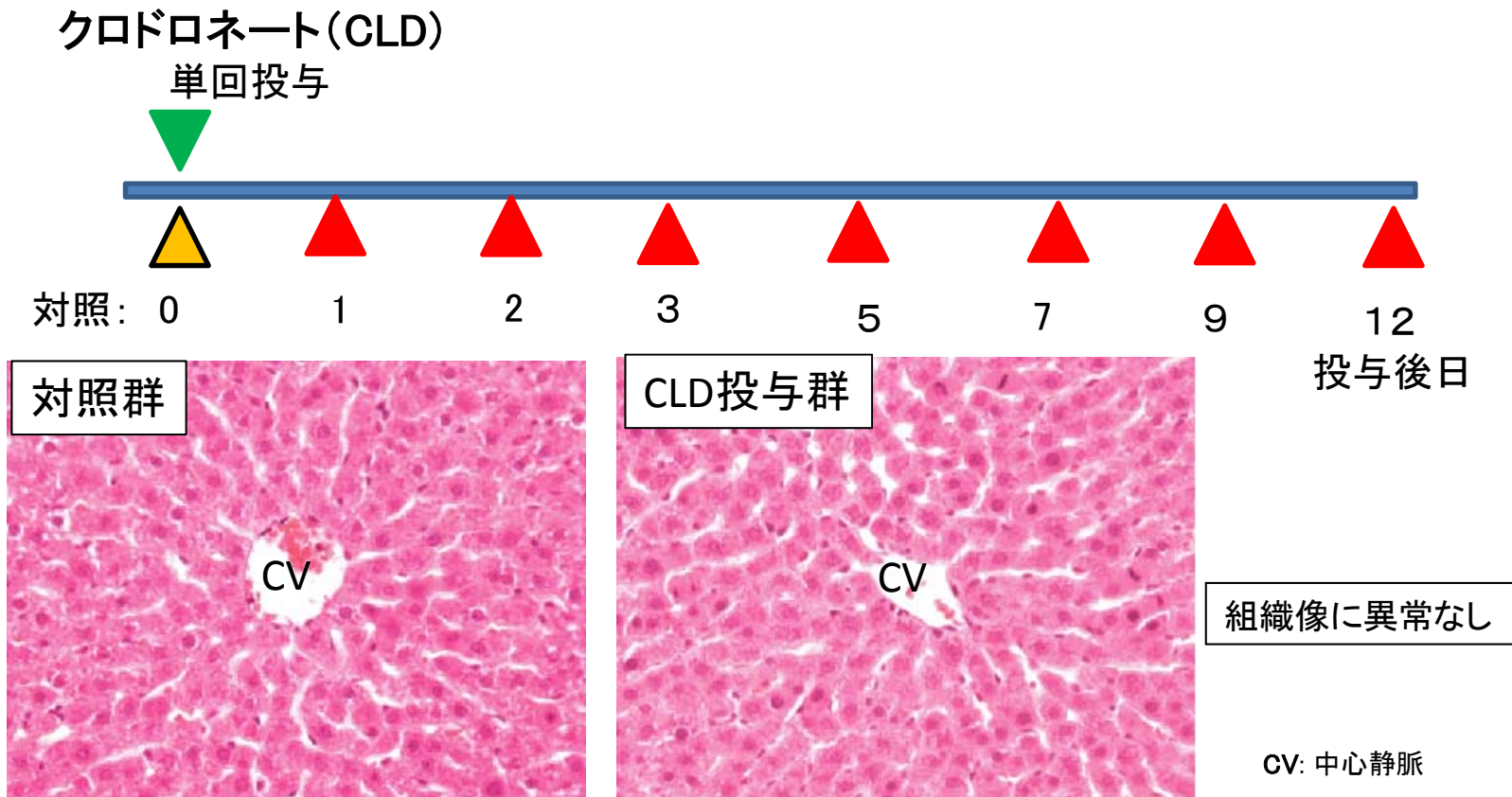
# 1. 肝マクロファージと恒常性

## 1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

F344雄ラット, 6週齢(体重150-160 g)

クロドロネート(CLD)単回投与: 50 mg/kg体重、静注

CLD: liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate clodronate

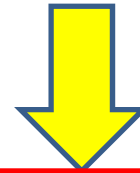




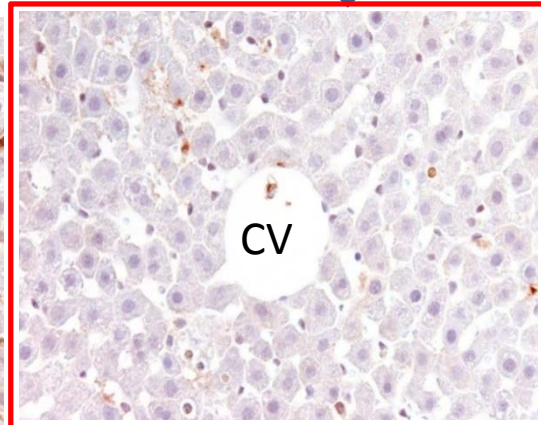
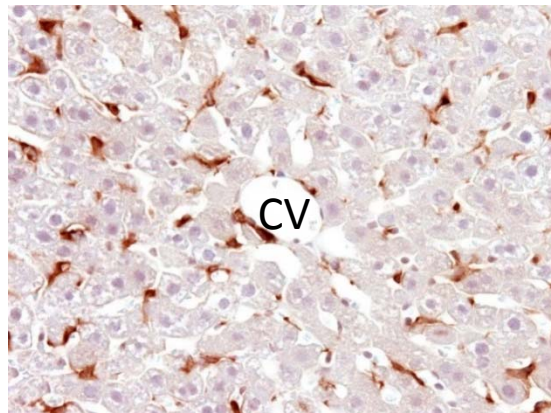
## 1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

クロドロネート (CLD) 投与により、肝組織像には傷害はないが、クッパー細胞が枯渇する。

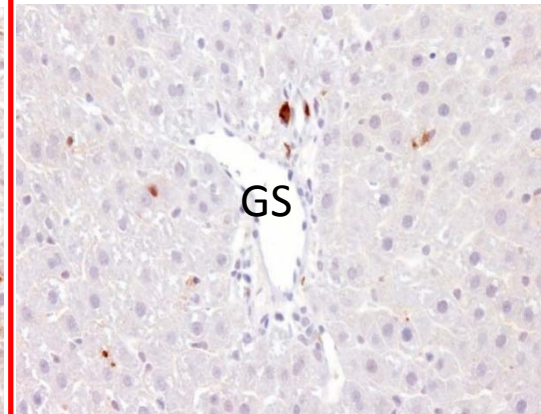
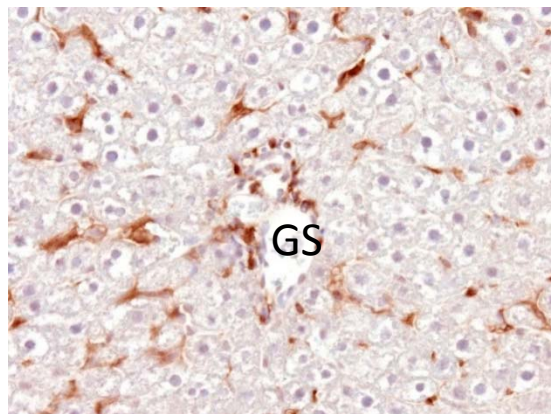
### CD163クッパー細胞



中心静脈周囲



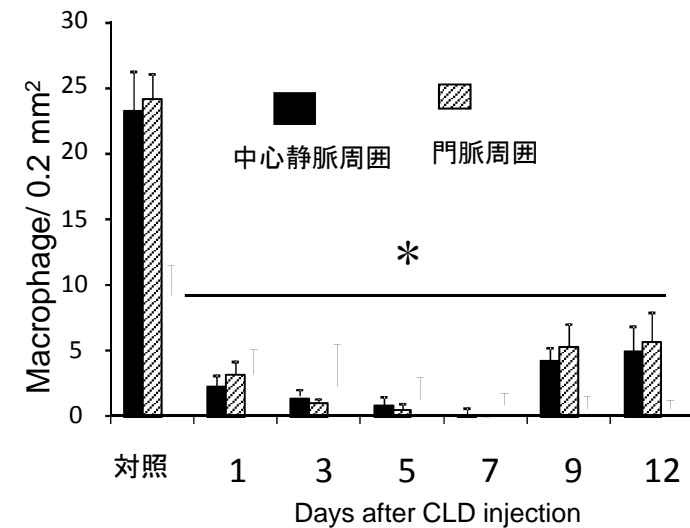
門脈野周囲



対照

CLD投与

### CD163クッパー細胞

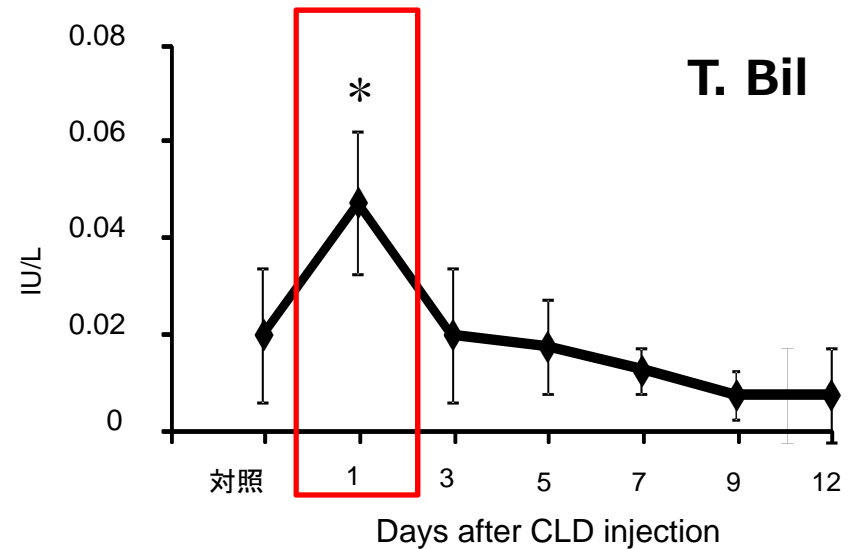
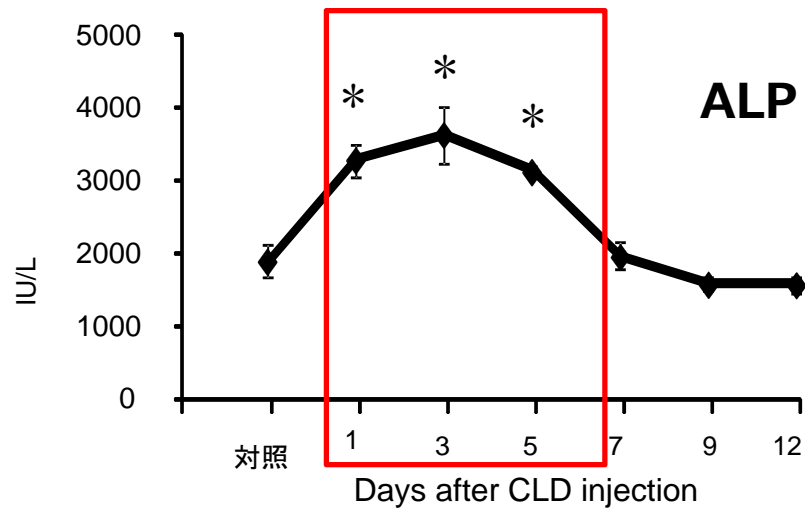
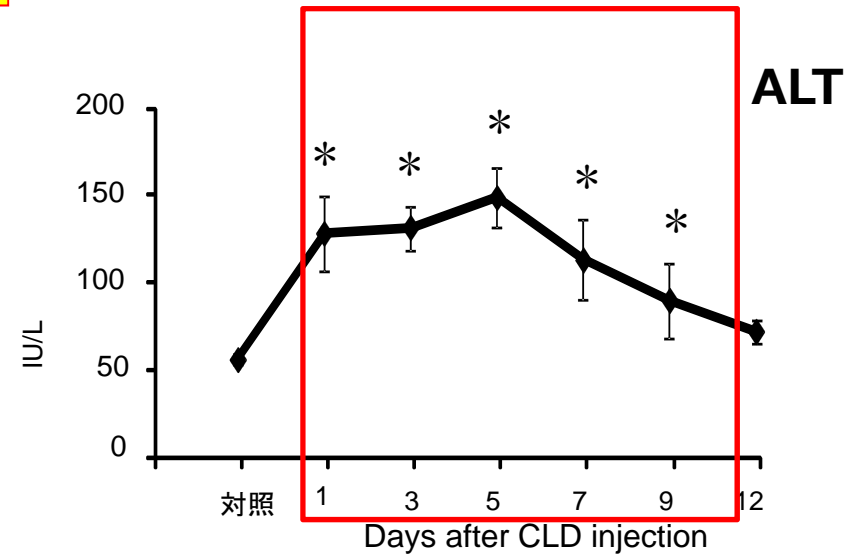
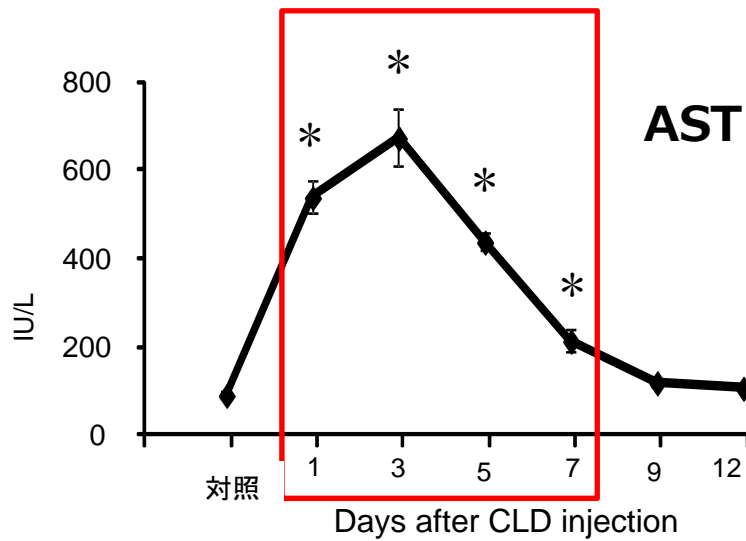


\*,  $P < 0.05$

CV: 中心静脈; GS: グリソン鞘

# 1-2: 肝マクロファージ枯渇実験

## 肝酵素値



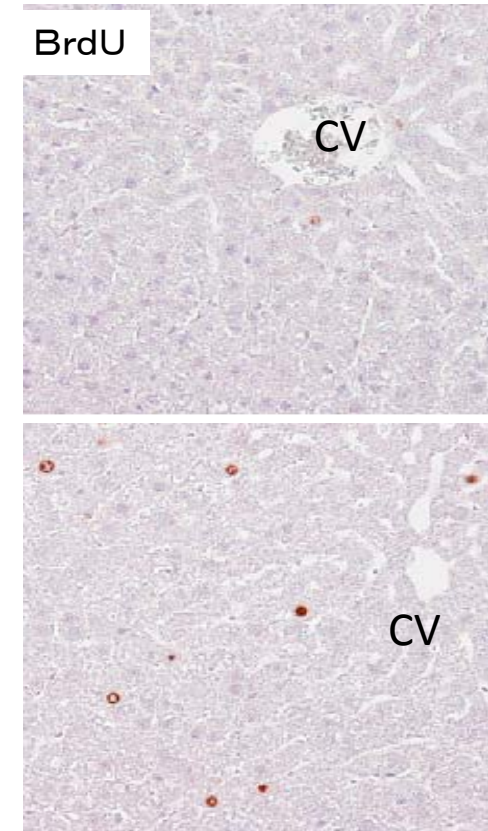
肝マクロファージの枯渇により肝酵素値が上昇

\*,  $P < 0.05$

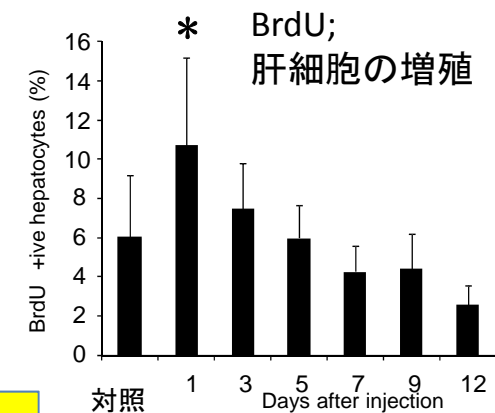
クッパー細胞枯渇により肝酵素のクリアランスが低下?

## CLD投与ラット肝の遺伝子プロファイル (>2 fold change)

Functional categories	Gene symbol	Gene description	Fold changea
Cell proliferation	Lcn2	Rattus norvegicus lipocalin 2 (Lcn2), mRNA [NM_130741]	16.56
	Map3k5	Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase kinase 5 (Map3k5), mRNA [NM_001277694]	7.58
	Rab27b	Rattus norvegicus RAB27B, member RAS oncogene family (Rab27b), mRNA [NM_053459]	5.57
	Tgfb2	Rattus norvegicus transforming growth factor, beta 2, mRNA (cDNA clone IMAGE:7938703), complete cds. [BC100663]	5.02
	Sphk1	Rattus norvegicus sphingosine kinase 1 (Sphk1), transcript variant 6, mRNA [NM_133386]	4.66
	Pdgfd	Rattus norvegicus platelet derived growth factor D (Pdgfd), mRNA [NM_023962]	3.98
	Dbp	Rattus norvegicus D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein (Dbp), mRNA [NM_012543]	3.91
	Map4k3	Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (Map4k3), mRNA [NM_133407]	2.92
	Wnt5b	Rattus norvegicus wingless-type MMTV integration site family, member 5B (Wnt5b), mRNA [NM_001100489]	2.41
	Wsb1	Rattus norvegicus WD repeat and SOCS box-containing 1 (Wsb1), transcript variant 1, mRNA [NM_001042561]	2.20
	Cdca7	Rattus norvegicus cell division cycle associated 7 (Cdca7), mRNA [NM_001025693]	2.09
Cell surface and structural protein	Krt1	Rattus norvegicus keratin 1 (Krt1), mRNA [NM_001008802]	12.43
	Krt1	Rattus norvegicus keratin 12 (Krt12), mRNA [NM_001008761]	4.52
	Orm1	Rattus norvegicus orosomucoid 1 (Orm1), mRNA [NM_053288]	3.13
	H19	Rattus norvegicus H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding) (H19), long non-coding RNA [NR_027324]	2.72
Signal transduction	Hnf4g	Rattus norvegicus hepatocyte nuclear factor 4, gamma (Hnf4g), mRNA [NM_001108939]	5.18



CV: 中心静脈



\*,  $P < 0.05$

肝マクロファージの枯渇により肝細胞増殖亢進

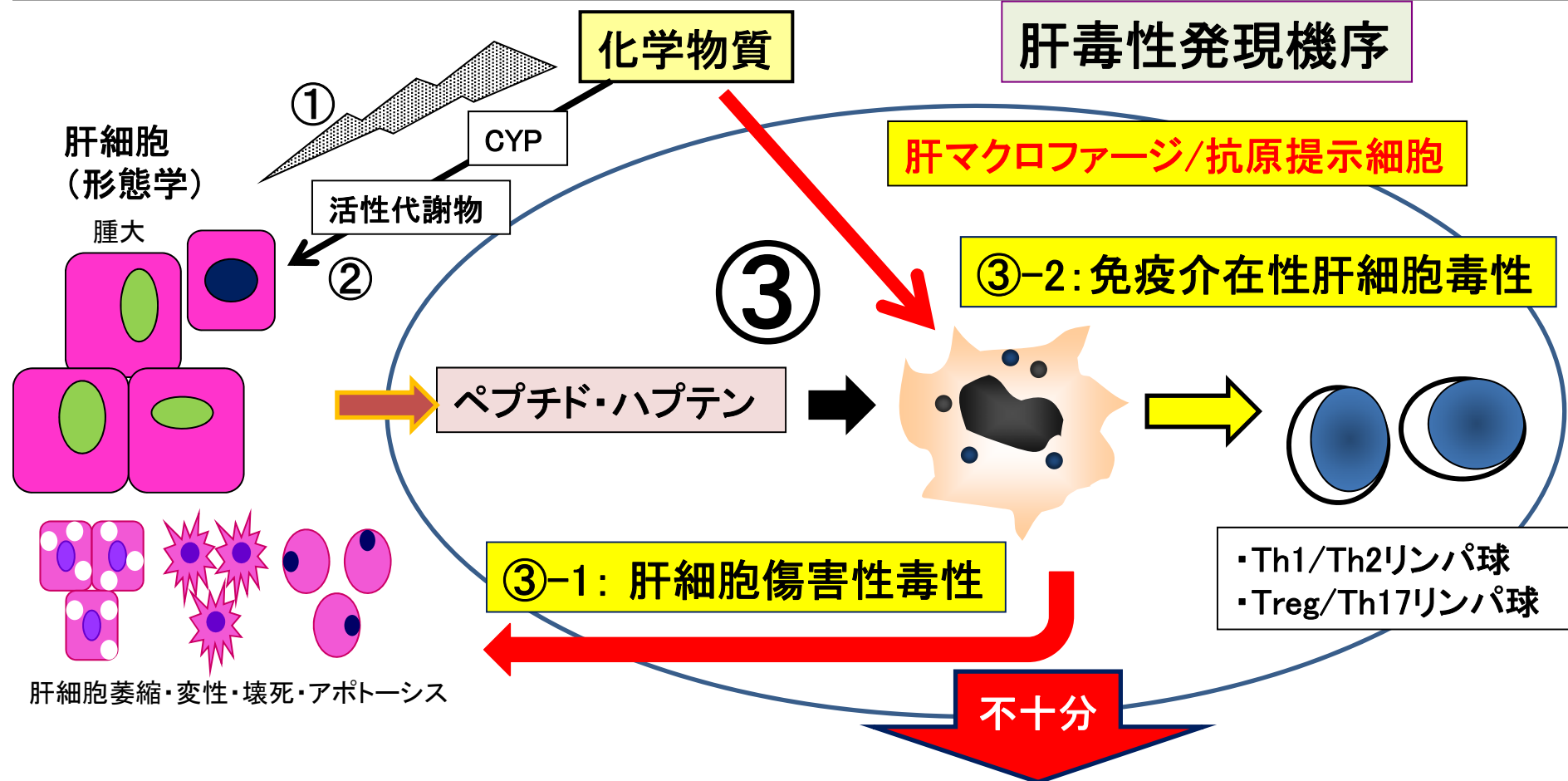
## 例：ラットの6か月間毒性試験

用量 (mg/kg/day)	雄	雌
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・肝絶対・相対重量増加</li> <li>・中心静脈周囲肝細胞腫大</li> <li>・AST とALT増加(↑↑)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・体重増加抑制</li> <li>・肝絶対・相対重量増加</li> <li>・中心静脈周囲肝細胞腫大</li> <li>・AST とALT増加(↑)</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>・中心静脈周囲肝細胞腫大</li> <li>・AST とALT増加(↑)</li> </ul>	著変なし
0.5	<ul style="list-style-type: none"> <li>・AST とALT増加(↑)</li> <li>(組織学的変化なし)</li> </ul>	

### 意義

- ⇒化学物質による肝マクロファージの機能抑制はないか？
- ⇒肝細胞肥大と肝マクロファージ機能抑制との係りは？
- ⇒肝マクロファージ機能特性の免疫組織化学的評価！

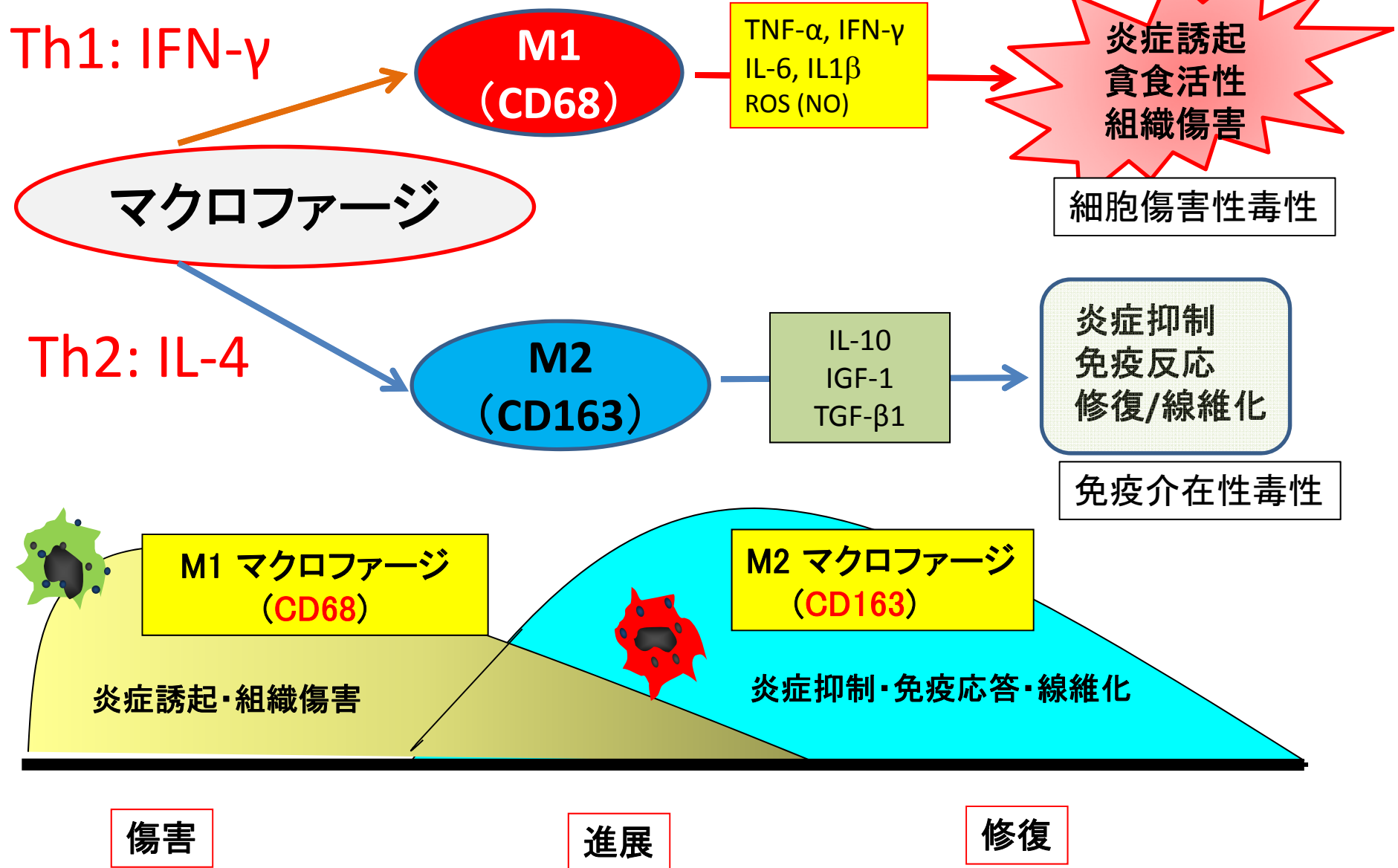
## 2. 肝マクロファージを介した肝毒性(肝細胞傷害機序)の評価手法



### 肝マクロファージの機能特性を指標とした肝毒性評価手法の構築の必要性

- ① 直接的な肝細胞傷害作用(膜、小器官、核酸)
- ② 活性代謝物を介した肝細胞傷害作用
- ③ 肝マクロファージを介した肝毒性発現機序
  - ③-1: 活性化マクロファージによる傷害因子産生に起因する肝細胞傷害性毒性
  - ③-2: MHC クラスII発現マクロファージによる免疫介在性肝細胞毒性

## 2-1: M1/M2マクロファージ分極化



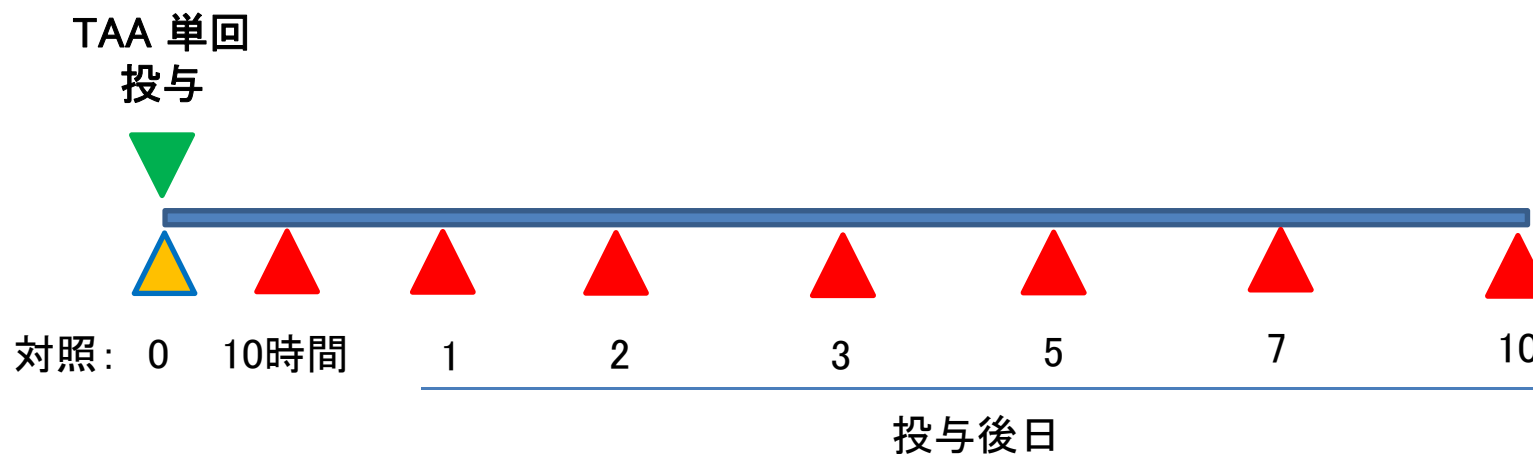
炎症性病変

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

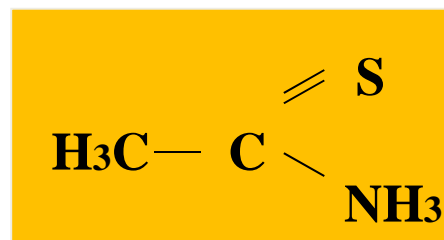
M1/M2マクロファージ分極化に基づいた評価手法の確立

F344 雄ラット, 6 週齢 (BW 150-160 g)

TAA, 単回腹腔内投与: 300 mg/Kg BW



TAA

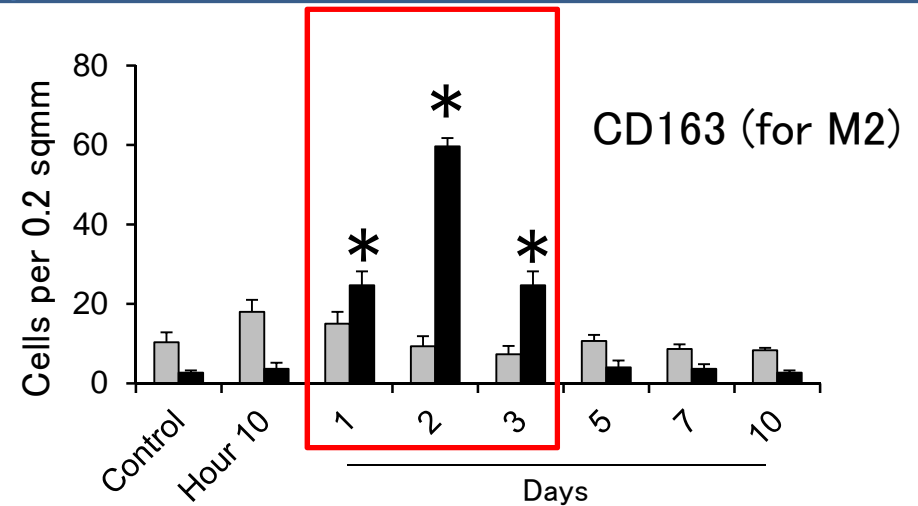
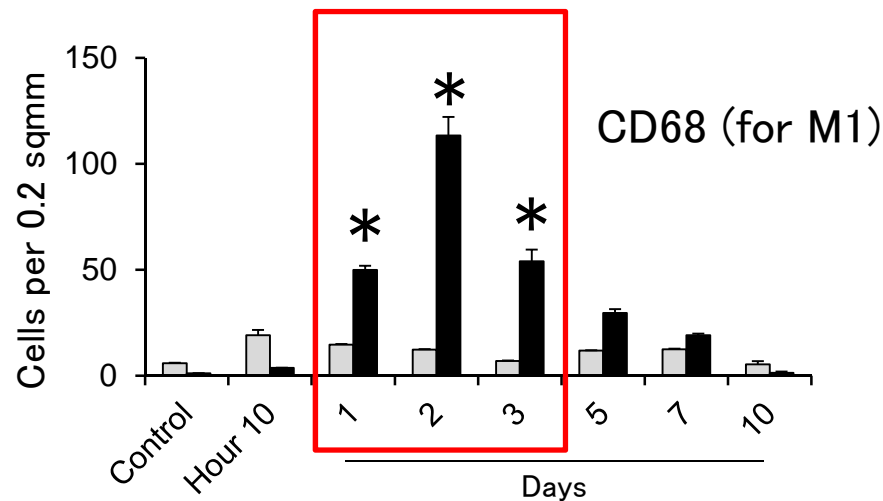
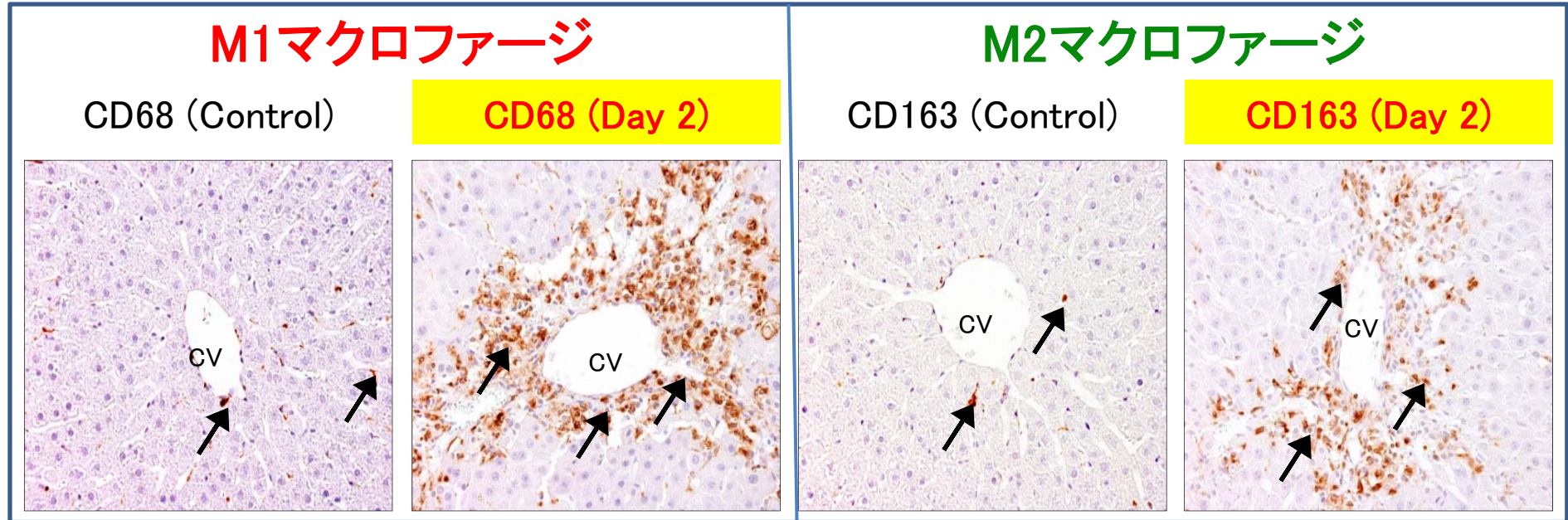






## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

### (1) CD68 (M1マクロファージ) と CD163 (M2マクロファージ) の出現

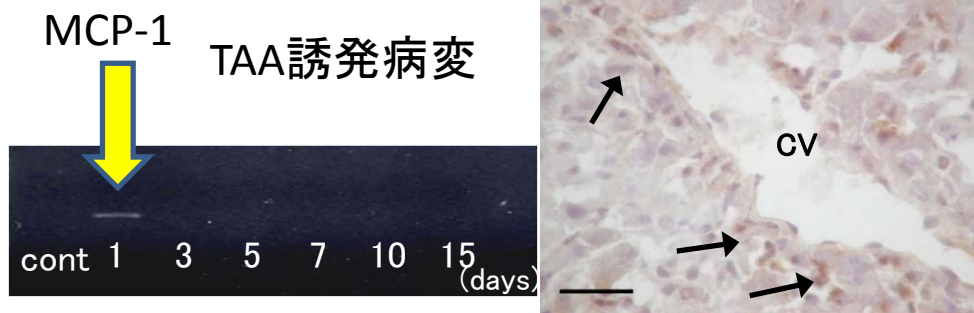


■ グリソン鞘;

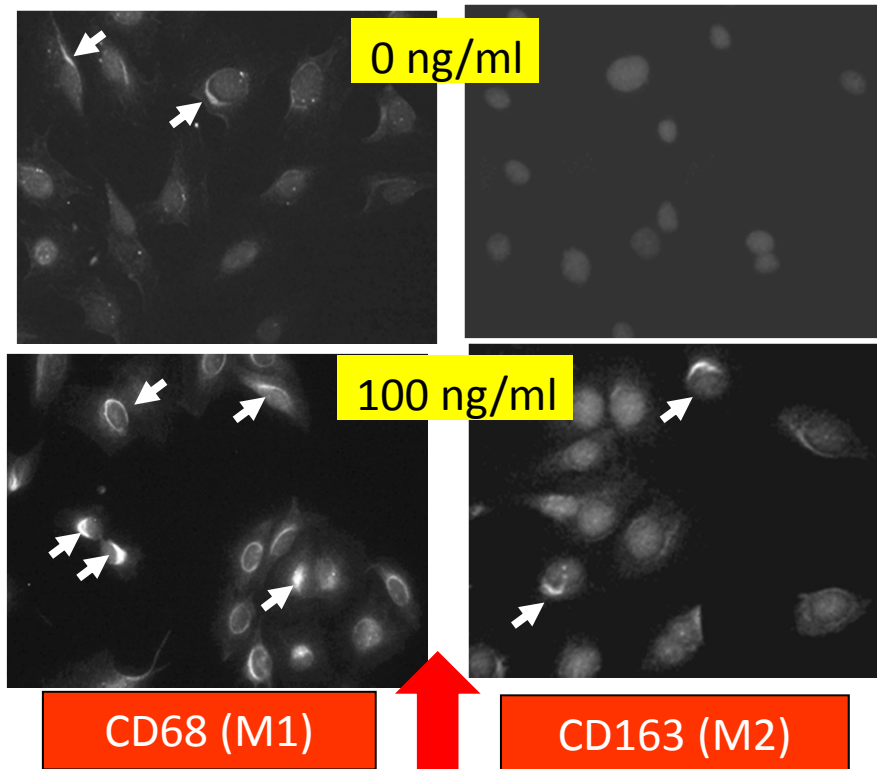
■ 中心静脈周囲

\*,  $P < 0.05$

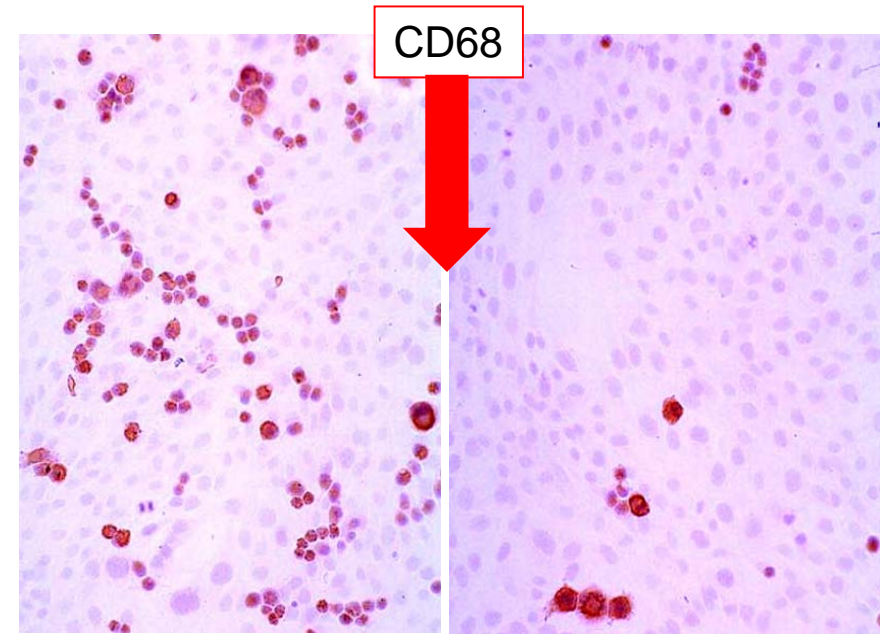
## (2) ラットマクロファージ株(HS-P)を用いたCD68/CD163発現機序: MCP-1



### CD68やCD163の発現増加



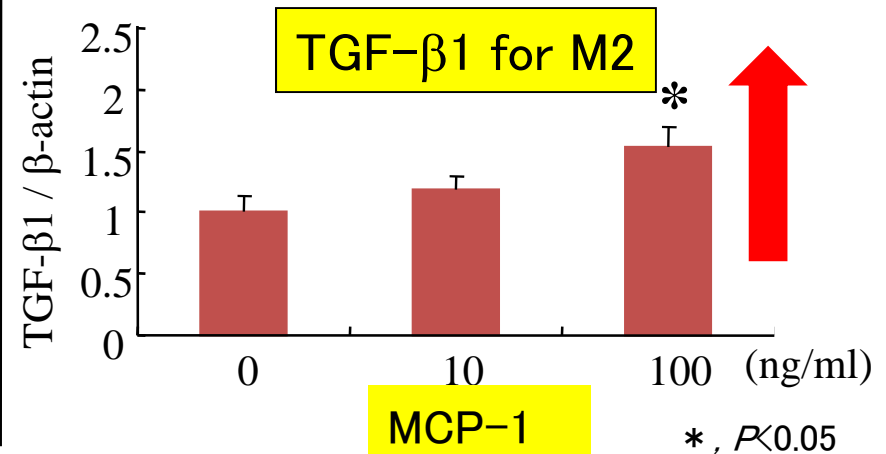
ラットマクロファージ株(HS-P)



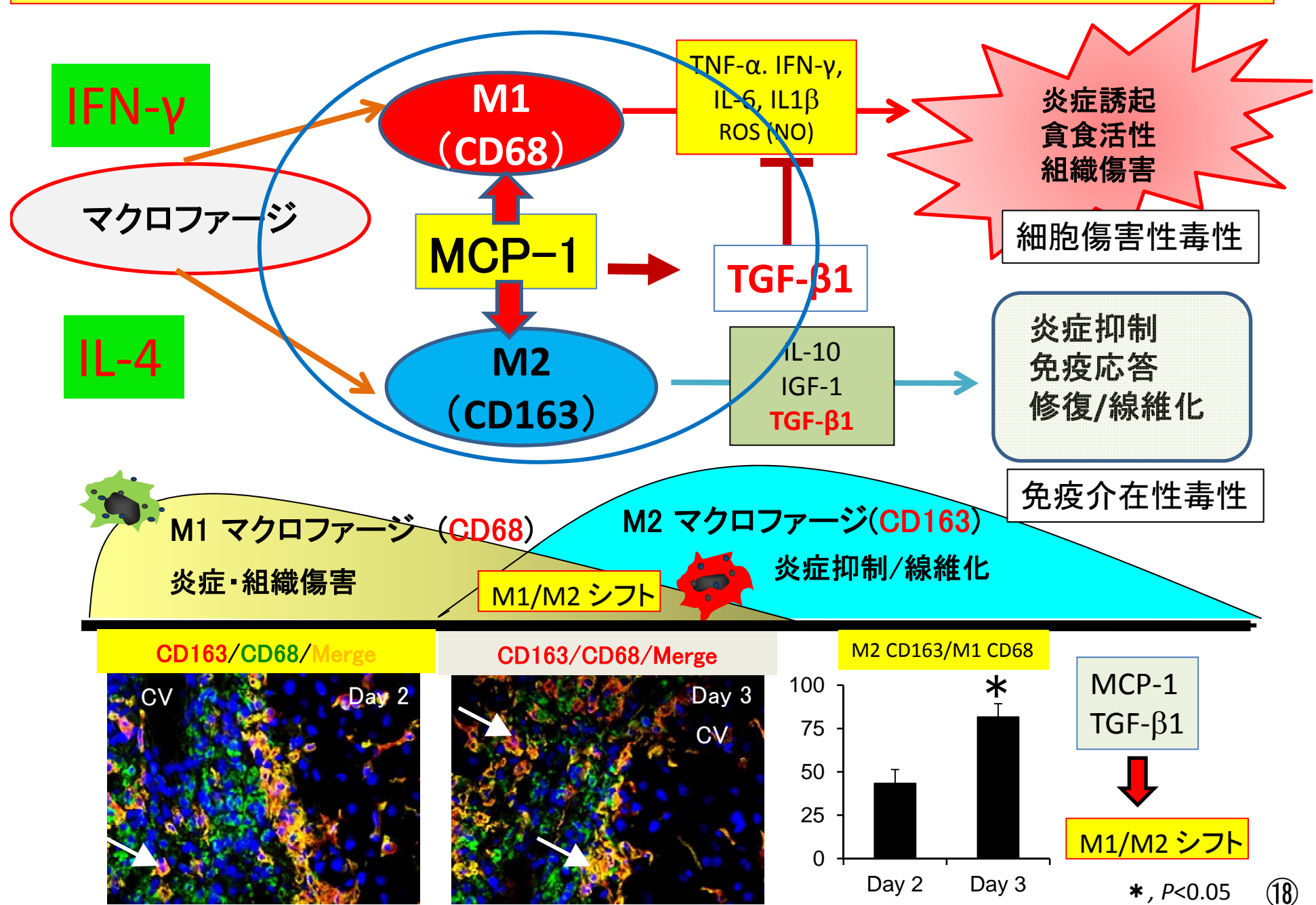
TGF- $\beta$ 1 (0 ng/ml)

TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml)

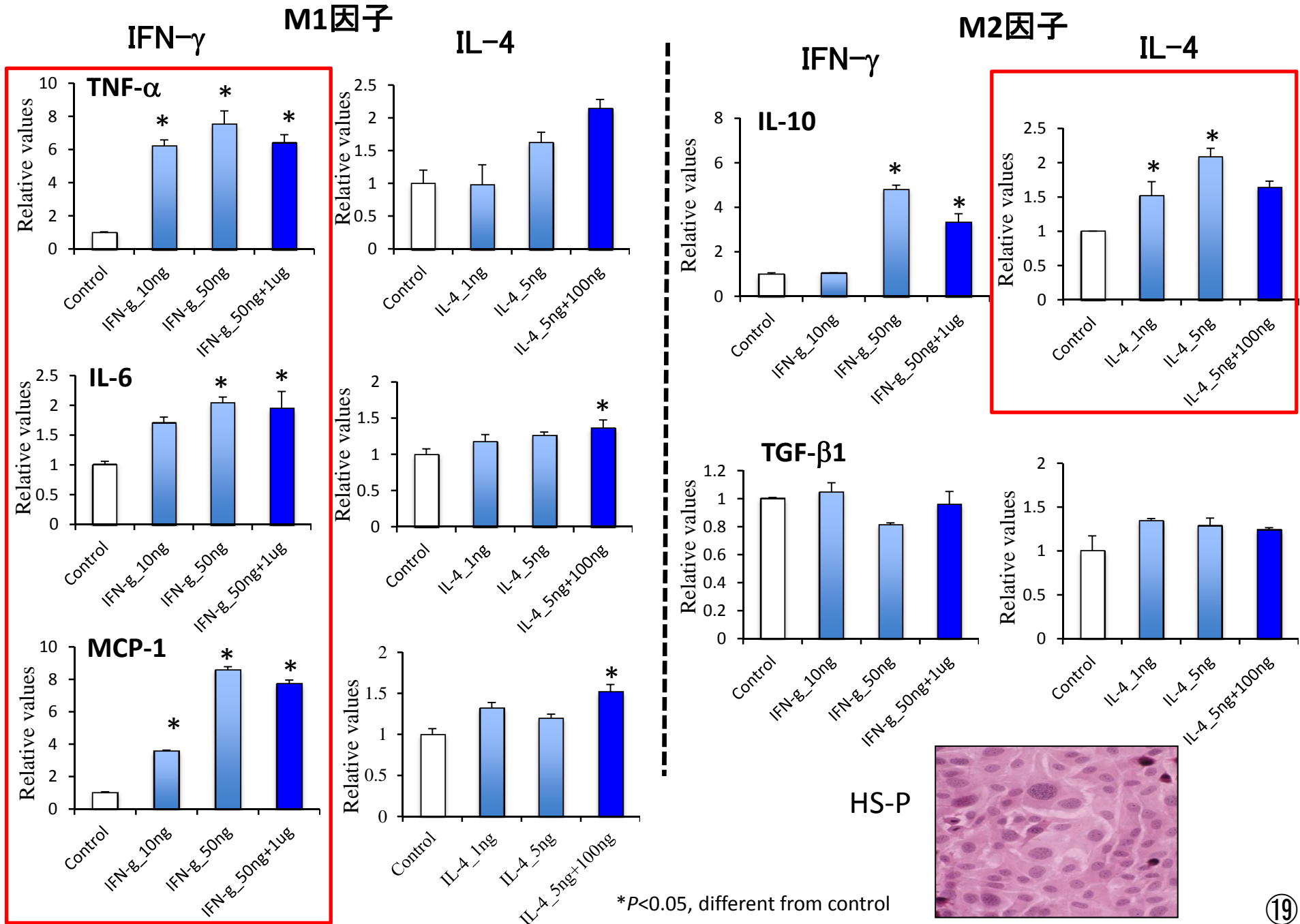
CD68/CD163発現の低下



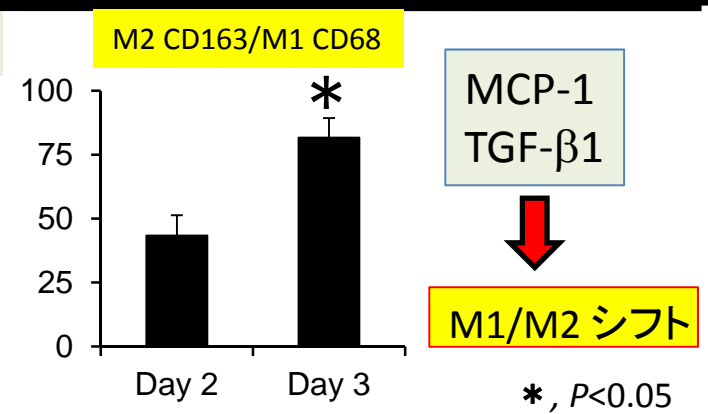
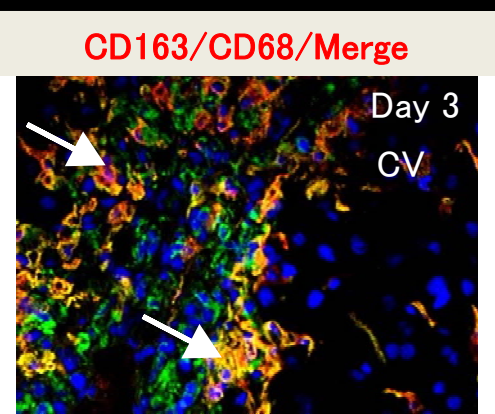
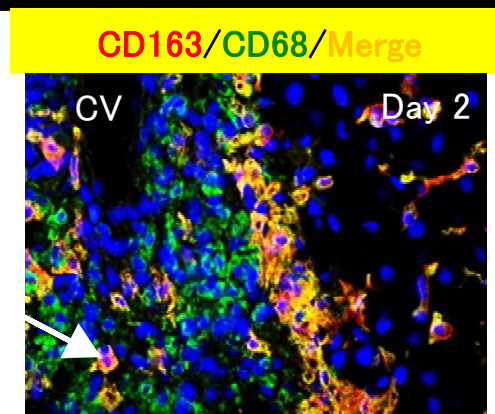
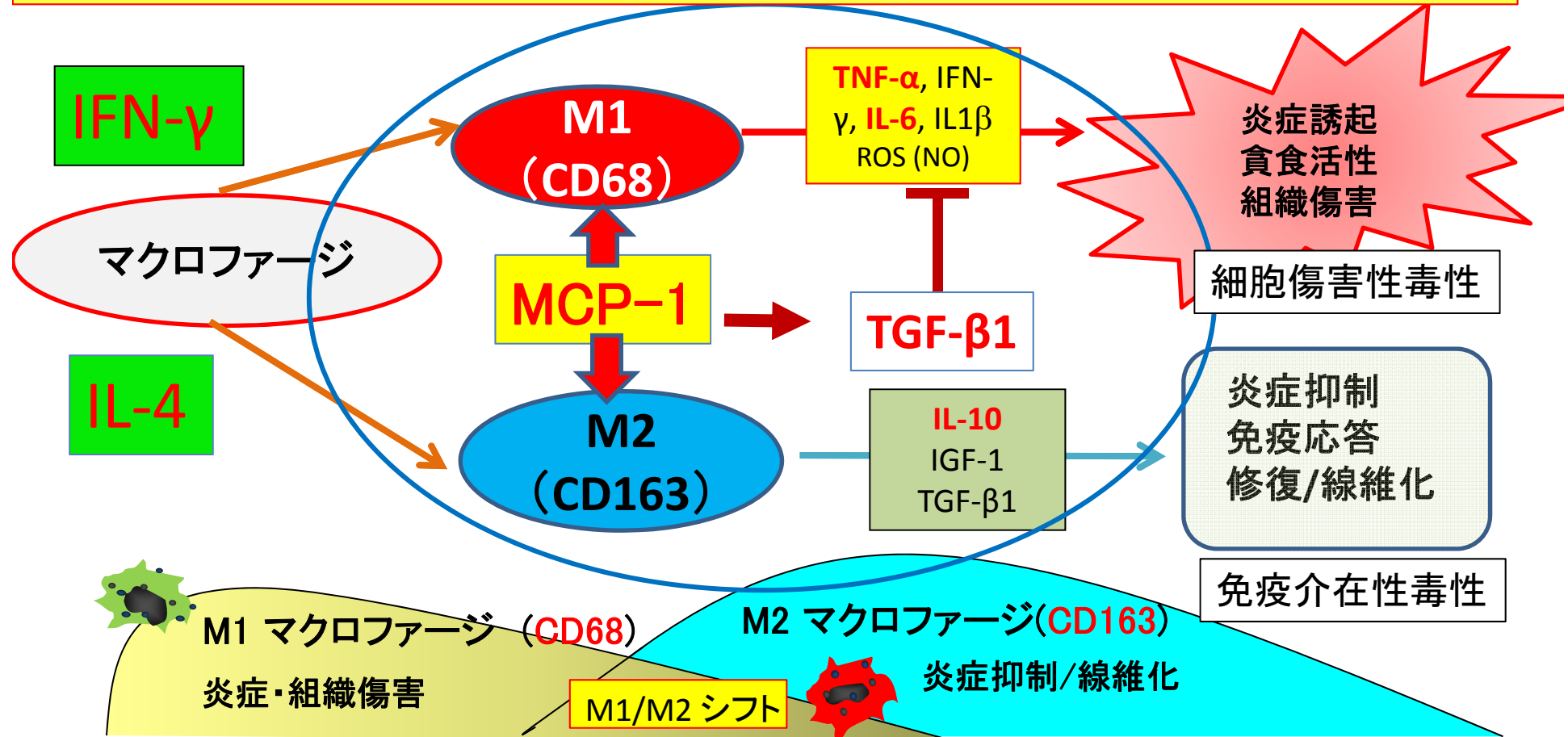
## 2-2:チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験:M1/M2マクロファージの出現



# IFN- $\gamma$ (M1誘導因子)とIL-4(M2誘導因子)を添加したラットマクロファージ株HS-P



## 2-2: チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験: M1/M2マクロファージの出現

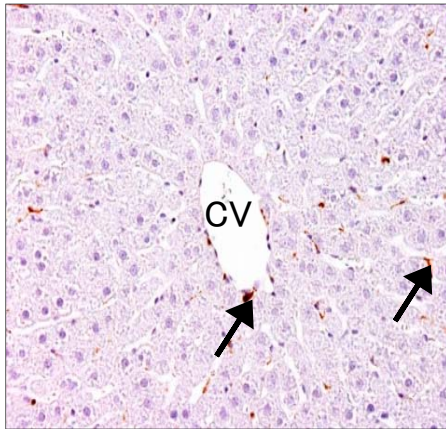


## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

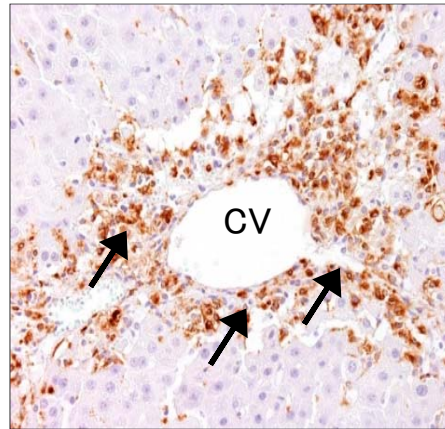
### (3) MHC クラスIIとCD204発現マクロファージのM1/M2分極化

#### M1マクロファージ

CD68 (Control)

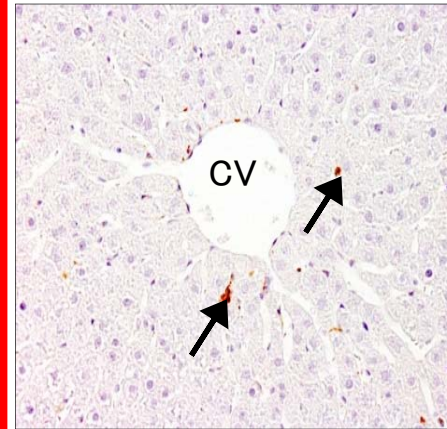


CD68 (Day 2)

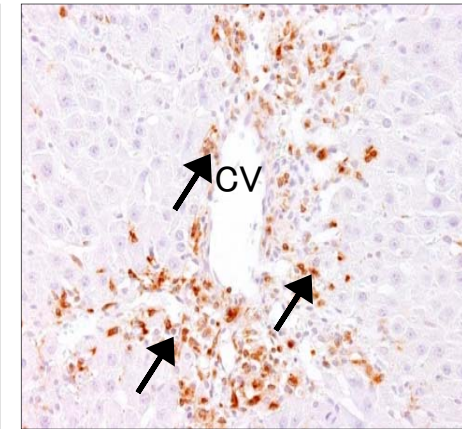


#### M2マクロファージ

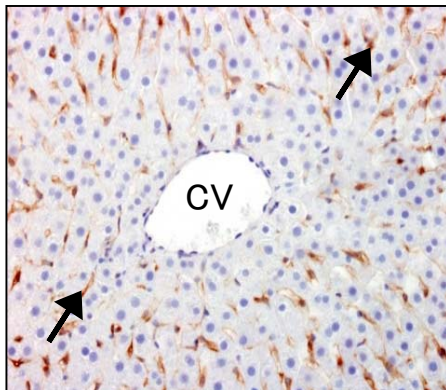
CD163 (Control)



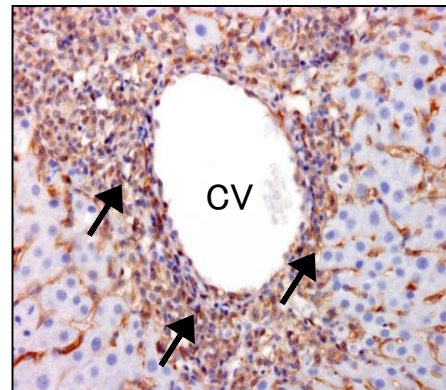
CD163 (Day 2)



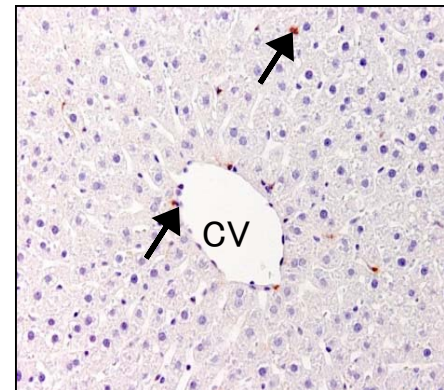
CD204 (Control)



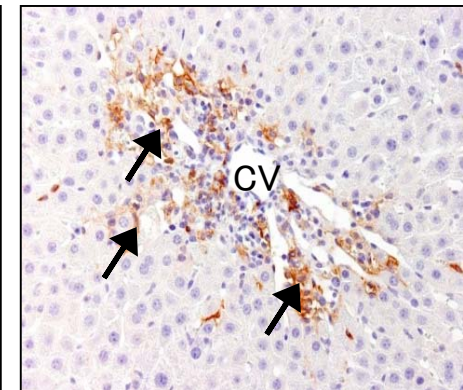
CD204 (Day 2)



MHC class II (Control)



MHC class II (Day 2)

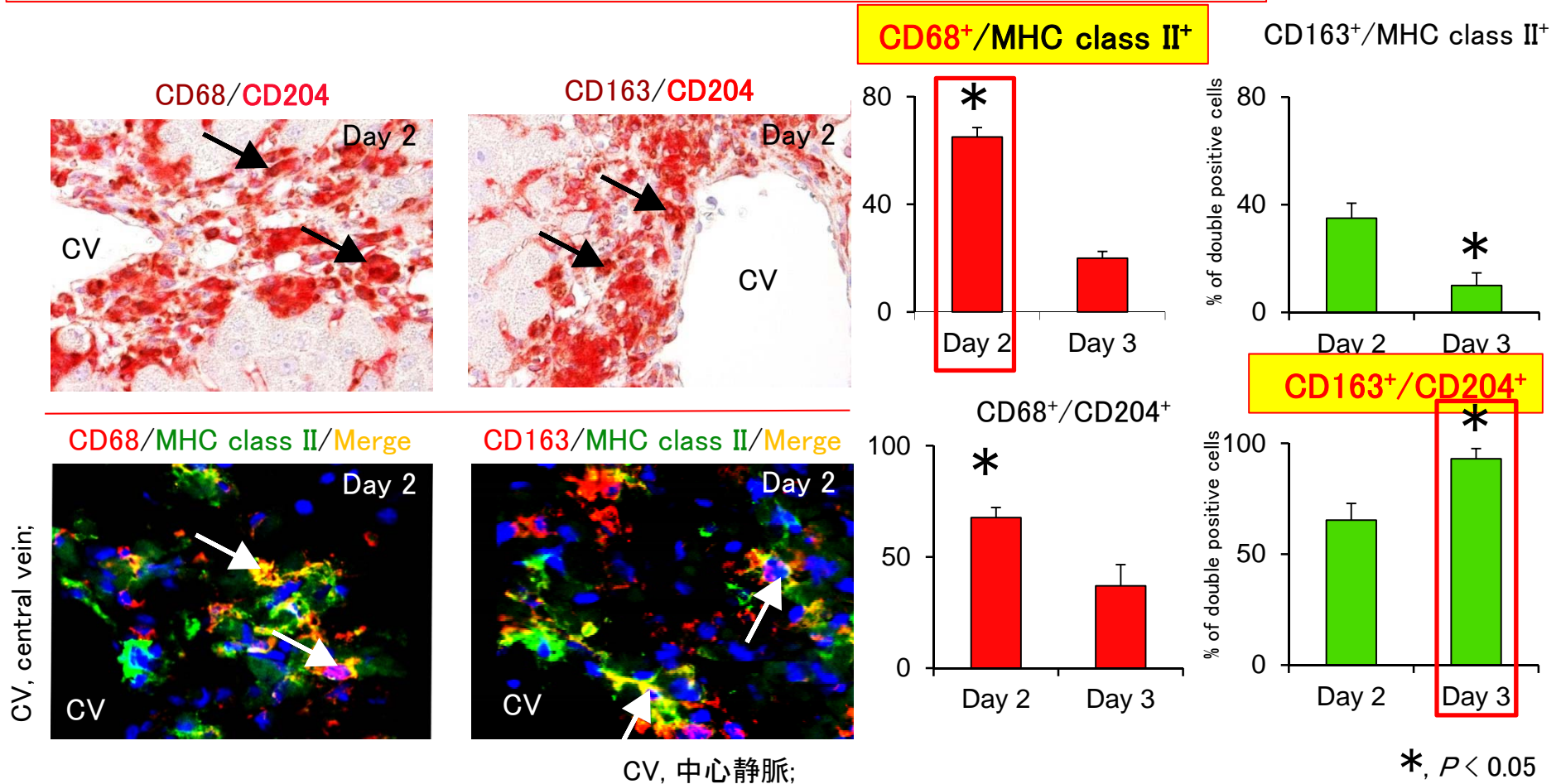


CV, 中心静脈

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験: 分極化の解析

### 二重免疫染色:

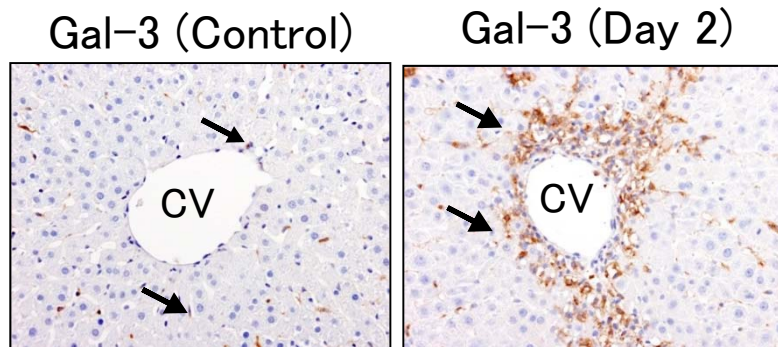
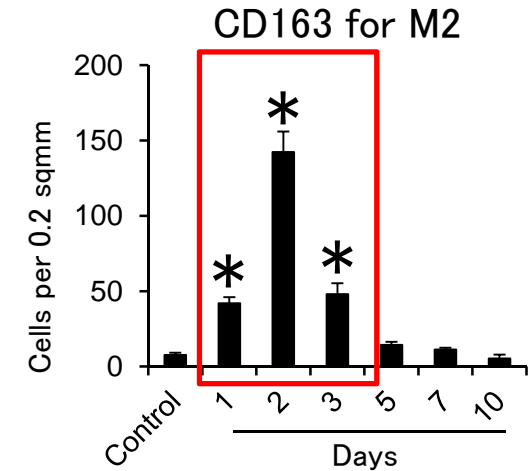
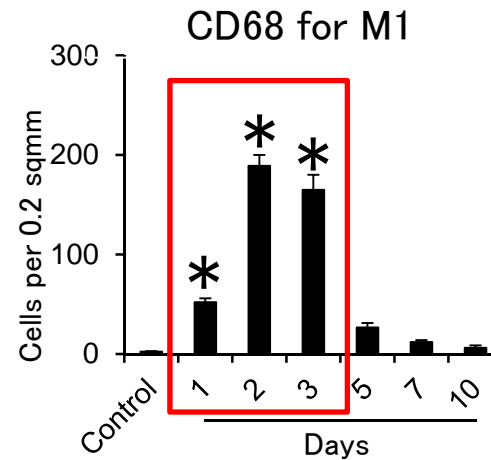
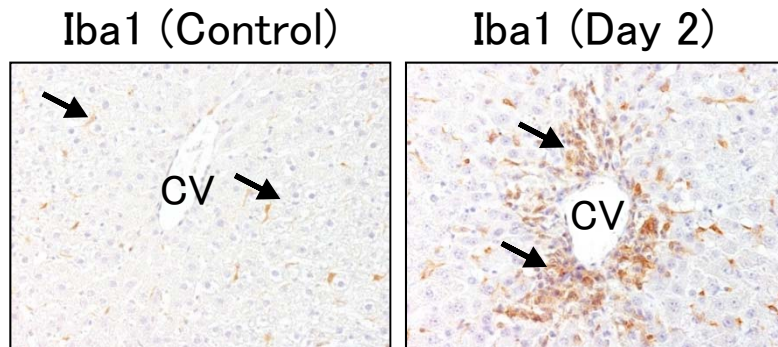
- CD68 (M1) 陽性細胞に対するMHCクラスIIあるいはCD204発現
- CD163 (M2) 陽性細胞に対するMHCクラスIIあるいはCD204発現



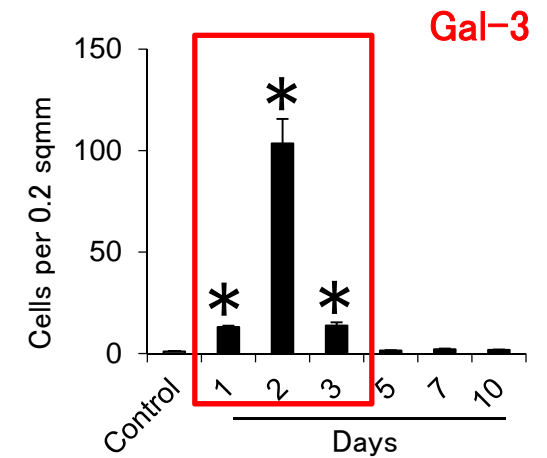
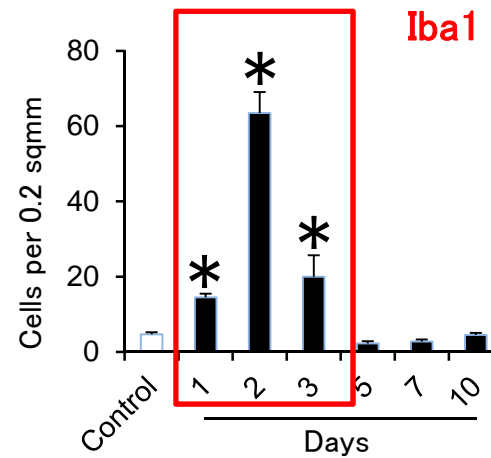
- MHC クラス II細胞はM1分極化
- CD204細胞はM2分極化

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

### (4) Iba1とGalectin-3(Gal-3)発現マクロファージのM1/M2分極化



CV, central vein



\*,  $P < 0.05$

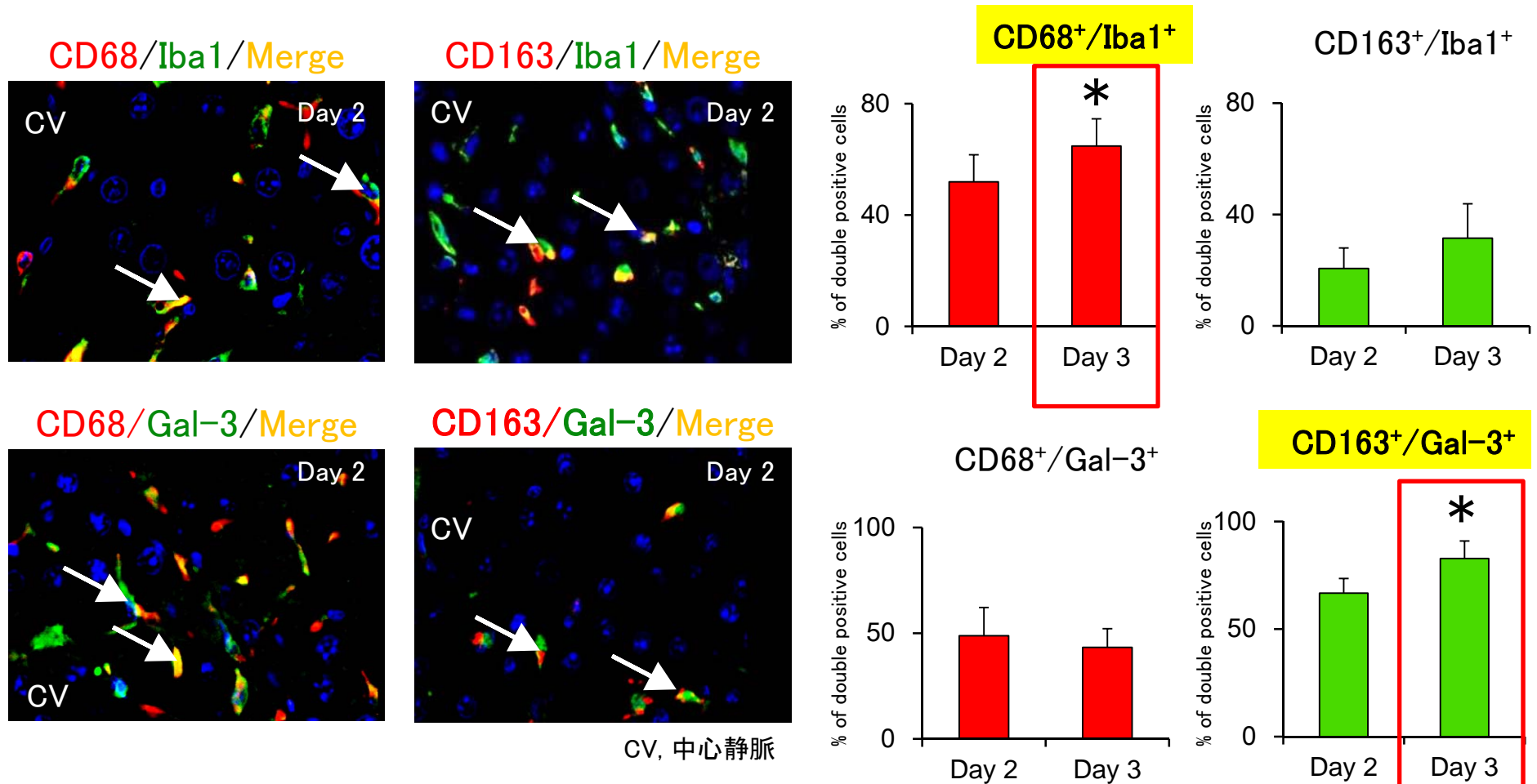
### M1/M2分極化の解析



## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験: 分極化の解析

### 二重蛍光免疫染色:

- ・CD68 (M1) 陽性細胞に対するIba1あるいはGal-3発現
- ・CD163 (M2) 陽性細胞に対するIba1あるいはGal-3発現

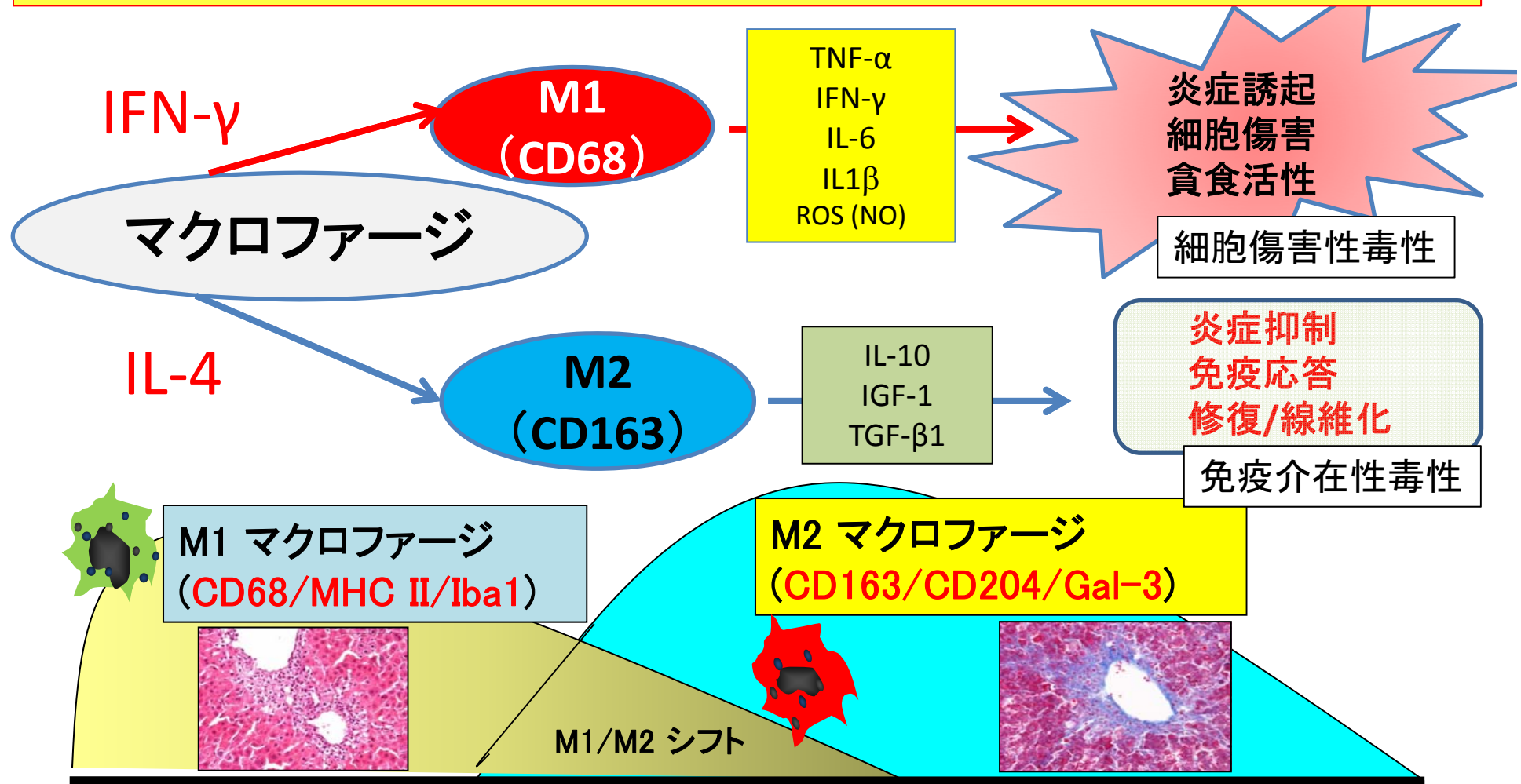


・Iba1細胞は M1分極化

・Gal-3細胞はM2分極化

\*,  $P < 0.05$

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝傷害実験: M1/M2分極化(まとめ)

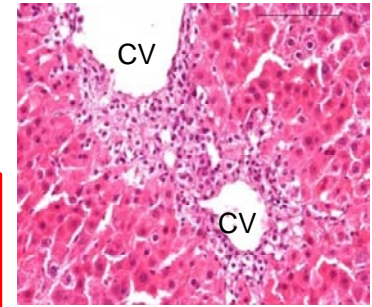


**M1:** ・貪食活性/傷害因子産生(CD68)      ・抗原提示能(MHC クラスII)  
・細胞活性・遊走(Iba-1)

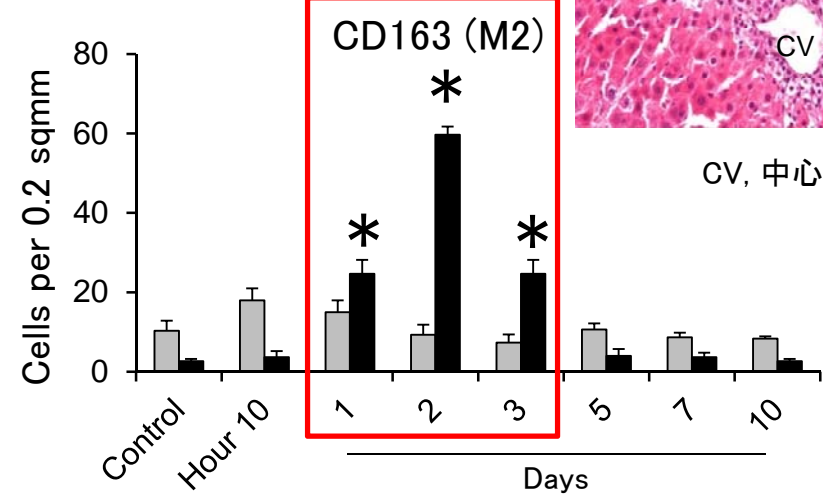
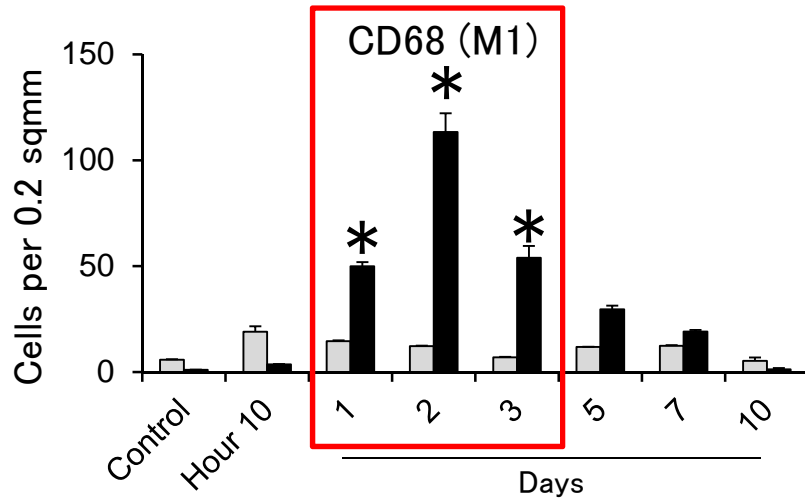
**M2:** ・炎症抑制因子産生TGF- $\beta$ (CD163)      ・線維化/組織修復 (Gal-3)  
・貪食活性/脂質代謝(CD204)

## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝細胞傷害実験

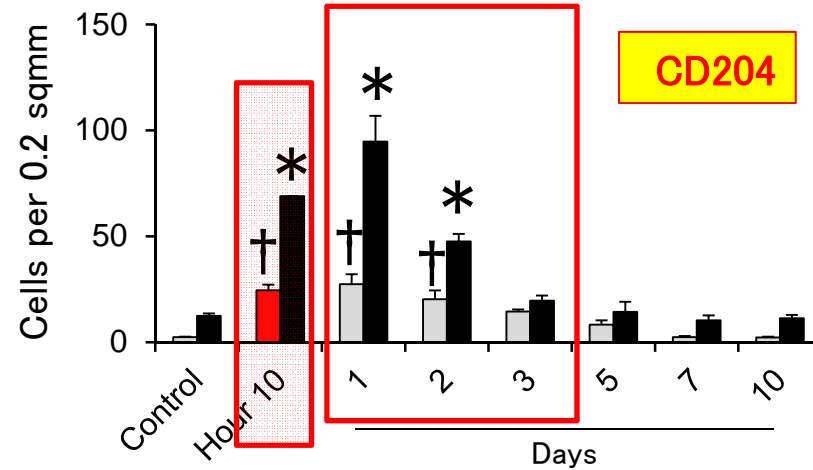
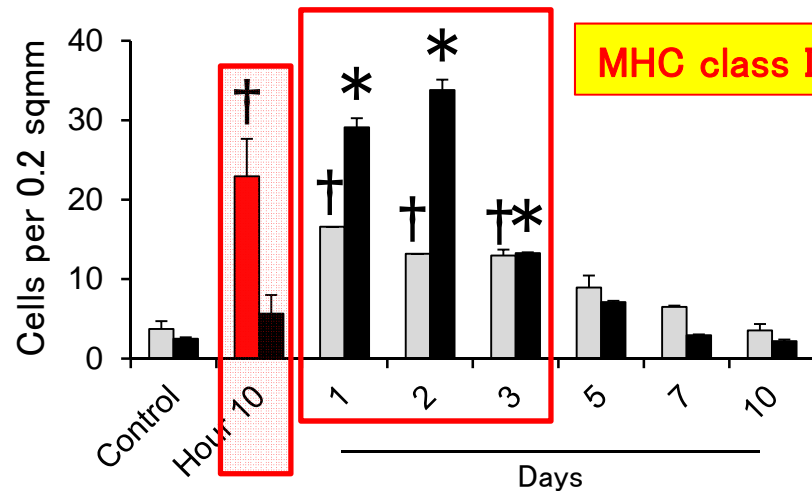
### (5) 肝マクロファージの初期誘導とM1/M2分極化



CV, 中心静脈



### グリソン鞘におけるマクロファージの出現

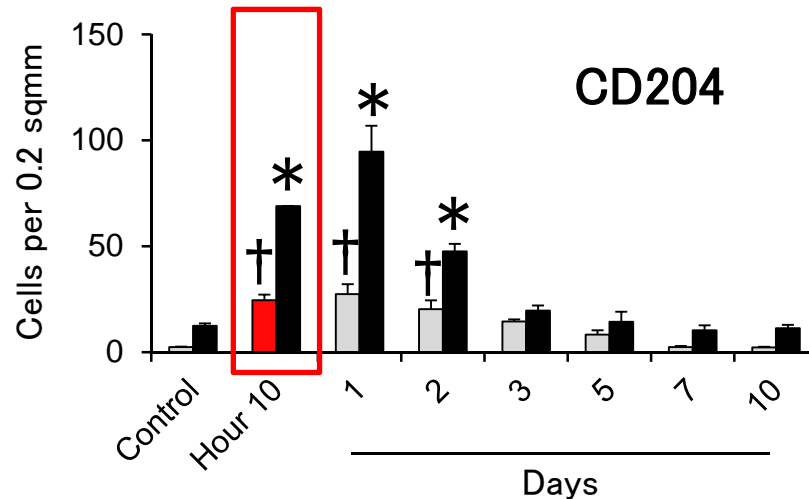
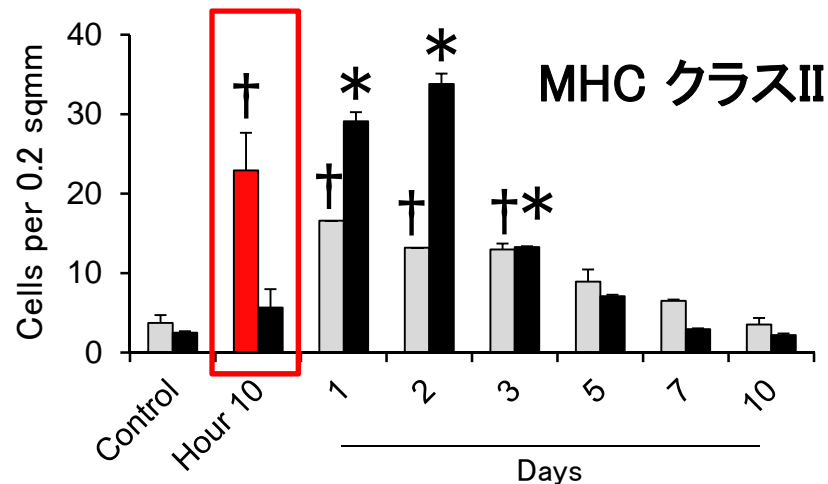


■ グリソン鞘; ■ 中心静脈

\* , †,  $P < 0.05$

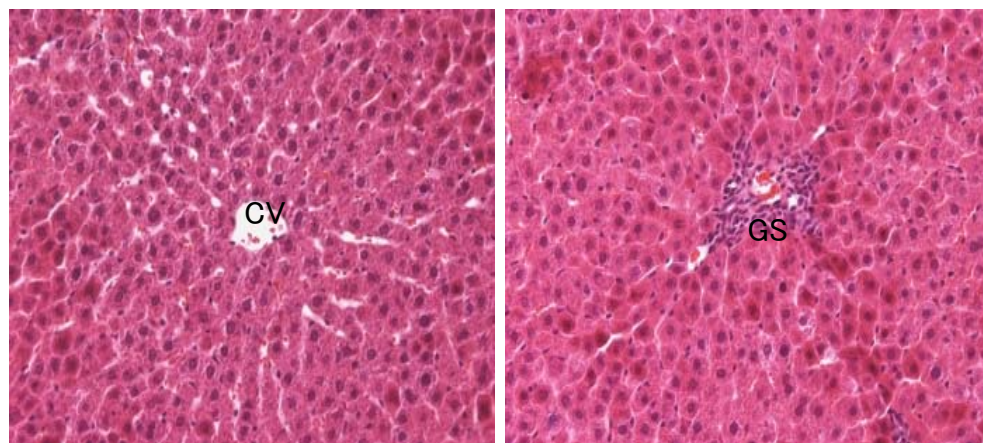
## 2-2: チオアセトアミド (TAA) 誘発肝傷害実験

### (5) 肝マクロファージの初期誘導: MHC クラス II と CD204 マクロファージ

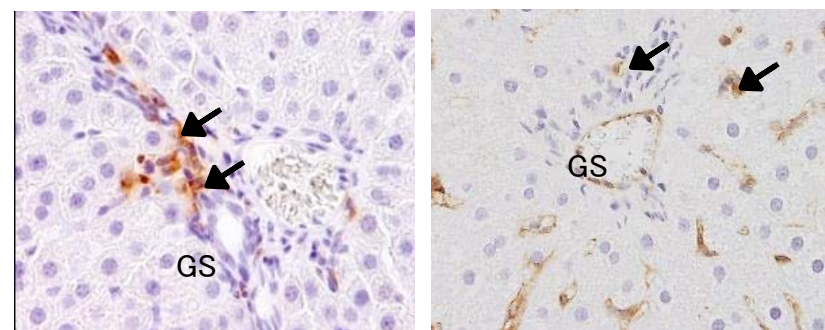


■ グリソン鞘    ■ 中心静脈

\* , †,  $P < 0.05$



10 時間 (HE)

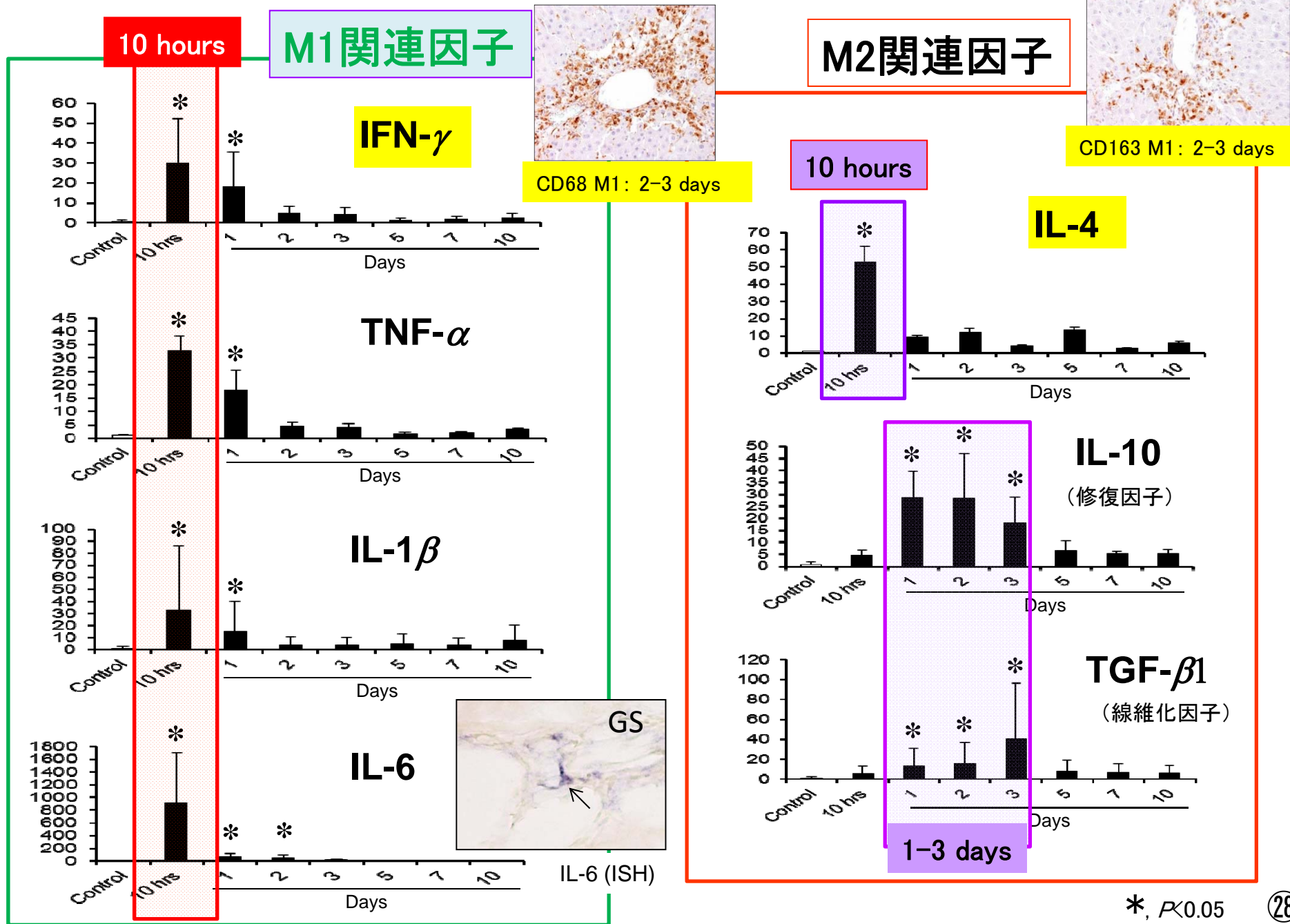


MHC class II

CD204

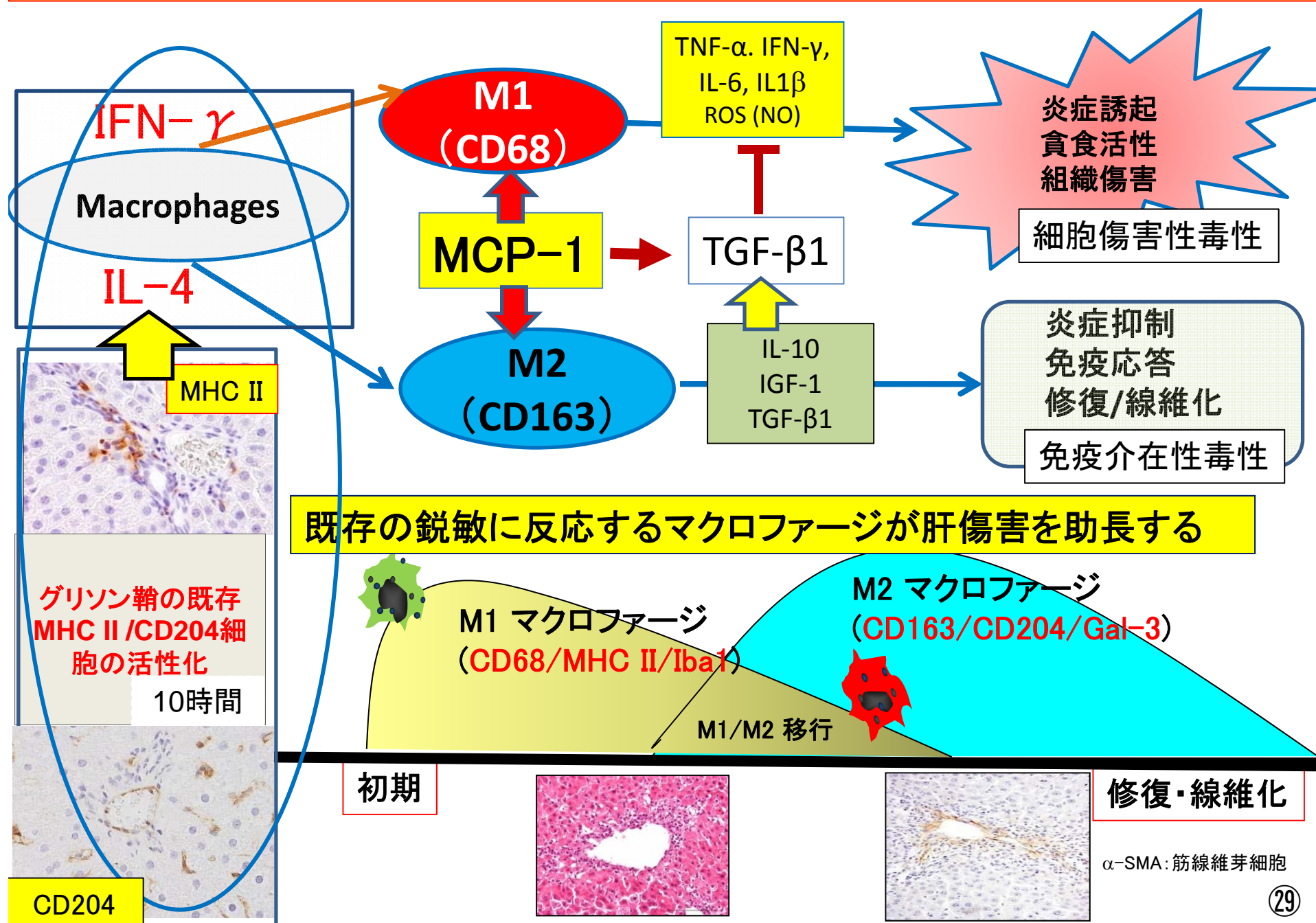
CV: 中心静脈; GS: グリソン鞘

# (5) 肝マクロファージの初期誘導とM1/M2分極化



\*  $P < 0.05$

## 2-2: チオアセトアミド(TAA)誘発肝細胞傷害実験: M1/M2分極化と肝毒性発現



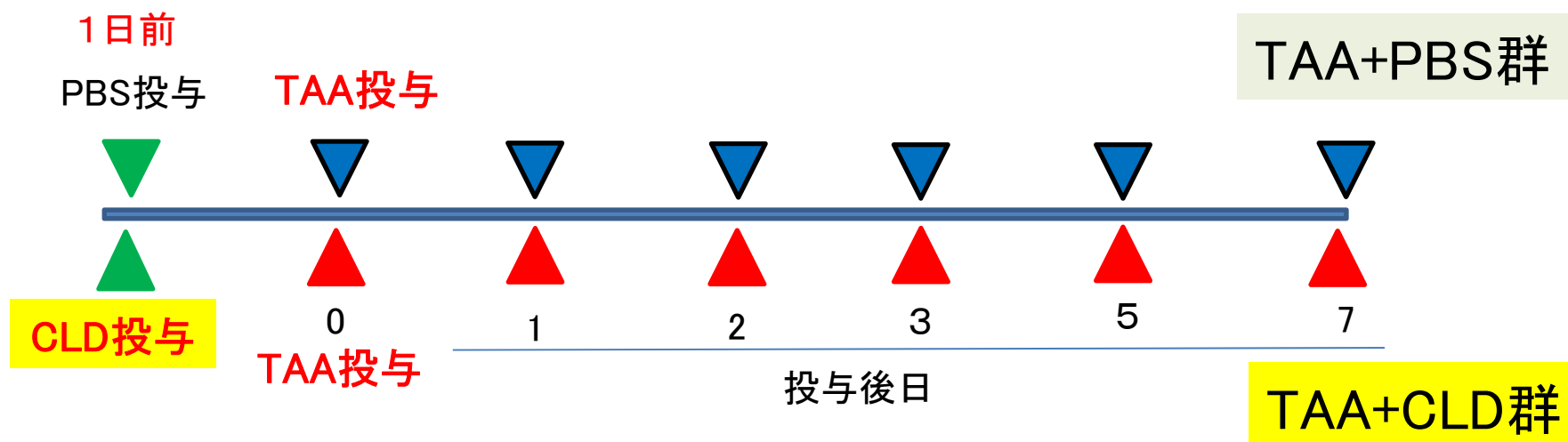
## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変

### クロドロネート(CLD)投与実験

F344 雄ラット, 6 週齢 (体重 150-160 g)

クロドロネート投与 (CLD): 50 mg/kg 体重, 静注

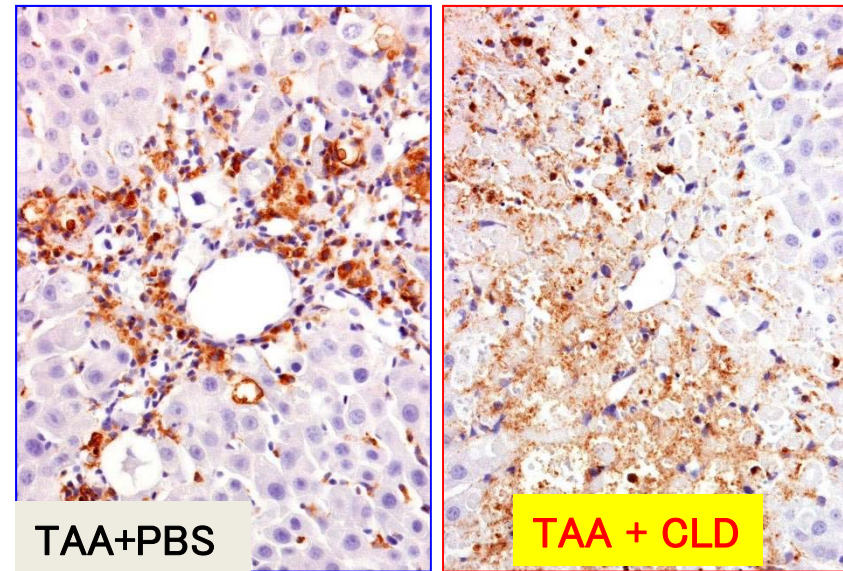
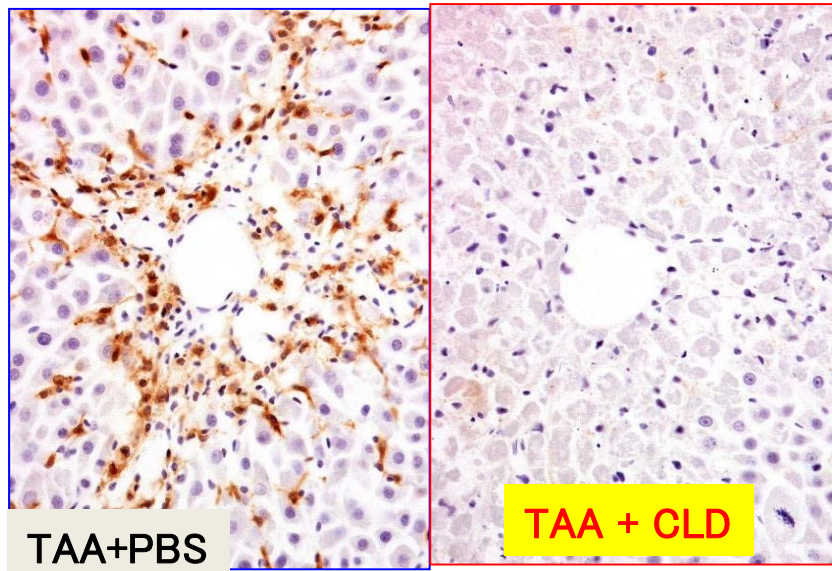
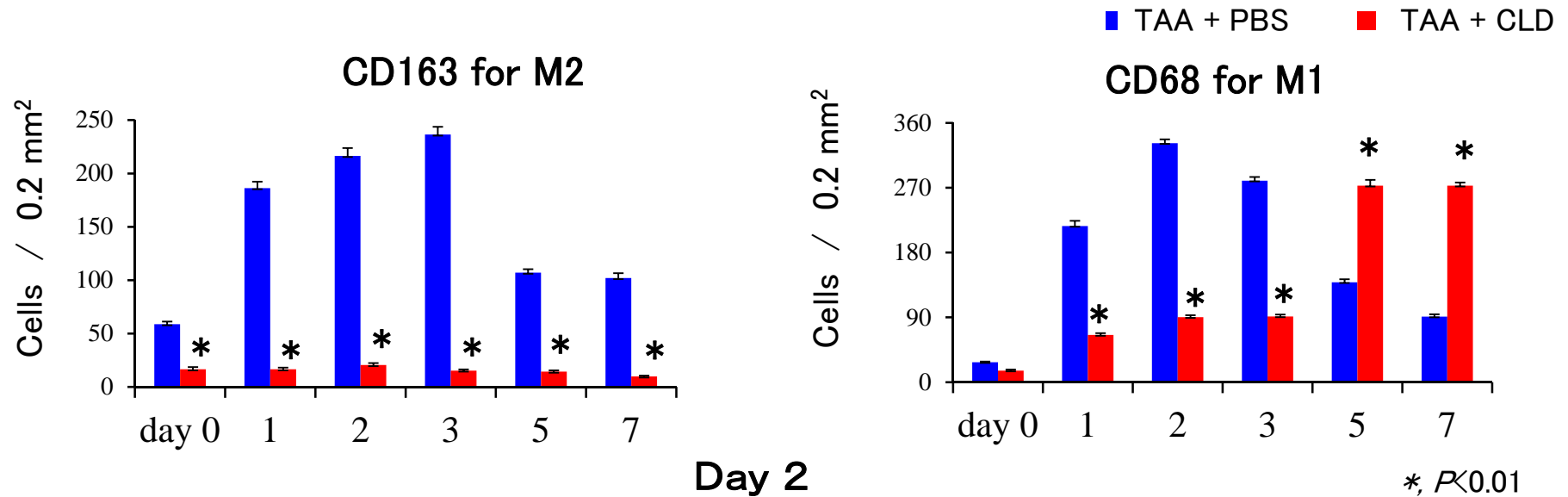
TAA, 腹腔投与・単回 : 300 mg/Kg 体重



肝マクロファージの枯渇は1週間持続

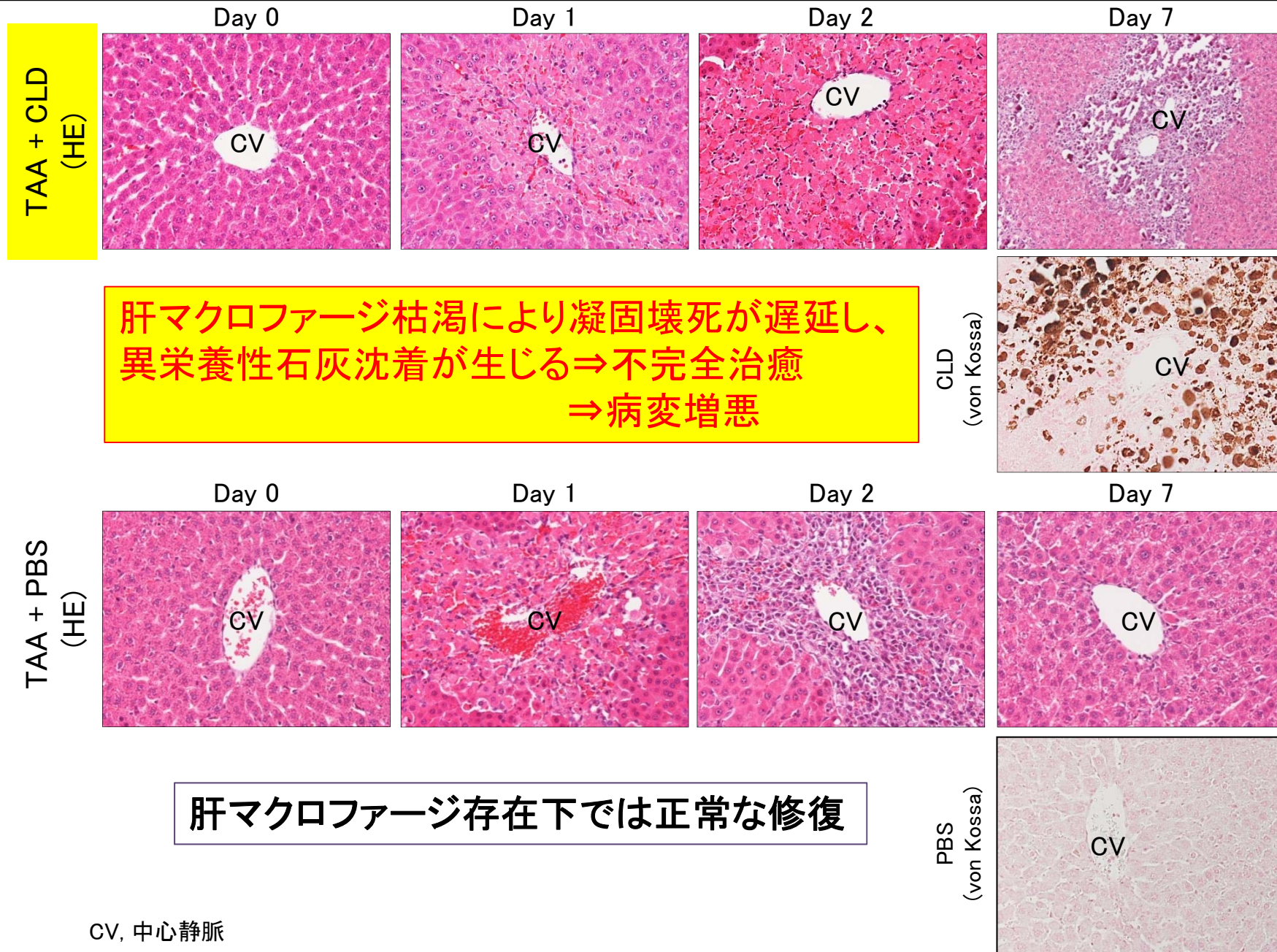
## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変

傷害部位に出現するCD68M1マクロファージとCD163M2マクロファージが激減



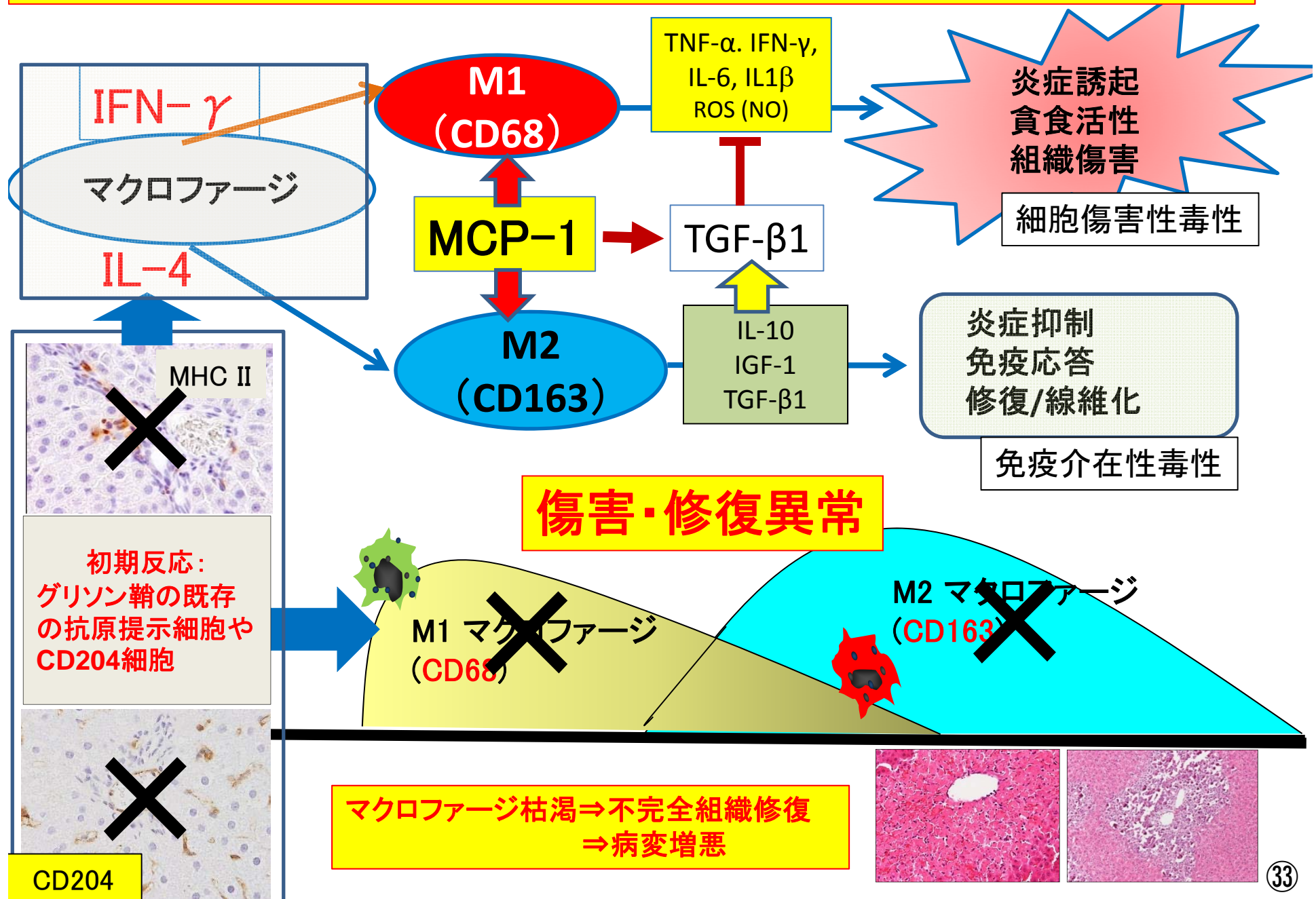


## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変



CV, 中心静脈

## 2-3: 肝マクロファージ枯渇状態におけるTAA 誘発病変



## まとめ

1. 肝マクロファージは恒常性維持に重要である。
  - ・活性化状態では、肝逸脱酵素が低下する。
  - ・枯渇状態では、肝逸脱酵素が増加し、かつ肝細胞が増殖する。
2. 薬物誘発肝細胞傷害病変(TAA誘発肝病変)はM1/M2マクロファージ分極化に基づいて解析できる。
  - ・傷害初期にはM1マクロファージ(CD68/MHC II/Iba-3)が、  
修復時にはM2マクロファージ(CD163/CD204/Gal-3)が出現する。
  - ・肝細胞傷害前に、グリソン鞘既存のマクロファージからM1/M2マクロファージ誘導因子が産生される。



- ・肝マクロファージの多様な機能特性に基づいた新規肝毒性評価手法の構築
  - ・肝マクロファージ機能を基軸とした*in vivo*と*in vitro*の実験系の構築
- ⇒マクロファージの出現状況を免疫組織化学染色法あるいは培養系を用いて評価することで肝毒性病変の発生機序の一端を解明できる。⇒メカニズム解析



食品健康影響評価への応用性: より精度の高いADI設定

## その他の実験（継続中）

1. **肝組織発生におけるM1/M2マクロファージの特性**に関する研究  
⇒胎生期にはCD68<sup>+</sup>M1マクロファージがアポトーシス細胞の貪食活性に、  
生後においては CD163<sup>+</sup> M2マクロファージが組織・機能分化に係ることが分かった。
2. TAA反復投与により作出した**肝硬変におけるGST-P陽性前腫瘍性病変におけるM1/M2マクロファージ特性**に関する研究  
⇒GST-P陰性偽小葉に比べ、GST-P陽性偽小葉ではM1/M2マクロファージが、  
より多く、しかも混在して出現していた。⇒前腫瘍性病変の形成に両マクロファージ  
が複雑に係ることが分かった。
3. TAA誘発肝病変におけるDanger Associated Molecular Patterns (**DAMPs**)による  
**免疫介在性肝毒性発現機序**に関する研究  
⇒S100A4などのDAMPsが傷害部位に発現し、TLR-4を介し抗原提示マクロファージ  
を活性化することで、免疫介在性の肝細胞傷害が生じる可能性が示された。
4. クロドロネート投与による肝マクロファージ枯渇条件下での  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate  
誘発の**小葉間胆管上皮傷害とその後の線維化形成の病態解析**  
⇒グリソン鞘の胆管上皮傷害病変の形成には、MHCクラスII発現マクロファージが重要  
であること、そして肝マクロファージ枯渇条件下では、胆管上皮傷害後の線維化が遅延  
することが分かった。

**Articles;**

1. Wijesundera KK, Izawa T, Murakami H, Tennakoon AH, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. M1- and M2-macrophage polarization in thioacetamide (TAA)-induced rat liver lesions; a possible analysis for hepato-pathology. *Histology and Histopathology*. 29: 497-511, 2014.
2. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Murakami H, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Experimental and Molecular Pathology*. 96: 382-392, 2014.
3. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Murakami H, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanakawa M, Kuwamura M, Yamate J. M1-/M2-macrophages contribute to the development of glutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive pseudolobules in thioacetamide-induced rat cirrhosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 67: 467-475. , 2015.
4. Pervin M, Golbar MD, Bondoc A, Izawa T, Kuwamura M, Jyoji Yamate. Immunophenotypical characterization and influence to liver homeostasis of depleting and repopulating hepatic macrophages in rats injected with clodronate. (submitted), 2015.

**Presentation ;**

1. Golbar HM, Izawa T, Alexandra B, Wijesundera KK, Tennakoon AH, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. Macrophage-derived galectin-3 is the key regulator of acute hepatic fibrogenesis in rats. *Proceedings of the 33rd Annual Symposium of the Society of Toxicologic Pathology (STP)*. Marriott Wardman Park Hotel, Washington DC, USA. Poster Presentation. Poster No. 19. June 22-26, 2014.
2. Pervin M, Golbar HM, Alexandra B, Uemura M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Characterization of repopulating macrophages in liver after depletion with liposomal clodronate in rats. 第157回日本獣医学会学術集会. 口頭発表. 札幌. Abstract No. BO-56. September 9-12, 2014.
3. Pervin M, Golbar HM, Alexandra B, Wijesundera KK, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Analyses of hepatic macrophages depleted by clodronate in rat liver. *Proceeding of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP)*, Poster Presentation. Abstract T-9. Atlanta, GA, USA. November 9-11, 2014.
4. 山手丈至: 教育講演「マクロファージと毒性病理学」: 第31回日本毒性病理学会学術集会 2015年1月29-30日 (東京)

**Related Articles;**

1. Golbar HM, Izawa T, Wijesundera KK, Tennakoon AH, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. Nestin expression in remodelling of  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced acute bile duct injury in rats. *Journal of Comparative Pathology* 151(2-3), 255-263, 2014.
2. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. Analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing ductular cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Experimental and Molecular Pathology*, 98: 476-485, 2015.