

いわゆる"細胆管増生"に関する病理学的研究 細胞形質,細胞動態およびトランスフォーミング増殖因子アルファ発現の解析を中心に

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9182">http://hdl.handle.net/2297/9182</a>

## いわゆる“細胆管増生”に関する病理学的研究

—細胞形質、細胞動態およびトランスフォーミング  
増殖因子アルファ発現の解析を中心に—

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)

原 田 憲 一

肝内胆管系の最末梢枝である細胆管は肝小葉辺縁部の肝細胞と門脈域内の小葉間胆管を結ぶ区分である。この細胆管は、反応性に富む組織成分で多くの肝胆道系疾患で増加し細胆管増生と呼ばれ、従来、この細胆管増生は非特異的な反応とされてきた。しかし、最近の免疫組織化学や分子生物学の進歩に伴い、この増生細胆管の病理学的意義が再び注目されている。今回、各種肝胆道系疾患患者129名から採取された外科的切除肝、針生検肝および剖検肝(ホルマリン固定パラフィン包埋切片と凍結肝)を対象に、これら増生細胆管の発生機序とその病理学的意義を検討したので報告する。細胞形質の変化は、サイトケラチン(cytokeratin, CK)、上皮膜関連抗原(epithelial membrane antigen, EMA)の免疫染色により行い、細胞動態は好銀性核小体形成領域(argyrophilic nucleolar organizer regions, AgNOR)の組織化学的染色と増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)の免疫染色、組織内ハイブリッド形成法(in situ hybridization, ISH)によりc-mycの発現を検討した。また、増殖およびトランスフォーメーションに関連したサイトカインであるトランスフォーミング増殖因子アルファ(transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )とそのレセプター(上皮増殖因子レセプター, epidermal growth factor receptor, EGFR)が胆管増生に果たす役割も検討した。組織学的特徴により増生細胆管を、管腔が明瞭な定型的細胆管と管腔が不明瞭な非定型的細胆管とに2分し得た。定型的細胆管は、主に門脈域内に認められ、検索した全例でみられた。一方、非定型的細胆管は、しばしば門脈域周囲の肝細胞と連続、または肝細胞索を置換する様に増生し、原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis, PBC)、原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)、肝外閉塞性黄疸、アルコール性肝線維症、亜広汎性肝壊死、肝内結石症、肝硬変、慢性活動性肝炎の症例で種々の程度に増生が認められた。表現型に関する検討では、定型的細胆管には胆管型CKとEMAの発現がみられたが、非定型的細胆管はEMA陰性で、胆管型CKの発現は不均一であった。細胞動態解析の検討により、増生した定型的細胆管でのAgNORおよびPCNA指数は、正常肝の細胆管での各指数に較べ有意に高値であった。PBCおよびPSCで見られた非定型的細胆管は増殖活性が低かったが、閉塞性黄疸や慢性活動性肝炎での非定型的細胆管では増殖活性亢進を示した。このような表現型および増殖活性の結果より、定型的細胆管増生は、胆管上皮細胞としての表現型を有した既存の胆管成分からの真の増生によるものと考えられた。一方、非定型的細胆管は胆管細胞としては不完全な表現型を有し、次の2種に分類できた。すなわち、PBCやPSCで見られた非定型的細胆管は、増殖活性が低く、グリソン鞘周囲の肝細胞からの形質転換(胆管上皮化生)による見かけ上の増加と考えられた。一方、慢性活動性肝炎や閉塞性黄疸で見られた非定型的細胆管は、増殖活性の亢進を伴っており、門脈域周囲の実質肝細胞を置換しつつ増生する胆管上皮の可能性が考えられた。免疫染色で、小葉間胆管、定型的細胆管および非定型的細胆管に、TGF- $\alpha$ とEGFRの強い発現を認めた。また、ウェスタンブロット法により胆汁中におけるTGF- $\alpha$ の存在を確認できた。また、ISHを用いたTGF- $\alpha$  mRNAの検出では、病的肝の所々の肝細胞とクッパー細胞にmRNAの発現を認めたが、胆管上皮には明らかな発現を認めなかった。これらの結果より、肝細胞およびクッパー細胞で産生されたTGF- $\alpha$ が、胆汁および胆管上皮のEGFRを介して胆管上皮に作用し、小葉間胆管および細胆管の増殖または形質転換に関与している可能性が示唆された。以上、各種肝疾患にみられる増生細胆管には、細胞形質と細胞動態による検討から、既存の胆管上皮に由来するものと肝細胞の化生によるものとがあらることが明らかとなった。これらの病変の発生にはTGF- $\alpha$ を含む種々の因子の関与が示唆された。

**Key words** intrahepatic bile duct, bile ductules, bile, cell kinetics, transforming growth factor- $\alpha$

肝内胆管系は、組織学的に、大型胆管、隔壁胆管、小葉間胆管、細胆管に分類され<sup>1)</sup>、各々のレベルに対応して特徴的な機能と病変(あるいは疾患)がみられる。例えば、小葉間胆管は、

肝動脈枝や門脈枝と門脈域内で伴走する胆管区分であり、このレベルの胆管病変として、原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis, PBC)の慢性非化膿性破壊性胆管炎<sup>2)~4)</sup>、C型慢性肝炎

平成7年11月22日受付、平成7年12月28日受理

Abbreviations: ABC, avidin biotin peroxidase complex; AgNOR, argyrophilic nucleolar organizer regions; CK, cytokeratin; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine; DIG, digoxigenin; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; EMA, epithelial membrane antigen; ISH, *in situ* hybridization; PBC,

の肝炎性胆管障害<sup>8,9</sup>が代表的であり、また隔壁胆管や大型胆管では原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC) の慢性閉塞性胆管炎や肝内結石症での慢性増殖性胆管炎が代表的である。薬剤性肝障害や移植片対宿主反応に伴う障害は主に小葉間胆管レベルで認められる。細胆管は小葉間胆管と肝細胞間隙で構成される毛細胆管の間に位置し、その中で、肝細胞に直接接する細胆管はヘリング管とも呼ばれている。また、この細胆管は固有の胆管上皮を有する細小の肝内胆管成分で、種々の病的状態において増殖あるいは炎症などの変化を示す。正常肝では、細胆管はグリソン鞘内に1~2個見られる程度であるが、病的肝においては、細胆管の拡張や壊死などの形態学的変化が見られ、種々の程度の増生(細胆管増生)<sup>12,17-19</sup>を伴う。従来、このような細胆管増生は非特異的な変化とされていたが、近年、その組織学的な亜分類や意義づけに関する研究がなされている。特に、その組織学的特徴により、管腔の明瞭な定型的細胆管と、明瞭な管腔を有さず樹枝状に増生する非定型的細胆管とに2分されている<sup>2,7,11-13</sup>。定型的細胆管は、閉塞性黄疸、急性肝炎、慢性肝炎、アルコール性肝線維症、早期のPBCやPSC、さらに種々の肝外病変に関連して二次的に出現する<sup>8,10</sup>。非定型的細胆管は、ScheuerによるPBC病期分類<sup>2</sup>で2期のPBCを特徴付ける病変であるが、3期や4期のPBCでも出現する<sup>9</sup>。また、PSCや肝の限局性結節性過形成、肝硬変、アルコール性肝線維症、亜広汎性肝壊死でも、非定型的細胆管に類似した細胆管増生をしばしば経験する<sup>8,11-13</sup>。組織形態のみならず、サイトケラチン(cytokeratin, CK)や糖鎖抗原などの免疫組織化学的所見により、これら2種の細胆管に関する病理学的意義や発生機序の違いが注目されている。しかし、現在までの所、これら細胆管増生の病理学的意義や発生機序に関して一定した見解は得られていない<sup>8,9,11-24</sup>。

近年、細胞動態解析のための種々の組織染色技術が進んで来ている。例えば、好銀性核小体形成領域 (argyrophilic nucleolar organizer regions, AgNOR) の組織染色<sup>25</sup>と増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)<sup>26,27</sup>の免疫染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片で応用可能な染色法で、各種細胞の細胞動態解析でしばしば用いられている。AgNOR染色では、rRNAの遺伝子とループを形成する核内非ヒストン蛋白がドットとして可染され、細胞の蛋白合成や細胞増殖と密接な関連性を有する<sup>25</sup>。また、PCNAは、DNAポリメラーゼ $\delta$ の補酵素であり、細胞周期の合成準備期(G1期)後期~合成期(S期)早期の核内に最も集積し、免疫染色で検出できる<sup>26,27</sup>。また、細胞の分化増殖に癌遺伝子およびその産物が深くかかわっていることが明らかにされてきている。特に、細胞増殖や癌化の観点から注目されているc-myc遺伝子は、細胞増殖刺激に対して速やかにmRNAへの転写が亢進し、細胞増殖を促す<sup>28</sup>。近年、アイソトープ標識プローブおよびジゴキニン(digoxigenin, DIG)などの非アイソトープ標識プローブを用いた核酸の検出技術が確立しつつあり、c-mycを含めた癌遺伝子のDNAやRNAが組織切片上で組織内ハイブリッド形成法(*in situ* hybridization, ISH)で検出出来るようになってきている。また、サイトカインは、免疫応答、炎症反応、増殖反応などの生体機能の発現を制御している分子群の総称で、そのうちの増殖因子とは組織で産生・放出されて周辺または自らの細胞増殖や分化などを調節する蛋白である。特に、増殖因子の一つであるトランスフォーミング増殖因子アルファ(transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )は、上皮細胞や間葉系細胞の増殖、分化を促進するサイトカインで、上皮増殖因子レセプター(epidermal growth factor receptor, EGFR)に結合して作用し、アミノ酸配列も上皮増殖因子(epidermal growth factor, EGF)

Table 1. Materials of liver specimens examined

Hepatobiliary diseases	Number of cases	Average age (yrs)	Sex Male : Female	Hepatitis viral marker
Primary biliary cirrhosis				
Stage 1	5 (5)	56.8	2 : 3	All negative
Stage 2	10 (4)	46.1	0 : 10	All negative
Stage 3	6 (2)	62.0	3 : 3	All negative
Primary sclerosing cholangitis				
Stage 1	1 (0)	56	1 : 0	All negative
Stage 2	2 (0)	65.0	0 : 2	All negative
Stage 4	2 (0)	64.5	1 : 1	All negative
Extrahepatic biliary obstruction	21 (7)	57.4	11 : 10	All negative
Alcoholic liver fibrosis	2 (2)	49.5	2 : 0	All negative
Submassive hepatic necrosis	12 (0)	44.5	7 : 5	All negative
Hepatolithiasis	4 (1)	57.8	3 : 1	All negative
Active liver cirrhosis	18 (2)	55.5	14 : 4	All type C
Chronic active hepatitis	22 (5)	55.4	16 : 6	Type B : C = 7 : 15
Chronic persistent hepatitis	10 (0)	48.2	7 : 3	Type B : C = 1 : 9
Normal liver	14 (13)	59.1	9 : 5	All negative

Figures in parentheses represent number of frozen section.

primary biliary cirrhosis; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PCNA LI, PCNA labeling index; PFA, paraformaldehyde; PSC, primary sclerosing cholangitis; TE, Tris-EDTA; TGF- $\alpha$ , transforming growth factor- $\alpha$

と約40%の相同性を有する<sup>29,30</sup>。種々の癌細胞や非腫瘍性上皮細胞で、TGF- $\alpha$ の発現が報告されており<sup>31-39</sup>、また、肝細胞癌などの患者から得られた腹水、胸水および尿中にもTGF- $\alpha$ の存在が証明されている<sup>40-42</sup>。しかし、胆管上皮でのTGF- $\alpha$ の発現について、2、3の報告<sup>35-39</sup>で記載はあるものの、胆管を中心としたTGF- $\alpha$ の生物学的意義の詳細な検討はなされていない。

本研究では、各種肝胆道系疾患にみられる細胆管増生を中心に、組織形態、表現型、細胞動態の解析を行い、増生細胆管の病理学的意義と増生機序の解明を行った。また、増生因子として、TGF- $\alpha$ に注目し、組織切片におけるTGF- $\alpha$ およびTGF- $\alpha$  mRNAの発現、そのレセプターであるEGFRの発現を検討し、また胆汁中でのTGF- $\alpha$ の検出も行うことにより、TGF- $\alpha$ が細胆管を中心とした肝内での胆管系の病理形態の発生にどのような生物学的意義を持っているのかを検討したので報告する。

対象および方法

I. 対象

1. 正常肝および各種肝胆道系疾患の肝組織標本

金沢大学医学部第二病理、金沢大学医学部第二外科、石川県立中央病院、福井県立病院、富山市民病院(1985~1994年)で経験された各種肝胆道系疾患患者129名から採取された外科的切除肝、針生検肝および剖検肝の肝組織片を1日~7日間10%中性ホルマリンで固定後、軟パラフィンで包埋した。各々のパラフィン包埋ブロックより20枚以上の4 $\mu$ mの切片を作成した。組織学的診断用に、作成した切片の一部を、HE染色、ゴモリの鍍銀染色、アザン・マロリー染色に用いた。また、41症例では、材料採取後、直ちに凍結用包埋剤(O. C. T. Compound)(Miles Inc., Elkhart, USA)に包埋し、その後、液体窒素で凍結および-80度で保存しておき、使用時に5 $\mu$ mの凍結切片を作成した。

疾患別の症例数、平均年齢、性別、B型およびC型肝炎ウィルスマーカーを表1に示す。閉塞性黄疸症例は、臨床的に膵頭部癌や総胆管癌の患者で、肝組織採取時までに1.5~10週(平均4.6週)の高ビリルビン血症を認めた症例である。なお、術前に、経皮経肝ドレナージで減黄処置を行った症例も含まれている。PBCおよびPSCの組織学的病期分類は、Scheuer分類<sup>9</sup>とLudwig分類<sup>43</sup>を混合した、いわゆるPBCの古典的病期分類<sup>44</sup>にしたがった。

2. 胆汁

金沢大学第二外科および第一内科、富山市民病院、浅ノ川総

合病院(1992~1994年)で経験された肝内および肝外閉塞性黄疸を来した患者から経皮経肝の胆道ドレナージおよび手術的に採取された35例の胆汁を対象とした。臨床診断別の症例数、平均年齢、性別を表2に示す。なお、胆汁採取を行い得た肝内結石症の1例は、肝組織片も同時に検索した。

II. 肝内胆管系の分類および増生細胆管の分類

肝内胆管系は、大きく大型胆管と小型胆管に2分した<sup>11</sup>。大型胆管とは左右肝管、領域胆管、区域胆管およびその一次分枝であり、固有の胆管壁があり、周囲に胆管付属腺がみられる。一方、小型胆管は隔壁胆管、小葉間胆管、細胆管に分類され、隔壁胆管は外径が100 $\mu$ m以上で、固有の胆管壁を有するが付属腺組織がない<sup>11</sup>。小葉間胆管は、本来のグリソン鞘の内部にある管腔明瞭な胆管でグリソン鞘辺縁の肝細胞とは隣接せず、外径が20~80 $\mu$ mで、肝動脈枝や門脈枝と伴走する胆管成分とした。細胆管はグリソン鞘辺縁部あるいは肝実質に接する胆管成分で、定型および非定型の細胆管とに2分した。すなわち、定型の細胆管は、横断面で4~6個の胆管上皮からなる管腔構造の明瞭な細胆管成分とした。非定型の細胆管は、樹枝状に増生する不明瞭な管腔または管腔を有さない細胆管成分とした。今回は主に、小葉間胆管と細胆管を中心に観察した。

III. 免疫染色を用いた表現型の解析

CK、上皮膜関連抗原(epithelial membrane antigen, EMA)の免疫染色を以下の如く行った。なお、CKは、Mollら<sup>45</sup>により、分子量および等電点により19種(CK1~19)に分けられ、それぞれの組織内分布が知られている。肝細胞はCK8,18<sup>(31,23,45-47)</sup>、胆管上皮細胞はCK7, 8, 18, 19<sup>(31,17,23,46,47)</sup>を含有するとされている。今回、モノクローナル抗CK抗体として、CK10, 14, 15, 16, 19を認識するAE1抗体(ImmunoBiologicals, Costa Mesa, USA)<sup>45,48</sup>とCK8, 18, 19を認識するCAM5.2抗体(Becton Dickinson, San Jose, USA)<sup>(31,23,49)</sup>を用いた。したがって、AE1は胆管上皮細胞のみを、CAM5.2は肝細胞および胆管上皮のCKを認識する。また、EMAは、種々の上皮細胞に存在する特異的な抗原で、胆管上皮には存在するが、肝細胞には存在しない抗原である<sup>9,50</sup>。

免疫染色は、129例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、Hsuら<sup>51</sup>にしたがいアビジン-ビオチン複合体(avidin biotin peroxidase complex, ABC)法で行った。すなわち各切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼを0.3%過酸化水素水加メチルアルコールで20分間ブロッキングし、そのうえ非特異的の化学結合反応を防止するため正常ウマ血清(10倍希釈, Vector Lab., Burlingame, USA)で30分間処置した。一次抗体として、マウス抗AE1モノクローナル抗体(50倍希釈)、マウス抗

Table 2. Materials of hepatic bile

Clinical diagnosis	Number of cases	Average age (yrs)	Sex Male: Female
Hepatolithiasis	4	56.0	1:3
Cholecystolithiasis	5	58.2	2:3
Common bile duct stone	8	70.7	4:4
Common bile duct cancer	3	72.7	2:1
Hilar cholangiocarcinoma	4	76.5	3:1
Pancreatic head cancer	6	70.3	6:0
Miscellaneous	5	68.0	2:3

CAM5.2 モノクローナル抗体 (50倍希釈), マウス抗ヒト EMA モノクローナル抗体 (50倍希釈, Dako, Glostrup, Denmark) を, 4°C で一晩反応させた. 2次抗体としてビオチン化抗マウス IgG (200倍希釈, Vector Lab.), 続いてペルオキシダーゼ標識 ABC 溶液 (Vectastain ABC Kit, Vector Lab.) で, 各々室温60分間反応させた. 免疫複合体反応物を0.01%過酸化水素加 3,3'-ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma chemical, St. Louis, USA) 溶液で可視化し, ヘマトキシリンで軽く核染後, 脱水封入した. 各反応過程間は, 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.5) (phosphatate-buffered saline, PBS) で充分洗浄を行い, また, 抗体の希釈はすべて PBS で行った.

なお, 陰性対象は1次抗体のかわりに非免疫血清や PBS を用い, 陽性所見が消失することにより確認した.

#### IV. 胆管上皮の細胞動態解析

129例のホルマリン固定パラフィン包埋切片のうち, PCNA 染色に最適とされている固定期間が1~3日<sup>52,53)</sup> のものを選択し, PBC 17例, PSC 4例, 肝外閉塞性黄疸17例, 亜広汎性肝壊死6例, 肝硬変13例, 慢性活動性肝炎16例, 慢性持続性肝炎8例, 正常肝9例を染色および検索対象とした.

##### 1. AgNOR の組織化学染色

Crocker ら<sup>29)</sup> の方法をもとに, 脱パラフィン切片をゼラチン加1%蟻酸溶液と50%硝酸銀溶液の1:2混和溶液内で28分間反応させ, 洗浄後, 5%チオ硫酸ナトリウムで5分間処置し, メチルグリーン溶液で核染し, 脱水封入した. 黒色から黒褐色調の明瞭なドットを陽性とした. 各切片で小葉間胆管, 定型のおよび非定型の細胆管を識別し, 各胆管成分における最低100個の胆管上皮細胞の核内 AgNOR 数を油浸レンズ下で数え, 各胆管成分に対する平均 AgNOR 数 (AgNOR スコア) を算出した.

##### 2. PCNA の免疫染色

1次抗体として, マウス抗 PCNA モノクローナル抗体 (PC10) (100倍希釈, Novocastra Lab., Newcastle, UK) を用いて, ペルオキシダーゼ標識 ABC 法を行い, DAB で可視化した. 反応陽性物は核に一致して出現し, 強く染まるものと中等度~軽度に染まるものがあったが両方とも陽性所見とした. 各切片で, 小葉間胆管, 定型のおよび非定型の細胆管を識別し, 各胆管成分における最低100個の胆管上皮細胞での PCNA 陽性および陰性細胞数を数え, 陽性比率をパーセントで示した [PCNA 陽性指数 (PCNA labeling index, PCNA LI)].

##### 3. c-myc mRNA の ISH

###### 1) アイソトープ標識 cDNA プローブの作製

プローブとして, c-myc に対する cDNA (3rd exon, 2本鎖 DNA, 1400塩基対, Oncor Inc., Gaithersburg, USA) を, ランダムプライマー法<sup>54)</sup> により 35S-dCTP (Amersham, Buckinghamshire, UK) で標識するため, マルチプライム DNA 標識システム (Multiprime DNA labeling system<sup>TM</sup>, Amersham) を用いた. すなわち, 1 $\mu$ g の c-myc cDNA を, 100°C で10分間熱変性 (denature) 後, dATP, dGTP, dTTP, 35S-dCTP (50 $\mu$ Ci), 緩衝液, プライマー溶液, ギチオスレイトール (dithiothreitol, DTT) および Klenow 酵素 (DNA ポリメラーゼから 5'→3' エクソヌクレアーゼ活性を除いたもの) を混和し, 37°C で2時間反応させた. その後, 冷エタノールで精製および沈殿させ, 風乾したものを, 50 $\mu$ l の Tris 塩酸-EDTA 緩衝液 (TE 緩衝液:

10mM Tris 塩酸および 1mM EDTA) に溶解した.

###### 2) 組織切片の前処理

材料は, PBC 2例, 閉塞性黄疸3例, 慢性活動性肝炎2例, 正常肝4例の凍結切片を用いた. 各凍結切片を, 4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) 加 PBS で15分間, 前固定した後, プロテナーゼ K (和光純薬, 大阪) (2.5 $\mu$ g/ml, 37°C, 15分間) と塩酸溶液 (0.2規定, 室温, 10分間) で除蛋白処置を行った. 4% PFA 加 PBS で10分間, 後固定した後, 非特異的なプローブの吸着防止のためにアセチレーション (0.1M トリエタノールアミン塩酸 pH8.0, 0.25% 酢酸溶液で10分間) を行い, エタノール系列で脱水, 風乾した. 各反応過程間は, PBS で充分洗浄した.

###### 3) ハイブリダイゼーション

風乾した切片を, 100 $\mu$ M DTT 加ハイブリダイゼーション溶液 (50%脱イオン化ホルムアミド, 10mM の Tris 塩酸 pH7.6, 200 $\mu$ g/ml の酵母 tRNA, デンハルト溶液, 10%デキストラン硫酸, 250 $\mu$ g/ml のサケ精子 DNA) で, 42°C, 1時間プレハイブリダイゼーションを行った. 上記ハイブリダイゼーション溶液で希釈したアイソトープ標識 cDNA プローブ (100ng/ml) を, 100°C で3分間熱処理後, 組織切片に滴下し, 42°C で24時間ハイブリダイゼーションを行った. 洗浄は, 50%ホルムアミド加 2 $\times$ SSC で42°C で20分間, 2 $\times$ SSC で42°C で30分間, 3回, 0.1 $\times$ SSC で42°C で20分間, 2回行った.

###### 4) ハイブリッドの検出-オートラジオグラフィ-

風乾した組織切片に暗室でオートラジオグラフィ用写真乳剤を塗布後, 4°C で7日間感光し, 現像, 定着してから, HE 染色を行ない, 脱水封入した.

なお, 陰性対象は組織切片を RNase A (Boehringer Mannheim Biochemica, Indianapolis, USA) で処理後, 上記プローブで ISH した切片, および Klenow 酵素を加えないプローブ (cDNA 合成が行なわれないプローブ) で ISH した切片で, 陽性所見が消失することをもって確認した.

#### VI. サイトカインに関する解析

##### 1. TGF- $\alpha$ および EGFR の免疫染色

材料は, 41例の凍結切片を用いた (表1). 各凍結切片を, 4% PFA 加 PBS で15分間固定した後, 内因性ペルオキシダーゼおよびビオチンのブロックを行った. 一次抗体としてマウス抗ヒト TGF- $\alpha$  モノクローナル抗体 (Ab-2, クローン213-4.4, 100倍希釈, Oncogene Science, Manhasset, USA) とマウス抗ヒト EGFR モノクローナル抗体 (Ab-1, クローン528, 100倍希釈, Oncogene Science) を用いて, ペルオキシダーゼ標識 ABC 法を行い, DAB で可視化した.

##### 2. TGF- $\alpha$ mRNA の ISH

###### 1) DIG 標識オリゴヌクレオチドプローブの作製

プローブとして, TGF- $\alpha$  mRNA に対するヒト TGF- $\alpha$  オリゴヌクレオチドアンチセンスプローブ (40塩基, Oncogene Science) と陰性コントロールとしてヒト TGF- $\alpha$  オリゴヌクレオチドセンスプローブ (40塩基, Oncogene Science) を, 3'末端テリング法<sup>55)</sup> により DIG で標識するため, DIG Oligonucleotide Tailing Kit<sup>TM</sup> (Boehringer Mannheim Biochemica) を用いた. すなわち, 100mM のオリゴヌクレオチドプローブに, テリング緩衝液, DIG 標識 dUTP 溶液, dATP 溶液, ターミナルトランスフェラーゼを混合し, 37°C で60分間反応させ, 精製および沈殿後, 50 $\mu$ l TE 緩衝液に溶解し

た。

2) ハイブリダイゼーション

41例の凍結切片を前処理した後、37℃、1時間プレハイブリダイゼーション、続いて37℃、16時間ハイブリダイゼーション(プローブ最終濃度 500ng/ml)を行った。洗浄は、すべて37℃で行った。

3) ハイブリッドの免疫化学的検出

洗浄後の組織切片を、DIG 緩衝液 1 (100mM Tris 塩酸 pH7.6, 150mM 塩化ナトリウム) で約 1 分間なじませた後、1.5%ブロッキング試薬 (Beohringer Mannheim Biochemica) 加 DIG 緩衝液 1 で 1 時間ブロッキングを行った。アルカリホスファターゼ標識抗 DIG ポリクローナル抗体 (500倍希釈, Beohringer Mannheim Biochemica) を室温、30分間反応させた後、DIG 緩衝液 1 で 15分間、2 回洗浄し、DIG 緩衝液 3 (100mM Tris 塩酸 pH9.5, 100mM 塩化ナトリウム, 50mM 塩化マグネシウム) で 3分間平衡化した。アルカリホスファターゼの発色は、450 $\mu$ l/ml テトラニトロ青テトラゾリウム塩 (Beohringer Mannheim Biochemica) および 175 $\mu$ l/ml 5-ブromo-4-クロロ-3-インドキシルリン酸塩 (Beohringer Mannheim Biochemica) 加 DIG 緩衝液 3 で、3~10時間発色反応を行っ

た。十分な発色を確認し、TE 緩衝液で反応を停止した後、水溶性封入剤で封入した。なお、陰性対象は、センスプローブを用いた染色で、陽性所見が消失することをもちて確認した。

3. 胆汁中における TGF- $\alpha$  蛋白の発現

35例の胆汁を、Folin-Lowry 反応<sup>6)</sup>により総蛋白濃度を測定

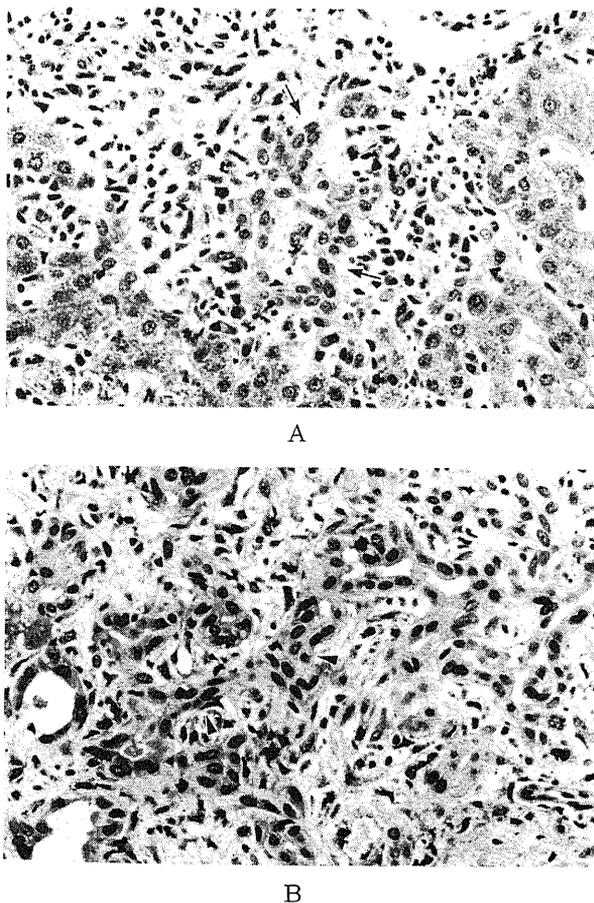


Fig. 1. Typical and atypical ductular proliferation in extrahepatic biliary obstruction. (A) Typical ductular proliferation (arrowheads). Their lumen and border are distinct, and there are no direct connection between ductules and periportal hepatocytes. HE. (B) Atypical ductular proliferation (arrowheads). They show an elongated or anastomosing configuration. HE.

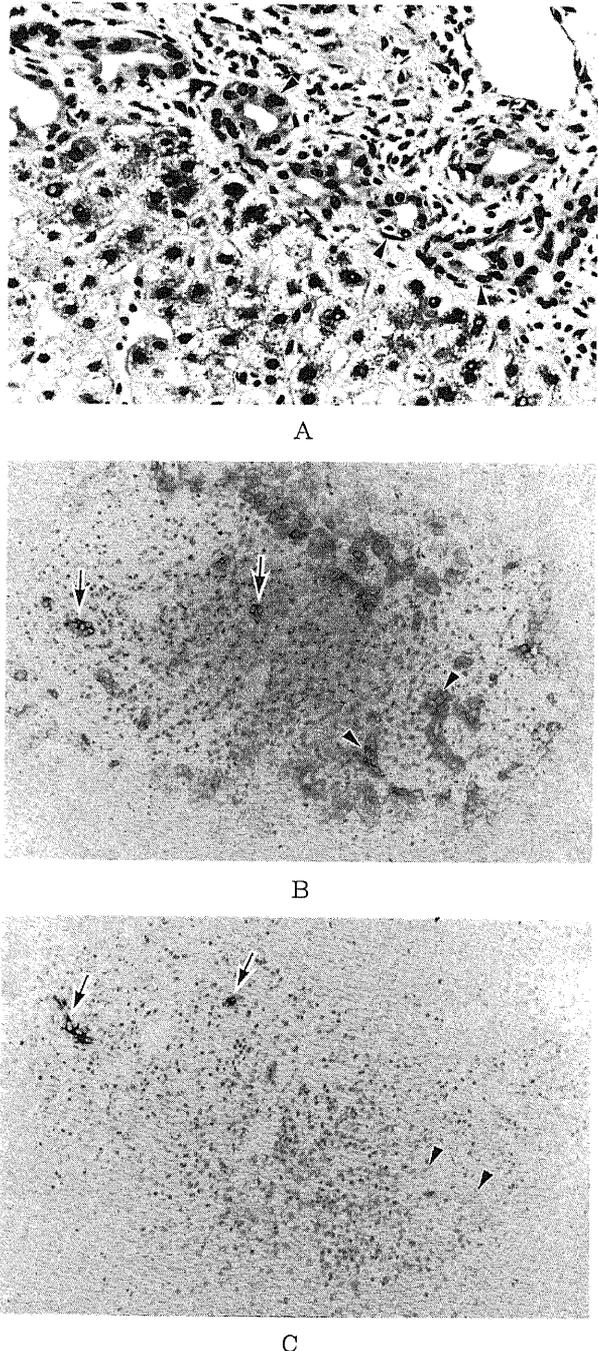


Fig. 2. Proliferation of atypical bile ductules in primary biliary cirrhosis. (A) Atypical ductules with vague lumen are continuous with periportal hepatocytes (arrows). HE. (B) Typical ductules (arrows) and atypical ductules (arrowheads) are positive for CAM 5.2. Immunohistochemical staining with CAM 5.2, counterstaining with hematoxylin. (C) Typical ductules (arrows) are positive for AE1, whereas atypical ductules (arrowheads) are negative. Immunohistochemical staining with AE1, counterstaining with hematoxylin.

し、すべて 5mg/ml の濃度になるように調整した。1 $\mu$ l の胆汁を直接、ニトロセルロース膜に滴下するドット法の他、ウェスタンブロット法として、5%の $\beta$ メルカプトエタノールを含む 10 $\mu$ l の各胆汁を、15%~25%の濃度勾配からなる SDS-PAGE (Multi Gel 15/25, 第一化学薬品, 東京) で、電気泳動を行った。分離した蛋白をニトロセルロース膜に転写し、3%ウシ血清アルブミン (和光純薬) で 4 $^{\circ}$ C, 一昼夜ブロッキングを行っ

た。免疫反応は、マウス抗 TGF- $\alpha$  モノクローナル抗体 (Ab-1, クローン 134A-2B3) (10倍希釈, Oncogene Science) で室温, 1時間反応後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスの免疫グロブリン (1000倍希釈, Dako) で、室温, 45分間反応を行い、DAB で可視化した。また、陽性コントロールとして、ヒト TGF- $\alpha$  リコンビナント蛋白 (MN5547) (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA) を用いた。

#### Ⅶ. 統計学的検討

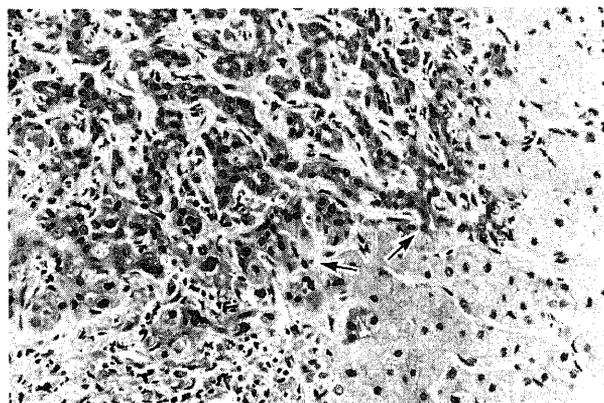
統計学的検討は、Student の t 検定を用いて行い、危険率 5%未満を以て有意差ありとした。

### 成 績

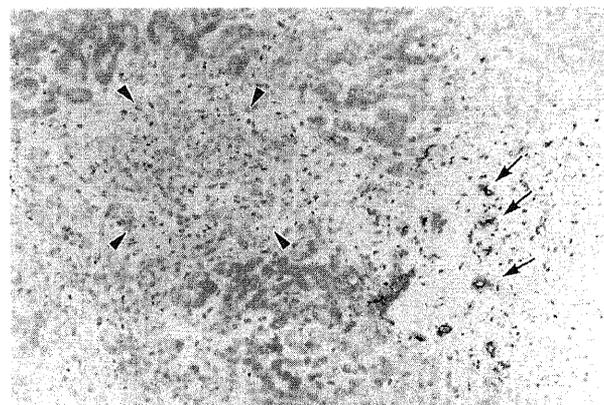
#### 1. 増生細胆管の組織像

定型的細胆管は、主に、門脈域内や線維性隔壁内あるいはその辺縁部にみられ、正常肝および全ての病的肝の症例で観察された。その数は、正常肝では門脈域 1 個当たり 1~3 個程度であったが、病的肝では種々の程度の定型的細胆管増生がみられた (図 1A)。

一方、非定型的細胆管は、正常肝ではみられなかったが、病的肝では、門脈域や線維性隔壁内で胞巣状に、またその辺縁部で増生しており、主として限界板の破壊と関連して増生しており、その一部は肝細胞索と連続している像が見られた (図 1B, 2A)。また、肝硬変症例では、非定型的細胆管が主として再生結節辺縁にみられ、肝細胞索に対して置換性に増生している像



A



B

Fig. 3. Atypical bile ductules in cirrhosis. (A) Proliferated atypical ductules are found around the regenerating nodules. There are direct connection between atypical ductules and periportal hepatocytes (arrows). HE. (B) Typical ductules (arrows) are positive for epithelial membrane antigen, whereas atypical ductules (arrowheads) are negative. Immunohistochemical staining for epithelial membrane antigen, counterstaining with hematoxylin.

Table 3. Prevalence of the atypical bile ductular proliferation in various hepatobiliary diseases

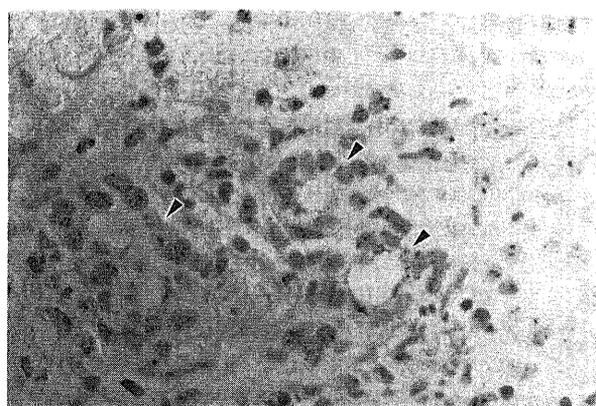
Hepatobiliary diseases	Prevalence (%)
Primary biliary cirrhosis	
Stage 1	0/5 <sup>a)</sup> (0)
Stage 2 & 3	10/16 (63)
Primary sclerosing cholangitis	
Stage 1	0/1 (0)
Stage 2 & 4	4/4 (100)
Extrahepatic biliary obstruction	9/21 (43)
Alcoholic liver fibrosis	2/2 (100)
Submassive hepatic necrosis	12/12 (100)
Hepatolithiasis	1/4 (25)
Active cirrhosis	5/18 (28)
Chronic active hepatitis	2/22 (9)
Chronic persistent hepatitis	0/10 (0)
Normal liver	0/14 (0)

<sup>a)</sup> Number of positive cases / number of total cases.

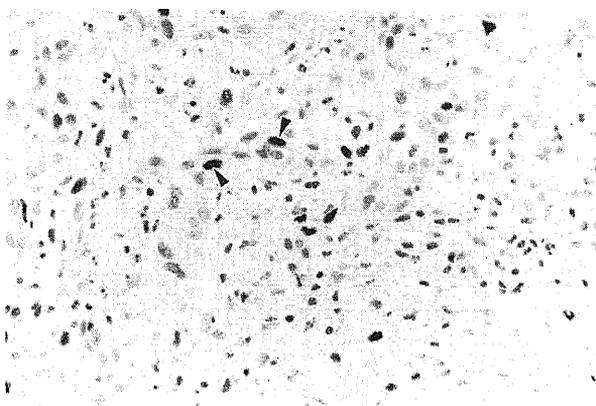
Table 4. Phenotypes of biliary epithelial cells and hepatocytes by immunohistochemical staining

Marker	Reactivity			
	Interlobular bile ducts	Typical bile ductules	Atypical bile ductules	Hepatocytes
Cytokeratin				
CAM 5.2	+	+	+	±~+
AE 1	+	+	+~-	-
EMA	+	+	-	-

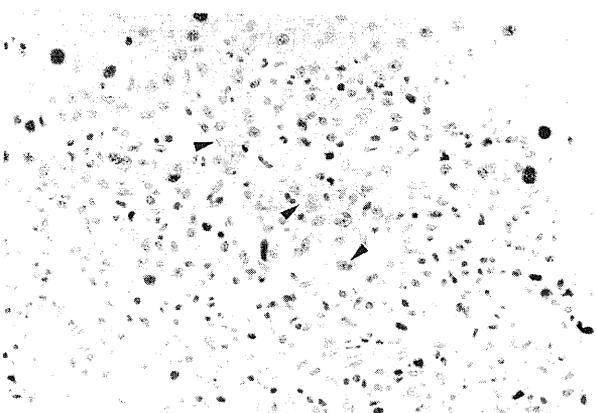
CAM 5.2 and AE 1 are monoclonal antibodies recognizing cytokeratin 10, 14, 15, 16 and 19, and cytokeratin 8, 18 and 19, respectively. +, positive; ±, weakly positive; -, negative; EMA, epithelial membrane antigen.



A



B



C

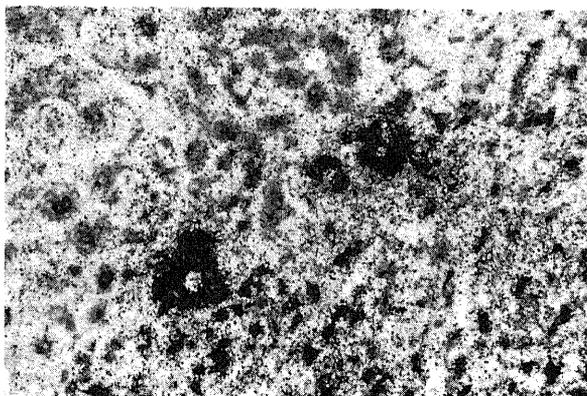
Fig. 4. Proliferative activities in typical and atypical bile ductules. (A) Black dots (AgNORs) are clearly seen in the nuclei of the typical ductules (arrowheads). An adjoining section shown in Fig. 1A. Staining for argyrophilic nucleolar organizer regions. (B) Some epithelial cells of the atypical ductules are positive for proliferating cell nuclear antigen (arrowheads). An adjoining section shown in Fig. 1B. Immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen, counterstaining with hematoxylin. (C) Atypical ductules in primary biliary cirrhosis shows no significant immunoreactivity for proliferating cell nuclear antigen (arrowheads). An adjoining section shown in Fig. 2A. Immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen, counterstaining with hematoxylin.

やほとんど非定型的細胆管で置換されている再生結節も見られた(図3A). 亜広汎性肝壊死でも, 広範な肝細胞の脱落部が非定型的細胆管でほとんど置換されている像も見られた. 2~4期のPBC(63%)やPSC(100%), 肝外閉塞性黄疸(43%), アルコール性肝線維症(100%), 亜広汎性肝壊死(100%), 肝内結石症(25%), 肝硬変(28%), 慢性活動性肝炎(9%)の症例でも非定型的細胆管増生を認めた. 非定型的細胆管の出現率を表3に示す.

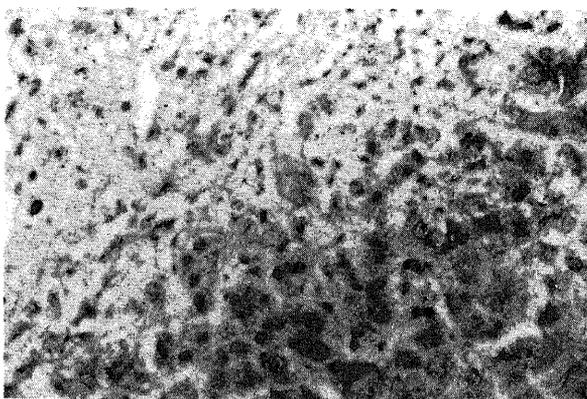
II. 表現型に関する免疫組織化学的解析

CAM 5.2は, 全ての小葉間胆管(PBC, PSCやC型慢性肝炎の障害像を示す小葉間胆管を含む), それに定型的細胆管と非定型的細胆管に強い発現を認めた(表4)(図2B). また, 肝細胞でもその細胞膜にCAM 5.2の発現が認められ, 特に病的肝で門脈域周囲の肝細胞に陽性像が見られた.

一方, AE1の発現は主として胆管上皮の細胞膜に強く発現しており, 全ての小葉間胆管と定型的細胆管, また約半数の非定型的細胆管に認められた(図2C). しかし, 非定型的細胆管の中には, CAM 5.2陽性で, AE1が弱陽性から陰性を示すものも見られ, この様な発現を示す非定型的細胆管は門脈域周囲の肝細胞索と連続していた(図2B, 2C). また, 非定型的細胆管におけるCK発現の不均一性は, 同一症例, また同一切片内でも



A



B

Fig. 5. Detection of c-myc mRNA in chronic active hepatitis by *in situ* hybridization. (A) Silver grains of c-myc mRNA are observed in proliferated bile ductules using a <sup>35</sup>S-labeled cDNA probe. (B) c-myc mRNA is not detected in negative control using section incubated with RNase before hybridization.

見られた。なお、肝細胞には AE1 の発現はほとんど見られなかったが、AE1 陽性の非定型的細胆管に隣接する肝細胞の一部には弱陽性を示すものも見られた。

EMA の免疫染色では、全ての小葉間胆管とほとんどの定型的細胆管において管腔面に膜状に EMA の発現を認めた。しかし、非定型的細胆管では明らかな発現は認められなかった (図 3B)。また、肝細胞では常に EMA は陰性であった。

### Ⅲ. 胆管上皮の細胞動態解析

AgNOR は、核内に黒～黒褐色調の微細顆粒として見られた (図 4A)、また PCNA は細胞の核に一致して発現がみられた (図 4B, 4C)。

#### 1. 小葉間胆管の増殖活性

正常肝における小葉間胆管の AgNOR スコアと PCNA LI は、 $1.58 \pm 0.19$  と  $26.6 \pm 6.98$  (平均±標準偏差) であった (表 5)。また、病的肝の小葉間胆管での AgNOR スコアは、閉塞性黄疸での  $1.92 \pm 0.43$  から亜広汎性壊死での  $2.33 \pm 0.22$  と幅広く分布していた。病的肝の小葉間胆管での PCNA LI も幅広く分布しており、慢性持続性肝炎での  $33.6 \pm 11.9$  から肝外閉塞性黄

疸での  $56.0 \pm 11.0$  に分布していた。全ての病的肝の小葉間胆管は、正常肝の小葉間胆管の増殖活性に較べ高値であったが、慢性持続性肝炎と正常肝との間に有意差は見られなかった。なお、病的肝相互間では有意な差は認められなかった。

#### 2. 定型的細胆管の増殖活性

正常肝における定型的細胆管の AgNOR スコアおよび PCNA LI は、 $1.56 \pm 0.25$ ,  $22.1 \pm 10.0$  であった (表 5)。病的肝での定型的細胆管の AgNOR スコアは、 $1.91 \pm 0.19$  (慢性活動性肝炎) ~  $3.00$  (PSC の I 期の 1 例) まで幅広く分布していた。PCNA LI も慢性持続性肝炎の  $38.3 \pm 12.3$  から PSC の I 期の 1 例  $66.6$  まで分布していた。いずれも、正常肝の定型的細胆管に較べ有意に高値であり、各病的肝での定型的細胆管の増殖活性亢進を認めた。しかし、病的肝の相互間では有意な差は認められなかった。

#### 3. 非定型的細胆管の増殖活性

非定型的細胆管増生が見られた 2~4 期の PBC (10 例) や PSC (3 例)、肝外閉塞性黄疸 (8 例)、亜広汎性肝壊死 (6 例)、肝硬変 (3 例)、慢性活動性肝炎 (2 例) の症例に関して、非定型

Table 5. AgNOR score and PCNA labeling index in biliary epithelial cells

Hepatobiliary disease	Number of cases	Interlobular bile ducts		Typical bile ductules		Atypical bile ductules	
		AgNOR score ×±S.D.	PCNA LI ×±S.D.	AgNOR score ×±S.D.	PCNA LI ×±S.D.	AgNOR score ×±S.D.	PCNA LI ×±S.D.
PBC							
Stage 1	5	$2.15 \pm 0.12$	$51.4 \pm 11.7$	$2.06 \pm 0.15$	$46.3 \pm 14.6$		
Stage 2&3	12	$2.26 \pm 0.39$	$54.4 \pm 18.6$	$1.95 \pm 0.23$	$52.5 \pm 15.2$	$1.45 \pm 0.14(10)^*$	$18.2 \pm 9.5(10)$
PSC							
Stage 1	1	2.02	48.5	3.00	66.6		
Stage 2&4	3	$2.33 \pm 0.22$	$41.3 \pm 6.0$	$2.25 \pm 0.30$	$54.5 \pm 6.7$	$1.33 \pm 0.12$	$19.2 \pm 4.4$ *
EBO	17	$1.92 \pm 0.43$	$56.0 \pm 11.0$	$2.09 \pm 0.36$	$59.1 \pm 15.9$	$2.42 \pm 0.42(8)$	$56.9 \pm 19.3(8)$
SMHN	6	$2.33 \pm 0.54$ *	$41.3 \pm 9.0$ *	$2.22 \pm 0.28$ *	$43.3 \pm 11.3$ *	$2.39 \pm 0.24$	$53.8 \pm 12.6$
LC	13	$2.05 \pm 0.20$	$51.6 \pm 13.9$	$1.92 \pm 0.28$	$43.3 \pm 18.2$	$2.42 \pm 0.54(3)$	$56.0 \pm 16.9(3)$
CAH	16	$1.93 \pm 0.26$	$50.8 \pm 16.4$	$1.91 \pm 0.19$	$55.1 \pm 18.7$	$2.02 \pm 0.13(2)$	$51.7 \pm 2.6(2)$
CPH	8	$1.78 \pm 0.21$	$33.6 \pm 11.9$	$2.02 \pm 0.32$	$38.3 \pm 12.3$		
N L	9	$1.58 \pm 0.19$	$26.6 \pm 6.9$	$1.56 \pm 0.25$	$22.1 \pm 10.0$		

AgNOR, argyrophilic nucleolar organizer region; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; IL, labeling index; S.D., standard deviation; PBC, primary biliary cirrhosis; PSC, primary sclerosing cholangitis; EBO, extrahepatic biliary obstruction; SMHN, submassive hepatic necrosis; LC, active liver cirrhosis; CAH, chronic active hepatitis; CPH, chronic persistent hepatitis; NL, normal liver; \*,  $p < 0.05$ .

Table 6. Expression of transforming growth factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\alpha$  mRNA and epidermal growth factor receptor in liver tissue

Materials and location	Expression of		
	TGF- $\alpha$	TGF- $\alpha$ mRNA	EGFR
Normal liver			
Interlobular bile ducts	+	-	+
Typical bile ductules	+	-	+
Hepatocytes	~±	~±	+
Hepatobiliary diseases			
Interlobular bile ducts	+	-	+
Typical bile ductules	+	-	+
Atypical bile ductules	+	-	+
Hepatocytes	+	+	+
Kupffer cells	±~+	±~+	-

TGF- $\alpha$ , transforming growth factor- $\alpha$ ; EGFR, epidermal growth factor receptor; +, positive; ±, weakly positive; -, negative.

的細胆管の増殖活性を検討した(表5)。PBCのAgNORスコアとPCNA LIは、各々、 $1.45 \pm 0.14$ ,  $18.2 \pm 9.58$ , PSCでは $1.33 \pm 0.12$ ,  $19.2 \pm 4.42$ で、いずれも正常肝での定型的細胆管の増殖活性と同程度であった。しかし、閉塞性黄疸、亜広汎性肝壊死、肝硬変、慢性活動性肝炎の非定型的細胆管では、各々の指数が $2.02 \pm 0.13 \sim 2.42 \pm 0.42$ ,  $51.7 \pm 2.65 \sim 56.9 \pm 19.3$ であり、病的肝における増生定型的細胆管と同程度の増殖活性亢進があり、PBCやPSCの非定型的細胆管に較べて有意に高値であった。

4. c-myc mRNA の発現

c-myc mRNA のオートラジオグラフィでのシグナルは、組織切片上の乳剤層に、明視野で黒い粒子として観察することができた。正常肝では、少数の小葉間胆管と肝細胞に弱いシグナルを認めるのみであったが、病的肝の小葉間胆管と定型的細胆管には、mRNAの有意なシグナルを認めた(図5A)。なお、非定型的細胆管に関しては、かなり組織破壊が強く、非定型的細胆管の同定および評価は困難であった。なお、陰性コントロールでは、有意なシグナルは見られなかった(図5B)。

V. サイトカインに関する解析

主な成績を表6に示す。

1. TGF- $\alpha$  の発現

TGF- $\alpha$  は、主に細胞質に発現が見られた。正常肝では、小葉間胆管、定型的細胆管のほとんどの胆管上皮に TGF- $\alpha$  の発現を認めた。胆管上皮に較べ発現は弱い、肝細胞にも散在性に陽性像を認めた(表6)。一方、病的肝では、PBCなどの障害胆管を含めた小葉間胆管、定型的細胆管の他、慢性胆汁うっ滞例で出現する非定型的細胆管にも、TGF- $\alpha$  の強い発現を認めた(図6A, 6B)。また、病的肝の肝細胞やクッパー細胞にも、TGF- $\alpha$  の強い発現を認めた(図6B)。

2. TGF- $\alpha$  mRNA の発現

TGF- $\alpha$  mRNA の発現は、細胞質に発現していた。正常肝では、散在性に肝細胞に弱い発現を認めたが、小葉間胆管、定型的細胆管胆管には明らかなシグナルは見られなかった。一方、病的肝で、肝細胞と所々のクッパー細胞に TGF- $\alpha$  mRNA の有意なシグナルを認めたが、小葉間胆管、定型的および非定型的細胆管に明らかな発現は認めなかった(図6C, 6D)。なお、センスプローブを用いた陰性コントロールでは、有意なシグナルは認めなかった。

3. EGFR の発現

EGFR は、細胞膜および細胞質に見られた。正常肝、病的肝

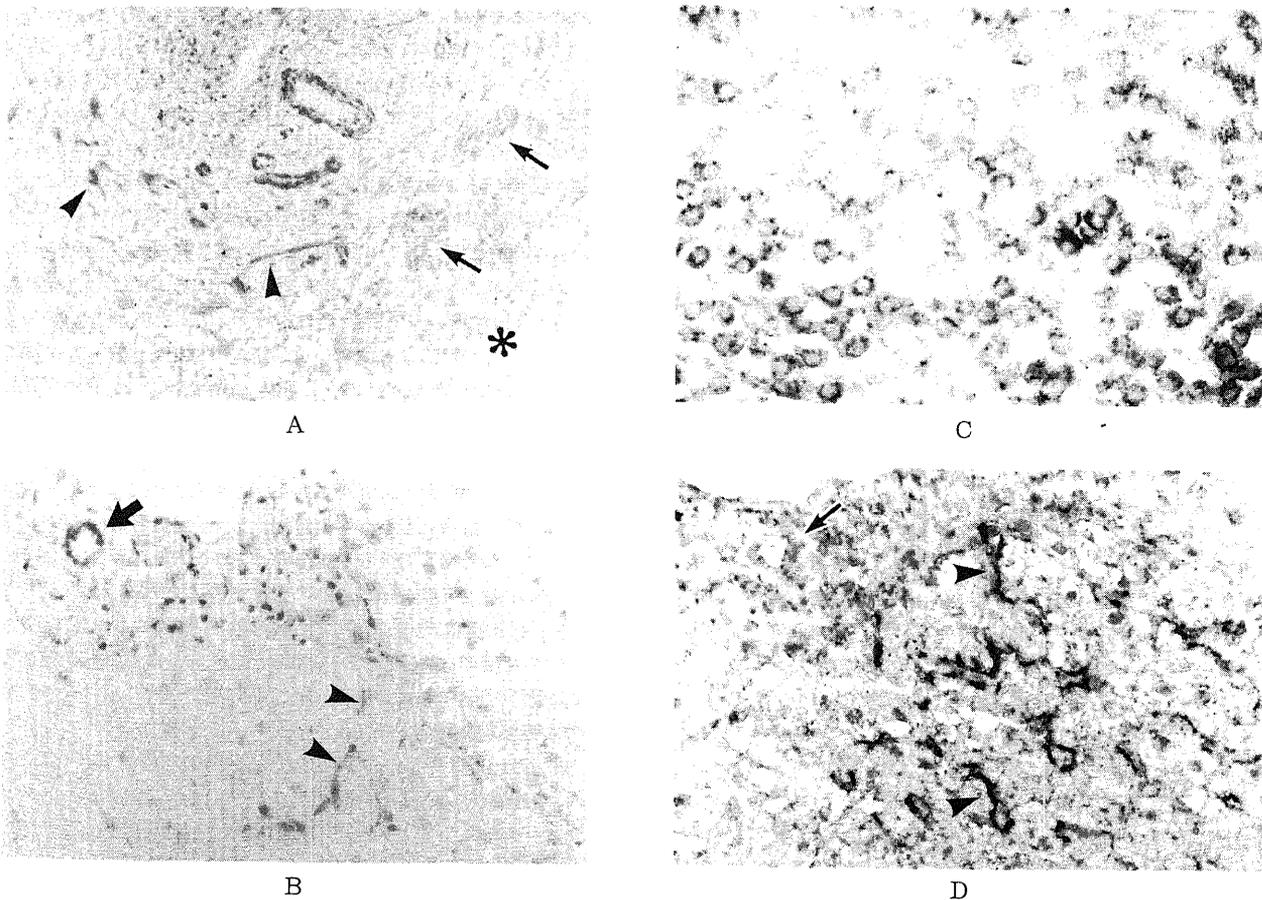


Fig. 6. Expression of TGF- $\alpha$  protein (A, B) and TGF- $\alpha$  mRNA (C, D). (A) Alcoholic liver fibrosis. Typical ductules (arrows) and atypical ductules (arrowheads) are observed with strong immunoreactivity. Periportal hepatocytes (asterisk) are also positive. (B) Chronic active hepatitis. Hyperplastic Kupffer cells in sinusoids (arrowheads) as well as interlobular bile duct in portal tracts (arrow) show immunoreactivity. (C) Primary biliary cirrhosis. A number of hepatocytes show positive signal in their cytoplasm. (D) A section adjacent to that shown in (B). Hyperplastic Kupffer cells (arrowheads) express specific signal, while interlobular bile duct (arrow) lacks expression. Immunohistochemical staining for TGF- $\alpha$ , counterstaining with hematoxylin (A and B). *In situ* hybridization with digoxigenin labeled antisense probe against TGF- $\alpha$  mRNA (C and D).

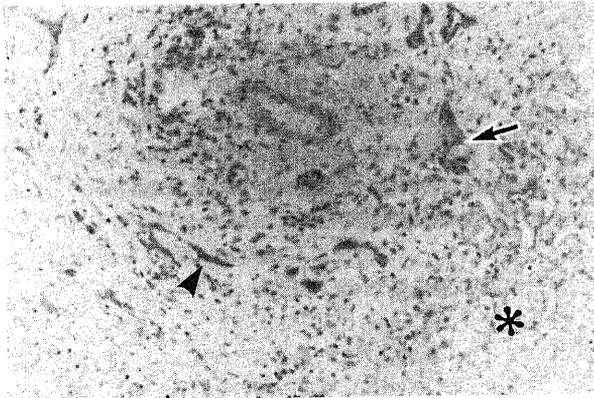


Fig. 7. Expression of EGFR in alcoholic liver fibrosis. A section adjacent to that shown in Fig. 6-A. Cytoplasmic expression is shown in proliferated bile ductules, typical ductules (arrow) and atypical ductules (arrowhead). Periportal hepatocytes (asterisk) are also expressed immunoreactivity, exclusively membranous. Immunohistochemical staining for EGFR, counterstaining with hematoxylin.

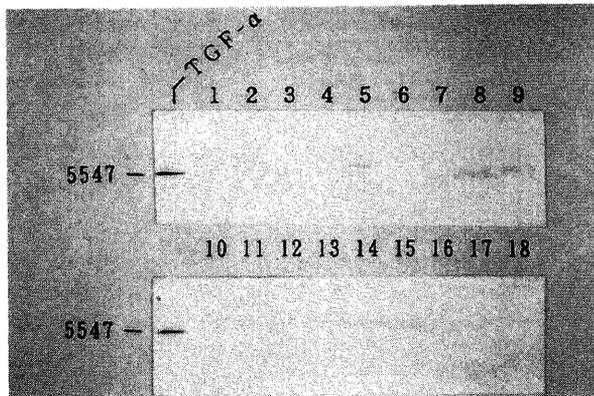


Fig. 8. Western blotting analysis of TGF- $\alpha$  from hepatic bile samples. TGF- $\alpha$  is detected in 15 (lanes 1-3, 5, 7-16, 18) of 18 samples. Lane 'TGF- $\alpha$ ' is a positive control using recombinant TGF- $\alpha$ .

を問わず、すべての小葉間胆管、定型のおよび非定型の細胆管の細胞膜と細胞質に EGFR の強い発現を認めた (図 7)。また、ほぼ全症例の肝細胞にも、主として膜状に EGFR の発現を認めた。なお、クーパー細胞には明かな陽性像は確認できなかった。

#### 4. 胆汁中における TGF- $\alpha$ の発現

イムノドット法により 35 例中 33 例の症例の胆汁中に TGF- $\alpha$  が検出できた。また、ウェスタンブロット法により、陽性コントロールとして用いたリコンビナント TGF- $\alpha$  は、分子量約 5500 領域にバンドを示した。また、35 例中 25 例の症例で、陽性コントロールと同じ分子量レベルにバンドが確認できた (図 8)。

#### 考 察

肝内胆管系、特に細胆管は、反応性に富む組織成分であり、多くの肝内外の病的状態において、肝内門脈域および線維性

壁内で増生や炎症を示す<sup>210)</sup>。この現象は一般的に細胆管増生あるいは細胆管反応と呼ばれ、非特異的な肝病変の 1 つとされてきた。最近、免疫組織化学あるいは分子生物学の著しい進歩に伴い、この細胆管増生の病的意義が再び注目されてきた。特に細胆管増生の形態、意義、機能、そして組織発生に関して、近年多くの報告がなされている<sup>1297-9)</sup>。

現在、増生細胆管はその組織学的特徴により、定型の細胆管と非定型の細胆管とに 2 分されている。これら 2 種類の組織発生に関して、門脈域内にある既存の胆管上皮が増生した結果生じたとする考え<sup>91622)</sup>と、グリソン鞘周囲の肝細胞が胆管上皮へ直接、形質転換 (化生) したための現象とする考え<sup>818111)-131518)-24)</sup>がある。また、近年、本来肝細胞と胆管上皮への両方への分化能を有するとされている幹細胞 (肝小葉辺縁部に存在する) が細胆管増生に関与しているとする報告もある<sup>7157)-60)</sup>。しかし、増生細胆管の組織発生とその意義に関して未だ不明な点が多く残されており、統一した見解が示されていない。本研究では、定型のおよび非定型の細胆管の増生機序を解明するために、細胆管増生の組織像と表現型に関する検討、細胞動態の解析、さらに細胞の形質転換に関連するとされている TGF- $\alpha$  発現の検討を行った。

細胆管は正常肝の門脈域には 1~3 個程度みられ、定型の細胆管の形態を示した。一方、多くの肝胆道系疾患でも種々の程度で定型の細胆管の増生がみられた。これらの定型の細胆管は、AE1, CAM 5.2, EMA の免疫染色による表現型の検討で、胆管上皮として完全な表現型を有していた。また、AgNOR スコアと PCNA LI を用いた細胞動態解析の結果から、病的肝で増生しているこれら定型の細胆管では増殖活性亢進が認められた。この様な結果より、定型の細胆管増生は肝細胞からの直接的な形質転換よりは、既存の細胆管上皮が増生し、形成されたものと推測された。また、病的肝における小葉間胆管も定型の細胆管と同様に増殖活性亢進所見を呈していた。また、これら疾患の定型の細胆管および小葉間胆管では、c-myc の mRNA のシグナルが多く見られた。c-myc 遺伝子は、細胞増殖刺激に対して速やかに mRNA への転写が亢進し、細胞増殖を促すとされており、この mRNA シグナルの増生は上述の細胞動態の成績を支持するものと理解される。これらの所見より、今回検索した肝胆道系疾患では増殖性変化が肝内小型胆管に広汎に及んでいることを示しており、したがって定型の細胆管の増生は既存の胆管上皮の増生の 1 つの反映と考えられる。

一方、非定型の細胆管は、PBC や PSC のような慢性胆汁うっ滞を呈する胆道系疾患でしばしば観察される細胆管反応である<sup>2189)43)46)61)</sup>。しかし、類似の形態の細胆管はアルコール性肝線維症等でも少なからず見られる<sup>1213)</sup>。今回の検討で、2~4 期の進行した PBC や PSC のみならず、肝外閉塞性黄疸、アルコール性肝線維症、亜広汎性肝壊死、肝内結石症、肝硬変、慢性活動性肝炎の各症例にも種々の程度に非定型の細胆管増生を認めた。肝硬変や亜広汎性肝細胞壊死の剖検症例や外科的切除肝では、非定型の細胆管が肝実質や再生結節のほとんどを置換している症例を経験することがあるが、今回検討した症例の中にもこの様な像を伴った症例があった。組織学的に、限界板の破壊を伴った領域で、非定型の細胆管は、門脈域周囲の肝細胞と入り乱れて、また連続して、肝細胞と混在して存在しており、限界板領域での肝細胞の消失または破壊と深く関与しているものと考えられた。上述の如く、高度例では、肝小葉や再生結節の

ほとんどが非定型的細胆管で置換されている像も見られたことも、この解釈に矛盾しない。

免疫染色を用いた表現型の検討では、CK 発現の検討で、大半の非定型的細胆管は完全な胆管上皮型としての表現型を有していたが、一部では AE1 陰性で胆管上皮としては不完全な表現型を示すものもあった。EMA は胆管上皮細胞に発現を認め、肝細胞には発現を認めない抗原であるが<sup>950</sup>、今回検討した非定型的細胆管には明らかな EMA の発現を認めなかった。したがって、非定型的細胆管は、胆管上皮細胞として不完全または未熟な表現型を示す胆管成分と考えられた。これに加え、非定型的細胆管に隣接する肝細胞は、AE1 が弱陽性であったことから、これらの肝細胞は胆管上皮としての表現型を獲得しつつある、また発現しつつあることを示している。これらの所見は、小葉辺縁部の肝細胞が胆管上皮細胞へ直接、形質転換をしつつある所見と思われる。

また、AgNOR スコアと PCNA LI を用いた増殖活性の検討で、非定型的細胆管の増殖活性に不均一性が見られた。すなわち、肝外閉塞性黄疸、亜広汎性肝壊死、肝硬変、慢性活動性肝炎の非定型的細胆管では、病的肝の増生定型的細胆管と同程度の増殖活性を示したが、PBC や PSC の非定型的細胆管では、正常肝の定型的細胆管と同程度の低い増殖活性であった。このような症例間における非定型的細胆管の増殖活性の相違は、組織発生または病理学的意義の違いを反映しているのかもしれない。すなわち、非定型的細胆管増生は胆汁うっ滞に関連した現象と考えられていることから、長期慢性胆汁うっ滞の状態である PBC や PSC の非定型的細胆管増生は、門脈域周囲肝細胞から胆管細胞への形質転換を反映し、急速に胆汁うっ滞が進展する肝外閉塞性黄疸、亜広汎性肝壊死、肝硬変、慢性活動性肝炎の非定型的細胆管増生は、増殖活性亢進を伴った未熟な胆管細胞による肝細胞の置換を反映しているのかもしれない。肝小葉あるいは再生結節のほとんどが非定型的細胆管で置き換わっている像は、この考え方に一致する。従って、非定型的細胆管増生は、急性および慢性胆汁うっ滞肝での肝細胞消失に関連した変化と考えられた。

さて、TGF- $\alpha$  は、EGF とアミノ酸配列において約40%の相同性を有し、また EGF と同様、EGFR に結合して作用し、腫瘍細胞および非腫瘍細胞の増殖や化生を含めた種々の形質転換に関連したサイトカインとされている<sup>30)~39)82)83)</sup>。また、TGF- $\alpha$  は、多くの非腫瘍性の細胞で産生され、ほとんどの上皮細胞の増殖に関与していることが報告されている<sup>84)85)</sup>。免疫組織化学的検討で、実験動物での肝部分切除後の肝細胞に TGF- $\alpha$  の存在が示されており、また、ヒトでも肝細胞癌だけでなく、胎児肝、成人肝の再生肝細胞や小葉間胆管などの非腫瘍性上皮細胞にも TGF- $\alpha$  の発現があると報告されている<sup>31)~36)82)83)</sup>。また、肝に関する生体外実験で、TGF- $\alpha$  mRNA の転写亢進に伴って、肝細胞の増殖に関する各種の成長因子も促進され、また、培養肝細胞において内因性 TGF- $\alpha$  が自らの成長を促進(オートクライン機構)することも示されている<sup>39)</sup>。これらの成績より、TGF- $\alpha$  は生体内においても肝細胞の増殖に重要な役割を果たすと考えられる。増生や種々の形質変化を示すことが知られている胆管上皮細胞でも TGF- $\alpha$  が何らかの役割を果たしているとの仮定で、本研究では、胆管と肝細胞の病態への TGF- $\alpha$  の関与を検討した。

免疫染色により、種々の病的肝で肝細胞に TGF- $\alpha$  および

EGFR の発現を認めた。さらに、ISH 法により肝細胞に TGF- $\alpha$  mRNA の発現を認めた。しかし、正常肝では、他の報告<sup>37)38)</sup>にもあるように、TGF- $\alpha$  mRNA の明らかな発現は認められなかった。この結果より、病的肝での肝細胞は TGF- $\alpha$  mRNA の転写亢進と TGF- $\alpha$  を産生していることが示されたが、正常肝の肝細胞では、病的肝と比べ、TGF- $\alpha$  mRNA の転写亢進はきわめて低いものと考えられた。また、近年、再生肝細胞のみならず、間葉系細胞、特にクッパー細胞での TGF- $\alpha$  産生の可能性があることが推測されている<sup>35)86)</sup>。今回の研究で、病的肝の肝細胞のみならず、クッパー細胞にも TGF- $\alpha$  および TGF- $\alpha$  mRNA の発現を認め、クッパー細胞も TGF- $\alpha$  産生能を有することが示された。

一方、胆管系に関しては、正常肝を含めた全ての症例の小葉間胆管、定型的および非定型的細胆管に TGF- $\alpha$  および EGFR の発現を認め、また、免疫プロット法、ウェスタンブロット法により胆汁中にも TGF- $\alpha$  の存在を確認できた。しかし、胆管上皮での TGF- $\alpha$  mRNA の発現は、正常肝症例のみならず、肝細胞に TGF- $\alpha$  mRNA の発現を認めた病的症例においても、認められなかった。胆管上皮における、免疫染色で TGF- $\alpha$  が発現し、TGF- $\alpha$  mRNA の発現がない現象は、外来性の TGF- $\alpha$  が胆管上皮の細胞膜(特に、EGFR)を通して、胆管細胞質膜および細胞内に取り込まれ、作用している像を反映していると思われる。したがって、肝細胞及びクッパー細胞で産生された TGF- $\alpha$  がオートクライン及びパラクライン機構により肝細胞自身に作用するのみならず、胆汁を介して胆管上皮細胞にも作用しているものと推定される。

TGF- $\alpha$  には、細胞の増殖や化生を含めた細胞形質転換に関連した機能があることが知られている。今回の成績より、胆管上皮細胞の膜や胞体内の TGF- $\alpha$  が、胆管上皮の増殖や化生を含めた形質転換に関与していることが強く示唆される。しかし、その正確な作用機序と細胞内での分子機構は今後の検討課題と考えられた。

## 結 論

各種肝胆道型疾患の肝組織切片および胆汁を材料とし、細胆管(定型的および非定型的)増生の病理学的意義と増生機序を検討し、以下の結論を得た。

1. 定型的細胆管は、全ての肝胆道型疾患で種々の程度に増生していた。非定型的細胆管は、PBC(2~4期)やPSC(2~4期)などの原発性胆道系疾患および肝外閉塞性黄疸、アルコール性肝線維症、亜広汎性肝壊死、肝硬変、慢性活動性肝炎症例で種々の程度と頻度で見られた。

2. 定型的細胆管は胆管上皮固有の表現型を有しており、また、増殖活性の亢進を認めた。小葉間胆管での胆管上皮細胞の増殖活性も亢進していた。つまり、多くの肝胆道系疾患では、小型胆管系全体の増殖活性が亢進しており、定型的細胆管増生は、既存の胆管上皮細胞からの増生によるものと考えられた。

3. 非定型的細胆管は胆管型の表現型としては不完全であり、細胞動態の検討から、増殖活性亢進を示すものと、増殖活性の弱いものがみられた。

4. 細胞増殖活性の弱い非定型的細胆管はPBCやPSC等の慢性胆汁うっ滞症例でみられ、主として肝細胞の化生による見かけ上の増生と考えられた。

5. 増殖活性の高い非定型的細胆管は肝外閉塞性黄疸、亜広

汎性肝壊死, 肝硬変や慢性活動性肝炎症例でみられ, 不完全な表現型の発現を示す胆管細胞の増殖と考えられ, これら疾患での肝細胞消失に関連する1つの現象と考えられた。

6. 小葉間胆管, 定型的細胆管および非定型的細胆管に, TGF- $\alpha$  と EGFR の強い発現を認めたことより, TGF- $\alpha$  が定型的および非定型的細胆管の増殖または形質転換に関連していることが示唆された。

7. 肝細胞とクッパー細胞に TGF- $\alpha$  mRNA の発現を認めたが, 胆管上皮には明らかな mRNA の発現を認められなかった。胆汁中 TGF- $\alpha$  は, 肝細胞およびクッパー細胞で産生され, EGFR を介して胆管上皮細胞内に取り込まれ, 細胆管の増生や化生等の形質転換に関連していることが示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始, 御指導と御校閲を賜りました中沼安二教授に深く感謝の意を表します。また, 御教示, 御鞭撻を頂きました寺田忠史助教授, 細 正博講師をはじめ第二病理学教室員の皆様方に深く御礼申し上げます。さらに, 貴重な検体材料を快く貸与または分与して頂いた, 金沢大学第二外科, 金沢大学第一内科, 石川県立中央病院, 福井県立病院病理部, 富山市民病院病理部, 浅ノ川総合病院の皆様方に心より感謝致します。なお, 本論文の一部の要旨は, 第26回日本肝臓学会西部会(1991年, 富山), 第82回日本病理学会総会(1993年, 東京), 第29回日本肝臓学会総会(1993年, 奈良), 第28回日本肝臓学会西部会(1993年, 佐賀), 第30回日本肝臓学会総会(1994年, 旭川)で発表した。

#### 文 献

- 1) Masuko, K., Rubin, E. & Popper, H.: Proliferation of bile ducts in cirrhosis. *Arch. Pathol.*, **78**, 421-431 (1964).
- 2) Scheuer, P. J.: In *Liver Biopsy Interpretation*, 3rd ed., p1-35, Bailliere Tindall, London, 1980.
- 3) Portmann, B., Popper, H., Neuberger, J. & Williams, R.: Sequential and diagnostic features in primary biliary cirrhosis based on serial histologic study in 209 patients. *Gastroenterology*, **88**, 1777-1790 (1985).
- 4) Nakanuma, Y. & Ohta, G.: Histometric and serial section observations of the intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, **76**, 1326-1332 (1979).
- 5) Danque, P. O. V., Bach, N., Schaffner, F., Gerber, M. A. & Thung, S. N.: HLA-DR expression in bile duct damage in hepatitis C. *Mod. Pathol.*, **6**, 327-332 (1993).
- 6) Lefkowitz, J. H., Schiff, E. R., Davis, G. L., Perrillo, R. P., Lindsay, K., Bodenheimer, H. Jr., Balart L. A., Ortego T. J., Payne J., Dienstag, J. L. & Gerber, M. A.: Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: A multicenter comparative study with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, **104**, 595-603 (1993).
- 7) Van Eyken, P. & Desmet, V. J.: Cytokeratins and the liver. *Liver*, **13**, 113-122 (1993).
- 8) Thung, S. N.: The development of proliferating ductular structures in liver disease: An immunohistochemical study. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **114**, 407-411 (1990).
- 9) Nakanuma, Y. & Ohta, G.: Immunohistochemical study on bile ductular proliferation in various hepatobiliary diseases. *Liver*, **6**, 205-211 (1986).
- 10) Desmet, V. J.: Intrahepatic bile ducts under the lens. *J. Hepatol.*, **1**, 545-559 (1985).
- 11) Butron, Vila, M. M., Haot, J. & Desmet, V. J.: Cholestatic features in focal nodular hyperplasia of the liver. *Liver*, **4**, 387-395 (1984).
- 12) Uchida, T. & Peters, R. L.: The nature and origin of proliferated bile ductules in alcoholic liver disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, **79**, 326-333 (1983).
- 13) Van Eyken, P., Sciot, R. & Desmet, V. J.: A cytokeratin immunohistochemical study of alcoholic liver diseases: Evidence that hepatocytes can express 'bile duct-type' cytokeratins. *Histopathology*, **13**, 605-617 (1988).
- 14) Rubin, E., Schaffner, F. & Popper, H.: Primary biliary cirrhosis. *Am. J. Pathol.*, **46**, 387-407 (1965).
- 15) Roskams, T., Campos, R. V., Drucker, D. J. & Desmet, V. J.: Reactive human bile ductules express parathyroid hormone-related peptide. *Histopathology*, **23**, 11-19 (1993).
- 16) Gall, J. A. M. & Bhatthal, P. S.: Origin and involution of hyperplastic bile ductules following total biliary obstruction. *Liver*, **10**, 106-115 (1990).
- 17) Van Eyken, P., Sciot, R., Van Damme, B., De Wolf-Peeters, C. & Desmet, V. J.: Keratin immunohistochemistry in normal human liver: Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient. *Virchow Arch. [A]*, **412**, 63-72 (1987).
- 18) Meybehm, M., Fischer, H. P. & Pfeifer, U.: Expression of HBs- and HBc- antigens in neoductular epithelium in chronic active hepatitis B: A further support for hepato-ductular metaplasia. *Virchow Arch. [B]*, **63**, 167-172 (1993).
- 19) Delladetsima, J. K., Vafiadis, I., Tassopoulos, N. C., Kyriakou, V., Apostolaki, A. & Smyrnof, T.: HBc Ag and HBs Ag expression in ductular cells in chronic hepatitis B. *Liver*, **14**, 71-75 (1994).
- 20) Nakanuma, Y. & Kono, K.: Expression of vimentin in proliferating and damaged bile ductules and interlobular bile ducts in nonneoplastic hepatobiliary diseases. *Mod. Pathol.*, **5**, 550-554 (1992).
- 21) Ayres, R. C., Hubscher, S. G., Shaw, J., Garner, C., Joplin, R., Williams, A. & Neuberger, J. M.: New monoclonal antibodies reacting with bile ducts: Further insights into the pathogenesis of bile ductular proliferation in biliary diseases. *J. Pathol.*, **165**, 153-161 (1991).
- 22) Roskams, T., van den Oord, J. J., De Vos, R. & Desmet, V. J.: Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. *Am. J. Pathol.*, **137**, 1019-1025 (1990).
- 23) Van Eyken, P., Sciot, R., Callea, F. & Desmet, V. J.: A cytokeratin-immunohistochemical study of focal nodular hyperplasia of the liver: Further evidence that ductular metaplasia of hepatocytes contributes to ductular "proliferation". *Liver*, **9**, 372-377 (1989).
- 24) Delladetsima, J. K., Kyriakou, V., Vafiadis, I., Karakitsos, P., Smyrnof, T. & Tassopoulos, N. C.: Ductular structure in acute hepatitis with panacinar necrosis.

- J. Pathol., 175, 69-76 (1995).
- 25) Crocker, J., Macartney, J. C. & Smith, P. J.: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. J. Pathol., 154, 151-156 (1988).
- 26) Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, B. R. & Garrels, J. I.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature, 303, 374-376 (1984).
- 27) Kawakita, N., Seki, S., Sakaguchi, H., Yanai, A., Kuroki, T., Mizoguchi, Y., Kobayashi, K. & Monna, T.: Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde. Am. J. Pathol., 140, 513-520 (1992).
- 28) Campisi, J., Gray, H. E., Pardee, A. B., Dean, M. & Sonenshein, G. E.: Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. Cell, 36, 241-247 (1984).
- 29) De Larco, J. E. & Todaro, G. J.: Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4001-4005 (1978).
- 30) Derynck, R.: Transforming growth factor alpha. Cell, 54, 593-595 (1988).
- 31) Evarts, R. P., Nakatsukasa, H., Marsdon, E. R., Hu, Z. & Thorgeirsson, T. N.: Expression of transforming growth factor-alpha in regenerating liver and during hepatic differentiation. Mol. Carcinogen, 5, 25-31 (1992).
- 32) Schaff, Z., Hsia, C. C., Sarosi, I. & Tabor, E.: Overexpression of transforming growth factor-alpha in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia from European patients. Hum. Pathol., 25, 644-651 (1994).
- 33) Maher, J. J. & Friedman, S. L.: Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver. Semin. Liver Dis., 13, 13-20 (1993).
- 34) Hsia, C. C., Axiotis, C. A., Di Bisceglie, A. M. & Tarbor, E.: Transforming growth factor-alpha in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. Cancer, 70, 1049-1056 (1992).
- 35) Yasui, W., Ji, Z.-Q., Kuniyasu, H., Ayhan, A., Yokozaki, H., Ito, H. & Tahara, E.: Expression of transforming growth factor alpha in human tissues: Immunohistochemical study and Northern blot analysis. Virchows Arch. [A], 421, 513-519 (1992).
- 36) Mead, J. E. & Fausto, N.: Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1558-1562 (1989).
- 37) Derynck, R., Goeddel, D. V., Ullrich, A., Gutterman, J. U., Williams, R. D., Bringman, T. S. & Berger, W. H.: Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. Cancer Res., 47, 707-712 (1987).
- 38) Castilla, A., Prieto J. & Fausto, N.: Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease: Effects of interferon alpha therapy. N. Engl. J. Med., 324, 933-940 (1991).
- 39) Yamaguchi, K., Carr, B. I. & Nalesnik, M. A.: Concomitant and isolated expression of TGF-alpha and EGF-R in human hepatoma cells supports the hypothesis of autocrine, paracrine, and endocrine growth of human hepatoma. J. Surg. Oncol., 58, 240-245 (1995).
- 40) Arteaga, C. L., Hanauske, A. R., Clark, G. M., Osborne, C. K., Hazarika, P., Pardue, R. L., Tio, F. & Von Hoff, D.D.: Immunoreactive alpha transforming growth factor activity in effusions from cancer patients as a marker of tumor burden and patient prognosis. Cancer Res., 48, 5023-5028 (1988).
- 41) Sherwin, S. A., Twardzik, D. R., Bohn, W. H., Cockley, K. D. & Todaro, G. J.: High-molecular-weight transforming growth factor activity in the urine of patients with disseminated cancer. Cancer Res., 43, 403-407 (1983).
- 42) Chuang, L. Y., Tsai, J. H., Teh, Y. C., Chang, C. C., Yeh, H. W., Guh, J. Y. & Tsai, J. F.: Epidermal growth factor-related transforming growth factors in the urine of patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology, 13, 1112-1116 (1991).
- 43) Ludwig, J., Dickson, E. R. & McDonald, G. S. A.: Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). Virchows Arch.[A], 379, 103-112 (1978).
- 44) Portmann, B., Popper, H., Neuberger, J. & Williams, R.: Sequential and diagnostic features in primary biliary cirrhosis based on serial histologic study in 209 cases. Gastroenterology, 88, 1777-1790 (1985).
- 45) Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R.: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell, 31, 11-24 (1982).
- 46) Van Eyken, P., Sciot, R., Callea, F., Van der Steen, K., Moerman, P. & Desmet, V. J.: The development of the intrahepatic bile ducts in man: A keratin-immunohisto-chemical study. Hepatology, 8, 1586-1595 (1988).
- 47) Feldman, G.: The cytoskeleton of the hepatocytes. J. Hepatol., 8, 380-386 (1989).
- 48) Tseng, S. C. G., Jarvinen, M. J., Nelson, W. G., Huang, J.-W., Woodcock-M, J. & Sun, T.-T.: Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. Cell, 30, 361-372 (1982).
- 49) Makin, C., Bobrow, L. & Bodmer, W.: Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. J. Clin. Pathol., 37, 975-983 (1984).
- 50) Bonetti, F., Chilosi, M., Pisa, R., Novelli, P., Zamboni, G. & Menestrina, F.: Epithelial membrane antigen expression in cholangiocarcinoma: A useful immunohistochemical tool for differential diagnosis with hepatocarcinoma. Virchow Arch. [A], 401, 307-313 (1983).

- 51) Hsu, M., Raine, L. & Frager, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 557-580 (1981).
- 52) Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, A. L., Yu, C. C. W., Kellock, D. B., Watkins, J. A., Barnes, D. M., Gillett, C. E., Camplejohn, R., Dover, R., Wassem, N. H. & Lane, D. P.: 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).
- 53) Garcia, R. L., Coltrera, M. D. & Gown, A. M.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues: Comparison with flow cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, **134**, 733-739 (1989).
- 54) Feinberg, A. P. & Vogelstein B.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
- 55) Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R. & Kessler, C.: Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferases. *Anal. Biochem.*, **192**, 222-231 (1991).
- 56) Coakley, W. T. & James, C. J.: A simple linear transform for the Folin-Lowry protein calibration curve to 1.0mg/ml. *Anal. Biochem.*, **85**, 90-97 (1978).
- 57) Slott, P. A., Liu, M. H. & Tavoloni, N.: Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology*, **99**, 466-477 (1990).
- 58) Sell, S. & Leffert, H. L.: An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2**, 77-86 (1982).
- 59) Sell, S.: Is there a liver stem cell? *Cancer Res.*, **50**, 3811-3815 (1990).
- 60) Sell, S.: Liver stem cells. *Mod. Pathol.*, **7**, 105-112 (1994).
- 61) Tavoloni, N.: The intrahepatic biliary epithelial cell: An area of growing interest in hepatology. *Semin. Liver Dis.*, **7**, 280-292 (1987).
- 62) Masuhara, M., Katyal, S. L., Nakamura, T. & Shinozuka, H.: Differential expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 messenger RNAs in two experimental models of liver cell proliferation. *Hepatology*, **16**, 1241-1249 (1992).
- 63) Burr, A. W., Carpenter, M. R., Hines, J. E., Gullick, W. J. & Burt, A. D.: Intrahepatic distribution of transforming growth factor-alpha during liver regeneration following carbon tetrachloride-induced necrosis. *J. Pathol.*, **170**, 95-100 (1993).
- 64) Beauchamp, R. D., Barnard, J. A., McCutchen, C. M., Cherner, J. A. & Coffey, R. J. Jr.: Localization of transforming growth factor alpha and its receptor in gastric mucosal cells. Implications for a regulatory role in acid secretion and mucosal renewal. *J. Clin. Invest.*, **84**, 1017-1023 (1989).
- 65) Chang, L. C., Chou, M. Y., Chow, P., Matossian, K., McBride, J., Chiang, T., Gallagher, G. T. & Wong, D. T. W.: Detection of transforming growth factor-alpha messenger RNA in normal and chemically transformed hamster oral epithelium by in situ hybridization. *Cancer Res.*, **49**, 6700-6707 (1989).
- 66) Meyer, D. H., Bachem, M. G. & Gressner, A. M.: Bidirectional effects of Kupffer cells on hepatocyte proliferation in vitro. *FEBS Lett.*, **283**, 150-154(1991).

**Pathological Study of Ductular Proliferation: Analysis of Phenotype, Cell Kinetics and Expression of Transforming Growth Factor- $\alpha$**  Kenichi Harada, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **105**, 39—53 (1996)

**Key words** intrahepatic bile duct, bile ductules, cell kinetics, transforming growth factor- $\alpha$ , bile

#### Abstract

Bile ductular proliferation is frequently seen in a number of hepatobiliary diseases. The proliferated bile ductules are histologically classifiable into typical and atypical ones. In order to clarify their histogenesis, the expressions of cytokeratins and epithelial membrane antigen (EMA), and the proliferative activity by argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) staining and immunostaining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), were examined using liver tissues from 129 patients with various hepatobiliary diseases. Typical ductules were found within the portal tracts in all specimens in varying degrees. In contrast, atypical ones were observed frequently in primary biliary cirrhosis (PBC) (stages 2 and 3), primary sclerosing cholangitis (PSC) (stages 2 and 4), extrahepatic necrosis, hepatolithiasis, active cirrhosis and chronic active hepatitis. They were frequently continuous to periportal hepatocytes representing disrupted limiting plates or replacing the hepatic parenchyma. Typical ductules expressed biliary-type cytokeratins and EMA, while atypical ones failed to express EMA and their expression of biliary cytokeratin was not constant. In cell-kinetic studies, the AgNOR score and PCNA labeling index of typical ones were higher in pathological livers than in normal livers. The score and index in atypical ones were low in PBC and PSC, while they were high in other pathological diseases such as extrahepatic biliary obstruction and active cirrhosis. These results suggest that typical ductules reflect an active proliferation of ductules with mature biliary makers. In contrast, atypical ones with immature biliary markers were classifiable into two categories: those with low proliferative activity in PBC and PSC may reflect ductular transformation of periportal hepatocytes, while those with high proliferative activity in other pathological diseases may relate to proliferation of ductular cells with immature ductular phenotypes, replacing of hepatocytes in hepatic parenchyma. Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) is one of the cytokines that are related to cell proliferation and transformation. The role and regulation of TGF- $\alpha$  were examined in various hepatobiliary diseases. TGF- $\alpha$  and its receptor, epidermal growth factor receptor (EGFR), were immunohistochemically expressed in interlobular bile ducts, proliferated bile ductules and most hepatocytes in various liver diseases. Moreover, we demonstrated by Western blot analysis that TGF- $\alpha$  protein was present in hepatic bile. In contrast, *in situ* hybridization demonstrated that TGF- $\alpha$  mRNA was localized in hepatocytes of some pathological liver tissues, but it was absent in biliary epithelial cells of the same tissues. These data suggest that the TGF- $\alpha$  is released into hepatic bile and contribute to biliary proliferation and transformation through EGFR existing cell surface membrane of biliary epithelial cells. Further studies seem essential to evaluate the pathological significance of these ductular proliferation using modern technology.