

肝内胆管系でのインターロイキン6の発現とその病理学的意義 ヒト肝組織及び培養胆管上皮細胞を用いた検討

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	http://hdl.handle.net/2297/9256

肝内胆管系でのインターロイキン6の発現とその病理学的意義

—ヒト肝組織および培養胆管上皮細胞を用いた検討—

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)

菅原浩之

インターロイキン6 (interleukin-6, IL-6) は、免疫反応の増強や種々の免疫異常症などで中心的役割を果たすのみならず、腫瘍細胞の増殖因子あるいは抑制因子としても作用することが最近明らかとなっている。今回、非腫瘍性および腫瘍性の肝内胆管系疾患の発生・進展における IL-6 の役割、特に肝内胆管系上皮での IL-6 の発現とその病理学的意義をヒト肝組織材料および肝内胆管上皮細胞の培養法を用いて検討した。肝組織材料として正常肝 8 例、原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) 16 例、肝外閉塞性黄疸 (extrahepatic biliary obstruction, EBO) 4 例、ウイルス性慢性活動性肝炎 (viral chronic active hepatitis, v-CAH) 9 例の外科的生検肝および針生検肝、それに外科的に切除された胆管細胞癌 43 症例を用いた (内、4 例は肝内結石症に合併した胆管細胞癌)。肝内胆管上皮細胞の培養は、原発性肝癌・転移性肝癌などの肝腫瘍性病変の外科的切除時に、腫瘍部より離れた肝実質より得られた 7 例の肝組織より、コラゲナーゼ灌流法とコラーゲンゲル上移植片培養法により行った。さらに、60 歳男性の肝内胆管細胞癌の腹膜転移巣から、コラーゲンゲル上移植片培養法を用いて樹立されたヒト胆管細胞癌 (CCKS1) を培養胆管細胞癌細胞として用いた。IL-6 および IL-6 レセプターの発現はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法を用いた免疫組織化学的染色により行った。IL-6 mRNA の発現は、組織内ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法により検討した。培地上清中の IL-6 は ELISA 法を用いて測定した。IL-6 は、正常肝組織では肝内胆管上皮の胞体内、特に内腔側に発現した。一方、EBO, v-CAH, PBC では、胆管上皮細胞の IL-6 の染色強度は増加し、特に PBC の障害胆管上皮で強い発現がみられた。ISH 法での検討では、PBC の肝内胆管細胞で IL-6 の mRNA のシグナルが得られた。IL-6 レセプターもこれら障害胆管に部分的に発現していた。初代培養を行った胆管上皮細胞では、細胞質に IL-6 蛋白、IL-6 mRNA、IL-6 レセプターの弱い陽性所見がみられ、培地上清中に IL-6 が検出された。次に、外科的に切除した胆管細胞癌での検討で、分化度の高い例で癌細胞そのものに IL-6 の強い発現がみられ、分化度の低下と共に IL-6 の発現が減少し、低分化症例では陰性例が多くみられた。また同一症例で分化度の違う癌の領域が混在している例では、分化度の高い部分で IL-6 の強い発現が、分化度の低い部分で IL-6 の発現が低下あるいは陰性化する傾向がみられた。また、分化度の高い胆管細胞癌細胞で IL-6 mRNA のシグナルが得られた。一方、肝内胆管癌細胞株 CCKS1 の培養細胞では、散在性に一部の胞体に IL-6 の発現が強く見られ、IL-6 レセプターの部分的発現、軽度から中等度の IL-6 mRNA のシグナルも得られた。以上、IL-6 は正常のヒト肝内胆管上皮に微量ながら存在し、胆管系の炎症や門脈域の炎症性病変では胆管上皮での IL-6 の産生が高まり、オートクライン機序を含めこれら病変の発生に関連することが示された。またヒト胆管細胞癌では、分化度の高い例では IL-6 が高率、広汎に発現し、分化度の低い症例では散在性に発現、あるいは陰性化することが示され、IL-6 は胆管細胞癌の分化に関連する因子としてオートクライン機序により働くことが示唆された。肝内結石症に合併する胆管細胞癌での検討では、IL-6 は前癌病変である胆管上皮ディスプラジアにも発現しており、胆管細胞癌の発癌段階で関与するものと考えられた。なお、胆管癌細胞の増殖と IL-6 発現とは負の関係にあり、IL-6 が胆管細胞癌の増殖促進因子とする所見は得られなかった。

Key words biliary epithelial cell, primary biliary cirrhosis, cholangiocarcinoma, interleukin-6, immunohistochemistry

インターロイキン6 (Interleukin-6, IL-6) は多くの機能を有するサイトカインの1種であり、その標識組織や細胞も多様に及ぶ^{7)~9)}。IL-6 の作用の中で、炎症性サイトカインとしての機能が代表的であり、細胞障害性T細胞の増殖・分化誘導、B細胞の抗体産生細胞への増殖・分化誘導が知られており、マクロ

ファージに対しても分化誘導作用を有することが知られている⁷⁾⁸⁾。さらに、肝細胞に対しても急性期蛋白質の産生誘導を行う⁹⁾¹⁰⁾とされている。最近、IL-6 と腫瘍との関連性も注目されている。すなわち、骨髄腫、膀胱癌、腎細胞癌、骨肉腫、神経膠芽腫、子宮頸癌などで IL-6 の産生が腫瘍組織を用いた免疫組織

平成8年11月29日受付、平成8年12月26日受理

Abbreviations: ABC/PO, avidin-biotin-peroxidase complex; APAAP, alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DEPC, diethylpyrocarbonate; DMEM, Dulbecco's modification of Eagle's medium; EBO, extrahepatic biliary obstruction; EGF, epidermal growth factor; FCS, fetal calf serum; GVHD, graft-versus-host disease; HGF, hepatocyte growth factor; IL, interleukin; ISH, *in situ* hybridization; OCT, optimum

化学的検討や腫瘍細胞の培養法で明らかにされており^{11)~13)}, さらに IL-6 が増殖促進因子として,あるいは分化・増殖誘導因子としてあるいは増殖抑制因子として,骨髄腫,リンパ腫,腎細胞癌,肺癌,乳癌の発生・進展に関連することが報告されている^{14)~18)}. また最近, IL-6 の遺伝子異常を認める疾患もいくつか報告されている. すなわち,慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患,心房内粘液腫やキャスルマン症候群などでは IL-6 の遺伝子異常が疾患の発生,進展に関連することが示唆されている^{19)~23)}.

胆道系疾患と IL-6 との関連性について最近, 2, 3 の報告がなされている. すなわち, Emilie らは, 正常肝の門脈域において門脈周囲の結合組織や門脈壁に IL-6 mRNA の発現を認めたと報告し²⁴⁾, Matsumoto らは IL-6 が初代ヒト肝内胆管培養細胞の細胞増殖, DNA 合成を促進し, 培地に IL-1 β やホルボールミリストートアテートを加えると培養胆管上皮での IL-6 の産生が促進されると報告している²⁵⁾. しかし, ヒト肝内胆管系の IL-6 の発現を病理学的, 免疫病理学的な観点から, 詳細に検索した報告は未だなされていない.

そこで今回, ヒト肝組織切片および肝内胆管上皮の培養細胞を用いて, 肝内胆管上皮細胞と胆管細胞癌上皮での IL-6, IL-6 レセプターおよび IL-6 mRNA の発現を検討し, 胆道系疾患と IL-6 との関連性を病理学的観点から検討したので報告する.

材料および方法

I. 材料

1. 肝組織材料

今回の検索に用いたヒト肝組織材料を疾患別に表 1 に示す.

1) 非腫瘍性肝組織

正常肝 8 例, 原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) 15 例, 肝外閉塞性黄疸 (extrahepatic biliary obstruction, EBO) 4 例, ウイルス性慢性活動性肝炎 (viral chronic active hepatitis, v-CAH) 9 例 (B型 2 例, C型 7 例) の外科的生検および針生検の凍結肝およびこれらの症例の 10% 中性緩衝ホルマリン固定後パラフィン包埋肝を用いた (表 1). いずれも成人例である. なお, 生検肝を切片作製用至適温度 (optimum cutting temperature, OCT) 化合物 (Miles, Elkhart, USA) に包埋し液体窒素内で凍結し, クリオスタット (Tissue Tek, Miles) で 5 μ m の凍結切片を作成後, 風乾し, 使用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存した. なお以下の検討では, 凍結切片を 100% アセトン (和光純薬, 大

阪) で 5 分間固定後, 使用した. また, ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより, 4~5 μ m の切片を 20 枚以上作成し, その内 4~5 枚を HE 染色などの病理組織診断用の染色に用い, 残りを以下に述べる免疫組織化学的検索などの検討に用いた. 各々の症例の診断は, 臨床所見, 検査成績, 病理組織所見を総合して行った.

2) 胆管細胞癌組織

外科的切除された胆管細胞癌 43 症例の 10% 中性緩衝ホルマリン固定後のパラフィン包埋標本を用いた. 全てのパラフィン包埋ブロックより, 4~5 μ m の切片を作成し, その内 4~5 枚を HE 染色などのルーチン染色を行い, 病理組織学的検索に供した. 残りの切片を免疫組織化学的検索などの検討に用いた. 胆管細胞癌の組織型および分化度は, HE 染色とムチカルミン染色, アルシアン青 pH2.5 染色を用いて, 外科・胆道癌取り扱い規約²⁶⁾に従い分類した. これら 43 症例の内訳は, 乳頭状腺癌 3 例, 高分化型管状腺癌 9 例, 中分化型管状腺癌 50 例, 低分化型管状腺癌 15 例, 粘液癌 1 例であった. 但し, 乳頭状腺癌 1 例, 高分化型管状腺癌 2 例, 中分化型管状腺癌 18 例, 低分化型管状腺癌 5 例は同一症例の別の部位から採取した組織標本である. また, 4 例は肝内結石症 (いずれもビリルビンカルシウム石) を合併しており, 癌部に接した肝内胆管上皮には異型性のある胆管上皮の過形成 (ディスプラジア) がみられた²⁷⁾. また, 結石を含有する肝内胆管では胆管壁の線維性肥厚と肝内胆管付属腺の増生がみられた²⁸⁾.

2. ヒト肝内胆管上皮の初代および継代培養

当教室で確立したコラーゲンゲル上での胆管上皮培養法^{29)~32)}を用いて, ヒト肝内胆管上皮の培養を行った. 材料は, 原発性・転移性肝癌の外科的切除例で腫瘍部より離れた部位より得られた肝組織 (拇指頭大) である. なお, これらの肝組織標本には腫瘍細胞が含まれていないことを組織学的に確認した. これらの組織は組織学的に正常肝 6 例, 肝硬変 4 例, v-CAH 4 例に分類された. これらの肝組織の一部は, 10% 中性緩衝ホルマリン内で固定し, ルーチンの染色による病理組織診断, 組織学的検索および免疫組織化学的検索に供した. 残りの肝組織を用い, 以下の如く肝内胆管上皮細胞の初代および継代培養を試みた.

胆管上皮細胞の培養方法を具体的に述べる. まず, 肝組織の肝切離面の動静脈内へ静脈留置針 (24G, テルモ, 東京) を挿入し, ペリスタポンプ (Masterflex, Chicago, USA) を用いてカルシウム不含 Hanks 液で灌流し脱血を行った. 次に, 0.04% の

Table 1. The liver tissue specimens used in this study

Non-neoplastic and neoplastic diseases	No. of cases	Age ($\bar{x} \pm SD$, years)	Sex (M : F)
Primary biliary cirrhosis	8	62.9 \pm 9.9	8 : 0
Extrahepatic biliary obstruction	4	64.8 \pm 9.0	3 : 1
Chronic active hepatitis	9	66.8 \pm 7.2	5 : 4
Normal liver	15	58.6 \pm 9.4	15 : 0
Cholangiocarcinoma	43	67.4 \pm 7.5	27 : 16

M, male; F, female.

cutting temperature; PFA, paraformaldehyde; PBC, primary biliary cirrhosis; PBS, phosphate-buffered saline; PSC, primary sclerosing cholangitis; RA, rheumatoid arthritis; streptABC/AP, streptavidine-biotin complex with alkaline phosphatase; Th, helper T cell; v-CAH, viral chronic active hepatitis

コラゲナーゼ (コラゲナーゼ S-1, 新田ゼラチン, 大阪) と 0.005% トリプシンインヒビター (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) を含む pH7.4 の Ham F-12 (Flow Laboratories, Irvine, UK) 培養液 (以下, コラゲナーゼ溶液) を 10 分間灌流し, 肝実質を可及的に消化した。その後, クシと歯ブラシで肝細胞を剥離除去し, 胆管樹 (biliary tree) を作製した。次にカルシウム不含 Hanks 液中に胆管樹を浮遊させ, マイクロサージャリー用のハサミとピンセット (夏目製作所, 東京) を用いて胆管樹を細切し微小組織片を作製した。この微小組織片をホルスコリン (forskolin) 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (和光純薬), ヒトリーコンピナント類表皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) 25ng/ml (Upstate Biotechnology, New York, USA), ヒトリーコンピナントインスリン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (和光純薬), ペニシリン G100 単位/ml (明治製菓, 東京), ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (明治製菓), ヒトリーコンピナント肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) (Sigma Chemical) 10mg/ml, 10% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Gibco, New York, USA) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM) (Flow Lab)/Ham F-12 (Flow Lab) 等量培養液に浮遊させ, 5% CO₂ インキュベーター内で 2 日間, 浮遊培養した。次に, 0.3% 酸可溶性 I 型コラーゲンゲル (Cellmatrix Type I-A, 新田ゼラチン), 10 倍濃度の DMEM/Ham F-12 等量培地, 2.2% NaHCO₃ および 200mM HEPES (和光純薬) を含む 0.05N NaOH 溶液をそれぞれ 8 : 1 : 1 の割合で混和し, それを細胞培養皿 (径 59mm, Corning, New York, USA) に 5ml 注入し, ゲル化 (固化) する前に 4℃ の冷蔵庫 (三洋, 大阪) に一時的に保管した。次に 2 日間浮遊した胆管樹の微小組織片をピンセットを用いて, 培養移植片 (explant) としてコラーゲンゲル培地 (ゲル培地) 上に静置した。37℃ でゲル化した後, 37℃, 5% CO₂ インキュベーター内で培養し, 初代培養を行った。培養液は 3 日毎に交換し, 経時的に 2 週間まで位相差顕微鏡 (オリンパス, 東京) で観察した。なお, 予備実験で行った初代培養では, 培養移植片から胆管上皮細胞がコラーゲン上を増殖, 進展し, 間質細胞はコラーゲンゲル内あるいは上皮直下で増殖した。培養開始後 3 ~ 5 日までは胆管上皮細胞の増殖速度が間質系細胞より速く発育先端を形成しているが, 培養開始 1 週間 ~ 10 日目では間質系細胞が上皮細胞の増殖先端部に追いつき, 追い越す現象がしばしば見られた。そこで, 本実験では, 初代培養開始 5 日 ~ 1 週間目に位相

差顕微鏡下で, 培養移植片と主に間質系細胞の増殖が見られるコロニー中心部の領域をハサミとピンセットを用いてゲル培地ごと除去し, できるだけ胆道系上皮成分のみの培養を試みた。そして, 培養開始後 2 週間目の培養標本の一部を 10% 中性緩衝ホルマリンに固定後, パラフィン包埋を行い, 型の如く 4 ~ 5 μm のパラフィン切片を作成し, 組織学的検討および免疫組織化学的検討に用いた。残りの標本を肝組織凍結切片作成に用いたと同様に OCT 化合物に包埋後凍結し, 5 μm の凍結切片を作成し, 以下の免疫組織化学的検討, 組織内ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization, ISH) 法による検討に用いた。なお, 培養移植片を 3 週間 ~ 4 週間培養を行った場合, 間質細胞の増殖が優位となり, 上皮細胞の同定は困難となった。特に高度の線維化を伴った病的肝組織では, その傾向が明瞭であった。

次に胆管系に上皮細胞のみの継代培養を試みた。初代培養において培養移植片より上皮細胞がゲル培地上を単層性に増殖進展し, 増殖先端部では間質細胞の混入のない上皮細胞のみからなる領域が所々に認められた。そこで, 上皮成分のみからなる部位を位相差顕微鏡下で選択的にゲル培地ごと切離し, 別のコラーゲンゲル上に培養移植片として移植し, 胆管上皮細胞のみの継代培養を 2 週間行った。そしてその培養液中の IL-6 の濃度を以下の如く, ELISA 法での測定に供した。なお, この培地中には間葉細胞は含まれておらず, この方法のために用いた培養液中にもヒト IL-6 は全く含まれていなかった。したがって, この方法により培養液中に検出される IL-6 は培養胆管上皮から分泌される IL-6 そのものを測定していると考えられる (後述)。

3. ヒト肝内胆管細胞癌の株化癌細胞 (CCKS1) の培養

ヒト肝内胆管細胞癌株 CCKS1 は, 60 歳男性の胆管細胞癌患者の腹膜転移巣の一部をヌードマウス皮下に移植し, さらにコラーゲンゲル上培養移植片培養法を用いて癌細胞を鈍化し, 株化したものである²⁰⁾。なお, 摘出腫瘍の組織像は櫛状構造を示す中分化型腺癌であった。株化した癌細胞は現在 100 代を越えて維持されており, その倍加時間は 60 時間で, 単クローン性に増殖し, 染色体数は 63 個である。CCKS1 は上皮性結合を示す多角形細胞で, シート状単層性に増殖し粘液産生が認められる。ヌードマウスの皮下への再移植が可能であり, 移植部の組織像は腹膜転移巣の癌組織と同様の粘液染色陽性の櫛状の構造を示す中分化腺癌を示した。

CCKS1 を培養フラスコ (Costar, Cambridge, USA) 内でコンフルエントな状態になるまで培養増殖させた (平均 2 ~ 3 週

Table 2. Primary antibodies used for immunohistochemistry

Antibodies against	Source	Animals immunized	Type of antibodies (IgG)	Optimal dilution
h-IL-6	Genzyme, Cambridge, USA	Mouse	Monoclonal	1 : 50
h-IL-6	R&D System, Minneapolis, USA	Goat	Polyclonal	1 : 100
h-IL-6 receptor α chain	Santa Cruz, Heidelberg, Germany	Rabbit	Polyclonal	1 : 50
h-Nuclear Antigen Ki-67 (MIB-1)	Immunotech, Marseille, France	Mouse	Monoclonal	1 : 100

h, human ; IL, interleukin.

間). 次に, 増殖した癌細胞を細胞スクレパー (Costar) を用いて機械的に剥離し, 培養液を遠心 (800rpm, 5分) し, 沈渣中の癌細胞を回収した. 次いで, 培養液で沈渣を十分洗浄した後, Lab-TEK チャンバースライド (1穴) (Nunc, Naperville, USA) 上に散布して, 血清培地で癌細胞がコンフルエントな状態に達するまで培養を続けた (平均1週間). その後, Lab-TEK チャンバースライドの各穴をリン酸緩衝液 (pH7.6) (phosphate buffer saline, PBS) で洗浄し, 冷100%アセトン (和光純薬) で2分間固定し, 風乾し, 以下の免疫組織化学的および ISH 法による検索に供した.

ヌードマウス皮下への CCKS1 の再移植を以下の如く行った. つまり, 100単位/ml ペニシリンG (明治製薬), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製薬), 10% FCS (Gibco) を含む DMEM (Flow Lab)/Ham F-12 (Flow) 等量培養液内に, CCKS1 を 5.0×10^6 個になる様に調整し, ニードマウス (BALB/c nunu, 日本 SLC, 浜松) の皮下に注射した. その結果, 2ヶ月後に皮下に

TCCGGCACAG GCGCCTTCGG TCCAGTTGCC TTCTCCCTGG 200
GGCTGCTCCT GGTGTTGTTG CTGCTGCCT TCCCTGCCCC 240
AGTACCCCCA GGAGAAGATT CCAAAGATGT AGCCGCCCCA 280

TCTTTCCAG ACATGTAACA AGAGTAACAT GTGTTGAAAG 1440
CAGCAAAGAG GCACTGGCAG AAAACAACCT GAACCTTCCA 1480
AAGATGGCTG AAAAAGATGG ATGCTTCCAA TCTGGATTCA 1520

CTGGTAAAA TCATCACTGG TCTTTGGAG TTTGAGGTAT 2280
ACCTAGAGTA CCTCCAGAAC AGATTTGAGA GTAGTGAGGA 2320
ACAAGCCAGA GCTGTGCAGA TGAGTACAAA AGTCCTGATC 2360

Fig. 1. The nucleotide sequence of genomic DNA encoding human IL-6. The upper is from the exon 2 area, the middle from the exon 3 area, and the lower from the exon 4 area of this genomic DNA. Nucleotide sequences (oligonucleotide) used for *in situ* hybridization method in this study are underlined.

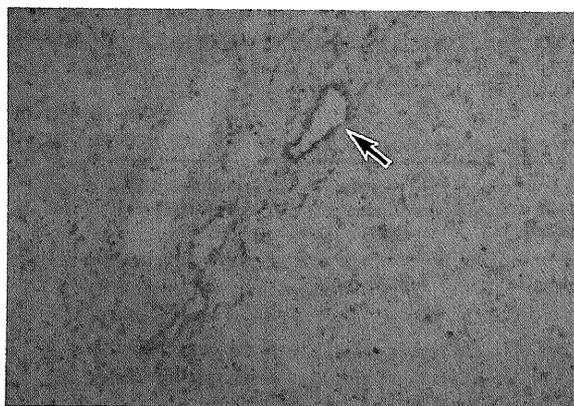
小豆大の腫瘍形成がみられた. マウスをエーテル麻酔で屠殺した後, 皮下腫瘍に割を入れ, 10%中性ホルマリン内で固定後パラフィン包埋を行い, その後約20枚の4~5 μ m切片を作成し, HE染色などのルーチン染色で組織像を検討すると同時に, IL-6の免疫染色を行った.

II. 検討方法

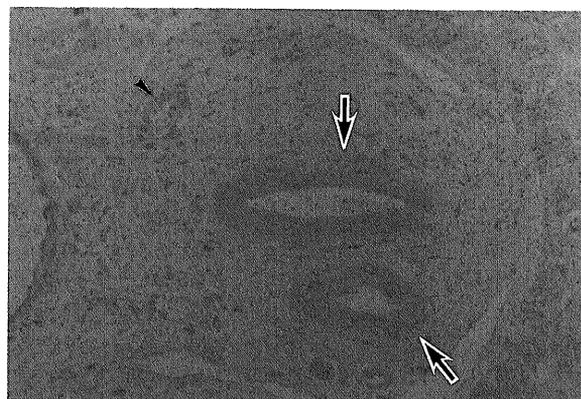
1. IL-6 および IL-6 レセプター発現の免疫組織化学的検討

Hsu ら³⁰⁾に従い, 通常のアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC/PO) 法により以下の免疫組織化学的検討 (免疫染色) を行った. 使用した抗体とその最適濃度を表2に示す. まず IL-6 と IL-6 レセプターの発現を凍結切片, パラフィン包埋 (肝組織切片, コラーゲンゲル上培養細胞胆管上皮) および CCKS1 を培養した Lab-TEK チャンバースライド (チャンバースライド) を用いて検討した.

まず, 凍結切片およびチャンバースライドを PBS 内に浸漬し, 抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体と抗ヒト IL-6 レセプター α 鎖ポリクローナル抗体を用い ABC 法で免疫染色を行った. なお, 今回検出を試みた IL-6 レセプター α 鎖は分子量 80kDa の糖蛋白で低親和性に IL-6 と結合する. なお, IL-6 と IL-6 レセプター α 鎖の複合体が, 分子量 130kDa 膜蛋白の糖蛋白 130 に結合し細胞内のシグナル伝達に関連することが知られている^{39,40)}. 凍結切片およびチャンバースライドを0.3%過酸化水素 (H_2O_2) 添加メチルアルコール液中で30分間反応させ, 内因性ペルオキシダーゼを失活させた. 次いで, 0.01%アビジン (アビジンD, Vector Laboratory, Burlingame, USA) で20分間, 0.001%ビオチン (和光純薬) で20分間反応させ内因性ビオチンを失活させた. 次に, 切片を10%の非免疫動物 (IL-6 の場合は馬血清, IL-6 レセプターの場合は山羊血清) 血清で20分間, 室温で処理し2次抗体の非特異的結合を阻止した. 次に, 予備実験によって決めた最適濃度 (表2) に PBS で希釈した一次抗体を反応させた. 次に, マウス IgG に対するビオチン化2次抗体 (馬, IgG) (Vector) および家兎 IgG に対するビオチン化2次抗体 (山羊, IgG) を PBS で200倍に希釈して室温で1時間反応さ



A



B

Fig. 2. Immunohistochemical staining of IL-6 on the bile duct in human normal liver, using the monoclonal (A) and polyclonal (B) antibodies against human IL-6. (A) In frozen liver section, IL-6 is expressed slightly to moderately in the cytoplasm of the small bile duct (arrow). (B) In paraffin embedded liver section, IL-6 is expressed slightly in the cytoplasm of the bile duct (arrows). Muscular cells of hepatic arterial element are also slightly positive for IL-6 (arrow head). Immunostaining (ABC method) and hematoxylin (A) or methylgreen (B), $\times 200$ (A) and $\times 200$ (B).

せ、ABC/PO 溶液 (Vectastain ABC kit) (Vector) 内で30分反応後、0.03% H₂O₂ 添加ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma Chemical) で発色させた。その後、ヘマトキシリンで核染後、脱水封入し鏡検した。なお、各々の反応の間に切片あるいはチェンバースライドを PBS 内で3回以上十分に洗浄した。

次に、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、ポリクローナル、モノクローナル抗体によりヒト IL-6 の発現を検討した。型の如く脱パラフィンを行った切片を、0.3% H₂O₂ 添加メチルアルコール液中で30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。なお、モノクローナル抗体使用の場合、あらかじめ切片を蒸留水に入れ、Shi ら²⁷⁾に従いマイクロウェーブ処理を行い抗原の露出増強を試みた。次いで、非特異的結合反応を低下あるいは防止するため、切片を10%の馬血清あるいは10%の家兎血清で20分間、室温で処理した。次に、PBS で最適濃度 (表 2) に希釈したモノクローナルあるいはポリクローナ

ル IL-6 抗体を、4℃で1晩反応させた。次に、マウス IgG に対するビオチン化2次抗体 (馬, IgG, 1:200) (Vector) あるいはヤギ IgG に対するビオチン化2次抗体 (家兎, IgG, 1:200) (Vector) を室温で1時間反応させ、ABC/PO 溶液 (Vector) 内で30分反応後、0.03% H₂O₂ 添加 DAB で発色させた。その後、メチルグリーンで核染後、脱水封入し、鏡検した。なお各々の反応の間には、切片を PBS 内で3回以上十分に洗浄した。

胆管細胞癌での IL-6 の染色程度を、その範囲と程度により+++, ++, +, -に分けた (+++, ほとんどの癌細胞が陽性のもの; ++, 半分位の癌細胞が陽性のもの; +, 部分的に癌細胞が陽性のもの; -, IL-6 の発現がないもの)。なお、染色強度は、++例で強く、+例で弱い傾向があった。しかし、+でも IL-6 の強い発現を示す例、++でも弱陽性を示す部位を混在する例もみられた。

2. IL-6 と Ki67 の2重染色

次に、部位により2種以上の分化度を示す5例の胆管細胞癌

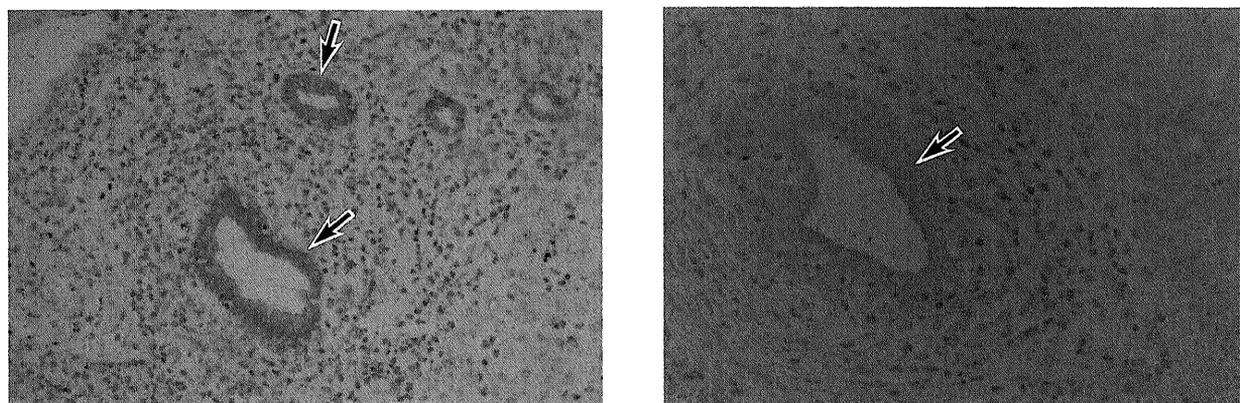


Fig. 3. Immunohistochemical staining of IL-6 on the damaged small bile duct in primary biliary cirrhosis, using the monoclonal (A) and polyclonal (B) antibodies against human IL-6. (A) In frozen liver section, IL-6 is expressed moderately in the cytoplasm of the bile small duct (arrows). (B) In paraffin embedded liver section, IL-6 is expressed moderately on the bile small duct (arrow). Muscular cells of arterial branches are also positive for IL-6. Immunostaining (ABC method) and hematoxylin (A) or methylgreen (B), $\times 200$ (A) and $\times 200$ (B).

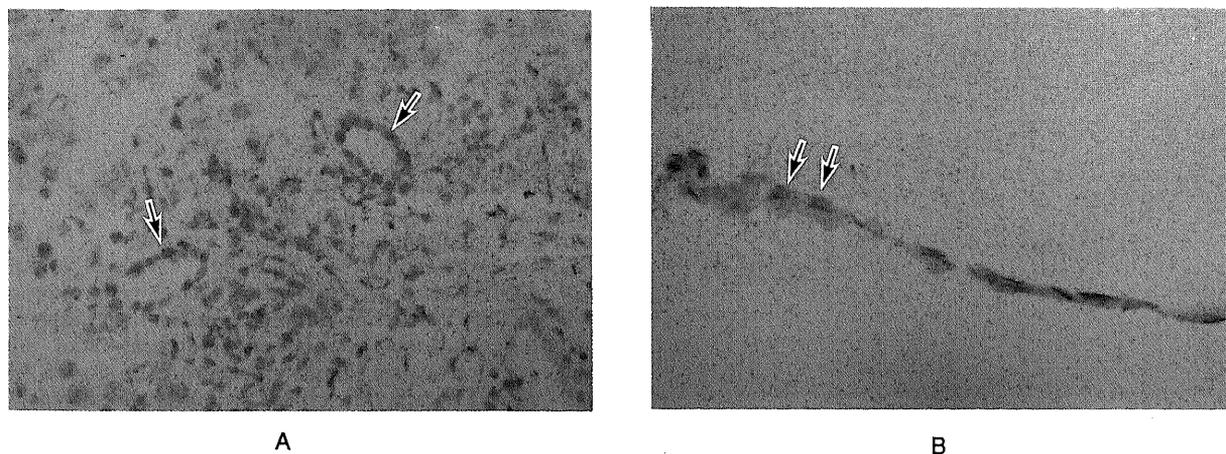


Fig. 4. IL-6 mRNA in the biliary epithelial cells demonstrated by *in situ* hybridization technique. (A) In primary biliary cirrhosis, signals of IL-6 mRNA are detected in the cytoplasm of some biliary epithelial cells (arrows). (B) In human intrahepatic biliary epithelial cells cultured on collagen gel for 2 weeks (primary culture), signals of IL-6 mRNA are detected in the cytoplasm of some cultured cells (arrows). Immunostaining (APAAP method) and hematoxylin, $\times 200$ (A) and $\times 200$ (B).

を用い癌細胞での IL-6 の発現と癌細胞の増殖活性との関連性を、IL-6 と Ki67 の 2 重免疫染色によりホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い検討した。Ki67 は G₀ 期、初期の G₁ 期以外の細胞の核に出現し、病理組織学的に細胞増殖マーカーとして汎用されている^{38)~40)}。型の如く脱パラフィンを行った切片を、0.3% H₂O₂ 添加メチルアルコール液中で30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼを失活させた。次いで、非特異的結合反応を低下あるいは防止するため、切片を10%の家兎血清で20分間、室温処理した。次に IL-6 に対するポリクローナル抗体を4℃で1晩反応させた。その後、ヤギ IgG に対するビオチン化2次抗体(家兎, IgG, 1:200)(Vector)を室温で1時間反応させ、次いでアルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン-ビオチン複合体(streptavidin-biotin complex with alkaline phosphatase, strept ABC/AP)(DAKO, Glostrup, Denmark)内で30分反応後、アルカリフォスファターゼ kit1(ファーストレッドを発色試薬として用いている)(Vector)で発色させた。

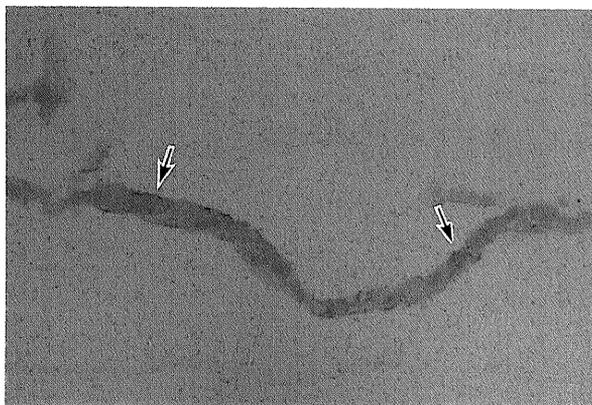


Fig. 5. Immunohistochemical staining of IL-6 in human intrahepatic biliary epithelial cells cultured on collagen gel for 2 weeks (primary culture). IL-6 is expressed in the peripheral cytoplasm of almost cultured cells (arrows). Immunostaining (ABC method) and hematoxylin, $\times 200$.

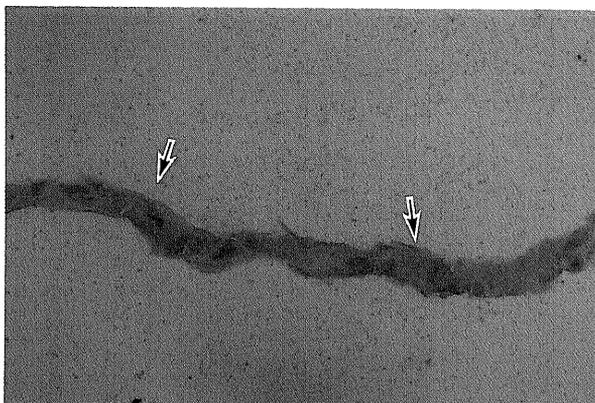
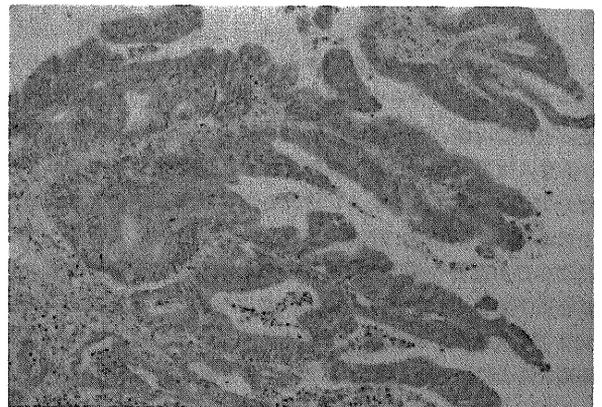
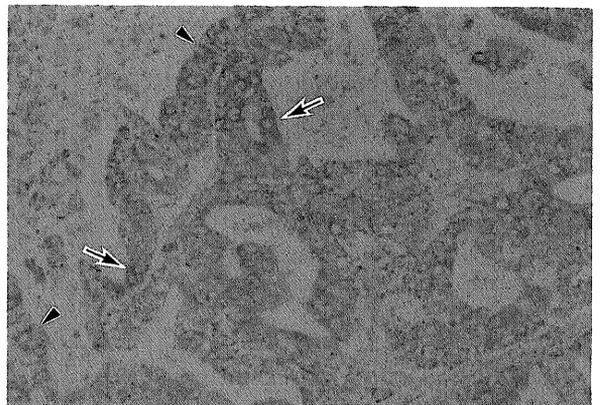


Fig. 6. Immunohistochemical staining of IL-6 receptor α chain in human intrahepatic biliary epithelial cells cultured on collagen gel for 2 weeks (primary culture). IL-6 receptor α chain is seen diffusely in the cytoplasm of cultured biliary epithelial cells (arrows). Immunostaining (ABC method) and hematoxylin, $\times 200$.

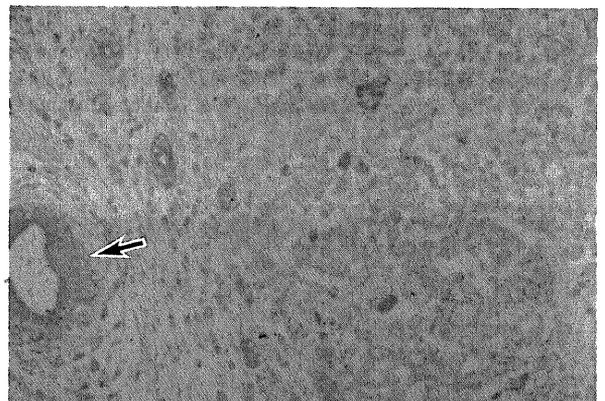
その後、水道水と PBS で十分に洗浄し、0.1%トリプシン(Difco Laboratories, Detroit, USA) 溶液(PBS, pH7.5)で37℃20分反応させ、冷 PBS で反応を停止させた。次いで、10mM クエン酸緩衝液 pH6 の溶液で5分間3回のマイクロウェーブ



A



B



C

Fig. 7. Immunohistochemical staining of IL-6 in cholangiocarcinoma showing variable histologic differentiation. (A) IL-6 is stained diffusely in the cytoplasm of papillary adenocarcinoma. (B) IL-6 is moderately expressed in the cytoplasm of moderately differentiated tubular adenocarcinoma. Some carcinoma cells show a diffuse staining pattern (arrows) and the others a membranous one (arrow heads). (C) IL-6 is hardly detectable in poorly differentiated tubular adenocarcinoma. Arrow shows an entrapped non-neoplastic interlobular bile duct showing a moderate expression of IL-6 in the cytoplasm in the tumor. Immunostaining (ABC method) and hematoxylin, $\times 200$ (A), $\times 200$ (B), and $\times 200$ (C).

で処理し、抗原の露出増強を試みた。その後、10%ウマ血清で室温で30分間反応させた後、100倍希釈の抗ヒト Ki67 抗体 (MIB1, Immunotech, Marseille, France) を室温で1時間反応させた。その後、マウス IgG に対する2次抗体 (馬, IgG, 1:200) (Vector Lab) を室温で1時間反応させ ABC/PO 溶液 (Vector) 内で30分反応後、0.03% H₂O₂ 添加 DAB で発色させ、ヘマトキシリンで8秒間核染後、脱水封入し鏡検した。IL-6 はファーストレッドで赤色に、また Ki67 は DAB で褐色に染色され、両者の識別は光学顕微鏡的に可能であった。観察は主として光学顕微鏡で行い、確認のため共焦点レーザー顕微鏡での観察も行った。なお、各々の反応の間には、切片を PBS 内で3回以上十分に洗浄した。

胆管細胞癌での IL-6 と Ki67 の発現の関連性を以下の如く検討した。つまり、弱拡大レベルで IL-6 を発現している部位と Ki67 を発現している部位をサーベイし、両者の関係を検討した。次いで、胆管細胞癌の分化度別に Ki67 の発現と検討した。また IL-6 陽性の癌細胞1000個と IL-6 陰性の癌細胞1000個中で、各々 Ki67 発現を示す癌細胞の%を求め、両群を比較検討した。

なお、免疫染色の特異性は以下の如く検討した。第一に、免疫染色の過程で一次抗体の代わりに PBS あるいは非免疫動物血清を用いることにより陽性像が得られないことにより確認した。第二に、100倍に希釈した IL-6 ポリクローナル抗体溶液に、ヒトリコンビナント IL-6 (Upstate Biotechnology Incorporated) が 1 μ g/ml になる様に加え、免疫染色の陽性反応が减弱化することにより確認した。

3. ISH 法による IL-6 mRNA 発現の検討

1) ジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブの作製

肝組織切片、培養胆管上皮細胞 (コラーゲンゲル上で初代培養を行った非腫瘍性の胆管上皮とチェンバースライド上で培養を行った CCKS1) での IL-6 mRNA の発現を以下の如く検討した。プローブとして IL-6 遺伝子の Exon2, 3, 4 領域から特異的塩基配列を選び (図1)、これに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブ (各60塩基, Bio-synthesis Inc, Lewisville, USA) およびセンスオリゴヌクレオチドプローブを合成し、3'末端のテイリング法⁴⁾にてジゴキシゲニンテイリングキット (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany) を用いジゴキシゲニンで標識した。すなわち、各100pmolのオリゴヌクレオチドプローブに、テーリング緩衝液、ジゴキシゲニン標識 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 μ l のトリス塩酸-EDTA 緩衝液に溶解した。

2) 肝組織切片、コラーゲンゲル上およびチェンバースライド上の培養胆管上皮の前処置

これらの標本を PBS で希釈した4%パラフォルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) (PFA/PBS) (pH7.6) で15分間、前固定した後、37°Cのプロテナーゼ K (2.5 μ g/ml, 和光純薬) 溶液中15分間反応させ、その後 0.2N HCl 溶液に10分間反応させ除蛋白処置を行った。次いで4% PFA/PBS (pH7.6) で10分間後固定を行い、非特異的なプローブの吸着防止のために 0.1M トリエタノールアミン塩酸 pH8.0 と0.25%酢酸溶液で10分間アセチレーションを行い、エタノール系列で脱水、風乾した。なお、各々の反応過程間は、ジエチルピロカーボネイト (diethylpyrocarbonate, DEPC) 処理した PBS で充分洗浄した。

3) ホルマリン固定パラフィン包埋切片での検討前処置

型の如く行った脱パラフィン切片を37°Cのプロテナーゼ K (5 μ g/ml, 和光純薬) 溶液で30分間反応させ、それから 0.2N HCl 溶液中で10分間反応させ除蛋白処置を行った。次いで4% PFA/PBS (pH7.6) で10分間後固定を行い、非特異的なプローブの吸着防止のために 0.1M トリエタノールアミン塩酸 pH8.0 と0.25%酢酸溶液で10分間アセチレーションを行い、エタノール系列で脱水、風乾した。なお、各反応過程間は DEPC 処理した PBS で充分洗浄した。

4) ハイブリダイゼーション

前処置した切片やチェンバースライドを、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 トリス塩酸 pH7.6, 酵母 tRNA 200 μ g/ml, 1 \times デンハルト溶液, 10%デストラン硫酸, サケ精子 DNA 250 μ g/ml) で50°C, 1時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、上記ハイブリダイゼーション溶液で希釈した 0.2nM/ml のジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブで、50°C, 16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、50°Cで30分間1回, 2 \times SSC で50°Cで20分間1回, 最後に、0.2 \times SSC で50°Cで20分間2回行った。

5) ハイブリッドの免疫組織化学的検出

ジゴキシゲニンの検出は、アルカリフォスファターゼ-抗アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase, APAAP) 法を用い、酵素抗体間接法で行った。すなわち、洗浄後の組織切片を1.5%ブロッキング試薬 (Boehringer Mannheim Biochemica) で1時間ブロッキング後、マウス抗ジゴキシゲニンモノクローナル抗体 (100希釈, Boehringer Mannheim Biochemica), 抗マウス免疫グロブリン抗体 (家兎, 100倍希釈, DAKO), APAAP 複合体 (DAKO) の順

Table 3. Expression of IL-6 in cholangiocarcinoma with respect to histologic differentiation

Expression of IL-6	No. of cholangiocarcinoma tissues examined	No. of tissues showing histology and differentiation of cholangiocarcinoma			
		Pap	Well	Mod	Por
##	20	1	6	13	0
#	34	2	2	25	5
+	19	0	1	11	7
-	4	0	0	1	3

IL, interleukin; pap, papillary adenocarcinoma; well, well differentiated tubular adenocarcinoma; mod, moderately differentiated tubular adenocarcinoma; por, poorly differentiated tubular adenocarcinoma.

##, strongly positive; #, weakly positive; +, slighty positive; -, negative.

に各々1時間反応させ、1mM レバミゾールを加えたアルカリフォスファターゼ基質 kit1 (Vector) 溶液中で十分な発色を確認し水性封入剤で封入し、光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。各反応過程間は、トリス緩衝液 (100mM トリス塩酸 pH7.6, 150mM 塩化ナトリウム) で充分洗浄した。なお、陰性対象として、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確認した。

4. 共焦点レーザー顕微鏡による検討

streptABC/AP 法あるいは APAAP 法で染色された標本では、ファーストレッドを発色系に用いている。ファーストレッドはローダミンと同波長の蛍光を発するので、染色標本を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM410, Carl Zeiss, Gottingen, Germany) 下で観察することによりファーストレッド、つまり標識物の局在をデジタル化し画像で検討した。レーザー光は 514nm のアルゴンレーザーを使用し、スキャン速度は8.65秒とし、ピンホールサイズ値は20とし、画像サイズは768×576ピクセルとした。画像アベレージングは8回として画像を得た。



Fig. 8. Immunohistochemical staining of IL-6 in the dysplastic biliary epithelial cells in a case of hepatolithiasis. IL-6 is clearly expressed on dysplastic epithelial cells. S, gallstone in the bile duct lumen. Immunostaining (ABC method) and hematoxylin, ×200.

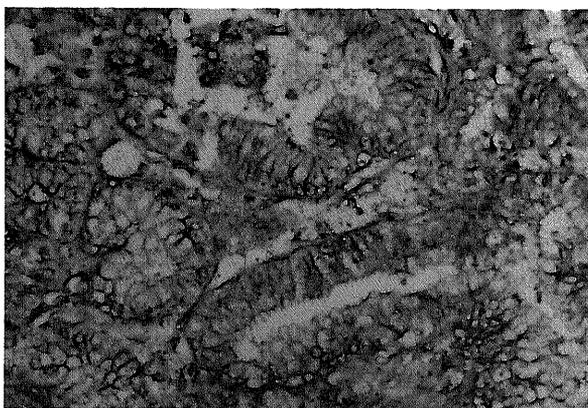


Fig. 9. Demonstration of IL-6 mRNA by *in situ* hybridization technique in the paraffin embedded sections of cholangiocarcinoma. IL-6 mRNA signals are detected in the cytoplasm of many cholangiocarcinoma cells. Counterstain is by methylgreen, ×200.

5. 培地中での IL-6 の測定

ヒト肝内胆管上皮細胞の初代培養に成功したのは3例であり、これらの症例を用い上皮成分よりなる培養移植片の継代培養を行った。その結果、肝硬変の1例のみで胆管上皮の増殖がみられた。この1例を用い、培養胆管上皮の IL-6 産生量を検討した。つまり、2.5 μg/ml ホルスコリン (forskolin) (和光純薬)、25ng/ml ヒトリーコンビナント EGF (Upstate Biotechnology)、10 μg/ml ヒトリーコンビナントインスリン (和光純薬)、100単位/ml ペニシリンG (明治製薬)、100 μg/ml ストレプトマイシン (明治製薬)、10% FCS (Gibco) を含む DMEM (Flow Lab)/Ham F-12 (Flow) 等量培養液で2週間継代培養後、培地を無血清 DMEM (Flow Lab) 培養液に変えて、48時間培養した。その培養液の上清を採取し、0.1 μm ディスポーザブルシリンジフィルター (Anotec, Banbury, England) で細胞成分を除去後、測定試料とした。つまり、2ステップサンドイッチ ELISA 法による IL-6 測定キット (富士レビオ、東京) を用い、IL-6 を測定した¹⁹⁾。なお、本キットは IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, 腫瘍壊死因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子などの他のサイトカインと交叉反応性は認められず、標準 IL-6 を用いた検討ではその測定感度は約 3pg/ml と推定された。なお、1回の測定に必要な検体量は 50 μl である。

成 績

I. ヒト肝内胆管系における IL-6 および IL-6 mRNA の発現

1. IL-6 の発現

モノクローナル抗体を用いた凍結切片での検討では、正常肝の細胆管、小葉間胆管と隔壁胆管の上皮細胞の核周囲や胆管内腔側の胞体に、IL-6 の弱い陽性所見が認められた (図 2A)。EBO, v-CAH, PBC では、IL-6 は細胆管～小葉間胆管～隔壁胆管の上皮細胞の胞体にび漫性に陽性となり、PBC の障害胆管の上皮でやや強い発現を認めた (図 3A)。

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体によるホルマリン固定パラフィン包埋切片での検討では、いずれも同じ染色結果が得られた。つまり、正常肝では10例中8例で、小葉間胆管および隔壁胆管上皮に陽性像が得られた。主に胞体の内腔側に IL-6 の発現が見られた (図 2B)。なお、動脈や静脈の平滑筋も軽度から中等度の陽性像を示した。肝細胞にもび漫性の弱陽性の所見を示すものも見られた。PBC 11例では、正常肝に比

Table 4. Immunohistochemical staining of interleukin-6 and Ki67 in cholangiocarcinoma

Cholangio-carcinoma cells	No. of total cells examined	No. (%) of Ki67-expressed cells
Well	1099	293 (26.7)
Mod	2245	708 (31.5)
Por	1580	591 (37.4)
IL-6 (+)	2775	840 (30.2)
IL-6 (-)	2149	752 (35.0)

Well, well differentiated tubular adenocarcinoma; mod, moderately differentiated tubular adenocarcinoma; por, poorly differentiated tubular adenocarcinoma; IL-6 (+), interleukin-6-positive carcinoma cells; IL-6 (-), interleukin-6-negative carcinoma cells; %, percentage of Ki67-positive cells.

べ障害胆管上皮での IL-6 発現が増強していたが (図 3B), 同一症例でも胆管により染色強度にバラツキがあり, ほとんど陰性の胆管も見られた. EBO では, 3 例中 2 例で細胆管~小葉間胆管および隔壁胆管の胆管上皮にび慢性的陽性像が得られ, 同一症例での染色強度のバラツキ像はほとんどみられなかった. 増生細胆管も IL-6 がび慢的に陽性であった.

肝硬変では, 細胆管, 小葉間胆管や隔壁胆管が陽性であり, さらに再生結節の肝細胞が種々の程度にび慢的に陽性で, 肝動脈や静脈の平滑筋も陽性像を示した. なお, 小葉間胆管や隔壁胆管では管腔縁が相対的に強く染まり, また胆管が大きくなるにつれ IL-6 の染色性が低下する傾向があった. なお, 同一症例でも肝内胆管により染色強度に違いが見られた.

次に, 胆管上皮での IL-6 mRNA の発現を検討した. その結果, 正常肝では陽性のシグナルはほとんどみられなかった. しかし, PBC の障害胆管の上皮細胞の胞体では陽性シグナルが主に核周囲, また核に重なるように得られた (図 4A). さらに, 門脈

域内に浸潤している単核細胞にも IL-6 mRNA の発現を認めた. なお, センスプローブを用いたコントロールでは, 標本中に陽性のシグナルは認められなかった.

2. IL-6 レセプターの発現

免疫組織学的検討で, PBC や EBO の凍結切片で散在性に胆管上皮の胞体にびまん性, あるいは内腔縁にやや強い IL-6 レセプターの陽性所見がみられた. 正常肝では胆管上皮に発現はみられなかった. なお, パラフィン包埋切片を用いた検討では, いずれの疾患においても IL-6 レセプターの発現はみられなかった.

3. ヒト胆道系培養の初代培養上皮の IL-6, IL-6 レセプターおよび IL-6 mRNA の発現

培養を試みた14例中上皮細胞の増殖がみられた成功例は, 正常肝2例と肝硬変1例の計3例であった. さらにこれら3例で, 培養を試みた胆管樹微小組織片の5%程度で培養移植片から胆管上皮の増殖がみられた. 2週間培養を行った培養胆管上皮で

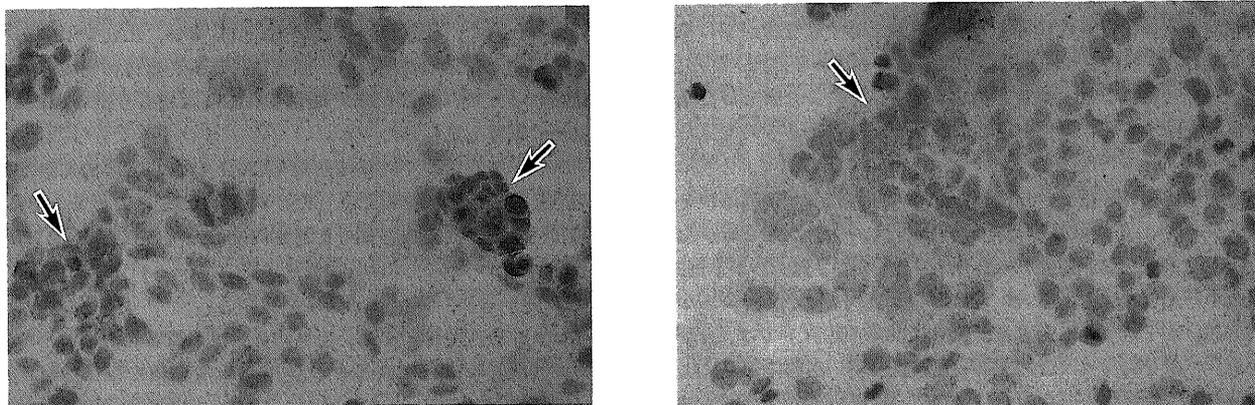


Fig.10 Immunohistochemical staining of IL-6 and *in situ* hybridization of IL-6 mRNA in cultured human cholangiocarcinoma (CCKS1). (A) IL-6 is expressed in the cytoplasm of some cultured CCKS1 cells (arrows). Counterstain is hematoxylin. Immunostaining (ABC method) and hematoxylin, $\times 200$. (B) Signals of IL-6 mRNA are discernible in the cytoplasm of some cultured cells (arrow). Visualization is done by immunostaining (APAAP) and hematoxylin, $\times 200$.

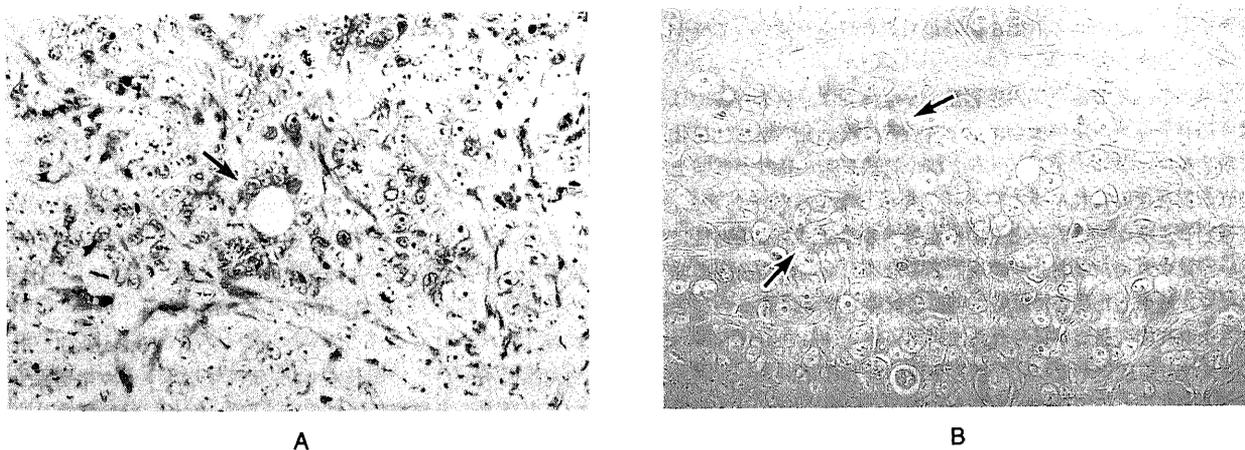


Fig.11. Histology of transplanted CCKS1 tumor in the nude mice and immunohistochemical staining of human IL-6 in the tumor. (A) Transplanted CCKS1 shows a moderately differentiated adenocarcinoma. Arrow: tubule formation. HE, $\times 200$. (B) IL-6 is focally detectable immunohistochemically in moderately differentiated adenocarcinoma (arrows). Immunostaining (ABC method) and hematoxylin, $\times 200$.

は、胞体にび漫性に IL-6 の軽度の発現がみられ、細胞膜にやや強く発現していた (図 5)。IL-6 レセプター α 鎖は、胆管上皮の胞体にび漫性の軽度の陽性所見が見られた (図 6)。ISH 法で IL-6 mRNA の発現を検討した結果、胆管上皮培養細胞において、組織の凍結切片と同様に、いくつかの細胞のその胞体、特に核周囲性にあるいは核に重なる様に IL-6 の mRNA のシグナルが得られた (図 4B)。

4. 培地中の IL-6 値

肝硬変の 1 例より得られ、胆管上皮細胞では、胆管上皮細胞の純粋継代培養に成功した。この例の 2 週目の培地上清を用い、ELISA 法で IL-6 を定量した。3 ケの培養皿での IL-6 の値は、14.9pg/ml, 2.6pg/ml, 11.9pg/ml であった。なお、培養前の血清培地および無血清培地中には、IL-6 は検出されなかった。

II. 胆管細胞癌での IL-6, IL-6 mRNA および Ki67 の発現

1. IL-6 および IL-6mRNA の発現

IL-6 の発現が胆管細胞癌の癌細胞で種々の頻度と染色強度で認められた (図 7A, B, C)。なお、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を用いた検討で、ほぼ同じ成績が得られたので以下ではまとめて述べる。染色パターンとして、胆管細胞癌の癌細胞の胞体がび漫性に染まるもの、核上部や管腔縁が主に染まるもの、さらに主に細胞周囲が染まるものがみられた。また、同一の癌性腺管でも、腺管を構成する癌細胞により異なった染色強度を示すもの、陰性と陽性の癌細胞が混在するものも見られた。

胆管細胞癌の組織型・分化度と IL-6 の発現程度との関連性を表 3 に示す。乳頭状腺癌では、++ が 1 例、+ が 2 例であった (図 7A)。高分化管状腺癌では、++ が 6 例、+ が 2 例、- が 1 例、また中分化管状腺癌 (図 7B) では、++ が 13 例、+ が 25 例、- が 11 例、- が 1 例であった。低分化管状腺癌 (図 7C) では、+ が 5 例、+ が 7 例、- が 3 例であった。また同一症例で部位により分化度や組織型の異なる場合、分化度が高い部分は高度に強く発現し、分化度の低い部分では IL-6 の発現が低下あるいは陰性化する傾向がみられた。しかし症例によっては、コード化あるいは単細胞性に増生する癌細胞が陽性であったり、また極性を失った低分化の癌細胞では、胞体がびまん性に陽性のもの、細胞辺縁部が染色されるものもみられた。なお、粘液癌では IL-6 の発現はみられなかった。以上より、胆管細胞癌ではその組織学的分化度が高い程、IL-6 の強く広汎な発現があり、分化度が低くなるにつれて、IL-6 の発現やその範囲が減少する傾向が明らかであった。

なお、肝内結石症+肝内胆管癌の 4 症例では、胆管癌部では種々のパターンの陽性像を示した。胆管被覆上皮の増殖性変化を示す部位、特にディスプラシア部の胆管上皮で IL-6 が乳頭状腺癌と同程度の陽性所見とパターンを示した (図 8)。しかし、被覆胆管上皮が陰性の部位や同一胆管でも部位による染色性に違いが見られた。なお、胆管細胞癌を合併した肝内結石症の非癌部で、増生した胆管付属腺、特に漿液腺の腺房に IL-6 のびまん性かつ高度の発現が見られた。

ホルマリン固定パラフィン切片を用いた ISH 法により、高分化胆管細胞癌 2 例全例で、癌細胞の胞体に陽性のシグナルが得られ (図 9)、核に重なる様な陽性所見もみられたが、陰性部位も存在した。しかし、中分化あるいは低分化の胆管細胞癌では mRNA のシグナルは陰性か、あるいは核周囲に僅かに認められる程度であった。

2. 胆管細胞癌での Ki67 の発現および IL-6 と Ki67 発現の関連性に関する検討

Ki67 は高分化から低分化の胆管細胞癌の核に種々の程度に発現したが、高分化、中分化、低分化の順に Ki67 陽性細胞の比率が増加した (表 4)。なお、非腫瘍部胆管上皮細胞では、一部の胆管上皮の核に Ki67 の発現が見られた。

次に、IL-6 発現の有無により Ki67 発現を検討した。IL-6 陽性細胞での Ki67 発現率は 30.2% であり、IL-6 陰性細胞での Ki67 発現率は 35.0% であり、IL-6 陰性細胞で Ki67 の発現が高率であった ($p < 0.05$) (表 4)。

3. ヒト胆管細胞癌培養株 CCKS-1 での IL-6, IL-6mRNA および IL-6 レセプターの発現

IL-6 の免疫染色では、チェンバースライド上で増生した癌細胞の一部で、その胞体にび漫性に IL-6 の発現が見られた (図 10A)。IL-6 陽性癌細胞と陰性の癌細胞が混在し、さらに弱陽性の癌細胞も混在してみられた。胆管癌培養細胞の ISH 法による mRNA 発現の検討では、散在性に一部の胆管癌培養細胞において、胞体にびまん性に強く IL-6mRNA の発現がみられた (図 10B)。陽性と陰性の癌細胞が混在しており、また弱陽性の癌細胞もみられた。胆管癌培養細胞 CCKS1 では、IL-6 レセプター α 鎖が種々の発現が見られ、散在性に一部の胞体に発現の強く見られるもの、胞体が弱く染色される癌細胞も少数みられた。陰性の細胞も見られた。

ヌードマウス皮下に移植した CCKS1 は、組織学的に篩状の形態を示す中分化腺癌であった。同部の IL-6 の免疫染色では、散在性に胆管癌細胞に IL-6 が胞体内での発現していた (図 11)。

考 察

ヒトの肝内胆管系には、種々の炎症性、腫瘍性疾患がみられる。代表的な炎症性疾患として、PBC や原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC)、骨髄移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) による胆管障害がある⁴³⁻⁴⁹。また腫瘍性疾患としては胆管細胞癌、胆管細胞腺腫がよく知られている。これら肝内胆管病変の発生と進展には、胆管上皮そのものの病的変化に加え肝内門脈域局所で産生、分泌される炎症性サイトカインあるいは増殖因子が深く関与していると考えられている^{43,49,50}。特に PBC では、門脈内で産生されるインターフェロン γ や IL-5 が重要な役割を果たすとされており、ヘルパー T 細胞 (helper T cell, Th) 1 系および Th2 系の CD4 陽性リンパ球がこれら病変の発生に関与する⁴⁹。特に、Th2 系 CD4 リンパ球は好酸球浸潤に深く関係しており、胆管病変の発生・進展にも関連することが注目されている^{49,51}。

さて IL-6 は現在、最も研究の進んでいる多機能サイトカインの 1 つである。生体の防御にとって中心的な役割を果たしており、免疫応答に重要な役割を果たすのみならず、肝細胞での急性期反応蛋白の合成、造血細胞の分化増殖にも関与し、B 細胞の刺激因子あるいは成熟因子としても注目されている。この多機能性のため IL-6 はインターフェロン β 2, 26kDa 蛋白、肝細胞刺激因子、ハイブリドーマ/プラズマサイトーム増殖因子といった種々の名称で呼ばれている¹¹⁻²⁰。近年、慢性関節リウマチ、慢性甲状腺炎などの自己免疫疾患や糸球体腎炎の発生、進展に IL-6 遺伝子の異常の関与することが示唆されている。つまり、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) では関節滑膜組織に浸潤した T 細胞 (Th₂ 系 CD₄ リンパ球)、さらに滑膜細

胞自身によって大量の IL-6 が産生され、これが RA の病態と進展に深く関連する¹⁹⁾。また、後天性免疫不全症患者にみられる高ガンマグロブリン血症は、IL-6 遺伝子の異常発現の結果であることが示唆され^{20,21)}、さらに成人 T 細胞白血病ウイルス 1 で形質転換したヒトリンパ球株では恒常的な IL-6 産生が観察されている。

さらに、IL-6 は免疫系担当細胞だけでなく、線維芽細胞や血管内皮細胞、腎メザンギウム細胞、 β 細胞など多くの細胞で産生されることが明かになってきており、種々の細胞に作用して多彩な生物活性を発揮する^{22,23)}。特に、IL-6 と腫瘍、特に悪性腫瘍との関連性が最近、注目されている。例えば、心房内粘液腫やキャスルマン症候群、唾液腺腫瘍、膀胱細胞癌株などでは腫瘍細胞自身が IL-6 を産生することが示され^{24,25)}、オートクライン、パラクライン機序により癌の発生や増大に関係し、また IL-6 は多発性骨髄腫の増殖因子であり、IL-6 異常発現によって、ポリクローナルな B 細胞異常のみならず、抗体産生細胞も悪性転化し得ることが報告された。

IL-6 は、肝や胆管系の病態形成にも深く関連していることが知られている。しかし、胆管上皮での IL-6 の発現と胆道系疾患の発生・進展との具体的な関連性に関して不明な点が多い。そこで本実験では、ヒト肝内胆管上皮での IL-6 の発現と胆道系疾患の病理学的意義をヒト肝、胆管組織および培養胆管上皮細胞を用いて検討した。

まず、正常肝組織を用いた免疫組織化学的検討で肝内胆管系上皮に IL-6 の軽度の発現がみられた。今回検索した、いわゆる組織学的な正常肝では、既に種々の病的因子やストレスが大なり小なり加わっていると考えられる。特に開腹手術時に肝組織を採取した症例が多く、開腹手術そのものを含め何らかの病的現象が肝や胆管系に及んでいる可能性がある。従って、真の意味での正常胆管系上皮での IL-6 の発現の有無は不明である。なお、IL-6 mRNA のシグナルは胆管上皮ではほとんどみられなかったため、IL-6 は生理的には胆管上皮ではほとんど産生されていないと思われる。また、IL-6 レセプターの発現は今回検討した正常肝の胆管上皮には発現がみられなかった。

次に、PBC や EBO、v-CAH などの胆管系や門脈域での炎症性変化の強い例では、肝内胆管上皮での IL-6 の発現が増強していることが明らかとなった。特に、PBC の障害胆管（慢性非化膿性破壊性胆管炎）で IL-6 の強い発現および mRNA のシグナルが見られた。さらに、頻度は低く散在性ではあるが IL-6 レセプターの発現も胆管上皮にみられた。このことは、障害胆管上皮そのものが IL-6 を発現し、オートクラインを含めた機序により PBC の胆管病変などの病態形成に関連していることを示すものである。なお、従来、PBC や EBO、また v-CAH での障害胆管では胆管上皮の過形成がみられ、微小乳頭状の変化も知られており、特に PBC で強いことが知られている^{26,27)}。

IL-6 には細胞の増殖活性を促進する作用があることが知られており、IL-6 は PBC やその他の胆道系疾患の障害胆管にみられる胆管上皮の過形成に深く関連している可能性が示唆される。また最近、IL-6 は炎症反応、特に他の一次性的炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られており、胆管上皮での産生された IL-6 は胆管炎の発生進展をむしろ抑制している可能性もある。

次に、当教室で確立したコラゲナーゼ灌流コラーゲンゲル上培養移植片培養法を用い、外科的に切除したヒト肝組織より肝

内胆管上皮の初代および継代培養を行い、IL-6 と胆管上皮との関連性をさらに検討した。すなわち、14例の外科的切除肝の一部肝組織を培養移植片として用い、胆管上皮細胞の初代培養を試みた。しかし、培養移植片から胆管上皮の増殖がみられたのは3例のみであった。これらの成功した培養移植片でも、その大部分が初代培養の初期の間に間質細胞に駆逐されてしまい、試みた培養移植片の5%程度で組織学的、免疫組織化学的検索に耐えうる胆管上皮細胞の増殖がみられた。そこで、初代培養に成功したこれら3症例を用い、2週間コラーゲンゲル上で培養を行い検討を行った。その結果、培養胆管上皮細胞で IL-6 および IL-6 mRNA の発現が見られた。また、軽度ではあるが IL-6 レセプターの発現もみられた。このことは胆管上皮が IL-6 を産生し、この IL-6 がオートクライン機序により胆管上皮に作用することを培養上皮細胞で証明できたものと考えている。肝組織標本中の肝内胆管上皮に IL-6、IL-6 mRNA、IL-6 レセプターが検出されたことも合わせ、IL-6 がオートクライン機序を含めた機序により胆管系の機能と病態に深く関係することがさらに示された。なお、初代培養を続けていくと、4週間後から胆管上皮細胞の増殖能は低下し、コラーゲンゲル上から剥離し、最後には胆管上皮が見られなくなってしまった。胆管上皮細胞の培養に関する従来報告でも、6週間まで培養に成功したが3~4週間より上皮の配列が乱れてしまうので4週間までが培養法を用いた胆管上皮細胞の研究に適しているとされ、さらに胆管上皮の代用として用いることの可能性が報告されている^{28,29)}。今回の実験でもこのことが明確に示され、非腫瘍性の胆管上皮の培養を用いた研究には適応と限界のあると考えられる。

次に、肝内胆管上皮の初代培養に成功した3例を用い、胆管上皮細胞のみの継代培養を試みた。この継代培養法はコラーゲンゲル培地での上皮細胞と間質細胞の増殖パターンと速度の違いに基づいた上皮細胞の分離培養法であり、当教室で開発、確立されたものである^{29,30)}。その結果、肝硬変1例で胆管上皮細胞のみの純粋継代培養に成功した。そこでこの純粋継代培養を2週間行い、その上清を ELISA 法で検出したところ、IL-6 が検出された。Matsumoto からも同様の報告を行っており、さらに IL-1 β やホルポールミリステートアセテートの添加により胆管上皮での IL-6 の産生が亢進したと述べている²⁹⁾。これらの成績から、培養胆管上皮が IL-6 を産生することがさらに確認された。

次に外科的に切除された43例の胆管細胞癌を用い、胆管細胞癌と IL-6 との関連性を検討した。従来、IL-6 と癌の発生進展に関して多くの報告がなされている。しかし癌の種類により、また報告者により結果が異なっている。例えば Takizawa らは株化した肺癌細胞の培養を用いて、IL-6 は癌細胞の抑制因子として作用することを述べている³¹⁾。また唾液腺腫瘍や脳下垂体腫瘍では高分化の癌で IL-6 の発現があり、IL-6 は増殖促進因子としてオートクライン機序で作用することが報告されている^{32,33)}。一方メラノーマでは、細胞培養法を用いた研究で癌の初期の段階では IL-6 は腫瘍細胞増殖促進作用があるが、癌が進展する段階では IL-6 はむしろ増殖抑制的に作用することを Lu らが最近明らかにしている³⁴⁾。

一方、肝内胆管細胞癌に関しては、Okada らは胆管細胞癌培養細胞株 (HuCC-T1) を用いた検討で培養液中に IL-6 が検出され、癌細胞が IL-6 を産生している可能性を報告している³⁵⁾。今回、外科的に切除された胆管細胞癌の検討で、IL-6 は胆管細胞癌の癌細胞に種々の頻度と分布で観察されたが、特に分化程度

と増殖に関して興味深い所見が見られた。つまり、組織学的に分化度が高くなる程、癌細胞での IL-6 の発現が亢進し、広汎かつ強くみられた。そして、癌の分化度が低下するに従い、IL-6 の発現は減少した。またホルマリン固定パラフィン胞埋切片を用いた ISH 法で IL-6 mRNA の発現を検討した結果でも、高分化胆管細胞癌で容易に検出され、IL-6 と同様の分布を示した。これらの所見は、IL-6 が分化度の高い胆管細胞癌で活発に産生され、胆管細胞癌の組織学的分化度と深く関連して発現されることを示すもので、IL-6 は形態形成因子としてオートクラインを含めた機序より作用していることが考えられる。なお、今回のポリクローナル抗体を用いた検討では、胆管細胞癌組織で IL-6 レセプターは検出されなかった。今回用いた材料がルーチンの方法で処理されており、これが IL-6 レセプターを検出し得なかった最大の原因と思われる。しかし、胆管癌細胞の IL-6 レセプターに IL-6 が既に結合しており、そのため通常の免疫染色ではレセプターを検出し得なかったかもしれない。

次に、IL-6 の発現と癌細胞の細胞増殖活性との関連性を検討した。今回 Ki67 の免疫染色を行ったが、Ki67 抗原は G₀ と G₁ の初期以外の増殖期の細胞の核に発現することが知られており、細胞増殖活性の検索に病理組織学的に汎用されている³⁹⁻⁴⁰。今回、この Ki67 と IL-6 の 2 重免疫染色により、IL-6 発現と細胞増殖活性を検討した。その結果、IL-6 の発現の目立つ例では Ki67 の発現は低く、また IL-6 陰性の癌細胞では細胞増殖活性が亢進していることが示された。IL-6 は高分化癌で強くみられるが、低分化になると発現が減少することも考えると、癌化した例では IL-6 は増殖因子としてではなく、むしろ分化に関与した因子として作用することが示唆される。また、IL-6 を発現しない癌細胞で Ki67 が高率に検出され増殖活性が高い成績が得られたことから、IL-6 の発現の停止（遺伝的に関連したものか）が胆管細胞癌の増殖につながることも考えられる。また、低分化な胆管細胞癌で IL-6 レセプターの発現を検討できなかったので結論を出せないが、胆管癌細胞がバラクライン機序により IL-6 の影響、つまり分化促進作用を受けており、IL-6 の減少で癌細胞の分化が低下し、増殖活性が増した可能性は残る。

また、胆管細胞癌を合併した 4 例の肝内結石症での免疫組織学的検討で、IL-6 は胆管細胞癌の前癌病変とされている胆管ディスプラジアでも乳頭状あるいは高分化胆管細胞癌と同様に胞体内に強く発現していた。このことは、胆管細胞癌は唾液腺腫瘍と同じく、その前癌状態の胆管上皮細胞に IL-6 の発現があり、その発現の持続が胆管細胞癌の発生に深く関係していることを示す所見と考えられる。IL-6 の発現に関して、胆管ディスプラジアと高分化胆管細胞癌との間に明確な差がなかったため、この 2 つの腫瘍性プロセス進展の間には、IL-6 以外の増殖因子あるいは癌関連遺伝子に突然変異に伴う遺伝子の異常、あるいはその表現型に変化が発生あるいは介在していることが強く推察される。今後の大きな研究課題と考えられる。

次に当教室で開発された胆管細胞癌培養細胞 (CCKS1) を用い胆管細胞癌と IL-6 との関連性をさらに検討した。その結果、CCKS1 の癌細胞では IL-6 蛋白が陽性であり IL-6 mRNA のシグナルがみられ、さらに IL-6 レセプターも陽性であった。つまり IL-6 がオートクラインの機序により胆管癌細胞の増殖や分化に関連していることが CCKS1 を用いた研究で示された。また、ヌードマウスへの皮下移植により癌細胞はヒト IL-6 を発現していたので、胆管細胞癌での IL-6 の発現が亢進し、CCKS1 癌細胞

での異常な分化や増殖に関連することも示唆された。

以上今回の研究により IL-6 はオートクラインを含めた種々の機序で胆管系疾患の発生や形態形成に深く関するサイトカインであることが示され、胆管上皮そのものが産生するサイトカインであることも示された。また胆管細胞癌では、IL-6 は組織形態形成や、胆管癌発生初期にも深く関連していることが示された。今後、IL-6 の胆管上皮での具体的な作用機序をさらに検討することにより、肝内胆管系の病変の理解が更に深まるものと思われる。

結 論

ヒト非腫瘍性肝組織、胆管細胞癌の外科的切除肝、ヒト肝内胆管細胞の培養、株化した胆管細胞癌 CCKS1 の培養を用いて、IL-6 と肝内胆管系の病態との関連性を検討し以下の結論を得た。

1. 正常肝の肝内胆管上皮で軽度ではあるが IL-6 の発現が見られた。しかし、IL-6 mRNA や IL-6 レセプターの発現はみられなかった。

2. PBC や EBO での障害胆管上皮で、IL-6 の発現が亢進しており IL-6 mRNA シグナルもみられた。さらに、IL-6 レセプターの発現もみられ、IL-6 がオートクラインの機序により胆管系の病態に関連していることが示された。

3. ヒト胆管細胞癌の癌細胞で IL-6 の発現が見られ、分化度の高いものでは、発現が強くまた広汎に発現し、分化度の低下とともに IL-6 の発現の分布と強度が低下した。IL-6 がヒト胆管細胞癌の分化に関連する因子であることが示唆された。

4. 胆管細胞癌での IL-6 と Ki67 抗原発現での検討から、細胞増殖活性と IL-6 発現との関連性を検討した結果、IL-6 陽性癌細胞では同陰性癌細胞より増殖活性は低く、IL-6 発現は胆管細胞癌細胞増殖とは逆の関連性を示すことが示された。

5. 肝内結石を合併した胆管細胞癌の検討では、IL-6 は胆管上皮ディスプラジアに発現しており、胆管細胞癌の発生初期に関連する因子の 1 つと考えられた。

6. 初代ヒト正常肝内胆管培養細胞と胆管細胞癌培養細胞において免疫染色と ISH 法で、IL-6、IL-6 レセプター、IL-6 mRNA の発現を認めた。特に、胆管細胞癌で発現が著しく亢進しており、細胞培養法による検討でも胆管上皮の病態に IL-6 が深く関与していることが示唆された。

以上より、IL-6 は、正常の肝内胆管系で軽度であるが発現し、病的肝の胆管上皮で IL-6 の発現が亢進していた。また、IL-6 は胆管癌の発生初期に、また癌化後は癌形態形成や分化度の維持にオートクラインを含めた機序で作用すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、直接御指導、御校閲を賜りました恩師 第二病理科中沼安二教授に深謝いたします。さらに本研究に御意見を賜りました第一外科 渡辺洋宇教授に感謝いたします。さらに、御協力、御助言を戴きました金沢大学医学部第二病理学教室ならびに金沢大学第一外科学教室の諸先生と教室員各位に厚く御礼申し上げます。最後に肝生検材料収集に御協力を賜りました厚生連高岡病院 平野 誠先生、福井済生会病院 三井 毅先生、小松市民病院 品川 誠先生、吉田 政之先生、福井県立病院 林 裕之先生の皆様方に感謝します。なお、本論文の一部は、第32回日本肝臓学会総会（神戸、1996）、第32回日本肝臓研究会（大阪、1996）で発表された。

文 献

1) van Damme J, Opendakker G, Simpson RJ, Rubira MR,

- Cayphas S, Vink A, Billiau A, van Snik J. Identification of the human 26-kD protein, interferon β_2 (IFN- β_2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 165: 914-919, 1987
- 2) Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J* 5: 2529-2537, 1986
- 3) Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kishimoto T. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF/IL-6) gene. *EMBO J* 6: 2939-2945, 1987
- 4) Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76, 1986
- 5) Vilcek J, Le J. Immunology of Cytokines: an Introduction. *The Cytokine Handbook*, 2nd ed, p6-10, Academic Press, London, 1994
- 6) Hirano T. Interleukin-6. *The Cytokine Handbook*, 2nd ed, p145-168, Academic Press, London, 1994
- 7) Takai Y, Wong G, Clark S, Burakoff S, Herrmann S. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 140: 508-512, 1988
- 8) Hirano T, Taga T, Yasukawa K, Nakajima K, Nakano N, Takatsuki F, Shimizu M, Murashima A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Kishimoto T. Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc Natl Sci USA* 84: 228-231, 1987
- 9) Koj A. The role of interleukin-6 as the hepatocyte stimulating factor in the network of inflammatory cytokines. *Ann NY Acad Sci* 557: 1-8, 1989
- 10) Andus T, Bauer J, Gerok W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 15: 129-135, 1992
- 11) Tabibzadeh SS, Poubouridis DP, May LT, Sehgal PB. Interleukin-6 immunoreactivity in human tumors. *Am J Pathol* 135: 427-433, 1989
- 12) Van Meir E, Sawamura Y, Diserens AC, Hamou MF, de Tribolet N. Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. *Cancer Res* 50: 6683-6688, 1990
- 13) Eustace D, Han X, Gooding R, Rowbottom A, Riches P, Heyderman E. Interleukin-6 (IL-6) functions as an autocrine growth factor in cervical carcinomas in vitro. *Gynecol Oncol* 50: 15-19, 1993
- 14) Yee C, Biondi A, Wang X, Iscove N, Sousa J, Aarden L, Wong G, Clark S, Messner H, Minden M. A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood* 74: 798-804, 1989
- 15) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332: 83-85, 1988
- 16) Miki S, Iwano M, Miki Y, Yamamoto M, Tang B, Yokokawa K, Sonoda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett* 250: 607-610, 1989
- 17) Chen L, Mory Y, Zilberstein A, Revel M. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon- β 2. *Proc Natl Sci USA* 85: 8037-8041, 1988
- 18) Takizawa H, Ohtoshi T, Ohta K, Yamashita N, Hirohata S, Hirai K, Hiramatsu K, Ito K. Growth inhibition of human lung cancer cell lines by interleukin 6 in vitro: a possible role in tumor growth via an autocrine mechanism. *Cancer Res* 53: 4175-4181, 1993
- 19) Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, Kishimoto T. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 18: 1797-1801, 1988
- 20) Jourdan M, Bataille R, Seguin J, Zhang XG, Chaptal PA, Klein B. Constitutive production of interleukin-6 and immunologic features in cardiac myxomas. *Arthritis Rheum* 33: 398-402, 1990
- 21) Seino Y, Ikeda U, Shimada K. Increased expression of interleukin-6 mRNA in cardiac myxomas. *Br Heart J* 69: 565-567, 1993
- 22) Yoshizaki K, Matsuda T, Nishimoto N, Kuritani T, Taeho L, Aozasa K, Nakahata T, Kawai H, Tagoh H, Komori T, Kishimoto S, Hirano T, Kishimoto T. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* 74: 1360-1367, 1989
- 23) Leger-Ravet MB, Peuchmaur M, Devergne O, Audouin J, Raphael M, Van Damme J, Galanaud P, Diebold J, Emilie D. Interleukin-6 gene expression in Castleman's disease. *Blood* 78: 2923-2930, 1991
- 24) Emilie D, Navratil E, Devergne O, Reynes M, Crevon MC, Samuel D, Galanaud P. Monokine gene expression in normal human liver: selective involvement of the portal compartment. *Liver* 12: 34-41, 1992
- 25) Matsumoto K, Fujii H, Michalopoulos G, Fung JJ, Demetris AJ. Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors in vitro: interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor promote DNA synthesis in vitro. *Hepatology* 20: 376-382, 1994
- 26) 日本胆道外科研究会. 外科・病理 胆道癌取り扱い規約. 改訂第3版, 49-50頁, 金原出版株式会社, 東京, 1993
- 27) Nakanuma Y, Terada T, Tanaka Y, Ohta G. Are hepatolithiasis and cholangiocarcinoma aetiologically related? A morphological study of 12 cases of hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *Virchows Archiv A Pathol Anat and Histol* 406: 45-58, 1985
- 28) Nakanuma Y, Yamaguchi K, Ohta G, Terada T, The Japanese Study Group of Hepatolithiasis. Pathologic features of hepatolithiasis in Japan. *Hum Pathol* 19: 1181-1186, 1988
- 29) 河村泰仁. 胆管系上皮細胞のコラーゲン・ゲル内初代培養の試み. *十全医会誌* 98: 993-1006, 1989
- 30) 斎藤勝彦, 吉田一晴, 河野尚子, 中沼安二. コラーゲン・ゲ

- ル上 microexplant 培養法を用いた胆道系上皮細胞の純粹培養法. 日消誌 89: 2693-2699, 1992
- 31) 吉田一晴. 家兎胆嚢上皮の細胞極性発現とその異常: コラーゲンゲル内培養法を用いた形態学的検討. 十全医会誌 103: 408-424, 1994
- 32) 片柳和義. マウス胆道系上皮細胞の区分別培養法の確立. 十全医会誌 105: 54-70, 1996
- 33) 斎藤勝彦, 湊 宏, 河野尚子, 中沼安二, 石田文生, 小杉光世. ヒト肝内胆管癌の株化 (CCKS1) 樹立. 肝臓 34: 122-129, 1993
- 34) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- 35) Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN β_2) receptor. *Science* 241: 825-828, 1988
- 36) Kishimoto T, Akira S, Taga T. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int J Immunopharmacol* 14: 431-438, 1992
- 37) Shi SR, Key ME, Karla KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748, 1991
- 38) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715, 1984
- 39) Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138: 867-873, 1991
- 40) Gerdes J, Becker MHG, Key G, Cattoretto G. Immunohistochemical detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 168: 85-86, 1992
- 41) Schmitz GG, 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)
- 42) Bronstein I, Edwards B, Voyta JC. 1, 2-dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrates. applications to immunoassays. *J Biolumin Chemilumin* 4: 99-111, 1989
- 43) Nakanuma Y, Kono N. Expression of HLA-DR antigens on interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis and other hepatobiliary disease: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 22: 431-436, 1991
- 44) Shimizu M, Yuh K, Aoyama S, Ichihara I, Watanabe H, Shijo H, Okumura M. Immunohistochemical characterization of inflammatory infiltrates at the site of bile duct injury in primary biliary cirrhosis. *Liver* 6: 1-6, 1986
- 45) Nakanuma Y. Distribution of B lymphocytes in nonsuppurative cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatol* 18: 570-575, 1993
- 46) Wiesner RH. Current concepts in primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc* 69: 969-982, 1994
- 47) Dilly SA, Sloane JP. An immunohistochemical study of human hepatic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 62: 545-553, 1985
- 48) Nakanuma Y, Harada K. Florid duct lesion in primary biliary cirrhosis shows highly proliferative activities. *J Hepatol* 19: 216-221, 1993
- 49) 八十島満枝, 中沼安二. 門脈域のサイトカイン発現から類推される原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における Th1/Th2 バランス. *消化器と免疫* 32: 183-188, 1996
- 50) Nakanuma Y, Tsuneyama K, Gershwin ME, Yasoshima M. Pathology and immunopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on bile duct lesions: recent progress. *Semin Liver Dis* 15: 313-328, 1995
- 51) Terasaki S, Nakanuma Y, Yamazaki M, Unoura M. Eosinophilic infiltration of the liver in primary biliary cirrhosis; A morphologic study. *Hepatol* 17: 206-212, 1993
- 52) Nakajima K, Martinez Maza O, Hirano T, Breen EC, Nishanian PG, Salazar Gonzalez JF, Fahey JL, Kishimoto T. Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN- β_2) production by HIV. *J Immunol* 142: 531-536, 1989
- 53) Breen EC, Rezai AR, Nakajima K, Beall GN, Mitsuyasu RT, Hirano T, Kishimoto T, Martinez Maza O. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* 144: 480-484, 1990
- 54) Hageman G, Content J, Volckaert G, Derynck R, Tavernier J, Fiers W. Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-KDa protein in human fibroblasts. *Eur J Biochem* 159: 625-632, 1986
- 55) Malide D, Russo P, Bendayan M. Presence of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in renal mesangial cells of lupus nephritis patients. *Human Pathol* 26: 558-564
- 56) Joplin R. Isolation and culture of biliary epithelial cell. *Gut* 35: 875-878, 1994
- 57) Joplin R, Hisida T, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Ayres R, Neuberger JM, Strain AJ. Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate in vitro in response to human hepatocyte growth factor. *J Clin Invest* 90: 1284-1289, 1992
- 58) Joplin R, Hart LL, Neuberger JM, Strain AJ. Characterization of long-term human intrahepatic biliary epithelial cell cultures (abstract). *Fed Am Soc Exp Biol* 7: A496, 1993
- 59) Gandour-Edwards R, Kapadia SB, Janecka IP, Julio Martinez A, Barnes L. Biologic markers of invasive pituitary adenomas involving the sphenoid sinus. *Mod Pathol* 8: 160-164, 1995
- 60) Gandour-Edwards R. Immunolocalization of interleukin-6 (IL-6) in salivary tumors. *Otolaryngol Head Surg* 109: 338, 1993
- 61) Gandour-Edwards R, Kapadia SB, Gumerlock PH, Barnes L. Immunolocalization of interleukin-6 in salivary gland tumors. *Human Pathol* 26: 501-503, 1995
- 62) Lu C, Kerbel RS. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human

