

マウス胆道系上皮細胞の区分別培養法の確立

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/2297/9183

マウス胆道系上皮細胞の区分別培養法の確立

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)

片 柳 和 義

胆道系は、解剖学的に総胆管、総肝管、胆嚢、肝門部肝内大型胆管 (肝門部胆管)、末梢部肝内小型胆管 (末梢部胆管) に分類される。ヒトの胆道系疾患では、各々の胆道区分が特異的に障害されることが多い。例えば、原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) や臓器移植後の肝障害では、肝内の小型胆管が選択的に障害され、原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC) では総肝管、総胆管、肝門部胆管に主な病変がみられる。これら胆道系疾患の発生と進展には、各々の解剖学的区分における胆道上皮細胞の構造や機能や抗原性の違い等が深く関連していると思われる。今回、胆道系疾患の発生機序や病態を解明する基礎的研究として、Slc/ICR マウスを用いて胆道系の解剖学的区分別培養の確立を試みた。すなわち、コラーゲナーゼ灌流法により、肝を消化して胆管樹 (biliary tree) を作製し、また、胆嚢、総胆管を個別に採取した。そして、実体顕微鏡下で、肝内外の各々の胆管系の区分 (総胆管、胆嚢、肝門部胆管、末梢部胆管) を含む微小組織片を作製し、培養移植片 (explant) として用いた。これら培養移植片をコラーゲンゲル培地上に静置し、上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) を含むヌー・セラム (Nu-Serum) 培地を重層し、初代培養を行った。次にコラーゲンゲル培地上の培養移植片より増殖進展した上皮細胞シート (間葉系細胞を含まない部) を選択的に切り取り、別のコラーゲンゲル培地に移植し、継代培養を行った。なお、継代培養では胆道系上皮細胞のみの純粋培養を行った。3週間毎に継代を繰り返すことにより、胆嚢、肝門、総胆管由来の胆道系上皮細胞の培養は10代まで、末梢部肝内胆管の胆道上皮の培養は6代まで継代培養することが出来た。形態学上、いずれの培養細胞も低円柱状~立方状の形態を示し、ゲル培地上を一層性に増殖進展した。いずれも粘液染色 (ジアスターゼ処理後過ヨウ素酸シッフ染色およびアルシアン青 pH2.5 染色) では粘液産生がほとんど見られなかった。 γ -グルタミルトランスベプチダーゼ (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GTP) 染色では培養細胞は胞体がび漫性に陽性であった。免疫組織化学的に、初代および継代のいずれの培養上皮細胞もサイトケラチン (cytokeratin, CK) Z-622 および A-575 にび漫性に陽性であった。また、レクチンのドリコスマメレクチン (*Dolichos biflorus* agglutinin, DBA), ピーナッツレクチン (peanut agglutinin, PNA), ダイズマメレクチン (soybean agglutinin, SBA) を用い、レクチン結合性を検討したところ、いずれの培養細胞も部分的~び漫性に陽性所見 (結合性) を示した。透過電顕像ではいずれの培養細胞も内腔面に豊富な微絨毛を見、細胞間には接着装置や嵌合ヒダが認められ、生体内の胆道系上皮とほぼ同じ形態を示した。また、胆道系上皮細胞をコラーゲナーゼ処理とトリプシン処理で分離し、コラーゲンゲル培地内で3次元培養を行うと、培養2日目より、嚢胞を形成し、経過とともに内腔が拡張した。次にサイトカイン添加より、胆道培養上皮にどのような変化が見られるかを検討した。培地中にインターフェロン γ (interferon-gamma, IFN- γ) を添加すると、初代および継代培養の上皮細胞に主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex antigen, MHC) クラス I, II や細胞接着分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) の発現が誘導され、本培養系を用いることにより胆道上皮の免疫病理学的過程を精細に観察することが可能と考えられた。また、外科的に切除したヒト胆嚢の一部より、マウスの場合と同様に微小組織片を作製して、コラーゲンゲル培地上で初代培養および継代培養 (純粋培養) を行うことが出来た。また、培養液中にヒト IFN- γ を作用させることにより、MHC クラス II や ICAM-1 の誘導が培養ヒト胆嚢上皮細胞でも同様に認められた。

Key words biliary epithelial cell, biliary tree, culture on collagen gel, major histocompatibility complex, adhesion molecule

成人のヒト肝内外の胆管は、全長約 2km に及び、肝細胞で分泌された胆汁を十二指腸へと導く導管である¹⁾。胆管および胆嚢の内腔面は一層の立方~円柱上皮によって覆われており、胆道系上皮は水、電解質の分泌、吸収作用といった生理機能を持っており、胆汁の流れ、成分の調節に重要な役割を担い²⁾、

また、粘液、IgA、リゾチーム、ラクトフェリンなどを分泌することにより、胆道の局所免疫にも携わっている³⁾。

さて、胆道系は解剖学的に総胆管、胆嚢、肝内大型胆管、肝内小型胆管等に区分される⁴⁾。肝内外の胆道系はレベル (区分) に応じて形態、粘液産生能、糖鎖の発現に違いがあり、また、

平成7年12月12日受付, 平成7年12月28日受理

Abbreviations: AB, alcian blue; ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CK, cytokeratin; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine; DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; DMEM, Dulbecco's modification of Eagle's medium, EGF, epidermal growth factor; γ -GTP, γ -glutamyl transpeptidase; GVHD,

多くのヒト胆道系疾患では胆管のレベルに応じて障害の程度や病像が異なっている。胆道系上皮細胞のそれぞれの区分における構造、機能、抗原性の違いが、これら疾患の部位選択性の背景にあると考えられているが、解明されていない点、不明な点が多く残されている。

さて、胆道系の解剖学的区分に応じた構造や機能や病態を解明する上で、胆道系の各区分毎の胆道上皮細胞を分離、培養する系を用いたアプローチが有効と思われる。胆道系上皮細胞の培養は従来からいくつか報告されており、当教室の河村ら⁹⁾、吉田⁷⁾が、ウサギを用いて胆囊上皮細胞のコラーゲンゲル内の3次元培養法を開発し、疾患解明における応用性を報告している。また、肝内胆管上皮細胞の培養としては Sirica ら⁸⁾のラットの総胆管結紮により、肝内胆管上皮細胞を増殖させ、コラゲナーゼ灌流法と密度勾配遠心法により分離培養する方法、Kumar ら⁹⁾による無処置の正常ラットから胆管上皮細胞をコラゲナーゼ灌流法と密度勾配遠心法により分離培養する方法、Kumar らの方法にモノクローナル抗体(胆管上皮細胞に特異的)を用いる免疫吸着性分離法を組み合わせた Ishii ら¹⁰⁻¹²⁾の方法、Yang ら¹³⁾が報告した正常ラットからコラゲナーゼ灌流法とコラーゲンゲル内3次元培養を応用して採取する方法などがある。しかし、これまでに胆道系の解剖学的区分に応じて胆道上皮細胞を分離し、培養した報告はない。そこで今回、マウスの胆道系上皮細胞を、胆外胆道系として総胆管、胆囊毎に区分し、また肝内胆道系として肝門部肝内大型胆管(肝門部胆管)、末梢部肝内小型胆管(末梢部胆管)をそれぞれ区別別に培養することを試み、総胆管、胆囊、肝門部胆管の胆道上皮は10代まで、末梢部胆管の胆道上皮は6代まで継代して観察し、これらの細胞学的性状を検討したので報告する。

材料および方法

1. 初代培養

材料として30~35gの雄マウス(Slc/ICR, 日本SLC, 浜松)を使用した。エーテル麻酔下で開腹し、静脈留置針(24G, テルモ, 東京)を下大静脈に挿入して下大静脈を流入部、門脈を流出部とした流路を作製した(図1)。ペリスタポンプ(Masterflex, Chicago, USA)を用いて、カルシウム不含Hanks液を灌流し、脱血した。次に0.04%のコラゲナーゼ(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, St. Louis, USA)を含むpH7.4のHam F-12(Flow Laboratories, Irvine, Scotland)培養液(以下、コラゲナーゼ溶液)を10分間灌流し、肝実質を消化した。肝臓を摘出後、クシと歯ブラシで肝細胞を剝離除去し、胆管樹(biliary tree)を作製した。また、これとは別に総胆管と胆囊を摘出した。

次にカルシウム不含Hanks液中に胆管樹を浮遊させ、実体顕微鏡下(オリンパス, 東京)で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、肝門部胆管と末梢部胆管に区分して細切し、微小組織片を作製した。また、胆囊および総胆管も同様に実体顕微鏡下で、胆囊は2または3分割、総胆管は3または4分割して、それぞれ微小組織片を作製

した。

微小組織片を2.5 μ g/mlホルスコリン(forskolin)(和光純薬, 大阪), 25ng/mlマウス上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)(Upstate Biotechnology, New York, USA), 10 μ g/mlインスリン(insulin)(和光純薬), 100単位/mlベニシリンG(明治製菓, 東京), 100 μ g/mlストレプトマイシン(明治製菓)および10%ヌー・セラム(Nu-Serum)V(Becton Dickinson Labware, Bedford, 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 Laboratories)/HamF-12(Flow Laboratories)等量培養液(以下、ヌー・セラム培地)に浮遊させ、5%CO₂インキュベーター内で1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1日間浮遊培養した微小組織片(胆囊, 総胆管, 肝門部胆管, 末梢部胆管の4区分, 以下4区分)をピンセットを用いて、培養移植片としてコラーゲンゲル培地(ゲル培地)上に静置し、37℃でゲル化した後、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)で観察した。ただし、予備実験で、初代培養では4区分の培養移植片から、胆道系上皮細胞がいずれも増殖、進展するが、肝内胆道系(肝門部胆管, 末梢部胆管)の培養移植片では培養開始3~5日までは胆道系上皮細胞の増殖が間質系細胞より先行していても培養開始1週間~10日目で間質系細胞が上皮細胞の増殖先端部に追いつき、追い越す現象が見られることが少なくないという知見を得ていた。このため、本実験ではしばしば肝外胆道系を含め、初代培養開始5日~1週間目に位相差顕微鏡下で、培養移植片と間質系細胞の増殖が見られるコロ

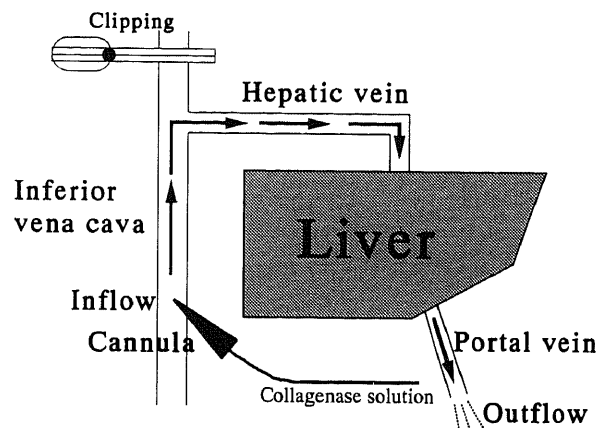


Fig. 1. The diagram showing the method of collagenase perfusion of a normal murine liver to prepare the biliary tree.

graft-versus-host disease; HGF hepatocyte growth factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IFN- γ , interferon gamma; LFA-1, lymphocyte-function associated antigen-1; MHC, major histocompatibility complex antigen; PAS, periodic acid Schiff; PBC, primary biliary cirrhosis; PBS, phosphate-buffered saline; PNA,

ニ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、胆道系上皮成分のみで、初代培養を続けた。

II. 継代培養

胆嚢、総胆管、肝門部胆管、末梢部胆管の各初代培養において、培養移植片より胆道系上皮細胞はゲル培地上を単層性に増殖進展した。増殖先端部では間質細胞の混入のない胆道系上皮細胞のみからなる領域が所々に認められた。この部位を位相差顕微鏡下で選択的にゲル培地ごと約径3mm大の楔型に切り取り、別のゲル培地に移植し、継代培養を行った。継代培養では10%ヌー・セラム (Nu-Serum) V の代わりに10%牛胎児血清 (Gibco, New York, USA) を含む血清培地を用いて3週間培養を行った。同様の操作を3週間毎に繰り返し、胆嚢、総胆管、肝門部胆管では10代まで、末梢部胆管は6代まで観察を続けた。

III. 3次元培養

継代培養を3週間行い、集密的(コンフルエント)状態に達した胆道系上皮細胞(4区分)をゲル培地ごとピンセットで培養皿から、剝離し、遠沈管(50ml, Corning)に入れ、1000単位/ml ディスパーゼ(合同酒精, 東京)を含むコラゲナーゼ溶液を注ぎ、密封して40分間インキュベーター内で震盪器(マイルドミキサー PR-12, タイテック, 埼玉)を用いて振盪し、ゲル培地を消化した。次にカルシウム不含 Hanks 液を遠沈管に添加し、遠心(800rpm, 5分間)し、上皮成分を沈殿させた。上澄み液を吸入後、さらに0.25%トリプシン(Sigma)と0.02%の EDTA(和光純薬)を含むカルシウム不含 Hanks 液(トリプシン溶液)を15分間作用させ、細胞を分散させた。血清培地を加えることによりトリプシンを不活性化させた後、再び遠心し、上皮成分を沈殿させた。上澄み液を吸引後、カルシウム不含 Hanks 液を添加して、拡散し、再度遠心し、沈殿させた。この沈渣物にゲル培地を加え、十分に混和後、細胞培養皿(径3.5cm)に3ml 注入し、37°Cで固化させた。この上に血清培地を重層して37°C, 5%CO₂インキュベーター内で3週間わたって培養し、位相差顕微鏡下で経時的に観察した。

IV. インターフェロン- γ (interferon-gamma, IFN- γ) 添加による主要組織適合抗原クラス I, クラス II および細胞接着分子の発現の検討

血清培地で3週間培養し、ほぼコンフルエントな状態に達した初代および継代培養細胞(4区分)において、血清培地中にマウス IFN- γ (Genzyme, Cambridge, USA) を添加(500単位/ml)し、3日間作用させた。標本作製および免疫染色は後述する。

V. 胆道系上皮細胞の形態学的検討

1. 光学的観察

〔培養細胞〕

初代培養では1週目と2週目、継代培養では3週目の胆道系上皮細胞(4区分)をゲル培地ごと10%緩衝ホルマリンで48時間固定した後、すだれ状にゲル培地をスライスし、パラフィン包埋後、薄切し、切片を作製した。また、3次元培養では培養3日目、1週目、2週目、3週目の4区分の胆道系上皮細胞をホルマリンで3日間固定した後、パラフィン包埋し、切片を作製した。

〔胆道系組織〕

30~35gの雄マウスをエーテル麻酔下で開腹後、下大静脈を切断し、失血死させて、肝臓、総胆管、胆嚢を直ちに摘出し、細切した後、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製した。

この切片を用い、HE染色、粘液や細胞表面の糖蛋白の有無を検索するためにジアスターゼ処理後ヨウ素シッフ(periodic acid Schiff, d-PAS)染色、アルシアン青(alcian blue, AB) pH2.5染色を行った。

2. γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GTP)の染色

γ -GTP染色をRutenbergら¹⁴⁾の方法に準じて行った。継代培養を3週間行い、コンフルエントな状態に達した4区分の胆道系上皮細胞をコラゲナーゼ処理とトリプシン処理により、可及的に単細胞化し、I型コラーゲン(新田ゼラチン)で塗布したLab-TEKチャンバースライド(2well)(Nunc, Naperville, USA)上に散布して、血清培地で、2週間培養した。次に80%エタノールを1時間作用させることにより固定し、 γ -グルタミル-4-メチオキシ-2-ナフチルアミド(γ -glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide)(Calbiochem, San Diego, USA) 2.5mg, pH7.4 Tris緩衝液5.0ml, 0.85% NaCl溶液14ml, グリシルグリシン(glycylglycine)(和光純薬)10mg, ファストブルーBBサルト(fast blue BB salt)(Sigma)10mgからなる染色液に37°Cで50分間作用させ、0.85% NaCl溶液で洗浄後、0.1M硫酸銅(和光純薬)溶液を2分間作用させ、生理食塩水、蒸留水で洗浄後、メチルグリーンで核染色し、封入した。 γ -GTPの陽性コントロールとして、マウス膵組織の凍結切片を使用した。

3. 5-ブromo-2'-デオキシウリジン(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)を用いたDNA合成期(S期)細胞の検出

チミジン(thymidine)類似体であるBrdUを用いて、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(avidin-biotin-peroxidase complex, ABC)法により、BrdUの免疫染色を行い、培養細胞のS期細胞の標識率を測定した。つまり、継代培養した胆道系上皮細胞をコラゲナーゼ処理とトリプシン処理により、I型コラーゲンを塗布したLab-TEKチャンバースライド上で3日間培養した。続いて培養液中に0.1mM BrdU(Extrasynthese, Genay, France)を添加し、37°Cで60分間作用させた後、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)(phosphate-buffered saline, PBS)で洗浄後、80%エタノールで固定した。続いて、PBSで洗浄後、2NのHCl溶液で30分間作用させた。0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ、PBSで洗浄した。その後、非特異反応阻止のため、正常山羊血清(フナコン, 東京, 10倍希釈)を作用させた。次に1次抗体としてラット抗BrdU抗体(Biosys, Compiègne, France, 250倍希釈)を室温で2時間反応させ、2次抗体としてビオチン化抗ラットIgG抗体(Vector Laboratories, Burlingame, USA)で30分反応させ、ABC法と0.005%過酸化水素加ジアミノベンチジン(3,3'-diaminobenzidine, DAB)(Sigma)処理によって発色させ、メチルグリーンで核染色を行い、封入し、検鏡した。標識率は核培養系とも1000個の培養細胞を観察し、陽性に染色され

peanut agglutinin; PSC, primary sclerosing cholangitis; SBA, soybean agglutinin; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1; VLA-4, very late antigen-4; 電顕, 電子顕微鏡; 肝門部胆管, 肝門部肝内大型胆管; 末梢部胆管, 末梢部肝内小型胆管

た細胞数を%で表した。

4. 免疫組織学的検討

初代と継代の培養細胞および胆道系組織のパラフィン包埋切片を用いて、免疫組織化学的にサイトケラチン (cytokeratin, CK) Z-622 (ウサギ抗ウシ (ワイド) ケラチン抗体, DAKO, Glostrup, Denmark, 300倍希釈) および CK A-575 (ウサギ抗ヒトケラチン抗体, DAKO, 300倍希釈) の発現を検討した。脱パラフィン切片を PBS で洗浄後、過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ、PBS で洗浄後、非特異反応阻止のため、正常山羊血清を作用させた。次に1次抗体の Z-622 および A-575 抗体を室温で2時間反応させ、2次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) で30分反応させ、ABC法とDAB処理によって発色させ、ヘマトキシリンまたはメチルグリーンで核染色を行い、封入後、検鏡した。

5. レクチン組織化学

初代と継代の培養栽培および胆道系組織のホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いて、レクチン結合性の検討を行った。使用したレクチンはドリコスマメレクチン (*Dolichos biflorus* agglutinin, DBA) (Vector Laboratories, 100倍希釈)、ピーナッツレクチン (peanut agglutinin, PNA) (Vector Laboratories, 50倍希釈)、ダイズマメレクチン (soybean agglutinin, SBA) (Vector Laboratories, 100倍希釈) の3種類である。いずれもビオチン化したものを用いた。脱パラフィン切片を PBS で洗浄後、過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ、PBS で洗浄後、適宜希釈したビオチン化レクチンを室温で2時間反応させ、ABC法とDAB処理で発色した。続いてヘマトキシリンで核染色を行い、封入し、検鏡した。

6. 電子顕微鏡 (電顕) 的観察

継代単層培養を3週間行った胆道系上皮細胞 (4区分) と3日間3次元培養を行った胆道系上皮細胞 (4区分) をゲル培地ごと細切して、4℃の2%グルタルアルデヒド (0.1M, カコジル酸緩衝液, pH7.4) で90分間固定し、同緩衝液で3回洗浄後、2%オスミウム酸で60分間固定し、型のごとく、エタノール系列で脱水し、エポン包埋し、超薄切片を作製した。続いて酢酸ウランとクエン酸鉛の2重染色を行い、透過電顕 (日立製作所, 東京) で観察を行った。

7. IFN- γ 添加による主要組織適合抗原クラス I, クラス II および接着分子の発現の検討

3日間 IFN- γ を作用させた4区分の初代および継代培養細胞をすだれ状にゲル培地ごと切開し、凍結用包埋剤 (O.C.T. Compound, Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, USA) に包埋し、液体窒素で急速に凍結させ、クリオスタット (マイルス・三共, 東京) で5 μ mの凍結切片を作製した。次に凍結切片をABC法により、主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス I (ラット抗マウスクラス I 抗体, ER-MP 42, BMA, Augst, Switzerland, 50倍希釈) と MHC クラス II (ラット抗マウスクラス II 抗体, ER-TR 3, BMA, 50倍希釈), 接着分子である細胞間接着分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) (ラット抗マウス ICAM-1 抗体, BSA-2, British Biotechnology, UK, 100倍希釈) と血管接着分子 1 (vascular adhesion molecule-1, VCAM-1) (ラット抗マウス VCAM-1 抗体, M/K-2, Southern Biotechnology, Birmingham-

m, USA, 25倍希釈) の発現の検討し、凍結切片を4℃4%パラホルムアルデヒド (半井化学, 京都) を含む PBS で10分固定後、洗浄し、過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ、PBS で洗浄した後、非特異反応阻止のため、正常山羊血清を作用させた。次に1次抗体を室温で2時間反応させ、2次抗体としてビオチン化山羊抗ラット IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland, USA, 100倍希釈) で30分反応させ、ABC法とDAB処理で発色させ、メチルグリーンまたはヘマトキシリンで核染色を行い、封入し、検鏡した。

さらに凍結切片を用いて、包埋前免疫反応法 (pre-embedding 法) による免疫電顕で抗原の局在性について検討した。各凍結切片をパラホルムアルデヒド溶液で固定後、過酸化水素加メタノールにより内因性ペルオキシダーゼを失活させ、正常山羊血清を作用させた後、各1次抗体を室温で2時間反応させた。続いて2次抗体としてペルオキシダーゼ標識の山羊抗ラット IgG 抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories, 100倍希釈) で30分間反応させ、DAB処理で発色させた。次に2%オスミウム酸で60分間固定し、型のごとく、エタノール系列で脱水し、エポン処理し、超薄切片を作製し、透過電顕で観察を行った。

また、マウスの肝臓 (末梢部胆管, 肝門部胆管), 総胆管, 胆嚢の凍結切片を利用して、同様に MHC クラス I, クラス II および ICAM-1, VCAM-1 の発現を検討した。

VI. ヒト胆嚢上皮細胞の培養

胆石症の診断で外科的に切除した胆嚢の一部を実体顕微鏡下で、出来るだけ漿膜下組織, 固有筋層, 粘膜下組織を切離した後、細切して、微小組織片を作製し、ゲル培地上で初代培養を2週間行った。続いて増殖先端部の胆嚢上皮細胞のみからなる部分を選択的に楔型に切り取り、別のゲル培地に移植し、2.5 μ g/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 μ g/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 (明治製菓, 東京), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製菓), 10%牛胎児血清 (Gibco) を含む DMEM (Flow Laboratories)/Ham F-12 (Flow Laboratories) 等量培養液を重層して継代培養を行った。継代培養した胆嚢上皮細胞をゲル培地ごとすだれ状にスライスし、パラフィン包埋後、薄切し、切片を作製した。

次に脱パラフィン切片を用いて、ABC法により、ヒト胆道系上皮細胞に特異的と報告されている中間径フィラメントの CK7, CK19 について検討した。1次抗体としてはマウス抗ヒト CK7 モノクローナル抗体 (OV-TL12/30, DAKO, 50倍希釈), マウス抗ヒト CK19 モノクローナル抗体 (BA17, DAKO, 50倍希釈) を、2次抗体として、ビオチン化ウマ抗マウス IgG (Vector Laboratories) を使用した。

継代培養した胆嚢上皮細胞にもヒトリーコンビナント IFN- γ (Sigma) を培地中に500単位/ml となるように添加し、3日間培養した。次にマウス胆道系上皮細胞と同じ手法で、凍結切片を作製し、ABC法により、主要組織適合抗原である MHC クラス II (マウス抗ヒト human leukocyte antigen-DR α , HLA-DR α 抗体, TAL-1B5, DAKO, 50倍希釈) と接着分子である ICAM-1 (マウス抗ヒト ICAM-1 抗体, BBIG-II, British Biotech, Abingdon, UK, 1000倍希釈), VCAM-1 (マウス抗ヒト VCAM-1 抗体, BBIG-V1, British Biotech, 1000倍希釈) の発現

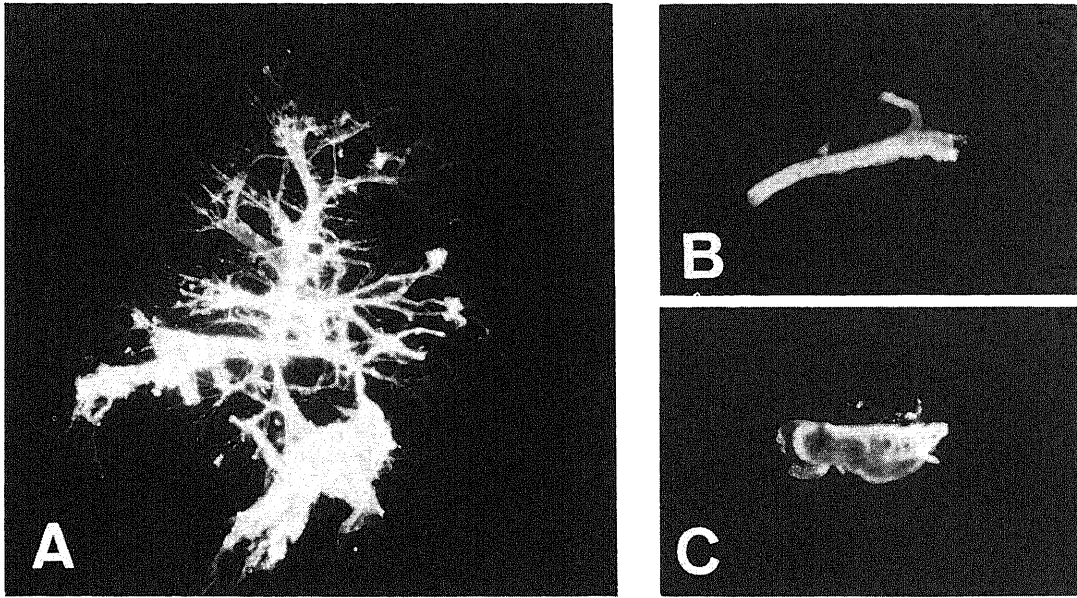


Fig. 2. Murine tissue specimens for explant of primary culture of biliary epithelial cells on collagen gel. (A) A biliary tree made by perfusing a normal liver by collagenase and removing liver parenchyma, (B) A common bile duct, (C) A gallbladder.

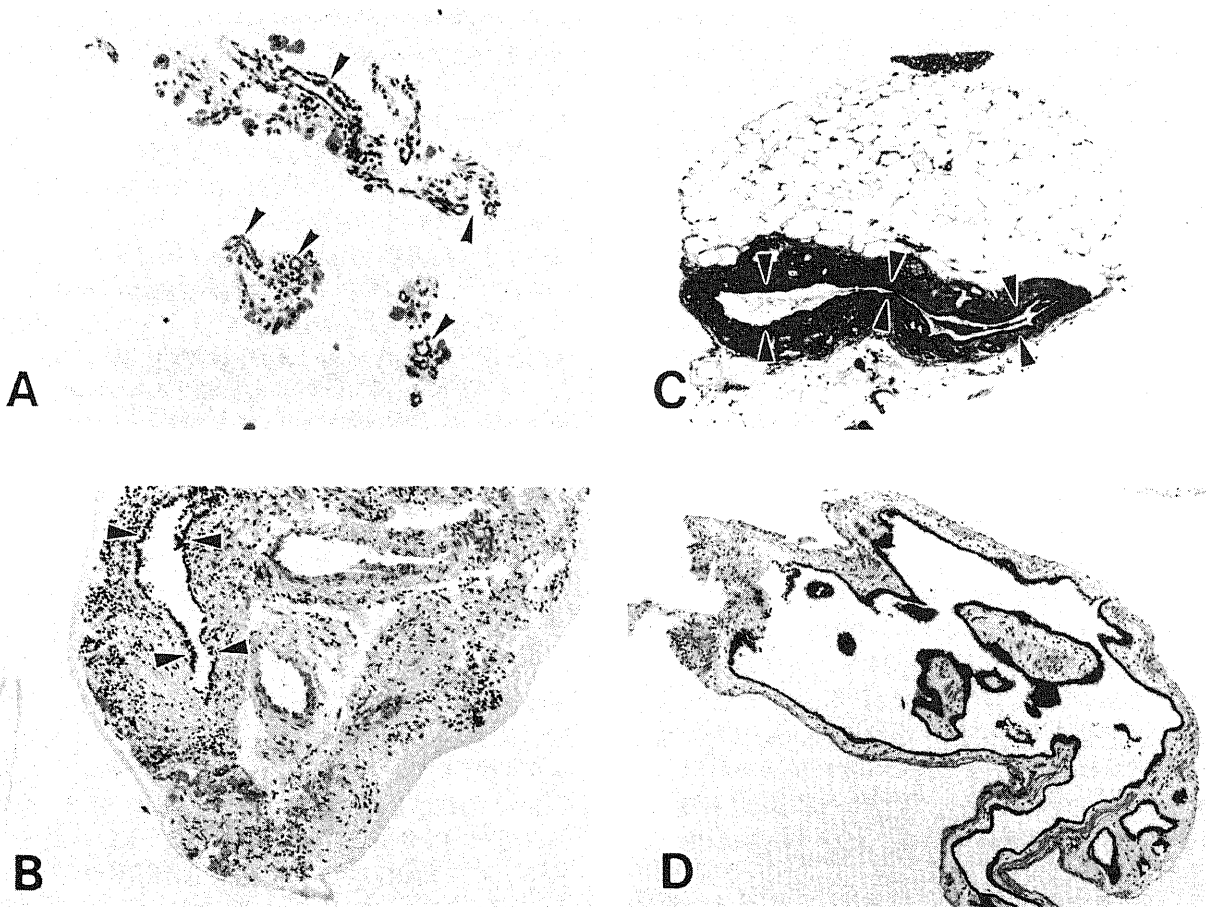


Fig. 3. Histologic findings of murine tissue specimens for explant of primary biliary epithelial culture on collagen gel culture. (A) Tissue specimens from peripheral region of biliary tree contain several intrahepatic small bile ducts (arrow heads). HE, $\times 200$. (B) A fragment of hilar region of biliary tree contains a large intrahepatic bile duct (arrow heads). HE, $\times 132$. (C) A tissue specimen of common bile duct (arrow heads) which is lined by a single layer of biliary epithelial cells. HE, $\times 100$. (D) A tissue specimen gallbladder which is lined by a single layer of biliary epithelial cells. HE, $\times 80$.

について検討した。

成 績

1. 初代培養

コラゲナーゼ灌流法より径約2×2cm大の微小な胆管樹を得ることが出来た(図2A)。実体顕微鏡下で胆管樹を肝被膜側の末梢部と肝門部に分け、微小組織片とした。各々別途採取した胆嚢および総胆管(図2B, C)を細切して同じく微小組織片を作製した。これらの一部をHE染色標本により観察し、いずれにも各々の解剖学的区分に準じた胆道系上皮を含んでいることを確認した(図3A, B, C, D)。これらの微小組織片を培養移植片とし、ゲル培地上に静置し、培養した(初代培養)。

初代培養開始後3日目より、ゲル培地上の培養移植片から、胆道系上皮細胞のシート状の増殖が観察された(図4)。なお、上皮細胞の増殖が見られない培養移植片では線維芽細胞や内皮細胞などの間質系細胞の増殖のみが認められた。また、いかなる細胞の増殖も観察されない培養移植片も見られた。4区分の培養移植片より、胆道系上皮成分の増殖を見たが、区分により、培養移植片から上皮が増殖進展してくる割合や速度が異なっていた(表1)。肝内胆道系(肝門部および末梢部)の胆道系上皮細胞の増殖進展する成功率は肝外胆道系(総胆管および胆嚢)に比べて低く、特に末梢部では増殖を開始した培養移植片は、培養を試みた培養移植片の7.5%であった。位相差顕微鏡による観察では増殖した胆道系上皮細胞は敷石状に配列し、次

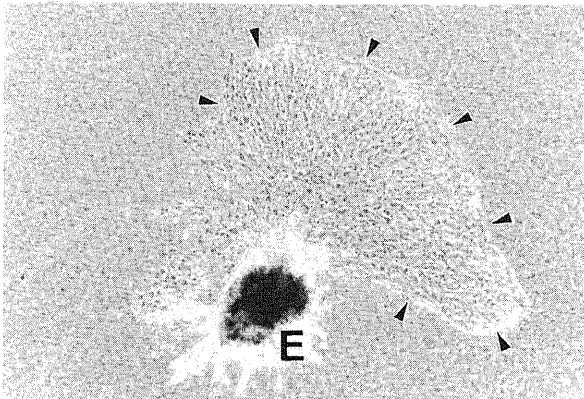


Fig. 4. The murine biliary epithelial cells (arrow heads) are actively spreading and forming an epithelial sheet on collagen gel from the explant (E). Primary culture of biliary epithelial cells of the peripheral bile ducts on collagen gel for 3 days. Phase contrast microscopy, ×60.

第にシート状にゲル培地上を増殖進展し、コロニーを形成した。位相差顕微鏡下での胆道系上皮細胞と間質系細胞の区別は容易であり、コロニーの増殖先端部では間質系細胞の混入のない領域が所々に認められた。

これらの標本をHE染色で観察すると胆道系上皮細胞はゲル培地上を一層性に増殖進展し、コロニーの中心部では円柱状～

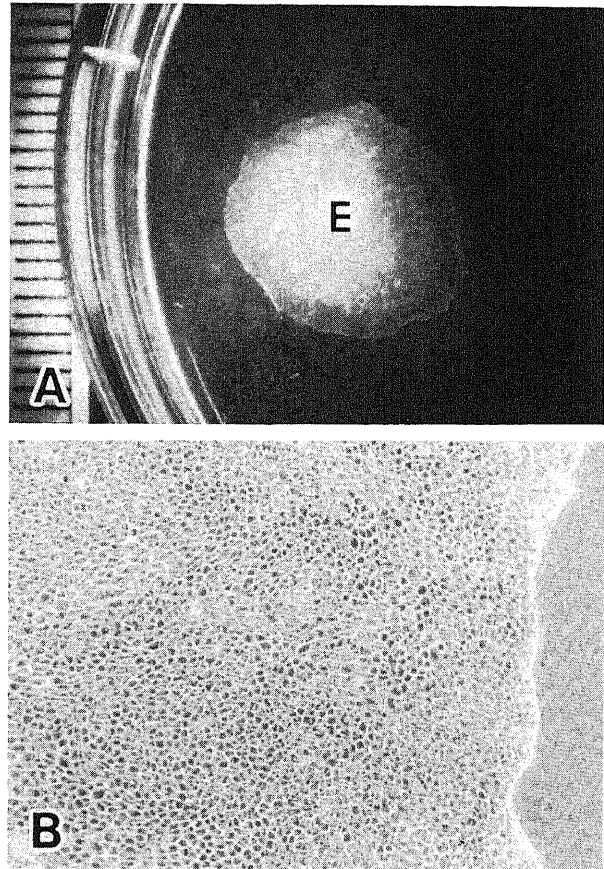


Fig. 6. Secondary culture of murine biliary epithelial cells obtained from primary culture, on collagen gel. (A) Biliary epithelial cells of hilar bile duct cultured for 2 weeks show a colony of biliary epithelial cells from explant (E). The diameter of colony (epithelial cell sheet) is about 2 cm. (B) Cultured biliary epithelial cells (6 passages) derived from the common bile duct forming epithelial cell sheet show cobble stone appearance. Phase contrast microscopy, ×150.

Table 1. Primary culture of murine biliary epithelial cells on collagen gel

Origin of murine biliary epithelial cells	Number of explants tried (A)	Number of explants showing epithelial cell growth on collagen gel (B)	Frequency of successful biliary epithelial cell culture (B/A, %)
Gallbladder	12	11	91.2
Common bile duct	16	12	75.0
Hilar bile duct	27	6	22.2
Peripheral bile duct	67	5	7.5

Explants were obtained from five mouse.

立方状の形態を示し、辺縁部では扁平な細胞形態を示した(図5A)。粘液染色(d-PAS, AB pH2.5)では、培養細胞は所々で内腔縁の刷子縁が陽性であったが、胞体内には粘液産生や貯留像はほとんど観察されなかった(図5B)。なお、ゲル培地上に静置

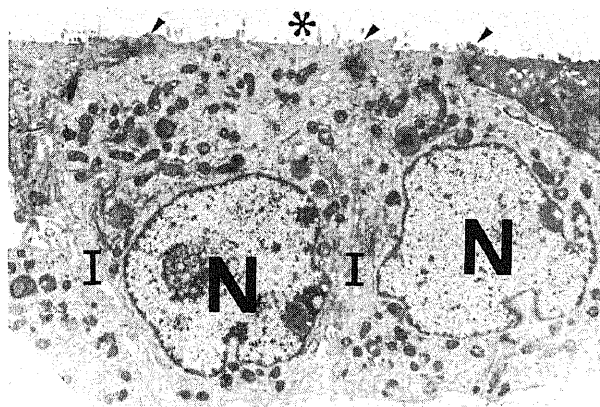
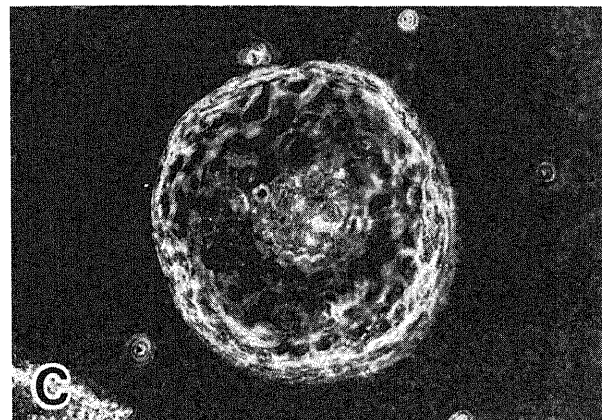
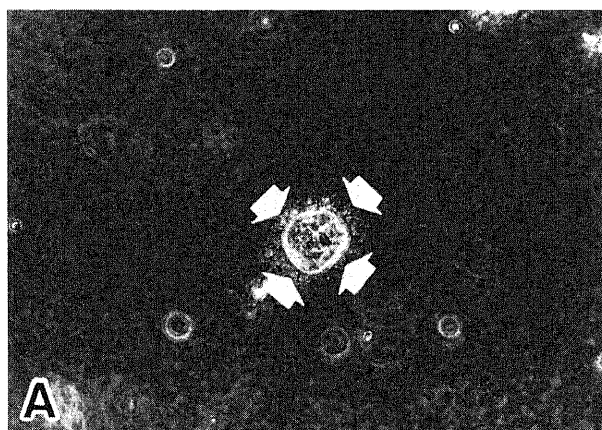


Fig. 7. Electron microscopic findings of murine biliary epithelial layer of peripheral small bile duct cultured on collagen gel for 3 weeks (3 passages). These biliary epithelial cells show many microvilli on the luminal surface (asteric), many mitochondria in their cytoplasm and basally situated nucleus (N). Arrowhead, junctional complex; I, intercellular digitation. $\times 4,000$.



した微小組織片直下および周囲のゲル培地内には線維芽細胞様、内皮細胞様の間質系細胞の浸潤、増殖が観察された。

II. 継代培養

初代培養で培養移植片より増殖した胆道系上皮細胞のシートで、上皮細胞のみからなる増殖先端部を選択的にハサミで切り取り、これを培養移植片として別のゲル培地上に移植した。その結果、形態学的に胆道系上皮細胞のみからなるシート状の増殖を示すコロニーが観察された。継代以後の培養では胆道系上皮細胞のみの純粋培養となった(図6A, B)。

4区分からの胆道系上皮培養細胞はそれぞれ、位相差顕微鏡やHE染色による観察では初代と同様であった。つまり、胆道系上皮細胞は一層性に増殖進展し、中心部では低円柱状～立方状、辺縁部では扁平な細胞形態を示した。粘液染色では継代培養細胞は初代と同様に所々内腔縁が陽性であったが、胞体内には粘液産生や貯留はほとんど見られなかった。ただし、ごく一部の上皮には細胞内に小腺腔(小嚢胞)を形成し、その内部に粘液が充満しており、粘液の産生が示唆された。

継代3週目の培養上皮を電顕的に観察すると、4区分のいずれの胆道系上皮においても極性の形成が明瞭で、培養液に面する管腔面、ゲル培地に面する基底面、それに培養上皮細胞間の側面を同定出来た。管腔面では微絨毛がよく発達しており、側面には閉鎖帯(tight junction)、接着斑(desmosome)等の接着装置(junctional complex)や嵌合ヒダ(interdigitation)を認めた(図7)。しかし、細胞内小器官は全体的に乏しく、生体内の胆

B

D

Fig. 8. A multicellular cyst is developed and growing within collagen gel after embedding peripheral small bile duct of mouse within collagen gel. (A) and (B) are cultured for 3 days, and (C) and (D) for 2 weeks, respectively. These cysts are covered by a single layer of biliary epithelia (B) and (D). Phase contrast microscopy, A, C, $\times 200$. HE, B, D, $\times 200$.

道系上皮細胞と類似した形態を示した。

Ⅲ. 胆道系上皮の3次元培養

継代3週目の培養胆道系上皮細胞をコラゲナーゼ処理とトリプシン処理により、可及的に単細胞化し、コラーゲンゲル培地内で3次元培養を行うと、培養2日目より、一層の胆道系上皮

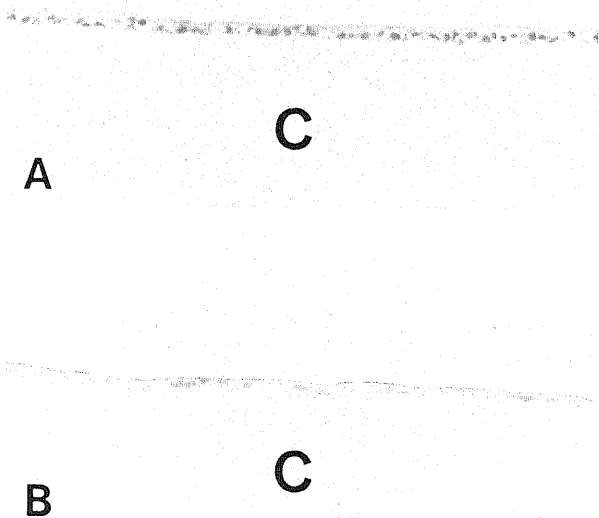


Fig. 5. Histologic findings of cultured murine biliary epithelial cells of hilar bile duct cultured on collagen gel for 2 weeks (primary culture). (A) The cultured epithelial layer is monolayer and the epithelial cells are cuboidal or columnar. C, collagen gel. HE, $\times 400$. (B) The luminal surface of the cultured biliary epithelial layer is positive for acid glycoprotein detected by alcian blue. C, collagen gel. Alcian blue pH 2.5 stain, $\times 400$.

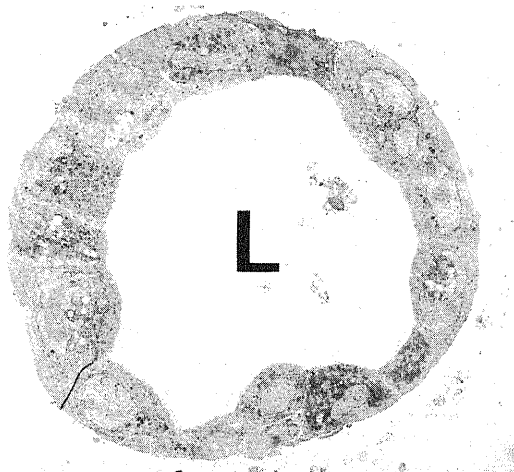


Fig. 9. Cyst wall of multicellular cyst from peripheral small bile duct of mouse cultured within collagen gel for 3 days, showing a single layer of biliary epithelial cells. Many microvilli at the luminal side and interdigitation are identifiable at the lateral side. L, lumen of cyst. Electron microscopy, $\times 1,200$.

細胞で覆われた嚢胞の形成を認め (図 8A, B), 経時的に嚢胞の内腔の拡張が観察された (図 8C, D). 4 区分のいずれの胆道系上皮細胞においても嚢胞形成像が認められた. 粘液産生は単層培養と同様であり, 散在性に観察される程度であった.

電顕的な観察では, 単層培養と同様に管腔面には微絨毛が密生し, 側面には接着装置, 嵌合ヒダが観察された (図 9).

Ⅳ. γ -GTP 染色による検討

Lab-TEK チャームスライド上で2週間培養した4区分の胆道系上皮細胞はいずれもび漫性に γ -GTP が陽性であった (図 10).

Ⅴ. BrdU を用いた S 期細胞の検出

Lab-TEK チャームスライド上で3日間培養した4区分の胆道系培養細胞の BrdU の標識率は胆嚢上皮が8.6%, 総胆管上皮が7.8%, 肝門部胆管上皮が9.2%, 末梢部胆管上皮が7.3%であった (図11).

Ⅵ. CK Z-622 および A-575 の免疫染色とレクチン (DBA, PNA, SBA) 染色の検討 (表 2)

免疫組織学上, CK Z-622 はマウス肝門部胆管, 末梢部胆管,

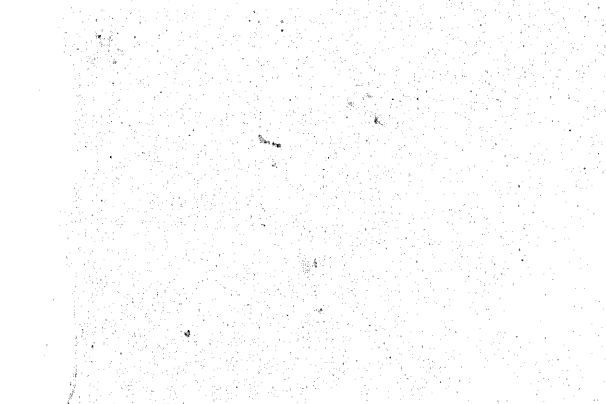


Fig. 10. Cultured biliary epithelial cells of peripheral small bile duct of mouse on Lab-TEK chamber slide are diffusely positive for γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP). Histochromy for γ -GTP, $\times 200$.

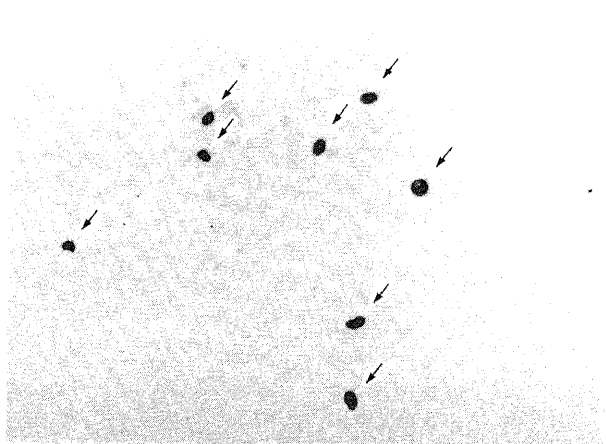


Fig. 11. Several nuclei (arrows) of cultured biliary epithelial cells (derived from hilar large bile duct of mouse) showing clear positive stains for 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Immunohistochemistry (ABC method) for BrdU, $\times 160$.

総胆管、胆嚢の各組織の上皮にび漫性の強陽性を示した。陽性細胞は細胞質がび漫性に染色された。一方、培養した4区分の胆道系上皮細胞においても初代から10代目(末梢部胆管は6代目)に至るまで、び漫性に陽性を示す部が多く、区分による違いは観察されなかった(図12A)。

CK A-575 はマウス肝門部胆管、総胆管、胆嚢の各組織の上皮にび漫性の強陽性を示したが、末梢部胆管では染色性は弱

く、部分的に染まるのみで、陰性の部も多く見られた。一方、培養細胞では初代から10代目(末梢部胆管は6代目)に至るまで、び漫性に陽性を示す部が多く、区分による違い、継代数による違いは観察されなかった。

レクチンのDBA, SBA はほぼ同様の染色(レクチン結合)パターンを示した。つまり、マウスの肝門部胆管、総胆管、胆嚢組織の各上皮では全ての細胞に陽性を示したが、末梢部胆管で

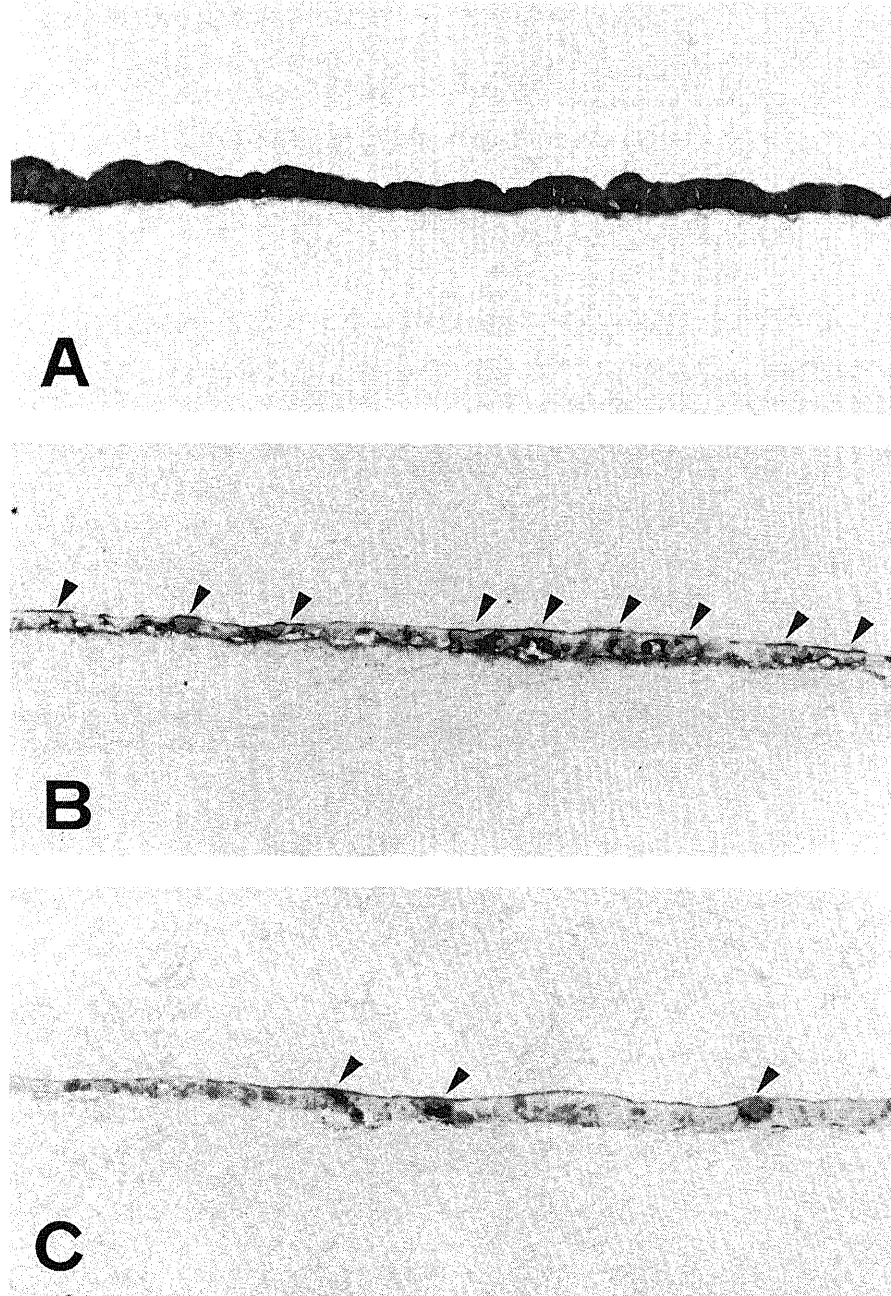


Fig. 12. Several phenotypes of murine biliary epithelial cells cultured on collagen gel. (A) Biliary epithelial cells of small bile duct cultured on collagen gel for 3 weeks are diffusely positive for cytokeratin recognized by Z-622. Immunohistochemistry (ABC method) for cytokeratin and hematoxylin, $\times 400$. (B) Biliary epithelial cells derived from hilar large bile duct cultured on collagen gel for 3 weeks show focal luminal staining (arrowheads) for *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA). Lectin immunohistochemistry for DBA and hematoxylin, $\times 400$. (C) Biliary epithelial cells of small bile duct cultured on collagen gel for 3 weeks show focal cytoplasmic staining of peanut agglutinin (PNA) (arrowheads). Lectin immunohistochemistry for PNA and hematoxylin, $\times 400$.

は染色性は弱く、部分的に染まるのみで、陰性の部が多かった。DBA, SBA は上皮細胞の管腔面の細胞膜と、細胞質が細顆粒状に陽性であった。一方、培養細胞では初代から10代目(末梢部胆管は6代目)に至るまで、部分的に陽性像が見られたが、解剖学的区分による染色性の差異は観察されなかった。しかし、全体的に継代培養細胞と比較して初代培養細胞の染色性はやや弱かった(図 12B)。

レクチンの PNA はマウス末梢部胆管組織では全ての上皮細胞に陽性像を示したが、肝門部組織では散在性に胆管細胞が陽性となるのみで、陰性の部も多く見られた。総胆管および胆嚢組織の各上皮は部分的〜び漫性に陽性像を見た。陽性細胞は DBA, SBA と同様に管腔面の細胞膜と、細胞質が細顆粒状に陽性であった。一方、培養細胞では初代から10代目(末梢部胆管は6代目)に至るまで、部分的に陽性を示すものが多く、解剖学的区分による染色性の差異は観察されなかった。また、DBA, SBA と同様に継代培養細胞と比較して初代培養細胞は

PNA 染色性がやや弱かった(図 12C)。

Ⅶ. IFN- γ 添加時の MHC クラス I, クラス II および ICAM-1, VCAM-1 の発現(表 3)

培地中に IFN- γ 添加後3日目では、MHC クラス I, クラス II および ICAM-1 が4区分のいずれの初代培養細胞および継代培養細胞においても細胞の輪郭を縁取るように膜状の発現が見られた(図 13A, B, C)。しかし、VCAM-1 の発現は見られなかった。免疫電顕による観察では MHC クラス I, クラス II および ICAM-1 の発現は細胞膜に認められ、特に側面および底面に強い発現が見られた(図 14)。また、IFN- γ 添加が行われていない対象群ではいかなる胆道系上皮細胞においても MHC クラス I, クラス II および ICAM-1, VCAM-1 の発現は観察されなかった。

マウス肝臓、胆嚢、総胆管の各組織の凍結切片を用いて同様に MHC クラス I, クラス II および ICAM-1, VCAM-1 の発現を検討したが、いずれにも明らかな発現は認められなかった。

Table 2. Expression of cytokeratins and lectins binding of murine biliary epithelial cells

Origin of murine biliary epithelial cells		Cytokeratin expression		Lectin binding		
		Z-622	A-575	DBA	SBA	PNA
Gallbladder	in vivo	++	++	+	+	+
	in vitro*	++	++	+	+	+
Common bile duct	in vivo	++	++	+	+	+
	in vitro*	++	++	+	+	+
Hilar bile duct	in vivo	++	++	+	+	-/+
	in vitro*	++	++	+	+	+
Peripheral bile duct	in vivo	++	-/+	-/+	-/+	++
	in vitro §	++	++	+	+	+

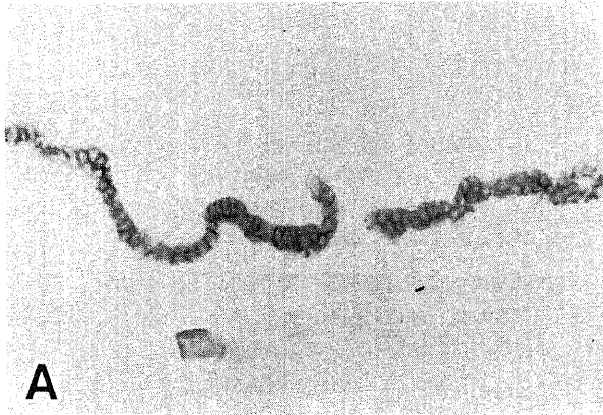
DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; SBA, soybean agglutinin; PNA, peanut agglutinin.

*, primary and 2~10 passaged culture of murine biliary epithelial cells; §, primary and 2~6 passaged culture of biliary epithelial cells; ++, diffusely and strongly positive; +, focally and weakly positive; -, negative.

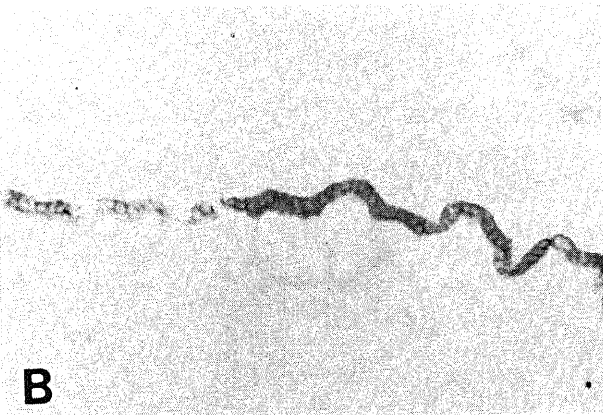
Table 3. Expression of MHC class I and class II antigens and adhesion molecules on cultured murine biliary epithelial cells with and without IFN- γ pretreatment

Origin of murine biliary epithelial cells		IFN- γ pretreatment	MHC antigens		Adhesion molecules	
			Class I	Class II	ICAM-1	VCAM-1
Gallbladder	in vivo	-	-	-	-	-
	in vitro*	+	+/++	+/++	+/++	-
Common bile duct	in vivo	-	-	-	-	-
	in vitro*	+	+/++	+/++	+/++	-
Hilar bile duct	in vivo	-	-	-	-	-
	in vitro*	+	+/++	+/++	+/++	-
Peripheral bile duct	in vivo	-	-	-	-	-
	in vitro*	+	+/++	+/++	+/++	-

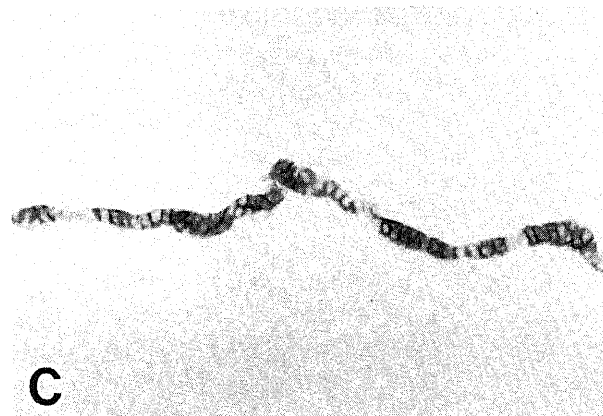
MHC, major histocompatibility complex antigen; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1; IFN- γ , interferon gamma; *, primary and passage culture of murine biliary epithelial cells. ++, strongly positive; +, weakly positive; -, negative.



A



B



C

Fig.13. Expression of major histocompatibility complex antigen (MHC) class I, class II and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on cultured biliary epithelial cells derived from peripheral small bile duct of mouse on collagen gel for 3 weeks after treatment for 3 days with 500 unit/ml mouse IFN- γ . (A) These cells show membranous expression of MHC class I. Immunohistochemistry (ABC method) for MHC class I and methylgreen, $\times 264$. (B) These cells show membranous expression of MHC class II. Immunohistochemistry (ABC method) for MHC class II and methylgreen, $\times 264$. (C) These cells show membranous expression of ICAM-1. Immunohistochemistry (ABC method) for ICAM-1 and methylgreen, $\times 264$.

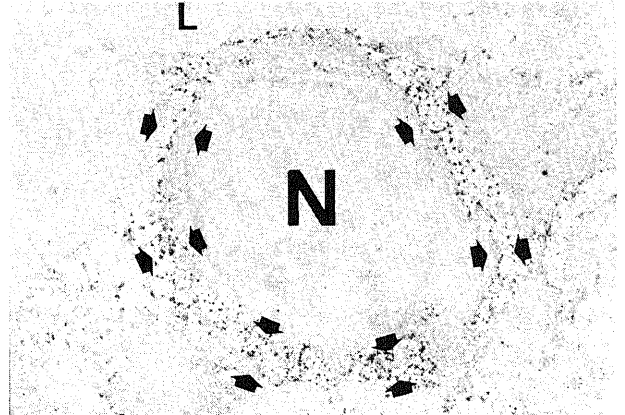
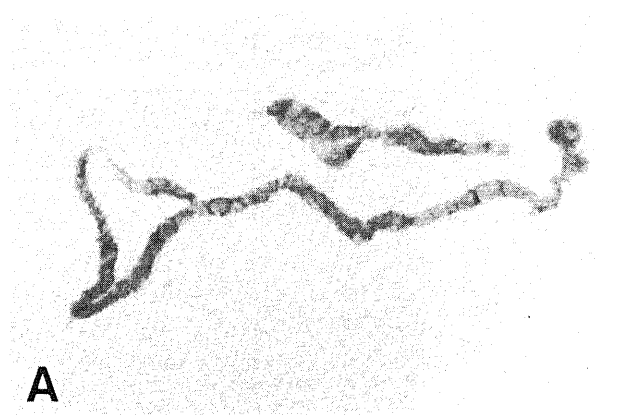
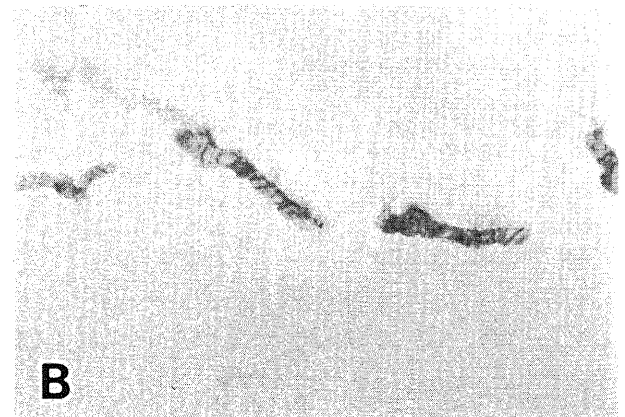


Fig.14. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expressed mainly on basolateral cell membrane of biliary epithelial cells of peripheral small bile duct of mouse cultured on collagen gel for 3 weeks after treatment with 500 unit/ml mouse IFN- γ for 3 days. N, nucleus; L, culture fluid. Immuno-electron microscopic study of ICAM-1, $\times 5,300$.



A



B

Fig.15. Expression of human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human gallbladder epithelial cells on collagen gel (3 passages) for 3 weeks after treatment 500 unit/ml human IFN- γ for 3 days. (A) These cells show membranous expression of human leukocyte antigen-DR (HLA-DR). Immunohistochemistry for HLA-DR and hematoxylin, $\times 320$. (B) These cells show membranous expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Immunohistochemistry for ICAM-1 and hematoxylin, $\times 264$.

Ⅷ. ヒト胆嚢上皮細胞の培養

ヒトの胆嚢の微小組織片を培養移植片として用い、ゲル培地で培養した場合、培養2日目より、ゲル培地上に静置した培養移植片から胆嚢上皮細胞のシート状の増殖を示すコロニーが観察され、増殖先端部では形態学上、間質細胞の混入のない領域が認められた。この部分を位相差顕微鏡下でゲル培地ごとハサミで選択的に切り取り、別のゲル培地に培養移植片として移植すると、形態学的には上皮細胞の増殖のみからなる継代純粋培養となった。ただし、2代目の胆嚢培養細胞は所々でゲル培地より、自然に剝離脱落する傾向が見られ、3代目ではこの傾向が強まり、かろうじてコロニーの形成が観察された。しかし、4代目ではコロニーの形成は見られず、胆嚢上皮細胞の培養は3代目まで可能であった。

免疫組織化学上、継代培養した胆嚢上皮細胞はCK7 およびCK19 がび漫性に陽性であった。

また、IFN- γ を作用させた胆嚢上皮培養細胞では膜状にHLA-DR およびICAM-1 の発現が観察された(図15A, B)。ただし、VCAM-1 の発現はマウスの場合と同様、IFN- γ によって誘導されなかった。IFN- γ 無添加群はHLA-DR, ICAM-1 の発現は見られなかった。

考 察

胆道系は肝細胞から分泌された胆汁を十二指腸に運ぶ導管であり¹⁰⁾、ヒトの場合では解剖学的に肝内小型胆管(細胆管, 小葉間胆管, 隔壁胆管), 肝内大型胆管(区域胆管, 領域胆管, 肝管), 総肝管, 総胆管, および胆嚢に区分される²⁴⁾。胆道系はレベル(解剖学的区分)に応じて形態, 粘液産生, 糖鎖発現に違いがあり, それぞれの生理機能にも違いがあると考えられている²⁴⁾。さらに多くのヒト胆道系疾患では選択的に障害される胆道系のレベルが異なっている²⁴⁾。したがって, 解剖学的区分に応じた胆道系上皮の機能や構造, 病態を解明するうえで, 胆道系の区分別の培養系は有用であり, また是非とも必要である。今回, 正常マウスを用いてコラゲナーゼ灌流法と培養移植片(explant)法により胆道系上皮細胞を末梢部胆管, 肝門部胆管, 総胆管, 胆嚢の4区分別に, 分離培養することに成功した。

さて, 培養移植片法によるマウス胆道系上皮細胞の純粋培養法は斎藤ら¹⁵⁾が胆嚢を用いて初めて報告している。その原理は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法である。すなわち, 生体より分離した微小組織片(explant)(上皮細胞成分と間質細胞成分が含まれる)をゲル培地上に静置し, 初代培養を行うと, 時間の経過とともに上皮細胞および間質細胞は増殖進展する。培養の早期では上皮細胞の増殖進展速度は間質細胞よりも速いためにゲル培地上の上皮細胞の増殖先端部では間質細胞の混入のない部位が出現する。そこで, この部分を選択的にハサミで切り取り, 継代移植することにより, 胆道系上皮細胞の純粋培養が可能となる。

今回, この培養移植片法を用いて胆嚢上皮細胞のみならず, 末梢部胆管, 肝門部胆管, 総胆管の各区分の上皮細胞の分離培養に成功した。位相差顕微鏡下で上皮細胞成分と間質細胞成分の識別は容易で, 上皮細胞は類円形~多角形の形をした細胞が敷石状に密に配列し, 増殖先端部は境界明瞭であった。これに対し, 線維芽細胞や内皮細胞等の間質細胞は紡錘形を示し, 放射状に散在し, 境界は不整であった。今回の培養実験で2代目以降は形態学上, 上皮細胞成分のみの純粋培養となった。しか

し, たとえ2代目の培養成分に間質細胞が混入していたとしても, 3代目以降も初代と同様にコロニーの増殖先端部から, 間質細胞のない部位を培養移植片として作製し, 用いることにより, 培養の回を重ねる毎に上皮細胞としての培養は純化され, 上皮細胞の成分のみになると考えられる。

今回, 実験動物としてマウスを使用した。動物実験系に頼られるラットに比べ, マウスを利用した理由は, 第一にマウス胆道系には胆嚢という器官があるが, ラットには胆嚢がなく, 胆嚢上皮細胞の培養はラットでは不可能である。第二にラットとマウスを比較した場合, 生体内では胆管(総胆管や肝内大型胆管)周囲の間質結合組織に関してマウスの方が胆管が細い分だけ少ない。それ故に初代培養における胆道系上皮細胞と間質細胞との増殖の競争では胆道系上皮細胞の方が有利になり, 培養移植片法はラットよりもマウスで行う方が有効な培養法と考えたからである。第三にラットの肝内胆管上皮細胞の分離培養法は少数ながら報告されている^{8)~13)}のに対して, マウスでの報告は今回が初めてである。また, ラットに比べてマウスはインターロイキン等の各種サイトカインや増殖因子が市販されており, 入手しやすく, これらを使った実験系を容易に立案することが可能である。以上の理由により, 今回, マウスを実験動物として用いた。

本実験では, 4区分の胆道系微小組織片をゲル培地上で培養を行い, 肝門部胆管, 胆嚢, 総胆管の各由来の培養細胞は10代目まで, 末梢部胆管由来の上皮は6代目まで継代培養を行った。初代培養ではいずれのレベルにおいてもゲル培地上に静置した培養移植片より, 胆道系上皮細胞の増殖, 進展が見られた。肝外胆道系(胆嚢, 総胆管)上皮細胞に比較して肝内胆管(肝門部胆管, 末梢部胆管)上皮細胞の進展してくる率が低く, 特に末梢部胆管では, 培養を試みた培養移植片の7.5%で上皮の増殖が見られたのみであり, 非常に低かった。この理由として, 今回行った肝内胆道系の初代培養で肝実質の消化, 除去のために酵素処理とクンによる機械的剝離により, 胆管上皮細胞の一部が障害を受け, 組織より脱落したり, また, 増殖能を喪失する可能性が理由としてあげられる。特に末梢部では胆管を取り巻く門脈域結合組織が乏しく, これらの障害をより被りやすいと考えられる。また, 一般的に培養細胞の増殖にはある程度の細胞数が必要とされており, 自己が産生する増殖因子の濃度や, 接触による細胞間コミュニケーションの影響が細胞の増殖能力に関与しているとされている¹⁶⁾。この点に関しても末梢部胆管は上皮細胞の絶対数が低く, 増殖に不利であったと思われる。なお, 初代培養では血清培地を用いず, ヌー・セラム培地(低血清培地)を使用した。血清培地は線維芽細胞の増殖を高度に促進する¹³⁾ので, 線維芽細胞の増殖抑制のために初代培養でヌー・セラム培地を用いた。ヌー・セラムは低濃度の牛胎児血清を含むが, 血清代替物として一般に広く使用されている。2代目以降は形態学的に胆道系上皮細胞のみの培養となったので, 血清培地を使用した。

形態学上, 初代および継代培養で胆道系上皮細胞はゲル培地上を, ゲル面を基底側, 培養液に接する面を内腔側という極性を保ちながら, 単層性に増殖進展した。顕微鏡的には内腔側には豊富な微絨毛が, 細胞間には接着装置や嵌合ヒダが観察され, 生体内の胆道系上皮細胞と同様の形態を示した。また, 継代培養細胞で胆道系上皮細胞の確認, 同定のために γ -GTP染色を行ったが, び漫性の陽性所見が得られ, 培養細胞は胆道系上皮

細胞由来であることが酵素学的にも示された。

CK は中間フィラメントの主要成分であり、主として種々の上皮細胞の胞体内での細胞骨格形成に関与している¹⁷⁾。現在、分子量 (40~70kDa)、等電点 (酸性、塩基性) により19種に分類され¹⁷⁾、上皮組織毎に特徴的な CK を含む^{18)~20)}。免疫染色で、CK Z-622 は生体内および培養系での胆嚢、総胆管、肝門部胆管、末梢部胆管の各上皮細胞でび漫性に強陽性を示した。CK Z-622 は広範囲の分子量 (48, 51, 52, 56, 58, 60kDa) の CK を認識するポリクローナル抗体で、マウス胆道系上皮細胞のマーカーになると報告されている^{22,23)}。Z-622 の染色結果は各培養成分が胆道系由来であることを示している。また、CK A-575 は生体内では胆嚢、総胆管、肝門部大型胆管の各上皮細胞ではび漫性に強陽性を示したのに対し、肝内末梢部の小型胆管では部分的に陽性所見を認めるのみであった。CK A-575 は培養系 (初代および継代培養) では各胆道系上皮細胞のいずれにもび漫性に強陽性を示し、解剖学的区分による違い、あるいは継代数による違いは認められなかった。CK A-575 は分子量 (56, 64kDa) の CK を認識するポリクローナル抗体である。生体内の肝末梢部胆管上皮細胞ではこの分子量 (56, 64kDa) に相当する CK が本来乏しく、培養系で発現が増強した可能性がある。

Shiojiri ら^{21,22)} は胎児マウスの肝臓の器官培養を用いて胆管の発生について検討し、レクチンの DBA, PNA, SBA の結合性が胆管上皮細胞の指標になると述べている。また、Takahashi ら²³⁾ は9種類のレクチン (タチナタマレクチン (concanavalin A), レンズマメレクチン (*Lens culinaris* agglutinin), コムギハイガレクチン (wheat germ agglutinin), DBA, SBA, アカインゲンマメレクチン-E (*Phaseolus vulgaris* erythro-agglutinin), PNA, ヒマレクチン-I (*Ricinus communis* agglutinin-I), ハリエニンダレクチン-I (*Ulex europaeus* agglutinin-I)) をマウス胆管上皮細胞で検討した結果、DBA, PNA, SBA が、マウス胆道系上皮細胞に特異的に結合するレクチンであることを報告している。今回3種類のレクチン (DBA, PNA, SBA) を用いて、生体内と培養系の胆道系上皮細胞についてこれらのレクチン結合性を検討した。生体内の胆道系上皮細胞においては DBA, SBA はほぼ同様の染色 (結合) パターンを示し、肝門部胆管、総胆管、胆嚢の各胆道上皮ではび漫性に強陽性を示した。しかし、末梢部胆管では染色性は弱く、部分的に染まるのみで、むしろ陰性の部が多く見られた。PNA は末梢部胆管ではび漫性に陽性像を示したが、肝門部胆管では散在性に陽性の細胞を見るのみで、陰性の部も多かった。また、総胆管および胆嚢の上皮は部分的〜び漫性の陽性像を示した。DBA, SBA, PNA の陽性細胞はいずれも管腔側の細胞膜と、細胞質が細顆粒状に陽性であった。一方、培養細胞では初代から10代目 (末梢部胆管は6代目) に至るまで、散在性または一部び漫性に陽性を示すものが多く、解剖学的区分による染色性の違いは観察されなかった。一般に、生体内の細胞を分離して、培養系に移行すると、初代培養、続いて継代培養と経時的に細胞形質が変化し、その細胞が本来生体内で有している特異的な機能、分化の一部が消失してしまうことが知られている²⁴⁾。その機能、分化の消失までの期間は数日、数週の単位の場合も多く、本例のレクチン染色の結果も、培養系の移行により、細胞の糖鎖 (糖蛋白) の発現の特異性が変化、消失したことを反映していると思われる。

4 区分の各培養胆道系上皮細胞はコラーゲンゲル培地内で培

養すると、いずれにおいても多細胞からなる囊胞を形成し、経時的に囊胞の拡大が観察された。コラーゲンは生体組織を構築、支持している細胞外マトリックスの主要構成成分のひとつで、その量は生体の全蛋白質の約3分の1を占め、現在、コラーゲンの分子種としては19種類以上知られている²⁵⁾。機能としては組織構築以外に、支持する細胞の機能発現の制御にも関与していると考えられており、コラーゲンを培養基質に用いることにより、培養細胞の形態形成、機能分化を促進するとされている。また、コラーゲンゲル培地内で培養を行うと、3次元的な形態形成、組織構築を示すことが知られており、乳腺上皮細胞^{26)~28)} や甲状腺濾胞細胞^{29,30)} を用いた報告が知られている。私共の教室でもウサギ胆嚢より胆嚢上皮細胞を分離し、コラーゲンゲル培地内で3次元培養を行うと2~3日後に多細胞性囊胞の形成が観察され、経時的に囊胞の拡大が観察されたことを報告している^{31)~32)}。また、さらに Johnson ら³³⁾ は肝内胆管上皮細胞をコラーゲンゲル培地内で3次元培養し、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) を添加すると、樹枝状の管腔が形成されることを報告している。

さて、原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) や原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC)、肝移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) では胆管上皮が標的細胞として生体の免疫系より、障害を受け破壊される^{32)~34)}。この免疫性胆管障害には CD8 (+) の細胞障害性 T 細胞による障害が主体をなし^{35,36)}、障害胆管には ICAM-1 と MHC クラス II (HLA-DP, -DQ, -DR) が異所性に発現することが知られている^{32,33,37)}。この異所性の発現は胆管周囲に浸潤したリンパ球より放出されるサイトカイン、特に IFN- γ により惹起されると考えられている^{33,38)}。この生体内の局所免疫反応を今回、培養系で再現した。すなわち、IFN- γ をマウス胆道系上皮およびヒト胆嚢上皮の培養細胞に作用させることにより、MHC クラス II と ICAM-1 の発現が観察された。また、正常肝において、ヒト胆道系上皮細胞はわずかではあるが、常時 MHC クラス I を発現しており^{34,37,39,40)}、PBC, PSC, GVHD 等の胆道系疾患ではクラス I の発現が増強すると報告されている^{34,39,41,42)}。しかし、今回の実験では生体内 (in vivo) の胆道系上皮や IFN- γ 無添加時の培養細胞では MHC クラス I の発現は認められず、IFN- γ 作用時のみにクラス I の発現が観察された。今回、生体内 (in vivo) の胆道系上皮や無処理の培養細胞でクラス I の発現が認められなかった理由としては、MHC クラス I の発現が微弱なため、使用した抗体で検出出来なかったためかもしれない。

MHC クラス I およびクラス II の発現は T 細胞の抗原認識には必要不可欠である。T 細胞は T 細胞レセプター (CD3 複合体) を介して、抗原提示細胞または標的細胞上の MHC クラス I または MHC クラス II と結合した抗原を認識する^{43,44)}。続いて抗原を認識した T 細胞は活性化され、増殖し、標的細胞を破壊する。この一連の免疫反応には ICAM-1 等の接着分子を介した抗原提示細胞または標的細胞と T リンパ球との直接的な結合が必要不可欠であるとされている⁴⁴⁾。

PBC の障害胆管では接着分子として ICAM-1 以外に VCAM-1 も発現していることが報告されている⁴⁵⁾。ICAM-1 および VCAM-1 はともに免疫グロブリン様ドメイン構造をもち、接着分子では免疫グロブリンファミリーに属する⁴⁶⁾。ICAM-1 に対応するリンパ球上のレセプターはリンパ球機能関

連抗原 1 (lymphocyte-function associated antigen-1, LFA-1) で、また、VCAM-1 に対応するレセプターは超後期抗原 4 (very late antigen-4, VLA-4) である^{45,46}。PBC の障害胆管周囲には LFA-1 または VLA-4 が陽性の T 細胞が観察され⁴⁵、T 細胞と標的細胞 (胆管上皮) との免疫応答には ICAM-1 と LFA-1 の結合および VCAM-1 と VLA-4 の結合が重要な役割を担っていると考えられる。今回、IFN- γ を作用しても VCAM-1 の発現は誘導されなかったが、障害胆管での VCAM-1 の発現の誘導には別の機序、たとえば IFN- γ 以外の別のサイトカインが関与しているのかもしれない。また、Osborn ら⁴⁷はヒト臍由来の培養血管内皮細胞を用いて、インターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) や腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) で VCAM-1 の発現が誘導されることを報告している。これらの免疫系での細胞と細胞、また、細胞とサイトカインなどの液性物質との関連性は、今回報告した培養系により、より詳しく、また、簡単に検索出来るものと思われる。

最後にヒトの胆嚢粘膜も同様に、単離し、純粋継代培養することが出来、さらに種々のサイトカインを添加し、マウスでの結果に類似した成績を得ることが出来た。このことは、ヒトの胆道系での区別培養が可能であり、さらにヒトの肝内胆管系を特異的に障害する PBC や PSC などの疾患の免疫現象を、培養系で検討できることを示唆している。

結 論

1. Slc/ICR マウスを用いて、胆嚢、総胆管、肝門部胆管、末梢部胆管の解剖学的区分からの胆道系上皮細胞の長期 (初代、継代) 培養を行うことに成功した。

2. 胆道系上皮細胞の初代培養をコラーゲンゲル培地上で行い、間葉系細胞の混入のない上皮成分からなる部分を切り取り、継代することにより胆道系上皮細胞の純粋培養に成功した。また、3週間毎に継代し、胆嚢、総胆管、肝門部胆管は10代目まで、末梢部胆管は6代目まで観察し得た。

3. 形態学上、初代、継代、また、いずれのレベルの胆道系上皮の培養細胞もコラーゲンゲル上を単層性に敷石状に増殖進展し、コロニーの中心部では立方状〜円柱状の形態を示し、辺縁部では扁平な形態を示した。粘液の産生はほとんど見られなかった。各胆道系培養細胞は γ -GTP 染色がび漫性に陽性であった。電顕による観察では管腔側には微絨毛が密生し、細胞間には接着装置や嵌合ヒダが見られ、生体内の胆道系上皮としての特徴を備えていた。

4. BrdU を用いた S 期細胞の陽性率は継代培養では胆嚢上皮は8.6%、総胆管上皮は7.8%、肝門部胆管上皮が9.2%、末梢部胆管上皮が7.3%であった。

5. 各胆道系培養細胞をコラーゲンゲル内で3次元的に培養すると、いずれの系も単層性の上皮で覆われた嚢胞の形成を示し、経時的に嚢胞の拡張が観察された。

6. 各胆道系培養細胞は CK Z-622 および A-575 にび漫性に強陽性を示した。培養細胞はレクチンの DBA, PNA, SBA には散在性または一部び漫性の結合性を示し、各解剖学的区分において明らかな染色性の差異は観察されなかった。生体内で見られたような区分によるレクチン結合能 (糖鎖発現) の違いは培養細胞では認められなかった。

7. 培地中にマウス IFN- γ を添加して3日間培養を行うこと

により、各胆道系上皮細胞には免疫組織化学的に MHC クラス I, クラス II および ICAM-1 の発現が誘導された。免疫電顕による観察ではいずれの発現も細胞の側面と底面の細胞膜に認められた。また、ヒト胆嚢上皮の培養細胞にヒト IFN- γ を作用させると、同様に MHC クラス II (HLA-DR) および ICAM-1 の発現が誘導された。

以上、マウス胆道系を胆嚢、総胆管、肝門部胆管、末梢部胆管と解剖学的に4区分に分け、各々の区分の胆道系上皮細胞を長期かつ純粋に培養することに成功した。この培養法は胆道系の解剖学的区分毎に上皮細胞の形態、免疫学的、生理学的機能を解明するうえで、また、胆道系疾患の病態解明に有用な方法と思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導頂きました本学第二病理中沼安二教授に心より感謝します。本研究に御協力頂きました富山市民病院臨床検査部長の斎藤勝彦博士、本学第二病理学教室の寺田忠史助教授、河野尚子博士ら、諸氏に深く感謝します。なお、本論文の一部は、第30回肝臓学会総会 (旭川, 1994)、第84回日本病理学会総会 (名古屋, 1995)、第30回肝臓学会西部会 (島根, 1995) で発表した。

文 献

- 1) Andrew, W. H. H.: Excretory function of the liver. *Lancet*, 2, 166-168 (1955).
- 2) 車谷 宏, 中沼安二: 肝内胆管系の解剖, 組織, 発生. 病理と臨床, 9, 1394-1399 (1991).
- 3) Nagura, H., Smith, P. D., Nakane, P. K. & Brown, W. R.: IgA in human bile and liver. *J. Immunol.*, 126, 587-596 (1981).
- 4) 中沼安二, 細 正博, 寺田忠史, 車谷 宏: 肝内胆管系解剖と組織学. 肝胆膵, 30, 433-439 (1995).
- 5) 河村泰仁: 胆道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).
- 6) Kawamura, Y., Yoshida, K. & Nakanuma, Y.: Primary culture of rabbit gallbladder epithelial cells in collagen gel matrix. *Lab. Invest.*, 61, 350-356 (1989).
- 7) 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).
- 8) Sirica, A. E., Sattler, C. A. & Cihla, H. P.: Characterization of a primary bile ductular cell culture from the livers of rats during extrahepatic cholestasis. *Am. J. Pathol.*, 120, 67-78 (1985).
- 9) Kumar, U. & Jordan, T. W.: Isolation and culture of biliary epithelial cells from the biliary tract fraction of normal rats. *Liver*, 6, 369-378 (1986).
- 10) Ishii, M., Vroman, B. & LaRusso, N. F.: Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterology*, 97, 1236-1247 (1989).
- 11) Ishii, M., Vroman, B. & LaRusso, N. F.: Morphologic demonstration of receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by isolated bile duct epithelial cells. *Gastroenterology*, 98, 1284-1291 (1989).
- 12) Ishii, M., Vroman, B. & LaRusso, N. F.: Fluid-phase endocytosis by intrahepatic bile duct epithelial cells isolated

- from normal rat liver. *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 515-524 (1990).
- 13) Yang, L., Faris, R. A. & Hixson, D. C.: Long-term culture and characteristics of normal rat liver bile duct epithelial cells. *Gastroenterology*, **104**, 840-852 (1993).
- 14) Rutenberg, A. M., Kim, H., Fischbein, J. W., Hanker, J. S., Wasserkrug, H. L. & Seligman, A. M.: Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 517-526 (1969).
- 15) 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継代純粋培養法. *日消誌*, **89**, 2693-2699 (1992).
- 16) 鈴木利光, 八巻俊文: 細胞増殖能の解析. *細胞培養ハンドブック*, 第1版, 70-73頁, 中外医学社, 東京, 1993.
- 17) Moll, R., Franke, W. W. & Schiller, D. L.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, 11-24 (1982).
- 18) Funchs, E. & Green, H.: Multiple keratins of cultured human epidermal cells are translated from different mRNA molecules. *Cell*, **17**, 573-582 (1979).
- 19) Hanukoglu, I. & Fuchs, E.: The cDNA sequence a type II cytoskeletal keratin reveals constant and variable structural domains among keratins. *Cell*, **33**, 915-924 (1983).
- 20) Steinert, P. M., Rice, R. H., Roop, D. R., Trus, B. L. & Steven, A. C.: Complete amino acid sequence of a mouse epidermal keratin subunit and implications for the structure of intermediate filaments. *Nature*, **302**, 794-800 (1983).
- 21) Shiojiri, N. & Nagai, Y.: Preferential differentiation of the portal vein in the development of mouse liver. *Anat. Embryol.*, **185**, 17-24 (1992).
- 22) Shiojiri, N. & Mizuno, T.: Differentiation of functional hepatocytes and biliary epithelial cells from immature hepatocytes of the fetal mouse in vitro. *Anat. Embryol.*, **187**, 221-229 (1993).
- 23) Takahashi, K., Viviano, C. J., Elwell, M. R., Bakewell, W. E., Kuwahara, M., Nakashima, N., Blackwell, B. N. & Maronpot, R. R.: Bile duct-specific lectins, *dolichos biflorus* agglutinin and peanut agglutinin, as probes in mouse hepatocarcinogenesis. *Lab. Invest.*, **73**, 424-432 (1995).
- 24) 梅田 誠: 培養細胞の機能. *組織培養の技術* (日本組織培養学会編), 第2版, 6-7頁, 朝倉書店, 東京, 1988.
- 25) 妻木範行, 木村友厚: コラーゲンの構造と機能. *細胞外マトリックス* (坂倉照好編), 第1版, 26-38頁, 羊土社, 東京, 1995.
- 26) Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, D. & Nandi, S.: Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3401-3405 (1979).
- 27) Yang, J., Guzman, R., Richards, J., Jentoft, V., Devault, M. R., Wellings, S. R. & Nandi, S.: Primary culture of human mammary epithelial cells embedded in collagen gels. *J. Natl. Cancer Inst.*, **65**, 337-343 (1980).
- 28) Yang, J., Elias, J. J., Petrakis, N. L., Wellings, S. R. & Nandi, S.: Effects of hormones and growth factors on human mammary epithelial cells in collagen gel culture. *Cancer Res.*, **41**, 1021-1027 (1981).
- 29) Toda, S. & Sugihara, H.: Reconstruction of thyroid follicles from isolated porcine follicle cells in three-dimensional collagen gel culture. *Endocrinology*, **126**, 2027-2034 (1990).
- 30) Toda, S., Yonemitsu, N., Hikichi, Y. & Sugihara, H.: Differentiation of human thyroid follicle cells from normal subjects and Basedow's disease in three-dimensional collagen gel culture. *Path. Res. Pract.*, **188**, 874-882 (1992).
- 31) Johnson, M., Koukoulis, G., Matsumoto, K., Nakamura, T. & Iyer, A.: Hepaocyte growth factor induces proliferation and morphogenesis in nonparenchymal epithelial liver cells. *Hepatology*, **17**, 1052-1061 (1993).
- 32) Broome, U., Hultcrantz, R. & Scheynius, A.: Lack of concomitant expression of ICAM-1 and HLA-DR on bile duct cells from patients with primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, **28**, 126-130 (1993).
- 33) Auth, M. K., Keitzer, R. A., Scholz, M., Blaheta, R. A., Hottenrott, E. C., Herrmann, G., Encke, A. & Markus, B. H.: Establishment and immunological characterization of cultured human gallbladder epithelial cells. *Hepatology*, **18**, 546-555 (1993).
- 34) Demetris, A. J., Lasky, S., Van Thiel, D. H., Starzl, T. E. & Whiteside, T.: Induction of DR/Ia antigens in human liver allografts. An immunocytochemical and clinicopathologic analysis of twenty failed grafts. *Transplantation*, **40**, 504-509 (1985).
- 35) Whiteside, T. L., Lasky, S. & Van Thiel, D. H.: Immunologic analysis of mononuclear cells in liver tissues and blood of patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*, **5**, 468-474 (1985).
- 36) Yamada, G., Hyodo, I., Tobe, K., Mizuno, M., Nishihara, T., Kobayashi, T. & Nagashima, H.: Ultrastructural immunohistochemical analysis of lymphocytes infiltrating bile duct epithelia in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **6**, 385-391 (1986).
- 37) Ballardini, G., Mirakian, R., Bianchi, F. B., Pisi, E., Doniach, D. & Bottazzo, G. F.: Aberrant expression of HLA-DR antigens on bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis: relevance to pathogenesis. *Lancet*, **2**, 1009-1013 (1984).
- 38) Demetris, A. J., Markus, B., Saidman, S., Fung, J., Makowka, L., Duquesnoy, R. & Starzl, T. E.: Establishment of primary cultures of human biliary epithelium and induction of class II major histocompatibility complex antigens by interferon gamma. *Transplant. Proc.*, **20**, 728-730 (1988).

- 39) Hubscher, S. G., Adams, D. H. & Elias, E.: Changes in the expression of major histocompatibility complex class II antigens in liver allograft rejection. *J. Pathol.*, 162, 165-171 (1990).
- 40) Daar, A. S., Fuggle, S. V., Fabre, J. W., Ting, A. & Morris, P. J.: The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38, 287-292 (1984).
- 41) Steinhoff, G., Wonigeit, K. & Pichlmayer, R.: Analysis of sequential changes major histocompatibility complex expression in human liver grafts after transplantation. *Transplantation*, 45, 394-401 (1988).
- 42) Duquesnoy, R. J., Saidman, S., Markus, B. H. & Zeevi, A.: Role of HLA in intragraft cellular immunology in human liver transplant. *Transplant. Proc.*, 20 (suppl. 1), 724-727 (1988).
- 43) Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. & Wiley, D. C.: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329, 512-518 (1987).
- 44) 森川雅之, 小松作蔵, 上出利光, 菊地浩吉: 移植免疫における T 細胞の活性化と接着分子. 最新医学からのアプローチ 2 接着分子 (宮坂昌之編), 130-141 頁, 第 1 版, メジカルビュー社, 東京, 1991.
- 45) Yasoshima, M., Nakanuma, Y., Tsuneyama, K., Van De Water, J. & Gershwin, M. E.: Immunohistochemical analysis of adhesion molecules in the micro-environment of portal tracts in relation to Aberrant expression of PDC-E2 and HLA-DR on the bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J. Pathol.*, 175, 319-325 (1995).
- 46) 加藤和則: 免疫グロブリンスーパーファミリー. 接着分子—基礎と病態への関与. *Mebio*, vol. 10 (No. 5), 12-17 頁, メジカルビュー社, 東京, 1993.
- 47) Osborn, L., Hession, C., Trizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G. & Lobb, R.: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule-1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59, 1203-1211 (1989).

Establishment of Biliary Epithelial Cell Culture from Different Anatomical Levels of Murine Biliary Tree
Kazuyoshi Katayanagi, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105, 54—70 (1996)

Key words biliary epithelial cell, biliary tree, culture on collagen gel, major histocompatibility complex, adhesion molecule

Abstract

Biliary tract is classifiable anatomically into four segments: gallbladder (GB), extrahepatic bile duct (EHBD), intrahepatic large bile duct (ILBD) and intrahepatic small bile duct (ISBD). In biliary diseases, certain anatomical segment(s) of the biliary tract are affected preferentially. Such preference may be related to the functions and antigenicity characteristic to the levels of the biliary tree. In order to clarify the pathogenesis of biliary diseases, a method of long-term culture of biliary epithelial cells (BECs) from several segments of murine biliary tract was established. First, the biliary tree was prepared from normal murine livers by collagenase perfusion and mechanical parenchyma removal. Gallbladder and extrahepatic bile duct were also resected separately. Therefore, small tissue fragments from each segment (GB, EHBD, ILBD, and ISBD) were prepared with scissors. These fragments were used as explants and cultured on collagen gel matrix (gel) for 2 weeks in Nu-Serum medium. BECs began to proliferate from each explant and spread as a sheet on gel. Some portions of spreading epithelial sheets were composed of only epithelial cells without mesenchymal contamination and such portions were cut and retransplanted on another gel secondarily. The subsequent passaged cultures of purified BECs were done every 3 weeks. The culture of BECs on collagen gel, derived from GB, EHBD, ILBD, was possible up to 10 passages, while those from ISBD up to 6 passages. Histologically, the cultured BECs were of a monolayer with a cuboidal and columnar shape. Secretion of mucin was hardly recognizable in their cytoplasm. γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), and cytokeratin detectable by antibodies Z-622 and A-575 were expressed in their cytoplasm. BECs of each level were focally and diffusely positive for bile duct-specific lectins, *Dolichos biflorus* agglutinin, soybean agglutinin and peanut agglutinin. Ultrastructurally, microvilli were dense on the luminal surface, and junctional complex and interdigitation were identifiable on lateral sides of BECs. Their overall morphological features were similar to those of in vivo BECs. Isolated and purified BECs were successfully cultured in collagen gel matrix and they began to form multicellular cysts after 2 days and their lumen gradually enlarged. After addition of interferon- γ (IFN- γ), major histocompatibility complex antigen (MHC) class I and II,

and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were expressed on the primary and passage culutred BECs. There were no differences between the four types of the culutred BECs as to staining patterns for mucin, γ -GTP, cytokeratins, lectins, MHC class I and II, and ICAM-1. Human gallbladder epithelial cells were also successfully cultured on gel using the same method and they expressed MHC-DR and ICAM-1 after stimulation of IFN- γ . This novel culture mehtod of BECs from the different anatomical levels will offer a useful tool for investigations into the physiology, immunology and pathology of BECs.