

Pathological Study of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Analysis of Cell Kinesis and Expression of Carbohydrate Residues

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/2297/8536

肝内胆管癌の病理学的研究

—細胞動態解析と糖鎖抗原発現を中心に—

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任: 中沼安二教授)

湊 宏

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, CC) の形態像と生物学的性状との関連性を明らかにする目的で、その組織型、分化度、肝内での占拠部位と種々の糖鎖抗原の発現や細胞動態との関連性を検討した。対象は、剖検肝62例と外科的切除肝13例の計75例の CC で、肝内での主な占拠部位により肝門型44例と末梢型31例に2分し、組織学的に、高分化腺癌21例、中分化腺癌26例、低分化腺癌24例、腺扁平上皮癌4例に分類した。糖鎖抗原として、血液型物質の A, B, H, ルイス^a (Lewis^a, Le^a), Le^b, Le^s, Le^x, 腫瘍関連抗原の癌胎児性蛋白抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA), 糖質抗原 19-9 (carbohydrate antigen, CA19-9) をアビジンビオチン複合体 (avidin biotin peroxidase complex, ABC) 法で染色した。CC の分化度との関連では、A 型型物質, Le^b, Le^s と CA19-9 は CC の分化度の低下に従い発現頻度が低下した ($p < 0.05$)。また、CC の分化度の低下に従い細胞での糖鎖発現の極性も変化した (つまり高分化腺癌では核上に染まる型、管腔内面に染まる型が多くみられ、低分化型腺癌では胞体にびまん性に染まる型、周囲の間質に染まる型が多くみられた)。これらの極性の変化は、共焦点レーザー顕微鏡で明確に示された。他の糖鎖抗原は比較的高頻度に発現され、その発現頻度は組織型や分化度と有意な関連はなかった。なお、腺扁平上皮癌は低分化腺癌と同様であった。CC の主な占拠部位と糖鎖発現との関連性で、末梢型より肝門型で ABH 型血液型物質の発現がやや高率であった。CC の細胞動態に関して、好銀性核小体形成体 (argyrophilic nucleolar organizer regions, AgNOR) 数と CC の分化度とは、負の相関を示し [高分化型腺癌, 2.22 ± 0.21 (平均値 \pm 標準偏差); 中分化型腺癌, 3.66 ± 0.85 ; 低分化型腺癌, 4.17 ± 0.49], 分化度の低下により Ag-NOR 数は増加した ($p < 0.01$)。増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 陽性指数は、中分化型腺癌で 24.0 ± 2.35 , 低分化型腺癌で 26.0 ± 4.89 であったのに比し、高分化型腺癌では 10.8 ± 2.14 と低値を示した ($p < 0.05$)。フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) による DNA プロイディパターンに関して、高分化型では異数倍体は33.3%と少なかったが、中分化型では84.6%, 低分化型で100%と異数倍体の割合が増加した。リンパ節転移を有する症例では、DNA 指数が高く (転移有, 19例, 1.68 ± 0.33 対転移無, 4例, 1.08 ± 0.09 , $p < 0.01$), DNA 指数は CC の転移能の指標となると考えられた。なお、肝門型と末梢型と、細胞動態の各々の指標の間には関連性がなかった。PCNA と各種糖鎖抗原との二重免疫染色により、細胞動態と糖鎖抗原の発現性との関連性を検討した結果、糖鎖抗原を発現する CC 細胞の PCNA 陽性指数と背景の CC の PCNA 指数との比較で、CEA と Le^s を発現する CC 細胞での PCNA 指数が有意に低値であった (CEA, 34.1 ± 7.4 対 3.6 ± 2.5 ; Le^s, 32.5 ± 5.3 対 4.5 ± 3.7 , $p < 0.01$)。次に、細胞動態と糖鎖 (抗原) 発現性との関係をより明確にするため、ヒト株化肝内胆管癌 (CCKSI) を用い蛍光抗体法と FCM を用いて検討した。糖鎖抗原である CA19-9, それに小麦胚凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA), コンカナバリン A (concanavalin A, ConA) レクチンレセプター (糖鎖) の発現で検討したところ、定常期と対数増殖期の間で糖鎖 (抗原) 発現の割合や蛍光強度に差はみられず、糖鎖 (抗原) 発現と細胞動態との明らかな関連性を見出すことはできなかった。本研究の結果、CC における糖鎖抗原の発現頻度とパターンと種々の細胞動態の指標は、CC の組織学的、生物学的悪性度とある程度反映することが示唆された。

Key words cholangiocarcinoma, adenocarcinoma, carbohydrate residues, cell kinetics, immunohistochemistry

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, CC) は肝内胆管上皮より発生する悪性腫瘍で、肝細胞癌について多い肝原発悪性腫瘍であり^{1)~3)}、近年、我が国で徐々に増加している。最近の画像診断学の進歩により早期に発見される例もあるが、診断

される時点ですでに進展している例が多く、その予後は不良で、発生機序や生物学的特性に関しても不明な点が多い。

さて、多くの腫瘍組織 (例えば、膀胱, 肺, 大腸, 子宮, 口腔など) において、正常組織で発現する ABH 血液型およびルイ

平成5年12月13日受付, 平成6年1月31日受理

Abbreviations: ABC, avidin biotin peroxidase complex, AgNOR, argyrophilic nucleolar organizer regions; AP, alkaline phosphatase; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9; CC, intrahepatic cholangiocarcinoma; CEA, carcinoembryonic antigen; ConA, concanavalin A; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DI, DNA index; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCM, flow cytometry; FITC, fluorescein isothiocyanate; HE,

ス (Lewis, Le) 血液型関連糖鎖抗原が減少あるいは消失することが報告されている^{4)~9)}。そして、これらの糖鎖抗原の形質変化がこれら腫瘍の悪性度や予後に関連すると報告されている^{4)~9)}。また、近年、いわゆる腫瘍マーカーと癌の悪性度との関連性も指摘されている。例えば、糖質抗原 19-9 (carbohydrate antigen, CA19-9) は、シアリル Le^a の抗原構造を有する腫瘍マーカーであり¹⁰⁾、CC 例の血中で増加する。癌胎児性蛋白抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) も CC の代表的な腫瘍マーカーであり、血液型物質と類似の多様な糖鎖構造を有するとされている^{11)~14)} が、その正確な糖鎖構造に関し不明な点が多い。現在、CC の病態と糖鎖発現との関連に関していくつか報告例がある^{15)~20)} が、系統的な研究は著者の知る限り未だなされていない。

最近、腫瘍の細胞動態の解析のための種々の手法がルーチンの病理検査材料で応用されつつある。例えば好銀性核小体形成体 (argyrophilic nucleolar organizer regions, AgNOR) 染色ではリボソーム RNA の遺伝子とループを形成する核内非ヒストン蛋白がドットとして可染され、細胞の蛋白合成や細胞増殖と密接な関連性を有する^{21)~23)}。また、合成期の細胞核に発現する増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の免疫染色も一般的となり、PCNA は、DNA ポリメラーゼ δ の補助蛋白であり、細胞の合成準備期 (G₁ 期) 後期~合成期 (S 期) 早期の核内に最も集積し、免疫染色で検出できる様になるとされている^{24)~26)}。さらに、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) による核 DNA 量の解析やプロイデパターンの決定は、腫瘍の細胞動態と生物学的特性等の解析に用いられている^{30)~33)}。これらの手法が、現在、腫瘍の組織学的特徴、臨床的特性、予後因子の解析等に有用であるという報告がなされつつある。しかし、CC に関してこれらの手法を用いた系統的な報告は殆どされていない¹⁹⁾²²⁾。

本研究では、CC の各種糖鎖抗原発現を免疫組織化学的手法により検討し、日常の病理検査材料に应用可能な種々の検索法を用いて CC の細胞動態を調べ、CC の臨床的、病理形態学的特徴との関連性を検討した。さらに、CC の組織切片を用いた PCNA と糖鎖抗原との二重免疫染色およびヒト肝内胆管癌由来の培養株 CCKS1³⁴⁾ を用いた FCM による検討により、糖鎖発現と細胞動態の関連性も合わせて検討したので報告する。

対象および方法

I. 対 象

1. CC の剖検および外科的切除例

金沢大学医学部第2病理学教室、金沢大学医学部付属病院、石川県立中央病院、福井県立病院、富山市民病院、加賀中央病院 (1975年~1992年) で経験された75例の CC 症例 (剖検例62例、外科的切除例13例) を対象とした。外科的切除時、あるいは剖検時の患者年齢は35歳~87歳 (平均67歳) で、男性43人、女性32人である。現在、CC の先行病変として知られている肝内結石症³⁵⁾³⁶⁾ が3例に、トロトラスト沈着症³⁷⁾ が1例にみられ、また、2例は非胆汁性肝硬変 (ウイルス性)³⁸⁾ に合併していた。その他の例では非特異的な反応性病変をみるか、あるいは種々の

程度の胆道閉塞に伴う変化を認めた。癌部、非癌部から数個の組織片を採取し、10%中性ホルマリンで固定後、パラフィン包埋した。各々のパラフィン包埋ブロックより20枚以上の 4 μ m の切片を作成し、これらの一部をヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, HE) 染色、ゴモリの鍍銀染色、アザン・マロリー染色、過ヨウ素酸シッフ (periodic acid Schiff, PAS) 染色、アルシアン青 (pH2.5) 染色、ムチカルミン染色に用いた。

2. ヒト肝内胆管癌由来培養株 CCKS1

ヒト肝内胆管癌細胞株 CCKS1 は、60歳男性の肝内胆管癌患者の腹膜転移巣からヌードマウス皮下に移植し、コラーゲン・ゲル上微小外植片 (microexplant) 培養法を用いて癌細胞を鈍化、確立したもの³⁴⁾ で、摘出腫瘍の組織像は篩状構造を示す中分化型腺癌であった。純化した癌細胞は現在100代を越えて継代維持しており、その倍加時間は約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。ヌードマウスへの再移植が可能であり、腹膜転移巣の癌組織と同様の中分化型腺癌を示した。これより培養フラスコ内で継代3日目の対数増殖期癌細胞と、2週間後の定常期癌細胞を得た。

II. 肝内胆管系の分類と CC の肉眼的、組織学的分類

肝内胆管は、左右肝管合流部より肝側の胆管系で肝内にあるものとし、左右肝管、区域胆管 (左右胆管の第1分枝で左葉は内側と外側、右葉では前方と後方)、領域胆管 (各区域胆管の第1分枝で前方枝と下方枝) とその末梢枝に分けた²⁰⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。また、本研究では肝管~領域胆管およびその第1分枝を肝内大型胆管とし、それより肝側の末梢枝をさらに隔壁胆管 (小葉間胆管より大きくグリソン鞘 (グ鞘) の中心に存在するもの)、小葉間胆管 (末梢グ鞘内にみられ径 20~40 μ m の小型小葉間胆管と 40~80 μ m の中型小葉間胆管)、細胆管 (小葉間グ鞘内周辺にみられ径 20 μ m 以下の胆管) とした。大型胆管と隔壁胆管は固有の胆管壁 (細胞成分に乏しい層状のコラーゲン線維よりなる) を有し、一層の胆管上皮が内腔を被う。胆管壁周囲の疎な線維結合組織は胆管周囲組織であり、大型胆管周囲に沿い胆管付属腺がみられる⁴⁰⁾。

Okuda ら⁴¹⁾ に従い、CC を肉眼的に末梢型31例と肝門型44例に分けた。末梢型は主腫瘍が肝門部より離れ肝実質内に位置するもので、肝門型とは主腫瘍が肝門部に位置し、肝外発生を示唆する明瞭な像がないものとした。組織学的には、胆道癌取扱規約⁴²⁾ に従い準拠し、腺癌と腺扁平上皮癌に分類した。前者はさらに細胞学的、構造学的異型度により高分化型、中分化型、低分化型腺癌に亜分類した。なお、組織学的な分類に際し、最も多くみられる組織像を、各例の組織像とした。

III. 糖鎖抗原の免疫組織化学

1. 免疫染色

免疫組織学的に検出を試みた糖鎖抗原は、血液型関連物質として A, B, H, Le^a, Le^b, Le^x, Le^y 抗原、腫瘍関連抗原として CEA, CA19-9 (シアリル Le^a) である (表1)。免疫染色は、Hsu ら⁴³⁾ に従いアビジンビオチン複合体 (avidin biotin

hematoxylin and eosin; Ig, immunoglobulin; Le, Lewis; LI, labeling index; PAP, peroxidase antiperoxidase complex; PBS, phosphate buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI, propidium iodide; WGA, wheat germ agglutinin; S 期, 合成期; グ鞘, グリソン鞘; G₀ 期, 休止期; G₁, 合成準備期

peroxidase complex, ABC) 法で行った. すなわち各切片を脱パラフィン後, 内因性ペルオキシダーゼを 0.3% H_2O_2 加メチルアルコールで20分間ブロックした後, 非特異的の化学結合反応を防止するため正常動物血清で15分間処置した. 続いて表1に示す1次性モノクローナル抗体を各々, スライド上で4°Cで一晩反応させた. ビオチン化抗マウスイムノグロブリン (immunoglobulin, Ig) G あるいは IgM 抗体 (2次抗体) (200倍希釈, Vector, Burlingame, CA, USA) で30分間室温で反応させ, 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.2) で洗浄後 ABC 溶液 (Vector) で40分間室温で反応させ, 反応物を 30% H_2O_2 20 μ l 加 0.2%3,3'-ジアミノベンチジン 4 塩酸塩 (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 溶液で可視化した. ヘマトキシンで核染を行い脱水封入した. 各反応過程間は, PBS で十分に洗浄後行った.

なお, 陰性対象は1次抗体の代わりに非免疫血清や PBS を用いた染色で, 陽性像が消失することをもって確認した.

2. ABO 血液型の判定

患者の ABO 式血液型は, Terada ら⁴⁾に従い, 染色した切片中の赤血球の染色態度より判断した. 例えば, 赤血球が A 型あるいは A 型と H 型, B 型抗原あるいは B 型と H 型に陽性的場合, それぞれ A 型と B 型とした. また赤血球が A 型と B 型抗原共に陽性であれば AB 型と判定し, H 型抗原のみ陽性の例は, O 型とした. ABO 血液型に関しては, 検索した75例中, 29例が A 型, 15例が B 型, 7例が AB 型, 24例が O 型と判定された.

3. 共通点レーザー顕微鏡による観察

CC 10例について, 15 μ m のパラフィン切片を作成し, 蛍光免疫染色を行った. すなわち, 脱パラフィン後, 抗 A, CA19-9, CEA, Le^a モノクローナル1次抗体 (表1) を4°Cで一晩反応させ, ビオチン化抗マウス IgG あるいは IgM (2次抗体, Vector) を30分, 次いでストレプト ABC/アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, AP) (DAKO, Glostrup, Denmark) を40分間反応させ, ベクターレッドキット (Vector)

で染色した. ベクターレッドは強い蛍光性を有し, ローダミンと同様の励起フィルターシステムで鮮赤色の蛍光を発するとされ, 本研究でも同様の赤色蛍光を示した. 共焦点レーザー顕微鏡はオリンパス (東京) の LSM-GB200 を使用し, 514.4nm のアルゴンレーザー光と 615nm のロングパスバリアーフィルターにより蛍光を得た.

IV. 細胞動態解析

48例の CC 症例 (剖検40例, 外科的切除8例; 肝門型24例, 末梢型24例; 高分化型13例, 中分化型19例, 低分化型15例, 腺扁平上皮癌1例) を用い, 以下の検索を行った.

1. AgNOR 染色

Crocker ら⁴⁾の方法により, 脱パラフィン切片をゼラチン加1%蟻酸溶液と50%硝酸銀溶液の1:2混和液内で30分間反応させ, 洗浄後, 5%チオ硫酸ナトリウムで5分間処置し, 0.3%メチルグリーン溶液で核染し, 脱水, 封入した. 黒色~黒褐色な明瞭なドットを陽性とし, 各々の例で100個の癌細胞 (代表的な組織像を示す部位) と100個の非癌部胆管上皮の核の AgNOR 数を油浸レンズ下で数え, 各例での代表的な分化度の部位で, 平均 AgNOR 数を算出した.

2. PCNA 染色

モノクローナル PCNA 抗体 (表1) を用い, ABC 法で PCNA の検出を試みた. PCNA 染色の判定は核が明瞭に褐色に染色されるものを陽性とし, 腫瘍の代表的な部分 (組織像あるいは分化度) で, 1000個の癌細胞中の PCNA 陽性細胞を数え, パーセントで示した [PCNA 陽性指数 (PCNA labeling index, PCNA LI)].

3. FCM による解析

Hedley ら⁴⁾の方法に従い, 個々のブロックより50 μ m 切片を数枚作製し, 脱パラフィン後, 0.5%ペプシン (Sigma) 加生理的食塩水 (pH1.5) で37°C, 60~90分間処理し単離細胞とした後, 45 μ m 孔を有するナイロンメッシュ (飯田製作所, 大阪) で濾過し, 2000回転/分で遠心後, 沈殿物をさらに PBS で洗浄遠心 (2000回転/分) した. 50 μ g/ml のプロピジウムイオダイド (propidium iodide, PI) (Sigma) (3~5ml) で, 核 DNA を蛍光染

Table 1. The list of antibodies and lectins used in this study, their specificity, dilution and source

Primary monoclonal antibody (class) and lectins	Carbohydrate binding specificity	Dilution applied	Source (laboratory)
Anti-A (mouse IgM)	GalNac (Fucal-2) Gal β 1-3 (or4) GlcNAc β 1-R	1:70	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Anti-B (mouse IgM)	Gala1-3 (Fucal-2) Gal β 1-3 (or4) GlcNAc β 1-R	1:35	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Anti-H (mouse IgM)	(Fucal-2) Gal β 1-4GlcNAc β 1-R	1:75	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Anti-Le ^a (mouse IgM)	Gal β 1-3 (Fucal-4) GlcNAc β 1-R	1:400	Kokusai-Shiyaku, Kobe
Anti-Le ^b (mouse IgM)	(Fucal-2) Gal β 1-3 (Fucal-4) GlcNAc β 1-R	1:800	Kokusai-Shiyaku, Kobe
Anti-Le ^a (mouse IgM)	Gal β 1-4 (Fucal-3) GlcNAc β 1-R	1:100	Signet, Dedham, Mass, USA
Anti-Le ^b (mouse IgM)	(Fucal-2) Gal β 1-4 (Fucal-3) GlcNAc β 1-R	1:50	Signet, Dedham, Mass, USA
Anti-CA19-9 (mouse IgG1)	NeuAca2-3Gal β 1-3 (Fucal-4) GlcNAc β 1-R	1:10	CIS, Cedex, France
Anti-CEA (mouse IgG1)		1:40	DAKO, Glostrup, Denmark
Anti-PCNA (mouse IgG2a)		1:200	Novocastra, Newcastle, UK
FITC-WGA	β (1 \rightarrow 4)-D-N-acetylglucosamine oligomer, sialic acid	1:100	Vector, Burlingame, CA, USA
FITC-ConA	α -D-Mannose > α -D-Glucose	1:100	Vector, Burlingame, CA, USA

Le, Lewis; FITC-WGA, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated wheat germ agglutinin; FITC-ConA, FITC-conjugated concanavalin A; GalNac, N-acetylgalactosamine; Fuc, fucose; Gal, galactose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid; CIS, CIS Bio International; ICN, ICN Immunobiologicals.

色した。蛍光顕微鏡(オリンパス, 大阪)で単離細胞核が明瞭に赤色蛍光を示していることを確認した後, フローサイトメーター (EPICS-C Scan, Coulter Inc., Hialeah, FL, USA) で, 約2万個の細胞核の DNA 量を測定した。2倍体 (diploidy) のコントロールとして同一症例の非腫瘍部肝組織の正常細胞を同様に処理し用いた。そして, 変動係数が8%以下の29例を用い, 以下の検討を行った。2倍体は単一の休止期 (G_0 期)+ G_1 期のピークがみられるものとし, 異数倍体 (aneuploidy) は複数の G_0 + G_1 期のピークがみられるものとした⁴⁷⁾。また, DNA 指数は, 異数倍体の G_0 + G_1 期のピークチャンネル数を2倍体の G_0 + G_1 期のピークチャンネル数で除した値とした。

4. 同一の CC 例の腫瘍内の異なる部位での細胞動態の違いの検討14例の CC 症例について, 核 DNA 量やプロイディオパターンの, DNA 指数を検討した。

5. 各々の細胞動態指標間での検討

8例の CC からの同一ブロックを用い, 上述の3種の方法で CC の細胞動態の解析を試み, 相互の関連性を比較検討した。

V. 糖鎖抗原発現と細胞動態との関連性

1. 二重免疫染色法

腫瘍の増殖能と糖鎖抗原発現との関連性を知るために, PCNA と4種の糖鎖抗原 (A 型, CA19-9, CEA, Le^x) との二重染色⁴⁸⁾を CC 5例で行った。二重染色は PCNA をペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ複合体 (peroxidase antiperoxidase complex, PAP) 法⁴⁹⁾にて, 糖鎖抗原を ABC/AP で染色した⁵⁰⁾。すなわち4 μ mの切片を脱パラ後, 内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし, 正常血清で処理後, 抗 PCNA モノクローナル抗体 (表1) で4℃で一晩反応させた後, ウサギ抗マウス免疫グロブリン (DAKO) を室温で30分間反応させ, 次いで PAP を30分間室温で反応させた。その後 H₂O₂ 加 DAB で反応物を発色させた。次に, 一次抗体を洗浄するため各切片をグリシン塩酸溶液 (pH2.2) 内で2時間室温で攪拌した。次いで, 各糖鎖抗原に対する1次抗体で4℃で一晩反応させた。これらの切片を, ビオチン化2次抗体と室温で30分間反応させ, ストレプト ABC/AP, ベクターレッドキットで反応, 発色させた。PCNA は増殖細胞の核内に褐色に染色され, 糖鎖抗原は腫瘍細胞あるいは非腫瘍部の胆管上皮の細胞質内に赤褐色に染色された。各症例において, 1000個の癌細胞を, 糖鎖抗原発現に関係なく腫瘍全体で数え, PCNA 陽性細胞数の割合 (PCNA LI) を求めた。次いで, 糖鎖抗原が陽性の細胞1000個中での PCNA LI を数え, 腫瘍全体の PCNA LI と比較した。

2. 株化 CC 培養細胞 CCKS1 での細胞動態と糖鎖抗原発現との関連性

1) 蛍光抗体法による検討

フラスコ上に増殖した培養癌細胞を70%アルコールで30分間固定し, 以下の染色を行った。糖鎖抗原として CA19-9 抗体を用い, 2次抗体にフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス免疫グロブリン (Silenus, Victoria, Australia) を用いた間接法を行った。また, レクチンによる糖鎖の検出として FITC 標識小麦胚凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA), 同コンカナバリン A (concanavalin A, ConA) (Fluorescein Lectin Kit I, Vector) を用い, 直接法により行った。なお, WGA は D-N-アセチルグルコサミンのオリゴマー, シアル酸と⁵¹⁾⁵²⁾, ConA は D-マンノース, D-グルコース⁵³⁾⁵⁴⁾と特異的に結合することが知られている。

それぞれの反応は4℃で一晩行い, PI (5 μ g/ml) で, 核 DNA の染色を行った。次いで, 実体蛍光顕微鏡(オリンパス)で観察し, 増殖期癌細胞と定常期癌細胞の間で陽性細胞と蛍光強度を比較検討した。

2) FCM による検討

FCM には, 増殖期癌細胞, 定常期癌細胞を, それぞれ0.02% エチレンジアミン4酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (半井化学, 京都) 加0.25%トリプシン (Difco, Detroit, MI, USA) 溶液で37℃, 5分間処理して単離細胞とした。次いで, 70%アルコール固定後に, 蛍光抗体法にて, 上記糖鎖抗原を免疫染色し, その後 PI で核 DNA を染色した。次いで, FCM (EPICS-C Scan) を用い, 各抗原の発現量を緑色蛍光量により, DNA 量を赤色蛍光量により, 細胞の大きさを前方散乱光により測定し, 各抗原の発現量と DNA 量, 各抗原の発現量と大きさとの関係を両パラメータを示すグラフにより検討した。

VI. 統計学的検討

統計学的検討は, χ^2 検定, Student の t 検定, スペアマン順位相関係数を用いて行い, 危険率0.05%未満を以て有意差ありとした。

成 績

1. 糖鎖抗原の発現

1. 非癌部胆管上皮における糖鎖抗原の発現

ABH 型物質は, 大型の胆管上皮および胆管付属腺に発現し, 小型の小葉間胆管や細胆管には殆ど発現がなかった。胆管上皮における A 型抗原は, A 型患者 (96.6%) と AB 型患者 (100%) のみに, B 型抗原は, B 型患者 (73.3%) と AB 型患者 (85.7%) のみに発現がみられた。H 型抗原は, 全ての種類の血液型に高率に陽性で全体として85.3%に陽性であった。Le^x と CA19-9 は全ての症例の大型胆管上皮, 付属腺および小型胆管上皮に発現がみられた (96%対100%)。一方, CEA は非癌部胆管上皮には発現がなかった。Le^x はほとんどの胆管上皮には陰性であったが, 一部の付属腺や過形成性の胆管上皮に陽性像がみられた。

2. CC の肉眼像, 組織型, 分化度と糖鎖の発現

組織学的に, CC 71例が腺癌 (肝門型42例; 末梢型29例) で, 4例が腺扁平上皮癌 (肝門型2例; 末梢型2例) であった。腺癌はさらに高分化型21例 (肝門型13例; 末梢型8例), 中分化型26例 (肝門型16例; 末梢型10例), 低分化型24例 (肝門型13例; 末梢型11例) に分類された (図1)。

ABH 血液型に関し, A 型抗原の発現は, A 型, AB 型患者の CC のそれぞれ72.4%と42.9%に発現し, B 型は B 型, AB 型患者のそれぞれ26.7%と28.6%に発現した。H 型抗原は全血液型で発現し, 66.7%で陽性であった。なお, ABH 型の発現は患者の血液型に一致し, 異なる血液型の発現はみられなかった。肉眼分類との対応では, 末梢型に比べ肝門型でやや高率に発現する傾向があったが, 有意差はなかった (表2)。Le^x, Le^b, Le^a, Le^c, CA19-9, CEA も同様の傾向がみられた (表2)。なお, Le 抗原, CEA, CA19-9 は, ABH 型物質に比べ高頻度に発現した。

腫瘍の組織型別, 分化度別の染色結果を表3に示す。腺癌では ABH 血液型物質の発現は, CC の分化度の低下と共に低下し, A 型では有意 ($p<0.05$) であった。Le 血液型物質,

CA19-9, CEA は低分化型腺癌でも、比較的良好に発現がみられたが、Le^b, Le^x, CA19-9 は低分化型腺癌で高分化型腺癌に比べ有意に低率であった ($p < 0.05$)。腺扁平上皮癌では、各糖鎖抗原の発現率は中～低分化型腺癌での発現率に類似していた (表 3)。

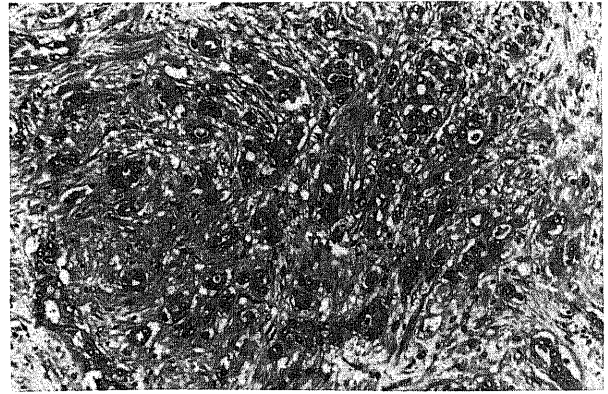
3. 糖鎖抗原の腫瘍細胞内での局在

CC の腫瘍細胞内での局在パターンは核上型、管腔型、膜型、

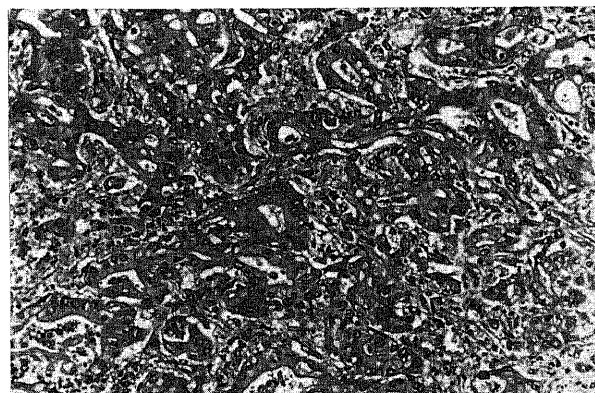
びまん型、間質型の 5 種に分類できた (表 4)。核上型は糖鎖抗原の発現が核上部の細胞質にみられるものであり、管腔型は管腔面の細胞膜部に線状に陽性像がみられるもの、膜型は全細胞膜が陽性であるもの、びまん型は細胞質全体が極性なく染色されるもので、間質型は主に腫瘍細胞周囲の間質に陽性像のみみられるものである。個々の染色パターンは共焦点レーザー顕微鏡により明瞭に示された (図 2)。つまり、共焦点レーザー顕微鏡



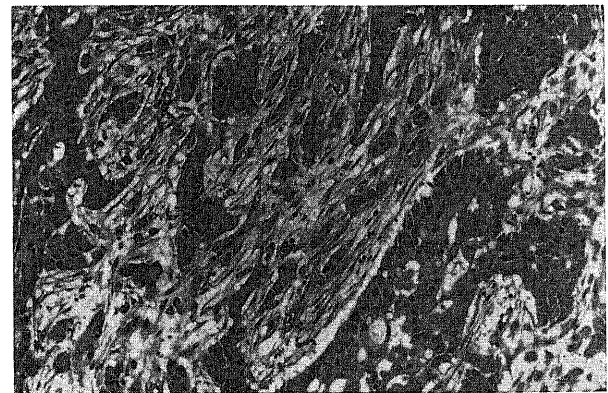
A



C



B



D

Fig. 1. Histological features of cholangiocarcinoma of various differentiation. A: Well differentiated adenocarcinoma. B: Moderately differentiated adenocarcinoma. C: Poorly differentiated adenocarcinoma. D: adenosquamous carcinoma. (HE stainings, original magnification $\times 200$)

Table 2. Expression of carbohydrate residues in hilar and peripheral types of cholangiocarcinoma

Antigen	Number (%) of carbohydrate residue-positive cases in	
	Hilar type (44) ^{a)}	Peipheral type (31) ^{a)}
A	16/24 ^{b)} (66.7)	6/12 ^{b)} (50.0)
B	3/13 ^{c)} (23.1)	0/8 ^{c)} (0)
H	18/44 ^{d)} (40.9)	9/31 ^{d)} (29.0)
Le ^a	34/44 (77.3)	20/31 (64.5)
Le ^b	40/44 (90.9)	22/31 (71.0)
Le ^x	35/44 (79.5)	19/31 (61.3)
Le ^y	37/44 (84.1)	23/31 (74.2)
CEA	37/44 (84.1)	22/31 (71.0)
CA19-9	41/44 (93.2)	23/31 (74.2)

^{a)} Number of cases examined.

^{b)} Cases belonging to A and AB.

^{c)} Cases belonging to B and AB.

^{d)} Cases belonging to A, B, AB, or 0.

Table 3. Expression of carbohydrate residues in cholangiocarcinoma

Antigen	Ratio (%) of carbohydrate residue-positive cases											
	Adenocarcinoma (71) ^a											Adenosquamous carcinoma (4)
	Well (21)			Moderate (26)			Poor (24)					
	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	
A	52.4	0	47.6	69.2	3.8	26.9	79.2	8.3	12.5	50	0	50
B	95.2	0	4.8	76.9	15.4	7.7	91.7	8.3	0	100	0	0
H	19.0	33.3	47.6	30.8	23.1	46.2	37.5	41.7	20.8	75	25	0
Le ^a	0	14.3	85.7	15.4	15.4	69.2	20.8	20.8	58.3	0	0	100
Le ^b	0	0	100	0	11.5	88.5	0	41.7	58.3	0	0	100
Le ^c	4.8	14.3	80.9	3.8	19.2	76.9	8.3	25.0	66.7	0	75	25
Le ^d	0	0	100	7.7	3.8	88.5	16.7	29.2	54.2	25	0	75
CA19-9	0	0	100	0	7.7	92.3	8.3	29.2	62.5	0	0	100
CEA	4.8	0	95.2	11.5	7.7	80.8	8.3	25.0	66.7	25	25	50

Well, well differentiated; Moderate, moderately differentiated; Poor, poorly differentiated.

-, negative; ±, weekly or only focally positive; +, positive.

^aNumber of cases examined.

Table 4. The number of cases of cholangiocarcinoma presenting individual immunostaining pattern of carbohydrate residues

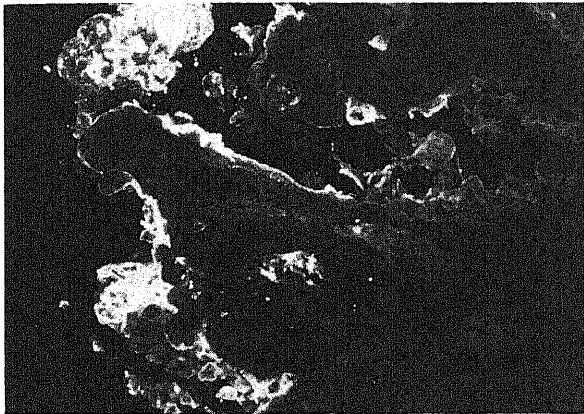
Antigen	Type of carcinoma	Number of cases	Number of cases showing				
			Sp	Ap	Mem	Diff	Stm
A	Well	10	2	7	0	1	0
	Mod	8	0	2	0	5	1
	Por	5	0	0	0	4	1
	Adsq	2	0	0	2	0	0
B	Well	1	0	1	0	0	0
	Mod	6	1	3	0	1	1
	Por	2	0	0	0	2	0
	Adsq	0	0	0	0	0	0
H	Well	17	11	5	0	1	0
	Mod	18	5	6	1	6	0
	Por	15	2	0	2	7	4
	Adsq	1	0	0	1	0	0
Le ^a	Well	21	3	11	0	7	0
	Mod	22	1	5	1	13	2
	Por	19	0	3	2	11	3
	Adsq	4	0	0	3	1	0
Le ^b	Well	21	4	1	0	16	0
	Mod	26	1	0	1	24	0
	Por	24	0	0	0	24	0
	Adsq	4	0	0	1	3	0
Le ^c	Well	20	7	10	0	3	0
	Mod	25	2	9	1	12	1
	Por	22	0	1	2	15	4
	Adsq	4	0	0	2	2	0
Le ^d	Well	21	9	8	0	4	0
	Mod	24	1	7	0	15	1
	Por	20	0	0	2	14	4
	Adsq	3	0	0	2	1	0
CA19-9	Well	21	3	14	0	4	0
	Mod	26	0	10	0	16	0
	Por	22	1	3	2	13	3
	Adsq	4	0	0	2	2	0
CEA	Well	20	0	15	3	2	0
	Mod	23	0	11	5	7	0
	Por	22	0	0	6	16	0
	Adsq	3	0	0	2	1	0

Well, well differentiated adenocarcinoma; Mod, moderately differentiated adenocarcinoma; Por, poorly differentiated adenocarcinoma; Adsq, adenosquamous carcinoma; Sp, supranuclear type; Ap, apical surface type; Mem, membrane type; Diff, diffuse cytoplasmic type; Stm, stromal type.

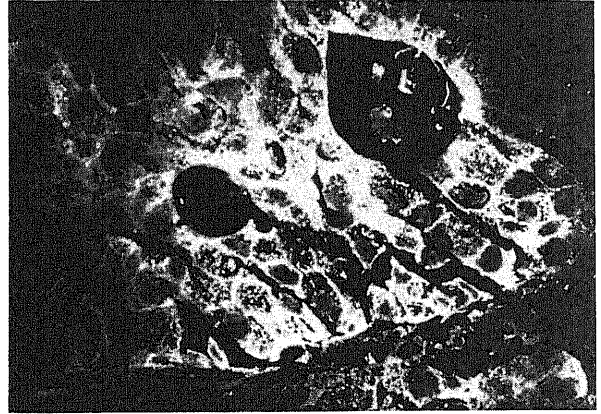
により、陰性部のバックグラウンドは減弱され、焦点部の細胞内糖鎖抗原陽性部は種々の角度より拡大観察され、より明瞭な局在が観察できた。

CCの同一症例内で、上述の種々の染色パターンが混在してみられたが、最も優勢な染色パターンを個々のCC例の染色パ

ターンとした。糖鎖抗原の発現パターンは、各々の抗原でやや異なっていたが、高分化型腺癌では、核上型と管腔型が多くみられ、低分化型腺癌や腺扁平上皮癌ではびまん型と膜型が多くみられ、中分化型では、管腔型とびまん型が主にみられた。なお、膜型は腺扁平上皮癌に多い傾向にあった(図3)。10例に間



A

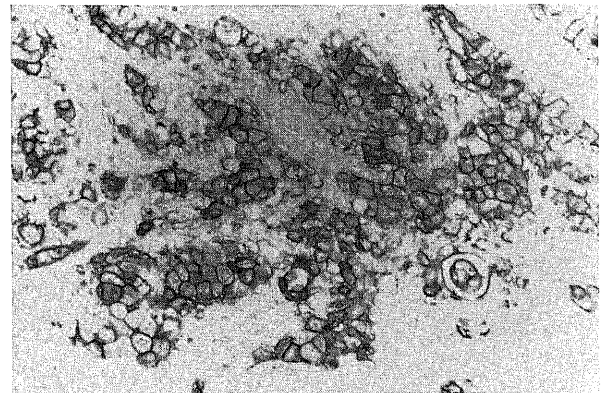


B

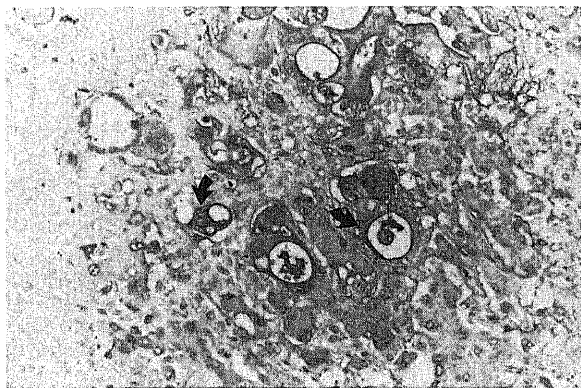
Fig. 2. Images of immunofluorescent stainings by confocal laser scanning microscopy. A: In the well differentiated papillary adenocarcinoma, blood group type A antigen is positive in the luminal surface of tumor cells (bright area). B: A antigen is a diffusely or membranously expressed in the poorly differentiated adenocarcinoma.



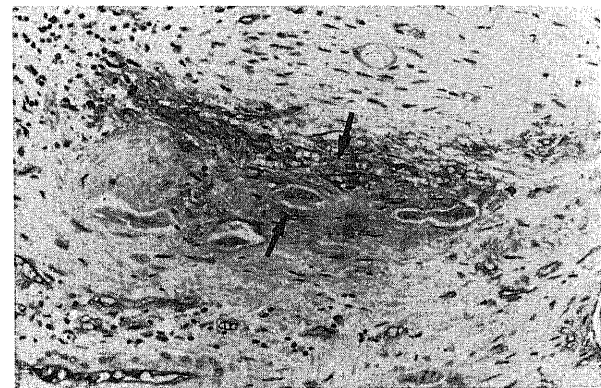
A



C



B



D

Fig. 3. Immunohistochemical staining of carbohydrate residues in cholangiocarcinoma. A: In well differentiated adenocarcinoma, carbohydrate antigen (Lewis^y) is expressed in the supranuclear cytoplasm (arrows). B: In the poorly differentiated adenocarcinoma, carbohydrate antigen (Blood group type A antigen) is stained diffusely in the cytoplasm (arrows). C: Membrane type expression of carbohydrate residues (Lewis^x) is seen in the adenosquamous carcinoma. D: Stromal type staining is recognized in poorly differentiated adenocarcinoma (arrows). (Immunostainings, ABC method, original magnification $\times 200$)

質型がみられ、そのうち4例は中分化型腺癌で、6例が低分化型腺癌であった(図3, 表4)。

4. 同一症例内の異なる部位での糖鎖抗原の発現

CC 10例を用いて、同一例で組織学的に異なる分化度内での、上記の核糖鎖抗原の発現様式を検討した。その結果、同一症例内でも、組織学的に分化度の異なる部位では、異なる糖鎖発現様式がみられた(表5)。

II. 細胞動態学的解析

1. AgNOR 数(図4)

非癌部胆管上皮20例での平均 AgNOR 数 1.89 ± 0.15 と

$1.61 - 2.10$ (平均値±標準偏差と範囲) に比べ、CC 48例での癌部での AgNOR 数は 3.45 ± 0.93 と $1.91 - 5.01$ で高値であった ($p < 0.01$)。また、癌細胞では非癌部胆管上皮に比べ不整形を示すドットの増加がみられた。腺癌の分化度による検討では、高分化型で 2.22 ± 0.21 、中分化型で 3.66 ± 0.85 、低分化型で 4.17 ± 0.49 であり、AgNOR 数は分化度の低下に従い増加した ($p < 0.01$)。腺扁平上皮癌では低分化腺癌とはほぼ同様の AgNOR 数を示した。なお、肝門型と末梢型との間で AgNOR 数に差はなかった(表6)。他臓器への転移、リンパ節転移の有無や程度と AgNOR 数との間に関連性はなかった(表7)。

Table 5. Expression pattern of carbohydrate residues in the different parts (well differentiated vs poorly differentiated) of the same case of 10 cases of cholangiocarcinoma

Case number	A		B		H		Le ^a		Le ^b		Le ^c		Le ^d		CA19-9		CEA	
	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P
1	Ap	St	—	—	—	—	Sp	—	D	D	Sp	St	Sp	St	Ap	St	D	St
2	—	—	—	—	Ap	D	D	D	Ap	D	Ap	M	D	D	Ap	D	Ap	D
4	—	—	—	—	Ap	St	Ap	St	D	D	Ap	St	Ap	M	Ap	St	Ap	M
9	Ap	—	—	—	—	—	Ap	St	Ap	D	Ap	D	Ap	St	Ap	—	Ap	—
19	—	—	—	—	—	—	D	D	Ap	D	Ap	—	Sp	D	Ap	D	Ap	D
23	—	—	—	—	Sp	St	Ap	M	Sp	D	Sp	D	Ap	D	Ap	D	Ap	D
27	Sp	D	—	—	Sp	Sp	Sp	D	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	St	Sp	St
37	Sp	M	Sp	D	Sp	Sp	Ap	M	Ap	D	Ap	D	Ap	M	Ap	D	Ap	M
49	—	—	Ap	D	Ap	St	D	St	D	D	D	D	D	D	D	D	Ap	D
72	—	—	—	—	—	—	—	—	D	—	M	D	D	D	Ap	D	M	D

W, more differentiated area; P, less differentiated area; —, negative; Ap, apical type; M, membrane type; D, diffuse type; St, stromal type.

In oblique styles are cases which show same staining pattern both in W and P.

Table 6. AgNORs number, PCNA labeling index, DNA index, and ploidy pattern in hilar and peripheral type of cholangiocarcinoma (CC)

Location & material of CC	AgNOR (mean ± SD)	PCNA LI (mean ± SD)	DI (mean ± SD)	Ploidy	
				Diploid	Aneuploid
Hilar type	3.34 ± 0.94 (24) ^a	19.9 ± 6.58 (9)	1.48 ± 0.36 (16)	4(25%)	12(75%)
Surgical	(3.64) (1)	(0)	(1.95) (1)	0	1
Autopsy	(3.28 ± 0.92) (23) *	(19.9 ± 6.58) (9) *	(1.45 ± 0.36) (15) *	4	11
Peripheral type	3.73 ± 0.82 (24)	25.1 ± 4.40 (13)	1.45 ± 0.40 (13)	2(15.4%)	11(84.6%)
Surgical	(3.14 ± 0.70) (7)	(23.6 ± 2.33) (5)	(1.34 ± 0.37) (3)	1	2
Autopsy	(3.78 ± 0.94) (17)	(26.0 ± 5.09) (8)	(1.55 ± 0.39) (10)	1	9

Surgical, surgical cases; Autopsy, autopsy cases.

^aNumber of cases examined.

*, statistically not significant.

Table 7. Relationship of AgNORs number, PCNA labeling index, DNA index, and ploidy pattern of cholangiocarcinoma to extrahepatic metastasis (autopsy cases)

Status of metastasis	AgNOR (mean ± SD)	PCNA LI (mean ± SD)	DI (mean ± SD)	Ploidy	
				Diploidy	Aneuploidy
Distant organ metastasis (—)	3.83 ± 0.76 (7) ^a	26.8 ± 0.8 (2)	1.34 ± 0.31 (7)	2 (28.6%)	5 (71.4%)
Distant organ metastasis (+)	3.61 ± 1.00 (26)	22.2 ± 6.92 (15)	1.62 ± 0.35 (16)	1 (6.3%)	15 (93.7%)
Regional lymph node metastasis (—)	3.23 ± 0.82 (8)	22.0 ± 5.82 (4)	1.08 ± 0.09 (4)	2 (50%)	5 (50.0%)
Regional lymph node metastasis (+)	3.79 ± 0.95 (25)	23.0 ± 6.89 (13)	1.63 ± 0.33 (19) ^b	1 (5.3%)	18 (94.7%)

(+), positive; (—), negative.

^aNumber of cases examined.

2. PCNA LI

腺癌では、高分化型で 10.8 ± 2.14 , 中分化型で 24.0 ± 2.35 , 低分化型で 26.0 ± 4.89 で、高分化型に較べ中分化型, 低分化型で PCNA LI が高値であった ($p < 0.01$). 肝門型 CC と末梢型 CC との間には PCNA LI 値に差はなかった (表 6). 他臓器へ

の転移, リンパ節転移の有無や程度と PCNA LI との間に関連性はなかった (表 7).

3. FCM による核 DNA 量の検討

29例中23例のプロイディパターンは異数倍体 (79.3%) で, 残りの 6例が 2倍体 (20.7%) であった. 組織学的分化度との関連性では, 高分化型の 4例 (66.7%) が 2倍体, 2例 (33.3%) が異数倍体, 中分化型の 2例 (15.4%) が 2倍体, 11例 (84.6%) が異数倍体, 低分化型腺癌では 9例全例が異数倍体を示した. 高分化型に較べ, 中分化型, 低分化型で異数倍体の占める割合が多かった ($p < 0.05$). 肝門型 CC と末梢型 CC との間でプロイディパターンの割合に差はなかった (表 6). 他臓器転移およびリンパ節転移との間には有意な関連性はなかったが, 転移例で異数倍体の占める割合が高くなる傾向があった (表 7).

次に, DNA 指数を検討した. CC 全体では 1.47 ± 0.38 と $1-2.25$ (平均値 \pm 標準偏差と範囲) であり, 分化度別では, 高分化型 6例では 1.25 ± 0.37 , 中分化型 13例では 1.38 ± 0.32 , 低分化型 9例では 1.79 ± 0.32 で, 腺癌の分化度の低下と共に, DNA 指数は高値となったが, 有意差はなかった. なお, 腺扁平上皮癌では 1.55 であった. 肝門型 CC と末梢型 CC の間に DNA 指数に有意な差はなかった (表 6). リンパ節転移陽性症例は, 同陰性例に比し, DNA 指数が高値を示し ($p < 0.01$), 臓器転移例でも同様の傾向を認めたが, 有意差はなかった ($0.05 < p < 0.10$) (表 7).

4. 同一症例の CC 内 2ヶ所での細胞動態的指標

AgNOR 数は分化度の低い部分で高値を示した (例えば高分化部, 2.28 ± 1.14 ; 低分化部, 3.84 ± 1.40) (表 8). CC 14例の内 11例で同様のプロイディパターンを示した. 内, 1例が 2倍体であり, 10例が異数倍体であった. 3例 (27%) で各々のプロイディパターンは異なっていた.

5. 同一症例, 同一部位での各々の CC での細胞動態指標間の関連性

AgNOR 数と PCNA LI とは正の相関を示した ($r = 0.795$, $p < 0.01$). AgNOR と PCNA の二重染色では AgNOR 数は

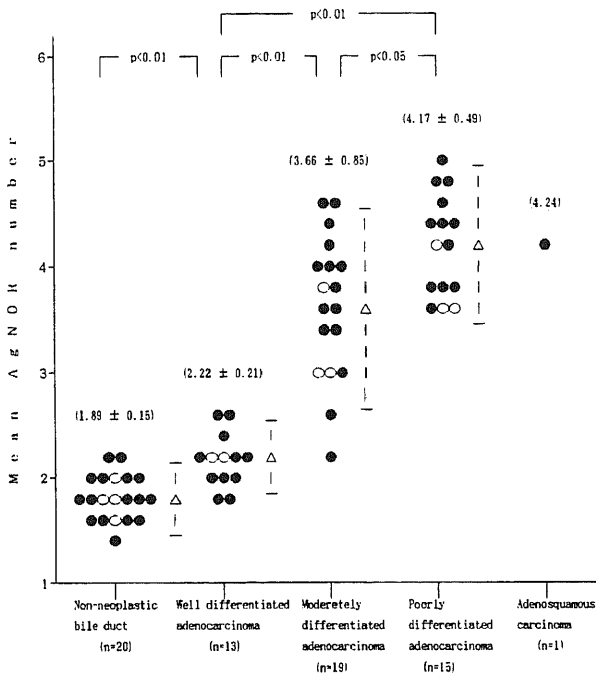


Fig. 4. Scattergram of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) numbers of nonneoplastic bile ducts and cholangiocarcinoma. There is step-wise increase of the number in the well, moderately and poorly differentiated adenocarcinoma, when tested by Spearman's rank correlation coefficient test, and also student's t-test. ●, autopsy cases; ○, surgical cases; (), mean \pm SD; △, mean; I, \pm SD.

Table 8. Comparison of AgNOR numbers in different two cancerous parts, well differentiated area and poorly differentiated area, in 14 cases of cholangiocarcinoma

Case number	AgNOR number (mean \pm SD) in		Statistic
	Well differentiated area	Poorly differentiated area	
2	2.92 \pm 1.37	3.85 \pm 1.68	p < 0.01
9	2.01 \pm 1.02	3.92 \pm 1.68	p < 0.01
13	2.58 \pm 1.04	3.18 \pm 1.29	p < 0.01
14	2.08 \pm 1.16	4.73 \pm 1.45	p < 0.01
19	3.42 \pm 1.41	4.51 \pm 1.57	p < 0.01
23	2.61 \pm 1.08	3.59 \pm 1.50	p < 0.01
24	1.87 \pm 0.86	2.90 \pm 1.17	p < 0.01
35	1.82 \pm 0.93	2.47 \pm 1.41	p < 0.01
39	2.95 \pm 1.76	4.86 \pm 1.88	p < 0.01
55	2.28 \pm 1.14	3.84 \pm 1.40	p < 0.01
57	2.57 \pm 0.83	2.86 \pm 1.04	p < 0.05
58	2.55 \pm 1.11	3.65 \pm 1.43	p < 0.05
59	2.23 \pm 0.91	3.73 \pm 1.33	p < 0.01
65	2.39 \pm 0.92	3.71 \pm 1.20	p < 0.01

PCNA 陽性細胞で陰性細胞より有意に高値を示した ($p < 0.01$) (表 9). また, AgNOR 数と核 DNA 量との間では, AgNOR 数は異数倍体 (23例, 3.99 ± 0.73) で 2倍体 (6例, 2.65 ± 0.49) よりも有意に高値を示した ($p < 0.01$) (図 5). AgNOR 数と DNA 指数との間には有意な相関がみられなかったが, DNA 指数が高い症例では, AgNOR 数が高値を示す傾向があった.

Ⅲ. 糖鎖抗原の発現と細胞動態の関連性の検討

1. PCNA と糖鎖抗原の二重染色

表10に示す如く, A 型物質, CA19-9 陽性細胞中の PCNA LI は CC 全体での PCNA LI とほぼ同じであった. 一方, CEA と Le^a では, 両者の間に負の相関の関係がみられた.

PCNA の発現は主に胞巣辺縁部の癌細胞にみられたのに対し, CEA, Le^a の発現は主に胞巣内部でみられる傾向があり, CEA あるいは Le^a 陽性細胞中の PCNA LI は腫瘍全体の PCNA LI に較べて有意に少なかった ($p < 0.01$) (図 6).

2. 株化培養細胞 CCKS1 を用いた検討

1) 蛍光抗体法

定常期での癌細胞は, 比較的小型で単層性に密に増殖しており, 対数増殖期では, 癌細胞は島状をなして増殖しており, 多角形で核の大小不同を伴ってみられた. 蛍光抗体法では, CA19-9 WGA, ConA は, 定常期, 対数増殖期のいずれにおいてもびまん性陽性像を示した. 定常期と対数増殖期において陽

Table 9. Comparison of AgNOR numbers between PCNA-positive carcinoma cells and PCNA-negative carcinoma cells in 7 cases of cholangiocarcinoma

Case number	AgNOR number (mean \pm SD) in		Statistic
	PCNA-positive cells	PCNA-negative cells	
3	3.34 ± 1.24	2.37 ± 1.11	$p < 0.01$
10	3.26 ± 1.23	2.66 ± 1.24	$p < 0.01$
21	3.33 ± 1.26	2.82 ± 1.56	$p < 0.02$
26	2.91 ± 0.79	1.99 ± 0.88	$p < 0.01$
32	3.40 ± 1.04	2.29 ± 1.19	$p < 0.01$
33	3.16 ± 1.01	2.41 ± 0.99	$p < 0.01$
41	3.54 ± 1.31	2.25 ± 1.05	$p < 0.01$

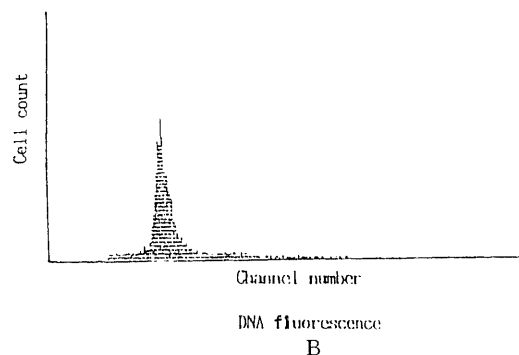
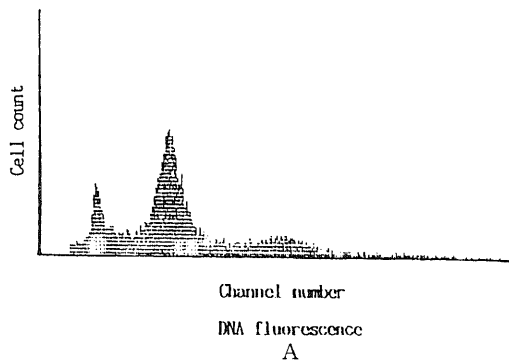
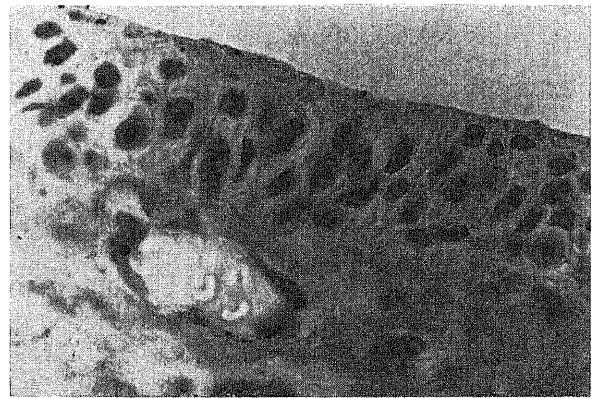
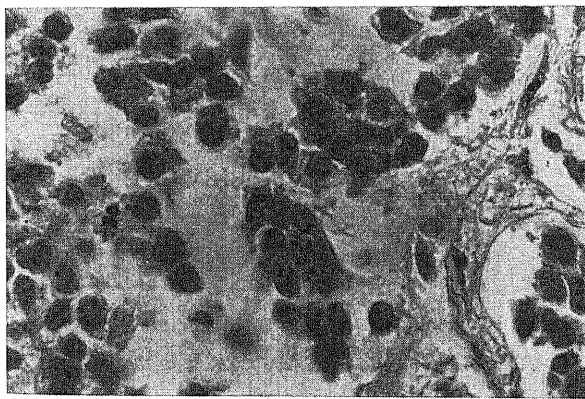


Fig. 5. AgNOR stainings and DNA histograms of cholangiocarcinoma (CC). A: AgNOR staining and DNA histogram of poorly differentiated adenocarcinoma. AgNOR increases in cancerous cells (mean AgNORs number of this region is 4.51 ± 1.72), and DNA histogram of this case shows aneuploidy (DI=1.97). (argyrophilic staining for nucleolar organizer regions, original magnification $\times 400$) B: AgNOR staining and DNA histogram of well differentiated adenocarcinoma. AgNOR staining shows a few dark stained dots in each cancerous cell (mean AgNOR number in this region is 2.21 ± 1.22), and DNA histogram of this case shows diploidy (DI=1.0). (argyrophilic staining for nucleolar organizer regions, original magnification $\times 400$)

性細胞の分布や細胞形態による蛍光強度の差はみられなかった。

2) FCM による検討

定常期細胞における CA19-9 の発現量を、FCM を用いて検討したヒストグラムを図 7A に示す。核 DNA 量の解析では定常期細胞の多くは G₀G₁ 期にあり、S 期細胞は殆どみられなかった(図 7A 左)。核 DNA 量、細胞のサイズと CA19-9 量の両パラメーターによるヒストグラム(図 7A 中央、右)では、CA19-9 量と細胞周期や細胞のサイズとの間に明瞭な相関関係はみられなかった。増殖期での核 DNA 量解析では、定常期に殆どみられなかった S 期細胞が増加しており、細胞集団全体の増殖活性が高いことが示された(図 7B 左)。核 DNA 量、細胞のサイズと CA19-9 量の両パラメーターによるヒストグラム(図 7B 中央、右)では増殖期においても CA19-9 量と細胞周期や細胞のサイズとの間に明瞭な相関関係は認められなかった。また、定常期と対数増殖期で緑色蛍光の強度つまり CA19-9 発現量に明確な差はなかった。レクチンによる糖鎖発現の検討では、定常期における WGA の結合量、すなわち WGA レセプター量を示すヒストグラム(図 7C 右)で、WGA レセプター量と細胞のサイズに直線的な相関関係がみられた。しかし、WGA レセプター量と核 DNA 量との間には直線的な相関はみ

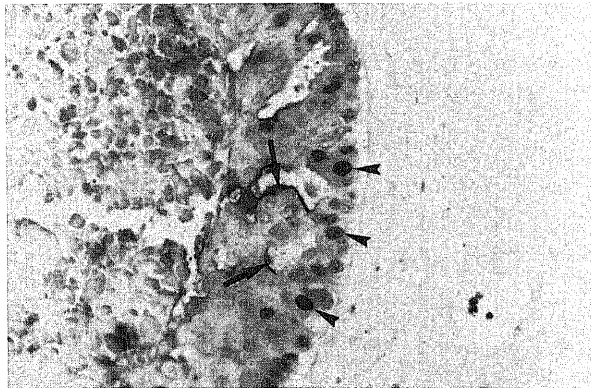


Fig. 6. Double immunostaining of PCNA and Lewis^x. PCNA is positive in the nuclei of cholangiocarcinoma cells (arrow heads), while Lewis^x is stained mostly PCNA negative cells (arrows). (Immunostaining, PAP and ABC method, original magnification ×320)

られなかった(図 7C 中央)。対数増殖期での WGA レセプター量のヒストグラム(図 7D)では、対数増殖期で増加している S 期細胞でも、同様に WGA レセプターと細胞のサイズに正の相関関係がみられた(図 7D 右)。ConA は主に細胞質内に陽性を示したが、FCM では WGA とほぼ同様の結果が得られ、レクチンレセプター量は細胞の大きさに依存し、細胞周期や増殖活性との関係が少ないことが示唆された。

考 察

血液型物質を含む糖鎖は、正常の体内で特徴的な分布と局在を示し、発生、癌化あるいは壊死炎症の過程でその発現パターンが変化することが知られている^{51,52,55-57}。また、これらの糖鎖抗原は臓器特異的な発現パターンを示し、個体間による違いも知られている。例えば、腸管では Cooper ら⁵⁸によれば、ABH 型物質と Le^b は正常成人の遠位大腸粘膜には発現されないが近位大腸に発現されるとし、Le^a とシアリル Le^a に関しては、成熟大腸上皮においては発現され、幼若な大腸上皮には発現しない。しかし Le^a は逆に、幼若な大腸上皮に強く発現される。一方、腫瘍化に際し、大腸癌や大腸腺腫では近位と遠位に関係なく ABH 型物質と Le^a が発現するとしている。また、胃では、Hirohashi ら⁵⁹によれば、正常胃粘膜には ABH 型物質の発現はあるが、腫瘍化と共に、これらの発現パターンが大きく変動するとしている。また、Le^a とシアリル Le^a (CA19-9) は分泌型患者の腸上皮化生部に選択的に発現することを見出している。

本研究では、まず、ヒト CC での糖鎖抗原の発現を、CC の肉眼および組織病理像と対比した。なお、非癌部肝内胆管上皮においては、ABH 型物質は主に大型胆管に発現を示し、小型の小葉間胆管や細胆管では発現されないという特徴的なパターンがみられ、Le^a、Le^b、Le^x、CA19-9 は大型肝内胆管から細胆管にいたる全てのレベルの胆管上皮に陽性であった。Le^x は、一部の付属腺と過形成性の胆管上皮以外は陰性であり、CEA はすべての非癌部胆管上皮に陰性であった。

さて、CC では血液型抗原が種々の頻度に発現しており、いくつかの点が明らかとなった。まず第 1 に、CC の肝内での解剖学的な局在(多くは発生部位を反映しており、肝門型と末梢型の 2 型に分類される^{41,60})と血液型関連糖鎖抗原の発現との関係に関して、末梢型より肝門型で糖鎖抗原がより発現される傾

Table 10. PCNA LI and expression of carbohydrate antigens in cholangiocarcinoma

Antigens	Number of cases examined	LI (carbohydrate antigen positive cells) (mean ± SD)	LI (tumor as a whole) (mean ± SD)
A	5	28.1±11.3	31.4±3.4
CA19-9	5	25.2±12.8	26.4±5.3
CEA	5	3.6±2.5	34.1±7.4
Lewis ^x	5	4.5±3.7	32.5±5.3

LI (carbohydrate antigen positive cells), PCNA labeling index in cells expressing each carbohydrate antigen; LI (tumor as a whole), PCNA labeling index of the cholangiocarcinoma as a whole.

*, statistically not different.

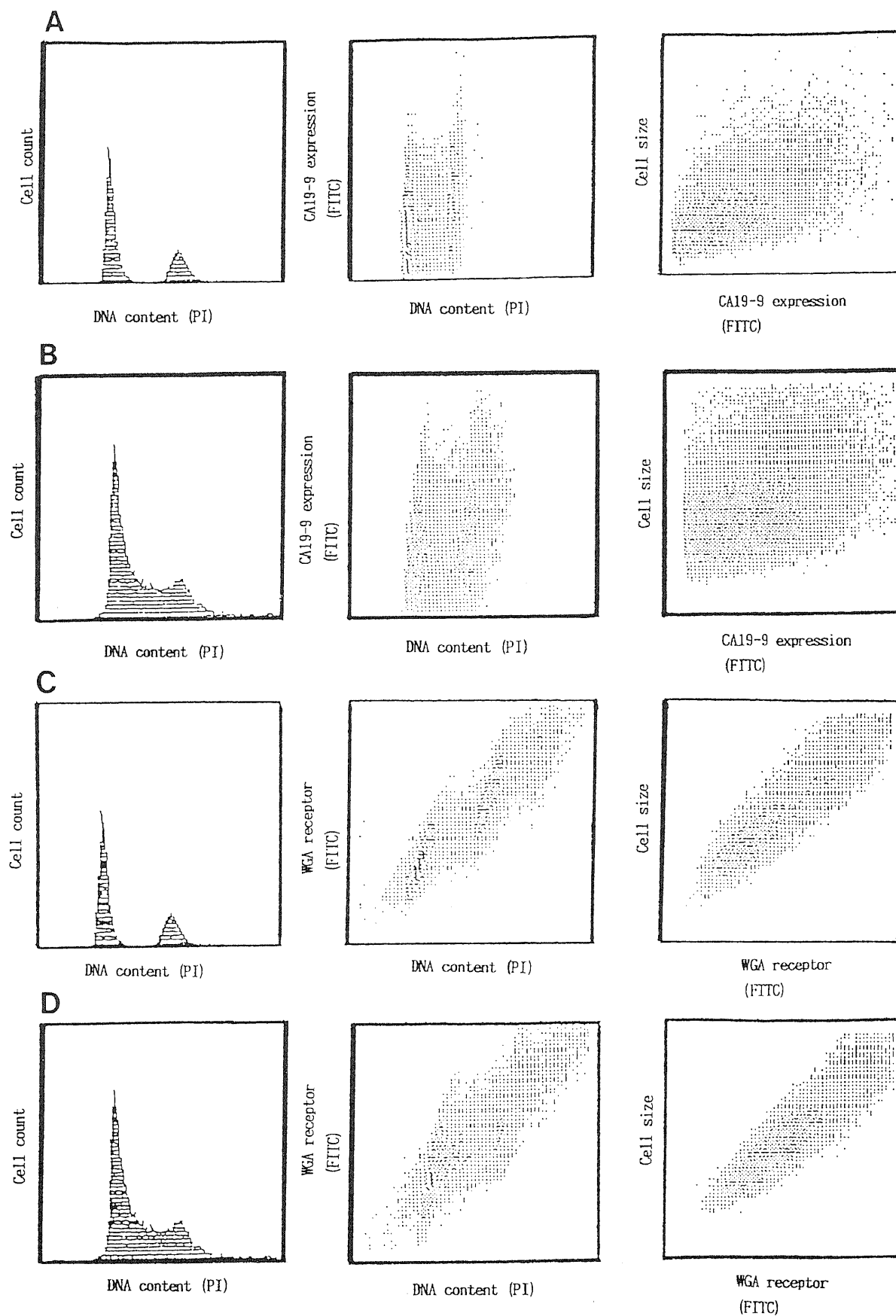


Fig. 7. Histograms of DNA analysis and carbohydrate residues' expression both in stationary phase and proliferative phase of cultured CC cell line (CCKS1). A: DNA content and CA19-9 expression in stationary phase. B: DNA content and CA19-9 expression in proliferative phase. C: DNA content and WGA receptor expression in stationary phase. D: DNA content and WGA receptor expression in proliferative phase.

向にあった。統計学的な有意差はみられなかったが、上述の如く、非癌部胆管での血液型関連糖鎖の分布パターンを参考にすると、肝門型で A, B 型物質が高率に発現していたのは、CC における糖鎖抗原の発現は、発生母地の性格を反映するのかもしれない。しかし、統計学的に有意ではなく、肝門型の CC でも肝門部に近い部の小型胆管から発生する可能性があるし、末梢型の胆管でも血液型関連糖鎖抗原が陽性である比較的太い隔壁胆管から CC が発生する可能性もある。

次に、CC の分化度と糖鎖抗原の発現との間には明らかな関連がみられた。つまり、CC の分化度が低下すればするほど、血液型関連抗原の発現は低下し、特に A 型抗原、Le^b, Le^x, CA19-9 では有意であった。他の臓器、特に膀胱癌でも類似の現象が指摘されており⁶⁵⁾、上皮系悪性腫瘍に共通した現象かも知れない。なお、他の臓器では、患者の血液型と異なる血液型抗原の発現が癌でみられており、悪性度が高いとする報告もあるが⁶¹⁾、このような現象は CC で認められなかった。また、CEA と Le^a は、非癌部の胆管系では殆ど発現はなかったが、癌部に発現がみられ低分化癌でも比較的高率に発現していた。この現象は、上述の ABH 型物質や Le^{a,b,x}, CA19-9 とは逆の発現パターンを示している。Nakamori ら⁶²⁾はシアリル Le^a の発現の増加は、大腸癌の臨床病理学的病期に関連し、高頻度の再発と、予後の悪さと関連したと報告しているが、CC でも類似のプロセスが想定される。糖鎖発現の頻度そのものに加え、腫瘍細胞内での局在も腫瘍の分化度に有意の関連性を示した。すなわち高分化癌では、糖鎖の発現は核上型あるいは管腔型を示し、低分化癌では、膜型やびまん型、あるいは間質型が増加した。このような糖鎖発現の極性の変化は腫瘍の組織学的分化度に深く関連して生ずると考えられ、このような極性の変化は他の腫瘍でも報告されている⁶³⁾。組織型および糖鎖発現の局在あるいは極性の変化は腫瘍細胞の生物学的特性そのもの（細胞内小器官の変化、あるいはある種の癌遺伝子産物による異所性の糖の転移、腫瘍による異常な糖分解酵素産生など^{64,65)}）に関連していると思われる。しかし、さらに未知の因子などによる可能性も考えられる。なお、共焦点レーザー顕微鏡は、これら糖鎖の細胞内局在を明確に示したが、診断そのものには有用でなかった。

なお、CC 10例を用い、同一例の異なる部位で、糖鎖の発現パターンを検討したところ、CC の個人に関係し、組織学的分化度に相関した。このことは、糖鎖の発現そのものが遺伝的に決定されたものではなく、むしろ組織像に依存していることを示すものとして興味深い。

近年、細胞動態に関する研究手法の開発に伴い、腫瘍の細胞動態、生物学的特性、臨床病理的特徴と予後の推定などについて多くの知見が得られつつある^{23)24)~33)66)~68)}。例えば、乳癌、肺癌、大腸癌などでは悪性度の高いものほど AgNOR 数、PCNA 陽性率が高く、乳癌、胃癌、大腸癌などでは進展した癌や転移例で DNA 異数倍体が多いという報告がある^{23)24)~33)66)~68)}が、腫瘍によって、また発生する臓器によって一致していない。また逆に、最近の報告ではこれらの細胞動態の指標、特に PCNA の陽性像に関しては、その有用性を疑問視する報告もある⁶⁹⁾。しかし、CC に関するこれら細胞動態学的研究、特に FCM を用いた研究は殆どされていない¹⁹⁾²²⁾。本研究は、ヒトの剖検材料と手術材料の CC を対象とし、CC の細胞動態学的指標と臨床病理学的特徴との関連性を検討したものであり、この

ような試みはいままでなされていない。

本研究ではまず第 1 に、細胞動態を示す各指標間の検討を行った。その結果、CC では PCNA LI と AgNOR とは正の相関関係を示すことが明らかになった。PCNA と AgNOR の二重染色による結果は、この関係を支持するものである。この所見は、最近、Harrison らの報告⁶⁹⁾、つまり肝では癌の転移や炎症で肝細胞の PCNA 発現率と増殖とは関係ないが、胆管ではこの関連性があると報告していることと一致する。DNA 異数倍体は 2 倍体に較べ有意に高い AgNOR 数を示した。乳癌でも Giri ら²³⁾により同様の結果が報告されている。しかし、今津ら⁷⁰⁾は DNA プロイディパターンと AgNOR 数とは相関を示さないと報告もしており、種々の細胞動態指標間での関連性は腫瘍の発生臓器により異なるのかもしれない。また、CC の組織学的分化度の低下に伴い、AgNOR 数が増加しており、PCNA LI の結果もほぼ同様の傾向がみられた。これらの所見は CC の組織学的分化度が、CC の増殖能に関係することを示唆する。また、FCM による解析では CC の多数が異数倍体であったが、とくに組織学的分化度が低下するにつれ異数倍体を示す例が増加し、DNA 指数も高値を示す傾向があった。従って、CC に関しては高分化型腺癌は細胞増殖能が低く、核 DNA 量も 2 倍体が多く、一方、中分化型、低分化型腺癌では細胞増殖能が高く、核 DNA 量も異数倍体が多いことが明らかになった。なお、腺扁平上皮癌の 1 例は (AgNOR 数が 4.24 と高値で、DNA 指数が 1.55 の異数倍体を示し)、低分化型腺癌と同様の増殖能を示した。

次いで、細胞動態的検索と悪性腫瘍の特徴の一つである転移との関連性を検討した。他臓器に発生する腫瘍（大腸癌、胃癌など）では転移例で核 DNA 量の多いことがよく知られており⁶⁷⁾⁶⁸⁾、特に異数倍体を示す悪性腫瘍が転移頻度が高いとされている⁶⁷⁾。本研究ではリンパ節転移のある CC で DNA 指数が高く、また異数倍体の占める割合が多かった。また、臓器転移でも同様の傾向が認められた。しかし、PCNA LI や AgNOR 数と転移との間に明確な関連性は得られなかった。これらの結果より、CC の転移能の指標として、現時点では、核 DNA 量の検索が最も重要と結論された。

腫瘍が進展すると、組織学的にも生物学的にも腫瘍に不均質性 (heterogeneity) の出現することは広く知られている⁷¹⁾⁷²⁾。この不均質性について細胞動態学の観点から CC について検出したところ、同一腫瘍でも異なる部位では異なる AgNOR 数、PCNA LI、プロイディパターンを示す例があり、異なるクローンの存在が示唆された。つまり、組織像のみならず、増殖活性やプロイディパターンにおいても不均質性の存在することが示唆された。

なお、他臓器の腫瘍では発生部位の違いによる腫瘍の細胞動態の差異が報告されている⁷³⁾が、CC の肝門型と末梢型間での細胞動態差異に関しては、現在までの所そのような検索はなされていない。本研究では AgNOR 数、PCNA LI、核 DNA 量のいずれも肝門型と末梢型で明らかな差異がみられなかった。しかし、今回検討した CC は剖検例あるいは外科的切除例であり、いずれも進展した例が多く、腫瘍発生初期の段階の症例を用い細胞動態学的研究を行うことが必要であり、そのことにより発癌と細胞動態との関連性がさらに明らかになるとと思われる。

最後に、CC での糖鎖抗原の発現と細胞動態の関連では、ヒ

ト CC 組織切辺を用いた免疫二重染色による検討で、CEA と Le^s の発現は PCNA の発現と負の相関を示した。今回検討した症例では、PCNA の発現が主に胞巣辺縁部の癌細胞にみられたのに対し、CEA、Le^s の発現は主に胞巣内部でみられる傾向があったので、腫瘍全体の PCNA LI に比し、糖鎖抗原の発現のある細胞の PCNA LI が低くなったと考えられる。なお、A 型物質と CA19-9 の発現は PCNA の陽性率とは関連が認められなかった。

次に、株化されたヒト CC (CCKS1) を用い、細胞集団の増殖性および細胞動態と糖鎖 (抗原) の発現様式との関連性を検討した。このような研究は膀胱癌、肺癌などでは報告があるが⁷⁴⁻⁷⁶⁾、CC では最初の培養実験系での基礎的研究と思われる。その結果、以下の二つの所見が得られた。一つは、蛍光染色法において定常期、対数増殖期細胞共に CA19-9、レクチン (WGA, ConA) が細胞集団全体にびまん性に陽性を示し、陽性細胞の分布や形態的な違いによる蛍光強度の差は認められなかった。二つ目は、FCM による検討で、対数増殖期では S 期細胞の増加がみられ細胞集団の増殖能が高いことが示されたが、定常期と対数増殖期で、各抗原の発現量に有意差はみられなかった。また、各抗原の発現量と核 DNA 量すなわち細胞周期との間に明瞭な相関関係はみられなかったが、レクチンレセプターの発現量は細胞のサイズと正の相関関係が認められた。PCNA との二重染色の結果および培養株を用いた検討より、CC では、一部の糖鎖は細胞周期に依存する可能性があるが、多くの糖鎖の発現は細胞周期に依存しない可能性が示唆された。一方、膀胱癌実験系で、レクチンレセプターの発現量と細胞のサイズの相関が報告されており⁷⁶⁾、今回の実験結果に一致するものと考えられる。組織学的に腫瘍内にみられた糖鎖抗原発現の不均質性はクロナルな変化、周囲の環境への反応による変化、あるいは癌の浸潤に関連した変化などの可能性が考えられた。

今回は剖検例や外科的切除例などの進展した CC を対象としたが、今後は針生検など小さな肝生検材料においても、糖鎖抗原の発現や細胞動態と形態との関連の検討が必要と思われる。そして、これらの指標と個々の症例の予後との関連性を検討し、最終的には治療の選択を決定する上で有用な指標となるかどうかを検討する必要性があると考えられた。

結 論

CC の剖検、外科材料および培養細胞株を用い、糖鎖抗原の発現および細胞動態学的指標と臨床病理学的特徴との関連性を検討し、以下の結論を得た。

1. CC での糖鎖抗原の発現は、末梢型に較べ肝門型にやや多く発現がみられる傾向があった。細胞動態学的には肝門型と末梢型との間に差はなかった。
2. CC における糖鎖抗原の発現率は腫瘍の分化度と関連し、低分化癌で発現率が低下する傾向があった。また、糖鎖抗原発現の腫瘍細胞内での局在も変化し、分化度が低下するに従って極性の消失がみられた。これらの所見は共焦点レーザー顕微鏡でも確認された。なお、CC では患者の血液型と異なるフェノタイプの発現はみられなかった。
3. 細胞動態学的解析で、組織学的分化度の低下に伴い AgNOR 数、PCNA LI が増加し、核 DNA 量も異数倍体も多かった。従って、組織学的分化度が CC の増殖能に関連するこ

とが示唆された。

4. 剖検例で検索した転移との関連では、リンパ節転移例の CC で DNA 指数が高く異数倍体の占める割合が多かった。

5. CC においては糖鎖抗原の発現においても細胞動態学的にも一部の症例で腫瘍内に不均質性が認められた。

6. PCNA と糖鎖抗原の二重染色では、PCNA LI と CEA あるいは Le^s の発現が負の相関を示し、細胞動態との関連性が示唆された。

7. 培養株での蛍光抗体法と FCM による検討で、定常期と対数増殖期で、CA19-9、レクチン (WGA, ConA) レセプターの発現量に有意差はみられなかった。また、レクチンレセプターの発現量は細胞のサイズと正の相関関係が認められたが、CA19-9、レクチンレセプターの発現量と核 DNA 量すなわち細胞周期との間に明瞭な相関関係はみられなかった。

謝 辞

稿を終えるに当たり、終始、御指導と御校閲を賜りました中沼安二教授に深謝の意を表します。また、御教示、御鞭撻を頂きました寺田忠史助教授、齋藤勝彦講師をはじめ第二病理学教室の教室員の皆様方に厚く御礼申し上げます。さらに、材料、器具を快く提供、貸与して頂いた、金沢大学医学部附属病院、石川県立中央病院、福井県立病院、富山市民病院、加賀中央病院の病理部、およびオリパス社の皆様方に心より感謝いたします。なお、本論文の一部の要旨は第26回日本肝臓学会西部会 (1991年、富山)、第28回日本肝臓学会総会 (1992年、東京)、第81回日本病理学会総会 (1992年、仙台)、第3回日本サイトメトリー学会総会 (1993年、東京) で発表した。

文 献

- 1) Gibson, J. B. & Sobin L. H.: Histological Typing of Tumors of the Liver, Biliary Tract and Pancreas. International Histological Classification of Tumors, 1st ed., p19-25, World Health Organization, Genova, 1978.
- 2) Nakanuma, Y., Kida, T., Minato, H. & Terada, T.: Pathology of cholangiocellular carcinoma. In T. Tobe, M. Okudaira, M. Ohto, Y. Endo, M. Mito, E. Okamoto, K. Tanikawa & M. Kojiro (eds.), Primary Liver Cancer in Japan, 1st ed., p39-50, Springer-verlag, Tokyo, 1992.
- 3) The Liver Cancer Study Group of Japan: Primary liver cancer in Japan. Ann. Surg., 211, 277-287 (1990).
- 4) Limas, C. & Lang, O.: A, B, H antigen detectability in normal and neoplastic urothelium. A study of the mechanisms involved. Cancer, 46, 1366-1373 (1980).
- 5) Coon, J. S. & Weinstein, R. S.: Blood group-related antigens as markers of malignant potential and heterogeneity in human carcinomas. Hum. Pathol., 17, 1089-1106 (1986).
- 6) Lee, J. S., Ro, J. Y., Sahin, A. A., Hong, W. K., Brown, B. W., Mountain, C. F. & Hittelman, W. N.: Expression of blood-group antigen A-A favorable prognostic factor in nonsmall cell lung cancer. N. Eng. J. Med., 324, 1084-1090 (1991).
- 7) Schoentag, R., Williams, V. & Kuhns, S.: The distribution blood group substance H and CEA in colorectal carcinoma. Cancer, 53, 503-509 (1984).
- 8) Davidshon, I., Kovarik, S. & Ni, L. Y.: Isoantigens A, B and H in benign and malignant lesions of the cervix. Arch. Pathol., 87, 306-394 (1969).

- 9) Dabelsteen, E. & Pindborg, J. J.: Loss of epithelial blood group substance A in oral carcinomas. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A*, **81**, 435-444 (1973).
- 10) Koprowski, H., Stepleski, Z. & Mitchell, K.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.*, **5**, 957-972 (1979).
- 11) Hakomori, S., Koscielak, J., Block, K. J. & Jeanloz, R. W.: Immunologic relationship between blood group substances and a fucose-containing glycolipid of human adenocarcinoma. *J. Immunol.*, **98**, 31-38 (1967).
- 12) Simmons, A. R. & Perlmann, P.: Carcinoembryonic antigen and blood group substances. *Cancer Res.*, **33**, 313-322 (1973).
- 13) Holburn, A. M., Mach, J. P., MacDonald, D. & Newlands, M.: Studies of the association of the A, B, and Lewis blood group antigens with carcinoembryonic antigen (CEA). *Immunology*, **26**, 831-843 (1974).
- 14) Yamashita, K., Totani, K., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Ueda, I. & Kobata, A.: Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer Res.*, **47**, 3451-3459 (1987).
- 15) Terada, T. & Nakanuma, Y.: Cell kinetic analysis and expression of carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19-9 and DU-PAN-2 in hyperplastic, preneoplastic and neoplastic lesions of intrahepatic bile ducts in livers with hepatoliths. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, **420**, 327-335 (1992).
- 16) Okada, Y., Jinno, N., Moriwaki, S., Morichika, S., Torigoe, S., Arima, T., Nagashima, H. & Koplowski, H.: Expression of ABH and Lewis blood group antigens in combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. Possible evidence for the hepatocellular origin of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Cancer*, **60**, 345-352 (1987).
- 17) Jovanovic, R., Jagirdar, J., Thumg, S. N. & Paronetto, F.: Blood-group-related antigen Lewis^x and Lewis^y in the differential diagnosis of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **113**, 139-142 (1989).
- 18) Kanai, T., Hirohashi, S., Upton, M. P., Ino, Y. & Shimosato, Y.: Expression of Lewis blood group antigens in cancerous and non-cancerous liver. *Jpn. Cancer Res.*, **78**, 968-976 (1987).
- 19) 川本 徹, 斉藤 澄, 轟 健, 小池直人, 金澤伸郎, 岩崎洋治, 中村恭一: 抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を用いた肝門部胆管癌の細胞増殖能の研究 - PCNA 発現と CEA, CA19-9, ならびに EGF receptor 発現との関係 -. *日消誌*, **90**, 144-153 (1993).
- 20) Nakanuma, Y. & Sasaki, M.: Expression of blood group-related antigens in the intrahepatic biliary tree and hepatocytes in normal livers and various hepatobiliary diseases. *Hepatology*, **10**, 174-178 (1989).
- 21) Dervan, P. A., Gilmartin, L. G., Loftus, B. M. & Carney, D. N.: Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. *Am. J. Clin. Pathol.*, **92**, 401-407 (1989).
- 22) Nonomura, A., Matsubara, F., Mizukami, Y., Izumi, R., Nakanuma, Y., Kurumaya, H., Watanabe, K. & Takayanagi, N.: Demonstration of nucleolar organizer regions in intrahepatic bile duct carcinoma by the silver-staining technique. *Liver*, **10**, 269-277 (1990).
- 23) Giri, D. D., Nottingham, J. F., Lawry, J., Dundas, S. A. C. & Underwood, J. C. E.: Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with ploidy and growth phase by DNA cytometry. *J. Pathol.*, **157**, 307-313 (1989).
- 24) Kurki, P., Ogata, K. & Tan, E. M.: Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **109**, 49-59 (1988).
- 25) Wseem, N. H. & Lane, D. P.: Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell. Sci.*, **96**, 121-129 (1990).
- 26) Robbins, B., Vega, D., Ogata, K., Tan, E. & Nakamura, R.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 841-845 (1987).
- 27) Landberg, G. & Roos, G.: Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res.*, **51**, 4570-4574 (1991).
- 28) Theunissen, P. H. M. H., Leers, M. P. G. & Bollen E. C. M.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology*, **20**, 251-255 (1992).
- 29) Allegranza, A., Girlando, S., Arrigoni, G. L., Veronese, F. A., Mauri, F. A., Gambacorta, M., Pollo, B., Dalla Palma, P. & Barbareschi, M.: Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, **419**, 417-423 (1991).
- 30) Bauer, K. D., Clevenger, C. V., Endow, R. K., Murad, T., Epstein, A. L. & Scarpelli, D. G.: Simultaneous nuclear antigen and DNA content quantification using paraffin-embedded colonic and multiparameter flow cytometry. *Cancer Res.*, **46**, 2428-2434 (1986).
- 31) Herman, C. J.: Cytometric DNA analysis in the management of cancer. *Clinical and laboratory considerations.* *Cancer*, **69**, 1553-1556 (1992).
- 32) Ballantyne, K. C., James, P. D., Robbins, R. A., Baldwin R. W. & Hardcastle, J. D.: Flow cytometric analysis of the DNA content of gastric cancer. *Br. J. Cancer*, **56**, 52-54 (1987).
- 33) Bowlby, L. S., DeBault, L. E. & Abraham, S. R.: Flow cytometric DNA analysis of parathyroid glands. Relationship between nuclear DNA and pathologic classifications. *Am. J. Pathol.*, **128**, 338-344 (1987).
- 34) 斉藤勝彦, 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).
- 35) 中沼安二, 湊 宏, 寺田忠史, 野々村昭孝: 肝内胆管癌. 分類と病理. 肝胆膵, 24, 209-216 (1992).
- 36) Nakanuma, Y., Terada, T., Tanaka, Y. & Ohta, G.: Are hepatolithiasis and cholangiocarcinoma aetiologically related? A morphologic study of 12 cases of hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 46, 45-58 (1985).
- 37) 宮川正澄, 柴田偉雄: トロトラストによる肝癌. 日本臨床, 25, 2255-2264 (1967).
- 38) 木田哲二, 寺田忠史, 中沼安二, 高柳尹立, 車谷 宏, 土井下建治: 肝硬変を合併する肝内胆管癌の臨床病理学的検討. 肝臓, 32, 90(1991).
- 39) Healey, J. E. & Schroy, P. C.: Anatomy of the biliary ducts within the human liver. *Arch. Surg.*, 66, 599-616 (1953).
- 40) Terada, T., Nakanuma, Y. & Ohta, G.: Glandular elements around the intrahepatic bile ducts in man; their morphology and distribution in normal livers. *Liver*, 7, 1-8 (1987).
- 41) Okuda, K., Kubo, Y., Okazaki, N., Arishima, T., Hashimoto, M., Jinnouchi, S., Sawa, Y., Shimokawa, Y., Nakajima, Y., Noguchi, T., Nakano, M., Kojiro, M. & Nakashima, T.: Clinical aspects of intrahepatic bile duct carcinoma including hilar carcinoma. A study of 57 autopsy-proven cases. *Cancer*, 39, 232-246 (1977).
- 42) 日本胆道外科研究会編: 外科・病理 胆道癌取扱い規約, 第2版, 49-51 頁, 金原出版, 東京, 1986.
- 43) Hsu, M., Raine, L. & Farger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 557-580 (1981).
- 44) Terada, T. & Nakanuma, Y.: Expression of ABH blood group antigens, Ulex europaeus agglutinin I, and type IV collagen in the sinusoids of hepatocellular carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 115, 50-55 (1991).
- 45) Crocker, J. & Nar, P.: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.*, 151, 111-118 (1987).
- 46) Hedley, D. W., Friedlander, M. L., Taylor, I. W., Rugg, C. A. & Musgrove, E. A.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 31, 1333-1335 (1983).
- 47) 癌 DNA 研究会用語検討委員会: 癌 DNA 研究会用語検討委員会報告. 癌の臨床, 37, 1-3 (1991).
- 48) 堤 寛, 長村義之: 光顕の酵素抗体法染色における特殊技法. 酵素抗体法 (渡辺慶一, 中根一穂編). 第3版, 159-161 頁, 学際企画, 東京, 1992.
- 49) Sternberger, L. A., Hardy, P. H. Jr., Cuculis, J. J. & Meyer, H. G.: The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorse-radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem.*, 18, 315-333 (1970).
- 50) Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abduliz, Z., Macdonald, S., Pulford, K. A. F., Stein, H. & Mason, D.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complex of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complex). *J. Histochem. Cytochem.*, 32, 219-229 (1984).
- 51) Monsigny, M., Sene, S., Obrenovitch, A., Roche, A. C., Delmotte, F. & Boschetti, E.: Properties of succinylated wheat-germ agglutinin. *Eur. J. Biochem.*, 98, 39-45 (1979).
- 52) Bhavandan V. P. & Katlic, A. W.: The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. The role of sialic acid. *J. Biol. Chem.*, 254, 4000-4008 (1979).
- 53) Bernhard, W. & Arvameas, S.: Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Exp. Cell Res.*, 64, 232-236 (1971).
- 54) Saito, K. & Nakanuma, Y.: Lectin binding of intrahepatic bile ducts and peribiliary glands in normal livers and hepatolithiasis. *Tohoku J. Exp. Med.*, 160, 81-92 (1990).
- 55) Hakomori, S.: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 733-764 (1981).
- 56) Feizi, T.: Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are oncodevelopmental antigens. *Nature*, 314, 53-57 (1985).
- 57) Okada, Y., Shimoe, T., Muguruma, M., Usumoto, R., Tsuji, T., Jinno, K., Moriwaki, S., Shin, S. & Hakomori, S.: Hepatocellular expression of a novel glycoprotein with sialylated difucosyl Le^x activity in the active inflammatory lesions of chronic liver disease. *Am. J. Pathol.*, 130, 384-392 (1988).
- 58) Cooper, H. S., Marshall, C., Ruggerio, F. & Steplewski, Z.: Hyperplastic polyps of the colon and rectum. An immunohistochemical study with monoclonal antibodies against blood groups antigens (sialosyl-Le^a, Le^b, Le^x, Le^y, A, B, H). *Lab. Invest.*, 57, 421-428 (1987).
- 59) Hirohasi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Tome, Y., Watanabe, M., Hirota, T. & Itabashi, M.: Distribution of blood group antigens and CA19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa. *Gann*, 75, 540-547 (1984).
- 60) Altaee, M. Y., Johnson P. J., Farrant J. M. & Williams, R.: Etiologic and clinical characteristics of peripheral and hilar cholangiocarcinoma. *Cancer*, 68, 2051-2055 (1991).
- 61) Clausen, H., Hakomori, S., Graem, N. & Dabelsteen, E.: Incompatible A antigen expressed in tumors of blood group O individuals: Immunohistochemical, and enzymatic characterization. *J. Immunol.*, 136, 326-330 (1986).
- 62) Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsusita, Y. & Irimura, T.: Increased expression of sialyl lewis^x antigen correlates with poor

survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.*, 53, 3632-3637 (1993).

63) Ahnen, D. J., Nakane, P. K. & Brown, W. R.: Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer. *Cancer*, 49, 2077-2090 (1982).

64) Hakomori, S.: Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.*, 45, 2405-2414 (1985).

65) Olsson, L.: Human monoclonal antibodies in experimental cancer research. *J. Natl. Cancer Inst.*, 75, 397-403 (1985).

66) Yu, C. C. W., Hall, P. A., Fletcher, C. D. M., Camplejohn, R. S., Waseem, N. H., Lane, D. P., & Levison D. A.: Haemangiopericytomas: The prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Histopathology*, 19, 29-33 (1991).

67) Bosari, S., Lee, A. K. C., Wiley, B. D., Heatley, G. J., Hamilton, W. M. & Silverman, M. L.: DNA quantitation by image analysis of paraffin-embedded colorectal adenocarcinomas. *Mod. Pathol.*, 5, 324-328 (1992).

68) Baretton, G., Carstensen, O., Schardey, M. & Lohrs, U.: DNA ploidy and survival in gastric carcinoma: A flow cytometric study. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 418, 301-309 (1991).

69) Harrison, R. F., Reynolds, G. M. & Rowlands, D.: Immunohistochemical evidence for the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by nonproliferating hepatocytes adjacent to metastatic tumors and in inflammatory conditions. *J. Pathol.*, 171, 115-122 (1993).

70) 今津浩喜, 笠原正男, 城野健児, 竹下健也, 丹波基博, 村上正基, 南 圭介, 見元祐司, 田代和弘, 黒田 誠, 溝口良順, 堀部良宗, 新井一史, 菅沼正司, 船曳孝彦: 十二指腸における DNA ploidy pattern 及び proliferation index と PCNA の検討. *日消誌*, 89, 1499-1505 (1992).

71) Kumar, V., Cotran, R. S. & Robbins, S. L.: *General Pathology: Neoplasia*. In V. Kumar, R. S. Cotran & S. L. Robbins (eds.), *Basic Pathology*, 5th ed., p195-196, WB Saunders, Philadelphia, 1992.

72) Carey, F. A., Lamb, D. & Bird, C. C.: Importance of sampling method in DNA analysis of lung cancer. *J. Clin. Pathol.*, 43, 820-823 (1990).

73) Offerhaus, G. J. A., Feyter, E. P. D., Cornelisse, C. J., Tersmette, K. W. F., Floyd, J., Kern, S. E., Vogerstein, B. & Hamilton, S. R.: The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology*, 102, 1612-1619 (1992).

74) Bahler, D. W., Lord, E. M., Kennel, S. J. & Horan, P. K.: Heterogeneity and clonal variation related to cell surface expression of a mouse lung tumor associated antigen quantified using flow cytometry. *Cancer Res.*, 44, 3317-3323 (1984).

75) Orntoft, T. F., Petersen, S. E. & Wolf, H.: Dualparameter flow cytometry of transitional cell carcinomas: Quantitation of DNA content and binding of carbohydrate ligands in cellular subpopulations. *Cancer*, 61, 963-970 (1988).

76) Coon, J. S., Watkins, J. R., Pauli, B. U. & Weinstein R. S.: Flow cytometric analysis of heterogeneity in blood group-related antigen expression in a human urinary bladder carcinoma cell line 647V. *Cancer Res.*, 45, 3014-3021 (1985).

Pathological Study of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Analysis of Cell Kinesis and Expression of Carbohydrate Residues Hiroshi Minato, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 103, 330—347 (1994)

Key words cholangiocarcinoma, adenocarcinoma, carbohydrate residues, cell kinetics, immunohistochemistry

Abstract

The relationship between biological behavior and morphology of intrahepatic cholangiocarcinoma (CC) was investigated by studying the expression of carbohydrate residues and cell kinetics relevant to histology, tumor differentiation and the intrahepatic location of CC. Seventy five cases of CC were divided into the peripheral type (31 cases) and the hilar type (44 cases), and also histologically, with well (21 cases) differentiated, moderately differentiated (26 cases), and poorly differentiated adenocarcinoma (24 cases), respectively. There were four cases of adenosquamous carcinoma. With respect to the relationship between expression of carbohydrate residues and differentiation of CC, immunoreactivity of A, Lewis (Le)^b, Le^x and carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) was reduced significantly in accordance with tumor dedifferentiation ($p < 0.05$). The polarity of carbohydrate residues examined was also reduced in proportion to the dedifferentiation of CC (e.g. supranuclear or luminal staining patterns were frequent in well differentiated adenocarcinoma, while diffuse cytoplasmic or stromal staining patterns were prevalent in those poorly differentiated). These staining patterns were clearly shown by confocal laser scanning microscopy. In adenosquamous carcinoma, expression of carbohydrate residues was similar to that in poorly differentiated cases. A, B and H tended to be more frequent in the hilar CCs than in the

peripheral CCs. The cell kinetics of CC was analyzed in 48 cases by counting the number of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), using immunostaining of proliferating cell nuclear antigens (PCNA) and flow cytometric DNA analysis in 48 cases. Dedifferentiation of CC was correlated by AgNOR number (2.22 ± 0.21 in well differentiated, 3.66 ± 0.85 in moderately differentiated and 4.17 ± 0.49 in poorly differentiated adenocarcinomas, respectively). In 22 cases, the labeling index (LI) of PCNA was higher in moderately and poorly differentiated adenocarcinomas (24.0 ± 2.35 and 26.0 ± 4.89 , respectively) than in well differentiated ones (10.8 ± 2.14). A minority of well differentiated ones was aneuploid (33.3%), while aneuploidy was prevalent in moderately (84.6%) and poorly differentiated ones (100%). In autopsy cases, the patients with lymphnode metastases showed a significantly higher DNA index (with metastases, $n=19$, 1.63 ± 0.33 ; no metastases, $n=4$, 1.08 ± 0.09). The anatomical location of CC along the biliary tree had no statistical relation to either of the cell kinetic data. The relationship between expression of carbohydrate residue and cell kinesis of CC was examined in paraffin-embedded tissue using double immunostaining, and also in cultured CC cell line (CCKS1) using the immunofluorescent method and flow cytometry. In double immunostaining, expression of carcinoembryonic antigen (CEA), or Le^x, negatively correlated with PCNA LI as a whole tumor (PCNA LI in CEA expressing cells, 3.6 ± 2.5 vs PCNA LI as a whole tumor, 34.1 ± 7.4 ; PCNA LI in Lewis^x expressing cells, 4.5 ± 3.7 vs PCNA LI as a whole tumor, 32.5 ± 5.3). In CCKS1, expression of CA19-9, wheat germ agglutinin (WGA) and concanavalin A (ConA) receptor was not significantly different between the stationary phase and proliferative phase. This study implies that a combination of carbohydrate residue expression and several cell kinetic data is valuable for the evaluation of the histological grades and biological behaviors of CC.