

# 家兔胆嚢粘膜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

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉田, 一晴 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8542">http://hdl.handle.net/2297/8542</a>

## 家兎胆嚢粘膜上皮の細胞極性発現とその異常： コラーゲングル内培養法を用いた形態学的検討

金沢大学医学部病理学第二講座（主任：中沼安二教授）

吉 田 一 晴

胆道系は1から2層の立方ないし円柱上皮で覆われた管腔組織で、上皮細胞の極性は吸収や分泌などの胆道系の生理機能に密接に関連し、また種々の胆道系疾患での上皮細胞の極性異常が指摘されている。今回、家兎胆嚢より粘膜上皮細胞を単離し、コラーゲングル内で三次元的に培養し、粘膜上皮の細胞極性の消失と発現を、特にその初期像に注目し、光学顕微鏡（光頭）、電子顕微鏡（電頭）、粘液多糖類染色、レクチン組織化学法、酵素組織化学法を用いて検討した。さらに細胞極性に種々の変化を与えることの知られている2, 3の物質を培地内に添加し、細胞極性に及ぼす影響を検討した。

コラーゲングル内での培養時間と培養上皮細胞の形態は、細胞極性発現の面より、大きく三期に分類し得た。1) 極性消失期（培養直後から12時間）：培養上皮の多くは単細胞性で、本来持っていた細胞極性（細胞接着装置、内腔面での微絨毛、細胞内小器官の分布、細胞表面での粘液多糖類と糖鎖の分布等）の殆どが消失し、細胞は小型球状化した。同時に、種々の大きさの二次ライソゾーム空胞（自己消化空胞）が細胞内に一過性に出現し、細胞の単離と培養操作に伴う細胞の障害、あるいは円柱上皮から小型球状細胞の形態変化に伴う細胞再構築に関連した現象と考えられた。2) 極性獲得期（培養12から24時間）：1から数個の上皮細胞集塊の胞体内に粘液多糖類〔過ヨウ素酸 Schiff 反応 (periodic acid Schiff, PAS), アルジャン青 (alcian blue, AB) pH2.5, 鉄ジアミン染色 (high iron diamine, HID), ムチカルミン染色〕陽性の小嚢胞が出現した。電頭的に小嚢胞の内面は微絨毛で覆われ、その多くは上皮細胞の胞体内にみられたが、少数の細胞では隣接する細胞間の小嚢胞としてみられ、未熟ながら緊密接着の形成がみられ、さらに、この小嚢胞へと向かう粘液顆粒や他の細胞内小器官の配置傾向も出現し、極性獲得初期像と考えられた。3) 極性成熟期（培養24時間以降）：培養細胞の増殖に伴い隣接する細胞の小嚢胞が癒合し、多細胞性嚢胞に移行した。嚢胞を形成する隣接細胞間には接着装置が発達し、分泌顆粒の嚢胞内への放出像、核上部にゴルジ装置等、嚢胞腔面へと向う細胞小器官の配置がみられた。核下部では小器官が少なく、また、コラーゲングルに接し基底面を形成した。このような生体の胆嚢粘膜上皮に近似した極性獲得に平行して、アデノシン三リン酸フォスファターゼ (adenosine triphosphatase, ATPase), アルカリ性フォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALPase), 粘液多糖類, レクチン染色で検出されるタチナタマメレクチン (concanavalin A, Con A), エンドウマメレクチン (*Pisum sativum* agglutinin, PSA), ソラマメレクチン (*Vicia faba* agglutinin, VFA), コムギハイガレクチン (wheat germ agglutinin, WGA), ドリコスマメレクチン (*Dolichos biflorus* agglutinin, DBA), ダイズレクチン (soybean agglutinin, SBA) の結合糖鎖やルテニウムレッド染色陽性の粘液多糖類が次第に高度、広汎に嚢胞内腔面に出現し、表現型の面からも生体の胆嚢粘膜上皮に近似した。次に、既に多細胞性嚢胞を形成している培養3日目の培地内にマイクロフィラメント重合阻害剤であるサイトカラシン B (cytochalasin B, CB) と上皮細胞の分化を調節するトランスフォーミング成長因子  $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF $\beta 1$ ) を添加し、添加後48時間まで形態学的に観察した。CB 添加で、多細胞性嚢胞の構成上皮の細胞相互の接着性が減少し、上皮細胞の胞体内に微小嚢胞（多くは粘液多糖類陽性）が形成され、その周囲には無構造物質の沈着が出現した。この像は、近年、小児科領域で報告されている先天性微絨毛萎縮症 (congenital microvillous atrophy) と類似していた。一方、TGF $\beta 1$  を培地内へ添加すると、細胞は高円柱状となり、細胞接着装置は発達し、細胞内小器官は数が増し、成熟し、その配列が生体の胆嚢粘膜上皮により類似した。TGF $\beta 1$  の添加により、培養上皮の細胞極性の発現と分化が促進したと考えられた。以上、単細胞化した家兎胆嚢粘膜上皮をコラーゲングル内で培養することにより、上皮細胞の極性消失、上皮細胞の極性獲得と成熟過程を形態と種々の表現型の面からダイナミックに観察できた。さらに培地中に CB や TGF $\beta 1$  を添加すると、極性の異常と過成熟に関連した像が出現した。本培養法は上皮細胞の細胞極性の機構と維持、また、その破綻とこれを修飾する因子やこれに関連した疾患の解明に有用で簡便なモデルと思われた。

**Key words** 細胞極性, 胆嚢粘膜上皮, コラーゲングル内培養法, 糖鎖, レクチン組織化学法

平成5年12月13日受付, 平成6年2月9日受理

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; AB, alcian blue; ACPase, acid phosphatase; ALPase, alkaline phosphatase; CB, cytochalasin B; Con A, concanavalin A; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine; DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGF, epidermal growth factor; FBS, fetal bovine serum; HE, hematoxylin and eosin; HID, high iron diamine; PAS, periodic acid Schiff;

臓器や組織の発生、発育過程において、細胞の極性の発現とその調節が重要である<sup>12)</sup>。また、細胞極性と関連して、糖鎖や酵素の発現や分布、さらに粘液多糖類の分泌などの表現型の発現も重要である<sup>12)</sup>。近年、細胞の極性発現とその調節、そして細胞外基質との関連性は病理学の分野でも注目されており、組織障害とそれに引続き生ずる修復と増殖(再生)、あるいは疾患の発生、特に腫瘍性疾患の発生に関連して注目されている<sup>13)</sup>。

さて、上皮細胞の極性は、上皮細胞と細胞外基質との直接の接触によって形成維持されており、細胞外基質の変化や異常に伴い細胞の極性が変化する<sup>4)~6)</sup>。この上皮細胞の極性とその維持、また極性異常の研究方法として、種々の培養法が用いられている。例えば、Miyagawa ら<sup>7)</sup>はプラスチック培養皿でブタ甲状腺濾胞上皮を培養しており、この系ではプラスチック面が濾胞の基底側、培養液に面する部位が濾胞内面の形成を規定したと述べている。また、三次元的なコラーゲンゲル内培養法は、培養細胞、組織の立体像の観察に適しており、Yang ら<sup>8)</sup>の乳腺腫瘍組織の培養に始まり、甲状腺濾胞上皮<sup>9)10)</sup>や扁平上皮の培養<sup>11)</sup>で組織構築の解明や生化学的所見との対比、さらに疾患の発生病理の理解にも用いられている<sup>12)13)</sup>。我々の教室でも以前、家兎胆嚢より粘膜上皮細胞を分離、単細胞化し、これをコラーゲンゲル内で培養すると、胆嚢上皮は増殖し、多細胞性上皮性嚢胞を形成し、培養2日目で腔内に粘液多糖類を分泌し、以後6週間にわたって腔の拡大が認められ、次第に生体の胆嚢粘膜上皮に近似していくことを報告した<sup>14)15)</sup>。この現象は、ウサギ胆

嚢上皮細胞が本来持っていた細胞極性が、コラーゲンゲル内の培養条件で再出現した像と捉えられた。しかし、培養法を用いた細胞極性に関する従来の研究では、主に培養2日から3日後の観察が中心であり<sup>14)15)</sup>、細胞極性の消失と極性獲得初期像のダイナミックな変化はほとんど検索されていない。また、培養細胞の光学顕微鏡(光顕)的、電子顕微鏡(電顕)的形態像や酵素発現に関する研究は多いが、上皮細胞の極性を特徴付ける種々の細胞膜型糖蛋白の発現過程の変動を詳細に研究した報告は少ない。そこで今回、培養初期の形態変化を詳細に検討し、さらに細胞膜型糖鎖の発現の推移をレクチン組織化学法<sup>16)~18)</sup>を用いて検討した。

近年、上皮細胞の極性発現や維持に関連するものとして細胞骨格と種々の増殖因子が注目されている<sup>20)21)</sup>。細胞骨格は細胞や組織の極性の形成や維持に重要であり<sup>21)</sup>、種々の細胞骨格障害因子[たとえばサイトカラシン B (cytochalasin B, CB) やコルヒチン]が組織の極性形成の解明に応用されている<sup>22)</sup>。また増殖因子の1つであるトランスフォーミング成長因子βファミリー(transforming growth factor β family)は上皮の立体的な構造や機能の変化や成熟に重要とされている<sup>23)</sup>。そこで、マイクロフィラメントの重合阻害剤であるCBとトランスフォーミング成長因子β1(transforming growth factor β1, TGFβ1)を細胞極性が完成しつつある培養3日目の培地(既に多細胞性嚢胞が形成されている)に添加し、細胞形態、特にその極性の変化や分化に及ぼす影響を検討した。

Table 1. Biotinylated lectins used in this study

Lectin	Carbohydrate-binding specificity	Source	Concentration of lectin applied (μg/ml)
1. Glc/Man group			
Con A	α-D-Man>α-D-Glu	E-Y lab.	10
PSA	α Man>αGlc=GlcNAc	E-Y lab.	10
VFA	α Man>αGlc=GlcNAc	E-Y lab.	10
2. GlcNAc group			
WGA	GlcNAc (β1, 4GlcNAc) 1-2>βGlcNAc>αNeu	E-Y lab.	10
STA	GlcNAc (β1, 4GlcNAc) 1-4	E-Y lab.	10
3. GalNAc/Gal group			
LBA	GalNAcα1, 3 {L-Fuc α1, 2} Galβ>GalNAc	Vector lab.	10
DBA	GalNAcα1, 3GalNAc > αGalNAc	E-Y lab.	10
SBA	GalNAcα1-3Gal>α and βGal	E-Y lab.	10
SJA	α and βGalNAc>α and βGal	E-Y lab.	10
MPA	αGalNAc>αGal	E-Y lab.	10
GS-1	αGalNAc>αGal	E-Y lab.	10
4. Fuc group			
UEA-1	αL-Fuc	E-Y lab.	10

GlcNAc, N-acetyl-glucosamine; GalNAc, N-acetyl-galactosamine; Fuc, fucose; Glc, glucose; Man, mannose; Gal, galactose; Neu, N-acetyl-neuraminic acid; Con A, concanavalin A; PSA, *Pisum sativum* agglutinin; VFA, *Vicia faba* agglutinin; WGA, wheat germ agglutinin; STA, *Solanum tuberosum* agglutinin; LBA, *Phaseolus limensis* agglutinin; DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; SBA, soybean agglutinin; SJA, *Sophora japonica* agglutinin; MPA, *Maclura pomifera* agglutinin; GS-1, *Griffonia simplicifolia* 1 agglutinin; UEA-1, *Ulex europeus* 1 agglutinin.

E-Y lab.: E-Y laboratories, San Mateo, USA.

Vector lab.: Vector laboratories, Burlingame, USA.

PBS, phosphate-buffered saline; PSA, *Pisum sativum* agglutinin; SBA, soybean agglutinin; TE, trypsin and EDTA; TGFβ1, transforming growth factor β1; VFA, *Vicia faba* agglutinin; WGA, wheat germ agglutinin; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

## 材料および方法

### 1. 家兎胆嚢粘膜上皮の形態学的検討

体重約 3Kg の家兎 (雄, 日本白色種, 静岡県実験動物農業協同組合) をペントバルビタール (ネンブタール, 大日本製薬, 大阪) の静脈内注射で麻酔し, 開腹後, 腹部血管を切断し, 放血死させ, 直ちに肝胆道を一塊として摘出した。その後, 胆嚢を取り出し, 内腔の胆汁を 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) (pH7.3) で十分に洗浄し, 3 分割した。一つの分割胆嚢片を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後, パラフィン包埋し, 4 $\mu$  切片を作成し, 光顕的検討とレクチン組織化学的検討に用いた。光顕的検討として, ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, HE) 染色, 粘液多糖類染色として中性粘液染色 [過ヨウ素酸 Schiff (periodic acid Schiff, PAS) 染色], 酸性粘液染色 [アルシアン青 (alcian blue, AB) pH2.5 染色, 鉄ジアミン (high iron diamine, HID) 染色], それにムチカルミン染色を行った。レクチン組織化学法に関しては後述する。次の 1/3 分割胆嚢片を常法により, 2.5% グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4, 4 $^{\circ}$ C) 内で細切し 60 分間固定し, その後同緩衝液で洗浄後, 1% オスミウム酸 (同緩衝液) で 4 $^{\circ}$ C, 60 分間後固定し, 常法により, エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片作成後, 酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色後, 透過電顕 H-300 (日立製作所, 東京) で観察した。残り 1/3 分割胆嚢片を OCT コンパウンド (Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, USA) 内に包埋し, 液体窒素で凍結後, クリオスタット (Tissue-Tek, Miles Inc) で 5 $\mu$ m の凍結切片を作成し, 室温で風乾燥後, -80 $^{\circ}$ C で保存し, 適宜, 以下の組織化学的, 酵素組織化学的検討に用いた。

### II. 胆嚢粘膜上皮の分離, 単細胞化とコラーゲンゲル内培養

#### 1. 胆嚢粘膜上皮細胞の分離

前報に従い<sup>10)9)</sup>, 体重約 3Kg の家兎 (雄, 日本白色種) をペントバルビタールの静脈内注射で麻酔後, 開腹し, 直ちに腹部血管を切断, 放血死させ, 肝胆道を一塊として取り出し, 胆嚢を分離剔出した。その後, 注射器で胆汁を取り, 37 $^{\circ}$ C のハンクス液で胆嚢内腔を洗浄後, 0.25% トリプシンと 0.02% エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) の混合液 [trypsin and EDTA (TE) 混合液] を注射器で胆嚢内に入れ, 37 $^{\circ}$ C で 60 分から 80 分間ハンクス液内に静置した。次に, TE 混合液を取り出し, 以下の培養に用いた。なお, 取り出した TE 混合液内には胆嚢粘膜上皮が含まれており, その 80% は単細胞性にバラバラになった粘膜上皮細胞で, 残りの 20% は 2 個から数個の上皮塊を形成していた<sup>10)9)</sup>。なお, 線維芽細胞などの間葉系細胞の混入はほとんどなかった。

#### 2. コラーゲン溶液の調整

7.5 容量の 0.3% 酸可溶性コラーゲン (タイプ I コラーゲン, 新田ゲラチン, 大阪) + 1.5 容量のウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Grand Island, USA) + 1 容量の 10 倍濃度の Williams の E 培地 (Flow Laboratories, Irvine, Scotland) を氷冷下で混合し, これに上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA) を 10ng/ml となるように添加してコラーゲン溶液を作製した。

#### 3. コラーゲンゲル内への胆嚢粘膜上皮細胞の包埋と初代培養

上皮細胞を含む TE 混合液を遠心分離 (5 分間, 1,000rpm) し, その沈査にコラーゲン溶液を加え, ピペッチングした後, プラスチック培養皿 (コーニング, 岩城ガラス, 東京) に分注した。これを培養皿ごと 37 $^{\circ}$ C で約 10 分間静置してコラーゲンを重合, 固化させ, コラーゲンゲル内に上皮細胞を包埋した。培養液 (15% FBS と 10ng/ml の EGF を含む Williams の E 培養液) をコラーゲンゲル上に重層して 37 $^{\circ}$ C で大気条件を 95% 空気, 5% CO<sub>2</sub> としたインキュベータ (ファルマ, サンヨー, 東京) 内で培養した。なお, 培養開始時のコラーゲンゲル内の細胞数は 1~3 $\times 10^5$  個/ml で, 培養液にはペニシリン G (100 単位/ml, 明治製菓, 東京) とストレプトマイシン (100 $\mu$ g/ml, 明治製菓) を添加した。細胞を位相差顕微鏡 (オリンパス, 東京) で経時的に観察し, さらに培養開始後 6, 12, 24, 48, 96 時間の培養細胞を以下の実験に供した。

#### 4. コラーゲンゲル内培養粘膜上皮細胞の形態学的検討

光顕的観察: 各培養時期の胆嚢粘膜上皮細胞が埋め込まれているコラーゲンゲルごと 2% グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で 60 分間固定し, パラフィン包埋切片とし, HE 染色, さらに前出の 4 種類の粘液多糖類染色を行なった。

透過電顕による観察: 上記の増生した胆嚢粘膜上皮をコラーゲンゲルごと細切し, 2% グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で室温 30 分間固定, 同緩衝液で洗浄後, 1% オスミウム酸で 60 分間後固定し, 常法により脱水, エポキシ包埋し, 超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し, 透過電顕で観察した。

凍結切片の作製: コラーゲンゲルを OCT コンパウンド内に包埋し, 液体窒素で凍結後, クリオスタットで 5 $\mu$ m の凍結切片を作成し, 室温で風乾燥後, -80 $^{\circ}$ C で保存し, 適宜, 以下の組織化学的, 酵素組織化学的検討に用いた。

### III. レクチン組織化学法, およびルテニウムレッド染色

#### 1. レクチン組織化学法

光顕的検討<sup>20)</sup>: ホルマリン固定, パラフィン包埋切片とした家兎胆嚢粘膜組織, および 2% グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で固定後の培養胆嚢粘膜上皮を含むコラーゲンゲルのパラフィン包埋切片を用い, 胆嚢粘膜上皮, およびコラーゲンゲル内培養上皮でのレクチン結合性を検討した。今回, 表 1 に示す 12 種のレクチン (いずれもビオチン化レクチン) を用いた。各々のレクチンとそれに特異的に反応する糖鎖, それに各々の希釈濃度 (PBS で希釈) を表 1 に示す。なお, 予備的検討で, タチナタマメレクチン (concanavalin A, Con A), エンドウマメレクチン (*Pisum sativum* agglutinin, PSA), ソラマメレクチン (*Vicia faba* agglutinin, VFA), コムギハイガレクチン (wheat germ agglutinin, WGA), ドリコスマメレクチン (*Dolichos biflorus* agglutinin, DBA), ダイズレクチン (soybean agglutinin, SBA) は胆嚢粘膜上皮内腔縁に染まり, 後述の極性消失期には陰性化し, 極性獲得期と共に細胞内小囊胞の内縁が陽性となり, 細胞極性の表現型に有用であったので, 本研究は, これら 6 種のレクチン結合性を中心に検討した。脱パラフィン切片を PBS で洗浄後, 0.3% 過酸化水素加メタノール内で内因性のペルオキシダーゼを失活させた。その後, 適宜希釈したビオチン化レクチンを湿箱内で 4 $^{\circ}$ C で 48 時間反応させた, PBS で十分に洗浄した後, Hsu ら<sup>20)</sup> の方法に従い, アビジン・ペオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-

biotin-peroxidase complex, ABC) キット (Vector Laboratories, Burlingame, USA) で反応させ、0.005%過酸化水素加ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) の PBS 溶液内で約 5 分間発色させ、PBS で洗浄した後、ヘマトキシリンで核染色を行い光顕で観察した。

陰性対照として、各レクチン染色毎にビオチン化レクチンの代わりに PBS で反応させ、反応陽性物が得られないことで確認した。

電顕的検討<sup>29)</sup>: 胆嚢粘膜上皮と培養上皮包埋コラーゲンゲルの凍結切片を用い、ペルオキシダーゼ標識レクチン (WGA, DBA, SBA) (E-Y Laboratories, San Mateo, USA) をレクチン濃度として 10 $\mu$ g/ml となるように PBS で希釈し、4℃で72時間反応させた。この3種のレクチンはいずれも上記の光顕的レクチン組織化学法で極性検討に用いた6種の中に含まれている。PBS で洗浄後、0.005%過酸化水素加 DAB で発色させ、1%オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で1時間後固定し、エタノールで常法により脱水し、スライドガラスにエポンを入れたゼラチンカプセルをかぶせ、そのまま重合させた後、スライドガラスより剝離し、超薄切片を作製し、無染色で透過電顕 H-300 (日立製作所) で観察した。

## 2. ルテニウムレッド染色 (電顕的検討)

ルテニウムレッド染色は細胞表面にある酸性糖蛋白を検出する方法として知られている<sup>20)</sup>。まず、生体の胆嚢粘膜と培養上皮を包埋したコラーゲンゲルの凍結切片を0.05%ルテニウムレッド (Sigma Chemical Company) (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で4℃, 60分間反応させ、1%オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で1時間後固定し、エタノール系列で脱水、エポンに包埋した。超薄切片を3%隣タングステン酸水溶液 (pH3.0) で30分染色し電顕で観察した。なお、陰性対照として、ルテニウムレッドを除いた反応液内で染色を行ない、反応陽性物が観察されないことを確認した。

## IV. 酵素組織化学染色 (電顕的検討)

培養開始後6, 12, 24, 48時間後に2%グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で30分間固定し、OCT コンパウンドで包埋し、-80℃で急速に凍結した後、クリオスタットで5 $\mu$ mに薄切し、以下の染色を行った。なお、反応後の試料は、いずれも1%オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で1時間後固定の後、常法により脱水し、スライドガラスにエポンを入れたゼラチンカプセルをかぶせ、そのまま重合した後、スライドガラスより剝離し、超薄切片を作成し無染色で観察した。

1. アデノシン三リン酸フォスファクターゼ (adenosin triphosphatase, ATPase)

小川ら<sup>27)</sup>の方法に従った。凍結切片を、0.2M Tris-HCl (pH8.5) 1.4ml, ATP 5mg, 蒸留水 2.0ml, 0.015M 硫酸マグネシウム 2.6ml, 0.5%クエン酸鉛 (pH10.0) 4.0ml の反応液で37℃で60分間反応させた。

2. アルカリ性フォスファクターゼ (alkaline phosphatase, ALPase)

小川ら<sup>28)</sup>の方法に従った。凍結切片を、3%グリセロリン酸ナトリウム 1.4ml, 1.5mM 硫酸マグネシウム 2.6ml, 0.5%クエン酸鉛 4.0ml, 0.2M Tris-HCl (pH8.5) 1.4ml, 蔗糖 0.8g の反応液 (pH9.0) 中に37℃30分間反応させた。

## 3. 酸性フォスファクターゼ (acid phosphatase, ACPase)

Gomori<sup>29)</sup>の方法に従った。凍結切片を0.05M 酢酸塩緩衝液 (pH5.0) 50ml, 蔗糖 4g, 硝酸鉛 50mg, 3% $\beta$ グリセロリン酸ナトリウム 5ml の反応液に室温で30分間浸漬した。

## V. CB と TGF $\beta$ 1 添加による培養上皮細胞の極性変化の観察

コラーゲンゲル内培養3日目 (多細胞性上皮性嚢胞<sup>14)18)</sup>を形成していることを確認) の培養液中に、CB (Sigma Chemical Company) と TGF $\beta$ 1 (フナコシ, 東京) を添加し、多細胞性嚢胞にみられる形態変化、特に培養上皮細胞の極性変化を中心に観察した。なお、予備的に、初代コラーゲンゲル内培養1, 2, 3日目に、それぞれCB 25 $\mu$ g/ml を添加し検討を行なった。その結果、培養1日目と2日目にCBを添加した実験では、CB添加後24時間目に培養上皮はバラバラとなり、壊死像が強く詳細な観察ができなかった。しかし、培養3日後での添加では、後述の如く、上皮細胞に種々の細胞極性の異常がみられ、細胞内小空胞も観察された。そこで、本研究では培養3日目のコラーゲンゲル内培養にCBおよびTGF $\beta$ 1を添加し検討した。CBとTGF $\beta$ 1の重層培養液中の濃度が、それぞれ最終的に25 $\mu$ g/mlと1ng/mlになる様に培養液に添加し、37℃で48時間まで培養した。なお、CBの濃度はCarruthersら<sup>20)</sup>、TGF $\beta$ 1はCassiniら<sup>30)</sup>が各々の実験に用いた濃度を参考にした。添加後24時間および48時間後に胆嚢上皮細胞を含むコラーゲンゲルを、2%グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.4) で室温30分間固定し、パラフィン切片とし、脱パラフィン後、HE染色、PAS, AB (pH2.5), HIDおよびムチカルミンの各種粘液多糖類染色を行い光顕で観察した。また、添加後24時間と48時間の胆嚢上皮細胞を含むコラーゲンゲルを2%グルタルアルデヒドで固定し、ついで1%オスミウム酸で後固定の後、常法により脱水、エポンに包埋し、超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色の後電顕下で観察した。

## 成 績

### I. 家兎胆嚢粘膜上皮の形態像

家兎胆嚢の粘膜上皮は一層、高円柱状で、核は基底側に位置し、胞体は淡明であった。粘液多糖類染色では、胆嚢粘膜上皮の胞体の殆どは陰性であったが、内腔縁はムチカルミン染色、AB (pH2.5), PAS, HID染色が陽性であった (図1a)。

電顕的には、円柱上皮の基底側に楕円形の核があり、胞体内には多くのミトコンドリアが認められ、核上部胞体内にはゴルジ装置、内腔側には分泌顆粒が存在し、内腔縁には密生する微絨毛がみられた (図2)。酵素組織化学ではこれらの内腔の微絨毛には膜状にALPaseが陽性であった。また、隣接する細胞間には内腔縁下に発達した細胞接着装置 [密着結合 (tight junction), 接着帯 (zonula adherens), 接着斑 (desmosome)] が、またその直下から基底部にかけて発達した鉗合ひだ (interdigitation) がみられ、同部および細胞基底部にもALPaseが陽性であった。ATPaseは内腔面の微絨毛で陽性であったが、細胞側面および基底面は陰性であった。なお、ACPaseはライソゾームに局限して陽性であった。

なお、レクチン染色、ルテニウムレッド染色の染色結果は、コラーゲンゲル内培養胆嚢粘膜上皮細胞の成績と一緒に後述する。

### II. コラーゲンゲル内での培養胆嚢粘膜上皮細胞の形態像: 位相差顕微鏡による観察

位相差顕微鏡では、培養直後では殆どの細胞は単細胞性でバ

ラバラの状態で観察され、一部の上皮細胞のみに胞体内小空胞が観察されたが、培養6から12時間後では多くの培養細胞の胞体内に空胞がみられた(図3a)。さらに培養24時間後では培養上皮細胞の数の増加が起こり、多細胞性の細胞塊となった。胞体内の空胞はこれらの多細胞性集塊では、細胞集塊中心部に融合した空胞(小嚢胞)として認められた。以後、漸次、細胞数が増

加し、これと平行して大型の空胞(嚢胞)が形成される像(多細胞性嚢胞の成熟)が観察された。しかし、単細胞性から数細胞性(空胞を有する)のままのものも散見された。

Ⅲ. コラーゲンゲル内培養胆嚢粘膜上皮細胞の形態像: 光顕、粘液多糖類染色および酵素組織化学による観察(表2)

HE染色、粘液多糖類染色を用いた予備的検討で、コラーゲ

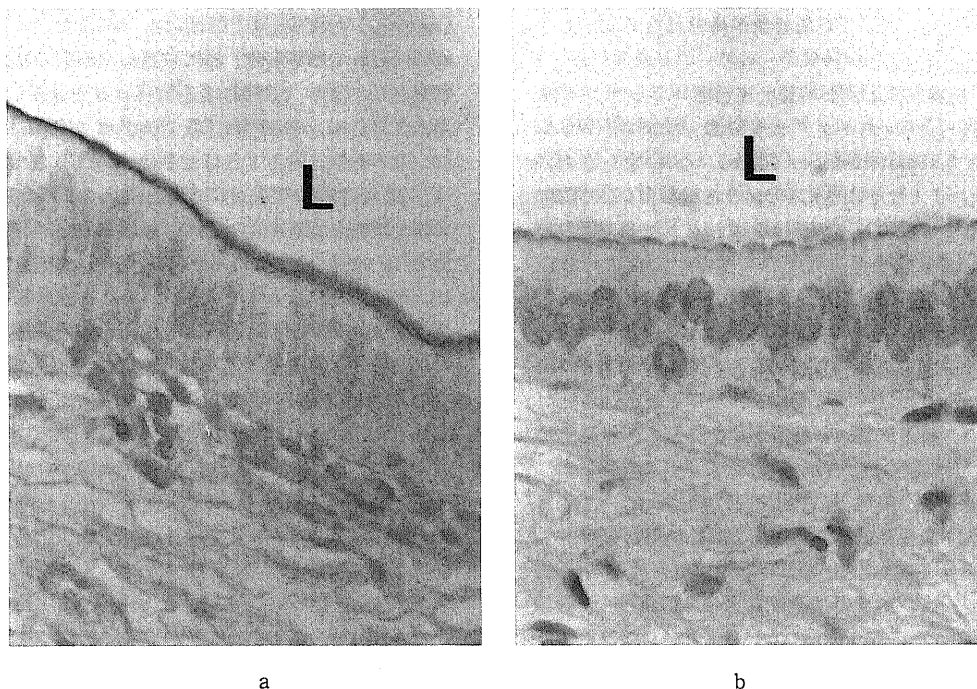


Fig. 1. Normal rabbit *in vivo* gallbladder mucosa comprises a single, high columnar epithelial layer. The luminal surface is positive for acid glycoprotein (a) and DBA (b). L, lumen of the gallbladder. a: Alcian blue (pH 2.5) staining,  $\times 460$ . b: Lectin histochemistry for DBA,  $\times 460$ .

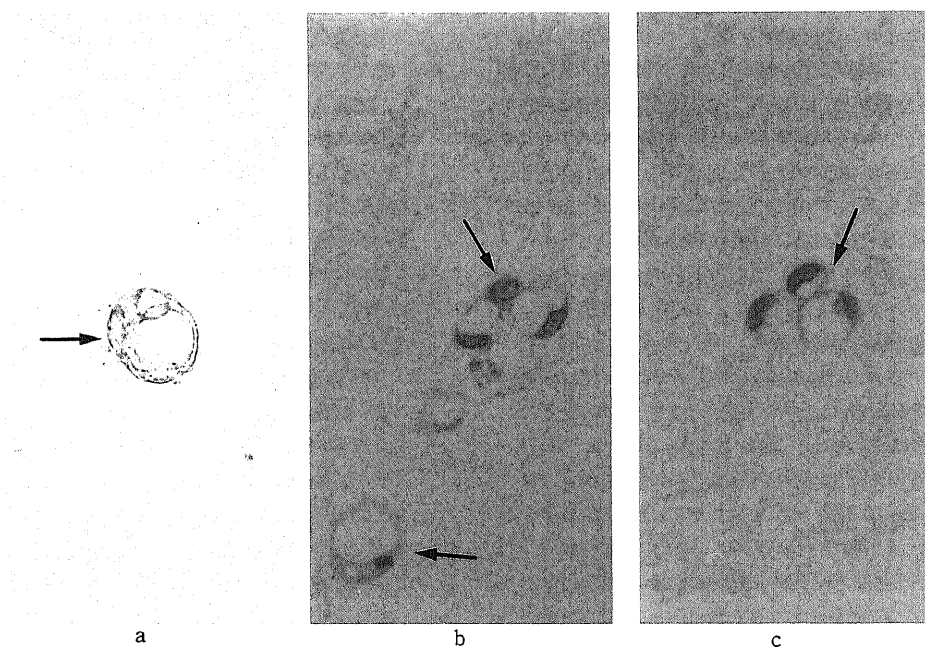


Fig. 3. Isolated rabbit gallbladder epithelial cells cultured in the collagen gel matrix for 6 hr (the phase of loss of cell polarity). A singly isolated cell and a few clumped epithelial cells (arrows) contain intracellular vacuoles of variable sizes. a: Phase contrast microscope,  $\times 400$ . b: Intracellular vacuoles are negative for PAS staining,  $\times 460$ . c: Intracellular vacuoles are negative for lectin histochemistry employing the DBA reaction,  $\times 460$ .

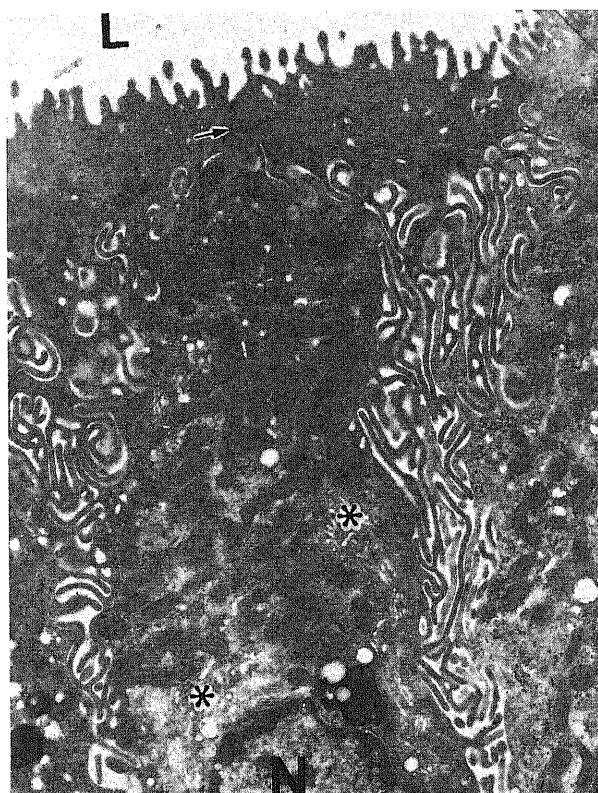


Fig. 2. Ultrastructural features of *in vivo* normal rabbit gallbladder epithelial cells. Numerous microvilli are seen on the luminal surface, and junctional complexes (arrows) and intercellular lateral digitations are seen in upper and middle to lower lateral sides, respectively. Note the well arranged cellular organelles: Golgi apparatus in the supra-nuclear area (\*) and many mitochondria in the supra-nuclear cytoplasm. L, lumen of the gallbladder N, nucleus,  $\times 6,500$ .

ンゲル内の胆嚢上皮細胞の形態像は大きく三期(極性消失期, 極性獲得期, 極性成熟期)に分けることが出来たので, 所見を各期毎に述べる. なお, この間の模式図を図4に示す. 胆嚢粘膜上皮と三期に分けたコラーゲンゲル内での上皮細胞のレクチン結合性を表3に示す.

#### 1. 極性消失期(培養後0から12時間)

##### 1) 形態学的検討

HE染色と粘液多糖類染色による観察: この時期は, 胆嚢粘膜上皮細胞がもっている本来の細胞極性が消失し, 一過性に二次性ライソゾーム空胞が出現するのが特徴である.

培養6時間までは, 粘膜上皮細胞の多くは単細胞性で円形ないし楕円形の形態を示し, 細胞質内にPAS等の粘液多糖類染色陰性の空胞が認められた(図3b). 小空胞は癒合して大きな空胞を形成し, 核や細胞質は空胞によって圧迫されているものもみられた. 2から数個の上皮細胞集塊を形成するものでも, 同様に胞体内に様々の大きさの空胞がみられた. しかし, これらの空胞は次第に減少し, 培養24時間では認められなくなった.

電顕的には, 培養6時間後では, 単離した胆嚢粘膜上皮細胞の表面の一部において, 絨毛様構造がみられた. その他の細胞表面では, 種々の長さの絨毛があり, 鉗合ひだに対応する側方翻入(lateral infoldings)に相当すると考えられた(図5a). 細胞質内に種々の大きさの空胞, 少量の粘液顆粒, 粗面小胞体やミトコンドリアが散在しており, ゴルジ装置は核周囲に位置して認められた. また, 一部の細胞ではゴルジ装置やミトコンドリア等の細胞内小器官もこの微絨毛部に向かって並んでいる様に見える. 上皮細胞の極性の遺残が示唆された. 一方, 細胞質内には膜で囲まれた空胞が出現し, 漸次増加し増大した. これらの空胞は後述の如くACPaseで陽性であり, 自己消化空胞と考えられた. 小空胞は癒合して, 大きな空胞を形成し, 核や細胞質

Table 2. Mucus histochemistry of rabbit *in vivo* gallbladder epithelial cells and those cultured collagen gel matrix

Staining <i>in vivo</i> gallbladder cells		Reactivity at the time (hr) after the start of <i>in vitro</i> culture				
		6~	12~	24~	48~	96~
PAS	A-CM (+)	—	—	O-CM (—)	O-CM (—)	O-CM (—)
				Cyto (—)	Cyto (—)	Cyto (—)
				ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
				ICC-C (+)	ICC-C (+)	ICC-C (+)
Muci-carmin	A-CM (+)	—	—	—	O-CM (—)	O-CM (—)
					Cyto (—)	Cyto (—)
					ICC-M (+)	ICC-M (+)
					ICC-C (—)	ICC-C (—)
HID	A-CM (+)	—	—	O-CM (—)	O-CM (—)	O-CM (—)
				Cyto (—)	Cyto (—)	Cyto (—)
				ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
				ICC-C (—)	ICC-C (+)	ICC-C (+)
AB pH 2.5	A-CM (+)	—	—	O-CM (—)	O-CM (—)	O-CM (—)
				Cyto (—)	Cyto (—)	Cyto (—)
				ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
				ICC-C (—)	ICC-C (+)	ICC-C (—)

ICC, intracytoplasmic cysts; ICC-M, ICC-membrane; ICC-C, contents in ICC; Muc, mucus granules; Cyto, cytoplasm; A-CM, apical cell membrane; O-CM, outer cell membrane; +, positive; —, negative; PSA, periodate acid Schiff; HID, high iron diamine; AB, alcian blue.



は空胞によって圧迫されているものもみられた(図 5b). 培養 6 から 12 時間目では ATPase 活性は細胞膜に僅かに陽性であり, 胞体内の空胞には染色されなかった. ALPase 活性は細胞膜周囲の細胞突起の一部に僅かに陽性となったが, 空胞は染色されなかった. ACPase 活性は培養 6 から 12 時間目の細胞では, 細胞内空胞の内側の膜および空胞内物質, 細胞質内のネマトライソゾーム<sup>20</sup>が陽性になった. また, 一部の 2 次ライソゾームが細胞質内の空胞の膜と癒合し, 空胞内部と連続している像が認められた(図 5c).

## 2. 極性獲得期 (培養後 12 から 24 時間)

粘液多糖類染色陽性の小囊胞が胞体内に出現するのが特徴である.

培養 12 から 24 時間で胞体の一部 (単細胞性上皮の胞体内で

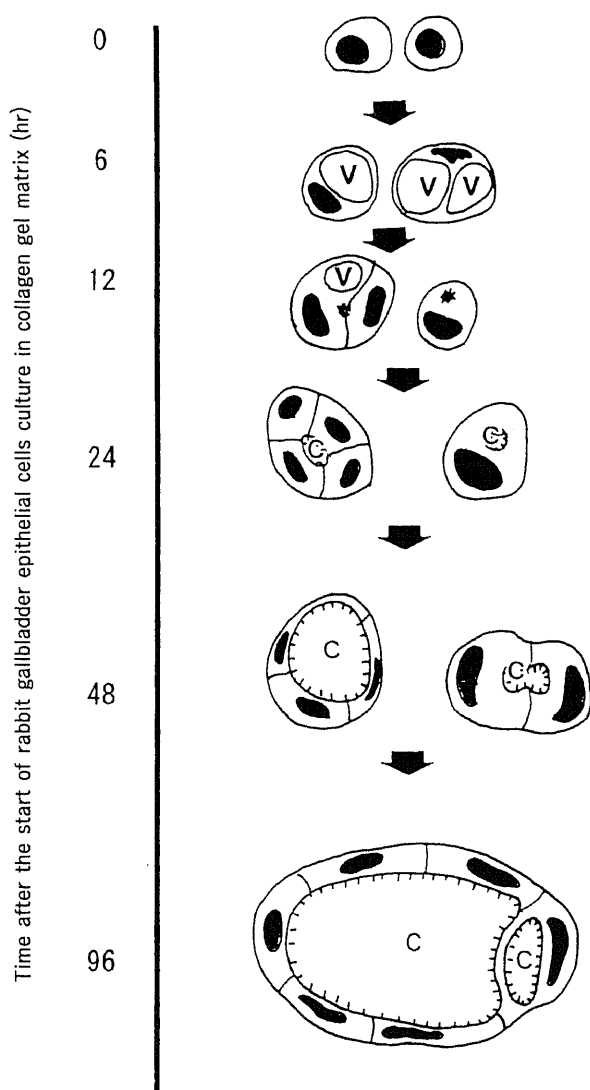


Fig. 4. Schematic presentation of loss and re-establishment of cell polarity in rabbit gallbladder epithelial cells cultured in the collagen gel matrix. Loss of cell polarity (until 12 hr): Polarity of columnar epithelial cells is lost and autophagic vacuoles appear transiently. Acquisition of cell polarity (during 12–48 hr): Intracytoplasmic cysts with microvilli are seen and the vacuoles disappear. Maturation of cell polarity (after 24 hr): Multicellular cysts develop. Cell polarity resembling cuboid to columnar epithelia is re-established. V, vacuoles C, cysts.

も, 数個の細胞集塊内でも) に粘液多糖類染色陽性の点状あるいは滴状の陽性物が出現した(図 6a). 12 時間後では PAS 染色陰性の空胞を同時に認めるものもあった. これらの胞体内の小囊胞は, 電顕的に内腔面に微絨毛を有する小囊胞で(図 7a), 後述の如く, 培養時間と共に大きくなり培養 48 時間後では増殖の結果, 上皮細胞塊の内部に囊胞をみる多細胞性囊胞に移行した. 上皮細胞の胞体内のみならず数個の隣接する上皮細胞の間に粘液多糖類陽性の小囊胞もみられた. 電顕的には, 小囊胞に向い, 分泌顆粒が出現し, また, 核周囲に中心体やゴルジ装置が出現し, 極性の形成傾向がみられた. 連続切片で微小囊胞を調べると, 一部はその行き先が同定出来ず細胞質内で消失していた. 一方, 細胞接着装置で囲まれた細胞間隙に開口する小囊胞もまれにみられた.

酵素組織化学的には ATPase は培養 24 時間では, 細胞膜と細胞内小囊胞の微絨毛, およびその他の内腔の膜面が染色された. ALPase は培養 24 時間では細胞周囲の細胞膜, 細胞内小囊胞の微絨毛, および内腔の一部の膜が染色された. ネマトライソゾーム, 2 次ライソゾームに陽性であった ACPase 活性は培養 24 時間目の細胞の細胞質内の細胞内囊胞は染色されず, 細胞内小囊胞の ACPase 活性は陰性であった.

## 3. 極性成熟期 (24 時間以降)

HE 染色では多細胞性の囊胞の形成が特徴であった. しかし, 同時に単細胞性あるいは 2 から 3 個よりなる上皮性細胞塊もみられた. 粘液多糖類染色では, 多細胞性囊胞には粘液多糖類がみられ, 特にその内腔縁が顕著であり(図 6b), 単細胞性あるいは 2 個から 3 個よりなる上皮細胞塊内にも粘液多糖類の貯溜がみられた. 多細胞性囊胞は 1 層性から 2, 3 層性であり, 胞体はやや好酸性であり, 壁内に篩状に粘液多糖類陽性の小囊胞がしばしばみられた. しかし, 1 層性に粘液多糖類が充満した上皮よりなる多細胞性囊胞もみられた.

電顕的には, 培養 48 時間以後で, 数個から十数個の上皮細胞からなる多細胞性囊胞を形成していた(図 7b). 囊胞内面には種々の密度の微絨毛を有し, 細胞間には接着装置が認められ, 培養時間とともに発達した. 内腔縁直下には飲み込み空胞(pinocytic vesicles)あるいは細胞陥入(invagination)の形成があり, 胞体内にはミトコンドリアなどの他の細胞内小器官が増加し, 胆嚢粘膜上皮に類似した. また, 核上部にゴルジ体が局在し, 分泌顆粒の囊胞内への放出像等, 囊胞内面へと向かう上皮細胞の極性がより分化し, 核下部では細胞内小器官は少なかった. なお, 全観察を通じて, 基底膜の形成は認められなかった.

酵素組織化学的には, ATPase は培養 2 日目で多細胞性囊胞の囊胞内腔の微絨毛と細胞膜, 細胞間隙, およびコラーゲンゲルと接した細胞膜が陽性となった. ALPase は培養 2 日目では多細胞性囊胞の囊胞内腔の一部の微絨毛と囊胞内の膜の一部, およびコラーゲンゲルと接した細胞膜が陽性となった. ACPase は培養 2 日目では細胞質内の小脂肪滴の膜が一部陽性となったが, 囊胞の微絨毛や囊胞内面は染色されなかった. 細胞質内のネマトライソゾームや 2 次ライソゾーム等の膜系が染色された.

## IV. レクチン組織化学法とルテニウムレッド染色による細胞膜型糖蛋白および粘液多糖類の変動

### 1. レクチン分布の光顕的検討

胆嚢粘膜上皮およびコラーゲンゲル内での上皮細胞のレクチ



ン結合性を表3に示す。Con A, PSA, VFA, WGA, DBA, SBA はいずれも胆嚢粘膜の内腔縁に結合性を示した(図1b)。コラーゲンゲル内の培養上皮でのレクチン染色では、極性を失った上皮細胞では空胞を含め Con A, PSA, DBA, SBA (図3c) は殆ど結合しなかった。なお、培養12時間後に形成された細胞内小空胞では染色を試みた6種のレクチンは結合を示さなかった。培養24時間目で DBA, ConA, VFA, WGA で細胞内の嚢胞内腔に沿って一部で膜状に陽性となった。さらに、WGA では細胞内嚢胞の内容物も染色され、培養48時間後では、これら6種のレクチンは嚢胞内腔縁が染色され(図6c)、さらに PSA が細胞質にび慢性に陽性となった。

## 2. レクチン組織化学: 電顕的検討(表4)

SBA 染色では胆嚢粘膜上皮では微絨毛と細胞膜に陽性であった。ゲル内培養では6から12時間後では陰性であったが、培養24時間後に小嚢胞内腔面の微絨毛、細胞間隙、ゴルジ装置、分泌顆粒が陽性となった。

WGA 染色では胆嚢粘膜上皮内腔縁は陽性、ゲル内培養では、培養6時間後に細胞膜が陽性で細胞内腔は陰性であったが、培養24時間後に細胞内小嚢胞の内腔の微絨毛が陽性となっ

た。

DBA 染色では胆嚢粘膜上皮の微絨毛と細胞膜が陽性、ゲル内培養では培養6から12時間後では陰性であったが、培養24時間後に小嚢胞内腔面の微絨毛、細胞間隙、ゴルジ装置、分泌顆粒が陽性となった(図8)。

## 3. ルテニウムレッド染色(表4)

胆嚢粘膜上皮では、胆嚢内腔の微絨毛と粘液分泌顆粒が陽性であった(図9a)。一方、ゲル内培養上皮では培養6時間までは、細胞表面に残っている微絨毛と細胞の翻入(infoldings)様突起の一部が陽性であった。しかし、培養24時間後では、上皮細胞の胞体内の小嚢胞の微絨毛膜と細胞質内の嚢胞周囲の分泌顆粒に陽性像がみられ、嚢胞に開口している像も見られた(図9b)。48時間後の多細胞性嚢胞では内腔面が陽性であった。

## V. CB および TGF $\beta$ 1 添加による培養胆嚢粘膜上皮細胞の極性と形態像の変化

### 1. CB 添加による影響

HE 染色による観察で、多細胞性嚢胞を構成する上皮細胞の相互の接着性が低下し、添加後48時間では、嚢胞を形成している細胞がバラバラになるものも出現した。また、この変化と同

Table 3. Lectin binding to rabbit *in vivo* gallbladder epithelial cells and those cultured in collagen gel matrix

Lectins <i>in vivo</i> gallbladder cells		Reactivity at the time (hr) after the start of <i>in vitro</i> culture				
		6~	12~	24~	48~	96~
ConA	A-CM (+)	—	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
			Cyto (+)	Cyto (+)	Cyto (+)	Cyto (+)
			Vac (—)	ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
				ICC-C (—)	ICC-C (—)	ICC-C (—)
PSA	A-CM (+)	—	O-CM (±)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
			Cyto (—)	Cyto (—)	Cyto (+)	Cyto (++)
			Vac (—)	ICC-M (—)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
			ICC-C (—)	ICC-C (—)	ICC-C (—)	
VFA	Cyto (+) A-CM (+)	O-CM (—) Cyto (+) Vac (—)	O-CM (—)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
			Cyto (++)	Cyto (+++)	Cyto (+)	Cyto (++)
			Vac (—)	ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
				ICC-C (—)	ICC-C (—)	ICC-C (—)
WGA	A-CM (+)	O-CM (+) Cyto (+) Vac (—)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (++)
			Cyto (+~—)	Cyto (++)	Cyto (+)	Cyto (++)
			Vac (—)	ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (++)
				ICC-C (+)	ICC-C (+)	ICC-C (+)
DBA	A-CM (+)	—	—	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
				Cyto (+)	Cyto (+)	Cyto (+)
				ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
				ICC-C (—)	ICC-C (—)	ICC-C (—)
SBA	A-CM (+)	—	—	O-CM (—)	O-CM (+)	O-CM (+)
				Cyto (+)	Cyto (+)	Cyto (+)
				ICC-M (+)	ICC-M (+)	ICC-M (+)
				ICC-C (—)	ICC-C (—)	ICC-C (—)

ICC, intracytoplasmic cysts; ICC-M, ICC-membrane; ICC-C, contents in ICC; Muc, mucus granules; Cyto, cytoplasm; A-CM, apical cell membrane; O-CM, outer cell membrane; Con A, concanavalin A; PSA, *Pisum sativum* agglutinin; VFA, *Vicia faba* agglutinin; WGA, wheat germ agglutinin; DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; SBA, soybean agglutinin.

Grading performed on the following scale; ++, intense; +, moderate; —, negative.

時に、上皮細胞の胞体内に様々な大きさの小空胞が出現した。粘液多糖類染色ではこれらの小空胞は内腔面と分泌物が PAS やその他の粘液多糖類染色で陽性であった (図 10a)。しかし、少数ではあるが陰性の空胞もみられた。レクチン組織化学でも

DBA, SBA, WGA の結合する空胞と結合しない空胞がみられた。一方、多細胞性囊胞の内面は DBA, SBA, WGA のいずれも結合性を示した。

電顕的観察では、培養上皮細胞内に出現した小囊胞には大き

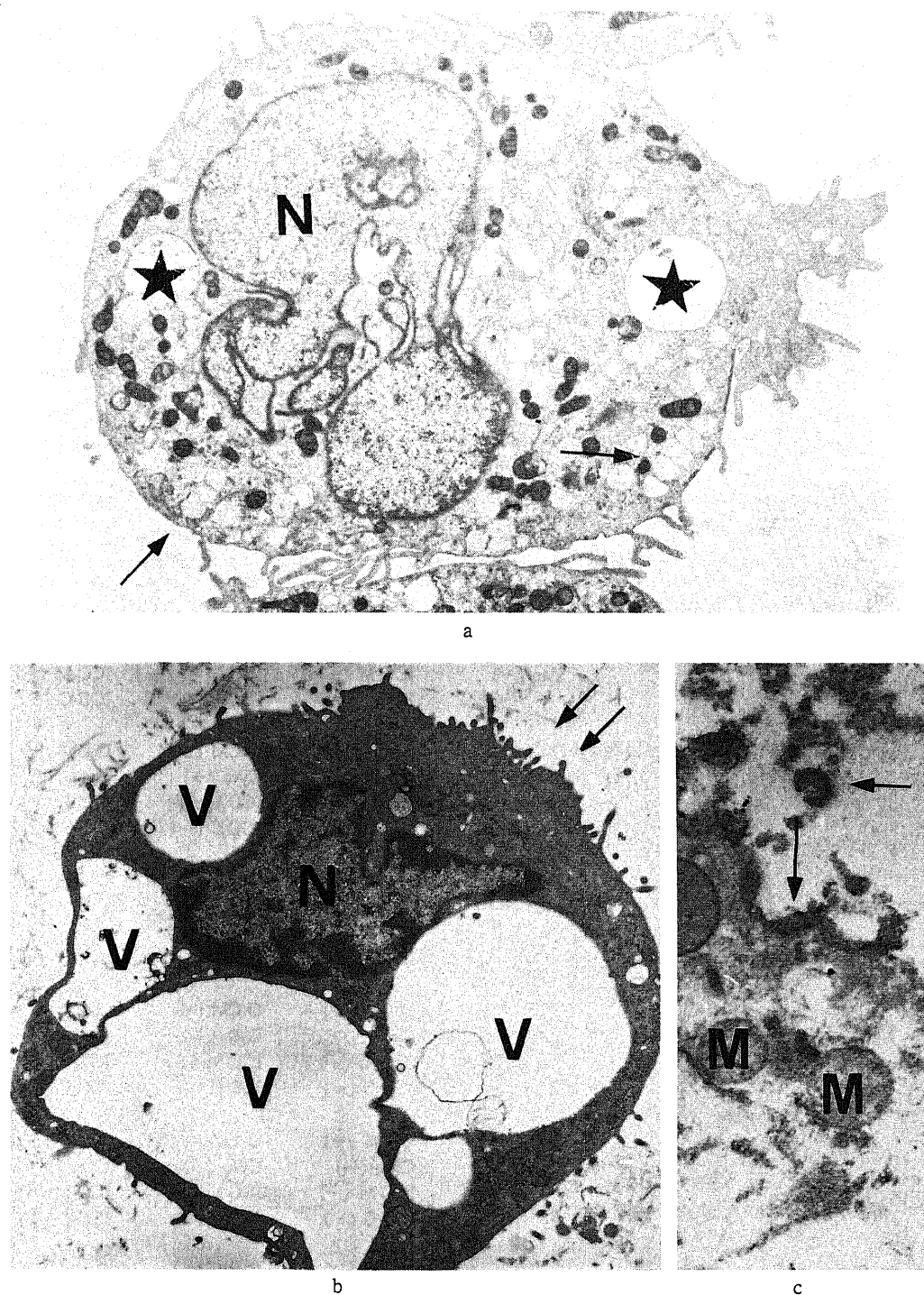


Fig. 5. Ultrastructural features of gallbladder epithelial cells cultured in the collagen gel matrix. The cells were cultured for 6 hr (a) and 12 hr (b, c), (the phase of loss of cell polarity). a: Cellular organelles are reduced in their number. There are several clusters of secretory granules (arrows), and mitochondria, and foci of longer villi on the cell surface. A few autophagic vacuoles (stars) are also seen in its cytoplasm. N, nucleus.  $\times 6,000$ . b: Several intra-cytoplasmic vacuoles (V) are seen, and compress nucleus (N). Cellular organelles are greatly reduced in their number. There is a foci of microvilli on the cell surface, reminiscent of luminal surface (arrows),  $\times 6,500$ . c: Reaction products (arrows), indicating the presence of acid phosphatase are identifiable on the wall of intracellular vacuoles and also in their contents. M, mitochondria. Ultrastructural demonstration of acid phosphatase by Gomori's method.  $\times 15,000$ .

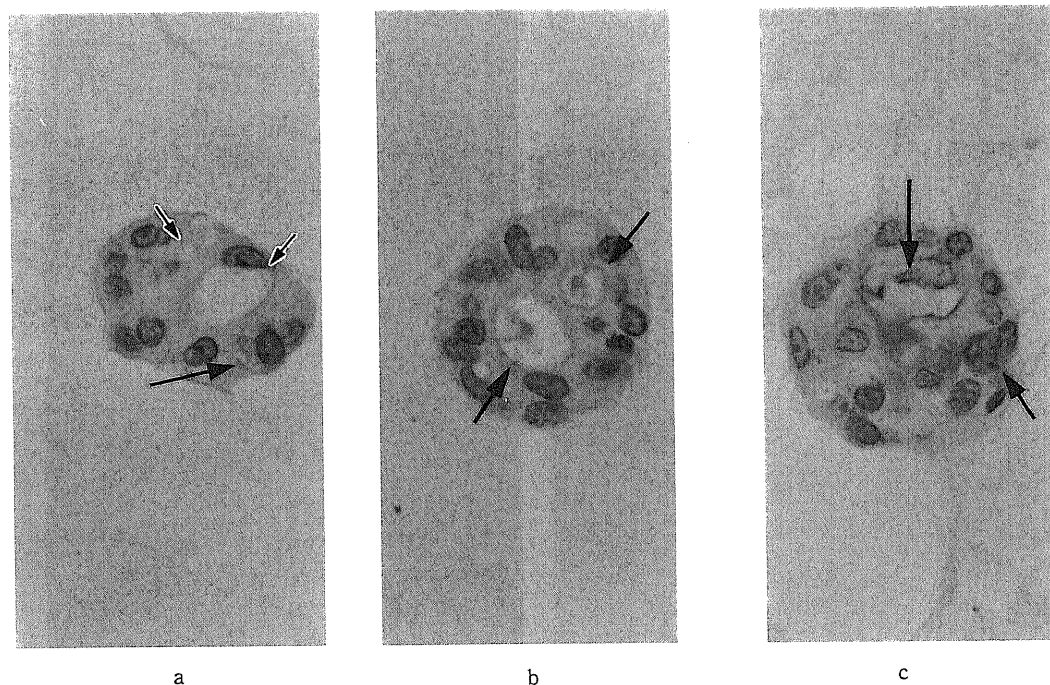


Fig. 6. Aggregated rabbit gallbladder epithelial cells cultured in the collagen gel matrix. The cells were cultured for 24 hr (a) and 48 hr (b, c), contain PAS-positive intracytoplasmic microcysts and also PAS-negative autophagic vacuoles (the phase of acquisition of cell polarity). a: Mucus glycoprotein is demonstrable in intracytoplasmic microcyst, while there are PAS-negative autophagic vacuoles (a small arrow head) simultaneously in this cell aggregate. PAS staining,  $\times 460$ . b: Epithelial cell aggregates are increased in their size, compared to the previous one (a, 24 hr). Mucinous cyst (large arrow heads) became multicellular and were surrounded by multi-layer of cells. PAS-positive mucus glycoprotein is seen on the luminal border and also in the lumen of these cysts (arrow). Some vacuoles are PAS-negative. PAS staining,  $\times 460$ . c: Reaction products by DBA lectin histochemistry are seen in the lumen and also on the luminal border of cysts (arrows), locations corresponding to PAS-positive materials (b).  $\times 460$ .

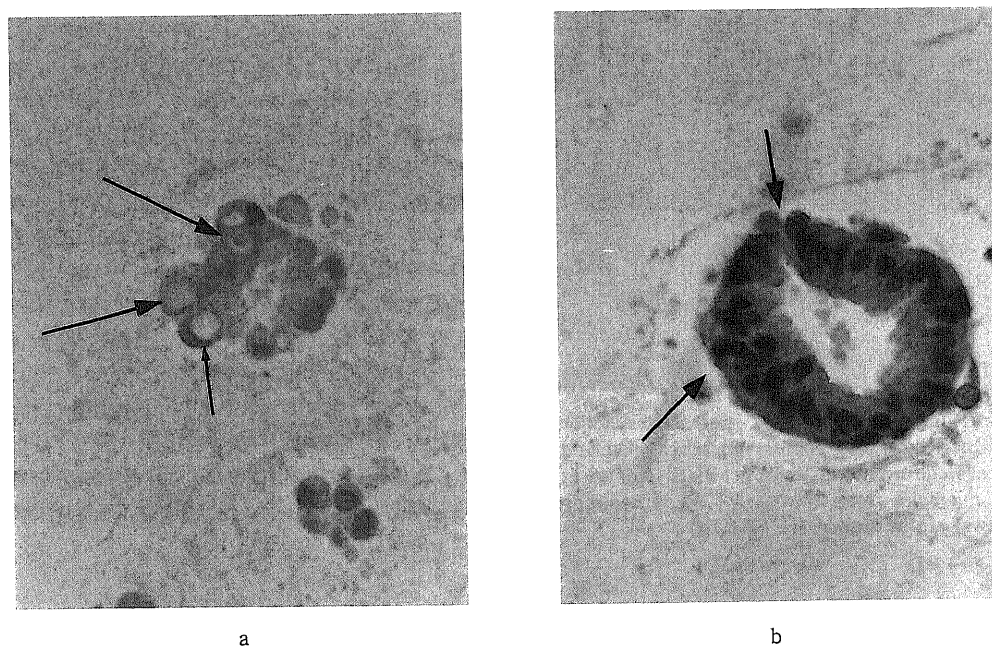


Fig. 10. The effect of cytochalasin B and transforming growth factor  $\beta 1$  on the morphological polarity of gallbladder epithelial cells cultured in the collagen gel matrix. a: Forty eight hours after addition of cytochalasin B  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  into the culture medium. Multicellular cyst of gallbladder epithelial cells, shows vacuoles (large arrow heads) in the cytoplasm and some of these vacuoles are positive for PAS, while others are negative (a small arrow head). Cell-cell adhesions of these multicellular cysts are loosened and disintegrated. PAS staining,  $\times 460$ . b: Forty eight hours after addition of transforming growth factor  $\beta 1$   $1 \text{ ng}/\text{ml}$  into the culture medium. Multicellular cysts (arrows) of rabbit gallbladder epithelial cells are of high columnar epithelial cells showing nuclear stratification. There are no mucin-positive microcysts in the wall of the multicellular cyst. HE staining,  $\times 460$ .

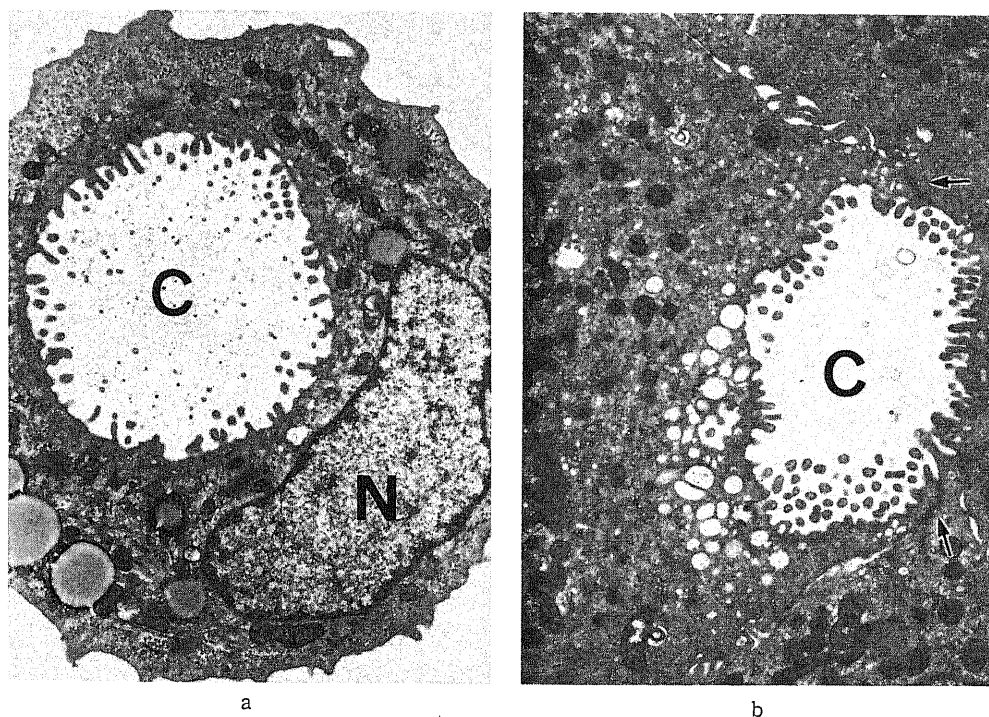


Fig. 7. Ultrastructural features of rabbit gallbladder epithelial cells cultured in the collagen gel matrix. The cells were cultured for 24 hr (a), and 48 hr (b). a: Intracytoplasmic cyst (C) is covered with microvilli and contains a small amount of glycocalyx substance. Cell organelles tend to be polarized around the cystic lumen.  $\times 6,500$ . b: Microcyst (C) composed of several epithelial cells, and covered with microvilli. Junctional complexes (arrows) and secretory granules under the microvilli are seen.  $\times 4,600$ .

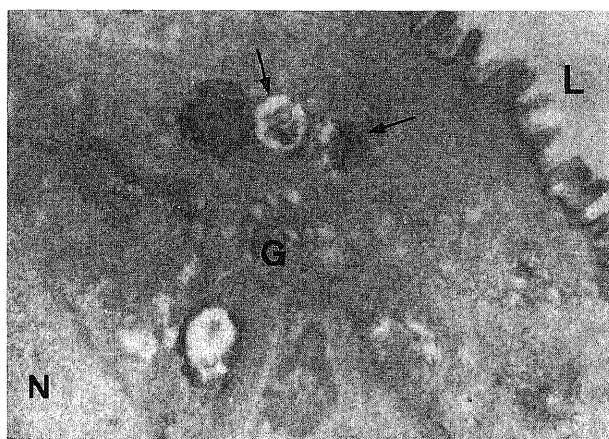


Fig. 8. Ultrastructural demonstration of the reaction products by DBA lectin histochemistry in rabbit gallbladder epithelial cells cultured in collagen gel matrix for 48 hr. Membrane of microvilli, Golgi apparatus (G) and secretory granules (arrows) are lectin-positive.  $\times 5,700$ .

く2種類あり、密な微絨毛を内腔に付するものと、微絨毛に比べ、やや密度が低く、また長い絨毛が付着しているものが見られた(図 11a)。微絨毛の密在するものでは粘液様の無構造の物質が空腔内腔にみられ、内腔に接する細胞質に無構造な物質の層状の沈着がみられた(図 11b)。一方、長い絨毛を有するものでは内腔に粘液様の物質はなく、また、無構造な物質の沈着もみられなかった。また、一部の細胞では微絨毛が、細胞の外側、つまりコラーゲンゲルと接した面にも出現し、これらの微

絨毛の中心部には微小管が認められた。

## 2. TGF $\beta$ 1 添加による変化

HE 染色による検討では、TGF $\beta$ 1 添加群では非添加群に比べ、嚢胞を構成する壁が肥厚し、細胞は高円柱状となる傾向が強く、核の多層化や核濃染像やいびつな核の出現もみられた(図 10b)。粘液多糖類染色では、いずれの染色でも多細胞性嚢胞の内腔面が種々の程度染色され、一部で染色性の低下もみられ、壁を構成する数層性の上皮細胞間にある小嚢胞では殆ど消失した。レクチン染色では DBA, SBA, WGA がいずれも嚢胞の内腔面に陽性となった。

電顕的観察では、多細胞性嚢胞の構成細胞は円柱状となり、細胞間隙にはよく発達した鉗合ひだが見られ(図 12a)、核がコラーゲンゲル側に偏在する様になり、核上部に発達した粗面小胞体とミトコンドリアがみられ、核上部にはゴルジ装置が、また多くの分泌顆粒が細胞内腔面に位置していた(図 12b)。また、細胞間接着装置(密着結合、接着帯、接着斑)は発達し、飲み込み小胞や細胞陥入が内腔面の細胞膜直下に多数みられ、開口分泌像も認められた。

## 考 察

我々の以前の研究で、家兎胆嚢より単細胞化した粘膜上皮をコラーゲンゲル内で三次元的に培養すると、2日から3日後に立体的組織構造(多細胞性嚢胞)を形成することを明らかにした<sup>14)15)</sup>。本法は胆道系上皮細胞の極性の検討(特に、極性の消失と逆転)に有用な方法と考えられたので、今回、コラーゲンゲル内培養の初期像を中心に培養細胞の形態変化を極性の面から検討した。なお、胆道系上皮での極性の維持や調節、その異常



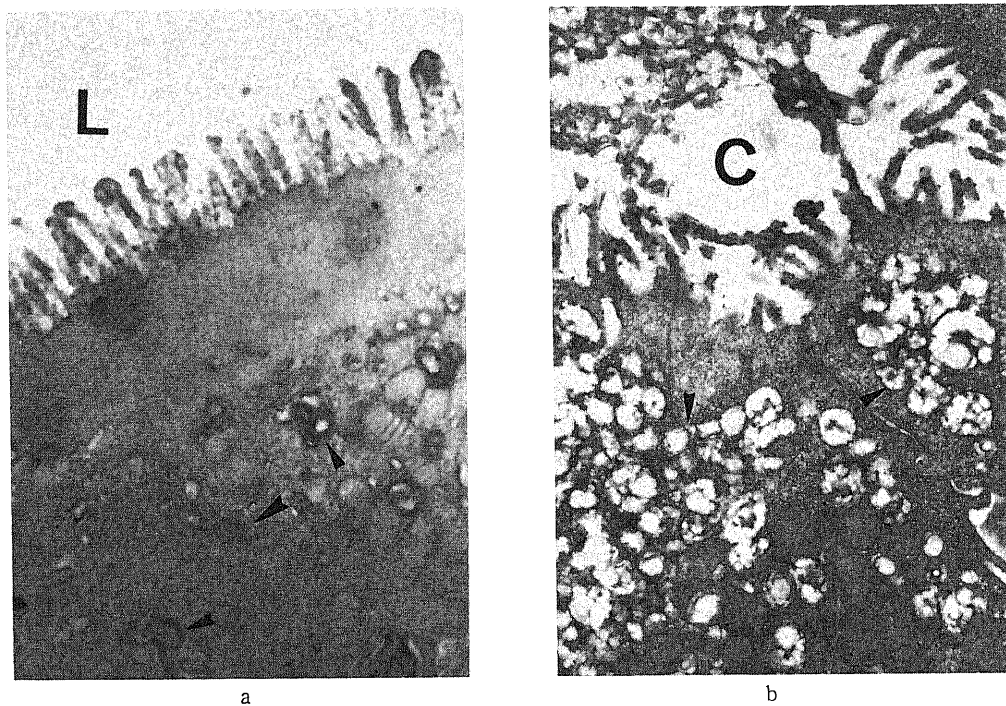


Fig. 9. Ultrastructural distribution of reaction products by ruthenium red staining in the rabbit gallbladder epithelial cells. Normal *in vivo* cells (a), and cultured cells in the collagen gel matrix for 24 hr (b). a: Reaction products are identifiable on the microvilli and the secretory granules (arrow heads). L, lumen of the gallbladder.  $\times 6,500$ . b: Reaction products are identifiable on the microvilli and the secretory granules (arrow heads). C, cystic cavity,  $\times 6,500$ .

Table 4. Ultrastructural location of mucus and lectin binding to rabbit *in vivo* gallbladder epithelial cells and those cultures in collagen gel matrix

Staining <i>in vivo</i> gallbladder cells		Reactivity at the time (hr) after the start of <i>in vitro</i> culture			
		6 ~	12 ~	24 ~	48 ~
DBA	MV (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
	O-CM (+)	Vac (-)	Vac (-)	L-CM (-)	L-CM (+)
	L-CM (+)			SG (+)	SG (+)
				Golgi (+)	Golgi (+)
				ICC-MV (+)	ICC-MV (+)
SBA	MV (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
	O-CM (+)	Vac (-)	Vac (-)	L-CM (+)	L-CM (+)
	L-CM (+)			SG (+)	SG (+)
				Golgi (+)	Golgi (+)
				ICC-MV (+)	ICC-MV (+)
WGA	MV (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
	O-CM (+)	V (+)	V (+)	V (+)	V (+)
	L-CM (+)	Vac (-)	Vac (-)	ICC-MV (+)	ICC-MV (+)
Rutheium red stain	O-CM (+)	V (+)	V (+)	O-CM (+)	O-CM (+)
	MV (+)	Vac (-)	Vac (-)	V (+)	V (+)
				ICC-MV (+)	ICC-MV (+)
				SG (+)	SG (+)

ICC, intracytoplasmic cysts; ICC-MV, ICC-microvilli; Cyto, cytoplasm; SG, secretory granules; Vac, vacuoles; Golgi, Golgi apparatus; V, long villi on the cell surface; O-CM, outer cell membrane; L-CM, lateral cell membrane; DBA, *Dolichos biflorus* agglutinin; SBA, soybean agglutinin; WGA, wheat germ agglutinin; +, positive; -, negative.

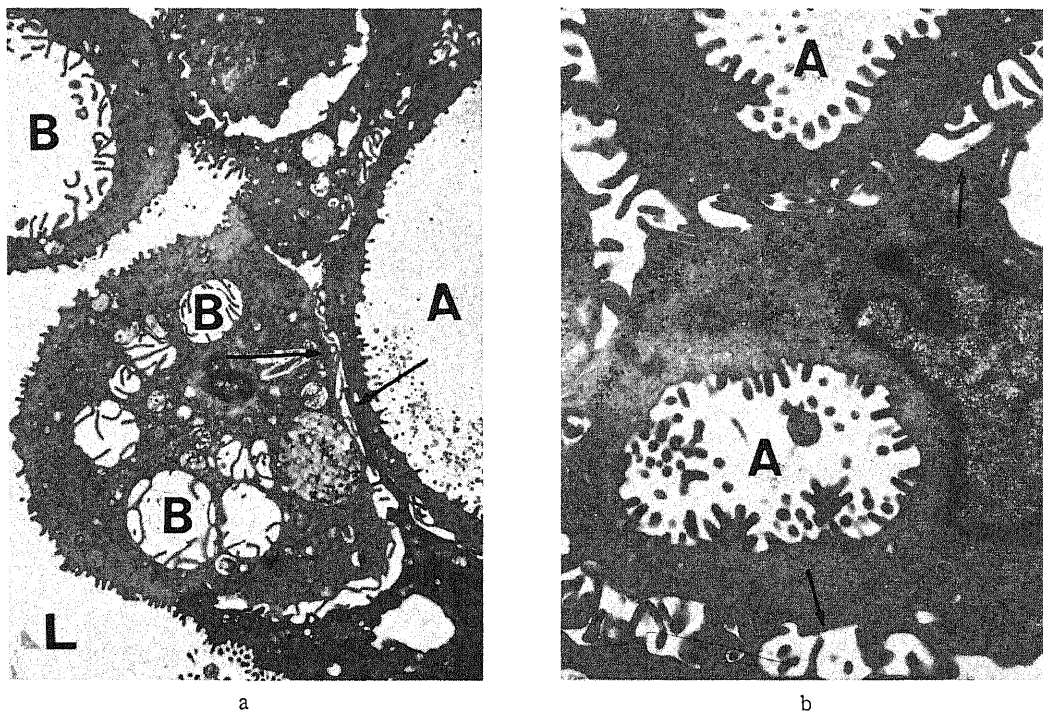


Fig. 11. Ultrastructural features of rabbit gallbladder epithelial cells show intracytoplasmic microcysts in the multicellular cyst wall 48 hr after addition of cytochalasin B 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  into culture medium. Some microcyst (A) are covered with microvilli and contain glycocalyxal substance, while the others (B) are lined by several slender villi. There are a thick zone of amorphous substance around microcysts (A). Intercellular lateral space are widened (arrows). L, lumen of multicellular cyst; N, nucleus, a: Lower magnification,  $\times 4,500$ . b: Higher magnification,  $\times 8,500$ .

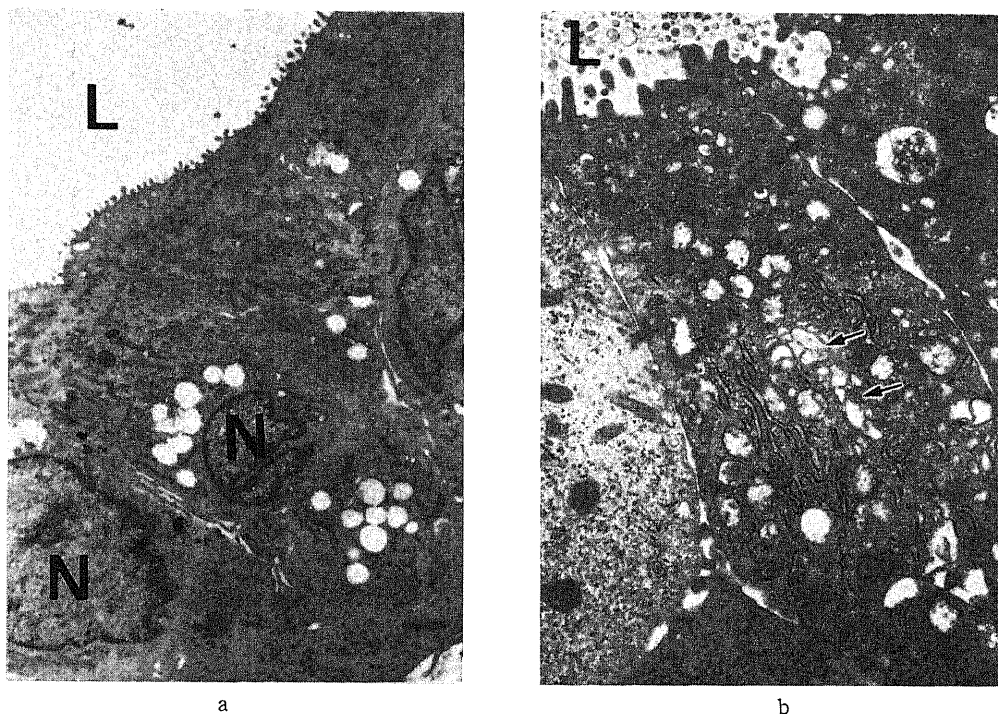


Fig. 12. Ultrastructural features of cultured rabbit gallbladder epithelial cells represent the features of the *in vivo* gallbladder mucosa 48 hr after addition of transforming growth factor  $\beta 1$  1 ng/ml into the culture medium. The nucleus is in the area facing the collagen gel matrix (a), junctional complexes, Golgi apparatus (arrows) and rough endoplasmic reticulum are in the apical cytoplasm (b). Luminal surface is covered with microvilli. L, cystic lumen; N, nuclei. a: Lower magnification,  $\times 4,500$ . b: Higher magnification,  $\times 8,500$ .

に関する詳細な検討は従来殆どなされていない。これらの変化は図4の模式図に示す様な大きく三つの時期(極性消失期, 極性獲得期, 極性成熟期)に分けて理解することが可能であったので, これらの時期を中心に考察する。

極性消失期は, 培養開始から12時間の間にみられた。つまり, 単細胞化した胆嚢上皮細胞をコラーゲンゲル内で培養すると, 胆嚢粘膜上皮の極性が完全に消失する。つまり, 電顕的に細胞接着装置は認められなくなり, 微絨毛やこれに向かう細胞内小器官の配列が消失し, 細胞小器官も著しく減少した。また, 粘液多糖類染色で, 本来, 胆嚢粘膜内面に検出される中性や酸性の粘液多糖類も消失し, また, Con A, SBA, DBA, WGAなどのレクチン結合性も殆ど消失した。これらのことは, 少なくとも胆嚢粘膜上皮の単細胞化に伴い, 胆嚢粘膜上皮細胞が本来持っていた細胞内合成蛋白質に対する硫酸化や炭酸付加, さらには糖付加機構が消失し, その結果, これらの糖蛋白質が粘膜上皮に発現されなくなり, これらの細胞極性に関連する小器官の発現や形成がみられなくなったことを意味すると思われる<sup>30)</sup>。また, その基礎となる蛋白質そのものの合成が停止したのかも知れない。なお, コラーゲンゲル内に培養された直後には, 単細胞化した粘膜上皮細胞の一部に微絨毛やこれに向かう細胞内小器官がわずかに認められたが, これは本来の胆嚢粘膜の構造が遺残している状態と考えられる。

この極性消失と連動して, 培養直後よりほとんどの上皮細胞内(1個1個バラバラになったものから, 3個から4個の小嚢胞を形成するものまで)に種々の大きさの空胞が一過性に形成され, 6時間でピークとなり, 12時間前後で消失した。この空胞はライソゾームのマーカー酵素である酸性フォスファターゼが陽性であり, 大型の2次ライソゾーム(自己消化空胞)と考えられた。胆嚢粘膜の上皮細胞を単細胞化してコラーゲンゲル内で培養した結果, 細胞は小型球状細胞になるが, その際に不必要な細胞内小器官や障害された細胞内成分を貪食した結果出現した自己消化空胞と考えられ, 細胞の再構築(remodelling)に関連した現象と考えられる。なお, これらの極性の消失と自己消化空胞の出現は単細胞性にバラバラとなった細胞にも, また, 2個から数個の細胞塊を形成したものにもみられたので, 単細胞化そのものがこれらの病変の発現に必須ではなく, 分離された上皮細胞が新たな培地内に包埋された結果生じたものと考えられた。いずれにしても, 細胞の分離, 単細胞化に伴う高度の細胞障害のため出現し, これらの空胞を持つ上皮細胞の一部は死滅していくのかも知れない。Gautamら<sup>30)</sup>も, 単離した直後のラット肝細胞では一過性に自己消化性の空胞が増加するが, 培養4時間目までにはほとんどが消失したと述べている。この空胞は肝細胞を分離する際の細胞の障害により出現したと考えており, 細胞の障害部位が自己消化を受けた像と考えている。

極性獲得期は培養後12から24時間にみられ, コラーゲンゲル内で極性を失った粘膜上皮細胞が, 再び生体の胆嚢粘膜に似た組織へと変換, 分化を開始する時期で, 後述の極性成熟期を特徴付ける多細胞性嚢胞形成へ至る中間的な過程として出現する。すなわち, 培養12時間以降で, 1個から数個の細胞集塊の培養上皮細胞内の胞体内に種々の粘液多糖類染色[PAS, AB(pH2.5), HID, ムチカルミン染色]で種々の程度に染まる微小嚢胞が形成される。初期には, 上述の自己消化空胞と粘液顆粒が同じ細胞塊内にみられた。電顕的な特徴として, その内腔縁は

胆嚢粘膜内腔縁に類似した微絨毛で覆われ, 酵素組織化学的にALPaseやATPaseが陽性であり, 細胞表面の糖衣を染色するルテニウムレッドも陽性で, Con A, PSA, WGA, DBA, SBAのレクチン結合性を示す。しかし, 胆嚢粘膜上皮や後述の多細胞性嚢胞の内腔面での粘液多糖類や糖鎖の発現に較べると, 分布も染色強度も狭く弱い。このことは, これらの培養細胞での蛋白質合成, さらにこれらの蛋白質に対する糖付加や硫酸化, シアル酸化が始まり, 細胞内腔縁へと移動し, 細胞内微小嚢胞内に放出されることを示唆している。微絨毛の存在もこの内腔に物質を積極的に分泌, あるいは一部は吸収している像かも知れない。なお, この時期から培養上皮細胞は増殖し, 数個以上の細胞集塊を形成し, これと相まって細胞内小嚢胞の形成から細胞内小嚢胞相互の融合へと進展し, 2個から3個の細胞よりなる細胞間小嚢胞となる像がみられる。そして, これらの小嚢胞へと向かう細胞内小器官の配列も明瞭となってくる。この像は, 肝細胞のカップレットで形成される毛胆管およびその周囲の形態<sup>32)</sup>と類似していた。

これらの細胞内微小嚢胞あるいは2個から3個の細胞よりなる小嚢胞は細胞増殖と平行して次第に大きくなったが, 単細胞あるいは2個から3個の上皮塊内にみられるものもあり, これらでも胞体内腔あるいは細胞間の内腔に粘液多糖類が貯留しており, 粘液分泌能は細胞増殖とは別途に進展していくことが示唆された。

極性成熟期は培養開始後24時間以後に出現し, 多細胞性嚢胞が完成する時期であり, その形態像は次第に生体の胆嚢粘膜上皮に近似あるいは類似してくる。この時期の詳細は既に, 河村ら<sup>14)15)</sup>によって述べられているので簡単に述べる。多細胞性嚢胞は十数個の細胞から形成され, 1層から数層の壁を構成し, 嚢胞内腔は粘液の貯溜を伴い, 次第に大きくなり, また細胞数の増加にともなって細胞の極性がさらに明瞭となる。接着装置が隣接した細胞膜の管腔側に認められた。さらに, ミトコンドリアや粗面小胞体等の細胞内小器官も増加し, 核上部に多くみられた。また, 壁を構成する細胞内にも小嚢胞が形成される。そして, 多細胞性嚢胞と小嚢胞の管腔面は粘液多糖類染色が強陽性となり, 細胞から管腔面に粘液が産生されていることが判った。つまり, 胆嚢粘膜上皮の内面を特徴付ける所見が, 新たに形成された嚢胞内面で完成されたことを意味する。

これらの嚢胞内面でレクチン染色やルテニウムレッド染色により検出される細胞膜型糖蛋白質も, 胆嚢粘膜上皮と同じであり, 極性獲得期より極性成熟期でより強く高度に染色された。また, ルテニウムレッド染色が多細胞性嚢胞の細胞内の粘液顆粒にも陽性となり, 培養胆嚢上皮細胞が本来持っていた極性を獲得したことを意味すると考えられた。これらの成績は培養細胞が粘液多糖類の産生と分泌能を獲得し, ゴルジ装置で蛋白質への糖鎖の付加が行われていることを意味しており, レクチン組織化学染色での糖鎖構造の変化は, これらの形態変化を反映していると思われる。

なお, 本実験で酸性フォスファターゼ陽性の管状物が胞体内にみられた。最近, この様な構造物がネマトライソゾームと呼ばれ<sup>30)</sup>その機能的意義が注目されている。本実験でもACPase反応で出現し, 細胞極性に深く関係しており, その意義を検討する必要がある。

さて, 組織や細胞の増殖, 成熟や極性発現は多因子の影響の下に形成される。これらの因子の中で, 最近, 細胞骨格と増殖



因子, それに細胞外基質が注目されている。今回, これらの中から, 細胞骨格に種々の影響を与える CB と増殖因子の 1 種である TGF $\beta$ 1 を培地内に添加し, コラーゲンゲル内での培養胆嚢上皮細胞に及ぼす影響を細胞極性の観点に注目し検討した。

CB はマイクロフィラメントの配列を障害し, 上皮細胞の分泌や細胞の運動など細胞膜が関連する物質の移送に関連した機序を障害する。Carruthers ら<sup>22)</sup> は, 細胞の極性は細胞骨格によって大きく規定されていると述べており, マイクロフィラメントの重合阻害剤である CB を添加すると, 培養小腸粘膜上皮内に刷子縁を有する異常な嚢胞が形成されるので, 細胞骨格が刷子縁の位置の決定に重要だとしている。今回の我々の実験でも, コラーゲンゲル内で上皮細胞としての極性がある程度完成した多細胞性嚢胞に CB を添加すると, 嚢胞を構成する細胞の接合がゆるみ, 48 時間後には構成上皮細胞がバラバラになる嚢胞も出現した。もう 1 つの特徴的所見として, 個々の細胞の胞体内に微絨毛を有する 1 個から 2 個の細胞内嚢胞が形成されるようになったことがあげられる。これらの所見は細胞極性の乱れの出現を意味する。今回の実験は Carruthers ら<sup>22)</sup> の, 細胞の極性はマイクロフィラメントによって調節されているとの考えを支持するものである。また, CB の添加により, 微絨毛の密在する小嚢胞の直下に層状に無構造物質が沈着したが, これは CB により重合が阻害された未重合のアクチンフィラメントの集合した像と考えられる。この像は肝細胞での毛胆管周囲でも出現することが知られている<sup>31)</sup>。さて, 先天性の乳児難治性下痢症として先天性微絨毛萎縮症が知られている<sup>34)</sup>。本症では近位の小腸の微絨毛が低形成性で, 電顕では腸上皮の刷子縁が障害され, 内腔面が平坦となり, 胞体内に巻き込む様に多数の微絨毛を伴った小嚢胞が形成されることが Phillips ら<sup>35)</sup> により報告されている。この像は今回の実験での CB 処理の際にみられる変化に類似しており注目される。Carruthers ら<sup>22)</sup> の述べている如く, 本症でもマイクロフィラメントを含めた細胞骨格の障害がこの微絨毛封入体 (microvillus involution) の発生に関係していると推定される。本実験モデルが本疾患あるいはこれと類似する胆道系疾患の病態の解明に応用できるかも知れない。次に, TGF $\beta$ 1 が胆嚢粘膜上皮の極性に及ぼす影響を検討した。TGF $\beta$ 1 は体内の全ての組織に存在し, その作用は多様であり, 細胞の増殖, 分化, さらには細胞機能の調節に関与している。TGF $\beta$ 1 は増殖因子の 1 つとして分類はされているが, 一部の間葉系細胞を除く多くの細胞に対して強力な増殖抑制因子として作用し, 組織の形態の成熟と細胞外マトリックスの合成の促進に重要な役割をもっている<sup>9)</sup>。肝臓では様々な非実質細胞から放出され, 細胞外基質を産生し<sup>36)</sup>, また肝細胞に対して強力な増殖抑制作用を示すことが知られており, 線維化や肝硬変への移行に関係するとされている<sup>37)</sup>。しかし, 非実質細胞である胆道系上皮に対する具体的な作用に関しては不明な点が多い。今回の実験では, 1 ng/ml の TGF $\beta$ 1 をコラーゲンゲル培地に添加し, コラーゲンゲル内で EGF と FBS の併用下で多細胞性嚢胞への影響をその形態像の変化を中心に調べた。なお, この量の TGF $\beta$ 1 により, EGF や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) によって促進される肝細胞の DNA 合成が完全に抑制されることが知られている<sup>21)</sup>。TGF $\beta$ 1 添加の結果, 嚢胞を構成する扁平で 1 層の上皮細胞は, 細胞の丈がのび, また多層化の変化を示し, また細胞相互の接着性 (発達した細胞接着装置を伴う) が増した。そして, 形態学的には上皮

細胞の極性形成と成熟が促進され, 生体の胆嚢粘膜上皮に類似した形態, あるいはより長期間コラーゲンゲル内で培養した胆嚢粘膜に類似した。また, 粘液多糖類染色でも嚢胞内腔面が線状に PAS で強陽性になり, DBA 等のレクチン結合態度からもより生体の胆嚢上皮細胞の表現型に類似していた。このことは, TGF $\beta$ 1 が, 胆嚢上皮細胞に作用して形態形成や極性形成 (成熟過程) を促進する作用を持っていることを示唆する。TGF $\beta$ 1 が間質細胞に作用するだけでなく, 胆道系上皮細胞の分化を促進する働きが明かとなった。

以上, 胆嚢上皮のコラーゲンゲル内培養法は, 胆道系上皮細胞の成熟と細胞極性形成を三次元的に検討でき, さらに細胞極性に影響を及ぼす種々の因子の作用を解析するに際し, 有用で簡便な方法であると考えられた。

## 結 論

家兔胆嚢粘膜上皮細胞を分離, 単細胞化し, コラーゲンゲル内培養し, その初期を細胞極性の面から観察し, また, 細胞極性に变化を与える 2, 3 の物質を添加し, 細胞極性に及ぼす影響を形態学的に観察した。

1. 培養直後から 12 時間で, 上皮細胞が持っている極性は消失した (極性消失期)。この時, 一過性に酸性フォスファターゼ陽性の自己消化空胞が出現し, 培養に伴う細胞障害や細胞の再構築に関連して出現した現象と考えられた。

2. 培養 12 から 24 時間前後で, 微絨毛を有し, 粘液多糖類陽性の小嚢胞が上皮細胞の胞体内に出現した (極性獲得期)。

3. 培養 24 から 48 時間で, この小嚢胞は多細胞性嚢胞になった (極性成熟期)。細胞小器官は増加し, 細胞間には発達した接着装置が認められ, 核上部でのゴルジ体の形成, 分泌顆粒の嚢胞内への放出像等がみられ, 嚢胞内面へと向かう細胞の極性発現が形成された。

4. 細胞極性形成に平行して, 生体の胆嚢粘膜上皮の微絨毛やゴルジ体にみられる糖鎖 (Con A, DBA, SBA, WGA などのレクチンに対する結合性とルテニウムレッド染色で陽性) や膜酵素 (ATPase, ALPase) の発現がみられた。

5. マイクロフィラメント重合阻害剤である CB の添加により, 多細胞性嚢胞の上皮細胞の接着性を低下させ, さらに, 上皮細胞内に微小嚢胞の形成が促進された。

6. 増殖因子の 1 種である TGF $\beta$ 1 の添加により, 培養細胞での極性発現は大きく修飾され, 多細胞性嚢胞の接着性が亢進し, 細胞は多層化し, 嚢胞の成熟を促進した。

以上, コラーゲンゲル内培養法は, 細胞極性の消失と発現の研究, さらに極性に異常を与える種々の物質の作用機序の研究に有用かつ簡便な方法と考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導頂きました本学名誉教授太田五六先生に深謝致します。また終始御指導と御校閲を賜りました本学第二病理学教室中沼安二教授に心より感謝します。本研究にあたり, 御協力と御序言を頂きました本学第二病理学教室の齋藤勝彦講師, 細正博講師を始めとする本学第二病理学教室の諸先生, 技師の諸氏に深く感謝します。なお, 本研究の一部は第 81 回日本病理学会総会 (1991 年, 仙台) で発表した。

## 文 献

- 1) Molitoris, B. A. & Nelson, W. J.: Alterations in the

establishment and maintenance of epithelial cell polarity as a basis for disease process. *J. Clin. Invest.*, **57**, 5-20 (1987).

2) Musat, A., Sattler, C. A., Sattler, G. L. & Pitot, H.: Reestablishment of cell polarity of rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, **18**, 198-205 (1993).

3) 武田勝男: 腫瘍, 新病理学総論, 第1版, 401-520頁, 南山堂, 東京, 1981.

4) Haralson, M. A.: Extracellular matrix and growth factors: An integrated interplay controlling tissue repair and progression to disease. *Lab. Invest.*, **69**, 369-372 (1993).

5) 鈴木不二男: 細胞外マトリクスと細胞増殖・分化, **29**, 905-917 (1992).

6) Gospodarowicz, D., Greenburg, G. & Birdwell, C. T.: Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.*, **38**, 4155-4171 (1978).

7) Miyagawa, J., Yamashita, K. & Fujita, H.: Fine structural aspects of phagocytotic activity in inverted follicle cells of cultured porcine thyroids. *Cell Tissue Res.*, **232**, 327-334 (1983).

8) Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, P. & Nandi, S.: Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gel matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3401-3405 (1979).

9) Chambard, M., Gabrion, J. & Mauchamp, J.: Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J. Cell Biol.*, **91**, 157-160 (1981).

10) 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. *Pathol. Res. Pract.*, **188**, 874-882 (1992).

11) Knuechel, R., Keng, P., Hofstaedter, F., Langmuir, V., Sutherland, R. M. & Penuy, D. P.: Differentiating patterns in two- and three-dimensional culture systems of human squamous carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, **137**, 725-736 (1990).

12) Munson, L., Wilkinson, J. T. & Schlater, D. H.: Effects of substratum on the polarization of bovine endometrial epithelial cells *in vitro*. *Cell Tissue Res.*, **261**, 155-161 (1990).

13) Sugihara, H., Toda, S., Miyabara, S., Fujiyama, C. & Yonemitsu, N.: Reconstruction of alveolus-like structure from alveolar type II epithelial in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Am. J. Pathol.*, **142**, 783-792 (1993).

14) 河村康仁: 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).

15) Kawamura, Y., Yoshida, K. & Nakanuma, Y.: Primary culture of rabbit gallbladder epithelial cells in collagen gel matrix. *Lab. Invest.*, **61**, 350-356 (1989).

16) 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).

17) Spicer, S. S. & Schulte, B. A.: Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 1-38 (1992).

18) Damjanov, I.: Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.*, **57**, 5-20 (1987).

19) McMillan, P. N., Ferayorni, L. S., Gerhardt, C. O. & Jauregui, H. O.: Light and electromicroscope analysis of lectin binding adult rat liver *in situ*. *Lab. Invest.*, **50**, 408-420 (1984).

20) 名取信策, 飯田和子, 矢原一郎: 細胞骨格蛋白に作用する薬物. 蛋白質核酸酵素, **28**, 789-800 (1983).

21) Johnson, M. D., Jennings, M. T., Gold, L. I. & Moses, H. C.: Transforming growth factor- $\beta$  in neural embryogenesis and neoplasia. *Hum. Pathol.*, **24**, 457-462 (1993).

22) Carruthers, L., Dourmashkin, R. & Phillips, A.: Disorders of the cytoskeleton of the enterocyte. *Clinics Gastroenterology*, **15**, 105-120 (1986).

23) 齋藤勝彦: 肝内胆管上皮およびその付属腺のレクチン結合能—正常肝, 肝内結石症肝および胃粘膜上皮との比較—. 十全医会誌, **95**, 930-945 (1986).

24) Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 557-580 (1981).

25) 村田長芳, 津山新一郎, 菅沼龍夫: レクチンの組織化学. 細胞, **20**, 240-245 (1988).

26) 長瀬光昌: 荷電およびトレーサー. 実験組織化学 (平野寛, 川生明, 横山正夫編), 第1版, 618-628頁, 丸善, 東京 (1987).

27) 齋藤多久馬: Adenosine triphosphatase, 新酵素組織化学 (武内忠男, 小川和朗編), 第1版, 358-368頁, 朝倉書店, 東京, 1980.

28) 馬屋原宏: Alkaline phosphatase, 新酵素組織化学 (武内忠男, 小川和朗編), 第1版, 298-313頁, 朝倉書店, 東京, 1980.

29) 馬屋原宏: Acid phosphatase, 新酵素組織化学 (武内忠男, 小川和朗編), 第1版, 298-313頁, 朝倉書店, 東京, 1980.

30) Araki, N., Ohno, J., Lee, T., Takeshima, Y. & Ogawa, K.: Nematolysosomes (elongate lysosomes) in rat hepatocytes: Their distribution, microtubule dependence, and role in endocytic transport pathway. *Exp. Cell Res.*, **204**, 181-191 (1993).

31) Hoi Sang, U., Saier, M. H. & Ellisman, M. H.: Tight junction formation in closely linked to the polar redistribution of intramembranous particles in aggregating MDCK epithelia. *Exp. Cell Res.*, **122**, 384-391 (1979).

32) Gautam, P., Ng, O. C. & Boyer, J. L.: Isolated rat hepatocyte couplets in short-term culture: Structural characteristics. *Hepatology*, **7**, 216-223 (1989).

- 33) Phillips, J. M., Oshio, C., Miyairi, M. & Smith, C. R.: Intrahepatic cholestasis as a canalicular: Evidence using cytochalasin. *Lab. Invest.*, 48, 205-211 (1983).
- 34) Schmitz, J.: A pathological condition due to congenital disorganization of the brush border. *In* CIBA Foundation Symposium (ed.), Brush Border Membranes, 1st ed., p245-252, CIBA, New York, 1983.
- 35) Phillips, A. D., Jenkins, P., Raafat, F. & Wulken-Smith, J. A.: Congenital microvillous atrophy: specific diagnostic feature. *Arch. Disease Childhood*, 60, 135-140 (1985).
- 36) Ciacci, C., Lind, S. E. & Podlasky, D. K.: Transforming growth factor  $\beta$  regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology*, 105, 93-101 (1993).
- 37) Cassini, A., Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Galli, G., Jezequel, A., Schuppan, D., Rotella, C. & Surrenti, C.: Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor  $\beta$ 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology*, 105, 245-253 (1993).

**Loss and Reestablishment of Cell Polarity in Rabbit Gallbladder Epithelial Cells Cultured in Collagen Gel Matrix, and its Alteration by Transforming Growth Factor  $\beta$  1 and Cytochalasin B.** Kazuharu Yoshida, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 103, 408—424 (1994)

**Key words** gallbladder epithelial cell, cultured in collagen gel matrix, cell polarity, carbohydrate residues, lectin histochemistry

#### Abstract

Cell polarity is involved in the various physiological functions of biliary epithelial cells, such as secretion and reabsorption. The disorder of their cell polarity is probably also related to the disease process in the biliary tree. To examine the loss and re-establishment of cell polarity and its alteration, singly isolated rabbit gallbladder epithelial cells were cultured in a collagen gel matrix for up to four days. Morphologies and phenotypes of the cultured epithelial cells were serially examined under a light and electron microscope with an emphasis on the cell polarity. The cell polarity was further examined by using mucin-staining, lectin histochemistry and enzyme histochemistry. The temporal structural and phenotypic changes of epithelial cells cultured in the collagen gel matrix were able to be classified in three phases from the standpoint of the cell polarity. The phase of loss of cell polarity (first 12 hr): This phase was characterized by the loss of mucosal epithelial cell polarity and also transient occurrence of autophagic vacuoles. The cultured cells were spherical and autophagic vacuoles, positive for acid phosphatase, were found in their cytoplasm. These vacuoles were thought to emerge in association with cell injuries or to reflect the remodelling of columnar cells to spherical cells after the isolation and culture. Scanty microvilli on the cell surface and reduction of cell organelles were also considerable. The phase of acquisition of cell polarity (12-24 hr): Mucus-positive intracytoplasmic microcysts developed in singly isolated cells or several aggregated epithelial cells. A majority of them were intracellular microcysts with microvilli, and other cellular organelles tended to be arranged around these microcysts. Intracytoplasmic microcysts showed similar phenotypic changes as seen in the multicellular cysts (see below). The phase of maturation of cell polarity (after 24 hr): Along with the epithelial cell proliferation, the microcysts gradually enlarged and transformed to multicellular cysts. Golgi apparatus in the supra-nuclear area, secretory granules in the apical region with release into the cystic lumen, and well-developed junctional complexes between the adjacent cells became more clearly recognizable. Morphological maturation of cell polarity was accompanied by the increased expression of adenosine triphosphatase, alkaline phosphatase activity, expression of carbohydrate residues shown by lectin binding (Con A, PSA, VFA, WGA, DBA, and SBA) and secretory activity of the mucus, all of which are seen in *in vivo* gallbladder epithelial cells. The effects on cell polarity of cytochalasin B (CB), which is known to depolymerize actin filaments, and transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF  $\beta$  1), which is known to regulate the proliferation and differentiation of epithelial cells, were also examined, using multicellular cysts cultured in the collagen gel matrix for 3 days. Forty-eight hours after the addition of CB in the culture medium, the cell-cell adherence diminished and the formation of intracytoplasmic microcysts developed in the multicellular cysts. Interestingly, the ultrastructural features of these microcysts resembled those of the cells in congenital microvillous atrophy affecting the intestine. The treatment with TGF  $\beta$  1 accelerated cell-cell adherence and differentiation of cell polarity of multicellular cysts cultured in the collagen gel matrix, approaching to the appearance of the *in vivo* gallbladder mucosa. In conclusion, this three-dimensional culture model of the gallbladder epithelial cells in the collagen gel matrix is thought to be a simple and useful *in vitro* model to study of cell polarity differentiation and the effect of some factors affecting cell polarity.