

# Primary Culture of Rabbit Intrahepatic Biliary Duct Epithelium, Extrahepatic Biliary Duct Epithelium and Gallbladder Epithelium, and Human Gallbladder Epithelium in Collagen Gel

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8146">http://hdl.handle.net/2297/8146</a>

## 胆道系上皮細胞のコラーゲン・ゲル内初代培養の試み

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任：中沼安二教授)

河 村 泰 仁

(平成1年10月2日受付)

胆道系上皮細胞を培養した研究は少ない。そこで今回、家兎およびヒトの胆道系上皮細胞をコラーゲン・ゲル内で培養し、その細胞性状を多糖類染色、蛍光抗体法および電子顕微鏡により観察した。つまり、家兎の肝内胆管および肝外胆管上皮細胞を3週間まで、家兎の胆嚢上皮細胞を6週間まで、ヒト胆嚢上皮細胞を1週間までコラーゲン・ゲル内で初代培養を行った。また、家兎胆嚢粘膜上皮細胞の単層培養を2週間まで行った。コラーゲン・ゲル内初代培養では、培養上皮細胞は時間と共に増殖し、多細胞による種々の大きさの嚢胞を形成した。嚢胞は次第に大きくなり、培養上皮細胞は中性および酸性粘液を産生し、嚢胞内には粘液が充満した。嚢胞を形成する培養細胞は立方～円柱上皮で、核は胞体の中心部～基底部にあり、電顕的には嚢胞内腔面に多数の微絨毛がみられ、微絨毛基部と基底部には被覆小窩、細胞間にはアスモゾーム、密着帯、細隙結合、発達した嵌合、また細胞質内には少数で小型のミトコンドリアおよび束状の中間径フィラメントが認められ、さらに発達したゴルジ装置に近接して粘液顆粒が認められた。これらの所見は培養経過とともにより生体内の胆道系上皮細胞に類似した。蛍光抗体法により、培養期間中、培養上皮細胞の細胞質にび慢性にサイトケラチンが検出された。培養1週間後の家兎胆嚢上皮細胞の BrdU による S 期細胞標識を行ったところ、その標識指数はコラーゲン・ゲル内培養細胞が9.6%、単層培養細胞が7.3%であり、培養細胞が増殖していることが示された。これらの所見は、培養期間中、家兎肝内胆管、肝外胆管および胆嚢上皮細胞で同じであり、さらにヒト胆嚢上皮細胞でも同様の所見が得られた。以上のコラーゲン・ゲル内初代培養結果は、胆道系上皮細胞の性状をよく保存しており、立体的にその増殖状態を検索することが出来た。なお、胆道系疾患の病態解明応用への予備的実験として、コラーゲン・ゲル内培養1週後の家兎胆嚢上皮細胞でマイトマイシンCを用いて毒性実験を行ったところ、コラーゲン・ゲル内で嚢胞形成を示していた上皮細胞に壊死、脱落などの病的変化を起こすことができた。

以上、家兎およびヒト胆道系上皮細胞をコラーゲン・ゲル内で培養したところ、胆道系上皮細胞の性状を試験管内で長期間維持していたので、コラーゲン・ゲル内培養法は胆道系上皮細胞の形態や機能の研究に有用と思われた。

---

**Key words** 胆道系上皮細胞, コラーゲン・ゲル, 培養

---

肝細胞で作られた胆汁は胆道系を通じて十二指腸に排泄される<sup>1)</sup>。胆道系にはこの胆汁の導管としての働き以外に、分泌、吸収作用のあることが推定されているが<sup>2)</sup>、胆道系の機能を検索するための確立された方法論が少なく、特に肝内の大型胆管、さらには肝外胆管系の機能に関しては殆ど知られていない。さて、

種々の培養系を用い、胆道系上皮の機能と形態異常を探ろうとする試みが従来よりいくつか報告されている。つまり、Elhamady ら<sup>3)</sup>がモルモットの胆嚢上皮細胞の組織培養を試みており、また Sirica ら<sup>4)</sup>がラットの胆管を結紮し、肝内で著しく増生した細胆管上皮細胞の培養を試みている。Kumar ら<sup>5)</sup>も正常ラットの

---

Abbreviations: AB, alcian blue; ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGF, epidermal growth factor; HE, hematoxylin and eosin; HID, high iron

肝内胆管上皮細胞の分離と培養について報告している。また、宮崎ら<sup>9)</sup>、吉富ら<sup>7)</sup>はヒト胆嚢上皮細胞の単層培養について、奥村ら<sup>8)</sup>はヒト胆嚢粘膜の器官培養についてそれぞれ報告している。しかし、正常な肝内の比較的太い胆管上皮細胞(肝内胆管)、総肝管および総胆管上皮細胞(肝外胆管)の培養についてはこれまで報告がない。

最近、Yang ら<sup>9)-12)</sup>、榎並ら<sup>13)-15)</sup>により、コラーゲン・ゲル内培養法が確立され、主に乳腺上皮細胞の培養に用いられ、その細胞学的性状が次第に明らかにされつつある。この方法では、培養上皮の性状を立体的に生体に近い状態で検索でき、さらに培養条件を変化させることにより、培養上皮の変化を三次元的に観察できる特徴がある。そこで、著者はこのコラーゲン・ゲル内培養法を用い、家兎の肝内大型胆管、肝外胆管、胆嚢上皮細胞およびヒトの胆嚢上皮細胞の初代培養を1週間から6週間まで試み、この培養条件下での胆道系上皮細胞の細胞学的性状を検討したので報告する。また、家兎胆嚢では、粘膜上皮の単層培養も合わせて行ったのでその成績も報告する。

#### 対象および方法

##### I. 材料

##### 1. 家兎胆道系粘膜上皮

体重約3Kgのウサギ(雄、日本白色種、静岡県実験動物)をペントバルビタール注射液(Pitmanmoore Inc., 米国)を静脈内注射して全身麻酔し、開腹後、腹

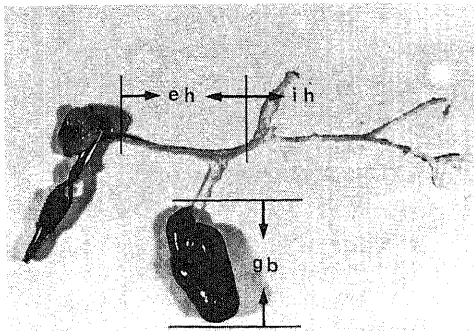


Fig. 1. Biliary tree of a rabbit intrahepatic biliary duct (ih), extrahepatic biliary duct (eh) and gallbladder (gb).

部の血管を切断して放血死させた。その後、肝臓を総胆管と共に取り出し、拡大鏡(3倍、大塚製作所、東京)で肝内胆管、肝外胆管、胆嚢の順に図1に示すように分離、摘出し、以下の如くその上皮細胞を分離し、培養に供した。

##### 2. ヒト胆嚢粘膜上皮

胆石症の診断で外科的に摘出した2例のヒト胆嚢(59才男性、65才女性)から肉眼的に正常と思われる部分を分離して、後述の如くその上皮細胞を培養に供した。

#### II. 培養方法および観察方法

##### 1. 単層培養

##### 1) 培養方法

家兎から摘出した胆嚢の腔を37°CのHanks液で洗浄し、その胆嚢腔内に0.25%トリプシンと0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)の混合液〔trypsin and EDTA (TE)混合液〕を注入した。その胆嚢を37°CのHanks液中に50~70分間静置し、その後注入したTE混合液を回収し、遠心分離(5分、1000 rpm)して、その中に含まれている上皮細胞を含む沈渣を集めた。この沈渣に15%になるよう牛胎児血清を入れたWilliam's E培地(ペニシリンGを100 units/mlに、ストレプトマイシンを100 μg/mlになるように添加)を加えて攪拌し、細胞数を計測後、プラスチック培養瓶に入れ、大気条件を95%空気、5% CO<sub>2</sub>として37°Cで培養した。培養開始時の細胞数は5~6 × 10<sup>5</sup>個/mlとした。培養液の交換は3日毎に

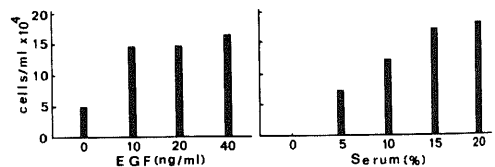


Fig. 2. Correlation between number of cells proliferated and concentration of EGF is shown on the left half, and the correlation between number of cells proliferated and concentration of fetal bovine serum is shown on the right side. These cells ( $1 \times 10^4$  cells/ml) were cultured for a week in monolayer system.

diamine; PAS, periodic acid schiff; PBS, phosphate-buffered saline; TE, trypsin and EDTA; 肝外胆管, 総肝管および総胆管; 肝内胆管, 肝内の比較的太い胆管; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

行った。培養2代への継代は培養1週間後に行った。

次に、培養条件を検討するため、単層培養した家兎の初代胆嚢上皮細胞を用いて、培養液中の血清濃度と上皮成長因子(EGF, Collaborative Research, Inc., 米国)濃度の検討を行った。予備的培養実験から、培養液中には血清とEGFの存在が必要であることがわかっていたので、血清濃度検討の場合は培養液中にEGFを10 ng/ml添加したものを基礎培養液とし、血清無添加基礎培養液およびこれに血清を5%, 10%, 15%, 20%となるようにそれぞれ添加した培養液で培養した。一方、EGFの濃度検討に際し、血清濃度を15%としたものを基礎培養液とし、EGF無添加基礎培養液およびこれにEGFを10, 20, 40 ng/mlとなるようにそれぞれ添加した培養液で培養した。培養開始時の細胞数はいずれの培養液の場合も $1 \times 10^4$ 個/mlとし、培養1週後の細胞数を数え、培養開始時の細胞数と比較検討した。その結果、図2に示すように血清濃度は15%で、EGF濃度は10 ng/mlでより強い細胞増殖が認められたが、それ以上に濃度を上げてその増殖程度に違いは見られなかった。そのため以下の実験は全て血清濃度を15%、EGF濃度を10 ng/mlとして実施した。

## 2) 初代単層培養細胞の増殖曲線と5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を用いた細胞増殖の確認

単層培養した初代家兎胆嚢上皮細胞の増殖曲線：家兎胆嚢上皮細胞を単層培養すると培養2代を過ぎる頃から線維芽細胞の増殖が盛んになったので、増殖曲線の検討には線維芽細胞の混入が少ない初代培養上皮細胞を使用した。胆嚢上皮から分離した細胞を血清濃度15%、EGF濃度10 ng/mlに調整したWilliam's E培地(100 units/mlのペニシリンGと100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含む)中に細胞数が $1 \times 10^4$ 個/mlとなるように直径35mmのプラスチックシャーレ(テルモ株式会社、東京)に分注して95%空気、5%CO<sub>2</sub>の大気条件下で培養した。細胞数の測定はThoma-Zeiss型の計算板を用いて培養6日後まで毎日行い、その推移を観察した。なお、培養開始5日後に培養液の交換を行った。

BrdUを用いたS期(DNA合成期)細胞の測定：BrdU(Sigma Chemical Co., 米国)を用いたS期細胞の同定は、単層培養1週後の初代胆嚢上皮細胞を用い、avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)法により行った<sup>10)</sup>。つまり、培養1週後にBrdU濃度が10  $\mu$ Mとなるように添加した培養液で60分間培養し、その後すぐに培養瓶の底面に付着している上皮細胞を純エタノールで10分間固定した後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>メタ

ノール処理30分、2N-HCl液中に30分間置いた。その後pH調整のため0.07 N-NaOH中に2分間、リン酸緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)中に5分間置いた後、5%正常ブタ血清で10分間処理して抗BrdU抗体(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 米国)を低温で30分間反応させた。その後、直前に作製したavidin-biotin-peroxidase complexにてBrdUを染色し、3,3'-diaminobenzidine(DAB)で発色後、ヘマトキシリンで核染色し、封入した。BrdUの標識指数は1000個の培養細胞の核を数え、その中に見られた陽性核数を数えて陽性率(%)で表現した。

## 3) 多糖類染色および電子顕微鏡的観察

培養開始1週目(培養初代)および2週目(培養2代)の胆嚢上皮細胞を用い、多糖類染色を行った。これらの培養上皮細胞はあらかじめtissue culture chambers/slides(Lab-Tec Division Miles, 米国)で培養したもので、スライドガラス上に接着増殖した培養上皮細胞をカルノア液で固定し、中性粘液染色として過ヨウ素酸シッフ(periodic acid schiff, PAS)染色、酸性粘液染色としてアルシアン・ブルー(alcian blue, AB) pH2.5染色、コロイド鉄染色、AB pH1.0染色およびhigh iron diamine(HID)染色、ムチカルミン染色を行った。通常の光顕的観察はヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin, HE)染色により行った。また、培養2週後(培養2代)のtissue culture chambers/slides上に接着増殖した胆嚢上皮細胞を用い、電子顕微鏡的観察を行った。つまり、培養上皮細胞がガラス面に接着したままの状態で4°Cの2.5%グルタルアルデヒド(0.1M カコジール酸塩緩衝液、pH7.4)で15分間前固定、同緩衝液で洗浄後1%四酸化オスミウム(同緩衝液)で30分間後固定した。その後、型のごとくエタノール系列で脱水し、エボンを入れたゼラチンカプセルを培養上皮細胞にかぶせるように置き、そのまま重合した後ゼラチンカプセルをはがしてゼラチンカプセル上に一層となって存在する細胞の超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で2重染色し、電子顕微鏡(H-300型、日立製作所、東京)で観察した。

## 2. コラーゲン・ゲル内培養

### 1) コラーゲン・ゲルの作製

コラーゲン・ゲルは、0.3%酸可溶性コラーゲン・ゲル(タイプIコラーゲン・セルマトリックス、新田ゼラチン株式会社、大阪)、1.5容量の牛胎児血清(Sera Lab., スコットランド)および1容量の10倍濃度William's E培地(Flow Lab., スコットランド)を混

合し、これに EGF を 10 ng/ml となるように添加したものをを用いた。

## 2) 培養方法

### i. 家兎肝内胆管、肝外胆管および胆嚢上皮細胞の単離方法と培養

家兎から分離、摘出した肝内胆管および肝外胆管は摘出後、その腔を切開して、TE 混合液中に入れ、37°C に加温しながらマグネチックスターラーで 50~70 分間ゆっくりと攪拌した。胆嚢は単層培養の場合と同様に、胆嚢腔内を 37°C の Hanks で洗浄したあと腔内に TE 混合液を注入して 37°C の Hanks 液中に 50~70 分間静置した。その後胆嚢腔内の TE 混合液を取り出して実験に用いた。胆嚢より得られた TE 混合液中の上皮細胞および上皮細胞の塊計 14,763 個を鏡検すると、このうち一個一個にまで単離できた上皮細胞は 79.5% であったが、2~10 個までの塊の上皮細胞集団が 16.7%、11 個以上の細胞集団が 3.7% に認められた。培養は、肝内胆管、肝外胆管、胆嚢上皮細胞のそれぞれを別個に、同様の方法で行った。なお、これらの胆道系より得られた細胞の殆どは上皮細胞であり、僅かに線維芽細胞が混入していたが、形態上、上皮細胞とは容易に区別できた。

その後、上皮細胞を含む TE 混合液を遠心分離 (5 分, 1000 rpm) し、その沈渣にコラーゲン・ゲルを加え、ピペッティングした後、プラスチック培養瓶 (Corning Laboratory Science Coop., 米国) に分注した。次に、培養瓶ごと 37°C で約 10 分間静置してゲル状になったところで培養液 (15% 牛胎児血清と 10 ng/ml の EGF を入れた William's E 培地) を重層して 37°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ー内で培養した。培養開始時コラーゲン・ゲル内の細胞数は 1~3 × 10<sup>6</sup> 個/ml とした。培養期間は、肝内胆管と肝外胆管上皮は 3 週間まで、胆嚢上皮は 6 週間まで培養した。培養液の交換は 3~4 日に一度の割合で行った。なお、培養液にはペニシリン G (100 units/ml) とストレプトマイシン (100 μg/ml) を添加した。培養上皮の形態的变化を培養 2 時間後、5 時間後、10 時間後、20 時間後、2 日後、4 日後、1 週間後、3 週間後 (胆嚢上皮は他に 6 週間後) に位相差顕微鏡によって経時的に観察した。

### ii. ヒト胆嚢粘膜上皮細胞の単離方法と培養

外科的に摘出したヒト胆嚢小片から肉眼的に正常と思われる部分を切り離した後、Hanks 液中で血液や胆汁を洗い流した。次いで漿膜、血管および平滑筋組織をできるだけ除去した後、約 5 mm 角に細切し、37°C の TE 混合液中に入れ、マグネチックスターラーで

70 分間ゆっくりと攪拌し、分離した上皮細胞を含む混合液を遠心分離 (5 分, 1000 rpm) した。得られた沈渣にコラーゲン・ゲルを加えピペッティングして均等に分散した後、プラスチック培養瓶に分注した。なお、培養開始時には少数の赤血球と線維芽細胞の混入が見られた。次いで家兎胆道系上皮細胞の場合と同じく、37°C で 10 分間静置し、固まった後培養液 (牛胎児血清と EGF の入った William's E 培地) を重層して 37°C で 95% 空気、5% CO<sub>2</sub> の大気条件に設定したインキュベーター内で培養した。なお、培養開始時のコラーゲン・ゲル内の細胞数は 3~5 × 10<sup>6</sup> 個/ml であった。培養液の交換は培養 3 日後に行った。培養は 1 週間行い位相差顕微鏡で経時的に観察した。

### 3) BrdU を用いた S 期細胞の測定

コラーゲン・ゲル内培養細胞での S 期細胞の同定を、コラーゲン・ゲル内培養 1 週間後の初代家兎胆嚢上皮細胞を用い ABC 法により行った<sup>10)</sup>。つまり、培養 1 週間後にコラーゲン・ゲル上に重層している培地に BrdU を 10 μM となるように添加して 60 分間培養した。その後コラーゲン・ゲルを約 5 × 5 mm に細切し、純エタノールで 3~4 時間固定してそのままパラフィン包埋切片を作製した。型のごとく脱パラフィン操作後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノール処理 30 分、さらに 2N-HCl 液で 30 分間処理した。その後 pH 調整のため 0.07 N-NaOH 中に 2 分間、PBS 中に 5 分間置き、5% 正常ブタ血清で 10 分間処理後、抗 BrdU 抗体を 37°C で 60 分間反応させ、BrdU の局在を ABC 複合体により酵素染色し、DAB で発色後、ヘマトキシリンで核染色し、封入した。BrdU の標識指数は、陽性細胞数を数えてその陽性率 (%) を算出して示した。

### 4) 光顕的観察、多糖類染色、免疫組織化学的染色および電子顕微鏡的観察

#### i. 光顕的観察と多糖類染色

家兎胆嚢粘膜上皮細胞は、培養 5 時間、10 時間、20 時間、2 日、1 週、3 週、6 週後に、家兎肝内胆管と肝外胆管上皮細胞は培養 1 週と 3 週後に、ヒト胆嚢上皮細胞は培養 1 週後に、それぞれの細胞を含むコラーゲン・ゲルをカルノア液で固定し、PAS 染色、AB pH2.5 染色、コロイド鉄染色、AB pH11.0 染色、HID 染色、それにムチカルミン染色を行った。また、10% 中性ホルマリン液で固定してパラフィン包埋し、型の如く HE 染色を行い光顕的に観察した。

#### ii. 免疫組織化学的染色

家兎肝内胆管と肝外胆管上皮細胞では培養 1 週と 3 週後に、胆嚢上皮細胞では培養 1 週、3 週および 6 週後に、ヒト胆嚢上皮細胞では培養 1 週後に、これらの

上皮細胞を含むコラーゲン・ゲルを未固定のまま、OCT compound (Lab-Tec Division, Miles Laboratories, 米国) に包埋後、 $-80^{\circ}\text{C}$  の  $n$ -ヘキサン中で急速に凍結してクリオスタットで薄切した。その後  $4^{\circ}\text{C}$  のアセトンで30秒～1分間固定後 PBS で洗浄し、一次抗体として抗ヒトサイトケラチン (Labsystems, フィンランド, 100倍希釈) 抗体を  $37^{\circ}\text{C}$  30分間反応させ、二次抗体として蛍光色素で標識した抗マウス IgG ヒツジ血清 (Cappel Laboratories Inc., 米国) を  $37^{\circ}\text{C}$  で30分間反応させた。観察は落射式蛍光顕微鏡 (Standard 18, Zeiss 社, 西独) で行った。なお、抗ヒトサイトケラチンで家兎の胆嚢の凍結切片を蛍光抗体間接法で染色すると粘膜上皮が強陽性に染まることを予め確認した。

### iii. 電子顕微鏡的観察

家兎肝内胆管と肝外胆管上皮細胞では培養1週と3週後に、胆嚢上皮細胞では培養1週、3週および6週後に、ヒト胆嚢上皮細胞では培養1週後にこれらの上皮細胞を含むコラーゲン・ゲルを細切し、 $4^{\circ}\text{C}$  の2.5%グルタルアルデヒド (0.1M カコジレイト緩衝液, pH7.4) で90分間前固定、同緩衝液で洗浄後1%四酸化オスミウム (同緩衝液) で90分間後固定した。その後、型のごとくエタノール系列で脱水、エポン包埋し、超薄切片作製後、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色後、電子顕微鏡 (H-300型, 日立製作所, 東京) で観察した。

### 3. 細胞毒によるコラーゲン・ゲル内培養上皮細胞の病理的变化

コラーゲン・ゲル内培養1週目の家兎胆嚢粘膜上皮細胞を用い、細胞毒であるマイトマイシンC (三共株式会社, 東京) により引き起こされる形態変化につい

て検討した。マイトマイシンCの培地中の濃度は1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001および0.0001  $\mu\text{g/ml}$  とし、それぞれコラーゲン・ゲル上に重層した培地に添加して  $37^{\circ}\text{C}$  で48時間培養した。その後すぐに上皮細胞を含むコラーゲン・ゲルを、カルノア液で固定し、パラフィン包埋切片を作製し、多糖類染色 (PAS, AB pH2.5, コロイド鉄, AB pH1.0, HID およびムチカルミン染色) を行った。また、10%緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋切片を作製し、HE染色を行い光顕的観察を行った。

## 成 績

### I. 家兎胆嚢粘膜上皮の単層培養

家兎胆嚢上皮細胞の単層培養は、プラスチック培養瓶で2週間まで行った。培養開始時、位相差顕微鏡下でトリパンブルー染色して生細胞数を測定したところ、培養上皮細胞の95%以上は生細胞であった。培養2日後の観察では、培養上皮細胞はそのほとんどが培養瓶の底面に接着しており、その形態は培養開始時とは異なり、細胞周囲にはいくつかの偽足様突起がみられた。また、島状に増殖した細胞集団もみられた。培養1週後には培養細胞は培養瓶の底面の2/3あるいはその全面を占めるように増殖し、敷石状に配列していた。また、一部の細胞集団の細胞間には、小空隙がみられた (図3)。培養1週後に、tissue culture chambers/slides 上に培養した上皮細胞では、HE染色でみると、核は卵型ないしは長楕円形で、細胞の大きさはやや不揃いで細胞質はわずかにエオジン好性であった。多糖類染色では、いずれの染色でもほぼ同様の染色態度で、一部の細胞の細胞質内にわずかな顆粒状の粘液がみられ、さらに細胞間に形成された小空隙

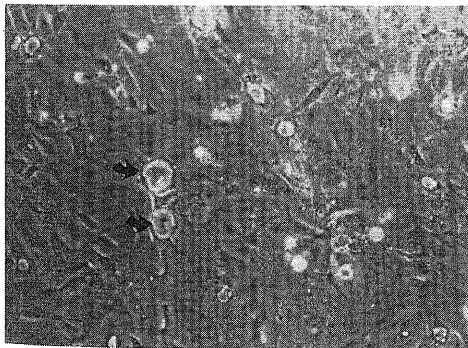


Fig. 3. Monolayer culture of rabbit gallbladder epithelial cells for a week. Some small vacuoles ( $\backslash$ ) are found in epithelial cell sheets. Phase contrast microscope,  $\times 175$

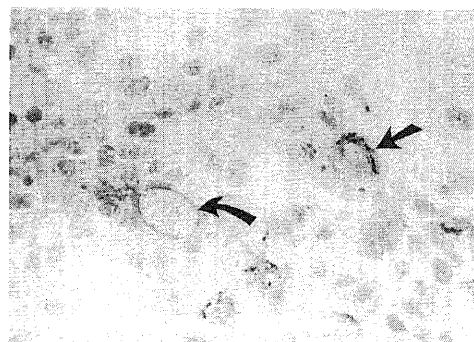


Fig. 4. Monolayer culture of gallbladder epithelial cells for a week. Mucin is observed in a small vesicle ( $\backslash$ ) and in the cytoplasm ( $\checkmark$ ). PAS stain,  $\times 248$

にも陽性の粘液がみられ(図4), 単層培養細胞で, 僅かではあるが粘液の産生が証明された. 単層培養2週後(2代目)の上皮細胞のHE染色結果では培養1週後に比べ細胞間の小空胞は減少し, 多糖類染色でも粘液はわずかしか認められなかった.

培養2週後の上皮細胞の電子顕微鏡的観察では, 培養細胞の表面に少数の微絨毛, 細胞質内には小器官の発達は乏しく, 少数のミトコンドリアとゴルジ装置がみられ, 隣接する細胞間には接着装置が認められた(図5).

家兎胆嚢上皮細胞の初代培養時の増殖曲線を図6に示す. 培養1日で, 培養開始時の約4倍に細胞数が増加したが, その後培養液の交換を行わずに観察を続けたところ, 培養3日後からは急激な細胞数の減少がみられた. そこで, 培養5日後に培養液を交換したところ, 培養1日後とほぼ同様な細胞増殖がみられた. すなわち, 単層培養した上皮細胞は培養初期に著しい増殖を示し, その増殖は培養液の交換時期に左右されることが示された.

BrdUを用いてS期細胞を標識したところ, 家兎胆嚢上皮細胞の単層培養1週後のBrdUの標識指数は7.3%であり, 細胞が増殖していることが確認された(図7).

## II. コラーゲン・ゲル内培養

### 1. 家兎肝内胆管, 肝外胆管および胆嚢粘膜上皮細胞のコラーゲン・ゲル内初代培養

肝内胆管, 肝外胆管および胆嚢上皮細胞の培養結果および細胞学的性状は同一であったので, 一括して記述する.

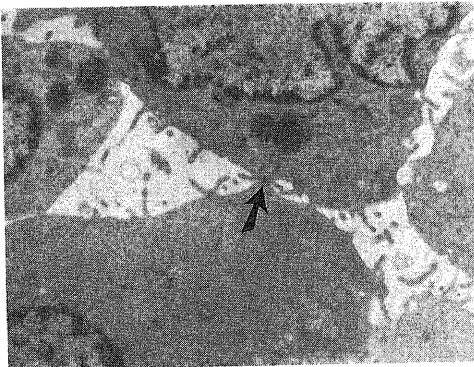


Fig. 5. Monolayer culture of rabbit gallbladder epithelial cells for 2 weeks. Note numerous microvilli on their cell surface, small number of organelles and junctional complexes ( $\wedge$ ) between adjacent epithelial cells.  $\times 13,000$

位相差顕微鏡下で, 1個の培養上皮細胞を追跡すると, 培養2時間後では, 上皮細胞がわずかに大きくなりはじめ, 細胞質内に単発性の空胞がほぼ半数の細胞で観察された. 培養4~5時間後では, 細胞質内の空胞がさらに大きくなり, 数の増加を示すものも認められた. 培養20時間後では, 細胞数の増加が起こり, 2個から数個までの細胞が結合している状態がみられ, 培養2日後ではこれらの細胞によって完全に囲まれた囊胞の形成が認められた(図8-b). 培養4日, 1週, 3週, 6週後と培養時間の経過に伴い囊胞腔の増大が認められた(図8-a). 形成された囊胞はおおむね球状であった. また, 培養5時間, 10時間, 20時間, 2日, 1週, 3週, 6週後に行ったHE染色および多糖類染色により観察したところ, 培養5時間後に培養上皮細胞の細胞質内にみられた空胞内腔は粘液陰性だった(図9-a). しかし, 培養10(図9-b)および20時間後(図9-c)になると, 培養上皮細胞はいくつかの細胞による塊を形成していることが多く, 細胞質内にはわずかな量の粘液の産生が認められた. 培養2日後には, 多細

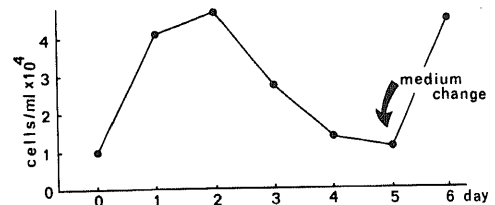


Fig. 6. Growth pattern of the rabbit gallbladder epithelial cells cultured in monolayer culture. Growth is shown by cell number counted. On the fifth day, the medium was exchanged.

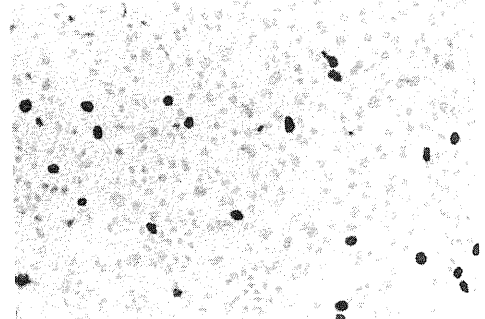


Fig. 7. Monolayer culture of rabbit gallbladder epithelial cells for a week. Several nuclei of the cells are positive for BrdU. BrdU immunostain and hematoxylin.  $\times 107$

胞からなる嚢胞すなわち多細胞性嚢胞の形成がみられ、この嚢胞腔内と嚢胞を形成する上皮細胞内腔側が粘液陽性であった(図9-d)。培養1週後では嚢胞を形成する細胞数の増加と嚢胞腔の増大が認められた。培養3週後になると種々の大きさの嚢胞形成(直径0.10~0.33mm)がみられ、嚢胞壁は一層の立方~円柱上皮より成っていた。さらに、単層の上皮層の一部の細胞で細胞質中に小型の嚢胞形成を示すものも認められた。培養10時間後からみられた細胞質内の粘液と培養2日以降の多細胞性嚢胞腔内および培養上皮細胞内腔側にみられた粘液には、多糖類染色によって中性と

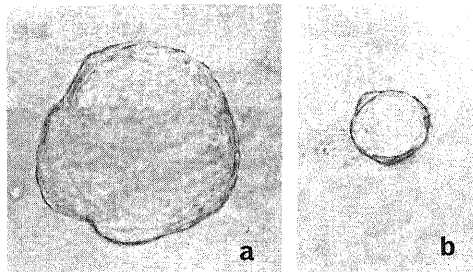


Fig. 8-a and b. A cystic mass formed by rabbit gallbladder epithelial cells cultured for 3 weeks in collagen gel matrix (a) is larger than that by gallbladder epithelial cells cultured for 2 days in collagen gel matrix (b). Phase contrast microscope, a,  $\times 175$ ; b,  $\times 175$

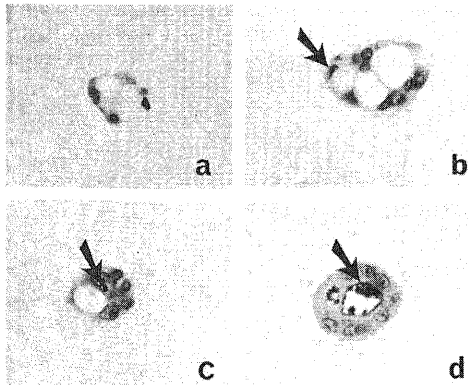


Fig. 9. Histologic section of rabbit gallbladder epithelial cells cultured in collagen gel matrix for 5 hours (a), 10 hours (b), 20 hours (c) and 2 days (d). a; several vacuoles are seen within the cytoplasm of cultured epithelium. Vacuoles of (a) are negative with PAS stain. b, c; mucus (↘) is detectable in the cytoplasm. d; mucus (↘) is secreted into and stored in the cyst lumen. a~d: PAS stain,  $\times 530$

酸性の2種類の粘液の存在が示唆された。また、単細胞の細胞質の小嚢腔内にも同一の粘液が証明された。なお、1週から6週までの培養期間中、これらの多糖類染色の強度に変化はみられなかった。さらに、培養3週後からは嚢胞周囲のコラーゲン・ゲルも粘液染色陽性となり、嚢胞からの粘液の漏れが認められた。なお、PAS染色で嚢胞壁周囲に基底膜様物質は認められなかった。

電子顕微鏡的観察では、培養1週後に、培養細胞が単独に存在している場合といくつかの細胞が連なって

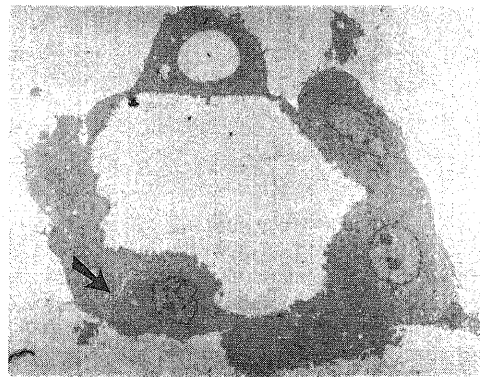


Fig. 10. Rabbit gallbladder epithelial cells cultured for a week in collagen gel matrix. Interdigitation (↘) at the lateral surface and numerous microvilli at the apical surface are seen.  $\times 1,400$

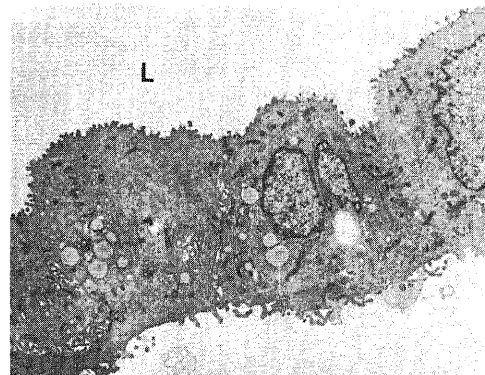


Fig. 11. Rabbit gallbladder epithelial cells cultured for 3 weeks in collagen gel matrix. The cyst wall consists of cuboidal epithelial cells. Numerous microvilli on the luminal surface. Numerous mitochondria, several secretory granules in the cytoplasm are observed. A few microvilli are also found on the basal surface of the epithelial cells. L: lumen,  $\times 5,250$



嚢胞を形成している場合と認められた。単独で存在している細胞の培養1週後の細胞質内には小型の嚢胞が、嚢胞の内面には微絨毛が嚢胞を囲むように存在し、小型の嚢胞周囲には線毛もみられた。核は嚢胞の基底側に位置し、細胞内小器官は乏しかった。多数の

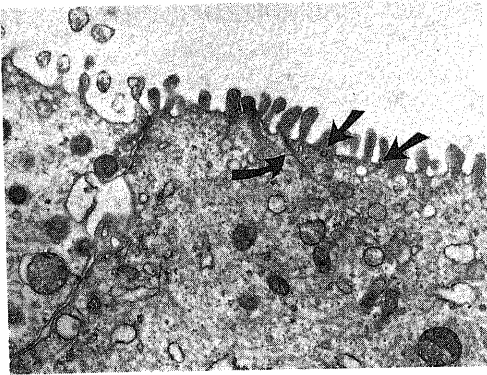


Fig. 12. Rabbit extrahepatic biliary duct epithelial cells cultured for 3 weeks in collagen gel matrix. Each microvillus contains a bundle of microtubules (∨) and coated pits (∨) at the root of the microvilli are observed.  $\times 17,500$

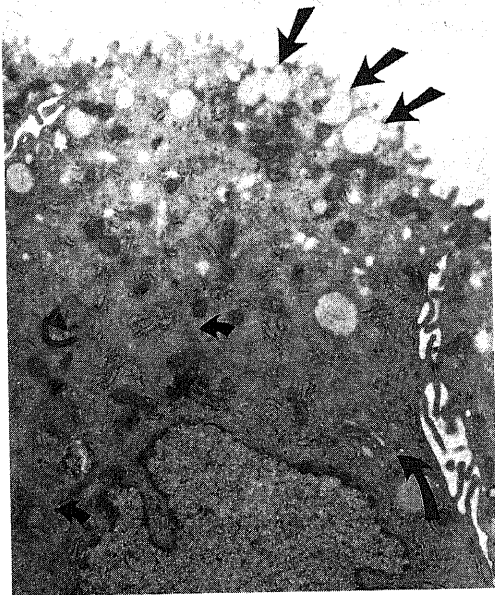


Fig. 13. Rabbit gallbladder epithelial cells cultured for 6 weeks in collagen gel matrix. Several secretory granules (∨), bundle of intermediate filaments (←), and a Golgi apparatus (∧) are observed in the columnar epithelial cells.  $\times 9,800$

細胞が連なって大型の嚢胞すなわち多細胞性嚢胞を形成しているものもあり、これら多細胞性嚢胞内腔面には多数の微絨毛がみられ、細胞の側面には嵌合が発達していた。また、多細胞性嚢胞を形成する上皮の細胞質内に、さらに小型の嚢胞を形成する細胞もみられた(図10)。培養3週後では、嚢胞を構成している細胞の丈は高く立方状となり、嚢胞内腔に向かって多数の微絨毛がみられた(図11)。また、細胞間には細胞結合だけでなく、密着帯、デスモゾームがみられ、細胞側面の嵌合は密になり、その間隙は狭くなった。細胞質内には小型で少数のミトコンドリア、発達したゴルジ装置および多くの分泌顆粒が認められた。また、微絨毛内部には微小管がみられ、細胞質内へ向かって伸びていた。微絨毛基部には胞体内に向かう嵌凹が、細胞質

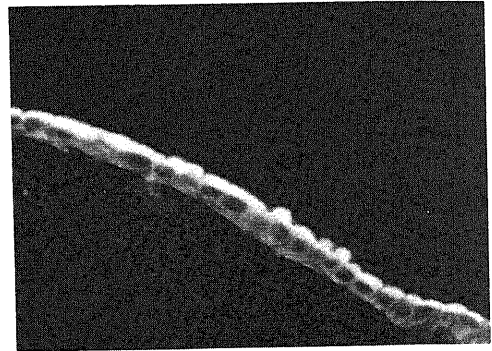


Fig. 14. Cytokeratin expression in rabbit intrahepatic biliary duct epithelial cells cultured for 3 weeks in collagen gel matrix. Cytoplasm is diffusely positive for cytokeratin.  $\times 500$

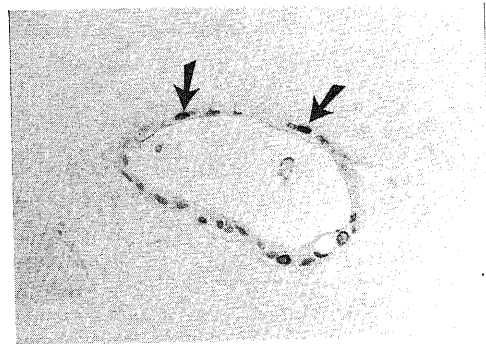


Fig. 15. Histologic section of rabbit gallbladder epithelial cells cultured in collagen gel matrix for a week. Several nuclei of the cells (∨) are positive for BrdU. BrdU immunostain and hematoxylin.  $\times 248$



Fig. 16. Histologic section of human gallbladder epithelial cells cultured for a week in collagen gel matrix. One epithelial cell is undergoing mitosis (✓). HE stain,  $\times 215$

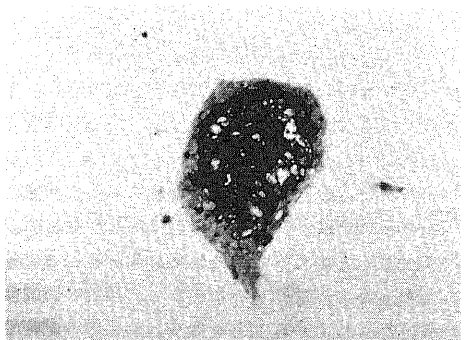


Fig. 17. Histologic section of human gallbladder epithelial cells cultured for a week in collagen gel matrix. A great quantity of mucus is stored within the cystic lumen. PAS stain,  $\times 132$

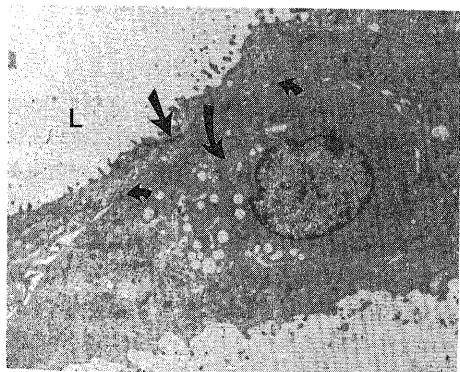


Fig. 18. Human gallbladder epithelial cells of the cyst cultured for a week in collagen gel matrix. There are many microvilli on the luminal surface, small mitochondria, several vacuoles and Golgi apparatus ( $\downarrow$ ) in the cytoplasm, prominent desmosomes ( $\leftarrow$ ) and a tight junction ( $\searrow$ ) between the plasma membranes of adjacent cells. L: lumen,  $\times 6,000$

内には豊富な中間径フィラメントが認められた (図12). 培養6週後では、嚢胞を形成している細胞は更に円柱状となり、嚢胞内腔側の細胞質には均等で濃淡のある分泌顆粒が多数認められた。核は基底側に偏在し、核上部には多数の分泌顆粒と発達したゴルジ装置がみられた。また、培養3週後よりも太い束状の中間径フィラメントが無数にみられた (図13).

サイトケラチン染色では、肝内胆管、肝外胆管および胆嚢上皮細胞のいずれも培養期間中細胞質がび漫性に陽性であった (図14).

BrdU 染色では、培養1週後のコラーゲン・ゲル内初代培養細胞における BrdU の標識指数は9.6%であり、コラーゲン・ゲル内培養細胞の増殖が確認された

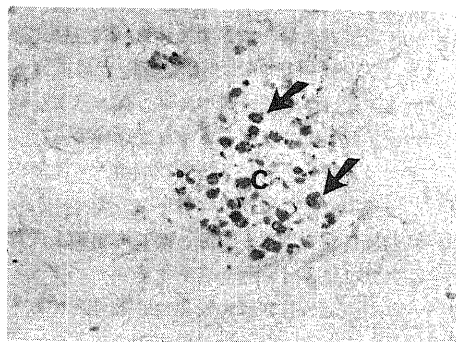


Fig. 19. All rabbit gallbladder epithelial cells lining a cyst (c) are dropped out into its cavity. Necrotic cells (✓) are floating in the cyst. addition of mitomycin C at the concentration of  $100 \mu\text{g/ml}$  into the culture medium. HE stain,  $\times 264$

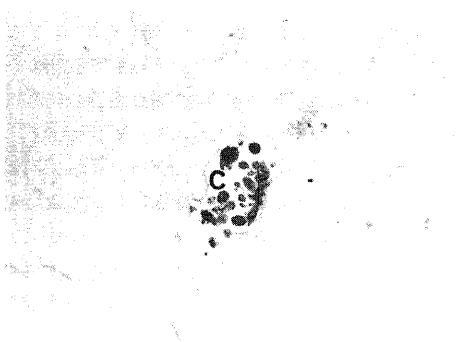


Fig. 20. The rabbit gallbladder epithelial cells forming a cyst (c) are largely dropped out. The remaining cells show a bleb formation and eosinophilic cytoplasm. Addition of mitomycin C at the concentration of  $10 \mu\text{g/ml}$  into the culture medium. HE stain,  $\times 264$

(図15).

## 2. ヒト胆嚢上皮細胞のコラーゲン・ゲル内初代培養

培養開始時、コラーゲン・ゲル内には一個一個にまで分離された上皮細胞と2~20個程度の上皮細胞の塊がみられた。培養1週後の位相差顕微鏡による観察では、培養上皮細胞は樹枝状配列もしくは塊を形成しているようにみられた。培養1週後の上皮細胞のHE染色では、種々の大きさの嚢胞がみられ、嚢胞壁のほとんどは一層性の立方~円柱上皮より成っていたが、一部の上皮は多層化を示した。また、培養上皮細胞の一部には分裂像がみられた(図16)。多糖類染色では嚢胞腔内と培養上皮細胞の嚢胞内腔側がいずれの染色でも同程度に、家兎胆道系上皮細胞よりもやや強く陽性であり、多量の中性および酸性粘液が分泌貯蔵されていた(図17)。電子顕微鏡的観察では、嚢胞内腔面に多数の微絨毛が、細胞相互間には密着帯、デスモゾームが、細胞質内には小型で少数のミトコンドリア、発達したゴルジ装置および空胞がみられた。(図18)。

サイトケラチン染色では、培養期間中、家兎の場合と同じく、細胞質がび漫性に陽性であった。

## Ⅲ. 細胞毒によるコラーゲン・ゲル内培養上皮細胞の変化

コラーゲン・ゲル内培養系を用い、細胞毒であるマイトマイシンCを添加し、培養上皮細胞にどのような形態変化がみられるかを検討した。その結果、高用量群である1000と100 $\mu$ g/ml群では嚢胞を形成する全ての細胞が凝固壊死に陥り、嚢胞腔内に脱落した(図19)。同群の多糖類染色では、いずれの染色でも陰性であり、粘液は消失した。10 $\mu$ g/ml添加群では嚢胞を形成する培養上皮の半分以上は脱落し、消失した。この時、残存している細胞にはプレブ様の突出がみられた。また、凝固壊死に陥っている細胞も少数認められた(図20)。多糖類染色では一部の残存細胞の細胞質内にわずかに粘液の産生が証明された。1 $\mu$ g/ml以下の用量群では、HE染色および多糖類染色結果のいずれにも明らかな異常は認められなかった。以上、マイトマイシンCを用いた毒性実験により、コラーゲン・ゲル内で嚢胞を形成した胆嚢上皮細胞に病的変化を起こすことが出来た。

## 考 察

胆道系上皮細胞の培養に関していくつかの報告がみられるがその中で、Elhamadyら<sup>3)</sup>はモルモット胆嚢の小片から粘膜上皮細胞を2週間培養し、光顕的、電顕的に観察している。Siricaら<sup>20)</sup>は、ラットの総胆管

結紮による肝内の増生細胆管を遠心分離して3日間培養し、酵素、化学、組織化学的分析および電顕的に検討している。Kumarら<sup>9)</sup>は正常ラット肝を遠心分離して肝内胆管上皮細胞を採取して電気泳動法や蛍光抗体法で検討している。他にも、ラット肝由来の細胞を遠心分離して胆管上皮細胞を得る試みはいくつか報告されている<sup>17-20)</sup>。また、最近では、ヒト胆嚢上皮細胞を培養して産生される粘液を定量しようとの試みもなされている<sup>7)</sup>。

本研究は、コラーゲン・ゲル内培養法を用い、家兎の肝内胆管、肝外胆管及び胆嚢上皮それぞれを別々に培養し、培養上皮細胞の形態や機能およびその経時的変化について検討したものである。また、家兎胆嚢上皮に関しては単層培養も行い比較した。従来、このような試みはなされていない。

まず胆道系上皮細胞を単細胞性にバラバラにするため、家兎の肝内胆管、肝外胆管およびヒト胆嚢小片ではこれをTE混合液中に入れた。また、家兎胆嚢ではその腔内にTE混合液を直接注入し、静置した。その結果得られた上皮細胞の殆どは単細胞にまで分離されていた。

コラーゲン・ゲル内で、これらの単細胞にまで分離された胆道系上皮細胞を観察すると、培養2時間後では培養細胞がわずかに大きくなり、約半数の細胞では細胞質内に種々の大きさの空胞がみられた。培養4~5時間後には細胞質内の空胞によって著しく拡張した細胞も認められた。しかし、この時間までは培養上皮細胞のほとんどは単細胞のままであった。培養10~20時間後には単細胞は少なくなり、多細胞による塊の形成が多く認められた。このことは、培養10時間以降に細胞の数的増加が起こることを示しており、コラーゲン・ゲル内に培養された細胞が分裂を開始するまでにはある程度の時間が必要なことを意味している。これに比べ、単層培養した胆嚢上皮細胞では培養1日後で既に4倍もの細胞の増加があり、単層培養の場合には培養初期に細胞増殖が起こることを示している。

一方、培養開始時から認められた細胞塊では、培養2時間後に細胞質内に種々の大きさの空胞が出現した。培養10~20時間後になると、これらの空胞とは別の部位に粘液の産生がみられ、培養2日後には初期の細胞質内空胞は消失し、かわって複数個の細胞による粘液陽性の多細胞性嚢胞の形成が認められた。このことから、嚢胞形成は、培養初期の空胞に起因するものではなく、培養10~20時間後から産生分泌された粘液が集合して小嚢胞を形成し、さらにこれらの個々の細胞質内小嚢胞が融合して大型の多細胞性の嚢胞を形成

したと思われた。なお、培養2時間後に細胞質内に形成された粘液陰性の空胞は、培養10～20時間後にはほとんどみられなくなることから、おそらく初代培養開始時に上皮細胞が受けた刺激に対する細胞の反応、すなわち空胞変性を示しているものと考えerるほうが妥当であり、この空胞が融合して後の粘液陽性の多細胞性囊胞になるとは考えにくい。

以上のことから、コラーゲン・ゲル内での囊胞形成過程には1個の細胞が増殖して囊胞を形成する場合と培養開始時からいくつかの細胞による塊があり、この塊を形成する細胞個々の細胞質内に分泌された粘液を含む小囊胞が融合して大型の多細胞性囊胞を形成する場合との2通りが考えられた。なお、培養上皮細胞の増殖は、BrdUを用いたS期細胞標識により確認した。

囊胞を形成する上皮細胞では、培養初期には立方状のものが次第に円柱状に変化成熟し、電顕的にも細胞間接着装置の複雑化、さらに細胞側面の嵌合の密化と細胞間隙の狭小化を伴っていた。これらの所見は、培養上皮が次第に生体内に見られる形態へと変わりつつあることを示している。また、培養細胞に形成された囊胞腔の内面に多数の微絨毛が認められ、細胞質内には多数の中間径フィラメントが認められた。なお、蛍光抗体法によるサイトケラチン染色では培養細胞の細胞質が培養期間中同程度に陽性であり、その染色強度に差はみられなかった。サイトケラチンは上皮細胞の中間径フィラメントの主要な構成成分であり胆道系上皮細胞にも多く存在していることが知られ<sup>20)</sup>、電子顕微鏡的観察で大量の中間径フィラメントが認められたことと一致している。このことは、培養細胞が胆道系上皮細胞の特徴を長期間維持していることを示す所見の一つだと考えられる。

さらに電子顕微鏡的観察では、培養細胞内腔側の微絨毛基部に被覆小窩を、基底側に被覆小窩と小胞を認めた。このことは、培養細胞には貧食能があり、培地中の蛋白質などの大きな分子の吸収と小胞による物質の輸送が行われていることを示唆していると思われた。なお、被覆小窩はElhamadyら<sup>21)</sup>のモルモットの培養胆嚢上皮細胞にも認められており、さらにモルモット胆嚢上皮細胞ではフェリチンを用いて生体内と試験管内のいずれでも貧食能と吸収した物質を輸送する機能のあることが証明されている<sup>22)</sup>。このことから、胆道系上皮が本来持っている種々の機能が、培養上皮にも現れていると考えられる。

一方、コラーゲン・ゲル内の培養細胞について培養開始時から時間を追って多糖類染色を行ったところ、

培養開始2～5時間後には培養細胞の細胞質内に空胞が出現したが、これらの空胞内には粘液は存在しなかった。しかし、培養10～20時間が経過すると細胞質内に空胞とは別の部位で粘液の産生がみられはじめ、しだいに細胞質内の粘液の量が多くなり、培養2日後には粘液を腔内に容れた多細胞性囊胞が見られるようになった。培養1週以降ではこの多細胞性囊胞はさらに大きくなり、内腔には多量の粘液を容れていた。この粘液の産生は6週間の培養期間中でもほとんど変わらず続いた。このことは培養10時間頃より細胞質内に産生されはじめた粘液が培養時間の経過と共にその量を増し、次第に細胞質内に蓄積したと考えられる。そして、このようにして細胞質内に蓄積された粘液囊胞が隣接する細胞の粘液囊胞と融合して、次第に大型の多細胞性囊胞を形成するものと思われた。また、多糖類染色では、家兎の胆道系上皮とヒト胆嚢上皮のいずれも同程度に強く陽性であり、中性と酸性粘液の存在が認められた。また、電顕的には上皮細胞には発達したゴルジ装置がみられ、それに近接して分泌顆粒とこの顆粒の内腔側への放出像が認められた。従って、これらの培養上皮細胞が活発に粘液産生を行っていると考えられる。なお、培養3週後からは囊胞周囲のコラーゲン・ゲルも多糖類染色陽性となったが、囊胞を構成する細胞間隙から漏れでた粘液に起因する変化だと思われた。ちなみに、今回の培養系で上皮細胞周囲には基底膜の形成は見られなかった。これに比べ単層培養した家兎胆嚢上皮細胞には培養1週後でもわずかな粘液の産生しか認められなかった。

胆道系上皮細胞が粘液を産生することは、肝内の比較的太い胆管<sup>24)</sup>、肝外胆管<sup>25)</sup>、総胆管<sup>26,27)</sup>、胆嚢管<sup>27)</sup>、肝管<sup>29)</sup>および胆嚢<sup>29-32)</sup>で知られている。本研究でコラーゲン・ゲル内に培養された細胞は、これら生体内での胆道系上皮細胞の持つ粘液産生機能を長期にわたって維持し、さらにこの粘液の産生、分泌が囊胞の形成、さらには増大に重要だと考えられた。

最後に予備的実験として細胞毒を用いて行った毒性実験で使用したマイトマイシンCは、アルキル化剤として細胞のDNA合成を抑えるとされている<sup>33,34)</sup>。本試験では、マイトマイシンCによりコラーゲン・ゲル内で囊胞形成を示した胆嚢上皮細胞に明らかな障害を起すことが出来、薬物の細胞毒性実験のモデルとしても有用であることを示した。今後、この方法を用いて胆道系疾患の病態の解析を行いたいと考えている。

なお、コラーゲン・ゲル内に培養した家兎肝内胆管、肝外胆管、胆嚢上皮細胞およびヒト胆嚢上皮細胞には培養期間中著しい違いは見られなかった。このこ

とはこれらの被覆上皮が生物学的にかなり相似していることを示していると考えられる。

## 結 論

1. 家兎肝内胆管, 肝外胆管, 胆嚢およびヒト胆嚢より上皮細胞を単離し, 単細胞化し, コラーゲン・ゲル内初代培養を行った. コラーゲン・ゲル内培養は, 家兎肝内胆管と肝外胆管上皮細胞では3週間まで, 家兎胆嚢上皮細胞では6週間まで, ヒト胆嚢上皮細胞では1週間まで行った. なお, 家兎胆嚢上皮細胞の単層培養も2週間まで行い, 比較検討した.

2. コラーゲン・ゲル内培養細胞は2~4日後には, 粘液陽性の多細胞性嚢胞を形成し, 培養時間の経過と共に培養細胞が増殖し, 嚢胞腔の増大が認められた. 多糖類染色により嚢胞内と培養上皮細胞内腔側にみられた粘液は, 中性および酸性粘液であった. また, 免疫組織化学的方法で観察したところ, 培養細胞には上皮性のサイトケラチンが認められた. これらの所見は培養期間中同程度にみられ, 家兎およびヒトの培養上皮細胞間に大きな違いはなかった. しかし, 単層培養した家兎胆嚢上皮細胞では粘液の産生は少なかった.

3. 電子顕微鏡的には, コラーゲン・ゲル内培養で形成された多細胞性嚢胞内面に多数の微絨毛が, 細胞質内には小型で少数のミトコンドリア, 発達したゴルジ装置, 多数の粘液顆粒, 中間径フィラメントが, 細胞間には接着装置が認められ, 胆道系上皮の特徴がみられた. なお, 単層培養した細胞には, 細胞表面にわずかな微絨毛, 細胞質内に乏しいミトコンドリア, そして隣接する細胞間に接着装置がみられただけであった.

4. BrdU によるS期細胞標識法によりコラーゲン・ゲル内での培養細胞の増殖が確認された.

5. マイトマイシンCを用いた毒性実験により, コラーゲン・ゲル内で嚢胞形成を示した胆嚢上皮細胞に病的変化を起こすことができた.

6. 以上, 家兎およびヒトの胆道系上皮細胞をコラーゲン・ゲル内で長期間培養することができた. この方法は, 胆道系上皮細胞の生理および病理像を3次元レベルで解析できる実験系と思われた.

## 謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導頂きました本学名誉教授太田五六先生, 本学第二病理中沼安二教授に心より感謝します. また, 本研究に御協力頂きました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, 本論文の一部は, 第22

回日本肝臓学会総会, 第77回日本病理学会総会, 第24回日本肝臓学会総会, 日本組織培養学会第62回大会, 第40回 The American Association for the Study of Liver Diseases (米国) で発表した.

## 文 献

- 1) Sheila, S.: Diseases of the Liver and Biliary System, 8th ed., p618-620, Blackwell Scientific Publications, London, 1989.
- 2) Elhamady, M. S., Hopwood, D., Milne, G., Ross, p. & Boucher, I. A. D.: Tissue culture of guinea-pig gall-bladder epithelium. *J. Pathol.*, **140**, 221-235 (1983).
- 3) Sirica, A. E., Sattler, C. A. & Cihla, H. P.: Characterization of a primary bile ductular cell culture from the livers of rats during extrahepatic cholestasis. *Am. J. Pathol.*, **120**, 67-78 (1985).
- 4) Sirica, A. E. & Cihla, H. P.: Isolation and partial characterizations of oval and hyperplastic bile ductular cell-enriched populations from the livers of carcinogen and noncarcinogen-treated rats. *Cancer Res.*, **44**, 3454-3466 (1984).
- 5) Kumar, U. & Jordan, T. W.: Isolation and culture of biliary epithelial cells from the biliary tract fraction of normal rats. *Liver*, **6**, 369-378 (1986).
- 6) 宮崎耕治: 肝・胆嚢細胞. 機能細胞の分離と培養 (三井洋司, 高木良三郎, 市原 明, 関口守正, 松村外志張編), 第1版, 192-205頁, 丸善株式会社, 東京, 1987.
- 7) 吉富聡一, 宮崎耕治, 中山文夫: 初代培養ヒト胆嚢粘膜上皮細胞における粘液分泌に関する研究. *日消誌*, **84 (Abstract)**, 543 (1987).
- 8) 奥村宏康, 坂本孝作, 中野眼一, 池田 均, 長嶋起久雄, 長町幸雄: ヒト胆嚢上皮の器官培養に関する研究. *日消誌*, **84 (Abstract)**, 2101 (1987).
- 9) Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, D. & Nandi, S.: Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3401-3405 (1979).
- 10) Yang, J., Guzman, R., Richards, J., Jentoft, V., Devault, M. R., Wellings, S. R. & Nandi, S.: Primary culture of human mammary

- epithelial cells embedded in collagen gels. *J. Natl. Cancer Inst.*, **65**, 337-343 (1980).
- 11) **Yang, J., Elias, J. J., Petrakis, N. L., Wellings, S. R. & Nandi, S.**: Effects of hormones and growth factors on human mammary epithelial cells in collagen gel culture. *Cancer Res.*, **41**, 1021-1027 (1981).
  - 12) **Yang, J. & Nandi, S.**: Growth of cultured cells using collagen as substrate. *Int. Rev. Cytol.*, **81**, 249-286 (1983).
  - 13) 榎並淳平, 榎並園子, 川村和男, 肥塚正博, 古閑睦好: マウス正常乳腺上皮細胞・乳癌細胞の培養. 組織培養, **9**, 397-400 (1983).
  - 14) **Enami, J., Koezuka, M., Hata, M., Enami, S. & Koga, M.**: Gel strength-dependent branching morphogenesis of mouse mammary tumor cells in collagen gel matrix culture. *Dokkyo J. Med. Sci.*, **12**, 25-30 (1985).
  - 15) 榎並淳平, 松沢昭雄, 肥塚正博, 川村和男, 古閑睦好: マウス正常乳腺上皮細胞および乳癌細胞の無血清培養: 細胞増殖因子, ホルモンによる増殖促進. 組織培養, **12**, 388-391 (1986).
  - 16) **Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H.**: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques; a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-580 (1981).
  - 17) **Sells, M. A., Katyal, S. L., Shinozuka, H., Estes, L. W., Sell, S. & Lombardi, B.**: Isolation of oval cells and transitional cells from the livers of rats fed the carcinogen DL-ethionine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 355-362 (1981).
  - 18) **Ledda, G. M., Sells, M. A., Yokoyama, S. & Lombardi, B.**: Metabolic properties of isolated rat liver cell preparations enriched in epithelial cells other than hepatocytes. *Int. J. Cancer*, **31**, 231-237 (1983).
  - 19) **Yaswen, P., Hayner, N. T. & Fausto, N.**: Isolation of oval cells by centrifugal elutriation and comparison with other cell types purified from normal and pre-neoplastic livers. *Cancer Res.*, **44**, 324-331 (1984).
  - 20) **Hayner, N. T., Braun, L., Yaswen, P., Brooks, M. & Fausto, N.**: Isozyme profiles of oval cells, parenchymal cells, and biliary cells isolated by centrifugal elutriation from normal and preneoplastic livers. *Cancer Res.*, **44**, 332-338 (1984).
  - 21) **Franke, W. W., Schmid, E., Kartenbeck, J., Mayer, D., Hacker, H. J., Bannash, P., Osborn, M., Weber, K., Denk, H., Wanson, J. C. & Drochmans, P.**: Characterization of the intermediate-sized filaments in liver cells by immunofluorescence and electronmicroscopy. *Biol. Cell.*, **34**, 99-110 (1979).
  - 22) **Hopwood, D., Milne, G. & Wood, R. A. B.**: The uptake of cationised ferritin and its subsequent redistribution by gallbladder epithelium in vivo. *J. Pathol.*, **136**, 95-109 (1982).
  - 23) **Elhamady, M. S., Miline, G., Hopwood, D., Ross, P. E. & Bouchier, M. S.**: The uptake of cationized ferritin by guinea-pig gallbladder in vitro. *Histochem. J.*, **16**, 275-285 (1984).
  - 24) 寺田忠史: ヒト正常肝, 肝内結石症肝および肝内胆管拡張症肝における肝内胆管付属腺組織の形態学的研究. 十全医会誌, **93**, 599-619 (1984).
  - 25) **Mcminn, R. M. H. & Kugler J. H.**: The glands of the bile and pancreatic ducts: autoradiographic and histochemical studies. *J. Anat.*, **95**, 1-11 (1961).
  - 26) **Chou, S. T. & Gibson, J. B.**: The histochemistry of biliary mucins and the changes caused by infestation with *clonorchis sinensis*. *J. Pathol.*, **101**, 185-197 (1970).
  - 27) **Burden, V. G.**: Observations on the histologic and pathologic anatomy of the hepatic, cystic and common bile ducts. *Ann Surg.*, **82**, 584-587 (1925).
  - 28) **Cautier, M., Jehan, P. & Odievre, M.**: Histologic study of biliary fibrous remnants in 48 cases of extrahepatic biliary atresia: correlation with postoperative bile flow restoration. *J. Pediatr.*, **89**, 704-709 (1976).
  - 29) **Lee, S. P. & Scott, A. J.**: The evolution of morphologic changes in the gallbladder before stone formation in mice fed a cholesterol-cholic acid diet. *Am. J. Pathol.*, **108**, 1-8 (1982).
  - 30) **Lee, S. P.**: Hypersecretion of mucus glycoprotein by the gallbladder epithelium in experimental cholelithiasis. *J. Pathol.*, **134**, 199-207 (1981).

31) Laitio, M.: Morphology and histochemistry of non-tumorous gallbladder epithelium. A series of 103 cases. *Pathol. Res. Pract.*, **167**, 335-345 (1980).

32) Hayward, A. F., Freston, J. W. & Bouchier, I. A. D.: Changes in the ultrastructure of gallbladder epithelium in rabbits with experimental

gallstones. *Gut*, **9**, 550-556 (1968).

33) 梅田 誠, 川崎一也, 齋藤 守: 天然発癌物質・シンポジウム, 形態的観察に重点をおいた Panel 法の応用. *日本臨床*, **30**, 942-949 (1972).

34) 桜井欽夫: 抗癌剤開発の現況(上). アルキル化剤の歴史. *化学療法の領域*, **3**, 1612-1618 (1987).

**Primary Culture of Rabbit Intrahepatic Biliary Duct Epithelium, Extrahepatic Biliary Duct Epithelium and Gallbladder Epithelium, and Human Gallbladder Epithelium in Collagen Gel** Yasuhito Kawamura, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **98**, 993—1006 (1989)

**Key words** biliary epithelium, collagen gel matrix, culture

#### Abstract

There have been few in vitro studies of biliary epithelial cells. In this study, rabbit intrahepatic biliary epithelium (rih), extrahepatic biliary epithelium (reh) and gallbladder epithelium (rgb), and human gallbladder epithelium (hgb) were cultured in collagen gel matrix for up to a week (hgb), 3 weeks (rih and reh) and 6 weeks (rgb). These cultured epithelial cells were examined by light microscopy, electronmicroscopy, histochemistry and immunofluorescent microscopy. In collagen gel matrix, singly isolated epithelial cells in collagen gel matrix began to increase in size and number, and these cultured cells took the form of various sized cysts. These cysts contained neutral and acid mucin. Ultrastructurally, the cyst wall was composed of cuboidal to low columnar epithelial cells. Numerous microvilli were found on the luminal surface of these epithelial cells and coated pit were found at the root of the microvilli. There were desmosomes, tight junctions, gap junctions and interdigitations between the plasma membranes of adjacent cells, and secretory granules near the well developed Golgi apparatus, small mitochondria and bundle of intermediate filaments in the cytoplasm. Cytokeratin was diffusely detected in the cultured epithelial cells. These characteristics of epithelial cells were identical among the rih, reh, rgb and hgb cultured in collagen gel, and also were similar to those of in vivo biliary epithelium. The cell kinetics was studied using a monoclonal antibody to 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU), and the BrdU positive nuclei suggestive of S-phase cells was demonstrated by the anti-BrdU monoclonal antibody as the first antibody. The BrdU labeling index of rgb in collagen gel culture was 9.6%, and rgb in monolayer culture was 7.3%. Cultured rgb in collagen gel matrix added by cytotoxic agent showed necrodegenerative changes. This collagen gel culture method was valuable for morphological and functional studies of the biliary epithelium.