

- et al : Mucinous cystic neoplasm (mucinous cystadenocarcinoma of low-grade malignant potential) of the pancreas : a clinicopathologic study of 130 cases. *Am J Surg Pathol* 23 : 1-16, 1999
- 2) Fukushima N, Mukai K : 'Ovarian-type' stroma of pancreatic mucinous cystic tumor expresses smooth muscle phenotype. *Pathol Int* 47 : 806-808, 1997
  - 3) Izumo A, Yamaguchi K, Eguchi T et al : Mucinous cystic tumor of the pancreas: immunohistochemical assessment of 'ovarian-type stroma'. *Oncol Rep* 10 : 515-525, 2003
  - 4) 信川文誠, 塩野さおり, 高瀬 優, 他 : 肝MCNと膵MCNの臨床病理学的相違. *胆と膵* 27 : 459-464, 2006
  - 5) Suzuki M, Fujita N, Onodera H et al : Mucinous cystic neoplasm in a young male patient. *J Gastroenterology* 40 : 1070-1074, 2005
  - 6) Devaney K, Goodman ZD, Ishak KG : Hepatobiliary cystadenoma and cystadenocarcinoma. A light microscopic and immunohistochemical study of 70 patients. *Am J Surg Pathol* 18 : 1078-1091, 1994
  - 7) Davies W, Chow M, Nagorney D : Extrahepatic biliary cystadenomas and cystadenocarcinoma. Report of seven cases and review of the literature. *Ann Surg* 222 : 1995
  - 8) Shiono S, Suda K, Nobukawa B et al : Pancreatic, hepatic, splenic, and mesenteric mucinous cystic neoplasm (MCN) are lumped together as extra ovarian MCN. *Pathol Int* 56 : 71-77, 2006
  - 9) Reddy RP, Smyrk TC, Zapiach M et al : Pancreatic mucinous cystic neoplasia defined by ovarian stroma: demographics, clinical features, and prevalence of cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2 : 1026-1031, 2004
  - 10) Owono P, Scoazec JY, Valette PJ et al : Hepatobiliary cystic tumors. Clinical, radiological and histopathological study of 7 cases. *Gastroenterol Clin Biol* 25 : 414-421, 2001
  - 11) 上田和彦, 角谷真澄, 上原 剛, 他 : 粘液産生性胆管腫瘍の画像所見. *肝胆膵* 58 : 809-815, 2009
  - 12) Ryu Y, Matsui O, Zen Y et al : Multicystic biliary hamartoma: imaging findings in four cases. *Abdom Imaging* 35 : 543-547, 2010
  - 13) 龍 泰治, 蒲田敏文, 松井 修, 他 : 胆管嚢胞性腫瘍と区別すべき非腫瘍性/過誤腫病変. *肝胆膵* 58 : 817-824, 2009

\* \* \*

## 胆管内管状腫瘍

佐藤保則\* 中沼安二\*

索引用語: 胆管内腫瘍, 膵管内腫瘍, 管状腫瘍, 腺腫, 癌

### 1 はじめに

近年, 肝胆道系に発生する腫瘍の疾患分類に膵の腫瘍分類を適用し, 肝胆道系疾患の病態病理を整理, 理解することが試みられつつある<sup>1)</sup>. 胆道と膵臓はほぼ同時期に前腸から派生するという発生学的な共通性があることから, 胆道と膵臓は本質的に相互に可塑性をもつ臓器という見方が可能であり, 膵疾患との比較を行うことで肝胆道系疾患の病態の理解がしやすくなる<sup>1)</sup>.

現行のAFIPによる膵腫瘍分類(2007年)において, 膵管内腫瘍はintraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN), intraductal oncocytic papillary neoplasm (IOPN), intraductal tubular neoplasm (ITN) の3つに大別されている<sup>2)</sup>. 新WHO分類(第4版)では, 膵管内腫瘍としてintraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN)の概念が新たに導入された<sup>3)</sup>.

胆管内管状腫瘍は稀な病変と考えられ, その疾患概念も一般的ではないが, 最近

われわれは総胆管に発生した管状腺管からなる腫瘍を経験し, それを膵ITNの胆道系 counterpartとして報告した<sup>4)</sup>. 時期を同じくして, 隣国の韓国から膵ITPNに相当する肝胆道系病変が報告された<sup>5)</sup>. このように膵ITN, ITPNの疾患概念が確立されるにつれ, それに相同性を示す肝胆道系病変が潜在的に存在することが明らかとなりつつある.

本稿では胆管内に発生する管状腺管からなる腫瘍を胆管内管状腫瘍(胆管ITN)と呼び, 膵ITNやITPNとの相同性に基づいて胆管ITNを紹介する. 次いで, われわれが経験した胆管ITNの症例を呈示する.

### 2 膵ITN とITPN

#### 1. 疾患の位置づけ

わが国の膵癌取り扱い規約(2009年)では, 膵ITNは膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)の中の「その他」の中の一つとして位置づけられている<sup>6)</sup>. 稀な膵管内腫瘍であり, 構造異型と細胞異型の程度により腺腫(intraductal tubular adenoma, ITA)と腺癌(intraductal

Yasunori SATO et al : Intraductal tubular neoplasm of the bile duct

\*金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 [〒920-8640 石川県金沢市宝町13-1]

tubular carcinoma, ITC)とに分けられる。後述するようにITNはpyloric gland adenomaの形態を示すことが多いが新WHO分類でpyloric gland adenomaはgastric-type IPMNに含まれる。また、現行の膵癌取扱い規約においてITPNの分類はまだ用いられていない。

## 2. 画像所見

Dynamic CTとMRIでは乏血性腫瘍、MRI T1強調画像で低信号、T2強調画像で高信号を呈する<sup>7,8)</sup>。MRCPでは主膵管内の陰影欠損としてとらえられ、腫瘍の尾側の主膵管は拡張し、随伴性膵炎を伴うことがある。腫瘍の膵頭側の主膵管の拡張はみられない。

## 3. 病理所見

### 1) 病理形態

肉眼的に膵ITNは膵管内の結節状病変であり、ときに有茎性である<sup>2)</sup>。膵管は2次性に拡張し閉塞することもある。ITPNは結節状の外観を呈することが多い<sup>3)</sup>。

組織学的に、ITNは管状異型腺管の密な増殖からなる。ITPNは管状、乳頭状もしくは乳頭管状の増殖形態を示す。いずれにおいても構成細胞は非粘液性で杯細胞はみられない。ITNはこれまでの報告では異型度は軽度で核分裂像もほとんどなく、pyloric gland typeのITA (pyloric gland adenoma)の形態を示すものが多い<sup>9)</sup>。上皮内癌や浸潤癌を伴うITCや、稀にintestinal typeのITCの報告例もある<sup>10~13)</sup>。また、ITPNは高異型度の病変あるいは腺癌であり、基本的に低異型度のものはみられないとされる<sup>3)</sup>。

### 2) 免疫組織化学

粘液の形質ではpyloric gland typeのITAが多いこととも関連して、免疫染色でMUC6やMUC5ACが陽性、MUC1やMUC2は陰性を示す<sup>2)</sup>。ITCの症例での検討では、MUC1陽性、MUC2とMUC5ACは陰性の症例が多

く<sup>10,11)</sup>、同様にITPNではMUC2とMUC5ACが陰性を示すことが特徴的とされる<sup>3)</sup>。また、intestinal typeのITCでは、MUC1は陰性、MUC2とMUC5AC、MUC6が陽性と報告されている<sup>13)</sup>。

## 4. 発生機序

膵ITN、ITPNは症例数が少ないこともあり、発生機序に関して確定的なことはまだわかっていない。癌に関しては通常のIPMNのように多段階的な発生を示さず膵管上皮から*de novo*で発生するとする説と、adenoma-carcinoma sequenceを経て発生するという説がある<sup>10,12)</sup>。腺腫と腺癌が混在したITNの症例では、免疫染色で癌部にp53の発現をみることがある<sup>12,13)</sup>。また、ITPNの8症例を用いた検討ではKRASの変異はなかったとされる<sup>3)</sup>。

## 3 胆管内腫瘍と膵管内腫瘍の相同性

### 1. IPNB

肝胆道系に発生するintraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB)は主膵管型のIPMNに相当する<sup>14)</sup>。IPMNと同様、IPNBにはgastric type, intestinal type, pancreatobiliary typeがあり、oncocytic typeも存在する。分枝型IPMNに相当する肝胆道系病変はまだ不明確だが、増殖性変化の目立つ胆管周囲嚢胞や胆管と非交通性の肝胆管嚢胞腺腫/腺癌の中にそうした病変が含まれている可能性がある<sup>1)</sup>。また、嚢胞形成型のIPNBや胆管周囲付属腺に由来するoncocytic typeのIPNBの報告があり、これらも分枝型IPNBに相当する可能性が指摘されている<sup>15)</sup>。

### 2. IOPN

膵IOPNはIPMNの一亜型(oncocytic type)とも考えられるが、IPMNに頻繁に認められるKRAS変異が少ないことなどから、AFIP

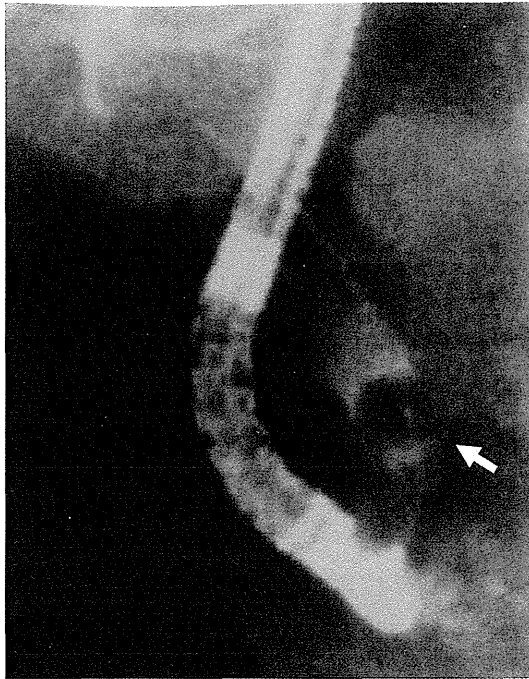


図1 胆管内管状腫瘍 ERC  
下部胆管に約10 mm大の陰影欠損を認める(矢印)

による膵腫瘍分類ではIPMNとは区別されている<sup>2)</sup>。新WHO分類ではIPMNの一亜型として取り扱われる。これまでにわれわれ<sup>16)</sup>と寺田ら<sup>17)</sup>がIOPNに相当する肝胆道系病変を報告している。

### 3. BillIN

Biliary intraepithelial neoplasia (BillIN)は胆管にみられる前癌病変/早期癌病変であり<sup>18)</sup>、pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)に相当する病変と考えられる。PanINではグレードが高くなるほど膵癌で認められるKRAS変異やp53などの発現異常の頻度が高くなるが、BillINでも高グレードになると免疫染色でp53の発現をみることがあり<sup>19)</sup>、また、KRAS変異を示すものがあることがわかっている(Hsu M et al., 未発表データ)。

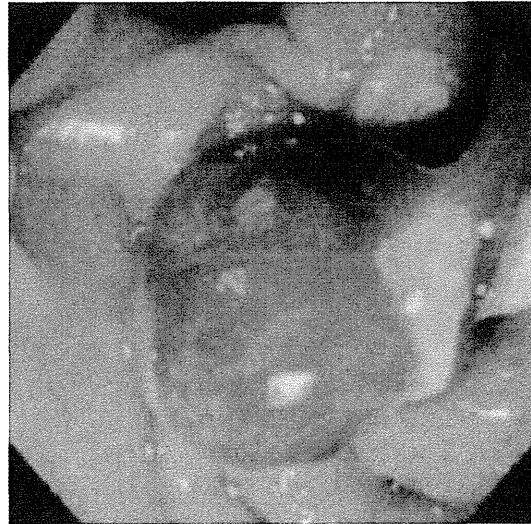


図2 胆管内管状腫瘍 内視鏡像  
表面平滑，発赤調の有茎性ポリープ。  
大きさは径10 mm大。

### 4. 胆管ITN

膵管内腫瘍はAFIPによる腫瘍分類ではIPMN, IOPN, ITNの3つに大別され<sup>2)</sup>、上述したように膵IPMNとIOPNについては肝胆道系にも同様の病変が存在する。これまで膵ITNに類似した肝胆道系病変は知られていなかったが、最近、われわれは管状腺管からなる胆管内腫瘍を膵ITNの胆道系 counterpartとして報告し<sup>4)</sup>、その後、膵ITPNに相当する肝胆道系病変の症例報告もなされた<sup>5)</sup>。

肝門部胆管や肝外胆管では、papillary adenomaやtubulovillous adenomaとして報告されている病変があり、その中にadenomaから発癌を示す病変があることも知られている<sup>20~23)</sup>。閉塞性黄疸の原因となりうる病変であり、こうした症例が膵ITPNに相当する胆管病変である可能性が高いと思われる。

なお、膵ITPNは粘液非産生性の病変であるが、今後、かりに膵ITPNの概念を肝胆道系に应用する場合、現行ではIPNBが粘液産

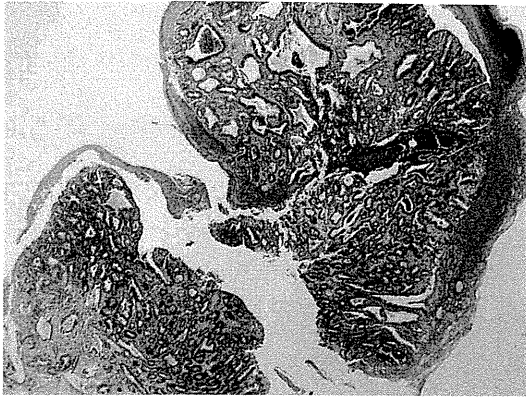


図3 胆管内管状腫瘍 病理組織像  
 中小の管状腺管より構成される病変。  
 乳頭状構造はみられない。

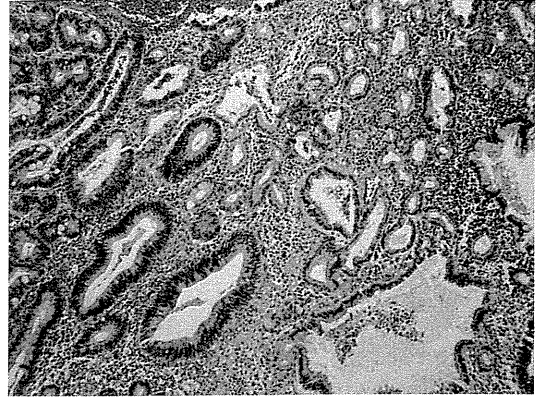


図4 胆管内管状腫瘍 病理組織像  
 異型性に乏しい管状腺管(右)と異型性の目立つ管状  
 腺管(左)とが混在している。

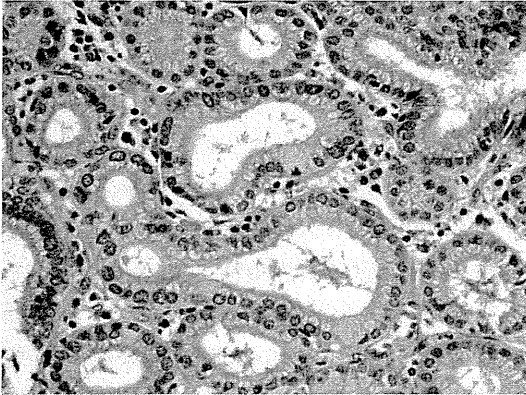


図5 胆管内管状腫瘍 病理組織像  
 異型性に乏しい管状腺管の拡大像。Pyloric gland  
 adenomaに類似する(low-grade tubular adenoma)。

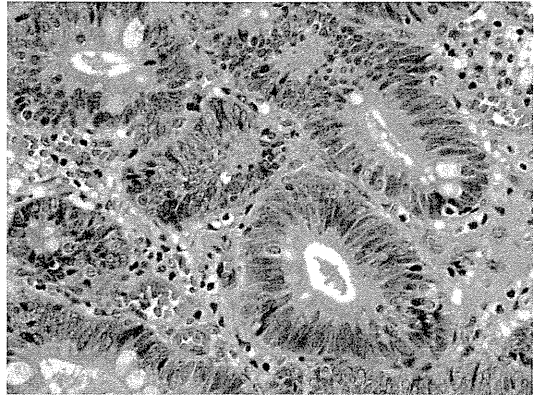


図6 胆管内管状腫瘍 病理組織像  
 紡錘形核を有する異型管状腺管。上皮に杯細胞が介  
 在する。大腸や十二指腸のtubular adenomaに類似  
 する(high-grade tubular adenoma)。

生性と非産生性のものを包括した概念である  
 こととも関連して、ITPNとIPNBの異同を  
 改めて検証する必要があるように思われる。

#### 4 症例呈示

以下にわれわれが経験した胆管ITNの1例  
 を呈示する。

##### 1. 症例

67歳女性。胆石・総胆管結石に対して経  
 過観察中、ERCにて総胆管に2個の結石、な

らびに下部胆管に約10 mmの陰影欠損を認  
 めた(図1)。内視鏡的乳頭切開術を施行し、  
 2個の総胆管結石(4 mm大、黒色石)を採石  
 した。さらに、下部胆管内に径10 mm大、  
 表面平滑な発赤調の有茎性ポリープを認め  
 (図2)、同病変に対してポリペクトミーを  
 行った。

##### 2. 病理所見

組織学的に、中小の管状腺管より構成され  
 る病変であり、乳頭状構造は認めなかった



図7 胆管内管状腫瘍 病理組織像  
一部に癌とみなしうる核異型と軽度の構造異型を示す部位を認める。間質浸潤はない(carcinoma *in situ*)。

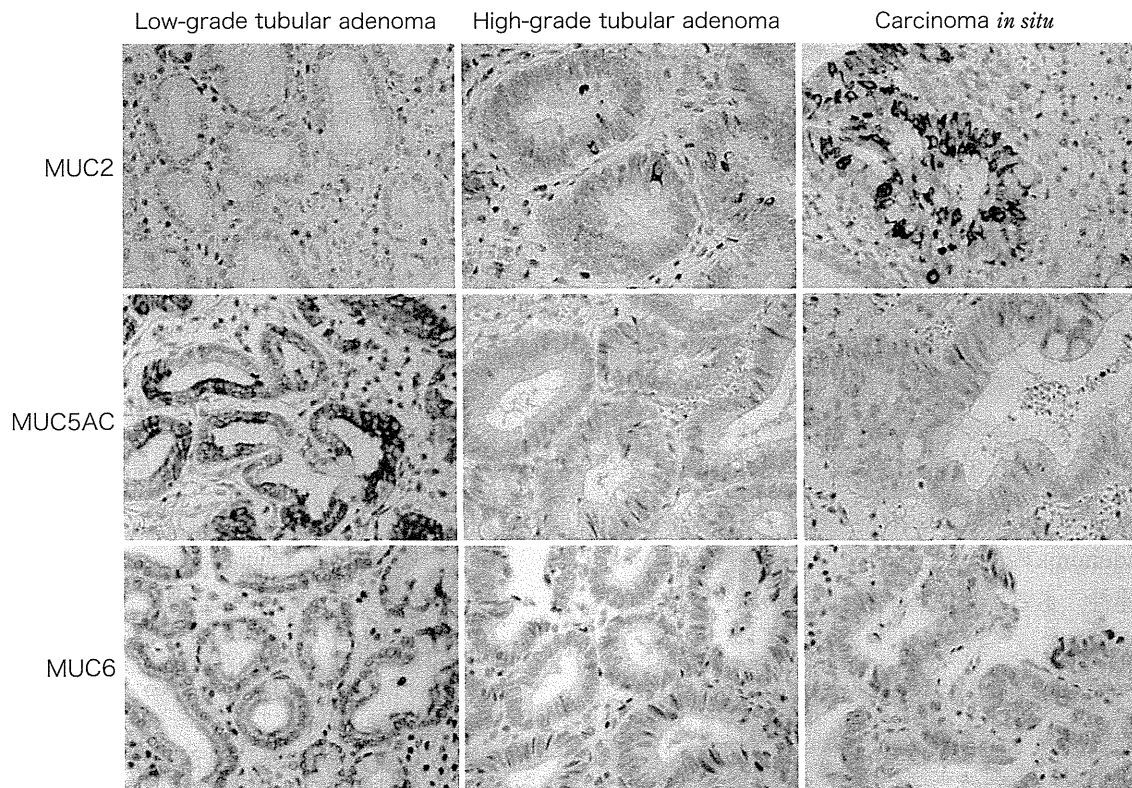


図8 胆管内管状腫瘍 免疫組織化学  
Low-grade tubular adenomaはMUC6とMUC5ACが陽性, high-grade tubular adenomaの一部分と carcinoma *in situ*はMUC2に陽性を示す。

(図3). 管状腺管には異型性の乏しい腺管(図4, 右側)と異型性の高度な腺管(図4, 左側)とが混在していた。異型性に乏しい管状腺

管は pyloric gland adenoma に類似していた (low-grade tubular adenoma) (図5)。異型性が高度な管状腺管には杯細胞が介在し, 大腸

や十二指腸の tubular adenoma によく類似していた (high-grade tubular adenoma) (図6). また, high-grade tubular adenoma の中に一部, 上皮内癌とみなしうる核異型と軽度の構造異型を示す部位があった (carcinoma *in situ*) (図7).

### 3. 免疫組織化学

Low-grade tubular adenoma は MUC2 陰性, MUC5AC と MUC6 は陽性であった (図8). 一方, high-grade tubular adenoma は MUC2 が一部に陽性, MUC5AC と MUC6 は陰性, carcinoma *in situ* は MUC2 陽性, MUC5AC 陰性, MUC6 は一部が弱陽性を示した (図8). Cytokeratin20 (CK20) は low-grade tubular adenoma は陰性, high-grade tubular adenoma の一部と carcinoma *in situ* は陽性であった. p53 は carcinoma *in situ* の一部が陽性を示した.

### 4. 考察

本例は細胞学的な形質の異なる管状腺管が混在した稀な胆管内腫瘍であった. 病理形態から判断して, carcinoma *in situ* は high-grade tubular adenoma に由来すると思われた. しかし, 病変内に不規則に混在する low-grade tubular adenoma と high-grade tubular adenoma の腫瘍発生の観点からの相互の関連性, あるいは先行病変の有無などは不明であった.

膵 ITN は pyloric gland type の ITA が多いとされており, 本例のような症例は例外的と思われる. また, 上皮に杯細胞が介在している点も非定型的であるが, 本例は膵 ITN に相同性を示す胆管内管状腫瘍と考えた.

## 5 おわりに

胆管内腫瘍の病態病理の解析は膵と比較して立ち遅れているが, 胆管内腫瘍の発生頻度

が膵管内腫瘍より低いことがその大きな要因の一つとなっている. 胆管内管状腫瘍も発生頻度が低い病変と推測されるが, 実際に胆管内管状腫瘍として認識, 分類することができる病変が存在する. 今後, 症例を集積し解析を行うことで, 胆管内管状腫瘍の臨床病理学的な特徴を明らかにしていく必要がある.

### 文 献

- 1) Nakanuma Y : A novel approach to biliary tract pathology based on similarities to pancreatic counterparts: Is the biliary tract an incomplete pancreas?. *Pathol Int* 60 : 419-429, 2010
- 2) Hruban RH : Intraductal tubular neoplasm. In: Hruban RH, Pitman KB, Klimstra DS eds. *AFIP Atlas of Tumor pathology Series 4, Tumor of the Pancreas*. Washington, DC: AFIP, 103-104, 2007
- 3) Yamaguchi H, Shimizu M, Ban S et al : Intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas distinct from pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 33 : 1164-1172, 2009
- 4) Sato Y, Osaka H, Harada K et al : Intraductal tubular neoplasm of the common bile duct. *Pathol Int* 60 : 516-519, 2010
- 5) Park HJ, Jang KT, Heo JS et al : A potential case of intraductal tubulopapillary neoplasms of the bile duct. *Pathol Int* 60 : 630-635, 2010
- 6) 日本膵臓学会編. 膵癌取扱い規約. 金原出版; 第6版 2009.7
- 7) Ishigami K, Yoshimitsu K, Irie H et al : Imaging of intraductal tubular tumors of the pancreas. *AJR Am J Roentgenol* 191 : 1836-1840, 2008
- 8) Oh DK, Kim SH, Choi SH et al : Intraductal tubular carcinoma of the pancreas: a case report with the imaging findings. *Korean J Radiol* 9 : 473-476, 2008
- 9) Bakotic BW, Robinson MJ, Sturm PD et al : Pyloric gland adenoma of the main pancreatic duct. *Am J Surg Pathol* 23 : 227-231, 1999
- 10) Tajiri T, Tate G, Inagaki T et al : Intraductal tubular neoplasms of the pancreas. Histogenesis and differentiation. *Pancreas* 30 : 115-121, 2005
- 11) Tajiri T, Tate G, Kunimura T et al : Histologic and immunohistochemical comparison of intraductal tubular carcinoma, intraductal papillary-mucinous



- carcinoma, and ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* 29 : 116-122, 2004
- 12) Itatsu K, Sano T, Hiraoka N et al : Intraductal tubular carcinoma in an adenoma of the main pancreatic duct of the pancreas head. *J Gastroenterol* 41 : 702-705, 2006
  - 13) Terada T : Intraductal tubular carcinoma, intestinal type, of the pancreas. *Pathol Int* 59 : 53-58, 2009
  - 14) Zen Y, Fujii T, Itatsu K et al : Biliary papillary tumors share pathological features with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hepatology* 44 : 1333-1343, 2006
  - 15) Nakanishi Y, Zen Y, Hirano S et al : Intraductal oncocytic papillary neoplasm of the bile duct: the first case of peribiliary gland origin. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16 : 869-873, 2009
  - 16) Sudo Y, Harada K, Tsuneyama K et al : Oncocytic biliary cystadenocarcinoma is a form of intraductal oncocytic papillary neoplasm of the liver. *Mod Pathol* 14 : 1304-1309, 2001
  - 17) Terada T, Taniguchi M : Intraductal oncocytic papillary neoplasm of the liver. *Pathol Int* 54 : 116-123, 2004
  - 18) Zen Y, Aishima S, Ajioka Y et al : Proposal of histological criteria for intraepithelial atypical/proliferative biliary epithelial lesions of the bile duct in hepatolithiasis with respect to cholangiocarcinoma: preliminary report based on interobserver agreement. *Pathol Int* 55 : 180-188, 2005
  - 19) Nakanishi Y, Zen Y, Kondo S et al : Expression of cell cycle-related molecules in biliary premalignant lesions: biliary intraepithelial neoplasia and biliary intraductal papillary neoplasm. *Hum Pathol* 39 : 1153-1161, 2008
  - 20) Morris-Stiff GJ, Senda Y, Verbeke CS et al : Papillary adenoma arising in the left hepatic duct: an unusual tumor in an uncommon location. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22 : 886-888, 2010
  - 21) Sotona O, Cecka F, Neoral C et al : Papillary adenoma of the extrahepatic biliary tract-a rare cause of obstructive jaundice. *Acta Gastroenterol Belg* 73 : 270-273, 2010
  - 22) Akaydin M, Ersoy YE, Erozyen F et al : Tubulovillous adenoma in the common bile duct causing obstructive jaundice. *Acta Gastroenterol Belg* 72 : 450-454, 2009
  - 23) Kim BS, Joo SH, Joo KR et al : Carcinoma in situ arising in a tubulovillous adenoma of the distal common bile duct: a case report. *World J Gastroenterol* 14 : 4705-4708, 2008

\* \* \*



## 神経内分泌腫瘍

原 田 憲 一\* 中 沼 安 二\*

索引用語: 胆道, カルチノイド, 神経内分泌癌, 腺内分泌癌, ソマトスタチンアナログ

### 1 はじめに

神経内分泌細胞からなる腫瘍の疾患名としてカルチノイドという名称が1世紀近く使用され, 形態学的概念も確立されている。しかし, 転移をきたす症例など臨床病理学的に種々の悪性を呈する症例や特徴的組織像を呈する症例の存在が明らかとなり, 神経内分泌の特徴を有する腫瘍に対してあらゆる病理学的用語が使われてきた。現在, 神経内分泌腫瘍(neuroendocrine tumor, NET)の名称が汎用されているが, NETの同義語または類義語として, 悪性度や組織像の特徴より, カルチノイド, 異型カルチノイド, 高分化型内分泌腫瘍(well differentiated endocrine tumor), 低分化型内分泌癌(poorly differentiated endocrine carcinoma), 高度悪性度神経内分泌癌(high grade neuroendocrine carcinoma), 小細胞癌(small cell carcinoma), 大細胞癌(large cell endocrine carcinoma)などの名称が使われてきている。また, 通常の前癌を伴うNETは

腺神経内分泌癌(adenoendocrine carcinoma)の名称も使用されている。さて, 胆道系原発のNETは稀であるが, 良性, 低悪性度, 高悪性度と生物学的活性の異なる腫瘍が存在し, NETの診断のみならず悪性度の評価も重要である。本稿では, 胆道系NETの特徴について自験例を交えて概説する。

### 2 疫学

胆道系NETは主に症例報告として発表されている程度で, 肝外胆管よりは胆嚢原発の症例が多く, またその多くは通常の前癌(胆管癌, 胆嚢癌)にNETを合併した腺内分泌細胞癌症例であり, 純粋なNETはさらに稀である。頻度など詳細な疫学的特徴はいまだ不明であるが, 草野ら<sup>1)</sup>による本邦の胆嚢原発の前癌細胞癌45例の文献的集計によると, 平均65.8歳, 女性に多く(75%), カルチノイド症状は1例のみと報告されている。また, 山田ら<sup>2)</sup>による本邦の胆管原発(胆嚢癌含まず)のNET25例の文献的集計によると, 平均69.5歳, 男女比は17:8で男性が多く,

Kenichi HARADA et al: Biliary neuroendocrine tumor

\*金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理 [〒920-8640 石川県金沢市宝町 13-1]

表1 胆道系神経内分泌腫瘍の組織学的分類

WHO 分類 2010 (消化管)	G1: mitotic count, <2 per 10 high power field (HPF) and/or ≤ 2% Ki67 index G2: mitotic count, 2-20 per 10 HPF and/or 3-20% Ki67 index G3: mitotic count, >20 per 10 HPF and/or >20% Ki67 index
• Neuroendocrine tumor (NET) - G1 (carcinoid)   - G2 • Neuroendocrine carcinoma (NEC) - large cell type   - small cell type • Mixed adenoendocrine carcinoma (MANEC) • Hyperplastic and preneoplastic lesions	
WHO 分類 2010 (胆嚢および肝外胆管)	
• Neuroendocrine tumor (NET) - G1 (carcinoid)   - G2 • Neuroendocrine carcinoma (NEC) - large cell NEC   - small cell NEC • Mixed adenoendocrine carcinoma (MANEC) • Goblet cell carcinoid • Tubular carcinoid	
胆道癌取扱い規約(第5版)	
• 小細胞癌 (small cell carcinoma) [ 内分泌細胞癌 (Endocrine cell carcinoma) ] • 腺内分泌細胞癌 (adenoendocrine cell carcinoma)	

腺癌併存例が17例と多くを占めている。また、胆嚢や肝外胆管のNETは、von Hippel-Lindau syndrome<sup>3)</sup>や多発性内分泌腫瘍1型(MEN-1)<sup>4)</sup>に伴って発生することも知られており、遺伝的素因の関与も考えられている。

### 3 臨床症状

NETは、いわゆるカルチノイド症状の有無から症候性NETと無症候性NET、ホルモン産生の有無から機能性と非機能性に分類されるが、胆道系NETは通常非機能性の無症候性であり、胆管癌や胆嚢癌として摘出された手術検体中に偶然発見される場合がほとんどである。文献的に胆道系の症候性NETとして、ガストリン産生性NET (gastrinoma)に伴うZollinger-Ellison syndrome, ACTH産生性NETに伴うクッシング症候群を呈した症例が報告されている<sup>4,5)</sup>。

### 4 組織学的分類 (表1)

消化管NETに関する旧WHO分類(2000年)では、高分化型神経内分泌腫瘍(WDNET)、高分化型神経内分泌癌(WDNEC)、低分化型神経内分泌癌(PDNEC)の3型が分類されており、腫瘍の大きさ、分化度、細胞増殖活性、浸潤や転移などの病理学的指標をもとに生物学的活性をおのこの、良性群、低悪性群、高悪性群に分類し、NETの予後予測や治療選択に重要な指標として用いられてきた<sup>6)</sup>。しかし、2010年の新WHO分類では消化管、胆のう肝外胆管ともに神経内分泌腫瘍(NET)、神経内分泌癌(NEC)、混合型腺内分泌癌(MANEC)に大別され、NETは細胞増殖活性にてさらにG1とG2に分類されている。本邦の胆道癌取扱い規約(第5版)では小細胞癌(内分泌細胞癌)と腺内分泌細胞癌に分類されており、原発性肝癌取扱い規約(第5

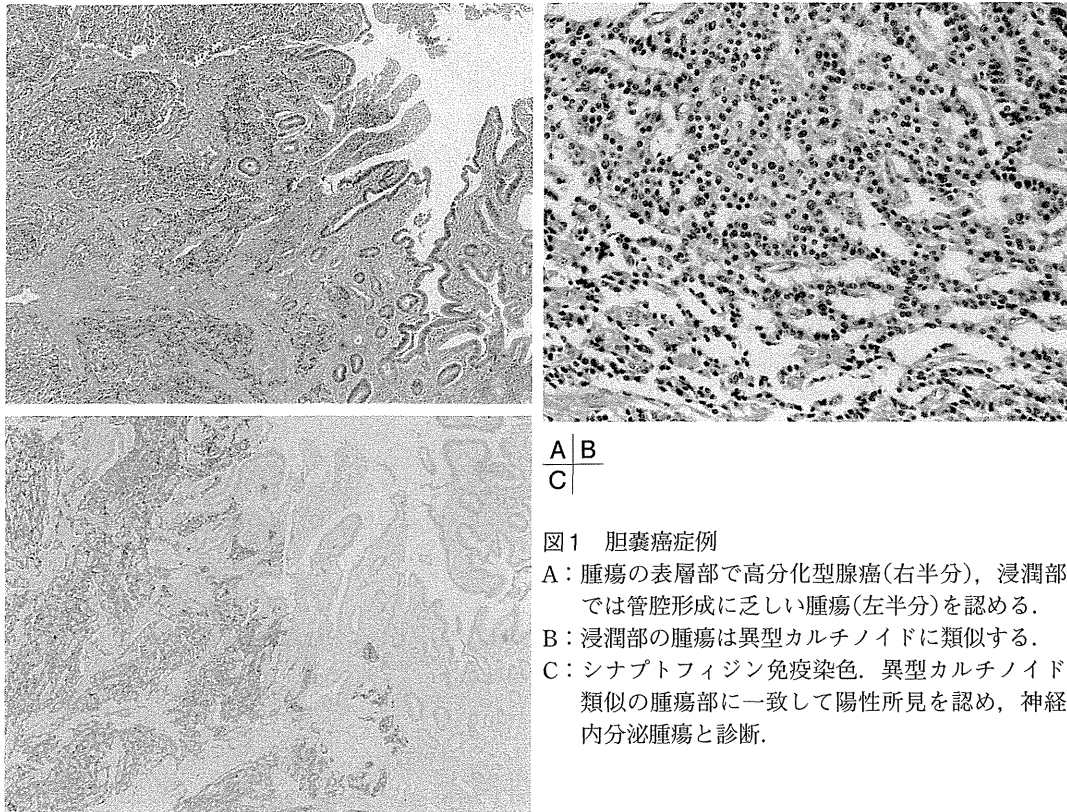


図1 胆嚢癌症例

- A: 腫瘍の表層部で高分化型腺癌(右半分), 浸潤部では管腔形成に乏しい腫瘍(左半分)を認める.  
 B: 浸潤部の腫瘍は異型カルチノイドに類似する.  
 C: シナプトフィジン免疫染色. 異型カルチノイド類似の腫瘍部に一致して陽性所見を認め, 神経内分泌腫瘍と診断.

版)では特にNETに関する記載はない。また、カルチノイド腫瘍、高分化内分泌細胞癌(異型カルチノイド)、大細胞性神経内分泌細胞癌(LCNEC)、小細胞癌の4つの組織学的区分も提唱されている<sup>7)</sup>。本稿ではWHOによる胆道系NETに準じて記載する。

### 1. 神経内分泌腫瘍(NET)

カルチノイドや旧WHO分類のWDNETやWDNECが含有され、一般的に異型の乏しい均一な細胞から成る。核は円形～卵円形で、核小体は目立たず、多型性は乏しい。細胞質は好酸性、顆粒状で、細胞境界は不明瞭である。通常、カルチノイドに特徴的なリボン状～索状または充実性の増殖を示す(図1)。また、増殖活性によりG1とG2に亜分類され、G1はいわゆるカルチノイドなどが属する。

### 2. 神経内分泌癌(NEC)

形態的に小細胞型と大細胞型に分けられ、各々肺癌の小細胞癌と大細胞神経内分泌癌(LCNEC)に相当する。小細胞型は円形～やや紡錘形の形態からなる腫瘍細胞で、シート状、胞巣状、索状を示し、特徴的な鋳型状核(nuclear molding)やロゼット形成もみられる症例もある。大細胞型は核小体が目立ち、淡明から微細顆粒状の核、中等量～豊富な細胞質を有する細胞からなり、類器官構造、索状、ロゼット様など神経内分泌系を示唆する所見を伴う(図2)。両者とも壊死を伴う傾向があり、また増殖活性は高く(G3)、高悪性度を示す低分化型神経内分泌癌とも呼ばれる。

### 3. 混合型腺内分泌癌(MANEC)

通常型腺癌とNET特に神経内分泌癌(NEC)が同時にみられる腫瘍は、胆道系NETの最

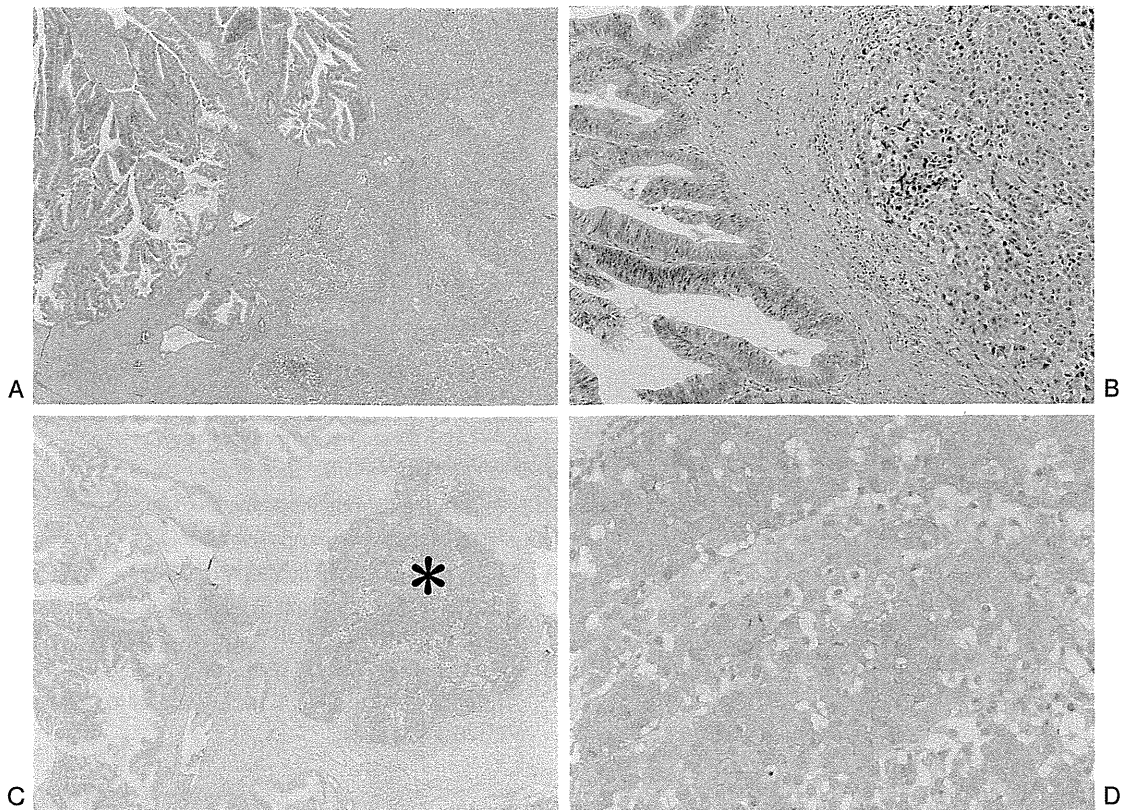


図2 胆嚢癌症例

- A：腫瘍の表層部で高分化型腺癌(左上),浸潤部では低分化な腫瘍(右下)を認める。  
 B：浸潤部の低分化な腫瘍(右半分)は,肺の大細胞性神経内分泌癌に類似する。  
 C：クロモグラニンA免疫染色. 浸潤部の低分化な腫瘍胞巣部(\*)に発現を認め, 神経内分泌腫瘍と確認。  
 D：ソマトスタチン受容体2型(SSTR2)の免疫染色. 神経内分泌腫瘍成分に膜状の発現を認める。

も多い組織型であり, 便宜的に両成分とも30%以上ある症例としている. 腺癌成分は管状から乳頭状の分化度が高い症例が多い(図1, 図2). NET成分の組織型としては, 神経内分泌癌(小細胞癌, LCNEC)の他に, 低悪性度の高分化型神経内分泌癌や異型カルチノイド腫瘍の成分(NETG2)もみられる.

## 5 表現型マーカー

NETの組織像として, 上述のごとく, カルチノイド, 小細胞癌, LCNECの像を呈する症例が多く, 形態的にNETが疑われた場合には, 神経内分泌の特徴を確認する必要が

ある. 銀還元性反応や好銀反応を利用した組織染色, 免疫組織化学染色, 電顕などにて内分泌顆粒の検出を行うが, 免疫染色が比較的簡便かつ特異性の高い方法であり, クロモグラニンA, シナプトフィジン, CD56 (NCAM)などの神経内分泌系マーカーがNETの指標として汎用されている(図1C, 図2C). なお, CD56は肝内小型胆管(特に細胆管)のマーカーでもあり, 末梢型肝内胆管癌でも陽性所見を認めるため, CD56染色による肝胆道系NETの鑑別には注意を要する. また, 胆管型ケラチンであるCK7, CK19も通常陽性であり, 胆管由来のNETを示唆する所見でも

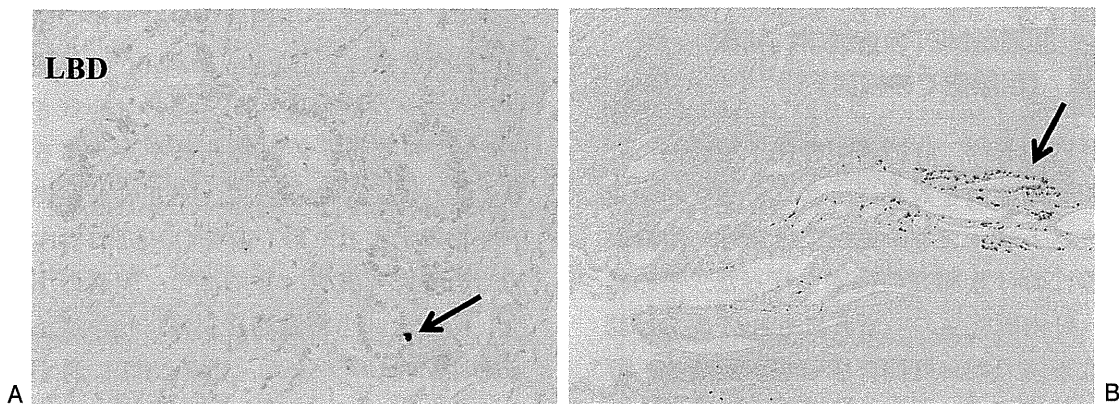


図3 クロモグラニンA免疫染色

- A：正常肝の肝門部大型胆管(LBD)の胆管付属腺にみられた神経内分泌細胞(→)。  
 B：胆嚢癌症例。表層の腺癌成分(左半分)には神経内分泌細胞はほとんど認めないが、浸潤部で神経内分泌細胞の増生を認める(矢印)。

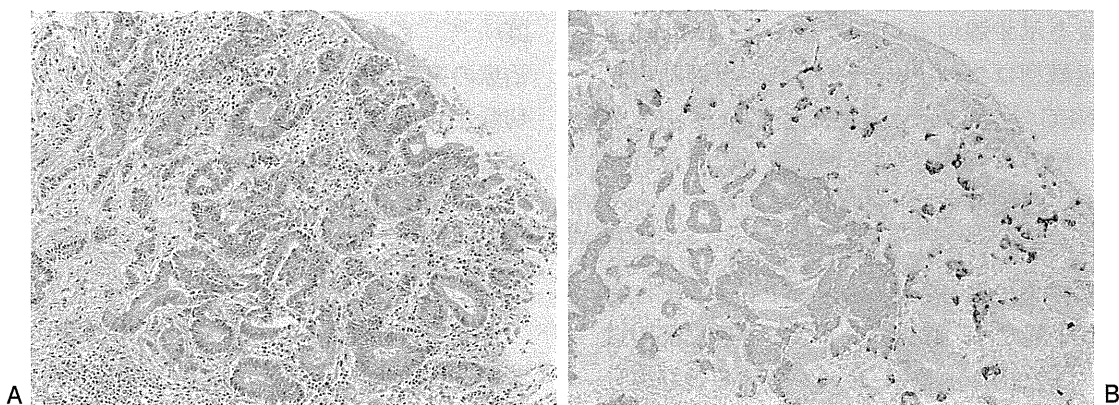


図4 肝門部胆管癌

- A：腫瘍の表層部および浸潤部ともに高分化型な腺癌を認める。  
 B：クロモグラニンA免疫染色。表層部では陽性細胞を散見するのみであるが、浸潤部では領域性に発現を認め、神経内分泌腫瘍と考えられる。

ある。ホルモンとしてはセロトニン、ガストリン、ソマトスタチン、膵ポリペプチドが陽性の症例が報告されている。

## 6 組織発生

胆道系NETの組織発生についてはいまだ詳細不明であるが、腺癌を伴う症例が多いため腺癌成分からNETへのtransdifferentiationによるとの説が一般的に考えやすい。また、

胆道系上皮には少数ではあるが神経内分泌細胞がもともと存在し<sup>8)</sup>、またしばしば慢性炎症性胆道系疾患の非腫瘍性胆管上皮内や胆管癌の上皮内に多数の神経内分泌細胞を認めることより、既存の神経内分泌細胞由来との考えもある(図3)。また、異所性膵・副腎組織由来、ステム細胞由来などの仮説も想定されている。

## 7

### 胆道系NETの病理学的特徴 (自験例での検討)

肝内胆管癌, 肝門部胆管癌, 胆嚢癌, 肝外胆管癌症例を対象に, クロモグラニンA, シナプトフィジンの免疫染色を行い胆道系腫瘍におけるNETの検索を行った. その結果, 肝内胆管癌のいずれにもNET成分は認めなかったが, 肝門部胆管癌, 胆嚢癌, 肝外胆管癌では4~10%の頻度で神経内分泌マーカーを発現する領域性のNET成分を認めた. いずれも純粋なNETではなく, 表層部では通常型腺癌(特に高分化型管状~乳頭状)を認め, 腺癌と連続しつつ浸潤部でNETの像を示す腺内分泌癌であった. NET成分の組織型は異型カルチノイド, 小細胞癌, LCNECであったが, 通常の腺癌と区別できないNETも存在した(図4). また, いずれの症例も浸潤部ではNET成分が主体であり, リンパ節転移を伴う症例はすべてNET成分の転移巣であった. また, NET成分を含有する症例では, 腺癌成分および非腫瘍部胆道上皮に神経内分泌マーカーを有する神経内分泌細胞を散在性に認めた(図3).

## 8 予 後

NETの悪性度は, 通常の癌腫と同様に, 局所での浸潤の程度(腫瘍径, 脈管侵襲, 神経周囲浸潤)および転移の有無で規定される. NETは通常の癌腫とは異なり, 細胞異型や構造異型が乏しいにもかかわらず転移をきたす症例があり, Ki67/MIB-1などの免疫染色による細胞増殖活性の評価が治療法や予後予測に重要である. 特に, 小細胞癌およびLCNECの低分化型な神経内分泌癌は特に予後が悪い. 腺癌とNETを併せ持つ前述の自験症例を対象にKi67の免疫染色を施行し

た結果, LCNECや小細胞癌成分では腺癌成分に較べて常にKi67 indexが高く, また脈管侵襲やリンパ節転移もNET成分で観察されたため, NET成分が腫瘍病勢を決定すると考えられた. したがって, NET成分が患者予後を規定するため, 術後のNETに対する補助治療も考慮すべきである. 胆嚢の小細胞型NETは肺小細胞癌と同様に化学療法の反応性が良い<sup>9)</sup>. また, 近年NETに対する分子標的療法として, ソマトスタチンアナログ(酢酸オクトレオチド)による抗腫瘍効果が期待されており, オクトレオチドの標的となるSSTR2やSSTR5の発現を病理検体で確認することは治療効果の予測に重要である(図2D)<sup>10)</sup>. もちろん神経内分泌腫瘍に対する治療の第一選択は外科的切除であるが, 今後切除不可能な胆道系NETや転移再発例における治療法としてソマトスタチンアナログは注目されている.

## 9 おわりに

胆道系NETは極めて稀な腫瘍であるが, 腺癌に併発するNETはしばしば経験される. NET成分が典型的なカルチノイドの像を呈している症例ではNETの診断は容易であるが, LCNECや小細胞癌のNETでは低分化型腺癌として誤認される例もあり, 表層部で高分化な腺癌, 浸潤部でNETという通常パターンは認識しておくべきである. また, 胆道系NETは悪性度が高い症例が多く, また分子標的療法による治療効果が期待できる症例もあるため, 今後胆道系NETに対する治療戦略についても検討すべきと思われる.

### 文 献

- 1) 草野智一, 青木武士, 安田大輔, 他: 胆嚢を原発とした腺内分泌細胞癌の1例. 日臨外会誌 69

- : 896-902, 2008
- 2) 山田恭子, 永野晴彦, 國崎主税, 他: 下部胆管原発腺内分泌細胞癌の1例. 日臨外会誌70 : 184-189, 2009
  - 3) Nafidi O, Nguyen BN, Roy A : Carcinoid tumor of the common bile duct: a rare complication of von Hippel-Lindau syndrome. *World J Gastroenterol* 14 : 1299-301, 2008
  - 4) Price TN, Thompson GB, Lewis JT et al : Zollinger-Ellison syndrome due to primary gastrinoma of the extrahepatic biliary tree: three case reports and review of literature. *Endocr Pract* 15 : 737-749, 2009
  - 5) Spence RW, Burns-Cox CJ : ACTH-secreting 'apudoma' of gallbladder. *Gut* 16 : 473-476, 1975
  - 6) Kloppel G : Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21 : 15-31, 2007
  - 7) 佐野壽昭: 胆道系の神経内分泌腫瘍. 胆と膵 28 : 169-172, 2007
  - 8) Kurumaya H, Ohta G, Nakanuma Y : Endocrine cells in the intrahepatic biliary tree in normal livers and hepatolithiasis. *Arch Pathol Lab Med* 113 : 143-147, 1989
  - 9) Fujii H, Aotake T, Horiuchi T et al : Small cell carcinoma of the gallbladder: a case report and review of 53 cases in the literature. *Hepatogastroenterology* 48 : 1588-1593, 2001
  - 10) Volante M, Brizzi MP, Faggiano A et al : Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol* 20 : 1172-1182, 2007

\* \* \*



# Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in chronic advanced liver disease and the cholangiocarcinomatous component of hepatocellular cholangiocarcinoma share common phenotypes and cholangiocarcinogenesis

Jing Xu,<sup>1,2</sup> Motoko Sasaki,<sup>1</sup> Kenichi Harada,<sup>1</sup> Yasunori Sato,<sup>1</sup> Hiroko Ikeda,<sup>3</sup> Ji-Hun Kim,<sup>4</sup> Eunsil Yu<sup>2</sup> & Yasuni Nakanuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Human Pathology, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Japan, <sup>2</sup>Department of Pathology, Shanxi Medical University, Taiyuan, China, <sup>3</sup>Pathology Diagnosis Section, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Japan, and <sup>4</sup>Department of Pathology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Centre, Seoul, Korea

Date of submission 3 July 2010

Accepted for publication 7 January 2011

---

Xu J, Sasaki M, Harada K, Sato Y, Ikeda H, Kim J-H, Yu E & Nakanuma Y

(2011) *Histopathology* 59, 1090–1099

## Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in chronic advanced liver disease and the cholangiocarcinomatous component of hepatocellular cholangiocarcinoma share common phenotypes and cholangiocarcinogenesis

**Aims:** Intrahepatic cholangiocarcinomas (ICCs) are known to arise in cases of non-biliary, chronic advanced liver disease (CALD), but their clinicopathological features remain unexplored. The aim of this study was to compare the histological and immunohistochemical ICCs arising in CALD with those arising in livers with non-specific reactive (NSR) changes.

**Methods and results:** Seventy-one cases of ICC arising in CALD were compared with ICCs arising in livers with NSR changes, including normal livers (72 cases) and the cholangiocarcinomatous (CC) component of hepatocellular cholangiocarcinomas (HC-CCs) (30 cases). The expression of mucin was higher in ICC with NSR changes, whereas it was relatively low in ICC with

CALD and the CC component of HC-CC. The expression of biliary markers [cytokeratin (CK)7, CK19, epithelial membrane antigen, and epithelial cell adhesion molecule (EpcAM)] was lower in CC with CALD and in the CC component of HC-CC than in CC with NSR changes. The expression of hepatic progenitor cell markers [neural cell adhesion molecule (NCAM) and c-kit] was higher in ICC with CALD and the CC component of HC-CC than in ICC with NSR changes. EpcAM and CK19 were constantly expressed in cultured CC cells, whereas NCAM was infrequently expressed in cultured CC cells. **Conclusions:** The carcinogenesis of ICC arising in CALD and the ICC component of HC-CC, each showing similar features, may involve hepatic progenitor cells.

**Keywords:** cholangiocarcinoma, combined hepatocellular cholangiocarcinoma, hepatic progenitor cell, liver cirrhosis, NCAM

**Abbreviations:** AB, Alcian blue; AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; CALD, chronic advanced liver disease; CC, cholangiocarcinoma; CK, cytokeratin; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; dPAS, periodic acid-Schiff after diastase digestion; EMA, epithelial membrane antigen; EpcAM, epithelial cell adhesion molecule; HCC, hepatocellular carcinoma; HC-CC, hepatocellular cholangiocarcinoma; HepPar 1, hepatocyte parafin 1; HPC, hepatic progenitor cell; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NCAM, neural cell adhesion molecule; NSR, non-specific reactive

---

Address for correspondence: Y Nakanuma, MD, Department of Human Pathology, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa 920-8640, Japan. e-mail: pbcpsc@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

© 2011 Blackwell Publishing Limited.

## Introduction

Intrahepatic cholangiocarcinomas (ICCs) arise from the intrahepatic bile ducts and affect adults of both sexes. ICCs are primary liver malignancies and are second in frequency after hepatocellular carcinoma (HCC).<sup>1–3</sup> Recently, the incidence of ICC has been increasing worldwide.<sup>3,4</sup> ICCs are heterogeneous in clinical features, genotype, and biological behaviour, depending on their anatomical location and histological differentiation. ICCs are largely divided into peripheral and perihilar types.<sup>1,2</sup> Peripheral ICCs presumably develop from the intrahepatic small bile duct, bile ductules, or hepatic progenitor cells (HPCs), and, grossly, show mass-forming growth.<sup>1</sup> Although the majority of ICCs are known to develop in apparently normal livers, a small number are associated with chronic biliary diseases and also non-biliary, chronic advanced liver diseases (CALD), particularly with hepatitis B and C virus infections.<sup>3–6</sup> Recently, ICC associated with CALD has reportedly been increasing in frequency, although its clinicopathological features and pathogenesis with respect to HPCs remain unexplored.

It is well established that cholangiocytes at different anatomical levels of the biliary tree show different phenotypes.<sup>7</sup> For example, neural cell adhesion molecule (NCAM), a surface glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily, is expressed in biliary cells at an early developmental stage (ductal plate), but gradually disappears with the maturation of bile ducts.<sup>8,9</sup> In adult livers, reactive bile ductules, particularly those with an indistinct lumen, aberrantly express NCAM. Small bile ducts and normal and mature bile ductules are negative for NCAM. Canals of Hering and proliferating HPCs in diseased human liver are reported to express c-Kit.<sup>10,11</sup>

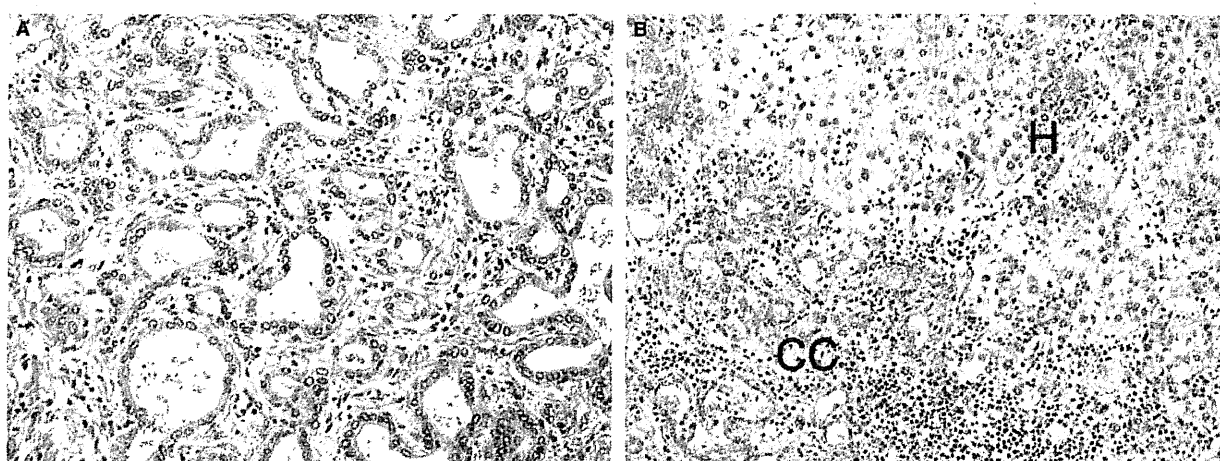
It has long been controversial whether hepatic malignancies arise from stem cells or HPCs that undergo malignant transformation, or from the dedifferentiation of neoplastically transformed mature hepatocytes.<sup>8,9</sup> Recently, there have been reports that hepatocellular cholangiocarcinoma (HC-CC) originates from the transformation of HPCs,<sup>12</sup> and the cholangiocarcinomatous (CC) component shows cholangiocytic differentiation of transformed HPCs. However, this component has not been well characterized.

The aim of this study was to characterize ICCs arising in cases of non-biliary CALD by comparing them with the ICC component of HC-CC and with ICC arising in livers showing normal histology or non-specific reactive (NSR) changes, histologically and immunohistochemically. Experiments with cell lines of ICC and HCC were also conducted to analyse the phenotype of ICC.

## Materials and methods

### CASE SELECTION AND TISSUE PREPARATION

Liver specimens containing ICC and surrounding liver tissue were obtained from 72 cases of ICC arising in livers with NSR changes and apparently normal histology and 71 cases of ICC with non-biliary, CALD showing extensive/bridging fibrosis or cirrhosis [owing to hepatitis virus infection, alcoholic steatohepatitis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), or cryptogenic cirrhosis]. NASH was diagnosed when each of the following requirements were met: (i) no positive results for hepatitis B surface antigen or anti-hepatitis C virus; (ii) histological findings consistent with NASH – steatosis, ballooning degeneration of hepatocytes, and lobular inflammation with or without fibrosis; and (iii) neither drug usage, alcohol abuse, hereditary diseases nor any other clinical manifestations causing liver cell damage. Forty patients had CALD caused by hepatitis virus infection, and 2, 17 and 12 had CALD caused by alcoholic steatohepatitis, NASH, and cryptogenic cirrhosis, respectively. Nineteen patients had fibrosis with lobular disarray, and the remaining 52 patients had cirrhosis in the ICC with CALD group. No patients in the ICC with NSR changes group had predisposing biliary conditions such as parasites, hepatolithiasis, or primary sclerosing cholangitis. In addition, 30 cases of HC-CC were collected, for which both carcinomatous components and surrounding liver tissue were available. Histologically, ICCs in the cases of NSR change or CALD and the ICC component of HC-CC were adenocarcinomas showing tubular, acinar, papillary, solid or cord-like patterns in combination with various fibrous and inflammatory stroma. Bile production was absent. Anaplastic or sarcomatous elements and squamous cell carcinomas were not evaluated in this study. The 173 liver tissue specimens included 32 autopsy specimens, 140 surgical specimens, and one wedge biopsy specimen, and were collected from the surgical and autopsy files of the Department of Human Pathology, Kanazawa University Graduate School of Medicine and its affiliated hospitals (1990–2010), and the surgical files of the Department of Pathology, Asan Medical Centre, Ulsan University School of Medicine, Korea (1996–2009). The diagnosis of ICC was taken from the original report. The diagnosis of HC-CC was made for tumours showing both distinct HCC and distinct CC components in this study. An intermediate component was also seen in tumours, to various degrees. Examples of ICC with CALD and HC-CC are shown in Figure 1. The relative frequencies of ICC with CALD, ICC with NSR changes, HC-CC and HCC were 7.4%, 6.7%,



**Figure 1.** A, An example of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) with chronic advanced liver disease (CALD). Haematoxylin and eosin (H&E). Adenocarcinoma shows a tubular structure surrounded by fibrous stroma with neutrophilic infiltration. B, An example of combined hepatocellular cholangiocarcinoma (HC-CC). A distinct hepatocellular component (H) composed of abundant eosinophilic cytoplasm and a cholangiocarcinoma component (C) showing a tubular structure are observed (H&E).

11.7% and 74.2%, respectively, over a period of 5 years (2005–2009) in our institute.

The main clinicopathological features and the incidence of hepatitis B or C virus infections are listed in Table 1.

All of these tissue samples, including tumour tissues and surrounding non-neoplastic tissues, were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Two or three blocks showing representative histology of carcinoma and background liver were selected in each case for further examination. More than 20 consecutive 4- $\mu$ m-thick sections were cut from each paraffin block, and stained with haematoxylin and eosin, Alcian blue (AB) pH 2.5 and periodic acid–Schiff after diastase digestion (dPAS) for neutral mucin

(red by dPAS), acid mucin (blue by AB) and mixed mucin (purple). The remaining sections were used for immunohistochemistry.

#### IMMUNOHISTOCHEMISTRY

The expression of hepatocyte parafin 1 (HepPar 1), cytokeratin (CK)7, CK19, NCAM, epithelial membrane antigen (EMA), epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), c-Kit and  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) was examined by immunohistochemistry. In this study dealing mainly with ICC, HepPar 1 and AFP were used as hepatocellular or HCC markers, CK7, CK19, EMA and EpCAM as biliary epithelial markers, and NCAM and c-Kit as HPC markers.<sup>7,10,11</sup> In brief, after deparaffinization, antigen

**Table 1.** The main clinical features of the cases examined

Diseases with different backgrounds	n	Age (years) (mean)	Gender (M/F)	Hepatitis virus			Other factors		
				HBsAg(+)	HCVAb(+)	HBsAg(+) HCVAb(+)	Alcoholic steatohepatitis	NASH	Cryptogenic cirrhosis
ICC with CALD	71	37–85 (60)	50/21	25	14	1	2	17	12
ICC with NSRs	72	35–93 (65)	45/27	0	0	0	0	0	0
HC-CC*	30	17–80 (62)	24/6	7	11	1	2	0	6

CALD, Chronic advanced liver disease; F, female; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HC-CC, combined hepatocellular cholangiocarcinoma; HCVAb, hepatitis C viral antibody; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; M, male; n, number of cases; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NSR, non-specific reactive change including almost normal liver histology.

\*Twenty cases were associated with liver cirrhosis, seven cases were associated with chronic viral hepatitis, and three cases showed non-specific reactive changes.

retrieval was performed for CK7, CK19 and HepPar 1 by microwaving in 10 mM citrate buffer (pH 6) for 20 min, and for NCAM and EpCAM by microwaving in 0.1% saponin buffer (pH 6) for 20 min. After blocking of endogenous peroxidase and incubation in normal goat serum (1:10; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 20 min, the deparaffinized sections were incubated overnight at 4°C with primary monoclonal antibodies: CK7 mouse antibody (clone M7018; 1:50; Dako Cytomation; Dako, Tokyo, Japan), CK19 mouse antibody (clone M888; 1:100; Dako Cytomation), EMA mouse antibody (clone M613; 1:200; Dako Cytomation), EpCAM mouse antibody (clone HEA125; 1:5; Abcam, Tokyo, Japan), NCAM mouse antibody (clone 1B6; 1:50; Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), c-Kit rabbit antibody (clone K963; 1:20; IBL), AFP rabbit antibody (clone A008; 1:500; Dako Cytomation; Fujioka, Japan), and HepPar 1 mouse antibody (clone OCH1E5; 1:100; Dako, Cytomation). The sections were then incubated at room temperature for 1 h with goat anti-mouse (the sections for c-Kit and AFP antibodies were incubated with goat anti-rabbit) immunoglobulins conjugated to peroxidase-labelled dextran polymer (EnVision; Dako Cytomation). The reaction products were developed by immersing the sections in a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution containing 0.03% hydrogen peroxide. Nuclei were lightly counterstained with haematoxylin.

The expression of CK7, CK19, NCAM, EMA, EpCAM, c-Kit and AFP was evaluated semiquantitatively according to the percentage of positive cells in the individual lesion: -, negative, 0%; +, focal, 1–10%; ++, moderate, 11–50%; and +++, diffuse, >50%. Distinct immunohistochemical reactivity was considered to be positive, and faint staining was regarded as negative.

#### CELL CULTURES

Six human CC cell lines (HuCCT1, CCKS-1, IHGGK, RBE, SSP-25, and TKKK) were used in this study. One HCC cell line (PLC5) was used as a control. HuCCT1, RBE, SSP-25, TKKK and PLC5 were obtained from the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan), and CCKS-1 was established in our laboratory.<sup>13,14</sup> IHGGK was obtained from the Cell Resource Centre for Biomedical Research, Tohoku University (Sendai, Japan). CCKS-1, RBE and SSP-25 were established from peripheral-type ICC,<sup>13,14</sup> but others were not specified. HuCCT1, CCKS-1, IHGGK, RBE and SSP-25 were cultured in RPMI-1640 (Life Technologies, Rockville, MD, USA); TKKK and PLC5 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium and nutrient mixture F-12 (1:1; Life Technologies). All media were

supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 1% antibiotics-antimycotics (Life Technologies). These cell lines were cultured under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C until the cells reached confluence.

#### WESTERN BLOTTING

Western blotting was performed for the detection of EpCAM, NCAM, CK19 and AFP in cultured cells. EpCAM and CK19 were used as biliary epithelial cell markers, NCAM as an HPC marker, and AFP as a hepatocellular or HCC marker. At present, three isoforms of NCAM with molecular masses of 120, 140 and 180 kDa have been identified. The expression of these three isoforms was examined in six human CC cell lines and one human HCC cell line.<sup>9,15–17</sup> Proteins were extracted from cultured cells with T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's directions. The western blot analysis was carried out on a 10% sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis gel. The proteins in the gel were transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with primary antibodies against EpCAM, NCAM, CK19 (the same antibody as used for immunohistochemistry), AFP (clone ZSA06; prediluted antibody; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and  $\beta$ -actin (clone AC-15; 1:3000; mouse monoclonal; Abcam, Cambridge, UK). The expression of each protein was detected with secondary antibodies conjugated to peroxidase-labelled polymers (EnVision system; Dako Cytomation). DAB was used as the chromogen.

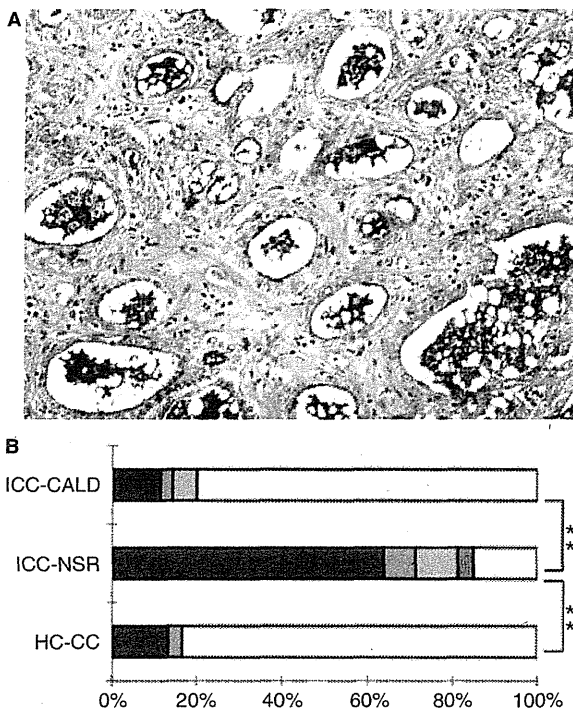
#### STATISTICAL ANALYSIS

Intergroup comparisons were made by use of the Mann-Whitney *U*-test. The results were considered significant if the *P*-value was <0.05.

## Results

#### MUCIN HISTOCHEMISTRY

In ICC with NSR changes and also ICC with CALD, mucin was expressed in the secretions within the lumen or acini as well as on the luminal surface and in the cytoplasm of carcinoma cells (Figure 2). Mucin expression was evident in 60 (83%) of 72 ICCs with NSR changes and in 16 (23%) of 71 ICCs with CALD, respectively (Table 2). Most of the mucin was of a mixed type, and only some carcinoma cells showed neutral mucin-stained red areas or acid mucin-stained blue areas. In contrast, in the ICC component of HC-CC,



**Figure 2.** A, Mucin, mixed or acid type, is detected in the secretions in the lumen and also along the acini of tubular carcinoma of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) arising in chronic advanced liver disease (CALD). Alcian blue pH 2.5 and periodic acid–Schiff after diastase digestion. B, Incidence of mucin production in ICC with CALD, ICC with non-specific reactive changes (NSRs) and combined hepatocellular cholangiocarcinoma (HC-CC). Mucin production is frequent in ICC with NSRs in comparison with ICC with CALD and HC-CC cases. □, negative; ▨, mixed mucin and acid mucin; ▩, mixed mucin and neutral mucin; ▪, neutral mucin; and ■, mixed mucin; \*\**P* < 0.001.

only five (17%) of 30 cases showed focal expression, and most of the mucin was of the mixed type.

**IMMUNOHISTOCHEMISTRY**

The main immunohistochemical results are summarized in Table 2 and Figures 3 and 4.

*Expression of CK7, CK19, EMA, and EpCAM*

**CK7 and CK19.** Both CK7 and CK19 were expressed in the cytoplasm of carcinoma cells of ICC and also of the ICC component of HC-CC (Figure 5A,B). Nearly all of the cases of ICC with NSR changes (99% and 100% of 72 cases) and ICC with CALD (96% and 96% of 71 cases) expressed CK7 and CK19, diffusely, although the expression was rather extensive. In the CC component of HC-CC, in 80% and 83% of 30 cases, respectively, CK7 and CK19 were expressed, whereas their expression was quite low in comparison with ICC with CALD and also ICC with NSR changes.

**EMA.** Both cytoplasmic and apical/luminal membrane staining were most common for EMA, whereas some cases showed only apical/luminal membranous staining (Figure 6A). EMA was positive in 100% of 72 ICCs with NSR changes, and in 69 (97%) of 71 ICCs with CALD. Regarding the CC component of HC-CC, only 21 (70%) of 30 cases expressed EMA, and this incidence was rather low in comparison with ICC with NSR changes and also ICC with CALD (*P* < 0.05).

**EpCAM.** EpCAM was expressed in the membranes of CC cells. EpCAM positivity was similarly observed in

**Table 2.** Mucin production and expression of cytokeratin (CK)7, CK19, neural cell adhesion molecule (NCAM), epithelial membrane antigen (EMA), epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), c-Kit, hepatocyte parafin 1 (HepPar 1), and  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) with chronic advanced liver disease (CALD), ICC with non-specific reactive changes (NSR) and hepatocellular cholangiocarcinoma (HC-CC)

Group	<i>n</i>	AB-dPAS <i>n</i> (%)	CK7 <i>n</i> (%)	CK19 <i>n</i> (%)	NCAM <i>n</i> (%)	EMA <i>n</i> (%)	EpCAM <i>n</i> (%)	c-Kit <i>n</i> (%)	HepPar 1 <i>n</i> (%)	AFP <i>n</i> (%)
ICC with CALD	71	16 (23)*	68 (96)	68 (96)	53 (75)****	69 (97)	69 (97)	58 (82)****	0	8 (11)*
ICC with NSRs	72	60 (83)	71 (99)	72 (100)	11 (15)	72 (100)	71 (99)	12 (17)	0	0
HC-CC	30	5 (17)**	24 (80)**	25 (83)**	20 (67)*****	21 (70)******	23 (77)**	19 (63)*****	0	1 (3)

AB-dPAS, Alcian blue pH 2.5 and periodic acid–Schiff after diastase digestion; *n*, number of cases.

\**P* < 0.05 for ICC with CALD versus ICC with NSRs; \*\**P* < 0.05 for HC-CC versus ICC with NSRs; \*\*\**P* < 0.05 for ICC with CALD versus HC-CC; \*\*\*\**P* < 0.001 for ICC with CALD versus ICC with NSR; \*\*\*\*\**P* < 0.001 for HC-CC versus ICC with NSRs.