

学 位 論 文 題 名

ウサギの胃の培養壁細胞の形態と

酸分泌動態とに関する基礎的検討

学位論文内容の要旨

【緒言】胃粘膜細胞を遊離させ細胞浮遊液の状態にする方法は、胃の蠕動運動や粘膜血流の影響を除外し、さらに自律神経の影響をも除外して、胃粘膜細胞の酸分泌を研究できる利点を有する。しかし、遊離胃腺細胞の細胞浮遊液にはガストリン含有細胞、主細胞および粘液分泌細胞も高い比率で含まれているため、胃酸分泌動態をそれらの影響を除外して研究することは困難であった。一方、細胞浮遊液の状態では数時間しか細胞としての機能を保持できないという時間的制限があったため、臨床的に重要な、長時間にわたる酸分泌の観察や薬剤の微量長期投与の効果を観察するには不適當であった。そこで、本研究では胃粘膜細胞を壁細胞単独の細胞浮遊液にして、酸分泌動態を形態と機能との面から検討した。さらに壁細胞を初代培養することにより、その形態と細胞機能がどのように変化するのか、一方、薬剤の微量長期投与がどのような影響を与えるのかをも検討した。

【方法】ウサギ単離壁細胞は体重約3 Kgの日本白ウサギ(雄性)から摘出した胃を用いて作製した。胃体部粘膜を剥離し1 mm角に細切した後、collagenase, dispase, ウシ血清アルブミンを含むMedium-199溶液に加え混合気通気下で37°C, 50分間インキュベートして細胞を単離した。この単離細胞を滅菌ガーゼで数回濾過した後35%Percoll溶液に浮遊させ 30,000G, 15分間の超遠心を2回行って単離壁細胞を得た。初代培養の方法はChewらの方法に準じてHamのF-12とDulbeccoのイーグル培地の1対1の混合液にウシ血清アルブミン、上皮成長因子、ハイドロコチゾン、インスリン、トランスフェリン、sodium selenite, グルコース、ゲンタマイシンを加えた培養液を用いて行った。超遠心により得た単離壁細胞をamphotericin Bで洗浄した後 polystyrene tube内で30分間インキュベートして線維芽細胞を管壁に接着させて除去した。この細胞浮遊液をMatrigelを塗布したtissue culture dishに移し、1日から4日間培養した。培養壁細胞の生存率はMTT assayを用いて評価した。すなわち培養細胞の付着しているdishにMTT溶液を入れ、60分間インキュベートし、産生されたformazanの量を分光光度計にて測定し、細胞の生存率を検索した。酸分泌は ^{14}C -aminopyrine(^{14}C -AP)の壁細胞への取り込みによって測定した。すなわち細胞浮遊液あるいは細胞の付着しているdishに各種薬剤と3.7kBqの ^{14}C -APを加え20分間インキュベートした後、細胞の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。形態学的解析は光顕、電顕を用いて行った。電顕標本は、細胞を2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、1%OsO₄で後固定した後、2%酢酸ウラン水溶液でブロック染色を行い、さらにアルコール脱水した後、エポキシ樹脂に包埋して作製した。これをHitachi HS-9型電子顕微鏡で観察した。

【結果】① 単離直後の壁細胞の形態と機能

単離直後の壁細胞は顕微鏡では好酸性でエオジンに濃染するほぼ同じ大きさの球形細胞として認められた。顕微鏡では細胞内の分泌細管は数と太さで多様性を示し、ほとんど細管の見られないものから著明に拡張しているものまで多彩な像が認められた。単離直後の壁細胞はヒスタミン、カルバコールでは濃度依存性に酸分泌反応を示したがガストリンでは反応を認めなかった。

② 培養壁細胞の形態と酸分泌反応

顕微鏡で観察すると、培養48時間後の壁細胞はほぼ均一の球形細胞となり、核の周囲にやや拡張した分泌細管が2から3個認められた。培養24, 48, 72時間後の壁細胞について酸分泌反応を検討したところ、ヒスタミンではすべての場合に単離直後の細胞と同様に濃度依存性に酸分泌反応が認められた。培養48時間後、カルバコールでは濃度依存性に酸分泌反応が認められたが、ガストリンでは反応を認めなかった。48時間培養した壁細胞にヒスタミン 10^{-4} Mを加えて5ないし15分刺激したところ、拡張した分泌細管が数個、核の周囲に認められた。この分泌細管には特徴的な細胞質のふちどりが認められた。

③ H_2 ブロッカーの長期投与が壁細胞に与える影響

シメチジン、ラニチジン、ファモチジンの3種類の H_2 ブロッカーの各濃度をculture dishに加え、壁細胞を48時間培養した。MTT assayで評価される培養壁細胞のviabilityはシメチジンで濃度依存性に上昇したが、他の2剤では変化を認めなかった。顕微鏡的には3剤に共通して分泌細管がほとんど認められず、細胞内には細胞障害を示唆する大小不同の小胞が充満している所見が認められた。

【考案】従来、単離胃粘膜細胞の培養は表層粘膜細胞以外は困難であったが、Chewらはウサギの壁細胞の初代培養を行い、酸分泌の機能を有する状態で7日間培養することに成功したと報告した。本研究においてもChewの方法に準じて培養を行ったが、壁細胞の単離はChewの方法と異なるPercollによる超遠心を2回繰り返すという独自の方法で純度の高い、しかも酸分泌能を温存した培養細胞を安定して得ることに成功した。接着物質として用いたMatrigelはラミニンと4型コラーゲンが主成分で壁細胞の基底膜の組成に極めて近いので、dishへの接着に適切であったと考えられるが、今後より適切な接着物質の開発が必要と考えられる。単離直後の壁細胞は分泌細管の拡張の程度が様々であったが、この原因としては単離する過程で酵素による障害、機械的な刺激を受けた可能性や、粘膜内の細胞からヒスタミン、ガストリンなどが遊離し壁細胞を刺激した可能性が考えられた。形態学的に検討すると、培養後の壁細胞は分泌細管がほぼ均一の形態を示すことが多く、単離直後の壁細胞を用いた実験系より安定した結果が得られると考えられる。今回の実験では、培養壁細胞における酸分泌反応において力価の点でヒスタミンが他の2つより優れており、ウサギではヒスタミンが酸分泌反応における最も重要な経路であると考えられた。今回、培養壁細胞をヒスタミンで刺激すると生体内では認められないふちどりが分泌細管の周囲に認められたが、この変化が意味するところは不明である。本研究ではMTT assay上、シメチジンが培養壁細胞のviabilityを上昇させたが、形態学的にはむしろ細胞障害を示唆する所見が認められた。この矛盾の原因を解明するためMTT assayの意義を検討する必要があると考えられた。今回使用した H_2 ブロッカーはいずれも臨床的有效濃度とほぼ同程度であったことより、 H_2 ブロッカーの長期にわたる大量投与が壁細胞に非可逆的な障害を与える可能性が示唆された。

【結語】① 単離壁細胞の初代培養が接着因子等の工夫により可能になった。② 単離直後の壁細胞は形態学的に位相の異なる細胞の集合体であった。③ 培養壁細胞は形態学的にかなり均一でしかも培養72時間までは単離直後とほぼ同様の酸分泌を起こすことより、壁細胞の機能を検討する良好な実験系として用いる

ことができた。④ ウサギにおいてはヒスタミンが酸分泌の刺激物質として最も重要であると考えられた。
⑤ 培養壁細胞のヒスタミンによる形態学的変化として、拡張した分泌細管周囲に特徴的なふちどりを認めた。⑥ 臨床的に長期にわたり大量のH₂ブロッカーを投与すると、壁細胞の非可逆的障害を起こす可能性のあることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 阿 部 和 厚

学 位 論 文 題 名

ウサギの胃の培養壁細胞の形態と 酸分泌動態とに関する基礎的検討

【緒言】 胃粘膜の細胞を遊離させ、さらに壁細胞単独の細胞浮遊液にすることにより、胃の蠕動運動、粘膜血流、神経などの影響を除外して、細胞レベルで胃酸分泌動態を研究することが可能になる。しかし、今までの方法による細胞浮遊液の状態では数時間程度しか細胞としての機能を保持できないという時間的制限があったため、長時間にわたる酸分泌の観察や薬剤の微量長期投与の効果を観察するには適切ではなかった。

そこで本研究では、長時間にわたって壁細胞を培養できる適切な方法を考案し、胃壁細胞の酸分泌動態を形態と機能との面から検討した。また、薬剤の微量長期投与が胃壁細胞にどのような影響を与えるのかも検討した。

【材料と方法】 日本白ウサギから摘出した胃の胃体部粘膜を剥離し、1 mm角に細切した後、collagenase, dispase, ウシ血清アルブミンを含むMedium-199に加え、混合気通気下で37°C、50分間インキュベートして細胞を単離した。これを滅菌ガーゼで数回濾過した後、35% Percoll溶液に浮遊させ、30,000G、15分間の超遠心を2回行って単離壁細胞を得た。初代培養の方法はChewらの方法に準じてDMEMとHamのF-12の1対1の混合液にウシ血清アルブミン、上皮成長因子、ハイドロコチゾン、インスリン、トランスフェリン、sodium selenite、グルコース、ゲンタマイシンを加えた培養液を用いて行った。超遠心により得た単離壁細胞をamphotericine Bで洗浄した後、polystyrene tube内で30分間インキュベートし、線維芽細胞を管壁に付着させて除去した。この細胞浮遊液をMatrigelを塗布したtissue culture dishに移し、1日から4日間培養した。培養壁細胞の生存率はMTT assayを用いて評価した。酸分泌は¹⁴C-aminopyrineの壁細胞への取り込みによって測定した。形態学的には顕微鏡、電顕によって検索した。

【結果】 ①単離直後の壁細胞の形態と機能

単離直後の壁細胞は顕微鏡では好酸性でエオジンに濃染するほぼ同じ大きさの球形細胞

として認められた。電顕では細胞内の分泌細管は数と太さで多様性を示し、ほとんど分泌細管が認められないものから著明に拡張しているものまで多彩な像が認められた。単離直後の壁細胞はヒスタミン、カルバコールでは濃度依存性に酸分泌反応を示したが、ガストリンでは反応を認めなかった。

②培養壁細胞の形態と酸分泌反応

電顕で観察すると培養48時間後の壁細胞はほぼ均一の球形細胞となり、核の周囲にやや拡張した分泌細管が2から3個認められた。培養48時間後の壁細胞について酸分泌反応を検討したところ、ヒスタミンではすべての場合に単離直後の細胞と同様に濃度依存性に酸分泌反応が認められた。培養48時間後、カルバコールでは濃度依存性に酸分泌反応が認められたがガストリンでは反応を認めなかった。48時間培養した壁細胞にヒスタミン 10^{-4} Mを加えて5ないし15分刺激したところ、拡張した分泌細管が数個、核の周囲に認められた。この分泌細管には特徴的な細胞質のふちどりが認められた。

③ H_2 ブロッカーの長期投与が壁細胞に与える影響

シメチジン、ラニチジン、ファモチジンの3種類の H_2 ブロッカーの各濃度をculture dishに加え壁細胞を48時間培養した。形態学的には電顕上、3剤に共通した所見として分泌細管はほとんど認められず、細胞質には細胞障害を示唆する大小不同の小胞と脂肪滴が多数認められた。

【考案ならびに結語】、①単離壁細胞の初代培養が接着因子等の工夫により可能になった。今回の研究では、壁細胞の単離はPercollを用いた密度勾配遠心を2回繰り返すという独自の方法を用い、純度の高い、しかも酸分泌能を温存した培養壁細胞を安定して得ることに成功した。今回接着因子として使用したMatrigelはマウスの肉腫から抽出した物質で、ラミニンと4型コラーゲンとが主成分であり基底膜の組成と極めて近いために、壁細胞のdishへの接着に有効であったが、今後、より有効な接着物質の開発が必要と考えられる。②単離直後の壁細胞は形態学的に多彩な像を示したが、この原因は単離する過程で酵素による障害、機械的な刺激を受けた可能性や粘膜内の細胞からヒスタミン、ガストリンなどが遊離し壁細胞を刺激した可能性が考えられた。③培養壁細胞は形態学的にかなり均一でしかも培養72時間までは単離直後とほぼ同様の酸分泌を起こすことより、壁細胞の機能を検討する上で良好な実験系として用いることができた。④ウサギにおいてはヒスタミンが酸分泌の刺激物質として最も重要であると考えられた。⑤培養壁細胞のヒスタミン刺激による形態学的変化として、拡張した分泌細管周囲に特徴的なふちどりを認めた。⑥臨床的に長期にわたり大量の H_2 ブロッカーを投与すると、壁細胞の非可逆的な障害を起こす可能性のあることが電顕所見から示唆された。

以上により、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。