

氏名(本籍)	かわにし のぶ ひろ 川西宣裕(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,417号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	ヒト胃粘膜細胞培養と胃腫瘍細胞培養の基礎的研究とその臨床応用
主査	筑波大学教授 医学博士 深尾立
副査	筑波大学教授 医学博士 板井悠二
副査	筑波大学教授 理学博士 坂内四郎
副査	筑波大学教授 医学博士 藤井敬二
副査	筑波大学助教授 医学博士 松井良樹

論文の要旨

目的：

個々のヒトの胃の正常細胞や癌細胞などの生理機能や薬剤に対する反応を検討するためには、各個体の培養された胃粘膜細胞や癌細胞が必要である。しかし、ヒト胃には細菌や真菌が存在することが多いために、胃粘膜組織の培養は困難であり、特に真菌汚染を防止することがきわめて困難であるとされてきた。本研究では、胃癌に対する個別的な治療法の選択に個々の患者の培養胃癌細胞を利用することを旨とし、胃内視鏡下生検材料からの胃粘膜細胞培養法の確立を目的とした。さらに、同方法を使って培養された正常胃粘膜細胞を使い、胃壁細胞のヒスタミンH₂受容体の有無を検討した。

方法：

A. 1992年6月より1994年10月までに得られた96例の内視鏡下胃生検組織を使った。真菌汚染に対する対策として1. 培養液に加える amphotericin B の濃度の検討を行った。2. ついで汚染細胞を洗滌する方法として考案したカバーガラス法の有効性を22例の生検材料を使って検討した。その他、培養に使う組織の前処理消化法、培養液へ添加する抗生剤の種類と濃度、牛胎児血清濃度も検討した。

B. A で最良と評価した方法が胃癌細胞培養に応用可能か否か検討した。培養に使う組織として、胃癌手術標本から生検鉗子あるいはナイフで剥ぎ取った組織にて検討した。また内視鏡下採取生検組織からの初代培養も試みた。

C. 初代培養正常胃粘膜細胞を使い、ヒスタミン刺激による壁細胞の酸分泌とヒスタミンH₂拮抗薬による酸分泌抑制を、胃酸と結合し活性型になると蛍光を発する omeprazole を使い観察した。蛍光強度%ΔF は以下の式で計算した。

$\{(\text{最大蛍光量} - 0\text{分時蛍光量}) / 0\text{分時蛍光量}\} \times 100$

また、培養胃粘膜細胞群のマクロファージ混在の有無は、一次抗体に抗 CD11b 抗体と二次抗体に TRITIC 結合ヤギ抗マウス IgG を使う蛍光抗体染色法にて検討した。

結果：

A. ①. Amphotericin B の最適濃度は $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ と $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、それらの条件でも培養 5 日後に真菌汚染は 22% に見られた。②. Collagen 被覆カバーグラス法を 1 に併用することにより、培養開始後 1 週目の真菌汚染率は 4% に低下した。③. Collagenase にて半消化状態にした組織を培養した場合がもっとも培養成功率が高かった。④. カバーグラス法に $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin B, 200 IU/ml penicillin, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicine, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, $60\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin および 10% 牛胎児血清添加培養液などの結果を全て取り入れた方法による胃粘膜細胞付着率（初代培養成功率）は 91% であった。⑤. 初代培養正常胃粘膜細胞の付着期間（培養可能期間）は約 3 週間であった。

B. 初代培養に際し、胃癌摘出手術標本からナイフで剥ぎ取った組織を使うと線維芽細胞の混入が避けられず、生検鉗子で得た組織を使うことが望ましいことが分った。内視鏡下生検組織を使うと、進行癌では 75% 以上の成功率で 6 週から 8 週の初代培養が可能であった。しかし、IIc 胃癌では成功率が低くかつ培養可能期間は 14 日であった。

C. ①. 初代培養 14 日目のヒト胃粘膜細胞に 10^{-3}M 濃度のヒスタミンの刺激を 20 分間加えると、ヒスタミン刺激した胃粘膜細胞群にのみ強い omeprazole 蛍光を発する壁細胞が認められた。②. 10^{-6} から 10^{-3}M 濃度のヒスタミンの刺激に対する壁細胞の dose response と 10^{-3}M 濃度のヒスタミンによる 5 分から 30 分までの刺激時間による time response を測定した。その結果 10^{-3}M 濃度のヒスタミン刺激時の $\% \Delta F$ が最も高く、刺激時間 20 分で最高の $\% \Delta F$ を示した。③. 10^{-3}M 濃度のヒスタミン単独で 20 分刺激する条件下と、ヒスタミンと同時に 10^{-4}M 濃度の ranitidine を加えた条件下で、omeprazole 添加後 0 分から 5 分まで 30 秒間隔、あるいは 0 分から 15 分まで 1 分間隔で、壁細胞内 omeprazole 蛍光量を測定した。ヒスタミン単独刺激では、刺激開始後 0.5 分あるいは 1 分で最大の $\% \Delta F$ を示し、その値はそれぞれ $19.00 \pm 2.40\%$ 、 $5.90 \pm 0.53\%$ であった。Ranitidine を添加すると、いずれも 1 分で最大蛍光量を示し、それぞれ $\% \Delta F$ は $1.30 \pm 0.18\%$ 、 $0.37 \pm 0.05\%$ であった。ヒスタミン単独刺激時の最大 $\% \Delta F$ は ranitidine 添加刺激時の最大 $\% \Delta F$ よりも有意に大きかった。④. 培養開始後 1 週の胃粘膜細胞群にはマクロファージと思われる CD11b^+ 細胞が認められたが、培養 2 週間後には認められなくなった。これらの結果から、胃壁細胞はヒスタミン H₂ 受容体を持ち、マクロファージの関与がなくともヒスタミン刺激を直接受けるものと推定され、胃壁細胞はヒスタミン H₂ 受容体を欠き、マクロファージを介して間接的にヒスタミン刺激を受けるとする説を否定するものであった。

審 査 の 要 旨

癌細胞の薬剤感受性は個々の患者により異なり、患者にあわせた治療法の選択が必要とされている。その際各患者から得られた培養癌細胞があれば薬剤感受性試験を in vitro で行うことができる。

本研究は上記のような利用目的を考え、内視鏡下生検組織を使った胃粘膜細胞の初代培養法の確立をはかったものである。胃組織の消化法、細菌と真菌汚染対策に工夫をこらし、90%以上の成功率で正常胃粘膜細胞の初代培養ができるようになった。また胃癌細胞でも70%以上の成功率で6週以上の培養に成功するようになった。真菌汚染対策法や線維芽細胞混入防止策など個々の方法に関しては、必ずしも斬新とはいえない部分があり、培養液組織のさらなる検討も必要と考えられる。しかし、著者の工夫と知られている方法を総合し、従来困難であった内視鏡下生検組織を使った正常胃粘膜細胞および胃癌細胞の初代培養を高い率で成功させるに至ったことは高く評価できる。この成果に対する最終評価は、本方法を臨床の胃癌治療に応用できてはじめて定まるものではあるが、標準的な簡便な方法が開発されていない現在、本方法は胃癌細胞薬剤耐性試験に関連する重要技術として追試されるべきものであろう。また、著者は本方法を胃壁細胞のヒスタミンH₂受容体の有無の検討に応用できることを示した。したがって、本方法は正常胃粘膜細胞の生理学的薬理学的研究にも広く利用できるものと期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。