

epitopes of human CD16 (Fc gamma RIII) monoclonal antibodies. Implications for ligand binding. *J Immunol* 157 : 1576-1581., †1996

9. Oshima Y, Fujimura A: Implication for how the single nucleotide polymorphism (SNP) of Fc receptor, Fc gamma RIIIa alters the interaction with anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* 99 : 4649-4650., †2002

骨髄間葉系幹細胞から平滑筋細胞への分化における物理的刺激の影響

総合医学第一講座 小林 信彦

【目的】骨髄間質細胞は造血幹細胞を支持するのみならず、それ自身が間葉系の様々な細胞に分化し得ることが知られている。近年、動脈硬化病変における肥厚内膜や血管拡張術後の新生内膜に認められる平滑筋細胞の一部が骨髄間質細胞由来であることが報告され、傷害内膜に定着した間葉系幹細胞が平滑筋細胞に分化し内膜形成に関与する可能性が示されている。培養平滑筋細胞を用いたこれまでの研究においては、ずり応力や圧負荷といった物理的刺激が脱分化した平滑筋細胞の増殖および再分化に影響することが示唆されているが、骨髄間葉系幹細胞の分化過程における物理的刺激の関与については不明である。本研究は、骨髄間質細胞から平滑筋細胞への分化における、ずり応力および圧負荷の影響を検討する。

【方法】マウス大腿骨頭を切断しPBSにて骨髄を洗い流し骨髄組織を採取する。赤血球を溶血除去した後に遠心分離した細胞を培養液 (Humedia SG2, Kurabo, Osaka) に浮遊させ、コラーゲンコートをしたプラスチックシャーレにて培養する。培地交換の際に浮遊細胞を除去し、接着能を有する間質細胞のみを選択的に培養する。Cell confluentとなった段階で trypsin-EDTA を用いて細胞を浮遊させ、Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden) を用いて比重分離を

行い、間葉系幹細胞を多く含む細胞分画を採取する。採取した細胞を物理負荷用のプレート上で培養し、1, 2, 3週間経過した段階で36時間の物理負荷を加えた。物理負荷には、ずり応力と圧負荷量を任意に設定可能な Biopump system (Sanei Medis Inc., Tokyo) を用いた。ずり応力主体の負荷、圧主体の負荷、両者を含む混合負荷の3種類の負荷方法を設定し、静止状態で培養を継続したコントロールとの間で、免疫蛍光染色法、および Western blot 法にて平滑筋ミオシン重鎖 (SM-MHC) の発現を比較検討した。

【結果】免疫蛍光染色法では、SM-MHC 陽性細胞の全細胞に対する比率を計測した。静止状態のコントロールにおいては、1週間の培養では、SM-MHC 陽性細胞は出現せず、2週間で0.28%、3週間で3.3%の陽性率であった。ずり応力主体の負荷を受けた細胞群においては、培養1週間後の負荷ではコントロール同様 SM-MHC 陽性細胞は出現せず、2週目で1.2% ($P < 0.05$ vs. Cn.), 3週目で7.3% ($P < 0.01$) の発現率であった。圧主体の負荷では1週目で0.66% ($P < 0.05$ vs. Cn.), 2週目で2.5% ($P < 0.01$), 3週目で13% ($P < 0.01$) と、高い陽性率を示した。ずり応力および圧負荷の混合負荷では、1週目が1.2% ($P < 0.01$ vs. Cn.), 2週目が2.9% ($P < 0.01$), 3週目が15% ($P < 0.01$) の陽性率であり、圧主体の負荷と同等の発現率を示した。負荷を加えた細胞群の間で SM-MHC 陽性比率を比較してみると、2週間および3週間培養後の負荷では、ずり応力主体の負荷に対し、圧負荷 ($P < 0.05$) および混合負荷 ($P < 0.01$) において有意に高い陽性率が認められた。

Western blot 法にて SM-MHC の発現量を各群間で比較すると、コントロールに比べ負荷を加えた細胞群において発現が増加し、特に圧負荷および混合負荷を加えた細胞群で発現が顕著であった。この結果は免疫蛍光染色法の結果と一致するものであった。

【考察】本研究結果は、物理的負荷が骨髄間質細胞から平滑筋細胞への分化を促進することを示すものであり、その傾向はずり応力よりも圧負荷において顕著であった。

従来、移植血管や血管形成術後の新生内膜に認められる未分化な平滑筋細胞は中膜の平滑筋が脱分化して遊走するものと考えられてきたが、最近の研究により新生内膜に見られる平滑筋細胞の一部は骨髄由来であることが示されている。しかし、骨髄細胞が平滑筋細胞に分化し内膜新生に関与する詳細な機序は不明である。本研究結果は、骨髄間質細胞が傷害内膜に付着し、拍動血流による物理負荷を受けて平滑筋細胞に分化する可能性を示唆するものと考えられる。一部の動物実験においては血管形成術後に高血圧状態を持続させると内膜新生が増強されることが報告されている。こうした知見は本研究結果と合致するものと考えられる。傷害血管の内膜新生に際しては血管内皮細胞も重要な役割を果たすものと推測されるが、本研究において用いた培養方法では内皮細胞は発現してこない。今後、血管内皮前駆細胞も含めた培養モデルにおいて、骨髄細胞から血管構成細胞への分化に及ぼす物理的負荷の影響を検討していきたい。

小腸移植に替わる新しい術式に関する実験的検討—小腸逆蠕動間置法及び小腸移植—

総合医学第 2 講座 吉田 卓義,
遠山 信幸, 清崎 浩一, 小西 文雄

緒言：腸管大量切除後の短腸症候群 (Short Bowel Syndrome/SBS) の病態は、複雑であり、併発する栄養障害、肝機能障害、感染症のため、その予後は極めて厳しい。唯一の根本的治療法は小腸移植である。しかし、その高度な拒絶反応や移植小腸の吸収機能評価の困難性から移植法案が可決された現在も、他の臓器移植から遅れをとっており、一般的実用化に至っていない。一方小腸移植に替わる治療法として、小腸 short-segment 逆蠕動間置法も検討されているが、基礎的研究やその有用性についての報告は少ない。今回、SBS 患者における TPN からの離脱、移植時における免疫抑制剤からの開放を含めた QOL のアップを目的とする臨床応用を念頭に置き、小腸移植の代替治療、あるいは小腸移植までの維持治療法としての自己小腸

short segment 逆蠕動間置術の有用性を、ラットモデルを用い、栄養学的、機能的観点から評価を行った。

方法：Wistar 系雄性ラット (体重250~350g) を用い、エーテル麻酔下に下記の短腸ラットモデルを作成した。A. 短腸モデル〔短腸 (S) 群〕：小腸をトライツ靭帯直後(約1.5cm)より回盲部(約1.5cm)近傍まで亜全摘施行。残存小腸を端々吻合した。B. 小腸逆蠕動間置モデル〔空腸間置 (JR) 群・回腸間置 (IR) 群〕：空腸または回腸の 2 cm のセグメントを逆蠕動式にトライツ靭帯より約 1 cm に端々吻合した。以上 3 群において、生存率(各群 n=20)、血算生化学検査(各群 n=6)、体重変化(各群 n=19)、便中総脂肪酸排泄 (Sulfo-phospho-vanillin 法) (各群 n=5) および X 線不透過マーカーを用いた腸管内停滞時間の測定 (各群 n=5) を行った。

結果：S 群 (N=20) では、体重増加が不良で、長期生存例は (術後60日以上) はなかった。臨床的には、下痢、貧血、栄養状態不良を呈した。逆蠕動間置モデル群では、術後20日の時点では JR 群 (N=20) 85% (17/20)、IR (N=20) 85% (17/20) と生存率では、有意差を認めなかったが、長期生存例では、JR 群66% (2/3)、IR 群100% (4/4) で、良好な体重増加率を示した。両群において、血算、生化学において、明らかな相違は認めなかった。術後3週目より S 群、JR 群に比べ、IR 群で有意 ($p < 0.05$) に体重増加が良好であった。便中総脂肪排泄量は S 群 $114.9 \pm 13.23 \text{ mg/g}$ 、JR 群 $97.3 \pm 21.89 \text{ mg/g}$ に比べ、IR 群 $68.8 \pm 12.6 \text{ mg/g}$ で有意 ($p < 0.01$) に低かった。胃内に15個挿入された不透過マーカーの12時間、24時間後腸内残存数はそれぞれ IR 群 $13.0 \pm 0.63 \rightarrow 4.2 \pm 2.04$ 個、JR 群 $10.8 \pm 1.47 \rightarrow 3.01 \pm 1.41$ 個、S 群 $9.2 \pm 1.47 \rightarrow 1.0 \pm 2.0$ 個と間置群で有意 ($p < 0.05$) に多かった。考察：一般的に短腸ラットにおいては10cm以上の順蠕動性小腸移植が必要とされている。本研究では、わずか 2 cm という小腸でも逆蠕動間置を行うことによって、脂肪吸収能および食物腸内停滞時間の点からも、小腸 short-segment 逆蠕動間置法の有用性が示唆された。