

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 ㊦ 第	号	氏 名	大 西 文 夫
主 論 文 題 名				
Concentration of Rat Bone Marrow Nucleated Cells Using Hypo-osmotic Hemolysis in Distilled Water (蒸留水による低浸透圧性溶血を用いたラット骨髄有核細胞濃縮法)				
(内容の要旨)				
<p>骨髄液には多くの幹細胞や前駆細胞が含まれ、それらの細胞を移植し虚血組織や骨折・骨欠損などの治療を行う臨床応用が近年行われるようになってきている。穿刺骨髄液の大部分は赤血球が占め、効率的な細胞移植を行うためにはそれらを溶血させ目的の細胞集団を得なくてはならない。しかし多くの報告ではフィコール液などの試薬を用いた比重遠心法や細胞分離装置により細胞の分離を行っており、これらは実際の臨床使用においては安全性・簡便性に問題がないわけではない。そこで入手が容易で人体に無害な蒸留水を用いた低浸透圧溶血法を考案し遠心分離法と組み合わせて効率的に骨髄有核細胞を濃縮する方法を検討した。</p> <p>ラット骨髄液を用いた溶血実験の結果、骨髄浮遊液に蒸留水を加えて3.3倍希釈の低浸透圧下で45秒間溶血処理を行った後に中和するのが効率的かつ有効な骨髄赤血球溶血・有核細胞濃縮の方法であることがわかった。これにより得られた有核細胞群に対しトリパンブルー染色を行い確認された生細胞率は89.5%であった。また、得られたペレットに対する免疫染色ではvascular endothelial growth factor (VEGF)・basic fibroblast growth factor (bFGF)・hepatocyte growth factor (HGF)などの血管新生因子活性を有する細胞を確認された。本法で得られた有核細胞群を比重遠心法で得られた細胞群と比較すると前者では単核球の他に顆粒球も多く含まれており、単核球の占める割合はそれぞれ67%、78%であった。</p> <p>このようにして得られる有核細胞群が血管新生効果・骨形成能を有するか否かを確認するためラット頭蓋骨欠損モデルを用いて濃縮骨髄有核細胞移植実験をおこなった。実験に用いたのはF344リタイヤラットでペントバルビタール腹腔内注射による麻酔下に頭蓋頭頂骨に左右1箇所ずつ径5mmの骨全層欠損を作成した。右の骨欠損部には前述した方法による濃縮骨髄有核細胞群をフィブリン糊を担体として移植し、左の骨欠損にはコントロールとしてフィブリン糊のみを移植した。その結果、右の骨欠損部（濃縮骨髄有核細胞移植群）で有意に仮骨形成・血管新生が増加した。以上より蒸留水法で溶血・濃縮した簡便な骨髄有核細胞移植法は臨床においても血管新生効果が得られる可能性が示唆された。</p> <p>前述のとおり有核細胞濃縮法として分離試薬を用いる方法や手動・自動細胞分離装置などを用いる方法があるが、これらは得られる細胞の選択性や回収率などにおいて優れた利点を有するものの特殊な試薬・機器を用いる必要性から臨床的な簡便性の点では難がある。一方で、蒸留水による低浸透圧性溶血を利用した本法は、得られる細胞の選択性の点では前者に及ばないものの血管新生効果・仮骨形成効果を認める有核細胞群を安全・簡便・即時的に濃縮でき臨床応用できる可能性が示唆された。</p>				