

氏名	もりもとよしひこ 森元良彦
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2590号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Comparative study of adult porcine pancreatic endocrine cell preparation using a technique of multiple injections and pancreatic duct cannulation without a proteolytic enzyme (消化酵素を用いないブタ内分泌細胞分離法—multiple injection法と膵管cannulation法との比較—)
論文調査委員	(主査) 教授 清野 裕 教授 今村正之 教授 井上一知

論文内容の要旨

緒言 糖尿病の治療法として、現在膵島移植が注目されているが、ヒトのみをドナー源とした場合にドナー不足に陥ることは明白である。そこで新たなドナー源として異種動物、その中でもブタが有望視されている。従来のコラゲナーゼを用いた方法では、安定した収量のブタ膵島を得ることや膵島の長期培養が非常に困難であった。そのためコラゲナーゼを使用しない方法が試みられ、自己消化を利用したブタ膵内分泌細胞の分離法(auto-digestion法)、および長期培養をすでに確立した。本方法での唯一の問題点は膵内分泌細胞収量が少ないことである。今回、この問題を解決するために、細胞収量の増加を目的として膵管内に non-enzyme buffer を注入する方法(cannulation法)を試み、従来する方法(multiple injection法)との比較を行った。

方法 屠殺場にて成熟食用ブタより膵臓を摘出、これらを以下の2群に分ける。Group 1 (n=6): 十二指腸開口部の副膵管より20Gのangiocatherterを挿入し冷却した0.01Mリン酸緩衝液(PBS)を注入、膵臓を膨化させた膵臓をRPMI 1640に冷保存し研究室に持ち帰った(cannulation法)。Group 2 (n=6): 屠殺場で入手した膵臓をRPMI 1640に冷保存し、研究室に持ち帰った後に19Gの注射針でPBSを膵組織に注入、膵臓を膨化させた(multiple injection法)。両群ともに膵周囲組織や被膜を取り除き、約2cm角に分割する。これをmechanical chopperを用いて細切し、cell separatorを用いて分離、Histopaqueを用いてpurificationを行った。得られたブタ膵内分泌細胞を、細胞収量、dithizone (DTZ) 陽性細胞数および陽性率、培養1週間後の生着細胞数、回収率(培養1週間後の生着細胞数/細胞収量)、グルコース負荷試験(static incubation test)による膵内分泌細胞の機能評価を行い両群の比較検討を行った。

結果 細胞収量はGroup 1 (cannulation法)は $2.97 \pm 0.59 \times 10^7$ 個とGroup 2 (multiple injection法)の $0.89 \pm 0.15 \times 10^7$ 個に比較して有意に高かった($p < 0.0001$)。DTZ陽性細胞数は $1.64 \pm 0.36 \times 10^7$ 個と $0.36 \pm 0.09 \times 10^7$ 個でGroup 1が有意に高かったが($p < 0.0001$)、DTZ陽性細胞率は $55.9 \pm 12.1\%$ と $41.5 \pm 6.2\%$ で両群間に有意差は認めなかった。回収率は $36.3 \pm 6.2\%$ と $40.7 \pm 4.5\%$ と両群間に有意差は認めなかった。Static incubation testでは、Stimulation Index (20mM D-glucoseのインスリン分泌量/3.3mM D-glucoseのインスリン分泌量)はそれぞれ 8.90 ± 3.48 と 4.85 ± 2.26 で有意差を認めなかった。

考察 cannulation法はmultiple injection法に比べて約3倍の細胞収量、約4.5倍の生着細胞数を得ることができた。膵管内にPBSを直接注入することにより膵島と外分泌細胞との間隙を広げ、以後の段階での効率的な自己消化が行われたものと考えられる。今回の実験結果により、膵管へのcannulationを行ったブタ膵内分泌細胞分離法は収量にすぐれており、得られた細胞のviabilityも良好であったため、非常に有用な方法であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

糖尿病治療法であるヒト膵島移植におけるドナー不足の解決策として異種のブタ膵島が有力視される。ブタ膵島分離法として、従来のコラゲナーゼ消化法は収量の安定性や、分離した細胞の培養での維持に問題があり、膵臓の自己消化を利用した自己消化法では、培養可能であるが、収量が少なかった。今回、自己消化法の収量増加の目的で、膵を膨化させる buffer を膵実質内へ直接注入する従来のマルチプルインジェクション法に対し、膵管から注入するカニューレーション法を試み、両者の有用性を比較した。

摘出した成熟ブタ膵臓を第1群（カニューレーション群，n=6）と第2群（マルチプルインジェクション群，n=6）に分け、両群とも、自己消化法にて膵内分泌細胞を精製した。

細胞収量や β 細胞を示す dithizone 陽性細胞数は第1群が第2群に比し有意に多かった。1週間培養後の細胞回収率や膵島機能の指標である stimulation index は有意差が無かった。

以上の結果は、カニューレーション法により長期培養可能な膵内分泌細胞の収量増加が可能である事を示した点で、糖尿病患者に対する異種膵島を用いたバイオ人工膵の臨床応用に向けて重要なブタ膵島分離技術の改良を行う上で極めて示唆に富む。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成15年1月28日実施の論文とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。