

氏名	キョ 許	ホウ 宝	ユウ 友
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)		
学位記番号	医 博 第 2510 号		
学位授与の日付	平 成 14 年 5 月 23 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 分 子 医 学 専 攻		
学位論文題目	Functional Comparison of the Single-Layer Agarose Microbeads and the Developed Three-Layer Agarose Microbeads as the Bioartificial Pancreas: An In Vitro Study (Agarose 単層マイクロビーズ型人工膵と Agarose/PSSa 三層マイクロビーズ型人工膵の機能比較: In Vitro における検討)		
論文調査委員	(主 査) 教 授 北	徹	教 授 清 野 裕 教 授 今 村 正 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年、糖尿病患者数は著しく増加している。申請者は、糖尿病治療のために、抗補体作用を有する合成高分子化合物 Poly Styrene Sulfonic acid (PSSa) を用いる PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓を研究してきた。そして、免疫抑制剤非使用下での小動物間の異種膵島移植において、長期間血糖値を正常化し得た。しかし PSSa は膵島細胞に対する毒性、生体適合性等の問題が解決していない。申請者は本研究において PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓及び Agarose 単層ビーズ型人工膵臓を作製し、長期間培養による封入膵島細胞の形態的变化とインスリン分泌機能について比較検討した。

8-10週齢の Golden ハムスターの膵臓を用いてコラゲナーゼ消化法により膵島を単離精製し、PSSa/Agarose 三層型マイクロカプセル及び Agarose 単層型マイクロカプセル中に封入した。それを実験群 (PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓群)、対照群 <Agarose 単層ビーズ型人工膵臓群> に分け、それぞれ 5%FBS を含む MEM 培養液中にて 30 日間培養し、以下の実験を行った (n=5)。1. 経時的な膵島の形態学的変化の観察。2. 経時的なインスリン放出量の測定 (Mean±SD)。(最初の二週間は毎日サンプリングし、それ以後は週に二回サンプリングした。) 3. 培養開発後 10 日目, 20 日目, 30 日目に、グルコース刺激によるインスリン分泌能検討した [100mg/dl のグルコースを含む MEM 培養液で 30 分間 Preincubation した後, 300mg/dL ないし 100mg/dL のグルコースを含む MEM 培養液で 1 時間毎の計 3 時間にわたり, static incubation を行い, MEM 培養液中インスリン量を EIA 法にて測定した (Mean±SD)]。

封入膵島の形態は実験群及び対照群のいずれにおいても 30 日目まで正常と変わらなかった。実験群では培養液中経時的なインスリン放出量 (152.93uU/islet/day±75.79) が対照群 (79.49uU/islet/day±55.70) に比して有意に高かった (P<0.05)。また、培養 10 日目, 20 日目, 30 日目のグルコース負荷試験の結果は、グルコース濃度 (低濃度, 高濃度, 低濃度) 刺激による 1 時間毎のインスリン分泌量が、実験群は 10 日目に 0.61±0.40μU/islet/h, 9.10±4.07μU/islet/h, 4.31±2.56μU/islet/h, 20 日目に 1.42±0.84μU/islet/h, 30.48±23.78μU/islet/h, 0.38±0.15μU/islet/h, 30 日目に 4.19±1.82μU/islet/h, 27.69±10.87μU/islet/h, 6.67±1.66μU/islet/h であり、対照群では 10 日目に 0.37±0.09μU/islet/h, 4.36±0.94μU/islet/h, 1.09±0.4μU/islet/h, 20 日目に 0.63±0.32μU/islet/h, 19.72±6.33μU/islet/h, 2.24±0.78μU/islet/h, 30 日目に 2.36±1.02μU/islet/h, 23.36±9.46μU/islet/h, 6.54±1.45μU/islet/h であった。従ってグルコース高濃度刺激によるインスリン分泌量は、実験群及び対照群のいずれにおいてもグルコース低濃度刺激によるインスリン分泌量に比して有意に高値であり (P<0.05)、Glucose-Stimulated Insulin Secretion Index (GSISI) においても、低濃度グルコース刺激と比べて高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌量は 6.61 倍以上と有意な増加を認めた。

(結論) PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓は長期間培養で、Agarose 単層ビーズ型人工膵臓とほぼ同程度に良好なインスリン分泌機能が保持され、形態学的、機能的に毒性や有害事象はほとんど認めなかった。従って、今後 PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓を用いる異種移植が、臨床上血糖調節に有効な可能性が示唆された。今後大動物実験を用いた研究が、

臨床応用のために必要と考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

近年、糖尿病患者数は著しく増加している。申請者は抗補体作用を有する合成高分子化合物 PSSa を用いる PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓の有用性と毒性、生体適合性等について研究してきた。本研究では、PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓(実験群)を作成して、*invitro* で Agarose 単層ビーズ型人工膵臓(対照群)と膵島細胞の形態と機能の変化について比較検討した。

封入した膵島の形態は実験群及び対照群のいずれでも30日目まで正常と変わらなかった。実験群では培養液中経時的インスリン放出量が  $152.93 \pm 75.79 \mu\text{U}/\text{islet}/\text{day}$  であり、対照群  $79.49 \pm 55.70 \mu\text{U}/\text{islet}/\text{day}$  に比して有意に高かった。経時的グルコース負荷試験において、グルコース高濃度刺激によるインスリン分泌量は実験群及び対照群のいずれにおいても、グルコース低濃度刺激によるインスリン分泌量に比して有意に良好であった。Glucose-Stimulated Insulin Secretion Index においても、低濃度グルコース刺激と比べて高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌量が6.61倍以上増加し、有意な増加を認めた。

以上の結果は、今後、PSSa/Agarose 三層ビーズ型人工膵臓に用いる異種移植が、臨床上血糖調節機能に利用できる可能性が示唆された。

本研究は医学、生化学、化学工学、組織工学の基礎知識と技術を駆使して行われ、膵島移植におけるドナー不足及び免疫抑制剤の問題の解決に貢献し得るものであり、将来的な膵島移植の臨床応用に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士(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14年3月6日実施の論文内容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。