

氏 名	サイ 崔	マン 万	キョウ 興
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	医 博 第 2333 号		
学位授与の日付	平 成 13 年 3 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 系 専 攻		
学位論文題目	Novel method for isolation of adult porcine pancreatic islets with two-stage digestion procedure. (二段階消化法による成熟ブタ膵ラ氏島の新しい分離法)		
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 野	裕	教 授 山 岡 義 生 教 授 今 村 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

二段階酵素消化法による成熟ブタ膵ラ氏島の新しい分離法

近年、臨床における膵ラ氏島移植症例の急速な増加と生着率の向上がみられてきた。絶対的なドナー不足が深刻な現状ではあるが、ラ氏島移植の場合は将来的にはドナー不足解消のためにドナーを異種に求め得るという大きな利点がある。異種の中でも特にドナー源が豊富で、インスリン構造もヒトと類似している成熟ブタからのラ氏島分離法を確立することが急務である。ブタ膵からのラ氏島の分離は非常に難しいとされているが、その分離成功率は膵臓の膨化と酵素消化の度合いによって大きく影響を受けるものと考えられている。申請者は本研究において、酵素消化の段階を2段階に分け、膵臓の膨化と酵素消化の双方においてより良い効果をあげ得る新しい酵素液を開発した。その結果は成熟ブタラ氏島を大量にかつ安定して分離することが可能な方法を開発し得た。

2歳のブタ(n=18)から採取した200kgの膵臓を用いた実験を行った。新しく開発した分離法はCold digestionとWarm digestionの2段階に分けた。まずCold digestionでは摘出したブタ膵の体尾部の膵管から新しい酵素液を注入し、約2時間氷上に静置して酵素液をブタ膵組織内に浸透させ、物理的に消化させた。次にWarm digestionでは、膵組織を45分間37度でincubationし、酵素液による化学的消化を促した。ラ氏島はデキストラン T70 不連続濃度勾配法によりCOBE2991 cell processorを用いて分離した。第2段階(Warm digestion)で分離された0, 15, 30, 45分後のブタラ島の組織学的検査を施行した。分離ラ氏島のviabilityの検定に関しては、KRBB液中に分離ラ氏島を入れ3.3mMおよび16.7mMのブドウ糖液にて刺激し37度1時間反応させた後に、インシュリン放出量を測定した。

時間0ではラ氏島周囲の膨化した腺房細胞の隔壁を認めた。温消化によるラ氏島周囲の腺房細胞の破壊は15分後及び30分後にそれぞれ認められた。破壊されバラバラになった腺房細胞はラ氏島周囲に45分後まで残存していた。一方、膵腺房細胞とは異なり、温消化の全行程においてラ氏島は全く障害されずに良好に保存されていた。分離ラ氏島の数は膵臓一個あたり $291,667 \pm 240,452 \text{ IEQ}$ (n=14)で膵組織1gあたり $3,294 \pm 2,199 \text{ IEQ}$ であった。回収されたブタラ氏島の純度は90%以上であった。無作為に抽出された10,000IEQのラ氏島から分泌されたインシュリン放出量は3.3mMブドウ糖刺激に対しては $83.9 \pm 13.4 \mu\text{U/dish/h}$ であるのに対して、16.7mMブドウ糖に対しては $104.1 \pm 12.9 \mu\text{U/dish/h}$ (n=20)と有意に良好な分泌反応を示した。

我々が開発した成熟ブタラ氏島分離法は再現性に富み、成功率は約80%を示した。成功率の向上は本法による膵臓の膨化法と酵素消化法の改善によるところが大きい。この新しい酵素液を用いた二段階酵素消化法による成熟ブタ膵ラ氏島の分離法は、将来的に糖尿病患者に対する臨床応用に際して極めて有用な手段になり得るものと期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

膵移植での絶対的なドナー不足に対し膵ラ氏島においてもブタの利用が考えられている。成熟ブタ(200kg以上、2歳以

上) 膵臓は脂肪が多く膵管が細いために消化酵素液の拡散が難しい上に、膵ラ氏島周囲組織が脆弱なため分離困難であった。

本研究では Collagenase の量を従来の半分にし、Dispase や DNase を加えて新規酵素液 (Collagenase 1mg/ml; Dispase 1mg/ml; DNase 0.1%; Trypsin Inhibitor 1% etc.) を調製した。膵臓の消化過程を二段階 (Cold Digestion, Warm Digestion) に分けた。Cold Digestion (氷上 2 時間) により酵素液浸潤性を改善し、Warm Digestion (37°C, 45 分間) によって成熟ブタ膵ラ氏島を大量にかつ安定して (成功率: 約 80%) 分離することに成功した ($291,667 \pm 240,452$ IEQ/頭; 3294 ± 2199 IEQ/g 膵組織; $n=14$; IEQ: 直径 $150\mu\text{m}$ に相当する膵島に換算した単位) 本法は再現性がよく形態的に良好な膵ラ氏島が純度良く得られる。

この新しい酵素液を用いた二段階酵素消化法による成熟ブタ膵ラ氏島の分離法は将来的に糖尿病に対する医療に際して有効に利用され得るものと期待される。

本研究は医学・生化学の基礎知識と技術を駆使して行われ、膵ラ氏島移植におけるドナー不足の解決に貢献し得るものであり、将来的な異種膵ラ氏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 13 年 2 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。