Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets

後藤，直大

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2007-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3795
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003795

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 97 】

氏　　名・（本　籍）	後藤　直大	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博い第1795号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成19年3月25日	

【 学位論文題目 】

Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets
（膵消化に二層法を適応することで膵島収量が増加し膵島機能が維持される）

審　査　委　員

主 査　教　授　藤澤　正人
教　授　清野　　進
教　授　春日　雅人

〈背景と目的〉

エドモントンプロトコールの発表後膵島移植は 1 型糖尿病の治療法のひとつとして受け入れられるようになった。膵島移植の短期成績は膵臓移植と同等といえるが、一人のドナーからのみでは一人のレシピエントのインスリン離脱を得ることは極めて困難である。これは膵臓から十分な膵島を回収できないことが最大の原因といえる。膵島収量を増加させる新たな方法の開発が望まれる。温度と酸素供給の観点から、膵消化は膵島移植に特有の温阻血障害とみなすことができる。新しい膵保存法として教室で開発された二層法は、保存中の膵臓に直接酸素を供給し ATP の合成を促進し細胞膜の構造を良好に維持させることが可能となるもので、膵摘出や保存における温冷阻血傷害を軽減し、UW 液による保存と比較して膵島収量を増加させることを報告してきた。また、二層法保存にて温阻血障害膵では UW 中のアデノシンを基質として ATP を産生することも明らかにした。そこで今回、われわれは二層法の考え方を膵島分離の消化過程に応用し、その効果について検討した。

〈方法〉

雄性ルイスラットをドナーとして使用した。膵摘出後膵管内にコラゲナーゼ溶解液（1mg/ml）10ml 投与した群を subgroup A に、コラゲナーゼ溶解液に 5mM のアデノシン(UW 中と同濃度)を加えたものを投与した群を subgroup B とした。膨化後の膵を 37° C で 20 分間消化する群を group 1 とし、酸素化 PFC を用い二層にした状態で消化を行った群を group 2 とした。なお PFC は少なくとも 30 分間 100%酸素でバブリングした後に使用した。消化中の膵の酸素濃度をクラークタイプの酸素分圧計にて測定した。また、消化直後の膵を用いて ATP の測定を HPLC を用いて行った。消化後膵島分離を行い、各群において膵島収量を比較検討した。また回収した膵島の *in vitro* の機能評価としてグルコース刺激試験を行った。また *in vivo* での評価として、ストレプトゾトシンの腹腔内投与により作成した糖尿病ヌードマウス(随時血糖≧350mg/dl)の腎皮膜下に 200 個の膵島を移植し機能評価を行った。この際の糖尿病の治癒は移植後の随時血糖値が 3 日間連続して 200mg/dl 以下となることと定義した。移植後 21 日目に IPGTT を行った。また移植後 30 日目に左腎摘出を行いその後の随時血糖が 350mg/dl 以上となることを確認した。

〈結果〉

消化中の組織中の酸素濃度は酸素化 PFC を用いなかったもの（group1）ではほぼ 0mmHg であった。一方酸素化 PFC を用いた群(group2)では速やかに 300mmHg まで上昇しその後維持された。組織中の ATP はコントロール群として回復直後の膵臓で測定したものが 4.2±0.7μmol/g dry weight であったのに対し group 1-A で 0.12±0.03(P<0.01)、group1-B で 0.70±0.10（P<0.01)、group2-A で 0.30±0.18（P<0.01)、group12-B で 2.90±0.80（P=0.19)であった。膵島収量は group1-A、group1-B、group2-A、group2-B でそれぞれ

1600±400(IEQ/pancreas)、1400±400、1300±400、2400±100(P<0.05 vs groups 1, 2-A)であった。グルコース刺激試験(Stimulation Index)では各群に差はみられなかった。*In vivo* の膵島機能をみるために行った糖尿病ヌードマウスへの移植成績では各群に差はなかった。移植後の血糖の推移および IPGTT でも各群に差はなかった。

〈考察〉

膵島移植は 1 型糖尿病の根治療法のひとつとして確立してきたが膵島分離や移植に伴い、viable 膵島数が減少していくため、移植の成功は限定的なものとなっており、移植成功率は high volume center でさえ満足できるものではない。現在膵島分離は Ricordi らが提唱した、いわゆる Ricordi 法が一般的な方法となっている。確かに、この方法により膵島収量は増加したものの、膵島分離の結果には未だにばらつきがあり予想できない部分も存在している。その原因として、コラゲナーゼ液そのものの影響も報告されているが、膵消化過程における温阻血と低酸素の影響もあると考えられる。われわれは膵保存法として UW 液と PFC を用いた二層法を開発した。二層法を用いることで膵組織を酸素化し ATP の合成を促進し細胞膜の構造を良好に維持させることが可能となる。二層法により膵保存中の冷阻血や膵摘出における温阻血を軽減することができることも証明してきた。二層法を用いた場合では、膵組織中の ATP 濃度が酸素化の指標として最も適している。犬モデルにおいては膵組織中の ATP 濃度と移植成績がよく相関することを示した。また温阻膵においては、ATP は UW 液中のアデノシンを基質として生成されることも報告した。膵消化は膵島移植に特有の一種の温阻血状態と考えられ、今回の研究では膵消化に二層法の考え方、すなわち酸素化の効果について検討した。酸素化 PFC を用いることで膵組織中の酸素濃度はよく保たれていた。しかしアデノシンを加えていない場合 ATP 濃度は上昇しなかった。酸素化 PFC およびアデノシン投与群においては組織中の ATP 濃度が著明に改善し、膵島収量の増加も見られた。二層法を用いる膵消化法において、膵保存の場合と同様、アデノシンが重要な役割を果たすことが判明した。加えて *in vivo* および *in vitro* の膵島機能の評価を行った。Stimulation Index は group 2-B で他群と比較しやや高値であったが有意差は得られなかった。200IC の膵島を糖尿病ヌードマウスへ移植した成績では各群に差はみられなかった。移植後の日々の血糖値の推移および IPGTT の結果でも各群に有意差は認めなかった。これらの結果から二層法にアデノシンの投与を加えた新しい膵消化法を用いた場合、従来法と比較して少なくとも同等の機能を有した膵島が回収できることが示された。

膵消化における酸素化の効果の機序として、アポトーシス抑制が中心的な役割を果たしていると思われる。低酸素状態や様々なサイトカインにより引き起こされるアポトーシスは膵島を細胞死に至らしめる主要な経路と考えられている。われわれや他のグループにより、二層法による膵保存によりミト

コンドリア回路を介したアポトーシスが抑制されることが報告されている。膵消化の過程においても二層法を用いることで膵保存と同様に、アポトーシスが抑制されえていると考えることは極めて合理的である。その他の効果としては、更なる検討が今後必要ではあるが、膵消化中のプロテアーゼ活性の抑制も考えられる。今回の研究は膵消化中の酸素化の重要性を示した初めての検討である。この概念を臨床の膵島分離に応用することで膵島収量の増加が期待できると思われる。しかしながら今回の検討はラットモデルであるためヒトとの違いについて考慮しなければならない。まずヒトの膵臓はラットの膵臓と比較し厚いため二層法による酸素化の程度に違いがある。この点に関しては薄くスライスするなどの工夫が必要となる。また臨床では Ricordi 法が用いられており、いかに効率よく酸素を供給するか、更なる検討が必須である。

今回我々が提唱した新しい膵消化法は、膵島収量を増加させることが可能となる魅力的な方法で、最終的には一人のドナーから一人のレシピエントへの移植によりインスリン離脱を得るという目標を達成することに貢献できると考えており、今後さらに検討をすすめていきたい。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第1800号	氏　名	後藤　直大
論文題目 Title of Dissertation	Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets 膵消化に二層法を適応することがで膵島収量が増加し膵島機能が維持される		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	荷傳正人 清野進 春田孝人	
審査終了日	平　成 19 年　1　月　23 日		

（要旨は 1,000 字～2,000 字程度）

膵島移植は、1 型糖尿病の治療法のひとつとして現在臨床応用されている。その短期成績は膵臓移植に匹敵するが、ひとりのレシピエントがインスリン離脱を得るにはいまだドナーひとりでは極めて困難である。これはひとつの膵臓からでは十分な膵島を回収できないことが最大の原因といえる。したがって、膵島収量を増やす新たな方法の開発が望まれている。著者らは、膵保存法として二層法が保存液中の膵臓に直接酸素を供給し ATP の合成を促進し細胞膜の構造を良好に維持することにより保存液中の冷阻血傷害を軽減し、University of Wisconnsin (UW) 液のみによる保存と比較して膵島収量を増加させることをすでに報告している。さらに、温阻血障害膵が二層法保存にて UW 液中のアデノシンを基質として ATP を産生することも明らかにしている。しかしながら、膵島分離のための膵消化過程においては温度と酸素供給の点から膵島にかなりの温阻血障害ひきおこすことが考えられる。そこで今回、著者らは保存における二層法の考え方を膵島分離の消化過程に応用し、その有用性について検討した。

実験では、雄性 Lewis ラットをドナーとして使用した。膵摘出後膵管内にコラゲナーゼ溶解液を投与した群を subgroup A、コラゲナーゼ溶解液に UW 液中と同濃度のアデノシンを加えたものを投与した群を subgroup B とした。膨化後の膵を 37°C で 20 分間消化する群を group 1、酸素化 perfluorocarbon(PFC)を用い二層にした状態で消化を行った群を group 2 とした。なお、PFC は少なくとも 30 分間 100%酸素でバブリングした後に使用した。消化中の膵の酸素濃度をクラークタイプの酸素分圧計にて測定した。また、消化直後の膵を用いて ATP の測定は HPLC を用いて行った。消化後膵島分離を行い、各群において膵島収量を比較検討した。また、回収した膵島の *in vitro* の機能評価としてグルコース刺激試験を行った。さらに、*in vivo* での評価として、ストレプトゾトシンの腹腔内投与により作成した糖尿病ヌードマウスの腎皮膜下に 200 個の膵島を移植し機能評価を行った。この際の糖尿病の治癒は、移植後の随時血糖値が 3 日間連続して 200mg/dl 以下となることと定義した。移植後 21 日目に Intraperitoneal glucose tolerance testing (IPGTT) を行った。また、移植後 30 日目に左腎摘出を行い、その後の随時血糖が 350mg/dl 以上となることを確認した。

消化中の組織中の酸素濃度は酸素化 PFC を用いなかったものではほぼ 0mmHg であった。一方、酸素化 PFC を用いた群では速やかに 300mmHg まで上昇しその後維持された。すなわち、酸素化 PFC を用いることで膵組織中の酸素濃度はよく保たれていた。また、酸素化 PFC およびアデノシン投与群においては組織中の ATP 濃度が著明に改善し、膵島収量の増加が見られた。しかし、アデノシンを加えていない場合 ATP 濃度は上昇しなかった。したがって、二層法を用いる

膵消化法において膵保存の場合と同様、アデノシンが重要な役割を果たすことが判明した。また、*in vivo* および *in vitro* の膵島機能の評価では各群間に明かな有意差を認めなかった。これらの結果から二層法にアデノシンの投与を加えた新しい膵消化法を用いた場合、従来法と比較して同等の機能を有した膵島がより多数回収できることが示された。二層法による膵保存における効果の機序は、膵島でのミトコンドリア回路を介したアポトーシスの抑制であることが報告されている。今回の膵消化における二層法による酸素化の効果の機序としてもアポトーシスの抑制が中心的な役割を果たしていると考えられる。さらに、酸素化による膵消化中のプロテアーゼ活性の抑制も考えられるが、その機序については今後のさらなる検討が必要である。

本研究は、膵島移植における膵消化について、その二層法による温阻血障害の軽減の効果を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった膵消化過程における酸素化の有用性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。