

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Low temperature collagenase digestion for islet isolation from 48-hour cold-preserved rat pancreas |
| Author(s)    | 堂野, 恵三   |
| Citation     |  |
| Issue Date   |  |
| Text Version | none   |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/38701">http://hdl.handle.net/11094/38701</a>                  |
| DOI          |  |
| rights       |  |
| Note         |  |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 堂野恵三   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)   |
| 学位記番号      | 第 11173 号  |
| 学位授与年月日    | 平成6年3月15日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当   |
| 学位論文名      | <b>Low temperature collagenase digestion for islet isolation from 48-hour cold-preserved rat pancreas</b><br>(低温コラーゲナーゼ消化法による48時間低温保存膵からのラ島分離) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 森 武貞<br>(副査)<br>教授 松田 暉 教授 白倉 良太  |

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ラ島移植の臨床応用のためには、保存膵からのラ島分離法の確立が必要である。新鮮膵では、in situ で膵管から逆行性にコラーゲナーゼを注入し、膵を摘出し、in vitro で37℃で消化し、density gradient 法により外分泌組織を殆ど含まないラ島の分離が可能である。しかし、保存膵からは新鮮膵でおこなうラ島分離法を用いても、十分な量の viable なラ島は分離されない。著者らはすでに、1) 保存膵では膵管系の圧抵抗性が弱く、十分なコラーゲナーゼ液の注入消化ができなく、収率がわるいこと、2) これを解消するためには、摘出時にコラーゲナーゼ液を注入し、保存後そのまま消化することにより収率が向上することを報告している。本研究ではこの方法をさらに発展させ、48時間保存膵から viable なラ島を数多く分離できるラ島分離を前提とした膵保存法の開発を目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

実験動物は220-250 g の雄性 WS ラットを用いた。保存液としては冷保存効果の優れた UW 液をもちい、コラーゲナーゼ消化の重要な因子である  $Ca^{++}$  濃度の設定をまずおこなった。総胆管より逆行性に種々の濃度の  $Ca^{++}$  (0.15-5 mM) を含むコラーゲナーゼ添加 UW 液を注入した新鮮膵からラ島分離をおこなった。 $Ca^{++}$  無添加ではコラーゲナーゼの活性の低下と、ラ島の構築破壊が見られたが、 $Ca^{++}$  添加とともにコラーゲナーゼ活性の回復とラ島の構築の維持が認められた。

コラーゲナーゼ UW 液注入後 4℃にて24、48時間保存後37℃で消化したところ、新鮮膵から分離されたラ島数は635±52個であったのに対し、各々573±59、395±113個のラ島が分離された。しかし、48時間保存膵から分離したラ島300個をストレプトゾトン糖尿病マウスの腎被膜下に移植しても、血糖の正常化は得られなかった。

この viability の低下の原因を明らかにするために、新鮮膵より分離したラ島を4℃の UW 液中で保存後、糖尿病マウスに移植したところ、少なくとも72時間までの保存では血糖の正常化が見られたことから、48時間保存膵のラ島自体の viability は低温保存中は保たれており、コラーゲナーゼ消化過程で失われるものと推察された。次に UW 液の傷害性を検討するため、UW 液中でラ島を20℃、37℃で培養後ブドウ糖刺激に対するインスリン分泌能を調べたところ、分泌能は37℃の培養では30分で低下するのに対し、20℃では120分まで維持されていた。そこで、20℃で消化分離が可能かどうかを検討した。FALGPA 法で測定したコラーゲナーゼ活性は温度依存性で、20℃では37℃の25%の活性が得られた。これらのことから20℃で消化を行ってもその頂値が120分以内に得られれば、細胞傷害性の少ない消化

法となりうることが推察された。

48時間保存膵を20℃、37℃で消化時間を変えて消化を行ったところ、37℃では10分で頂値（395±113個）が得られたが、消化時間の延長にともない急速に収率が低下し、60分ではラ島が分離されなくなった。一方、20℃では90分後に頂値（414±75個）が得られ、120分では386±64個のラ島が分離された。すなわち、20℃の消化では至適消化時間の幅は広がった。また、20℃で分離したラ島をストレプトゾトシン糖尿病マウスに300個移植したところ8匹中7匹の血糖の正常化が可能であった。

#### 【総括】

ラ島分離を前提とした膵保存法は臓器移植を前提とした膵保存法と異なる。膵摘出時にコラゲナーゼとCa<sup>++</sup>を含む保存液であるUW液を膵管内に逆行性に注入し、保存後低温消化することによって、ラット48時間保存膵からviabilityの良好なラ島分離が可能であった。この低温消化法は細胞傷害性の少ない消化法で長期保存膵からのラ島分離を可能にする方法と考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

これまでは保存膵からのラ島分離は困難で、ラ島移植の臨床応用の大きな障壁となっていた。本研究は、長期保存膵からのラ島分離の方法を詳細に検討し、ラ島収率の向上には保存液にカルシウムの添加が有効であること、ラ島のviabilityの向上には低温コラゲナーゼ消化が有効であることを明らかにし、48時間保存膵から十分な血糖制御能をもったviabilityの良いラ島を分離する方法を確立したものである。この方法は臨床応用可能な優れたもので、学位に値するものと認める。