



Title	Low temperature collagenase digestion for islet isolation from 48-hour cold-preserved rat pancreas
Author(s)	堂野, 恵三
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38701">https://hdl.handle.net/11094/38701</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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> (低温コラーゲナーゼ消化法による48時間低温保存臍からのラ島分離)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 森 武貞 (副査) 教 授 松田 噴 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、保存臍からのラ島分離法の確立が必要である。新鮮臍では、in situ で臍管から逆行性にコラーゲナーゼを注入し、臍を摘出し、in vitro で37°C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、保存臍からは新鮮臍でおこなうラ島分離法を用いても、充分な量の viable なラ島は分離されない。著者らはすでに、1) 保存臍では臍管系の圧抵抗性が弱く、充分なコラーゲナーゼ液の注入消化ができない、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時間保存臍から viable なラ島を数多く分離できるラ島分離を前提とした臍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、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 液を注入した新鮮臍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 °C にて 24, 48 時間保存後 37°C で消化したところ、新鮮臍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 時間保存臍から分離したラ島 300 個をストレプトゾトシ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、新鮮臍より分離したラ島を 4 °C 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 時間保存臍のラ島自体の 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°C, 37°C 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°C の培養では 30 分で低下するのに対し、20°C では 120 分まで維持されていた。そこで、20°C 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°C では 37°C の 25% の活性が得られた。これらのことから 20°C 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時間保存臍を20°C, 37°Cで消化時間を見て消化を行ったところ, 37°C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°C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°Cの消化では至適消化時間の幅は広かった。また, 20°C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臍保存法は臍器移植を前提とした臍保存法と異なる。臍摘出時にコラゲナーゼと  $\text{Ca}^{++}$  を含む保存液である UW 液を臍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 時間保存臍から 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臍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

これまで保存臍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, 長期保存臍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時間保存臍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。