



Title	Significant improvement in islet yield and survival with modified ET-Kyoto solution (ET-Kyoto/neutrophil elastase inhibitor)
Author(s)	町田, 智彦
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59742">https://hdl.handle.net/11094/59742</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	まち だ とも ひこ 町 田 智 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 5 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 4 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Significant Improvement in Islet Yield and Survival with Modified ET-Kyoto Solution(ET-Kyoto/Neutrophil Elastase Inhibitor) (Modified ET-Kyoto 液 (ET-Kyoto/ 好中球エラスターゼ阻害剤) を用いることにより分離膵島の収量および生存が有意に改善する。)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 澤 芳樹 (副査) 教 授 高原 史郎 教 授 福澤 正洋

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

膵島移植は低侵襲な1型糖尿病の根治療法である。しかし長期での移植膵島の生着は依然不良であり、インスリン治療からの離脱には2～3回の膵島移植が必要である。また1人のドナー膵から移植に適した十分量の膵島を獲得する分離技術はまだ確立されていない。本研究では、膵島分離過程においてドナー膵臓内に残存する好中球が活性化され、活性化好中球から放出されるエラスターゼ (NE)が膵島を傷害すると仮説を立て、NE阻害剤 (Sivelestat)を用いることで膵島傷害が軽減され、viabilityの高い高品質な移植用膵島を多数獲得できるか検討した。さらに膵島移植後にレシピエント好中球による移植膵島の拒絶に着目し、膵島レシピエントにNE阻害剤を投与することでグラフトの生着期間の延長が得られるか否か検討した。

### 〔 方 法 〕

1. C57BL/6Jマウスを用いてコラゲナーゼ消化法により膵島分離を行った。用いた分離液はUW液, 20  $\mu$ M Sivelestat添加UW液 (S-UW液), ET-Kyoto液, 20  $\mu$ M Sivelestat添加ET-Kyoto液 (S-Kyoto液)とした。4群間で以下の項目を検討した。1) 膵島分離過程における膵臓内のエステラーゼ染色, 分離液中のNE活性を測定し、活性化好中球とNEの有無を評価した。2) 分離膵島の収量, 純度, 形態, viability (TMRE assay), インスリン分泌能 (static incubation)を測定した。 3) 各分離液を用いた分離膵島500個を同種異系でマウス腎被膜下へ移植し、生着延長効果を検討した。
2. S-Kyoto液を用いて分離された膵島500個を同種移植されたレシピエントにSivelestat 2mg/日を移植前日から移植後14日まで連日、腹腔内に投与し、グラフト生着期間の延長効果を評価した。実験群としてはSivelestat投与群と非投与群に分け、膵島グラフトの生着期間、血中NE活性および血中サイトカイン値の推移 (Day1, Day4, Day7, Day14, Day21, Day28)を解析した。

## 〔 成 績 〕

- 1) 移植膵島分離・純化過程においてドナー膵臓のコラゲナーゼ消化後に活性化好中球が認められ、その数はS-Kyoto群では $3.6 \pm 0.5$  個/視野で、他の群(UW群:  $10.2 \pm 1.1$  個/視野, S-UW群:  $6.8 \pm 0.4$  個/視野, ET-Kyoto群:  $9.2 \pm 1.3$  個/視野)に比し有意に少なかった (UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , S-UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.01$ , ET-Kyoto群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ )。

消化後の分離液中のNE活性はS-Kyoto群では $331 \pm 33 \mu\text{M}$ で、他の群(UW群:  $456 \pm 15 \mu\text{M}$ , S-UW群:  $416 \pm 27 \mu\text{M}$ , ET-Kyoto群:  $449 \pm 14 \mu\text{M}$ )に比し有意にその活性が抑えられた (UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , S-UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , ET-Kyoto群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ )。

- 2) S-Kyoto群の分離膵島の収量が $651 \pm 52$  IEQであり、他の分離液(UW群:  $243 \pm 68$  IEQ, S-UW群:  $276 \pm 126$  IEQ, ET-Kyoto群:  $367 \pm 70$  IEQ)に比し有意に多かった(UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , S-UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.01$ , ET-Kyoto群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.05$ )。

S-Kyoto群の分離膵島の純度は $91.3 \pm 1.9$  %であり、他の分離液(UW群:  $82.7 \pm 3.1$  %, S-UW群:  $84.0 \pm 2.2$  %)に比し有意に高かった(UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , S-UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.01$ )。電子顕微鏡による分離膵島表面の形態もS-Kyoto群では他の分離液に比して大きく、表面の性状も平滑であった。

S-Kyoto群の分離膵島のviable cellsは $75.4 \pm 2.0$  %であり、他の分離液(UW群:  $60.0 \pm 5.6$  %, S-UW群:  $63.3 \pm 4.4$  %, ET-Kyoto群:  $67.0 \pm 1.2$  %)に比し有意に多かった(UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , S-UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , ET-Kyoto群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.01$ )。

分離膵島のインスリン分泌能を表すStimulation indexはS-Kyoto群では $1.49 \pm 0.08$ であり、他の分離液(UW群:  $1.30 \pm 0.06$ , S-UW群:  $1.31 \pm 0.12$ , ET-Kyoto群:  $1.38 \pm 0.12$ )に比し有意に高かった(UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , S-UW群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.001$ , ET-Kyoto群 vs. S-Kyoto群;  $p < 0.05$ )。

- 3) マウス移植実験におけるグラフト生着期間はS-Kyoto液では平均11.2日で、ET-Kyoto液では平均7.4日に比して有意に延長した( $p < 0.01$ )。

2. S-Kyoto液を用いた分離膵島のグラフト生着期間は $11.2 \pm 1.1$ 日であったが、同じ膵島でSivelestatを投与した群では $21.0 \pm 3.2$ 日と有意に( $p < 0.001$ )延長し、レシピエントにSivelestatを投与することによる生着延長の上乗せ効果が得られた。またレシピエントの血中NE活性では移植後28日目で有意な抑制を認めた(投与群 vs. 非投与群:  $76 \pm 20 \mu\text{M}$  vs.  $114 \pm 19 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ )。

レシピエントの血中サイトカイン値もSivelestat非投与群ではIL-6とTNF- $\alpha$ に関して移植後7, 14日目に最も高値を示したが、Sivelestat投与群ではその上昇が有意に抑制された(IL-6; 投与群 vs. 非投与群:  $11 \pm 5 \text{pg/ml}$  vs.  $81 \pm 25 \text{pg/ml}$ ,  $p < 0.05$  TNF- $\alpha$ ; 投与群 vs. 非投与群:  $10 \pm 2 \text{pg/ml}$  vs.  $21 \pm 5 \text{pg/ml}$ ,  $p < 0.05$ )。

## 〔 総 括 〕

Sivelestatを膵島分離の際に用いて分離液中の好中球エラスターゼ活性を抑制することで高品質な移植用膵島を獲得することができ、さらにこの方法により分離された移植用膵島ではグラフト生着も有意に延長できた。またレシピエントにSivelestatを投与することで膵島グラフトの生着延長効果を認めた。今回解析した方法は容易に臨床応用が可能で、one-donor one-recipient膵島移植を実現し得る可能性がある。

膵島移植は低侵襲な1型糖尿病の根治療法であるがその長期成績は依然不良である。また1人のドナー膵から十分量の膵島を分離することは困難とされている。本研究では膵島分離過程において灌流後もドナー膵臓内に残存する好中球がコラゲナーゼ消化の際に活性化され、活性化好中球から放出されるエラスターゼ (NE)により膵島が傷害されることが示された。そこで膵島分離過程でNE阻害剤を用いることで膵島の傷害が軽減され、viabilityの高い良質な膵島を多数獲得できることがマウスのモデルを用いて明らかになった。またこの良質な膵島をレシピエントに移植することで有意にグラフト生着期間が延長した。さらに膵島移植レシピエントに移植前日から移植後2週間目まで連日、NE阻害剤を併用投与することでグラフト生着期間の延長の上乗せ効果が得られた。

本研究は容易に臨床応用が可能であり、臨床膵島移植の長期成績の向上に有意義な知見をもたらした。よって本論文は博士(医学)の学位授与に値する。