

氏名(本籍) もり もと かず ひろ  
守 本 和 弘

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 博 第 1 0 5 7 号

学位授与年月日 平 成 2 年 3 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学研究科  
(博士課程) 外科学系専攻

学位論文題目 各種腓ランゲルハンス島分離法の検討と同種移植  
の試み

(主 査)  
論文審査委員 教授 森 昌 造 教授 藤 村 重 文  
教授 豊 田 隆 謙

## 論 文 内 容 要 旨

糖尿病の治療法の一つに膵ランゲルハンス島（ラ氏島）移植があるが、臨床的には今までに長期生着例は認められていない。その原因は、拒絶反応の問題の他に、大動物の膵ラ氏島分離法に十分なラ氏島の回収率で高いviabilityの得られるものが無い事があげられる。今回効率が良く又安定したラ氏島分離法を求める為に、独自に考案したNegative Pressure Method（以下N. P. M.）と、近年Ricordiらが人膵ラ氏島分離に用いたAutomated Method（以下A. M.）に若干の改良を加えた分離法の2法について検討し、さらに犬を用いて膵ラ氏島自家移植及び同種移植実験を行ないその可能性を追求した。以前は分離中のラ氏島の同定は困難な為に、ラ氏島の回収率はインスリンとアミラーゼ含有量の比などで評価していた。しかしラ氏島が特異的に染色されるDithizonを用いる事で、赤色に染まったラ氏島が容易に同定出来る様になった為、その個数を実際数えられる様になった。

N. P. M. は膵管のコラゲナーゼ灌流に陰圧を利用し、膵を均一に膨満させ又常に新鮮で活性の高いコラゲナーゼを持続的に灌流させる装置を用いた方法であり、コラゲナーゼ消化の後に、機械的消化を加えラ氏島分離を行なった。一方A. M. は消化が行なわれる容器とそれに接続する循環回路から構成され、コラゲナーゼ消化と機械的消化を同時に自動的に行なう方法である。容器内にガラス球と膵管内にコラゲナーゼを注入した膵を入れ、周囲を0.08%のコラゲナーゼ液で満たし、垂直に振盪させた。容器の下方より同濃度のコラゲナーゼ液が流入し、300 $\mu$ mのフィルターを通過後分離された組織が上方から流出し、別の容器に回収された。コラゲナーゼ液は回路内を循環し再度容器内に入った。消化中数回液を採取し、ラ氏島の分離状態をモニターし、消化時間を決定した。消化停止時に容器を上下逆に装着し直し、組織片が下方に流出する様にし、流速をあげ、さらに別の容器に回収した。

犬の膵を2つの方法で分離し、ラ氏島をDithizonで染色し、100 $\mu$ m以上のものを数え膵1g当りの回収率を求めた。N. P. M. 群は2000 $\pm$ 750/gで、A. M. 群では2560 $\pm$ 350/gであり、A. M. の方がより多く、しかも極めて安定した回収率であった。さらにDithizonで染色したラ氏島をHand pickで採取し、単離ラ氏島糖負荷試験を行なったところ、反応性の良好なインスリン分泌能を示した。又豚膵を用いA. M. でラ氏島分離をし、5000/g以上の回収率を得た。人膵ではこの方法で2870/gの回収率であり、インスリン分泌能も良好であった。

犬の部分膵を用い2法でラ氏島分離を行ない、膵全摘した犬の脾臓内に被膜を穿孔してラ氏島を含む膵組織片を自家移植した。N. P. M. 群はラ氏島2800 $\pm$ 840/kgが移植され、8頭中3頭が生着した。A. M. 群では4060 $\pm$ 630/kgが移植され、5頭中4頭が生着したが、3頭は1カ月以

降徐々に機能を示さなくなった。A. M. は早期生着は良好であり、ラ氏島回収率も高く安定していた為、以後の実験はA. M. を用いる事にした。さらにラ氏島数を増加させる為全腓を使用し、組織片が確実に脾臓内に移植される様に、脾静脈分枝から逆行性に移植する方法に変更した。この結果5000±480/kgが移植され、7頭中6頭が長期生着した。又6頭の経静脈的ブドウ糖負荷試験の血糖消失率は、移植前1.67±0.76、移植2週間後0.85±0.26と前に比べ有意に低下し、3カ月後は1.45±0.55と回復傾向を示した。以上の良好な自家移植の結果より、この分離法、移植法を用いて犬ラ氏島同種移植実験を施行した。

免疫抑制剤投与方法の違いから非投与群、アザチオプリン（Az）投与群、サイクロスポリン（CyA）経口投与群、CyA筋肉内投与群の4群に分けた。非投与群、Az投与群、CyA経口投与群は、7日以内に血糖値が急上昇し、全例拒絶された。CyA経口投与群は消化器系の副作用の為に血中CyA濃度は100 µg/l未満と低値であったが、CyA筋肉内投与群では血中濃度は200～1200 µg/lと高値となり、12頭中5頭が13日以上生着延長を示した。2頭は40日以上生着し、内1頭は100日を越えた。生着延長を示した5頭の移植ラ氏島数は7830±1150/kgであり、すぐに拒絶された7頭の4740±850/kgに比し有意に多かった。（ $P<0.01$ ）しかも自家移植の生着に必要な5000/kgよりも多かった。これはCyAのラ氏島細胞に対する障害性が加わる事により、多くのラ氏島が必要になる為と思われた。

A. M. は低濃度に設定したコラゲナーゼを用いても大動物のラ氏島分離が可能であり、回収時に若干の改良を加えた事により、さらに良好な回収率にする事が出来た。今後、抗原性減弱の為、移植部位やラ氏島に対する傷害を除く為に、腓外分泌組織を除去する効率のより純化法の開発が必要であるが、今回の実験において、臨床応用の可能性が示されたと思われる。

## 審査結果の要旨

インスリン依存型糖尿病の治療法の一つである膵ランゲルハンス島（ラ氏島）移植は、臨床的には今日まで長期生着例を認めていない。その原因として拒絶反応の他に、大動物の膵ラ氏島分離法として、十分なラ氏島回収の得られる方法が確立していない事も指摘されている。

本研究では大動物のモデルとして主に犬を用い、効率が良く、又安定したラ氏島分離法の開発の為に、独自の考案によるNegative pressure method（以下N.P.M.）及びRicordiらの発表によるAutomated method（以下A.M.）に若干の改良を加えた方法に対し、ラ氏島分離を検討し、さらに自家移植、同種移植を試みその可能性を追求している。又ラ氏島回収率の評価は、Dithizonでラ氏島を超生体染色し、数を実測する事により表わしている。

N.P.M.群では膵1gあたり $2000 \pm 750$  (/g)の回収率であるのに対し、A.M.群では $2560 \pm 350$  /gのラ氏島が得られており、より多く又安定した回収率である。さらに染色したラ氏島を手取的に採取し、糖負荷試験を実施し、ラ氏島のviabilityを確認している。その上で部分膵（全膵の約65%）を用い2法で分離したラ氏島を含む膵組織片を脾臓内に自家移植している。N.P.M.では8頭中3頭の生着に対し、A.M.では早期の生着は5頭中4頭とすぐれている。次に全膵を用いA.M.でラ氏島分離し、移植片を確実に脾内に移植する為に、脾静脈から逆行性に移植する法に変更した結果、体重1kgあたり $5000 \pm 480$  (/kg)が移植され7頭中6頭が長期生着を認めている。さらに経静脈性糖負荷試験を実施し、良好な耐糖能を証明している。以上の自家移植法を確立した上で本研究は同種移植への応用を試みている。

免疫抑制剤投与方法により4群に分け同種移植実験を施行している。サイクロスポリン（CyA）筋肉内投与群においてのみ、経口投与によるCyAの副作用を防止出来た為、CyA血中濃度の上昇を認め、その結果12頭中5頭に生着延長効果を得ている。内1頭は100日以上長期生着を示している。この5頭の移植ラ氏島数は、体重1kgあたり $7380 \pm 1150$  (/kg)であり、初期に拒絶された7頭の $4740 \pm 850$  /kgに比べ有意の差を認めている。（ $P < 0.01$ ）。この結果は自家移植の生着に必要な約5000/kgのラ氏島数よりも、はるかに多くを必要としており、CyAのラ氏島細胞に対する障害の関与を示唆している。

豚、人に於てもA.M.でラ氏島分離を試み、この分離法の可能性を追求し、良好な成績を示している。

以上が本研究の骨子であるが、膵ラ氏島移植の成立する条件を独自に工夫したラ氏島分離法で比較検討し、移植ラ氏島数を自家移植と同種移植の場合で異なる事を示し、今後の研究推進の方向づけを示すとともに、ラ氏島移植の臨床応用への可能性を示唆した。学位授与に値するものと認める。