

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 禎翼

インスリン依存性糖尿病 (IDDM) は、自己免疫あるいは特発性の機序により膵 β 細胞が破壊され、絶対的なインスリン不足により比較的若齢で発症する糖尿病の一つである。膵島移植は IDDM に対する根治療法として注目されているが、確実な術後拒絶反応の抑制法など未だに解決すべき問題点が多い。その解決法の一つとして、免疫隔離バイオ人工膵島の開発が研究されてきた。免疫隔離膜は、膵島の栄養成分およびインスリンなどは自由に通過させ、免疫系細胞や液性免疫に関する分子の侵入は防止しなければならない。従来免疫隔離膜として人工化学物質が試みられてきたが、その生体適合性、耐久性の低下、免疫隔離能および材料自体が持つ異物反応など様々な問題点があり、臨床応用に至ったものはない。

申請者は膵島をレシピエント由来の生体組織で包む形態のバイオ人工膵島ができれば、レシピエントの免疫システムは、そのレシピエント由来の表面抗原を認識してバイオ人工膵島を自己と認識(錯覚)するのではないかと考えた。また、軟骨はその産生する細胞外器質の network により、液性免疫分子の侵入を防ぐ可能性があり、免疫隔離膜となり得るのではないかと考えた。本研究では、このような全く新しいコンセプトに基づき、イヌとラットから軟骨細胞の培養と膵島分離を行い、軟骨細胞によって膵島を封入する新規バイオ人工膵島の作製およびその機能評価を試みた。

第 2 章では、本研究で用いるイヌとラットからの膵島分離法と耳介軟骨細胞の初代培養法などの材料と方法について検討した。膵島の分離はビーグル犬、Lewis ラットおよびその high responder である Brown Norway(BN)ラットから行った。その結果、いずれからも効率よく膵島が分離された。また、軟骨細胞の初代培養はビーグル犬と BN ラットから行った。その結果、イヌの耳介軟骨は分離が容易で、増殖は急激であった。実験には第 3 継代目の細胞を用いた。なお、凍結保存後の生存率は平均 51.01%であった。ラット初代培養では線維芽細胞の混入があり、初代細胞を実験に用いた。

第 3 章では、バイオ人工膵島作製のため、軟骨細胞を用いて膵島を封入する 5 つの作製法を検討した。軟骨細胞を高密度で膵島と何らかの圧力をかけて培養する 3 つの方法では、いずれも膵島の封入が不完全であった。一方、第 3 継代目の軟骨細胞を 32℃以下で細胞非付着性となる温度応答性の培養皿を用いて 3~6 週間培養し、これを低温下でシート状に回収する細胞工学的手法を用いた方法では、この軟骨細胞シートを積層化し、その間に多くの膵島を封入することができた(マクロカプセル化バイオ人工膵島)。また、比較的高密度のイヌおよびラットの耳介軟骨細胞を用いてラット膵島と 6 日間の振とう培養する方法でも、一つの膵島を軟骨細胞で封入するバイオ人工膵島(マイクロカプセル化バイオ人工膵島)が作製できた。

第 4 章ではこれらのバイオ人工膵島に対し、その形態学的観察と *in vitro* における長期間のインスリン分泌機能を評価した。形態観察では、いずれのバイオ人工膵島でも膵島は軟骨細胞

内に封入されており、長期の培養後においても膵島の生存ならびにインスリン分泌活性が観察された。この成績は、膵島単独での培養ではその機能を 2 週間以上維持するのが困難とされていることから、軟骨細胞による封入が膵島の生存を助ける機能を示唆した。

第 5 章では、その作製にかかる時間ならびに門脈内投与で移植できる手技の容易さを考慮し、マイクロカプセル化バイオ人工膵島の免疫隔離能を、*in vitro* の条件下ではあるが、膵島に対して自家、同種ならびに異種の血清を添加した培養液中で培養し、膵島の生存ないし活性をインスリン分泌機能から評価した。

high responder である Lewis ラットおよび BN ラットの膵島と耳介軟骨を用いてバイオ人工膵島を作製し、膵島に対して自家、同種および異種(イヌ)の各血清の添加された培地で 18 日間培養した。その結果、膵島に対して異種であるイヌ血清を添加した培地で培養した群では、培養 15 日以降は他の群と比べて有意にインスリン分泌量が多く、この群では培養 39 日目においてもインスリン分泌能がみられ、組織学的にも膵島の生存が確認された。さらに、イヌ軟骨細胞とラット膵島からなるバイオ人工膵島を作製し、50%のイヌ血清を加えた培地で 7 日間培養した。その結果、イヌ血清を非動化した場合と非動化を行っていない場合に関わらず、膵島は生存し、インスリン分泌は維持された。これらの結果は、今回作製したマイクロカプセル化バイオ人工膵島が液性免疫を阻止する可能性を示唆した。また、軟骨には何らかの膵島保護作用がある可能性も示唆されたことから、生体材料のみで作製したこのバイオ人工膵島が、有力な IDDM の治療法になり得ることを示すものであり、今後、*in vivo* での免疫隔離と血糖変動に合わせたインスリン分泌能に関しても評価する価値があると考えられた。

以上要するに、本研究は全く新しいコンセプトに基づくバイオ人工膵島の開発を試みたものであり、今後、この分野の研究ならびに臨床応用に大いに貢献するものである。よって審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の論文として価値あるものと認めた。