

明 細 書

発明の名称： 膵島含有カプセルの製造方法

技術分野

[0001] カプセル化膵島に関する技術が開示される。

背景技術

[0002] 膵島移植は人体への負荷が比較的少ない糖尿病の治療手段であるが、移植された膵島が長期生着するためには強力な免疫抑制が必要な場合がある。微小なマイクロカプセル化膵島を多数腹腔内へ移植する方法が検討されており、この場合、免疫抑制は不要であるが、未だ十分な治療成績は得られていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：W02001/052871

非特許文献

[0004] 非特許文献1：METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 137, 575-580, 1988

非特許文献2：TRANSPLANTATION, Vol. 53, 1180-1183, No. 6, June 1992

非特許文献3：Bioartificial Pancreas, Vol., 98, No. 6, 1996, 1417-1422

非特許文献4：Drug Delivery System, Vol., 12, No. 2, 1997

非特許文献5：JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH B: APPLIED BIOMATERIALS, 2013 VOL., 101B, ISSUE 2, 258-268

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 改良された膵島含有カプセルの製造方法を提供することが一つの課題である。

課題を解決するための手段

[0006] 斯かる課題の解決手段として下記を包含する発明が提供される。

項 1.

(a) 脾島を $10,000 \text{ IEQ/mL}$ 以上の濃度で含有するアルギン酸ナトリウム溶液 A を調製する工程、

(b) 該アルギン酸ナトリウム溶液を二価カチオン溶液に滴下し、ゲル化した粒子を回収する工程、

(c) 工程 (b) で回収した粒子をポリ-L-オルニチン溶液 A に添加し、攪拌後、粒子を回収する工程、

(d) 工程 (c) で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液 B に添加し、攪拌後、粒子を回収する工程、及び

(e) 工程 (d) で回収した粒子をクエン酸ナトリウム溶液に添加し、攪拌後、粒子を回収する工程

を含む、脾島含有カプセルの製造方法。

項 2.

脾島が、生後 1～3 週齢の幼若ブタから取得した脾島である、項 1 に記載の方法。

項 3.

脾島含有カプセルの平均直径が $550 \sim 750 \mu\text{m}$ である、項 1 又は 2 に記載の方法。

項 4.

アルギン酸ナトリウム溶液 A のアルギン酸ナトリウム濃度が $1 \text{ w/v} \%$ 以上 $3 \text{ w/v} \%$ 以下である、項 1～3 のいずれかに記載の方法。

項 5.

ポリ-L-オルニチン溶液 A のポリ-L-オルニチン濃度が $0.05 \text{ w/v} \%$ 以上 $3 \text{ w/v} \%$ 以下である、項 1～4 のいずれかに記載の方法。

項 6.

アルギン酸ナトリウム溶液 B のアルギン酸ナトリウム濃度が $0.1 \text{ w/v} \%$ 以上 $0.3 \text{ w/v} \%$ 以下である、項 1～5 のいずれかに記載の方法。

項 7.

工程（d）において、工程（c）で回収した粒子を、ポリＬ－オルニチン溶液Bに添加し、攪拌後、回収した後に、アルギン酸ナトリウム溶液Bに添加する、項１～６のいずれかに記載の方法。

項８．

ポリＬ－オルニチン溶液BのポリＬ－オルニチン濃度が $0.01\text{ w/v}\%$ 以上 $0.1\text{ w/v}\%$ 未満である、項７に記載の方法。

発明の効果

[0007] 糖応答性が改善されたカプセル化脾島が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]カプセル化直後の脾島及びカプセル化後２５日培養した脾島の顕微鏡写真を示す。a～dはカプセル化直後であり、e～hは２５日間培養後である。

a及びeは $8,000\text{ IEQ/mL}$ の脾島を用いて作製したものであり、b及びfは $12,000\text{ IEQ/mL}$ の脾島を用いて作製したものであり、c及びgは $16,000\text{ IEQ/mL}$ の脾島を用いて作製したものであり、d及びhは $20,000\text{ IEQ/mL}$ の脾島を用いて作製したものである。

[図2]カプセル化後２５日培養した脾島の糖応答性を測定した結果を示す。

[図3]カプセル化後２５日培養した脾島について測定した糖応答性をSimulation Index (SI)として示す。

[図4]サイズの異なる脾島含有カプセルについて糖応答性を測定した結果を示す。

[図5]サイズの異なる脾島含有カプセルについてSIを測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 脾島含有カプセルの製造方法は、下記の工程（a）～（e）を含むことが好ましい：

（a）脾島を $10,000\text{ IEQ/mL}$ 以上の濃度で含有するアルギン酸ナトリウム溶液Aを調製する工程；

（b）該アルギン酸ナトリウム溶液を二価カチオン溶液に滴下し、ゲル化した粒子を回収する工程；

(c) 工程 (b) で回収した粒子をポリ-L-オルニチン溶液 A に添加し、攪拌後、粒子を回収する工程；

(d) 工程 (c) で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液 B に添加し、攪拌後、回収する工程；及び

(e) 工程 (d) で回収した粒子をクエン酸ナトリウム溶液に添加し、拌後、回収する工程。

[0010] 工程 (a) で使用する膵島は、インスリン産生 β 細胞、グルカゴン含有 α 細胞、ソマトスタチン分泌デルタ細胞、及び膵臓ポリペプチド含有細胞 (P P 細胞) を含むことが好ましい。膵島は、その大部分がインスリン産生 β 細胞であることが好ましい。

[0011] 膵島の由来は、特に制限されないが、ヒト、ブタ、マウス、ラット、サル、又はイヌであることが好ましい。一実施形態において、膵島は、ブタ由来であることが好ましく、幼若ブタ (例えば、生後 3 日～4 週間又は生後 7 日～3 週間) の膵島であることが好ましい。膵島は、当該技術分野において知られている方法を任意に採用することにより得ることができる。例えば、消化酵素に *Liberase* を用いる方法 (T. J. Cavanagh et al., *Transplantation Proceedings*, 30, 367 (1998)) を好ましく用いることができる。

[0012] 膵島のサイズは、 $50\mu\text{m}$ 以上 $400\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。膵島のサイズは、顕微鏡のマイクロメーターを用いて測定することができる。膵島は、 β 細胞を 10% 以上含んでいることが特性として好ましい。 β 細胞の割合の上限は特にないが、例えば、80% である。

[0013] アルギン酸ナトリウム溶液 A を構成するアルギン酸ナトリウムの物性は、特に限定されない。

[0014] アルギン酸ナトリウム溶液 A のアルギン酸ナトリウム濃度は、特に制限されないが、例えば、 $1\text{w}/\text{v}\%$ 以上 $3\text{w}/\text{v}\%$ 以下であることが好ましい。

[0015] アルギン酸ナトリウム溶液 A は、膵島を $10,000\text{IEQ}/\text{mL}$ 以上の濃度で含有することが、カプセル化後の膵島の糖応答性を良好にするという

観点で好ましい。ここで、IEQとは、直径150 μ mを基準とした脾島の数を意味する。脾島濃度は、11,000IEQ/mL以上、又は12,000IEQ/mL以上であることが好ましい。脾島濃度の上限は特に制限ないが、例えば、30,000IEQ/mL以下、25,000IEQ/mL以下とすることができる。

[0016] アルギン酸ナトリウム溶液Aは、脾島を上記のような濃度で含有するように調製される限り、その具体的な調製方法は制限されない。例えば、生理食塩水に適量のアルギン酸ナトリウムを溶解し、そこに適量に脾島を添加し、必要に応じて攪拌することにより、アルギン酸ナトリウム溶液Aを得ることができる。

[0017] 工程(b)で使用する二価カチオン溶液は、そこにアルギン酸ナトリウム溶液Aを滴下することにより、脾島を包含したゲル化粒子(カプセル)が得られる限り制限されない。このような二価カチオン溶液を構成する二価カチオンとしては、水溶液中で二価の金属イオンを遊離する塩(例えば、塩化カルシウム、乳酸カルシウム、塩化バリウム、及び塩化ストロンチウム等)を挙げることができる。一実施形態において、好ましい塩は塩化カルシウムであり、好ましい二価カチオン溶液は塩化カルシウム溶液である。

[0018] 二価カチオン溶液の二価カチオンの濃度は、特に制限されず、例えば、50~500mMの範囲で設定することができる。

[0019] 二価カチオン溶液へのアルギン酸ナトリウム溶液Aの滴下様式は、脾島を包含するゲル化粒子が得られる限り制限されない。一実施形態において、二価カチオン溶液に、アルギン酸ナトリウム溶液Aを適当な大きさのニードルを通して滴下することが好ましい。

[0020] ゲル化粒子の回収は、任意であり、例えば、ゲル化粒子が形成された二価カチオン溶液を一定時間静置させ、上清を除去すること又はこれを繰り返すことにより、実施することができる。

[0021] 工程(c)で使用するポリ-L-オルニチン溶液Aは、工程(b)で形成されたゲル化粒子をコーティングすることができるものであれば特に制限さ

れない。例えば、ポリ-L-オルニチンを生理食塩水に溶解することで調製することができる。

[0022] ポリ-L-オルニチン溶液Aにおけるポリ-L-オルニチンの濃度は特に制限されないが、例えば、 $0.05\text{ w/v}\%$ 以上 $3.0\text{ w/v}\%$ 以下に調製することができる。一実施形態において、ポリ-L-オルニチン溶液Aにおけるポリ-L-オルニチンの濃度は $0.1\text{ w/v}\%$ 以上 $2.0\text{ w/v}\%$ 以下であることが好ましい。

[0023] 工程(c)の「工程(b)で回収した粒子をポリ-L-オルニチン溶液Aに添加」とは、工程(b)で回収したゲル化粒子にポリ-L-オルニチン溶液Aを添加する態様も包含する。工程(c)における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、 $20\sim300\text{ rpm}$ で1分間～20分間が好ましい。

[0024] 工程(c)におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、ポリ-L-オルニチン溶液Aを一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、アルギン酸によるゲル化層の表面がポリ-L-オルニチンでコーティングされた構造を有することが好ましい。

[0025] 工程(d)で使用するアルギン酸ナトリウム溶液Bは、工程(a)で使用するアルギン酸ナトリウム溶液Aと同一濃度であっても異なってもよい。一実施形態において、アルギン酸ナトリウム溶液Bのアルギン酸ナトリウム濃度は、コーティング操作の容易性という観点でアルギン酸ナトリウム溶液Aのアルギン酸ナトリウム濃度よりも低いことが好ましい。例えば、アルギン酸ナトリウム溶液Aのアルギン酸ナトリウム濃度が $1\text{ w/v}\%$ 以上 $3\text{ w/v}\%$ 以下である場合、アルギン酸ナトリウム溶液Bのアルギン酸ナトリウム濃度は $0.1\text{ w/v}\%$ 以上 $0.3\text{ w/v}\%$ 以下であることが好ましい。

[0026] 工程(d)の「工程(c)で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液Bに添加」とは、工程(c)で回収したゲル化粒子にアルギン酸ナトリウム溶液Bを添加する態様も包含する。工程(d)における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、 $20\sim300\text{ rpm}$ で1分間～15分間攪拌すること

が好ましい。

[0027] 工程（d）におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、アルギン酸ナトリウム溶液Bを一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、アルギン酸によるゲル化層の表面がポリ-L-オルニチンでコーティングされ、更にその上にアルギン酸によるゲル化層を有することが好ましい。

[0028] 一実施形態において、工程（c）で回収した粒子を、アルギン酸ナトリウム溶液Bに添加する前に、ポリ-L-オルニチン溶液Bに添加し、攪拌後、粒子を回収し、それを工程（d）のアルギン酸ナトリウム溶液Bに添加することが好ましい。ここで、ポリ-L-オルニチン溶液Bは、ポリ-L-オルニチン溶液Aと同一濃度又は異なってよい。一実施形態において、ポリ-L-オルニチン溶液Bのポリ-L-オルニチン濃度は、ポリ-L-オルニチン溶液Aのポリ-L-オルニチン濃度よりも低いことが好ましい。例えば、ポリ-L-オルニチン溶液Bのポリ-L-オルニチン濃度は0.01 w/v%以上0.1 w/v%未満であることが好ましい。

[0029] 工程（e）で使用するクエン酸ナトリウム溶液は、0.5～3 w/v%の濃度でクエン酸ナトリウムを含有することが好ましい。ゲル化粒子内のカチオンをキレートし、ゲルから液状に近づけることでインスリン放出を促す目的でクエン酸ナトリウム溶液を添加する。

[0030] 工程（e）の「工程（d）で回収した粒子をクエン酸ナトリウム溶液に添加」とは、工程（d）で回収したゲル化粒子にクエン酸ナトリウム溶液を添加する態様も包含する。工程（e）における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、20～300 rpmで1分間～15分間であることが好ましい。

[0031] 工程（e）におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、クエン酸ナトリウム溶液を一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、内部がより液状に近づいていると考えられる。

[0032] このようにして得られた膵島含有カプセルは、優れた糖応答性を有し、またそれを安定的に保持する。一実施形態において、工程（e）で回収されたゲル化粒子（膵島含有カプセル）は、良好な糖応答性を示すという観点で、その平均直径が $2000\mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、 $1500\mu\text{m}$ 以下又は $1000\mu\text{m}$ 以下であることがより好ましい。膵島含有カプセルのサイズの下限は特に制限されないが、例えば、 $100\mu\text{m}$ 以上、 $200\mu\text{m}$ 以上、 $300\mu\text{m}$ 以上、 $400\mu\text{m}$ 以上、又は $500\mu\text{m}$ 以上である。平均直径とは、 $20\sim 50$ 個の膵島含有カプセルについてサイズを顕微鏡のマイクロメーターで測定し、その平均値を算出した値である。

実施例

[0033] 以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

[0034] 1. カプセル化膵島の作製

1. $7\text{w}/\text{v}\%$ アルギン酸ナトリウム溶液（Pronova）に生後14日齢のブタから分離した幼若ブタ由来膵島を $8,000\text{IEQ}/\text{mL}$ 、 $12,000\text{IEQ}/\text{mL}$ 、 $16,000\text{IEQ}/\text{mL}$ 、又は $20,000\text{IEQ}/\text{mL}$ の濃度で懸濁した。これをニードルに通し、エアフローにより懸濁液をカットしながら 109mM 塩化カルシウム溶液中に滴下させた。塩化カルシウム溶液から固化したアルギン酸ビーズを回収し、 $0.075\text{w}/\text{v}\%$ のポリ-L-オルニチン（PLO）（分子量 $5,000\sim 15,000$ ）溶液に添加し、10分間攪拌した。ビーズを回収し、さらに $0.038\text{w}/\text{v}\%$ PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、 $0.17\text{w}/\text{v}\%$ アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌し、最後に 1.6% クエン酸ナトリウム溶液に添加して2分間攪拌させてカプセル化膵島を得た。得られたカプセル化膵島を 37°C で CO_2 インキュベーター中で25日間培養した。

[0035] カプセル化直後及び培養25日後にフラスコからカプセル化膵島を少量取り、 35mm ディッシュに移した。ディッシュを倒立顕微鏡（4倍率）で観察し、カプセル化膵島を撮影した（図1）。図1のa～dはカプセル化直後

であり、e～hは培養25日後である。a及びeは8,000 I E Q / m L の臍島を用いて作製したものであり、b及びfは12,000 I E Q / m L の臍島を用いて作製したものであり、c及びgは16,000 I E Q / m L の臍島を用いて作製したものであり、d及びhは20,000 I E Q / m L の臍島を用いて作製したものである。カプセル直径は平均で約600 μ mであった。

[0036] 2. 糖応答性評価

カプセル化してから25日間、RPMI 1640培地に2%ブタ血清、10 mMニコチンアミド、及び抗生物質を添加した培地中で培養した後の各カプセル化臍島500 I E Qを74 μ mネットウェルインサート（Corning社製）に入れた。洗浄後、臍島の入ったインサートを500 mg / L 低グルコース培地中で1時間静置させ、その後培地を回収した。続いて、カプセル化臍島の入ったインサートを3750 mg / L 高グルコース培地中有で1時間静置させ、その後培地を回収した。回収した培地中のインスリン濃度をELISA法を用いて測定した（図2）。また、低グルコース培地中インスリン濃度に対する高グルコース培地中インスリン濃度比をStimulation Index (SI)として算出した（図3）。図2に示されたとおり、8,000 I E Q / m L の臍島で作成したカプセルよりも、より高い濃度の臍島を用いて作成したカプセルの方が、高い糖応答性を示すことが判明した。

[0037] 3. カプセルサイズと糖応答性

上記1.と同様の手順で、エアフローの速度を調整することで直径約500～1800 μ mのカプセル化臍島を作製した。3000 μ mのカプセル化臍島はシリンジに18 Gサーフローの外筒を接続して滴下させ作製した。16,000 I E Q / m L の幼若ブタ由来臍島を含有する懸濁液を用いて臍島含有カプセルを作製した。

[0038] 得られた臍島含有カプセルについて、上記2と同様にして糖応答性を評価した結果を図4及び図5に示す。これらの結果から、カプセルの直径は20

00 μ 以下、1800 μ m 以下、又1500 μ m 以下が糖応答性に好ましいことが判明した。