

洈ランゲルハンス島の保存およびその門脈内移植に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8649

膵ランゲルハンス島の保存およびその門脈内 移植に関する実験的研究

金沢大学医学部第2外科学講座（主任：宮崎逸夫教授）

山 崎 軍 治

（昭和51年11月22日受付）

本論文の要旨の一部は1975年第11回日本移植学会総会，1976年第12回日本移植学会総会，1977年第77回日本外科学会総会において発表した。

近年糖尿病患者に対するインスリンや抗生物質による治療法の進歩とともに，重篤な合併症による死亡が激減した。しかし糖尿病の意義は依然として重大であり，とくに最近では糖尿病性血管障害が注目をあつめている。それはこの血管障害が糖尿病患者の大きな死因を占めているからである。小坂¹⁾は糖尿病患者の死因の40~50%が脳，心，腎などの血管障害がしめしていると報告している。また，後藤ら²⁾は本邦例を集計した結果では，血管障害死が占める率は，臨床例では，1917人中47.3%，剖検例では2754人中41.2%であったと報告している。さて，糖尿病における血管障害は細小血管症（microangiopathy）と動脈硬化による血管障害（macroangiopathy）とに大別され，このうち細小血管症が糖尿病に特有な血管障害と考えられている。この細小血管症は糖尿病患者の生体のあらゆる部位で発現するが，腎と網膜はその好発臓器の1つとして知られ，特有の糸球体硬化症や網膜症を呈することが知られている。

ところで，生体内における血糖-インスリンの相互関係は食事，運動などをはじめとする諸因子の影響を受け，時々刻々と変動している。しかし糖尿病患者に対して今日まで広く行なわれてきている，1日1~3回の固定したインスリンの投与方法では，このような生理的な相互関係を日夜厳密に維持することは，きわめて困難である。近年，糖尿病患者に対するインスリン治療の実際として，とくに血管障害の進展防止を意図として，より生理的な血糖-インスリン相互関係を自動的に維持するためには，feed back systemにより

調節された量のインスリン投与が必要であるといわれている。このような feed back system 開発の方法としては，現代のエレクトロニクスの発達に基づく“人工膵β細胞”の開発と，移植学の発展に基づく“膵移植”の二つの方法が検討されている。人工膵β細胞の研究では，七里ら³⁾は血糖持続測定器，ミニコンピューター，インスリン注入器を接続した，“大型体外人工膵β細胞システム”を作成し，重症ケトアシドーシスを示す膵摘糖尿病犬に使用した。その結果，膵摘糖尿病犬は血糖のすみやかな改善とともに，ケトアシドーシスの消失を見，システム作動中は正常血糖を維持し，また使用インスリン量を大巾に節約できたと報告している。

一方，膵移植に関する研究は，1927年 Gayet⁴⁾ や1929年 Houssay⁵⁾ によって始められ，1957年 Lichtensteinら⁶⁾は血管吻合による whole organ を用いた膵移植を行ない，6日間の生存犬を報告している。その後 Tersigni⁷⁾ や Gruylら⁸⁾はステロイドや抗リンパ球血清を使用して，移植後20~60日まで拒否反応を抑制し，その間は移植膵は正常な内外分泌能を有していたと報告している。しかしながら whole organ を用いる膵移植はその目的を十分達するには至らなかった。そしてその原因は膵外分泌腺細胞の存在にあると考えられていた。

ところで，1965年 Moskalewski⁹⁾がコラゲナーゼ処理により膵ランゲルハンス島（膵ラ島）の分離に成功し，1967年 Lacy-Kastianovsky¹⁰⁾がこれに改良を加えて，技術的に容易に膵ラ島が得られるようになっ

Experimental Studies on *In Vitro* Culture of Pancreatic Islet of *Langerhans* and its Transplantation into the Portal Vein System. Gunji Yamazaki Department of Surgery (II), (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University.

た。そこで、Ballinger-Lacy¹¹⁾は実験的糖尿ラットに膵ラ島を腹腔内または皮下に同種移植し、糖尿病状態の改善をみたと報告している。

他方、移植免疫とともに臓器移植の分野で重要である、臓器保存についての研究がすすめられ、低温保存、高圧酸素下保存、灌流保存や凍結保存などが試みられている。寺脇ら¹²⁾によれば肝の高圧酸素下灌流で24時間、岡崎¹³⁾、増田ら¹⁴⁾によれば腎の低温灌流でも72時間の保存が限界とされている。しかし、膵ラ島は組織片が微小なため、これらの方法よりも培養法による保存が適当であり、著者は器官培養を応用した方法で膵ラ島の保存を試み、さらにこの保存ラ島の門脈内移植を行って、若干の新知見を得たので報告する。

〔I〕 保存ランゲルハンス島のインスリン分泌能
保存ランゲルハンス島のインスリン分泌能を検討するため、培地にグルコース、トルブタミド、グルカゴンや各種消化管ホルモン等を添加した時のインスリン分泌能を新鮮ラ島と比較の上検討した。

I. 実験材料および実験方法

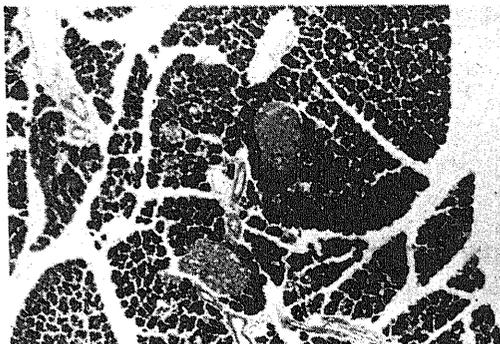


図1 Hanks液注入による膨化膵の組織像
(H・E染色, 40倍)

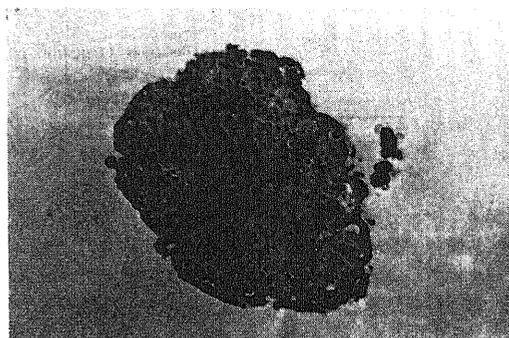


図2 分離ラ島の組織像
(H・E染色, 100倍)

1. 実験動物

体重200~300gのWistar系雄ラットをオリエンタル固形飼料MFおよび水道水を与えて、同一条件下で7~14日間飼育後実験に供した。

2. 膵ラ島の分離 (図1, 2)

Wistar系雄ラットをラボナール(50mg/kg, 腹腔内投与)麻酔下に膵臓を摘出し、Lacyら¹⁰⁾の方法にさらに改良を加えたOkamotoの方法に従い、温和な条件でコラゲナーゼ処理を行ない膵ラ島を分離した^{15), 16)}。すなわち、上腹部正中切開で開腹後、総胆管の十二指腸開口部を結紮し、総胆管の肝門部に近いところより23Gの翼状針を刺入し、グルコース60mg/dlを含む、Hanks液20mlを注入し、膵全体を膨化させる。ついで膵を脾、胃および十二指腸より切除し上記buffer中で洗浄する。この際、脂肪組織、リンパ組織や大血管などは切除しておく。つぎに膵組織をハサミで細かく切りきざみ、20ml容三角フラスコに入れ、コラゲナーゼ(Worthington社製, CLS IV Lot. No. 45D006)30mgとbovine serum albumin(Armour社製)100mgを含むHanks液5mlを加える。ついで上記三角フラスコを密栓し37℃のwater bath incubatorの中で150~200回/分の振盪の下に、約15分間膵切片をコラゲナーゼで消化させる。消化された膵組織-コラゲナーゼ混合液を50ml容の円錐形メスシリンダーに移し変え、warm Hanks液で4回、ついでcold Hanks液で4回、合計8回の洗浄沈澱をくり返して膵外分泌腺組織を除去する。洗浄が終つて、得られた沈澱を、cold Hanks液に浮遊させてシャーレに移す。これを冷却しながら実体顕微鏡下にてcapillary pipetteを用い、膵ラ島を分離採取し、大ききのほぼ等しい辺縁の整な膵ラ島を以下の実験に供した。

3. 膵ラ島の保存

得られた膵ラ島はDulbecco modified Eagle培地(20%牛胎児血清, Penicillin-G 100 u/ml, Streptomycin 50 μg/ml含有)5mlを含むtissue culture dishに20コあて入れ、O₂ 95%:CO₂ 5%からなる混合ガス通気下、37℃で1~7日間、炭酸ガス培養器内で保存した。なお培地の交換は2~3日毎におこなつた。

4. 分離ラ島のインスリン分泌能

得られた新鮮ラ島及び保存ラ島はKrebs-Ringer-Bicarbonateに5mM Glutamate, 5mM Fumarate 5mM Pyruvate, 0.2% Bovine serum albumin, 種々のインスリン分泌刺激物質を加えたmedium 0.5mlに、4~6コあて入れ、一定時間O₂ 95%:CO₂ 5%通気下、37℃でインキュベートした。インキュベート後にmedium中に放出されたインスリン量をPhade-

bas insulin test^{17),18)} (固相法, 塩野義社製) にて測定した。なお, インスリン刺激物質としてはグルコース, グルカゴン (Novo 社製), トルブタミド (日本ヘキスト社製), パンクレオザイシン (Boots 社製), セクレチン (エーザイ社製), ガストリン (帝国臓器社製), セルレイン (協和醸酵社製) を用いた。

図3~9の各点はラット3~5匹から得られた, 膵ラ島を4~6コあて, 各インキュベーションフラスコに入れた時の平均値と標準偏差である。

II. 実験結果

1. グルコース単独刺激によるインスリン分泌

1, 3, 5 および7日間それぞれ保存した分離ラ島の, グルコース刺激によるインスリン分泌量は図3のごとく, グルコース 50mg/dl 存在下, およびグルコース 300mg/dl 存在下では, 保存ラ島は新鮮ラ島とほぼ同程度のインスリン分泌能を示していた。

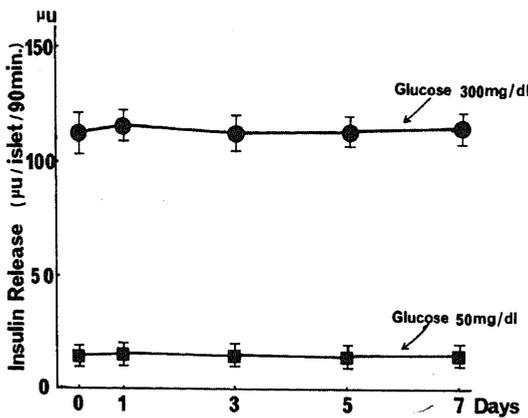


図3 新鮮ラ島および保存ラ島のインスリン分泌
各値は Mean ± S. D. n = 7

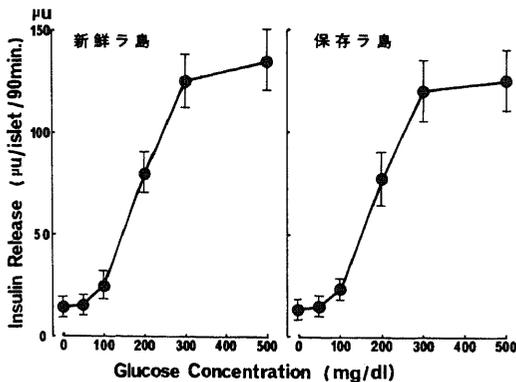


図4 新鮮ラ島および3日間保存ラ島のグルコース濃度とインスリン分泌量
各値は Mean ± S. D. n = 10

また, グルコース濃度とインスリン分泌量との関係を新鮮ラ島と3日間保存ラ島につき検討したのが図4である。いずれもグルコース濃度 100mg/dl 以上から急激なインスリン分泌反応を示し, そのインスリン量はグルコース濃度 300mg/dl でほぼ plateau に達していた。

次に反応時間とインスリン分泌量との関係を見ると (図5), 新鮮ラ島および3日間保存ラ島は, グルコー

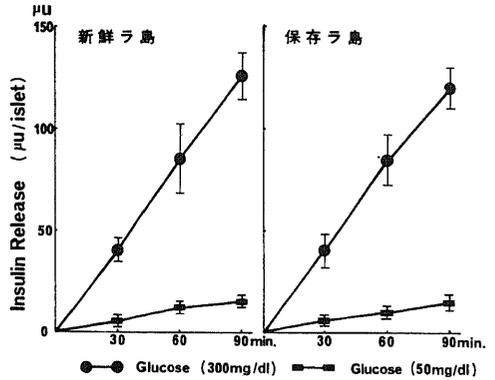


図5 新鮮ラ島および3日間保存ラ島のインスリン分泌の時間的経過
各値は Mean ± S. D. n = 10

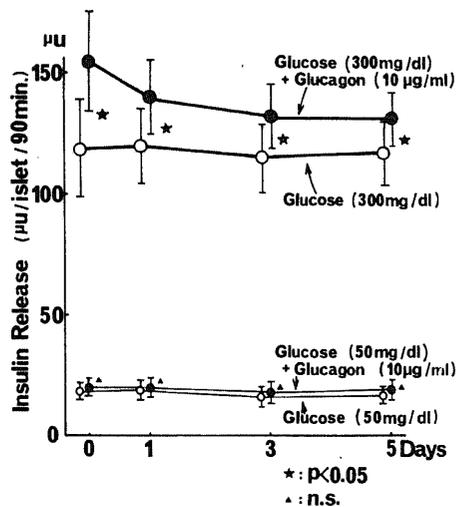


図6 グルカゴンのインスリン分泌に及ぼす影響
各値は Mean ± S. D. n = 7
★はグルコース 300mg/dl 存在下でのグルカゴン添加群と無添加群間の有意差をあらわしている (P < 0.05).
▲はグルコース 50mg/dl 存在下でのグルカゴン添加群と無添加群間には有意差がないことをあらわしている。

ス 300mg/dl 存在下で30分, 60分, 90分と時間とともにインスリン分泌量は, ほぼ直線的に増加していた。

2. グルカゴンのインスリン分泌におよぼす影響 (図6)

medium にグルカゴン 10 μg/ml 添加時のインスリン分泌量を見ると, グルコース 300mg/dl 存在下では, 保存5日間まで保存ラ島は新鮮ラ島よりも, 分泌量の軽度低下を認めるも, グルコース単独群よりも分泌量は増加傾向を示していた。また, グルコース50mg/dl 存在下では, 新鮮および1~5日間保存ラ島はグルカゴンに対して反応しなかった。

3. トルブタマイドのインスリン分泌におよぼす影響 (図7)

medium にトルブタマイド 1mg/ml 添加時のインスリン分泌量を比較してみると, グルコース 50mg/dl および 300mg/dl 存在下では, ともにトルブタマイド添加群の方が有意にインスリン分泌量の増加を認めた。しかし新鮮ラ島と保存ラ島間には有意差は認められなかった。

4. 各種消化管ホルモンのインスリン分泌におよぼす影響

medium にパングレオザイミン 2u/ml, セクレチン 2u/ml, ガストリン 3γ/ml あるいはセルレイン 0.4 μg/ml を加えた時のインスリン分泌量を新鮮ラ島と3日間

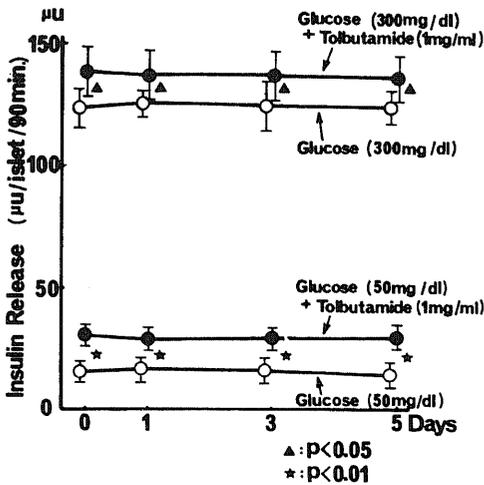


図7 トルブタマイドのインスリン分泌に及ぼす影響 各値は Mean ± S. D. n = 7
▲はグルコース 300mg/dl 存在下でのトルブタマイド添加群と無添加群間の有意差をあらわしている (P < 0.05)。
★はグルコース 50mg/dl 存在下でのトルブタマイド添加群と無添加群間の有意差をあらわしている (P < 0.01)。

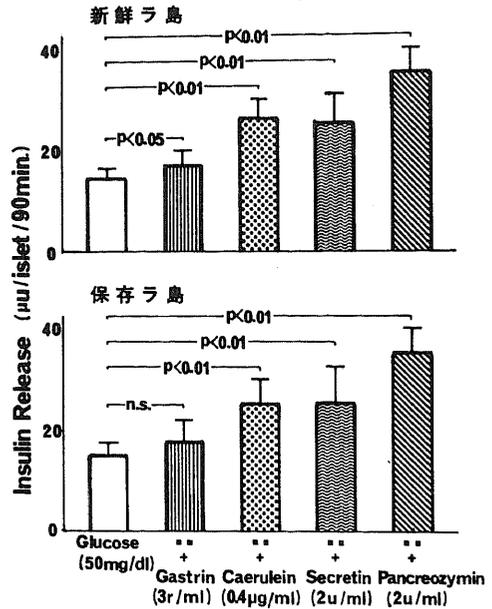


図8 各種消化管ホルモンのインスリン分泌に及ぼす影響 (グルコース 50mg/dl 存在下) 各値は Mean ± S. D. n = 7 Pは各種消化管ホルモン添加群とグルコース単独群間の有意差をあらわしている。

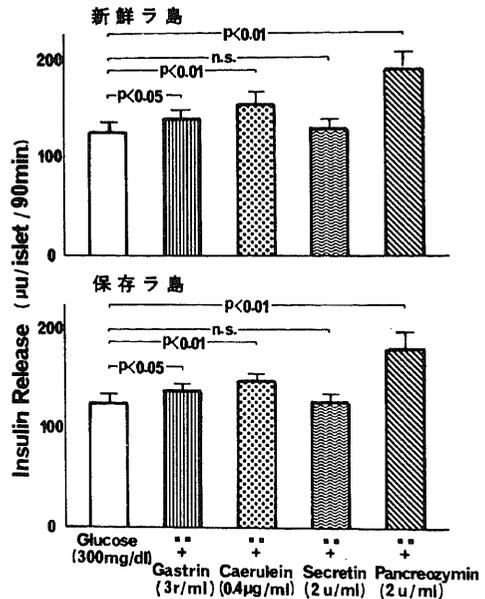


図9 各種消化管ホルモンのインスリン分泌に及ぼす影響 (グルコース 300mg/dl 存在下) 各値は Mean ± S. D. n = 7 Pは各種消化管ホルモン添加群とグルコース単独群間の有意差をあらわしている。

保存ラ島につき検討した。グルコース50mg/dl 存在下(図8)では、新鮮ラ島および保存ラ島とも程度差は認められるが、すべての消化管ホルモン刺激に反応し、インスリン分泌の増加を認めた。またグルコース 300mg/dl 存在下(図9)では、新鮮および保存ラ島ともにパングレオザイミン、ガストリン、セルレイン添加により有意に分泌量の増加を示した。しかしセクレチン添加では新鮮および保存ラ島とも、インスリン分泌量の増加は認められなかった。

III. 小 括

器官培養を応用した方法で、ラット膵ラ島の保存を7日間行ない、保存ラ島の機能を知る目的で、グルコースや各種消化管ホルモン添加時のインスリン分泌能を検討した。その結果、膵ラ島は保存7日間までグルコースによく反応し dose response, time responseとも新鮮ラ島と同様なパターンを示していた。また保存ラ島はグルカゴン、トルブタマイドや各種消化管ホルモン刺激に対し、新鮮ラ島とほぼ同程度のインスリン分泌能を有していた。

〔I〕 保存ランゲルハンス島の門脈内移植

〔I〕での *in vitro* 実験から、保存ラ島は新鮮ラ島と同程度のインスリン分泌能を有していることが明らかとなったが、それではこの保存ラ島が *in vivo* でもその作用を発揮し、実験的糖尿病状態を改善することができるかを検討する目的で、次に3~5日間保存した膵ラ島の門脈内移植を試みた。

1. 実験材料および実験方法

1. 実験動物

体重200~350gのWistar系雄ラットを次の3群に分け実験に供した。

- 1) 正常群 10匹
- 2) 移植群 14匹
- 3) 糖尿群 10匹

各群のラットは metabolic cage に収容され、固形飼料および水道水を *ad libitum* に与えられ、同一条件下で16~20週飼育された。

2. 膵ラ島の分離および保存

〔I〕・I・2および〔I〕・I・3に同じ

3. ストレプトゾトシン糖尿ラットの作製

Wistar系雄ラットに、pH 4.5のクエン酸緩衝液0.01Mを含む生理食塩水にストレプトゾトシン(Upjohn社製)を注射直前に溶解し、65mg/kgを尾静脈より静注し実験的糖尿を作製した。

4. 保存ラ島の門脈内移植

ストレプトゾトシン糖尿(St.糖尿)ラット作製2週間後に、3~5日間保存した膵ラ島の門脈内移植を、木

村¹⁹⁾の方法に従って行なった。すなわち、エーテル麻酔下に約3cmの上正中切開で開腹し、まず大腸および小腸を左側へ移動させると、門脈と上腸間膜静脈が露見される。そこでシリコン処理された1ml容の注射器に保存ラ島250~300コを吸引し0.8mlまでとする。次に23G注射針の先端に彎曲をつくり、門脈本幹に1ml先端を刺入する、そして血液を0.2ml吸引し保存ラ島と血液を混濁させてから、ゆっくりと注入する。注入が終ると注射針を抜き、門脈を軽く綿棒にて数分間圧迫し、止血を確認した後に腸管を元の部位に戻し閉腹した。術後経時的に体重、血糖、尿量および尿糖を測定した。

5. 体重測定

移植群については移植後早期には毎週、また移植後4週以後は2~4週毎に体重測定を行なった。なお正常群および糖尿群は移植群に準じて体重測定を行ない、各群の平均値をもって表わした。

6. 血糖、尿量および尿糖の測定

血糖測定は18時間絶食後、ラットの眼窩静脈叢より採血し、o-toluidine法(グルコーステストワコー)にて測定した。移植群では移植後早期は頻回に、また移植2週以後は2~4週毎に血糖の測定を行なった。また正常群および糖尿群は2~4週毎に血糖の測定を行なった。尿糖測定は1日尿を適当な濃度に蒸留水で稀釈したのち、やはりo-toluidine法にて測定した。

7. ブドウ糖静脈内負荷試験(IV-GTT)

膵ラ島移植後8週の時点で、正常群10匹、移植群5匹および糖尿群5匹にIV-GTTを行なった。方法は5%ブドウ糖溶液を1.5g/kgの割合で尾静脈より静注した。静注前および静注後5, 15, 30, 60, 90分に眼窩静脈叢よりヘマトクリット管にて採血を行ない、血糖や血中Immunoreactive Insulin(IRI)測定に供した。耐糖能はLundbaek²⁰⁾の用いているK値で表現し、血中IRI反応は負荷後5分のinsulinogenic index²¹⁾で表現した。なお採血した血液は、ただちに血漿を分離しインスリン測定日まで-20℃に凍結保存した。またIRIの測定はPhadebas insulin testを用いて行なった。

8. トルブタマイド試験

移植後8週目に正常群5匹、移植群3匹および糖尿群3匹にトルブタマイド試験を行なった。方法は5%Rastinon溶液を60mg/kgの割合で尾静脈より静注し、静注前および静注後15, 30, 60, 90分に採血を行ない、血糖や血中IRIの測定を行なった。なお血糖値の結果は血糖下降率であらわした。

9. グルカゴン試験

移植後8週目に正常群5匹, 移植群3匹および糖尿病群3匹にグルカゴン試験を行なった。方法はグルカゴン 50 μ g/kgの割合で尾静脈より静注し, 静注前および静注後5, 15, 30, 45分に採血を行ない, 血中 IRI 測定に供した。

10. 肝機能検査

1) 血清トランスアミナーゼ (GOT, GPT)

Reitman-Frankel 法²²⁾に従って測定した。

2) アルカリフォスファターゼ (Al-P)

King-King 法²³⁾に従って測定した。

3) チモール混濁試験 (TTT)

Maclagan 法²⁴⁾に従って測定した。

11. 肝の組織学的検索

10%ホルマリン固定後, パラフィン切片を作製し,

Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行ない観察した。

II. 実験結果

保存ラ島を門脈内に移植した後, 4週間を経過した時点で, 空腹時血糖 150mg/dl 以下および尿糖 1g/日以下を移植成功例とした。その結果では移植群14匹中10匹が移植成功例となり, 以下の各種検査はこの10匹を中心に, 正常群10匹および糖尿病群10匹を対照として検索を行なった。

1. 体重の変化 (図10)

移植前には体重減少を認めていた St. 糖尿ラットは, 移植後2週までは手術侵襲のためか軽度の体重減少を示すも, 以後は急激に体重の増加を示し, 移植後6週でストレプトゾトシン静注前の体重に回復し, 以後も同様な割合で体重増加を認めた。移植後8週の時点で3群を比較すると (表1), 正常群463 \pm 36g, 移植群353 \pm 23g および糖尿病群290 \pm 19gであり, 移植群は糖尿病群に比し有意に体重増加を認めた ($P < 0.001$)。

2. 血糖, 尿量および尿糖の変化 (図11, 12)

正常群の空腹時血糖は70~110mg/dlであるが, 糖尿病群では 280~350mg/dlと高血糖を示していた。一方移植群では, 移植前の高血糖は移植後1週で著明に改善され, 血糖は 100 \pm 28mg/dl となり, 移植後2週では 91 \pm 11mg/dl と正常範囲に復していた, そしてその効果を16週まで持続していた。また尿量や尿糖も保存ラ島の移植により著明に改善された, すなわち多尿と高尿糖を持続していた St. 糖尿ラットは, 移植後4週で尿量は18 \pm 3ml/日, 尿糖は 0.6 \pm 0.3g/日と著明に改善されていた, しかしながら尿糖の完全な消失は認められなかった。

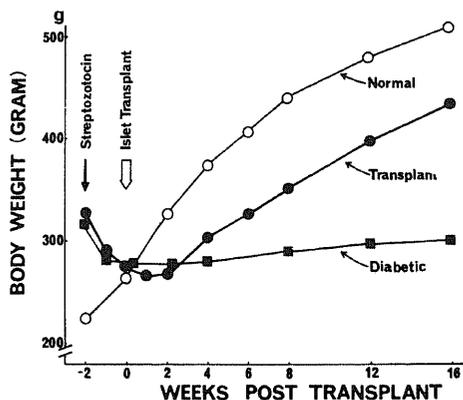


図10 保存ラ島を移植されたラットの体重の変化

表1. 保存ラ島移植後8週の体重, 血糖, 尿量および尿糖
各値は Mean \pm S.D. n = 10

	Rat (8 W.)		
	Normal n = 10	Transplant n = 10	Diabetic n = 10
Body Weight (gram)	463 \pm 36	353 \pm 23*	290 \pm 19
Fasting Blood Glucose (mg/dl)	87 \pm 15	88 \pm 10*	286 \pm 20
Urine Volume (ml/day)	17 \pm 4	18 \pm 3*	57 \pm 20
Urine Glucose (g/day)	0	0.39 \pm 0.17*	4.5 \pm 1.3

* Transplant Vs. Diabetic : $P < 0.001$

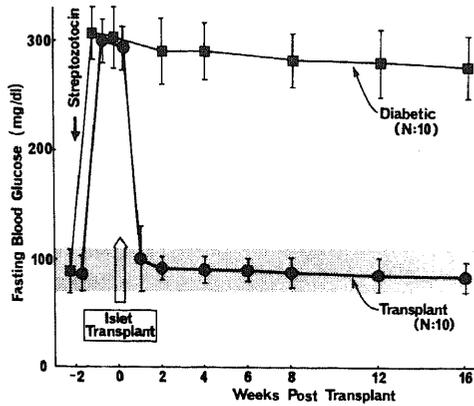


図11 保存ラ島移植後の血糖の経過
各値は Mean ± S. D. n = 10

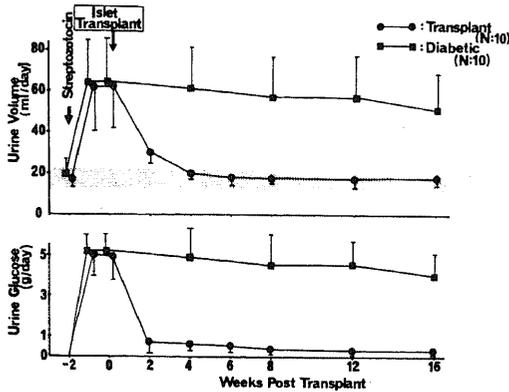


図12 保存ラ島移植後の尿量および尿糖の経過
各値は Mean ± S. D. n = 10

ところで、移植後8週の時点で3群の血糖、尿量および尿糖を比較すると(表1)、移植群は糖尿病群に比し明らかに、血糖や尿量は改善され、正常範囲に復していた。また尿糖も 0.39 ± 0.17 g/日と著明に減少していた。

3. ブドウ糖静脈内負荷試験(図13)

正常群と移植群の空腹時血糖や血中 IRI は、それぞれ 86 ± 10 mg/dl, 18 ± 4 μ l/mlと 91 ± 14 mg/dl, 19 ± 4 μ l/mlであった。糖負荷により血糖および血中 IRI はほぼ対応して変化し、最高値はともに負荷後5分に見られ、正常群では 351 ± 44 mg/dl, 108 ± 15 μ l/mlであり、移植群では 379 ± 43 mg/dl, 62 ± 14 μ l/mlであった。またそれ以後の血糖や血中 IRI は漸減傾向を示していた。一方糖尿病群では、糖負荷による血中 IRI の上昇はほとんど認められなかった。

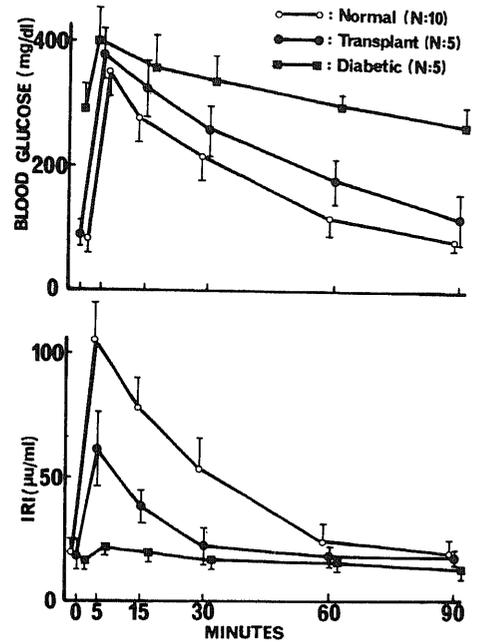


図13 ブドウ糖静脈内負荷試験
各値は Mean ± S. D.

以上3群の耐糖能をLundbaekのK値(図14)で比較すると、正常群 2.16 ± 0.76 , 移植群 1.36 ± 0.21 , 糖尿病群 0.61 ± 0.18 であり、移植群は糖尿病群に比し明らかに高値を示していた($P < 0.01$),しかしながら正常群と同程度までには改善されていなかった。

次に血中 IRI の反応を insulinogenic index (図15)で比較すると、正常群は 0.35 ± 0.08 , 移植群は 0.15 ± 0.05 , 糖尿病群は 0.05 ± 0.01 であり、移植群は糖尿病群に比し有意に高値を示していた($P < 0.01$),しかし正常群よりも低値を示していた。

4. トルブタミド試験(図16)

負荷後30分の血糖下降率は正常群 $37 \pm 3\%$, 移植群 $29 \pm 4\%$ および糖尿病群 $14 \pm 3\%$ であり、移植群は糖尿病群よりも有意に高値を示していた($P < 0.01$).一方血中 IRI 曲線では負荷後15分, 30分で移植群は糖尿病群よりも高値を示しているが, 正常群よりも低値を示す傾向が認められた。

5. グルカゴン試験(図17)

負荷後5分の血中 IRI は正常群 65 ± 11 μ l/ml, 移植群 51 ± 7 μ l/mlであり、移植群は糖尿病群に比し明らかに上昇を認めていた($P < 0.01$),しかしながら正常群よりも低い値を示していた。

6. 肝機能検査

門脈に膵ラ島を注入し、肝臓での生着を期待する本術式は、直接肝臓に影響を及ぼすので、移植後8週まで経時的に肝機能の変動を検索した。その結果、GOT (図18), GPT (図19) はともにストレプトゾトシン静

注3日目頃より上昇を示すが、2週間後にはほぼ正常に復していた。そこで門脈内移植を行なうと、移植後3日、1週では再び軽度の上昇を認めるも、移植後2週で正常範囲に復し、以後は正常値を持続していた。一方TTT (図20) はほとんど正常範囲内での変動であった。他方、Al-p (図20) はストレプトゾトシン投与により上昇を示し、膵ラ島移植により、さらに上昇を認め移植後2週で19.6u.とピークを示すも、以後漸時減少傾向を示し、移植後8週では12.5u.と正常値に近づいていた。

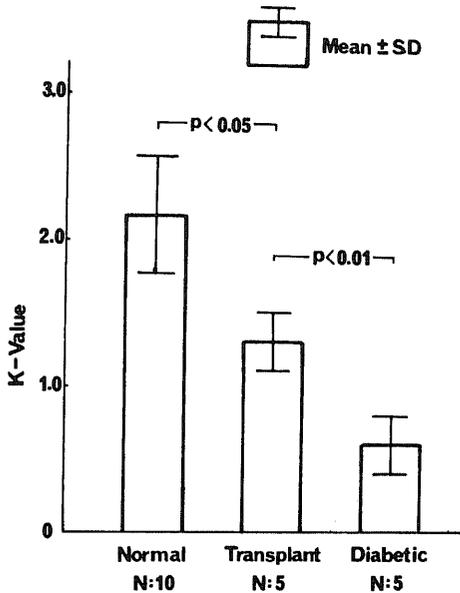


図14 ブドウ糖静脈内負荷時のK値

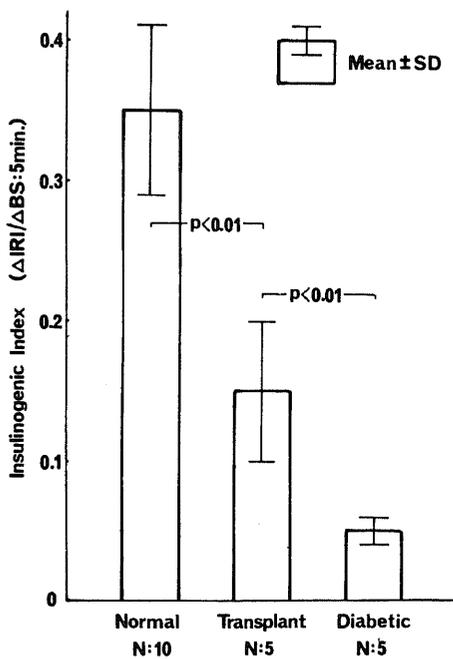


図15 ブドウ糖静脈内負荷後5分の insulinogenic index

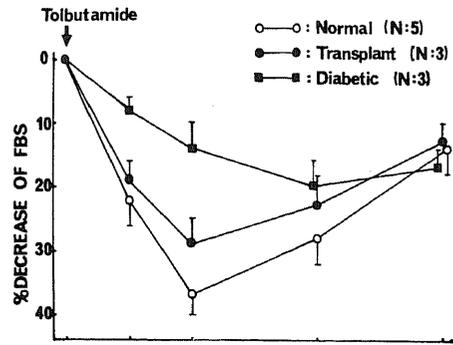


図16 トルブタマイド試験
各値は Mean ± S. D.

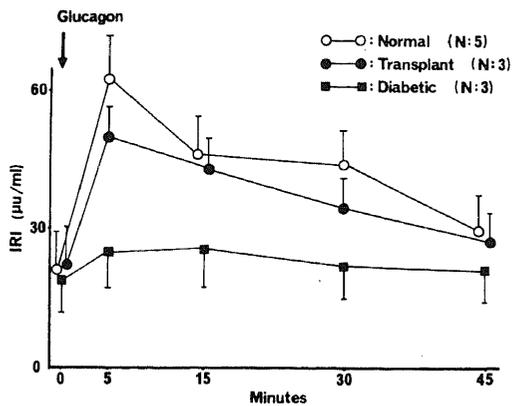


図17 グルカゴン試験
各値は Mean ± S. D.

7. 肝の組織像 (図21)

移植後8週の肝組織像では、移植された膵ラ島はグリソン鞘内の門脈終末枝に沈着し、ラ島細胞もほぼ intact な状態を保ち、多少の細胞浸潤を認めるも十分に機能を発揮しているものと、推測された。また、移植ラ島周辺の肝細胞は正常像を呈し、肝のうっ血や線維化などの所見は認められなかった。

III. 小 括

移植前は高血糖、多尿、高尿糖および体重減少を認めていた St. 糖尿ラットは、保存ラ島移植後ほぼ1週間で、著明にその糖尿病状態は改善され、その効果は16週間持続していた。また IV-GTT では、移植群は負荷後の血糖および血中 IRI はほぼ対応して変化し、最高値は負荷後5分に見られ、以後漸減傾向を示していた。移植群のK値や insulinogenic index は糖尿群よりも高値を示すも、正常群よりも低い値を示していた。他方移植群はトルブタマイドやグルカゴン負荷に対しても良好な IRI の反応性を示していた。これらの事実は、保存ラ島は移植後も十分にその機能を

発揮しているものと推察された、しかしながら 300コ程度のラ島数では、K値や insulinogenic index までも正常と同程度に改善するのは困難と考えられた。

〔III〕 移植ラ島数の耐糖能に及ぼす影響

保存ラ島数250~300コの門脈内移植では、血糖、尿量および尿糖は著明に改善されたが、耐糖能が正常と同程度までに改善されるには至らなかった。そこで、耐糖能の正常化に要するラ島数を知るため、100コ、300コ、600コの新鮮ラ島をそれぞれ St. 糖尿ラットの門脈内に移植し、移植ラ島数の耐糖能に及ぼす影響を検討した。

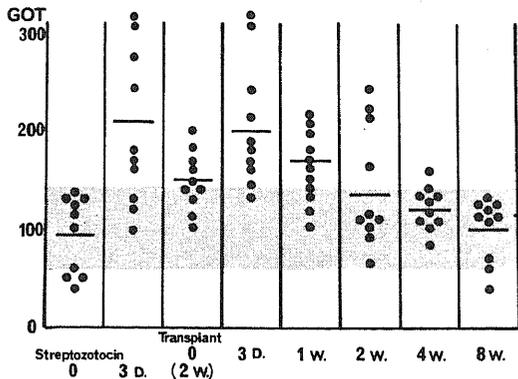


図18 GOTの変化

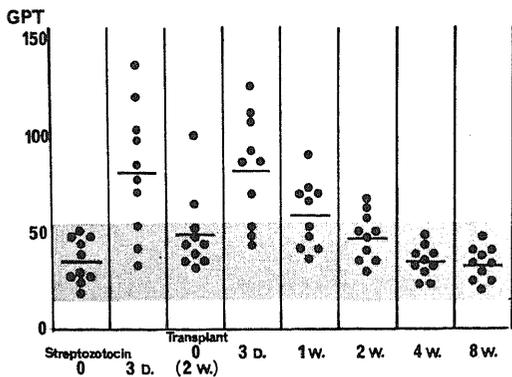


図19 GPTの変化

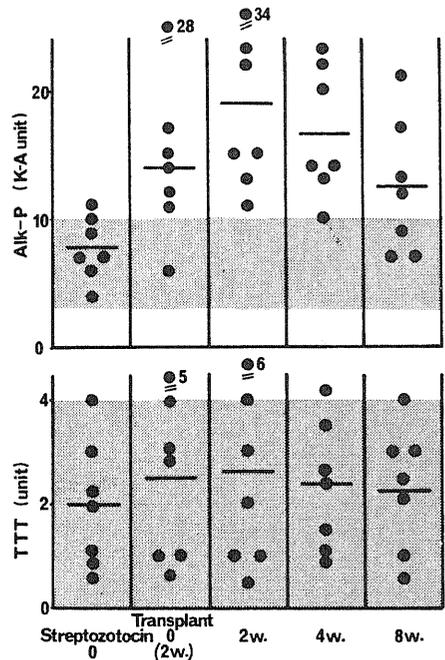


図20 Al-P および TTT の変化

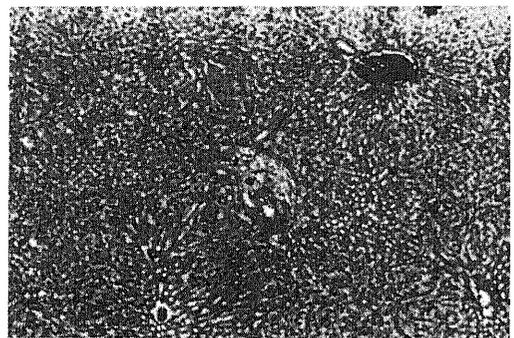


図21 保存ラ島の門脈内移植後8週の肝組織像 (H・E染色, 40倍)

1. 実験材料および実験方法

1. 実験動物

体重200~300 g Wistar 系雄ラットを次の5群に分け実験に供した。

- 1) 正常群 5匹
- 2) 糖尿群 5匹
- 3) 100コ移植群 5匹
- 4) 300コ移植群 5匹
- 5) 600コ移植群 5匹

2. ストレプトゾトシン糖尿ラットの作製

〔II〕・I・3に同じ

3. 膵ラ島の分離および門脈内移植

〔I〕・I・2に準じて分離した新鮮ラ島を各々100コ、300コ、600コづつ〔II〕・I・4に準じて門脈内へ移植した。

4. 血糖および尿糖の測定

〔II〕・I・6に同じ

5. ブドウ糖静脈内負荷試験

新鮮ラ島移植後4週の時点で正常群5匹、糖尿群4匹、100コ移植群4匹、300コ移植群4匹および600コ移植群4匹に〔II〕・I・7に準じてIV-GTTを行

ない、K値および insulinogenic index を求めた。

II. 実験結果

1. 血糖および尿糖の変化 (図22)

300コ移植群および600コ移植群は、ともに移植後1週で著明にその高血糖は改善され、血糖は各々 99 ± 20 mg/dl, 94 ± 23 mg/dl と正常範囲に復していた。また尿糖も著明に改善されいづれも1g/日以下となっていた。一方100コ移植群では、移植前の高血糖は移植後1週で 152 ± 26 mg/dl, 移植後2週で 156 ± 20 mg/dl と改善されているが、それ以後再び増悪傾向を示し、移植後4週では 180 ± 30 mg/dl と高血糖を示していた。また尿糖でも移植後4~6週の時点で3g/日前後の尿糖が認められた。

2. ブドウ糖静脈内負荷試験 (図23, 24)

移植群ではいづれも血糖および血中IRIは、ほぼ対応して変化しており、負荷後5分に最高値を示し、以後漸減傾向を示していた。負荷後5分の血中IRI値では100コ移植群 38 ± 5 μ u/ml, 300コ移植群 60 ± 15 μ u/ml, 600コ移植群 80 ± 11 μ u/ml と移植ラ島数の多い程インスリン分泌量の増加が認められた。とくに600コ移植群では血糖曲線および血中IRI曲線とも正常群と類似のパターンを示していた。

ところで耐糖能を示すK値(図25)は正常群で2.09

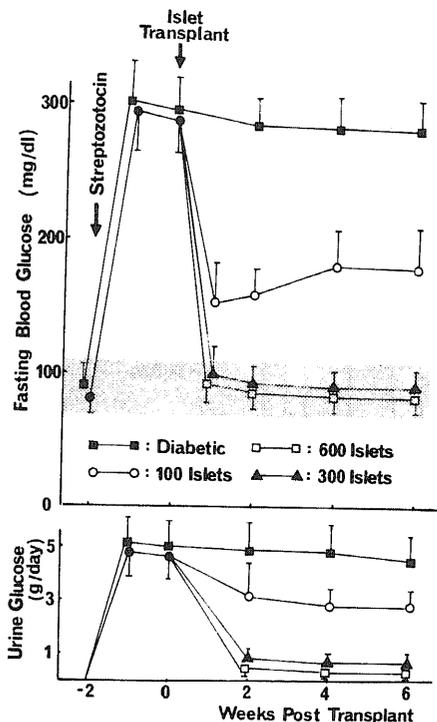


図22 新鮮ラ島移植後の血糖および尿糖の経過
各値は Mean \pm S. D. n = 5

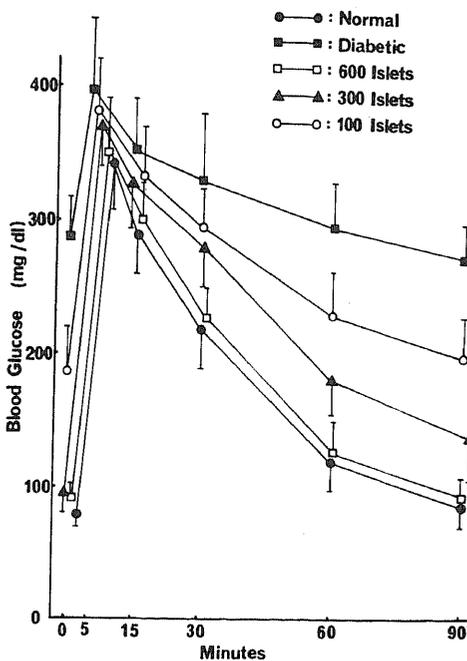


図23 ブドウ糖静脈内負荷試験 (血糖の変化)
各値は Mean \pm S. D. n = 4

±0.45, 糖尿群で 0.62±0.22, 100コ移植群で0.81±0.12, 300コ移植群で1.34±0.24, 600コ移植群で1.75±0.16であり, 移植ラ島数の多い程高値を示していた, とくに 600コ移植群は正常群とほぼ同程度の耐糖能を

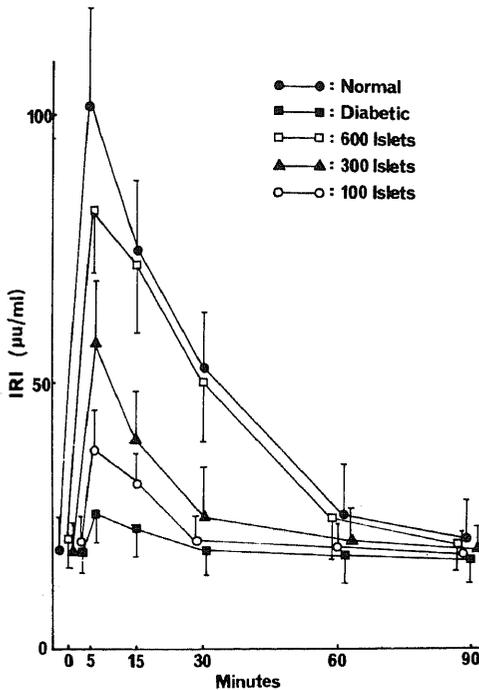


図24 ブドウ糖静脈内負荷試験 (血中 IRI の変化) 各値は Mean ± S. D. n = 4

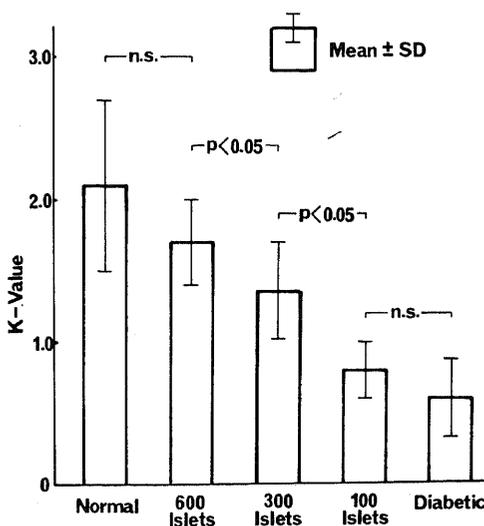


図25 ブドウ糖静脈内負荷時の K 値 各値は Mean ± S. D. n = 4

示していた。

つぎにインスリンの反応を負荷後5分の insulinogenic index (図26) で比較すると, 正常群は0.33±0.07, 糖尿群は0.05±0.007, 100コ移植群は0.07±0.02, 300コ移植群は0.14±0.05, 600コ移植群は0.23±0.05であり, やはり移植ラ島数の多い程 insulinogenic index は正常群に近い値を示していた, しかも 600コ移植群では正常群との間に有意差を認めなかった。

III. 小 括

移植ラ島数が 100コ, 300コ, 600コと増加するに従って, 耐糖能を示す K 値や insulinogenic index は上昇していた。さらに 600コ移植群では血糖曲線や血中 IRI 曲線は正常群と類似のパターンを示し, K 値や, insulinogenic index も正常群との間には有意差は認めなかった。この事実は膵ラ島を門脈内に移植する際に, 耐糖能を正常化するためには, 少なくとも 600コ以上のラ島数が必要であることが明らかとなった。

考 察

糖尿病は coma era から infection era を経て, 現在 angiopathy era にあるといわれている。

すなわち, 1922年 Banting & Best²⁵⁾ によりインスリンが発見されて以来, 糖尿病性昏睡による死亡が激減し, また種々の抗生物質の開発によって感染症に

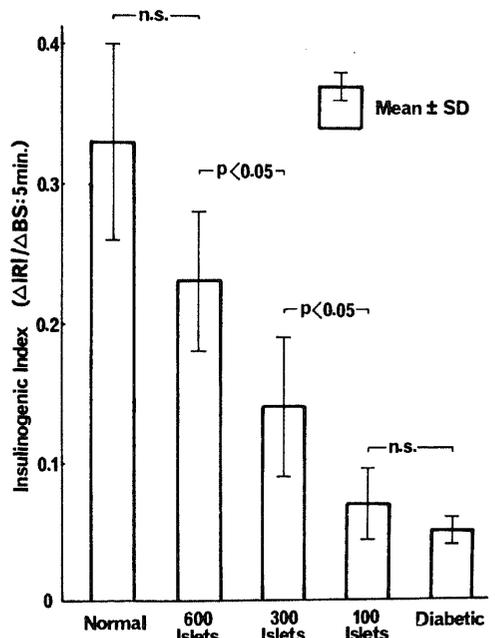


図26 ブドウ糖静脈内負荷後5分の insulinogenic index 各値は Mean ± S. D. n = 4

よる死亡も減少し、糖尿病患者の寿命がのび罹病期間が長くなった現在、細小血管症とくに糖尿病性腎症²⁶⁾や網膜症²⁷⁾の合併は避けがたいものとなり、その予防法や治療法の確立の必要にせまられている。なんとなれば、現在広く行なわれている食事療法、経口剤による薬物療法では、良好にコントロールされた患者でも、細小血管症は完全には阻止しえないからである。この細小血管症の問題について、Mauerら²⁸⁾やWeilら^{29),30)}は膵移植により糖尿病性腎症の進展が防止されることを報告して以来、インスリンの発見により一度は省りみられなくなった膵移植の研究が再び活発に行なわれるようになってきた。一方、近年増加の傾向にある膵癌³¹⁾に対し、その根治性を追求した拡大手術である膵全摘^{32),33)}が、積極的かつ安全に行なえるようになるには、膵全摘後の膵内分泌の脱落を補足する、膵移植の必要性が痛感されている現状である。しかるに現在、膵移植の方法としては血管吻合による膵移植と膵ラ島移植が試みられている。血管吻合による whole organ を用いる膵移植は Lichtenstein ら⁶⁾の報告以来、Bergan ら³⁴⁾、Idezuki ら³⁵⁾、Seddon ら³⁶⁾、Dejode ら³⁷⁾、太田³⁸⁾ら多くの研究者によって創意工夫がなされてきている。すなわち、手技的には膵のみを移植する方法と、膵と十二指腸を同時に移植する方法がある。この whole organ を用いる膵移植における問題点は、膵外分泌組織をいかに処理するかということである。その方法として膵管を結紮して外分泌組織を線維化させてしまう方法と膵内瘻をつくる方法が行なわれてきた。膵管結紮法は Dragstedt³⁹⁾や Idezuki ら³⁵⁾も指適する如く、膵小葉に強い線維化がおり、膵血流が減少し膵ラ島の機能不全を招くことが明らかとなってきた。それ故、その後は膵と十二指腸を一塊として移植し、十二指腸を移植膵の外分泌排出管として利用する方法がとられてきたが、この方法も腸自体が Peyer's patch というリンパ装置を有しているため、拒否反応を受けやすいと報告されている。そこで、最近では移植膵の膵管を直接 recipient の腸管又は尿管と吻合する方法が試みられている。Gledman ら⁴⁰⁾や、Toledo-Pereyra ら⁴¹⁾によれば膵管を尿管へ吻合した場合には、長期にわたる観察でも障害を認めず、尿路系は膵外分泌酵素に対して抵抗性のつよいことが明らかとなってきた。一方、Orloff ら^{42),43)}、野沢ら^{44),45)}は microsurgery の手法を駆使して、純系ラットの膵移植を試みており、移植膵の内分泌機能のみならず、活発な外分泌機能の長期観察をも可能としている。

ところで、臨床的には Kelly ら⁴⁶⁾は1966年12月17日、米国ミネソタ大学において、糖尿病性腎症を合併

した28才女性の若年性糖尿病末期患者に、尿毒症の治療と糖尿病のコントロールの目的で、屍体から得られた膵を腎とともに移植したのが最初である。その方法としては donor の左腎および膵体尾部をそれぞれ、recipient の右腸骨窩および左腸骨窩に移植した。この時 donor の腹腔動脈と門脈を recipient の総腸骨動、静脈にそれぞれに端々吻合し、また膵管は結紮した。術後に免疫抑制と膵外分泌抑制のため azathioprine, prednisolon の投与、⁶⁰Co の照射を行なったところ、術後早期には腎機能の改善は認められなかったが、血糖は徐々に下降し術後6日間はインスリンが不要となり、血糖も 133mg/dl と下降していた。しかしながら術後7日目より再び血糖は上昇ははじめ、インスリンも必要となってきた、そしてこの頃より膵外瘻を形成し腎機能の回復も認められぬまま、移植後60日目に移植膵と移植腎の摘出を余儀なくされたと報告されている。その後1975年1月までに ACS/NIH Organ Transplant Registry^{47),48)}に報告された膵臓移植臨床例は36例に上っている。これらの患者のうち4人は10カ月以上生存し、1人は32カ月も元気に生活している。この事実は移植膵が拒否反応を受けない限り、患者の homeostasis 機構の中に完全に受け込み、正常な機能を発揮し血漿インスリン値、血糖値が正常にコントロールされ、インスリン投与を全く必要としなくなることを示している。以上の如く whole organ を用いる膵移植は手術手技が複雑な上に、膵炎、膵瘻、出血等の術後合併症の発生の危具も見られるので、膵内分泌組織すなわち膵ラ島のみ移植も検討されるようになってきた。

そこで、膵の約2%を占める膵ラ島のできるだけ多数をいかに周囲の組織から分離、採取するかということが問題となってきた。1964年 Hellerström⁴⁹⁾がマウス膵より膵ラ島を機械的に取り出す free hand microdissection 法を考案したが、技術的にかんがひの習熟が必要で、1回に多くのラ島を採取することは不可能であった。ところが1965年 Moskalewski⁹⁾がコラゲナーゼ処理により膵ラ島の分離に成功し、1967年 Lacy-Kastianovsky¹⁰⁾がこれに改良を加えて技術的に容易に膵ラ島が得られるようになった。そこで Balingier-Lacy¹¹⁾はこのようにして得られた400~600コの膵ラ島を、実験的糖尿ラットの腹腔内に同系移植したところ、高血糖を持続していた St. 糖尿ラットは著明にその糖尿状態は改善され、血糖値の下降、尿量および尿糖量の減少を認めた。また対照糖尿群では80%が3カ月以内で死亡したのに対して、移植群では死亡を見なかったと報告している。また Reckardら⁵⁰⁾,

Ziegler ら⁵¹⁾は 600~1200コのアラ島を腹腔内に同系移植したところ、65%に移植後48時間で血糖の正常化、引きつづいて糖尿病に伴う各種症状の消失、すなわち糖尿病状態の改善を認めた。そしてこのような状態は少なくとも移植後30日以上、長いものでは15カ月持続していたと報告している。さらに Panijayanondら⁵²⁾、Leonardら⁵³⁾もアラ島の腹腔内投与にて同様な報告を行なっている。一方、Kempら⁵⁴⁾は正常状態では膵アラ島 β 細胞より分泌されたインスリンは、直接門脈を介して肝細胞に至るところから、分離アラ島を門脈内に注入し肝に移植した場合はより生理的、より効果的と考え、400~600コのアラ島を門脈内に移植した。その結果、腹腔内投与では糖尿病状態の改善の得られないアラ島数で、著明に糖尿病状態の改善が得られたと報告している。

このようにラットにおける膵アラ島の同系移植の研究は、インスリン分泌細胞の移植が可能であるのみならず、移植により著明な糖尿病状態の改善に成功している。しかしながら、これらの報告はいつでも新鮮アラ島を使用した実験であり、膵アラ島移植を、より現実的、より臨床的な方向に発展させるには“donor islet”の確保のためにも保存アラ島移植の方が望ましい。

膵アラ島の保存に関しては現在、組織代謝をできるだけおさえ冬眠状態において保存する低温保存と、組織代謝を正常に保ち保存する培養保存が試みられている。Knightら⁵⁵⁾、Frankelら⁵⁶⁾は分離アラ島を4℃の低温で保存すると、48時間までインスリン分泌を認めるがそれ以上の長期の保存は不可能であると報告している。他方、Moskalewski⁹⁾により始められた培養による保存は、その後本邦でも高木ら⁵⁷⁾、池上⁵⁸⁾、小島ら⁵⁹⁾により追試、検討されており、高木ら⁵⁷⁾は75日間の長期にわたる培養に成功している。そこで長期にわたる保存では、もっぱら培養による保存がルーチン化されてきた。しかしながら、これまでの研究は形態学的観察が主であり、培養により保存された膵アラ島が機能的に、どの程度の反応力を有しているかについては、いまだ十分解明されていない。そこで著者はグルコースのみでなく、グルカゴン、トルブタマイドや各種消化管ホルモン添加時のインスリン分泌につき検討を加えた⁶⁰⁾。その結果、保存アラ島は新鮮アラ島とほぼ同程度のインスリン分泌能を有しており、保存7日目までは膵アラ島は機能的にも正常であることが推測された。

そこで、*in vitro*で正常な機能を営む保存アラ島が*in vivo*でもその作用を発揮し実験的糖尿病の改善を計ることができるかどうかを検討する目的で、ストレプトゾトシン糖尿ラットの門脈内へ250~300コの保存アラ島を移植した。その結果、移植前は高血糖、多尿、高尿

糖および体重減少を認めていたストレプトゾトシン糖尿ラットは、移植後ほぼ1週間で著明にその糖尿病状態は改善され、16週間その効果を持続していた。この事実、保存アラ島は移植後も十分にその機能を発揮し、糖尿病状態の改善に効果を発揮したものと推察された。

ところで、膵アラ島を移植する部位としては筋肉内、腹腔内、皮下などがこれまでえらばれているが、現在では著者らのように門脈より注入し、肝に生着させる方法がもっとも良い成績をあげている。すなわち、肝は血流が豊富であり、特に門脈血は高濃度のグルコース、アミノ酸や各種消化管ホルモンを含んでおり、膵アラ島の生着、生存にきわめて有利である。また分泌されたインスリンは肝をまず通って末梢に至る点では、かなり生理的と思われる。その上、門脈内への移植では他のルートによる移植よりも必要アラ島数を減少できると考えられる。Kempら⁶¹⁾、Reckardら⁶²⁾は腹腔内投与では1200コのアラ島数が必要であるが、門脈内投与では300~600コで目的を達しうると認めている。また著者の保存アラ島移植実験では、250~300コの門脈内移植で著明にその糖尿病状態の改善を認めている、しかしながら耐糖能を示すK値や insulinogenic index は正常と同程度までには改善されず、そのためには実験(III)で明らかな如く、少なくとも600コの膵アラ島数が必要と思われた。ところで、肝内に生着した膵アラ島が本当に機能しているかを検討するため、Zieglerら⁶²⁾は肝右葉に選択的に分離アラ島を移植し、糖尿病の改善を確認したのちに、肝右葉を切除すると高血糖が再発することを認めた。また Charles⁶³⁾は糖尿ラットの肝内にアラ島を移植し、血糖の低下、IRIの上昇、IRGの減少を認めた後に、膵アラ島移植肝を*in vitro*で灌流するとインスリン分泌があり、これがグルコースに反応することを認めている。この事実は膵アラ島の門脈内移植時に見られる糖尿病の改善が、自己アラ島の機能回復によるものではなく、移植したアラ島の機能存続によるものであることが証明されたといえよう。

ところで門脈内へ移植された膵アラ島は、はたしてどのくらいの期間、その機能を維持できるのであろうか。著者の実験では移植後16週までしか経過を追えなかったが、Amamooら^{64),65)}は6カ月間の経過観察の結果を報告している。それによれば、移植後少なくとも6カ月間は対照の糖尿ラットに見られるような、体重減少、下痢、脱毛などの症状は完全に消失し、正常対照と同様な体重増加や、血糖の正常化を認めており、門脈圧、GOT、プロトロンビン時間やビリルビン等の肝機能も正常に維持されていると報告している。また組織学的にも肝に異常は認められず、肝のうつ血、線

維化、血管の閉塞などの所見は認められず、門脈の終末枝にラ島が沈着しているのが認められたが、それによる血流障害はなかったと報告している。

次に Nephropathy の問題であるが、糖尿病ラットに見られる腎病変はヒトのそれに類似しているといわれている、すなわち、組織学的にメサンギウムが肥厚し、その中に免疫グロブリン (IgG, IgM) や補体 (C-3) の沈着が見られると報告されている。Brownら⁶⁶⁾はこのような腎病変を合併している、St. 糖尿ラットの腎を同系の正常ラットへ移植すると、2カ月以内にメサンギウムの IgG, IgM や C-3 は消失し、光顕的にも腎病変の進行停止もしくは、改善が認められると報告している。また、このような腎症を合併している糖尿ラットに臍移植を行なった場合にも同様の結果が得られたと Weilら^{29), 30)}は報告している。一方 Mauerら^{28), 67), 68)}はストプトソトシン注射後6~8カ月経過した糖尿ラットに、同系ラット臍より分離したラ島を腹腔内に移植すると、移植後1~2週より腎病変すなわちメサンギウムの肥厚が減少しはじめ、3~4週から6~9週となるにつれ腎病変の改善は著明となってきた。またメサンギウムに沈着している IgG の量も移植後1~2週で減少しはじめ、3~4週でほとんど消失していた。さらに IgM, C-3 についても同様に1~2週で消失しはじめ6~9週では、ほとんど見られなくなったと報告している。これらの事実、糖尿病性腎症は糖尿状態の改善を計り、正常な代謝状態になれば reversible であることを示している。また本病変が臍ラ島移植によりすみやかに改善されることも明らかとなった。

つぎに、移植学の最も大きな問題である拒否反応は臍ラ島の場合にはどのような反応を示すのであろうか。出月⁶⁹⁾によれば、臍の同種移植を行うと、出血、浮腫、単核球の侵潤、壊死像などの拒否反応を示す組織学的変化は、acinal cell を中心に証明され、ラ島組織は比較的よく保たれているので、ラ島の抗原性はそれ程高くないと予想されていた。しかし、Reckardら^{50), 62), 70)}によると臍ラ島の腹腔内への同種移植、すなわち AgB incompatible の Fischer rat islet を ACI rat に移植すると、すべて3日以内に reject された、しかし AgB compatible の ACI rat islet を DA rat に移植した場合には Median Survival Time (MST) は 8.1 日であったと報告している。また Barker⁷¹⁾, Marquestら⁷²⁾も同様な所見を認めており、臍ラ島に対する拒否反応は予期に反して強いようであり、Major Histocompatibility Locus が存在するようである。しかしながら他臓器の移植と同様に、抗リンパ球血清

(ALS), azathioprine や steroid などの免疫抑制療法は多少の効果があるようである。すなわち Zieglerら⁵¹⁾は AgB incompatible な同種移植に ALS を投与すると MST 8.1日が15日~100日にも延長したと報告されている。ところで、Barkerら⁷³⁾は AgB compatible の DA rat islet を ACI rat に移植する際、門脈内投与では MST は約30.5日と腹腔内投与の MST 11.5日の3倍にも延長していると報告しており、肝に抗原性を低下させる効果があるらしいという興味ある事実を認めている。

一方、Lazarowら⁷⁴⁾は拒否反応の研究に際して動物組織が培養されることにより、抗原性が低下し拒否反応を受けにくいと報告している。実際 Luekerら⁷⁵⁾は CFW mice の卵巣の同種移植に際し、培養群の、MST は90日と非培養群の21日より著明に延長したと報告しており、Jacobsら⁷⁶⁾, Summerlinら⁷⁷⁾, Laffertyら⁷⁸⁾も同様の所見を認めている。しかし一方 Raafら⁷⁹⁾は副甲状腺の移植実験で培養群と非培養群との差は認められなかったと報告している、また Weberら⁸⁰⁾は臍ラ島の培養後の移植には差がないと報告しており、培養組織の免疫機構の解明は今後の重要な研究課題の1つと思われる。

ところで臍ラ島移植を臨床化、実用化するに際しての問題点の1つは、1匹の donor から分離されるラ島数と1匹の recipient に要するラ島数との開きが大きいことである。その解決にはラ島の回収率の向上が必要となってくる。従来 collagenase digestion 法では、使用するコラゲナーゼや臍外分泌腺の含有する蛋白分解酵素のために、overdigestion となり1匹のラットより150~200コのラ島を採取するのが限界であった。そこで Lindallら⁸¹⁾, Scharpら⁸²⁾は Ficoll gradient 法を用いて、Digestion と Filtration を組み合わせた方法を考案してからは、1匹のラット臍から平均 447コのラ島を分離することが可能となってきたと報告している。そこでこの技術を用いて、ブタやサルなどの高等動物の臍ラ島の分離および移植が試みられ、Sutherlandら^{83), 84)}は30~50kgのブタより摘出した臍より、Ficoll gradient 法により臍ラ島を分離し、臍摘糖尿ブタの腹腔内又は筋肉内に投与すると、高血糖は著明に改善され、生存日数も対照の6日から28日に延長したと報告している。また Scharpら⁸⁵⁾は赤毛ザルより Digestion Filtration Chamber を用いて臍ラ島を分離し、これを臍摘糖尿ザルの門脈内に移植したところ、著明にその糖尿病状態は改善され、移植後6週まで生存したと報告している。

以上の如く、臍ラ島の門脈内移植はラ島の生着、生

存および移植後の拒否反応を減弱させることなどの点で、有利であることが示されてきている。さらに今回の著者の実験で明らかのように、膵ラ島の保存および保存ラ島の門脈内移植が可能となるにおよんで、臓器保存と保存臓器の移植の問題も、実験的にはその解決の糸口が見い出されたわけである。

総括ならびに結論

糖尿病に対する新しい治療法として、膵ラ島の保存ならびに保存ラ島移植の可能性を実験的に検討した。すなわち、器官培養を応用した方法でラット膵ラ島の保存を7日間行ない、保存ラ島の機能を知る目的でグルコース、グルカゴン、トルブタマイドや各種消化管ホルモン添加時のインスリン分泌能を検討した。さらに、3～5日間保存した膵ラ島をストレプトゾトシン糖尿ラットの門脈内へ移植し各種検索を行なった、また移植ラ島数の耐糖能に及ぼす影響についても検討を加え、以下の結論を得た。

1. 膵ラ島は保存7日目までグルコースによく反応し、dose response, time response とも新鮮ラ島と同様なパターンを示していた。

2. 保存膵ラ島はグルカゴン、トルブタマイドや各種消化管ホルモン刺激に対し、新鮮ラ島とほぼ同程度のインスリン分泌能を有していた。

3. 3～5日間保存した膵ラ島をストレプトゾトシン糖尿ラットの門脈内に250～300コ移植すると、移植前は高血糖を持続していた St. 糖尿ラットは、移植後ほぼ1週間で著明にその糖尿病状態は改善され、血糖は 100mg/dl 前後に、尿糖は 0.5g/日以下となり、その効果は16週間持続していた。

4. 組織学的検索において、門脈内に投与された保存ラ島はグリソン鞘内の門脈終末枝に着床していることが認められた。

5. 血液生化学的検索において、保存ラ島の門脈内移植は肝臓に対して、機能的にそれ程悪影響を及ぼさないことが判明した。

6. 保存ラ島移植後8週目のブドウ糖静脈内負荷試験では、移植群は糖負荷後の血糖および血中 IRI はほぼ対応して変化し、最高値は負荷後5分に見られ、以後漸減傾向を示していた。また、移植群の耐糖能を示すK値や insulinogenic index は糖尿群よりも明らかに高値を示すも、正常群よりも低値を示していた。

7. トルブタマイドやグルカゴン負荷に対しても、保存ラ島移植群は良好な IRI の反応性を示していた。

8. 100コ、300コ、600コの新鮮ラ島をそれぞれSt. 糖尿ラットの門脈内に移植し、4週後にブドウ糖静脈

内負荷試験を行なったところ、移植ラ島数が 100コ、300コ、600コと増加するに従って、K値や insulinogenic index はより改善されていた。さらに 600コ移植群では血糖曲線や血中 IRI 曲線は正常群と同様なパターンを示し、K値や insulinogenic index も正常群との間に有意差を認めなかった。

以上の実験結果から、分離膵ラ島は保存7日目までは機能的には、新鮮ラ島と同程度のインスリン分泌能を有しており、この保存ラ島は門脈内移植後も十分にその機能を発揮し、糖尿病状態の改善に効力を示したものと推察された。また、門脈内ルートによる移植では耐糖能を正常化するためには、少なくとも 600コ以上のラ島数が必要であることが明らかとなった。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師宮崎逸夫教授に深甚の謝意を表します。また終始、御指導、御教示を頂いた中川原儀三助教授、富山医科薬科大学生化学・岡本宏教授、金沢大学がん研付属病院外科・秋本龍一博士の三先生に心から感謝致します。併せて、本研究遂行に際し御協力いただいた移植グループの諸兄ならびに、第2外科学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 小坂樹徳：総合臨床, 22, 773 (1973).
- 2) 後藤由夫・佐藤信一郎・増田光男：総合臨床, 22, 779 (1973).
- 3) 七里元亮・河盛隆造・鮎谷佳和・繁田幸男・阿部裕：糖尿病, 19 (Supplement), 100 (1976).
- 4) Gayet, R. & Guillaumie, M. M. : C. R. de la Soc. de la Biol., 97, 1613 (1927).
- 5) Houssay, B. A. : C. R. de la Soc. de Biol., 100, 138 (1929).
- 6) Lichtenstein, I. L. & Barschak, R. M. : J. Internat. Coll. Surg., 28, 1 (1957).
- 7) Tersigni, R., Toledo-Pereyra, L. H. & Najarian, J. S. : Surg., 78, 599 (1975).
- 8) De Gruyl, J., Westbrook, D. L., Dijkhuis, C. M., Vriesendorp, H. M., Macdicken, I., Elion-Gerritsen, W., Verschoor, L., Hulsmans, H. A. M. & Hörchner, P. : Transplant. Proc., 5, 755 (1973).
- 9) Moskalewski, S. : Gen. Comp. Endocrinol., 5, 342 (1965).
- 10) Lacy, P. E. & Kastianovsky, M. : Diabetes, 16, 35 (1967).
- 11) Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : Surg., 72, 175 (1972).

- 12) 寺脇朝治・宮武 実・小西陽一・伊藤福太郎・勝井琢男・豊川元邦・中島日出男・木下征夫・小木藤四郎・中島佐一：移植, 3, 391 (1968).
- 13) 岡崎 肇・堤 栄昭・後藤勝也・佐々木崇・葛西森夫：日本移植学会雑誌, 10 (総会臨時号-II), 82 (1975).
- 14) 増田富士男・佐藤 勝・斉藤賢一・管谷公平・千野一郎：移植, 10, 92 (1975).
- 15) Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H. & Takeda, R. : FEBS Letters, 54, 103 (1975).
- 16) 秋本龍一・中川原儀三・木村捷一・山崎軍治・杉井 衛・小島靖彦・大野 進・水上哲秀・宮崎逸夫：移植, 10, 185 (1975).
- 17) 井出健彦：臨床成人病, 2, 209 (1972).
- 18) 森下寿々枝・黒田耕平・市原紀久雄・垂井清一郎・島 健二：最新医学, 27, 1037 (1972).
- 19) 木村捷一・中川原儀三・杉井 衛・山崎軍治・小島靖彦・大野 進・宮崎逸夫・秋本龍一：移植, 10, 212 (1975).
- 20) Lundbaek, K. : Brit. Med. J., 1, 1507 (1962).
- 21) 松浦靖彦・本吉光隆・山田治男・清水紀博・安沢龍徳・池田義男・種瀬富男・阿部正和：糖尿病, 16, 113 (1973).
- 22) Reitman, S. & Frankel, S. : Amer. J. Clin. Path., 28, 56 (1957).
- 23) King, P. R. & King, E. J. : J. Clin. Path., 7, 332 (1954).
- 24) Maclagan, N. F. : Brit. J. Exp. Path., 25, 234 (1944).
- 25) Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R. & Fletcher, A. A. : Canad. Med. Ass. J., 12, 141 (1922).
- 26) 広瀬賢次：糖尿病のすべて, 356頁, 東京, 南江堂, 1971.
- 27) 小坂樹徳：綜合臨床, 22, 818 (1973).
- 28) Mauer, S. M., Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Leonard, R. J., Najarian, J. S., Michael, A. F. & Brown, D. M. : Diabetes, 23, 748 (1974).
- 29) Weil, R., Nozawa, M., Koss, M., Weber, C., Reemtsma, K. & McIntosh, R. : Surg. Forum, 25, 386 (1974).
- 30) Weil, R., Nozawa, M., Koss, M., Weber, C., Reemtsma, K. & McIntosh, R. : Surg., 78, 142 (1975).
- 31) 木庄一夫・中瀬 明・内田耕太郎：日本癌治療学会誌, 10, 82 (1975).
- 32) 中瀬 明：日消外会誌, 8, 457 (1975).
- 33) 松本由朗・小野博通・山本剛史・中瀬 明・永松良夫・本庄一夫：日本消化器病学会誌, 73, 143 (1976).
- 34) Bergan, J. J., Hoehn, J. G., Dorter, N. & Dry, L. : Arch. Surg., 90, 521 (1965).
- 35) Idezuki, Y., Feemster, J. A., Dietzman, R. H. & Lillehei, R. C. : Surg. Gynec. Obstet., 114, 553 (1962).
- 36) Seddon, J. A. & Howard, J. M. : Surg., 59, 226 (1966).
- 37) DeJode, L. R. & Howard, J. M. : Surg. Gynec. Obstet., 114, 553 (1962).
- 38) 太田和夫：移植, 1, 56 (1966).
- 39) Dragstedt, L. R. : Ann. Surg., 118, 576 (1943).
- 40) Gliedman, M. L., Rifkin, H., Ross, H., Soberman, R., Zarday, Z., Tellis, V., Freed, S. & Veith, F. J. : Diabetes, 22 (Supplement 1), 295 (1975).
- 41) Toledo-Pereyra, L. H., Castellanos, J., Lampe, E. W., Lillehei, R. C. & Najarian, J. S. : Ann. Surg., 182, 567 (1975).
- 42) Orloff, M. J., Lee, S., Charters, A. C., Grambort, D. E., Storck, G. & Knox, D. : Ann. Surg., 182, 198 (1975).
- 43) Charters, A. C., Lee, S., Storck, G., Chandler, J. G. & Orloff, M. J. : Am. J. Surg., 129, 16 (1975).
- 44) 野沢真澄：移植, 9, 150 (1974).
- 45) Nozawa, M., Weil, R., McIntosh, R. & Reemtsma, K. : Transplantation, 17, 137 (1973).
- 46) Kelly, W. D., Lillehei, R. C., Merkel, F. K., Idezuki, Y. & Goetz, F. G. : Surg., 61, 827 (1967).
- 47) Bergan, J. J. : Bull. Am. Coll. Surg., 60, 24 (1975).
- 48) ACS/NIH Organ Transplant Registry : J. A. M. A., 226, 1211 (1973).
- 49) Hellerström, C. : Acta Endocrinol., 45, 122 (1964).
- 50) Reckard, C. R., Ziegler, M. M. & Barker,

- C. F. : Surg., 74, 91 (1973).
- 51) Ziegler, M. M., Reckard, C. R. & Barker, C. F. : J. Surg. Res., 16, 575 (1974).
- 52) Panijayanond, P. & Monaco, A. P. : Surg. Forum, 25, 379 (1974).
- 53) Leonard, R. J., Lazarow, A. & Hegre, O. D. : Diabetes, 22, 413 (1973).
- 54) Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Lacy, P. E. & Ballinger, W. F. : Nature, 244, 447 (1973).
- 55) Knight, M. J., Scharp, D. W., Kemp, C. B., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : Cryobiology, 10, 89 (1973).
- 56) Frankel, B. J., Gylfe, E., Hellman, B. & Idahl, L. : J. Clin. Invest., 57, 47 (1976).
- 57) 高木良三郎・小野順子・池上 隆・福岡道雄 : 医学のあゆみ, 89, 695 (1974).
- 58) 池上 隆 : 福岡医誌, 65, 259 (1974).
- 59) 小島靖彦・中川原儀三・大野 進・山崎軍治・木村捷一・水上哲秀・秋本龍一・宮崎逸夫 : 移植, 10, 175 (1975).
- 60) 山崎軍治・中川原儀三・岡本 宏・秋本龍一・木村捷一・小島靖彦・大野 進・宮崎逸夫 : 移植, 11, 87 (1976).
- 61) Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : Diabetologia, 9, 486 (1973).
- 62) Reckard, C. R., Ziegler, M. M., Naji, A., Galbut, D. & Barker, C. E. : Surg. Forum, 25, 374 (1974).
- 63) Charles, M. A., Imagawa, W., Forsham, P. H. & Grodsky, G. M. : Endocrinology, 98, 738 (1976).
- 64) Amamoo, D. G., Wood, J. E. & Donovan, J. L. : Mayo Clin. Proc., 49, 289 (1974).
- 65) Amamoo, D. G., Wood, J. E. & Holley, K. E. : Mayo Clin. Proc., 50, 416 (1975).
- 66) Brown, D. M., Lee, C. S., Sutherland, D. E. R., Michael, A. F. & Mauer, S. M. : Transplant. Proc., 7, 751 (1975).
- 67) Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Mauer, S. M. & Najarian, J. S. : Surg. Forum, 25, 309 (1974).
- 68) Mauer, S. M., Steffes, M. W., Sutherland, D. E. R., Najarian, J. S., Michael, A. F. & Brown, D. M. : Diabetes, 24, 280 (1975).
- 69) 出月康夫 : 臨床科学, 9, 976 (1973).
- 70) Reckard, C. R. & Barker, C. F. : Transplant. Proc., 5, 761 (1973).
- 71) Barker, C. F. : Diabetes, 24, 766 (1975).
- 72) Marquest, R. L. & Heystek, G. A. : Transplantation, 20, 428 (1975).
- 73) Barker, C. F., Reckard, C. R., Ziegler, M. M. & Naji, A. : Diabetes, 24 (Supplement 2), 418 (1975).
- 74) Lazarow, A., Wells, L. J., Carpenter, A. M., Hegre, O. D., Leonard, R. J. & McEvoy, R. C. : Diabetes, 22, 877 (1973).
- 75) Lueker, D. C. & Sharpton, T. R. : Transplantation, 18, 457 (1974).
- 76) Jacobs, B. B. & Huseby, R. A. : Transplantation, 5, 410 (1967).
- 77) Summerlin, W. T., Brouthar, C., Foanes, R. B., Payne, R., Stutman, O., Hayflick, L. & Good, R. A. : Transplant. Proc., 5, 707 (1973).
- 78) Lafferty, K. J., Cooley, M. A., Woolnogh, J. & Walker, K. Z. : Science, 188, 259 (1975).
- 79) Raaf, J. H., Farr, H. W., Myers, W. P. L. & Good, R. A. : Am. J. Surg., 128, 478 (1974).
- 80) Weber, C., Weil, R., McIntosh, R. & Reemtsma, K. : Transplantation, 19, 442 (1975).
- 81) Lindall, A., Steffes, M. & Sorensen, R. : Endocrinology, 85, 218 (1969).
- 82) Scharp, D. W., Kemp, C. B., Knight, M. J., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : Transplantation, 16, 686 (1973).
- 83) Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Bauer, G. E., McManus, D., Noe, B. D. & Najarian, J. S. : J. Surg. Res., 16, 102 (1974).
- 84) Lampe, E. W., Sutherland, D. E. R. & Najarian, J. S. : Surg., 79, 138 (1976).
- 85) Scharp, D. W., Murphy, J. J., Newton, W. T., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : Surg., 77, 110 (1975).

Abstract

Transplantation of isolated islets of *Langerhans* may become a feasible treatment of diabetes mellitus. Implantation of isolated islets is surgically much simpler and less hazardous than that of whole pancreas. *In vitro* preservation of intact islets is of great importance to allow accumulation of enough islet material for transplantation. In this paper, isolated pancreatic islets of Wistar rats were preserved *in vitro* and biochemical and physiological properties of the islets were investigated. We have also studied the possibility of transplantation of preserved islets into the portal vein system in order to improve the experimental diabetic state.

The results thus obtained were as follows :

1. Glucose stimulated insulin release of the islet was best maintained by preservation in tissue culture medium with a high concentration of glucose at 37°C for 7 days.

2. Various stimulators of insulin release, such as glucagon, tolbutamide and gastro-intestinal polypeptides, enhanced insulin release of preserved islets as well as that of fresh islets.

3. The transplantation of approximately 250 to 300 preserved islets into the portal vein of streptozotocin induced diabetic rats resulted in a significant reduction of hyperglycemia, polyuria and glucosuria and a restoration of weight gain. These effects were maintained for 16 weeks.

4. Microscopic examination and hepatic function studies indicated that transplanted islets were lodged in the portal venules and did not interfere with the hepatic function.

5. From the results of intravenous glucose tolerance tests, K-value and insulinogenic index of the transplanted rats were found to be significantly higher than those of untreated diabetic rats, but not restored to the normal values.

6. Plasma IRI levels of the transplanted rats were also elevated after a load of glucagon and tolbutamide.

7. In order to examine the number of islets sufficient to ameliorate the diabetic state, 100, 300 or 600 islets isolated from normal rats were transplanted into the portal system of diabetic rats. Glucose tolerance was normal in rats receiving 600 islets, near normal in those receiving 300 islets and subnormal in those receiving 100 islets.

These results indicated that physiological function of pancreatic islets was maintained in tissue culture medium for 7 days and that the transplantation of preserved islets into the portal vein system ameliorated the diabetic state induced by streptozotocin. In order to improve completely K-value and insulinogenic index, at least 600 islets should be transplanted to a diabetic rat. Further support is thus provided for its possible application to the treatment of human diabetes.