

Studies on Xenotransplantation of Pancreatic Islets of Langerhans

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/2297/7765

膵ランゲルハンス氏島の異種移植に関する研究 特に diffusion chamber を用いた 膵島移植について

金沢大学医学部第二外科学教室 (主任: 宮崎逸夫教授)

福井医科大学第一外科学教室 (主任: 中川原儀三教授)

野 手 雅 幸

(昭和60年1月16日受付)

ポリカーボネート製のメンブランフィルターを利用した diffusion chamber に、ゴールデンハムスターのランゲルハンス氏島 (ラ氏島) を封入 (islet chamber) し、ストレプトゾトシン糖尿病ラットに対する異種移植の研究を行った。予備実験で、材質の異なる6種類のフィルターを比較したが、グルコースやインスリンの chamber 内外への透過性に著明な差はみられなかった。1,500個のハムスター・ラ氏島を封入した islet chamber を腹腔内に移植した場合、移植後1週間は血中インスリン値が有意に上昇したが、血糖値には変化がなかった。しかし、封入ラ氏島数を6,000個にすると、5匹の糖尿病ラットのうち2匹が約10日間の間、血中インスリン値の上昇、血糖値の低下、尿糖値の低下など著明な改善を示した。一方、ラ氏島を直接異種移植した場合は、移植後2~3日間のわずかな改善を除いて、糖尿病状態に対し著明な改善効果はみられなかった。糖尿病ラットに移植された diffusion chamber 内のラ氏島の組織学的検索では、免疫担当細胞の浸潤はみられなかったが栄養素のフィルター不透過に起因すると思われるラ氏島の変性が認められた。しかし、diffusion chamber を用いずに直接異種移植をした場合には、より著明な免疫拒絶反応とラ氏島の破壊がみられた。diffusion chamber の使用による免疫反応回避効果を評価するために、直接細胞障害試験を用いて被移植ラットの抗ハムスター抗体を測定した。ラ氏島を門脈内または腹腔内に直接移植した糖尿病ラットでは抗体価は2~5日以内に上昇し始めたが、diffusion chamber (islet chamber) を用いた場合には、2週間の間、抗体価の上昇をきたさなかった。以上の結果より、diffusion chamber 内に封入されたラ氏島の異種移植は膵移植研究のうえで有用な方法であり、diffusion chamber が異種組織に対する免疫拒絶反応に対して回避効果を有することが示唆された。

Key words islet chamber, diffusion chamber, xenotransplantation of islets, immunosuppression, direct cytotoxic test

1922年 Banting ら¹⁾によるインスリンの発見は、糖尿病患者の予後を著しく改善したことは周知の事実である。しかし現在一般に行なわれているインスリンの投与方法では、とくに血糖値の変動が不安定な若年型糖尿病患者に対しては適切な血糖値のコントロールが得られ難く、長年インスリン治療が行なわれている糖尿病患者においても、徐々に進行する細小血管症を完全には防止することができない。さらに近年の外科手

術の進歩に伴って膵癌や慢性膵炎に対して、しばしば膵全摘術が施行されるようになり、フィードバック制御による血糖管理はますます必要となっている。

このような問題を解決するうえで膵移植は有用な一つの手段であることから、近年、膵ランゲルハンス氏島 (ラ氏島) 移植の研究が進められてきている²⁾⁻⁶⁾。ところで膵移植は、血管吻合を必要とする膵臓器移植と血管吻合を行わず膵組織片あるいは膵ラ氏島のみを

Abbreviations: B.W., body weight; Cha., chamber; D.Cha., diffusion chamber; D.C.T., direct cytotoxic test; D.M.E.M., Dulbecco modified Eagle's medium; E.Cha., empty chamber; H.E., hematoxylin-eosin; I.Cha., islet chamber; K.R.B., Krebs-Ringer-bicarbo-

移植する方法とに大別することができる。従来分離ラ氏島移植は血管吻合を行なう臓器移植に比し拒絶反応が起こりにくいとされていたが、Reckardら⁷⁾、大北ら⁹⁾の報告にみられるようにラ氏島自身にも強い抗原性を有することが明らかにされ、自家あるいは同系移植以外では拒絶反応の出現は深刻な問題となってきた。

そこで本研究では、フィルター膜(membrane filter, Mb.F.)を使用したdiffusion chamber (D.Ch.)を作製し、その内部にゴールドンハムスターより分離したラ氏島を封入してislet chamber (I.Ch.)とし、ストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラットの腹腔内に異種移植を行なった。これによる糖尿病状態の改善および拒絶反応の発現の有無について、主として免疫反応回避効果の面から検討した。

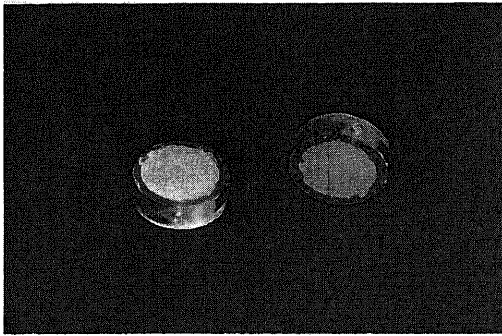


Fig. 1. Photograph of diffusion chamber. The chamber is made of membrane filters (Bio-Rad) with a pore size of $0.45 \mu\text{m}$, attached to both sides of polycarbonate rings using MF[®] cement. The polycarbonate ring has a hole to allow an injection of the islets into the diffusion chamber.

材料および方法

I. D.Ch.の作製

D.Ch.の外殻はポリカーボネートを切断し利用した。すなわち、外径 18 mm, 内径 14 mm のポリカーボネートチューブを幅 7 mm に切断し、その外周の一部にラ氏島を封入するため直径約 2 mm の小孔をもうけた。その後ポリカーボネートチューブの両面に MF[®] cement (Millipore Corporation, Bedford) で Mb.F.を接着し、D.Ch.を作製した(図 1)。

使用した Mb.F.は 6 種類で、その孔径は 0.22, 0.45, (ただしポリカーボネート製は $0.40 \mu\text{m}$), $1.2 \mu\text{m}$ の 3 種である。材質は 5 種類までが人工セルロース膜よりなり、他の 1 種類はポリカーボネート製である。ポリカーボネートで作製された Mb.F.は、他の人工セルロースのものより薄く ($10 \mu\text{m}$)、孔の形態は monopore である(表 1)。

II. グルコースおよびインスリンの Mb. F.透過性の検索

1. ラ氏島分離法

ラ氏島は、体重 (Body weight, B.W.) 200~300 g のウイスター系雄ラットより Lacy ら¹⁰⁾の方法に準じて採取した。すなわち、総胆管の十二指腸開口部を結紮し、肝管合流部より 21~23 G の翼状針を刺入してハンクス (Hanks) 液 20 ml により膵を膨化後、摘出した。摘出した膵は眼科用剪刀にて細切後、脂肪等の浮遊細片を除去して 50 ml 容の三角フラスコに入れた。ついでハンクス液で 8 mg/dl 濃度としたコラゲナーゼ (collagenase, Millipore Corporation, Class IV) 溶液を 5 ml 加え、37°C の水浴槽で 10~15 分間振とう ($150\sim 200$ 回/分)、泥状となった時点でインキュベーションを中止した。消化された膵を円錐形メスシリン

Table 1. Physical properties of membrane filter

Membrane source (catalogue no.)	Chemical composition	Pore size (μm)	Filter thickness (μm)
Fuji (FM-22)	Cellulose acetate	0.22	135
Fuji (FM-45)	Cellulose acetate	0.45	135
Fuji (FM-120)	Cellulose acetate	1.20	140
Sartorius (SM 11306)	Cellulose nitrate	0.45	130
Sartorius (SM 11303)	Cellulose nitrate	1.20	140
Bio-Rad (313-0059)	Polycarbonate	0.40	10

nate; Mb.F., membrane filter; P.A.P., peroxidase anti-peroxidase; S.T.I., short time incubation; STZ, streptozotocin.

ダーに移し、30 ml の温および冷ハックス液にて各々4回の洗浄をくり返した。

洗浄後得られた沈殿をダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's, D.M.E.M.) を入れたシャーレ内に移し、実体顕微鏡下でラ氏島をキャピラリーピペットを用いて採取した。

2. 分離ラ氏島の D.Cha. 内封入法

採取したラ氏島は、0.2% 牛血清アルブミン (Abmour pharmaceutical Corporation, Chicago, U.S.A.), 5 mM グルタミン酸, 5 mM ピルビン酸, 5 mM フマル酸を添加したグルコースを含まないクレブスリンガー重炭酸 (Krebs-Ringer bicarbonate, K. R. B.) 緩衝液 1 ml 中に 2 個浮遊させ、D.Cha. の小孔より注入した。小孔は注入後、超高速遠心機用チューブ (Beckman®, ultracentrifuge tube) を 5 mm × 5 mm に切断したもので密封し I.Cha. とした。

3. short time incubation (S.T.I.) によるグルコースおよびインスリンの D.Cha. 透過性の検討

I.Cha. 移植効果発現の条件としてまず D.Cha. 内に封入されたラ氏島が正常にその内分泌機能を発揮し、さらに分泌されたインスリンが D.Cha. 外へ拡散することが必要となる。そこでこれらの検索のために、グルコースの D.Cha. 内への、あるいはインスリンの D.Cha. 外への透過性を S.T.I. により検討した。すなわちグルコース 100 mg/dl または 400 mg/dl 濃度の K.R. B. 液 10 ml を入れた試料瓶中に、2 個のラ氏島を容した I.Cha. を浸漬し、37°C 温浴中にて 90 回/分で 90 分間振とうした。

インキュベーション終了後、I.Cha. 内外のグルコース濃度およびインスリン濃度を測定した。グルコース濃度 (mg/dl) はグルコースオキシダーゼ法¹¹⁾にて、インスリン濃度 (μ U/ml) は固相法¹²⁾ (Phadebas insulin test, 塩野義製薬社製) により測定した。

グルコースの D.Cha. 内への移行度は、インキュベーション後の D.Cha. 内グルコース濃度を g_1 、D.Cha. 外グルコース濃度を g_2 とし、内外における濃度比 g_1/g_2 で算出した。インスリンの拡散率は、D.Cha. 内外のインスリン量をそれぞれ i_1 、 i_2 とし $i_2/i_1 + i_2$ の式で求めた。

III. ハムスター・ラ氏島の糖尿病ラットへの異種移植

1. 実験動物

donor ラ氏島は、8~10 週令の体重 100 g 前後の雄ゴールデンハムスターの膀胱より分離し、recipient には体重 300 g 前後のウイスター系雄ラットを用いた。ラ氏島分離は無菌的に前述のコラゲナーゼ消化法に準じて行った。

2. STZ 糖尿病ラットの作成

糖尿病ラットはウイスター系雄ラットの尾静脈より STZ 50~65 mg/kg を静注して作成した。recipient には、空腹時血糖が 400~500 mg/dl となったものを使用した。

3. 門脈内および腹腔内直接移植群

異種であるゴールデンハムスターとウイスターラット間の移植では拒絶反応の発現が予想されるので、ラ氏島を門脈内および腹腔内に直接移植したものを、I. Cha. 移植の対照群とした。

1) 門脈内移植

門脈内移植は、糖尿病ラットをエーテル麻酔下で開腹し、1 ml の D.M.E.M. に浮遊させた 1500 個のゴールデンハムスター・ラ氏島を、23 G 注射針で露出した門脈内に注入することにより行なった。

2) 腹腔内直接移植

腹腔内移植では、糖尿病ラットをエーテル麻酔後開腹し、D.M.E.M. 1 ml に浮遊した 1500 個のゴールデンハムスター・ラ氏島を腹腔内に直接注入散布して行なった。

4. I.Cha. の腹腔内移植群

1) D.Cha. および D.Cha. 内培地の滅菌法

D.Cha. は 10% エチレンオキシドガスで 5 時間滅菌したものを使用した。Mb.F. は S.T.I. によるグルコースおよびインスリンの透過性の成績などから、ポリカーボネート製の Mb.F. (Bio-Rad 社製、孔径 0.4 μ m) を使用した。培地は D.M.E.M. に 0.2% 牛血清アルブミン、ペニシリン G 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml を添加したものをミリポアフィルターで濾過滅菌して使用した。

2) 封入ラ氏島数

D.Cha. 内に封入したラ氏島数は 1,500 個および 6,000 個の 2 群とし、6,000 個移植群は 3,000 個づつ 2 個の I.Cha. に分けて移植した。対照としてラ氏島を含まず培地のみを入れた D.Cha. を作製し、empty chamber (E.Cha.) 移植群とした。

3) I.Cha. の移植方法

それぞれの I.Cha. はエーテル麻酔下の糖尿病ラットの腹腔内に静置した。なお抗生剤の投与は行なわなかった。

5. 移植後の測定項目

移植ラットは、術後 1 週間は代謝ケージ内で飼育した。体重、尿量、尿糖を、移植当日、および移植後 1, 3, 5, 7, 10, 14 日目に測定した。血糖値および血中インスリン値は、8 時間の絶食後ラット尾を切断することにより採血して測定した。

血糖値はグルコースオキシダーゼ法¹¹⁾、血中インス

リン値は固相法¹²⁾により測定した。尿糖は体重 100 g あたりの 24 時間尿中排泄量 (g/day/100 gB.W.) で表示した。

6. 移植ラ氏島の病理組織学的検討

移植したラ氏島の組織学的検索を、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色法および、ペルオキシダーゼ・アンチペルオキシダーゼ複合物 (P.A.P.) を利用したインスリン酵素抗体法¹³⁾を用いて行なった。

検索対照は、門脈内移植群における肝、および I.Ch. 腹腔内移植群における D.Ch. 内組織で、いずれも移植後 7~10 日目のもを用いた。門脈内移植群では摘出した肝を中性緩衝ホルマリンで固定後、幅約 5 mm のスライスにし、その各々をパラフィンにて包埋して、各ブロックの同部位から 2 枚づつ 10 種類の切片を作製した。得られた切片の H.E. 染色を行ない、ラ氏島を認めるものみに P.A.P. 法によるインスリン酵素抗体法を施行した。I.Ch. 腹腔内移植群では、ラ氏島塊の付着しているフィルター面をフィルターとともに摘出し中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後 1 ブロックにつき同部位より 2 枚づつ、10~15 種の計 20~30 枚の切片を作製して、それぞれに H.E. 染色およびインスリン酵素抗体法を行なった。

IV. 直接細胞障害試験 (Direct cytotoxic test, D. C.T.) による抗ハムスター組織抗体の測定

1. 細胞浮遊液の調製

被検細胞はゴールデンハムスター胸腺より調製した。すなわち、ハムスターをエーテルにて麻酔後胸腺を傷つけないように摘出し、0°C の低温培地内に入れて先細の鋸子でほぐすように細分した。培地には、56°C30 分で非働化した牛胎児血清 (Gibco Labo, Cat # 200-6140) を 6% 濃度に添加した D.M.E.M. を使用した。細胞浮遊液は、位相差顕微鏡下でタイ好酸球計算板 (Tatai eosinophil counter, カヤガキ医理工工業製) により 3.2×10^6 個/ml に調製し、細胞死亡率が 10% 以下のものを使用した。

2. 抗血清の調製

抗血清は 56°C の温浴中で 30 分間加温し非働化したものを用いた。門脈内ハムスター・ラ氏島移植後 14 日目の血清を D.M.E.M. により倍々希釈し、そのそれぞれに障害性を検したところ 1/4 希釈が他のどの希釈倍数よりも高い障害性を示したので、1/4 希釈を血清の希釈濃度とした。

3. 補体の調製

補体はモルモット補体 (Miles 社製) を使用した。補体は抗血清を含まない試料で細胞障害性を検することにより補体自身のもつ障害性のないことを確認後、抗血清の場合と同様に至適希釈濃度を 1/4 とした。

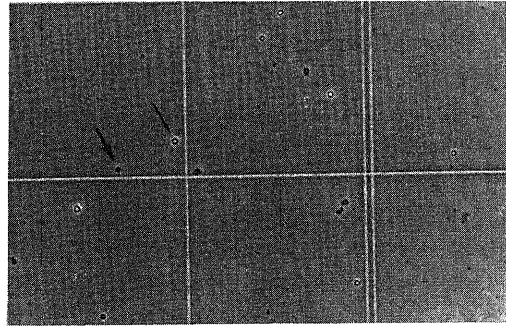


Fig. 2. Microscopic features of cells in a cytotoxic test. These are typical microscopic features of cells fixed in 0.5% glutaraldehyde solution containing 20% of glycerol ($\times 100$). Viable cells exhibit typical lymphocyte morphology (small arrow), while dead cells show an appearance as large dark circles (large arrow).

4. 細胞障害試験の方法

まず 3.2×10^6 個/ml のハムスター胸腺細胞浮遊液 0.05 ml を含む小試験管内にそれぞれの recipient ラットより採取し 1/4 に希釈された抗血清を 0.05 ml 加え、37°C 温浴中で 40 分間インキュベートした。次に希釈された補体 0.05 ml を加えて再び 37°C 温浴中で 30 分間インキュベートした後、20% グリセロールを含んだ 0.5% グルタルアルデヒド溶液 0.05 ml を混和して被検細胞を固定した。

被検細胞の判定には、位相差顕微鏡下で、Tatai eosinophil counter を用いて鏡検し、明るく輝いて見えるものを生細胞、暗く見えるものを死細胞とした (図 2)。その生および死細胞数より細胞死亡率 $\{ (死細胞数 / 全細胞数) \times 100 \}$ を算出し被検血清の細胞障害活性とした。

検索対象は、門脈内移植群、腹腔内直接移植群、I. Ch. 腹腔内移植群の 3 群で、各群よりそれぞれ 3 匹づつの移植後、1, 3, 5, 7, 10, 14 日目の血清を採取、各々の血清による細胞死亡率の変化を一匹づつ曲線で表示した。

統計学的検定はすべてスチューデントの検定により行ない、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. Mb.F. の相違によるグルコースの透過性とインスリンの拡散率

1. グルコースの透過性

Mb.F. の孔径および素材の相違によるグルコース透過性の差異を検討し、結果を表 2 に示した。

1) Mb.F.の孔径の相違と透過性

セルロースアセテートよりなる Mb.F.では、孔径がそれぞれ 0.22, 0.45, 1.20 μm での透過率 (g_1/g_2) は、グルコース濃度が 100 mg/dl でそれぞれ 74.4, 71.2, 68.7% であり、またグルコース濃度が 400 mg/dl の場合でもそれぞれ 76.9, 78.4, 78.4% と、孔径の大小による透過率の違いはみられなかった。

セルロースナイトレート製の Mb.F.では、孔径が 0.45, 1.20 μm の両者を比較すると、グルコースの透過率はグルコース濃度が 100 mg/dl でそれぞれ 87.3, 92.1% と差はなく、またグルコース濃度が 400 mg/dl の場合でもそれぞれ 91.4, 95.0% と著明な差はみられず、いずれの孔径でも良好な透過性を示した。

2) Mb.F.の素材の相違と透過性

Table 2. Diffusion rate of glucose through membrane filter in relation to chemical composition, pore size and glucose concentration.

Membrane filter made of	pore size (μm)	Numbers of experiment	Original glucose concentration of the medium (mg/dl)	Glucose concentration after incubation		Diffusion rate (g_1/g_2) \times 100%
				outside (g_2)	inside (g_1)	
Cellulose acetate	0.22	7	100	92.6 \pm 0.8*	68.9 \pm 7.9	74.4
			400	371.9 \pm 1.8	286.1 \pm 7.3	76.9
	0.45	7	100	94.3 \pm 0.5	67.1 \pm 2.5	71.2
			400	374.4 \pm 1.3	293.6 \pm 5.6	78.4
	1.20	7	100	93.7 \pm 2.7	64.4 \pm 8.0	68.7
			400	371.1 \pm 4.8	291.0 \pm 11.1	78.4
Cellulose nitrate	0.45	7	100	91.6 \pm 1.8	80.0 \pm 2.8	87.3
			400	371.7 \pm 5.8	339.6 \pm 16.1	91.4
	1.20	7	100	92.6 \pm 3.8	85.3 \pm 8.0	92.1
			400	366.3 \pm 2.9	347.9 \pm 11.3	95.0
Poly-carbonate	0.40	10	100	91.1 \pm 1.5	86.4 \pm 7.9	94.8
			400	366.8 \pm 10.4	338.0 \pm 11.5	92.2

A diffusion chamber made of each of different kinds of membrane filter was put into a glucose-containing medium. After incubation for 90 min at 37°C, the concentration of glucose inside and outside the diffusion chamber was measured. *, Values are expressed as mean \pm S.D.

Table 3. Diffusion rate of insulin through membrane filter in relation to chemical composition, pore size and glucose concentration.

Membrane filter made of	pore size (μm)	Numbers of experiments	Glucose concentration of the medium (mg/dl)	Insulin levels ($\mu\text{U/ml}$)		Diffusion rate [$i_1 \div (i_1 + i_2)$] \times 100
				i_1 **	$i_1 + i_2$ **	
Cellulose acetate	0.22	7	100	22.0 \pm 12.6*	58.1 \pm 17.9	37.9
			400	46.7 \pm 23.8	109.2 \pm 33.0	42.8
	0.45	7	100	16.6 \pm 6.0	41.8 \pm 11.5	39.7
			400	82.9 \pm 18.7	142.8 \pm 27.8	58.1
	1.20	7	100	19.5 \pm 14.7	55.3 \pm 15.7	35.3
			400	54.2 \pm 20.0	112.4 \pm 30.4	48.2
Cellulose nitrate	0.45	8	100	16.5 \pm 6.0	43.3 \pm 14.8	38.1
			400	54.3 \pm 34.9	119.7 \pm 27.6	45.4
	1.20	8	100	14.0 \pm 9.0	36.4 \pm 25.1	35.7
			400	70.5 \pm 20.2	127.2 \pm 38.3	55.4
Poly-carbonate	0.40	8	100	22.2 \pm 10.0	61.9 \pm 36.5	35.7
			400	88.6 \pm 32.7	150.8 \pm 44.4	59.0

A diffusion chamber containing 2 islets was put into the medium containing two different concentration of glucose, incubated at 37°C for 90 min, and then concentration of insulin inside and outside the diffusion chamber was measured. *, Values are expressed as mean \pm S.E.M.; **, insulin levels, inside (i_1) and outside (i_2) the islet chamber.

Mb.F.の孔径が $0.40\ \mu\text{m}$ 付近の場合を3種の素材と比較すると、グルコース濃度が $100\ \text{mg/dl}$ では、セルロースアセテート、セルロースナイトレート、ポリカーボネートの透過率はそれぞれ71.2, 87.3, 94.8%であり、セルロースアセテートは他の2種の素材に比べてグルコースの透過性が劣っていた。グルコース濃度が $400\ \text{mg/dl}$ の場合も、セルロースアセテートが78.4%であるのに対し、セルロースナイトレートは91.4%、ポリカーボネートが92.2%と前者に比し後2者が透過性に優れていた。

2. インスリンの拡散率

各種Mb.F.によるインスリンの拡散率を検討し、結果を表3に示した。

1) ラ氏島1個当りのインスリン産生量

D.Cha.内外の濃度より算出されたラ氏島1個当りのインスリン産生量(i_1+i_2)は、グルコース $100\ \text{mg/dl}$ 刺激では 50.1 ± 27.4 (Mean \pm S.E.M., 以下同様) μU であった。一方グルコース $400\ \text{mg/dl}$ 刺激では $127.4\pm 35.8\ \mu\text{U}$ と、グルコース濃度の上昇により高いインスリン産生量を示した。

2) Mb.F.の孔径の相違と拡散率

各孔径によるインスリン拡散率をみると、セルロースアセテートの場合、グルコース $100\ \text{mg/dl}$ 刺激では、 $0.22, 0.45, 1.20\ \mu\text{m}$ の各孔径における拡散率(i_2/i_1+i_2)はそれぞれ37.9, 39.7, 35.3%と差はなかった。グルコース $400\ \text{mg/dl}$ 刺激でも、それぞれ42.8, 58.1, 48.2%と有意の差を認めなかった。またセルロースナイトレートの場合も同様に、孔径の相違によるインスリンの拡散率に差は認められなかった。

3) Mb.F.の素材の相違と拡散率

孔径が $0.45\ \mu\text{m}$ (ただしポリカーボネートは $0.40\ \mu\text{m}$)でみると、グルコース $100\ \text{mg/dl}$ 刺激の場合の拡散率は、セルロースアセテートでは39.7%、セルロースナイトレートでは38.1%、ポリカーボネートでも35.7%と各材質間に差はなく、また $400\ \text{mg/dl}$ でもそれぞれ58.1, 45.4, 59.0%とほぼ同様の値を示した。また孔径が $1.2\ \mu\text{m}$ でもセルロースアセテート、セルロースナイトレート間には有意の差はなかった。

4) D.Cha.外グルコース濃度の拡散率に与える影響
いずれの材質および孔径においても、インキュベーター前のCha.外グルコース濃度が高い程、すなわちD.Cha.内インスリン産生量が大い程D.Cha.外への拡散率は高く、グルコース $100\ \text{mg/dl}$ 刺激で35.3~39.7%であった拡散率は、グルコース $400\ \text{mg/dl}$ 刺激では42.8~59.0%と上昇した。

II. 糖尿病ラットへのラ氏島異種移植効果

1. 門脈内異種移植群

結果を図3aに示した。門脈内移植群6匹の血糖値は、移植前 462 ± 31 (Mean \pm S.D., 以下同様) mg/dl と高値を示していたが、移植後1日目には $169\pm 88\ \text{mg/dl}$ と有意の低下を示した($p < 0.001$)。しかし3日目には $312\pm 119\ \text{mg/dl}$ と再上昇の傾向をみせ、5日目には $369\pm 145\ \text{mg/dl}$ と移植前値に比し有意差を認めず、以後高血糖が持続した。尿糖は、移植前には $5.3\pm 0.8\ \text{g/day/100 g B.W.}$ と高値を示したが、移植後1日目には $0.6\pm 0.5\ \text{g/day/100 g B.W.}$ と著明に減少した。しかし、血糖値の上昇とともに3日目には $2.5\pm 1.7\ \text{g/day/100 g B.W.}$ と再上昇を示し、5日目には移植前値に復した。一方、血中インスリン値は移植前 $16.7\pm 5.9\ \mu\text{U/ml}$ であったが、移植後1日目には $76.6\pm 16.8\ \mu\text{U/ml}$ と著明な上昇をみた。この値は3日目以降より徐々に減少をきたしたものの14日目までは移植前値に比し有意の高値を持続した。体重は移植後徐々に減少し、移植前の体重を100とすると、14日目には 87.7 ± 8.1 と有意の減少を示した。

以上の結果より、移植後3~5日目頃には拒絶反応

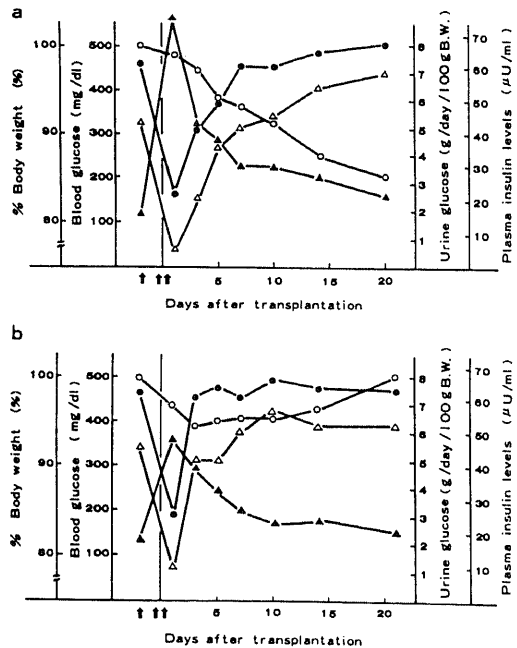


Fig. 3. Effects of xenotransplantation of islets into STZ-induced diabetic rats *via* portal vein (a) and peritoneal cavity (b) on the body weight, blood glucose, urine glucose and plasma insulin level. Each value represents the mean of 6 (a) and 4 (b) animals. ↑, Intravenous injection of STZ; ↑↑, islets transplantation; ○, % body weight; ●, blood glucose; △, urine glucose; ▲, plasma insulin levels.

が出現し、しだいに進行したものと推察された。

2. 腹腔内直接異種移植群

結果を図3bに示した。移植を施行した4匹の移植前血糖値は、 466 ± 38 mg/dlであった。移植後1日目には 190 ± 29 mg/dlと有意に低下したが ($p < 0.01$)、3日目には 445 ± 61 mg/dlと移植前値に復し、以後21日目まで400 mg/dl以上の高血糖を持続した。尿糖は、移植前値の 5.7 ± 0.6 g/day/100 g B.W.に比し、移植後1日目のみ 1.3 ± 0.4 g/day/100 g B.W.と有意の低下 ($p < 0.001$)を示したが、3日目には 5.0 ± 1.2 g/day/100 g B.W.と差はみられなくなった。体重減少は徐々に進行したが、移植後14日目には移植前値と有意差はなくなり以後漸次上昇を示した。

以上の結果より、腹腔内直接異種移植では、門脈内移植より早期に拒絶反応が発現したものと考えられた。

III. 糖尿病ラットへのI.Cha.腹腔内異種移植効果

上述のごとく、素材の差によるインスリン拡散率の差はみられなかったので、異種移植に用いたD.Cha.にはポリカーボネート製のMb.F.を使用した。

1. E.Cha.移植群

対照として、4匹のラットにラ氏島を含まないE.Cha.を移植した。血糖値は、移植後21日目まで低下することなく400 mg/dl以上の高血糖を持続し(図4a)、尿糖も術後1日目には、移植前の 5.1 ± 0.5 g/day/100 g B.W.に比し有意の差はなかった(図4b)。また血中インスリン値も移植後は $10 \mu\text{U/ml}$ 台で、移植前値と差はなかった(図4c)。

2. 1,500個のラ氏島封入I.Cha.移植群

6匹のラットに1,500個封入I.Cha.の腹腔内移植を行なった。血糖値は移植後いずれも400 mg/dl以上の値を示し、E.Cha.移植群と比較して有意差はなかった(図4a)。尿糖は、移植後1日目に 2.0 ± 0.9 g/day/100 g B.W.とE.Cha.移植群の 3.6 ± 1.2 g/day/100 g B.W.に比し有意の低値 ($p < 0.05$)を示したものの、3日目には 5.1 ± 0.9 g/day/100 g B.W.と再上昇を示し以後高値を持続した(図4b)。一方血中インスリン値は、移植後1日目には $40.9 \pm 15.3 \mu\text{U/ml}$ と最高値を示し、以後漸減するも術後21日目まではE.Cha.移植群とは有意の差 ($p < 0.05$)をみ、(図4c)、移植ラ氏島よりのインスリン分泌の継続が示唆された。

3. 6,000個のラ氏島封入I.Cha.移植群

D.Cha.内の封入ラ氏島数を6,000個として5匹のラットに移植し、結果をその各々について図5に示した。

血糖値は5匹中2匹に改善がみられた(図5a)。すなわち1匹は移植後3日目より207 mg/dlと低下し、

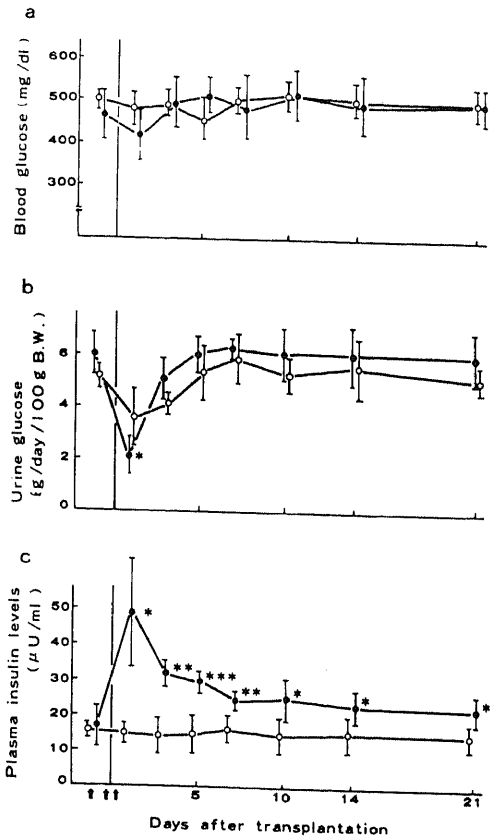


Fig.4. Effects of xenotransplantation of islet chamber (1,500 islets) into STZ-induced diabetic rats on blood glucose (a), urine glucose (b), and plasma insulin levels (c). ↑, Intravenous injection of STZ; ↑↑, chamber transplantation; ○, empty chamber (n=4); ●, islets chamber (n=6). Results are given as mean±S.D. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

以後5, 7, 10日目にはいずれも200 mg/dl以下の値を維持したが、14日目以降より再上昇を示した。他の一匹では1~7日目まで200 mg/dl以下の血糖値を維持したが、10日目以降よりは300 mg/dl以上の血糖値を示した。しかし残りの3匹は移植後1日目に低下傾向を示したが、3日目より400 mg/dl以上と移植前値に復した。

尿糖はすべての例で移植後1日目には1 g/day/100 g B.W.以下の値を示した(図5b)。しかし5日目まで2 g/day/100 g B.W.以下の値を維持したものは血糖値の下降をみた2匹のみで、他の3匹は5日目にはすでに約4 g/day/100 g B.W.の尿糖排泄を示した。

血中インスリン値は、血糖値、尿糖の改善があった2匹に上昇をみた(図5c)。1匹では、移植後1日目

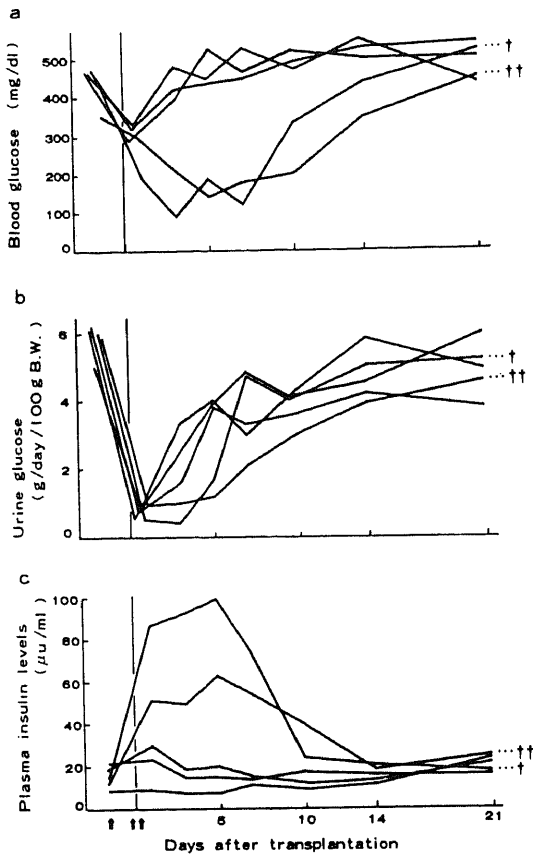


Fig. 5. Effects of xenotransplantation of islet chamber (6,000 islets) into STZ-induced diabetic rats on blood glucose (a), urine glucose (b) and plasma insulin levels (c). ↑, Intravenous injection of STZ; ↑↑, islet chamber transplantation; † and ††, both of them showed an effective clinical response ($n_1=5$).

以降 50.7, 48.2, 61.0, 53.4, 38.3 $\mu\text{U/ml}$ と 10 日目まで、また他の 1 匹でも、移植後 86.4, 91.3, 98.0, 73.2 $\mu\text{U/ml}$ と 7 日目まで高値を示したが、両者ともに以後漸減した。残りの 3 匹は移植後 1 日目には軽度の上昇がみられたものの、以後低値を持続した。

以上より 5 匹の移植例中 2 匹に移植効果があったと考えられた。

IV. 移植ラ氏島の組織学的観察

門脈内移植後 7 日目の肝組織像では、移植ラ氏島は門脈内に栓塞像として観察された。しかし、P.A.P.法による検索では β 顆粒の存在は認められるものの、ラ氏島被膜は破壊されており、ラ氏島内細胞にも中等度の変性像が観察された。またラ氏島周囲にはリンパ球や単球の著明な浸潤をみ、拒絶反応の発現が示唆された

(図 6 a, b)。一方 I.Ch. 腹腔内移植群では I.Ch. のフィルター表面は肉眼的にフィブリン様の薄い膜様物質で被われているが肉芽形成や膿瘍形成はみられなかった(図 7)。また組織学的検索では封入されたラ氏

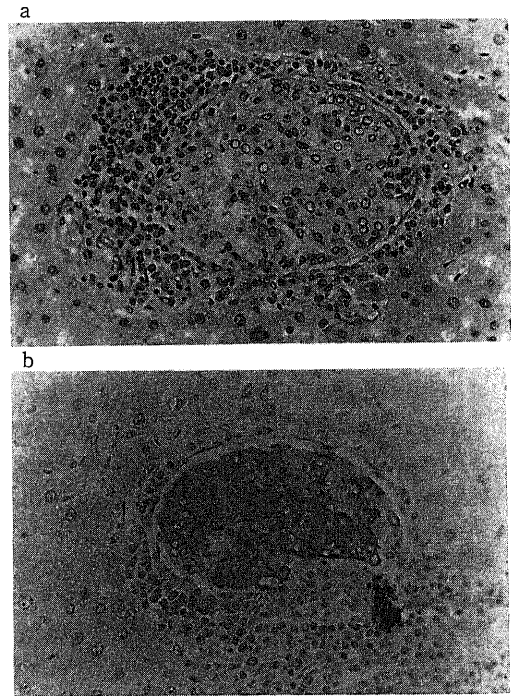


Fig. 6. Islets of Langerhans of hamster at the 7th day after xenotransplantation into the portal vein of diabetic rats. Hematoxylin-eosin (a, $\times 100$), and immunoperoxidase staining for insulin (b, $\times 100$). Extensive lymphocytic and monocytic infiltrations are observed around the transplanted-islets.

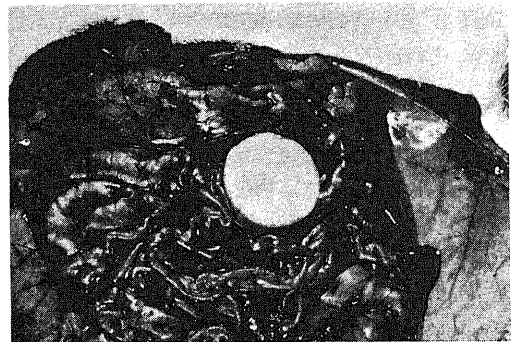


Fig. 7. Photograph of islet chamber in the peritoneal cavity at 1 week after transplantation. The chamber is encapsulated in a thin fibrous material and shows no evidence of apparent granulation or abscess formation around it.

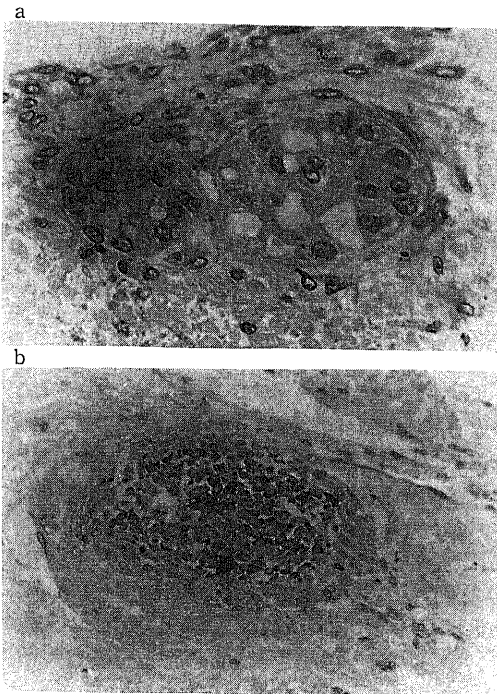


Fig. 8. Islets of Langerhans of hamster enclosed into the diffusion chamber at 1 week after the transplantation into the peritoneal cavity of diabetic rats. Hematoxylin-eosin (a, $\times 200$) and immunoperoxidase staining for insulin (b, $\times 100$). These islet cells are found to be partly degenerated compared with freshly isolated cells, but lymphocytic and monocytic infiltration are not observed.

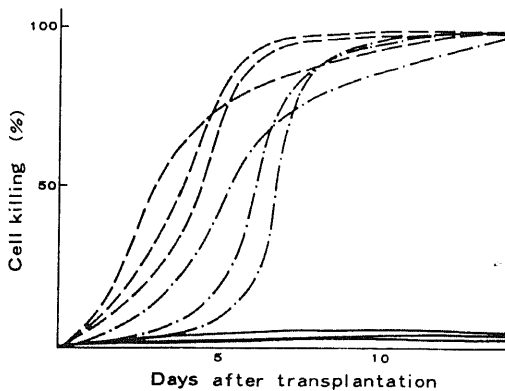


Fig. 9. Cytotoxic activity of islet-transplanted rat sera against hamster thymus cells. Three rats are selected for each study.

- , Intraperitoneal islet chamber transplantation;
- - -, direct islet transplantation into abdominal cavity;
- · - ·, direct islet transplantation *via* portal vein.

島の変性と破壊が認められた(図8 a, b). しかしリンパ球や単球の浸潤は認められず, 以上のようなラ氏島の変化は拒絶反応というよりもむしろ栄養障害の結果と推察された.

V. D.C.T.による抗ハムスター組織抗体の測定

門脈内移植群では, 細胞死亡率が移植後3~5日目頃より徐々に上昇しはじめ, 6~10日目にはピークに達した. これに対し腹腔内移植群では, より早期の2~3日目頃より細胞死亡率の上昇がみられ, 4~5日目にはすでにピークに達し, 曲線は門脈内移植群に比し左方に位置した. また, 被検細胞の死亡率が50%を超える日数は門脈内移植群で 6.0 ± 0.7 日であり, 腹腔内移植群では 3.8 ± 0.7 日と腹腔内移植群で有意に早かった. すなわち腹腔内移植群では, 門脈内移植に比しより早期に拒絶反応が発現すると考えられた.

一方 I. Cha. 腹腔内移植群では3匹とも細胞死亡率の上昇はみられず, 移植拒絶反応による抗ハムスター組織抗体価の上昇はないものと推察された(図9).

考 察

膵移植は, 1892年に Heden¹⁴⁾が実験的に試みたのに始まる. その後 Ssobolew¹⁵⁾は糖尿病の治療法として膵移植が有用な手段であることを示唆したが, 1922年のインスリンの発見によりその価値を失ったかに見えた. しかしその間, 血管外科あるいは腎移植を中心として発展した移植免疫学の進歩に伴ない, Lichtensteinら¹⁶⁾が血管吻合による全膵移植を試みたのをきっかけとして再び脚光を浴びるようになった. 様々な研究によって膵移植は, インスリン治療では管理困難な若年性糖尿病末期患者に効果のあることが明らかにされ, 実験的には糖尿病に随伴する小血管病変の進行も防止されることが指摘されている¹⁷⁾⁻²⁰⁾. また, 近年の外科手術の進歩に伴ない, 膵癌および慢性膵炎に対し膵全摘術が積極的に行なわれるにいたり, その内分泌欠落状態を補足する意味でも, 膵移植はさらに重要性を増してきていると思われる. 事実1966年12月より1982年5月までに行なわれた世界各国における膵移植の全臨床症例数は223回208例におよび, 特に1980年から1982年5月までの約2年半には126例と急激な増加をみている²¹⁾.

ところで膵移植は, 血管吻合による全膵移植と血管吻合のないラ氏島移植とに大別できるが, 臨床的に全膵移植を考える時, 膵は他の臓器に比し阻血許容時間が短かく, 常温における20°C以上の阻血では不可逆的な組織変化をおこしてしまう. そして脳死の段階での臓器摘出が困難な我が国の現状では, 供給源も屍体膵に頼らざるを得ず臨床応用が困難である. これに比し

ラ氏島移植はその供給源を屍体臓、人工流産臓、手術的摘出臓などに求めることができ、手技的にも血管吻合がなく臨床応用が可能な方法といえる。

ラ氏島移植においては従来、ラ氏島自身は抗原性が弱く移植拒絶反応が起こりにくいとされていた。しかし、Reckardら²⁰⁾は組織不適合性の強い (strong histocompatibility) 動物間での移植、すなわちフィッシャー (Fisher) (Ag-B⁺) ラット・ラ氏島を ACI (Ag-B⁺) ラットの腹腔内に入れた移植では3日以内に拒絶されたとし、また組織不適合性の弱い (weak histocompatibility) 動物間での移植、すなわち ACI (Ag-B⁺) ラット・ラ氏島を DA (Ag-B⁺) ラットの腹腔内に行なった移植でも平均生存期間は8.1日であったと報告している。また Marquestら²²⁾、大北ら⁹⁾も同様な結果を報告しており、最近ではラ氏島自体も強い抗原性を有すると考えられている。さて、これらの拒絶反応を回避し長期の移植ラ氏島生着を期待するためには、組織適合性の一致するものを選択すること、免疫原性を最小にすること、移植拒絶反応のおきにくい部位へ移植すること、有効な免疫抑制法を適用することなどの方法が考えられる。そこで本研究では拒絶反応の発現を阻止するため、Mb.F.を利用したD.Ch.を作製し、移植片(ラ氏島)とrecipientの免疫担当細胞との直接接触を阻害する方法を選択した。実験にはrecipientのラットに対して異種であるハムスター・ラ氏島をD.Ch.内に封入してI.Ch.とし、そのSTZ糖尿病ラット腹腔内移植による糖尿病状態の改善効果と、I.Ch.による異種移植時の拒絶反応回避効果を検討した。

ハムスター臓よりのラ氏島分離は、これまで行なわれた教室のラット臓よりの方法²³⁾²⁴⁾と同様に行なった。しかし臓の膨化処理はその施行の有無に関係なく一匹あたり約300個のラ氏島を採取し得たのでこれを省略した。得られたハムスター・ラ氏島はラット・ラ氏島に比し、外分泌組織や結合組織成分の付着が少ない、より純粋な、そしてより大型のラ氏島であった。ハムスター・ラ氏島は分離が容易であり、採取ラ氏島数もラットの約3~4倍で、ラ氏島1個あたりのインスリン分泌量も中島ら²³⁾はラットの約2倍を示すと報告している。

ラット・ラ氏島1個当りの、90分間におけるインスリン産生量については、Lacyら¹⁰⁾は30 mg/dl グルコース刺激では95 μ U、300 mg/dl グルコース刺激では256 μ Uであったとし、また小島ら⁴⁾は100 mg/dl グルコース刺激で110 μ U、300 mg/dl グルコース刺激では211 μ Uのインスリン分泌がみられたと報告している。しかし本研究でのD.Ch.内に封入したラ氏島1個

あたりのインスリン分泌量はこれらの報告よりやや低値を示した。これはCha.内グルコース濃度がインキュベート前の0 mg/dlから時間の経過とともに徐々に上昇するため、ラ氏島に対し常に最高濃度によるグルコース刺激が持続されず、90分間のインスリン分泌量が低下するものと考えられた。しかしCha.外グルコース濃度が100 mg/dlから400 mg/dlへと上昇すると、ラ氏島のインスリン分泌量はその刺激に応じ3~5倍と増加することから、Cha.外グルコース刺激に反応し得ることは明らかである。

Mb.F.のグルコースおよびインスリンの透過性に関しては、Theodorouら²⁴⁾がD-[6-³H]グルコースおよび¹²⁵I-labelledインスリンを使用し、その孔径と材質の違いによる透過性の相違を報告している。本研究では実際の移植状況により近似させることを目的として、Cha.内にラ氏島を封入し90分のS.T.I.を行なった。インキュベート開始後、Cha.外グルコースはCha.内に透過し、そのグルコースによりCha.内ラ氏島が刺激されインスリンを分泌し、産生されたインスリンがMb.F.を通過してCha.外へ拡散することを想定して、インキュベート後のグルコース透過度とインスリンの拡散率を比較検討した。グルコースの透過度は、セルロースアセテートでやや低値を示したが、セルロースナイトレートやポリカーボネートでは孔径の大小とは関係なく良好な値を示した。一方インスリン拡散率では予想に反し、十分な結果を得ることができず、Cha.外グルコース濃度が100 mg/dl刺激の場合で35.3~39.7%、グルコース濃度400 mg/dl刺激でも42.8~59.0%にとどまった。これはTheodorou²⁴⁾も指摘するように、インスリンの容器およびMb.F.への吸着が大きな原因と考えられる。しかしインスリンの容器への吸着は、容器内インスリン濃度が一定以上になると飽和となり無制限に吸着を起さないとする報告²⁵⁾もあり、実際の移植ではI.Ch.内には1,000個以上のラ氏島が封入されI.Ch.内のインスリン濃度は高濃度になるため、移植時にはより高いインスリン拡散率が得られると推定した。

腹腔内移植に利用したI.Ch.のMb.F.には、ポリカーボネート製のものを選択した。先に述べたごとく、ポリカーボネート製のMb.F.は他の材質に比して特にグルコースやインスリンの透過性に秀れているとは言えない。しかし、厚さが10 μ mと薄く、また孔の形状も他の材質がスポンジ状の構造をもっているのに比し1個づつの単穴であり、孔数も単位あたり10⁶個と、フィルター全表面の12%に相当し、腹腔内移植時のラ氏島生着に必要な栄養の浸透に有利であると考えられたからである。Maratosら²⁶⁾も同じ理由でポリカーボ

ネット製の Mb.F. の利点を指摘しており、さらに孔径からみても $0.40 \mu\text{m}$ はリンパ球との接触を妨げるのに十分な大きさと思われる。

膵ラ氏島移植は、Ballinger ら²⁷⁾により 400~600 個のラ氏島をラットの腹腔内や筋肉内に同系移植し、糖尿病状態の著明な改善をみたとの報告に始まる。Kemp ら²⁸⁾は STZ 糖尿病ラットに対し、皮下へ 850~970 (平均 890) 個、腹腔内へ 600~850 (平均 770) 個、腹腔内へ 400~600 (平均 550) 個の分離ラ氏島を移植し、門脈内が最も効果的な移植部位であることを指摘した。Reckard ら²⁹⁾も、腹腔内移植では 800~1,200 個のラ氏島を必要とするが門脈内移植では 300~600 個で十分であると述べている。このように移植部位により糖尿病状態を改善するのに必要なラ氏島数は異なるが、本研究において門脈内および腹腔内直接移植の際移植したラ氏島数 1,500 個は、これらの報告より考えても十分移植効果を期待できる個数と考えられた。それにもかかわらず、移植後 1 日目には両移植群とも血中インスリン値の上昇とそれともなう血糖値の低下がみられたものの、3 日目には門脈内移植群で $312 \pm 119 \text{ mg/dl}$ と再び上昇、腹腔内移植群では $445 \pm 61 \text{ mg/dl}$ とすでに移植前値に復した。これは、中島ら²⁹⁾のゴールデンハムスターラ氏島を donor とした STZ 糖尿病ラットへの門脈内移植実験で、1,600 個のラ氏島を移植した場合、平均生着日数が 3.0 ± 0.6 であったとの報告とほぼ一致する結果である。これらの結果に関しては、移植後の組織学的検索で門脈内に栓塞像として認められるラ氏島周囲にリンパ球や単球の著明な細胞浸潤がみられたことや、D.C.T. により移植ラット血清中の抗ハムスター組織抗体の上昇がみられたことなどから、移植ラ氏島数の個数不足が原因とするよりも、移植拒絶反応によるものと考えられる。

D.Cha. に関する研究は Algire ら³⁰⁾により免疫反応を抑制する手段として始められた。当初はハーダー腺 (Harderian gland)³⁰⁾、胸腺³¹⁾、卵巣³²⁾、腫瘍組織³⁰⁾、甲状腺³³⁾等を D.Cha. 内に封入し、各組織の生着やその機能についての検討が行なわれていたが、ラ氏島への応用は Reemtsma³⁴⁾が魚のラ氏島を D.Cha. 内に封入して糖尿病ラットの腹腔内に移植し、3 日間の糖尿病状態の改善を観察したのに始まる。その後 Strautz³⁵⁾は遺伝性肥満マウス (Hereditary-Obese Mice, obob) の腹腔内に non-obob マウスのラ氏島を 200~250 個封入した I.Cha. を移植したところ、14 日目より血糖値の低下を認め 45 日目まで持続したと報告している。また Maratos ら²⁶⁾は STZ 糖尿病 CBA マウスの腹腔内に 10,000 個のラ氏島を封入した I.Cha. を移植し、糖尿

病状態の改善を観察している。一方 Gates ら³⁶⁾は新生児ウサギの膵を D.Cha. 内に封入し、ニュージーランド肥満マウス (New Zealand Obese mice) の腹腔内に移植すると、血糖値、血中インスリン値および経口糖負荷試験の改善がみられたが、6 週後に D.Cha. を摘出したところ血糖値の最上昇を招きすべて死亡したと報告している。しかし Theodorou ら³⁷⁾は 1,100~1,400 個のラ氏島を D.Cha. 内に封入し、STZ 糖尿病ラットの腹腔内に同系移植を試みたが 12 週間の観察期間中糖尿病状態の改善はみられなかったと述べている。このように I.Cha. の移植成績に関しては必ずしも満足な結果が得られているとはいえない。著者の I.Cha. 腹腔内移植実験で、封入ラ氏島数 1,500 個では、E.Cha. 移植群と比較して血糖値や尿糖の改善を得るには至らなかった。しかし血中インスリン値は移植後 1 日目には平均 $40.9 \mu\text{U}$ と高値を示し、以後全観察期間中 E.Cha. 移植群より有意に高値を維持した。血中インスリン値が高値にもかかわらず血糖値や尿糖値の改善がみられなかったことは、ラ氏島数の不足が原因であると考えられたためラ氏島数を 6,000 個に増やして移植を試みた。その結果、5 例中 2 例に 7~10 日目まで血糖値の低下と同期間における血中インスリン値の高値を認めた。I.Cha. 内の移植ラ氏島数は Gates ら³⁶⁾は 200 個のマウス・ラ氏島で、Strautz³⁵⁾は 200~250 個のマウス・ラ氏島で、肥満マウスに対し十分移植効果を認めたとしている。しかし recipient がより大きいラットの場合では、腹腔内に直接移植した場合でも Kemp ら²⁸⁾は 600~850 個、Recard ら²⁹⁾は 800~2,400 個が必要であるとしており、さらに D.Cha. 内に封入すると Theodorou ら³⁷⁾が示すごとく 1,100~1,400 個のラ氏島数では移植効果を発揮するにはいたっておらず、本研究の結果から考えて少なくともラ氏島数は、6,000 個以上は必要であろうと思われた。

D.Cha. 内に封入したラ氏島の生存期間は報告者により異なる。本実験で、6,000 個を封入した I.Cha. 移植例 5 匹のうち 3 匹には血糖値の改善や血中インスリン値の上昇が観察されなかった。また他の 2 匹も 7~10 日後には、再び血糖値の上昇がみられた。これらの原因として、組織学的検索により I.Cha. 内のラ氏島変性が指摘されることから、ラ氏島生着に必要な栄養補給不足が原因の一つとして考えられた。Theodorou ら³⁷⁾は、その原因がフィルター表面の線維芽細胞の付着やときにみられる I.Cha. 周囲の膿瘍形成にあると指摘している。本研究では、D.Cha. のエチレンオキサイドガスによる滅菌と移植に際しての厳重な消毒によって、膿瘍の発生はみていない。しかし、フィルター表面の線維芽細胞と思われる薄い膜様物の形成はほとんどの

例にみられ、インスリンの拡散や栄養素の浸透によって大きな障害となっていることが考えられた。Jolleyら³⁹⁾は、Porathら⁴⁰⁾や Cuatrecasas⁴¹⁾の方法によりコラゲナーゼやプロナーゼを Mb.F. に付着させ、これを使用した D.Cha. で移植したところ線維芽細胞の付着がみられず良好な移植結果が得られたとしており、今後検討すべき方法と考えられる。

D.C.T. は、有核細胞を対象とした抗原抗体反応の検出法として Gorer ら⁴²⁾により開発され、腫瘍免疫や組織適合系の研究には重要な方法となっている。中野ら⁴³⁾はハムスター・ラ氏島を門脈内に移植し、放射線照射時の生着延長効果について D.C.T. により抗ハムスター組織抗体を測定し考察している。本実験でも D.Cha. の免疫学的有効性の判定に D.C.T. を張ら⁴⁴⁾および張⁴⁵⁾の方法に準じて行なった。被検細胞の判定に、張らはトリパンプルーを用いているがここではグルタルアルデヒドによる細胞固定を行ない、その生死を位相差顕微鏡により判定する方法⁴⁶⁾を用いた。グルタルアルデヒドによる固定は、トリパンプルーによるものよりも長時間の観察が可能であり、より簡便な方法と思われる。

Barker ら⁴⁷⁾は Ag B compatible の DA ラットのラ氏島を ACI ラットに移植すると、門脈内移植で平均生着時間が約 30.5 日と、腹腔内移植時の約 11.5 日に比し 3 倍も延長することを報告、肝に抗原性を低下させる効果があることを示唆した。著者の D.C.T. により抗ハムスター抗体を検した成績でも、被検細胞の死亡率が 50% を越える日数は門脈内移植で 6.0 ± 0.7 日と、腹腔内移植の 3.8 ± 0.7 日より明らかに延長し、異種移植においても腹腔内移植よりも門脈内移植により長い生着が得られることを示した。Kolb ら⁴⁸⁾は、睪微小組織片を門脈内に移植した場合にみられる拒絶反応はリンパ球依存ではなくマクロファージによると報告しているが、このような事実と考え合わせ興味深い問題と思われる。

さて Teodorou ら²⁴⁾³⁷⁾、Maratos ら²⁶⁾、Gates ら³⁶⁾は、Mb.F. が移植組織と免疫担当細胞との接触を防げ得ることから D.Cha. が移植拒絶反応回避効果を有する可能性のあることを示唆しているが、その実証はなされていない。ここで測定した I.Cha. 腹腔内移植における抗ハムスター抗体の抗体価は、2 週間の測定期間中全く上昇を認めなかった。この事実は D.Cha. のもつ免疫反応回避効果を証明しているものと考えられる。

I.Cha. 腹腔内移植は、長期間にわたる糖尿病状態の改善、すなわち長期間の D.Cha. 内ラ氏島の生着という点や、門脈内や腹腔内への移植に比しより多くのラ氏島数を必要とする点など、解決されるべき問題が指摘

される。しかし異種移植において拒絶反応を克服し得る可能性があることは大きな利点であり、残された諸問題点を解決することにより臨床的にも応用可能な方法と考えられた。

結 論

diffusion chamber 内に封入したハムスター・ランゲルハンス氏島 (islet chamber) の糖尿病ラットへの異種移植を試み、その移植効果と diffusion chamber による免疫反応回避効果に関し検討した。

1. グルコースおよびインスリンの各種 membrane filter による透過性を 90 分の short time incubation により検索した結果、グルコースの透過性はセルロースナイトレートやポリカーボネートが、セルロースアセテートより秀れていた。またインスリンの拡散率は材質や孔径の相違によって変化せず、いずれの場合にも全インスリン産生量の 35~60% の拡散を得た。これらの事実より、以後の実験には主としてポリカーボネート製のフィルターを使用した。

2. 門脈内および腹腔内へのラ氏島の直接移植群では、移植後早期に拒絶反応の出現がみられ移植効果の消失が観察された。

3. islet chamber 腹腔内異種移植では、封入ラ氏島数が 1,500 個の場合、移植後血中インスリン値の上昇がみられたものの血糖値や尿糖の改善をみるには至らなかった。しかしラ氏島数を 6,000 個とすると 7~10 日間に、糖尿病状態の改善がみられた。

4. ハムスター・ラ氏島を直接ラットの門脈内に異種移植した場合は、組織学的にラ氏島組織の変性、周囲へのリンパ球や単球の浸潤がみられ、免疫学的拒絶反応が推察された。しかし islet chamber の異種移植では、その表面にフィブリン様物質の付着がみられたが、免疫系細胞の浸潤はみられなかった。ただ栄養物質のフィルター透過障害によると思われるラ氏島の変性破壊像が観察された。

5. direct cytotoxic test により測定した抗ハムスター組織抗体の検索で、門脈内移植群は腹腔内移植群に比し抗体価の上昇が遅れて発現した。一方 islet chamber 腹腔内移植群では、観察期間中抗体価の上昇はみられなかった。

以上の結果から diffusion chamber を用いた異種ラ氏島の腹腔内移植は、異種移植による拒絶反応を回避することによって移植効果を高めるものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った宮崎逸夫教

授、御教示、御鞭撻を賜った中川原儀三教授に謹んで謝意を捧げます。また、終始御指導いただいた福井医科大学第1外科学教室小島靖彦講師に深く感謝いたします。最後に、種々御援助、御指導下さいましたがん研究所分子生物部亀山忠典教授、ならびに野村孝弘博士に深謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は第18回日本移植学会総会(1982年、福岡)および第19回日本移植学会総会(1983年、旭川)にて発表した。

文 献

- 1) Banting, F. G. & Best, C. H.: The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. Clin. Med.*, 8, 251-266 (1922).
- 2) 木村捷一: ラット, ラ島移植に関する実験的研究. 十全医会誌, 86, 159-173 (1977).
- 3) 山崎軍治: 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. 十全医会誌, 86, 56-73 (1977).
- 4) 小島靖彦: 単離ラット膵ランゲルハンス島の長期培養における形態学的観察と生物学的機能維持について. 十全医会誌, 86, 74-89 (1977).
- 5) 大野 進: ラット膵ランゲルハンス氏島の凍結保存に関する実験的研究 (形態学的観察と生物学的機能維持). 日外会誌, 80, 611-626 (1979).
- 6) 竹山 茂: 灌流ラット膵ラ島細胞の器官培養による実験的保存に関する研究. 十全医会誌, 91, 1125-1137 (1982).
- 7) Reckard, C. R., Ziegler, M. M. & Barker, C. F.: Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. *Surg.*, 74, 91-99 (1973).
- 8) Reckard, C. R. & Barker, C. F.: Transplantation of isolated pancreatic islets across strong and weak histo-compatibility barriers. *Transpl. Proc.*, 5, 761-763 (1973).
- 9) 大北日吉・深水 昭・西野裕二・梅山 馨: 糖尿病ラットにおける単離膵ラ島移植. 移植, 16, 309-316 (1981).
- 10) Lacy, P. E. & Kostianovsky, M.: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16, 35-39 (1967).
- 11) Miskiewicz, S. J. Arnett, B. B. & Simon, G. E.: Evaluation of a glucose oxidase-peroxidase method adapted to the single-channel-autoanalyzer and SMA 12/60. *Clin. Chem.*, 19, 253-257 (1979).
- 12) 西村ひろみ・平田幸正: Sephadex 固相法によるインスリンの測定—Phadebas Insulin Test の使用経験. 基礎と臨床, 6, 1544-1548 (1972).
- 13) 長村義之・渡辺慶一: 酵素抗体法. ホルモンと臨床, 24, 1074-1087 (1976).
- 14) Heden, E.: Graffe sous Cutanée du pancréas. *Compt. rend. Soc. de Biol.*, 44, 307-308 (1892).
- 15) Ssobolew, L. W.: Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Secretion der Bauchspeicheldrüse. *Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med.*, 168, 91-128 (1902).
- 16) Lichtenstein, I. L. & Barschak, R. M.: Experimental transplantation of the pancreas in dogs. *J. Internat. Coll. Surg.*, 28, 1-6 (1957).
- 17) Mauer, S. E., Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Leonard, R. J., Najarian, J. S., Michael, A. F. & Brown, D. M.: Pancreatic islet transplantation; effects on the glomerular lesions of experimental diabetes in the rat. *Diabetes*, 23, 748-753 (1974).
- 18) Mauer, S. E., Steffes, M. W., Sutherland, D. E. R., Najarian, J. S., Michael, A. F. & Brown, D. M.: Studies of the rate of regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation. *Diabetes*, 24, 280-285 (1975).
- 19) 野沢真澄: ストレプトゾトシン糖尿病ラットの腎病変に対する膵臓移植の効果. 糖尿病, 17, 522-524 (1974).
- 20) Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Mauer, S. M., Brown, D. M. & Najarian, J. S.: Reversal of the secondary lesions of diabetes by islet transplantation in the rat. *Transpl. Proc.* 7, Suppl., 1, 747-749 (1975).
- 21) Sutherland, D. E. R.: Current status of pancreas transplantation: registry statistics and an overview. *Transpl. proc.*, 15, 1303-1307 (1983).
- 22) Marquest, R. L. & Heystek, G. A.: The effect of immuno-suppressive treatment on the survival of allogenic islets of Langerhans in rats. *Transplantation*, 20, 428-431 (1975).
- 23) 中島祥介・中野博重・仲川恵三・瀬川雅数・深井泰俊・白鳥常男: 異種ランゲルハンス氏島移植 (第I報)—golden hamster 膵ラ島島の分離方法と単離膵ラ島島の形態および機能について—移植, 15, 256-260 (1980).
- 24) Theodorou, N. A. & Howell, S. L.: An assessment of diffusion chambers for use in pancreatic islet cell transplantation. *Transplantation*, 27, 350-353 (1979).

- 25) 岡本博夫・菊地武夫・谷沢久之：インシュリンの輸液容器への吸着。薬剤学, 39, 107-111 (1979).
- 26) Maratos, E., Taub, R. N. & Bramis, J.: Amelioration of streptozotocin-induced diabetes in mice by the implantation of pancreatic islets in diffusion chambers. Mt. Sinai J. Med., 43, 415-422 (1976).
- 27) Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. Surgery, 72, 175-186 (1972).
- 28) Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Effect of transplantation site on the results of pancreatic islets isografts in diabetic rats. Diabetologia, 9, 486-491 (1973).
- 29) Reckard, C. R., Ziegler, M. M., Naji, A., Galbut, D. & Barker, C. F.: Physiologic and immunologic status of longfunctioning transplanted pancreatic islets in rats. Surg. Forum., 25, 374-376 (1974).
- 30) Algire, G. H., Weaver, J. M. & Prehn, R. T.: Growth of cells *in vivo* in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice. J. Nat. Cancer Inst., 15, 493-507 (1954).
- 31) Levey, R. H., Trainin, N. & Law, L. W.: Evidence for function of thymic tissue in diffusion chambers implanted in neonatally thymectomized mice. Preliminary report. J. Nat. Cancer Inst., 31, 199-206 (1963).
- 32) Sturgis, S. H. & Castellanos, H.: Functional survival of ovarian homografts within Millipore filter chambers in the castrate rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94, 569-572 (1957).
- 33) Potter, J. F. & Haverback, C. Z.: Homotransplantation of endocrine tissue in a diffusion chamber. Ann. Surg., 151, 460-464 (1960).
- 34) Reemtsma, K.: Experimental islet cell grafting: A transplantation model. Transpl. Proc. 2, 513-515 (1970).
- 35) Strautz, R. L.: Studies of hereditary-obese mice (obob) after implantation of pancreatic islets in millipore filter capsules. Diabetologia, 6, 306-312 (1970).
- 36) Gates, R. J. & Lazarus, N. R.: Reversal of streptozotocin-induced diabetes in rats by intraperitoneal implantation of encapsulated neonatal rabbit pancreatic tissue.: Lancet, December, 17, 1257-1259 (1977).
- 37) Theodorou, N. A., Vrbova, H., Tyhurst, M. & Howell, S. L.: Problems in the use of polycarbonate diffusion chambers for syngeneic pancreatic islet transplantation in rats. Diabetologia, 18, 313-317 (1980).
- 38) Gates, R. J., Hunt, M. I., Smith, R. & Lazarus, N. R.: Return to normal of blood-glucose, plasma-insulin, and weight gain in New Zealand obese mice after implantation of islets of Langerhans. Lancet, September, 16, 567-571 (1972).
- 39) Jolly, W. B., Hinshaw, D. B., Call, T. W. & Alvord, L. S.: Xenogenic pancreatic islet transplantation in proteolytic enzyme-bonded diffusion chambers in diabetic rats. Transpl. Proc., 9, 363-365 (1977).
- 40) Porath, J., Axén, R. & Ernback, S.: Chemical coupling of proteins to agarose. Nature. 215, 1491-1492 (1967).
- 41) Cuatrecasas, P.: Agarose derivatives for purification of protein by affinity chromatography. Nature, 228, 1327-1328 (1970).
- 42) Gorers, P. A. & O'Gorman, P.: Cytotoxic activity of isoantibodies in mice. Transplant. Bull., 3, 142-143 (1956).
- 43) 中野博重・中島祥介・仲井恵三・瀬川雅数・白鳥常男: 異種膵ランゲルハンス氏島移植-Irradiationの生着延長効果について-。移植, 17, 352-358 (1982).
- 44) 張 紹元・西岡久寿弥: Direct cytotoxic test. 移植, 5, 277-280 (1970).
- 45) 張 紹元: Cytotoxic test. 免疫実験操作法II, 細胞抗原IV-1, 346-348 (1971).
- 46) Shiroishi, T., Sagai, T. & Moriwaki, K.: A simplified micromethod for cytotoxicity testing using a flat-type titration plate for the detection of H-2 antigens. Microbiol. Immunol., 25, 1327-1334 (1981).
- 47) Barker, C. F., Reckard, C. R., Ziegler, M. M. & Naji, A.: The liver as an immunologically privileged site for rat pancreatic islet allografts. Diabetes, 24 (Supplement 2), 418 (1975).
- 48) Kolb, E., Urfer, K. & Largiadér, F.: Early rejection of Allotransplanted pancreatic islets in the dog. Transpl. Proc., 11, 543-548 (1979).

Studies on Xenotransplantation of Pancreatic Islets of Langerhans; Special Reference to an Assessment of Pancreatic Islet Cell Transplantation using Diffusion Chambers Masayuki Note, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 94, 39-53 (1985)

Key words: islet chamber, diffusion chamber, xenotransplantation of islets, immunosuppression, direct cytotoxic test

Abstract

In order to examine a xenotransplantation of islets of Langerhans obtained from the golden hamster into the streptozotocin induced diabetic rat, a diffusion chamber was devised for enclosure of the islets using polycarbonate membrane filters. Preliminary test of six kinds of filters showed no significant differences in the permeability of glucose or insulin into or from the chamber. In the case of intraperitoneal xenotransplantation of the islet diffusion chamber containing 1,500 hamster islets, the plasma insulin levels of the diabetic rats were significantly elevated for a week after transplantation but the blood glucose levels remained unchanged. However, 2 of 5 diabetic rats with the chambers containing 6,000 islets transplanted showed an increase in the plasma insulin level and decrease in the blood glucose level for about 10 days with a lowered level of urinary glucose. In contrast, direct xenotransplantation of islets gave no significant effects on the diabetic status of the rats, except for a slight improvement within few days of transplantation. Histological examination of the islets in the diffusion chambers xenotransplanted into the diabetic rats showed no significant infiltration of immunocompetent cells, but degenerative changes of the islets were observed. These changes were probably due to an interruption of permeability of nutrient substances through the membrane filter. On the contrary, severer immune rejection responses and destruction of implanted islets occurred in the case of direct xenotransplantation. Anti-hamster antibody in the xenotransplanted rats was determined by a direct cytotoxic test to evaluate the immunoprotective effect of the diffusion chamber. In the diabetic rats which received islets directly *via* portal vein or peritoneal cavity, the antibody titer began to rise within 2 to 5 days, whereas xenotransplantation with the islet diffusion chamber caused no elevation of antibody titer during a 2-week period. These result may indicate that the xenotransplantation of islets of Langerhans enclosed in the diffusion chamber is a useful tool in the study of pancreas transplantation, because the diffusion chamber method protects an immunological rejection against xenogenic tissues.