

Studies on Organ Culture of Cryopreserved Rat 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/2297/7739

凍結保存ラット膵ランゲルハンス島の器官培養に関する研究

金沢大学医学部第二外科学講座 (主任: 宮崎 逸夫教授)

福井医科大学第一外科学講座 (主任: 中川原儀三教授)

今 堀 努

(昭和59年7月11日受付)

本研究では凍結保存の前後に培養したラット膵ランゲルハンス島(ラ島)のインスリン産生能並びにその移植効果について検索した。種々の凍結条件の検討により、ラ島はウィスター系雄ラットよりコラゲナーゼ消化法により分離された後、凍害防止剤として10%ジメチルスルフォキシド(dimethylsulfoxide, DMSO)を用い、4°Cで30分浸漬した後に、-196°Cの液体窒素中で7-14日間凍結保存された。この条件下で凍結保存すると、ラ島の75%が凍結前と同様の形態を維持していた。次に凍結保存前後はおける培養付加の意義を、インスリン産生能より検討した。凍結前3-4日培養付加ラ島は、培養せずに凍結したラ島と比較して、解凍直後にはインスリン産生能に差を認めなかったが、しかし解凍後さらに培養を行うと、培養経過に伴うインスリン産生能は早く回復する傾向を示した。この傾向は、グルコース(50-300 mg/dl)負荷試験で明らかな差となってあらわれた。次に移植実験で、凍結の前後に3-4日の短期培養を付加した凍結保存ラ島を、ストレプトゾトシン糖尿ラットの門脈内へ同種移植すると、移植後2週間以内に糖尿病状態より回復し、有効な結果を示した。以上より、ラット膵より分離され凍結保存されたラ島の最も有効な移植方法は、凍結前に3-4日の培養を付加することであり、更に移植時に3-4日の培養を追加することである。

Key words ラット膵ランゲルハンス島, 凍結保存, 器官培養, 同種移植

近年膵臓悪性腫瘍や高度慢性膵炎に対して膵臓全摘術が積極的に施行される¹⁾が、術後の内・外分泌機能の欠落、なかんずくインスリン欠落に対する補充療法としての膵移植は注目される方法である。膵移植法としては、膵臓器移植、組織移植、膵ランゲルハンス島移植に分けられるが、教室ではこれまでラット膵ランゲルハンス島(以下ラ島と略す)移植の基礎的研究を進めてきた。

ところでラ島移植で糖尿病を改善させるには数多くのラ島を移植することが必要で²⁾、移植手技のみならずその保存法も重要な課題となる。ラ島の長期保存法としては現在、培養あるいは凍結を利用する2方法があげられている³⁾。教室の凍結保存に関するこれまでの研究で、分離ラ島の保存ならびに移植は可能であることを証明してきたが、解凍後のインスリン産生能は50%前後と必ずしも満足できる結果が得られていな

い。これは主に凍結-解凍過程で被るラ島損傷に起因すると推察されている⁴⁾。

本研究では凍害防止剤の濃度、浸漬温度、浸漬時間を決定する目的で、解凍後のラ島回収率および解凍後のインスリン産生量を指標としてこれらの諸条件を検討した。次いでこれらのうちで最適条件下でラ島を凍結保存し、その後に培養を付加した凍結-培養ラ島について、そのインスリン産生能および同種移植効果について検討した。

材料および方法

I. 膵ランゲルハンス島の分離法

1. 実験動物

実験動物は体重200-300gのウィスター(Wistar)系雄ラットを用いた。

2. 実験器具および滅菌法

Studies on Organ Culture of Cryopreserved Rat Pancreatic Islets of Langerhans. **Tsutomu Imahori**, Department of Surgery (II) (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University and Department of Surgery (I) (Director: Prof. G. Nakagawara), Fukui Medical School.

実験器具は全て滅菌したものを使用し、操作は臍摘出の段階より無菌的に行った。すなわち臍摘出の際に使用した手術器具は高圧滅菌(120°C, 20分間)し、シャーレ、三角フラスコ、ピペット等のガラス器具は乾熱滅菌(160°C, 60分間)した。さらにゴム栓、培養皿、凍結用試験管はガス滅菌(10%アセチレンオキシaidガス, 5時間)したものを使用し、ミリポアフィルター(0.45 μ)は滅菌済のものを用いた。

3. 臍臓摘出とランゲルハンス島の分離

ラットをエーテル吸入麻酔後ヒビテン液で全身消毒し開腹した。Lacyら⁹⁾の方法にならない総胆管の十二指腸開口部を結紮した後、総胆管内にハックス液(グルコース60mg/dl含有)20mlを注入し臍全体を水腫状に膨化させた。次いで腸管を損傷しないように注意深く臍を摘出し、無菌箱内へ移した。摘出臍を20-30mlの冷ハックス液で洗浄後、眼科用クーバーを用いできるだけ細く切りながら50ml容三角フラスコに入れた。コラゲナーゼ(collagenase 4188 CLS IV, Miripore Co., U. S. A.) 30mg, 牛血清60mgをハックス液8mlに溶解後、ミリポアフィルターで濾過滅菌し、三角フラスコに注入しゴム栓で密栓後、37°C水浴槽内で約15分間振盪(shaking incubation, 150回/分)し消化を行った。一様に泥状となった時点で消化を終え、50ml容円錐形メスシリンダーに移し換え、温ハックス液で4回、さらに冷ハックス液で4回洗浄および沈澱を繰り返す。残存するコラゲナーゼや臍外分泌組織を除去した。最終沈澱物を冷ハックス液と混和後滅菌シャーレに移し、実体顕微鏡下でラ島を確認しながら毛細管ピペットにて採取し実験に供した。

II. 凍結方法

1. 凍結条件の設定

分離直後のほぼ完全な形態を保つラ島10個を20%牛胎児血清(fetal bovine serum, Lot. 40551204 Flow Laboratories, U. S. A.)を添加したダルベッコ培地(Dulbecco-modified Eagle's MEM, グルコース100mg/dl含有)、および凍害防止剤の2.5mlを入れた凍結用チューブ(38×12.5mm, Nac, Sweden)に收容した。凍害防止剤としてジメチルスルフォキシaid(dimethylsulfoxide, MERCK, West Germany, 以下DMSOと略す)を用い、その濃度(5%, 10%, 20%)、その浸漬温度(4°C, 20°C)、時間(30分, 60分)の組み合わせで12群を作製した。またこれらの条件の他に、分離後短期培養を付加し、ついで4°C下で10%DMSOを30分間浸漬作用させたのち凍結保存した群(凍結前培養群)を作製し合せて検討した。

2. 凍結方法

分離ラ島をDMSO濃度、浸漬温度、時間の各種条件

下で浸漬作用させたのちに、-20°C冷凍庫中で30分間、次いで-80°C超冷温槽で30分間静置後、-196°C液体窒素中に移し保存した。保存期間は7-14日であり、解凍は37°C水浴槽中にて行った。

III. 培養方法

培養液は20%牛胎児血清を添加したダルベッコ培地を使用し、アンピシリン(ampicillin)100 μ g/dl, ストレプトマイシン(streptomycin)100 μ g/dlを添加して基礎培地とした。培養器としてmulti-dish tray(Limbro, U. S. A. 24穴)を用い、各ウェル(well)の基礎培地1mlの中へ、諸条件下で浸漬後凍結保存して得られたラ島2個を、毛細管ピペットにて移し、37°C 5%炭酸ガス培養恒温器で静置培養した。培地交換は原則として3日毎に行い、培地中に産生されるインスリン量を固相法(solid phase method, Shionogi, Japan)にて測定した。なお、凍結期間によるラ島のインスリン産生能の比較検討では培地交換は毎日行った。

IV. グルコース負荷試験による凍結-培養ラ島のインスリン産生能

解凍直後、解凍後培養4日目、2週間目のラ島を用い、短時間インキュベーション(short time incubation)によるインスリン分泌実験を行った。対象とした凍結保存ラ島は、解凍後の回収率および培養において、培地中に産生されたインスリン量の成績より良好と判断した10%DMSO・4°C・30分作用群(C-30)と凍結前培養群(G-30)の2群である。まず、両群のラ島を0.2%牛血清アルブミン(bovine serum albumin, Lot. 46206, Armour Pharmaceutal Co., U. S. A.)を添加したハックス液にて120分間プレインキュベーション(pre-incubation)した。その後、各々のラ島5個を試験用培地0.5ml含有小試験管内に入れ95%酸素、5%炭酸ガスを通気後、90分間37°C水浴槽中にて70-80回/分の振盪(shaking incubation)を行い、培地中に産生されたインスリン量を測定した。試験用培地としてはクレブス・リンガー重炭酸緩衝液(Krebs-Ringer bicarbonate)に0.2%牛血清アルブミン、5mM グルタミン酸(glutamic acid)、5mM ピルビン酸(pyruvic acid)、5mM フマル酸(fumaric acid)を添加したものを使用し、グルコース無添加(0mg/dl)と50mg/dl, 300mg/dl添加の計3群で検討した。

なお、以上の推計学的処理はステューデントTテスト(Student's t-test)で行い、0.05以下のP値を有意差ありと判定した。

V. 凍結-培養ラ島の形態的、組織学的観察

解凍後培養に供せられたラ島の形態は倒立型培養顕微鏡、ノマルスキー式微分干渉顕微鏡を用いて観察し

た。組織学的検索は解凍直後、あるいは凍結-培養ラ島をラット門脈より注入した後、肝臓を摘出し5mm間隔の全肝ブロックを作製、ヘマトキシリン・エオジン染色 (hematoxylin-eosin stain, 以下 H-E 染色と略す)、アルデハイド・フクシン染色 (aldehyde-fuchsin stain, 以下 A-F 染色と略す) を施し、小葉間静脈内に栓塞したラ島で観察を行った。

VI. 凍結-培養ラ島の門脈内同種移植

1. 糖尿ラットの作成

体重250-300gのウィスター系雄ラットにストレプトゾトシン (streptozotocin, lot. 1613E, Upjohn, U. S. A., 以下 STZ と略す) 65 mg/kg を尾静脈より静注し糖尿ラットを作成した。静注後は代謝ケージに収容し、血糖、尿糖、尿量、体重を測定した。静注後1週間目で24時間絶食とし尾静脈より採血、血糖値300 mg/dl 以上のものを STZ 糖尿ラットとし移植実験に供した。

2. 門脈内同種移植

移植方法は門脈内注入法とし、凍結前に培養した G-30 群をさらに解凍後短期培養を付加して用いた。それらのラ島350-400個をシャーレに集め、27ゲージ針にて1ml注射器に吸入、全量が1ml以下となるようにした。その後、実験的に作成した STZ 糖尿ラットをエーテル吸入麻酔下にて開腹、門脈本幹内へラ島を直接注入し、綿棒にて数分間圧迫、止血を確認後閉腹した。移植後は代謝ケージに収容し血糖、尿量、尿糖、体重の諸検査を行った。なお、免疫抑制剤、抗生剤の

投与は行わなかった。

成 績

I. 解凍後のラ島回収率

7日間凍結保存後に解凍したラ島を、培養顕微鏡下で観察してラ島回収率を検討した(表1)。

DMSO濃度で比較すると10%群は52-75%と良好な回収率を示したが、5%群は全て45%以下であった。20%群では作用温度による影響が大きく、4°C・30分浸漬では63%、60分浸漬では52%の回収率であるのに対して、20°C・30分浸漬では27%、60分では22%の回収率であり有意の低値 ($p < 0.01$) を示した。作用温度による影響は10%群についてもみられ、4°Cの回収率が平均67.5%と20°Cの53%に比較して有意の高値 ($p < 0.01$) を示した。また浸漬時間の比較では、30分群の方が60分群に対して一般に回収率は高値を示した。以上より10%DMSO・4°C・30分群 (C-30) が回収率75%であり、ついで20%DMSO・4°C・30分群 (A-30)、10%DMSO・4°C・60分群 (C-60) は60%以上と高値を示し、10%DMSO・20°C・60分群 (D-60)、20%DMSO・4°C・60分群 (A-60)、10%DMSO・20°C・30分群 (D-30) は50%以上の回収率であった。一方5%DMSO・20°C・30分群 (F-30)、20%DMSO・20°C・30分群 (B-30)、20%DMSO・20°C・60分群 (B-60) は35%以下の回収率であった。なお凍結前培養群 (G-30) の回収率は80%と最も高い値を示した。

II. 凍結-培養ラ島のインスリン産生能

Table 1. Effects of immersion of islets of Langerhans in DMSO at different conditions on the shape of islets after thawing

Term of the groups	Conditions of immersion of the islets in DMSO			Ratio of the islets with normal shape after thawing to frozen islets (%)
	Concentration of DMSO (%)	Temperature (°C)	Time (min.)	
A-30	20	4	30	63±2.5
A-60	20	4	60	52±11.7
B-30	20	20	30	27±11.2
B-60	20	20	60	22±19.1
C-30	10	4	30	75±8.9
C-60	10	4	60	60±13.4
D-30	10	20	30	52±14.0
D-60	10	20	60	54±7.4
E-30	5	4	30	43±12.5
E-60	5	4	60	41±4.9
F-30	5	20	30	45±8.9
F-60	5	20	60	31±3.7
G-30*	10	4	30	80±6.3

* Only the islets of this group are cultured for 3-4 days before pretreatment of the immersion.

1. 凍結期間のインスリン産生能におよぼす影響
回収率の良好であった10%DMSO・4°C・30分群
(C-30)の7日間凍結, 14日間凍結群と凍結前培養群
(G-30)の14日間凍結保存ラ島を, 解凍後に培養に供
した. 毎日交換された培地中のインスリン量を測定し,

凍結期間のインスリン産生におよぼす影響を検討した
(図1).

各群のインスリン量は, 培養1日目では397-530
 $\mu\text{U}/\text{ml}$ と高値を示したが, 2日目には最低値となり,
その後インスリン量は培養経過とともに漸次増加し

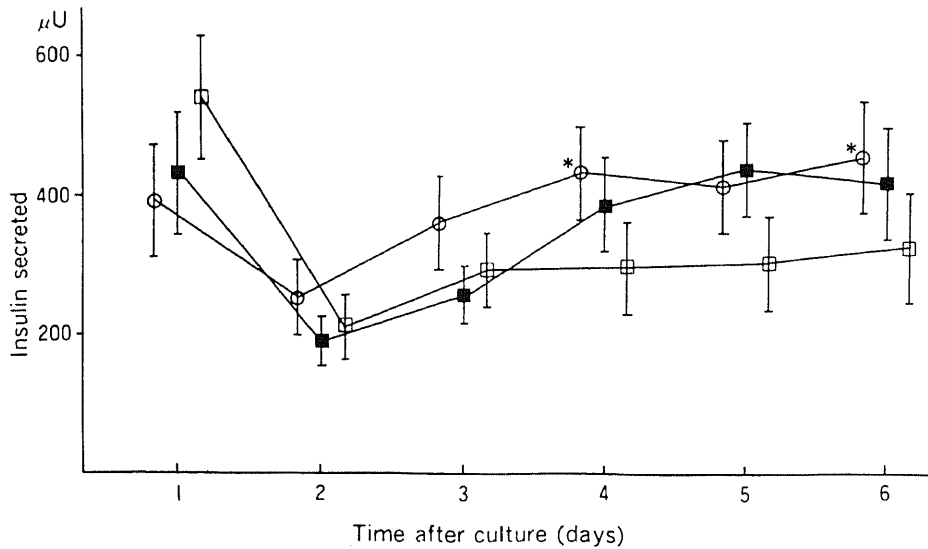


Fig. 1. Daily changes in insulin release from cultured islets of Langerhans. Islets of C-30 are cryopreserved for 7 (■) & 14 (□) days and those of G-30 for 14 days (○).

*Significant difference between C-30 (14 days) and G-30, $p < 0.05$.

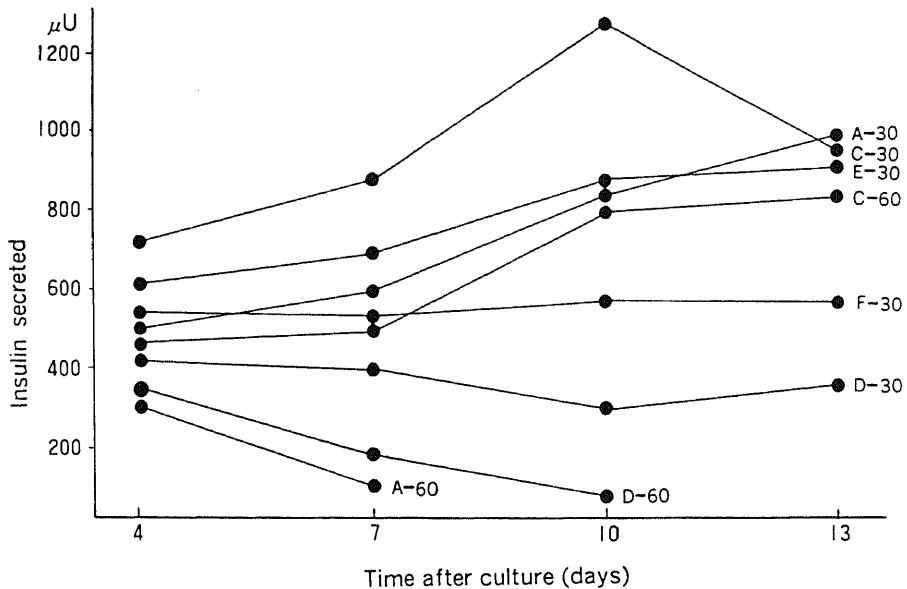


Fig. 2. Changes in insulin release from each group into the culture medium at different periods of culture. Refer to Table 1 for the terminology of each group.

た。

C-30 群の 7 日間凍結群と 14 日間凍結群を比較すると、1-3 日目は 7 日間凍結群が 14 日間凍結群より低値を、4 日目には 7 日間凍結群が高値となる傾向がみられたが、6 日目には有意差は認められなかった。したがって、7 日間凍結と 14 日間凍結の間には凍結期間によるインスリン産生能への明らかな影響はないと判断された。

一方 14 日間凍結で凍結前非培養群 (C-30) と凍結前培養群 (G-30) を比較するに、培養直後は両群間で差は認めないが、培養経過とともに凍結前培養群は凍結前非培養群に比し有意のインスリン産生能の増加をみた。

2. 凍結条件からみたインスリン産生能

ラ島回収率が比較的良好であった 8 群について、14 日間凍結保存を行い、3 日毎に交換された培地中のインスリン量を測定し、凍結条件からみたインスリン産生能の検討を行った (図 2)。培養初期は 10%DMSO・4°C・30 分群 (C-30) が $735 \pm 98.2 \mu\text{U/ml}$ と最高値であり、5%DMSO・4°C・30 分群 (E-30)、5%DMSO・20°C・30 分群 (F-30) が比較的良好な値であった。培養日数の経過とともに 20%DMSO・4°C・30 分群 (A-30)、C-30、E-30、C-60 群はインスリン産生能の増加がみられ、培養 13 日目には C-30 群は $1068 \pm 114 \mu\text{U/ml}$ となり、A-30、E-30 群と共に $1000 \mu\text{U/ml}$ 以上の値となり、培養によるインスリン産生能の改善が示唆され

た。また、F-30 群は初期インスリン産生量は比較的良好であるにもかかわらず、培養によるインスリン産生量の増加はみられず、13 日目のインスリン量は C-30 群の 58% とどまった。10%DMSO・20°C・30 分群 (D-30) も培養経過を通じてインスリン産生量に変化なく、F-30 群と同様に培養によるインスリン産生能の回復は得られなかった。一方 10%DMSO・20°C・60 分群 (D-60)、20%DMSO・4°C・60 分群 (A-60) は培養初期よりインスリン産生量は低値であり、培養経過とともにインスリン産生量は低下した。A-60 群は 7 日目、D-60 群は 10 日目にインスリン量が $100 \mu\text{U/ml}$ 以下となり、培養によるインスリン産生能の回復はみられないと判断された。

3. 凍結前培養ラ島のインスリン産生能

凍結前に 3-4 日間の短期培養を付加したラ島 (G-30) を 14 日間凍結保存した後培養に移し、3 日毎に交換された培地中のインスリン産生量を測定し、凍結前非培養群 (C-30) と比較しながら凍結前に培養を付加した意義について検討した。対照としては分離直後の新鮮ラ島を用いた (図 3)。

凍結前培養群の 4 日目インスリン量は $823 \pm 64.0 \mu\text{U/ml}$ で対照の 63%、凍結前非培養群は $735 \pm 98.2 \mu\text{U/ml}$ で対照の 57% であり共に対照に比較して有意の低値 ($p < 0.01$) をみた。しかし培養経過とともに両群のインスリン産生量は増加し、7 日目には対照と差異はみられなくなった。13 日目には G-30 群は

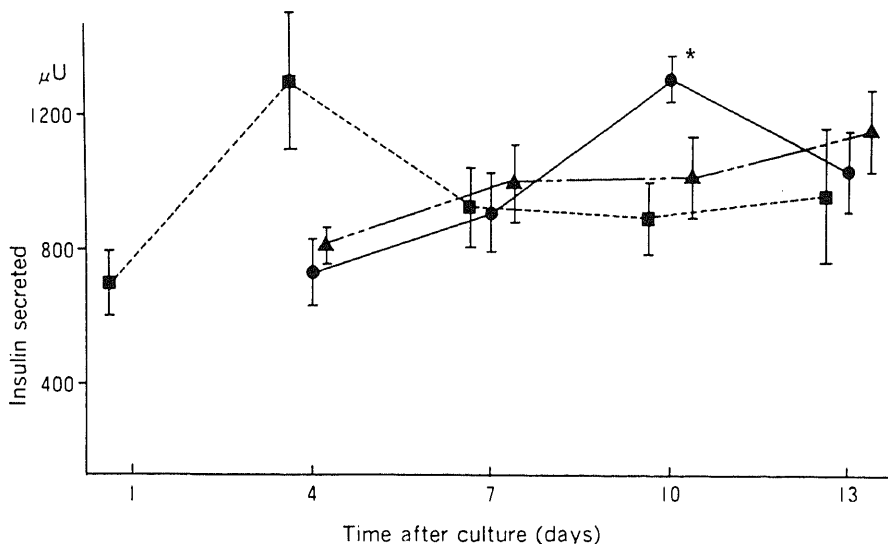


Fig. 3. Comparison of insulin secreted from group G-30 (▲) and C-30 (●) into the culture medium. Freshly prepared islets are used as the control group (■).

*Significant difference between C-30 and G-30, $p < 0.05$.

Table 2. Effect of glucose on insulin release from cultured islets of groups C-30 and G-30

Culture period after thawing	Insulin secretion ($\mu\text{U}/5$ islets/90 min.) of islets isolated from pancreas in Krebs-Ringer bicarbonate		
	Glucose concentration (mg/100 ml)		
	0	50	300
Control*	$69.7 \pm 10.7^{**}$	75.0 ± 7.4	161.8 ± 20.0
Group C-30	0	35.2 ± 9.8	40.2 ± 8.8
	4 days	63.8 ± 17.1	72.8 ± 17.4
	2 weeks	67.3 ± 4.3	74.3 ± 3.0
Group G-30	0	39.0 ± 6.6	62.0 ± 18.5
	4 days	41.4 ± 9.9	64.6 ± 10.9
	2 weeks	41.6 ± 7.2	66.0 ± 11.4

* Control study was performed by using of freshly prepared islets.

** Values are expressed as mean \pm S.D. (N=10).

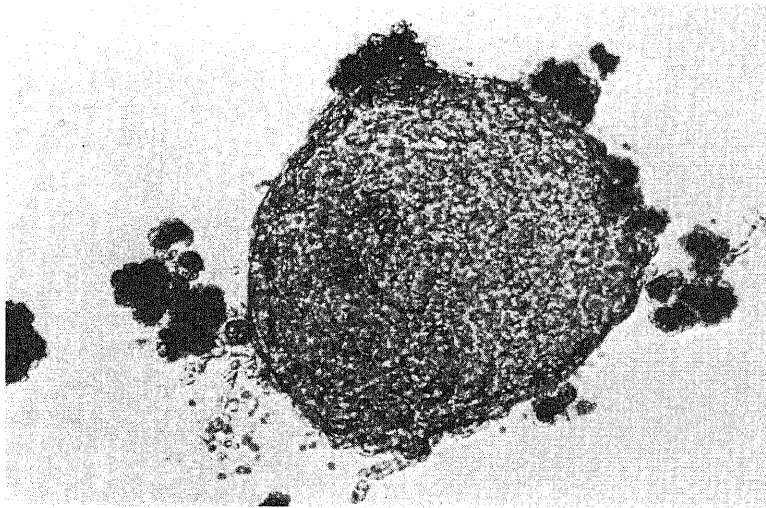


Fig. 4. Representative islet of Langerhans isolated from the rat pancreas by collagenase digestion. The islet is oval in shape and some exocrine pancreatic tissues remain attached around it ($\times 100$).

$1194 \pm 128 \mu\text{U}/\text{ml}$ で対照の 125%, C-30 群は $1068 \pm 114 \mu\text{U}/\text{ml}$, 112% となり共に対照を上まわるインスリン産生能であった。一方 C-30 群と G-30 群間での比較では, 10 日目を除いてはインスリン産生量に有意の差は認められなかった。

4. グルコース負荷試験による凍結-培養ラ島のインスリン産生能

解凍後の回収率およびインスリン産生能が良好であった 10% DMSO \cdot $4^\circ\text{C} \cdot$ 30 分群 (C-30) と凍結前培養群 (G-30) の 2 群について検討した (表 2)。

解凍直後の基礎培地 (グルコース濃度 0 mg/dl) で

のインスリン産生能の比較では, C-30 群, G-30 群共に対照の 50.5%, 56.0% と有意の低値 ($p < 0.01$) を示した。しかし, グルコース負荷でみると, G-30 群のインスリン量は 50 mg/dl 負荷で対照とほぼ同程度のインスリン産生量を示したのに対し, C-30 群では各々 53.6%, 55.0% と低値 ($p < 0.01$) であり, 凍結前に短期培養を付加することはインスリン産生能維持に有利であると判断された。

一方培養経過より検討すると, 両群共に培養経過とともにインスリン産生量の増加がみられ, 培養によるインスリン産生能の回復が確認された。特に G-30 群

の 300 mg/dl グルコース負荷に対するインスリン産生量は、4 日目で対照の 106.3%、2 週目で 114.8%と対照以上のインスリン産生量を示したのに対し、C-30 群は各々 76.8%、97.5%にとどまり凍結前培養群のインスリン産生能の回復が早いことが示唆された。

III. ラ島の形態学的、組織学的観察

分離直後のラ島は半透明で、概ね円形ないし楕円形であるも辺縁はやや不整で、一部のラ島では被膜が損傷したものや、外分泌組織の付着したものも見られた

(図 4)。これらのラ島を培養に移すと 3 日目以内にほとんど全てのラ島は球形となり、周辺部の構造は分離直後のものに比して平滑となり、被膜の損傷も修復された形で培養された。また付着していた外分泌組織はほとんどラ島より剥離していた(図 5)。これら培養ラ島を凍結保存し解凍すると、ラ島は全体に水腫状に膨脹し、辺縁も不整で、一部ラ島では“ケバ立ち”が観察された。また被膜の一部が破壊されたラ島もみられた(図 6)。解凍後に更に培養に移すと、3 日目にはほ

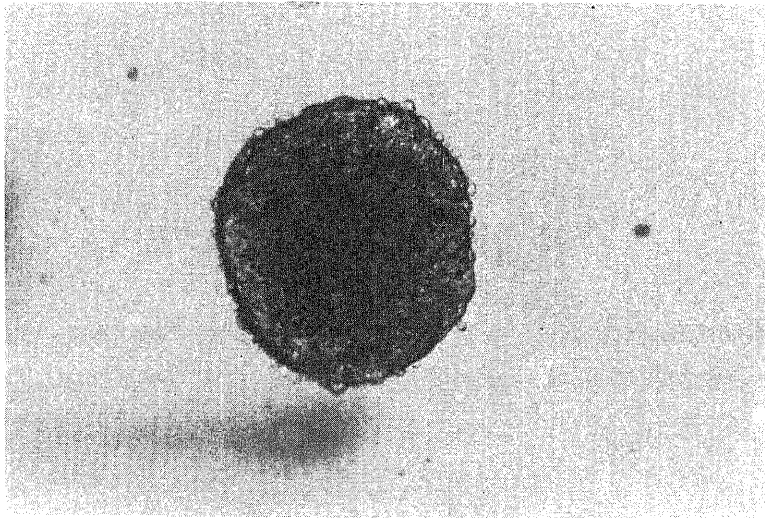


Fig. 5. Islet of group G-30 cultured for 3 days immediately after isolation. It becomes round in shape ($\times 100$).

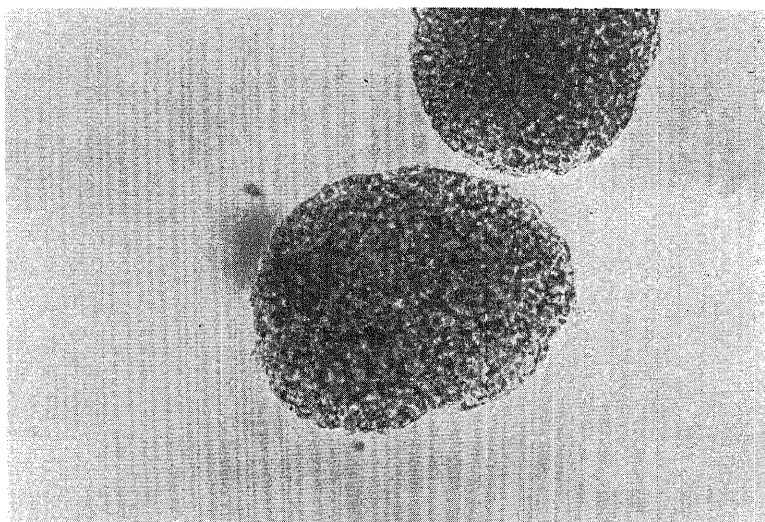


Fig. 6. Islets of group G-30 cryopreserved and immediately after thawing. These islets closely resemble freshly isolated islets ($\times 100$).

とんどのラ島は辺縁整となり、被膜の強靱化が起り、解凍後に水腫状に膨張していたラ島は全体に充実した球形として観察された(図7)。それ以降培養を継続しても大きな変化は見られなかった。

組織学的検索では、解凍直後のラ島はH-E染色では、辺縁は整で被膜におおわれ、分離直後と同様の像を呈し、明らかな細胞質の変化、核の膨化は見られなかった(図8)。またA-F染色で観察すると青紫色に濃染した顆粒を有するベータ細胞(β -cell)をラ島内に多

数認めた(図9)。

一方、解凍後3日間培養したラ島のH-E染色およびA-F染色では、ラ島細胞の軽度空胞変性を見るものの、解凍直後のものとほぼ同様の像を呈していた(図10, 11)。

IV. 門脈内同種移植

1. ストレプトゾトシン糖尿ラット対照群

STZ糖尿ラット5匹についての20週までの観察では、血糖値は常に300 mg/dl以上を呈し、尿糖は平均

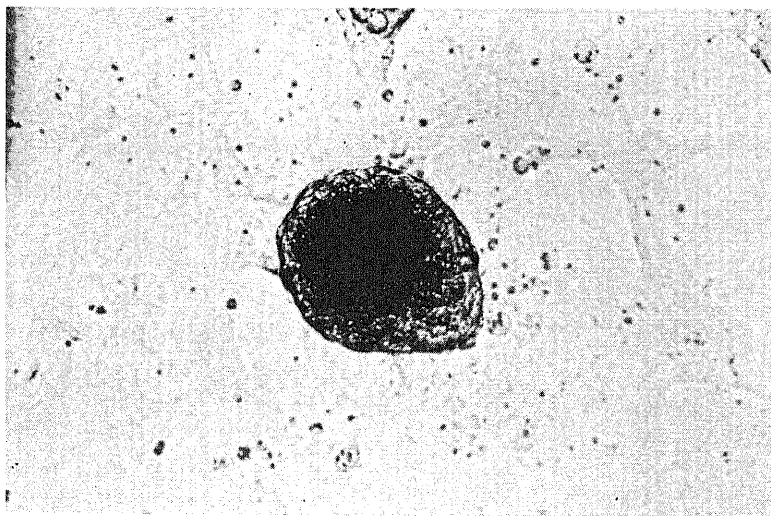


Fig. 7. Islet of group G-30 cryopreserved and cultured for 3 days ($\times 100$).

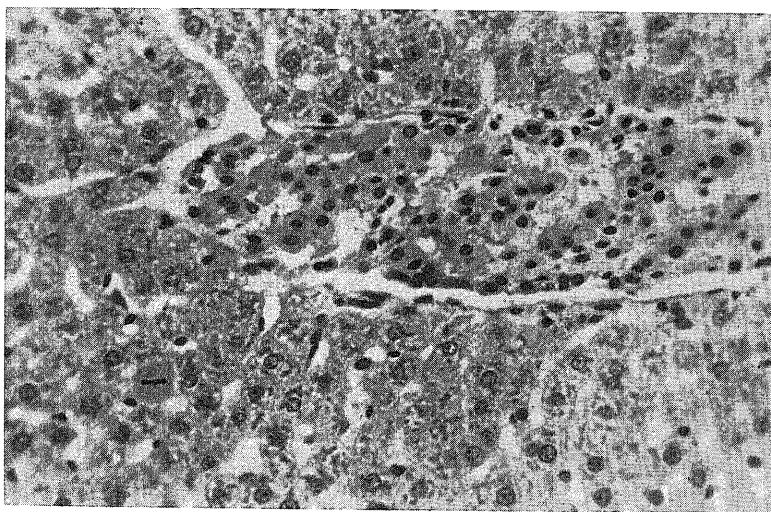


Fig. 8. Histology of an islet of Langerhans cryopreserved and transplanted in the liver without culture. The cellular features appear normal ($\times 100$, H-E stain).

10.2 g/日、尿量も 113 ml/日 で体重は 20 週で平均 32% の減少を示した。

2. 同種移植ラットの経時的推移

4 例の移植実験を行った。移植経過は以下の如くである (図 12; C-1, C-2, C-3, C-4 ラット)。

1) C-1 ラット: 体重 305 g, 血糖 100 mg/dl ラットに STZ を静注すると 1 週後に血糖は 400 mg/dl 以

上、尿量 155 ml/日、尿糖 12.5 g/日の糖尿病状態を示した。そこで約 350 個のラ島を門脈内に移植した。移植後 1 週間で血糖 150 mg/dl, 尿量 60 ml, 尿糖 1.2 g/日と著明な改善がみられ、2 週目には血糖 110 mg/dl となり以後 12 週まで 120 mg/dl 以下の値であった。16 週になり一時的に 150 mg/dl と上昇するも 20 週目には 135 mg/dl に復していた。尿糖は 2 週目で 0.75

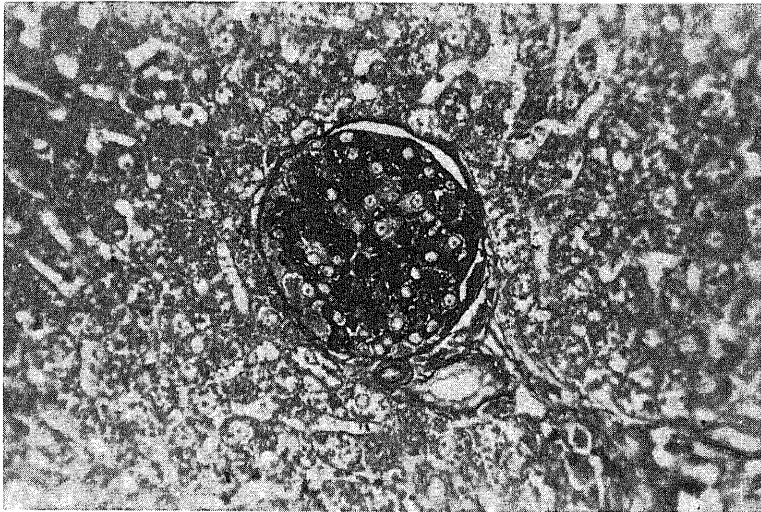


Fig. 9. Histology of an islet cryopreserved and transplanted in the liver without culture. β -Cells are usually not found at the periphery of the islet ($\times 100$, A-F stain).

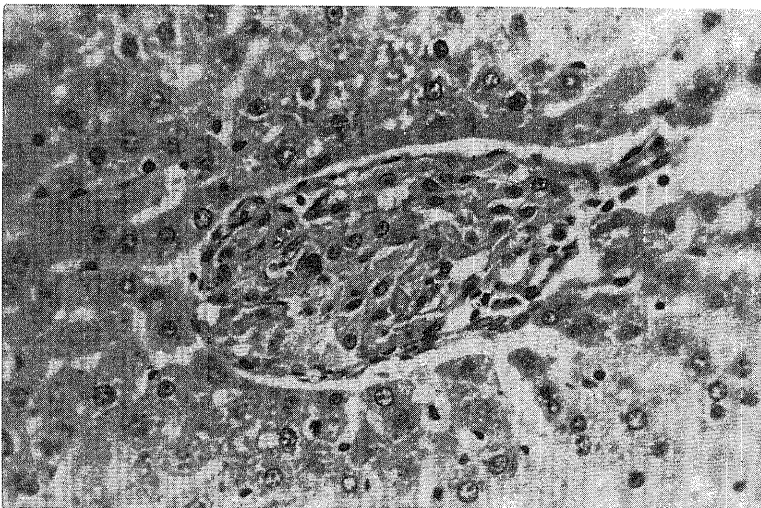


Fig. 10. Histology of an islet of Langerhans cryopreserved and transplanted in the liver after a 3-day culture. The islet cells appear viable with normal structural organization, indicating the favorable effect of the culture on the viability of cells ($\times 100$, H-E stain).

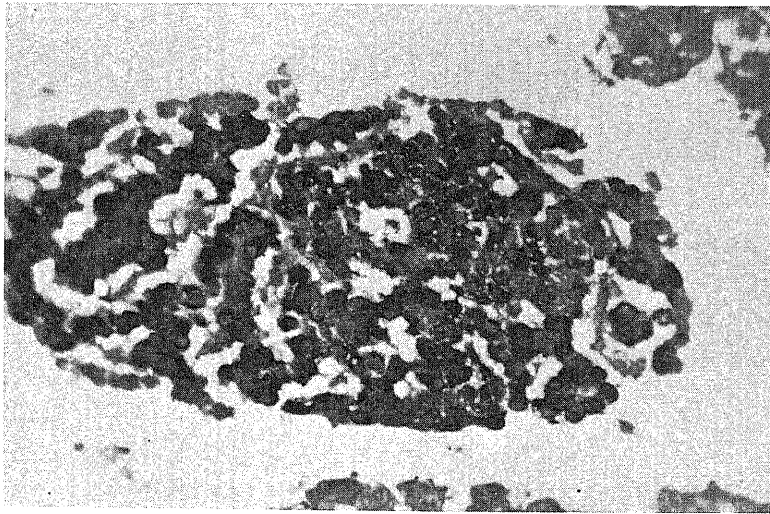
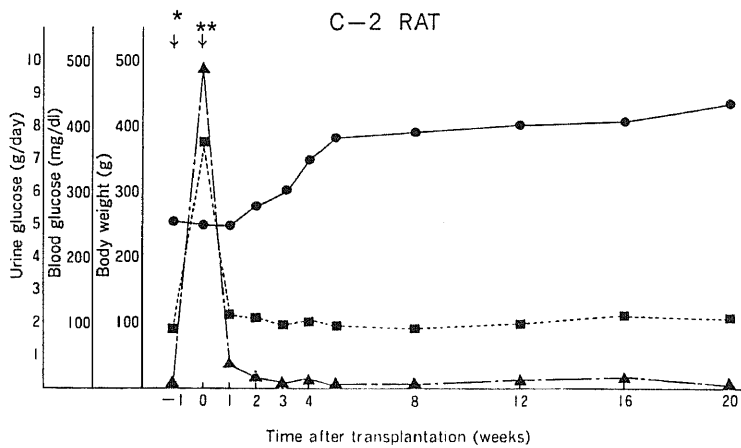
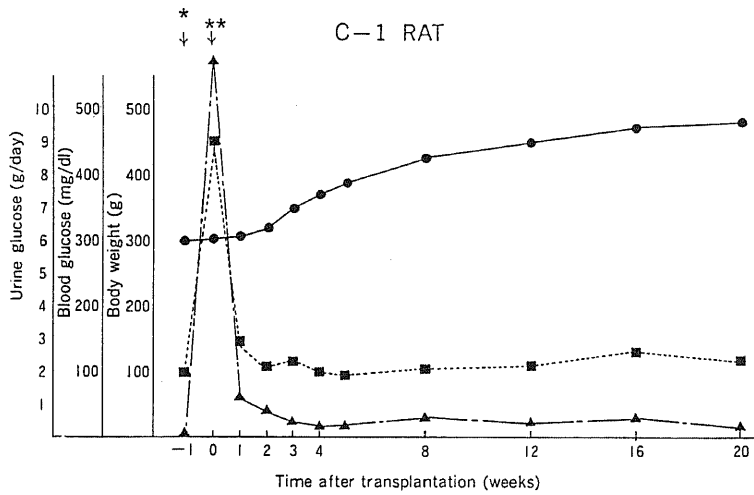


Fig. 11. Histology of an islet of Langerhans cryopreserved and transplanted in the liver after a 3-day culture. β -Cells show slight degeneration as compared with those of islets without culture in Fig. 9 ($\times 100$, A-F stain).



g/日と低下し、以降0.2-0.5 g/日の間で推移した。尿量は3週目以降15 ml/日以下であった。また体重は移植後漸次増加し、20週で460 gとなった。

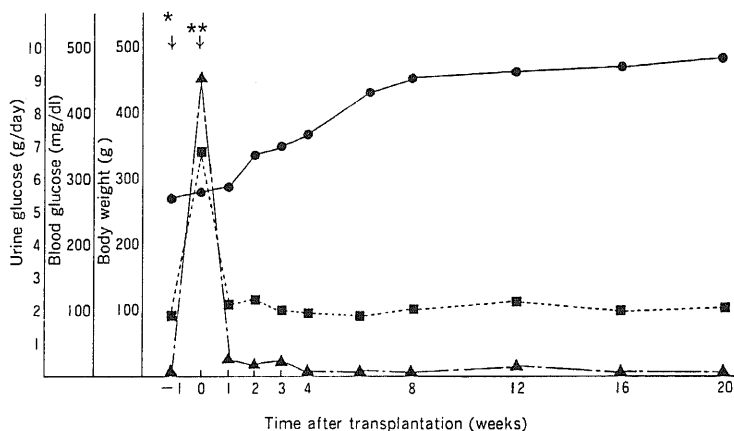
2) C-2 ラット：STZ 静注により255 gから5 gの体重減少があり、血糖は375 mg/dl、尿糖9.8 g/日を示した。ラ島400個の移植により、1週目には血糖122 mg/dl、尿糖0.5 g/日となり、以降血糖115 mg/dl以下、尿糖0.0-0.2 g/日を推移した。全身状態も良好で20週には体重430 gと69%の増加を認めた。

3) C-3 ラット：STZ 静注1週後体重275 g、血糖345 mg/dl、尿糖9.0 g/日のレシーピエント (recip-

ient)ラットにラ島400個を移植した。1週後には血糖118 mg/dl、尿糖0.4 g/日となり20週まで血糖125 mg/dl以下、尿糖0.0-0.4 g/日を推移した。体重は76%の増加をみた。

4) C-4 ラット：体重280 g、血糖95 mg/dlのラットでSTZ 静注により体重270 g、血糖400 mg/dl以上、尿糖9.4 g/日を示した。ラ島400個移植により1週後には血糖280 mg/dl、2週目190 mg/dl、4週目130 mg/dlとなり6週目以降12週まで120 mg/dl以下の血糖値であった。尿糖は1週後2.1 g/日であり、6週目で0.5 g/日以下となった。また体重は2週目以降漸

C-3 RAT



C-4 RAT

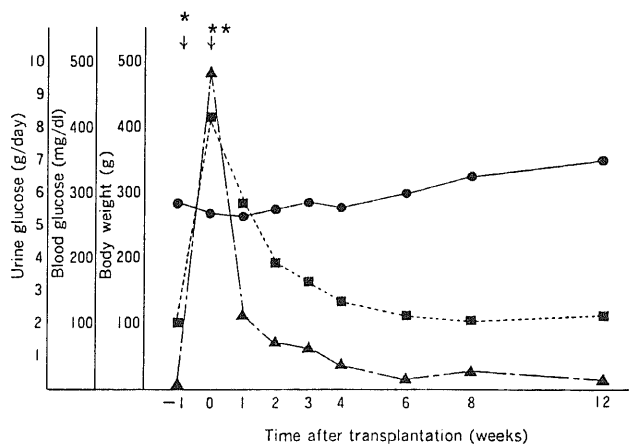


Fig. 12. Effects of transplantation (***) of islets of Langerhans into streptozotocin (*)-induced diabetic rats via portal veins (C-1, C-2, C-3 and C-4 rats). they were evaluated by the serum glucose (■), urine glucose (▲) and weight gain (●). Islets cultured for 3-4 days both before and after the cryopreservation (G-30) were used for the present experiments.

次増加したが、増加率は6.3g/週で4例中一番低値であった。本例は15週目に死亡したが死因は不明であった。

考 察

膵ラ島移植により糖尿病治療を試みる研究はLacyら⁵⁾によるコラゲナーゼ消化法(collagenase digestion method)を用いたラ島分離法の確立以来盛んに行われるようになった。Ballingerら⁶⁾、Karlら⁷⁾、Reckardら⁸⁾、Zieglerら⁹⁾、Panijayanondら¹⁰⁾、Leonardら¹¹⁾、木村¹²⁾等は400-1200個のラット分離ラ島を腹腔内、睾丸、門脈内等への同系、同種移植し糖尿病状態からの回復をみたし報告している。しかし、ラットやモルモット等の小動物においてはコラゲナーゼ消化法によるラ島分離は容易で、糖尿病改善のための必要ラ島量を得ることは可能であるが、大動物やヒトではラ島分離は困難であり、得られるラ島数も不十分なため有効な移植効果が発揮されていない現状である¹³⁾。従ってこれらのラ島移植を考える時、大量のラ島を確保する意味においても、一時的に何らかの方法で細胞活性(viability)を失うことなく保存、確保することが重要な課題である。これらの有効な長期保存方法には現在、培養保存と凍結保存の2方法が考えられている。

膵組織の培養の歴史を振り返ると、1954年Chen¹⁴⁾がラット胎児膵を液体培地で10日間培養し、形態学的に観察したことに始まる。分離ラ島の培養保存はMoskalewski¹⁵⁾により始められ、その後高木¹⁶⁾、池上¹⁷⁾、Anderssonら¹⁸⁾、Kostianovskyら¹⁹⁾、小島²⁰⁾、山崎²⁾等によりなされている。小島²⁰⁾は80日間の培養保存を行い、形態学的、機能的に観察検討しており、形態的には分離直後の新鮮ラ島とほぼ同様で、培地中のインスリン産生量もほぼ一定であった。また、グルコース負荷によるインスリン分泌刺激実験でも、新鮮ラ島と同様な分泌反応を示したと報告している。また山崎²⁾も7日間培養保存したラ島を用い、インスリン分泌に対するグルコース、グルカゴン、各種消化管ホルモンの影響の検討を行い、新鮮ラ島と同程度にこれらに充分反応しうるとしている。

ところで培養保存は培養日数の経過とともに培地中の線維芽細胞の増殖、細菌汚染の危険性の増大、手技の煩雑さなどによって大量のラ島を長期保存するには困難な面が多いと考えられる。したがって移植を目的とした大量のラ島の長期保存には凍結保存がより有効な手段と考えられる。

精子²¹⁾、赤血球²²⁾等の単細胞から始った凍結保存は凍害防止剤の研究とともに、骨髄²³⁾、皮膚²⁴⁾、角膜²⁵⁾、心臓²⁶⁾、腎臓²⁷⁾についても行われるようになってきた。

一般に大きな臓器の場合凍害防止剤の臓器内への一様な浸透は困難であり、また臓器内部の温度コントロールが難しいため、細胞内外の氷晶化がおり、細胞破壊や組織構造破壊を招来せしめ、臓器としての機能を十分に再現し得ない問題点を残している。しかしラ島は非常に小さな組織であり凍結保存にかける期待は大きい。出月ら²⁸⁾は膵組織小片を7.5%DMSOで15分間飽和後10-15°C/分の急速冷却により凍結保存を試み、膵全摘犬の腹腔内へ移植したところ、着床生着し血糖値の改善をみたとしている。Kempら²⁹⁾も胎児ラット膵を2M、DMSOにて0.24°C/分の冷却速度で-196°Cにて9-13週間保存後、糖尿病ラット腎被膜下へ移植を行い、糖尿病よりの改善をみたとしている。Knightら³⁰⁾、Frankelら³¹⁾、Fergusonら³²⁾、大野³³⁾等も同様な凍結保存を行い、その有効性を報告している。

さて凍結保存においては凍害防止剤の必要性は言及するまでもないが、凍害防止剤の浸漬作用条件も重要な因子と考えられる。著者は本実験では凍害防止剤としては広く使用されているジメチルスルフォキシド(dimethylsulfoxide, DMSO)を用いたが、DMSO自体の細胞毒性は強く、その濃度決定は重要な問題である。Fergusonら³²⁾、Bretzelら³⁴⁾、Rajotteら³⁵⁾は10%DMSOを用いて好結果を報告しているが、本実験では5%、10%、20%のDMSO濃度を作成し、それぞれの浸漬温度(4°C、20°C)、浸漬時間(30分、60分)の組み合わせによりラ島を凍結保存した。その後解凍して得られたラ島の回収率および凍結-解凍後にそれぞれのラ島を培養に供し、培地中に産生されたインスリン量よりDMSOの浸漬条件を検討した。その結果、DMSO濃度でみると5%、20%群の回収率は悪く、10%群が50%以上の良好な回収率を示した。浸漬温度および時間の検索では、4°C群、30分群が一般に高回収率であった。また回収率の良好であった8群を対象とした凍結-解凍後の培養でも、一般に回収率が良好であった群は充分培養に耐え、培養経過とともにインスリン産生能の回復がみられる傾向であった。これらはラ島が至適条件下で凍結保存されれば、細胞内破壊が少なく、その結果ラ島の構造破壊も軽微で、機能が充分保持されることを示している。しかしながら回収率が良好であるにもかかわらず、培地中のインスリン産生が不良であった群(20%DMSO・4°C・60分群)もみられた。これは高濃度DMSO60分作用により凍結時の氷晶による細胞破壊は少ないが、DMSO自体の毒性が強く作用したためであろうと考えている。窪田ら³⁶⁾もDMSOの浸漬作用条件についてグルコース負荷によるインスリン分泌能より検討を加えており、4°C・30分浸漬における5%、10%低濃度DMSO群で

は、500 mg/dl グルコース負荷で新鮮ラ島群の 75-85%の分泌能であり、15%では 64%、20%DMSO では 48.9%と DMSO 濃度が上昇するにつれてインスリン分泌能が低下すると報告している。また浸漬温度も 20°C の場合は 4°C に比較するとインスリン分泌能は低下するとしている。これらの結果は著者の結果と軌を一にしており、解凍後のラ島回収率を考慮するならば 10%DMSO・4°C・30 分が浸漬作用条件として最適であると判定された。

凍結保存は手技的にも容易な保存方法であるが、凍結-解凍過程で被るラ島損傷は無視出来ない。大野²³⁾の報告によると解凍直後のインスリン産生能は新鮮ラ島群の 50%前後であり、著者の成績でも同様の成績であった。また分離直後の新鮮ラ島あるいは培養ラ島移植では移植後 1 週間で糖尿病状態より回復するのに比較して、大野²³⁾、窪田²⁷⁾は解凍直後のラ島移植では 4 週間が必要であるとしている。すなわち移植された凍結保存ラ島が正常な生物学的機能を維持し始めるには 4 週間生体培養される必要のあることを示唆している。そこで著者はコラゲナーゼ消化法で分離されたラ島を培養に移すと、分離操作で生じた損傷は 3 日以内に修復されるという事実²⁰⁾に基き、凍結保存の前後に培養を付加する新しい保存法を考案し、その形態およびインスリン産生能におよぼす意義について検討した。まずコラゲナーゼ消化法で分離したラ島を培養に供すると、3 日目にはラ島は球形となり、被膜の損傷も修復された。その後凍結保存を試みると、その回収率は 80%と向上がみられた。また、これらのラ島を解凍後さらに培養に供し、1 日毎の培地交換でインスリン産生能をみると、凍結前非培養群では分離直後のインスリン産生能に回復するまで約 6 日間を要するのに比し、凍結前培養群では 3 日目には分離直後のインスリン産生能まで回復する傾向を示し、形態学的観察においても分離直後のラ島に近いまでの修復をみた。更にグルコース刺激による解凍直後のインスリン産生能の検索でも、凍結前培養群は凍結前非培養群に比して高いインスリン産生能であった。以上の結果より、凍結前に短期培養を付加することは、凍結-解凍過程で被るラ島損傷を軽微なものとし、しかもインスリン産生能を充分保持せしめ、更に解凍後の機能回復をも促進しうるものであり、有効な手段と考えられた。次に至適条件下で凍結保存されたラ島の解凍後培養実験において、培養直後では分離直後の対照ラ島に比し培地中のインスリン産生量は低値であるが、培養経過とともに漸増の傾向を示し、培養 13 日目では対照を上まわる程度にまで回復した。また、グリコース刺激によるインスリン産生能をみても、培養経過とともにその機

能の改善をみており、組織学的検索でも凍結-培養ラ島細胞内に豊富に β 顆粒を認めた。以上の結果より、凍結保存ラ島も解凍後の培養は可能であり、しかも機能的にインスリン産生能が回復しうることを示すものである。これは Rajotte ら²⁵⁾の解凍後 48 時間の培養により β 細胞の形態学的改善がみられ、インスリン分泌能でも分離直後と有意差はみられなかったとする報告と同様であった。そこで解凍後に培養を付加し、内分泌機能の改善をはかった凍結-培養ラ島の STZ 糖尿病ラット門脈内移植実験を行った。その結果、糖尿ラットは移植後 1-2 週後に血糖値の正常化をみた。移植効果の判定は糖尿状態の重症度、移植ラ島数、移植経路の相違により単純に比較できないと考えられるが、凍結-解凍直後の移植では正常状態にまで回復するのに約 4 週間を要するという報告と比較すると、著者の凍結保存後に短期培養を付加し、形態的にも機能的にもより正常なラ島を移植することは、凍結保存ラ島移植では有効な方法であることが明らかとなった。

以上、凍結-培養ラ島のインスリン産生能、移植効果を中心として報告したが、本実験ではラ島の組織適合性、抗原性についての検討は行わなかった。Summerlin ら²⁶⁾は培養保存された皮膚の移植実験で生着期間の延長を認めたとしている。また Lacy ら²⁹⁾は分離ラ島で、培養を施すことにより移植組織に含まれる白血球 (passenger leucocyte) が取り除かれることにより生着期間の延長をみたと報告している。この意味においても培養を付加することは意義があると思われる。

結 論

膵ラ島移植においてラ島の長期保存は重要な課題である。著者は臓器保存法としての凍結保存法に器官培養を組み合わせ、ラ島の凍結保存法について検討し、以下の結論を得た。

1. コラゲナーゼ消化法により分離したラ島を用いて、ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) 作用下に凍結保存を試みた所、10%DMSO・4°C・30 分浸漬作用の凍結保存を行ったラ島の解凍後回収率は、75%と最も良好な結果であった。

2. 種々の DMSO 濃度、浸漬温度および時間の条件下で作用された後凍結保存したラ島を培養に移すと、10%DMSO・4°C・30 分群、20%DMSO・4°C・30 分群、5%DMSO・4°C・30 分群、10%DMSO・4°C・60 分群は培養によりインスリン産生能の回復がみられ、特に 10%DMSO・4°C・30 分群は培養早期より良好なインスリン産生能を示した。

3. 凍結前に短期培養を付加すると、解凍後ラ島回

収率は80%に向上した。更にこれらラ島を培養に供すると、インスリン産生能の回復は凍結前非培養群に比してより早い傾向であり、またグルコース負荷に対するインスリン産生量でも凍結前非培養群より良好な結果であった。

4. STZ作成糖尿病ラット門脈内へ、凍結前後に短期培養を付加したラ島の同種移植実験を行い良好な結果を得た。

以上の成績より、ラ島の保存、移植においては、10% DMSO・4°C・30分浸漬が優れており、また凍結保存の前後に短期培養を付加することにより、良好なインスリン産生能が得られ、その移植成績は満足なものであった。

本論文の要旨は、第8回臓器保存研究会、第17回日本移植学会において発表した。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授、また本研究に直接御指導、御助言を戴きました福井医科大学第1外科中川原儀三教授、小島靖彦博士に心から感謝致します。心よく研究の場を与えて下さいました金沢大学がん研究所病院外科磨伊正義教授、同じくウィルス部波田野基一教授に深謝します。また特殊染色において御助力を頂きました金沢大学第1病理中西功夫教授ならびに御協力いただいた教職員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 宮崎逸夫・小西孝司：慢性肺炎の手術適応と術式。消化器外科，5，1404-1410 (1982)。
- 2) 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)。
- 3) 中川原儀三・小島靖彦：膵細胞移植。移植，16，283-288 (1981)。
- 4) 大野 進・中川原儀三・水上哲秀・秋本龍一・木村捷一・山崎軍治・小島靖彦・宮崎逸夫：ラット膵ランゲルハンス島移植の実験的研究。移植，14，121-125 (1979)。
- 5) Lacy, P. E. & Kostianovsky, M.: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes, 16, 35-39 (1967)。
- 6) Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. Surgery, 72, 175-186 (1972)。
- 7) Karl, R. C., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Progress report; Transplantation of insulin-secreting tissues. Gut, 18, 1062-1072 (1977)。
- 8) Reckard, C. R., Ziegler, M. M. & Barker, C. F.: Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. Surgery, 74, 91-99 (1973)。
- 9) Ziegler, B., Hahn, H. J., Speck, G. A. & Ziegler, M.: Untersuchungen an Langerhansschen Insulin in vitro. Endokrinologie, 64, 269-276 (1975)。
- 10) Panijayanond, P., Soroff, H. S. & Monaco, A. P.: Pancreatic islets isografts in mice. Surg. Forum, 24, 329-331 (1973)。
- 11) Leonard, R. J., Lazarow, A. & Hegre, O. D.: Pancreatic islet transplantation in the rat. Diabetes, 22, 413-428 (1973)。
- 12) 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，86，1-12 (1977)。
- 13) Najarian, J. S., Sutherland, D. E. R., Matas, A. J., Steffes, M. W., Simmons, R. L. & Goetz, F. C.: Human islet transplantation. Transplant. Proc., 9, 233-236 (1977)。
- 14) Chen, J. M.: The cultivation in fluid medium of organised liver, pancreas and other tissues of foetal rats. Exp. Cell Res., 7, 518-529 (1954)。
- 15) Moskalewski, S.: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gen. Comp. Endocrinol., 5, 342-353 (1965)。
- 16) 高木良三郎・小野順子：実験モデルとしての膵島培養。医学のあゆみ，103，360-367 (1977)。
- 17) 池上 隆：膵の器官培養に関する研究。福岡医誌，65，259-265 (1974)。
- 18) Andersson, A. & Hellerström, C.: Metabolic characteristics of isolated pancreatic islets in tissue culture. Diabetes, 21, 546-554 (1972)。
- 19) Kostianovsky, M., Lacy, P. E., Greider, M. H. & Still, M. F.: Long term (15 days) incubation of islets of Langerhans isolated from adult rats and mice. Lab. Invest., 27, 53-61 (1972)。
- 20) 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)。
- 21) Polge, C., Smith, A. U. & Parkes, A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 666 (1949)。
- 22) 隅田幸男・顧 一介・紫野良一・柏田欣志・田代稔・奥山綏夫：冷凍血液の現況と将来。手術，21，816-830 (1967)。
- 23) Tran, P. T. & Bender, M. A.: Protection of

- mouse bone marrow by inorganic compounds during freezing and thawing. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 388-390 (1960).
- 24) Perry, V. P.: Description of current tissue bank methods of skin preservation. *Cryobiology*, **3**, 178-191 (1966).
- 25) Kaufmann, H. E.: Fourth annual meeting of society for cryobiology; Preserved corneal tissue for transplantation. *Cryobiology*, **3**, 355-391 (1967).
- 26) Karow, A. M., Unal, M. O., Carrier, O., Daniel, C. R., Webb, W. R. & Holland, W. C.: Preliminary observation on drug responses in viably frozen mammalian hearts. *Cryobiology*, **3**, 335-340 (1967).
- 27) Halasz, N. A., Rosenfield, H. A., Orloff, M. J. & Seifert, L. N.: Whole organ preservation. *Surgery*, **61**, 417-421 (1967).
- 28) 出月康夫・窪田 倭: 膵移植の現状と問題点. *日本臨床*, **35**, 329-336 (1977).
- 29) Kemp, J. A., Mullen, Y., Weissman, H., Heininger, D., Brown, J. & Clark, W. R.: Reversal of diabetes in rats using fetal pancreases stored at -196°C . *Transplantation*, **26**, 260-264 (1978).
- 30) Knight, M. J., Scharp, D. W., Kemp, C. B., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Effects of cold storage on the function of isolated pancreatic islets. *Cryobiology*, **10**, 89-90 (1973).
- 31) Frankel, M. J., Scharp, D. W., Kemp, C. B., Nunnally, S. B., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Cryopreservation of pancreatic islets. *Eur. Surg. Res.*, **6**, 89 (1974).
- 32) Ferguson, J., Allsopp, R. H., Taylor, R. M. R. & Johnston, I. D. A.: Isolation and long term preservation of pancreatic islets from mouse, rat and guinea pig. *Diabetologia*, **12**, 115-121 (1976).
- 33) 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. *日外会誌*, **80**, 611-626 (1979).
- 34) Bretzel, R. G., Schneider, J., Dobroschke, J., Schwemmler, K., Pfeiffer, E. F. & Federlin, K.: Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. *Horm. Metab. Res.*, **12**, 274-275 (1980).
- 35) Rajotte, R. V., Stewart, H. L., Voss, W. A. G., Shnitka, T. K. & Dossetor, J. B.: Viability studies on frozen-thawed rat islets of Langerhans. *Cryobiology*, **14**, 116-120 (1977).
- 36) 窪田 倭・田村仁信・出月康夫・横井 隆・風間厚宏・渡辺 弘: 凍害防止剤 DMSO のラット, ラ島氏におよぼす影響. *移植*, **16**, 276-282 (1982).
- 37) 窪田 倭・田村仁信・出月康夫・横井 隆・渡辺弘: 膵ラ氏島移植の現況と問題点. *移植(総会臨時号)*, **17**, 38 (1982).
- 38) Summerlin, W. T., Broutbar, C., Foanes, R. B., Payne, R., Stutman, O., Hayflick, L. & Good, R. A.: Acceptance of phenotypically differing cultured skin in man and mice. *Transplant. Proc.*, **5**, 707 (1973).
- 39) Lacy, P. E., Davie, J. M. & Finke, E. H.: Effect of culture on islet rejection. *Diabetes*, **29**, 93-97 (1980).

Studies on Organ Culture of Cryopreserved Rat Pancreatic Islets of Langerhans Tsutomu Imahori, Department of Surgery (II) (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University and Department of Surgery (I) (Director: Prof. G. Nakagawara), Fukui Medical School - *J. Jusen Med. Soc.*, **93**, 555-570 (1984)

Key words: Cryopreservation, Islets of Langerhans, Culture, Transplantation

Abstract

The present study was undertaken to examine insulin-releasing activity and therapeutic ability of rat pancreatic islets of Langerhans cultured before and after cryopreservation. Based on the results of various pretreatment conditions tested, the following procedures were found to be the best; the islets were isolated from male Wistar rats by collagenase digestion, incubated with an anti-freezer dimethylsulfoxide (DMSO, 10%) at 4°C for 30 minutes, and then cryopreserved at

-196°C in liquid nitrogen for 7–14 days. This preincubation with DMSO made it possible to maintain 75% of the original appearance of the islets after cryopreservation. Insulin-releasing activities of the islets with or without organ culture before and after freezing were comparatively examined. Just after thawing of the islets which had been cultured for 3–4 days before cryopreservation, they did not have any better capacity to produce insulin than the islets which had been directly cryopreserved without the preculture. However, during an additional culture after thawing, the former tended to recover the insulin-releasing activity more rapidly than the latter; a significant difference was found between both of them in the glucose (50–300 mg/dl) loading test. The islets cultured for 3–4 days both before and after the cryopreservation, were transplanted to streptozotocin-induced diabetic rats via the portal vein, resulting in a good recovery from diabetic states within 2 weeks of transplantation. Therefore, the most beneficial method for transplantation of cryopreserved islets of the rat pancreas is to preculture for 3–4 days before cryopreservation and to culture additionally for 3–4 days before transplantation.