

灌流ラット腩ラ島細胞の器官培養による実験的保存に関する研究

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/2297/9040

正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第91巻 第6号 1055-1066 (1982)

エンドトキシンショック時の末梢循環および肺循環に 対するプロスタグランディンの作用

金沢大学医学部麻酔学教室 (主任: 村上誠一教授)

岸 槌 進 次 郎

(昭和57年12月14日受付)

誤	正
p. 1064 結論 4) プロスタグランディンの <u>活性化</u> の低下が確かめられた。	不活性化

金沢大学十全医学会雑誌 第91巻 第6号 1125-1137 (1982)

灌流ラット豚ラ島細胞の器官培養による実験的保存に関する研究

金沢大学医学部第2外科学教室 (主任: 宮崎逸夫教授)

福井医科大学第1外科学教室 (主任: 中川原儀三教授)

竹 山 茂

(昭和57年12月25日受付)

誤	正
p. 1131 Table 2. Control \pm <u>1.07</u> **	10.7**

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

金沢大学医学部第2外科学教室 (主任: 宮崎逸夫教授)

福井医科大学第1外科学教室 (主任: 中川原儀三教授)

竹 山 茂

(昭和57年12月25日受付)

断頭によるラット屍体膵を用いて低温(4℃)、高圧(4気圧)ならびに酸素飽和の3種類の条件の組み合わせで腹腔動脈より6時間灌流を行い、さらにそれらの灌流膵のランゲルハンス氏島(以下ラ島)を培養することによりその保存性を検討した。変性ラ島出現率は低温・酸素飽和条件下の灌流膵が最も低く、この条件下の灌流膵分離ラ島は新鮮膵分離ラ島の86.5%のインスリン分泌能を保持していた。これらのラ島を培養すると、灌流により幾分障害を受けていたラ島は3~4日で形態学的に修復され、3日ごとに交換した培地中のインスリン量は培養期間の21日間ラ島2個あたり851~1134 μ u/mlの範囲内で変動した。またグルコース刺激に対するインスリン分泌反応も新鮮膵分離ラ島とほぼ同等に保たれており、ストレプトゾトシン(streptozotocin)糖尿ラットに対するこれらのラ島の門脈内移植実験でも糖尿病状態のすみやかな改善がみられた。これらの実験結果は灌流膵より分離したラ島は培養によりその生物学的活性が保持されることを示しており、臨床応用への可能性を示唆している。

Key words 屍体膵, ランゲルハンス氏島, 灌流保存, 培養保存, 門脈内移植

糖尿病はインスリンの発見¹⁾によって一応コントロールが可能となった。しかしながら若年で発症する糖尿病は早晚内科的にコントロールが困難となり、現行のインスリン定量投与法の限界が明らかとなった。すなわち定時的なインスリン投与法は生体の生理的糖代謝リズムに合致したものではなく、細小血管症の発生を防止することができないからである。細小血管症の発生、進展防止には正確なフィードバック機構により調節された量のインスリン投与が理想的で、種々の方法のひとつとして膵移植が検討されている²⁾。

膵移植には大別して2つの方法が考えられる。すなわち、血管吻合によって膵全体あるいは一部を移植する方法³⁾と、膵組織片あるいはランゲルハンス氏島(以下ラ島と略)組織のみを外分泌より分離して移植する方法である⁴⁾。私どもの教室では膵ラ島移植を中心として検討を行っており⁵⁾、そのひとつとしてラ島保存を目的とした灌流保存に関する研究では灌流経路とし

て腹腔動脈経路が最も有効であるとの結論を得ている⁷⁾。しかしながら、5時間までの灌流実験の結果をみるとラ島機能の保存状態は必ずしも満足できるものではなく、分離直後の新鮮ラ島機能と比較すると約50%の機能低下を認めた。そこで本研究では内分泌機能の保持を目的として、まずより有効な灌流条件の検討を行い、次にこれらの灌流膵より分離したラ島に培養を付加することによって機能の改善が可能か否かを検索し、さらにこの保存ラ島を用いて糖尿病ラットへの同種移植を試みた。

材料および方法

I. 屍体膵の灌流保存

1. 実験動物

膵臓の摘出、灌流および灌流後の培養、移植には体重250~350gr.のウィスター(Wistar)系雄ラットを用いた。

Experimental Preservation of Langerhans' islets of Perfused Cadaver Rat Pancreas by Organ Culture. **Shigeru Takeyama**, 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.

2. 灌流臓器

エーテル麻酔後断頭による脳死を死と判定した。灌流臓器は Grodsky らの方法⁹⁾に準じ総胆管の十二指腸開口部を結紮後、総胆管内へハックス (Hanks) 液を約5ml 注入し、膨化させた豚を胃、十二指腸、脾臓とともに摘出し灌流臓器とした (図1)。

3. 灌流液

1968年 Curry ら⁹⁾が考案したものに準じサヴィオゾール液 (ミドリ十字社製) にグルコース (glucose) を加えたものを用いた。組成は Na^+ : 131mEq/l, K^+ : 4mEq/l, Ca^{++} : 3mEq/l, Cl^- : 110mEq/l, ラクテート (lactate): 28mEq/l, デキストラン (dextran) 40: 30gr/l, グルコース: 1gr/l, pH: 8 である。

4. 灌流法

教室の一連の研究⁷⁾により灌流経路を腹腔動脈とし、infusion pump (泉工医科工業社製) を用いて1分間約10ml の速度で灌流した。

灌流条件は低温 (4°C)、高圧 (4気圧) ならびに酸素飽和の3種類の負荷の組み合わせで行った。低温負荷は冷却器を用いて灌流液を4°Cとし、灌流臓器はハックス液の中に静置し水にて冷却した。高圧負荷は恒温圧力槽 (大西熱学工業所製) を用いて4気圧とし間歇灌流とした。酸素飽和負荷は豚臓保存用人工肺 (泉工医科工業社製) を用いて溶存酸素濃度を飽和状態とし、灌流時間はすべて6時間とした (図2)。

実験群は3種類の負荷の組み合わせにより以下の8群を作成した。すなわち1群: 室温・大気圧 (対照群), 2群: 低温負荷, 3群: 高圧負荷, 4群: 低温・高圧負荷, 5群: 酸素飽和負荷, 6群: 低温・酸素飽和負荷, 7群: 高圧・酸素飽和負荷, 8群: 低温・高圧・酸素飽和負荷である。

ところで高圧負荷条件では本装置の関係上30分ごとの間歇灌流となるため間歇灌流による豚への影響が考えられる。そこで次に30分間ごとの6時間間歇灌流実

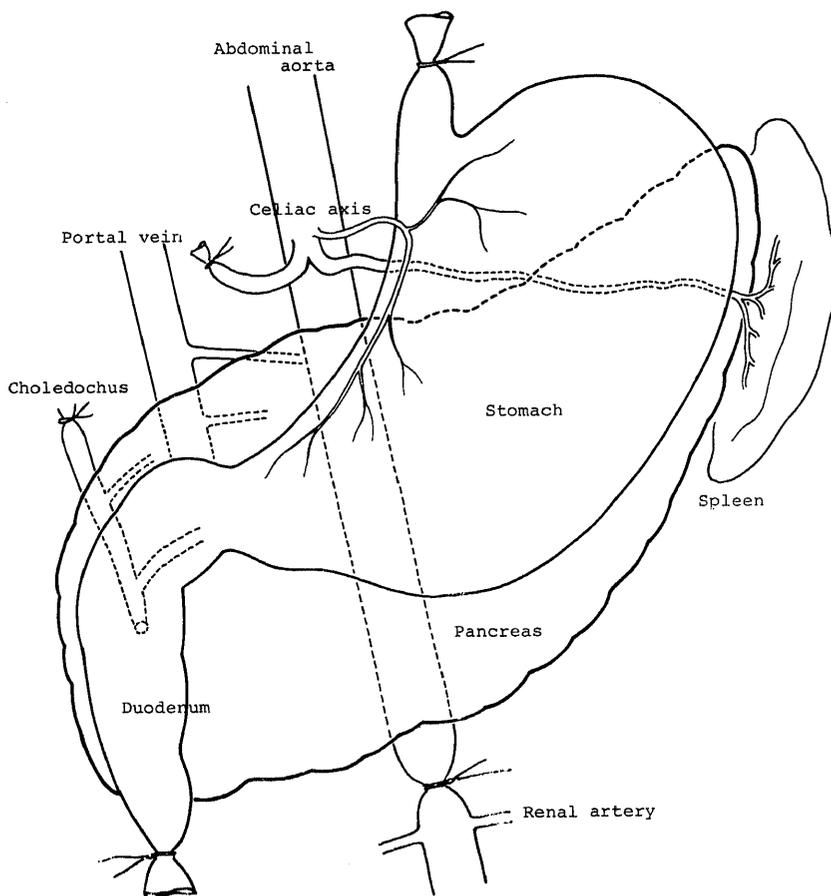


Fig. 1 Schema of perfused organs.

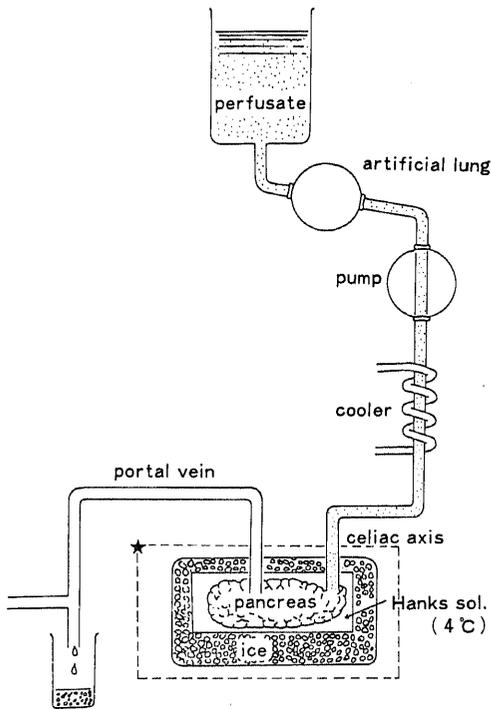


Fig. 2 Diagram of pancreas perfusion system (Fig. shows the perfusion under the condition of hypothermia and oxygenation.)★ The perfusion under the condition of hyperbaria was performed within the hyperbaric chamber.

験を行い組織学的に持続灌流保存膵と比較検討した。

実験群は1'群：室温・大気圧，2'群：低温負荷，3'群：酸素飽和負荷，4'群：低温・酸素飽和負荷の4群である。

II. 灌流膵の組織学的検索

灌流膵の組織学的検索にはヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin, 以下 H-E と略) 染色法, Gomori¹⁰⁾ のアルデハイド・フクシン (aldehyde-fuchsin, 以下 A-F と略) 染色藤田変法¹¹⁾, 蛍光抗体法¹²⁾ならびに酵素抗体法¹³⁾を用いた。

蛍光抗体法は日本抗体研究所の抗血清を用いインスリン蛍光抗体法の第1抗体をモルモット (guinea pig), 第2抗体をヤギより作成したものを, またグルカゴン蛍光抗体法は第1抗体をウサギ, 第2抗体をヤギより作成したものを, さらに第2抗体の標識には蛍光色素フルオレスセイン・イソチオシオン酸塩 (fluorescein isothiocyanate) を使用した。染色法は脱パラフィン切片に第1抗体を加え37°C 孵卵器内で90分間反応させ, その後切片を冷リン酸緩衝生理的食塩水 (phosphate buffered saline solution, 以下 PBS と略) で5分間ず

つ3回洗浄した。次いで第2抗体を加え同様に37°C 孵卵器で60分間反応させたのち冷 PBS で洗浄後乾燥させグリセリンで封入, 蛍光顕微鏡下に観察した。

酵素抗体法は間接法の1種であるペルオキシダーゼ・アンチペルオキシダーゼ複合物 (peroxidase anti-peroxidase complex, 以下 PAP と略) を用いた方法で行った。インスリン酵素抗体法, グルカゴン酵素抗体法はともに第1抗体はモルモットで作成し, 第2抗体としてはヤギで作成した抗ウサギ抗体を用いた。染色法は脱パラフィン切片に第1抗体を加え室温で60分間反応させたのち冷 PBS で洗浄した。次いで未標識第2抗体と室温で30分間反応させ冷 PBS で洗浄し, 最後に PAP と室温で30分間反応させ冷 PBS で洗浄後0.005% 過酸化水素加3, 3-ジアンベンチデン溶液と反応させた。呈色反応が十分に認められた時点で冷 PBS で反応を停止させ, 蒸留水で洗浄後脱水ラインを通し封入した。

III. 灌流膵の内分泌機能検索

1. ラ島の分離

それぞれの条件下の6時間灌流膵より Lacy-Kostianovsky の方法¹⁴⁾ によってラ島を分離した。灌流臓器より摘出した膵を眼科用クーバーで細切しながら50ml 容三角フラスコ内に入れたのち, コラゲナーゼ (collagenase) 40mg (CLS IV, Worthington 社製) とハンクス液5~8ml を入れ, 37°C の水浴槽で泥状液となるまで12~15分間振とう (150~200回/分) した。得られた泥状液を50ml 容の円錐形メスシリンダーに移し, 温ハンクス液で4回, 次いで冷ハンクス液で4回洗浄と沈殿を繰り返す。残存するコラゲナーゼや膵外分泌組織を除去した。最終の洗浄後, 沈殿物をシャーレに移し少量のハンクス液と混和し実体顕微鏡下で鏡検しながら毛細管ピペットでラ島を採取した。

2. ラ島の内分泌機能検索

採取された分離ラ島は0.2% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, Abmour pharmaceutical Corporation, Chicago, U. S. A.) を添加したグルコース60mg/100ml 含有のハンクス液で1時間のプレインキュベーション (preincubation) を行ったのち, これまで教室で行ってきた short time incubation¹⁵⁾ に供し培地中に放出されたインスリン量を測定した。すなわち各群それぞれのラ島5個ずつを試験培地0.5ml 含有小試験管内に入れ, 95% O₂・5% CO₂ を通気後90分間37°C の水浴槽で70~80回/分の振とうを行った。培地中に放出されたインスリン量は固相法 (phadebas insulin test, 塩野義社製) にて測定した。

試験培地としてクレブス・リンガー重炭酸緩衝液 (Krebs-Ringer bicarbonate) に5mM グルタミン酸

(glutamic acid), 5mM フマル酸 (fumaric acid), 5mM ピルビン酸 (pyruvic acid), 0.2% 牛血清アルブミンを添加したものをを用い, インスリン分泌刺激剤としてグルコース50mg/100ml, 300mg/100ml を用いた.

IV. 灌流豚ラ島の培養

1. 対象

6時間灌流実験より形態学的, 機能学的に最も保存状態が良好と判断された条件下の豚より得られたラ島を対象とした. なお灌流臓器摘出よりラ島採取まではすべて無菌的操作とし, 実験器具等の滅菌法は教室のこれまでの方法¹⁵⁾に準じて行い, 手術用器具, ミソポアフィルター(0.45 μ 孔径)は高圧滅菌(120°C, 20分間), ガラス器具類は乾熱滅菌(160°C, 1時間), さらにゴム栓はガス滅菌(10%アセチレンオキシドガス, 5時間)したものを使用した.

2. 培養法

培養液には20%牛胎児血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's MEM) にペニシリン G (penicillin G) 100単位/ml, ストレプ

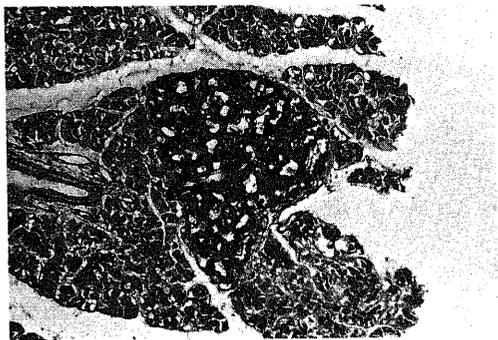


Fig. 3 A normal islet of a non-perfused pancreas. Aldehyde-fuchsin stainig, $\times 66$.

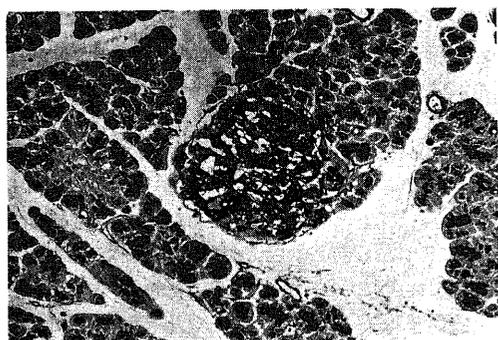


Fig. 4 A degenerative islet of pancreas perfused for 6 hours under the condition of hypothermia and oxygenation. It was characterized by degranulation, vacuolation and destruction of capsule. Aldehyde-fuchsin staining, $\times 66$.

トマイシン (streptomycin) 100 μ g/ml を添加したものをを用いた. 培養には17mm径の multi-dish tray (Limbro, 24well) を用い, 各ウェル (well) に培養液1ml と分離ラ島を2個ずつ入れ37°C・5%炭酸ガス培養恒温器で静置培養した. 培地交換は3日ごとの交換を原則としたが, 線維芽細胞の増殖が著しい場合はやや太めの毛細管ピペットを用いてラ島を損傷することのないように注意して吸引し, 培養器ごとと交換した. 交換した培地はインスリン量測定のため-20°Cで凍結保存した.

3. 形態学的観察

培養ラ島の形態学的観察は倒立型培養顕微鏡を用いて multi-dish tray をステージの上ののせて観察するとともに, 毛細管ピペットでスライドガラスの上に採取しカバーガラスをかけて鏡検した.

4. 内分泌機能検索

3日ごとに交換された培地を用いてラ島2個あたり培地中に放出されたインスリン量を測定した.

また分離直後, 3日間培養, 1週間培養, 2週間培養ラ島を用い2時間のプレインキュベーション後に short time incubation 法を行い, 培養の内分泌機能に与える影響を検討した.

V. 灌流後培養ラ島の門脈内同種移植

1. 糖尿病ラットの作成

移植実験のための糖尿病ラットの作成は尾静脈からストレプトゾトシン (streptozotocin, 以下 STZ と略) 65mg/kg を投与することにより行った. 1週間後に24時間絶食とし尾静脈より採血, グルコーステストワコー (glucose test Wako) の除蛋白法により血糖を測定し, 血糖値300mg/100ml 以上のものを STZ 糖尿病ラットとして門脈内移植実験に供した. 尿糖も24時間尿の一部を用いて同様の方法で測定した.

2. 門脈内移植法

6時間灌流ののち1週間前後培養したラ島300~400個を毛細管ピペットを用い双眼実体顕微鏡下で採取し, 37°Cハンクス液中に浮遊させたのち, 1ml 容ディスポ注射器内に吸引して全量が1ml となるようにし, 吸引後注射針を27ゲージの皮下針とした. 次いで STZ 糖尿病ラットをエーテル麻酔下に開腹し門脈本幹を露出, 注射針を刺入してゆっくりと灌流・培養ラ島を注入した. 注入後刺入部位を綿棒にて圧迫し止血を確認したのち2層縫合で閉腹した. 移植終了後ラットは代謝ケージに収容し血糖, 尿糖, 尿量を測定した.

成 績

I. 屍体膵の灌流保存

1. 変性ラ島出現率

灌流膵ラ島の変性の有無の判定はH-E染色よりも詳細な観察が可能であったA-F染色標本で行った。正常膵のラ島は結合織の被膜をもった細胞の集団として存在する(図3)が、各実験群において被膜の破壊、空胞形成ならびに細胞配列の乱れなど伴ったさまざまな程度の変性ラ島の出現をみた(図4)。ラ島の検索は各群の灌流膵より5枚ずつの標本を作製し全ラ島に対する変性ラ島の比率を変性ラ島出現率とした。

持続灌流実験群の変性ラ島出現率は表1-1)のごとくであり、6群の低温・酸素飽和負荷が30%と最も低値を、3群の高圧負荷が92%と最も高値を示した。次に負荷別に検討すると、低温負荷、酸素飽和負荷においては負荷(+)群が(-)群に比していずれも変性ラ島出現率は低値を示したのに対し、高圧負荷では逆に負荷(+)群が高値を示した。

ところで高圧負荷群では間歇灌流になるため間歇灌流の膵への影響を検討した。

表1-2)は間歇灌流膵の変性ラ島の出現率である。これを持続灌流実験の成績と比較検討すると間歇灌流群では持続灌流膵の同じ負荷群のものよりいずれも変性ラ島出現率は高値を示した。しかしそれぞれの群に高圧負荷を加えた持続灌流膵のそれと比較すると変性ラ島出現率は低値であった。

2. 蛍光抗体法, 酵素抗体法による組織学的観察

蛍光抗体法, 酵素抗体法を用いた正常ラ島の観察では、インスリン陽性細胞はラ島周辺部を除いてほぼ全域に存在していた(図5, 6)がグルカゴン陽性細胞はラ島周辺部のみに存在していた(図7, 8)。低温・酸素飽和負荷6時間灌流膵の蛍光抗体法では、インスリン陽性細胞の蛍光が若干低下し(図9)グルカゴン陽性細胞の配列の乱れと数の減少を認めた(図10)。室温・大気圧6時間灌流膵の酵素抗体法では、インスリン陽性細胞はラ島のほぼ全域に存在しているもののインスリン呈色反応は弱くラ島のほぼ全域に一様に認められた(図11)。グルカゴン陽性細胞はラ島周辺部に認めるが著明な配列の乱れを伴っていた(図12)。

II. 灌流膵ラ島の内分泌機能の検討

6時間灌流膵の変性ラ島出現率が低値を示した4つの群で検索した。その結果は表2に示すごとくである。なお以下の実験においては対照として新鮮分離ラ島を用いた。

分離ラ島のグルコース無添加(0mg/100ml)および50mg/100ml, 300mg/100ml刺激状態における分泌能を灌流条件で検討すると、グルコース無添加では6群は対照に比し分泌能低下は認めなかったが他の3群ではいずれも有意に分泌能の低下をみた(P<0.05)。50mg/100ml負荷では8群のみ対照に比し低下を示し、

Table 1. Degeneration of islets in various conditions of perfusion*

1) Continuous perfusion

Group	Condition of perfusion			No. of degenerative islets No. of normal islets (%)
	Temperature	Atm.	Oxygenation	
1**	15°C	1	-	80
2	4°C	1	-	40
3	15°C	4	-	92
4	4°C	4	-	60
5	15°C	1	+	45
6	4°C	1	+	30
7	15°C	4	+	90
8	4°C	4	+	50

2) Intermittent perfusion

Group	Condition of perfusion			No. of degenerative islets No. of normal islets (%)
	Temperature	Atm.	Oxygenation	
1'	15°C	1	-	85
2'	4°C	1	-	52
3'	15°C	1	+	60
4'	4°C	1	+	42

* Perfusion was performed for 6 hours.

** Control

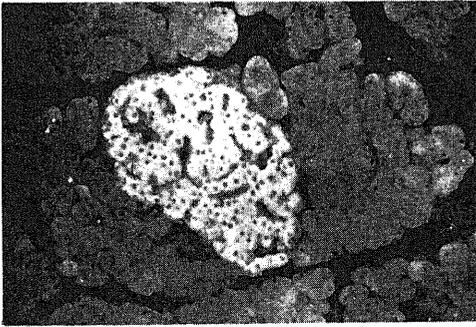


Fig. 5 Fluorescent photomicrograph of normal islet stained by fluorescent antibody against insulin. The fluorescence-positive cells are found uniformly except at the periphery of islet, $\times 100$.

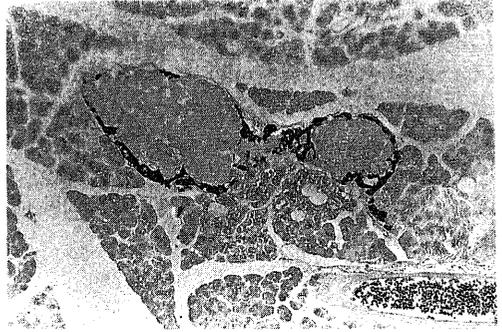


Fig. 8 Normal islets of a non-perfused pancreas stained by peroxidase-antiperoxidase for detection of glucagon. The glucagon-positive cells are found at the periphery of the islets, $\times 66$.

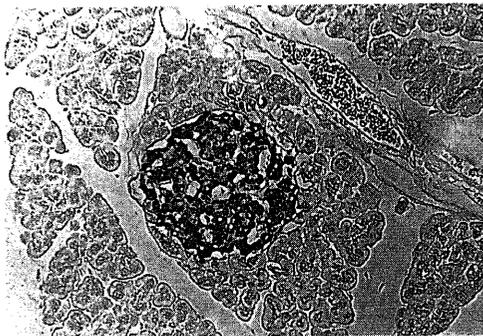


Fig. 6 Normal islet of a non-perfused pancreas stained by peroxidase-antiperoxidase method for detection of insulin. The insulin-positive cells are found uniformly except at the periphery of islet, $\times 66$.

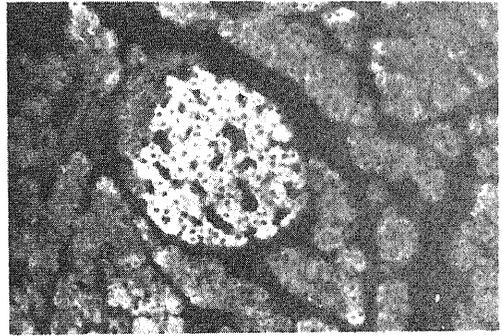


Fig. 9 and 10. Fluorescent photomicrograph of the islet of pancreas perfused for 6-hours under the condition of hypothermia and oxygenation. Number of A- and B- cells are found sufficiently, although it was slightly reduced compared with those of non-perfused pancreas, $\times 100$.

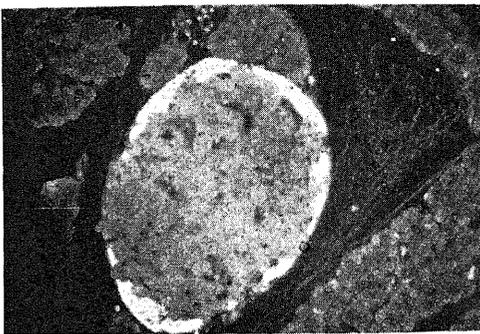
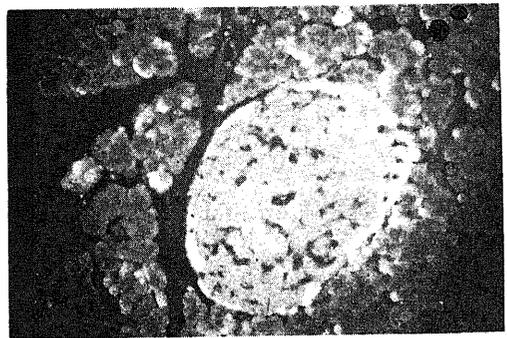


Fig. 7 Fluorescent photomicrograph of normal islet stained by fluorescent antibody against glucagon. Highly fluorescent cells are shown at the periphery of the islet, $\times 100$.



300mg/100ml 負荷ではいずれの群でも同様に低下を示した。しかしながら 6 群の300mg/100ml 負荷では対照の86.5%の分泌能を依然として保持していた。

次にそれぞれの群でのグルコース負荷に対する分泌能を検討すると、8 群の50mg/100ml 負荷以外いずれにおいてもグルコースが高濃度になるに従い有意にインスリン分泌量の増加がみられた ($p < 0.01$)。

III. 灌流膵分離ラ島の培養実験

1. 培養ラ島の形態学的検討

Multi-dish tray 内のラ島を倒立型培養顕微鏡下で観察すると分離直後ラ島は概ね円形ないし楕円形を呈するものの辺縁は不整であった。これを培養に移すとほとんどすべてのラ島は培養 2~3 日で辺縁平滑となり以後21日目までその形態を維持した。しかしこの間少数ながら一部のラ島には中心部に不透明部分の出現を認めるものも観察された。またラ島を培地中より取り出してスライドガラス上でカバーガラスをかけて鏡

検するとより詳細な観察が可能となった。この方法によると分離直後ラ島では一部判然としなかった被膜も培養ラ島では全周性に追跡が可能となり、このことは被膜の修復と強靱化が起こったことによるものと思われた (図13, 14)。

2. 培養ラ島の機能学的検討

1) 培地中へのインスリン放出

表 3 は21日にわたる培養期間においてラ島 2 個あたりの培地中に放出されたインスリン量を測定したものである。両群とも最初の 3 日間は有意に高値を示したものの ($p < 0.01$) その後は有意の変動を認めなかった。また両群の間には全期間を通じて有意差は認められなかった。

2) Short time incubation によるインスリン分泌実験

グルコース負荷によるインスリン分泌量は表 4 のごとくである。各時期の培養ラ島のグルコース負荷に対

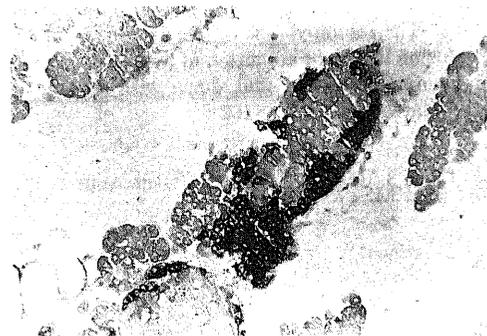
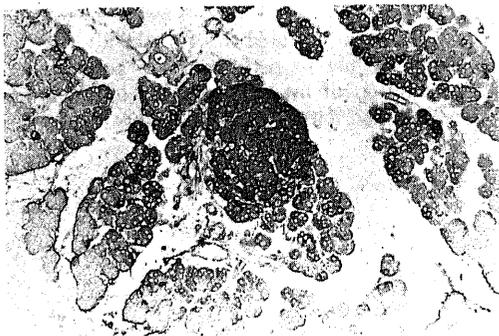


Fig. 11 and 12. The islet of pancreas perfused for 6-hours at 15°C (room temperature) was stained by peroxidase antiperoxidase method. Both A- and B- cells are extremely reduced in number and found somewhat atypical in arrangement, $\times 66$.

Table 2. Insulin secretion of islets isolated from the pancreas after 6-hours' perfusion

Condition of perfusion for pancreas	Insulin secretion (μ U/5 islets/90 min.) of islets isolated from pancreas in Krebs-Ringer bicarbonate		
	Glucose concentration (mg/100ml)		
Group	0	50	300
Control	69.7 \pm 1.07**	75.0 \pm 7.4	161.8 \pm 20.0
(2) 4°C	57.7 \pm 9.5	81.0 \pm 10.4	128.3 \pm 14.3
(5) Oxygenation	60.5 \pm 9.5	78.8 \pm 9.8	131.8 \pm 13.4
(6) 4°C·Oxygenation	61.7 \pm 13.4	86.3 \pm 12.9	139.9 \pm 22.4
(8) 4°C·4Atm. ·Oxygenation	54.1 \pm 10.6	60.8 \pm 12.7	110.8 \pm 16.7

* Islets isolated from non-perfused pancreas

**Values are expressed as Mean \pm S.D. N=10

する反応をみると、グルコース50mg/100ml 負荷では灌流・分離直後群と3日培養群にのみグルコース無添加と比較して有意に分泌量の高値を認めた ($p < 0.05$)。グルコース300mg/100ml 負荷ではグルコース50mg/100ml 群と比較してすべての群に有意差を認めた ($p < 0.01$)。次にそれぞれのグルコース負荷による各群のインスリン分泌量を各時期で比較すると、インスリン無

添加では対照に比して灌流・分離直後群以外はいずれも有意に低値を示し ($p < 0.05$)、グルコース50mg/100ml 添加では灌流・分離直後群で有意に高値を ($p < 0.05$)、灌流・3日培養群では逆に低値を示した ($p < 0.01$)。グルコース300mg/100ml では対照に比して灌流・分離直後群のみ有意に低値を示したのに比し ($p < 0.05$)、灌流・1週培養群は最も高い分泌能を有しいず

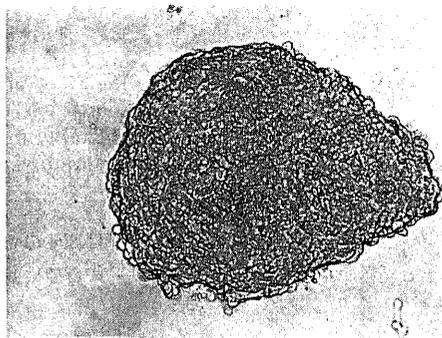


Fig. 13 The isolated islet just after 6-hours' perfusion under the condition of hypothermia and oxygenation showed oval shape with somewhat irregular outer layer, $\times 100$.

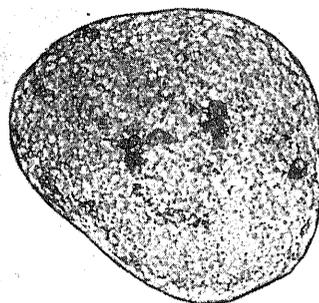


Fig. 14 The islet cultured for 3 weeks after isolation from pancreas perfused for 6-hours under the condition of hypothermia and oxygenation became round with regular outer layer, $\times 100$.

Table 3. Insulin secretion of islets isolated from the pancreas after 6-hours' perfusion

Treatment of pancreas	Insulin contents ($\mu\text{U}/\text{ml}/3$ days) secreted from islets isolated from pancreas						
	Incubation period (days)						
	3	6	9	12	15	18	21
Perfusion** (-)***	1300 \pm 200*	918 \pm 155	896 \pm 137	952 \pm 196	920 \pm 140	905 \pm 142	878 \pm 147
Perfusion** (+)	1134 \pm 157	889 \pm 152	939 \pm 174	880 \pm 184	872 \pm 138	851 \pm 181	856 \pm 217

* Values are expressed as Mean \pm S.D. N=10

** Pancreas were perfused for 6 hours under the condition of 4°C and oxygenation.

*** Fresh-isolated islets

Table 4. Effect of glucose on insulin secretion of cultured islets from perfused pancreas

Incubation period of islets isolated from 6-hr. perfused pancreas	Insulin secretion ($\mu\text{U}/5$ islets/90 min.) of islets in Krebs-Ringer bicarbonate		
	Glucose concentration (mg/100 ml)		
	0	50	300
Control**	69.7 \pm 10.7*	75.0 \pm 7.4	161.8 \pm 20.0
0	61.7 \pm 13.4	86.3 \pm 12.9	139.9 \pm 22.4
3 days	48.0 \pm 9.5	57.5 \pm 5.2	161.0 \pm 17.3
1 week	52.0 \pm 17.1	64.6 \pm 19.0	195.2 \pm 24.1
2 weeks	55.1 \pm 15.1	64.4 \pm 18.2	173.0 \pm 23.5

* Values are expressed as Mean \pm S.D. N=10

** Fresh-isolated islets

れの群よりも有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

IV. 灌流後培養ラ島の門脈内同種移植

STZ 糖尿病ラット 4 匹に移植を行った。移植後 20 週以上生存したのは 3 匹でこれらはいずれも糖尿病状態の改善をみた。残り 1 匹は腹腔内出血で移植翌日死亡した。

ラ島移植後 20 週以上生存例の経時的推移は以下のごとくである。

1. Case 1 ラット (図 15-1) : STZ 糖尿病ラット 1 週目 (血糖 380mg/100ml, 尿糖 8.5g/日) に灌流・培

養ラ島 400 個を移植した。移植後 1 週間で血糖は 100mg/100ml と著明に下降し以後 4 週目の 105mg/100ml 以外いずれも 100mg/100ml 以下であった。尿糖は移植後 1 週間で 0.6g/日と著減し以後 0~0.2g/日の範囲内で変動した。体重は STZ 静注後わずかに減少を示したが移植 1 週目には STZ 静注前を上回り以後漸次増加した。

2. Case 2 ラット (図 15-2) : STZ 糖尿病ラット 1 週目 (血糖 320mg/100ml, 尿糖 6.8g/日) に灌流・培養ラ島 300 個を移植した。血糖は移植後 1 週間で 120mg/100ml となり 4 週目まで 105~120mg/100ml の間での

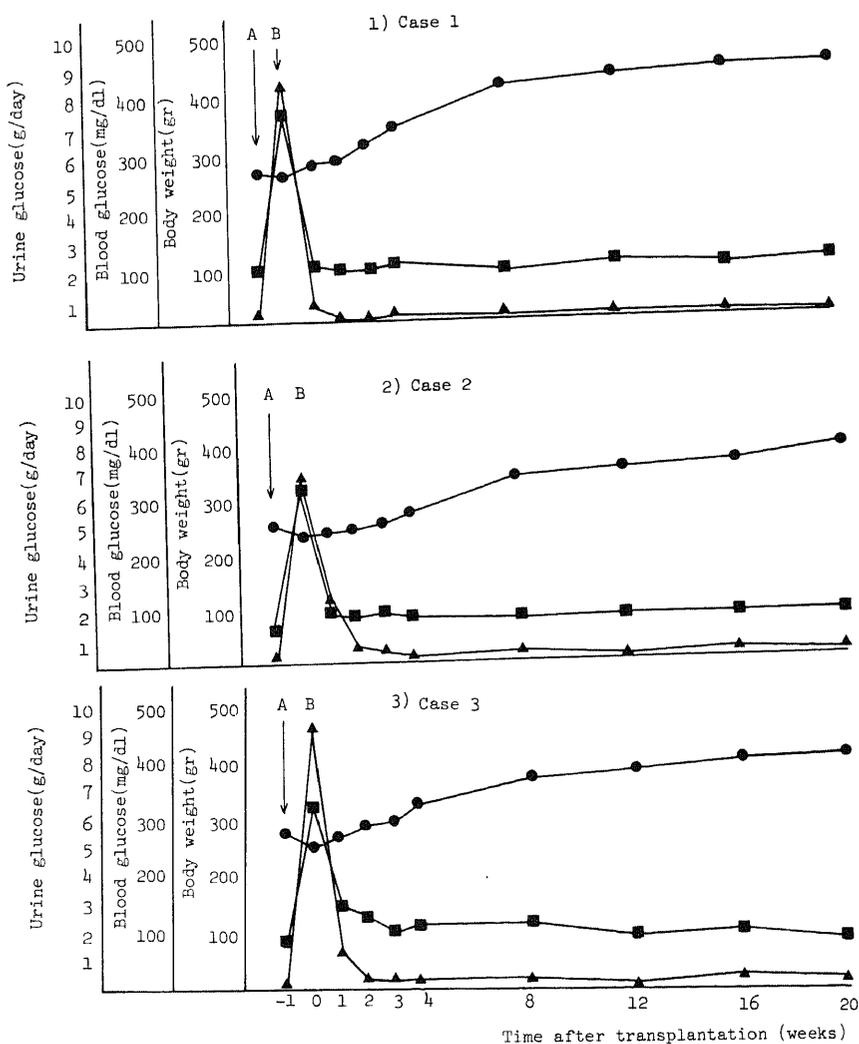


Fig. 15 Effect of the transplantation of islets* on streptozotocin-induced diabetic rats. A : intravenous infusion of streptozotocin (65mg/kg. of body weight). B : implantation of preserved pancreatic islets. ● : body weight. ■ : blood glucose. ▲ : urine glucose. * Islets cultured for 3 to 7 days after isolation from perfused pancreas were transplanted..

変動を認めたが、8週以後はいずれも100mg/100ml以下となった。尿糖は移植後1週間で2.9g/日、2週で0.8g/日、3週で0.6g/日と漸減し4週以後は0.2g/日以下となった。体重はSTZ静注後1週間で8%の減少を認めたが移植後3週でSTZ静注前に回復し以後順調に増加した。

3. Case 3ラット(図15-3)): STZ糖尿病ラット1週目(血糖350mg/100ml, 尿糖9.8g/日)に灌流・培養ラ島300個を移植した。血糖は移植後1週間で160mg/100ml, 2週で140mg/100mlとなり以後20週まで90~130mg/100mlの範囲内で変動したが全体に低下傾向を認めた。尿糖は移植後1週間で1.5g/日となり以後0.5g/日以下であった。体重は移植後1週間でSTZ静注前値に回復し以後漸次増加した。

考 察

膵移植については既に1902年 Ssobolew¹⁹⁾が糖尿病の治療法のひとつになる可能性を示唆している。しかしその後インスリンの発見に伴い糖尿病はコントロール可能な疾患となり膵移植は忘れかけられた存在となりつつあった。ところが糖尿病患者の寿命が伸び罹病期間が長くなることによりインスリン治療の限界が明らかとなって膵移植は再び脚光を浴びる治療法となった。

1957年 Lichtenstein ら¹⁷⁾は血管吻合による全膵移植を初めて報告しているが良好な結果は得られなかった。しかし1965年以降膵移植実験は多くの研究者により試みられるようになり膵移植は糖尿病状態の改善のみでなく細小血管症の発生、進展防止にも有効であることが確認された²³⁾。

ところで膵移植の臨床応用を考える場合膵臓は腎臓などと異なり単一臓器という解剖学的制約があり、移植を行う際その供給源としては必然的に屍体膵と手術摘出膵に限られてくる。屍体膵利用の場合膵は温阻血時間の短い臓器であり、しかも一般に脳死が認められていない我国の現状では屍体より膵を摘出し健全な状態で保存することは重要な問題である。その上著者のラ島移植では一度に大量のラ島が必要であり分離ラ島の保存という問題も重要な意義をもってくる。そこで著者は将来の臨床応用の可能性を検討するためにその前段階としてラットにおける屍体膵の灌流保存法の検討を行うとともに、灌流膵より分離したラ島の培養保存とその保存ラ島の移植実験を行った。

まずラ島移植に際して必要なラ島の分離法は1964年 Hellerström¹⁶⁾がマウス膵を用いて freehand microdissection を発表したのが最初であるが、1965年 Moskalewski¹⁹⁾はコラゲナーゼを用いてモルモット膵よりラ島を分離している。現在広く普及しているコラ

ゲナーゼ消化法は Lacy ら¹⁴⁾が開発したものであるが、著者もこの方法に準じて行った。しかし6時間灌流膵ではラ島自身が幾分障害を受けている上にコラゲナーゼにも高い細胞障害性があるため、顕微鏡下に採取可能なラ島は1匹のラットにつき50個が限界であった。Scharp らは1匹のラットより採取できた分離ラ島はコラゲナーゼ消化法では平均151個であったのに比しコラゲナーゼ消化法に汎過法を併用することにより平均447個と約3倍になったと報告²⁰⁾しており、今後回収率を上げるためには密度勾配法²¹⁾や汎過法など何らかの改善が必要であろう。

次に移植ラ島の保存法の問題であるが今回著者はラ島分離前の保存法として灌流法、分離後の保存法として培養法の検討を行った。

教室の灌流保存実験では5時間灌流膵の形態学的、機能学的検討より腹腔動脈経路がラ島保存に最も有効であるとの結論を得ている⁷⁾。そこで著者は腹腔動脈経路の灌流に低温、高圧、酸素飽和の3種類の負荷を組み合わせた6時間灌流実験を行い、ラ島保存により効果的な灌流法の検討を行った。その結果変性ラ島出現率と機能学的検討より、低温負荷と酸素飽和負荷の場合にラ島保存に関して有効性が認められ、特に低温・酸素飽和負荷の組み合わせの場合に灌流膵ラ島が最も良好に保存されることが確認された。低温負荷と酸素飽和負荷の有効性はヒトやイヌの腎や心臓の灌流保存実験でも広く認められており²²⁾²³⁾、著者の成績と一致する。高圧負荷に関しては Idezuki ら²⁴⁾はイヌ摘出膵を用いた浸漬保存実験でその有効性を発表しているが、今回それが認められなかった原因としては保存法が若干異なることにもよるがイヌとラットの膵組織の違いによるところが大きいのではないかと推察している。

膵ラ島の培養実験は以前より形態学的観察やインスリン分泌能の検索の目的で行われている。今回著者は6時間灌流保存ののち分離されたラ島は形態学的、機能学的に若干の障害を受けていたので培養により保存のみでなくそれらの改善も可能か否か検討を行った。形態学的には培養によりラ島の被膜の修復がみられ、実体顕微鏡下では培養2~3日ではほぼ完了し以後良好な形態を維持した。機能学的検討では培地中に放出されたインスリン量は培養1~3日間に有意に高値を示したが、これは6時間灌流ならびにコラゲナーゼ消化法によるラ島の分離過程における細胞膜障害などによりインスリンが漏出し易くなったことに起因するものであろうと考えられた。Lazarow ら²⁵⁾はヒトのラ島の培養実験において2日間ごとに培地中に放出されるインスリン量の測定を行い最初の2日間のみ有意に高値を示すという著者と同様の所見を認めている。インス

リン分泌能をより確実に反映すると思われる高濃度グルコース負荷による short time incubation では、灌流・培養群は灌流・分離直後群に比して明らかに分泌能の上昇を認めており対照と比較しても同等ないしは若干上回っていた。

以上より培養はラ島の形態学的、機能学的改善ならびに維持に有効であることが確認された。

次に灌流後培養ラ島の移植であるが、上皮小体、副腎などの内分泌臓器の移植が血管吻合による血行再建を必要としないことは早くから報告されている²⁶⁾。ラ島の移植部位の検討は Ziegler ら²⁷⁾により脾・腎被膜下、胃漿膜下、筋肉内、精巣内、腹腔内などにおいて試みられた。しかし Kemp ら²⁸⁾は門脈内移植が最も少数のラ島で糖尿病状態の改善をもたらすことができかつ生理的条件にも合致すると報告しており、また山崎⁹⁾、Amamoo ら²⁹⁾は門脈内移植でも重篤な肝機能障害を発生することはなく門脈内は安全な移植部位であると報告している。

門脈内への移植ラ島数については糖尿病の程度と関係があり一概には言えない。Kemp ら²⁸⁾、Amamoo ら³⁰⁾は糖尿病状態の改善をもたらすためには400~600個、Karl ら³¹⁾は最低600個のラ島が必要であるとしている。しかし著者の門脈内移植実験では300~400個のラ島で十分な糖尿病状態の改善を得ることができた。これは分離ラ島に培養過程を加えることにより障害の強いラ島を除去し良好な機能、形態を有するラ島のみを移植することができたことによるものと思われた。また水上⁷⁾は灌流膵からの分離直後ラ島300個の移植実験で血糖値が正常値に復するのに平均4週を要したのに比し、培養を付加した著者の実験では3例中2例は1週、1例は2週を要したにすぎず、血糖の下降がよりすみやかであったことは障害の少ないラ島のみを移植したことに加えて培養によりラ島の機能を十分に回復させた状態で移植できたことによるものと判断された。

また、今回著者はラ島の形態学的観察に従来の H-E 染色法、A-F 染色法に加えて蛍光抗体法、酵素抗体法の応用が可能か否か検討を行った。高木³²⁾、緒方³³⁾、池上³⁴⁾は幼若ウサギおよびラット膵の培養ラ島の A-F 染色法と蛍光抗体法との比較において A-F 染色法では培養日数の経過とともに次第に B 細胞の A-F 染色性が低下するのに比し、蛍光抗体法では B 細胞の蛍光の強さは培養期間中ほとんど変化せず B 細胞の同定には後者の方が信頼度が高くより適確であると報告している。著者は H-E 染色法、A-F 染色法、蛍光抗体法、酵素抗体法による正常膵、灌流膵ラ島の検討を行ったが、ホルモン分布状態の把握には A-F 染色法とともに蛍光抗体法、酵素抗体法も有力な手段であると考えられた。

膵移植の臨床例は1966年 Kelly ら³⁵⁾が糖尿病性腎症を合併した若年性糖尿病患者に腎とともに膵を移植したのが最初である。しかし今日まで膵移植は数症例を除いて期待された程の効果が得られていない。一方ラ島の移植は1977年 Najarian ら³⁶⁾がヒト屍体膵よりラ島を分離し7人の患者に10回にわたって腹腔内、筋肉内、門脈内に移植し、最長18か月間投与インスリン量の減少をみたが糖尿病の治癒した症例はみられなかった。また腹膜炎、門脈圧上昇、肝機能障害などラ島移植による合併症はみられなかったと報告している。1980年 Cameron ら³⁷⁾は慢性膵炎の患者に膵組織片を門脈内に自家移植し6か月間良好な機能を発揮したと報告しており、今後ラ島の分離法などの改善を加えることにより大量のラ島を得ることが可能となり、また拒否反応の抑制法が確立されればラ島の門脈内移植法は十分臨床に応用し得るものと思われる。

結 論

灌流法と培養法による膵ラ島の保存実験を行い形態学的、機能学的検討を行うとともに、保存ラ島をストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 糖尿病ラットの門脈内に移植し以下の結論を得た。

1. ラ島保存のための腹腔動脈による灌流実験では灌流膵ラ島の形態学的、機能学的検討より低温負荷と酸素飽和負荷ではその有効性を認めることができたが、高圧負荷単独あるいは前記負荷に高圧負荷を組み合わせた条件下ではその有効性は認められなかった。
2. 最も保存状態が良好であった低温・酸素飽和負荷6時間灌流膵より分離したラ島を培養すると、6時間灌流とラ島の分離操作により障害を受けたラ島は形態学的にはほぼ3日で修復され以後観察期間の21日目まで良好な形態を維持した。また機能学的にも培養ラ島において高濃度グルコース負荷 (300mg/100ml) に対するインスリン分泌反応の著明な改善が認められた。
3. 門脈内注入法による灌流後培養ラ島の同種移植実験では、ラ島300~400個ですみやかに糖尿病状態の改善を得ることができた。

以上より屍体膵の灌流保存は低温・酸素飽和負荷のもとに行い、灌流膵より分離したラ島の培養は保存のみでなく形態学的、機能学的改善に有効であり、さらにこれらの処置を行ったのち移植する方がより効果的であることが確認された。

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

科学教室小島靖彦博士に深く感謝いたします。最後に、種々に御援助下さいましたがん研究所ウイルス部波田野甚一教授、がん研究所付属病院外科部磨伊正義教授に感謝いたします。なお、本論文の要旨の一部は第17回日本移植学会総会(1981年、筑波)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) **野沢真澄**: ストレプトゾチ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).
- 3) **Mauer, S. M., 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).
- 4) **渡辺一男・落合武徳・西島浩・林良輔・佐藤博・雨宮浩**: 膵組織片移植の研究(I). 未分離膵組織の脾内自家移植について. *移植*, **13**, 298~300 (1978).
- 5) **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**, 1~4 (1977).
- 6) **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).
- 7) **水上哲秀**: 屍体膵灌流保存に関する実験的研究. *日外会誌*, **80**, 195~210 (1979).
- 8) **Grodsky, G. M. & Bennett, L. L.**: Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes*, **15**, 910~913 (1966).
- 9) **Curry, D. L., Bennett, L. L. & Grodsky, G. M.**: Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, **83**, 572~583 (1968).
- 10) **Gomori, G.**: Aldehyde-Fuchsin. A new stain for elastic tissue. *Amer. J. Clin. Path.*, **20**, 665~666 (1950).
- 11) **藤田恒夫・渡辺雪子**: ランゲルハンス島のA, B, D細胞の染色法. *臨床検査*, **5**, 29~32 (1972).
- 12) **川生明**: 蛍光抗体法. *ホルモンと臨床*, **24**, 1089~1098 (1976).
- 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) **Lacy, P. E. & Kostianovsky, M.**: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, **16**, 35~39 (1967).
- 15) **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).
- 16) **Ssobolew, L. W.**: Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Secretion der Bauchspeicheldrüse. *Arch. Path. Anat.*, **186**, 91~128 (1902).
- 17) **Lichtenstein, I. L. & Barschak, R. M.**: Experimental transplantation of the pancreas in dogs. *J. Internat. Coll. Surg.*, **28**, 1~6 (1957).
- 18) **Hellerström, C.**: A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. *Acta Endocrinol.*, **45**, 122~132 (1964).
- 19) **Moskalewski, S.**: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **5**, 342~353 (1965).
- 20) **Scharp, D. W., Murphy, J. J., Newton, W. T., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.**: Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery*, **77**, 100~105 (1975).
- 21) **Leonard, R. J., Lazarow, A. & Hegre, O. D.**: Pancreatic islet transplantation in the rat. *Diabetes*, **22**, 413~428 (1973).
- 22) **薄場彰**: 屍体膵移植時の屍体内臓器灌流至適流量に関する研究. *移植*, **15**, 181~189 (1980).
- 23) **白倉良太・広瀬一・中田精三・宮本勝彦・賀来克彦・奥田彰洋・前田世礼・岸本英文・小林博徳・北村惣一郎・森透・川島康生**: 死体心移植のシステム化を前提とした心保存の研究(I). 死体内冷却冠灌流法. *移植*, **15**, 330~334 (1980).
- 24) **Idezuki, Y., Goetz, F. C., Kaufman, S. E. & Lillehei, R. C.**: In vitro insulin productivity of preserved pancreas: A simple test to assess the viability of pancreatic allografts. *Surgery*, **64**, 940~947 (1968).
- 25) **Lazarow, A., Wells, L. J., Carpeter, A. M., Hegre, O. D., Leonard, R. J. & MC Evoy, R. C.**: Islet differentiation. organ culture and transplantation. *Diabetes*, **22**, 877~912 (1973).
- 26) **Stone, H. B., Owings, J. C. & Gey, G. O.**: Living grafts of endocrine glands. *Am. J. Surg.*, **24**, 386~395 (1934).
- 27) **Ziegler, M. M., Reckard, C. R. & Backer, C. F.**: Long-term metabolic and immunological considerations in transplantation of pancreatic islets. *J. Surg. Res.*, **16**, 573~581 (1974).
- 28) **Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W.,**

- Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Effects of transplantation site on the results of pancreatic islets isografts in diabetic rats. *Diabetologia*, **9**, 486~491 (1973).
- 29) Amamoo, D. G., Woods, J. E. & Helley, K. E.: Effect of intrahepatically implanted islets of Langerhans on hepatic function in the rat. *Mayo clin. proc.*, **50**, 416~419 (1975).
- 30) Amamoo, O. G., Woods, J. E. & Donoran, J. L.: Preliminary experience with pancreatic islet cell implantation. *Mayo. Clin. Proc.*, **49**, 289~292 (1974).
- 31) Karl, R. C., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Transplantation of insulin-secreting tissues. *Gut*, **18**, 1062~1072 (1977).
- 32) 高木良三郎: 器官培養における膵内分泌機能の観察. *医学のあゆみ*, **56**, 1~7 (1966).
- 33) 緒方佳晃: 器官培養ドラット膵の形態と内分泌機能に関する研究. *日内分泌会誌*, **46**, 148~162 (1970).
- 34) 池上隆: 膵の器官培養に関する研究, (II). ラット膵ラ島の単離と培養. *福岡医誌*, **65**, 259~265 (1974).
- 35) Kelly, W. D., Lillehei, R. C., Merkel F. K., Idezuki, Y. & Goetz, F. C.: Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*, **61**, 827~837 (1967).
- 36) Najarian, J. S., Sutherland, D. E. R., Matas, A. J., Steffes, M. W., Simmons, R. L. & Goetz, F. C.: Human islet transplantation. A preliminary report. *Transpl. Proc.*, **4**, 233~236 (1977).
- 37) Cameron, J. L., Mehigan, D. G., Harrington, D. P. & Zuidema, G. D.: Metabolic studies following intrahepatic autotransplantation of pancreatic islet graft. *Surgery*, **87**, 397~400 (1980).

Experimental Preservation of Langerhans' islets of Perfused Cadaver Rat Pancreas by Organ Culture Shigeru Takeyama, 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, Kanazawa, 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **91**, 1125—1137 (1982)

Key words: cadaver pancreas, islet of Langerhans, perfusion, culture, transplantation.

Abstract

The present study was undertaken to examine the perfused cadaver rat pancreas extirpated from decapitated rats for the viability and biological activities. Perfusion was made just after decapitation through the celiac axis under following conditions: hypothermia (4°C), hyperbaria (4 absolute atmospheres) and oxygenation. After six hours of perfusion, the islets isolated from the pancreas were submitted to organ culture and examined for the preservability. The condition of perfusion affected the ratio of degenerative islets/normal islets, showing the lowest one under the condition of hypothermia with oxygenation; insulin-secreting abilities of the islets, under this condition, were maintained at a level of 86.5% or more of that of freshly isolated islets. When these pancreatic islets were further cultured *in vitro*, slightly modified cell shapes that occurred at perfusion were restored to normal state within the first three to four days of culture. The insulin contents of the culture, when the medium was exchanged every three days, ranged in 851-1134 $\mu\text{U/ml}$ /two islets during twenty-one days' culture period. Insulin secretion responsible for glucose addition was approximately the same between cultured and freshly isolated islets. Transplantation of these islets into the portal vein of streptozotocin-induced diabetic rats resulted in a good recovery from the diabetic state. These data seem to indicate that *in vitro* culture of islets isolated from perfused pancreas can well preserve their original biological activities. Also, they suggest that the cultured pancreatic islets obtained from perfusion may be useful for clinical transplantation into diabetic cases.