ラット,ラ島移植に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8656

ラット,ラ島移植に関する実験的研究

金沢大学医学部第二外科学講座(主任:宮崎逸夫教授) 木 村 捷 一 (昭和52年1月14日受付)

(本論文の要旨は1975年10月第11回日本移植学会総会及び1976年10月第12回日本移植学会総会及び1976年6月第19回日本糖尿病学会総会において報告した。)

糖尿病にインスリン注射の占める役割は大きいが、 インスリンの需要は個体の食物摂取量、活動量あるい は内分泌系の活動変化等に伴って時々刻々変化するも のであり、糖尿病患者に対して行われている固定した インスリン量の投与では不完全である。そこで、この ような欠点を補うものとして膵臓移植が脚光を浴びる ようになった. 膵移植の臨床応用は, 1966年, Kellу らがはじめて行って以来,これまでに世界で30数 例の報告! をみるが、その成績は、腎以外の他臓器移 植と同様、必ずしも満足のいくものでない、膵移植後 の拒絶現象の最大の原因は膵外分泌腺の存在にあると され、その対策として、 "Banting pancreas" の状 態,つまり graft の膵管を結紮してから移植する方 法がとられたりしてきた. しかし Dragstedt? は犬 に膵管結紮をすると外分泌腺の萎縮のみならず、数ケ 月後には膵内分泌腺にも障害が及んで糖尿病を惹起す るにいたると述べていることからも、長期に観察した 場合, 膵管結紮による内分泌腺への影響が無視できず 重要な課題となる. 一方, 野沢3), Lee らいは microsurgery の手法を駆使して、ラットの膵移植を試み ており、 graft 膵の内分泌機能の長期観察をも可 能としている. ところで、 膵移植の目標が糖尿病の治 療にある以上、解決すべき種々の問題が山積している 全膵移植よりも, 膵 ランゲルハンス 島 (以下ラ島と 略す)を移植、生着させることが、いろいろな意味で はるかに秀れているものと思われる。 ラ島分離法は19 64年, Hellerström⁵⁾ が free hand microdissection を考案して以来、種々改良され、 現在 Lacy & Kostianvsky 5 0 collagenase digestion method がその原法とされている. 移植ラ島として,

数多くを取り出すと同時に、最も intact な σ 島を 取り出すことが必要であり、即ち collagenase の σ う島に及ぼす影響をなるべく少なくすることが重要である。本実験には Lacy σ の原法に基き、岡本 σ の方法にならって、 σ 島分離を行った。

ラ島移植の初期の研究では、ラ島移植が糖尿病の改善もしくは治癒が可能であるか否かという点の追求にしばられ、1972年、Ballingerらもは、400~600個のラ島を腹腔内投与することにより、 streptozotocin糖尿ラットに血糖値の下降、尿量及び尿糖量の減少など病状の改善を認め、対照群に比較し延命効果も得られたと報告している。以後諸家の実験報告の33、36、38、があるが、ラ島移植の問題点として移植部位がまず第1に上げられる、腹腔内、筋肉内、皮下など移植部位が考慮されているが、正常状態では、分泌された insulin が直接門脈内を通って肝細胞に至るところから、

Kempら¹⁰⁾ はラ島を門脈内に注入し、 insulin を直接肝細胞に作用させる様にしたならば、生理的条件を満足させ、移植ラ島数も少なくてすむのではないかと考え、400~600個のラ島を門脈内に注入した。その結果、腹腔内では、600~850個のラ島移植でも、糖尿病の改善が不十分であったが、門脈内注入では血糖値、尿量、尿糖も減少し、"治癒"をもたらしたと報告している。以後ラ島門脈内移植に関する追試が行われているが、至適ラ島数、移植ラ島の肝内生着及び機能存続等に関してまだまだ研究の余地を残している。

本研究は、第1にラ島分離を行い、 collagenase digestion method によって分離されたラ島の分泌能を証明した、第2に門脈内移植実験を行い、 recipient として streptozotocin 糖尿ラットを使用し

Experimental study on pancreatic islet transplantation of the rat. **Shoichi Kimura**, Department of the 2nd Surgery, (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University.

たが、血糖、尿糖、体重の変化、延命効果等について 移植群との比較検討を行った、第3に、門脈内移植後 の糖尿病の改善及び治癒を証明すると同時に、ラ島肝 内生着について検討を行った。

実験 I ラ島の分離

I. 実験動物

体重200~400gの Wistar 系雄 ラットを使用し、エーテル吸入麻酔または、 Thiopenthal-Na の腹腔内投与で麻酔.

Ⅱ.ラ島分離法

1. 膵の膨化

開腹後、総胆管を十二指腸開口部で結紮し、岡本らの手法にならって肝管の最終合流部から21~23ゲージの翼状針を刺入し、glucose 60mg/dl濃度の Hanks 液20mlを注入する、膵被膜が破れる寸前ぐらいの圧で注入すると、もっともよく膨化する、膵全体が水腫状に膨化し、あたかもゼラチンの中に樹枝が埋め込まれた様な外観となる(図1).

2. 膨化膵の摘出

ついで膨化した膵を鋭的に摘出するが、この際脂肪組織などの周囲組織は注意深く排除しつつ切離する、 摘出後直ちに20~30mlの冷却した Hanks 液の中に 入れて洗浄し、その浮遊傾向のある部分は膵組織でないからできるだけ取り除く(図2).

3. 摘出膵の細切

20ml容の三角フラスコの口で膵をピンセットでつまみ上げ、眼科用クーパーを用いて摘出膵をできる限り細かく切り刻む、細切後、三角フラスコの中にcollagenase (CLS, Lot No. 45C246, 150 u/mg、Worthigton Biochemical Corporation) 40mgとbovine serum albumin (Lot No. M46206, Armour pharmaceutical corporation) 100mgを混入し、これに Hanks 液 5 mlを加える (図 2).

4. shaking incubation

上記三角フラスコを密栓して、 37° Cの incubator の中で、 $150\sim200$ 回/分の振とうの下に約15分間、細切した膵組織を collagenase で泥状に消化させる (図 2).

5. 洗 浄

この消化された泥状液を warm Hanks 液で 4回、ついで cold Hanks 液で 4回、合計 8回洗浄、 沈澱を繰り返して、残存する collagenase および 膵外分泌組織を除去する、詳述 すると incubation を終えた泥状液を50ml容の円錐形メスシリンダーに 移し換え、これに warm Hanks 液を目盛り一杯ま で加えて約1分30秒程静置後、上清を約25ml程捨てる.この操作が第1段階で、つぎから合計 8回の洗浄を行う、上記の上清を捨てた残留液に warm Hanks 液を再び目盛一杯加えて、スポイド付ピペットにて10秒間強く撹拌して沈澱物を良く洗浄後、約1分30秒間静置する。再びその上清を25ml捨て、同様の操作をくり返す。 warm Hanks 液での洗浄が 4回終えたら、同じように cold Hanks 液で 4回洗浄す

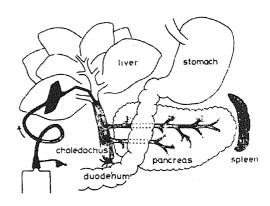


図1 ラット膵への Hanks 液注入模式図 (2段階に曲げた翼状針を使用)

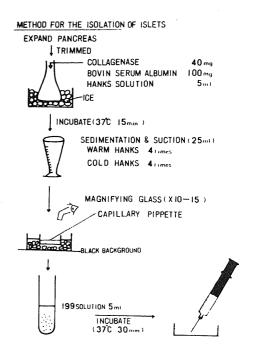


図2 膨化膵摘出後のラ島分離法

る. cold Hanks 液による洗浄が進むにつれて、白くて丸い、コロッとした感じのラ島がほぼ直線的に沈下するのが、静置中に肉眼でも見えてくる.

6. ラ島の採集

最後の洗浄を終えて上清を捨てた後、メスシリンダーに残った液に少量の cold Hanks 液を追加して良く混和し、これを ice bath 内の冷却されたシャーレに移してラ島を鏡検採集する、内径5mmの市販ガラス管にて自家製の capillary pipette を作製し双眼拡大鏡(15倍率)下で採集する、もし外分泌組織が多量で1回の選別でラ島のみをひろい上げるのが無理であれば、1回選別されたものを再度鏡検再集して選別する(図2).

Ⅲ. 分離ラ島のインスリン分泌量の測定

分離 σ 島 σ 6 個をNo199液 σ 2 mlの中に入れ、 σ 37°Cにて、 σ 5 分、 σ 15分、 σ 30分、 σ 60分、 σ 90分間 incubate し Phadebas insulin test (シオノギ)にて測定した、又No199液に glucose σ 50mg/dl、 σ 300mg/dlを加えて同様の測定を行った、

IV. 分離ラ島の染色

分離ラ島を皮膚用メッシュに包み、10%の緩衝中性 ホルマリンにて固定,パラフィンブロックを6ミクロ ンに薄切し Hematoxylin-eosin 染色を行った。又 ラ島各種細胞を染め分けるため特殊染色を行った. Gomori の aldehyde fuchsin 染色の藤田変法で あるが、ソルチア液にて固定し、6 ミクロンに薄切し 脱パラフィン後水洗する.次いで酸化液(2.5% 過マ ンガン酸カリウム液1容,5%硫酸水1容,蒸溜水6 容)で1分酸化し切片は褐色になる.次に5%蓚酸水 で還元,脱色し水洗する.60%アルコールに1分間浸 した後アルデヒドフクシン液(塩基性フクシン2.0g, パラアルデヒド2.0ml, 濃塩酸2.0ml. 60% アルコー ル100.0ml) で30分間染色する. 次に60%アルコール で3回洗い、軽く水洗し、フクシン・ ポンソー液 (ポンソー・ド・キシリヂン0.5g,酸性フクシン0.2g. オレンジG0.2g,0.5%酢酸水100.0ml)で8分間染色す る. 次に0.5%酢酸水で洗い、3%燐タングステン酸 液に数秒間浸し,0.5%酢酸水で洗い,2% ライト・ グリーン液で数分染色する.染色後0.5%酢酸水で洗 い,100%アルコールで脱水,キシロールで透徹,封入 する.

V. 実験結果

collagenase digestion method の原法に一部修正を加えた方法でラ島分離を行った. 一匹の donorより150~200個のラ島が分離された.

1. 正常分離ラ島のインスリン分泌量

分離 島に glucose 300mg/ dlを加えた場合のインスリン分泌量は図3 に示す様に、30分値 39.8 ± 12.8 μU ($M\pm S.D.$)、60分値 78.0 ± 16.2 μU ($M\pm S.D.$)、90分値 117.2 ± 14.5 μU ($M\pm S.D.$) を示した。

2. 正常ラ島の形態

分離直後のラ島は球形ないし卵円形であり、ラ島の 被膜の一部に損傷を伴うものや外分泌の一部付着する ものがみられたが、多くは半透明で表面平滑なラ島で 分離された、

1) H.E 染色

viable なう島がほぼ純粋に分離されており、一部周辺に外分泌腺細胞が残存するう島もみられる。但しそれらは変性を示している(写真A)。

2) A.F 染色

A.F 染色では、A細胞の分泌顆粒は赤色に、 B細胞の分泌顆粒は青紫色に、D細胞の分泌顆粒は淡緑色に、外分泌顆粒は赤色に染色された、ラ島各細胞の弁別については、B細胞が最も多く、A細胞がこれにつぎ、膨化**膵**ではラ島の peripheral zone にわずかに見られる程度(約5%)であった(写真B).

Ⅵ. 小 括

ラ島分離法として、collagenase digestion method を行ったが、最小の collagenase でかつ、できるかぎり短時間内に消化を終えることにより、viable なラ島を分離できた。その証明として、生化学的には分離ラ島のインスリン分泌測定を行い、分泌能が十分保れており、形態学的には、A.F. 染色により B細胞の分泌顆粒の染色と他細胞の弁別が行い得た。

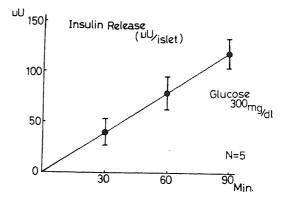


図3 正常ラ島のインスリン分泌量 (glucose 300 mg/dl)

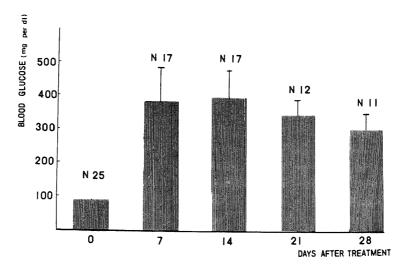


図 4 Streptozotocin 注射後の血糖値 (M±S.D)

実験Ⅱ ラ島門脈内移植

I. 実験動物

体重150~300gの比較的純系な Wistar 系雄 ラットを使用し、エーテル吸入麻酔又は Thiopental-Naの腹腔内投与で麻酔.

Ⅱ. 実験方法

1. Donors

実験 I の方法によりラ島分離を行い移植ラ鳥とする、1 匹の donor rat より約150 個前後のラ島が分離されるが、1 匹の recipient rat に対して、2 匹の donor rat より分離されたラ島を移植した、分離されたラ島をNo199被5 mlの中に入れ、30 分間 37 ° Cにて incubate し、27 ゲージ鈍針にて1 ml 容 デスポ注射器に吸入する、ラ島250 ~ 350 個を吸入するが、鈍針内にラ島残留を防ぐため、吸入後さらに、No199液のみを吸入し、全体量が1 ml 以内となるようにする、吸入後27 ゲージ皮内針に替える。

2. Recipients

recipient として streptozotocin (S.T.Z.) 糖尿ラットを作成した、ラット尾静脈より streptozotocin (Lot No. 10518-G, G, S-37, Upjohn) 65mg/kgを静注し S.T.Z 糖尿ラットを作成する。 クェン酸 (21.01g in 1000ml H₂O)、 クェン酸ナトリウム (29.41g in 1000ml H₂O)よりpH4.5の citrate bufferをつくり、その2.5mlに S.T.Z. 50mgを溶解し、 5分以内に静注する、作成後 metabolic cage に入れ、血糖、一日尿糖、体重、水分摂取量、固形飼料摂

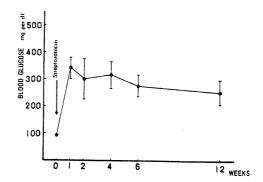


図 5 生存 S. T. Z 糖尿ラットの血糖値 (M±S. D.)

取量等の測定を行った、糖尿ラット作成2週間後recipientとして使用した、エーテル麻酔下にて開腹し、門脈よりラ島を注入し綿棒にて数分圧迫し止血を確かめた後、2層縫合にて閉腹する、移植後 metabolic cage に入れ、血糖、一日尿量及び尿糖、体重変化等の諸検査を行った、移植群では移植前血糖が250~300mg/dlのものを第1群、移植前血糖が400~450mg/dlのものを第2群として、移植後12週間の経過観察を行った。

3. 血糖, 尿糖, 耐糖試験の測定

血糖測定は24時間空腹にしたラット内眼裂よりヘマトクリック管を刺入し0.1mlメランジュールにて採血し、1.0ml生食水に入れる、5%トリクロール酢酸溶液1.0mlにて除蛋白し、上清0.5mlをとり、 Glucose

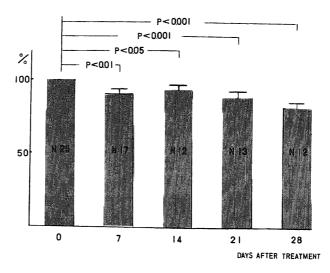


図 6 Streptozotocin 注射後の体重変化 (M±S.D.)

Test Wako の発色試液5.0mlを加える.ついで沸とう水浴中で8分間加熱.3分間流水で冷却する.測定は標準の吸光度及び検体の吸光度より算出した.尿糖測定は24時間尿の一部を20倍希釈し、0.05ml 超微量ピペットにて試料を採取し、Glucose Test Wakoの発色試液5.0mlを加え、血糖と同様な方法で算出した.耐糖試験は50%ブドウ糖注射液を3g/kgの割合で24時間空腹ラット尾静脈より注入し、注射前、注射後15分、30分、60分、120分にラット内眼裂より採血し血糖測定を行った。

4. 移植ラ島の肝内生着の検索

門脈内移植後48時間後及び3ヶ月後の肝組織を検索した. recipient rat を開腹し、肝内に入る動静脈及び門脈を結紮し肝を摘出する. 摘出肝は10%緩衝中性ホルマリンにて固定し、半固定時に各肝葉ごとに2mm間隔の切片とする. 各切片ごとに4枚づつの標本を作成し、H.E 染色及び A.F 染色を行った.

Ⅲ. 実験結果

1. S.T.Z. 糖尿ラットコントロール群

1) 死亡率

25匹のラット尾静脈より S.T.Z. 注射し、生存糖尿ラットは、7日目17匹(死亡率32%)、14日目17匹(死亡率32%)、21日目12匹(死亡率52%)、28日目11匹(死亡率56%)であった(図4)、

2) 血糖

図 4 に示す様に高血糖を示した. 又生存 S.T.Z. 糖 尿ラットの12週間の follow up では図 5 に示す様 に高血糖を持続している.

3) 尿量, 尿糖

S.T.Z. 注射後14日目尿量は平均46ml, 尿糖1.48g/day, 21日目尿量は平均55.5ml, 尿糖2.41g/day, 28日目尿量は平均43.3ml, 尿糖4.82g/day, 56日目尿量は平均78.3ml, 尿糖3.65g/dayであった.

4) 体重

S.T.Z. 注射前体重を100%とし、注射後の体重変化をみると図6に示すごとく変化した。

5) 組織所見

a) H.E 染色

H.E 染色ではラ島の絶対的分布が正常に比べて減少しており、ラ島の大きさも軽度縮小、構成細胞の密度が高く、索状配列の増強がみられる、又毛細血管の増生と内皮の増殖もみられる、分泌顆粒の胞体量も減少し淡明胞体を持つ細胞(B細胞)の減少が推定される、一方ラ島の過形成像は認められない(写真C).

b) A.F 染色

A.F 染色では、H.E 染色所見以外に B 細胞が ほぼ 完全に消失し、代償性に A. D細胞が増加している 写真 D).

2. 門脈内移植群

1) 第1群(移植前血糖250~300mg/dl)

a) 血 糖

S.T.Z. 注射前血糖が86.0±9.3mg/dl (M±S.D.) あり、S.T.Z. 注射後1週目263.2±22.0mg/dl, 2週 目289.6±59.8mg/dlとなった、ラ島門脈内移植後1 週目では 125.2 ± 30.7 mg/dl、2週目では 116.4 ± 15.4 mg/dl、3週目では 110.4 ± 11.4 mg/dl、4週目では 101.2 ± 7.5 mg/dl、6週目では 96.4 ± 6.1 mg/dl、7週目では 93.6 ± 4.3 mg/dl、8週目では 90.2 ± 14.0 mg/dl、9週目では 94.4 ± 9.1 mg/dl、10週目では 101.6 ± 10.5 mg/dl、12週目では 92.0 ± 8.6 mg/dlとなった(図7)、

b) 尿 糖

S.T.Z. 注射後1週目の尿糖は 3.9 ± 0.9 g/dayとなり、ラ島門脈内移植後第1週目では 0.10 ± 0.06 g/day.2週目では 0.09 ± 0.03 g/day.3週目では 0.11 ± 0.02 g/day、4週目では 0.11 ± 0.07 g/day、6週目では 0.11 ± 0.04 g/day、8週目では 0.11 ± 0.05 g/day.10週目では 0.08 ± 0.03 g/day、12週目では 0.09 ± 0.04 g/dayとなった(図7).

c) 症 例

イ) No 1 ラット

S.T.Z. 糖尿ラット(血糖290mg/dl)に250個のラ鳥門脈内移植,血糖は移植後1週目1週目180mg/dl. 2週目146mg/dl. 3週目100mg/dlと改善されたが. 4週目で190mg/dlとやゝ上昇、しかしそれ以後12週目まで正常血糖値を示した.尿糖は移植前4.8g/dayと高値を示していたが、移植後減少し、2週目の1.2g/day以外は、0.08~0.24g/dayと低値を示した. 体重は S.T.Z. 注射後2週目で13.8%減少したが、移植後漸次回復し、4週目で S.T.Z. 注射前の体重となった(図8).

ロ) No29ラット

S.T.Z. 糖尿ラット (血糖290mg/dl)に300個のラ島門脈内移植、血糖は移植後 1週目94mg/dlと改善され以後ほぼ正常値を示している。尿糖は、移植前4.4g/dayと高値を示していたが、移植後 $0.05\sim0.20$ g/dayと低値を示した、体重は S.T.Z. 注射により10.5%減少したが、移植後 8週目で S.T.Z. 注射前の体重に回復し、以後漸次増加し12週目で注射前の5%増加した(図 8).

2) 第2群(移植前血糖400~450mg/dl)

a) 血 糖

S.T.Z. 注射前血糖が 86.4 ± 2.0 mg/dlあり、S.T.Z. 注射後 1 週目 430 ± 15.8 mg/dl、 2 週目 414.4 ± 16.6 mg/dlとなった、ラ島門脈内移植後 1 週目では 254 ± 32.9 mg/dl、2 週目では 240.4 ± 55.5 mg/dl、3 週目では 196.8 ± 78.6 mg/dl、4 週目では 196.0 ± 88.5 mg/dl、5 週目では 146.8 ± 45.2 mg/dl、8 週目では 144.0 ± 32.9 mg/dl、10週目では 102.4 ± 14.0 mg/dl、12週目では 103.2 ± 9.7 mg/dlとなった(図 9).

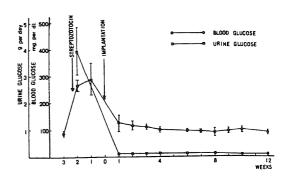


図7 S.T.Z 糖尿ラット (血糖 250~300 mg/dl) へのラ島門脈内移植後の血糖及び尿糖の変化

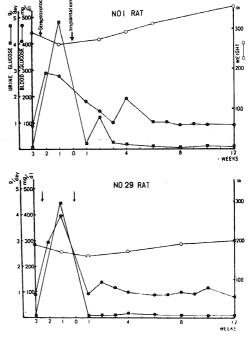


図8 症例1.29 rat の移植前後の血糖, 尿糖および 体重の変化

b) 尿 糖

S.T.Z. 注射後 1 週目の尿糖は 3.9 ± 0.9 g/dayとなり、ラ島門脈内移植第 1 週目では 0.26 ± 0.13 g/day、2 週目では 0.17 ± 0.12 g/day、4 週目では 0.14 ± 0.08 g/day、6 週目では 0.15 ± 0.06 g/day、8 週目では 0.17 ± 0.07 g/day、10 週目では 0.17 ± 0.06 g/day、12 週目では 0.16 ± 0.11 g/dayとなった(図 9).

c) 症 例

イ) No 2 ラット

S.T.Z. 糖尿ラット (血糖450mg/dl)に300個のラ島門脈内移植,血糖は移植後1週目280mg/dlに減少,しかし8週目まで200mg/dl以下には減少せず,10週目,12週目では94、96mg/dlとなった.尿糖は移植前5g/dayと高値を示していたが、移植後0.30g/day以下に維持されている.体重はS.T.Z. 注射により7.4%減少し、移植後わずかではあるが増加傾向にある.しかしS.T.Z. 注射前にまでは回復されなかった(図10).

ロ) No 8 ラット

S.T.Z. 糖尿 $_{9}$ $_{9}$ ト (血糖440mg/d1)に250個の $_{9}$ 島門脈内移植,血糖は移植後 $_{2}$ 週目まで $_{280}$ $_{300mg}$ $_{d1}$ を示し、3 週目以後は $_{100mg}$ $_{d1}$ 前後の血糖値を維持している。尿糖は移植前 $_{3.5g}$ $_{day}$ と高値を示していたが、移植後 $_{0.03}$ $_{0.10g}$ $_{day}$ と低値を示している。体重は S.T.Z. 注射により $_{16.6\%}$ 減少し、移植後はほとんど体重変化は認められなかった(図10).

3) 組織学的検索

a) 移植後48時間目の肝内ラ島

portal space—グリソン氏鞘の門脈内にラ鳥の塞栓像として認める。内分泌細胞約50個が集塊として門脈に塞栓する。大部分がB細胞で、A細胞は3~5個である。塞栓周囲に3個の好中球浸潤があり、塞栓外間に一部赤血球もみられる。他に渗出性変化なく、又糖尿病性肝所見としての細動脈硬化、肝細胞核のグリコーゲン変性等は認められない(写真E)。

b) 移植後3ヶ月目の肝内ラ島

グリソン氏鞘内に約50個の集塊状ラ島のB細胞を見る.同一グリソン氏鞘内に門脈,動脈,細胆管があり,これらはグリソン氏鞘内の間質に存在する.毛細血管により小索に区別され,周囲には円形細胞,macrophageの浸潤を軽度伴う.又肝に糖尿病変化は特に認められない(写真F,G).

c) 移植後3ヶ月目の膵

S.T.Z. 糖尿 $_{7}$

4) 耐糖試験

a) 正常ラット群

負荷前血糖は 83.2 ± 6.9 mg/dl、15分後は 374 ± 35.1 mg/dl、30分後は 364 ± 37.5 mg/dl、60分後は 260 ± 17.4 mg/dl、120分後は 175 ± 18.0 mg/dlであった($n=5.M\pm S.D.$)。

b) S.T.Z. 糖尿ラット群

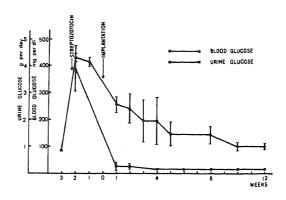


図9 S.T.Z 糖尿ラット (血糖 400~450 mg/dl) へのラ島門脈内移植後の血糖及び尿糖の変化

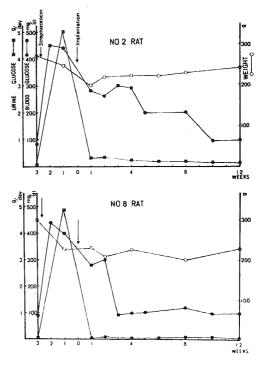


図10 症例2 8 rat の移植前後の血糖, 尿糖, 体 重変化

負荷前血糖は254±24.1mg/dl,15分後は438±40.9 mg/dl,30分後は420±41.3mg/dl,60分後は392±35.6 mg/dl,120分後は367±36.7mg/dlであった(n=5, M±S.D.).

c) 移植ラット群

移植ラット5症例の耐糖曲線は図11の曲線を描き,

木

ほぼ正常パターンを示す.

5) 肝機能検査

正常ラット群、門脈内移植1ヶ月後及び2ヶ月後の肝機能検査では図12に示す様に、G.P.T.では移植2ヶ月後群ではやや上昇し、A1.P. も一部高値を示すものがあった。L.D.H. は移植1ヶ月後群で1000単位以上を示すものであったが、2ヶ月後群では正常範囲内である。その他、血清蛋白、G.O.T.、黄疸指数、T.T.T.、Z.T.T.、には著明な変化は認められなかった。

Ⅳ. 小 括

ラ島門脈内移植の recipient として、S.T.Z.糖ラットを使用するが、その対照群として、又移植前後の生化学的及び形態学的変化を証明するために、S.T.Z.糖尿ラットを作成し、種々の検索を対った。S.T.Z.65mg/kgの注射により、血糖値、尿糖値、尿量は著明に増加し、血糖値は処置後12週目でも246.3±42.49mg/dl (M±S.D.) と高値を示した、体重減少も著明で28日目群では、注射前の82.1±3.1% (M±S.E.) となりP<0.001と有意の差を示す、又注射後28日目では死亡率56%となり、糖尿ラット群の死亡が著明である、耐糖試験では明らかな糖尿パターンを示し、組織学的にはB細胞のほぼ完全な消失を認めた。

250~350個のラ島を S.T.Z. 糖尿ラット門脈内 に移植した. recipient の移植前血糖が、250~300mg/dlでは、移植後血糖及び尿糖は低下し、病状治癒をもたらした. しかし〕移植前血糖が400~450mg/dlでは、移植後尿糖低下は著明であるが、血糖はある程度は改善されるが、治癒までには困難であった. しかし、耐糖試験ではほぼ正常パターンを示している. 次に門脈内移植後のラ島肝内生着の検索では、48時間後及び3ヶ月後とも、ラ島分泌細胞は健在で、細胞の変性及び分離などは認められない. 又同ラット膵組織は糖尿ラット膵組織像を呈し、明らかにB細胞が消失している.

考 察

1964年、Hellerström⁵⁾ が free-hand microdissection を考案し、マウス膵からラ島を分離、1965年 Keen¹⁵⁾ らが膵管結紮後のラ島を分離したが、ラ島をまったく機械的に取り出すだけのこの方法は薬物による影響が無い点で非常に秀れていると云える。しかし本法の技術にはかなり習熟が必要とされ¹¹¹、又1回に多くのラ島を採取することは不可能で、せいぜい1匹あたり30個ほどであるという。他方、 Moskalewski¹²⁾ がモルモット膵を collagenase で処理して

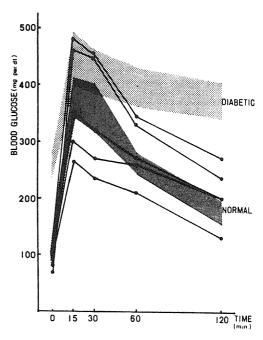


図11 耐糖試験曲線 (門脈内移植 2 ケ月目,正常ラット, S. T. Z. 糖 尿ラット)

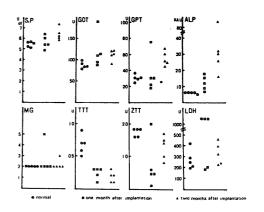


図12 肝機能検査

ラ島を分離する方法を、1965年、はじめて発表し、その有用性は高く評価された。ついで1967年 Lacy & Kostianovsky⁶ がラットでの collagenase digestion method を確立して以来、本法によるラ島分離が広く用いられる³⁰ に至った、最近 Scharp ら¹³は digestion-filtration chamber を使用し、ラ島を分離すれば、原法では1匹あたり151個のラ島分離個数

であるが、447個のラ島分離ができ、これを猿のラ島 分離に応用していると報告している. さて、Lacy & Kostianovsky の原法的では、胆管内にポリエチレン チューブを挿入して膵を膨化させているが、ポリエチレン チューブの挿入は、相当大きなラット(400~500g以 上)でないと技術的に難しい様に思われる、又、 仁木 10らは細い胆管には、皮下針の先端を少し屈曲させて 使用しているが、 Hanks 液を注入する際に注射器に かける力が直接針先に伝わるので、胆管をつきぬけた り引き裂いたりすることがあるから注意を要すると述 べている.この点付針では力が直接針先に及ぶことは なく、2段に曲げておくと胆管穿刺もきわめて容易で あり、胆管内に挿入されている部分の針を、左拇指と 示指で胆管ごと強く圧迫固定して注入すれば、胆管を 損傷することはほとんどなく, さらに肝内へ液が逆流 する怖れもない、又、23ゲージの翼状針では体重150 g前後の小さなラットにも施行できる利点がある. collagenase digestion method のハイライトはな んといっても、 collagenase を使用させる時であろ う. intact なラ島を取り出すという点が難しく、そ のため諸家によって、 collagenase の量、消化時 間、振とうの程度などに多少の違いがみられ、それぞ れ工夫の跡がうかがわれる. LacyらりはHanks液 5 ml につき50~60mgの collagenase で20分間 incubation しており、仁木らいは collagenase の濃度を 60mg/3mlHanks 液と高くし,magnetic stirrerで振 とうを激しく行い消化時間を10~13分と短縮させてい る. 又、最近では分解産物を数種の異なった濃度の Ficol 液を使用し、 density gradient 法によって 分離している報告¹⁷¹⁹⁾ もあり、 Weber ら¹⁶⁾ は、 その 方法で平均200個前後のラ鳥を分離し、とり出された ラ島の80~90%が生存していると報告している. David ら¹⁸⁾ は同方法により人間の ラ島分離を行い、 又豚におけるラ鳥分離及び移植実験を行っている. intact なう鳥を取り出すという点では、これまでの 原法を改良する必要がある. その理由は collagenase の作用時間が全ラ島に同一であるため、初期に分 離されたラ島にも、さらに collagenase の作用が 働き、全ラ鳥分離を終える時には、かなりラ鳥に損傷 を与えることになるからである Scharpら¹³⁾の digestion-filtration method は分離 されたラ島を collagenase の作用から除去し、分離されてないラ島 にのみ collagenase が作用するように工夫されて いるので、より intact なう島が分離できるようで ある. 本実験では、 Lacy らの原法に近いやり方を 続けており、多少異なるところと云えば、岡本らりの

方法にならって、消化時に bovine serum albumin を加えている点である。いづれにせよ、もっとも活性の高いう島を得るためには、最少の collagenase で、かつできる限りの短時間内に消化を終えることが肝要である。

移植実験における recipient として、糖尿病ラッ トの作成が必要となるが、これまで実験的糖尿病に関 する研究は数多くあり,人間の複雑な糖尿病の発生機 序さらに病態生理を解明するに不可欠な役割を果して いる. 本実験では、 Streptozotocin 糖尿 ラットを 使用しているが、Streptozotocin は Streptomyces achromogenes から産生された薬剤で、1963年 Rakieten ら20 により、催糖尿病作用があることが明 らかにされた、しかも本剤はA細胞を傷つけることな く選択的にB細胞を障害し、又肝など膵以外への 臓器 に対する障害も少なく, より安全は薬剤であるとされ ている²⁰⁾²¹⁾. Slijepcevic ら²²⁾ は、実験糖尿病とし て、膵全摘と S.T.Z. 糖尿ラットを比較しているが、 S.T.Z. 糖尿ラットは全摘ラットより、24時間以内に 高尿糖を示し、薬剤の量により種々の程度の糖尿病を 作成できるなど,移植実験の recipient として適し ていると報告している. S.T.Z. 処置後の死亡率に関 して, もちろん S.T.Z. の量により異なるのは当然で あり、Slijepcevicら²²⁾ は S.T.Z.80mg/kg では60日 以内に死亡はなく、100~120mg/kgでは45日以内に4 0%が死亡、150mg/kgでは28日以内に全部死亡した と報告している. 本実験では、S.T.Z.65mg/kgでも28 日以内に56%が死亡した. S.T.Z.処置後の血糖に関し ては、Arison ら23 はS.T.Z.50mg/kg及び65mg/kgの 処置を比較し、8日目では、274mg/dlと314mg/dlで あり前者の方がや、低い血糖値を示すが、36日目、4 ケ月目では両者とも300mg/dl前後の血糖値を示すと 報告している. 一方, Slijepcevicら20 は, S.T.Z.10 0mg/kg以上では250mg/dl以上の高血糖となるが、 S.T.Z.65mg/kgでは100mg/dl程度の血糖であると報 告している. 本実験では, S.T.Z.65mg/kg処置にて図 4の如く300mg/dl以上の高血糖を示した.次に発症 後の follow up で血糖が正常範囲に復する例がある かどうかという問題であるが、本実験でのS.T.Z.処置 後高血糖を示したものでは、図5に示す様に12週間の follow up では、いづれも高血糖を持続し、正常 範囲に復する傾向はみられなかった.しかし,馬場ら 241は、4週間後には空腹時血糖が正常範囲に復した例 が見うけられ、さらに6ヶ月以後では耐糖能が正常範 囲に復したものが出現し,死亡率も減少.しかも,3 ケ月後血糖が正常化したものの膵ラ島組織 で 糖 尿 病

木

によると、S.T.Z. の量が80、100、120mg/kgと増す

に従って, 体重減少も著明であり, 特に雌ラットに著

しいと報告している、本実験では、7日目には、処置

前体重の $90.6\pm2.4\%$ となるが、14日目で一次的に $93.5\pm2.6\%$ と7日目より増加し、以後減少傾向にあり、28日目では $82.1\pm3.1\%$ (P<0.001) となり、体重減少は著明である、S.T.Z.糖尿ラットのラ島組織像は、写真C、Dの如くであり、馬場ら 24 の報告と一致している、一方、Lazarus 21 、Howard 25 は、 rabbitにS.T.Z.糖尿病を作成し、光顕及び電顕上の所見を報

告しているが、B細胞の消失及び変性を認めている.

ラ島移植に関して、1972年、 Ballinger ら8)は、 Streptozotocin 糖尿ラットの腹腔内又は皮下に,400 ~ 600個のラ島を移植し、血糖、尿糖、尿量の改善と 体重の回復を認め、対照糖尿群では4/5が3ヶ月以内 で死亡したのに対し、実験群では死亡をみなかったと 報告している、同年 Gases ら9 も、N.Z.Oマゥス腹 腔内移植により、血糖、尿糖及び耐糖試験の改善と組 織学的検索を行っている. 1973年, Leonard ら^{III} も,アロキサン糖尿ラットの腹腔内にラ島を移植し, 血糖及び尿糖の改善と耐糖試験の正常化を認めてい る. 1973年, Reckardら²⁶⁾ が述べている様に, 腹腔内 移植では、正常血糖を得るためには、1200個のラ島移 植が必要であり、少なくとも6匹の donor rat が 必要である・ ついで移植部位を考慮して、 より少 数のう鳥で十分な糖尿病の改善を期待し、 Kemp ら¹⁰⁾は,ラ島を門脈内に注入し、インスリンを直接肝細 胞に作用させたならば, 生理的条件を満足させ, イン スリンの効果も大きいのではないかと考え、400~600 個のラ鳥を門脈内に注入した. 850~970個の皮下移植 及び,600~850個の腹腔内移植では血糖,尿糖の改善 は不十分であるが、 門脈内移植では十分な糖尿病の改 善を認めた、以後門脈内移植の追試が諸家で行われて いるが、 Ziepler られ は、右門脈内にラ島を注入し、 糖尿病の改善を認めた後、肝右葉切除を行い、高血糖 の再発を来したと報告,これはラ島移植による糖尿病 の改善が、移植ラ鳥の 機能によるものであることを

証明している. この様にラットにおけるラ島移植の研究はインスリン分泌細胞の移植が可能であることを示しているが、ラ島移植の問題点に対してさらに究明する必要がある. ラ島移植部位に関しては、ラ島が着床生存するに好条件であることが必要であり、諸家の研究より門脈内注入が最も好ましいようである. 1976年 Gray ら28 は、門脈内、腹膜内、皮下、末梢静脈内、上腸管膜動脈内に移植を行ったが、門脈内移植群では10匹中6匹が生存、門脈内移植群以外は、移植後すべて死亡したと報告している. 本実験では門脈内移植により、糖尿病状態の改善を認め、又延命効果も明らかに認められた、しかし、今後 rejection の問題

を考えた場合、このルートがはたして最も適当である

かどうかは疑問である.

さて、門脈内に注入されたラ島がどの様な状態で生 存するのか組織学的に検索すると、 Kemp らば は門 脈内注入後,24時間では肝内の門脈内に栓塞として認 められ、10週後も同部位に血管の新生を伴って生存し ていることを示している. 又18週では門脈内の結合織 内にラ島が生着し、B細胞顆粒も認められ、分泌能の 正常なことを示している、 Gray²⁸⁾ らの実験でも門脈 内注入1ヶ月後の肝内門脈内にラ島の栓塞像を認めて いる.しかし、14ヶ月後の肝組織ではラ島細胞が拡散 し、フクシンに染まるB細胞顆粒は島状を呈していな い. 本実験では、48時間後及び3ヶ月後のラ島肝内生 着を検討したが、いづれも、グリソン氏鞘内の門脈内 にラ島の栓塞像として認め、明らかにフクシンに染ま るB細胞顆粒を認めた、又B細胞顆粒以外でフクシン に染色されるものがないかどうか検討するため, 正常 肝組織を aldehyde-Fuchsin 染色すると、門脈周囲 に青紫色に染まる細胞が認められ、これは macrophage と判定した. 少なくとも3ヶ月以内では、生着 ラ島は血管新生等の組織化は認められるが、ラ島細胞 の拡散傾向は認められなかった。

次に1匹の donor から分離される、 ラ鳥数と、1匹の recipient に要する島数との開きが大きいということがあり、解決される問題の一つである。従来の方法では、ラットでは $150\sim200$ 個、ヒトでは全ラ島のわずか $10\sim50$ %を回収しうるに止まり、事実ヒヒでの実験では何らの代謝 改善も 認めなかった 29 、一方ラ島移植時にインスリンを投与し、正常血糖値を保つことにより必要島数を減少したとする報告 30 もあるが、本実験では $250\sim350$ 個のラ鳥を門脈内移植し、糖尿病状態の改善を検討した。これは 1 匹の donor より約150個のラ鳥が分離されることより、最小限の鳥

数として2匹の donor より分離された250~350個を使用した.しかし、移植前血糖値によりその効果り、実験結果で示したように、糖尿病状態の高度のものでは、その改善にとどまり治癒までには困難であった.しかし軽症の糖尿病では、移植後、血糖、煙、体重減少は改善され、治癒をもたらした.至適かに関しては、これまで諸家の報告にもあるように、門脈内移植では400~600個必要とされているが、同度に投与う島を移植した場合には、糖尿病の回復部に一般に投与う島の数に比例すると云われているが、同度は、450~350個のラ島門脈内移植でも効果があると考える、又重症の糖尿病に対しては、250~350個の門脈内移植とインスリン投与の併用実験も今後必要と思われる。

結 論

糖尿病治療への新しいアプローチとして、ラット、 膵ランゲルハンス島の門脈内移植を行った。

- 1. S.T.Z.糖尿ラット群では、4週以内に56%が死亡したが、移植群では死亡を認めず延命効果があった。
- 2. S.T.Z.糖尿ラット群では血糖, 尿糖は12週間の follow up でも高値を示したが, 移植群では, 血糖, 尿糖の改善がみられた.
- 3. S.T.Z.糖尿ラットの膵組 織像は、 ラ鳥の絶対的分布わ減少、大きさの軽度縮小とB細胞の消失を認め、組織学的にも分泌能の消失を証明した.
- 4. ラ島250~350個の門脈内移植では、移植前血糖が250~300mg/dlのものは糖尿病状態の治癒を認め、移植前血糖が400~450mg/dlのものでは、糖尿病状態の改善を認めた
- 5. 肝内生着ラ島のB細胞は健在であり、同ラット 膵組織ではB細胞顆粒の消失が証明されていることから、組織学的にも門脈内移植の有用性を証明した。
- 6. 門脈内移植群の2ヶ月目の耐糖試験は正常パターンを示した.
- 7. 門脈内移植群の肝機能障害は認められなかった。

以上より、ラットにおける、インスリン分泌細胞の 移植が可能であるのみならず、移植によって糖尿病の 改善もしくは治療が可能である.

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を戴いた宮崎逸夫教授に深謝いたします。また直接御指導、御助言を 戴いた、中川原儀三助教授、岡本宏博士ならびに秋本龍一博士に深く感謝いたします。さらに病理学的検索に多大な御指導をいただきました。 念沢医科大学第二病理、小西

二三男講師ならびに教室員各位に感謝の意を表します.

文 献

- 1) non author: JAMA, 226, 1211 (1973).
- 2) Dragstedt, L. R.: Ann. Surg., 118, 576 (1964).
- 3) 野沢真澄 & Lee, S.: 移植, 7,316 (1972).
- 4) Lee, S., Tung, K. S. K., Koopmans, H., Chandler, J. G. & Orloff, M. J.: Transplantation, 13, 421 (1972).
- 5) Hellerström, C.: Acta. Endocrinol., 45, 122 (1964).
- 6) Lacy, P. E. & Kostianovsky, M.: Diabetes, 16, 35 (1967).
- 7) Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H. & Takeda, R.: FEBS Lett., 54, 103 (1975).
- 8) Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Surgery, 72, 175 (1972).
- 9) Gates, R. J., Hunt, M. I., Smith, R. & Lazarus, N. R.: Lancet, 16, 547 (1972).
- 10) Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Diabetologia, 9, 486 (1973).
- 11) Ballinger, M. F. & Lacy, P. E.: Surgery,72, 175 (1972).
- 12) Moskalewski, S.: Gen. Comp. Endocrinol. : 5, 342 (1965).
- 13) Scharp, D. W., Murphy, J. J., Newton, W.T., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Surgery,77, 100 (1975).
- 14) 仁木 厚:代謝, 12, 271 (1975).
- 15) Keen, H., Sells, R. & Jarrett, R. J.: Diabetologia, 1, 28 (1965).
- 16) Weber, C., Well, R., Mcintosh, R. & Reemtsma, K.: Transplantation, 19, 442 (1975).
- 17) Leonard, R. J., Lazarow, A. & Hegre, O.D.: Diabetes, 22, 413 (1973).
- Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Bauer,
 G. E., Mcmanus, D., Noe, B. D. & Najarian,
 J. S. : J. Surg. Res., 16, 102 (1974).
- 19) Scharp, D. W., Kemp, C. B., Knight, M. J., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E.: Transplantation, 6, 686 (1973).
- 20) Rakieten, N., Rakieten, M. L. & Nadkarni, M. V.: Cancer Chemother. Rep., 29, 91 (1963).

- 21) Lazarus, S. S. & Shapiro, S. H.: Diabetes,
- **21,** 129 (1972).
- 22) Slijepcevic, M., Helmke, K. & Federlin, K.: Horm. Metab. Res., 7, 20 (1975).
- 23) Arison, R. N., Ciaccio, E. I., Glitzer, M. S., Cassaro, J. A. & Pruss, M. P. : Diabetes, 16, 51 (1967).
- 24) 馬楊茂明, 土井邦紘、 吉田宗儀、 金子滋夫 : Diabetes Journal, 3, 1 (1975).
- 25) Howard, C. F.: Diabetes, 21, 138 (1972).
- 26) Recard, C. R., Ziegler, M. M. & Barker,C. F.: Surgery, 74, 91 (1973).
- 27) Ziegler, M. M. & Rechard, C. R.: Transplant. proc., 7, 743 (1975).
- 28) Gray, B. N. & Watkins, E.: Aust. j. Ezp. Biol. Med. Sci., 54, 57 (1976).
- 29) Goetz, F. C.: Metabolism, 23, 875 (1974).
- **30)** Marguet, R. L. & Wiegel, A. R.: REP-TNO Annual Report, 145, (1974).
- 31) Leonard, R. J., Hegre, O. D. & Lazarow,

- G.: Diabetes, 24, 419 (1975).
- 32) Thomas, D. R., Fox, M. & Griene, A. A. : Nature, 242, 23 (1973).
- **33**) **Strautz, R. L.**: Diabetologia, **6**, 306 (1970).
- 34) Steffes, M. W., Sutherland, D. E. R.,Mauer, S. M., Najarian, J. S. & Brown, D.M.: Transplantation, 19, 449 (1975).
- 35) Mauer, S. M., Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Leonard, R. J., Najarian, J. S., Michael, A. F. & Brown, D. M.: Diabetes, 23, 748 (1974).
- 36) Steffes, M. W., Sutherland, D. E. R.,
 Mauer, S. M., Leonard, R. J., Najarian, J. S.
 & Brown, D. M. : J. Lab. Clin. Med., 85, 75 (1975).
- 37) Orloff, M. J., Lee, S., Charters, A. C., Grambort, D. E., Storck, L. G. & Knox, D. : Ann. Surg., 182, 198 (1975).
- 38) 野沢真澄:糖尿病,17,522 (1974).

Abstract

Recently there has been much interest in the possibility of pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas has been described by Lacy et al. In this study, islets of Langerhans were isolated from Wistar rats by the collagenase digestion method of Lacy et al. and the improved technique of Okamoto et al.

Recipients were made diabetic by the intravenous injection of streptozotocin (Upjohn) at a dose schedule of 65mg/kg. Isologous islets (250-350) were injected into the portal vein of the rat 14 days after induction of diabetes.

These studies indicate:

- (1) While the mortality of streptozotocin-induced diabetic rats was high (56% died within a month), none of the islet transplantated rats died within 3 months.
- (2) All diabetic controls showed marked polydipsia, polyphagia, polyuria, glycosuria and hyperglycemia. (>250mg/dl for 3 months)
- (3) In the rats with blood glucose of 250-300 mg/dl, the diabetic condition was cured by the transplantation.
- (4) In the rats with blood glucose of 400-450 mg/dl, improvement of the diabetic condition was observed.
- (5) Well granulated islets were noted in terminal radicles of the portal vein 48 hrs. and 3 months after transplantation. In contrast, B cell granules disappeared in the pancreas of the recipient rats.

- (6) Intravenous glucose tolerance tests were done on all recipient rats 2 months after transplantation. The response of all transplant recipients was similar to that of normal controls.
- (7) Liver function test of transplant recipients was normal.

