

単離ラット腓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

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/2297/8650

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

金沢大学第2外科学講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

小 島 靖 彦

(昭和51年11月27日受付)

内分泌臓器の動物における移植実験は、甲状腺、上皮小体、副腎などについては既にいくつか報告されている^{1)~3)}。これらの多くは筋肉、皮下組織、肝、脾、腸管漿膜などに内分泌臓器を implant するのみで移植が可能である。膵臓においても implantation による移植がラット、マウスにおいて試みられているが、移植された膵臓は、崩壊排除がひどく、一般に完全なる移植は困難であることが指摘されている⁴⁾⁵⁾。さらに Lillehei ら⁶⁾は犬の膵臓移植において、移植膵の外分泌組織には著しい崩壊がおこるが、ランゲルハンス島 (以下ラ島と略す) は正常に維持されていることを組織学的に認めた。

一方、膵臓よりラ島を分離するための試みがなされ、1964年 Hellerström⁷⁾ は、free-hand microdissection によってラ島を分離する方法を、また、1965年 Moskalewski⁸⁾ は、膵臓を collagenase で処理し、膵外分泌組織を消化しつつラ島を分離する方法を報告している。その後 Lacy ら⁹⁾は膵管内へ Hanks 液を加圧注入し、外分泌組織を膨化させた後、collagenase で処理して得たラ島は形態学的にも機能的にも分離以前のものと変わらないと述べている。さらに Ballinger ら¹⁰⁾は、Lacy らの方法によって分離したラットのラ島を糖尿病ラットに移植し、糖尿病が改善されることをみた。その後、ラ島の in vitro 培養ならびに培養ラ島の移植実験が試みられつつあるが¹¹⁾¹²⁾、著者も培養によるラ島の長期保存法、培養ラ島のインシュリン産生能、およびその同種移植について検討した。

1. ラ島の培養実験

1. 実験材料と方法

1) 実験器具および滅菌法

ラ島の培養に際し、実験器具はすべて滅菌したものを用い、操作は膵摘出の段階より無菌的に行なった。ラットより膵摘出の際に使用した手術用器具、およびミリポアフィルター (0.45 μ 孔径) は高圧滅菌 (120 $^{\circ}$ C, 20分間) し、シャーレ、三角フラスコ、ピーカー円錐形メスシリンダー、ピペット、マイクロピペット、パスツールピペット等のガラス器具は乾熱滅菌 (160 $^{\circ}$ C 1時間) した。さらにゴム栓はガス滅菌 (10%アセチレンオキサイドガス, 5時間) したものを使用した。

2) 実験動物

膵臓摘出、および培養ラ島の移植には、体重200~300gの Wistar 系ラットを用いた。

3) 膵組織消化用酵素

摘出膵の消化に用いた collagenase (Type IV, Worthington Biochemical Corporation) は、使用時に40mgを Hanks 液5mlに溶解し、ミリポアフィルターで加圧濾過滅菌した。

4) 膵臓摘出とラ島の分離

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⁾の方法にならい、総胆管の十二指腸開口部を結紮した後、岡本ら¹³⁾の方法によって、肝管の最終合流部より21G~23Gの翼状針 (2段階に屈曲させて使用) を挿入、glucose を60mg/dl濃度に含む Hanks 液20mlを注入した。この際、Hanks 液を十分注入することにより膵全体を水腫状に膨化させた (Photo. 1, 2)。腸管を損傷しないように注意しながら、周囲の脂肪組織をできるだけ排除して、膨化した膵体部および尾部を鋭的に摘出した。摘出した膵を直ちに20~30mlの冷却した Hanks 液で洗浄し、浮遊傾向のある部分はできるだけ除去した。さらに、摘出膵を眼科用クレー

Experimental studies on organ culture of isolated rat pancreatic islets in relation to morphological observation and maintenance of biological function. Yasuhiko Kojima, Department of Surgery (II), (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University.

パーを用いて細かく切りながら20ml容三角フラスコに入れた。細切後、無菌箱内で8 mg/mlの collagenase を加え、ゴム栓で密栓した三角フラスコを、37°Cで metabolic shaker にかけて150~200回/分の shaking incubation のもとに、組織片を15~20分間消化した。時々消化状態を観察し、一様に泥状になった時消化を終了した。shaking incubation を終えた泥状液を無菌的に50ml容メスシリンダーに移し、30 mlの warm Hanks 液を加えて静かに攪拌し、1~2分間静置した後、上清部を約25ml吸引で除去した。次いで再び warm Hanks 液を加え、ラ島附着物を洗い取るように駒込ピペットでやや強く攪拌した。1~2分間静置した後、浮遊物を含めその上清を吸引除去した。同様の操作を warm Hanks 液で4回洗浄後、cold Hanks 液で更に4回洗浄することにより、残存する collagenase および睪外分泌組織をラ島より除去した。最終洗浄で得られたラ島を含む沈澱物を少量の cold Hanks 液に懸濁し、これを冷却した滅菌シャーレに移して、鏡検しながらラ島を確認し、採取して培養に供した。

5) ラ島の培養法

培養液は20%牛胎児血清を加えた Dulbecco modified Eagle 培地に、ペニシリンG 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml を添加して、基礎培地とした。

培養には常に17mm径の multi-dish tray (Limbro, 24穴、滅菌済)を用いた。multi-dish tray の各 well に基礎培地を1ml入れ、単離されたラ島を毛細管ピペットで2個づつ入れて、37°C、5%炭酸ガス培養恒温器で静置培養し、培地の交換は3日ごとに無菌箱内で行なった。この際パスツールピペットを用いて注意深く培養液を吸引することにより、ラ島をまったく損ねることなく容易に全培養液を交換することができた。交換した培地は insulin を測定するため-20°Cに保存した。

6) insulin 測定

ラ島の培養に際し、培地中に放出された insulin の測定は、培地を10倍に稀釈したうえ、Phadebas insulin test (solid phase method) により定量測定した。

7) 培養ラ島の形態学的、組織学的観察

倒立型培養顕微鏡、位相差顕微鏡、ノマルスキー式微分干渉顕微鏡を用いて培養ラ島を形態学的に観察した。倒立型培養顕微鏡観察においては、multi-dish tray をステージの上のせ鏡検し、また位相差顕微鏡、ノマルスキー式微分干渉顕微鏡観察においては、培養ラ島を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。

培養ラ島の組織学的観察のためには、ラ島をパラフィン包埋し、組織切片を作製して、ヘマトキシリン・

エオシン (H E) 染色またはアルデヒドフクシン (A F) 染色 (Gomori 原法の藤田変法) を施して、 β 細胞等の検索を行なった。

2. 実験結果

1) 単離ラ島の培養

collagenase 処理により単離され、冷却シャーレに集められたラ島を暗視野で双眼実体顕微鏡で鏡検すると、ラ島は球形ないし楕円球形を呈し、充実性ある米粒の外観を呈していた (Photo. 3)。これら単離したラ島を毛細管ピペットで採取し、基礎培地での培養に移した。multi-dish tray に移したラ島の形態を確認するために、倒立型培養顕微鏡で観察すると、分離直後のラ島は被膜の一部損傷したものや、外分泌組織の一部を附着したものがみられたが、おおむね半透明、表面平滑で正常なラ島が単離された (Photo. 4)。かかるラ島を培養すると、培養後3日以内にほとんどすべてのラ島は球形になり、その周辺部の構造は分離直後のものに比し、より平滑となり、一見被膜の強靱化が起ったように観察された。分離時に一部損傷を受けたラ島も多くは修復された形で培養された。また附着していた外分泌組織は、ラ島より剝離していた (Photo. 5)。これらラ島はプラスチック表面に定着することなく、浮遊状態で培養された。

培養10日目前後に2個のラ島が融合する場合が見られ (Photo. 6)、培養の経過にともない1個のラ島になるものも観察された。いったん球形を呈した培養ラ島は以後の培養においても形態的には大きな変化を示すことはなかったが、培養4週目頃より、ラ島のあるものでは、中心部に不透明な部分の出現が認められるようになった (Photo. 7, 8)。かかる不透明部分は、以後の培養日数経過にともない大きさを増す傾向にあり、培養ラ島の中心部より壊死が起ったものと考えられた。またいくつかの well において、培養に用いたラ島の他に、小型のラ島を思わせる細胞集塊の形成がみられ、培養70日目頃にはかなり明瞭な形態を示すようになった (Photo. 9, 10)。これらの事以外には、位相差顕微鏡またはノマルスキー式微分干渉顕微鏡を用いての培養ラ島の微細構造および表面形態の観察で、分離直後のものと著しい変化は認められなかった。培養4週後の位相差顕微鏡の強拡大における観察ではラ島の表面より上皮性細胞の増殖がみられ、またラ島細胞内に分泌顆粒が存在し、Andersson ら¹⁴⁾の報告と一致する所見であった。ノマルスキー式微分干渉顕微鏡においてはラ島細胞は明瞭に輪廓されて観察された (Photo. 11, 12, 13, 14)。

長期培養実験は80日で打ち切られた。この時点にお

けるラ島は、中心部の不透明部分の進行は著しかったが、ラ島そのものに崩壊はまったくみられないところから、3日間隔での培地交換で更に長期培養も可能であると考えられた。

2) 培養ラ島の insulin 産生

ラ島の長期培養において、insulin 産生を調べるために、3日間隔で交換した培地に含まれる insulin を定量測定した。その結果は Fig. 1 に示すごとく、ラ島2個あたり産生される insulin 量は1097~1434 μ U/ml の範囲で、80日間の培養期間をとおしてほぼ一定であった (Fig. 1)。このことは、単離ラ島が長期間の培養中 insulin を産生し続けており、かつその産生する活性において分離直後のものと同じであることを暗示している。そこでこのことを確認するために、分離直後30日培養、60日培養のそれぞれのラ島について insulin 産生量を比較検討した。

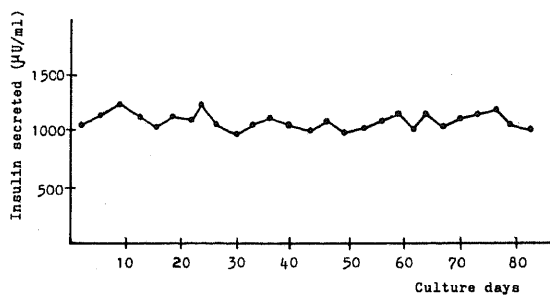


Fig. 1. Insulin contents in culture media obtained every 3 days for long cultures.

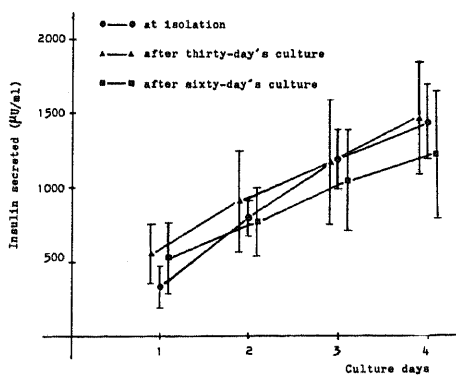


Fig. 2. Comparative activity of insulin secretion in islets of Langerhans at various culture stage.

それぞれのラ島を毛细管ピペットで採取し、新しい基礎培地1mlを入れた multi-dish tray の各 well に2個ずつ移した。37°C, 5%炭酸ガス恒温器で、1日間、2日間、3日間、4日間、培地の交換なしに培養し、培地中に産生された insulin 量を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。いずれのラ島の場合も培養日数にともない、培地に蓄積される insulin 量はほぼ直線的に増加した。しかし、insulin 産生率を比較すると、分離直後のラ島でやや高く、30日培養、60日培養後のラ島の順で若干低下する傾向にあった (Fig. 2)。ラ島を毛细管ピペットで採取する際、できるだけ大きさが均一になるように注意したが、長期間培養のラ島を採取する場合、個数をそろえるためにならずしも大きさを均一に選ぶことはできなかった。

これらの結果から、培養によって長期間維持されたラ島は、分離直後のものに比較して insulin 産生能は若干低下する傾向を示すが、少なくとも80日間の培養において、insulin 産生能は本質的に変化することなく保持されることが考えられた。

次に、Photo. 9および10で示した小型ラ島様の細胞集塊について、insulin の産生能を検討した。培養75日目に親ラ島のみを毛细管ピペットで除去し、残った細胞集塊を Hanks 液で洗った後、新しい基礎培地を加えて培養した。3日ごとに培地を交換し、培地中に含まれる insulin を測定した。その結果、最初の3日間の培地には15.5 μ U/ml の insulin が含まれ、2回目では7 μ U/ml、3回目では4 μ U/ml と培地交換ごとに産生 insulin 量は減少し、その後は insulin を検出し得なくなった。このことは新生の細胞集塊は強い insulin 産生能をもたず、形態的には小型ラ島のごとく観察されるが、insulin 産生細胞である β 細胞を含まない細胞集塊であると考えられた。

3) 培養ラ島の組織学的観察

A F染色で観察すると、分離直後のラ島は青紫色に濃染した顆粒 (A F可染顆粒) を有する β 細胞が一様に分布していた。一方、H E染色で観察すると、培養4週後のラ島は、分離直後 (Photo. 15) とほぼ同様の像を示し、ごく一部の細胞質内には小空胞を認めるが大部分の細胞では核の膨化や細胞質の変性を認めなかった。A F染色では青紫色に濃染した顆粒を有する β 細胞をラ島内に多数認めた (Photo. 16)。

前述した、4週間以上培養されたラ島の中心部にみられる不透明な部分は、H E染色標本での観察で、中心部壊死の所見であった。しかし周辺部は正常な細胞が多く残存し、A F染色においても β 顆粒の存在を示していた。

3. 小 括

Dulbecco's modified Eagle MEMに20%牛胎児血清を含む培養液を基礎培地とし、multi-dish trayを用いて、単離ラ島の80日間の長期培養を行なった。かかる培養ラ島は培養が長期になるにしたがい、insulin 産生能が若干低下する傾向を示したが、全期間を通じほぼ一定の insulin を培地中に放出していた。形態学的には培養に移したラ島は被膜に強靱化がみられる他は著しい変化を認めなかった。しかし、培養4週目頃から中心部に壊死が起こり始めるラ島がみられたが、insulin 産生においてあまり大きな影響がないことから、ここに用いた培養方法はラ島の保存に適していると考えられる。

II. 培養ラ島の内分泌機能

ラ島のinsulin 産生は glucose の濃度に依存することが知られている¹⁵⁾ので、培地中のglucose 濃度を変え、培養ラ島の insulin 産生能を検討し、更に glucagon (Sigma Chemical Company) 添加時の培養ラ島の insulin 産生能についても検討した。

1. 実験方法

1) 培地中への insulin 放出

同一ラットより分離したラ島を Dulbecco 培地および glucose 濃度を 100 mg/dl に低下させた modified Dulbecco 培地で培養し、両培地中の insulin 量を測定、比較した。

2) short time incubation による insulin 分泌実験

ラ島を分離直後群、1週間培養群、2週間培養群にわけ検索を行なった。分離直後群は、ラ島分離後0.2% bovine albumin (Abmour Pharmaceutical Corporation, Chicago, U.S.A) を添加した glucose 60 mg/dl 含有の Hanks 液にて1時間 preincubation を行なった。1週間、2週間培養の各々のラ島を、双眼実体顕微鏡下にラ島培養用の multi-dish tray を置き、

毛細管ピペットで1個づつひろい、上記 albumin および glucose 含有 Hanks 液を加え、2時間 preincubation を行なった。かくて、各群それぞれ5個のラ島を test medium 0.5ml 含有小試験管内に入れ、95% O₂, 5% CO₂ を通気後、90分間37℃の水浴槽中にて70~80回/分の shaking incubation を行ない、培地中に放出された insulin 量を Phadebas insulin test (solid phase method) にて測定した。

insulin 分泌用培地 (test medium) として、Eagle's MEM および Krebs-Ringer bicarbonate を使用した。まず Eagle's MEM 使用の場合、0.2% bovine albumin 存在下で、添加する glucose 100mg/dl 群、300 mg/dl 群または glucagon 10μg/ml + glucose 100mg/dl 群の3種類を test medium として用いた。一方、Krebs-Ringer bicarbonate 使用の場合、0.2% bovine albumin, 5mM glutamic acid, 5mM pyruvic acid, 5mM fumaric acid を添加したものを base とし、glucose 濃度を60mg/dl 群、300mg/dl 群または glucagon 10μg/ml + glucose 60mg/dl 群の3種類について insulin 産生を比較した。

2. 実験結果

1) glucose 刺激による培養ラ島の insulin 産生能

3日間隔で測定された培地中の insulin 量は、glucose 濃度 450mg/dl 群では 100mg/dl 群に比し約1000μU/ml 程高い値を示した。しかし、9日間の培養期間中、それぞれの両培地中に放出された insulin 量は有意の差を示さず、かかる方法で測定された培養ラ島の glucose 刺激による insulin 産生能は、この期間中有意の変動が認められなかった (Table 1)。

2) short time incubation における培養ラ島の glucose または glucagon 刺激効果

glucose 濃度の insulin 産生に及ぼす影響を培養ラ島の short time incubation で測定すると、Eagle's MEM, Krebs-Ringer bicarbonate いづれの test me-

Table 1. Insulin secretion ability of islets of Langerhans stimulated by glucose every 3 days after cultures from 3 to 9 days

Glucose concentration	Insulin secretion (μU/ml/3days)		
	Culture days		
	3	6	9
100 mg / 100 ml	485 ± 122 (24)	452 ± 206 (24)	456 ± 108 (24)
450 mg / 100 ml	1518 ± 511 (24)	1351 ± 375 (24)	1425 ± 386 (24)

All values expressed as Mean ± S. D. (N).

dium を用いても、分離直後のラ島より1~2週間培養したものの方に、より多くの insulin 産生能が測定された (Table 2, 1) 2))。

さらに Eagle's MEM の glucose 100mg/dl 群と 300 mg/dl群を比較すると、前者の insulin 分泌は $109.6 \pm 20.9 \mu\text{U/ml}$ (分離直後), $155.6 \pm 35.2 \mu\text{U/ml}$ (1週間培養), $182.5 \pm 43.9 \mu\text{U/ml}$ (2週間培養) であるのに対して、後者のそれはそれぞれ $211.2 \pm 20.6 \mu\text{U/ml}$,

$388.8 \pm 57.3 \mu\text{U/ml}$, $388.0 \pm 50.4 \mu\text{U/ml}$ であり高濃度の glucose において約2倍以上の insulin 産生量の増加をみた (Table 2, 1))。

Krebs-Ringer bicarbonate においても同様で, glucose 60mg/dl の insulin 分泌は, $52.2 \pm 18.2 \mu\text{U/ml}$ (分離直後), $73.8 \pm 24.3 \mu\text{U/ml}$ (1週間培養), $120.8 \pm 21.6 \mu\text{U/ml}$ (2週間培養) であるのに対して, glucose 300mg/dl群のそれは, それぞれ $368.5 \pm 45.4 \mu\text{U/}$

Table 2. Stimulating effect of glucose or glucagon on insulin secretion from cultured islets of Langerhans.

1) in Eagle's MEM

Exp. 1

Incubation medium	Insulin secretion ($\mu\text{U/ml/90 min}$) in Eagle's MEM		
	at isolation	1 week culture	2 weeks culture
Glucose (100mg/100ml)	109.6 ± 20.9 (9) (1.00)	155.6 ± 35.2 (9) (1.00)	182.5 ± 43.9 (9) (1.00)
Glucose (300mg/100ml)	211.2 ± 20.6 (8) (1.93)*	388.8 ± 57.3 (8) (2.50)	388.0 ± 50.4 (8) (2.13)

Exp. 2

Incubation medium	Insulin secretion ($\mu\text{U/ml/90 min}$) in Eagle's MEM		
	at isolation	1 week culture	2 weeks culture
Glucose (100mg/100ml)	57.5 ± 29.3 (8) (1.00)	134.3 ± 44.8 (8) (1.00)	160.3 ± 47.3 (8) (1.00)
Glucose (100mg/100ml) + Glucagon (10 $\mu\text{g/ml}$)	206.0 ± 39.4 (10) (3.58)**	396.0 ± 53.2 (10) (2.95)	429.8 ± 56.8 (10) (2.68)

2) in Krebs-Ringer bicarbonate

Incubation medium	Insulin secretion ($\mu\text{U/ml/90 min}$) in KRB		
	at isolation	1 week culture	2 weeks culture
Glucose (60mg/100ml)	52.2 ± 18.2 (10) (1.00)	73.8 ± 24.3 (10) (1.00)	120.8 ± 21.6 (8) (1.00)
Glucose (300mg/100ml)	368.5 ± 45.4 (10) (7.06)*	403.9 ± 50.6 (10) (5.47)	535.9 ± 76.4 (8) (4.44)
Glucose (60mg/100ml) + Glucagon (10 $\mu\text{g/ml}$)	136.2 ± 22.8 (10) (2.61)**	189.8 ± 31.9 (10) (2.57)	252.5 ± 46.5 (8) (2.09)

All values expressed as Mean \pm S. D. (N).

* ratios (glucose 100 mg / glucose 300 mg)

** ratios (glucose 100 mg / glucose 100 mg + glucagon 10 μg)

* ratios (glucose 60 mg / glucose 300 mg)

** ratios (glucose 60 mg / glucose 60 mg + glucagon 10 μg)

mL, $403.9 \pm 50.6 \mu\text{U/mL}$, $535.9 \pm 76.4 \mu\text{U/mL}$ であり, glucose 60mg/dL群よりも 300mg/dL群に有意の差をもってその分泌値の増加をみた (Table 2, 2)。

一方, glucagon に対する反応をみると, 分離直後, 1週間および2週間培養のラ島を用い, Eagle's MEM (glucose 100mg/dLを含有) 単独での insulin 分泌を測定すると $57.5 \pm 29.3 \mu\text{U/mL}$ (分離直後), $134.3 \pm 44.8 \mu\text{U/mL}$ (1週間培養), $160.3 \pm 47.3 \mu\text{U/mL}$ (2週間培養) の値を示した。しかし, glucagon $10 \mu\text{g/mL}$ を添加すると insulin 分泌は, それぞれ $206.0 \pm 39.4 \mu\text{U/mL}$, $396.0 \pm 53.2 \mu\text{U/mL}$, $429.8 \pm 56.8 \mu\text{U/mL}$ となり glucagon 刺激によく反応し, insulin 分泌の約3~4倍の増加を認めた (Table 2, 1)。

Krebs-Ringer bicarbonate の場合も同様で Krebs Ringer bicarbonate (glucose 60mg/dL含有) に glucagon $10 \mu\text{g/mL}$ を添加した場合の insulin 分泌は, それぞれ $136.2 \pm 22.8 \mu\text{U/mL}$ (分離直後), $189.8 \pm 31.9 \mu\text{U/mL}$ (1週間培養), $252.5 \pm 46.5 \mu\text{U/mL}$ (2週間培養) であり, Krebs-Ringer bicarbonate 単独群の約2倍の増加を示した (Table 2, 2)。

3. 小 括

Dulbecco 培地の glucose 濃度 100mg/dL 及び 450 mg/dL として単離ラ島を培養し, insulin 産生量を比較した。glucose 450mg/dL 培地は, 100mg/dL 培地に比し, 約 $1000 \mu\text{U/mL}$ 高い insulin 分泌の増加をみた。更に1週間培養, 2週間培養ラ島につき, glucose および glucagon 刺激による分泌実験を short time incubation で行なったところ, 分離直後と同様によくそれらに反応し, glucose または glucagon の濃度にもよるが, insulin 分泌能の約2~4倍の増加をみた。したがって, 1~2週間培養ラ島も分離直後のラ島に殆んど匹敵する insulin 分泌能を保持していると考えられた。

III. 培養ラ島の同種移植実験

培養ラ島は in vivo に移植した場合 insulin の生合成能を発揮するか否かが本研究の最終的な目的である。そこで streptozotocin 誘発糖尿ラットを用い, 培養ラ島の門脈内移植実験を行なった。

1. 実験材料ならびに方法

1) 培養ラ島の採取

multi-dish tray で2週間培養したラ島を毛細管ピペットを用い, 双眼実体顕微鏡下で採取し Hanks 液を入れたシャーレ内へ収容し, 移植用ラ島とした。

2) streptozotocin 糖尿ラットの作成

体重150~450g の Wistar 系雄ラットに streptozotocin 65mg/kg を尾静脈より静注し糖尿ラットを作成した。静注後は metabolic cage に収容し, 血糖, 尿

糖, 尿量, 体重を測定した。血糖は, 24時間絶食後, 眼窩静脈叢へヘマトクリット管刺入により血液を採取, glucose test Wako の除蛋白法により測定した。尿糖も同様に24時間尿の一部を用いて測定した。

3) 培養ラ島の門脈内同種移植

シャーレ内に集められた2週間培養ラ島300~400個を27G鈍針にて1mLディスポ注射器に吸入し全量が1mL以内になるようにした。吸入後27G皮下針に変えた後, recipient 糖尿ラットをエーテル吸入麻酔下にて開腹, 門脈を露出した。門脈本幹内へ培養ラ島300~400個を直接注入後, 綿棒またはガーゼにて数分間圧迫, 止血を確認した後閉腹した。implantation 終了後は metabolic cage に収容し諸検査を行なった。なお, 免疫抑制剤は投与しなかった。

2. 実験結果

1) Normal Controls

7匹の正常ラットの血糖, 尿量, 尿糖を測定した。血糖 $80.0 \sim 104.1 \text{ mg/dL}$ (89.4 ± 7.5), 尿量 $9.8 \sim 20.3 \text{ mL/day}$ (14.6 ± 3.1) 尿糖 0.3 g/day 以下であった。

2) Diabetic Controls

30匹の control 群を作成した。

i) 血糖: streptozotocin 注射後1週間以内に10匹が死亡したが, 1週目の血糖 200 mg/dL 以上を示したものは17匹であった。さらに7匹が4週までに死亡したが, いずれも 400 mg/dL 以上の高血糖を示していた。生存糖尿ラットの follow up ではいずれも高血糖を示し正常化する傾向はなかつた。

ii) 尿糖: 血糖 200 mg/dL 以上を示したラットには $2.0 \text{ g/day} \sim 6.5 \text{ g/day}$ の尿糖がみられた。

iii) 体重: streptozotocin 注射後1週目で平均体重の減少率は11.75%であり, 4週目では17.6%となり漸次体重は減少する傾向にあった。

3) Diabetic Recipients

diabetic recipient rat として, まず16匹に streptozotocin を投与したが1週以内に8匹が死亡した。残り8匹中, 1週間後の血糖 300 mg/dL 以上を示したものは4匹であった。そこで, これら4匹に培養ラ島の門脈内移植実験を行なった。

4) Intraportal Implantation

i) recipient rat の経時的推移

a. No. 4 rat : streptozotocin 糖尿ラット1週目 (血糖 416.2 mg/dL) に培養ラ島 400個を移植した。移植後1週間で血糖値は 145.2 mg/dL と著明に下降したが, その後は 110 mg/dL 前後で5週まで経過し, 7週以後は正常値を示した。移植前, 尿糖 9.4 g/day , 尿量 108 mL/day と高値を示したが, 移植後2週目よりほ

は正常値となった。体重はstreptozotocin 静注後10.5%の減少を示したが、移植後1週目には streptozotocin 静注前に回復し、以後漸次増加した (Fig.3, 1)。

b. No.6 rat : streptozotocin 糖尿ラット1週目 (血糖 326.8mg/dl) に培養ラ島400個を移植した。血糖は1週~3週まで161.5~145.4mg/dl と十分な下降を認めなかったが、5週目より正常値を示した。尿量は移植前89ml/dayと高値であったが2週目より正常値を示し、尿糖は3週目で0.5g/dayであったが4週目より正常値となった。体重は3週目まで増減をくりかえしたが4週目より増加傾向がみられた (Fig.3, 2)。

c. No.10 rat : streptozotocin 糖尿ラット1週目 (血糖 348 mg/dl, 尿量56ml/day, 尿糖 5.8 g/day) に培養ラ島 400個を移植した。1週目より血糖, 尿糖, 尿糖は正常値に回復し、以後の経過においても変化は認めなかった。体重は1週目までに23.7%の減少を示したが、それ以後漸次増加し6週目より streptozotocin 静注前の体重となった (Fig. 3, 3)。移植8週目に屠殺し肝標本作製した。

d. No.7 rat : streptozotocin 糖尿ラット1週目 (血糖 320mg/dl, 尿量70ml/day, 尿糖 7.2 g/day) に培養

ラ島 300個を移植した。血糖は4週目まで漸次減少し、尿量は1週目より正常値を示した。しかし、尿糖は1週目より減少をみたものの正常値とはいえず4週目まで1.0~1.8g/dayであった。5週目に入ると血糖 310 mg/dl, 尿量58ml/day, 尿糖 4.8 g/day と再び糖尿病状態となり、以後の経過においても正常値に回復しなかった。体重はstreptozotocin 注射後減少するのみであり、8週目には32.9%の減少となり、その後死亡した (Fig.3, 4)。

ii) recipient 肝の組織学的所見

recipient ラット (No.10, No.7 rat) の肝を摘出し、中性干渉ホルマリン固定後5mm間隔の全肝ブロックを作製、HE染色、AF染色 (藤田変法) にて組織学的検索を行った。門脈内移植24時間後の肝では移植ラ島は小葉間静脈内に塊状に存在し、胞体内顆粒は正常で細胞の萎縮または破壊像を認めなかった。またラ島の周囲には少数のリンパ球を散見するのみであった (Photo. 17)。移植8週後の肝 (No.10 rat) ではラ島は高度に萎縮し、周囲は fibroblast, epitheloid cell によりとりかまわれていた。しかし、中心部の細胞では顆粒をもつ胞体が数個残存し (Photo.18) その顆粒はAF染色でも紫色に染色され、

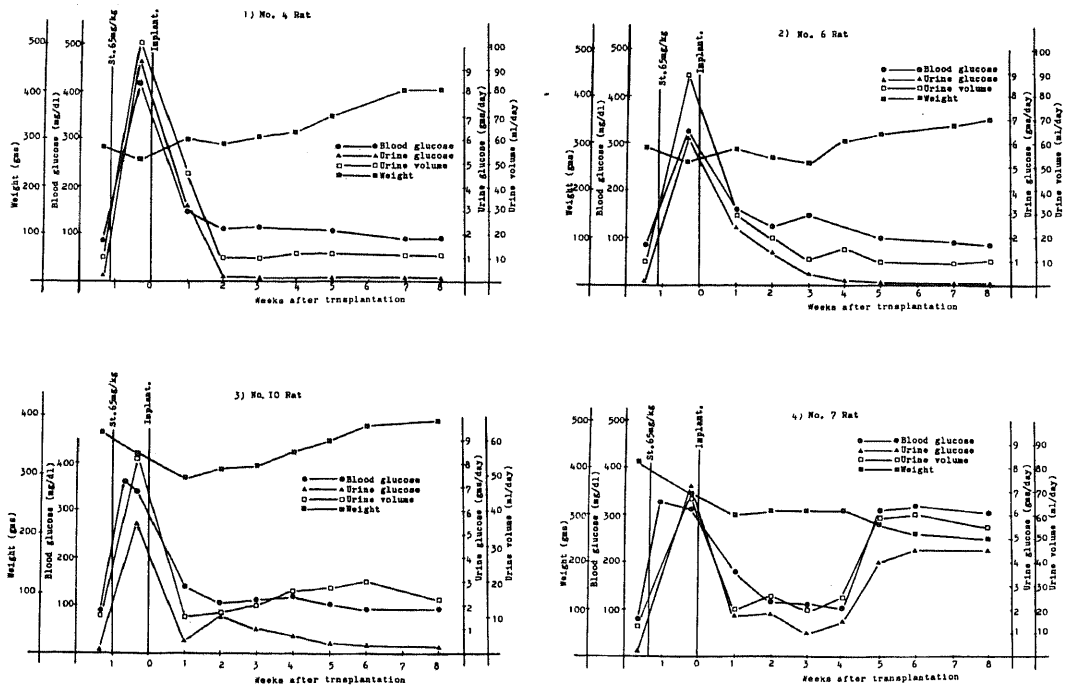


Fig. 3. Therapeutic effect of islets of Langerhans transplanted after 2 weeks culture on streptozotocin-induced diabetic rats. 1) No.4 rat 2) No.6 rat 3) No.10rat 4) No.7 rat

細胞の存在を示した。移植5週目より再び糖尿病状態を呈したラット(No.7 rat)の移植8週後の肝組織所見は小葉間静脈, 中心静脈, sinusoid は高度に拡張し内腔に血液を充満させていた。うっ血した中心静脈および小葉間静脈周囲には多数の単球およびリンパ球, 少数の好中球の浸潤をみ, immunological rejection が生じたことを推測させる像であった(Photo. 19)。

3. 小 括

2週間培養保存のラ島300~400個を4匹の streptozotocin 誘発糖尿病ラットの門脈内へ同種移植した。移植後1週目で著明に糖尿病状態は改善され, そのうち3匹は8週目まで正常値を維持し, 糖尿病状態よりの回復をみせた。移植されたラ島の insulin 産生能力は維持され, 長期間その機能を発揮することが判明した。しかし, ラ島同種移植においても, No.7 rat にみられたごとく, immunological rejection がおこり, 糖尿病再発のありうることを示された。

総括および考察

膵移植は血管吻合を必要とする全臓器移植と血管吻合をとらなわれない膵組織の implantation の2つに大別することができる¹⁶⁾¹⁷⁾。血管吻合を必要とする移植法は手技的にも難しく, 膵炎, 膵液瘻, 出血等の合併症をきたしやすく, 一定期間しかその効果が発揮できないという難点がある¹⁸⁾¹⁹⁾。一方, implantation による移植は手技的にも簡単であり, 膵内分泌組織の移植を考える際に興味ある方法といえる。この implantation による移植は新生児, 胎児のラット, ハムスター膵の嚢丸, cheek pouch, 皮下への implantation⁴⁾²⁰⁾²¹⁾あるいは培養されたラット胎児膵の前眼房, 腹腔内, 腎被膜への implantation 等²²⁾²³⁾, 種々検討されてきたが, 十分にその効果を発揮しえず, その原因は共存する外分泌組織にあるといわれている。この間に, 純粋にラ島のみ分離が可能となり^{7)~9)}, このラ島 implantation が膵移植の有力な手段となってきた¹⁰⁾。そこで, 本研究においてラ島を体外に取り出したのちも, 生体内におけると同様な内分泌機能の発揮を期待できる器官培養保存法を試み, 培養保存が可能か否か, 培養ラ島の内分泌機能は強く維持されているか否か, 培養ラ島の糖尿ラットへの移植およびその治療効果は可能か否かを究明することを目的とした。

まず, ラ島の分離は free-hand microdissection method⁷⁾ と collagenase digestion method⁸⁾⁹⁾ に大別される。前者は, 機械的にラ島を取り出すため酵素によるラ島の変化や影響が少ないとされているが, 技術的に難法であり大量のラ島をうることができず,

せいぜい1匹あたり30個前後であるという。一方, collagenase 法は, 技術的に容易であり一度にラット1匹あたり200~300個のラ島が得られる利点がある。collagenase 法を成功させるには, まず至適な collagenase を使用すること, collagenase の濃度, 消化時間と温度, 振とうの程度が問題となる。Lacy ら⁹⁾は collagenase 濃度50~60mg/5 ml Hanks 液で20分間 incubation し, 仁木ら²⁴⁾は collagenase 濃度60mg/3 ml Hanks 液とし magnetic stirrer を用いて消化時間を10~13分と短縮させている。著者²⁵⁾は, collagenase 濃度40mg/5 ml Hanks 液として15~20分間, 37℃ incubator 内で150~200回/分の振とうを行ない, 1匹のラットより200個前後のラ島を得ることができた。

次に, 哺乳動物の膵臓器官培養の歴史をみると, 1954年 Chen²⁶⁾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。1956年 Coalson ら²⁷⁾は培地中の insulin を bioassay により証明し, その後 Trowell, Lazarow, Murrell らにより, in vitro においても insulin の合成および放出の行なわれることが示された^{28)~34)}。更に, 高木ら³⁵⁾は幼若家兎膵を15日間器官培養し, 光学, 蛍光, 電子顕微鏡で観察するとともに培地中に含まれる insulin を測定, 少なくとも6~9日間, 膵β細胞はその機能を維持していると報告した。これらの培養法は, 膵組織細切片の器官培養であるが, その後の collagenase digestion method の開発によりラ島のみ培養へと発展した⁸⁾。

一方, 膵細胞レベルでの培養である単層培養としては Hilwig ら³⁶⁾のハムスター膵, Macchi ら³⁷⁾の新生児ハムスター膵, Lambert³⁸⁾, 河津³⁹⁾, 金沢ら⁴⁰⁾のラット新生児膵の培養があり, 最近では, 高木⁴¹⁾, Lacy ら⁴²⁾の成熟ラットラ島の単層培養法と発展しており insulin 分泌の研究におおいに貢献しているといえよう。著者の培養の目的は, 将来の移植を目的としたものであり, この点を考慮に入れると単離ラ島培養保存が最適と考えられた。

単離ラ島培養は Moskalewski⁸⁾, 高木⁴³⁾, 池上⁴⁴⁾⁴⁵⁾, Andersson⁴⁶⁾, Kostianovsky ら⁴⁷⁾により行なわれている。Moskalewski⁸⁾は, 時計皿培養によりモルモット膵単離ラ島の長期培養に最初に成功しており, 培養ラ島の形態についても検討を加えている。それによると, β顆粒は培養経過とともに減少し, glucose 濃度の高い時ほどその程度は大きいとしている。しかし, 池上⁴⁵⁾は glucose 濃度の増加にともないβ顆粒の含有量が変化することはないとしており, 著者の培養においても, 培養経過とともにβ顆粒が明らかに

減少することは認め得なかつた。高木ら⁴³⁾は microplate を用いて75日間の長期培養に成功しており、培地中には12000~19000 μ U/mlの insulin が分泌され、ラ島の細胞も電顕的にその微細構造がよく保たれていたと報告している。また、Kostianovsky ら⁴⁷⁾は成熟ラットの単離ラ島を用いて15日間培養を行ない、細胞損傷および壊死は少なく、glucose 刺激においても glucose 100mg/dl よりも glucose 300mg/dl の場合により多くの insulin 分泌をみたとし、Andersson ら⁴⁶⁾も NMRI-mouse の単離ラ島の12日間培養後、形態学的にも機能的にも分離直後と差はなかつたと述べている。更に山崎ら⁴⁸⁾も7日間保存のラ島について、glucose, glucagon および各種消化管ホルモン添加時の insulin 分泌能につき検討を加え、保存ラ島も新鮮ラ島とほぼ同程度の insulin 分泌能を有するとしている。

著者の multi-dish tray を用いた培養においても、80日間培地中に insulin が証明され、培地交換も吸引のみで技術的にも繁雑でなくラ島保存の目的にかなった実験系と考えられる。更に、位相差顕微鏡、ノマルスキー式微分干渉顕微鏡を用いた形態学的観察では分離直後と著しい差異はみられず、4週間培養のAF染色においても β 顆粒を確認することができた。更に、かかる形態学的正常性の維持に加え、glucose 高濃度添加群の培養においても insulin 分泌量の明らかな増強をみており、池上⁴⁴⁾⁴⁵⁾、Zieglerら⁴⁹⁾⁵⁰⁾の所見とも一致して機能の保持を確認し得た。培養ラ島を用いた short time incubation の実験でも Kostianovsky⁴⁷⁾、Andersson ら⁴⁶⁾の報告にみられるごとく、glucose 高濃度添加群、glucagon 添加群に insulin 分泌の増加を認めた。この結果も培養ラ島の機能保持を示し、著者の培養法の妥当性を示すものといえよう。

培養ラ島が in vitro において正常にその内分泌機能を保持していることはすでに述べてきたが、in vivo へ移植した場合も insulin の生合成が行なわれるかどうかは、重症糖尿病への治療につながる問題として重要な課題である。

分離直後の新鮮ラ島の移植においては、腹腔内、皮下、筋肉内、睾丸内、門脈内と種々試みられており^{10)51)~60)} Ballingerら¹⁰⁾は400~600個のラットラ島を腹腔内あるいは筋肉内へ同系、同種移植し、糖尿病の改善をみ、移植ラ島の除去により再び糖尿病状態になったとしている⁵¹⁾。同様に Reckard⁵³⁾⁵⁴⁾、Gates, Hunt⁵⁷⁾、Steffes⁵²⁾、Barkerら⁵³⁾も腹腔内移植を行ない、Barker らによれば12ヶ月間正常血糖値を維持しうるには1200個のラ島が必要であるとした。

1973年 Kemp ら⁵⁹⁾⁶⁰⁾は streptozotocin 糖尿ラット

に対し、皮下、腹腔内、門脈内へラ島の同系移植を行なっているが、400~600個の門脈内移植で移植後、血糖値、尿量は正常となり尿糖もみられなくなり、この効果は2ヶ月間持続し、移植場所として門脈内移植が最も効果的であると指摘した。木村ら⁶¹⁾も300個のラットラ島の同種移植において糖尿病の改善をみ、移植後の glucose tolerance test も正常パターンであったとしている。

一方、培養ラ島の移植に関する研究も最近散見されるようになり Weber¹¹⁾、Boyles¹²⁾、山崎ら⁴⁸⁾の報告がある。Weber らは新生児ラット群ラ島の同系移植実験において、新鮮ラ島および Petri dishes により24時間培養したラ島の両群につき腹腔内移植を行なっているが、移植後10日目に両群とも糖尿病より回復し、6ヶ月間正常値を維持したと述べている。また、Boyles らも2週間培養ラ島を腹腔内へ同種移植したところ、12ヶ月間正常値を維持し得たとし、さらに山崎らも3~5日間の保存ラ島の門脈内同種移植において、移植後1週間で著明に糖尿病状態は改善され、6~8週間その効果は持続したと報告している。

著者もまた multi-dish tray で2週間培養したラ島300~400個を門脈内へ同種移植を行なった。門脈内移植を選択した理由は、移植ラ島の個数が少なくても有効な移植効果が得られ、手技的にも特に難解でなく完全な糖尿病よりの改善が期待でき、さらに免疫学的にみて肝は、homograft にとって有利な場所かもしれないとの報告がみられたからである⁶²⁾⁶³⁾。結果は、移植後1週間前後で糖尿病よりの完全な改善がみられ、おおよそ予期通りであった。このことは、短期間の培養でもその内分泌機能が分離直後のものと変わらず、in vivo に移植した場合、諸家の報告のごとく、insulin 生合成能は維持され、長期間その機能を発揮しうることを示している。ただ、糖尿病の程度により、その完全回復と維持には何個のラ島が最低必要なか、個体差(例えば次に述べる免疫学的排除反応の強さなど)と関連して検討されるべきであろう。

さて、ここで、移植ラ島の recipient ラット肝での経時変化が問題である。Kemp ら⁶⁰⁾は門脈内移植24時間後の肝においては移植ラ島は terminal portal venule にみられ、10週後においてはグ氏鞘の結合織中に血管新生をともなって存在し、さらに18週後においてもグ氏鞘の結合織中に正常の β 細胞がみられたとしている。Griffith ら⁶⁴⁾も門脈内同系移植後の肝の形態学的検査において光顕的、電顕的考察を加え、移植ラ島を200 μ 以下の門脈枝に認めている。しかも、移植後2日までの β 細胞は、著明な脱顆粒を示すが、6~14

日までには正常の状態に回復し、脱顆粒の時期には小胞体、Golgi 装置、未熟な顆粒がふえていと報告している。木村ら⁶⁵⁾も同種移植後3ヶ月の recipient 肝のAF染色においてグ氏鞘に組織化されたラ島を確認し、免疫学的拒否反応の所見はみられなかったと述べている。

一般にラ島は、他の臓器に比し抗原性が低く、免疫反応が起こりにくいと考えられてきた⁶⁶⁾。しかし、ラ島の allograft, xenograft の移植において正常血糖の得られる期間は期待に反して短かく⁵⁴⁾、しかも免疫抑制剤の使用においてもその効果の延長を図ることはできなかったとの報告も少なくない⁵³⁾⁶⁷⁾⁶⁸⁾。また、Weber ら⁶⁹⁾は、ラ島の isograft, allograft, xenograft の腹腔内移植比較実験において、allograft, xenograft の場合移植後数日間しかその効果を発揮し得ず、全膵移植よりむしろ早期に rejection が起こりうるとしている。更に、ziegler ら⁶⁸⁾も allograft ラ島の腹腔内移植においてラ島が組織適合抗原を有することを証明した。加うるに Leonard ら⁷⁰⁾は腹腔内同種移植において1~3週後に、Younoszai ら⁷¹⁾は20日後に rejection をきたした例を報告し、ラ島のみ移植においても早期に拒否反応が起こり得ることを示した。

著者の培養ラ島の門脈内同種移植においても移植後5週目より rejection を起したとみられる1例をみている。

以上、単離ラ島の器官培養により、長期間その内分泌機能を維持しつつ保存できることが明らかとなった。さらに streptozotocin 糖尿ラット門脈内へ培養ラ島を implantation し、recipient ラット肝にラ島を組織化させ、かかる移植ラ島は長期間、その機能を発揮しつつ、ラット糖尿病のほぼ完全な回復を生ぜしめうることが確認された。しかし移植を考える際、常に問題となるのは rejection であり、ラ島のみ移植においても最近重要視され、著者の培養ラ島の移植においても1, 2経験された。この rejection の問題に関しては、培養により抗原性の減弱化を期待しようとの見方もある¹²⁾⁷²⁾が、この問題は、今後さらに解析される必要がある。

結 論

膵ラ島移植実験の一環として、ラ島の長期保存は重要課題の一つである。著者は器官培養法を利用して、ラット膵ラ島の培養保存法について検討し、以下の結論を得た。

1. collagenase digestion method によりラットの膵ラ島を単離し、multi-dish tray において、37℃ 5

% CO₂-air で培養した。3日間隔で培地交換を行なったところ、少なくとも80日間の培養保存が可能であった。

2. 培養ラ島の産生する培地中の insulin 量は、常にほぼ一定値を持続した。分離直後、30日培養、60日培養の各ラ島について insulin 産生能を比較したが、長期培養保存による insulin 産生能の低下はほとんど認められず、いずれのラ島も同程度の insulin を産生した。

3. 単離ラ島を培養に移すと、まず損傷した被膜の修復と強靱化が観察されたが、4週間以上の培養でラ島中心部に壊死が起こり始めた。しかし、それ以外に大きな形態学的変化はみられなかった。

4. HE染色またはAF染色によって、培養4週目のラ島の組織学的観察所見は、β細胞顆粒の分布状態等において、分離直後のものと差異のないことを確認した。

5. 培養ラ島の insulin 産生機能は培地中に含まれる glucose 濃度を 100mg/dl から 450mg/dl にあげると、約3倍に insulin 分泌が増加した。更に glucagon を培地に添加すると、insulin 分泌は一層増強された。これらのことから、培養ラ島は、培養の長期にわたりその機能が十分保持されていると結論できる。

6. 2週間培養のラ島300~400個を streptozotocin 糖尿ラットの門脈内へ同種移植したところ、4匹の recipient は1週間前後で完全に糖尿病より回復し、8週まで正常値を維持し得た。しかし、1匹において糖尿病の再発が起り、移植ラ島の免疫学的拒否反応が問題として残った。

本論文の要旨は第3回臓器保存研究会、第12回日本移植学会総会において発表した。

稿を終えるに臨み御指導、御校閲を賜りました宮崎逸夫教授、金沢大学癌研究所ウィルス部波多野基一教授に心から感謝致します。また本研究に直接御指導、御助言いただきました中川原儀三助教授、森田修行博士、秋本龍一博士に感謝の意を表します。さらに組織学的検索に御指導いただきました金沢医科大学第2病理教室三俣昌子講師ならびに特殊染色において多大の御助力をいただきました金沢医科大学第2病理教室各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Liddle, E. B., Wittenstein, G. J. & Swan, H. : Surg. Forum, 4, 701 (1953).
- 2) Eiseman, B., Hughes, R., Summers, W. & Traylor, F. : Ann. Surg., 142, 961 (1955).

- 3) Swan, H., Harper, F. & Christensen, S. P. : *Surgery*, 32, 293 (1952).
- 4) House, E. L., Jacobs, M. S. & Pansky, B. : *Anat. Rec.*, 144, 259 (1962).
- 5) Dubois, A. M. & Gonet, A. : *Acta Anat. (Basel)* 41, 336 (1960).
- 6) Lillehei, R. C., Simmons, R. L., Najarian, J. S., Weil, R., Uchida, H., Ruiz, J. O., Kjellstrand, C. M. & Goetz, F. C. : *Ann. Surg.*, 172, 405 (1970).
- 7) Hellerstöm, C. : *Acta Endocrinol.*, 45, 122 (1964).
- 8) Moskalewski, S. : *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5, 342 (1965).
- 9) Lacy, P. E. & Kostianovsky, M. : *Diabetes*, 16, 35 (1967).
- 10) Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : *Surgery*, 72, 175 (1972).
- 11) Weber, C., Weil, R., McIntosh, R. & Reemtsma, K. : *Transplantation*, 19, 442 (1975).
- 12) Boyles, R. R. & Seltzer, H. S. : *Diabetes*, 24 (Suppl. 2), 420 (1975).
- 13) Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H. & Takeda, R. : *FEBS Letters*, 54, 103 (1975).
- 14) Andersson, A., Hellerström, C. & Petersson, B. : *Z. Zellforsch.*, 82, 110 (1967).
- 15) Garcia, E. C. & Gill, J. R. : *Diabetologia*, 5, 61 (1969).
- 16) 出月康夫 : *外科治療*, 21, 348 (1969).
- 17) 出月康夫 : *臨床科学*, 9, 976 (1973).
- 18) Bergan, J. J., Hoehn, J. G., Porter, N. & Dry, L. : *Arch. Surg.*, 90, 521 (1965).
- 19) Idezuki, Y., Feemster, J. A., Dietzman, R. H. & Lillehei, R. C. : *Surg. Gynecol. Obstet.*, 126, 1002 (1968).
- 20) House, E. L., Burton, C., Cooper, H. & Anderson, E. : *Endocrinology*, 63, 389 (1958).
- 21) Browning, H. & Resnik, P. : *Yale, J. Biol. Med.*, 24, 141 (1951).
- 22) Hegre, O. D., Wells, L. J. & Lazarow, A. : *Diabetes*, 21, 193 (1972).
- 23) Lazarow, A., Wells, L. J., Carpenter, A. M., Hegre, O. D., Leonard, R. J. & McEvoy, R. C. : *Diabetes*, 22, 877 (1973).
- 24) 仁木 厚・仁木初美 : *代謝*, 12, 79 (1975).
- 25) 秋本龍一・中川原儀三・木村捷一・山崎軍治・杉井 衛・小島靖彦・大野 進・水上哲秀・宮崎逸夫 : *移植*, 10, 185 (1975).
- 26) Chen, J. M. : *Exp. Cell Res.*, 7, 518 (1954).
- 27) Coalson, R. E. : *Anat. Rec.*, 124, 484 (1956).
- 28) Trowell, O. A. : *Exp. Cell Res.*, 16, 118 (1959).
- 29) Murrell, L. R. : *Exp. Cell Res.*, 41, 350 (1966).
- 30) Murrell, L. R. & Lazarow, A. : *Anat. Rec.*, 145, 264 (1963).
- 31) Murrell, L. R., Morgan, C. R. & Lazarow, A. : *Exp. Cell Res.*, 41, 365 (1966).
- 32) Wells, L. J. & Borghese, E. : *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3, 265 (1963).
- 33) Schweisthal, M. R., Ceas, M. P. & Wells, L. J. : *Anat. Rec.*, 145, 282 (1963).
- 34) Schweisthal, M. R., Ceas, M. P. & Wells, L. J. : *Anat. Rec.*, 147, 149 (1963).
- 35) 高木良三郎 : *医学のあゆみ*, 56, 1 (1966).
- 36) Hilwig, I., Schuster, S., Heptner, W. & Wasielewski, E. V. : *Z. Zellforsch.*, 90, 333 (1968).
- 37) Macchi, I. A. & Blaustein, E. H. : *Endocrinology*, 84, 208 (1969).
- 38) Lambert, A. E., Blondel, B., Kanazawa, Y., Orci, L. & Renold, A. E. : *Endocrinology*, 90, 239 (1972).
- 39) 河津捷二・金沢康徳・小坂樹徳 : *日内分泌誌*, 50, 229 (1974).
- 40) 金沢康徳 : *代謝*, 12, 1071 (1975).
- 41) 高木良三郎 : *日本臓器病研究会誌*, 5, 1 (1975).
- 42) Kostianovsky, M., McDaniel, M. L., Still, M. F., Codilla, R. C. & Lacy, P. E. : *Diabetologia*, 10, 337 (1974).
- 43) 高木良三郎・小野順子・池上 隆・福岡道雄 : *医学のあゆみ*, 89, 695 (1974).
- 44) 池上 隆・高木良三郎・岡田楷夫 : *医学のあゆみ*, 82, 691 (1972).
- 45) 池上 隆 : *福岡医誌*, 65, 259 (1974).
- 46) Andersson, A. & Hellerström, C. : *Diabetes*, 21 (Suppl. 2), 546, (1972).
- 47) Kostianovsky, M., Lacy, P. E., Greider, M. H. & Still, M. F. : *Lab. Invest.*, 27, 53 (1972).

- 48) 山崎軍治・中川原儀三・岡本 宏・秋本龍一・木村捷一・小島靖彦・大野 進・宮崎逸夫 : 移植, 11, 87 (1976).
- 49) Ziegler, B., Butter, R., Ziegler, M., Hahn, H. J. & Fiedler, H. : Acta Biol. Med. Ger., 32, 503 (1974).
- 50) Ziegler, B., Hahn, H. J., Speck, G. A. & Ziegler, M. : Endokrinologie, 64, 269 (1975).
- 51) Ballinger, W. F., Lacy, P. E., Scharp, D. W., Kemp, C. B. & Knight, M. : Brit. J. Surg., 60, 313 (1973).
- 52) Steffes, M. W., Sutherland, D. E. R., Mauer, S. M., Najarian, J. S. & Brown, D. M. : Transplantation, 19, 449 (1975).
- 53) Reckard, C. R. & Barker, C. F. : Transplant. Proc., 5, 761 (1973).
- 54) Reckard, C. R., Ziegler, M. M. & Barker, C. F. : Surgery, 74, 91 (1973).
- 55) Ferguson, J. & Scothorne, R. J. : Brit. J. Surg., 59, 316 (1972).
- 56) Thomas, D. R., Fox, M. & Grieve, A. : Transplant. Proc., 1, 765 (1973).
- 57) Gates, R. J., Hunt, M. I., Smith, R. & Lazarus, N. R. : Lancet, 2, 567 (1972).
- 58) Gray, B. N. & Watkins, E. Jr. : Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 54, 57 (1976).
- 59) Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Lacy, P. E. & Ballinger, W. F. : Nature, 244, 447 (1973).
- 60) Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : Diabetologia, 9, 486 (1973).
- 61) 木村捷一・中川原儀三・杉井 衛・山崎軍治・小島靖彦・大野 進・宮崎逸夫・秋本龍一 : 移植10, 212 (1975).
- 62) Barker, C. F. & Corriere, J. N. Jr. : Ann. Surg., 165, 279 (1967).
- 63) Mandel, M. A., Monaco, A. P. & Russell, P. S. : J. Immunol., 95, 673 (1965).
- 64) Griffith, R. C., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. : Diabetes, 24 (Suppl. 2), 419 (1975).
- 65) 木村捷一・中川原儀三・山崎軍治・小島靖彦・大野 進・水上哲秀・磯部芳彰・宮崎逸夫 : 移植, 11 (総会臨時号), 84 (1976).
- 66) Gonet, A. E. & Renold, A. E. : Diabetologia, 1, 91 (1965).
- 67) Panijayanond, P. & Monaco, A. P. : Surg. Forum, 25, 379 (1974).
- 68) Ziegler, M. M., Reckard, C. R. & Barker, C. F. : J. Surg. Res., 16, 575 (1974).
- 69) Weber, C., Zatriqi, A., Weil, R., McIntosh, R., Hardy, M. A. & Reemtsma, K. : Surgery, 79, 144 (1976).
- 70) Leonard, R. J., Lazarow, A. & Hegre, O. D. : Diabetes, 22, 413 (1973).
- 71) Younoszai, R., Sorenson, R. L. & Lindall, A. W. Jr. : Diabetes, 19 (Suppl. 1), 406 (1970).
- 72) Summerlin, W. T., Broutbar, C., Foanes, R. B., Payne, R., Stutman, O., Hayflick, L. & Good, R. A. : Transplant. Proc., 5, 707 (1973).

Explanation of photograph

Photo. 1. Histological examination of swollen pancreas after injection with Hanks solution and islet of Langerhans in center area. (Hematoxylin eosin, Mag. : 62.5×)

Photo. 2. Histological examination of islet of Langerhans. (Aldehyde fuchsin, Mag. : 125×)

Photo. 3. Islets of Langerhans isolated by collagenase digestion, magnification : ×12 in dark field.

Photo. 4. Islet of Langerhans at isolation. (Mag. : 100×)

Photo. 5. Islet of Langerhans cultured for 10 days. (Mag. : 100×)

Photo. 6. Fused islets of Langerhans at 10 days culture. (Mag. : 100×)

Photo. 7. Islet of Langerhans cultured for 30 days. (Mag. : 100×)

Photo. 8. Islet of Langerhans cultured for 50 days. (Mag. : 100×)

Photo. 9. Islet of Langerhans cultured for 70 days with cells masses liking a small islet. (Mag. : 50×)

Photo. 10. Magnification of cells masses liking a islet of Langerhans. (Mag. : 100×)

Photo. 11. Islet of Langerhans at isolation by phase contrast microscope. (Mag. : 31.25×)

Photo. 12. Islet of Langerhans at isolation by differential interference microscope. (Mag. : 31.25×)

- Photo. 13.** Islet of Langerhans cultured for 4 weeks. (Phase contrast microscope, Mag. : 125×)
- Photo. 14.** Islet of Langerhans cultured for 4 weeks. (Differential interference microscope, Mag. : 125×)
- Photo. 15.** Hematoxylin eosin stain of islet of Langerhans at isolation. (Mag. : 31.25×)
- Photo. 16.** Aldehyde fuchsin stain of islet of Langerhans after 4 weeks culture. (Mag. : 125×)
- Photo. 17.** Histology of islet of Langerhans 24 hours after transplantation into the rat liver. (Hematoxylin eosin, Mag. 125×)
- Photo. 18.** Histology of recipient rat liver 8 weeks after injection of islets into the portal vein. (Hematoxylin eosin, Mag. : 125×)
- Photo. 19.** Histology of the liver, No 7, in the case of recurrent diabetes. (Hematoxylin eosin, Mag. : 125×)

Abstract

Islets of Langerhans from an adult Wister rat were isolated by collagenase technique and cultured in an air-CO₂ (95-5%) incubator at 37°C. Two islets in every well of multi-dish trays were cultured with 1 ml of Dulbecco modified Eagle's medium, supplemented with 20% bovine fetal serum, streptomycin (100 μg/ml) and penicillin G (100U/ml). The culture medium was exchanged every 3 days and the amount of insulin released into the medium was measured by Phadebas insulin test.

The cultured islets were examined for histology and morphology, as well as their insulin secretion-stimulating substance, glucose and glucagon. Furthermore, the possibility that these islets might maintain their therapeutic abilities in streptozotocin-induced diabetic rats was investigated.

The results were as follows;

1) Insulin contents of culture medium exchanged every 3 days ranged from 1097 to 1434 microunit/ml/two islets during 80 days' culture period.

2) Cultured islets showed demonstrable responses of insulin secretion by glucose and glucagon stimulation.

3) No distinct difference could be detected in the morphology during cultured period, and β-granules were found to be intact histologically as long as 4 weeks culture.

4) Diabetic rats receiving about 300 to 400 cultured islets recovered from diabetic state within a week after transplant and maintained normal healthy level for 8 weeks.

These results indicated that islets retained their activity of insulin secretion during prolonged culture *in vitro* by our techniques for organ culture and were also capable of functioning when transplanted into homologous recipient rats with diabetes.

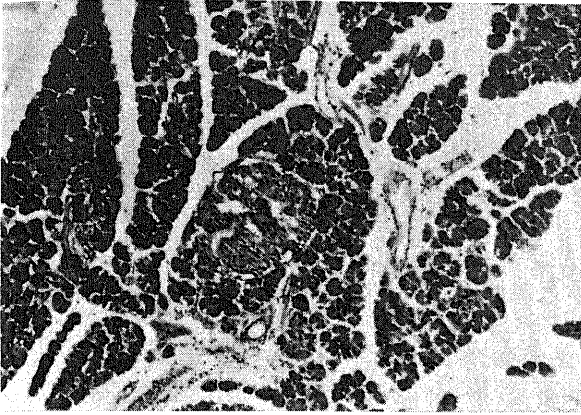


Photo. 1.

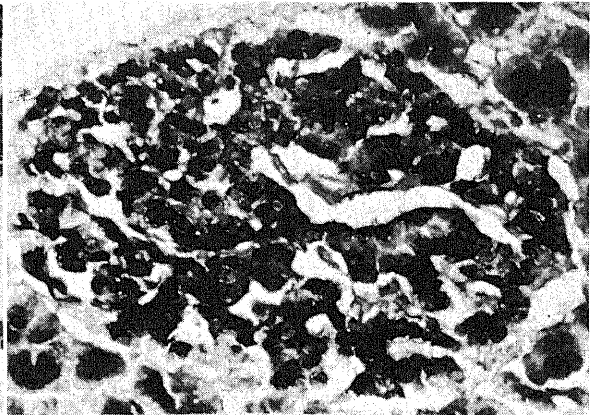


Photo. 2.

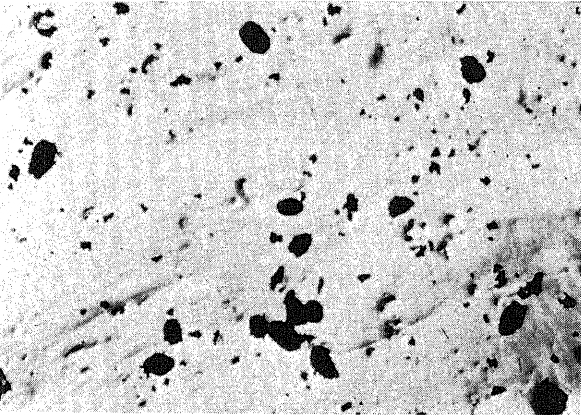


Photo. 3.

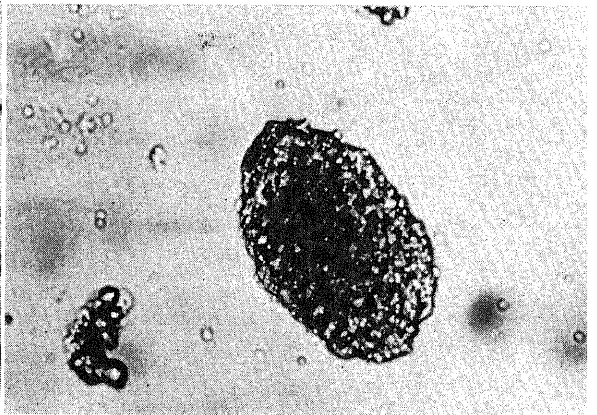


Photo. 4.

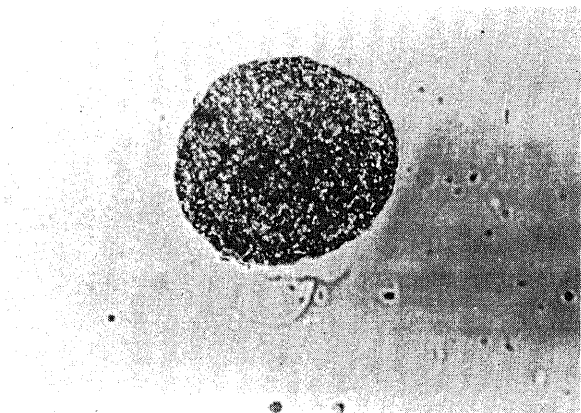


Photo. 5.

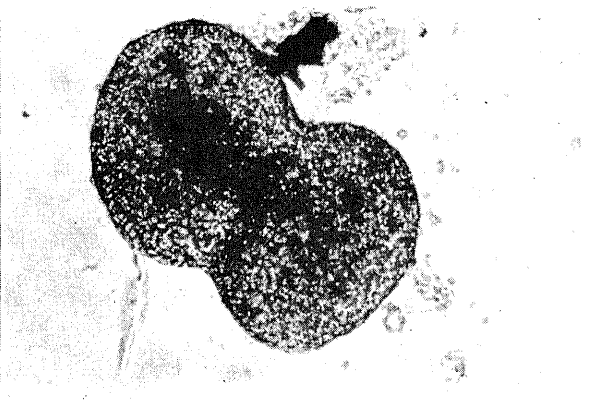


Photo. 6.

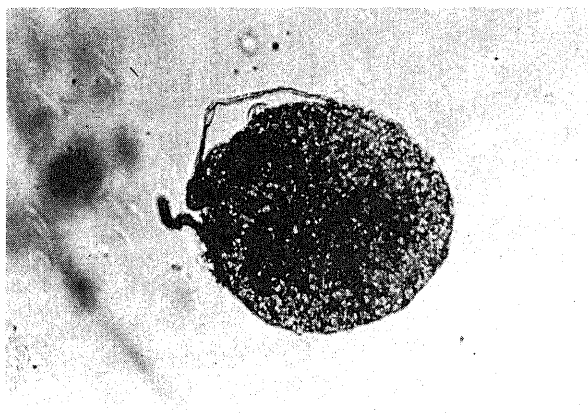


Photo. 7.

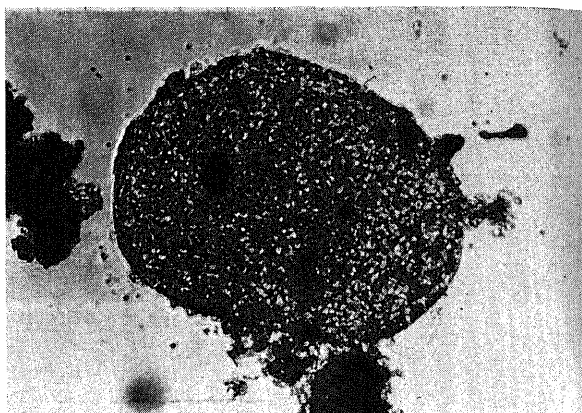


Photo. 8.

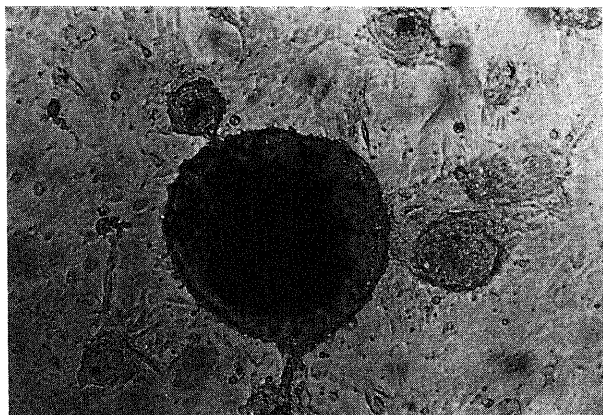


Photo. 9.

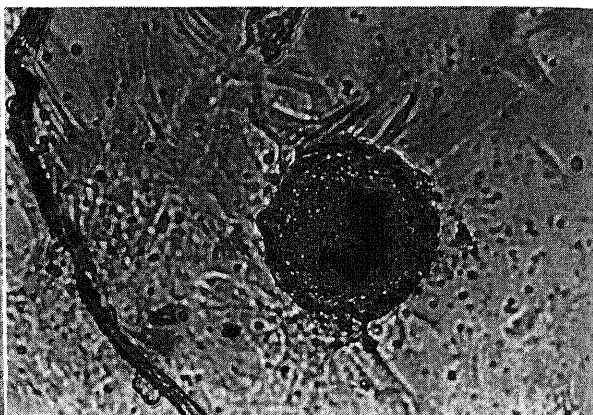


Photo. 10.

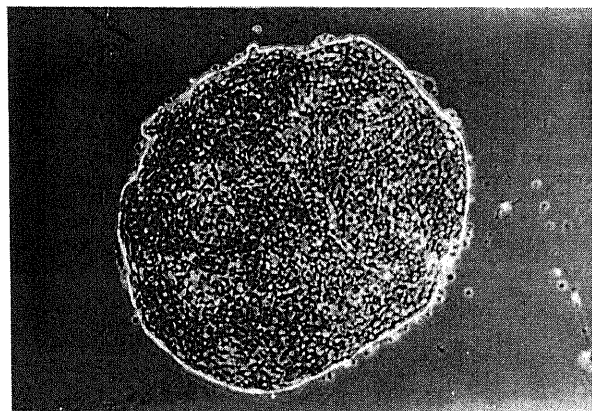


Photo. 11.

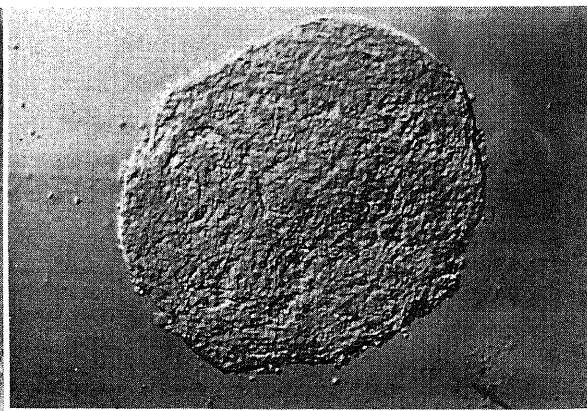


Photo. 12.

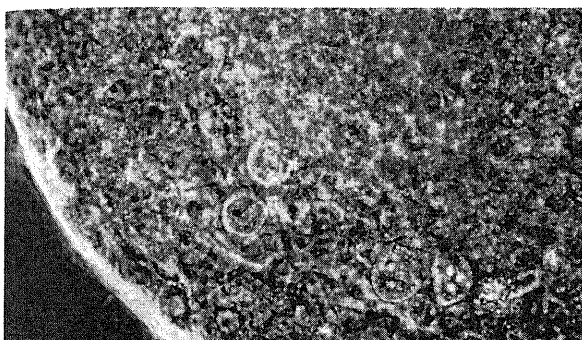


Photo. 13.

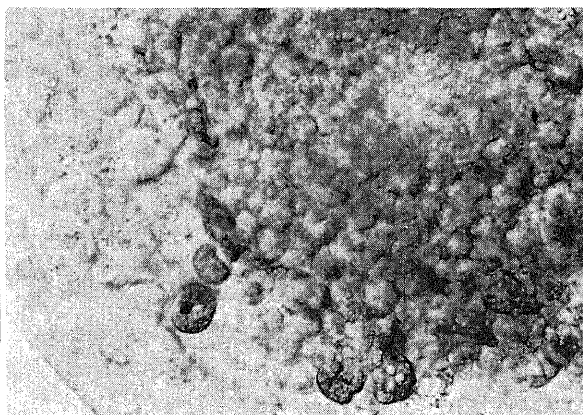


Photo. 14.

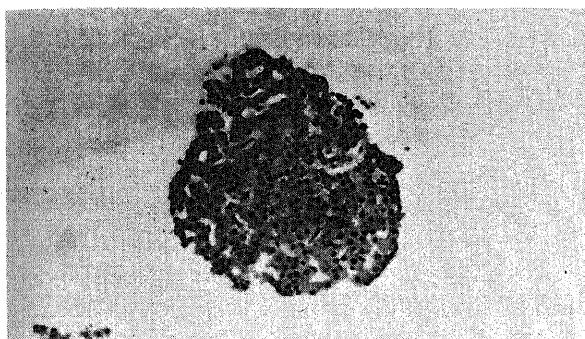


Photo. 15.

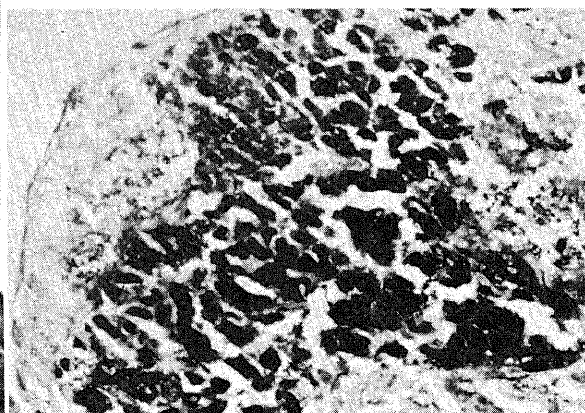


Photo. 16.

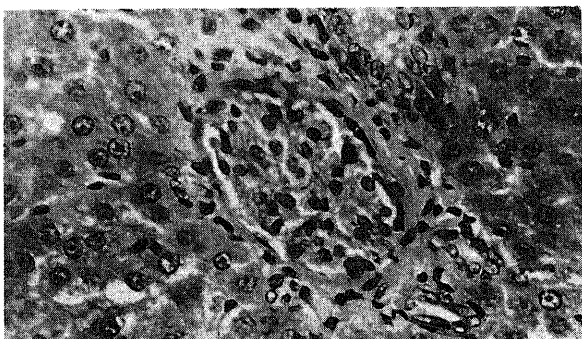


Photo. 17.

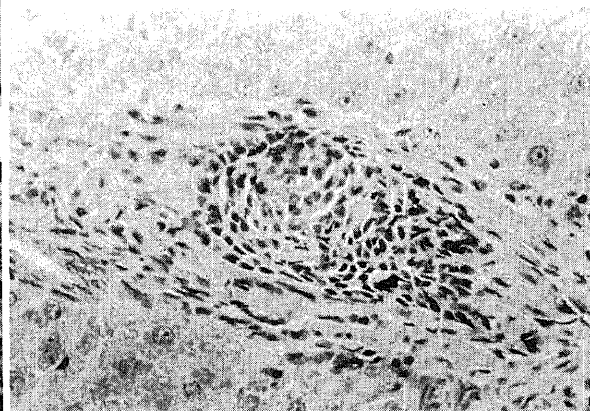


Photo. 18.

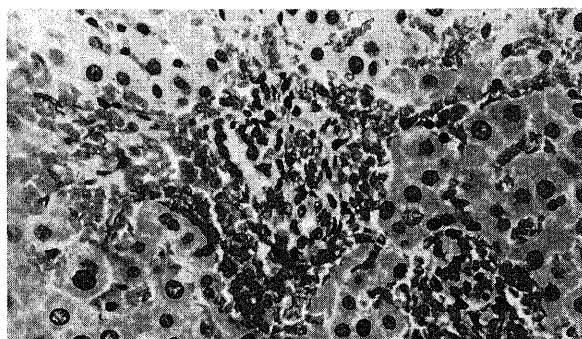


Photo. 19.