日消外会誌　14（2）：133～140，1981年

膵再生に関する実験的研究

長崎大学医学部外科学第2教室（指導：土屋涼一教授）
向　井　憲　重

STUDIES OF PANCREATIC REGNERATION AFTER SUBTOTAL PANCREATECTOMY IN RATS

Norishige MUKAI
2nd Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine
(Director : Prof. Ryoichi Tsuchiya)

ラット膵広範切除後の残存膵における外分泌および内分泌細胞の再生能について，thymidine-H^3 を用いた autoradiography による DNA 合成能，膵放射能活性，nuclear volume，残存膵重量の測定等により検討し，さらに Sandmeyer 型糖尿病発生と膵ラ島細胞再生との関連性についても追求した．膵広範切除後，残存膵は著明な重量増加を認め，膵放射能活性は3日目より10日目まで高値を示した．外分泌細胞は術後早期より活発な DNA 合成を行い，細胞分裂によってその数的減少を補い，さらに20日目以降 hypertrophy を呈した．残存膵ラ島細胞においても3日目をピークに活発な DNA 合成による細胞増殖が，10日目より20日目までは細胞肥大が認められたが，40日目以降これら細胞の変性像が散見され，この時期に糖尿病の発生が認められた．

索引用語：膵広範切除，Sandmeyer 型糖尿病，膵再生，autoradiography, nuclear volume

緒　言

近年，膵の良性，悪性疾患に対し根治性を計る意味で膵の広範切除が行われるようになり[1)2)]，その結果術後の膵機能障害が重要な問題として残されている．膵は外分泌および内分泌機能を有し，膵広範切除により膵機能不全をきたしやすい．しかし，実験的には，膵外分泌の機能的予備力は大であり，臨床的にも膵広範切除後の外分泌機能不全発生は少ない．一方，内分泌障害として膵広範切除後，Sandmeyer 型糖尿病[3)4)]が発生することはよく知られている．一般的に，膵の再生能は低いとされているが，外分泌ならびに内分泌細胞に区分して経時的に再生率を具体的に提示した研究は少ない．本研究ではラットに対し膵広範切除を行い，残存膵における外分泌および内分泌細胞の再生能につき，autoradiography による DNA 合成能，膵放射能活性，残存膵重量，nuclear volume などにより検討を試み，さらに Sandmeyer 型糖尿病発生と膵ラ島細胞再生との関連をも追求したので報告する．

実験方法

1．実験動物

生後2カ月～3カ月，体重140～180g（平均157g）のウィスター系ラットの雄を使用し，オリエンタル実験動物用固型飼料 MF および水にて飼育した．35匹のラットに対し膵広範切除を施行し，さらに対照群として35匹のラットに，開腹後，膵と結腸間膜の剝離術のみを施行した．

2．膵広範切除術

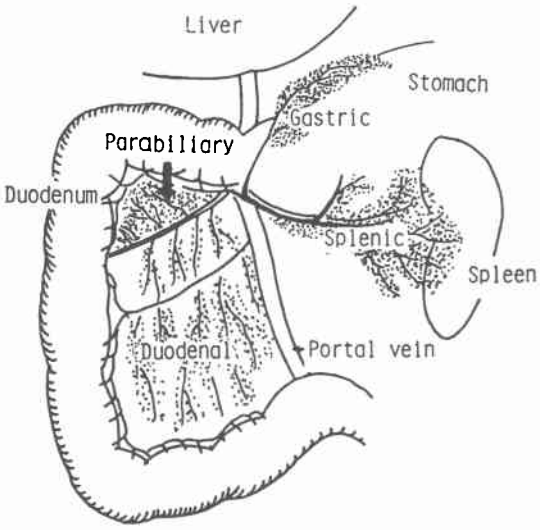
ラットは手術前12～24時間絶食とし，エーテル全身麻酔下に正中切開にて開腹した．ラット膵は薄い膜状構造を呈しており，gastric, splenic, duodenal, para-biliary segment に大別される[5)]（Fig. 1）．

膵広範切除術は Foglia[6)] の方法に準じ，十二指腸と胆管の間に囲まれる para-biliary segment のみを残し，他の3つの segment はすべて切除した．その切除量は約90％である．膵広範切除群，対照群共閉腹前に生理的食塩水5ml を腹腔内に注入後，腹壁は2層縫合にて閉鎖し，術後12～24時間より水及び飼料の投与を開始した．なお，抗生物質は全く使用しなかった．

3．実験群の設定

膵広範切除群，対照群をそれぞれ7グループに分け，

Fig. 1. Anatomy of the rat pancreas.



各グループは5匹とし，術後第1日，3日，5日，10日，20日，40日，60日目に屠殺した．さらに5匹を0日群として屠殺した．

4．検査内容および方法

体重は手術時より屠殺時まで5日毎に測定した．

空腹時血糖は手術時および屠殺時に尾切断により採血し，OTB 法にて測定した．

組織標本は屠殺前12時間以上絶飲食とし，(6-^{3}H) thymidine 0.5μCi/g 体重を腹腔内に注入し，1時間後エーテル全身麻酔下に，膵広範切除群は残存膵を，対照群は para-biliary segment のみを摘出し，光顕および autoradiography 用標本として採取した．摘出膵はそれぞれ重量測定を行ったのち，直ちに10%ホルマリン溶液中にて固定した．

光学顕微鏡用標本は，脱水，パラフィン包埋後，切片を Hematoxyline-eosine にて染色し検鏡した．

autoradiography 用標本作製は，採取固定した膵組織片をパラフィン包埋後，4μ の切片とし，脱パラフィン後，暗室内で Dipping 法により SAKURA-NR-M_2 液体乳剤（小西六写真工業株式会社製）を塗布し，シリカゲルを入れた暗箱に入れ，5℃に保存し，露出期間は30日間とした．30日後現像定着を行い，同標本を，Hematoxyline-eosine にて染色し，1,000倍にて光顕下に labeling index を測定した．autoradiography 用標本は1ラットにつき少なくとも3枚以上作製し，外分泌及び内分泌細胞ともに1,000個の核を数えて測定した．labeling cell の判定は細胞核内の銀粒子数が3個以上を陽性とした．

膵放射能活性は摘出膵から約5mg の膵片を採取し，counting vial 内で1ml の Soluen (Packard) にてホモジネートし，9ml のインスタゲルを加え，暗所にて24時間静置後，Beckman LS-100型液体シンチレーションシステムにて10分間1回測定し，dpm/mg に換算した．

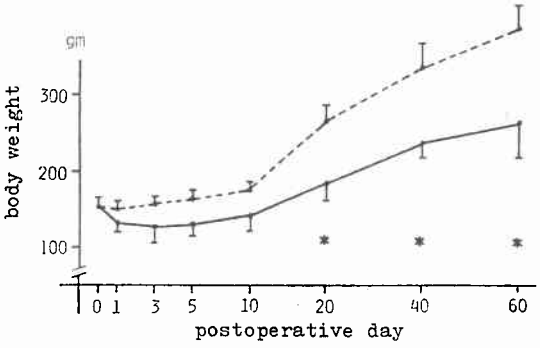
nuclear volume 測定には光顕用標本を使用し，外分泌組織およびラ島を1,000倍にて写真撮影した後，同倍率で撮影したマイクロメーターにて，acinar cell および islet cell の核の長径および短径を測定し，Koulisch[7] の報告した式，すなわち$4/3\pi a^2b$ (a: half of the smaller diameter, b: half of the greater diameter) を用いて算出した．なお，acinar および islet cell の核は1ラットにつき，それぞれ100個測定した．

実験成績

1）体重

膵広範切除群の術後第1日目の体重減少は対照群に比しやや高度であり，術前の体重への回復も，対照群が3日目で既に術前体重を上廻っているのに対し，切除群では10日以上を要した．その後両群共に順調な体重増加をみとめるが，20日目以降切除群の体重は対照群に比し，増加が低率であった ($p<0.001$) (Fig. 2).

Fig. 2. Body weight of sublotally pancreatectomized and control rats after operation. Mean±SD.

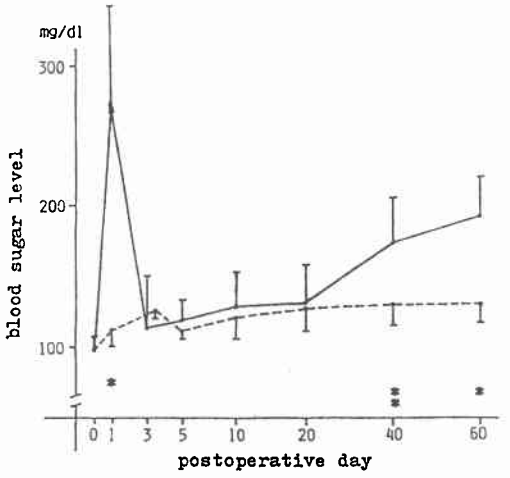


*: $p<0.001$
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control rat (n=5).

2）空腹時血糖

膵広範切除群における第1日目の血糖値は術前の平均値±標準偏差値が96.6±9.2mg/dl に対し，271.1±67.5 mg/dl と高値を示し，また対照群との間にも有意の差

Fig. 3. Blood sugar levels of subtotally pancreatectomized and control rats. Mean±SD.



*: p<0.001, **: p<0.05
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control tat (n=5).

(p<0.001) を認めた．しかし，術後3日目には術前値にまで下降し，術後3日，5日，10日，20日の血糖値はそれぞれ，116.2±32.8mg/dl, 119.4±16.7mg/dl, 129.6±27.1mg/dl, 133.8±46.4mg/dl とほぼ安定した値をとり，対照群との間にも有意の差は認められない．しかし，第40日目174.0±33.6mg/dl (p<0.05)，第60日目192.0±28.4mg/dl (p<0.001) と再び増加し，対照群との間に有意の差が認められた (Fig. 3).

すなわち切除群は1日目に一過性の高血糖を示し，一旦ほぼ正常血糖に回復したのち，40日目以降に持続性の高血糖に移行し，多飲，多尿および尿糖の出現をみるに至った．

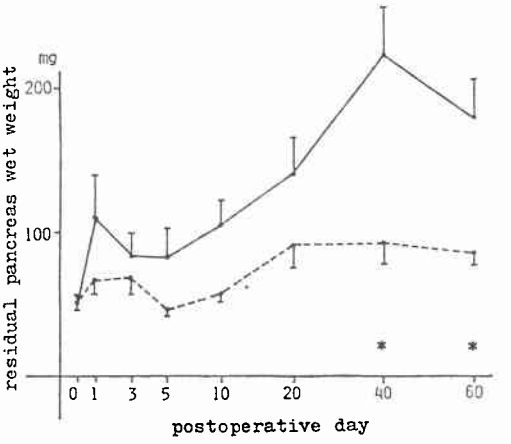
3) 残存膵の肉眼的所見及び湿重量

ラット膵は薄い膜状構造を呈しているが，膵広範切除群においては日が経つにつれ実質臓器の如く肥厚を示した．para-biliary segment である残存膵の湿重量（N＝5）は52.6±3.8mg であり，切除群の1日目は112.1±26mg と約2倍に増加した．これは術後残存膵の浮腫が最も強い時期であり，浮腫が改善されるにしたがい，3日目84.5±16.4mg，5日目82.8±20.7mg とやや減少を示した．しかし，10日目には105.7±18.0mg，20日目139.7±26.3mg，40日目223.8±32.9mg と増加の傾向を示した．対照群も体重の増加につれ，わずかに増加するが，60日目で切除群が178.2±28.9mg であるのに対し，対照群は86.3±7.3mg にすぎず，明らかに有意の差 (p<0.001) が認められた (Fig. 4).

4) 残存膵放射能活性

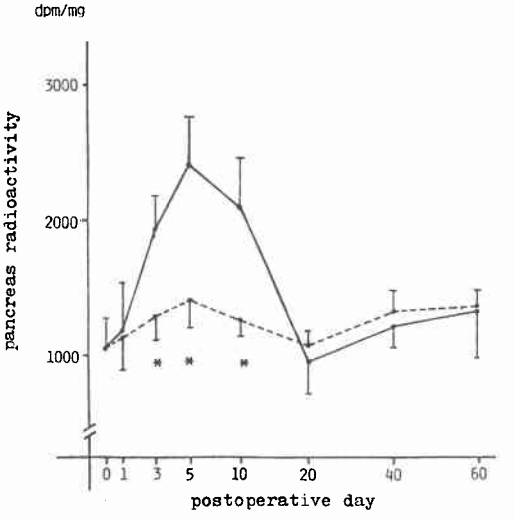
液体シンチレーションによる残存膵の放射能活性を測

Fig. 4. Weight of residual pancreas after subtotal resection compared with weight of corresponding segment in controls. Mean±SD.



*: p<0.001
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control rat (n=5).

Fig. 5. Pancreas homogenate radioactivity. Mean±SD.



*: p<0.01
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control rat (n=5).

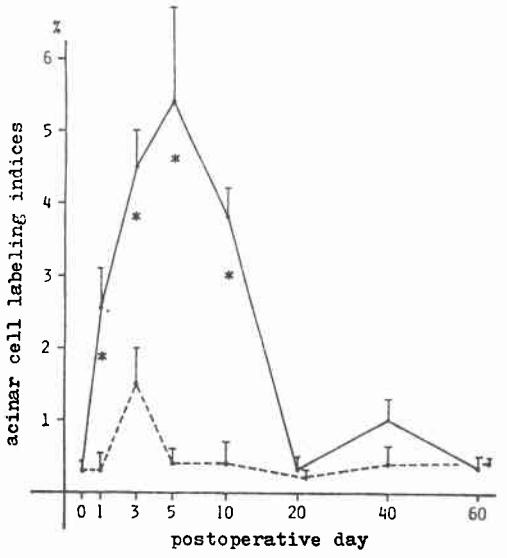
定した．切除群の前値が1,071±200dpm/mg（N＝5）に対して，第1日目は1,189±480dpm/mg を示し，対照群と有意の差は認められない．ただし，この時期は術後の浮腫が最も強く，しかも5mg 膵組織片あたりの count 値を示したので，浮腫がなければより高値を示すものと考えられる．切除後3日，5日，10日目の値は，それぞれ1,938±230dpm/mg，2,403±260dpm/mg，2,096±277 dpm/mg を示し，対照群に比し有意の増加（$p<0.01$）を認めた．しかし，20日，40日，60日目では放射能活性は低下し，対照群との間に有意差はない（Fig. 5）．

すなわち切除群における残存膵放射能活性は術後5日目をピークに3日より10日目まで高値を示した．

5）aciner cell の DNA 合成能および nuclear volume

thymidine-^{3}H を用いた autoradiography による DNA 合成能を labeling index で表わした．切除群においては，前値0.32±0.20%（N＝5）より，第1日目2.56±0.68%，3日目4.46±0.52%を，5日目には5.37±1.25%とピークを示し，その後やや低下して，10日目3.80±0.41%を示した．この期間中対照群との間に有意の増加（$p<0.001$）を認めた．その後20日目には0.30±0.18%と前値と類似の値を示し，40日目で再び1.17±0.17%に

Fig. 6. Pancreas acinar cell nuclear labeling indices in subtotally pancreatectomized and control rats. Mean±SD.



*: $p<0.001$
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control rat (n=5).

Fig. 7. Autoradiography of pancreas of subtotally pancreatectomized rat 5 days after operation. Four acinar cell nuclei are labeled with grain of thymidine-^{3}H. H.E. stain. ×1,000.

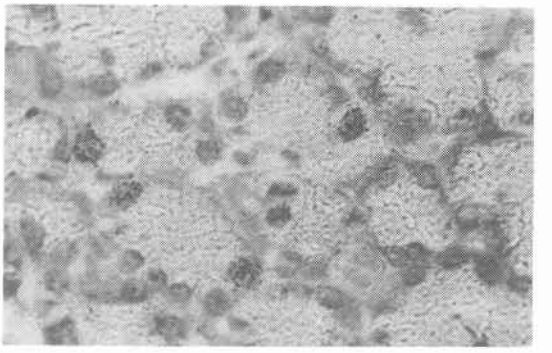
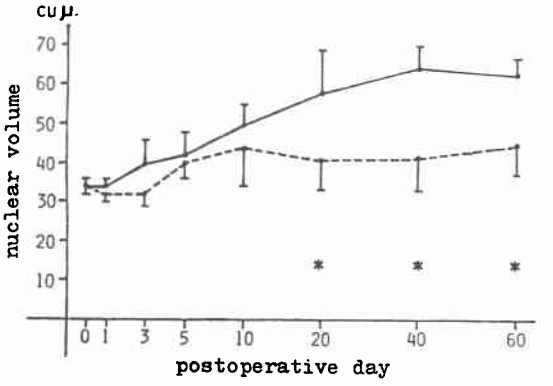


Fig. 8. Nuclear volume of acinar cells in subtotally pancreatectomized and control animals after operation. Mean±SD.



*: $p<0.005$
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control rat (n=5).

上昇したのち，60日目では前値および対照群値と同様な値をとった．すなわち labeling index は2峰性を示した（Fig. 6）．Fig. 7 に腺房細胞の核内に取り込まれた粒子ならびに核分裂像を示す．

腺房細胞の nuclear volume をみると，手術時は34.4±2.4cu. μ で，術後両群ともに増加を示し，10日目まで有意差は認められない．対照群において10日目以降，nuclear volume の増加は認められないが，切除群では，20日目58.9±11.4cu. μ，40日目64.2±6.2cu. μ，60日目61.2±6.0cu. μ と増加し，対照群と有意の差を認めた（$p<0.005$）（Fig. 8）．

すなわち，膵広範切除後の残存膵 aciner cell は1日

目より10日目まで活発な DNA 合成が行なわれ，hyperplasia を呈し，20日目以降では主として細胞の hypertrophy が認められた．

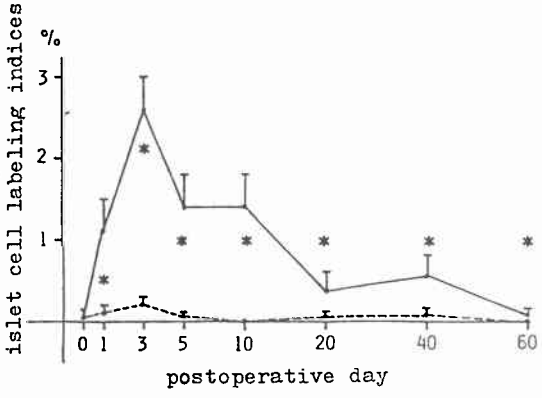
6) islet cell の DNA 合成能および nuclear volume

膵ラ島細胞の labeling index はAおよびB細胞を区別して測定する事が困難なために，全体として測定した．なお，ラット膵ラ島内はほとんどがB細胞で占められており，A細胞はラ島周辺部にわずかに散在する分布を示した．

切除群におけるラ島細胞の labeling index は，第3日目をピークに，1日目より60日目まで，対照群に較べ高値を示し，有意の差が認められた（$p<0.001$）．すなわち，labeling index は，1日目1.06±0.41%，3日目2.52±0.43%，5日目1.37±0.4%，10日目1.40±0.35%，20日目0.42±0.17%，40日目0.62±0.20%，60日目0.12±0.04%を示し，明らかに DNA 合成能の亢進を認めた．しかし，外分泌細胞のそれに較べるとやや低値である．（Fig. 9, 10）．

islet cell nuclear volume をみると，手術時は40.1±5.3cu.μ であるが，切除群において，3日目47.8±7.8 cu. μ，5日目48.0±5.8cu. μ，10日目53.3±5.2cu. μ，20日目60.1±2.6cu. μ と増加し，10日目（$p<0.01$）および20日目（$p<0.001$）で対照群との間に有意差が認められた（Fig. 11）．しかし40日目以降，全く増加は認められず，対照群との間に有意差は認められない．

Fig. 9. Labeling indices of islet cells in subtotally pancreatectomized and control animals. Mean±SD.



*: $p<0.001$
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control rat (n=5).

Fig. 10. Autoradiogram of pancreas of subtotally pancreatectomized rat 5 days after operation. Two islet cell nuclei are labeled. H.E. stain. ×1,000.

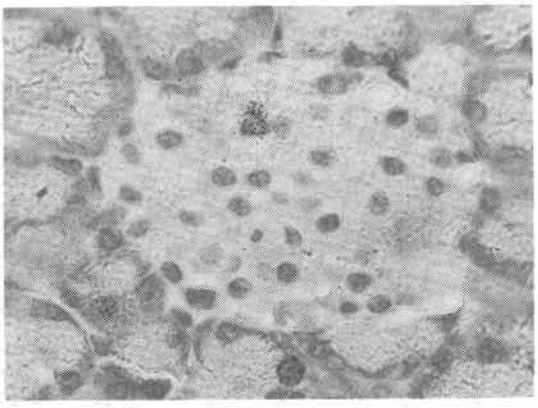
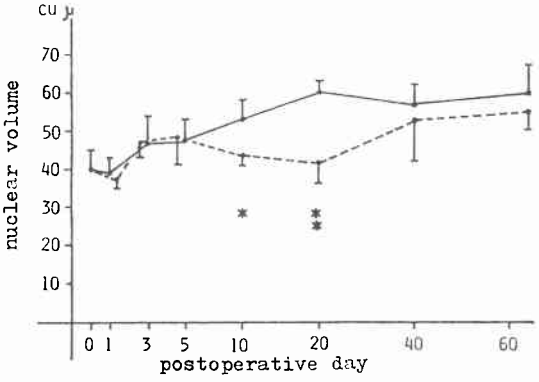


Fig. 11 Nuclear volume of islet cells in subtotally pancreatectomized and control animals. Mean±SD.



*: $p<0.01$, **$p<0.001$
——: pancreatectomized rat (n=5),
……: control rat (n=5)

すなわち，膵広範切除後のラ島細胞は，わずかに hyperplasia を呈し，その後 hypertrophy を示すが，その再生能は腺房細胞に比し低い．光顕的に40日目以降で，ラ島は不整形を示すものが多く，線維化を伴い，島細胞は萎縮し，紡錘形の濃染する核を有する細胞が増加した．

考　察

膵広範切除術後の病態生理および残存膵における形態学的変化に関しては多くの報告があり，膵再生に関する報告も少なくない．Fisher[8] は膵全摘犬に対し，8カ月間インスリン投与を行い，断端から0.5g の膵組織の再

生を証明した．Condorelli[9]らは20匹の犬に対し30～50%膵切除を行い，膵部分切除によって再生が刺激されることを示唆した．Lehv & Fitzgerald[10]はラットの約50%膵切除を行ない，残存膵の著明な重量増加と acinar cell の再生を証明し，さらに Pearson[11]も同様に，50%，70%，90%膵切除後の再生能を検討し，切除量を増す程再生率は高率であったと述べている．

本研究はウィスター系ラットの雄を使用し，90%膵切除後の残存膵における再生能を外分泌ならびに内分泌細胞に区分して，経時的に分析したものである．膵広範切除後，残存膵は肉眼的に球状に肥大し，術後40日目では，術直後の4倍以上の重量増加を認めた．thymidine-^{3}H を用いた液体シンチレーションによる膵放射能活性は，Lehv[10]らは術後30時間をピークに第1～2.5日で増加をみたとしているが，本実験では第5日目をピークに第3日より10日目まで高値を示した．

まず膵外分泌系の再生をみる目的で腺房細胞の autoradiography による DNA 合成能を labeling index でみると，第5日目の5.37%をピークに，第1日目より10日目まで高値を示し，対照群の3乃至10倍に達した．また術後40日目に軽度の上昇を示した．一方，nuclear volume は，切除群において40日目まで増加をつづけ約2倍に増大し，対照群に比し20日以降で明らかに hypertrophy を呈した．すなわち，残存膵 aciner cell はまず活発な DNA 合成が行われ，細胞分裂によってその数的減少を補い，その後細胞ならびに核の肥大が起こり，膵の再生が完成するものと思われる．

Scow[12]は95%膵切除ラットにおいて，術後の消化吸収機能は正常であったと述べ，Hotz[13]は，70%切除では外分泌機能は正常であり，90%切除では術後2週間前後でトリプシン，アミラーゼ排出量が正常の約60～80%に減少するが，5週前後で正常化すると報告した．Dragstedt[14]は犬を用いて90～95%膵切除を行い，消化吸収機能に障害はないものと述べている．このように，膵外分泌に関してその機能的予備力は大で，正常の約5%膵組織が残れば消化吸収機能に障害はないものとされている．これらの事実は，膵外分泌組織の再生による機能の代償も一因と考えられる．

つぎに膵大量切除後の膵内分泌細胞の再生と Sandmeyer 型糖尿病発生の関係について検討した．一般に膵広範切除後，いわゆる Sandmeyer 型糖尿病が発症する事は古くより知られており，この病態生理に関し多数の報告がある[15)16)17)18)19)20)21)]．吉岡ら[16]は犬膵切除後28日間の観察で，80%以上の切除例に糖尿病発現をみたとし，Dragstedt[14]は80～90%切除で糖尿病は発生しないとした．水本ら[17)18)]は，犬を用いて膵広範切除後の糖代謝と膵内分泌機能の変動を観察し，88%以上の切除では術後早期に糖尿病が発症し，70～80%切除では6週以降にはじめて糖尿病が発生し，70%以下の切除では糖尿病の発生がみられないと報告した．Martin ら[19]はラットに対し膵広範切除を行ない，正常血糖，尿糖陰性の "Pre-diabetic period" を経て，20日目以降高血糖，尿糖陽性の "early diabetic period" に移行すると述べたが，吉野[20]はラット膵広範切除後の残存膵ラ島B細胞を電子顕微鏡的に観察し，B細胞が切除により量的減少をきたしている上に，それを代償するための残存膵B細胞の持続的な機能亢進状態がいっそうB細胞の消耗，機能廃絶を起こし，さらに数的減少をきたして糖尿病発生に至ることを示唆した．

本実験ではラット膵広範切除後第1日目に高血糖を生じるが，その後20日目までは正常血糖を維持し，40日目以降に糖尿病の発生をみた．切除群における残存膵ラ島細胞の DNA 合成能は3日目をピークに実験全経過を通じ，対照群より高値を示した．ただし，細胞増殖度は外分泌細胞に比較すると幾分低値であった．nuclear volume も膵切除後20日目までは有意に増加を示すが，40日目以降ではラ島は不整形を示すものが多くなり，種々の程度の線維化を伴いながら，島細胞は萎縮し，紡錘形の濃染する核を有する細胞が増加した．すなわち，膵広範切除のラ島細胞はまず DNA 合成が行われ hyperplasia を呈し，ついで hypertrophy をきたすが，40日目以降ではこれら細胞の変性像を散見するようになる．したがって長期経過例では，再生能低下，体重増加によるインスリン消費量の増加，B細胞の機能亢進に続く消耗などが原因となって糖尿病が発生するものと推定された．

以上，膵外分泌および内分泌細胞の間には再生能に幾分差異が認められたが，その理由は明らかでない．おそらく stem cell に差があるためか，または同一の stem cell から発生したものであれば分化過程における生物学的特性に差異があるためであろう．なお，ラ島の再生能は実験に用いる動物の種属や年齢によって大きく左右される．五島[21]は膵広範切除犬にて，残存膵ラ島の hyperplasia は全く認められなかったとしているが，ラットを用いた本実験では明らかな hyperplasia と hypertrophy が認められている．Friedman[22]は，ラット膵切除後の残存膵ラ島の主な形態的変化は hyperplasia であ

るのに対し，犬では degeneration が主体であったと述べ，その理由として，実験に用いる犬はほとんどが adult であり，若い成長期の動物とは反応が異なるものと報告している．

膵ラ島の再生に関して，ductule 由来[23]，centro-acinar cell からの transformation[24] など，いくつかの説が唱えられているが，本実験にて解明することはできなかった．

結　論

ラット膵広範切除（約90%切除）後，60日間，残存膵における外分泌および内分泌細胞の再生能につき検討した．

1．膵広範切除後，残存膵は肉眼的に円柱状に肥厚し，著明な重量増加を認め，術後40日目には約4倍に達した．膵放射能活性は術後第3日より10日目まで高値を示した．

2．膵外分泌細胞は術後早期より活発な DNA 合成が行われ，labeling index は第5日目をピークに3日目より10日目まで，および40日目で高値を示した．なお，形態的にも，20日目以降 hypertrophy を呈し，著明な再生能を有することを証明した．

3．残存膵ラ島細胞においても3日目をピークに活発な DNA 合成による細胞増殖が，10日目より20日目までは細胞肥大が認められたが，40日目以降ではこれら細胞の変性像が散見された．そしてこの時期に糖尿病の発生をみるようになった．

稿を終るにあたり，ご指導とご校閲を賜わった恩師土屋凉一教授，伊藤俊哉助教授に深謝するとともに，ご協力下さった第2外科教室員ならびに教室補助員各位に感謝する．

本論文の要旨は第79回日本外科学会総会で発表した．

なお，本研究の一部は，厚生省臓器大量切除調査研究助成金の援助によった．

文　献

1) Child, C.G., et al.: A reappraisal of removal of 95% of the distal portion of the pancreas. Surg. Gynec. Obstet., **129:** 49—56, 1969.
2) Frey, C.F., et al.: Pancreatectomy for chronic pancreatitis. Ann. Surg., **184:** 403—414, 1976.
3) Sandmeyer, W.: Ueber die Folgen der partiellen Pankreas exstirpation beim Hund. Z. Biol., **31:** 12—85, 1895.
4) Pflüger, E.: Untersuchungen uber den Pankreasdiabetes. Pfluegers. Arch., **118:** 265—321, 1907.
5) Richard, C., et al.: Segmental division of the rat pancreas for experimental procedures. Lab. Invest., **13:** 1303—1321, 1964.
6) Foglia, V.G.: Caracteristicas de la Diabetes en la rata. Rev. Soc. argent. de Biol., **20:** 21—37, 1944.
7) Koulisch, S. and Kleinfeld, R.G.: The role of nucleolus. I. Tritiated cytidine activity in liver parenchymal cells of thioacetamide-treated rats. J. Cell. Biol., **23:** 39—51, 1964.
8) Fisher, N.F.: Regeneration of pancreas from pancreatic duct. J.A.M.A., **83:** 502—503, 1924.
9) Condorelli, A., et al.: Experimental study of the regenerative capacity of the pancreas after partial resection of the gland. Policlinico (chir.), **70:** 163—180, 1963.
10) Lehv, M. and Fitzgerald, P.J.: Pancreatic acinar cell regeneration. IV. Regeneration after surgical resection. Am. J. Pathol., **53:** 513—535, 1968.
11) Pearson, K.W., et al.: Effect of partial surgical pancreatectomy in rats. I. Pancreatic regeneration. Gastroenterology, **72:** 469—473, 1977.
12) Scow, R.O.: Total pancreatectomy in the rat: Operation, effects, and postoperative care. Endocrinology, **60:** 359—367, 1957.
13) Hotz, J., et al.: Reserve capacity of the exocirine pancreas. Enzyme secretion and fecal fat assimilation in the 95% pancreatectomized rat. Digestion, **9:** 212—223, 1973.
14) Dragstedt, L.R.: Some physiologic problems in surgery of the pancreas. Ann. Surg., **118:** 576—593, 1943.
15) Shoda, M.: Histologic changes of the anterior hypophysis in Sandmeyer dogs. Arch. Jap. Chir., **29:** 1—15, 1960.
16) 吉岡　一：膵切除．日外会誌，**55**：766—788，1954.
17) 水本竜二ほか：膵の機能（Ⅶ）膵切除と代謝．代謝，**10**：1403—1412，1973.
18) 八杉八郎ほか：膵広範切除犬の糖代謝と膵内分泌機能の変動．糖尿病，**17**：336—343，1974.
19) Martin, J.M. and Lacy, P.E.: The prediabetic period in partially pancreatectomized rats. Diabetes, **12:** 238—242, 1963.
20) 吉野寮三：膵広汎切除後に発生する糖尿病に関する実験的研究．日本臨床電子顕微鏡学会誌，**9**：241—255，1976.
21) 五島博道：膵切除後糖尿病の病態生理の研究．特に Sandmeyer 型糖尿病における糖代謝ならびに膵島の変化について．日外会誌，**80**：242—

551, 1979.
22) Friedman, N.B. and Marble, A.: Island hyperplasia in the partially depancreatized rat. Endocrinology, 577—582, 1941.
23) Marx, M., et al.: Elektronmikroskopische Untersuchungen zur Inselregeneration im Rattenpankreas nach subtotaler Pankreatektomie. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., **110:** 569—587, 1970.
24) Huges, H.: An experimental study of regeneration in the islets of Langerhans with refference to the theory of balance. Acta. Anat., **27:** 1—61, 1956.