

会長講演

## 膵ランゲルハンス島移植

福井医科大学 1 外科学教室

中川原儀三

膵移植は重症糖尿病に対する根本的な治療法である。なかでも膵ランゲルハンス島（以下ラ島と略記）移植は内分泌組織のみを移植するというユニークな手法であり、手術侵襲が少ないこと、手技的に簡便なこと、繰り返し移植が可能なこと、グラフトの免疫原性を修飾できうること、など血管吻合を伴う臓器移植にくらべて利点が多い。しかし世界的にも臨床症例数は少なく、結果も満足すべきものではない。福井医科大学第1外科学教室では、ラ島移植の問題点を解決すべく凍結保存を中心としたラ島保存法、拒絶反応の抑制法などについて研究を進めてきた。その結果、いまだ動物実験の段階ではあるが、ラ島の凍結保存が有用であることや免疫原性の修飾が可能であることなど、いくつかの知見を得た。

**Key words:** insulin dependent diabetes mellitus, pancreatic islets, transplantation, cryopreservation, immunomodulation

### はじめに

Banting and Best<sup>1)</sup>によるインスリンの発見および各種の抗生物質の開発により、糖尿病の重篤な合併症による死亡率は激減した。しかし一方で若年初発型のインスリン依存性糖尿病（insulin dependent diabetes mellitus: IDDM と略記）においてはインスリン治療のみでの適切な血糖のコントロールは困難であり、腎症や網膜症などの血管病変の合併症をきたすことが知られている。これは1日数回のインスリン投与では生体における血糖—インスリンの相互関係を厳密に調整できないからである。すなわち時々刻々変動する血糖に対して生理的な feed back system により制御されたインスリンの投与が必要となる。そこで糖尿病による合併症の進展を予防し、患者の quality of life の向上を図ることを目的として膵移植が考案されるに至った。膵移植の方法としては、膵全体あるいは体尾部を血管吻合によって移植する臓器移植（膵臓器移植）と、分離したラ島、あるいは膵組織細片（crude な状態のラ島を含む）を移植するラ島移植に大別できる。

著者は以前より、移植の中でも独特の分野ともいえるこのラ島移植に関して研究を進めてきた。本稿ではラ島移植の変遷と現況、問題点、将来の展望について教室の研究結果を交えて述べる。

### I. ラ島移植の変遷

#### 1. 膵組織小片の移植

インスリンの発見に先立つこと30年前、1893年に Williams<sup>2)</sup>は羊の膵組織小片をヒトに移植し糖尿病治療を試みておりこれがラ島移植始まりとされている。この試みは成功しなかったものの、免疫学や移植学が確立していなかった時代に、しかも臨床においてラ島の異種移植が行われたことは非常に興味深い。そしてその後の約100年間にわたるラ島移植の研究は、まさにこの Williams の試みを成功させることを目標に進められたといっても過言ではない。1951年 Browning<sup>3)</sup>はマウス胎児膵を前眼房に移植すると、外分泌組織は萎縮し内分泌組織のみが発育し、血管新生を伴って生着していることを報告した。一般に新生児、胎児膵は自己消化が起こりにくく、膵重量に比べ数多くのラ島を有する利点があり、これら膵組織の舉丸、cheek-pouch、皮下への移植や、培養されたものの前眼房、腹腔内、腎皮膜下への移植が報告されている。これまでのところ新生児膵あるいは胎児膵を用いた小動物における膵組織片の implantation は成功しているが、イヌ、ヒトでは良好な効果を得るに至っていない。

#### 2. 分離ラ島の移植

1964年 Hellerström<sup>4)</sup>はマウスを用いて、ラ島を機械的に取り出す free-hand microdissection 法を考案したが、手技的に難しく大量のラ島採取は困難であった。しかし1965年 Moskalewski<sup>5)</sup>が膵をコラゲナーゼで処理し、膵外分泌を消化しラ島を分離することに成功

\* 第46回日消外学会総会

<1995年11月15日受理> 別刷請求先：中川原義三

〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合目23 福井医科大学第1外科

し、1967年には Lacy & Kostianovsky<sup>6)</sup>が膵管内に Hanks 液を加圧注入し、膵外分泌を膨化させることでコラゲナーゼの消化が容易になることを示してから、ある程度多数のラ島採取が可能となった。Ballinger & Lancy<sup>7)</sup>は、このようにして得られたラ島を移植に応用し、400~600個の分離ラ島を糖尿ラットの腹腔内または皮下に同種移植し、糖尿病の改善をみたし報告した。その後多くの研究者により腹腔内、皮下、筋肉内、睾丸内、門脈内等にラ島移植が試みられ小動物においてはその有用性が示された。一方、大動物においては膵組織の結合織が豊富なためコラゲナーゼ消化が難しく、pure かつ十分量のラ島を分離することができないことから、臨床に応用できなかった。その後 ficoll gradient 法や digestionfiltration 法などの大量分離法が開発され、大動物におけるラ島移植も可能となり、ついに1977年に Najarian<sup>8)</sup>が、ヒトでラ島移植（正確には膵組織細片移植）を行った。しかしこの注目すべき試みにおいて、患者は一時的なインスリン投与量の減少効果を得たものの、インスリン投与からの離脱という福音を得るまでには至らなかった。そして小動物での良好な実験結果に比べ、ヒトでのラ島移植の困難さが明らかになるにつれ臨床応用は停滞していった。その結果1980年代はラ島移植にとってさらなる基礎的研究の充実を求められる時代となった。しかし近年、ヒト膵から純度、量とも満足の行く単離法が確立され、さらには拒絶反応の抑制に新しい知見が得られたことなどによりラ島移植が再び脚光を浴びてきた。

## II. ラ島移植の現況

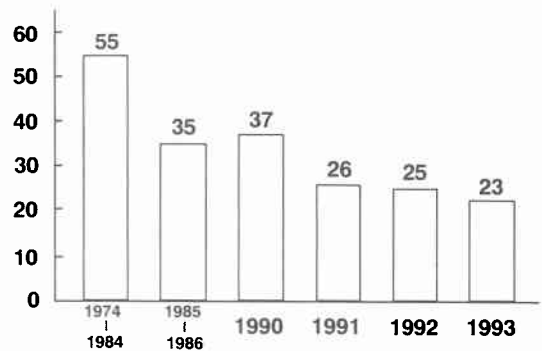
ラ島移植の国際登録センター (Islet Transplant Registry) の集計<sup>9)</sup>によると1974年から1993年までに北米やヨーロッパの施設を中心に201例のラ島移植が行われている (Fig. 1)。最近4年間の症例をみると IDDM 症例で移植後1年以上インスリン治療を必要としなかったものは8例(9%)であった。また単独のドナー膵から単離したラ島を用いた移植が13例(69%)でその他は多数のドナーよりの移植であった。移植部位はほとんど(74%)が経門脈的肝内移植であった。このように臨床においては症例数、成績ともに満足すべき結果に至っておらず、いまだ解決すべき課題が山積していることを物語っている。

## III. ラ島移植の問題点

### 1. ラ島の分離

ラット、マウスなどの小動物ではコラゲナーゼ消化法によりラ島は容易に分離でき、しかも分離したラ島

Fig. 1 Number of adult islet all grafts by year performed from 1974 through 1993



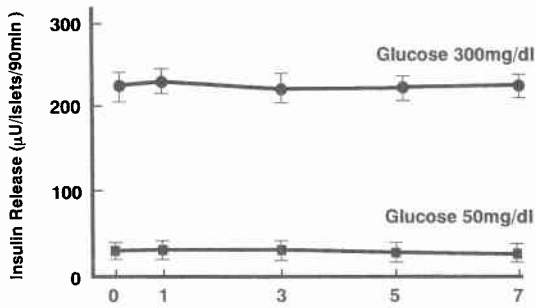
を同系の recipient に移植すると、糖尿病は改善する。ところが前述のごとく、ヒトの膵組織は結合織が豊富なため、従来の力価のコラゲナーゼでは消化作用が十分に行われず、pure で viability の高いラ島の大量分離は困難であった。そこで臨床応用を目指して本法にさまざまな改良が加えられた。まず1981年に洞口ら<sup>10)</sup>により、膵管からコラゲナーゼを注入するコラゲナーゼ膵管内注入法が開発された。また1984年に Gray ら<sup>11)</sup>は膵管に注入するコラゲナーゼ濃度とカルシウム濃度を従来より高くすることで大量のラ島分離が可能であるとした。さらに大里ら<sup>12)</sup>は膵摘出時に UW (University of Wisconsin) 液を溶媒としたコラゲナーゼ溶液を膵管から注入し保存後にラ島分離を行い良好な成績を得たと報告している。そして Ricordi ら<sup>13)</sup>はヒトラ島分離を自動化する方法を考案し、大量のラ島の採取に成功している。

### 2. ラ島の保存

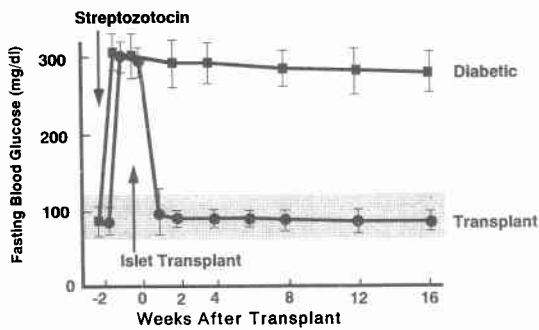
#### ① 培養保存

著者らは器官培養を応用した方法でラットラ島の保存を7日間行い、培養ラ島の機能をインスリン分泌能で評価し、さらに3~5日間保存したラ島を streptozotocin 糖尿ラットの門脈内へ移植した。培養ラ島は保存7日目までは新鮮ラ島と同程度のインスリン分泌能を有しており (Fig. 2)、この培養ラ島は門脈内よりの移植後も十分にその機能を発揮し (Fig. 3)、糖尿病状態の改善に効力を示した。次に長期間培養保存を目的として、分離ラ島を multidish tray において37°C、5%CO<sub>2</sub>-air で培養した。3日間隔で培地交換を行ったところ、少なくとも80日間の培養保存が可能であり<sup>14)</sup>インスリン分泌能の低下はみられず、形態学的には分離時に損傷した被膜の修復と強靱化が観察された

**Fig. 2** Time-course study of insulin release from preserved islets.



**Fig. 3** Fasting blood glucose levels in transplant rats and diabetic rats. The shaded area indicates the confidence band for fasting blood glucose in normal rats.



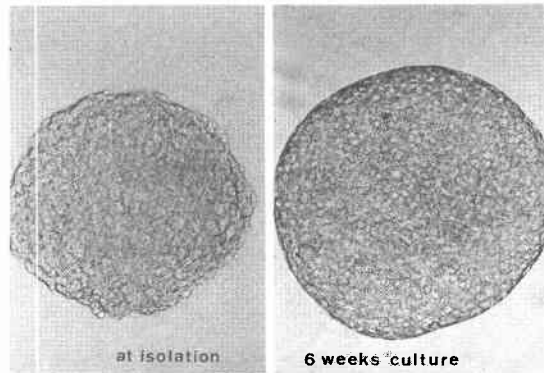
(Fig. 4). また2週間培養のラ島300~400個を streptozotocin 糖尿ラットの門脈内へ注入すると recipient の糖尿病は1週間前後に改善した。

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

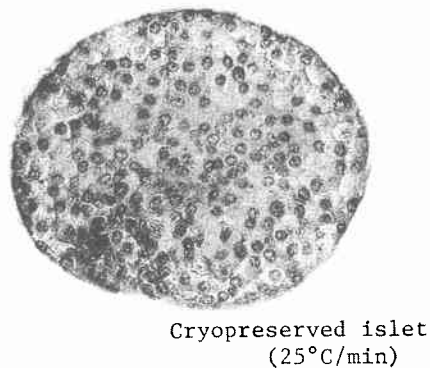
② 凍結保存

精子、赤血球等の単細胞保存より始まった凍結保存は臓器保存のうえで興味ある方法である。通常、凍結保存には凍害防止剤を用いるが、大きな臓器の場合、凍害防止剤の臓器内への一様な浸透は困難であり、細胞内外の氷晶化により細胞破壊、および組織破壊をきたし臓器としての機能を十分に保持できない。この点、ラ島は非常に小さい組織であるため凍害防止剤が一様に浸透し、良好な凍結保存が可能と考えられる。ただし凍結保存の成功には、凍害防止剤の選択、凍結およ

**Fig. 4** Histological studies of fresh islet (left) and cultured islet (right) (Orig. ×100)



**Fig. 5** Histological studies of cryopreserved islet (H-E staining Orig. ×560)



び解凍条件の設定など多くの問題点を解決する必要がある。凍害防止剤として Dimethylsulfoxid (以下、DMSO と略記) や Glycerin などがあるが、一般には組織への浸透性の良好な DMSO が多く用いられている。著者らは、凍結の前後に培養を付加したうえで、DMSO を用い、凍結速度を緩慢速度 (1°C/分) と急速速度 (25°C/分) に分けて比較検討した。ラ島回収率はともに良好で、とくに DMSO の濃度が15%での回収率が最も良好であった。形態学的に観察すると凍結保存ラ島は非凍結ラ島に比べて、やや小型化していたが、核配列の乱れや周辺組織の破壊も認められなかった (Fig. 5)。またグルコース刺激におけるインスリン分泌能は、培養ラ島群 1°C/分および25°C/分の凍結保存群間に差は見られなかった (Table 1)。また300mg/dl の高濃度刺激に対しては、3群ともに基礎分泌の約3

**Table 1** Effects of cryopreservation on glucose stimulated insulin release from hamster pancreatic islets. Values of insulin release and expressed as  $\mu\text{U}/10\text{islets}/60\text{min}$

	Glucose concentration		
	30 mg/dl (1st hour)	30 mg/dl (2nd hour)	300 mg/dl (3rd hour)
Islet frozen at 1°C/min	146.0±37.5	158.1±38.7	419.8±101.3
Islet frozen at 25°C/min	168.1±66.7	161.8±47.9	428.8±81.8
non-frozen cultured islet	162.1±10.7	159.6±46.6	494.9±107.9

\*p<0.01

**Table 2** Effects of cryopreservation on insulin and DNA content of hamster pancreatic islets

	Insulin ( $\mu\text{U}/10$ islets)	DNA ( $\mu\text{g}/10$ islets)	Insulin/DNA
Islet frozen at 1°C/min	5,316±1,291	0.44±0.04	13,756±1,114
Islet frozen at 25°C/min	6,138±1,629	0.46±0.06	13,057±2,000
non-frozen cultured islet	7,952±2,062	0.59±0.07	13,420±2,370

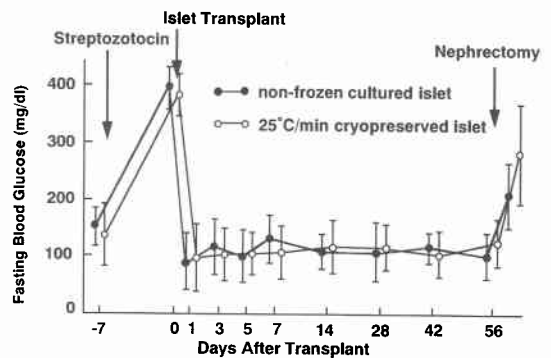
\*p<0.01

倍のインスリン分泌が見られた。ラ島内細胞1個当たりのインスリン含有量を比較検討するための、インスリン/DNAでは、いずれも各群に有意差を認めなかった (Table 2)。さらに labelling index よりみたラ島細胞複製能も3群間で差は認めなかった。このように凍結速度によりラ島回収率に差がないこと、凍害防止剤にはDMSOが良いことなどが明らかとなり、培養と凍結との条件を設定することができた。さらに凍結保存ラ島の移植効果を見る目的で、ハムスターを用い1,000個のラ島を腎皮膜下に移植しその効果を検討すると、血糖値は正常化し、体重の増加も見られた。そして56日目にラ島を移植した腎臓を摘出すると、凍結群、非凍結群の両群において血糖の急激な上昇が認められた (Fig. 6)。

### 3. 移植部位

移植部位として Kemp ら<sup>15)</sup>は門脈内移植をあげ、肝に生着させるほうがより生理的であり、移植ラ島も300~600個で有効であるとしている。Ballinger, Lacy ら<sup>12)</sup>は400~600個のラ島を実験的糖尿ラットの腹腔内に同系移植したところ、streptozotocin 糖尿ラットは

**Fig. 6** Blood glucose level of streptozotocin diabetic hamsters implanted into the renal subcapsular space with about 1,000 hamster islets. Nephrectomy was performed on the 56th day after transplantation.



血糖値の正常化、尿量および尿糖量の減少を認めた。また対照の糖尿群では80%が3か月以内で死亡したのに対して、移植群では死亡をみなかったと報告している。著者ら<sup>17)</sup>も250~300個のラ島を糖尿ラットの門内

脈内に注入することで、著明な糖尿病状態の改善をみている。ところで、ラ島移植部位として筋肉内、腹腔内、皮下などが試みられてきたが、門脈より注入し、肝に生着させる方法が比較的良好な成績をあげている。この理由としては、肝は血流が豊富であり、特に門脈血は高濃度グルコース、アミノ酸や各種消化管ホルモンを含んでおり、ラ島の生着、生存に有効であろうこと、また分泌されたインスリンはまず肝臓を通過して末梢に至る点で生理的と思われること、などが考えられる。しかし長期的にみるとグラフトの機能不全をきたすとの報告<sup>18)</sup>もあり、今後検討しなければならない。また近年、原ら<sup>19)</sup>はラ島を腰椎穿刺により脊髄くも膜下腔内へ移植し、糖尿病ラットの血糖の正常化を長期にわたり観察したとし、免疫特異部位としての脊髄くも膜下腔内の有用性を挙げており、大変興味深い。

4. 拒絶反応の抑制

ラ島移植においても他の臓器移植と同様に、免疫抑制剤が使用される。最近、15-deoxy spergualinのような有効性の高い免疫抑制剤が報告<sup>20)</sup>されるようになったが、依然として recipient に対する副作用やラ島に対する障害は無視できない。一方、ラ島移植の特色として、分離培養の過程で移植ラ島の抗原性を修飾できることから、immunoalterationによる拒絶の抑制が試みられてきた。同種移植において donor と recipient の主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex : 以下、MHC と略記) を適合させることは拒絶を回避するために重要である。ラ島の内分泌細胞には Class I 抗原の発現はみられるが移植抗原の中で最も強力な抗原系である Class II 抗原は発現しないとされている<sup>21)</sup>。したがって外分泌組織の混在しないラ島を移植するかぎり免疫原性は比較的小さいと考えられてきた。ところがラ島内には内分泌細胞の他に Class II 抗原を発現する passenger leukocyte と呼ばれる細胞が混在しており、抗原性を有するとともに、いわゆる抗原呈示細胞 (antigen presenting cell : APC) として働き、拒絶反応を惹起すると考えられるに至った<sup>22)</sup>。そしてこれまでにこの passenger leukocyte を除去あるいは不活化させることで拒絶反応を抑制する様々な方法が報告されている。Lacy ら<sup>23)</sup>はラ島を24°Cで7日間培養したり、95%の高濃度酸素下で7日間培養することで passenger leukocyte を除去し、拒絶反応を抑制したと報告している。筆者の教室では以下に述べる方法でラ島の immunoalteration を試みている。

1) 分散ラ島の凍結保存

ラ島を細胞にまで分散し、それらを凍結保存することにより免疫修飾が可能か否かを試みた<sup>24)25)</sup>。方法としてはまずラ島を分離後 EDTA-Dispase 法<sup>25)</sup>にて分散し、さらに凍結後液体窒素にて浸漬して2週間保存を行った。解凍は37°C恒温槽にて振盪しながらの急速解凍とした。そして再度培養を付加すると、培養2~3日目に cluster を形成しはじめ、約1週間であわゆる“pseudo islet” (以下、F.C.I.C と略記) となった。これを分離した後1週間培養した非分散培養ラ島 (以下 C.I と略記) を対照として比較した。組織学的に検索すると、F.C.I.C は対照の C.I に比べやや小型の傾向にはあるものの細胞変性、核濃縮像などの変化は認められず、C.I とほぼ同様の形態を呈していた (Fig. 7)。さらに組織切片止上のインスリン染色陽性細胞/全ラ島細胞の面積比を画像解析装置を用いて測定すると、その比率はほぼ同率であった。またインスリン分泌能をみても基礎分泌、高濃度のグルコース刺激時のインスリン分泌量ともほぼ同様の値を示した (Fig. 8)。インスリンおよび DNA 含有量はいずれも F.C.I.C の方が

Fig. 7 Histological studies of FCIC and CI (H-E staining Orig. ×400)

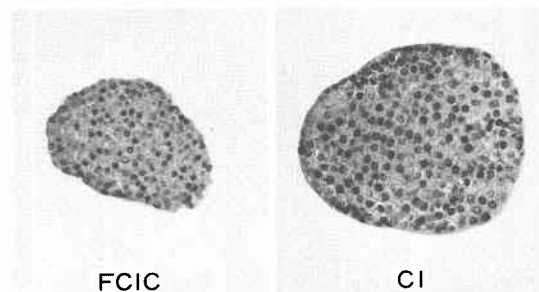
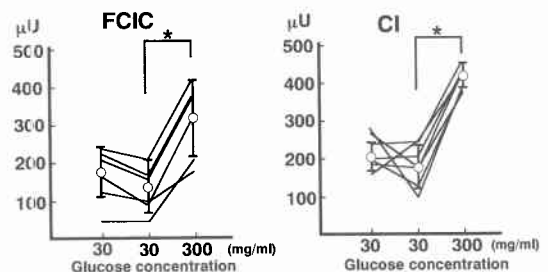
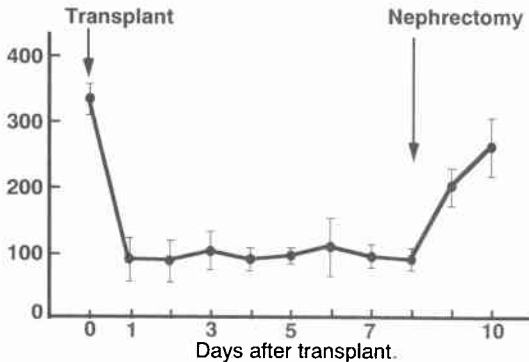


Fig. 8 Glucose stimulated insulin release from FCIC and CI. Values of insulin release are expressed as  $\mu\text{U}/10\text{islets}/60\text{min}$



**Fig. 9** Effect of isogeneic FCIC transplantation on blood glucose levels. Blood glucose levels of three streptozotocin diabetic rats to Transplantation of FCIC isografts. Nephrectomy was performed on the 8th day after transplantation.



**Fig. 10** SDS-PAGE of proteins derived from each group of islet cells

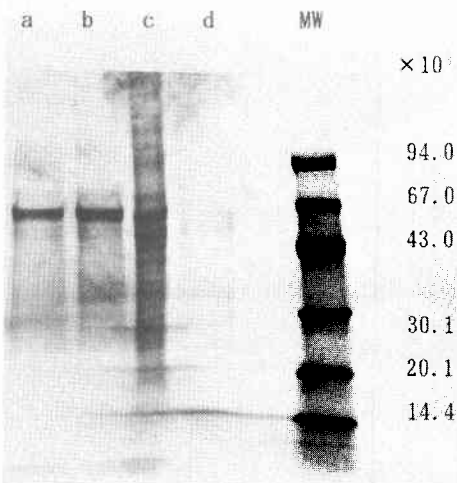
FCIC (lane a): Pseudoislets which were formed from dissociated islet cells in vitro culture after freezing-thawing process.

PI (lane b): Pseudoislets which were formed from dissociated islet cells in vitro culture.

CI (lane c): Non-frozen cultured islet.

IC (lane d): islet cells directly after dissociation.

Molecular weight standards are listed on the right.



C.I に比べて減少していたが、ラ島 1 個当たりのインスリン含有量では F.C.I.C と C.I の間に差は見られなかった。F.C.I.C の同系移植は、腎被膜下に被膜外に漏

出することなく確実な移植が可能であり、F.C.I.C 移植後直ちに血糖値の正常化を認め、移植 8 日目に腎摘出を行うと血糖値の再上昇を認めた (Fig. 9)。摘出した腎の組織切片を作製し、移植された F.C.I.C を免疫組織化学染色にて検索すると腎被膜下にインスリンに染まる viable な細胞集塊を多数認めた。また同種移植において F.C.I.C 群は C.I 群に比べて生着日数で有意な延長を認めた。次にラ島細胞に免疫原性の減弱化が得られたか否かについて sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (以下、SDS-PAGE と略記) による細胞膜蛋白の検討を行った (Fig. 10)。分散した直後のラ島細胞 (I.C) の細胞膜表面には明瞭な蛋白の band は認められなかった。また分散ラ島細胞の 1 週間培養で再構築された (P.I) には band の出現がみられたが、対照とした非分散ラ島 (C.I) と異なり band 数が少なく、しかも Class II 抗原  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の 33~35kDa, 27~29kDa 領域には band が認められなかった。F.C.I.C のパターンも P.I と同様であり、Class II 抗原領域には band が認められなかった。以上より F.C.I.C により免疫原性の修飾効果が示唆された。

## 2) X 線照射ラ島

さらに著者ら<sup>27)</sup>は免疫抑制の一方法として X 線照射による移植効果を試みた。実験動物として ACI と Lewis の雄性ラットを用い、同系移植および同種移植において放射線照射の効果を検討した。分離ラ島は 3 日間の培養後に X 線照射を施し、さらに日間の培養を付加した後移植に用いた。拒絶の起こらない同系移植での血糖値の推移を 40 日間で見ると、OGy 群では移植後 1~2 日で、また 20Gy と 40Gy 群では移植後 7 日以内に血糖値の正常化がみられた。しかし 80Gy, 120Gy, 160Gy と照射量が多くなるにしたがって、血糖値の正常化は得られず、80Gy 以上の照射はラ島への障害が強いと考えられた。同種移植での血糖値の推移をみると、分離直後の新鮮ラ島群および培養のみで X 線照射のない OGy 群では全例 10 日以内に血糖の再上昇がみられた。これに対し 20Gy 群では 6 例中 3 例が 20 日以上にわたり 200mg/dl 以下の血糖値を維持した。また 40Gy 群でも 6 例中 2 例が比較的長期にわたり 200 mg/dl 以下の血糖値を維持し、拒絶の遅延が示唆された。次に分離ラ島の MHC の Class I 抗原および Class II 抗原をモノクローナル抗体を用いた間接法で染色すると、Class II 抗原陽性細胞数は照射群で有意に低下していた。また Class I 抗原はラ島の内分泌細胞の細

胞膜に強く染色されたが照射群と非照射群の間に染色性の差異はみられなかった。以上の結果より X 線照射により Class II 抗原陽性細胞の除去がおり、その免疫原性の減弱が生じたたと推察された。

### 3) Hybrid 型人工膵

Hybrid 型人工膵臓は、ラ島をそのまま移植するのではなく、高分子化合物の半透膜で被包化し移植することにより、宿主の生体防御系から免疫隔離 (Immunoisolation) しようというものである。現在 Hybrid 型人工膵臓は、用いる人工素材の種類から、Diffusion chamber 型, Hollow fiber 型, Microcapsule 型に大別されるが、いずれの型においても最大の課題は、ラ島を封入する高分子半透膜をどのような素材にするかということである。理想的な膜の条件としては、1) グルコースやインスリンなどの比較的低分子の物質は通過させるが免疫グロブリンや免疫担当細胞などは通過させないという特性を持つこと、2) ラ島が長期間機能する環境を維持しうること、3) 移植された生体内で安定し、生体適合性がよいこと、などが挙げられる。著者らはアガロースの半透膜を用いることで、マイクロカプセル化ラ島を作成し移植実験を行っている。マイクロカプセル化は岩田ら<sup>28)</sup>の方法で行い、用いたラ島の約半数をマイクロカプセル化しえた。従来より移植部位としてカプセルの容量が多く、十分なスペースのある腹腔内移植が報告されてきた。著者らもラットの腹腔内に1,000個のマイクロカプセルを移植し、100日を超える生着をみている。しかし、マイクロカプセル化ラ島が機能しなくなった場合それらを腹腔内から回収することは非常に難しい。そこで現在、著者らは大網を皮下に脱出させ、漿膜を遊離した大網内のスペースにカプセル化ラ島を移植する実験系を試みており良好な結果が得られつつある。

最近、Soon-Shiong ら<sup>29)</sup>は、8人の死体膵より分離したヒトラ島をアルギネートとグルロン酸でカプセル化し9,957個/kgをI型糖尿病患者の腹腔内に移植し糖尿病状態から脱却せしめたと報告している。それによると、移植後24時間以内に血糖は正常化し、移植前に0.1ng/mlだったC-peptideは、8か月目には1.0ng/mlとなり、1日45~50U必要であったインスリン投与も9か月後には必要なくなったとしている。このように臨床での成功例も報告されるようになってきたが、一般化するにはさらに改良が必要といえる。

### 5. 新生仔ラ島移植の有用性

新生仔膵からのラ島 (islet-like cell clusters, ICC)

**Table 3** Effects of cryopreservation on glucose stimulated insulin release from new born hamster pancreatic islets. Values of insulin release are expressed as  $\mu\text{U}/10\text{islets}/60\text{min}$

	Glucose concentration		
	30 mg/dl (1st hour)	30 mg/dl (2nd hour)	300 mg/dl (3rd hour)
3days cultured	1.52±0.26	1.43±0.43	3.34±0.49
1week cultured	63.82±13.39	14.61±3.24	73.40±11.35
2weeks cultured	106.10±6.57	91.35±11.07	197.00±18.02

分離は細切した膵を培養することで、比較的容易に行える。そのうえ新生仔膵はラ島の占める割合が高く、ラ島自体も増殖能を有していることからグラフトとして有用と考えられる。著者らは新生仔ラ島の生物学的機能を検索し、その増殖能と移植効果について以下の実験を行った<sup>30)</sup>。新生仔ゴールデンハムスター膵を実体顕微鏡下で経時的に観察すると、細切した直後では内・外分泌組織が混在しラ島の存在も明らかではなかった。しかし培養約1週目には球形の正常の形態を有したラ島が得られた。ラ島の組織学的検索をH.E.染色にて観察すると、外分泌組織の付着はなく、細胞変性、核濃染像などの変化は認められず、成熟ゴールデンハムスター膵より分離したラ島とほぼ同様な組織像を呈していた。またインスリンおよびグルカゴンは明瞭に染色され、数・量ともに成熟ゴールデンハムスターラ島と同様であった。新生仔ラ島の30mg/dlのグルコース負荷によるインスリン分泌能は、分離後3, 7, 14日と培養日数が進むにつれ、その基礎分泌量はそれぞれ著明な増加を示した。一方、300mg/dl濃度のグルコース負荷におけるインスリン分泌能も培養日数が進むにつれて増加し、その値も基礎分泌量の2~3倍と成熟ラ島に近い値となった (Table 3)。また新生仔ラ島内のインスリンおよびDNA含有量は培養3日目でもいずれも定値を示したが、1週目、2週目と斬増し、培養約5週目前後にはplateauに達した。

### おわりに

近年、糖尿病治療における膵移植の重要性は以前にも増してきたといえる。事実、欧米の多くの施設で全膵移植が行われるようになり、良好な臨床結果が報告されるようになった。しかしこれらの膵臓器移植は腎移植など他の臓器移植に比べると、手技的な困難さや合併症の多さなど依然多くの問題を残している。一方、膵移植が糖尿病治療を目的としていることから、内分

泌細胞のみを移植するラ島移植は、その安全性、手技の簡便さ、繰り返し投与の可能性などから合目的な手法といえる。さらにラ島移植の利点として *in vitro* で免疫原性を修飾し、拒絶反応を防止しうる可能性が示唆されている。また臓器移植の急速な普及に伴って、donor 不足や医療財政への圧迫などの問題が一層深刻となるであろうこと、脳死が法的に認められていない本邦において、心停止下での移植に限界があることなどから将来的には donor を異種に求める必要性がでてくる。ラ島移植はこれら異種移植の可能性を有しており、例えばブタに代表される大動物からのラ島の大量分離、保存により、islet bank を確立すれば、恒久的なラ島の供給が可能となり、immunoalterlation や immunoisolation を行うことで臨床に十分用うることができると思われる。

著者らがラ島移植の研究に着手してから世界中で数々の知見が報告されてきた。ラ島というわずか200  $\mu\text{m}$  足らずの小組織の中に秘められた多くの謎と限りない可能性が我々研究者の探究心をとらえてやまないものである。本邦におけるラ島移植はいまだ基礎的実験段階の域を出ていないが、著者らはこれら地道で熱意のある研究が将来の臨床応用に大きな礎となると確信している。そして今後さらにラ島移植の研究が発展し、より安全な形での臨床応用が実現することで多くの糖尿病患者の福音となることを期待したい。

(共同研究者：藤沢克憲，木村俊久，長谷川保弘，岡田章一)

#### 文 献

- Banting FG, Best CH: The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin MED* 7: 251-266, 1922
- Williams PW: Notes on diabetes treated with grafts of shepp's pancreas. *Br Med J* 19: 1303-1304, 1894
- Browning H, Resnik P: Homologous and heterologous transplantation of pancreatic tissue in normal and diabetic mice. *Yale J Biol Med* 24: 141-152, 1951
- Helleström C: A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. *Acta Endocrinol* 45: 122-132, 1964
- Moskalewski S: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 5: 342-353, 1965
- Lacy PE, Kostianovsky M: Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39, 1967
- Ballinger WF, Lacy PE: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72: 175-186, 1972
- Najarian JS, Sutherland DER, Goetz FC et al: Human islets transplantation. A preliminary report. *Transplant Proc* 9: 233-236, 1977
- Federlin K, Bretzel RG, Hering BJ: International islet transplant registry. *News Letter* 4: 1-19, 1994
- Horaguchi A, Merrell RC: Preparation of viable islets cells from dogs by a new method. *Diabetes* 30: 455-458, 1981
- Gray DWR, McShane P, Grant A et al: A method for isolation of islets of Langerhans from the human pancreas. *Diabetes* 33: 1055-1061, 1984
- Ohzato H, Gotoh M, Monden M: Intraductal injection of collagenase solution at the time harvesting—A possible solution for preservation and collagenase digestion. *Transplant Proc* 22 (Suppl. 2): 782-783, 1990
- Ricordi C, Lacy PE, Finke EH et al: Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37: 413-420, 1988
- Kojima Y, Nakagawara G, Miyazaki I: Culture of the islets of Langerhans for transplantation. *Jpn J Surg* 12: 71-75, 1982
- Kemp CB, Knight MJ, Lacy PE: Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isograft in diabetic rats. *Diabetologia* 9: 486-491, 1973
- Ballinger WF, Lacy PE: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72: 175-186, 1972
- Nakagawara G, Kojima Y, Miyazaki I: Insulin-releasing activity and successful transplantation of pancreatic islets preserved by tissue culture. *Surgery* 83: 188-193, 1978
- Warnock GL, Degroot T, Rajotte RV: The natural history of pure canine islet autografts in hepatic or splenic sites. *Transplant Proc* 21: 2617-2618, 1989
- Hara Y, Taniguchi H, Ishihara K: Successful interthecal transplantation of islet without immunosuppressive drugs. Recent advances in insulin therapy. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V, 1990, p365-368
- Gores PE, Najarian JS, Sutherland DE et al: Insulin independence in type I diabetes after transplantation of unpurified islets from single donor with 15-deoxy-spergulin. *Lancet* 341: 19-21, 1993



- 21) Faustman D, Hauptfelt V, Davie JM et al: Murine pancreatic beta cells express H-2K and H-2D but not Ia antigen. *J Exp Med* 151 : 1563—1568, 1980
- 22) Pipeleers DG, In, tveld PA, Pipeleers-Marichal et al: Presence of pancreatic hormones in islet cells with MHC-class II antigen expression. *Diabetes* 36 : 872—876, 1987
- 23) Lacy PE, Davie JM, Finke EH: Prolongation of allograft survival following in vitro culture (24°C) and a single injection of ALS. *Science* 204 : 312—313, 1979
- 24) 平泉 泰, 小島靖彦, 中川原儀三: 膵ラ島細胞の凍結保存に関する研究. 凍結保存ラ島の生物学的機能と移植効果. *移植* 26 : 218—229, 1991
- 25) Kimura T, Fujisawa K, Nakagawara G: Experimental studies on cryopreservation of dissociated pancreatic islet cells with reference to maintenance of biological function. *Cell Transplant* 3 (Suppl) : 13—14, 1994
- 26) Ono J, Takaki R, Fukuma M: Preperation of single cells from pancreatic islets of adult rat by the use of Dispase. *Endocrinol Jpn* 24 : 265—270, 1977
- 27) Kimura T, Nakagawara G: Prolonging survival of islet allograft by pretreating isolated islets with X-ray irradiation. *Transplant Proc* 26 : 2290—2291, 1994
- 28) Iwata H, Amemiya H, Matsuda T et al: Evaluation of microencapsulated islets in agarose gel as bioartificial pancreas by studies of hormone secretion in culture and by Xenotransplantation. *Diabetes* 38(Suppl) : 224—225, 1989
- 29) Soon-Shiong P: Insulin independence in a type I diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343 : 950—951, 1994
- 30) 藤沢克憲, 中川原儀三: 新生仔ハムスター膵ランゲルハンス島の生物学的機能の検索—特にその増殖能と移植について. *移植* 29 : 245—253, 1994

### Transplantation of Pancreatic Islets

Gizo Nakagawara

First Department of Surgery, Fukui Medical School

Islet transplantation in Type I insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) has some advantages over vascularized pancreas organ transplantation, such as the easy and safe technique of transplantation, and the possibility of immunomodulation of the graft. But data from clinical studies have shown that some serious problems still need to be overcome. One of the problems islet transplantation is the islet storage. There are some preservation methods, including culture, low temperature preservation, and cryopreservation, but cryopreservation may be the only possible method of long-term preservation. Islets can be cryopreserved without loss of their biological activity by using the cooling rate of 1°C/min and 25°C/min. And cryopreserved islets can normalize the blood glucose level of diabetic hamsters in isogenic transplantation. To reduce the immunogenicity of the islets, isolated pancreatic islets were dissociated into islet cells and cryopreserved. There was a significant prolongation of survival of dissociated and cryopreserved islet cells in allogeneic transplantation in rats. Irradiation of islets and encapsulation of islets were also examined and these methods were useful for controlling rejection in islet transplantation. We believe these approaches will permit application of these methods to the treatment of diabetes in human with allografts xenografts.

**Reprint requests:** Gizo Nakagawara First Department of Surgery, Fukui Medical School  
23 Shimoaizuki, Matsuokacho, Yoshidagun, Fukui, 910-11 JAPAN