日消外会誌　29（4）：911～915，1996年

特集12

アガロースマイクロカプセル化異種膵ラ島移植

奈良県立医科大学第1外科
青松　幸雄　中島　祥介　金廣　裕道　久永　倫聖
瀧　順一郎　高　済峯　金　達也　八倉　一晃
大山　孝雄　大橋　一夫　西尾　和司　山田　高嗣
中野　博重

Discordant異種膵ラ島移植におけるアガロースマイクロカプセル化（Mc(+)）と15-Deoxyspergualin(DSG)投与の併用効果につき検討した．雑種成犬単離ラ島を5％アガロースハイドロゲルにて，マイクロカプセル化した．6,000個膵ラ島を糖尿病BALB/cマウス，またはNODマウスの腹腔内に異種移植した．Mc（+）ラ島の平均生着日数はそれぞれ37.8日，30.6日であり，Mc（−）群に対し有意の生着延長効果を認めた．Mc（+）に少量のDSG投与を加えることにより，平均生着日数は76.3日，75.3日とさらに著明に延長した．Mc(+)群のマウス抗イヌ抗体価レベルは，DSG投与の有無にかかわらず，移植後50％以上となる場合も認めたが，正常血漿糖濃度が維持され，抗体はMc（+）ラ島に傷害をあたえなかった．アガロースマイクロカプセル化とDSG投与の併用による著明な生着延長効果を認め，将来の異種ラ島移植におけるバイオ人工膵の有用性を示した．

Key words: agarose-microencapsulated islet xenotransplantation, 15-deoxyspergualin, antibody titer level

はじめに

I型糖尿病に対する生理的な血糖値の調節，合併症の予防のための侵襲の少ない早期治療を目的とした同種膵ランゲルハンス島（以下，ラ島）移植は，ドナー源の安定供給，拒絶反応の防御という21世紀に向けての課題を残した．我々はこの解決策を，discordantな異種ラ島移植における，免疫隔離の手法と免疫抑制の手法との併用療法に求めた．今回は，異種膵ラ島移植のアガロースマイクロカプセル化と15-Deoxyspergualin（以下，DSG）投与の併用効果につき検討したので報告する．

方　法

1．実験動物

ドナーとして，両性の雑種成犬（体重9～20kg）を，レシピエントとして，雄性6週齢のBALB/cマウス（日本クレア，東京），または，雌性10週齢のNODマウス（日本クレア，東京）を用いた．BALB/cマウスにストレプトゾトシン（220mg/kg）を，また，NODマウスにサイクロフォスファミド（200mg/kg）を腹腔内投与し糖尿病を作製した．連続2回の血漿糖濃度が400 mg/dl以上の時，レシピエントとして用いた．

2．イヌ膵ラ島単離方法

全身麻酔下に開腹した後，温阻血時間を最小限とするために主要な血管を温存しつつ膵周囲組織を剝離した後，膵を摘出し冷Hanks'液に浸漬した．コラゲナーゼ溶液は6mgのコラゲナーゼtype S-1（260units/mg）（新田ゼラチン社，大阪）を1mlのHanks'液（ニッスイ，東京）に溶解し作製した．37℃の恒温槽内にて5ml/g膵重量のコラゲナーゼ溶液を膵管内に注入しつつ膵組織を膨化させ，膵組織を約30分間消化した．次に，Warnockら[1]の方法に準じ，Ficoll不連続密度勾配遠心法にて膵ラ島を単離した．単離されたラ島をDithizone(Sigma，St. Louise，MO)溶液にて染色した後，実体顕微鏡にて染色されたラ島の収量，大きさ，純度を測定した．

3．単離イヌ膵ラ島のマイクロカプセル化方法

岩田ら[2]の方法に準じ，加圧加熱溶解した5％アガロース（清水食品，清水）溶液に単離イヌ膵ラ島を混

＊第46回日消外会総会シンポ2・臓器移植の現況と21世紀への展望

<1995年12月6日受理>別刷請求先：青松　幸雄
〒634　橿原市四条町840　奈良県立医科大学第1外科

Table 1　Graft survival of canine islet xenotransplantation in diabetic mice

group	recipient	treatment	n	graft survival time(d)	mean±SD
a	BALB/c	None	5	0, 0, 0, 0, 3	0.6±1.2[a]
b	BALB/c	Mc(+)	6	6, 16, 20, 37, 66, 82	37.8±27.5[b]
c	BALB/c	DSG2.5mg/kg/d	5	0, 0, 0, 0, 4	0.8±1.6[c]
d	BALB/c	Mc(+)+DSG2.5mg/kg/d	7	35, 47, 77, 77, 98, >100, >100	76.3±24.4[d]
e	NOD	None	5	0, 0, 3, 4, 7	2.8±2.6[e]
f	NOD	Mc(+)	8	16, 16, 17, 20, 21, 32, 41, 82	30.6±21.1[f]
g	NOD	DSG2.5mg/kg/d	5	0, 0, 0, 0, 0	0[g]
h	NOD	Mc(+)+DSG2.5mg/kg/d	7	32*, 36*, 82*, 83, 94, >100, >100	75.3±27.0[h]
i	NOD	DSG4.0mg/kg/d	5	0, 0, 3, 8, 12	4.6±4.7[i]
j	NOD	Mc(+)+DSG4.0mg/kg/d	5	14*, 17*, 19, 21*, 26*	19.4±4.0[j]

*died on normoglycemia

[b]Versus[a] ($p<.05$). [d]Versus[b] ($p<.01$), [c] ($p<.01$).

[f]Versus[e] ($p<.05$). [h]Versus[g] ($p<.01$), [f] ($p<.01$), [i] ($p<.01$). [j]Versus. [i] ($p<.01$).

和し，流動パラフィンを加え，氷中で用手的に攪拌し，アガロースをゲル化した．Hanks'液にて洗浄後，流動パラフィンおよびHanks'液を除去し，5％マイクロカプセル化膵ラ島を作製した．

4．異種膵ラ島移植方法

全身麻酔下にマウスを正中で開腹し，6,000個[3]のイヌ膵ラ島を腹腔内に移植した．

5．実験群

マイクロカプセル化の有（以下，Mc(+)）無，免疫抑制剤投与の有無，および投与量により群分けした．なお，免疫抑制剤として15-deoxyspergualin（日本化薬，東京）を用い，2.5mg/kg，あるいは4.0mg/kg を移植後連日腹腔内投与した（**Table 1**）．

6．移植異種膵ラ島の拒絶判定方法

移植後定期的に採血し，血漿分離後，Beckman Glucose Analyser II にて血漿糖濃度を測定した．血漿糖濃度が2回連続して250mg/dl 以上の時，拒絶と判定し，1回目の測定日をもって拒絶日とし，移植した日から拒絶日までの日数をもって生着日数とした．

7．マウス抗イヌ抗体価レベル測定方法

イヌ末梢血を採取し，単核球層を分離後，2×10^6個/ml となるように Hanks'液と混和した．56°C30分間加熱し非働化したレシピエントマウスの血漿50μl とイヌ単核球浮遊液500μl を混和後，30分間氷中にて静置した．これに500μl の2次抗体溶液を混和後，30分間氷中に静置した．2次抗体溶液としては，Gout anti-mouce IgG+IgM (H+L chains) conjugated with FITC(Caltag Laboratories Inc., South San Francisco, CA)からイヌ単核球と非特異的に結合する分画を除去後，Hanks'液と混和し700倍希釈したものを使用した．FACS 分析にて10^4個中の％positive cell を測定し，50％以上をマウス抗イヌ抗体価レベル陽性，5％以下をマウス抗イヌ抗体価レベル陰性とした．

8．組織学的検査方法

レシピエントの腹腔内より採取したマイクロカプセル化膵ラ島を10％ホルマリンにて固定後，hematoxylin-eosin 染色を施行した．

9．統計学的処理方法

統計学的処理は Student's t test にて行ない，$p<0.05$をもって有意差有りとした．

結　果

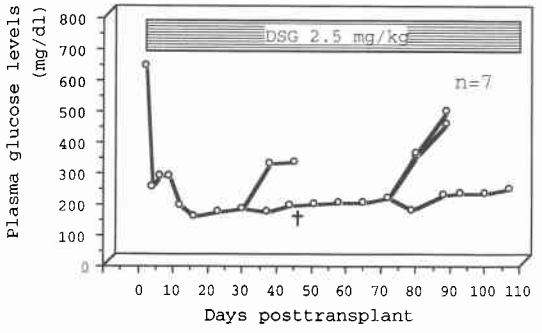
1．単離イヌ膵ラ島，マイクロカプセル化ラ島

単離ラ島数は膵重量1g 当り1,135±447個，単離ラ島の大きさは，50～100μm が42％，100～200μm が55％，200μm 以上が3％であった．純度は約80％であった．5％アガロースマイクロカプセルにより，1個から3個のラ島がマイクロカプセルの中に封入された．マイクロカプセル化ラ島の直径は400～500μm，ラ島の直径は約100μm，マイクロカプセル膜の厚さは150～200μm であった．

2．マイクロカプセル化異種膵ラ島移植における血漿糖濃度の推移

レシピエントが BALB/c マウスの場合，マイクロカプセル化ラ島移植・DSG 非投与群の血漿糖濃度は，全例が移植後速やかに正常域に達した．しかしながら，全例が82日以内に拒絶反応により高値となった．マイクロカプセル化ラ島移植・DSG 投与群の血漿糖濃度も，全例が移植後速やかに正常域に達した．7例中2

Fig. 1 Microencapsulated canine islet xenotransplantation in BALB/c mice with DSG



例において，100日以上の正常血漿糖濃度を示した(**Fig. 1**)．レシピエントがNODマウスの場合，BALB/cマウスの場合と同様の血漿糖濃度の推移を示した．

3．移植異種膵ラ島の生着日数

レシピエントをBALB/cマウスとしたとき，a, c群の非マイクロカプセル化ラ島移植における平均生着日数は，それぞれ0.6日，0.8日であり，DSG投与の有無による有意差は認めなかった．b, d群のマイクロカプセル化膵ラ島移植における平均生着日数はそれぞれ37.8日，76.3日であり，非マイクロカプセル化群に対し有意差を認めた．マイクロカプセル化に少量のDSG投与を加えたd群は，非DSG投与のb群に比べ生着延長効果を認め，7匹中2匹において100日以上の長期生着を認めた．レシピエントをNODマウスとしたとき，f, h, j群のマイクロカプセル化ラ島移植における平均生着日数はそれぞれ30.6日，75.3日，19.4日であり，非マイクロカプセル化群に対し有意差を認めた．マイクロカプセル化に少量のDSG投与を加えたh群は，非DSG投与のf群に比べ生着延長効果を認め，7匹中2匹に100日以上の長期生着を認めた．DSG投与量を増量したj群は，5匹中4匹が生着死し，h群に対し生着期間が有意に短縮した(**Table 1**)．

4．マウス抗イヌ抗体価レベル

非マイクロカプセル化ラ島移植において抗体価レベルは移植後約2週で陽性となった．マイクロカプセル化ラ島移植・DSG非投与群ではラ島移植単独群と同様に4例すべてが移植後2週にて陽性となった．抗体価レベル陽性，血漿濃度が高値を示した例の他に，抗体価レベル陽性にもかかわらずに正常血漿糖濃度で推移する例を認めた．一方，マイクロカプセル化ラ島移植・DSG投与群では抗体価レベル陰性であった2例と移植後約4週にて抗体価レベル陽性となった2例に分れた．しかし，抗体価レベル陽性2例においても，陰性2例と同様に正常血漿糖濃度で推移した(**Table 2**)．

5．組織学的検査

d群のマウス(生着日数97日)より，105日目に摘出したマイクロカプセル化ラ島はviableであり，マイクロカプセル周囲の細胞浸潤は軽度で，強度のコラーゲン線維や線維芽細胞の増生は認められなかった(**Fig. 2**)．

Fig. 2 Histological findings of microencapsulated canine islet retrieved from intraperitoneal cavity of BALB/c mouse 105 days after xenotransplantation (H & E stain; original magnification ×100)

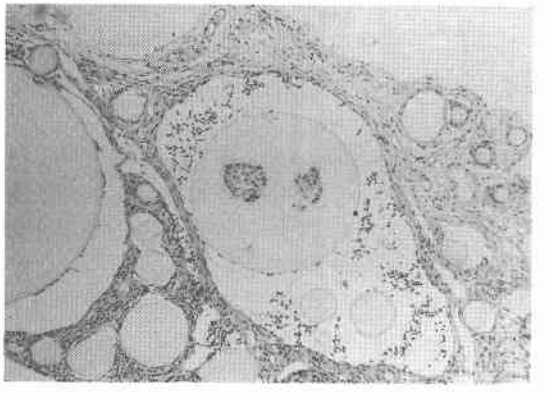


Table 2 Antibody titer status and plasma glucose change after islet xenotransplantation

recipient	n	treatment	ab titer status negative/positive	normoglycemia /hyperglycemia
BALB/c	2	None	2 : positive 2 wks after Tx	2 ; hyperglycemia
BALB/c	4	Microencapsulation	4 : positive 2 wks after Tx	2 ; normoglycemia 2 ; hyperglycemia
BALB/c	4	Microencapsulation +DSG 2.5mg/kg/d	2 : positive 4 wks after Tx 2 : negative	4 ; normoglycemia

考　察

マイクロカプセル化膵ラ島移植の研究は，1980年，Lim ら[4]により，ラ島の拒絶反応の防御に免疫隔離膜として alginine L-polylysine alginate（以下，ALA）膜を用いて行われ，1994年，1例目の臨床例[5]が報告された．我々が免疫隔離膜として用いたアガロースハイドロゲルの膜特性は，分子量の小さいグルコース，インスリン，酸素や栄養は容易に膜を通過するが，免疫担当細胞などの細胞成分は膜を通過しない．アガロースハイドロゲルは容易に材料入手が可能で，作製方法も安定しており，移植後105日においてもアガロースマイクロカプセルの変性は認めず，力学的，形態学的にも安定していた．

今回我々は discordant な異種ラ島移植におけるマイクロカプセル化膵ラ島移植の有用性を示した．ラ島移植発展には，ドナー源の安定供給が必須条件となり，なおかつ倫理的な観点，ヒトインスリンとの相似性よりブタやウシなどの大動物がドナーとなり，ヒトへの discordant な異種ラ島移植に期待が寄せられる．このことより，実験モデルとして我々は異種ラ島移植における discordant な組み合わせを用いた．

レシピエントが BALB/c マウス，NOD マウスの場合，マイクロカプセル化ラ島の平均生着日数はそれぞれ37.8日，30.6日であり，非マイクロカプセル化群に比べ，有意の生着延長効果を認めた．一方，レシピエントである BALB/c マウス，NOD マウス間におけるマイクロカプセル化ラ島の生着日数の差異は認めなかった．レシピエントを NOD マウスとした場合，ALA 膜による discordant のマイクロカプセル化異種膵ラ島移植において，Sun ら[6]のグループを除いては，移植後早期に血糖値の再上昇を認め，100日以上の長期生着を認めたという報告[7]はない．この原因として IDDM モデルである NOD マウスの移植マイクロカプセルである ALA 膜に対する反応性の強さが指摘されており，マイクロカプセル化ラ島周囲の高度の細胞浸潤，コラーゲン増生が報告されている．Soon-Shiong ら[8]は ALA 膜中の mannurinic acid を低濃度に変えることにより生体適合性を良好にしたと報告している．我々のアガロースハイドロゲルマイクロカプセルは，組織像において，マイクロカプセル周囲の細胞浸潤，コラーゲン増生は軽度で，生体適合性は良好であると考えられた．

マウス抗イヌ抗体価レベルの推移より，ラ島のマイクロカプセル化にかかわらず，抗体価レベルは移植後2週に陽性になり，異種抗原が提示されたものと考えられた．この理由として，主には，マイクロカプセル化されなかったラ島や膵組織片の移植時の混入によるものと考えられた．抗体価レベル陽性にもかかわらず血漿糖濃度は正常値のまま推移することより，抗体は，移植マイクロカプセル化ラ島に傷害をあたえず，5％アガロース膜を通過しないものと考えられるが，抗体が膜を通過しているか否かについては今後の検討を要する．

我々はマイクロカプセル化ラ島移植後，少量の DSG を連日腹腔内投与することにより著明な生着延長効果を認めた．免疫抑制剤として用いた DSG は，ステロイド剤，CsA，FK506と異なり，β 細胞機能および糖代謝を損なわず[9]，膵ラ島移植において有用な免疫抑制剤の一つであると考えられる．Nakajima ら[10]は異種ラ島移植における抗体産生抑制効果を，Dickneite ら[11]は，マクロファージ活性化の抑制を報告している．抗体価レベルの推移より，マイクロカプセル化および少量の DSG 連日腹腔内投与群において抗体産生を著明に抑制した例と，DSG 非投与群に比し抗体産生の時期を遅延させた例とを認めたが，双方とも血漿糖濃度は抗体価レベル陽性，陰性にかかわらず正常値を保った．このことより DSG のマイクロカプセル化ラ島移植における効果は，抗体産生抑制によるものの他に，マイクロカプセル化ラ島を保護する何らかの働きが存在するものと考えられた．DSG の効果の一つとして，マクロファージ活性化の抑制という働きが推察された．

マイクロカプセル化ラ島を腹腔内移植した場合，抗原提示された，あるいは炎症反応による活性化マクロファージから放出される Nitric Oxide や，IL-1β，TNF-α，INF-γ などのサイトカインはラ島に対し細胞傷害を惹起することが報告されている[12][13]．Nitric Oxide はともより，上記サイトカインの分子量はインスリンの分子量と近接しておりインスリンのみを選択的に透過させる免疫隔離膜を作製することは困難である．解決方法として，我々が用いた免疫隔離膜と免疫抑制剤との併用によるものの他に，ラ島の培養などによる免疫原性の減弱をもたらす免疫操作との併用，免疫隔離膜の改良，作製方法の改良などについて検討する必要がある．しかしながら，今回の実験で discordant な異種移植であるにもかかわらず5％アガロース膜によるマイクロカプセル化と少量の免疫抑制剤 DSG 投与により100日以上の生着をえることができ，臨床応用の可能性が示唆されたものと考える．

稿を終えるにあたり，御懇篤なる御指導を賜わりました京都大学生体医療工学研究センター岩田博夫助教授ならびに国立小児病院研究所雨宮　浩所長に深甚なる謝辞を捧げます．

文　献

1) Warnock GL, Ellis D, Rayjotte RV et al: Studies of the isolation and viability of human islets of Langerhans. Transplantation **45**: 957—963, 1988
2) 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**: 224—225, 1989
3) Aomatsu Y, Iwata H, Takagi T et al: Miecoencapsulated islets in agarose gel as bioartifical pancreas for discordant xenotransplantation. Transplant Proc **24**: 2922—2923, 1992
4) Lim F, Sun AM: Microencapsulated islets as bioartificial pancreas. Science **210**: 908—910, 1980
5) Soon-Shiong P, Heintz RE, Medideth N et al: Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. Lancet **343**: 950—951, 1994
6) Lum Z, Tai IT, Krestow M et al: Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets. Diabetes **40**: 1511—1516, 1991
7) Weber CJ, Zabinski S, Koschitzky T et al: The role of $CD4^+$ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in NOD mice. Transplantation **49**: 396—404, 1990
8) Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R et al: Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. Transplantation **54**: 769—774, 1992
9) Xenos ES, Casanova D, Sutherland DER et al: The in vivo and in vitro effect of 15-deoxyspergualin of pancreas islet function. Transplantation **56**: 144—147, 1993
10) Nakajima Y, Yabuuchi H, Kanehiro H et al: Prolongation of pancreatic islet xenograft survival and thymus alteration by 15-deoxyspergualin. Transplantation **48**: 351—352, 1989
11) Dickneite G, Schorlemmer HU, Sedlacek HH: Decrease of mononuclear phagocyte cell functions and prolongation of graft survival in experimental transplantation by (±)-15-deoxyspergualin. Int J Immunopharmac **9**: 559—565, 1987
12) Xenos ES, Stevens RB, Sutherland DER et al: The role of nitric oxide in IL-β-mediated dysfunction of rodent islets of Langerhans. Transplantation **57**: 1208—1212, 1994
13) Cole DR, Waterfall M, McIntyre M et al: Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: A possible role for cytokines in graft failure. Diabetologia **35**: 231—237, 1992

Agarose-microencapsulated Islet Xenotransplantation

Yukio Aomatsu, Yoshiyuki Nakajima, Hiromichi Kanehiro, Michiyoshi Hisanaga, Junichiro Taki, Saiho Ko, Tatsuya Kin, Kazuaki Yagura, Takao Ohyama, Kazuo Ohashi, Kazushi Nishio, Takatsugu Yamada and Hiroshige Nakano
First Department of Surgery, Nara Medical University

Pancreatic islets were microencapsulated in an agarose hydrogel as a semipermeable membrane to prevent their xenorejection. We evaluated this bioartificical pancreas in discordant xenografting with or without administration of 15-deoxyspergualin (DSG). A 5% agarose suspension containing purified canine islets was emulsified in paraffin oil and solidified by cooling in an ice-bath. Canine islets were xenotrasplanted intraperitoneally in to BALB/c mice and NOD mice rendered diabetic with streptozotocin (220 mg/kg body weight ip) and cyclophosphamide (200 mg/kg body weight ip), respectively. Graft survivals in BALB/c mice (37 ± 28 days) and NOD mice (31 ± 21 days) with microencapsulation were significantly longer than those without microencapsulation used as controls. With the combination of DSG (2.5 mg/kg per day) and microencapsulation, the islet xenograft survival (76 ± 24 days, 75 ± 27 days) could be extended much longer and indefinite graft survival was observed in two of seven, respectively. Regardless of whether, were low doses of DSG adminisered or not, mouse anti-dog antibody titer levels of BALB/c were elevated to more than 50% two and four weeks after xenotransplantion of microencapsulated islets; however, their plasma glucose levels remained normal. Antibody-mediated damage to microencapsulated islet could not be detected. Combined therapy by agarose-microencapsulation and administration of DSG might be a promising strategy for clinical application to prevent rejection in discordant islet xenotransplantation.

Reprint requests: Yukio Aomatsu First Department of Surgery, Nara Medical University
840 Shijo-cho, Kashihara, Nara, 634 JAPAN