

原 著

実験的糖尿病ラットにおける細胞植え込み型人工膵島 (bio-artificial endocrine pancreas) に関する研究

¹⁾東京女子医科大学 第三外科学 (主任: 太田和夫教授), ²⁾同 総合研究所研究部

³⁾同 糖尿病センター内科, ⁴⁾同 腎臓病総合医療センター

⁵⁾大阪大学医学部栄養学教室

ヒロタニ サチコ¹⁾ ・ オオガワ ラヒサコ^{2),3)} ・ ミヤザキ ジュンイチ⁵⁾ ・ カリベ サチヨ³⁾
 廣谷 紗千子¹⁾ ・ 大河原 久子^{2),3)} ・ 宮崎 純一⁵⁾ ・ 莉部 幸代³⁾
 ホリタ シゲル⁴⁾ ・ ナカヤマ ヒデキ⁴⁾ ・ カワシマ マユコ⁴⁾ ・ ナカガワ ヨシヒコ¹⁾
 堀田 茂⁴⁾ ・ 中山 英喜⁴⁾ ・ 川島 真由子⁴⁾ ・ 中川 芳彦¹⁾
 テラオカ サトシ¹⁾ ・ オオタ カズオ¹⁾
 寺岡 慧¹⁾ ・ 太田 和夫¹⁾

(受付 平成 8 年 8 月19日)

Study of Xenotransplantation Using a Diffusion Chamber with a B-Cell Line as a Bioartificial Endocrine Pancreas (Bio-AEP): Implantation of MIN6 Cell of STZ-induced Diabetic Rat

Sachiko HIROTANI¹⁾, Hisako OHGAWARA^{2),3)}, Jun-ichi MIYAZAKI⁵⁾, Sachiyo KARIBE³⁾,
Shigeru HORITA⁴⁾, Hideki NAKAYAMA⁴⁾, Mayuko KAWASHIMA⁴⁾,
Yoshihiko NAKAGAWA¹⁾, Satoshi TERAOKA¹⁾
and Kazuo OTA¹⁾

¹⁾Department of Surgery III, ²⁾Medical Research Institute, ³⁾Diabetes
Center and ⁴⁾Kidney Center, Tokyo Women's Medical College

⁵⁾Department of Nutrition and Physiological Chemistry, Osaka University Medical School

This experiment was designed to investigate whether MIN6-cells, which are derived from transgenic mouse insulinoma cells, could be a useful tool for a bioartificial endocrine pancreas (Bio-AEP), when enclosed in a diffusion chamber constructed of a semipermeable membrane (pore size 0.2 μ m) and a silicon ring.

Six streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats were each implanted with a Bio-AEP containing MIN6-cells, but without any immunosuppression therapy. Three STZ-induced diabetic rats were implanted with a diffusion chamber without the MIN6-cells, as a sham operation.

In three of the six STZ-diabetic rats with a Bio-AEP, fasting blood glucose levels were normalized immediately and remained within normal range until the 32th week after implantation (good control). In the other three rats, with Bio-AEPs, the blood glucose level rose gradually from the 24th week after implantation (poor control). The fasting blood glucose levels in the three rats in the sham operation group were higher than 600 mg/dl, immediately after the implantation.

Thirty-five weeks after implantation, the Bio-AEPs were removed from the nine diabetic rats. Subsequently, the blood glucose levels of the three rats in the good control groups, rose quickly, whereas those of the rats in the sham operation and poor control groups, were sustained above 600 mg/dl, which was as high as the level before Bio-AEP removal.

The Bio-AEP removed from the rats in the good control group were intact. In contrast, in the poor control group, either the nucleopore membrane or the silicon ring had been damaged and the MIN6-cells had disappeared due to lysis.

No relationship was found between the location of the Bio-AEP in the abdominal cavity and the blood glucose levels.

We conclude that the Bio-AEP containing MIN6-cells is useful for a long-term normalization of blood glucose levels in diabetic rats.

緒 言

インスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus ; IDDM) では、強化インスリン療法を用いて血糖値の正常化を図っても、なお多くの症例において腎症、網膜症、神経障害などの併発を避けることはできないのが現状である。糖尿病性腎症に陥り、透析療法が必要となるに至った症例の予後は不良であり、網膜症、神経障害などのために、日常生活ではさまざまな支障が生じるようになる。長期的展望における生存率、quality of life の向上を目的として、膵腎同時移植が行われているが、viable な臓器の確保は現在の日本においては困難な場合が多い¹⁾。

このような合併症の発生や進行を阻止し得る治療法として、膵島移植の研究が進められている。この治療法における利点としては、multiple donor からの膵島を用いることが可能²⁾であり、長期凍結保存できる³⁾ので、手術を待機的に、かつ反復して行えることなどがある。また、膵移植で問題となる外分泌腺の処理が不要な点なども、その利点の一つとしてあげられよう。

膵島移植の方法としては2通りがあり、①膵島細胞を門脈内、肝、脾、腎被膜下、皮下、筋肉内などに移植する⁴⁾ものと、②免疫隔離作用を持つ device に膵島細胞を封入し、hybrid 型人工膵島として移植する⁵⁾ものがある。

①は免疫反応を回避する方法として、immunoalteration^{6)~8)}、immunosuppression⁹⁾¹⁰⁾の手法を用いており、移植細胞に高濃度酸素下培養、凍結保存、紫外線照射などの前処理を行ったうえ、steroid、cyclosporin、1,5-deoxyspergualin や tacrolimus などの免疫抑制剤を投与するものである。

これに対し②は immunoisolation¹¹⁾の手法を用

いており、高分子半透膜や高分子重合体などで膵島を包埋して隔離環境下におき、免疫反応を招来させないことから、免疫抑制剤の投与は必要としない。現在、この hybrid 型人工膵島には、diffusion chamber (DC)¹²⁾、microencapsulation¹³⁾、hollow fiber¹⁴⁾の3 type のものが研究されており、東京女子医科大学においてはわれわれが¹⁵⁾DC 型 bio-artificial endocrine pancreas (Bio-AEP) の開発を行っている。

今後、ヒトへ臨床応用していくためには、Bio-AEP が長期にわたり良好な血糖コントロール機能を発揮することを確認する必要がある。最近われわれは、0.2~0.6 μ m の pore size の Nucleopore membran (NM) を用いた Bio-AEP を、streptozotocin (STZ) にて惹起した糖尿病ラットの腹腔内に移植し、免疫隔離膜としての至適孔径の検討と、短期実験における Bio-AEP の血糖コントロール機能の評価を行ってきた¹⁶⁾。今回は長期実験として、0.2 μ m の pore size の NM を用いた DC 型 Bio-AEP を糖尿病ラットの腹腔内に移植し、32週間にわたって血糖値を追跡し、Bio-AEP の腹腔内における位置と血糖コントロール良否の関連性、摘出した Bio-AEP の肉眼的ならびに顕微鏡的な所見、および Bio-AEP 摘出後の血糖値の変化について検討した。

材料および方法

1. 使用したランゲルハンス島細胞の種類、培養基質ならびに人工膵の構造

1) 移植膵細胞：MIN6 cell

移植膵細胞としては、insulin promoter SV40 T 抗原遺伝子を C57bl/6 mouse に導入した transgenic mouse より樹立された mouse insulinoma cell line (MIN6 cell) を用いた¹⁷⁾。本 cell line は大阪大学医学部栄養学教室・宮崎純一より供給を

表1 細胞基質の成分

A) Composition of collagen-gel
8 volume: collagen solution Type I(LA)
1 volume: 10x RPMI 1640 without NaHCO ₃ and with 10mM nicotinamide
1 volume: sterile reconstitution buffer (2.2g NaHCO ₃ in 100ml of 0.05N NaOH & 200mM HEPES)
B) Composition of agarose-gel
1 volume: 4.0% agarose-solution & with 0.02% Hema-PVMA co-polymer
1 volume: 2x PRMI 1640 with NaHCO ₃
Composition of the mixed matrix
a) MIN6-cells in FBS(10% of the final concentration in the mixed matrix)
b) 1 volume of A)
c) 1 volume of B)

うけた。細胞は25cm² culture flask中に約80~90% confluentした時点で0.05~0.125% trypsin/0.5mM EDTA in PBSにて剥離し、RPMI 1640-medium (大日本製薬ラボラトリープロダクツ部, 大阪)中に採取,その後3日間,RPMI 1640-medium中で浮遊培養し,細胞の再凝集塊(islet-like cell clusters; ICCs)を作製した。

2) 細胞培養基質: mixed matrix¹⁸⁾ (表1)

細胞培養基質としては, 0.02% (W/V) PVMAを添加した4.0% (W/V) agaroseを用いた。使用に先立ち, 30分間オートクレーブにて滅菌し, これを2倍濃度のRPMIと等量に混合したのち, 等量のCellmatrix (Type 1 collagen gel; 新田ゼラチン, 東京)を加え10mMのnicotinamideを混じ, mixed matrixを作製した。このmixed matrix中における各成分の最終濃度は, 1.0% (W/V) agarose—0.005% (W/V) PVMA—0.015% (W/V) Type I collagen gel in RPMI 1640である。

3) Bio-AEPの構成 (図1)

Bio-AEPに用いたDCは, 板状円形で, 直径2.5cm, 厚さ0.5cmのsilicon ringの両面に, polycarbonateを素材とした選択的透過膜であるNM (Nuclepore Co. California, USA)を接着させたもので, 容量は2.0ml, NMのpore sizeは0.2μmである。このDCのsilicon ringの側面から18G注射針を穿刺し, mixed matrixに懸濁した

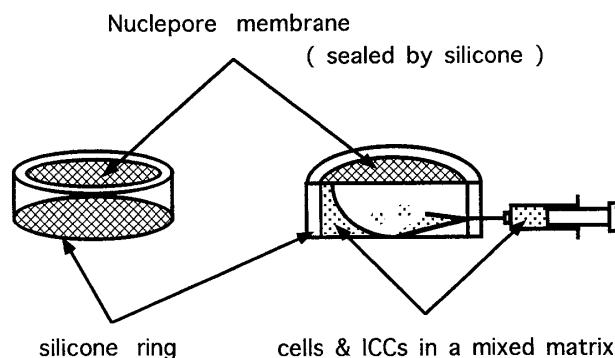


図1 Bio-AEPとして用いるdiffusion chamber silicon ringの両面にNuclepore membraneを装着し, その中に移植細胞 (ICCs) と mixed matrixを注入する。

MIN6 cellを注入した。この際, MIN6 cellが1 chamberあたり 8×10^6 cellとなるよう封入した。

2. Recipientならびに移植の方法

1) Recipient

Recipientとして用いた糖尿病ラットは, 4週齢の雌性Jcl; Wistar (体重150~200g)にSTZ 60 mg/kg·BW¹⁹⁾を尾静脈より静注して糖尿病を惹起した。固形飼料MF (オリエンタル酵母社, 東京)および飲料水は任意に与えた。

なお, 本実験のすべては東京女子医科大学動物実験倫理委員会規程に従って行っている。

2) 移植術および術後の観察項目

Pentobarbital sodium麻酔下 (5mg/100g·BW腹腔内注入)にて, recipientの腹腔内にBio-AEPを1匹に1 chamber, 位置の固定をせず移植した (n=6)。Sham operationとして, MIN6 cellを封入しないBio-AEPを同様の手技で移植した (n=3)。なお観察期間において, 両群ともに免疫抑制剤は投与しなかった。

3) 移植後の観察項目

移植後32週間にわたり, recipientの空腹時血糖および体重を測定した。32週目にpentobarbital sodium麻酔下に開腹し, 腹腔内諸臓器およびBio-AEPの位置, 外観を観察したのちBio-AEPを摘出した。またその後も35週までrecipientを生存させ, 引き続き空腹時血糖, 体重を測定した。

3. 組織学的検討

1) 移植後32週目にrecipient腹腔より摘出し

た Bio-AEP をブアン液（ピクリン酸飽和水溶液：ホルマリリン：氷酢酸＝15：5：1）で固定した後、HE 染色および PAP 染色を行い、組織学的変化を観察した。

2) 摘出した Bio-AEP の NM を切離し、2.5% グルタルアルデヒド（25% グルタルアルデヒド：0.05M カコジル酸緩衝液＝1：10）、2% 四酸化オスミウムで固定後、50、70、90、100% の各濃度のエチルアルコールで脱水した。続いて臨界点乾燥（HCP-1型日立臨界点乾燥装置：HITACHI）、Pt、Pd のコーティング（E-102型イオンスパッター：HITACHI）を行い、膜ならびに表面に付着している細胞などを走査電顕（S-800型電界放射型走査電子顕微鏡：HITACHI）で観察した。

3) 移植後35週目に recipient を pentobarbital sodium 麻酔下に犠牲死させ、自己臍を摘出し、ブアン固定後、HE 染色および PAP 染色を行い、組織学的に検討した。

結 果

STZ を投与したラット 9 匹は、全例 3 週間以上にわたり空腹時血糖が 300mg/dl 以上となったので、sham operation 3 例、Bio-AEP 移植群 6 例の 2 群に分け recipient として実験に供した。

1. Bio-AEP 移植後35週の体重の推移（図2）

いずれのラットも、移植後16週までは体重増加がみられたが、以後、sham operation 群 3 例（No. 1, 2, 3）は徐々に体重が減少し、35週目の平均体重は、実験開始時体重より平均2.26%の増加であった。これに対し、Bio-AEP 移植群は、観察期

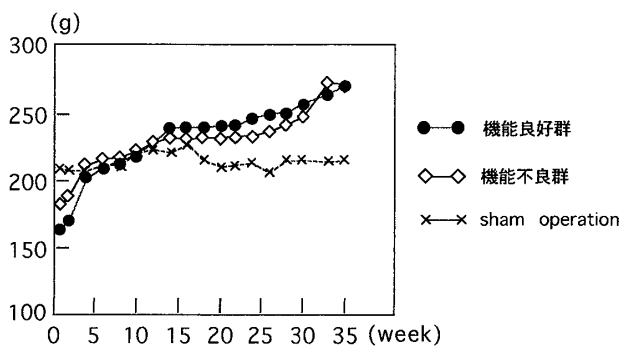


図2 機能良好群（No. 4, 5, 6）、機能不良群（No. 7, 8, 9）、sham operation 群（No. 1, 2, 3）の平均体重の推移

間中、持続的に体重増加がみられ、35週目の平均体重は、実験開始時体重より平均56.90%の増加であった。しかし個々のラットによる相違があり、後述する血糖コントロール良好であった 3 例（No. 4, 5, 6）は、血糖コントロール不良であった 3 例（No. 7, 8, 9）に比し、体重増加が多い傾向がみられた（66.45% vs 48.47%）。

2. 移植後32週間、および Bio-AEP 摘出後の空腹時血糖の推移（図3）

Sham operation 群 3 例（No. 1, 2, 3）と、Bio-AEP 移植群 6 例（No. 4, 5, 6, 7, 8, 9）の空腹時血糖の経過を示した。Bio-AEP を移植した

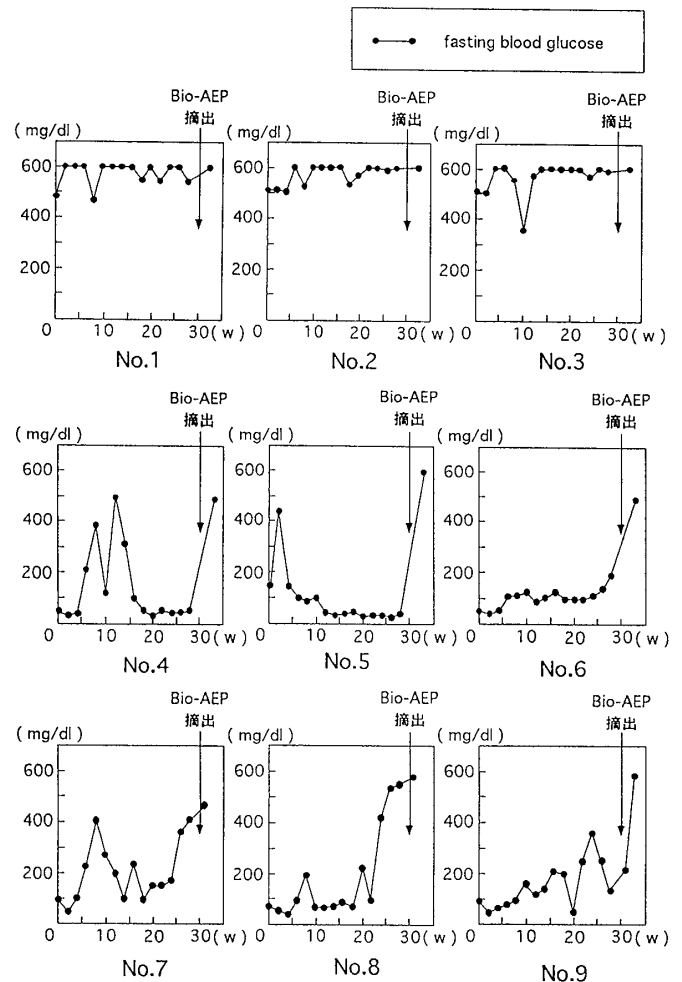


図3 ラット個別の空腹時血糖

No. 1, 2, 3の sham operation 群は Bio-AEP 移植後、摘出後も空腹時は 600mg/dl 以上の高値で経過。No. 4, 5, 6は Bio-AEP 移植後、空腹時血糖は正常化、摘出後、血糖は 600mg/dl 以上に上昇（機能良好群）。No. 7, 8, 9は Bio-AEP 移植後24週から血糖上昇（機能不良群）。

6例のうち、No. 4, 5, 6の3例は、15~32週にわたり、空腹時血糖が100mg/dl以下で経過し、血糖コントロール良好であった(機能良好群)。それに対し、No. 7, 8, 9の3例では、Bio-AEP移植後の空腹時血糖は不安定で、殊に24週目以降では、血糖値の上昇傾向を示した(機能不良群)。Sham operation群3例では移植直後から32週まで、空腹時血糖は600mg/dl以上で推移した。

これら9例において移植後32週目にBio-AEPを摘出し、その後の血糖を観察したところ、機能良好群3例はBio-AEP摘出後から急激に血糖コントロール不良となり、空腹時血糖値は500mg/dl以上となった。Sham operation群3例と機能不良群3例は摘出前と同様に500~600mg/dl以上の高血糖状態を持続した。

3. Bio-AEPの所見と血糖値

1) Bio-AEPの腹腔内における位置、外観(図4, 5, 6, 表2)

開腹したところ、腹腔内には感染、臓器間の高度癒着、イレウスなどは認められなかった。Bio-AEPは容易に見出され、その存在部位は、No. 4, 6, 7では肝下面の門脈近傍、No. 5, 8では正中から左側の臍高で小腸に埋るように、No. 9では左上腹部の胃の腹側に位置していた。

外観としては、機能良好群のNo. 4, 5, 6では、Bio-AEPは網目状の血管が表面を覆う薄い線維性被膜に包まれるか、または大網が被覆しているもの大網を挙上するとBio-AEPが容易に露出し、周囲臓器との癒着は全くなかった。Bio-AEP内容は白色または軽度黄色で、DCのsilicon ring, membraneの損傷は認められなかった(図

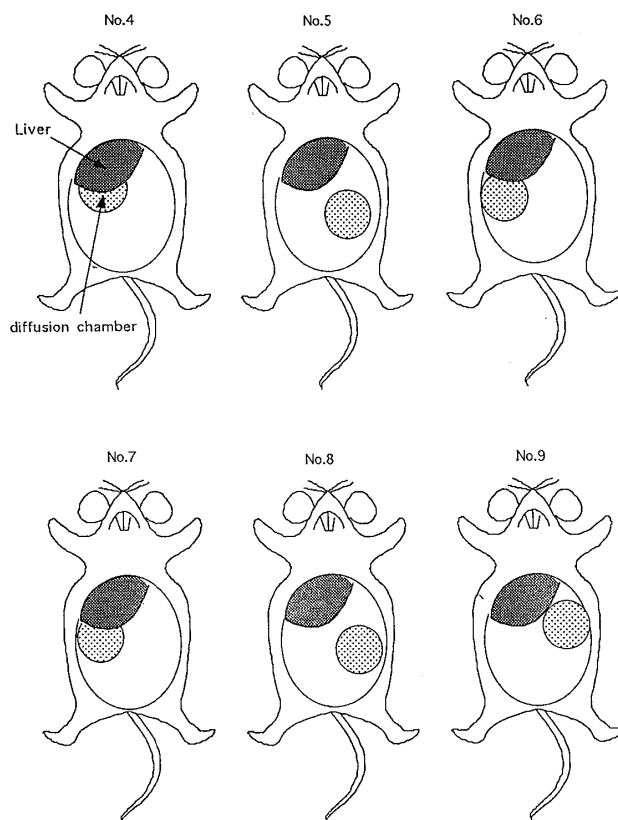


図4 腹腔内におけるBio-AEPの位置

5, 表2)。

機能不良群のNo. 7, 9では、NMがsilicon ringより剥離し、その間隙からrecipientの大網がDC内に侵入、充満し、MIN6 cellおよびmixed matrixは完全に消失していた。No. 8では、Bio-AEPは膨隆した厚い赤褐色の線維性被膜に覆われ、被膜に切開を加えるとDC周囲に褐色の液体が貯留しており、DC内は茶褐色を呈し、MIN6 cellは融解壊死に陥っていた。このDCのsilicon ring側面には、MIN6 cell注入の際、18G針で穿

表2 Bio-AEPの位置と外観

	Bio-AEPの位置	Bio-AEPの外観	血糖コントロール
No. 4	肝下面, 門脈近傍	Bio-AEP内白色, 大網で覆われ, 癒着なし	good
No. 5	左臍高, 小腸に埋没	Bio-AEP内黄白色, 癒着なし	good
No. 6	肝下面, 門脈近傍	Bio-AEP内白色, 大網で覆われ, 癒着なし	good
No. 7	肝下面, 門脈近傍	Bio-AEP膜損傷, Bio-AEP内に大網侵入	poor
No. 8	左臍高, 小腸に埋没	silicon ringに針孔損傷, Bio-AEP内融解壊死	poor
No. 9	左上腹部	Bio-AEP膜損傷, Bio-AEP内に大網侵入	poor

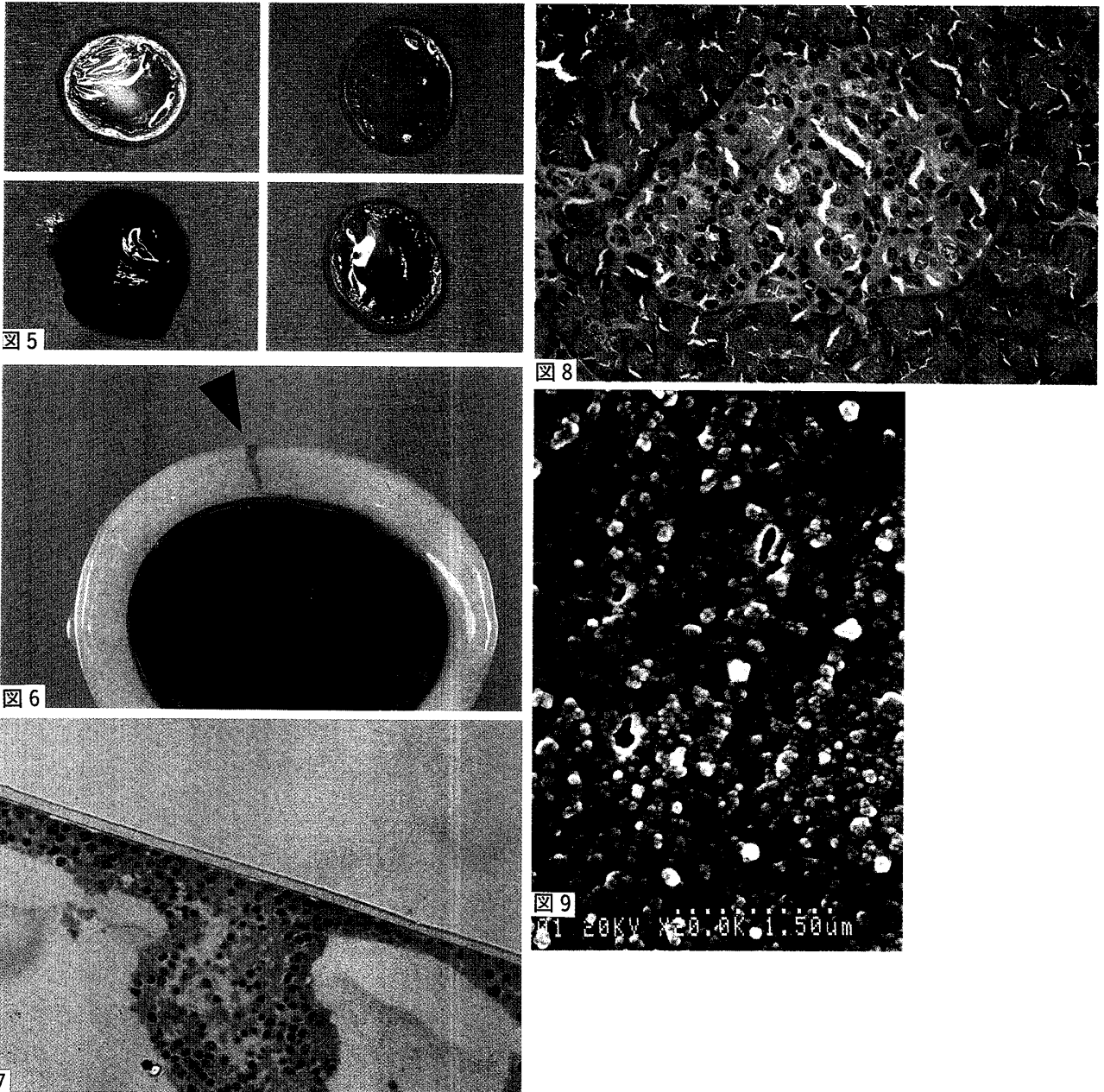


図5 抽出した Bio-AEP

左上) No. 4, 白色で Bio-AEP の損傷なし. 右上) No. 5, 黄白色で Bio-AEP の損傷なし. 左下) No. 8, Bio-AEP は厚い褐色の繊維性被膜で包まれている. 右下) No. 9, Bio-AEP の NM 接着が損傷し, 間隙から大網が侵入.

図6 No. 8から抽出した Bio-AEP

silicon ring に細胞注入操作時の穿孔孔損傷 (▼) が認められる. Bio-AEP 内は融解壊死に陥っている.

図7 No. 4から抽出した Bio-AEP の組織学的所見

Nucleopore membrane 直下に MIN6 cell が重層するように並んでいる.

図8 No. 4から抽出した自己臍の病理学的所見

PAP 染色による検索において, インスリン産生細胞はほとんど欠落し, グルカゴン産生細胞が主な集落を形成していた.

図9 No. 6から抽出した Bio-AEP の走査電顕像

リンパ球, 血小板, フィブリンなどが付着しているため, Nucleopore membrane 表面の詳細な観察は不能.

刺した部位に亀裂が入り損傷していることが確認された(図5, 6, 表2).

2) 摘出した Bio-AEP の組織学的所見(図7).

血糖コントロールが良好であった No. 4より摘出した Bio-AEP の組織学的所見を図7に示す. NM直下に viable な MIN6 cell が集積しており, リンパ球浸潤などは認められなかった. PAP染色では細胞内にインスリン分泌顆粒が確認された.

3) Recipient 自己臍の肉眼的および病理学的所見(図8)

自己臍は萎縮, 軟化しており, 色調は赤褐色に変化していた. 病理学的所見としては, PAP染色による検索において, インスリン産生細胞はほとんど欠落し, 主としてグルカゴン産生細胞が集落を形成していた.

4) NM の電顕所見(図9)

摘出した Bio-AEP 膜表面には, 血球細胞, 結合組織などが付着しており, 走査電顕では膜孔径の詳細な観察は不能であった.

考 察

DC型 Bio-AEP は, 大きく3つの要素, ①移植細胞, ②細胞培養基質, ③免疫隔離機構を持つ device, によって構成されている.

①移植細胞: 正常臍島細胞の他に, 最近では遺伝子工学的手法を用いた transgenic insulinoma 細胞株¹⁷⁾や, 臍内分泌細胞でない細胞, たとえば AtT20細胞²⁰⁾や, fibroblast²¹⁾にヒトインスリン遺伝子を挿入する方法が試みられている. 今回の実験でわれわれは広義の遺伝子細胞療法として, insulin promoter SV40T 抗原遺伝子を C57bl/6 mouse に導入した transgenic mouse より樹立された mouse insulinoma cell line を用いた¹⁷⁾. この株化細胞には MIN6 と MIN7 があり, MIN6 cell は glucose transporter (GLUT 2) を持ち, 血糖値の変動に対応して正常臍細胞と同様のインスリン分泌がおこるため, 本細胞株を使用した.

②細胞培養基質: 移植する細胞が人工臓器のなかで長期間におよび機能維持を保つような基剤を選択しなければならない. 従来用いられてきた基剤には, alginate-polylysine¹³⁾, chitosan-

alginate²²⁾, polyacrylate²³⁾, agarose gels²⁴⁾ などがあるが, 最近, 岩田ら²⁵⁾は, microencapsulated islets に5%高濃度 agarose を用いている. 従来のスフェロイド(多細胞性球状凝集塊)や細胞包埋アガロースまたはコラーゲンゲルなどにおける三次元再構築体細胞²⁶⁾には毛細血管系がないため, 内部構成細胞の活性は, 新鮮な培養液の拡散浸透性に依存している. そのため, 再構築体が大きくなるほど, 長期間の維持が困難になるという欠点がある. そこでわれわれは, 細胞によりよい環境を与えるため, すなわち, 培養液を流通させる人工環境(matrix)として, 吸水性と適度な柔軟性を有するような環境を作るために, 1.0%低濃度 agarose と糖鎖を含有した高分子重合体, および extracellular matrix を混合した mixed matrix を考案した.

③Device: 免疫隔離作用を有する高分子重合体または免疫隔離膜を用いて作製する. Microencapsulated islets の基剤として, 岩田²⁷⁾は5.0% agarose と polystyrene sulfonic acid (PSSa) などの高分子重合体を用いている. 免疫隔離膜としては, Amicon XM-50 membrane²⁸⁾, Millipore membrane²⁹⁾, Sartorius membrane などを用いた報告がなされている. われわれの実験では NM¹⁵⁾を用いており, この膜は, Millipore membrane や Sartorius membrane の膜に比し, 膜厚が薄く, 均一な孔径を有している. 最近, われわれは, pore size 0.2~0.6 μ m の NM にて作製した Bio-AEP を用いて短期実験を行い¹⁶⁾, 0.2 μ m の群で良好な血糖コントロールを得たことを報告した. この実験より, NM が免疫隔離機能を発揮するのに至適な pore size は0.2 μ m と考えられたので, 今回の長期異種移植実験においては0.2 μ m の pore size の NM を用いた. また, NM の生体適合性をみるために, 長期移植後の膜表面の変化を光学顕微鏡および走査電顕で観察した. Immunoisolation の概念に基づいている Bio-AEP が良好な機能を発揮するためには, DC が長期間にわたり intact に保たれていることが必須と考えられる.

DC型 Bio-AEP 移植後, 32週まで観察可能で

あった糖尿病ラット9例（機能良好群3例，機能不良群3例，sham operation群3例）のうち，良好な血糖コントロールを示した3例のラットから摘出したBio-AEPを観察したところ，いずれもDCの損傷はなく，また封入したMIN6 cellは良好な状態で保たれていた。

機能良好群3例におけるBio-AEPの腹腔内での位置についてみると，2例は門脈近傍の肝下面に位置しており，1例は左側腹部，小腸間に埋没しており，Bio-AEPの腹腔内位置には個体により相違がおきた。これは移植したDCが腹腔内において異物として認識されにくいいため，他臓器との癒着がおこらずに可動性をもって腹腔内に存在していたためと推測される。このことは免疫隔離膜として用いたNuclepore membraneが，生体内において異物として認識される可能性が極めて低いことを反映したものである。

これに対し，血糖コントロールが不良であった3例では，明らかなDCの損傷が確認された。3例中1例は，Bio-AEP作製過程においてMIN6 cellをDCに封入する際の針穴の不完全閉鎖によるものであった。この不完全閉鎖を防ぐためには，Bio-AEPを作製する際，異種細胞封入針を18G以下のものを用いるか，針穴をシリコンオイルなどで閉鎖する方法を考慮すべきと考える。

他の機能不良を示した2例はBio-AEPの膜の破損によるもので，膜がシリコンリングに接着されている部から剝離，その間隙から大網が侵入し，DC内容および周囲に強固に癒着していた。この破損の原因は，移植期間中に生じた膜とシリコンの接着部の劣化によるものと推定される。今後はこの点についても改良を加えるべきと考えられた。

光学顕微鏡的観察においては，NM表面に線維性被膜は認められなかった。走査電顕的観察では，フィブリンや血球細胞の付着により膜表面が覆われ，poreの開存は確認できなかった。しかし，長期間の血糖正常化が観察された点から，膜孔は機能的に開存していたものといつてよからう。

以上の実験結果から，MIN6 cellをbioreactorとして封入したDC型Bio-AEPは，免疫隔離能

および生体適合性に優れ，将来的に免疫抑制剤を必要としない長期異種移植の臨床応用を可能にするものと考えられる。

結 論

1. Transgenic mouseより樹立されたMIN6 cellを，semipermeable membraneであるNuclepore membraneで包埋したhybrid型人工膵島，Bio-AEPを作製した。

2. Bio-AEPの移植により，32週にわたり実験的糖尿病ラットの空腹時血糖を正常に維持することができた。

3. Pore sizeが $0.2\mu\text{m}$ のNuclepore membraneにおいて，長期間の免疫隔離が可能であった。

4. Nuclepore membraneは生体適合性に優れた膜であることが示された。

5. Nuclepore membraneとsilicon ringの接着法，および，細胞注入時に使用する針のサイズや，穿刺孔の閉鎖に関して，さらに検討する余地がある。

本研究は第3回吉岡博人記念総合医学研究奨励金および文部省科学研究費補助金にて行った。

なお，本論文の一部を第23回膵・膵島移植研究会(1996年，島根)にて発表した。

文 献

- 1) 寺岡 慧，馬場園哲也，星野智昭ほか：臓器の問題—膵移植の現況と今後の課題—Diabetes Frontier 4 : 61-66, 1993
- 2) Gotoh M, Porter J, Kanai T et al: Multiple donor allotransplantation. A new approach to pancreatic islet transplantation. Transplantation 45 : 1008-1012, 1988
- 3) Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA et al: Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 35 : 89-95, 1992
- 4) 谷口 洋：臓器の問題—膵島移植—。Diabetes Frontier 4 : 34-45, 1993
- 5) 大河原久子，河村真規子：臓器の問題—細胞植え込み型人工臓器—。Diabetes Frontier 4 : 46-52, 1993
- 6) Lacy PE, David JM, Finke EH: Prolongation of islet allograft survival following in

- vitro culture (24°C) and single injection of ALS. *Science* 204 : 312-313, 1979
- 7) **Lacy PE, Finke EH, Janney CG et al**: Prolongation of islet xenograft survival by in vitro culture of rat megaislets in 95% O₂. *Transplantation* 33 : 588-592, 1982
 - 8) **Lau H**: Prolongation of rat islet allograft survival by direct ultraviolet irradiation of the graft. *Science* 223 : 607-609, 1984
 - 9) **Dickneite G, Walter P, Schorlemmer HU et al**: The immunosuppressive properties of 1, 5-deoxyspergualin and its effects on experimental skin and islet cell transplantation. *Recent Adv Chemother* 21 : 949-950, 1985
 - 10) **Yasunami Y, Ryu S, Kamei T et al**: Effects of a novel immunosuppressive agents, FK-506, on islet allograft survival in the rat. *Transplant Prac* 21 : 2720, 1989
 - 11) **Lanza RP, Sullivan SJ, Chick WL**: Islet transplantation with immunoisolation. *Diabetes* 42 : 1503-1510, 1992
 - 12) **Galletti PM, Altman JJ**: Extracorporeal treatment of diabetes in man. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 30 : 675-677, 1984
 - 13) **Sun AM, O'shea GM, Goosen MFA**: Injectable microencapsulated islet cells as a bioartificial pancreas. *Appl Biochem Biotechnol* 10 : 87-99, 1984
 - 14) **Maki T, Otsu I, O'Neil J et al**: Treatment of diabetes by xenogeneic islets without immunosuppression. Use of a vascularized bioartificial pancreas. *Diabetes* 45 : 342-347, 1996
 - 15) **Ohgawara H, Nishijima-Karibe S, Satoh A et al**: New type of bioartificial pancreas employing a diffusion chamber. *Artif Organ* 14(Suppl 3) : 11-14, 1990
 - 16) **Ohgawara H, Miyazaki J, Nishijima-Karibe S et al**: Embedded-culture of pancreatic β -cells derived from transgenic mouse insulinoma as a potential source for xenotransplantation using a diffusion chamber. *Cell Transplant* 4(Suppl 3) : 307-313, 1995
 - 17) **Miyazaki J, Arai K, Yamato E et al**: Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion-special reference to expression of glucose transporter isoform. *Endocrinology* 127 : 126-132, 1990
 - 18) **Ohgawara H, Kobayashi A, Kawamura M et al**: Development of a method for embedded culture of pig pancreatic islet-like cell clusters in agarose containing maltose-carrying polystyrene (HEVM) and nicotinamide. *Cell Transplant* 3 : 83-89, 1994
 - 19) **岡本 宏**: 膵 β 細胞破壊と防止についての岡本モデルとその展開. *糖尿病* 37 : 99-102, 1994
 - 20) **Hughed SD, Johnson JH, Quaade C et al**: Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 688-692, 1992
 - 21) **Selden RF, Skoskiewics MJ, Russell PS et al**: Regulation of insulin-gene expression : Implications for gene therapy. *N Engl J Med* 317 : 1067-1076, 1987
 - 22) **Matthew HWT, Salley SO, Peterson WD Jr**: Microencapsulated hepatocytes. *Trans Am Soc Artif Organs* 37 : 328, 1991
 - 23) **Lacy PE, Hegre OD, Vazeou AG et al**: Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenograft of encapsulated islets. *Science* 254 : 1782-1784, 1991
 - 24) **Lacy PE, Kostianovsky M**: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16 : 35, 1967
 - 25) **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 1) : 224-225, 1989
 - 26) **大河原久子, 河合達郎, 寺岡 慧**: 細胞植え込み型人工膵臓—Diffusion chamberによる異種移植の可能性について—. *人工臓器* 20 : 209-212, 1991
 - 27) **岩田博夫**: 異種ラ島を用いたバイオ人工膵臓の現状と問題点. *今日の移植* 8 : 307-320, 1995
 - 28) **Knazek RA, Kohler PC, Gullins PM**: Hormone production by cell growth in vitro on artificial capillaries. *Exp Cell Res* 84 : 251, 1974
 - 29) **Valente V, Feno M, Campsisi C et al**: Allogeneic pancreatic islet transplantation by means of artificial membrane chamber in 13 diabetic patients. *Transplant Proc* 12 : 223-226, 1980