

原 著

ブタ自家膵島移植モデルの作製

張 正 堃

新潟大学大学院医歯学総合研究科

消化器・一般外科学分野(第一外科)

(指導：若井俊文教授)

Development of Autologous Islet Transplantation Model with Swine

Zhengkun ZHANG

*Division of Digestive and General Surgery,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Toshifumi WAKAI)*

## 要 旨

【緒言】膵島移植は血糖コントロールがきわめて困難な1型糖尿病患者に対して実施される細胞移植治療である。5年後のインスリン離脱率は約15%にすぎず、未だ十分な成績には至っていない。膵島移植の治療成績の向上のためには良好な動物モデルでの検討が不可欠であり、臨床に即した大動物モデルが必要である。今回われわれは慢性膵炎に対する自家膵島移植の手技に着目し、ブタを用いた膵全摘によるインスリン依存性糖尿病モデルおよび自家膵島移植モデルの作成が可能かどうかを検証した。さらに2型糖尿病に用いられる Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が自家膵島移植に与える影響についても検証した。

【対象と方法】15-25 か月齢、体重 9-25kg のブタを用いた。自家膵島移植に用いられる膵全摘の手技を応用した糖尿病モデルを作成した (n=4, 糖尿病群)。次に切除膵を用いた自家膵島移植モデルを作成した (n=4, 膵島移植群)。膵島分離は Ricordi 法に準じて行い、経門脈的に肝内へ移植した。さらに膵島移植に GLP-1 を投与したモデルを作成した (n=4, 膵島移植+GLP 群)。以上の実験群に対して、術後 7 日間経過観察を行い、生存率、空腹時血糖値の推移、術前、術後 7 日目の経静脈的ブドウ糖負荷試験による内分泌機能を評価した。また術後 7 日目に膵島移植群の肝生検を行い組織学的に膵島生着の有無を検討した。

【結果】糖尿病群、膵島移植群、膵島移植+GLP 群の術後 7 日目の生存率はそれぞれ 25% (1/4) , 75% (3/4) , 100% (4/4) であった。糖尿病群に比べ、膵島移植+GLP 群では生存率が改善した (p=0.0404)。糖尿病群において死亡した 3

頭の死因は、高血糖による脱水 (n=2) と腹腔内感染症 (n=1) であった。膵島移植群で死亡した1頭の死因は門脈塞栓であった。術後7日間の血糖値は糖尿病群で  $289.7 \pm 141.7$  mg/dl と高値であったが、膵島移植群では  $123.4 \pm 88.4$  mg/dl と改善し (p=0.0384) , 膵島移植+GLP群では  $67.4 \pm 23.8$  mg/dl と膵島移植群からさらに改善した (p=0.0118) 。術後7日目の経静脈ブドウ糖負荷試験では、糖尿病群の1頭は著明な高血糖を示したが、膵島移植群, 膵島移植+GLP群では術前に比べ血糖値の増悪は認められなかった。膵島移植群の術後7日目の肝生検で門脈内に移植膵島の生着を確認した。

**【結論】** 膵全摘によるブタ糖尿病モデルおよび自家膵島移植モデルの作成に成功した。GLP-1 は移植膵島の耐糖能を改善する可能性が示唆された。

**キーワード：** 動物実験, 糖尿病, 膵全摘, 膵島移植, ブドウ糖負荷試験, GLP-1

**Reprint requests to:** Zhengkun ZHANG

Division of Digestive and General Surgery,

Niigata University Graduate School of Medical

and Dental Sciences,

1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,

Niigata , 951-8510, Japan.

**別刷請求先：**〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野（第一外科）

張 正堃

## 結 言

膵島移植は血糖コントロールがきわめて困難な1型糖尿病患者に対して主に欧米にて実施されている細胞移植治療である。膵島移植は臓器そのものを移植する膵臓移植に比べ、手術侵襲が低く安全性が高いという利点があるが、インスリン離脱状態を達成するために複数の脳死ドナーからの移植が必要であるとされ<sup>1)2)</sup>、ドナー不足が深刻なわが国において難しい課題である。現在、欧米の移植膵島の5年後の生着率は約80%とされている。しかし、5年後のインスリン離脱率は約15%にすぎず、未だ十分な成績に至っていない<sup>3)</sup>。本邦においては、欧米に比べ症例数は少ないものの2007-2010年の3年インスリン離脱率は44%と報告されている<sup>4)</sup>。インスリン離脱率が低い原因として、移植直後に移植膵島が門脈血と接触することにより、凝固系、補体系が著しく活性化され、原始免疫反応が惹起される状態 (instant blood-mediated inflammatory reaction: IBMIR) や、門脈内での虚血、低酸素状態による移植膵島の喪失、免疫抑制剤による膵島毒性などが考えられている<sup>5)</sup>。これらの困難な課題を解決するため、臨床に即した大動物による糖尿病実験モデルが不可欠であるが、安定した糖尿病モデルの報告は少ない<sup>6)7)</sup>。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は現在広く臨床で使用される2型糖尿病治療薬である。GLP-1にはインスリン分泌促進作用の他に、膵β細胞保護作用や膵β細胞増殖作用を有することが報告されている<sup>8)</sup>。膵島移植にGLP-1を併用することで、インスリン離脱率が改善する可能性が示唆されている<sup>9)</sup>。今回われ

われは，慢性膵炎に対する自家膵島移植の手技に着目し<sup>10)</sup>，ブタを用いて膵全摘によるインスリン依存性糖尿病モデルの作成が可能か検討した．また，臨床と同様に経門脈的に肝内に膵島を移植する自家膵島移植モデルが作成可能かを検討した．さらに2型糖尿病治療薬のGLP-1を自家膵島移植モデルに投与し，その影響を検討した．

## 材料と方法

本研究は，新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け，新潟大学動物実験指針，ARRIVE ガイドライン<sup>11)</sup>，および実験動物の管理と使用に関する指針<sup>12)</sup>に従って実施した．

### 1. 動物実験モデル

#### 1-1. 膵全摘による糖尿病モデル（糖尿病群）の作成

15-25 か月齢，体重 9-20 kg のブタ（オリエンタル酵母工業 ゲッチンゲンミニブタ，ゼンノープレミアムブタ）を使用した．ブタは少なくとも実験開始1週間前に動物実験施設に搬入し順化の期間とした．飼育施設は準清潔区域であり，室温は 24.1-25.9 °C，湿度は 35-53%，照明により昼は 12 時間，夜は 12 時間に調整されている．食餌（MP-A，オリエンタル酵母工業）は 1 日あたり

864.0 ± 9.9 kcal/300g 与え、水分は給水管より自由に摂取可能とした。実験当日は禁食とした。ミダゾラム 0.02 mg/kg と塩酸メドトミジン 0.04 mg/kg を筋注し麻酔導入後、イソフルラン 1.0–1.2%、酸素 50%、空気 50%で麻酔維持を行った。体位は仰臥位とし、手術中の体温は 37.0 ± 0.5 °C に維持した。術野を消毒後、左外頸静脈を露出し、中心静脈カテーテルを留置した。抗生剤としてペニシリン 2 万単位/kg を投与後、術中補液として外頸静脈カテーテルより重炭酸リンゲル液 20 ml/kg/時間を投与した。膵全摘は過去の報告<sup>6) 7)</sup>を参考に臨床の自家膵島移植の術式<sup>10)</sup>を応用した。上腹部正中に 20 cm の皮膚切開を加え開腹した。通常脾臓が創部直下に認められ、膵臓の手術の際には術野の妨げとなるため、はじめに短胃動静脈および脾動静脈を結紮切離し脾臓を摘出した (図 1-A)。胃を頭側へ、結腸小腸を尾側へ圧排し膵臓を露出させ、膵尾側から頭側に向かって膵臓を周囲組織から剥離した。ブタの膵臓は、上腸間膜静脈を 360° 取り囲んでいるため、上腸間膜静脈背側で膵を一旦離断し剥離をすすめた。腹側膵 (ヒトでは膵鉤部に相当) はかなり背側尾側まで伸びていることが多いため、膵組織の遺残がないように十分確認を行った。門脈および上腸間膜静脈へは膵臓からの細い流入血管が多く、容易に損傷しやすいため、門脈にテーピングを行い、慎重に血管を結紮切離し処理した。膵頭部には結腸が癒着しているため、これを剥離し膵頭部を十分露出した。膵頭部を十二指腸から剥離して尾側からの剥離ラインに連続させるが、その際十二指腸沿いの血管のアーケードを確実に温存することが重要であり、これで十二指腸全温存の膵全摘が可能となった。膵管を十二指腸近傍で結紮切離し膵を全摘した (図 1-B)。胆管は直接十二指腸に流入する

ため胆道再建の必要はない。膵全摘後（図 1-C）に摘出した膵重量を測定した（図 1-D）。腹腔内の止血を確認後，閉創した。全身麻酔を終了し飼育ケージへ戻し十分な覚醒を確認した。手術の所要時間は約 2 時間，出血量は少量であった。

## 1-2. 膵全摘および自家膵島移植モデル（膵島移植群）の作成

1-1 で述べた手順で全身麻酔を行い，左外頸静脈へカテーテルを挿入ののち膵臓を全摘した。摘出した膵臓は門脈付着部で離断し，尾側膵（約 50%）を自家膵島移植に用いた。尾側膵の主膵管に 24 ゲージの血管留置用カテーテルを素早く挿入し，カテーテルと膵管を固定した。4 °C の UW 液（University of Wisconsin Solution）で満たした滅菌容器の中に尾側膵を入れ，浸潤保存した。脾静脈から 16 ゲージのカテーテルを挿入し，膵島細胞移植の投与経路とした。

膵島分離はバックテーブルで行い，清潔操作で実施した。コラゲナーゼ 250 mg（Collagenase NB8，Serva Electrophoresis，Uetersen，Germany）をハンクス液 50 ml で溶解し 4 °C に冷却した。膵臓を UW 液から取り出し，ハンクス液で洗浄した後，氷冷した金属トレイ内でコラゲナーゼ溶液を主膵管より灌流させた。灌流時間は 10 分間で，開始 5 分は 80 mmHg，後半 5 分は 180 mmHg の灌流圧で行った。膵臓の膨化を確認後，膵を外科鉗で細切し 7 つのステンレスボールとともに Ricordi チャンバー<sup>13)</sup> に入れた。膵臓消化のシステム（図 2）はコラゲナーゼ溶液を再灌流しながら行った。コラゲナーゼ溶液の温度を 5 分以内に 37 °C



に上昇させるように恒温槽の温度を調整した。コラゲナーゼ溶液が循環している灌流システムから数分おきに 1 ml のサンプルを取り、顕微鏡で膵島の分離状態を確認した。十分な消化が確認できた時点で灌流液を RPMI 培養溶液 (RPMI 1640, lifetechnologies corporation) で希釈ししながらコニカルチューブへ回収し氷冷した。遠心分離 (1000 回転×1 分間) を行い、CMRL 培養溶液 (CMRL lifetechnologies corporation) で洗浄した。消化された膵島組織の純化は行わず、2500-3000 IEQ/kg (islet equivalent/kg body weight) に膵島を調整し、脾静脈から経門脈的の肝内へ移植した。肝門圧を適宜モニタリングしながら膵島の投与速度を調整した。移植前に 40 U/kg のヘパリンを経静脈的に投与した。移植終了後、脾静脈のカテーテルを抜去し、カテーテル挿入部を結紮した。止血を確認後、閉創して全身麻酔を終了し、飼育ケージへ戻した。膵島分離から移植終了までは約 2 時間で、その後の管理は糖尿病群と同様に行った。

### **1-3. 自家膵島移植に GLP-1 を投与したモデル (膵島移植+GLP 群) の作成**

膵全摘および自家膵島移植モデルを作成する際、肝内へ膵島を移植すると同時に GLP-1 アゴニストの持続性エキセナチド (ビデュリオン<sup>®</sup>, アストラゼネカ, Wilmington, DE) 50  $\mu$ g/kg を 1 回皮下へ投与した。その後の処置および管理は膵島移植群と同様に行った。

### **1-4. 術後管理**

術直後から自由飲水とし，手術翌日から食餌を1日あたり  $864.0 \pm 9.9$  kcal/300g 与えた．脱水防止のため外頸静脈より重炭酸リンゲル液 20 ml/kg/日 を連日投与した．術後7日間経過観察を行い，術後合併症および生存率について検討した．7日目にミダゾラム 0.02 mg/kg と塩酸メドトミジン 0.04 mg/kg を筋注し麻酔導入後，イソフルランで深昏睡を得た後，KCL (1 mEq/ml) 10 ml の静脈投与により安楽死させた．

## 2. 血糖測定

血糖測定 (mg/dl) の採血は耳静脈から行い，LFS クイックセンサー (ライフスキャン社) と血糖測定器 (ワンタッチウルトラビュー，ライフスキャン社) を用いて行った．

## 3. 経静脈内ブドウ糖負荷試験による内分泌機能評価

術前および術後7日目に経静脈内ブドウ糖負荷試験を実施した．ブタを鎮静した状態で，10%ブドウ糖 0.5 g/kg を静脈内投与し，0，5，10，15，20，30，40，50，60，90 および 120 分に採血を行い，血糖値 (mg/dl) ，血清インスリン ( $\mu$  IU/ml) を測定した．

## 4. 組織学的評価

膵島移植後7日目のブタの肝臓組織を採取し，ホルマリンで固定を行い，パラフィン包埋した．パラフィン包埋ブロックから連続2切片を作製し，1枚目はヘ

マトキシリン・エオジン (HE) 染色, 2 枚目はインスリン免疫染色を行い, インスリン陽性細胞を観察した. 一次抗体は Guinea pig anti-porcine insulin(Dako, Carpinteria, CA, USA), 二次抗体は VECTASTAIN ABC Guinea Pig IgG Kit(Dako, Carpinteria, CA, USA)を用いた.

## 5. 統計学的解析

統計学的解析は SPSS Statistics (version 22, IBM, Tokyo, Japan) を用いて行った. 測定値は平均値±標準偏差で表示した. 血糖値の比較には Mann-Whitney U test を用いた. 累積生存率を Kaplan-Meier 法により算出し, logrank 法で検定した. 両側 P 値 < 0. 05 を統計学的有意とした.

## 結 果

### 術後合併症および生存率の検討

糖尿病群の術後 7 日目の生存率は 25%(1/4)であった. 死亡した 3 頭はすべて術後 3 日目に死亡しており, 3 頭ともに術後は経口からの食餌, 水分摂取不良を認めていた. 剖検所見では, 腹腔内の感染所見を認めた 1 頭以外は異常所見を認めなかった. 死因は高血糖による脱水が 2 頭, 腹腔内感染症が 1 頭であった. 膵島移植群の術後 7 日目の生存率は 75%(3/4)であった. 死亡した 1 頭は術後 1 日目に死亡し, 剖検所見では, 著明な腸管うっ血を伴う門脈塞栓を認めた. 死因は

移植膵島による門脈塞栓症であった。膵島移植+GLP 群の生存率は 100% (4/4) であった。膵島移植を追加しても糖尿病群の生存率は改善しない ( $p=0.3609$ ) が、膵島移植に GLP-1 を投与することで生存率が改善した ( $p=0.0404$ ) (図 3)。

### 術後血糖値の検討

術後 7 日間の空腹時血糖の推移を検討した(図 4-A)。糖尿病群では経時的に血糖が上昇し不安定化した。術後 7 日間の血糖値は糖尿病群で  $289.7 \pm 141.7$  mg/dl であった。糖尿病群の血糖値に比べ膵島移植群の血糖値は  $123.4 \pm 88.4$  mg/dl ( $p=0.0384$ )，膵島移植+GLP 群の血糖値は  $67.4 \pm 23.8$  mg/dl といずれも改善した ( $p=0.0006$ )。また，膵島移植+GLP 群では膵島移植群に比べても血糖値が改善した ( $p=0.0118$ ) (図 4-B)。

### 経静脈ブドウ糖負荷試験

術前と術後 7 日目に経静脈ブドウ糖負荷試験を実施した。糖尿病群の 1 頭は著明な高血糖を示し、ブドウ糖負荷後の血清インスリンは測定感度 ( $0.30 \mu$  IU/ml) 以下であり、インスリンは枯渇した状態であった。膵島移植群，膵島移植+GLP 群では術前に比べ、血糖値の上昇は認められなかった (図 5)。

### 肝生検の病理組織学的評価

膵島移植群および膵島移植+GLP 群の 7 日目の肝組織を病理組織学的に検討した。HE 染色で肝内門脈内に細胞内顆粒を有する移植膵島細胞を認めた。抗インスリン抗体による免疫組織化学で良好に染まり、肝内に生着した膵島細胞であることを確認した (図 6)。

## 考 察

今回の検討で膵全摘によるブタ糖尿病モデルを作成することに成功した。糖尿病の動物モデルとしてはマウス、ラットが用いられることが多いが、臨床応用する上では大動物モデルによる検証は不可欠である。これまで大動物としてブタを始めとした糖尿病モデルの実験が報告されている<sup>14)-16)</sup>。糖尿病モデルの動物実験としてはストレプトゾトシン (STZ) を用いた薬剤誘発糖尿病モデルが代表的である<sup>14)15)17)-22)</sup>。STZ の薬剤投与は比較的容易であり、Tang らはミニブタに対して、STZ120 mg/dl を経静脈的に投与し、糖尿病モデルの作成に成功した<sup>22)</sup>。しかし、STZ 投与モデルでは耐糖能異常は一過性にすぎず、とりわけインスリン依存性の糖尿病モデルとしては不十分との指摘もある<sup>23)</sup>。また、STZ 投与後の時期によっては、破壊された内分泌細胞が回復してくるため、安定したモデルとは言い難い<sup>23)</sup>。さらに STZ は肝腎毒性があり<sup>24)</sup>、過量投与により致死的となる<sup>25)</sup>。薬剤の副作用を軽減するため、STZ を少量頻回投与するプロトコールが報告されているが<sup>18)</sup>、投与方法が煩雑であり理想的な動物モデルとは言い難い。今

回の膵全摘による糖尿病モデルでは、理論的に術後のインスリン分泌は完全に枯渇するため、インスリン依存性の糖尿病モデルとして信頼性が高い。一方で、膵全摘の手技は難易度が高く、合併症の危険性も高い。われわれは過去の報告を詳細に検討し<sup>6)7)26)–28)</sup>、脾摘による良好な視野確保、十二指腸アーケードの温存による腸管切除再建、胆道再建を回避するなど、可能な限り術式の簡略化に努めた。その結果、手術時間2時間程度で、出血もほとんどなく、非常に有用なモデルを作成し得た。術後の経静脈的ブドウ糖負荷試験の結果からもインスリン分泌は完全に枯渇していた。糖尿病群での術後7日の生存率が25%であり、死亡した3頭はいずれも糖尿病関連死亡であったことから、きわめて重篤な耐糖能障害のモデルであると考えられる。Kobayashiらは23頭の膵全摘によるブタ糖尿病モデルを報告しているが、平均生存期間は $7.6 \pm 2.7$ 日で、死亡率は100%であった<sup>6)</sup>。最近、90%膵臓切除とSTZ投与を組み合わせたブタの糖尿病モデルが報告された<sup>27)</sup>。この方法の利点は、若干の膵組織を残しながら剥離をすすめるため、剥離操作による腸管や血管損傷の危険性が減り、安全性が向上する。さらに、遺残した10%程度の内分泌細胞に対しては通常量のSTZで十分な内分泌機能廃絶が期待できる。その一方で、STZを術後48時間以内に使用するため、糖尿病関連以外の致命的な合併症を引き起こす可能性があり注意が必要である。

膵島移植は膵臓移植と同様に、膵臓の $\beta$ 細胞を移植する、糖尿病に対する根治的な治療である<sup>29)</sup>。しかしながら、長期のインスリン離脱を維持することが困難なこと、複数ドナーからの膵島が必要であることが臨床的な課題である。長

期のインスリン離脱を維持するために、分離、移植過程での膵島細胞の喪失をできるだけ少なくすることと、膵島移植に有効な免疫抑制療法の開発することが望まれる。特に移植直後の IBMIR と呼ばれる生体反応は、移植膵島細胞の傷害および移植膵島の 50%以上の喪失を引き起こし、移植膵島の生着を阻む原因と言われている<sup>5)</sup>。現在予防のための有効な対策がなく、動物モデルでの詳細な病態解明が必要である。今回行った膵全摘によるブタ糖尿病モデルでは、臨床膵島移植に準じた方法<sup>30)</sup>を用いて分離直後の新鮮な膵島を自家移植することによって、死亡率が低下し耐糖能が改善した。移植 7 日目の膵島細胞の生着も組織学的に確認が可能であった。膵島移植後の門脈塞栓にて 1 頭を失ったが、他の合併症、とりわけ糖尿病関連の合併症は認められなかった。膵島移植後の門脈塞栓は海外の臨床例でも報告されており<sup>31)</sup>、膵島移植後に起こりうる最も重篤な合併症の一つである。移植膵島は門脈内に塞栓されるため、投与量に比例して門脈圧は上昇することが明らかとなっており<sup>32)</sup>、臨床的には総投与体積が 0.25cm<sup>3</sup>/k g 未満が推奨されている<sup>8)</sup>。膵島移植中の至適門脈圧に関する、大動物での検討の報告はない。今回は臨床での門脈圧亢進症に対する治療経験を参考に、20 cmH<sub>2</sub>O を超えないように投与速度を調節したが、総投与体積が過剰だった可能性もある。動物モデルでの至適投与体積については今後検討が必要である。

GLP-1は現在広く一般に用いられている2型糖尿病の治療薬である。GLP-1は小腸から分泌され、β細胞にあるGLP-1受容体に結合してインスリン分泌を促進させるとともにグルカゴン分泌抑制を介した血糖降下作用がある<sup>8)</sup>。さらに、β細

胞の分化，増殖作用や， $\beta$ 細胞保護作用（抗アポトーシス作用）もあるとされ，膵島移植での生着改善効果について期待されている．実際にGLP-1受容体作動薬のエキセナチドが膵島移植の生着を改善するとの報告がある<sup>9)</sup>．STZ誘発糖尿病マウスにGLP-1を投与した研究では移植膵島量の維持と血糖値の安定効果が確認された<sup>33)</sup>．GLP-1は膵島再生の観点からも注目されており，膵 $\beta$ 細胞の自己複製や，幹・前駆細胞から膵島細胞への再生を促進する効果が報告されている<sup>34)</sup>．興味深いことに，アルバータ大学から83例の臨床膵島移植例において，膵島前駆細胞と考えられる膵導管細胞を多く含む細胞群を移植した方が，2年後の血糖コントロールが良いことが報告された<sup>35)</sup>．今回の検討では，GLP-1による移植膵島の耐糖能改善効果を認めたが，この効果が単なるインスリン分泌促進によるものなのか，何らかの膵島生着促進や，膵島再生が関与しているのかについては不明である．今後，膵島移植後の肝生検材料を用いて，詳細な検討をすすめる必要がある．また，同種膵島移植の大動物モデルの作成についても取り組む予定である．

## 結 論

膵全摘により内因性インスリンの枯渇したブタ糖尿病モデルを作成することに成功した．切除膵を用いたブタ自家膵島移植モデルを作成し，膵島の肝内生着を確認した．GLP-1は移植膵島の耐糖能を改善する可能性が示唆された．



## 謝 辞

今回の研究に際しご指導を賜りました新潟大学消化器・一般外科分野 若井俊文先生，小林 隆先生，三浦宏平先生に厚く御礼申し上げます。また，新潟大学消化器・一般外科学分野の皆様に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-238, 2000.
- 2) Paty BW: Islet Transplant for Type 1 Diabetes: An overview. *Paediatr Child Health* 10: 38-40, 2005.
- 3) Gruessner AC: 2011 Update on Pancreas Transplantation: Comprehensive Trend Analysis of 25, 000 Cases Followed Up Over the Course of Twenty-Four Years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud* 8: 6-16, 2011.
- 4) 日本膵, 膵島移植研究会膵島移植班: 膵島移植症例登録報告(2016). *移植* 51: 178-186, 2016.
- 5) Korsgren O, Lundgren T, Felldin M, Foss A, Isaksson B, Permert J, Persson NH, Rafael E, Rydén M, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Nilsson B: Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation. *Diabetologia* 51: 227-232, 2008.
- 6) Kobayashi K, Kobayashi N, Okitsu T, Yong C, Fukazawa T, Ikeda H, Kosaka Y, Narushima M, Arata T, Tanaka N: Development of a Porcine

Model of Type 1 Diabetes by total Pancreatectomy and Establishment of a Glucose Tolerance Evaluation Method. *Artif Organs* 28: 1035-1042, 2004.

- 7) Kinasiewicz A, Sabat M, Szymańska, Wierzbicki Z, Fiedor P: Surgical removal of the pancreas with one-step autotransplantation of isolated Langerhans islets into the hepatic portal system in the pig. *Pol Arch Med Wewm* 119: 299-304, 2009.
- 8) Kendall DM, Riddle MC, Rosenstock J, Zhuang D, Kim DD, Fineman MS, Baron AD: Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. *Diabetes Care* 28: 1083-1091, 2005.
- 9) Faradji RN, Tharavanij T, Messinger S, Froud T, Pileggi A, Monroy K, Mineo D, Baidal DA, Cure P, Ponte G, Mendez AJ, Selvaggi G, Ricordi C, Alejandro R: Long-term insulin independence and improvement in insulin secretion after supplemental islet infusion under exenatide and etanercept. *Transplantation* 86: 1658-1665, 2008.
- 10) Sutherland DE, Radosevich DM, Bellin MD, Hering BJ, Beilman GJ, Dunn TB, Chinnakotla S, Vickers SM, Bland B, Balamurugan AN, Freeman ML, Pruett TL: Total pancreatectomy and islet autotransplantation for chronic pancreatitis. *J Am Coll Surg.* 214: 409-424, 2012.

- 11) Kilkenny C, Browne W, Cuthill I C, Emerson M, Altman G D: The ARRIVE Guidelines Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments. *Br J Pharmacol* 160: 1577-1579, 2010.
- 12) National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8<sup>th</sup> edition, National Academies Press (US), 2011.
- 13) Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW: Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37: 413-420, 1988.
- 14) Ludwig B, Ludwig S, Steffen A, Knauf Y, Zimmerman B, Heinke S, Lehmann S, Schubert U, Schmid J, Bleyer M, Schönmann U, Colton CK, Bonifacio E, Solimena M, Reichel A, Schally AV, Rotem A, Barkai U, Grinberg-Rashi H, Kaup FJ, Avni Y, Jones P, Bornstein SR: Favorable outcome of experimental islet xenotransplantation without immunosuppression in a nonhuman primate model of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 11745-11750, 2017.
- 15) Shin JS, Kim JM, Kim JS, Min BH, Kim YH, Kim HJ, Jang JY, Yoon IH, Kang HJ, Kim J, Hwang ES, Lim DG, Lee WW, Ha J, Jung KC, Park SH, Kim SJ, Park CG: Long-term control of diabetes in immunosuppressed

nonhuman primates (NHP) by the transplantation of adult porcine islets. *Am J Transplant* 15: 2837-2850, 2015.

16) Misawa K, Ichikawa K, Ojima K, Hamano S, Kitamura T, Komatsu H: Effect of KAD-1229, a nonsulfonylurea hypoglycemic agent, on plasma glucose and insulin in streptozotocin-induced diabetic dogs.

*Pharmacology* 62: 65-72, 2001.

17) Friedrichs P, Schlotterer A, Sticht C, Kolibabka M, Wohlfart P, Dietrich A, Linn T, Molema G, Hammes HP: Hyperglycaemic memory affects the neurovascular unit of the retina in a diabetic mouse model. *Diabetologia* 60: 1354-1358, 2017.

18) Edward H. Leiter: Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: Influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 630-634, 1982.

19) Saeki Y, Ishiyama K, Ishida N, Tanaka Y, & Ohdan H: Role of Natural Killer Cells in the Innate Immune System After Intraportal Islet Transplantation in Mice. *Transplant Proc* 49: 139-144, 2016.

20) Bloch K, Vanichkin A, Vardi P: Islet Transplantation in a Subarachnoid Cavity Surrounding Olfactory Bulb of Diabetic Rats. *Transplantation* 95: e54-e57, 2013.

- 21) Schlegel KA, Prechtl C, Möst T, Seidl C, Lutz R, von Wilmowsky C:  
Osseointegration of SLActive implants in diabetic pigs. *Clin Oral Implants Res* 24: 128-134, 2013.
- 22) Tang K, Xiao X, Liu D, Shen Y, Chen Y, Wang Y, Li B, Yu F, Ma D, Yan J, Liang H, Yang D, Weng J: Autografting of bone marrow mesenchymal stem cells alleviates streptozotocin-induced diabetes in miniature pigs: real-time tracing with MRI in vivo. *Int J Mol Med* 33: 1469-1476, 2014.
- 23) Jin X, Zeng L, He S, Chen Y, Tian B, Mai G, Yang G, Wei L, Zhang Y, Li H, Wang L, Qiao C, Cheng J, Lu Y: Comparison of single high-dose streptozotocin with partial pancreatectomy combined with low-dose streptozotocin for diabetes induction in rhesus monkeys. *Exp Biol Med* 235: 877-885, 2010.
- 24) Kume E, Fujimura H, Matsuki N, Ito M, Aruga C, Toriumi W, Kitamura K, Doi K: Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol* 55: 467-480, 2004.
- 25) Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, Román-Ramos R, Vega-Avila E, Campos-Sepúlveda E, Alarcón-Aguilar F: Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc West Pharmacol Soc* 54: 5-9, 2011.

- 26) Chaib E, Galvão FH, Rocha-Filho JA, Silveira BL, Chen L, de C Carvalho MP, Pariz CE, de Almeida FS, Waisberg DR, de Souza YE, Machado MC, D'Albuquerque LA: Total Pancreatectomy: Porcine Model for Inducing Diabetes - Anatomical Assessment and Surgical Aspects. *Eur Surg Res* 41: 52-55, 2011.
- 27) Pepper AR, Welch I, Brumi A, MacGillivray A, Mazzzuca DM, White DJ, Wall W: Establishment of a stringent large animal model of insulin-dependent diabetes for islet autotransplantation: Combination of Pancreatectomy and Streptozotocin. *Pancreas* 42: 329-338, 2013.
- 28) Morales AP, Conde EG, López MG, Valle MI, Díaz JF, Jáuregui PH: An improved method of 90% pancreatectomy using a low dose of streptozotocin at the pancreaticoduodenal artery results in a rapid diabetic stage in dogs. *Acta Diabetol* 42: 153-155, 2005.
- 29) Anazawa T, Tsuchiya T, Gotoh M: [Pancreas and islet transplantation]. *Nihon Rinsho* 70: 790-794, 2012.
- 30) McCall M, Shapiro AM: Islet cell transplantation. *Semin Pediatr Surg* 23: 83-90, 2014.
- 31) Wahoff DC, Papalois BE, Najarian JS, Kendall DM, Farney AC, Leone JP, Jessurun J, Dunn DL, Robertson RP, Sutherland DE: Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection. *Ann Surg.* 222: 562-75, 1995.

- 32) Kawahara T, Kin T, Shapiro AM: A comparison of islet autotransplantation with allotransplantation and factors elevating acute portal pressure in clinical islet transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 19: 281-288, 2012.
- 33) Kim SJ, Nian C, Doudet DJ, McIntosh CH: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with sitagliptin (MK0431) prolongs islet graft survival in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 57: 1331-1339, 2008.
- 34) 野口 洋文: 膵β細胞への分化誘導とそのメカニズム. *胆と膵* 32: 1233-1236, 2011.
- 35) Street CN, Lakey JR, Shapiro AM, Imes S, Rajotte RV, Ryan EA, Lyon JG, Kin T, Avila J, Tsujimura T, Korbitt GS. Islet graft assessment in the Edmonton Protocol: implications for predicting long-term clinical outcome. *Diabetes* 53: 3107-3114, 2004.



## 図の説明

### 図1 膵全摘の術中所見

(A) 短胃動静脈を切離の後，脾動静脈を露出し結紮切離を行う．その後脾臓を摘出する．(B) 十二指腸の血行を温存した状態で膵臓を十二指腸から剥離する．膵管を十二指腸の流入部で結紮した後，膵管を切離する．(C) 膵全摘終了後の状態．門脈から上腸間膜静脈が全周性に露出されている．(D) 全摘出された膵臓．

St : 胃, Sp : 脾臓, SV : 脾静脈, SA : 脾動脈, Du : 十二指腸, PD : 膵管, PV : 門脈, HA : 肝動脈, SMV : 上腸間膜静脈, IVC : 下大静脈, Ph : 膵頭部, Pt : 膵尾部

### 図2 膵島消化・分離システム

①Ricordi チャンバー, ②ステンレスボール, ③温度センサー, ④恒温槽, ⑤外科剪刀, ⑥アイスボックス

### 図3 術後生存率

各群の術後7日間の生存率を比較した．術後7日目の生存率は，膵全摘による糖尿病群 (DM) (n=4) で25%，膵島移植群 (IT) (n=4) で75%，膵島移植

+GLP 群 (IT+GLP) (n=4) で 100%であり, DM 群に比べ, IT+GLP 群で生存率が改善した. (\*p < 0.05)

#### 図 4 術後血糖値

(A) 術後 7 日間の空腹時血糖の推移を示した. 糖尿病群 (DM) では経時的に血糖が上昇し不安定化した.

(B) 術後 7 日間の血糖値は糖尿病群 (DM) で  $289.7 \pm 141.7$  mg/dl, 膵島移植群 (IT) で  $123.4 \pm 88.4$  mg/dl, 膵島移植+GLP 群 (IT+GLP) で  $67.4 \pm 23.8$  mg/dl であった. DM 群に比べ, IT 群および IT+GLP 群では血糖値は改善した. また IT+GLP 群では IT 群に比べて血糖値が改善した. (\*p < 0.05)

#### 図 5 経静脈的ブドウ糖負荷試験

糖尿病群 (DM) (n=1), 膵島移植群 (IT) (n=3), 膵島移植+GLP 群 (IT+GLP) (n=4), 術前群 (Pre-op) (n=5)

#### 図 6 膵島移植後 7 日目の肝生検組織

(A) 移植された膵島が肝内の門脈領域に塞栓されている. HE 染色.  $\times 200$ .

(B) 移植膵島にインスリンがびまん性に強く発現している. インスリン染色.  $\times 200$ .

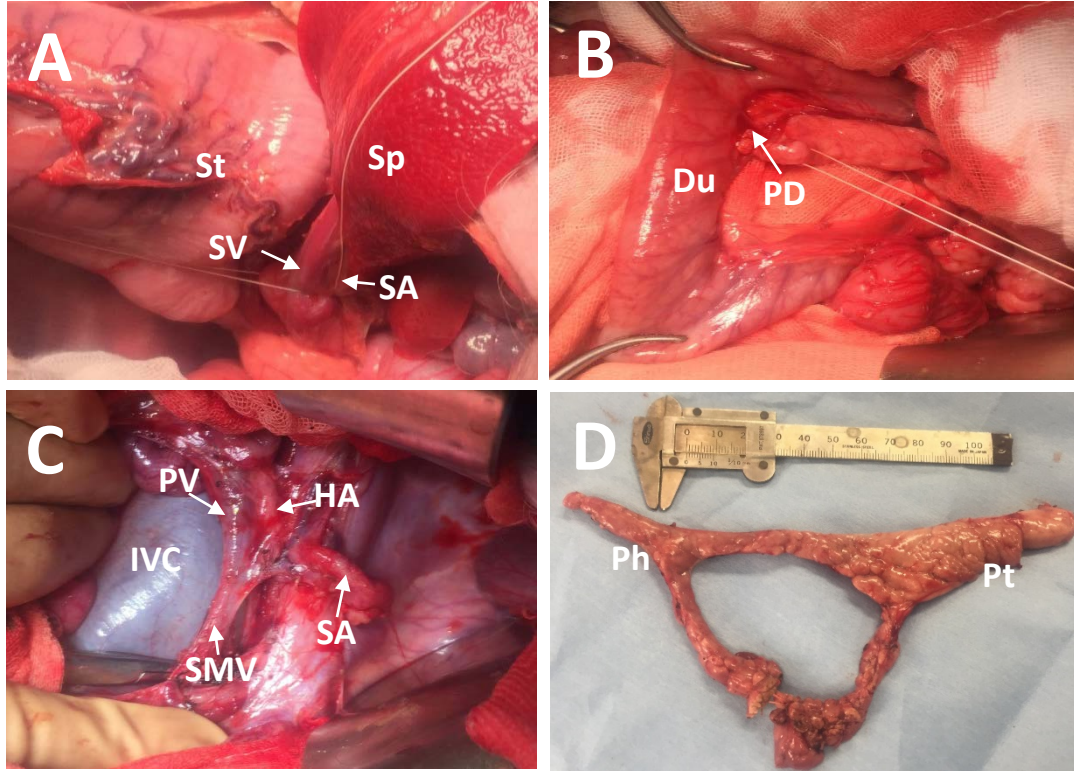
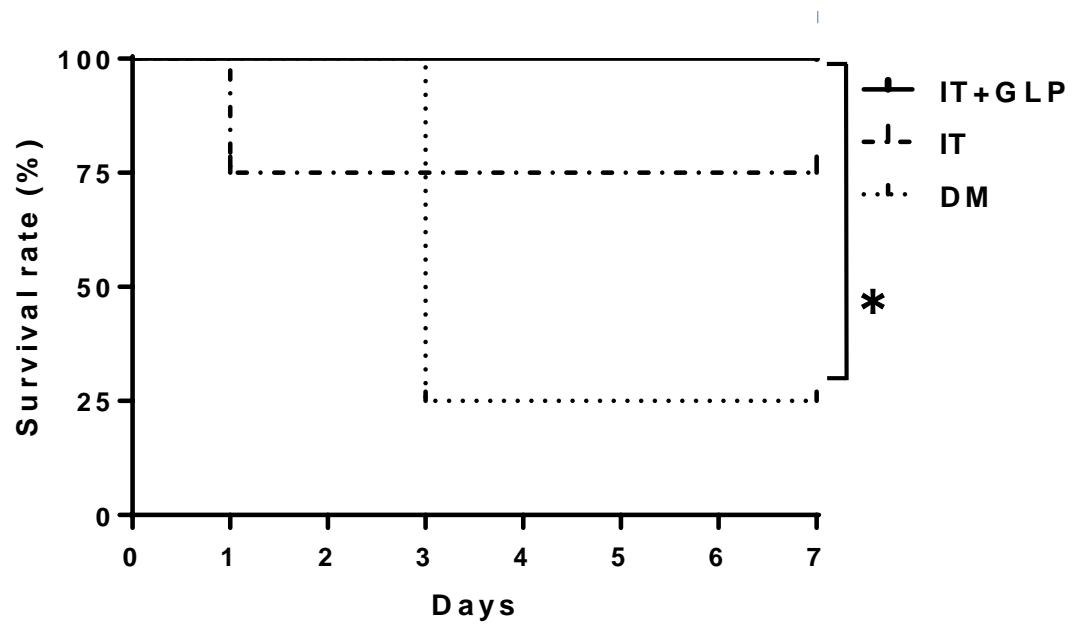
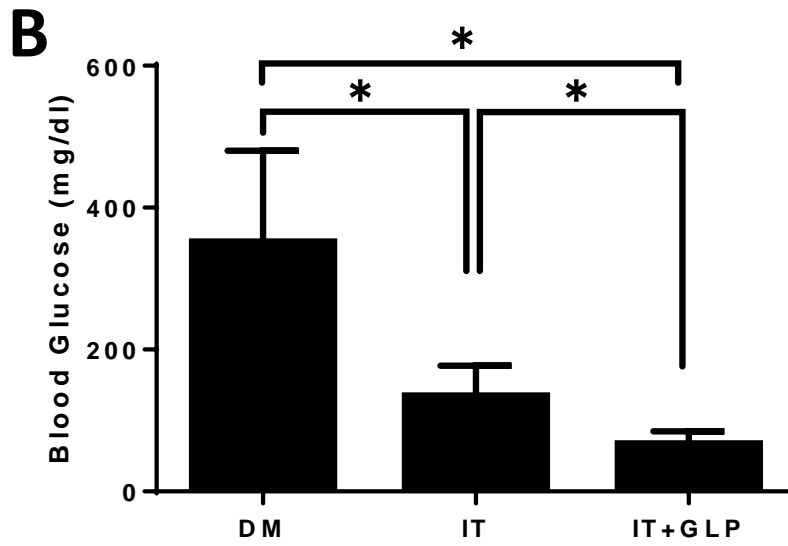
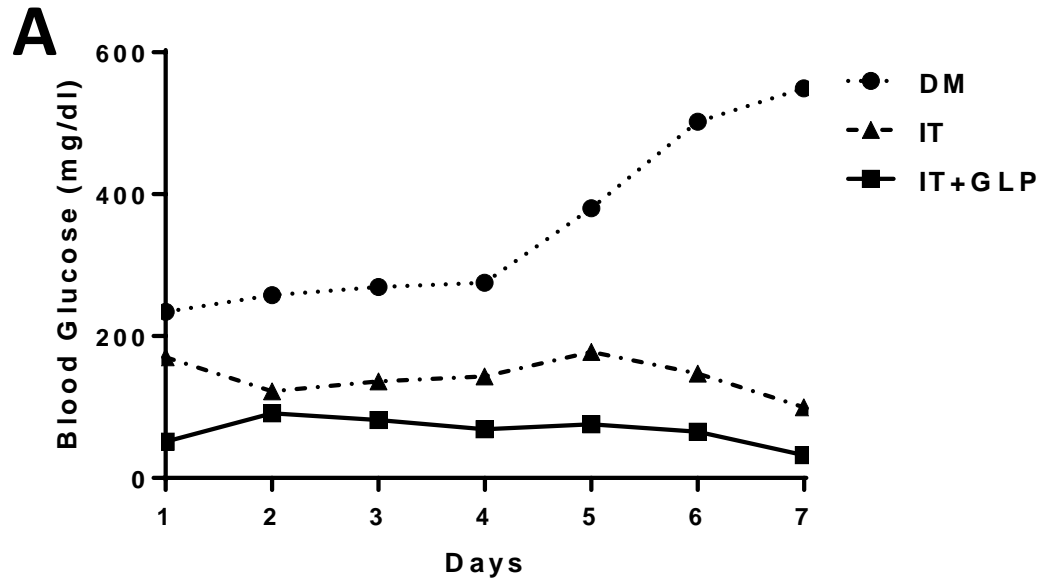


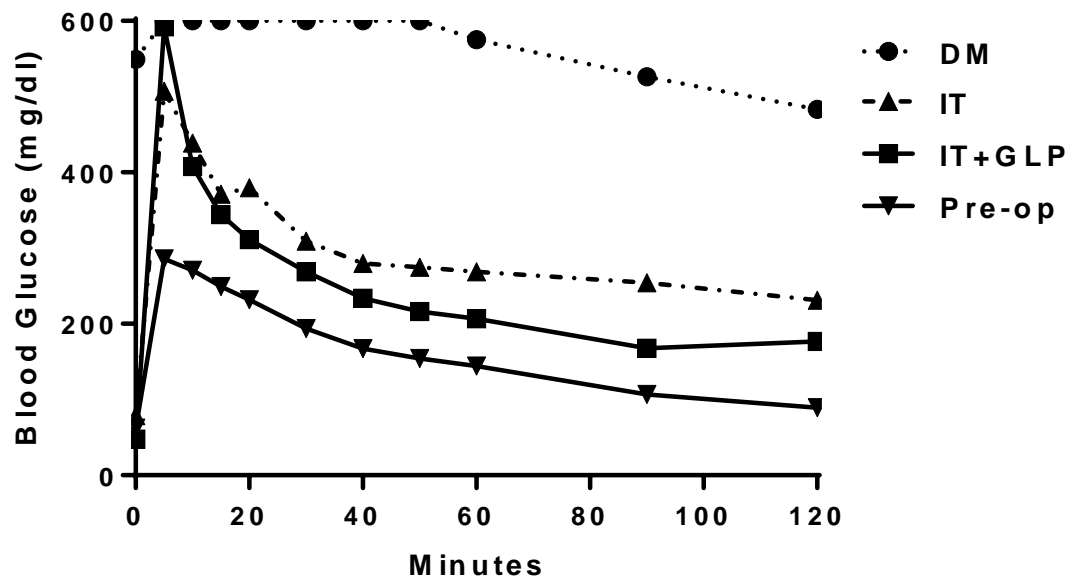
图 1



图 2







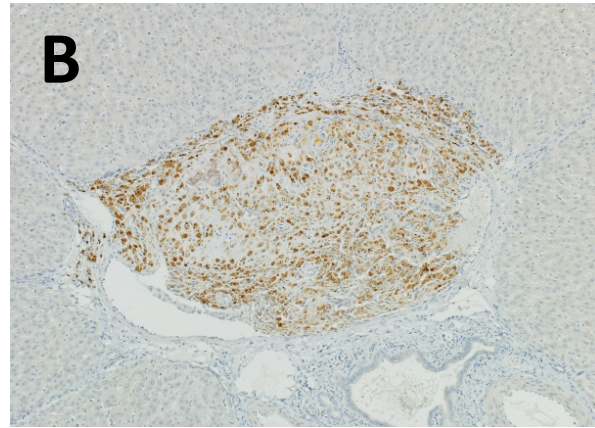
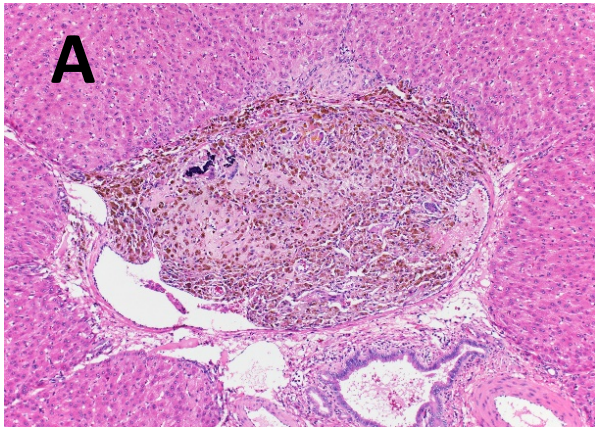


图6