

イザルのパーキンソン病モデルで運動機能障害の他にパーキンソン患者でみられる認知・弁別機能障害が生じているか否かを検証することを目的とした。今回開発した課題提示システムは、パーキンソン患者で機能低下が報告されている①視覚刺激の抽象的カテゴリー分類能力および②set-shifting機能をサルで評価することを目的としてプログラムを作成した。その結果、パーキンソンモデルザルは単純弁別課題は正常群とほぼ変わらない期間で習得可能になったが、典型的な set-shifting 課題である逆転弁別課題の習得では困難を示した。このことから、本装置がカニクイザルの認知機能を評価する有用なシステムであると判断できる。さらに、MPTP 処理個体ではパーキンソン患者と同様に、単純弁別課題の習得経過で見られるように初期学習障害はないが、記憶した反応法を状況に応じて修正する set-shifting 機能が著しく傷害されていることが判明した。一方、パーキンソン患者では前頭葉傷害患者で見られるような固執傾向がないことが報告されている。逆転弁別課題では各段階で正刺激が逆転することから、前課題での正刺激に対する固執反応が課題の習得を遅らせる可能性も考えられるが、図 5 下段に示すように、前課題の正刺激に固執する傾向は認められない。

これらの結果から、MPTP 処理で作成したカニクイザルのパーキンソン病モデルでは、色刺激提示での正刺激に反応する単純弁別機能はほぼ正常で、負刺激に反応する逆弁別機能だけが低下していることから、本モデルがパーキンソン患者における運動機能障害の治療効果判定だけでなく、認知機能障害を指標とした治療効果の評価にも有用なモデルであることが実証された。

## E. 結論

パーキンソン病患者で機能障害が指摘されている認知機能をカニクイザルで評価するシステムを開発した。このシステムを用いて、MPTP 処理で作成したパーキンソンモデルの認知機能を正常個体のそれと比較した結果、正刺激に対する単純弁別機能は正常だが、負刺激に対する逆転弁別機能が

著しく低下していることが判明した。この set-shifting 機能低下はパーキンソン患者で報告されている機能障害ときわめて類似していることから、MPTP 処理で作成したカニクイザルのパーキンソン病モデルがパーキンソン患者における運動機能障害の治療効果判定だけでなく、認知機能障害を指標とした治療効果の評価にも有用であることが実証された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirata M, Hirai M, Terao K, Suzuki Y, Sugano S, and Hashimoto K, Prediction of unidentified human genes on the basis of sequence similarity to novel cDNAs from cynomolgus monkey brain. *Genome Biology*, 2002 3: Research 0006.1-0006.5

Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A, Matsumura M, Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I, and Ozawa K, Behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associate viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Human Gene Therapy*, 2002 13: 345-354.

Lee WW, Nam KH, Terao K and Yoshikawa Y, Age related telomere length dynamics in healthy cynomolgus monkey's PBMC measured by Flow FISH. *Immunology*, 2002 105: 458-465.

Kawasaki K, Mitsui Y, Ono T, Ogawa H, Takano I, Sankai T, and Terao K, Simple assay method for serum oxytocin and comparison of serum oxytocin levels between infant-accepted and infant-rejected monkeys during parturition in cynomolgus monkeys. *Experimental Animals*, 2002 51: 181-185.

Terao K, Suzuki J. and Ohkura S, Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer (NK) cells in macaque monkeys. Implication of plasma cortisol levels. *Primates* 2002 43: 329-338.

Asada Y, Kawamoto Y, Shotake S. and Terao K, Molecular evolution of IgG subclass is different from that of IgG in non-human primates, implication of antigenic

determinant among apes-. Primates 2002 43: 343-349.

Suzuki J, Ohkura K, and Terao K, Baseline and stress levels of cortisol in conscious and unrestrained Japanese macaques (*Macacca fuscata*). Journal of Medical Primatology, 2002 31: 340-344.

Tutida J., Kawasaki K, Sankai T, Kubo N, Terao K, Koyama T, Makino J. and Yoshikawa Y., New type of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis*. International Primatology, 2003 -in press-

Suzuki MT, Terao K and Yoshikawa Y, Familial early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Primates, 2003 -in press-

## 2. 学会発表

川崎勝義、小山高正、山海 直、寺尾恵治、吉川泰弘、老齡ザルの非修正法による迷路学習、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京

李 元雨、寺尾恵治、吉川泰弘、カニクイザルの末梢 CD4/CD8 共陽性 (DP) T 細胞と腸管上皮 DPT 細胞との性状比較、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京

寺尾恵治、李 元雨、柴田宏昭、南 基煥、老齡カニクイザル NK 細胞の表現型と機能、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京

成田勇人、小野文子、鴻野あや子、羽成光二、揚山直英、大藤圭子、村松慎一、池口邦彦、藤本健一、中野今治、寺尾恵治、カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの作出、第 18 回日本霊長類学会、7 月 19-21 日、2002 年、東京

川崎勝義、中島宙美、関田清司、小山高正、寺尾恵治、山海 直、吉川泰弘、コカイン自己投与カニクイザルの線条体ドーパミン・マイクロダイアリシス、日本神経精神薬理学会、10 月 17 日～18 日、前橋

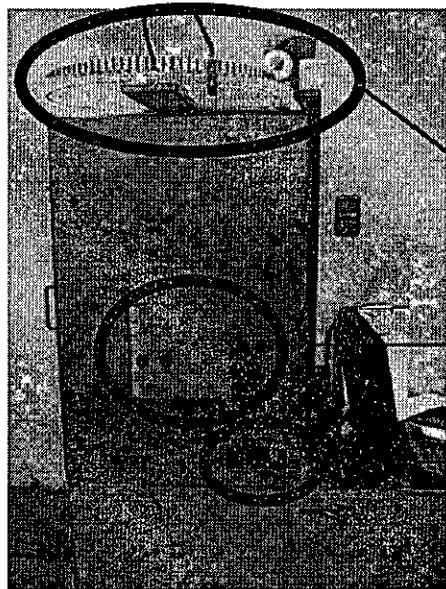


### 装置側面

→ コンピュータ・ディスプレイ

→ ビデオ録画装置

→ システム制御用コンピュータ



### 装置前面（動物側）

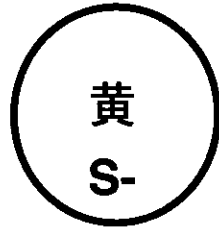
→ 自動給餌装置

→ 課題提示装置

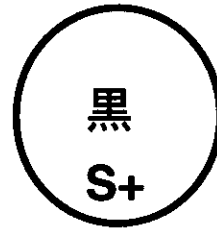
→ 報酬箱

図 1：新規に開発したカニクイザルの認知・弁別機能解析装置

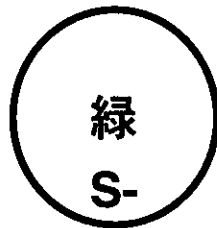
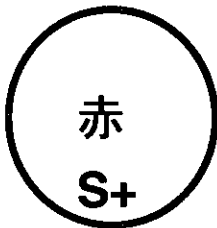
①単純色弁別課題 01



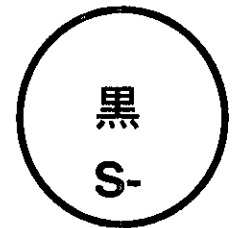
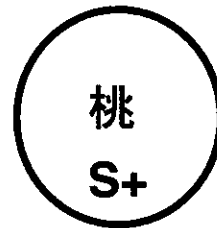
④逆転弁別課題 01



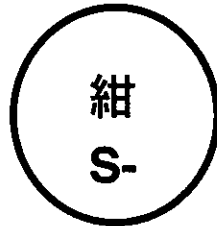
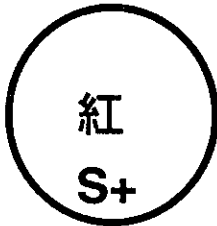
②単純色弁別課題 02



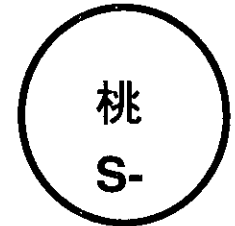
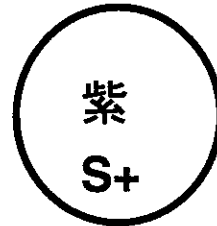
⑤逆転色弁別課題 02



③単純色弁別課題 03



⑥逆転色弁別課題 03



S+ : 報酬有り      S- : 報酬無し

図2 : カニクイザルの認知・弁別機能解析に用いた課題

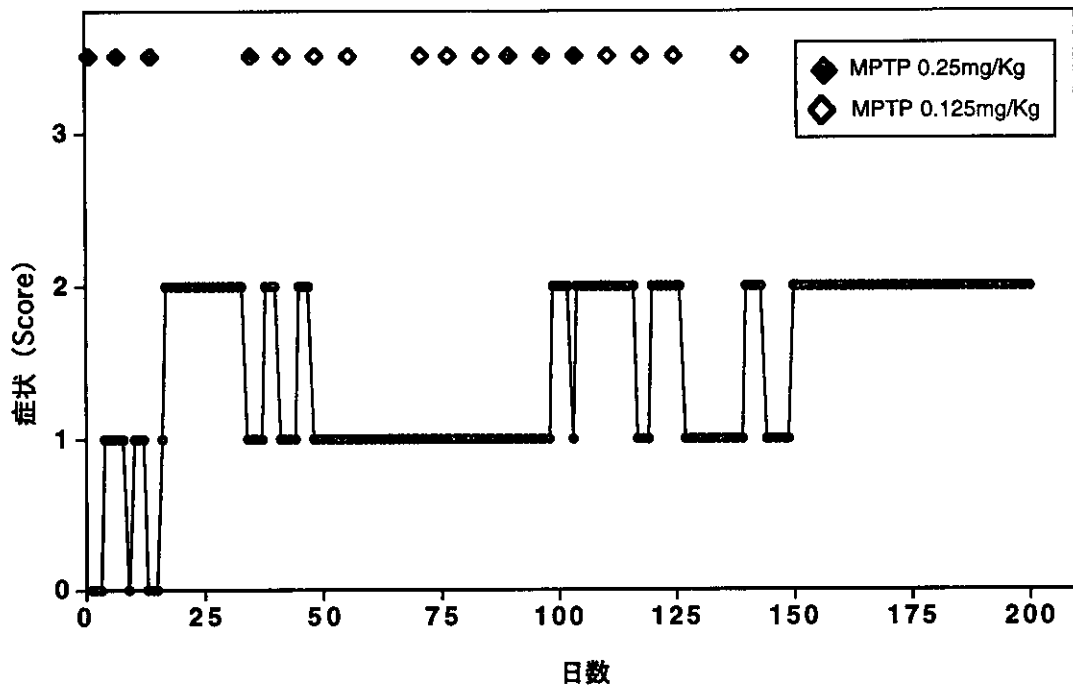


図 3：認知・弁別機能解析に供したカニクイザルの症状発現までの経過

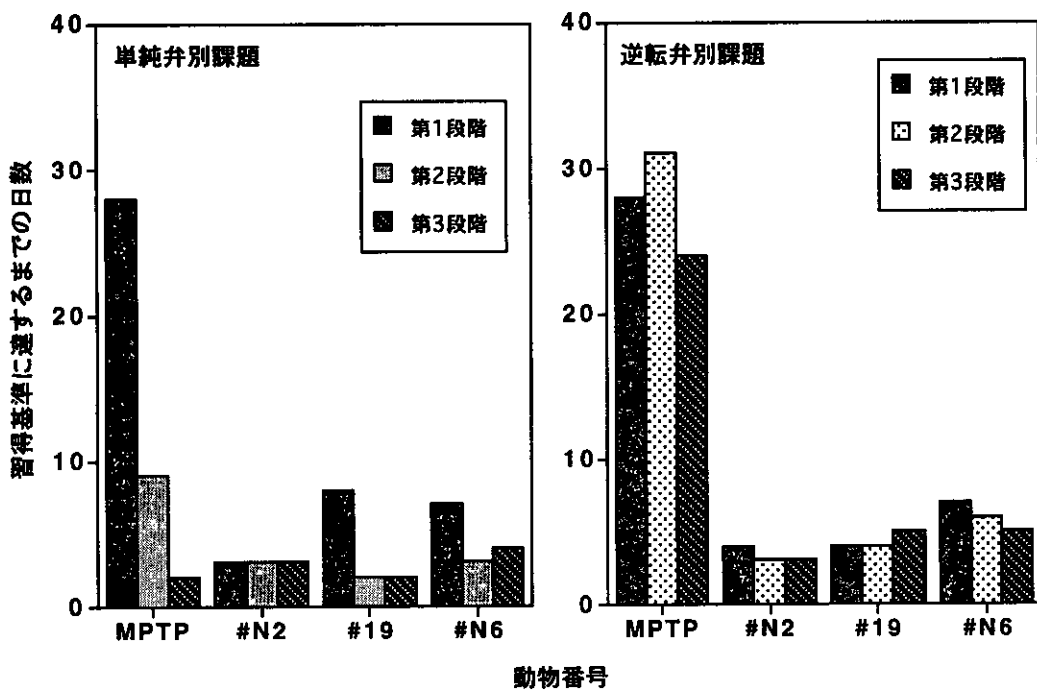


図 4：単純弁別課題および逆転弁別課題での習得基準に達するまでの日数

## カニクイザルにおける糖尿病モデル動物に関する研究

主任研究者：小野文子<sup>1)</sup>

協力研究者：大河原久子<sup>2)</sup>、枝村一弥<sup>3)</sup>、佐々木信雄<sup>3)</sup>、羽成光二<sup>1)</sup>、鴻野あや子<sup>1)</sup>

成田勇人<sup>1)</sup>、小川浩美<sup>1)</sup>、揚山直英<sup>1)</sup>、大藤圭子<sup>1)</sup>、成田豊子<sup>1)</sup>

藤本浩二<sup>1)</sup>

1) 社団法人予防衛生協会、<sup>2)</sup> 東京女子医科大学総研細胞再生医療部門

<sup>3)</sup> 東京大学農学部生命科学研究科

研究要旨：糖尿病を自然発症した、筑波医学実験用霊長類センターの育成カニクイザルを用いて成熟ブタ膵内分泌細胞を内包した免疫抑制剤を必要としない異種移植の可能な人工膵島を腹腔内に移植し、糖尿病治療効果について検討した。血糖値、インシュリン値をモニターするとともに抗ブタ膵内分泌細胞抗体を測定したところ8例中7例で抗体が検出された。抗体が陰性で維持された1例において約半年間血糖値の低下とインシュリン値の上昇が認められBio-AEPが有効に機能したものと思われた。また、抗体が検出された動物から摘出したチャンバーでは破損が認められた。そこで、移植したサル末梢血を用いてブタ内在性レトロウイルス（PERV）感染について検索したところ、検出されなかった。今後チャンバーについて安定した形態を確立することにより、糖尿病治療の新たな展開に寄与すると考えられるとともに、自然発症性糖尿病カニクイザルを用いた治療実験は、ヒトへ臨床応用に先駆けて、異種移植における重要な問題であるPERV等の検討においても重要な役割を担う。

キーワード：カニクイザル、糖尿病、PERV、人工膵島

### A. 研究目的

これまで、霊長類センターの育成カニクイザルにおける糖尿病発症動態について検討をおこなってきた結果、II型糖尿病として15歳以上において、肥満に引き続き発症しその後急激な消瘦を伴いI型へ移行するものであり、成人病疾患の解析及び治療研究を行ううえで、自然発症性糖尿病モデル動物として非常に有用であると考えられた。さらに、Aging Farm（老化動物育成ファーム）における基礎データの蓄積の中で、死亡した動物について臨床および病理検索を

行った結果、死亡例の6割が糖尿病を発症しており、糖尿病が加齢疾患をコントロールするうえで非常に重要な病態であることが明らかとなった。また、飼料変更により摂取カロリーの低下に基づき糖尿病発生率の減少傾向が認められることから、環境要因が糖尿病発生の誘引となっていることが示唆された。

今年度は、糖尿病の治療を目的とした完全埋め込み型人工膵島（ブタ膵内分泌細胞をDiffusion chamberに封入したもの）を自然発症糖尿病サルの腹腔内に移植し治療効果

について検討を行った。

## B. 研究方法

動物は筑波医学実験用霊長類センターで飼育され、糖尿病を自然発症した 18~27 歳の育生カニクイザル (*Macaca fascicularis*) 8 頭頭を用いた。移植は 19~30 歳齢の糖尿病を発症しているカニクイザル 7 頭に行われた。飼育環境は室温  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 12 回/時間、14 時間照明/日 (5 時~19 時) に設定し、ステンレス製個別ケージ [サイズ; 800mm (W)  $\times$  500mm (L)  $\times$  800mm (H)] に個別に収容し飼育した。飼料は、市販固型飼料 (Type AS; Oriental Yeast Co. Ltd.) 約 70g と補食としてリンゴ 100g を 1 日 1 回与えた。

人工膵島は大河原らによって開発されたチャンバー型のバイオ人工膵島 (Bio-artificial endocrine pancreas; Bip-AEP) を用いた。大きさは外形 4~5cm、内径 3cm 高さ 2mm の diffusion chamber 型の容器で、上下の両面の選択的透過膜から構成され、その内腔は、成熟ブタ膵内分泌細胞と細胞外マトリックスで満たされている (Fig. 1)

移植はケタラル麻酔下で腹腔内にチャンバー挿入手術により 1 頭につき 1~3 回実施した。再移植時には前回挿入したチャンバーの癒着の程度が軽いものについては摘出後再移植を行うこととした。

動物は移植前後で経時的に体重、空腹時血糖値、インシュリン値、HbA1c、グリコアルブミン (GA)、フルクトサミン、及び経静脈または経口糖負荷試験により治療効果の判定を行った。経静脈糖負荷試験はケタラル麻酔下で 50% グルコース 1ml/kg を静脈内投与し、

投与前および、投与後 10,20,30,60,90 分後に採血、経口糖負荷試験は 1 日分の飼料を給餌し無麻酔下で給餌前及び、1, 2, 4, 6, 8 時間後に採血し血糖値及びインシュリン値の測定を行った。

ブタ膵臓細胞に対する抗体は Bip-AEP に用いた培養ブタ膵内分泌細胞により抗原スライドを作成し FA 法により行った。移植を実施した 8 例中 6 例において解剖を行いチャンバーの状態と移植による各臓器に対する影響について検討を行った。

ブタ内在性レトロウイルス (PERV) 感染のモニターは移植したサルの末梢血を用いて PERV proviral DNA を PCR 法について検索した。

## C. 研究成果

移植に用いた 8 頭において移植前の血液検査所見の平均値は (Glucose  $259.4 \pm 119.3\text{mg/dl}$ 、Insulin  $5.1 \pm 5.6 \mu\text{IU/ml}$ 、HbA1c  $34.6 \pm 9.9\%$ 、GA  $34.6 \pm 9.9$ 、Fructosamin  $518.5 \pm 122.8$ ) は長寿研究用サルの平均値 (Glucose  $77.1 \pm 25.2\text{mg/dl}$ 、Insulin  $27.5 \pm 38.2 \mu\text{IU/ml}$ 、HbA1c  $3.71 \pm 1.3\%$ 、GA  $10.7 \pm 4.8$ 、Fructosamin  $255.0 \pm 62.5$ ) と比較して、いずれの指標も明らかな異常値を示していた。移植後 3 ヶ月目の検査では #6 において、空腹時血糖値  $87\text{mg/dl}$ 、Insulin  $43.4 \mu\text{IU/ml}$  および HbA1c  $6.9\%$  と術前に比べて改善されていた (Table. 1)。症状の改善された #6 では移植は 1 ヶ月間隔で 2 回行った。移植 1 ヶ月前から移植後 1 年間の Insulin 値、血糖値、体重の変化を Fig. 2 に示す。2 回目の移植直後より、Insulin 値が急激に上昇しその後 2 回のピークが認められながら正常 Insulin 値を示し、4 ヶ月

目頃より漸減傾向となった。空腹時血糖値は Insulin 値の上昇に伴い漸次低下の傾向を示した。体重は移植前まで減少傾向が認められていたが移植後 7 ヶ月日間は体重減少は停止した。その後、体重減少傾向が認められた。Fig.3 は術前の静脈内糖負荷試験を示す。糖負荷による Insulin の反応は全く認められなかった。術後より負荷試験は日内変動をみるために、通常の飼料を給餌してから経過を観察するために、経口糖負荷試験を実施したが、Fig.4 に示すように術後 3 ヶ月目では Insulin 値の上昇、血糖値の減少が認められた。しかし、7 ヶ月目以降の検査では Insulin の反応は認められず血糖値は食後高い値を維持したままであった。他 7 頭では移植後症状の改善は認められなかった。

移植した細胞に対する生体反応を検索するために、チャンバー内に充填したブタ膵内分泌細胞を抗原として、サルの血清中の抗体を蛍光抗体法で測定したところ、移植前はいずれの個体も陰性であった。5 頭において 1 回目の移植 1 ヶ月後に抗体は陽性となった。また、1 回目の移植で抗体が検出されなかった 3 頭中 2 頭においても 2 回目の移植後抗体は検出された。症状の改善が認められた 1 頭においてのみ、移植後も抗体陰性を維持していた。

8 頭中 3 頭 (# 2, 5, 6) の末梢血について PERV の gag, pol, env 領域のプライマーを用いて PCR を実施したところ検出されなかった。

最移植時に摘出したチャンバーおよび、解剖時に観察したチャンバーの状態は、チャンバー周囲の血管増生は著しく、チャンバー全体に厚い包膜を形成している場合も

認められた。Fig. 5 に示す # 8 では 2 つのチャンバーが挿入された状態で解剖を実施した、1 つは子宮と腸管に癒着し周囲に結合織の増生が顕著であったが、チャンバーの破損は認められず、内部細胞も白く安定した状態を維持していた。他方は腹膜と強固に癒着し臓側面側のメンブランは完全に剥離し、チャンバー内部は血様組織が充満していた。

# 10 では 2 個のチャンバー移植後 1 個を手術的に摘出を行ったところ、周囲に血管の増生が認められるものの、チャンバーに異常は認められなかった。他方は解剖時に摘出を行ったところ、胃と大網に軽度癒着し、一見異常がないように思われたが、メンブランとシリコンリングのわずかな隙間から血管が侵入し、チャンバー内に血様組織を認めた。

#### D. 考察

高齢化社会とともに、ライフスタイルの欧米化に伴いわが国においても、糖尿病は急増し解決しなければならない最も重要な疾患の一つである。ヒトでは糖尿病の重篤な合併症として動脈硬化、網膜症、腎不全さらに糖尿病性壊疽などをもたらしており、長寿研究用の高齢カニクイザルにおいても、第 1 の死因となっている。糖尿病の終末像は膵β細胞の破壊あるいは機能不全によるインスリン欠乏状態であり、インスリン治療が必要となる。しかし、インスリン治療では血糖値を生理的範囲内にコントロールすることは不可能であり、根本治療にはなり得ない。そこで、インスリン治療に代わる根治療法として遺伝子治療、再生医療および、膵β細胞移植が考えられる。今回用



いた異種膵β細胞移植では免疫抑制剤の投与を用いずに制御する方法として、宿主と移植片との間に高分子や選択的透過膜を介在させることにより、免疫隔離を行うことにある。今回自然発症性糖尿病サル8例に膵島細胞を移植したところ、1例で約半年間にわたり空腹時血糖値の低下とインスリン分泌、および経口糖負荷試験の結果、耐糖能の改善が確認された。他7例においてはインスリンの分泌は認められず、明らかな血糖値低下効果は得られなかった。

最初に移植を行った1例において、移植後1ヶ月目にBウイルス抗体が陽転したため、検討をおこなったところ、Bウイルスに対する特異抗体ではなく、抗原調整細胞に対する抗体である可能性が示唆されたため、ブタ膵島β細胞を用いた抗原スライドを作成し蛍光抗体法を行った。その結果ブタ膵島β細胞に対する抗体であることが確認された。そこで、この方法を用いて、移植前後の抗体を確認したところ移植前は全頭で抗体陰性であったが、移植後8例7例で抗体陽性となり、移植効果のあった1例において抗体は陰性であったことから、移植細胞を抗原として認識する生体反応が生じたことが示唆された。移植後摘出したチャンバーおよび解剖時に摘出したチャンバーの状態は抗体陽性となった例ではチャンバーの破損または膜の剥離が確認された。膜の剥離が認められたチャンバー内の膵島細胞は脱核が認められていた。移植後経時的に抗体測定を行うことにより、チャンバーの状態をモニターすることが可能となった。

ブタ細胞を用いた異種移植を行ううえで最も重要な問題は、PERVの感染である。

米国CDCやFDAではブタ由来細胞を移植されたドナーのPERVの感染をモニターする目的でPCR法を用いた報告がなされている。今回我々が用いたブタ膵島β細胞についてPCRを行ったところ全ての細胞でPERVゲノムが検出された。そこで、移植したサルの末梢血で同様の検索を行ったところ、PERVのマイクロキメリズムおよび感染は認められなかった。今後さらに、長期にわたり、経時的に検索を行うとともに、PERV以外の病原体についても検索を進めて行き異種移植の安全性についての検討をおこなっていく必要がある。

以上のことより、ブタ膵島細胞を用いた完全埋め込み型人工膵島はチャンバーの状態を良好に維持することにより、生体免疫反応を誘発することなく、良好なインスリン分泌を誘導し、糖尿病をコントロールすることが可能であることが示唆された。また、生体内における移植チャンバーの状態は膵島細胞に対する抗体を測定することによりモニターが可能であると考えられた。今後移植後の病理検索を行うことにより、チャンバーを用いた異種移植による生体の影響について検討するとともに、血液及び各臓器におけるPERV及び他の病原体の感染状況を検索し、臨床応用への可能性について検討をおこないたい。

## E. 研究発表

### 学会発表

1. 枝村一弥、小川博之、佐々木伸雄、大河原久子：異種膵島移植におけるPERVモニター法の適応 第29回膵・膵島移植研究会 2002

2. H.Ohgawara, K.Edamura, F. Ono :

A Bioartificial endocrine pancreas  
fottreatment of diabetes. The 62th  
American Diabetes Association. 2002

論文発表

1. Morimoto Y, Nasu K, Iwami Y, Nagai  
K, Edamura K, Ohgawara H.

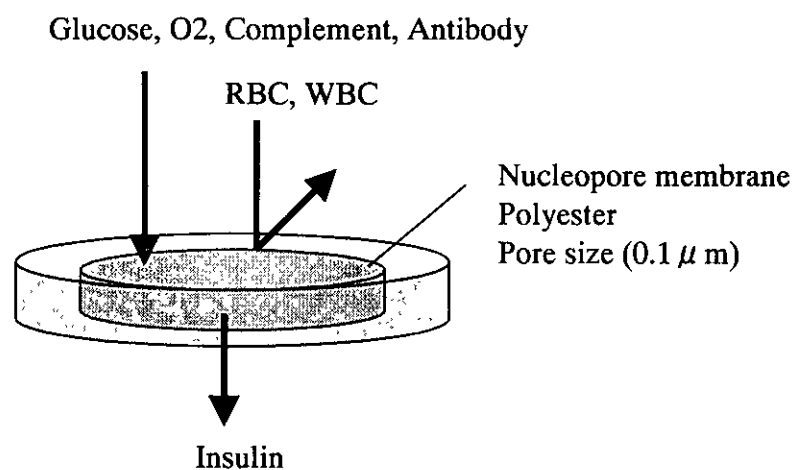
Related Articles, Books,  
LinkOut Comparative study of adult  
porcine pancreatic endocrine cell  
preparation using a technique of multiple  
injections and pancreatic duct  
cannulation without a proteolytic  
enzyme. *Pancreas*. 2003 Mar;26(2):185-9.

2: Tsuchiya M, Tsuchiya K, Iwami Y,  
Ohgawara H. Related Articles, Books,  
LinkOut Analysis of gene expression and  
insulin secretion by monolayer-forming  
adult porcine pancreatic endocrine cells.  
*Pancreas*. 2003 Jan;26(1):71-5.

3: Sato A, Wang PC, Ohgawara  
H. Related Articles, Books, LinkOut  
Effect of stimulators such as GLP-1,  
PACAP, and nicotinamide on  
glucose-stimulated insulin secretion from  
porcine pancreatic endocrine cells in  
long-term culture.  
*Pancreas*. 2002 Jul;25(1):86-93.

4: Edamura K, Ohgawara H, Nasu K,  
Iwami Y, Sato A, Ishikawa S, Matsuki N,  
Ono K, Ogawa H, Sasaki N. Related  
Articles, Books, LinkOut Effect of the  
extracellular matrix on pancreatic  
endocrine cell function and its  
biocompatibility in dogs.  
*Cell Transplant*. 2001;10(4-5):493-8.

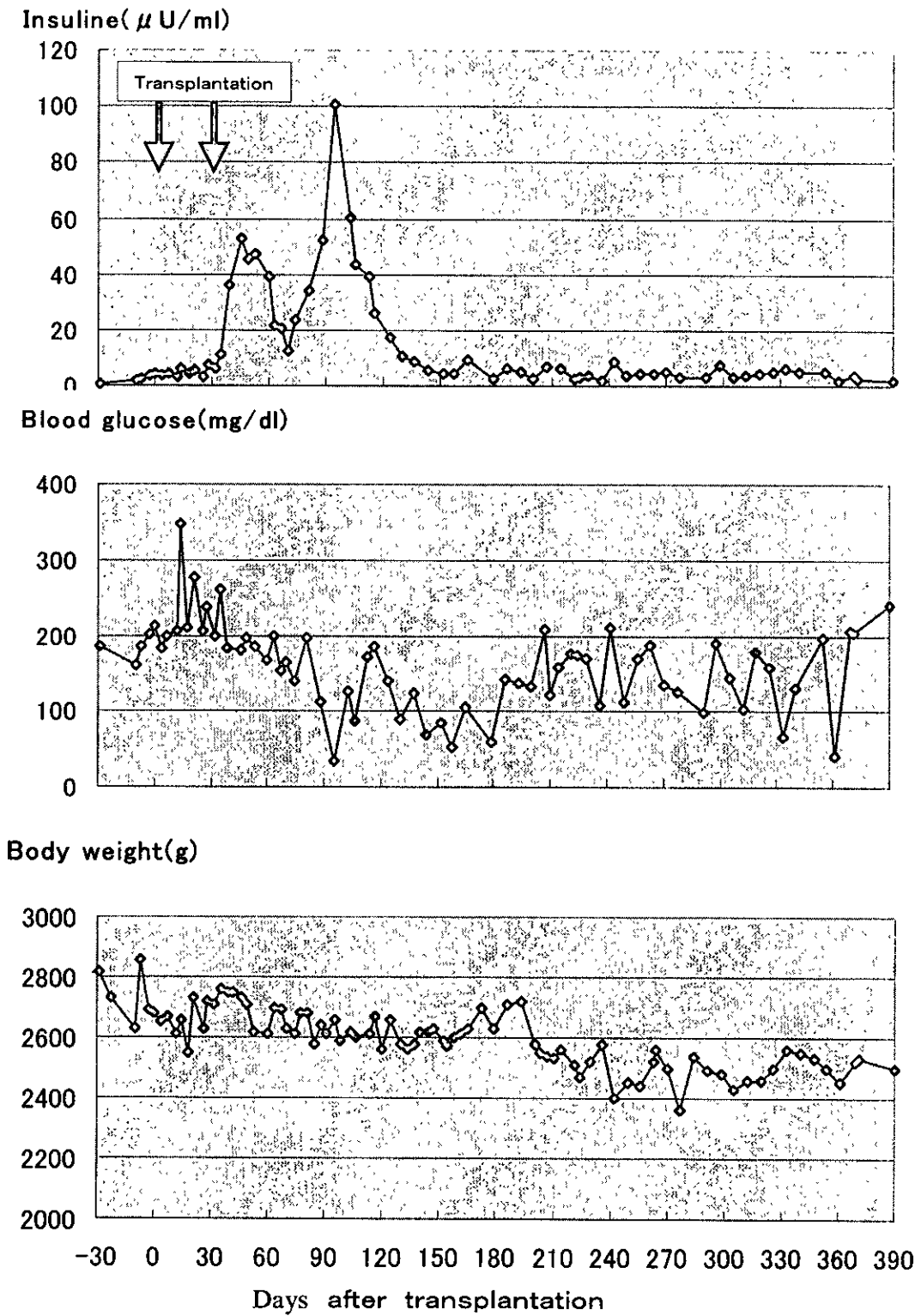
**Fig.1 Nucleopore membrane for Bio-AEP**



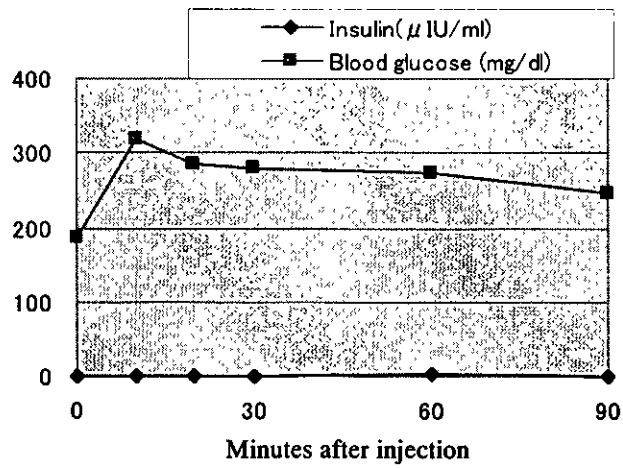
**Table. 1 バイオ人工膵島(ブタ)移植カニクイザルの経過**

動物通番	性別	年齢	移植前			移植3ヶ月後			膵島細胞抗体
			HbA1c %	Insulin μU/ml	Glucose mg/dl	Hb %	Insulin μU/ml	Glucose mg/dl	
#4	♂	19	5.4	0.3	523	5.1	1.2	596	+
#2	♀	20	9.6	2.2	173	7.9	2.8	293	+
#5	♀	19	9.6	11.3	222	6.7	7.1	175	-
#6	♀	18	9.1	1.6	161	6.9	43.4	87	-
#8	♀	22	10.8	4.7	196	9.8	5.0	218	+
#9	♀	18	10.2	0.4	336	-	1.2	337	+
#10	♀	19	12.0	1.0	241	11.7	2.1	255	+
#14	♀	27	8.3	13.0	223	8.7	10.4	234	+

**Fig. 2 Xeno-implantation of Bio-AEPs (#6)**



**Fig. 3 Intravenous glucose tolerance test : pre transplantation (#6)**



**Fig. 4 Oral glucose tolerance test ;post transplantation (#6)**

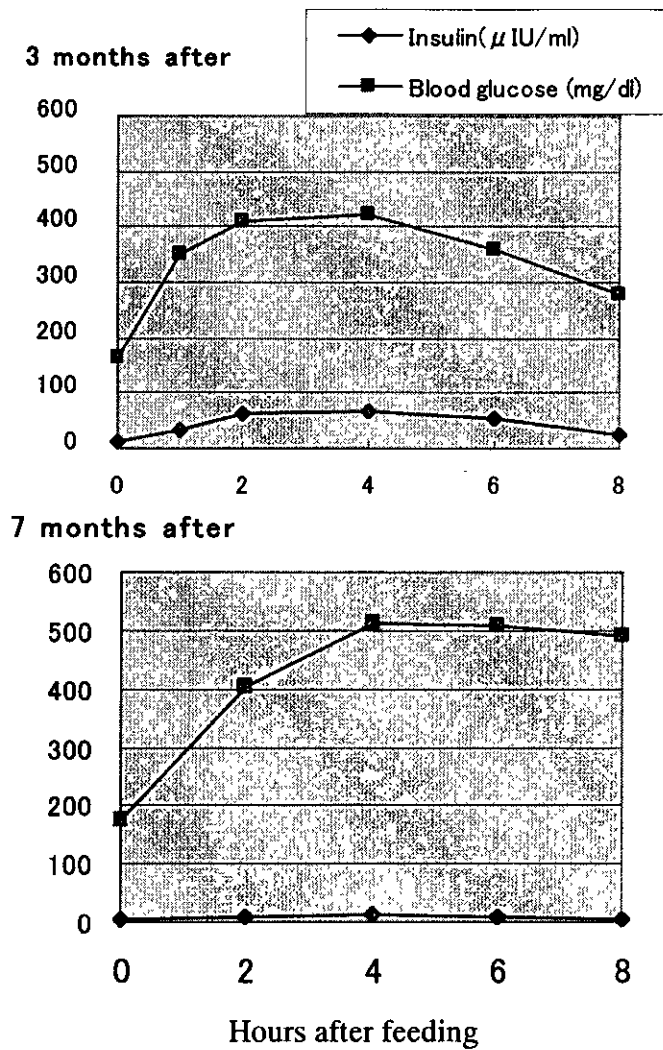
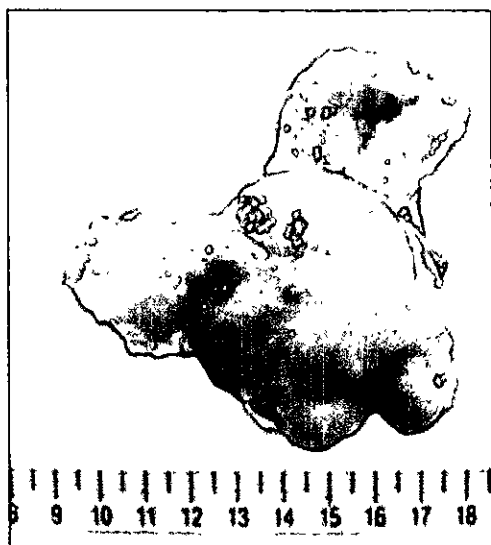
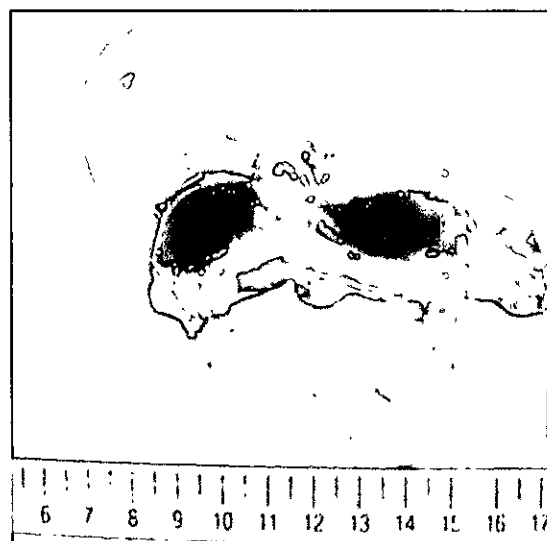


Fig.5 Macroscopical pictures of chamber

#8-1



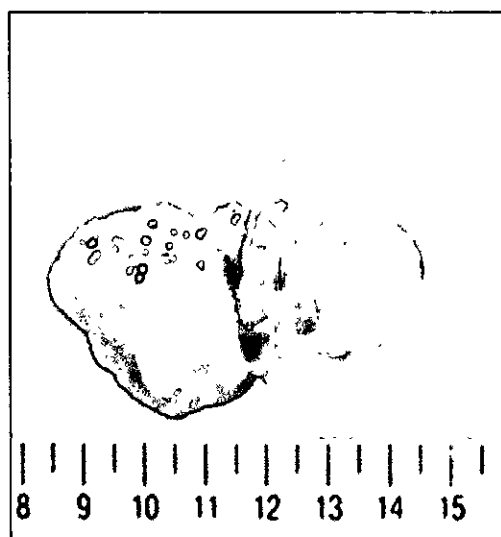
#8-2



#10-1



#10-2



## 自然発症糖尿病猿における豚膵内分泌細胞の 異種移植による治療効果

分担研究者 佐々木伸雄 (東京大学大学院農学生命科学研究科 教授)  
枝村一弥 (東京大学大学院農学生命科学研究科 大学院生)  
小野文子 (予防衛生協会)  
大河原久子 (東京女子医科大学総合研究所細胞再生医療部門 助教授)

### 研究要旨

我々は糖尿病の根治療法を目的とした、豚の膵内分泌細胞 (PE-cell) を用いた拡散チャンパー型バイオ人工膵島 (Bio-AEP) の開発を行ってきた。そこで、自然発症糖尿病猿 (カニクイザル) に Bio-AEP を異種移植し、その移植効果について検討した。全身麻酔下にて  $0.9\sim 4.0\times 10^7$  cells/kg の豚 PE-cells を含んだ Bio-AEP を腹腔内に移植した。本実験では、インスリンおよび免疫抑制剤の投与は行わなかった。移植後は、経時的に空腹時血糖、インスリンおよびヘモグロビン A1c (HbA1c) のモニターを行った。また、移植後に豚内在性レトロウイルス (PERV) の感染の有無についても検討を行った。Bio-AEP を移植した 3 頭中 1 頭でインスリン投与なしに 6 カ月以上空腹時血糖が正常化し、かつその間の血糖維持の指標である HbA1c も減少した。この例は、我々の知る限り拡散チャンパー型 Bio-AEP による自然発症糖尿病猿の異種移植成功の初めての例と思われる。他の 2 頭においては、移植後血糖は正常に復さなかったものの、HbA1c の低下を認めた。また、移植した全症例で PERV の感染およびマイクロキメリズムは認められなかった。今回移植した 1 例では明らかな臨床効果を認め PERV の感染も認められなかったことから、Bio-AEP の移植は糖尿病治療の新たな戦略となりうる可能性が示唆された。

キーワード：カニクイザル、糖尿病、バイオ人工膵島、豚膵島移植、豚内在性レトロウイルス

### A. 研究目的

現在、糖尿病患者は全国に 670 万人以上、40 歳以上の 10 人に 1 人は予備軍と呼ばれ、いまや糖尿病は国民病となっている。現在行われているインスリン療法のみでは細小血管の合併症の進展は防げず、膵および膵島移植が唯一の根治療法と考えられている。中でも免疫抑制剤を必要とせず長期にわたるメンテナンスフリーが可能な人工膵臓が作製できれば糖尿病の治療成績は飛躍的に向上する。

我々は糖尿病の根治療法を目的として、豚膵内分泌細胞 (PE-cell) を用いた拡散チャンパー型バイオ人工膵島 (Bio-AEP) の開発を行っている。これはシリコンリングと選択的透過膜で構成され PE-cell は物理的に免疫隔離されている。過去に、Bio-AEP を移植したラ

ットにて 50 週以上機能を維持しており、免疫抑制剤無しに異種移植も可能となった。次いで、膵全摘犬へ豚 PE-cell を含む Bio-AEP を異種移植し、大型動物モデルにおいて異種移植の効果を検討したところ、インスリン離脱には至らなかったものの一定期間の明らかな血糖降下効果を示した。しかし、血糖再上昇後 Bio-AEP は 3 頭中 2 頭で完全に破壊されており、さらに摘出した Bio-AEP 内の PE-cell は電顕にて低酸素が原因と考えられる壊死を呈した。

我々はこれらの結果を踏まえ、Bio-AEP の臨床応用を実現するために Bio-AEP の厚さを薄くして酸素供給を増やす構造に変え、さらに培養基質に多少の変更を加えた。今回、我々はこの新型 Bio-AEP を自然発症糖尿病猿に異種移植し治療する機会を得たので、その移植効果に

について検討した。

## B. 研究方法

### バイオ人工膵島 (Bio-AEP)

検討に用いたバイオ人工膵島の直径は 5.0cm で、厚さは 0.2 cm である (図 1)。Bio-AEP を構成しているチャンバーの内腔容積は 2ml で、そこに細胞外基質が充填されており、豚 PE-cell が三次元培養されている。豚 PE-cell の分離および培養方法は、大河原らがすでに確立しており、その方法に従った。

### 自然発症糖尿病猿

筑波医学実験用霊長類センターで飼育管理されているカニクイザル (*Macaca fascicularis*) のコロニーで発生した、雌の自然発症糖尿病猿 3 頭を用いた。図 2 は、このコロニーにおける健常および糖尿病猿の外貌写真を示した。糖尿病の個体は、健常の個体に比べ重度の消瘦を呈していた。また、発症猿の膵臓を病理組織学的に検索したところ、膵島のアミロイド変性が認められた (図 3)。

図 4 は、今回用いた糖尿病猿と正常猿の体重と空腹時血糖 (FBG) の推移を示した。糖尿病の猿は、全てに肥満歴があり、発症後に FBG の上昇と急激な体重減少を認めた。

Case-1 は 18 歳の雌で、移植前の体重が 2.6kg と重度の消瘦を呈した。この猿は、慢性の肥満後に急激な体重減少を認め、15 歳から FBG の上昇を認めた (図 4-B)。本症例は、ヒトの脂肪組織萎縮性糖尿病と類似していた。

Case-2 は 19 歳の雌で、移植前の体重が 3.4kg と消瘦していた。この猿は、慢性の肥満後から徐々に体重が減少し、15 歳から急激な FBG の上昇を認めた (図 4-C)。本症例は、ヒトの肥満後に認められる典型的なインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) と類似していた。

Case-3 は、20 歳の雌で、移植前の体重は 2.5kg と重度に消瘦していた。この猿は、10 歳から徐々に FBG が上昇し、15 歳から正常域を越

えた高血糖を認めた (図 4-D)。本症例は、ヒトの緩徐進行型糖尿病と類似していた。

これら 3 頭は、病歴、FBG の推移、経静脈糖負荷試験 (IVGTT) の結果から、全て老齢で肥満後に発症するヒトの II 型糖尿病と考えられた。本実験は、東京女子医科大学動物実験施行規則に従って行った。

### 移植方法と術後管理

硫酸アトロピン(0.05 mg/kg)の皮下投与後に塩酸ケタミンを筋肉内投与し全身麻酔を行った。必要に応じてイソフルランの吸入麻酔を行った。全身麻酔後に、背臥位に保定し、正中切開を行った。0.9~4.0×10<sup>7</sup> cells/kg の豚 PE-cells を含んだ Bio-AEP を腹腔内に移植した。1 回の手術で 1 個の Bio-AEP を移植し、各症例 2~3 回の移植を行った。

本実験では、インスリンおよび免疫抑制剤の投与は行わなかった。術前、術後の餌は市販のモンキーフード(Type AS, Oriental Yeast Co., Ltd. Tokyo, Japan)とリンゴを与えた。1 日の食餌の総カロリーは 267 kcal/head とした。

### 術後のモニター

移植後は、経時的に FBG、インスリンおよびヘモグロビン A1c (HbA1c) のモニターを行った。また、移植後に豚内在性レトロウイルス (PERV) の感染の有無についても検討を行った。

## C. 研究成果

Case-1 の移植直前の FBG は 286 mg/dl、インスリン値は 0.5 μU/ml、HbA1c は 9.01%であった (図 5)。移植直前の IVGTT では糖負荷に対してほとんどインスリン分泌が認められず、K 値は 0.71 と低値を示した。まず、2.8×10<sup>7</sup> (1.1×10<sup>7</sup>/kg)個の豚 PE-cells を含む Bio-AEP を腹腔内に移植した。移植直後から FBG の減少が認められたが、移植 3 週目に急激な上昇を認めた (図 5)。次いで、移植 5 週目に 7.3×10<sup>7</sup> (2.8×10<sup>7</sup>/kg)個の豚 PE-cells を含む Bio-AEP を再度移植した。2 回目の移植後、インスリン



投与なしに 6 カ月以上空腹時血糖が正常化し、かつその間の血糖維持の指標である HbA1c も 9.01 から 5.95%へと減少した。この例は、我々の知る限り拡散チャンパー型 Bio-AEP による自然発症糖尿病猿の異種移植成功の初めての例と思われる。この猿は、移植後に一般状態の回復を認めたが、体重の増加は認められなかった。

Case-2 の移植直前の FBG は 332mg/dl、インスリン値は 9.3  $\mu$ U/ml、HbA1c は 9.64%であった (図 6)。移植直前の IVGTT では、糖負荷に対してインスリン分泌が認められるものの負荷 90 分後の血糖値は高値を示した。K 値は 1.73 であった。3.0 $\times 10^7$  (0.9 $\times 10^7$ /kg)個の豚 PE-cells を含む Bio-AEP を移植したところ、移植 3 週後に FBG は正常に復した (図 6)。しかし、その後 FBG が安定しないため、4.2 $\times 10^7$  (1.2 $\times 10^7$ /kg)個の豚 PE-cells を含む Bio-AEP を再度移植した。若干の FBG の低下を認めたが、正常には復さなかった。HbA1c は、9.64%から 7.12%へと減少した。この症例では、3 回目の移植も行ったが、血糖の正常化は得られなかった。

Case-3 の移植直前の FBG は 334mg/dl、インスリン値は 4.2  $\mu$ U/ml、HbA1c は 9.60%であった (図 7)。移植直前の IVGTT では、糖負荷に対するインスリンの分泌量は明らかに低く、K 値は 0.37 であった。2.8 $\times 10^7$  (7.0 $\times 10^7$ /kg)個の豚 PE-cells を含む Bio-AEP を移植したところ、FBG は急激に低下したが、正常化には至らなかった (図 7)。HbA1c は、9.6%から 7.7%へと減少した。その後も FBG が安定しないため、10.4 $\times 10^7$  (4.0 $\times 10^7$ /kg)個の豚 PE-cells を含む Bio-AEP を再度移植した。2 回目の移植後は、HbA1c の若干の低下を認めたが、FBG は正常には復さなかった。さらに、3 回目の移植を行ったが、血糖の正常化は得られなかった。実験期間中、体重の変化は認められなかった。

今回移植した全例で PERV のモニターを行

ったところ、PERV の感染およびマイクロクメリズムは認められなかった (図 8)。

#### D. 考察

本研究では三次元培養した豚 PE-cell を免疫隔離膜を有する Bio-AEP に入れて自然発症 II 型糖尿病のカニクイザルに異種移植した。その結果、1 頭でインスリン投与なしに 27 週以上空腹時血糖が正常化し、かつその間の血糖維持の指標である HbA1c も減少した。この例は、我々の知る限り拡散チャンパー型 Bio-AEP による自然発症糖尿病猿の異種移植の成功の初めての例と思われる。他の 2 頭においては、移植後血糖は正常に復さなかったが HbA1c の低下を認めた。

現在までに、豚膵島を猿に異種移植した後に、インスリンを投与せずに血糖の正常化に成功した報告は 2 つしかない。1992 年に Sun, A. M.らは、豚膵島をマイクロカプセル法を用いて自然発症糖尿病猿に異種移植したところ、150 日以上血糖の正常化に成功した。また、1996 年に Sun, Y.らが豚膵島細胞を同じく alginate-polylysine-alginate でカプセル化し移植したところ、9 頭中 7 頭で血糖の正常化に成功している。これら 2 つの報告は、ともにマイクロカプセル法を用いているが、拒絶反応が生じたときに肝炎になる可能性が報告されており、また拒絶時の摘出も困難である。一方、我々が開発している Bio-AEP は問題が生じたときに容易に摘出することが可能で、何度も繰り返し移植することができるなど利点が多い。

異種移植の最も深刻な問題の一つに、自然抗体を介した超急性拒絶反応が挙げられる。猿は、豚の細胞に発現している Gal $\alpha$ 1-3Gal という糖鎖に対し自然抗体を持っていることが知られている。近年の報告では、Gal $\alpha$ 1-3Gal は豚の膵管には発現しているが、膵島には発現していないため、異種膵島移植時に超急性反応が生じる可能性は低いと報告されている。

過去に、我々が移植に用いている豚 PE-cell においても、同様に Gal $\alpha$ 1-3Gal の発現の有無を確認した。その結果、約 20%で Gal $\alpha$ 1-3Gal の発現を認めた。しかし、本検討では超急性拒絶反応は認められなかった。おそらく、培養基質で用いた細胞外マトリックスの成分が補体の拡散速度を遅くし、補体を失活した結果、拒絶が生じなかった可能性が高い。

Case-1 が成功した理由の一つに、十分な数の豚 PE-cell を移植したことが挙げられる。Case-1 では、レシピエントの体重に対して合計  $3.9 \times 10^7$  個の豚 PE-cells を移植した。我々は他の報告と異なり、膵島でなく内分泌細胞を用いている。そのため、他の報告と移植した細胞数の比較を行うことは困難である。過去の検討で、1 つの膵島に約 2000~3000 個の内分泌細胞が含まれていることを明らかにした。これを踏まえて計算を行うと、体重に対して約 13,000 個の膵島を Case-1 に移植したことになる。過去の統計から、International Islet Transplant Registry では、インスリン離脱を可能とするために少なくとも 6,000 個以上の膵島の移植を推奨している。近年、Shapiro, A. M. J.らの行っているエドモントンプロトコールでは、インスリン離脱を可能とするためにレシピエントの体重に対し  $11,547 \pm 1,604$  IEQ の膵島を移植している。この移植数だと、7 例中全てでインスリン離脱に至っている。従って、我々は十分な数の豚 PE-cell を Case-1 に移植できたと考えている。

過去の犬を用いた検討では、低酸素が原因と思われる細胞の壊死が認められた。今回、Bio-AEP の構造を薄したことも、豚 PE-cell の十分な酸素化の一助となった可能性が高い。

3 頭中 2 頭では、十分な細胞数を移植したにも関わらず、FBG の正常化は得られなかった。NIDDM はインスリンの分泌と感受性の不均衡の結果生じる。Case-2 では、IVGTT を行ったとき糖負荷に対してインスリンの分泌が認められたが、血糖の十分な低下は認めら

れず、インスリン抵抗性が認められた。Case-3 では緩徐進行型糖尿病で、おそらく長期に渡ってインスリン抵抗性が存在していたと考えられる。Case-2 や Case-3 のようにインスリン抵抗性が存在していたときには、移植の治療効果が得られない可能性がある。従って、NIDDM の患者は、膵島移植の適応として相応しくないかもしれない。

今回、高齢で発症した糖尿病の猿を用いて行った検討は、今後 Bio-AEP をヒトへと臨床応用する上で重要な知見を得ることができた。

## E. 結論

Bio-AEP の移植は糖尿病治療の新たな戦略となりえる可能性が示唆された。一方で、この猿を除き本法は解決すべき問題のあることも明らかになった。今後はさらにその改良を目指し、糖尿病治療への応用について検討を進める予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Edamura, K., Ohgawara, H., Nasu, K., Iwami, Y., Sato, A., Ishikawa, S., Matsuki, N., Ono, K., Ogawa, H., Sasaki, N. Effect of the extracellular matrix on pancreatic endocrine cell function and its biocompatibility in dogs. *Cell Transplant.* 10:493-498. 2001.
- 2) Ohgawara, H., Morimoto, Y., Edamura, K., Ono, F. A Bioartificial endocrine for treatment of diabetes. *Bulletin of Med. Res. Institute Tokyo Women's Medical Univ.* 22:132. 2002.
- 3) Morimoto, Y., Nasu, K., Iwami, Y., Nagai, K., Edamura, K., Ohgawara, H. Comparative study of adult porcine pancreatic endocrine cells preparation using a technique of multiple enjection and pancreatic duct cannulation without

proteolytic enzyme. *Pancreas* 26:185-189. 2003.

- 4) Edamura, K., Itakura, S., Nasu, K., Iwami, Y., Ogawa, H., Sasaki, N., Ohgawara, H. Xenotransplantation of porcine pancreatic endocrine cells to total pancreatectomized dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 65(5): 2003. (*in press*).
- 5) Edamura, K., Nasu, K., Iwami, Y., Ogawa, H., Sasaki, N., Ohgawara, H. Effect of adhesion or collagen molecules on cell attachment, insulin secretion and glucose responsiveness in the cultured adult porcine endocrine pancreas. *Cell transplant.* 2003. (*in press*).

## 2. 学会発表

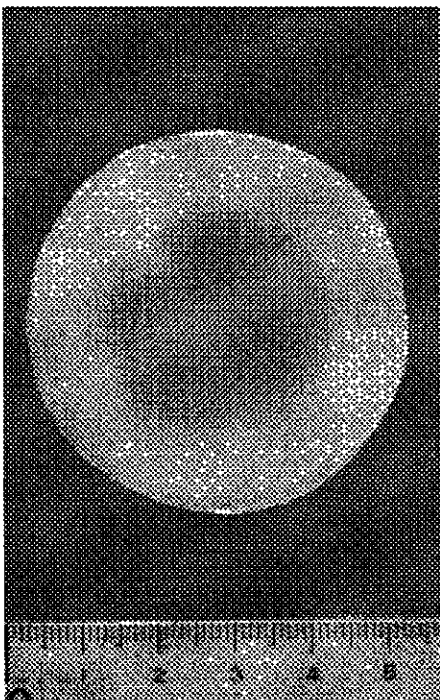
- 1) 枝村一弥、森元良彦、小川博之、佐々木伸雄、大河原久子、異種膵島移植における PERV モニター法の適応、第 29 回膵・膵島移植研究会 (2002/3/15-17、福島)
- 2) 森元良彦、枝村一弥、長井一高、大河原久子、ブタ膵内分泌細胞分離の新たな試み、第 1 回再生医療学会 (2002/4/18-19、京都国際会館、京都)
- 3) Ohgawara, H., Morimoto, Y., Edamura, K., Ono, F. A bioartificial endocrine pancreas for the treatment of diabetes. 62nd Annual Meeting and Science Sessions, American Diabetes Association (2002/6/14-18, Moscone Convention Center, San Francisco, California, U.S.A.)
- 4) 枝村一弥、大河原久子、小川博之、佐々木伸雄、実験的糖尿病犬に対する豚膵島細胞異種移植時の PERV 感染の可能性、第 134 回日本獣医学会 (2002/9/19-22、岐阜大学、岐阜)
- 5) Edamura, K., Ono, F., Nasu, K., Iwami, Y., Yasuda, K., Seino, S., Sasaki, N., Ohgawara, H. Success of porcine islet xenograft using

bioartificial endocrine pancreas in spontaneously diabetic monkeys. Rachmiel Levine Symposium 2002. -Advances in Islet Cell Biology- (2002/10/9-12. Hilton Anaheim. Anaheim. CA. U.S.A.)

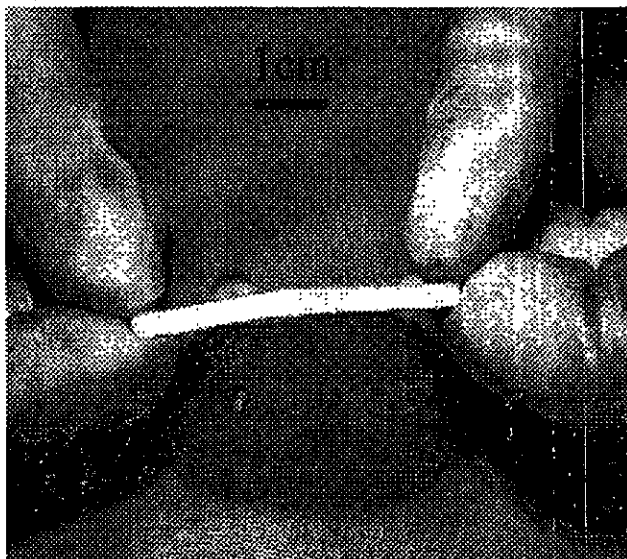
- 6) Sato, S., Edamura, K., Ono, F., Nasu, K., Iwami, Y., Ogawa, H., Sasaki, N., Ohgawara, H. A bioartificial endocrine pancreas for the treatment of diabetes. 5th International Meeting of the Tissue Engineering Society International (2002/12/8-10, International Conference Center, Kobe, Japan)

図1

A



B



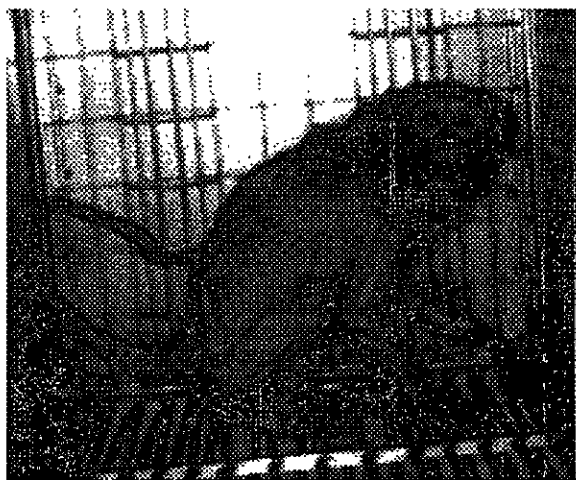
新型バイオ人工膵島 (Bio-AEP) の形状を示した。今回用いた新型Bio-AEPの直径は5cmで、薄さは0.2cmである。

図2

A



B



健常猿(A)と糖尿病猿(B)の外貌写真。糖尿病猿は、健常猿に比べて著しく痩せている。