

明 細 書

発明の名称：カプセル化膵島

技術分野

[0001] カプセル化膵島に関する技術が開示される。

背景技術

[0002] 膵島移植は人体への負荷が比較的少ない糖尿病の治療手段であるが、移植された膵島が長期生着するためには強力な免疫抑制が必須であり、移植患者への免疫抑制剤の投与が医療現場では実施されている。ただし免疫抑制剤の投与には副作用等のリスクがあるため、微小なマイクロカプセル化によって免疫隔離をして膵島を多数腹腔内へ移植する方法が検討されており、この場合、免疫抑制は不要もしくは投与量を減衰させることが可能であるが、未だ十分な治療成績は得られていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：W02001/052871

非特許文献

[0004] 非特許文献1：METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 137, 575-580, 1988

非特許文献2：TRANSPLANTATION, Vol. 53, 1180-1183, No. 6, June 1992

非特許文献3：Bioartificial Pancreas, Vol., 98, No. 6, 1996, 1417-1422

非特許文献4：Drug Delivery System, Vol., 12, No. 2, 1997

非特許文献5：JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH B: APPLIED BIOMATERIALS, 2013 VOL., 101B, ISSUE 2, 258-268

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 改良されたカプセル化膵島を提供することが一つの課題である。

課題を解決するための手段

[0006] 斯かる課題の解決手段として下記を包含する発明が提供される。

項 1 .

コアが 5 重膜で覆われた製剤であり、

前記コアは膵島を含み、

前記 5 重膜の内側から 1 番目、3 番目及び 5 番目の膜はアルギン酸を含み、

内側から 2 番目及び 4 番目の膜はポリオルニチンを含む、

製剤。

項 2 .

製剤の平均直径が $400\text{ }\mu\text{m}$ 以上である、項 1 に記載の製剤。

項 3 .

製剤の平均直径が $400\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以下である、項 1 又は 2 に記載の製剤。

項 4 .

糖尿病治療用である、項 1 ～ 3 のいずれかに記載の製剤。

項 5 .

膵島が、生後 1 ～ 3 週齢の幼若ブタから取得した膵島である、項 1 ～ 4 のいずれかに記載の製剤。

項 6 .

(a) 膵島を含有するアルギン酸ナトリウム溶液 A を調製する工程、

(b) 該アルギン酸ナトリウム溶液 A を二価カチオン溶液に滴下し、ゲル化した粒子を回収する工程、

(c) 工程 (b) で回収した粒子をポリ L-オルニチン溶液 A に添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、

(d) 工程 (c) で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液 B に添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、

(e) 工程 (d) で回収した粒子をポリ L-オルニチン溶液 B に添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、

(f) 工程 (e) で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液 C に添加し、

所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、及び

(g) 工程 (f) で回収した粒子をクエン酸ナトリウム溶液に添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程

を含む、項 1～5 のいずれかに記載の製剤の製造方法。

項 7.

ポリ-L-オルニチン溶液 A のポリ-L-オルニチン濃度が 0.05 w/v % 以上 1 w/v % 未満である、項 6 に記載の方法。

項 8.

工程 (d) において、工程 (c) で回収した粒子を、ポリ-L-オルニチン溶液 A' に添加し、所定の時間攪拌後、回収した後に、アルギン酸ナトリウム溶液 B に添加する、項 6 又は 7 に記載の方法。

発明の効果

[0007] 糖尿病の治療に有効な手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]カプセル化膵島投与後の糖尿病モデルマウスにおける血中グルコース濃度を測定した結果を示す。黒塗り四角は三重膜製剤を投与した結果であり、●は五重膜製剤 1 を投与した結果であり、▲は五重膜製剤 2 を投与した結果であり、×は五重膜製剤 3 を投与した結果である。

[図2]カプセル化膵島投与後の線維化率を測定した結果を示す。黒塗り四角は三重膜製剤を投与した結果であり、●は五重膜製剤 1 を投与した結果であり、▲は五重膜製剤 2 を投与した結果であり、×は五重膜製剤 3 を投与した結果である。

発明を実施するための形態

[0009] 製剤は、コアが 5 重の膜で覆われた製剤であり、前記コアは膵島を含み、前記 5 重膜の内側から 1 番目、3 番目及び 5 番目の膜はアルギン酸を含み、内側から 2 番目及び 4 番目の膜はポリオルニチンを含むことが好ましい。斯かる製剤は、より長期に亘って血糖値を適切な範囲に維持することを可能にし得る。一実施形態において、製剤は、5 重よりも多い膜（例えば、6 重膜

、7重膜、8重膜、9重膜、又は10重膜)で覆われていてもよい。五重の膜で覆われた製剤とは、後述するような膜を形成する工程を5回含む方法で調製された製剤であることを意味し得る。

[0010] 膵島の種類は、任意であり特に制限されない。膵島は、インスリン産生 β 細胞、グルカゴン含有 α 細胞、ソマトスタチン分泌デルタ細胞、及び膵臓ポリペプチド含有細胞(PP細胞)を含むことが好ましい。膵島は、その大部分がインスリン産生 β 細胞であることが好ましい。膵島の由来は、目的に応じて選択し得、ヒト、ブタ、マウス、ラット、サル、又はイヌであることが好ましい。一実施形態において、膵島は、ブタ由来であることが好ましく、幼若ブタ(例えば、生後3日~4週間又は生後7日~3週間)の膵島であることが好ましい。膵島は、当該技術分野において知られている方法を任意に採用することにより得ることができる。例えば、消化酵素にLiberaseを用いる方法(T. J. Cavanagh et al. Transplantation Proceedings, 30, 367 (1998))を好ましく用いることができる。

[0011] 膵島のサイズは、50 μ m以上400 μ m以下が好ましく、50 μ m以上350 μ m以下がより好ましい。膵島のサイズは、顕微鏡のマイクロメーターを用いて測定することができる。膵島は、 β 細胞を10%以上含んでいることが特性として好ましい。 β 細胞の割合の上限は特にないが、例えば、80%である。

[0012] 膜がアルギン酸を含むとは、膜が主としてアルギン酸で構成されていることを意味する。膜がポリオルニチンを含むとは、膜が主としてポリオルニチンで構成されていることを意味する。

[0013] 製剤は、1カプセル中に1~5の膵島を含有することが好ましい。

[0014] アルギン酸の膜を構成するアルギン酸の種類は特に制限されない。ポリオルニチンの膜を構成するポリオルニチンの種類は特に制限されない。

[0015] 製剤は、線維化を抑制する観点から平均直径が400 μ m以上が好ましく、より好ましくは420 μ m以上である。平均直径の上限は特にないが、例

例えば、 $700\mu\text{m}$ 以下、 $600\mu\text{m}$ 以下、又は $500\mu\text{m}$ 以下に設定することができる。平均直径は、後述する実施例で採用した測定方法で測定することができる。

[0016] 上述の製剤は、糖尿病の治療に有用である。糖尿病の種類は特に制限されず、例えば、1型糖尿病を挙げることができる。その他、上記製剤は、原因を問わず血糖コントロールが難しい患者の治療に有用である。

[0017] 脾島の製造方法は任意である。一実施形態において、脾島は、次の工程（

a）～（g）を含むことが好ましい：

（a）脾島を含有するアルギン酸ナトリウム溶液Aを調製する工程、

（b）該アルギン酸ナトリウム溶液Aを二価カチオン溶液に滴下し、ゲル化した粒子を回収する工程、

（c）工程（b）で回収した粒子をポリ-L-オルニチン溶液Aに添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、

（d）工程（c）で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液Bに添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、

（e）工程（d）で回収した粒子をポリ-L-オルニチン溶液Bに添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、

（f）工程（e）で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液Cに添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程、及び

（g）工程（f）で回収した粒子をクエン酸ナトリウム溶液に添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収する工程。

[0018] アルギン酸ナトリウム溶液Aのアルギン酸ナトリウム濃度は、特に制限されないが、例えば、 $1\text{w}/\text{v}\%$ 以上 $3\text{w}/\text{v}\%$ 以下であることが好ましい。

[0019] アルギン酸ナトリウム溶液Aは、脾島を $10000\text{IEQ}/\text{mL}$ 以上の濃度で含有することが、カプセル化後の脾島の糖応答性を良好にするという観点で好ましい。ここで、 IEQ とは、直径 $150\mu\text{m}$ を基準とした脾島の数を意味する。脾島濃度は、 $11,000\text{IEQ}/\text{mL}$ 以上、又は $12,000\text{IEQ}/\text{mL}$ 以上であることが好ましい。脾島濃度の上限は特に制限ない

が、例えば、30,000 IEQ/mL以下、25,000 IEQ/mL以下とすることができる。

[0020] アルギン酸ナトリウム溶液Aは、臍島を上記のような濃度で含有するように調製される限り、その具体的な調製方法は制限されない。例えば、生理食塩水に適量のアルギン酸ナトリウムを溶解し、そこに適量に臍島を添加し、必要に応じて攪拌することにより、アルギン酸ナトリウム溶液Aを得ることができる。

[0021] 工程(b)で使用する二価カチオン溶液は、そこにアルギン酸ナトリウム溶液Aを滴下することにより、臍島を包含したゲル化粒子(カプセル)が得られる限り制限されない。このような二価カチオン溶液を構成する二価カチオンとしては、水溶液中で二価の金属イオンを遊離する塩(例えば、塩化カルシウム、乳酸カルシウム、塩化バリウム、及び塩化ストロンチウム等)を挙げることができる。一実施形態において、好ましい塩は塩化カルシウムであり、好ましい二価カチオン溶液は塩化カルシウム溶液である。

[0022] 二価カチオン溶液の二価カチオンの濃度は、特に制限されず、例えば、50~500 mMの範囲で設定することができる。

[0023] 二価カチオン溶液へのアルギン酸ナトリウム溶液Aの滴下様式は、臍島を包含するゲル化粒子が得られる限り制限されない。一実施形態において、二価カチオン溶液に、アルギン酸ナトリウム溶液Aを適当な大きさのニードルを通して滴下することが好ましい。

[0024] ゲル化粒子の回収は、任意であり、例えば、ゲル化粒子が形成された二価カチオン溶液を一定時間静置させ、上清を除去すること又はこれを繰り返すことにより、実施することができる。

[0025] 工程(c)で使用するポリーオルニチン溶液Aは、工程(b)で形成されたゲル化粒子をコーティングすることができるものであれば特に制限されない。例えば、ポリーオルニチンを生理食塩水に溶解することで調製することができる。

[0026] ポリーオルニチン溶液Aにおけるポリーオルニチンの濃度は特に制限

されないが、 $0.05\text{ w/v}\%$ 以上 $1\text{ w/v}\%$ 未満が製剤（カプセル）の平均直径を $50\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $400\text{ }\mu\text{m}$ 以下に制御する観点で好ましい。一実施形態において、ポリ－オルニチン溶液Aにおけるポリ－オルニチンの濃度は $0.9\text{ w/v}\%$ 以下又は $0.8\text{ w/v}\%$ 以下であることが好ましい。

[0027] 工程（c）の「工程（b）で回収した粒子をポリ－オルニチン溶液Aに添加」とは、工程（b）で回収したゲル化粒子にポリ－オルニチン溶液Aを添加する態様も包含する。工程（c）における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、1分間～20分間が好ましい。

[0028] 工程（c）におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、ポリ－オルニチン溶液Aを一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、アルギン酸によるゲル化層の表面がポリ－オルニチンでコーティングされた構造を有することが好ましい。

[0029] 工程（d）で使用するアルギン酸ナトリウム溶液Bは、工程（a）で使用するアルギン酸ナトリウム溶液Aと同一濃度であっても異なってもよい。一実施形態において、アルギン酸ナトリウム溶液Bのアルギン酸ナトリウム濃度は、コーティング操作の容易性という観点でアルギン酸ナトリウム溶液Aのアルギン酸ナトリウム濃度よりも低いことが好ましい。例えば、アルギン酸ナトリウム溶液Aのアルギン酸ナトリウム濃度が $1\text{ w/v}\%$ 以上 $3\text{ w/v}\%$ 以下である場合、アルギン酸ナトリウム溶液Bのアルギン酸ナトリウム濃度は $0.1\text{ w/v}\%$ 以上 $0.3\text{ w/v}\%$ 以下であることが好ましい。

[0030] 工程（d）の「工程（c）で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液Bに添加」とは、工程（c）で回収したゲル化粒子にアルギン酸ナトリウム溶液Bを添加する態様も包含する。工程（d）における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、1分間～15分間攪拌することが好ましい。

[0031] 工程（d）におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、アルギン酸ナトリウム溶液Bを一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、アルギン酸によるゲル化層の

表面がポリＬ－オルニチンでコーティングされ、更にその上にアルギン酸によるゲル化層を有することが好ましい。

- [0032] 一実施形態において、工程（c）で回収した粒子を、アルギン酸ナトリウム溶液Bに添加する前に、ポリＬ－オルニチン溶液A'に添加し、所定の時間攪拌後、粒子を回収し、それを工程（d）のアルギン酸ナトリウム溶液Bに添加することが好ましい。ここで、ポリＬ－オルニチン溶液A'は、ポリＬ－オルニチン溶液Aと同一濃度又は異なってよい。一実施形態において、ポリＬ－オルニチン溶液BのポリＬ－オルニチン濃度は、ポリＬ－オルニチン溶液AのポリＬ－オルニチン濃度よりも低いことが好ましい。例えば、ポリＬ－オルニチン溶液A'のポリＬ－オルニチン濃度は0.01 w/v%以上0.05 w/v%未満であることが好ましい。
- [0033] 工程（e）及び工程（f）は基本的に工程（c）及び工程（d）の繰り返しである。ポリＬ－オルニチン溶液BにおけるポリＬ－オルニチンの濃度は特に制限されないが、0.01 w/v%以上0.05 w/v%未満が好ましい。
- [0034] 工程（e）の「工程（d）で回収した粒子をポリＬ－オルニチン溶液Bに添加」とは、工程（d）で回収したゲル化粒子にポリＬ－オルニチン溶液Bを添加する態様も包含する。工程（e）における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、1分間～20分間が好ましい。
- [0035] 工程（e）におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、ポリＬ－オルニチン溶液Aを一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、アルギン酸によるゲル化層の表面がポリＬ－オルニチン、アルギン酸、及びポリＬ－オルニチンでコーティングされた構造を有することが好ましい。
- [0036] 工程（f）で使用するアルギン酸ナトリウム溶液Cは、工程（d）で使用するアルギン酸ナトリウム溶液Bと同一濃度であっても異なってもよい。例えば、アルギン酸ナトリウム溶液Cのアルギン酸ナトリウム濃度は0.1 w/v%以上0.3 w/v%以下であることが好ましい。

- [0037] 工程（f）の「工程（e）で回収した粒子をアルギン酸ナトリウム溶液Cに添加」とは、工程（e）で回収したゲル化粒子にアルギン酸ナトリウム溶液Cを添加する態様も包含する。工程（f）における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、1分間～15分間攪拌することが好ましい。
- [0038] 工程（f）におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、アルギン酸ナトリウム溶液Cを一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、アルギン酸によるゲル化層の表面がポリレーオルニチン、アルギン酸、ポリレーオルニチン、及びアルギン酸でコーティングでコーティングされた構造を有することが好ましい。
- [0039] 工程（g）で使用するクエン酸ナトリウム溶液は、0.5～3w/v%の濃度でクエン酸ナトリウムを含有することが好ましい。ゲル化粒子内のカチオンをキレートし、ゲルから液状に近づけることでインスリン放出を促す目的でクエン酸ナトリウム溶液を添加することができる。
- [0040] 工程（g）の「工程（d）で回収した粒子をクエン酸ナトリウム溶液に添加」とは、工程（d）で回収したゲル化粒子にクエン酸ナトリウム溶液を添加する態様も包含する。工程（e）における攪拌の速度及び時間は任意であり、例えば、1分間～15分間であることが好ましい。
- [0041] 工程（e）におけるゲル化粒子の回収の様式は任意であり、例えば、クエン酸ナトリウム溶液を一定時間静置させ、上清を除去することでゲル化粒子を回収できる。回収されたゲル化粒子は、内部がより液状に近づいていると考えられる。

実施例

- [0042] 以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。
- [0043] 1. 三重膜製剤の作製
1. 7w/v%アルギン酸ナトリウム溶液（Pronova）に生後14日齢のブタから単離した幼若ブタ由来臍島を16,000IEQ/mLの濃度で懸濁した。これをニードルに通し、エアフローにより懸濁液をカットし

ながら109 mM塩化カルシウム溶液中に滴下させた。塩化カルシウム溶液から固化したアルギン酸ビーズを回収し、0.075 w/v%のポリオールニチン (PLO) (分子量5,000~15,000) 溶液に添加し、10分間攪拌した。ビーズを回収し、さらに0.038 w/v% PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、0.17 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌し、最後に1.6%クエン酸ナトリウム溶液に添加して2分間攪拌させて、臍島がアルギン酸膜、ポリオールニチン膜、アルギン酸膜という三重膜で覆われたカプセル化臍島(製剤)を得た。得られたカプセル化臍島を37℃でCO₂インキュベーター中で25日間培養した。

[0044] 2. 五重膜製剤の作製1

1. 7 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液 (Pronova) に生後14日齢のブタから単離した幼若ブタ由来臍島を16,000 IEQ/mLの濃度で懸濁した。これをニードルに通し、エアフローにより懸濁液をカットしながら109 mM塩化カルシウム溶液中に滴下させた。塩化カルシウム溶液から固化したアルギン酸ビーズを回収し、0.075 w/v%のポリオールニチン (PLO) (分子量5,000~15,000) 溶液に添加し、10分間攪拌した。ビーズを回収し、さらに0.038 w/v% PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、0.17 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌した。ビーズを回収し、再度0.038 w/v% PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、0.17 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌した。最後に1.6%クエン酸ナトリウム溶液に添加して2分間攪拌させて、臍島がアルギン酸膜、ポリオールニチン膜、アルギン酸膜、ポリオールニチン膜、及びアルギン酸膜という五重膜で覆われたカプセル化臍島(五重膜製剤1)を得た。得られたカプセル化臍島を37℃でCO₂インキュベーター中で25日間培養した。

[0045] 3. 五重膜製剤の作製2

1. 7 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液 (Pronova) に生後14日齢のブタから単離した幼若ブタ由来臍島を16,000 IEQ/mLの濃

度で懸濁した。これをニードルに通し、エアフローにより懸濁液をカットしながら109 mM塩化カルシウム溶液中に滴下させた。塩化カルシウム溶液から固化したアルギン酸ビーズを回収し、0.10 w/v%のポリ-L-オルニチン (PLO) (分子量5,000~15,000) 溶液に添加し、10分間攪拌した。ビーズを回収し、さらに0.05 w/v% PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、0.17 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌した。ビーズを回収し、再度0.038 w/v% PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、0.17 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌した。最後に1.6%クエン酸ナトリウム溶液に添加して2分間攪拌させて、臍島がアルギン酸膜、ポリオルニチン膜、アルギン酸膜、ポリオルニチン膜、及びアルギン酸膜という五重膜で覆われたカプセル化臍島 (五重膜製剤2) を得た。得られたカプセル化臍島を37℃でCO₂インキュベーター中で25日間培養した。

[0046] 4. 五重膜製剤の作製3

1.7 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液 (Pronova) に生後14日齢のブタから単離した幼若ブタ由来臍島を16,000 IEQ/mLの濃度で懸濁した。これをニードルに通し、エアフローにより懸濁液をカットしながら109 mM塩化カルシウム溶液中に滴下させた。塩化カルシウム溶液から固化したアルギン酸ビーズを回収し、0.15 w/v%のポリ-L-オルニチン (PLO) (分子量5,000~15,000) 溶液に添加し、10分間攪拌した。ビーズを回収し、さらに0.075 w/v% PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、0.17 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌した。ビーズを回収し、再度0.038 w/v% PLO溶液に添加し、6分間攪拌して回収し、0.17 w/v%アルギン酸ナトリウム溶液に添加して6分間攪拌した。最後に1.6%クエン酸ナトリウム溶液に添加して2分間攪拌させて、臍島がアルギン酸膜、ポリオルニチン膜、アルギン酸膜、ポリオルニチン膜、及びアルギン酸膜という五重膜で覆われたカプセル化臍島 (五重膜製剤4) を得た。得られたカプセル化臍島を3

7℃でCO₂インキュベーター中で25日間培養した。

[0047] 5. カプセルサイズの測定

6ウェルプレートにカプセル化膵島を取り、実体顕微鏡 (M165FC, Leica) を用いて2倍の倍率でカプセルを撮影した。Leica Application Suite V3の円分析ツールを用い、30個のカプセルの直径を測定し、平均値を計算した。

[0048] 6. カプセル強度の測定

35mmディッシュにカプセル化膵島を20～50個取り、粘度測定装置を用いてカプセルを上から押し潰し、カプセルが破壊された時の力を測定した。かかった力をカプセル数で除して、1カプセルあたりの強度とした。

[0049] 7. 膵島包埋量の測定

6ウェルプレートに膵島を取り、50μm以上の膵島の個数を50μm刻みでカウントした。各膵島数にサイズごとに決められたファクターを乗じ、IEQを算出した。これらの和を総IEQとし、16,000IEQになるように調整しアルギン酸ナトリウムを加えた。

[0050] 8. 糖尿病マウスを用いた有効性評価

STZにより糖尿病を誘導したC57BL/6Jマウスの腹部を正中線に沿って小切開した。そこに滅菌スポイトを用いて生理食塩液に懸濁したカプセル化膵島を10,000IEQ/bodyの用量で移植した。移植後は12週間飼育を行い、マウスの尾静脈から採血し経時的に血糖値を測定した。

図1に示されるとおり、五重膜製剤の投与により、三重膜製剤よりも長期間に亘って、糖尿病マウスにおける血中グルコース濃度の上昇を抑制できることが確認された。

[0051] 9. 線維化率の測定

健常C57BL/6Jマウスの腹部を正中線に沿って小切開した。そこに滅菌スポイトを用いてカプセル化膵島を1,000capsules/bodyの用量で移植した。移植から1週間後に腹腔内から、Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) の入った125mLコ

ンテナーにカプセル化脾島を回収した。上清を除き、HBSSを加えて洗浄した。懸濁したカプセル化脾島を35mmディッシュに取り、線維芽細胞で覆われたカプセル個数をカウントした。線維化カプセル数をディッシュ内の全カプセル数で除し、2ディッシュ分の平均値を線維化率として表した。

図2に示されるとおり、カプセル化脾島の直径が凡そ400 μ mを超えると、その線維化が有意に抑制されることが確認された。