

microplate counter (Micro Beta Plus; Wallac, Turku, Finland). ELISAs for human IFN- γ , IL-5, and IL-10 were performed using ELISA kits (OptEIA; BD-Biosciences, Boston, MA, USA) according to the manufacturer's protocols.

Cytotoxicity Assay

To prepare effector cells, cultures with IL-2 and irradiated GM-CSF-transduced autologous tumor cells as described above were prepared in 96-well round-bottomed plates and the plates were cultured for 7 days. On the day of the assay, aliquots of 100 μ l of the culture medium were removed from each well and then labeled target cells (5×10^3 cells/100 μ l/well) were added. To label the target cells, single-cell suspensions of cultured autologous or allogeneic RCC cells, autologous NRC, and K562 cells were incubated with $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (100 μ Ci) for 1 h at 37°C and washed three times prior to use. For blocking experiments, F(ab')₂ anti-CD3 mAb prepared as described previously [44] was added to a final concentration of 10 μ g/ml at the start of the assay. The plates were incubated at 37°C for 6 h, the supernatants were collected using a Skatron cell harvester system (Diversified Equipment Co., Lorton, VA, USA), and the radioactivity was measured using a γ counter. Spontaneous release (SR) and maximal release (MR) were measured in the supernatant of target cells alone with 100 μ l of either medium or 10% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA). The percentage specific cytotoxicity was calculated using the following formula: % cytotoxicity = experimental release - SR / MR - SR \times 100.

Analysis of the TCR β Repertoire

Total RNA was isolated from PBMC and homogenized tumor tissues using Trizol reagent (Invitrogen) with a cryo-press crusher (Microtech Nichion, Tokyo, Japan). TCR β repertoire analysis was performed as described previously [45]. Briefly, TCR β cDNA was synthesized using C-oligonucleotides (5'-CGGGCTGCTCCTT GAGGGCTGCG-3') with AMV reverse transcriptase (Invitrogen). The TCR cDNA was amplified by 40 cycles of PCR with each of the 24 V β 5' primers (V β 1-w24) and the C β 3' primer in PCR buffer containing 1 U of Hot Start Taq polymerase (AmpliTaQ Gold; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The products were subjected to Southern blot analysis using a ³²P-labeled C β probe. Different samples of each V β product were compared after quantifying the autoradiographs by densitometry BAS-2000II (Fuji Photo Film Corp.). To refine CDR3 size analysis, the V β -C β PCR product was copied in a 10-cycle run-off reaction with a fluorescence-labeled C β primer. The labeled PCR products were electrophoresed on a DNA sequencer (ABI Prism 377; Applied Biosystems) in the presence of a fluorescent size standard and analyzed with a DNA fragment size program (GeneScan; Applied Biosystems).

The PCR products of the CDR3 fragment were cloned into the pCRII-TOPO vector system (Invitrogen). Thirty

colonies containing the insert fragment were selected at random and sequenced using an ABI Prism Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and an automatic DNA sequencer ABI 373 (Applied Biosystems). The amino acid sequence of the CDR3 region was deduced using the software GENETYX-MAC v10.1.4 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Detection of Antitumor Antibodies

The antitumor antibodies appearing in patients' sera were detected by Western blot analysis according to the standard procedure with some modifications [18]. Briefly, humoral antitumor immune responses were evaluated using the reactivity of the tumor cell lysate and sera from the patients. Autologous RCC and NRC were extracted in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl at pH 7.6, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 500 units/ml aprotinin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). A fibroblast cell line of human lip origin, which was established in our laboratory, and a small-cell lung carcinoma cell line, H69, were used as irrelevant control cells. Cell lysates were denatured, reduced in SDS sample buffer with 2-mercaptoethanol, and then electrophoresed on 7.5% polyacrylamide minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The proteins were transferred onto Immobilon membranes (Millipore, Bedford, MA, USA) and the blots were stained with Ponceau S solution (Sigma) for visualization. After destaining with TBST (0.1% Tween 20-Tris-buffered saline) and blocking with 5% nonfat dried milk in TBST overnight, the blots were probed with diluted (1:300) patient sera for 2 h. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit F(ab')₂ anti-IgG Ab (DAKO, 1:3000 dilution) was added for 1 h, and the blots were developed with an ECL kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Fumihiko Komine, Tsuyoshi Tanabe, Hitomi Nagayama, Hitoshi Hibino, Muneomi Endo, Tomoko Yamazaki, Mariko Morishita, Koichiro Kuwabara, Momoyo Ohki, Sanae Suzuki, and the staff of The Advanced Clinical Research Center, Research Hospital, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, for their excellent patient care and their strong support of this clinical study. We also thank Drs. Ken-ichi Tobisu and Hiroyuki Fujimoto (National Cancer Center, Japan), Taro Shuin (Kochi Medical College), Shunichi Fukuhara (Kyoto University), Yusuke Nakamura (The Institute of Medical Science, University of Tokyo), Toshio Kuroki (Gifu University), Ken-ichi Arai (The Institute of Medical Science, University of Tokyo), Jonathan W. Simons (Emory University), and Glenn Dranoff (Dana-Farber Cancer Institute) for helpful advice and discussions. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

RECEIVED FOR PUBLICATION JULY 5, 2004; ACCEPTED JULY 5, 2004.

REFERENCES

1. Marumo, K., et al. (2001). The prevalence of renal cell carcinoma: nation-wide survey in Japan in 1997. *Int. J. Urol.* 8: 359-365.
2. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators Interferon- α and survival in



- metastatic renal carcinoma: early results of a randomized controlled trial. *Lancet* 353: 14–17.
3. Bukowski, R. M. (1997). Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 80: 1198–1220.
 4. Motzer, R. J., Bacik, J., Murphy, B. A., Russo, P., and Mazumdar, M. (2002). Interferon- α as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 20: 289–296.
 5. Clark, J. I., et al. (1999). Daily subcutaneous ultra-low-dose interleukin 2 with daily low-dose interferon- α in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 5: 2374–2380.
 6. Tagliaferri, P., et al. (1998). Daily low-dose subcutaneous recombinant interleukin-2 by alternate weekly administration. *Am. J. Clin. Oncol.* 21: 48–53.
 7. Figlin, R. A., et al. (1999). Multicenter, randomized, phase III trial of CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 17: 2521–2529.
 8. Childs, R., et al. (2000). Regression of metastatic renal-cell carcinoma after non-myeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 343: 750–758.
 9. Dranoff, C., et al. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3539–3543.
 10. Jaffee, E. M., Thomas, M. C., Huang, A. Y. C., Hauda, K. M., Levitsky, H. I., and Pardoll, D. M. (1996). Enhanced immune priming with spatial distribution of paracrine cytokine vaccines. *J. Immunother.* 19: 176–183.
 11. Dranoff, C. (2002). GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 188: 147–154.
 12. Ellem, K. A., et al. (1997). A case report: immune responses and clinical course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 44: 10–20.
 13. Berns, A. J., et al. (1995). Phase I study of non-replicating autologous tumor cell injections using cells prepared with or without GM-CSF gene transduction in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum. Gene Ther.* 6: 347–368.
 14. Simons, J. W., et al. (1997). Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Res.* 57: 1537–1546.
 15. Simons, J. W., et al. (1999). Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res.* 59: 5160–5168.
 16. Soiffer, R., et al. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13141–13146.
 17. Chang, A. E., Li, Q., Bishop, D. K., Normolle, D. P., Redman, B. D., and Nickloff, B. J. (2000). Immunogenic therapy of human melanoma utilizing autologous tumor cells transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Hum. Gene Ther.* 11: 839–850.
 18. Jaffee, E. M., et al. (2001). Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J. Clin. Oncol.* 19: 145–156.
 19. Kusumoto, M., et al. (2001). Phase I clinical trial of irradiated autologous melanoma cells adenovirally transduced with human GM-CSF gene. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 373–381.
 20. Salfgia, R., et al. (2003). Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 21: 624–630.
 21. Soiffer, R., et al. (2003). Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 21: 3343–3350.
 22. Nemunaitis, J., et al. (2004). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 96: 326–331.
 23. Tani, K., et al. (2000). Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell carcinoma using lethally irradiated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced autologous renal cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46(Suppl.): S73–S76.
 24. Kawai, K., et al. (2002). Advanced renal cell carcinoma treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene therapy: a clinical course of the first Japanese experience. *Int. J. Urol.* 9: 462–466.
 25. Thomas, M. C., Greten, T. F., Pardoll, D. M., and Jaffee, E. M. (1998). Enhanced tumor protection by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression at the site of an allogeneic vaccine. *Hum. Gene Ther.* 9: 835–843.
 26. Borrello, I., Sotomayor, E. M., Cooke, S., and Levitsky, H. I. (1999). A universal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing bystander cell line for use in the formation of autologous tumor cell-based vaccines. *Hum. Gene Ther.* 10: 1983–1991.
 27. Luznik, L., et al. (2003). Successful therapy of metastatic cancer using tumor vaccines in mixed allogeneic bone marrow chimeras. *Blood* 101: 1645–1652.
 28. Mastrangelo, M. J., et al. (1999). Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* 6: 409–422.
 29. Hanada, K. I., Yewdell, J. W., and Yang, J. C. (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427: 252–256.
 30. Puisieux, I., et al. (1996). Restriction of the T-cell repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from nine patients with renal-cell carcinoma: relevance of the CDR3 length analysis for the identification of in situ clonal T-cell expansions. *Int. J. Cancer* 66: 201–208.
 31. Gaudin, C., et al. (1995). In vivo local expansion of clonal T cell subpopulations in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 55: 685–690.
 32. Gaugler, B., et al. (1996). A new gene encoding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44: 323–330.
 33. Vissers, J. L. M., et al. (1999). The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 59: 5554–5559.
 34. Rosenberg, S. A., et al. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316: 889–895.
 35. Nakazaki, Y., et al. (1998). Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine leukemia/lymphoma cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Ther.* 5: 1355–1362.
 36. Wang, Z., Qiu, S. J., Ye, S. L., Tang, Z. Y., and Xiao, X. (2001). Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 8: 751–758.
 37. Van Elsas, A., Hurvitz, A. A., and Allison, J. P. (1999). Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J. Exp. Med.* 190: 355–366.
 38. Kojima, T., et al. (2003). Tumor-derived Gp96 combined with GM-CSF gene-transduced tumor cells inhibit tumor growth in mice through migration and maturation of CD11c⁺ cells. *Hum. Gene Ther.* 14: 715–728.
 39. Buzio, C., et al. (1997). Effectiveness of very low doses of immunotherapy in advanced renal cell cancer. *Br. J. Cancer* 76: 541–544.
 40. Lissoni, P., et al. (2002). Ten-year survival results in metastatic renal cell cancer patients treated with monoimmunotherapy with subcutaneous low-dose interleukin-2. *Anti-cancer Res.* 22: 1061–1064.
 41. Schomburg, A., et al. (1992). In vivo and ex vivo antitumor activity in patients receiving low-dose subcutaneous recombinant interleukin-2. *Nat. Immunol.* 11: 133–143.
 42. Sobol, R. E., et al. (1999). Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a phase I study. *Clin. Cancer Res.* 5: 2359–2365.
 43. Tani, K., et al. (1989). Implantation of fibroblasts transfected with human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) cDNA into mice as a model of cytokine supplement gene therapy. *Blood* 74: 1274–1280.
 44. Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (1992). CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175: 353–360.
 45. Hase, H., et al. (2000). Case report: the availability of TCR-V β repertoires analysis with RT-PCR methods for the early detection of pulmonary relapsed T-cell malignancy after the autologous stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.* 64: 124–127.

臨床膵島移植のための膵島分離技術

5

Technical aspects of human islet isolation for clinical transplantation

Keywords

膵島, インスリン依存状態糖尿病, 膵島分離, 膵島移植, 細胞組織移植療法

興津 輝¹⁾ 松本 慎一¹⁾²⁾ 岩永 康裕¹⁾
野口 洋文¹⁾ 小林 直哉³⁾ 田中 紀章³⁾
前川 平⁴⁾ 田中 紘一¹⁾

- 1) 京都大学医学部附属病院 移植外科
- 2) 京都大学医学部附属病院 臓器移植医療部
- 3) 岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・腫瘍外科
- 4) 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部/分子細胞治療センター

はじめに

インスリンを投与しなければ生命を維持できない、いわゆるインスリン依存状態にある1型糖尿病の患者に対して、膵島移植という医療が欧米で大きな社会的注目を集め、臨床における治療法として確立されようとしている。膵島移植とは、生体での血糖調節に中心的役割を果たしている細胞集団の“膵島”を点滴の要領で門脈内に注入する細胞組織移植である。移植を受ける側(レシピエント)への侵襲が小さく、膵島移植は1型糖尿病患者にとって最も理想に近い治療法であるとみなされている。2000年になされたカナダ・エドモントンのアルバータ大学での臨床膵島移植治療成功の報告¹⁾は、膵島移植の歴史の流れを大きく変える出来事であった。この報告以来、4年あまりの間ですでに約300例の膵島移植が欧米を中心に行われている。

これは、ヒトでの膵島移植が報告された1970年代から1999年までの約30年間に行われた膵島移植の症例数に匹敵する。現在の膵島移植は、アルバータ大学で確立された、いわゆる“エドモントン・プロトコール”を基本として実施されており、その特徴は表1のように要約される。

現在、世界中の施設で膵島移植成績をさらに向上させる努力がなされている。今回は、膵島移植を支えている技術、特に膵島を分離する技術の背景や現行の標準手技、必要な周辺環境などについて解説する。

膵島とは

膵臓は肝臓の下側、胃の後方の上腹部に存在する実質臓器である(図1)。機能的には、蛋白質などを分解する消化酵素を消化管に分泌する外分泌と、ホルモンを血液中に分泌する内分泌の二つの働きをもつ。消

Okitsu, Teru¹⁾ / Matsumoto, Shinichi¹⁾²⁾ / Iwanaga, Yasuhiro¹⁾ / Noguchi, Hirofumi¹⁾ / Kobayashi, Naoya³⁾ / Tanaka, Noriaki³⁾ / Maekawa, Taira⁴⁾ / Tanaka, Koichi¹⁾

1) Department of Transplant Surgery, Kyoto University Hospital

2) Transplantation Unit, Kyoto University Hospital

3) Department of Gastroenterological Surgery, Transplant, and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

4) Department of Transfusion Medicine & Cell Therapy, Kyoto University Hospital

E-mail : teruokitsu@kuhp.kyoto-u.ac.jp

表1 エドモントン・プロトコールの特徴

<p>1) 膵島分離技術の確立 “エドモントン・膵島分離プロトコール”と呼ばれる。臨床膵島移植に耐えるだけの質と量の水準を満たす膵島分離方法を確立した。</p> <p>2) 新鮮膵島の移植 膵島移植は膵島分離後可及的迅速に行った。膵島分離後2時間以内を目標とした。</p> <p>3) インスリン離脱のための十分量の膵島移植 移植膵島の総量がインスリン離脱を期待できる十分な量となるまで、比較的短期間に複数のドナーから単数のレシピエントに移植を施行した。</p> <p>4) 新しい免疫抑制プロトコールの導入 ラバマイシン(シロリムス)を中心に抗IL-2受容体抗体(ダクリズマブ)と低容量のタクロリムスを組み合わせた免疫抑制療法を実行した。それまで移植後の免疫抑制療法に一般的であった副腎皮質ステロイドは移植膵島に悪影響があるとの理由で意図的に排除した。</p>

化酵素を分泌する外分泌腺が膵臓全容積の95%以上を占め、内分泌腺は5%以下である。この膵内分泌腺組織は、光学顕微鏡像において外分泌腺組織の海の中に浮かぶ島のようにみえることから膵臓の島、膵島(islet)と呼ばれている。膵島は内分泌腺細胞の集団であり、 α 細胞、 β 細胞、PP細胞、 δ 細胞などからなっている。なかでも、 α 細胞と β 細胞がそのほとんどを占め、 α 細胞は膵島構成細胞の約20%を、 β 細胞は約80%を占める。この二種類の細胞は、それぞれグルカゴンとインスリンという血糖の調節に非常に重要な役割を果たすホルモンを産生、分泌している。グルカゴンは血糖を上げる作用を、インスリンは血糖を下げる作用をもつ。体内で産生されるホルモンで血糖を下げるほうに働くのはインスリンのみである。膵島移植を理解する上で重要なことは、膵島を構成する細胞が単に血糖調節のためのホルモンを分泌するだけでなく、その細胞自身で血糖を感知することができることである。血糖調節の主体は複数の器官が関与した複雑な系に依存していない。すなわち膵島単独で、運動時や摂食時などの急激に変化する血糖に対して迅速

に反応し、それに見合った適量のホルモンを分泌することによって血糖を非常に狭い範囲に調節することができる。効果対象の感知と作用の調節を膵島単独で行い得るという事実が膵島移植の理論的根拠となっている。

膵島分離の背景

膵島分離とは、膵臓のほとんどを占める外分泌腺組織を除去して、膵島のみを取り出すことである。臨床における膵島分離は、その分離された膵島を移植する膵島移植を前提として行われる。

膵島移植の主な対象疾患である1型糖尿病は、自己免疫異常によって膵 β 細胞が破壊され、インスリンが枯渇する疾患である²⁾。1920年代のインスリンの発見以前では、その診断が死の宣告に相当する不治の病であった。今から約80年前のインスリン発見によってこの常識が一変し、それ以降現在まで1型糖尿病を中心とするインスリン依存状態糖尿病に対する処置は自己血糖測定とインスリン製剤の投与が基本となっている。発見当初、インスリン療法は糖代謝異常を改善し、急性死因である糖尿病性ケトアシドーシスを防ぐことに貢献して、患者の生活を正常人のそれに近づける決定的な方法であるとみなされていた。確かに大量生産が可能であり、どの患者に対しても供給され得るものであるという点において、その果たした役割は絶大といえる。しかし一方で、低血糖性昏睡の発症を惹起し、厳格な使用にもかかわらず、腎不全、失明、神経障害などの長期合併症の併発を完全に阻止できないことが明らかとなった³⁾。

1型糖尿病を多く抱える欧米では、インスリン依存状態糖尿病に対する治療としてインスリン療法では不十分であり、血糖を自動的に調節する組織の再生置換療法が必要であると考えられている。このための方法として、膵臓を臓器として移植する膵臓移植と、今回話題となっている膵島移植がある。両移植療法は、単

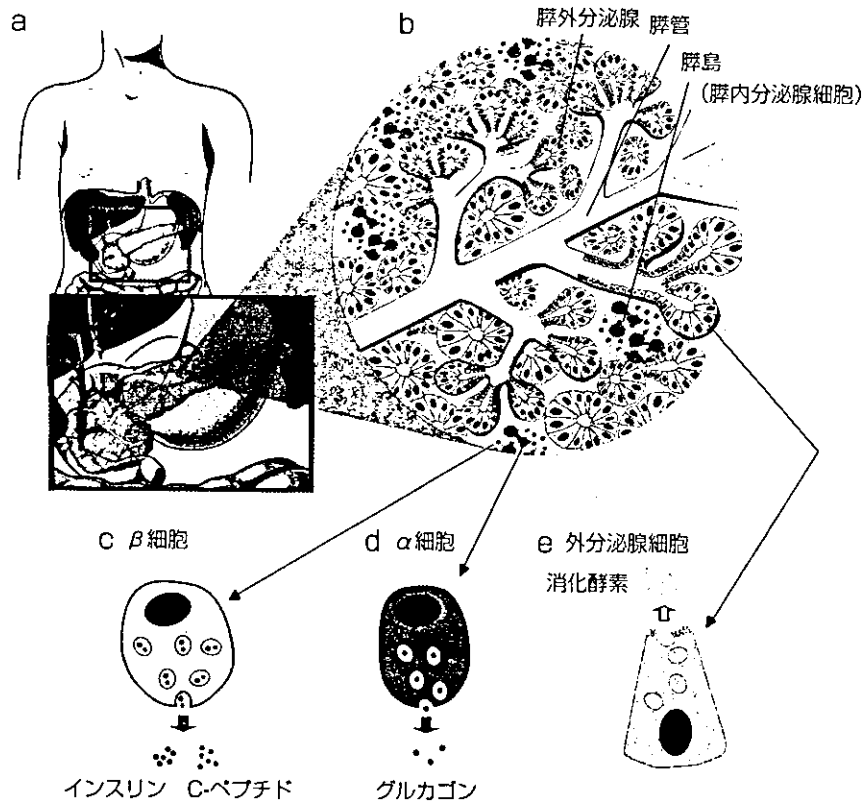


図1 膵臓の外分泌腺細胞と内分泌腺細胞(膵島)

- a: ヒトの膵臓は上腹部に存在する。肝臓の下側、胃の後方に位置する。
- b: 膵内分泌腺細胞の塊である膵島は外分泌腺の中に点在して存在する。
- c: β細胞はインスリンとC-ペプチド(C-peptide)を同量産生し、血液中に分泌する。
- d: α細胞はグルカゴンを産生し、血液中に分泌する。
- e: 外分泌腺細胞は消化酵素を膵管内に分泌し、それが消化管に排泄される。

にインスリン療法による日常の煩わしさから患者を解放し、生活の質(QOL)を向上させることだけがその目的では決してない。これらの移植療法は、今なお低血糖性昏睡および長期合併症によって致死の危険性を高率に有するインスリン依存状態糖尿病を、治癒という最終目標に向かわせる手段として、インスリン製剤投与によるインスリン療法よりもはるかに潜在能力をもった治療法である。現在の医療において、心不全、肝不全、腎不全などの生命維持機能が廃絶した状態に対する唯一の根治療法がそれぞれの臓器の移植医療であるように、膵β細胞不全といえる1型糖尿病に対す

る根治療法は膵臓移植あるいは膵島移植であるとみなされている。

膵臓移植は免疫抑制剤の進歩とその手術術式の改良によって、今日では術後1年間の生着率が80%に達しており、すでにインスリン依存状態糖尿病に対する治療の選択肢の一つとして位置づけられている。しかし、膵臓移植では手術侵襲が大きいこと、また付随して移植される外分泌腺による合併症が重症となり得るなどの問題があるため、単独で行われるよりも、むしろ腎不全併発例に対して腎移植とともに行われることが主流となっている。

これに対してその合併症の原因となっている膵外分泌腺を除去して移植しようというのが膵島移植である。膵島移植の臨床実施は1974年に始まっている。1999年までに欧米で約300例の膵島移植が行われたが、その成績は芳しいものではなく、一般の治療法として導入できるものではなかった。膵島移植では、免疫抑制剤内服の不利益はあるものの、インスリン療法で経験する低血糖発作の心配、膵臓移植の際に考えられる手術侵襲、移植後合併症によるレシピエントの生命の危険性がない。すなわち、膵島移植は、最小の危険性で糖尿病発症以前の状態に非常に近い身体に戻ることが期待できる治療法といえる。欧米において、四半世紀以上にわたる臨床成績不振という事実にもかかわらず、膵島移植への希望と期待は一貫して絶大であった。このような状況を背景として、2000年7月にアルバータ大学での膵島移植の臨床治験がNew England Journal of Medicineに報告された¹⁾。1型糖尿病でインスリン療法による血糖調節が非常に困難であり、腎不全の出現していない7人の患者に対して膵島移植を行ったところ、すべての症例においてインスリンから離脱できたとの内容であった。この報告以降、膵島移植は膵臓移植に匹敵する成績を期待できるとの認識を得て、臨床におけるインスリン依存状態糖尿病に対する治療手段の一つとして確立するべく世界中が動きはじめた。アルバータ大学での治験成功を可能とした最大の要因の一つが、“エドモントン・膵島分離プロトコル”として知られる膵島分離技術の確立であった。

標準的膵島分離技術

臨床において膵島移植が成功するためには、量質ともに良好な膵島を分離する必要がある。現在、世界の標準となっている“エドモントン・膵島分離プロトコル”は、大きく分けて次の三つの段階、①コラゲナーゼ溶液の膵管内注入による膵臓の膨化、②膵臓の

消化と消化膵組織の回収、③膵島の純化からなっている(図2)。

膵島分離用のコラゲナーゼとして、現在リペラーゼHIが世界標準として使用されている。リペラーゼHIは細菌由来の純化されたコラゲナーゼを混合したものである。従来のコラゲナーゼに比し、製造単位(ロット)間での効果が均一で、活性が強く、エンドトキシン含量が極めて少ないことが特徴となっている⁵⁾。

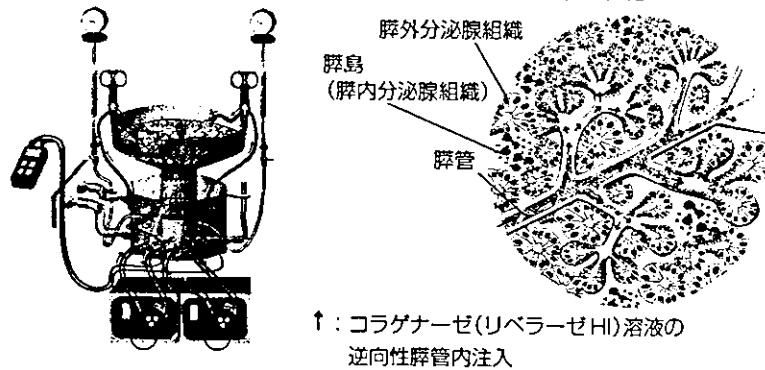
分離操作はまず、ポンプを用いてリペラーゼHI溶液を注入圧調節下に主膵管に注入し、膵臓を膨化させる。リペラーゼHI溶液は膵管を逆流して膵組織にくまなく行きわたる。

続いて消化操作に移る。膨化させた膵臓をRicordiのチェンバーに入れ、消化のための回路を溶液で満たし、閉鎖系としてポンプで循環させ、温度を体温近くに上昇させる。すると、膵組織の中に注入されたリペラーゼHIが活性化し、細胞と細胞を結合している組織(結合組織)を形成するコラーゲン(膠原線維)を溶解して膵組織が分解する。消化操作中のある段階で、膵島はそれを構成する細胞が凝集している形態を保ったまま、膵外分泌腺組織だけが膵島の周囲より解離する。この時点で消化を止めることが重要である。どの時点でコラゲナーゼを不活化するかは個々の膵臓の状態によって異なるため、操作中のリアルタイムでの消化状況のモニターリングが必要となる。回路より採取したサンプルをジチゾンで染色、検鏡により確認して消化停止の時期を決定する。膵島分離操作が成功するか失敗に終わるか、この消化停止の時期決定の判断にかかっているといても過言ではない。しかも、適切な判断を下すためにはかなりの熟練を要する。消化停止が早すぎると未消化となり、外分泌腺組織が膵島から十分解離せず、後の純化操作を困難とする。一方、消化停止が遅れた場合、コラゲナーゼの作用が進みすぎ(過消化)、膵島構成細胞間の結合自体も壊され単細胞化する。単細胞化は組織としての膵島本来の機能消失につながり、移植効果発現に不利となる。溶液の

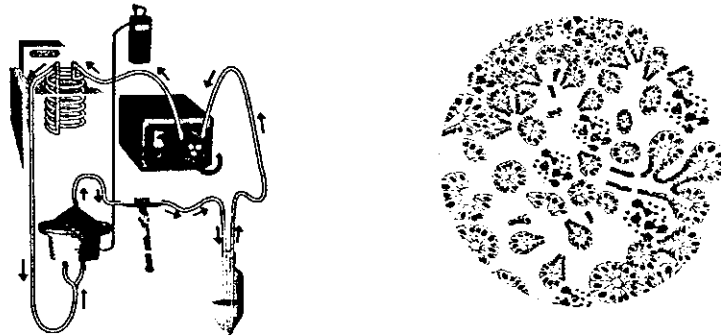
温度を下げ、血清蛋白を加えることでコラゲナーゼを不活化することができる。実際には、回路を開放系としてヒトアルブミンを含んだ室温の溶液を回路内に通

すことで消化を止め、膵組織を回収していく。この際、加えられた溶液によりコラゲナーゼが希釈されることもその活性を低下させるのに貢献している。回収され

a 注入圧調節下でのコラゲナーゼ溶液の膵管内注入による膵臓の膨化



b 酵素による膵臓消化



c 冷却装置付 COBE2991 を用いた連続比重遠沈法による膵島純化

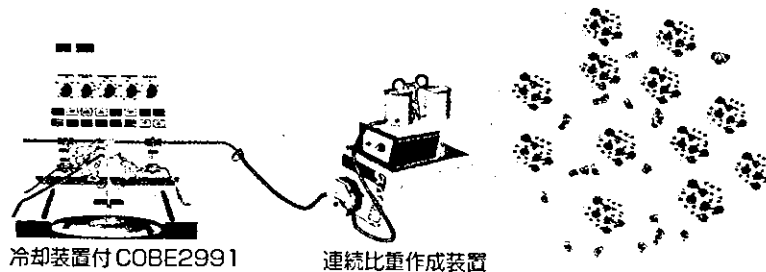


図2 エドモントン・膵島分離プロトコール

a: 膵管への管挿入後、ポンプを用いて圧調節を行いながらコラゲナーゼ溶液を膵管に注入し、膵臓を膨化させる。b: 溶液の温度を体温(37℃)にすることでコラゲナーゼが活性化し、組織をばらばらにする。その後、直ちに冷却を行い、過消化を防ぐ。c: フィコールの悪影響を抑えることができる冷却装置付 COBE2991 と、連続比重作成装置を用いた連続比重遠沈法による膵島の純化。

た膵組織は遠心分離器にて遠心洗浄され、集められて濃縮される。

最終段階の純化では、膵島が膵外分泌腺組織に比べて比重が軽いことを利用する。すなわち、血球洗浄装置として通常使用されているCOBE2991内に、フィコールを用いて連続比重濃度勾配を形成する。洗浄濃縮した消化膵組織をその中に添加して、連続比重遠沈法にて膵島と外分泌腺組織を分離させた後、COBE

2991内の溶液を分画ごとに採取していく。検鏡によってどの分画に膵島が存在するかを判定し、膵島を回収して分離操作が終了する。

膵島移植手技

膵島移植とは、前述の一連の分離操作で得られた膵島を門脈に点滴の要領で注入する細胞組織移植である

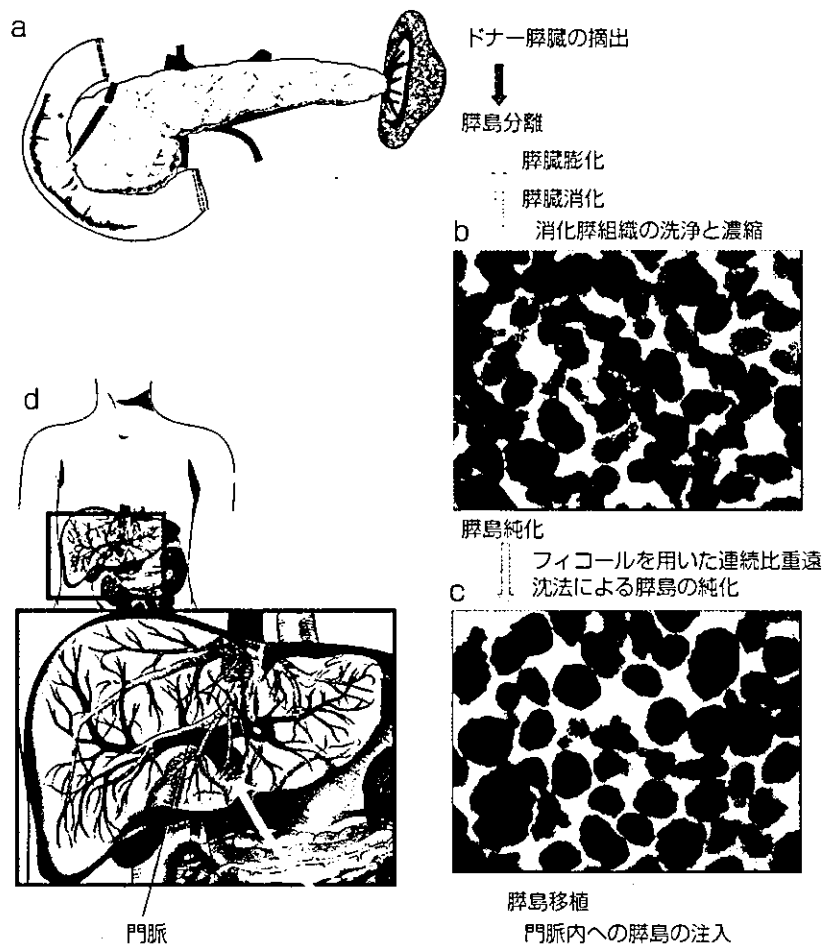


図3 膵臓摘出から膵島移植に至るまでの主な操作段階

a: ドナーからの膵臓摘出。b: コラゲナーゼを用いて分離した膵組織。ジチゾン染色という特殊な染色方法にて膵島は赤く染まっている。c: 連続比重遠沈法を用いて純化された膵島。膵外分泌腺のほうが膵内分泌腺(膵島)よりも比重が重いことを利用する。d: 膵島移植。レシピエントの門脈内に挿入したカテーテルを用いて純化した膵島を注入する。

(図3)。現在、ヒトにおいては、膵島の移植部位は門脈内以外には行われていない。移植部位が門脈以外(腹腔内、腎被膜下)の場合では、成績が門脈内に比べて有意に劣ることがすでに示されている⁶⁾。門脈内注入の方法は二つある。経皮経肝的に門脈穿刺をするものと、小さな創で開腹して腸管を露出し腸間膜静脈から注入するものである⁷⁾。分離された膵島は規定の基準(表2)を満たした場合、移植に適切と判断し、移植用の溶液に再懸濁して点滴バックに入れ、レシピエントの準備ができるまで室温にて攪拌機の上で保存される。レシピエントが処置室に入室して門脈にカテーテルが留置されると、そのカテーテルより分離膵島を重力による自然落下で注入する⁸⁾。

膵島分離操作における分離膵島の安全性と有効性を確保することの必要性

膵島移植が臨床での治療として成立するためには、患者(レシピエント)が利益を受けることが十分に期待され、かつ不利益を受ける危険性を最小限とするシステム上で行われることが必須である。インスリン依存状態糖尿病に対して行われている膵島移植のための膵島分離には、当然のことだが、他人由来の膵臓が用いられる。さらに、膵島は多種類の溶液、薬品を用いた生体外での多段階の煩雑な操作を経て初めて分離することが可能となる。そのため、他人であるドナーが保持していた感染性病原体が移植組織を通してレシピエントに伝播する危険性と、操作中に混入した病原体あるいは有害物質が分離膵島とともにレシピエント

の体内に入る危険性があり、これらの危険性を極力排除する必要がある。また、有効性の確保の観点から、移植する膵島が膵島として機能するかどうかを判定することが求められる。米国では、連邦食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)の指導下に、すでに膵島移植についての規制がなされている⁹⁾。FDAは移植に用いられる膵島を、全身に影響を及ぼす体性細胞(somatic cell)であると認識していると同時に、薬剤としての範疇にも入るとして、これら二つの観点から規制をかけている。前者の観点から、GTP(good tissue practice)と呼ばれる規制事項を適応し、特に伝染病物質の混入の排除を目指している。また、後者の観点からは、GMP(good manufacturing practice)という製造工程と品質管理の基準を確保するための規制を適応することを試みている。具体的には、①膵島分離にかかわる約束事を成文化して標準作業手順書(standard operating procedures: SOP)を作成する、②ドナーにおける感染症の有無の確認、③膵島分離操作はクリーンルームであるCPC(cell processing center)内のみで実施し、その際に用いる器具や培養液は十分に品質管理を受けたものを使用する、④記録を残して随時参照することを可能にする、⑤インフォームド・コンセントを含めた質のよい臨床試験のデザインを構築し、それに則って実施する、などを膵島分離および膵島移植を行う施設の必要条件としている。

わが国でも、再生医療を応用した治療の可能性に大きな期待がかけられており、この新しい医療を臨床実施するための必要事項として安全性と有効性を確保するための規制の重要性が認められてきている¹⁰⁾。膵島移植はすでに世界で行われている細胞組織移植医療であり、膵島移植の分野で安全性と有効性を確保するための規則を確立することは、将来において施行されるであろうさまざまな再生医療の臨床実施にとっても大きな貢献となると考えられている。

表2 新鮮な状態で移植するための分離膵島の基準

- | |
|------------------------------------|
| 1. 膵島量 $\geq 4,000$ IE/kg(患者体重) 以上 |
| 2. 純度 $\geq 30\%$ |
| 3. 組織量 ≤ 10 mL |
| 4. Viability $\geq 70\%$ |
| 5. エンドトキシン ≤ 5 IE/kg(患者体重) |
| 6. グラム染色陰性 |

■ 膵島分離結果への影響因子と膵島分離 ■ 向上のための技術改良

膵島分離成功の是非は、分離に用いる膵臓自体の善し悪しに大きく影響される。すなわち、良好な膵島分離のためには外分泌腺組織の状態がよい必要がある。このため、膵島分離を目的とした膵臓摘出には想像以上の繊細さが要求される。たとえば、膵臓に触って圧力をかけるだけでも膵外分泌腺細胞はその含有酵素である蛋白分解酵素を放出する。そのため自己融解が始まり、コラゲナーゼによる消化操作を困難にする。実際に、アルバータ大学では、膵島をできるだけ良好な状態で分離することを目指し、以前は臓器摘出時に粗野に扱われた膵臓に対して、細心の注意を払うようプロトコルを作成した。膵臓摘出を他臓器に先駆けて優先し、開腹後すぐに腹腔内に氷を入れ膵臓を冷却、十二指腸と脾臓を把持して膵臓自体に極力触らないようにした。さらに、膵島分離施設にできるだけ迅速に運搬することにより、冷阻血時間も短くすることを目指した。これにより、膵外分泌腺組織を含めて非常に健全な状態で膵臓を分離操作にもっていくことが可能となった。また、アルバータ大学では、膵島分離に用いる膵臓ドナーの基準を厳格に決定し、その基準を満たした膵臓のみを使用した。

“エドモンドン・膵島分離プロトコル”として、臨床における膵島分離技術はすでに確立されたといえるが、改良の余地はまだ十分に存在している。ヒトの膵島は膵臓内に100万～150万个存在するといわれているが、このうち標準的な膵島分離技術にて回収できるのは20%からせいぜい50%である。さらに、毎回の分離操作で移植に十分な膵島が得られるとは限らない。その割合は約3～4割、すなわち10回の分離操作をして移植できる膵島を得ることができるのは3回か4回である。

“エドモンドン・膵島分離プロトコル”が確立さ

れて以降、画期的な技術が一つ出現した。それは、摘出した膵臓を分離施設に運搬する段階での臓器保存法で、わが国の神戸大学で開発された二層法(two layer method: TLM)という手技である¹⁰⁾。二層法は、人工血液であるパーフルオロカーボン(PFC)と臓器保存液として標準的なUW液を併用し、両液を一つの保存容器に入れると混ざることなく二層に分かれることからこの名前がある。膵臓は比重の関係からちょうど二層の境界に位置し、PFCからは酸素を、UWからは栄養の供給を受けることができる。二層法は単に臓器を保存するのみではなく、臓器の細胞の活性を向上させる働きがあると考えられている。それまでの標準であったUW液のみを用いた保存方法と比較して、二層法による保存を行った場合、分離膵島の収量が約2倍になり¹²⁾、しかも境界域のドナーからの膵臓を使用した際にも、移植に使用できる膵島が分離され得るとの報告がなされている¹³⁾。すでに北米の主要膵島移植施設では、膵島分離のための膵臓保存として二層法が採用されている。

■ おわりに

インスリン依存状態糖尿病、特に1型糖尿病に対する究極の治療とは、糖尿病にならないようにすることである。確実に発症を予言できてそれが予防できるようになるのが理想である。しかし、これには1型糖尿病発症における遺伝的要因と環境要因の影響の解明を待たなければならない。現在、治療対象となり得るのは、糖尿病をすでに発症した、すなわちインスリン分泌の機構が廃絶した状態である。この際の理想的な治療法は、免疫抑制剤使用の必要のない、血糖感受性を有するインスリン分泌細胞の移植である。しかも、他人からの組織提供の必要がない再生医療の技術を用いた方法が期待される。しかしながら、これも実用までにはかなりの道程があると予想される。他人の膵組織を用いた膵島移植は、これらの治療法が実現するまで

の過渡的な手段として位置づけられる。この膵島移植は、過去30年以上に及ぶ多くの人々の期待と努力によって最近ようやく臨床での本格的開始がなされようとしている。膵島移植を支える技術はまだ決して完成されているとはいえない。しかし、人類に有用であると認められた分野において必要とされる技術は、改良と改善がなされ進化していくという原則に基づいて、膵島移植における技術は確実に進歩する。そして、このことはインスリン依存状態糖尿病治療における膵島移植のさらなる可能性を引き出し、その射程を押し広げていく。また同時に、細胞組織移植の側面をもつ膵島移植医療の成功は、1型糖尿病治療に向けて将来実施されるであろう再生医療を応用した次世代の細胞組織療法のための重要な準備を可能とする。

毎日数回の採血による血糖測定とインスリンの皮下注射、運動と摂食の制限、低血糖発作の不安、それに数年後の腎不全、失明、下肢切断などの合併症発症の恐怖から解放されることを誰もが望んでいる。親に連れられて外来を受診した子供の患者が1型糖尿病と診断されたときに、治療の選択肢の一つとして細胞組織移植を提示することができる。このような状況が膵島移植の臨床あるいは研究に従事する者の究極の希望である。膵島移植医療のさらなる成功は、そのようなときを迎えるための大きな一歩として期待されている。

謝 辞

本研究の一部は、21世紀COEプログラム「融合的移植再生治療を目指す国際拠点形成」の支援を受けて行われた。

●文 献

1) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al: 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) Atkinson MA, Maclaren NK: The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331: 1428-1436, 1994
- 3) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986, 1993
- 4) ITR. Newsletter. 8, 1999
- 5) Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, et al: Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes* 46: 1120-1123, 1997
- 6) ITR. Newsletter. 9, 2001
- 7) Osama Gaber A, Chamsuddin A, Fraga D, et al: Insulin independence achieved using the transmesenteric approach to the portal vein for islet transplantation. *Transplantation* 77: 309-311, 2004
- 8) Baidal DA, Froud T, Ferreira JV, et al: The bag method for islet cell infusion. *Cell Transplant* 12: 809-813, 2003
- 9) Weber DJ, McFarland RD, Irony I: Selected Food and Drug Administration review issues for regulation of allogeneic islets of Langerhans as somatic cell therapy. *Transplantation* 74: 1816-1820, 2002
- 10) Maekawa T: Current good manufacturing practices (cGMP) controlled cell processing for the development of novel advanced cell and gene therapy. The 65th Annual meeting of Japanese Society of Hematology and The 45th Annual meeting of Japanese Society of Clinical Hematology. Education program book, 43-48, 2003
- 11) Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, et al: A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. *Transplantation* 46: 457-460, 1988
- 12) Matsumoto S, Qualley SA, Goel S, et al: Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-Perfluorochemical plus O₂) method of pancreas preservation on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation* 74: 1414-1419, 2002
- 13) Ricordi C, Fraker C, Szust J, et al: Improved human islet isolation outcome from marginal donors following addition of oxygenated perfluorocarbon to the cold-storage solution. *Transplantation* 75: 1524-1527, 2003

治療的血管新生療法と輸血部門の役割

阿部 充 木村 剛 木村晋也 前川 平

体内の組織を栄養する血管の動脈硬化が進展し臓器の虚血症状が生じる虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に対する治療として、従来より生活習慣の改善（禁煙など）、薬物治療や運動療法に加えて、カテーテルを用いた血管形成術や外科的なバイパス術が行われていた。しかし、動脈硬化が高度でそのどちらの治療にも適さない患者が存在することも事実であり、これらの患者に対してはいままで対症療法的に経過をみるしかなかった。

最近そのような症例に対して、周辺の健常組織からの血管新生や側副血行の発達を促進させ虚血組織の血流を確保しようとする、いわゆる治療的血管新生 therapeutic angiogenesis とよばれる試みが盛んに行われるようになってきた。動物実験のデータが集積しつつあり、実際に臨床に応用されその結果も報告されている。本稿では、基礎研究から血管新生療法開発に至る過程を述べ、このあたらしい細胞治療法を展開させるために今後解決すべき問題点を概説する。

血管新生と血管発生

発生学および組織学的観点より、広義の血管新生 neovascularization は狭義の血管新生 angiogenesis と血管発生 vasculogenesis に分けられる。前者は既存の血管の内皮細胞の増殖、遊走およびリモデリングを基本とした新しい娘血管の形成であり、以前は出生後の血管新生はすべてこの形式のみをとると考えられていた。しかし血管発生、つまり、従来胎児期にのみ存在すると考えられていた血管芽細胞 angioblast、または血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cell (EPC)

からのまったく新しい血管の発生が、実は成熟個体の体内で生じていることが最近明らかとなってきた。

その端緒は、1997年、血管内皮前駆細胞 (EPC) が成体の循環血液中に存在すると浅原らが報告したことにはじまる¹⁾。このEPCは骨髄に由来し、細胞表面に血液幹細胞と同様にCD34を発現しており、成熟個体においても末梢血中の単核球細胞の一群として循環し、血管発生に関与することが明らかにされている。この発見はその後の血管新生療法 (therapeutic angiogenesis) への扉を開くものであった。

生体内において血管新生は促進因子と抑制因子のバランスによって制御されており、促進因子が抑制因子よりも優勢になったときにはじめて血管新生が開始される。促進因子、抑制因子ともに単一のものではなく、作用機序の異なる複数の因子が共同的に作用すると考えられている。これらのなかで血管新生に対してプラスに作用する因子 (VEGF, VEGF-2, FGF2, FGF4, HIF-1 α , HGF) を遺伝子または遺伝子組み換え蛋白のかたちで投与する治療は、遺伝子治療あるいはサイトカイン療法とよばれ、治療的血管新生療法のひとつの大きな柱となっている。

細胞治療としての血管新生療法

もうひとつの柱として細胞治療がある (表1)。これは生体内に存在する幹細胞を投与し適切に分化させることにより、臓器あるいは組織 (この場合は血管) を再生させ治療に応用しようとするものである (図1)²⁾。現在、臨床試験研究中の血管新生細胞治療法としては、末梢血中および骨髄中の血管内皮前駆細胞を用いたものがある。血管内皮前駆細胞は末梢血中にも存在するが、造血幹細胞と血管内皮系幹細胞は共通の幹細胞 hemangioblast

あべ みつる/京都大学医学部附属病院循環器内科
 きむら たけし/同 循環器内科助教授
 きむら しんや/同 輸血細胞治療部講師
 まえかわ たいら/同 輸血細胞治療部教授

1900

0388-2969/04/¥500/論文/JCLS

表1 報告されている心臓領域での細胞治療

報告者/施設	細胞	投与方法	疾患
Strauer BE	BMC	IC	AMI
Assmus B	BMC, Cultured PBSC	IC	AMI/CHF
Tse HF	BMC	Intra-myocardium (経皮的)	Refractory ischemia
Perin EC	BMC	Intra-myocardium (経皮的)	Ischemic LV dysfunction
関西医科大学	BMC	Intra-myocardium (経皮的)	Refractory ischemia
Menasche P	Cultured skeletal myoblast	Intra-myocardium (観血的)	Old MI
Serruys P	Cultured skeletal myoblast	Intra-myocardium (経皮的)	Old MI
千葉大学	G-CSF mobilized PBSC	G-CSFの皮下投与	AMI
岐阜大学	G-CSF mobilized PBSC	G-CSFの皮下投与	AMI
NIH	G-CSF mobilized PBSC	G-CSFの皮下投与	Refractory ischemia Refractory ischemia

AMI: acute myocardial infarction, BMC: bone marrow cell, CHF: congestive heart failure, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, IC: intra-coronary, LV: left ventricular, Old MI: old myocardial infarction (scarred), PBSC: peripheral blood stem cell.

から発生し、種々の刺激により骨髄から動員されると考えられている。血管内皮前駆細胞 (EPC) はCD34陽性細胞分画に主に存在すると考えられている。しかし、通常の末梢血中にはCD34陽性細胞は骨髄の1/10の0.2%程度しか存在せず、特にこの治療法の対象となる成人においては骨髄由来細胞の方が血管新生に有利であると考えられている。骨髄単核球中には血管内皮系幹細胞が0.01%存在し、内皮系幹細胞以外の造血細胞はVEGF, Angiopoietin-1などの血管新生を促進する因子を合成し分泌する。

これらの結果をもとに、世界初の循環器病での細胞移植による血管新生治療であるTACT trialが日本で実施された³⁾。それによると、従来の治療で下肢虚血改善の認められないFontaine 3~4度の合計45人の患者に対して、全身麻酔下で約500mlの自家骨髄液を採取し、分離した約10億個の骨髄単核球を虚血肢の筋肉内40カ所に分割注入した。その内20例は末梢血単核球を対照としてrandomized, double-blindで評価が行われた。骨髄単核球投与群のABIは平均0.10増加し、対照の末梢血単核球投与群の0.02より有意に増加していた。下肢の疼痛の完全緩解が20人中18人の患者で認められ、トレッドミルテストの歩行距離は約

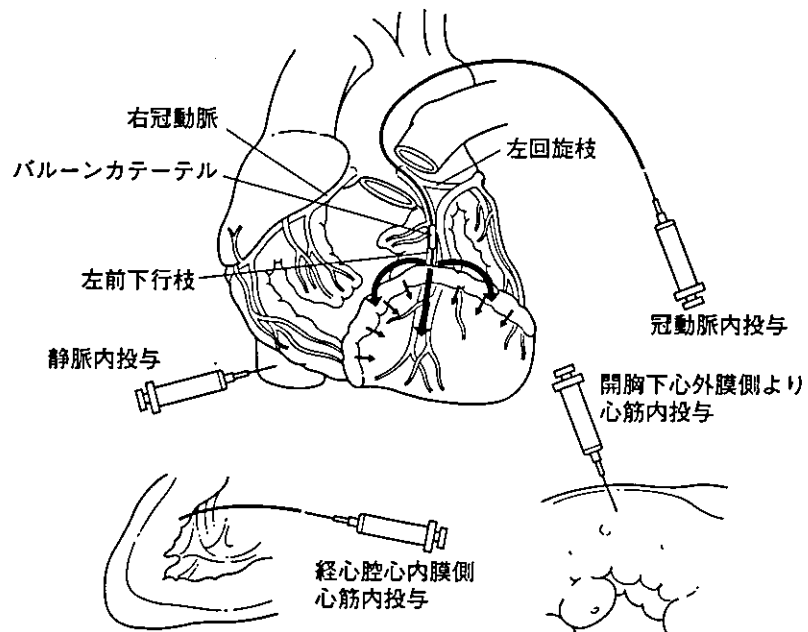


図1 心筋梗塞に対する細胞の投与方法 (文献5を改変)

2.6倍へと増加した。

同様に、急性心筋梗塞患者を対象に、平均で発症4.3日後に自己骨髄単核球 (50mlの骨髄から分離) または末梢血前駆細胞を冠動脈内投与したTOPCARE-AMIによると、4カ月後に左室駆出率は8.5%改善し (一般治療群では2.5%の改善)、梗塞領域の局所壁運動の改善や収縮末期の左室容積の減少も認められた⁴⁾。

薬物治療では症状がコントロールできず、かつ冠動脈バイパス術や経皮的冠動脈形成術の実施も困難である患者を対象に、虚血心筋に骨髄単核球を投与する試みも行われている⁵⁾。NOGA map-

ping システムのガイド下に40mlの骨髓液から分離した単核球を投与し、3カ月後の評価にて、症状、心筋灌流、虚血領域の壁運動の改善が認められている。

血管新生治療の問題点

血管新生療法の臨床応用はまだはじまったばかりだが、有効性とともに関与する問題点が次第に明らかにされつつある。通常、ドナーに顆粒球コロニー刺激因子 granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) を投与し末梢血中に動員した造血幹細胞および造血前駆細胞をアフエレーシスで回収して、白血病などの血液疾患患者に移植する同種末梢血幹細胞移植では、虚血性心疾患などの既往を有するものはドナー候補とはなり得ない⁶⁾。また、一般的に虚血性心疾患患者にG-CSFを投与することは禁忌であると考えられている。

治療的血管新生細胞療法では、通常であれば対象とならない虚血性心疾患患者や動脈閉塞性疾患患者に対して、G-CSFの投与、アフエレーシス操作、あるいは骨髓細胞の採取といった過程が含まれる。したがって、治療効果がこれらのリスクを上回るベネフィットを患者に提供することができるのかどうか、医療倫理上の妥当性がはたしてあるのかどうか、十分な基礎的検討とともに、治療成績を逐次公開し透明性を保った探索的臨床試験研究（トランスレーショナルリサーチ）の進捗が期待される。

血管新生治療への輸血部門のかかわり

以上述べてきた血管新生治療には、細胞の分離

操作という過程が含まれる。したがって、大学病院などでは治療法の開発に輸血部門が関与することが多い。ヒト細胞を治療に用いる上述の血管新生治療、再生治療、それに多くの遺伝子治療などは、細胞治療 cell therapyとして包括される。細胞治療の原型は輸血療法であり、骨髓移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植などは細胞治療の第一世代といえよう。輸血用血液製剤は血液センターで、いわゆるGMP (good manufacturing practice) 基準に則って作製され各病院に供給されている。臍帯血バンクにおける細胞の保存もほぼ同様である。骨髓移植や末梢血幹細胞の場合は、各施設で独自の基準で扱われている。米国FDA (食品医薬品局) は単なる骨髓細胞や末梢血幹細胞の分離や保存は minimally manipulated (最低限の操作) として、GMP基準に則った規制は行っていない。最近では、閉鎖系で実施されるCD34陽性細胞の分離なども“minimally manipulated”であるとしている。血管新生治療に用いる細胞の分離、処理も、培養操作や遺伝子導入を伴わない限り“minimally manipulated”に準ずると考えられるが、専用の処理スペースで、標準作業手順書 standard operating procedures (SOP) を作成し、分離過程の記録や操作を担当した人員の記録などを十分に担保して実施するべきである。このような操作はしかるべき部署 (たとえば輸血部門) の機能を充実させ、臨床科とタイアップして行うべきである。細胞治療開発の根底には安全な輸血療法に通じる考え方が脈々として流れているからである⁷⁾。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
- 2) Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003; 107: 929-34.
- 3) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
- 4) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.
- 5) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
- 6) 同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン—日本造血細胞移植学会、日本輸血学会(改訂第3版、2003年4月21日)(http://www.jshct.com/about_guideline.html)
- 7) 前川 平. 先端医療開発に必要なGMP準拠細胞プロセッシング—Institutional GMP構築の必要性—。臨床血液 2004; 45: 32-8.

心停止ドナーからの膵島移植によって インスリン離脱した1型糖尿病の1症例

山田祐一郎*¹ 松本 慎一*² 福田 一仁*¹ 濱崎 暁洋*¹
 小倉 雅仁*¹ 松岡 啓子*¹ 藤本 新平*¹ 興津 輝*³
 岩永 康裕*³ 野口 洋文*³ 米川 幸秀*³ 永田 英生*³
 柴田登志也*⁴ 笠井 泰成*⁵ 前川 平*⁵ 清野 裕*^{1,6}
 田中 紘一*^{2,3}

要約：本邦初の膵島移植成功例である。症例は36歳、女性。15歳時に口渇・全身倦怠・体重減少あり、1型糖尿病と診断。強化インスリン療法がされるも、血糖コントロールは不安定であり、無自覚低血糖によって交通事故の既往もある。膵島移植の適応と判定され、2004年4月7日ならびに7月2日の2回、心停止ドナーの膵臓から単離された。それぞれ350,400 IE (islet equivalent) と474,000 IEの膵島を経皮経肝的に門脈内に移植された。免疫抑制薬としてバシリキシマブ・ラパマイシン・タクロリムスが用いられ、強化インスリン療法で厳密な血糖コントロールが行われた結果、インスリン必要量は漸減し、2回目の膵島移植後の第20病日にインスリンを離脱。第32病日に施行した75g経口糖負荷試験では正常型を呈した。

Key words：①膵島移植 ②1型糖尿病 ③無自覚低血糖

〔糖尿病47(12)：945～950, 2004〕

緒言

膵β細胞量が枯渇したインスリン依存領域の糖尿病患者では、刻々と変動する血糖値に対していかにインスリン療法を工夫しても血糖値が不安定である。このような症例では、長期的には高血糖による糖尿病合併症の危険性の一方、短期的には低血糖による意識障害の危険性に曝されている。したがって、血糖値に応じてインスリンを分泌する膵β細胞の補充がインスリン依存領域の糖尿病患者の治療に求められ、膵臓移植や膵島移植が推進されている。

わが国において、膵臓移植は臓器移植法制定以降、脳死ドナーからの膵臓移植が推進されている¹⁾。しかしながら、手術の危険性が高いことなどから、透析が

導入された症例への膵腎同時移植が主な適応となり、合併症のない、あるいは少ない糖尿病患者にはわが国では現時点で施行されていない。一方、膵島移植は新たな免疫抑制薬を用いたエドモントンプロトコールの導入以降²⁾、欧米では合併症のない、あるいは軽度の糖尿病患者に対し、脳死ドナーからの膵島移植が推進されている。しかしながら、わが国では臓器移植法により脳死ドナーからの膵島単離が認められていないため、温阻血によって障害をうける可能性のある心停止ドナーの膵臓から膵島を単離することが必要である。

我々は心停止ドナーからの膵島移植を2回行うことによって、インスリン離脱に成功したインスリン依存領域の1型糖尿病の症例を経験したので、報告する。

*¹ 京都大学医学部附属病院糖尿病・栄養内科(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54)

*² 同 臓器移植医療部

*³ 同 移植外科

*⁴ 同 放射線部

*⁵ 同 輸血・細胞治療部

*⁶ 関西電力病院(〒553-0003 大阪市福島区福島2-1-7)

連絡先：山田祐一郎(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54 京都大学医学部附属病院糖尿病・栄養内科)

受付日：2004年9月13日

採択日：2004年12月2日

Table 1 脾島移植適応判定申請時の糖尿病の評価

インスリン分泌能	
食事負荷試験	
血中 C ペプチド	
負荷前	<0.1 ng/ml
2 時間後	<0.1 ng/ml
グルカゴン負荷試験	
血中 C ペプチド	
負荷前	<0.1 ng/ml
2 時間後	<0.1 ng/ml
蓄尿	
C ペプチド	<1.0 μg/日
血糖コントロール	
HbA _{1c}	5.8%
M 値	37.0
MAGE 値	172 mg/dl
自己免疫	
抗 GAD 抗体	2.5 U/ml
抗インスリン抗体	(-)
抗サイログロブリン抗体	17.6 U/ml
抗 TPO 抗体	10.7 U/ml
合併症の評価	
網膜症	
中等度非増殖網膜症	
focal photocoagulation 後で安定	
腎症	
尿中 Alb	4.6 mg/日
神経障害	
振動覚(r/l)	84.0/84.3 μm
R-R 間隔 CV	2.1%
IMT(r/l)	0.8/0.5 mm
ABI(r/l)	1.06/1.06
心電図	
特記すべきことなし	

なお、本研究は京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会によって実施が承認されている。

症 例

症例：36 歳，女性，AB 型 Rh(+)。

主訴：無自覚低血糖。

家族歴：特記すべきことなし。

既往歴：22 歳時より摂食障害あり，時に過食と自己嘔吐。

個人歴：喫煙・飲酒なし。

現病歴：15 歳時に口渇・全身倦怠・体重減少あるため，近医受診。1 型糖尿病と診断された。直ちに強化インスリン療法が開始されるが，血糖コントロールは不安定であり，無自覚低血糖によって交通事故の既往もある。Table 1 に示すように，内因性インスリン分泌は枯渇，血糖コントロールは 30~40 単位のイン

Table 2 第 1 回入院時の一般検査

血液検査			
WBC	4400		×10 ⁶ /μl
RBC	413 万		×10 ⁶ /μl
Hb	12.6		g/dl
Ht	37.9		%
Plt	20.2 万		×10 ⁶ /μl
PT(INR)	1.13		
APTT	40.2		sec
感染症			
VDRL	(-)		
梅毒 TP 抗体	(-)		
HBs 抗原	(-)		
HBs 抗体	(-)		
HCV 抗体	(-)		
内分泌検査			
TSH	1.1		μU/ml
free T ₄	0.91		ng/dl
生化学検査			
AST	25		IU/l
ALT	26		IU/l
LDH	177		IU/l
ALP	189		IU/l
γ-GTP	43		IU/l
ChE	179		IU/l
TP	6.7		g/dl
Alb	4.0		g/dl
T-Bil	2.2		mg/dl
Na	143		mEq/l
K	3.8		mEq/l
Cl	104		mEq/l
Cre	0.7		mg/dl
BUN	16		mg/dl
T-CHO	186		mg/dl
HDL-CHO	79		mg/dl
LDL-CHO	82		mg/dl
TG	40		mg/dl
HbA _{1c}	9.1		%

スリンを用いて HbA_{1c} 5.8~9.8%，M 値³⁾37.0，MAGE 値⁴⁾172 mg/dl と不良，合併症は中等度非増殖網膜症で腎症は 1 期であり，2004 年 1 月脾・脾島移植研究会ワーキンググループ「脾島移植班」脾島移植適応検討委員会に脾島移植適応判定評価を申請し，同年 3 月，適応と判定され脾島移植のレシピエントとして登録された。

身体所見：171 cm，63 kg，心肺腹部に特記すべきことなし。

入院経過(第 1 回脾島移植)：2004 年 4 月 2 日に血糖のコントロールが不良であるため入院の上，加療されていた(Table 2)。2004 年 4 月 7 日くも膜下出血に

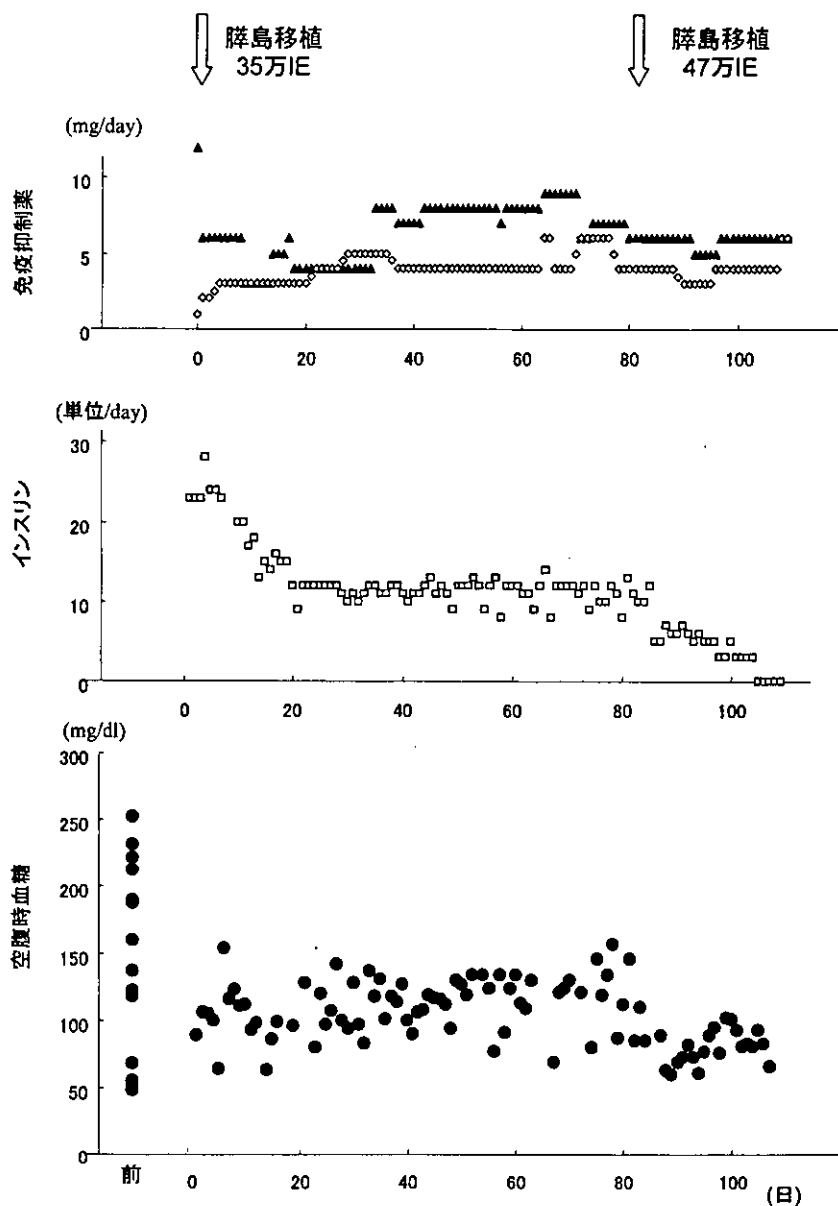


Fig. 1 臨床経過. 上段に免疫抑制薬ラバマイシン(▲)ならびにタクロリムス(◇)の使用量, 中段に空腹時血糖, 下段に使用した一日あたりのインスリン量を示す. 横軸は第1回移植後の日数を表す.

よる心停止ドナー(40歳代男性, 180 cm, 78 kg, 血液型B(+))より膵臓の提供があったため, 膵島単離を行った. 収量は350,400 IE(islet equivalent), 純度60%, 細胞量7 mlと膵島移植が可能であると判断, 膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」のレシピエント選択のルールに基づき, 膵島移植の第一候補となった.

バシリキシマブ20 mg点滴静注, ラバマイシン12 mg内服, タクロリムス1 mg内服し, 血管造影室に移動, エコーガイド下に経皮経肝的に門脈を穿刺し, 単離した膵島を移植した. 第1病日以降の免疫抑制薬は, トラフレベルがラバマイシンについては12~15 ng/ml, タクロリムスについては3~6 ng/mlとなるように内服量を調節(Fig. 1上段), また第4病日にバシリキシマブ20 mgを点滴静注した.

血糖コントロール(Fig. 1下段)は, 第4病日まで速効型インスリンを持続静注, 以降は超速効型インスリンと持効型溶解インスリンを用いて食前80 mg/dl, 食後2時間100 mg/dlを目標にインスリン量を調節した. インスリン必要量は漸減し(Fig. 1中段), 血糖コントロールも第32-33病日の血糖から算出されたM値4.6, MAGE値73 mg/dl(Table 3)と著明に改善していた. 第44病日には一日合計11単位のインスリン皮下注射で退院した.

また, 第30病日にグルカゴン負荷試験を施行, Cペプチドは負荷前0.21 ng/ml, 負荷6分後0.47 ng/mlと内因性インスリンの存在が確認され, グルカゴンに対する反応性も認められた(Table 4).

入院経過(第2回膵島移植): 2004年7月2日(第1回膵島移植第86病日)くも膜下出血による心停止ドナ

Table 3 血糖不安定性の指標

	第1回 移植病日 (日)	第2回 移植病日 (日)	M 値	MAGE 値 (mg/dl)	インスリン (単位/日)
2002年9月27日	—	—	37.0	172	30
2004年5月10日	33	—	4.6	73	11
2004年8月5日	120	34	0.6	33	0

M 値は基礎値を 100 mg/dl として算出。MAGE 値は 2 日間の血糖値を基に算出。

Table 4 グルカゴン負荷試験

	第1回 移植病日 (日)	第2回 移植病日 (日)	血糖		CPR	
			(mg/dl)		(ng/ml)	
			0分	6分	0分	6分
2002年9月24日	—	—	84	89	<0.1	<0.1
2004年5月7日	30	—	108	133	0.21	0.47
2004年7月2日	86	—	121	143	0.25	0.66
2004年7月30日	115	29	88	113	0.35	1.2

1 mg のグルカゴン負荷によるインスリン分泌能を測定した。

Table 5 75 g 経口糖負荷試験

	0分	30分	60分	90分	120分
血糖(mg/dl)	86	137	154	170	123
インスリン(μ U/ml)	1.8	9.5	15.0	19.2	9.9
C ペプチド(ng/ml)	0.45	1.1	2.0	3.0	2.7

第2回膵島移植術後第32病日に施行した75g糖負荷試験の結果を示す。

—(50歳代女性, 153 cm, 60 kg, 血液型B(+))より膵臓の提供があったため膵島単離を行った。収量は474,000 IE, 純度40%, 細胞量5 ml と膵島移植が可能であると判断された。本症例のインスリン必要量は一日約11単位であり, 7月2日に施行したグルカゴン負荷試験で(Table 4), C ペプチドは負荷前0.25 ng/ml, 負荷6分後0.66 ng/ml と第1回膵島移植第30病日の成績より改善しているもののまだ低値であるため, 膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」のレシピエント選択のルールに基づき, 膵島移植の第一候補となった。

エコーガイド下に経皮経肝的に門脈を穿刺し, 単離した膵島を移植した。同様に免疫抑制薬を用い, 血糖コントロールも第1病日より超速効型インスリンと持効型溶解インスリンを用いた。第19病日(第1回膵島移植第105病日, 以下同様)にはインスリン注射から離脱, 第29病日(第115病日)に施行したグルカゴン負荷試験(Table 4)では, C ペプチドは負荷前0.35 ng/

ml, 負荷6分後1.2 ng/ml とさらに改善を示し, 第32病日(第118病日)に施行した75g経口糖負荷試験(Table 5)では正常型を示した。第35病日(第121病日)にインスリン離脱のまま退院。第33~34病日の血糖から算出されたM値0.6, MAGE値33 mg/dlであった(Table 5)。

合併症・副作用: 膵島移植では, 移植そのものによる合併症と免疫抑制薬による副作用が治療の主なリスクである⁵⁾。本症例において, 第1回目の膵島移植直後の腹部エコー検査にて右腎臓周囲に低エコー領域の出現を認めたため, 開腹手術を行ったところ, 腹腔内に約1 lの出血を認めた。しかしながら, すでに止血していた。第2回目の膵島移植では問題なかった。

また, 移植後に一過性の肝障害を来すことが報告されているが, 本症例において, 第1回移植の第4病日, 第2回移植の第7病日にそれぞれ頂値を示す肝障害を認めた(ASTは, それぞれ95 IU/l, 74 IU/l)。しかしながら, いずれも一過性で一か月以内に前値に復

した。

免疫抑制薬の副作用として、骨髄抑制が報告されている。本症例において、白血球減少が認められたため、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を投与した。また、高脂血症はスタチンを投与することでLDLコレステロール値を100 mg/dl以内に保つことが可能であった。タクロリムスによる腎症の増悪が報告されているが、クレアチニンクリアランスは移植後も73 ml/min(体表面積補正)と低下していない。感染症は認められていない。

考 察

膵島移植は新たな免疫抑制薬を用いたエドモントンプロトコル²⁾の導入以降、300例以上の症例に対して行われ、膵臓移植に匹敵する成績が報告されている。欧米では、そのほとんどが、脳死ドナーより提供された膵臓から膵島が単離され、温阻血時間が問題となる心停止ドナーからの膵島移植については1例が報告されているに過ぎない⁶⁾。しかしながら、わが国においては臓器移植法によって、脳死ドナーからの膵島単離は認められていないため、条件のより厳しい心停止ドナーから十分な機能を有する膵島を単離することが要求されている。

膵臓の保存に二層法⁷⁾を改変して保存液にET-Kyoto液⁸⁾を用い、さらに膵島分離法はエドモントンプロトコル²⁾を改良することによって、心停止ドナーから効率よく膵島を単離する手技を確立し(松本ら:投稿中)、1回の移植にレシピエントの体重1 kgあたり5,000 IE以上の膵島を単離することが可能となり、わが国においても心停止ドナーを用いた膵島移植でインスリン離脱が可能であることを示すことができた。Ryanらは、体重1 kgあたり9,000 IEの膵島を移植することでインスリン離脱が可能であることを報告している⁹⁾。これらの症例はすべて脳死ドナーから提供された膵島を用いた成績であるが、我々は心停止ドナーから単離した膵島を体重あたり約13,000 IE用い、インスリン離脱に成功した。より少ない膵島量でインスリン離脱が可能かどうかは、今後の症例の積み重ねが必要である。

膵島移植の治療の最終的な目標はインスリン依存状態の糖尿病患者がインスリン離脱することであるが、もう一つの目標は血糖の不安定性の改善による無自覚血糖や低血糖昏睡など急性合併症からの離脱である。血糖の不安定性の評価にはいろいろな指標が提案されているが^{3,4,9)}、我々はM値とMAGE値を用いて評価した。その結果、いずれの指標も、膵島移植前、膵島1回移植後、膵島2回移植後と進むにつれて、改善し

た。MAGE値に関して、カナダ・アルバータ大学にて管理されている1型糖尿病患者の成績が報告され、中央値は8.1 mMで、50%の患者が6.2~10.5 mMに分布している。本症例では、移植前の173 mg/dl(9.6 mM)が、1回移植で73 mg/dl(4.1 mM)、2回移植で33 mg/dl(1.8 mM)と著明な改善を示した。第1回移植後も、1カ月に数回30~40 mg/dl台の低血糖発作を認めたが、第2回移植後は全く消失し、この観点からも膵島移植は有効な治療法と考えられた。

Fig. 1に示すように、インスリン必要量は漸減し、また、Table 4に示すように、第1回移植後に施行したグルカゴン負荷試験でも、第30病日に比較して第86病日で内因性インスリン分泌は改善した。膵島内の血管と肝臓の血管の吻合が進むことがその要因と考えられている¹⁰⁾。最近、膵β細胞そのものが増殖するとの報告がされた¹¹⁾。移植膵島のインスリン分泌亢進が膵β細胞の増殖に関与しているかどうか興味深い。

2回目の移植後に施行した75 g糖負荷試験では正常型を示した。しかしながら、インスリン分泌は低く、insulinogenic indexでも0.15に過ぎず、インスリン分泌のピークは負荷90分後と遅延していた。糖尿病性自律神経障害による胃排泄の低下に伴う血糖上昇の遅延とともに移植した膵β細胞量の不足も寄与していると考えられた。それにもかかわらず血糖曲線が正常型であるのは、本症例が1型糖尿病であるためもともとインスリン抵抗性がないこと、移植後体重が減少したこと⁹⁾などによりインスリン感受性が良好であるためと考えられた。

膵島移植は、門脈を穿刺するため約10%の症例において、出血が認められている⁹⁾。本症例においても、第1回の移植後に約1 lの出血があった。門脈内に穿刺したカテーテルの抜去にあたり、十分量のコラーゲンで止血処置をし、腹部エコー検査で経時的に観察することが必要である。その他の合併症・副作用は、既報の範囲内であった。

2回の移植でインスリン離脱が可能であること、血糖の安定性が達成され無自覚性低血糖が消失したこと、ならびに合併症・副作用の程度から、わが国においても心停止ドナーからの膵島移植がインスリン依存領域の糖尿病に対する安全かつ有効な移植手技であることが明らかとなった。

謝 辞：本研究にあたり、膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」の諸先生方に深謝いたします。

本研究の一部は、厚生労働科学研究費ならびに文部科学省21世紀COEプログラムによる。

文献

- 1) 金澤康徳(2003)日本人臍移植の現状と将来への展望. 内分泌・糖尿病科 16: 407-410
- 2) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-238
- 3) Schlichtkrull J, Munck O, Jersild M (1965) The M-Valve, an Index of Blood-Sugar Control in Diabetics. *Acta Med Scand* 177: 95-102
- 4) Service FJ, Molnar GD, Rosevear JW, Ackerman E, Gatewood LC, Taylor WF (1970) Mean amplitude of glycemic excursions, a measure of diabetic instability. *Diabetes* 19: 644-655
- 5) Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM (2002) Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 51: 2148-2157
- 6) Markmann JF, Deng S, Desai NM, Huang X, Velidedeoglu E, Frank A, Liu C, Brayman KL, Lian MM, Wolf B, Bell E, Vitamaniuk M, Doliba N, Matschinsky F, Markmann E, Barker CF, Naji A (2003) The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 75: 1423-1429
- 7) Matsumoto S, Kuroda Y (2002) Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation* 74: 1804-1809
- 8) Bando T, Kosaka S, Liu C, Hirai T, Hirata T, Yokomise H, Yagi K, Inui K, Hitomi S, Wada H (1994) Effects of newly developed solutions containing trehalose on twenty-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 92-98
- 9) Ryan EA, Shandro T, Green K, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Shapiro AM, Vantyghem MC (2004) Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes* 53: 955-962
- 10) Andersson A, Korsgren O, Jansson L (1989) Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes* 38(Suppl 1): 192-195
- 11) Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46