

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

膵島移植実施のための膵島品質管理と
膵臓バンク構築の研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 剣持 敬

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

睥島移植実施のための睥島品質管理と睥島バンク構築の研究	1
主任研究者 剣持 敬	

II. 分担研究報告

睥島移植実施のための睥島品質管理と睥島バンク構築の研究	15
分担研究者 松本 慎一	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	27
-----------------------	----

I. 総括研究報告

腓島移植実施のための腓島品質管理と腓島バンク構築の研究

主任研究者 剣持 敬

膵島移植実施のための膵島品質管理と膵島バンク構築の研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 剣持 敬 国立病院機構千葉東病院臨床研究センター長

平成18年4月

研究要旨

前年度までに、臨床膵島移植実施のため、国立病院機構千葉東病院臨床研究センター及び京大病院内に GMP 準拠の膵島分離・凍結保存施設を構築し、運営方法や膵島分離・凍結保存を含めた実際の手順を詳細に記述した標準作業手順書（SOP）を完成させた。これらの、準備背景を元に、両施設で脳死・心停止ドナーからの膵島分離を 37 回施行した。37 回中 19 回（51%）が新鮮膵島移植に用いられ、10 名の 1 型糖尿病患者に移植された。うち 3 名がインスリン離脱し、他の 5 名も低血糖発作の消失、必要インスリン量の減少、HbA1C の正常化が得られ、臨床的有効性が確認された。新鮮膵島移植に用いなかった膵島は、両施設の膵島分離・凍結保存施設にて凍結保存されている。サンプルの機能、感染の評価では、全例感染はなく、形態学的にも十分保たれ、インスリン分泌能も有しており、千葉東式凍結保存法の有効性が確認された。現在、このデータを基礎に凍結膵島移植が「トライン（案）」を作成済みであり、今年度中の臨床凍結膵島移植が実施される見込みである。

A. 研究目的

臨床膵島移植が 2004 年よりわが国で開始され、順調に症例数が増加している。脳死ドナー膵を使用する欧米と異なり、わが国ではほとんどが心停止ドナー膵からの膵島移植が施行されている。心停止ドナー膵からの膵島分離は困難なことも多く、即座に膵島移植（新鮮膵島移植）に用いられない場合も多い。また心停止ドナーは長期の死戦期や感染を伴うこともあり、精製された膵島の安全性確保が重要である。また新鮮膵島移植に用いられなかった場合には、凍結保存をすることにより、ドナー膵から得られた膵島を効率的に移植に使用することが可能となる。以上のようなわが国の現状を考慮すると、本研究のような膵島バンクを構築して、安全性、有効性が確認された膵島を供給するシステムを作成することが、わが国の膵島移植発展かつ成績向上の上

重要と考える。

前年度までに、当院および京都大学を中心に、臨床膵島分離・凍結保存・移植が実施され、わが国の臨床膵島移植が開始された。また当院、京都大学において、GMP 準拠の Cell processing center が整備され、品質管理上最も重要な環境整備が完了した。またすでに両施設ですでに 10 人の重症 1 型糖尿病患者に対して膵島移植が実施され、うち 3 名のインスリン離脱、他の 7 名も低血糖発作の消失、インスリン必要量の低下、HbA1C の正常化などが得られており、心停止ドナー膵を用いての膵島移植の安全性・有効性が臨床的に証明された。また 15 例の膵島凍結保存が行なわれており、臨床凍結膵島移植が実施される日も間近である。今年度は、移植成績の向上を目的として非純化膵島移植の実験的検討、凍結ヒト膵島の安全性・有効性の検討。当院の臨床膵島移植例の検討、当院で施行した生体膵臓

移植症例の検討より、膵臓移植と膵島移植の安全性、有効性を臨床的に比較検討した。

B. 研究方法

1. イヌ非純化膵島移植の実験的検討

1) 動物

ビーグル犬(8.5-11kg)16頭を用いた。麻酔はペントバルビタール静脈内麻酔法にて施行した。

2) 方法

ビーグル犬を全身麻酔下に開腹。膵を全摘し、膵島分離施行した。

[膵島分離法]摘出膵はわれわれの独自の方法にて膵島分離した。すなわち摘出膵の主膵管より 37℃ コラゲナーゼ液 (2.0mg/ml HBSS, Collagenase P, Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN) を注入し、膵をメカニカルチョッパーにて細切したのち、独自の膵島消化装置を使用して(図1)、膵組織を消化した。

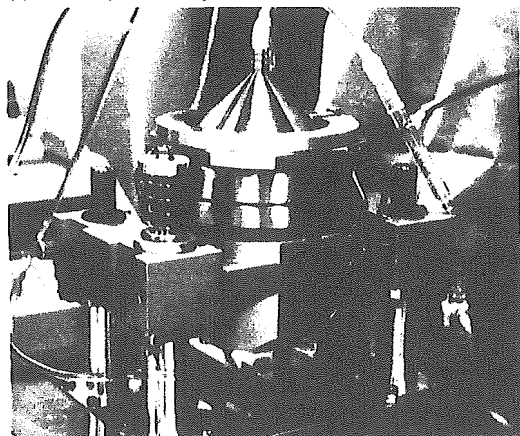


図1. 膵島消化装置

[実験群]消化組織を純化することなく、生理食塩水 100ml に混濁し、移植する群(非純化群、n=6)と消化組織を COBE2991 Cell processor を用いて Euro-Ficoll 比重遠心法にて膵島を純化し生食 100ml に浮遊し移植した群(純化 E 群、n=5)、HES-Collins 比重遠心法にて純化し生食 100ml に浮遊し移植した群(純化 H 群、n=5)の3群にわけ検討した。

[膵島自家移植]各群ともに上腸間膜静脈

より、カテーテルを刺入し、門脈本幹にカテ先を留置した。点滴法にて約 15-30 分かけて自家移植した。なお、各群ともに生食 100ml の膵島浮遊液内にヘパリン 2000 単位を混入した。移植終了後カテーテルは速やかに抜去した。

[検索項目]各群ともに膵島収量、純度、移植膵島 pellet 量、形態学的検討、膵島機能検査(perifusion study)、移植後血糖値の推移、IV-GTT を施行した。

2. ヒト凍結膵島の安全性・有効性の検討

1) 対象

2003年9月より2005年10月までの間に当院で施行した膵島分離 15 例のうち、新鮮膵島移植に用いた 2 例、膵島がほとんど分離し得なかった 1 例を除き、当院臨床研究センターの Cell processing center (膵・膵島移植研究会膵島移植班膵島バンク関東甲信越ブロック)において凍結保存されている 12 例の膵島のサンプル(チューブにて凍結保存されたもの)を検討材料として用いた。

2) 方法

[凍結膵島解凍法]凍結チューブ(セラムチューブ)を 37℃ 恒温槽にて解凍(rapid thawing technique)した後、直ちにヒト膵島培養用の Serum free medium (CMRL 1000ml+HEPES 5.95g+NaHCO₃ 2g+NAD 1.22g + Antibiotic-Antimycotic 10ml + L-glutamine 146mg + Zinc-sulfate 2.7mg+ITS+premix 10ml)で 1 回洗浄し、実験に供した。

[感染のチェック]解凍直後の膵島培養液(洗浄直後)を一部採取し、細菌、嫌気性菌、真菌、抗酸菌(結核菌含む)の感染の有無を培養法にてチェックした。

[形態学的検討]解凍された膵島を Overnight culture し、膵島の形態を光顕像(HE、インスリン免疫染色法)、電顕像にて評価した。

[膵島内分泌機能検査(Static incubation)]

膵島を解凍後 Serum free medium にて Overnight culture した後、膵島 10 個を

用いて以下の方法で Static incubation を行なった。

Static incubation

12 well microplate (FALCON 3043) および 12 well transwell microplate (pore size 12 μ m, Corning Transwell 3403)を用い、Medium として Overnight culture 用 (5.6mM-glucose RPMI (100mg/dl) + 10%FCS)、low glucose Test 用(3.3 mM glucose RPMI1640 + 0.1% FCS)、high glucose Test 用 (20 mM glucose RPMI1640+0.1% FCS) を使用した。以下に方法を簡潔に記す。

Overnight culture

Medium (I)に膵島を浮遊させ 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂-incubator 内で一晩静置培養する。

Pre-incubation

Medium (II-a) 2ml を添加した Transwell②に膵島 (各 10 個、径 150 μ m 以上、5 well) を入れ、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂-incubator の中で 60 分静置培養する。この培養上清を”Pre”とする。

Static incubation

- 1) Lo1 : Pre-incubation 終了後、Medium (II-a) を 2ml 入れた Well に Transwell を移動し、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂-incubator 内で 60 分静置培養する。この培養上清を回収し”Lo1”とする。
- 2) Hi : Lo1 終了後 Transwell を Medium (II-b)2ml を入れた洗浄用 Well に移動して洗浄後、Medium (II-b)2ml を入れた測定用 Well に移動し、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂-incubator 内で 60 分静置培養する。この培養上清を回収し”Hi”とする。
- 3) Lo2 : Hi 終了後 Transwell を Medium (II-a)2ml を入れた洗浄用 Well に移動して洗浄後、Medium (II-a)2ml を入れた測定用 Well に移動し、37 $^{\circ}$ C 5%CO₂-incubator 内で 60 分静置培養する。この培養上清を回収し”Lo2”とする。
- 4) テスト終了直後各々の培養上清を 3,000rpm 60 秒遠心し、上清を採取し、

インスリン濃度を測定する。

Lo1、Hi、Lo2 の 3 検体をインスリン測定に提出し、測定は SRL に依頼した。

[実験群] Static incubation から算出した Stimulation index(SI)が ≥ 1.2 を機能良好群、 <1.2 のものを機能不良群に分け比較検討した。

3. 当院での膵島移植症例の検討

[方法]膵臓摘出、膵島分離・移植の方法については、前年度報告書の通りである。

[症例 1] 10 代女性。Brittle 型糖尿病。インスリン必要量は計 48 u、血中 C-peptide: <0.05 ng/ml であった。移植膵島数は 491,040IEQ (5,517 IEQ/g) 純度は 70% であった。移植後の免疫抑制法は Edmonton Protocol 原法 (Sirolims (0.2mg/kg P.O. \rightarrow 0.1mg/kg P.O. Drug level:12-15ng/ml (3Mo), 7-10 ng/ml(>3Mo))、Tacrolimus (1mg P.O.*2/day Trough level: 3-6ng/ml)Daclizumab (1mg/kg I.V. every 2 weeks, total 5 doses)) で行なった。

[症例 2] 20 代女性。Brittle 型糖尿病。インスリン必要量は計 52u、血中 C-peptide: <0.05 ng/ml であった。免疫抑制法は Edmonton protocol の Daclizumab を Basiliximab に置換して行った。

[検討項目]

- 1) 移植中のモニタリング: Vital sign (血圧、脈拍、血中酸素飽和度)、門脈圧、自覚症状を連続的にモニタリングした。
- 2) 移植後検査項目: 低血糖発作の頻度、血糖値、血中高感度 C-peptide 値、投与インスリン量、HbA1C 値を経時的に測定した。

4. 当院の生体膵臓移植症例の臨床的検討

当院では国内初の生体膵臓移植を 2003 年 1 月に施行して以来現在までに 5 例の生体膵臓移植を施行し、うち 3 例は生体膵・腎同時移植であった。今回すでに移植後 1 年を経過した 2 例の生体膵・腎同

時移植症例につき臨床経過を報告する。
 [症例1]レシピエントは31才、女性。1型糖尿病腎不全のため強化インスリン療法と人工透析療法を受けている。無自覚かつ遷延性の低血糖発作を頻回に認める。ドナーは64才の父親。ABO血液型はA型で一致。ドナー適応評価：ドナーは採血・検尿検査で異常なく、Direct crossmatchにて陰性を確認後、入院して適応評価を行った。特に基準としたのはHbA1C、75g-OGTT、IV-GTTである。われわれはIV-GTTをminimal model analysis法にて解析しているが、インスリン第1相分泌能を示す Δ C-peptide (0-5分)が正常であることを必須条件とした。本ドナーは7.937 ng/ml/5minと正常であった。また解剖学的にはdynamic CTにて、膵臓が十分なサイズを有する、MRCPにて胆管、膵管に走行異常を認めない、dynamic CTより3Dで構築した膵臓と腎臓の血管像で安全な摘出が可能であることなどを確認した。

[症例2]レシピエントは39才、女性。1型糖尿病腎不全のためインスリン療法、人工透析療法を受けている。無自覚性の低血糖発作が頻回。ドナーは61才の父親。ドナー適応評価：症例1と同様の検査を行い適応評価した。 Δ CPRは6.568 ng/ml/5minと正常で、dynamic CT、MRCP、3D血管像で異常を認めなかった。
 [移植手術術式]

ドナーは開腹下で左腎を摘出。摘出腎はベンチで冷却灌流され、腎移植に供した。膵体尾部を周囲より剥離、脾臓とともに摘出した。移植膵の動脈は脾動脈根部、静脈は脾静脈根部とした。膵の摘出前にヘパリンを投与、摘出後プロタミンで中和した。摘出した膵体尾部+脾臓は4℃ UW液にて灌流し、ベンチで脾臓を分離切除した(図2)。レシピエント手術は、左腸骨窩腹膜外法にて腎移植を施行。ついで右腸骨窩腹膜外に膵体尾部を移植した。血管吻合はレシピエントの外腸骨動静脈に移植膵の脾動静脈をend-to-sideで

行った。膵液は膵管粘膜縫合にて膀胱にドレナージした。膵管には6Fr節つきステントチューブを挿入経膀胱的に体外に誘導した(図3、4)。

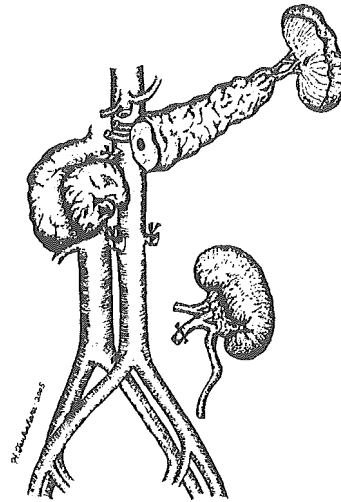


図2. ドナー手術術式

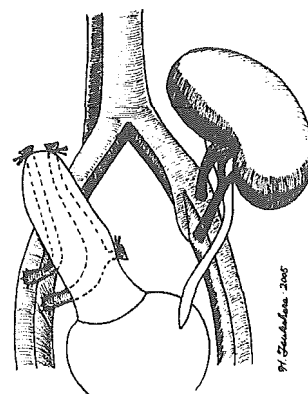


図3. レシピエント手術術式

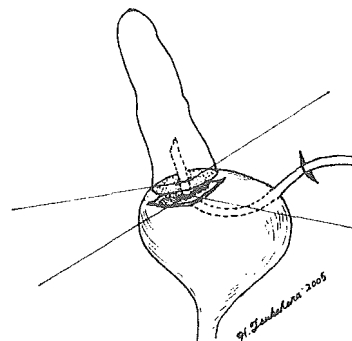


図4. レシピエント膵・膀胱吻合法

【移植後管理法】ドナーは術後 7 日間 piperacillin、gabexate mesilate を投与した。術後 5 日間絶食とした。レシピエントの移植後免疫抑制剤は ciclosporin、mycophenolate mofetil、predonisone、basiliximab の 4 剤投与を行った。抗凝固療法として術中、術後 7 日間 heparin を持続投与し、以後は 1 年間 aspirin を経口投与した。感染症予防のため piperacillin、fluconazole、ganciclovir を投与した。移植膵炎予防として gabexate mesilate を 7 日間、octreotide を 5 日間投与した。1 週間は絶食として中心静脈栄養を施行した。

C. 研究結果

1. イヌ非純化膵島移植の実験的検討

1) 膵島収量、純度、移植膵島 pellet 量

膵島収量は、非純化群が $8,811 \pm 6,828$ IEQ/g、純化 E 群 $6,730 \pm 3,536$ IEQ/g、純化 H 群 $9,021 \pm 3,757$ IEQ/g であった。純度は非純化群が $2.5 \pm 0.55\%$ 、純化 E 群 $85.9 \pm 8.8\%$ 、純化 H 群 $92.5 \pm 7.5\%$ であった。移植膵島 pellet 量は非純化群で 10.8 ± 1.9 ml であったのに対し、他の 2 群では < 2 ml であった。

2) 形態学的検討

非純化群では、膵島は良好な形態を有し、一部は外分泌組織に包埋される形で存在した。純化 E 群では膵島の大きさはばらばらで、小膵島は一部破壊が見られた (図 5)。純化 H 群では良好な膵島がほぼ均一な大きさに分離された (図 5)。

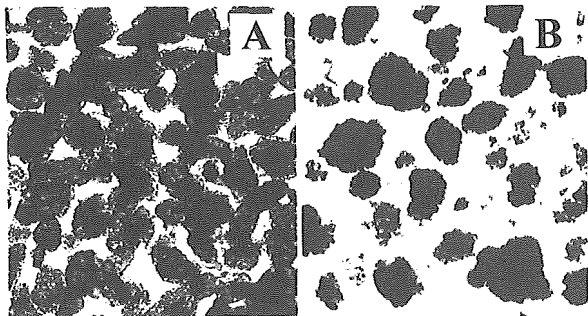


図5. 分離膵島像 (A: 純化 H 群、B: 純化 E 群)

3) 膵島機能検査 (Perifusion Study)

各群の膵島の perifusion study の結果を

示す (図 6)。非純化群ではグルコース負荷に対するインスリン分泌は遅延し、かつ分泌量も低く、stimulation index も 2.1 であった。これに対し純化群では 2 峰性のインスリン分泌が得られ、特に純化 H 群では stimulation index も 10.8 と良好であった。

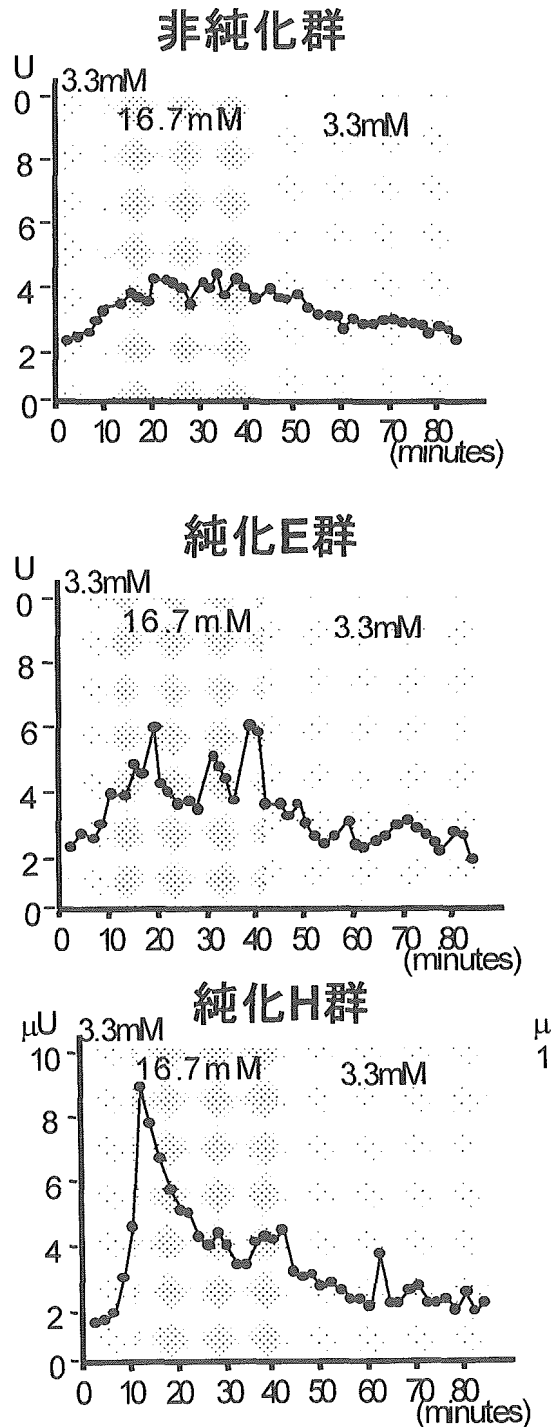


図6. Perifusion study

4) 移植後血糖値の推移 (図7)

純化E群では移植後血糖値は200mg/dl前後で推移したのに対し、純化H群、非純化群では血糖値は100mg/dl前後と正常値で推移した。

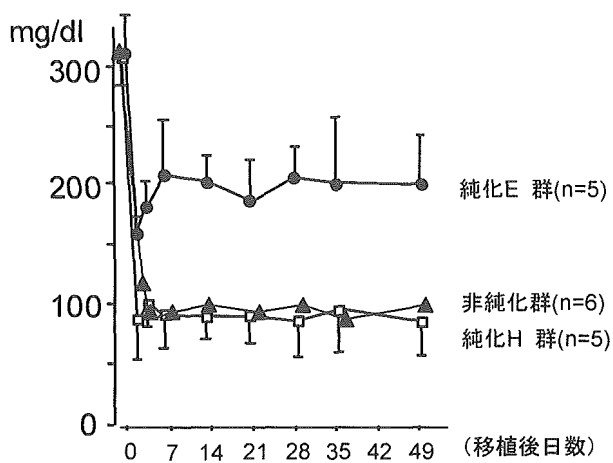


図7. 移植後血糖値の推移

2. ヒト凍結膵島の安全性・有効性の検討

1) 膵島分離データ

表1. 凍結保存膵島分離データ

番号	ドナー年齢	ドナー性	収量 (/g)	純度 (%)	SI
1	62	男	1975.48	30	2.46
2	48	女	1953.92	70	5.83
3	53	男	613.46	60	4.21
4	19	女	2264.39	30	1.56
5	61	女	1280.78	40	1.38
6	28	女	1795.00	70	2.95
7	22	男	1050.17	10	1.42
8	51	女	1041.43	40	11.7
9	46	男	394.17	30	1.4
10	57	男	1449.12	40	1.46
11	69	女	1754.66	30	4.55
12	10	男	1157.12	30	1.57

今回検討に用いた12例の凍結保存膵島の分離時のデータを表1に示す。年齢は10歳~69歳、収量は394.17~2264.39IEQ/gであった。Static incubationにて算出したstimulation indexは1.4~5.83と十分なインスリン分泌能を有していた。

2) 凍結解凍後感染チェック

12例ともに細菌、嫌気性菌、真菌、抗酸菌の培養で発育せず、陰性であった。

3) 膵島機能検査 (Static incubation)

Static incubation から算出した Stimulation index(SI)が ≥ 1.2 を示す機能良好群が8例、 < 1.2 であった機能不良群は4例であった。以下2群につき比較検討した。

4) 形態学的検討

機能良好群では形態が良好に保持されたものが7/8(87%)であったのに対し、機能不良群では1/4(25%)と機能不良群では形態の保持が困難であった。形態良好群のDithizone染色像(図8)、HE染色像(図9)、インスリン染色像(図10)、電子顕微鏡像(図11)ではいずれも正常の膵島の形態が保持されていた。

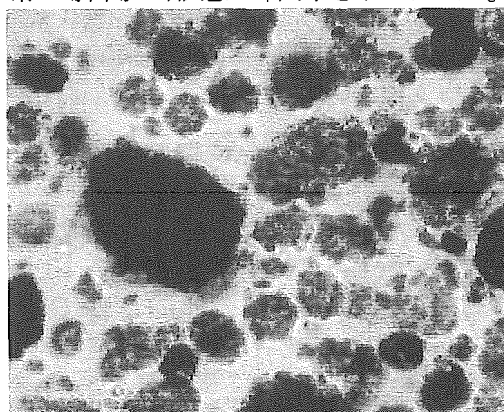


図8. Dithizone 染色像

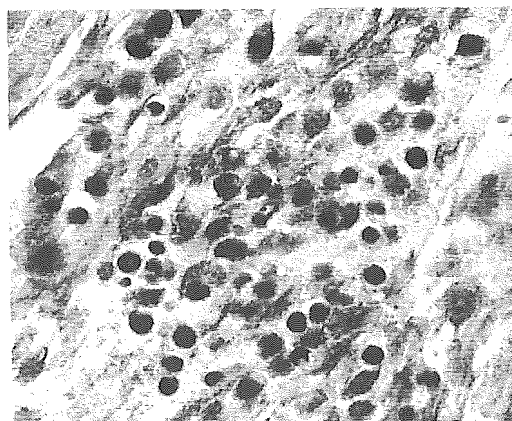


図9. HE 染色像

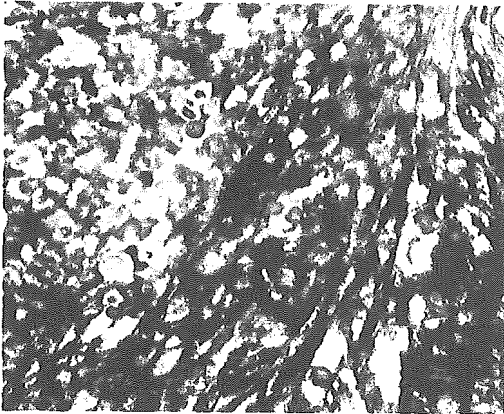


図10. インスリン染色像

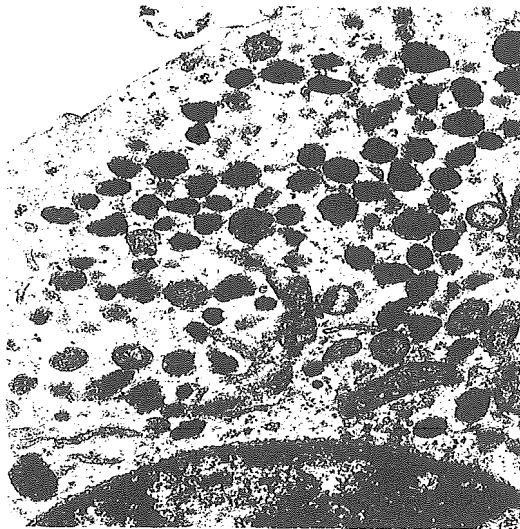


図11. 電子顕微鏡像

3. 当院での膵島移植症例の検討

症例1、2ともに移植中の Vital sign に著変なく、自覚症状も全く認めなかった。門脈圧も軽度上昇のみであった。移植後は出血などの合併症無く、血糖コントロールの改善と低血糖発作の消失、インスリン使用量の減少が得られ(図12、13)、高感度 C-peptide 値は 0.05→0.7ng/ml (症例1)、0.05→0.5ng/ml (症例2) と上昇した。HbA1c も血糖値の安定化に伴い、著明に低下した。インスリン離脱は得られなかったが患者 QOL の著明な改善がみられた。免疫抑制剤による副作用として症例2に口内炎が発現したが、Rapamycin の減量により消失した。両症例ともに、現在追加の膵島移植待機中である。

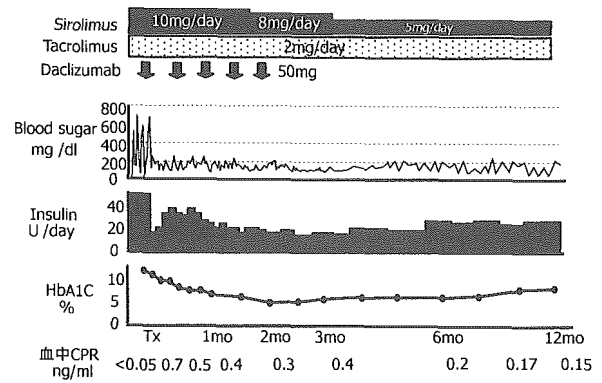


図12. 膵島移植臨床例(症例1)

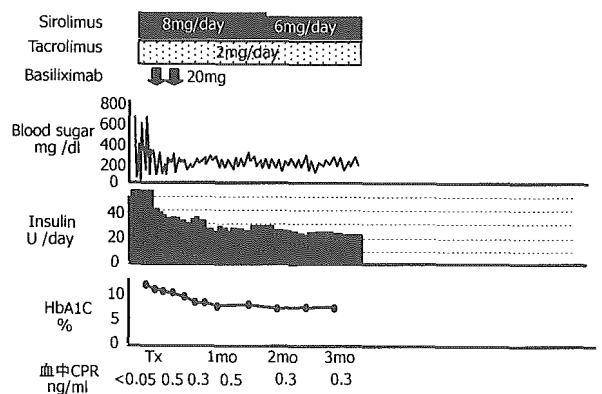


図13. 膵島移植臨床例(症例2)

5. 当院の生体膵臓移植症例の臨床的検討

移植後経過を示す。

[症例1] ドナーは血糖値、血清クレアチニン値ともに正常範囲で合併症なく経過し移植後15日退院した。レシピエントの経過は図4に示す。移植手術中より血糖値は安定し、移植後2週間インスリンを投与したがその後は完全離脱し、移植後102日退院した。1年6ヶ月経過した現在もインスリンは使用していない。移植後即利尿が得られ、現在血清クレアチニン値は0.8~0.9mg/dlである。移植後、移植膵、腎の血流ドプラー検査を頻回に行ったが、血流は終始良好で血栓形成や拒絶反応を認めなかった。血中高感度 C-peptide 値は移植前が感度以下 (<0.05ng/ml) であったのに対し、移植直後は5~10 ng/ml、2ヶ月以降現在まで3~5 ng/mlで推移している。低血糖発作は移植後全くみられず、移植前頻回(1日

8～10回)に起こった起立性低血圧も現在では消失した。

【症例2】ドナーは合併症なく経過し移植後31日退院した。レシピエントの経過は症例1と同様に血糖値は安定し、移植後1週間インスリンを投与したがその後はインスリン離脱した。即利尿が得られ、現在血清クレアチニン値は1.5mg/dl前後である。血栓形成や拒絶反応は見られず、移植後99日退院した。血中高感度C-peptide値は、1年経過した現在5～7ng/mlで推移している。低血糖発作は完全に消失した。

D. 考察

わが国において膵島移植の臨床が開始され、その90%以上を本研究の代表研究者と分担研究者の施設で行なわれており、わが国の膵島移植を担っていると自負できる。臨床例の経験より、悪条件の心停止ドナー(いわゆるマージナルドナー)からは、高収量、高純度の膵島が得られないことも多い。本年度の研究成果として、大動物実験において、純度が低い場合にも膵島移植が可能かどうかイヌ膵島自家移植モデルにて検討した。In vitroの膵島機能評価(perfusion study)においては、非純化膵島の機能は低いと評価されたが、自家移植では長期の正常血糖維持が可能であり、今後低純度でも十分な収量がある場合には新鮮膵島移植に使用できる可能性を示唆した。このデータをもとに今後新鮮膵島移植の純度の基準(現在は $\geq 30\%$)の見直しが必要と考えられた。

膵島バンク構築のためには安全な膵島凍結保存法が必須である。現在われわれは前年度の報告書に記した独自のバッグ一括大量凍結保存法を臨床に応用している。今回、すでに当院バンクに凍結保存されている12例の膵島を解凍し、その安全性・有効性を評価した。感染は1例もみられず、当院GMP準拠CPCにおける凍結保存技術の安全性が確認された。ま

た機能評価においては、凍結保存により形態、機能低下が約1/3の例にみられたが、サンプルのチェックにより解凍前に評価しえるため、新鮮膵島移植に比較して有効性の予測が可能であり、有用であると考えられた。

新鮮膵島移植を行なった2例はいずれも血中C-peptide値の陽性化、低血糖発作の消失、血糖値の安定化が得られた。1回の移植でインスリン離脱は得られていないが、患者のQOLの格段の向上が確認され、膵島移植の臨床的有効性が証明された。今後両症例は追加移植を強く希望され、待機中である。

更に当院で施行された生体膵・腎同時移植より以下の知見が得られた。1型糖尿病腎不全患者は頻回の自己血糖測定と綿密なインスリン注射、週3回の人工透析という負担を強いられるのみでなく、低血糖発作や自立神経障害による突然死の危機に直面しており、精神的負担も大きい。また心血管系合併症進行例では予後も不良である。このような患者に対して、膵・腎同時移植は極めて有効な治療である。生体膵・腎同時移植での大きな問題点は他の生体間移植と同様にドナーの安全性確保である。ミネソタ大学においても当院においても、IV-GTTによる第1相インスリン分泌能(rapid insulin release)を重視している。しかしこの指標だけで安全性が確保されるものではなく、当院では種々の全身精査のデータを移植・膵臓外科医、糖尿病内科医、腎臓内科医、麻酔医などからなる適応評価委員会で十分に検討・評価している。また現在さらに精密な膵機能評価法として ^{11}C -methionine PETの導入を行っている。また当院で施行した2例のドナーは術後の合併症なく、1年、1年6ヶ月を経過した現在、糖尿病の発症はなく(75g-OGTT正常パターン)、通常的生活を送っているが、今後長期の経過を慎重に観察する必要がある。外来にて検査を行うのみでなく、体重や血圧のコン

トロールなど糖尿病、腎不全発症のリスクファクターを減らすよう指導している。またレシピエント側の問題点としては、提供する膵臓は体尾部のみであり、十分な膵内分泌機能がもたらされ、インスリン離脱が可能であるかという点が危惧される。しかし当院の2例の生体膵・腎同時移植および1例の腎移植後生体膵臓移植症例はすべてインスリン離脱し、移植後の耐糖能も正常パターンで推移していることより、ミネソタ大学での臨床例と同様、生体膵移植の場合は体尾部でも十分な機能をレシピエントにもたらすことが明らかとなった。一方、脳死・心停止ドナーからの移植に比較しての生体膵・腎同時移植の利点は以下があげられる。親子間の場合、HLAはone haplotype matchであり免疫学的に有利で、その結果免疫抑制剤の投与量を減量し得ること、阻血時間を最小限にし移植膵のviabilityを良好に保つことが可能であることが最大の利点である。しかし筆者らの経験より更に重要なのは、待機的手術であるため、移植前に十分なドナー、レシピエントの評価および移植前処置（特にレシピエントへの免疫抑制剤投与、血糖のコントロール）が可能であり、安全性が高められる点である。レシピエントは1型糖尿病かつ透析患者であり、種々の合併症を伴っている場合が多く、この点は極めて重要であると実感している。生体間移植においては常に、ドナーの安全性、レシピエントへの有効性（身体的、精神的、社会的側面を含めて）、倫理的・社会的問題点を考慮しつつ進めるべきであるが、当院の1例目においては、移植学会の生体間移植における倫理ガイドラインを遵守した上での、適応検討委員会での十分な討論、倫理委員会での承認はもちろんのこと、ドナー、レシピエント、ご家族に対し繰り返しInformed consentを行った（計5回）。

E. 結論

臨床膵島移植はわが国で着実に症例の

積み重ねがされており、本研究の成果によるところ大である。また種々の問題点も本研究の基礎的実験にて徐々に解決されており、凍結膵島移植の実施も間近である。

F. 健康危険情報

エドモントンプロトコールに利用されるシロリムスにより、特に、口腔内潰瘍が認められた。シロリムス減量により改善した。

G. 研究発表

1. 論文発表 (書籍)

1. 膵島移植の現状と将来の可能性 カラー版糖尿病学 基礎と臨床 門脇 孝ら編、西村書店、2005、東京 劍持 敬
2. 膵島移植 南山堂 医学大辞典 第19版1刷 pp1307、2006年3月10日 劍持 敬

(雑誌)

1. 劍持 敬、丸山通広、浅野武秀 ● 特集 21世紀の新しい外科治療 移植 膵臓・膵島移植 現代医療 36: 97-102, 2004
2. Maruyama M, Kenmochi T, Sakamoto K, Arita S, Iwashita C, Kashiwabara H. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants. Transplant Proc 36(4): 1133-1134, 2004
3. Maruyama M, Kenmochi T, Asano T, Saigo K, Miyauchi H, Miura F, Ochiai T. Laparoscopic distal pancreatectomy as the total biopsy of the pancreas: tool of minimally invasive surgery. Hepatobiliary Pancreat Surg 11(4): 290-292, 2004

2005

4. Matsui Y, Asano T, Kenmochi T, Iwakawa M, Imai T, Ochiai T. Effects of carbon-ion beams on human pancreatic cancer cell lines that differ in genetic status. Am J Clin Oncol 27(1): 24-28, 2004
5. 剣持 敬, 丸山通広, 西村元伸, 浅野武秀 1型糖尿病に対する膵島移植 看護技術 50(13): 1-4, 2004
6. 剣持 敬, 丸山通広, 西村元伸, 浅野武秀 1型糖尿病における膵ラ氏島移植の現状と将来 Diabetes Frontier 5(15): 679-684, 2004
7. 剣持 敬, 丸山通広, 西郷健一, 岩下 力, 大月和宣, 渡邊里美, 浅野武秀 わが国における臨床膵島移植の新しい展開と将来展望 再生医療 3(4): 69-76, 2004
8. 剣持 敬, 浅野武秀, 丸山通広, 大月和宣, 岩下 力, 渡邊里美, 西郷健一, 宮内英聡, 白鳥 享, 落合武徳 当施設の献腎摘出方法 Organ Biology 12(1): 39-46, 2005
9. 剣持 敬, 浅野武秀, 宮本正章, 丸山通広, 坪 尚武, 大月和宣, 岩下 力, 青木有紀子, 宮崎麻里子, 鈴木亜希子, 西郷健一 臨床に向けた膵島保存の現状 Organ Biology 12(2): 101-111, 2005
10. 剣持 敬, 浅野武秀, 丸山通広, 落合武徳 生体膵・腎同時移植の現状と将来 日外会誌 106(8): 489-493, 2005
11. 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 丸山通広, 坪 尚武, 岩下 力, 大月和宣, 西村元伸, 落合武徳 わが国初の生体部分膵・腎同時移植の1症例 移植 40(5): 466-472,

12. Miura F, Takada T, Asano T, Kenmochi T, Ochiai T, Amano H, Yoshida M. Hemodynamic changes of splenogastric circulation after spleen-preserving pancreatectomy with excision of splenic artery and vein. Surgery 138(3): 518-522, 2005
13. 剣持 敬 日本の膵島移植の現況は？ 肥満と糖尿病 5(2): 286-288, 2006
14. 剣持 敬, 丸山通広, 大月和宣 臨床膵島移植の現状と展望 医学のあゆみ (in press, 2006)

2. 学会発表 国際学会

1. Takashi Kenmochi, Takehide Asano, Ken-ichi Saigo, Michihiro Maruyama, Chikara Iwashita, Kazunori Ohtsuki Successful simultaneous pancreas and kidney transplantation from a living donor. -First case in Japan- 5th Korea-Japan Transplantation Forum 2004/10/23 Seoul_

全国学会

1. 剣持 敬, 浅野武秀, 丸山通広, 渡邊里美, 岩下 力, 西郷健一 わが国の膵島移植の現状と課題(ワークショップ) 第47回日本糖尿病学会年次学術集会 2004/5/13 東京
2. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 岩下力, 浅野武秀, 宮内英聡, 落合武徳 膵体尾部切除術における GABEXATE MESILATE の有用性—膵液漏防止、膵機能保持の点より— (一般口演) 第16回日本肝胆膵外科学会 2004/5/13 大阪
3. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 岩下力, 大月和宣, 渡邊里美, 浅野武秀

- CP-1 液を用いた腓島一括凍結法の基礎的検討と臨床応用 (シンポジウム) 第 11 回日本臓器保存生物医学会総会 2004/5/21 広島
4. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、岩下 力、渡邊里美 わが国における臨床腓島移植の現状と課題 (パネルディスカッション) 第 40 回日本移植学会総会 2004/09/16 岡山
 5. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、岩下 力、渡邊里美 生体部分腓・腎同時移植の 1 例 (一般口演) 第 40 回日本移植学会総会 2004/09/16 岡山
 6. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、岩下 力、大月和宣、西村元伸 1 型糖尿病に対する生体部分腓・腎同時移植の 1 例 (一般口演) 第 66 回日本臨床外科学会総会 2004/10/13 盛岡
 7. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、大月和宣、岩下 力、宮内英聡、落合武徳 1 型糖尿病腎不全に対する生体腓・腎同時移植の効果と意義 (一般口演) 第 38 回日本臨床腎移植学会 2005/1/28 大津
 8. 剣持 敬、浅野武秀、西郷健一、丸山通広、大月和宣、岩下 力、宮内英聡、落合武徳 1 型糖尿病性腎不全に対する生体部分腓・腎同時移植 (ビデオ) 第 105 回日本外科学会 2005/5/13 名古屋
 9. 剣持 敬、丸山通広、西郷健一、坪尚武、岩下 力、大月和宣、鈴木亜希子、宮崎麻里子、西村元伸 1 型糖尿病腎不全に対する生体部分腓・腎同時移植 (一般ビデオ) 第 59 回国立病院総合医学会 2005/10/15 広島
 10. 剣持 敬、丸山通広、西郷健一、岩下 力、大月和宣、坪尚武、宮崎麻里子、鈴木亜希子、若林 恵 1 型糖尿病腎不全に対する生体腓腎同時移植 3 例の経験 (一般口演) 第 9 回国立移植研究会 2005/10/14 広島
 11. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、大月和宣、西郷健一、坪尚武、岩下 力、青木有紀子、宮崎麻里子、鈴木亜希子 心停止ドナーからの腓臓摘出、腓島分離・保存の現況と問題点 (シンポジウム) 第 41 回日本移植学会 2005/10/30 新潟
 12. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、大月和宣、坪尚武、岩下 力 生体腓・腎同時移植における腓・膀胱吻合法の有用性 (一般口演) 第 41 回日本移植学会 2005/10/29 新潟
 13. 剣持 敬 シムレクト導入療法を用いた生体腓・腎同時移植 (イブニングセミナー) 第 41 回日本移植学会 2005/10/29 新潟
 14. 剣持 敬 AP/C2 monitoring の有用性: 生体腓腎同時移植 (シンポジウム) Ciclosporin Pharmaco-Clinical Forum 2004 2004/7/24 名古屋
 15. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、大月和宣、岩下 力 1 型糖尿病性腎不全に対する生体部分腓・腎同時移植の導入 (一般口演) 第 32 回腓・腓島移植研究会 2005/3/19 福岡
 16. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、大月和宣、岩下 力 腎移植後生体部分腓臓移植 (LDPK) の 1 例 (一般口演) 第 32 回腓・腓

島移植研究会 2005/3/19 福岡

生物医学会総会 2004/5/21 広島

17. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、坪 尚武、大月和宣、岩下力、若林 恵、鈴木亜希子、宮崎麻里子 臓器移植、生体ドナー・マージナルドナーの利用(シンポジウム) 第33回臓器・臓器移植研究会 2006/3/18 千葉
18. 剣持 敬、浅野武秀、丸山通広、西郷健一、坪 尚武、大月和宣、岩下力、若林 恵、鈴木亜希子、宮崎麻里子 安全な生体臓器・腎同時移植の施行について - 3例の経験より - (一般口演) 第33回臓器・臓器移植研究会 2006/3/18 千葉
3. 剣持 敬 パネル「臓器移植の現状と展望」 第3回日本組織移植学会・学術集会 2004/8/28 横浜
4. 剣持 敬 一般演題 悪性腫瘍 第38回日本臨床腎移植学会 2005/1/27 大津
5. 剣持 敬 Session C 優秀研究賞応募演題(臨床部門1) 第32回臓器・臓器移植研究会 2005/3/19 福岡
6. 剣持 敬 臓器・臓器移植1 第41回日本移植学会 2005/10/30 新潟
7. 剣持 敬 ワークショップ「臓器移植の最前線」 第32回日本低温医学会 2005/11/25 つくば
8. 剣持 敬 糖尿病 第39回日本臨床腎移植学会 2006/1/27 鬼怒川

地方会・その他

1. 剣持 敬、西郷健一、丸山通広、岩下力、大月和宣、浅野武秀、宮内英聡、落合武徳 1型糖尿病腎不全に対する生体臓器・腎同時移植の導入(一般口演) 第1093回千葉医学会例会 2004/12/19 千葉
2. 剣持 敬 腎疾患に対する臓器移植、臓器移植、臓器移植に関する臨床的研究(一般口演) 平成17年度腎疾患政策医療ネットワーク協議会 2005/10/13 広島
3. 剣持 敬、西郷健一、丸山通広、坪 尚武、岩下 力、大月和宣 当院の移植医療の現状(一般口演) 第1116回千葉医学会例会 2005/12/18 千葉

座長

1. 剣持 敬 臓器11 第16回日本肝胆臓器外科学会 2004/5/13 大阪
2. 剣持 敬 一般演題1 (P-1)「免疫・ドナー拡大」 第11回日本臓器保存

招待講演

1. 剣持 敬 臓器移植の現状と将来の可能性(教育講演) 第4回日本組織移植学会 2005/8/27 大阪
2. 剣持 敬 糖尿病治療における臓器・臓器移植の現状と展望(ランチョンセミナー) 第39回日本小児内分泌学会 2005/10/21 東京
3. 剣持 敬 1型糖尿病は移植で治るんですか?(講演) 第33回臓器・臓器移植研究会・市民公開講座「専門医がやさしく解説する糖尿病講座」 2006/3/19 千葉
4. 剣持 敬 糖尿病性腎症に対する臓器・臓器移植の現状(特別講演) 千

- 葉市医師会外科医会学術講演会
2004/11/25 千葉
5. 剣持 敬 移植医療の現況について
(特別講演) 第23回国臨協関信支
部千葉地区会定期総会 2004/7/3 千
葉
 6. 剣持 敬 膵島(講演) 第1回
JOTCo.・都道府県 Co.・組織移植 Co.・
アイバンク Co.合同セミナー
2004/9/25 東京
 7. 剣持 敬 重症糖尿病に対する膵・膵
島移植の現況と展望(講演) 第49
回千葉糖尿病スタッフ研究会
2004/10/9 千葉
 8. 剣持 敬 糖尿病性腎症に対する移
植医療—先端医療である膵島移植、膵
腎同時移植とは?—(特別講演) 第
17回腎臓病を考える会(千葉県腎臓
病協議会) 2004/10/30 千葉
 9. 剣持 敬 わが国の膵島移植の現状
と展望(特別講演) 第7回近畿膵移
植検討会 2004/11/13 大阪
 10. 剣持 敬 生体膵・腎同時移植の臨床
(特別講演) 第11回千葉県糖尿病性
腎症研究会 2004/11/19
 11. 剣持 敬 膵島移植の現状と課題(特
別講演) 第122回糖尿病談話会
2004/11/24 東京
 12. 剣持 敬 膵島移植について(特別講
演) 千葉県 IDDM の会「なっつ」第
1回勉強会 2004/11/28 千葉
 13. 剣持 敬 糖尿病性腎症に対する膵
臓・膵島移植の臨床(特別講演) 第
3回埼玉西北部糖尿病セミナー
2005/2/4 坂戸
 14. 剣持 敬 1型糖尿病に対する膵臓
移植・膵島移植の現状(特別講演) 第
8回青森膵疾患研究会 2005/2/26
青森
 15. 剣持 敬 1型糖尿病に対する膵臓
移植・膵島移植の現状(特別講演) お
茶の水糖尿病療養担当者教育セミナ
ー 2005/4/23 東京
 16. 剣持 敬 1型糖尿病に対する膵・膵
島移植の臨床(特別講演) 富山成長
期糖尿病研究会「第2回富山成長期糖
尿病セミナー」 2005/6/18 富山
 17. 剣持 敬 1型糖尿病に対する膵島
移植、膵臓移植の臨床(特別講演) 第
6回芝糖尿病・代謝・内分泌カンファ
レンス 2005/7/14 東京
 18. 剣持 敬 糖尿病に対する膵・膵島移
植の臨床(特別講演) 第5回 Islet
Biology 研究会 2005/7/22 東京
 19. 剣持 敬 当院における先端医療の
現状(特別講演) 三菱ウェルファーマ社内
研修会 2005/7/26 千葉
 20. 剣持 敬 1型糖尿病に対する膵・膵
島移植の臨床(教育講演) 熊谷糖尿
病ネットワーク第8回特別例会
2005/8/6 熊谷
 21. 剣持 敬 国立病院機構千葉東病院
における移植医療の現状(講演) 君
津中央病院院内講演会 2005/9/5 君
津
 22. 剣持 敬 生体部分膵腎同時移植の
経験と今後の展望(特別講演) 臓器
移植 Topics Seminar 2005/9/10
名古屋
 23. 剣持 敬 1型糖尿病に対する膵・膵
島移植の臨床と将来展望(特別講演)

第 11 回千葉小児糖尿病研究会
2005/9/13 千葉

24. 剣持 敬 1 型糖尿病腎不全に対する生体膵腎移植の臨床（特別講演）
新潟大学大学院特別講義 膵移植フォーラム 2005/9/15 新潟
25. 剣持 敬 1 型糖尿病に対する膵臓移植・膵島移植の適応と臨床実施（講演）
第 11 回糖尿病治療を考えるフォーラム 2005/10/1 東京
26. 剣持 敬 国立病院機構千葉東病院における生体膵臓移植の経験（講演）
第 8 回近畿膵移植検討会 2005/11/26 大阪
27. 剣持 敬 1 型糖尿病に対する膵臓・膵島移植の臨床（特別講演） 第 14 回武蔵野糖尿病研究会
2005/12/10 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他
新聞報道
添付書類参照

II. 分担研究報告

睥島移植実施のための睥島品質管理と睥島バンク構築の研究

分担研究者 松本 慎一

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

膵島移植実施のための膵島品質管理と膵島バンク構築の研究

分担研究者 松本慎一 藤田保健衛生大学医学部外科 教授

研究要旨

本研究の目的は、昨年度に引き続き、重症糖尿病の治療としての臨床膵島移植実施のための膵島品質管理と膵島バンク構築である。本邦では心臓死ドナーからの膵島移植となるため、膵島分離に高い技術が要求される。また、臨床膵島移植を開始するためには、臨床に用いるレベルの品質を持つ膵島を分離するシステムが不可欠である。心臓死ドナーからの膵島分離技術を確立するため、研究室内にヒト膵島分離と同じシステムを構築し、膵島分離技術を確立した。前年度までに、京都大学では、臨床膵島移植を行うために Good Manufacturing Practice (GMP) 準拠の膵島分離施設を建設し、この施設を運営するための Standard Operative Procedure (SOP) を完成させた。

以上のように、技術的そして品質管理のハードルをクリアした後、本邦一例目となる膵島移植を平成 16 年 4 月 7 日に実施した。その後、17 回の膵島移植を 8 名の 1 型糖尿病患者に実施した。移植膵島は全例において機能した。5 例において分離膵島の凍結保存を行った。本年度の重要な知見として、複数回移植を受けた 5 名の患者のうち 3 名がインスリンより離脱し、エドモントンプロトコールの再現が可能であることが判明した。一方、エドモントンプロトコールに用いられるシロリムスの副作用である骨髄抑制、口腔内潰瘍、浮腫、卵巣囊腫、生理不順を経験した。これらの副作用による QOL の低下はあまりなかった。さらに、ミコフェノール酸モフェチルを導入し、シロリムスを減量することで、これらの副作用すべてが改善した。

A. 研究目的

本研究の目的は、重症糖尿病の治療としての臨床膵島移植実施のための膵島品質管理と膵島バンク構築である。

B. 研究方法

前年度、我が国で初めて臨床膵島移植を実施した。今年度は、移植成績の更なる成績向上をめざし、膵島分離方法の改良の研究を進めた。また、臨床例においてはその症例を増やすとともに、最近の知見を踏まえたプロトコールの改良を行った。

1) 昨年度、確立したブタを用いた実験系を用い膵島分離法改善の研究を実施した。また、メカニズムを解析する目

的で、多くの群を用いた比較実験のために小動物（ラット）を用いた膵島実験の系を確立した。膵島移植においては、膵臓より膵島を分離する過程が最も高い技術を要する。膵島分離前の膵臓保存の溶液が膵島分離に大きく影響を与えるため、溶液の解析実験を実施した。大動物（ブタ）において、通常の保存方法である University of Wisconsin 溶液（UW）と酸素化した Perfluorocarbon (PFC) を用いた二層法 UW/PFC 法と新しく開発した、

2) ET-Kyoto 溶液に Ulinastatin (Miraclid®; M) を添加し作成した M-Kyoto 溶液を用いた二層法 M-Kyoto/PFC を比較し

た。

- 3) 小動物を用いて、UW に Ulinastatin を添加した M-UW 溶液を作成し、UW, M-UW, ET-Kyoto, M-Kyoto 溶液の4つの溶液の解析を行った。
- 4) 昨年度に引き続き、心停止ドナーからの臨床膵島移植および臨床応用へ向けての凍結保存を実施した。臨床のフォローアップ症例において、免疫抑制剤の改良を行った。

C. 研究結果

1) 大動物（ブタ）の実験の結果

M-Kyoto/PFC を用いた群では、平均収量は 3936 ± 566 IE (islet equivalent 1IE=直径 $150\mu\text{m}$ の膵島1つ)であり、UW/PFC を用いた場合は 2885 ± 290 IE であり M-Kyoto を用いた場合有意に ($P < 0.01$) に膵島収量が増えていた。M-Kyoto/PFC の群は UW/PFC と比較して、トリプシン活性が有意に抑制されており ($P < 0.01$)、M-Kyoto 溶液に添加された Ulinastatin が有効に作用していると考えられた。また、M-Kyoto/PFC 群は消化時間が 8.0 ± 0.6 分であり、UW/PFC 群の 15.6 ± 1.6 分に比べて有意に ($P < 0.01$) 短縮されていた。以上から、M-Kyoto/PFC 群では、消化酵素であるリベレースの活性を維持しながらも、膵島障害性のあるトリプシンのみを選択的に阻害する効果があると考えられた。

2) 小動物（ラット）の実験結果

ラットの膵臓を摘出し、UW/PFC, M-UW/PFC, ET-Kyoto/PFC, M-Kyoto/PFC の4群での保存後膵島分離を実施した。膵島の収量は M-Kyoto/PFC 群で有意に他の3群より多く得られた。M-UW/PFC および M-Kyoto/PFC の両群はそれぞれ UW/PFC, ET-Kyoto/PFC の群に比べて有意にトリプシン活性を抑制しており、Ulinastatin が有効に作用されていることが示された。消化時間の測定により、UW および M-UW は M-Kyoto と比べてリベレースの活性を阻害することが証明され、大動物の実験での考察どおり、

M-Kyoto 溶液は、Ulinastatin のトリプシン阻害効果および UW の欠点であるリベレース阻害性が少ないことが、膵島分離成績向上に貢献できていることが証明された。

3) 臨床膵島移植

京都大学医学部附属病院にて平成 16 年 4 月 7 日に、本邦初めての膵島移植が実施された。この症例は 2 回の膵島移植の後インスリン注射から離脱し、本邦初めての膵島移植によるインスリン離脱症例ともなった。以降平成 18 年 3 月までで、22 回のヒト膵島分離を実施し、全例においてグラム染色陰性、Endotoxin 量も標準的な体重患者以下であり、清潔度に関してクリアしていた。また、全例において純度、組織量、Viability の基準を満たしていた。膵島収量は 22 例中 17 例において移植基準を満たし、膵島分離成功率は $17/22(84\%)$ であった。膵島分離成功率は、世界のトップ施設においも 50% 以下であり、世界的にも突出した成功率の高い技術を確立した。膵島分離成功には、保存時間が短いこと、年齢が若く慢性膵炎がないことが重要であった。

移植膵島は全例において機能を開始し、血糖値の安定化と低血糖発作の頻度の減少を認めた。また、複数回移植を行った 5 名の患者の内インスリン注射からの離脱者も 3 名得られた。移植後、シロリムスの副作用と思われる、骨髄抑制、口腔内潰瘍、浮腫、卵巣嚢腫、生理不順が見られたため、シロリムスの減量とミコフェノール酸モフェチルの導入という新しい免疫抑制療法を 8 例中 7 例で開始した。この方法で、口腔内潰瘍、浮腫、卵巣嚢腫、生理不順はほぼ解消した。

D. 考察

本年度の研究成果として、まず、動物実験において、京都膵島分離法において M-Kyoto 溶液の重要性を大動物及び小動物の実験で示した。さらに、小動物の実験でウリナスタチンによる、トリプシン抑制作用と京都溶液の細胞保護作用の両方が揃うことで、膵島収量が有意に増加