

2002

16) Lakey JR, Tsujimura T, Shapiro AM, et al : Preservation of the human pancreas before islet isolation using a two-layer (UW solution-perfluorochemical) cold

storage method. Transplantation 74 : 1809-1811, 2002

17) Weber DJ, McFarland RD, Irony I : Selected Food and Drug Administration review issues for regulation of allogenic

islets of langerhans as somatic cell therapy. Transplantation 74 : 1816-1820, 2002

## 当施設の献腎摘出方法

剣持 敬<sup>1,2)</sup>, 浅野武秀<sup>3)</sup>, 丸山通広<sup>1)</sup>, 大月和宣<sup>1)</sup>, 岩下 力<sup>1)</sup>,  
渡邊里美<sup>2)</sup>, 西郷健一<sup>1,2)</sup>, 宮内英聡<sup>4)</sup>, 白鳥 享<sup>4)</sup>, 落合武徳<sup>4)</sup>

- 1) 国立病院機構千葉東病院外科
- 2) 同臨床研究センター先端医療技術開発研究部
- 3) 千葉県がんセンター消化器外科
- 4) 千葉大学大学院先端応用外科

Procurement of kidney grafts from cadaveric donors  
—Our technique—

Takashi Kenmochi<sup>1,2)</sup>, Takehide Asano<sup>3)</sup>, Michihiro Maruyama<sup>1)</sup>,  
Kazunori Ohtsuki<sup>1)</sup>, Chikara Iwashita<sup>1)</sup>, Satomi Watanabe<sup>2)</sup>,  
Kenichi Saigo<sup>1,2)</sup>, Hideaki Miyauchi<sup>4)</sup>, Tohru Shiratori<sup>4)</sup>, Takenori Ochiai<sup>4)</sup>,

- 1) Department of Surgery Chiba-East National Hospital, National Hospital Organization (NHO)
- 2) Division of Clinico-Research Center, Chiba-East National Hospital,  
National Hospital Organization (NHO).
- 3) Division of Digestive Surgery, Chiba Cancer Center.
- 4) Department of Academic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University.

In our country, non-heart-beating donors (NHBD) are most frequently used for cadaveric renal transplantations. Kidney graft viability may decrease due to the various factors, involving donor age, complications, prolonged period of donor hypotension and warm ischemia. Rapid cooling and procurement of both kidneys are the first step and essential for maintaining graft viability. For these purposes, we have developed in situ machine wash out (ISMW) technique and original initial wash out solution. Immediate function and accumulative renal function rates after clinical renal transplantation were increased with these developments.

We, now, insert a silicon double balloon catheter and heparin before cardiac arrest under an approval from donor families. This process makes possible rapid cooling and wash out of blood from both kidneys. Subsequent procurement of both kidney grafts is performed rapidly with en bloc technique.

In our experiences of 247 renal transplantations, graft survival rates of cadaveric renal transplants are comparatively lower than those of living renal transplants. We should make an effort to improve kidney graft preservation method and to increase a number of cadaveric donors. Furthermore, the system for the procurement from NHBD should always be improved.

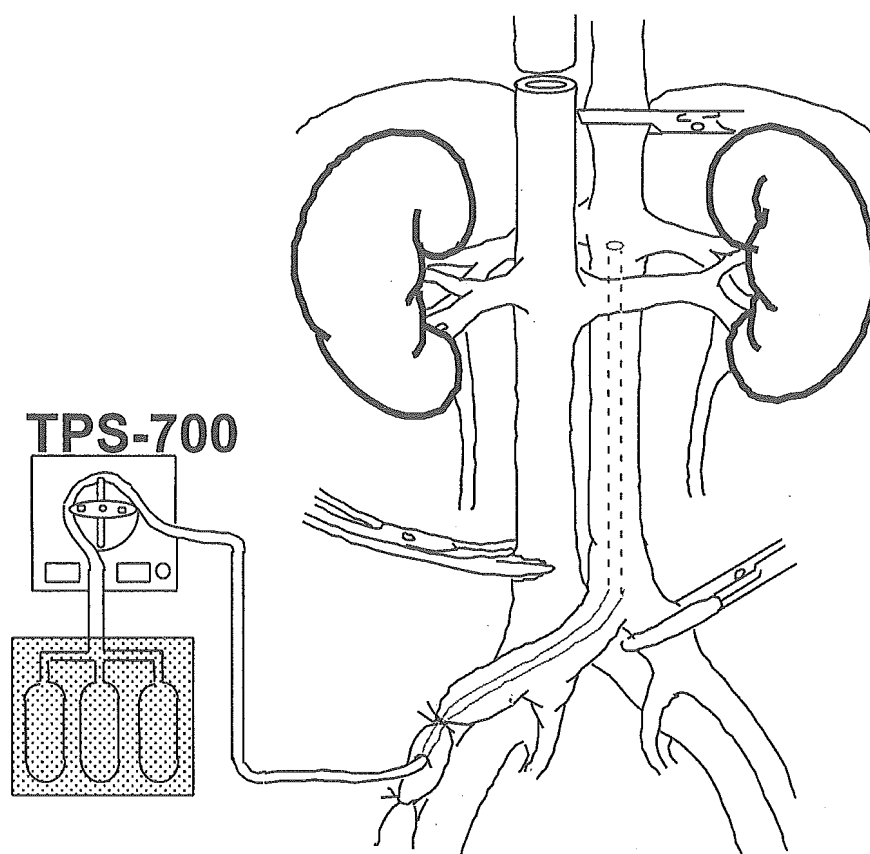


図1 In Situ Machine Wash out (ISMW 法)  
(TPS-700 : Senko Med Mfg. Co., Tokyo)

## はじめに

現在 12,000 人以上の末期腎不全患者（透析患者）が献腎移植の待機患者として日本臓器移植ネットワークに登録されている<sup>1)</sup>。しかしながらわが国においては、脳死、心停止ドナー数は欧米に比較して極端に少なく、2004 年の全国の献腎移植数は脳死ドナー提供の 6 例を含めわずかに 173 例のみである<sup>1)</sup>。献腎移植が少ないことに対応して、わが国では腎臓移植数の 80% が生体腎移植として施行されている。生体腎移植は待機的手術のためドナー、レシピエントの詳細な全身評価が可能であり、移植片の viability も良好であるた

め、その成績は極めて良好である。しかしドナーの安全性や倫理的問題に関しては常に課題が残り、移植医療の発展のためには献腎移植数の増加が必須である。現在わが国では献腎移植は脳死、心停止ドナーの両者からの提供が可能であるが、脳死ドナー数は平成 9 年に「臓器の移植に関する法律」<sup>2)</sup> が施行されて以来、年間数例にとどまっており、心停止ドナーの提供がほとんどである。心停止ドナー提供腎においては、生体腎や脳死提供腎に比して死戦期が長く、種々の程度の傷害が加わっており、移植片の viability 低下は避けられない。腎摘出操作は移植に至るまでの腎保存のスタートラインとしてその後の保存過程に影響を及ぼす重要な過程である。筆者らはいわゆる marginal donor からの腎摘出法につき種々の工夫をし、臨床応用してきたが、本稿では現在までの工夫とそれらに基づいた現在の当施設の献腎摘

### 【キーワード】

献腎移植, ISMW 法, 心停止ドナー, CMH 液, 献腎摘出

表1 心停止ドナー提供腎移植成績

—献腎摘出法による比較—  
(千葉大学第2外科, 1967—1994)

	n	総阻血時間 (分)	即機能腎 (%)	無機能腎 (%)
Drip	41	251 ± 89	7(17.1%)	4(9.8%)
ISMW	73	364 ± 166	25(34.2%)	3(4.1%)

Drip : 点滴法

ISMW : In Situ Machine Wash out 法

出法につき述べる。

### 1. In Situ Machine Wash Out (ISMW) 法

摘出腎の viability 保持には急速な冷却, 急速な血液の wash out により臓器の呼吸, 代謝を急速に停止させることが重要と考えられる。腹腔臓器の摘出においては大動脈よりのカニューレシヨンを先行し摘出に先立って冷却液を灌流する方法 (In situ cooling technique) が推奨されている<sup>3)</sup>が, 筆者らは心停止ドナーからの移植腎摘出の際, roller pump を用いて腹腔内臓器全体を急速冷却灌流する In Situ Machine Wash out (ISMW 法) を 1979 年 7 月導入し (図 1)<sup>4)</sup>, それまでの点滴法に比較し移植後即利尿率は 17.1% から 34.2% と 2 倍となり, 無機能率 (Primary nonfunction) は 9.8% から 4.2% と半減しており有効性が認められた (表 1)。導入当時は心停止前のカテーテル挿入が認められていなかったため, ISMW 法のための腹部大動脈カテーテルは開腹後右外腸骨動脈より挿入し, 横隔膜部で大動脈を鉗子でクランプして灌流開始し, 脱血は下大静脈を切離して行っていた (図 1)。

### 2. 死体内灌流液

ISMW 法に使用する死体内灌流液として, 1980 年までは乳酸化リンゲル液を使用していたが, 以後は modified Collins 液 (CM 液 : Euro-Collins 液の glucose を D-mannitol に置換して

作製) を用いた。1988 年, Belzer は肝, 脾等の臓器摘出に際しては, colloid pressure を保持している灌流液の使用が臓器細胞の浮腫を防ぎ, 微小循環を維持し有効な冷却および灌流を得るのに不可欠であると述べ, 死体内灌流液としての UW 液の有効性を示した<sup>5)</sup>。筆者らもイヌ心停止ドナーモデル (温阻血 30 分) を用いて, 腎・脾の摘出における UW 液の有効性に関する実験的研究を行い, 腎に関しては CM 液, 乳酸化リンゲル液に比較して UW 液灌流による優位性は得られなかったが, 脾摘出に際しては UW 液灌流の有効性を確認した<sup>6)</sup>。肝, 脾の摘出も考慮し, 1990 年 10 月より死体腎摘出に際して UW 液を灌流液として用いた。脾や腸管の浮腫は肉眼的にみられず良好な灌流を得たが, 死体腎摘出に関しては CM 液に比較して移植後の成績に有意な改善は得られなかった。また大量に使用するためコストがかかることが問題点と思われた。そこで筆者らは心臓死ドナーからの肝, 脾, 腎摘出を目的として, hydroxyethyl starch (HES) と D-mannitol を主成分とする細胞内液組成の初期灌流液 CMH 液を開発した (表 2)。本灌流液を 1991 年より死体腎摘出に使用し, UW 液に比較して, 即利尿率, 累積利尿発現率ともに良好であり, 17 日で 100% の利尿発現が得られ有意な移植後の早期の利尿発現が得られ臨床における有用性が確認された (図 2)<sup>7)</sup>。しかしながらその後, 製造側の事情で製造, 供給が中止され, 現在は後述する灌流液を用いている。

表2 CMH液の組成

component	concentration (mEq)
KCl	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30
D-mannitol	230
HES (MW: 4 × 10 <sup>5</sup> )	6%
pH	7.4
mOsm/L	360

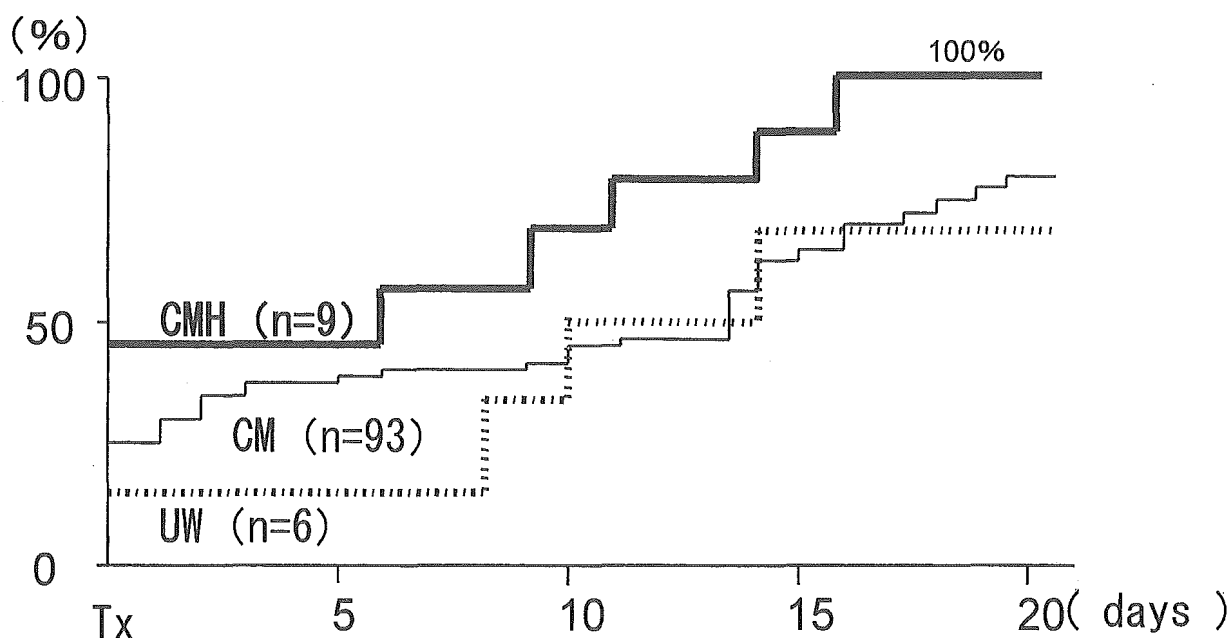


図2 心停止ドナー腎移植後機能発現率—灌流液別比較—

(千葉大学第2外科, 国立佐倉病院外科, 1979-1992)  
1日尿量 1,000 ml を超えた日を機能発現日とした。

### 3. 現在の献腎摘出の実際

#### 1) ダブルバルーンカテーテル留置

脳死判定がなされ、ご家族の承諾が得られた場合には、心停止前のダブルバルーンカテーテルの留置とヘパリンの投与を行う。当施設ではシリコン製精検ダブルバルーンカテーテル(図3)を使用している。カテーテル留置時期は死戦期の経過で経験的に決定しているが、血圧が60を切った

時点を目安にすることが多い。右鼠径部(鼠径靭帯直下)に横切開で皮膚切開し、大腿動脈に動脈径に応じ12~16Frのカテーテルを挿入する。カテーテルの位置はX線撮影を行い確認しておく。大腿静脈には18Frアーガイルセーラムサンプルチューブを挿入する。脱血用に尿バックを連結しておく。この状態で創を閉じ清潔に保っておく。またカテーテル内および末梢静脈よりヘパリンを注入する。さらに心停止後即座にベッドサイドで

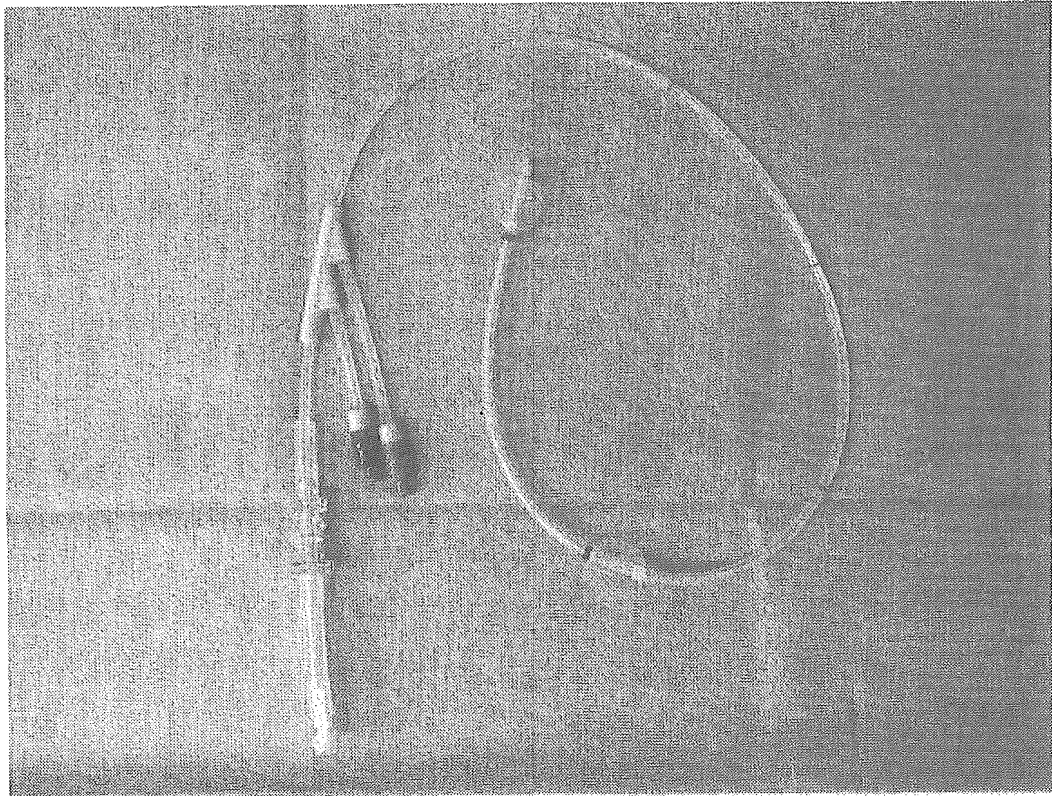


図3 シリコン製精検ダブルバルーンカテーテル (14 Fr)

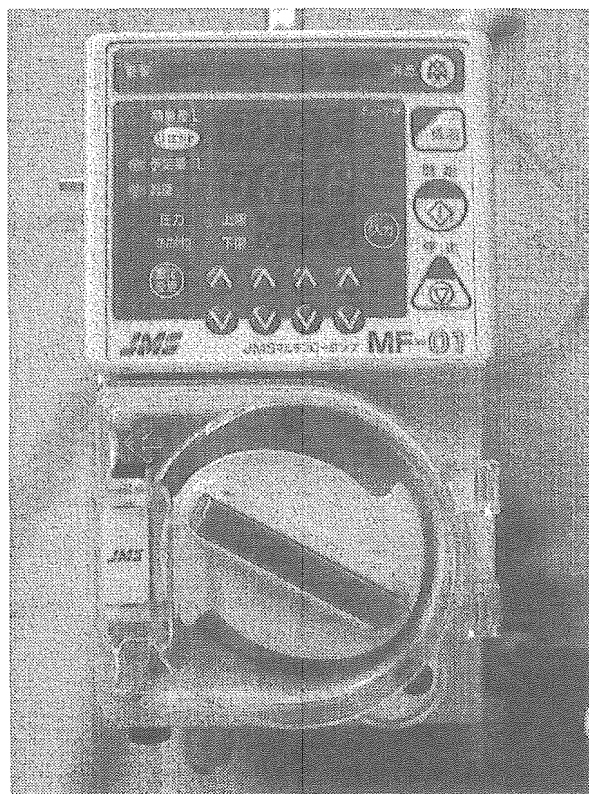


図4 死体内灌流用ローラーポンプ (JMF マルチフローポンプ, MF-1)

表3 千葉東病院移植チーム腎摘出用灌流液

(3000 ML ベッドサイド, 6000 ML 手術室)

- ユーロコリンズ液: 8370 ML (18 バイアル)
- 50 %ブドウ糖: 630 ML

成分 (上記調整液 100 ML 中)

リン酸一水素カリウム	740 mg
リン酸二水素カリウム	205 mg
塩化カリウム	112 mg
炭酸水素ナトリウム	84 mg
ブドウ糖	3.5 g

- ピクシリン (ABPC): 3 G
- ノボ・ヘパリン: 15000 単位
- 注射用水: 適量

(調整は国立病院機構千葉東病院無菌製剤室にて行う)

の初期灌流が可能となるよう、点滴台に取り付け可能なローラーポンプ (JMF マルチフローポンプ, MF-1) (図4) および小型アイスボックス内に3Lの冷却灌流液 (表3) を用意し、すでに連結しておく。

#### 2) ベッドサイドでの初期灌流

心停止・死亡確認後、2つのバルーンを膨らませてポンプにて冷却灌流液を分間200—300 ml で注入する。同時に大腿静脈に挿入した脱血チューブを開放する。ご家族とのお別れの時間や、短時間の検死が必要な場合にも、腎の冷却灌流が行われており、余裕をもって手術室に搬送が可能である。脳死判定がなされていない場合や、急速に心停止を来したした場合などは、ベッドサイドでのカテーテル挿入ができないので、心停止後心マッサージを行いながら速やかに手術室に搬送する。

#### 3) 献腎摘出法

手術室に搬送し、手術台にドナーを移したら、外回りの医師により直ちに、すでに手術室に準備・展開されている大型アイスボックス内の6Lの冷却灌流液にダブルバルーンカテーテルを連結し変える。同時進行で迅速に腹部胸部の広い範囲をイソジン消毒する。ダブルバルーンカテーテルが留置されていない場合には、可及的速やかに開腹し、右 (または左) 外腸骨動脈よりダブルバルーンカテーテルを挿入、右 (または左) 総腸骨静脈より18Frアーガイルセーラムサンプルチューブを挿入し、2つのバルーンを膨らませて灌流を開始

する。腹部切開は剣状突起から恥骨までの正中切開とし、開創器をかける。両側腎を腹部大動脈、下大静脈とともに en bloc に摘出する方法は諸家の報告とほぼ同様であるが<sup>9)</sup>、その手順を記す。最初に上行結腸外側にて後腹膜を切開し、さらに回盲部を脱転、Treitz 靭帯まで内側を切開する。この時点で、右尿管を可及的膀胱側で結紮切離する。尿管の先端はモスキートペアンで把持しておく。続いてS状結腸、下行結腸外側の後腹膜を切開し、左尿管を可及的膀胱側で結紮切離する。両側の後腹膜の剥離は両腎前面および両側腎静脈が露出するように十分に行う。腸間膜根部にて上腸間膜動脈を剥離し、大動脈起始部にて結紮切離する。横隔膜内側脚を切離し、大動脈を露出しておく。両側腎を後腹膜腔より剥離し、大動脈、大静脈のみで連結されている状態とする。この間は十分な冷却灌流が行われていれば決して急いで行う必要はなく、むしろ腸管損傷に十分注意して丁寧な手術を進めてゆく。腎静脈の上下で下大静脈を切離、上腸間膜動脈の上で腹部大動脈を切離し、大動脈後壁を脊椎骨に沿って切離し、腎動脈の十分下で切離する。両側腎、尿管、腹部大動脈、下大静脈を en bloc に摘出して、Bench surgery に移行する。

#### 4) Bench surgery

大動脈を縦切開し、腎動脈の分枝を確認する。この時点でUW液にて1mの落差で動脈より灌流を行う。両側腎が灌流された時点で、両側の腎

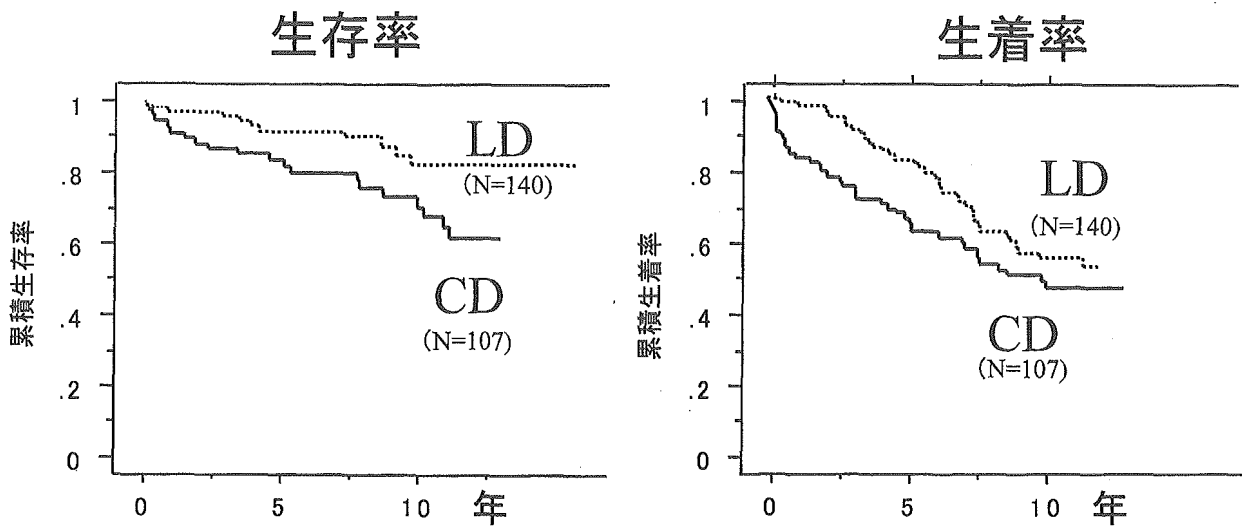


図5 腎移植後成績 (国立佐倉病院, 国立病院機構千葉東病院, 1967-2004)

臓に分枝する動脈を含めてカフをつけて大動脈を分ける。その後下大静脈を縦切開し、分割する。腎臓プラスチック容器内の冷却 UW 液に浸漬保存し、さらに2重に滅菌ビニール袋に収納し、アイスボックス内に収納し搬送する。

#### 4. 献腎移植の成績

当施設 (旧国立佐倉病院を含む) では 2004 年末までに献腎移植 107 例, 生体腎移植 140 例の計 247 例の腎臓移植を行ってきた。献腎, 生体腎移植の生存率, 生着率を図5に示す。生存率, 生着率ともに生体腎移植で良好であるが, 有意差は認めなかった。生存率の差の主因は生体腎移植例の年齢が有意に若年であることに起因すると考えられる。また生着率をみると, 1年生着率が生体腎 95.4%, 献腎 83.5%と, 献腎移植においては移植後早期の移植腎廃絶が多いことがわかる。この原因としては, primary nonfunction や拒絶反応に加え, 合併症を伴うレシピエントの心血管系合併症や重篤な感染症も含まれていた。献腎移植の成績を左右する因子として, ドナー側因子, 移植腎の viability, レシピエント側因子などがあげられる。ドナー側因子としては年齢や高血圧, 糖尿病などによる動脈硬化が存在し, すでに糸球体硬化がある場合がある。またわが国では死戦期の人工呼吸器の強制終了 (レスピレーターオフ)

が一般的ではないため, 長期の低血圧の持続や過剰な昇圧剤の投与により, 腎の血流低下に伴う温阻血が加わっており, 移植腎の viability が低下していることが多いと考えられる。長期の無尿時間がある場合には, 摘出した腎を使用するかどうかの判定は難しいが, 当施設では無尿時間が 12 時間を越えるような腎では移植前生検 (0 hour biopsy) を行って, 血栓のないことを確認している。更に, わが国の献腎移植のレシピエントは長期の待機を余儀なくされるため, 高齢かつ長期の人工透析歴 (すでに 30 年以上のレシピエントも登録されている) を有し, 種々の合併症が存在する。2004 年に当施設で施行した 5 例の献腎移植症例のうち 4 例が透析歴 20 年以上であった。また 2 例が狭心症, 心筋梗塞のため冠動脈拡張術の既往があった。このようにレシピエント側の因子も献腎移植の成績に大きく影響していることは間違いないと考えられる。現在の臓器移植ネットワークの献腎移植希望者選択方法<sup>9)</sup>では, 地域性 (同一都道府県内) 重視の他, 待機日数のポイントが高く, 高齢のレシピエントが選択される機会が多くなることは免れない。社会的見地からは待機日数の加算は公平性を持つが, 医学的, 安全性の点からは課題も残る。HLA 型の適合度も歴史的な背景が強く, 現在医学的にどのくらい意義を有するか, また現在の点数が妥当かの問題も含め



今後検討すべきと考えられる。

## 5. おわりに

20万人以上の人工透析患者に対して、唯一の根治療法は腎臓移植である。しかしながら生体腎移植を含めてもわが国では腎臓移植実施数は年間1,000に満たない。更に献腎移植数も年間200例に満たない。このような状況の中、1人でも多くの透析患者さんに移植の恩恵を享受していただくためには、我々移植医はまず各地域(Local network)で腎提供数を増やすべく地道な努力を続けて行く必要がある。千葉県においても独自のドナーアクションプログラムの立ち上げを行っている。成績向上のため、またドナー本人やご家族の腎提供の意思を生かす意味においても、脳死判定を行い、ご家族の承諾を得た上での積極的なレスピレーターオフや昇圧剤のオフも行ってゆく必要がある。しかしながら、この問題は一方的に移植医側が主張できるものではなく、個々の症例の経過・背景、提供施設の先生方やご家族の意見、ひいては社会的コンセンサスに関わる問題であり、今後慎重に論議されてゆくべきと考える。現状ではわれわれは少ない提供腎を確実に移植に用いるような摘出法、保存法、移植後管理法の改善に全力を尽くすとともに、日本臓器移植ネットワークの各支部で行われているように、献腎移植の1例1例を詳細に検討し、日々献腎移植のシステムの

向上を図ってゆくことが肝要と考える。

## 文 献

- 1) 社団法人日本臓器移植ネットワーク・ホームページ (<http://www.jotnw.or.jp/>)
- 2) 臓器の移植に関する法律 平成9年7月16日法律第104号
- 3) 臓器保存研究会編：移植臓器提供のためのマニュアル，臓器保存研究会，東京，1990，pp15
- 4) 鈴木孝雄，浅野武秀，落合武徳，他 死体内腎冷却灌流装置の開発 移植 16：482-486，1981
- 5) 3 Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation 45：673-676，1988
- 6) 剣持 敬，福岡敏幸，林 良輔，他 温阻血腫・腎摘出のための死体内灌流液としての UW solution の有用性 移植 26：127-132，1991
- 7) 剣持 敬，浅野武秀，磯野可一。腎保存の現況 低温医学 23：242-248，1997
- 8) 星長清隆，心停止ドナーからの献腎摘出 Organ Biology 11：303-311，2004
- 9) 厚生労働省通達健医 1143号，平成13年12月25日

## 臨床に向けた膵島保存の現状

剣持 敬<sup>1) 2)</sup>, 浅野武秀<sup>3)</sup>, 宮本正章<sup>4)</sup>, 丸山通広<sup>1)</sup>, 坪 尚武<sup>1) 2)</sup>, 大月和宣<sup>1)</sup>  
岩下 力<sup>1)</sup>, 青木有紀子<sup>2)</sup>, 宮崎麻里子<sup>2)</sup>, 鈴木亜希子<sup>2)</sup>, 西郷 健一<sup>1) 2)</sup>

1) 国立病院機構千葉東病院外科

2) 同臨床研究センター

3) 千葉県がんセンター消化器外科

4) 日本医科大学第一内科

## Cryopreservation of pancreatic islets for clinical islet transplantation.

Takashi Kenmochi<sup>1) 2)</sup>, Takehide Asano<sup>3)</sup>, Masaaki Miyamoto<sup>4)</sup>, Michihiro Maruyama<sup>2)</sup>  
Naotake Akutsu<sup>1) 2)</sup>, Kazunori Ohtsuki<sup>1)</sup>, Chikara Iwashita<sup>1)</sup>, Yukiko Aoki<sup>2)</sup>,  
Mariko Miyazaki<sup>2)</sup>, Akiko Suzuki<sup>2)</sup>, enichi Saigo<sup>1) 2)</sup>

1) Department of Surgery Chiba-East national Hospital, National Hospital Organization (NHO)

2) Department of Clinical Research Center, Chiba-East National Hospital, National Hospital Organization (NHO)

3) Division of Digestive Surgery, Chiba Cancer Center

4) Department of the First Internal Medicine, Nippon Medical School

Cryopreservation (CP) is an essential technique in performing a clinical islet transplantation due to a lot of advantages. CP allows us to transplant a large number of islets from multi donors, to perform a scheduled transplantation and to check contaminations and the endocrine function of the islets before transplantation.

CP of the islets from large animals was first achieved by Rajotte using DMSO as a cryoprotectant. We have developed an automated CP technique by the cryounit with our original freezing program in UCLA. With this method, successful clinical transplantations of frozen-thawed islets were performed.

We have further improved this method, and developed Chiba-East CP technique. In this technique, a large number of islets in the cryobag were cryopreserved automatically using a program freezer. Frozen-thawed canine islets showed high recovery rate (>70%) and enough endocrine function evaluated with both static incubation and perfusion study. Based on these results with a large animal species, we have introduced this technique into CP of human islets in our country.

### はじめに

膵臓より膵ランゲルハンス島のみを取り出して

移植する膵島移植は、1型糖尿病など重症糖尿病に対する安全で低侵襲の根治療法である(図1)。

1974年ミネソタ大学において臨床膵島移植が開

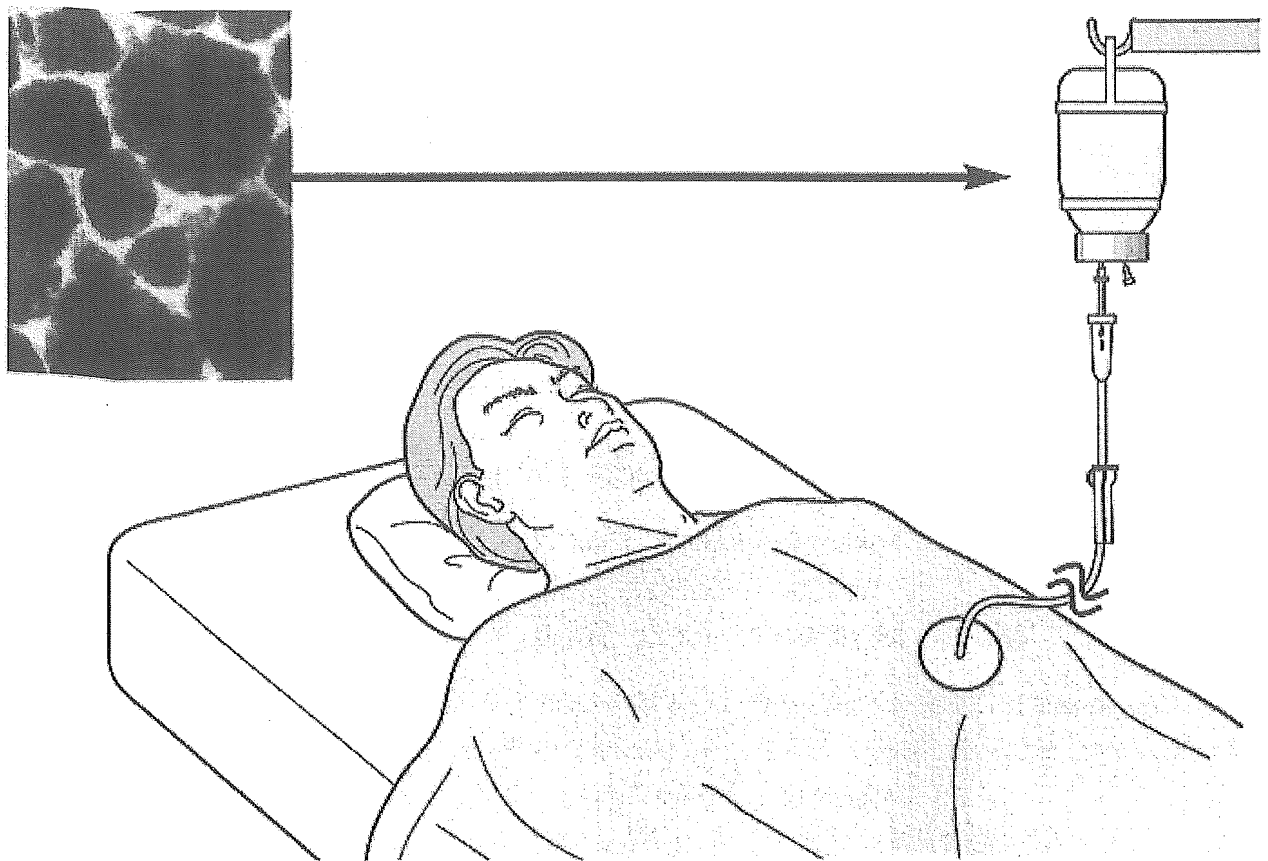


図1. 膵臓移植法

分離膵島は点滴法にて門脈内に投与され、肝臓に生着しインスリンを分泌する。安全性が高く、患者さんの負担も少ない

始されたが<sup>1, 2)</sup>、最近までその成績は他の臓器移植に比較して不良であった<sup>3)</sup>。2000年カナダのアルバータ大学が導入した新たなプロトコル (Edmonton Protocol) により極めて高いインスリン離脱率が報告され<sup>4, 5)</sup>、欧米において膵島移植症例が急増し、1型糖尿病に対する治療法のオプションとして確立しつつある。

わが国においても1996年より、膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」が中心となり、National Projectの形でわが国の臨床膵島移植実施準備を進めてきた。2003年9月に膵島分離が、2004年4月には心停止ドナー膵提供の膵島移植の臨床が開始され、まさにわが国で

【キーワード】

膵島移植, 心停止ドナー, 2層法, 凍結保存, CP-1液

は膵島移植医療のスタートを切ったばかりである。すでに2005年4月までに27例の膵島分離、8例の1型糖尿病患者に対して14回の新鮮膵島移植 (凍結保存せずに移植する) が行われておりその有効性も明らかになってきた。

膵島は内分泌細胞の集団であり、細胞としてのとらえかたと膵島内には動静脈が構築されている微小臓器としてのとらえかたが存在する。Edmonton Protocolでは凍結保存膵島を用いず、分離後なるべく早く移植することが好成績につながる一因であると考えているが、これはまさに他の臓器移植と同様の概念であり、膵島を臓器としてとらえ対応しているといえる。現行の凍結保存法においては凍結・解凍膵島は新鮮膵島と同じ量的、質的レベル (回復率100%) が達成されていない。このことが臨床膵島移植において凍結保存が否定的であるという意見の根拠となっている。

凍結保存法はすでに生殖医学、皮膚や心臓弁などの組織移植の領域では標準的な手技となっているほか、食品製造工学等における凍結保存技術の進歩は著しい。膵島移植領域においても、凍結保存法は必要不可欠の手技である。その根拠は以下の理由による。1) 何らかの理由ですぐに移植に用いられない場合に得られた膵島を有効に利用できること：特にわが国の膵島移植医療においてはドナーのほとんどが心停止ドナーであり、悪条件ドナーいわゆる Marginal donor が多い。したがって分離後も膵島収量が十分でなく新鮮膵島移植に用いられないことも多い。2) 大量の膵島を一次的に移植が可能である：分離時期の異なる膵島を合わせて移植することが可能である。3) 感染や機能のチェックを行う時間的余裕ができること：新鮮膵島移植においては分離から移植まで1-2日しかないため、抗酸菌や真菌などの十分な感染チェックは不可能である。また糖負荷によるインスリン分泌能や Insulin biosynthesis などの機能試験の結果を得てからの移植は困難である。4) レシピエントに待機的、計画的移植が遂行し得ること：レシピエントの移植前評価、血糖の調節が可能であり、移植前免疫抑制剤投与などの万全な準備ができ安全性が高められる。5) 膵島バンクが構築できる：分離施設を有しない施設での膵島移植の実施や HLA matching での膵島移植の遂行などが可能である。以上のような多くのメリットを有しているほか、凍結保存による immunomodulation が可能であることも報告されている<sup>6)</sup>。

Rajotte らは小動物や大膵島の凍結保存法<sup>7, 8)</sup>を開発し、世界で始めて臨床膵島移植に応用した<sup>9)</sup>。本稿では、筆者らが Rajotte らの方法を基礎に UCLA にて考案・開発した臨床膵島移植における凍結保存法と膵島バンク構築 (University of California Islet Transplant Consortium) の実際について、および当院で考案し、現在臨床応用している千葉東膵島凍結法について述べる。

## 1. University of California Islet Transplant Consortium : UCITA

UCITA は University of California Los Angeles (UCLA) が膵島分離・凍結保存センターとなり、UCLA, University of San Francisco (UCSF), University of Irvine (UCI) で膵島移植を行うネットワークである<sup>10)</sup>。このネットワークの形成には UCLA には凍結保存法 (膵島バンク) の開発が必須であった<sup>11)</sup>。

### 1) ヒト膵島凍結保存法

筆者らの開発したヒト膵島凍結保存法は自動化された cryounit (GE9000, Gordiner Electric Inc.) を使用し、まず室温にて15分間 0.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + RPMI 溶液にヒト膵島を浸漬し、氷上で5分間、2.1 M DMSO + RPMI 溶液に浸漬するという2段階的に DMSO 濃度を上昇させる。その後筆者らがプログラムした自動化された cryounit へ 2.0 ml cryovial を用いて 2.1 M DMSO + RPMI 溶液に浸漬した膵島を静置し -6.5 °C で nucleation を惹起し、その後 -50 °C に至るまで -0.3 °C/minute で緩速凍を行った。保存は -196 °C の液体窒素タンク内にバンキングした (図2)。解凍は急速解凍法で行い、液体窒素タンクより直ちに cryovial を、37 °C 恒温槽に移し、解凍後 RPMI1640 + 10 % fetal bovine serum + 0.75 M sucrose 溶液に移入し、その後徐々に RPMI1640 溶液で希釈しつつ洗浄を繰り返し DMSO を除去した。解凍した膵島は 37 °C 培養用インキュベータ (95 % air + 5 % CO<sub>2</sub>) にて2日間以上の付加培養を行った。6例の static incubation の結果を表1に示す。37 °C 培養群 (control 群) と凍結・解凍群の high glucose (16.7 mM) および high glucose + theophylline (10 mM) 刺激下のインスリン放出能は、control 群を 100 % とすると、88.4 ± 7.0 % (p = 0.269), 85.9 ± 7.3 % (p = 0.173) と良好であり、stimulation index (S.I.) は control 群と凍結・解凍群で 3.13 ± 0.53 vs 2.84 ± 0.42, 4.99 ± 1.17 vs 4.60 ± 1.33 とほぼ同等の膵島機

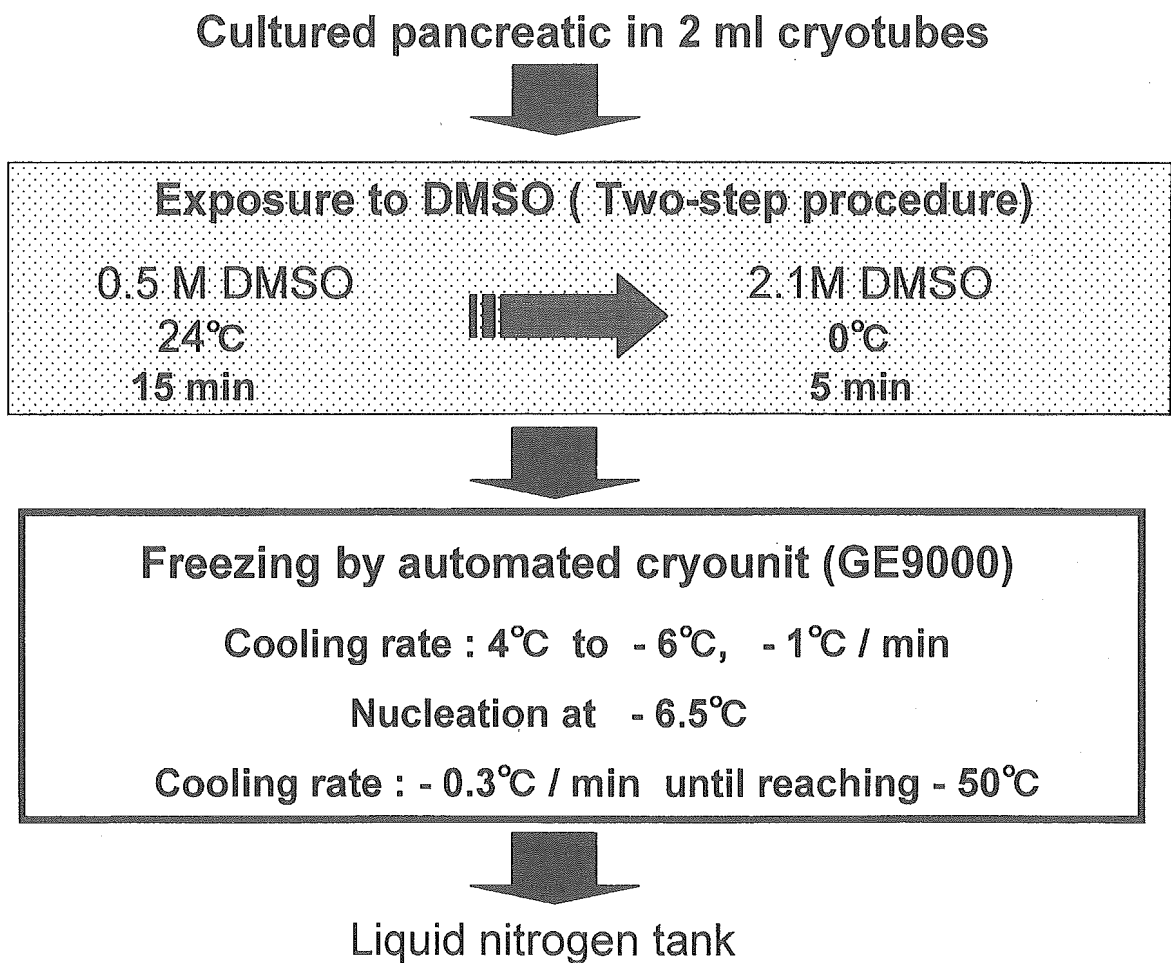


図2. ヒト膵島凍結手順 (Diabetes Research Center, UCLA, 1994)

表1. 凍結・解凍ヒト膵島の static incubation test (Diabetes Research Center, UCLA, 1994)

Preparation ID	Frozen-thawed <sup>a)</sup>		
	Basal <sup>b)</sup>	Hi-glucose <sup>c)</sup>	Hi-glucose <sup>d)</sup> + theophylline
# 98	81.0	96.0	108.0
#104	111.7	100.5	104.9
#110	86.2	97.8	73.6
#112	73.0	65.1	72.3
#120	87.4	103.2	90.5
#124	71.5	68.0	66.0
Mean ± SEM (%)	85.1 ± 6.0	88.4 ± 7.0	85.9 ± 7.3

<sup>a)</sup> 凍結・解凍群/control群, <sup>b)</sup> Low glucose (2.8mM) stimulation, <sup>c)</sup> High glucose (16.7mM) stimulation, <sup>d)</sup> High glucose + 10mM theophylline stimulation

表2. Incubation biosynthesis test

Sample ID	<sup>3</sup> H uptake (cpm / dish)	
	Control group (nonfrozen)	Frozen-thawed group
#124	5,877	4,680
#135	5,435	3,496
#141	2,091	1,696
#146	173	120
#151	1,467	1,313
Mean	3,008.6	2,261
±SEM	±1,126.4 (100%)	±811.7 (75.2%)

表3. ヒト膵島凍結手順 (Diabetes Research Center, UCLA, 1994)

期 間: 1992年9月～1994年9月	
膵 臓 分 離: 99例	成 功 率: 84.5%
ド ナ ー 年 齢: 31.2 ± 2.2 (才)	
膵 島 収 量: 277,000 ± 24,100 IEQ	
IEQ/gm tissue: 8,678.7 ± 1,315.5	
純 度: 82.9 ± 1.6%	
冷 血 和 存 例: 28例	
計: 4,436,500 IEQ	
ABO血 液 型: A型	640,500 IEQ
B型	1,438,000 IEQ
AB型	570,000 IEQ
O型	1,788,000 IEQ
保 存 期 間: 1週～2年	

能を有していた。また insulin biosynthesis は、control 群の 3,008.6 ± 1,126.4 cpm/dish/18 hr. に対して、凍結・解凍群は 2,261.0 ± 811.7 cpm/dish/18 hr. と control 群の 75.2% (n = 5, p = 0.605) を示した (表2)。

## 2) 膵島バンクの構築と UCITA における凍結保存膵島移植

表3に UCLA における 1992年9月から、1994年9月の2年間 (筆者が在籍していた期間) のヒト膵島分離結果と膵島バンク状況を示した。膵島バンクとして登録された膵島は A型 64.05万 islet equivalent (IEQ), B型 143.8万 IEQ, AB型 57万 IEQ, O型 178.8万 IEQ, 計 443.65万 IEQ であり保存期間は最長2年間であった。

膵島バンクを活用し UCLA 外科において施行した臨床膵島移植の1例を提示する。レシピエントは 56歳, 白人男性。1型糖尿病と末期糖尿病腎不全の患者である。膵島・腎同時移植を施行した。腎と同一ドナーから分離された 388,000 IEQ の新鮮膵島と膵島バンクから凍結・解凍膵島を 484,800 IEQ 加えて計 872,800 IEQ 移植した。膵島移植法は RPMI1640 + 10% human albumin 溶液に膵島を浮遊させ、経門脈的にカニューレションしゆっくり点滴した。移植後免疫抑制は、muromonab CD3, cyclosporin A, azathioprine, steroid が投与され、膵島・腎ともに機能良好で経過した。移植前、感度以下であった血中 C-peptide 値は、移植後2日目には 0.6 ng/ml, 2

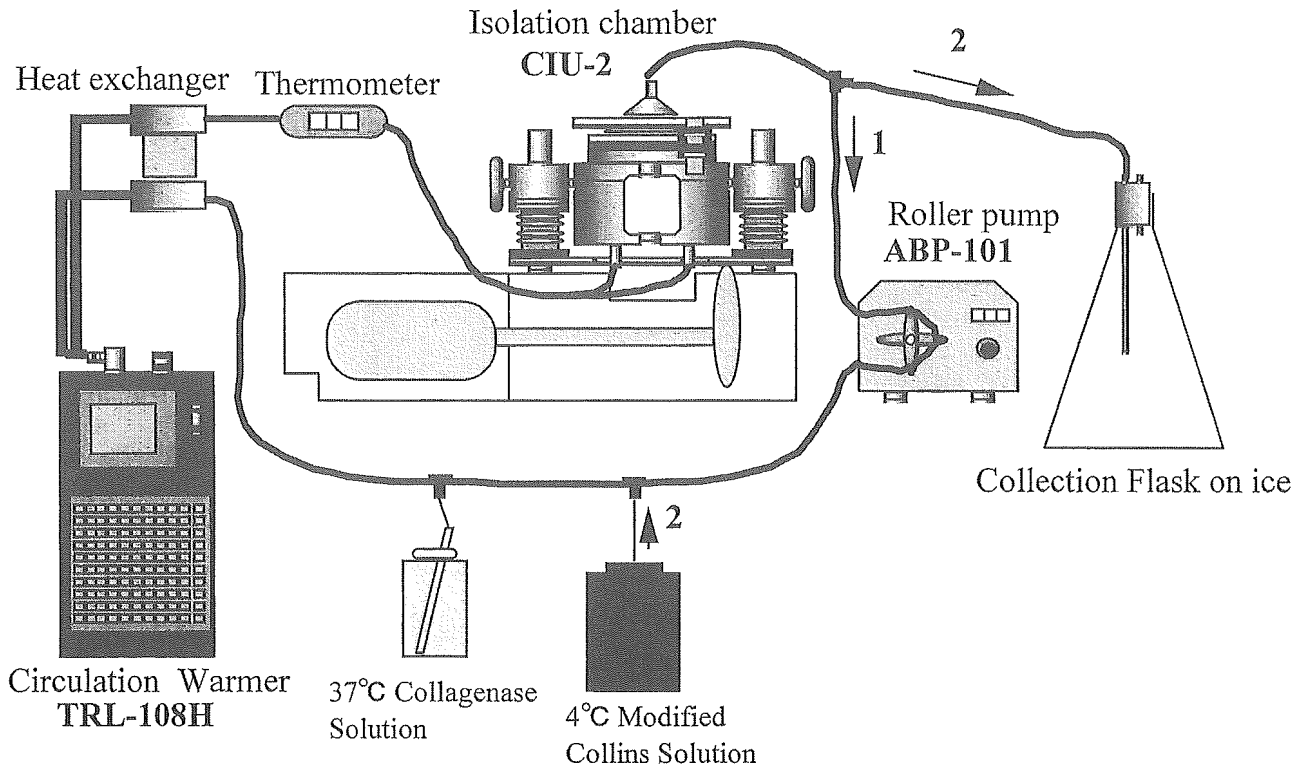


図3. 千葉東式自動膵臓消化装置回路図 (千葉東病院臨床研究センターCPC, 2004年)

週間で1.3 ng/ml, 3ヶ月で1.1 ng/mlと良好な膵島機能が裏付けられた。患者は低血糖発作, 透析から解放され, 少量のインスリン治療のみで経過している。

## 2. 千葉東式凍結保存法

前述のUCLAでの凍結保存法開発の経験より, わが国におけるヒト膵島凍結保存法を考案, 開発した<sup>12)</sup>。改良点は, UCLAの方法では多くのcryovialに分注する操作が必要であり操作に熟練を有すること, 感染の機会が増加する可能性があることより, 当院臨床研究センターにおいて, 凍結バッグを用いた一括大量凍結保存法を考案し, 大動物モデルにて基礎的検討を行い有効性, 実用性を確認した上で臨床に使用している。

### 1) イヌ膵島凍結保存の基礎的研究

[動物] ビーグル犬 (10.0 – 12.0 kg) 5頭を用いた。麻酔はペントバルビタール静脈内全身麻酔にて行った。

[膵島分離法] 独自に開発した千葉東式膵島分離

法を用いて行った<sup>13, 14, 15)</sup>。すなわち, 摘出膵の膵管より37°Cコラゲナーゼ液 (2.0 mg/ml HBSS, Collagenase P, Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN) を注入し膵を膨化させる。膨化した膵をメカニカルチョッパーにて細切した後, 独自の膵島消化装置 (図3) を用いて膵組織を消化した。消化膵よりCOBE2991 cell processorを用いてEuro-Ficoll比重遠心法にて膵島を精製した。

[膵島凍結保存法] 分離膵島は12時間~20時間培養した後凍結保存した。膵島数を計測後5% DMSO, 6% hydroxyethyl starch (HES), 4% FBSを含むRPMI 1640に混入した。混入操作は氷上で行った。その後75 ml バッグ (cryogenic storage container, 7005-2, CharterMed Inc., USA) (図4) に封入した。膵島を封入した凍結用バッグはプログラムフリーザー (CryoMed Model 1010, Forma Med Inc., USA) (図5) にて凍結保存した。凍結プログラムは前述のUCLAのプログラムを参考に, 新たに表3のプ

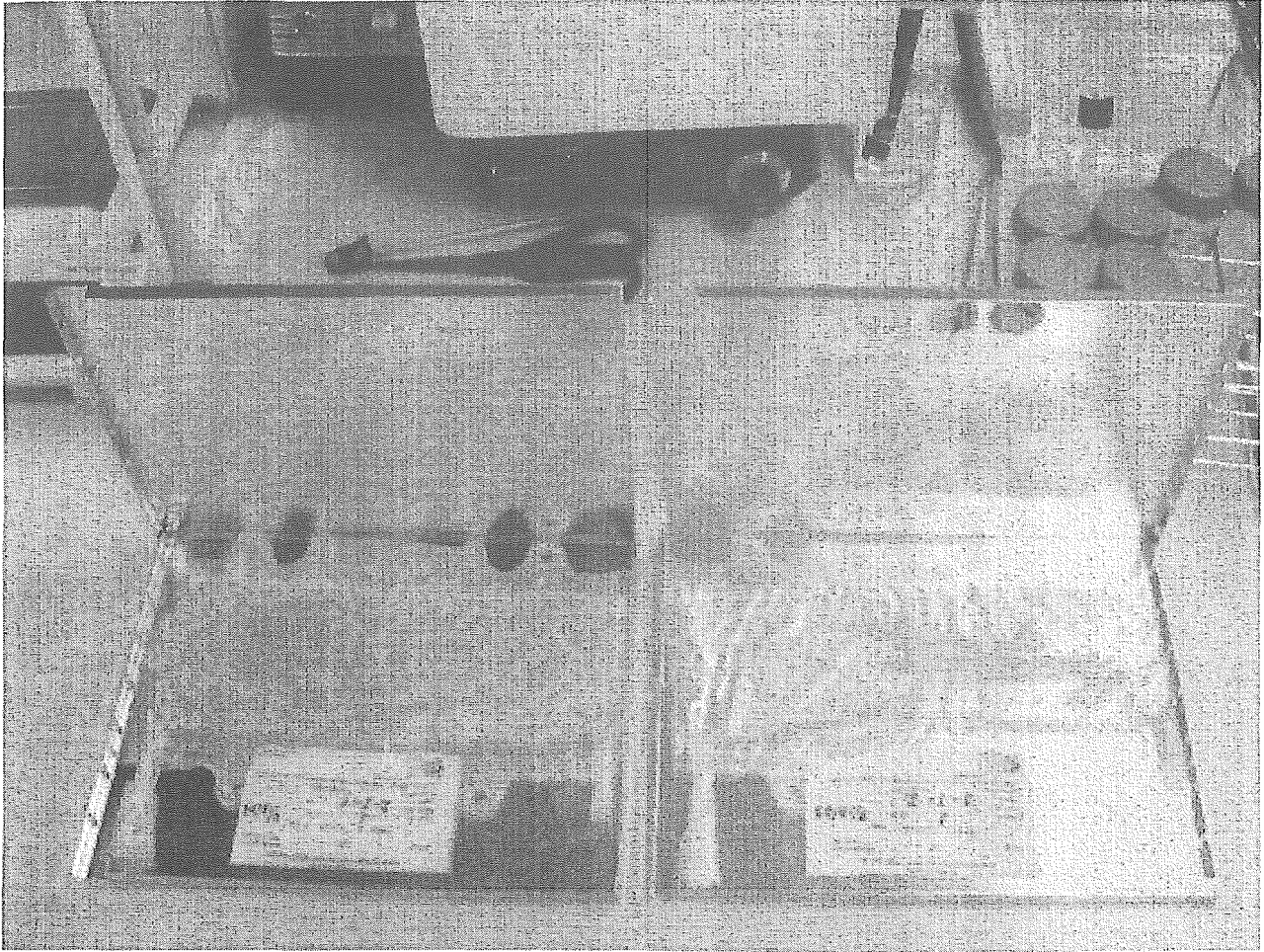


図4. 凍結保存用バッグとコンテナ (千葉東病院臨床研究センターCPC, 2004年)

プログラムを考案した。凍結膵島は最終的に液体窒素タンク内 (-196 °C) に保存した。28日間保存後、解凍し実験に供した。解凍は37°C恒温槽内で急速解凍法を用いて行った。膵島は10% FBS添加したRPMI 1640にて1回洗浄し、同液にて12時間~20時間培養した。培養後、回復率を凍結前後の膵島数の比にて算出した。解凍膵島の機能評価はstatic incubationおよびperfusion studyにて行った。static incubationは以下の方法で施行した。膵島10個を12well transwell microplatesの各wellに5well分注し、1mlのRPMI 1640 + 3.3 mM D-glucose + 0.1% BSA (basal media)を加えた。60分CO<sub>2</sub>インキュベータにて培養した後、新たな12well microplatesに移し、RPMI 1640 containing + 20 mM D-glucose + 0.1% BSA (glucose stimulation)を添

加し、60分CO<sub>2</sub>インキュベータにて培養した。さらに新たな12well microplatesに移し、再度basal mediaを添加し、60分CO<sub>2</sub>インキュベータにて培養した。それぞれの培養液を採取し、ELISA法にてインスリン濃度を測定し、glucose stimulation mediaと2回目のbasal mediaのインスリン分泌量の比をstimulation Indexとした。Perfusion studyは100個の膵島をチャンバー内に封入し、low glucose medium (Krebs Buffer液 + 3.3 mM D-glucose)にて80分灌流した後30分間high glucose medium (Krebs Buffer液 + 20 mM D-glucose)を灌流して刺激し、再度low glucose mediumで灌流した。1分ごとのサンプルのインスリン濃度をELISA法にて測定した。

[結果] 解凍後の膵島形態は良好に保たれており、





図5. プログラムフリーザー (CryoMed Model 1010, 千葉東病院臨床研究センターCPC, 2004年)

表4. ヒト膵島凍結手順 (Diabetes Research Center, UCLA, 1994)

1. 2.0 °C / min until sample = 4.0 °C
2. 1.0 °C / min until sample = - 3.0 °C
3. 50.0 °C / min until chamber = - 70.0 °C
4. 25.0 °C / min until chamber = - 10.0 °C
5. 0.3 °C / min until chamber = - 40.0 °C
6. 5.0 °C / min until chamber = - 80.0 °C
7. Storage in liquid N<sub>2</sub> tank (-196 °C)

Dithizone による染色性も良好であった (図6)。膵島回復率 (解冻後膵島数 / 凍結前膵島数) は  $71.16 \pm 20.14 \%$  (mean  $\pm$  SD) とほぼ満足すべきものであった。さらに static incubation の S. I. も,  $1.80 \pm 0.78$  とインスリン分泌能を有してい

た (図7)。Perifusion study では解冻後の膵島は glucose 刺激に対して急峻かつ2峰性のインスリン分泌能を示しており, 良好な内分泌機能が示された (図7)。

2) 臨床膵島凍結保存

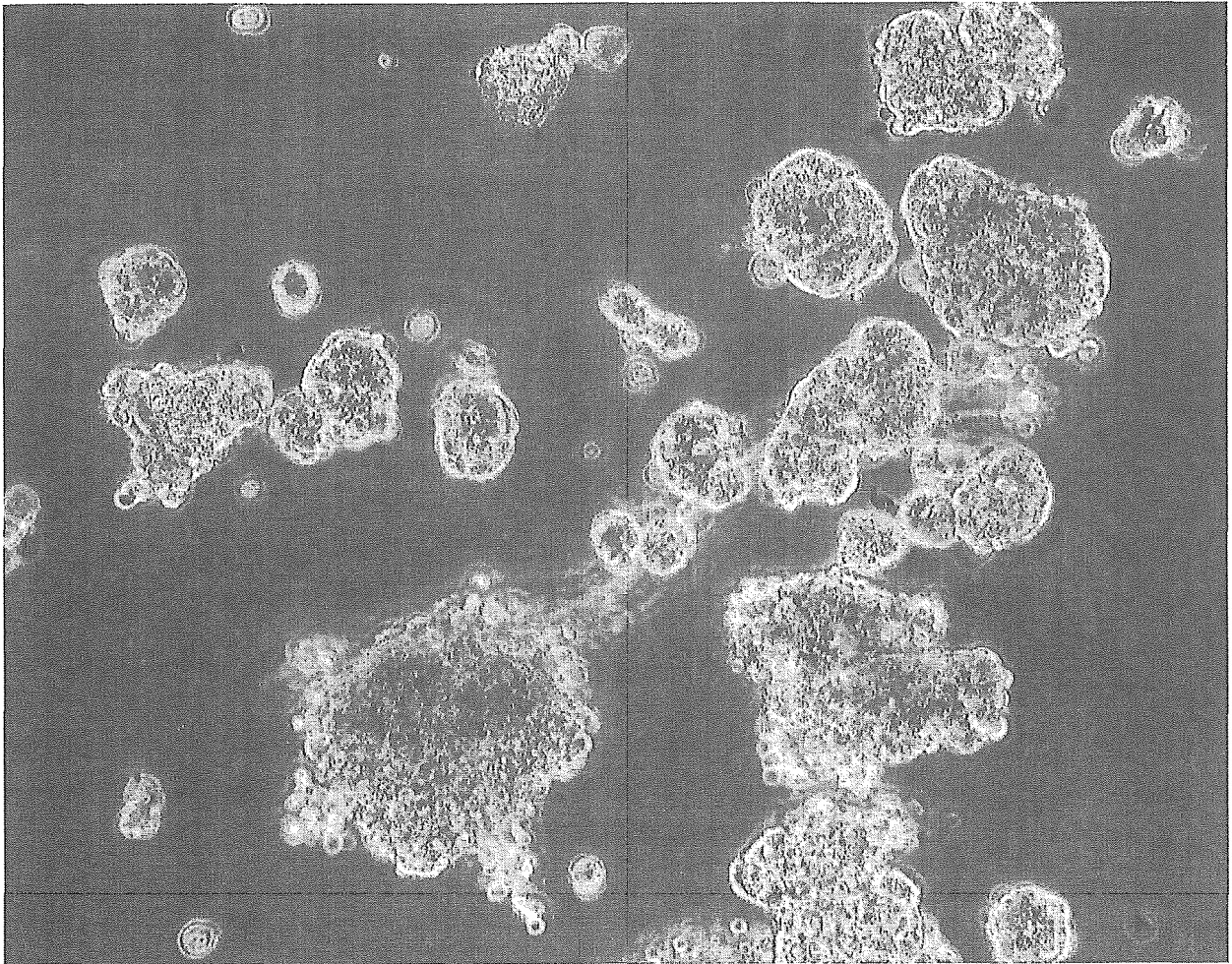


図6. 凍結解凍後のイヌ膵島倒立顕微鏡写真

わが国の膵島移植はすでに報告したように膵・膵島移植研究会「膵島移植班」を組織し、National Projectとして現在まで全国の多施設共同研究の形で臨床実施準備を進めてきた<sup>16)</sup>。2003年9月に膵島分離・凍結保存が開始され、2004年4月にわが国初の臨床膵島移植が行われた。2005年4月までにすでに27例の膵島分離が行われ、8例の1型糖尿病患者に膵島移植が実施されている。また12例の分離は新鮮膵島移植の基準を満たさなかったため凍結保存されている。個人情報を含むため詳細については記せないが、現在までに当院で凍結保存されている膵島は凍結前の膵臓保存液、膵島培養液、凍結液ともに感染がなく、static incubationにおいてもインスリン分泌能を有することがわかっており、今後移植に使用可能であると考えている。現在まだ凍結保存膵島の

移植は施行されていないが、膵島移植班において凍結保存膵島移植のガイドラインの作成を進めており、今年度中の凍結保存膵島の移植が予測される。

### おわりに

Edmonton Protocolの実施により、臨床膵島移植は一気に現実化し、カナダではすでに保険適応となるに至っている。Edmonton Protocolの大きな特徴は凍結保存をせず、新鮮（分離直後あるいは短時間培養後）膵島移植を行うことである。このことにより、現時点では膵島移植の臨床において凍結保存の導入には否定的な意見もある。しかしながら、凍結保存法は細胞移植、組織移植において不可欠な技術であり、多くの利点を与えるものである。今後は新鮮膵島と同等の量的、質的

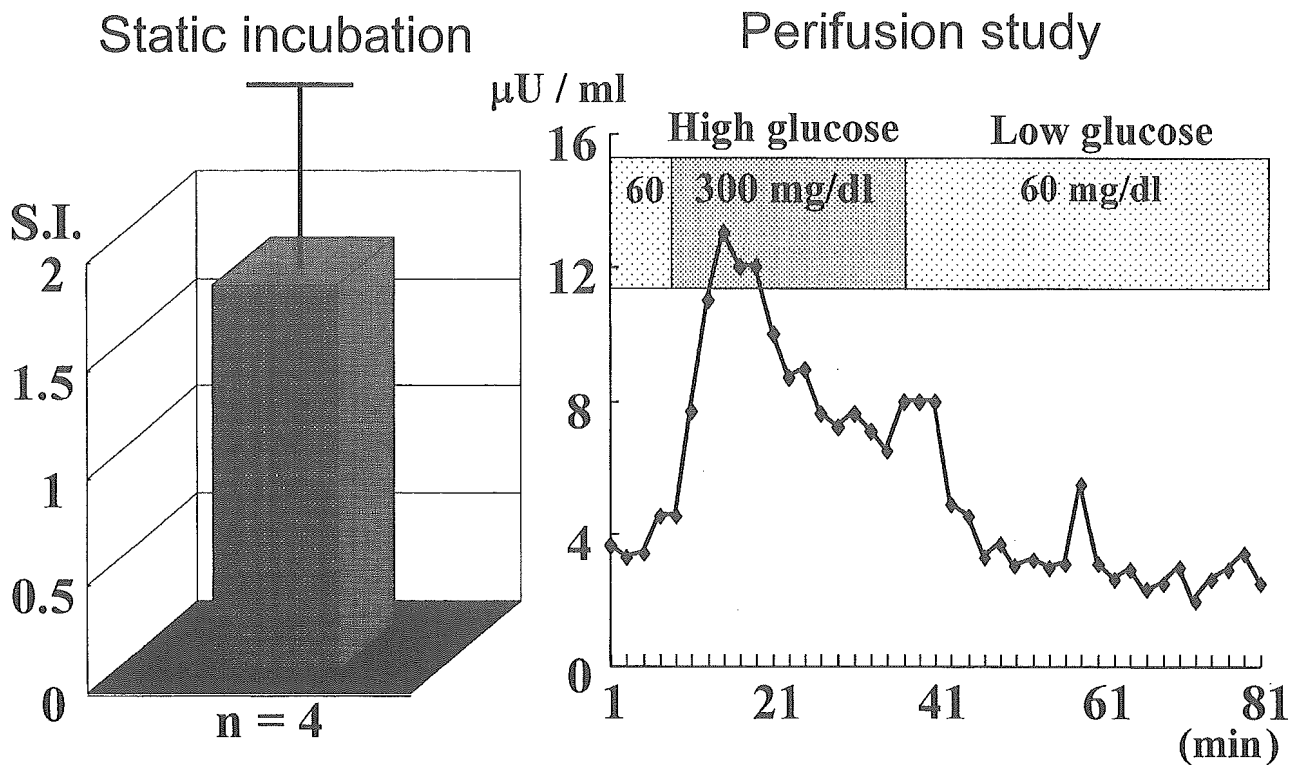


図7. 凍結解凍後のイヌ膵島機能試験

な膵島を得られる保存法の開発が必要であり、これが達成されれば品質管理の点、患者の安全性確保に有効であるのみでなく、膵島バンク構築が可能となり、現在限られた施設で行われている膵島移植がより広まってゆくこととなる。

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金、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島バンク構築の研究(研究代表者：剣持 敬)」の助成により遂行した。

#### 文献

- 1) Najarian JS, Sutherland DER, Matas AJ et al. Human islet transplantation : a preliminary report. *Transplant Proc* 9 : 233-236, 1977
- 2) Sutherland DER, Matas AJ, Najarian JS Pancreatic islet cell transplantation. *Surg Clin North Am* 58 : 365-382, 1978
- 3) Islet Transplant Registry, Newsletter #9, Vol.8, 2001 ([www.med.uni-giessen.de/itr/](http://www.med.uni-giessen.de/itr/))
- 4) 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
- 5) Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 50 : 710-719, 2001
- 6) Miyamoto M, Kenmochi T, Nakagawa Y et al. Immunogenicity of cryopreserved human islets. *Transplant Proc* 27 : 3406-3408, 1995
- 7) Rajotte RV, Warnock GL, Bruch LC et al. Transplantation of cryopreserved and fresh rat islets and canine pancreatic fragments : comparison of cryopreservation protocols. *Cryobiology* 20 : 169-184, 1983

- 8) Rajotte RV, Warnock GL, Kneteman NN  
Cryopreservation of insulin-producing tissue in rats and dogs. *World J Surg.* 8 : 179-186, 1984
- 9) Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA et al.  
Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35 : 89-95, 1992
- 10) Brunicardi FC, Atiya A, Stock P et al.  
Clinical islet transplantation experience of the University of California Islet Transplant Consortium. *Surgery.* 118(6) : 967-972, 1995
- 11) Miyamoto M, Mullen Y, Stein E et al.  
Cryopreservation of human islets by a fully automated cryounit. *Transplant Proc* 26 : 832, 1994
- 12) Maruyama M, Kenmochi T, Sakamoto K et al.  
Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants. *Transplant Proc* 36 : 1133-1134, 2004
- 13) Jingu K, Asano T, Kenmochi T et al.  
Combined method of mechanical chopper and automated digestion system for islet isolation. *Transplant Proc* 26 : 634-636, 1994
- 14) Kenmochi T, Asano T, Jingu K et al.  
Development of a fully automated islet digestion system. *Transplant Proc* 32 : 341-343, 2000
- 15) Mullen Y, Kenmochi T. Preparation and storage of pancreatic islets. United States Patent 1999, Patent Number 5, 919, 703.
- 16) 剣持 敬, 丸山通広, 浅野武秀。わが国における膵島移植臨床実施準備状況 *Organ Biology* 10 : 331-338, 2003