

2007/6013A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

(基礎研究成果の臨床応用推進研究)

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺岡 慧

平成 20 年 (2008) 年 4 月

# 目次

I. 総括研究報告	
「探索医療の成果としての膵島移植医療の確立」総括研究	
寺岡 慧	3
II. 分担研究報告	
1. 各種消化酵素を用いたブタ膵島分離と膵島評価法の開発に関する研究	里見 進 13
2. 「分離膵島の viability 評価」および「わが国における臨床膵島移植成績」に関する研究	後藤満一 15
3. 膵搬送・膵島分離・膵島移植における酸素化 PFC の効果に関する研究	黒田嘉和 17
4. 「イヌ分離膵島純化法と膵島収量・機能」および「ヒト膵島分離・凍結保存」に関する研究	剣持 敬 19
5. 膵島分離法の改良と分離膵島中の $\beta$ cell viability 評価法に関する研究	岩永康裕 27
6. 移植後早期膵島傷害の機序とその制御法の開発に関する研究	安波洋一 33
7. 膵島への decoy Fas・膜結合型 FasL 遺伝子導入と膵島傷害の制御効果に関する研究	伊藤壽記 35
8. 膵島移植の効果と安全性調査におけるデータ解析方法に関する研究	山口拓洋 48
9. 膵島移植医療の有効性と安全性評価のためのエンドポイント設定に関する研究	嶋澤るみ子 50
10. 膵島移植医療における Quality of Life に関する研究	畑中暢代 53
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
IV. 研究成果の刊行物・別冊	65

# I. 総括研究報告

研究課題：探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

主任研究者：東京女子医科大学腎臓病総合医療センター外科

同 先端生命医科学研究所代用臓器学

寺岡 慧

**研究要旨** 糖尿病患者に対する根治療法としての膵島移植を確立する目的で以下の探索的研究を行った。従来、膵島分離に頻用されてきた Liberase HI (Roche 社製) の製造工程で、その強化培地中にウシ脳抽出物が添加されていたことが判明し、Liberase HI に代わりうる消化酵素の探索的研究を行った。Serva 社製 Collagenase を用いて大動物の膵島分離を行い、収量、viability、機能評価などの検討を行った。機能評価については従来 perfusion study が行われていたが、より迅速に評価が可能な評価法について探索研究を行った結果、糖負荷膵島呼吸活性法、 $\beta$  細胞自体の viability 評価、ATP 量測定、ADP/ATP 比測定などの有用性が確認された。また酸素化 perfluorochemical (PFC) の保存液への添加と消化酵素との併用が、膵島収量の増加、viability 維持に有用であった。

膵島移植後における早期膵島傷害の機序の解明とその制御法の探索的研究を行った結果、傷害機序に炎症性サイトカインが関与していることが明らかとなり、抗 IL-6R 抗体などの抗サイトカイン療法の有効性が確認された。また同時に移植早期膵島傷害の原因と考えられる血液凝固性炎症反応 (IBMIR) の制御法についての探索研究の結果、オリゴ糖であるトレハロースの有用性が示唆された。

また移植後慢性期の膵島傷害の機序の解明とその制御法の探索研究を行った結果、新しい傷害制御分子であるヒト decoy Fas および膜結合型ヒト FasL のブタ膵島への過剰発現がヒト CD8<sup>+</sup>細胞傷害活性の制御に有用であることが示唆された。またレシピエントリンパ球とドナーリンパ球を抗 CD80/86 単抗体の存在下で共培養すると抑制性 T リンパ球が誘導され、このレシピエント由来の抑制性 T リンパ球を移植後レシピエントに戻す (adoptive transfer) と末梢性免疫寛容が導入できることが明らかにされた。またヒトリンパ球の共培養においても CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞 (調節性 T リンパ球; Treg) が誘導され、リンパ球混合培養 (MLR) を用量依存性に抑制することが確認された。末梢性免疫寛容の導入により、拒絶反応および自己免疫機序による傷害が制御される可能性が示唆され、さらに免疫抑制薬の長期投与による副作用 (感染症、悪性腫瘍、腎毒性) から解放される可能性が期待される。

膵島移植における統計解析、評価法の探索研究の結果、インスリン離脱率のみでなく、移植後インスリン投与量の減量、HbA1c の改善、低血糖発現率の減少など血糖コントロールの安定化がエンドポイントとして有用であることが示唆された。また長期の研究支援体制、データ管理が不可欠であることが確認された。さらに 1 型糖尿病患者 (膵島移植未登録)、膵島移植待機患者、膵島移植患者の Quality of Life (QOL) 調査から、医療サイドと患者側との間に若干の認識のずれがあり、これが少なからず患者の満足度に影響を与えている可能性が示唆され、今後この結果をインフォームド・コンセント (IC)、診療に feed-back し、より適切な IC、患者とのコミュニケーションを図ることが必要と考えられた。

## 1. 研究目的

増加しつつあり、生命予後に重大な影響を及ぼす糖尿病患者に対する根治療法としての膵島移

植医療を確立する。製造工程にウシ脳抽出物が用いられていたことが判明したため、使用できなくなった Liberase HI に代わりうる消化酵素の探

索的研究が不可欠である。新たな消化酵素を用いた膵島分離法の標準化を目的として、分離・純化・膵島評価法の検討を行う。

膵島移植の成績向上のためには、移植後早期および慢性期の膵島傷害の機序の解明とその制御法の探索研究が不可欠である。膵島移植後早期にその50~70%が傷害され apoptosis に陥るため、インスリン離脱には2~3回の膵島移植を必要とするが、1回の移植でインスリン離脱を可能とする目的で(1-donor/1-recipient)、早期膵島傷害の機序を解明しその制御法を開発する。また移植後慢性期に膵島が傷害されるが、同種免疫応答(慢性拒絶反応)によるものか、自己免疫機序によるものか、あるいは非免疫学的機序によるものか不明であり、膵島移植の長期生着を改善する目的で慢性期膵島傷害の機序を解明しその制御法を開発する。

また臨床例についての統計解析、QOL 調査により、評価法を探索し、これらのエンドポイントによる総合的な評価を行い、これをさらに研究、臨床に feed-back してよき探索医療としての膵島移植を確立することを目的とする。

## 2. 研究方法

①従来膵島分離に用いられてきた消化酵素である Roche 社製 Liberase HI と Serva 社製 Collagenase を用いてブタ膵島分離を行い、収量を比較検討し、分離膵島の viability、機能評価法の探索を行った。糖負荷膵島呼吸活性法、ADP/ATP 比、インスリン/DNA 比、Trypan blue 試験と同系糖尿病ラットへの移植効果との相関について検討した(里見分担研究者)。

②膵島分離過程における膵消化の至適条件を探索する目的で、膵消化過程における回路内 ATP 測定を行い、至適消化から過消化に至る変化について検討した(後藤分担研究者)。

③ラットおよびイヌ膵島移植モデルにおいて、摘出膵の搬送、膵島分離、膵島移植の各行程に酸素化 PFC を用いて収量、viability 評価、早期膵島傷害の制御効果について検討した(黒田分担研究

者)。

④従来の膵島の viability 評価は $\alpha$ 細胞なども含めた評価であり、 $\beta$ 細胞は $\alpha$ 細胞より傷害を受けやすいことから $\beta$ 細胞独自の viability 評価法の開発が待たれていた。本研究では分離膵島中の $\beta$ 細胞独自の viability assay 法の探索研究を行った。まず分離膵島を single cell とし、7-AAD で染色後 flow-cytometry で生細胞を分離し、さらに Newport green を用いて $\beta$ 細胞を標識・分離した後に tetramethylrhodamine ethyl ester を用いて $\beta$ 細胞ミトコンドリアの膜電位を測定した。次いで LASER scanning cytometry (LSC) を用いて膵島中の $\beta$ 細胞の構成率を解析し、 $\beta$ 細胞独自の viability を検討した。さらに各種オリゴ糖による早期傷害制御能について探索する目的でトレハロースを添加してヒト血液と分離膵島との培養を行い、その効果を検討した(岩永分担研究者)。

⑤より効率的な分離膵島の純化法の探索を行う目的で、COBE2991 Cell Processor を用いて Euro-Ficoll 比重遠心法と HES-Collins 比重遠心法によりイヌ分離膵島を純化し、純化した膵島の Perfusion study におけるインスリン分泌能と、イヌ同種膵島移植後の血糖値の比較検討を行った(剣持分担研究者)。

⑥門脈内に移植された膵島は移植後早期にその50~70%が傷害され、これが1回の膵島移植によるインスリン離脱を困難なものとしていた。1回の膵島移植によるインスリン離脱を可能とするためには、この膵島移植後の早期傷害を克服することが不可欠である。この早期傷害機序について解析し、その制御法について探索研究を行った。これに基づいてわが国ではキャッスルマン病の治療薬として承認されている抗 IL-6R 抗体を投与して膵島移植後の早期傷害を制御しうるか否かについて検討した(安波分担研究者)。

⑦膵島移植後の慢性期傷害を制御する目的で、ブタ膵島にヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 遺伝子を導入し、これを標的細胞として  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用いて CD8<sup>+</sup>細胞による直接細胞傷害性を検討した(伊藤分担研究者)。

⑧アカゲサルを用いてドナーおよびレシピエントリンパ球を抗 CD80/86 単抗体存在下で共培養すると、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>細胞が誘導され、MLR を用量依存性に抑制し、腎移植後 2 週目にこの細胞をレシピエントに戻す (adoptive transfer) とその後は免疫抑制薬を打ち切っても移植腎が永久生着する (Bashuda, Teraoka et al: J Clin Invest 115: 1896, 2005)。平成 19 年度はヒトリンパ球においても同様のリンパ球が誘導できるか否かについて検討した。2 名の健常ボランティアから採取されたリンパ球を用い、一方を Responder、他方を Simulator として抗 CD80/86 単抗体存在下で共培養を行い、flow-cytometry を用いて培養リンパ球の解析を行った。またこれらの細胞が MLR を抑制し得るか否かについて検討を行った (寺岡主任研究者)。

⑨従来、膵島移植の有効性についてはインスリン離脱と C-peptide 値が用いられてきたが、より長期の総合的な評価の指標として、低血糖の頻度の減少、HbA1c 値の改善など血糖管理の安定化、糖尿病合併症の進展防止、QOL の向上、移植手技および免疫抑制による有害事象などについて検討を行った (嶋澤分担研究者)。

⑩これまでに実施された臨床膵移植症例の統計解析を行い、上記の評価項目について検討した (後藤分担研究者)。

⑪膵島移植の効果と安全性に関するレトロスペクティブ調査における解析方法について Clinical Islet Transplantation Registry の Analysis Plan を参考に検討した (山口分担研究者)。

⑫1 型糖尿病患者 (膵島移植未登録)、膵島移植待機患者、膵島移植患者の QOL 調査を行い、医療サイドと患者間の認識のずれ、両者のコミュニケーション、さらにそれらが患者の満足度に及ぼす影響などについて検討を加えた (畑中分担研究者)。

### 3. 研究結果及び考察

①Liberase HI と Collagenase を用いたブタ膵島分離の実験では、膵組織消化に要する時間、膵組

織消化率、膵島収量において両群間に有意な差を認めなかった。また両群間において分離膵島の機能、viability にも差を認めず、Serva 社製 Collagenase は Liberase HI の代替消化酵素として有用と考えられた (里見分担研究者)。

②膵消化過程における回路内 ATP 量は至適膵消化判定の 5~10 分先行して上昇し、回路内 ATP 量の測定は至適膵消化の有用な示標と考えられた (後藤分担研究者)。

③酸素化 PFC を摘出膵の搬送、膵島分離、膵島移植の各行程に用いることにより、収量、viability の改善が認められた。またラットおよびイヌ膵島移植モデルにおいて生着膵島数の増加が確認され、上記の各行程において虚血傷害が関与していること、また酸素化 PFC を用いることにより虚血傷害が軽減することが確認された (黒田分担研究者)。

④flow-cytometry によって測定された  $\beta$  cell viability に、LSC により算出された膵島中の  $\beta$  細胞構成率を乗じた  $\beta$  cell viability index は  $\beta$  細胞独自の viability 評価の有用な示標となりうることが示唆された。各種オリゴ糖による早期膵島傷害の制御効果については、トレハロース添加により顆粒球数が有意に高値を示し、顆粒球の消費が抑制されたものと考えられた (岩永分担研究者)。

⑤膵島純化に関する探索研究の結果、HES-Collins 比重遠心法により得られた純化膵島の perfusion study において良好なインスリン分泌能が認められ、イヌ膵島移植モデルにおいても血糖の正常化が認められた。今後さらに C3a などの補体、TNA- $\alpha$  などのサイトカインについて検討が必要と考えられた (剣持分担研究者)。

⑥移植膵島の早期傷害の機序については NKT 細胞、Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>好中球が活性化され炎症性サイトカインを産生し、これらにより移植膵島が傷害される機序が明かとなった。抗 IL-6R 抗体と抗 CD4 抗体の投与により膵島の早期傷害が制御され、より効率的な生着が得られることが明らかとなった (図 1)。これにより臨床膵島移植において 1 回の膵島移植によりインスリン離脱を可能とす

る展望が切り開かれた（安波分担研究者）。

⑦ヒト decoy Fas、膜結合型ヒト FasL 遺伝子を高発現した膵島細胞はヒト CD8<sup>+</sup>細胞による直接細胞傷害性を強く抑制した。またこれらの遺伝子を発現した膵島の移植実験では生着延長効果が認められた（伊藤分担研究者）。

⑧ヒトリンパ球を抗 CD80/86 単抗体存在下で 2 週間共培養することにより CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞が誘導され、この細胞は regulatory T cell (Treg) であると推察された（図 2）。またこの Treg がヒトリンパ球の MLR を用量依存性に抑制することが確認された（図 2）。これによってアカゲザル腎移植モデルで確認された末梢性免疫寛容の導入が、ヒトにおいても可能であることが示唆された。この Treg はレシピエント由来であるため安全であり、本法による免疫寛容の導入は同種免疫応答による拒絶反応のみでなく、自己免疫機序による膵島傷害の制御にも有用と考えられ、かつ免疫抑制薬の長期投与による副作用（感染症、悪性腫瘍、腎毒性など）も回避しうることから、安全かつ有効な方法と考えられた（寺岡主任研究者）。

⑨膵島移植の有効性評価についてはインスリン離脱、C-peptide 値のみでなく、より有効なリスク・ベネフィット評価には、低血糖の頻度の減少、HbA1c 値改善など血糖管理の安定化、糖尿病合併症の進展防止、QOL の向上、免疫抑制薬による有害事象などがより長期の総合的な評価の指標として重要となることが確認された（嶋澤分担研究者）。

⑩臨床膵移植症例の統計解析の結果、C-ペプチド値の上昇、インスリン投与量の減少、低血糖出現頻度の減少、HbA1c の改善など（図 3）、血糖管理の安定化が得られたことが明らかとなった（後藤分担研究者）。

⑪膵島移植の効果と安全性に関する統計解析の手法については、現状ではわが国の膵島移植例数が限られていることから、事前情報や先行研究結果を利用すること、また多くの変数を不備なく測定するためには、長期的かつ経時的にデータを収

集する必要があり、長期的データ管理を含めた研究支援体制が必要と考えられた（山口分担研究者）。

⑫1 型糖尿病患者（膵島移植未登録）、膵島移植待機患者、膵島移植患者の QOL 調査の結果、医療サイドと患者間の認識のずれ、両者のコミュニケーションの問題が示唆され、QOL 向上のためには患者が膵島移植に何を期待しているかを把握し、これを IC に反映させ、患者と医療サイド間の認識のずれを最小化し、患者の満足度を改善することが重要と考えられた（畑中分担研究者）。

## 4. 評価

### 1) 達成度について

①膵島分離・純化法の標準化については、主として現在入手しうる Serva 社製 Collagenase を用いて行い上記の成果を得たが、mammalian-free の新しい Liberase の開発が遅れたため、平成 20 年度の検討課題となった。

②移植後早期の膵島傷害の制御については、抗 IL-6R 抗体と抗 CD4 抗体の併用によりほぼ達成し得た。

③慢性期の膵島傷害の制御については、より安全な末梢性免疫寛容導入により拒絶反応、自己免疫による傷害の両者を制御しうる可能性が示唆され、ほぼ達成されたと考えられる。

③リスク・ベネフィット評価項目、統計解析法については、前者はほぼ達成し得たが、後者については現状の問題点、今後の課題の抽出にとどまった。

④QOL 調査については、調査項目、調査法、その解析法、臨床への feed-back など、平成 19 年度の検討課題をほぼ達成し得たと考えられる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

#### ①学術的意義

本研究は臨床膵島移植確立のための探索的研究であるが、ここで得られた種々の知験、技術は多大な波及効果を発揮しうると考えられる。膵島分離および純化の技術、さらに viability 評価法は

種々の細胞療法、再生医療に応用可能である。

また移植部位における IBMIR の機序の解明とその制御法の開発は他の細胞移植、再生医療の分野における学術的探索研究に波及的効果を持ちうると考えられる。さらに decoy Fas および膜結合型 FasL 遺伝子の導入による CD8<sup>+</sup>細胞傷害活性の制御というコンセプトは、同じ機序による疾患、例えば1型糖尿病における insulinitis、ウイルス性肝炎などの治療のコンセプトにも通じると考えられる。

自己リンパ球由来の Treg の誘導は、安全かつ有効な末梢性免疫寛容の導入を可能にし、慢性拒絶反応が致命的な結果をもたらす心移植、肺移植、肝移植においてはとくに有用と考えられる。また免疫抑制薬の長期使用による感染症や悪性腫瘍などの発生を回避しうる点でも有用と考えられる。さらに近年自己免疫疾患の発生機序としての自己寛容の破綻の過程における Treg の重要性が注目されており、Treg の誘導が自己免疫疾患を制御しうる可能性も秘めている点でも意義深い。

## ②国際的意義

酸素化 PFC を用いた膵保存、抗 IL-6R 抗体による早期膵島傷害の制御は世界に発信しうる研究成果である。また海外ではドナー骨髄の移植による中枢性免疫寛容の報告がなされているが、ドナー骨髄の移植では常に GVHD という危険な合併症が不可避である。この点で自己リンパ球由来の Treg による末梢性免疫寛容の導入は、安全かつ有効な免疫制御法と考えられ、さらに自己免疫疾患にも応用できる可能性を秘めており、日本発のオリジナルな研究成果である。

## ③社会的意義

膵臓移植が1型糖尿病のみならず、インスリン依存性の2型糖尿病においても治療効果をあげているように、膵島移植も将来的には1型糖尿病のみならずインスリン依存性2型糖尿病の治療に応用できる可能性がある。とくに高齢者に対しては外科的侵襲が少ないことから、有用な治療法となりうる可能性を秘めている。糖尿病腎症は透析導入の原因疾患として1位を占めており、糖尿病透

析患者の生命予後は不良であり、さらにその QOL は劣悪なものである。膵島移植により血糖管理の安定化を図り腎症など糖尿病合併症の進展を防止することにより、これらを克服することが可能と考えられる。また腎症進展の制御により増大する透析医療費を節約することも可能であり、糖尿病透析患者に対しては腎移植と併用することにより、さらに患者の QOL を向上させ、医療費の節約を図ることが可能と考えられる。

また安全な免疫寛容の導入により移植成績の向上、QOL の改善、さらに免疫抑制薬の長期使用が不要になることから膨大な医療費の節減が可能と考えられる。

本研究は、探索研究→臨床応用→統計解析とリスク・ベネフィット評価→QOL 調査とその解析→これらの研究ならびに臨床への feed-back により、よりよい探索医療モデルを提案し、患者と医療サイドの成熟した関係を構築するモデルとして、医療不信を克服しうる可能性をもつという観点からも意義深い研究と考えられる。

## 3) 今後の展望について

①平成 20 年 8 月には mammalian-free で GMP grade の新しい Liberase が市販され、平成 20 年 3 月より行っている Liverase 試作品を用いた膵島分離の検討を踏まえて、厚生労働省との協議、さらに各施設倫理委員会の承認を経た上で臨床膵島移植の再開が期待される。

②抗 IL-6R 抗体はキャスルマン病の治療薬として認可されており、臨床応用は可能であり、抗 IL-6R 抗体を用いることにより1回の膵島移植によりインスリン離脱 (1-donor/1-recipient) が可能となることが期待される。

③平成 20 年度は免疫抑制法の改良を行い、その結果を評価・検討し、その後倫理委員会の承認を経た上で、自己由来 Treg を用いた末梢性免疫寛容の導入を目指すことを展望する。

④新たなエンドポイントの設定の上で、リスク・ベネフィット、コスト・ベネフィットを評価し、さらには QOL 調査を行い、これらを本研究、臨床に feed-back してよりよい医療モデルを提案し、



真に信頼に足る、患者満足度の高い膵島移植医療を構築する。

## 5. 結論

探索医療としての膵島移植を確立するためには、膵島分離・純化法および膵島の viability・機能評価の標準化が必要である。またその成績の向上には、早期膵島傷害と慢性期膵島傷害の機序の解明とその制御法の開発が不可欠である。また臨床例の統計解析、有用性評価、QOL 調査などの結果を、研究、臨床に feed-back し、よりよい研究モデル、医療モデルを構築することが重要である。

## 6. 研究発表

### 1) 主な論文発表

- 1) Satoshi Teraoka. Do patients who are aged 70 years or over benefit from deceased donor renal transplantation? Nature Clinical Practice Nephrology. 3:484-485, 2007
- 2) 寺岡 慧. 免疫抑制薬としての分子標的治療薬. Annual Review 腎臓 2008 : 153-170、2008
- 3) 寺岡 慧. 腎臓移植. からだの科学(255) : 155-170、2007
- 4) 寺岡 慧. 膵臓移植と膵島移植. 消化器外科学レビュー2008 : 161-165、2008
- 5) 寺岡 慧、他. 膵臓移植・膵腎同時移植. 生活習慣病看護エッセンスブック-糖尿病とメタボリックシンドローム(印刷中)
- 6) 寺岡 慧. 膵臓移植における免疫抑制療法. [出月康夫、野沢真澄(監)、寺岡 慧、伊藤壽記(編)]膵臓移植-糖尿病根治を目指して(印刷中)
- 7) 寺岡 慧. 移植膵の非免疫学的傷害. [出月康夫、野沢真澄(監)、寺岡 慧、伊藤壽記(編)]膵臓移植-糖尿病根治を目指して(印刷中)
- 8) 寺岡 慧. 膵臓移植の動向. プラクティス(印刷中)

## 2) 主な学会発表

### ①口頭発表

- 1) 各種臓器の移植の現状. 寺岡 慧. 第 132 回日本医学会シンポジウム. 2007 年
- 2) 本邦における膵・膵島移植の現状. 寺岡 慧. 第 10 回近畿膵移植検討会. 2007 年
- 3) わが国における脳死下臓器提供の現状と課題. 寺岡 慧. 第 43 回日本移植学会総会. 2007 年
- 4) 膵移植後の抗凝固療法. 小川勇一、中島一朗、寺岡 慧、他. 第 35 回膵・膵島移植研究会. 2008 年
- 5) 糖尿病根治へのブレイクスルー. 寺岡 慧. 第 34 回膵・膵島移植研究会. 2007 年

### ②司会/特別発言

- 1) 高齢者あるいは長期透析者(20年以上)に対する腎移植の問題点. 寺岡 慧. 第 40 回日本臨床腎移植学会. 2007 年
- 2) わが国の臓器移植 現状と問題点 各種臓器の移植の現状. 寺岡 慧. 第 107 回日本外科学会総会. 2007 年
- 3) これでいいのか、日本の献腎移植-移植医、移植コーディネーター、移植患者からの提言-. 寺岡 慧. 第 41 回日本臨床腎移植学会. 2008 年
- 4) わが国の臓器移植-現状と問題点. 寺岡 慧. 第 132 回日本医学会シンポジウム. 2007 年
- 5) 今後の展望-膵臓移植 vs. 膵島移植. 寺岡 慧. 第 35 回膵・膵島移植研究会. 2008 年
- 6) New Insights to Pathophysiology of Liver Ischemia and Reperfusion Injury. 寺岡 慧. 第 34 回日本臓器保存生物医学会. 2007 年
- 7) 移植患者のマネジメント~知っておきたい内科学的トピックス~. 寺岡 慧. 第 43 回日本移植学会総会. 2007 年
- 8) 組織移植医療の定着を求めて. 寺岡 慧. 第 6 回日本組織移植学会総会. 2007 年

## 7. 知的所有権の出題・取得状況

なし

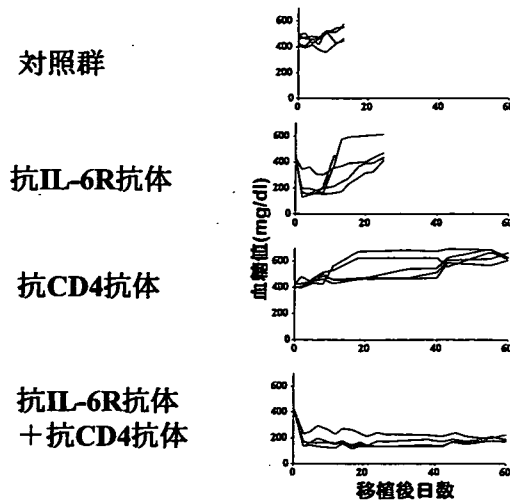


図1 抗IL-6R抗体による移植早期膵島傷害の制御  
同種膵島200個を糖尿病ラットに移植。対照群、抗CD4抗体投与群では血糖低下は認められず、抗IL-6R単独投与群では移植後いったん血糖は低下するが直ちに上昇する。抗IL-6R抗体・抗CD4抗体併用投与群では血糖は低下し、その後長期間にわたり血糖低下が維持された。

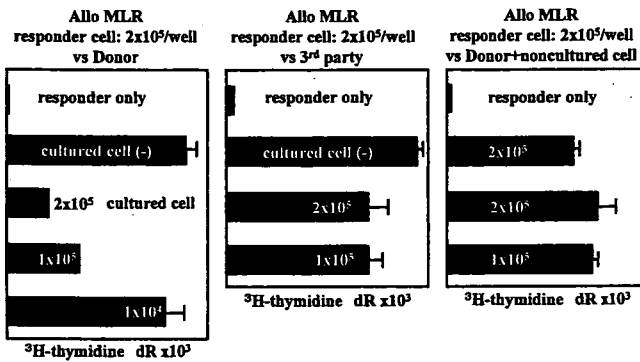


図2-A ヒトリンパ球混合培養 (MLR)  
ResponderとStimulatorのリンパ球間のMLRに、培養して得られたTregを添加、Tregは用量依存性にMLRを抑制した(左)。  
Responderと第三者のリンパ球間のMLRは抑制されない(中)。  
ResponderとStimulator間のMLRに培養していないResponderのリンパ球を添加してもMLRは抑制されない(右)。

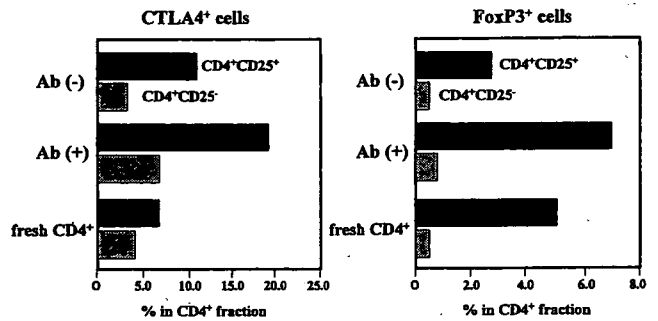


図2-B 培養リンパ球のphenotype  
抗CD80/86単抗体を添加するとCD4+CD25+CTLA-4+リンパ球が高発現するが、抗体無添加群、培養していない新鮮CD4+リンパ球では増加しない(左)。  
抗CD80/86単抗体を添加するとCD4+CD25+FoxP3+リンパ球が高発現するが、抗体無添加群、培養していない新鮮CD4+リンパ球では増加しない(右)。

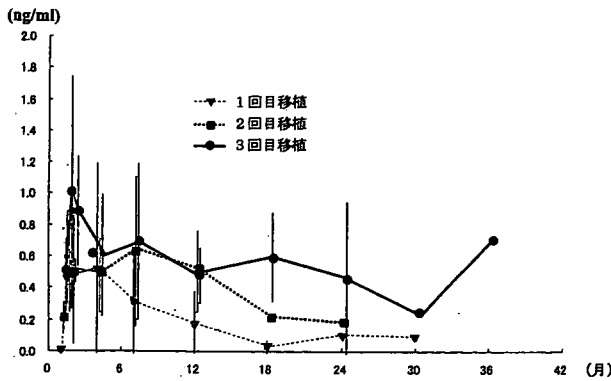


図3-A 膵島移植後の血中C-ペプチドの推移

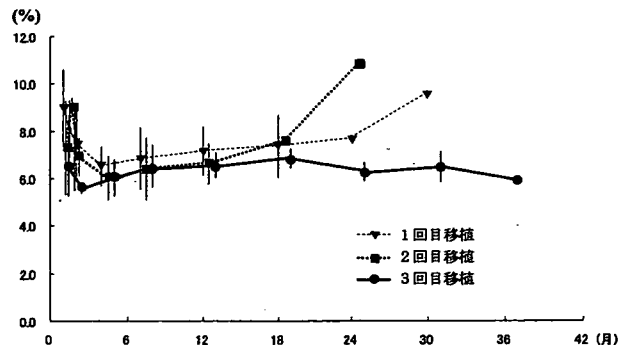


図3-B 膵島移植後のHbA1cの推移

## II. 分担研究報告

研究要旨：臨床膵島移植を再開するために代替酵素剤の前臨床研究、およびそういった新規酵素剤の有用性に関する検証を可能とする精度の高い膵島機能評価法構築の開発研究を行った。その結果、Serva酵素は現行の世界標準であるLiberase HIの代替えとなり得ることが示唆された。また、呼吸活性計測技術は有用な非侵襲性膵島評価法であることが判明した。

研究協力者：後藤昌史

東北大学移植再建内視鏡外科

## 1. 研究目的

本邦における探索医療の良き模範例を形成する事を目的に本研究を立ち上げたが、H18年3月に膵島分離用酵素にウシ成分が混入している事が発覚したため、現在世界的に膵島移植が一時停止の状態となっている。移植を切望している重症糖尿病患者様のためにも、一刻も早い膵島移植の再開が望まれる。はからずも今回、これまでのゴールドスタンダードであったRoche社のLiberase HIが使用できなくなったため、それに替わり得る代替酵素の探索的臨床研究が急務となっている。この観点に立ち、本学ではまずServa社のCollagenaseが代替品となり得るかの検討を行った。Serva社のCollagenaseは、これまでも幾つかの膵島分離センターにて使用されてきたが、その品質がRoche社のLiberase HIに劣り、臨床応用が困難である事が報告されてきた。今回我々は、本学が独自に考案した膵島分離法を使用する事により、この酵素を臨床応用する事が可能であるか否かについて、前臨床モデルである温阻血を被ったブタ膵臓を使用し検討を行った。

こういった新規酵素の有用性を検証するためには、精度の高い膵島機能評価法を構

築する事が必須である。これまで信頼に足る膵島機能評価法は存在せず、この事自体、膵島移植の分野における大きな世界的課題となっている。そのため我々は、本研究において我々がこれまでに独自に考案した新規膵島評価システムの探索的臨床研究へ向けた前臨床研究にも着手した。

## 2. 研究方法

(I) 臨床膵島移植再開へ向けたServa社製Collagenaseの有用性に関する検討

疑似臨床モデルとして、温阻血を約40分被ったブタ膵臓を使用して膵島分離実験を行った。東北大学においてこれまでに行われたServa群による膵島分離 (n=3) と、直前に行われたLiberase 群による膵島分離 (n=6) の結果を比較検討した。Liberase群においては4ロット、Serva群においては1ロットのCollagenaseが使用された。

(II) 非侵襲性呼吸計測技術の発展的活用による東北大式膵島評価法の確立

分離されたラット膵臓にheat shockを0, 40, 50, 60, 80秒加えた(各群n=6)。膵臓呼吸測定法、膵臓呼吸活性の糖負荷による変動を計測する糖負荷膵臓呼吸活性法、糖負荷膵臓機能試験、ADP/ATP ratio, insulin/DNA ratio, Tripan Blue testと分離膵臓による同種同系糖尿病ラットの移植効果の相関について検討を行った。

### 3. 研究結果

(I) 膵組織消化に要する時間及び膵組織消化率に両群間で差は認めず、膵島収量にも有意な差は認めなかった (Liberase群 vs Serva群 : 9999±1173 vs 8978±1472 IEQs)。また、両群間において分離膵島の機能およびバイアビリティーにも差を認めなかった。

(II) 糖負荷膵島呼吸活性、呼吸活性基礎値、ADP/ATP assay、糖負荷試験と移植効果との間に有意な相関を認めた ( $p=0.80, 0.71, -0.66, 0.53$ )。Insulin/DNA ratio及び Tripan Blue testは移植効果との間に相関を認めなかった ( $p=-0.47, 0.23$ )。糖負荷膵島呼吸活性法においては、呼吸測定法と糖負荷試験を組み合わせると91%の的中率が得られた。

### 4. 考察

Serva社製Collagenaseも、我々が考案した新規膵島評価法も、前臨床試験において科学的にその有効性が証明されたため、今後本研究の主目的であるヒト膵臓による探索的臨床研究へと発展させていくことが望まれる。

### 5. 結論

(I) Serva社製Collagenaseは、臨床疑似モデルであるブタ膵島分離に有効であった。

(II) 迅速、簡便、高精度である糖負荷膵島呼吸活性法は、移植効果を短時間での確に予見し得る理想的な膵島評価法である。

### 6. 健康危険情報

特になし。

### 7. 研究発表

論文発表

1) Takahashi H, Goto M, Ogawa N, Saitoh Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Doi H, Satomi S: The influence of a current style of culture on the quality of isolated pancreatic islets. Trans-

plant Proc (in press), 2008

2) Goto M, Yoshikawa Y, Matsuo K, Shirasu A, Ogawa N, Takahashi H, Saitoh Y, Fujimori K, Kurokawa Y, Tamai M, Satomi S: Optimization of a Prominent Oxygen-Permeable Device for Pancreatic Islets.

Transplant Proc (in press), 2008

学会発表

- 1) 第46回日本生体医工学会・2007-0425・膵島移植 -糖尿病根治におけるメディカルイノベーション-
- 2) 第50回日本糖尿病学会・2007-0524・膵島移植の現状と展望
- 3) 第6回日本組織移植学会総会・2007-0804・東北大学における臨床膵島移植
- 4) 第43回日本移植学会・2007-1123・非侵襲呼吸計測技術導入による高精度移植前膵島評価法の確立 他3題
- 5) 第34回膵膵島移植研究会・2008-0307・臨床膵島移植再開へ向けたServa酵素の有用性に関する検討 他 6題

### 8. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

なし

(2) 実用新案登録

なし

(3) その他

なし

研究者 後藤 満一 福島県立医科大学医学部外科学第一講座教授

研究要旨：膵島分離のための膵消化の至適条件は、臨床膵島分離、動物実験にてATPを指標として解析できること、また本邦におけるこれまでの臨床膵島移植成績を集計し、今後の展開の必須要項を明らかにした。

#### A. 研究目的

- 1) 膵島分離過程において至適消化から過消化に至る変化を明らかにし、膵消化の至適条件を明らかにする。
- 2) 膵島移植班事務局として本邦における臨床膵島移植成績を明らかにする。

#### B. 研究方法

- 1) 臨床膵島分離における膵消化過程の回路内ATP測定、動物実験において膵消化液の分離膵島に及ぼす影響を経時的に検討。
- 2) 膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局としてわが国の膵島移植成績を集計報告。

（倫理面への配慮）

臨床膵島分離および動物実験はいずれも事前に施設内倫理委員会の承認を得た。

#### C. 研究結果

- 1) 臨床膵島分離では至適消化判定の5-10分先行して回路内ATP量の上昇を認めた。動物実験では、膵消化液中に分離膵島のATPを減少させる障害因子の存在を明らかにした。
- 2) 移植率52%、インスリン離脱3例、全例で血糖の安定化を認めた。

#### D. 考察

膵消化過程で回路内のATPはdynamicに変動し、その測定は適切な消化時期の決定に重要であり、また、わが国の心停止膵を用いた膵島移植の成績は欧米の成績に匹敵する。

#### E. 結論

膵消化過程のATPの迅速測定で至適消化時期の判定が可能となる。また、本邦の膵島移植は、この結果と各施設のTRを導入することにより、更に発展する可能性をもつ。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 穴澤貴行、他. 膵島移植の現状と展望 移植42(3):235-241, 2007.
- 2) 斎藤拓朗、他. わが国における膵島移植の現況—膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局からの報告. 今日の移植20(3):199-204, 2007.
- 3) 膵・膵島移植研究会 膵島移植班膵島移植症例登録報告(2007) 移植42(5):439-447, 2008.
- 4) K. Ohtake et. al. Bone marrow traffic to regenerating islet induced by

streptozotocin injection and partial  
pancreatectomy in mice. Transplant  
Proc (in press)

## 2. 学会発表

1)Gotoh M, et al. Actions of the Japanese Society for Pancreas and Islet transplantation for recipients of human islets isolated using Liberase HI. CTS-IPITA-IX2007 Joint Conference 2007. USA.

2)Saito T, et al. Islet transplantation program from non-heart beating donor, report from Japanese Islet Transplantation Registry.

CTS-IPITA-IX2007 Joint Conference  
2007. USA.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究者：黒田嘉和 神戸大学 教授

研究要旨：ラットおよびイヌ膵島移植モデルにおいて、高酸素溶解能を有するPFC (perfluorochemical) を膵島移植における膵搬送、膵島分離、膵島移植の各行程に応用することで、膵島収量、膵島のviabilityおよび膵島移植の成績を改善した。

#### A. 研究目的

二層法は、高酸素溶解能を有するPFCと従来からの臓器保存液を組み合わせた膵保存法で、1988年に我々が開発したものである。二層法の最大の特徴は保存中に膵が酸素化されることで、これまで膵臓移植実験において保存中の冷阻血傷害や摘出時の温阻血傷害が軽減されることを明らかにしてきた。今回、酸素化PFCを膵島移植の各行程に応用し、その有用性を検討した。

#### B. 研究方法

ラットおよびイヌ膵島移植モデルにおいて酸素化PFCを膵搬送時における膵保存、膵島分離、膵島移植の各行程に使用し、膵島の回収量、in vitro viability、移植後の機能などを評価した。

①膵搬送時にラットおよびイヌ温阻血傷害膵を、酸素化PFCとUniversity of Wisconsin (UW) 液との二層法で保存し、膵島収量、viabilityを検討した。

②ラットおよびイヌ温阻血傷害膵の、コラゲナーゼを用いた消化時に酸素化PFCを併用し、膵島収量、viabilityについて検討した。

③ラットおよびイヌ膵島移植モデルにおいて、移植時に酸素化PFCを腹腔内に投与して門脈内酸素分圧を測定し、膵島生着に与える効果を検討した。

#### C. 研究結果

##### ①膵搬送における酸素化PFCの応用

我が国の膵島移植に使用できる膵臓は心停止下摘出膵にほぼ限定され、摘出前後の温阻血傷害が必至である。温阻血傷害膵を二層法保存することで、温阻血傷害を克服し、膵島の収量とviabilityが回復することをラットおよびイヌ膵島移植モデルによって明らかにした。

##### ②膵消化における酸素化PFCの応用

コラゲナーゼを用いた膵消化は、温度と酸素供給の観点からは膵島移植に固有の温阻血傷害とみなすことができる。そこで、膵消化時に酸素化PFCを併用し、消化中の膵も酸素化することで膵島収量が大幅に向上することを明らかにした。

##### ③ 移植における酸素化PFCの応用

臨床膵島移植においては、通常膵島は門脈経由で肝臓に移植される。しかし、移植された膵島の50～70%は、生着することなく移植直後に失われてしまうといわれている。これは、移植時の膵島のhypoxiaが主因であるとされ、移植成功への大きな障害となっている。そこで、移植時に酸素化PFCを腹腔内投与することの効果を実験的に検討した。酸素化PFCの腹腔内投与により門脈の酸素分圧が上昇し、生着膵島数が増加することにより移植成績が向上することを明らかにした。



## D. 考察

膵島移植はドナーからの膵臓摘出、膵搬送、膵島分離、移植という長時間の行程を必要とする。その各過程において膵島は虚血による障害を受ける。今回、酸素化PFCを用いて膵島を酸素化することにより膵島移植成績は改善した。膵島移植における酸素化は重要な課題であり、今後さらなる方法の改善が望まれる。

## E. 結論

動物実験による膵島移植において酸素化PFCを膵搬送、膵島分離、膵島移植の各行程に応用することで、膵島移植成績を改善した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Goto T, Tanioka Y, Sakai T, Terai S, Kamoda Y, Li S, Tanaka T, Tsujimura T, Matsumoto I, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets. *Transplantation*, 83, 754-758, 2007
- 2) Li S, Sakai T, Suzuki Y, Goto T, Tanaka T, Yoshikawa T, Kakinoki K, Tanioka Y, Matsumoto I, Fujino Y, Kuroda Y. Improved quantity and in vivo function of islets isolated by reduced-pressure controlled injection of collagenase in a rat model. *Cell Transplantation*, 16, 539-545, 2007
- 3) 摘出膵をヘリコプターで搬送し、膵島移植を施行した1例. 谷岡康喜, 酒井哲也, 仲井照和, 大河原弘達, 黒田嘉和. 移植 42巻5号 470-473, 2007
- 4) 膵提供からみた膵島移植の現状と問題点当施設における経験. 大河原弘達, 谷岡康喜, 酒井哲也, 春日雅人, 黒田嘉和. 移植42巻4号 354-358, 2007

### 2. 学会発表

- 1) Islet transplantation from uncontrolled non-heart-beating donors: a single-center experience. Toshiaki Tsujimura, Yasuki Tanioka, Tetsuya Sakai, Ipepei Matsumoto, Shiri Li, Sachio Terai, Yonson Ku, Yoshikazu Kuroda. 13<sup>th</sup> ESOT congress 2007
- 2) 糖尿病根治における技術革新 多段階二層法による膵島移植の確立 谷岡康喜, 酒井哲也, 黒田嘉和 第43回日本移植学会総会
- 3) marginal dose 膵島移植における移植後酸素化 Perfluorochemical 腹腔内投与の有効性 酒井哲也, 李世日, 谷岡康喜, 松本逸平, 後藤直大, 寺井祥雄, 加茂田泰久, 辻村敏明, 藤野泰宏, 黒田嘉和 第62回日本消化器外科学会総会
- 3) 本学における不安定1型糖尿病に対する心停止下膵島移植治療の現状 辻村敏明, 谷岡康喜, 松本逸平, 酒井哲也, 寺井祥雄, 具英成, 黒田嘉和 第38回日本膵臓学会大会
- 4) 不安定1型糖尿病に対する心停止下膵島移植治療 辻村敏明, 谷岡康喜, 酒井哲也, 松本逸平, 寺井祥雄, 黒田嘉和 第19回日本肝胆膵外科学会・学術集会
- 5) ドナー確保に対する組織バンクの活動 神戸大学膵島移植班へのドナー情報からの検討 大河原弘達, 谷岡康喜, 酒井哲也, 黒田嘉和 第43回日本移植学会総会

### G. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

基礎研究成果の臨床応用推進研究

分担研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立

－「イヌ分離膵島純化法と膵島収量・機能」および「ヒト膵島分離・凍結保存」に関する研究－

分担研究者 剣持 敬 国立病院機構千葉東病院臨床研究センター長

研究要旨：イヌを用いた基礎的検討より、現在膵島移植における大きな問題点の一つとしての膵島分離・純化中の膵島数減少につき、純化を行わない膵島移植も十分可能であることが示され、今後臨床応用に向け検討すべき結果と考えられた。当院で脳死・心停止ドナーからの膵島分離を24回施行した。4名の1型糖尿病患者に移植された。全例、低血糖発作の消失、必要インスリン量の減少、HbA1Cの低下が得られ、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、凍結保存した。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。

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を伴うこともあり、効率的な膵島分離法が必須である。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ため、優れた膵島保存法の開発も必須の技術である。本年度は、大動物(ブタ、イヌ)において確立した当施設の膵島分離法・膵島凍結保存法を臨床応用することを目的とする。

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。

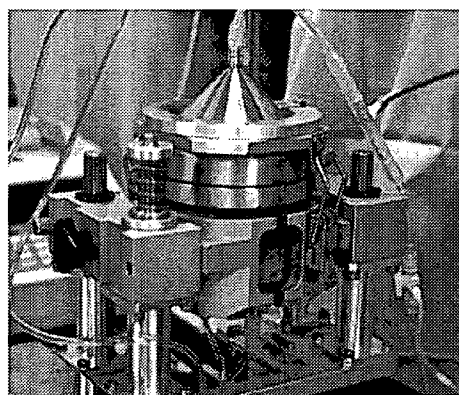


図1. 膵島消化装置

[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(perfusion study)、移植後血糖値の推移、IV-GTTを施行し

た。

## 2. 当施設におけるヒト膵臓分離・凍結保存の臨床的研究

### 1) 対象

2003年9月～2007年3月に国立病院機構千葉東病院臨床研究センターCell Processing Center(CPC)において、脳死または心停止ドナーより提供を受けた膵臓より24回(脳死1回、心停止23回)の膵臓分離を施行した。

### 2) 膵臓の摘出・搬送法

脳死または心停止ドナーより、膵臓移植に使用されない場合に、ご家族の同意を得て、膵臓の提供を受けた。膵臓の摘出は「膵臓移植実施マニュアル(膵・膵臓移植研究会編、初版2002年、第2版2004年、第3版2006年)」にしたがって行なった。献腎移植のための腎臓を摘出した後、膵臓を摘出した。搬送法は原則として神戸大学2層法にて行なったが、時間的に不可能な場合には UW 液にて保存・搬送した。

### 3) 膵臓分離法

膵臓分離は GMP 準拠膵臓分離 unit である、国立病院機構千葉東病院臨床研究センターCPCにて実施した。この操作は「膵臓移植実施マニュアル(膵・膵臓移植研究会編、初版2002年、第2版2004年、第3版2006年)」および日本組織移植学会のガイドラインに沿い、無菌的操作で施行された。以下に千葉東病院式膵臓分離法の手順を示す。

- ①膵臓のクリーニング、重量測定
- ②膵臓の膨化(低温リベレース液)
- ③膵の細切(2-3cm 角)
- ④千葉東膵臓消化装置(図1)で温消化
- ⑤膵消化組織の回収
- ⑥膵臓の純化(Euro-Ficoll discontinuous technique、COBE2991)
- ⑦膵臓移植、培養、凍結保存

### 4) 膵臓凍結保存法

当施設では、UCLA 法を改良した独自の凍結保存法を考案し、大動物実験で良好な結果を得た後、臨床に応用している。以下に千葉膵臓凍結法の手順を示す。

- ①膵臓を凍結保存液である CP-1 液に懸濁する。
- ②凍結用バッグ(7005-2, CharterMed Inc., USA)に封入する
- ③プログラムフリージングシステム(Cryomed Model 1010, Forma Med Inc., USA)にて $-80^{\circ}\text{C}$ に冷却する。
- ④凍結プログラムは UCLA の方法に準じ、改良を加え、表1のように設定した。
- ⑤液体窒素タンク(ヒト膵臓バンクシステム)内に保存した。

表1. 膵臓(ヒト、大動物)凍結プログラム

1.  $2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until sample= $4.0^{\circ}\text{C}$
2.  $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until sample= $3.0^{\circ}\text{C}$
3.  $50.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until chamber= $-70^{\circ}\text{C}$
4.  $25.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until chamber= $-10^{\circ}\text{C}$
5.  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until chamber= $-40^{\circ}\text{C}$
6.  $5.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until chamber= $-80^{\circ}\text{C}$

## 3. 当施設における臨床膵臓移植の研究

Edmonton protocol に従い、分離された膵臓は、膵臓移植班の作成した「新鮮膵臓移植の基準」を満たした場合に、分離直後または Serum free medium にて短時間(6-12 時間)培養後に移植に使用した。レシピエント選択は膵臓移植班事務局により行なわれた。

### 1) 膵臓移植法

国立病院機構千葉東病院放射線部血管造影室にて実施した。局所麻酔下に超音波ガイドで門脈穿刺し、カテーテルを挿入、門脈造影した後、点滴法にて門脈内移植した。移植中は心電図、血圧、脈拍、酸素飽和度、門脈圧を持続モニターした。カテーテル抜去はスポンゼルに造影剤を混じて塞栓しながら確実な止血を確認して行なった。

### 2) 移植後免疫抑制法

1 例目は Edmonton protocol 原法とし、Sirolimus, Tacrolimus, Daclizmab で行なった。2 例目からは Daclizmab に代えて、Basiliximab を使用した。

## C. 研究結果

### 1. イヌ非純化膵臓移植の実験的検討

#### 1) 膵臓収量、純度、移植膵臓 pellet 量

膵臓収量は、非純化群が  $8,811 \pm 6,828 \text{ IEQ/g}$ 、純化 E 群  $6,730 \pm 3,536 \text{ IEQ/g}$ 、純化 H 群  $9,021 \pm 3,757 \text{ IEQ/g}$  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。移植膵臓 pellet 量は非純化群で  $10.8 \pm 1.9 \text{ ml}$  であったのに対し、他の2群では  $< 2 \text{ ml}$  であった。

#### 2) 形態学的検討

非純化群では、膵臓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 群では膵臓の大きさはばらばらで、小膵臓は一部破壊が見られた(図2)。純化 H 群では良好な膵臓がほぼ均一な大きさで分離された(図5)。

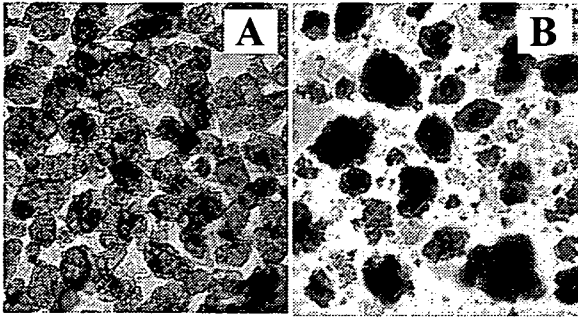


図2. 分離膵島像(A:純化H群、B:純化E群)

3) 膵島機能検査 (Perifusion Study)  
 各群の膵島の perifusion study の結果を示す (図3)。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。

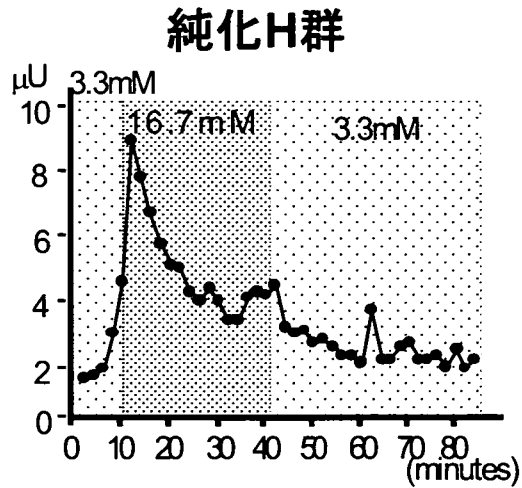
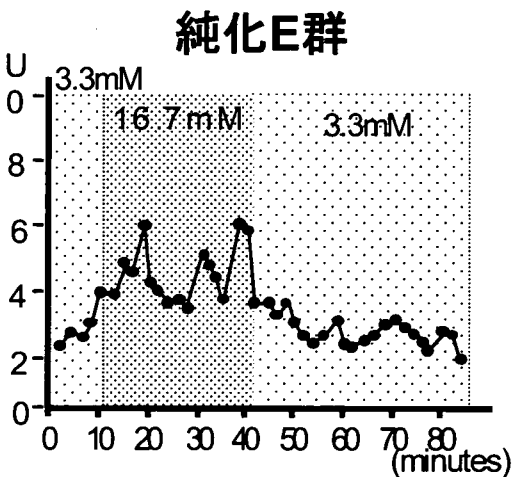
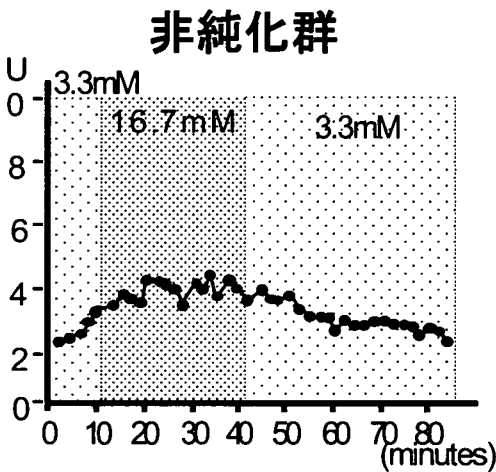


図3. Perifusion study

4) 移植後血糖値の推移 (図4)

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。

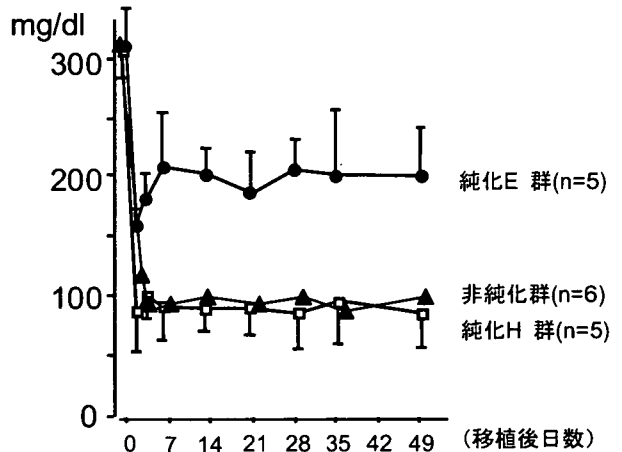


図4. 移植後血糖値の推移

2. 当施設におけるヒト膵島分離・凍結保存の臨床的研究

1) ドナーの検討

当施設において施行した 24 例の膵島分離は脳死ドナー 1 例、心停止ドナー 23 例であった。心停止ドナー 23 例の背景は、年齢は 10 歳～69 歳 ( $37.5 \pm 18.0$  歳) であった。死因は脳血管障害 10 例、低酸素血症 7 例と悪条件ドナーが多かった。レスピレータオフは 2 例 (8.7%) のみであった。また 8 例 (34.8%) が心停止のエピソードを有していた。心停止前のカニューレション施行は、14 例 (60.9%) であった。無尿時間は 0～1800 分 (平均 305 分) であった。温阻血時間は 0～30 分 (平均 10.0 分)、総阻血時間は  $320.1 \pm 86.3$  分であ