

25. Takahashi, H.; Goto, M.; Ogawa, N.; Saitoh, Y.; Fujimori, K.; Kurokawa, Y.; Doi, H.; Satomi, S. Influence of a current style of culture on the quality of isolated pancreatic islets. *Transplant Proc* 40(2):358-359; 2008.
26. Terasaki, P. I.; Cecka, J. M.; Gjertson, D. W.; Takemoto, S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 333(6):333-336; 1995.
27. Toyama, H.; Takada, M.; Suzuki, Y.; Kuroda, Y. Activation of macrophage-associated molecules after brain death in islets. *Cell Transplant* 12(1):27-32; 2003.
28. Wennberg, L.; Song, Z.; Bennet, W.; Zhang, J.; Nava, S.; Sundberg, B.; Bari, S.; Groth, C. G.; Korsgren, O. Diabetic rats transplanted with adult porcine islets and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunomide remain normoglycemic for up to 100 days. *Transplantation* 71(8):1024-1033; 2001.

Figure Legends

Fig. 1: Islet recovery and purity after isolation. Appearance of the isolated islets without brain death (A) and with brain death (B) at a magnification of 20 \times . (C): Isolated islet yield from brain-dead donors (black bar) and control donors (white bar).

Fig. 2: Islet viability and function after isolation. ATP/DNA ratio in the fresh isolated islets (A) and in overnight-cultured islets (C). The stimulation index of the respiratory activity using a scanning electrochemical microscopy in the fresh isolated islets (B) and in overnight-cultured islets (D). The black bar stands for brain-dead donors and the white bar represents control donors.

Fig. 3: mRNA expression of TF and MCP-1 in the pancreatic tissues. mRNA expression of TF (A) and MCP-1 (B) in the pancreatic tissues from the donors with/without brain death was analyzed using real-time PCR assay. The black bar stands for brain-dead donors and the white bar represents control donors.

Fig. 4: mRNA expression of TF and MCP-1 in the fresh isolated islets. mRNA

expression of TF (A) and MCP-1 (B) in the fresh isolated islets from the donors with/without brain death was analyzed using real-time PCR assay (**P<0.01 vs. control). The black bar stands for brain-dead donors and the white bar represents control donors.

Fig. 5: Time course change of TF and MCP-1 mRNA expression in the isolated islets. Time course change of TF (A) and MCP-1 (B) mRNA expression in the isolated islets from the donors with/without brain death. The black bar stands for brain-dead donors and the white bar represents control donors. A significant difference was observed in TF expression in the islets from brain-dead donors between 3-h and 48-h culture.

● 膵β細胞を増やす

膵島移植の現状と展望

後藤昌史*1*2

要 旨

膵島移植が今後広く普及していくためには、1つの臓器によって1人の患者を治療する One-to-One を確立する必要がある。そのためには膵島分離技術の洗練に加え、さらにグラフト生着の促進に主眼を置いた研究を進めていく必要がある。また、極端にドナーが少ない我が国の特殊事情を考慮すれば、今後の膵島移植の方向性として、すでに開始されているバイオ人工膵島移植といった選択肢も十分視野に入れておく必要がある。

はじめに

2000年に新しい膵島移植療法としていわゆるエドモントンプロトコルが報告されたことにより、膵島移植は世界中で大きな社会的関心を集め、1型糖尿病患者に対する一選択肢としてその第一歩を踏み出した。この流れを受け、我が国においても2004年4月より膵島移植が開始され、すでに現在までに28例が行われている。東北大学病院においても、2006年8月に全国で6つ目の膵島移植実施施設として認定され、これまでに2例の移植を実施している。前世紀は臓器移植が大きく開花したが、今世紀中にはより低侵襲な細胞療法へ主役が移り変わっていくと考えられている。その中でも膵島移植は特に早い時期に標準治療として確立すると考えられて

いるが、現在の膵島移植はエドモントンプロトコルの長期成績を受け、「血糖を安定化させるための低侵襲治療」と位置づけられている。本稿では、こういった膵島移植の現状と課題について可及的に分かりやすく説明し、それに対する筆者らの取り組みについても併せて述べる。

膵島移植とは

インスリン投与に生命をゆだねている1型糖尿病患者は、現在世界中に400万人以上いると言われている。さまざまな理由で患者数は現在も増加し続けており、2025年にはおよそ3,000万人に達するものと推測されている¹⁾²⁾。これらのうち多くは、頻回の自己血糖測定とインスリン療法によって血糖コントロールが可能であるが、一部の患者は深刻な低血糖性昏睡による致死の危険に常に曝されている。さらに近年に至り、インスリン療法ではその厳格な使用にもかかわらず、血管病変に基づく腎不全、失明、神経障害、心筋梗

*1 東北大学国際高等研究教育機構 准教授

*2 東北大学大学院医学系研究科 先進外科

キーワード：膵島移植、重症1型糖尿病、グラフト生着、One-to-One、医工連携

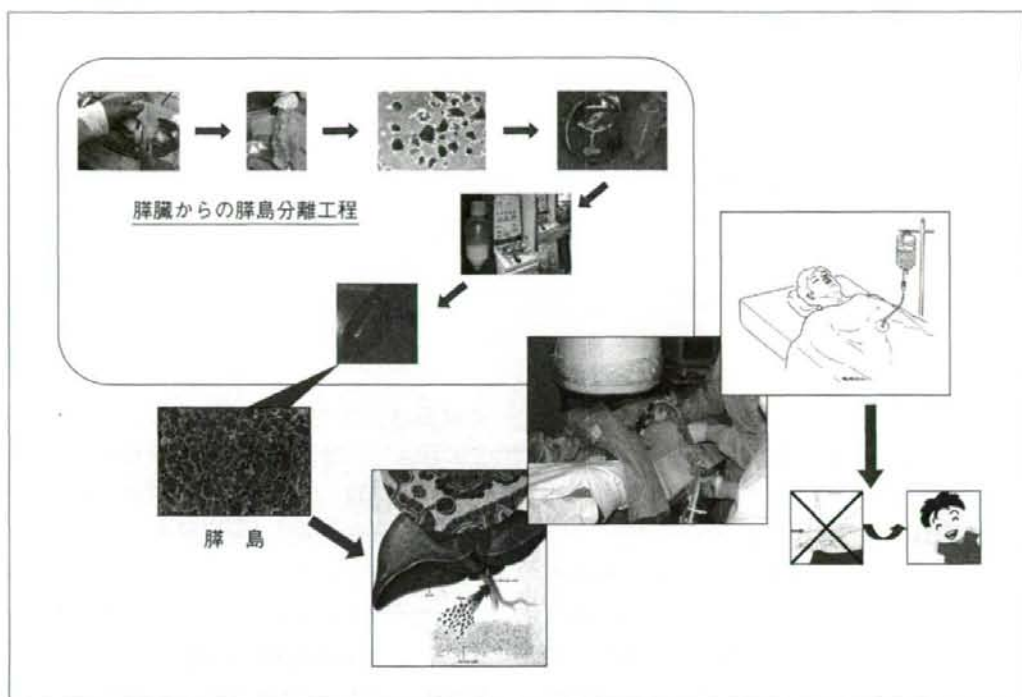
塞、脳卒中といった糖尿病性長期合併症の併発を、完全には阻止できないことが明らかとなってきた。我が国においても、現在約10万人の1型糖尿病患者が存在している。昨今の人口高齢化に伴い、透析導入患者に占める糖尿病患者の割合は年々増加しており、またその予後が他疾患を原因とするものよりはるかに不良であることが報告されている。したがって、医療的側面および長期的な医療費削減を踏まえた社会的側面からも、これら糖尿病患者を治癒へ向かわせる根治療法、すなわち膵β細胞の置換療法の確立が急務であると考えられている。

これまでそういった置換療法として膵臓の臓器移植が臨床的に確立されてきたが、手術侵襲が大きいこと、必要ではない外分泌組織の附随移植が合併症の原因となること、また拒絶反応時に移植グラフトの除去が必要であることなどから、それに代わる置換療法として低侵襲で合理的な膵島移植の確立が強く望まれてきた。このような状況下で、2000年に新しい膵島移植療法としてエドモントンプロトコルが報告され³⁾、欧米を中心に広く普及し、現在まさに1型糖尿病患者に対する理想的治療法として確立されようとしている。膵島移植の第一義的目的は、インスリンの強化療法によっても血糖コントロールが困難である重症1型糖尿病患者の血糖値を安定化させ、それにより低血糖発作を解消することである。それにより副次的に糖尿病性合併症を阻止し、究極的には患者のQOLを向上させるためインスリンからの離脱を目指す。膵島移植の適応となる患者は膵臓のインスリン分泌能が枯渇しており、糖尿病学会専門医などのエキスパートによる治療によっても血糖のコントロールが困難であるインスリン依存性の重症1型糖尿病患者である。膵島移植の禁忌としては、重症感染症や悪性腫瘍の治療中が挙げられる。また、アルコール中毒や

重症肥満の患者も適応外となる。本邦で膵島移植を希望する場合は、必要検査データをそろえたうえで、膵・膵島移植研究会が設置する膵島移植適応検討委員会に主治医より申請を行う必要がある。適応があると認められた場合には、膵・膵島移植研究会にレシピエント登録を行い膵島の提供を待つことになる。膵・膵島移植研究会が認定し、膵島移植を行うことが可能な施設が現在全国に7つ（東北大学、福島医科大学、千葉東病院、大阪大学、京都大学、神戸大学、福岡大学）存在するが、現行のルールでは患者が複数の施設に登録を行うことも可能である。膵島移植は膵臓移植と異なって、局所麻酔下で行うことが可能である（図1）。膵臓より分離した膵島を、約200mlの溶液とともに輸液バッグに入れて移植に備える。超音波検査で肝臓内の状況を確認したうえで、肝臓内の血管である門脈へカテーテルを穿刺し、X線透視で確認しながらカテーテルを通して膵島浮遊液を注入する。注入終了後、穿刺したカテーテルを抜去し、止血操作を行って移植操作が終了する。全工程に要する時間は約20～40分である。膵島移植手技は現在の医療技術では簡易な技術であり、移植手術の際の合併症は臓器移植手術に比較して極めて少ないと言える。また、同様の手技は門脈の採血や血管の造影などで頻繁に行われている方法であるため、多くの経験が積まれている。

移植膵島が生着すれば、血糖値を感知して必要な量のインスリンが分泌され、血糖値が低下すればインスリン分泌も自動的に少なくなるので血糖値が正常化する。血糖が正常域まで低下しない場合は、移植膵島が拒絶反応により消失した場合と、肝臓の中に生き残った移植膵島の量が不足している場合が考えられる。いずれの場合も、インスリン注射を続けて次の膵島移植の機会を待つことになる。欧米では比較的短い期間で次の膵島移植の機

図1 膵島移植の流れ



膵島移植とは、特殊な酵素剤を使用して膵臓よりインスリンを産生する膵島のみを抽出し、局所麻酔下に点滴の要領で移植を行う低侵襲・安全な細胞療法である。

会が訪れるが、日本では2回目の膵島移植を受けることができるまでにかかなりの時間を要するため、生着した膵島グラフトに過剰な負荷がかかる点が大きな問題である。膵島移植においては、拒絶反応が起こった場合でも移植した膵島は自然に消滅するため、膵臓移植と異なり改めてグラフトを摘出する必要がない点は特記に値する。

膵島移植の現状

これまで膵島移植推進の原動力となってきたのは、アルバータ大学、マイアミ大学、ミネソタ大学を中心とする北米の研究グループである。一方ヨーロッパにおいても、ギッセン、ミラン、GRAGIL、Nordic Network を中心とし、膵島移植を医療として確立することができるよう試行錯誤が繰り返されてきた。

特に近年、その地理的および財政的不利な条件を補うべく、国家の枠を越えた大規模な膵島移植統合プロジェクトが推進される傾向が見られ、その結果ヨーロッパにおいても膵島移植は急激に普及し始めている。ヨーロッパによく見られる膵島移植統合プロジェクトの試みは、ドナーおよびレシピエントのプールを増やし臓器を有効利用するといった利点をもたらすばかりではなく、短期間での大規模臨床試験を可能にするため今後も一層進み、この分野全体にさまざまな恩恵をもたらすものと思われる⁴⁻⁷⁾。

エドモントンプロトコルの世界規模の追試における長期経過により、エドモントンプロトコルでは脳死ドナーからの膵島移植を数回重ねることによって長期に及ぶ血糖安定化が可能であるが、インスリン離脱の長期維

持は難しいことが判明した⁸⁾。しかし、現在重症の1型糖尿病患者が膵島移植を受ける目的は、インスリン注射が面倒であるからではなく、インスリンでコントロールできない血糖状態を安定化させるためである。したがってその本来の目的を達成するうえでは、リスクの少ない低侵襲療法である膵島移植は合目的な治療法と言える。近年では、移植時の免疫抑制導入薬として抗胸腺細胞グロブリン抗体と抗 TNF α 製剤を併用することにより、グラフト生着が大幅に促進され、インスリン離脱期間も延長するという報告がなされている⁹⁾。今後臨床に即した研究がさらに進むことにより、近い将来インスリン離脱の長期維持が可能になると思われる。

日本においても、2004年4月より臨床膵島移植が開始された。現在のところ我が国では、膵島移植が法律上、組織移植の範疇に組み入れられるため、心停止ドナーからの臓器使用を余儀なくされている。これは世界的に見ても極めてまれであり、これまで心停止ドナーを使用する膵島移植は不可能であると言われていたことを考慮すれば、1つの大きな臨床的チャレンジであると言える。2007年3月までに57回の膵島分離が行われ、そのうち28回において、延べ17人の患者へ移植が行われている。心停止ドナーからの臓器提供に限られるという我が国独特の厳しい環境が、短期間に飛躍的な膵島分離技術の革新をもたらしているため、今後脳死ドナーからの状態の良い臓器を使用することにより、我が国の膵島移植は世界に類を見ない素晴らしい発展を遂げる可能性を大いに有していると思われる。

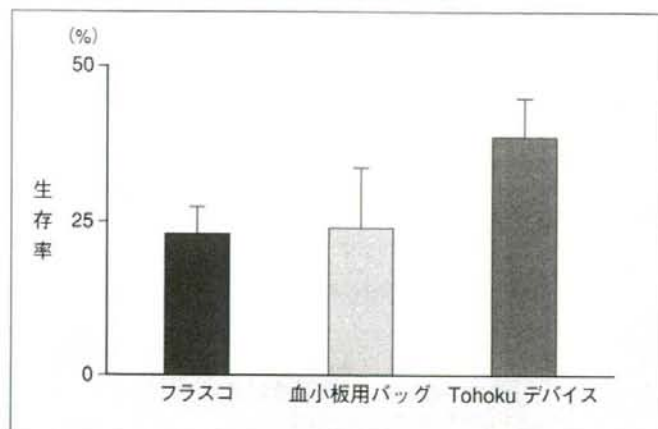
膵島移植の課題とその対策

膵島移植が今後より広く普及していくためには、患者の要求を満たすことはもちろんであるが、それに加えて臓器という限りある貴

重な社会資源を有効利用するため、1つの臓器によって1人の患者を治療する、いわゆる One-to-One を確立する必要がある。我々は、One-to-One を妨げる主たる原因が ① 膵島分離技術の未成熟、② 有用な移植前膵島評価法の欠如、③ 移植後早期における膵島グラフトの生着不全に集約されるものと考え、こういった諸問題に対応すべく多角的アプローチを積極的に導入し、本学独自の膵島移植法を考案するに至っている。具体的には、これまでの基礎検討の結果に基づき、膵管への酵素注入圧を低圧（約 60mmHg）とし、その代わりに酵素溶液濃度を世界標準の約4倍（6 mg/ml）に保つというユニークな膵島分離法を確立した¹⁰⁾。世界標準として広まったエドモントンプロトコルでは、酵素注入圧は高圧（180mmHg）であり、酵素溶液濃度は低値（1.5mg/ml）に設定されていたが、膵島へのダメージを考慮して、近年我々の方式に切り替える施設も出始めている。また、膵島分離の成否を分ける最大の要因は、膵管を通しいかに酵素剤を効率良く外分泌組織内へ注入できるかという点であるが、ケースによっては膵尾部まで酵素を充填することが困難であるため、膵管内へカテーテルを導入する手技も確立した¹⁰⁾。さらに、実際の臨床膵島分離においては、臓器摘出時の損傷に起因する注入酵素剤の漏れがしばしば問題となる。そこで我々はその解決法として、注入酵素剤に微量色素を混入することによって損傷部位を同定し、脆弱な膵組織に最適な修復法として医療用ボンドの導入を世界に先駆けて確立し、今や世界標準となるに至っている¹⁰⁾¹¹⁾。また我々は、膵島分離作業時間の短縮化と分離膵島のバイアピリティーを向上させるため、酸素透過性に富む新規素材を導入した世界初となる膵島専用の培養・移植用デバイスの構築にも成功している¹²⁾（図2）。

現在膵島移植は、欧州より供給されていた

図2 各条件下における培養膵島残存率の比較



我が国における心停止ドナーからの膵島移植の擬似モデルである、温阻血を40分被った分離ブタ膵島を各条件下で約12時間培養し、膵島残存率を比較した。酸素透過性に優れた新規開発デバイスは、膵島保存効果を有することが判明した。

膵島分離用酵素剤にウシ成分が混入されていたことの発覚により、一時停止へ追い込まれている。2009年春頃にはウシ成分を除外した酵素剤が新たに供給され膵島移植が再開される見通しであるが、その効力に関しては未知であり、またこれまでの酵素剤に共通する課題としてロット間の格差問題が存在するため、我々は動物成分を完全に含まない安全なリコンビナントタイプの国産新規酵素剤の開発に乗り出している。

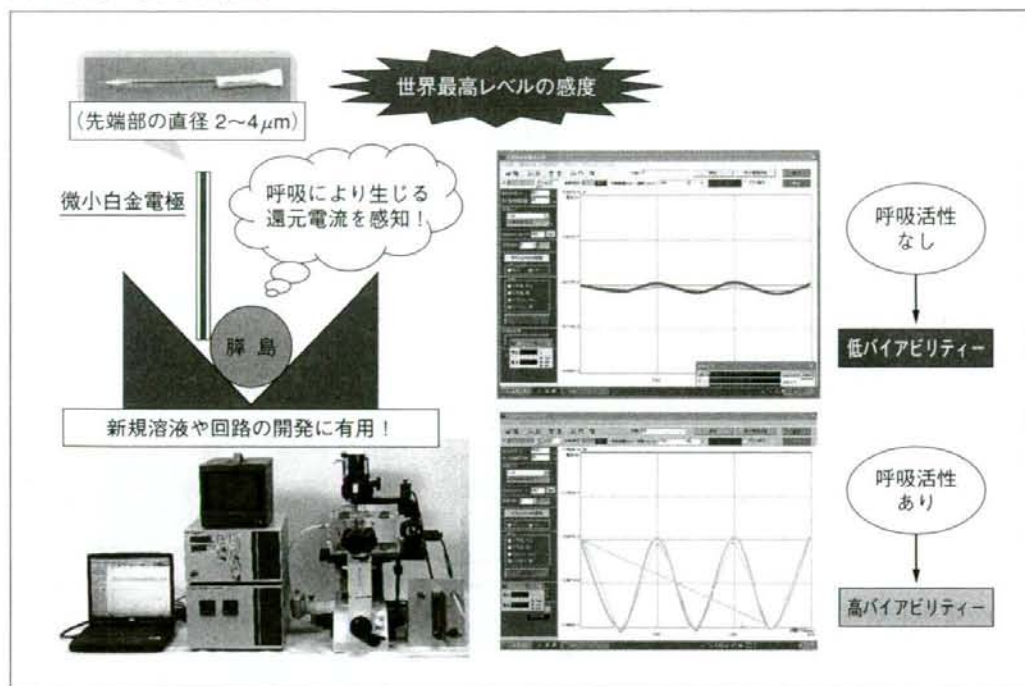
現行の膵島移植における大きな課題の1つとして、有用な移植前膵島評価法の欠如が挙げられる。我々はこれまでに、分離膵島のバイアビリティーを簡便かつ正確に計測する手法としてADP/ATPアッセイを確立し提唱してきたが¹³⁾、近年医工連携を導入し、膵島自身の呼吸によって生じる還元電位を波形として具現化する呼吸活性測定システムの確立に成功している(図3)。このシステムはこれまでのバイアビリティー評価法とは根本的に異なり、非侵襲的であるため、膵島そのもののバイアビリティーを経時的に観察することが初めて可能となった。

移植後早期における膵島グラフトの生着不全を制御するためのアプローチとして、我々はこれまでに強力な抗凝固・抗補体作用を有する低分子量デキストラン硫酸(LMW-DS)の有用性を見だし、報告してきた¹⁴⁻¹⁶⁾(図4)。実際、LMW-DSはNIH studyとして取り上げられ、2009年1月より海外にて臨床試験が開始された。しかし、LMW-DSはその抗補体作用に比して内因系抗凝固作用が著しく亢進しているため、ケースによっては出血のリスクを伴い、至適量の投与が難しいことも判明している。そこで現在我々は、すでに臨床現場で活用されている抗凝固薬と、臨床応用が望めるcGMPグレードの補体阻害ペプチドの組み合わせによる新規プロトコルを構築中である。近い将来、本学トランスレーショナルリサーチセンターにおける探索的臨床研究へ発展させたいと考えている。

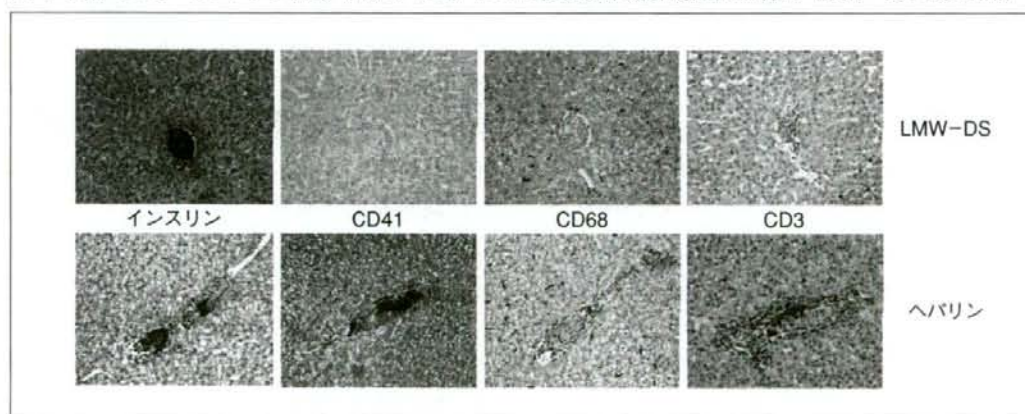
膵島移植の今後の展望

膵島移植は、血糖コントロールに苦しむ重症1型糖尿病患者にとって、まさに理想的な患者に優しい治療法である。日本における膵

図3 膵島の呼吸活性計測システム



高感度を有する微小白金電極を活用し、膵島自身の呼吸によって生じる還元電流を、波形として具現化するシステムを構築した。呼吸活性値は膵島のバイアビリティーと強く相関することが、筆者らのこれまでの研究によって判明している。

図4 低分子量デキストラン硫酸 (LMW-DS) による移植後早期膵島障害の制御 (文献⁶⁾より改変引用)

LMW-DS (上) あるいはヘパリン (下) 投与下にブタ膵島を移植された糖尿病サルにおける移植後 24 時間の膵島グラフトの免疫組織化学染色像。顕微鏡倍率は×200。LMW-DS が自然免疫反応を強力に制御することにより、それに引き続き起こる獲得免疫反応も効果的に制御されることが判明した。

島移植の今後の展望であるが、医療の世界の流れとして、一度低侵襲治療が受け入れられた暁には逆戻りすることはなく、さらにその治療を改善していく方向に向かうのが常である。したがって、PTCA や内視鏡手術をより好む我が国においては、今後技術の進展に伴って膵島移植は一層広く普及していくものと考えられる。しかし、極端にドナーが少ない我が国の特殊事情を考慮すると、今後の膵島移植の方向性として、異種膵島を使用するバイオ人工膵島移植や再生医療といった選択肢も、十分視野に入れておく必要があると思われる。

文 献

- 1) Amos A F, et al: The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 14 (Suppl 5): S1-85, 1997.
- 2) King H, et al: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21 (9): 1414-1431, 1998.
- 3) Shapiro A M, et al: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343 (4): 230-238, 2000.
- 4) Benhamou P Y, et al: Human islet transplantation network for the treatment of Type I diabetes: first data from the Swiss-French GRAGIL consortium (1999-2000). Groupe de Recherche Rhin Rhjne Alpes Geneve pour la transplantation d'Ilots de Langerhans. *Diabetologia* 44 (7): 859-864, 2001.
- 5) Kessler L, et al: Reduction of blood glucose variability in type 1 diabetic patients treated by pancreatic islet transplantation: interest of continuous glucose monitoring. *Diabetes Care* 25 (12): 2256-2262, 2002.
- 6) Guignard A P, et al: Cost analysis of human islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes in the Swiss-French Consortium GRAGIL. *Diabetes Care* 27 (4): 895-900, 2004.
- 7) Kempf M C, et al: Logistics and transplant coordination activity in the GRAGIL Swiss-French multicenter network of islet transplantation. *Transplantation* 79 (9): 1200-1205, 2005.
- 8) Shapiro A M, et al: International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355 (13): 1318-1330, 2006.
- 9) Bellin M D, et al: Prolonged insulin independence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes. *Am J Transplant* 8 (11): 2463-2470, 2008.
- 10) Goto M, et al: Refinement of the automated method for human islet isolation and presentation of a closed system for *in vitro* islet culture. *Transplantation* 78 (9): 1367-1375, 2004.
- 11) Goto M, et al: Technical improvement of human pancreatic islet isolation. *Transplant Proc* 37 (2): 1313-1314, 2005.
- 12) Goto M, et al: Optimization of a prominent oxygen-permeable device for pancreatic islets. *Transplant Proc* 40 (2): 411-412, 2008.
- 13) Goto M, et al: The ADP/ATP ratio: A novel predictive assay for quality assessment of isolated pancreatic islets. *Am J Transplant* 6 (10): 2483-2487, 2006.
- 14) Goto M, et al: Low molecular weight dextran sulfate prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets. *Transplantation* 77 (5): 741-747, 2004.
- 15) Johansson H, et al: Low molecular weight dextran sulfate: a strong candidate drug to block IBMIR in clinical islet transplantation. *Am J Transplant* 6 (2): 305-312, 2006.
- 16) Goto M, et al: Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* 15 (4): 225-234, 2008.

Current Status and Future Prospect of Pancreatic Islet Transplantation

Masafumi Goto^{1,2}

¹ Tohoku University International Advanced Research and Education Organization

² Division of Advanced Surgical Science and Technology, Tohoku University
Graduate School of Medicine

■ 原 著

ラット膵島移植モデルにおける 移植前培養膵島に対する新鮮膵島の優位性の検証

高橋英幸¹, 後藤昌史^{1,2}, 小川則彦¹, 藤盛啓成³,
黒川良望⁴, 土井秀之¹, 里見 進¹

The study on the advantage of fresh islets to cultured islets using a rat model of islet transplantation

¹Division of Advanced Surgical Science and Technology, Graduate School of Medicine Tohoku University,

²Tohoku University International Advanced Research and Education Organization,

³Division of Surgical Oncology, Graduate School of Medicine Tohoku University,

⁴Tohoku University Hospital

Hideyuki TAKAHASHI¹, Masafumi GOTO^{1,2},
Norihiro OGAWA¹, Keisei FUJIMORI³, Yoshimochi KUROKAWA⁴,
Hideyuki DOI¹, Susumu SATOMI¹

[Summary]

Objective: Although one of the key factors of the Edmonton protocol is transplanting fresh islets just after islet isolation, it has recently been reported that the outcome of islet transplantation with short-term cultures could be comparable to that with freshly isolated islets. To verify the superiority of fresh islets to cultured islets, in this study we compared freshly isolated islets with cultured islets in terms of islet quality using a rat model of islet transplantation.

Design and Methods: The quality of freshly isolated islets was compared with that of cultured islets with CMRL 1066 including 10% allogeneic serum, CMRL 1066 including 0.5% human serum albumin, and Miami medium. The evaluation was performed using static glucose stimulation test, insulin/DNA content, ADP/ATP ratio, and intraportal transplantation model to syngeneic diabetic rats. The expression of inflammatory mediators in the islets was examined by western blotting assay for tissue factor (TF) which is the initiator of detrimental instant blood-mediated inflammatory reactions (IBMIR).

Results: Although the survival rate was similar in all groups, stimulation index in glucose challenge test and insulin/DNA were significantly higher in fresh islets than the others ($p=0.008$ and 0.0001 , respectively). ADP/ATP ratio was maintained lower in both fresh and serum groups than the others. Most importantly, the expression of TF on the islets was significantly lower in fresh islets ($p=0.01$), suggesting that a current style of culture could enhance TF-dependent IBMIR after transplantation. In an in vivo transplantation model, the curative rate and insulin amount in the recipient liver was considerably higher in the fresh islet group than in the others. Intravenous glucose tolerance was also ameliorated in fresh and serum groups rather than the non-serum group. Notably, the disadvantage of the non-serum culture group was recovered by correcting the graft amount just prior to transplantation.

Conclusions: In conclusion, freshly isolated islets without prior culture are more beneficial to the transplantation outcome under current style of culture. Further improvements are required to optimize a substitute for serum supplements using a clinical available model.

Keywords: Islet, Culture, Transplantation, Serum, Fresh, Diabetes

¹ 東北大学大学院医学系研究科先進外科学分野, ² 東北大学国際高等研究教育機構,

³ 東北大学大学院医学系研究科腫瘍外科学分野, ⁴ 東北大学病院

(2008・2・26 受理; 2009・1・28 受理)

I. 研究背景

2000年に登場したエドモントンプロトコルは、膵島移植を重症I型糖尿病患者に対する治療の一選択肢へと押し上げた¹⁾。膵島移植は膵臓移植に比べ安全・簡便・低侵襲という利点を有するが、1人の患者を治療するために複数ドナーを必要とし、さらにその長期成績にも問題があることが判明している⁴⁾。

膵島移植の成績の鍵を握る重要な要因のひとつとして、“移植膵島の品質”があげられる。通常、膵島の品質とはその形態、機能、バイオビリティによって評価される包括的・多角的な膵島の状態を示す総称を意味するが、さまざまな膵島移植操作工程により影響を受けることが知られている⁵⁻¹⁰⁾。移植前培養の有無も膵島の質へ多大な影響を及ぼすと考えられるが、その効果に関しては統一見解が得られていないのが現状である。

エドモントンプロトコルがその柱のひとつとして新鮮膵島移植を提唱し、それまでに比し良好な成績を収めたため、現在わが国を含め世界中の多くの施設が臨床において新鮮膵島移植を施行している。実際、新鮮膵島移植のほうが移植前培養を行った場合より良好な移植成績を示すという研究結果が近年相次いで報告されている¹¹⁻¹³⁾。しかし、膵島移植の研究が開始された当初は、不純物の除去や免疫原性低下を理由に移植前膵島培養が推奨されてきた¹⁴⁻¹⁹⁾。さらに新鮮膵島移植は、夜間のスタッフ動員や、移植前検査の施行に関し実務上の明らかな欠点を有しているため、移植前短期培養を有効に活用しようという試みは合目的である。培地は血清添加^{19,20)}と無血清培地^{21,22)}に大別され、これらを移植前培養に用いることにより新鮮膵島移植に遜色のない成績が得られることが報告されている¹⁹⁻²³⁾。

これまでの多くの研究においては、移植実験時にグラフト量の補正を行っていたため、臨床に即した新鮮膵島移植と培養膵島移植の比較は困難であった^{19,20,24)}。また、移植部位も臨床の場合と異なり、腎被膜下が選択されてきた^{13,14,22,25)}。一部の研究において培養膵島が新鮮膵島と同等の効果を発揮した背景には、このような実験手法の差異が存在している。今回われわれは、グラフト補正を行わない経門脈的移植モデルを用いることにより、移植前培養膵島に対する新鮮膵島の優位性を検証した。

II. 研究方法

1. 実験動物

本動物実験は「東北大学における動物実験に関する指針」に従って施行した。*in vitro* 実験においては8~10週齢の雄性Wistarラット (Jpn SLC, Inc) を使用し、*in vivo* 移植実験においてはドナーとレシビエントに8~10週齢の雄性Lewisラット (Jpn SLC, Inc) を使用した。すべてのラットに餌と水分を自由摂取させた。

2. 膵島分離

Collagenase (type V; SIGMA) 溶液の膵管内注入による膵組織の消化、およびHistopaque-1119 (SIGMA) とLymphoprep™ (Nycomed Pharma AS) を用いた濃度勾配遠心 (3,785×g, 10 min) による膵島の純化を行った。膵島はCMRL 1066 (0.5% ヒトアルブミン, 50 µg/ml Gentamycin, 0.25 µg/ml Fungizone, 20 µg/ml Ciprofloxacin 添加) に回収し、その後、新鮮膵島群と培養膵島群に分類した。

3. 実験群

分離後2時間の膵島を新鮮膵島、37℃で48時間培養した膵島を培養膵島と定義した。

In vitro 実験

各群200個の膵島を採取し以下の群に分類した。TF (tissue factor) 解析においては、160 IEQs/mlの培養密度にて検討を行った。

1. 新鮮膵島群

2. 培養群；以下の培地を使用した。

- 血清群；10%ラット同系血清添加CMRL 1066
- ヒトアルブミン群 (HSA)；0.5% HSA+CMRL 106
- Miami群；Miami培地 (Mediatech Inc. FL USA) (膵島移植において最も有用性が確立されている市販無血清培地^{21,23)})

In vivo 実験

予備実験の結果から、ラット同系膵島移植モデルにおける膵島のmarginal massを3.5 IEQ/g (BW) に決定し、以後の移植実験に適用した。

1) 移植時にグラフト量補正を行わない実験系

おのおの3.5 IEQ/g (BW) の膵島を準備し、以下の各群に分類し8回の移植実験を行った。培養膵島はグラフト量の補正を行わずに移植した。

1. 新鮮膵島群

2. 培養群；以下の培地を使用した。

- a) 血清群: 10% ラット同系血清添加 CMRL 1066
b) Miami 群: Miami 培地

2) 移植時にグラフト量補正を行う実験系

以下の群に分類し5回の移植実験を行った。

1. 新鮮脾島: 3.5 IEQ/g (BW) を移植した。

2. 培養群: Miami 培地で培養後, 3.5 IEQ/g (BW) の脾島を準備し, 移植を行った。

4. 検査

糖負荷テスト (static glucose stimulation: SGS test)

各群 20 個の脾島を回収し, 低濃度グルコース溶液 (1.67 mM) と高濃度グルコース溶液 (16.7 mM) に対する上清インスリン濃度を測定し, その比を Stimulation Index (S.I.) として算出した。インスリン測定は市販の ELISA キット (モリナガインスリン測定キット, 森永生化学研究所) を用いて行った。

ADP/ATP 比

ADP/ATP 比は脾島のエネルギー状態を評価するための検査であり, ApoGlow kit (Cambrex Bio Science Nottingham Ltd.) を使用した³⁶⁾。80 IEQ の脾島を nucleotide-releasing reagent と混合し, nucleotide-monitoring reagent を溶液に加え, luminometer (FB 12 Luminometer, Berthold Detect) を用いて ATP の半定量化を行った。溶液中の ADP は, ADP converting reagent を加えることによって ATP に変換されるため, 同一脾島内の ADP/ATP 比を短時間で計測することが可能となる。

Insulin/DNA

20 個の脾島を回収し, 超音波粉碎機で粉碎し, 0.18 M HCl/96% エタノールにて抽出作業を行った。溶液より High Range Rat Insulin ELISA キット (Mercodia) を使用してインスリンを測定した。DNA 定量キット (セルガレージ社) を使用し DNA 量を計測し, その比率を算出した。

Western blotting 解析

2,000 IEQs の脾島からタンパクを抽出し, BCA Protein Assay kit (Thermo) を使用して抽出タンパクの定量化を行った上で電気泳動を施行した。泳動後, 50 V・200 mA の条件下に 90 分間 PVDF (invitrogen) 膜へ転写を行った。一次抗体としてウサギポリクローナル抗ラット TF 抗体を反応させた。本抗体は, ラット TF の extracellular domain に相当するリコンビナントタンパクを使用し作製を行った。二次抗体として HRP を標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体を反応させ, ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) に

て TF 抗原の検出を行った。脳組織 (TF のポジティブコントロール) および脂肪組織 (TF のネガティブコントロール) を使用し, 作製抗体の特異性が確認された。

脾島生存率

分離当日に対する培養 48 時間後の脾島の数の割合で示した。

脾島の形態指数 (図 1)

分離当日に対する 48 時間培養後の指数総計を百分率で表示した。形態指数は以下の定義に従った。0 点: 完全に辺縁形態が崩壊している, 1 点: 部分的に辺縁形態が崩壊している, 2 点: 辺縁形態が良好に保たれている。

5. 移植実験

糖尿病ラットの作成

冷クエン酸バッファー (pH 4.5) にて調整した Streptozotocin (SIGMA) 65 mg/kg をラット尾静脈より静注し, 連日同時刻に簡易式血糖測定計 (メディセーフリーダー (GR-101, TERUMO)) にて血糖値を測定した。2 回以上連続して 400 mg/dl 以上となったものを糖尿病ラットと判定し, STZ 静注後 1 週間以上経過したラットをレシピエントとして移植実験に使用した。

移植手術

手術は麻酔下 (ペントバルビタール 15 mg/kg i.v.) で行い, 脾島を 25 ゲージ翼状針 (TERUMO, Japan) を使用し経門脈的に肝臓へ移植した。

グラフト生着

グラフト機能は, 血糖値, 経静脈的ブドウ糖負荷試験 (IVGTTs), 肝内インスリン量により評価した。血糖値が 2 回以上連続して 200 mg/dl 以下となったラットを糖尿病治療状態と定義した^{23,27-30)}。血糖測定は自由摂食, 自由摂水の条件下で無麻酔下にて行った。

経静脈的ブドウ糖負荷試験 (IVGTTs)

移植 4 週間後に行い, 解析には血中濃度曲線下面積 (AUC) とグルコース消失率 (KG) を使用した。

肝内インスリン量

移植 4 週間後に肝臓を摘出し粉碎した。0.18 M HCl/96% エタノールを混合させ, 4°C で 24 時間抽出作業を行った上で遠心分離を行い, 上清から肝内インスリン量を測定した。移植時のグラフト量 (IEQs) で補正し肝内インスリン量を算出した (pmol/IEQ)。

6. 統計学的処理

測定値は平均値±標準誤差で表示した。2 群間の比較には Student's-t-test を, 多群間の比較には one-way

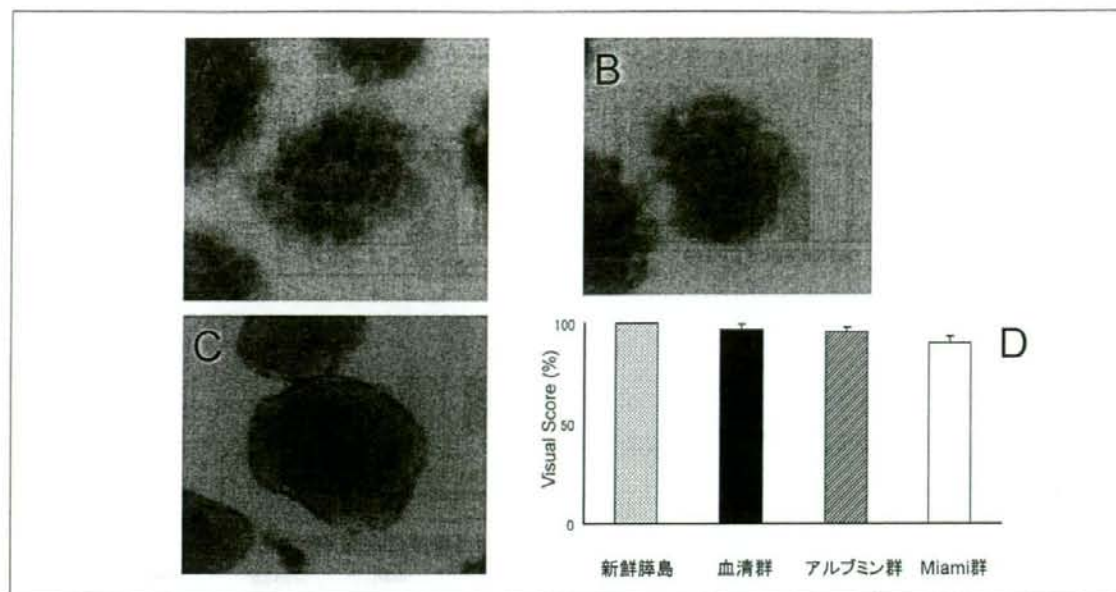


図1 新鮮膵島および各培養群における膵島の形態指数

A:完全に辺縁形態が崩壊している(0点), B:部分的に辺縁形態が崩壊している(1点), C:辺縁形態が良好に保たれている(2点) Miami群において低値を示した。

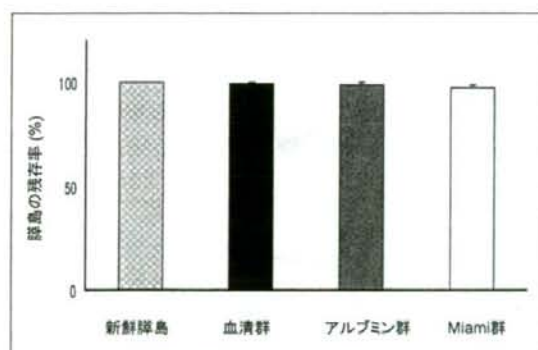


図2 新鮮膵島および各培養群における膵島の生存率
n=5
各群で顕著な差を認めなかった。

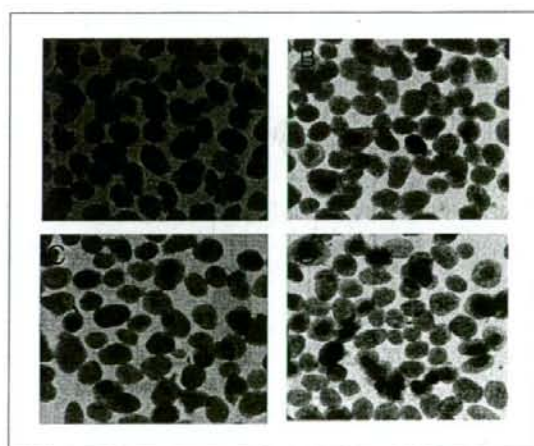


図3 新鮮膵島および48時間培養後の膵島の形態像
A:新鮮膵島, B~C:48時間培養後の膵島の形態像
(B:血清群, C:アルブミン群, D: Miami群)

analysis of variance および多重比較検定 (Tukey-Kramer) を施行し, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

III. 研究結果

1. *In vitro* 実験

膵島の生存率および形態

各群間で生存率に差を認めなかったが (図2), Mi-

ami 群においては辺縁形態指数の低下が確認された (図1D, 3)。

膵島の品質

糖負荷試験における刺激指数は, 新鮮膵島において有意に高値を示した ($p = 0.008$ 図4A)。膵島内インス

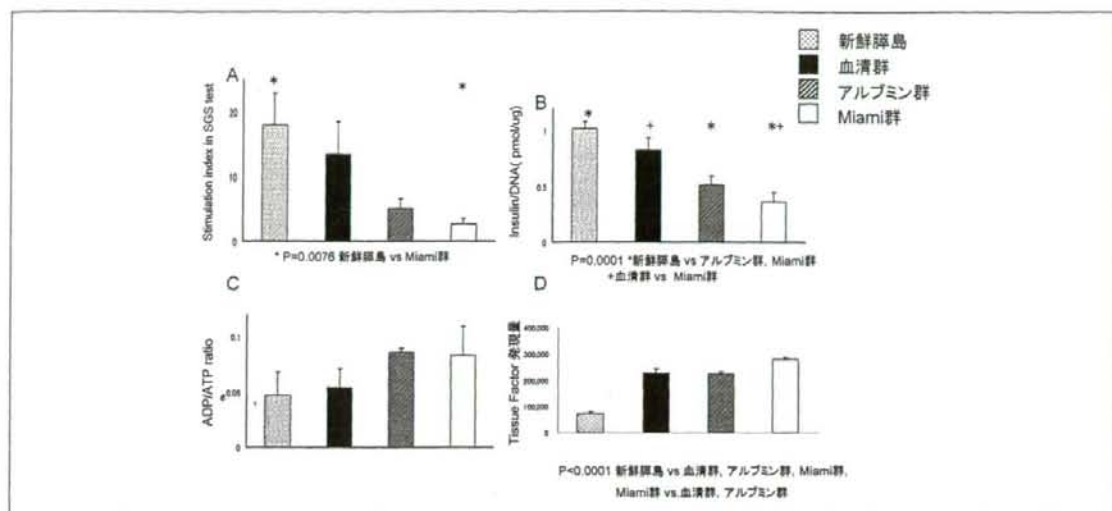


図4 新鮮膵島および各培養群における膵島の品質検討

n=5

A: 糖負荷に対するインスリン分泌反応の刺激指数, B: 膵島が含有する単位重量当たりのインスリン量, C: 膵島内のADP/ATP比, D: 新鮮膵島および各培養群における膵島のtissue factor発現量

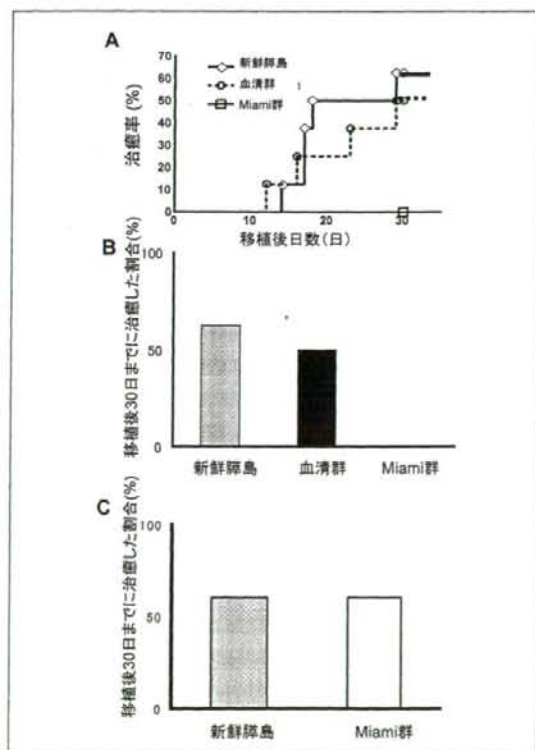


図5 新鮮膵島および各培養群における糖尿病ラットの治癒率
A: グraft量補正なし, B: 移植後30日までに治癒した割合(graft量補正なし), C: 移植後30日までに治癒した割合(graft量補正あり)

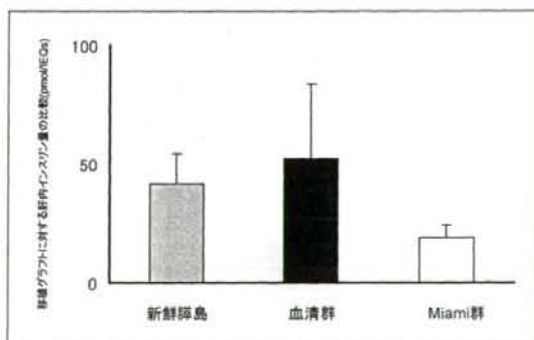


図6 グraft量補正を行わない実験系における, 新鮮膵島および各培養群の移植4週間後の肝内インスリン量の比較

n=3

リン量も, 新鮮膵島が有意に高値を示した ($p=0.0001$, 図4B)。ADP/ATP比は, 新鮮膵島および血清群において良好な値を示した (図4C)。

膵島のtissue factor発現量

作製したTF抗体は, ウェスタンブロッティング解析においてTFの発現が既に確認されている脳・胎盤組織といったポジティブコントロールに対し47 kDaのバンドを検出し, 腎臓・肺組織といったネガティブコントロールに対してはバンドを検出せず, TFに特異性を有していた。新鮮膵島において有意に低いTF

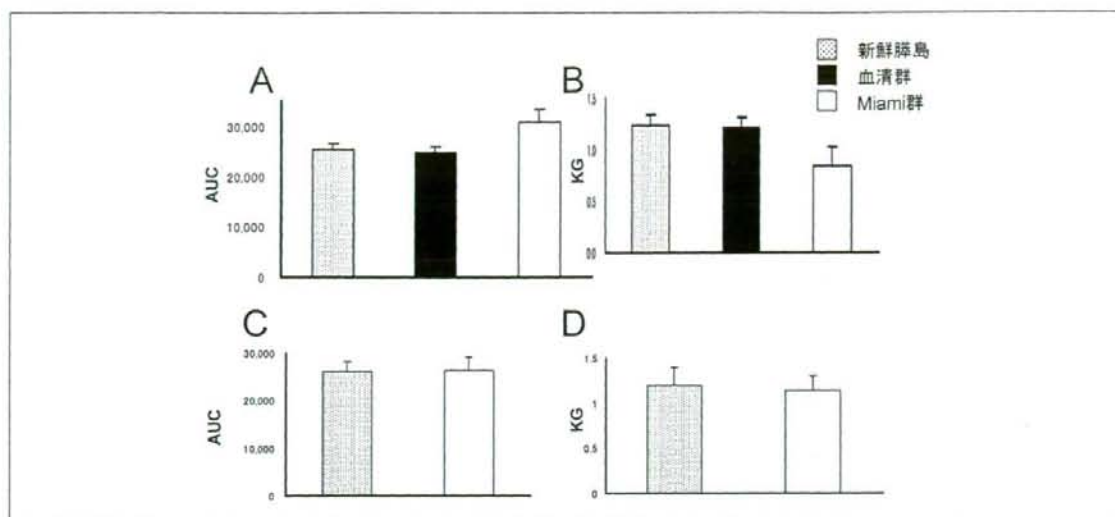


図7 新鮮脾臓および各培養群における、移植4週間後の経静脈的糖負荷耐糖能試験

A・C: area under the curve, B・D: Kg 値

AおよびBは移植時にグラフト量の補正を行わず、CおよびDは移植時にグラフト量の補正を行った (A・B: n=8, C・D: n=3)。

発現を認めた (図4D)。

2. *In vivo* 移植実験

グラフト量の補正を行わない実験系 (n=8)

Miami群においては全例が治癒しなかったが、新鮮脾臓群は63%が治癒し、培養群に比し高い治癒率を認めた (図5A, B)。肝内インスリン量は、新鮮脾臓群および血清群において高値を示した (図6)。IVGTTsにおいては、新鮮脾臓および血清群においてAUCの低下、および血糖値の急峻な回復傾向が認められた (図7A, B)。

グラフト量の補正を行う実験系 (n=5)

Miami群においても新鮮脾臓と同様の治癒率を示した (図5C)。IVGTTsにおいてもMiami群におけるAUCの上昇、および血糖値の回復遅延傾向が解消された (図7C, D)。

IV. 考察

本研究においては、臨床に準じ移植時のグラフト量補正を行わず、また移植部位として現在のスタンダードである肝臓を選択し、培養脾臓に対する新鮮脾臓の優位性について検討を行った。鋭敏な新規脾臓評価法を導入することにより、新鮮脾臓の方が培養脾臓に比し、機能・バイアピリティーのいずれにおいても優れており、良好な移植結果を示すことが判明した。さら

に培養群における比較では、血清添加培地が無血清培地より脾臓の質を良好に保持し得ることが明らかとなった。

本研究で用いた経門脈的移植モデルでは、他の移植部位と異なりグラフト自身が発現するTFに起因する即時型血液媒介性炎症反応 (instant blood-mediated inflammatory reaction: IBMIR) が起こることが知られている^{31,32)}。従って、本モデルにおける脾臓の品質を正確に反映するためには、脾臓の機能やバイアピリティーの評価だけでは不十分である。そこで、われわれは抗ラットTF抗体を作製し、脾臓グラフト自身が発現するTFの半定量化を評価項目へ追加した。検討により、新鮮脾臓においてTFの発現が低いことが判明し、これが移植成績の向上をもたらした一因であると推察される。注目すべきは、新鮮脾臓においても一定量のTFの発現を認めたことである。このことは、適切な移植前短期培養を行いグラフトが発現するTFを効果的に制御することにより、移植成績がさらに向上し得る可能性を示唆している。

本検討における培養群においては、血清群の脾臓の質が、無血清群に比べ良好であった。同様の報告はこれまでもいくつか認められている^{10,19,30)}、その効能機序はいまだ明瞭ではない。本研究においては、血清培養群の脾臓におけるTF発現量は制御されなかつ

たものの、糖負荷試験やインスリン量は無血清群に比べ良好に保持されていた。この結果は、血清が豊富に含有している諸因子により膵島の機能が賦活化されたことを示唆している。しかし、血清の臨床応用は供給経路の確保や未知のウイルス混入のリスクといった社会的問題を兼ね備えているため、血清効果の中核を成している因子を解析・同定し、血清群に遜色のない無血清培地を作製することが今後必要であると思われる。

新鮮膵島と培養膵島に関するこれまでの多くの研究は、移植時にグラフト量の補正を行い両群の移植膵島数を一致させた条件下で検討が行われていた^{19,20,24,34-36)}。しかし、実際の臨床においては培養後にグラフト数の補正を行うことは不可能であり、培養効果を正確に把握するためには、補正を行わない実験系が不可欠である。新鮮膵島移植と培養膵島移植の効果に関する統一見解が得られていない最大の要因は、ここに存在すると考えられる。本研究の結果、グラフト量の補正の有無により移植効果が顕著に変わることが明らかとなった。移植結果がグラフト量の補正により飛躍的に上昇した Miami 培地群においても、培養中の膵島生存率自体に大きな変化は認めなかった。本検討においては、移植結果がグラフト量の補正により飛躍的に上昇した Miami 培地群においても、培養中の膵島生存率自体に大きな変化は認めなかった(図1)。しかし、培養期間中に膵島サイズの縮小化や辺縁形態の不整化(図2, 3D)が認められたことを考慮すると、移植膵島数の一致に際し、容易に視認できるこれらの条件の補正を通し膵島の品質が大きく是正されたと考えられる。従って顕著な移植結果の差異は、グラフトの数そのものではなく、補正時に生じるグラフト形態に基づく“膵島の品質”に起因するものであると推察される。

このように、新たに構築した膵島評価法と臨床に準じグラフト量の補正を行わない移植実験モデルを用いることにより、新鮮膵島が培養膵島を大きく凌駕することが判明した。

謝辞：本研究は、日本学術振興会科学研究費基盤Bおよび中島記念国際交流財団の助成を受けた。稿を終えるにあたり、本研究にご協力いただいた東北大学国際高等研究教育機構後藤研究室の猪村武弘、真屋 梢、後藤めぐみ各氏に感謝致します。

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* 2000; 343: 230-238.
- 2) Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, *et al.* Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001; 50: 710-719.
- 3) Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, *et al.* Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002; 51: 2148-2157.
- 4) Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, *et al.* International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355: 1318-1330.
- 5) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, *et al.* Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-2069.
- 6) Markmann JF, Deng S, Desai NM, *et al.* The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1423-1429.
- 7) Lee TC, Barshes NR, Brunricardi FC, *et al.* Procurement of the human pancreas for pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 481-483.
- 8) Goto M, Johansson U, Eich TM, *et al.* Key factors for human islet isolation and clinical transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1315-1316.
- 9) 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* 2003; 75: 1524-1527.
- 10) Goto M, Eich TM, Felldin M, *et al.* Refinement of the automated method for human islet isolation and presentation of a closed system for in vitro islet culture. *Transplantation* 2004; 78: 1367-1375.
- 11) King A, Lock J, Xu G, *et al.* Islet transplantation outcomes in mice are better with fresh islets and exendin-4 treatment. *Diabetologia* 2005; 48: 2074-2079.
- 12) Matsumoto S, Yamada Y, Okitsu T, *et al.* Simple evaluation of engraftment by secretory unit of islet transplant objects for living donor and cadaveric do-

- nor fresh or cultured islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3435-3437.
- 13) Olsson R, Carlsson PO. Better vascular engraftment and function in pancreatic islets transplanted without prior culture. *Diabetologia* 2005; 48: 469-476.
 - 14) Yasunami Y, Ryu S, Ueki M, *et al.* Donor-specific unresponsiveness induced by intraportal grafting and FK 506 in rat islet allografts: importance of low temperature culture and transplant site on induction and maintenance. *Cell Transplant* 1994; 3: 75-82.
 - 15) Ryu S, Yasunami Y. The necessity of differential immunosuppression for prevention of immune rejection by FK 506 in rat islet allografts transplanted into the liver or beneath the kidney capsule. *Transplantation* 1991; 52: 599-605.
 - 16) Ketchum RJ, Moore WV, Hegre OD. Increased islet allograft survival after extended culture by a mechanism other than depletion of donor APCs. Lack of correlation between the elimination of donor MHC class II-positive accessory cells and increased transplantability. *Transplantation* 1992; 54: 347-351.
 - 17) Malejczyk M, Malejczyk J, Abgarowicz K, *et al.* Immunogenicity of allogeneic pancreatic islet grafts: the effect of in vitro culture and the site of transplantation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1989; 37: 11-16.
 - 18) Warnock GL, Dabbs KD, Cattral MS, *et al.* Improved survival of in vitro cultured canine islet allografts. *Transplantation* 1994; 57: 17-22.
 - 19) Andersson A. Isolated mouse pancreatic islets in culture: effects of serum and different culture media on the insulin production of the islets. *Diabetologia* 1978; 14: 397-404.
 - 20) Tatarkiewicz K, Garcia M, Lopez-Avalos M, *et al.* Porcine neonatal pancreatic cell clusters in tissue culture: benefits of serum and immobilization in alginate hydrogel. *Transplantation* 2001; 71: 1518-1526.
 - 21) Froud T, Ricordi C, Baidal DA, *et al.* Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant* 2005; 5: 2037-2046.
 - 22) Hering BJ, Kandaswamy R, Harmon JV, *et al.* Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 diabetes with anti-CD3 anti-body. *Am J Transplant* 2004; 4: 390-401.
 - 23) Carter J, Karmiol S, Nagy M, *et al.* Pretransplant islet culture: a comparison of four serum-free media using a murine model of islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3446-3449.
 - 24) Rijkkelijkhuizen JK, van der Burg MP, Töns A, *et al.* Pretransplant culture selects for high-quality porcine islets. *Pancreas* 2006; 32: 403-407.
 - 25) Rush BT, Fraga DW, Kotb MY, *et al.* Preservation of human pancreatic islet in vivo function after 6-month culture in serum-free media. *Transplantation* 2004; 77: 1147-1154.
 - 26) Goto M, Holgersson J, Kumagai-Braesch M, *et al.* The ADP/ATP ratio: A novel predictive assay for quality assessment of isolated pancreatic islets. *Am J Transplant* 2006; 6: 2483-2487.
 - 27) Omer A, Duvivier-Kali V, Fernandes J, *et al.* Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets. *Transplantation* 2005; 79: 52-58.
 - 28) Wennberg L, Song Z, Bennet W, *et al.* Diabetic rats transplanted with adult porcine islets and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunomide remain normoglycemic for up to 100 days. *Transplantation* 2001; 71: 1024-1033.
 - 29) Noguchi H, Ueda M, Nakai Y, *et al.* Modified two-layer preservation method (M-Kyoto/PFC) improves islet yields in islet isolation. *Am J Transplant* 2006; 6: 496-504.
 - 30) Nakano M, Matsumoto I, Sawada T, *et al.* Caspase-3 inhibitor prevents apoptosis of human islets immediately after isolation and improves islet graft function. *Pancreas* 2004; 29: 104-109.
 - 31) Goto M, Groth CG, Nilsson B, *et al.* Intraportal pig islet xenotransplantation into athymic mice as an in vivo model for the study of the instant blood-mediated inflammatory reaction. *Xenotransplantation* 2004; 11: 195-202.
 - 32) Goto M, Johansson H, Maeda A, *et al.* Low molecular weight dextran sulfate prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets. *Transplantation* 2004; 77: 741-747.
 - 33) Johansson H, Lukinius A, Moberg L, *et al.* Tissue

- factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 1755-1762.
- 34) Matsumoto S, Goel S, Qualley S, *et al.* A comparative evaluation of culture conditions for short-term maintenance (<24 hr) of human islets isolated using the Edmonton protocol. *Cell Tissue Bank* 2003; 4: 85-93.
- 35) Rutzky LP, Bilinski S, Kloc M, *et al.* Microgravity culture condition reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets 1. *Transplantation* 2002; 74: 13-21.
- 36) Bohman S, Andersson A, King A. No differences in efficacy between noncultured and cultured islets in reducing hyperglycemia in a nonvascularized islet graft model. *Diabetes Technol Ther* 2006; 8: 536-545.