

200817007A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 寺岡 慧

平成 21 年(2009)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. 「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 ……………13
2. 「膵管内 p38MAPK inhibitor 注入によるイヌ膵島分離成績の向上」および「ヒト膵島分離・凍結保存」に関する研究	剣持 敬 ……………17
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 ……………26
4. 「膵島前駆細胞から膵島への分化培養法の開発」および「早期移植膵島傷害の機序としての血液凝固性炎症反応の制御」に関する研究	岩永康裕 ……………27
5. 早期移植膵島傷害の機序としての炎症性メディエーター発現の制御に関する研究	里見 進 ……………32
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 ……………37
7. 移植膵島におけるオートファジー様細胞死の意義と分子機構の解析に関する研究	伊藤壽記 ……………39
8. 初回膵島移植後データの予備的検討、臨床試験実施計画書の作成に関する研究	山口拓洋 ……………43
9. 膵島移植医療におけるエンドポイント設定に関する研究	嶋澤るみ子 ……………45
10. 膵島移植医療における Quality of Life に関する研究	畑中暢代 ……………48
11. 膵消化酵素 Liberase HI における牛由来プリオンのバイオアッセイ	毛利資郎 ……………58
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	……………61
IV. 研究成果の刊行物・別冊	……………67

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

研究代表者：寺岡 慧 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター外科教授
同 先端生命医科学研究所代用臓器学教授

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の抽出物が添加されていたことが判明し、2007 年 3 月以降臨床膵島移植は中断された。これまでに 18 例 (34 回) に対して **Liberase HI** を用いた臨床膵島移植が実施されたが、実施症例の安全性を確認するために、**Liberase HI** に **BSE** プリオンが混入しているか否かについて検討する目的で、**BSE** プリオン蛋白質遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスの脳内に **Liberase HI** を注入し、その影響を確認中である。

臨床膵島移植の再開を目指して、哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素 (**Liberase・MTF**) を用いてブタ膵島分離実験を行った。また膵島分離過程において膵島の **viability** を維持しつつ膵島収量を増加させるための膵消化の至適条件を検討する目的で、消化回路内溶液の **ATP** を含む **adenine nucleotide (AN)** を測定した。さらに移植前膵島培養時に **Mitomycin C (MMC)** を添加することによって膵島生着延長効果が得られることを前年度報告したが、その機序として **MMC** 添加により膵島中心部の壊死領域が有意に縮小すること、**p53** および **p21waf1** タンパクの発現亢進が認められたが、**p-Akt** や **caspase-3** の発現は変化しなかったことが確認された。より効率的な膵島分離を目指してイヌ膵島分離モデルにおいて **p38MAPK inhibitor** の膵管内注入を行い、膵島細胞の **apoptosis** 抑制効果による膵島収量の増加を確認した。またバンキングシステムを目指して膵島の凍結保存の検討を行ってきたが、さらに保存後の膵島回復率を改善させる目的で、磁場環境下での食品凍結保存技術である **Cell Alive System**、あるいは **Prokept** を用いた電磁波過冷却法などの膵島保存への応用について検討を加えた。

臨床膵島移植における成績向上の最大の障壁は、早期移植膵島傷害および長期生着不全であり、とくに前者の克服は 1 回の膵島移植によりインスリン離脱を目指す”1-donor to 1-recipient”の移植の実現にとって不可欠である。前者の機序として血液凝固性炎症反応 (**Intact Blood-mediated Inflammatory Reaction, IBMIR**)、肝内の **NKT** 細胞を介する活性化好中球による傷害などが前年度までの研究によって明らかにされている。**IBMIR** を軽減する基礎的検討によって **Agent R** という糖質の添加が **IBMIR** を軽減しうる可能性が示唆された。さらに早期移植膵島傷害に膵島が発現する炎症性メディエーターが関与している可能性が検討され、その結果膵島に発現した **tissue factor (TF)** および **monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1)** が、膵島分離操作などの過程で虚血傷害が加わることによりその発現が顕在化することが明らかとなった。またマウス肝内膵島移植モデルの検討において、アデノシンおよびアデノシントランスポーター阻害薬である **dypiridamole** が膵島移植後肝内 **NKT** 細胞ならびに好中球からの **IFN- γ** 産生を抑制し、同種膵島移植モデルにおいて抗 **CD4** 抗体とアデノシンの投与によって”1-donor to 1-recipient”の移植が達成された。

長期生着不全の克服については移植膵島の再生促進とオートファジー様細胞死の抑制の面から検討が行われた。前者については従来膵島分離過程で廃棄されていた組織中に膵島前駆細胞が存在すること

が明らかとなり、この前駆細胞から膵島への分化培養方法の開発し、前駆細胞からインスリン陽性細胞への分化を確認した。また従来臨床膵島移植における免疫抑制薬として使用されてきた sirolimus 自体が膵島のオートファジーを誘導することが明らかとなり、オートファジー阻害薬である 3-methyladenine (3-MA) がオートファジー誘導のマーカー LC3-II タンパクの膵島内蓄積を抑制し、膵島の viability およびインスリン分泌能を改善させることが判明した。

これまでに実施された臨床膵島移植症例の初回移植後の C-peptide、HbA1c などの各パラメーター間の関係について検討し、さらに臨床膵島移植におけるエンドポイントの検討から HbA1c、重症低血糖発作の頻度などの数値データに加えて QOL に直結する低血糖症状に基づく評価が重要であると考えられた。膵島移植医療においては QOL の改善、満足度の向上が重要であり、前年度までの研究結果に基づいて、本年度は新たに患者満足度、期待度に関する意識調査を行った。

A. 研究目的

近年増加しつつあり、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。製造工程にウシ脳の抽出物が用いられていた Liberase HI に代わりうる、哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素である Liberase-MTF 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 to 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、その傷害機序として同種免疫応答 (慢性拒絶反応)、自己免疫機序、オートファジー様細胞死、さらに膵島再生不全などがあげられ、膵島移植の長期生着を改善する目的でこの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。

B. 研究方法

1. 移植膵島の 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 (後藤満一分担研究者)

1) Wistar ラットおよびブタ膵消化試験

Wistar ラット膵およびブタ膵消化を行い、その過程で経時的に膵組織、および閉鎖回路内溶液を採取し、adenine nucleotide (AN) を測定して膵島収量との関係を検討した。

2) 移植前膵島の MMC 処置による膵島生着延長効果の検討

移植前に膵島を MMC の存在下に培養し、膵島の形態学的変化を電顕で観察するとともに、誘導される遺伝子をマイクロアレイにより検討した。

3) Liberase-MTF によるブタ膵島分離

哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素 (Liberase-MTF) を用いてブタ膵島分離実験を他施設合同で行い、その条件、収量について検討した。

4) わが国における臨床膵島移植の成績

これまでに実施された 18 例 (34 回) の膵島移植の長期機能について検討を加えた。

5) 膵消化酵素 Liberase HI における牛由来プリオンのバイオアッセイ (毛利資郎動物衛生研究所プリオンセンター所長、寺岡 慧研究代表者より研究委託)

これまでに臨床膵島移植を実施した 18 例 (34 回) の安全性を確認するために、Liberase HI に BSE プリオンが混入しているか否かについて検

討した。BSE プリオン蛋白質遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスの脳内に Liberase HI を注入し、BSE プリオンのバイオアッセイを行った。

2. 効率的膵島分離法の開発と膵島凍結保存法の開発 (剣持 敬分担研究者)

1) 効率的膵島分離法の開発

より効率的な膵島分離を目指してイヌ膵島分離モデルにおいて p38MAPK inhibitor の膵管内注入を行い、膵島収量と膵島細胞の apoptosis 抑制効果について検討した。

2) 膵島凍結保存法の開発

また将来のバンキングシステムを目指して膵島の凍結保存の検討を行った。前年度までに細胞傷害性を抑制する膵島凍結保存法 (CHIBA CRYO TECHNIQUE) を開発してきたが、さらに保存後の膵島回復率を改善させる目的で、磁場環境下での食品凍結保存技術である Cell Alive System、および Prokept を用いた電磁波過冷却法によりラット膵島保存を行い、その効果について検討を加えた。

3. 膵島輸送条件に関する研究 (黒田嘉和分担研究者)

ラット膵島を 22°C RPMI (1 群)、4°C UW 液 (2 群) および、それぞれに酸素化 PFC を加えた (3、4 群) 条件下で 24 時間保存後、保存膵島の機能評価を行った。

4. 移植膵島傷害の機序の解明と制御法の開発 (岩永康裕、里見 進、安波洋一、伊藤壽記各分担研究者)

移植膵島傷害の機序として血液凝固性炎症反応 (Intact Blood-mediated Inflammatory Reaction, IBMIR)、肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による傷害、オートファジー様細胞死などが前年度までの研究によって明らかにされている。本年度は下記の検討を行った。

1) 血液凝固性炎症反応の制御 (岩永康裕分担研究者)

血液凝固性炎症反応の制御法の探索的検討を行った。ルーブチューブ内で、Agent R で処理したブタ膵島をヒト血液と揺動させながら共培養

し、その後に採取した血液の組成を分析した。

2) 炎症性メディエーター発現制御法の開発 (里見 進分担研究者)

膵島が発現する炎症性メディエーターが早期移植膵島傷害に関与している可能性に着目し、脳死ラットモデルを用いて、脳死ならびに膵島分離操作が膵島における tissue factor (TF) monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) 遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。

3) 肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による膵島傷害の制御 (安波洋一分担研究者)

マウス肝内同種同系膵島移植モデルにおいて、アデノシン投与が膵島生着率に与える効果、ならびに肝内単核球 FACS 解析による NKT 細胞、好中球からの IFN- γ 産生に与える影響について検討した。さらに α -galactosylceramide 刺激後の NKT 細胞、好中球からの IFN- γ 産生に及ぼすアデノシンの効果についても検討した。

同種異系膵島移植 (BALB/c \rightarrow B6) において抗 CD4 抗体とアデノシンの投与し、その生着効果を検討した。さらにアデノシントランスポーター阻害薬である dypiridamole についても上記の効果について検討した。

4) 移植膵島傷害におけるオートファジー様細胞死の関与と分子機構の解析 (伊藤壽記分担研究者)

マウス分離膵島を sirolimus (SRL) 存在下で培養した後に、オートファジー誘導マーカーである LC3-II の発現 (Western blot)、膵島の viability (MTS assay)、インスリン分泌能について検討した。

SRL 処理とともにオートファジー阻害薬である 3-methyladenine (3-MA) の存在下でマウス分離膵島を培養し、LC3-II の発現 (Western blot)、膵島の viability (MTS assay)、インスリン分泌能について検討した。

5. 膵島移植におけるエンドポイントの設定と移植後データの解析 (山口拓洋、嶋澤るみ子各分担研究者)

哺乳類成分を含まず GMP 基準をクリアした膵

消化酵素が入手できないため臨床膵島移植が再開されなかったことから、米国 Clinical Islet Transplantation (CIT) Study のプロトコール (CIT-06 および CIT-07) のプライマリーエンドポイントを用いて、国内 18 症例 (34 移植) の評価を行った。さらに初回膵島移植後の C-peptide、HbA1c などの各パラメーター間の関係を、相関係数や回帰モデルを用いて検討し、これらを臨床膵島移植の再開に向けた臨床試験実施計画書の作成に反映させた。

6. 膵島移植医療における QOL に関する研究 (畑中暢代分担研究者)

膵島移植医療においては QOL の改善、満足度の向上が重要であり、前年度までに受けた 778 件の医療相談の内容をカテゴリー分けし、糖尿病患者の特異的 QOL 尺度について検討した。これらの作業後 5 段階の Likert 型尺度を持つ、8 分野合計 50 項目からなるアンケート用紙を作成し、その過程において糖尿病専門医および統計専門家により、新規尺度の内容妥当性について検討した。上記の過程で作成されたアンケート用紙を用いて 108 名の 1 型糖尿病患者に対して調査を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 移植膵島の 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 (後藤満一分担研究者)

1) Wistar ラットおよびブタ膵消化試験

回路内 ATP レベルは 25 分で頂値に達し、30 分を過ぎると急速に減少した。膵島収量は消化開始後 30~35 分で頂値に達することから、回路内 ATP レベルは至適消化時期を示すことが明らかとなった。

2) 移植前膵島の MMC 処置による膵島生着延長効果の検討

MMC の添加培養により、膵島中心部の壊死領域は有意に縮小し、p53 および p21waf1 タンパクの発現亢進が認められた。しかし p-Akt や caspase-3 の発現は変化しなかった。MMC 添加培養により膵島の中心壊死が軽減され、細胞周期

停止を誘導するタンパクの発現が増加することが判明した。

3) Liberase-MTF によるブタ膵島分離

哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素 (Liberase-MTF)、Serva collagenase、Liberase HI を用いてブタ膵島分離実験を他施設合同で行った結果、Serva collagenase で最も回収率が低く、viability (AO/PI)、ADP/ATP 比については 3 群間に有意差は認められなかった。

4) わが国における臨床膵島移植の成績

これまでに実施された 18 例 (34 回) の膵島移植の長期機能について検討を加えた結果、C-peptide 分泌からみた膵島生着率は 1 年で 73.3%、2 年で 58.7%であった。また移植術および免疫抑制薬による合併症は非常に少なく、その安全性が確認された。

5) 膵消化酵素 Liberase HI における牛由来プリオンバイオアッセイ (毛利資郎動物衛生研究所プリオンセンター所長、寺岡 慧研究代表者より研究委託)

Liberase HI は強力な消化酵素活性を有するため、加熱による酵素活性の失活が必要であった。また接種部位を脳内接種から腹腔内接種に切り替えて経過を観察中である。

2. 効率的膵島分離法の開発と膵島凍結保存法の開発 (剣持 敬分担研究者)

1) 効率的膵島分離法の開発

イヌ膵島分離モデルにおいて p38MAPK inhibitor の膵管内注入を行った群は対照群に比べて、有意な膵島収量の増加を確認した。TUNEL 法およびレーザースキュンサイトメトリー法を用いた検討で、 β 細胞における apoptosis の比率は p38MAPK inhibitor 膵管内注入群で有意に減少していた。p38MAPK inhibitor 膵管内注入により、膵島細胞の apoptosis が抑制されたことによって膵島収量が増加したものと考えられた。

2) 膵島凍結保存法の開発

イヌ分離膵島を CHIBA CRYO TECHNIQUE で凍結保存後、解凍した膵島の形態は保持され、膵島回復率は 71.2% と良好であり、static

incubation で stimulation index は 1.80 ± 0.78 とインスリン分泌は良好であり、perifusion assay において良好なインスリン分泌を示した。

またヒト凍結膵島 (UCLA にて提供) を解凍後、streptozotocin 投与により糖尿病としたヌードマウスの腎被膜下に移植し、良好な血糖降下効果を確認した。

Cell Alive System 法により凍結保存後、解凍して static incubation を行った結果、CP-1 液による保存が最も良好な stimulation index を示した。また電磁波過冷却法によりラット膵島保存では Prokept 群、UW 群において良好な回復率、stimulation index が示された。

CHIBA CRYO TECHNIQUE に加えて、今後 Cell Alive System 法、Prokept を用いた電磁波過冷却法は、将来のバンキングシステムのための膵島保存に有望な方法と考えられた。

3. 膵島輸送条件に関する研究 (黒田嘉和分担研究者)

保存後の回収率は 4°C UW 液に酸素化 PFC を加えた群 (4 群) で有意に低く、移植実験においても治癒率が低い傾向があった。酸素化 PFC を添加した群においては、ATP 量、energy charge は有意に低く、膵島が接触する PFC の表面張力に曝され integrity が保てない、酸化ストレスによる組織障害などが考えられた。

4. 移植膵島傷害の機序の解明と制御法の開発 (岩永康裕、里見 進、安波洋一、伊藤壽記各分担研究者)

1) 血液凝固性炎症反応の制御 (岩永康裕分担研究者)

血液凝固性炎症反応の制御法の探索的検討を行った。ループチューブ内で、Agent R で処理したブタ膵島をヒト血液と揺動させながら共培養し、その後に採取した血液の組成を分析した結果、血小板の減少速度、血液凝固速度は Agent R 群で最も遅く、血液凝固反応が抑制されたことが示唆された。

2) 炎症性メディエーター発現制御法の開発 (里見 進分担研究者)

脳死ラット群では膵島収量が減少したが、膵島 viability、呼吸活性指数には差が認められず、膵組織の TF および MCP-1mRNA レベルにおいても差は認めなかった。しかし分離膵島における TF および MCP-1mRNA レベルは脳死群で有意に上昇していた。

脳死は分離膵島における炎症性メディエーター発現を誘導するイニシエーターの役割を果たしており、これに分離操作という虚血傷害が加わることによりその発現が顕在化するものと考えられた。

3) 肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による膵島傷害の制御 (安波洋一分担研究者)

マウス肝内同種同系膵島移植モデルにおいて、1 回のアデノシン投与により 1-donor to 1-recipient の膵島移植が達成された。肝内単核球 FACS 解析によってアデノシン投与群では NKT 細胞、好中球からの $\text{IFN-}\gamma$ 産生が抑制された。さらに α -galactosylceramide 刺激後の NKT 細胞、好中球からの $\text{IFN-}\gamma$ 産生が、アデノシン投与により抑制された。

同種異型膵島移植 (BALB/c \rightarrow B6) において、抗 CD4 抗体およびアデノシンの投与により、1-donor to 1-recipient の膵島移植が達成された。

さらにアデノシントランスポーター阻害薬である dypiridamole についてもアデノシンと同様に早期移植膵島傷害を軽減する作用を有することが確認された。

4) 移植膵島傷害におけるオートファジー様細胞死の関与と分子機構の解析 (伊藤壽記分担研究者)

SRL 存在下で培養したマウス分離膵島では、オートファジー誘導マーカーである LC3-II タンパクの発現は有意に増加し、マウス膵島にオートファジーが誘導されていることが確認された。MTS assay による解析の結果、膵島の viability は SRL により有意に低下した。さらに static glucose challenge test によるインスリン分泌能の検討では、SRL により stimulation index が有意に低下した。

3-MA によるオートファジーブロックングでは、LC3-II タンパクの発現が抑制され、viability およびインスリン分泌能は回復した。

Edmonton protocol において不可欠の免疫抑制薬とされてきた SRL が、実は逆にオートファジー誘導を介して早期移植膵島傷害、インスリン分泌低下に関与していたことが明かとされ、3-MA により膵島のオートファジーが抑制されることが判明した。

5. 膵島移植におけるエンドポイントの設定と移植後データの解析 (山口拓洋、嶋澤るみ子各分担研究者)

サンプルサイズからあくまで探索的な検討にすぎないが、C-peptide と HbA1c の関係は、移植後の時間により一定の傾向は認められなかった。評価項目としてどの時点でのパラメーターを用いるかが重要であるかが示唆された。

主要評価項目を初回膵島移植 1 年後の HbA1c 7.0 以下かつ重症低血糖発作の消失とし、期待割合を 70%、閾値割合を 40%、検定の有意水準を片側 5%、検出力を 80% として、20 人を目標サンプルサイズとした。

CIT 臨床試験のエンドポイントとして CIT-06 では移植後 1 年後 HbA1c < 6.5% かつ重症低血糖発作の消失とされ、CIT-07 では移植後 1 年後 HbA1c < 7.0% かつ移植後 1 年間の重症低血糖発作の消失である。国内 18 症例中 14 例で初回移植 1 年後の HbA1c が測定されており、HbA1c < 7.0% は 14 例中 10 例であり、HbA1c < 6.5% は 14 例中 5 例であった。

重症低血糖発作についてはわが国の臨床膵島移植症例においては調査がなされていないため解析できなかった。重症低血糖発作の有無、その程度、頻度は患者の QOL にとって非常に重要な指標であり、膵島移植前および後に必ず調査し評価項目とするのが妥当と考えられた。

6. 膵島移植医量における QOL に関する研究 (畑中暢代分担研究者)

108 名の 1 型糖尿病患者に対するアンケート調査の結果、8 割以上がインスリン治療からの開放

を希望し、移植医療に対する興味や期待を有していたが、実際に膵島移植を希望する割合は 66% に止まった。移植希望者と非希望者の糖尿病罹病期間については、前者で 8.4 ± 8.2 年、後方で 12.5 ± 8.2 年と希望者で有意に短かった。低血糖症状の頻度は前者で 13.7 ± 17.9 回/月、後方で 9.1 ± 7.8 回/月で希望者に多い傾向にあった。しかし無自覚性低血糖の頻度は、前者で 12.0 ± 27.4 回/月、後方で 2.2 ± 2.8 回/月であり、移植希望者で有意に多かった。

また上記調査の結果、QOL に影響する因子として、低血糖症状 ≥ 5 回/月以上、女性、40 歳以上、成人発症糖尿病、罹病期間 < 3 年などがあげられた。

D. 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。これらについては今年度までの研究において、ほぼ達成できた。とくに哺乳類成分を一切含まない新しい膵消化酵素である Liberase-MTF の効果が他施設共同実験によって確認された。これで GMP 基準の新 Liberase が入手できれば、臨床膵島移植の再開が可能となる。

また膵島移植の成績の向上には、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。早期移植膵島傷害の機序として血液凝固性炎症反応 (IBMir)、肝内の NKT 細胞を介する活性化好中球による傷害、オートファジー様細胞死などが明かとされ、さらに後二者については今年度の研究でその制御法が開発されつつある。これについてはわが国が世界に向けて発信できるオリジナルな研究成果である。

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が、臨床膵島移植医療におけるエンドポイントとして C-peptide、HbA1c、重症低血糖発作の消失などが確定し、最終的な臨床膵島移植

再開に向けての実施計画書が完成した。

従来膵消化酵素として使用してきた **Liberase HI** の製造工程においてウシ脳の抽出物が使用されていたことが判明して以来、臨床膵島移植は中断されたままとなっているが、**GMP** 基準の哺乳類成分を一切含まない新しい **Liberase** が入手でき次第臨床膵島移植を再開すべく、再開に向けての準備は完了したと言える。

E. 研究発表

1. 主な論文発表

- 1) 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 : 225-256, 2008
- 2) 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 : 201-214, 2008
- 3) 伊藤壽記、寺岡 慧. 移植膵の長期予後. [出月康夫、野沢真澄 (監)、寺岡 慧、伊藤壽記 (編)] : 371-377, 2008
- 4) 寺岡 慧. 膵臓移植の現況と課題. プラクティス別冊糖尿病の治療 新たなる展開 : 113-119, 2008
- 5) 寺岡 慧. 膵臓移植と膵島移植. 消化器外科学レビュー2009 : 159-165, 2009
- 6) 中島一郎、寺岡 慧. マージナルドナーからの膵臓移植. *Organ Biology*15(2) : 129-137, 2008
- 7) 瀧之上昌平、寺岡 慧. 【腎移植】腎移植の実際 糖尿病性腎症と腎移植. 臨床検査 52(7) : 778-782, 2008
- 8) 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
- 9) 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

- 10) 寺岡 慧. 腎臓移植. *からだの科学*(255) : 155-170、2007

2. 主な学会発表

1) 口頭発表

- 1) ABO incompatible kidney transplantation. Satoshi Teroaka. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong. 2008
- 2) Transplantation in Japan. Satoshi Teroaka. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong. 2008
- 3) Donation after cardiac death in Japan. Satoshi Teroaka. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong. 2008
- 4) Donation after brain death in Japan. Satoshi Teroaka. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong. 2008
- 5) マージナルドナーからの膵臓移植膵臓移植適応と限界. 小川勇一、頓所 展、寺岡 慧、他. 第44回日本移植学会総会. 2008年
- 6) 糖尿病腎不全に対する腎移植の現況と今後の展望. 寺岡 慧. 第23回糖尿病合併症学会. 2008年
- 7) 腎症 : 腎不全・透析・移植 1型糖尿病患者における膵移植後の移植腎病理組織の変化. 入村 泉、馬場園哲也、寺岡 慧、岩本安彦、他. 第23回日本糖尿病合併症学会. 2008年
- 8) CKD 特に末期腎不全の治療法の選択 糖尿病性末期腎不全に対する治療法の選択. 馬場園哲也、新田孝作、田辺一成、寺岡 慧. 第53回(社)日本透析医学会学術集会・総会

2008年

- 9) 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
- 10) 本邦における膝・膝島移植の現状. 寺岡 慧. 第10回近畿膝移植検討会. 2007年
- 11) 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
- 12) 膝移植後の抗凝固療法. 小川勇一、中島一朗、寺岡 慧、他. 第35回膝・膝島移植研究会. 2008年
- 13) 糖尿病根治へのブレイクスルー. 寺岡 慧. 第34回膝・膝島移植研究会. 2007年

2) 司会/特別発言

- 1) 移植ドナー選択における倫理問題-病的臓器の移植はどこまで許容されるか-. 寺岡 慧. 第108回日本外科学会総会. 2008年
- 2) 臓器移植法の改正に向けて-これでいいのか日本の臓器移植法. 寺岡 慧. 第42回日本臨床腎移植学会. 2008年
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 今後の展望-膝臓移植 vs. 膝島移植. 寺岡 慧. 第35回膝・膝島移植研究会. 2008年
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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

F. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

II. 分担研究報告

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

「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

分担研究者 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：アデノシン測定により膵島分離中の膵島のviabilityを評価する実験系を小動物（ラット）および大動物（ブタ）で確立した。これにより膵島移植手技の客観化・標準化が可能となり、また、膵島収量を増加あるいは膵島viabilityを維持のための種々のmodificationを評価することが可能となり、膵消化の至適条件を検討することが可能となった。また移植前培養時のマイトマイシン処置は移植後膵島の生着延長効果を示すが、膵島培養中にマイトマイシンを短時間添加することにより、膵島の中心壊死が軽減され、細胞周期停止を誘導するタンパクの発現が上昇することを明らかにした。さらに、本邦の臨床膵島移植成績を集計し、今後の展開の必須要件を明らかにした。臨床膵島移植では初回膵島移植から1年、2年後における膵島生着率がそれぞれ73.3%、58.7%で、合併症は低頻度であった。この結果は世界的に特筆に値するものとなった。わが国の卓越した分離技術をもとに膵島の長期生着が期待できる新たな免疫抑制プロトコールを計画し、多施設共同研究を実施する。また、高度医療実施に関する申請を行う。

A. 研究目的

膵島分離では、その過程でグラフト内に含まれる多くの膵島が失われている。膵島移植の治療成績を向上させるためには、より多くの膵島を回収することは重要な課題である。しかしながら、現在行われている膵消化は消化液の検鏡で消化時期をモニターしており、消化終了のタイミングは実施者の経験によって決定されている。すなわち消化回路内溶液を採取し、膵島を染色するdithizone を加え、膵外分泌組織から遊離した膵島の出現を指標としているにすぎない。これまで膵消化過程における消化状態および膵島のviabilityをモニターできる指標がなかったことから、われわれはATPを含むadenine nucleotides (AN)が膵消化状態の指標となるか否かを検討するとともに、過消化液中による膵島障害について検討した。

また、われわれはこれまで移植前膵島培養時に30分間Mitomycin (以下MMC)を加えることにより膵島生着延長効果を得られることを報告してきたが、この際に誘導されるmRNAの変化をマイクロアレイにより検討するとともに、膵島の組織学的変化を超微形態学的に検討した。

さらに膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局として、膵島分離技術の標準化を目指した多施設合同膵島分離実験を計画、実施し、また、わが国における臨床膵島移植の成績を明らかにした。

B. 研究方法

1) ラット膵消化実験

Wisterラットの膵をコラゲナーゼで120分後まで消化した。経時的に膵組織を採取し、ANを測定すると共に組織学的に検討した。また、各消化時間で得られた消化液上清と新鮮分離膵島を混合培養し、さらに、各消化時間で得られた消化液はSDS pageによるタンパク分析を行った。

2) ブタ膵消化実験

Ricordi chamberを用い、ヒト膵島分離に類似させた閉鎖回路を用いた実験系で、ブタ膵消化を行い、回路内容液を経時的に採取し、膵島収量とANの関係を検討した。

3) 移植前膵島MMC処置による膵島生着延長効果の機序の検討

移植前に膵島をMMCの存在下に培養し、誘導される遺伝子をマイクロアレイにより検討した。また、移植前の形態変化を超微形態学的に検討するとともにアポトーシス関連タンパク質の発現を検討した。

4) 膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局
わが国における臨床膵島移植の成績を明らかにするために、膵島移植を実施した症例を対象とし内分泌機能、免疫抑制剤、移植手技に伴う合併症について共通のフォーマットを作成し調査した。また、膵島分離技術の標準化を目指した多施設合同膵島分離実験を実施した。

(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) ラット膵消化実験

図-1

至適消化時間である30分を超えて120分まで過消化を行う系を含めてadenine nucleotideの推移を検討したところ、30分を超えると急速にATP量が減少することが明らかになった(図-1)。組織学的には、膵膨化直後から膵外分泌細胞間隙は経時的に増大し、30分を超えると膵島の形態は周辺部から不正となった。

Changes of ATP content and EC in 150mg of pancreas during collagenase digestion.

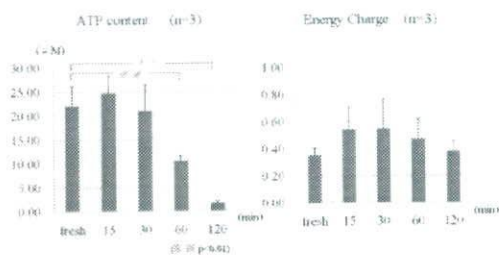
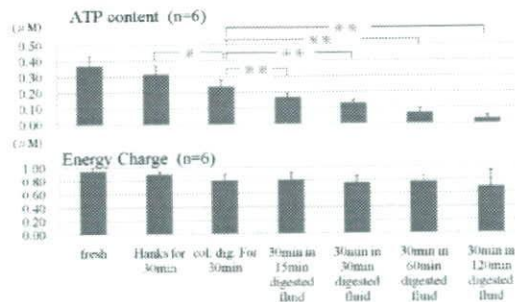


図-2

また、各消化時間で得られた消化上清と新鮮分離膵島を30分間混合培養すると、30分を超える消化液内の培養では急速に膵島のATPも低下した。(図-2)。

各消化時間で得られた消化液のSDS pageによるタンパク分析では、消化時間の長期化に伴い、多くのタンパク質の誘導が観察

Changes of ATP content and EC in 40 islets.

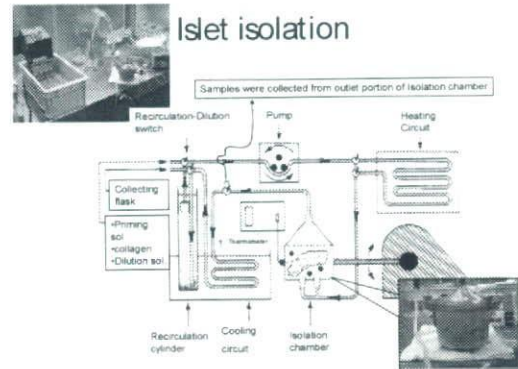


された。

2) ブタ膵消化実験

ヒト膵島分離に使用するRicordi chamberを用いて、ブタ膵を消化し、回路内容液を経時的に採取しATPを測定した(図-3)。

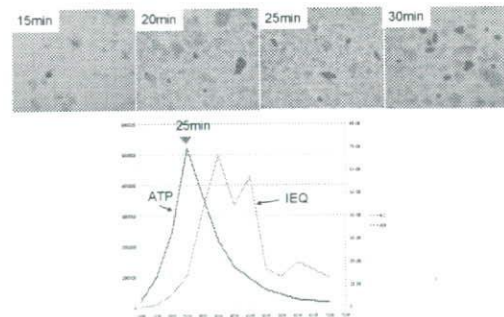
図-3



膵島収量の頂値は消化開始後30~35分に認めたが、回路内ATPレベルは25分前後に頂値を示した。すなわち、回路内ATP量は至適消化時期に先行して上昇した(図-4)。

図-4

Changes of ATP and IEQ during digestion



3) 移植前膵島MMC処置による膵島生着延長効果の機序の検討

移植前に膵島をMMCの存在下に培養し、誘導される遺伝子をマイクロアレイにより検討した

図-5

Gene	Accession #	Gene ID	Function	P fold change
10	U03461	beta-actin	actin	1.0
11	U03461	beta-actin	actin	1.0
12	U03461	beta-actin	actin	1.0
13	U03461	beta-actin	actin	1.0
14	U03461	beta-actin	actin	1.0
15	U03461	beta-actin	actin	1.0
16	U03461	beta-actin	actin	1.0
17	U03461	beta-actin	actin	1.0
18	U03461	beta-actin	actin	1.0
19	U03461	beta-actin	actin	1.0
20	U03461	beta-actin	actin	1.0
21	U03461	beta-actin	actin	1.0
22	U03461	beta-actin	actin	1.0
23	U03461	beta-actin	actin	1.0
24	U03461	beta-actin	actin	1.0
25	U03461	beta-actin	actin	1.0
26	U03461	beta-actin	actin	1.0
27	U03461	beta-actin	actin	1.0
28	U03461	beta-actin	actin	1.0
29	U03461	beta-actin	actin	1.0
30	U03461	beta-actin	actin	1.0
31	U03461	beta-actin	actin	1.0
32	U03461	beta-actin	actin	1.0
33	U03461	beta-actin	actin	1.0
34	U03461	beta-actin	actin	1.0
35	U03461	beta-actin	actin	1.0
36	U03461	beta-actin	actin	1.0
37	U03461	beta-actin	actin	1.0
38	U03461	beta-actin	actin	1.0
39	U03461	beta-actin	actin	1.0
40	U03461	beta-actin	actin	1.0
41	U03461	beta-actin	actin	1.0
42	U03461	beta-actin	actin	1.0
43	U03461	beta-actin	actin	1.0
44	U03461	beta-actin	actin	1.0
45	U03461	beta-actin	actin	1.0
46	U03461	beta-actin	actin	1.0
47	U03461	beta-actin	actin	1.0
48	U03461	beta-actin	actin	1.0
49	U03461	beta-actin	actin	1.0
50	U03461	beta-actin	actin	1.0
51	U03461	beta-actin	actin	1.0
52	U03461	beta-actin	actin	1.0
53	U03461	beta-actin	actin	1.0
54	U03461	beta-actin	actin	1.0
55	U03461	beta-actin	actin	1.0
56	U03461	beta-actin	actin	1.0
57	U03461	beta-actin	actin	1.0
58	U03461	beta-actin	actin	1.0
59	U03461	beta-actin	actin	1.0
60	U03461	beta-actin	actin	1.0
61	U03461	beta-actin	actin	1.0
62	U03461	beta-actin	actin	1.0
63	U03461	beta-actin	actin	1.0
64	U03461	beta-actin	actin	1.0
65	U03461	beta-actin	actin	1.0
66	U03461	beta-actin	actin	1.0
67	U03461	beta-actin	actin	1.0
68	U03461	beta-actin	actin	1.0
69	U03461	beta-actin	actin	1.0
70	U03461	beta-actin	actin	1.0
71	U03461	beta-actin	actin	1.0
72	U03461	beta-actin	actin	1.0
73	U03461	beta-actin	actin	1.0
74	U03461	beta-actin	actin	1.0
75	U03461	beta-actin	actin	1.0
76	U03461	beta-actin	actin	1.0
77	U03461	beta-actin	actin	1.0
78	U03461	beta-actin	actin	1.0
79	U03461	beta-actin	actin	1.0
80	U03461	beta-actin	actin	1.0
81	U03461	beta-actin	actin	1.0
82	U03461	beta-actin	actin	1.0
83	U03461	beta-actin	actin	1.0
84	U03461	beta-actin	actin	1.0
85	U03461	beta-actin	actin	1.0
86	U03461	beta-actin	actin	1.0
87	U03461	beta-actin	actin	1.0
88	U03461	beta-actin	actin	1.0
89	U03461	beta-actin	actin	1.0
90	U03461	beta-actin	actin	1.0
91	U03461	beta-actin	actin	1.0
92	U03461	beta-actin	actin	1.0
93	U03461	beta-actin	actin	1.0
94	U03461	beta-actin	actin	1.0
95	U03461	beta-actin	actin	1.0
96	U03461	beta-actin	actin	1.0
97	U03461	beta-actin	actin	1.0
98	U03461	beta-actin	actin	1.0
99	U03461	beta-actin	actin	1.0
100	U03461	beta-actin	actin	1.0

MMC添加培養3日後で発現亢進あるいは低下した遺伝子を図-5に示す。

また、MMC添加培養による移植前の形態変化を超微形態学的に検討した結果、MMC無添加培養で膵島中心部に出現する細胞死はアポトーシスではなくネクローシスによるものであった(図-6、7)。

図-6

TUNEL staining of islets treated with MMC and cultured for 20hr (counter stain : eosin).

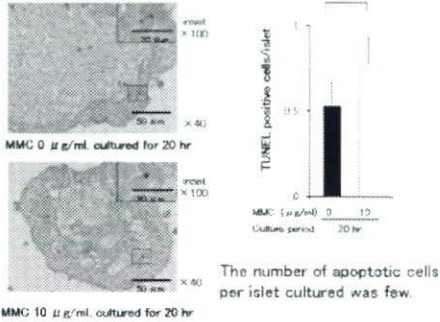
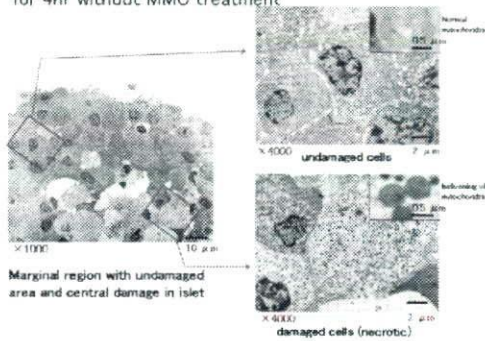


図-7

Electron microscopic observation of islet cultured for 4hr without MMC treatment



この壊死領域は、MMC添加培養により有意に縮小した(図-8)。また、MMC添加培養によりリン酸化p53タンパクおよびp21waf1タンパクの発現亢進を認めたが、p-Aktやcaspase-3の発現は変化を認めなかった(図-9)。

図-8

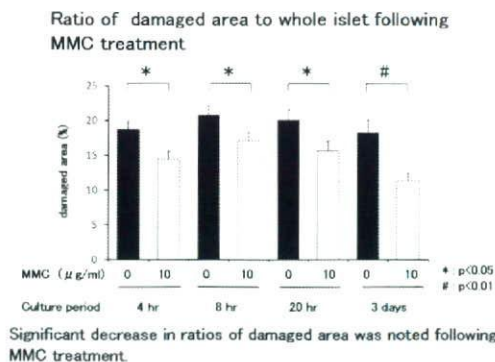
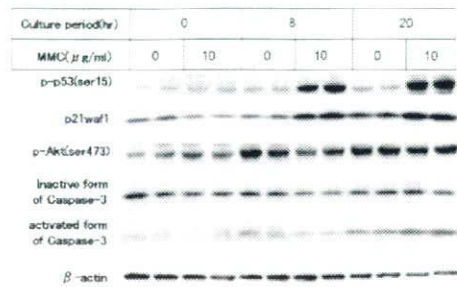


図-9

Western blot analysis of p53, p21waf1, Akt, Caspase-3, and β actin in MMC-treated and cultured islets



4) 膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局として

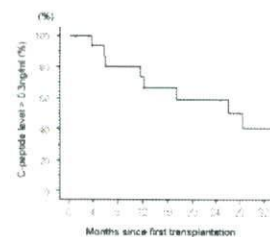
膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局として、膵島分離技術の標準化のために哺乳類成分との接触のない新しい膵消化酵素(Liberase-MTF)を用いた多施設共同によるブタ膵島分離実験を計画・実施した。

またわが国における臨床膵島移植の成績について1年後、2年後における膵島生着率が73.3%、58.7%であることを、内分泌機能の推移とともに報告した(図-10)。

これまでの移植症例における合併症では移植術に伴うものとして、腹腔内出血を1例に認めたがその頻度は0.03%と低く、また免疫抑制剤による副作用は、術前から糖尿病性腎症3B期であった1例に術後免疫抑制剤による腎不全の進行を認めたが、その他はすべて保存的に治癒した。

図-10

膵島生着率



D. 考察

膵消化過程の客観的評価法は適切な消化時期の決定に重要である。小動物と大動物それぞれの系でATPをはじめとするアデノシンの測定を組み合わせることにより、膵消化過程をより客観的に評価することが可能となった。

今後はこれらの系を用いて各種プロテアーゼ阻害剤等による膵島分離効率の改善を目指した検討を予定している。

また移植前膵島に対するMMC処置は膵島生着に寄与することを報告してきたが、この処置により多くの遺伝子の発現が亢進あるいは低下していること、および培養による膵島中心部の障害が主としてネクローシスによるものであり、MMC処置によりこの障害が軽減されることを明らかにした。今後はこれを大動物の実験系に応用し、臨床応用を目指している。

臨床膵島移植では初回膵島移植から1年、2年後における膵島生着率がそれぞれ73.3%、58.7%で、この結果は世界的に特筆に値する。これまでの移植症例における合併症発生率も低かった。これらの検討および欧米における報告に基づき、導入療法としてサイモグロブリンおよび抗IL-2レセプター・モノクローナル抗体、維持療法としてカルシニューリン阻害剤にミコフェノール酸を組み合わせ用いた臨床膵島移植における多施設共同の免疫抑制プロトコルを計画し、実施する予定である。

E. 結論

膵消化過程の客観的評価法により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各施設のTRを導入し、新たなプロトコルを開始することにより更に発展する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 膵・膵島移植研究会 膵島移植班膵島移植症例登録報告 (2008). 移植43(6):482-485, 2008.

2) Gunji T, et al. Mitomycin-C treatment followed by culture produces long-term survival of islet xenografts in rat to mouse model. Cell Transplant. 17(6):619-629, 2008.

2. 学会発表

1) Oshibe I, et al. Adenine nucleotide levels in closed automated enzymatic digestion system for porcine islet isolation: a new aspect of dilution timing. Korea-Japan Transplantation Forum 2008. Korea.

2) Saito T, et al. Morphological and molecular biological assessment of rat islets pretreated with Mitomycin -C before transplantation. Korea-Japan Transplantation Forum 2008. Korea.

3) Saito T, et al. Current status of islet transplantation from non-heart beating donor in Japan: a report from Japan Pancreas Islet Transplantation Registry. ICTS 2008. Australia.

4) Tsukada M, et al. Highly toxic environment to isolated islets during collagenase overdigestion. ICTS 2008. Australia.

5) 後藤満一. 糖尿病治療における膵・膵島移植. 第1回西宮市立中央病院糖尿病センターセミナー. 招請公演. 2008.

6) 後藤満一. 膵・膵島移植の今後の展開. 第11回阪神胆膵疾患研究会. 招請公演. 2008.

7) 齋藤拓朗, 他. 膵島移植の現状と問題点～膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局報告. 第35回膵・膵島移植研究会. 2008.

8) 齋藤拓朗, 他. 膵島移植における連携体制. 第7回日本組織移植学会学術集会. 2008.

9) Current status of islet transplantation from non-heart beating donor in Japan: a report from Japan Pancreas Islet Transplantation Registry. 第35回日本低温医学会. 2008.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

探索医療の成果としての膵島移植医療の確立
「膵管内 p38MAPK inhibitor 注入によるイヌ膵島分離成績の向上」
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

平成21年3月

研究要旨

わが国の臨床膵島移植は心停止ドナー膵を用いていることより、より効率的な膵島分離法、凍結保存法の開発が必要である。今回、イヌ膵島分離モデルにて膵管内 p38MAPK inhibitor 注入による膵島分離成績の向上に関する研究を行い、膵島細胞のアポトーシス抑制による膵島収量の増加効果が確認された。また Hydroxyethyl starch と DMSO を凍結阻害剤とする当施設の膵島凍結保存法はイヌ膵島を良好に保存可能であり、すでに臨床応用している。糖尿病ヌードマウスを用いた in vivo の研究にて、本保存法にて凍結したヒト膵島は解凍後インスリン分泌能を有するが、糖尿病改善には新鮮膵島の約 2 倍の膵島数が必要であった。さらに、われわれは新たな膵島凍結保存法である Cell Alive System による膵島凍結保存法の基礎的研究を、また膵島分離から移植までの膵島保存法の基礎的研究を開始した。今後更に検討し、臨床応用につなげてゆきたい。

A. 研究目的

臨床膵島移植が 2004 年よりわが国で開始され、現在までに 65 回のヒト膵島分離が行われ、18 名の重症糖尿病患者に 34 回の臨床膵島移植が実施された。しかしながら、27 回の膵島分離は、わが国の新鮮膵島移植実施基準を満たさなかったため、各施設で凍結保存されている。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。いわゆるマージナルドナーであ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。したがって、より効率的な膵島分離法の工夫が必要である。現在わが国ではまだ凍結保存膵島の臨床応用はされていないが、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。今回、膵島分離成績向上のため、膵管内 MAPK inhibitor 注入の有効性に関する基礎的研究、当施設の独自の膵島凍結保存法の基礎的研究を行うとともに、新たな凍結保存法や膵島分離から移植までの短時間の保存法についても基礎的検討を開始したので報告する。

B. 研究方法

1. 膵管内 p38MAPK inhibitor 注入によるイヌ膵島分離成績の向上に関する研究。

1) 材料と方法

ビーグル犬(10.4-17.5kg) 12 頭を用いた。麻酔は

ラボナール静脈内麻酔+フォーレン吸入麻酔法にて施行した。膵を全摘し、膵島分離施行した。膵島分離は前年度報告した当院の膵島分離法にて施行した。

2) 実験群

摘出した膵臓の膵管より p38MAPK inhibitor である、SB203580 を含有した UW 液を注入した p38IH 群(n=6)と UW 液のみを注入した Control 群(n=6)の 2 群に分けた。

3) 膵島分離

両群ともに 20~22 時間二層法にて保存した後、膵島分離を行った。

4) 検討項目

膵島収量、ウェスタンブロッティングによる p38MAPK 活性、TUNEL 法および、レーザースキャンサイトメリーを用いた B 細胞のアポトーシス、PCR 法を用いた TNF- α の発現につき検討した。

2. 当施設の膵島凍結保存法の有効性に関する研究

[当施設の凍結保存法]

当施設では、細胞外凍結阻害剤として hydroxyethyl starch (HES) を加えることにより、Dimethyl sulfoxide (DMSO) 濃度を通常量の半分以下に低下させ、細胞傷害性を抑制する独自の膵島凍結保存法(CHIBA CRYO TECHNIQUE)を考案した。すでに報告したが、簡単に方法を述べる。

①膵島を凍結保存液である CP-1 液(極東製薬)に懸濁する。CP-1 液の組成は細胞内凍結阻害剤として、5% DMSO、細胞外凍結阻害剤として 6% HES、更

に4% ヒト血清アルブミンを含有する。

②凍結用バッグ(7005-2, CharterMed Inc., USA)に封入する(図1.)



図1. ヒト膵島凍結用バッグ

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°Cに冷却する(図2.)。



図2. プログラムフリージングシステム

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。

表1. 膵島(ヒト, 大動物)凍結プログラム

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°C
4. 25.0°C/min until chamber=-10°C
5. 0.3°C/min until chamber=-40°C
6. 5.0°C/min until chamber=-80°C

⑤液体窒素タンク(ヒト膵島バンクシステム)内に保存。

2-1. イヌ膵島凍結保存の実験的検討

1) 動物

ビーグル犬(7.5~12kg)5頭を用いた。麻酔はラボナール静脈内麻酔+フォーレン吸入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。膵島分離は前年度報告した当院の

膵島分離法にて施行した。

膵島分離後, Overnight で Serum free medium (CMRL1066, 1%ITS+TMPremix [Insulin(6.25µg/ml), Transferrin(6.25µg/ml), Selenious acid(6.25ng/ml), Linoleic acid(5.35µg/ml), Albumin(1.25mg/ml)], 1%L-glutamine, 1%antibiotic antimycotic solution, 16.8µmol/lzinc sulfate, HEPES(5.95g), NaHCO3(2.0g), Nicotinamide(1.22g), pH7.4)にて培養後, CHIBA CRYO TECHNIQUEにて凍結保存した。

保存後3~7日後に急速解凍し, RPMI1640+10% FBSにて1回洗浄後, 更に Serum free mediumにて24時間培養した。

培養後以下の項目につき検討した。

- 形態
- 膵島回復率
- Static incubation
- Perifusion assay

2-2. ヒト凍結膵島の in vivo 機能試験に関する基礎的研究

1) 材料と動物および方法

ヒト凍結膵島(uclaにて提供, 分離, 凍結保存)を streptozotocin (180mg/kg IV)にて作成した糖尿病ヌードマウスの左腎被膜下に移植した。移植法はすでに報告したが, 左腎の移植部位対側より, 先を鈍とした23G翼状針にて穿刺し, 移植した。

2) 実験群

以下の3群とした。Fresh 1000 群 (n=5):1,000 IEq 新鮮ヒト膵島を移植, CP1000 群 (n=3):1,000 IEq 凍結解凍膵島を移植, CP2000 群 (n=3):2,000 IEq 凍結解凍膵島を移植, の3群とした。

3) 検索項目

新鮮膵島と凍結解凍膵島につき, Static incubationを行った。ヌードマウスは移植後随時血糖値を測定した。また移植後3週間の時点で膵島移植した左腎臓摘出術を施行し, 血糖値の上昇を確認した。

3. 新たな膵島保存法の開発

さらなる有効性を追求し, 当施設では, 新たな膵島保存法の開発を行っている。未だ研究を開始したばかりであり, preliminary のデータである。

3-1. Cell Alive System による新たな膵島凍結保存法の基礎的研究

1) Cell Alive System

Cell Alive System (CAS)はABI社が開発した食

品凍結保存技術である。磁場環境下で、液体窒素を使用せず、60% Ethylen-glycol を-0.5°C/min to -30°Cのプロトコールで凍結する(図3)。植物や食品の解凍後の形態は良く保持されることが示されている(図4)。今回、ABI社との共同研究にて、膵島凍結保存に用いた。

2) 材料と動物および方法

ラット膵島を用い、本凍結保存法に至適の凍結保存液の検討を行った。本法で凍結保存し、2~3日後に急速解凍し、Static incubationを施行した。

3) 実験群

使用する凍結保存液により以下の4群に分けた。CP-1群(n=3)、RPMI群(n=3)、UW群(n=3)、PFC群(n=3)とした。

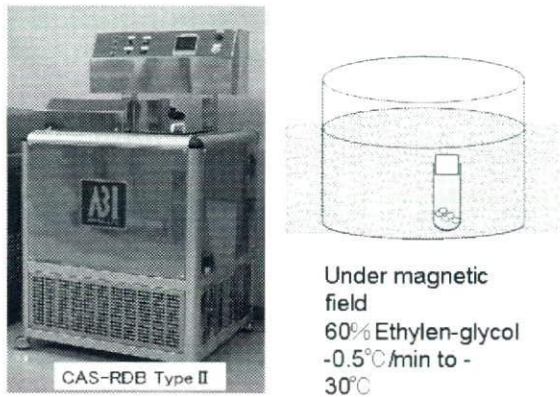
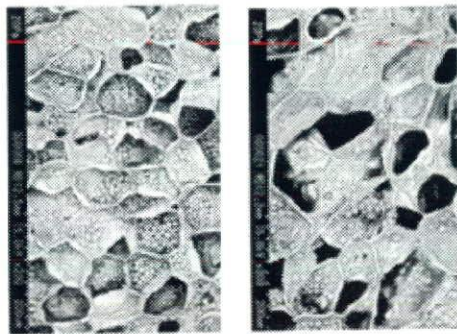


図3. Cell Alive System (CAS)



CAS Conventional

図4. 凍結解凍後のわさびの葉の形態

3-2. 電磁波過冷却法を用いた短時間膵島保存法の基礎的研究。

1) PROKEPT(図5)

PROKEPT はメビックス社が開発した研究用冷却装置で、電磁波環境下で無振動とすることで、-5°Cで

も水が凍らない、いわゆる過冷却を可能とする。今回、膵島分離から移植までの、通常では37°Cの培養を行う行程に有効性があるかを検討した。

2) 材料と動物および方法

ラット膵島を用い、以下の実験群の方法で7日間保存後、形態学的変化、膵島回復率、Static incubationを施行した。

3) 実験群

培養群(n=3): 37°Cで培養保存(Serum free media), UW群(n=3): 4°C UW液単純冷却保存, Prokept群(n=5): 電磁波過冷却装置(Prokept)による-5°C UW液保存, の3群とした。



図5. 電磁波過冷却装置(PROKEPT)

C. 研究結果

1. 膵管内 p38MAPK inhibitor 注入によるイヌ膵島分離成績の向上に関する研究。

1) 膵島収量

両群の膵島収量は、p38IH群が 65,012±9,385 IEQ/pancreas (35,000~98,175)と Control 群の 45,700±5,103 IEQ/pancreas (26,498~58,152) に比較して、有意に収量増加が得られた。また膵臓重量あたりの収量も、p38IH群が 2,134±297 IEQ/g (997.2~2837.4)と Control 群の 1,477±145 IEQ/g (1,118.1~1889.3)に比較して有意に増加した

2) ウェスタンブロッティングによる p38MAPK 活性形態学的検討

図6に示すように、p38IH群では低温保存後も、p-p38/p38で表されるp38MAPK活性は抑制されていたのに対し、Control群では低温保存後にp38MAPK活性の有意な上昇がみられた。

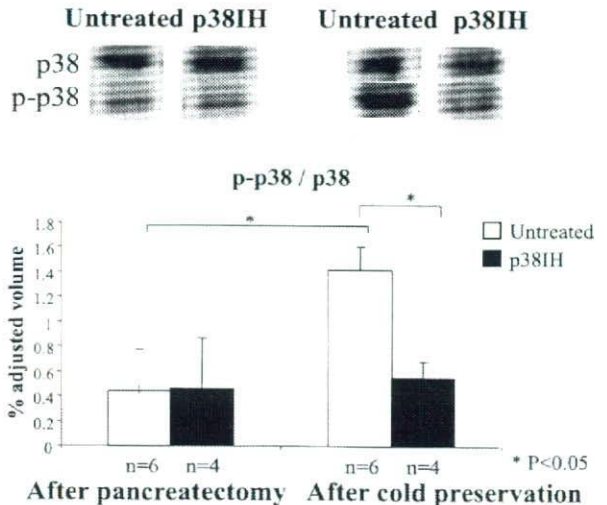


図6. 低温保存後の p38MAPK 活性

3) TUNEL 法および、レーザースキャンサイトメトリーを用いた β 細胞のアポトーシスの評価

TUNEL 法にて評価した β 細胞のアポトーシスは p38IH 群で抑制されていた(図7)。またレーザースキャンサイトメトリーにおいても、 β 細胞におけるアポトーシス細胞の比率は、p38IH 群で $44 \pm 9.4\%$ と Control 群の $61.6 \pm 4.8\%$ と有意に少なかった(図8)。

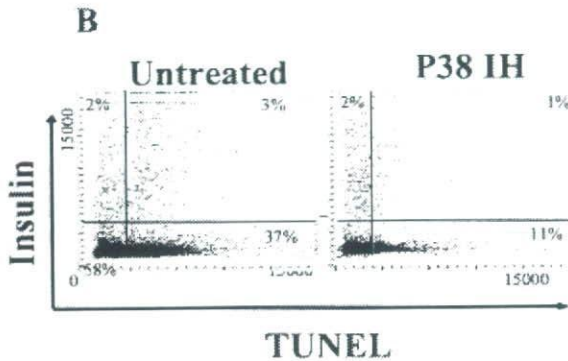


図7. β 細胞のアポトーシスの評価(TUNEL 法)

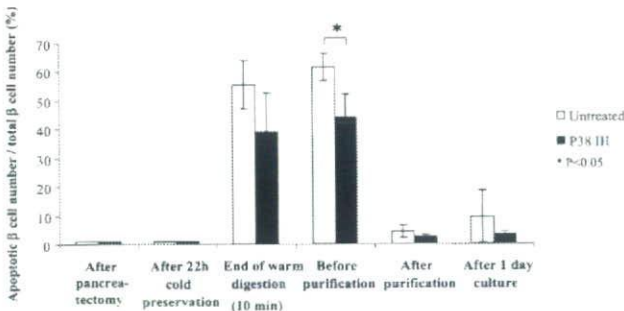


図8. β 細胞のアポトーシスの評価(LSC 法)

4) PCR 法を用いた TNF- α の発現

Real-time RT PCR 法にて測定した TNF- α の発現量は Control 群では低温保存後および膵臓の温消化後に有意な上昇を示したが、p38IH 群では保存後、消化中、純化後、1 日培養後で、一定であり上昇を認めなかった。

2. 当施設の膵島凍結保存法の有効性に関する研究

2-1. イヌ膵島凍結保存の実験的検討

1) 形態学的検討

凍結解凍後の膵島は若干の fragmentation を認

めるが、膵島の形態は保持されていた。

2) 膵島回復率

凍結前の膵島数 $80,349 \pm 37,1641$ IEq, 純度 $87.0 \pm 5.7\%$ に比較して、凍結解凍後は膵島数 $57,595 \pm 31,027$ IEq, 純度 $96.2 \pm 1.6\%$ であった。膵島回復率は $71.2 \pm 20.1\%$ であった。

3) Static incubation

Stimulation index は 1.80 ± 0.78 とインスリン分泌能は良好であった。

4) Perifusion assay

グルコース刺激に対し全例、良好なインスリン分泌を有した。図9に1例(#2)のデータを示す。良好な二峰性のインスリン分泌がみられた。

Perifusion study after cryopreservation

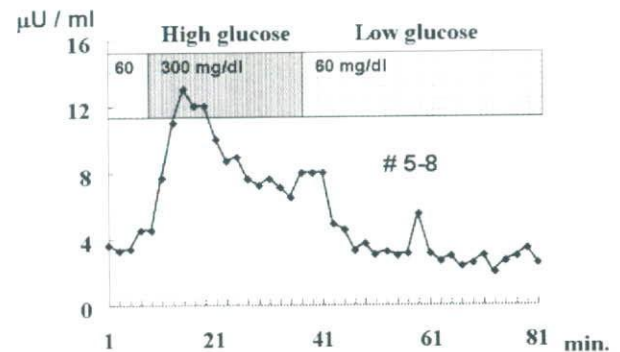


図9. Perifusion assay (凍結解凍後イヌ膵島)

2-2. ヒト凍結膵島の in vivo 機能試験に関する基礎的研究

1) In vitro static incubation

非凍結膵島の Stimulation index は 5.44 ± 2.38 ($n=5$) であったのに対し、凍結膵島は解凍後、 2.85 ± 1.48 ($n=6$) と低下がみられた。

2) 移植後血糖値の推移(図10)

Fresh 1000 群 ($n=5$) では全例移植後血糖値は 200mg/dl 以下となり、膵島を移植した腎臓の摘出により、再度血糖値は上昇した。一方、CP1000 群 ($n=3$) では3例中1例が 300mg/dl 以下となったが、2例は高血糖で推移し、十分な血糖効果作用は得られなかった。しかし、CP2000 群 ($n=3$) では、血糖値が 200mg/dl 以下となるのに約1週間と効果発現が遅い傾向を示したが、3例全例に 200mg/dl 以下の血糖効果作用が認められ、腎臓の摘出により、再度血糖値は上昇した。