

表1. 膵島移植ドナー適応基準

1. ドナ一年齢は原則として70歳以下とする。
  2. 心停止後から膵臓灌流開始までの許容時間(温阻血時間)は原則として30分以下とする。
  3. 感染症等の除外項目は組織移植学会のガイドラインに準じて行なう。
  4. 摘出膵保存法はUW液による単純浸漬保存または二層法を用いることが望ましい。
- 家族から「膵島移植のための膵臓提供の承諾」が得られた場合、脳死ドナー、心停止ドナーから、ともに提供を受けることが出来る。いずれの場合も「膵島移植のための膵臓提供」は心停止後となる。

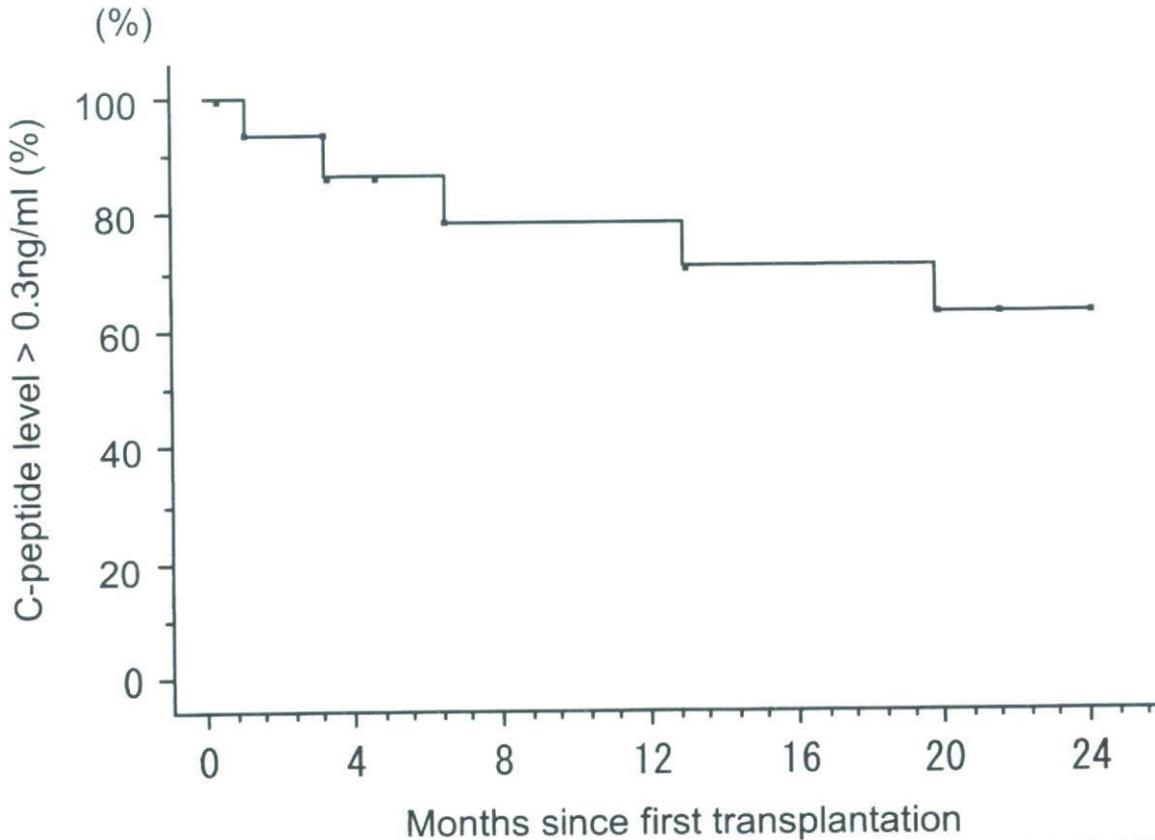
(文献(8)より引用)

表2. 新鮮膵島移植の基準 (参考)

分離膵島が以下の条件を満たすときに、新鮮膵島を移植する。

1. 膵島量  $\geq 5,000$ IE/kg(患者体重)以上
2. 純度  $\geq 30\%$
3. 組織量  $\leq 10$ ml
4. Viability  $\geq 70\%$
5. Endotoxin  $\leq 5$ EU/kg (患者体重)
6. グラム染色陰性

(文献(8)より引用)



(文献(9)より引用)

図2. 膵島生着率 (日本)

2007年3月までに17名に33回の移植が施行された。内訳は1回7名、2回4名、3回6名であった。それぞれの移植後1カ月におけるインスリン必要量は術前 $39.7 \pm 18.0$  U/dayに対して、1回移植後 $24.2 \pm 11.0$  U/day、2回移植後 $21.4 \pm 11.5$  U/day、3回移植後 $21.0 \pm 7.7$  U/dayと減少した。HbA1c値についても、術前 $8.8 \pm 1.8\%$ に対して、1回移植後 $7.5 \pm 1.4\%$ 、2回移植後 $6.5 \pm 1.4\%$ 、3回移植後 $6.2 \pm 1.2\%$ と低下した。初回移植後6ヵ月、1年、2年時における累積膵島生着率(C-ペプチド $0.3\text{ng/ml}$ 以上で判定)はそれぞれ86.5%、78.7%、62.9%であった<sup>9)</sup>(図2)。

#### 4. 当院における膵島分離

膵島移植は、ドナーから膵臓を摘出し分離施設に運搬して(膵臓保存工程)、GMP基準に則ったクリーンルーム内で膵臓から膵島を分離する必要がある。膵島分離法はRicordi法<sup>1)</sup>が一般的に用

いられている。まず、酵素(コラゲナーゼ)を膵管から注入し、温度を $37^{\circ}\text{C}$ 近くまで上げることによって酵素を活性化させて膵臓を消化する(膵臓消化工程)。消化によって細くなった膵組織から、比重勾配を利用して膵島だけを集める(膵島純化工程)。こうして分離された膵島を直ちにあるいは1、2日間培養後に、レシピエントに局所麻酔下で門脈を通して肝臓内に移植する。

膵島分離は脳死ドナー膵を用いても十分な膵島収量を安定して得ることが困難であるが、温阻血障害のかかる心停止ドナーを用いた場合、さらに難しくなることが予想された。そこで当院では心停止ドナー膵島移植を始めるに当たって、上記の作業行程のひとつひとつを細かく検討し改良を加えて心停止ドナーに特化した膵島分離法を開発した(図3)。

#### 膵臓摘出

本邦における膵島移植のための膵臓摘出は今の

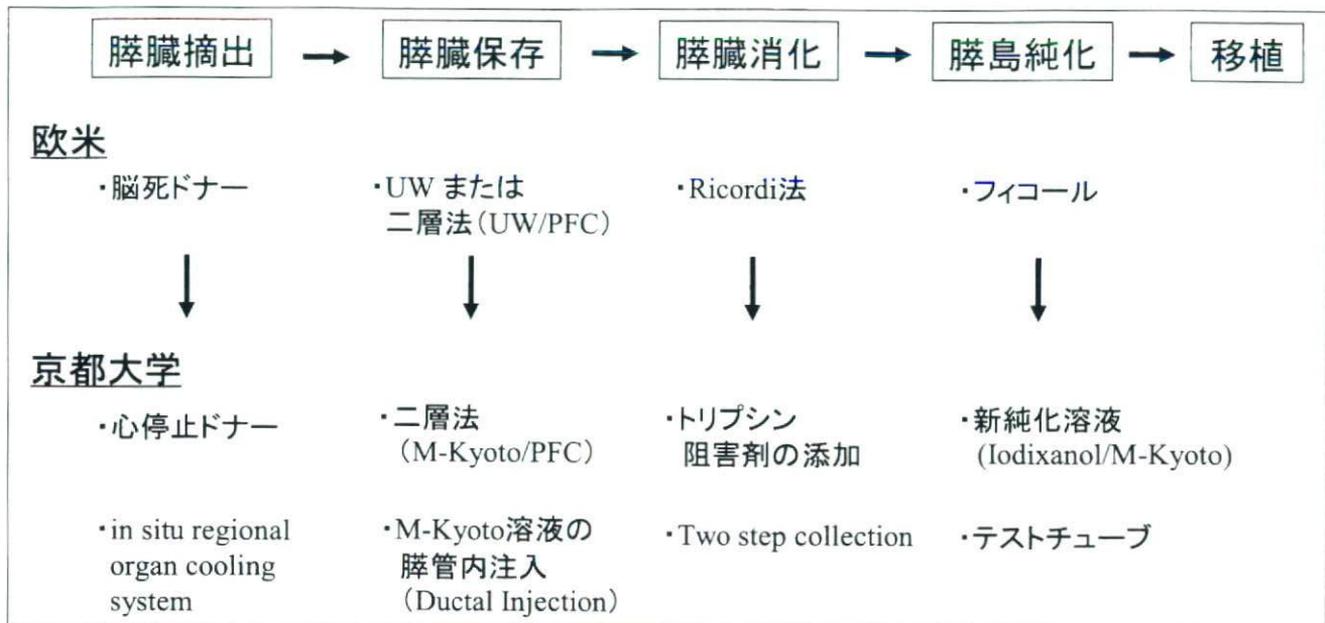


図3. 京都大学における膵島分離法の改良

ところ全例腎移植のための膵臓摘出と同時に行なっている。膵臓摘出の際には、同意が得られた場合、ドナーの臨床的脳死が確認された後にダブルバルーンカテーテルを大腿動脈から挿入し、心停止後できるだけ早く冷却液を灌流している (in situ regional organ cooling system)。膵島移植のために膵臓も同時に摘出する際にはダブルバルーンが腹腔動脈もカバーするように留置する。それによって心停止後、膵臓も速やかに冷却され温阻血時間を短縮している<sup>10)</sup>。手術室では腎摘出が最初に行われるが、開腹直後に大網を開放し膵前面に細胞外液のアイススラッシュを入れて膵臓を冷却する。そして腎摘出終了後、膵臓を摘出する。

#### 膵臓保存工程

膵島移植のための膵臓保存には膵臓移植と同様にUW (University of Wisconsin) 液が一般的に使用されていたが、最近黒田らが開発した二層法<sup>11)</sup> (UW/Perfluorocarbon (PFC)) が欧米でも標準的に用いられている<sup>12)</sup>。しかしながら、UW液は①コラゲナーゼ活性を阻害、②カリウム濃度が高い細胞内液型組成である (高カリウムは膵β細胞のインスリン脱顆粒を促進し膵島障害に関係するといわれている) ことから、膵島分離前の膵臓保存にはもっと適した保存溶液があると考えら

れた。そこで私達は臓器保存液として開発されたET-Kyoto溶液にトリプシン阻害剤 (Ulinastatin) を加えたM-Kyoto溶液という膵島移植に特化した溶液を開発した。ET-Kyoto溶液はコラゲナーゼ活性をほとんど阻害せず、カリウム濃度が低い細胞外液型組成である。Ulinastatinは膵外分泌腺から放出されるトリプシンによる自己融解を抑制し膵島を保護する<sup>13)</sup>。まず、膵臓摘出直後にバックテーブルでトリミングの後、膵管内に膵管カニューレを挿入し、そこから膵重量1g当たり1mlの量のM-Kyoto溶液を注入し、膵管保護を行なう (ductal injection)<sup>14)</sup>。それから膵臓をM-Kyoto / Perfluorocarbon (PFC) の二層法で保存し、当院まで搬送する。

#### 膵臓消化工程

コラゲナーゼを膵管から注入した後、膵臓をRicordi Chamberに入れて消化を開始する。2分毎に組織をサンプリングして消化具合をモニターしている。そのサンプルの中に一つでもフリーの膵島が見られたら、灌流液中の組織の回収を始める (一次回収)。この際、遠心沈降の後にコラゲナーゼを含んだ上清は消化回路の中に戻す。この操作によって、早くにフリーとなった膵島の過消化を防ぐことができる<sup>15)</sup>。消化組織サンプル中に

多くのフリーの膵島が見られ出したら、希釈と冷却で消化を止めながら全組織の回収を始める（二次回収）。このように二段階の組織回収を行っている（Two step collection）。

また、消化後の組織洗浄液にもトリプシン阻害剤（Ulinastatin）を加えて、膵島保護に努めている。

### 膵島純化工程

通常、膵島純化に使う比重勾配はフィコールで作られている。しかし、フィコールには組織障害性があるため、私達は比重勾配に造影剤であるIodixanol<sup>16)</sup>を用いたM-Kyoto溶液ベースの純化溶液を開発した。この溶液は、エンドトキシンレベルが低いこと、また、従来の純化溶液に比べて粘度が格段に低いため遠心中に膵島組織が受ける物理的な力（せん断力）が小さくて済むことが有利な点である。

心停止ドナー膵の場合は温阻血によって外分泌組織の比重が軽くなる。そこで、6通りに比重を振ったテストチューブに少量のサンプル組織をそれぞれ入れて遠沈し、外分泌組織の沈み具合をみて高比重溶液の最適な値を決定している。

これらの方法を用いて、当院では2004年4月から2007年3月末までに25例の心停止ドナー膵を用いた膵島分離を行なった。そのうち20例（80%）が移植基準を満たした。北米の代表的な膵島移植施設での膵島分離成功率（移植率）は、脳死ドナーを用いても50%を超えていないことを考えると、分離の成功率を飛躍的に向上させたことになる。

### 5. 当院における移植成績の検討

当院ではこれまでインスリン依存状態糖尿病患者9名に対して計19回（ドナー20名分）の移植を施行した。内因性インスリンの分泌には、24時間ほぼ一定量が出続ける基礎分泌と食事などの血糖値の上昇に対応してタイミングよく出る追加分泌があるが、移植後1ヵ月目の解析で、1回の膵島移植でインスリンの基礎分泌補充量は有意に減少

することが分かった。また、血糖値の不安定性の指標であるM値（日内の血糖値が100あるいは120 mg/dlの基準値からどれくらいかけ離れているかを示す値）とMAGE（日内の血糖値の変動幅の大きさを示す値）については有意に低下し、重症低血糖が消失した<sup>17)</sup>。

インスリン離脱については、複数回移植を行なった6人のうち3人で達成することができた。ただし、その期間はそれぞれ215、79、14日とアルバータ大学から発表された脳死ドナーを用いた場合の長期成績と比べると非常に劣っている。

また、複数回移植症例6人中2人において、初回移植からそれぞれ30ヵ月後と50ヵ月後に移植膵島の廃絶を確認し、免疫抑制剤を中止した。1例は自己抗体がdouble positiveで、特に抗GAD抗体は大変高値であった。もう1例は、移植前のインスリン使用量が0.7U/kg以上とインスリン抵抗性が高いと考えられる症例であった。複数回移植を行なった膵島単独症例5人のうち2人において現在でもCペプチドは陽性（basal c-peptide level  $\geq$  0.3ng/ml）である（それぞれ初回移植後37、39ヵ月経過）。

### 6. おわりに

当院におけるインスリン離脱率及び2007年に膵・膵島移植研究会膵島移植班から報告された本邦における膵島生着率はともにアルバータ大学から発表された成績に比べると劣っている。その原因として、エドモントンプロトコルでは治験としてレシピエント適応基準が厳しく設けられていること、欧米のドナーのBMI（Body Mass Index）が大きいこと、アジア人は欧米人に比べてインスリン分泌能が低いこと、そして、心停止ドナーを用いているため膵臓が温阻血で障害されていることなどが考えられる。

移植効果については、膵島移植後1ヵ月におけるインスリン必要量とHbA1c値は、移植前に比べると明らかに減少した。従って、マージナルドナーである心停止ドナーを用いた膵島移植で重症インスリン依存状態糖尿病に対して治療効果を示

すことができたと言える。深刻なドナー不足の問題を考えると、本邦における結果は大きな意義がある。

当院では、膵臓摘出から膵島分離までの各ステップを詳細に検討し改良を加えて、心停止ドナーに特化した膵島分離法を開発した。その結果、心停止ドナーの膵臓でも高い分離成功率を得ることができた。通常膵島分離では、脳死ドナー膵を用いても十分な収量を安定して得ることが困難である。ドナー膵の有効利用の観点から、当院で開発した膵島分離法は非常に有用で、世界に発信できる技術と考えている。

### 参考文献

- 1) Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Sharp DW. Automated method for islet isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37 : 413-420, 1988
- 2) 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
- 3) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 54 : 2060-9, 2005
- 4) Kapur S, Bonham CA, Dodson SF, Dvorchik I, Corry RJ. Strategies to expand the donor pool for pancreas transplantation. *Transplantation*. 67 : 284-90, 1999
- 5) 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*. 75 : 1524-7, 2003
- 6) Markmann JF, Deng S, Desai NM, et al. The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 75 : 1423-1429, 2003
- 7) 北村惣一郎, 島崎修次, 糸満盛憲, et al. ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン. *日本組織移植学会雑誌* 2 : 41-57, 2003
- 8) 膵島移植実施マニュアル 第3版. 膵・膵島移植研究会/編. 東京 2006
- 9) 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 : 439-447, 2007
- 10) Nagata H, Matsumoto S, Okitsu T et al. Procurement of the human pancreas for pancreatic islet transplantation from marginal cadaver donors. *Transplantation* 82 : 327-331, 2006
- 11) Kawamura T, Kuroda Y, Suzuki Y, et al. Seventy-two-hour preservation of the canine pancreas by the two-layer (Euro-Collins' solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation*. 47 : 776-8, 1989
- 12) Iwanaga Y, Sutherland DE, Harmon JV, Papas KK. Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 13 : 445-51, 2008
- 13) 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*. 6 : 496-504, 2006
- 14) Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, et al. Successful islet transplantation from non-heart-beating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. *Transplantation* 82 : 460-5, 2006
- 15) Balamurugan AN, Chang Y, Fung JJ, Trucco M, Bottino R. Flexible management of enzymatic digestion improves human islet isolation outcome from sub-optimal donor pancreata. *Am J Transplant*. 3 : 1135-42, 2003
- 16) Van Der Burg MP, Basir I, Bouwman E. No porcine islet loss during density gradient purification in a novel iodixanol in University of Wisconsin solution. *Transplant Proc*. 30 : 362-3, 1998

17) Sassa M, Fukuda K, Matsumoto S, et al. A single transplantation of the islets can cause glycemic stability and reduction of basal

insulin requirement. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 73 : 235-40, 2006