

200917003A

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臍島移植医療の確立

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 寺岡 慧

平成 22 年(2010)年 5 月

## 目 次

I. 統括研究報告	
1. 「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. 研究分担報告	
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 …………… 13
2. 「探索医療の成果としての膵島移植医療の確立」に関する研究	剣持 敬 …………… 17
3. 「探索医療の成果としての膵島移植医療の確立」に関する研究	岩永康裕 …………… 24
4. 探索医療の成果としての膵島移植医療の確立	里見 進 …………… 28
5. 移植後膵島障害の制御法開発	安波洋一…………… 34
6. in vivo モデルを用いた移植膵島におけるオートファジー誘導の有無	伊藤壽記 …………… 37
7. 臨床試験実施計画書の作成	山口拓洋 …………… 40
8. 細胞治療に対するエンドポイント設定の研究	嶋澤るみ子 …………… 42
9. 膵島移植医療における QOL に関する研究	畑中暢代 …………… 45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	…………… 57
IV. 研究成果の刊行物・別冊	…………… 63

# 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した。不活化 Liberase HI をマウス腹腔内に接種後、Western blotting、免疫染色法によってウシ由来プリオンの検出を試みたが、ウシ由来プリオンは検出限界以下であった。

臨床膵島移植の再開を目指して、種々の条件下でマウス、ラットおよび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 量を、total adenine nucleotide (TAN) 量を測定した。ATP 量、TAN 量は分離膵島の viability 評価に有用と考えられた。Liberase RI を用いて Wistar ラットの膵島分離を行い、種々の条件下で温阻血負荷を加え、WST-1 assay、ADP/ATP assay により viability 評価を行った。これらの検討の結果、ADP/ATP 比および WST-1 absorbance/DNA 比は阻血膵島の viability 評価に有用であった。また分離膵島の培養を行う器材の開発を行ったが、新たに開発されたデバイスの有用性が確認された。

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。移植膵島傷害の機序として今年度は High-mobility group box 1 (HMGB1) およびオートファジーの関与について検討を加えた。マウス分離膵島を 37°C 低酸素下で培養すると中心性壊死に陥り、培養液中 HMGB1 濃度は有意に上昇するが、PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazon が低酸素下培養膵島傷害を軽減することが判明した。膵島に対する SRL 処理がオートファジーを誘導して、viable 膵島の減少と non-viable 膵島の増加、インスリン染色性の低下を来し、3-MA 処理あるいは投与によりオートファジーは抑制され、膵島傷害は制御され、インスリン染色性が回復した。

膵島移植に影響を与える因子を多変量解析により検討した結果、心停止ドナーからの膵島分離成功に寄与する因子として冷阻血時間、Kyoto 液の使用、ドナー死戦期における低血圧持続などがあげられた。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可能となり、いよいよ新しい免疫抑制プロトコールによる、心停止ドナーからの膵島移植が高度医療として再開されるが、その臨床試験実施計画書を作成した。臨床膵島移植におけるエンドポイントの検討から SUIITO index の有用性が QOL 改善、インスリン離脱率との相関において確認された。QOL 調査の結果から、治療選択の際に患者が必要とすると考えられる情報を網羅した患者用小冊子を作成した。患者の治療選択におけるオートノミー (自律性) を支援する観点から大変重要と考えられた

## 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-S 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) ラット膵消化試験

コラゲナーゼを用いて 120 分後まで Wistar ラット膵消化を行い、経時的に膵組織を採取し、組織学的検討を行い adenine nucleotide (AN) を測定した。また経時的に採取した消化液上清と振戦膵島を混合培養し、消化液を用いて SDS-page によりタンパク分析を行った。

### 2) ブタ膵消化試験

Ricordi chamber を用いてブタ膵消化実験を行い、膵島収量と回路内容液中の AN との関係を検討した。

### 3) 膵島分離酵素のプリオン感染の可能性に関する検討

動物衛生研究所プリオン研究センター毛利資郎所長の協力により、不活化 Liberase HI をマウス腹腔内に接種して、免疫染色法および Western blotting (WB) 法を用いてウシ由来プリオンの検出を行った。

### 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) の膵島移植の臨床データを解析し、膵島分離、膵島移植に影響を与える因子を検討した。

### 2. 哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素を用いたブタ膵島分離実験 (岩永康裕分担研究者)

哺乳類成分を一切含まない新たに開発された膵消化酵素である Liberase MTF-S が Liberase HI と同等の効果を有するか否か、すなわち Liberase HI の代替品になりうるか否かについて検討を加え、心停止ブタを用いてその至適条件について検討した。

### 3. 分離膵島の viability 評価法の開発 (剣持 敬分担研究者)

Liberase RI を用いて Wistar ラットの膵島分離を行い、30 分間の温阻血負荷群と対照群において WST-1 assay、ADP/ATP assay、Dithizone 染色および TUNEL 法によるアポトーシス評価により、分離膵島の viability 評価を行った。

### 4. 至適分離膵島培養器財の検討 (里見 進分担研究者)

温阻血負荷ブタ分離膵島を従来法、市販血小板用培養バッグ、新規開発デバイスの 3 群に分けて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下に 24 時間培養し、ADP/ATP assay 法を用いて 3 群間の viability を比較検討した。

### 5. 移植膵島傷害の機序の解明と制御法および再生法の開発 (岩永康裕、安波洋一、伊藤壽記各分担研究者)

移植膵島障害機構の解明とその制御法の開発は、臨床膵島移植の成功への課題としてもっとも重要な課題のひとつであるが、昨年度までの研究によって、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明らかにされた。本年度は下記の検討を行った。

### 1) 前駆細胞を用いた膵島様組織選択培養法の開発 (岩永康裕分担研究者)

マウス膵から膵島を分離後に廃棄される外分泌細胞、間質系細胞から、ある培養条件下で上皮系前駆細胞を選択的に増殖させ、これが膵島様組織へ分化させることが可能か否かを検討した。

### 2) 移植膵島から放出される High-mobility group box 1 (HMGB1) による膵島傷害とその制御 (安波洋一分担研究者)

マウス単離膵島を低酸素下で培養し (1%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>+94%N<sub>2</sub>)、膵島細胞死と High-mobility group box 1 (HMGB1) 放出との関連性、ならびに機序について検討し、さらに PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazone を用いた移植前処置によって制御しうるか否かについて検討を加えた。

### 3) 移植膵島におけるオートファジー誘導の有無に関する検討 (伊藤壽記分担研究者)。

B6 マウスおよび GFP-LC3 transgenic mice を用いて膵島分離を行い、sirolimus (SRL) 存在下で培養した後に、TMRE assay、7-AAD assay 法により膵島の viability を検討した。

また GFP-LC3 transgenic mice に SRL 0.2mg/kg を腹腔内投与し、膵島および膵外分泌組織におけるオートファジー誘導を検討した。

さらに SRL 処理とともにオートファジー阻害薬である 3-methyladenine (3-MA) 処理を行い、オートファジー誘導が制御できるか否かについて検討した。GFP-LC3 transgenic mice に SRL 0.2mg/kg とともに 3-MA10mM を腹腔内投与し、in vivo におけるオートファジー抑制効果につい

ても検討を加えた。

### 6. 新たな免疫抑制法プロトコールによる高度医療としての臨床膵島移植の再開における実験計画書の作成 (山口拓洋分担研究者)

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可能となり、thymoglobulin/basiliximab および etanercept、CNI 阻害薬 (ネオーラル<sup>R</sup>あるいはグラセプター<sup>R</sup>)、mycophenolate mofetil (MMF) を用いた新しい免疫抑制プロトコールによる、心停止ドナーからの膵島移植が高度医療として再開されるが、その臨床試験実施計画書を作成した。

### 7. 細胞治療におけるエンドポイント設定の研究 (嶋澤るみ子分担研究者)

国内臨床膵島移植実施例の臨床データを用いて、Secretory Unit of Islet Transplant objects (SUITO) index の有用性について検討を加えた。

### 8. 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)

患者の健康状態全般を反映する short-form health survey (SF-36)、糖尿病患者の QOL を反映する Diabetes Form 2.1、インスリン治療の満足度を反映する Insulin treatment satisfaction questionnaire (ITSQ) を膵島移植前および膵島移植後の患者を対象として実施し、評価検討を加えた。

さらに前年度までの患者意向調査を踏まえ、また今回の SF-36、Diabetes Form 2.1 および ITSQ による患者意識調査を踏まえ、患者にとって必要であると判断された情報を網羅した患者用小冊子を作成した。これは患者の治療選択における自律性 (オートノミー) を支援することが目的である。

## 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) ラット膵消化試験

膵消化中に経時的に採取された膵外分泌組織

は徐々にその integrity を喪失し、adenosine 濃度も経時的に低下するが、この消化液上清と新鮮膵島を混合培養すると、次第に膵島細胞の integrity が失われ、ATP レベルが低下してゆくことが明らかとなった。しかし serine protease inhibitor を用いると膵島傷害は軽減し、膵島の保護効果が認められた。

## 2) ブタ膵消化試験

回路内容液中の ATP 量は消化が進につれて増加し、total adenine nucleotide (TAN) 量、膵島数、IEQ も徐々に増加するが、ATP 量は先んじてピークに達し、膵島収量が最大になる時期と一致した。消化液中の TAN 量と IEQ は正の相関を示し、ATP/TAN 比は消化開始後 15 分で plateau に達し、40 分以降で有意に減少した。膵島内 ATP 量、消化液中 TAN 量は膵島収量の指標となることが判明した。

## 3) 膵島分離酵素のプリオン感染の可能性に関する検討

Liberase HI を蒸留水で希釈後、100°C10 分間不活化し、マウス腹腔内に接種し、WB 法、免疫蛍光染色法でプリオンを検討した結果、免疫染色法および Western blotting (WB) 法を用いてマウス腹腔内におけるウシ由来プリオンの検出を行った。免疫染色法および WB 法によってもマウス腹腔内にウシ由来プリオンは検出限界以下であった。Liberase HI 50mg 中に BSE ウシ脳 0.05mg に相当するプリオン感染価は含まれていないことが明らかとなった。

## 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) の膵島移植の臨床データを解析し、膵島分離、膵島移植に影響を与える因子を多変量解析により検討した結果、心停止ドナーからの膵島分離成功率は 53% (34 回/64 回) であり、膵島分離成功に有意に寄与する因子として冷阻血時間が短いこと、保存液として Kyoto 液を使用することがあげられた。

心停止ドナーから複数回の膵島移植を受けた場合における移植膵島の生着率は、1 年 100%、2 年 80%、3 年で 57.1% であり、移植膵島生着に寄

与する因子としてドナー死戦期における低血圧持続時間があげられた。

## 2. 哺乳類成分を含まない新しい膵消化酵素を用いたブタ膵島分離実験 (岩永康裕分担研究者)

哺乳類成分を一切含まない新たに開発された膵消化酵素である Liberase MTF-S を用いて心停止ブタ膵から膵島分離を行い、膵島収量、回収率および viability 評価を行い、Liberase HI と同等の効果を有するか否かについて比較検討した。膵島収量、回収率および viability (AO/PI) は Liberase HI のそれと同等であり、Liberase MTF-S は Liberase HI に代わりうる消化酵素薬として利用可能と考えられた。

## 3. 分離膵島の viability 評価法の開発 (剣持 敬分担研究者)

対照群と比較して 44°C60 分 incubate 群 (in vitro40 分温阻血群) の ADP/ATP 比は有意に高値であった。しかし 30 分 incubate では両群間に差は認められなかった。

対照群の WST-1 absorbance/DNA 比は培養開始後時間の経過とともに上昇したのに対し、44°C 60 分 incubate 群ではほとんど上昇が認められなかった。44°C30 分 incubate 群では時間の経過とともに上昇は認められたが、対照群と比較して上昇は軽度であった。

対照群、温阻血群の膵島をそれぞれ Dithizone で染色したが、両者ともよく染色され顕微鏡下で形態学的な相違は認められなかった。また両軍の膵島を TUNEL 染色したが、両群とも TUNEL 染色陰性で相違は認められなかった。

また in vivo 温阻血群と対照群の膵島の viability 評価を行ったが、温阻血群の ADP/ATP 比は有意に高値であり、WST-1 absorbance/DNA は温阻血群で有意に低下していた。

以上より温阻血負荷膵島の viability 評価において、WST-1 absorbance/DNA および ADP/ATP 比は有用であると推察された。

## 4. 至適分離膵島培養器財の検討 (里見 進分担研究者)

従来法、市販血小板用培養バッグ、新規開発デ

バイスの3群間で、膵島残存率は新規開発デバイス群で  $37.4 \pm 6.4\%$  (vs  $21.9 \pm 4.7$ ,  $19.8 \pm 7.8$ ) でもっとも良好であった。

*in vitro* 糖負荷試験においても新規デバイス群の stimulation index がもっとも優れていた。viability test (ADP/ATP assay) においても新規開発デバイス群が有意に低値を示し、apoptosis に陥る膵島の割合が減弱させることが判明した。

## 5. 移植膵島傷害の機序の解明と制御法および再生法の開発 (岩永康裕、安波洋一、伊藤壽記各分担研究者)

### 1) 前駆細胞を用いた膵島様組織選択培養法の開発 (岩永康裕分担研究者)

マウス膵島を分離後に廃棄される外分泌細胞、間質系細胞から膵島様組織へと培養可能な前駆細胞を分離し、新規選択培養法を開発した。純化培養により得られた細胞にインスリン分泌細胞への転写に必要な転写因子 Ngn3 の発現を確認した。得られたインスリン産生細胞のインスリン分泌量は多く、明瞭なグルコース応答性を示し、糖尿病マウスに移植後、血糖値の低下が認められた。

### 2) 移植膵島から放出される High-mobility group box 1 (HMGB1) による膵島傷害とその制御 (安波洋一分担研究者)

マウス単離膵島を  $37^{\circ}\text{C}$ 、低酸素下で培養すると、6時間で中心壊死、12時間で単離培養膵島の中心部がすべて壊死に陥った。

単離培養液中 HMGB1 およびインスリン濃度を測定したが、HMGB1 濃度は6時間で有意に上昇し、12時間でさらに高値を示した。またインスリン濃度は12時間で有意に上昇した。

PPAR $\gamma$  アゴニストである pioglitazon が低酸素下培養膵島傷害を軽減することが判明し、ドナー膵島を移植前3時間のみ pioglitazon 存在下で培養することにより、移植後早期膵島傷害が制御しうるということが明らかとなった。

### 3) 移植膵島におけるオートファジー誘導の有無に関する検討 (伊藤壽記分担研究者)。

無処置膵島においては膵島全体にび慢性に蛍光が観察されたが、SRL 処理膵島においては

cup-shape 様に集簇した GFP-LC3 dots の蓄積が観察され、オートファジーの誘導が肉眼的に確認できた。また 3-MA による Blocking assay では cup-shape 様に集簇した GFP dots は消失し、対照群と同様にび慢性の蛍光を観察するのみとなり、オートファジー誘導を抑制することができた。

次にオートファジーが膵島の viability にいかなる影響を与えたか否かについて TMRE assay、7-AAD assay 法により検討した。TMRE assay では対照群の膵島の viability は約 80%であったのに対し、SRL 処理群では 52.1~62.4%まで viability は低下した。

3-MA による Blocking assay では膵島の viability は 80.1~84.3%に回復した。

死細胞を detect する 7-AAD assay では、無処置膵島においては 3.9~4.7%が non-viable として detect されたが、SRL 処理膵島においては 17.7~18.7%まで non-viable islets は増加した。3-MA による Blocking assay では、non-viable islets は 5.0~12.7%まで減少した。

GFP-LC3 transgenic mice に SRL 0.2mg/kg を2週間腹腔内投与した膵臓では、膵島、膵外分泌組織ともに GFP-LC3 dots の蓄積が観察された。3-MA、SRL 同時投与では GFP-LC3 dots の蓄積は観察されなかった。また膵島のインスリン染色では、無処置膵島においては膵島内に均一にインスリン顆粒が染色されたが、SRL 投与群ではインスリン染色の強度が減弱しており、これは 3-MA による Blocking では対照群と同様に明瞭にインスリン顆粒が染色された。

以上より膵島に対する SRL 処理がオートファジーを誘導して、viable 膵島の減少と non-viable 膵島の増加、インスリン染色性の低下を来とし、3-MA による処理 (*in vitro*) あるいは 3-MA の同時投与 (*in vivo*) によりオートファジーは抑制され、viable 膵島の増加と non-viable 膵島の減少、さらにはインスリン染色性の回復が達成されたものと推察された。

## 6. 新たな免疫抑制法プロトコールによる高度医



## 療としての臨床膵島移植の再開における実験計画書の作成 (山口拓洋分担研究者)

thymoglobulin/basiliximab および etanercept、CNI 阻害薬 (ネオーラル<sup>®</sup>あるいはグラセプター<sup>®</sup>)、mycophenolate mofetil (MMF) を用いた新しい免疫抑制プロトコールによる、心停止ドナーからの膵島移植が高度医療として再開されるが、その臨床試験実施計画書を作成した。研究の全体スケジュール、観察・検査・報告スケジュールを整理し、それらに沿う形で症例報告所を作成した。

## 7. 細胞治療におけるエンドポイント設定の研究 (嶋澤るみ子分担研究者)

SUITO index は、空腹時血中 c-peptide 濃度 (ng/dL) / [空腹時血糖値 (mg/dL) - 63] x 1500 で求められ、健常者を 100% として移植膵島の生着数が算出される計算式であり、30 以上でインスリンからの離脱が可能となり、10 以上で QOL の改善が得られるが、10 未満の場合は QOL の改善は認められなかった。SUITO index はインスリン減少率と高い相関が認められ、有用な指標と考えられた。

## 8. 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)

1 型糖尿病患者の 88% が低血糖症状からの解放を、86% がインスリン治療からの離脱を希望し、88% が膵島移植への興味を示した。他方、60% が膵島移植により 1 型糖尿病から解放されると考えており、94% が合併症に対して不安や恐怖を持っていることが判明した。患者の治療選択の際には医学的な情報のみでなく、患者が意思決定の際に必要な情報を提供することが重要と考えられた。

上記の患者が必要とすると考えられる情報を網羅した患者用小冊子の作成は、患者の治療選択におけるオートノミーを支援する観点から大変重要と考えられた。

## D. 結論

探索医療としての膵島移植を確立するためには、膵島分離法および分離膵島の viability・機能

評価の標準化が必要であり、これらについてはほぼ達成できた。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 を用いた膵島分離における至適条件の設定が達成され、GMP 基準の新 Liberase が入手可能となった現在、これを用いた心停止ドナーからの臨床膵島移植を再開すべく、新たな免疫抑制プロトコールのもとに高度医療として申請中である。

膵島移植の成績の向上には、移植後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。昨年度までの研究によって、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らかにされた。本年度は GFP-LC3 transgenic mice を用いてオートファジー様細胞死と 3-MA によるその制御効果を可視化し、さらに新たに HMGB1 による膵島傷害が解明され、pioglitazon によるその制御法が開発された。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。

また新しい細胞治療の臨床導入に向けては、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、本年度はさらに SUITO index が導入され、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、現在高度医療に申請中である。

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たが、GMP 基準の哺乳類成分を一切含まない新しい Liberase の入手可能となった現在、これを用いた新たな免疫抑制プロトコールのもとでの心停止ドナーからの臨床膵島移植が、高度医療としての認可を待っていないよ再開される地点に到達した。

**E. 研究発表**

**1. 主な論文発表**

なし

**2. 主な学会発表**

**1) 口頭発表**

なし

**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

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究研究事業）  
（分担）研究報告書

「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

分担研究者 後藤 満一 福島県立医科大学医学部臓器再生外科学講座教授

研究要旨：前年度より引き続き、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確立しうる可能性がある。また精製過程でウシ脳成分が用いられていた臨床膵島分離用酵素に、プリオン感染の可能性があるかどうかの検証を行った。さらに、本邦の臨床膵島分離・移植成績を集計し、膵島分離・移植結果に影響を及ぼす因子について明らかにした。これらの検討および欧米における報告に基づき、臨床膵島移植における新たな多施設共同の免疫抑制プロトコルを計画し、高度医療評価制度へ申請している。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名  
（分担研究報告書の場合は、省略）

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、より多くの膵島を採取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至適と考えられる条件で施行されているものの、その検証は十分ではなく、また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。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傷害について検討した。

また、本邦での臨床膵島移植停止の要因となった、膵島分離用酵素(Liberase HI)の製造過程にウシ脳成分が含まれていたという問題に対し、この酵素の使用によるプリオン感染の可能性についての検証を加えるべく実験を計画した。さらに日本膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局として、わが国における臨床膵島移植の成績をまとめ、膵島分離・移植に影響を与える因子を明らかにし、今後の展開に応用することとした。その上で、欧米の現状もふまえ、臨床膵島移植再開に向けた新しいプロトコルの作成をめざした。

B. 研究方法

1) ラット膵消化実験

Wistar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、adenosines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adenosinesの関係を検討した。

3) 膵島分離用酵素のプリオン感染の可能性に関する検討

動物衛生研究所 プリオン病研究センター 毛利資郎先生の協力により、膵島分離用酵素におけるウシ由来プリオンの検出を目的に、ウシ型マウスを用いたバイオアッセイ(不活化Liberase HIをマウス腹腔内に接種し、免疫染色法(IHC)およびWestern blotting法(WB)により検出)を行った。

4) 日本膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局

これまでの臨床データを解析し、膵島分離・移植に影響を与える因子を明らかにした。また、欧米の現状をふまえ、臨床再開に向けて新たな免疫抑制プロトコルを作成した。

（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

膵消化中に経時的に組織を採取すると、膵外分泌組織は徐々にその形態のintegrityを失っていくことが認められた。また、adeno-sinesを測定すると、これも経時的に減少することが確認された。消化液上清と新鮮分離膵島を混合培養実験では、培養時間につれて、膵島細胞のintegrity が失われていき、ATPレベルが低下していくことが明らかとなり、serine protease inhibitorsを用いると膵島は保護されることが明らかとなった。

2) ブタ膵消化実験

消化液中のATP量は消化が進むにつれて増加し、TAN量、膵島数、IEQも徐々に増加した。ATP量はTAN量、膵島数、IEQに先んじてピークを迎えた。従来法による膵消化停止のタイミングは、消化液中膵島数の変化率が最大に達した時期と一致していた。消化液中ATP量の変化率のピークは、膵島数変化率のピークに常に先んじて認められていた。消化液中TAN量とIEQは正の相関を示し、TAN量は消化液中の膵島量の指標となることが示唆された。消化液中のviableな細胞の割合としてATP/TAN比を検討すると、消化開始後15分以内にplateauに達し、消化開始後40分以降は有意に減少した。膵島内ATP量を測定すると、過消化期におけるATP量はそれ以前の時期の膵島内ATP量より少なく過消化期における膵島の傷害が推測された。

3) 膵島分離用酵素のプリオン感染の可能性に関する検討

LiberaseHI (Lot93410261, Lot93237620)を蒸留水で希釈後、100℃10分間不活化した。5mg/50 μl, 10mg/100 μl, 50mg/500 μlをそれぞれ10頭ずつのマウスの腹腔内に接種。Liberase接種マウスはすべてWB, IHCとも検出限界以下(図1)。WBにおける牛BSE脳(BSE5)の検出能は10<sup>-4</sup>であることから、検出限界は牛BSE脳0.05mgに相当する感染価である。また、100℃10分の処理で感染価が1/100に低下したと考えると、Liberase50mg中にはウシ脳5mgに相当するプリオン感染価は含まれていないと推定された。

【図1.】

Detection of BSE Prion infectivity in Liberase by FDC bioassay

Inoculum	Dose	IHC	WB
Liberase (Lot93410261)	5mg/50 μl	0/10	0/10
	10mg/100 μl	0/10	0/10
	50mg/500 μl	0/10	0/10
Liberase (Lot93410261)	5mg/50 μl	0/10	0/10
	10mg/100 μl	0/10	0/10
	50mg/500 μl	0/10	0/10
BSE5 (cattle brain)	5mg/50 μl	6/6	6/6

IHC: immunohistochemistry

WB: Western blotting

4) 日本膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局として

これまでの本邦での膵島分離成功率は53% (34/64)であった。膵島分離に関与する因子の多変量解析により、冷保存時間が短いこと、Kyoto液を保存液として用いることが膵島分離成功に有意に影響を及ぼすことが明らかになった。また、低血圧の時間が8時間以内である場合は、8時間以上である場合に比べ有意に成功率が高かった。複数回の移植を受けた場合1, 2, 3年後の移植後移植片生着率はそれぞれ100, 80, 57.1%であった。



#### D. 考察

ラット膵消化実験から、膵島分離中に膵島は膵消化により膵外分泌細胞から放出されるプロテアーゼにより傷害を被ることが確認され、各種プロテアーゼ阻害剤により膵島分離効率の改善が図れることが示唆された。

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。ブタ膵消化実験から、膵消化液中のアデノヌクレオチド量の検討は細胞のviabilityの指標となるとともに、至適な消化停止のタイミングを決定する指標となりうる可能性が示唆された。

以前に使用された膵島分離用酵素がプリオン感染を持つ可能性は極めて低いことが実験的に証明された。また、これまで移植を受けた症例にもその感染を示唆する症状の報告がないことも含め、現時点ではこの酵素の使用による問題は臨床的には認められないことが確認された。しかし、今後も移植を受けた症例のフォローアップは必要である。

本邦で行われた臨床膵島移植の膵島生着率に関しては、心停止ドナーを用いているという特徴をふまえると、世界的に特筆に値すると考えられる。これまで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ールを計画した。現在高度医療評価制度に申請しており（平成22年4月現在、「条件付き適」の評価）、この制度のもとで臨床膵島移植の再開を目指している。

#### E. 結論

本邦の膵島移植は各施設のTRを導入し、新たなプロトコー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

齋藤拓朗, 後藤満一. わが国における臓器移植の現況と将来展望—脳死移植実施10周年を記念して—膵島移植の成績. 移植. 44:S129-S131, 2009.

Tsukada M, et al. Exposure of isolated islets to a toxic environment during collagenase-digestion. Cell Transplantation. in press.

Oshibe I, et al. Adenine nucleotide levels in a closed enzymatic digestion system for porcine islet isolation. Cell Transplantation. in press.

##### 2. 学会発表

Saito T, et al. Preexisting donor factors and isolation variables leading to successful islet transplantation from donors after cardiac death. The 12<sup>th</sup> Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association 2009. 10.12-17 Venice, Italy

Oshibe I, et al. Adenine Nucleotide Levels in Closed Enzymatic Digestion System for Porcine Islet Isolation. CTS - JSOPMB Joint Conference 2009. 4.20-21 Okayama, Japan

<p>後藤満一. 膵島分離と拒絶反応の制御—糖尿病根治をめざして— 第19回Surgical Scienceの会 招請講演 2009. 4. 2 福岡</p> <p>押部郁朗, 他. ブタ膵消化時における 回路内アデノヌクレオチド量の検討-灌流開始タイミングの側面から- 第109回日本外科学会定期学術集会 2009. 4. 2-4 福岡</p> <p>斎藤隆晴, 他. Mitomycin C(MMC)で処置した移植前のラット膵島の形態学的・生化学的検討. 第109回日本外科学会定期学術集会 2009. 4. 2-4 福岡</p> <p>齋藤拓朗, 他. I型糖尿病移植治療の現況と展望 膵移植vs. 膵島移植 わが国における膵島移植の現状と展望 膵・膵島移植研究会膵島班事務局からの報告. 第109回日本外科学会定期学術集会 2009. 4. 2 福岡</p> <p>後藤満一, 他. わが国における膵島移植の現状と展望. 第57回日本輸血・細胞治療学会総会 2009. 5. 28-30 さいたま</p>	<p>G. 知的所有権の取得状況</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 特許取得 なし</li> <li>2. 実用新案登録 なし</li> <li>3. その他 なし</li> </ol>
--	--

「探索医療の成果としての膵島移植医療の確立」に関する研究

研究分担者 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

分離後の膵島の viability を測定することは、膵島移植後の耐糖能の予測に有用であるが、確立された方法はない。WST-1 は細胞内で mitochondria により formazan となり変色するため、細胞の viability の評価に有用である。Lewis ラット雄より膵島を分離した。約 50 個ずつの膵島を 44°C の恒温槽でそれぞれ 0 (Control), 30, 60 分 incubate し、温阻血を負荷した。膵島に WST-1 を加え、1, 2, 4 時間後に microplate reader で absorbance を測定、さらに膵島を融解し DNA 量を測定した。WST-1 assay の absorbance を DNA 量で補正し比較した。また in vivo で 0, 30 分の温阻血時間の WST-1 absorbance /DNA 値を比較した。

Control 及び 44°C で 30, 60 分 incubate された膵島の WST-1 absorbance/DNA 値は 4 時間後で  $1.11 \pm 0.18$ ,  $0.72 \pm 0.08$ ,  $0.49 \pm 0.11$  と Control と比し有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。30 分の温阻血時間の膵島の WST-1 absorbance/DNA は 4 時間後で、Control が  $0.12 \pm 0.12$  であったのに対し、 $0.41 \pm 0.25$  と有意に低下した ( $P < 0.01$ )。

WST-1/DNA assay は汎用性が高く、膵島分離後、簡便・正確に viability を評価することが可能であった。

## A. 研究目的

臨床膵島移植が 2004 年 4 月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。現在、膵臓の消化酵素の問題で一時的にわが国の膵島移植は中断を余儀なくされているが、酵素の問題は解決され、早々の再開が期待されている。昨年度までにイヌ非純化膵島移植の実験的検討、当施設におけるヒト膵島分離・凍結保存の臨床的研究、当施設における臨床膵島移植の研究、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、当施設の膵島凍結保存法の有効性に関する研究、新たな膵島保存法の開発の諸研究を実施し、膵島分離から移植、凍結保存に至る種々の過程につき臨床成績向上に寄与する技術開発に努めてきた。

わが国の臨床膵島移植においては、心停止ドナーを用いることがほとんどであり、分離された膵島機能を評価することは、移植膵島数の決定や移植後機能の予測の上で極めて重要である。しかしながら、分離膵島機能を正確に評価する方法は確立されていない。本年度は、新たな膵島 viability 評価法の基礎的研究を行い臨床応用の可能性につき検討した。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

Lewis rat, 雄, 300-350g (日本エスエルシー) を膵島ドナーとして使用した。実験動物は国立病院機構千葉東病院臨床研究センター共同実験準備室 2 で飼育、管理した。すべての rat に餌と水分を自由摂取させた。本研究は国立病院機構千葉東病院実験動物安全管理委員会の承認の下、研究を行った。

### 2. 方法

#### 1) 膵島分離

rat を全身麻酔下に U 字切開を行い開腹。横隔膜を切開し開胸、胸腔内下大静脈を切開し脱血死させた。十二指腸側を結紮した総胆管より逆行性に 1mg/ml の Liberase RI 溶解液 8ml を膵管内に注入し、膵を膨化させ摘出した。50ml チューブ内で摘出膵を 37°C の恒温槽で 30 分間 incubate した後冷却した HBSS を 40ml 加え、1 分間振盪し、膵を消化した。Histopaque-1077 を用いた比重遠心分離法により、膵島分離した。

#### 2) In vitro 温阻血

採取した膵島 50 個を RPMI Medium 1640 に浮遊させ、44°C の恒温槽でそれぞれ 0 (Control), 30, 60 分 incubate し、温阻血を負荷した。各群の膵島の viability を ADP/ATP assay (n=5) と WST-1/DNA assay (n=3) にて比較検討した。

#### 3) In vivo 温阻血

rat の膵膨化前に 30 分の温阻血を負荷した。下

大静脈切断直後に Liberase RI 溶解液を注入し、臍膨化を行った群を Control 群(n=5), 下大静脈を切断し 30 分後に臍膨化をおこなった群を in vivo 温阻血群(n=5)とし臍島の viability を Dithizone 染色, TUNEL 染色, ADP/ATP assay, WST-1/DNA assay にて比較検討した。

#### 4) WST-1 assay

臍島約 50 個を含む RPMI 溶液 100 $\mu$ l を, 96 well plate に移し替えた後, 各 well に 10 $\mu$ l の WST-1 (Roche) を加えた. 1, 2, 4 時間後に microplate reader を用いて, 主波長 450nm, 副波長 690nm で absorbance を測定した。

#### 5) DNA 抽出

WST-1 assay 後の臍島を 1.5ml マイクロチューブ内で PBS に浮遊し, 超音波ホモジナイザーを用いて検体をホモジナイズした. 添付プロトコールに従いサンプルごとの総 DNA を抽出した。

#### 6) DNA 測定

Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) のプロトコールに沿って以下の如く行った. 各サンプルを 100 $\mu$ L ずつ 96 well plate 移した後に, Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent を 100 $\mu$ L ずつ加え, 5 分間室温で静置後, Standard 溶液とともに microplate reader でそれぞれの蛍光測定を行った. 励起フィルター 485nm, 測定フィルター 535nm, 測定時間を 1 秒間とした. Standard 溶液の測定値より検量線を作成し, その検量線をもとに, 蛍光測定の結果から, DNA 量を測定した。

#### 7) ADP/ATP assay

GloMax 96 (Promega) を用い, ApoGlow (三光純薬) キットのプロトコールに沿って以下の如く行った. In vitro 温阻血臍島として, 44°C の恒温槽でそれぞれ 0, 30, 60 分 incubate した臍島浮遊液をそれぞれ白色プレートに 50 $\mu$ l ずつ加え, 手操作にて 50 $\mu$ l の Nucleotide Releasing Reagent (NRR) を加え, 3 ステップ法に沿って測定した (n=5). 同様に In vivo 温阻血臍島として, Control 群と in vivo 温阻血群の臍島浮遊液をそれぞれ白色プレートに 50 $\mu$ l ずつ加え, 手操作にて 50 $\mu$ l の Nucleotide Releasing Reagent (NRR) を加え, 3 ステップ法に沿って測定した (n=5).

#### 8) Dithizone 染色

In vivo 温阻血を誘導した Control 群と in vivo 温阻血群の臍島浮遊液に Dithizone 溶液 20mg, Dimethyl sulfoxide 2ml, HBSS 18ml を滴下し, 顕微鏡下に臍島の染色状況を確認した。

#### 9) TUNEL 法による apoptosis の評価

In vivo 温阻血を行った Control 群と in vivo 温阻

血群の臍島を検体とし, パラフィン固定を行った後に Tokyo central pathology laboratory co. に TUNEL 染色を依頼し作成した。

#### 10) Statistical analysis

2 群間の比較は対応のない student t 検定で統計処理を行い,  $p < 0.05$  で有意差ありとした。

### C. 研究結果

#### 1. In vitro 温阻血

##### 1) ADP/ATP assay

Control 群の ADP/ATP ratio は  $0.28 \pm 0.33$  であったのに対し, 44°C, 60 分 incubate された臍島の ADP/ATP ratio は  $0.60 \pm 0.27$  と有意に高値であった. しかし, 30 分 incubate 群では  $0.55 \pm 0.35$  と Control 群と比し, 高値ではあるが有意な差は認められなかった (図 1).

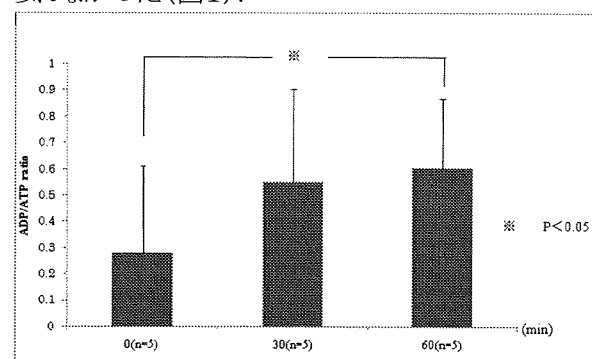


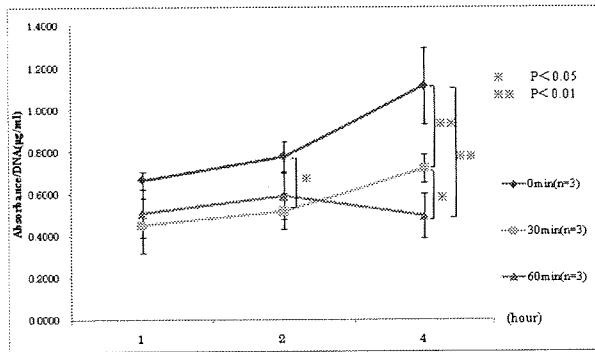
図 1. in vitro 温阻血臍島における ADP/ATP assay

##### 2) WST-1 absorbance/DNA の測定

Control 群の臍島の WST-1 absorbance/DNA 値は 1, 2, 4 時間後でそれぞれ  $0.66 \pm 0.04$ ,  $0.78 \pm 0.07$ ,  $1.11 \pm 0.18$  と上昇が認められたのに対し, 44°C で 60 分 incubate された臍島の WST-1 absorbance/DNA 値はほとんど上昇が認められなかった. 44°C で 30 分 incubate された臍島の WST-1 absorbance/DNA 値は  $0.45 \pm 0.13$ ,  $0.52 \pm 0.09$ ,  $0.72 \pm 0.07$  と時間の経過とともに上昇を認めたものの, Control 群と比し, 上昇は軽度であった (図 2). Control 群と比し, 30 分, 60 分 incubate 群で WST-1 absorbance/DNA 値は 4 時間後で有意に低値であった ( $P < 0.01$ ). さらに 60 分 incubate 群は 30 分 incubate 群と比しやはり 4 時間後の WST-1 absorbance/DNA 値において有意に低値であった ( $P < 0.05$ ).

WST-1 は臍島のような組織浮遊液でも生細胞に取り込まれ, 変色し, mitochondria 機能を反映できることが分かった. その変色の程度は細胞障害の程度を反映していると考えられた。

図2. in vitro 温阻血膵島における WST-1/DNA assay

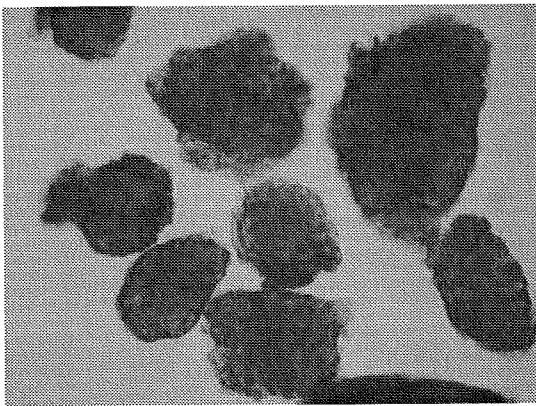


## 2. In vivo 温阻血

### 1) Dithizone 染色

Control 群, in vivo 温阻血群の膵島をそれぞれ Dithizone にて染色した(図3). 両者とも Dithizone によく染色され, 顕微鏡下では形態学的な違いは見出せなかった.

a : Control 群の膵島



b : in vivo 温阻血群の膵島

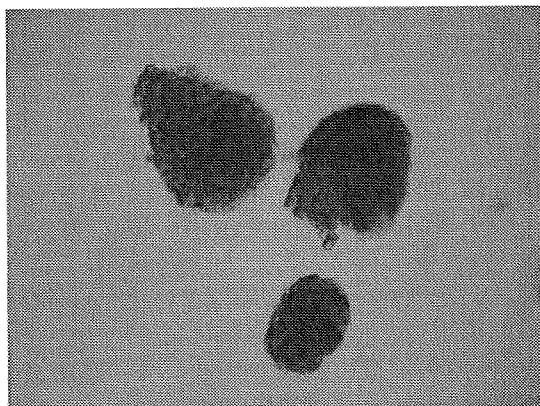


図3. in vivo 温阻血膵島における Dithizone 染色

2) TUNEL 法による apoptosis の評価  
Apoptosis の評価のために Control 群, in vivo 温阻血群の膵島を TUNEL 染色した. TUNEL 染色は

両群とも陰性で両者に明らかな違いは認められなかった.

### 3) ADP/ATP assay

Control 群の ADP/ATP ratio は  $0.28 \pm 0.33$  であったのに対し, in vivo 温阻血群の ADP/ATP ratio は  $1.63 \pm 0.55$  と有意に高値であった(図4).

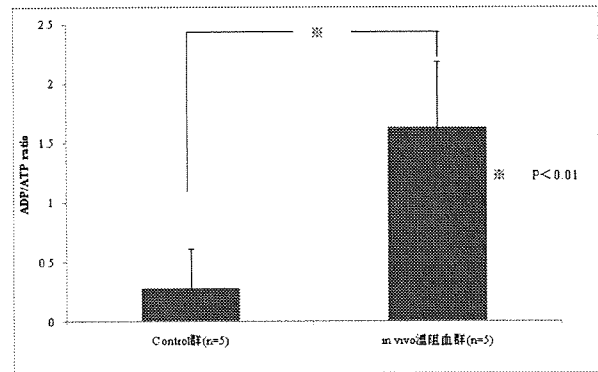


図4. in vivo 温阻血膵島における ADP/ATP assay

### 4) WST-1 absorbance/DNA の測定

Control 群の WST-1 absorbance/DNA の 1, 2, 4 時間後の測定値はそれぞれ  $0.10 \pm 0.07$ ,  $0.26 \pm 0.17$ ,  $0.41 \pm 0.25$  と時間の経過とともに absorbance が上昇していったのに対し, in vivo 温阻血群の WST-1 absorbance/DNA はそれぞれ  $0.04 \pm 0.04$ ,  $0.10 \pm 0.11$ ,  $0.11 \pm 0.12$  とほとんど上昇せず, 全測定時間において有意に低値であった(図5). WST-1/DNA assay で in vivo における温阻血障害の程度も評価が可能であることが示唆された.

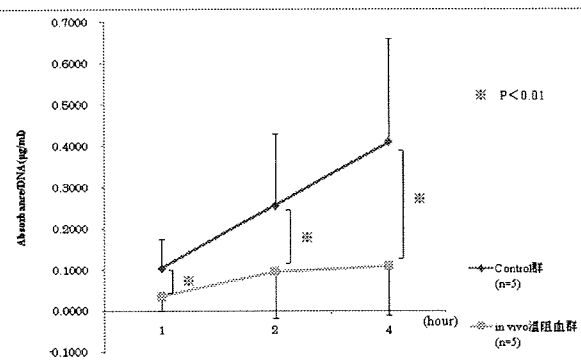


図5. in vivo 温阻血膵島における WST-1/DNA assay

## D. 考察

膵島の viability の測定方法には, Laser scanning cytometry(LSC), Oxygen consumption rate(OCR), ADP/ATP rati, MTT assay, などを用いた方法が報告されている. LSC は装置が非常に高価であり,



また測定のためには何かしらの染色が必要なため、迅速性にも問題がある。OCRは装置が市販化されるまでには至っておらず、LSC同様迅速性に問題がある。現時点ではADP/ATP ratioは最も迅速で簡便な膵島のviability測定法と考えられるが、LSC装置程ではないものの、装置(Luminometer)が高価であることや、Luminometer自体が他のassayで汎用性に乏しい。そのためMTT assayの応用を検討したが、MTT assayは古典的で汎用性の高いviability測定方法である半面、脂溶性であることから膵島のような組織浮遊内で攪拌溶解する際には、膵島を破壊してしまう。そこでMTTを水溶性にしたWST-1に着目した。WST-1 assayは生細胞のmitochondriaの脱水素酵素による、tetrazolium塩WST-1の切断に基づく、細胞増殖と生存能を定量化するための発色キット[3H]-チミジン取り込みassayに代わるNon-RI法である。tetrazolium塩は、細胞内の酵素でformazanに分解される。生細胞が多い場合、サンプル中にはmitochondriaの脱水素酵素の全活性が多いことになる。この酵素活性の増加は、培養中の代謝的に活性のある細胞数と直接相関する、形成formazan色素の増加を導く。代謝的に活性な細胞により製造されたformazan色素は、色素溶液のabsorbanceを適切な波長で測定することが可能であり、通常ELISAで使用するmicroplate readerにより定量化される。

WST-1 assayはMTTに比べいくつかの利点を持っている。①不溶性のformazan結晶に分解され、それを可溶化しなければならないMTTに比べ、WST-1は水溶性の分解産物を産し、余分な可溶化のステップ無く測定できる。そのため、microplate readerの使用により大量サンプル処理が可能である。②WST-1はより安定的である。それゆえ、2~8°Cで大きな分解が無く、数週間は保存できる。③より広い直線域を持ち、素早い発色を示す。反応時間が短いため、全てのassayは1枚のmicroplate中で行える。④ラジオアイソトープや可溶化のための揮発性の有機溶媒を使用しないため、安全である。⑤absorbanceは、生細胞数と強く相関し、MTTより高感度である。

今回in vitro温阻血を行うため、膵島を44°Cでincubateを行った。結果は44°Cでincubateを行うとWST-1 absorbance/DNA値が細胞障害の程度に依存し、低下することが示された。さらに、in vivo温阻血を行うため、30分の温阻血時間を設けWST-1/DNA assayを施行すると、温阻血群で膵島のabsorbance/DNAはControl群に比べて有意に低く、膵島のviabilityを反映していると考えられ

た。すなわち、WST-1は膵島のような組織浮遊液でも、膵島細胞内に取り込まれ、mitochondria内でformazanに変化し、viabilityの評価が可能であると考えられた。また、WST-1 assayを施行し2時間後、より正確には4時間後の測定値で膵島のviabilityを評価することが可能であると考えられた。

Dithizon染色ではControl群と比し、30分の温阻血障害後の膵島も形態学的な差を見出せなかった。TUNEL染色では30分の温阻血障害後の膵島がほとんど陰性であったが、TUNEL染色がapoptosisの最終形の評価であるのに対し、WST-1/DNA assayではmitochondria機能を反映しているため、TUNEL染色陰性の早期の細胞障害をWST-1/DNA assayでは評価できたと考えている。

rat膵島に対するWST-1/DNA assayはin vitroあるいはin vivoで誘導された膵島の温阻血障害の程度を定量することが可能であった。今後、大動物膵島に対するassayや移植モデルとの相関性を検討することにより、臨床膵島移植における有用な膵島viability測定方法として確立出来ると考えられる。

## E. 結論

WST-1/DNA assayは汎用性が高く、膵島分離後簡便・正確にviabilityを評価することが可能であった。臨床膵島移植での有用性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (書籍)

1. 剣持 敬. 膵・膵島移植 病気と薬パーフェクト BOOK2009. 池田宇一, 大越教夫, 横田千津子 編, 南山堂, pp1543-1545, 2009, 東京
2. 剣持 敬. V.移植療法の新しい展開 ①膵臓移植の現況と展望 糖尿病カレントライブラリー「糖尿病治療の新しい展開」岡 芳知 編, 文光堂, pp74-80, 2009, 東京
3. 剣持 敬. XIV. 腎移植と膵移植 2. ABO血液型不適合膵臓移植 腎移植のすべて.

高橋公太 編, メディカルビュー社,  
pp490-493, 2009, 東京

4. 剣持 敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪 尚武, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平 ABO 血液型不適合ドナーからの生体膵・腎同時移植の成績 ABO 血液型不適合移植の新戦略 2009. 高橋公太・田中紘一 編, 日本医学館, pp55-62, 2009, 東京
5. 剣持 敬, 大月和宣. 手術室・器械用具と業務. ナースの外科学 改訂第 5 版 磯野可一 編, 中外医学社, pp15-50, 2010, 東京
6. 剣持 敬, 大月和宣, 磯野可一. 鏡視下手術. ナースの外科学 改訂第 5 版 磯野可一 編, 中外医学社, pp145-155, 2010, 東京
7. 剣持 敬. 臓器移植. ナースの外科学 改訂第 5 版 磯野可一 編, 中外医学社, pp156-168, 2010, 東京
8. 剣持 敬. 移植(肝臓・膵臓). 消化器外科イラスト LIBRARY 改訂第 2 版 浅野武秀 監, 貝沼 修 編, メディカルビュー社 pp177-189, 2010, 東京

(雑誌)

1. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Ito T. (2009) Clinical Islet Transplantation in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 16:124-130
2. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Ohtsuki K, Ito T, Suzuki A, Miyazaki M(2010). Living Donor Pancreas Transplantation in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 17:101-107
3. 剣持 敬, 丸山通広, 鈴木亜希子(2009) 当施設での ABO 血液型不適合腎移植—治療戦略の変遷とリツキシマブの有用性— 今日の移植 22:193-197
4. 剣持 敬(2009) 膵臓炎が発症したらどう対応よいでしょうか? 腎と透析 66:644-646
5. 剣持 敬(2009) マージナルドナーシリーズ

[8]腎臓 Organ Biology 16:237-245

6. 剣持 敬(2009) 特集-「移植の医療経済」各臓器移植分野における医療経済 膵臓移植の医療経済 移植 44:31-35
2. 学会発表(移植関連, First authorのみ)
  1. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Akutsu N(2009) Cryopreservation of human islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide. (Symposium) XII International Congress of the The Okayama 2009 CTS - JSOPMB Joint Conference 2009.4.20 Okayama, Japan
  2. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Otsuki K, Ito T, Matsubara H(2009) Simultaneous Pancreas and Kidney Transplantation from Living Donors in Japan. - Outcome of Eleven Consecutive Clinical Trials in a Single Institution- (Oral presentation) International Pancreas and Islet Transplant Association. 2009.10.12 Venice, Italy
  3. Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Otsuki K, Ito T, Matsubara H(2009) Three-Year follow-Up of Simultaneous Pancreas and Kidney Transplantation from ABO-incompatible Living Donors. (Oral presentation) International Pancreas and Islet Transplant Association. 2009.10.12 Venice, Italy
  4. Kenmochi T(2009) Islet transplantation in Japan (Invited speaker). The 9th Symposium of Research for beta-cell and Islet Transplantation. 2009.11.28 Seoul, Korea
  5. 剣持 敬(2009) わが国の腎移植統計からみた長期生着阻害要因(講演) Renal Transplantation Forum 2009. 2009.5.16 東京
  6. 剣持 敬(2009) 臓器移植についてのレクチャー:わが国の現状.(講演) 日本移植学会公開講座. 2009.5.24 千葉市