

- 39) Transplantation in Japan. Teroaka S. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong.2008
- 40) Donation after cardiac death in Japan.Teroaka S. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong.2008
- 41) Donation after brain death in Japan.Teroaka S. Conjoint Annual Scientific Congress, Royal Australasian College of Surgeons and The College of Surgeons of Hong Kong.2008
- 42) マージナルドナーからの臍臓移植の適応と限界. 小川勇一、頓所 展、寺岡 慧、他. 第44回日本移植学会総会. 2008年
- 43) 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
- 44) 腎症：腎不全・透析・移植1型糖尿病患者における臍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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) 本邦における臍・臍島移植の現状. 寺岡 慧. 第10回近畿臍移植検討会. 2007年
- 48) 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
- 49) 臍移植後の抗凝固療法. 小川勇一、中島一朗、寺岡 慧、他. 第35回臍・臍島移植研究会. 2008年
- 50) 糖尿病根治へのブレイクスルー. 寺岡 慧. 第34回臍・臍島移植研究会. 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-臍臓移植 vs.臍島移植. 寺岡 慧. 第35回臍・臍島移植研究会. 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

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）
（総合）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：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。また移植前培養時のMitomycin（以下MMC）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MMCを添加することにより、膵島の中心壊死を軽減しさらに細胞周期停止を誘導するタンパクの発現を認めることを明らかにした。さらに、本邦の臨床膵島分離・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。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、実施体制を、膵島移植班事務局の立場で整えた。臨床膵島移植は、膵島分離用酵素の製造過程にウシ脳抽出物が含まれていたため停止しているが、その酵素がプリオン感染の可能性を有するかどうかについても検証を加え、その可能性は極めて小さいことを明らかにした。

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遺伝子をマイクロアレイにより検討するとともに、移植前の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。

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。

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) 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。

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-1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-2、3)。

図-2

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

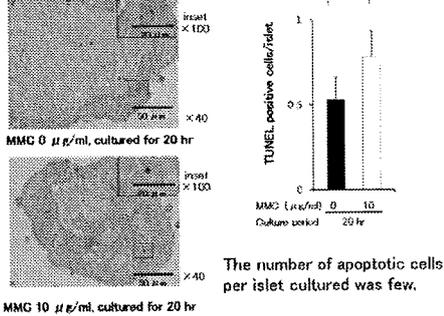
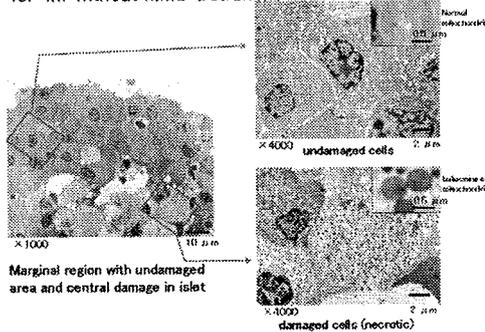


図-3

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-4)。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-5)。

図-4

Ratio of damaged area to whole islet following MMC treatment

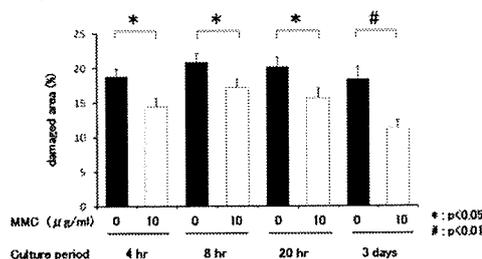
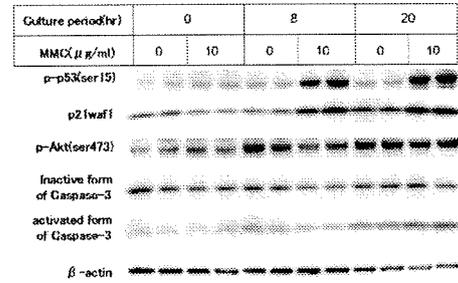


図-5

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



4) 日本膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局として

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、新しい酵素は従来の酵素と同等以上の効果を持つことを確認した。

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。

5) 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°C10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10⁻⁴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°C10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。

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 adenine nucleotides 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。

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。

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。

また、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も証明され、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。

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) 穴澤貴行、他. 膵島移植の現状と展望. 移植 42(3):235-241, 2007.
- 2) 齋藤拓朗、他. わが国における膵島移植の現状—膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局からの報告. 今日の移植 20(3):199-204, 2007.
- 3) 膵・膵島移植研究会 膵島移植班膵島移植症例登録報告 (2007). 移植 42(5):439-447, 2007.
- 4) K.Ohtake et al. Bone marrow traffic to regenerating islet induced by streptozotocin injection and partial pancreatectomy in mice. Transplant Proc. 40(2):449-51, 2008.
- 5) 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.

6) 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.

7) 齋藤拓朗, 後藤満一. わが国における臓器移植の現状と将来展望—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.

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

9) 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

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

2) Saito T, et al. Islet transplantation program from non-heart beating donor, report from Japanese Islet Transplantation Registry. CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference 2007. USA.

3) 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.

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

5) 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.

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

7) 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.

8) 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.

<p>9) 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.</p> <p>10) 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.</p> <p>11) 膵・膵島移植研究会. 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.</p> <p>12) Saito T, et al. Preexisting donor factors and isolation variables leading to successful islet transplantation from donors after cardiac death. The 12th Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association 2009.10.12-17 Venice, Italy</p> <p>13) 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> <p>14) 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>15) 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>16) 齋藤隆晴, 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>17) 齋藤拓朗, 他. I型糖尿病移植治療の現状と展望 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>18) 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"> 1. 特許取得 なし 2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし
--	--

「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

基礎研究より非純化膵島移植も十分可能であり、臨床応用可能と考えられた。当院で臨床膵島分離を 24 回施行、4 名の1型糖尿病患者に移植した。低血糖発作の消失、必要インスリン量の減少、HbA1C 値の低下が得られ、臨床の有効性が確認された。凍結保存された膵島は全例感染なく、形態も良好で、インスリン分泌能も有し、当施設の凍結保存法の有効性が示された。膵管内 p38MAPK inhibitor 注入により、膵島細胞のアポトーシス抑制による膵島分離成績の向上が得られた。HES 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、臨床応用した。本保存法にて凍結したヒト膵島は糖尿病マウスの血糖改善に新鮮膵島の約 2 倍の膵島数を必要とした。

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。脳死ドナー膵を使用する欧米と異なり、わが国では心停止ドナー膵からの膵島移植が施行されている。心停止ドナー膵からの膵島分離は困難なことも多く、即座に膵島移植(新鮮膵島移植)に用いられない場合も多い。また心停止ドナーは長期の死戦期を伴うこともあり、効率的な膵島分離法が必須である。また新鮮膵島移植に用いられなかった場合には、凍結保存をすることにより、ドナー膵から得られた膵島を効率的に移植に使用することが可能となるため、優れた膵島保存法の開発も必須の技術である。本研究において初年度は、大動物(ブタ、イヌ)において確立した当施設の膵島分離法・膵島凍結保存法を臨床応用することを目的とした。また、2年目には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を施行、またさらなる効率的膵島凍結保存法の開発を目的として、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。

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。最終年度は、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. 膵島分離法の基礎的研究

1) 動物

ビーグル犬(8.5-11kg) 16 頭を用いた。麻酔はペントバルビタール静脈内麻酔法にて施行した。

2) 方法

ビーグル犬を全身麻酔下に開腹。膵を全摘し、膵島分離施行した。

[膵島分離法]摘出膵はわれわれの独自の方法にて膵島分離した。すなわち摘出膵の主膵管より 37°C コラゲナーゼ液(2.0mg/ml HBSS, Collagenase P, Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN)を注入し、膵をメカニカルチョッパーにて細切したのち、独自の膵島消化装置を使用して(図1)、膵組織を消化した。

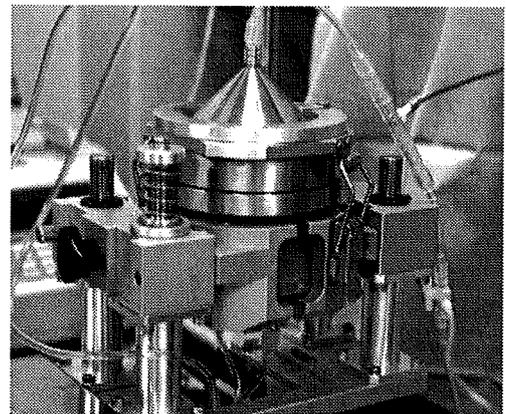


図1. 膵島消化装置

[実験群]消化組織を純化することなく、生理食塩水 100ml に混濁し、移植する群(非純化群, n=6)と消化組織を COBE2991 Cell processor を用いて Euro-Ficoll 比重遠心法にて膵島を純化し生食

100ml に浮遊し移植した群(純化 E 群, n=5), HES-Collins 比重遠心法にて純化し生食 100ml に浮遊し移植した群(純化 H 群, n=5)の3群にわけ検討した.

[膵島自家移植]各群ともに上腸間膜静脈より, カテーテルを刺入し, 門脈本幹にカテ先を留置した. 点滴法にて約 15-30 分かけて自家移植した. なお, 各群ともに生食 100ml の膵島浮遊液内にヘパリン 2000 単位を混入した. 移植終了後カテーテルは速やかに抜去した.

[検索項目]各群ともに膵島収量, 純度, 移植膵島 pellet 量, 形態学的検討, 膵島機能検査(perifusion study), 移植後血糖値の推移, IV-GTT を施行した.

2. 当施設におけるヒト膵島分離・凍結保存の臨床的研究

1) 対象

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

2) 膵臓の摘出・搬送法

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

3) 膵島分離法

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

- ①膵臓のクリーニング, 重量測定
- ②膵臓の膨化(低温リベレース液)
- ③膵の細切(2-3cm 角)
- ④千葉東膵島消化装置(図1)で温消化
- ⑤膵消化組織の回収
- ⑥膵島の純化(Euro-Ficoll discontinuous

technique, COBE2991)

⑦膵島移植, 培養, 凍結保存

4) 膵島凍結保存法

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

- ①膵島を凍結保存液である CP-1 液に懸濁する.
- ②凍結用バッグ(7005-2, CharterMed Inc., USA)に封入する
- ③プログラムフリージングシステム(Cryomed Model 1010, Forma Med Inc., USA)にて-80°C に冷却する.
- ④凍結プログラムは UCLA の方法に準じ, 改良を加え, 表1のように設定した.

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.

3. 当施設における臨床膵島移植の研究

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

1) 膵島移植法

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

2) 移植後免疫抑制法

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

4. 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トリーを用いた 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。

5. 当施設の膵島凍結保存法の有効性に関する研究

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2)

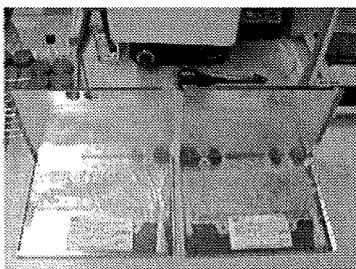


図2. ヒト膵島凍結用バッグ

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3)。

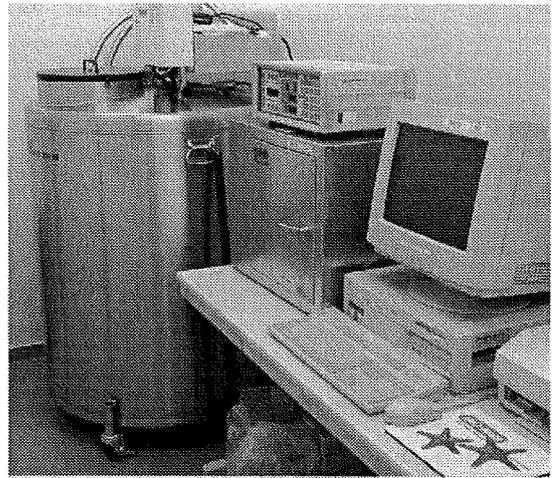


図3. プログラムフリージングシステム

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。

⑤液体窒素タンク(ヒト膵島バンクシステム)内に保存。

5-1. 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(6.25 μ g/ml), Transferrin(6.25 μ g/ml), Selenious acid(6.25ng/ml) , Linoleic acid(5.35 μ g/ml) , Albumin(1.25mg/ml)] , 1%L-glutamine , 1%antibiotic antimycotic solution , 16.8 μ mol/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

5-2. 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. ニ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.

6. 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.

6-1. 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 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -30°C のプロトコールで凍結する (図 4). 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 5). 今回, ABI 社との共同研究にて, 膵島凍結保存に用いた.

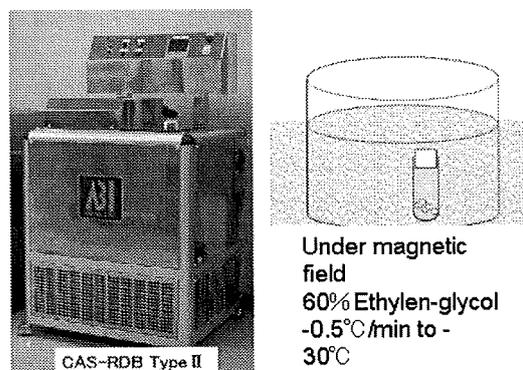
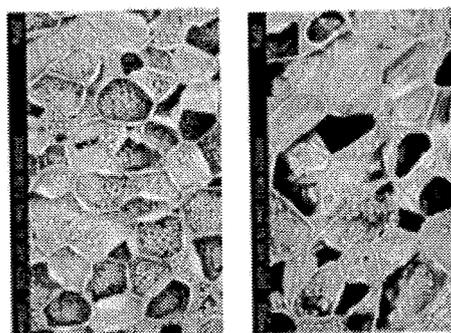


図4. Cell Alive System (CAS)



CAS Conventional

図5. 凍結解凍後のわさびの葉の形態

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.

6-2. 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6)

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6. 電磁波過冷却装置(PROKEPT)

7. 新たな膵島 viability 評価法の研究

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, 膵膨化を行った群をControl群(n=5), 下大静脈を切断し30分後に膵膨化をおこなった群をin vivo 温阻血群(n=5)とし膵島の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

膵島約50個を含むRPMI溶液100μlを, 96well plateに移し替えた後, 各wellに10μl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後の膵島を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100μLずつ96well plate移した後に, Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagentを100μL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/ATPassay

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 温阻血膵島として, 44°Cの恒温槽でそれぞれ0, 30, 60分incubateした膵島浮遊液をそれぞれ白色プレートに50μlずつ加え, 手操作にて50μl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 温阻血膵島として, Control群とin vivo 温阻血群の膵島浮遊液をそれぞれ白色プレートに50μlずつ加え, 手操作にて50μl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 温阻血群の膵島浮遊液にDithizone溶液20mg,

Dimethyl sulfoxide 2ml, HBSS 18ml を滴下し、顕微鏡下に膵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 温阻血群の膵島を検体とし、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. 膵島分離法の基礎的研究

1) 膵島収量, 純度, 移植膵島 pellet 量

膵島収量は、非純化群が $8,811 \pm 6,828$ IEQ/g, 純化 E 群 $6,730 \pm 3,536$ IEQ/g, 純化 H 群 $9,021 \pm 3,757$ IEQ/g であった。純度は非純化群が $2.5 \pm 0.55\%$, 純化 E 群 $85.9 \pm 8.8\%$, 純化 H 群 $92.5 \pm 7.5\%$ であった。移植膵島 pellet 量は非純化群で 10.8 ± 1.9 ml であったのに対し、他の2群では < 2 ml であった。

2) 形態学的検討

非純化群では、膵島は良好な形態を有し、一部は外分泌組織に包埋される形で存在した。純化 E 群では膵島の大きさはばらばらで、小膵島は一部破壊が見られた。純化 H 群では良好な膵島がほぼ均一な大きさと分離された (図7)。

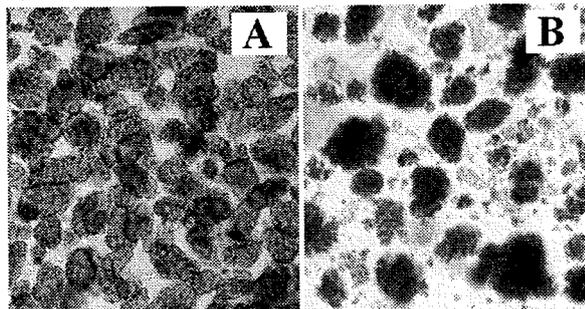


図7. 分離膵島像 (A: 純化 H 群, B: 純化 E 群)

3) 膵島機能検査 (Perifusion Study)

各群の膵島の perifusion study の結果を示す (図8)。非純化群ではグルコース負荷に対するインスリン分泌は遅延し、かつ分泌量も低く、stimulation index も 2.1 であった。これに対し純化群では2峰性のインスリン分泌が得られ、特に純化 H 群では stimulation index も 10.8 と良好であった。

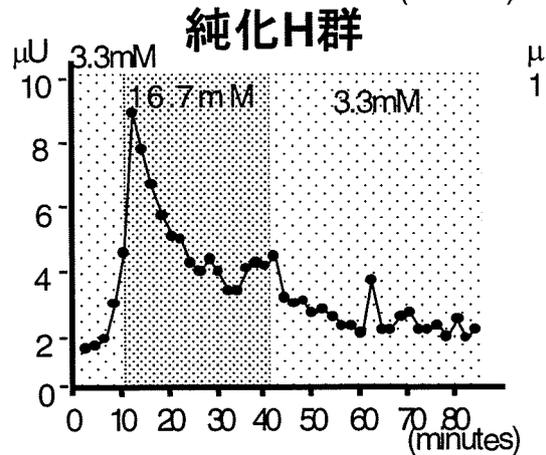
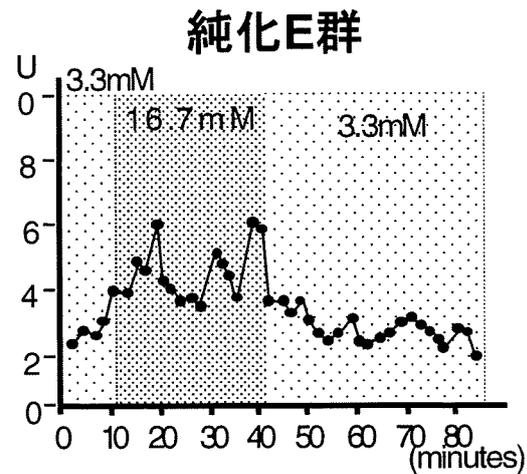
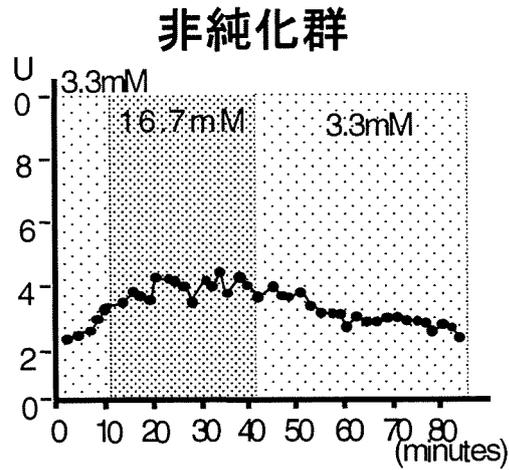


図8. Perifusion study

4) 移植後血糖値の推移 (図9)

純化 E 群では移植後血糖値は 200mg/dl 前後で推移したのに対し、純化 H 群、非純化群では血糖値は 100mg/dl 前後と正常値で推移した。

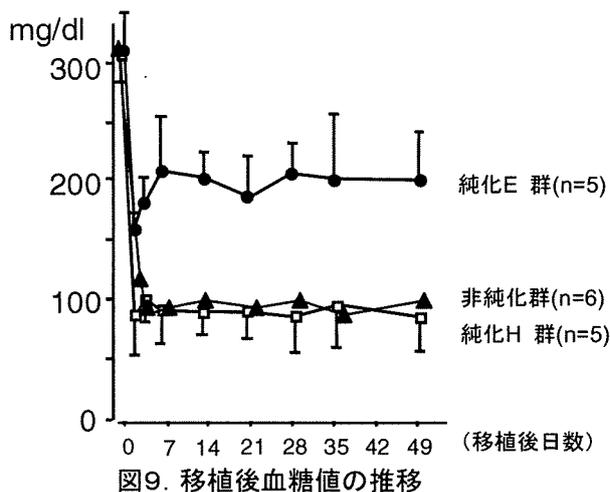


図9. 移植後血糖値の推移

2. 当施設におけるヒト膵島分離・凍結保存の臨床的研究

1) ドナーの検討

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

死体内灌流は 13 例 (56.5%) がローラーポンプによる強制灌流法、10 例 (43.5%) が滴下灌流法であった。搬送は 17 例 (73.9%) が 2 層法で、他の 6 例 (26.1%) が UW 液単純浸漬保存法で施行した。

2) 膵島分離結果

膵島収量は、400～491,040IEQ (平均 148,511 IEQ) で、純度は 1～70% (平均 35.3%) とばらつきが大きかった。図 10 のごとく、不良例では膵島の破壊、外分泌組織の混入が見られた。

Static incubation による膵島内分泌機能評価では、Stimulation index は 1.38-11.69 であった。

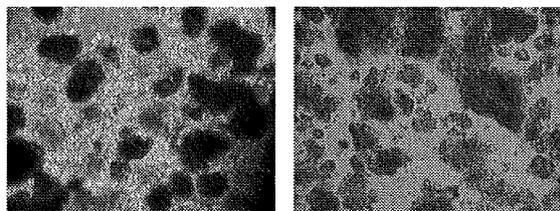


図 10. 膵島分離良好例 (左)、不良例 (右)

膵島分離成功 (高収量、高純度) に影響する因子として、心停止エピソードが無いこと、死因が脳血管障害でないこと、無尿時間が短いこと、総阻血時間が短いこと、2 層法で保存・搬送することなどがあげられた。23 例のうち 6 例 (26.1%) がわが国の新鮮膵島移植基準を満たし、移植に用いられ、15 例 (65.2%) は凍結保存された。他の 2 例は、膵島が得られず、焼却処分した。

3) 膵島凍結保存結果

今回検討に用いた 15 例の凍結保存膵島の分離時のデータでは、年齢は 10 歳～69 歳、収量は 394.17～2264.39IEQ/g であった。Static incubation にて算出した stimulation index は 1.4～5.83 とインスリン分泌能を有していた。15 例ともに細菌、嫌気性菌、真菌、抗酸菌の培養で発育せず、陰性であった。サンプルの機能検査が施行し得た 12 例の検討では、分離直後の膵島機能検査 (Static incubation) から算出した Stimulation index (SI) が ≥ 1.2 を示す機能良好群が 8 例、 < 1.2 であった機能不良群は 4 例であった。以下 2 群につき形態学的に比較検討した。

機能良好群では形態が良好に保持されたものが 7/8 (87%) であったのに対し、機能不良群では 1/4 (25%) と機能不良群では形態の保持が困難であった。形態良好群の Dithizone 染色像 (図 11)、HE 染色像 (図 12)、電子顕微鏡像 (図 13) ではいずれも正常の膵島の形態が保持されていた。

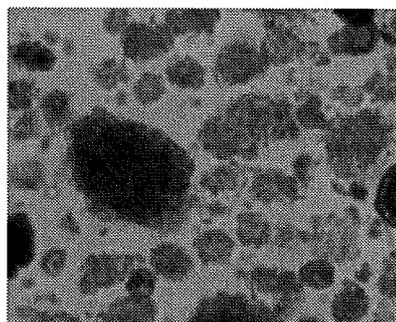


図 11. Dithizone 染色像

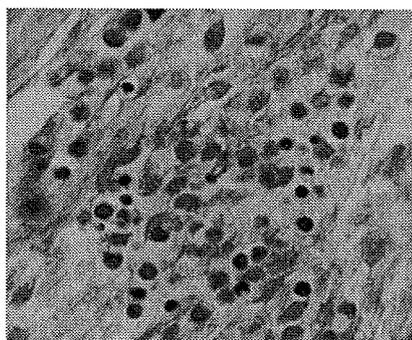


図 12. HE 染色像

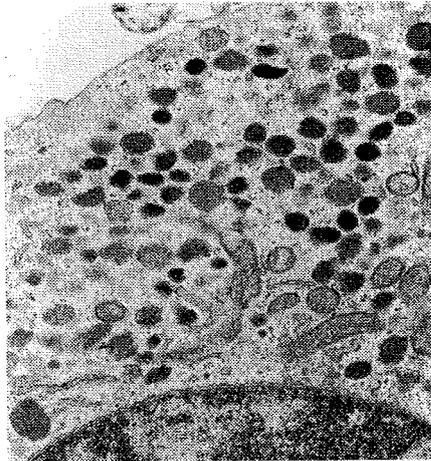


図 13. 電子顕微鏡像

3. 当施設における臨床膵島移植の研究

23 例の分離のうち新鮮膵島移植基準を満たした 6 例の分離膵島を 4 名の 1 型糖尿病患者に移植した。2 例が 2 回移植例であった。全例移植中の Vital sign に著変なく、自覚症状も全く認めなかった。門脈圧も軽度上昇のみであった。移植後は出血などの合併症無く、血糖コントロールの改善と低血糖発作の消失、インスリン使用量の減少が得られ、高感度 C-peptide 値は陽性化した(表 2.)。HbA1c も血糖値の安定化に伴い、著明に低下した。インスリン離脱は得られなかったが患者 QOL の著明な改善がみられた。免疫抑制剤による副作用として 3 例に口内炎が発現したが、Rapamycin の減量により消失した。

表 2. 臨床膵島移植結果

- 国立病院機構千葉東病院外科 -

症例	年齢	移植回数	低血糖発作	インスリン量	CPR	合併症
	性				Pre → Post	
#1	16・♀	2	消失	1/2	<0.05 → 0.8	口内炎
#2	21・♀	2	消失	1/3	<0.05 → 0.6	口内炎
#3	33・♂	1	減少	2/3	<0.03 → 0.2	なし
#4	29・♀	1	消失	1/3	<0.03 → 0.6	口内炎・皮膚炎

図 14 に、2 回膵島移植を受けた症例 1 の血糖値の推移を示した。1 回目の膵島移植後血中 C-peptide 値は 0.8ng/ml と陽性化し、低血糖発作の消失、インスリン投与量の減少、血糖値の安定化が得られたが、1 年後より血中 C-peptide 値の低下、血糖値の不安定化、インスリン必要量の増加が見られた。2 回目の移植により再度血糖値は安定化した。臨床膵島移植においては、短いインターバルでの再移植の必要性が示唆され、また長期

の膵島機能維持の困難性も明らかとなった。

移植後経過(症例 #1、16歳、女性)

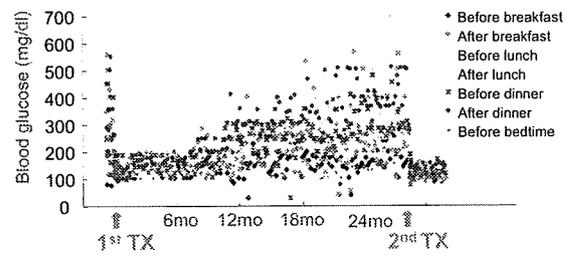


図 14. 膵島移植臨床例(症例 1)

4. 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) ウェスタンブロットティングによる p38MAPK 活性形態学的検討

図 15 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。

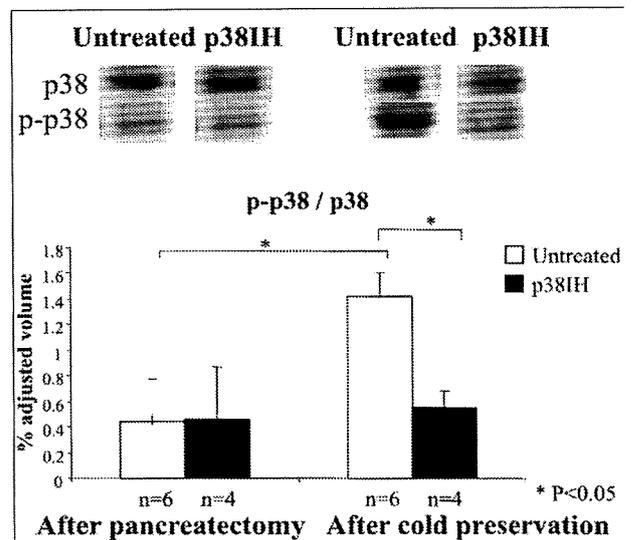


図 15. 低温保存後の p38MAPK 活性

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 16). 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 17).

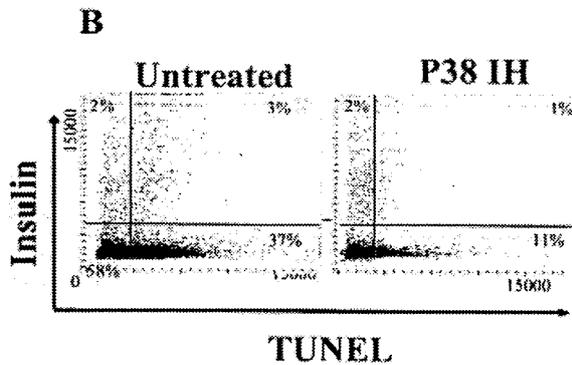


図 16. β 細胞のアポトーシスの評価 (TUNEL 法)

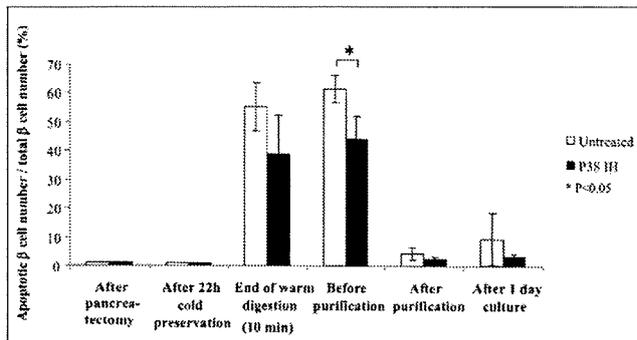


図 17. β 細胞のアポトーシスの評価 (LSC 法)

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.

5. 当施設の膵島凍結保存法の有効性に関する研究

5-1. 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 $80,349 \pm 37,164$ IE_q, 純度 $87.0 \pm 5.7\%$ に比較して, 凍結解凍後は膵島数 $57,595 \pm 31,027$ IE_q, 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 18 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

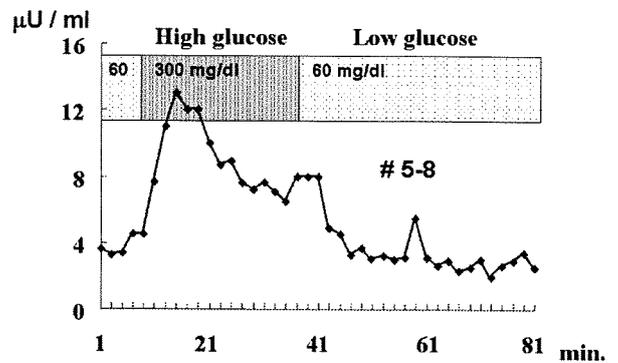


図 18. Perifusion assay (凍結解凍後イヌ膵島)

5-2. 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 19)

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.

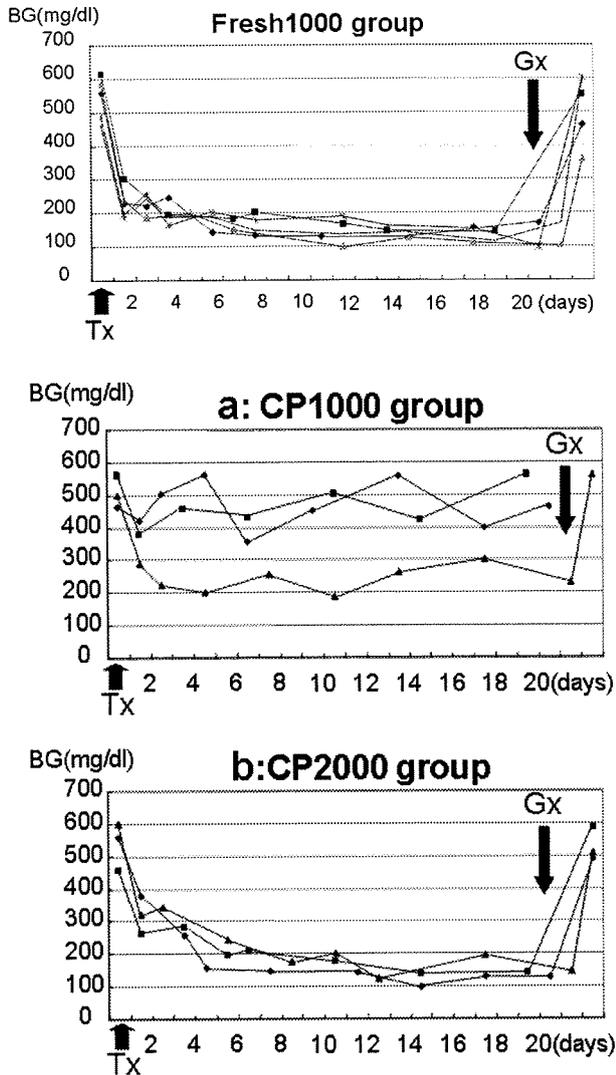


図 19. 膵島移植後血糖値の推移

6. 新たな膵島保存法の開発

6-1. Cell Alive System による新たな膵島凍結保存法の基礎的研究

1) static incubation

Stimulation index は CP-1 群: 2.57 ± 0.86 ($n=3$), RPMI 群: 1.76 ± 0.25 , UW 群: 2.07 ± 0.23 , PFC 群: 1.03 ± 0.15 と CP-1 群で最も良好であり, 本凍結保存法においても CP-1 液が至適であると考えられた(図 20).

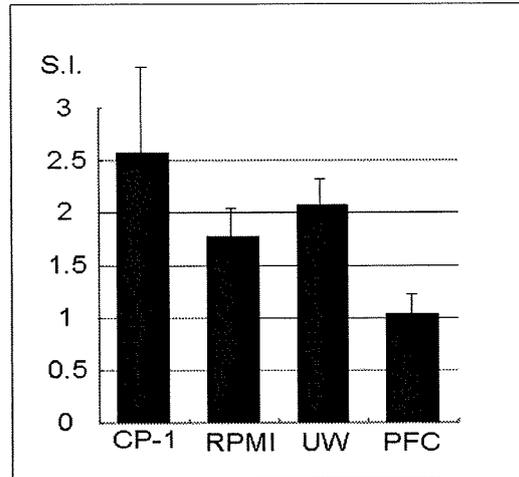


図 20. Stimulation Index

6-2. 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) 形態学的検討

UW 群, Prokept 群では形態は良好に保たれたが, 培養群では, 膵島の fragmentation, 中心壊死が著明であった.

2) 膵島回復率

膵島回復率は, 培養群: 63.5%, UW 群: 95.3%, Prokept 群: 92.8 と, 培養群に比し UW 群, Prokept 群で回復率が良好であった.

3) Static incubation

Stimulation index は培養群: 1.22, UW 群: 2.56, Prokept 群: 2.33 と回復率と同様, 培養群に比し UW 群, Prokept 群で良好であった.

7. 新たな膵島 viability 評価法の研究

1. In vitro 温阻血

1) ADP/ATP assay

Control 群の ADP/ATP ratio は 0.28 ± 0.33 であったのに対し, 44°C , 60 分 incubate された膵島の ADP/ATP ratio は 0.60 ± 0.27 と有意に高値であった. しかし, 30 分 incubate 群では 0.55 ± 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 21).

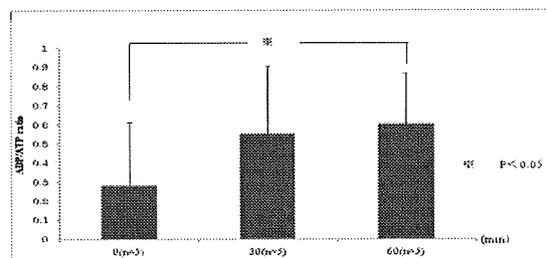


図 21. in vitro 温阻血膵島における ADP/ATP assay

2) WST-1 absorbance/DNA の測定

Control 群の膵島の WST-1 absorbance/DNA 値は 1, 2, 4 時間後でそれぞれ 0.66 ± 0.04 , 0.78 ± 0.07 , 1.11 ± 0.18 と上昇が認められたのに対し, 44°C で 60 分 incubate された膵島の 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 された膵島の WST-1 absorbance/DNA 値は 0.45 ± 0.13 , 0.52 ± 0.09 , 0.72 ± 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 22).

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 は膵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.

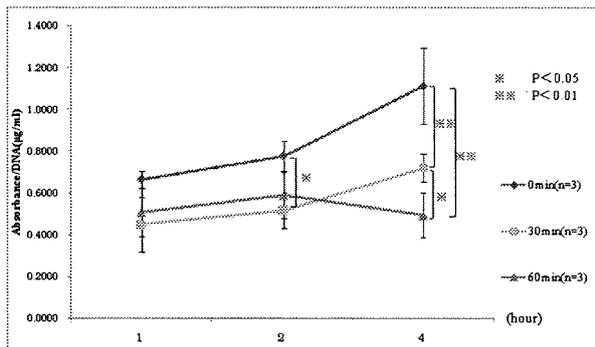


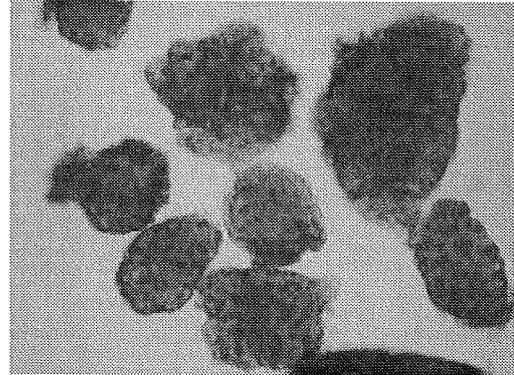
図 2. in vitro 温阻血膵島における WST-1/DNA assay

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 23). 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

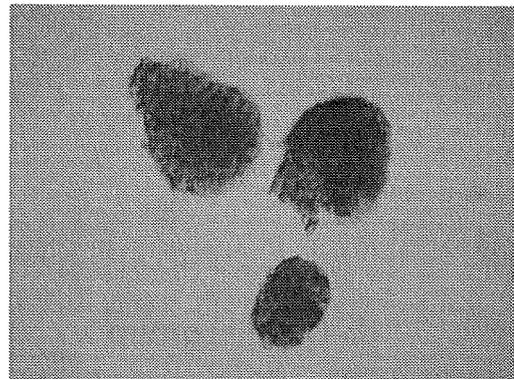


図 23. in vivo 温阻血膵島における Dithizone 染色

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 ± 0.33 であったのに対し, in vivo 温阻血群の ADP/ATP ratio は 1.63 ± 0.55 と有意に高値であった(図 24).

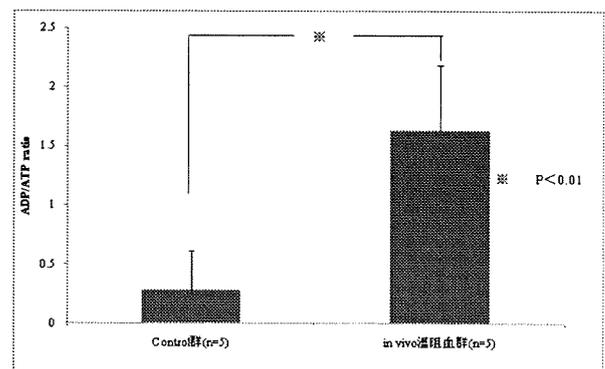


図 24. in vivo 温阻血膵島における ADP/ATP assay

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 ± 0.07 , 0.26 ± 0.17 , 0.41 ± 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 ± 0.04 , 0.10 ± 0.11 , 0.11 ± 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 25). 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。

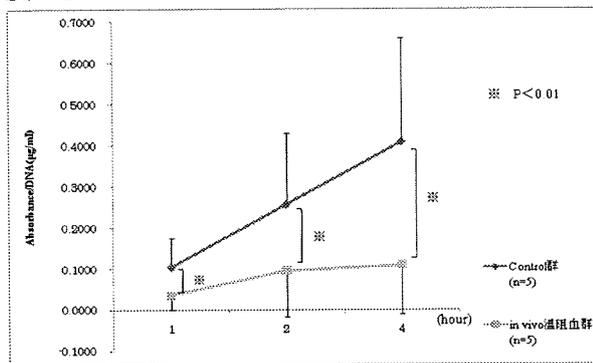


図 25. in vivo 温阻血群における WST-1/DNA assay

D. 考察

わが国において膵島移植の臨床が開始されたが, わが国の臨床例の経験より, 悪条件の心停止ドナー (いわゆるマージナルドナー) からは, 高収量, 高純度の膵島が得られないことも多い. 初年度の研究成果として, 大動物実験において, 純度が低い場合にも膵島移植が可能かどうかイヌ膵島自家移植モデルにて検討した. In vitro の膵島機能評価 (perifusion study) においては, 非純化膵島の機能は低いと評価されたが, 自家移植では長期の正常血糖維持が可能であり, 今後低純度でも十分な収量がある場合には新鮮膵島移植に使用できる可能性を示唆した. このデータをもとに今後新鮮膵島移植の純度の基準 (現在は $\geq 30\%$) の見直しが必要と考えられた。

凍結保存膵島を公平・公正に膵島移植に用いるためには膵島バンク構築が急務と考えられる. そのためには安全な膵島凍結保存法が必須である. 現在われわれは独自のバッグ一括大量凍結保存法を臨床に応用している. 今回, すでに当院バンクに凍結保存されている 15 例の膵島を解凍し, その安全性・有効性を評価した. 感染は 1 例もみられず, 当院 GMP 準拠 CPC における凍結保存技術の安全性が確認された. また機能評価においては, 凍

結保存により形態, 機能低下が約 1/3 の例にみられたが, サンプルのチェックにより解凍前に評価しえるため, 新鮮膵島移植に比較して有効性の予測が可能であり, 有用であると考えられた。

新鮮膵島移植を行なった 4 例はいずれも血中 C-peptide 値の陽性化, 低血糖発作の消失, 血糖値の安定化が得られた. 1-2 回の移植でインスリン離脱は得られていないが, 患者の QOL の格段の向上が確認され, 膵島移植の臨床的有効性が証明された。

わが国において当施設の 4 例を含む 18 例の心停止ドナー提供の臨床膵島移植が実施され, その安全性と有効性が得られているが, いくつかの課題も明らかとなってきた. わが国では条件の悪い心停止ドナー (いわゆるマージナルドナー) からの膵島分離であり, ドナーの条件により膵島収量, 純度のばらつきが大きい. 脳死ドナー膵からの膵島分離を原則とする欧米の膵島分離法がそのままわが国に適用するとは限らず現行の膵島分離法を更に改良し, 膵島分離成績を改善することは, わが国の膵島移植の発展に必須と考えられる。

次年度の膵管内 p38MAPK inhibitor 注入によるイヌ膵島分離成績の向上に関する研究成果から, 膵臓の保存中また膵臓消化中の膵細胞のアポトーシスを抑制することで, 膵島および膵外分泌組織の viability を保持し, 分離膵島数 (収量) の増加が可能となることが確認された. 本研究は大動物を用いた結果であり, 臨床応用が可能と考えている。

現在世界的には Edmonton protocol の成功から, 新鮮膵島移植が主流であり, 凍結膵島の移植は行われていないのが現状である. しかしながら, わが国では心停止ドナー膵からの膵島分離となるため, 新鮮膵島移植の基準を満たさない分離例も多くみられる. ドナーの少ないわが国においては, このような膵島を凍結保存し, 以後の移植に使用することは医学的のみならず, ドナーやドナー家族の提供意思の実現や社会的にも必要である。

当施設では, 膵島の凍結保存に広く使用されている DMSO が膵島傷害性を有するため, 細胞外凍結阻害剤として HES を使用することで, DMSO 濃度を通常の半分以下とする方法で, 膵島を凍結保存した. イヌを用いた基礎研究では, 十分な凍結効果が得られ, 臨床応用した. 凍結解凍したヒト膵島を糖尿病ヌードマウスに移植した in vivo の検討にて, 本方法にて凍結解凍された膵島はインスリン分泌能を有しており, 糖尿病の回復効果を維持していることが確認された. しかし効果は新鮮膵

島に比較し約半分となることが *in vitro*, *in vivo* の結果より示された. この結果より, 今後わが国で凍結膵島移植の臨床応用する場合, 新鮮膵島と同等の効果を得るためには約2倍の膵島数が必要であると考えられる.

しかしながらわれわれの凍結保存法にても膵島回復率は70%程度にとどまっております, さらに優れた膵島回復率を実現する膵島凍結保存法の開発も重要である. 今回, Cell Alive System による新たな膵島凍結保存法の基礎的研究を開始した. この方法で, 植物や組織の凍結保存に優れた結果が得られており, 新たな凍結保存法として期待される. また膵島分離から移植までは現在, 無血清培地での培養法が一般的であるが, 膵島数の減少, 機能低下, Contamination のリスクなどが問題点である. われわれは, 培養に代わる方法として, 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を行い, Preliminary であるが培養法よりも優れた保存結果を得た. 今後更に検討し, 臨床応用につなげてゆきたい.

最終年度では新たな膵島 viability 法につき検討した. 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化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