

**Figure 8: Upregulation of autophagy in rapamycin-treated GFP-LC3 transgenic mice.** Representative images of islets stained with H&E, GFP images of pancreatic islets and acinar cells, images of islets stained for insulin and images of TUNEL staining after the indicated period of treatment. Also shown are the merged microphotographs of GFP images and insulin staining. Numbers in the right upper corner of the photographs represent the mean ± SD intensity of GFP and insulin staining, expressed in arbitrary units, of five different islets. \*p < 0.05, compared with the control; \*\*p < 0.01, compared with the control; ++p < 0.01, compared with rapamycin alone. Images were obtained from GFP-LC3 transgenic mice treated with (A) 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin alone and (B) 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin-plus-10 mM 3-MA. Bars = 100 μm.

Autophagy is the degradation of redundant or faulty cell components (1–4,12). Recent studies have described a link between diabetes and autophagy (43,44). Two groups independently reported the findings of increased apoptosis and reduced proliferation of β cells with resultant reduction in β-cell mass in β-cell-specific autophagy-deficient mice (*Atg7<sup>fl/fl</sup>; RIP-Cre* mice; Refs. 43,44). These studies indicated that basal autophagy is indispensable for the maintenance of normal islet architecture, such as mitochondria and function of β cells (43,44).

As shown in Figure 1 and immunoblot analyses reported by others (36,44–46), endogenous LC3-II expression was detected in cell lysates from pancreatic islets and a low level of constitutive autophagy (here referred to as “basal autophagy”) was present in normal control islets. Our results

also showed that rapamycin resulted in overinduction of autophagy in islets with consequent impairment of insulin function, both *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that overinduction of autophagy by rapamycin in islet β cells negatively affects insulin function by modulating cell death through accelerated self-digestion and degradation of essential cellular components. Based on the effect of rapamycin on islet β cells, it is possible that excessive digestion of various types of cellular structures, including insulin granules, mitochondria and endoplasmic reticulum membranes takes place in autophagic vacuoles, because this structure lacks stringent substrate specificity, which is different from that used by the ubiquitin–proteasome system (47); in other words, any structure in the cytosol could become a substrate for autophagy (43,44). This may explain the significantly low insulin production capacity of *in vitro*

Rapamycin Induces Autophagy in Islets Both *In Vitro* and *In Vivo*

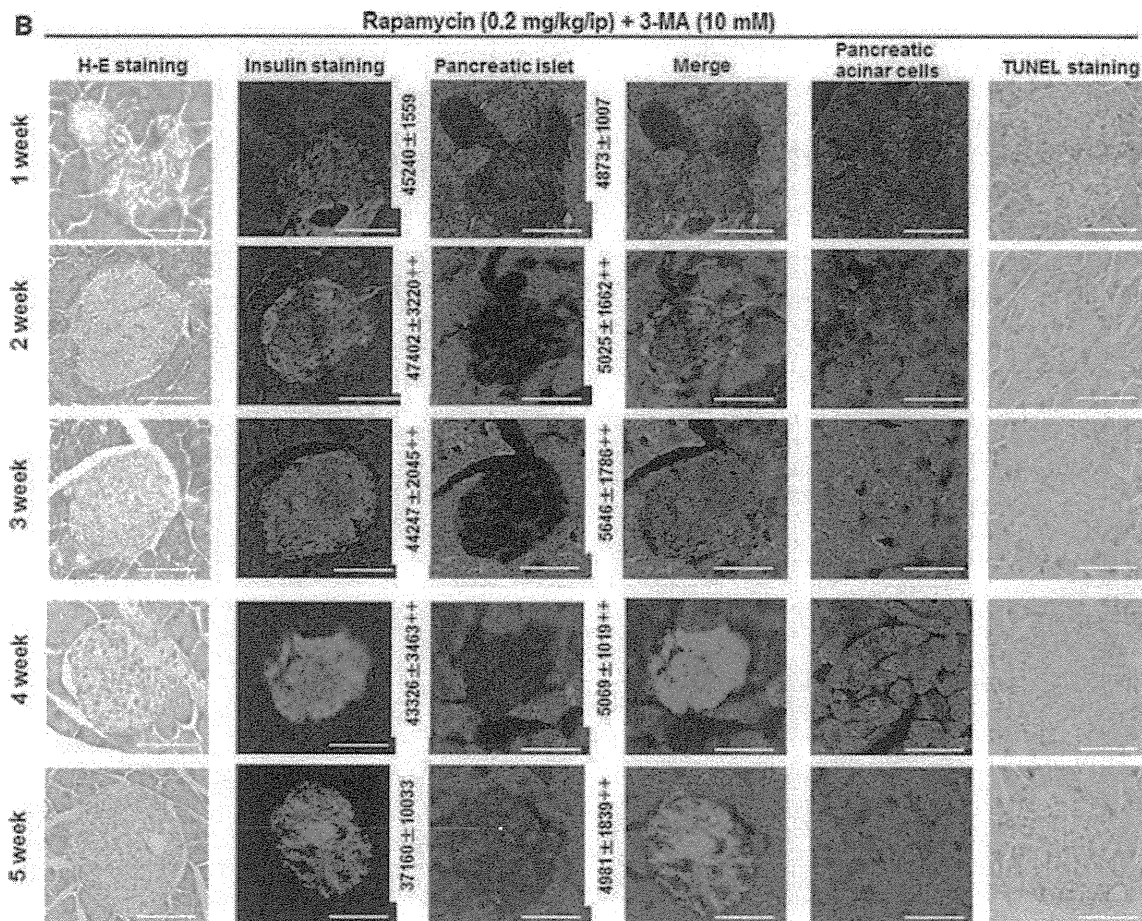


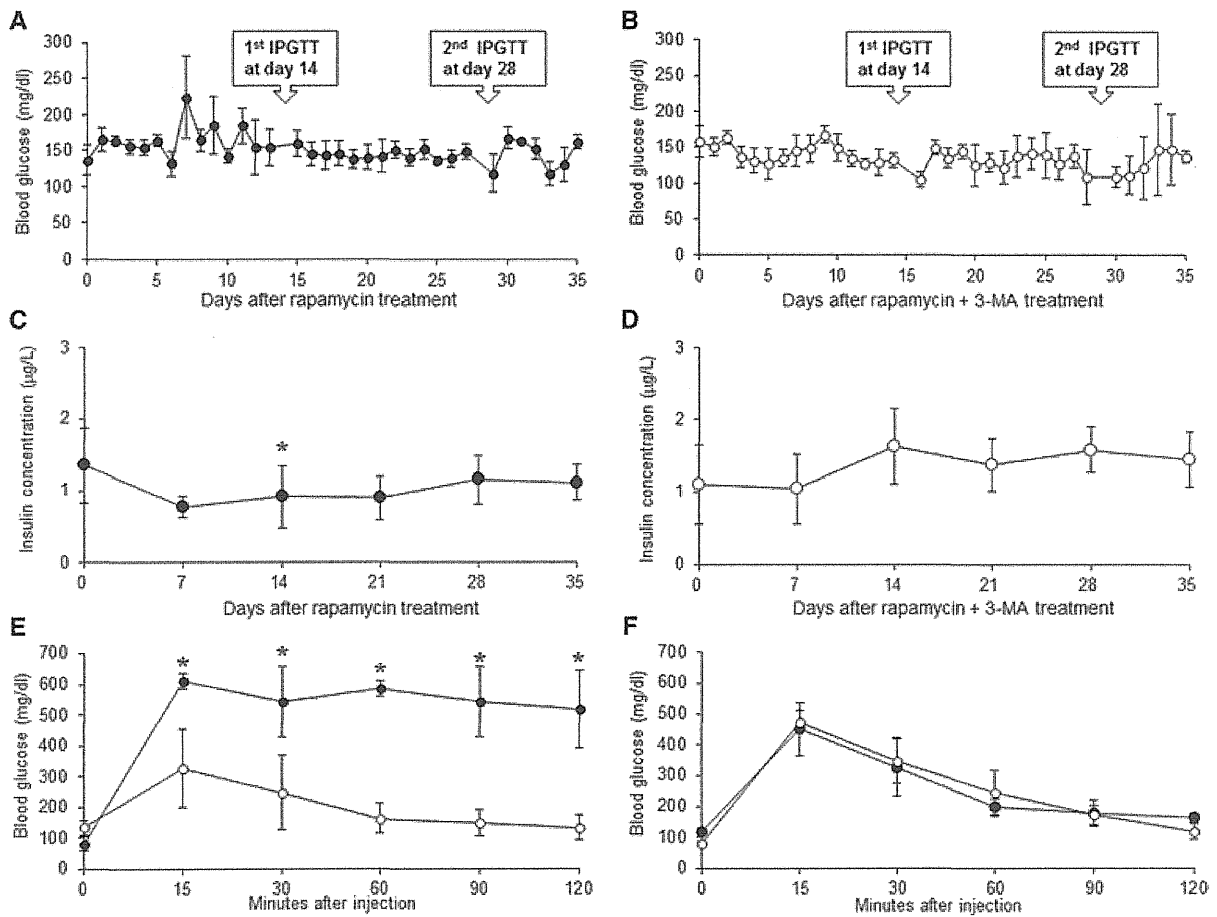
Figure 8: Continued.

rapamycin-treated islet  $\beta$  cells, the significant reduction of insulin staining intensity in islets of rapamycin-treated mice and the marked impairment of glucose tolerance assessed by IPGTT (Figures 5, 8A and 9E). Based on these results, we speculate that the main etiology of progressive dysfunction of transplanted islets is reduced insulin production related to rapamycin treatment and the related overinduction of autophagy.

Although the protective role of basal autophagy on pancreatic  $\beta$ -cell function has been proposed in loss-of-function studies on Atg/genes (43,44,48), accelerated autophagy seems to be involved in certain types of cell death (2,49–51). For this reason, we evaluated  $\beta$ -cell apoptosis by TMRE staining and TUNEL, and dead cells by 7-AAD. Figures 4A and B showed that rapamycin increased the percentages of apoptotic  $\beta$  cells and 7-AAD-positive dead islet cells. Furthermore, the TUNEL-positive apoptotic cells were observed in islets of rapamycin-treated mice and these apoptotic cells disappeared after the administration of 3-MA. These findings seem to indicate the existence

of crosstalk between autophagy and apoptosis and various links between autophagy and cell death, which may occur in a hierarchical or independent fashion (52–55). In this regard, Masini et al. (48) reported that exposure of nondiabetic islets to high concentrations of free fatty acid resulted in accumulation of autophagic vacuoles. Together with enhanced  $\beta$ -cell death, which was associated with decreased LAMP2 expression. These results suggest that accelerated autophagy may contribute to  $\beta$ -cell death under special conditions, such as rapamycin treatment.

The upregulation of autophagy after rapamycin treatment resulted in a significant impairment of  $\beta$ -cell insulin function, and this effect may contribute to islet graft dysfunction observed in islet recipients. We also demonstrated that 3-MA ameliorated rapamycin-related  $\beta$ -cell dysfunction both *in vitro* and *in vivo*. Thus, this new modulator of autophagy, such as 3-MA, should be tested further clinically, and better therapeutic agents with specific autophagic activity need to be developed for the prevention and treatment of islet graft dysfunction.



**Figure 9: Nonfasting blood glucose and plasma insulin concentrations after treatment and glucose tolerance test at days 14 and 28.** (A) Blood glucose level of GFP-LC3 transgenic mice treated with 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin alone. (B) Blood glucose level of GFP-LC3 transgenic mice treated with 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin-plus-10 mM 3-MA. (C) Plasma insulin concentration of mice treated with 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin alone. (D) Plasma insulin concentration of mice treated with 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin-plus-10 mM 3-MA. (E) Glucose tolerance test after treatment at day 14. (F) Glucose tolerance test after treatment at day 28. Closed circles: data of mice treated with 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin alone; open circles: data of mice treated with 0.2 mg/kg/i.p. rapamycin-plus-10 mM 3-MA. Data are mean  $\pm$  SD of five mice in each treatment group.

**Acknowledgments**

The authors thank Dr. F.G. Issa ([www.word-medex.com.au](http://www.word-medex.com.au)) for the careful reading and editing of the manuscript. We also thank Dr. N. Kawaguchi and Prof. N. Matsuura (Osaka University) for their help in the execution of this project and the valuable suggestions.

**Funding source:** This work was supported by a grant from the Ministry of Education, Sports and Culture of Japan to M. T. (No. 22591520) and by Kobayashi Foundation for Cancer Research to M. T.

**Disclosure**

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

**References**

1. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6: 463-477.
2. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42.
3. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140: 313-326.
4. Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432: 1032-1036.
5. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004; 36: 585-595.
6. Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441: 885-889.

*American Journal of Transplantation* 2012; 12: 102-114

## Rapamycin Induces Autophagy in Islets Both *In Vitro* and *In Vivo*

7. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441: 880–884.
8. Levine B. Cell biology: Autophagy and cancer. *Nature* 2007; 446: 745–747.
9. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 2007; 13: 619–624.
10. Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol* 2009; 10: 461–470.
11. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011; 469:323–335.
12. Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1535–1541.
13. Abraham RT. Mammalian target of rapamycin: Immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 330–336.
14. Augustine JJ, Bodziak KA, Hricik DE. Use of sirolimus in solid organ transplantation. *Drugs* 2007; 67: 369–391.
15. Kirken RA, Wang YL. Molecular actions of sirolimus: Sirolimus and mTOR. *Transplant Proc* 2003; 35 (Suppl 3): 227S-230S.
16. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926–1945.
17. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103: 253–262.
18. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230–238.
19. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001; 50: 710–719.
20. Markmann JF, Deng S, Huang X, et al. Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet infusions. *Ann Surg* 2003; 237: 741–749.
21. Froud T, Ricordi C, Baidal DA, et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant* 2005; 5: 2037–2046.
22. Hering BJ, Wijkstrom M. Sirolimus and islet transplants. *Transplant Proc* 2003; 35 (Suppl 3): 187S–190S.
23. Li Y, Li XC, Zheng XX, et al. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5: 1298–1302.
24. Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, et al. Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells. *Diabetes* 2006; 55: 1571–1580.
25. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060–2069.
26. Desai NM, Goss JA, Deng S, et al. Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: Local immunosuppression or islet toxicity? *Transplantation* 2003; 76: 1623–1625.
27. Ricordi C, Zeng YJ, Alejandro R, et al. *In vivo* effect of FK506 on human pancreatic islets. *Transplantation* 1991; 52: 519–522.
28. Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, et al. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 2006; 443: 345–349.
29. Zhang N, Su D, Qu S, et al. Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes* 2006; 55: 2429–2436.
30. Bell E, Cao X, Moibi JA, et al. Rapamycin has a deleterious effect on MIN-6 cells and rat and human islets. *Diabetes* 2003; 52: 2731–2739.
31. Lopez-Talavera JC, Garcia-Ocaña A, Sipula I, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: Reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology* 2004; 145: 467–474.
32. Cantaluppi V, Biancone L, Romanazzi GM, et al. Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: Relevance for islet transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2601–2611.
33. Miriuka SG, Rao V, Peterson M, et al. mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death. *Am J Transplant* 2006; 6: 2069–2079.
34. Zahr E, Molano RD, Pileggi A, et al. Rapamycin impairs *in vivo* proliferation of islet beta-cells. *Transplantation* 2007; 84: 1576–1583.
35. Li X, Zhang L, Meshinchi S, et al. Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 2965–2973.
36. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 1101–1111.
37. Johnson AL, Ratajczak C, Haugen MJ, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression and activity in hen granulosa cells. *Reproduction* 2007; 133: 609–616.
38. Ichii H, Pileggi A, Molano RD, et al. Rescue purification maximizes the use of human islet preparations for transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 21–30.
39. Ichii H, Wang X, Messinger S, et al. Improved human islet isolation using nicotinamide. *Am J Transplant* 2006; 6: 2060–2068.
40. Sawada T, Matsumoto I, Nakano M, et al. Improved islet yield and function with ductal injection of University of Wisconsin solution before pancreas preservation. *Transplantation* 2003; 75: 1965–1969.
41. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E1323–E1332.
42. Laugharne M, Cross S, Richards S, et al. Sirolimus toxicity and vascular endothelial growth factor release from islet and renal cell lines. *Transplantation* 2007; 83: 1635–1638.
43. Jung HS, Chung KW, Won Kim J, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 2008; 8: 318–324.
44. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 2008; 8: 325–332.
45. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, et al. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 2007; 282: 18573–18583.
46. Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. The role of autophagy in pancreatic beta-cell and diabetes. *Autophagy* 2009; 5: 280–282.
47. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 801–847.
48. Masini M, Bugliani M, Lupi R, et al. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2009; 52: 1083–1086.
49. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science* 2004; 306: 990–995.
50. Fujitani Y, Ueno T, Watada H. Autophagy in health and disease. 4. The role of pancreatic beta-cell autophagy in health and diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C1–C6.
51. Marsh BJ, Soden C, Alarcón C, et al. Regulated autophagy controls hormone content in secretory-deficient pancreatic endocrine beta-cells. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2255–2269.

**Tanemura et al.**

52. Moretti L, Cha YI, Niermann KJ, Lu B. Switch between apoptosis and autophagy: Radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle* 2007; 6: 793–798.
53. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 741–752.
54. Marchetti P, Masini M. Autophagy and the pancreatic beta-cell in human type 2 diabetes. *Autophagy* 2009; 5: 1055–1066.
55. Liu JJ, Lin M, Yu JY, Liu B, Bao JK. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 2011; 300: 105–114.

**Supporting Information**

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Supplementary Materials and Methods**

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## 糖尿病診療と療養指導に必要な知識 2

レクチャー

## 7 本邦における膵臓・膵島移植の現況と展望

伊藤壽記<sup>1,2</sup>, 川本弘一<sup>2</sup>, 永野浩昭<sup>2</sup>

1 大阪大学大学院医学系研究科 生体機能補完医学講座, 2 同消化器外科

● Key Words ● 1型糖尿病, 膵腎同時移植, マージナルドナー, 改正臓器移植法, 膵島移植 (心停止下)

## Summary

本邦での脳死下での膵臓移植は 2011 年末までに 119 例が実施された。1997 年に実施された、いわゆる“臓器移植法”が 2010 年 7 月に改正され、その後の膵臓移植数は約 7.8 倍と増加した。本邦の膵臓移植のドナーは高齢で血行動態が不安定な、いわゆる“マージナルドナー”が約 75%を占めているが、移植成績は 1 年, 3 年, 5 年生存率はともに 95.5%, 膵生着率は各々, 85.7%, 79.4%, 72.1%と欧米と遜色ない結果が得られている。また、2007 年より中断されていた膵島移植も本年 6 月より再開された。

## はじめに

本邦における脳死下での臓器移植は、1997 年 10 月 16 日に実施された、「臓器の移植に関する法律」、いわゆる“臓器移植法”に端を発するが、実際の脳死下での臓器移植 (心, 肝, 腎) が施行されたのは、法実施後 1 年 4 か月後の 1999 年 2 月 28 日であった。なお、膵臓移植については、日本臓器移植ネットワークへの登録の開始が、他の臓器より遅れて 1999 年 10 月からとなり、2000 年 4 月 25 日に第 1 例の膵腎同時移植 (simultaneous pancreas and kidney transplantation: SPK) が行われた。

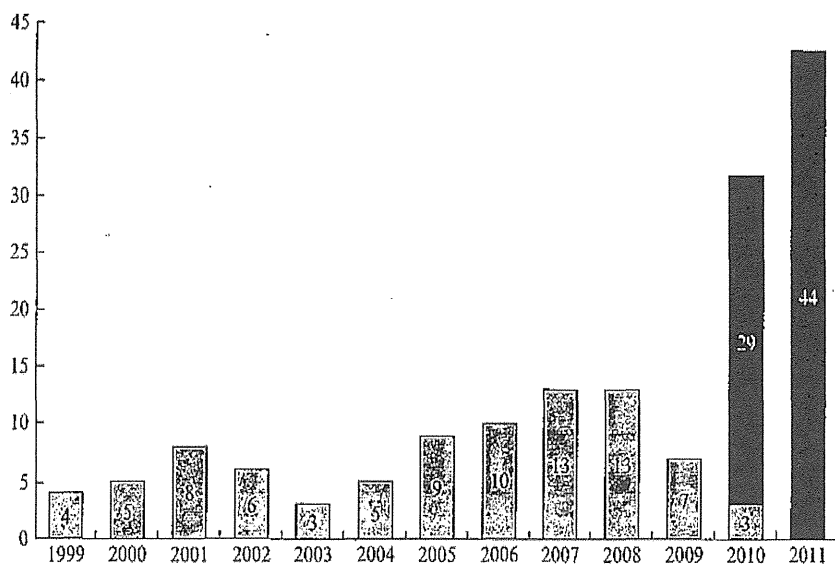
この法律は実施に至る条件が厳格に制限されており、世界の標準からは随分とかけ離れたものであり、その後は年間平均 10 例弱の提供に過ぎず、臓器移植治療しかなない患者のニーズに応えるには程遠い法律であった。そのため、膵臓移植レシピエントにおいても、登録後の待機

期間が延び、その間に糖尿病合併症で死亡したり、状態が悪化して登録を取り下げざるをえない患者が増える事態が生じてきた。同法は当初 3 年後の見直しを条件とした暫定法であったが、各部署からの要請にもかかわらず、3 年たっても見直されることがなかった。そして、奇しくも脳死臓器移植 10 年目にあたる 2010 年 (7 月 17 日) に改正臓器移植法が実施される運びとなった。

本稿では、本邦における膵臓・膵島移植の現況につき述べるとともに、法改正を受けてどのように変わったかについても述べる。なお、データの解析は 2011 年 12 月末までの症例が対象となった。

## 脳死下での臓器提供の推移

臓器移植法実施からの脳死下における臓器提

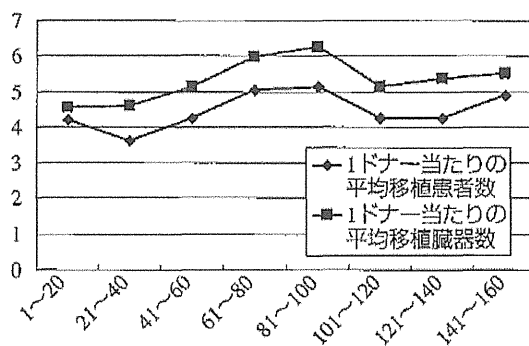


\* 黒色は法改正後の提供数

図 1. わが国の脳死臓器提供の推移 (2011.12.31)

供数の年次推移が示されている (図 1)。臓器移植法改正前では、脳死下での臓器提供は 12 年 9 か月でわずかに 86 例しかみられなかったが、改正後は予想に反して、2011 年 12 月末までの 1 年 6 か月で 73 例と約 7.4 倍の急速な増加がみられた。そのうち、膵臓移植は改正前 64 例であったが、改正後は 57 例であり、その増加率は約 7.8 倍とほぼ同様であった。そして、こうした臓器提供の多くが本人の意思表示によるものではなく、ご遺族の同意のみで行われたことを考えると、今回の臓器移植法改正の意義の大きいことがうかがわれる。

また、1 ドナーあたりの平均移植患者数ならびに平均移植臓器数をみてみると、確かに法改正後はともにやや低下した感は否めない (図 2)。しかしながら、本邦での 1 ドナーあたりの平均移植臓器数をみると 5 を超えており、米国の 3.05 をはるかに凌駕している。従って、ドナーの少ない本邦においては、提供者の意思が十分に反映されていると考えられる。



米国：1ドナー当たりの平均移植臓器数3.05

図 2. わが国の脳死臓器提供数の推移 (2011.12.31)

## 膵臓移植の現況

### 1) 膵臓移植待機レシピエントについて

膵臓移植のレシピエント登録は、1999 年以降、年間 25 名前後が新規に登録されていたが、改正後のほぼ 2 年間で 68 名と増加がみられた。

2011 年 12 月末で計 198 名が待機中である。性別では女性が 133 名と男性の 65 名の約 2 倍

(症例数)

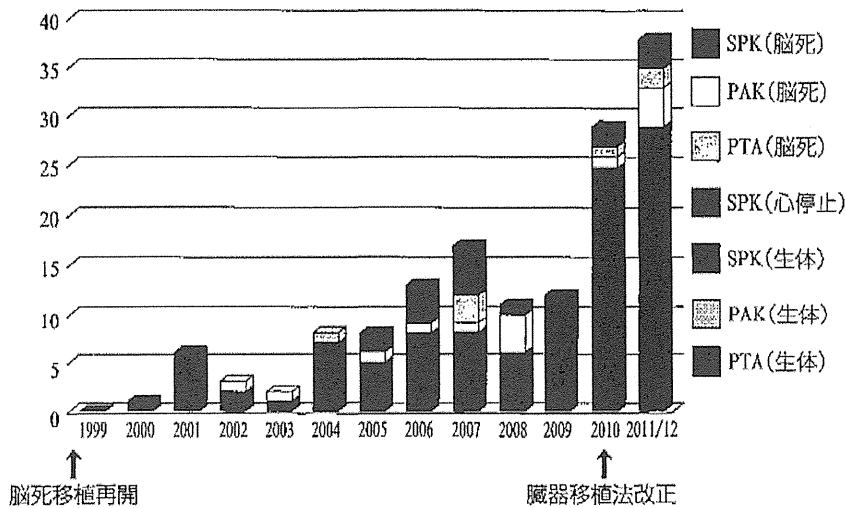


図3. 膵臓移植症例数の推移

であり、年齢別では40歳代が87名と最も多く、次いで50歳代(55名)、30歳代(40名)と続く。問題は待機期間であり、5年以上の待機者は、2010年末の調査では175例中67名(38%)であったが、2010年末では60名(30%)と、移植件数ならびに新規登録患者数の増加に伴ってやや改善傾向がみられる。しかしながら、待機期間中に、2011年末で35名が死亡し、また25名が糖尿病による重篤な合併症の進行にて登録を抹消している。

## 2) 膵臓移植を受けたレシピエントについて

2011年末までの脳死下での臓器提供は159例あり、その内、膵臓が提供に至ったのは119例(74.8%)であった。その内訳は膵腎同時移植(SPK<99例>)、腎移植後膵移植(pancreas after kidney transplantation: PAK<14例>)、および腎不全のない膵単独移植(pancreas transplantation alone: PTA<6例>)であった。なお、提供されなかったのは40例(内、28例が医学的理由)であった。また、同期間中に2例の心停止

下での膵臓移植(SPK)が行われた。さらに、生体ドナーからの膵臓移植も25例行われた。移植症例数の年次推移が示されている(図3)。

ドナーについては、男女比(63:58)はほぼ同等で、年齢では40歳代が33名、50歳代が31名と、本邦では特に高齢者が多く、また脳死の原因として、脳血管障害が69例と最も多い(57%)といった特徴がある。

レシピエントについては、性別、年齢は欧米と同様の傾向であり、女性が74例(61%)と多く、年齢では30歳代が49名、40歳代が48名であった。糖尿病歴は平均24.6年でSPKでの透析歴は平均7.0年で最高19年であった。

一番の問題は、移植を受けたレシピエントの待機期間であるが、平均1,264日(53~4,344日)とほぼ3年半であった。

移植膵全体の平均総冷阻血時間は11時間47分、SPKでの腎のそれは11時間22分であり、ともに十分安全域であった。

移植術式では、膵液を本来の腸管に流す腸管ドレナージ(enteric drainage: ED)が81%と多



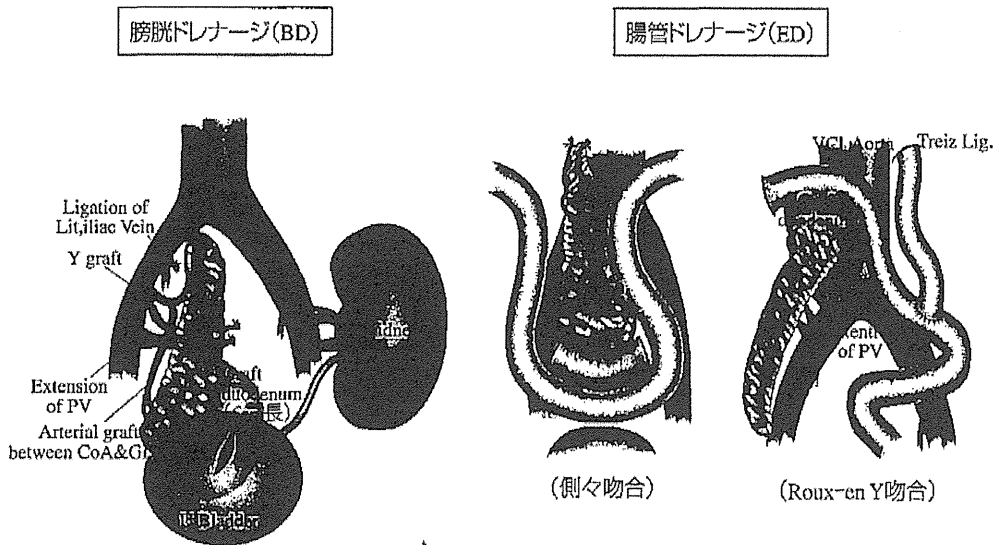


図4. 移植術式

くを占め、膀胱に流す膀胱ドレナージ (bladder drainage : BD) は 19%であった (図4)。免疫抑制療法は通常、カルシニューリン阻害薬 (CNI)、ステロイド、代謝拮抗薬と抗リンパ球抗体の4剤で導入し、CNIと代謝拮抗薬とステロイドで維持する。ほとんどの症例で、CNIはタクロリムス (TAC) が、代謝拮抗薬ではミコフェノール酸・モフェチル (MMF) が、また抗リンパ球抗体は抗 IL-2 レセプター抗体が用いられている。ステロイドはインスリン抵抗性を促すため、われわれの施設では3か月でオフしている。

移植成績 (2011年12月末) は、レシピエント生存率は95.5%、移植脾臓の生着率は1年、3年、5年で各々85.7%、79.4%、72.1%と症例数が増えても、以前と変わらない成績が得られている (図5)。また、SPKでの移植腎生着率も1年、3年、5年で各々91.3%、91.3%、85.3%と良好であり、これらの成績は欧米と比べて決して遜色ない結果と考えられる。

### マージナルドナーについて

通常、心、肝、肺などの代替手段が限られる、いわゆる life-saving organs の待機患者に比して、脾臓移植レシピエントは待機中の一般状態は比較的良好である。したがって、欧米での脾臓移植においては、肝臓や心臓の待機患者数との相対的な割合から、臓器としての脾臓は余っており、余剰分は膵島あるいは研究用として使用されている。たとえば、2006年の米国 OPTN/SRTR (Organ Procurement and Transplantation Network/Scientific Registry of Transplant Recipients) の Annual Report<sup>2)</sup>によれば、2005年の1年間で脳死ドナーの内、65%の脾臓は摘出されなかった。19% (n=1,442) の脾臓が摘出後移植された。また、5%は摘出されるも移植に至らなかった。2%は摘出され研究用に使用された。0.9%は脾臓移植として摘出されたが、膵島移植にまわされた。

臓器提供における肝・膵比率 (ratio of liver to pancreas grafts) をみると、海外の主たる OPOs (Organ Procurement Organization) ならびに全米

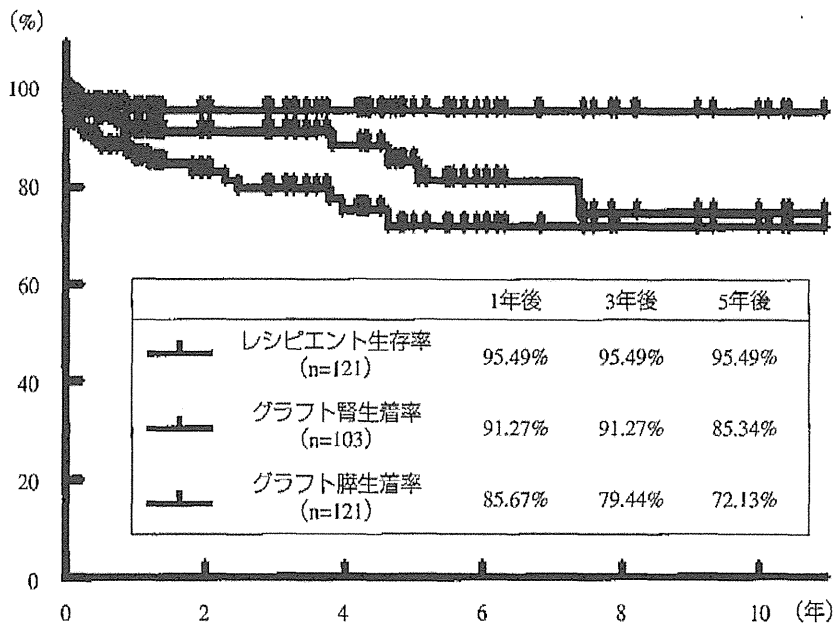


図5. 膵臓移植後のレシピエント生存率とグラフト生着率 (2011年12月末時点)

の OPOs において、その比率は、各々、7.18, 3.26 と本邦の 1.1 に比して、かなり高いことがわかる。すなわち、海外では肝臓に比して、膵臓は積極的に摘出されていないことになる。これは肝臓とは異なり、膵臓移植の目的が腎臓移植と同様に、主として、QOL を追求する医療であると考えられているからである。

しかしながら、Wisconsin 大学などでは、selected, less-than-ideal donor を積極的に用いて、肝・膵比率を 1.25 まで引き下げ、良好な膵臓移植の成績を報告している<sup>3)</sup>。

さて、本邦において、臓器移植法改正の前後で肝・膵比率をみてみると、改正前には 1.05 (67/64) であったのに対して、改正後は 1.21 (69/57) とやや増加傾向がみられた。これは移植症例の増加に伴って各施設が移植の適応をより慎重に対処していると思われた。法改正後、臓器提供が増えたとはいえ、まだまだ少ない本邦では、条件が厳しいドナー、マージナルドナーを積極的に用いていることが特徴としてあげられる。Kapur らの定義<sup>4)</sup> (①45 歳以上、②不安定

な血行動態 (高用量あるいは複数種のカテコラミンの使用)、③心停止下ドナー) によると、本邦では約 75% がマージナルドナーであった<sup>5)</sup>。

法改正前後でマージナルケースの数を比較してみると、改正前では 64 例中 49 例 (76.6%) であったのに対して、改正後では 57 例中 40 例 (70.2%) とやや低い傾向がみられた。

### 本邦での膵島移植について

膵島移植は 2000 年の Shapiro らの報告<sup>6)</sup> を受け、一気に注目された。すなわち、膵島移植を受けた 7 例で全例インスリン離脱が達成されたというものであった。この方法はエドモントンプrotocol と呼ばれ、①対象が腎症発症前の 1 型糖尿病で無自覚低血糖が頻発もしくは血糖が非常に不安定な症例に限定して、②免疫抑制法としてステロイドを使用せず、ダクリズマブ (抗 IL-2R 抗体) で導入し、シロリムスと低用量のタクロリムスを使用し、③体重あたり

10,000 IEs 以上の新鮮膵島を移植する、という内容であった。ただし、通常、インスリンフリーとなるのに、1 症例あたり 2~3 回の移植を要した。

その後の多施設での共同研究でも同プロトコルの移植早期におけるインスリン離脱率の再現性は確認できた。しかし、長期のフォローでインスリン離脱率は 3 年で 40%、5 年で 20% と不良であった<sup>7)</sup>。

本邦では、膵・膵島移植研究会の膵島移植班を中心に準備を進めており、2004 年 4 月に国内初の膵島移植が行われた。2007 年 3 月までに 64 例の膵島分離、18 症例 (33 回) への移植が施行された。その結果、3 名にインスリン離脱を達成することができた。

ところが、2007 年 3 月、膵島分離に使用するコラゲナーゼ (Liberase HI) にウシの脳組織が混入している可能性が明らかとなり、Kreutzfeldt Jakob 病感染が危惧され、臨床膵島移植は中断された。

海外のいくつかの施設では、さらなる免疫抑制療法の試みがなされ、エドモントンプロトコルの成績を凌駕する成績も報告されるようになってきた。特に、初回導入時に抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン (ATG) およびヒト型可溶性 TNF $\alpha$  レセプター製剤 (Etanercept) を用い、維持にはカルシニューリン阻害薬 (CNI) とエベロリムスまたはミコフェノール酸モフェチル (MMF) などを組み合わせた免疫抑制によりインスリン離脱率の向上が報告されている<sup>8)</sup>。

本邦でも、非哺乳類由来のコラゲナーゼを用いた膵島分離を行い、新規免疫抑制薬による膵島移植が、文科省の橋渡し研究推進プログラムの支援を受けて、2012 年 6 月 1 日から再開された。

## 脳死下膵臓移植の今後

法改正を受けて、今後、脳死下での臓器移植は着実に症例数を増やしていくことが予想される。しかしながら、脳死の原因として脳血管障害が半数以上を占める本邦においては、マージナルドナーは避けて通ることができない関門であり、死戦期におけるさらなるドナー管理ならびに周術期のきめの細かい管理が要求されると思われる。

現在 (2012 年 1 月末日)、日本臓器移植ネットワークに登録待機している患者のなかで、膵臓待機者が 198 名に対し、腎臓単独待機者は 12,523 名と圧倒的に多く、その較差はすぐには解消しない。当面は、4 種類の施設からの脳死下での臓器提供の促進に加えて、4 類型以外の施設からの献腎の促進といったドナーアクションプランもこれまでと同様に進めていかねばならない。さらに、また近々再開された膵島移植との住み分けも考慮されなければならない。すなわち、心停止下で摘出された膵臓を用いる膵島移植では、献腎症例が少なくなることについて、症例数が確保できないのではないかとといった懸念が生じる。したがって、脳死下での膵臓提供に際しても、高齢ドナーや肥満症例などの一定の条件つきで、膵島移植に配分するなどのルールづくりが必要になることが予想される。

## おわりに

本稿では、一昨年の臓器移植法の改正を受けて、脳死下での臓器移植が一気に増えたが、その前後で治療成績には大きな変化を認めなかったことを述べた。

しかしながら、今後も条件の厳しいマージナルドナーが多くを占めていることには変わりはない。

ない。ドナー管理のみならずレシピエントの周術期管理をしっかりと行ったうえで、さらなる移植成績の向上のために障害となる因子を明らかにしていくことが今後ますます必要になってくる。

### Essential Points

- ◆本邦での脳死ドナーからの膵臓移植は 119 (膵腎同時移植 99 例, 腎移植後膵移植 14 例, 膵単独移植 6 例) であり, 他に心停止ドナーから 2 例, 生体ドナーから 25 例の膵臓移植が行われた。
- ◆本邦での膵臓移植は“マージナルドナー”が多い (75%) のが特徴であるが, 治療成績は欧米と遜色ない結果が得られている。
- ◆2010 年 7 月の改正臓器移植法により, 膵臓移植は約 7.8 倍増加した。

### 文献

- 1) 伊藤壽記, 杉谷 篤, 石橋道男, ほか: 臓器移植法実施後に施行された脳死下膵腎同時移植の 1 症例 移植 2001; 36: 174-183.
- 2) Andreoni KA, Brayman KL, Guidinger MK, *et al.*: Kidney and Pancreas Transplantation in the United States, 1996-2005. *Am J Transplantation* 2007; 7: 1359-1375.
- 3) Krieger NR, Odorico JS, Heisey DM, *et al.*: Underutilization of pancreas donors. *Transplantation* 2003; 75: 1271-1276.
- 4) Kapur SC, Bonham CA, Dodson SF, *et al.*: Strategies to expand the donor pool for pancreas transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 284-290.
- 5) 伊藤壽記, 石橋道男: 本邦膵移植症例登録報告 (2011) 日本膵・膵島移植研究会 移植 2011; 46: 546-551.
- 6) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, *et al.*: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238.
- 7) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, *et al.*: Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-2069.
- 8) Bellin MD, Kandaswamy R, Parkey J, *et al.*: Prolonged insulin dependence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes. *Am J Transplantation* 2008; 8: 2463-2470.

# 19

## 膵臓移植の血糖管理

伊藤壽記（大阪大学大学院医学系研究科生体機能補完医学講座）

松久宗英，黒田暁生（徳島大学糖尿病臨床・研究開発センター）

宮下和幸（大阪大学大学院内分泌代謝内科）

key words：マージナルドナー，糖毒性，免疫抑制剤，高インスリン血症，islet rest

### ○ I. 膵臓移植について

膵臓移植はインスリン分泌が枯渇した1型糖尿病患者に対して行われ，その意義はインスリン分泌を再開させて糖代謝を是正し，腎症や神経障害などの合併症の改善，あるいはそれらの進行阻止により患者のQOLを改善させることであるといわれてきた。しかし，近年，膵腎同時移植（simultaneous pancreas and kidney transplantation：SPK）の遠隔成績<sup>1)</sup>により，SPKでは生命予後をも改善させることが示されており，欧米での糖尿病性腎症に対するSPKはすでに通常医療として定着している。これは腎不全を合併した末期糖尿病患者の予後を左右する，心臓ならびに脳の動脈硬化性変化が改善または阻止されることに起因すると考えられるからである。

膵臓移植のレシピエントカテゴリーとして，SPKが大半を占めるが，その他に，腎移植後の膵臓移植（pancreas after kidney transplantation：PAK）と腎不全のない膵臓単独移植（pancreas transplantation alone：PTA）とがある。前者は，患者が腎不全となり透析が導入されると，QOLが著しく低下するため，まず生体腎移植が先行されるケースである。この場合には，移植腎に1型糖尿病の再燃や糖尿病合併症の進行が懸念されるため，将来的には膵臓移植が考慮されることになる。また，後者では，果たして，どの時期（“a point of no return”）までにPTAを行えばよいのかについての結論は得られていない。

一方，生活習慣から肥満を呈して，インスリン抵抗性を特徴とする2型糖尿病は高インスリン血症から行き着くところ，インスリン分泌不全となり，最終的には1型と類似した病態を呈するため，米国では2型糖尿病に対しても頻度（全体の6%程度）は多くないが，膵臓移植が行われている。この場合，レシピエントの年齢は1型と異なり，相対的に高齢となるが，自己免疫応答は起こらない。

膵臓移植は通常，脳死下での臓器提供者から行われるが，膵腎移植の場合と同様に心停止下でも可能である。さらに，生体ドナーからの部分膵臓移植（通常，約50%の膵体尾部が用いられる）は臓器提供者の少ない本邦において行われている。

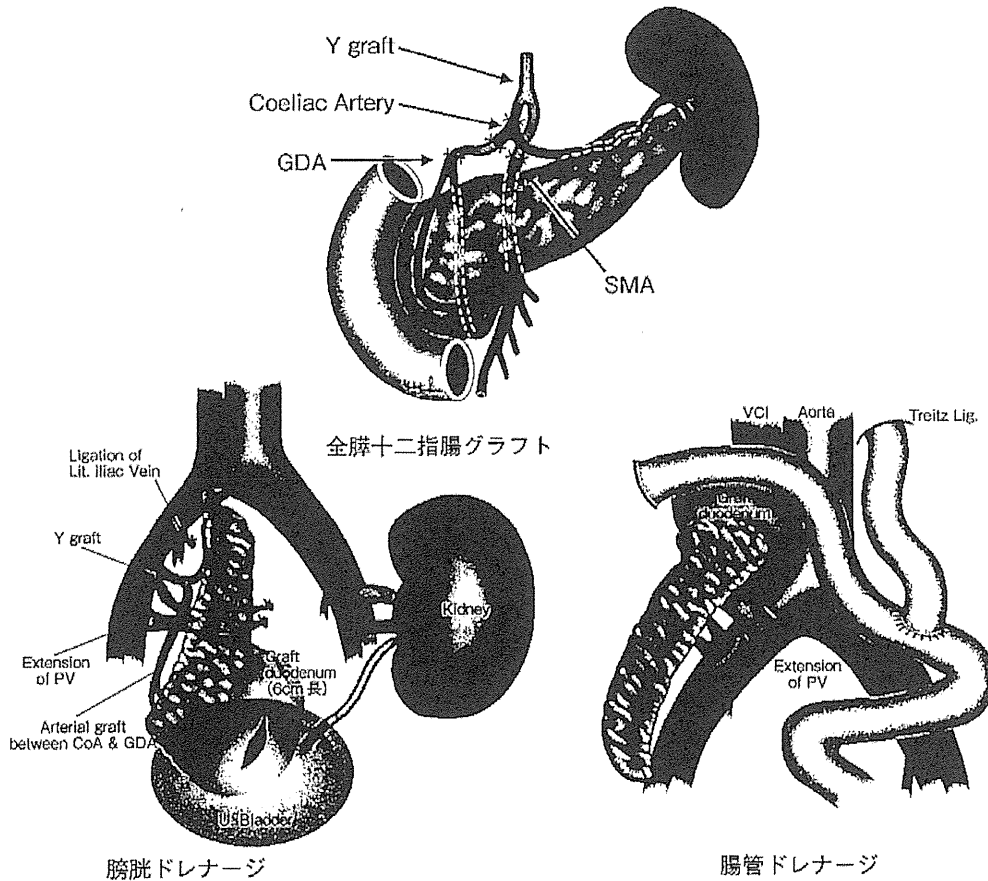


図1 膀胱ドレナージと腸管ドレナージ

次に、移植術式については、心、肺、肝の移植とは異なり、異所性（骨盤腔内）に全膵十二指腸グラフト（血流再開後に脾臓は摘出される）として移植される。通常、右側骨盤腔に膵グラフトを移植し、左側に腎グラフトを移植する。これは膵の静脈（門脈）吻合のアクセスが左側に比して右側が容易であり、グラフトの収まり具合が自然であると考えられるからである。また、SPKでは左腎静脈が長いので、できればドナーの左腎が用いられる（図1下）。

移植膵の血行再建は、一般に静脈（門脈）を大循環系に吻合するが、生理的な門脈系に吻合することもある。一方、動脈系に関しては、膵頭部への血流は腹腔動脈からGDAを介する経路と上腸間膜動脈を介する経路の二つが存在するが、移植膵頭部への血流を十分に確保する目的で、本邦ではgastroduodenal artery (GDA)の再建を積極的に行っている。脂肪肝などで肝摘出がない場合には、GDAは温存されるが、肝摘出の際には多くの場合GDAへの血流は遮断される。再建方法は腹腔動脈からの血行がどこで遮断されるかにより異なる<sup>2)</sup>。さらに、ドナー腸骨動脈をY graftとして用いてグラフトの動脈と吻合し1本化する（図1上）。

## ○ 19. 膵臓移植の血糖管理

移植膵の外分泌（膵液）ドレナージの方法には、膀胱ドレナージ（bladder drainage：BD）と腸管ドレナージ（enteric drainage：ED）があるが、後者が主流である（図1下）。

一般に、移植膵は抗原性が強く、他の臓器に比して拒絶されやすいことが知られている。また、移植膵には1型糖尿病の原因となった自己免疫の再燃が起こりうる。したがって、膵臓移植ではアロ免疫応答（拒絶反応）のみならず自己免疫応答も制御しなければならない。その結果、免疫抑制は他の臓器移植に比しheavyとなる。通常、抗IL-2レセプター抗体（Basiliximab）、カルシニューリン・インヒビターであるタクロリムス（TAC）、ステロイド、代謝拮抗剤（ミコフェノール酸モフェチル：MMF）による4剤で導入し、TACとMMFで維持する方法が一般的である。なお、われわれの施設ではステロイドはインスリン抵抗性を惹起し耐糖能を低下させるため、移植後3ヵ月でオフすることとしている。

## ○ II. 本邦における膵臓移植の特徴

本邦における膵臓移植は、1997年の「臓器の移植に関する法律」、いわゆる“臓器移植法”が実施されて後、2000年4月に第1例目の膵腎同時移植が行われた<sup>3)</sup>。この法律は実施に至る条件が厳格に制限されており、世界の標準からは随分かけ離れたものであった。そのため、その後は年間平均10例弱の提供に過ぎず、臓器移植治療しかない患者にとってそのニーズに応えるには程遠い法律であった。そのため、膵臓移植レシピエントにおいては、登録後の待機期間が延び、その間に糖尿病合併症で死亡したり、状態が悪化して登録を取り下げざるを得ない患者が増える事態が生じてきた。

同法は当初3年後の見直しを条件とした暫定法であったが、各部署からの要請にもかかわらず、3年たっても見直しされることがなかった。そして、奇しくも脳死臓器移植10年目に当たる2010年(7月17日)に改正臓器移植法が実施される運びとなった。改正法の効果は明らかであり、実施後約1年半で73例の臓器提供があり、内56例の膵臓移植が行われた。法改正前に比して、約7倍の増加となった。

本邦の膵臓移植はマージナルドナーが多いことが特徴である。Kapurら<sup>4)</sup>の定義(1. 45歳以上, 2. 不安定な血行動態(複数または高用量のカテコラミンの使用), 3. 心停止下ドナー)によると、本邦では約75%がマージナルドナーである。こうしたマージナルドナーでは脳死に至った原因の多くが動脈硬化性疾患による脳血管障害が多いこともあげられる。したがって、グラフトの動脈にもなんらかの硬化性変化が存在すること、さらにこのようなドナーには明らかな糖尿病がなくても潜在的な耐糖能異常や膵の脂肪変性などの可能性を否定できない。こうしたドナーの傾向は、欧米の状況とは大いに異なる所である。すなわち、米国では膵臓移植のドナーの年齢が15～29歳が63.8%（平均24歳）と若い人が大半を占め、また脳死の原因として頭部外傷が

第1位で約70%（本邦では18%）を占めていた<sup>5)</sup>。

### ○ Ⅲ. 膵臓移植におけるインスリン分泌の特徴

健康人におけるインスリン分泌動態は、内分泌・代謝系と神経系により絶妙なコントロールを受け、その結果、血糖の恒常性（70～120 mg/dL）を維持している。すなわち、内分泌系では膵臓からのインスリンやグルカゴンに加えて、他に成長ホルモン、グルココルチコイド、カテコールアミン、さらには glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や gastric inhibitory peptide (GIP) などの消化管ホルモンも関与し、また代謝系では肝臓と筋肉（骨格筋）が糖代謝を制御している。神経系は、副交感神経がインスリン分泌を促進するが、交感神経はそれを抑制する。しかし、交感神経ならびに副交感神経はともにグルカゴン分泌を促進する。

一方、インスリンが枯渇した1型糖尿病患者に対する膵臓移植においては、大循環系に置かれた膵臓グラフトから分泌されたインスリンが肝臓を経由することなく、直接大循環系に流入するため、高インスリン血症を呈すること、また完全に除神経されていることが相違点としてあげられる。さらに、膵臓移植の臨床では、以下のさまざまな要因によって、移植膵インスリン分泌機能の発現が遅延（delayed graft function : DGF）する。想定される DGF による耐糖能異常のメカニズムを図2に示す。

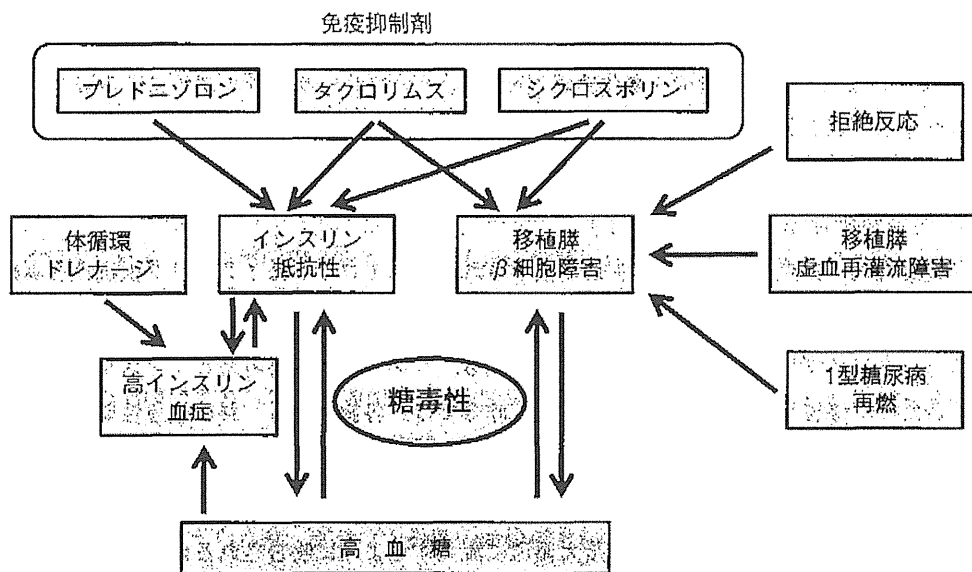


図2 膵臓移植における耐糖能障害



## 1. 移植前の影響要因

### 1) 臓器摘出時の損傷

臓器摘出時の機械的圧迫などにより、臓器の浮腫が促される。

### 2) マージナルドナー

臓器移植法改正後、本邦における臓器移植は提供数が増加したとはいえ、まだまだドナー不足が続いている。そうした中で、欧米と比較して、本邦のドナー条件は決して良くない<sup>6)</sup>。高齢者(≥40歳が63%、平均43歳)、脳死の原因が動脈硬化性疾患(57%)、ハーベスト前の死戦期における昇圧剤使用、といったマージナルケース(76.7%)が多いのが特徴である。

### 3) 保存条件

摘出臓器の保存は冷却した University of Wisconsin (UW) 液による単純浸漬法であり、臓器の摘出から血流再開までの総冷虚血時間(TCIT)は平均11時間35分(5時間38分～20時間39分)である。臓器は、心、肝に比して、長時間保存が可能であるが、やはり長くなれば障害をきたす可能性はある。

## 2. 移植時ならびに移植後の影響要因

### 1) 移植時の損傷

血管吻合時の移植臓器の把持、圧迫、牽引などは血流再開時の浮腫の原因になるので、グラフトに対して愛護的に扱う。

### 2) 虚血再灌流障害 (ischemia reperfusion injury)

虚血の後に引き続き起こる再灌流により、血管内皮細胞傷害や微小循環障害をきたすことが知られている。障害を引き起こす機序として、スーパーオキシド( $O_2^-$ )やヒドロキシルラジカル( $HO\cdot$ )などの活性酸素や一酸化窒素(NO)などのフリーラジカル産生による障害、各種サイトカイン、エンドセリン、アラキドン酸など各種ケミカルメディエータ産生による障害、活性化好中球と血管内皮細胞の相互作用に基づく障害などの機序が考えられている。

### 3) 免疫抑制剤 (CNI, ステロイド)

移植後急性期には高用量の免疫抑制剤が投与される。ステロイドはインスリン抵抗性を高めて耐糖能を低下させる。また、カルシニューリン・インヒビター (CNI) として用いられるタクロリムス(シクロスポリンも用いられる)についても、インスリン分泌障害とインスリン抵抗性の両面にわたって傷害することが知られている。昨今では、各施設とも、移植後急性期のタクロリムスのトラフ値を20 ng/mLを超えないよう、当初よりは低く管理している。

### 4) 高インスリン血症

通常、臓器グラフトからの静脈血は直接大循環に流入するように吻合されるが、生理的な門脈系へ吻合される術式(門脈ドレナージ:PD)も存在する。PDでは、大循環ドレナージ(SD)に

表1 膵移植10例の臨床プロフィール

| 症例  | レシピエント                 |         |        |           | ドナー      |  |  |
|-----|------------------------|---------|--------|-----------|----------|--|--|
|     | 年齢 / 性別 / カテゴリー / TCIT | 年齢 / 性別 | 脳死の原因  | カテコールアミン  | マージナルドナー |  |  |
| 1.  | 30 M SPK 10' 23"       | 50代 F   | CVA    | (-)       | (+)      |  |  |
| 2.  | 35 M SPK 12' 39"       | 30代 M   | CVA    | 1劑 > 10 γ | (+)      |  |  |
| 3.  | 34 F PAK 11' 29"       | 40代 M   | CVA    | 1劑        | (-)      |  |  |
| 4.  | 36 F SPK 11' 45"       | 50代 M   | Injury | 2劑        | (+)      |  |  |
| 5.  | 36 M PAK 15' 36"       | 50代 M   | CVA    | 1劑        | (+)      |  |  |
| 6.  | 37 F SPK 13' 42"       | 40代 F   | CVA    | 1劑        | (-)      |  |  |
| 7.  | 34 F SPK 11' 2"        | 50代 M   | CVA    | 1劑 > 10 γ | (+)      |  |  |
| 8.  | 40 F SPK (LD)          | 60代 F   | (-)    | (-)       |          |  |  |
| 9.  | 54 M SPK 11' 03"       | 50代 F   | CVA    | 2劑        | (+)      |  |  |
| 10. | 43 F SPK 20' 45"       | 50代 M   | CVA    | 1劑 > 10 γ | (+)      |  |  |

症例2と5は同一で再移植, 症例8は生体移植

CVA: cerebrovascular accident

比して、空腹時の軽度の血糖高値とインスリンの低値が認められる。これに対してSDでは末梢で高インスリン血症を呈するため、空腹時や食前の血糖値を生理的状态より低下させる。さらに、膵臓移植 (SD) ではインスリン分泌組成が、健常人よりも、基礎分泌量の割合が高く、追加分泌量は低くなる。追加分泌パターンも遅延することが言われている。このようなインスリンの基礎分泌と追加分泌の変化は、静脈血の灌流パターンだけでなく、除神経の影響も考えられる。

グルカゴンについては自己膵から門脈への生理的分泌に加えて、移植膵から大循環への分泌が上乘せされ、その結果、空腹時からグルカゴン濃度が高値を呈する。しかしながら、1型糖尿病の患者で見られる、低血糖時のグルカゴン分泌反応の低下は膵臓移植で改善しており、低血糖の自覚症状閾値にも改善がみられる。

#### 5) 膵臓移植術後の合併症

もろもろの要因により、術後1週間から10日までに、グラフト静脈血栓症が約5~7%の頻度で起こる。主として、血流再開後にグラフトの脾摘をすることによりグラフト門脈の血流が低下すること、さらにグラフトの血流再開後の浮腫により、ねじれや回転が生じ、吻合血管が狭窄することが原因と考えられる。グラフト動脈の血栓症も起こるが、これはレシピエント動脈の硬化性変化 (多くは石灰化を伴う) が強く、そのための technical な要因が考えられる。こうした

○ 19. 臓器移植の血糖管理

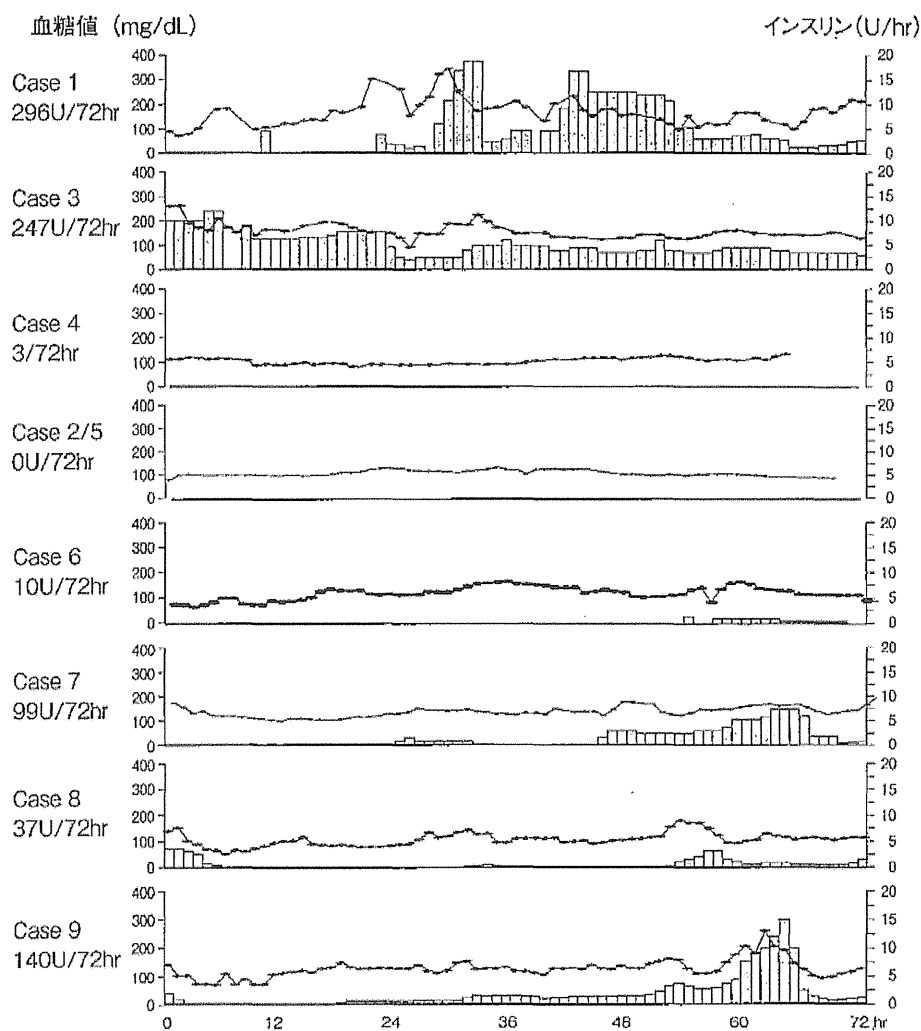


図3 脳死下臓移植患者8症例の移植後急性期における血糖およびインスリン注入量の推移

血糖症が一旦起こると、移植臓の摘出を余儀なくされることが多い。

また他に、グラフト膵炎、縫合不全や腹腔内感染などの合併症が生じると耐糖能が低下する。

6) 拒絶反応

臓器移植の場合、組織学的に拒絶を診断することは困難であり、臨床的な診断となる。ステロイドパルス療法などの治療により、耐糖能が低下する。

○ IV. 移植臓に対する血糖管理

前述のごとく、周術期を通してさまざまな影響を受けている移植臓に対して、われわれはグラ

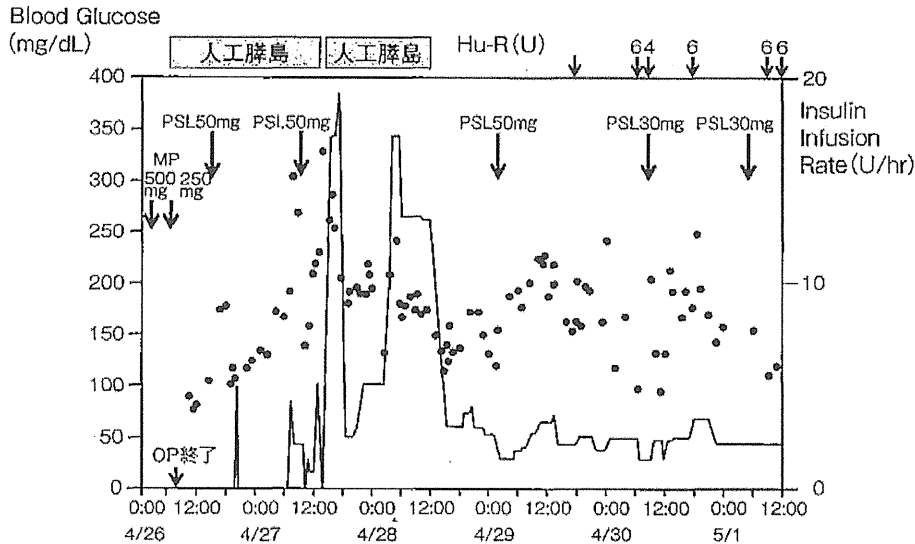


図4 移植後急性期の血糖値の変動と管理

フト膵島のインスリン分泌能を可及的に保護すべく、とりわけ移植後急性期には積極的にインスリンを使用して高血糖をできる限り回避することによって、いわゆる“islet rest”<sup>7)</sup>を誘導して、移植膵島のβ細胞を糖毒性 (glucose toxicity) から保護し、かつオーバーワークにより疲弊させないとする方針を取っている。とくに、マージナルドナーの多い本邦においては、こうした戦略が遠隔期での移植膵機能に反映されるであろうという仮説を立て検討してきた<sup>8)</sup>。

われわれはこれまでに25例の膵臓移植 (生体膵腎移植の1例を除き、すべて脳死下) を経験している。初期の10例に対して、術後72時間は人工膵島 (STG-22, 日機装社) を用いて、目標血糖値を100～150 mg/dLとした、厳格な血糖管理を行った。術後早期にグラフト静脈血栓症を呈し移植膵の摘出を余儀なくされた症例2と腎グラフトのprimary non-functionの症例10を除いた計8例について解析した。なお、症例2は、1年後にPAK (膵再移植, 症例5) を行った。なお、症例8は生体ドナーからの部分膵腎同時移植である。臨床データのプロフィールを表1に示している。

前述のKapurの定義により、10例の中でmarginal caseは症例1, 2, 4, 5, 7, 9, 10の7例であった。移植後72時間に要した総インスリン量は0～296 Uと個体差が見られた (図3)。症例1の移植後72時間の、より詳細な血糖の推移とインスリン投与量が示されている (図4)。移植後72時間に多くのインスリンを要する理由として、マージナルドナーの諸要因に加えて、術中から引き続き、高用量のステロイドが複数回投与されることとの関連性が示唆される。

72時間以降も同様に血糖を頻回に測定し、目標血糖は空腹時では<120 mg/dLに、また食後2時間値は<170 mg/dLとなるように強化インスリン療法を行っている (表2)。