

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

第三世代・第四世代脾臓分離法を用いた臨床脾臓移植の実施

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野口 洋文

平成26 (2014) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
第三代・第四世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施	-----	1
野口 洋文		
II. 分担研究報告		
1. 国立国際医療研究センター研究所	-----	7
霜田 雅之		
2. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	-----	10
藤原俊義		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業)
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
総括研究報告書

第三世代・第四世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施

研究代表者 野口 洋文 独立行政法人国立病院機構千葉東病院 外科

研究要旨

膵島移植は、インスリン依存状態糖尿病（主に1型糖尿病）に対する治療法であり、局所麻酔下にて膵島を経門脈的に注入するため、膵臓移植に比べ低侵襲で安全性が高いことが特徴である。研究代表者はハーバード大学、京都大学、ベイラー研究所で合計100例以上のヒト膵島分離を実施しており、第三世代膵島分離法を確立した。第三世代膵島分離法とは、1) 膵管保護、2) 二層法保存、3) 新規臓器保存液、4) 比重コントロールによる膵島純化、5) 膵島追加純化、6) 分離膵島低温保存、の6つの技術改変を行っており、分離成功率（膵島分離を実施して移植に至る確率）は80%以上、インスリン離脱率が単回移植で100%となった。本研究では平成25年度、26年度に第三世代膵島分離技術を用いた臨床膵島移植を日本で実施するとともに、現在開発中の第四世代分離法を最終年度の平成27年度に臨床実施することを目的としている。第四世代分離法とは、1) 膵管保護溶液にJNK抑制ペプチドを添加、2) 新規臓器保存液（HN-1溶液）の使用、3) 連続比重・密度勾配による純化、の3つの技術改変を加えたものである。本申請は3年の研究計画であるが、ヒト膵島分離を共同研究者の国立国際医療研究センターとともに、年間1-3例行う予定にしている。

平成25年度は研究代表者が所属している千葉東病院で2例の膵島移植を実施することができ、また、京都大学、大阪大学での臨床膵島分離作業にも携わり、千葉東病院の症例も併せて5回の臨床膵島分離を行い、移植を4回実施した。当初の計画より多い症例数を実施することが可能であった。

研究分担者

氏名	所属機関名
霜田 雅之	国立国際医療研究センター研究所
藤原 俊義	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

A. 研究目的

膵島移植は、インスリン依存状態糖尿病（主に1型糖尿病）に対する治療法であり、局所麻酔下にて膵島を経門脈的に注入するため、膵臓移植に比べ低侵襲で安全性が高いことが特徴である。研究代表者はハーバ

ード大学で膵島分離技術を習得したのち、京都大学所属時に膵島移植グループの主要メンバーの一人として、日本初となる心停止ドナーからの膵島移植および生体ドナーからの膵島分離を実施した。その後、アメリカのベイラー研究所で教授として100例以上のヒト膵島分離を実施しており、豊富な臨床経験を持つ。

膵島分離技術は非常に複雑で施設間格差が大きいことがわかっている。研究代表者は現在までに1) 膵管保護、2) 二層法保存、3) 新規臓器保存液、4) 比重コントロールによる膵島純化、5) 膵島追加純化、6) 分離膵島低温保存、の6つの膵島分離技術の改変を行っている。この6つの技術を臨床応用した第三世代分離法では、分離成功率(膵島分離を実施して移植に至る確率)は80%以上でありインスリン離脱率が単回移植で100%となった。欧米の標準施設では分離成功率は30-50%であり、インスリン離脱率は単回移植で10%(複数回移植で80%)であることを考慮すると、申請代表者の技術が世界最高水準であるといえる。本研究ではこの技術を用いた臨床膵島移植を日本で実施するとともに、現在開発中の第四世代分離法を最終年度に臨床実施することを目的としている。第四世代分離法とは、1) 膵管保護溶液にJNK抑制ペプチドを添加、2) 新規臓器保存液(HN-1溶液)の使用、3) 連続比重・密度勾配による純化、の3つの技術改変を加えたものである。本年度、ブタ膵島分離にてその有効性を確認しており、来年度に安全性の確認を行ったのち、平成26年度に倫理委員会に申請予定である。承認が得られれば、平成27年度に臨床実施を行う予定である。本申請は3年の研究計画であ

るが、ヒト膵島分離を共同研究者の国立国際医療研究センターとともに、年間1-3例行う予定にしている。

B. 研究方法

本研究では、第三世代膵島分離法を用いて臨床膵島移植を行うとともに、現在、研究開発を行っている「第四世代膵島分離法」を完成させ、平成27年度にこの技術を用いた臨床膵島移植を実施することを目的としている。

「第四世代膵島分離法」の技術開発は日本学術振興会科学研究費(基盤B 平成24年-26年)のもと、ブタ膵を用いて現在行われており、この開発研究自体には本研究費は使用しない。本研究費は臨床膵島移植を実施するために使用される。

<平成25年度計画：第三世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施>

第三世代膵島分離法は申請代表者が京都大学所属時およびベイラー研究所所属時に中心となって研究開発した技術である。具体的には、

- 1) 膵管保護
- 2) 二層法保存
- 3) 新規臓器保存液
- 4) 比重コントロールによる膵島純化
- 5) 膵島追加純化
- 6) 分離膵島低温保存

の6つの膵島分離技術の改変を行っている。この技術はすでにベイラー研究所で臨床実施されており、分離成功率は80%を超え、インスリン離脱率が単回移植で100%であった。欧米の標準施設では分離成功率は30-50%であり、インスリン離脱率は単回移植で10%(複数回移植で80%)であることを考

慮すると、申請代表者の技術が世界最高水準であるといえる。また、臨床実施されていることからわかるように、この技術の安全性はすでに確認されている。

申請代表者は京都大学およびベイラー研究所で膵島移植のプロジェクトを立ち上げる際、クリーンルーム内での膵島分離を行う際の標準作業手順書 (Standard Operating Procedure: SOP) 作成を行った経験を持つ。千葉東病院でもすでに手順書作成は終了しており、いつでも膵島分離ができる体制となっている。また、千葉東病院では、クリーンルームと同じ形態の部屋を研究室に設置し、イヌおよびブタ膵を用いて膵島分離のトレーニングを行っている。

国立国際医療研究センターでは独自の膵島分離法で膵島移植を実施する計画となっており、本年はその準備を行っている状況である。平成25年度にヒト膵島分離を1-3例行う予定にしている。

(倫理面への配慮)

臨床膵島移植に関しては、日本膵・膵島移植研究会より膵島分離・移植施設として認定を受けた施設でのみ実施できるしくみとなっている。人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除においては、日本膵・膵島移植研究会の指針に従って膵島移植を実施することにより確保できる。インフォームドコンセントの様式も、日本膵・膵島移植研究会で用意されているものを使用する。

米国では膵島移植は FDA の規制の下に行われているが、日本では日本膵・膵島移植研究会の定めた基準に従って膵島移植を行うことになっている。研究代表者は米国で FDA の規制の下、100 例以上のヒト膵島

分離を行ってきた経験者であり、また日本でも京都大学所属時に 23 例のヒト膵島分離を実施している。日本膵・膵島移植研究会の指針でも、米国 FDA と同じく GMP 基準に則って膵島分離を行うことと提唱している。膵島移植における GMP は、世界における膵島分離方法の標準であり、その基本理念は患者の安全と移植の効果の確保である。

C. 研究結果

平成25年度は臨床膵島移植を1-3例実施する計画となっていたが、研究代表者が所属している千葉東病院で2例の膵島移植を実施することができた。2例とも移植後の膵島生着率は良好であり、早期に追加移植が可能であればインスリン離脱が達成できるレベルであった。また研究代表者は京都大学、大阪大学での臨床膵島分離作業にも携わっており、京都で膵島分離を2例実施し、うち1例を移植することができた。大阪大学では遺伝性膵炎の患者の膵臓を摘出し膵島分離後に患者に戻す「膵島自家移植」を実施することが可能であった。以上のとおり研究代表者は5回の臨床膵島分離を行い、移植を4回実施しており、当初の計画より多い症例数を実施することが可能であった。

共同研究施設の国立国際医療研究センターでは臨床膵島分離・移植の体制が整い、平成26年3月に日本膵・膵島移植研究会から膵島分離・移植施設として認定された。平成26年度から臨床膵島移植を実施する予定である。

共同研究施設の岡山大学であるが、研究代表者が6月まで所属していた大学であり、7月以降は臨床膵島移植に関する活動を行っていないため、分担金額は0円となっている。平成

26年度は共同研究者から外れる予定となっている。

以上のとおり、平成25年度は当初の計画よりも多くの移植を実施することが可能であり、良好な研究成果であると考えられた。

D. 考察

日本で臨床膵島移植を行っていくうえでの最大の問題点はドナー情報の入手過程であり、ドナーコーディネートを一元化しなければ日本の膵島移植の成功は困難である。膵島移植は複数回の移植でインスリン離脱を目指す治療であり、初回移植から2回目、3回目の移植までの期間があくと、インスリン離脱を達成することが困難となることが報告されている。現在の日本のドナー数を考慮すると、ドナー情報のとりこぼしにより2回目、3回目の膵島移植の時期が遅くなると、インスリン離脱症例を出すことが困難となることが予想される。ドナーコーディネートの問題は、厚生労働省、日本臓器移植ネットワーク、日本組織移植ネットワーク、および日本膵・膵島移植研究会が関与する事案であり、関係団体が協力して早期に解決していただけることを期待している。また、日本の移植医療の根本的な問題として脳死ドナーの絶対的不足がある。欧米のドナーの割合を日本の人口に当てはまると、日本でも2500例前後の脳死ドナーが発生しているはずであるが、実際には年間45例前後にとどまっているのが現状である。国民への普及啓発活動を根気よく続けていくとともに、脳死での臓器提供が行われやすい環境を作ることが大事であると思われる。

E. 結論

平成25年度は研究代表者が所属している千

葉東病院で2例の膵島移植を実施することができ、また、京都大学、大阪大学での臨床膵島分離作業にも携わり、千葉東病院の症例も併せて5回の臨床膵島分離を行い、移植を4回実施した。当初の計画より多い症例数を実施することが可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Seita M, Noguchi H, Kubota Y, Kawamoto H, Nakaji S, Kobayashi N, Fujiwara Y. Development of Canine Models of Type 1 Diabetes with Partial Pancreatectomy and the Administration of STZ. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):25-31

2: Kubota Y, Noguchi H, Seita M, Yuasa T, Sasamoto H, Nakaji S, Okitsu T, Fujiwara Y, Kobayashi N. Maintenance of viability and function of rat islets with the use of ROCK inhibitor Y27632. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):15-23.

3: Kawai T, Noguchi H, Kuise T, Nakatsuka A, Katayama A, Imagawa N, Kataoka HU, Saitoh I, Noguchi Y, Watanabe M, Fujiwara T. Comparison of incubation solutions prior to islet purification in porcine islet isolation. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):9-14.

4: Katayama A, Noguchi H, Kuise T, Nakatsuka A, Hirota D, Kataoka HU, Kawai T, Inoue K, Imagawa N, Saitoh I, Noguchi Y, Watanabe M, Wada J, Fujiwara T. Comparison of new

preservation solution, HN-1, and University of Wisconsin solution in pancreas preservation for porcine islet isolation. *Cell Med.* 2013, 6(1-2):3-8.

5: Kaitsuka T, Noguchi H, Shiraki N, Kubo T, Wei FY, Hakim F, Kume S, Tomizawa K. Generation of Functional Insulin-Producing Cells From Mouse Embryonic Stem Cells Through 804G Cell-Derived Extracellular Matrix and Protein Transduction of Transcription Factors. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Jan;3(1):114-27.

6: Miyamoto Y, Koshidaka Y, Noguchi H, Oishi K, Saito H, Yukawa H, Kaji N, Ikeya T, Suzuki S, Iwata H, Baba Y, Murase K, Hayashi S. Observation of positively-charged magnetic nanoparticles inside HepG2 spheroids using electron microscopy. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):89-96.

7: Kataoka HU, Noguchi H. ER stress and β cell pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes and islet transplantation. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):53-57.

8: Kuise T, Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Fujiwara T. Isolation efficiency of mouse pancreatic stem cells is age-dependent. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):69-73.

9: Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Fujiwara T. Culture conditions for mouse pancreatic stem cells. *Cell Med.* 2013, 5(2-3):63-68.

10: Noguchi H, Kobayashi N. Controlled expansion of mammalian cell populations

by reversible immortalization. *J Biotechnol Biomater* 3: 158.

11: Oishi K, Miyamoto Y, Saito H, Murase K, Ono K, Sawada M, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T, Hayashi S, Noguchi H. In vivo imaging of transplanted islets labeled with a novel cationic nanoparticle. *PLoS One.* 2013;8(2):e57046.

2. 学会発表

1: 坪尚武、西郷健一、長谷川正行、丸山通広、大月和宣、青山博道、松本育子、野口洋文、浅野武秀、関直人：再開後初めての心停止ドナー下膵島移植の1例。第41回日本膵・膵島移植研究会。2014/3/7-8 名古屋

2: 野口洋文：臨床膵島分離技術についてワークショップ15「膵島移植の成績向上を目指して」。第49回日本移植学会総会。2013/9/5-7 京都

3: 橋詰 亮、米川敦子、宮崎麻里子、大月和宣、坪尚武、丸山通広、西郷健一、長谷川正行、青山博道、松本育子、浅野武秀、野口洋文、伊藤泰平、剣持 敬：SF-36v2™を用いた膵臓移植・膵腎同時移植後レシピエントの長期QOL調査。第41回日本膵・膵島移植研究会。2014/3/7-8 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業)
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書

第三世代・第四世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施

研究分担者 霜田 雅之 国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト研究長

研究要旨

研究目的： 本研究は、第三世代・第四世代膵島分離法を用いた膵島移植を臨床で実施することを目的としている。分担研究施設である独立行政法人国立国際医療研究センター（以下 NCGM）は独自のプロトコールで臨床研究として実施する。

研究方法： H25 年度は、NCGM では臨床試験の準備を行う。本研究費は、臨床実施に必要な薬剤、溶液、器材、文書等の消耗品の購入、整備に使用する。設備、大型機器、人件費等は他の研究費で支出する。体制、準備が完了次第臨床試験を実施する（H26 年度からを予定）が、まず少数例のパイロットスタディとして有効性と安全性の評価を行い、その結果により次相の臨床研究を行う予定である。

成果、結果： H25 年度は臨床研究の準備を進めた。研究用ヒト膵臓の入手が困難な我が国では大型動物であるブタを用いてヒト膵島分離と同様の工程でのシミュレーションを行うことが重要であるが、H25 年度は 13 例のブタ膵島分離を行った。膵島分離結果も良好である。臨床実施に向けて体制構築を進め、H25 年 6 月に施設内の倫理委員会の承認を得た。臨床試験の際に膵島分離を行うに当たって膵島の品質管理に必要な GMP 基準を満たす細胞調製施設(CPC)をNCGM内に稼働させた。H26 年 3 月に日本膵膵島移植研究会より膵島分離・移植実施施設に認定された。

考察・結論： NCGM については、H25 年度の計画を順調に消化した。H26 年度からの移植実施を予定している。

A. 研究目的

本研究では第三世代分離法技術を用いた臨床膵島移植を日本で実施するとともに、現在開発中の第四世代分離法を H27 年度から臨床実施することを目的としている。国立国際医療研究センターでは独自の膵島分離法で膵島移植を実施する計画となっている。

B. 研究方法

NCGM で臨床試験として行われる膵島移植の概要は以下である。

対象： 血糖値が不安定な 1 型糖尿病患者。
登録人数： 3 名。登録期間： 24 ヶ月。観察期間： 24 ヶ月。試験デザイン： 単施設、前向き介入試験、非ランダム化、非盲検。主要

エンドポイント：初回移植から1年後にHbA1c値(NGSP値)が7.0%未満であり、かつ初回移植後28日から移植後365日にかけて重症低血糖発作が消失した患者の割合。

年次計画は以下である。

平成25年度：臨床試験の体制準備

- a. 細胞調製施設の準備
- b. 倫理委員会の承認
- c. 日本膵膵島移植研究会の施設認定

平成26年度

- a. 臨床試験開始・患者登録
- b. 膵島移植実施
- c. 評価項目のデータ収集

平成27年度

- a. 臨床試験継続
- b. 評価項目のデータ収集

C. 研究結果

H25年度は臨床試験の準備を進めた。研究用ヒト膵臓の入手が困難な我が国では大型動物であるブタを用いてヒト膵島分離と同様の工程でのシミュレーションを行うことが重要であるが、H25年度は13例(H24年度より計22例)のブタ膵島分離を行った。膵島分離結果も良好である。臨床実施に向けて体制構築を進め、H25年6月に施設内の倫理委員会の承認を得た。臨床試験の際に膵島分離を行うに当たって膵島の品質管理に必要なGMP基準を満たす細胞調製施設(CPC)をNCGM内に稼働させた。H26年3月に日本膵膵島移植研究会より膵島分離・移植実施施設に認定された。

D. 考察

H25年度の計画は順調に達成した。全体計画として、研究代表機関である国立病院機構千葉東病院とともにヒト膵島分離を年間1-3例行う予定となっているが、H25年度は研究代表者が予定数を上回る膵島分離、移植を行っ

た。H26年度よりはNCGMもヒト膵島分離数に貢献すべく研究を推進する。

E. 結論

NCGMとしてH25年度の計画は予定とおり達成した。H26年度より臨床膵島移植を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Tamai M, Shimoda M, Matsumoto S. Questionnaire Survey on the Perception of Type 1 Diabetic Patients and Family Members about Allogeneic and Bio-artificial Islet Transplantation, DNA Vaccine, and iPS Cellular Therapy. 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th AASD Scientific Meeting Seoul, Korea November 6-9th, 2013

2. Shimoda M, Tamai M, Matsumoto S. MOTIVATION FOR RECEIVING ALLOGENEIC AND XENOGENIC ISLET TRANSPLANTATION AMONG JAPANESE TYPE 1 DIABETIC PATIENTS. 12th CONGRESS INTERNATIONAL XENOTRANSPLANTATION ASSOCIATION

OSAKA JAPAN November 13th

3. Chujo D, Foucat E, Nguyen TS,
Chaussabel D, Shimoda M, Matsumoto S,
Yagi K, Banchereau J, Ueno H. An
Integrated Approach to Determine
ZnT8-specific T Cell Repertoire in Type 1
Diabetes Patients and Healthy Adults.

The 13th International Congress of the
Immunology of Diabetes Society Mantra
Lorne, Victoria, Australia 7-11th
December 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別紙 3

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業)
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
分担研究報告書

第三世代・第四世代膵島分離法を用いた臨床膵島移植の実施

研究分担者 藤原 俊義 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学 教授

研究要旨

(藤原俊義教授は、研究代表者が申請当時に所属していた大学の教授であるが、研究代表者が7月に千葉東病院に移籍したため、本研究に携わったのは4-6月の期間のみとなっている。厚生科研費の配分時期との兼ね合いにより平成25年度の実担金は0円となっており、本研究にも7月以降は関与していない。平成26年度は研究分担者から外れている。)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	特になし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Seita M, Noguchi H, Kubota Y, Kawamoto H, Nakaji S, Kobayashi N, Fujiwara Y.	Development of Canine Models of Type 1 Diabetes with Partial Pancreatectomy and the Administration of STZ.	Cell Med.	6(1-2)	25-31	2013
Kubota Y, Noguchi H, Seita M, Yuasa T, Sasamoto H, Nakaji S, Okitsu T, Fujiwara Y, Kobayashi N.	Maintenance of viability and function of rat islets with the use of ROCK inhibitor.	Cell Med.	6(1-2)	15-23	2013
Kawai T, Noguchi H, Kuise T, Nakatsuka A, Katayama A, Imagawa N, Kataoka HU, Saitoh I, Noguchi Y, Watanabe M, Fujiwara T.	Comparison of incubation solutions prior to islet purification in porcine islet isolation.	Cell Med.	6(1-2)	9-14	2013
Katayama A, Noguchi H, Kuise T, Nakatsuka A, Hirota D, Kataoka HU, Kawai T, Inoue K, Imagawa N, Saitoh I, Noguchi Y, Watanabe M, Wada J, Fujiwara T.	Comparison of new preservation solution, HN-1, and University of Wisconsin solution in pancreas preservation for porcine islet isolation.	Cell Med.	6(1-2)	3-8	2013
Kaitsuka T, Noguchi H, Shirakami N, Kubo T, Waki FY, Hakim F, Kume S, Tomizawa K.	Generation of Functional Insulin-Producing Cells From Mouse Embryonic Stem Cells Through 804G Cell-Derived Extracellular Matrix and Protein Transduction of Transcription Factors.	Stem Cells Transl Med.	3(1)	114-27	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyamoto Y, Koshidaka Y, Noguchi H, Oishi K, Saito H, Yukawa H, Kaji N, Ikeya T, Suzuki S, Iwata H, Baba Y, Murase K, Hayashi S.	Observation of positively-charged magnetic nanoparticles inside HepG2 spheroids using electron microscopy.	Cell Med.	5(2-3)	89-96	2013
Kataoka HU, Noguchi H.	ER stress and β cell pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes and islet transplantation.	Cell Med.	5(2-3)	53-57	2013
Kuise T, Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Fujiwara T.	Isolation efficiency of mouse pancreatic stem cells is age-dependent.	Cell Med.	5(2-3)	69-73	2013
Noguchi H, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Fujiwara T.	Culture conditions for mouse pancreatic stem cells.	Cell Med.	5(2-3)	63-68	2013
Noguchi H, Kobayashi N.	Controlled expansion of mammalian cell populations by reversible immortalization.	J Biotechnol Biomater	3	158 (online only journal)	2013
Oishi K, Miyamoto Y, Saito H, Murase K, Onoe K, Sawada M, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T, Hayashi S, Noguchi H.	In vivo imaging of transplanted islets labeled with a novel cationic nanoparticle.	PLoS One.	8(2)	e57046	2013

Development of Canine Models of Type 1 Diabetes With Partial Pancreatectomy and the Administration of Streptozotocin

Masayuki Seita,* Hirofumi Noguchi,† Yasuhiro Kubota,* Hironobu Kawamoto,*
Shuhei Nakaji,‡ Naoya Kobayashi,* and Toshiyoshi Fujiwara*

*Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

†Department of Surgery, Clinical Research Center, Chiba-East National Hospital, National Hospital Organization, Chiba, Japan

‡Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Okayama University of Science, Okayama, Japan

We created canine models of type 1 diabetes that were suitable for the assessment of cell therapies, such as islet transplantation and bioartificial pancreas, with low-dose streptozotocin (STZ) injection and partial pancreatectomy. In our model, a 50% pancreatectomy was performed with general anesthesia, followed by systemic injection of 35 mg/kg STZ into a vein of the foreleg. Four weeks after the administration of STZ, the fasting blood glucose level of our model dogs was found to be over 200 mg/dl twice on different days, and we could not detect any canine insulin by the intravenous glucose tolerance test (IVGTT). We therefore diagnosed the dogs to have induced diabetes. Some studies have reported high-dose STZ to be very toxic for both the kidney and liver, and therefore a lower dose is desirable to induce diabetic models without any associated kidney or liver damage. We think that the combination of a partial pancreatectomy can thus make it possible to reduce the dose of STZ, and it is therefore useful for the creation of type 1 diabetes models. We believe that our model is a safe and reliable model for type 1 diabetes in canines to assess the efficacy of pancreas-targeted cell therapies.

Key words: Pancreatectomy; Streptozotocin (STZ); Diabetes; Dogs

INTRODUCTION

Presently, the number of diabetic patients is steadily increasing worldwide. Among these, intensive insulin therapy is essential against type 1 diabetes mellitus (DM) caused by pancreatic islet destruction due to autoimmunity; however, the strict management of blood sugar levels is difficult and the risk of hypoglycemic episodes is high. Moreover, it is also known that microvasculature/peripheral neuropathy cannot be completely prevented. Many strategies, including pancreatic transplantation, pancreatic islet transplantation, and bioartificial pancreas (BAP), have been devised as medical treatments to replace insulin therapy (3,7,10,11). In actual medical practice, seven diabetic patients that underwent allogeneic pancreatic islet transplantation using the Edmonton protocol carried out at the University of Alberta in 2000 successfully withdrew from insulin usage (18). Various studies are still being carried out in the field of pancreatic islet transplantation (12–15), in addition to studies on xenotransplantation of the pancreatic islets of pigs, etc. (2).

However, in transplantation studies that assume xenotransplantation, it is prospectively that the transition to

clinical application in humans will be very difficult from an ethical standpoint. Accordingly, a large animal diabetes model is essential for appropriate evaluation *in vivo*. Among large animals, dogs are known to exhibit diabetes symptoms very similar to that of humans and may be said to be the animal that is the most suitable for diabetes studies. Streptozotocin (STZ) is frequently used to induce diabetes in animal models, but high doses may cause additional toxicity of the kidneys and liver. In this study, we developed a safe and reliable diabetes model of a dog by partial pancreatectomy and systemic administration of low doses of STZ. Moreover, a BAP transplanting experiment was carried out using one of these dogs and is being reported together with the study.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Five female beagles (Katayama Chemical, Inc., Osaka, Japan), weighing about 10 kg, were used in this study. The experiments on animals were performed at the Department of Animal Resources in the Okayama University Advanced Science Research Center, and all

procedures were conducted within the guidelines for humane care of laboratory animals and approved by the Okayama University Institutional Animal Care and Use Committee. All dogs used in the study were housed in individual kennels and fed twice daily (morning and evening) on a diet of biscuit fortified with vitamins and minerals.

Diagnosis of Diabetes

We determined the diagnostic criteria of induced diabetes as follows, with reference to articles and various clinical practice guidelines.

1. A fasting blood glucose of 200 mg/dl or more is measured two times on different days.
2. There is no responsiveness toward glucose tolerance testing upon intravenous glucose tolerance test (IVGTT) and dog-type insulin is substantially undetected.

General Anesthesia

Avascularization was lightly carried out by having an assistant fix the forelegs. A route was secured with a 20-gauge indwelling needle (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) from the veins appearing on the surface. Diprivan (1%; AstraZeneca, Osaka, Japan) was intravenously injected. A tracheal tube of approximately 6.0 Fr (Japan Medicalnext Co., Ltd., Osaka, Japan) was inserted into the tracheal tube and connected to an artificial respirator. Anesthesia was maintained using Sevofrane (Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) for inhalation. Respiratory care was carried out at a tidal volume of approximately 200 ml and respiratory frequency of approximately 20 times per minute. Diprivan (1%) was injected by 1 ml each time the anesthetic depth became shallow. Muscle relaxants were not used. Atropine sulfate hydrate (0.5 mg; Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka, Japan) was used to prevent complications such as vomiting, etc., at the time of awakening.

Surgical Procedures

A laparotomy was carried out upon upper ventral incision. It was confirmed that there were no intraperitoneal abnormalities. The omental bursa was opened, and a pink pancreas was confirmed. This was separated from the tail of the pancreas, thrust ligation was carried out where it intersects with the veins of the upper intestinal membrane, and the pancreas tail was subsequently resected. Next, the duodenum was fixed, and the accompanying pancreas uncinata process was resected at a level not damaging the papilla of the Vater. The surgical incision was carefully closed upon confirming hemostasis.

Injection of STZ

STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was initially prepared aseptically as solutions containing 100 mg/ml

in trisodium citrate (Sigma-Aldrich) buffer (pH 4.5) and sterilized by filtration through 0.22- μ m filters (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The drug solution was prepared immediately before administration due to the fact that these compounds often display chemical instability in solution form. The solution of 35 mg/kg STZ was systemically injected into a vein in the foreleg or a cervical vein. Next, light sedation with propofol (Sigma-Aldrich) was used, as STZ often causes blood vessel pain.

Postoperative Management

Wound infection is the most common complication in large animal experiments carried out at our institute. From this experience, the wounded area was wrapped with gauze (Hakujiji, Tokyo, Japan) and securely taped, and the wound was managed in order to avoid contact with fecaluria. Since infection from saliva is also common, an Elizabethan collar (Mau, Tokyo, Japan) was used to prevent wound infection due to removal of the gauze and saliva. Cefamezin alfa (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) was administered at 0.25 g/day as an antibiotic for 5 days following surgery. The gauze was changed daily for a week as a general rule, and the wound was maintained clean. The stitches were removed on day 14.

Changes in Body Weight

The body weight of the dogs following surgery was measured every 2 weeks.

Biochemical Analysis

Blood was drawn from the dog's foreleg regularly in order to measure the biochemical features of the canine, such as total protein (TP), albumin (ALB), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (T-Bil), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CR), amylase (AMY), lipase, Na, K, and Cl. All samples were measured by Idexx Laboratories (Tokyo, Japan).

IVGTT

After partial pancreatectomy and the injection of STZ, the IVGTT was conducted at the point that the fasting blood glucose level of dogs was over 200 mg/dl twice on a different day. The data were compared with those obtained from IVGTT conducted prior to the surgery. For IVGTT, a bolus injection of 50% glucose (Sigma-Aldrich) concentrated solution at 1.0 g/kg of body weight was given. Blood was collected at the time points of 0, 5, 15, 25, 35, 45, 60, and 120 min to measure blood glucose levels and insulin concentrations, using a Medisafe mini GR-102 (Terumo Corporation) and a Canine Insulin ELISA Kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden) according to the provider's protocol, respectively.

Histological Assessment

Autopsy was performed 8 months after surgery and STZ injection. All samples were fixed with 20% formalin (Sigma-Aldrich), embedded in paraffin (Sigma-Aldrich), and processed for staining with hematoxylin and eosin (H&E; Sigma-Aldrich). Insulin staining was also performed for samples taken from the residual pancreas, using anti-insulin antibody (Dako, Carpinteria, CA, USA).

A Case of BAP Transplantation

We are developing a bag-type BAP using a semipermeable membrane, which involves an immunity isolation effect (7). This BAP device was placed inside the abdomen of dog 1 that generated diabetes in this study, and on a later day, a fresh pancreatic islet isolated from a male Lewis rat (12 weeks old; Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) weighing approximately 300 mg was infused a total of three times every 7 days (14,200, 9,150, and 10,120 IEQ, respectively). Islet isolation was conducted as described previously (11).

RESULTS

Operation and Postoperative Complication

In order to create a diabetes model of beagle dogs, the pancreas tail was excised where it intersects the veins of the upper intestinal membrane, and subsequently the pancreas uncinata process accompanying the duodenum was extracted at a level not damaging the papilla of the vater. The extracted pancreas weighed an average of 13.7 g, and from the fact that the weight at complete excision of the pancreas carried out on a beagle with the same weight was 28 g, it was found that approximately a 50% pancreatectomy was possible using this method (Table 1).

No acute phase side effects related to surgery such as wound infection, secondary hemorrhage, aspiration pneumonia, etc., were observed. However, a mild tendency for loose stool believed to be due to an impaired exocrine pancreas was observed from a relatively early phase.

Table 1. Detailed Data of the Dogs Actually Used in the Experiment

Dog No.	Body Weight (kg)	Pancreas Weight (kg)	Amount of STZ (mg/kg)	Date of DM After Operation	Survival Days
1	10.5	14.2	35	35	170
2	10.0	12.8	15+35	28	160
3	11.0	15.6	15+35	28	192
4	11.5	12.2	35	23	145
5	11.5	13.8	35	21	125
Average	10.9±0.65	13.72±1.32		27.0±5.43	158.4±25.3

STZ, streptozotocin; DM, diabetes mellitus.

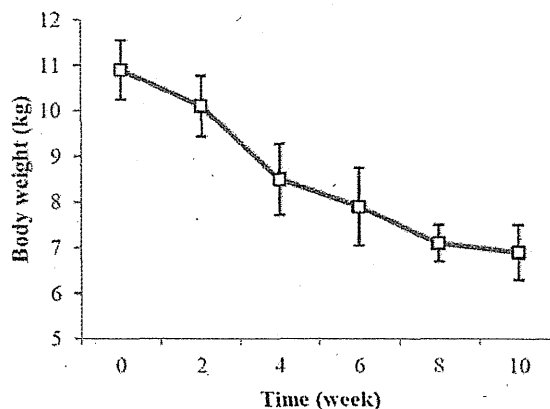


Figure 1. Changes in body weight. STZ was intravenously injected after resecting the pancreas tail and pancreas uncinata process of a beagle. The body weight was measured every 2 weeks following surgery.

Changes in Body Weight

STZ (15 or 35 mg/kg) was intravenously injected following pancreatectomy (Table 1). Following pancreatectomy and STZ administration, a decline in body weight was gradually observed, and the average body weight 2 months after operation was approximately 7.1 kg (Fig. 1).

Biochemical Parameters Indicated the Progress of Diabetes

A biochemical test was carried out the fourth week following surgery. No abnormalities were observed in the pancreatic exocrine function upon biochemical tests, and moreover, no other major abnormal findings including liver function/renal function were observed (Table 2).

Table 2. The Biochemical Data of the Dogs Used for the Experiment 4 Weeks Following Surgery

	Average (n=5)	Reference Interval
TP (g/dl)	6.44±0.38	5.0–8.0
ALB (g/dl)	3.04±0.26	2.8–4.0
AST (IU/L)	41.8±9.26	10–50
ALT (IU/L)	55.2±18.0	15–70
T-Bil (mg/dl)	0.22±0.13	0.1–0.5
ALP (IU/L)	138.6±31.1	20–150
BUN (mg/dl)	14.2±5.19	10–28
CR (mg/dl)	0.63±0.12	0.5–1.5
AMY (mg/dl)	423.4±63.5	399–1041
Lipase (mg/dl)	660.4±163.8	245–1585
Na (mEq/L)	142.8±2.39	141–152
K (mEq/L)	4.6±0.38	4.4–5.4
Cl (mEq/L)	107.4±2.07	105–115

TP, total protein; ALB, albumin; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; T-Bil, total bilirubin; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CR, creatinine; AMY, amylase.

Changes in IVGTT Before and After Surgery

An IVGTT test was carried out 4 weeks following surgery. Compared to normal dogs, the blood glucose levels of 4 weeks following surgery stayed about the same with respect to the glucose tolerance test and transited as hyperglycaemia; moreover, dog-type insulin was also not detected (Fig. 2).

Pathological Findings

The residual pancreas was markedly atrophic upon autopsy (Fig. 3). Most parts were replaced by fatty tissues in the pathology specimen as well, and only islet pancreas tissues were observed in some parts (Fig. 4A, B). The vaguely recognized pancreatic islets did not stain at all for insulin, and it was believed that the insulin-secreting ability had disappeared (Fig. 4C). No findings suggesting

complications to other organs such as the lungs, kidneys, liver, etc., were observed.

Changes in Blood Glucose Levels After BAP Transplantation

We are developing a bag-type BAP using a semi-permeable membrane, which involves an immunity isolation effect. This bag-type device involving an immunity isolation effect was placed inside of the abdomen of dog 1 after generation of diabetes in this study, and starting on day 90, fresh pancreatic islets were isolated from a Lewis rat and infused at three later time points. The blood glucose level declined to 200 mg/dl or less within several days following transplantation with the first and second infusion; however, a tendency was observed for the blood glucose level to subsequently gradually increase. A relatively stable

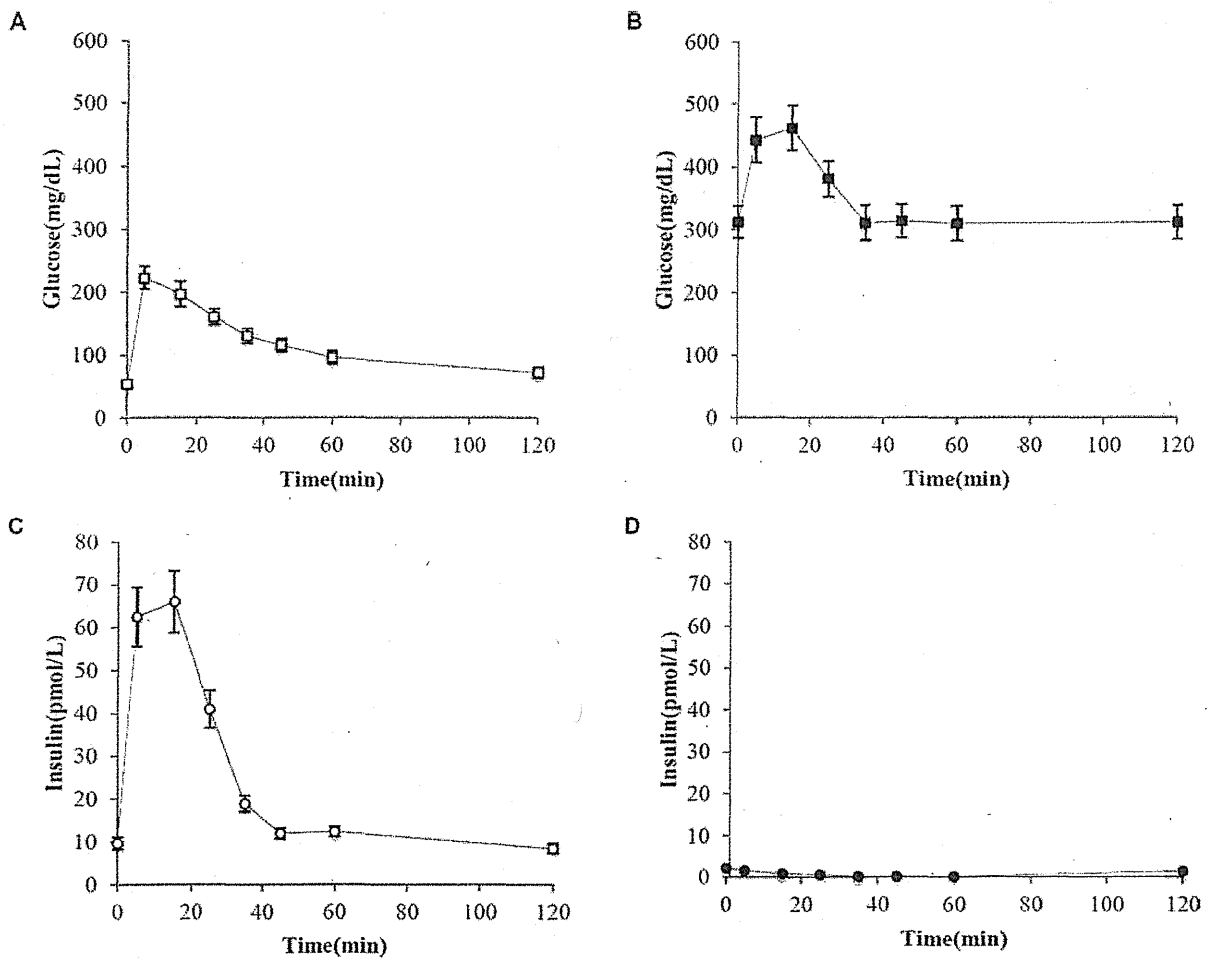


Figure 2. Comparison of the IVGTT in normal dogs and dogs that developed diabetes. (A) The transition of the blood glucose level in normal dogs. (B) The transition of the blood glucose level in diabetic dogs 4 weeks following surgery. (C) The transition of insulin secretion in normal dogs following glucose load. (D) The transition of insulin secretion in diabetic dogs 4 weeks following surgery.

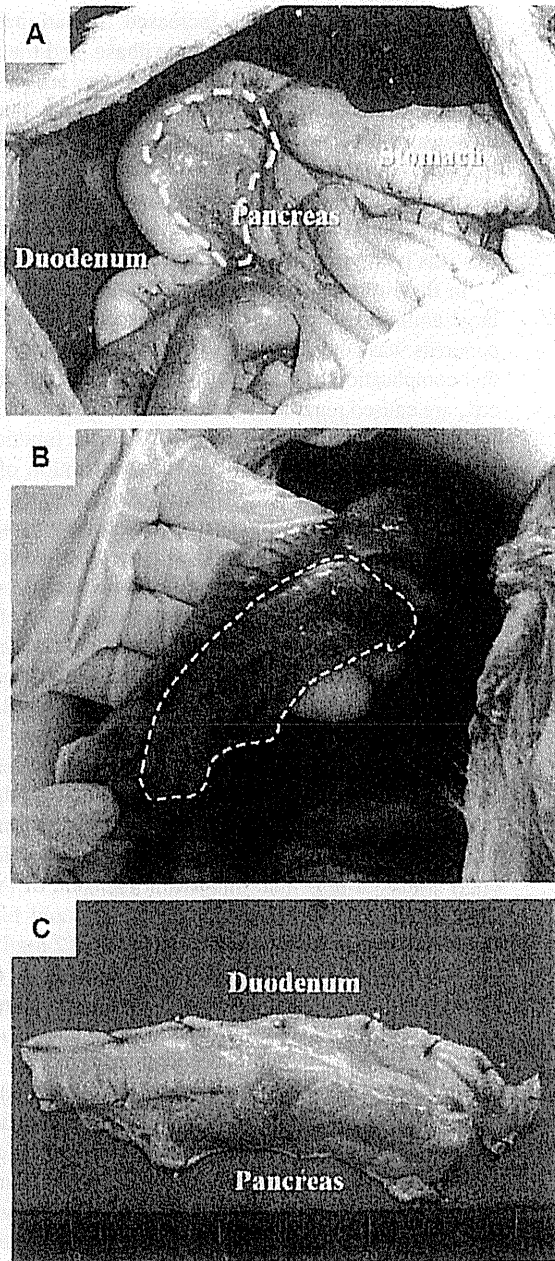


Figure 3. Image at autopsy and image of the resected specimen. (A) Findings in the abdominal cavity upon an autopsy. The remaining pancreas heads (inside the dotted line) are attached to the duodenum. (B) The residual pancreas (inside the dotted line) was thin and observed with prominently atrophic. (C) A clear abnormality was observed in the duodenal mucosa side including the papilla of the water.

blood glucose level of 200–250 mg/dl was observed for 2 months following the third infusion (Fig. 5). This suggested that the transplanted pancreatic islets may have

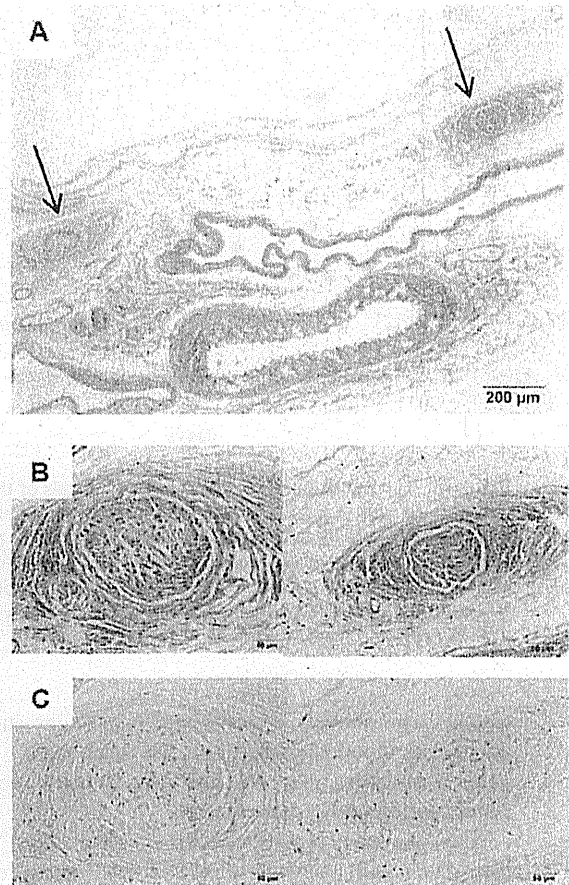


Figure 4. Pathological findings of the excised pancreas (H&E and insulin staining). (A) A low-magnified (100 \times) H&E-stained image. Most parts are replaced with fatty tissues, with islet pancreas tissues observed in some parts (arrows). (B) A high-magnified (400 \times) H&E-stained image. These are tissues believed to be barely remaining pancreatic islets. (C) A high-magnified (400 \times) insulin-stained image. The remaining pancreatic islets did not stain at all from insulin staining.

engrafted in the device and were carrying out good matter/nutrition exchange for at least 2 months. The unexpected death of dog 1 between days 167 and 170 from undetermined causes prevented any follow-up of the BAP.

DISCUSSION

The number of diabetic dogs is increasing following a recent pet boom, with cases of dog owners consulting animal hospitals on the rise (5). Interestingly, dogs are known to exhibit diabetes symptoms similar to that of humans, such as retinopathy, nephropathy, etc. Accordingly, it may be said that dogs are the most suitable research subject in animal experiments related to diabetes. Moreover, they have relatively gentle characteristics

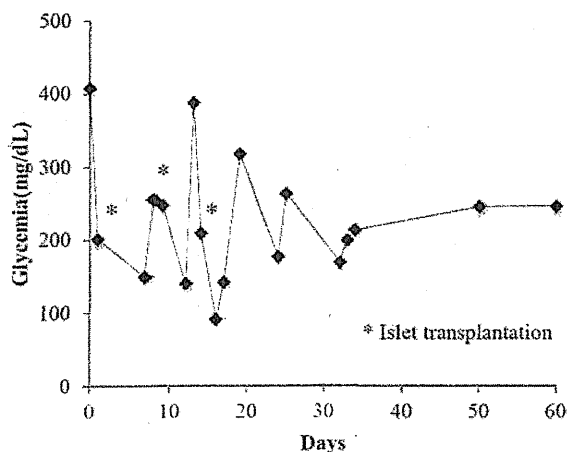


Figure 5. The transition of the blood glucose levels of the dog transplanted with a BAP. The bag-type device comprising an immunity isolation effect with respect to dog 1 is placed, and on a later day, fresh pancreatic islets isolated from a Lewis rat were infused a total of three times every 7 days (14,200, 9,150, and 10,120 IEQ, respectively). Blood glucose levels are shown over a 60-day period. *Days of infusion of pancreatic islets.

among large animals, experimental operations such as anesthesia, blood sampling, etc., are much easier compared to monkeys, pigs, etc., and there is also a merit of simple perioperative management.

There are many reports related to creating a type 1 diabetes model with mammals using STZ (16,19), and reports using large animals such as dogs, pigs, and monkeys can also be found (6,8). The dose of STZ for each animal species differs depending on the article; however, in an example of high-concentration STZ doses of 100 mg/kg or more, complications of liver function and renal function impairment have been reported. In order to obtain a diabetes model with good general condition, diabetes must be induced with the minimum required dose of STZ. Accordingly, we believed that the STZ dose may be reduced by means of carrying out partial pancreatectomy, thereby allowing for a safer and more reliable diabetes model.

In an experiment using the same beagle, Tschoepe et al. (20) systemically administered 28–38.5 mg/kg STZ but were unable to accomplish the creation of a complete diabetes model. Moreover, Anderson et al. (1) administered 40 mg/kg alloxan, which also comprises β cytotoxicity, simultaneously with 35 mg/kg STZ and succeeded in creating a diabetes model; however, necrosis of the liver tissues accompanying wide-ranging fatty infiltration was observed upon autopsy. In our study, 50% pancreatectomy was concomitantly used, and STZ administration at various concentrations was attempted. At first, when 65 mg/kg, which is the standard dose for small animals such as rats, etc., that have not undergone pancreatectomy, was

systemically administered, increased transaminase was observed at an early postoperative phase, and the animal died from liver failure 20 days following surgery (data not shown). In contrast, at 15 mg/kg STZ administration, diabetes was not observed, and an additional administration was required (dogs 2 and 3). Diabetes was generated in all cases administered 35 mg/kg and the liver function/renal function 4 weeks following surgery was good, so this was believed to be the optimal STZ concentration.

In the current studies on creating a diabetes model in large animals, there are many reports mentioning that the pancreas was completely or partially excised. It is known that complications of the digestive system such as diarrhea, etc., are caused regarding cases with complete excision of the pancreas due to the pancreatic exocrine function also being affected. Accordingly, the administration of drugs compensating for the exocrine function becomes necessary. Moreover, reconstruction of the biliary system is required, complicating the surgical procedure and thereby also increasing the risk of complications due to surgery such as bile leakage, secondary hemorrhage, etc. (17).

There are also several reports regarding the creation of diabetic dog models by combining partial pancreatectomy and STZ. Freyse et al. (4) selectively administered 2 mg/kg STZ to the pancreaticoduodenal artery in addition to 77% pancreatectomy and succeeded in creating diabetes models at a ratio of 16:55 dogs. Moreover, although the ratio of excision is not mentioned, Tschoepe et al. administered STZ in different concentrations from the pancreaticoduodenal artery of dogs that underwent excision of the pancreas head as well as excision of the tail and failed in inducing diabetes with the administration of 2 mg/kg STZ but generated diabetes in all dogs at a dose of 25 mg/kg. Morales et al. (9) carried out 90% pancreatectomy and 2 mg/kg STZ administration via the pancreaticoduodenal artery to fox terriers and succeeded in inducing diabetes in all five dogs. The method of selectively directly cannulating and infusing STZ to the pancreaticoduodenal artery is capable of overwhelmingly reducing the dose of STZ and selectively administrating only to the pancreas; therefore, it is theoretically believed to be the most ideal route. However, the method of identifying the artery and directly puncturing requires specialized knowledge, and time is required for acquiring these skills. Moreover, the surgical operation itself becomes complicated, resulting in greater surgical invasion. Consequently, this results in, of course, an increased risk of complications such as pancreatic fistula, secondary hemorrhage, etc.

Our method involves simply resecting the pancreas uncinata process and pancreas tail without touching the biliary system or blood circulatory system; therefore, there is minimal surgical invasion, the surgical time is short, and the risk of complications is minimized. Digestive symptoms such as loose stool, etc., are also mild compared to