

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591411
 研究課題名（和文） 移植時低酸素状態にある門脈内膵島に対する新しい酸素供給法による生着改善効果の検討
 研究課題名（英文） Novel method of supply of oxygen to the intraportally-transplanted islets can improve their engraftment.
 研究代表者
 酒井 哲也 (SAKAI TETSUYA)
 神戸大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：80372647

研究成果の概要：膵島移植は膵島を分離あるいは門脈内に移植する際に膵島が著しく障害され、1人の患者様を完治させるのに複数回の移植を必要としている。移植直後の障害として門脈内に移植された膵島の低酸素状態に着眼した。ラットの同系門脈内膵島移植において、移植直後に酸素化した Perfluorochemical (PFC) を腹腔内に投与し、6時間毎、48時間までこれを交換することで門脈内酸素濃度を上昇させ、その結果、移植成績および移植後28日目の糖代謝の改善を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	480,000	3,180,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植・再生医療、糖尿病、外科、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は膵島を分離する際、さらには門脈内に移植する際に膵島が著しく障害され、1人の患者様を完治させるのに結果として複数回の移植を必要としている。ドナー不足の現状を鑑みるとこの点は膵臓移植に大きく遅れを取る点として膵島移植普及の大きな障害となっている。移植直後の障害の1つは門脈内に移植された膵島の低酸素状態であり、これを改善することが生着時の loss を最小限にすると考えられる。

2. 研究の目的

高濃度酸素溶解能を持つ Perfluorochemical

(PFC) を腹腔内に投与することにより門脈内酸素濃度を上昇させ、その結果、移植膵島に十分な酸素を供給しうると考え、最終的にはこれにより移植膵島の生着率を向上させるかを検証することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ルイスラットを用いて以下の実験を行った。
 (1) ウレタン麻酔下に酸素化した PFC をラットの腹腔内に投与することで (group1)、酸素化しなかった PFC を投与した群 (group2) および何も投与しなかった control 群と比べて、実際に門脈内酸素濃度が上昇するかどうか、および経時的な変化を検討した。

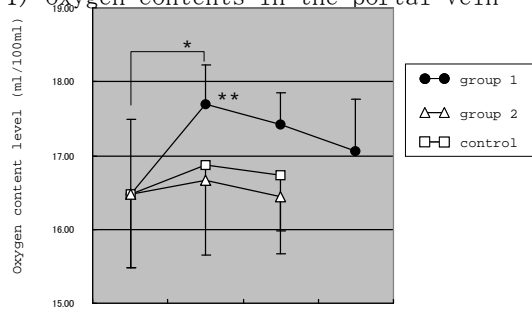
(2) ラットの同系門脈内膵島移植において、基礎実験として移植膵島量の marginal dose を決定したのち、marginal dose の分離膵島を移植した直後に酸素化した PFC を腹腔内に投与した群 (group1) と酸素化しなかった PFC を投与した群 (group2) および何も投与しなかった control 群の 3 群間で、PFC を投与した群 (group1, 2) では 6 時間毎、48 時間までこれを交換し、3 群それぞれの移植成績および移植後 28 日目の糖代謝を検討した。移植成績は移植後に 3 日間以上連続で正常血糖を呈したものを移植成功とし、成功率を比較検討した。また、耐糖能は移植後 28 日目に overnight で絶食にした後のラットに glucose を腹腔内投与し 10, 30, 60, 90, 120 分後に抹消静脈血糖値を測定した Intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT) で検討し、そのグラフにおける area under the curve (AUC) で定量的に評価した。

(3) 次に、移植成績の向上が PFC を投与することで実際に生着数が増加したことによることを証明するために、移植後 28 日目に犠牲死させて摘出した肝臓を全割し、病理組織学的に移植された膵島を定量的に評価することで、門脈内への生着が有意に改善しているかを検討した。

4. 研究成果

(1) 酸素化した PFC をラットの腹腔内に投与することで (group 1) 3 時間後の門脈内酸素濃度は有意に上昇し (* p=0.0128)、その値は酸素化していない PFC を投与した群 (group 2) および何も投与しなかった control 群に比べても有意に高値を示した (** p=0.0265)。さらに 6 時間後では group 1 では group 2 に比べ高い傾向を示したが (p=0.0603)、9 時間後には差を認めなかったため、PFC による門脈内酸素濃度の上昇効果は 6 時間までと考え、移植実験での投与間隔を 6 時間毎とした。

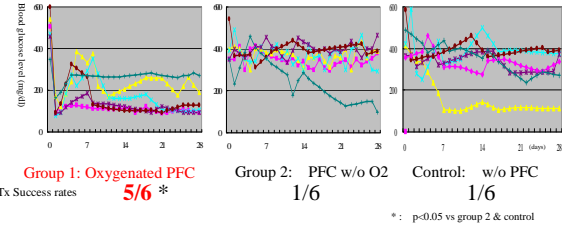
1) oxygen contents in the portal vein



(2) 膵島の収量はラット 1 匹当り 2350 ± 200 IEQ (1070 ± 90 islets) で純度は 90% 以上であった。移植の marginal dose を決定するために 1000, 1500, 2200IEQ の膵島を同系ラットの門脈内に移植したところ、その成功率は

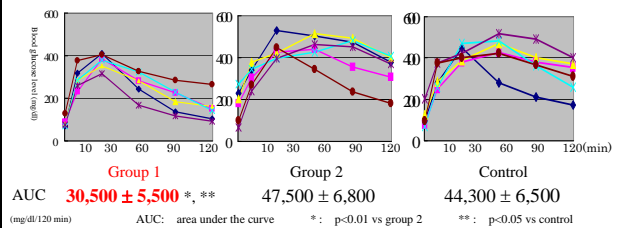
それぞれ 0/6, 1/6, 6/6 であり、1500IEQ が marginal dose であると判断し、以下の移植実験を行った。1500IEQ の膵島を移植した直後に酸素化した PFC を腹腔内に投与した群 (group1)、酸素化しなかった PFC を投与した群 (group2) および何も投与しなかった control 群の 3 群の移植後 28 日間の血糖の推移をグラフ 2.1) に示す。移植成功率はそれぞれ 5/6, 1/6, 1/6 であった。

2.1) Daily blood glucose levels after IPTT



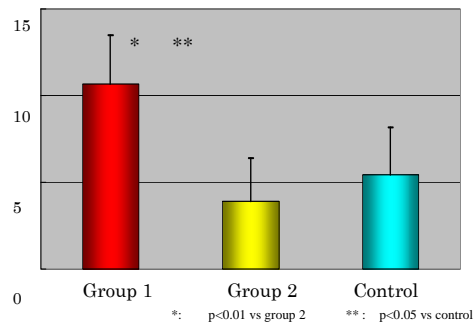
また、移植後 28 日目の IPGTT の結果をグラフ 2.2) に示す。それぞれの曲線下面積 (AUC) の値は 30500 ± 5500 mg/dl/120 min、 47500 ± 6800 mg/dl/120 min (p=0.0018 vs group1) および 44300 ± 3300 mg/dl/120 min (p=0.0123 vs group1) で有意に良好な血糖コントロールが得られ、酸素化した PFC を投与することで移植成績が向上することを証明した。

2.2) IPGTT on the 28th post-transplant



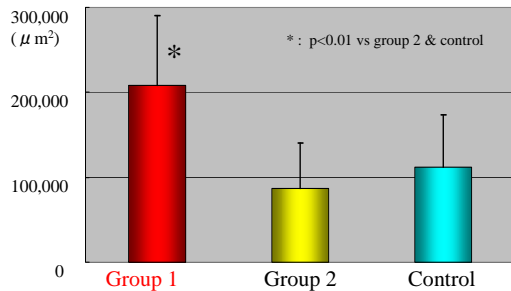
(3) 移植後 28 日目に犠牲死させて摘出した肝臓を全割し、H-E 染色およびインスリン染色を行い、生着している膵島を数えたところ、標本内の膵島数は group 1 は 12.83 ± 3.31 と、group 2: 4.67 ± 3.01 (P=0.002)、control: 6.50 ± 3.33 (P=0.004) に比べ、有意に生着膵島数が多かった (グラフ 3.1)。group 2 とコントロール群には差を認めなかった。

3.1) No. of engrafted islets in the left & median lobes of the liver



さらに、コンピューターソフト (Win ROOF ver 5.6, Mitani corporation, Japan) を用いて、生着膵島の面積和を計算したところ、group 1 は $209.0 \pm 81.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ と group 2 ($86.6 \pm 53.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $P=0.006$) および control ($112.6 \pm 61.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $P=0.024$) に比べ有意に大きく (グラフ 3.2)、酸素化した PFC を投与することで移植した膵島の生着が改善し、その結果、前述の良好な移植成績をもたらすことが証明された。

3.2) The total of engrafted islet area in the lobes of the liver



以上より、これまで臨床の膵島移植で移植およびその後の生着過程において、血管再建を行わない膵島移植では膵島の移植された環境による低酸素状態から、生着過程で多くの膵島を loss していた可能性が確かめられた。そして、この方法、つまりは腹腔内に酸素化した PFC を投与することで、門脈内酸素濃度は上昇し、その結果、移植した膵島の生着数が増加し、最終的には移植成績の向上が得られた。この方法は大動物による再現性の確認は必要なものの、臨床に応用することで移植成績の向上はもとより、効率の高い移植により、ドナー不足の解消にも繋がる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Li S, Sakai T, Suzuki Y, Goto T, Tanaka T, Yoshikawa T, Kakinoki K, Tanioka Y, Matsumoto I, Fujino Y, Kuroda Y. Improved quantity and in vivo function of islets isolated by reduced-pressure controlled injection of collagenase in a rat model. Cell Transplant. 16: 539-545, 2007, 査読あり
- 2) Goto T, Tanioka Y, Sakai T, Terai S, Kamoda Y, Li S, Tanaka T, Tsujimura T, Matsumoto I, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained

viability of isolated islets. Transplantation 83(6): 754-758, 2007, 査読あり

- 3) Sakai T, Li S, Tanioka Y, Goto T, Tanaka T, Matsumoto I, Tsujimura T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Intraperitoneal injection of oxygenated perfluorochemical improves the outcome of intraportal islet transplantation in a rat model. Transplant Proc. 33: 3289-3292, 2006, 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 谷岡康喜、酒井哲也、黒田嘉和. 多段階二層法による膵島移植の確立. 第 43 回日本移植学会、2007. 11. 22-24、仙台
- 2) 酒井哲也、李世日、谷岡康喜、松本逸平、後藤直大、寺井祥雄、加茂田泰久、辻村敏明、藤野泰宏、黒田嘉和. Marginal dose 膵島移植における移植後酸素化 Perfluorochemical 腹腔内投与の有効性. 第 62 回日本消化器外科学会、2007. 7. 18-7. 20、東京
- 3) Sakai T, Li S, Tanioka Y, Matsumoto I, Terai S, Kamoda Y, Goto T, Tsujimura T, Fujino Y, Kuroda Y. The histological analysis of the engraftment of intraportally-transplanted islet improved by intraperitoneal injection of oxygenated perfluorochemical. American Transplant Congress 2007. 5. 5.-5. 9., San Francisco USA
- 4) 後藤直大、鈴木康之、金城勝、酒井哲也、谷岡康喜、寺井祥雄、加茂田泰久、外山博近、辻村敏明、松本逸平、藤野泰宏、黒田嘉和. 二層法を利用した移植前膵島機能評価法. 第 107 回日本外科学会、2007. 4. 11-13、大阪
- 5) 李世日、酒井哲也、谷岡康喜、松本逸平、寺井祥雄、加茂田泰久、後藤直大、辻村敏明、藤野泰宏、黒田嘉和. 酸素化 Perfluorochemical (PFC) 腹腔内投与における経門脈的移植膵島の生着改善効果における組織学的検討. 第 34 回膵・膵島移植研究会、2007. 3. 30-4. 1、大阪
- 6) 後藤直大、谷岡康喜、酒井哲也、寺井祥雄、加茂田泰久、李世日、辻村敏明、松本逸平、藤野泰宏、鈴木康之、黒田嘉和. 二層法を応用した膵消化法の有用性. 第 34 回膵・膵島移植研究、2007. 3. 30-4. 1、大阪
- 7) 酒井哲也、李世日、松本逸平、谷岡康喜、加茂田泰久、後藤直大、辻村敏明、藤野泰宏、鈴木康之、黒田嘉和. 移植膵島に対する酸素化 Perfluorochemical (PFC) 腹腔内投与による生着改善効果. 第 41 回日本

- 移植学会、2006.9.7-9.9、千葉
- 8) Goto T, Tanioka Y, Kamoda Y, Li S, Tanaka T, Tsujimura T, Matsumoto I, Sakai T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Increase of tissue ATP level during digestion by the two-layer method results in high islet yield and good viability. World Transplant Congress 2006.7.22-7.27., Boston USA
 - 9) Sakai T, Li S, Tanioka Y, Goto T, Tanaka T, Yoshikawa T, Kakinoki K, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Improved quantity and in vivo function of islets isolated by reduced-pressure controlled injection of collagenase in a rat model. World Transplant Congress 2006.7.22-7.27., Boston USA
 - 10) Sakai T, Li S, Tanioka Y, Goto T, Tanaka T, Matsumoto I, Tsujimura T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Intraperitoneal injection of oxygenated Perfluorochemical improves the outcome of intraportal islet transplantation in a rat model. World Transplant Congress 2006.7.22-7.27., Boston USA

[図書] (計 1 件)

- 1) 酒井哲也、黒田嘉和(分担執筆)、総編集：杉本恒明、矢崎義雄、内科学 第9版(朝倉出版)、3章 3) 膵・膵島移植 196-198:2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 哲也 (SAKAI TETSUYA)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：80372647

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

黒田 嘉和 (KURODA YOSHIKAZU)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：70178143
松本 逸平 (MATSUMOTO IPPEI)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：30379408
辻村 敏明 (TSUJIMURA TOSHIAKI)
神戸大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30403249