

平成22年5月28日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390333
 研究課題名（和文） ナノテクノロジーを利用した組織障害を最小化する臨床用膵島分離技術の開発
 研究課題名（英文） Development of islet isolation technique to minimize tissue injury by applying nanotechnology
 研究代表者
 興津 輝（OKITSU TERU）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：10378672

研究成果の概要（和文）：

膵島移植医療の成績を決定する膵島分離工程のうち膵島純化と膵臓消化の工程の技術改良を微細工学分野の知見を適応することで実現することを目指した。膵島純化工程では、流体力学的解析によりせん断が分離膵島の破壊に関与することを明らかとし、粘度の低い溶液を使用することにより分離膵島量を向上させることに成功した。また、膵臓消化工程では、ナノバブルによる溶液の酸素化を目的として、消化中の膵臓の酸素消費量の測定を行った。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to develop islet isolation procedure to improve the quality and quantity of isolated islets by applying nanotechnology especially to islet purification and pancreas dissociation steps. On the islet purification step, we clarified by fluid dynamic analysis the mechanical force, shear, contributes to islet destruction and succeed to improve islet yield by using purification solution with lower viscosity than the standard solution. On the pancreas dissociation step, we succeeded to measure O₂ consumption of pancreas during this step.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：移植外科学、膵島移植、膵島分離、ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は重症インスリン依存状態糖尿病に対する血糖調節担当組織（膵島）の移植再生療法である。膵島移植成績は生着する膵島量に依存するため、良質の膵島を数多く移植することが移植後の十分な耐糖能改善のためには必要となる。すなわち、移植膵島を膵臓より取り出してくる膵島分離技術はこの膵島移植の成否を直接左右する。本邦における臨床膵島移植は、2004年に開始されたが、それを可能とした要因のひとつに、条件の悪い心停止ドナー膵から臨床使用に耐えうる膵島の分離技術の開発がある。現行の方法はさらなる改良を行うことができ、その改良によってより良い分離膵島の獲得が可能となり、本邦における膵島移植成績の改善を期待することができる。

2. 研究の目的

膵島分離における、膵島純化工程と膵臓消化工程での改良を目指す。

1) 膵島純化工程では、膵外分泌腺組織と膵島組織の比重の違いを利用して消化膵組織より膵島組織のみを抽出する。臨床での膵島純化は標準的に COBE2991 細胞分離装置内に Ficoll 溶液による比重濃度勾配の形成によって行われる。当該工程における膵島破壊への力学的関与を流体力学的解析を行うことによって明らかとし、その知見を基に膵島純化方法の改良を行う。

2) 膵臓消化工程では、膵管から逆行性に膵臓内にコラゲナーゼ溶液を注入した膵臓を体温付近の温度に上昇させることによってコラゲナーゼを活性化させ、膵組織を分解し、内分泌細胞塊である膵島を膵外分泌組織より解離させる。膵臓消化工程では、膵組織は温阻血の状況にあると考えられ酸素の供給不足から組織障害に陥っていると予想される。当該工程において、ナノバブルを用いて酸素を供給することは組織保護に有用であると予想されるため、消化中の膵組織の消費酸素量を把握する。

3. 研究の方法

1) ①計測流体力学 (computational fluid dynamics) を用いて数値計算から純化操作中のせん断力を算出した。

②粘度計による膵島破壊実験での、せん断力の大きさ・加重時間と膵島破壊の程度との関係から、臨床膵島純化前後のブタ膵島の直径比 (純化後/純化前) に関する膵島破壊モデルを作成した。

①と②から導いた純化前後での膵島の直径比の理論値と実際にブタ膵島を Ficoll と COBE2991 によって純化した際の純化前後での実測値による膵島の直径比を比較することによって膵島純化工程中の膵島破壊に物理的要因 (せん断) が関与しているかどうかを判断した。

2) ヒト膵臓と大きさが近似しているブタ膵臓を用いた。ブタ膵臓を含む溶液の温度を4℃から37℃まで変更可能で、溶液の酸素濃度を測定可能な密閉式の容器を開発し、この装置を用いて溶液の温度を4℃から37℃にした場合の膵臓が消費する溶存酸素量を計測した。この実験を溶液中の酸素濃度の初期値を変更して行った。酸素濃度の初期値はナノバブル化した酸素を供給することにより行った。

4. 研究成果

1) 計測流体力学による数値計算により算出されたせん断力を、粘度計の膵臓破壊実験により導いた膵臓破壊モデルに代入することにより求めた純化前後の膵臓の直径比が、実際の膵臓純化前後の膵臓直径比に高い相関を示したことから膵臓純化の際の分離膵臓の破壊にせん断が関与していることが明らかとなった。また、せん断力は比重濃度勾配を形成する溶液の粘度と正の相関を有することが判明した。すなわち、粘度を調節することによって膵臓破壊の要因となるせん断力を制御できることが分かった。

標準溶液である Ficoll 溶液よりも低粘度の M-Kyoto/ Iodixanol 溶液を用いて膵臓分離を行うことによって分離膵臓へ負荷される力学的破壊を減少させることができ、分離膵臓量を向上させることができた。

2) 消化中の膵臓は、温度依存性に溶液中の含有酸素を消費することが判明した。また、含有酸素の初期値が高いほど消費酸素量も向上することが判明した。

このことにより、膵臓消化工程において酸素を供給することは意義のあることであるこ

とが明確となった。また、酸素供給のためのナノバブル技術の適応のためのデータを取得することができた。

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 2 件)

① 興津 輝、豊田健太郎、小林直哉、小寺秀俊、上本伸二: 糖尿病に対する再生医療学的アプローチ. 炎症と免疫, 16(1), 62-97, 2008 (査読無)

② Shintaku H., Okitsu T., Kawano S., Matsumoto S., Suzuki T., Kanno I., Kotera H. Effects of fluid dynamic stress on fracturing of cell-aggregated tissue during purification for islets of Langerhans transplantation. J. Phys. D: Appl. Phys. 41(11); (115507-1)-(115507-9), 2008 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

① 興津 輝, 他: 京都大学における心停止ドナーからの腎移植後新鮮膵臓移植. 第 7 回日本組織移植学会 2008 年 8 月 23 日 札幌

② Okitsu T., et.al. Three Year Follow-Up after Clinical Islet Transplantation from Donation-After-Cardiac-Death (DCD) Donors to Type 1 Diabetic Patients. 2008 American Transplant Congress, May 31-June 4, Toronto, CANADA

③ 興津 輝, 他: 膵臓分離技術改良による膵臓移植の可能性の拡大. シンポジウム「今後の展望 膵臓移植 vs 膵臓移植」. 第 35 回膵・膵臓移植研究会 2008 年 3 月 7-8 日 京都

④ 興津 輝, 他: Kyoto液を用いた膵島分離法の開発と臨床成績. シンポジウム「糖尿病根治における技術革新」. 第 43 回日本移植学会総会 2007 年 11 月 22-23 日 仙台

⑤ 興津 輝, 他: 免疫抑制維持療法にステロイドを併用する腎移植後膵島移植 2 例の報告. 第 43 回日本移植学会総会 2007 年 11 月 22-23 日 仙台

⑥ 興津 輝: 京都大学における心停止ドナー膵島移植. シンポジウム「膵島移植の現況」. 第 34 回日本臓器保存生物医学会 2007 年 11 月 16-17 日 札幌

⑦ Okitsu T, et al. THE ESTABLISHMENT OF ISLET ISOLATION METHOD WITH NON-HEART BEATING DONORS FOR CLINICAL ISLET TRANSPLANTATION. CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, 2007 Sep 15-20, Minnesota, USA

⑧ Okitsu T, et.al. ISLET ALLOGRAFTS FROM NON-HEART BEATING DONORS IN TYPE 1 DIABETIC PATIENTS AT KYOTO, JAPAN: TWO YEAR FOLLOW UP. CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference, 2007 Sep 15-20, Minnesota, USA

⑨ 興津 輝, 他: 京都大学における心停止ドナーからの膵島分離および新鮮膵島移植. 第 6 回日本組織移植学会 2007 年 8 月 4 日 大阪

⑩ 興津 輝, 他: 心停止ドナーからの膵島分離技術の開発とそれによる新鮮膵島移植の実施. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会

2007 年 5 月 24-26 日 仙台

⑪ 興津 輝, 他: 心停止ドナー新鮮膵島移植のための膵島分離法の開発と臨床応用. 第 107 回日本外科学会定期学術集会 2007 年 4 月 11-13 日 大阪

⑫ 興津 輝, 他: Kyoto膵島分離法を用いた心停止ドナー膵島分離および移植成績. シンポジウム「糖尿病根治へのブレイクスルー」. 第 34 回膵・膵島移植研究会 2007 年 3 月 30-31 日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

興津 輝 (OKITSU TERU)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 10378672

(2) 研究分担者

小寺 秀俊 (KOTERA HIDETOSHI)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号: 20252471

川野 聡恭 (KAWANO SATOYUKI)
大阪大学・基礎工学研究科・教授
研究者番号: 00250837

新宅 博文 (SHINTAKU HIROHUMI)
大阪大学・基礎工学研究科・助教
研究者番号: 80448050