

平成23年5月17日現在

機関番号：11301
研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21791239
研究課題名 (和文) 膵組織保存と酵素分離過程への酸素化システム導入による
分離膵島の質の向上
研究課題名 (英文) Improvement of pancreatic tissue preservation during organ
storage through the introduction of an Islet of Langerhans oxygenation system
研究代表者
稲垣 明子 (INAGAKI AKIKO)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教
研究者番号：20360224

研究成果の概要 (和文)：

膵島移植において安定して質の高い膵島を得る方法を確立することは移植成績の向上に直結する重要な課題のひとつである。そこで、本研究では保存過程の虚血状態や、膵島分離工程での溶存酸素濃度の低下による膵島損傷を解決するために、膵臓摘出直後から膵島分離終了までの間の酸素供給システムを確立することを目的とした。膵組織の保存の酸素化については人工ヘモグロビンを膵管から導入したが、分離膵島の収量や質の向上は確認出来なかった。いっぽう、膵島分離工程における中空糸加圧モジュールを用いて閉鎖分離回路内を酸素化することで、膵島の収量、energy status が向上し、アポトーシスを回避出来ることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

Establishing methods to prepare high quality Islets of Langerhans for transplantation is an important subject directly linked to improving transplantation success. This research aims to prevent hypoxic damage to the Islets of Langerhans. We accomplished this by introducing a method to ensure consistent oxygenation from pancreatic organ storage to the completion of pancreatic enzyme treatment. The method involved injecting artificial hemoglobin into the pancreatic ducts to oxygenate the pancreatic tissue during storage. The introduction of oxygenation to the pancreatic ducts via artificial oxygen carriers, as well as the use of hollow fiber pressurization modules within the donor islets clearly improved the output, energy status, and viability of islets and suppressed apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：膵島移植

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は全身麻酔も手術も必要としな

い一型糖尿病の低侵襲な根治療法として注目を集めている。しかし、一人の患者の治癒に2-3人のドナーの膵臓を要することもあり、膵島移植ははまだ糖尿病治療のスタンダードには至っていない。その大きな要因として考えられるのが、膵臓の保存から膵島分離過程における低酸素状態である。膵島移植の成績は移植膵島の質と量が重要な要素の一つである。しかし、現行法では保存過程の虚血状態や、37℃の閉鎖回路内で行われる膵島分離工程での溶存酸素濃度の低下が原因で多くの膵島が損傷し、生体での機能を維持した十分な量の膵島を得る困難である。

2. 研究の目的

本研究では膵組織の保存・分離工程を通じた酸素供給システムを確立することで、機能を保持した膵島を失うことなく得ることを目的とした。具体的には、膵組織保存では膵管からの人工ヘモグロビンの注入により膵組織内部まで酸素を供給し、分離工程では中空糸モジュールによる分離回路内への酸素の無菌的に供給を行った。

3. 研究の方法

<保存段階における膵組織の酸素化>

(1) 膵組織保存の酸素化に対する人工ヘモグロビンの効果の検証

保存段階における膵組織の酸素化を効率よく行うために酸素化人工ヘモグロビンが有効であるかどうかを検証した。実験モデルは人工ヘモグロビンを保存前に膵管内に注入し、膵管保護および内部からの組織酸素化を意図した **Pre-ductal injection** 実験、および保存液として使用し外部からの浸透での組織全体の酸素化を期待した保存実験の2つの系とし、生理食塩水をコントロールとした。4℃で10時間保存した後の膵臓からコラゲナーゼを用いて膵島を分離し、収量、形態、機能 (ADP/ATP、ATP/DNA、呼吸 S.I.) を評価した。

(2) 加圧式中空糸モジュールによる分離回路内の酸素化による分離膵島への影響

中空糸モジュールによる分離回路内の酸素化により分離膵島の収量や質が向上するかどうかを検証した。実験モデルは心停止ドナーを使用せざるを得ない我が国の現状を考慮し温阻血を40分被ったブタ膵臓を用いた。19時間冷保存したブタ膵臓をヒト臨床膵島分離と同様の分離回路を用いて膵島分離

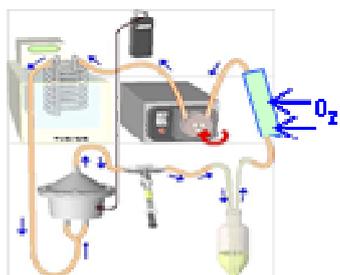


図 1. 加圧式中空糸モジュールを導入したブタ膵島分離回路

を行い、従来の方法と閉鎖回路内を加圧式中空糸モジュールで酸素化導入することで、膵島の収量や機能が向上するかを検証した。分離膵島の機能は、培養中残存率、viability、ADP/ATP テスト、呼吸活性、エネルギー保持率、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ヌードマウスへの分離膵島の腎皮膜下への移植実験により評価した。

4. 研究成果

(1) 膵組織保存の酸素化に対する人工ヘモグロビンの効果の検証

現在膵組織保存で広く使われている Perfluorochemica (PFC) のように分離膵島にまで影響が残らず、実験中の酵素による消化の過程での明らかな消化阻害は見られなかった。しかし **Pre-ductal injection** 実験では、形態に差はなかったが、他のすべての項目で生理食塩水群を下回り、保存実験では、形態を含めすべての項目で生食群が上回っていた。以上の結果から、今回使用した人工ヘモグロビンの導入では、分離膵島の収量や質の向上といった酸素化による効果は確認できなかった。

(2) 加圧式中空糸モジュールによる分離回路内の酸素化による分離膵島への影響

現行の通常膵島分離回路に比べ、加圧式中空糸モジュールを導入した膵島分離回路を使用することで分離膵島の収量が増加した (図 2)。また分離膵島の呼吸活性 (図 3)、energy status が向上し、それに伴いアポトーシスに陥る膵島の割合が有意に減少する事が判明した。また、膵島の収量や機能も温阻血障害を伴う膵島分離においては顕著に改善する事が判明した。

回路の煩雑さや容存酸素濃度の継続的モニタリング手法などに課題を残すものの、本研究のストラテジーは心停止ドナーの使用を余儀なくされている我が国の膵島移植にとって有用である事が本研究により明らかとなった。

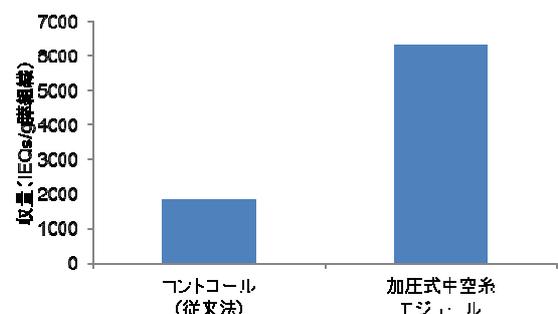


図 2. 膵島の収量

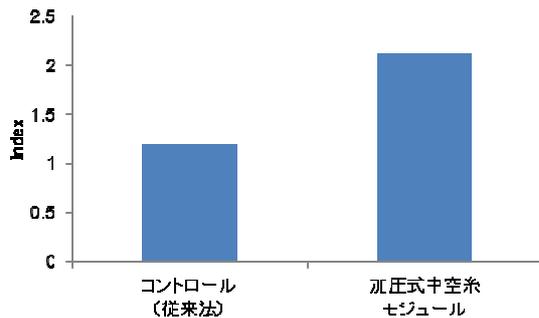


図 3. 分離膵島の呼吸

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) K Tokodai, M Goto, A Inagaki, W Nakanishi, N Ogawa, K Satoh, N Kawagishi, S Sekiguchi, B Nosson, N Okada, H Okada, S Satomi. Attenuation of the cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation. 査読有 Transplantation, 90 (12) : 1358-65, 2010

(2) M Goto, T Imura, A Inagaki, N Ogawa, H Yamaya, K. Fujimori, Y Kurokawa and S Satomi. The Impact of Ischemic Stress on the Quality of Isolated Pancreatic Islets. 査読有 Transplantation Proc, 42(6): 2040-2043, 2010.

(3) K Tokodai, M Goto, A Inagaki, W Nakanishi, N Okada, H Okada, S Satomi. C5a-Inhibitory Peptide Combined with Gabexate Mesilate Prevents the Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in a Rat Model of Islet Transplantation. 査読有 Transplantation Proc, 42(6):2040-43, 2010.

[学会発表] (計 12 件)

(1) 後藤昌史、坂田直昭、山谷英之、元井冬彦、山口 賢、猪村武弘、稲垣明子、伊藤経夫、林 洋毅、石垣 泰、片桐秀樹、長谷川 豊、澤田正二郎、廣田衛久、下瀬川 徹、関口 悟、藤盛啓成、江川新一、海野倫明、里見 進. 膵動静脈奇形に起因する急性腹膜炎に対しグラフト

保護プロトコルの導入により良好な結果を得た自家膵島移植症例の報告、第 38 回日本膵・膵島移植研究会、2011 年 3 月 4 日、京都

(2) 阿佐美健吾、後藤昌史、猪村武弘、稲垣明子、関口 悟、藤盛啓成、淀井淳司、里見 進. Thioredoxin-1 による移植後早期膵島障害の抑制 2011 年 3 月 4 日、第 38 回日本膵・膵島移植研究会、2011 年 3 月 4 日、京都

(3) F Zhaoqiang, M Goto, T Imura, A Inagaki, H Yamaya, Y Kurokawa, S Sekiguchi, K Fujimori, J Yodoi, S Satomi. A Study on the Influence and Control of Ischemic Stress during Pancreas Preservation on Isolated Islets, 第 38 回日本膵・膵島移植研究会、2011 年 3 月 4 日、京都

(4) 稲垣明子、後藤昌史、大橋一夫、里見 進. 膵島を含有するシート作製方法の検討、第 10 回日本再生医療学会総会、2011 年 3 月 1 日、東京

(5) 後藤昌史、山形洋平、渡邊君子、村山和隆、猪村武弘、稲垣明子、山谷英之、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、里見 進. 現状における臨床グレードの膵島分離用酵素剤の検証、第46回日本移植学会総会、2010年10月22日、奈良

(6) 後藤昌史、山形洋平、渡邊君子、村山和隆、猪村武弘、稲垣明子、山谷英之、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、里見 進. 安全で高性能な新規膵島分離用酵素剤の開発、第46回日本移植学会総会、2010年10月22日、奈良

(7) K Tokodai, M Goto, A Inagaki, W Nakanishi, N Okada, H Okada, S Satomi. Interruption of a cross-talk between the complement and coagulation cascades improves early outcomes after intraportal islet transplantation, XXIII International Congress of The Transplantation Society, 16 August 2010, Vancouver, Canada.

(8) 稲垣明子、後藤昌史、大橋一夫、小林英司、里見 進. 細胞シートによる膵島の新規移植方法の検討、第 9 回日本再生医療学会総会、2010 年 3 月 18 日、広島。

(9) 後藤昌史、山形洋平、渡邊君子、村山和隆、猪村武弘、稲垣明子、山谷英之、小川則彦、藤盛啓成、黒川良望、里見 進

. 臨床再開へ向けた膵島分離用酵素剤の比較検討, 第37回膵・膵島移植研究会, 2010年3月12日, 宇都宮.

- (10) Masafumi Goto, Takehiro Imura, Akiko Inagaki, Norihiko Ogawa, Hideyuki Yamaya, Keisei Fujimori, Yoshimochi Kurokawa, Susumu Satomi. The impact of ischemic stress on the quality of isolated pancreatic islets, International Pancreas and islet transplant association. October 13 2009, Venice, Italy.
- (11) Kazuaki Tokodai, Masafumi Goto, Akiko Inagaki, Wataru Nakanishi, Noriko Okada, Hidechika Okada, Susumu Satomi. A strong candidate approach to prevent the instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical islet transplantation, International Pancreas and islet transplant association. October 13 2009, Venice, Italy.
- (12) 後藤昌史、猪村武弘、稲垣明子、小川則彦、山谷英之、Feng Qiang、藤盛啓成、黒川良望、里見 進. 臓器の阻血障害が膵島分離へ及ぼす影響に関する検討、第45回日本移植学会総会、2009年9月17日、東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 明子 (INAGAKI AKIKO)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教
研究者番号：20360224

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：