

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591887

研究課題名(和文) 膵ランゲルハンス島(膵島)移植における持続冷却灌流装置による膵臓保存に関する研究

研究課題名(英文) Effectiveness for islet isolation by hypothermic machine perfusion preservation of pancreas

研究代表者

坏 尚武 (Akutsu, Naotake)

独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：00344979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、条件の悪いマージナルドナーから提供された膵臓を従来の冷却浸漬保存でなく持続冷却灌流装置(LifePort)にて保存し、分離膵島の収量を上げ、膵島機能を保持させ、1型糖尿病に対する膵島移植に寄与させるためのものである。ビーグル犬を用いた実験により、分離膵島の収量・機能とも、従来法より優れていることが明らかとなった。さらなる保存条件の改善や工夫が必要ではあるが、近い将来の臨床応用が期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hypothermic machine perfusion preservation (HMP) by LifePort™ is thought to be a better preservation technique for pancreas harvested from marginal donors such as non-heart-beating donor. In this experiment, we indicated that yield and function of islet isolated from 24hours-preserved canine pancreas with LifePort™ removed after 30 minutes warm ischemic time. It suggests that HMP for pancreas would be a useful method for islet transplantation from marginal donors in Japan.

研究分野：移植

キーワード：膵島移植 臓器保存 持続冷却灌流保存

1. 研究開始当初の背景

(1) I型糖尿病に対する膵島移植が国内で始まったものの、依然として大きな問題はドナー不足である。2010年の改正脳死移植法の施行により、脳死下膵島移植が増えることを期待したが、脳死下の臓器提供は思いの外増加せず、また、膵臓移植に使用されるため、脳死下膵島移植数の増加はあまり期待できない状況である。そこで、膵臓移植においては、心停止下ドナーのような、条件の悪いいわゆるマージナルドナーよりの膵臓摘出・膵島分離が増加する可能性が高くなると予想される。そこで、膵臓摘出から膵島分離までの間、いかに膵臓に障害を与えることなく膵臓の機能を維持できるかが、より良い膵島を分離するためには重要であると考えられる。

(2) LifePort™ (LP)は Organ Recovery Systems社により開発された臓器搬送用の持続冷却灌流装置であり、現在欧米において障害を伴った腎臓の搬送に臨床応用され、その有効性が確認されている。本装置はマージナルドナーの多いわが国の脳死移植や心停止ドナーからの臓器移植、特に虚血再灌流障害を受けやすい膵臓の保存に有用であり、膵島移植の安全性や成績の向上に有効であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ビーグル犬を使用し、障害膵モデルより膵臓を摘出し、LPにより持続冷却灌流保存することにより、膵臓の障害が最小限に抑えられ、従来法である UW 液による浸漬保存に比べて分離膵島の収量や機能が改善でき、臨床膵島移植に応用し、成績向上に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)動物：10頭の1歳のメス・ビーグル犬(体重7.5kg~12.5kg、平均9.8kg)を使用した。

(2)膵臓摘出手術：ビーグル犬を全身麻酔下に全膵臓摘出を行った。30分の温阻血時間において摘出を行った。膵臓摘出後、シリコン製のカニューレチューブの一端を腸間膜静脈より門脈に留置し、反対側端を後頸部皮下より体外に誘導しておく。

(3)膵臓保存：摘出された膵臓は以下の2群に分け保存を行った。(図1)

①持続灌流保存群(LifePort群)(n=5)：膵十二指腸動脈にカニューレーションを行い、LifePortに装着し、24時間持続冷却灌流保存を行った。灌流条件は図1のとおりである。

②浸漬保存群(UW群)(n=5)：4℃のUW液(on ice)で24時間浸漬保存を行った。

(4)保存膵臓の病理学的検討：24時間保存した膵臓の一部をHE染色、免疫染色(インスリン抗体、グルカゴン抗体)、TANEL染色で病理学的検討を行った。

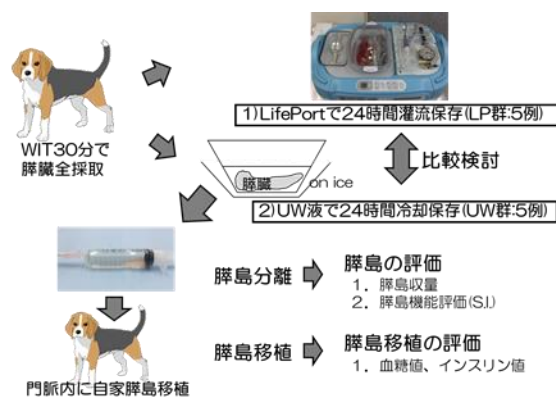


図1 実験方法

(5)膵島分離：

① 膨化：24時間保存された膵臓は膵管カニューレより、4℃ Liberase T-Flex (Roche) (1.5mg/ml)溶液を200ml注入し、10分間、膨化させる。

② 温消化：クーバーにて膨化膵臓を細切し、Ricordi Chamberにセットし、35℃で約10分間、温消化する。

③ 回収：十分に消化され、膵島が溶液中に出現した時点で、冷消化をいくつかの消化膵組織を250mLチューブに回収を始める。

④ 純化：収集した消化膵組織を、Optiprepを使用したcontinuous gradient溶液に混合し、比重遠心法を用いてCOBE2991細胞分離装置で膵島精製を行った。

(6)膵島収量評価・機能評価：分離・純化膵島の収量：純化前後の膵島懸濁液をDithizone染色液にて染色し、膵島数の算定を行った。光学顕微鏡にて膵島の形態を観察し形態評価を行った。

Static incubation：膵島を低グルコース培養液(RPMI-1640 with 3.3mM D-glucose)にて60分間 pre-incubationした後、高グルコース培養液(RPMI-1640 with 16.7mM D-glucose)内で60分間 incubation、その後再度低グルコース培養液にて60分間 incubationした。各相のインスリン濃度を測定した。

(7)膵島自家移植：純化した膵島を全膵摘出したビーグル犬に門脈カニューレーションチューブより注入し、肝臓内に自家移植を行う。

(8)移植膵島評価：膵島移植を行ったビーグル犬より採血を行い、血糖とインスリンの推移を検討する(第1、3、5、7病日)。

(9)推計学的分析：データは平均値±標準偏差値で表示し、Unpaired Student's t testを用いた分析した。P<0.05にて統計学的有意とした。

表1 LifePort の灌流条件

灌流液:	KPS-1 (Organ Recovery Systems Co.) pH:7.4, Osm:300mOsm/L, Na:80mEq, K:25mEq
灌流圧:	10mmHg (systolic perfusion pressure)
灌流温度:	4°C
灌流時間:	24 時間

4. 研究成果

(1) 膵島分離に伴った結果:

Liberase で十分に膨化し分離に使用された膵重量は LifePort 群で大きい傾向にあった。また、温消化時間・回収時間も LifePort 群で、UW 群に比べて有意差はなかったが長い傾向にあった(表 2)。

表2 分離膵臓重量と分離時間

	LifePort 群	UW 群
分離膵臓重量	29.3±10.1g	26.5±5.2g
温消化時間	11±2.8 分	8±3.5 分
回収時間	59.5±7.6 分	58±10.1 分

(2) 保存膵臓の病理学的検討:

UW 群、LifePort 群とも、HE 染色、インスリン染色において対照群に比べて、24 時間保存した膵臓の組織学的差は認められなかった。

(図 2)

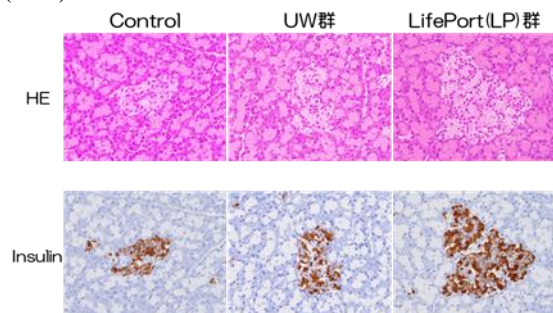


図2 保存膵臓の病理組織

HE: HE 染色。Insulin: 抗インスリン抗体による免疫染色

(3) 分離膵島収量:

分離膵島の COBE2991 で純化前後の収量を比較した(図 3)。純化前は LifePort 群で 65,942±45,228 IEQ であるのに対して、UW 群で 21,650±12,355 IEQ と有意差はないが LP 群で収量が多い傾向にあった。分離に使用した g 膵あたりの収量に関しても LP 群で 2,790±1,875 IEQ に対して UW 群で 817±469 IEQ と多い傾向にあった。さらに、純化後の収量に関しては、LP 群で 20,154±7,229 IEQ に対して UW 群で 5,083±4,821 IEQ と有意に LP 群で収量が多いことがわかった。さらに g 膵臓あたりの収量に関しては、LP 群で 862±264 IEQ に対して UW 群で 182±175 IEQ とこれも有意に LP 群で多いことがわかった。

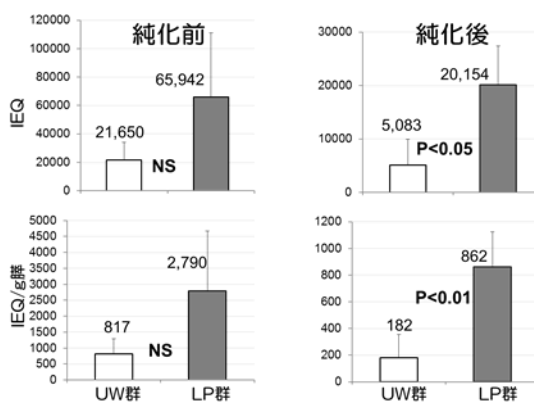


図3 分離膵島の収量

(4) 分離膵島形態学的評価:

2 群間における分離膵島の形態を比較検討した(図 4)。膵島の大きさに関しては、LifePort 群で UW 群に比べて大きい傾向があり、また、形態上も LifePort 群でより膵島の形態が保たれていた。

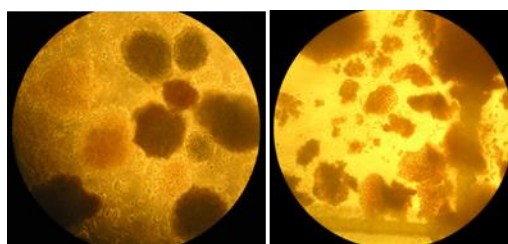


図4 分離膵島の形態学的評価

(5) 分離膵島機能評価:

2 群間における分離膵島の機能評価を Static Incubation にて行った(図 5)。LP 群において Stimulation Index (SI) は 3.12±3.33 と UW 群の 1.28±1.22 に比べて有意差はないが、インスリン分泌能がすぐれていた。LifePort による冷却灌流保存により膵島機能はより維持できると考えられた。

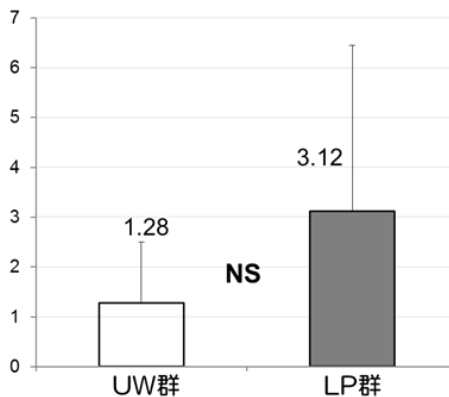


図5 分離膵島の分泌能評価

Static Incubation Study により Stimulation Index を算出し、分離膵島のインスリン分泌能を評価した。

(6) 分離膵島自家移植後機能評価:

分離膵島を全膵摘出ビーグル犬(1 型糖尿病

モデル)に戻して(自家移植をして)血清中の血糖とインスリン値の推移を調べ、膵島移植の効果を検討した(図6)。移植後早期のインスリン分泌はLP群でUW群に比べてやや良好であり、血糖値の低下も認められたが、7日目で2群間での血糖値、インスリン値の差はなかった。さらに長期的な観察が必要と考えられた。

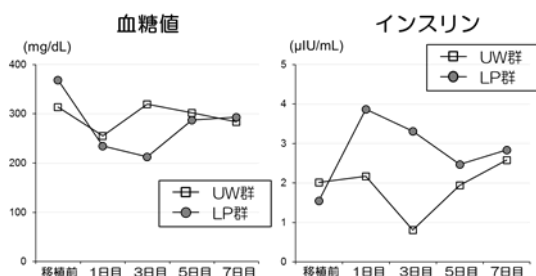


図6 膵島自家移植後の血糖値・インスリン値の推移

(7) 考察

臓器保存による臓器障害の主な原因は虚血再灌流障害であると考えられている。現在膵島移植の臨床において、摘出された膵臓は、主にUW液による冷却浸漬保存や2層法を用いて保存・搬送される。しかし、これらの保存法による長時間保存は、虚血における蛋白分解酵素の放出と活性酸素の産生による血管内皮細胞の障害により間質の浮腫を来し、虚血状態の遷延と好中球浸潤の主因となり、組織の破壊による臓器の不可逆性の変化・壊死を起こすと考えられ、分離後の膵島内分泌機能保持の点からも必ずしも優れているとは考えられない。これを改善するためには、保存・搬送中の膵臓の viability の低下を可及的に抑制し、虚血再灌流障害を回避することが不可欠である。

持続灌流保存法は、装置の巨大さや煩雑さなどから、臓器保存法としては一般的ではなかった。しかし、近年の工学技術やコンピューター技術の急速な発展により、持続冷却灌流装置の小型化・携帯化が進み、臨床応用が可能となってきた。もともと持続冷却灌流保存法が臓器保存に関しては優れていると考えられており、その有効性に期待されていた。最近開発された LifePort™ (LP) は、十分に小型化され搬送が可能で、欧米では既に障害を伴った腎臓の保存・搬送に臨床応用され、その有効性が確認されている。本装置はマージナルドナーの多いわが国の脳死移植や心停止ドナーからの臓器移植、特に虚血再灌流障害を受けやすい膵臓の保存に有用と考えられ、本研究で使用することを発想した。

実際に、30分温阻血をかけビーグル犬より摘出した膵臓を24時間保存すると、組織学的には、従来の浸漬保存法と比べて差はなかったが、分離のために使用できた膵臓重量は、若干LP群の方が大きく、LPの方が優れている可能性が示唆された。今回の実験では行っ

ていないが、さらに長時間保存で比較すれば、組織学的にも差が出る可能性があると考えられた。

分離膵島の収量に関しては、明らかにLPで保存した群が、従来の浸漬保存群(UW群)に比べて、全体の収量・膵臓単位重量あたりの収量においても優れていることが判明した。また、分離膵島の機能に関しては、Static Incubation Studyによるインスリン分泌能の評価をおこなったが、LP群で、従来法であるUW群に比べて、優れていることがわかった。以上のように、分離膵島の収量、機能とも持続冷却灌流保存法の優位性が判明した。

1型糖尿病モデルのビーグル犬に今回の分離膵臓を自家移植した実験では、短期的には分離膵臓からのインスリン分泌が確認され、血糖の低下も認められたものの、移植後1週間程度経つと、従来法であるUW群と差は認められなかった。分離膵臓収量は、従来法に比べて優れてはいるが、純化によりかなり膵臓の損失が認められ、1型糖尿病のビーグル犬において、血糖を正常に維持するには十分な膵臓数でなかったことが一因であると考えられる。何らかの保存条件の改善により純化前の分離膵臓の収量をあげることで、純化により損失する膵臓数を減らす方策が必要と考えられた。

以上、本研究で用いたLPをマージナルな脳死下ドナー膵臓移植や心停止下ドナー膵臓移植のための膵臓保存に臨床応用するためには、保存条件の検討やさらなる工夫と検証が必要と思われるが、臨床応用可能な技術であると考えられた。

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11件)

(1) Otsuki K, Yoshikawa T, Kenmochi T, Maruyama M, Akutsu N, Iwashita C, Ito T, Asano T: Evaluation of segmental pancreatic function using 11C-methionine positron emission tomography for safe living donor operation of pancreas transplantation. *Transplant Proc* 43(9): 3237-3276, 2011

(2) 坪 尚武, 剣持 敬, 齊藤友永, 西郷健一, 丸山通広, 岩下 力, 大月和宣, 伊藤泰平, 浅野武秀: 持続灌流装置 (LifePort) による障害腎・膵の保存・搬送に関する実験的研究. *Organ Biology* 18(1): 81-86, 2011

(3) 剣持 敬: わが国における臓器移植のための臓器摘出の現状と実績 (2011). *移植* 46(6):501-505, 2011

(4) Maruyama M, Kenmochi T, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Otsuki K, Ito T. Results of islet isolation and their relationship to the clinical outcome of kidney transplantation in cases where both grafts are harvested from the same

non-heart-beating donor. Cell Transplantation 21: 559-563, 2012

(5)大月和宣、剣持 敬、丸山通広、坪 尚武、岩下 力、伊藤泰平、青山博道、松本育子、浅野武秀、松原久裕、吉川京燦 生体膵移植ドナー評価からみた ¹¹C-MethioninePET による膵内分泌機能評価の可能性 胆と膵 33 (7) 621-4, 2012

(6)Maruyama M, Kenmochi T, Saigo K, Akutsu N, Iwashita C, Otsuki K, Ito T. Results of islet isolation and their relationship to the clinical outcome of kidney transplantation in cases where both grafts are harvested from the same non-heart-beating donor. Cell Transplantation 21: 559-563, 2012

(7)大月和宣、剣持 敬、丸山通広、坪 尚武、岩下 力、伊藤泰平、青山博道、松本育子、浅野武秀、松原久裕、吉川京燦： 生体膵移植ドナー評価からみた ¹¹C-MethioninePET による膵内分泌機能評価の可能性 胆と膵 33 (7) 621-4, 2012

(8)Maruyama M, Kenmochi T, Akutsu N, Otsuki K, Ito T, Matsumoto I, Asano T: A review of autologous islet transplantation. Cell Medicine 5: 59-62, 2013

(9)丸山通広、剣持 敬、伊藤泰平、坪 尚武、浅野武秀： 膵・膵島移植における免疫抑制療法 Organ Biology 20: 218-221, 2013

(10)Otsuki K, Akutsu N, Maruyama M, Saigo K, Hasegawa M, Aoyama H, Matsumoto I, Asano T, Ito T, Kenmochi T.: Three-dimensional computed tomographic volumetric changes in pancreas before and after living donor surgery for pancreas transplantation: effect of volume on glucose metabolism. Transplant Proc. 46:963-6, 2014

(11)Otsuki K, Yoshikawa K, Kenmoshi T, Akutsu N, Maruyama M, Asano T, Saigo K, Hasegawa M, Aoyama H, Matsumoto I, Ito T, Uchino Y.: Evaluation of Insulin Independence Using (11)C-Methionine Positron Emission Tomography After Living-donor and Brain-dead Donor Pancreas Transplantation. Transplant Proc. 46: 1913-6, 2014

〔学会発表〕(計 14 件)

①Akutsu N, Maruyama M, Iwashita C, Otsuki K, Ito T, Saigo K, Asano T, Kenmochi T.: Laparoscopic fenestration: Minimally invasive treatment for symptomatic lymphocele after kidney transplantation. SAGES 2011. 2011/3/30-4/2. San Antonio, USA

②Akutsu N, Maruyama M, Iwashita C, Otsuki K, Ito T, Saigo K, Asano T, Kenmochi T.: Minimally invasive living donor operation for simultaneous pancreas and kidney transplantation: HALS-nephrectomy and distal pancreatectomy. 13th World Congress of IPITA. 2011/6/1-4. Prague, Czech Republic

③Akutsu N, Kenmochi T, Saitoh T, Maruyama

M, Iwashita C, Otsuki K, Ito T, Matsumoto I, Asano T: Hypothermic machine perfusion preservation is efficient for non-heart-beating donor kidney transplantation in Japan. 24th International Congress of The Transplantation Society, 2012/7/15-19, Berlin

④坪尚武、西郷健一、長谷川正行、大月和宣、青山博道、松本育子、浅野武秀、剣持敬、丸山通広、伊藤泰平：「腎不全治療における膵・膵島移植の役割」生体膵臓移植、膵・腎同時移植、第 46 回日本臨床腎移植学会、2013/1/30-2/1、浦安

⑤坪尚武、西郷健一、長谷川正行、大月和宣、青山博道、松本育子、浅野武秀、剣持敬、丸山通広、伊藤泰平：当院における膵臓移植 30 例の検討、第 40 回日本膵・膵島移植研究会、2013/3/1-2、高松

⑥Akutsu N, Maruyama M, Saigo K, Hasegawa M, Otsuki K, Aoyama H, Matsumoto I, Moguchi H, Asano T, Ito T, Kenmochi T.: Summary of 8 cases HALS-nephrectomy and distal pancreatectomy: minimally invasive living donor operation for simultaneous pancreas and kidney transplantation. 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013/9/2-6. Kyoto, Japan

⑦Akutsu N, Maruyama M, Saigo K, Hasegawa M, Otsuki K, Aoyama H, Matsumoto I, Moguchi H, Asano T, Ito T, Kenmochi T.: Summary of 33 cases pancreas transplantation in a single institution. 13th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2013/9/2-6. Kyoto, Japan

⑧Akutsu N, Maruyama M, Saigo K, Hasegawa M, Otsuki K, Aoyama H, Matsumoto I, Moguchi H, Asano T, Ito T, Kenmochi T.: HALS-nephrectomy and distal pancreatectomy in living donor operation for simultaneous pancreas and kidney transplantation: summary of 8 cases in a single institution. IPITA2013 14th World Congress. 2013/9/24-27. Monterey, USA

⑨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、浅野武秀、剣持敬、伊藤泰平：本邦の生体膵臓移植の成績と課題 肝膵移植外科関連委員会企画シンポジウム「膵・膵島移植の現状と展望」第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2013/6/12 宇都宮

⑩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

⑪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、剣持敬、伊藤泰平：安全な生体膵臓移植ドナー手術 腎移植連絡協議会「生体ドナーの安全性を考える」第 47 回日本臨床腎移植学会・学術集会。2014/3/12-14 奈良

⑫坪尚武、丸山通広、西郷健一、長谷川正行、大月和宣、青山博道、松本育子、野口洋

文、浅野武秀：生体膵腎同時移植ドナー手術における HALS+小開腹下腎採取・膵体尾部切除術 第27回日本小切開・鏡視外科学会総会 2014.8.21-22 函館

⑬ 塚 尚武、丸山通弘、松本育子、西郷健一、長谷川正行、大月和宣、青山博道、石田健倫、齊藤友永、野口洋文、浅野武秀：膵島移植に向けた採取膵持続灌流保存の検討 第41回臓器保存生物医学学会総会 2014.11.28-29 大阪

⑭ 塚 尚武、丸山通弘、大月和宣、松本育子、石田健倫、齊藤友永、西郷健一、長谷川正行、青山博道、野口洋文、浅野武秀：心停止下膵島移植に向けた LifePort による持続冷却灌流保存の検討 第42回日本膵・膵島移植研究会 2015.3.6-7 新宿

〔図書〕(計2件)

(1) 剣持 敬：膵・膵島移植 Pancreas and Islet Transplantation. 病気と薬パーフェクト BOOK2012. 横田千津子、池田宇一、大越教夫(編)、南山堂、pp1557-1559, 2012

(2) 丸山通広：膵島。「マージナルドナー」丸善出版株式会社、53-60, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://chiba-easthp.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚 尚武 (AKUTSU NAOTAKE)

国立病院機構千葉東病院・臨床研究部・部長

研究者番号：00344979

(2) 研究分担者

大月 和宣 (OTSUKI KAZUNORI)

国立病院機構千葉東病院・臨床研究部・室長

研究者番号：50399755

丸山 通広 (MARUYAMA MICHIIHIRO)

国立病院機構千葉東病院・診療部長

研究者番号：40399754

剣持 敬 (KENMOCHI TAKASHI)

藤田保健衛生大学・医学部臓器移植科・教授

研究者番号：50215133

伊藤 泰平 (ITO TAIHEI)

藤田保健衛生大学・医学部臓器移植科・准教授

研究者番号：60509701

(3) 連携研究者

西郷 健一 (SAIGO KENICHI)

国立病院機構千葉東病院・診療部長

研究者番号：60323424

長谷川 正行 (HASEGAWA MASAYUKI)

国立病院機構千葉東病院・外科医長

研究者番号：80648030

青山 博道 (AOYAMA HIROMICHI)

国立病院機構千葉東病院・外科医師

研究者番号：80598243

松本 育子 (MATSUMOTO IKUKO)

国立病院機構千葉東病院・外科医師

研究者番号：70649128

野口 洋文 (NOGUCHI HIROFUMI)

琉球大学・医学部再生医学講座・教授

研究者番号：50378733