

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659582

研究課題名(和文) 膵島特異的微小気泡超音波造影剤の開発

研究課題名(英文) Development of contrast agent of ultrasonography for visualizing pancreatic islets

研究代表者

坂田 直昭 (Sakata, Naoaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50431565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：本研究では膵島を特異的に造影できる超音波造影剤を開発し、超音波検査で移植膵島を描出することに挑戦した。造影剤はポリエチレングリコール鎖をもつリポソームにオクトレオチドを結合させ、パーフルオロカーボンガスを封入する事で作成した。糖尿病マウスに膵島移植を行い、この造影剤による造影超音波検査を行ったところ、移植膵島のエコー輝度は上昇し、その造影効果はマウスの膵内分泌機能と関連した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a novel contrast agent of ultrasonography aiming to visualizing transplanted pancreatic islets. The contrast agent was made by attachment of octreotide on liposome via polyethylene glycol chain, and was used after infusion of C3F8 gas. Enhanced ultrasonography using this agent for diabetic transplanted syngeneic islets showed increase of echogenicity in transplanted islets. The enhancement was significantly correlated with endocrine function of the mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：超音波検査 ナノバブル 膵島移植

### 1. 研究開始当初の背景

膵島移植は膵ランゲルハンス島をドナー膵臓より分離抽出し、重症の糖尿病患者に移植することで血糖の良好なコントロールを図る、インスリン依存性の糖尿病の根治につながる細胞移植治療であるが、移植された膵島は拒絶反応や非特異的炎症反応など、様々な要因で多くが移植早期に脱落する。よって、移植膵島の生着を直接評価できる非侵襲的な検査法を確立することは、膵島の状態変化に応じた治療方針を立案する上で非常に意義がある。近年、magnetic resonance imaging (MRI)(Jirak D et al. (2004)) や Positron Emission Tomography(PET)(Toso C et al. (2005))などの画像検査により移植膵島を可視化する試みが、動物モデルで進められている。超音波検査は、臓器の形や、病変を即時に描出することができる無害かつ簡便な画像検査で、無害かつベッドサイドで簡便にでき、病状に応じて繰り返し行うことが可能であることから、われわれは移植膵島を超音波機器で可視化する試みを進めてきた。腎被膜下移植のモデルでは移植膵島塊を確認することができたが (Sakata N et al. (2011))、ひとつひとつの膵島は 400 $\mu$ m 以下と小さく、肝内移植のモデルにおいて膵島を可視化することは困難であった。近年、転移性肝腫瘍を超音波検査で描出する際に微小気泡 (マイクロバブル) 性の造影剤が臨床で使用されるようになった。われわれは、マイクロバブル造影剤で移植膵島を造影することができるか肝内移植の動物モデルで検討したが、既存の造影剤では移植膵島を確認することはできなかった。以上より、膵島を特異的に造影する超音波用造影剤を開発することを想起した。

### 2. 研究の目的

膵島を特異的に造影できる超音波造影剤を開発し、超音波検査で移植膵島を描出できるかを検討する。

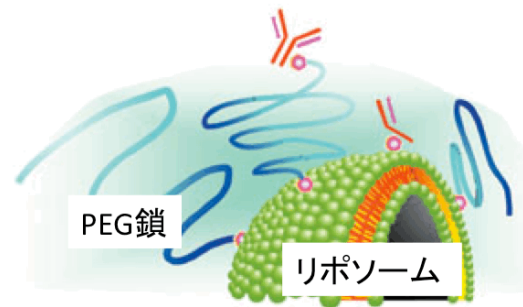
### 3. 研究の方法

課題 1. 膵島を特異的に造影するナノバブル造影剤の開発

<膵島特異的微小気泡性造影剤の作成>

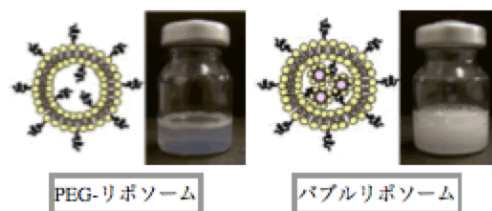
リン脂質よりポリエチレングリコール(PEG)鎖を持つリポソームを作成し、PEG鎖にオクトレオチド(ソマトスタチンアナログ)を結合させて造影剤を作成する。

### 蛋白(本研究ではオクトレオチド)



実験には超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンを封入して使用する。

### 微小気泡性造影剤の作成法



<超音波検査>

無処置の正常血糖マウスに高周波超音波検査 (VEV0770: Visualsonics) を行い、膵臓の位置を確認する。本造影剤をマウスの尾静脈より投与し、投与後の膵臓を観察する。

課題 2. 小動物を用いた膵島移植実験と微小気泡性造影剤による移植膵島の描出

<膵島移植>

ドナーマウスの膵臓より膵島を分離抽出する。糖尿病マウスの腎被膜下に 500 個の膵島を同種同系移植する。対照として皮下と腎被膜の切開を置いた sham 手術群 (糖尿病群) を置いた。

<超音波検査>

膵島移植後 56 日に造影超音波検査を行った。まず、造影剤投与前の膵臓表面の移植膵島を観察し、そのエコー輝度を測定した。次いで超音波造影剤をマウスの尾静脈より注入し、移植膵島の超音波下での観察を 15 分間続けた。最終的にエコー輝度の変化を計測した。

<血糖/血清インスリン測定、糖負荷試験>

移植後 56 日に尾静脈より血液サンプルを採取し、血糖測定 (アセンシアブリーズ、バイエル) と ELISA による血清インスリンの測定を行った (シバヤギ)。同時期にグルコース溶液を腹腔内に投与し、投与後 120 分までの血糖変化を追跡し、その変化面積 (血糖値 X 時間) を計測した。

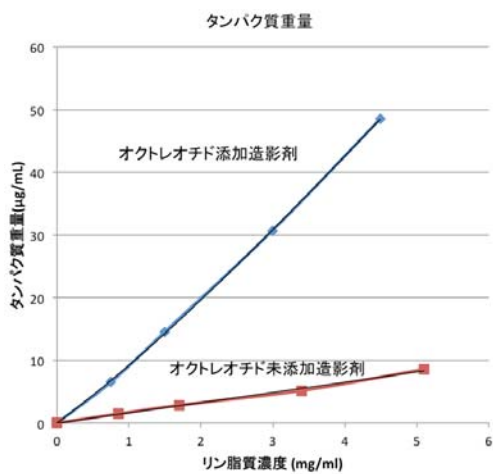
<超音波検査所見と内分泌機能の関連評価>

移植膵島のエコー輝度の変化面積と血糖値、血清インスリン値、糖負荷試験の血糖変化面積との相関を回帰分析で評価した。

4. 研究成果

<試作した超音波造影剤の特性>

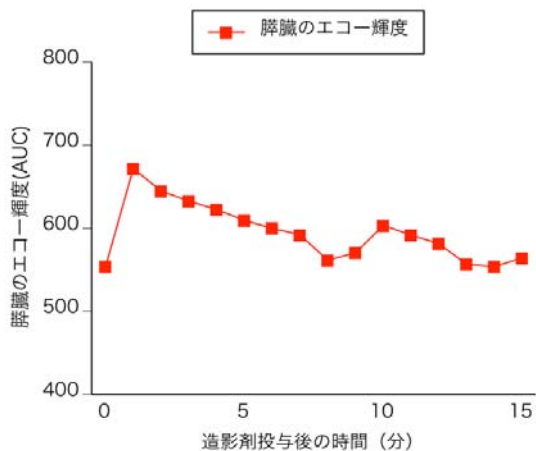
試作した超音波造影剤は径が500nm程度のナノバブル造影剤であった。本造影剤はオクトレオチドを加えなかったものに比べタンパク重量は増加しており、オクトレオチドの結合が証明できた。安全性に関しては本造影剤を投与したマウスで死亡したものはなく、また、耐糖能の悪化も見られなかった。



オクトレオチドの添加に伴い造影剤のタンパク質重量が増加した。

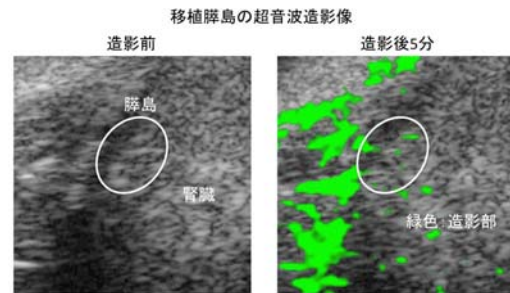
<正常血糖マウスに対する超音波実験>

正常血糖マウスにオクトレオチド造影剤による超音波検査を行った。膵臓のエコー輝度は投与後1分で急峻に上昇し、徐々に低下し投与後15分ではほぼ元のレベルに低下した。



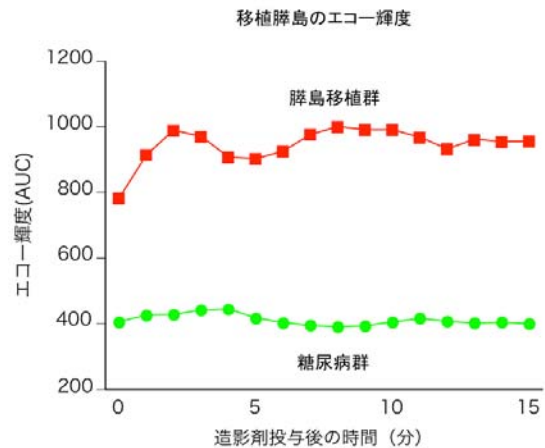
<移植膵島に対する超音波検査>

腎被膜下の移植膵島は超音波検査で高エコー域(白色)として認められ、造影後膵島内部に造影剤の流入が認められた。



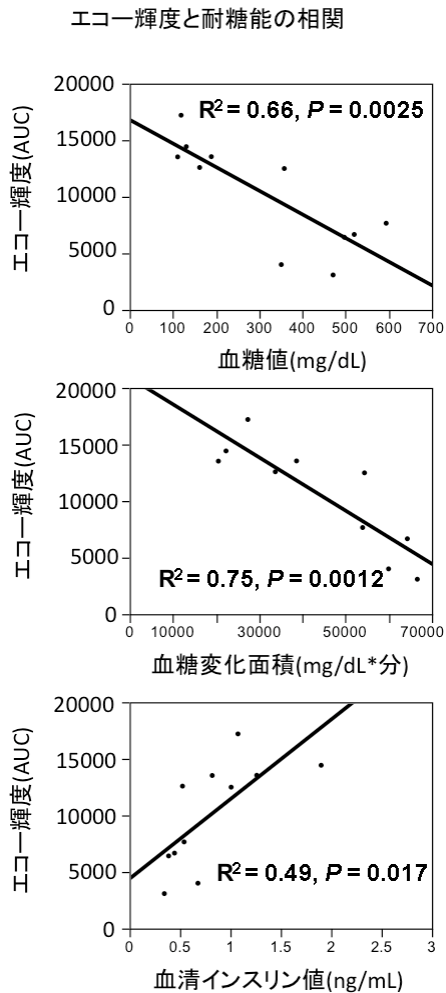
移植膵島は造影剤投与後内部が造影される。

また、膵島移植群の膵島のエコー輝度は糖尿病群に比べ著明に上昇していた。



＜超音波検査所見と内分泌機能の相関評価＞

移植膵島のエコー輝度は血糖値、血清インスリン値、糖負荷試験での血糖変化面積とそれぞれ強い相関関係が認められた。



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 7 件)

1. Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30(1):1-10. 査読あり
2. Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi

S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M. Clinical experiences in the treatment of pancreatic arteriovenous malformation by total pancreatectomy with islet autotransplantation. *Transplantation*. 2013;96(5):e38-40. 査読あり

3. Hata T, Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hayashi H, Motoi F, Goto M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Postoperative cholestasis and cholangitis after total pancreatectomy with biliary reconstruction impair the function of autotransplanted islets. *Transplantation*. 2013;96(5):e40-3. 査読あり
4. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Aoki T, Mizuma M, Motoi F, Katayose Y, Kodama T, Egawa S, Unno M. Imaging of transplanted islets by positron emission tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasonography. *Islets*. 2013;5(5):179-187. 査読あり
5. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Sumi S, Goto M, Unno M. Development of polyvinyl alcohol bioartificial pancreas with rat islets and mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2013;45(5):1875-80. 査読あり
6. Sakata N, Goto M, Gumpei Y, Mizuma M, Motoi F, Satomi S, Unno M. Intraoperative ultrasound examination is useful for monitoring transplanted islets: a case report. *Islets*. 2012;4(5):339-42. 査読あり
7. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Egawa S, Unno M. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:256707. doi: 10.1155/2012/256707. 査読あり

[学会発表] (計 32 件)

1. 坂田直昭、後藤昌史、元井冬彦、片寄友、江川新一、下瀬川徹、里見進、海野倫明. Clinical Experiences of Islet Autotransplantation in Tohoku University. 第45回日本膵臓学会大会 2014年7月11日-7月12日 北九州
2. 坂田直昭、吉松軍平、土屋朗之、畠達夫、深瀬正彦、元井冬彦、内藤剛、片寄友、江川新一、海野倫明. 筋肉内膵島移植の臨床応用に向けて. 第69回日本

- 消化器外科学会総会 2014年7月16日-7月18日 郡山
3. 畠 達夫、坂田直昭、吉松軍平、土屋朗之、深瀬正彦、青木 豪、川口 桂、藪内伸一、深瀬耕二、水間正道、中川 圭、林 洋毅、岡田恭穂、森川孝則、吉田 寛、元井冬彦、内藤 剛、片寄 友、江川新一、海野倫明. 膵島移植における神経成長因子(Nerve Growth Factor)の役割と機能解析. 第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月3日-4月5日 京都
  4. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Fukase M, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Co-transplantation with bone marrow derived MSCs in the intramuscular islet transplantation. International Hepato-Pancreato-Biliary Association 2014 11<sup>th</sup> World Congress 2014年3月23日-3月27日 Seoul, Korea
  5. 坂田直昭、後藤昌史、吉松軍平、畠 達夫、林 洋毅、中川 圭、山谷英之、澤田正二郎、廣田衛久、元井冬彦、江川新一、片桐秀樹、下瀬川徹、里見 進、海野倫明. 自家膵島移植とその検討. 第41回膵・膵島移植研究会 2014年3月7日-3月8日 名古屋
  6. 吉松軍平、坂田直昭、土屋朗之、畠 達夫、深瀬正彦、青木 豪、森田浩美、竹村太郎、箕輪貴司、元井冬彦、片寄 友、江川新一、海野倫明. マウスモデルにおける筋肉内膵島移植に対する骨髄由来間葉系幹細胞共移植の効果. 第41回膵・膵島移植研究会 2014年3月7日-3月8日 名古屋
  7. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Aoki T, Mizuma M, Motoi F, Katayose Y, Kodama T, Unno M. Imaging of transplanted islets by ultrasonography. The 14 World Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA2013) 2013年9月24日-9月27日 Monterey, USA
  8. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Hata T, Fukase M, Motoi F, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Intramuscular co-transplantation of islets and bone marrow derived mesenchymal stem cells in rodent model. The 14<sup>th</sup> World Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA2013) 2013年9月24日-9月27日 Monterey, USA
  9. Tsuchiya H, Sakata N, Yoshimatsu G, Unno M. Transplant efficacy: understanding the effectiveness of islet transplantation. The 14<sup>th</sup> World Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA2013) 2013年9月24日-9月27日 Monterey, USA
  10. Hata T, Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hayashi H, Motoi F, Goto M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Postoperative cholangitis and liver dysfunction after total pancreatectomy with biliary reconstruction impair the function of autotransplanted islets. The 14<sup>th</sup> World Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA2013) 2013年9月24日-9月27日 Monterey, USA
  11. 坂田直昭、吉松軍平、土屋朗之、畠 達夫、青木 豪、水間正道、中川 圭、林 洋毅、元井冬彦、内藤 剛、片寄 友、海野倫明. 膵島移植の成績向上を目指して: 当研究グループの取り組み. 第49回日本移植学会総会 2013年9月5日-9月7日 京都
  12. Tsuchiya H, Sakata N, Yoshimatsu G, Unno M. Efficacy of intramuscular islet transplantation. The 13<sup>th</sup> Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST2013) 2013年9月2日-9月6日 Kyoto.
  13. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Hata T, Unno M. Bone Marrow and Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Islet Transplantation. ASahct2013 2013年8月27日-8月28日 Sendai
  14. 坂田直昭、吉松軍平、土屋朗之、青木 豪、川口 桂、藪内伸一、深瀬耕二、大塚英郎、乙供 茂、水間正道、岡田恭穂、中川 圭、林 洋毅、森川孝則、吉田 寛、元井冬彦、内藤 剛、片寄 友、江川新一、海野倫明. 門脈内膵島移植の問題と新たな移植部位の確立に向けて. 第44回日本膵臓総会 2013年7月25日-7月26日 仙台
  15. 坂田直昭、吉松軍平、土屋朗之、畠 達夫、深瀬正彦、青木 豪、石田晶玄、元井冬彦、片寄 友、海野倫明. 間葉系幹細胞破水等移植成績を向上させる光となるか. 第68回日本消化器外科学会総会 2013年7月17日-7月19日 宮崎
  16. 坂田直昭、後藤昌史、小玉哲也、元井冬彦、水間正道、吉松軍平、青木 豪、深瀬耕二、大塚英郎、乙供 茂、岡田恭穂、中川 圭、林 洋毅、森川孝則、吉田 寛、内藤 剛、三浦 康、片寄 友、里見 進、海野倫明. 移植膵島の超音波画像. 第113

- 回日本外科学会定期学術集会 2013年4月11日-4月13日 福岡
17. 坂田直昭、江川新一、力山敏樹、吉松軍平、元井冬彦、三浦 康、片寄 友、海野倫明. ドナー膵の機能評価を予見するためのCT所見に関する検討. 第40回日本膵・膵島移植研究会 2013年3月1日-3月2日 高松
  18. 坂田直昭、吉松軍平、海野倫明. 本邦における自家膵島移植の適応に関する検討. 第40回日本膵・膵島移植研究会 2013年3月1日-3月2日 高松
  19. 坂田直昭、元井冬彦、吉田 寛、内藤 剛、三浦 康、廣田衛久、正宗 淳、片寄 友、江川新一、下瀬川徹、海野倫明. 当科における慢性膵炎に対する取り組み. 第194回日本消化器病学会東北支部例会 2013年2月9日 仙台
  20. Sakata N, Yoshimatsu G, Aoki T, Ishida M, Fukase K, Ottomo S, Mizuma M, Okada T, Nakagawa K, Hayashi H, Morikawa T, Yoshida H, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Miura K, Egawa S, Unno M. Surgical treatment for chronic pancreatitis, discussion of drainage and total pancreatectomy with islet autotransplantation. 2012 Joint American Pancreatic Association (APA) / International Association of Pancreatology (IAP) Annual Meeting 2012年10月31日-11月3日 Miami, USA
  21. Sakata N, Goto M, Yoshimatsu G, Mizuma M, Motoi F, Satomi S, Unno M. Intraoperative ultrasound examination is useful for monitoring transplanted islets. XXIV International Congress of The Transplantation Society 2012年7月15日-7月19日 Berlin, Germany

[その他]

ホームページ等

Read & Researchship

<http://researchmap.jp/read0154889/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂田 直昭 (SAKATA, Naoaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50431565

### (2) 研究分担者

小玉 哲也 (KODAMA, Tetsuya)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：40271986