

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 12 日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461933

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の臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Continuous hypothermic machine perfusion preservation of pancreas for efficient islet transplantation

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部)・その他部局等・部長

研究者番号：00344979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：1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。その解決手段のひとつは、マージナルドナーから提供された膵臓の有効な利用である。そこで、マージナルドナーからの採取膵を携帯型持続冷却灌流装置(LifePort)にて保存することにより、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を普及させることが期待できる。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(UW法や二層法による単純冷却浸漬保存)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)：Although clinical research of islet transplantation for type 1 diabetes has starts in Japan, severe donor shortage hampers the progress. A possible solution is use of marginal donors such as donors after cardiac death (DCD). A continuous hypothermic perfusion machine, LifePort™(LP), used for preservation and transportation of marginal kidney for organ transplantation. The effectiveness has been approved especially in the preservation. We applied LP to preservation of pancreas that is sensitive to ischemia reperfusion injury and found that the machine would be efficacious on islet isolation..

In experimental DCD pancreas canine model, continuous hypothermic machine perfusion resulted in higher recovery and function of islets than simple cold storage and two layer method. Further improvement will achieve clinical application of the method on DCD pancreas preservation.

研究分野：移植外科

キーワード：膵島移植 持続冷却灌流保存 臓器保存

1. 研究開始当初の背景

(1) 2000年にエドモントンプロトコルが報告されて、その高い生着性や安全性などから、I型糖尿病に対する治療法として膵ランゲルハンス島(膵島)移植が注目され、国内でも臨床応用が始まった。しかし、わが国において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、脳死下膵島移植の増加が期待されたが、脳死下移植のための臓器提供は思いのほか増えなかった。脳死下で提供された条件の良い膵臓は、まず、膵臓移植に使用されるため、条件の良い脳死下膵島移植数の増加は期待できない状況にある。そこで、膵島移植の症例数を増やすためには、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からの膵臓摘出・膵島分離が必要となる。そこで、膵臓摘出から膵島分離までの間、すなわち摘出膵臓の保存の間に、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) 現在、一般的に臓器保存においては、その簡便性や安全性から、UW液による単純冷却浸漬保存法が用いられている。また、膵臓保存においては、UW液と酸素化されたPerfluorochemical (PFC)による二層法による冷却浸漬保存法を使用する施設もあり、膵島移植のための膵臓保存においても、同様の状況である。マージナルドナーが多い膵島移植においては、膵臓のより有効な保存法の開発が必要であると考えられる。

(3) 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によって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液や二層法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：15頭の1歳のメス・ビーグル犬(体重8.0kg~12.0kg、平均9.7kg)を使用した。

(2)膵臓摘出手術：ビーグル犬を全身麻酔下に30分の温阻血時間をおいたのち全膵臓摘出を行った。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いた。

(3)膵臓保存：摘出された膵臓は以下の3群に分け保存を行った。(図1)

- ①持続灌流保存群(LifePort(LP)群)(n=5)：膵十二指腸動脈にカニューレを行い、LifePortに装着し、24時間持続冷却灌流保存を行った。灌流条件は表1のとおりである。
- ②二層法群(二層法群)(n=5)：4℃のUW液と4℃の酸素化PFCで24時間浸漬保存を行った(on ice)。
- ③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)で病理学的検討を行った。

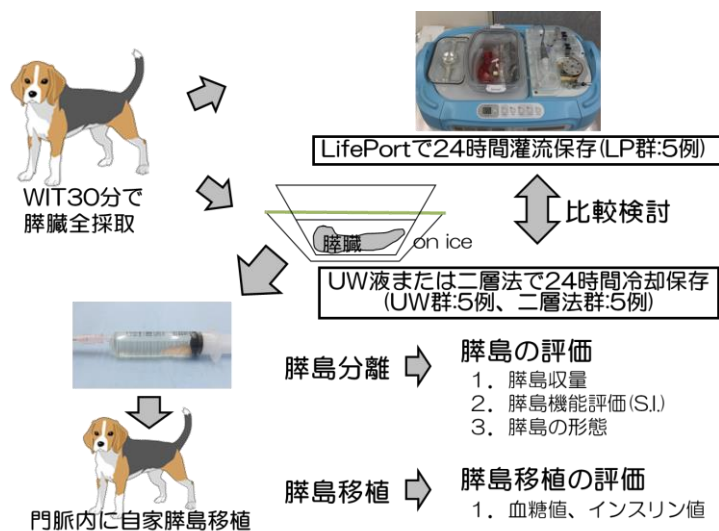


図1 実験方法

(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、膨化させた。
- ② 温消化：クーパーにて膨化膵臓を細切し、Ricordi Chamberにセットし、35℃で約10分間、温消化した。
- 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チューブに回収した。
- 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：

- ①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。
- ②Static 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ションチューブより注入し、肝臓内に自家移植を行った。

(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した(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)膵島分離における結果：

Liberase で十分に膨化し分離に使用された膵重量は LP 群で大きい傾向にあった。また、温消化時間・回収時間も3群間で有意差はなかったが、LP 群でそれぞれ長い傾向にあった(表2)。

表2 分離膵臓重量と分離時間

	UW 群	二層法群	LifePort 群
分離膵臓重量	26.5±5.2g	24.4±3.8g	29.3±10.1g
温消化時間	8±3.5 分	8.2±2.9 分	11±2.8 分
回収時間	58±10.1 分	50.8±7.5 分	59.5±7.6 分

(2)保存膵臓の病理学的検討：

3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)

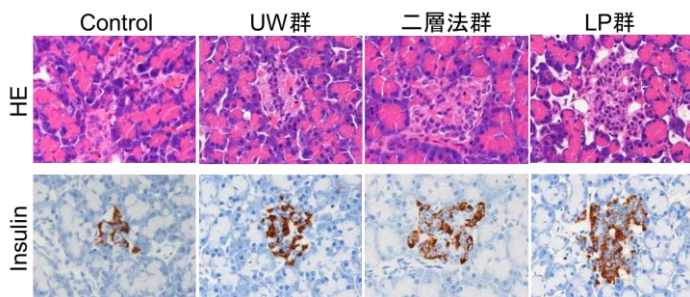


図2 保存膵臓の病理組織

HE: HE 染色。Insulin: 抗インスリン抗体による免疫染色

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 LP 群で 55,944±38,590 IEQ であるのに対して、UW 群で 19,303±11,917 IEQ、二層法群で 20,043±14,719 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 1,771±1,276 IEQ に対して UW 群で 710±471 IEQ、二層法群で 835±564 IEQ と LP 群が多い傾向にあった。さらに、純化後の収量に関しては、LP 群で 20,594±14,463 IEQ に対して UW 群で 4,770±4,232 IEQ、二層法群で 7,313±4,714 IEQ と UW 群と LP 群の間に有意差があった。さらに g 膵臓あたりの収量に関しては、LP 群で 669±424 IEQ に対して UW 群で 165±156 IEQ、二層法群で 334±239 IEQ とこれも LP 群と UW 群に有意差があった。

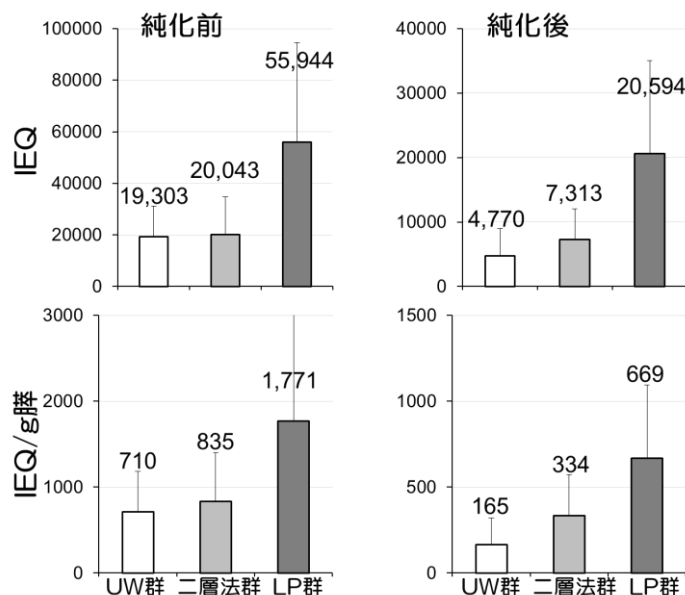


図3 分離膵島の収量

(4)分離膵島形態学的評価：

3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、LP 群で UW 群や二層法群に比べて大きい傾向があり、また、形態上も LP 群で膵島の形態がより保たれていた。

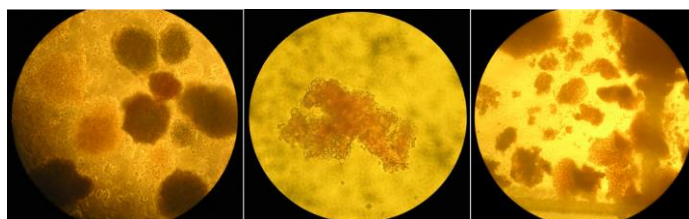


図4 分離膵島の形態学的評価

(5)分離膵島機能評価：

3 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 2.22 ± 0.53 と、UW 群の 1.48 ± 1.03 や二層法群の 1.97 ± 0.82 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。

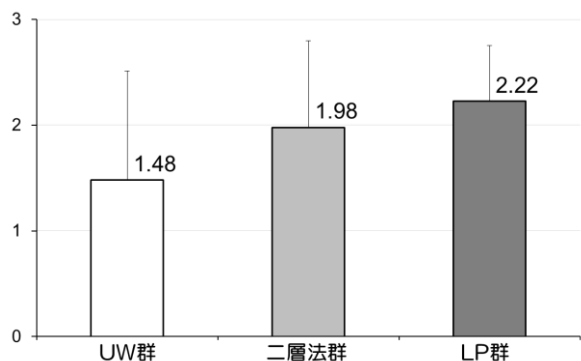


図 5 分離膵島の分泌能評価
Static Incubation Study により Stimulation Index を算出し、分離膵島のインスリン分泌能を評価した。

(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 群や二層法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 3 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。

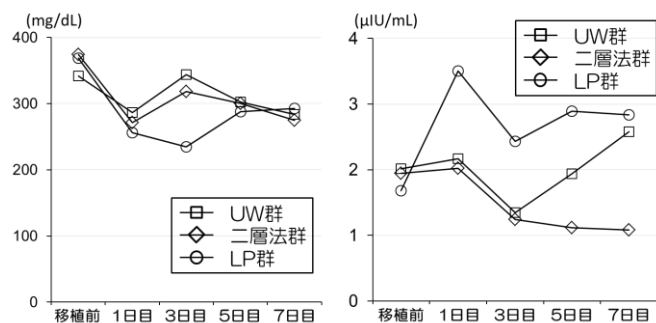


図 6 膵島自家移植後の血糖値・インスリン値の推移

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二層法を用いて保存・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とし、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、UW 法や二層法などの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。分離膵島の収量に関しては、明らかに LP で保存した群が、UW 群や二層法群などの従来の浸漬保存群に比べて、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により、LP 群で、UW 群や二層法群よりも、優れている傾向にあった。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島を自家移植した実験では、短期的には分離膵島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、UW 群や二層法群と差は認められなかった。心停止モデルにおいて、膵臓純化の過程でかなり膵島の損失が認められ、1 型糖尿病のビーグル犬の血糖値を正常にもどるには十分な膵臓数を得られなかったことが原因であると考えられる。保存条件の改善により膵島の損失を改善する方策が必要と考えられた。

以上、本研究で用いた LP による膵臓保存は、UW 液や二層法による従来法による保存に比べて膵島移植に対して有効であり、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 10 件)

- (1) 冨 尚武、丸山通広、大月和宣、石田健倫、齊藤友永、西郷健一、長谷川正行、青山博道、剣持 敬、野口洋文：心停止下臍島移植に向けた持続冷却灌流保存法による臍臓保存。Organ Biology24: 55-59, 2017
- (2) 丸山通広、冨 尚武、大月和宣、青山博道、西郷健一：自家臍島移植 Up-to-Date. 胆と臍38: 869-871, 2017
- (3) Otsuki K, Ito T, Maruyama M, Akutsu N, Saigo K, Hasegawa M, Aoyama H, Matsumoto I, Uchino Y.: Positron emission tomography and autoradiography of (18)F-fluorodeoxyglucose labeled islets with or without warm ischemic stress in portal transplanted rats. Transplant Proc. 48:229-233, 2016
- (4) 丸山通広、西郷健一、冨 尚武、大月和宣、長谷川正行、青山博道、松本育子、浅野武秀、橋詰 亮：高齢者ドナー・レシピエントの現状. 日本腎不全看護学会誌 17: 23-27, 2015
- (5) 大月和宣、剣持 敬、丸山通広、冨 尚武、西郷健一、長谷川正行、青山博道、松本育子、浅野武秀、伊藤泰平：当院の脳死臍臓移植における欧米と本法のマーシナルドナー基準の比較. 移植 50: 211-215, 2015
- (6) 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
- (7) Otsuki K, Yoshikawa K, Kenmochi 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
- (8) Aoyama H, Asano T, Kainuma O, Shinohara Y, Sugamoto Y, Matsubara H.: Effect of radiofrequency ablation on intrahepatic bile ducts and vessels. Journal of Japan Society of Computer Aided Surgery. 16: 367-76, 2015
- (9) Noguchi H, Saitoh I, Tsugata T, Kataoka H, Watanabe M, Noguchi Y.: Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection. Cell Death Differ. 22: 145-55, 2015
- (10) 冨 尚武：安全な生体臍臓移植ドナー手術「腎移植連絡協議会からの提言 生体ドナーの安全性を考える」. 11-21, 2014

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① Akutsu N, Ishida T, Maruyama M, Otsuki K, Saitoh T, Saigo K, Hasegawa M, Aoyama H, Kenmochi T, Noguchi H.: Hypothermic machine perfusion preservation of pancreas for islet transplantation in non-heart-beating canine donor

model. IPITA 2017. 2017/6/20-23. Oxford, UK

- ② Akutsu N, Maruyama M, Otsuki K, Saigo K, Hasegawa M, Aoyama H, Kenmochi T.: Hypothermic machine perfusion preservation of kidney from non-heart-beating donor in Japan. CAST 2017. 2017/11/27-30. Cebu, Philippines
- ③ 冨 尚武、丸山通広、大月和宣、石田健倫、西郷健一、長谷川正行、青山博道、剣持敬、野口洋文：臓器横断的シンポジウム 16「灌流臓器保存の現状と将来」心停止下腎移植における持続冷却灌流保存法の臨床応用、第 53 回日本移植学会総会、2017/9/7-9、旭川
- ④ 冨 尚武、丸山通広、大月和宣、石田健倫、西郷健一、青山博道、剣持敬、野口洋文：シンポジウム 6「臓器保存の up to date: 我々の進むべき道」持続冷却灌流保存法の腎保存への臨床応用、第 44 回日本臓器保存生物医学学会学術集会、2017/11/10-11、大阪
- ⑤ Akutsu N, Ishida T, Maruyama M, Otsuki K, Saitoh T, Saigo K, Hasegawa M, Aoyama H, Matsumoto I, Kenmochi T, Noguchi H.: Hypothermic machine perfusion preservation of non-heart-beating donor pancreas for islet transplantation. 26th international congress of the transplantation society. 2016/8/18-23. Hong Kong
- ⑥ 冨 尚武、丸山通広、大月和宣、石田健倫、齊藤友永、西郷健一、長谷川正行、青山博道、剣持 敬、野口洋文：持続冷却灌流保存法による臓器保存、第 43 回日本臓器保存生物医学学会学術集会、2016. 11. 26-27、八王子
- ⑦ 冨 尚武、丸山通広、大月和宣、西郷健一、長谷川正行、青山博道、関 直人、西村元伸：Deoxyspergualin (DSG) が有効であった腎移植後臍単独移植における急性拒絶反応の 1 例、第 44 回日本臍・臍島移植研究会、2017. 3. 10-11、京都
- ⑧ 冨 尚武、丸山通広、大月和宣、西郷健一、長谷川正行、青山博道、松本育子：当院における脳死臍臓移植の検討、第 24 回日本組織適合性学会大会、2015. 9. 10-12、水戸
- ⑨ 冨 尚武、丸山通広、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：シンポジウム(1)「細胞移植の新たな展開」心停止下臍島分離のための採取臍保存法の検討、第 42 回日本臓器保存生物医学学会学術集会、2015. 11. 13-14、盛岡
- ⑩ 冨 尚武、丸山通広、大月和宣、石田健倫、齊藤友永、西郷健一、長谷川正行、青山博道、松本育子、野口洋文：心停止下臍島移植のための持続冷却灌流保存法による採取臍保存の検討、第 43 回日本臍・臍島移植研究会、2016. 3. 4-5、広島
- ⑪ 冨 尚武、丸山通広、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：臍島移植に向けた採取臍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

⑫ 坏 尚武、丸山通広、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：心停止下臍島移植に向けた LifePort による持続冷却灌流保存の検討、第 42 回日本臍・臍島移植研究会、2015. 3. 6-7、新宿

〔図書〕（計 0 件）

〔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

坏 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・統括診療部長
研究者番号：40399754

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・外科医長
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

(3)連携研究者