



# Possibility of islet transplantation from a non-heart-beating donor pancreas resuscitated by the two-layer method

田中, 智浩

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3473

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003473>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 6 4 】

氏 名・（本 籍）	田中 智浩	（ 兵庫県 ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学 位 記 番 号	博い第1686号	
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当	
学位授与の 日 付	平成17年9月25日	

【 学位論文題目 】

Possibility of islet transplantation from a non-heart-beating donor pancreas resuscitated by the two-layer method  
(二層法を用いた心停止ドナーからの膵島移植の可能性)

審 査 委 員

主 査	教 授	藤澤	正人
	教 授	久野	高義
	教 授	尾原	秀史

### <背景と目的>

2000 年 6 月にカナダのアルバータ大学から、独自の免疫抑制プロトコルにより膵島移植成功率が画期的に向上したと報告され、それ以後膵島移植は 1 型糖尿病に対する治療法の一つとして確立されるに至った。しかし、現在日本において膵島移植は臓器移植の範疇には入らず、組織移植のカテゴリーに属しているため、脳死ドナーからの移植は原則として認められておらず、心停止ドナーからの移植に限定されている。また、欧米においても脳死ドナー不足は深刻であり、心停止ドナーからの膵島移植の可能性が模索されている。心停止ドナーは脳死ドナーと異なり心停止後に臓器の摘出を行うため、摘出臓器の温阻血障害が最大の問題であり、障害による膵島収量や機能の低下を最小限にすることが重要な課題である。

教室で開発された二層法は、高濃度酸素溶解能を有するperfluorochemical (以下PFC)をUniversity of Wisconsin (以下UW)液と組み合わせた臓器保存法で、保存中の膵臓に直接酸素を供給し、ATPの合成を促進し、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ポンプを回転させ、細胞膜の構造を良好に維持できることが証明されている。その結果、膵臓の長期保存が実験的かつ臨床的に可能になっただけでなく、温阻血障害を受けた膵臓の機能回復効果も膵臓移植実験において証明された。さらに、2002年にアルバータ大学から、臨床において短時間の二層法が長時間の冷阻血障害を改善できたと報告されている。

今回、我々は心停止ドナーからの膵島分離・移植実験において、短時間二層法の温阻血障害軽減効果について検討した。

### <方法>

雄性 Lewis ラットを用いて心停止ドナーモデルを作製した。ジエチルエーテル吸入により心停止させ、その後 37℃の恒温槽において温阻血障害を付加した。温阻血時間 0 分、30 分、45 分の 3 群 (各々WI0, WI30, WI45 群) で検討した。各群において、温阻血後直ちに膵島分離を行った群を subgroup a とし、3 時間の二層法保存後に膵島分離を行ったものを subgroup b とした。温阻血時間は、心停止時からコラゲナーゼ溶解液の膵管内注入時または二層法保存開始時までと定義した。まず、各群において膵島収量を比較検討した。次にストレプトゾトシンの腹腔内注射により作成した糖尿病ヌードマウス (随時血糖 $\geq 350\text{mg/dL}$ ) の左腎被膜下に、一定数 (200 個、300 個) の膵島移植を行い、*in vivo* での膵島機能を評価した。この際の糖尿病治癒は、移植後の随時血糖値が 3 日間連続して  $200\text{mg/dL}$  以下となることと定義した。移植後 14 日に左腎摘出を行い、その後の随時血糖が  $350\text{mg/dL}$  以上となるこ

とを確認した。また膵島分離前の膵臓組織内 ATP 濃度を測定した。さらにコラゲナーゼによる膵臓の化学的消化後に、HE 染色を行い膵臓の形態学的検討を行った。

### <結果>

膵島収量 (IEQ/rat) の検討では、WI45-a 群、WI45-b 群ではほとんど収量が得られなかった ( $61\pm 33$ ,  $23\pm 11$ )。一方、WI30-a 群、WI30-b 群では各々  $689\pm 271$ 、 $1372\pm 190$  と一定の膵島収量が得られ、3 時間の二層法保存を加えることにより約 2 倍の収量を得ることができた ( $P = 0.0001$ )。また、ヌードマウスへの膵島移植による糖尿病治癒率 (cure rate) は、WI30-a 群、WI30-b 群で 200 個/mouse を移植すると各々 0%, 37.5%であったが、300 個/mouse の移植では各々 0%, 75%と二層法保存により *in vivo* での膵島機能の改善を認めた。特に WI30-b 群で 300 個/mouse を移植すると、WI0-a 群、WI0-b 群ともに 100%であるのに対して有意差を認めない程度まで改善させることができた ( $P = 0.47$ )。膵島分離前の膵臓組織内 ATP 濃度 ( $\mu\text{mol/g dry weight}$ ) に関しては、WI0群には及ばないものの、WI30-a群、WI30-b群で各々  $0.61\pm 0.22$ 、 $2.13\pm 0.47$  と二層法保存により有意な上昇を認めた。形態学的検討では、WI30-a 群で温阻血障害が著明であり正常な形態が維持されていない膵島が明らかに多くみられたが、WI30-b 群では形態が良好に維持されていた。

### <考察>

膵島移植においてもドナー不足は国内外を問わず深刻な問題であり、脳死ドナーのみでは移植待機患者数の増加に追いつかないのが現状である。そこで心停止ドナーから提供される膵島に関心が高まっている。心停止ドナーでは摘出臓器の温阻血障害が最重要問題であるが、二層法は単純浸漬保存でありながら保存中に膵臓を酸素化し、ATP 産生を可能とする保存法であり、以前の研究結果からも温阻血障害の軽減効果が期待できる。実際の臨床ではドナー膵臓の摘出施設と膵島分離・移植施設が異なることがほとんどで、搬送に 3 時間以上を要することがまれではない。搬送時の保存の間に膵臓の viability を回復させ、その後に分離される膵島の収量や機能を改善させることは、心停止ドナーからの膵島移植成績向上において極めて有益な手法となり得る。

当教室では膵臓移植の動物実験において、二層法を用いることにより臓器保存時間の延長や温阻血障害からの回復効果を証明してきた。また、これまで報告されたラットからの膵島分離の実験では、温阻血時間 30 分が限界点

と考えられ、ほとんど収量が得られないとされてきた。しかし、この実験では短時間の二層法保存を行うことにより、膵島収量のみならず *in vivo* での膵島機能の改善も証明することができた。また二層法保存により、温阻血障害膵の ATP 濃度を上昇させることができ、膵島の形態を維持させることが可能であった。渉猟し得た範囲では、過去にコラゲナーゼによる化学的消化後の膵臓を形態学的に評価した文献はなく、初の評価法であると考えられる。この形態学的な検討では、二層法を用いなかった WI30-a 群では膵島の形態は保たれておらず、化学的消化過程に続く物理的消化過程で容易に破壊されたと予想される。それに対し、二層法を用いた WI30-b 群では膵島の形態は良好に保たれており、これが分離後の改善した膵島収量、膵島機能に反映したと考察された。

現在我が国では、膵島移植のドナーの大部分が心停止ドナーである。まだ膵島分離・移植経験数は限られているが、二層法保存を用いた症例では良好な成績を収めている。この動物実験により、心停止ドナーからの摘出膵臓に関しては、全例に二層法保存を行うことを推奨できると考える。

#### <結語>

心停止ドナーからの膵島移植では短時間二層法を使用することで、膵島収量の増加および移植成績の向上が期待できる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1687 号	氏 名	田中 智浩
論文題目 Title of Dissertation	Possibility of islet transplantation from a non-heart-beating donor pancreas resuscitated by the two-layer method 二層法を用いた心停止ドナーからの膵島移植の可能性		
審査委員 Examiner	主 査 蔭澤 正人 Chief Examiner 副 査 久野 高義 Vice-examiner 副 査 尾原 希史 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 8 月 17 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

近年、1型糖尿病の治療法として膵島移植が注目されてきており、欧米をはじめ本邦においても臨床例の報告がなされている。臓器移植法との関係から本邦では心停止ドナー膵からの膵島移植にほぼ限定されているが、最近、脳死ドナー膵からの膵島移植を行っている欧米においてもドナー不足の観点から、心停止ドナー膵による膵島移植が模索されている。この際の最大の問題点は、摘出時の温阻血障害による膵島収量、膵島機能の低下である。したがって、適切な方法によりこの問題点を改善し、膵島収量、機能を脳死ドナー膵と比べて遜色ないものとするのが重要である。

今回、本研究者が用いた二層法は、高酸素溶解能を有する perfluorochemical と UW 液等の臓器保存液を組み合わせた臓器保存法であり、神戸大学医学部消化器外科学教室で開発された独自の方法である。本法は、現在、欧米での臨床膵島移植において標準的膵保存法と位置付けられるまでになっている。

本研究においては、心停止ドナーからの膵島移植を念頭におき、温阻血障害膵に対する短時間（3時間）二層法保存の効果を、ラット膵島移植モデルを用い、膵島収量と膵島機能の点から検討した。

今回の実験において、ラットにおいては膵摘出時に30分の温阻血を行うと膵島収量はほとんど得られなかった。しかし、30分温阻血膵を3時間二層法（4℃）で保存することでその収量は約2倍に改善され、温阻血なしのコントロールに匹敵する膵島収量が得られるようになった。温阻血時間がより長期（45分）になると、3時間二層法で保存しても膵島収量の改善を認めなかった。

ついで、得られた膵島の機能について糖尿病ヌードマウスの腎被膜下への移植成績により検討した。温阻血なしのコントロール膵からの膵島、あるいは温阻血のない膵に3時間二層法で保存した後に得られた膵島においては、300個の膵島を移植することにより全例血糖が正常化した。一方、30分温阻血膵からの膵島300個をヌー

ドマウスに移植しても血糖の正常化は得られなかったが、30分温阻血膵を3時間二層法保存後に得られた膵島300個の移植では、75%において血糖の正常化が得られた。このことにより、膵島収量のみならず、膵島機能においても、二層法による温阻血障害の回復効果を証明することができた。

さらに、二層法保存後膵の viability の指標となる ATP 濃度を検討した。その結果、温阻血により大幅に低下した ATP 濃度が、3時間二層法により回復していることが明らかとなった。

また、コラゲナーゼによる化学的消化後の膵の形態を HE 染色にて検討したところ、30分温阻血膵の化学的消化後には、正常形態を保っていない膵島が多数観察されたが、30分温阻血膵に3時間二層法で保存した膵の消化後では、膵島の形態は良好に保たれていた。

本邦での臨床の場合においては、摘出膵は温阻血により障害を受けている上に、搬送過程等でも障害を受けるため臓器保存は必須である。この搬送の間に摘出膵の viability を回復させ、その後に分離される膵島の収量や機能を改善させることは、実際の臨床の場合で心停止ドナー膵からの膵島移植を行う上では極めて有用である。本研究においては、短時間（3時間）の二層法保存を行うことにより膵島収量のみならず膵島機能の改善も明らかとなり、臨床における有用性が示唆された。

以上、本研究は、心停止ドナーからの膵島移植における二層法保存の有用性について基礎的に検討したものであるが、従来成績が危惧されていた温阻血後の膵島移植において二層法を用いることにより膵島収量ならびに機能を改善することができることを明らかにし、膵島移植の成績向上につながる重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。