

図1 わが国1例目の膵島移植前後の血糖値

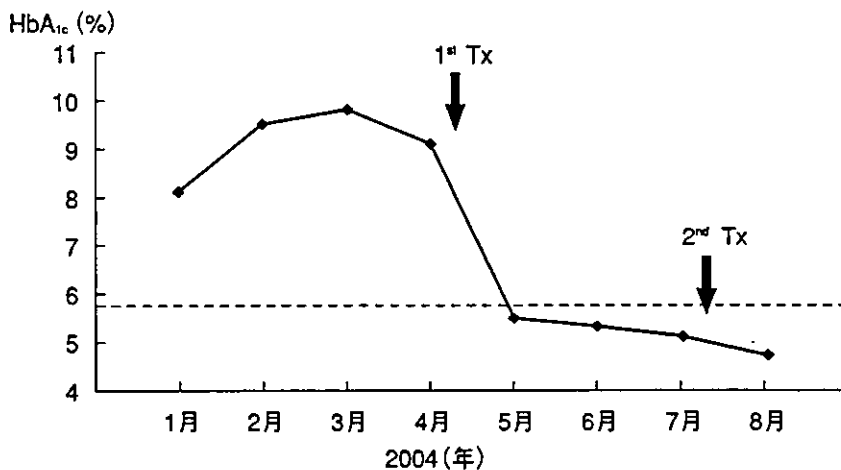


図2 わが国1例目の膵島移植前後のHbA<sub>1c</sub>

行われていますが、移植による死亡、発癌、重篤な合併症は全く報告されていません<sup>2)</sup>。これは、移植が点滴という安全な方法であることに加えて、免疫抑制剤が臓器移植と比べて軽微であることが原因と考えられています。

日本においては、現在まで5人の患者さんに対して7回の膵島移植が行われています。日本では脳死ではなく心停止後の提供者の膵臓を用いるために、膵島分離には欧米より数段高度な技術が要求されます。日本の7回の膵島移植のうち6回は京都大学病院にて行われました。すべての移植において、膵島からのインスリン分泌が確



認されており、京都大学で移植を受けた4人のすべての患者さんが血糖値のコントロールが良好になっています。特に、移植後3カ月を過ぎた1例目の患者さんは完全にインスリン注射から離脱しています。この患者さんは「まさか、この病気が治る日がくるとは思ってもみなかったので、幸せの一言です」というコメントを退院時におっしゃっていました。

京都大学では、生体ドナー膵島移植も行う準備が整っています。

文 献

- 1) Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, et al: Diabetes Mellitus as a Predictor of Cancer Mortality in a Large Cohort of US Adults. *Am J Epidemiology* 159:1160-1167, 2004
- 2) Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, et al: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *NEJM* 343:230-238, 2000

KEY WORD



解説

**膵島分離:** 膵臓は90%以上を占める外分泌組織や結合組織と数パーセントほどの膵島からなる。この数パーセントの膵島を膵臓から取り出すことを膵島分離という。膵臓をコラゲナーゼという酵素でバラバラにした後、特殊な技術で膵島のみを純化するというステップが行われ通常6~8時間かかる。

**生体ドナー膵島移植:** 心停止ドナーが不足していることから、身内の方から半分膵臓を提供していただき膵島を分離して移植する方法。生体膵島移植は、心停止ドナーと比べ質の高い膵島が分離できることから、良好な成績が期待できる。

ADVICE



膵島移植は臓器移植と違って、患者さんへの負担が軽くさらに安全性が高い1型糖尿病の根治療法です。インスリン分泌が枯渇した1型糖尿病患者さんの治療として欧米では確立されており、日本でも手の届くところまできました。

症例報告

心停止ドナーからの膵島移植によって  
インスリン離脱した1型糖尿病の1症例

山田祐一郎	松本 慎一	福田 一仁	濱崎 暁洋
小倉 雅仁	松岡 啓子	藤本 新平	興津 輝
岩永 康裕	野口 洋文	米川 幸秀	永田 英生
柴田登志也	笠井 泰成	前川 平	清野 裕
田中 紘一			

糖 尿 病

第47巻 第12号別刷  
2004年12月30日発行

日本糖尿病学会

## 心停止ドナーからの膵島移植によって インスリン離脱した1型糖尿病の1症例

山田祐一郎\*<sup>1</sup> 松本 慎一\*<sup>2</sup> 福田 一仁\*<sup>1</sup> 濱崎 暁洋\*<sup>1</sup>  
 小倉 雅仁\*<sup>1</sup> 松岡 啓子\*<sup>1</sup> 藤本 新平\*<sup>1</sup> 興津 輝\*<sup>3</sup>  
 岩永 康裕\*<sup>3</sup> 野口 洋文\*<sup>3</sup> 米川 幸秀\*<sup>3</sup> 永田 英生\*<sup>3</sup>  
 柴田登志也\*<sup>4</sup> 笠井 泰成\*<sup>5</sup> 前川 平\*<sup>5</sup> 清野 裕\*<sup>1,6</sup>  
 田中 紘一\*<sup>2,3</sup>

要約：本邦初の膵島移植成功例である。症例は36歳、女性、15歳時に口渇・全身倦怠・体重減少あり、1型糖尿病と診断。強化インスリン療法がされるも、血糖コントロールは不安定であり、無自覚低血糖によって交通事故の既往もある。膵島移植の適応と判定され、2004年4月7日ならびに7月2日の2回、心停止ドナーの膵臓から単離された、それぞれ350,400 IE (islet equivalent) と474,000 IEの膵島を経皮経肝的に門脈内に移植された。免疫抑制薬としてバシリキシマブ・ラバマイシン・タクロリムスが用いられ、強化インスリン療法で厳密な血糖コントロールが行われた結果、インスリン必要量は漸減し、2回目の膵島移植後の第20病日にインスリンを離脱。第32病日に施行した75g経口糖負荷試験では正常型を呈した。

Key words：①膵島移植 ②1型糖尿病 ③無自覚低血糖

〔糖尿病47(12)：945～950, 2004〕

### 緒言

膵β細胞量が枯渇したインスリン依存領域の糖尿病患者では、刻々と変動する血糖値に対していかにインスリン療法を工夫しても血糖値が不安定である。このような症例では、長期的には高血糖による糖尿病合併症の危険性の一方、短期的には低血糖による意識障害の危険性に曝されている。したがって、血糖値に応じてインスリンを分泌する膵β細胞の補充がインスリン依存領域の糖尿病患者の治療に求められ、膵臓移植や膵島移植が推進されている。

わが国において、膵臓移植は臓器移植法制定以降、脳死ドナーからの膵臓移植が推進されている<sup>1)</sup>。しかしながら、手術の危険性が高いことなどから、透析が

導入された症例への膵腎同時移植が主な適応となり、合併症のない、あるいは少ない糖尿病患者にはわが国では現時点で施行されていない。一方、膵島移植は新たな免疫抑制薬を用いたエドモントンプロトコルの導入以降<sup>2)</sup>、欧米では合併症のない、あるいは軽度の糖尿病患者に対し、脳死ドナーからの膵島移植が推進されている。しかしながら、わが国では臓器移植法により脳死ドナーからの膵島単離が認められていないため、温阻血によって障害をうける可能性のある心停止ドナーの膵臓から膵島を単離することが必要である。

我々は心停止ドナーからの膵島移植を2回行うことによって、インスリン離脱に成功したインスリン依存領域の1型糖尿病の症例を経験したので、報告する。

\*<sup>1</sup> 京都大学医学部附属病院糖尿病・栄養内科(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54)

\*<sup>2</sup> 同 臓器移植医療部

\*<sup>3</sup> 同 移植外科

\*<sup>4</sup> 同 放射線部

\*<sup>5</sup> 同 輸血・細胞治療部

\*<sup>6</sup> 関西電力病院(〒553-0003 大阪市福島区福島2-1-7)

連絡先：山田祐一郎(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54 京都大学医学部附属病院糖尿病・栄養内科)

受付日：2004年9月13日

採択日：2004年12月2日

Table 1 脾島移植適応判定申請時の糖尿病の評価

インスリン分泌能	
食事負荷試験	
血中 C ペプチド	
負荷前	<0.1 ng/ml
2 時間後	<0.1 ng/ml
グルカゴン負荷試験	
血中 C ペプチド	
負荷前	<0.1 ng/ml
2 時間後	<0.1 ng/ml
蓄尿	
C ペプチド	<1.0 μg/日
血糖コントロール	
HbA <sub>1c</sub>	5.8%
M 値	37.0
MAGE 値	172 mg/dl
自己免疫	
抗 GAD 抗体	2.5 U/ml
抗インスリン抗体	(-)
抗サイログロブリン抗体	17.6 U/ml
抗 TPO 抗体	10.7 U/ml
合併症の評価	
網膜症	
中等度非増殖網膜症	
focal photocoagulation 後で安定	
腎症	
尿中 Alb	4.6 mg/日
神経障害	
振動覚 (r/l)	84.0/84.3 μm
R-R 間隔 CV	2.1%
IMT (r/l)	0.8/0.5 mm
ABI (r/l)	1.06/1.06
心電図	
特記すべきことなし	

なお、本研究は京都大学大学院医学研究科・医学部  
医の倫理委員会によって実施が承認されている。

## 症 例

症例：36 歳，女性，AB 型 Rh(+)。

主訴：無自覚低血糖。

家族歴：特記すべきことなし。

既往歴：22 歳時より摂食障害あり，時に過食と自己嘔吐。

個人歴：喫煙・飲酒なし。

現病歴：15 歳時に口渇・全身倦怠・体重減少あるため，近医受診。1 型糖尿病と診断された。直ちに強化インスリン療法が開始されるが，血糖コントロールは不安定であり，無自覚低血糖によって交通事故の既往もある。Table 1 に示すように，内因性インスリン分泌は枯渇，血糖コントロールは 30~40 単位のイン

Table 2 第 1 回入院時の一般検査

血液検査		
WBC	4400	×10 <sup>6</sup> /μl
RBC	413 万	×10 <sup>6</sup> /μl
Hb	12.6	g/dl
Ht	37.9	%
Plt	20.2 万	×10 <sup>6</sup> /μl
PT(INR)	1.13	
APTT	40.2	sec
感染症		
VDRL	(-)	
梅毒 TP 抗体	(-)	
HBs 抗原	(-)	
HBs 抗体	(-)	
HCV 抗体	(-)	
内分泌検査		
TSH	1.1	μU/ml
free T <sub>4</sub>	0.91	ng/dl
生化学検査		
AST	25	IU/l
ALT	26	IU/l
LDH	177	IU/l
ALP	189	IU/l
γ-GTP	43	IU/l
ChE	179	IU/l
TP	6.7	g/dl
Alb	4.0	g/dl
T-Bil	2.2	mg/dl
Na	143	mEq/l
K	3.8	mEq/l
Cl	104	mEq/l
Cre	0.7	mg/dl
BUN	16	mg/dl
T-CHO	186	mg/dl
HDL-CHO	79	mg/dl
LDL-CHO	82	mg/dl
TG	40	mg/dl
HbA <sub>1c</sub>	9.1	%

スリンを用いて HbA<sub>1c</sub> 5.8~9.8%，M 値<sup>3)</sup>37.0，MAGE 値<sup>4)</sup>172 mg/dl と不良，合併症は中等度非増殖網膜症で腎症は 1 期であり，2004 年 1 月脾・脾島移植研究会ワーキンググループ「脾島移植班」脾島移植適応検討委員会に脾島移植適応判定評価を申請し，同年 3 月，適応と判定され脾島移植のレシピエントとして登録された。

身体所見：171 cm，63 kg，心肺腹部に特記すべきことなし。

入院経過(第 1 回脾島移植)：2004 年 4 月 2 日に血糖のコントロールが不良であるため入院の上，加療されていた(Table 2)。2004 年 4 月 7 日くも膜下出血に

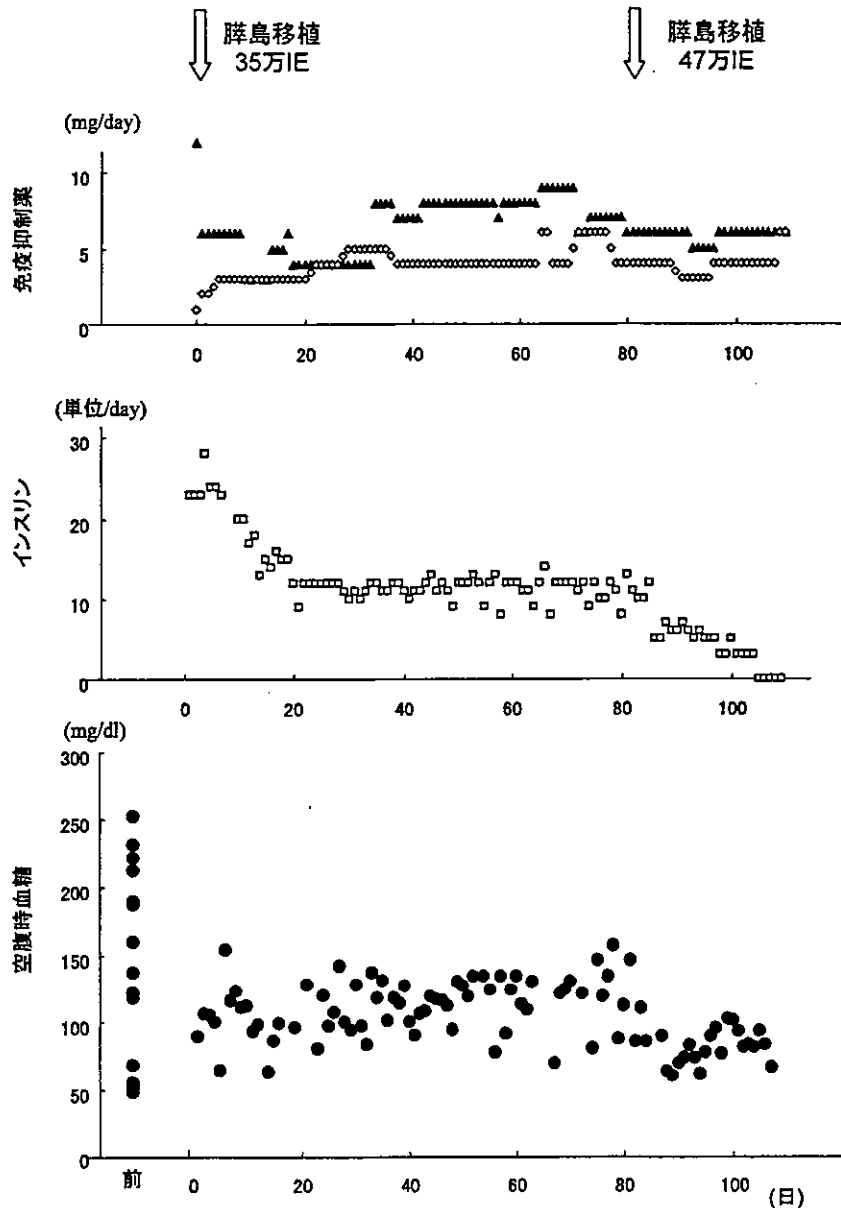


Fig. 1 臨床経過. 上段に免疫抑制薬ラパマイシン(▲)ならびにタクロリムス(◇)の使用量, 中段に空腹時血糖, 下段に使用した一日あたりのインスリン量を示す. 横軸は第1回移植後の日数を表す.

よる心停止ドナー(40歳代男性, 180 cm, 78 kg, 血液型B(+))より膵臓の提供があったため, 膵島単離を行った. 収量は350,400 IE(islet equivalent), 純度60%, 細胞量7 mlと膵島移植が可能であると判断, 膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」のレシピエント選択のルールに基づき, 膵島移植の第一候補となった.

バシリキシマブ20 mg点滴静注, ラパマイシン12 mg内服, タクロリムス1 mg内服し, 血管造影室に移動, エコーガイド下に経皮経肝的に門脈を穿刺し, 単離した膵島を移植した. 第1病日以降の免疫抑制薬は, トラフレベルがラパマイシンについては12~15 ng/ml, タクロリムスについては3~6 ng/mlとなるように内服量を調節(Fig. 1上段), また第4病日にバシリキシマブ20 mgを点滴静注した.

血糖コントロール(Fig. 1下段)は, 第4病日まで速効型インスリンを持続静注, 以降は超速効型インスリンと持効型溶解インスリンを用いて食前80 mg/dl, 食後2時間100 mg/dlを目標にインスリン量を調節した. インスリン必要量は漸減し(Fig. 1中段), 血糖コントロールも第32-33病日の血糖から算出されたM値4.6, MAGE値73 mg/dl(Table 3)と著明に改善していた. 第44病日には一日合計11単位のインスリン皮下注射で退院した.

また, 第30病日にグルカゴン負荷試験を施行, Cペプチドは負荷前0.21 ng/ml, 負荷6分後0.47 ng/mlと内因性インスリンの存在が確認され, グルカゴンに対する反応性も認められた(Table 4).

入院経過(第2回膵島移植): 2004年7月2日(第1回膵島移植第86病日)くも膜下出血による心停止ドナ

Table 3 血糖不安定性の指標

	第 1 回 移植病日 (日)	第 2 回 移植病日 (日)	M 値	MAGE 値 (mg/dl)	インスリン (単位/日)
2002 年 9 月 27 日	—	—	37.0	172	30
2004 年 5 月 10 日	33	—	4.6	73	11
2004 年 8 月 5 日	120	34	0.6	33	0

M 値は基礎値を 100 mg/dl として算出。MAGE 値は 2 日間の血糖値を基に算出。

Table 4 グルカゴン負荷試験

	第 1 回 移植病日 (日)	第 2 回 移植病日 (日)	血糖		CPR	
			(mg/dl)		(ng/ml)	
			0 分	6 分	0 分	6 分
2002 年 9 月 24 日	—	—	84	89	<0.1	<0.1
2004 年 5 月 7 日	30	—	108	133	0.21	0.47
2004 年 7 月 2 日	86	—	121	143	0.25	0.66
2004 年 7 月 30 日	115	29	88	113	0.35	1.2

1 mg のグルカゴン負荷によるインスリン分泌能を測定した。

Table 5 75 g 経口糖負荷試験

	0 分	30 分	60 分	90 分	120 分
血糖 (mg/dl)	86	137	154	170	123
インスリン ( $\mu$ U/ml)	1.8	9.5	15.0	19.2	9.9
C ペプチド (ng/ml)	0.45	1.1	2.0	3.0	2.7

第 2 回膵島移植術後第 32 病日に施行した 75 g 糖負荷試験の結果を示す。

— (50 歳代女性, 153 cm, 60 kg, 血液型 B(+)) より膵臓の提供があったため膵島単離を行った。収量は 474,000 IE, 純度 40%, 細胞量 5 ml と膵島移植が可能であると判断された。本症例のインスリン必要量は一日約 11 単位であり, 7 月 2 日に施行したグルカゴン負荷試験で (Table 4), C ペプチドは負荷前 0.25 ng/ml, 負荷 6 分後 0.66 ng/ml と第 1 回膵島移植第 30 病日の成績より改善しているもののまだ低値であるため, 膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」のレシピエント選択のルールに基づき, 膵島移植の第一候補となった。

エコーガイド下に経皮経肝的に門脈を穿刺し, 単離した膵島を移植した。同様に免疫抑制薬を用い, 血糖コントロールも第 1 病日より超速効型インスリンと持効型溶解インスリンを用いた。第 19 病日 (第 1 回膵島移植第 105 病日, 以下同様) にはインスリン注射から離脱, 第 29 病日 (第 115 病日) に施行したグルカゴン負荷試験 (Table 4) では, C ペプチドは負荷前 0.35 ng/

ml, 負荷 6 分後 1.2 ng/ml とさらに改善を示し, 第 32 病日 (第 118 病日) に施行した 75 g 経口糖負荷試験 (Table 5) では正常型を示した。第 35 病日 (第 121 病日) にインスリン離脱のまま退院。第 33~34 病日の血糖から算出された M 値 0.6, MAGE 値 33 mg/dl であった (Table 5)。

合併症・副作用: 膵島移植では, 移植そのものによる合併症と免疫抑制薬による副作用が治療の主なりスクである<sup>9)</sup>。本症例において, 第 1 回目の膵島移植直後の腹部エコー検査にて右腎臓周囲に低エコー領域の出現を認めたため, 開腹手術を行ったところ, 腹腔内に約 1 l の出血を認めた。しかしながら, すでに止血していた。第 2 回目の膵島移植では問題なかった。

また, 移植後に一過性の肝障害を来すことが報告されているが, 本症例において, 第 1 回移植の第 4 病日, 第 2 回移植の第 7 病日にそれぞれ頂値を示す肝障害を認めた (AST は, それぞれ 95 IU/l, 74 IU/l)。しかしながら, いずれも一過性で一カ月以内に前値に復

した。

免疫抑制薬の副作用として、骨髄抑制が報告されている。本症例において、白血球減少が認められたため、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を投与した。また、高脂血症はスタチンを投与することでLDLコレステロール値を100 mg/dl以内に保つことが可能であった。タクロリムスによる腎症の増悪が報告されているが、クレアチニンクリアランスは移植後も73 ml/min(体表面積補正)と低下していない。感染症は認められていない。

## 考 察

膵島移植は新たな免疫抑制薬を用いたエドモントンプロトコル<sup>2)</sup>の導入以降、300例以上の症例に対して行われ、膵臓移植に匹敵する成績が報告されている。欧米では、そのほとんどが、脳死ドナーより提供された膵臓から膵島が単離され、温阻血時間が問題となる心停止ドナーからの膵島移植については1例が報告されているに過ぎない<sup>6)</sup>。しかしながら、わが国においては臓器移植法によって、脳死ドナーからの膵島単離は認められていないため、条件のより厳しい心停止ドナーから十分な機能を有する膵島を単離することが要求されている。

膵臓の保存に二層法<sup>7)</sup>を改良して保存液にET-Kyoto液<sup>8)</sup>を用い、さらに膵島分離法はエドモントンプロトコル<sup>2)</sup>を改良することによって、心停止ドナーから効率よく膵島を単離する手技を確立し(松本ら：投稿中)、1回の移植にレシピエントの体重1 kgあたり5,000 IE以上の膵島を単離することが可能となり、わが国においても心停止ドナーを用いた膵島移植でインスリン離脱が可能であることを示すことができた。Ryanらは、体重1 kgあたり9,000 IEの膵島を移植することでインスリン離脱が可能であることを報告している<sup>9)</sup>。これらの症例はすべて脳死ドナーから提供された膵島を用いた成績であるが、我々は心停止ドナーから単離した膵島を体重あたり約13,000 IE用い、インスリン離脱に成功した。より少ない膵島量でインスリン離脱が可能かどうかは、今後の症例の積み重ねが必要である。

膵島移植の治療の最終的な目標はインスリン依存状態の糖尿病患者がインスリン離脱することであるが、もう一つの目標は血糖の不安定性の改善による無自覚血糖や低血糖昏睡など急性合併症からの離脱である。血糖の不安定性の評価にはいろいろな指標が提案されているが<sup>3,4,9)</sup>、我々はM値とMAGE値を用いて評価した。その結果、いずれの指標も、膵島移植前、膵島1回移植後、膵島2回移植後と進むにつれて、改善し

た。MAGE値に関して、カナダ・アルバータ大学にて管理されている1型糖尿病患者の成績が報告され、中央値は8.1 mMで、50%の患者が6.2~10.5 mMに分布している。本症例では、移植前の173 mg/dl(9.6 mM)が、1回移植で73 mg/dl(4.1 mM)、2回移植で33 mg/dl(1.8 mM)と著明な改善を示した。第1回移植後も、1カ月に数回30~40 mg/dl台の低血糖発作を認めたが、第2回移植後は全く消失し、この観点からも膵島移植は有効な治療法と考えられた。

Fig. 1に示すように、インスリン必要量は漸減し、また、Table 4に示すように、第1回移植後に施行したグルカゴン負荷試験でも、第30病日に比較して第86病日で内因性インスリン分泌は改善した。膵島内の血管と肝臓の血管の吻合が進むことがその要因と考えられている<sup>10)</sup>。最近、膵β細胞そのものが増殖するとの報告がされた<sup>11)</sup>。移植膵島のインスリン分泌亢進が膵β細胞の増殖に関与しているかどうか興味深い。

2回目の移植後に施行した75 g糖負荷試験では正常型を示した。しかしながら、インスリン分泌は低く、insulinogenic indexでも0.15に過ぎず、インスリン分泌のピークは負荷90分後と遅延していた。糖尿病性自律神経障害による胃排泄の低下に伴う血糖上昇の遅延とともに移植した膵β細胞量の不足も寄与していると考えられた。それにもかかわらず血糖曲線が正常型であるのは、本症例が1型糖尿病であるためもともとインスリン抵抗性がないこと、移植後体重が減少したこと<sup>9)</sup>などによりインスリン感受性が良好であるためと考えられた。

膵島移植は、門脈を穿刺するため約10%の症例において、出血が認められている<sup>5)</sup>。本症例においても、第1回の移植後に約1 lの出血があった。門脈内に穿刺したカテーテルの抜去にあたり、十分量のコラーゲンで止血処置をし、腹部エコー検査で経時的に観察することが必要である。その他の合併症・副作用は、既報の範囲内であった。

2回の移植でインスリン離脱が可能であること、血糖の安定性が達成され無自覚性低血糖が消失したこと、ならびに合併症・副作用の程度から、わが国においても心停止ドナーからの膵島移植がインスリン依存領域の糖尿病に対する安全かつ有効な移植手技であることが明らかとなった。

謝 辞：本研究にあたり、膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」の諸先生方に深謝いたします。

本研究の一部は、厚生労働科学研究費ならびに文部科学省21世紀COEプログラムによる。

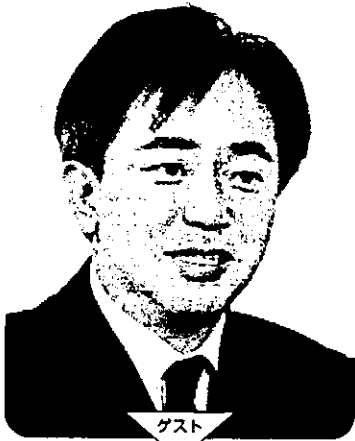


## 文献

- 1) 金澤康徳(2003)日本人膵移植の現状と将来への展望. 内分泌・糖尿病科 16: 407-410
- 2) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-238
- 3) Schlichtkrull J, Munck O, Jersild M (1965) The M-Valve, an Index of Blood-Sugar Control in Diabetics. *Acta Med Scand* 177: 95-102
- 4) Service FJ, Molnar GD, Rosevear JW, Ackerman E, Gatewood LC, Taylor WF (1970) Mean amplitude of glycemic excursions, a measure of diabetic instability. *Diabetes* 19: 644-655
- 5) Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbutt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM (2002) Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 51: 2148-2157
- 6) Markmann JF, Deng S, Desai NM, Huang X, Velidedeoglu E, Frank A, Liu C, Brayman KL, Lian MM, Wolf B, Bell E, Vitamaniuk M, Doliba N, Matschinsky F, Markmann E, Barker CF, Naji A (2003) The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 75: 1423-1429
- 7) Matsumoto S, Kuroda Y (2002) Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation* 74: 1804-1809
- 8) Bando T, Kosaka S, Liu C, Hirai T, Hirata T, Yokomise H, Yagi K, Inui K, Hitomi S, Wada H (1994) Effects of newly developed solutions containing trehalose on twenty-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 92-98
- 9) Ryan EA, Shandro T, Green K, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Shapiro AM, Vantyghem MC (2004) Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes* 53: 955-962
- 10) Andersson A, Korsgren O, Jansson L (1989) Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes* 38(Suppl 1): 192-195
- 11) Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46

Diabetes Front

# 膵島移植の最前線



松本 慎一先生  
(京都大学医学部附属病院移植外科)

## 2004年で大きく変わった日本における膵島移植の臨床

山田 1型糖尿病の根治療法として注目される膵島移植は、2004年4月7日に京都大学にて国内で初めて行われ、インスリン離脱することに成功しました。まだ日本では始まったばかりですが、今後が大変期待されます。本日は膵島移植の第一線で活躍中の松本 慎一先生(京都大学医学部附属病院移植外科)をお招きし、日本で膵島移植が始まった経緯や現在の状況などお話しして頂きたいと思います。



山田 祐一郎先生  
(京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科学講座)

### 膵島移植とは

山田 最初に膵島移植とはどういうものか説明して頂けますか。

松本 膵島移植は、インスリン依存状態の糖尿病患者に対する新しい治療方法で、一番の特徴は膵臓から血糖値をコントロールする細胞の集まりである膵島を特殊な技術を使って分離し、それを患者に対して侵襲の少ない点滴で膵臓に移植する治療です。

山田 具体的に、患者に対する侵襲はどういうものでしょうか。

松本 「移植」という名前はつきませんが、実際に手術をするのではなく、超音波で膵臓の血管を探し、局所麻酔の下でカテーテルを放射線科の医師に入れて頂き、あとは10~20分の点滴で膵島細胞を落としていきます(図1)。ですから、もちろん患者のお腹を開ける必要はないし、全身麻酔も必要ありません。

山田 臓器移植というと「脳死」や「心臓死」などいろいろな表現があり、わかりにくい部分があると思うのですが、膵島移植との関係について説明して頂けますか。

松本 膵島移植は、特にアメリカ、ヨーロッパで最近盛んに行われるようになり、アメリカの場合、主に脳死の提供者、いわゆる脳死ドナーから行っています。日本の場合、脳死ドナーが非常に少ないため、本当に心臓が止まって亡くなった方、いわゆる心臓死ドナーから主に行っています。膵島は心臓が止まっても、できるだ

け早く摘出すれば移植が可能なのです。

しかし、日本では脳死ドナー、心臓死ドナー共に数が非常に少ないため、2005年1月に初めて生体ドナーから膵島移植を行いました。

### 日本で膵島移植が始まった経緯

山田 2000年にカナダのエドモントンにあるアルバータ大学で、初めて膵島移植に関する非常に良い成績が発表された時には、松本先生はちょうど北米にいらしたと思いますが、どのような印象を持たれましたか。

松本 彼らは膵島移植を1999年から始め、2000年に治療方法を確立して「エドモントンプロトコル」として発表しました。その時、私はシアトルのワシントン大学にいて、彼らとは膵島移植の仲間として交流があり「実は最近非常に膵島移植がうまくいっている」という話は聞いていました。それで実際にエドモントンに行くと、膵島移植でインスリン離脱した人がどんどん出ているということでした。当時、カナダの首相が見学に来るなど町中大変沸いていました。

そして2000年にクリントン大統領から「膵島移植を1型糖尿病の治療としてサポートしよう」という発表があり、それに伴い大きな予算が付き、それこそ降って湧いたような膵島移植ブームが起こりました。そのため膵島移植の経験者や、かかわっていた人は、全米であちこち

らリクルートされるような状態になり、私自身もいろいろな大学から「膵島移植を立ち上げないか」という声がかかりました。

特にアメリカでは脳死ドナー数が年間約6,000あり、そのうちの約1,000は膵臓の臓器移植として用いられていましたが、残り約5,000の膵臓は研究用、あるいはそのままドナーから摘出されなかったため、臨床に用いない膵臓を膵島移植に生かそうと分離の研究が非常に盛んでした。それで私を含めて、アメリカで膵島移植に携わったものは、ヒトの膵臓からの膵島分離を行っていたわけです。

山田 そういふ経緯が日本における成功につながっていると思いますが、実際に日本で膵島移植が始まったのは2004年とエドモントンプロトコルの発表から4年たったからです。その遅れた原因と、それに対する解決についてどういうことをされたのか教えて頂けますか。

松本 日本でも膵島移植を行うためにいろいろなグループが研究していましたが、新しい医療を探り入れるにはいろいろなハードルがあり、既存の医療の中にいかに組み込むかが非常に難しい点になります。

日本で膵島移植を行う場合、安全面では膵島移植に必要なクリーンルームを備えた大がかりな施設がなかったこと、そして技術面では脳死ドナーがほとんどいないこと、さらに日本のドナーから本当に膵島摘出できるのかという問題もあり

ました。

それらを1つ1つ解決していったわけです。

まず、私自身が2002年に帰国するきっかけとなったのは、京都大学が将来の細胞治療に向けてCell Process Centerをつくり本格的に取り組むという話を聞いたからです。

そして脳死ドナーがほとんどいない問題には、心臓死ドナーからの膵島移植を検討しました。2002年にペンシルバニア大学で心臓死ドナーからの膵島移植に成功したという報告が1例あり、不可能ではないだろうと思いい、実際にペンシルバニア大学で膵島移植を担当されている中国人のDr. Dengという医師に何が一番大切か聞いたところ「チームワークが最も大事であり、心臓死ドナーからでも膵臓摘出・分離から移植まで素早く行えば可能」とのことでした。

最初は動物実験でブタを使って開始しました。ブタの膵島はヒトよりばらばらになりやすく弱いという特徴があり難しいにもかかわらず、いろいろと工夫して行くと、膵島が多くとれることがわかりました。そして2004年に動物実験のノウハウを用いてヒトの心臓死ドナーから膵島分離を初めて行ったところ、それも上手くいきました。

このように安全面ではCell Process Centerができたこと、技術面では心臓死ドナーからでも膵島分離できたという大きなハードルを超えることができたので、膵・膵島移植研究会の膵島移植班に話をして日本で初めて心臓死ドナーからの膵島移植を行うことになったのです。

さらに、膵島移植において非常に重要なことは術前・術後の管理です。移植後は、各医師に非常に丁寧に丁寧な血糖コントロールをして頂くことで、心臓死ドナーであっても生着率をある程度確保できます。このようないろいろな小さな工夫の積み重ねで、日本でも膵島移植が開始できるようになったわけです。

2004年にスタートして海外に比べ4年間の遅れがありますが、アメリカの膵島移植の1例目は1970年代ですから、今まで日本は膵島移植に関して30年遅れ

図1 膵島移植の行程

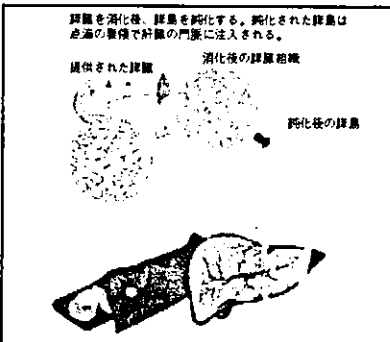


表 膵島移植レシピエント条件

＜脳死ドナー膵島移植レシピエント条件＞	
【適応】	1. 内因性インスリンが著しく低下し、インスリン治療を必要とする
	2. 糖尿病専門医の治療努力によっても、血糖コントロールが困難
	3. 原則として75歳以下
	4. 膵臓移植、膵島移植につき説明し、本人、家族、主治医の同意が得られている
＜生体ドナー膵島移植レシピエント条件＞	
【適応】	1. 1型糖尿病あるいは膵性糖尿病の病歴が5年以上ある。
	2. インスリン分泌が枯渇していること。枯渇していることは以下の条件を満たすこと。
	A. 尿中C-peptide < 10μg/day
	B. 空腹時 C-peptide < 0.3ng/mL
	C. 食後あるいはグルカゴン負荷後 C-peptide < 0.5ng/mL
	3. (社)日本糖尿病学会専門医が6ヶ月以上治療しても重症低血糖発作などがあり血糖コントロールが困難で、さらに京都大学病院にて入院してインスリン分泌能を評価し、血糖コントロールを行った後も血糖の調節が困難であるとみなされた症例。

ていたわけです。それが最新のエドモントンプロトコルが2000年に始まり、2004年に開始したわけですから、30年の遅れが4年の遅れに短縮され、かなり世界の水準に近づきました。私自身は4年の遅れについて、むしろ「かなり近づいた」という印象を持っています。

### インスリン離脱して糖尿病を完治する

山田 「日本人はもともとインスリン分泌能が低く、膵島移植をしてもインスリン離脱に至らないのではないかと」印象をお持ちの糖尿病専門医も多いと思いますが、今回、日本でも既に2例の方がインスリン離脱になりました。実際、どのような患者に移植をして、それがどのような成果を得てきたのか、今までの京都大学の成果について簡単に説明して頂きますか。

松本 膵島移植を受けられる方は1型糖尿病の期間が5年以上で、インスリン分泌能が全く枯渇しているといった条件があります(表)。2004年4月7日に京都大学移植外科にて国内1例目の膵島移植を行い、インスリン離脱を達成しました。2005年1月19日には世界で初めて生体膵島移植に成功し、こちらもインスリン離脱しました。そして2005年3月末までに本学では12例目(生体移植1例を含む)の膵島移植を行いました。3月18日には4人目の患者がインスリン離脱しました。

私としては、心臓死ドナーであっても膵島分離技術自体は欧米の脳死ドナーによるものとあまり変わらず、そしてレシピエントの血糖コントロールが非常に良くなるという印象を持っています(図2)。

### 無自覚低血糖と生体膵島移植

山田 膵島移植の最終的な目標は、インスリン離脱して糖尿病を完治することですが、その途中に無自覚低血糖を改善する目的もあることがよく言われます。その辺りについて教えて頂きますか。

松本 無自覚低血糖の糖尿病患者は気づかないうちに血糖値が閾値以下になり、急に意識を失ったりして非常に危険な状態になるため早急に改善する必要があります。膵島移植のより良い適応になるのです。

2005年1月に行った生体膵島移植の場合も、レシピエントが無自覚低血糖だったので倫理委員会は「健康な人にメスを入れてまで膵島移植をすることも必要であろう」と判定しました。今回の生体膵島移植は、非常に遅く1回の移植で両方の目的が達せられ、このような形で生体膵島移植の成功例は世界で初めてです。まだ1例だけで、さらに長期の経過

をみるのが重要ですが、今後、このように非常に血糖コントロールの悪い患者にとって新しい治療のオプションが増えたと考えています。

山田 生体膵島移植となると、ドナーに対する安全性が非常に心配になります。例えばドナーが膵臓を半分提供した後に糖尿病になるというようなことないのでしょうか。

松本 1970年代からミネソタ大学では膵臓を半分切ってそのまま移植する生体膵臓移植を140例ほど行っています。それで1996年に、それまでのドナーの評価を行ったところ、約6%の方に耐糖能異常が見つかったのです。それで徹底したデータ分析を行ったところ「肥満者である」「2型糖尿病が血縁者にいる」「十分なインスリン分泌能を持たない」ということがあると、ドナーが2型糖尿病になりやすいことがわかりました。したがって、ミネソタ大学では1996年から生体膵臓ドナーの条件を改良し、その3点をきちんと確認するようになりました。その後30例以上の生体膵臓移植が行われていますが、ドナーに糖尿病の発症はありません。検査さえしていれば、膵臓を半分提供することにより糖尿病の発症率が上がることはないという結果です。

さらに、日本においては以前から胃痛患者でリンパ節転移が疑われる方に膵臓の半分を摘出するという手術が行われていますが、50%の膵切除であれば糖尿病発症の確率が格段上がることはないことがわかっており、これは海外でも同様です。

### 膵島分離の技術的な課題とドナー不足の問題

山田 2004年の1年間で膵島移植の臨床は随分大きく変わってきたと思いますが、今後、それをさらに広げていくためにはまだまだいろいろな問題点があると思います。その中の1つとして、心臓死ドナーから膵島をより単離する際の技術的な課題があると思いますが、それについて教えて頂きますか。

松本 膵島分離は実験段階から始まり、2000年にエドモントンプロトコルが発案され、やっとある程度の標準ができました。エドモントンプロトコルの最も良かった点は、膵島分離方法の標準が示されたため、改良が行いやすくなった点です。標準の方法より良い成績が出れば改良であると判断できるからです。

しかし、まだ完璧ではありません。人間の膵臓には膵島が約100万個ありますが、我々が心臓死ドナーからとれる膵島は平均40万個で回収率は約4割です。欧米で脳死ドナーを使っても大体同じ

で、残りの6割は分離の作業で失われます。ですから、例えば4割を8割にすると、2人のドナーが必要ところが1人でも可能になります。

膵島分離は、まず膵臓を消化してばらばらになった膵島だけを集める純化というプロセスがありますが、消化の段階で膵島も一緒に消化してなくなってしまう局面があるので、消化するための酵素collagenaseの改良や、温度や時間など条件の検討など、世界各国で適切に消化するプロセスの研究をしています。

ミネソタ大学では「one donor one recipient」に大変こだわっていて、技術的にいろいろな改良を重ねれば、現在の技術でもそれが可能であることを主張しています。

山田 ただ、1対1になっても、まだ日本で膵島移植を必要とされる方は数万人いらっしゃいます。その方たちの治療を進めていくとなると、ドナーが増えるようにお願いしていかなければいけないと思います。北米では数千人の脳死ドナーがおられるというお話でしたが、日本の現状はいかがでしょうか。

松本 日本では脳死ドナーは年間5例くらいです。比較的多いといわれている心臓死ドナーでも年間100例ほどで、ドナー数は欧米に比べると非常に少ない状況です。

最近、各都道府県の自助努力でドナー獲得を目指し、移植医療の啓発活動を行う「ドナーアクションプログラム」が始まったので、日本でも今後、心臓死ドナーが増えてくるのではないかと考えております。2004年度からドナー数が上向ってきたという報告もあるので、実際にドナー数はじわじわと上がってくるのではないのでしょうか。

しかし、根本的に膵島移植が必要な数万人という患者数を脳死ドナー、心臓死ドナーでカバーするのはかなり難しいと思います。日本でもドナー不足は非常に大きな問題ですが、欧米でも同様であり、アメリカで数千人のドナーがいるとはいえ、それを大きく上回る膵島移植に必要な1型糖尿病患者がいらっしゃいます。そのため、アメリカではドナー不足の解決法の次の段階として、異種移植や生体ドナーもその範疇として考えているようですね。

山田 異種移植とは具体的にはブタやサルを使うのでしょうか。

松本 そうです。実際、サルだと数が少ないので、ブタの膵臓を使うことが現実的になります。約2年前、メキシコで実際にブタの膵臓を特殊なチャンパーに入れて1型糖尿病の患児に移植したという報告もあります。先進国では幾つか倫理

的な問題、社会的な容認の問題があるので、すぐには実行できないと思いますが、動物実験レベルでは、例えば糖尿病にしたサルをブタの膵臓で半年ぐらい正常血糖を維持できたという報告があり、医学的なハードルは意外と超えられるのではないかと思います。あとは社会的な容認あるいは倫理的な問題が年々をかけて皆さんに理解して頂けるようになれば、ここ5~6年のスパンで欧米においてブタの異種移植が始められる可能性はあるでしょう。

### 膵島移植のデメリット

山田 今後が期待される膵島移植ですが、デメリットとしては何があるのか教えてください。

松本 一つは移植後の拒絶反応や自己免疫反応を抑えるために、一生免疫抑制剤を飲み続けなければならないことです。免疫抑制剤には、口腔内アフタなどの副作用があります。発症から長期間経過した1型糖尿病患者は、既に合併症を有していることが多いため、移植によって受ける利益と免疫抑制剤によって生じる不利のバランスをよく考える必要があります。

もう一つ、膵島移植は新しい治療のため、日本では保険適応になっていないことです。カナダではすでに保険適用になり、アメリカでもメディケアという国家での保障に組み込む準備が進んでいます。

### 実際に膵島移植を受けるための手続き

山田 最後になりましたが、血糖が非常に不安定な受け持ち患者に膵島移植を受けようとする時、担当医はどのような手続きをとれば良いのか簡単にご説明頂けますか。

松本 現在、京都大学では膵島移植外来を週1回、金曜日に行っております(<http://isleteriko.com/>)。膵島移植を考えた時に、「まずはお電話かEメール等で移植外科情報室の膵島移植コーディネーターに「こういう症例があるけれども、どうしたらいいか」と話をすることが第一歩になります。そこでコーディネーターが丁寧に説明いたします。実際には、適応がある方とない方がいらっしゃるのを判断するために必要な検査等を教えます。

その後、実際に京都大学で膵島移植外来を受けて頂き、適応の有無を判定する膵島移植班の適応判定委員会にデータを送ります。心臓死ドナー膵島移植の場合、日本の膵・膵島移植研究会の膵島移植班が全国統一して患者の管理を行っています。京都大学では、その判定のために必要な検査を効率よく1週間で行う入院システムをつくっているのです。それで適応のある方が登録をするという手順です(図3)。

山田 膵島移植は今まで全く血糖コントロールがうまくいかなかったインスリン依存の糖尿病患者にとって非常に大きな福音となると思います。今後、さらに発展することを期待して終わりたいと思います。本日はどうもありがとうございます。

(DITN)

図2 膵島移植前後のHbA1cの変化

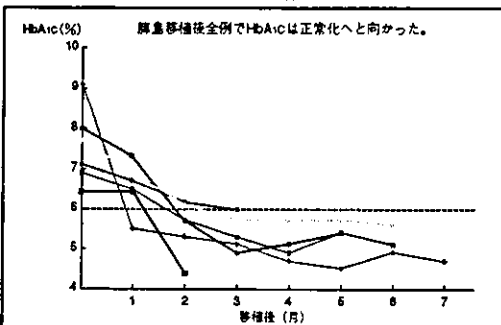
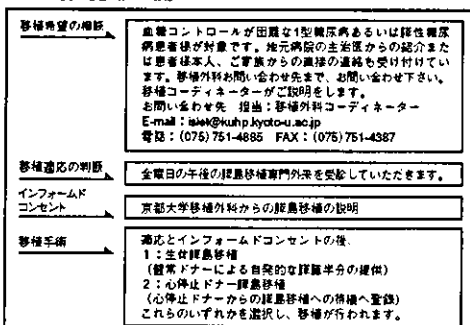


図3 膵島移植の流れ



# Efficacy of Human Islet Isolation From the Tail Section of the Pancreas for the Possibility of Living Donor Islet Transplantation

Shinichi Matsumoto,<sup>1,2,4</sup> Koichi Tanaka,<sup>1</sup> D. Michael Strong,<sup>2</sup> and Jo Anna Reems<sup>2,3</sup>

**Background.** Islet transplantation is on the rise for the treatment of type 1 diabetes. Apparent donor shortages could be alleviated through use of living donor pancreata. A critical issue for using a section of pancreas from living donors is whether islet yields would be sufficient for transplantation.

**Methods.** After obtaining human pancreata, islets were isolated from the head section (n=20, head group), tail section (n=23, tail group) or whole pancreas (n=24, whole group). Islets were isolated by enzymatic digestion followed by purification, then assessed for yields, purity, morphology, functionality, and insulin content.

**Results.** Fifteen of twenty cases (75%) in the head group, all cases (100%) in the tail group, and 23 of 24 cases (96%) in the whole group were successfully completed for islet isolation. Islet yield per gram pancreas was significantly higher in the tail group compared with both the head and whole groups (head,  $1,472 \pm 326$  IE/g; tail,  $4,256 \pm 574$  IE/g; whole,  $2,424 \pm 506$  IE/g). Total islet yield from the head group was significantly lower compared with both tail and whole groups (head,  $75,016 \pm 18,933$  IE; tail,  $197,469 \pm 28,236$  IE; whole,  $208,207 \pm 43,414$  IE), and the tail group showed similar islet yield to the whole group. The whole group showed significantly lower purities and the head group showed significantly lower morphologic scores. There were no significant differences in viability, function, and insulin content among the three groups.

**Conclusions.** The tail section of the human pancreas is suitable for islet isolation. The living donor islet transplantation may be feasible using only this section of the pancreas for the first transplantation to reduce hypoglycemic unawareness for small recipients, which might be followed by the second islet transplantation from cadaveric donor.

**Keywords:** Human islet isolation, Living donor, Human pancreas.

(*Transplantation* 2004;78: 839–843)

After the success of clinical islet transplantation reported by the University of Alberta group, results of islet transplantation have significantly improved (1–4). Continued improvement and greater demand for islet transplantation have created a shortage of donor pancreata. This shortage could be alleviated through the possible use of living donor pancreata. One important factor for successful islet transplantation is the use of high quality human pancreata (2–4). Recently, the University of Minnesota demonstrated that an islet transplantation from a single donor high quality pancreas could cure a patient with type 1

diabetes (5). It is apparent that obtaining high quality isolated islets from high quality pancreata is extremely important to achieve successful clinical islet transplantations (6,7).

Organs from brain-dead donors are less viable than organs obtained from living donors because of the occurrence of cytokine storms during the process of brain death (8,9). The University of Minnesota group demonstrated better results when using pancreata from living donors for transplantation compared with brain-dead donors (10). However, a critical issue for using organs from living donors is whether a sufficient number of viable islets can be obtained from only a section of the pancreas. Efficacy of islet isolation using only half of a pancreas is unknown.

The purpose of this study is to assess the islets from either the head or tail of a pancreas and to compare these islets with those obtained from a whole pancreas.

## MATERIALS AND METHODS

### Islet Isolation

Human pancreata for research purposes were procured after obtaining informed consent from relatives of brain-dead, multiorgan, cadaveric donors through Life Center Northwest Organ Procurement Agency (UNOS region 6, Seattle, WA) or IIAM or NDRI from April 1999 to August 2000. Because

This work was supported in part by the Juvenile Diabetes Research Foundation International, NIH grant 5U42 RR016604, the Ministry of Education, Science, and Culture, and The 21st Century Center of Excellence Program, Japan.

<sup>1</sup> Kyoto University Hospital Transplantation, Unit 54, Shogoin, Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Japan.

<sup>2</sup> Puget Sound Blood Center/Northwest Tissue Center, Seattle, WA.

<sup>3</sup> University of Washington Medical Center, Department of Hematology, Division of Medicine, Seattle, WA.

<sup>4</sup> Address correspondence to: Dr. Shinichi Matsumoto, Kyoto University Hospital Transplantation, Unit 54, Shogoin, Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Japan 606–8507. E-mail: shinichi@kuhp.kyoto-u.ac.jp.

Received 2 February 2004. Revision Requested 3 March 2004. Accepted 29 March 2004.

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/04/7806-839

DOI: 10.1097/01.TP.0000130177.03326.D5

pancreata in this study were procured for research purposes, all pancreata were procured after clinically used organs. Twenty head sections of pancreata (head group), 23 tail sections of pancreata (tail group) and 24 whole pancreata (whole group) were processed to isolate islets.

The islet isolation method was based upon the Ricordi method with some modifications, as previously described (11–14). Briefly, enzymatic digestion was initiated by intraductal collagenase solution infusion into the chilled pancreas. Collagenase solution consisted of Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Mediatech, Herndon, VA) with 1.5 mg/mL purified collagenase mixture (Liberase HI, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) (15), 10 U/mL Heparin (Elkins-Sinn, Inc, Cherry Hill, NJ), 6.7 Kunitz units/mL DNase (Roche), and 4 mM Pefabloc [AEBSF; 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Roche] (12–14). Five lots of Liberase were used for the head of pancreata (Lot# 49079620, 85142320, 85147720, 85204720, 85210020), seven lots were used for tail section of pancreata (Lot# 49079620, 84648720, 85142320, 85147720, 85204720, 85210020, 85210052), and six lots were used for whole pancreata. Collagenase solution was infused at 4°C with roller-pump, which allowed for reinfusion of any collagenase solution that leaked from the pancreas. After successful distension, the processing pan temperature was increased to 37°C. The progress of tissue digestion was monitored visually. When the pancreas was approximately half digested, chilled HBSS with 5% neonatal calf serum (Gibco BRL, Rockville, MD) was added, and the temperature of the processing pan was adjusted to 4°C. The digested tissue was collected and washed three times using chilled HBSS with 5% neonatal calf serum.

Before purification, a simple density measurement of the pancreatic digestate was performed, and the gradient density was adjusted accordingly (12–14). A prepurification density assessment was performed by centrifuging samples (volume 150  $\mu$ L) in 5 mL aliquots using six different density solutions (1.090, 1.095, 1.100, 1.105, 1.110, and 1.115 g/cm<sup>3</sup>). The digested particles were observed as to whether they pelleted, floated, or were distributed evenly throughout the solution to define the optimum density parameters of the density-gradient solution. The heaviest density that still had some suspended particles was selected for the heavy density solution. After determining the density of the heavy solution, islets were purified by the continuous density gradient using a COBE 2991 cell processor (Gambro BCT, Denver, CO), as previously described (12–14). Briefly, the digestate was gravity-fed into the COBE 2991 cell processor and centrifuged at 1,000 rpm (200 G). The system was bled of air, and the bottom solution and digested tissue were overlaid with 250 mL of a continuous density-gradient solution from a two-reservoir gradient former. The solution was pumped into the spinning cell processor at 60 mL/min, beginning with the high and ending with the low-density gradient. These layers were then finally capped by the addition of 60 mL of gradient solution. When purification was complete, the contents of the spinning COBE bag were collected into six 250-mL conical centrifuge tubes, prefilled with 90 mL CMRL 1066 culture media (Mediatech). Purified islets were washed and assessed for yield, viability, and morphology.

Purified islets (15,000 IE) were cultured in 10 mL CMRL 1066 culture media with 0.002% ciprofloxacin (Bayer Corporation, West Haven, CT) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL) at room temperature without CO<sub>2</sub> for 24 hr in a T75 flask (Sarstedt, Inc., Newton, NC).

### Islet Evaluation

Islet preparations were evaluated for yield, purity, and morphology by dithizone staining (16,17). Two independent investigators qualitatively assessed gross morphology by scoring the islets for shape (flat vs. spherical), border (irregular vs. well-rounded), integrity (fragmented vs. solid-compact), uniformity of stain (not uniform vs. perfectly uniform) and diameter (all <100  $\mu$ m vs. greater than 10% >200  $\mu$ m). Each parameter was graded from 0 to 2, with 0 equaling the worst and 2 equaling the best score. Consequently, the worst islet preparations scored as 0, and the best islet preparation scored as 10. Spherical, well-rounded, solid-compact, uniformly stained, and large islets were characterized as the best islets. Islet viability was assessed using acridine orange (10  $\mu$ mol/L) and propidium iodide (15  $\mu$ mol/L) (AO/PI) staining to visualize living and dead islet cells simultaneously (18). Fifty islets were examined individually to determine viability, and an average viability value was calculated. The number of trapped islets is defined as the number of islets with more than 50% of their nonendocrine interface intact.

Islet function was assessed by monitoring the insulin secretory response of the purified islets according to a procedure described by the Edmonton group (2,17). Briefly, after an overnight culture, islets (150 IE) were incubated with either 2.8 mM or 20 mM glucose in RPMI 1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) for 2 hr at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The supernatant was collected for insulin measurement. Insulin concentrations in these experiments were analyzed with a human insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (ALPCO Insulin ELISA kit, Windham, NH). The stimulation index was calculated by determining the ratio of the insulin released from islets in the high-glucose concentration to the insulin released from islets in the low concentration. In addition, after overnight culture, 150 islet equivalent (IE) human islets were lysed with acetic acid to measure total insulin content (17).

### Statistics

With respect to the statistical analysis of the data collected, values are expressed as mean  $\pm$  SE. To compare the data of three groups, ANOVA was used, followed by a posthoc test (Fisher's PLSD test). To compare the data of two groups, two-tailed Student *t* test was used. To analyze cause of death, chi-square test was used. All statistical analyses were performed using Stat View 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). *P* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Donor Characteristics

Donor characteristics for each group are shown in Table 1. There were no significant differences among the three experimental groups with regard to donor age, body weight, body mass index, and cold ischemic time (Table 1). In the head group, causes of death consist of eight cases of cerebrovascular accident (CVA), four cases of head trauma, two cases of anoxia, and one case of another cause. In the tail group, causes of death consist of seven cases of CVA, nine cases of head trauma, two cases of anoxia, and five cases of other causes. In the whole group, causes of death consist of seven cases of CVA, ten cases of head trauma, one case of anoxia, and five cases of other causes. Regarding the ratio of cause of death, there was no significant difference among the three groups (*P*=0.59).

**TABLE 1.** Donor characteristics

	Age (years)	Body weight (kg)	Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	Cold ischemic time (hrs)
Head (n=15)	45.6±3.5	88.2±6.4	29.3±2.0	21.2±3.4
Tail (n=23)	43.1±3.4	85.2±5.3	29.7±1.8	21.9±2.8
Whole (n=23)	37.2±3.0	91.7±9.5	29.0±2.6	15.4±1.8
P value <sup>a</sup>	0.17	0.85	0.98	0.14

<sup>a</sup> The three groups were statistically compared using ANOVA. There was no significant difference among the three groups. Data are presented as mean ± SE.

**TABLE 2.** Pancreas characteristics

	Pancreas weight (g)	Used pancreas weight (g)	Remaining pancreas weight (g)	Percent used pancreas (%)
Head (n=15)	90.6±6.4	48.8±3.3	41.3±3.3	55.4±2.9
Tail (n=23)	88.4±5.3	47.5±3.1	44.1±3.0	50.3±2.2
Whole (n=23)	87.6±5.7	—	—	—
P value <sup>a</sup>	0.96	0.79	0.59	0.17

<sup>a</sup> The three groups were statistically compared using ANOVA for pancreas weight. The two groups (head group and tail group) were statistically compared using two-tailed Student *t* test for used pancreas weight, remaining pancreas weight, and percent pancreas used. Data are presented as mean±SE.

### Pancreas Characteristics

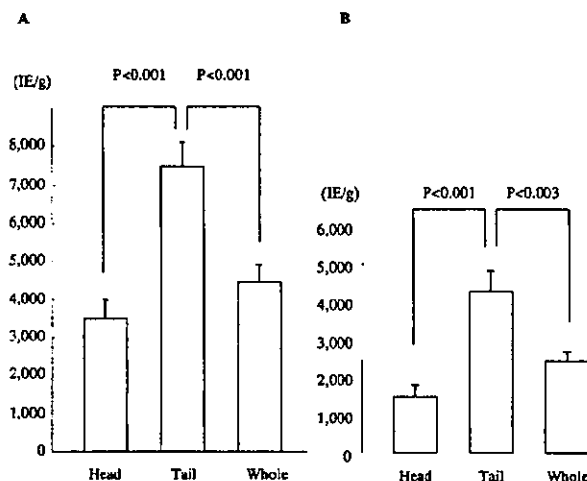
There were no significant differences among the three experimental groups with regard to pancreas weight (Table 2). We further compared used pancreas weight, remaining pancreas weight, and percentage used pancreas in both head and tail groups (Table 2). There was no significant difference between the two groups.

### Isolation Results

Five isolations out of 20 cases in the head group, none out of 23 cases in the tail group, and one out of 24 cases from the whole group failed an islet isolation attempt. The head section of the pancreas was significantly more difficult to process than either the tail or whole group ( $P<0.02$  vs. tail group;  $P<0.05$  vs. whole group). Consequently, analyses were performed upon 15 cases from the head group, 23 cases from the tail group, and 23 cases from the whole group.

The islet yield per gram pancreas before purification was 3,485±497 IE/g with the head group, 7,490±602 IE/g with the tail group, and 4,484±451 IE/g with the whole group. Resulting in significantly higher islet yields per gram of tissue in the digestate from the tail group than with either the head ( $P<0.001$ ) and whole groups ( $P<0.001$ ) (Fig. 1A). Similarly, islet yields per gram of pancreas after purification were 1,472±326 IE/g with the head group, 4,256±574 IE/g with the tail group, and 2,424±506 IE/g with the whole group, again showing that the tail group produced significantly higher islet yields per gram of tissue than either the head ( $P<0.001$ ) or whole groups ( $P<0.01$ ) (Fig. 1B).

Total islet yield before purification was 165,641±25,995 IE with the head group, 357,408±38,634 IE with the tail group, and 406,237±58,848 IE with the whole group. Resulting in overall islet yields being significantly lower with the head group than with the tail group ( $P<0.001$ ) and the whole group ( $P<0.004$ ) (Fig. 2A). Total islet yields after purification were 75,016±18,933 IE with the head group, 197,469±28,236 IE with the tail group and 208,207±43,414 IE with the whole

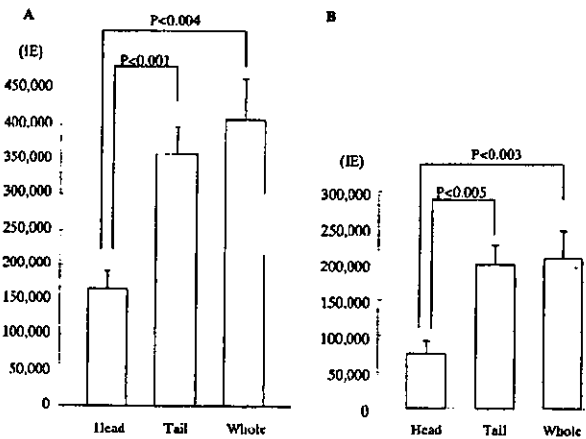


**FIGURE 1.** Islet yields per gram of pancreas from the head and tail sections and from whole pancreata (A) before and (B) after purification. Islet from tail section of the pancreas provided significantly higher islet yields per gram of pancreas compared with the other two groups.

group. The head group showing significantly lower islet yields when compared with the tail ( $P<0.005$ ) and the whole groups ( $P<0.003$ ) (Fig. 2B). After purification, islet yields from the tail group showed similar islet yields as the whole group ( $P=0.79$ ).

The whole group showed significantly lower purity when compared with both head ( $P<0.03$ ) and tail ( $P<0.02$ ) groups (Table 3). There were no significant differences among the groups with regard to islet viabilities (Table 3). The head group showed a significantly lower morphologic score compared with the other two groups (Table 3). Percentage of trapped islets were similar among the three groups (Table 3).

When incubated in low glucose (2.8 mM), there were no significant differences in the basal insulin secretion levels



**FIGURE 2.** Total islet yields from the head and tail sections and from whole pancreata (A) before and (B) after purification. Total islet yields were similar between the tail group and whole pancreas group after purification.

of islets among the three groups (Table 4). Insulin secretion from islets incubated in high glucose (20 mM) was similar between the tail and the whole groups and less than one-third in the head group; however, there were no significant differences among the three groups (Table 4). The stimulation indexes were similar between the tail and the whole groups and lower in the head group; however, there were no significant differences among the three groups (Table 4). Insulin contents were similar among the three groups (Table 4).

**DISCUSSION**

The shortage of human islets for transplantation is likely to become more dramatic as success in clinical protocols and the number of procedures performed increases (1,19). One of the solutions of the donor shortage is living donor islet transplanta-

tion. Living pancreas transplantation has shown that half of a pancreas provides a sufficient islet mass to maintain normal blood glucose levels (10). However, efficacy of islet isolation using only half of a pancreas is unknown.

For the first time, this study clearly documents that the tail section of a pancreas is suitable for islet isolation. The tail section alone provided about 90% of the islet yields as compared with islet yields from whole pancreata. Notably, islet yields were similar between the tail group and the whole group after purification.

It has been shown that effective delivery of collagenase through the pancreatic duct to exocrine tissue is important to obtain high islet yield (20,21). Because the pancreas head has multiple orifices of pancreatic duct and removal of the duodenum from the pancreas head usually injures pancreatic tissue, it is difficult to deliver collagenase into the head section. In contrast, the pancreatic tail section has one main pancreatic duct, and it is easy to remove the tail section during procurement. Therefore, it seems reasonable that the tail section of pancreas is suitable for islet isolation.

In addition to lower islet yield, islets from the head section had a significantly lower morphologic score compared with the other two groups. Also, islets from the head group had the lowest viability and stimulation index after static incubation. This probably reflects the difficulty of isolating intact islets from the head section of pancreas.

Purification of a large amount of tissue is difficult even using COBE 2991 cell processor (7). In this study, purity of islets in the whole pancreas group was significantly lower compared with the other two groups. This might reflect the difficulty of islet purification for large amounts of tissue. Therefore total islet yields in the tail group became similar to the whole pancreas group after purification.

Obviously, high quality and quantity of islets is the key to successful islet transplantation. The Edmonton group originally minimized cold ischemic time and recently used

**TABLE 3.** Islet characteristics

	Purity (%)	Viability (%)	Score	Trapped islet (%)
Head (n=15)	76.4±6.7	89.6±2.7	2.9±0.5 <sup>c</sup>	23.4±6.0
Tail (n=23)	76.6±5.6	94.4±1.4	5.9±0.8	25.5±4.7
Whole (n=23)	55.5±12.1 <sup>b</sup>	92.6±1.1	6.4±0.4	30.7±4.9
P value <sup>a</sup>	<0.04	0.16	<0.003	0.59

<sup>a</sup> The three groups were statistically compared using ANOVA with Post hot test (Fisher's PLSD method). Whole group had significantly lower purity compared to the other groups. Head group had significantly lower score compared with the other groups. Data are presented as mean ±SE.

<sup>b</sup> P<0.05 vs. head group; P<0.02 vs. tail group.

<sup>c</sup> P<0.005 vs. tail group; P<0.001 vs. whole group.

**TABLE 4.** Insulin concentration during static incubation and insulin content

	Insulin concentration (μU/IE)		Stimulation index	Insulin content (μU/IE)
	Low glucose	High glucose		
Head (n=15)	2.2±1.2	2.8±1.3	1.5±0.2	329±58
Tail (n=23)	4.6±1.9	9.9±3.6	2.5±0.6	302±56
Whole (n=23)	5.0±2.2	11.0±5.2	2.4±0.4	384±121
P value <sup>a</sup>	0.74	0.58	0.39	0.63

<sup>a</sup> The three groups were statistically compared using ANOVA. There was no significant difference among the three groups. Data are presented as mean ±SE.

the two-layer pancreas preservation to maintain high quality donor pancreatic tissue (2,7, 22). It has also been shown that brain death itself causes a cytokine storm that can damage islets (8,9). Using living donor pancreas grafts could, therefore, minimize cold ischemic time and decrease islet damage, potentially making the use of islets from living donor more suitable for transplantation.

In this study, the total islet yields were approximately 200,000 IE using both the tail part of pancreata and whole pancreata. Shapiro et al. (2) demonstrated that they transplanted islets when islet yield was more than 4,000 IE/kg recipient body weight. Therefore if the body weight of recipient was less than 50 kg, these islets could be transplanted. Edmonton protocol typically required islet transplantation twice; however, hypoglycemic unawareness was dramatically reduced after single islet transplantation. Related to living donor, it has been shown that autologous islet transplantation was more successful with smaller islet yields (23,24). With islet autotransplantation, 200,000 islets are required for insulin sufficiency (25). With this evidence, it should be reasonable to expect that single islet transplantation from tail part of living donor pancreata might improve hypoglycemic unawareness, even there is a possibility to achieve insulin independence.

Many patients with type 1 diabetes experience frequent hypoglycemic unawareness, which is potentially life threatening. For these patients, islet transplantation could be considered as life-saving therapy, and we should not ignore the possibility of living donor islet transplantation. On the other hand, we can transplant islets from cadaver donor after the first living donor islet transplantation. In this case, the purpose of the living donor islet transplantation is reducing episodes of hypoglycemic unawareness, and the purpose of the second islet transplantation is curing type 1 diabetes.

In this study, we used modified Ricordi method (Seattle research open-pan method), which reduced volume of dilution solution and eliminated meticulous temperature control and is therefore simple and easy. With this method, we were able to evaluate the effect of pancreas preservation method and the effect of trypsin inhibition upon islet isolation (13). However, the quality of islets is inferior to Ricordi method, and we used this method for research only. Because the purpose of this study was to evaluate the efficacy of islet isolation based upon part of the pancreas, we chose this method.

Safety for the pancreatic donor is critical, and the University of Minnesota group established criteria for living pancreas transplantation (10). More than 120 living donor pancreas transplants have revealed that risks to pancreas donors were smaller than with other living donor organ transplants including kidney and liver (10). The concern about diabetes after pancreas resection could be minimized using the current Minnesota donor criteria, and no diabetes has been shown following the criteria (10).

## CONCLUSION

The tail section of a human pancreas is suitable for islet isolation. Total islet yields from the tail section were similar to yields from a whole pancreas, thus making living donor islet transplantation a future possibility for the first transplant to reduce hypoglycemic unawareness for small recipients, and this might be followed by the second islet transplantation from cadaveric donor.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Laura Schreiber for her editorial assistance.

## REFERENCES

1. Ricordi C. Islet transplantation: A brave new world. *Diabetes* 2003; 52: 1595.
2. Shapiro AMJ, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with Type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230.
3. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation. *Diabetes* 2001; 50: 710.
4. Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, et al. Successful islet transplantation. Continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002; 51: 2148.
5. Hering BJ, Matsumoto I, Sawada T, et al. Impact of two-layer pancreas preservation on islet isolation and transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 1813.
6. Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, et al. Variable in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* 1996; 61: 1047.
7. Lakey JR, Burridge BW, Shapiro AMJ. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int* 2003; 16: 613.
8. Takada M, Nadeau K, Hancock W, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation* 1998; 65: 1533.
9. Toyama H, Takada M, Suzuki Y, et al. Activation of macrophage-associated molecules after brain death in islets. *Cell Transplant* 2003; 12: 27.
10. Gruessner RWG, Sutherland DER. Living donor pancreas transplantation. *Transplant Reviews* 2002; 16: 108.
11. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988; 37: 413.
12. Matsumoto S, Lawrence O, Rigley T, et al. University of Wisconsin solution with trypsin inhibitor Pefabloc improves survival of viable human and primate impure islets during storage. *Cell and tissue banking* 2001; 2: 15.
13. Matsumoto S, Rigley T, Reems JR, et al. Improved islet yields from macaca nemestrina and marginal human pancreata after two-layer method preservation and endogenous trypsin inhibition. *Am J Transplant* 2003; 3: 53.
14. Matsumoto S, Stevens RB, Strong DM. Pancreatic islet cell processing for transplantation. In: Phillips GO, ed. *Advances in tissue banking*. Singapore, World Scientific Publishing 2002, p. 267.
15. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, et al. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, Liberase. *Diabetes* 1997; 46: 1120.
16. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat* 1990; 27: 185.
17. Matsumoto S, Qualley S, Goel S et al. Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-perfluorochemical plus O2) method of pancreas preservation on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation* 2002; 74: 1414.
18. Bank HL. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988; 24: 266.
19. Inverardi L, Kenyon NS, Ricordi C. Islet transplantation: Immunological perspectives. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 507.
20. Lakey JR, Warnock GL, Shapiro AM, et al. Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. *Cell Transplant* 1999; 8: 285.
21. Sawada T, Matsumoto I, Nakano M, et al. Improved islet yield and function with ductal injection of University of Wisconsin solution before pancreas preservation. *Transplantation* 2003; 75: 1965.
22. Lakey JR, Tsujimura T, Shapiro AMJ, et al. Preservation of the human pancreas before islet isolation using a two-layer (UW solution-Perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 2002; 74: 1809.
23. Farney AC, Najarian JS, Nakhleh RE, et al. Autotransplantation of dispersed pancreatic islet tissue combined with total or near-total pancreatectomy for treatment of chronic pancreatitis. *Surgery* 1991; 110: 427.
24. Pyzdrowski KL, Kendall DM, Halter JB, et al. Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. *N Engl J Med* 1992; 327: 220.
25. Farney AC, Sutherland DER. Islet autotransplantation. In: Ricordi C, ed. *Pancreatic islet cell transplantation*. Austin, R. G. Landes 1992, p. 291.



## Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation



Shinichi Matsumoto, Teru Okitsu, Yasuhiro Iwanaga, Hirofumi Noguchi, Hideo Nagata, Yukihide Yonekawa, Yuichiro Yamada, Kazuhito Fukuda, Katsushi Tsukiyama, Haruhiko Suzuki, Yukiko Kawasaki, Makiko Shimodaira, Keiko Matsuoka, Toshiya Shibata, Yasunari Kasai, Taira Maekawa, A M James Shapiro, Koichi Tanaka

Published online April 19, 2005  
10.1016/S0140-6736(05)75196-5

Rising demand for islet transplantation will lead to severe donor shortage in the near future, especially in countries where cadaveric organ donation is scarce. We undertook a successful transplantation of living-donor islets for unstable diabetes. The recipient was a 27-year-old woman who had had brittle, insulin-dependent Type 1 diabetes mellitus for 12 years. The donor, who was a healthy 56-year-old woman and mother of the recipient, underwent a distal pancreatectomy. After isolation, 408 114 islet equivalents were transplanted immediately. The transplants functioned immediately and the recipient became insulin-independent 22 days after the operation. The donor had no complications and both women showed healthy glucose tolerance. Transplantation of living-donor islets from the distal pancreas can be sufficient to reverse brittle diabetes.

Kyoto University Hospital Transplantation Unit (S Matsumoto MD), Department of Transplantation and Immunology, Kyoto University Graduate School of Medicine (T Okitsu MD, Y Iwanaga MD, H Noguchi MD, H Nagata MD, Y Yonekawa MD, Prof K Tanaka MD), Department of Diabetes and Clinical Nutrition, Kyoto University Graduate School of Medicine (Y Yamada MD, K Fukuda MD, K Tsukiyama MD, H Suzuki MD, Y Kawasaki MD, M Shimodaira MD, K Matsuoka MD), Kyoto University Hospital Radiology and Nuclear Medicine Service (T Shibata MD), and Kyoto University Hospital Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy (Y Kasai BS, Prof T Maekawa MD), Kyoto Japan; and Clinical Islet Transplant Programme, University of Alberta, Edmonton, Canada (Prof A M James Shapiro MD)  
Correspondence to: Dr Shinichi Matsumoto, Kyoto University Hospital Transplantation Unit, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan  
shinichi@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Since the success of islet transplantation in 2000,<sup>1</sup> demand for the procedure has risen substantially and donors will soon be in very short supply. Islet transplantation from living donors represents an alternative approach to expand the potential donor pool, particularly in countries such as Japan where access to cadaveric organ donors is especially scarce.<sup>2</sup> We report a successful procedure of living-donor transplantation of islets for unstable diabetes that was undertaken at Kyoto University Hospital on Jan 19, 2005. This study was approved by the ethics committee of the Kyoto University Graduate School and Faculty of Medicine, Japan.

The donor was a healthy 56-year-old woman who was the mother of the recipient and blood-group compatible. To keep to a minimum the risk of impaired glucose tolerance in the donor, and after lessons learned previously by a US study group<sup>3</sup> in living-donor segmental pancreas transplantation, we ensured that: our donor was not obese (body-mass index <25 kg/m<sup>2</sup>), she had a healthy glucose pattern and insulinogenic index (ie, [peak insulin-basal insulin]/[blood glucose at peak insulin-blood glucose at basal insulin]) during an oral glucose tolerance test (OGTT), and autoantibody concentrations for GAD (glutamic acid decarboxylase) and insulin were negative.<sup>3</sup> Our donor's insulinogenic index was more than 0.5, and her haemoglobin (Hb) A1c value was less than 5.6%, which met our criteria.

The recipient was a 27-year-old woman who developed chronic pancreatitis aged 4 years and developed insulin-dependent Type 1 diabetes at age 15 years. Every 2 days, she had hypoglycaemic episodes of which she was unaware, so she was admitted to control her blood glucose. The main aim of this transplantation was to eliminate these frequent hypoglycaemic episodes.

The recipient's glycaemia was very unstable before transplantation (figure 1). Blood C-peptide concentrations were negative after glucagon stimulation, and HbA1c was 9.9%. The recipient received a mean of 28 U (SD 2) of insulin per day (0.56 U/kg per day). She did not have any renal or retinal complications.

The donor underwent a distal pancreatectomy in which the pancreatic transection plane was made to the left of the portal vein. The pancreatic tail was used for islet isolation.<sup>3</sup> We flushed the resected pancreas graft immediately and protected the main pancreatic duct of the resected pancreas graft by ductal injection.<sup>4</sup> The graft was transported on two-layer preservation,<sup>5</sup> and the cold ischaemic time lasted for 44 min. Islet isolation was done under GMP (good manufacturing practice) conditions in the cell-processing centre of Kyoto University Hospital. Based on the Ricordi method,<sup>5</sup> the pancreas was digested with liberase (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) containing trypsin inhibitors. Islet purification was avoided because the total tissue volume was less than 10 mL (9.5 mL). Total islet yield was 408 114 islet equivalents (islet viability 99%). The insulin stimulation index after static incubation<sup>5</sup> was 27.4. We transplanted isolated islets into the recipient's liver via access to percutaneous portal vein under local anaesthesia shortly after islet processing was completed.

Although the recipient's response after transplantation was uneventful, temporal bone-marrow suppression (ie, reduction of white blood cells in transit) and increase of liver-enzyme concentrations took place. Both values returned to normal amounts within 1 month. The recipient received sirolimus and tacrolimus treatment 7 days before transplantation to achieve stable target therapeutic values (sirolimus 12–15 mg/L, tacrolimus 4–6 mg/L). Basiliximab (20 mg) was given 4 days before transplantation and repeated on the day of transplantation, and infliximab (5 mg/kg) given 1 day before transplantation.

After transplantation, daily blood glucose was tightly controlled with positive C-peptide (figure 1). We gradually weaned insulin dosage and the recipient became insulin-independent from the 22nd day after transplantation. She has now been insulin-independent for 2 months. She was discharged 37 days after

transplantation with a normal OGTT result (figure 2A) and an insulinogenic index of 0.58 mU/L (figure 2B). The donor's postoperative clinical course was uneventful. She was discharged 18 days after the operation. 37 days after transplantation, the donor's OGTT result was healthy (figure 2A), and her insulinogenic index was 0.77 mU/L (figure 2B).

Historically, two previous attempts at transplantation of living-donor islets were done at the University of Minnesota, MN, USA;<sup>4</sup> however, these events were unsuccessful. Compared with cadaveric pancreas donation, islets from living donors can greatly improve functional viability because of several advantages: there is no exposure to islet-toxic proinflammatory cytokines derived from brain injury, the pancreas can be retrieved under ideal conditions without haemodynamic instability, cold ischaemic injury can be reduced to an

absolute minimum, and close matching of human leucocyte antigens (HLA) between donors and recipients might reduce the risk of rejection.

As with all types of transplantations with living donors, donor safety is of great concern. In fact, 3–5% of complications in living donors were reported for segmental pancreas transplantation, including pancreatic fistula, pancreatitis, wound infection, and bleeding, and 3% for relaparotomy.<sup>3</sup> Although no deaths and life-threatening complications occurred in these 130 living pancreas donors,<sup>3</sup> pancreatectomy should still be undertaken safely. Donation of half the pancreas has the potential to induce new diabetes in a healthy donor, which has arisen previously.<sup>3</sup> The risk of diabetes can be reduced substantially if the donor is not obese, the donor islet autoantibody status is negative, and the donor OGTT result is healthy, but these precautions might not eliminate the risk entirely. Even if obese donors have suitable islet masses, surgeons should avoid obese donors for their future health.

A reliable method of islet isolation is critical for living-donor transplantation. To ensure the best conditions after pancreas procurement, we used the two-layer pancreas preservation,<sup>5</sup> ductal pre-injection,<sup>4</sup> and the Ricordi isolation method, with additional use of trypsin inhibitors.<sup>5</sup> As a result of these procedures, we could obtain 12 transplantable islet preparations from 13 cases of pancreata from donors who had died from cardiac arrest in our programme in Japan.

Since transplantation, our recipient has achieved insulin independence and remains insulin-free with excellent glycaemic control. The metabolic effect of this

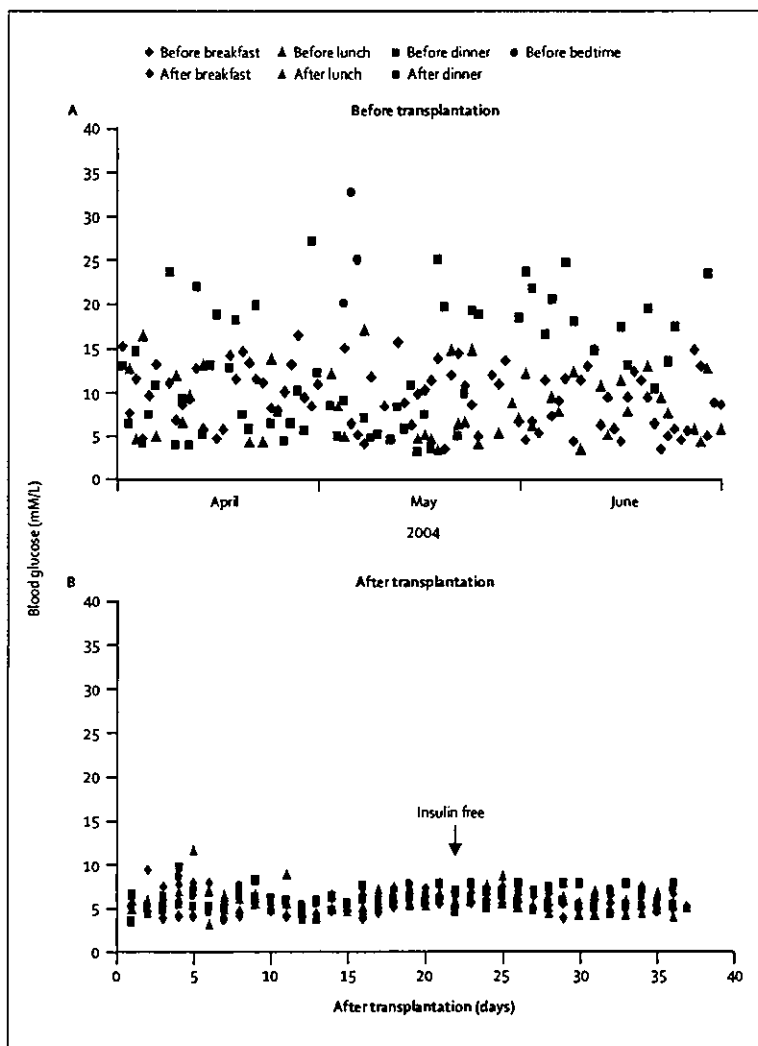


Figure 1: Daily blood glucose before and after islet transplantation

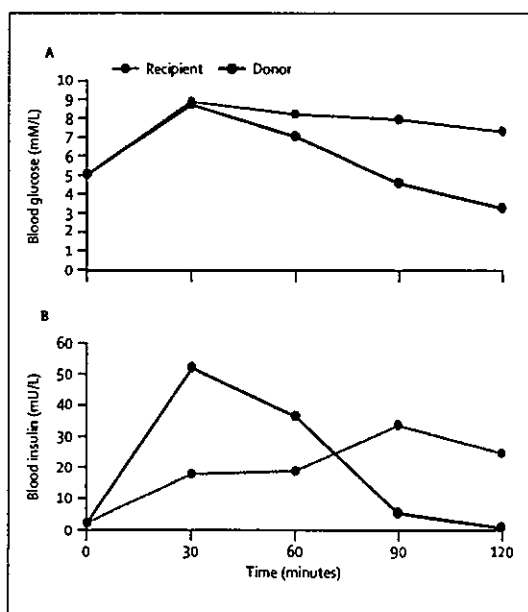


Figure 2: Concentrations of blood glucose (A) and insulin (B) measured during OGTT

living islet transplant, derived from just half a living pancreas, seems similar to that achieved from the use of two or more whole pancreas isolations in our programme of cadaveric islet transplantation. The difference in organ requirements probably indicates the improved potency of islets prepared from living donors. Because the recipient did not have autoimmune type 1 diabetes, the transplanted islets did not need protection against autoimmune disease. This factor might have been important for the success of this transplantation.

Islet transplantation is only currently applicable for adults because of the potential side-effects of immunosuppressants. Until safe immunosuppressants are available, transplantation of living-donor islets should not be undertaken for children.<sup>7</sup> For islet transplants to become a widespread clinical reality, diabetes reversal needs to be achieved with one donor only, to reduce risks and costs and to increase the availability of transplantation.<sup>8</sup> Our successful transplantation might have implications for the ongoing transition of the procedure, from clinical investigation to routine clinical care.

Long-term follow-up is important because data<sup>9</sup> have suggested a substantial rate of loss in insulin independence over time. However, the survival of islets that are positive for C-peptide and the good control of glycaemia can both be maintained in more than 80% of individuals 5 years after transplantation.<sup>9</sup> Therefore, we postulate that living-donor islets might survive relatively long (at least for 5 years), and that our recipient would be free from hypoglycaemic unawareness episodes even if she needs insulin injections in the future.

In conclusion, from our successful transplantation of living-donor islets for the treatment of unstable diabetes, our recipient achieved and maintained insulin independence after the procedure. We believe that such transplantation of living-donor islets can be an additional option in the treatment of insulin-dependent diabetes.

#### Contributors

S Matsumoto participated in the study conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, and drafting of the article. T Okitsu, Y Iwanaga, H Noguchi, H Nagata, Y Yonekawa, Y Yamada, and K Tanaka participated in the study conception and design and acquisition of data. K Fukuda, K Tsukiyama, H Suzuki, Y Kawasaki, M Shimodaira, K Matsuoka, T Shibata, Y Kasai, T Maekawa, and A M J Shapiro participated in the acquisition of data. All authors revised the article critically for intellectual content.

#### Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by the Ministry of Education, Science, and Culture, the Ministry of Health, Labour and Welfare and the 21st Century Centre of Excellence Programme, Japan. We thank Yusuke Nakai, Michiko Ueda, and Akemi Ishii for their technical support. The funding source had no role in study design, data collection, data interpretation, data analysis, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study, and had final responsibility for the decision to submit for publication.

#### References

- 1 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230–38.
- 2 Matsumoto S, Tanaka K, Strong DM, Reems JA. Efficacy of human islet isolation from the tail section of the pancreas for the possibility of living donor islet transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 839–43.
- 3 Gruessner RWG, Sutherland DER. Living donor pancreas transplantation. *Transplant Rev* 2002; 16: 108–19.
- 4 Sawada T, Matsumoto J, Nakano M, Kirchoff N, Sutherland DE, Hering BJ. Improved islet yield and function with ductal injection of University of Wisconsin solution before pancreas preservation. *Transplantation* 2003; 75: 1965–69.
- 5 Matsumoto S, Rigley TH, Reems JA, Kuroda Y, Stevens RB. Improved islet yields from *Macaca nemestrina* and marginal human pancreata after two-layer method preservation and endogenous trypsin inhibition. *Am J Transplant* 2003; 3: 53–63.
- 6 Sutherland DE, Matas AJ, Goetz FC, Najarian JS. Transplantation of dispersed pancreatic islet tissue in humans. *Diabetes* 1980; 29 (suppl 1): 31–44.
- 7 Hathout E, Lakey J, Shapiro J. Islet transplant: an option for childhood diabetes? *Arch Dis Child* 2003; 88: 591–94.
- 8 Hering BJ, Kandaswamy R, Ansari JD, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005; 293: 830–35.
- 9 Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Lakey JR, Bigam D, Shapiro AM. Beta-score: an assessment of beta-cell function after islet transplantation. *Diabetes Care* 2005; 28: 343–47.

## A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice

Hirofumi Noguchi<sup>1,2,3</sup>, Masayuki Matsushita<sup>1</sup>, Teru Okitsu<sup>2,3</sup>, Akiyoshi Moriwaki<sup>1</sup>, Kazuhito Tomizawa<sup>1</sup>, Sunghyun Kang<sup>4</sup>, Sheng-Tian Li<sup>1</sup>, Naoya Kobayashi<sup>2</sup>, Shinichi Matsumoto<sup>3</sup>, Koich Tanaka<sup>3</sup>, Noriaki Tanaka<sup>2</sup> & Hideki Matsui<sup>1,5</sup>

Calcineurin inhibitors such as cyclosporine A and FK506 have been used for transplant therapy and treatment of autoimmune diseases. However, the inhibition of calcineurin outside the immune system has a number of side effects, including hyperglycemia. In the search for safer drugs, we developed a cell-permeable inhibitor of NFAT (nuclear factor of activated T cells) using the polyarginine peptide delivery system<sup>1,2</sup>. This peptide provided immunosuppression for fully mismatched islet allografts in mice. In addition, it did not affect insulin secretion, whereas FK506 caused a dose-dependent decrease in insulin secretion. Cell-permeable peptides can thus provide a new strategy for drug development and may eventually be useful clinically.

Small domains called protein transduction domains have been developed for the delivery of bioactive peptides and proteins into eukaryotic cells<sup>1,2</sup>. These delivery systems have proven useful in answering important biological questions using cultured cells<sup>3–5</sup>. Recently, protein transduction domains were used to successfully deliver covalently attached proteins *in vivo* into all tissues in a mammal<sup>6</sup>. An important question is whether these strategies will be effective and safe if used as a peptide or protein drug for long-term treatment. To examine these important issues, we chose islet transplantation as a model for evaluating the peptide delivery system. An important mechanism whereby calcineurin promotes T cell activation and cytokine gene induction is largely attributed to a family of transcriptional regulators referred to as NFAT. The immunosuppressants cyclosporine A and FK506, which are used clinically to prevent transplant rejection, inhibit the activity of calcineurin phosphatase on all its protein substrates, including NFAT<sup>7,8</sup>. Although these drugs have revolutionized transplant therapy, their use is associated with progressive loss of renal function, hypertension, hyperglycemia, neurotoxicity and increased risk of malignancy<sup>9–12</sup>. Recently, an NFAT inhibitor peptide, VIVIT, was developed based on the conserved calcineurin docking site of the NFAT family<sup>13</sup>. The peptide interferes

selectively with calcineurin-NFAT interaction without affecting calcineurin phosphatase activity, so it may be useful as a therapeutic agent that is less toxic than current drugs.

For efficient *in vivo* delivery of the NFAT inhibitor peptide into T cells, we synthesized VIVIT peptide as a C-terminal fusion protein with 11-arginine (11R). Polyarginine facilitates the uptake of peptides and protein into cultured mammalian cells with high efficiency<sup>14–17</sup>. We also constructed a negative control peptide conjugate (11R-VEET) by scrambling the sequence of VIVIT amino acids. To examine whether 11R-VIVIT transduces lymphocytes, Jurkat cells were treated with FITC-conjugated 11R-peptides. Two hours after transduction, FITC-conjugated 11R-VIVIT and 11R-VEET were observed as a fluorescent signal in all living Jurkat cells (Fig. 1a). The transduction efficiency was the same for both peptides, and both were distributed throughout the cells.

To determine the effect of 11R-peptides on NFAT, we examined NFAT nuclear translocation and NFAT-dependent reporter activity. Inhibition of NFAT nuclear translocation was investigated in 293 cells transfected with GFP-NFAT-1 (ref. 13). The GFP-NFAT-1 signal was diffusely distributed in the cytoplasm and absent from the nucleus. After 20 min of stimulation with 500 nM ionomycin in the medium, alone or with 11R-VEET, the fluorescent GFP-NFAT-1 translocated to the nucleus (Fig. 1b). In contrast, the presence of 1  $\mu$ M 11R-VIVIT blocked the ionomycin-induced translocation of GFP-NFAT-1 from the cytoplasm to the nucleus (Fig. 1b,c). Strong inhibition of GFP-NFAT-1 nuclear localization was also observed with 1  $\mu$ M FK506 (Fig. 1b,c).

To demonstrate directly that 11R-VIVIT specifically inhibits the calcineurin-NFAT pathway, we examined NFAT-1- and NF- $\kappa$ B-dependent transcription activity in Jurkat cells. We transfected Jurkat cells with NFAT and NF- $\kappa$ B reporter plasmids, then treated the cells with 11R-VIVIT or 11R-VEET for 1 h and with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin for an additional 12 h. 11R-VIVIT specifically and significantly inhibited NFAT reporter activity, but did not inhibit NF- $\kappa$ B-dependent activity (Fig. 1d,e).

Departments of <sup>1</sup>Physiology and <sup>2</sup>Gastroenterological Surgery, Transplant and Surgical Oncology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama, 700-8558 Japan. <sup>3</sup>Department of Transplantation and Immunology, Kyoto University Hospital, 54 Kawara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507, Japan. <sup>4</sup>Department of Pathology, Harvard Medical School and the Center for Blood Research, 200 Longwood Avenue, Boston, Massachusetts 02115, USA. <sup>5</sup>Protein Therapy, Preventure Program, Office of Technology Transfer, Japan Science and Technology Corporation, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama, 700-8558 Japan. Correspondence should be addressed to M.M. (masayuki@cc.okayama-u.ac.jp).

Published online 8 February 2004; doi:10.1038/nm994