

することが示された。この研究により、M-Kyoto 溶液の膵島移植における重要性が証明された。この追加実験により、昨年申請していた膵島分離に用いる新しい溶液の特許に加えて、（特許願；整理番号 7862004JP；発明者 松本慎一、和田洋巳）膵島分離法として国際特許 PCT 出願を果たした。（特願 2005-211228；発明者 松本慎一、野口洋文、和田洋巳）現在では臨床膵島移植において UW 液に換えて、全例で M-Kyoto 溶液を使用している。膵島分離成功率は 84%と世界的に突出した良好な成績であり、世界中から技術指導の要請が来ている。実際に、米国、カナダ、フランス、UK、ペルー、韓国、中国、台湾から施設見学に来られ、また、松本自身、米国、フランス、UK、台湾の施設を訪問し、本年度は、ペルー、韓国、中国を訪問予定である。また、これらを背景に、マイアミ大学の Ricordi 教授が提唱した、世界の膵島移植最先端施設からなる、Diabetes Research Institute Federation の日本の Director に松本は就任した。

臨床膵島移植は着実に症例を伸ばして、膵島分離は 22 例で 17 例を合計 8 名の 1 型糖尿病患者に移植するとともに、残りの 5 例全例が凍結保存が可能であった。凍結保存膵島は、剣持敬、松本慎一らを委員とする、膵・膵島移植研究会の凍結膵島移植委員会で運営のルールを決定後臨床へ用いる。

本年度の研究において、臨床例でも重要な知見を得た。まず、5 例の複数移植の結果 3 名がインスリン離脱を達成できた。エドモントンプロトコールでは、脳死ドナーを用いることで 5 割から 8 割がインスリン離脱が可能であることが示されているが、我が国の心停止ドナーという厳しい条件でも、エドモントンプロトコールに匹敵する結果を示せた。つまり、膵島移植が近い将来、日本での重症糖尿病の治療のオプションとしてその地位を確立できる貴重な知見となった。一方、エドモントンプロトコールで使用する免疫抑制剤とくにシロリムスの副作用が我が国の膵島移植症例でも見られた。特に、

骨髄抑制、口腔内潰瘍、浮腫、卵巣嚢腫、生理不順が認められた。これらの副作用は、患者の QOL にはあまり影響を及ぼさない比較的軽微なものであるものの、その対応策として、シロリムスの減量とそれともなうミコフェノール酸モフェチルの導入を実施した。この結果副作用がほぼ解決し、膵島移植のさらなる安全性の確立ができた。

膵島移植研究の今後の課題であるが、まず、1 ドナーでの 1 人の糖尿病患者の完治、長期における成績の向上がある。よりよい研究環境をもとめて、分担研究者の松本は、膵臓手術で日本の第一人者の一人である宮川秀一教授がおられ、移植医療に対して日本をリードする藤田保健衛生大学に新しく、医学部外科教授（膵・膵島移植担当）として就任した。京都大学での心停止ドナーの大半が中日本地域からであり、藤田保健衛生大学で膵島移植を開始すれば、膵島分離で重要な保存時間の短縮が可能となる。藤田保健衛生大学ではすでに、膵島移植のための研究室が整い、臨床膵島移植のためのセルプロセスセンターが手術室の隣に設立されることが決定されており、年内での臨床開始を目標に全力で準備している。

尚、分担研究者の松本は、併任の京都大学医学部附属病院・臓器移植医療部で引き続き心停止ドナー膵島移植を続ける。

E. 結論

今回の研究により日本での膵島移植も欧米に匹敵する実績が得られ、特に膵島分離技術は、世界でも突出した成績が得られた。シロリムスの副作用は、ミコフェノール酸モフェチルを導入することで解消することが判明した。

F. 健康危険情報

エドモントンプロトコールに利用されるシロリムスにより、特に、骨髄抑制、口腔内潰瘍、浮腫、卵巣嚢腫、生理不順が認められた。これらの副作用は、患者の QOL 自身を下げることはほとんどないものの、ミコフェノール酸モフェチル導入

によりシロリムス減量すると改善することも判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表 (2005～)

(書籍)

1. 先端医療シリーズ 32 「糖尿病の最新医療」松本慎一 (先端医療技術研究所) 東京 7-11 ; 2005
2. 分子糖尿病学の進歩—基礎から臨床まで;松本慎一 (金原出版株式会社) 東京 122-127; 2005
3. 臨床免疫学;松本慎一 (日本臨牀) ;東京;695-699; 2005
4. 膵島移植と膵臓移植療法の位置づけ 松本慎一 ファーマナビゲーター糖尿病編; 100-108, 2005
5. 膵島移植の現状 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 松本慎一 50-55, 2006
6. Pancreas Preservation S. Matsumoto, H. Noguchi, N. Kobayashi, A. Gruessner, DER Sutherland. Basic concept of organ procurement, perfusion and preservation for transplantation; R.G.Landes (in press)
7. 松本慎一 生体膵移植・膵島移植 小児・思春期糖尿病管理の手びき、日本糖尿病学会 編集 (印刷中)

(雑誌)

1. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, et al. Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet* 2005; 365: 1642-1644.
2. Matsumoto S, Tanaka K. Pancreatic

islet cell transplantation using non-heart-beating-donors (NHBDS). *J of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 2005; 12: 227-230.

3. Matsumoto S. Clinical application of perfluorocarbons for organ preservation. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 2005; 33: 75-78.
4. Matsumoto S, Iwanaga Y, Okitsu T, et al. Analysis large scale nonhuman primate islet isolation *Transplant Proc* 2005; 37:1317-1321.
5. Noguchi H, Susan Bonner Weir, Wei FY, Matsushita M, Matsumoto S. BETA2/NeuroD protein can be transduced into cells due to an arginine- and lysine-rich sequence. *Diabetes* 2005; 54: 2859-2866.
6. Noguchi H, Nakai Y, Matsumoto S et al. Cell permeable peptide JNK inhibitor prevents islet apoptosis immediately after isolation and improves islet graft function. *Am J Transplant* 2005; 5: 1848-1855.
7. Noguchi H, Matsushita M, Matsumoto S et al. Mechanism of PDX-1 protein transduction. *Biochem Biophys Res Comm* 2005: 332: 68-74.
8. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga H, et al. Insulin independence of unstable diabetic patient after single living donor islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3427-3429.
9. Matsumoto S, Yamada Y, Okitsu T, et al. Simple evaluation of engraftment by secretory unit objects (SUITO) for living donor and cadaveric donor fresh or cultured islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3435-3437.
10. Okitsu T, Matsumoto S, Iwanaga Y, et al. Kyoto islet isolation method – the optimized one for non-heart-beating donors with highly efficient islet

- retrieval. *Transplant Proc* 2005; 37: 3391-3392.
11. Nagata H, Matsumoto S, Okitsu T, et al. In situ cooling of pancreata from non-heart-beating-donors prior to procurement for islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3393-3395.
 12. Saito T, Ise K, Sato Y, Gotoh M, Matsumoto S et al. The start of an islet transplantation program in Japan. *Transplant Proc* 2005; 37: 3424-3426.
 13. Yonekawa Y, Matsumoto S, Okitsu T, et al. Effective islet isolation method with extremely high islet yields from adult pigs. *Cell Transplant* 2005; 14: 575-562.
 14. Matsumoto S, Noguchi H, Yonekawa Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Liu X, Nagata H, Kobayashi N, Ricordi C. Pancreatic islet transplantation for treating diabetes. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2006; 6: 23-37.
 15. Noguchi H, Ueda M, Nakai Y, Iwanaga Y, Okitsu T, Nagata H, Yonekawa Y, Kobayashi N, Nakamura T, Wada H, Matsumoto S. Modified two-layer preservation method (M-Kyoto/PFC) improves islet yields in islet isolation. *Am J Transplant* 2006, 6, 496-504.
 16. Noguchi H, Matsumoto S. Protein transduction technology: A novel therapeutic perspective. *Acta Medica Okayama* 2006; 60: 1-11.
 17. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, et al. Successful islet transplantation from non-heart-beating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. *Transplantation* (in press)
 18. Nagata H, Matsumoto S, Okitsu T, et al. Procurement of the human pancreas for pancreatic islet transplantation from marginal cadaver donors. *Transplantation* (in press)
 19. Noguchi H, Matsumoto S, Okitsu T, et al. PDX-1 protein is internalized by lipid raft – dependent macropinocytosis. *Cell Transplant* (in press)
 20. Noguchi H, Matsumoto S, Matsushita M, et al. Immunosuppression for islet transplantation. *Acta Medica Okayama* (in press)
 21. Ikeda H, Kobayashi N, Matsumoto S, et al. A newly developed bioartificial pancreas successfully controls blood glucose in totally pancreatectomized diabetic pigs. *Tissue Engineering* (in press)
 22. Miki A, Narushima M, Matsumoto S, et al. Maintenance of mouse rat and pig pancreatic islet function by co-culture with human islet-derived fibroblasts. *Cell Transplant* (in press)
 23. Sassa M, Fukuda K, Fujimoto S, Toyoda K, Fujita Y, Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Ohara T, Okamoto M, Tanaka K, Seino Y, Inagaki N, Yamada Y. A single transplantation of the islets can cause glycemic stability and reduction of basal insulin requirement. *Diabetes Research and Clinical Practice* (in press)
 24. Yonekawa Y, Okitsu T, Wake K, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Liu X, Kobayashi N, Matsumoto S. A new mouse model for intraportal islet transplantation with limited hepatic lobe as a graft site. *Transplantation* (in press)
 25. Yamada Y, Fukuda K, Fujimoto S, Hosokawa M, Tsukiyama K, Nagashima K, Fukushima M, Suzuki H, Toyoda K, Sassa M, Funakoshi S, Inagaki N, Taniguchi A, T. Sato S, Matsumoto S, Tanaka K, Seino Y. SUIT, secretory units of islets in transplantation: an index for

- therapeutic management of islet transplanted patients and its application to type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* (in press)
26. 松本慎一、田中紘一 生体膵島移植 医学のあゆみ 2005; 213: 765.
 27. 松本慎一 膵島移植にまつわる最近の話題 先端医療シリーズ「糖尿病の最新医療」2005
 28. 松本慎一 膵島移植 内分泌・糖尿病科 2005; 20: 503-510.
 29. 松本慎一 重症糖尿病の治療としての膵島移植 医報とやま 2005; 1385; 8-10.
 30. 松本慎一 膵島移植の実際ー外科から 糖尿病診療マスター 2005; 3: 614-618
 31. 松本慎一 ここまできた糖尿病の外科治療 糖尿病診療マスター 2005; 3: 629-633.
 32. 松本慎一 心臓死ドナーおよび生体ドナー膵島移植 メディカル朝日 2005; 34: 60-61.
 33. 松本慎一 膵島移植の現状と今後 静岡腎臓バンクだより 2005; 21: 4.
 34. 松本慎一 膵島移植治療の現在 看護技術 2005; 51: 41-44.
 35. 興津輝、松本慎一ら 臨床膵島移植のための膵島分離技術 再生医療 2005; 3: 81-89.
 36. 野口洋文、松本慎一ら PDX-1 蛋白導入システムによる膵島再生への効果 再生医療 2005; 8: 19-24.
 37. 野口洋文、松本慎一ら 膵β細胞再生を目指した新規分化誘導法の確立 今日の移植 2005; 18: 424-428.
 38. 興津輝、松本慎一ら 京都大学における膵島移植 今日の移植 2005; 18; 409-414
 39. 野口洋文、松本慎一ら 蛋白導入システムによる薬剤開発と膵島移植への応用 岡山医学会雑誌 2005; 117; 105-108.
 40. 永田英生、松本慎一ら 1型糖尿病に対する移植療法の進歩 Mebio 2005; 22; 87-91.
 41. 松本慎一、興津輝、岩永康裕、野口洋文、米川幸秀、永田英生 Cutting Edge 膵島移植 Medical Science Digest 2006; 32; 4-5.
 42. 松本慎一 膵島移植の現況 移植 2005; 40; 348-357.
 43. 松本慎一 1型糖尿病の膵移植・ラ氏島移植の現状と将来:Brush Up! CDE 糖尿病診療マスター 2006 増刊号 2006; 4; 135-139
 44. 松本慎一 組織移植の現状と展望 膵島移植 日本外科学会誌 2006; 107, 86-89.
 45. 松本慎一 膵島移植における mTOR 阻害剤の使用経験 今日の移植 (印刷中)
 46. 松本慎一 膵島移植 脳死・脳蘇生 (印刷中)
 47. 松本慎一 糖尿病の生体膵移植と膵島移植 糖尿病最新の治療 2007-2008 (印刷中)
 48. 松本慎一 再生医療シリーズ「ラ氏島移植」Organ Biology (印刷中)
 49. 松本慎一 生体膵島移植 Diabetes Journal (印刷中)

2. 学会発表 (2005～)

国際学会

1. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, et al. Insulin independence of unstable diabetic patient after single living donor islet transplantation. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
2. Iwanaga Y, Matsumoto S, Okitsu T, et al. The success case of pancreas donation for living donor islet transplantation. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
3. Okitsu T, Matsumoto S, Iwanaga Y, et al. Kyoto islet isolation method- the optimized one for non-heart-beating donor with highly efficient islet retrieval. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
4. Nagata H, Matsumoto S, Okitsu T, et al. In situ cooling of pancreata from non heart beating donors (NHBDS) prior to procurement for islet isolation. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
5. Saitoh T, Ise K, Matsumoto S, et al. Islet transplantation program in Japan. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
6. Noguchi H, Matsumoto S, Okitsu T, et al. Islet transplantation using Kyoto protocol from non heart-beating donors. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
7. Matsumoto S, Yamada Y, Okitsu T, et al. Simple evaluation of secretory unit of islet transplant objects (SUITO) for living donor and cadaveric donor fresh or cultured islet transplantation. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7

8. Yonekawa Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Matsumoto S, et al. A new model for mouse intrahepatic islet transplantation. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
9. Yonekawa Y, Matsumoto S, Okitsu T, et al. A method for large scale porcine islet isolation. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
10. Iwanaga Y, Matsumoto S, Yonekawa Y, et al. The extract of green tea, polyphenol is effective for cryopreservation of porcine islets. 10th World congress of international pancreas and islet transplant association 2005 May 4-7
11. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, et al. Successful islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes from non-heart beating donors. American Transplant Congress 2005 May 21-25
12. Matsumoto S. Islet Transplantation-Kyoto Experiences 27th Annual Meeting of Endocrine Society and Diabetes Association of the R.O.C 2006 March 25-26

全国学会

13. 松本慎一、興津輝、岩永康裕ら 心臓死ドナーからの新鮮および培養膵島移植 第 38 回日本臨床腎移植学会 平成 17 年 1 月 27 日
14. 原美幸、神野哲夫、松本慎一ら 藤田保健衛生大学病院における膵島提供のコーディネートについて 第 38 回日本臨床腎移植学会 平成 17 年 1 月 27 日
15. 82. 永田英生、松本慎一、興津輝ら 腎摘出医と膵臓摘出医の連携によって成功した、心停止ドナーからの膵島移植 第 38 回日本臨床腎移植学会 平成 17 年 1 月 27 日
16. 松本慎一 膵島移植に関する最近の話題 第 27 回糖尿病治療研究会 平成 17 年 2 月 26 日

17. 松本慎一 京都大学における膵島移植
第 9 回組織工学・再生医学ワークショップ
平成 17 年 3 月 12 日
18. 松本慎一 特別報告:世界初の生体膵
島移植 第 33 回膵・膵島移植研究会
平成 17 年 3 月 19 日
19. 松本慎一、興津輝、岩永康裕ら 心臓死
ドナーからの新鮮および培養膵島移植
第 33 回膵・膵島移植研究会 平成 17
年 3 月 18-20 日
20. 84. 興津輝、岩永康裕、松本慎一ら 心
臓死ドナーからの膵臓摘出法について
第 33 回膵・膵島移植研究会 平成 17
年 3 月 18-20 日
21. 松本慎一 膵島移植の最近の話題につ
いて 第 12 回細胞治療研究会 平成 17
年 4 月 12 日
22. 興津輝、松本慎一、岩永康裕ら京都大
学における膵島移植 21 世紀 COE シン
ポジウム 平成 17 年 4 月 14 日
23. 野口洋文、岩永康裕、松本慎一ら膵β細
胞再生を目指した新規分化誘導法の確
立 21 世紀 COE シンポジウム 平成 17
年 4 月 14 日
24. 興津輝、松本慎一、岩永康裕ら 本邦に
おける心停止ドナー膵島移植-エドモン
トン・プロトコールからの検討 第 105 回日
本外科学会 平成 17 年 5 月 11-13 日
25. 8 米川幸秀、松本慎一、興津輝ら マウ
ス経門脈的肝右葉選択的膵島移植モデ
ルの完成 第 105 回日本外科学会 平
成 17 年 5 月 11-13 日
26. 松本慎一 心臓死ドナーおよび生体ドナ
ー膵島移植 第 48 回日本糖尿病学会
平成 17 年 5 月 12 日
27. 松本慎一、興津輝、永田英生ら 心臓死
ドナー膵島移植による 1 型糖尿病の治療
第 48 回日本糖尿病学会 平成 17 年 5
月 12-14 日
28. 野口洋文、松本慎一、興津輝、ら再生膵
β 細胞移植を目指した新規分化誘導法
の確立 第 48 回日本糖尿病学会 平成
17 年 5 月 12-14 日
29. 松本慎一 膵島移植の治療成績-生体
ドナーの安全性を含めて-第 53 回日本
輸血病学会 平成 17 年 5 月 26 日
30. 松本慎一膵島移植 UPDATE 第 6 回糖
尿病と生活習慣病治療研究会 平成 17
年 5 月 28 日
31. 松本慎一 日本における膵島移植の現
状 第 18 回日本脳死・脳蘇生学会 平
成 17 年 6 月 3 日
32. 野口洋文、興津輝、松本慎一ら 膵島分
離時における c-Jun NH2-terminal
kinase 活性化と、抑制剤投与による膵
島移植成績への影響 第 22 回胆膵生
理機能研究会 平成 17 年 6 月 25 日
33. 永田英生、岩永康裕、松本慎一ら 心臓
死ドナーを用いた膵島移植の確立第 22
回胆膵生理機能研究会 平成 17 年 6
月 25 日
34. 米川幸秀、興津輝、松本慎一ら 当院で
のブタ膵島分離の初期経験 第 4 回日
本組織移植学会 平成 17 年 8 月 27 日
35. 永田英生、岩永康裕、松本慎一ら 心臓
死ドナーからの臨床膵島移植成功にむ
けて膵臓摘出法の確立 第 4 回日本組
織移植学会 平成 17 年 8 月 27 日
36. 松本慎一 膵島移植の更なる成績向上
を目指して 第 11 回糖尿病治療を考
えるフォーラム 平成 17 年 10 月 1 日
野口洋文、岩永康裕、松本慎一ら 心停止ド
ナーを用いた臨床膵島移植の確立 第
4 回日本組織移植学会 平成 17 年 8 月
27 日

37. 松本慎一、岩永康裕、興津輝ら 生体ドナー膵島移植による重症糖尿病の治療 第4回日本組織移植学会 平成17年8月27日
38. 興津輝、岩永康裕、松本慎一ら 本邦における新鮮膵島移植のための心停止ドナー膵島分離法の確立と実施 第4回日本組織移植学会 平成17年8月27日
39. 岩永康裕、松本慎一、米川幸秀ら 緑茶ポリフェノールのブタ膵島凍結保存における有用性 第8回日本組織工学会 平成17年9月1,2日
40. 松本慎一 生体膵島移植 第32回日本低温医学会総会 平成17年11月25日
41. 松本慎一 日本 IDDM ネットワーク創立10周年 1型糖尿病を考える全国フォーラム 膵島移植～1型糖尿病根治へのロードマップ～ 平成18年1月28日
42. 松本慎一 本邦における膵島移植の進展 第4回再生医療学会 平成18年3月8日
43. 松本慎一 生体膵島移植の臨床展望 第33回膵・膵島移植研究会 平成18年3月18日
44. 松本慎一 小児期膵切除後のインスリン依存状態糖尿病に対する生体ドナー膵島移植世界初成功例 第106回日本外科学会 総会 平成18年3月29日
45. 松本慎一 膵島移植の現況第35回南大阪糖尿病セミナー平成17年2月12日
46. 松本慎一 膵島移植 UPDATE 第34回筑後佐賀糖尿病学術講演会 平成17年4月15日
47. 松本慎一 膵島移植の現況第18回 西 招待講演
- 三河糖尿病研究会 平成17年4月21日
48. 松本慎一 膵島移植の現況第26回 臓器移植談話会 平成17年5月16日
49. 松本慎一 膵島移植について 福井赤十字病院移植談話会 平成17年9月2日
50. 松本慎一 膵島移植の現況 第43回日本糖尿病学会中四国地方会 平成17年11月12日
51. 松本慎一 膵島移植ワーキンググループ 第8回 近畿膵移植検討会 平成17年11月26日
52. 松本慎一 糖尿病の新しい治療法 膵島移植 第39回名古屋糖尿病イブニングカンファレンス 平成18年1月26日
53. 松本慎一 1型糖尿病 膵島移植について 第7回西東京 EBM をめざす糖尿病薬物治療研究会 平成18年2月4日
54. 松本慎一 膵島移植アップデート 第2回徳島移植後管理検討会 平成18年2月7日
55. 松本慎一 膵島移植現状と展望 第2回生活習慣病の未来の治療を考える会 平成18年3月11日
56. 松本慎一 膵島移植の最近の話題 第4回信州糖尿病研究会 平成18年3月14日
57. 松本慎一 膵島移植に関する最近の話題 第7回札幌臨床糖尿病研究会 平成18年4月8日
58. 松本慎一 膵島移植の現状と展望 第34回大阪臨床糖尿病研究会 平成18年4月15日

59. Matsumoto S. Puget Sound Blood Center. Islet Transplantation in Japan. May 2005, Seattle
平成 16 年 12 月 22 日
出願番号：特願 2005-211228
発明者：松本慎一、和田洋巳
発明の名称：膵島細胞の分離方法
出願人：国立大学法人京都大学
出願日：平成 17 年 7 月 21 日
(基礎となる出願：特願 2004-370732)
(優先日：2004 年 12 月 22 日)
60. Matsumoto S. Islet transplantation at Kyoto University. University of Miami June 30th 2005, Miami
61. Matsumoto S. Living donor islet transplantation – The first success and challenge Grand Rounds Lecture Baylor University November 30th 2005, Dallas
PCT 出願
発明者：松本慎一、野口洋文、和田洋巳
平成 17 年 12 月 22 日
62. Matsumoto S. Islet transplantation Project at Kyoto University. Road Map to Cure for Type 1 Diabetes. Baylor University November 30th 2005, Dallas
2. 実用新案登録
なし
63. Matsumoto S. Pancreatic islet cell transplantation from a living donor – The world's first case. The Fort Worth club December 1st 2005, Fort Worth
3. その他
新聞報道
添付書類参照
64. Matsumoto S. Islet transplantation in Kyoto including live donor. Baylor Research Institute February 16, 2006, Dallas
65. Matsumoto S. Islet transplantation Project for Diabetes at Kyoto University. Franco-Japanese Translational Research Initiative (1st) February 25, 2006, Kyoto
66. Matsumoto S. Islet transplantation current status and goal. Kamogawa Juku March 4th, 2006, Kyoto
67. Matsumoto S. Living donor islet transplantation. World First Success. Chung Gung Memorial Hospital March 26th, 2006, Taipei

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許願 整理番号 7862004JP
発明者 松本慎一、和田洋巳
識別番号 100065215
受付番号 50402196503
出願番号通知 2004-370732
発明の名称 組織保護又は保存液

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
剣持 敬	膵島移植の現状と将来の可能性	門脇 孝ら	カラー版糖尿病学	西村書店	東京	2005	
剣持 敬	膵島移植		医学大辞典 第19版1刷	南山堂	東京	2006	1307
松本慎一	糖尿病の最新医療		先端医療シリーズ 32	先端医療技術研究所	東京	2005	7-11
松本慎一			分子糖尿病学の進歩－基礎から臨床まで	金原出版	東京	2005	122-127
松本慎一			臨床免疫学	日本臨牀	東京	2005	695-699
松本慎一	膵島移植と膵臓移植療法の位置づけ		ファーマナビゲーター糖尿病編			2005	100-108
松本慎一	膵島移植の現状		Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌			2006	50-55

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
剣持 敬、他	●特集 21世紀の新しい外科治療 移植 膵臓・膵島移植	現代医療	36	97-102	2004
Kenmochi T, et al.	Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants.	Transplant Proc	36(4)	1133-1134	2004
Kenmochi T, et al.	Laparoscopic distal pancreatectomy as the total biopsy of the pancreas: tool of minimally invasive surgery.	Hepatobiliary Pancreat Surg	11(4)	290-292	2004
Kenmochi T, et al.	Effects of carbon-ion beams on human pancreatic cancer cell lines that differ in genetic status.	Am J Clin Oncol	27(1)	24-28	2004
剣持 敬、他	1型糖尿病に対する膵島移植	看護技術	50(13)	1-4	2004
剣持 敬、他	1型糖尿病における膵ラ氏島移植の現状と将来	Diabetes Frontier	5(15)	679-684	2004
剣持 敬、他	わが国における臨床膵島移植の新しい展開と将来展望	再生医療	3(4)	69-76	2004
剣持 敬、他	当施設の献腎摘出方法	Organ Biology	12(1)	39-46	2005
剣持 敬、他	臨床に向けた膵島保存の現状	Organ Biology	12(2)	101-111	2005
剣持 敬、他	わが国初の生体部分膵・腎同時移植の1症例	移植	40(5)	466-472	2005
Kenmochi T, et	Hemodynamic changes of splenogastric	Surgery	138(3)	518-522	2005

al.	c circulation after spleen-preserving pancreatectomy with excision of splenic artery and vein.				
剣持 敬	日本の膵島移植の現況は？	肥満と糖尿病	5(2)	286-288	2006
剣持 敬、他	臨床膵島移植の現状と展望	医学のあゆみ			
Matsumoto S, et al	Insulin independence after living-donor or distal pancreatectomy and islet allotransplantation.	<i>Lancet</i>	365	1642-1644	2005
Matsumoto S, et al	Pancreatic islet cell transplantation using non-heart-beating-donors (NHB Ds).	<i>J of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery</i>	12	227-230	2005
Matsumoto S.	Clinical application of perfluorocarbons for organ preservation.	<i>Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology</i>	33	75-78	2005
Matsumoto S, et al	Analysis large scale nonhuman primate islet isolation	<i>Transplant Proc</i>	37	1317-1321	
Matsumoto S, et al	Insulin independence of unstable diabetic patient after single living donor islet transplantation.	<i>Transplant Proc</i>	37	3427-3429	2005
Matsumoto S, et al	Simple evaluation of engraftment by secretory unit objects (SUITO) for living donor and cadaveric donor fresh or cultured islet transplantation.	<i>Transplant Proc</i>	37	3435-3437	2005
松本慎一、他	生体膵島移植	医学のあゆみ	213	765	2005
松本慎一	膵島移植	内分泌・糖尿病科	20	503-510	2005
松本慎一	膵島移植の実際ー外科から	糖尿病診療マスター	3	614-618	2005
松本慎一	ここまできた糖尿病の外科治療	糖尿病診療マスター	3	629-633	2005
松本慎一	膵島移植治療の現在	看護技術	51	41-44	2005
松本慎一	膵島移植の現況	移植	40	348-357	2005
松本慎一	1型糖尿病の膵移植・ラ氏島移植の現状と将来:Brush Up! CDE	糖尿病診療マスター	4	135-139	2005
松本慎一	組織移植の現状と展望	日本外科学会誌	107	86-89	2005

IV. 刊行成果（単行書、雑誌）別刷

膵臓・膵島移植

剣持 敬^{1)*}, 丸山 通広¹⁾, 浅野 武秀²⁾

1) 国立佐倉病院 外科 (*医長)

2) 千葉県がんセンター 消化器外科 (部長)

はじめに

移植医療は臓器不全に対する臓器置換根治療法として20世紀初頭に立ち上がり、20世紀後半には本格的に臨床応用され、定着してきた。現在、腎臓移植、肝臓移植、心臓移植は、重症腎不全、肝不全、心不全に対する究極の根治療法として確立されている。しかし、倫理的問題、ドナー不足、免疫抑制剤による副作用、医療費など多くの問題点を抱えていることも事実である。移植医療の21世紀における発展の方向は、これらの問題点を解決する方向で進めるべきであると考えられる。臓器移植および組織移植は、広義の再生医療の範疇に入り、不全に陥った臓器・組織を自己以外の臓器・組織で再生させるものである。「自己以外」が移植医療の本質であるが、同時に前述した問題点を生み出している。したがって、自己細胞、自己組織よりの再生医療が、移植医療に代わる21世紀の新しい医療として発展すべき方向であると考えられる。

膵臓移植³⁾は、インスリン依存型糖尿病に対する根治療法として欧米においては定着しており、我が国でも脳死ドナーからの膵臓移植が行

われている¹⁾。移植技術の向上、免疫抑制剤の進歩などに伴い、現在膵臓移植の成績は腎臓移植、肝臓移植などの成績と同等であり、安全性もほぼ確立しているといえる²⁾。一方、膵島移植⁴⁾は、安全性の高い、低侵襲の根治療法である。長くその成績は不良であり実験的医療の感が強かった³⁾が、近年欧米において成績が向上しており、医療としての現実性がみえてきた⁴⁾。我が国でも、膵・膵島移植研究会ワーキンググループの数年にわたる活動の成果として、2003年度中の膵島移植開始が見込まれており、今後の成績が期待される。

本稿では、20世紀の実績をもとに、21世紀の外科治療としての膵臓および膵島移植がどのように展開していくべきか考察したい。

膵臓・膵島移植の歴史と現状

1. 膵臓移植

膵臓移植は、1966年米国において最初の臨床例が施行された⁵⁾。当時は、拒絶反応に加えて移植手技に起因する合併症のため移植膵が廃絶する例が多く⁶⁾、移植後血栓症予防、膵液ドレナー

注) 用語解説参照

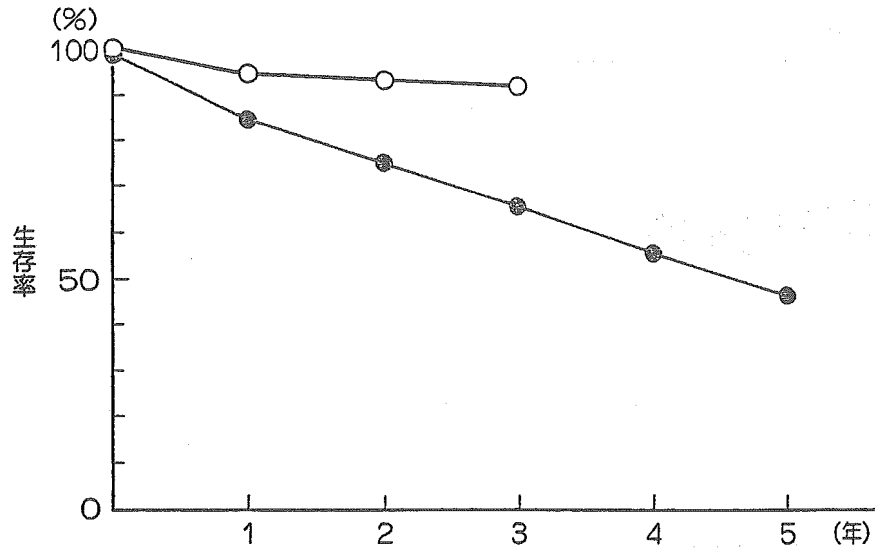


図 1. 我が国の糖尿病腎症 1983 年以降透析導入患者と 1997~2001 年米国膵腎同時移植患者の予後

- : 我が国の糖尿病腎症 1983 年以降透析導入患者 (n=117,389)
- : 1997~2001 年米国膵腎同時移植患者 (n=3,891)

シ法の実験的・臨床的研究が多数実施されている。臨床例が急増し、成績が飛躍的に向上したのは 1980 年代に入ってからであり、他の臓器移植と同様 cyclosporin (CsA) が登場したためである。その後ミネソタ大学などの先進施設が世界をリードし、2000 年 10 月までの症例数は 16,000 例を超えている²⁾。

膵臓移植は、膵腎同時移植 (SPK)、腎移植後膵臓移植 (PAK)、膵臓単独移植 (PTA) の三つに分類されるが、全症例の約 85% は SPK である。また PAK は 10% を占める。すなわち、膵臓移植は腎臓と同時性または異時性に行われることがほとんど (95%) である。その成績をみても、1994~1998 年に米国で行われた膵臓移植例の 1 年生着率は、SPK が 83% と、PAK の 71%、PTA の 64% に比較して良好である²⁾。これら世界の現状よりいえることは、膵臓移植は糖尿病の根治療法というより、(糖尿病)腎不全の根治療法としてきわめて有効であるという事実である。我が国の透析導入原因疾患の 1 位を占める糖尿

病腎症は、透析導入後の 5 年生存率が 49.8% ときわめて予後不良である⁷⁾。SPK の 3 年生存率が 90% 以上であることより、膵臓移植はそのほとんどが SPK として施行されており、糖尿病腎不全の救命医療として位置付けられる (図 1)。一方、腎不全を伴わない 1 型糖尿病に施行される PTA は、厳密な内科治療に抵抗性で、低血糖発作や合併症の進行などにより著しく QOL が低下している場合に行われるものであり、真の糖尿病根治療法といえる。当初は生着率が低かったが、最近では 1 年生着率が 78% と SPK とほぼ同等の成績になった。この最も大きな要因は、最近の免疫抑制法の向上である。PTA では拒絶反応の診断が困難であり、成績向上のためには拒絶反応を完全に抑制する免疫抑制法が望まれる。calcineurin inhibitor として tacrolimus (FK) が登場したこと、腸管からの安定した吸収を可能とした CsA 製剤である Neoral® が開発されたこと、代謝拮抗薬として従来 azathioprine に比較してより強力な

表 1. 我が国の膵臓移植症例(臓器移植法実施後)

症 例	1	2	3	4	5	6	7*1	8	9	10
移植実施日	H12.4.25	H13.1.8	H13.1.21	H13.7.26	H13.8.17	H13.11.3	H13.12.29	H14.1.2	H14.8.30	H14.11.14
ドナー年齢・性	50代・女	30代・男	50代・女	10代・女	40代・男	20代・女	30代・女	40代・男	30代・女	30代・男
レシピエント年齢・性	30代・男	30代・男	30代・男	40代・男	30代・女	20代・女	30代・女	30代・女	30代・男	30代・女
透析期間(年)	4	5	5	2	7	3	2	1,KTx	11	6
インスリン歴(年)	17	23	25	22	27	20	17	21	27	29
待機日数	200	458	389	639	685	764	156	395	975	1,139
術 式	SPK/BD	SPK/BD	SPK/BD	SPK/ED	SPK/ED	SPK/ED	SPK/BD	SPK/BD	SPK/BD	SPK/ED
免疫抑制療法	F/M/P	CsA/M/P	CsA/M/P	F/M/P	F/M/P	F/M/P	F/M/P	F/M/P	F/M/P	F/M/P
インスリン離脱日数	42	なし	83	12	103	0	30	200	0	0
膵生着	生着中	廃絶*2	生着中	生着中	生着中	生着中	生着中	生着中	生着中	生着中

SPK：膵腎同時移植, PAK：腎移植後膵移植, BD：膀胱ドレナージ, ED：腸管ドレナージ, KTx：腎移植, F：tacrolimus, CsA：cyclosporin A, M：ミコフェノール酸モフェチル(MMF), P：ステロイド.

*1：心停止ドナーからの移植,*2：静脈血栓症にて移植膵摘出

(本データは膵臓移植実務者委員会提供)

mycophenolate mofetil(MMF, Cellcept®)が開発されたことが大きい。また、膵臓移植においては、移植後初期の autoimmunity(自己免疫反応)の回避のため ALG, OKT3 などが使用されている。最近では、抗 CD25 抗体である daclizumab(Zenapax®), basiliximab(Simulect®)が開発され、膵臓移植のさらなる成績向上に寄与する可能性がある。

一方我が国では、1984年筑波大学で脳死 SPK が行われた⁸⁾が、その後は心停止ドナーからの膵腎同時移植が主流となり 1993年までに東京女子医科大学を中心に 14例が行われた。我が国の脳死下臓器移植に関する議論、法整備のため一時中断を余儀なくされたが、2002年4月に大阪大学において臓器移植法実施後初めての脳死 SPK が行われた⁹⁾。以後現在までに 10例の膵臓移植(SPK9例, PAK1例)が行われている(表 1)。我が国の膵臓移植の特徴として、いわゆる marginal donor(高齢, 長期死線期, 昇圧剤投与など)の頻度が高いことが挙げられる。これを反映してか、10例中 5例が移植後のインス

リン離脱に 30日以上要している。さらに、今後の長期の膵機能(内分泌機能)の維持への影響も心配される。しかし、その成績は、1例を除き移植後 8ヵ月~3年 3ヵ月経過して生着中ときわめて良好である。我が国における膵臓移植実施の際には、実施認定施設の実務者が中心となる実務者委員会が支援する体制となっており¹⁾、移植後の経過や問題点についても常に全国チームとして情報交換し、全国レベルでのカンファレンスが行われている。このシステムの構築が、欧米に比較して限られた症例数でも良好な成績を得ている結果につながったと考えられる。

2. 膵島移植

膵島移植の歴史は古く、1894年にはヒツジ膵を用いた異種移植が行われているが、臨床同種膵島移植は 1974年ミネソタ大学により行われた¹⁰⁾。1988年に Ricordi らにより自動膵島分離装置が開発された¹¹⁾のを契機に、1990年代に臨床膵島移植症例数が増加している。しかし、2000年までの世界の症例数は 493例と他の臓器移植数に比較して少なく、限られた施設にて行われ

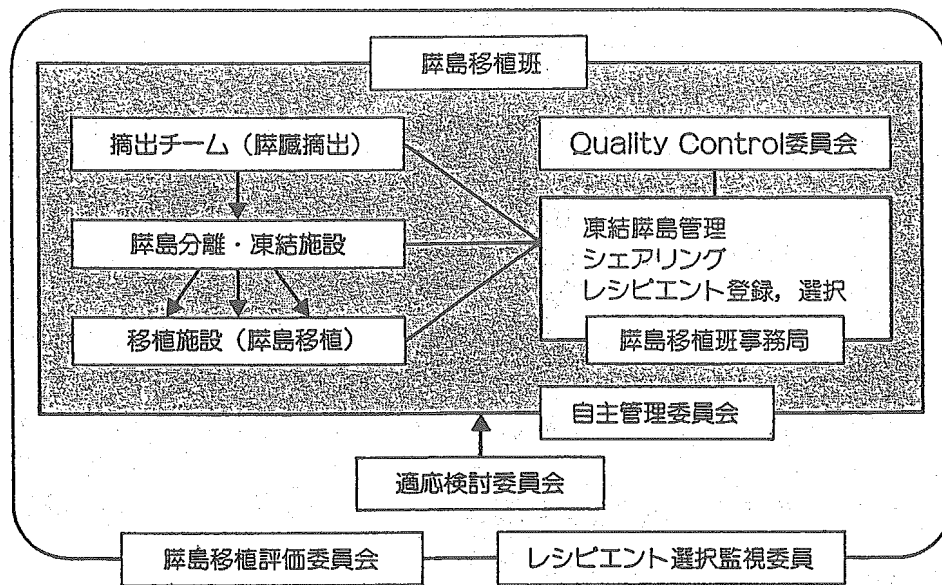


図 2. 我が国における膵島移植実施体制

(膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」2002年5月)

る実験的医療であった¹²⁾。その大きな理由は、移植成績(生着率)の低さであった。1990～1999年に1型糖尿病患者に対し行われた同種膵島移植後の1年インスリン離脱率は、11%に過ぎなかった¹²⁾。2000年カナダのアルバータ大学が考案したEdmonton protocolによりきわめて高いインスリン離脱率が報告され¹³⁾、膵島移植の状況は一変した。初期に行った7例全例にインスリン離脱が得られたというセンセーショナルな結果であった。以後同大学では症例を重ね、2003年3月には50例に達している。そのうちEdmonton protocolに従って行われた17例の移植後1年、2年の累積インスリン離脱率は、それぞれ81.6%、53.0%と良好であり、膵臓単独移植に匹敵するものである¹⁴⁾。Edmonton protocolの好成績のポイントは、①十分量の新鮮膵島を分離後速やかに移植する、②インスリン離脱が得られなければ再移植を行う、③腎不全を伴わない1型糖尿病を対象とする、④ステロイドを用いない免疫抑制法を行う、などが挙げられる。とくに注目すべきは免疫抑制法である。

膵島への毒性を有するステロイドは使用せず、tacrolimusも低量に抑えている。またsirolimus (Rapamune®)はT細胞内シグナル伝達経路の中でRAS/MAPK系をブロックすることが知られているが、筆者らの研究においても膵島の拒絶にはCa/CN系より、RAS/MAPK系が強く関与しているデータが得られている。現在Edmonton protocolは世界各国で追試されており、膵島移植医療のスタンダードといえる。

一方我が国では、1996年臨床膵島移植実施を目的として、膵・膵島移植研究会ワーキンググループ「膵島移植班」(事務局：国立佐倉病院外科)を組織し、全国統一チームとして臨床実施準備を進めており、医学的検討、実施体制作り、レシピエント適応検討・登録などを行ってきた。膵島移植班では、ネットワーク内にQuality Control委員会、自主管理委員会、適応検討委員会、膵島移植評価委員会を設置し、公平・公正に移植を遂行するシステムを構築した(図2)。膵島移植は、その性格から日本組織移植学会のガイドライン^{15,16)}に沿い、組織移植の範疇で

表 2. 我が国の膵島移植適応基準

膵島移植適応基準	
1. 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、膵島移植に関して、本人、家族、主治医の同意が得られている。
2. 禁 忌	
1)	重度の心疾患、肝疾患(心移植または肝移植と同時に行う場合には考慮する)。
2)	アルコール中毒。
3)	感染症。
4)	悪性腫瘍(5年以内に既往がないこと)。
5)	重症肥満。
6)	未処置の網膜症。
7)	その他移植に適さないもの。

行っていくこととなった。そして、2002年に膵島移植実施マニュアルを完成させた¹⁷⁾。その後、厚生労働省、日本組織移植学会、日本臓器移植ネットワークなどとの調整を行い、現在我が国の膵島移植実施体制が完成した。

提供者(ドナー)は心停止ドナーが主になるが、脳死ドナーでも脳死下臓器摘出後に家族の承諾を得て行うことが可能である。膵臓の保存は、米国でのヒト膵島分離に有効性が確認されており¹⁸⁾、神戸大学2層法を用いることを原則とする。

膵島移植の適応基準は、我が国の脳死膵臓移植の適応基準¹⁹⁾、Edmonton protocolを参考にして表2に示すような適応とした。適応基準を満たす希望者は、膵島移植班内の適応検討委員会にて適応が決定されるが、とくに審査の対象となるのは内因性インスリンの枯渇の証明、血糖の不安定性であり、高感度C-peptide値が0.1 ng/mL未満であることが重要視されている。

膵島移植の時期は、同血液型の新鮮膵臓と凍結膵島を合わせて少なくとも9,000 IEQ/kg体

重が確保された場合に登録患者よりレシピエントを選択し、実施される。

免疫抑制法は臨床的有効性から考えて、当初はEdmonton protocolを実行すべきと考えている。最近、ヨーロッパの多施設共同研究(Swiss-French GRAGIL consortium)において、Certican[®]、Neoral[®]、Simulect[®]による免疫抑制法のtrialもなされており、新しい免疫抑制法の出現も期待される。

21世紀の膵臓・膵島移植の展開

SPKは、末期腎不全を伴った糖尿病腎症の現段階で唯一の救命治療法として位置付けられる。年々増加している糖尿病に起因する腎不全患者数を考慮すれば、今後の課題は何といても症例数の増加にある。深刻なドナー不足は我が国の臓器移植の抱える大問題であり、すでに種々のアプローチによるドナーアクションプログラムも実施されている²⁰⁾。また、SPKを救命手段と捉えるならば、生体膵臓移植の導入は十分意義のあることと考える²¹⁾。

一方、膵島移植が本格的に臨床応用されてきたのはここ数年のことであり、21世紀にその真価が問われることになる。膵島移植は安全性が高く、侵襲が少ない、繰り返し移植が可能、凍結保存が可能などの多くの利点を有する。また、SPKと異なり腎不全に至る前に膵島移植を行えば、QOLの改善、合併症の進行阻止が可能であり、真の糖尿病根治療法になり得る。しかし、欧米とくに我が国での最大の問題点は、膵臓移植と同様に深刻なドナー不足にある。この点の解決法として、臓器移植同様ドナーアクションプログラム実施によるドナー数の増加、生体膵島移植の導入が挙げられる。しかし、膵島移植は細胞療法の一つであり、遺伝子工学的手法を用いて膵島細胞を増殖させることや異種移植の臨床応用も、近未来的には実現可能であると考えられる。究極的には、膵臓幹細胞、末梢血、骨髄幹細胞などの自己細胞を取り出してβ細胞へ分化させて体内に戻す *ex vivo* 再生医療や、肝、膵など体内の臓器に局所的に遺伝子導入を行ってβ細胞を誘導する *in vivo* 再生医療を実現することにより、ドナー不足のみならず免疫抑制剤の問題や倫理的問題を一気に解決できる。β細胞再生医療は、欧米や我が国において多くの基礎研究が進んでおり、膵島移植の臨床応用に伴い急速に臨床応用される可能性もあり、21世紀前半での臨床実現が期待される。

文 献

- 1) 伊藤壽記ほか：膵臓(膵腎同時)移植のわが国における経験。移植 38 : 116, 2003.
- 2) International Pancreas Transplant Registry, Annual Reports, 2001 Year-End Update. (<http://www.iptr.umn.edu/annualreports.htm>)
- 3) Islet Transplant Registry, Newsletter #9, Vol 8, 2001. (www.med.uni-giessen.de/itr/)
- 4) Shapiro AM *et al* : Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med 343 : 230, 2000.
- 5) Kelly WD *et al* : Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. Surgery 61 : 827, 1967.
- 6) Surtherland DER *et al* : Minnesota experience with 85 pancreas transplants between 1978 and 1983. World J Surg 8 : 244, 1984.
- 7) 日本透析医学会編：わが国の慢性透析療法の現況, 2001年12月31日現在.
- 8) 深尾 立ほか：同種膵腎同時移植の1例。移植 21 : 331, 1986.
- 9) 伊藤壽記ほか：臓器移植法実施後に施行された脳死下膵腎同時移植の1症例。移植 36 : 174, 2001.
- 10) Najarian JS *et al* : Human islet transplantation: a preliminary report. Transplant Proc 9 : 233, 1967.
- 11) Ricordi C *et al* : An automated method for the isolation of human pancreatic islets. Diabetes 37 : 413, 1988.
- 12) Islet Transplant Registry, Newsletter #9, Vol. 8, 2001. (www.med.uni-giessen.de/itr/)
- 13) Shapiro AM *et al* : Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med 343 : 230, 2000.
- 14) 金 達也：Personal communication, アルバート大学.
- 15) 島崎修次ほか：ヒト組織を利用する医療行為の倫理的問題に関するガイドライン。日本組織移植学会雑誌 1 : 35, 2002.
- 16) 北村惣一郎ほか：ヒト組織を利用する医療行為の安全性確保・保存・使用に関するガイドライン。日本組織移植学会雑誌 1 : 45, 2002.
- 17) 膵・膵島移植研究会「膵島移植ワーキンググループ編」：膵島移植実施マニュアル(膵島移植班)2002年5月.
- 18) Matsumoto 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 74 : 1414, 2002.
- 19) 金澤康徳：膵臓移植に関する実施要綱(2001年3月改訂)移植学会合同委員会, 膵臓移植中央調整委員会編.
- 20) 厚生科学研究「臓器移植の社会基盤に向けての研究」(主任研究者：大島伸一, 名古屋大学医学部)
- 21) Gruessner RW *et al* : Simultaneous pancreas-kidney transplantation from live donors. Ann Surg 226 : 471, 1997.



Simplified Method for Cryopreservation of Islets Using Hydroxyethyl Starch and Dimethyl Sulfoxide as Cryoprotectants

M. Maruyama, T. Kenmochi, K. Sakamoto, S. Arita, C. Iwashita, and H. Kashiwabara

ABSTRACT

Cryopreservation is an ideal method for long-term storage of human islets. Dimethyl sulfoxide (DMSO) has been used as an intracellular cryoprotectant. However, because of its toxicity, DMSO has to be added stepwise and diluted stepwise with sucrose. We combined hydroxyethyl starch (HES) as an extracellular cryoprotectant with DMSO to simplify the freeze-thawing procedure. Islets were isolated from the pancreas of beagle dogs by an automated digestion method and Ficoll purification. After overnight culture, the islets were cryogenically stored using cooling by a programmed freezing system. After 4-week storage in liquid nitrogen, the container was rapidly thawed in a 37°C water bath. The function of the islets was assessed upon static incubation immediately after thawing, showing a recovery rate of 71.16% ± 20.14% and a stimulation index of 1.80 ± 0.78. In conclusion use of HES allowed a decrease in DMSO concentration and simplified the freeze-thawing procedure for islets.

CRYOPRESERVATION IS AN ideal method for long-term storage of human islets. According to International Islet Transplant Registry (#9, 2001), insulin independence was achieved if over 6000 IEq/kg body weight are transplanted. Cryopreserved islets combined with fresh islets have achieved insulin independence for patients with type 1 diabetes.¹ Dimethylsulfoxide (DMSO) has been used as intracellular cryoprotectant. However, because of its islet toxicity DMSO has to be added stepwise.² Low concentration of DMSO (5%) combined with hydroxyethyl starch (HES) as extracellular cryoprotectant have been used for cryopreservation of bone marrow or peripheral blood stem cell.³ We applied this method to cryopreserve islets and simplify the thawing process.

MATERIALS AND METHODS

Islets were isolated from the pancreata of five adult beagle dogs by an automated two-step digestion method that we have developed followed by Ficoll purification. After overnight culture, a known number of islets were suspended in RPMI 1640 containing 5% DMSO, 6% HES, and 4% FBS on ice, then transferred into 75-mL cryogenic storage containers (7005-2, CharterMed Inc, Lakewood, NJ, USA). The container was cooled using a programmed freezing system, Cryomed Model 1010 (Forma Med Inc, Marietta, Ohio, USA). After 4-week storage in liquid nitrogen, the container was rapidly thawed in a 37°C water bath. The islets were sedimented and resuspended with RPMI 1640 containing 10% FBS.

After overnight culture the number of islets was measured and the recovery rate calculated by comparison with the number before cryopreservation.

To assess the function of the thawed islets, static incubation was performed. Briefly, five aliquots of 10 islets were placed into 12-well transwell microplates with 1 mL RPMI 1640 containing 3.3 mmol/L D-glucose, 0.1% BSA as basal medium. After 60 minutes the culture transwells were transferred into new 12-well microplates with RPMI 1640 containing 20 mmol/L D-glucose and 0.1% BSA (glucose stimulation). After 60 minutes the culture transwells were transferred to new 12-well microplates to add basal medium again for an additional 60-minute culture. Each medium was centrifuged and immediately frozen for later assay of insulin concentration by ELISA. The stimulation index was calculated by comparing the insulin content in the glucose stimulation medium with the second basal medium.

RESULTS

Morphologically the shape of frozen-thawed islets was well maintained; fragmentation or clumping of islets was hardly observed. Recovery rate after thawing was 71.16% ±

From the Department of Surgery, Sakura National Hospital, Chiba, Japan.

Address reprint requests to Michihiro Maruyama, MD, PhD, Department of Surgery, Sakura National Hospital, 2-36-2 Ebaradai, Sakura, Chiba 2858765, Japan. E-mail: maruyama@snh.hosp.go.jp

20.14% (mean \pm SD) and the stimulation index of the static incubation was 1.80 ± 0.78 .

DISCUSSION

In this study we evaluated a simple method of islet cryopreservation using HES and a low concentration of DMSO. The recovery rate after thawing was 71.16% and islet function was well maintained. Our results indicate that the use of HES as a cryoprotectant combined with DMSO can avoid a complicated freezing-thawing process. This simpli-

fied method may be applicable to clinical human islet preservation.

REFERENCES

1. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan E, et al: *Diabetologia* 34:55, 1991
2. Rajotte RV, Warnock GL, Kneteman NM, et al: *Transplant Proc* 21:2638, 1989
3. Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al: *Bone Marrow Transplant* 19:283, 1997