

ている。2000年以降の新規登録者数の推移を図3に示す。

5. ドナー適応基準と脾提供

ドナーの適応として、日本組織移植学会の「ヒト組織を利用する医療行為に関するガイドライン」⁴⁾に基づいて感染症などを除外し(表4)、さらに、①年齢が70歳以下、②温阻血時間は原則30分以内、③摘出脾保存法はUW液による単純浸漬保存または二層法を用いることが望ましい、などを定めている(表5)⁵⁾。

海外では脾臓移植に用いられる脾臓も脳死ドナーか

ら摘出されているが、わが国では脾臓移植は組織移植として位置付けられ、心停止後の提供が可能であることから、脳死ドナーから提供された脾臓は脾臓移植に供され、脾臓移植を目的とした脾提供は主として心停止ドナーから行われている。従って、腎移植を目的とした心停止後の腎提供時に脾臓移植を目的とした脾提供についてドナーご家族にICを行い、ご承諾をいただいている。IC取得から提供に至る過程では日本組織移植学会のみならず日本臓器移植ネットワークおよび各県の移植コーディネーターの多大なるご協力をい

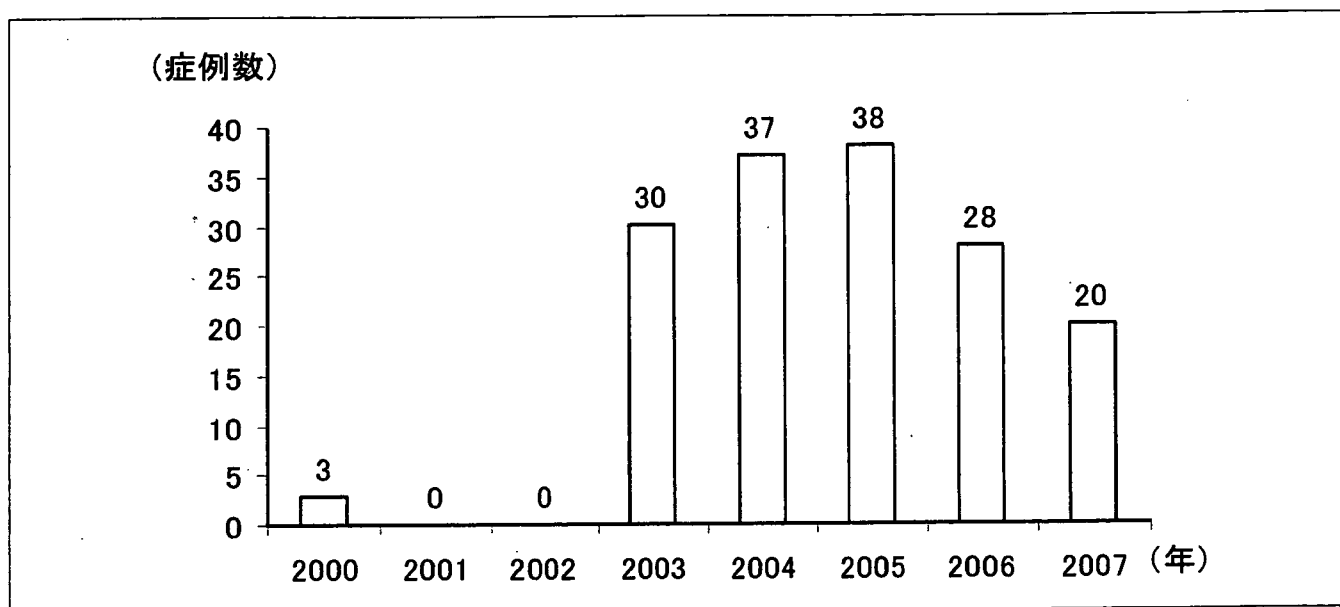


図3 新規登録者数の推移

表4 組織提供者全般の除外項目

- ・原因不明の死亡
- ・敗血症あるいは全身性感染症
- ・Creutzfeldt-Jakob病
- ・悪性腫瘍
- ・白血病、悪性リンパ腫などの血液腫瘍
- ・重篤な代謝性・内分泌性疾患、血液疾患や膠原病などの自己免疫疾患
- ・梅毒検査陽性、TPHA
- ・B型肝炎
- ・C型肝炎
- ・HIV感染症
- ・成人T細胞性白血病
- ・パルボウイルスB19感染症
- ・ウエストナイルウイルス感染症
- ・新型肺炎SARS感染者
- ・その他、各組織特有の採取除外条件に合致する者

(文献4より抜粋)

表5 腫島移植ドナー適応基準

1. ドナー年齢は70歳以下
2. 心停止後から摘出までの許容時間は原則として30分以内が望ましい
3. 感染症等の除外項目は組織移植学会のガイドラインに準じて行う
4. 保存はUW液による単純浸漬または二層法等を用いることが望ましい

家族から「腫島移植のための膵臓提供の承諾」が得られた場合、脳死ドナー、心停止ドナーから、ともに提供を受けることができる。いずれの場合も「腫島移植のための膵臓提供」は心停止後となる。

(文献5より引用)

表6 レシピエント選択基準

1. 地域性
2. ABO血液型
3. すでに腫島移植を受け、腫島移植によりインスリン離脱が期待できる例
4. 待機日数

—レシピエントは各ブロック事務局に登録されたレシピエント候補より2→4の順に選択する
 —血液型一致候補がない場合は血液型適合候補のなかから再度選択順位を決定する
 —当初数例は再移植、再々移植を優先する
 —移植時にはリンパ球クロスマッチを施行する

(文献5より引用)

表7 新鮮腫島移植の基準

- ・分離した腫島が以下の基準を満たすときに、新鮮腫島を移植する
 - 腫島量 $\geq 5,000$ IEQ/kg (患者体重)
 - 純度 $\geq 30\%$
 - 組織量 ≤ 10 ml
 - Viability $\geq 70\%$
 - Endotoxin ≤ 5 EU/kg (患者体重)

(文献5より引用)

ただいている。

6. レシピエント選択基準

ドナー発生時には、レシピエント選択基準(表6)に従い、登録されたレシピエントからレシピエントが選択される。個々のレシピエント情報はブロック事務局と腫島移植班事務局で共有しているが、ドナー発生時にはブロック事務局からのレシピエント選定依頼に従い、腫島移植班事務局はレシピエント選定作業を行い、選定結果をブロック事務局へ送付するとともに研究会内のレシピエント選択監視委員へデータを送付し、順位選択の整合性を確認している(図2)。

7. 腫島分離・移植と免疫抑制法

腫島分離とは、摘出した膵臓から外分泌腺組織を除

去してインスリンを産生する腫島のみを取り出す作業である。腫島分離は消化酵素の膵管内注入による膵消化と比重遠心法による分離の過程に分けられ、その方法の詳細については各実施施設がそれぞれ独自の工夫を行っている。腫島移植実施マニュアルでは分離した腫島を移植に供するか否かについて一定の基準を設けており、レシピエント体重あたり $5,000$ IEQ/kg以上の腫島収量があり、純度 30% 以上、組織量 10 ml未満、viability 70% 以上、エンドトキシン 5 EU/kg未満、グラム染色陰性などの基準を満たした場合に新鮮腫島移植を行うこととされている。この基準を満たさなかった場合は、原則として凍結保存としている(表7)。

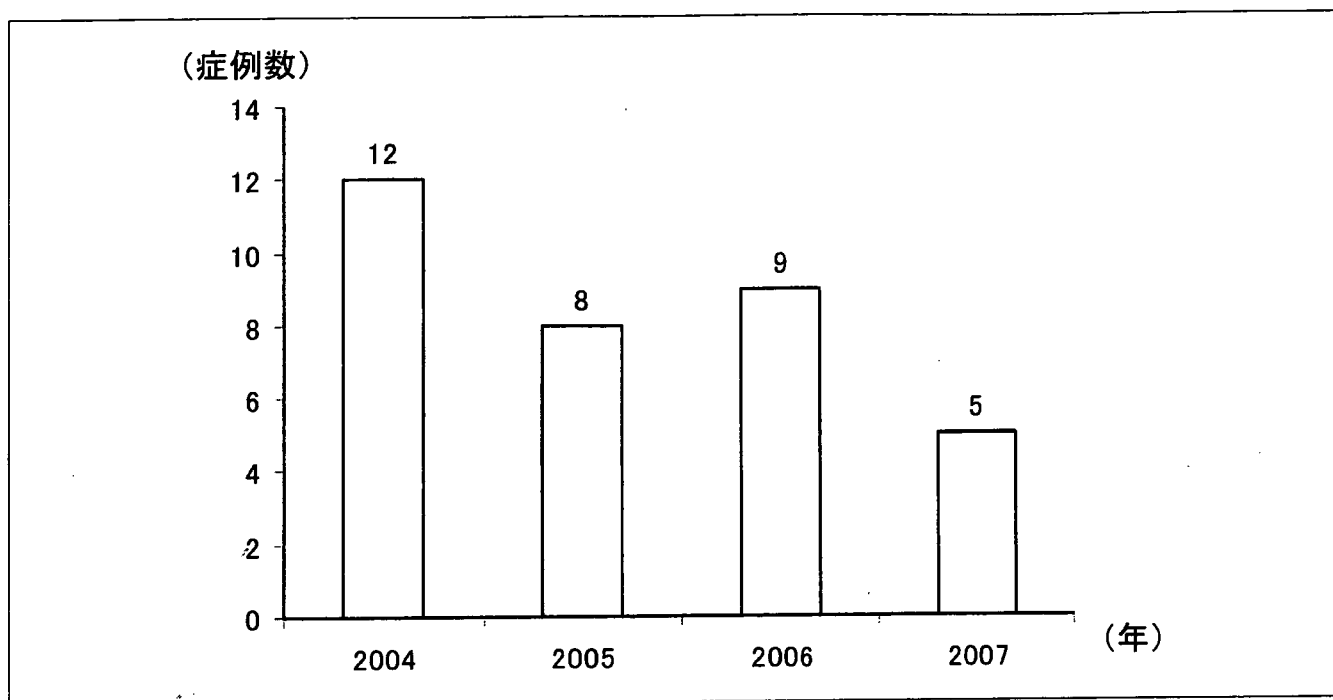


図4 脾島移植症例数の推移

表8 脾島分離・移植にかかわる諸因子

	非移植症例 (n=31)	移植症例 (n=33)	
ドナー年齢(歳)	42.5±17.4	39.1±16.0	N.S.
温阻血時間(分)	9.0±9.6	6.0±0.6	N.S.
冷阻血時間(分)	345±96	286±113	p=0.03
分離脾島量(IEQ)	101,534±74,297	423,707±157,320	p=0.0001

脾島移植は局所麻酔下に超音波ガイド下門脈穿刺を行い、門脈内へカテーテルを挿入し、脾島を含む液体を門脈内へ注入することにより行われる。術後免疫抑制は、エドモントンプロトコールでは、抗IL-2受容体抗体である daclizumab, mTOR 阻害剤である silorimus および低用量の tacrolimus を組み合わせてステロイドを用いないことが特色であるが、わが国の脾島移植でも daclizumab を basiliximab に替え、silorimus および tacrolimus を組み合わせた方法が採用されている。

III. 結果と考察

2007年3月までに64回の脾島分離が行われ、1例の脳死ドナーを除く63回は心停止ドナーからの提供であった。このうち33回で移植の条件を満たしていたため17症例(男性5例、女性12例)に対して脾島移植が行われた(移植率:移植回数/分離回数×100=

52%)。移植症例の平均年齢は37.3歳、糖尿病歴は6~37(平均20.8)年であった。移植症例数の年次推移を図4に示す。移植例と非移植例ではドナーの年齢、温阻血時間には有意差を認めなかったが、冷阻血時間は移植例で有意に短かった(表8)。脾島移植手技に伴う合併症は腹腔内出血1例(0.03%)のみで、比較的安全に施行されている。

脾島移植は3回まで行うことが可能で、これらの17例に対する移植回数は1回7名、2回4名、3回6名であった。それぞれの移植後1カ月における、インスリン必要量(図5a:術前39.7±18.0 U/day, 1回移植後24.2±11.0 U/day, 2回移植後21.4±11.5 U/day, 3回移植後21.0±7.7 U/day)とHbA_{1c}値(図5b:術前8.8±1.8%, 1回移植後7.5±1.4%, 2回移植後6.5±1.4%, 3回移植後6.2±1.2%)は術前に比して減少し、術前陰性であったC-ペプチドは移植後に陽性となった(図5c:1回移植後0.5±0.4 ng/ml, 2回移植後0.4

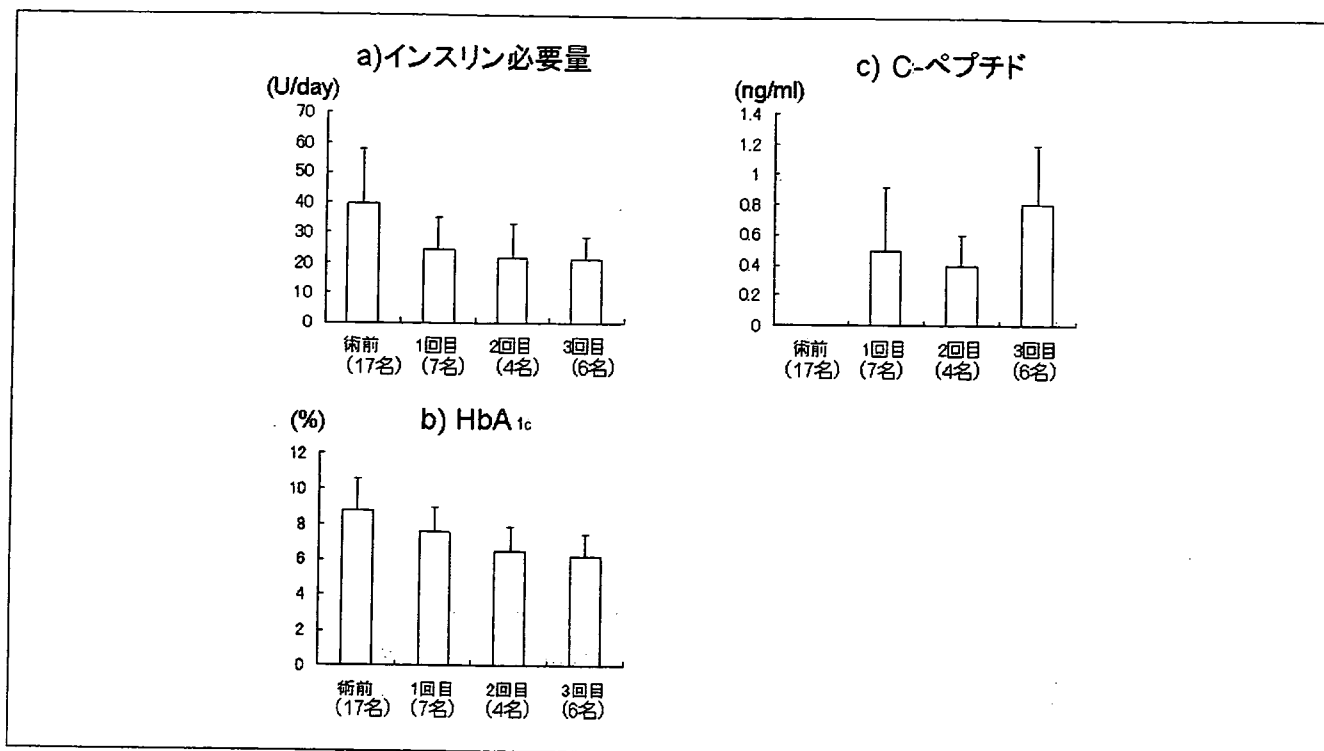


図5 膵島移植前後のインスリン必要量, C-ペプチド, HbA_{1c} の推移

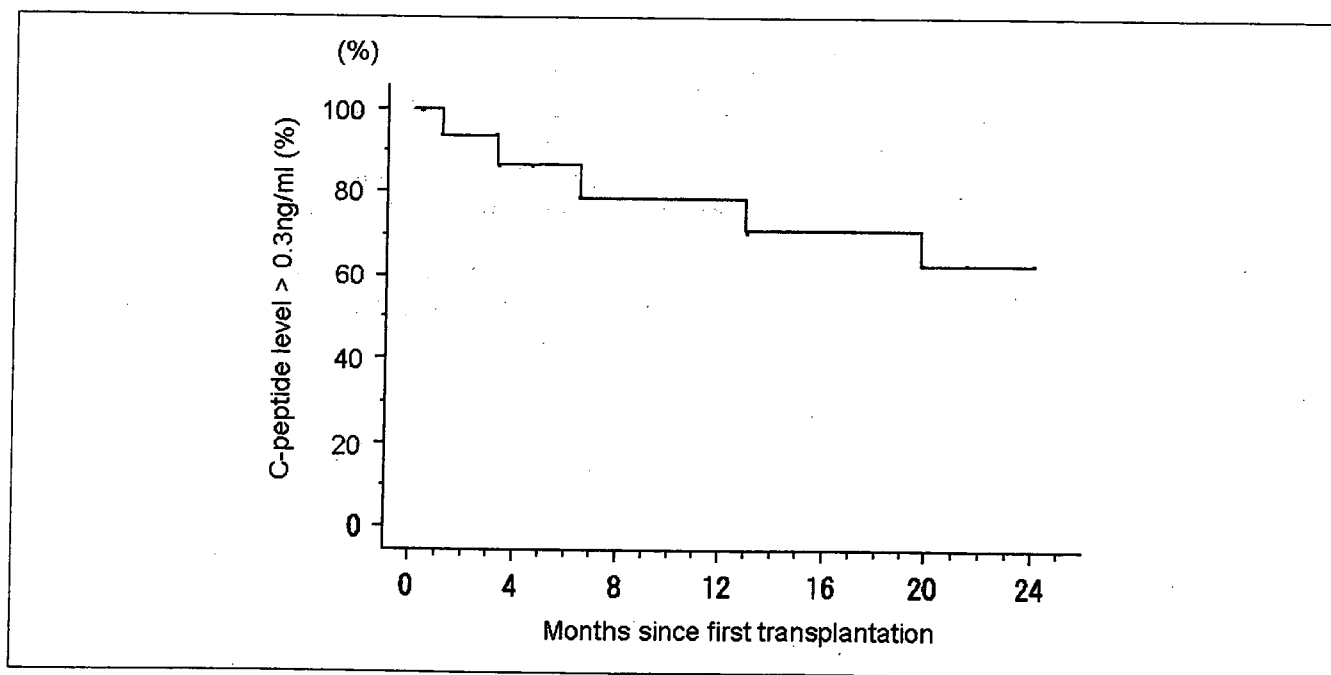


図6 膵島生着率

±0.2 ng/ml, 3回移植後 0.8±0.4 ng/ml)。これらの症例のうち、2回移植の1例と3回移植の2例の計3症例でインスリン離脱を認めた。総移植膵島量は、インスリン離脱例では非離脱例に比して有意に高値を示した(離脱例: 135,0627±456,973 IEQ, 非離脱例:

709,318±362,904 IEQ, p=0.02)。

移植症例には腎移植後膵島移植の2症例が含まれ、いずれもインスリン投与量の減量を認め経過良好である。これらの症例では膵島移植時に basiliximab を併用するものの、基本的な免疫抑制法は腎移植に用いら

れている方法を継続しており、膵島移植に伴う移植腎機能の低下には細心の注意が払われている。

2006年に『New England Journal of Medicine』にエドモントンプロトコールによる膵島移植の多施設共同研究の結果が報告されたが、この中ではbasal C-peptide levelが0.3 ng/ml以上ある場合を膵島生着としている³⁾。同基準を本邦における症例に当てはめると、初回移植後6カ月、1年、2年時における累積膵島生着率はそれぞれ86.5%、78.7%、62.9%であった(図6)。

本邦において開始された主として心停止ドナーによる膵島移植は、観察期間は短いもののI型糖尿病に対して糖尿病状態の改善を期待できる治療法となりうる事が確認され、また実施体制も充実しつつある。現在、凍結保存膵島の使用基準について検討されており、凍結膵島単独あるいは新鮮膵島と組み合わせた形で使用される見込みである。今後は、膵島分離・移植などの費用負担の問題を解決する必要があり、これについても先進医療への申請へ向けて、使用薬剤の医師主導治験を立ち上げる計画が進行中である。

IV. おわりに

膵・膵島移植研究会が長年にわたって準備を進め、2004年から開始された膵島移植症例の第1回の集計結果を誌上で公にすることができた。膵・膵島移植研

究会会員をはじめとする関係各位のご協力の賜であり、稿を終えるにあたり改めて感謝の意を表したい。

文責：膵・膵島移植研究会膵島移植班事務局
後藤満一，斎藤拓朗

文 献

- 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: 230-238.
- 2) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, *et al.* Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-2069.
- 3) Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, *et al.* International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355: 1318-1330.
- 4) 北村惣一郎, 島崎修次, 糸満盛憲, *et al.* 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* 2003; 2: 41-57.
- 5) 膵・膵島移植研究会編. 膵島移植実施マニュアル 第3版. 東京: 膵・膵島移植研究会, 2006.

特集「組織移植の現状と今後の展望」

膵島移植の現状と展望

穴澤貴行, 斎藤拓朗, 佐藤佳宏, 見城 明, 木村 隆,
塚田 学, 伊勢一哉, 後藤満一
福島県立医科大学医学部第1外科

■ ■ はじめに

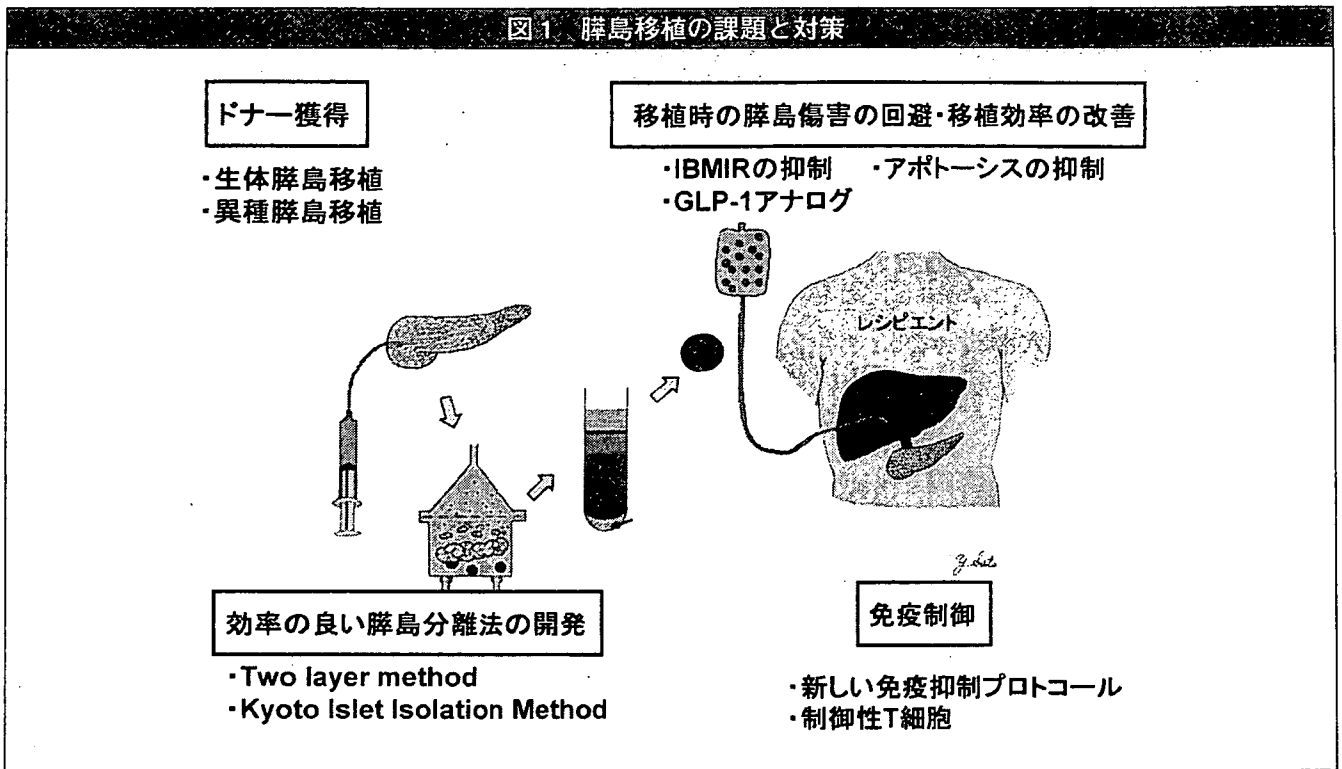


難治性糖尿病, 特に糖尿病専門医の指導によっても血糖コントロールが不良な1型糖尿病の患者は, 生活の質の低下のみならず重症低血糖発作あるいはケトアシドーシスなどによる生命の危機にさらされている。このような難治性糖尿病ではインスリン分泌が廃絶しており, 根治的治療を目指して, 膵臓移植と膵島移植が行われている。膵臓移植は米国を中心として全世界で年間1,600例前後施行されている¹⁾。対象は1型糖尿病であるが, ほとんどの症例は腎不全を伴った症例で, 膵腎同時移植が行われている。また, 症例数は少ないが, 糖尿病性腎症発生前には膵単独移植が, 腎不全症例に対しては腎移植が先に実施され, その後膵移植を実施する場合もある。膵臓移植は優れた治療効果を示すが血管吻合を伴う開腹手術を必要とし, さらに低侵襲なアプローチが望まれていた。膵島移植は, 膵臓のごくわずかな割合を占めるに過ぎない内分泌組織である膵島のみを取り出して移植する方法で, 患者への手技に伴う侵襲はきわめて低い。

1960年代に膵臓から膵島を分離する手段としてコラゲナーゼ消化と比重遠心法を組み合わせた方法が報告され²⁾, 1977年にミネソタ大学より初めての臨床膵島移植が報告された³⁾。しかし, 1990年から1999年における1型糖尿病237例に対する膵島移植の成績は, 膵島生着率(移植1年目の血中C-peptide 0.5 ng/ml以上)が41%, 移植後1年以降のインスリン離脱率が11%と, その成績は他の臓器移植に比べ不良であった⁴⁾。この中に含まれる多くのレシピエントは腎移植後の症例か, もしくは腎移植と同時に膵島が移植

された。しかし, 2000年にカナダのアルバータ大学から, いわゆるエドモントン・プロトコールによる膵島移植により移植後1年におけるインスリン離脱率80%という成績が報告されてから⁵⁾, 膵島移植は全世界に広まった。1999年から2004年の5年では43施設において471人もの患者に膵島移植が行われるようになった⁶⁾。このプロトコールは, 腎機能に障害のない症例で膵島単独移植を行うこと, 免疫抑制剤としてはsirolimusを中心にdaclizumabと低容量のtacrolimusを組み合わせステロイドを使用しないこと, 分離した膵島はただちに移植し(新鮮膵島移植), 移植膵島が十分な量に達するまで複数回移植することなどを特色とする。2005年にはエドモントン・プロトコールによる膵島移植65例の5年間のフォローアップ成績が発表された⁷⁾。65例中52例が2回の移植を, 11例が3回の移植を行い, 移植症例における内因性インスリン分泌の指標となるC-ペプチドの陽性率は5年後で80%と良好であった。C-ペプチドの陽性例ではHbA1cが8.0%程度から6.7%程度にまで改善し, また, 重症低血糖からの回避が図られ, 1型糖尿病患者のQOLは著しく改善されることが明らかとなった。しかし, インスリン離脱率は移植後1年で約80%, 3年で約20%, 5年で10%以下と徐々に低下することが報告され, 現在のプロトコールでは長期的にはインスリン投与からの離脱は難しいことも明らかとなった。長期生着を得るためには, ①効率の良い膵島分離法の開発, ②移植時の膵島傷害の回避, ③免疫制御, ④ドナー獲得が世界的な課題として挙げられるが(図1), わが国では次項に述べるように心停止ドナーが用いられるため, さらにこれらの事項の閾値が低い。本稿で

図1 膵島移植の課題と対策



は、2006年7月に開催された国際移植学会とアメリカ移植学会の joint congressである World Transplant Congress (WTC) においての膵島移植に関する最新の情報をまじえ、それぞれの問題点に関する今後の動向を紹介する。

■ ■ わが国における膵島移植の現況

わが国では1997年、膵・膵島移植研究会内に膵島移植実施を目的とする膵島移植班が発足し、移植医や糖尿病内科医、腎臓内科医などを含むワーキンググループを中心として、日本組織移植学会および日本移植学会と連携しながら臨床膵島移植の準備を進めてきた。

膵島移植には凍結保存膵島を用いる方法もあるが、欧米での臨床成績を踏まえて、わが国では分離直後に膵島移植を施行する新鮮膵島移植が優先されている。膵臓摘出から移植までの時間を短縮するために、全国を分離・凍結施設を中心とするブロック単位に分け、各ブロックで膵臓摘出・分離（凍結）・移植を行うこととしている。分離・凍結施設は北から東北大学、福島県立医科大学、国立病院機構千葉東病院、京都大学、神戸大学、福岡大学に2007年4月より実施可能となった大阪大学を加えた7施設である。

ドナーの適応は、日本組織移植学会の「ヒト組織を利用する医療行為に関するガイドライン」⁹⁾に基づいて感染症などを除外し、さらに①年齢が70歳以下、②温阻血時間は原則30分以内、③摘出膵保存法はUW液による単純浸漬保存または二層法を用いる、などを満たした場合、ドナーとして適切であると判断される。本邦では膵島移植は組織移植として分類されており、脳死ドナーから摘出した膵グラフトの多くは膵臓移植に使用されており、心停止ドナーから摘出した膵臓を利用せざるをえず、主に脳死ドナーから摘出した膵臓を利用する欧米諸国とは異なる状況にある。

膵島移植の適応となるレシピエントは、内因性インスリン分泌が著しく低下し、インスリン治療を必要とする状態で、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な、75歳以下の患者である。禁忌の条件としては重度の心・肝疾患、アルコール中毒、感染症、悪性腫瘍の既往、重症肥満、未処置の膵炎などが挙げられている。糖尿病性腎症に関しては、免疫抑制剤の副作用による腎機能の悪化を考慮してⅢA期までを適応としている。腎移植後の症例では、移植後6カ月以上経過し、クレアチニン1.8 mg/dl以下で直近6カ月の血清クレアチニンの上昇が0.2以下で、ステロイド内服量10 mg/dl以下、などの基準で移植の対象とし、免疫抑制剤は原則として腎移植後

に使用している薬剤を用いることなどを定めている。レシピエント候補者として、2006年8月23日までで135名が膵島移植班事務局（福島県立医大外科学第一講座内）へ登録されている。わが国では2004年に第1例目の臨床膵島移植が施行され、2006年9月までに主として心停止ドナーによる51回の膵島分離と24回の移植が13人のレシピエントに行われた（表1）。このうち3人がインスリン治療から離脱し、その他全例でインスリン投与量の減少と、無自覚性低血糖発作からの解放が得られている¹⁰⁾。このことは心停止ドナーからの膵島移植も可能であるということを示したものである。

膵島分離過程におけるトピックス

膵島分離とは、摘出した膵臓からそのほとんどを占める外分泌腺組織を除いて、インスリンを産生する膵島のみを取り出す作業である。膵島移植のプロトコルでは分離した膵島を移植に供するか否かについて一定の基準を設けており、その多くはエドモントン・プロトコルに準拠している。本邦でも膵・膵島移植研究会膵島移植班が作成した膵島移植実施マニュアルに従い、レシピエント体重当たり5,000 IEQ/kg以上の

収量があり、純度30%以上、組織量10 ml未満、viability 70%以上、エンドトキシン5 IU/kg未満、グラム染色陰性などの基準を膵島分離の結果が満たした場合に新鮮膵島移植を行うこととされている。

膵臓内に膵島は100万～150万個存在するが、現時点での標準的な膵島分離技術で回収できるのは、その20～50%であるとされる¹¹⁾。膵島移植が組織移植のひとつとして整理される本邦では、脳死ドナーの多くは膵臓移植に使用され、心停止ドナーから摘出した膵臓を膵島移植に用いることとなる。このためドナーの死戦期に関連する温阻血時間が長く、さらに搬送を目的とした保存による冷阻血が加わるため、脳死ドナーの場合と比べ不利な条件下での膵島分離を余儀なくされている。従って、保存に伴う膵島に対する温・冷虚血障害の軽減と分離数の増加をもたらす工夫が必要とされ、本邦でもその研究が盛んである。

虚血障害の軽減のための工夫としては近年、two layer method (TLM)の有用性が注目されてきた。TLMとは、UW液と酸素化perfluorochemical (PFC)の二層からなる液に摘出膵を浸漬し冷保存中に膵グラフトに対して酸素を供給する方法である。この方法を用いることにより膵摘出に伴う温・冷阻血障害からの機能回復効果が報告されてきた^{12,13)}。これまでTLMでは

表1 本邦膵島移植症例の概要

実施例	年齢・性	移植回数	移植後のインスリン量
1	30代・女性	2	インスリン離脱
2	10代・女性	1	インスリン減量
3	30代・男性	3	インスリン減量
4	30代・女性	3	インスリン減量
5	40代・女性	3	インスリン離脱
6	30代・男性	3	インスリン減量
7	30代・女性	1	インスリン減量
8	50代・男性	3	インスリン離脱
9	20代・女性	1	インスリン減量
10	30代・女性	1	インスリン減量
11	30代・女性	1	インスリン減量
12	30代・男性	1	インスリン減量
13	30代・男性	1	インスリン減量

<http://square.umin.ac.jp/JITR/seiseki.htm> (2007年3月12日接続) より引用

UW液のみで保存した場合と比べて、分離膵島の量がおよそ2倍になると報告されてきたが、WTCでのNordic Networkでの大規模な臨床試験による比較報告によると、214例の臨床症例をTLMとUW液のみで保存した2群に分けて収量・移植成績などを比較し、TLMの有用性は見出せなかったと報告された。また最近報告された別の報告においても、TLMの臨床における有用性は証明されず¹⁴⁾、全例にTLMを適用すべきかについては依然として検討の必要がある。

また、京都大学グループからはKyoto Islet Isolation Method (KIM)が報告された。この方法では、心停止ドナーに対し、心停止前に留置した大動脈内ダブルバルーンカテーテルを用いて膵臓をただちに冷却灌流する急速中心冷却法に、膵摘出後の細胞保護効果のあるM-Kyoto Solutionの膵管内注入、さらにPFCとM-Kyoto Solutionを組み合わせたmodified two layer methodによる膵の冷保存を行い、また、膵島消化の過程ではウリナスタチンによるトリプシン活性の抑制、純化の過程では従来のFicollに換えて比重をきめ細かく設定しうるiodixanolを用いる、などの工夫を加えた¹⁵⁾。その結果、心停止ドナー19例からの膵島分離中、17例で膵島移植可能となるという良好な結果が得られた¹⁶⁾。この方法ではドナーが高齢で慢性膵炎の既往がある場合には十分な収量が得られないものの、ドナーの性別、BMI、病院滞在日数、血液生化学検査の結果に左右されず、良好な結果を収めている¹⁷⁾。

その他、分離過程における温阻血障害を軽減する方法として酸素供給源であるoxygenated polymerized, stroma-free-hemoglobin-pyridoxalatedを膵管内に注入する方法¹⁸⁾、分離過程に使用する溶液に抗酸化作用を有するN-acetyl cysteineを加えることで、分離過程におけるアポトーシスを抑制し、膵島分離収量を増加しうるとの報告¹⁹⁾などの膵島分離過程における工夫がWTCにおいて報告された。

■ 膵島移植過程におけるトピックス

膵島移植の過程におけるトピックスとしては移植直後の免疫反応の制御、膵島β細胞数増加作用あるいはアポトーシスの軽減作用を有する薬剤、さらに移植手技や免疫抑制剤による術後合併症についての報告が挙げられる。

現在の膵島移植では、局所麻酔下に肝臓の門脈を穿

刺し門脈内へ膵島を移植する方法が一般的である。しかし、移植直後に引き起こされる非特異的炎症反応による移植膵島の細胞死により多くの膵島が失われ、経門脈的に移植された膵島はその25-50%しか生着しないとされている²⁰⁾。この炎症反応はinstant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR)と称され、血小板、凝固系、および補体系の活性化が関与する反応である。このIBMIRを介する移植後早期の移植膵島の減少を防止するために、膵島に抗tissue factor抗体を加えて培養しその後移植する方法を試みたところ移植膵島の機能が持続されたことが報告された²¹⁾。その他、NF-κB阻害剤(DHMEQ)移植前投与によるIBMIR抑制²²⁾、Lundらが報告した移植前膵島に対する糖質コルチコイド処理によるIBMIR抑制による移植後早期の移植片機能消失予防などが報告された。移植膵島の生着向上のためにIBMIRを抑制する工夫がはかられている。

また、glucagons-like peptide-1 (GLP-1)アナログであるexenatideの利用も注目されている。GLP-1アナログは2005年にアメリカで2型糖尿病の治療薬として承認されたもので、β細胞数増加とインスリン分泌促進、胃内容排出遅延やグルカゴン分泌の抑制作用などを有する。Exenatideを膵島移植後のレシピエントに皮下投与すると、比較的少ない量の膵島を移植した場合でもインスリン離脱を可能にしうるとの報告があり、その有用性が注目されている^{23,24)}。また、移植後の膵島のアポトーシスを防ぐために、caspase阻害剤²⁵⁾、エリスロポエチン²⁶⁾などを用いたとの報告があり、移植膵島の生着向上をきたしうる薬剤として期待される。

膵島移植における合併症についての報告もあり、移植手技に伴うものとして腹腔内出血17%、門脈血栓12%であったが、外科的処置が必要となるような重篤な合併症はなく、免疫抑制に伴う合併症としては、貧血(54%)、白血球減少(42%)、口腔内潰瘍(50%)、ウイルス性心筋炎(8%)、などが報告された²⁷⁾。これまでも膵島移植では移植手技に伴う重篤な合併症は少ないとされてきたが、今後は免疫抑制に伴う合併症をさらに減らすことが課題のひとつと考えられる。

■ 免疫抑制に関するトピックス

エドモントン・プロトコールでは、mTOR阻害剤であるrapamycin (sirolimus)を中心に抗IL-2受容体抗

体 (daclizumab) と低容量の tacrolimus を組み合わせ、ステロイドを用いない免疫抑制法により移植成績の改善を認め、免疫抑制法の工夫も膵島移植成功の重要な key のひとつであることが示された。現在も、この方法は膵島移植における免疫抑制療法の主流となっており、2006年には約60%の症例で採用されており²⁸⁾、本邦の膵・膵島移植研究会膵島移植班でも daclizumab を basiliximab に替えた方法が採用されている。

しかし、この方法を用いても1人のドナーから分離した膵島で1人のレシピエントのインスリン離脱が得られる、いわゆる one donor-one recipient は達成されていなかった。ミネソタ大学の Hering らは、体重 70 kg 以下、インスリン投与量 40 U/日以下、初回移植例、CCr 60 ml/min² 以上、門脈圧亢進症がなく肝機能正常者であるという厳格な基準に基づいて選んだ 8 例の 1 型糖尿病患者に、7,271±1,035 IEQ/kg の膵島を移植し、anti-thymocyte globulin, 抗 TNF α 抗体 (etanercept), daclizumab による導入療法に続いて、MMF, sirolimus 主体の維持療法を行い、全例 1 回の移植でインスリン離脱し、さらに 8 例中 5 例は 1 年を経過してもインスリン離脱状態を維持していることを報告した²⁹⁾。WTC では、同グループから膵島移植における新たな免疫抑制法として anti-thymocyte globulin, etanercept, cyclosporine, everolimus を用いた方法が報告され、重篤な有害事象なく 6 例中 5 例でインスリン離脱が得られている³⁰⁾。

免疫抑制剤はどの薬剤も副作用を有するため、膵島移植の長期成績改善の方策としての免疫寛容誘導は夢の治療法である。この分野では、免疫応答を抑制的に制御して免疫系における恒常性の維持に重要な役割を果たすとされる制御性 T 細胞 (CD4+CD25+T regulatory cells: Treg) が注目されており、拒絶反応の抑制のみならず移植免疫寛容の誘導においても重要であることが示されつつある³¹⁾。WTC では、マウスの同種異系移植モデルを用い、膵島移植と同時に移植局所へ 4×10^5 個の制御性 T 細胞を投与することにより 100 日以上以上の生着が得られたとする報告³²⁾、あるいは IL-2 の存在下に抗 CD3 抗体と TNF レセプターファミリーのメンバーである 4-1 BB のリガンドを作用させることにより体外で制御性 T 細胞の増殖・分化を誘導する可能性³³⁾、樹状細胞の制御性 T 細胞への関与³⁴⁾などの報告があり、制御性 T 細胞を用いたドナー抗原特異的免疫寛容誘導のメカニズムは解明されつつあるが、今後さらに臨床応用に向けての研究が望まれる。

ドナー不足に対する対策

前述のように、one donor-one recipient を目指す試みが進んでいるものの、現状では、インスリン離脱のためには 1 人のレシピエントに対し 2~3 回の膵島移植を必要とする。このため、他の臓器移植以上にドナー不足が問題となる。ドナー不足の解決方法としては生体膵島移植と異種移植が注目されている。

生体ドナーによる膵島移植、すなわち生体膵島移植は京都大学で本邦第 1 例目が行われ³⁵⁾、この症例の経過³⁶⁾は WTC でも報告された。生体膵島移植では、海外における脳死ドナーにおける膵島分離の経験から全膵から分離される膵島数は膵体尾部から分離される膵島数と有意差がない点に着目し、術前のドナー耐糖能評価および CT による膵体積評価から膵体尾部を切除してもドナー耐糖能を維持することが可能な膵切離線を設定し、ドナー膵体尾部を切除して同部から膵島分離を行う方法である。脳死の過程を経ないため分離される膵島収量は比較的多く、脳死ドナーによる全膵からの膵島収量を上回り 1 回の移植でインスリン離脱を得ることができた。しかしドナーに対する手術侵襲とレシピエントの長期成績が不明であるなど、今後検討すべき問題も多い。

異種膵島移植は大きな可能性を秘めている。Valdes は、1 型糖尿病の小児に対し、アルギン酸でマイクロカプセル化したブタ膵島を sertoli 細胞とともに皮下に移植し、血糖の安定化が得られたことを報告している³⁷⁾。WTC では、Emory 大学の Cardona らにより、遺伝子改変を受けていないブタをドナーとしたサルへの異種膵島移植において、抗 IL-2 受容体抗体、抗 CD 154 抗体の短期投与と rapamycin, belatacept による免疫抑制維持療法による長期生着の可能性が報告された³⁸⁾。繁殖が容易なブタをドナーとする異種移植は魅力的であるが、ブタからヒトへの異種移植の臨床応用では、超急性拒絶反応の対策、ブタ内因性レトロウイルス (PERV) 感染の可能性、倫理的問題等が指摘されている。

おわりに

WTC における話題をまじえ、膵島移植の現状と課題に対する取り組みを紹介した。現在、世界中の施設で盛んな研究により膵島分離技術の改良や移植効率の改善が進みつつあり、免疫寛容誘導、異種移植などの

新しいアプローチにより、免疫抑制療法の問題点やドナー不足の問題にも解決の方向が示されていくものと期待される。本邦では、主として心停止ドナーからの膵島移植が行われているため検討すべき課題も多いが、膵島移植を1型糖尿病の治療法のひとつとして定着させるために本邦独自の研究の進展が望まれる。

文 献

- 1) Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant* 2005; 19: 433-455.
- 2) Moskalewski S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 1965; 44: 342-353.
- 3) Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-39.
- 4) Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ, *et al.* Human islet transplantation. *Transplant Proc* 1977; 9: 233-236.
- 5) Islet Transplantation Registry, Newsletter 2001; #9, Vol.8.
- 6) 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: 230-238.
- 7) Shapiro AM, Lakey JR, Paty BW, *et al.* Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 1304-1307.
- 8) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, *et al.* Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-2069.
- 9) 北村惣一郎, 島崎修次, 糸満盛憲, 他. 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* 2003; 2: 41-58.
- 10) <http://square.umin.ac.jp/JITR/index.htm>. Accessed 1 March 2007.
- 11) Ricordi C, Lakey JR, Hering BJ. Challenges toward standardization of islet isolation technology. *Transplant Proc* 2001; 33: 1709.
- 12) Tsujimura T, Kuroda Y, Kin T, *et al.* Human islet transplantation from pancreata with prolonged cold ischemia using additional preservation by the two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation* 2002; 74: 1687.
- 13) Tsujimura T, Kuroda Y, Avila JG, *et al.* Influence of pancreas preservation on human islet isolation outcomes: impact of the two-layer method. *Transplantation* 2004; 78: 96-100.
- 14) Kin T, Mirbolooki M, Salehi P, *et al.* Islet isolation and transplantation outcomes of pancreas preserved with University of Wisconsin solution versus two-layer method using preoxygenated perfluorocarbon. *Transplantation* 2006; 82: 1286-1290.
- 15) Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, *et al.* Successful islet transplantation from nonheartbeating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. *Transplantation* 2006; 82: 460-465.
- 16) Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, *et al.* The clinical islet isolation method optimized for non-heart-beating donors with highly efficient islet retrieval. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 455.
- 17) Liu X, Matsumoto S, Okitsu T, *et al.* Analysis of donor and isolation variables from non-heart-beating donors using kyoto islet isolation method. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 436.
- 18) Avila JG, Wang Y, Barbaro B, *et al.* Improved outcomes in islet isolation and transplantation by the use of a novel hemoglobin-based O₂ carrier. *Am J Transplant* 2006; 6: 2861-2870.
- 19) Ramachandran S, Benschhoff N, Jendrisak M, *et al.* Pre-treatment of donor with N-acetyl cysteine and during islet isolation increases islet yield and function. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 576.
- 20) Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, *et al.* Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002; 51: 2148-2157.
- 21) Berman DM, Cabrera O, Kenyon NM, *et al.* Effect of inhibition of tissue factor on nonhuman primate islet allograft survival. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 156.
- 22) Ueki S, Yamashita K, Aoyagi T, *et al.* Control of al-

- lograft rejection by applying a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Transplantation* 2006; 82: 1720-1727.
- 23) Hatipoglu BA, Avila J, Benedetti E, *et al.* Exenatide combined with islet transplantation for the treatment of type I diabetes. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 339.
- 24) Froud T, Faradji R, Baidal DA, *et al.* The use of exenatide to improve islet engraftment, function and long termsurvival. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 342.
- 25) Emamaullee JA, Schur C, Shapiro AM, *et al.* Caspase inhibitor therapy in islet transplantation promotes marginal mass islet graft survival and function. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 159.
- 26) de Thomas D, Stauffer C, Yang H, *et al.* Islet protective bioactivities of erythropoietin. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 343.
- 27) Taddeo F, Maffi P, Bertuzzi F, *et al.* Complications after islet transplantation alone: a single center experience. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 453.
- 28) CITR annual report, 2005. Available from: <https://web.emmes.com/study/isl/reports/reports.htm>. Accessed 12 June 2006.
- 29) Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, *et al.* Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005; 293: 830-835.
- 30) Hering BJ, Parkey J, Fraga D, *et al.* Islet allograft survival in type 1 diabetes with anti-thymocyte globulin, etanercept, cyclosporine, and everolimus. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 454-455.
- 31) Wood KJ, Luo S, Aki A. Regulatory T cells: potential in organ transplantation. *Transplantation* 2004; 77 (1 Suppl) : S 6-S 8.
- 32) Bortecen KH, Bushell AR, Feng G, *et al.* Local administration of in vivo generated treg prevent the rejection of islet allografts. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 155.
- 33) Elpek KG, Yolcu ES, Franke D, *et al.* A novel approach to expand CD 4+CD 25+FoxP 3+T regulatory cells ex vivo. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 155.
- 34) Rutzky L, Zhang H, Tammy P, *et al.* Host immature dendritic cells (DC) induce T regulatory (Treg) - mediated tolerance to pancreatic islets depleted of donor DC in microgravity cultures. *Transplantation* 2006; 82 (1 Suppl 3) : 157.
- 35) Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, *et al.* Insulin independence after living donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet* 2005; 365: 1642-1644.
- 36) Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, *et al.* Follow-up study of the first successful living donor islet transplantation. *Transplantation*. 2006; 82: 1629-1633.
- 37) Valdes R. Xenotransplantation trials. *Lancet* 2002; 359: 2281.
- 38) Cardona K, Korbitt GS, Milas Z, *et al.* Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nat Med* 2006; 12: 304-306.

Application of the Two-Layer Method on Pancreas Digestion Results in Improved Islet Yield and Maintained Viability of Isolated Islets

Tadahiro Goto,¹ Yasuki Tanioka,^{1,2,4} Tetsuya Sakai,¹ Sachio Terai,¹ Yasuhisa Kamoda,¹ Shiri Li,¹ Tomohiro Tanaka,¹ Toshiaki Tsujimura,^{1,2} Ippei Matsumoto,¹ Yasuhiro Fujino,¹ Yasuyuki Suzuki,³ and Yoshikazu Kuroda^{1,2}

Background. Oxygenation of the pancreas during preservation by the two-layer method (TLM) has shown beneficial effects in islet transplantation. Here, we apply this concept (oxygenation) to the isolation process.

Methods. Rat pancreases were digested using four different methods. Pancreases were digested with preoxygenated perfluorocarbon (PFC) in group 2 and without it in group 1. Additionally, adenosine was included in the collagenase solution in subgroups B but not in subgroups A. Islet yields and viability were compared between groups.

Results. Tissue oxygen tension in group 1 was essentially zero during digestion, but rapidly reached around 300 mm Hg and was maintained in group 2. The tissue adenosine triphosphate (ATP) level in rat pancreas just after laparotomy (control) was 4.2 ± 0.7 $\mu\text{mol/g}$ dry weight; after digestion, it was 0.12 ± 0.03 $\mu\text{mol/g}$, 0.70 ± 0.10 $\mu\text{mol/g}$, 0.30 ± 0.18 $\mu\text{mol/g}$, and 2.90 ± 0.80 $\mu\text{mol/g}$ in groups 1A, 1B, 2A, and 2B, respectively. No significant differences were observed between group 2B and control ($P=0.19$). Islet yields (IEQ/pancreas) were 1600 ± 400 , 1400 ± 400 , 1300 ± 400 , and 2400 ± 100 in groups 1A, 1B, 2A, and 2B, respectively. The islet yield of group 2B was significantly higher than other groups ($P<0.05$). The cure rate after transplanting 200 islets into athymic nude mice did not differ (80% in all groups). The stimulation indices in the four groups were also the same.

Conclusions. Tissue ATP levels after digestion were well maintained using TLM with adenosine digestion method. Consequently, greater numbers of islets could be retrieved. The new method was at least equivalent to islet function isolated by conventional method. Clinical study is therefore warranted.

Keywords: Islet transplantation, Digestion, Perfluorocarbon, Viability, Two-layer method.

(*Transplantation* 2007;83: 754–758)

Because of the introduction of the Edmonton Protocol (1), pancreas islet transplantation has been established as an accepted treatment modality for patients with type 1 diabetes mellitus (DM). Although short-term success rates of pancreas islet transplantation are now almost identical to those with whole organ transplantation, it is still difficult to obtain sufficient islets from a single donor for one recipient (1, 2). Insufficient islet mass isolated from a single pancreas may be the main reason for this (2). New strategies to maximize islet yield are mandatory to solve this problem. During the process of digestion to isolate the islets, the graft may be damaged by hypoxia and warm ischemia. We have developed a two-layer cold storage method (TLM) for pancreas preservation, using University of Wisconsin solution (UW) and perfluorocarbon

(PFC). TLM directly oxygenates the graft by bubbling oxygen through PFC so that the graft continuously generates adenosine triphosphate (ATP) during preservation, which is essential for cellular integrity. We have shown that cold and warm ischemic damage during procurement and preservation are reduced with TLM (3–6). It has also been shown that yield of isolated islets after pancreas preservation by TLM was significantly improved compared with UW solution (7, 8). In addition, islet transplantation from a single donor has been achieved in selected diabetic patients using TLM (9, 10). Here, we apply this method to the isolation process to examine and compare the effectiveness of oxygenation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Lewis rats weighing approximately 300–350 g (Oriental Yeast Co., Ltd. Tokyo, Japan) and male Balb-c nude mice (Clea Japan, Inc. Tokyo, Japan) aged 6 to 8 weeks were used in this study. All animals were kept and used in compliance with the “Guidelines for Animal Experimentation at Kobe University Graduate School of Medicine.” Protocols were reviewed and approved by Kobe University Animal Care Committee.

Experimental Protocols

The donor rats were anesthetized by diethyl ether (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). The common bile duct was cannulated using PE50 polyethylene tubing (Becton Dickinson Company, Sparks, MD) and the distal common bile duct was clamped. The pancreas, spleen, and duodenum were then removed en bloc. Pancreases were

This study was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan for the 21st Century COE program, Center of Excellence for Signal Transduction Disease: Diabetes Mellitus as Model.

¹ Division of Gastroenterological Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan.

² 21st Century COE Program, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan.

³ Department of Gastroenterological Surgery, Kagawa University, Kagawa, Japan.

⁴ Address correspondence to: Yasuki Tanioka, M.D., Ph.D., Division of Gastroenterological Surgery, Department of Clinical Molecular Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kobe University, 7-5-2 Kusunokicho, Chuo-ku, Kobe 650-0017 Japan.

E-mail: tanioka@med.kobe-u.ac.jp

Received 2 October 2006. Revision requested 28 November 2006.

Accepted 1 December 2006.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/07/8306-754

DOI: 10.1097/01.tp.0000256338.53305.a9

distended with either 1 mg/mL of collagenase (Collagenase P; Roche, Indianapolis, IN) solution in 10 mL of Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma, St. Louis, MO; subgroup A) or collagenase solution containing adenosine (5 mM; subgroup B). We have previously shown that adenosine is an exogenous substrate for adenosine triphosphate (ATP) production in ischemically damaged pancreases (11). This concentration of adenosine is the same as in UW.

The spleen and duodenum were removed. Distended pancreases were excised and digested according to two protocols. In group 1, distended pancreases were incubated in a 50 mL conical tube, without shaking, at 37°C for 20 min. In group 2, distended pancreases were put on PFC and incubated at 37°C for 20 min. PFC was saturated with gaseous oxygen for 30 min before use. PFC, a hyperoxygen carrier, was obtained from the F₂ Chemical Corporation (London, England). Because PFC is immiscible with water and has a high density, it clearly separates from the HBSS. The pancreas graft lies at the interface on the surface of the PFC, covered with HBSS. The digested pancreas was washed with HBSS three times by centrifugation (150g, 2 min, 4°C) and then purified on a discontinuous density gradient using Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO) and HBSS. The islets were collected and washed in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI; Gibco, Burlington, Ontario). The crude number of islets in each diameter class was determined by counting them after diphenylthiocarbazone (DTZ) staining using an optical graticule. Islet yields (islet equivalents/pancreas) were counted by two independent investigators who did not know the experimental groups and were compared among the four groups.

Measurement of Tissue Oxygen Tension and Tissue ATP Concentration

Tissue oxygen tension during digestion was measured by Clark type polarographic oxygen electrodes (Unique Medical) (12). We also measured ATP concentrations in the pancreas just after incubation, which is a good marker for their oxygenation state (13). After incubation at 37°C for 20 min, small parts of the pancreases in each group were rapidly frozen in liquid nitrogen, then lyophilized overnight, and kept at -80°C until analysis. The dry tissue ground to powder was weighed and 100 mg was homogenized in 4 mL ice-cold 0.5 N perchloric acid. The precipitated proteins were removed by centrifugation, and tissue ATP concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Then 10 μ L of supernatant was injected for HPLC on a reversed-column CLC-ODS equilibrated with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.0% methanol (14).

Glucose Stimulation Test

The insulin secretory response to glucose was measured using a modified method described previously (15). Briefly, after 1 hr culture in RPMI 1640 solution containing 60 mg/dL of glucose at 37°C, triplicate samples of 10 islets sized 150–200 μ m were handpicked and transferred to cell culture inserts (Falcon). They were then incubated in 1.5 mL of RPMI 1640 solution containing 60 mg/dL of glucose (low glucose) at 37°C for 1 hr. Thereafter, they were incubated in 1.5 mL of RPMI 1640 solution containing 360 mg/dL of glucose (high glucose) for 1 hr. Cell-free supernatants were immediately

removed and stored separately at -20°C until assessment. Insulin was measured using rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay kits (Merckodia AB, Uppsala, Sweden). Insulin release volume under high glucose stimulation was divided by that under low glucose stimulation to determine the stimulation index (SI).

Islet Transplantation

Immediately after purification, 200 islets (diameter range 150–200 μ m) in each group were handpicked. The islets were transplanted beneath the left renal subcapsule of athymic Balb-c nude mice in which diabetes had been induced by intraperitoneal injection of Streptozotocin (240 mg/kg; Roche, Indianapolis, IN) and confirmed by 3 consecutive days of nonfasting blood glucose levels >350 mg/dL. After transplantation, blood glucose levels were measured every day for the first 7 days and then every second day for the next 21 days. Intraperitoneal glucose tolerance tests were performed 21 days and nephrectomies 30 days after transplantation. Cure was defined as 3 consecutive days of blood glucose levels <200 mg/dL and subsequent return to hyperglycemia (>350 mg/dL) after nephrectomy (5).

Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

Intraperitoneal glucose tolerance testing (IPGTT) was performed 21 days posttransplantation. Normal saline containing 2.5 mg of glucose was injected intraperitoneally into fasting recipient nude mice. Blood sugar levels were measured before injection and at 5, 10, 15, 30, 60, 90, and 120 min after injection.

Data Analysis

All values were expressed as means \pm SDM. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test and the Mann-Whitney *U* test, where applicable. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

In Vitro

Tissue Oxygen Tension

Tissue oxygen tension in Group 1 was essentially zero during digestion, whereas it rapidly reached \sim 300 mm Hg and was maintained in group 2 (Fig. 1).

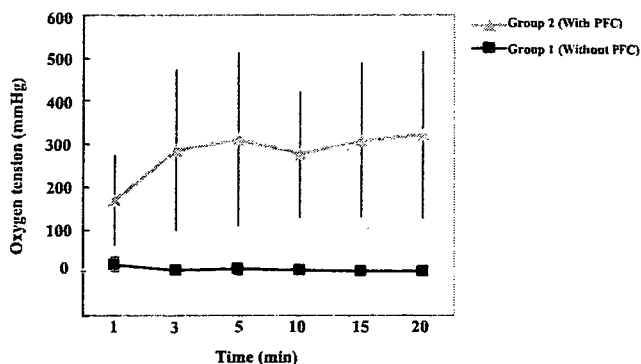


FIGURE 1. Tissue oxygen tension during digestion. In Group 1, it was about zero during digestion, whereas it rapidly reached about 300 mmHg and maintained in group 2.

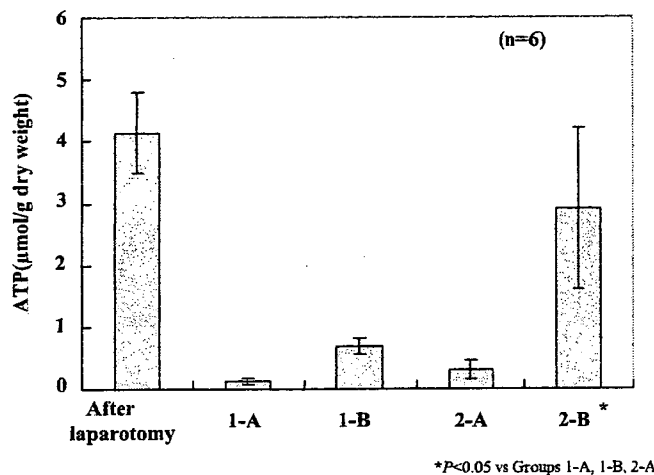


FIGURE 2. ATP concentration of each group. TLM with adenosine increased ATP levels.

Tissue ATP Levels

Tissue ATP levels just after laparotomy (controls) were 4.2 ± 0.7 $\mu\text{mol/g}$ dry weight. The ATP levels after digestion were 0.12 ± 0.03 in group 1A ($P < 0.01$ vs. control), 0.70 ± 0.10 in group 1B ($P < 0.01$ vs. control), 0.30 ± 0.18 in group 2A ($P < 0.01$ vs. control), and 2.90 ± 0.80 in group 2B ($P = 0.19$ vs. control; Fig. 2).

Islet Yields and Stimulation Index

The islet yields of all groups are shown in Table 1. Stimulation indices (in vitro function) of all groups are shown in Table 1. Islet yields (IEQ/pancreas) were 1600 ± 400 , 1400 ± 400 , 1300 ± 400 , and 2400 ± 100 in groups 1A, 1B, 2A, and 2B, respectively. Thus, when pancreases were digested by TLM with adenosine administration (group 2B), the islet yield was significantly higher than other groups ($P < 0.05$). However, the stimulation indices (in vitro function) were not significantly different among the four groups.

In Vivo

Transplantation to Nude Mouse

To investigate islet function more accurately, we assessed athymic diabetic nude mice transplanted with preserved islets (Table 2). The cure rate after transplanting 200 islets was 80% in all four groups. Thus, no differences were found between the four groups. Figure 3 showed daily blood glucose of transplanted mice in four different groups. It is clearly shown that glycemic profiles in four groups are almost

TABLE 1. Islet yields (IEQ/pancreas)

Group	PFC	Adenosine	IEQ/pancreas
1-A	—	—	1600 ± 400 (n=6)
1-B	—	+	1400 ± 100 (n=6)
2-A	+	—	1300 ± 400 (n=6)
2-B	+	+	2400 ± 100 (n=6) ^a

Data are expressed as mean \pm SD. ^a $P < 0.05$ vs Groups 1-A, 1-B, 2-A. IEQ, islet equivalent; SD, standard deviation.

TABLE 2. Islet function

Group	PFC	Adenosine	Stimulation index	Tx ^a success
1-A	—	—	1.50 ± 0.44	4/5 (80%)
1-B	—	+	1.78 ± 0.63	4/5 (80%)
2-A	+	—	1.85 ± 0.81	4/5 (80%)
2-B	+	+	2.08 ± 0.57	4/5 (80%)

Data are expressed as mean \pm SD.

^a 200 islets were transplanted beneath the left renal subcapsule of athymic Balb-c nude mice.

same indicating that insulin secretion from transplanted islets in four groups are equivalent throughout the study period.

Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

To further investigate the function of the implanted islets, we performed IPGTT 21 days posttransplantation (Fig. 4). There were no significant differences among the four groups of area under the curve resulting from this test.

DISCUSSION

Islet transplantation has become a treatment modality promising to cure patients with type 1 diabetes mellitus. However, successful islet transplantation is limited by the great loss of islets during isolation and after transplantation. Success rates are not satisfactory even at experienced high-volume centers (2, 16, 17). Currently, the Ricordi's method has become the standard procedure for use as an isolation technique (18). Certainly, this method greatly improves islet yield, but the process of pancreas digestion is still variable and unpredictable. These results are partly from the vagaries of collagenase digestion itself (19, 20) but also from the complex effects of warm ischemia and hypoxia during the process of digestion (20, 21).

We have developed a TLM for pancreas preservation using UW solution and PFC (3). Pancreas grafts were oxygenated during preservation in TLM and generated ATP, which was essential to maintain cellular integrity (14). Consequently, cold ischemia during preservation and warm ischemia during procurement were successfully reduced by TLM (6). We have clarified that tissue ATP levels of pancreas in the TLM is the most reliable and sensitive marker for oxygen status of the TLM (4). Tissue ATP levels of pancreas in the TLM showed good relation to the transplant outcome of pancreas transplantation in a dog model. We have also clarified that adenosine in UW was main substrate for ATP production in ischemically damaged pancreas (11). In terms of temperature and oxygen status, the process of pancreas digestion can be regarded as warm ischemia specific to islet transplantation.

The aim of the present studies is to apply the TLM to the process of pancreas digestion and to see its effects. In these experiments, assessing tissue oxygen tension during digestion clearly indicated that the pancreas was well oxygenated by preoxygenated PFC during digestion. We could successfully apply TLM to the process of pancreas digestion. However, oxygenation of the pancreas during digestion by preoxygenated PFC itself showed no beneficial effect on tissue ATP levels and islet yield. When oxygen was provided together with adenosine administration into the pancreas, tissue ATP levels

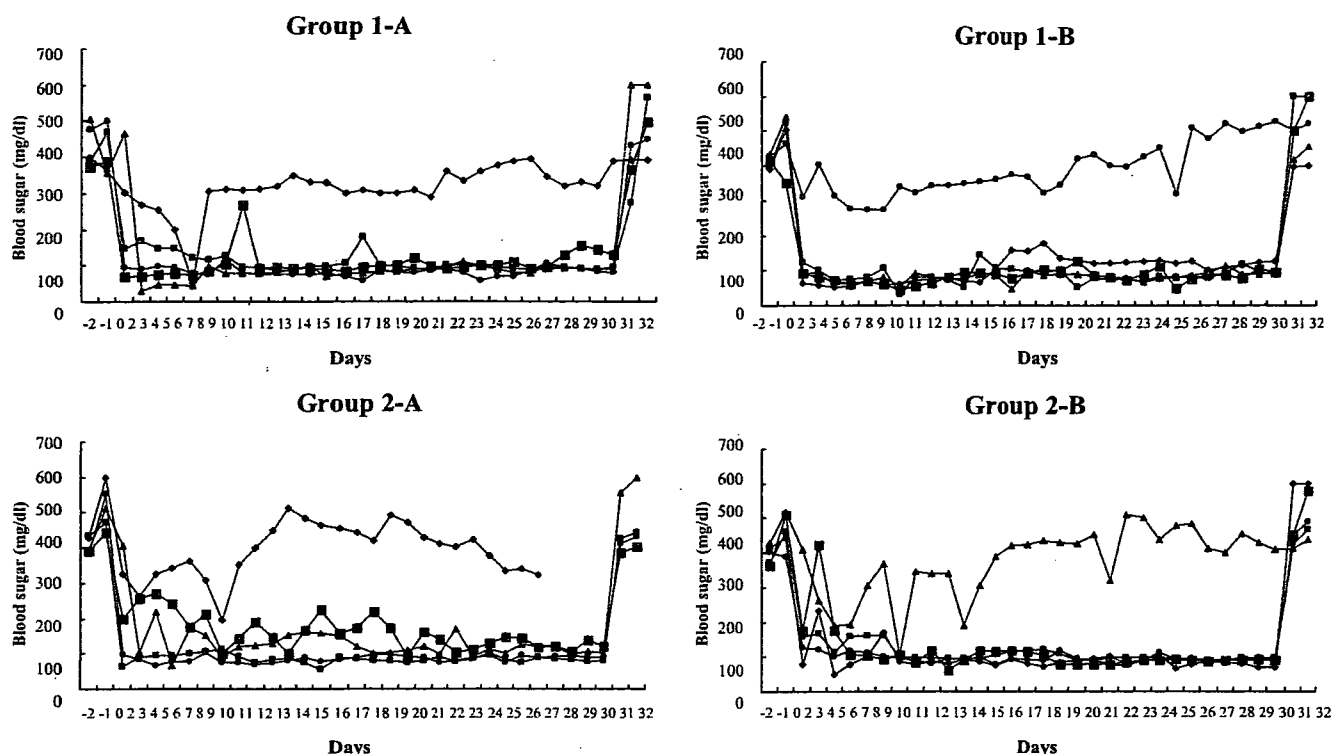


FIGURE 3. Individual daily nonfasting blood glucose levels of streptozotocin-induced diabetic nude mice after receiving 200 transplanted islets (n=5 in each group). Nephrectomies were performed 30 days after transplantation.

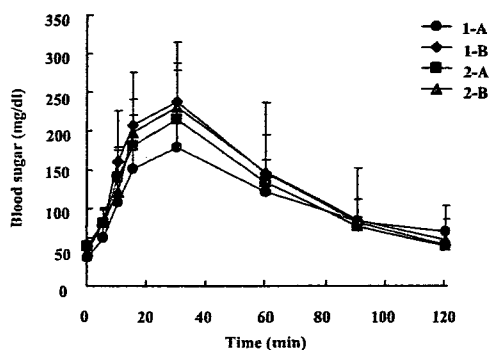


FIGURE 4. Time courses of blood glucose levels on IPGTT at 21 days after 200 islet transplantations in each group. Data are expressed as means±SD. Closed circle: group 1A (n=4); closed rhombus: group 1B (n=4); closed square: group 2A (n=4); closed triangle: group 2B (n=4).

after digestion were well maintained. Consequently, greater numbers of islets could be retrieved. These results are in accordance with those of our previous studies using dog pancreas transplant model. As mentioned before, warm ischemically damaged pancreases generated ATP using adenosine in UW and resumed their viability (4). In this context, it is reasonable to assume that adenosine administration is a key for successful application of the TLM to the process of pancreas digestion.

In addition, we tested in vitro and in vivo function of islets. Stimulation indices in group 2B (TLM with adenosine) tended to be higher than in other groups, but the differences

failed to achieve any significance. Two hundred islets from any group transplanted into nude mice showed an equal success rate. Additionally, the results of the IPGTT as well as daily blood sugar levels in four groups showed that the function of the implanted islets was also equivalent among these groups. From the present results, quality of islets isolated using new method (TLM with adenosine) was at least equivalent to that of islets isolated using the conventional method. It was also indicated that adenosine has no detrimental effect on islet yield and quality.

For assessment of the quality of isolated islets, various methods have been proposed. For example, Goto et al. reported the usefulness of the adenosine diphosphate (ADP)/ATP ratio of isolated islets (22). However, so far, islet transplantation into nude mice is regarded as one of the most reliable assessments (22). They showed that out of three independent parameters (stimulation index, insulin/DNA ratio, ATP/ADP ratio), only ATP/ADP ratio showed good correlation to transplant outcome. As mentioned in their paper, islet transplantation into nude mice is so far regarded as one of the most reliable assessments. The major drawback using this assay is its time-consuming manner. The ATP/ADP ratio could be a promising alternative for this assay.

In the present study, the advantage of our new method was only remarkable in increasing islet yield. The quality of islets was equivalent to that of islets from a conventional method. We had the same findings in various studies searching suitable pancreas preservation for islet isolation (23, 24). Islets survived by insults of digestion phase have almost equal quality. Our new method increases such “sustainable” islets compared to the conventional method.

Regarding the mechanism underlying the benefits of oxygenation during digestion, suppression of apoptosis may play a pivotal role. Apoptosis, initiated by hypoxic metabolic stress and various cytokines, was shown to be the major pathway through which islets underwent cell death. We and another group reported that apoptosis mediated by mitochondrial pathway was inhibited in pancreases after TLM preservation (25, 26). It is quite reasonable to consider that even in the process of digestion TLM acts in the same manner as in the preservation.

Another factor that could potentially affect the recovery and viability of islets is protease activity of pancreas during digestion (19). Warm ischemia is one of the causes of pancreas tissue damage and secondary leads to effects on the activity of proteases (27). Although further experiments are mandatory, we hypothesize that our new digestion method (TLM with adenosine) is effective in preventing these processes and can thus reduce islet damage from warm ischemia.

Our present study is so far the first that advocates the importance of oxygenation during pancreas digestion. Our findings will help to increase human islet yield if this idea is successfully transferred in clinical settings. However, we must take the differences between isolation method of human and rodents into consideration. Firstly, human pancreas is thicker and denser than rat pancreas. We acknowledge that a thick human pancreas is more difficult to oxygenate by the TLM, but modifications to the procedure, such as slicing the pancreas, may overcome these disadvantages. Indeed, recently, it was proposed that the effects of TLM are limited by the thickness of the pancreas (28). Secondly, human pancreas isolations generally use the Ricordi chamber. Moreover, the temperature used in human pancreas digestion is sometimes lower than 37°C. We obtained the same efficacy of oxygenation even at low temperature such as 34–35°C in our preliminary experiments (data not shown). Regarding the mode of digestion, we still regard the Ricordi method as standard. However, we are planning to perform several experiments. For instance, we try to add a new device to facilitate oxygen delivery during digestion using the Ricordi chamber. We also focus our intention to develop a new system instead of the Ricordi, which is more effective in oxygen delivery to human pancreas during digestion.

There is every possibility that smaller numbers of islets could reverse type 1 diabetes mellitus if individual islet function from pancreas digested by new method (TLM with adenosine) is sufficiently improved. Consequently, it is considered that TLM may contribute to the achievement of the goal of one donor to one recipient islet transplantation. In conclusion, this digestion method (TLM with adenosine) represents a new and promising strategy to increase islet yield in a rodent model. Clinical study is therefore warranted.

REFERENCES

- 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.
- Froud T, Ricordi C, Baidal DA, et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant* 2005; 5: 2037.
- Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, et al. A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. *Transplantation* 1988; 46: 457.
- Morita A, Kuroda Y, Fujino Y, et al. Assessment of pancreas graft viability preserved by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) method after significant warm ischemia. *Transplantation* 1993; 55: 667.
- Fujino Y, Kuroda Y, Suzuki Y, et al. Preservation of canine pancreas for 96 hours by a two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1991; 51: 1133.
- Matsumoto S, Kandaswamy R, Sutherland DER, et al. Clinical application of the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical plus O₂) method of pancreas preservation before transplantation. *Transplantation* 2000; 70: 771.
- Hiraoka K, Trexler A, Eckman E, et al. Successful pancreas preservation before islet isolation by the simplified two-layer cold storage method. *Transplant Proc* 2001; 33: 952.
- Tanioka Y, Sutherland DER, Kuroda Y, et al. Excellence of the two-layer method (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) in pancreas preservation before islet isolation. *Surgery* 1997; 122: 435.
- Ricordi C, Szust J, Al-Adullah I, et al. Towards making every pancreas count: significant improvement in human islet isolation from marginal (older) donors following addition of oxygenated perfluorocarbon to the cold storage solution. *Am J Transplant* 2002; 2: 229.
- Tsujimura T, Kuroda Y, Kin T, et al. Human islet transplantation from pancreases with prolonged cold ischemia using additional preservation by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation* 2002; 74: 1687.
- Kuroda Y, Hiraoka K, Tanioka Y, et al. Role of adenosine in preservation by the two-layer method of ischemically damaged canine pancreas. *Transplantation* 1994; 57: 1017.
- Matsumoto S, Kuroda Y, Hamano M, et al. Direct evidence of pancreatic tissue oxygenation during preservation by the two-layer method. *Transplantation* 1996; 62: 1667.
- Kuroda Y, Fujino Y, Kawamura T, et al. Mechanism of oxygenation of pancreas during preservation by two-layer (Euro-Collins' solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation* 1990; 49: 694.
- Fujino Y, Kuroda Y, Morita A, et al. The effect of fasting and exogenous adenosine on ATP tissue concentration and viability of canine pancreas grafts during preservation by the two-layer method. *Transplantation* 1993; 56: 1083.
- 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.
- Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005; 16: 830.
- Street CN, Lakey JRT, Shapiro AMJ, et al. Islet graft assessment in the Edmonton protocol. *Diabetes* 2004; 53: 3107.
- Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988; 37: 413.
- Lakey JRT, Helms LMH, Kin T, et al. Serine-protease inhibition during islet isolation increase islet yield from human pancreases with prolonged ischemia. *Transplantation* 2001; 72: 565.
- Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 2004; 53: 2559.
- Abdelli S, Ansite J, Roduit R, et al. Intracellular stress signaling pathways activated during human islet preparation and following acute cytokine exposure. *Diabetes* 2004; 53: 2815.
- Goto M, Holgersson J, Kumagai-Braesch M, et al. The ADP/ATP ratio: a novel predictive assay for quality assessment of isolated pancreatic islets. *Am J Transplant* 2006; 6: 2483.
- Kneteman NM, DeGroot TJ, Warnock GL, et al. The evaluation of solutions for pancreas preservation prior to islet isolation. *Horm Metab Res* 1990; 25: 4.
- Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35.
- Ramachandran S, Desai NM, Goers TA, et al. Improved islet yields from pancreas preserved in Perfluorocarbon is via inhibition of apoptosis mediated by mitochondrial pathway. *Am J Transplant* 2006; 6: 1696.
- Matsuda T, Suzuki Y, Tanioka Y, et al. Pancreas preservation by the 2-layer cold storage method before islet isolation protects isolated islets against apoptosis through the mitochondrial pathway. *Surgery* 2003; 134: 437.
- Benz S, Schnabel R, Weber H, et al. The nitric oxide donor sodium nitroprusside is protective in ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *Transplantation* 1998; 66: 994.
- Papas KK, Hering BJ, Gunther L, et al. Pancreas oxygenation is limited during preservation with the two-layer method. *Transplant Proc* 2005; 37: 3501.

■ 原 著

膵提供からみた膵島移植の現状と問題点 —当施設における経験—

大河原弘達¹, 谷岡康喜^{1,2}, 酒井哲也², 春日雅人¹, 黒田嘉和^{1,2}

Current status of pancreas donation for islet transplantation —Single center experience from 2004 to 2007 in Japan—

¹Kobe University School of Medicine 21st Century Center of Excellence Program,
²Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Kobe University

Hirotsu OHKAWARA¹, Yasuki TANIOKA^{1,2}, Tetsuya SAKAI², Masato KASUGA¹, Yoshikazu KURODA^{1,2}

【Summary】

Objective: Stable organ donation is one of the keys for successful transplantation. We retrospectively reviewed our records of pancreases donated for islet transplantation to clarify current problems and provide a future perspective to increase the number of pancreas donations.

Design: Case-control study.

Methods: From April 1 2004 to March 2007, we were informed of 24 potential donors for islet transplantation from the Japan Organ Transplant Network (JOT) via the West Japan Tissue Transplant Network. Of those, 8 pancreases were procured for islet isolation. The remaining of 16 cases did not meet the inclusion criteria for pancreas procurement for various reasons. The records of these 24 cases were retrospectively reviewed.

Results: Twelve cases were rejected for medical reasons, namely infectious diseases in 5 cases (TPHA-positive, 2 cases; HCV-positive, 1 case; HTLV-1-positive, 1 case; and autoimmune disease, 1 case), cardiac arrest in 3 cases, abnormal blood parameters in 1 case, and highly edematous pancreas upon laparotomy in 1 case. In the other 4 cases, the processes of written consent from a kin for organ and/or tissue donation were not completed. In contrast, we procured pancreases for islet transplantation in 4 cases in so called type 4 hospitals and in 4 cases in emergency hospitals. Donors were hospitalized because of intra-cranial bleeding in 4 cases, hypoxic encephalopathy in 3 cases, and brain infarction in 1 case. Attending doctors played a key role for donation in 3 cases.

Conclusion: Educational programs about donation to staff in emergency hospitals are important and necessary. The process of getting consent from a kin must be improved.

Keywords: islet transplantation, pancreas donation, informed consent

1. はじめに

提供臓器の確保は、移植医療を確立するための第一歩といえる。臓器移植においては、日本臓器移植ネットワークを中心に、臓器提供のための社会基盤が整備されている。一方、組織移植に分類され、臓器移植法の範疇外であるわが国の膵島移植においては、従来組織提供のための社会基盤が、特に西日本地域ではきわ

めて脆弱であった¹⁾。そこで、組織提供を円滑に進めるために、国立循環器病センターに神戸大学が協力し、西日本組織移植ネットワークが設立された。2004年11月からは、専任の組織移植コーディネーター(Co)2人が着任した。しかしながら、提供臓器を確保するためには、Coを補佐する目的から、組織バンクとも言うべき膵島分離・移植施設が果たすべき役割は依然として大きいといえる。

今回、提供臓器確保に向けた今後の神戸大学の活動の方向性を明らかにすべく、現在までの神戸大学における膵提供について検討した。

¹神戸大学医学部 21世紀 COE プログラム, ²神戸大学大学院外科学講座

(2007・6・12 受領; 2007・8・3 受理)

表1 膵・膵島移植研究会で認定された膵島分離・移植施設と担当地域

施設	担当地域
東北大学	北海道*, 青森, 岩手, 宮城, 秋田
福島県立医大	北海道*, 福島, 山形, 新潟, 群馬, 栃木, 茨城(北部)
千葉東病院	茨城(南部), 埼玉, 千葉, 東京, 神奈川
京都大学	東海・北陸地方, 京都, 滋賀, 奈良
大阪大学	大阪**, 和歌山**
神戸大学	兵庫, 中国・四国地方
福岡大学	九州・沖縄地方

*: 交互に担当 ** : 2007年3月までは神戸大学が担当

II. 対象と方法

1. 膵島移植実施におけるブロック体制

わが国の膵島移植は、1997年から膵・膵島移植研究会ワーキンググループ“膵島移植班”を中心に全国の多施設共同研究の形で臨床実施準備が進められてきた²⁾。2007年4月、大阪大学が新たに加わり、全国で7施設が膵島分離・移植施設として認定され、臨床膵島移植を実施している(表1)。膵島移植においては、冷阻血障害により、膵島分離成績が低下することが知られており、摘出膵の搬送・保存には、われわれが開発した膵保存法である二層法の使用が望ましい³⁾。また、臓器搬送時間も可及的に短縮することも必要である⁴⁾。そこで、他の移植とは異なり、ドナー発生地域

によって膵島分離・移植施設があらかじめ定められており(ブロック制の導入)、神戸大学は兵庫県と中国・四国地方を担当している(表1)。

2. 神戸大学におけるドナー発生からの情報の流れ

図1は、神戸大学におけるドナー発生からの情報の流れと臓器提供(膵島移植のための膵臓の提供)の説明(IC)の流れを示している。神戸大学では、膵島移植のための膵臓提供にあたっては、心停止前にカニューレーションが行われる腎提供症例に限定している。そのため、神戸大学におけるドナー情報は、日本臓器移植ネットワーク(JOT)西日本支部あるいは各府県臓器移植コーディネーター(県Co)から、西日本組織移植ネットワークを介して寄せられることがほとんどである。また、提供にあたっては、JOT、県Coとの取り決めにより、まず臓器提供(腎提供)のICをJOTCoあるいは県Coが行った後、ご家族に対して組織提供に関するオプション提示を行い、承諾が得られた場合に、改めて組織移植Coにより膵島移植のための膵臓の提供に関するICが行われている。

今回、2004年度から2006年度(2004年4月～2007年3月)までの3年間に神戸大学に寄せられたドナー情報(初期情報の段階で、年齢、感染症、合併症等で適応無しとなったものを除く)について、西日本組織移植ネットワークの協力の下に検討した。

III. 結果

この3年間に神戸大学に寄せられたドナー情報は、

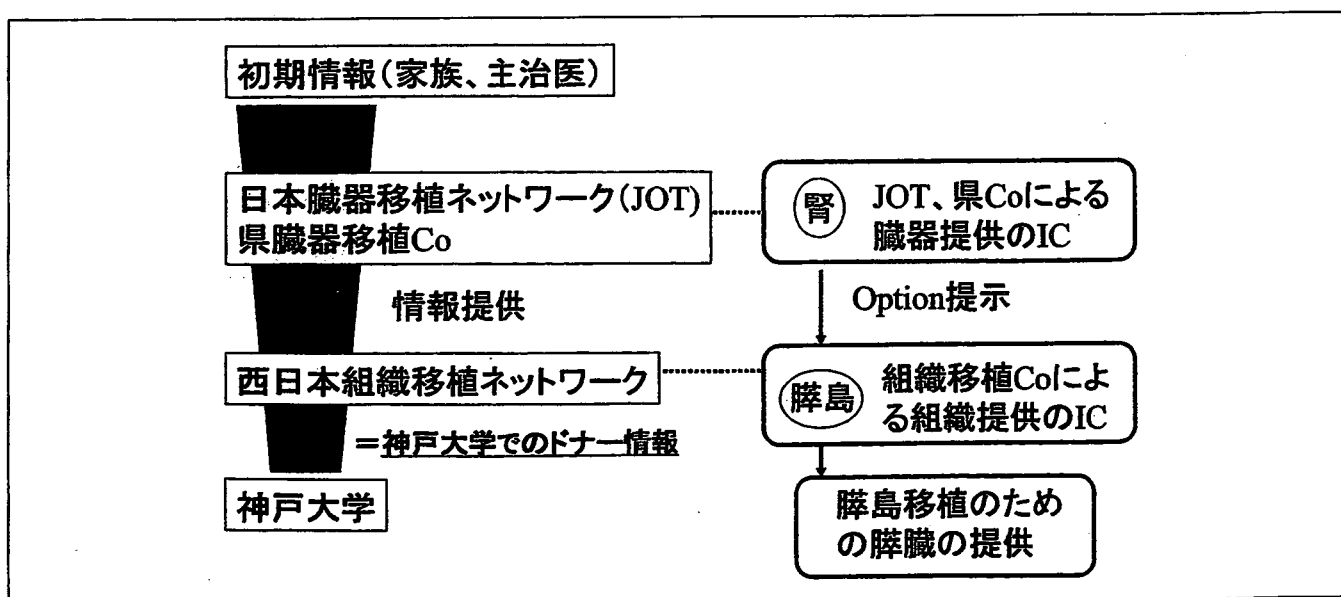


図1 ドナー発生後の情報の流れとICの流れ(神戸大学の場合)

表2 神戸大学に寄せられたドナー情報

地域	2004年度	2005年度	2006年度	計
近畿(大阪・兵庫・和歌山)	6(3)	5(3)	9(2)	20(8)
中国・四国	0(0)	1(0)	2(0)	3(0)
その他*	0(0)	1(0)	0(0)	1(0)
計	6(3)	7(3)	11(2)	24(8)

() : 実際に提供に至ったもの

* : 脾臓移植マニュアルに規定されたバックアップ

表3 提供に至らなかった症例の内訳

医学的理由	12例	家族の同意が得られず	4例
感染症	5	臓器提供のIC後	
TPHA陽性	2	組織提供のICができず	3
HCV抗体陽性	1	組織提供のICができた	1
HTLV-1抗体陽性	1		
自己免疫疾患	1		
急変(心停止)	3		
血液検査異常	2		
開腹所見	1		
その他	1		

近畿地方(大阪府・兵庫県・和歌山県)から20例(うち実際に提供に至ったもの8例)、中国・四国地方から3(0)例、その他1(0)例の合計24(8)例であった(表2)。年度別に見てみると、2004年度は6例(提供数3例)、2005年度は7例(3例)、2006年度は11例(2例)と着実に情報数は増加していたが、提供数はほぼ横ばいであった。3年間に8例の脾臓の提供が実現したが、全例近畿地方からの提供であった。

次に、提供に至らなかった16例について、その理由を見てみると(表3)、医学的理由によるものが12例、家族の同意が得られなかったものが4例であった。医学的理由によるものの内訳は、初期情報の段階では明らかではなかった感染症が新たに判明したものが5例(TPHA陽性2例、HCV抗体陽性1例、HTLV-1抗体陽性1例、その他1例)、患者さんが急変(心停止)したものの3例、入院中の血液検査異常によるものの2例、摘出手術時の開腹所見で脾臓に異常を認めたものの1例、その他1例であった。一方、脾臓移植への脾臓提供に関して、家族の同意が得られなかったものの4例については、臓器移植に関するIC後、組織移植Coの説明が行えなかったものの3例、組織移植Coが説明はできたものの同意が得られず提供に至らなかったものの1例であった。

次いで、提供に至った8例について検討した。まず、原疾患に関しては、脳出血4例、低酸素脳症3例、脳梗塞1例であり、全例が脳神経外科入院中の症例からの提供であった(図2)。また、提供施設は、2次救急施設、4類型施設がともに4例ずつであった(図3)。さらに提供の契機をみてみると、家族からの申し出が5例であり、主治医からのオプション提示も3例あった(図3)。

IV. 考察

移植医療を成功させるためには、臓器・組織を安定して確保することはきわめて重要である。臓器移植においては、臓器移植法をはじめとする法整備とともにJOTCo、県Coを中心に、臓器提供のための社会基盤が、全国レベルで整備されている。

一方、組織移植においては、法律はもとよりコーディネーションの体制も著しく立ち遅れていた。そこで、従来個別に活動していた東西の組織移植研究会が合併・統合して、2001年10月に日本組織移植学会が設立され、全国レベルの指針作成に着手した。その結果、2003年に“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”、“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”がまとめられた。以来、脾臓移植を含む組織移植は、このガイドラインを遵守して施行されることになった。一方、コーディネーターに関しても、既に活動していた東日本組織移植ネットワークに対応する形で、2004年4月に西日本組織移植ネットワークが設立され、形の上ではようやく臓器移植の場合と同様の体制が整えられた。しかし、西日本組織移植ネットワークの場合、専属の組織移植Coは現在2名のみであり、ネットワークを補佐する意味においても、ドナー確保のために組織バンクの果たす役割は依然として大きいといえる。

今回のドナー情報の検討から、①臓器提供の説明は