

表1. 献腎移植レシピエント背景 (国立病院機構千葉東病院外科, 39例, 2004年4月~2009年1月)

1. 症例数(16歳以上/未満)	39例(36/3)
2. 年齢	46.6±13.0歳
3. 性(男/女)	26/13
4. 原疾患	
1)慢性糸球体腎炎	20例(51.3%)
2)IgA腎症	5例(12.8%)
3)腎硬化症	2例(5.1%)
4)糖尿病	1例(2.6%)
5)低形成腎	1例(2.6%)
6)アルポート症候群	1例(2.6%)
7)その他	4例(10.3%)
8)不明	5例(12.8%)
5. 透析年数	
1)16歳以上	19.3±6.1年
2)16歳未満	3.3±2.4年
6. 移植結果	
1)Primary nonfunction	2例(5.1%)
2)即利尿例	5例(14.3%)
3)転帰	2例:Primary nonfunction 1例:移植後約1年で慢性拒絶反応のため透析再導入

ロコリンズ液を用いている。

3. 当施設の献腎移植症例

当施設では2004年4月開院以来, 現在までの4年10ヶ月間に39例の献腎移植を施行している。レシピエントの背景因子を表1に示す。年齢は46.6±13.0歳で, 透析導入原疾患は慢性糸球体腎炎が20例(51.3%)と最も多かった。透析歴は16歳以上の症例は19.3±6.1年と長期透析歴を有しており, 最長例は30年4ヶ月であった。免疫抑制法は生体腎移植と同じプロトコールであり, サイク

ロスポリンAまたはタクロリムス, ミコフェノール酸モフェチル, プレドニゾロン, バシリキシマブの4剤併用療法とした。2症例では尿量は1日250~350mlと部分機能は認めるものの, 透析離脱はできず, Primary nonfunctionであった。他の機能発現例では, 移植後約1年で慢性拒絶反応のため透析導入となった1例を除き, 生着中である。

4. 献腎移植ドナーの背景因子

当施設39例の献腎移植のドナー30名の背景因子

表2. 献腎移植ドナー背景 (国立病院機構千葉東病院外科, 30名, 2004年4月~2009年1月)

1. ドナー数	30名
2. 脳死/心停止ドナー数	5名/25名
3. 年齢・性(男/女)	44.4±15.7歳(13名/17名)
4. 死因	
1) 脳血管障害	15名(50.0%)
2) 低酸素脳症	10名(33.3%)
3) 脳挫傷	5名(16.7%)
5. 心停止エピソードの有無	有:12例(40.0%), 無:18例(60.0%)
6. 人工呼吸器の中断の有無	4/25(16.0%) (脳死ドナーを除く)
7. 昇圧剤使用の有無	有:24例(80.0%), 無:6例(20.0%)
8. 低血圧(60mmHg以下)持続時間	0~39時間(5.5±9.5)
9. 無尿持続時間	0~38時間(8.5±13.7)
10. 心停止前カニューレーションの有無	有:14例(46.7%), 無:16例(53.3%)
11. 温阻血時間	0~29分(7.2±8.4)
12. 総阻血時間	4.6~18.8時間(9.4±3.5)

を表2に示す。脳死ドナー5名、心停止ドナー25名で、年齢は44.4±15.7歳、男女比は男性13名、女性17名であった。死因は脳出血やくも膜下出血などの脳血管障害が15名(50.0%)と半数を占め、蘇生後脳症などの低酸素脳症が10名(33.3%)と続いており、交通事故などによる脳挫傷は5名(16.7%)と少なかった。蘇生後脳症などで心停止のエピソードを有する例は12例(40.0%)と高率であった。人工呼吸器の中断(レスピレーターオフ)を行ったのは4名(16.0%)のみであった。昇圧剤は24名(80.0%)と多くの例で使用し、使用例では最終投与量もDOA, DOBともに10γ以上と多量であった。血圧が60mmHg以下の低血圧持続時間は0~39時間(平均5.5時間)で、無尿時間は0~38時間(平均8.5±13.7)時間と長時間の死戦期が存在した。24時間以上の無尿が見られた例も6例(20%)であった。急激な心停止や臨

床的脳死診断がされないなどの理由により、心停止前のカニューレーション、全身ヘパリン化ができなかった例は16例(53.3%)と半数以上を占めていた。温阻血時間は7.2±8.4分、総阻血時間は9.4±3.5時間であった。

5. UNOSのECD基準による検討

当施設の献腎移植ドナーをECD基準で2群に分け移植成績について比較検討した。当施設の献腎移植ドナー30名をECD基準で分けると、ECD群9名(30.0%)、Non-ECD群21名(70.0%)であり、心停止ドナーであることを除いても、3割のドナーがECDの基準を満たした。同一ドナーからの2腎が当施設の2例のレシピエントに移植される例があるため、両群のレシピエントはECD群12名(34.3%)、Non-ECD群23名(65.7%)であった。ECD群ドナー9名のうち、年齢が60

表 3. 献腎移植ドナーのUNOS Expanded criteria donor (ECD) による比較検討 (国立病院機構千葉東病院外科, 30名, 2004年4月~2009年1月)

ドナー結果			
群	ECD 群 (n=9)	non-ECD 群 (n=21)	p value
年齢(歳)	63.4±6.0	36.2±10.5	<0.001
男/女	5/4	9/12	NS
最終血清Cr値(mg/dl)	3.5±2.3	3.8±3.6	NS
レシピエント結果			
群	ECD 群 (n=12)	non-ECD 群 (n=23)	p value
1. Primary nonfunction	2/12(16.7%)	0/23(0%)	NS
2. 移植後即利尿	0/12(0%)	5/23(21.7%)	NS
3. 1ヵ月後血清 Cr 値	2.78±1.34mg/dl	1.84±0.63mg/dl	<0.05

歳以上の条件に合致したのが6名, 50歳以上で脳血管障害, 高血圧, 血清クレアチニン値1.5mg/dl以上を伴う条件に合致したのが3名であった。表3に両群の比較検討結果を示す。当然であるが, ECD群のドナーの年齢は63.4±6.0歳とnon-ECD群の36.2±10.5に比較し, 有意に高齢であった。ドナーの最終クレアチニン値はECD群で3.5±2.3mg/dl, non-ECD群で3.8±3.6mg/dlと差を認めず, 血清クレアチニン値は今回の検討では有意な要因ではないと考えられた。レシピエントの結果の比較では, Primary nonfunctionはnon-ECD群ではみられず, ECD群で2例(16.7%)にみられた。また移植後側利尿はECD群ではみられなかったが, non-ECD群で5例(21.7%)にみられた。5例のうち4例は脳死ドナーであったが, 1例は心停止ドナーであった。1ヵ月後の血清Cr値はECD群で2.78±1.34mg/dlであったのに対し, non-ECD群では1.84±0.63mg/dlと有意に低値を示した。また3ヵ月後の血清クレアチニン値もECD群で1.89±0.83mg/dl, non-ECD群で1.45±0.32mg/dlとnon-ECD群で良好であった(図1)。

以上の結果より, UNOSのECD基準は心停止ドナーが多いわが国においても, Primary nonfunction, 移植後即利尿発現の予測などの移植腎予後を反映し, 特に移植後早期の腎機能の予測が可能であると考えられた。しかしながら, ECD基準の項目である血清クレアチニン値は今回の検討では両群に差を認めなかった。これは欧米では脳死ドナーを対象としているため無尿時間は短く, ドナー腎機能を反映するが, わが国の場合には, 心停止であり, ほとんどの例でレスピレーターオフはされないため, 長時間の低血圧や乏尿・無尿の時間が存在し, 死戦期には腎血流の低下に伴う急性腎不全の病態を呈するため, 摘出前に急激に上昇することも多い。したがって血清クレアチニン値はドナーの真の腎機能を表すものではない。事実当施設では最終クレアチニン値が10mg/dl以上のドナーから3例の献腎移植を施行したが, いずれもレシピエントの血清クレアチニン値は1.5mg/dl以下と腎機能良好で生着中である。

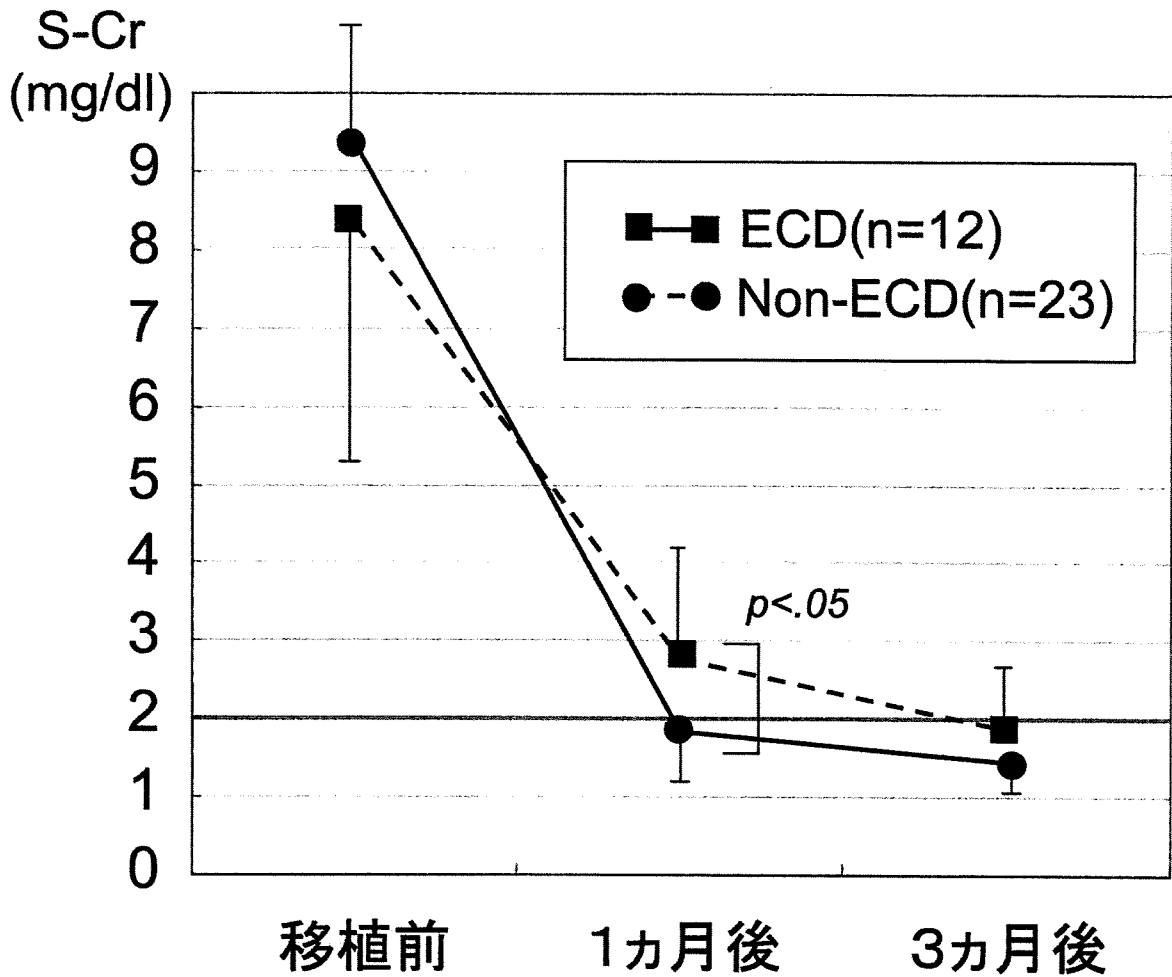


図1. 献腎移植後の血清クレアチニン値の推移.

Non-ECD群では1ヶ月後、3ヶ月ともにECD群に比較して低値であり、良好な腎機能を維持していた。(国立病院機構千葉東病院外科, 2004年4月~2009年1月)

5. 考察

心停止ドナーからの臓器提供がほとんどであるわが国の献腎移植においては、マージナルドナーの使用は回避できないのが現状である。心停止ドナーにおいては臓器のViabilityが低下する極めて多くの要因が存在する。ドナーの因子としての、年齢、死因（動脈硬化の程度）、高血圧、糖尿病、肝硬変などの全身疾患の合併などがあげられる。またレスピレータオフが極めて少ないわが国の現状では、死戦期での血圧低下に伴う臓器の血流障害や血栓形成、臓器の低酸素化などで、温阻血に

匹敵する臓器障害が進行する。また摘出時には、温阻血障害の他、急速な灌流による臓器・組織の浮腫による障害が加わる。また保存時間が長時間となれば細胞内のアシドーシスによる低温保存障害が起こる。これらの障害はすべて移植後血流再開後に虚血再灌流障害として表出する。献腎移植では虚血再灌流障害は急性尿細管壊死（Acute tubular necrosis: ATN）を引き起こし、回復するまで無尿期が存在する。生体腎移植や脳死腎移植ではほとんど無尿期がないことより、心停止ドナーの死戦期の影響であると考えられる。

このような現状より、それぞれの障害を少なく

するために種々の工夫がされてきた。筆者らも長時間の死戦期を伴うマージナルドナーからの腎臓の機能保持を目的として、腎摘出に際して、急速冷却と血球成分や微小血栓の除去を目的として、ISMW法を考案し、Rapid wash out and coolingにより、満足すべき結果を得ている。しかしながら、灌流状態は良好であり、肉眼的には問題ないと判断した腎のPrimary nonfunctionを最近経験し、摘出前にすでに機能が発現しなくなるまでにViabilityが低下している例もあり、このようなドナーの摘出前評価法の必要性を痛感した。本ドナーは70歳以上で、高血圧を伴い、死因は脳出血であった。摘出に際しては年齢のこともあり、ドナーのご家族には十分なInformed consentをコーディネーターから実施していただき、摘出後の臓器の状態により移植に至らず、提供の意思を叶えられない可能性もあることをお伝えし、摘出に至った。軽度アルコール性肝硬変を認めたが、灌流状態は良好であり、移植可能と判断した。移植は2名のレシピエントに行われ、無尿期を経て利尿発現したが2名ともに1日250~350mlの尿量であり、人工透析を併用している。またこの2例を含め当施設では4例の70歳以上のドナーからの献腎移植を施行したが、他の2例は腎機能発現し、透析を離脱したが、血清クレアチニン値は2.5mg/dlと高値で推移している。このような観点より、ドナーの年齢の要因は極めて重要であると考えられる。

摘出後の移植前のviabilityの評価法として、Matsunoらは、低温持続灌流法を用いた評価を推奨している^{10, 11)}。筆者らも臓器灌流装置ORPH3000C (Senko Med Mgf. Co., Tokyo)を用いてイヌ肝、脾を低温持続灌流し、酸素消費量、組織灌流量による移植前のviabilityの判定が可能であることを報告した^{12, 13)}。低温持続灌流法は摘出された臓器の移植後の血流状態や代謝機能をシミュレーション可能な優れた方法であるが、灌流装置が必要であり、比較的複雑なセッティングなどの手間がかかること、灌流しながらの搬送は不可能であることなどより一般的に使用されない。

しかし、最近搬送可能な臓器灌流装置 (LifePort™ Kidney transporter, Organ Recovery System, Inc., Illinois) が開発された¹⁴⁾。わが国のような心停止ドナーからの献腎移植の際に、摘出腎の機能の評価および機能回復に寄与する可能性を有しており期待される。筆者も現在イヌ腎移植モデルにて有用性につき基礎的に検討中である。

UNOSのECD基準では脳死ドナーにおいても年齢のファクターを最重要視しており、次に動脈硬化の程度を脳血管障害、高血圧の要因で評価している。今回の筆者の検討では、クレアチニン値はわが国のドナー評価には妥当ではないと考えられたが、UNOSのECD基準は、わが国の献腎移植において、移植腎の予後、機能の予測がある程度可能であり、有用と考えられた。特に献腎移植の医療現場においては、Primary nonfunctionの回避は最も重要なことである。Primary nonfunctionはドナーおよびご家族の崇高な提供意思を完全に達成できないのみならず、長期の待機を余儀なくされるレシピエントにとっては、大きな精神的負担を強いられることになる。勿論、Primary nonfunctionはドナーの要因のみで決まるものではなく、長期待機、長期透析に伴う、レシピエントの動脈硬化や血栓形成、免疫学的要因、薬剤の副作用などの様々な要因が重なり生じるものであり、ドナーの評価のみで解決し得るものではない。しかしながら、長期の待機が当たり前の現在のわが国の献腎移植においては、レシピエントの動脈硬化や心血管系合併症の頻度は高いため、よりドナーの評価、選択を厳重に行うことの重要性が増している。移植後のPrimary nonfunctionは心血管系イベントや全身状態の低下をも惹起する可能性もあり、レシピエントの命に関わる重要なテーマである。

現在までにわが国で施行された献腎移植ドナーの背景因子とレシピエントの短期、長期成績を解析し、わが国の状況に即した、献腎移植ドナー適応基準、特にPrimary nonfunctionのリスクが大きいドナーの基準を示すことは、今後の献腎移植

の安全性向上の上極めて有用である。一方では、献腎移植ドナーのViability低下は多くの要因であり、基準を作成することは困難であること、基準を設けると提供可能なドナーが失われ、更にドナー数の減少につながるという意見もある。しかし本当にそうであろうか。筆者も移植学会の臓器提供推進委員として、提供施設の医師たちとのディスカッションを行っているが、提供医よりドナーの具体的適応基準を求めること声が多く聞かれる。勿論、感染症、悪性腫瘍、腎臓に異常がある場合にはドナーの適応ではないという基準は皆周知しているのである。しかしたとえば80歳の方に救急医からオプション提示しても良いのか、糖尿病や肝硬変といった全身疾患を合併している場合はどうか、などの具体的な質問を受けるにつけ、やはり移植医として、今までのわが国の経験から一定の基準作りは必要であると考えている。また患者さん側からも、60歳を過ぎても提供できるのですか、昔癌になったから私はできないと思っていました、といった意見も聞かれ、むしろ基準を提示することで、今まで提供ができなかったとされていた人に提供の意思実現の機会をもたらすことも可能であろう。

6. 終わりに

わが国では約12,000の透析患者さんが腎移植を待っているが、年間の献腎移植数は200例と深刻なドナー不足である。このような現状で、一人でも多くの患者さんを救うために、移植医は、マージナルドナー提供の腎臓をより安全に使用するための研究を継続し、わが国の献腎移植の成績は心停止ドナーを用いているにも関わらず脳死腎移植が標準である欧米をも凌駕する成績を上げている。しかしながら、未だ数%にはPrimary non-functionがあり、献腎移植の安全性と有効性の追求は、現在尚重要な課題である。UNOSのECDのような基準の提示はわが国の40余年間を超える献腎移植症例の検討からなされるべきであり、そのことが、レシピエントの成績向上に寄与するのみでなく、今後臓器提供の現場も含め献腎移植医療

が理解、信頼されることにつながると信じている。

文献

- 1) 八木澤 隆. 臨床腎移植統計報告. 第42回日本臨床腎移植学会. 1月29日, 浦安市.
- 2) 社団法人日本臓器移植ネットワーク・ホームページ (<http://www.jotnw.or.jp/>)
- 3) Metzger R, Delmonico F, Feng S, et al. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant* 3 : 114-125, 2003
- 4) 剣持 敬, 福岡敏幸, 林 良輔, 他. 温阻血腫・腎摘出のための死体内灌流液としてのUW solutionの有用性. *移植* 26 : 127-132, 1991
- 5) 有田誠司, 浅野武秀, 剣持 敬, 他. 初期灌流液CMH solutionの有用性の解析—初期灌流におけるhydroxyethyl starch, mannitolの効果. *Organ Biology* 1 : 117-124, 1994
- 6) 剣持 敬, 浅野武秀, 磯野可一. 腎保存の現況. *低温医学* 23 (4) : 242-248, 1997
- 7) Asano T, Enomoto K, Ohtsuka M, et al. Usefulness of rapid machine cooling in the procurement of livers. *Transplant Proc* 21 : 1307-1308, 1989
- 8) 剣持 敬, 浅野武秀, 丸山通広, 他. 当施設の献腎摘出方法. *Organ Biology* 12 : 39-46, 2005
- 9) 鈴木孝雄, 浅野武秀, 落合武徳, 他. 死体内腎冷却灌流装置の開発. *移植* 16 : 482-486, 1981
- 10) Matsuno N, Sakurai E, Tamaki I, et al. The effect of machine perfusion preservation versus cold storage on the function of kidneys from non-heart-beating donors. *Transplantation* 57 : 293-294, 1994
- 11) Matsuno N, Sakurai E, Uchiyama M, et al. Role of machine perfusion preservation in kidney transplantation from non-heart beating donors. *Clin Transplant* 12 : 1-4, 1998
- 12) 植松武史. 肝移植のためのviability assay法—

- 摘出肝の低温持続灌流下における組織酸素消費量測定の意義—日外会誌90：1765-1773, 1989
- 13) Kenmochi T, Asano T, Nakagori T, et al. The studies of the viability assay of canine segmental pancreatic grafts by short-time perfusion technique. Transplantation 53 : 745-750, 1992
- 14) Reznik ON, Bagnenko SF, Loginov IV, et al. Increasing kidneys donor' s pool by machine perfusion with the LifePort—pilot Russian study. Ann Transplant 11 : 46-48, 2006

特集「移植の医療経済」

各臓器移植分野における医療経済
膵臓移植の医療経済

剣持 敬^{1,2}

¹ 国立病院機構千葉東病院外科, ² 国立病院機構千葉東病院臨床研究センター

はじめに

膵臓移植 (pancreas transplantation) は1型糖尿病などの重症糖尿病に対する根治療法である。欧米においては既に23,000例以上の臨床例の蓄積があり¹⁾, 治療法として確立されているといえる。わが国においても1984年に最初の脳死膵臓移植 (膵・腎同時移植) が施行されたが²⁾, 脳死問題が社会的な論議となり, その後心停止ドナー膵臓移植が行われた。1997年の臓器移植法の施行後, 2000年に脳死膵臓移植が再開され³⁾, 現在までに50例以上が行われている。医師, 看護師, 移植コーディネーターなどの医療従事者や医学研究者は, 膵臓移植の手技, 合併症, 成績, 安全性などの医学的側面や脳死, 生体ドナーからの膵臓の提供に伴う倫理的・社会的側面についてはきわめて多くの基礎的, 臨床的研究を行ってきた。その成果として, 膵臓移植の成績は格段に向上し, 欧米, わが国ともに膵臓移植は重症糖尿病の1治療法として認識されている。

しかしながら, 移植医, 移植研究者にとって, 膵臓移植にはどのくらいの費用がかかるのか, 脳死や心停止また生体ドナーからの膵臓移植実施において, どのような医療費の支払いシステムがわが国に存在するかといった医療費の問題, ひいては対象疾患である糖尿病に現在のわが国でどのくらいの医療費が必要であり, 膵臓移植の推進が国民の健康に寄与するのみでなく, わが国の医療費削減に寄与するかといった医療経済に関しては, 専門外分野でもあり, あまり研究対象としてこなかったのも事実である。しかし実際に移植を行う医師である筆者も患者さん側から移植の医療費に関する質問を直接受けることは日常的であり, 臨

床医や研究医にとっても正しい医療費支払いシステムの最低限の理解は必要であると痛感する。また行政が執行する医療費配分や支払いシステムについての問題点を現場の医師レベルから指摘してゆくためにも医療経済の知識は有用であると考えられる。

本稿では現在のわが国の膵臓移植実施に関しての医療費の側面につきまとめるとともに, その問題点や改善の方法, さらには糖尿病治療における膵臓移植の有用性を, 医療経済的見地から考察したい。

膵臓移植の種類

表1に示すように, 膵臓移植はドナーにより, 脳死膵臓移植, 心停止膵臓移植, 生体膵臓移植に大別される。また膵臓移植と腎臓移植の関係により3つのカテゴリーに分類され, これらカテゴリーは脳死, 心停止, 生体いずれの場合にもあてはまる。すなわち膵・腎同時移植 (SPK), 腎移植後膵臓移植 (PAK), 膵臓単独移植 (PTA) の3つのカテゴリーに分類されるが, 世界的にもわが国でも膵臓移植症例の80%がSPKである⁴⁾。医療費の面からもこの膵臓移植の種類ごとに異なっている。

膵臓移植の費用

膵臓移植の実施には実際に手術費用, 入院費用, 検査費用などの一般の外科診療費用に加え, 免疫抑制剤の投与が必須であり高額となる。当施設での生体膵腎同時移植の経験から算出した膵臓移植レシピエント医療費総額は, 初年度が600~800万円, 次年度から年

表1 臓器移植の分類

- | |
|--|
| 1. ドナー別の分類
1) 脳死臓器移植
2) 心停止臓器移植
3) 生体臓器移植
2. 腎移植との関係による分類 (カテゴリー)
1) 膵・腎同時移植 (simultaneous pancreas and kidney transplantation : SPK)
2) 腎移植後膵臓移植 (pancreas after kidney transplantation : PAK)
3) 膵単独移植 (pancreas transplantation alone : PTA) |
|--|

に200～250万円と高額であった。上述したように臓器移植には、ドナーや腎臓移植との関係で、種々の場合があるが、費用負担も異なっている。以下におおのこの場合の費用の支払いシステムに述べる。

1. 脳死 (心停止) 膵腎同時移植, 腎移植後膵臓移植の場合

現在保険適応されている医療である。点数は膵腎同時移植:108,600点, 腎移植後膵臓移植:88,600点である。さらに腎臓移植を同時に施行ないしは既に施行されていることから、腎臓移植後に受けられる種々の社会福祉サービスが適応される。すなわち身体障害者1級の取得, 自立支援医療 (更正医療:18歳以上), 育成医療 (18歳未満) などがあげられる。しかしながら、透析中に受けられる特定疾病療養受療証制度は利用できなくなり、また経過が良好であれば障害年金も支給停止となる。患者さんの自己負担は所得に応じて異なるが、月に数千円～2万円程度である。

2. 脳死 (心停止) 膵臓単独移植の場合

この場合も保険適応されている医療である (保険点数:88,600点)。しかしながら、慢性腎不全を伴っておらず、身体障害者の認定はなく、本人であれば2～3割負担となる。さらに自己負担が一定の金額を超えた場合、超えた額が払い戻される「高額療養費制度」がある。

3. 生体臓器移植の場合

生体ドナーからの移植は膵腎同時移植, 腎移植後膵臓移植, 膵臓単独移植のいずれも現在、保険医療ではない。当施設では既に12例の生体膵臓移植の実績を有し、その成績も良好であり、現在、先進医療や高度医療への申請を行っているが、いまだ認められてい

い。患者自費負担または施設負担が現状である。

■ ■ ■ 脳死ドナー摘出に伴う費用配分

脳死臓器移植を実施するためにはドナーからの臓器 (および腎臓) の提供が前提であり、多臓器摘出に伴う費用配分は日本臓器移植ネットワークにより詳細に規定されている。「臓器移植費用配分規定」(2006年4月1日施行)により、①移植病院:死体から摘出した臓器の移植を実施する施設, ②医師派遣病院:死体から臓器を摘出する医師を派遣する施設, ③提供病院:臓器提供の候補者の死亡診断を行い、臓器提供を行う施設, ④検査センター:臓器移植のために必要な検査を実施する施設、それぞれに対し費用配分が定められている。実際の費用については、「臓器移植 (脳死下提供) 費用配分細則」(2006年4月1日施行)により定められている。さらに提供施設に対しては、「脳死下臓器提供関連費用交付規程」(2006年4月1日施行)により、摘出チームの派遣費用や臓器搬送費用は、「療養費の対象となる医師派遣旅費及び臓器搬送費処理規程」(2006年4月1日施行)によりそれぞれ規定されている。脳死臓器移植の費用配分の流れを図1の概要図に示すが、診療報酬支払いはいったん医療機関である移植病院にすべて支払われるが、移植手術以外の支払い分すなわち、脳死臓器提供管理料、移植用臓器採取術、リンパ球直接交差試験料、特別会計手数料は日本臓器移植ネットワークに配分される。この費用は提供病院、医師派遣病院、検査センターに再配分される。配分の費用は各臓器により異なる。図2に膵腎同時移植と1腎の単独移植が行われた場合の膵臓、腎臓の採取に伴う費用の配分を示す。これらの費用は時間外 (提供施設) であれば、40%加算、休日、深夜 (午後10時～午前6時) であれば80%加算される。

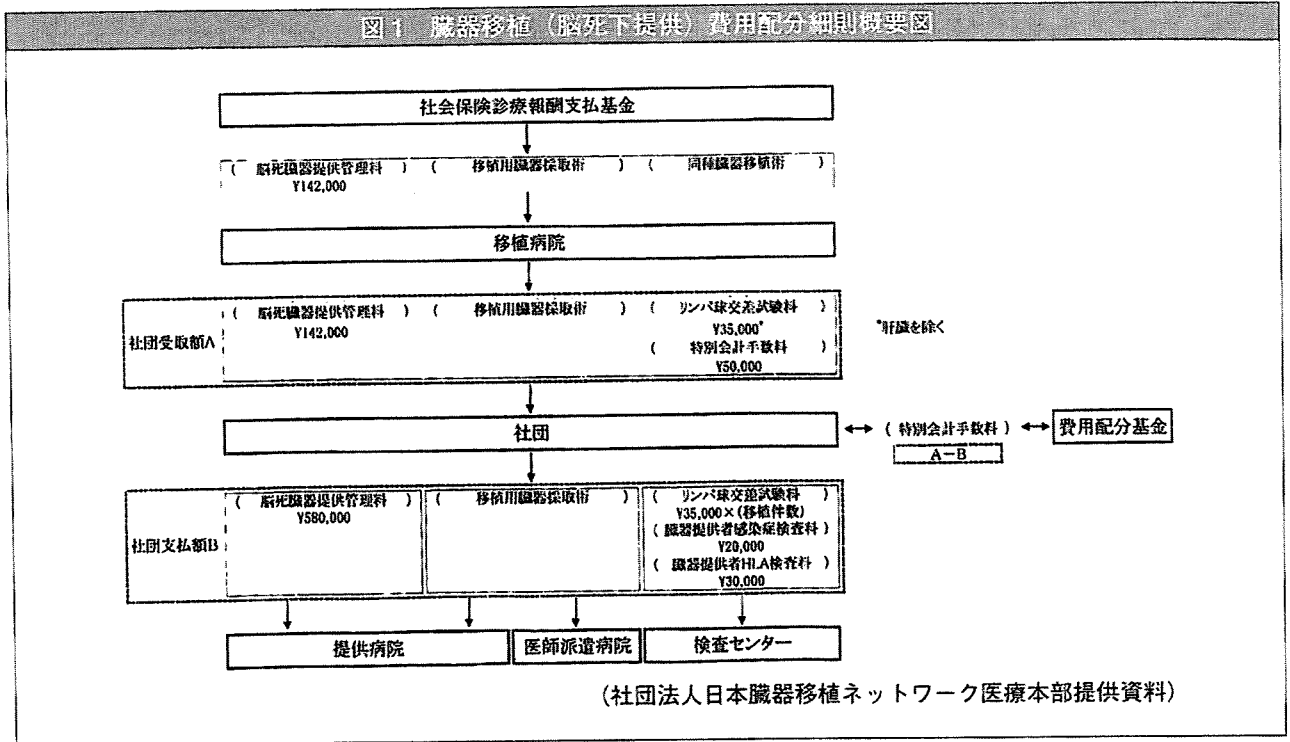


図2 臓器移植（脳死下提供）費用配分細則
別表2. 移植用臓器採取料に関わる費用配分表

膵腎同時移植が行われ、かつ1腎が単独移植された場合 (単位:円)

膵腎同時移植病院		日本臓器移植 ネットワーク	費用配分	
移植用膵腎採取術(死体)	700,000		提供病院	485,000
リンパ球直接交差試験料	35,000	医師派遣病院	485,000	
特別会計手数料	50,000	医師派遣病院(膵腎)	342,500	
合計	785,000	医師派遣病院(腎)	142,500	
膵臓移植病院		検査センター	100,000	
移植用腎採取術(死体)	300,000	臓器提供者HLA検査料	30,000	
リンパ球直接交差試験料	35,000	リンパ球直接交差試験(膵腎)	35,000	
特別会計手数料	50,000	リンパ球直接交差試験(腎臓)	35,000	
合計	385,000	1,170,000		
		費用配分基金	100,000	
		特別会計手数料(膵腎)	50,000	
		特別会計手数料(腎臓)	50,000	

(社団法人日本臓器移植ネットワーク医療本部提供資料、改変)

■ ■ ■ 糖尿病の医療経済と膵臓移植

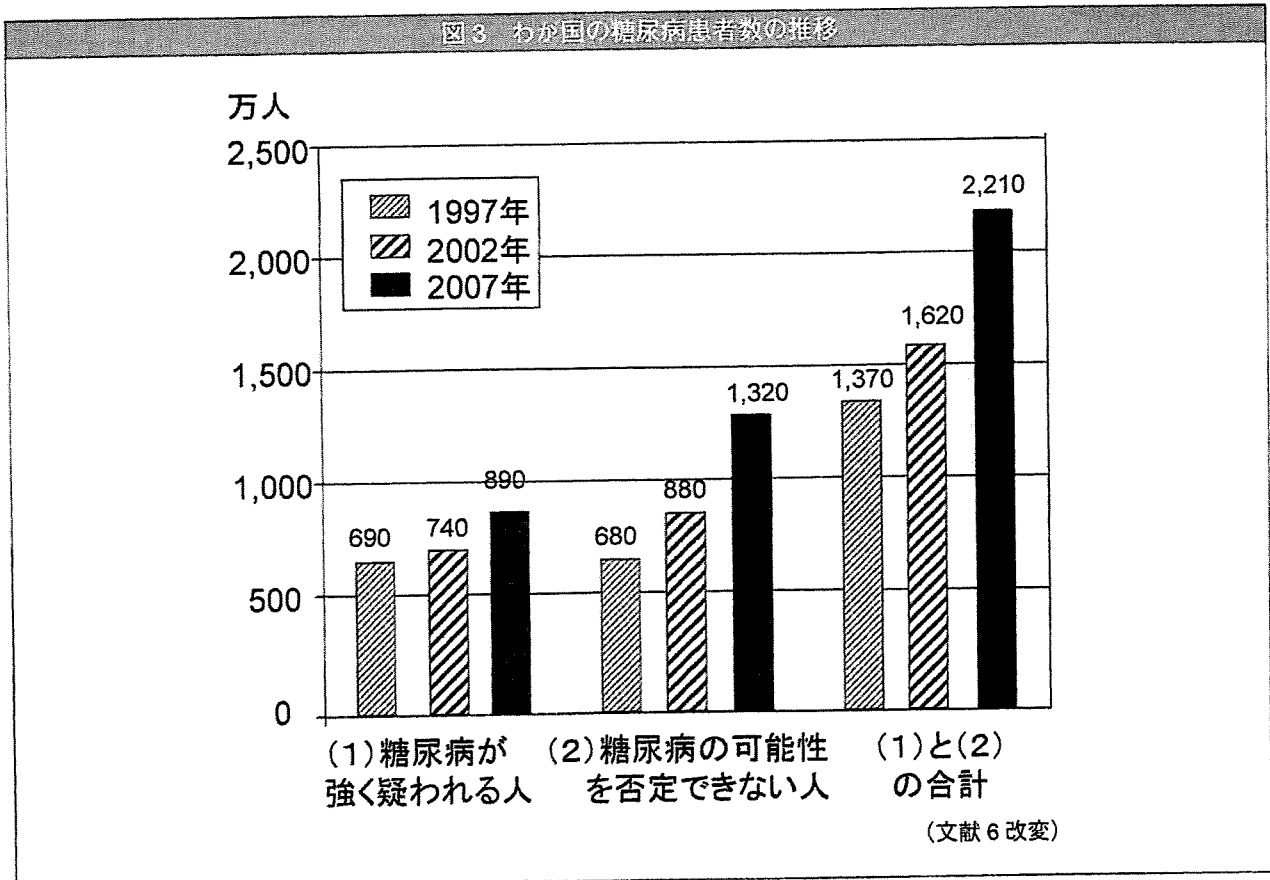
糖尿病は世界的に急増しており、世界の158の国や地域が加入している国際糖尿病連合（IDF）は、2007年4月26日スペインのバルセロナで開催された国際会議で「2型糖尿病予防についての合意声明」を発表した⁵⁾。この声明によると、毎年400万人近くが糖尿病が原因で亡くなっており、世界の糖尿病有病者数は2億4,600万人で、2025年に3億8,000万人に増えると予測し、糖尿病が各国の医療経済にとって重い負担になると警告している。わが国の糖尿病患者数も増加の一途をたどっており、2006年の厚生労働省の調査によると「糖尿病が強く疑われる人」は890万人、「糖尿病の可能性が否定できない人」は1,320万人に上っている（図3）⁶⁾。患者数の増加はわが国の医療経済を圧迫しており、厚生労働省保険局2004年度の調査では、国民総医療費31.5兆円のうち1.9兆円を糖尿病医療費が占めるに至っている。わが国の糖尿病のほとんどを占める2型糖尿病では、医療費削減のためには発症予防が効果的であり、IDFの声明においても、

生活習慣を改善し、体重を適切に管理し、運動を習慣として行うことで、2型糖尿病の発症を予防できることが、米国、フィンランド、中国、インド、日本での研究調査で確かめられた。また医師、看護師、薬剤師らによる健康診査や、自己検診によって、2型糖尿病の発症リスクの高い人を見つけだし予防することを奨励している⁷⁾。わが国の医療制度改革においても、発症予防を徹底することにより2015年度までに2型糖尿病などの生活習慣病の有病者・予備群を25%減少させることを目標としている。

一方、1型糖尿病は発症予防が困難な病態であり、医療経済からみると発症後の糖尿病合併症（網膜症、腎症、神経障害、心血管系疾患など）の進展阻止が重要である。合併症の発症は1型糖尿病患者のquality of life（QOL）を低下させ、末期腎症のため人工透析が導入されると予後もきわめて不良となる。加えて、このような合併症の発症は、人工透析などのさらなる医療費増大につながっている。

膵臓移植は、内科的治療の困難な1型糖尿病患者にQOLおよび予後の改善をもたらす究極的治療法とい

図3 わが国の糖尿病患者数の推移



え、医療経済的にも理にかなった治療法といえる。膵臓移植の推進により、医療経済への寄与は計り知れない。しかしながら、わが国の膵臓移植実施数は年々増加しているとはいえ欧米に比較して、きわめて少ないのが現状である。医療経済への寄与のためには移植数の増加が必須である。今後の最も大きな課題として、他の臓器移植と同様、深刻なドナー不足の解消があげられる。ドナー数の確保には地域レベルでのドナー増加対策（ドナーアクションプログラムなど）に加え、臓器移植法の改正を含め、国家レベル、行政レベルでの対策が必須であり、日本移植学会、行政、患者会などが一丸となった推進活動が必要である。また、わが国の脳死臓器移植患者はドナー不足のため、長期の待機を余儀なくされる。わが国の献腎移植患者の平均待機年数も14年以上である。このような背景より、当施設では、長期待機が困難な1型糖尿病腎不全患者に対し、わが国に先駆けて生体膵・腎同時移植を導入した⁷⁾。現在までに12例（うち10例が膵・腎同時移植）を実施し、ABO血液型不適合間の膵・腎同時移植も3例に実施した⁸⁾。レシピエントはインスリン離脱、透析離脱を達成し、劇的なQOLの改善を示した。またドナーも膵液瘻、糖尿病などの合併症は見られず、全例社会復帰している。しかし、わが国では生体膵臓移植は保険適応もなく、先進医療、高度医療も認定されていないため、現行では医療費面で施設の負担が莫大である。脳死移植を待てない重症1型糖尿病患者さんの救命のためには、今後生体膵臓移植の症例を重ね、有効性と安全性を示し、1日も早く保険適応とすることがわれわれの使命と考えている。

文 献

- 1) International Pancreas Transplant Registry, annual reports 2004.
http://www.iptr.umn.edu/IPTR/annual_reports.html.
(参照 2009-02-5).
- 2) 深尾 立, 大塚雅昭, 岩崎秀生, 他. 同種膵腎同時移植の一例. 移植 1986; 21: 331-340.
- 3) 伊藤壽記, 杉谷 篤, 石橋道男, 他. 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 2001; 36: 174-183.
- 4) Ishibashi M, Ito T, Sugitani A, *et al.* Present status of pancreas transplantation in Japan-donation predominantly from marginal donors and modified surgical technique: report of Japan pancreas transplantation registry. Transplant Proc 2008; 40: 486-490.
- 5) Governments must act on biggest epidemic in human history: New IDF consensus on prevention of diabetes is launched. Press Release. Barcelona: International Diabetes Federation. Thursday 26 April, 2007.
- 6) 厚生労働省. 2007年国民健康・栄養調査 1.
- 7) 剣持 敬, 浅野武秀, 西郷健一, 他. わが国初の生体部分膵・腎同時移植の1症例. 移植 2005; 40: 466-472.
- 8) Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, *et al.* Successful simultaneous pancreas and kidney transplantation from ABO-incompatible living donors. Xenotransplantation 2007; 14: 381.

Comparison of M-Kyoto Solution and Histidine–Tryptophan–Ketoglutarate Solution With a Trypsin Inhibitor for Pancreas Preservation in Islet Transplantation

Hirofumi Noguchi,^{1,2,3,4,6} Michiko Ueda,³ Shuji Hayashi,² Naoya Kobayashi,⁵ Hideo Nagata,³ Yasuhiro Iwanaga,¹ Teru Okitsu,¹ and Shinichi Matsumoto^{3,4}

The use of University of Wisconsin (UW) preservation solution in islet transplantation has some disadvantages, including inhibition of collagenase activity for pancreatic digestion. Histidine–tryptophan–ketoglutarate (HTK) solution has demonstrated an efficacy similar to UW solution for organ preservation in clinical pancreas transplantation. Recently, we reported that islet yield from porcine pancreata was significantly greater when they were preserved using M-Kyoto solution compared with UW solution. Here, we compared HTK solution with ulinastatin (M-HTK) and M-Kyoto solution for islet yield. In porcine islet isolation, islet yield after purification was significantly greater in the M-Kyoto/perfluorochemical (PFC) group compared with the M-HTK/PFC group. The M-Kyoto/PFC group had a significantly lower ADP/ATP ratio compared with the M-HTK/PFC group, suggesting that different islet yields might be due to the differences as energy sources of the solutions used. In conclusion, M-Kyoto/PFC solution is better for pancreas preservation before islet isolation than M-HTK/PFC solution.

Keywords: Islet transplantation, Islet isolation, M-Kyoto solution, Histidine–tryptophan–ketoglutarate solution, Trypsin inhibitor.

(*Transplantation* 2007;84: 655–658)

Pancreatic islet transplantation represents a viable option for the treatment of patients with unstable type 1 diabetes mellitus who have frequent severe hypoglycemia and hypoglycemia unawareness (1–6). Since the Edmonton protocol was announced, more than 500 type 1 diabetes patients in more than 50 institutions have undergone islet transplantation to cure their disease. However, treatment of diabetic patients by pancreatic islet transplantation often requires the use of islets from two to four donors to produce insulin independence in a single recipient (1, 2, 5, 6). After isolation and transplantation, islets are susceptible to apoptosis, which limits their function and probably long-term islet graft survival.

Donor pancreata usually are preserved with University of Wisconsin (UW) solution. Recent reports have shown that the two-layer method (TLM), which uses oxygenated per-

fluorochemical (PFC) and UW solution, is superior to simple cold storage in UW not only for preserving the whole pancreas but also for improved viable islet yield in subsequent islet transplantation (7, 8). However, use of UW solution in islet transplantation has some disadvantages. The high potassium concentration in UW solution causes insulin release from pancreatic β cells (9), and the high viscosity of UW solution may prevent sufficient flushing. Moreover, UW solution inhibits the activity of Liberase, an enzyme blend used for pancreatic digestion (10, 11). Our previous study showed that ET-Kyoto (Kyoto solution[®], Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) with ulinastatin (Miraclid[®], Mochida Pharmaceutical, Tokyo, Japan) (M-Kyoto) in combination with PFC significantly improved viable islet yields compared with UW/PFC preservation (12). The effectiveness of ET-Kyoto solution has also been demonstrated in clinical lung transplantation (13, 14) and skin flap storage (15). ET-Kyoto solution contains trehalose and gluconate. Trehalose has a cytoprotective effect against stress, and gluconate acts as an extracellular anti-oncotic agent, which prevents cells from swelling (16). Histidine–tryptophan–ketoglutarate (HTK) solution (Custodiol[®], Alsbach, Hähnlein, Germany), originally developed for cardioplegia, is being used with increasing frequency in cardiac, renal, and hepatic transplantation (17, 18). The protective effect of HTK solution is based on the strong buffering capacity of histidine. This solution has a low viscosity, easy handling properties and a relatively low cost. Some studies have demonstrated comparable results between UW and HTK solution for pancreas preservation not only in experimental animal models (19–21) but also clinical pancreas transplantation (22–24).

In this study, we compared M-Kyoto solution with HTK solution containing ulinastatin (M-HTK) for islet isolation. Animal studies were approved by the Institu-

Supported in part by the Ministry of Education, Science and Culture, the Ministry of Health, Labor and Welfare.

¹ Transplantation Unit, Kyoto University Hospital, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, Japan.

² Department of Advanced Medicine in Biotechnology and Robotics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Showa-ku, Nagoya, Japan.

³ Fujita Health University, Second Department of Surgery, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi, Japan.

⁴ Baylor Institute for Immunology Research, Baylor Research Institute, Dallas, TX.

⁵ Department of Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama, Japan.

⁶ Address correspondence to: Hirofumi Noguchi, M.D., Ph.D., Baylor Institute for Immunology Research, Baylor Research Institute, 3434 Live Oak St., Dallas, TX 75204.

E-mail: hirofumn@baylorhealth.edu

Received 10 May 2007. Revision requested 31 May 2007.

Accepted 31 May 2007.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/07/8405-655

DOI: 10.1097/01.tp.0000277625.42147.62

TABLE 1. Pig islet isolation characteristics

	M-Kyoto (n=6)	M-HTK (n=4)
Pancreas size (g)	105.2±17.8	108.9±29.0
Operation time (min)	7.8±2.1	7.0±2.2
Warm ischemic time (min)	26.7±3.6	26.0±2.9
Cold ischemic time (min)	123.0±3.5	123.5±3.1
Phase I period (min)	10.2±3.6	9.5±2.1
Phase II period (min)	35.3±6.1	32.8±8.6

Data are expressed as mean±SD.

TABLE 2. Pig islet characteristics

	M-Kyoto (n=6)	M-HTK (n=4)
Islet yield before purification (IE/g)	10,121±1,674	7,904±4,970
Islet yield after purification (IE/g) ^a	6,599±1,854	3,147±1,979
Viability (%)	96.5±2.7	96.4±4.4
Score	9.3±0.6	9.5±1.0
Purity (%)	70.0±16.7	82.2±21.9
Recovery rate (%)	65.6±17.9	43.4±13.3
Stimulation index	2.29±0.67	1.58±0.23

Data are expressed as mean±SD.

^a Islet yield after purification was significantly greater in the M-Kyoto/PFC group than in the M-HTK/PFC group ($P<0.05$).

tional Animal Research Committees of Kyoto University, Nagoya University, and Fujita Health University. Porcine pancreata were obtained at a local slaughterhouse. About 10 minutes after the cessation of heart beating, the surgery was started. After removing the pancreas, we immediately inserted a cannula into the main pancreatic duct, infused ei-

ther M-Kyoto or M-HTK preservation solution for ductal protection, and placed the pancreas into the respective two-layer preservation container (M-Kyoto/PFC or M-HTK/PFC). Islet isolation was conducted in accordance with the Kyoto Islet Isolation Method modified in the Edmonton protocol (1, 4–6, 8, 12). The characteristics of the porcine islet isolation protocols are shown in Table 1. There were no significant differences in pancreas size, operation time, warm ischemic time, cold ischemic time, Phase I period, or Phase II period between the two groups. Islet yield before purification was higher, but not significantly so, in the M-Kyoto/PFC group (n=6) compared with the M-HTK/PFC group (n=4). Islet yield after purification was significantly higher in the M-Kyoto/PFC group compared with the M-HTK/PFC group (Table 2). Other porcine islet characteristics are shown in Table 2. There were no other significantly different characteristics between the two groups.

Islet function was assessed by the adenosine diphosphate (ADP)/adenosine triphosphate (ATP) ratio, which shows the energy status of islets and correlates with transplantation outcome, according to a procedure described by Goto and colleagues (25). The ADP/ATP ratio was measured using the ApoGlow™ kit (Cambrex Bio Science Nottingham Ltd., Nottingham, UK). The ADP/ATP ratio in the M-Kyoto/PFC group was significantly lower than in the M-HTK/PFC group (Fig. 1A). These data suggest that different islet isolation effects between the two preservation solutions might be due to their differences as energy sources. To assess the islet graft function of each group in vivo, mice with severe combined immunodeficiency disease (SCID; CLEA Japan, Inc., Meguro, Tokyo) were used for the experiments. The recipients were rendered diabetic by a single injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 220 mg/kg. The 1,500 or 2,000 IE pig islets obtained from each group were transplanted into the renal subcapsular space of the left kidney of diabetic SCID mice as previously described (26–28). When 1500 IEs from each group were transplanted below the kidney capsule of STZ-induced diabetic SCID mice, the normoglycemic rate was

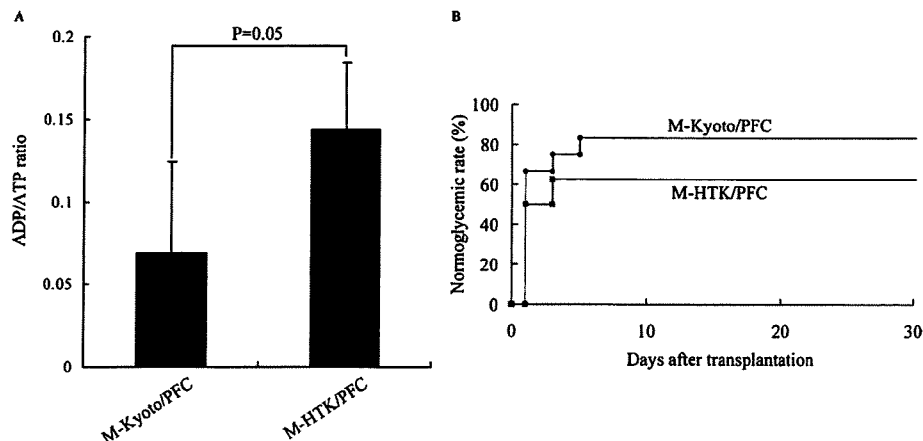


FIGURE 1. ADP/ATP ratio and transplant experiment. (A) The ADP/ATP ratio was measured to evaluate the energy status of cultured islets using the ApoGlow™ kit. The ADP/ATP ratio in the M-Kyoto/PFC group was barely lower than in the M-HTK/PFC group. Data are expressed as the mean±standard deviation. (B) Normoglycemic rate of STZ-induced diabetic SCID mice after islet transplantation. Immediately after isolation, 1,500 IEs were transplanted below the kidney capsule of diabetic SCID mice. Normoglycemia was defined as two consecutive posttransplant blood glucose levels showing less than 200 mg/dl (M-Kyoto group n=12; M-HTK group n=8).

greater, but not significantly so, in the M-Kyoto/PFC group (n=12) compared with the M-HTK/PFC group (n=8) (Fig. 1B). When 2000 IEs from each group were transplanted below the kidney capsule of STZ-induced diabetic SCID mice, the normoglycemic rate was more than 80% in both groups.

Inhibitory effects of collagenase on preservation solutions, such as UW solution, result in poor islet yield and islets of poor viability (10, 11). It has been reported that the components in UW solution found to be most inhibitory were magnesium, low Na⁺/high K⁺, hydroxyethyl starch (HES), and adenosine. Allopurinol, in combination with either lactobionate or glutathione, was markedly inhibitory, and the most inhibitory solution tested was a combination of three components, raffinose, glutathione, and lactobionate (11). M-Kyoto solution has high Na⁺/low K⁺ and, of the UW components, it contains only HES at a lower concentration. Moreover, trehalose and ulinastatin in M-Kyoto solution inhibit collagenase digestion less than UW solution (12). The M-HTK solution includes magnesium, but does not include HES, adenosine, allopurinol, lactobionate, glutathione, or raffinose. It has also been shown that the adenosine, allopurinol, and glutathione are not essential for the cold storage of pancreatic digests prior to islet purification (29). To assess the inhibitory effects on collagenase by M-Kyoto and M-HTK solutions, the rate of inhibition on collagenase digestion was measured in accordance with the modified method as previously described (11). The median digestion time was 79.0±2.9 min for M-Kyoto solution and 77.0±1.3 min for M-HTK solution. There are no significant differences between the two solutions on collagenase activity. Therefore, the different islet yields after purification are not due to differences in collagenase inhibition between these two solutions.

The TLM is important for preserving pancreata before islet isolation because it helps to preserve the organ, whereas UW preservation results in the deterioration of both islet isolation efficacy and posttransplant islet function (7, 8). The pancreas is directly oxygenated by PFC during pancreas preservation and maintains a high level of ATP in tissues. ATP drives a sodium pump, maintains cell integrity and repairs warm ischemic injury (30, 31). After significant warm ischemic injury, adenosine in UW solution is used as a substrate of ATP synthesis, however, without significant warm ischemia, ATP is generated from ADP or AMP located in the cells. We showed previously that ATP levels after preservation in M-Kyoto/PFC were similar to those in UW/PFC preservation and that adenosine is not important for ATP generation when the warm ischemic time was less than thirty minutes (12). In this study, neither the M-Kyoto solution nor the M-HTK solution included adenosine. The ADP/ATP ratio in the M-Kyoto/PFC group was around half of that measured in the M-HTK/PFC group (Fig. 1), suggesting that different islet isolation effects between the two preservation solutions might be because of their differences as energy sources. Because energy status is an excellent predictor of successful pancreas transplantation (32), a low ADP/ATP ratio also might reflect effective two-layer preservation. Gluconate as an energy source or trehalose as a cytoprotectant might contribute to the effective M-Kyoto/PFC preservation of warm ischemically damaged pancreata.

In conclusion, M-Kyoto solution is superior to M-HTK solution for islet isolation. The improved pancreas preservation and islet isolation by M-Kyoto solution was not due to differences in collagenase digestion between the two solutions. However, a significantly lower ADP/ATP ratio was observed in the M-Kyoto/PFC group, compared to the M-HTK/PFC group, suggesting that the energy sources might be a factor in the islet yield differences observed between the two solutions. On the basis of these data, we now use M-Kyoto solution for clinical islet transplantation from non-heart-beating donor (NHBD) pancreata. M-Kyoto/PFC preservation makes it feasible to use NHBDs for efficient islet transplantation into type 1 diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mr. Yusuke Nakai (Kyoto University), Dr. Xiaoling Liu, and Hiroki Kamiya (Fujita Health University) for technical support; Dr. Carson Harrod for editing the manuscript; and Ms. Nobuyo Hatanaka and Maki Watanabe (Fujita Health University) for assistance.

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.
- Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005; 293: 830.
- Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, et al. Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet* 2005; 365: 1642.
- Noguchi H, Iwanaga Y, Okitsu T, et al. Evaluation of islet transplantation from non-heart beating donors. *Am J Transplant* 2006; 6: 2476.
- 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.
- Matsumoto S, Kuroda Y. Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 1804.
- Matsumoto S, Qualley SA, 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.
- Fujimoto S, Mukai E, Hamamoto Y, et al. Prior exposure to high glucose augments depolarization-induced insulin release by mitigating the decline of ATP level in rat islets. *Endocrinology* 2002; 143: 213.
- Robertson GS, Chadwick D, Thirdborough S, et al. Human islet isolation—a prospective randomized comparison of pancreatic vascular perfusion with hyperosmolar citrate or University of Wisconsin solution. *Transplantation* 1993; 56: 550.
- Contractor HH, Johnson PR, Chadwick DR, et al. The effect of UW solution and its components on the collagenase digestion of human and porcine pancreas. *Cell Transplant* 1995; 4: 615.
- Noguchi H, Ueda M, Nakai Y, et al. Modified two-layer preservation method (M-Kyoto/PFC) improves islet yields in islet isolation. *Am J Transplant* 2006; 6: 496.
- Omata M, Hasegawa S, Bando T, et al. Application of ET-Kyoto solution in clinical lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 338.
- Chen F, Fukuse T, Hasegawa S, et al. Effective application of ET-Kyoto solution for clinical lung transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 2812.
- Wu SF, Suzuki Y, Kitahara AK, et al. Skin flap storage with intracellular and extracellular solutions containing trehalose. *Ann Plast Surg* 1999; 43: 289.
- Belzer FO, Southard JH. Organ preservation and transplantation. *Prog Clin Biol Res* 1986; 224: 291.

17. Bretschneider HJ. Myocardial protection. *Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 28: 295.
18. Erhard J, Lange R, Scherer R, et al. Comparison of histidine–tryptophan–ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study. *Transpl Int* 1994;7: 177.
19. Hesse UJ, Troisi R, Jacobs B, et al. Cold preservation of the porcine pancreas with histidine–tryptophan–ketoglutarate solution. *Transplantation* 1998; 66: 1137.
20. Troisi R, Meester D, Van Den Broecke C, et al. Functional and structural integrity of porcine pancreatic grafts subjected to a period of warm ischemia and cold preservation with histidine–tryptophan–ketoglutarate (custodiol) or University of Wisconsin solution. *Transplantation*, 2003; 75: 1793.
21. Leonhardt U, Tytko A, Exner B, et al. The effect of different solutions for organ preservation on immediate postischemic pancreatic function in vitro. *Transplantation* 1993; 55: 11.
22. Potdar S, Malek S, Eghtesad B, et al. Initial experience using histidine–tryptophan–ketoglutarate solution in clinical pancreas transplantation. *Clin Transplant* 2004; 18: 661.
23. Englesbe MJ, Moyer A, Kim DY, et al. Early pancreas transplant outcomes with histidine–tryptophan–ketoglutarate preservation: A multicenter study. *Transplantation* 2006; 82: 136.
24. Fridell JA, Agarwal A, Milgrom ML, et al. Comparison of histidine–tryptophan–ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution for organ preservation in clinical pancreas transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1304.
25. Goto M, Holgersson J, Kumagai-Braesch M, Korsgren O. The ADP/ATP ratio: A novel predictive assay for quality assessment of isolated pancreatic islets. *Am J Transplant* 2006; 6: 2483.
26. Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, et al. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 2004; 10: 305.
27. Noguchi H, Nakai Y, Matsumoto S, et al. Cell permeable peptide of JNK inhibitor prevents islet apoptosis immediately after isolation and improves islet graft function. *Am J Transplant* 2005; 5: 1848.
28. Noguchi H, Nakai Y, Ueda M, et al. Activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) pathway during islet transplantation and prevention of islet graft loss by intraportal injection of JNK inhibitor. *Diabetologia* 2007; 50: 612.
29. Chadwick DR, Robertson GS, Contractor HH, et al. Storage of pancreatic digest before islet purification. The influence of colloids and the sodium to potassium ratio in University of Wisconsin-based preservation solutions. *Transplantation* 1994; 58: 99.
30. Matsumoto S, Fujino Y, Suzuki Y, et al. Evidence of protein synthesis during resuscitation of ischemically damaged canine pancreas by the two-layer method. *Pancreas* 2000; 20: 411.
31. Tanioka Y, Kuroda Y, Kim Y, et al. The effect of ouabain (inhibitor of an ATP-dependent Na⁺/K⁺ pump) on the pancreas graft during preservation by the two-layer method. *Transplantation* 1996; 62: 1730.
32. Morita A, Kuroda Y, Saitoh Y. Evaluation of the viability and energy metabolism of ischemically damaged canine pancreas during preservation by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Kobe J Med Sci* 1992;38: 205.

Tea Polyphenol Inhibits Allostimulation in Mixed Lymphocyte Culture

Jong-yoon Kim,* Tatsuo Kina,† Yasuhiro Iwanaga,‡ Hirofumi Noguchi,‡
Kazuaki Matsumura,* and Suong-hyu Hyon*

*Department of Simulation Medical Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University,
Kyoto 606-8507, Japan

†Department of Immunology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

‡Department of Transplantation Immunology, Kyoto University Hospital, Kyoto 606-8507, Japan

Green tea polyphenols are known to protect allogenic donor tissues from acute rejection by their recipients. This immunosuppressive effect may be generated by a unique chemical property of the major component, epigallocatechin-*o*-gallate (EGCG), which can block specific cell surface molecules of the donor tissues. To test this hypothesis, we examined the effects of EGCG on the murine mixed lymphocyte reactions. EGCG treatment of stimulator cells significantly attenuated the proliferation of responder T cells. The proliferation did not recover upon the secondary stimulations by fresh untreated cells or exogenous IL-2. Flow cytometric analyses showed that EGCG treatment decreased the staining intensities of various cell surface molecules including MHC II, which plays a major role in antigen presentation, and B7.1, B7.2, and their ligand, CD28, which are required for costimulatory signals in T-cell activation. These results suggest that an anergic state of alloreactive T cells may be induced by either weakening of antigen signaling or blockage of costimulatory signals with EGCG. Other possible mechanisms behind the immunosuppressive effect and a potential use of EGCG treatment of donor tissues in transplantation medicine are discussed.

Key words: Costimulatory signals; Allorecognition; Polyphenol; EGCG

INTRODUCTION

Studies on transplantation immunology have shown that some plant-derived chemicals can prevent transplantation-associated problems such as graft rejection and graft versus host disease (GVHD) (5,19,21). Among these chemicals, green tea polyphenols, better known as anti-cell proliferation agents, were recently found to prevent allogenic rejection of nerve transplants in rats, where immersing peripheral nerve bundles in a polyphenol solution before transplantation completely avoided rejection by the host (7). This process should involve immunological interactions between the polyphenol-treated donor tissue and the host immune cells but not a direct proliferation arrest of the latter, which is not treated with polyphenols.

The exact mechanism of this immunosuppressive effect and a specific active component of the polyphenols have not yet been defined (21). Because the polyphenols are known to bind to cell surface macromolecules (12) and impair receptor–ligand interactions (2), we hypothesized that they would attach to such cell surface mole-

cules that are involved in antigen recognition and interfere with the recognition of a donor tissue as foreign by its recipient. In the present study, we tested this hypothesis by examining the influence of (–)-epigallocatechin-*o*-gallate (EGCG), a major green tea polyphenol component, on various parameters of allostimulation using a murine mixed lymphocyte culture (MLR) system.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female BALB/c and C57Bl/6 mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan) and housed under specific pathogen-free conditions. Mice were used at the age of 9–11 weeks old. All experiments were approved by the local review board of Kyoto University and were conducted in accordance with the national and international guidelines for laboratory animal care.

EGCG Treatment Protocol

Spleens were aseptically removed from BALB/c (H-2K^d) and C57Bl/6 (H-2K^b) female mice, and cell suspen-

Received June 28, 2006; final acceptance October 6, 2006.

Address correspondence to Suong-hyu Hyon, Ph.D., Department of Simulation Medical Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Tel/Fax: 81-75-751-4109; E-mail: biogen@frontier.kyoto-u.ac.jp

sions were prepared by teasing and flushing the spleens with forceps and filtering through a 50- μ m filter in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 1% FCS. Cells were centrifuged at $300 \times g$ for 5 min, resuspended in 10 ml RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) containing 0, 200, or 400 μ M EGCG/ 10^7 cells, and incubated at 4°C for 1 h. After incubation, cells were immediately washed twice with RPMI-1640 (10% FCS) before being used in mixed lymphocyte reactions or cell surface marker analyses.

Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Splenocytes derived from BALB/c mice were used as "stimulator" cells and those from C57Bl/6 as "responder" cells. In both one-way and two-way MLRs, the stimulator cells were untreated or treated with EGCG before coculture. In a one-way MLR, cells from BALB/c mice were treated with 20 ppm mitomycin C (MMC) (MP Biomedicals, Aurora, OH) in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS at 37°C for 30 min to arrest their proliferation before EGCG treatment. In a two-way MLR, both stimulator and responder populations were left capable of responding. Each cell population was resuspended in complete medium (RPMI-1640 supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 ppm streptomycin) to a final concentration of 5.0×10^6 cells/ml. The stimulator and responder cells were mixed at a 1:1 ratio (100 μ l each) in 96-well microplates and incubated triplicate at 37°C with 5% CO₂ for 72 h. Cell proliferation was assessed by counting an aliquot of harvested cells from each MLR well with a trypan-blue exclusion method.

Measurement of IL-2

After the period of MLR incubation, supernatants from the cultures were assayed for IL-2 production using cytokine quantification ELISA kits according to manufacturer's instruction (eBioscience, San Diego, CA). The detection limit of IL-2 was 10 pg/ml.

Secondary Stimulation of MLR Cultures

One-way MLR wells were separately prepared, and after 48 h of incubation the cells were recultured with MMC-treated fresh BALB/c splenocytes (5.0×10^6 cells/ml) in complete medium. Some MLR wells were cultured with exogenous recombinant murine IL-2 (1.7 IU/ml) (eBioscience). These MLR cultures were incubated for an additional 48 h, and cell proliferation was assessed as described earlier.

Flow Cytometric Analyses of Cell Surface Molecules

Flow cytometric analyses of cell surface molecules of the control and EGCG-treated splenocytes were performed using a series of fluorescence-labeled mono-

clonal anti-mouse CD/MHC antibodies and corresponding isotype-matched control antibodies. These antibodies are to detect CD28, CD49d, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), MHC I, MHC II (eBioscience), and TCR $\alpha\beta$ (Pharmingen, San Diego, CA). The splenocytes were treated with red blood cell lysis buffer (eBioscience) for 5 min, and mononuclear cells were treated with EGCG-containing media and washed with RPMI (10% FCS) and a staining buffer (eBioscience) at 4°C. Each splenocyte sample was reconstituted in 50 μ l of the staining buffer and subjected to antibody labeling for 15 min. After washing the samples twice with the staining buffer, a minimum of 10,000 events per sample was collected and analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Detection of Cell Proliferation by Flow Cytometry

To examine if the proliferation of responder T cells was attenuated by coculturing with EGCG-treated stimulator cells, cell samples from MLR cultures after 72 h were stained with FITC-labeled anti-mouse CD71 monoclonal antibody (BD Pharmingen) and with PE-labeled anti-mouse Thy 1.2 monoclonal antibody (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) and analyzed on FACScan.

Detection of Apoptosis by Flow Cytometry

To examine whether apoptosis is induced in the responder and EGCG-treated stimulator cells in MLR culture, apoptosis was examined by flow cytometry. Cells collected from MLR plates after 24 h of incubation were washed once with PBS. The cells were stained with PE-labeled anti-mouse H-2K^b monoclonal antibody (Caltag Laboratories, CA), which stains the responder cells (C57Bl/6). Then apoptotic cells were stained with FITC-labeled Annexin V according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, MN) and analyzed on FACScan.

Statistical Analysis

All results are expressed as mean \pm SD. Differences between the experimental groups of triplicate samples were analyzed by ANOVA and Fisher's PLSD using StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC). Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Mixed Lymphocyte Reaction

We first examined the effects of EGCG treatment on allorecognition of responder T cells using one-way and two-way MLR cultures. In one-way MLR, responder T cells (C57Bl/6, H2K^b) recognized untreated stimulator cells (BALB/c, H-2K^d) as foreign and showed substan-

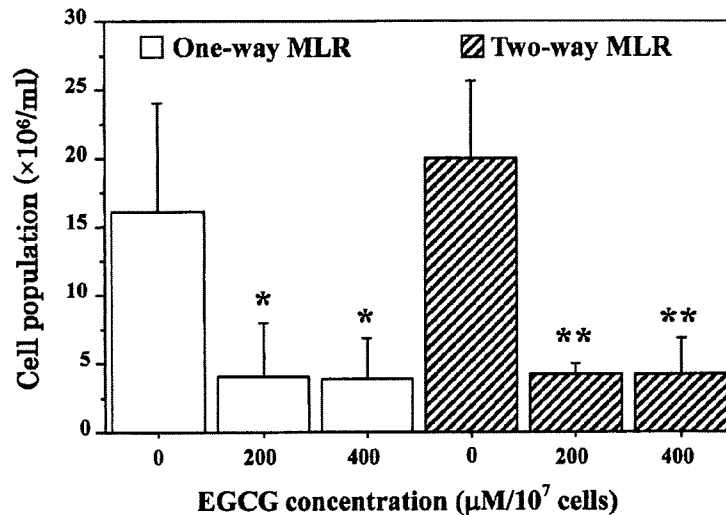


Figure 1. Effects of EGCG treatment on induction of one-way and two-way MLR. C57Bl/6 splenocytes were cocultured with EGCG-treated stimulator BALB/c splenocytes either treated (one-way MLR) or untreated with MMC (two-way MLR). Differences were significant between treated and untreated groups (* $p < 0.0001$; ** $p < 0.018$).

tial proliferation (Fig. 1). The proliferation was attenuated down to 20–30% when stimulator cells were treated with 200 or 400 µM EGCG. Microscopic images of MLR cultures for these cells showed the suppressed levels of foci formation (Fig. 2). In two-way MLR, where both stimulator and responder cell populations are capable of proliferation, EGCG treatment similarly resulted in the attenuated proliferation (Fig. 1). We next examined the effects of EGCG treatment on IL-2 production in MLR cultures and found that EGCG treatment strongly reduced the production of IL-2 in one-

way MLR cultures as detected by ELISA after 72 h of incubation (Fig. 3). IL-2 production was also reduced in two-way MLR cultures after EGCG treatment of BALB/c splenocytes (Fig. 3).

Detection of Cell Proliferation by Cytometry

CD71, transferrin receptor, is expressed on the cell surface of actively dividing cells and has been used as an activation marker of T-cell proliferation. To examine if the proliferation of responder T cells was attenuated by coculturing with EGCG-treated stimulator cells, cells

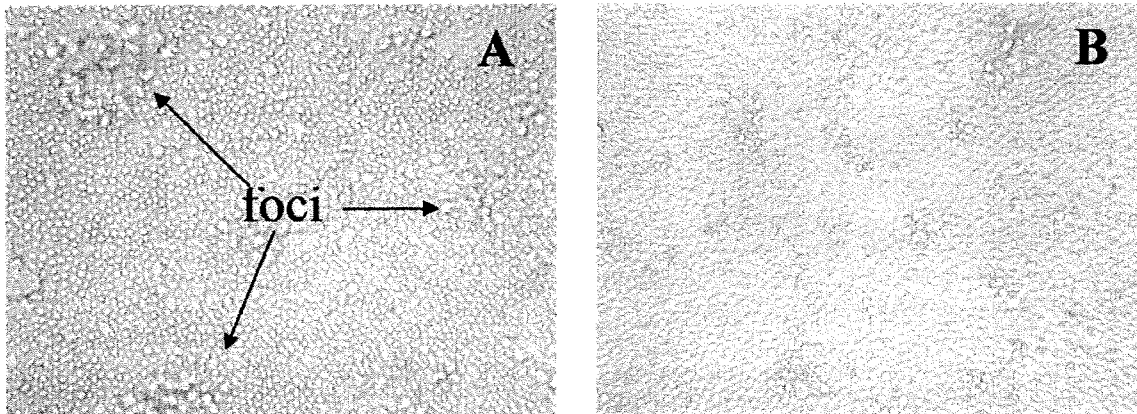


Figure 2. Foci formation of responder T cells in one-way MLR cultures. C57Bl/6 responder cells were cocultured with BALB/c stimulator cells that had been either untreated (A) or treated with 400 µM EGCG (B). Microscopic images of cultured cells in a flat-bottomed 96-well plates were photographed after 72 h of incubation.

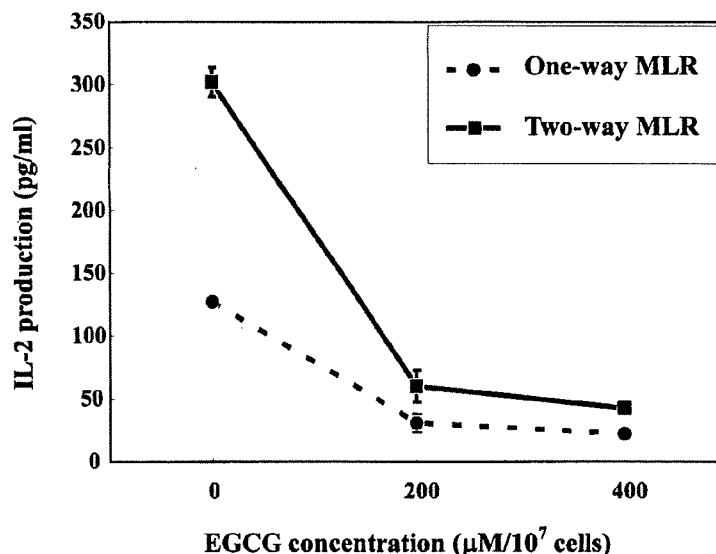


Figure 3. Inhibition of IL-2 production by EGCG treatment of stimulator cells in both one-way and two-way MLR cultures. Differences were significant between treated and untreated groups ($p < 0.0001$) for both MLRs.

from MLR culture were stained with FITC-labeled anti-mouse CD71 and PE-labeled anti-mouse Thy 1.2 antibodies, and analyzed by flow cytometry. The expression level of CD71 of EGCG-treated groups was significantly reduced down to the level of the control or the unstimulated responder cells (C57Bl/6) (Fig. 4).

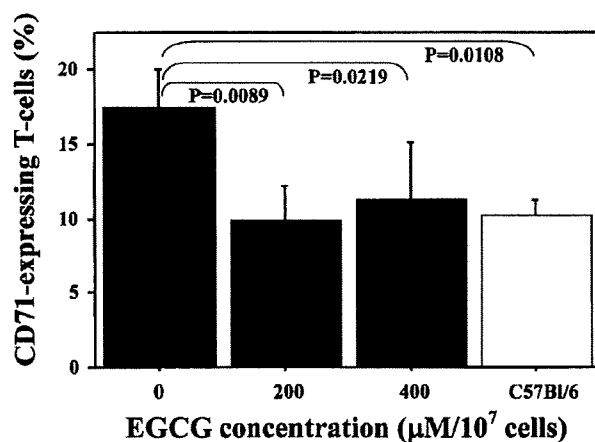


Figure 4. CD71 expression in T-cell population stimulated with EGCG-treated stimulator cells in MLR culture. Cells harvested from the MLR cultures (black columns) and from C57Bl/6 alone (white column) as a background reference were stained with FITC-anti-CD71 and PE-anti-Thy 1.2 antibodies and analyzed by FACScan.

Flow Cytometry of Cell Surface Molecules

To investigate whether the cell surface molecules of splenocytes are masked by EGCG, we performed the flow cytometric analysis of various cell surface molecules of splenocytes after EGCG treatment. Detection of most of the tested cell surface molecules was reduced by EGCG treatments, and the levels of reduction appeared to vary among different surface molecules (Table

Table 1. Detection of Cell Surface Epitopes

Epitope	EGCG Concentration (/10 ⁷ Cells)		
	0 μM	200 μM	400 μM
TCRαβ	31.0	29.9 (3.5)	29.7 (4.2)
MHC I	96.3	92.5 (3.9)*	90.5 (6.0)*
MHC II	43.8	32.5 (25.8)*	33.2 (24.2)*
CD28	17.6	8.7 (50.6)*	9.4 (46.6)*
CD49d	42.9	19.7 (54.1)*	20.5 (52.2)*
B7.1 (CD80)	21.2	3.1 (85.4)*	6.0 (71.7)*
B7.2 (CD86)	11.6	4.2 (63.8)*	9.7 (16.4)†

Percent of epitope-positive cells measured by flow cytometry. Values in parentheses for EGCG-treated samples (200 and 400 μM/10⁷ cells) represent the average percent reduction in the detection relative to the untreated control samples (0 μM/10⁷ cells). Each value is an average of triplicate samples.

* $p < 0.0001$ compared with untreated controls.

† $p < 0.03$ compared with untreated controls.