



Effect of oxygenated perfluorocarbon on isolated islets during transportation

寺井, 祥雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4718

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004718>

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



氏 名	寺井 祥雄
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4718 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Effect of oxygenated perfluorocarbon on isolated islets during transportation （分離膵島輸送における酸素化 PFC の効果）

審 査 委 員

主 査	教 授	藤澤 正人
	教 授	林 祥剛
	教 授	匂坂 敏明

学位論文の内容要旨

Effect of oxygenated perfluorocarbon on isolated islets during transportation

分離膵島輸送における酸素化 PFC の効果

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

肝胆膵外科学

(指導教員：具 英成教授)

寺井 祥雄

緒言

新しい免疫抑制剤のプロトコールの開発と膵島分離方法の改善により、近年、膵島移植は 1 型糖尿病の治療の選択肢のひとつとなってきた。膵島移植ではドナー膵から膵島が分離され、レシピエントに移植される。膵島分離の行程は非常に複雑なため、安定した良好な膵島分離成績を得るには、同一チームでの修練が望ましい。また GMP 基準の膵島分離施設の建設と維持には莫大な費用を必要とする。以上の理由により、膵島分離のセンター化の必要性が提唱されている。今後、膵島分離センターから移植病院へ膵島が輸送されるというケースは増加してくると予想され、適切な膵島輸送法を確立することは急務である。

膵島は組織であり、多くの細胞の集合であると同時に、小さな臓器としてみなすことができる。現在、膵島の保存には、細胞培養に準じた方法がとられているが、膵島の輸送方法に、“細胞”と“臓器”とのいずれに準じた条件が適切なのかは明らかにされていない。

また膵島を輸送する際、膵島は気密性の高い容器に詰められる。そして輸送中に膵島は集簇し、ペレットを形成する。このような条件下では膵島は酸素不足となり Viability の低下をきたすため、膵島輸送中に何らかの方法で膵島に酸素を供給することが必要である。我々はこれまで膵臓の保存に高濃度酸素溶解能を有する PFC を併用することにより保存中の膵臓に十分な酸素を供給する二層法保存を開発し、膵臓移植や膵島移植前の膵臓保存において有用であることを報告してきた。

本研究では、細胞培養条件および臓器保存条件のいずれが膵島輸送において適切なのか、またこれらに酸素化 PFC を併用する advantage はあるのかを検討した。

対象と方法

膵島の分離

Lewis ラットの膵臓を Collagenase P (1mg/dl)を用いて、37℃,20 分間かけて消化し、Histopaque 1077 および HBSS の非連続勾配遠心法により外分泌組織を分離して、純化膵島を得た。

膵島の保存方法

純化したラット膵島 1000 IE を以下の条件下にて密閉した容器内で 24 時間保存した。

Group1: RPMI 1640 液 22℃

Group2: RPMI 1640 液 + 酸素化 PFC 22℃

Group3: UW 液 4℃

Group4: UW 液 + 酸素化 PFC 4℃

PFC は 95%O₂、5%CO₂ で 60 分間、酸素化した。PFC は不溶性で密度が高く、RPMI 液および UW 液とは二層に分離し、膵島は PFC の表面に存在した。

*In vitro*における膵島の Quality 評価

分離直後および保存直後の各群において *In vitro* における膵島の Quality を検討するため以下の項目について評価を行った。

1. 回収率
2. SI (Static incubation) による機能評価
3. FDA/PI 染色により Viability 評価
4. ATP、ADP、AMP を bioluminescent enzyme cycling assay を用いて計測し、ATP 量、Energy charge(EC)、ADP/ATP 比について評価

In vivo における膵島の機能評価

In vivo における機能を評価するため、保存した膵島を streptozotocin(STZ)誘導下糖尿病ヌードマウスの腎皮膜下に移植した。移植の7日前に 240mg/kg の STZ をヌードマウスに腹腔内投与し、随時血糖が3日連続で 20mM 以上であるものを糖尿病マウスとして用いた。移植後 28 日に IPGTT(Intraperitoneal glucose tolerance test)を行い、移植膵島のさらなる機能評価を行った。移植後 29 日には移植腎の摘出を行った。移植後 3 日連続して随時血糖が 11.1mM 以下であり、移植腎の摘出の後、高血糖に戻ったものを糖尿病の治癒と定義した。

抗酸化酵素の遺伝子発現

本研究では PFC は膵島の輸送に対して有用でなかった。PFC による酸化ストレス障害の程度を検討するため、Group3 および Group4 において抗酸化酵素である SOD1 および Mn-SOD の遺伝子発現を RT-PCR を用いて調べた。

結果

保存後の回収率は Group 4 において他の群と比べて有意に低かった。しかし FDA/PI による Viability および SI による膵島機能については4群で有意な差を認めなかった。ATP 量、Energy charge(EC)においては Group1(RPMI 単独群)に比べ Group2 (RPMI+PFC 群)で有意に低く(P<0.05)、Group3 (UW 単独群) に比べ Group4 (UW+PFC 群) で有意に低かった(P<0.05)。しかし、RPMI 群と UW 群の間には有意な差を認めなかった。ADP/ATP 比は Group1 (RPMI 単独群)に比べ Group2 (RPMI+PFC 群)で有意に高く(P<0.05)、Group3 (UW 単独群) に比べ Group4 (UW+PFC 群) で有意に高かったが(P<0.05)、こちらも RPMI 群と UW 群の間には有意な差を認めなかった。

移植後の治癒率においては有意差は認めなかったが、Group 4 では 40% で治癒率が低い傾向にあった。IPGTT において、Group 4 におけるグルコース負荷後 30、60、90、120 分の血糖値は Group 3 と比べ有意に高かった(P<0.05)。さらに IPGTT による AUC(Area under curve)の値も Group 4 では Group 3 に比べ有意に高かった。

SOD および Mn-SOD の発現は Group 4 において Group 3 に比べて有意に高かった。

考察

膵島の培養における酸素化 PFC の効果は議論のあるところで、Takahashi らは RPMI と酸素化 PFC が RPMI 液単独と比べ優れていると報告している。一方で Bergert らは、酸素化 PFC の使用は膵島の培養に対しては有用でなかったと報告しているが、彼らの研究は *in vitro* による評価のみであった。本研究では膵島輸送に対して酸素化 PFC が有用であるかどうかについて検討した。ATP や EC で評価した *In vitro* での膵島の Viability は PFC を加えた群で有意に低かった。Goto らは低 ADP/ATP ratio が移植結果と相関するとし、ADP/ATP ratio は移植に代わる検査として有用であるとしている。今回の実験では ADP/ATP ratio は PFC を加えた群で有意に高かった(Fig3A)。 *In vivo* の移植実験では、IPGTT の血糖値や AUC は、UW 単独群に比べて UW+PFC 群で有意に高かった。また UW+PFC 群の治癒率も他の群に比べ低い傾向にあった。以上より、UW 液に酸素化 PFC を付加することにより膵島の Quality は低下すると言える。また、RPMI 液にしても酸素化 PFC の有用性は確認できなかった。

臓器保存で有効であった酸素化 PFC が膵島輸送条件において有効でなかった理由としては、二つのことが推察される。ひとつは膵島と PFC の間の表面張力である。PFC は脂溶性で、高い密度を持つため UW や RPMI とは分離し、膵島はその境界面に存在する。PFC 自身は無毒であるが、膵島が直接 PFC に触れているために表面張力にさらされ、膵島の構造に影響を与えている可能性がある。酸素化 PFC が有効でない別の理由としては、酸素の供給過多により生じる酸化ストレスにより組織障害が生じた可能性である。この研究において SOD1 および Mn-SOD の mRNA の発現は、PFC を付加した群で有意に上昇していた。抗酸化酵素は ROS により規定されるため、これらの結果は PFC による過剰な酸素化により ROS の産生が増加していることを示唆する。ROS は通常の好気性代謝では低値であるが、細胞に壊死を起こすような酸化ストレスのもとでは ATP を欠乏させ、細胞死を引き起こす。膵島は臓器に比べて非常に小さいため、酸素化 PFC が膵島にとって過剰な酸素を供給したと考えられる。膵島輸送において酸素化は重要な因子のひとつであり、適切な酸素量を供給できる別の方法が必要であろう。

結論

膵島輸送時、UW 4℃と RPMI 22℃は膵島機能を同程度維持した。現在膵島輸送は培養液を用い室温で行われているが、細菌混入のリスクを考えると、低温保存がより適切かもしれない。また臓器で有効であった酸素化 PFC の付加は膵島輸送に対しては有用でなかった。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲第2040号	氏 名	寺井 祥雄
論 文 題 目 Title of Dissertation	Effect of oxygenated perfluorocarbon on isolated islets during transportation 分離膵島輸送における酸素化 PFC の効果		
審 査 委 員 Examiner	主 査 蔭澤 正人 Chief Examiner 副 査 林 祥剛 Vice-examiner 副 査 勾坂 敏朗 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

本研究では膵島輸送における保存法と酸素化 PFC の効果についての検討がなされている。まず、保存法についての検討では4つの保存法を比較しており、保存後の回収率は Group 4 (UW+PFC 群) において他の群と比べて有意に低かった。しかし FDA/PI による Viability および SI による膵島機能については4群で有意な差を認めなかった。ATP 量、Energy charge (EC) においては Group1 (RPMI 単独群) に比べ Group2 (RPMI+PFC 群) で有意に低く ($P<0.05$)、Group3 (UW 単独群) に比べ Group4 (UW+PFC 群) で有意に低かった ($P<0.05$)。しかし、RPMI 群と UW 群の間には有意な差を認めなかった。ADP/ATP ratio は、低値であるほど、膵島の viability が良いとの報告があり、ADP/ATP 比は Group1 (RPMI 単独群) に比べ Group2 (RPMI+PFC 群) で有意に高く ($P<0.05$)、Group3 (UW 単独群) に比べ Group4 (UW+PFC 群) で有意に高かったが ($P<0.05$)、こちらも RPMI 群と UW 群の間には有意な差を認めなかった。結論として *In vitro* では臓器保存条件と細胞培養条件の比較においては回収率、SI、FDA/PI staining、Energy status のいずれにおいても有意な差は認めなかった。一方酸素化 PFC の効果に関しては SI、FDA/PI では有意差を認めなかったが、Energy status においては酸素化 PFC を加えた群で有意に不良であった。さらに、移植後の治癒率において有意差は認めなかったが、Group 4 では40%で治癒率が低い傾向にあった。IPGTT において、Group 4 におけるグルコース負荷後 30、60、90、120 分の血糖値は Group 3 と比べて有意に高かった ($P<0.05$)。さらに IPGTT による AUC (Area under curve) の値も Group 4 では Group 3 に比べて有意に高かった。このことから臓器保存液において、PFC を加えた群で移植された膵島の機能は不良であると考えられた。

臓器保存で有効であった酸素化 PFC が膵島輸送条件において有効でなかった理由としては、二つのことが推察される。ひとつは膵島と PFC の間の表面張力である。PFC は脂溶性で、高い密度を持つため UW や RPMI とは分離し、膵島はその境界面に存在する。PFC 自身は無毒であるが、膵島が直接 PFC に触れているために表面張力にさらされ、膵島の構造に影響を与えている可能性がある。酸素化 PFC が有効でない別の理由としては、酸素の供給過多により生じる酸化ストレスにより組織障害が生じた可能性である。この研究において SOD1 および Mn-SOD の mRNA の発現は、PFC を付加した群で有意に上昇していた。抗酸素酵素は ROS により規定されるため、これらの結果は PFC による過剰な酸素化により ROS の産生が増加していることを示唆する。ROS は通常の好気性代謝では低値であるが、細胞に壊死を起こすような酸化ストレスのもとでは ATP を欠乏させ、細胞死を引き起こす。膵島は臓器に比べて非常に小さいため、酸素化 PFC が膵島にとって過剰な酸素を供給したと考えられる。膵島輸送時、UW 4℃と RPMI 22℃は膵島機能を同程度維持した。現在膵島輸送は培養液を用い室温で行われているが、細菌混入のリスクを考えると、低温保存がより適

切かもしれない。また臓器で有用であった酸素化 PFC の付加は膵島輸送に対しては有用でなかった。膵島輸送において酸素化は重要な因子のひとつであり、適切な酸素量を供給できる別の方法を考慮すべきである。

本研究は膵島輸送における膵島保存法について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった膵島保存における有効かつ至適な保存条件について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。