

機関番号：82506

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591539

研究課題名 (和文) 電子スピン共鳴 (ESR) を用いた、膵島移植における膵島障害メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Analysis of the mechanism of islet injury during islet transplantation using electron spin resonance.

研究代表者 丸山 通広 (MARUYAMA MICHIIHIRO)

国立病院機構 千葉東病院・臨床研究センター・室長

研究者番号：40399754

研究成果の概要 (和文) : スピントラップ剤である CYPMPO を用いることにより、電子スピン共鳴にて容易にフリーラジカルの測定ができた。臓器保存液である UW 液、ET-Kyoto 液を添加してもフリーラジカルのシグナルは減弱されず、通常濃度での臓器保存液の効果はフリーラジカルの消去によるものでは無いことが示唆された。膵島分離時の酸化ストレスは膵島収量に悪影響を与えることが判明した。膵移植モデルにおいて、血液中のフリーラジカルを測定することはきわめて困難であった。

研究成果の概要 (英文) : Free radical adducts was easily detected by electron spin resonance (ESR) using 2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2λ5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide (CYPMPO). Signal of free radical adducts did not decrease by adding UW solution or ET-Kyoto solution as organ preserve solution. Oxidative stress during islet isolation may affect islet yield. It was very difficult to detect free radical adducts in blood sample of islet isolation model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：膵島移植、フリーラジカル

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は 2000 年に発表されたエドモンソンプロトコルによりその成績が飛躍的に向上し、欧米では 1 型糖尿病に対する根本治療の一つになりつつある。しかしながら、ワンドナー・ワンレシピエントではインスリンフリーを得るのは困難であり、また移植膵島機能も時間と共に低下してしまうのが現状であり、その対策は見いだせていない。それ

は移植膵島障害をモニターする方法に乏しいということも大きな原因である。膵島移植では膵グラフトから単離した膵島を経門脈的に肝臓内に移植する。移植された膵臓は肝臓内に正着する前に機械的刺激や、非特異的炎症反応により障害されると言われている。また正着した後も、ホストの免疫機構や、免疫抑制剤等による障害にさらされる。膵島移植における移植片障害のモニター

は、腎移植における血清クレアチニンや肝移植における血清トランスアミナーゼのように簡潔に測定できるものは無く、血糖コントロールが悪化してからは、移植膵島を救うことは極めて困難である。また腎移植・肝移植のように生検することは現実的に不可能である。

一方電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance・ESR)はフリーラジカル等の酸化物質を微量であっても、酸化物質の種類毎に容易にかつ迅速に測定しうる装置であり、主に理学・工学系の基礎研究に広く用いられている。

2. 研究の目的

従来早期診断し得なかった移植膵島障害を迅速にかつ安価にさらに非侵襲的に測定する技術を確認する。例えば、カルシニューリン阻害薬やステロイド剤の毒性による障害と、拒絶反応の障害とは曝露される酸化ストレスも異なるはずであり、おのずと出現する酸化物質の種も異なってくる。その種を ESRにて測定、診断できる。移植膵島機能の長期的評価に分子生物学的方法による研究報告は散見されるが、ESRを用いる報告は無い。この技術が確立し得れば、移植膵島障害の種類も判別でき、機能廃絶する前にそれを予防し、膵島の長期正着が期待できる。

3. 研究の方法

(1) ラットからの膵島分離

9週齢 (200~250 g) の雄性 Lewis ラットを用いた。ペントバルビタールにて麻酔後、開腹。胆管よりコラゲナーゼ溶液を注入し膵臓を膨化後摘出。振盪しながら消化。Ficollによる比重勾配法にて膵島を純化した。

(2) 膵島移植モデルの作成

ストレプトゾトシンにて糖尿病を発症せしめたラットをペントバルビタールにて麻酔後開腹。膵背側の門脈本幹を穿刺し、膵島を注入。経日的に血糖を測定し、通常血糖が3日以上連続したものを移植成功とした。

(3) ヒドロキシラジカルの測定

10 mMの過酸化水素、スピントラップ剤として10mMの2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2λ5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide (CYPMP0)を含むリン酸緩衝液へ10秒間紫外線照射を行い、直ちにESRにて測定した。ESRの強度は最初のマンガマーカの値に対する比をとり数値化した。

(4) 臓器保存液によるフリーラジカル消去効果の検討

細胞内液組成である University Wisconsin 液 (UW 液)、細胞外液組成である ET-Kyoto 液をそれぞれ10倍希釈、2倍希釈に調整して紫外線照射し、ヒドロキシラジカルの値をESRにて測定した。

(5) 新規抗酸化剤が膵島収量に与える効果の検討と、その効果がフリーラジカルを消去することによるものかの解析

ラットを深麻酔にて致死せしめ、30分後に膵島分離を行い、温阻血モデルとした。胆管へ注入するコラゲナーゼ溶液に新規抗酸化剤を1mM、10mM、100mM混注し膵島収量を測定した。

その各群において、膵臓消化の際の上清100μlに10mMCYPMP0を添加し直ちにESRにて測定した。

(6) 膵島移植モデルにおける血中フリーラジカルの測定

門脈内に膵島を移植し、直後、3時間後、6時間後、24時間後尾静脈より100μlの血液を採取し、10mMCYPMP0を添加し直ちにESRにてフリーラジカルを測定した。

4. 研究成果

(1) ラットからの膵島分離

1匹のラットより約1000ヶの膵島が分離可能となった。

(2) 膵島移植モデルの作成

膵島600ヶの移植では5匹中全例糖尿病は治癒できなかったが、膵島を1000ヶとすると、5匹中4匹(80%)が正常血糖となった。

(3) ヒドロキシラジカルの測定

ESRの設定は、磁場領域 336.5±5 mT、変調幅 0.2 mT、マイクロ波強度 10 W、時間定数 0.03 秒にて。CYPMP0-OH アダクトである 6 本波を観測した (図1)。

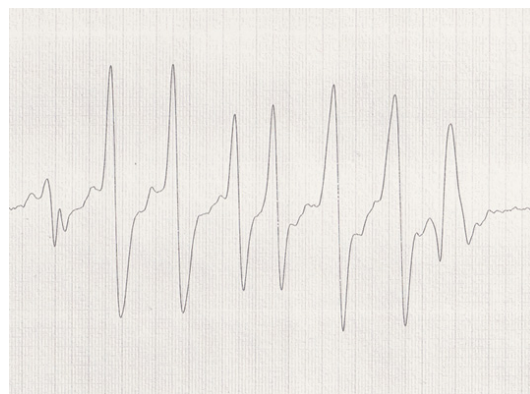


図1

(4) 臓器保存液によるフリーラジカル消去効果

果の検討

コントロールの ESR 強度 3.78 に対し、UW 液 10 倍希釈 3.54、2 倍希釈 3.85、ET-Kyoto 液 10 倍希釈 3.68、2 倍希釈 3.65 とフリーラジカル消去効果は認めなかった。

(5) 新規抗酸化剤が膵島収量に与える効果の検討と、その効果がフリーラジカルを消去することによるものかの解析

図 2 のように新規抗酸化剤 10mM 添加群において膵島収量が最も多かった。

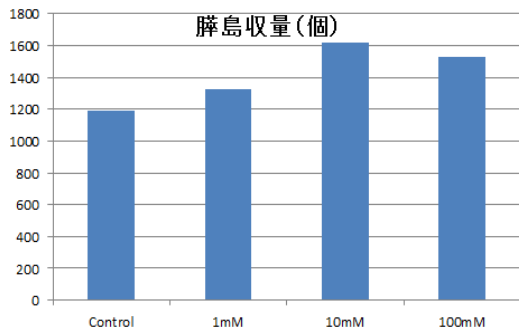


図 2

いずれの上清中からは ESR のシグナルは計測し得なかった。

(6) 膵島移植モデルにおける血中フリーラジカルの測定

いずれの血中サンプルからも ESR のシグナルを測定し得なかった。

研究成果総括

本研究は膵島分離、移植時におけるフリーラジカルおよび酸化ストレスの関与を明らかにし、それを ESR にて測定するというものであった。保存液におけるフリーラジカル消去能は明らかでは無かったが、膵島分離時における酸化ストレスは膵島収量に悪影響を与えていることが明らかになった。

ESR にてヒドロキシラジカルの測定は可能であったが、膵島分離時の上清や移植時の血液からはフリーラジカルを測定し得なかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kenmochi T, Asano T, Maruyama M, et al. Cryopreservation of Human Pancreatic Islets from Non-heart-beating Donors Using Hydroxyethyl Starch and Dimethyl Sulfoxide as Cryoprotectants. Cell Transplant. 査読有り, Vol. 17, 2008,

pp61-67

- ② 坪 尚武、剣持 敬、丸山通広、舘島凍結保存、移植、査読無し、43 巻、2008、357-363
- ③ Maruyama M, et al. Laparoscopic-assisted distal pancreatectomy and nephrectomy from a live donor. J Hepato-Biliary-Pancreat Sci. 査読有り, Vol. 17, 2010, pp193-196
- ④ Kenmichi T, Asano T, Maruyama M, et al. Clinical islet transplantation in Japan. J Hepato-Biliary-Pancreat Surg. 査読無し, Vol. 16, 2009, pp124-130
- ⑤ 丸山通広、他、生体膵臓移植の現況と展望、外科治療、査読無し、102 巻、2010、881-886
- ⑥ 丸山通広、他、我が国の膵臓移植の現況、今日の移植、査読無し、23 巻、2010、269-274
- ⑦ 丸山通広、他、生体膵臓移植ドナー手術における鏡視下手術、胆と膵、査読無し、32 巻、2010、85-89

[学会発表] (計 8 件)

- ① 丸山通広、他、当院における心停止ドナーからの膵島分離・移植成績と今後の展望、第 63 回日本消化器外科学会総会、2008 年 7 月 16 日、札幌
- ② 丸山通広、他、当院における膵島分離・移植成績、日本膵臓学会大会、2008 年 7 月 30 日、横浜
- ③ 丸山通広、他、同一心停止ドナーからの膵島分離成績と腎移植成績との関係、第 36 回膵・膵島移植研究会、2009 年 2 月 28 日、福岡
- ④ 丸山通広、他、The correlation of the result of islet isolation and clinical outcome of kidney transplantation from the same non-heart beating donors. 第 36 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会、2009 年 4 月 20 日、岡山
- ⑤ 丸山通広、他、生体膵臓移植における鏡視下手術の導入、第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010 年 4 月 10 日、名古屋
- ⑥ 丸山通広、他、生体膵臓移植における膵膀胱吻合法の工夫、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 16 日、下関
- ⑦ 丸山通広、他、膵体部嚢胞性腫瘍に対する尾側膵切除後、膵尾部の自家移植、第 38 回日本膵・膵島移植研究会、2011 年 3 月 5 日、奈良
- ⑧ Maruyama M, et al., Pancreaticocystostomy for living-related donor pancreas transplantation. Americans

Hepato-Pancreato-Biliary association
annual meeting 2011, 2011年3月12日、
マイアミ (アメリカ合衆国)

[図書] (計2件)

- ① 丸山通広、中外医学社、消化器外科の基
本手術手技、2010、279-283
- ② 丸山通広、メジカルビュー社、膵臓の内
視鏡外科手術、2010、162-170

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山通広 (MARUYAMA MICHIMIRO)

独立行政法人・国立病院機構千葉東病院・
臨床研究センター・室長

研究者番号：40399754

(2) 研究分担者

坏 尚武 (AKUTSU NAOTAKE)

独立行政法人・国立病院機構千葉東病院・
臨床研究センター・室長

研究者番号：00344979