

Luciferase transgenic ラットを用いた臓器保存液スクリーニングシ

ステム

A novel screening system for development of organ preservation solution using Luciferase Transgenic rat

菊地健志*1 堀田淳*2 小林英司*3

*1)自治医科大学 臓器置換研究部 大学院修士

*2)自治医科大学 臓器置換研究部 研究生

*3)自治医科大学 臓器置換研究部 教授

現在までに多くの臓器保存液が開発されてきた。しかし、臓器保存効果の単純評価が困難であったために、開発には経験則や膨大な労力が必要であった。

今回、筆者らは Luciferase transgenic ラット臓器を用いて、臓器保存液の ATP 保存力を指標とした簡単な臓器保存液のスクリーニングシステムを開発したので報告する。

はじめに

臓器保存液の開発は、20世紀の医療革命である臓器移植治療の発展を支えた。ドナーから臓器を摘出し、移植完了までの間、臓器のバイアビリティー低下を最小限に抑えることは本治療が現実化するために必修であった。

摘出した臓器の保存方法は、摘出臓器に還流装置を接続して灌流液を循環させ保存する方法と、血液を洗い流した後、単純に浸漬冷却する方法とに分けることができるが、現在の臓器移植現場ではその簡便さなどから単純冷却による保存液浸漬が主流となっている¹⁾。単純冷却による浸漬保存は、1969年Collinsらによって発表され²⁾、その後完成したEuro-Collins(EC)液によって広く利用され始めた。EC液は膜非透過性物質としてglucoseを使用し、カリウムイオン濃度が高くナトリウムイオン濃度の低い、細胞内液型組成となっている。細胞は保存することで細胞膜ポンプの働きが低下し、細胞内へのナトリウムイオンの流入が起こり傷害されてしまう。そこでEC液は細胞内液型組成の成分を基本とし、保存後の細胞内イオンバランス変化の影響が軽減されるように設計されたのである。このEC液の出現により、腎臓などの臓器を摘出後にクーラーボックスなどで手軽に運ぶことが可能となり、国を越えての輸送も行われるようになった。

さらにその後、臓器が保存され再度血流が再開される際に生じる生体反応（虚血再還流障害）についての知見が加わったことや、細胞内への代謝産物の蓄積や活性酸素の産生などに様々な対策がなされ、1990年に革命的な保存液University of Wisconsin (UW) 液³⁾が実用化された。現在、UW液は世界でもっとも使用されている臓器保存液となっている。

その後もアミノ酸 (glycine) やホルモン (l-carnitin)、さらにcAMP⁴⁾などを添加することが臓器保存効果に有効であるとする報告がされている。一方、和田 洋巳博士(前京都大学呼吸器外科教授)らは、EC液やUW液とは異なり組成中のナトリウムイオン濃度をカリウムイオン濃度より高く設計した、いわゆる細胞外液型の電解質バランスで、EC液やUW液に遜色のない臓器保存液、ET-Kyoto液を考案している⁵⁾。ET-Kyoto液は糖類として、ストレス下で細胞保護作用をもたらす非還元性二糖類トレハロースを使用したことが特徴となっている。またこの臓器保存液は現在、株式会社大塚製薬工場が実用化に向け開発中である。

これまでに開発された高性能の臓器保存液使用によって臓器保存時間は延長されてはいるものの、現存の臓器保存液はまだ十分な効果とは言えず、現在も新規開発や新規添加物の探索など研究が続いている。しかし、新規保存液の開発にしる既存液への新規物質添加にしる、多種の候補物質の中でその種類や濃度、さらにはそれらの組み合わせによる複合的効果を判断するとなるとある種の経験や勘、さらに動物実験などによる膨大な労力をつぎ込むことが必要であった。

そのような中、我々は画期的な臓器保存液のスクリーニングシステムの開発に成功した。

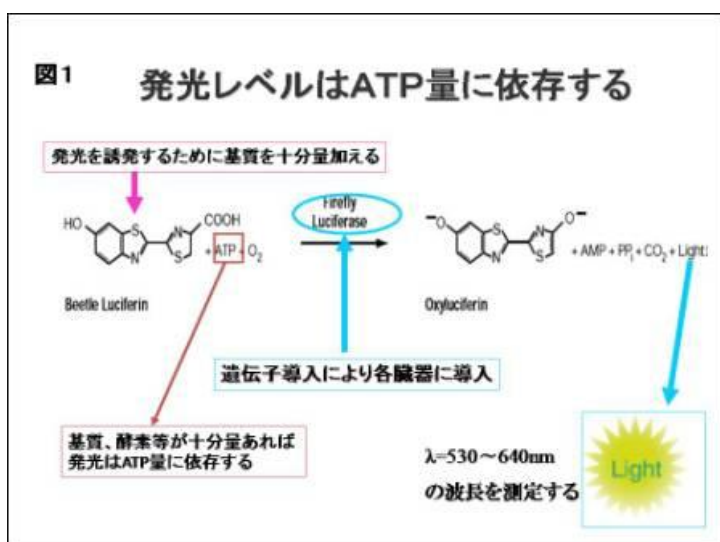
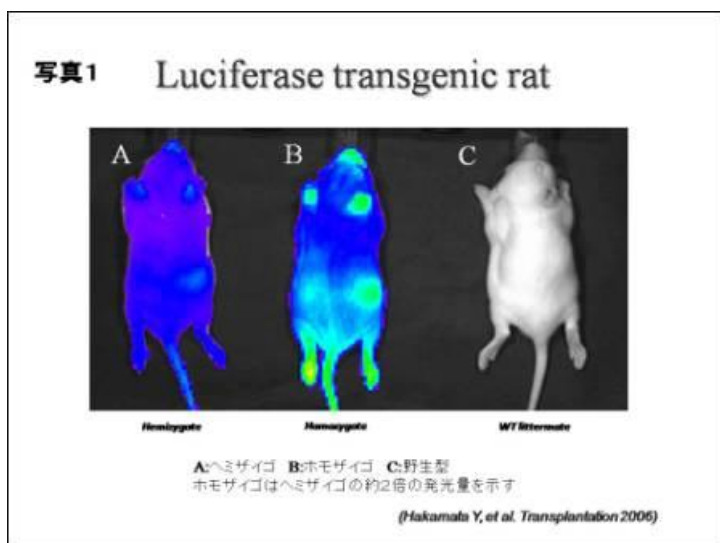
ATP とルシフェラーゼ反応

単純冷却保存は、冷却によって臓器の代謝活動を低下させることで組織を保存する手法である。しかし、低代謝状態とはいえ酸素などの供給のない状態では、細胞活動のエネルギー源、ATPは速やかに減少していく。細胞内ATPの枯渇は、ATPを必要とする細胞活動の停止を意味し、その結果恒常性を保てなくなった細胞は傷害を受けることになる。特に細胞膜に存在し、細胞内外のイオンバランスを調節している膜ポンプの活動はATPに強く依存するため、ATP量の低下は細胞内イオン流入による細胞膨化傷害を引き起こすことが知られている。この点に注目し、これまでも、ATP量の変化から保存臓器・組織の劣化を判断するという事は行われてきた⁶⁻¹¹⁾。しかしその手技は極めて煩雑であった。

先に筆者らは、遺伝子改変（トランスジェニック）技術を用いてホタルの発光タンパク質Luciferaseを全身に発現したLuciferase(Luc) transgenic(Tg)ラットを誕生させて

いる¹²⁾。Luc Tgラットは基質Luciferinを投与することによって、ラットの持つLuciferaseによってLuciferinの酸化がなされ全身から発光する（写真1）。このホタルLuciferase-Luciferinによる発光反応にはATPが必須であり、ATPを律速にした場合の発光量はATP量と比例することが分かっている(図1)。

今回筆者らが報告するのは、このLuc Tgラットから摘出した臓器を保存液に浸漬し、浸漬後の発光レベルを連続的に測定することによって間接的に保存臓器中のATP量の変化を測定するシステムについてである。



スクリーニングシステムとして

筆者らはまず、性質の異なる液2種を用いて臓器保存実験を行った。Luc Tg ラットから取り出した臓器の血液を洗い、各保存液に単純浸漬させ4℃で保存し、その発光を24時間ごとに測定していった。臓器保存液(ET-Kyoto液)に浸漬したものでは発光が継続しているのに対し、組織保護効果の低いと考えられる生理食塩水ではその発光は保存液グループよりも早く減少していくことが確認された(写真2)。

さらに筆者らは、株式会社大塚製薬工場との共同研究を行い、臓器保存液スクリーニングシステムとしてより多くのサンプルを一度にスクリーニング可能な組織スライス法への発展を試みた。組織スライス法ではLuc Tg ラットの臓器をそのまま使用するのではなく、組織スライサーによって1個体から大量の組織スライスを作成し、同一プレートに乗せ発光輝度を一気に測定する方法である(写真3)。本法は、臓器保存液やLuciferinなどの試薬類の使用量の大幅な削減ができると共に、一度に大量の臓器保存液の効果を連続して評価できる画期的な方法であり、本年1月18日に国際特許出願を行なっている。

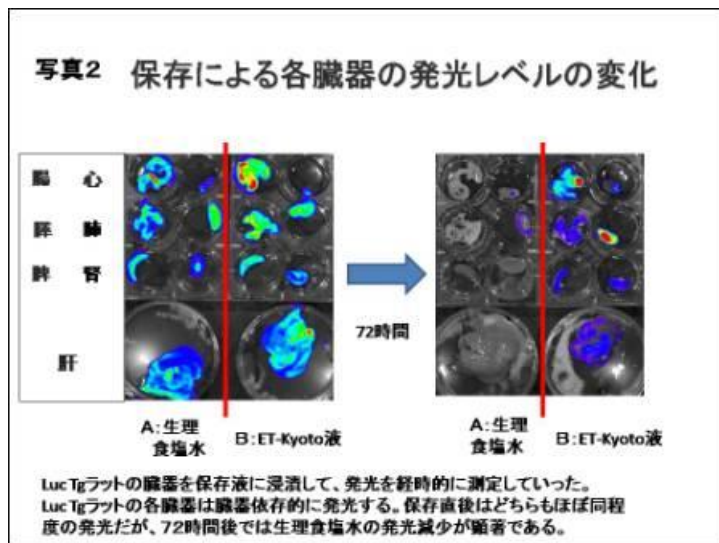
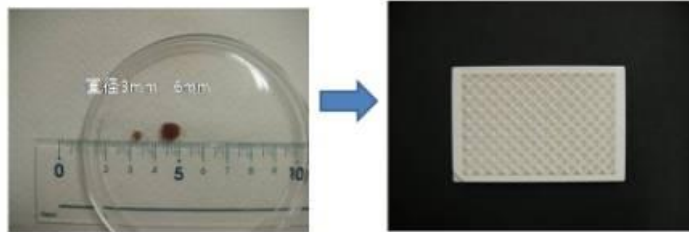


写真3 組織スライス方式



均一な組織スライスをつくり、96穴のプレート上でプレートリーダーにて発光量を測定する。

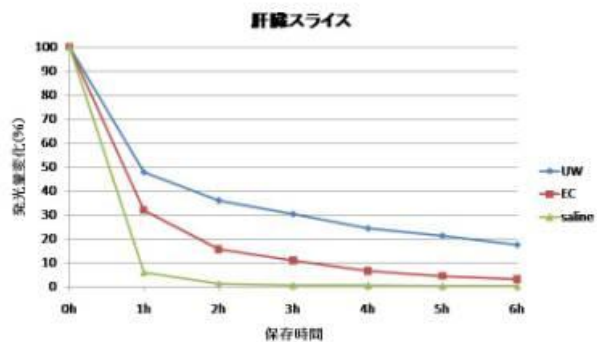
組織スライスによる臓器保存液の評価

我々は組織スライスによる臓器保存液スクリーニングシステムによって肝臓、腎臓、心臓などの組織スライスを用いて既存の各種臓器保存液の保存効果の評価を行った。例として肝臓スライスの発光量の時間変化を示す(図2)。この結果はこれまで多くの論文で言及されてきた、UW液の保存効果の優位性を支持するものとなると考えられる。

14-16)

また、本システムを用いることで既存の保存液への添加物の効果やその濃度、さらには添加物の組み合わせなども単純にスクリーニングすることも可能である。

図2 スライス肝臓の発光量変化の一例



Luc1gプラットの肝臓をスライスし、各種臓器保存液入りの96穴プレートにて4℃保存、経時的に発光量の変化を測定した。グラフは保存0時間値を100%とした。

おわりに

筆者らが今回開発したスクリーニングシステムについて若干の例を用いて簡単に説明した。

本スクリーニングシステムは、臓器保存液の組成の検討を科学的根拠に基づき、簡単・大量・短時間に行えるものである。このシステムによって保存臓器の ATP 保持力の観点から、既存の保存液の客観的評価が簡単に可能となると考えられる。また、保存液への添加物質の種類・濃度・組み合わせもスクリーニング可能なため、本システムによってこれからの臓器保存液の開発が飛躍的に発展していくことを期待する。

謝辞

本研究の組織スライスの作成における、自治医科大学環境医学部門 香山不二雄教授のご協力に心から感謝致します。

文献

- 1) Zhou YC, et al: Preservation. Clin Transpl. 1992;;383-90.
- 2) Collins GM, et al: Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. Lancet. 1969 Dec 6;2(7632):1219-22.
- 3) Ploeg RJ, et al: Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. Transplantation. 1988 Aug;46(2):191-6.
- 4) Sands WA, et al: Inhibition of pro-inflammatory cytokine receptor signalling by cAMP in vascular endothelial cells. Biochem Soc Trans. 2005 Nov;33(Pt 5):1126-8.
- 5) Chen F, et al: Development of new organ preservation solutions in Kyoto University. Yonsei Med J. 2004 Dec 31;45(6):1107-14.
- 6) Delmas-Beauvieux MC, et al: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of isolated rat liver during hypothermic ischemia and subsequent normothermic perfusion. J Hepatol. 1992 May;15(1-2):192-201.

- 7) Delmas-Beauvieux MC, et al: 31P NMR studies of rat liver cold preservation with histidine-buffered lactobionate solution. *Cryobiology*. 1993 Dec;30(6):551-61.
- 8) Michel P, et al: Evaluation of a new preservative solution for cardiac graft during hypothermia. *J Heart Lung Transplant*. 2000 Nov;19(11):1089-97.
- 9) Michel P, et al: A comparative study of the most widely used solutions for cardiac graft preservation during hypothermia. *J Heart Lung Transplant*. 2002 Sep;21(9):1030-9.
- 10) Peltz M, et al: Perfusion preservation maintains myocardial ATP levels and reduces apoptosis in an ex vivo rat heart transplantation model. *Surgery*. 2005 Oct;138(4):795-805.
- 11) Wei L, et al: Experimental small bowel preservation using Polysol: a new alternative to University of Wisconsin solution, Celsior and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution? *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 21;13(27):3684-91.
- 12) Hakamata Y, et al: "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation*. 2006 Apr 27;81(8):1179-84.
- 13) Jamieson NV, Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation*. 1988 Oct;46(4):517-22.
- 14) Cavallari A, et al: A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2003 Aug;9(8):814-21.
- 15) Feng L, et al: Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl*. 2007 Aug;13(8):1125-36.
- 16) Bando T, Significance of cyclic adenosine monophosphate and nitroglycerin in ET-Kyoto solution for lung preservation. *Ann Thorac Surg*. 2000 Mar;69(3):887-91; discussion 891-2.