

# 緑茶カテキンを用いた生体組織保存液

玄 丞<sup>\*</sup>・松村 和明

## 臓器・組織移植と保存液

事故や疾病などにより臓器不全になった患者への救命手段の一つとして臓器・組織移植が行われている。従来より行われてきたこの臓器移植であるが、外科的技術の向上および新規免疫抑制剤の登場により最近では急激に件数および成功率が向上し、現在では世界中で移植医療として確立されるに至っている。特にアメリカでは、脳死患者からの移植も多く、2002年には計約4,000,000件の臓器・組織移植が行われている(表1)。移植用臓器はレシピエントに移植されるまでの間、臓器保存液に浸漬して輸送される。保存液の中で最も世界的シェアが大きいものはUW (University of Wisconsin) 液で、ついでユーロコリンズ液である。いずれも腎臓、肝臓、膵臓移植用に主に用いられ、4°Cにて4~24時間程度しか臓器を保存することができない。<sup>1,2)</sup> 臓器移植の増加に伴って移植用臓器の保存も重要な研究課題として残されており、よりすぐれた保存効果を持つ保存液の開発が強く望まれている。臓器は生体から切り離されることにより血流が途絶え、活性が低下する。種々の臓器に共通していえることは、虚血および血流再開時に生じるフリーラジカルが引き金となり、細胞膜の脂質過酸化に伴う膜障害が起こり、その結果臓器のさまざまな機能障害が生じる

ということである。つまり、この酸化による細胞障害を抑えることがより良い保存液を開発することの鍵となる可能性がある。

一方、組織移植は、表1から明らかなように臓器移植よりも格段に件数が多いことが特徴である。組織および細胞は通常-196°Cで保存されているが、たとえば小口径血管の場合、凍結・解凍の作業を行うことにより障害を起こし、移植に問題が残る場合がある。また、角膜は凍結により内皮細胞に障害を与えるため、凍結保存できず4°Cで1週間程度の保存しかできない。これらの組織の凍結障害および常温での保存時においても活性酸素による細胞障害が保存に悪影響を及ぼすことが考えられる。

近年、組織工学技術の急速な進歩により、培養皮膚や培養軟骨、角膜が臨床応用のレベルまで近づいており、組織の供給が今後大幅に伸びる可能性がある。

ヒトからの提供による血液、細胞、組織、臓器あるいは組織工学や遺伝子工学技術により生産された組織が適用される場面が増大しているにもかかわらず、その保存技術や流通ネットワークシステムが確立されていないのが現状である。そこで我々は、保存時の細胞障害を防ぐ目的で抗酸化活性という点から緑茶カテキンに注目し、凍結することなく、組織・臓器の機能を保ったまま保存することが可能な保存液の研究開発に取り組んでいる。

表1. アメリカにおける臓器および組織移植件数

		1999	2000	2001	2002	2003
Organ	Kidney	12,400	13,372	14,152	15,001	n.d.
	Liver	4,707	4,962	5,178	5,425	n.d.
	Lung	889	956	154	1,148	n.d.
	Pancreas	1,298	1,346	1,352	1,370	n.d.
	Intestine	71	79	112	141	n.d.
Tissue	Cornea	33,020	33,260	33,035	33,042	33,049
	Blood stem cells	n.d.	n.d.	n.d.	132,000	127,000
	Bone	970,000	n.d.	n.d.	1,116,000	1,170,000
	Heart valves	96,000	101,000	107,000	112,000	118,000
	Vascular	n.d.	n.d.	n.d.	794,000	790,000
	Skin	n.d.	1,051,934	1,588,967	1,698,280	1,820,237

n.d., no data.

\* 著者紹介 (代表) 京都大学再生医科学研究所 (助教授) 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53  
TEL. 075-751-4125 FAX. 075-751-4141 E-mail: biogen@frontier.kyoto-u.ac.jp

### カテキンによる細胞増殖コントロール

緑茶カテキン類の抗ガン作用は近年大きく取り上げられ、心臓病への効果や代謝の活性化などさまざまな効能が注目を浴びている。<sup>3,4)</sup>

玄らはマウス線維芽細胞由来 L929 細胞およびブタ肝細胞を緑茶カテキンで処理することで、細胞分裂をいったん停止させ、またその洗浄により増殖を再開させることが可能であることを発見した。<sup>5)</sup> フローサイトメトリーを用いた詳細な検討より、カテキンを投与することによりS期、M期の細胞の減少とともにG0/G1期の細胞が増加し、洗浄後は徐々にSおよびM期の細胞が増加してくることが確認された。

細胞の増殖を機能の阻害なく抑制できるならば、組織として定常状態にある細胞の代謝を抑えることにより、保存することが可能であるのではないかと仮説の下、我々はこれまで種々の組織の保存を行ってきた。本稿では、これら研究の一部を紹介し、非凍結組織保存液の可能性を報告する。

### 角膜の保存

角膜とは眼球の表面にある透明な膜で、表面より5～7層の細胞が重層した角膜上皮、コラーゲンとプロテオグリカンが整然と配列した角膜実質、および内皮細胞より形成されるバリアー機能とポンプ機能をもつ角膜内皮の3層から構成されている。感染などの外的疾患や遺伝的疾患、外傷などにより透明性を喪失するなどして機能を失った場合、角膜移植が必要となる。角膜の保存状態は、良好な移植成績を得る上で非常に重要な要素である。角膜の場合、凍結保存は内皮細胞に回復不能な大きなダメージを与えるため、未凍結で保存されている。これまでさまざまな保存液が開発されてきているが、それらの目的とするところは、主に角膜組織の膨潤を防ぎ、viabilityを維持することである。現在最も眼科の臨床において用いられている保存液にOptisol<sup>®</sup>があげられるが、保存期間は4°Cでたかだか7～10日間である。そこで我々は、緑茶カテキンをOptisol<sup>®</sup>に添加することで、角膜の保存期間の延長を試みた(投稿中)。Optisol<sup>®</sup>に各種濃度になるように緑茶カテキンを加え、その中にウサギ強角膜片を浸漬し4°Cで24時間処理した。その後、洗浄した角膜を新たなOptisol<sup>®</sup>中にて2週間保存した。図1に保存角膜上皮のヘマトキシリン・エオジン染色像を示す。Optisol<sup>®</sup>のみに浸漬した場合、2週間保存後には上皮組織に障害が見られるのに対し、緑茶カテキン添加

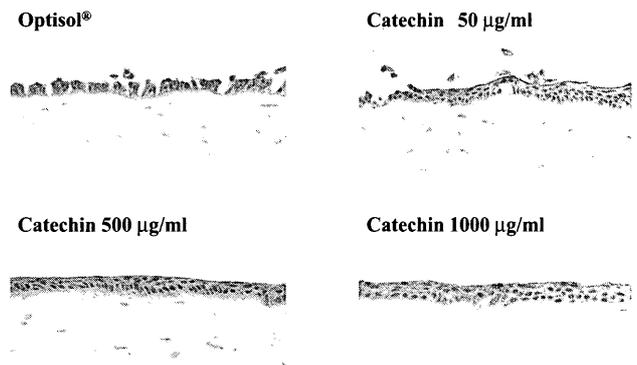


図1. 保存角膜上皮に対する緑茶カテキンの影響

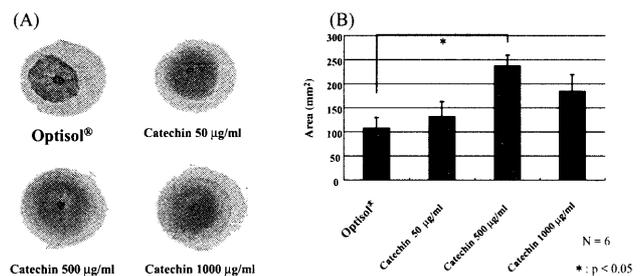


図2. 保存角膜上皮の増殖能に対する緑茶カテキンの影響。(A)ヘマトキシリン染色像、(B)増殖面積。

Optisol<sup>®</sup>中では明らかに形態が保たれている。

さらに、直径3 mmの角膜中心をくりぬき、ディッシュ上で24時間培養したときの角膜上皮細胞の遊走を顕微鏡で観察し、その面積を調べた結果を図2に示す。カテキン添加Optisol<sup>®</sup>中で処理した角膜は増殖能が有意に高く、保存後もviabilityが保たれていることがわかる。また、角膜内皮細胞に関しても、緑茶カテキンを添加することで、4°Cで4週間という保存期間において形態が保持されることがわかっている。以上の結果から、緑茶カテキンにより角膜上皮、内皮ともに形態や機能の維持に有用である可能性が示唆された。

### 膵島の保存

膵臓には消化酵素を分泌するだけでなく、インスリンやグルカゴンなどのホルモンを分泌する内分泌器官としての役割がある。これらホルモンを分泌している数千個の細胞からなる組織を膵島またはランゲルハンス島と呼ぶ。この膵島が正常に機能しなくなった糖尿病患者は年々増えているため、膵臓移植や膵島移植、膵島再生の研究が盛んに行われている。我が国でも2004年4月に京都大学病院にて初の膵島移植が行われ、良好な結果を納めている。膵島移植において、ドナー膵臓から移植用膵

島を純化し移植まで持つて行く道程で、いかに活性と機能を低下させずに保存するかは非常に重要である。従来、膵島は冷凍で保存されているが、解凍後の生存率や機能低下の問題で移植には使われていない。むしろラット膵島を緑茶カテキンで処理すると37°Cで2ヶ月間も形態のみでなく生理活性も保持できることを見いだした。<sup>6)</sup>そこで、緑茶カテキンを用いてヒト膵島の保存を試みた。<sup>7)</sup>通常、ヒト膵島は単離してから移植するまでの間、37°Cで培養する。このときの培養液に所定濃度となるように緑茶カテキンを添加し、48時間培養した後、形態、機能を評価した。図3に48時間後の形態を示す。明らかに緑茶カテキンを添加した培地の方が形態を保っていた。図4に24時間後の生存率を示す。緑茶カテキンを添加しなかった系では50%程度なのに比べ、緑茶カテキン添加ではいずれの濃度においても80%を超えた値を示した。図5は保存後の膵島からRNAを抽出し、RT-PCRを行った結果である。BCL-2タンパクはアポトーシスを抑制し、BAXタンパクはアポトーシスを引き起こす転写因子

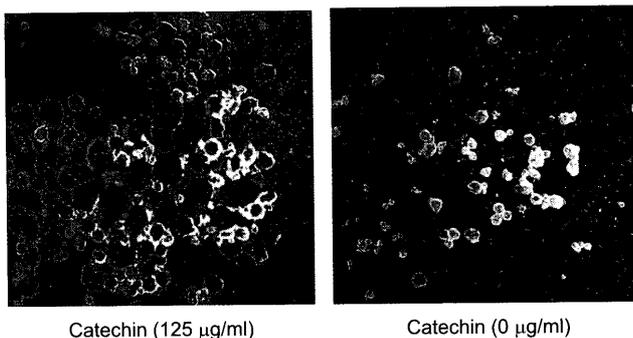


図3. 緑茶カテキンの48時間保存後のヒト膵島の形態への影響

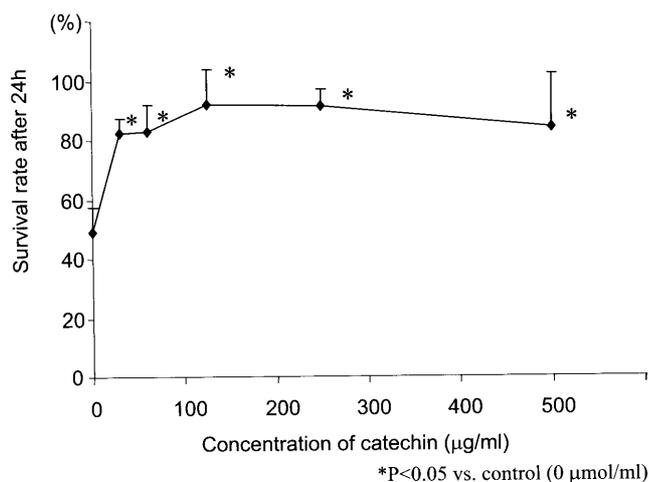


図4. 保存ヒト膵島生存率に対する緑茶カテキンの影響

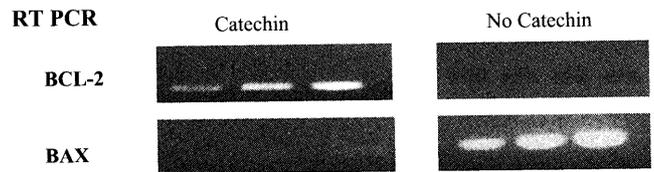


図5. 48時間保存ヒト膵島のBCL-2およびBAX発現への緑茶カテキンの影響

である。この結果より、緑茶カテキン処理により膵島細胞のアポトーシスが抑制されていることがわかる。また、保存後のインスリン産生能も低下していないことが確認されている。外科手術を必要としない膵島移植は今後、糖尿病根治療法として確立されることは間違いないと考えられるが、その際に緑茶カテキンが活躍することが期待できる。

### 血管の保存

次に、ラットの腹腔大動脈を緑茶カテキンで長期保存した結果を示す。ラット (Lewis 355 g) の腹腔大動脈 (3~5 cm) を採取し、1 mg/mlの緑茶カテキン添加培地にて24時間処理した後、37°Cで一定期間保存した。保存4週間後の血管の力学的特性を調べたところ、緑茶カテキン未処理群に比べて有意に形態を維持し、採取直後と同程度の引張破断強度、伸度を示した。また、血管内に生理食塩水を流し、その血管内圧に対する膨張度を測定したところ、やはり緑茶カテキン処理の保存血管ではより採取直後に近い値が得られた。8週間保存した血管を同種移植に供したところ、炎症反応も起きず、約2ヶ月後に犠牲死させるまで拒絶されなかった (図6)。<sup>8)</sup>

また、ヒトの伏在静脈の保存も行った。伏在静脈はバイパス術時に移植される静脈である。緑茶カテキン処理後、37°C、2週間の保存期間において血管内皮細胞の生存が確認され、endothelial nitric oxide synthase (eNOS)

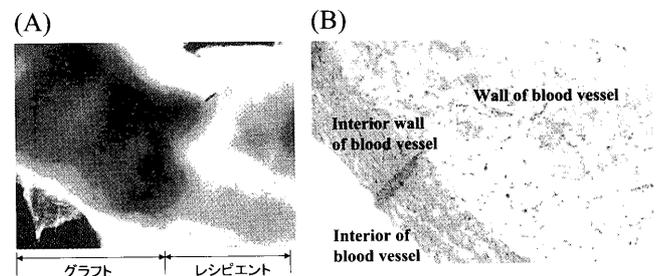


図6. 緑茶カテキン1 mg/mlで24時間処理後2ヶ月間保存したラット腹腔大動脈。(A) 60日後の血管。血栓が認められない。(B) 組織切片の光学顕微鏡像。

の発現も保たれていた。eNOSは血管拡張を促す一酸化窒素を合成する酵素であり、血管の機能が保たれていたことがわかる。また、血管形態も維持されていたことがわかった。<sup>9)</sup>

### 神経の保存

20 mmのラット座骨神経を1週間1 mg/mlの濃度の緑茶カテキンで処理後、4°Cで3週間保存し同種移植した。移植24週後の電子顕微鏡写真を図7に示す。緑茶カテキン未処理群では軸索の数も減少していたが、処理群では軸索がミエリン化された正常に近い形状を保っていた。また、シュワン細胞の生存率も有意に高い結果が得られた。

### 組織保存のメカニズム

緑茶カテキンがどのようなメカニズムで細胞の増殖コントロールと生体組織の保存に寄与しているのか、正確なところはまだわからないが、我々は以下のように考えている。これまで、カテキンを含むポリフェノール類にさまざまな生理活性があることは多くの報告より明らかである。たとえば、抗ガン作用、抗菌作用、心臓病予防作用などである。これらの作用のメカニズムとしては大きく以下のように説明されている、まず、フレンチパラドックスとして赤ワインのポリフェノールが一躍有名となった心臓病予防であるが、これはポリフェノール類の強い抗酸化活性により活性酸素が除去されるためであると言われている。<sup>3)</sup> 抗ガン作用に関しては、ガン細胞を直接アポトーシスに導く作用と、マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性を阻害し、ガンの進行を食い止める作用を併せ持つことが報告されている。<sup>10,11)</sup> 一方、正常細胞ではアポトーシスを引き起こさない。<sup>12)</sup> また、我々は緑茶カテキン類がタンパク質と非常に強い親和性を持ち、可逆性のある強い吸着作用を持つことを明らかにした。<sup>13)</sup>

これらの実験結果を総合すると、緑茶カテキンが細胞

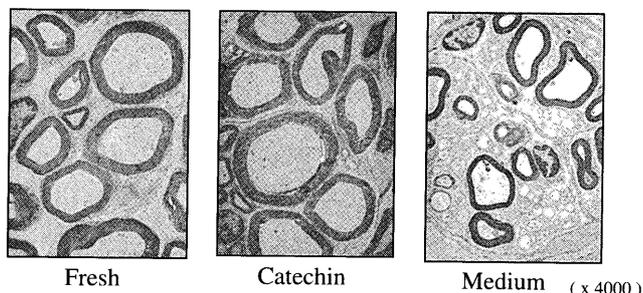


図7. 3週間保存後移植したラットの24週後の坐骨神経の電子顕微鏡像。

表面の種々のレセプタータンパク質に物理的に吸着し、シグナル伝達を一時的に阻害している可能性が示唆される。すなわち、増殖因子による信号が伝達されず、代謝活性が抑制される。また、抗酸化活性のある緑茶カテキンが細胞膜近傍に多数存在することにより脂質酸化によるフリーラジカルを消去し、細胞膜破壊を抑えている可能性がある。そして、洗浄により緑茶カテキンが脱着することにより信号伝達が再開され、スムーズに増殖が開始されるのではないかと考えられる。組織においては、細胞への吸着に加えて細胞外マトリクスへの吸着が起こり、一時的な架橋のようにマトリクスを補強する役割を果たし、同時にMMPによる分解を阻害することで、組織として長期の形態維持が可能になると考えられる。

緑茶カテキンは角膜、脾島、血管、神経といった種々の組織の未凍結下での保存にきわめて有効であることが示唆された。現在、日本では東京大学病院と大阪国立循環器病センターに「組織バンク」が設立されているが、ここでの血管、軟骨、皮膚や心臓弁などの保存は-196°Cでの凍結保存法が採用されている。また、保存研究も凍結法の改良に関するものである。しかし、凍結には細胞破壊を防止するためにジメチルスルホキシドを添加する必要があり、その毒性の問題は解決されていない。我々は、今回種々の実験結果から、今後のさらなるメカニズムの解明を詳細に調査するとともに、各種組織の常温保存法として緑茶カテキンを用いた方法の提案を行うものである。

### 文 献

- 1) Rubinsky, B. *et al.*: *Cryobiology*, **27**, 85 (1990).
- 2) Wilkins, L. M. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 747 (1994).
- 3) Yang, C. S.: *Nature*, **389**, 134 (1997).
- 4) Cao, Y. *et al.*: *Nature*, **398**, 381 (1999).
- 5) Hyon, S. H. *et al.*: *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **6**, 289, (2001).
- 6) Zhan, G. M. *et al.*: *Cell Transplantation*, **13**, 145 (2004).
- 7) Hyon, S. H. *et al.*: *J. Biotechnology*, **85**, 241 (2001).
- 8) 玄 丞然ら: *Organ Biology*, **9**, 61 (2002).
- 9) Han, D. W. *et al.*: *J. Biotechnology*, **110**, 109 (2004).
- 10) Gupta, S. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**, 177 (2003).
- 11) Demeule, M. *et al.*: *Biochem. Biophys. Acta*, **1478**, 51 (2000).
- 12) Yamamoto, T. *et al.*: *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **307**, 230 (2003).
- 13) Nakajima, N. *et al.*: *Proc. IUPAC Polymer Conference on the Mission and Challenges of Polymer Science and Technology* (2002).