

偶然を見逃さない-光るラットを用いてやってきたアプローチ

小林英司

慶應義塾大学医学部 臓器再生医学講座

要約

1960年 Medawar が MHC が異なれば臓器は拒絶されるという移植免疫の「法則」を打ち出しノーベル生理学・医学賞を受賞した。しかし、恩師 Calne は、同じころ臨床の臓器移植を行いながら、免疫抑制薬がなく臓器移植が成功する稀な例があることを見つけ、その現象解明と臨床応用に挑んだ。ヒトをはじめ、生きている生物には「まぐれ」は存在せず、必ずその理由が存在する。しかし、実験における偶然を見逃さないための心構えが重要である。

著者は、臓器移植、再生医療の研究手段として、GFPTg ラット、LuciferaseTg ラットを世界に先駆け作出して、イメージング技術を利用して生体の不思議な現象の解明とその医療応用に挑んできた。本小総説では、まず実験医学に基づく移植免疫学の歴史を振り、実験の偶然を見逃がさなかった先人について紹介した。そして、近年加速する幹細胞研究を進める上で光るラットからの実験史実をヒントに医学・医療に応用する著者の研究の歩みを紹介した。

はじめに

医学は、科学的史実にもとつき、病めるヒトを癒し治療する学問である。この真理は、近代医学が始まってからぶれることのない思想であろう。患者をきめ細やかに観察することは、病気を診断する面で最も重要なことである。しかし、その観察医学だけでは、ヒトに初めての薬物を投与したり、新しい治療法を試ことはできない。実験動物を使った介入研究により科学的根拠を求める手法として実験医学が生まれた。そして1960年ノーベル生理学・医学賞を受賞した Medawar と Burnet の移植免疫の法則の発見もまさに実験医学的手法であった。この実験医学では、偶然を見逃してはならない。生き物にまぐれは存在しない。

近年の臨床における臓器移植医療は、死しかない患者を蘇らせる治療として奇跡の治療と呼ばれている。しかし、次世代の我々が目指すべきは、移植をしなくても病気を治す方法はもとより、自らの手で臓器を作り上げることであることは明白である。これまで著者が、この課題に挑む手法として、In vivo 光イメージング手法を駆使して、偶然起こる実験医学での出来事を定量化して再現性の良い条件を見つけ出してきた。

本短総説は、まず実験医学、移植免疫学の祖の歩んできた道を振り返った。そして先人による移植免疫学の中で生まれた法則とその法則に従わない稀な現象の発見について概説した。まさに自然科学におけるセレンディピティである。フランスのルイ・パスツールは、リール大学学長就任演説で「偶然は構えのある心にはしか恵まれない」（1854年）と述べたとい

う。そして、著者の光るラット誕生にいたる背景を紹介したうえで、そのラットを使った臓器再生医学研究の成果の一部に解説を加えた。

実験医学の祖の生涯

実験医学



Dr. Claude Bernard (1813-1878)

移植免疫学



Sir Peter Medawar (1915-1987)

(Picked up from the Internet)

実験医学の祖と言われる Bernard は、1813 年フランス東部のローヌ地方の村サン・ジュリアンで、ワイン商を営む父と、農民の母との間に生まれた 1)。彼は村のイエズス会の学校で初等教育を受け、リヨンの大学に入学したが、薬剤師の助手になるため大学を離れた。彼は余暇の間にヴォードヴィル・コメディの台本書きに専念し、21 歳で劇作家を志しパリへ向かった。しかしながらパリで彼の台本

を読んだ評論家は作家をあきらめ、医学の道を志すよう彼に諭した。Bernard はこの助言に従い、病院でインターンとなった。そして、1834 年にパリに移り、パリ大学の医学部に入学した。1836 年実習医試験、1839 年インターン試験にそれぞれ合格している。1841 年、マンジャンディ教授の助手になり、生理学的実験の専門家となった。1843 年に医学の学位を取得して、1845 年マリー・フランソワーズ・マルタンと見合い結婚した。1854 年からソルボンヌ大学で生理学の教授を務めた。さらに、1855 年にはコレージュ・ド・フランスで医学の教授に就任した。そして健康を害して静養している 2 年間に「実験医学研究序論」を書き上げ 1865 年に発表している 2)。Bernard はその中で、「科学は、単に観察を行うだけでなく、実験を行うことによって確立する」と述べている 2)。そして「医学は、単に観察に基づく医学（観察医学）ではなく、実験に基づく医学（実験医学）になるべきだ」医学における実験を推奨している。すなわち、観察が所与の自然現象を受動的に探究するのに対して、実験は自然に能動的に働きかけて、人為的に変化を加えた現象を探究するものであると述べた。そして「多少危険性のある治療薬または激しい医薬をあらかじめ犬について実験を行うことなしに、直ちにこれを病院内の患者に施すことが道徳的であるとは、どうしても私は認めることができない。」と動物実験を定義したという 2)。その後 Bernard は、1868 年にはアカデミー・フランセーズ会員に選出されたが、1869 年に妻と離婚し、その年に亡くなっている。

一方、移植免疫学の父 Medawar は 1915 年、イギリス人の母親とレバノン人の父親の間にリオデジャネイロ市で生まれた 3)。彼は、第二次世界大戦中に皮膚移植の研究から移植の

研究を始めた。Medawer は 1947 年から 51 年にかけてバーミンガム大学、1951 年から 62 年にかけてユニヴァーシティ・カレッジ・ロンドンの動物学の教授を務めた。1956 年、Medawer によって移植免疫の基本とも言えるマウスの皮膚移植モデルを使って 5 つの実験が示された 4)。第 1 の実験は、自己物質と異物（非自己）との識別能をみたものである。当時確立された近交系マウスを用いて、同系間の皮膚移植は accept され、異系間のそれは拒絶されるという実験である。第 2 の実験は、応答の記憶をみたものである。第 1 の実験で異系の皮膚移植を行ない第 1 の移植片を拒絶した宿主に再度同じ異系の皮膚移植を行なうと、一次拒絶の場合は約 10 日で移植片が失われるが、2 度目の移植片はより早く拒絶されることをみたものである。第 3 の実験は応答の特異性をみたものである。第 2 の実験の宿主に他の異なる異系のマウスの皮膚を移植した場合は、一次拒絶反応を示すことから、応答の記憶には特異性を持っていることを示した。第 4、第 5 の実験はそれぞれ異系皮膚を拒絶した宿主の細胞性免疫応答および液性免疫応答をみたものである。前者は、皮膚を拒絶した宿主の脾細胞を宿主と同系の正常マウスに注射 (adoptive cell transfer) した際、その宿主が同一ドナー皮膚移植片を二次反応で拒絶することを示すものであった。体液性応答の実験は、皮膚移植片を拒絶した宿主の体内にドナーに対する抗体ができていることを示した実験であった 4)。この移植免疫の法則の発見で、1960 年フランク・マクファーレン・バーネットとともにノーベル生理学・医学賞を受賞した。Medawer は、1962 年には国立医学研究所へ移り、1977 年から 83 年には王立研究所の実験医学の教授となった。そして 1981 年から 87 年には王立医学大学院の総長を務めた。Medawer は偉大な科学者であるばかりでなく、オペラ、哲学、クリケットなど様々なものに興味を持っていた。彼は高い知性と勤勉さ、カリスマ性を持った、生まれつきのリーダーだった。彼はまた、流暢で明瞭でウィットに富んだ文章を書くことができたという。彼は 1965 年にナイトに叙せられ、1981 年にメリット勲章を叙勲した。1986 年にエクセター大聖堂で行われた年に 1 度の学術協会の会合で訓話を読んでいる最中に、彼は脳出血で倒れた。科学界と政府の間に関係に気疲れし、体調を悪化させたとも言われている。Medawer は自力で話すことも動くこともできなくなった後も、妻の助けを借りて叙述や研究を続けた。しかしさらに脳出血が続き、1987 年に亡くなった。彼は 2005 年に亡くなった妻のジーンと同じイーストサセックス州の墓地に埋葬されていると言われている 3)。

偶然を見抜く実験医学と移植免疫学の発展の歴史

移植片が拒絶される現象が免疫反応であると実験的に見事に証明した Medawer は、ノーベル賞受賞の翌年の 1961 年に 'Immunological Tolerance' については述べている 5)。移植片拒絶の法則を見出した実験医学の祖は、その法則を打ち破るトレランスをこれもまた実験的に見事に証明している。

彼は、その論文でまず 1945 年の RD Owen の仕事を最初に触れている。すなわち 80 組以上の牛の双子を調べ、そのほとんどが同じ血液型であるとするものであった 6)。

IMMUNOGENETIC CONSEQUENCES OF VASCULAR ANASTOMOSES BETWEEN BOVINE TWINS¹

Almost thirty years have passed since Lillie² used the demonstrated union of the circulatory systems of twin bovine embryos of opposite sex to explain, on an endocrine basis, the frequent reproductive abnormality of the female twin. Since the appearance of Lillie's paper, the freemartin, as the modified female is called, has become an important example of the effects of hormones on sex-differentiation and sexual development in mammals.³ Consequences other than endocrinological of nature's experiment in parabiosis have, however, received little attention.

Estimates of the frequency of identical as compared with fraternal twinning indicate that the former is relatively rare in cattle.⁴ Tests for inherited cellular antigens in the bloods of more than eighty pairs of bovine twins show, however, that in the majority of these pairs the twins have identical blood types. Identity of blood types between full and not twins is, in frequent, as might be expected from the large number of different, genetically controlled antigens⁵⁻⁸ (now approximately 40) identified in the tests. If, therefore, the frequent identity of blood types in twin pairs can be explained neither as the result of monozygotic twinning nor as chance identity between fraternal twins, nor as the sum of these two factors, it is evident that some mechanism is operating to produce frequent phenotypic identity of blood types in genetically dissimilar twins. The vascular anastomoses between bovine twins, known to be a common occurrence,⁹ provides an explanation.



Immunological Effects of Experimental Embryonal Parabiosis

According to Burnet and Fenner¹ and also Lopashov and Stroyeva,² the inability to react against autologous antigens by the formation of antibodies develops during fetal life (when the embryo is not yet able to produce antibodies), by the action of the antigens of the embryo's own tissues on the reticulo-endothelial system. According to Burnet and Fenner, a similar inability to form antibodies can be provoked by even a foreign antigen entering the reticulo-endothelial system during this stage. The experiments of Burnet, Stone and Kidney³, in which living influenza virus (A₁), bacterial virus C16 and human erythrocytes were introduced into chick embryos, did not confirm their hypothesis. In agreement with the theory are, however, the findings of Owen⁴ in respect of bovine twins. In the case of twins this phenomenon is due to placental anastomosis, that is, to natural embryonal parabiosis.



Table 1. TIMES OF LEMBA'S AGGLUTININS AGAINST CHICK ERYTHROCYTES IN CHICKS

Parabiosis	Controls
2*	32† 54, 32
1*	54, 64
1, 4	128, 128
4	32, 8
64†	64
	32, 64

* Animals immunized by erythrocytes of embryonal parabiotic partner.

† Parabiosis in which the exchange of blood was excluded by agglutination test.

‡ Exchange of blood was unequivocally demonstrated.

All parabioses or their partners were tested by agglutination immediately after hatching for the exchange of erythrocytes.

For exact material, in which erythrocyte exchange was not tested, see Fenner et al. (ref. 3).

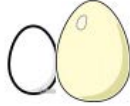
Table 2. TIMES OF NATURAL (BY PARENTAGE) AND LEMBA'S AGGLUTININS AGAINST CHICK ERYTHROCYTES IN CHICKS

Parabiosis	Controls
64 (18), 256 (22)	64 (4), 64 (8)
128 (2)	128 (2)
256 (2)*, 256 (1)	256 (9)
512 (4)*†	512 (16), 1,024 (2)
1,024 (2)*†	1,024 (2)

* Represents an animal immunized by the erythrocytes of its embryonal partner.

† The chick of the dark partner was transplanted on the 6th day after hatching, the transplant surviving sixteen days.

All parabioses have been tested by agglutination immediately after hatching with respect to the exchange of erythrocytes.



そして胎盤の癒合した個体の別の牛が生後成熟した後に皮膚を交換してもそれを受け入れてしまう現象であった。牛の異性多胎において雌胎仔が生殖器の分化に異常をきたし不妊となる個体をフリーマーチンと呼ばれているが、胎盤癒合によって生じる血液キメラの結果とされている。性染色体がXX/XYのキメラを示し、ホルスタイン種では1-2%に見られるという。

そして1950年初頭、この現象は、異種間でも再現できる実験を M Hasek の報告に触れている。すなわち、鶏とアヒルの受精卵のパラビオージスを作り、その後生まれてきた鳥に血液で免疫しても抗体が生じないことを証明している7)。Hasek は、Owen の発見した血液のキメラ以外にこの現象を誘導したことをその時代に推測している。

'ACTIVELY ACQUIRED TOLERANCE' OF FOREIGN CELLS

By Dr. R. E. BILLINGHAM*, L. BRENT and P. B. MEDAWAR, F.R.S.
Department of Zoology, University College, University of London

Experiments with Mice

A single experiment will be described in moderate detail: the recipients were mice of CBA strain, the donors of A strain. The data for transplantation between normal mice of these strains are as follows. The median survival time of A-line skin grafts transplanted to normal CBA adults (transplanted 6 weeks-8 months) is 119 ± 5.2 days. In reacting against such a graft, the host enters a state of heightened resistance; a second graft transplanted up to sixty days after the transplantation of the first survives for less than six days, and immunity is still strong, though it has weakened perceptibly after four months. Heightened resistance may be passively transferred to a normal CBA adult by the intra-peritoneal implantation of pieces of lymph nodes excised from a CBA adult which has been actively immunized against A-line skin.

In the experiment to be described (Exp. 13), a CBA female in the 15-16th day of pregnancy by a CBA male was anaesthetized with 'Nembutal', and its body wall exposed by a median ventral incision of the skin. The skin was incised but not reflected, and particular care was taken not to damage the mammary vessels. By manipulation of the abdomen with changed pressure, six fetuses were brought into view through the body wall. Each was injected intra-embryonically with 0.01 ml. of a suspension of adult tissue cells through a very fine hypodermic needle passing successively through the body wall, stomach wall, and dorsal mesenteron. (The inoculum itself, consisting of a suspension in Ringier's solution of small explanted tissue fragments, isolated cells, and cell debris, had been prepared by the prolonged chopping with scissors of livers, kidneys and spleens from an adult male A-line mouse.) After injection of the fetuses, the skin was closed with interrupted sutures.

Preliminary Experiments with Chickens

Donors and recipients in these experiments were of Rhode Island Red and White Leghorn breeds, respectively. Skin transplanted from ten weeks old Rhode Island Red chicks to White Leghorn recipients of the same age, using Cameron and Longmire's method¹, is completely destroyed within ten days of grafting, to the accompaniment of an inflammatory reaction of conspicuous violence.

The embryonic chick is particularly well suited to experiments which make use of ocular inoculation, because the retroviral route is so easily accessible. Using methods demonstrated to us by Dr. C. Knipf, whose help has been of the greatest value, we have obtained successful results by transfusing 0.2 ml. unmodified whole blood from an 11-12 day old embryonic Rhode Island Red donor into a chorionic-allantoic vein of a White Leghorn embryo of the same age. Fourteen days after hatching, a test-graft of skin was transplanted to the recipient from the original donor. In seven such trials, five grafts showed prolongation of survival; of these, three succumbed within fifty days to the accompaniment of very much reduced inflammatory changes, and two still survive, with normal growth of red feathers, to the present time (125 days).



そして1953年 Medawar らのマウスの胎仔または鶏の胎生期に生きた抗原を打ち込んで免疫寛容が成り立つという実験に発展している8)。彼らはこれを 'Actively Acquired Tolerance' と名付けている。

Bone Marrow and Lymphoid Cell Injection of the Pig Foetus resulting in Transplantation Tolerance or Immunity, and Immunoglobulin Production

It is known that the pig is capable at birth of immune responses to some antigens (phages^{1,2}; animal viruses^{3,4}; toxoids⁵; and homologous^{6,7}). The finding that thymectomy in neonatal pigs is without effect on homograft rejection⁸ also suggests that the pig, unlike many laboratory rodents^{9,10} acquires the faculty of graft rejection before birth. Information on immune responses of pig foetuses to injected antigens has not been found in the literature. This communication outlines such research.

Large white pig foetuses at 60, 80 or 104 days of gestation were injected intraperitoneally through the uterine wall at laparotomy of the dam with an allogeneic white cell suspension taken either from blood and bled lymph nodes (6×10^8 nucleated cells/kg of body weight) or from tibial bone marrow (13.5×10^8 nucleated cells/kg of body weight). Pig lymph contains very few lymphocytes¹¹, and so this rich source of lymphocytes in other species could

be used for postnatal of a carbon-32 also for acute litter were killed with Angiostatin at birth to the cell suspension.

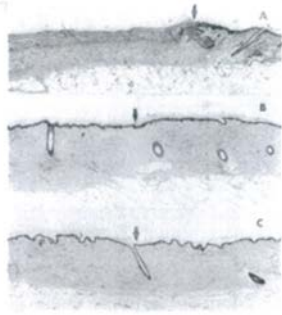


Fig. 1. Photomicrographs of histology from homografts on skin grafted at 60 days gestation with: A, control conventional anti-graft; B and C, bone marrow cell suspension from the skin graft donor (1:12) (same donor as in A) on left and normal skin on right; A, Conventional anti-graft treated mice 6 days after engraftment; Primary homograft rejection; B, Bone marrow cell treated mice 10 days after engraftment; Tolerant; C, Bone marrow cell treated female pig 10 days after engraftment; Tolerant.

1967年、英国ケンブリッジ大では Binns が、Medawer がマウス等の小動物で示した Actively Acquired Tolerance について、ブタ胎仔に他のブタの骨髄細胞やリンパ細胞を打って免疫寛容を誘導した実験をしている 9)。胎生 60 日であれば免疫寛容の誘導ができることを報告している。

Induction of Immunological Tolerance by Porcine Liver Allografts

by R. Y. CALNE
R. A. SELLS
I. R. FENIA
D. R. DAVIS

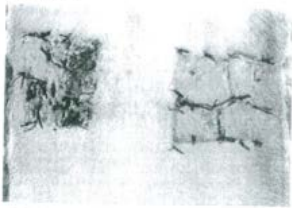


Fig. 2. Appearance of skin grafts after 10 days, 24 days after orthotopic liver allografting. Three indifferent donor grafts on the left are indistinguishable from two control skin grafts on the right.



Fig. 1. Diagram of the incision used in primary liver transplantation. The aorta with coeliac artery, the portal vein and intraperitoneal inferior vena cava of donor are anastomosed to the corresponding vessels of the recipient. The suprarenal cava and common bile ducts are ligated. The gall bladder of the donor is anastomosed to that of the recipient.

1969年同じく英ケンブリッジ大の Calne は、移植抗原が異なるブタ間でも肝臓移植例の中に免疫抑制薬を使用しなくても免疫寛容になるものがあることを発見し報告した 10)。

R Calne は同時期に、免疫抑制薬を臨床応用して臨床の臓器移植を切り開き、世界中に臓器移植という医療革命を成し遂げた。

Reversal of transplantation immunity by liver grafting

Naoshi Kamada, H.H.S. Davies & Bruce Roser

Department of Immunology, ABC Institute of Animal Physiology, Babraham, Cambridge CB2 4AT, UK

The transplantation of organs between individuals of a species normally has two main consequences: (1) the tissue is rejected unless the individuals are matched for identity of transplantation antigens, especially those encoded by the major histocompatibility complex (MHC), and (2) the recipient is sensitized to the transplantation antigens of the donor so that second-set grafts are rejected in a more violent manner. These rules of transplantation are not obeyed by liver grafts. Orthotopic transplants of liver are never rejected by many strains of rat even though the MHC barrier is crossed. We have recently shown that instead of sensitizing the recipient, these end-stage liver grafts induce a state of donor-specific unresponsiveness in which subsequent grafts of other organs, such as skin, are accepted permanently. It is possible that many strains simply cannot mount a sufficiently vigorous destructive immune response to outstrip the liver's great capacity to repair immune damage and that the systemic unresponsiveness observed is due to diversion of alloreactive lymphocytes with donor specificity into the liver allograft. Manipulations which increase the vigour of the immune response might therefore tip the balance in favour of liver graft rejection and away from induction of unresponsiveness. We have previously measured the degree to which the immune response can be increased by previous exposure to MHC antigens in a quantitative adoptive transfer system. In the strain combination DA (MHC haplotype RT-1^a) grafted to PVG (RT-1^b), the lymphocytes of immunized animals are 1,000 times more potent than those of non-immune animals in procuring graft destruction when transferred to irradiated hosts. Unexpectedly, we have now found that liver grafts transplanted into previously immunized rats not only fail to reject but convert the state of heightened reactivity to donor grafts characteristic of immune recipients into one of non-reactivity characteristic of tolerant animals.

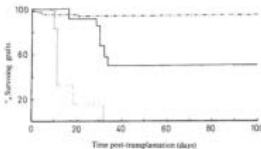


Fig. 1. Survival of liver grafted rats. Apart from three early technical failures, 69 normal PVG rats grafted with DA livers (---) survived indefinitely while BN rats grafted with DA livers (---) all died within 32 days. When PVG rats were sensitized by rejection of DA skin grafts 28 days before liver transplantation (---), 50% behaved as high responder animals, rejecting their liver grafts within 34 days, while 50% failed to reject and survived indefinitely.

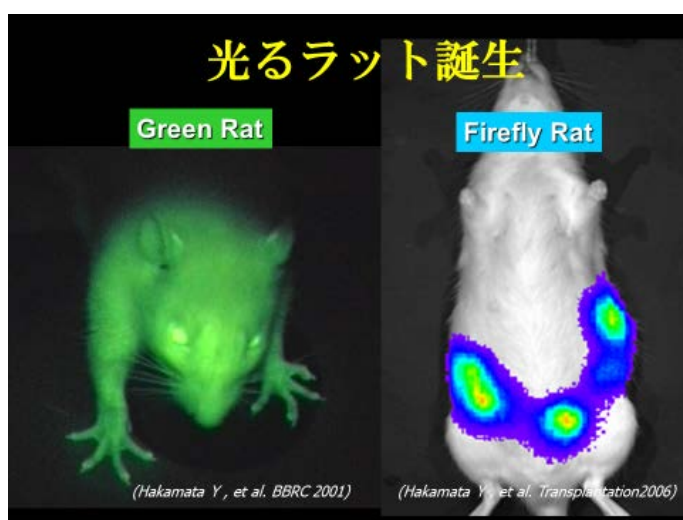


一方、肝臓が異なるMHCの壁を乗り越え、自然免疫寛容になる現象は Liver Tolerance と呼ばれ、同グループの鎌田らによって遺伝子背景の明らかなラットを使って精力的に進められた 11)。

実験医学をベースとした移植免疫学との出会い

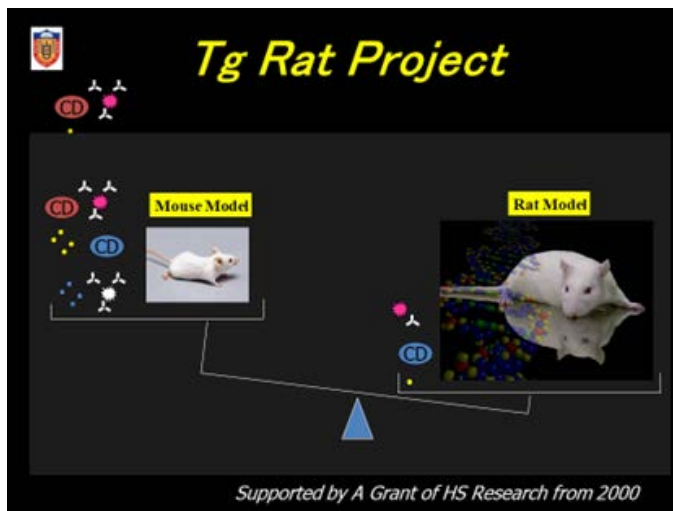
著者がこの実験医学の世界に入り、光るラットを誕生させるまでには、医師という職業の中で引き込まれた背景がある。初めて実験医学という世界を見せていただいたのは平成元年の1989年のことであったが、それまでは田舎で勤務する外科医として難しい手術をこなす外科医に憧れていて、‘難しい手術‘とは、必然的に腕がいい医者なら成功するが、未熟であれば失敗するということになる。医学はなんと不平等であろう。そして一か八かの挑戦的な治療は、実験的であろうと感じていた。そして父を医学部卒業の直前に亡くし、臨床医としての勉強をする傍ら、心臓移植という方法で救えたかもしれないという臓器移植治療に強い関心があった。平成元年に、新潟大学医学部の免疫学教室、藤原道夫教授の門戸をたたき移植免疫学を勉強し始めた。前述の実験医学との出会いである。そしてマウスの皮膚移植モデルをもって学位をまとめた12)。その縁で1992年ケンブリッジ大学のSir Roy Calen教授にお会いした。そしてラット肝移植を開発した鎌田博士に従い、オーストラリア、ブリスベンに留学し、肝移植のLiver Toleranceの実験的研究に夢中になっていった13)。帰国後、母校自治医大に戻り一般外科医として臨床に追われていたが、1995年転機が訪れた。藤村昭夫教授が主催する臨床薬理学の准教授に選んでいただき、臓器移植に使う免疫抑制薬の勉強をするチャンスを得たのである。種々の免疫抑制薬をラット臓器移植モデルを駆使して時間薬理学を学んだ。そして2000年、第2代自治医科大学学長高久文磨先生のご指導で母校に臓器移植と臓器再生の研究を専門とする臓器置換研究部を作っていただき、教授に就任した。

光るラット誕生



専門研究部では、従来の研究手法に固執せず、自分の得意とする動物の臓器移植モデルを使って‘偶然では生きない‘はずの現象を解明しよう考えた。その一つの武器が、「光るラット」である14, 15)。

光技術を生物科学研究に応用した光イメージング技術は、“蛍光”蛋白遺伝子を利用するもの14,16,17)と、蛍などからとった“発光”蛋白の変換酵素であるルシフェラーゼ遺伝子を利用するもの15)があった。前者は低周波の非可視光を当てることにより励起された光、後者は高感度カメラの下で、基質であるルシフェリンを加えると蛍のように見える。これらの光のもととなる遺伝子を目的細胞に遺伝子導入し、種々の研究に利用する。たとえば癌細胞にこれらの遺伝子を導入し、その癌細

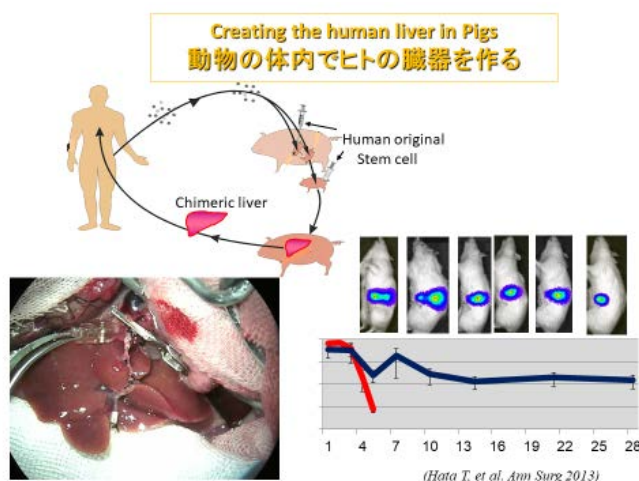


胞を動物に移植すれば、癌の動きを光の移動としてみる事ができた。これらの遺伝子を受精卵に移植し、生物個体を誕生させれば(トランスジェニック技術:以下、Tg 技術)、“光る動物”が誕生したわけである。前述したが、この Tg 技術はもともとマウスで開発され、種々の働きが未知の遺伝子の、生物個体のなかでの働きをみる方法として発展してきた。

ここで触れておかなければいけないが、先行する光る動物としては、マウスでは成功例ができてはじめていた時であったが、ヒトを概挿する再現性のよい臓器移植モデルとして、マウスの 10 倍体サイズがあるラットを選んだ。これが‘偶然で臓器移植は成功しない’とこだわった理由である 14,15)。

光で組織、臓器の再生を見る

2000 年は、自治医科大学でも小児生体肝移植が始まった年でもある。著者は、マイクロサージャリーを専門として、肝臓の細かい血管を繋ぐ役割を担っていた。同時にスターとした研究部では、自ずから臓器移植に起因する生命現象の謎に挑む外科系の大学院生が集う形となった。当初、開発した GFP ラットは、直ちに有名になった 14)。しかも、GFP の輝度は、当時もっとも発現量が高いと評価された 16)。さらに GFP は臓器移植で使用しやすいように In bred ラットでの作成を試み、移植細胞や組織のイメージングに汎用されるようになった 17)。

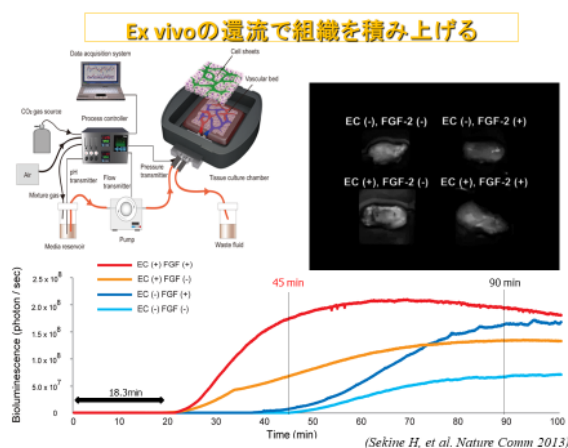


なった 17)。

一方、臨床では数多くの小児肝臓移植を行った 18)。死を待つ状態の患児が、両親からの部分肝臓で蘇り、外科医としての喜びを仲間と共に行うほど、生体であれ脳死であれドナーが必要な現実のうち当たり、自らの手で臓器を作り出す研究を進めたいと強く思った。

そこでまず着手したのが、ブタの体内でヒトの臓器を作り上げるといってもない計画であった。まずマウスラット間でマウスの体内で肝臓をラット肝細胞に置き換え、ラットへの移植に成功した 19)。

マウスをブタ、ラットをヒトに見立てその仮説を証明した。マウスの胎仔または新生仔にラットの肝細胞を注入する。そして In Vivo バイオリアクターと考えるマウス自体の肝臓が、しだいに障害を生じ発育しないように遺伝子操作を加える。マウスは、成長するにつれラットの肝細胞に置き換わるといものである。この手法で作られたマウスの肝臓は 95% 以上がラットの肝細胞と置き換わった。血管系や胆管系はマウスのままであるはずだが、ラットをレシピエントにしてこの肝臓を血管付きで移植すると極めて免疫学的有利性が生まれ、長期生着を示した。しかしこの手法は、バイオリアクターとして使うマウスが、マウスとしての方向性が示されてからのラット細胞の注入のため、SCID 化する必要があった。しかし、この原理をヒトサイズのブタで実証するには SCID 化したブタが必要である。しかし SCID ブタは、その繁殖や衛生管理など極めて高額なことがその後の開発の障害になっている。

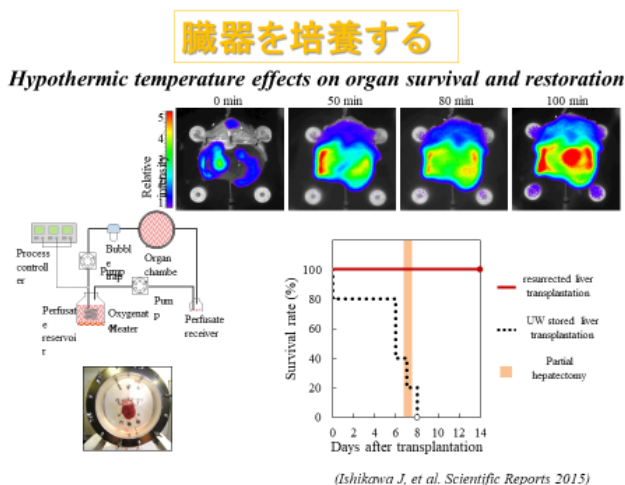


次に挑戦したのが、循環する血管網を還流培養して、その上にシート状の細胞を積み重ねていくという Tissue Fabrication への挑戦である 20)。

蛍光ラットの新生仔の心臓から心筋細胞をシート状に培養した。それを毛細血管網をリアクターで還流培養している上に重ね合わせた。その回路内に血管内皮 (EC) を入れこむかまたグロース

ファクターとして FGF-2 を入れるかを重ね合わせた心筋シート組織の光を観察して、EC と FGF-2 の両者を流すことで心筋シートの ATP が最も早く回復することを確かめた 20)。

さらに、心臓が止まった状態から臓器を取り出し、それを還流培養することで臓器だけ甦らそうという挑戦を行った 21)。



この蛍光ラットの臓器を還流培養し、その回路にルシフェリンを入れれば含差する ATP レベルが光として定量できる 15)。心臓停止したドナーを想定して、ラットの心停止を誘発して、60 分後に肝臓を取り出し還流培養するすると ATP が枯渇している。しかし還流培養を酸素含有させた赤血球を混ぜた蘇生還流を行うと、肝臓の ATP がしだいに増加させることができた。実験では、

この蘇生した肝臓を他のラット（レシピエント）に異所性に植え、最終的に肝再生を起こさせることに成功した 21)。

終わりに

治療法のない患者に新しい治療を開発するという明確な目的をもって動物実験を行ってきた。しかしこの生きた動物を犠牲にする実験医学は、介入により偶然を見つけ出す手段である。偶然見つかる革命的治療をより高率に仮説を示すための手段が必要である。光イメージング技術を用いた光るラットの誕生は、偶然をより高率に再現する手段であった。本短説は、実験医学、移植免疫の歴史に触れたうえで、著者が試みてきた光るラットを使った、臓器再生の研究の歩みを紹介した。

最後に恩師 Calne は、「猫は9つの命をもち、容易に死なない。しかしその猫も好奇心から身を亡ぼすことがある」という英国のことわざを引き出し、「科学の歯止め」という書を書いている 22)。医学は科学にもとづく医療を極める学問である。その科学への好奇心が、生きている動物を使う価値があるのかどうかを常に問う必要が実験医学にある。

謝辞

光るラットは、自治医科大学において袴田陽二教授（現、日本獣生命科学大学）、村上孝教授（現、埼玉医科大学）、高橋将文教授（自治医科大学）らと共に開発してきた。

また本論文で紹介した動物の体内でヒトの臓器を作ろうとする研究は、京都大学医学部（畑俊彦先生、上本伸二教授）と、バイオリアクターを使って体外でヒト組織を組み立てる研究は、東京女子医科大学（関根秀一先生、清水達也教授、岡野光夫教授）、さらに心停止臓器を還流培養で蘇生する試みは、理化学研究所（石川潤先生、辻孝先生）らとの共同研究の成果である。

文献

1. フランソワ・トリモリエール、カトリーヌ・リシ編、樺山紘一日本語版監修『ラルース 図説 世界史人物百科 III フランス革命 - 世界大戦前夜』原書房(2005年4月10日、p.274)
2. <https://www.amazon.co.jp/実験医学序説-岩波文庫...>
3. Peter B. Medawar 著 加藤珪訳 科学の限界 地人選書 27, 地人書館, 1987; ISBN 978-4805202494
4. www.igaku-shoin.co.jp/nwsppr/n1997dir/n2233dir/n2233_02.htm
5. MEDAWAR PB. Immunological tolerance. Nature. 1961 Jan 7;189:14-7. No abstract

available

6. Owen RD IMMUNOGENETIC CONSEQUENCES OF VASCULAR ANASTOMOSES BETWEEN BOVINE TWINS. *Science*. 1945 Oct 19;102(2651):400-1. No abstract available
7. HASEK M, HRABA T. Immunological effects of experimental embryonal parabiosis. *Nature*. 1955 Apr 30;175(4461):764-5. No abstract available.
8. BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953 Oct 3;172(4379):603-6. No abstract available.
9. Binns RM Bone marrow and lymphoid cell injection of the pig foetus resulting in transplantation tolerance or immunity, and immunoglobulin production. *Nature*. 1967 Apr 8;214(5084):179-80. No abstract available
- 1 0. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*. 1969 Aug 2;223(5205):472-6. No abstract available
- 1 1. Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature*. 1981 Aug 27;292(5826):840-2. No abstract available.
- 1 2. Kobayashi E, Kawai K, Ikarashi Y, Fujiwara M.: Mechanism of the rejection of major histocompatibility complex class I-disparate murine skin grafts: rejection can be mediated by CD4+ cells activated by allo-class I + II antigen in CD8+ cell-depleted hosts. *J Exp Med*. 1992; 176: 617-621.
- 1 3. Kobayashi E, Kamada N, Enosawa S, Toyama N, Walker N, Miyata M.: Prevention by liver transplantation of the graft-versus-host reaction and allograft rejection in a rat model of small bowel transplantation. *Transplantation*. 1994; 57(2): 177-181.
- 1 4. Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 31;286(4):779-85
- 1 5. Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation*. 2006 Apr 27;81(8):1179-84
- 1 6. Mothe AJ, Kulbatski I, van Bendegem RL, Lee L, Kobayashi E, Keating A, Tator CH Analysis of green fluorescent protein expression in transgenic rats for tracking transplanted

neural stem/progenitor cells. *J Histochem Cytochem.* 2005 Oct;53(10):1215-26. Epub 2005 Jun 27

- 1 7 . Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P, Kobayashi E. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Apr 1;329(1):288-95.
- 1 8 . Mizuta K, Sanada Y, Wakiya T, Urahashi T, Umehara M, Egami S, Hishikawa S, Okada N, Kawano Y, Saito T, Hayashida M, Takahashi S, Yoshino H, Shimizu A, Takatsuka Y, Kitamura T, Kita Y, Uno T, Yoshida Y, Hyodo M, Sakuma Y, Fujiwara T, Ushijima K, Sugimoto K, Ohmori M, Ohtomo S, Sakamoto K, Nakata M, Yano T, Yamamoto H, Kobayashi E, Yasuda Y, Kawarasaki H. Living-donor liver transplantation in 126 patients with biliary atresia: single-center experience. *Transplant Proc.* 2010 Dec;42(10):4127-31. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.11.002.
- 1 9 . Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg.* 2013 Mar;257(3):542-7. doi: 10.1097/SLA.0b013e31825c5349
- 2 0 . Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, Dobashi I, Wada M, Yamato M, Kobayashi E, Umezu M, Okano T. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun.* 2013;4:1399. doi: 10.1038/ncomms2406
- 2 1 . Ishikawa J, Oshima M, Iwasaki F, Suzuki R, Park J, Nakao K, Matsuzawa-Adachi Y, Mizutsuki T, Kobayashi A, Abe Y, Kobayashi E, Tezuka K, Tsuji T. Hypothermic temperature effects on organ survival and restoration. *Sci Rep.* 2015 Apr 22;5:9563. doi: 10.1038/srep09563
- 2 2 . Roy Y Calne. *The Ratchet of Science-Curiosity Killed the Cat*, Nova Science Publishers