

学位論文

組織の凍結保存における物理的および化学的環境  
構築による解凍後生存率の改善

DM08006 岩間 輝

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
医療工学群 医用生体工学  
指導教授 馬淵 清資

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 目 次

頁

第1章 序論	1
第2章 様々な冷却速度における単層培養細胞の凍結保存後の生存率に与える細胞密度の影響	
2.1 はじめに	4
2.2 方法	5
2.2.1 細胞密度および実験試料	5
2.2.2 冷却速度	6
2.2.3 凍結装置	6
2.2.4 凍結解凍手順	7
2.2.5 解凍後細胞生存率の評価および構造観察	8
2.3 結果	9
2.3.1 各条件における生/死細胞の分布	9
2.3.2 解凍後の相対生存率	11
2.4 考察	12
2.5 まとめ	14
第3章 ヒアルロン酸の予備培養による高密度単層培養細胞の凍結保存後の細胞障害の軽減	
3.1 はじめに	15
3.2 方法	17
3.2.1 実験試料	17
3.2.2 冷却速度	17
3.2.3 実験装置	17
3.2.4 凍結解凍手順	17
3.2.5 解凍後生存率	18

3.2.6 蛍光標識 HA の観察	18
3.3 結果	20
3.4 考察	25
3.5 まとめ	26
 第4章 厚い組織移植材料を模擬した配向単層細胞の凍結保存において、細胞生存率に及ぼす凍結中の厚み方向に生じる冷却速度の温度依存性の影響	
4.1 はじめに	27
4.2 方法	29
4.2.1 細胞配向用基質	29
4.2.2 細胞培養および実験試料	30
4.2.3 実験装置	30
4.2.4 凍結解凍実験手順	31
4.2.5 解凍後生存率の評価	32
4.2.6 冷却曲線からの冷却速度の決定	34
4.2.7 一定の冷却速度での凍結	36
4.3 結果	36
4.4 考察	40
4.5 まとめ	44
 第5章 結 論	45
 謝 辞	48
 参考文献	50
 論文目録	57



## 論文要旨

**DM08006 岩間 輝**

### [序 論]

臓器、組織、細胞の移植医療は、末期機能不全に対する新しい治療の開発や熱傷による欠損部の代替治療への応用、また幹細胞などの利用による治療の開発など、その重要性は非常に高い。こうした臓器、組織、細胞の質や量的な問題は未だに十分解決しているとは言えない。そのため、保存による機能喪失機序の解明や保存の質を改善することは重要である。

保存技術のひとつとして凍結保存があり、半永久的に保存しておくことが原理的には可能である。しかし、現時点で凍結保存技術は細胞レベルでの成功例が多く、組織レベルでは小さいか薄い組織に限定され、厚みを持つ複雑な構造の臓器や組織の凍結保存成功例はいまだに確立されていない。これは懸濁細胞の凍結保存とは異なり、構造の違いや組織内部の冷却速度の変化などが解凍後の生存率に影響することが挙げられる。また凍結中の細胞損傷を防ぐために凍結保護物質が用いられるが、優れた凍結保護物質でも①細胞の浸漬を要する、②毒性、③解凍後の除去処理などが挙げられる。これらを解決するためには凍結中の細胞周囲の環境を改良することで解凍後の生存率の改善が得られるのではないかと考えた。

本論では、凍結保存における物理的環境と化学的環境について凍結中の現象を解明し、組織の解凍後生存率の改善手段を探ることを目的とした。物理的環境として、組織の構造的な要因と生存率の関係性、凍結過程での組織内の冷却速度変化、また化学的環境として新しい凍結保護効果の改善手段について検討を行った。

### [細胞密度と解凍後生存率]

まず細胞と組織との構造的な違いの一つに細胞密度が挙げられる。そこで本実験では生体組織を模擬したヒト皮膚繊維が細胞を高密度単層培養した試料を様々な冷却速度で凍結させ、解凍後の生存率にいかに関与を与えるかについて検討を行った。

ヒト皮膚線維芽細胞（Cell System- Fb Cells）を DMEM+10%FBS+1%AB にて任意の細胞密度で培養したものを試料として用いた。凍結保護物質として 10% DMSO を用いて冷却速度 0.1~10°C/min で凍結実験を行った。

その結果、細胞密度が高い試料で生存率は低下した。また蛍光染色により細胞の分布を観察した結果、高密度の培養細胞では死細胞の密集した部位が見られたことから、高密度の細胞では細胞同士の接触による機械的ストレスにより細胞生存率が低下すると考えられた。

### [凍結保護効果の改善]

凍結中の細胞損傷を防ぐためには凍結保護物質を用いる。高密度の組織においては、細胞密度の密集により解凍後の生存率に影響を与えるため、細胞間同士の接触を極力避ける必要がある。また凍結中におきる脱水や細胞内氷晶形成を阻害するために水和力の高い物質を用いることで保護効果を改善できればと考えヒアルロン酸（HA）を用いて高密度単層培養細胞の解凍後の生存率について検討を行った。高分子量（130 万）の HA を濃度 0.5%に調製し、予備培養を行い、完了後 10%DMSO に置換し凍結保存を行った。その結果、急速冷却速度での凍結で DMSO 単独では生存率が低下したのに対し、HA-DMSO では DMSO に比べ生存率は高く、低密度細胞で凍結した試料解凍後生存率と差が見られなかった。これは凍結前に HA で予備培養することにより細胞膜近傍に残った HA が凍結時の細胞膜の損傷を防いだと考えられる。これより高細胞密度単層培養

細胞の凍結保存では、HA による予備培養を行うことで凍結保護効果が増強されることが示された。

#### [凍結過程で冷却速度の変化]

HA による予備培養は凍結保護効果を増強させるが、厚みのある組織に対しては分子量も大きいいため更なる予備培養時間がかかることが予想される。厚みのある組織では凍結中の熱伝導率が部位ごとに異なり、HA を添加した厚みのある組織が最適な冷却速度条件を求めるのは困難である。そこで厚みのある組織を模擬した高密度細胞の細胞内温度と冷却速度および解凍後生存率の関係性について検討を行なった。その結果、試料の解凍後の細胞生存率は、厚みとして想定された各部位に生じた冷却速度の温度依存性によって影響を受け、そして温度制御部から離れるにつれてその影響も大きくなることが明らかとなった。また試料の凍結解凍後の細胞生存率は細胞外凍結による脱水の程度によって影響を受けるので、細胞外凍結が開始する $-7^{\circ}\text{C}$  から細胞内の脱水が終結する $-40^{\circ}\text{C}$  までの温度範囲の平均冷却速度を評価指標として冷却速度に温度依存性を持つ条件で凍結された試料の細胞生存率が記述可能である。

#### [結 論]

凍結保存における物理的環境と化学的環境を構築することにより、解凍後生存率の改善手段について検討した。その結果、

- ・物理的環境

高密度培養細胞では凍結保存中に細胞同士の接触による機械的ストレスにより生存率に影響を与えるが、細胞同士の接触の緩和により生存率を改善する可能性が示された。20mm ほどの厚さを持つ組織において、凍結順序によって凍結中の熱伝導率の変化に起因する一時的な冷却速度の変化が影響を与えることは

少なく、制御した冷却速度によって試料の細胞生存率の予測が可能であることが示唆された。

- ・化学的環境

凍結保護物質のほかに HA と組み合わせることにより、解凍後に高い生存率が得られることが示され、細胞の回収率も改善される可能性が示唆された。しかし解凍後の細胞機能に変化がないか注意深く見る必要があるとともに、さらなる生存率の改善される物質の探索がさらに必要であると考ええる。

# 第1章

## 序 論

近年医療技術の進歩に伴い、生体組織・臓器などの移植による治療が注目を集めている。臓器移植は、腎疾患患者を始め肝疾患・心疾患など、各種臓器における重症疾患患者に対する回復手段として広まってきている<sup>(1)</sup>。また生体組織や人工組織などは、整形外科や美容外科領域において、回復の促進の観点からも組織の医療上の利用がされている<sup>(2)</sup>。しかし、生体組織の利用には倫理的な問題があり、また人工組織においても iPS 細胞の樹立から多くのセルラインの作成が進んできているが、応用までの過程に膨大な費用と時間がかかり、分化誘導後の細胞の安全性や倫理的な問題も多く存在する。移植医療の需要と供給のバランスを保つための方法の一つに半永久的に保存ができる凍結保存技術がある。

凍結保存の対象は、細胞レベルでは精子・卵子、実験試料用細胞や、組織レベルでも皮膚・血管・心臓弁・歯根なども成功した例として挙げられる<sup>(3)</sup>。しかし、ある程度の厚みを持つ生体組織や、大きく複雑な構造を持つ臓器においては、凍結保存技術は確立されていない。この凍結保存が確立できない主な原因として、

- ・ 個々の細胞に、凍結時の最適な冷却速度が存在し、凍結障害を保護する凍結保護物質とその最適な濃度も各々の細胞により異なる。
- ・ 組織は1つの性質をもった細胞の集合体であり、臓器は組織の集合体であるので、細胞密度はおのずと高くなる。また、個々の細胞の大きさ、細胞同士の配置・形態が細胞1つ1つで異なるため、物理的な周囲環境に左右されうる。
- ・ 生体組織・臓器は容積が大きく、凍結時に細胞内部までの均一な冷却速度の維持が困難である。
- ・ 生体組織・臓器には血管系が存在する。

などが挙げられる。つまり凍結時において細胞内・外の脱水することができない水分により形成される氷が、細胞・組織構造をその内部・外部から機械的に破壊し、凍結時における極度の細胞内脱水による局所的な塩害や細胞内微細構造の破壊、細胞の形態変化、呼吸や各種酵素活性の低下、細胞分裂能や細胞運動能の損失、蛋白変性、pHの変化などの機序により、凍結による細胞・組織へ『凍結傷害』を招く結果となる。これらのことは、解凍過程でも同じことが言える。生体組織・臓器の凍結保存方法を成功させるには、

- ・ どのような細胞にも最適な新しい凍結保護物質
- ・ 大きな容量の生体組織・臓器においても、内部まで均一に冷却速度を伝達することができる凍結保存法、解凍法
- ・ 臓器を細胞レベルまでに分解してから凍結保存を行い、解凍後に復元するという画期的な方法

など多角的な角度から解決方法を模索しなければならない。しかし現時点では、肝臓、

腎臓などの実質臓器の凍結保存は困難であり、臨床応用は行われていない。これに対し、いわゆる implantation (植え込み) のみで移植効果のみられるものは、凍結保存が可能であり、臨床応用も行われている。これは、

- ・ 凍結保護物質の拡散・浸透が比較的一様である。
- ・ 容積が小さく熱伝導性も良好で、細胞に近い状態で凍結保存が行われる。

と、以上のようなことが挙げられている。

こうした成功例とともに問題点となる原因をより明確にし、更にそれを取り除く必要があると考えた。

本論の目的は、組織の凍結保存における物理的および化学的環境の構築による解凍後生存率の改善を目的とした。まず高細胞密度による細胞生存率の低下する要因を明らかにするために、物理的な要因として細胞密度が凍結後の細胞生存率に影響を与えるか検討した。また高密度培養細胞の生存率低下を防ぐ目的でヒアルロン酸 (HA) による解凍後の生存率が改善するか検討を行った。さらに厚みを持つ生体組織を想定し、凍結過程に組織内部に起こる熱伝導率変化に伴う冷却速度の変化が解凍後の生存率に与える影響について検討を行い、解凍後の生存率の改善できる条件について検討を行った。

## 第2章

# 様々な冷却速度における単層培養細胞の凍結保存後の解凍後生存率に与える細胞密度の影響

### 2.1 はじめに

角膜や心臓弁、皮膚や軟骨の治療などの生体組織や足場に埋め込まれた細胞を用いた人工組織などの移植など、移植医療が広く用いられるようになっている中、長期間の保存法として凍結保存がしばしば使用されている。しかし、細胞を埋め込む生体組織や人工組織における凍結保存細胞の解凍後の生存率は細胞懸濁液に比べ一般的に低いといわれている。これらの組織について凍結保存に成功した例でもその複雑な構造により制限されている<sup>(4,5)</sup>。構造的な複雑さの要因として細胞密度、細胞の配置、細胞間結合、細胞や基質との相互作用などが挙げられる<sup>(5,6,7)</sup>。

初期培養条件または凍結中では、高細胞密度では細胞同士の接触回数は凍結中も初期培養でさえも増加する。懸濁細胞の凍結中の細胞間の接触ダメージのメカニズムは



これまで検討されてきた。たとえば緩速冷却速度での凍結では細胞同士が密に接触することにより機械的にダメージを受ける。さらに、赤血球の凍結保存において、初期濃度が高密度になると細胞外凍結により packing effect と呼ばれる機械的なダメージを受け溶血を引き起こすことが知られている<sup>(8-12)</sup>。このように高細胞密度における凍結保存後の生存率の減少は懸濁状態の凍結中でも起こるため、単層培養細胞でも凍結保存後の生存率に対し高細胞密度による影響があると考えられる。しかし、単層培養細胞における凍結保存では、様々な冷却速度での凍結による細胞同士の接触が増加したときの解凍後の細胞生存率に対し、いかに影響を与えているかについては殆ど分かっていない。

本実験では、細胞同士の接触する単層培養細胞の初期培養密度が凍結解凍後の生存率に影響を与えるかを検討した。試料はヒト皮膚線維芽細胞を用いて任意の細胞密度で培養し、様々な冷却速度を用いて解凍後の生存率を評価した。さらに、凍結前後での生/死細胞の分布について蛍光顕微鏡画像を用いて観察した。

## 2.2 方法

### 2.2.1 細胞密度および実験試料

ヒト皮膚線維芽細胞 (normal cells purchased from the Cell Systems, 2F0-C25, Kirkland, Washington, USA) をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Invitrogen Gibco 12320, New York, USA) に 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS; Invitrogen Gibco 26140, New York, USA) と 1% v/v antibiotic solution (AB; Invitrogen Gibco Antibiotic-Antimycotic 15240) を加えたものを用いた。

フラスコ (TPP 90150, 150 cm<sup>2</sup>) で培養された細胞をトリプシンにより剥がし、遠心分離後に培養液を加えて細胞懸濁液を作成した。位相差倒立顕微鏡観察下で血球計算

盤 (Erma Burkert-Turk 血球計算盤 2963) を用いて細胞数をカウントし、細胞を培養皿 (AGC テクノグラス, IWAKI 3000-035,  $\phi 35$  mm) にて任意の細胞密度にて  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  のインキュベータ内で 24 時間単層培養したものを用いた。試料の細胞面積密度はヒト皮膚組織の細胞面積密度を考慮し、 $5.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  をコンフルエントとし、さらに  $0.2$  および  $1.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  の 3 条件で実験試料を作成した。

### 2.2.2 冷却速度

冷却速度は過去の研究をもとに決定した。凍結保護物質の種類により異なるが、ヒト皮膚構造での最適冷却速度は  $0.4\text{--}8^{\circ}\text{C/min}$  である<sup>(12)</sup>。解凍後生存率にそれぞれの細胞密度が影響することを考慮し、明確な最適冷却速度を割り出すために、最適冷却速度だと考えられる付近の速度として、冷却速度を  $0.1$ 、 $0.3$ 、 $1$ 、 $3$ 、 $10^{\circ}\text{C/min}$  の 5 条件とした。

### 2.2.3 凍結装置

試料凍結のための装置を Fig. 2-1 に示す。温度制御は、ヒータへの直流電源 (菊水電子工業 PAD35-10L,  $0\text{--}35\text{V--}10\text{A}$ )、電圧をプログラム調温計 (横河電機 UP750) で、フィードバック制御することにより行なった。温度制御を行うために、箔型熱電対 (チノー CO60-T, JIS-T 型) で温度測定を行なった。温度測定用のエポキシ系接着剤で固定した熱電対をアルミ板 ( $55 \times 70 \times t1$  mm) に接着し、断熱材 (ダウ加工、スタイロフォーム GK-RB) を黄銅製のおもり ( $2.8 \text{ kg}$ ) で圧着して密閉した。

プログラム調温計の初期設定は、熱電対の計器出力レンジ ( $-270.0 \sim 400.0^{\circ}\text{C}$ )、直流電圧 ( $0 \sim 10 \text{ V}$ )、時間比例 PID 電圧パルス出力とした。プログラム設定は、スタート目標設定値を  $4^{\circ}\text{C}$  に設定し、15 分間保持させ、その後、各設定冷却速度になるようにセグメントタイムを設定し、冷却速度  $0.1$ 、 $0.3^{\circ}\text{C/min}$  は  $-40^{\circ}\text{C}$  まで、 $1$ 、 $3$ 、 $10^{\circ}\text{C/min}$

は $-80^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、その温度に達したら、スイッチを切り、 $-185^{\circ}\text{C}$ 以下になったら凍結終了とした。

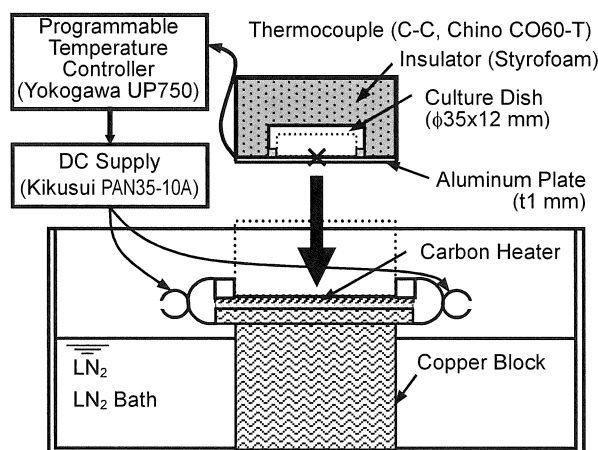


Fig. 2-1 Experimental apparatus for freezing samples.

#### 2.2.4 凍結解凍手順

実験試料を凍結する直前に、インキュベータ内に静置してあるシャーレを取り出し、クリーンベンチ内でシャーレ中の培養液をパスツールで全て吸引除去した。そこに凍結保護液を2 ml 加えた。プログラム調温計により試料室を $4^{\circ}\text{C}$ に定値制御し、加温面の温度を $4^{\circ}\text{C}$ に安定させるために15分間、その状態を保持した。その後、プログラム調温計で目的とする冷却速度になるように設定し、温度制御を行いながら冷却した。冷却面の温度が $-40$ 、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下では温度制御をせず、 $-185^{\circ}\text{C}$ 以下になるまで冷却した。

その後、凍結装置から試料室（アルミ板から上の部分）を取り出し、 $37^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽に浸された銅ブロックの上に乗せおもり(2.8 kg)で圧着した。この状態を10分間保持して試料を解凍した。

## 2.2.5 解凍後細胞生存率の評価および構造観察

解凍後の試料は、蛍光二重染色され、蛍光顕微鏡による画像から細胞生存率が算出された。生細胞の細胞質が Calcein-AM (同仁化学 341-07901 ; 励起波長 : 490 nm, 放出波長 : 515 nm) で、死細胞の細胞核が DAPI (同仁化学 340-07971 ; 励起波長 : 360 nm, 放出波長 : 460 nm) それぞれ染色された。試料は実験容器からピンセットで取り出され、培養皿に細胞培養面を上にして置かれた。培養液 1 ml で希釈された濃度 2.86 nM の DAPI 溶液を培養皿に入れ、5 分間インキュベータ内に静置し、その後吸引除去した。次に、Calcein-AM 溶液 (1 ml、濃度 4  $\mu$ M) を、培養皿に入れ、30 分間インキュベータ内で静置し、その後吸引除去した。試料を培養皿から取り出し、別の培養皿に細胞が下になるように置き、1 ml の DMEM を加えた。

蛍光倒立顕微鏡 (Nikon TE-300-DEF-S) と CCD カメラ (浜松ホトニクス ORCA-ER) を用いた試料中の細胞の蛍光発光画像と位相差画像を、画像処理ソフト (Scanalytics Inc. IPLab/Win Ver.4.0.3) にてパーソナルコンピュータに取り込んだ。Calcein-AM 陽性細胞数と DAPI 陽性細胞数は、パーソナルコンピュータに取り込まれた画像から画像ソフト (Adobe Photoshop CS3) を用いて、Calcein-AM 用生細胞数と DAPI 用生細胞数をカウントした。細胞生存率は凍結融解後の培養皿底面の任意の 5 か所を抽出して画像を取り、各蛍光にて染色された細胞数をカウントした。以下の式を用いて相対生存率を算出した。細胞生存率に蛍光色素の影響を受けないよう解凍後の細胞の生存率を評価した。

(相対生存率) =

{ (凍結融解試料中のカルセイン-AM-陽性細胞の平均数) /

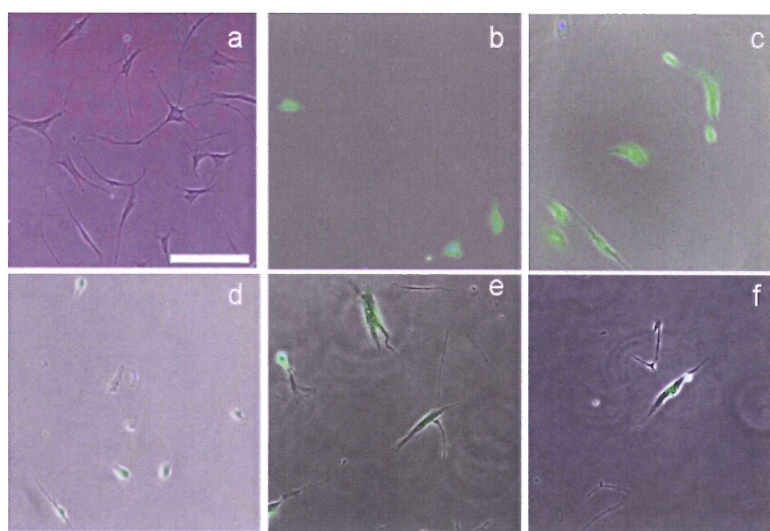
( 各実験の対照試料中のカルセイン-AM-陽性細胞の平均数)} $\times 100(\%)$ ]

取り込まれた画像から生細胞および死細胞の分布状態を観察した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 各条件における生/死細胞の分布

細胞密度と冷却速度をパラメーターとして凍結前後での生細胞 (Calcein-AM: 緑色)と死細胞 (DAPI:青色) の分布状態について蛍光顕微鏡を用いて観察した結果を Figs. 2-2~2-4 に示した。



**Fig. 2-2 Survival distribution at the cell density of  $0.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>.**

**(The above alphabet represents the sample of control or each cooling rate; a: control, b: 0.1°C/min, c: 0.3°C/min, d: 1°C/min, e: 3°C/min, f: 10°C/min.)**

細胞密度  $0.2$ 、 $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> では凍結前、解凍後での凍結前後の細胞同士の接触はほとんど見られなかった (Figs. 2-2, 2-3)。細胞密度  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> では凍結前で

は細胞同士が密に接触していた (Fig. 4 a)。また、冷却速度 0.1、0.3°C/min における解凍後では、死細胞の密集部分が観察された (Fig. 2-4 b, c)。冷却速度 1~10°C/min において解凍後の細胞に剥離している部分が観察された (Fig. 2-4 d, e, f)。

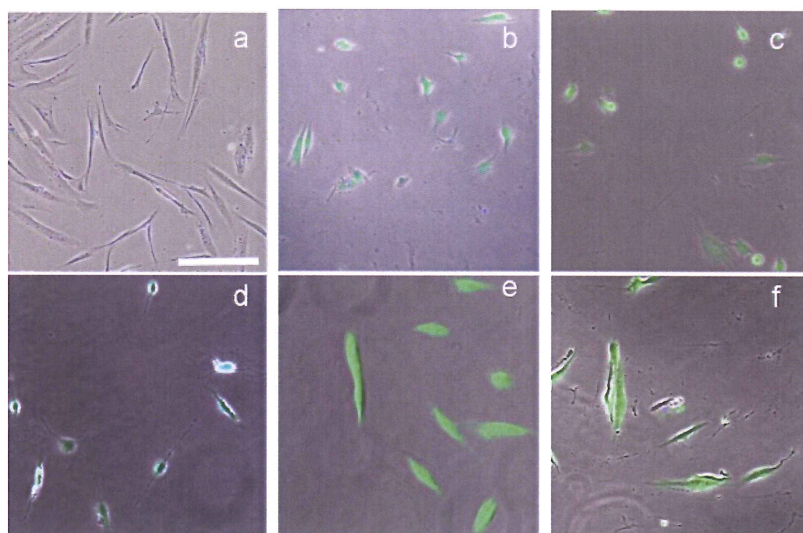


Fig. 2-3 Survival distribution at the cell density of  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>

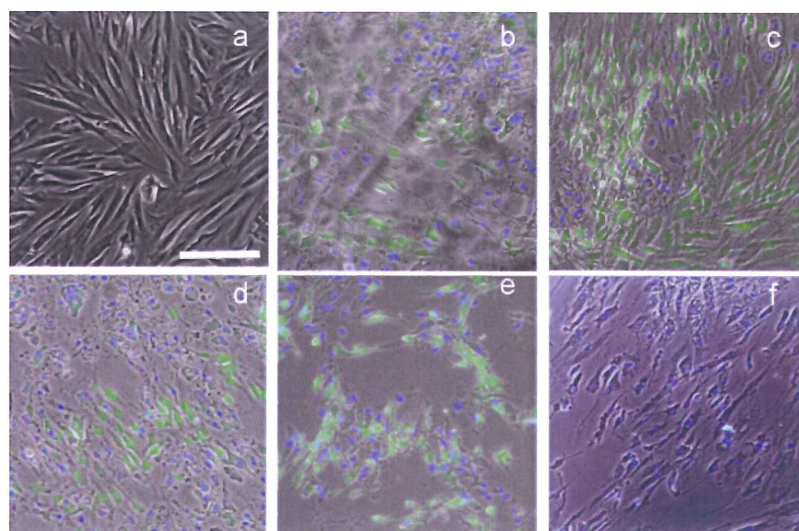
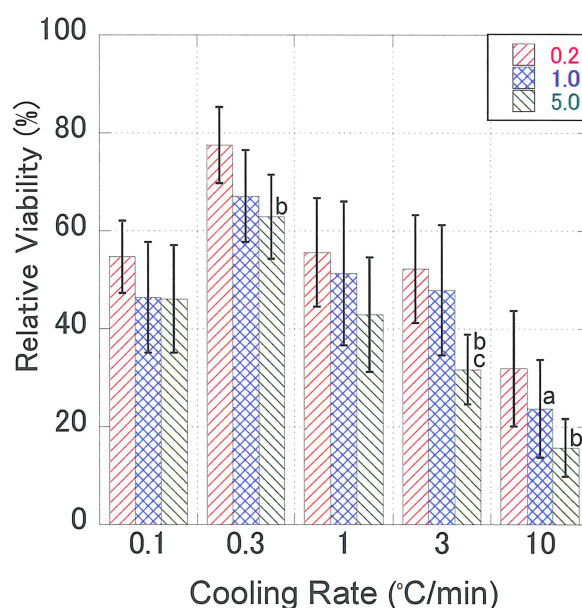


Fig. 2-4 Survival distribution at the cell density of  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>



## 2.3.2 凍結解凍後の相対生存率

細胞密度 $0.2$ 、 $1.0$ 、 $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の条件におけるヒト皮膚線維芽細胞の凍結保存後の生存率と冷却速度の関係を Fig. 2-5 に示す。細胞密度はそれぞれ [ $\times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>] で示す。



**Fig. 2-5 Relationship between relative viability and cooling rate ( Statistical analysis was used Mann-Whitney U-test with Bonferroni Correlation:  $n=6$ ,  $p < 0.05$  )**

冷却速度  $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$  および  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  において  $0.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> と  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で差がみられた ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test with Bonferroni Correlation,  $n = 6$ )。高冷却速度の3および $10^\circ\text{C}/\text{min}$ では差は見られなかった。またどの細胞密度においても、冷却速度 $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$ で生存率は、最も高い値を示し、 $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$ よりも遅い速度および速い速度では生存率は減少していた。どの冷却速度においても、細胞密度が上昇

するに従って、生存率は低下していた。

## 2.4 考察

本研究では、細胞密度をパラメーターとし任意の単層培養したヒト皮膚線維芽細胞の凍結解凍後の生存率を比較した。

任意の細胞密度で培養したヒト皮膚線維芽細胞の凍結・解凍後の生存率は、どの細胞密度においても  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で最も高い値を示した。Armitage らによると、単層細胞 (Monolayers) の凍結・解凍後の生存率は、冷却速度  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  においては生存率 40%弱であったが、さらに冷却速度を遅くすると生存率は劇的に増加し、 $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  にて 80% を越えたとある<sup>(13, 14)</sup>。また過去の研究から三次元人工組織培養細胞では細胞密度の上昇に伴い生存率が低下したが、ヒト皮膚線維芽細胞の最適冷却速度である  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  よりも遅い速度で生存率が最も高い値を示すことが報告されている<sup>(15)</sup>。一般に凍結中は、氷晶形成に伴い溶質濃度上昇に伴い細胞は脱水され、細胞密度が高ければ一細胞あたりの自由水は減少する(自由水/cells が減少する)。冷却速度と生存率の関係は、細胞が十分に脱水し、かつ細胞内凍結が起こりにくい速度である。懸濁細胞では1つ1つの細胞間に距離がることによって十分な脱水が行われる。一方、培養細胞では細胞表面積が限られるため、十分な脱水が行われるまでに時間を要するため、単層培養細胞では懸濁細胞の最適冷却速度である  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ではなく、緩速冷却で凍結することにより、細胞の脱水が十分に行われることで生存率が高くなったと考えられる。さらに遅い  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  では生存率は低下しており、これは溶液効果による細胞の障害や濃縮した未凍結溶液中に曝されたことによる障害によるものと考えられる。 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  より速い冷却速度(急速冷却)の1、3、 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  では、 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  よりも相対生存率はどの細胞密度においても低下していた。これは細胞内氷晶形成による細胞内の微細構造の



破壊によって引き起こされたと考えられる。以上のことから、単層培養したヒト皮膚線維芽細胞の最適冷却速度が  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  であることが示された。

細胞密度ごとに解凍後の生存率を比較すると、細胞密度の上昇に伴い生存率が減少する傾向が見られた。ヒト皮膚線維芽細胞の三次元人工組織培養細胞における凍結保存後の膜の完全性は、細胞密度の上昇に伴い低下することが報告されおり<sup>(7)</sup>、細胞密度の上昇が解凍後の生存率に関与することを示している。本実験で解凍後の細胞の生死状態を観察した結果、細胞面積密度が  $0.2 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$  と低い場合(Fig. 2-2)、細胞同士の接触はほとんど見られない。そのため細胞は塩害を起こさず、しかも、細胞内凍結も起こらない状態となり生存率が高くなったと考えられる。

細胞密度  $0.2 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$  における代表的な細胞間の距離は、それぞれ、およそ 0.22、0.1、0.05 mm である[(代表的な細胞間距離) = (細胞面積密度)<sup>-1/2</sup> (cm)]。懸濁液中の球状の線維芽細胞は直径 0.025 mm から 0.05 mm の範囲である。培養フラスコに付着している単層培養した線維芽細胞は、細長い形（紡錘形）で、長辺で約 0.15 mm、短辺で約 0.02 mm の長さである。

Acker らは、細胞－細胞と細胞表面の相互作用が組織系の低温応答で重要な役割を果たすこと、そして、細胞－細胞接触が速い冷却の後に膜完全性に影響を与えることを報告している<sup>(16)</sup>。観察結果から、細胞密度  $1.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$  から細胞同士の接触がみられるようになり、 $5.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$  では明らかな細胞同士の接触がみられる。急速冷却である 1、3、 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  では、残存している細胞数が減少しており、細胞内凍結による致命的な障害により細胞膜に影響を与えていると考えられる。それに伴い  $0.2 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$  より高細胞面積密度では、機械的ストレス (mechanical stress) と細胞の変形(最小容積説)による膜の損傷によって細胞の剥離が生じ、先祖ン率が低下したと考えられる。つまり高細胞密度における死細胞の密集および生存率低下は細胞同士の接触機会の増加によって機械的損傷が増すことにより引き起こされていると思わ

れる。

## 2.5 まとめ

本実験では、凍結保存した単層培養細胞の解凍後生存率に及ぼす細胞密度の影響について、検討した。凍結解凍後の生存率は細胞密度の上昇に伴い減少することが示された。また細胞密度の上昇により凍結過程での細胞の接触が過度に上昇することにより、機械的ストレスによる死細胞の密集がおこることが示唆された。

## 第3章

# ヒアルロン酸の予備培養による高密度単層培養細胞の凍結保存後の細胞障害の軽減

### 3.1 はじめに

一般的に細胞懸濁液の凍結保存では最適な物質及び濃度の凍結保護液と最適な冷却速度を用いることにより、解凍後の高い生存率を得られる。これは二つの主要な細胞障害に起因し、緩速冷却による溶液効果と急速冷却による細胞内凍結が防がれるためである<sup>(17, 18)</sup>。

しかし足場に細胞を埋め込むような人工組織や生体組織では、その構造の複雑さにより懸濁状態の細胞よりも生存率が低い<sup>(19, 20)</sup>。解凍後の生存率を低下させる重要な構造的要因の一つとして細胞密度が挙げられる。高密度の組織を凍結した時、細胞外凍結中に起こる高密度の懸濁細胞の場合のように、細胞内の機械的ストレスにより容易に引き起こされる<sup>(21)</sup>。さらに高密度培養細胞では凍結中に重大なダメージを受け、基

質から脱落する。

細胞膜の損傷防ぐため、アルコールや糖、アミノ酸などの多くの物質が凍結保護物質として使われている<sup>(22, 23)</sup>。細胞と組織の間では凍結保護メカニズムは異なると考えられているが、細胞内溶液の低下や細胞膜の安定化、細胞内氷晶形成の阻害は共通の効果である。多くの凍結保護物質の中で、ジメチルスルホキシド (DMSO) は、細胞膜透過性の物質であり、極めて優秀な凍結保護効果を持ち多くの細胞種での凍結保存に用いられている。しかし、DMSO 単体での凍結保存では最適な濃度で用いても高密度で培養した細胞の生存率が低下するのを防ぐのは難しい。そのため細胞密度の上昇に関連する生存率の低下を防ぐために別の方法が必要となる。

ヒアルロン酸 (HA) は、細胞膜非透過性の物質であり、平均分子量約 100 万の天然物で、体の様々な部位に存在している。しかしながら、これまでの研究により HA がエンドサイトーシスにより様々な細胞に取り込まれることが分かっている<sup>(25)</sup>。HA は、高い水和能力および低い細胞毒性を有するため、整形外科や眼科などの医療分野で保護材として添加されている<sup>(26, 27)</sup>。さらに凍結保存精子のための活性化添加剤としての効果や<sup>(28, 29)</sup>、幹細胞や前駆細胞の凍結保存において細胞接着やコロニー形成に対する相乗作用を持っている<sup>(30)</sup>。

氷晶成長は高い水和能力を持つ物質を含む溶液により凍結中に防ぐことができる。HA は生体物質の長期保存のための凍結乾燥により安定した水素結合を提供することにより凍結保護効果を発揮する<sup>(31)</sup>。さらに我々の以前の研究により低分子量 HA は凍結保護効果を有し、予備培養した単層細胞の凍結で細胞膜の完全性を改善することが示された<sup>(32)</sup>。この水和能力は一定の濃度下で分子量が上がることで上昇する<sup>(33)</sup>。したがって、わずかに大きい分子量 (例えば  $10^6$  <) の HA を高密度の凍結保護物質や生体あるいは人工組織に加えたとき、細胞膜の損傷は軽減され結果として解凍後の生存率が改善されるかもしれない。

高密度単層培養細胞の凍結保存においてHAの予備培養により細胞膜が保護されることにより細胞障害が軽減し、結果として解凍後の生存率が低下すると仮説を立てた。

本実験では生体組織を模した高密度培養単層細胞を用いてHAの予備培養後に凍結保存し、解凍後の細胞生存率が改善するか調べることを目的とした。

## 3.2 方法

### 3.2.1 実験試料

単層培養したヒト皮膚線維芽細胞を  $0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (低密度培養細胞) または  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (高密度) で培養した試料を実験に用いた。培養液条件は第2章と同様である。

### 3.2.2 冷却速度

線維芽細胞の高い生存率が得られる冷却速度は  $0.3 \sim 3^\circ\text{C}/\text{min}$  であり [5]、本実験では単層培養細胞の最適冷却速度である  $0.3^\circ\text{C}$  および  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  を用いた。

### 3.2.3 実験装置

第2章と同様の装置を用いた (Fig. 2-1)。

### 3.2.4 凍結解凍手順

HAは平均分子量130万のものをを用いた。予備培養時間とHA濃度は予備実験の結果より、予備培養時間6時間、予備培養のHA濃度を0.5% w/wとした。DMEMに0.5% w/wのHAおよび1% ABを加えたものを予備培養液および凍結保護物質として調製した。通常の凍結融解条件としての凍結保護液として10% v/v DMSOおよび20% v/v

FBS を DMEM に加え用いた。凍結解凍実験の条件は、1) 6 時間 HA 予備培養後 HA 含有凍結保護液にて凍結融解 [HA]、2) 4°C で 15 分 DMSO 浸漬後凍結融解 [DMSO]、3) 6 時間 HA 予備培養後 DMSO にて凍結融解 [HA - DMSO]、の 3 条件にて行った。

### 3.2.5 解凍後生存率

第 2 章と同様に、二重蛍光染色を用いて解凍後の生存率および残存率を評価した。解凍後の試料の培養皿から任意の 5 か所を撮影し得られた画像を用いて以下の式により解凍後生存率を算出した。

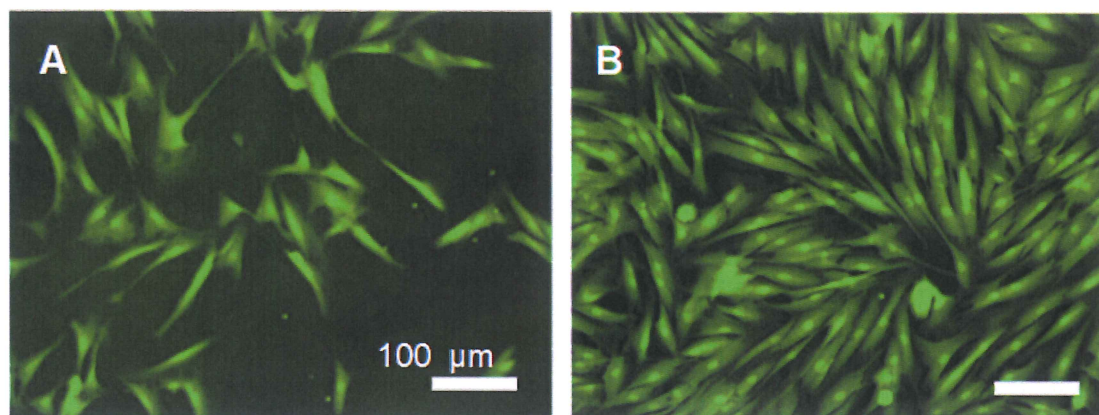
$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{凍結・解凍後の Calcein 陽性細胞数の平均値}}{\text{コントロールの Calcein 陽性細胞数の平均値}} \times 100$$

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{凍結・解凍後の Calcein 陽性の平均} + \text{DAPI 陽性の平均}}{\text{コントロール Calcein 陽性の平均} + \text{DAPI 陽性の平均}} \times 100$$

細胞の重なりにより Calcein-AM と DAPI にて陽性となった細胞は死細胞としてカウントした。

### 3.2.6 蛍光標識 HA の観察

FITC 標識した HA を用いて、予備培養後の細胞内外の HA を観察した<sup>(34)</sup>。5.0 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> で 24 時間培養した線維芽細胞に HA 濃度 0.1% w/w で DMEM (+1% AB) に溶解した培養液を加え、で培養し 6 時間予備培養した。培養した試料の培養液を除去後、緩衝液にて 10 回洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した (Fig. 3-1)。

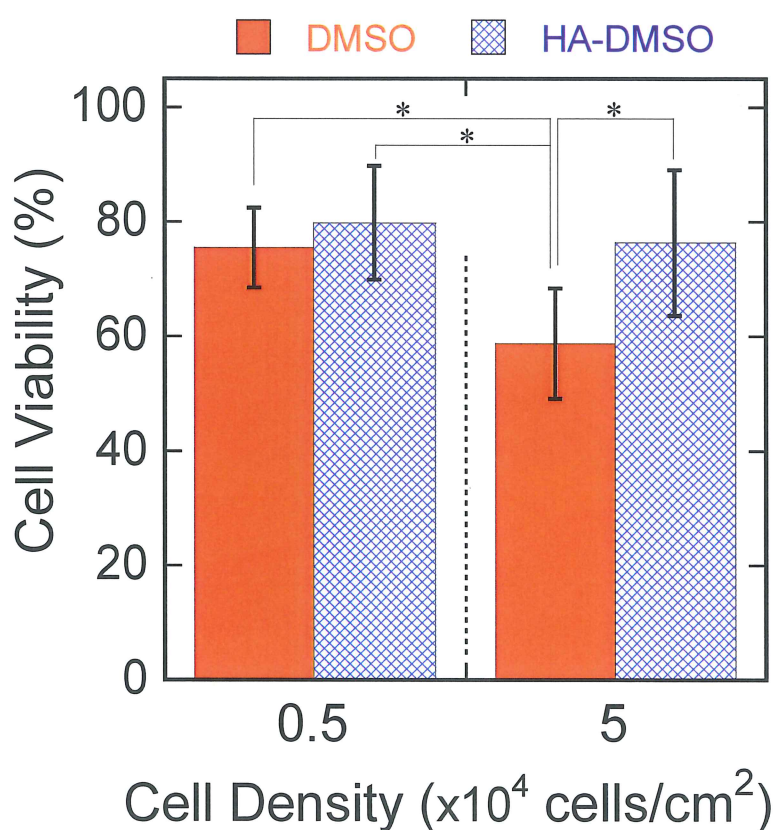


**Fig. 3-1 Representative fluorescence stained images of human dermal fibroblast monolayers using a fluorescence microscope in the control sample.**

[Each image was captured at the following cell density: (A)  $0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, (B)  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. The Calcein-AM fluorescence is colored light grey.]

## 3.3 結果

0.3°C/min にて凍結した各試料の生存率を Fig. 3-2 に示す。0.5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度では、DMSO および HA-DMSO で 75.5 ± 6.9% and 79.8 ± 9.9%であった。2 つの条件間で有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis test,  $p > 0.05$  for  $n = 7$ )。5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> では 58.8 ± 9.6% および 76.4 ± 12.7%であった。HA-DMSO 条件下での細胞生存率は DMSO 条件下より高い値を示した (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$  for  $n = 7$ )。

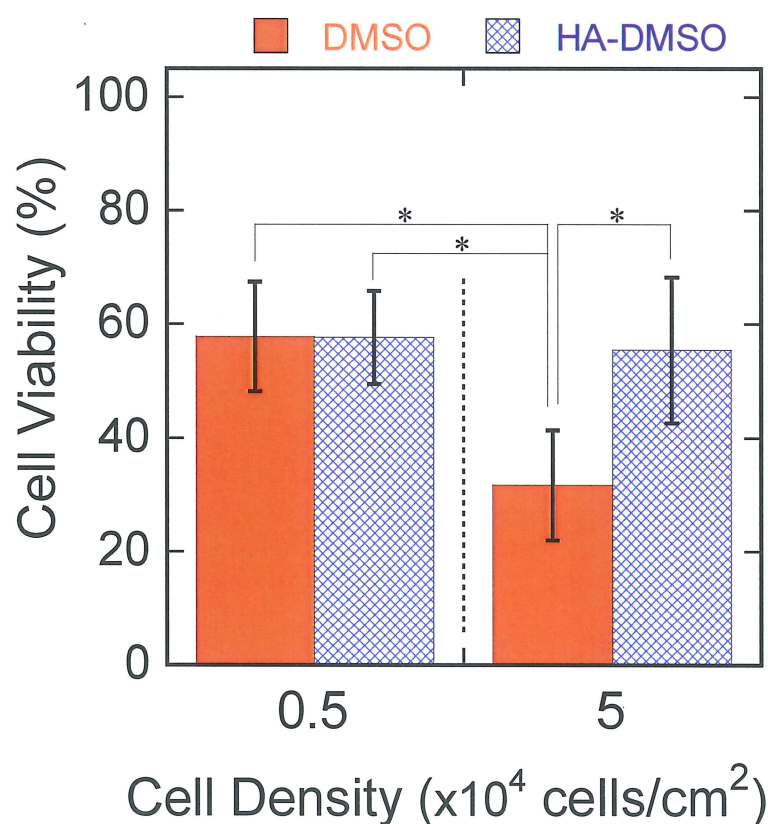


**Fig. 3-2 Viability of post-thaw cells in each solution when the sample was frozen at a cooling rate of 0.3°C/min at each cell density.**

[Experimental conditions at each cooling rate are DMSO and HA-DMSO. Error bars show SD. Asterisks (\*) show a statistically significant difference in cell viability (Mann-Whitney U test,  $*p < 0.01$  for  $n = 7$ ).]



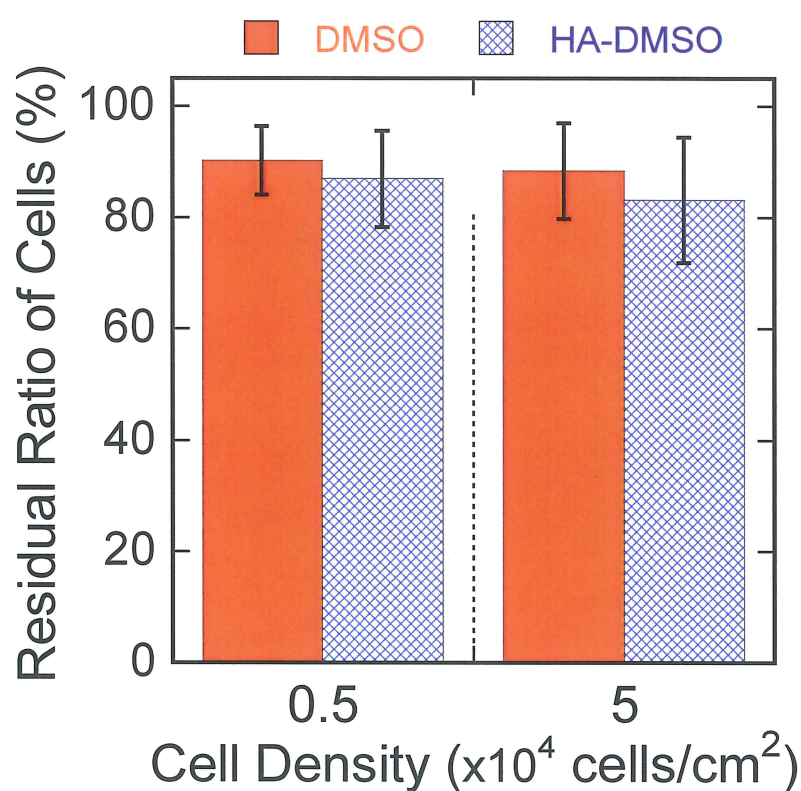
冷却速度  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  にて凍結した試料の解凍後生存率を Fig.4 に示す。 $0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の細胞密度ではDMSO および HA-DMSO で  $57.9 \pm 9.6\%$  および  $57.7 \pm 8.2\%$  であった。2つの条件間で有意差は見られなかった(Kruskal-Wallis test,  $p > 0.05$  for  $n = 7$ )。 $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>では  $31.7 \pm 9.7\%$  および  $55.5 \pm 12.8\%$  であった。HA-DMSO 条件下での細胞生存率はDMSO 条件下より高い値を示した(Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$  for  $n = 7$ )。



**Fig. 3-3 Viability of post-thaw cells in each solution when the sample was frozen at a cooling rate of  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at each cell density.**

[Experimental conditions at each cooling rate are DMSO and HA-DMSO. Error bars show SD. Asterisks (\*) show a statistically significant difference in cell viability (Mann-Whitney U test,  $*p < 0.01$  for  $n = 7$ ).]

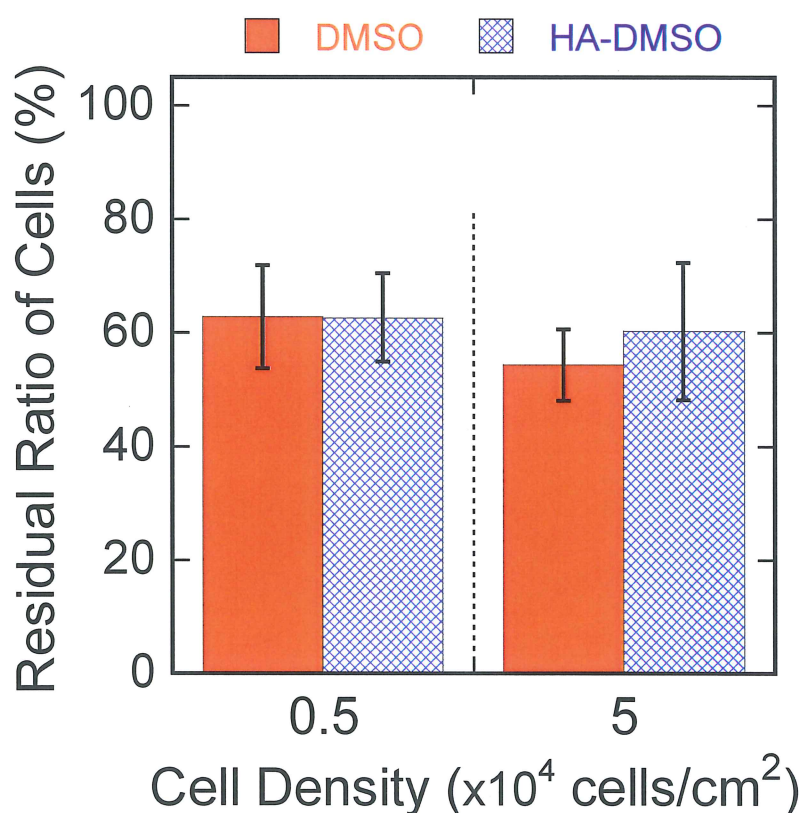
冷却速度  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  にて凍結した試料の解凍後残存率を Fig. 3-4 に示す (mean  $\pm$  SD)。  
 $0.5 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  の細胞密度における各凍結条件の残存率は、 $90.3 \pm 6.2\%$ 、および  
 $87.0 \pm 8.7\%$ 、 $5 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  の細胞密度における残存率は、 $88.4 \pm 8.6\%$  および  
 $83.2 \pm 11.2\%$  であった。各条件で統計的な有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis test,  $p$   
 $> 0.05$  for  $n = 7$ )。



**Fig. 3-4** Residual ratio of post-thaw cells in each solution when the sample was frozen at a cooling rate of  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at each cell density.

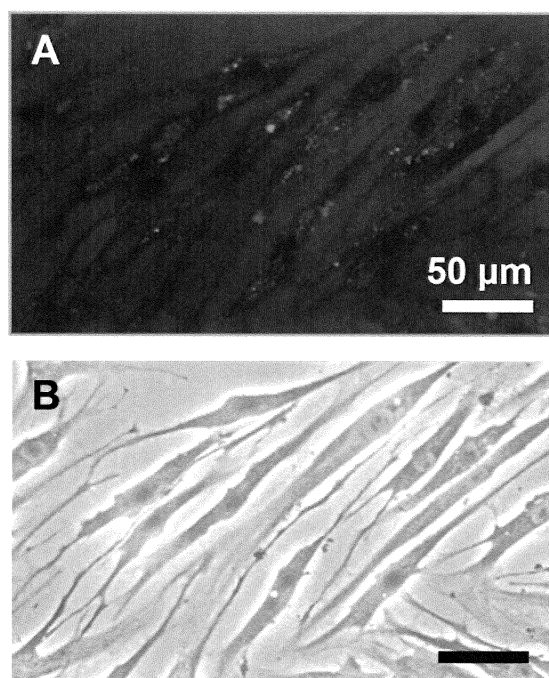
[Experimental conditions at each cooling rate are DMSO and HA-DMSO. Error bars show SD.]

3°C/min にて凍結した試料の解凍後残存率を Fig. 3-5 に示す (mean  $\pm$  SD)。DMSO および HA-DMSO 条件下での残存率は、細胞密度  $0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で  $62.9 \pm 9.1\%$  and  $62.7 \pm 7.8\%$ 、 $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で  $54.4 \pm 6.3\%$  and  $60.3 \pm 12.1\%$  であった。各条件で統計的な有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis test,  $p > 0.05$  for  $n = 7$ )。



**Fig. 3-5** Residual ratio of post-thaw cells in each solution when the sample was frozen at a cooling rate of 3°C/min at each cell density.

[Residual rate of post-thaw cells. Experimental conditions at each cooling rate are DMSO and HA-DMSO. Error bars show SD.]



**Fig. 3-6 Images of representative configurations of human dermal fibroblast monolayers using a fluorescence microscope after preliminary incubation in DMEM containing 0.1% w/w FITC-labeled HA for 6 h.**

[The fluorescence of FITC is colored white (light grey); (A) is the fluorescence image and (B) is the phase-contrast image.]

Fig. 3-6 は 0.1% w/w HA-FITC で 6 時間予備培養した後、蛍光顕微鏡にて観察した画像で A は蛍光画像、B が位相差顕微鏡画像である。A 画像の FITC の蛍光は白色に光っている。白色部分は細胞質中に存在していると考えられ局在している。細胞外の HA を 10 回洗浄したにもかかわらず細胞外にも蛍光が残っており B の画像にて細胞の輪郭が明確になっている。

### 3.4 考察

DMSO にて凍結した各冷却速度の解凍後生存率は、細胞密度  $0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> のほうが  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> よりも高かった。しかしどちらの冷却速度においても HA-DMSO 条件下では解凍後生存率の値はほぼ同じであった。これは細胞密度の上昇に伴う生存率の低下と考えられるが高細胞密度条件下では HA による予備培養により改善された。さらに DMSO 単独でも十分に高い生存率が得られることから、細胞密度  $0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 条件においては DMSO と HA-DMSO に有意差は見られなかった。また本研究でも確かに細胞密度は生存率に影響を与えている。

残存率は冷却速度に依存したが、細胞密度には非依存的な結果であった。細胞の残存率に影響を与える要因については、細胞膜が障害を受けた時に細胞が壊れ、培養皿から細胞がはがれると推定される。結果としてどちらの要因も重大で致命的なダメージとなる。DMSO および HA-DMSO のどちらの条件でも冷却速度 0.3°C/min での細胞生存率は 3°C/min よりも高かった。したがって、致命的なダメージを招く細胞内凍結<sup>(18, 35)</sup> は、0.3°C/min よりも速い速度での凍結で頻繁に起こっている。冷却速度 0.3°C/min での残存率が 3°C/min の低かったのは 3°C/min でより細胞内凍結が起こる可能性が大きいためと考えられる。さらに、細胞内凍結が重大な細胞障害を招くことで、細胞の残存率の減少をもたらすことが示唆された。

高細胞密度における DMSO 条件下で解凍後の細胞生存率と残存率との間に大きな差が見られたのに対し、他の条件ではほぼ同じような結果となった。HA による予備培養によって減少した生存率が改善されたことから、細胞ダメージの程度は培養皿底部からの剥離を引き起こすほどの重大なものではない。これは HA が、凍結中の隣り合う細胞同士の接触に HA-DMSO 条件下での細胞外の HA が細胞膜への機械的ストレスを、細胞破壊が起きない程度に減少させていると考えられる。または HA-DMSO 溶液の HA 濃度は凍結前に DMSO 溶液に置換されることで希釈されているが、細胞膜

近傍に接着または残っていることにより凍結保護効果を有することが示唆された。

細胞内の HA の取り込みが、細胞質内の FITC 標識 HA の蛍光の局在により確認された (Fig. 3-6A)。取り込みのメカニズムについて、他の研究では培養ラット表皮細胞にて HA レセプターの CD44 を介してエンドサイトーシスにより取り込まれ、次いで数時間をかけて細胞内に放出される。細胞によって HA はエンドサイトーシスにより取り込まれた後に、6 時間の予備培養にて分散された<sup>(35, 36)</sup>。これは凍結中の HA の水和により細胞内の水性環境が結合したと示唆された。これは分解された HA の水和を介して凍結中の氷晶形成または脱水を阻害することにより細胞障害を防ぐのに寄与したと考えられる。したがって、HA の予備培養による凍結保護効果が増強され、凍結中の細胞膜の破壊が減少したと思われる。

以上のように、解凍後の細胞生存率に対する細胞密度の影響は、HA の予備培養による細胞膜内外両方の凍結保護により減少した。これは生体組織または人工組織の凍結保存後の細胞生存率が HA による予備培養により改善されることが示唆された。

### 3.5 まとめ

高密度単層培養ヒト皮膚線維芽細胞を 0.5% HA 溶液にて 6 時間予備培養を行い、10%DMSO 凍結保護液にて凍結すると、解凍後の細胞生存率は低細胞密度の細胞と同程度に改善された。したがって、HA を使用した予備培養は、生体組織または人工組織のような、高密度に成長した細胞に対し凍結保護効果を増強させる。

以上のように、解凍後の細胞生存率に対する細胞密度の影響は、HA の予備培養による細胞膜内外両方の凍結保護により減少した。これは生体組織または人工組織の凍結保存後の細胞生存率が HA による予備培養により改善され、凍結過程での細胞生存率の改善が可能であることが示された。

## 第4章

# 厚い組織移植材料を模擬した配向単層細胞の凍結保存において細胞生存率に及ぼす凍結中に厚み方向に生じる冷却速度の温度依存性の影響

### 4.1 はじめに

近年、角膜や心臓弁の移植、皮膚や軟骨の欠損の修復、難治性神経疾患の治療などのために組織移植材料、すなわち、生体組織や担体に細胞が組み込まれた人工組織の必要性が高まりつつある<sup>(37-41)</sup>。これらの長期保存の手段として凍結保存が頻繁に用いられる。しかし、現状ではそれらの保存後における質は十分とは言えない。なぜならば、凍結保存後におけるそれらの細胞生存率低下や機能障害が大きいからである。これには構造と容積の両方の問題が複雑に影響を及ぼしている。構造の問題として、細胞密度、細胞の配置、細胞同士の接触や接合、細胞と基質の相互作用などが挙げられる<sup>(42-46)</sup>。容積の問題として、凍結保存の際に生じた材料の厚み方向の各部位の冷却条件の違いが挙げられる。これまで、構造の問題に関しては盛んに研究が進められてきたが、容積の問題に関してはほとんど注目されてこなかった。これは、これまでは5



mm 未満の厚みを持つ試料が保存対象だったためと考えられる。従って、これから必要とされるであろう 5 から 20 mm 程度の厚みを持つ組織移植材料の凍結保存における質向上のためには、構造の問題だけでなく容積の問題も考慮した冷却条件の検討が必要である。

細胞や生体組織を凍結する場合は two-step freezing が頻繁に用いられる<sup>(47, 48)</sup>。これは、凍結開始温度から約 $-40^{\circ}\text{C}$ までは一定速度でゆっくり冷却することで細胞外凍結により細胞を適度に脱水し(1 段目)、それ以下は保存温度まで制御せずに急速冷却する(2 段目)方法である。この 1 段目の冷却速度には最適値が存在し(最適冷却速度<sup>(49)</sup>)、解凍後の細胞生存率が最も高くなる。小容積の細胞懸濁液が凍結される際は、1 段目の試料内部における冷却曲線、すなわち温度と時間の関係はほぼ直線となる。その結果、試料の全体ではほぼ一様の冷却速度で凍結される。しかし、厚い組織移植材料を凍結保存する際は、それよりも遙かに大容積のため、たとえ試料の表面を一定の冷却速度で凍結しても、試料深部の冷却曲線は熱伝導の制約により非線形となる。その結果、試料の表面と深部の間で冷却速度に差が生じる。厚い組織移植材料の凍結過程においては、材料の表面と深部の間に生じる冷却速度差だけでなく冷却速度の温度依存性も、厚み方向の各部位ごとの細胞生存率の違いを生み出す可能性がある。しかし、冷却速度の温度依存性が具体的に細胞生存率にどの程度の影響を与えているかについては殆ど知られていない。それは、厚い組織移植材料の凍結保存後における局所的な細胞生存率を調べるのが難しいためである。

厚い組織移植材料の凍結保存においては、試料の厚み方向に熱伝導による凍結順序が生じる。これは 3 次元的であり生存率と対応させるには複雑過ぎる。従って、実験試料の冷却部位を限定し、単純な熱伝導を実現することにより凍結現象と生存率を対応させることが可能となる。さらに、生体組織や厚みのある担体に組み込まれた人工組織を用いる代わりに、シート状の基質に単層培養細胞を厚み方向に配置し順序を与



えて凍結すれば、幾つかの部位における冷却速度の変化と同位置における解凍後の生存率の関係性を検討可能となる。そして、このことにより先に述べた構造的問題を制限し、単純化した系で厚み方向の現象を模擬可能であると考えられる。また、細胞を基質上で培養すると生体組織本来の配向性は失われる。生体組織の細胞配列を模擬し、かつ、試料に凍結順序を与えるためには試料の細胞配向が問題となる。手段としての細胞の配向や力学的応答としての細胞の配向に関しては既に様々な研究成果が報告されたが<sup>(50-53)</sup>、基質上に設けた機械溝が細胞の配向ガイドとして用いられるのが細胞を配向させるための最も簡便な方法と考えられる<sup>(54, 55)</sup>。この技術を利用すれば、より実際の組織移植材料に近い状態を実現可能である。これらのことから、特に組織の持つ厚み方向の細胞の配列と凍結順序を模擬出来ると考えられる。

本研究では、組織の細胞配列を模してシート状の基質上の機械溝で配向制御された単層培養細胞に一次元的熱伝導により順序を与えて凍結させた時の解凍後における配向方向と厚み方向を模擬した各部位における生存率を調べた。更に、その各部位における温度に依存した冷却速度の変化と解凍後の細胞生存率の関係について検討した。以上より、20 mm 程度の厚い生体組織の凍結保存を想定し、試料の凍結過程において試料の内部に生じる冷却曲線の非線形性、即ち、冷却速度の温度依存性が解凍後の細胞生存率に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 4.2 方法

### 4.2.1 細胞配向用基質

基質には、細胞接着性が良いこと、表面形状加工が容易であること、滅菌可能であることから、高分子カバースリップ (Nunc<sup>TM</sup> Thermanox<sup>®</sup> Plastic Coverslips, 150067, 24 × 24 × 0.2mm に加工) が選択された。基質表面の溝加工には SiC 耐水研磨紙 (三共理

化学、研磨紙番号 #1000) を使用した。細胞の配向制御に有効な研磨紙番号 (#1000) は予備実験により決定した。基質はゴムブロック ( $30 \times 30 \times 3$  mm) に固定し、研磨紙上でゴムブロックを介し一定荷重 (33 N) を加え一方向に引くことで溝を作成した。溝加工された基質は蒸留水とアセトン中で交互に超音波洗浄した後、高圧蒸気滅菌 ( $120^{\circ}\text{C}$ 、20 min) を行った。本実験で基質に加工された溝の幅は  $1 \sim 4$   $\mu\text{m}$ 、深さは  $0.3 \sim 1.0$   $\mu\text{m}$ 、溝間の距離は  $60 \sim 100$   $\mu\text{m}$  であった。

#### 4.2.2 細胞培養および実験試料

溝加工された高分子基質上に細胞を播種し培養した配向単層細胞を試料とした。ヒト皮膚線維芽細胞 (normal cells purchased from the Cell Systems, 2F0-C25, Kirkland, Washington, USA) をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Invitrogen Gibco 12320, New York, USA) に 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS; Invitrogen Gibco 26140, New York, USA) と 1% v/v antibiotic solution (AB : Invitrogen Gibco Antibiotic-Antimycotic 15240) を加えたものを用いた。

フラスコ (TPP  $150\text{ cm}^2$ ) で培養された細胞をトリプシンにより剥がし、遠心分離後に培養液を加えて細胞懸濁液を作成した。位相差倒立顕微鏡観察下で血球計算盤 (Erma Burkert-Turk 血球計算盤 2963) を用いて細胞数をカウントし、基質 ( $24 \times 24$  mm) 上に細胞面積密度  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> になるよう細胞懸濁液を播種した。作成した。インキュベータ内で 24 時間培養後に実験試料として用いた。さらに配向制御溝と細胞の配列が凍結解凍後の細胞生存率に与える影響を評価するため、表面に溝加工のない基質上に細胞を培養した非配向単層細胞を作製した。

#### 4.2.3 実験装置

実験試料に凍結順序を与えるため冷却装置は第 2、3 章で作成した凍結装置を改良

したものを用いた (Fig. 4-1)。

実験試料容器としてポリプロピレン製秤量瓶 (Kartell (Milano, Italy : 高さ 69 mm、直径 40 mm、容量 60 ml) を用いた。実験試料を上下方向に固定するため、ポリテトラフルオロエチレンのガイド管 (内径 24 mm、外径 36 mm、高さ 33 mm) を加工し用いた (Fig. 4-2)。

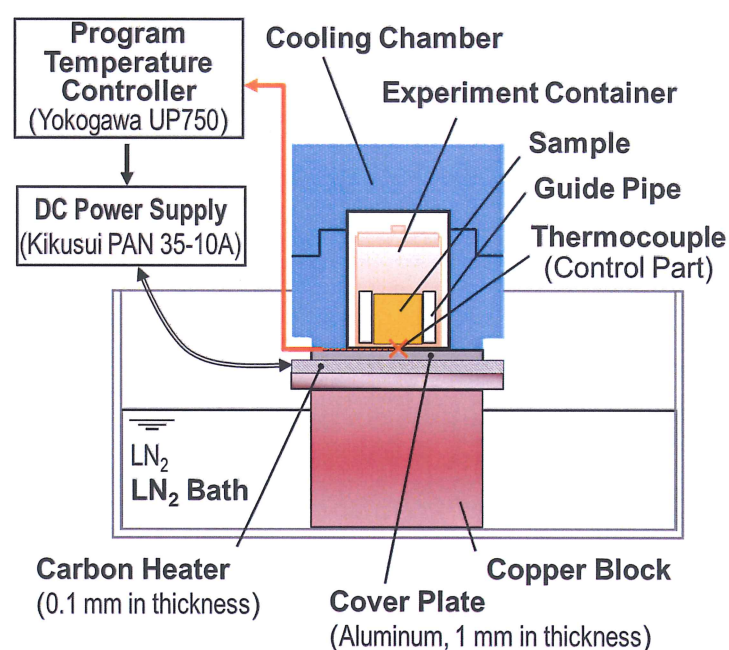


Fig. 4-1 Experimental apparatus for freezing samples.

#### 4.2.4 凍結解凍実験手順

本研究では、二段階凍結法による凍結保存を想定して冷却速度と温度範囲の条件が設定された<sup>(47, 48)</sup>。実験試料は、冷却速度の温度依存性が凍結解凍後の細胞生存率に与える影響を調べるために、実験容器底部に垂直に置かれ (Fig. 4-2 Perpendicular Placement) 凍結順序を与えて制御冷却速度 0.2, 0.3, または 0.5°C/min で凍結された細胞が水平配向した試料の解凍後の細胞生存率を評価した。さらに基質上に加工された

配向制御溝や配向の方向（水平、垂直）は凍結解凍後の細胞生存率に影響を与えないことを予備実験により確認している

共通の実験手順を示す。実験前に、14 ml の凍結保護液（10% v/v dimethyl sulfoxide (DMSO) + DMEM）を実験容器に入れ、4°C に冷却する。実験試料は培養皿からピンセットで取り出し、実験容器に入れ蓋をする。冷却室に入れられた試料は、凍結装置の銅ブロック上に圧着され、試料全体が 4°C から -40°C 以下になるまでは任意の制御冷却速度で、それ以下は冷却速度約 20°C/min で -180°C 以下まで冷却された。その後、実験容器を冷却装置から取り出し、37°C の恒温水に 20 分間浸し解凍した。

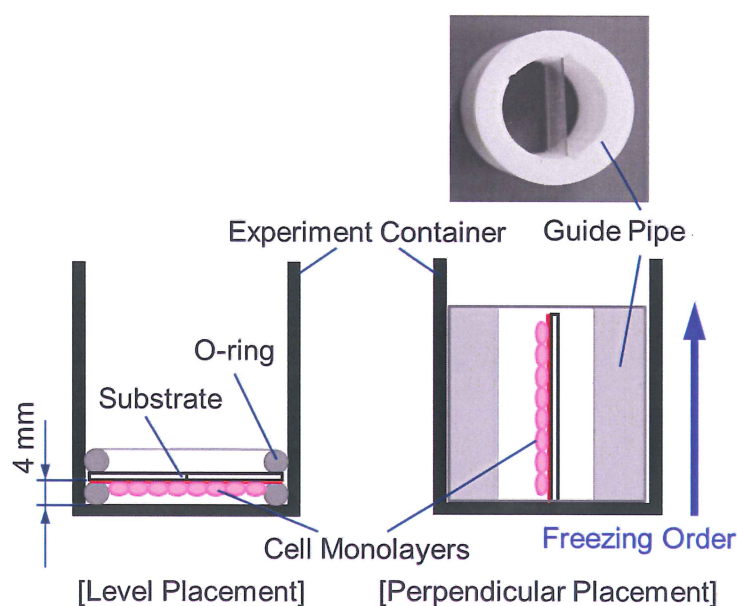


Fig. 4-2 Placement of samples and freezing order.

#### 4.2.5 解凍後生存率の評価

解凍後の試料を蛍光二重染色し、蛍光顕微鏡による画像から細胞生存率が算出された。生細胞の細胞質が Calcein-AM で、死細胞の細胞核を DAPI で染色した。実験容器から取り出した試料に 2.86 nM の DAPI を加え 5 分間インキュベータし、その後吸

引除去した。次に、4 $\mu$ m Calcein-AM を加え 30 分間静置した後吸引除去した。その別の培養皿に培養面が下になるよう置き 1 ml の DMEM を加え観察を行った。

蛍光倒立顕微鏡 (Nikon TE-300- DEF-S) と CCD カメラ (浜松ホトニクス ORCA-ER) を用いて画像処理ソフト (Scanalytics Inc. IPLab/Win Ver.4.0.3) でパーソナルコンピュータ蛍光画像と位相差画像を取り込んだ。蛍光細胞数は、パーソナルコンピュータに取り込まれた画像から画像ソフト (Adobe Photoshop CS3) を用いてカウントした。Fig. 4-3 に示すように試料は 9 つの領域に区分し、1 区分毎に任意の領域 1 つを選定され、合計 9 領域で生細胞数と死細胞数がカウントされた。このとき、基質における各領域の下端からの距離が温度測定の高さとできる限り同じになるように考慮された (Fig. 4-5)。

次に細胞生存率は次式を用いて算出した。

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{凍結・解凍後の Calcein 陽性細胞数の平均}}{\text{コントロールの Calcein 陽性細胞数の平均}} \times 100$$

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{凍結・解凍後の Calcein 陽性の平均} + \text{DAPI 陽性の平均}}{\text{コントロール Calcein 陽性の平均} + \text{DAPI 陽性の平均}} \times 100$$

凍結順序が無い条件では 9 領域の各生存率の平均を試料の平均細胞生存率とした。また、凍結順序がある場合は、1～3 の各生存率の平均を基質上部 (下端から 20 mm の部位)、4～6 の各生存率の平均を中部 (下端から 12 mm の部位)、7～9 の各生存率の平均を下部 (下端から 4 mm の部位) の生存率とした。実験は凍結融解をしていない対象試料で繰り返し行った。コントロールの非配向と配向の単層培養細胞の蛍光染色画像を Fig. 4-4 に示す。この画像で (Fig. 4-4B)、溝の方向は水平で、Calcein-AM により生細胞の細胞質が緑色に染色された。この様子から、溝の方向とほぼ平行に細胞

が配向していることが確認された。

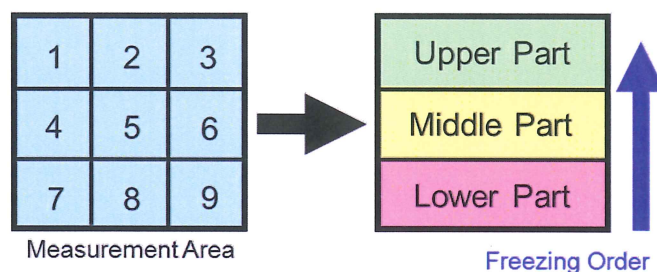


Fig. 4-3 Measurement area of cell viability in a post-thaw sample.

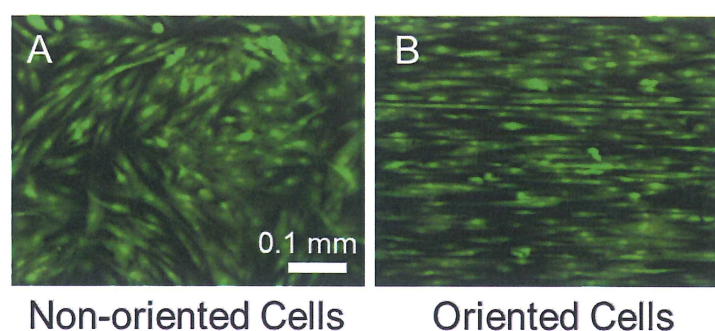


Fig. 4-4 Fluorescent images of control samples.

#### 4.2.6 冷却曲線からの冷却速度の決定

凍結順序を与えた配向試料の部位別の冷却速度の温度依存性を検討するため、試料の各部での冷却曲線（温度の時間依存性）を計測した。ガイドパイプに 14 ml の 10% DMSO を含む凍結保護液を加え実験容器にセットした。0.2、0.3 と 0.5°C/min に制御した冷却速度で凍結され、下端から 4 mm (a)、12 mm (b)、20 mm (c)に熱電対を取り付け、温度の経時変化を測定した (Fig. 4-5)。それぞれの制御冷却速度で試料上端の温度が−40°C 以下になるまで、データロガー (Omron (Kyoto, Japan) ZR-RX40、サンプリング周期：100s) により 3 回ずつ計測した。垂直に基質を置き 0.5°C/min で凍結した



時の基質上の各部位における冷却曲線（温度と時間の関係）を Fig. 4-6 に示す。また基質の端から中央までの各領域における温度偏差は $-7\sim-40^{\circ}\text{C}$ の間で $0.8^{\circ}\text{C}$ 以下の差であったため。水平方向の一様性と凍結順序は確保されたと見なされた。

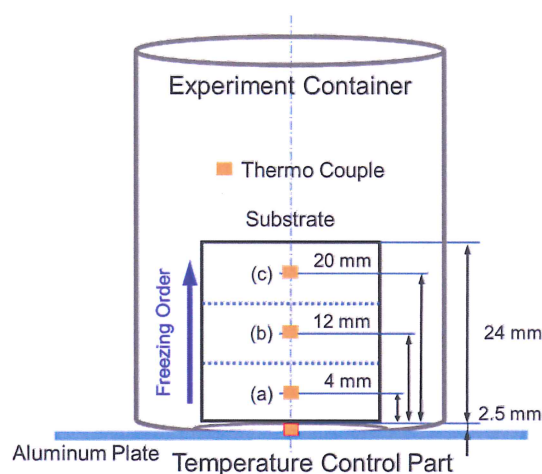


Fig. 4-5 Measurement points of temperature.

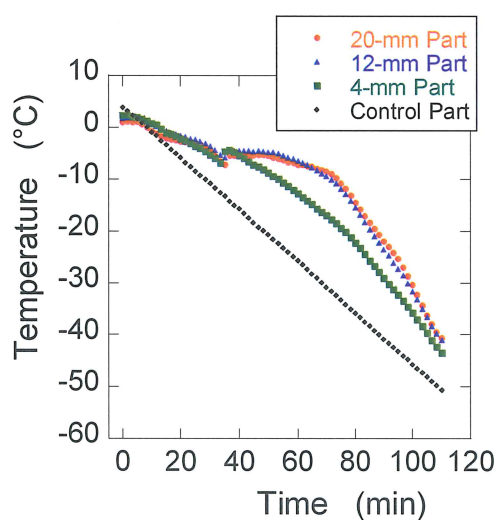


Fig. 4-6 Representative cooling curve in each substrate region frozen at a cooling rate of  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  under perpendicular placement.

隣り合う二つの温度データ間の冷却速度は、1 回ごとの温度のデータと周期時間か

ら算出され、それらの平均温度と冷却速度を対応させた。これらを基に、温度を $-25^{\circ}\text{C}$ で揃え 3 回の冷却速度のデータを平均し、ばらつきを抑えるためにスムージング (10 データの移動平均) が行った。潜熱の影響を避けた測定温度である $-7^{\circ}\text{C}$  から脱水の終結温度である $-40^{\circ}\text{C}$  の範囲において温度と冷却速度の関係が決定された。この結果から、各条件における平均冷却速度と最大冷却速度が算出された。

#### 4.2.7 一定の冷却速度での凍結試料

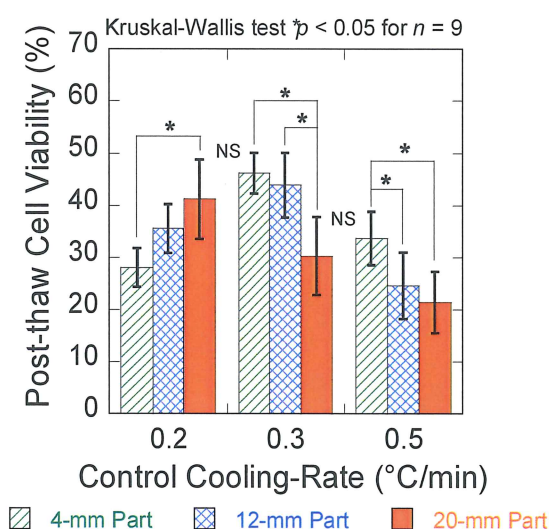
温度に依存して変化する冷却速度で試料が凍結された場合と細胞生存率を比較するため、より一定に近い冷却速度で同じ試料が凍結された場合の解凍後の細胞生存率を測定した。試料の凍結には、先に説明した装置ではなく、我々の過去の論文で示された凍結装置を用いた<sup>(56)</sup>。冷却速度はほぼ一定の  $0.1, 0.3, 0.6, 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  とし、試料は 35 mm 培養皿中に水平に置かれて凍結された。凍結保護物質の浸漬条件、温度条件、凍結解凍後の細胞生存率の測定は前述した通りである。また、この実験装置において、制御冷却速度に対する試料の冷却速度の偏差は最大 +20% 以内であった。

### 4.3 結果

垂直に置かれて制御部冷却速度  $0.2, 0.3, 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で凍結された試料 (水平配向細胞) の解凍後の細胞生存率を Fig. 4-7 に示す。縦軸に細胞生存率が、横軸に制御冷却速度 ( $0.2, 0.3, 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) となっている。制御部冷却速度  $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の 4mm の部位、12mm の部位、20mm の部位における細胞生存率はそれぞれ  $28.1 \pm 3.7\%$ ,  $35.6 \pm 4.7\%$ ,  $41.2 \pm 7.6\%$  であり、温度制御部から離れるにつれて増加した。そして、4 mm の部位と 20 mm の部位の細胞生存率の差は統計的に有意だった (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.05$  for  $n = 9$ )。制御部冷却速度  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  での 4 mm の部位、12 mm の部位、20 mm の部位における



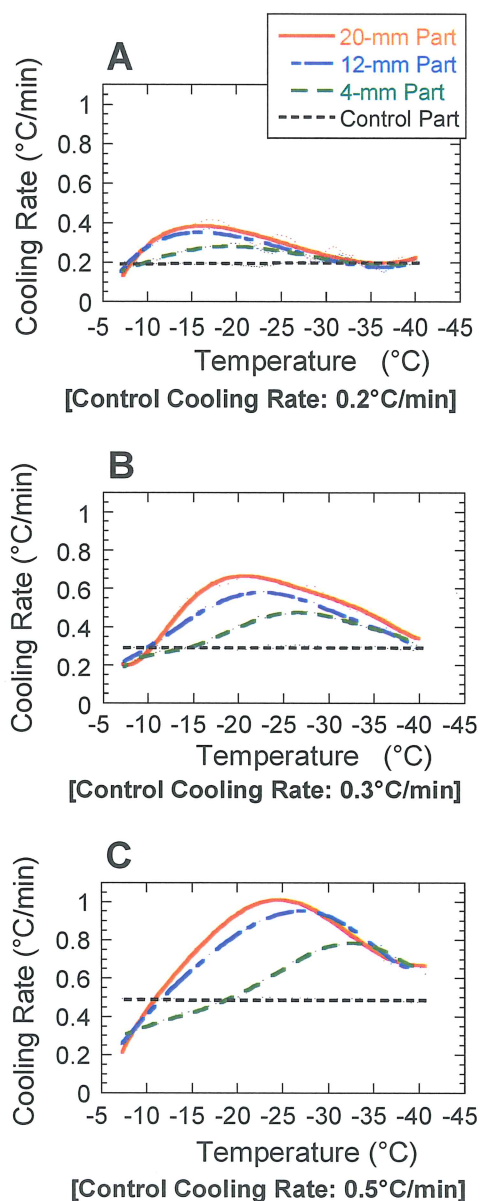
細胞生存率はそれぞれ  $46.2 \pm 3.9\%$ ,  $43.9 \pm 6.2\%$ ,  $30.3 \pm 7.5\%$  であり、温度制御部から離れるにつれて低下した。そして、4mm と 20mm の部位、12mm と 20mm の部位それぞれの細胞生存率の差は統計的に有意だった (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.05$  for  $n = 9$ )。制御部冷却速度  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  の場合の 4mm の部位、12mm の部位、20mm の部位における細胞生存率はそれぞれ  $33.7 \pm 5.1\%$ ,  $24.6 \pm 6.4\%$ ,  $21.4 \pm 5.9\%$  であり、温度制御部から離れるにつれて低下した。そして、4mm と 12mm の部位、4mm と 20mm の部位それぞれの細胞生存率の差は統計的に有意だった (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.05$  for  $n = 9$ )。



**Fig. 4-7** Post-thaw cell viability in each part of horizontal-oriented cells frozen at control cooling-rates of 0.2, 0.3, and  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  under perpendicular placement.

温度制御部を 0.2, 0.3, または  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  の冷却速度で制御した基質の  $-7^\circ\text{C}$  から  $-40^\circ\text{C}$  までの各部位の冷却速度の温度依存性はそれぞれ Figs. 4-8A, 4-8B, 4-8C に示される。縦軸に冷却速度が、横軸に温度がとられる。各条件の曲線は多項式を用いて近似した。制御部の冷却速度は、どの制御冷却速度においても一定と見なされたが、基質の各測定部位においては上に凸の曲線となった。制御冷却速度と最大冷却速度の差は、

温度制御部から離れるにつれて（試料の 4mm の部位から 20mm の部位にかけて）大きくなり、しかも、曲線のピーク（冷却速度の最大値）も高温度側にシフトした。



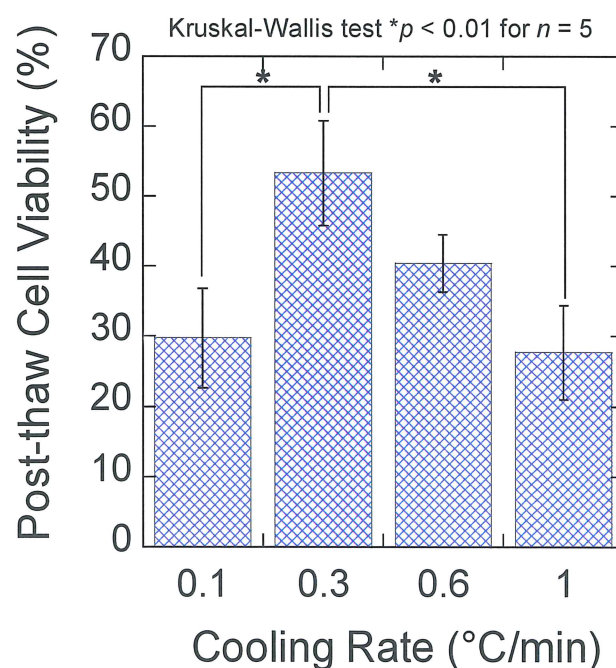
**Fig. 4-8** Temperature dependency of the cooling rate in each part of a substrate.

各制御冷却速度における冷却曲線 (Figs. 4-8A, 4-8B, 4-8C) から算出された各部位で

の平均冷却速度と最大冷却速度を Table. 4-1 にまとめた。ここで、平均冷却速度算出の温度範囲は、脱水に重大な影響を与える温度範囲と考えられる  $-7^{\circ}\text{C}$  から  $-40^{\circ}\text{C}$  までとした。どの制御冷却速度においても、平均冷却速度も最大冷却速度も温度制御部から離れるにつれて増加した。

**Table. 4-1 Average and maximum cooling rate in each part.**

Measurement Part	Average Cooling Rate (Maximum Cooling Rate), $^{\circ}\text{C}/\text{min}$		
Temperature Control Part	0.20	0.30	0.50
4-mm Part	0.24 (0.30)	0.37 (0.48)	0.55 (0.79)
12-mm Part	0.27 (0.37)	0.47 (0.58)	0.74 (0.96)
20-mm Part	0.29 (0.42)	0.53 (0.66)	0.78 (1.02)



**Fig. 4-9 Relationship between post-thaw cell viability and cooling rate when samples of oriented cell were cryopreserved with constant cooling-rate under level placement in a culture dish.**

一定と見なされる各冷却速度で凍結された配向細胞の解凍後の細胞生存率を Fig. 4-9 に示す。縦軸に細胞生存率、横軸に冷却速度としている。冷却速度 0.1, 0.3, 0.6, 1°C/min における細胞生存率は、それぞれ  $29.8 \pm 7.1\%$ ,  $53.3 \pm 7.5\%$ ,  $40.4 \pm 4.1\%$ ,  $27.7 \pm 6.7\%$  であった。細胞生存率は、0.3°C/min で最も高い値となり、それより冷却速度が速くても遅くても低下した。また、冷却速度 0.1 と 0.3°C/min、0.3 と 1°C/min それぞれの細胞生存率は、統計的に有意であった(Kruskal-Wallis test,  $P < 0.01$  for  $n = 5$ )。

#### 4.4 考察

冷却速度の温度依存性が試料の凍結解凍後の細胞生存率に与える影響を検討した。本実験では、容器外側底部の温度制御部が一定冷却速度に制御された。試料が冷却されると約-7°C までは溶液が未凍結状態であり、試料の上部と下部の温度差が拡大する。それ以下の温度では溶液が下部から凍結し上部に向かって広がっていくため、上下方向の熱伝導率が高くなり-40°C 付近まで各試料の上部と下部の温度差が減少していく (Fig. 4-6 など)。その結果、試料の各部の冷却速度はいったん増加し、-15°C から-30°C までにピークを迎え、次に減少しながら制御冷却速度に近づいていく曲線となる (Figs. 4-8A, 4-8B, 4-8C)。したがって、各温度における冷却速度の制御冷却速度に対する最大偏差は、試料の 4mm の部位では小さいが 20mm の部位では大きくなる。

制御冷却速度 0.2°C/min では、試料の部位が温度制御部から離れるにつれて(即ち、試料の下部から上部にかけて) 最大冷却速度と制御冷却速度の差は増加し、凍結解凍後の細胞生存率が高くなった (Figs. 4-7, 4-8A)。これは、試料の部位が温度制御部から離れるにつれて冷却速度が生存に適した条件に近づいていったためと考えられる。制御冷却速度 0.3°C/min と 0.5°C/min では、試料の部位が温度制御部から離れるにつれて最大冷却速度と制御冷却速度の差は増加し、凍結解凍後の細胞生存率は低下した。

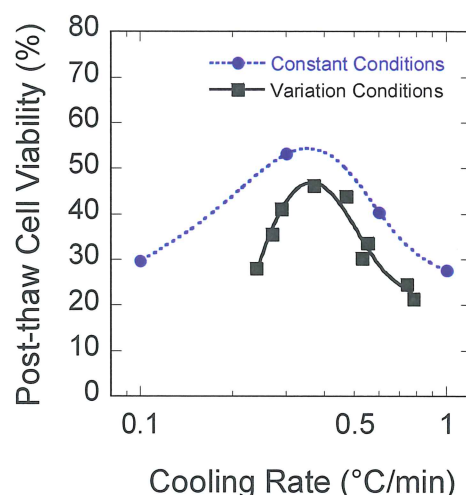
これは、試料の部位が温度制御部から離れるにつれて冷却速度が生存に適した条件から遠ざかっていったためと考えられる。Fig. 4-9 に示されるように、温度に依存せず一定とみなせる冷却速度で凍結した試料では、解凍後の細胞生存率は  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で最も高くなった（即ち、最適冷却速度）。このことから、制御冷却速度  $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の条件は、最適冷却速度よりも遅い冷却速度の条件に相当すると考えられるので、試料の部位が温度制御部から離れるにつれて試料の溶液効果<sup>(49, 57)</sup>による障害が減少していくことが予想される。制御冷却速度  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  と  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の条件は、最適冷却速度よりも速い冷却速度の条件に相当すると考えられるので、試料の部位が温度制御部から離れるにつれて細胞内凍結による障害が増加することが予想される。

温度に依存して冷却速度が変化する条件では、それぞれの凍結解凍後の細胞生存率が比較されることは困難である。そのため、評価指標として平均冷却速度が使用されて、一定の冷却速度とみなせる条件との生存率の比較が試みられる。変化する冷却速度の条件として Fig. 4-7 と Table 4-1 から平均冷却速度と細胞生存率の関係を、一定の冷却速度の条件として Fig. 4-9 から細胞生存率と冷却速度の関係がプロットされた図を Fig. 4-10 に示す。縦軸に細胞生存率が、横軸に冷却速度がとられ多項式でフィットされた。

この図から双方の条件で  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  と  $0.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の間に細胞生存率のピークを持つ上に凸の曲線になり、しかも、これらの曲線の傾向がほぼ一致した。このことから、試料の厚み方向に生じる冷却速度の温度依存性が細胞生存率に及ぼす影響は平均冷却速度を指標として比較できると考えられる。近似曲線の形において冷却速度が温度に依存して変化する条件の曲線は冷却速度一定の条件の曲線と似ているので、 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ （ピーク細胞生存率）よりも低速側は溶液効果によって、ピークの高速側は細胞内凍結によって細胞生存率が低下したと考えられる。さらに、冷却速度が温度に依存して変化する条件の方が冷却速度一定の条件よりも、全体的な細胞生存率が低くなったこ



と、そして、ピークの低冷却速度側が急峻となったことは、平均冷却速度では説明出来ない影響である。つまり、これらは冷却速度の温度依存性による影響であると考えられる。



**Fig. 4-10 Relationship between post-thaw cell viability and cooling rate when samples were frozen in constant conditions or variation conditions.**

冷却速度の温度依存性は、試料の冷却の際に各温度に対して適切な値をとれば細胞生存率の向上に役に立つと考えられている。冷却速度と細胞外の氷晶形成による溶質濃縮により引き起こされる細胞脱水の流束の関係から、次に示される冷却の考えが理論的に有効であるとされる。即ち、凝固点から $-20^{\circ}\text{C}$ までの細胞からの脱水量が比較的多い温度範囲では脱水の推進力を高めるために温度低下とともに冷却速度を増加させ、 $-20^{\circ}\text{C}$  から $-40^{\circ}\text{C}$  までの脱水が終結に向かう温度範囲では細胞内の過冷却を防ぐため冷却速度を温度低下とともに減少させる<sup>(58)</sup>。例えば、Tijssen らによると、凍結保護物質 10% DMSO を用いた the cryopreservation of peripheral blood stem cell transplants の凍結保存において、冷却速度が変化する条件の方が一定の冷却速度の条

件よりも細胞生存率がわずかに高くなったと報告された<sup>(59)</sup>。細胞外凍結による脱水の原理からすると、細胞内外の未凍結液の濃度差が推進力となる。この濃度差は、冷却速度が大きくなるにつれて増加する。従って、単位温度あたり濃度差は温度の低下に伴って低下するので、一定の推進力を確保するためには冷却速度は温度の低下に伴って大きくする必要がある。しかし、冷却速度の増加は細胞内の過冷却度を増加させるので、細胞内凍結を起こし細胞が損傷しやすくなる。偶然の結果かもしれないが、少なくとも本研究の冷却速度の温度依存性の曲線の形は上のものと似ていると思われる。

これらのことを基にして同じ冷却速度で比べると、一定の冷却速度で凍結させた場合の方が温度に依存して変化する冷却速度で凍結させた場合よりも細胞の脱水は緩やかとなる（つまり、非効率的な条件）可能性がある。温度に依存して変化する冷却速度の条件の方が一定の冷却速度の条件よりも細胞生存率のピークの低冷却速度側の傾きが急峻なのは（Fig. 4-10）、実質的な脱水過多により溶液効果が起こりやすいことが原因と考えられる。一定の冷却速度の条件よりも変化する冷却速度の条件の方が細胞生存率のピークが低くなったのは、温度低下に伴う急激な冷却速度増加による細胞内凍結の増加が原因として考えられる。また、変化する冷却速度の条件におけるピークの高冷却速度側の生存率低下は、細胞内凍結が増加したことが原因と思われる。これは、変化する冷却速度による脱水促進効果よりも高冷却速度による過冷却が勝るからである。よって、冷却速度の温度依存性をうまく利用すれば、最適条件においては一定の冷却速度よりも細胞生存率の改善に有利に働くが、厚み方向に相当する最適条件以外の条件では不利に働くことが示唆された。

熱伝導の観点からは質量の割合の大部分を占める水の相変化が試料の凍結現象において支配的となる。従って本研究では、細胞の凍結順序と基質の各位置における冷却速度の温度依存性が凍結解凍後の試料の細胞生存率に与える影響については、配向

単層細胞で組織の配列状態を模擬することで組織の厚み方向の現象を再現出来たと考える。しかし、構造的要因による凍結に対する細胞の応答、即ち、凍結に伴う細胞同士や細胞と基質（マトリクス）の3次元的な相互作用が細胞生存に与える影響は再現できなかった。このことは今後さらに追求する必要がある。

#### 4.5 まとめ

厚み約 20mm の組織移植材料を模擬した配向単層培養細胞において、下部から上部に向かう順序で凍結させた場合の解凍後の細胞生存率を調べた結果以下のことが分かった。

1. 試料の解凍後の細胞生存率は、厚みとして想定された各部位に生じた冷却速度の温度依存性によって影響を受け、そして、温度制御部から離れるにつれてその影響も大きくなることが明らかとなった。
2. 試料の凍結解凍後の細胞生存率は細胞外凍結による脱水の程度によって影響を受けるので、細胞外凍結が開始する $-7^{\circ}\text{C}$  から細胞内の脱水が終結する $-40^{\circ}\text{C}$  までの温度範囲の平均冷却速度を評価指標として冷却速度に温度依存性を持つ条件で凍結された試料の細胞生存率が記述可能である。



## 第5章

### 結 論

本論文では、組織の凍結保存における物理的および化学的環境の構築による解凍後生存率の改善を目的として研究を行い以下の結論を得た。

ヒト皮膚線維芽細胞の細胞密度と凍結解凍後の細胞生存率は、初期培養での細胞密度が高くなるほど生存率に影響することが示され、凍結中の細胞密度の局所的な上昇に伴い細胞間接触による細胞へのダメージを与えていた。この結果から、密な細胞間の接触を物理的または化学的な相互作用で防ぐことにより解凍後生存率の改善ができると考えた。また凍結保存後の利用するには、凍結した試料中の細胞が十分に機能するための細胞数が必要であり、凍結後の細胞の回収率も重要である。したがって単層培養細胞が基質上に残存しているかを確認する必要がある。

まず密な細胞間を保護する役割として、細胞膜の表面を保護するような性質により機械的ストレスを低減させること、かつ溶液効果により引き起こされる水分子の移動を制限することで細胞内氷晶形成を阻害するという観点から、生体組織にも存在し、

高い水和力を持つ HA によって細胞を保護できないかと考えた。また細胞と HA との相互作用により細胞の遊走作用を促進する (ref) との報告もあるため、HA と細胞接着因子との関連が考えられたため細胞の残存にも寄与すると考えた。実験の結果、HA による凍結前の予備培養は 6 時間という長時間を要するが、凍結により細胞密度が上昇していても低細胞密度と同程度の生存率に改善された。を維持できることが示された。

高密度単層培養ヒト皮膚線維芽細胞を 0.5%HA 溶液にて 6 時間予備培養を行い、10%DMSO 凍結保護液にて凍結すると、解凍後の細胞生存率は低細胞密度の細胞と同程度に改善された。したがって、HA を使用した予備培養は、生体組織または人工組織のような、高密度に成長した細胞に対し凍結保護効果を増強させた。

以上のように、解凍後の細胞生存率に対する細胞密度の影響は、HA の予備培養による細胞膜内外両方の凍結保護により減少した。これは生体組織または人工組織の凍結保存後の細胞生存率が HA による予備培養により改善され、凍結過程での細胞生存率の改善が可能であることが示唆された。解凍後の細胞の残存率は最適冷却速度から逸脱した時に細胞が残存しやすい可能性が考えられた。しかし、さらに厚みのある組織となると、HA での予備培養は、分子量が大きく、さらなる予備培養時間が延長すると考えられる。また厚みのある組織では、凍結中の熱伝導率が部位ごとに異なり、HA を添加した厚みのある組織が最適な条件で凍結しにくくなると考えられた。そこで厚みのある組織内の温度とその時の冷却速度および解凍後の生存率の関係性について検討を行った。

厚み約 20mm の組織移植材料を模擬した配向単層培養細胞において、模擬的に下部から上部に向かう順序で凍結させた場合の解凍後細胞生存率を検討した結果は以下のことが分かった。

1] 試料の解凍後の細胞生存率は、厚みとして想定された各部位に生じた冷却速度の

温度依存性によって影響を受け、そして、温度制御部から離れるにつれてその影響も大きくなることが明らかとなった。

2) 試料の凍結解凍後の細胞生存率は細胞外凍結による脱水の程度によって影響を受けるので、細胞外凍結が開始する $-7^{\circ}\text{C}$ から細胞内の脱水が終結する $-40^{\circ}\text{C}$ までの温度範囲の平均冷却速度を評価指標として冷却速度に温度依存性を持つ条件で凍結された試料の細胞生存率が記述可能である

以上のことより厚みを持つ生体組織の凍結保存における解凍後生存率の改善について、

- ・ 物理的環境

高密度培養細胞では凍結保存中に細胞同士の接触による機械的ストレスにより生存率に影響を与えるが、細胞同士の接触の緩和により生存率を改善する可能性が示された。

20mm ほどの厚さを持つ組織において、凍結順序によって凍結中の熱伝導率の変化に起因する一時的な冷却速度の変化が影響を与えることは少なく、制御した冷却速度によって試料の細胞生存率の予測が可能であることが示唆された。

- ・ 化学的環境

凍結保護物質のほかに HA を組み合わせることにより、解凍後に高い生存率が得られることが示され、細胞の回収率も改善される可能性が示唆された。

しかし解凍後の細胞機能に変化がないか注意深く見る必要があるとともに、さらなる生存率の改善される物質の探索がさらに必要であると考える。

## 謝 辞

本研究は、北里大学大学院医療系研究科医学専攻医療工学群医用生体工学の馬淵清資教授のもと、終始熱心なご指導ご鞭撻を賜り、お陰をもちまして本論文の完成に至りました。ここに深く感謝の意を表する次第です。

本研究の遂行にあたり、ご指導を頂いた北里大学医療衛生学部生体工学研究室の氏平政伸准教授には、日常の議論を通じ多くの知識や示唆を賜り、また多くの局面にて多大なるご指導ご鞭撻を頂いたことに篤く感謝申し上げます。氏平准教授なくして本論文の完成はありませんでした。誠にありがとうございました。

本研究を進めるにあたり、生体工学研究室の酒井利奈講師には研究の相談やゼミでのアドバイス、大学院での生活などいろいろな局面で御世話になり、篤く感謝申し上げます。

本研究に対する多大なる御助言を頂きました北里大学医学部整形外科学の成瀬康治講師、内田健太郎助教にこの場をお借りして深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり博士課程生活において公私ともに有意義なものを頂いた北里大学医療衛生学部 生体工学研究室の凍結班の皆様に篤く御礼申し上げます。

北里大学医療衛生学部生体工学研究室に関わる全ての皆様に深く感謝の意を表します。

平成 25 年  
岩間 輝

## 参考文献

### 第1章

- (1) 阿曾弘一, 隅田幸男: 低温医学, 1.5臓器, 朝倉書店, (1983), 243.
- (2) C C Bondoc and J F Burke, Clinical experience with viable frozen human skin and a frozen skin bank, *Ann Surg.* 1971 September; 174(3): 371–382.
- (3) 木村昇ら: 組織凍結保存装置の改良に関する研究, 低温医学, 22巻1号(1996), 61-66.

### 第2章

- (4) Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, and Zendejas E (2004) *Cryobiology* 48, 363-371.
- (5) Fisher RL, Hasal SJ, Sanuik JT, Hasal KS, Gandolfi AJ, Brendel K. Cold- and cryopreservation of dog liver and kidney slices. *Cryobiology.* 1996;33:163-171.
- (6) Karlsson JOM and Toner M (1996) *Biomaterials* 17, 243-256.
- (7) McGrath JJ (1984) in *Heat Transfer in Medicine and Biology 2* (eds) Shitzer A and
- (8) Nei T (1967) *Cryobiology* 4, 153-157.346

- (9) Nei T (1968) *Cryobiology* 4, 303-308.
- (10) Nei T (1981) *Cryobiology* 18, 229-237.
- (11) Pegg DE and Diaper MP (1983) *CryoLetters* 4, 129-136.
- (12) Pegg DE, and Diaper MP, Skaer HL and Hunt CJ (1984) *Cryobiology* 21, 491-502. Eberhart RC, Plenum Press, New York, pp. 212-219.
- (13) Routledge, C., Armitage, W.J., Cryopreservation of cornea: a low cooling rate improves functional survival of endothelium after freezing and thawing, *Cryobiology* Vol. 46, No. 3 (2003), pp. 277-283.
- (14) Armitage WJ. Cryopreservation for corneal storage. In: Bredehorn-Mayr T, Duncker GIW, Armitage WJ eds.: *Eye Banking. Developments in ophthalmology*. Basel, Karger, 2009;43:63-9.
- (15) Matsumura, Y., Ujihira, M., Nogawa, S., Kimura, K., Ichikawa, H., Mabuchi, K., Investigation of the influence of cell density of human fibroblasts cryopreserved inside collagen sponges at various cooling rates, *CryoLetters* Vol. 28, No. 5 (2007), pp. 337-346.
- (16) Jason P. Acker, Locksley E. McGann, Cell-Cell Contact Affects Membrane Integrity after Intracellular Freezing, *Cryobiology*. 2000 Feb;40(1):54-63.

### 第3章

- (17) Meryman HT, Williams RJ, Douglas MS. Freezing injury from "Solution Effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*. 1977;14:287-302.
- (18) Mazur P. Freezing of living cells: mechanism and implications. *Am J Physiol*.

- 1984;247:C125-C142.
- (19) Karlsson JOM, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17:243-256.
- (20) Fisher RL, Hasal SJ, Sanuik JT, Hasal KS, Gandolfi AJ, Brendel K. Cold- and cryopreservation of dog liver and kidney slices. *Cryobiology*. 1996;33:163-171.
- (21) Matsumura Y, Ujihira M, Nogawa S, Kimura K, Ichikawa H, Mabuchi K. Investigation of the influence of cell density of human fibroblasts cryopreserved inside collagen sponges at various cooling rates. *CryoLetters*. 2007;28:337-346.
- (22) Fuller BJ. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*. 2004;25:375-388.
- (23) Schlafer M. Pharmacological consideration in cryopreservation. In: Karow AM Jr, Pegg DE eds. *Organ Preservation for Transplantation*. New York: Marcel Dekker; 1981. pp. 177-212.
- (24) Laurent TC, Fraser JRE. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992;6:2397-2404.
- (25) Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242:27-33.
- (26) Iwata H. Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate. *Clin Orthop Relat R*. 1993;289:285-291.
- (27) Liesegang TJ. Viscoelastic substances in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 1990;34:268-293.
- (28) Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum*



- Reprod. 1997;12:1949–1954.
- (29) Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*. 2007;67:1060-1067.
- (30) Turner R, Mendel G, Wauthier E, Barbier C, Reid LM. Hyaluronan-supplemented buffers preserve adhesion mechanisms facilitating cryopreservation of human hepatic stem/progenitor cells. *Cell Transplant*. 2012 Apr:1-27; DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368912X637000>.
- (31) Peer D, Florentin A, Margalit R. Hyaluronan is a key component in cryoprotection and formulation of targeted unilamellar liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1612: 76-82.
- (32) Ujihira, M., Iwama, A., Aoki, M., Aoki, K., Omaki, S., Goto, E., Mabuchi, K., Cryoprotective effect of low-molecular-weight hyaluronan on human dermal fibroblast monolayers. *CryoLetters*. 2010;31:101-111.
- (33) Mabuchi K, Obara T, Ikegami T, Kanayama T. Molecular weight independence of the effect of additive hyaluronic acid on the lubricating characteristics in synovial joints with experimental deterioration. *Clin Biomech*. 1999;14:352-356.
- (34) de Belder AN, Wik KO. Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydr Res*. 1975;44:251-257.
- (35) Knudson W, Chow G, Knudson CB. CD44-mediated uptake and degradation of Hyaluronan. *Matrix Biol*. 2002;21:15-23.
- (36) Tammi R, Rilla K, Pienimäki JP, MacCallum DK, Hogg M, Luukkonen M, Hascall VC,

Tammi M. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem*. 2001;276:35111-35122.

#### 第4章

- (37) Routledge C, Armitage WJ. Cryopreservation of cornea: a low cooling rate improves functional survival of endothelium after freezing and thawing. *Cryobiology*. 2003;46(3):277-83.
- (38) Birtas V, Armitage WJ. Heart valve cryopreservation: protocol for addition of dimethyl sulphoxide and amelioration of putative amphotericin B toxicity. *Cryobiology*. 2005;50(2):139-43.
- (39) Chen F, Zhang W, Wu W, Jin Y, Cen L, Kretlow JD, Gao W, Dai Z, Wang J, Zhou G, Liu W, Cui L, Cao Y. Cryopreservation of tissue-engineered epithelial sheets in trehalose. *Biomaterials*. 2011;32(33):8426-35.
- (40) Jomha NM, Elliott JA, Law GK, Maghdoori B, Fraser Forbes J, Abazari A, Adesida AB, Laouar L, Zhou X, McGann LE. Vitrification of intact human articular cartilage. *Biomaterials*. 2012; 33(26): 6061-8.
- (41) Dong JF, Detta A, Hitchcock ER. Susceptibility of human foetal brain tissue to cool- and freeze-storage. *Brain Res*. 1993;621(2):242-8.
- (42) Karlsson JOM, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17:243-256.
- (43) Matsumura Y, Ujihira M, Nogawa S, Kimura K, Ichikawa H, Mabuchi K. Investigation of the influence of cell density of human fibroblasts cryopreserved inside collagen

- sponges at various cooling rates. *CryoLetters*. 2007;28:337–346.
- (44) Liu B, McGrath JJ. Effects of two-step freezing on the ultra-structural components of murine osteoblast cultures. *CryoLetters*. 2006;27(6):369–74.
- (45) Acker JP, McGann LE. Cell-cell contact affects membrane integrity after intracellular freezing. *Cryobiology*. 2000; 40(1): 54–63.
- (46) Teo KY, DeHoyos TO, Dutton JC, Grinnell F, Han B. Effects of freezing-induced cell-fluid-matrix interactions on the cells and extracellular matrix of engineered tissues. *Biomaterials*. 2011 Aug;32(23):5380-90.
- (47) Farrant J, Walter CA, Lee H, McGann LE. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology*. 1977; 14: 273–286.
- (48) Ross-Rodriguez LU, Elliott JA, McGann LE. Investigating cryoinjury using simulations and experiments. 1: TF-1 cells during two-step freezing (rapid cooling interrupted with a hold time). *Cryobiology*. 2010; 61(1): 38–45.
- (49) Mazur P. Freezing of living cells: mechanism and implications. *Am J Physiol*. 1984;247:C125-C142.
- (50) Wang JH, Yang G, Li Z, Shen W. Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *J Biomech*. 2004;37(4):573–6.
- (51) Umeno A and Ueno S. Quantitative analysis of adherent cell orientation influenced by strong magnetic fields. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. 2003; 2(1): 26–28.
- (52) Ohashi T, Sugawara H, Matsumoto T, Sato M. Surface topography measurement and intracellular stress analysis of cultured endothelial cells exposed to fluid shear stress,

- JSME Intl. J. Series C. 2000; 43: 780–786.
- (53) Zhang X, Gao X, Jiang L, Zhang X, Qin J. Nanofiber-modified surface directed cell migration and orientation in microsystem. *Biomicrofluidics*. 2011;5(3):32007 1-10.
- (54) Chou L, Firth JD, Uitto VJ, Brunette DM. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *Journal of cell Science*. 1995; 108: 1563–1573.
- (55) Altomare L, Gadegaard N, Visai L, Tanzi MC, Farè S. Biodegradable microgrooved polymeric surfaces obtained by photolithography for skeletal muscle cell orientation and myotube development. *Acta Biomater*. 2010;6(6):1948–57.
- (56) Ujihira M, Iwama A, Aoki M, Aoki K, Omaki S, Goto E, Mabuchi K. Cryoprotective effect of low-molecular-weight hyaluronan on human dermal fibroblast monolayers. *CryoLetters*. 2010;31:101–111.
- (57) Meryman HT, Williams RJ, Douglas MS. Freezing injury from “Solution Effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*. 1977;14:287-302.
- (58) Woelders H, Chaveiro A. Theoretical prediction of optimal freezing programmes. *Cryobiology*. 2004; 49: 258–271.
- (59) Tijssen MR, Woelders H, de Vries-van Rossen A, van der Schoot CE, Voermans C, Lagerberg JW. Improved postthaw viability and in vitro functionality of peripheral blood hematopoietic progenitor cells after cryopreservation with a theoretically optimized freezing curve. *Transfusion*. 2008;48(5):893–901.

## 論文目録

## 公刊論文

- (1) Iwama A, Yamada C, Uchida K and Ujihira M, Pre-incubation with Hyaluronan Reduces Cellular Damage after Cryopreservation in Densely Cultured Cell Monolayers, *Bio-Medical Materials and Engineering* **23**, (in press).
- (2) Iwama A, Ishibashi K, Amamori A, Oura K, Tanaka Y, Yamada T and Ujihira M, Effects of Temperature Dependency of Cooling Rate Arising in Thickness Direction during Freezing on Cell Viability in Cryopreservation of Oriented Cell Monolayers Simulating Thick Tissue Implants, *Journal of Biomechanical Science and Engineering* **8**(1) (2013.4), p. 49-62.
- (3) Ujihira M, Iwama A, Aoki M, Aoki K, Omaki S, Goto E and Mabuchi K, Cryoprotective Effect of Low-Molecular-Weight Hyaluronan on Human Dermal Fibroblast Monolayers, *CryoLetters* **31**(2) (2010.4), 101-111.
- (4) Sakai R, Iwama A, Itoman M, Mabuchi K., Rotational stability based on displacements obtained by simulation and measurement when torsion loading is applied to hip stems. *J Orthop Sci.* 2008 May;13(3):248-54.

## 国際会議講演論文

- (1) Iwama A, Saiki Y, Ujihira M, The effect of Cell Orientation Control on the Cell Viability after Cryopreservation in Monolayer Cells Cultured by Arbitrary Cell Densities, Abstracts of the 6th World Congress on Biomechanics (Suntec, Singapore) 2010.8.4, [Abstracts p.488 2010.8].

- (2) Iwama A, Shibuya K, Matsui A, and Ujihira M, Observation of Survival Distribution in Monolayer Cells after Cryopreservation: Influence of Cell Density on Post-thaw Viability, 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Sapporo, Japan) 2009.7.22, [Abstract: *Cryobiology* **59**(3) p.390 No.72 2009.11 (or CRYO 2009 p.123 2009.7)].
- (3) Ujihira M, Iwama A, Aoki M, Aoki K, Omaki S, Goto E, Mabuchi K, Investigation of the cryoprotective effect of low-molecular-weight hyaluronic acid on human dermal fibroblast monolayers, 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Sapporo, Japan) 2009.7.23, [Abstract: *Cryobiology* **59**(3) p.398 No.99 2009.11 (or CRYO 2009 p.146 2009.7)].

## 講演論文

- (1) 山田拓也, 岩間 輝, 氏平政伸, 厚い組織を模擬した配向単層細胞の凍結保存において冷却速度の非線形性が解凍後生存率に与える影響, 日本機械学会 第 23 回バイオフィロンティア講演会 (青森) 2012.10.6, [講演論文集 No.12-47 p.107-108 2012.10].
- (2) 岩間 輝, 川口翔子, 氏平政伸, Xe ガスによる人皮膚線維芽細胞の低温障害に対する保護効果, 日本機械学会 第 22 回バイオフィロンティア講演会 (三重) 2011.10.8, [講演論文集 No.11-14 p.107-108 2011.10].
- (3) 岩間 輝, 田中 侑, 氏平政伸, 厚みのある組織の凍結保存における生存率改善に向けた冷却速度の検討, 日本機械学会 2011 年度年次大会 (東京) 2011.9.12, [講演論文集 CDROM No.11-1 J024022 p.1-3 2011.9].
- (4) 岩間 輝, 山田知依, 氏平政伸, 単層培養ヒト線維芽細胞へのヒアルロン酸添加による凍結保護効果の増強, 第 56 回低温生物工学会大会 (岩手) 2011.7.7, [講演要旨 p.11 2011.7].
- (5) 岩間 輝, 諸泉めぐみ, 氏平政伸, 単層培養細胞の凍結保存において基質の水透過性が最適冷却速度に与える影響, 日本機械学会 第 23 回バイオエンジニアリング講演会 (熊本) 2011.1.9, [講演論文集 No.10-74 p.507-508 2011.1].
- (6) 岩間 輝, 大浦和宏, 氏平政伸, 厚みを持つ組織の凍結保存における解凍後生

- 生存率の改善に関する検討, 日本機械学会 2010 年度年次大会 (愛知) 2010.9.8, [講演論文集 No.10-1 Vol.6 p.153-154 2010.9].
- (7) 岩間 輝, 大浦和宏, 雨森 彩, 氏平政伸, 凍結方向を持つ凍結保存において配向細胞の解凍後の生存率に与える凍結保護物質の浸透圧の影響, 日本機械学会 第 22 回バイオエンジニアリング講演会 (岡山) 2010.1.10, [講演論文集 No.09-55 p.250 2010.1].
- (8) 岩間 輝, 松井俊樹, 氏平政伸, 凍結保存された単層細胞において解凍後の生存率に及ぼす基質の影響, 日本機械学会 第 20 回バイオフィロンティア講演会 (和歌山) 2009.11.7, [講演論文集 No.09-10 p.29-30 2009.11].
- (9) 岩間 輝, 多久 智, 氏平政伸, ヒアルロン酸添加による凍結中の高密度単層細胞における細胞損傷の低減, 日本機械学会 2009 年度年次大会 (岩手) 2009.9.14, [講演論文集 No.09-1 Vol.5 p.19-20 2009.9].
- (10) 岩間 輝, 雨森 彩, 松井 俊樹, 氏平政伸, 配向制御された細胞において凍結方向が生存率に与える影響, 第 46 回日本伝熱シンポジウム (京都) 2009.6.4 [講演論文集 I-311 CD-ROM 2009.6] .
- (11) 岩間 輝, 氏平政伸, 配向制御された細胞において凍結方向が解凍後生存率に与える影響, 日本機械学会 第 19 回バイオフィロンティア講演会 (東京) 2008.9.24 [講演論文集 No.08-30 p.5-6 2008.9].
- (12) 岩間 輝, 氏平政伸, 生体組織の凍結保存を目的とした単層培養細胞の配向制御, 第 47 回日本生体医工学会 (兵庫) 2008.5.10 [講演論文集 Vol. 46 Suppl. 1 p. 114 2008.5].
- (13) 岩間 輝, 渋谷健一郎, 氏平政伸, 凍結保存された単層培養細胞における生存分布の 2 次元観測: 細胞密度と冷却速度の影響, 日本機械学会 第 18 回バイオフィロンティア講演会 (福岡) 2007.10.7 [講演論文集 No.07-35 p.91-92 2007.10].
- (14) 岩間 輝, 氏平政伸, 緩速冷却による細胞の凍結保存において生存率に及ぼす高粘度溶液の効果, 第 46 回日本生体医工学会 (宮城) 2007.4.25 [講演論文集 Vol. 45 Suppl. 1 p. 114 2007.4].
- (15) 岩間 輝, 村谷信太郎, 氏平政伸, 凍結中の細胞同士の接触が解凍後生存率に与える影響, 日本機械学会 第 17 回バイオフィロンティア講演会 (長野) 2006.11.11 [講演論文集 No.06-46 p.25-26 2006.11] .