

学 位 論 文 要 旨

氏 名

岩間 輝



論 文 題 目

「組織の凍結保存における物理的及び化学的環境の構築による
解凍後生存率の改善」

指 導 教 授 承 認 印

馬 渕 清 賀



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

氏 名 岩間 輝

[緒論]

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難治性の疾患に対する治療の開発など、その重要性は非常に高い。こうした医療においては、保存後の臓器、組織、細胞の湿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、保存における臓器、組織、細胞の機能喪失機序の解明や保存の質を改善することが重要である。

移植用臓器を保存する手段の一つとして凍結保存がある。これは極低温で、臓器や組織の代謝機能を停止することにより、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、現時点での凍結保存技術は細胞レベル（懸濁細胞）での成功例は多くあるが、組織レベルでは皮膚や血管、心臓弁などに限定され、厚みを持つ生体組織や複雑な構造の臓器を対象とした凍結保存技術は未だ確立されていない。その要因として、懸濁細胞の凍結保存とは異なり、細胞と組織の構造の違いや熱伝導に起因する冷却速度の変化などの物理的な要因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、培養細胞などで用いられる代表的な凍結保護物質としてジメチルスルホキシド (DMSO) やグルコースがある。しかし解凍後の生存率の良好な凍結保護物質でも問題点として①細胞の浸漬が必要である、②毒性がある、③解凍後に除去処理を必ず行う、などが挙げられる。これらを解決するためには凍結の手順や過程の中で、細胞の周囲環境を改良することにより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の凍結環境を改善することにより、組織の凍結保存の条件をパラメータとした解凍後生存率の改善手段を探ることを目的とした。特に物理的環境として、細胞と組織の構造と解凍後の生存率の関係性および凍結過程での熱伝導に起因する冷却速度変化について、また化学的環境として凍結保護効果を改善することに着目し、組織の凍結保存への手がかりを探る。

[細胞の配向性と解凍後生存率]

細胞と組織の構造的な違いの一つに細胞の配向性がある。再生医療やインプラント技術の発達により作成された人工組織では、細胞をある方向に向けて培養し、向きをそろえることで生体への適合性を高めるといった研究が進んでいる。このような配向された培養細胞を即時利用可能な方法で凍結保存が出来れば、ドナー不足の解消や患者を待たせることなく医療現場に届けるまたはストックさせておくことも可能であり、また高い生体適合性により患者の侵襲も軽減でき、インプラント治療を円滑に行うことができると考えられる。そこで、本実験では、配向させた単層培養したヒト皮膚線維芽細胞についての凍結条件について検討した。

実験試料と条件

ヒト皮膚線維芽細胞 (Cell System- Fb Cells) をダルベコ改変イーグル培地 (DMEM, Invitrogen GIBCO) + 10% ウシ胎児血清 (FBS, Invitrogen GIBCO) + 抗生物質 (Invitrogen GIBCO) を用いて、インキュベータ (SANYO MCO-17AIC) 内で培養 (5% CO₂, 37°C) 後、トリプシンで剥がし、耐水研磨紙 (三共理化学 #1000) にて溝加工した高分子基質 (24 × 24 × 0.2 mm) 上に細胞を 5.0 × 10⁴ cells/cm² の細胞密度で播種し、24 時間および 1 週間培養したものを試料とした。

凍結保護物質として 10% ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて、冷却速度 0.3, 1.0°C/min で凍結実験を行った。

凍結装置

試料室は、培養皿ごと凍結できるように、断熱材 (ダウ加工, スタイロフォーム GK-RB) に試料を入れるための穴 (φ50 × 12 mm) をくりぬいて作製された。培養皿を底面から冷却するため、試料室下部にアルミ板 (55 × 70 × 1 mm) を固定した。アルミ板には熱電対 (CHINO CO60-T, JIS-T) を固定し、培養皿底部の温度を測定した。液体窒素 (槽内) で冷却された銅ブロック上に、カーボン板ヒータ (ニラコ, 50 × 50 × 1 mm) を固定し、ヒータに加える電圧をプログラム調温計 (YOKOGAWA UP750) で制御することにより温度制御を行った。

凍結後の試料は、4 μM Calcein-AM と 2.86 nM DAPI (同仁化学) でそれぞれ生細胞と死細胞を二重染色し、蛍光倒立顕微鏡 (Nikon TE-300- DEF- S) と CCD カメラ (浜松 ORCA- ER) で撮影した。位相差画像と蛍光画像を解析ソフト (Scanalytics Inc. IPLab/Win) に取り込み、画像ソフト (Adobe Photoshop) で合成した。合成した画像から、凍結後の Calcein-AM 陽性細胞数をコントロールの Calcein 陽性細胞数で除して生存率を算出した。

各実験に使用した細胞、凍結保護物質および凍結装置は同様のものを用いている。

結果

非配向制御のものと比べ配向制御した試料は細胞の偏りが少なく、しかも、解凍後の細胞の残存率が高い傾向にあることが示唆された。また配向制御した試料の場合、どちらの冷却速度においても培養時間が長いほうが生存率は高くなった。それに対し、非配向制御の試料では生存率に違いは見られなかった。そして、凍結試料における細胞の残存率は、1 週間培養の冷却速度 1°C/min において高値を示した。

作成された試料の平均細胞密度は 24 時間培養のもの (約 2 × 10⁴ cells/cm²) と比べ 1 週間のものの方が 1.5 倍程度高値を示した。また、剥がれた細胞中からは、生存細胞は見つからなかった。

以上のことから、高密度配向単層培養細胞においては、培養時間 24 時間より 1 週間培養での細胞で、配向の影響が大きく現れ、解凍後の生存率が增加することが明らかとなった。

[凍結過程での熱伝導に起因する冷却速度の変化]

組織には配向性が存在するため、大きい組織になると細胞の向きに対する凍結方向が現れる。この凍結方向が与える解凍後の生存率への影響については、調べられていない。このことから高密度配向単層培養細胞に凍結方向 (垂直および平行) を与え、細胞の向きに対する凍結方向の、解凍後生存率への影響について検討した。

その結果、細胞の向きに対しては、垂直に冷却することにより生存率が改善される可能性が示唆された。しかし、冷却部から離れた部位においては、各冷却速度で生存率が減少する結果が示された。ここで、冷却部から離れた点においては、熱伝導が異なることによる冷却速度の分布が異なることが考えられたため、各冷却速度に対する冷却速度の変化と生存率の関係について検討を行った。高分子基質上に熱電対を置き凍結方向を与えて冷却し、凍結過程の温度変化をデータロガー (Omron RX-40) にて測定した。さらに測定した温度変化から経時的な冷却速度の変化を算出し、生存率と比較し検討を行った。

厚みのある組織や臓器においては、細胞外の氷晶形成に伴う塩濃縮速度による細胞の脱水速度 (細胞膜を挟んだ細胞内外の水の流束) を一定に保つことにより得られる非線形性の冷却曲線が理想とされている (Tijssen et al. 2008)。算出した冷却速度変化を見ると、最適冷却速度である $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ においては、上部に行くに伴い冷却速度の非線形性が見られたが、 0.2 、 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ においては、非線形性だったものの生存率は低くなった。これは、 $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では DMSO 中に細胞が長時間晒された事による生存率の低下や細胞外凍結による溶液効果などの影響と考えられる。また $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ では、冷却部から遠い部位での生存率が他の部位と比べ極端に低下せず、非線形性の冷却速度変化が生存率低下の緩和になったと考えられる。

[凍結保護効果の改善]

凍結中の細胞損傷を防ぐためには、必ず凍結保護物質が用いられる。代表的な凍結保護物質として DMSO などがあるが、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以下でのより遅い冷却速度では、氷晶形成前の未凍結溶液中に細胞が長時間晒されることにより、DMSO の毒性による影響がでる可能性がある。そこで生体内に存在するヒアルロン酸 (HA) に着目した。HA は生体内にも広く分布し、毒性も極めて少なく、水和性が高いといった特徴があげられる。特に高分子量 HA は低分子に比べ水和力が高いため、凍結過程での細胞の損傷を軽減できるのではないかと考えた。そこで本実験では、組織を模擬した高密度単層培養細胞を用いてヒアルロン酸と DMSO を共に利用することで、解凍後の生存率にどのような影響を与えるか検討した。

実験試料と条件

生体組織を模擬するため培養皿にヒト皮膚線維芽細胞を DMEM + 10%FBS + 1%抗生物質を用いて単層培養させたものを実験試料とした。

予備浸漬液として高分子量 (130 万) の HA を用い、濃度を 0.5% に設定した。凍結保護液として、DMEM に DMSO を 10%、FBS を 20% 加えたものと、予備浸漬液を凍結保護液として使用した。凍結実験は、DMSO のみ、0.5% HA を予備浸漬のみ、0.5% HA を予備浸漬後 DMSO (DMSO + HA) で凍結した 3 条件で行った。冷却速度は、 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ と $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ とした。

結果

蛍光顕微鏡にて解凍後の細胞の様子を観察すると、HA のみで凍結した場合には、凍結後も細胞膜が保護されていることが分かるが、Calcein-AM と DAPI の両方が染まっていた。各条件における生存率では、HA だけでは凍結保護効果はほとんど見られなかった。DMSO のみと比べて DMSO + HA の方がどちらの冷却速度においても高い生存率を示した。

これは凍結前に HA 溶液に試料を浸漬することによって、細胞膜の近傍の水和を促進し、凍結時の細胞膜の損傷を防ぎ、さらに細胞の形態維持や細胞の剥がれを防止する作用を示す

と考えられる。また、HA 単独では細胞を生存させるまでの効果は得られなかったが、少なくとも凍結中の細胞膜に対する強力な保護作用があると考えられる。

この結果より高細胞密度単層培養細胞の凍結保存において、凍結保護物質に HA を加えて用いることで、高い生存率が得られることが明らかとなった。

【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、

1. 物理的環境について

- ・ 配向制御と長期間培養、細胞の向きに対する凍結方向などの影響を知ることで、組織における凍結保存の解凍後生存率が改善される可能性を示すことができた。
- ・ 20mm 程の厚さを持つ組織においては、凍結時の冷却速度の変化が生存率に与える影響は小さいことが示された。

このことから、凍結した組織を臨床で用いる際の適合性の促進、生着率の改善に繋がると考えられる。細胞の向きを考慮した凍結保存を行うことで凍結可能な人工組織の開発などに応用できると考えられる。

2. 化学的環境について

- ・ 凍結保護物質に HA と DMSO を用いることで、解凍後に高い生存率が得られる。

組織においても、細胞の剥がれの減少や形態を維持することで、生存率が改善されることが期待される。

以上のことが明らかとなった。