

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05840

研究課題名(和文) 水の構造化による細胞の低温保存における障害低減効果

研究課題名(英文) Effect of damage reduction in cold storage of cells by structurization of water.

研究代表者

氏平 政伸(Ujihira, Masanobu)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：70286392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、水の構造化による物質輸送の抑制効果に着目し、キセノンガス加圧溶解と2つの板材料の表面間に挟まれた薄膜液の2つのアプローチによる細胞の低温保存(温度範囲：-2～6℃)における障害低減効果を細胞レベルで明らかにすることを目的とした。成果として、第1に、キセノンガス加圧溶解により細胞障害を低減出来ることと、最適な加圧圧力(0.5MPa)と温度(4℃)を明らかにし、第2に、細胞の低温保存に2枚のガラス板間に挟み込んだ薄膜液(液厚さ約20μm)を利用することで細胞障害を低減出来ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this subject was to clarify the effect of damage reduction in cold storage (temperature range from -2 to 6℃) of cells by two approaches using pressurized dissolution of xenon gas and thin film solution inserted between the two surfaces of plate material on a cell level by structurization of water, paying attention to the inhibition effect of the substance transportation. As a result, firstly, it was clear that reduction of cell damage could be achieved by pressurized dissolution of xenon gas, and the optimal pressure (0.5 MPa) and temperature (4℃) were found; secondly, it was also clear that reduction of cell damage was achieved by using the thin film solution (approximately 20 micrometers in thickness) between two glass plates at cold storage of the cell.

研究分野：生体熱工学

キーワード：水構造化 キセノンガス 加圧溶解 板状材料表面 薄膜液 低温保存 細胞障害低減効果

## 1 . 研究開始当初の背景

現在、多くの細胞と血管や角膜など一部の生体組織では長期保存の手段として凍結保存が行われている。しかし、凍結に伴う様々なストレスや保護物質添加による毒性が細胞に修復不能な障害をもたらす場合が少なくない。このことから、凍結保存に耐えられない細胞や組織、そして全ての臓器では非凍結環境で保存されている。

また、最近では再生医療の分野で細胞シート工学によるシート状人工組織が作製され角膜や心筋などの移植に用いられようとしているが、移植待ちの最終状態では保護物質除去が困難で少しの損傷も許容されないことから凍結保存は適さない。

これらの保存に適した方法は冷温保存 ( 0 ~ 4 ) であるが、現状の保存可能期間は細胞や組織で 0.5 ~ 2 週間、臓器で 2 ~ 3 日が限度である。需要と供給のバランスを考えると保存可能期間が少しでも長い方が好ましい。よって、冷温保存可能期間の延長を図るための有効な手段の模索が必要である。

冷温保存における細胞生存と機能維持の必須条件としては、代謝の本質である化学反応速度の抑制と能動輸送停止による電解質バランスの喪失など物質不均衡の抑制が挙げられる。冷温保存では温度の効果によってある程度代謝は抑制されるが、物質不均衡に関しては従来の保存液の利用では組成の工夫等の不十分な効果に留まっている。

本研究で解決したい点は、まずは細胞レベルで冷温保存中の物質不均衡による障害を低減する新たな方法を探ることである。つまり、疎水性ガスのキセノン ( Xe ) を利用し保存液中の試料に加圧溶解するか、別のアプローチとして、対象をシート状人工組織に特化した板ガラス等の 2 つの固体表面を利用した薄い液膜によって、細胞内外における水構造化を実現させて物理的に物質輸送を抑制することで、細胞・生体 ( 人工 ) 組織・臓器などの冷温保存における保存期間の延長の可能性を探ることが狙いである。

## 2 . 研究の目的

本研究では、水の構造化による物質輸送の抑制効果に着目し、キセノンガス加圧溶解と固体表面を利用した薄膜液の 2 つのアプローチによる冷温障害低減効果を細胞レベルで明らかにすることを目的とする。そこで、次の 2 つの目標を掲げる。

第 1 に、冷温保存条件で疎水性ガス加圧溶解による水の構造化 ( ガスハイドレート非生成の条件 ) による細胞障害低減効果を明らかにするため、単層培養細胞試料に保存液中で Xe ガスを加圧溶解し圧力と温度をパラメータとして保存し、保存後に細胞活性 ( 生存 ) を評価し、溶解しない場合と比較する。そして、効果的な温度と加圧条件を検討する。

第 2 に、冷温保存条件で固体表面を利用した薄膜水の構造化による細胞障害低減効果を明らかにするため、2 枚のカバーガラスで適切な厚みの薄膜液と共に挟み込んだ単層培養細胞を冷温保存し、保存後の細胞活性を調べ、挟み込まない場合と比較する。このことから、シート状人工組織の冷温保存に有効な手段となり得るかどうかについて基礎的検討を行う。

## 3 . 研究の方法

### (1) 実験用細胞の選定と細胞活性評価

#### 実験用の細胞選定

実験に用いる細胞として熱傷治療に有用なヒト皮膚繊維芽細胞 ( Cell Systems-Fb Cells CS-2FO-101 ) を選定した。予め継代培養 [ 培養液 : Dulbecco's Modified Eagle Medium ( DMEM ) + 10% ウシ胎児血清 + 1% 抗生物質 ] し凍結バイアルで液体窒素中に保存しておいた細胞を解凍する。その後、培養フラスコでコンフルエントになるまでインキュベータ ( Panasonic MCO-19AIC-PJ, 37 , 5% CO<sub>2</sub> ) 内で培養したものを酵素で剥がして試料作製に用いた。

#### 細胞活性の評価

細胞機能の評価法として、テトラゾリウム塩アッセイ ( 同仁化学 Cell Counting Kit-8 : WST-8 ) を用いて細胞活性を評価した ( 条件 : 37 , 5% CO<sub>2</sub>, 1 ~ 2 h ) 。ミトコンドリア脱水素酵素活性による生成物質の水溶性ホルマゼン吸光度を、分光光度計 ( GE Healthcare Gene Quant 1300, 波長 450 nm ) で測定した。試料の冷温保存後の細胞活性回復のため、評価前に試料をインキュベータに 2 時間静置し、培養条件の細胞活性をコントロールとした細胞活性率とした。

### (2) Xe ガス加圧溶解による細胞障害の低減効果と冷温保存期間の延長効果

#### 細胞障害低減効果の温度依存性

研究代表者の先行研究課題 ( 科研費基盤研究 ( C ) 23560241 ) により、Xe ガス加圧溶解による細胞障害低減効果の時間依存性と圧力依存性 ( 4 ) については明らかとなっている。これと追加実験により、加圧溶解の有無によって保存後の細胞活性率に差が付き易い保存時間として、実験における保存時間 ( 18 h ) を決定した。更に、予備実験により Xe ガスの最適加圧圧力 [ 0.5 MPa ( ゲージ圧 ) ] を求めその値を利用した。

Xe ガスを任意の温度 ( - 2 ~ 6 ) と加圧圧力 ( 0.5 MPa ) で試料の保存液 ( DMEM を選定 ) 中に溶解し一定時間 ( 18 h ) 保存した後に細胞活性を評価し、加圧しない場合と比較した。細胞障害低減効果の Xe ガス溶解の圧力依存性と温度依存性を検討した。

実験装置概要を図 1 に示す。細胞を 35 mm 培養皿 ( Iwaki 3000-035, 表面処理有り ) の底面に  $4.5 \times 10^4$  cells/dish で播種して 2 日間単層

培養した。保存液として DMEM を用い各試料に 2 mL ずつ加え、試料 4 個を培養皿ごと重ねて耐圧容器（耐圧硝子工業 TVS-1, 材質 SUS316, 耐圧 10 MPa, 約 100 mL）に入れた。大気圧の空気存在下で Xe ガス（東京レアガス, 純度 99.995%）を加圧圧力 0.5 MPa で暴露した。試料の温度は、恒温水循環装置（ヤマト科学 クールニクスサーキュレータ CTW 801S: 購入設備）で恒温水中に耐圧容器を浸けて保存温度（ $-2 \sim 6$ ）に調節した。試料の保存には冷凍機付インキュベータ（Panasonic MIR-254-PJ: 購入設備）を用いた。実験後、泡の発生と急激な膨張による細胞障害を防ぐため容器内のガスを段階的に減圧した。

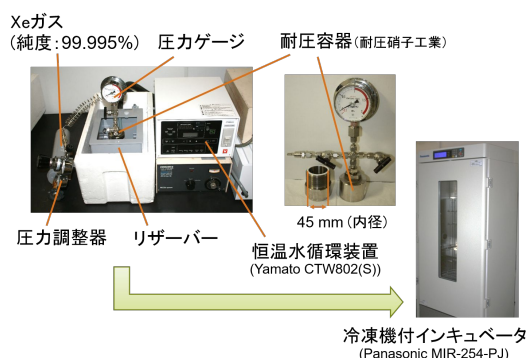


図 1 実験装置概要

### 溶液粘度測定による障害低減効果のメカニズムの検討

試料液体を満した透明耐圧容器（耐圧硝子工業 ハイパーグラスシリンダー HPG-96-3, 耐圧 2 MPa, 容積 96 ml）の円筒管に球（Blookfield Ametek KF Ball Kit, SN 1235, 材質 Boron Silicate Glass, 直径 15.5994 mm, 質量 4.4101 g: 購入品）を自然落下させ、その落下時間をストップウォッチで測定し、ストークスの粘性抵抗の法則を応用した式（JIS Z 8803<sub>2011</sub>「液体の粘度測定方法」）によって簡易的に粘度を算出した。

まず、透明耐圧容器に球を入れ、蒸留水または DMEM（凝固点 約  $-2.5$ ）を満し、Xe ガス（純度 99.995%）を圧力 0（Xe 無し・大気解放）、0.5 MPa で加圧溶解し、 $-2 \sim 4$  の条件で 1 h 静置した。静置後、容器の上下を逆にした時の球の落下時間を測定し粘度を求めた。

次に、透明耐圧容器に球を入れ、蒸留水または DMEM を満し、Xe ガスを 0（加圧せず） $\sim 0.8$  MPa で加圧溶解し、 $4$  の条件で 1 h 静置した。静置後、容器の上下を逆にした時の球の落下時間を測定し粘度を求めた。

### (3) 固体表面による水の構造化と細胞障害低減効果

#### 凍結開始温度の測定

細胞培養用カバーガラス（Matsunami C1210, ポリ-L-リジンコート, 直径 25 mm 厚さ約

0.15 mm）を 35 mm 培養皿（Iwaki 1000-035, 表面処理無し）に置き、DMEM をカバーガラス間の厚さが  $20 \sim 200 \mu\text{m}$ （液量調節  $10 \sim 100 \mu\text{l}$ ）になるように乗せ、別の細胞培養用カバーガラス（Matsunami C1200, 表面コート無し, 直径 25 mm, 厚さ  $0.12 \sim 0.17 \text{ mm}$ ）で挟み込んだもの（薄膜液試料）と、培養皿底面に細胞培養用カバーガラス（Matsunami C1210）を置き DMEM を 3 ml 入れたもの（非薄膜液試料）を試料とした。試料に熱電対（JIS-T）を貼り付けデータロガー（Omron ZR-RX40）に接続後、断熱材に包み  $-80$  の冷凍庫に入れ、温度の時間経過を測定し凍結開始温度（潜熱放出により温度上昇が始まる温度：過冷却のなり易さ）を読み取った。

### 低温保存における細胞障害低減効果の時間依存性

実験試料の作製について図 2 に示す。細胞培養用カバーガラス（Matsunami C1210）を基質として用い 35 mm 培養皿（Iwaki 1000-035）の底面に置き、ヒト皮膚繊維芽細胞（Cell Systems-Fb Cells CS-2FO-101）を基質中心部に  $8.0 \times 10^5$  cells 播種し、インキュベータ内（ $37$ , 5%  $\text{CO}_2$ ）で 24 h 単層培養したものを実験試料とした。

実験試料に保存液として  $5 \mu\text{l}$  の DMEM を加え（液厚さ約  $20 \mu\text{m}$  に設定）、別の細胞培養用カバーガラス（Matsunami C1200）で挟み込んだものを薄膜液試料として作製した（図 2(a)）。比較用として、実験試料を培養皿に細胞培養面を上にして置き細胞培養用カバーガラスで挟み込まずに DMEM 1 ml を入れたものを非薄膜液試料として作製した（図 2(b)）。また、培養条件を同じにした別の試料をインキュベータ内で維持し、コントロールとして用いた。

薄膜液（挟み込み）試料と非薄膜液（挟み込まない）試料を冷凍機付インキュベータ内に  $4$  で  $3 \sim 48$  h 静置した。その後、生細胞の活性を回復させるため冷凍機付インキュベータ内で 1 h 復温後、WST-8 により細胞活性を評価した。

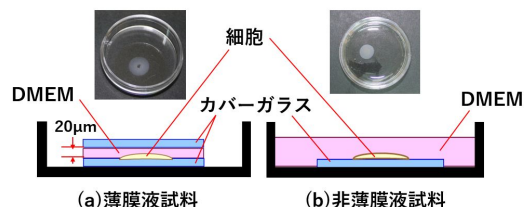


図 2 実験試料の作製

### 低温保存における細胞障害低減効果の温度依存性

薄膜液試料と非薄膜液試料を冷凍機付インキュベータ内に、 $-2 \sim 6$  で保存時間を 18 h として静置し低温保存を行った。この保存時間は予備実験により決定された。その後、生細胞の活性を回復させるためインキュベ

一タ内で 2 h 復温後, WST-8 により細胞活性率を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Xe ガス加圧溶解による細胞障害の低減効果と低温保存期間の延長効果

###### 細胞障害低減効果の温度依存性

低温保存後の細胞活性の温度依存性の結果より(図 3), 本実験の温度範囲において, 4 で Xe ガスを加圧溶解した場合が, 他の温度や Xe ガスを加圧溶解しない(0 MPa)場合よりも細胞活性率は高値を示した。このことから, Xe ガスを 0.5 MPa で加圧し 4 に保つのが最も細胞障害低減効果が高い, つまり, 最適加圧圧力が 0.5 MPa で最適温度が 4 であると言える。よって, この条件において低温保存期間の延長効果が最も高いことが明らかとなった。

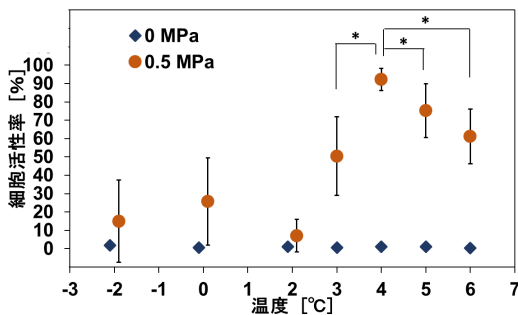


図 3 低温保存後の細胞活性の温度依存性 [Xe ガス加圧溶解有り (0.5 MPa) 無し (0 MPa) の場合のデータをプロット, バーは標準偏差, Mann-Whitney U test \* $P < 0.01$   $n = 12$ ]

##### 溶液粘度測定による障害低減効果のメカニズムの検討

粘度と温度との関係の結果より(図には示されない, 温度範囲 -2 ~ 4 ), 蒸留水および DMEM の粘度における全体的な差は殆ど見られなかったが, 4 において加圧溶解による粘度の僅かな増加が見られた。

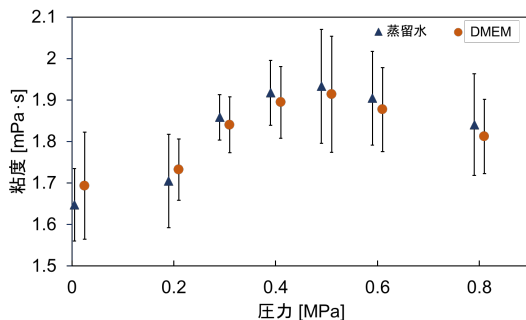


図 4 粘度と加圧圧力との関係 [DMEM と比較のための蒸留水のデータをプロット, バーは標準偏差,  $n = 10$ ]

粘度と加圧圧力との関係の結果より(図 4),

最大粘度が得られたのは 0.5 MPa で加圧したときであり, この加圧圧力において Xe ガスによる水の構造化(束縛による粘度の上昇)の度合いが最も高くなっていることが示唆された。

また, この加圧圧力(0.5 MPa)は, 細胞障害低減効果が最大となる加圧圧力と一致することが分かった。

##### (2) 固体表面による水の構造化と細胞障害低減効果

###### 凍結開始温度の測定

液厚さと凍結開始温度の結果より(図 5), 溶液をカバーガラスで挟み込んだ薄膜溶液において凍結開始温度の低下が確認された。また, 比較的厚い液膜で凍結開始温度の低下が得られた。このことから, 特に 100  $\mu\text{m}$  以下の液厚さで挟み込んだカバーガラス間の溶液中の水はある程度構造化されていると推察される。

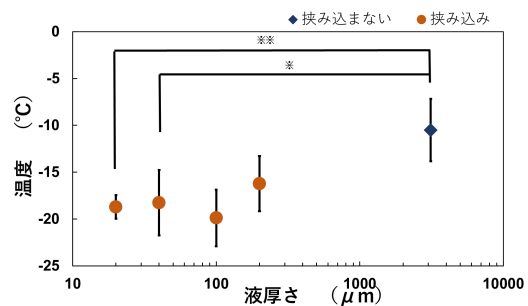


図 5 液厚さと凍結開始温度

[薄膜液(挟み込み)試料と非薄膜液(挟み込まない)試料のデータをプロット, バーは標準偏差, Kruskal-Wallis H test \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$   $n = 5$ ]

##### 低温保存における細胞障害低減効果の時間依存性

低温保存時間と細胞活性率の関係の結果より(図 6), カバーガラスで細胞を挟み込んだ(薄膜液)試料の方が挟み込まない(非薄膜)試料よりも細胞活性率が高くなった。

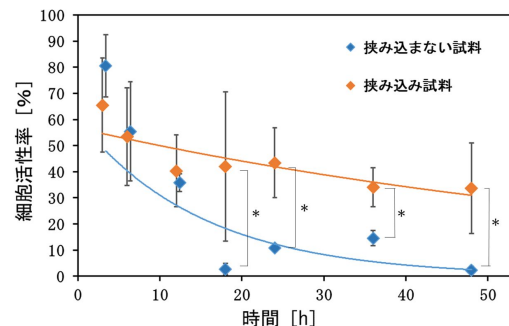


図 6 低温保存時間と細胞活性率の関係 [薄膜液(挟み込み)試料と非薄膜液(挟み込まない)試料のデータをプロット, バーは標準偏差, 近似曲線でフィット, Mann-Whitney U test \* $p < 0.01$   $n = 12$ ]

これは、カバーガラス表面近傍で溶液中の水が構造化(束縛)されたことの影響により、細胞内外の水の移動が抑制されることで、代謝不均衡による障害を低減したためと考えられる。

単層培養ヒト皮膚繊維芽細胞の冷温保存(4)において、2枚のカバーガラスで細胞と共にDMEMを薄膜状に挟み込むことで冷温による細胞障害を低減出来ることが明らかとなった。このことから、細胞の冷温保存における保存可能時間が延長出来る可能性が示唆された。

冷温保存における細胞障害低減効果の温度依存性

冷温保存温度と細胞活性率の関係の結果より(図7)、温度が高くなるにつれて冷温による細胞障害低減効果も僅かに高くなる傾向になった。このことから、単層培養細胞の冷温保存に2枚のカバーガラスに挟み込んだ薄膜液を利用することで、冷温保存温度範囲の比較的高い温度(4~6)において効果的に細胞障害を低減出来ることが明らかになった。

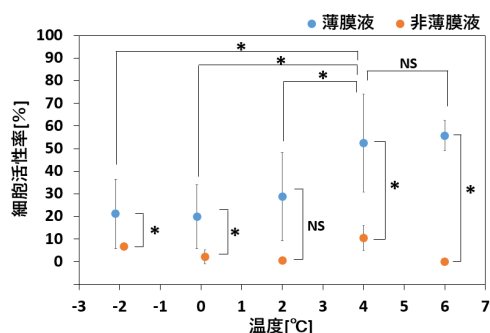


図7 冷温保存温度と細胞活性率の関係

[ 薄膜液試料と非薄膜液試料の場合をプロット, バーは標準偏差, Mann-Whitney U test \* $p < 0.01$   $n=12$  ]

#### 成果のまとめ

キセノンガスの加圧溶解, または, 2枚の板状材料に挟み込んだ薄膜液を利用することは, 前者は細胞レベルの対象の冷温保存において, 後者は特にこれから発展していくと思われるシート状人工組織や薄い生体組織の冷温保存において, それぞれ保存可能期間を延ばす有効な手段になり得る。

これらの成果を組織レベルや臓器レベルの保存対象に適用するためには更なる研究が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 1 件)

Seino K, Sato K, Kawaguchi S, Kiyokawa S, Uchida K, Ujihira M, Protective effects of pressurized xenon gas against cold damage in a cell monolayer, *The Kitasato Medical Journal*,

査読有り, Vol. 46, No. 1, 2016, p. 73-80.

[ 学会発表 ] (計 3 件)

氏平政伸, 秦菜津美, 松下奈央, 酒井利奈, 吉田和弘, 細胞の冷温保存における板状材料を利用した薄膜水による障害低減効果, 日本機械学会 第30回バイオエンジニアリング講演会(京都府京都市・京都大学 2017.12.14) 講演論文集 No. 17-33, p. 130.

秦菜津美, 加茂翔大, 吉田和弘, 氏平政伸, 板状材料を利用した薄膜水の構造化による細胞の冷温障害低減効果, 日本機械学会 第27回バイオフロンティア講演会(北海道札幌市・北海道大学 2016.10.22) 講演論文集 No. 16-64, p.39-40.

松下詩織, 清川沙耶花, 酒井利奈, 氏平政伸, 細胞の冷温保存においてキセノンガス加圧による障害低減効果に及ぼす温度の影響, 日本機械学会 第27回バイオフロンティア講演会(北海道札幌市・北海道大学 2016.10.22) 講演論文集 No. 16-64, p.37-38.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

氏平 政伸 (UJIHIRA, Masanobu)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号: 7 0 2 8 6 3 9 2

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

酒井 利奈 (SAKAI, Rina)  
北里大学・医療衛生学部・准教授  
研究者番号: 1 0 3 8 3 6 4 7

吉田 和弘 (YOSHIDA, Kazuhiro)  
北里大学・医療衛生学部・助教  
研究者番号: 1 0 7 9 1 3 7 9

清川 沙耶花 (KIYOKAWA, Sayaka)

加茂 翔大 (KAMO, Shota)

秦 菜津美 (HATA, Natsumi)

松下 詩織 (MATSUSHITA, Shiori)

井上 みのり (INOUE, Minori)

松下 奈央 (MATSUSHITA, Nao)