

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04222

研究課題名(和文) 低温保存における細胞障害に及ぼす能動輸送停止回避の影響と疎水性ガス加圧溶解の効果

研究課題名(英文) Effects of stoppage evasion of active transport and pressurized dissolution of a hydrophobic gas on cellular damage in cold storage.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の成果として、まず、低温保存中の能動輸送停止の境界温度を探し出すための電気インピーダンス計測法を確立した。そして、低温保存におけるラット心臓横紋筋細胞の能動輸送は6℃で停止が回避されることが示唆された。

次に、低温保存における細胞の能動輸送停止の有無と細胞障害の関連性および境界より高い温度におけるキセノンガスの加圧溶解の有効性を明らかにした。即ち、キセノン加圧溶解が有りの場合は特に4～6℃の範囲において保存時間が24時間までは高い細胞保護効果を示した。更に、能動輸送停止は細胞生存率を大きく低下させる要因となり、その結果として細胞膜の完全性の喪失による絶縁抵抗の低下が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次の3つの意義を合わせて移植医療や再生医療に貢献できる。

1) 低温保存で用いる能動輸送停止温度(0～4℃)に対しそれを回避した温度(6℃)の保存への有効性が示唆された。保存可能時間の延長に繋がる可能性がある。2) キセノンガス加圧溶解は低温保存した細胞に高い保護効果を示すことから、保護物質に用いることで保存可能時間の延長に繋がる。また、保存中のみ効果を働かすことが出来、保存後の減圧で自然除去となることが画期的である。3) 電気インピーダンス計測による能動輸送停止の判別の機序として細胞膜のダメージによる電気的性質の変化が示唆された。これは細胞生存率にも直結するため、生存率評価への利用にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：As a result of this research task, the electrical impedance measuring method for discovering the boundary temperatures of the active transport stoppage under cold storage was established first. And it was suggested to the active transport of the rat heart striated myocyte in cold storage that a stoppage is avoided at 6 degrees C.

Next, the existence of an active transport stoppage of the cell in cold storage, relevance with a cell damage, and the availability of pressurized dissolution of xenon gas at a temperature higher than a boundary temperature were clarified. Namely when pressurized dissolution of xenon gas was performed, specifically, protective effect of cells showed high value at a storage time till 24 hours in the range of 4-6 degrees C especially. Moreover, the active transport stoppage became a factor which reduces the rate of cell viability greatly, and the decrease of the insulation resistance by loss of the completeness of a cell membrane was suggested as the result.

研究分野：生体熱工学

キーワード：低温保存 キセノンガス加圧溶解 能動輸送停止の回避 細胞保護効果 電気インピーダンス計測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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の生体組織では、長期保存手段として凍結保存が行われているが、凍結に伴う様々なストレスや添加保護物質の毒性が少なからず修復不能な細胞障害をもたらす。このことから、凍結保存に不適な一部の細胞や多くの生体組織、全ての臓器では非凍結状態の冷温（通常 0~4℃）で保存されている。しかし、保存数時間後に能動輸送停止に伴う電解質バランス喪失による細胞障害が起こり、結果としてミトコンドリアの損傷 [1] と細胞膜完全性の喪失が顕著となる。そのため、現状の保存可能期間は細胞や組織で 0.5~2 週間、臓器で 0.5~3 日が限度である。需給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。

冷温（< 約 5℃）保存中の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の不均衡による障害の抑制と能動輸送停止による電解質バランス喪失に伴う障害の抑制が挙げられる。前者はより低温であるほど抑制され有利となる。後者は溶液組成の工夫や粘度上昇による物質輸送抑制策が盛んに研究されてきたが効果が不十分である。それとは別の考えとして能動輸送停止の回避があるが、氷温が実用的なためか、或いは、より低温の方が代謝抑制の観点から保存に有利との考えからか、能動輸送が働く温度（約 5℃）の保存に関しては殆ど注目されてこなかった。また、事実として細胞の保存で温度範囲が 5~10℃の方が 0~5℃よりも長期保存可能なことを示す研究結果も散見される [2]。よって、更なる保存可能期間の延長のためには保存温度を再検討する必要がある。

研究代表者はこれまで、疎水性ガスのキセノン (Xe) を保存液中の細胞試料に加圧溶解することによって細胞内外における溶液粘度上昇などによる物質輸送の機械的抑制を利用した冷温保存における保存期間延長の可能性を探ってきた（学振科研費 基盤研究 (C) No. 23560241, No. 15K05840）。成果として、Xe 加圧溶解による冷温に対する細胞障害低減効果（0~4℃において 4 × 0.5 MPa で最大）が明らかとなった [3,4]。従って、境界温度以上の温度で利用しても、この効果が得られる可能性が有る。また、保存温度が高くなればミトコンドリアの損傷低減や Xe の化学的保護作用も期待できる。

冷温保存における保存状態の良し悪しは、能動輸送停止による電解質バランス喪失の有無と程度が関与すると考えられるので、保存中にこのことを知る必要があるが、細胞内外の電解質組成の変化を直接調べることは困難であった。一方、細胞や生体組織の電気インピーダンスの周波数特性を調べると、通常の生存状態では細胞内と細胞外では値が大きく異なることが知られている。従って、冷温保存中の細胞の電気インピーダンス周波数特性を計測することで、電解質バランス喪失の有無と程度を知ることが出来ると考えられるが、これまで調べられていない。

2. 研究の目的

本課題では次の3つのことを検討することを目的とした。

(1) 冷温細胞障害の主要因と考えられる能動輸送停止による電解質バランス喪失の有無と程度、そして能動輸送が停止する境界温度（約 5~10℃の間に存在）について、細胞試料の冷温保存における電気インピーダンス周波数計測により究明し、保存後のミトコンドリア活性による生存率評価と合わせ能動輸送停止と細胞障害との関連性を検討する。

(2) 疎水性ガスとして Xe を選定し、冷温とみなせる温度範囲において加圧溶解による細胞試料保存後の障害低減効果を調べることで、能動輸送停止回避温度における Xe 加圧溶解による冷温保存が保存可能期間延長の有効手段となり得るか検討する。

(3) 電気インピーダンス測定結果について能動輸送の停止と細胞生存率がどのように関わっているかを検証するため、細胞試料を能動輸送が停止すると考えられる 4℃で冷温保存した場合の任意時間保存中の電気インピーダンスの変化を調べ、保存後の生存率をつき合わせて検討する。

3. 研究の方法

【共通の方法】

実験細胞としてラット心臓横紋筋細胞 (ECACC Cell Lines H9c2 (2-1): 消耗品) を用い、電極付きチャンパー (図 1, Alpha MED Scientific Inc. MED プロブ, 中央部に 8×8=64 個の微小電極を配置: 消耗品)、または、35 mm 培養皿の底面に一定数を 24 h 単層培養したものを試料とした。保存液として保存効果の無い培養液(ダルベッコ改変培地)を用いた。

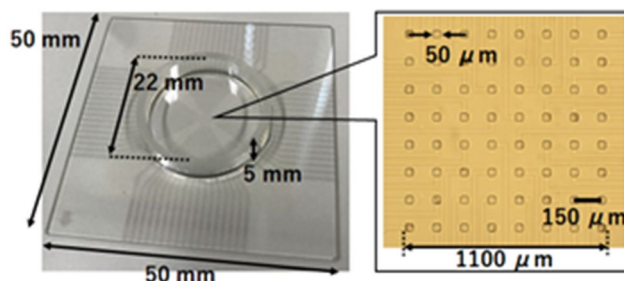


図 1 電極付きチャンパー

試料の保存庫として冷凍機付インキュベータ (Panasonic MIR-254-PJ: 現有) を用いた。冷温保存後の細胞生存率評価としてミトコンドリア活性を調べるテトラゾリウム塩アッセイ (同仁化学 WST-8: 消耗品) を用いた。また、各試料の温度を箔型熱電対 (JIS-T: 消耗品) とデータロガー (日置電機 LR8416-91: 新規購入) で適宜モニターした。予備的測定により、冷凍機付インキュベータ庫内における細胞試料の温度制御分解能として 0.5 °C 以内が確保できていることが確認された。

(1) 電気インピーダンス計測法の確立と能動輸送停止の回避温度の模索

まず、電極付チャンパー細胞試料の電気インピーダンスの周波数特性を計測するシステム (専用計測回路と電極付きチャンパーとのインターフェイス基板の外注: 消耗品) の構築を行った。チャンパー底面の微小電極に対応する 4 電極法 [電流印加 (10 μ A, 10~100 kHz) 2 電極 + 電圧測定 2 電極] とした (図 2)。電気インピーダンス計測用電気回路の設計については、研究協力者である根武谷吾氏 (Posh Wellness Laboratory) の協力を得た。測定データをパーソナルコンピュータに取り込むシステムとした。

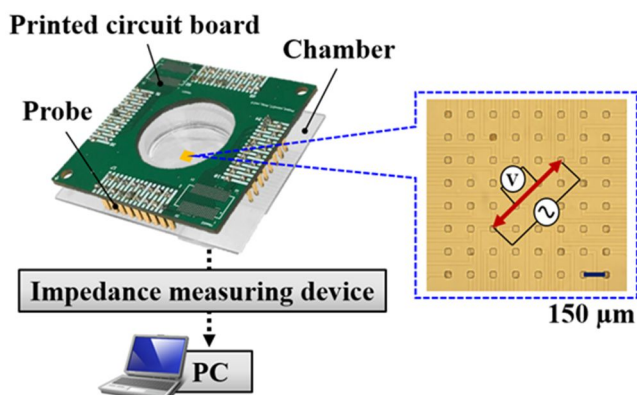


図 2 電気インピーダンス計測システム

次に、冷凍機付インキュベータの庫内で細胞試料の冷温 (4°C) 保存中の電気インピーダンスの時間依存性を調べ、値に違いが得られるか検討し計測法を確立し、測定周波数を決定した (10 μ A, 20 kHz)。同様の方法により 4~7°C, 3~12 h で調べ能動輸送停止の境界温度を探索した。更に、各保存時間における細胞障害の程度を WST-8 で調べ電気インピーダンス測定値 (時間の初期値で規格化した割合で表現) と付き合わせた。

(2) 冷温保存における細胞の能動輸送停止の有無と細胞障害との関連性

Xe 加圧溶解の実験 (3) と保存環境を揃えるため培養皿細胞試料と耐压容器 (耐压硝子工業 TVS-1: 現有) を用い、4~7°C の各温度で試料を培養液中で 0~72 h 冷温保存し 3~24 h おきの保存後の細胞生存率を評価した。

(3) 細胞の冷温保存における Xe 加圧溶解による障害低減 (保護) 効果

加圧溶解する疎水性ガスとして Xe (純度 99.999%) を用い加圧圧力 0.5 MPa (最適条件) とした。培養皿細胞試料と耐压容器 (耐压硝子工業 TVS-1: 現有) を用い、4~6°C の各温度で Xe を加圧溶解した試料としない試料を各保存液中で 0~72 h 冷温保存し 3~24 h おきの保存後の細胞生存率を評価した。ガス加圧溶解の時は恒温水循環装置 (ヤマト科学 CTW 801S: 現有) と恒温槽を用いて耐压容器を保存温度に調節した。そして、保存温度と能動輸送停止の有無、ミトコンドリアの損傷との関係について検討した。

(4) 能動輸送停止または細胞生存率低下と電気インピーダンス変化の関係

電極付きチャンパー細胞試料を能動輸送が停止すると考えられる 4°C で冷温保存した場合の 3~24 h 保存中の電気インピーダンス比率 [10 μ A, 10 kHz (100 kHz に対する比率)] の変化と保存後の生存率を調べた。そして、(1) で得られた能動輸送停止の有無による電気インピーダンス変化の結果と比較した。また、過去の別の研究である加熱処理後の電気インピーダンスと細胞生存率の測定データも利用して、細胞の生死による電気インピーダンスの違いに関わる要因と電気等価回路モデルについて検討した。

4. 研究成果

(1) 電気インピーダンス計測法の確立と能動輸送停止の回避温度の模索

システム構築と予備実験を経て冷温保存中の細胞の能動輸送停止の境界温度を探し出すための電気インピーダンス計測法を確立した。そして、冷温保存におけるラット心臓横紋筋細胞における能動輸送は 6°C で停止が回避されることが示唆された。

このことは、簡易的かつ間接的ではあるが電気インピーダンス計測により細胞の能動輸送の有無が判別可能であることを示唆している。そして、一般的にこれまで言われてきた通り 5 付近に能動輸送停止の境界温度が存在していることを支持している。

【補足説明】

能動輸送が停止すると思われる温度 (4, 5°C) では停止しないと思われる温度 (6, 7°C) よりも時間に依存して電気インピーダンス (20 kHz, 保存時間の初期値である 3 h の値を基に規格化した相対値) が急激に低下する傾向となった (図 3)。なお、図中のデータ数等細かい情報についての説明は省略した。

(2) 冷温保存における細胞の能動輸送停止の有無と細胞障害との関連性

能動輸送停止無しの場合の方が有りの場合よりも 24 h 以内の冷温保存において生存率が高いことが明らかとなった。

このことは、今後、細胞や組織の冷温保存における保存温度の見直しに繋がる可能性があり、能動輸送停止無しの最低温度の 6℃ を利用できることを示唆している。

【補足説明】

4~7℃における細胞生存率はどの温度でも 3 h と比べ 12 h の方が少し低下したが、能動輸送停止有りとみなせる 4, 5℃よりも無しとみなせる 6, 7℃の方が高くなった(図 4)。また、冷温保存 3 h と比べ 12 h 後の電気インピーダンス (20 kHz) の割合は 4℃と 5℃において大きく減少したが、6℃と 7℃ではほとんど減少しなかった。なお、図中のデータ数や統計処理等の細かい情報についての説明は省略した。

(3) 細胞の冷温保存における Xe 加圧溶解による障害低減(保護)効果

Xe ガス加圧溶解が有りの場合は特に 4~6℃の範囲において保存時間が 24 h までは高い細胞保護効果を示した。

このことは、今後、細胞や組織の冷温保存における保護物質として Xe ガスは有効であることを示しており、保存対象に加圧溶解して用いることで保存可能期間の延長が期待できる。

【補足説明】

4~6℃の範囲において保存温度によらず保存時間が 24 h までは高い細胞障害低減効果(または保護効果)を示したが 72 時間では僅かな効果だった(図 5)。図中の Xe ガス加圧溶解有りは 0.5 MPa, Xe ガス加圧溶解無しは 0 MPa である。なお、図中のデータ数や統計処理等の細かい情報についての説明は省略した。

(4) 能動輸送停止または細胞生存率低下と電気インピーダンス変化の関係

能動輸送停止は保存時間 24 h までの冷温保存においては細胞生存率を大きく低下させる要因となり、その結果として細胞膜の完全性の喪失による細胞生存率の低下と電気的性質の変化を反映した絶縁抵抗の低下が示唆された。

このことは、今後、細胞や組織における細胞生存率の非侵襲的かつ即時的な計測法としての電気インピーダンス計測に繋がっていくことが期待できる。

【補足説明】

この成果は(2) 図 4 の結果から明らかとなった。つまり、12 h において能動輸送停止有りとみなせる保存温度の 4, 5℃よりも無しとみなせる 6, 7℃の方が細胞生存率は高くなった。

図には示されないが、4℃の冷温保存における電気インピーダンス比率 [10 kHz (100kHz 値に対する比率)] と細胞生存率の時間依存性については、電気インピーダンスの比率と細胞生存率

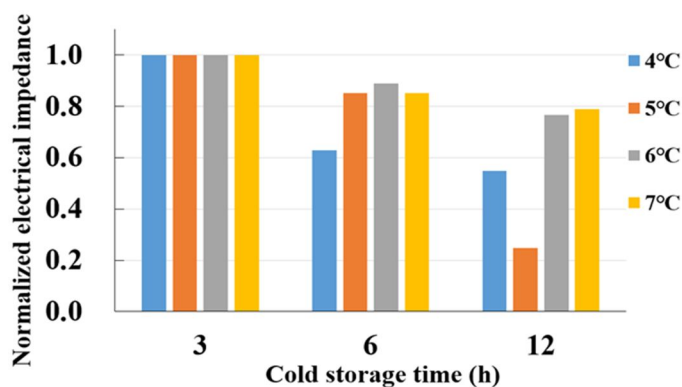


図 3 冷温保存中の電気インピーダンス相対値

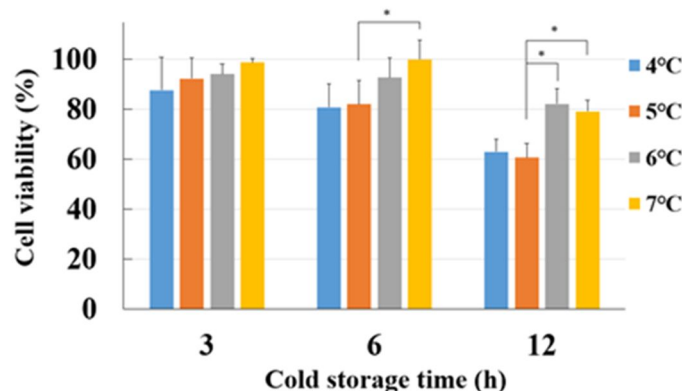


図 4 冷温保存後の細胞生存率

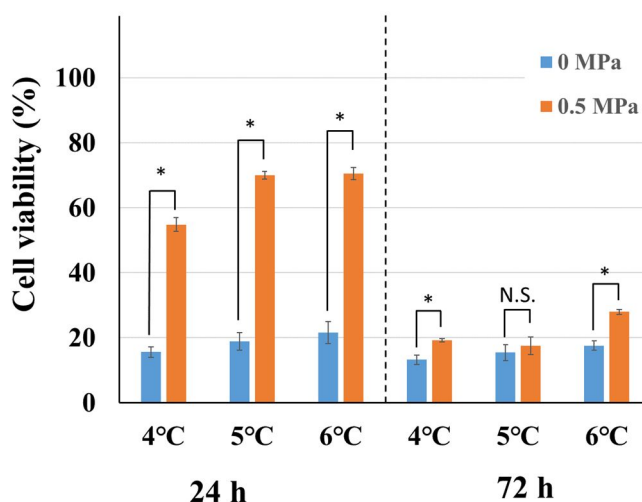


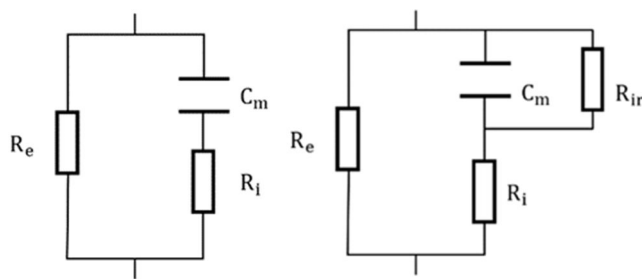
図 5 キセノンガス加圧溶解の細胞保護効果

に相関が見られた。これは、研究代表者の過去の別のテーマの研究における加熱処理による死細胞(処理前の生細胞と処理後の死細胞)で測定された電気インピーダンス比率においても同様の低下が確認された。

そして、本課題で用いた単層培養細胞の電気的特性は生体組織のものと同等とみなせることが明らかとなった(図6)。以前から提唱されてきた生体組織の等価電気回路によると、生細胞(生体組織)の電気等価回路は図6(a)で表される。

本課題と過去の研究の結果を基にすると、死細胞における電気インピーダンスの低下は図6(b)の電気等価回路(仮説)に示すように、細胞膜の電気的性質の変化を反映した絶縁抵抗(R_{ir})の低下として表されることが示唆された。この結果を招く主要因として能動輸送停止が考えられた。

また、図には示されないが、電気インピーダンス比率の周波数特性の結果からは、生細胞が死に至るときに細胞膜の電気容量(C_m)の変化は認められなかった。



(a) 生細胞

(b) 死細胞

[C_m : 細胞膜電気容量, R_i : 細胞内抵抗, R_e : 細胞外抵抗, R_{ir} : 絶縁抵抗]

図6 生細胞と死細胞における電気等価回路

< 引用文献 >

- [1] Schneeberger S, Life of a liver awaiting transplantation, *Nature* 557, 2018, 40–41.
- [2] Uchida T, Nagayama M, *et al.*, Optimal temperature range for low-temperature preservation of dissociated neonatal rat cardiomyocytes, *Cryobiology* 63, 2011, 279–284.
- [3] 氏平政伸, 細胞の低温保存におけるキセノンガス加圧溶解による障害低減, 2018年度 日本冷凍空調学会 年次大会講演論文集, 2018, D224/1-4.
- [4] Seino K, Ujihira M, *et al.*, Protective effects of pressurized xenon gas against cold damage in a cell monolayer, *The Kitasato Medical Journal* 46(1), 2016, 73-80.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujimaki M, Sei R, Yokoseki K, Nebuya S, Sakai R, Yoshida K, Ujihira M	4. 巻 33(4)
2. 論文標題 Distinguishing heat-treated dead cells from viable cells using frequency dependence of electrical impedance.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤巻雅博, 高橋淳彦, 清 来夢, 細川慎也, 吉田和弘, 酒井利奈, 氏平政伸
2. 発表標題 細胞の冷温保存中の能動輸送停止回避が生存率に及ぼす影響とXeガス加圧溶解による保護効果
3. 学会等名 日本機械学会 熱工学コンファレンス 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤巻雅博, 清 来夢, 根武谷吾, 吉田和弘, 酒井利奈, 氏平政伸
2. 発表標題 電気インピーダンス計測を用いた冷温保存細胞のリアルタイム生存率評価の試み
3. 学会等名 第59回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤巻雅博, 細川慎也, 清来夢, 高橋淳彦, 吉田和弘, 酒井利奈, 氏平政伸
2. 発表標題 細胞の冷温保存におけるキセノンガス加圧溶解による保護効果に及ぼす温度の影響
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清来夢, 藤巻雅博, 佐藤弘和, 根武谷吾, 吉田和弘, 酒井利奈, 氏平政伸
2. 発表標題 電気インピーダンス周波数特性を用いた低温保存細胞の生存評価
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sei R, Sato H, Nebuya S, Yoshida K, Sakai R, Ujihira M
2. 発表標題 Evaluation of cell viability during cold storage using electrical impedance measurement.
3. 学会等名 The 11th International Biotribology Forum and the 40th Biotribology Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清来夢, 佐藤弘和, 根武谷吾, 吉田和弘, 酒井利奈, 氏平政伸
2. 発表標題 電気インピーダンス周波数特性計測を用いた細胞の低温保存における生存評価
3. 学会等名 日本機械学会 福祉工学シンポジウム 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤巻雅博, 西室郁哉, 吉田和弘, 酒井利奈, 氏平政伸
2. 発表標題 低温保存による細胞障害に及ぼす温度と能動輸送停止の影響
3. 学会等名 日本機械学会 熱工学コンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤巻雅博, 富樫竜之介, 清来夢, 根武谷吾, 吉田和弘, 酒井利奈, 氏平政伸
2. 発表標題 電気インピーダンスを用いた冷温保存中の単層細胞のリアルタイム測定
3. 学会等名 第60回 日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	根武谷 吾 (Nebuya Satoru)		
研究協力者	藤巻 雅博 (Fujimaki Masahiro)		
研究協力者	清 来夢 (Sei Raimu)		
研究協力者	酒井 利奈 (Sakai Rina)		
研究協力者	吉田 和弘 (Yoshida Kazuhiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------