

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650114

研究課題名（和文） ヒト細胞の新規凍結保存方法

研究課題名（英文） Development of cryoprotectant for human cell

研究代表者

大須賀 敏明 (Osuga Toshiaki)

千葉大学・フロンティアメディカル工学研究開発センター・准教授

研究者番号：80223816

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞の凍結保存には凍害を防ぐために DMSO が添加されているが、副作用が生じる場合もあるため、新規凍結保存剤を開発した。新規凍結保存剤で凍結保存した造血幹細胞を培養して赤血球と白血球へ分化するコロニーの数は DMSO で凍結保存した場合と同等であり、凍結保存液に入れた細胞の生存率は高く、ラットの体内で有害な分子を生じなかったため、新規凍結保存剤は DMSO に劣らない凍結保存剤となることが判明した。

研究成果の概要（英文）：In order to prevent freezing damage for the hematopoietic stem cell, a cryoprotectant DMSO was added. Since side effects are caused by DMSO, a new cryoprotectant was developed. The ability of the new cryoprotectant is not inferior to that of DMSO since the number of the colonies generated by the hematopoietic stem cell where freezing preservation is carried out using the new cryoprotectant is equivalent to the case using DMSO. Since harmful molecules were not produced in the body of a rat, the toxicity of the new cryoprotectant is expected to be low.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	0	2,600,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：造血幹細胞、血液病、DMSO、臍帯血、凍害

1. 研究開始当初の背景

（1）細胞をそのまま凍結すると細胞がつぶれるため、凍結保存剤が添加されている。現在まで白血球の凍結保存剤として使用されてきたジメチル酸化硫黄（DMSO）は、優れた凍害保護作用とともに、副作用も生じることが見逃されてきた。凍結保存された造血幹細胞を解凍して、静脈注射を行う骨髄移植において、DMSO は肝機能傷害やアレルギーを生じ

る場合がある。1970 年代に欧米で DMSO による副作用の報告書が出版されている。硫黄は d 軌道にわずかな確率で存在する電子が、優れた凍害保護作用とともに、反応性を持ち副作用を生じることが推測される。

（2）本研究では DMSO に近い有機分子を分析して、副作用のない新規凍結保存剤を提案した。

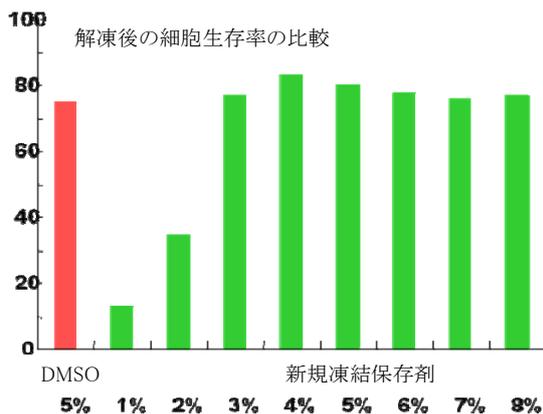
2. 研究の目的

反応性の低い分子を凍結保存剤として使用すると、副作用が低下することは予想されるが、同時に凍結保存剤としての機能も低下する。また同時に生体分子に類似な分子となるために、生体内で通常生じる多様な反応に組み込まれて新たな生成物を生じる。これらの生成物が有害でないことを立証して、毒性の低い凍結保存剤を開発する必要が生じる。

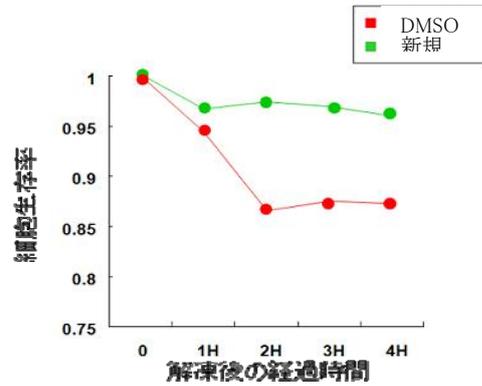
3. 研究の方法

常温で一時間 DMSO と新規凍結保存剤の 5% 溶液を造血幹細胞と接触させる実験では、新規凍結保存剤の方が DMSO より細胞生存率が高く、細胞毒性は低いことが判明した。多様なメチル化酵素は、分子の認識性が高いため、体内で新規凍結保存剤と反応して有害な反応物を生じる可能性は少ない。しかし、凍結保存剤で造血幹細胞を保存するための濃度は DMSO と同じ 5% であり、人体に服用する薬剤よりも極めて高いことも、本研究では最も重視した。5% 濃度の新規凍結保存剤と接触する細胞が異常代謝を行う可能性が、存在しないことを証明する実験を行なった。

ラットに注射して、新規凍結保存剤が、体内で異常代謝をしないことを確認した。この分析に使用する質量分析は高い精度を持つが、コストがかかることが難点である。今後も質量分析を用いた新規凍結保存剤による代謝生産物の検出を続け、新規凍結保存剤が体内で異常な代謝分子を作る可能性がないことを動物実験で重ねて確認してゆく。



上図の左の一例は、DMSO の最適な濃度 5% で凍結した時の解凍後の細胞生存率を示し、右の八例は新規凍結保存剤の濃度を変えて凍結した時の解凍後の細胞生存率を示したグラフである。新規凍結保存剤も DMSO と同様に 4~5% の濃度で凍結保存を行うと、解凍後の細胞生存率が最も高いことがわかる。



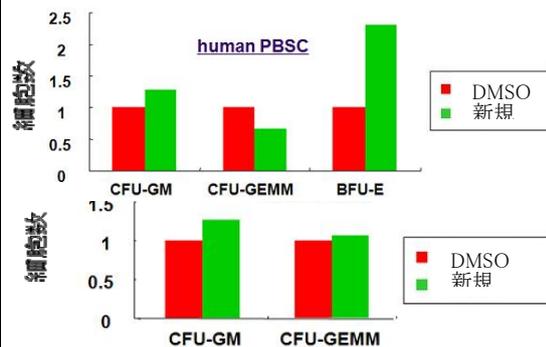
上図において、横軸は解凍後の経過時間で縦軸は造血幹細胞の生存率を示す。下が DMSO の 5% 溶液と常温で接触した細胞の生存率の変化で、上が新規凍結保存剤 5% 溶液と常温で接触した細胞の生存率の変化である。DMSO と接触した細胞は、2 時間以上経過すると 15% 死亡するが、新規凍結保存剤と接触した細胞は 2 時間接触しても死亡率は 3% に留まっている。

凍結細胞を室温で解凍後に移植するまでの時間に、凍結保存剤が細胞を傷害する可能性があるため、この実験を行なった。

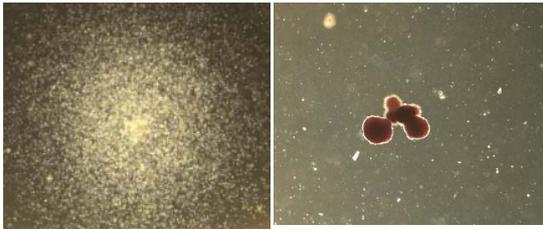
(1) 新規凍結保存剤の有効性の実証

凍結・解凍後の培養コロニー数で判定

凍害保護剤が細胞凍結及びその前後で細胞に与えるダメージは、凍結解凍後に細胞を培養して判定する。ヒト造血幹細胞 PBSC やマウス骨髄細胞 BM を培養すると、赤血球、顆粒球、マクロファージに分化する。解凍後の分化細胞が正常で細胞数が多い場合に、凍害保護剤による細胞へのダメージが少ないと判定する。



上図は、造血幹細胞が分化して形成するコロニーの数を棒グラフとしたもの。BFU-E と書いてあるのは赤血球に分化したコロニーの数で、残りの棒グラフは白血球に分化したコロニーの数である。左が DMSO で凍結し、右が新規凍結保存剤で凍結し、解凍後のコロニー形成数を棒グラフとしたものである。新規凍結保存剤は、DMSO で凍結した場合に比較して、CFU-GEMM (顆粒球のコロニー) を除いては解凍後のコロニー形成数が多い。



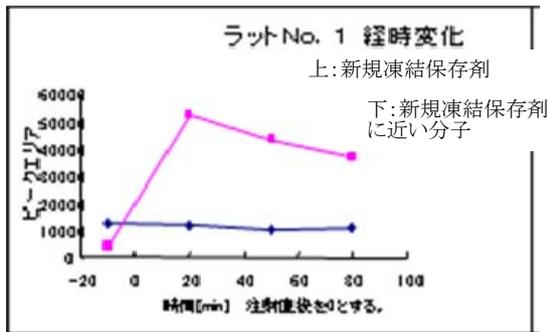
上図は、新規凍結保存剤で凍結保存した造血幹細胞を、解凍した後に細胞培養して分化した白血球（左）と赤血球（右）の画像

(2) 新規凍結保存剤の安全性の実証

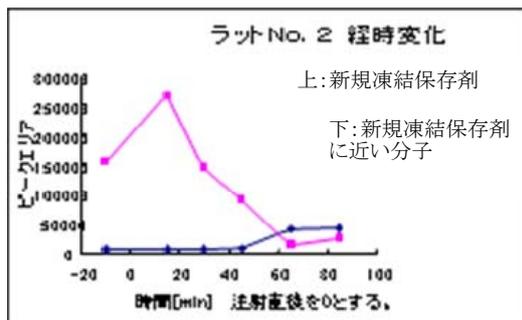
-動物体内で有害物質を作らない

投与した薬剤が体内で生じる代謝物は、ラットの尾から蒸散するガスを微量分析して特定する。採取したガスの質量分析を行えば、体内にはいった凍結保存剤が、有害物質を生じても高感度で検出できる。

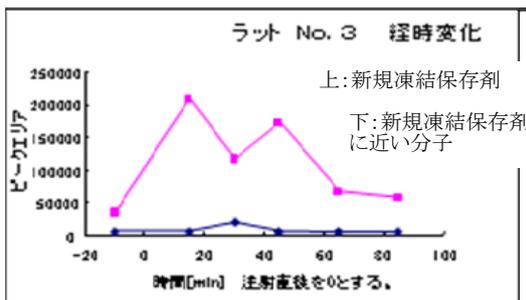
カウント数



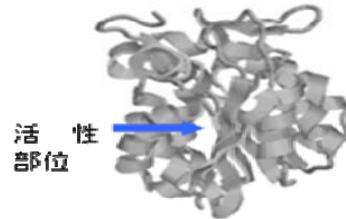
カウント数



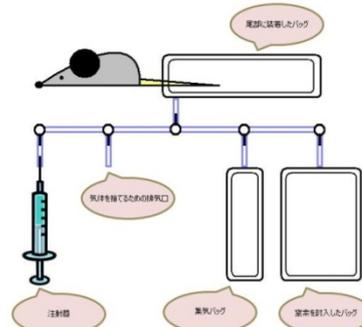
カウント数



上図において、横軸は三匹のラットに新規凍結保存剤を注射してからの経過時間[分]であり、縦軸は尾部から蒸散して検出された分子数である。新規凍結保存剤は、グラフの上の線で示されるように、100分にわたって尾から蒸散することが判明するが、新規凍結保存剤から化学変化してできる有害物質と考えられる分子は下の線のように、検出数は少ない。従って、三匹のラットの尾から蒸散するガスを質量分析した結果、新規凍結保存剤は投与後3時間を経過しても体内で有害な物質を生じないことが判明した。



上図はメチル化酵素の活性部位を示す。体内のメチル化酵素が新規凍結保存剤をメチル化して有害物質を作る可能性は低い。しかし凍結保存剤は、通常の薬剤より濃度が高い。また新規凍結保存剤は DMSO より生体分子に近い分子を採用しているため、通常の代謝経路に組み込まれて有害物質を発生する可能性を慎重に点検する必要がある。



ラットの尾から蒸散するガスを採取して質量分析を行う模式図。

4. 研究成果

従来使われている細胞凍害保護剤 DMSO の毒性を低減した新規保護剤の凍結保存実験の結果、細胞生存率は新規凍結保存剤が DMSO を上回ることがわかった。新規凍結保存剤を投与後長時間が経過しても体内で有害な物質を生じないことが判明した。

凍害保護剤を開発は、臍帯血の凍結保存といった医療だけに留まらず、畜産の品種改良や、食材の冷凍保存など、様々な分野の改良に応用することができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：血液細胞の凍結保存剤

発明者：大須賀敏明、清水直美、中世古知、

田村裕、浅井隆善、高梨美及子

権利者：千葉大学

種類：特許

番号：2009-270830

出願年月日：2009年11月27日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大須賀 敏明 (Osuga Toshiaki)

千葉大学・フロンティアメディカル工学研

究開発センター・准教授

研究者番号：80223816