

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560241

研究課題名(和文) 生体組織レベルの凍結保存を目的としたキセノンガスの細胞生存率改善効果

研究課題名(英文) The improvement effect of xenon gas on cellular viability for cryopreservation of biological tissue

研究代表者

氏平 政伸 (UJIHIRA, Masanobu)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：70286392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、生体組織レベルの厚い試料の低温保存における凍結中の細胞間ストレスによる障害と非凍結の低温自体による細胞障害の低減のためのキセノン(Xe)ガスの有効性を明らかにすることであった。そこで、代表的凍結保護物質のジメチルスルホキシドとXeガス加圧除圧による溶存を併用した際の細胞の凍結過程における障害軽減の増強効果と、4℃における低温自体のストレスに対する細胞への保護効果を検討した。成果として、試料を低冷却速度で凍結した場合に細胞間のストレスによる障害軽減に対するXeガス溶存の有効性が示唆され、非凍結の低温自体による細胞障害の低減にXeガスの加圧添加が有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this task was to clarify the efficiency of a xenon gas in order to reduce the damage by the intercellular stress during freezing and the cellular damage by the low temperature itself under an unfrozen condition in cryopreservation of a sample with a level of thick biological tissue. First, the enhanced effect of reduction of cellular damage in freezing process of a cell with a combination of dimethylsulfoxide as a typical cryoprotectant and pressurized dissolution and decompression of xenon gas was examined. And then the protective effect to the cell against the stress of the low temperature itself at 4 degree Celsius was examined. As a result, when a sample was frozen at a low cooling rate, it was suggested that dissolution of xenon gas was effective in reduction of damage by the intercellular stress, and it was clear that pressurized addition of xenon gas was effective in reduction of the cellular damage by the low temperature itself under an unfrozen condition.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：低温保存 凍結保存 キセノンガス 細胞障害 保護効果

1. 研究開始当初の背景

現在、多くの細胞や血管や角膜など一部の生体組織では凍結保存が成功しているが、臓器では未成功のため冷温保存 (0~4°C) に留まっている。冷温保存の可能期間はせいぜい2~3日であるため、長期保存には凍結保存を成功させる必要がある。細胞や組織の凍結保存に関する研究の趨勢は、成功したものでは手順の最適化や実用化の推進、未成功のものでは凍結解凍過程における損傷機構の究明が行われている。しかし、従来の細胞レベルの知見を組織や臓器の保存に適用することには限界があるので、組織レベル以上の凍結保存方法については新たなアイデアがどうしても必要になってくる。

凍結保存において細胞を生存させるための必須条件として、冷却速度と凍結保護物質 (種類と濃度) の最適条件の決定がある。しかし、組織のように厚みが大きくなると熱伝導の問題により表面と深部で冷却速度に開きが生じ、しかも、選定された凍結保護物質の分子量が大きくなるにつれ深部まで様に浸透させるのが難しくなる。それに加え、組織では凍結過程における細胞の変形や細胞間の機械的ストレスの影響も加わるため生存率が更に低下すると考えられている。

本研究で解決したい点は、厚みのある組織の凍結保存において高生存率が得られる冷却速度範囲を拡大することと凍結中の細胞間の機械的ストレスによる損傷を低減することである (図1)。つまり、凍結保護物質に加えて疎水性ガスのキセノン (Xe) を利用し試料に圧力をかけることで深部まで様なガス浸透を実現し、しかも、細胞内外に水和のクラスターを生成させることによりこれまで冷却速度にシビアに依存していた氷晶形成と温度に頼っていた代謝を積極的に抑制することで、組織の凍結保存における生存に有利な条件を引き出すことが狙いである。

従来のXeガス利用に関する研究としては、臨床におけるガス吸入による脳神経細胞の損傷軽減 (麻酔作用)、室温における植物の代謝抑制、また、低温における細胞保護作用に関する研究も散見される。しかし、これらは主に代謝抑制に着目したものであり、Xeガスが細胞の凍結過程に与える物理化学的影響 (脱水や氷晶形成) を始めとして、凍結

に対する細胞への保護効果や従来の凍結保護物質と併用した場合の相乗効果の有無については全く不明である。

2. 研究の目的

本課題においては、生体組織レベルの厚い試料の低温保存における凍結中の細胞間ストレスによる障害と非凍結の低温自体による細胞障害の低減のためのXeガスの有効性を明らかにすることを目的とした。

具体的には、代表的な凍結保護物質のジメチルスルホキシド (DMSO) とXeガス加圧除圧による溶存を併用した際の細胞の凍結過程における障害軽減の増強効果と、更に、4°Cにおける低温自体のストレスに対するXeガス加圧による細胞への保護効果について基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 凍結保存におけるXeガスの有効性

① 実験試料

本研究では生体組織の厚みの影響の本質を内部に生ずる冷却速度の違いと捉えた。そこで、冷却速度の影響と生存能を調べ易くするため、ヒト皮膚線維芽細胞 (Cell Systems Fb Cells) を35 mm培養皿 (Corning 3294) に 4.5×10^4 cells/dishで24時間 (5% CO₂, 37°C) 単層培養したものを実験試料とした。また、同条件でインキュベータ (Panasonic MCO-19AIC-PJ) 内で維持した試料をコントロールとして用いた。凍結保護液として10% DMSO + ダルベコ改変培地 (DMEM, Life Technologies Gibco) を用いた。

② 実験装置

耐圧容器 (耐圧硝子工業, SUS316, 内容積約100 ml, 耐圧10 MPa) を使用し断熱材で覆った。容器の温度を制御するためカーボン板ヒータ付銅ブロックを断熱材製の液体窒素槽内に置き、その下部を液体窒素で冷却した。プログラム温度調節計 (Yokogawa UP750) と直流電源によりヒータにかかる電圧を制御して温度管理を行った (図2)。

③ 凍結プログラム

生体組織や細胞の凍結保存では2段階凍結法が頻りに用いられる。これは約-40°Cまでの凍結過程を緩やかな冷却速度で制御し (1段階目)、その後冷却速度の制御なしに保存温度 (例えば液体窒素温度の-196°C) まで下げる (2段階目) 方法である。本研究では、実験のやり易さからこの方法の1段階目で評価を行った。その理由は、-40°Cまで緩速冷却すると細胞の脱水がほぼ完全に終了し、それ以下の温度における凍結過程は細胞生存に与える影響が小さいためである。

凍結前にそれぞれの試料の温度の差を小さくするために、-5°Cで30分維持し、0.1,

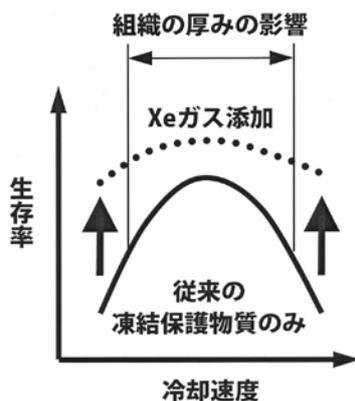


図1 Xeガスに期待される凍結保護効果の概念

0.2°C/min (緩速冷却速度の条件), 0.3°C/min (最適冷却速度の条件), 1.0°C/min (急速冷却速度の条件) の各冷却速度で凍結を行った。凍結過程における細胞の脱水を十分に行わせることと各試料の温度差を考慮し、全ての試料が-40°C以下になるまで冷却するプログラムとした。



図2 試料凍結のための実験装置

④ 試料の凍結

培養した試料を冷蔵庫(4°C)内で15分静置させた。その後、培養液を吸引除去し、凍結保護液を2ml加え、4つの試料を培養皿ごと重ねて耐圧容器内に入れた(図3)。その後、耐圧容器ごと凍結装置に移し-5°Cで15分維持することでDMSOを浸透させ、次に示す条件において凍結を行った。

DMSO のみの凍結 そのまま任意の冷却速度で試料の凍結を行った。

Xe ガス, N₂を加圧・除圧後に凍結 Xe ガス(純度 99.999%), または, N₂(純度 99.9998%)を0.48 MPa(-5°C)の圧力になるように加圧添加し, 15分維持した後に除圧した。減圧は段階的に行い, その後, 任意の冷却速度で試料の凍結を行った(DMSO + Xe, N₂)。ここで, Xe の他に N₂を用いたのはガス加圧自体の影響を調べるためであった。

⑤ 試料の解凍

凍結プログラム終了後, 耐圧容器を凍結装置から取り出し, 恒温水槽(TAITEC, RERSONAL-11)内の37°Cの温水に浸し, 断熱材を取り外し, 耐圧容器を素早く開け, 中の試料4個を培養皿ごと取り出した。それらを恒温層においた銅ブロック上に置き5~7分かけて解凍を行った。

⑥ 細胞の生存評価

試料解凍後の細胞の生存はテトラゾリウム塩(タカラバイオ WST-1)を用い, ミトコンドリア酵素活性による生成物質のホルマザン産生量を測定した。解凍終了後凍結保護液を吸引除去し, DMEM で洗浄後1ml加え, インキュベータ内で2時間静置し復温させた。その後, 実験試料にWST-1を100 µl加え, インキュベータ内で1時間静置し, それぞれの吸光度を分光光度計(GE Gene Quant 1300)により測定した。コントロールは, インキュベータ内で同じ時間静置させたものを用い

た。実験試料の吸光度をコントロールの吸光度で除して, コントロールに対する実験試料の相対活性を細胞活性率として求めた。

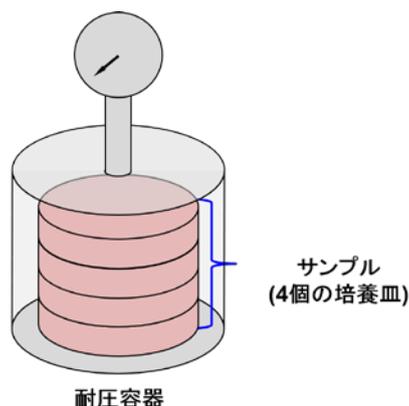


図3 耐圧容器と試料

(2) 低温障害に対する Xe ガスの有効性

① 実験試料

ヒト皮膚繊維芽細胞を用い, 35 mm 培養皿に 4.5×10^4 cells/dishで24時間単層培養したものを試料として用いた(1の実験と同じ)。

② 実験装置と手順

冷温(非凍結)保存実験装置の概観を図4に示す。保存液には, DMEM と University of Wisconsin 液(UW液, アステラス製薬 ピアスパン), ET-Kyoto 液(ETK液, 大塚製薬)を用いた。

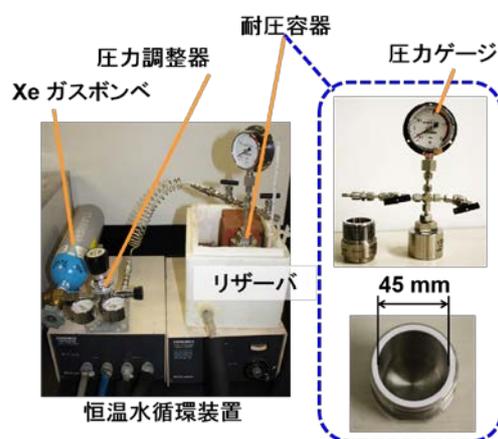


図4 冷温保存実験装置の外観

試料を耐圧容器に入れ Xe ガスを0.5 MPaで加圧添加し4°Cで0~72時間保存した。試料を4°Cに保つため, Xe ガスの加圧添加の時には恒温水循環装置とリザーバを, 保存の時には冷凍機付インキュベータ(Panasonic MIR-254-PJ)を用いた。比較として Xe ガスを加圧添加しないものについても同様に実験を行った。保存終了後段階的に減圧し, インキュベータ内で2時間復温させ, 細胞活性率をWST-1により評価した。また, 0~1.0 MPaの圧力範囲において, 0.5 MPaが最もXeガスによる保護効果が高いことを予備実験

により確認した。

4. 研究成果

(1) 実験結果と考察

① 凍結保存における Xe ガスの有効性

各冷却速度における凍結保存後の細胞活性率を図 5 に示した。この図を基に DMSO のみと Xe を加えた場合を比べるために近似曲線を求めたものを図 6 に示した。

急速冷却条件 (1°C/min) と最適冷却速度条件 (0.3°C/min) で試料を凍結した場合は、Xe の有無による細胞の活性率に差は見られなかった。しかし、緩速冷却速度条件 (0.1, 0.2°C/min) では、細胞活性率は DMSO + Xe の場合において細胞保護効果が増強された。

また、Xe ガスが細胞膜の脂質に付着し、細胞膜を保護することが先行研究により示されている。このことから、本実験結果において、緩速冷却条件 (0.1, 0.2°C/min) において細胞保護効果が増強した理由として、Xe ガスの加圧・除圧による溶存が細胞外凍結に伴う細胞膜近傍の氷晶形成による機械的ストレスから細胞膜を保護し、細胞活性率が向上したと考えられる。

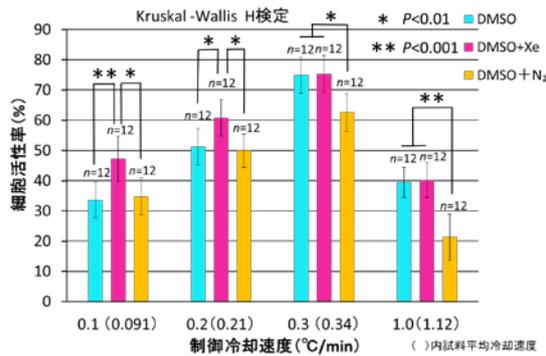


図 5 制御冷却速度と解凍後の細胞活性率

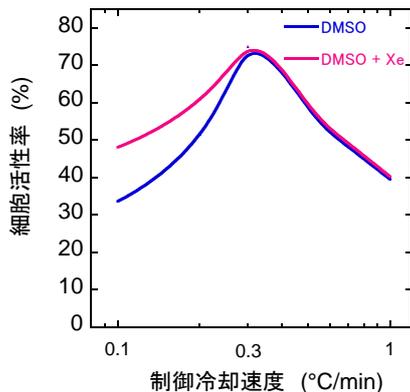


図 6 解凍後の細胞活性率の近似曲線

一方、N₂を用いた凍結保存実験において、DMSO のみの凍結保存より最適冷却速度 (0.3°C/min) 以上の速度条件下で細胞活性率が減少し、緩速冷却条件 (0.1, 0.2°C/min) において細胞活性率に差はみられなかった。この原因は不明であり加圧自体の影響も明確

にならないが、少なくとも最適冷却速度以上の速度では、N₂加圧添加によって細胞内凍結が増加したもので、つまり、保護の増強効果が無く条件によっては DMSO の効果を減ずる作用があることが考えられる。

また、予備実験で Xe ガスを加圧維持し凍結保存を行った解凍後の試料の様子を図 7 に示す。この図に示されるように解凍や減圧時、また減圧終了後にクラスレート融解による気泡が急激に発生し、冷却速度に関わらず細胞活性率は 0% となった (結果は図に示されない)。よって、この方法による加圧維持とクラスレートの生成は、細胞の凍結保存には有用ではないこと示唆された。つまり、加圧維持による凍結方法を確立することは出来なかった。



図 7 加圧維持凍結試料の解凍後の様子

② 低温障害に対する Xe ガスの有効性

図 8~10 に示されるように、DMEM, UW 液, ETK 液どのの保存液においても Xe ガスを加圧添加したものの方がより長時間高い細胞活性率を維持した。このことから、Xe ガスを加圧添加することで水が構造化され、細胞内外の水を束縛することで水の移動が物理的に抑えられ、能動輸送停止による細胞の代謝の不均衡が軽減されたと考えられる。また、この実験の全ての条件においてクラスレートが生成していなかった (液体の状態における水の構造化) ことが減圧後の目視によって確認された。

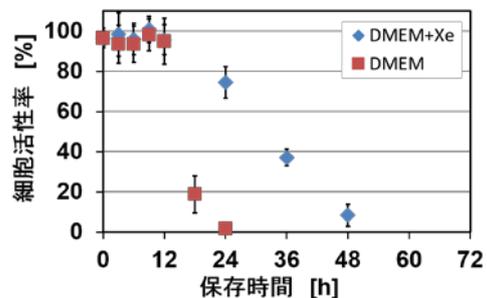


図 8 保存時間と細胞活性率の関係 (DMEM)

本研究で用いた液のうち DMEM と ETK 液は細胞外組成液 (Na⁺ > K⁺) であるが、この二つの液で異なる点は ETK 液には二糖類のトレハロースが含まれることである。過去の研究によると、トレハロースには低温による細胞膜損傷の軽減効果があることから、ETK

液ではこの効果と Xe ガスによる保護効果の相乗効果により DMEM の場合よりも保存期間を延長することが出来たと考えられる。また、UW 液は細胞内組成液 ($\text{Na}^+ < \text{K}^+$) であるが、本研究ではこの液を用いた場合の方が DMEM の場合よりも保存可能時間が短かった。これは、試料として用いた皮膚繊維芽細胞では細胞外組成液の方が保存への相性が良いことが考えられる。

これらのことから、単層培養ヒト皮膚線維芽細胞の冷温保存 (4°C) において、Xe ガスの加圧添加により (但しクラスレート非生成の場合) 高い保護効果をもたらすことが明らかになった。

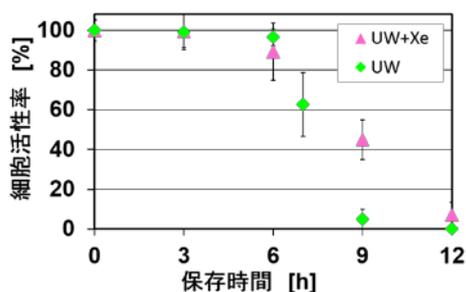


図9 保存時間と細胞活性率の関係 (UW 液)

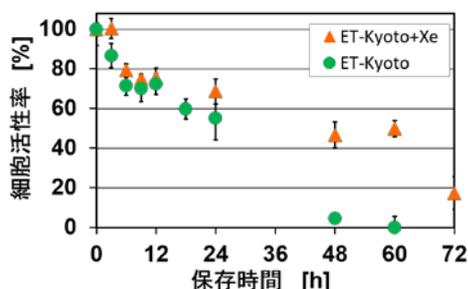


図10 保存時間と細胞活性率の関係 (ETK 液)

(2) 研究成果のまとめ

凍結、非凍結それぞれの低温保存条件において以下の成果が得られた。

- ① 厚みのある生体組織の試料を一様に凍結するためには低冷却速度で凍結させる必要があるが、低冷却速度で凍結した場合に最適冷却速度より低い冷却速度において起こる細胞間のストレスによる障害軽減に対する Xe ガス溶解の有効性が示唆された。この成果は、生体組織レベルの試料の凍結保存における生存率改善に寄与するものと考えられる。
- ② 非凍結の低温自体による細胞障害の低減に Xe ガスの加圧添加が有効であることが明らかとなった (但しクラスレート非生成の場合に限る)。この成果は、生体組織レベルの試料の 0

~ 4°C の冷温保存における保存期間延長に寄与するものと考えられる。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 青野佳菜子, 佐藤 航, 氏平政伸, 細胞の凍結保存におけるキセノンガス加圧添加による保護効果, 日本機械学会 第 24 回バイオフィロンティア講演会 (京都府 京都市 同志社大学 2013.11.2), 講演論文集 No.13-68 p.161-162.
- ② Seino K, Sato K, Ujihira M, Protective Effects of Pressurized Addition of Xenon Gas against Cold Damage in Cell Monolayer, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (in conjunction with 52nd Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering (JSMBE)) (Osaka-shi Osaka-fu Japan, Osaka International Conference Center 2013.7.6), Program Book p. 103.
- ③ 青野佳菜子, 氏平政伸, 細胞の凍結保存におけるキセノンガスの保護効果, 日本機械学会 第 23 回バイオフィロンティア講演会 (青森県 弘前市 弘前文化センター 2012.10.6), 講演論文集 No.12-47 p.105-106.
- ④ 青野佳菜子, 氏平政伸, キセノンガスの加圧添加による細胞の低温障害の低減, 第 57 回低温生物工学会年会 (茨城県 つくば市 つくば国際会議場 2012.6.1), 講演要旨 p.38.
- ⑤ 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 (三重県 津市 アスト津 2011.10.8), 講演論文集 No.11-14 p.107-108.

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・准教授
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