

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18360104
 研究課題名（和文） 生体組織の凍結損傷に及ぼす細胞レベルの熱物質移動の影響
 研究課題名（英文） Heat and mass transfer at cell level associated with tissue injury during freezing
 研究代表者
 高松 洋（TAKAMATSU HIROSHI）
 九州大学・大学院工学研究院・教授
 研究者番号：20179550

研究成果の概要：本研究では生体組織の凍結損傷に関する知見を得ることを目的として、凍結解凍実験および凍結損傷の主要因の一つである電解質濃度上昇に細胞を暴露する浸透圧付与実験を行った。そして、同じ種類の細胞を試料とした二つのモデル、すなわち基板上に付着伸展した培養細胞と単離して溶液中に浮遊した状態の細胞を用いて実験を行い、細胞形態の影響を検討した。その結果、周囲溶液の濃度上昇に伴う脱水収縮特性および凍結解凍後の生存率には有意な差がないこと、および、培養細胞の個数密度が高く細胞間の接着が顕著になると凍結後の生存率が高くなることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：凍結，細胞，物質移動，浸透圧，三次元観察，凍結損傷，生存率，水透過率

1. 研究開始当初の背景

組織や臓器の凍結保存技術や高精度凍結手術の開発には細胞や組織の凍結損傷メカニズムの解明が不可欠である。単離した細胞を浮遊させた細胞懸濁液を凍結させた場合、まず、細胞外で氷晶が形成される。その氷の成長に伴って電解質濃度が上昇し、結果として細胞内外に浸透圧差が生じて細胞が脱水収縮する。緩慢凍結の場合にはこの細胞外電解質の濃縮が細胞損傷の主要因と考えられており「溶液効果」と呼ばれている。温度降

下に伴う電解質濃度の上昇に比べて細胞の収縮が遅いと細胞内溶液の過冷却が増大し、細胞内で氷晶が生成される。急速凍結の場合には、この細胞内凍結が細胞損傷の原因であると考えられている。したがって、細胞の脱水収縮特性は細胞の損傷原因に深く関係している。

上記の知見は、単離した細胞を液に懸濁した浮遊状態の細胞を試料とした実験から得られたものであり、細胞凍結の基礎研究にはこのような細胞懸濁液がモデルとして用い

られる。これに対して基板上に単層培養した細胞では凍結解凍後の生存率が異なるという報告もなされており、浮遊状態の細胞と組織では凍結損傷に至る過程とその要因も異なる可能性がある。しかし、これまでの研究報告では、どちらの凍結耐性が高いかは報告によって異なり、その違いの原因も明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、凍結損傷に重要な影響を与える脱水収縮特性および凍結解凍後の生存率について、基板に接着伸展した培養細胞と浮遊状態の細胞の比較を行い、これらに対する細胞-基質接着および細胞形態の影響を明らかにして生体組織の凍結に関する有用な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞の脱水収縮特性

細胞周囲の電解質溶液の濃度変化に対する細胞の応答を実時間で三次元観察するとともに、細胞の体積変化の測定結果に基づき細胞の浸透的特性を求めた。

① 実験装置および実験方法

図1に示す溶液灌流実験装置を用いて細胞周囲の水溶液の濃度を变化させた。細胞を顕微鏡ステージに設けた灌流チャンバー（幅4mm、長さ40mm、高さ50 μ m）の中に保持し、そこに等張(0.15M)と高張(0.5M)のNaCl水溶液をそれぞれ充填した2台のシリンジポンプを用いて、まず等張液を充填したシリンジから溶液を灌流した後、高張液を充填したもう一方のシリンジからの送液に切り替えてチャンバー内のNaCl濃度を急増させた。そして、共焦点レーザスキャナを用いて2.5秒毎に一連の断層画像を取得した。得られた断層画像に画像処理を施した後、三次元再構築を行い表面積や体積を測定した。なお、実験では温度を23 $^{\circ}$ C一定に保持した。

実験試料にはヒト前立腺癌細胞株PC-3を用いた。浮遊細胞の実験では、細胞を0.15M NaCl水溶液(pH 7.4, 300 mosmol/kg)に懸濁して試料として用いた。一方、付着細胞の実験では、灌流チャンバーの片面のガラスをコラーゲンでコーティングし、この面にシリコンゴム製の堰を用いて10⁴個/cm²の密度で細胞を播種し、18時間以上培養したものを試料として用いた。いずれの場合にも細胞膜の脂質をDiI (Cell TrackerTM CM-DiI)により染色して蛍光観察を行った。

② 細胞膜の水透過率の算出

以下のモデルにより細胞の体積変化を計算し、実験で求めた体積変化の測定値を再現する細胞膜の水透過率を決定した。

細胞の内側と外側の浸透圧差により水だけが細胞膜を透過すると仮定すると、細胞の

体積変化は次式で表せる。

$$\frac{dV}{dt} = -L_p A (\pi_e - \pi_i) = -L_p A R T (o_e - o_i) \quad (1)$$

ここに、 V は細胞の体積、 t は時間、 L_p は水透過率、 A は水透過に寄与する細胞の表面積、 R は一般ガス定数、 T は絶対温度、 π は浸透圧、 o は浸透圧濃度であり、添え字 e および i はそれぞれ細胞の外側と内側を表す。なお、体積変化の過程で水の透過に寄与する細胞膜の面積は一定に保たれると仮定し、付着細胞の場合は、細胞底部の接着面積を除いた表面積を水透過に有効な表面積とした。一方、浸透圧濃度は次式で求められる。

$$o = \sum_{j=1}^n \phi_j \nu_j c_j \quad (2)$$

ここに、 ϕ は浸透圧係数、 ν は溶質1分子から生ずるイオンまたは分子の数、 c は溶質のモル濃度であり、添え字 j は溶質の種類を表す。

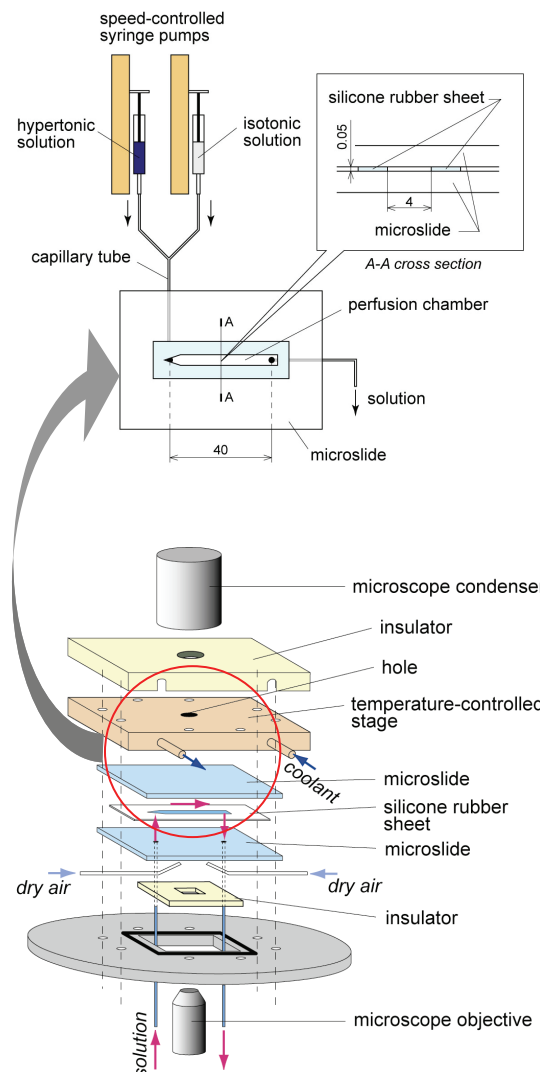


図1 溶液灌流実験装置

細胞が初め等張液（浸透圧濃度 o_0 ）中において体積 V_0 であり、その後、周囲の溶液の濃度が o_e に変化する場合を考えると、細胞内の溶質の保存より

$$o_i(V - V_b) = o_0(V_0 - V_b) \quad (3)$$

を得る。ここに V_b は浸透に不活性な体積であり、細胞内の自由水以外の体積を表す。 V_b および L_p を仮定し、式(1)~式(3)を数値的に解くことにより細胞の体積変化を求めた。

(2) 細胞の凍結損傷

細胞の凍結損傷に及ぼす細胞-基質接着の影響を調べるため、凍結解凍後の細胞の生存率を測定した。低温顕微鏡（図2）を用い、初期温度 -1°C 、凍結温度 -10°C 、凍結保持時間 10 min、解凍速度 50 K/min として、冷却速度が 5 K/min と 50 K/min の場合について実験を行った。

試料には、0.15 M NaCl 水溶液に懸濁した細胞およびコラーゲンでコーティングしたガラス面に 10^4 個/cm² の密度で細胞を播種し 18 時間以上培養した細胞に加えて、 1.3×10^5 個/cm² の密度で播種しほぼコンフルエント状態になった細胞も用いた。細胞の生死判定のため、水溶液中には予めヨウ化プロピジウム (PI) を 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で混入した。

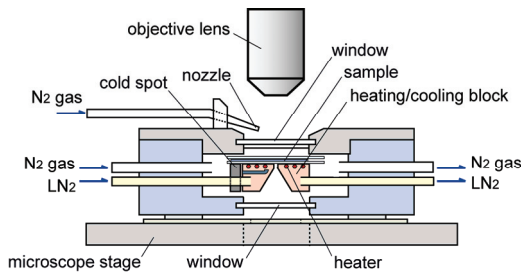


図2 低温顕微鏡

4. 研究成果

(1) 細胞の脱水収縮特性

浮遊細胞および付着細胞の脱水収縮前後の三次元再構築像の例をそれぞれ図3および図4に示す。懸濁液中でほぼ球状の浮遊細胞が周囲の電解質濃度の上昇に伴って全ての方向に収縮しやや歪んだ形状になったのに対し、付着した培養細胞は付着面積がほぼ一定のまま高さ方向にのみ収縮した。なお、どちらの細胞の表面にも凹凸が観察された。

図5は初期体積と水透過に有効な表面積の関係をそれぞれの細胞についてプロットしたものである。図中の実線は最小二乗法により求めた近似直線を示しており、破線は球の体積と表面積の関係を示している。球形に近い浮遊細胞の表面積は球よりやや大きくなった。一方、培養細胞の場合には、全表面積が浮遊細胞より大きいのは自明であるが、水透過に有効な頂端部側のみの表面積は浮遊

細胞とほぼ等しいかやや小さいことが明らかになった。

図6は体積変化の測定例として、ほぼ同程度の初期体積を持つ細胞（浮遊細胞： $6516 \mu\text{m}^3$ 、付着細胞： $6167 \mu\text{m}^3$ ）について初期体積で規格化した細胞の体積を時間に対して示したものである。最終体積の割合は約 8% 浮遊細胞のほうが小さいが、収縮に要する時間はほぼ等しい。図中の実線は実験結果に合うような L_p と V_b/V_0 の値を与えた計算値を示しており、この場合、浮遊細胞では $L_p = 8.2 \times 10^{-14}$

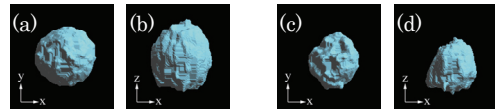


図3 浮遊細胞の三次元再構築画像：初期状態の上面図(a)と側面図(b)、脱水収縮後の上面図(c)と側面図(d)。

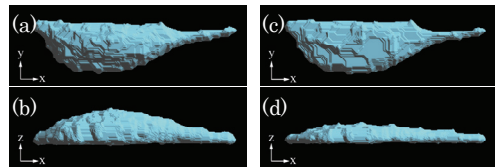


図4 付着細胞の三次元再構築画像：初期状態の上面図(a)と側面図(b)、脱水収縮後の上面図(c)と側面図(d)。

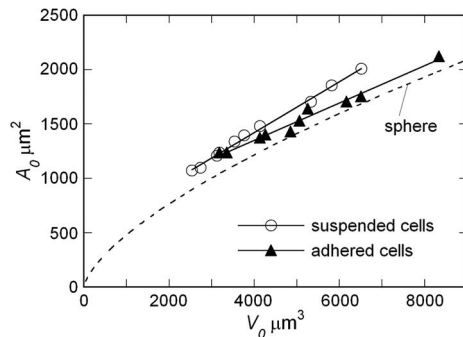


図5 等張液中の細胞の体積と水透過に有効な表面積の関係

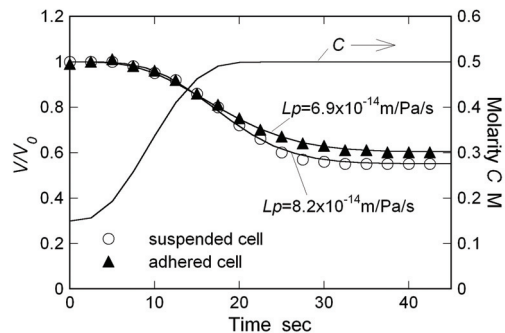


図6 細胞の体積変化の例

m/Pa/s, $V_b/V_0 = 0.33$, 付着細胞では $L_p = 6.9 \times 10^{-14}$ m/Pa/s, $V_b/V_0 = 0.43$ とすれば実験結果と計算結果との二乗平均誤差が最小となった. 同様の測定をそれぞれ 10 個の細胞について行った結果を表 1 に示す. 浮遊細胞と比較して付着細胞の L_p は 11%ほど小さく ($p < 0.05$), V_b/V_0 は逆に 30%ほど大きいという結果が得られた. 膜の水透過率は細胞膜の性質に依存するが, 付着細胞の場合には, 細胞内に形成された細胞骨格が細胞内外の圧力差に対する抵抗となり, 見かけ上の水の透過率が小さくなる可能性が考えられる. しかし, 体積と表面積の測定精度を考慮すると, 浮遊状態と付着状態の細胞の見かけの L_p には有意差がないと考えられる. 一方, V_b/V_0 が付着細胞のほうが大きい原因も, 体積の測定精度の形状依存性に主な原因があると考えられるが, その他の原因については現段階では不明である. なお, L_p に及ぼす細胞体積の影響は認められなかった.

表 1 浸透に関する細胞の性質: 細胞膜の水透過率 L_p , 浸透に不活性な体積 V_b , 初期体積 V_0 , ($n=10$).

	L_p [$\times 10^{-14}$ m/Pa/s]	V_b/V_0	V_0 [μm^3]
Suspended	7.13 ± 0.69	0.354 ± 0.058	4065 ± 1368
Adhered	6.36 ± 0.74	0.519 ± 0.107	4883 ± 1547

(2) 細胞の凍結損傷

図 7 に凍結前の細胞の生存率で規格化した凍結解凍後の細胞の生存率を示す. 浮遊細胞と付着細胞では冷却速度が 50 K/min のほうが 5 K/min の場合より生存率が低くなったが, 冷却速度にかかわらず浮遊細胞と付着細胞の凍結解凍後の生存率には優位差は認められなかった. これに対して, コンフルーエント状態の細胞の生存率は, 冷却速度が違ってほぼ等しかった. そして, 単離細胞と付着細胞より生存率が有意に高く, 特に 50 K/min の場合にその差が顕著であった.

図 8 は細胞内凍結の発生率を示している. 5 K/min では細胞内凍結は発生しにくく, 単離細胞と付着細胞では全く生じていない. これに対して 50 K/min の場合には, 単離細胞と付着細胞では約 40%, コンフルーエント状態の細胞では約 90%で細胞内凍結が生じた. したがって, 単離細胞と付着細胞では細胞内凍結が生じた細胞のほとんどが損傷したのに対し, コンフルーエントではほとんどが細胞内凍結を起こしたにもかかわらずその大部

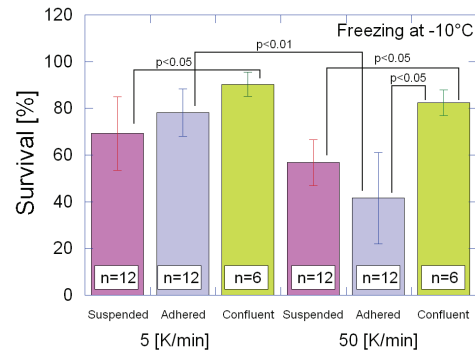


図 7 凍結解凍後の生存率

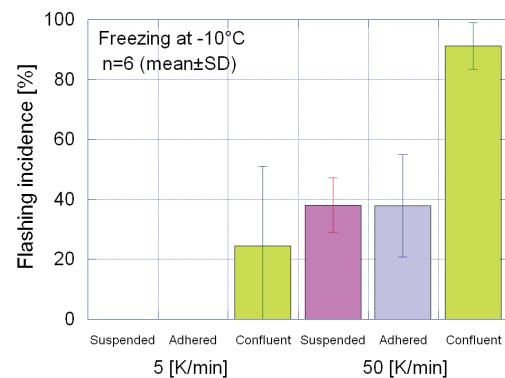


図 8 細胞内凍結の発生率

分が生存することが明らかになった.

(3) まとめ

以上の結果より次の結論を得た.

- 1) 単離した細胞と孤立した培養細胞では, 水透過に寄与する細胞の表面積および細胞膜のみかけの水透過率がほぼ等しいため脱水収縮特性にほとんど差がなく, 凍結解凍後の生存率もほぼ等しい.
- 2) 培養細胞が細胞間接着を有する場合には, 細胞内凍結が生じやすくなるが, それにもかかわらず生存率が有意に高くなる. したがって, 致命的でない細胞内凍結は, 細胞の凍結損傷を抑制する効果がある.

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① T. Yoshimori, H. Takamatsu, 3-D measurement of osmotic dehydration of isolated and adhered PC-3 cells, *Cryobiology* 58, pp. 52-61 (2009) 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

- ① H. Takamatsu, Do cells adhered on a surface differ from isolated cells in

- supercooling of intracellular solution during freezing? 第35回日本低温医学会総会, 2008.11.30, 東京.
- ② T. Yoshimori, H. Takamatsu, Osmotic Response and Injury of Cells in Hypertonic NaCl Solutions; Real-Time 3-D Measurement of Volume Change of Cells, 7th JSME-KSME Thermal and Fluids Engineering Conference, 2008.10.16, 札幌.
- ③ T. Yoshimori, H. Takamatsu, 3-D measurement of osmotic dehydration behavior of PC-3 cells: Suspension vs. adhered cells, CRYO 2008, 45th Meeting of the Society for Cryobiology, 2008.7.23, Charlotte, U.S.A.
- ④ T. Yoshimori, M. Fukagawa, H. Takamatsu, Effect of cell-to-surface interaction on freeze tolerance and osmotic response of cells, ASME 2008 Summer Bioengineering Conference, 2008.6.25, Marco Island, U.S.A.
- ⑤ 吉森崇志, 高松洋, 細胞膜の水透過率と細胞の収縮特性—浮遊細胞と培養接着細胞の比較—, 第45回日本伝熱シンポジウム, 2008.5.21, つくば.
- ⑥ 吉森崇志, 高松洋, 細胞の浸透圧脱水の三次元計測—脱水収縮に及ぼす細胞基質接着の影響—, 日本機械学会第20回バイオエンジニアリング講演会, 2008.1.25, 東京.
- ⑦ 深川正樹, 吉森崇志, 内田悟, 高松洋, PC-3 細胞の凍結損傷に及ぼす細胞基質接着の影響, 第44回日本伝熱シンポジウム, 2007.5.22, 長崎.
- ⑧ 橋口孝, 吉森崇志, 高松洋, 高浸透圧ストレスを受けたPC-3 細胞の生存率—単離細胞と培養付着細胞の比較—, 日本機械学会第19回バイオエンジニアリング講演会, 2007.1.7, 仙台.
- ⑨ T. Yoshimori, H. Takamatsu, Real Time 3-D measurement of dehydration process of cells, CRYO 2006, 43rd Meeting of the Society for Cryobiology, 2006.7.26, Hamburg, Germany.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 洋 (TAKAMATSU HIROSHI)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：20179550

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

住本 英樹 (SUMIMOTO HIDEKI)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30179303