

機関番号：32607  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20560197  
 研究課題名(和文) 凍結による生体組織レベルの細胞膜損傷の評価と保湿剤による損傷低減効果  
 研究課題名(英文) The evaluation of plasma-membrane injury and the effect of a moisturizer on injury reduction in freezing of tissue level  
 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

研究成果の概要(和文)：本研究では、高細胞密度である生体組織レベルの試料における細胞同士の接触状態が凍結解凍過程において細胞膜損傷に与える影響を、配向と細胞密度を制御した単層培養細胞を用いて検討した。更に、保湿剤であるヒアルロン酸の細胞膜近傍の水和による生存率改善の可能性を探った。その結果、細胞密度が高くなると細胞膜損傷が増すこと、そして、細胞配向と凍結順序により損傷程度が異なることが示唆された。更に、ヒアルロン酸に細胞膜への凍結保護効果があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： In this study, influence of the contact state of cells in the sample of tissue level as high cell density on a plasma-membrane injury in a freeze-thaw process was investigated using the monolayer-culture cell which controlled the orientation and the cell density. Furthermore, feasibility of the improvement in cell viability by the hydrate near the plasma membrane of the hyaluronan which is a moisturizer was investigated. As a result, it was suggested that a plasma-membrane injury increased with increasing the cell density, and that the extent of an injury depended on a cell orientation and freezing sequences. Moreover, it is clear that hyaluronan has cryoprotective effect for plasma-membrane.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生体熱工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：生体熱工学，生体組織の凍結保存，ヒアルロン酸，凍結保護効果

## 1. 研究開始当初の背景

近年の移植治療や再生医療の進歩により、生体組織や細胞の需要と供給を満たす凍結保存の重要性が高まっている。現状は、細胞レベルでは多くのもので解凍後に高生存率が得られているのに対し、組織レベルでは血

管や角膜など一部のものしか確立されておらず、しかも、低生存率である。この要因の1つとして、懸濁細胞と組織の構造的違い、即ち、細胞密度の増加に伴う細胞同士の接触機会の増加が挙げられる。しかし、これが凍結解凍後の細胞生存に及ぼす影響とメカニ

ズムについては不明である。

また、仮に細胞密度の増加が細胞外の氷晶形成時に細胞膜損傷の増大を引き起こすならば、ヒアルロン酸（以下 HA と略す）等の保湿剤を添加することで細胞間隙や膜近傍における水和を促進し細胞膜損傷を低減できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体組織を模擬した、配向と細胞密度を制御した単層培養細胞を用い密度上昇に伴う接触状態の違いが凍結解凍過程において細胞膜損傷に与える影響を明確にし、更に、HA による細胞膜近傍の水和による生存率改善の可能性を探ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 配向単層培養細胞の凍結解凍後生存率

- ① 配向制御された単層培養細胞、または、非配向のものについて凍結順序を与えて凍結し（図 1）、解凍後に蛍光画像による生存率の測定を行った。
- ② 配向制御された単層培養細胞、または、非配向のものを凍結し、解凍後に蛍光画像による生存分布の観測と全体的生存率測定を行った。

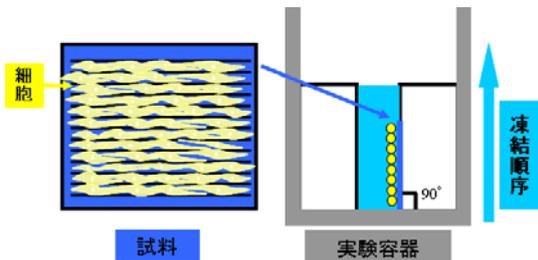


図 1 配向試料と凍結順序の概念

#### [方法の詳細]

研磨紙で溝加工し滅菌された細胞培養用高分子基質（Nunc Thermanox, 24 × 24 × 0.2 mm, 高圧蒸気滅菌済）表面上でヒト皮膚繊維芽細胞を  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で 24 h 培養（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）し配向試料とした。

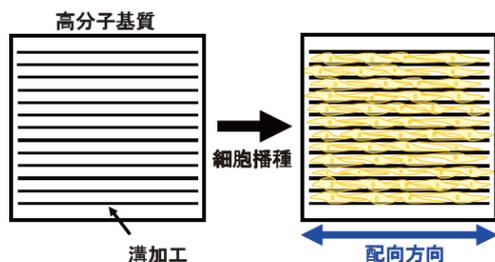


図 2 試料の配向制御

試料 1 枚に凍結保護液 [10% ジメチルスルホキシド (DMSO) 含有培養液 (培養液:

ダルベコ改変培地)] を加え、図 3 に示すように細胞の配向に対し方向を与えて一次元的な凍結順序を実現し、図 4 に示す装置により冷却速度 0.3°C/min (4°C ~ -80°C) で -185°C 以下まで凍結させた。

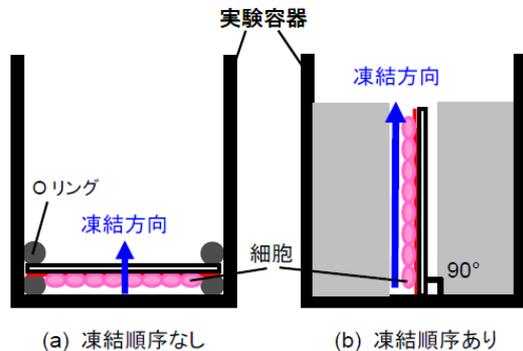


図 3 試料と凍結順序

その後、試料を解凍し、生細胞の細胞質と死細胞の核をそれぞれ Calcein-AM と DAPI（同仁化学）で蛍光二重染色し、蛍光倒立顕微鏡（Nikon TE-300-DEF-S）とデジタル CCD カメラ（浜松ホトニクス ORCA-ER）を介し、パーソナルコンピュータの画像処理・解析システム（Scanalytics Inc. IP Lab/ Win Ver. 4.0.1）に蛍光画像と位相差画像を取り込み合成し、生死細胞数から生存率を算出した。

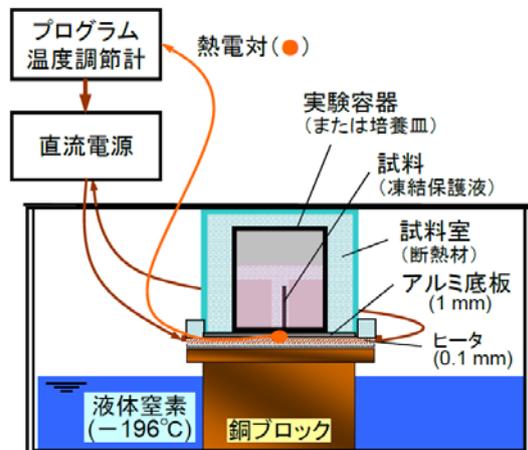


図 4 試料の凍結装置

### (2) HA 添加による生存率改善効果

- ① 非配向の単層培養細胞 (35 mm 培養皿,  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) を用い、低分子量 HA [ナトリウム塩, 分子量 約 3 万, 濃度 0, 0.5, 5% (0% は培養液のみの場合)] を加えた液における凍結 (予備培養時間 4 h, 冷却速度: 3°C/min) 解凍後の細胞膜完全性を調べた。
- ② 細胞外の HA を除去した場合の凍結解凍後の細胞膜完全性を調べた (5% HA,

予備培養時間 6 h, 冷却速度 3°C/min). 予備培養の条件で, 蛍光物質の Fluorescein Isothiocyanate 標識 HA (HA 分子量 約 10 万, 濃度 1%) の細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡により調べた.

- ③ 高分子量 HA (分子量 約 130 万, 濃度 0.5wt%) と細胞膜透過型の凍結保護物質である DMSO (濃度 10%) を併用した場合に凍結保護効果が増強されるかどうかについて非配向の単層培養試料 (冷却速度: 0.3, 3°C/min) で調べた. また, 蛍光二重染色による細胞の生存を検証するため, 試料の全体的な細胞のミトコンドリア活性によるホルマザン産生量 (タカラバイオ WST-1) を分光光度計 (GE GeneQuant 1300: 購入設備) により調べた.

なお, 試料の凍結装置と凍結解凍後の細胞生存率の評価の装置は, (1) と同様であった.

#### 4. 研究成果

##### (1) 配向単層培養細胞の凍結解凍後生存率

- ① 高細胞密度の配向単層培養細胞では細胞の配向に対し垂直に凍結順序を与えて冷却することにより生存率が改善されることが示唆された (図 4 参照). 結果の詳細を次に記す.

[図 4 の説明: 縦軸にコントロールに対する相対生存率, 横軸に各試料をとった (基質に垂直に凍結した試料→①非配向, ②配向; 基質に平行に凍結した試料→③非配向, ④配向に平行, ⑤配向に垂直). バーは標準偏差である. 溝の存在, 即ち, 配向制御は生存率には影響を与えず, 配向に対し垂直方向に凍結したものが比較的相対生存率が高くなった.]

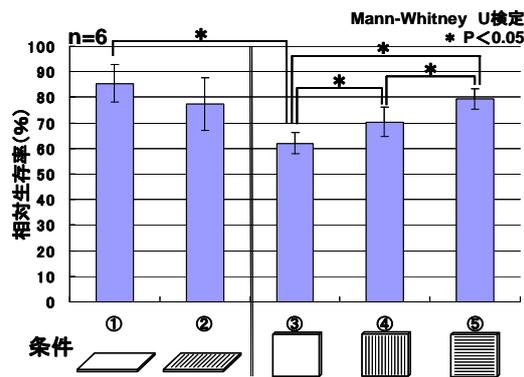


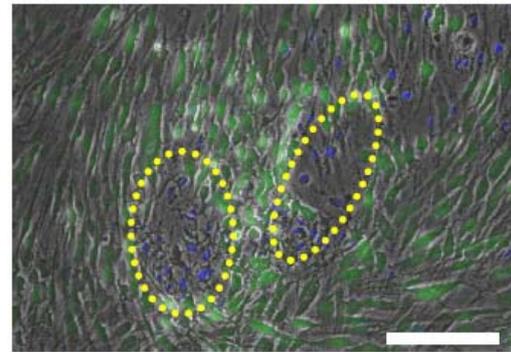
図 4 配向・非配向試料の凍結順序と凍結解凍後の細胞生存率

- ② 高細胞密度の非配向単層培養細胞では局所的な細胞密集により生存率が低くなったが (図 5 参照), 配向させ

た細胞の方が非配向細胞と比べ全体的な生存率が高くなった (図 6 参照). 結果の詳細を以下に記す.

[図 5 の説明: 黄色の点線で囲った細胞密集部では死細胞 (青色: DAPI 陽性) が多く見られた.]

[図 6 の説明: 縦軸に凍結解凍後のコントロール (非凍結試料) に対する相対細胞生存率, 横軸に試料の細胞密度をとった (n=6). 左側は非配向試料, 右側は配向試料である. どの細胞密度でも配向試料の方が非配向試料よりも相対生存率が高くなった.]



0.1 mm

図 5 非配向試料の凍結解凍後の様子 (冷却速度 0.3°C/min)

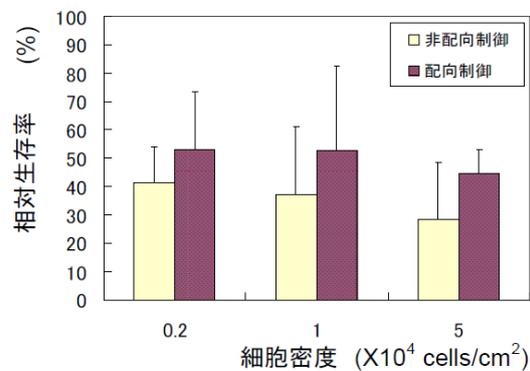


図 6 配向・非配向試料の凍結解凍後の細胞生存率

##### (2) HA 添加による生存率改善効果

- ① 低分子量 HA に凍結保護効果があり, 適切な濃度で用いることで凍結保存における細胞膜の完全性が維持されることが示唆された (図 7 参照). 結果の詳細は次に記す.

[図 7 の説明: 縦軸にコントロールに対する相対膜完全率, 横軸に HA 濃度をとった (P < 0.05, n = 6, トリパンプルー排除試験法による細胞膜の

完全性の評価). バーは標準偏差である. HA 濃度の増加に依存し相対膜完全性は高くなった.]

- ② 高分子量 HA の細胞内における損傷低減効果が明らかとなった. また, 蛍光 HA の細胞への取り込みが観察されたことから, 保護効果には細胞膜への作用と貪食による細胞内への作用が関与していることが示唆された (図 8, 図 9 参照). 結果の詳細を次に記す.

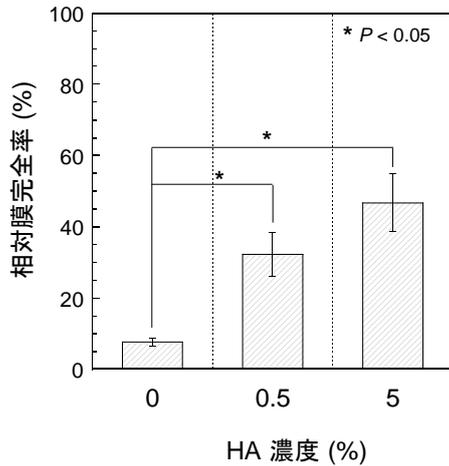


図 7 低分子量 HA 濃度と凍結解凍後の相対膜完全率の関係

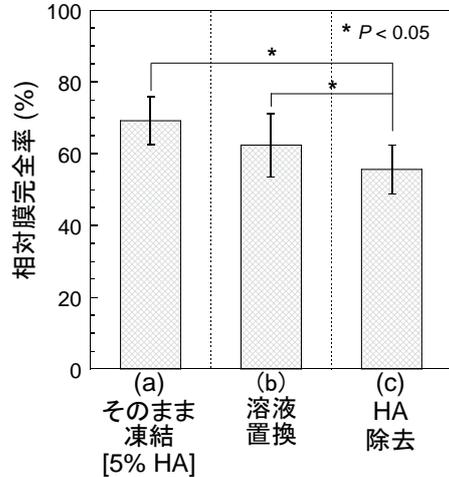


図 8 低分子量 HA を 6 h 浸漬後の除去と凍結解凍後の相対膜完全率の関係

[図 8 の説明: 縦軸にコントロールに対する相対膜完全率を, 横軸に各条件をとった. 条件は, 左から 5% HA に 6 h 浸漬後そのまま凍結させた試料, 真ん中は HA 浸漬後に浸漬液を培養液に置換し凍結させた試料, 右は HA 浸漬後 HA を洗浄除去し培養液で凍結させた試料, である. 凍結解凍後の生存率は(a)の状態と(b)の状態では同じで,

(c)の状態ではわずかに低くなった. このことから, 細胞の凍結に対する HA の保護効果は細胞内と細胞膜双方にあることが示唆された.]

[図 9 の説明: 上側は位相差画像で, 下側は同位置での蛍光画像である (a) HA に 6 時間浸漬直後; (b) 浸漬液除去後; (c) HA を洗浄除去後). 図中(c)下においては, HA が細胞内に取り込まれ細胞質が光っているのが観察された.]

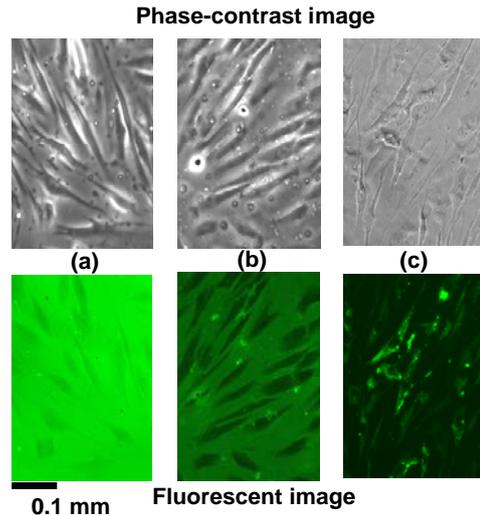


図 9 低分子量 FITC 標識 HA を 6 h 浸漬後の細胞の蛍光画像

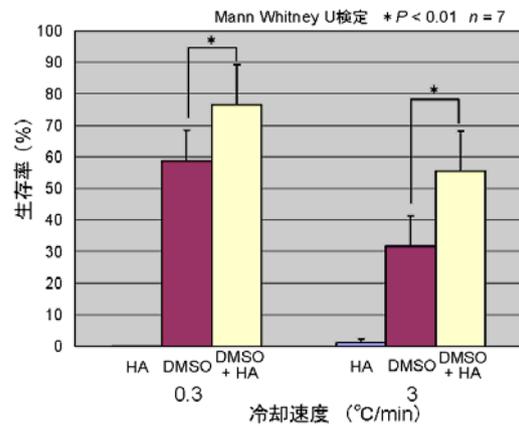


図 10 高分子量 HA を添加した試料の凍結解凍後の細胞生存率

- ③ DMSO のみの凍結と比べ HA を加えた試料の方が, 凍結解凍後の細胞生存率が高くなった (図 10 参照). 詳細は図 5 の説明に記す. また, 凍結解凍後の細胞残存率も同様の傾向を示した (図には示していない). このことから, HA は細胞内で氷晶抑制効果を示し, しかも, 細胞外で細胞膜保護効果

や示していると考えられた。

[図10の説明：縦軸に凍結解凍後の細胞生存率、横軸に冷却速度をとった (n=7; 左から HA 浸漬後そのまま凍結, DMSO 中で凍結, HA 浸漬後 DMSO 中で凍結). DMSO を単独で用いた場合よりも, ヒアルロン酸を添加したものの方が生存率は高くなった. また, ヒアルロン酸のみでは非常に生存率が低く, WST-1 による細胞活性も非常に低かった.]

### (3) まとめ

細胞密度が高い組織レベルの凍結保存対象においては、凍結させる順序と細胞の配向方向を選ぶことで生存率が改善されることが示唆された。更に、保水剤であるヒアルロン酸を利用すると細胞膜損傷と細胞内凍結を低減し生存率が改善されることが明らかとなった。これらのことから、組織レベルの試料に対する細胞の配向を考慮した凍結方法と保湿剤の利用した細胞膜低減による生存率の改善が期待される。

## 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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Masanobu Ujihira, Akira Iwama, Makie Aoki, Kanako Aoki, Sayaka Omaki, Erika Goto, Kiyoshi Mabuchi, Cryoprotective Effect of Low-Molecular-Weight Hyaluronan on Human Dermal Fibroblast Monolayers, *CryoLetters* 査読有り, Vol. 31 No. 2, 2010, 101-111.

[学会発表] (計10件)

- ① 岩間 輝, 諸泉めぐみ, 氏平政伸, 単層培養細胞の凍結保存において基質の水透過性が最適冷却速度に与える影響, 日本機械学会 第23回バイオエンジニアリング講演会 (熊本 2011.1.9), 講演論文集 No.10-74 p.507-508.
- ② 岩間 輝, 大浦和宏, 氏平政伸, 厚みを持つ組織の凍結保存における解凍後生存率の改善に関する検討, 日本機械学会 2010年度年次大会 (愛知 2010.9.8), 講演論文集 No.10-1 Vol.6 p.153-154.
- ③ Akira Iwama, Masanobu Ujihira, Yasuhiro Saiki, The effect of Cell Orientation Control on the Cell Viability after Cryopreservation in Monolayer Cells Cultured by Arbitrary Cell Densities, Abstracts of the 6th World Congress on Biomechanics (Suntec, Singapore 2010.8.4), [Abstract p.488].
- ④ 岩間 輝, 大浦和宏, 雨森 彩, 氏平政

伸, 凍結方向を持つ凍結保存において配向細胞の解凍後の生存率に与える凍結保護物質の浸透圧の影響, 日本機械学会 第22回バイオエンジニアリング講演会 (岡山) 2010.1.10, 講演論文集 No.09-55 p.250.

- ⑤ 岩間 輝, 松井俊樹, 氏平政伸, 凍結保存された単層細胞において解凍後の生存率に及ぼす基質の影響, 日本機械学会 第20回バイオフィロンティア講演会 (和歌山 2009.11.7), 講演論文集 No.09-10 p.29-30.
- ⑥ 岩間 輝, 多久 智, 氏平政伸, ヒアルロン酸添加による凍結中の高密度単層細胞における細胞損傷の低減, 日本機械学会 2009年度年次大会 (岩手 2009.9.14), 講演論文集 No.09-1 Vol.5 p.19-20.
- ⑦ Masanobu Ujihira, Akira Iwama, Makie Aoki, Kanako Aoki, Sayaka Omaki, Erika Goto, Kiyoshi Mabuchi, Investigation of the cryoprotective effect of low-molecular-weight hyaluronic acid on human dermal fibroblast monolayers, 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Sapporo 2009.7.23), Abstract: *Cryobiology* 59(3) p.398 No.99.
- ⑧ Akira Iwama, Ken-ichiro Shibuya, Aya Matsui, Masanobu Ujihira, Observation of Survival Distribution in Monolayer Cells after Cryopreservation: Influence of Cell Density on Post-thaw Viability, 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Sapporo 2009.7.22), Abstract: *Cryobiology* 59(3) p.390 No.72.
- ⑨ 岩間 輝, 氏平政伸, 配向制御された細胞において凍結方向が解凍後生存率に与える影響, 日本機械学会 第19回バイオフィロンティア講演会 (東京 2008.9.24), 講演論文集 No.08-30 p.5-6.
- ⑩ 岩間 輝, 氏平政伸, 生体組織の凍結保存を目的とした単層培養細胞の配向制御, 第47回日本生体医工学会 (兵庫 2008.5.10), 講演論文集 Vol. 46 Suppl. 1 p. 114.

## 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：70286392

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし