

[B22] 細胞凍結技術

知能機械工学科 山田研究室
0024018 永澤 みゆき

1. 緒言

生体機能を維持させたまま、単一細胞や体積の大きい生体組織を長期保存する需要は、遺伝子工学や生体組織工学を応用した医療行為の進展により拡大を続けている。生体の器官や組織を長期保存する方法として、組織の温度を下げる事により代謝を抑えて必要酸素量を少なくするという観点から極低温での凍結保存が最も確実であると考えられる。本来の機能をまったく損なわずに生物の器官や組織を長時間保存できる技術確立する事は、生命科学と工学の境界領域の課題として重要である。現在、一般的に行われている長期凍結保存法では単細胞レベルを対象として冷却速度の制御および氷核生成の起きにくい凍害防御剤を支持液として適切に選択することによって行われている。凍害防御剤には細胞膜透過型と非透過型があるが、生体適合性の高い糖類は非膜透過型の凍害防御剤として優れていると考えられていることから、細胞を凍結させる際の支持液として糖の生理浸透圧 (300mOsm / kg・H₂O) 水溶液を用い細胞内凍結におよぼす影響をみた。また、糖類の中でも安価であり食品や化粧品にも含まれるトレハロースに注目し、細胞内凍結への影響をみた。

2 実験方法と装置

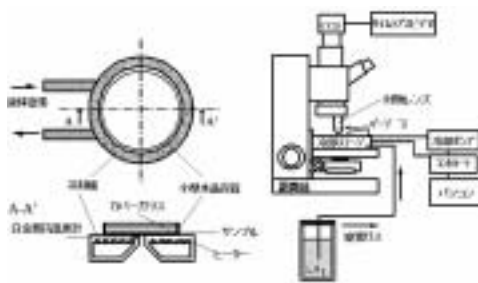


図1 低温顕微鏡観察システム

本研究では、ヒト T 細胞株 Jurkat を継代培養によって増殖させてから実験に供した。また凍結率の測定には、図1に示すような低温顕微鏡観察システムを用いた。

細胞懸濁液を滴下した小型水晶容器を冷却ステージ内の冷却部にて温度制御しながら顕微鏡観察を行った。冷却面の温度制御は冷却面に設置された白金抵抗測温体とヒーターおよび液体窒素でなされる。

各種、糖水溶液の調製は、生理浸透圧濃度 300mOsm / kg・H₂O となるように各糖粉末を秤量して純水に溶解した。

3. 実験結果と考察

3.1 細胞外に存在する糖の種類による細胞内凍結率変化

300mOsm/kg・H₂O では細胞の平均直径は 10.0 ± 0.5 μm であった。-90 / min.の冷却速度で-80 まで降温したところ、細胞内が凍結した細胞は顕微鏡下では黒色ないしは茶褐色を呈するため細胞内凍結の発生を確認できた。図2に示す様に、培養液では 100%細胞内凍結が起きているのに対して、グルコースでは 50%以下にまで下がった。また、糖の分子量が大きくなるにつれて細胞内凍結が起きにくくなっているが、トレハロースでは二糖類であるにもかかわらず、細胞内凍結はほとんど見られなかった。細胞自体を大きくするため(細胞の持つ膨圧の影響をみる)に糖水溶液の浸透圧を変えて細胞径 14 μm で凍結実験を行った結果では、図3に示す様に生理浸透圧で凍結した場合と同じ様に二糖類以上で凍結が抑制されて

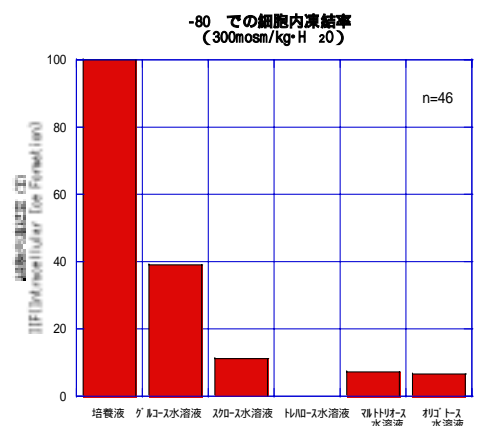


図2 生理浸透圧濃度での細胞内凍結率

いる事がわかった。細胞外の糖溶液中で生成した氷晶は、細胞を圧迫することはなかった。凍結率測定後に急速融解を試みたがその際、細胞内が未凍結であった細胞も融解温度に達する前にすべて細胞内凍結（再結晶）をおこし、完全に解凍された後に形状を留めた細胞はなかった。

3.2 一定温度に保持した時の細胞内凍結率の経時変化

培養液と糖水溶液の混合液を全体としては生理浸透圧濃度になる様に各々の比率で混合した。凍結実験は、図4に示す様な温度プログラムにて行い、30分間の保持温度中では、1分間隔で観察した。

図5に示す様に、トレハロースのみで構成されている水溶液中では、細胞内凍結が定常状態になるまでの待ち時間が存在すること、またその待ち時間がトレハロース濃度が低いほど短くなっていることが分かった。

古典的核生成理論に基づき細胞外トレハロースが細胞原形質膜と氷の接触角()に対する影響を解析したところ、図6に示す様に、 はトレハロースの影響はあまりみられなかったが温度低いほど大きいことがわかった。

4. まとめ

糖類は細胞内に取り込まれていないにもかかわらず、凍結過程において細胞内凍結を抑制していること、糖類の中でも二糖類の凍結防御能力が優れていることが示唆された。90 / min.の急速解凍においても細胞内で再結晶が生じ、今後の課題となっている。

古典的角生成理論から、細胞外からの氷晶の侵入が阻害されたり、氷・細胞膜界面エネルギーが高くなることにより細胞内凍結が抑制されていることが示唆される。

従来の凍害防御剤としてのトレハロースの評価は、凍結解凍後の細胞生存率に重点が置かれていたため、実際の細胞凍結保護の仕組みに不明な点があった。今回の知見を得たことで、解凍過程での再結晶を回避できれば、理想的な凍結-解凍プロセスに大きく近づく可能性があると考えられる。

5. 参考文献

- 化学辞典；東京化学同人
- 生物学辞典 第四版；岩波書店
- 白樫 了；生産研究 第55巻 第2号、(2003)
- Mehmet Toner and Ernest G. Cravalho；J.Appl.Phys.67(3)、(1990)
- D.R.Uhlmann,J.Non-Crystalline Solid 7,(1972)
- 山田 幸生ら；からだと熱と流れの科学 オーム社 (1998)
- 山田 幸生；伝熱 Jour.HTSJ,Vol.41,No.166(2002)
- 福迫 尚一郎；日本冷凍空調学会論文集 vol.7、No.1 (1990)
- 冷凍；日本冷凍空調学会 Vol.79、No.915(2004)

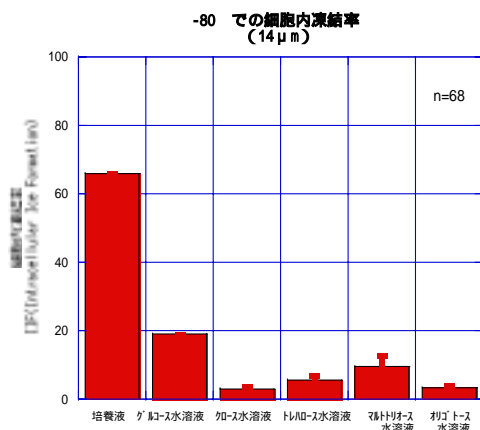


図3 細胞径 14 μm での細胞内凍結率

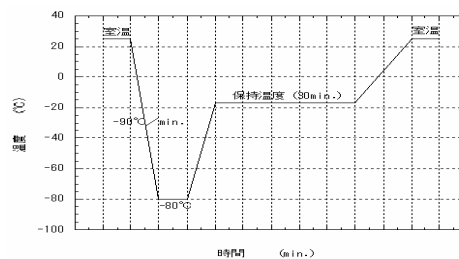


図4 温度プログラム

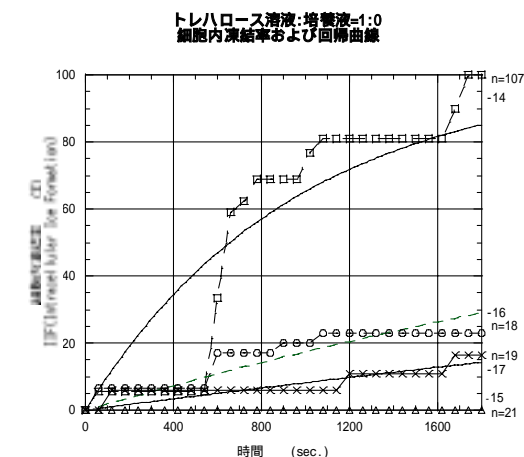


図5 トレハロース(生理浸透圧)溶液中における細胞内凍結率

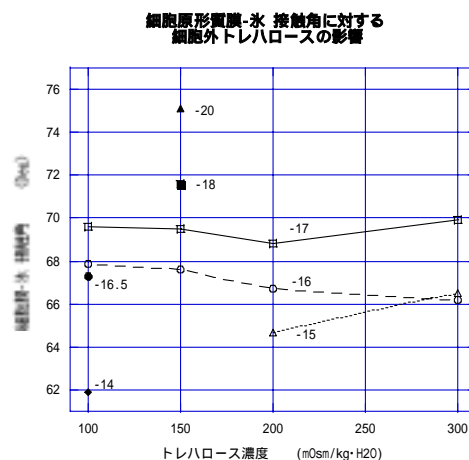


図6 細胞原形質膜-氷接触角()に対するトレハロース水溶液の影響