

GP バイオサイエンス社)を用いた。なお、これらの培地の成分は公表されていないが、血清は含まれているとされている。

骨芽細胞の分化誘導に際しては、10 mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml L-アスコルビン酸、0.1 M デキサメサゾンを含む培地に添加し、継代培養はせず、培地交換で3週間維持した。骨芽細胞分化の確認は、アルカリフォスファターゼ染色による。細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で室温、5分間固定、純水で洗い、0.25 mg/ml naphthol AS-BI phosphate、0.25 mg/ml fast red violet LB salt in 0.1 M Tris buffer (pH 8.5)で室温、10分間染色、水洗した。アルカリフォスファターゼ活性の細胞は赤染される。

脂肪細胞の分化誘導に際しては、0.25 μ M デキサメサゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、0.1 mM インドメタシン、5 μ g/ml インスリン (ヒト・リコンビナント)で4日処理、5 μ g/ml インスリンのみで3日処理からなる一連の処理スケジュールを3ラウンド繰り返した(計3週)。脂肪細胞は、oil red Oにより中性脂肪顆粒を染色することにより検出した。

3) 肝伊東細胞の培養法および性状の検討

ヒト正常伊東細胞株 LI90 は、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地を用いて増殖した。TGF- β 処理の実験においては、細胞を12ウェルプレートに播種し、10 ng/ml TGF- β により、7日間継続的に処理後、細胞数を計数した。

α -smooth muscle actin (SMA)は、次のような手法を用いて免疫蛍光染色することにより確認した。細胞を24 well plate のガラスカバースリップ上に播種し、3日培養後、4%パラホルムアルデヒド-PBSにて5分間固定、1% BSA、0.1% Triton X-100を含むPBSで透過処理とブロッキングを行い、ブロッキング液で希釈した抗 α -smooth muscle actin マウスモノクローナル抗体(LabVision, Co., Actin, Smooth Muscle Ab-1, Clone 1A4; 1/200 希釈)で室温1時間、ついで FITC 標識蛍光二次抗体で室温1時間染色した。

脂肪細胞の分化誘導に際しては、0.25 μ M デキサメサゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、0.1 mM インドメタシン、5 μ g/ml インスリン (ヒト・リコンビナント)で4日処理、5 μ g/ml インスリンのみで3日処理からなる一連の処理スケジュールを3ラウンド繰り返した(計3週)。脂肪細胞は、oil red Oにより中性脂肪顆粒を染色することにより検出した。

4) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

ヒト正常骨格筋芽細胞は、米国 Zen bio 社から市販されている製品(カタログ番号 SKB-F)を用いた。

Type I コラーゲンをコートした培養器に播種し、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM) + 10% ウシ胎児血清で培養した。細胞培養が70~80%コンフルエントに達した時期に、横紋筋の分化誘導を開始した。分化誘導培地は DMEM を基礎培地とし、添加血清を熱非働化馬血清 0.1%、10%の二通りとして、次の条件を検討した。

- ①血清のみ
- ②血清 + 10 mM LiCl
- ③血清 + 0.1 μ M dexamethasone + 10 ng/mL EGF (ヒト・リコンビナント EGF)
- ④血清 + 0.1 μ M dexamethasone + 10 ng/mL EFG + 10 mM LiCl

免疫抗体染色は、細胞を24 well plate のコラーゲンコート済ガラスカバースリップ上に播種、分化誘導処理後、4%パラホルムアルデヒド-PBSにて5分間固定、1% BSA、0.1% Triton X-100を含むPBSで透過処理とブロッキングを行い、抗 myosin heavy chain マウスモノクローナル抗体 (R & D systems, Inc., Clone MF20, 1/200 希釈)処理、引き続き一次抗体を認識する FITC 標識二次抗体で処理し、DAPIによる細胞核染色後に蛍光顕微鏡にて検鏡した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト由来細胞に関しては「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施する。

研究分担者・平敏夫が所属する株式会社プライマリーセルにおいては、ヒト試料の取扱いに関しては親会社であるコスモ・バイオ株式会社において、コスモ・グループ生命倫理委員会に諮り、上記指針を踏まえて承認をうけて実施している。

C. 研究結果

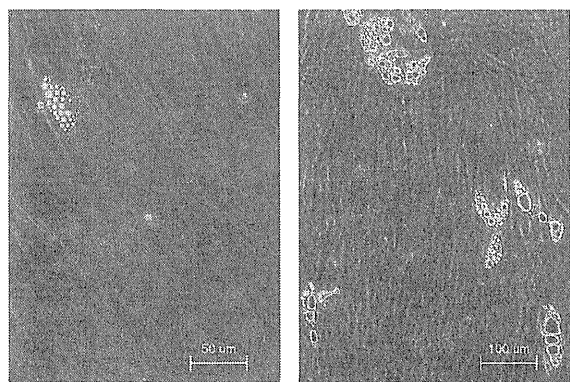
1) 無血清培地によるヒト幹細胞培養の検討

ヒト腸間膜由来脂肪前駆細胞 HT99560192、HT85523822 は無血清条件では接着が悪かった。また無血清培地で培養・分化誘導した場合、脂肪蓄積は認められたものの分化する細胞の割合はわずかであった(図 1)。生理的インスリン濃度下では、分化誘導後に脂肪の蓄積が若干認められた。市販のヒト皮下脂肪細胞においても無血清条件では細胞接着が劣ったが分化誘導後に脂肪の蓄積が若干認められた(図 2)。生理的インスリン濃度下では、接着・増殖は良好で、分化誘導により旺盛な脂肪細胞分化が認められた。

ヒト腸間膜由来脂肪前駆細胞における脂肪マーカー遺伝子発現解析の結果を図3に、同じくヒト皮下脂

肪細胞における結果を図4に示した。

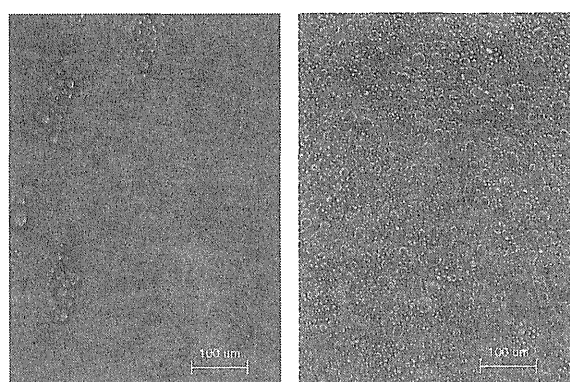
【図1】ヒト腸間膜由来脂肪前駆細胞 (HT99560192) の脂肪分化



無血清培地 (day 30)

血清含有培地 (day 21)

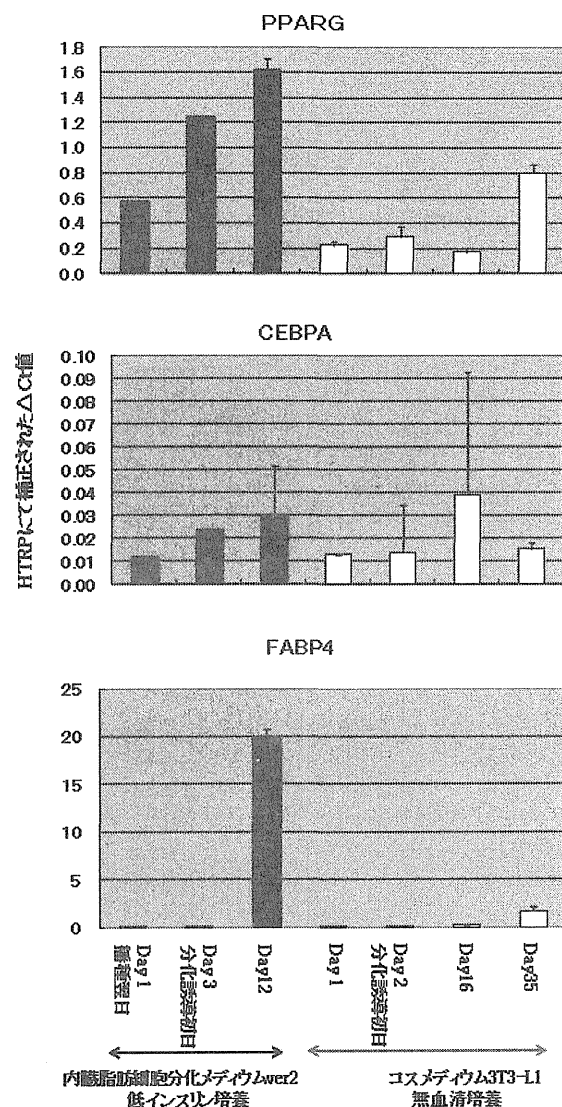
【図2】7220 細胞の脂肪分化



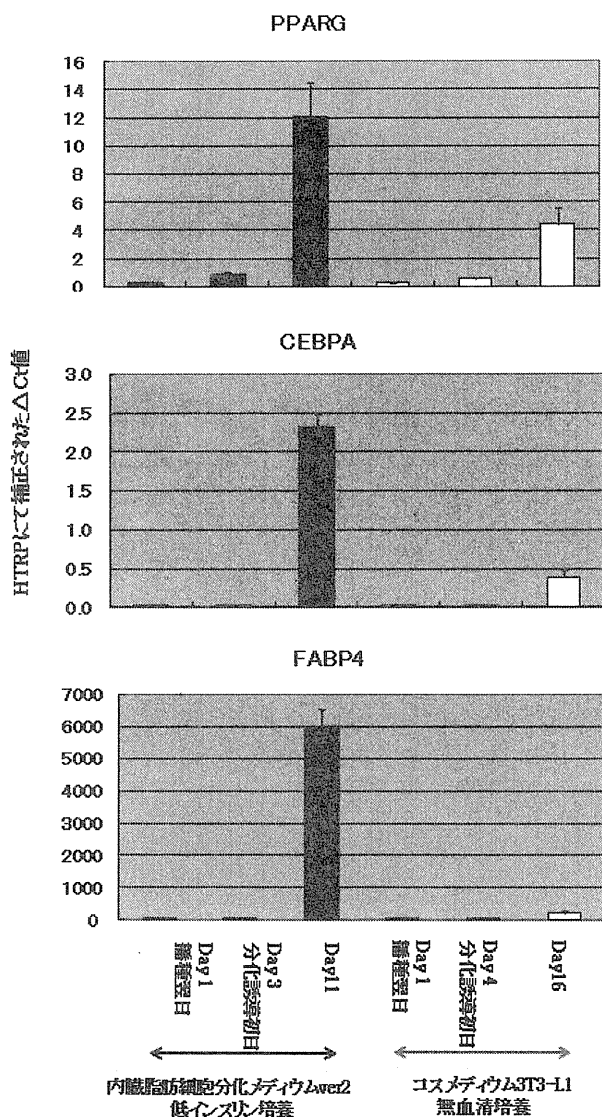
無血清培地 (day 18)

血清含有培地 (day 18)

【図3】ヒト腸間膜由来脂肪前駆細胞における脂肪マーカー遺伝子発現。■ 内臓脂肪細胞分化メディウム ver2 : 10%血清を含む生理的インスリン濃度 1ng/ml にて下培養)、□ コスメディウム 3T3-L1 : 無血清培養。各データは HPRT の遺伝子発現値にて補正。日数は播種日を Day 0 として計算。



【図 4】ヒト皮下脂肪細胞における脂肪マーカー遺伝子発現。■内臓脂肪細胞分化メEDIUM ver2：10%血清を含む生理的インスリン濃度 1ng/ml にて下培養)、□ コスメEDIUM 3T3-L1：無血清培養。各データは HPRT の遺伝子発現値にて補正。日数は播種日を Day 0 として計算。



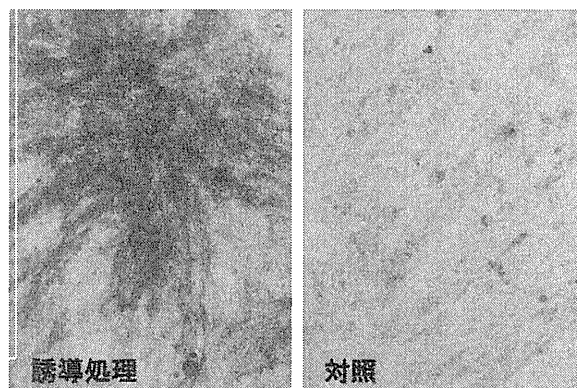
2) 間葉系幹細胞の分化誘導法および分化能の検討
 検討した間葉系幹細胞は、骨髄由来遺伝子導入不死化間葉系幹細胞株9株、臍帯血由来遺伝子導入不死化間葉系幹細胞株2株の合計11株である。

β -グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾンによる骨芽細胞への分化誘導検討結果を以下に示す。

細胞名	由来	骨芽細胞	
		処理区	対照区
UCBTERT-21	臍帯血	+	±
UCB408E6E7TERT-33	臍帯血	++	±
UE6E7T-3	骨髄	+	+
UBE6T-6	骨髄	+	+
UE6E7T-2	骨髄	++	+
UBE6T-7	骨髄	-	-
UE7T-9	骨髄	+++	+
UE6E7T-11	骨髄	+++	+
UE6E7T-12	骨髄	++	++
UE7T-13	骨髄	+++	++
UBE6T-15	骨髄	+	+

表に示すように、ほぼ全ての細胞株について、骨芽細胞の分化が確認できた(図5)。分化誘導処理を行わない対照との比較では、誘導処理を行った方が分化の頻度が高い傾向がみられた。

【図5】UE6E7T-2 細胞の骨芽細胞分化誘導



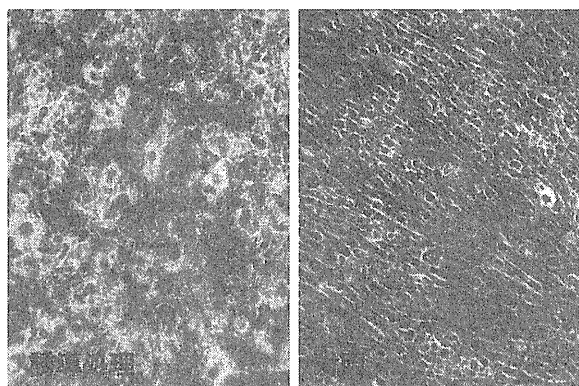
UBE6T-7 細胞では骨芽細胞が誘導できなかったが、この結果は今回の分化誘導処理条件でのものであり、異なる処理条件によって分化することも考えられるため、本細胞株が間葉系幹細胞であることを排除する結果ではない。

脂肪細胞への分化は、デキサメサゾン、IBMX、インドメタシン、インスリンにより誘導した。結果を次に示す。

細胞名	由来	脂肪細胞	
		処理区	対照区
UCBTERT-21	臍帯血	+	-
UCB408E6E7TERT-33	臍帯血	++	-
UE6E7T-3	骨髄	+++	-
UBE6T-6	骨髄	+	-
UE6E7T-2	骨髄	++	+
UBE6T-7	骨髄	±	-
UE7T-9	骨髄	±	-
UE6E7T-11	骨髄	+	-
UE6E7T-12	骨髄	++	-
UE7T-13	骨髄	++	-
UBE6T-15	骨髄	++	±

脂肪細胞の分化は全ての細胞株について確認できた。誘導効率の程度は細胞株によって様々であった。図6に分化誘導後の UE6T-15 の写真を示す。

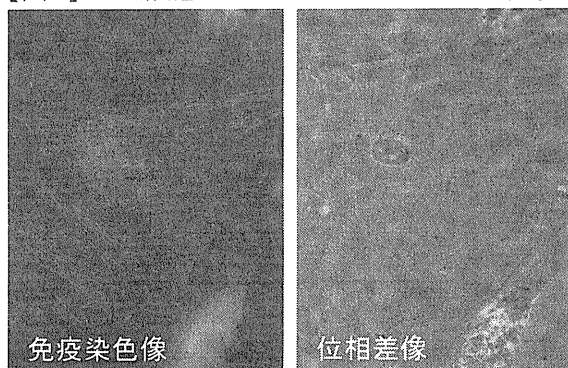
【図6】UE6T-15 の脂肪細胞分化誘導



3) 肝伊東細胞の培養法および性状の検討

LI90 細胞を α -smooth muscle actin (SMA) 抗体により免疫蛍光染色すると、一部に SMA 陽性の細胞が確認された(図7)。また、デキサメサゾン、IBMX、インドメタシン、インシュリン処理により、微細ではあるが対照よりも増大した脂肪滴が誘導された(図8)。

【図7】LI90 細胞の α -smooth muscle actin 発現



【図8】LI90 細胞における脂肪滴の誘導

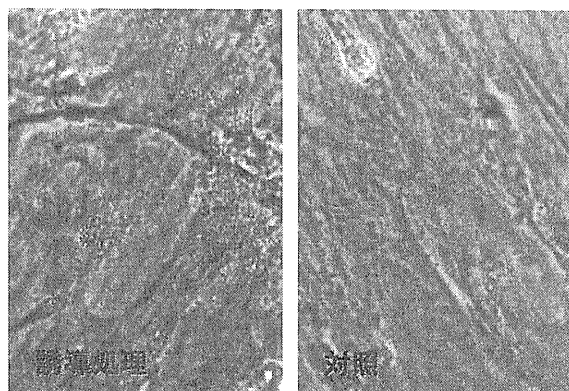
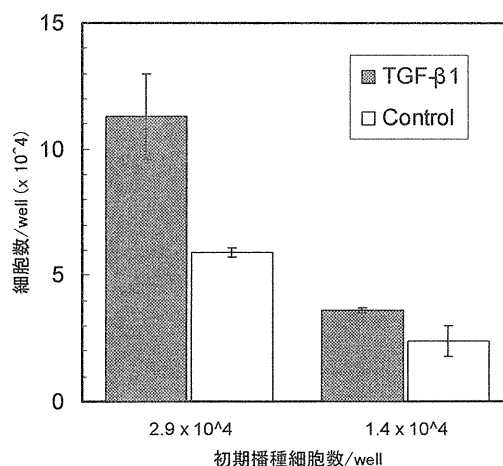


図9に、初期播種細胞数、 2.9×10^4 cells/well, 1.4×10^4 cells/well として播種した LI90 細胞の増殖に対する TGF- β の効果を示す。TGF- β は、LI90 細胞の増殖を促進した。また、TGF- β 添加により、細胞がコンフルエントを超えた状態になってからもさらに重層して増殖していることが認められた。

TGF- β 処理した LI90 細胞を SMA 染色すると、対照よりむしろ SMA 陽性細胞の割合が減少する傾向があった。

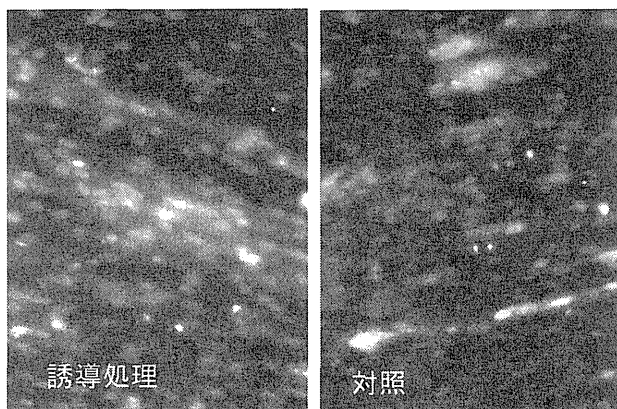
【図9】TGF- β による LI90 細胞の増殖促進



4) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

ヒト正常筋芽細胞を分化誘導処理すると、7日目までには筋管様の構造の形成がみられた。馬血清 10% の処理においては、細胞が増殖したが、1%では増殖は抑えられた。また、dexamethasone, EGF は細胞の状態を良好にしたが、分化誘導には影響しないように思われた。いずれの処理においても、10 mM LiCl の添加は、myosin heavy chain 陽性の細胞の割合を高めた(図10)。

【図10】10%馬血清+0.1 μ M dexamethasone + 10 ng/mL EGFにて、10 mM LiClの存在、非存在下に2週間分化誘導したヒト正常筋芽細胞の myosin heavy chain 蛍光免疫蛍光染色像



D. 考察

1) 無血清培地によるヒト幹細胞培養の検討

PPAR γ 、FABP4、CEBPAの脂肪分化マーカーの遺伝子発現はいずれも分化誘導により上がることが確認できた。一方で、無血清環境下での分化マーカーの上昇率は、10%血清(NCS)を含む生理的インスリン濃度環境下によるものに比べ低く、これは顕微鏡下での脂肪蓄積する細胞の割合の推移と合致する。また、皮下脂肪細胞にくらべ内臓脂肪細胞の分化マーカーの発現は1~2オーダー低いものであった。この原因がドナー依存のためか、組織依存性によるものかは不明である。

本研究により、生理的インスリン濃度環境下、および無血清培養環境下、いずれにおいてもヒト組織由来細胞の脂肪分化を確認することができた。特にヒト皮下脂肪細胞の生理的インスリン濃度環境下では分化効率が高かったが、他の3条件では分化効率が劣った。今後さらに検討を加えることにより分化効率を改善できる可能性が十分にあると考えられる。

2) 間葉系幹細胞の分化誘導法および分化能の検討

平成24年度は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクに登録されている11種類のTERT遺伝子導入不死化ヒト間葉系幹細胞株の分化能を検証し、寄託者の指定する培地をベースとしてほぼ全ての細胞において骨芽細胞への分化能、脂肪細胞への分化能が確認できた。平成23年度におけるヒト正常間葉系幹細胞27種の分化能確認と合わせ、本研究で得られた成果は細胞研究利用者への重要な情報となる。本年度の研究で用いた分化誘導条件は、いずれもほぼ確立された手法であるが、ひとつの問題として、

基本培地が血清を含んでいることが挙げられる。

ヒト間葉系幹細胞を用いた創薬、再生医療研究には、無血清、成分既知の培地や、改善された分化誘導法が求められている。本研究では、寄託者により指定された培地を用いた分化誘導を行ったが、今後は新規な無血清培地等の開発、分化誘導法の改善を計り、ヒト間葉系幹細胞の創薬研究への価値をさらに高めてゆきたい。

3) 肝伊東細胞の培養法および性状の検討

本研究において、ヒト肝伊東細胞株LI90がSMAを発現していることが確認された。この結果は、LI90細胞が活性化した肝伊東細胞としての性質を持つことを保証するものである。活性化した肝伊東細胞は肝硬変をはじめとする肝疾患において重要な役割をはたすことから、本成果は、創薬研究におけるLI90細胞の有用性を高める付加価値となった。

また、LI90細胞に対して脂肪滴を誘導する検討においては、脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導と同様の手法によって脂肪滴の出現をみた。この結果は、伊東細胞が脂肪前駆細胞と類似した機構によって脂肪滴を形成することを示唆している。脂肪肝では伊東細胞にも中性脂肪が蓄積することが知られており、本成果は脂肪肝等の肝疾患への創薬研究へのLI90細胞の利用に役立つものと思われる。

肝伊東細胞はTGF- β などにより活性化して筋線維芽細胞へ転換する。そのモデルとしてLI90へのTGF- β による影響を検討した。TGF- β により、LI90の細胞増殖が促進された。ラット肝伊東細胞において、TGF- β はPDGFの分泌を促進することにより、autocrineな増殖促進が起こることが報告されている。本研究において、LI90においてもTGF- β は同様の機作により増殖を促進している可能性がある。さらに、TGF- β 処理により、コンフルエントを超えて細胞が重層しながら増殖することが認められたことは、TGF- β がLI90細胞にトランスフォームを誘導している可能性を示唆している。一方、TGF- β 処理により、SMA陽性の細胞の割合が減少する傾向があった。この原因は不明であるが、細胞増殖が急激に誘導されたことにより、細胞あたりのSMA量の希釈が起こった可能性はある。トータルなSMAの変化も検討する必要がある。

研究目的の項で述べたように、LI90細胞は世界各国でヒト肝伊東細胞のモデルとして研究利用されており、貴重な培養資源である。今後も新たな分化誘導技術、培養法を開発し、創薬研究基盤としての貢献をめざしたい。

4) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

本研究では、筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系を開発するため、Wnt 経路に注目した。Wnt は細胞間相互作用に様々な働きを持つ細胞外因子で、筋の初期分化を制御しているとされている。Wnt は、レセプターである Frizzled を介して disheveled 蛋白をリン酸化し、リン酸化された disheveled が Axin 複合体を介して GSK-3 β による β -catenin のユビキチン化を阻害することにより細胞内 β -カテニンのプールを増大することにより作用を及ぼす。塩化リチウムは GSK-3 β の阻害剤であり、Wnt の作用をミミックすることが知られている。

平成23年度報告において、塩化リチウム処理により、ラット筋芽細胞 L6、ヒト横紋筋肉腫細胞株 RD において横紋筋分化が促進されることを認めた。さらに L6 細胞においては、自律収縮する横紋筋が容易に誘導可能であり、非常に効率のよい分化誘導法であることを認めた。平成24年度は、さらにヒト正常筋芽細胞を用いて、塩化リチウム処理が横紋筋分化に有効であることを認め、前年度の L6 細胞株、RD 細胞株モデルの妥当性が確認された。

平成23年度報告と合わせ、本成果は、一般的な細胞株と塩化リチウム処理という簡便かつ効率的な分化誘導法を提供することにより、分化した横紋筋を用いた創薬研究に貢献すると思われる。

E. 結論

無血清培養法に関しては、ヒト脂肪前駆細胞の無血清培養と分化誘導を試みた。脂肪細胞分化は認められるものの、従来の血清を含む培地による分化

誘導能と比較した結果、さらなる条件検討が必要であることが明かとなった。

培養技術に関しては、ヒト TERT 遺伝子導入不死化間葉系幹細胞株 11 株につき骨芽細胞、脂肪細胞への分化能の検査を行い、幹細胞としての性質が保証されることを確認した。また、ヒト正常伊東細胞 LI90 の細胞特異的マーカーの発現、脂肪滴の蓄積、TGF- β による活性化等の性状を検証し、LI90 細胞の品質を保証することができた。また、筋芽細胞株 L6、横紋筋肉腫 RD や正常ヒト筋芽細胞を用い、Wnt 経路を活性化することによる簡便かつ効率の良い横紋筋への分化誘導法を開発した。横紋筋を用いたアッセイ系などへの応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

温度調整機能・圧力調整機能を持たせた保存容器・輸送容器等の開発

所 属 株式会社プライマリーセル
分担研究者 清水 恭子

研究要旨 「国民の健康の推進と確保」に資する「ヒト」研究の生物研究資源の基盤整備は厚生労働省の重要課題である。そこで本研究では生体機能を維持した初代細胞を多くの研究者に提供する事を目的として、非凍結状態での細胞輸送技術の確立を試みた。本年度の研究では、昨年度に試作した定温輸送容器の性能試験を行うとともに、海外との輸出入仕様の確立を目指した。

A. 研究目的

不死化された株化細胞等は凍結で輸送されるのが一般的である。しかし、生体機能により近いといわれている初代細胞は、凍結により死滅するものも珍しくなく、仮に死滅から逃れた場合も、最大の長所である生体機能の喪失などが高頻度でおこる。これは特に貴重なヒト由来初代細胞においては深刻な問題である。現在新鮮なヒト非凍結初代細胞を使うことができるのは、一部の研究施設に限定されているが、安定的に輸送する方法が確立できれば、さらに幅広い研究者がこれらを利用することが可能となり、非凍結状態での保管や輸送技術の確立が望まれている。

我々は昨年度、乾電池で駆動可能な細胞定温輸送容器の開発を試み、5℃および32℃用の輸送容器を試作した。今年度はこの試作器を用いて、出荷先や季節を変えて実送試験を行い、性能を検証した。さらに海外からの輸出入を想定した長時間の温度保持についても検討した。

1) 5℃および32℃輸送容器の性能評価

昨年度は性能評価として、戸外静置、車中静置、倉庫静置、トラック便輸送、航空便輸送を連続して行い、その間の5℃定温輸送容器内部の温度が4日間以上定温を保つことを確認した。しかしながら、従来の経験から外気温の変化は季節や地域によって大きく異なることと、輸送中の衝撃や取り扱いが容器内の温度に影響する可能性も考えられることから、日本国内の数箇所に季節を変えて試作器を発送し、性能が十分に保たれるかを検証した。

2) 輸出入用定温輸送容器の開発

現在日本で販売されているヒト由来の初代培養細胞や組織は多くが海外企業から輸入されたもので、その殆どが凍結であるため、入手できるものに限りがある。海外から新鮮な研究用組織や研究用細胞を輸入できるようになれば、凍結に弱い種類の細胞も採取できるようになり、研究の幅が広がると予想される。

海外への輸送は国内輸送以上に条件が過酷で、出荷から到着まで最低で4日間を要し、通関にさらに日数を要することも多い。本研究ではいままでに試作した輸送容器を改良し、より長期間定温を保持できる定温輸送容器を開発する。

3) 定温環境下にて輸送された細胞の品質評価系の検討

研究用非凍結細胞で国内では入手が大変困難にもかかわらず、海外では比較的容易に入手できるものにヒト臍島があげられる。しかし、臍島は温度環境に大変敏感であり、また臍島調製の際に混入する外分泌細胞画分はプロテアーゼ類等多量の消化酵素を分泌し、これらが臍島の品質劣化を進める一因であると考えられる。そのため外分泌細胞の混入度を測定することは品質管理上、極めて重要であると考えられる。本研究では品質管理に使用できる遺伝子マーカーを探索する目的で、DNAアレイおよびリアルタイムPCRを用いてラット臍島、および臍島調製時に生じる外分泌画分の発現解析を行った。

B. 研究方法

1) 5°Cおよび 32°C 輸送容器の性能評価

昨年度に試作した輸送容器を使用して、6、7、8、11 および 12 月に輸送試験を行い性能評価しつつ改良を加えた。輸送容器の準備は次のように行った。発送当日に市販の単三アルカリ乾電池が 16 本収納可能な電池ボックスをセットして定温輸送容器内面に埋め込まれた面状ヒーターに接続した。保冷剤は、5°C 輸送容器には予め-14°C 程度に冷却した保冷剤 CV-2・500g(玉井化成、小樽)4 個を、32°C 輸送容器には予め 37°C に加温した水溶性蓄熱材 パッサーモ P-32・500g(玉井化成)5 個を、定温容器周辺に配置した。温度記録のため、定温容器の中と輸送容器の外側の 2 箇所、もしくは電池ボックス脇を加えた 3 箇所にデータログを配置した(図 1)。この輸送容器を用いて四季を通じて様々な地域への輸送試験を繰り返し行い、輸送期間中の温度記録を回収した。

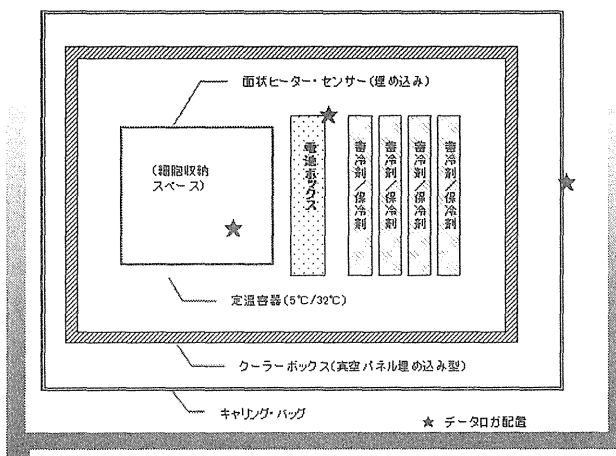


図 1: 定温輸送容器の概略図

上: 上から見た概略図

下: 斜めから見た概略図

2) 輸出入用定温輸送容器の開発

5°C 輸送容器をもとに、取扱いの容易さと長時間

温度を維持するために①箱の外寸を旧型 175(W) x 150(D) x 190(H) mm から新型 180(W) x 180(D) x 190(H) mm、内寸を旧型 140(W) x 120(D) x 150(H) mm から新型 125(W) x 125(D) x 125(H) mm に変更し(図 2)、必要な容積を確保するとともに、容器を壁面厚を上げ保温性を向上。②蓋の形状を変更し操作性を改善するとともに保温性を向上。(図 3)、③蓋に設置していた温度計が内部温度漏えいの原因であったため、これを外して保温性を向上。(図 2) ④電池ボックス接続ケーブルおよびコネクタ形状を改良し、任意数の電池ボックスを連結可能にし、耐久性および操作性を向上などの改良を行った。

輸出入仕様試験においては、電池ボックスを 3 個接続し、単三アルカリ乾電池を合計 48 個収容した。保冷剤は予め約-14°C に冷却した保冷剤 CV-2・500g(玉井化成)9 個を定温容器周辺に配置した(図 5)。温度記録のため、定温容器の中、輸送容器の外側と電池ボックス脇の 3 箇所にデータログを配置した。この輸送容器の輸送様態を想定し、様々な温度環境に 7 日間静置したのち、温度記録を回収した。

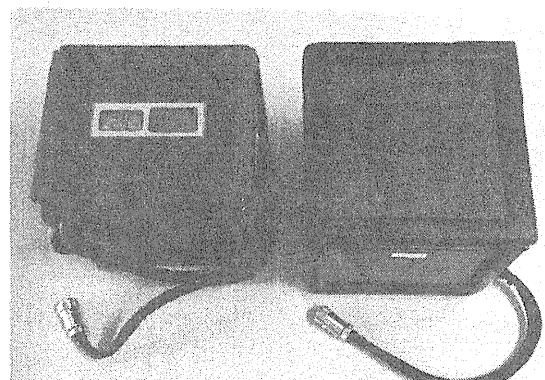


図 2: 旧型(左)と改良型低温輸送容器(右)。断熱性向上のために壁面厚を上げた結果、外寸が変更になった。また、熱漏えいの原因であった温度計を廃止



図 3: 蓋の形状を改良し、断熱性向上とともに操作性を改善した

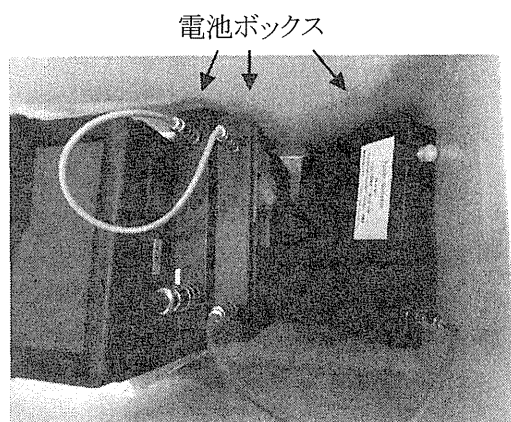


図4: 電池ボックスのコネクタ形状および接続ケーブルを改良した

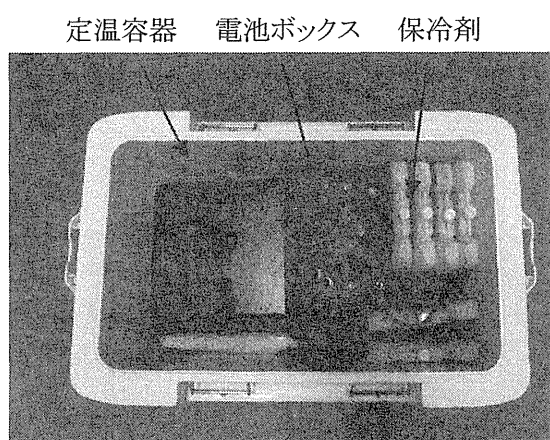


図5: 海外仕様の配置図。写真撮影のため上部設置の保冷材を除いて撮影。

3) 定温環境下にて輸送された細胞の品質評価系の検討

3-1) ラット膵島、外分泌細胞由来 RNA の調製

Shibataら方法の改良法にて細胞を採取した。すなわち 8週齢の Sprague-Dawley ラットを安楽死させ、総胆管から 0.5%コラゲナーゼ溶液を注入し、膵臓を摘出しハサミで細切して 15 分間程度消化させた。遠心法により洗浄したのち、RPMI 培地に浮遊させてディッシュに移し、実体顕微鏡で観察しながら膵島様の細胞塊をハンドピックアップ法にて回収した。同時に非膵島様細胞を回収、10%FBS を含む RPMI 培地に懸濁、 1×10^7 個を遠心洗浄し、これを外分泌細胞として 1mL TRI reagent (コスモ・バイオ、東京) に懸濁し、直ちにポリトロンを用いて溶解した。

回収した膵島はフィコール液を用いて密度勾配

遠心にて再精製した後、遠心により細胞を回収して培地に浮遊させ、実体顕微鏡下にて目視観察しながら、膵島をピペットにて回収し、10%FBS を含む RPMI 培地に懸濁した。

精製した膵島 200 個は、RPMI 培地にて遠心洗浄後、直ちに 1mL TRI reagent に懸濁し、ポリトロンにて溶解した。TRI reagent 溶解液に 1/5 量のクロロホルムを加えてよく攪拌した後、 $20,000 \times g$ 、10 分間の遠心後上層を回収した。上清を別の 1.5 mL チューブに採取し、上清と同量のイソプロパノールを加えて攪拌した後 10 分間インキュベートし、 $20,000 \times g$ 、10 分間遠心により RNA ペレットを得た。ペレットを 75% エタノールにて洗浄後一旦風乾し、これにヌクレアーゼフリー水を加えて総 RNA 溶液とした。得られた RNA 溶液はバイオアナライザー 2100 および RNA6000 ナノキット (アジレント、米国カリフォルニア州) で純度検定を行った結果、RIN (RNA Integrity Number) 値は膵島 RNA が 9.4、外分泌細胞 RNA が 6.5 であった。

3-2) DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析は DNA チップ研究所 (横浜市) に委託し、ラット遺伝子発現解析用マイクロアレイ 88 x 60K (アジレント) にて行った。アレイのシグナル比が 10 倍以上の差があるものを、リアルタイム PCR によるバリデーション候補として抽出した。

3-3) リアルタイム PCR によるバリデーション

総 RNA $1 \mu g$ 量を材料として RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (コスモ・バイオ、東京) にて cDNA を調製した。逆転写反応はキットに含まれる OligodT primer と Random Primer を等比混合プライマーにて行い、cDNA 合成反応液は $70^\circ C$ で 10 分間インキュベートすることにより失活後 10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA 溶液 pH8.0 にて 10 倍希釈し、リアルタイム PCR 用テンプレートとして $4^\circ C$ 保管した。

リアルタイム PCR は LightCycler 480 PCR Real-Time PCR Instrument (ロッシュアプライドサイエンス、スイス) または EverGreen qPCR KIT (BM 機器、東京) を使用し、サイバーグリーン法により行った。反応に用いたプライマーは、シグマアルドリッチ社にてデザインおよび合成されたものを使用した。各データ (C_p 値) は GAPDH の遺伝子発現値を用いて補正を行い、膵島および外分泌細胞にて特異的に発現の高い遺伝子を選定した。

C 研究結果

1) 5°Cおよび 32°C 輸送容器の性能評価

32°C 用輸送容器では四季を通して、いずれの地域でも定温が保たれ、非凍結細胞の定温輸送に問題がないことが確認できた。

5°C 用輸送容器では、6 月八王子および京都に発送したものにおいて、発送後約 10 時間後から温度の上昇が認められたが(図6)、その原因として移動に伴う外気の急激な上昇により保冷剤が溶けた可能性が考えられたため、検証として保冷剤の使用数を 1 個追加し 5 個として 7 月に再度輸送試験を行った。その際、保冷剤の凍結・融解をモニターするために保冷剤付近に収容している電池ボックス脇にデータロガを配置して温度を記録した。その結果、保冷剤を 5 個に増量した条件では約 6°C 温度が保たれ、保冷剤の融解もなかった(図7)。盛夏時期である 8 月に保冷剤を 5 個使用して輸送試験を行ったところ、いずれも良好な輸送温度が保たれた(図 8)。その後寒冷期である 12 月におこなった輸送試験でも良好な結果が得られていることから(図 9)、国内輸送に関してはこの仕様で問題がないと考えられる。

2) 海外向け輸送容器の開発

輸送を想定した期間中に温度の上昇が認められた。定温が保たれた時間は 30 分～3 日間で、輸入に最低限必要な 4 日間に至らなかった。(図 10)

梱包した状態を詳細に確認したところ、ヒーターの温度センサー埋め込み位置と保冷剤が直接接触していた可能性が判明した。このため、センサーが輸送箱の実温度よりも低い温度を感知して通電し、ヒーターを過剰に作動させた可能性を疑い、低温輸送容器の壁面厚、蓋の形状および梱包方法に改良を加えた。しかし、根本的な改善はみられず、現在、さらに原因究明調査を継続中である。

3) 定温環境下にて輸送された細胞の品質評価系の検討

髒島輸送を想定したマーカー選定を行った結果、表 1 にリアルタイム PCR での遺伝子発現において髒島での発現が 外分泌細胞での発現にくらべて 10 倍以上高い遺伝子を示す。表 2 には同様に 外分泌細胞での発現が髒島での発現にくらべて 100 倍以上高い遺伝子を示す。外分泌画分には、髒島調製時のコラゲナーゼ処理中に消化を受けた髒島由来細胞が含まれることが予想されるため、髒島特異マーカーに比べ、外分泌特異マーカーは高倍率を設定した。この結果、髒島 29 遺伝子、外分泌細胞 11 遺伝子を選定した。

D. 考察・結論

国内用の 32°C 輸送容器に関しては、昨年度に試作した仕様で定温が保てることが確認できた。5°C 輸送容器では夏季の高温の影響を受けることが判明したが、保冷剤の数を増やすことで、その後の各地域への輸送試験では定温が保たれていることが確認できた。また、電池ボックス連結により厳寒期や翌日到着が難しい地域にも容易に対応が可能となった。今後も継続的に実地データを蓄積し、将来的には非凍結細胞のみならず、移植用組織運搬や iPS 細胞などから分化した細胞の輸送など応用範囲を広げていきたいと考えている。

海外用では今回の検討では至適条件の確立には至らなかった。保温性改善の目的で肉厚にするために外寸を大きくしたことにより電池・ヒーター・保冷剤の容積バランスが崩れたと推測され、至適条件を確立するためには詳細な条件検討が必要と考えられた。

定温輸送細胞の品質評価系のモデルとして選定した髒島 29 遺伝子、外分泌細胞 11 遺伝子の有効性を証明するためには、年間を通して様々な気温環境下で、幅広いエリアへの実送試験データの蓄積が必要である。また、遺伝子発現解析データとグルコース刺激によるインスリン分泌試験との相関を確認する研究も必要である。今後も継続的にこれらのデータの蓄積および輸送容器やその使用手順の改良を行いたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

図6 輸送試験データ例：5℃容器を用いた輸送試験結果例。

京都と八王子への発送のみにおいて発送約 10 時間程度から内部温度の上昇する温度不良がみられた。温度不良の例として京都への発送例、および正常例として江東区への発送例を示す。

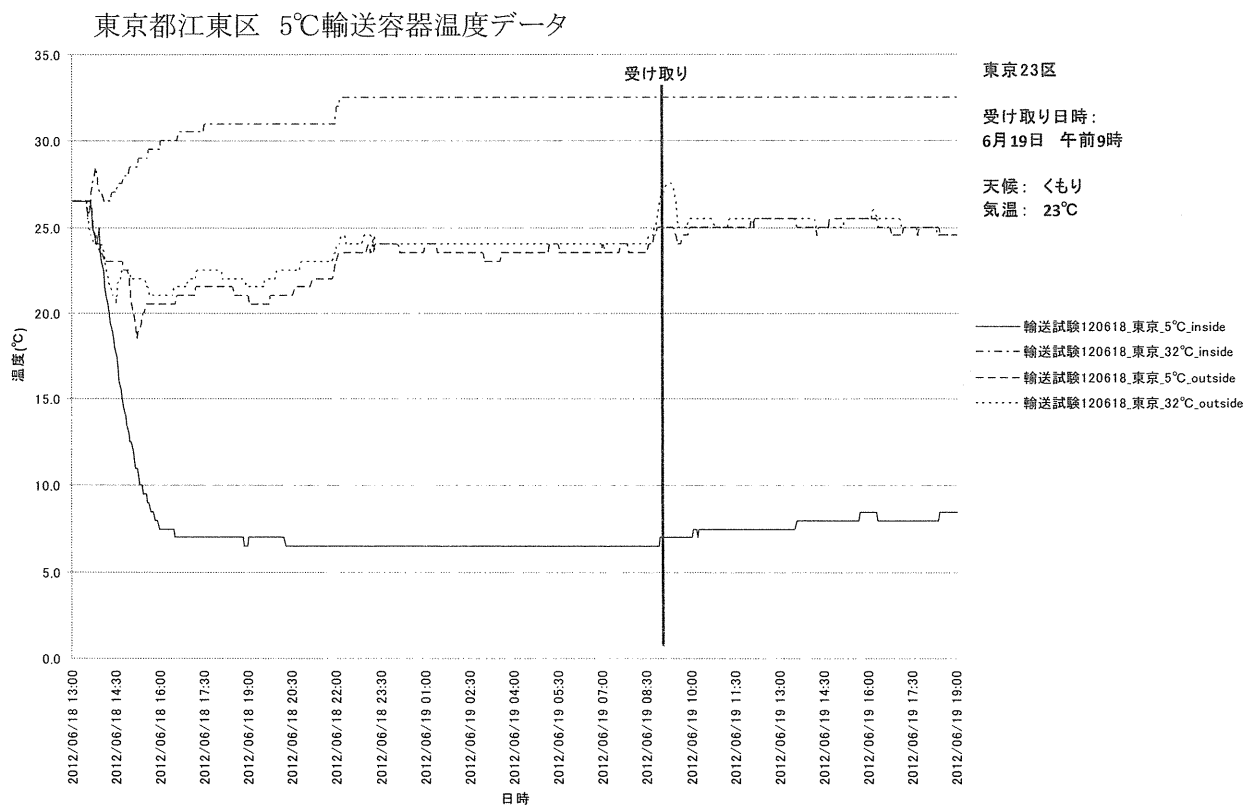
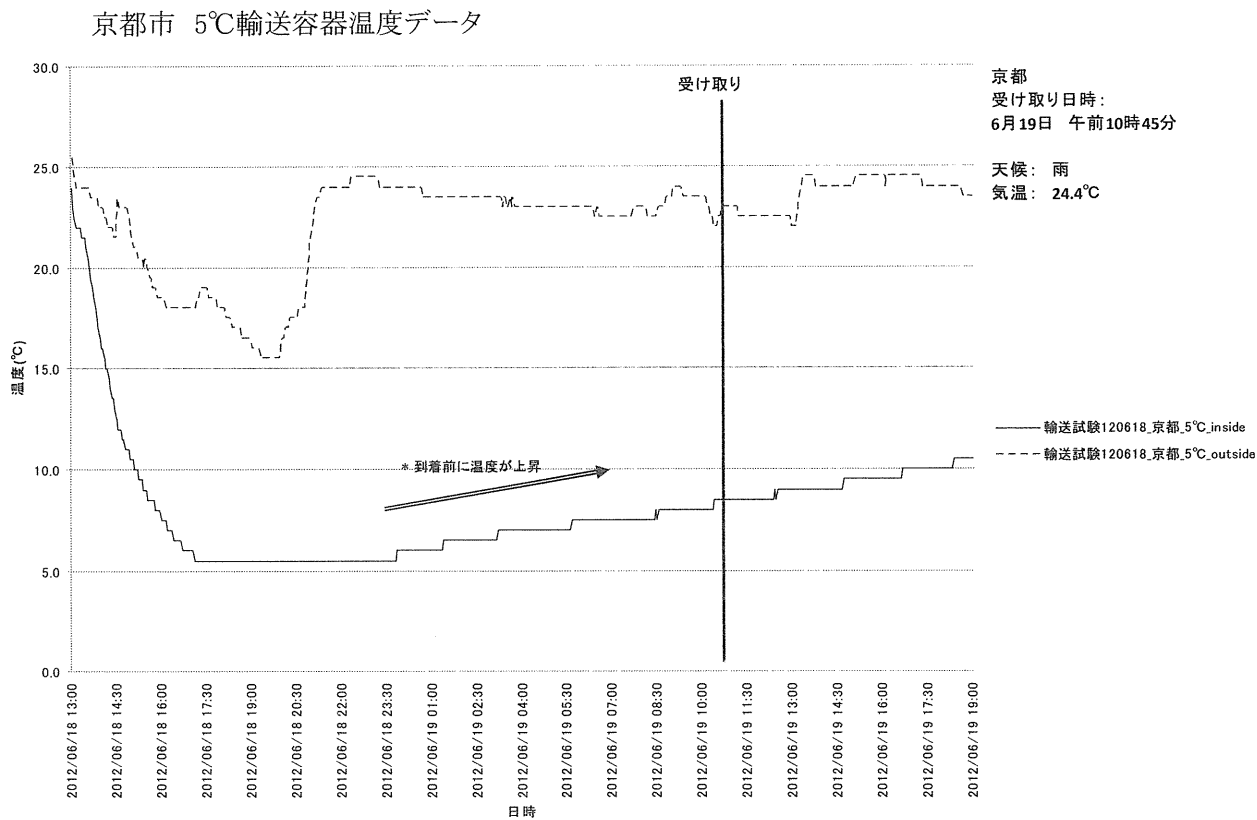


図7 輸送試験データ例：保冷剤数を変えて5℃容器を用いた同日、同地域への輸送試験結果例。

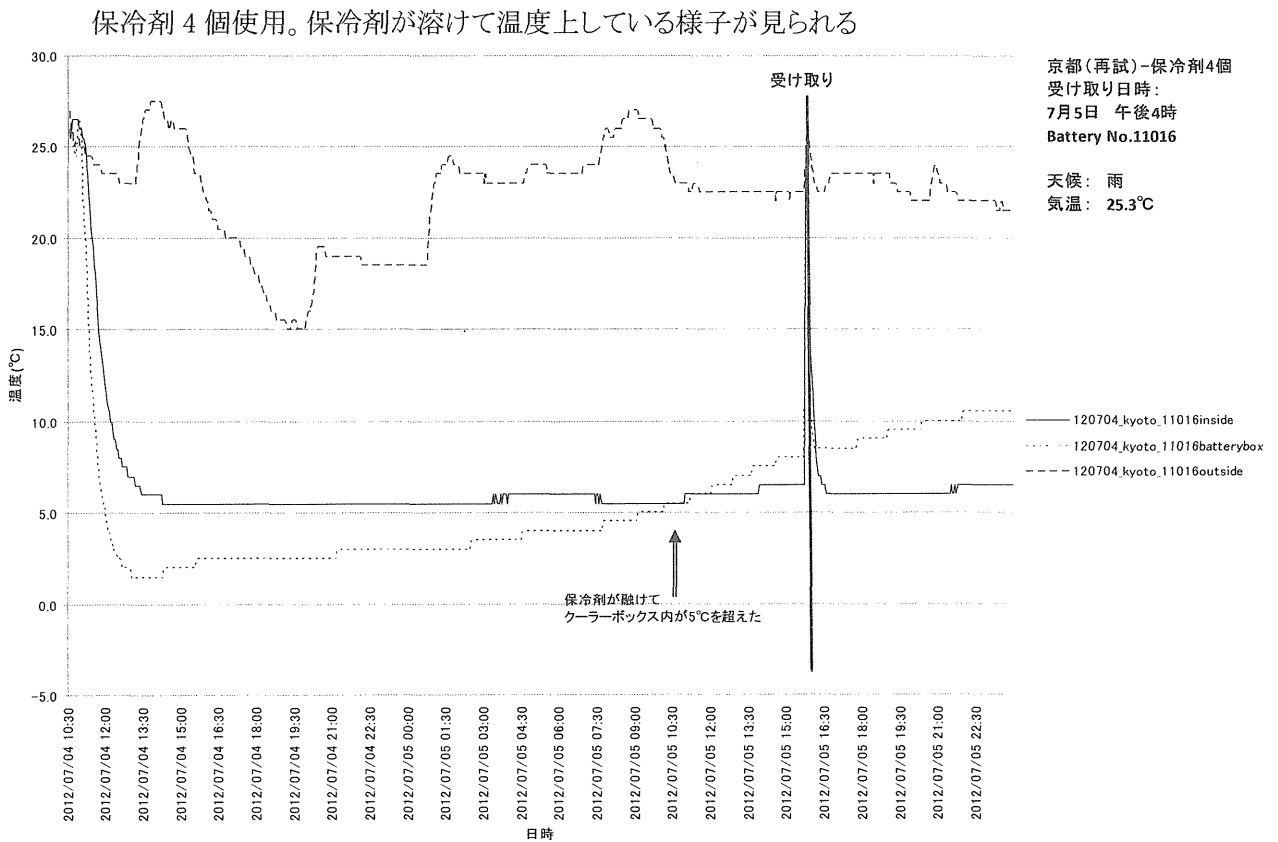
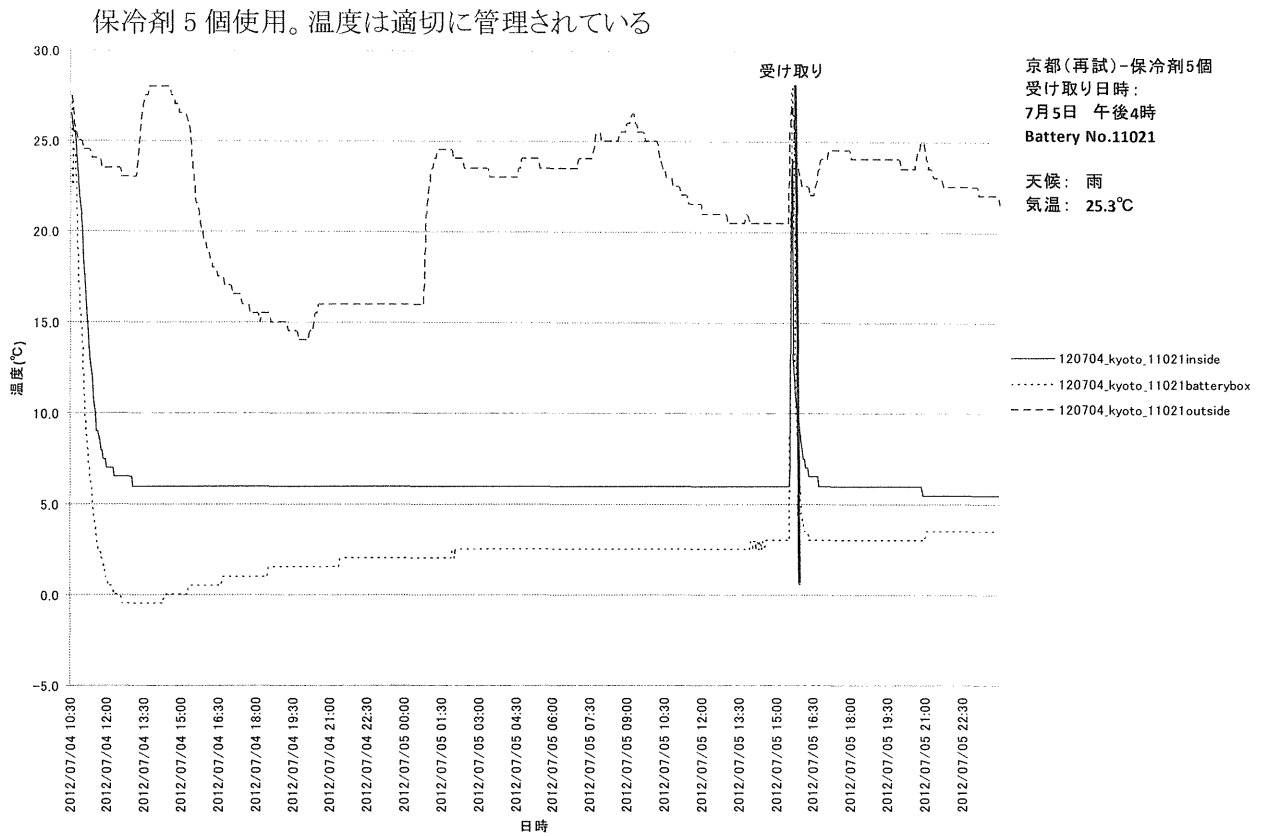


図 8 盛夏時期(8月)の輸送試験データ例

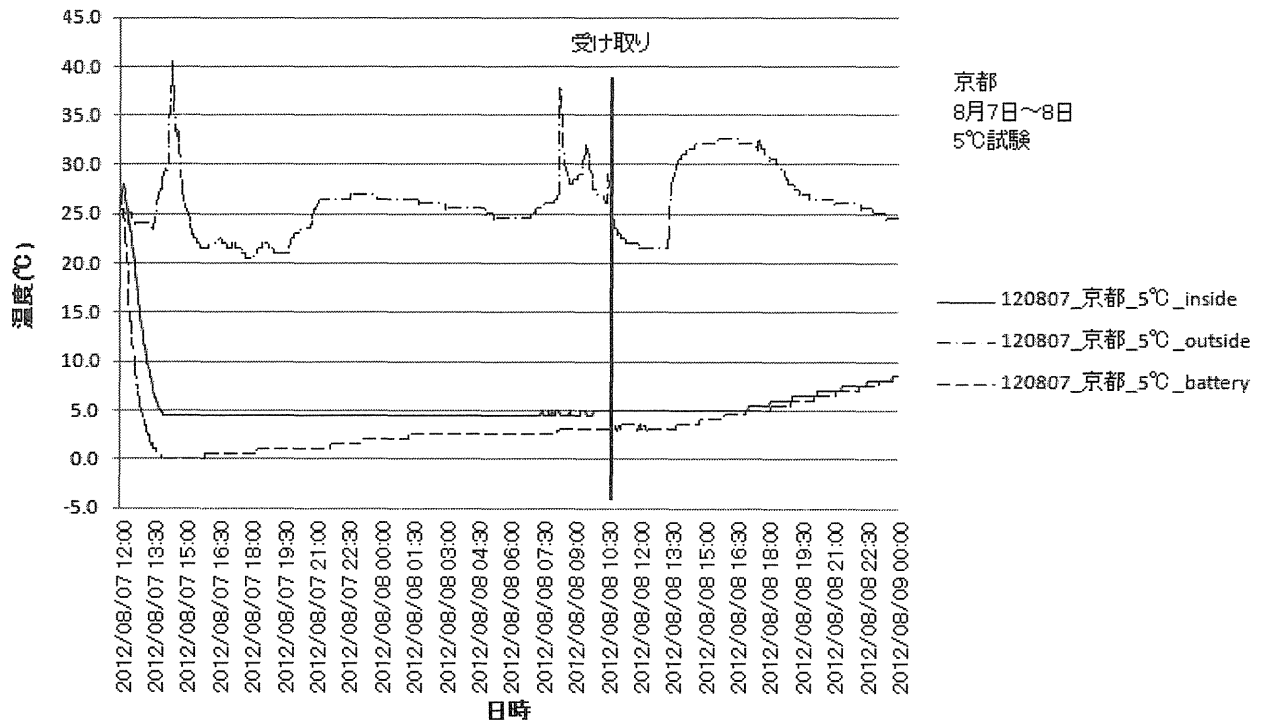
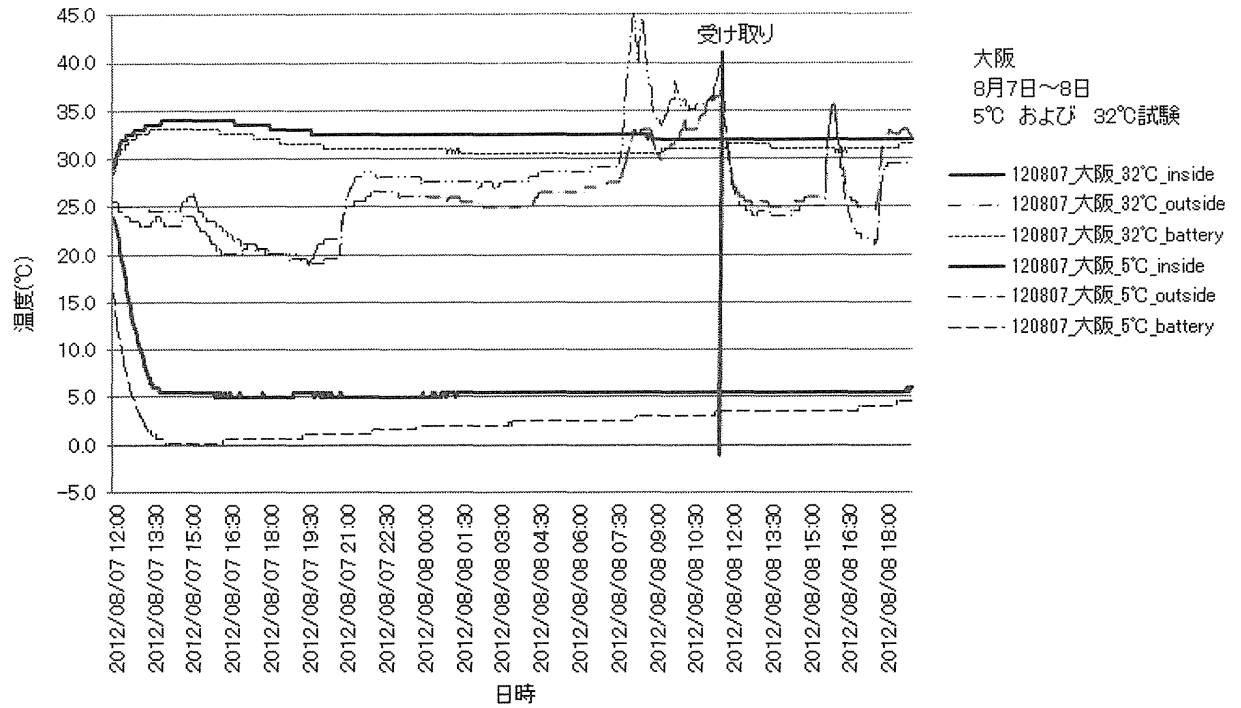


図9 寒冷期の輸送試験輸送試験データ例

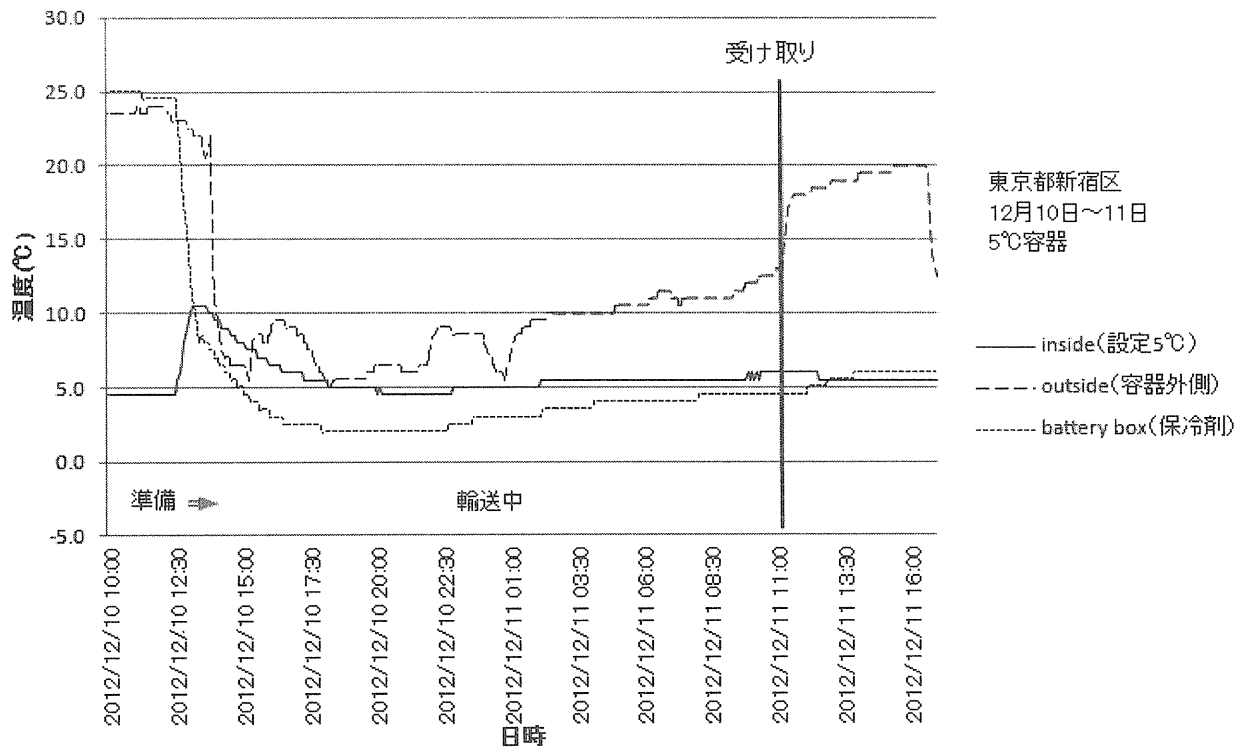


図10 輸出入仕様 輸送試験データ例:電池の消耗が原因と思われる温度が3日目前後で発生する

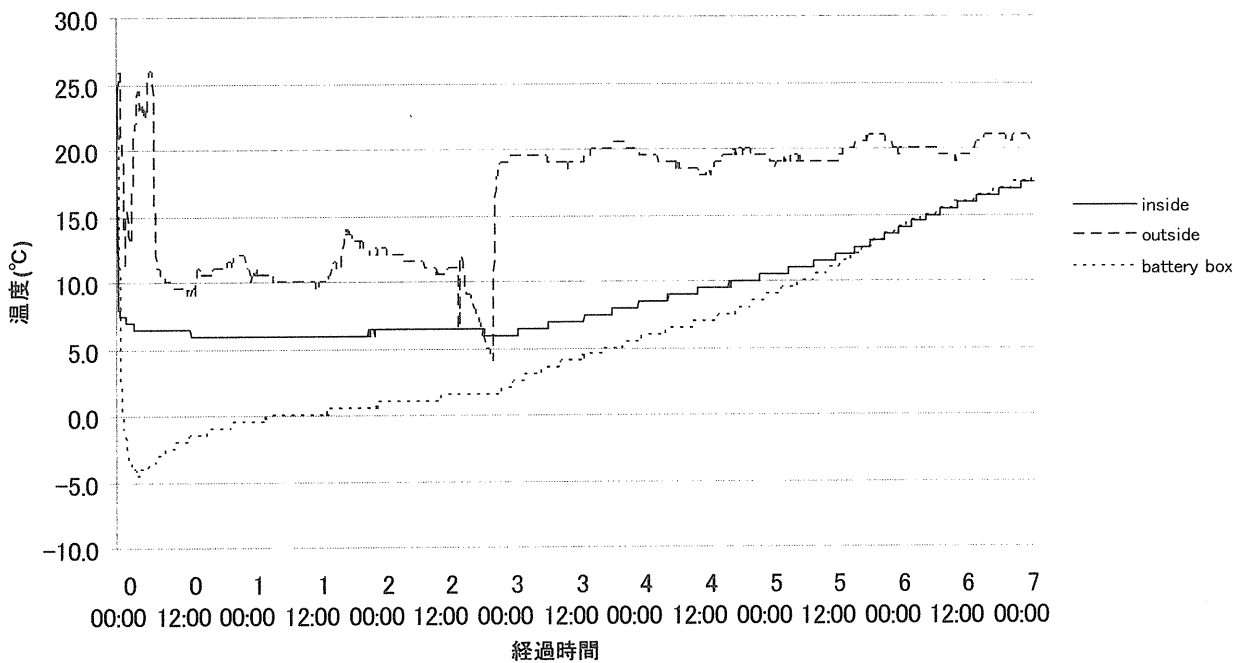


表1 膵島マーカー遺伝子

GeneSymbol	膵島/外分泌 発現比率	NOTE
Ins1	5293.5	alcohol metabolic process, glucose metabolic process, hexose metabolic process, monosaccharide metabolic process, cellular carbohydrate metabolic process, small molecule metabolic process, alcohol metabolic process, developmental process, biological process
Ins2	2179.8	alcohol metabolic process, anatomical structure development, multicellular organismal development, response to peptide hormone stimulus, developmental process, response to endogenous stimulus, response to organic substance, response to hormone stimulus, biological regulation, alcohol metabolic process, biological process, cellular carbohydrate metabolic process, biological regulation, cellular carbohydrate metabolic process, biological regulation
Gcg	680.3	response to endogenous stimulus, system development, glucose metabolic process, hexose metabolic process, monosaccharide metabolic process, developmental process, cellular carbohydrate metabolic process
Sst	183.5	response to endogenous stimulus, anatomical structure development, multicellular organismal development, developmental process, biological process
Scg2	149.1	system development, biological process, response to organic substance, biological regulation, small molecule metabolic process, biological process
Cpe	124.5	peptide hormone processing, response to endogenous stimulus, biological process, response to organic substance
Pcsk2	123.6	system development, glucose metabolic process, hexose metabolic process, monosaccharide metabolic process, developmental process, biological process, cellular carbohydrate metabolic process, biological regulation, small molecule metabolic process
Ppp1r1a	89.9	biological process, biological process, response to endogenous stimulus, biological process, system development, glucose metabolic process
Ppy	70.0	biological process, anatomical structure development
Glut2	66.7	glucose transporter
Pcsk1	65.8	enzyme/prohormone, developmental process, multicellular organismal development, positive regulation of secretion, positive regulation of transport, regulation of localization, regulation of secretion, regulation of transport, response to endogenous stimulus, response to glucose stimulus, response to hormone stimulus, response to organic substance, response to peptide hormone stimulus, secretion, secretion by cell
Hba-a2	55.3	hemoglobin protein, multicellular organismal process
Slc2a2	47.2	biological process, biological regulation, biological process, biological regulation

Ucn3	43.4	corticotropin-releasing factor, cell-cell signaling, generation of a signal involved in cell-cell signaling, hormone secretion, hormone transport, insulin secretion, peptide hormone secretion, peptide secretion, peptide transport, positive regulation of insulin secretion, positive regulation of peptide hormone secretion, positive regulation of peptide secretion, positive regulation of secretion, positive regulation of transport, regulation of localization, regulation of peptide secretion, regulation of peptide transport, regulation of secretion, regulation of transport, response to endogenous stimulus, response to glucose stimulus, response to hormone stimulus, response to organic substance, secretion, secretion by cell, signal release
Slc30a8	24.6	zinc transporter/insulin secretion, response to glucose stimulus, cell-cell signaling, divalent inorganic cation transport, divalent metal ion transport, generation of a signal involved in cell-cell signaling, hormone secretion, hormone transport, insulin secretion, peptide hormone secretion, peptide secretion, peptide transport, response to organic substance, secretion, secretion by cell, signal release
Mlx1p1	16.1	transcription factor, response to glucose stimulus
Npy	12.0	biological process, biological process
Hadh	10.6	response to peptide hormone stimulus, biological regulation, system development, biological regulation, biological process, biological regulation, biological process, anatomical structure development, multicellular organismal development, developmental process, biological process
Rab3b	外分泌画分 では発現が 未検出	GTP binding protein
Scg5		
Cacna1c		calcium channel,
Gipr		gastric inhibitory polypeptide receptor
Entpd3		
Resp18		
Slc8a1		calcium transporter
Sur1		ATP-binding cassette transporter
Ifitm3		transmembrane protein
Gck		glucose kinase

表 2 外分泌細胞マーカー遺伝子

GeneSymbol	外分泌/膵 島 発現比率	NOTE
Cpa2	265.0	enzyme from pancreas,
Reg3a	128.0	acute inflammatory response
Pla2g1b	123.6	enzyme from pancreas, digestion
Ctr1	117.0	serine protease
Pnlip	117.0	enzyme from pancreas, digestion, post-embryonic development
Prss3	113.8	protease from pancreas, digestion
Cel	110.7	protease from pancreas,
Reg3b	106.9	protein/regeneration, acute inflammatory response , acute-phase response
Pnliprp2	104.7	digestion
Pnliprp1	104.0	protein/regulation, post-embryonic development
Cela2a	100.4	serine protease,

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷

該当なし

