

## 同種細胞シートの保存法に関する研究

研究分担者 長嶋 比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・教授

研究協力者 前原 美樹 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室・研究員

研究要旨：今年度は、これまでに開発したウサギ軟骨細胞シートガラス化保存法の改良として、(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大、(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討、(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認、(4) 長期保存後の細胞シートの評価を行った。その結果、(1) 我々の開発した細胞シートガラス化保存法は、非積層化シートに有効であり、特に非積層化細胞シートでは前処理時間の大幅な短縮が可能であること、(2) アルミフィルムでパッケージングされたガラス化細胞シートは、液体窒素ガス気相中(約-150℃)、液体窒素中(-196℃)いずれの保存状態にも耐え得ること、(3) 市販ガラス化液の使用によって、自家作製液と同等の成績が得られること、(4) 細胞シートの長期安定保存が可能であること、などが示された。

### A. 研究目的

これまでに開発した細胞シートガラス化保存法の適用拡大と改良を目的として、以下の項目について実験を行った。

(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大、(2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討、(3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認、(4) 長期保存後の細胞シートの評価

### B. 研究方法

#### 1. ウサギ軟骨細胞シートの培養

ウサギ軟骨細胞(株)コスモバイオ)を温度応答性培養皿(35mm, UpCell®, CellSeed)に $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  cells/dishの濃度で播種し、20% FBSを添加したDMEM/F12培地(GIBCO)で培養した。培養3-4日目に細胞がコンフルエントに達したことを確認して、10%FBSおよび100 $\mu$ Mのアスコルビン酸を添加したRPMI1640培地(GIBCO)に置き換えた。

培養14日目に薄層(1層)形成を確認し、実験

に用いた。2層もしくは3層化細胞シートを実験に供する際は、得られた単層シートをCell shifter (CellSeed)を用いて積層化した後、更に1週間追加培養した。

#### 2. 細胞シートの凍結保存および融解

既に関節したガラス化法を用いた(Maehara et al., 2013)。これは、胚や卵子のガラス化に用いられるMVC法(Kuwayama et al., 2005)のコンセプトを細胞シートに適用したものである。

細胞浸透性凍害保護剤として、平衡液には10% DMSOおよび10% Ethylene glycol (EG)を用いた。ガラス化液のDMSOおよびEG濃度は、それぞれ20%とし、細胞非浸透性凍害保護剤として0.5M sucroseおよび10%(w/v)カルボキシル化ポリリジン(COOH-PLL)を加えた(自家作製液)。

細胞シートをパッケージング素材に収容し、液体窒素蒸気(-150℃)に暴露してガラス化し

た。

保存後のシートは、38℃に加熱したウォームプレート上に静置することで融解した。ピンセットを用いて細胞シートをパッケージから回収し、1M、0.5M sucrose を含む 20mM Hepes 緩衝 TCM199 (20% bovine calf serum 添加) に順次移し、凍害保護剤の希釈ならびに洗浄を行った。

### 3. ガラス化後の細胞シートの評価

融解後の細胞シートは、形態評価(シート構造の破損の有無)の後、コラゲナーゼ処理して細胞分散し、細胞の生存性をトリパンブルー染色により判定した。

### 4. 実験内容

#### (1) 非積層化細胞シートへの応用拡大

従来法ではガラス化前の平衡液(ES)およびガラス化液(VS)への浸漬時間(前処理時間)は、それぞれ 25 分および 20 分としていた。本年度は、前処理時間の短縮を検討した。表 1 に示す様に、非積層化細胞シートに対してはそれぞれ 10 分および 10 分、もしくは 10 分および 5 分の前処理条件を従来法の条件と比較した。2 層化細胞シートに対してはそれぞれ 20 分および 12.5 分、もしくは 12.5 分および 10 分の前処理条件を従来法の条件と比較した。

#### (2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討

前処理が終了した細胞シートを、食品用ラップフィルム((株)クレハ、ポリ塩化ビニリデン、10.5 $\mu$ m)もしくはアルミフィルム((株)三菱ア

ルミニウム、アルミ фольド、厚さ 12 $\mu$ m)を用いてパッケージングし、液体窒素蒸気(-150℃)に暴露してガラス化した。

ウサギ軟骨細胞シートが液体窒素液相中での保存に耐え得るかを確認するために、以下の実験を行った。2 層化細胞シートを用いて、従来通りの液体窒素液相中でのガラス化あるいは液体窒素液相中への浸漬を行い融解後のシートの形態維持、細胞生存性を評価した。

#### (3) 市販ガラス化保存液の検討

自家作製液と同組成の市販予定ガラス化液(バイオベルデ社製)を使用し、その有効性の確認を行った。

#### (4) 長期保存後の細胞シートの評価

ガラス化細胞シートを、液体窒素タンク中(気相、-150℃)で 2 週間~1 か月間保存し、融解後の形態維持ならびに細胞生存性を評価した。

### C. 結果

#### (1) 非積層化細胞シートへの応用拡大

非積層化シート(計 9 例)において、融解後のシート構造に破損は全く生じることなく(図 1, A-D)、細胞生存性も高く保たれていた(89.5%)。この成績は、非ガラス化対照区(95.5%)と比較しても同等であった。また、非積層化シートでは、ガラス化前の前処理時間を従来の 45 分から 15 分に大幅に短縮しても、シートの構造(無傷での回収率: 100%)、細胞生存性(87.8%)ともに良好に保たれることが分かった。積層化シート(2 層, 計 13 例)を従来法でガラス化した結果、融解後のシート構造に破損は全く生じるこ

となく(図 1, E-H)、細胞生存性も高く保たれていた(86.1%)。ガラス化前の前処理時間を 32.5 分に短縮しても、同等の成績は保たれていた。しかし、前処理時間を大幅に短縮した場合(ES 12.5 分/VS 10 分処理)には、7 例中 2 例において融解時に氷晶形成が生じた(表 1)。

#### (2) 長期保存を目的とするパッケージング素材と保存法の検討

ラップフィルムによりパッケージングされた細胞シートを、液体窒素ガス気相中でガラス化した後に液体窒素液相中で保存した場合、5 例中 1 例のシートに破損が生じた(図 2-A)。

パッケージングにアルミフィルムを用いた場合、液体窒素ガス気相中でガラス化する従来法では、融解後のシート構造の破損は全く生じることなく、細胞生存性は 85.0%であった。この成績は、非ガラス化試料(85.8%)に匹敵するものであった。アルミフィルムでパッケージングされたシートを、液体窒素ガス気相中でガラス化した後に液体窒素液相中に浸漬した場合も、シートの破損は生じず、また細胞の生存性も高く維持された(84.2%)。しかし、アルミフィルムでパッケージングされたシートを液体窒素液相中に浸漬してガラス化した場合は、細胞生存性(82.4%)は高く保たれたものの、シート構造の破損が顕著であった(無傷回収率 0%, 図 2-C)。

#### (3) 市販予定ガラス化保存液の有効性確認

市販予定ガラス化液(バイオベルデ社製)はウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存に有効であることが確認された。融解後のシートの構造

は無傷に保たれており(無傷回収率 100%, 図 3-B)、細胞生存性は 82.2%であった。この成績は、自家作製液(無傷回収率 100%, 細胞生存性 83.5%)および非ガラス化試料(無傷回収率 100%, 細胞生存性 84.5%)と同等であった。

#### (4) 長期保存後の細胞シートの評価

3 層化細胞シートを 2 週間液体窒素ガス気相中に保存し融解した結果、シート構造の破損は全く生じることなく(無傷回収率 100%, 図 4-B)、細胞生存率も 83.2%と高く保たれていた。この成績は、非ガラス化試料及びガラス化直後に融解した試料と同等であった。

次に、2 層化細胞シートを 30 日間保存し融解した結果、融解後のシート構造の破損は見られず(無傷回収率 100%, 図 5-B)、細胞生存率(79.2%)も高く保たれていた。この成績は、非ガラス化試料及びガラス化直後に融解した試料と同等であった。

### D. 考察

(1) 非積層化細胞シートへの応用拡大試験において、2 層化シートの前処理時間を大幅に短縮した際には、融解時に氷晶形成が見られた。積層数の多い細胞シートをガラス化する場合には、凍害保護剤を十分に浸透させるために、ある程度の長さの前処理時間は必要であると考えられる。

(2) アルミフィルムによるパッケージングは、細胞シートのガラス化だけでなく長期保存にも適していると思われる。今後はより長期保存後の検証が必要である。

E. 結論

1. 細胞シートの積層数に応じて、凍害保護剤の浸透に要する前処理時間の短縮が可能である。
2. パッケージング素材として、アルミフィルムが有望である。アルミフィルムでパッケージングされた細胞シートは、液体窒素ガス気相中(約-150 )、液体窒素液相中(-196 )いずれの保存状態にも耐える。
3. 市販(予定)ガラス化保存液(バイオベルデ社製)の有効性が検証された。
4. 軟骨細胞シート長期ガラス化保存が可能である。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

<招待講演・国内>

1. 長嶋比呂志. 受精卵凍結保存のノウハウは組織・臓器の保存にどこまで応用可能か?. 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会, 28-29 Nov 2014; 大阪.

<国内学会>

1. 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 松村和明, 玄丞然, 長嶋比呂志. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-2. 第14回日本再生医療学会総会, 19-21 Mar 2015; 横浜.

表1. 非積層および積層化(2層)ウサギ軟骨細胞シートのガラス化：前処理時間短縮の検討

シート積層数	前処理時間	無傷での回収率 <sup>1</sup>	融解時氷晶形成	細胞生存率 <sup>2</sup>
非積層	ES 25分/VS 20分	100% (3/3)	0% (0/3)	91.0% (n=3)
	ES 10分/VS 10分	100% (3/3)	0% (0/3)	91.1% (n=3)
	ES 10分/VS 5分	100% (3/3)	0% (0/3)	87.8% (n=3)
	非ガラス化対照	100% (1/1)	0% (0/1)	95.5% (n=1)
2層	ES 25分/VS 20分	100% (6/6)	0% (0/6)	86.4% (n=6)
	ES 20分/12.5分	100% (7/7)	0% (0/7)	88.5% (n=6)
	ES 12.5分/VS 10分	100% (7/7)	28.6% (2/7)	84.8% (n=7)
	非ガラス化対照	100% (5/5)	0% (0/5)	89.0% (n=5)

ES: 平衡液； VS: ガラス化液； <sup>1,2</sup> 各区間に有意差なし

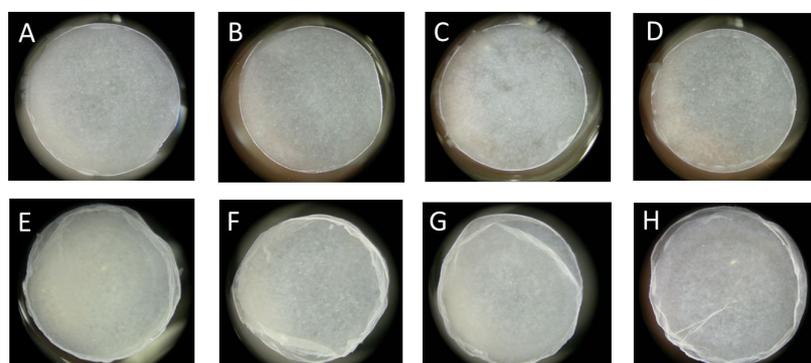


図1. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化・融解後の形態

A-D. 非積層化細胞シート； E-H. 2層化細胞シート； A. ES25分/VS20分処理区； B. ES 10分/VS 10分処理区； C. ES 10分/VS 5分処理区； D. 非ガラス化対照区； E. ES 25分/VS 20分処理区； F. ES 20分/VS 12.5分処理区； G. ES 12.5分/VS 10分処理区； H. 非ガラス化対照区

表2. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化：液体窒素液相への浸漬の影響

パッケージング素材	ガラス化条件		無傷での回収率	細胞生存率 <sup>*</sup>
	液体窒素気相でガラス化	液体窒素液相に浸漬		
食品用ラップフィルム	+	+	80.0% (4/5)	84.2% (n=5)
	+	-	100% (8/8)	85.0% (n=8)
アルミフィルム	-	+	0.0% (0/2)	82.4% (n=2)
	+	+	100% (2/2)	84.2% (n=2)
非ガラス化対照			100% (8/8)	85.8% (n=8)

2層化細胞シートを用いた； <sup>\*</sup> 各区間に有意差なし

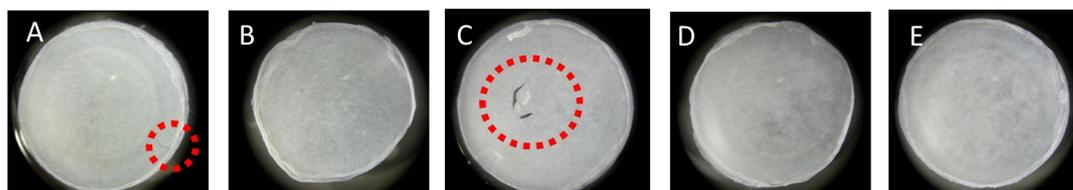


図2. ウサギ軟骨細胞シートのガラス化・融解後の形態

- A. 食品用ラップフィルムでパッケージングしたシートを、液体窒素蒸気でガラス化後に液体窒素液相中に浸漬した結果、シート構造の破損が見られた(赤丸印)； B. アルミフィルムでパッケージングし、液体窒素気相中でガラス化された細胞シート； C. アルミフィルムでパッケージングした細胞シートを液体窒素中に直接浸漬してガラス化した結果、シート構造の破損が生じた(赤丸印)； D. アルミフィルムでパッケージングし、液体窒素ガス気相中でガラス化後に液体窒素液相中に保存された細胞シート； E. 非ガラス化対照区

表3. 市販予定(バイオベルデ社製)ガラス化液の有効性の確認

ガラス化液	無傷での回収率	細胞生存率
自家(明治大学)製	100% (7/7)	83.5% (n=7) <sup>ab</sup>
バイオベルデ社製	100% (9/9)	82.2% (n=9) <sup>a</sup>
非ガラス化対照	100% (5/5)	84.5% (n=5) <sup>b</sup>

2層化細胞シートを用いた； <sup>a,b</sup>異符号間に有意差あり(p>0.05)

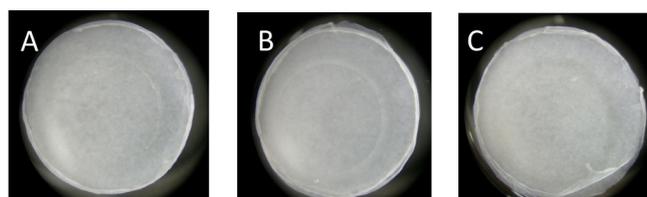


図3. ガラス化および融解後のウサギ軟骨細胞シートの形態

- A. 自家(明治大学)製ガラス化液を使用してガラス化された細胞シート； B. バイオベルデ社製ガラス化液を使用してガラス化された細胞シート； C. 非ガラス化対照区

表4. 長期保存されたガラス化細胞シートの評価：3層化ウサギ軟骨細胞シート

実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率
ガラス化区	0日間	100% (1/1)	83.4% (n=1)
ガラス化保存区	2週間	100% (2/2)	83.2% (n=2)
非ガラス化対照区	-	100% (1/1)	84.1% (n=1)

ガラス化直後に融解した

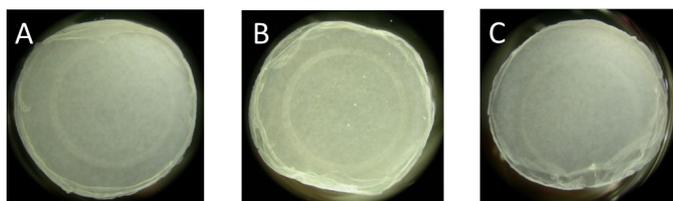


図4. 長期保存されたガラス化細胞シートの融解後の形態

(3層化細胞シートを2週間保存)

A. ガラス化直後に融解； B. 2週間保存； C. 非ガラス化対照

表5. 長期保存されたガラス化細胞シートの評価：2層化ウサギ軟骨細胞シート

実験区	保存期間	無傷での回収率	細胞生存率*
ガラス化区	0日間	100% (3/3)	78.0% (n=3)
ガラス化保存	30日間	100% (3/3)	79.2% (n=3)
非ガラス化対照区	-	100% (2/2)	82.2% (n=2)

ガラス化直後に融解した； \*各区間に有意差なし

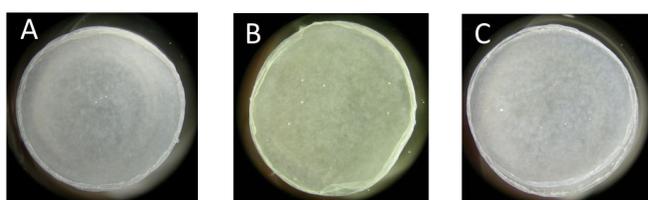


図5. 長期保存されたガラス化細胞シートの融解後の形態

(2層化細胞シートを1ヶ月保存)

A. ガラス化直後に融解； B. 1ヶ月保存； C. 非ガラス化対照