

# 凍結保存における細胞内構造と障害メカニズム

東レリサーチセンター 中田克

## 1. Introduction

細胞や臓器の凍結保存は、再生医療分野だけでなく畜産や食品分野において、貴重な細胞や食料資源を長期・安定的に保管・使用するために重要な技術である。凍結保存における細胞障害としては、主に細胞内での氷晶形成による細胞内構造や細胞膜が物理的に破壊されることが懸念されている。凍結保存時における細胞保護を目的として使用される凍結保護剤は、主に細胞内氷晶形成を抑制することをターゲットとして研究・開発が進められている。しかし、細胞の凍結保存過程においては凍結保護剤そのものの細胞毒性や細胞内外の浸透圧バランスによる細胞の体積変化・脱水、酸化ストレスなどによる障害などさまざまな物理的、生物学的な要因が競合的に細胞障害を引き起こしていると考えられ、凍結保存における細胞障害の詳細メカニズムは未解明の課題である。

凍結保護剤は 1949 年の Polge ら(Nature, 164(1949)666)によるグリセロールの凍結保護効果の発見を契機にジメチルスルホキシド(DMSO)、エチレングリコールやプロピレングリコールなど低分子系保護剤、スクロース、トレハロースなどの糖類、さらにはポリエチレングリコールやポリビニルピロリドン(PVP)などの高分子系保護剤の研究・開発が行われている。一般には低分子系保護剤の方が普及しており、低分子系保護剤は細胞内へ浸透することで細胞内での氷晶形成を抑制する効果があると言われている。しかし、低分子系保護剤は細胞内で代謝により有害物質へ変化し、生物学的毒性を発現することが知られている(Asian Journal of Pharmaceutics, 10(2016)10.1-6)。糖や高分子系保護剤は一般的に細胞内へは浸透せず、代謝毒性は発現しないという利点がある。凍結保存は実施者の経験・手技によるところが多く、またいかなる細胞をも対象とした保護剤や保存法開発には至っていないのが現状である。その研究の多くは実際に細胞を凍結保存し、融解後の生存率や機能発現を調べるという試行錯誤によるところが多く高コストなものである。凍結保護剤の開発促進のためには、保護剤による細胞障害抑制効果の物理的・定量的な評価法を確立し、保護メカニズムを解明することが重要である。細胞内氷晶形成については Huebinger ら(Biophysical Journal, 110(2016)840))は電子顕微鏡や X 線回折を用いた研究例が一部あるのみであり、細胞内氷晶による細胞障害に関する定量的な研究例はほとんどない。

我々は保護剤として PVP を用いて融解後生存率と細胞内氷晶形成の関係性を調べてきた。図 1 に融解後生存率の PVP 濃度依存性、図 2 に -70 °C での顕微鏡および  $\mu$  ビーム X 線回折( $\mu$ XRD; SPring-8 BL24XU)を用いた細胞内氷晶の観察結果を示す。その結果、PVP 濃度が高くなるにつれて生存率が向上し、細胞内の氷晶サイズが小さいことが示唆された。さらに PVP 50wt%溶液中では細胞内氷晶は準安定相である立方晶(Ic)を形成していることがわかった。しかし、 $\mu$ XRD で対象とした細胞は 1 個のみで、再現性の検証が必要であり、根本的に対象細胞数を増やす工夫が求められる。

そこで、統計的に十分な細胞数を対象とし、かつ選択的に細胞内の構造解析するためのアプローチとして DNP-SANS が期待される。細胞懸濁液に TEMPOL とラジカルクエンチャーを添加すると TEMPOL は細胞内外に分布する一方でクエンチャーは細胞内に浸透できないため、細胞内のみラジカル活性状態にすることができ、DNP で細胞内のみ散乱コントラスト変調できる可能性がある。なお、細胞内外の TEMPOL、クエンチャー分布について電子スピン共鳴(ESR)法を用いて確認済である。

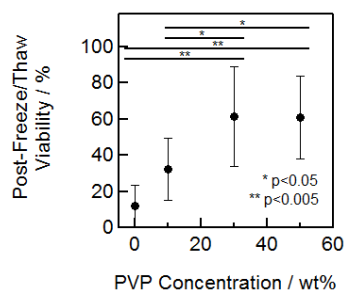


図 1 細胞の融解後生存率の PVP 濃度依存性

本実験では DNP-SANS による細胞内氷晶の構造解析の予備実験として、SANS で細胞由来の散乱が観測されるか、また TEMPOL 添加による試料の構造に与える影響有無を調べた。

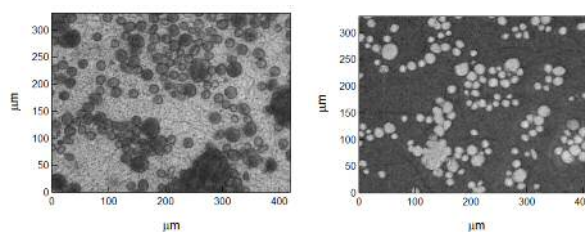


図 2 PBS(上段左)、PVP 50 wt%(上段右)中での顕微鏡像 (下段) 50 wt%での  $\mu$  ビーム X 線回折での細胞内外スキャン像

## 2. Experiment

マウス胎仔由来の間葉系幹細胞 C3H10T1/2 を培養フラスコから剥がして、遠心・上清除去後、各種 PBS バッファー溶液で再懸濁して試料とした。懸濁溶液には PBS と PBS に PVP( $M_w = 4,000 \sim 5,000$ ) を 30 wt% と 50 wt% 溶解した溶液を用いた。さら

に 50 wt% 溶液には TEMPOL 50 mL 添加した溶液も調製した。各溶液の細胞濃度は  $2 \times 10^6$  cells/mL に調製した。調製した試料を BL20 の SANS セル(石英窓:1.0 mm、試料厚さ 0.5 mm)に充填して室温 SANS 測定を行った。また、ブランクとして細胞無しの溶液の測定も行った。ビーム出力は 600 kW で、各測定で 30 分間積算した。

## 3. Results

得られた細胞懸濁液の SANS データから各細胞無の溶液のデータを引いた結果を図 3 に示す。すべての試料において  $Q^2$  で減衰する散乱が観測された。また、50 wt%/TEMPOL 系では充填した試料量が少なく統計精度が低いため判断は難しいが、TEMPOL 無添加の試料と顕著な違いはないと考えられる。観測された散乱は細胞膜や細胞内の生体分子複合体に由来するものと推察される。

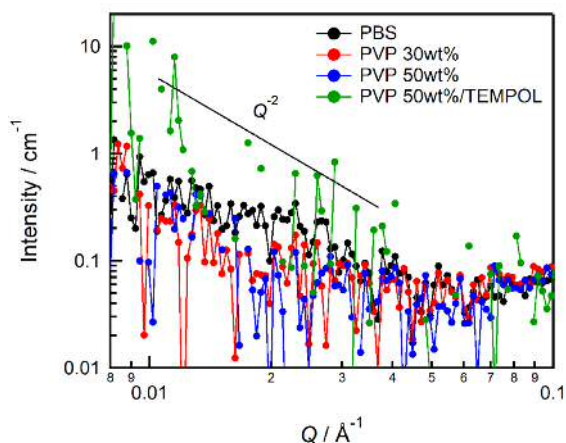


図 3 細胞懸濁液の SANS プロファイル

## 4. Conclusion

本実験で細胞懸濁液の DNP-SANS の予備実験として室温での SANS 検討を行った。測定中に細胞がセル中で沈降し、照射中性子ビームから外れることが懸念されたが有意なデータが取得できたと考える。また、TEMPOL を添加しても SANS データに顕著な差異が見られなかったことから DNP-SANS 実験でのスピンコントラスト偏重が期待される。さらに BL20 は低角バンクも有しており  $4 \text{ \AA}^{-1}$  まで測定可能であるため、細胞内で形成された氷晶の結晶構造(結晶形、結晶量、サイズ)についても解析できる可能性があり、期待が持たれる。