ブタ膵ラ島凍結保存法開発のための基礎的研究

—至適凍結条件の検討—

近畿大学第2外科

宮 本 正 章 大 柳 治 正 田 中 勝 喜

UCLA 外科

剣 持 敬 Yoko Mullen

凍結保存リンパ球は、移植前後の種々の組織適合性試験における typing や matching あるいは移植後の donor graft に対する recipient の免疫反応の評価等、移植免疫研究において非常に有用であり、さらに反復した試験の再現をも可能とする。われわれは、recovery に優れたブタ膵ラ島凍結保存法開発を最終目的とした種々の基礎的な至適凍結条件検索のため、その preliminary test として trypan blue 染色により凍結解凍リンパ球の% viability を算出し検討を加えたので報告する。その結果、成熟ブタリンパ球に対する最も優れた至適凍結保存条件は、凍害防御剤としての DMSO 濃度は 5% とし、programmed freezer を使用し、凍結用 medium として RPMI 1640 を使用し、さらに 10% FBS を添加した場合と判明した。これらの基礎的な検討結果は、今後種々の動物種のリンパ球および膵ラ島凍結保存法に応用できうる可能性がある。

索引用語 ブタ膵ラ島、凍結保存法、リンパ球、Dimethyl Sulfoxide (DMSO)、Programmed Freezer

緒 言

異種移植は、移植医療において深刻な donor 不足を解決するための根本的解決法として最近注目されている。特に繁殖力が旺盛で、解剖学的にもヒトに近く、食用動物として開発されてきたという歴史的動物愛護の観点からもブタが特に有望視されている¹⁾。

一方糖尿病治療のための膵ランゲルハンス氏島(膵ラ島)移植においても、成熟ブタ膵ラ島は、Islet allotransplantation へ至る大動物での実験モデルとして、また異種移植実験モデルとしても欧米を中心に盛んに研究されている。しかし、この成熟ブタ膵ラ島は、ヒト、イヌ等の膵ラ島と異なり、その形態学的特性により、とても脆くその分離は至難の技である²⁾。われわれは、viability, purity に富み、大量に分離可能な2段階ヒト膵ラ島分離法を開発し報告してきたが³⁾、さらに次の段階として、成熟ブタ膵ラ島分離法を開発し、その分離成熟ブタ膵ラ島を利用した islet bank の

確立、さらにその microencapsulation を目的としてブタ膵ラ島凍結保存法の開発に着手した。しかし、世界中の成熟ブタ膵ラ島分離を出がけている数少ない施設、文献を見ても、満足すべき recovery rate を示している施設はなく、その困難さを物語っている⁴⁾。

そこでわれわれは、ブタ膵ラ島凍結保存法開発の前段階として、その至適凍結条件の検討、再確認を目的として研究を開始したが、ブタ膵ラ島は、その採取自体が非常に難しく、また分離培養も困難であり、さらに cost performance も大変悪く、テストとしての再現性も悪いため、そしてリンパ球そのものの至適凍結条件を検討する目的をも含めて、検討材料としてまず成熟ブタリンパ球を選択した。分離が非常に容易なブタリンパ球は、移植前後の種々の組織適合性試験における typing や matching、あるいは移植後の donor graft に対する recipient の免疫反応の評価等、移植免疫研究において非常に有用であり、その凍結保存至適条件についての基礎的検討を加え、若干の知見を

図1 Programmed freezerによるブタリンパ球凍結チャート

得たので報告する。

方法および対象

成熟ブタリンパ球分離

ヘパリン使用下に成熟ブタ静脈より採血し、これを Phosphate buffer saline (PBS) にて希釈後、Lymphocyte separation medium (LSM) に重層して 4°C 400 xg で 30 分間遠心し、serum と erythrocytes より分離した。Lymphocyte layer を micropipet により吸引し、さらに PBS を加え洗浄、遠心した。遠心後 Tris/Ammonium chloride (NH₄Cl) を加え、室温下に 5 分間静置し、erythrocytes を溶解した。その後 Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて 2 回洗浄後、最後に RPMI 1640 (RPMI: Sigma 社 R 6504) にて洗浄し実験に供した³⁾。

凍結保存法

Programmed freezing: このようにして得られた成熟ブタリンパ球を PRMI にて洗浄後、2ml cryovials (Nalge Company) に入れ、各 DMSO 濃度に調整し、これらをコンピュータ制御 automated cryounit (GE 9000, 大陽東洋酸素株式会社、大阪) の freezing chamber へ移入し、われわれ独自に作製した以下のリンパ球用プログラムに従って凍結保存した。

- Step 1: 4°C to -6°C at -1°C/min
- Step 2: -6°C to -45°C at -39°C/min
- Step 3: -45°C to -15°C at 30°C/min
- Step 4: -15°C to -25°C at -1°C/min
- Step 5: -25°C to -50°C at -2°C/min

このプログラムでの実際の freezing chart を図 1 に提示した。Sample temperature が -50°C に到達した時点で自動的に freezing は終了し、直ちに液体窒素タンクで保存した (-196°C 保存)。そして、解凍までは少なくとも 24 時間はこの状態を保持した。

Non-programmed freezing: ブタリンパ球を RPMI にて洗浄後、2ml cryovials に入れ、各 DMSO 濃度に調整し、直ちに -70°C にセットした deep freezer (Forma Scientific Inc, CA) に移入し、24 時間この状態で保存し、24 時間後液体窒素タンクへ移入し保存した (-196°C 保存)。

解凍法

いずれの freezing 法による凍結ブタリンパ球も、液体窒素タンクより直ちに 37°C water bath に浸し、“急速解凍法”により解凍した。完全解凍後これを RPMI+10% FBS を使用して洗浄を繰り返し、hemacytometer を使用してリンパ球数の計算を行った。その後基礎的検討のため最も簡便で短時間で判定可能な trypan blue 染色により viability test を行った。各グループは 1 回毎に triplicates で実験を行い、% viability を計算し比較検討した。

% viability は、以下の式により求めた。

$$\% \text{ viability} = \frac{\% \text{ viability after procedure}}{\% \text{ viability before procedure}}$$

実験は以下の凍結至適条件について検討を加えた。

1) 細胞内凍害防止剤としての Dimethyl sulfoxide (DMSO) そのものの toxicity を知る為、まず非凍結でただブタリンパ球に DMSO を暴露させ、DMSO の濃度差 (5%, 10%, 15%) およびその暴露時間 (5 分, 10 分, 15 分, 20 分) および調整時の温度 (4°C, 室温) の検討。

2) 凍結法による検討として、Programmed freezing (GE 9000) と Non-programmed linear freezing の差異の検討。

3) 凍結に使用する Medium の違いとして、RPMI, saline さらにブタ豚ラ島専用保存液として独自に開発途上であり、表 1 に組成を示した Raffinose, K-Lactobionate, KH₂PO₄, MgSO₄ よりなる modified UW solution (mUW) の検討。

表 1 modified UW solution (mUW) の組成

Solution	HBSS	UW	mUW
Impermiants	Glucose	Raffinose K-Lactobionate	Raffinose (30) K-Lactobionate (100)
H+ buffers	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄ (15)
Metabolites and others	Na ₂ HPO ₄ MgSO ₄ KCL NaCl CaCl ₂	MgSO ₄ Adenosine Glutathione Alloprinol Dexamethazone HES	MgSO ₄ (5)
Na+ (mEq)	138	30	30
K+ (mEq)	5.8	120	120
mOsm/ L	284	320	320
pH	7.2	7.4	7.4

図 2 リンパ球% viability に対する DMSO 濃度の影響

4) medium に対する蛋白添加の意義として 10 % fetal bovine serum (FBS) 使用の有用性について検討を加えた。

有意差検定は, Mann-whitney 検定を用い, $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

結 果

1) DMSO 濃度, 暴露時間およびその温度

DMSO そのものの影響を知る為非凍結で, 成熟ブタリンパ球を, (1) DMSO 濃度 5%, (2) DMSO 濃度 10%, (3) DMSO 濃度 15% とし, 各 DMSO 濃度に調節した RPMI+10% FBS 溶液に入れ, per volume 当りの % viability を計測した。さらにその暴露時間, 温度についても比較検討した。その結果, 室温 5 分間暴露において, DMSO 濃度

5% の % viability は, $94.9 \pm 0.5\%$ であり, 10% では $88.8 \pm 0.5\%$, 15% では $90.1 \pm 0.9\%$ であった。濃度 5% 間と比較して両群共に明らかな有意差が存在した ($n=9$, $P < 0.01$, 図 2)。また, 暴露時間は, DMSO 濃度が 15% になると, 時間経過とともに % viability は低下する傾向が存在した ($n=9$, 図 3)。DMSO 濃度 5% における温度条件は, 暴露時間 5~20 分でその % viability は, 4°C すなわち氷上では $97.3 \pm 0.9\%$, 24°C すなわち室温では $96.3 \pm 0.7\%$ と有意差はなかった ($n=9$)。

2) Programmed freeze と Non-programmed linear freezer

RPMI+10% FBS 溶液を使用して DMSO 濃度 5% および 10% において両者を比較すると, programmed freezer では, % viability は $83.5 \pm 0.7\%$ であり, Non-programmed linear freezer では, $78.5 \pm 1.2\%$ で有意差が存在した ($n=9$, $P < 0.05$, 図 4)。Saline 溶液による検討では, programmed freezer においては $66.0 \pm 1.7\%$ であり, Non-programmed linear freezer においては, $48.8 \pm 3.9\%$ と明らかな有意差が存在した ($n=9$, $P < 0.01$, 図 4)。

3) 凍結用 medium の差異

Programmed freezer における各種 medium の % viability は, 5% DMSO においては, RPMI は, $85.0 \pm 0.2\%$, bUW は, $84.5 \pm 0.5\%$, ($n=9$, この 2 群は有意差なし, 図 5), saline は, $71.0 \pm 0.3\%$ ($n=9$, $P < 0.01$) であり, DMSO 濃度が 10

図3 DMSO濃度と暴露時間の影響

図4 RPMI 1640+10% FBS 溶液と生食液における freezing procedure の影響

図6 FBS 添加の効果について

図5 Programmed freezer における各溶液の % Viability の比較

% となると, RPMI は, $84.0 \pm 0.2\%$, bUW は, $72.5 \pm 1.8\%$, ($n=9$, $P<0.01$)と有意差が存在した(図5)。saline は, $61.0 \pm 2.0\%$ ($n=9$, $P<0.001$)であった。Non-programmed linear freezer における % viability は, 5% DMSO においては, RPMI は, $77.0 \pm 0.4\%$, bUW は, $75.5 \pm 2.1\%$,

($n=9$, この2群は有意差なし), saline は, $53.5 \pm 5.8\%$ ($n=9$, $P<0.01$)であり, DMSO 濃度が 10% となると, RPMI は, $83.0 \pm 0.3\%$, bUW は, $68.0 \pm 1.5\%$, ($n=9$, $P<0.01$)と有意差が存在した。saline は, $44.0 \pm 1.1\%$ ($n=9$, $P<0.01$)であった。

4) 10% FBS の添加

Programmed freezer において溶液として RPMI と bUW を使用した場合の % viability は, 10% FBS (+) 群は, $79.5 \pm 3.4\%$ であり, 10% FBS (-) 群は, $70.8 \pm 3.6\%$ と有意差が存在し ($P<0.005$, 図6), Non-programmed freezer における % viability は, 10% FBS (+) 群は, $74.0 \pm 1.8\%$ であり, 10% FBS (-) 群は, $63.3 \pm 2.0\%$ と有意差が存在し ($P<0.05$, 図6), 10% FBS の有効性が示唆された。

考 察

膝う島移植における凍結保存法は, 移植までに

十分な時間を保証し、充分量の移植臍ラ島数を確保し、human leukocytes antigen (HLA) の full matching をも可能とし、さらに immunomodulation method としても応用でき、臍ラ島移植成功のためには、必要不可欠な技術である⁵⁾。

さらに discordant xenotransplantation としての成熟ブタ臍ラ島は、ドナー臍不足を根本的に解決する可能性があるが、その場合でも成熟ブタ臍ラ島に対する凍結保存法は、37°C 培養に限界がある以上、必要不可欠な手技である。このため成熟ブタ臍ラ島凍結保存法の開発は急務であるが、成熟ブタ臍ラ島は、電顕的に peri-insular extracellular matrix (ECM) が欠如し、cell-to-cell adhesion となっているため臍ラ島自体がとても脆弱である⁶⁾。成熟ブタ臍ラ島の分離自体が困難な上にさらに凍結保存法となると至難の技であり、Tai らの報告⁷⁾をみてもその recovery rate は 50 % にも達しないのが現状である。このため新しいブタ臍ラ島専用保存液の開発とともにその至適凍結条件の詳細な検討、確認のため本研究を開始した。

さらに移植免疫におけるリンパ球の活用は、mixed lymphocyte reaction (MLR) による helper T cell が標的とする class II alloantigen の検索、さらに MLR の二次反応として primed lymphocyte test (PLT), cytotoxic T cell の機能を表し、移植臓器の拒絶反応を反映する cell mediated lympholysis (CML) や、hyperacute rejection あるいは accelerated rejection 予防のために、移植直前に donor T cell と recipient 血清のクロスマッチを行う、抗 donor T 細胞抗体の検索、そして human leukocyte antigen (HLA) のタイピング、クロスマッチ等にと必要不可欠のものである⁸⁾。そしてこの凍結保存リンパ球は、second set testing をも含めて同一個体での頻回の試験の再現性を保証し、さらに検査の時間的余裕をも保証する。そのため viability に優れた recovery rate の高いリンパ球に対する凍結保存法の至適条件の検討も、また意義あるものである。

リンパ球に対する機能検査としては、flow cytometry (FCM), mixed lymphocyte culture (MLC) 等が知られているが、いずれも時間と手間

がかかり、今回は、preliminary study であり、基礎的条件のみを短時間で把握したく、最も簡便な短時間で判定可能な viability test である trypan blue 染色による簡易機能検査を実施した。

細胞膜透過型凍害防御剤である DMSO は、その束一性 (colligative property) により氷晶形成量を抑制し、細胞外凍結から細胞を守り、蛋白質の水和水の結合している場所に DMSO が選択的に置換結合して脱水による蛋白質の構造と機能の変化を防ぐが、高濃度では細胞に毒性を示すようになり、さらに解凍により DMSO を除去する時、DMSO の膜透過速度は水のそれに比較して遅いことから、急激な水の細胞内侵入がおり細胞や細胞内器官が膨張して希釈ショック (dilution shock) の傷害を受ける⁹⁾。このため至適 DMSO 濃度の検討は、極めて重要であり、今回われわれは、その toxicity の面から検討したが、DMSO 濃度 5 % における % viability が最も優れており、さらに濃度 15 % になると暴露時間とともにその % viability が低下し、ブタリンパ球に対しては、5 % をその推奨濃度と考えた。

次に凍結方法による検討では、programmed freezer において % viability は優れており、programmed freezer の使用が推奨された。これは、細胞の生存上最適な冷却速度が存在し、programmed freezer の場合リンパ球の最適冷却速度により合致していたためと考えられた。すなわち冷却速度が早過ぎると細胞内の水の多くが細胞内に残って過冷却され、細胞外から植氷されて細胞内凍結を起こすと考えられる¹⁰⁾。

われわれの使用している automated cryounit, GE-9000 は、DOS-V の computer と連動することで図示したごとく実際のチャートを表示することができ、 $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ という slow cooling が可能であり、検体温度、チェンバー温度のいずれでも cooling, heating の trigger を規定でき、そのため従来の方法とは違い nucleation も自動的に惹起され、non-programmed linear freezer (deep freezer) と比較すると、液体窒素を必要とする点だけが短所であるが、価格も廉価でこの簡便さ、あらゆる細胞の凍結保存にも使用できうる点を考えると非常に利用価値の高いものであると考えら

れ、各種細胞バンクの確立には必須のものであると考えられた。

われわれは、ブタ臍ラ島専用保存液開発のため impermiantes としての raffinose と K-lactobionate よりなる mUW solution を試作したが、5% DMSO においてこそ RPMI と % viability において有意差はなかったものの、その他では RPMI が優り、mUW solution 作製の労力および cost performance を考えると簡便で廉価な RPMI を使用することが推奨された。われわれは、ヒト臍ラ島移送用保存液として RPMI の有用性を報告してきたが¹¹⁾、RPMI は、元々リンパ球などの造血系細胞の浮遊培養に適した培養液として開発されたものであり、その組成は、基本的には Hank's balanced salt solution (HBSS) とほぼ同じ細胞外液組成で、細胞培養に必要な 13 種のアミノ酸、8 種のビタミン B 群、およびブドウ糖が加えられている¹²⁾ ため凍結保存時にも適していると考えられた。

また、蛋白製剤（ことにアルブミン）そのものにも細胞膜非透過型の凍害防御剤として機序もあるが、さらにその他の機序について、凍結により細胞膜の特定の蛋白質が選択的に加水分解され低分子化し、細胞の浸透圧的応答が失われてくるが、これの修復効果および膜安定化作用によるものではないかと考えられた。よって 10% FBS の使用は、明らかにその凍結解凍リンパ球の % viability を上げ推奨されるものであった。

結 語

総合的に判断すると、成熟ブタリンパ球に対する最も優れた至適凍結保存条件は、programmed freezer を使用し、5% DMSO 濃度で、RPMI+10% FBS を使用した場合であった。これらの基礎的な検討結果は、今後種々の動物種のリンパ球および臍ラ島凍結保存法に応用できうる可能性が存在した。

本論文の要旨は、第2回日本低温医学会総会（平成7年11月17日、岡山）で発表した。

文 献

- 1) Kenmochi K, Mullen Y, Miyamoto M, et al: Swine as an allograft model. Porcine immunology, Ed Lenny JK Boston, 177-183, 1994
- 2) 宮本正章, 大柳治正, 剣持 敬他: ヒト, ブタ (adult, fetus) 臍ラ島に対する自動化凍結保存法の進歩とその immunomodulation としての意義. 低温医 22: 54-60, 1996
- 3) Kenmochi K, Miyamoto M, Nakagawa Y, et al: Improved yield and survival of porcine islets with newly developed Lap-1 solution. Transplant Proc 26: 3412, 1994
- 4) Rajotte RV, Evans MG, Wornock, et al: Islet cryopreservation. Horm Metab Res 25: 72-81, 1990
- 5) 宮本正章, 田中勝喜, 大柳治正他: Islet bank の確立とその将来展望—臨床臍ラ島移植の成功因子として—。今日の移植 9: 315-320, 1996
- 6) V Deijinen, Hulstaert CE, Wolter G, et al: Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig and man. Cell Tissue Res 139: 267-275, 1992
- 7) Tai J, Chenug SC, Tze WJ: Effect of sucrose on cryopreserved porcine islets. Transplant Proc. 26: 825-826, 1994
- 8) 井上博雄, 能勢義介: HLA の細胞免疫学的解析. HLA ハンドブック. 辻 公美編. サイエンスフォーラム. 東京. p. 47-56, 1987
- 9) 高橋恒夫: 動物細胞の凍傷傷害と凍害防御剤の作用機序. 凍結保存, 酒井 昭編, 朝倉書店, 東京, p. 15-22, 1989
- 10) Mazur P: Freezing of living cells. mechanisms and implications. Am J Physiol 247: 125-142, 1984
- 11) 中川芳彦, Yoko Mullen, 剣持 敬他: ヒト臍ランゲルハンス島移植における移送用保存液. 今日の移植 8: 217-224, 1995
- 12) Moore GE, Sandberg AA, Ulrich K: Suspension cell culture and in vivo and in vitro chromosome constitution of mouse leukemia L 1210. J Natl Cancer Int 36: 405-421, 1966

- 1) Kenmochi K, Mullen Y, Miyamoto M, et al: