生体凍結保存における細胞の耐浸透圧の測定* (viability と評価関数としての最小細胞体積分率)

白 檉 了^{*1}, 棚 澤 一 郎^{*2}

Measurement of Critical Osmotic Pressure for Biological Cells (Minimum Cell-Volume-Ratio as an Estimation of Viability)

Ryo SHIRAKASHI and Ichiro TANASAWA

The critical osmotic pressure that biological cells can endure is measured. Optimal parameters of freezing process as well as pre-freezing process are restricted by the critical osmotic pressure which can be translated into the critical normalized volume of the cell. Viability of the cells is measured after the cells suffered from a certain osmotic pressure, and the viability should be estimated from the view point of bio-physico functions demanded. In this study, endothelial cells and smooth muscle cells composing porcine arteries are selected as sample cells. The viability of endothelial cell is estimated by dye-exclusion test, and the viability of smooth muscle cell is estimated by measuring contraction-relaxation rate. Optimal parameters of freezing process as well as pre-freezing process can be obtained by estimating the normalized volume of the cell. The critical normalized volume of cells can be estimated from the measured critical osmotic pressure.

Key Words: Bioengineering, Biological Tissue, Cryoprotective Agent, Cryopreservation, Pre-freezing process, Cell Membrane Permeability

1. 結 言

医用生体組織の凍結保存は、通常、凍害防御剤を組織内に浸透させる前処理過程と凍害防御剤を含んだ組織を凍結する凍結過程およびその後の解凍過程により構成される。組織のviabilityはそれを構成する細胞の体積変化と密接な関係にあると考えられる。細胞体積変化は、前処理過程では、細胞内自由水の細胞外への流出と凍害防御剤の流入との物質移動に関する競合過程と関係している。また、凍結過程における体積変化は、緩慢冷却では細胞外凍結により濃縮した細胞外の溶質濃度が細胞内の自由水の流出と関係し、ある程度の急速冷却では細胞内凍結と関係する。このような物質移動および氷生成がもたらす細胞の体積変化から、最適な前処理-凍結条件が説明されている⁽¹⁾。

最適な条件が凍結対象に対し具体的に分かっているならば、寸法の小さな組織については比較的容易に実現できる。現実には赤血球や精子等の単細胞や神経細胞等の比較的規模の小さな組織の凍結保存はかなりの成功をおさめている。しかし、最適条件は、凍結対象ごとに

経験的に知られているにすぎず、また、物質移動や熱移動過程に対して抵抗が大きく濃度や温度に分布が生じやすい大型の生体組織では、最適条件の実現自体が大きな問題となる。そこで、筆者らの一連の研究では、大型の生体組織を含んだ、凍結対象により定まる最適な前処理-凍結条件を決める一般的方法の確立を目的として、解析の基本となる組織細胞の数値計算モデル⁽²⁾、凍結対象と凍害防御剤に関わるパラメータの計測及び計測法^{(3),(4)}、実際の凍結保存過程の制御パラメータの決定方法⁽⁵⁾について報告してきた。

ところで、凍結保存過程の制御パラメータの決定には、この過程を評価する評価関数が不可欠であり、実際の細胞のviabilityと予測可能な評価関数との対応の定式化、即ちviabilityからみた評価関数の制限条件が必要である⁽⁵⁾。凍結保存した生体組織のviabilityの定義については様々な試み⁽⁶⁾がなされているが、本質的には生体組織がもつ機能を凍結-解凍後も保持しているか否かという点で判断される。生体組織が必要とする機能は、生体組織の幾何構造を保持する機能と細胞の生理学的機能とに大別できる。こうした機能が喪失される主要因は、前者の場合は1)細胞外の水分凍結による組織の力学的破壊であり、後者の場合は細胞死である。

* 原稿受付 1997年8月13日。

^{*1} 正員, 東京大学生産技術研究所 (〒106-8558 東京都港区六本木7-22-1)。

^{*2} 正員, 東京農工大学工学部 (〒184-8588 小金井市中町2-24-16)。

この細胞死については、さらに、2)水分の凍結に伴う細胞膜の力学的破壊⁽¹⁾, 3)非等浸透圧環境下における過収縮によるorganelle間距離の近接, あるいは細胞内電解質の濃縮によるorganelleの変性^{(1),(7)}, 4)凍害防御剤自身に起因する生化学的毒性⁽¹⁾, が主要因であると言われている。

大きな組織を凍結保存する場合、前処理過程において組織内の細胞内外、特に細胞内を凍害防御剤を高濃度に含んだ状態にすることは、細胞死の要因2)を回避すると同時に、大きな組織細胞の凍結保存を成功させる有力な方法の一つであると考えられる。これは、前処理過程で生体組織中の細胞内外の凍害防御剤濃度を上げることができれば、緩慢冷却によるviabilityを向上させることができ⁽⁵⁾、また、Fahyらの実験⁽⁸⁾によれば、細胞内外の凍害防御剤濃度を共晶点近傍にまで上げた状況では、自由水は冷却速度に関係なく、極低温で体積膨張を伴う凍結(氷晶生成)をせずにガラス化することが示されていることから類推できる。このような観点からみると、4)の影響が少ない凍害防御剤(例えばエチレングリコール⁽⁹⁾)を選定すると、細胞死の要因は前処理過程で曝される高浸透圧環境が原因となる3)が重要と考えられる。

そこで、本研究では、前述した前処理-凍結過程に関する計算機援用設計法を構築するために、組織細胞内の熱・物質移動および相変化過程を記述する物理変数を用いて上記の3)を定量的に評価することを目的とした。この定量的評価には、細胞体積を評価関数として選定することが最も自然と考えられる。例えば、Peggらは、兎の内皮細胞の浸透圧ストレスによるviabilityの変化を電子顕微鏡による細胞内微細構造観察から考察しており、おおよそ等価細胞体積分率 β (高浸透圧平衡下での細胞内の浸透圧成分の体積と標準状態の細胞内の浸透圧成分の体積との比)で0.23~1.6程度⁽¹⁰⁾の範囲で健全な細胞内微細構造がみられたと報告している。但し、この研究に関しては、平滑筋細胞の耐浸透圧評価がなされていない点、細胞の機能でviabilityを評価していない点で問題があると考えている。細胞体積分率を評価パラメータとするとすると、次には細胞死を具体的に何により判定し、細胞体積分率の閾値を求めるかが問題となる。現実の細胞死の判定は、生命の定義によって大きく左右されてしまうほど一般的には困難であるが、医用目的の凍結保存の場合は、前述の"細胞の生理学的機能"が喪失されたか否かに依っていると考えられる。例えば、Peggら⁽⁶⁾は兎の動脈を使った実験で内皮細胞と平滑筋細胞のviabilityをその生理学的機能に基づき、凍害防御剤として

DMSOやエチレングリコールを用いた場合の耐毒性評価や凍結解凍後のviabilityの評価をした。しかしながら、この研究では、細胞の機能の評価と耐浸透圧が関連づけられていない点で問題が残ると考えている。

本研究では、ブタの頸動脈を試料とし、組織を構成する細胞の非浸透圧成分を除いた許容最小細胞体積分率に関する知見をブタの頸動脈を試料として得るとともに、浸透圧ストレスを受けた内皮細胞と平滑筋細胞のviabilityをそれぞれ対象となる細胞の機能に基づき測定し、これを限界耐浸透圧=等価細胞体積分率として表現した。

2. 細胞限界浸透圧の測定方法

本章では細胞が耐えうる浸透圧を、必要とされる機能に基づき評価し、限界浸透圧を推定する方法について述べる。対象とした細胞はブタ頸動脈中の内皮細胞と平滑筋細胞である。

2.1 組織の機能の選定 血管の持つ機能を、幾何構造的機能(中膜、外膜の様な組織繊維がつくる血管の幾何構造とその力学特性)と、生理学的機能にわけると、生理学的機能は、構成細胞である内皮細胞と平滑筋細胞の生化学的機能に代表される。多くの血管移植手術において、人工血管で代替がきかない理由は、血管壁にある内皮細胞の物質透過性や抗血栓効果、平滑筋細胞の収縮-弛緩による血管内の流路の断面積を調整を通しての血流量の能動的制御、といった生理学的機能を再現できないことにある⁽¹¹⁾。以上の様な事情を考えると、凍結保存による血管の意義は、生理学的機能の保持にあると考えられる。そこで、本研究では、生化学的機能を担う内皮細胞と平滑筋細胞の細胞死あるいはviabilityの評価を行った。

2.2 試料の準備および処理 試料である頸動脈は、屠殺場で採取した死後1時間以内のブタ頸動脈(外径4-5mm、管壁厚さ1-2mm)を、その場でPBS(リン酸緩衝液)で洗浄処理した後、培養液(Dulbecco's Modified Eagle Medium(D-MEM))或いは血清入りPBSに漬けて0℃にて実験室に移送した。なお、平衡浸透圧は約270~288mosmol(通常の細胞支持液相当)である。

次に、この頸動脈を、5本に切り分けて、通常の細胞支持液の平衡浸透圧である288mosmolのPBS(リン酸緩衝液(Phosphate Buffer Powder, pH 7.2; WAKO))に浸漬して浸透圧平衡にした後、遠沈管に入った5種類の濃度(pH=7.2)の0~5℃のPBS水溶液にそれぞれ浸漬し、浸透圧平衡になるまで放置した(30~40分)。イオンは非電解質物質に比べて透過率が極端に低く、細胞膜を透過しないと仮定できるので、電解質濃度により細

Fig.1 Schematic of experimental apparatus of PI stain

Fig.2 Schematic of experimental apparatus of contractivity

胞が受ける浸透圧は異なることになる。標準電解質溶液濃度を C_0 (mol/m^3) (288 mosmol) とし、そのときの細胞内の浸透圧成分の体積を V_0 (m^3) とすると、濃度 C (mol/m^3) における細胞内の浸透圧成分の体積 V (m^3) 及び浸透圧成分の体積分率 β (m^3/m^3) の浸透圧平衡での値は

$$C_0 V_0 = CV, V = (C_0 / C) V_0, \beta = C_0 / C \quad (1)$$

のように記述できる。実験では、 β 相当で 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 の濃度の PBS 水溶液を用いた。

2.3 内皮細胞の色素排除法試験

内皮細胞の機能は、2.1 節で述べた生理学的機能の他にも血液中に様々な物質を分泌して、血液の状態を正常に保とうとする等、様々な機能があり⁽¹²⁾、それらを全て評価することは困難である。しかしながら、内皮細胞が血液や血管壁に及ぼす作用は、本質的には細胞膜が介在して、膜を透過する物質によって行われると考えられる。従って、内皮細胞の細胞膜の透過機能の健全性を評価する試験をおこなうことにした。

内皮細胞の色素排除法試験は Pegg らの方法⁽⁶⁾を参考にした。色素排除法試験とは、正常な細胞膜は透過しない色素が細胞膜の物質選択透過機能が損失された試験細胞の内部に入り込む現象を利用して細胞を染色することにより、細胞の生死を判別する方法である。内皮細胞は血管内壁に単層に配置された細胞であるので、本試験では、血管内に色素を流して染色した。色

Fig.3 Endothelial cells dyed with PI (observed with light microscope)

素としては、G 励起蛍光色素 PI (Propidium Iodide; SIGMA) をもちいた。図 1 に色素を注入する装置の概略を示した。内圧は流路中の注射器を加圧することにより加え、ペリスターポンプにて溶液を循環させた。実験では、まず、5 本の頸動脈を装置に装填し、80 ~ 100 mmHg の内圧下で PI ($10 \mu\text{g/ml}$) を約 5 ~ 10 分間血管内に送り込んだ。次に、K-H 溶液 (Krebs-Henseleit solution) により血管内壁の余分な色素成分を除去し、頸動脈を軸方向に切り開きスライドガラスで挟み観察用試料を作成した。この観察用試料を、100W の水銀灯光源の蛍光顕微鏡を用いて G 励起の落射光でビデオ撮影し、ダメージを受けた部分のみ発光することから、コントロールである $\beta = 1$ の画面の発光画素数が 0 になる様に画像を 2 値化し、発光部の面積 (画素数) を測定して、各 β のダメージ度として求めた。撮影に用いた CCD カメラは最低被写体照度 F1.2 (4.5 ルクス) の高感度ビデオカメラ (DXC-107A; Sony) を用いた。実験は各 β の値につき、1 回のみ行った。

2.4 平滑筋細胞の収縮-緩和試験

平滑筋細胞は交感神経伝達物質のノルエピネフリン (= ノルアドレナリン) に反応して収縮をおこし、同じく神経伝達物質のアセチルコリンにより緩和するという性質を持っている。本試験では、電解質水溶液への浸漬は 2.2 節と同じ手順でおこない、収縮-緩和の試験方法は Pegg らの方法⁽⁶⁾を改変した等張力下の収縮-緩和試験をおこなった。

Fig.4 Damaged endothelial cell % stained by PI

Fig.5 Contraction% and relaxation% of smooth muscle

図2に装置系を示した。K-H溶液には常に95%O₂-5%CO₂ガスを吹き込み続けた。供試血管は図2に示すように両端に針金を通して片方を固定し、もう一方に重さ2gの重りをつり下げて一定の張力を加えた。具体的には以下の手順により行った。まず、K-H溶液で約1時間洗浄した血管を長さ約3mmのリング状に切断して試料とし、これを3×10⁻⁶Mのノルエピネフリンで収縮させた後に、2×10⁻⁴Mのアセチルコリンを加えて平滑筋を弛緩させ、試料に収縮-緩和能力があることを確認した。収縮-緩和能力が確認された試料を、K-H溶液で約20分洗浄して平衡状態に戻し、図2に示した長さLを測り、これをL₀とした。10⁻⁶Mまたは3×10⁻⁶Mのノルエピネフリンに浸漬して平滑筋を収縮させ、約5分間後に血管を撮影してLの長さを測り、これをL_{NE}とした。さらに10⁻⁵Mまたは2×10⁻⁴Mのアセチルコリンに浸漬して平滑筋を緩和させ、約5分間後に血管を撮影してLの長さを測り、これをL_{Ach}とした。

以上の測定に基づき、次の式より収縮率(contraction%)と緩和率(relaxation%)を定めた。

$$\text{contraction}\% = \frac{L_0 - L_{NE}}{L_0}, \quad \text{relaxation}\% = \frac{L_{Ach} - L_{NE}}{L_0 - L_{NE}} \quad (2)$$

測定は同一サンプルを切り分けて各実験2回ずつおこなった。収縮又は緩和率の測定は各サンプルの血管半径方向を2箇所計測した。なお、平滑筋細胞の収縮-緩和試験は表1に示す2つの条件でおこなった。

Table 1 Condition of smooth muscle contractivity experiment

	Immersed time (min)	Nor-epinephrine (M)	Acetylcholine (M)
experiment 1	60 - 70	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
experiment 2	30 - 40	3 × 10 ⁻⁶	2 × 10 ⁻⁴

3. 細胞限界浸透圧の測定結果と考察

図3に、PI染色した内皮細胞の蛍光顕微鏡写真を示した。明るい部分が、細胞膜が損傷したことにより細胞内に色素が侵入して励起発光している部分である。この写真を元に、図4に浸透圧平衡に相当するβの値を横軸にして蛍光発光した内皮細胞の面積率を示す。図4によれば内皮細胞はβ=0.2のときはダメージが大きい。0.4になると急激にダメージが減っていることがわかる。従って、内皮細胞の限界細胞体積分率β_{crit}は0.2以上～0.4未満の間にあると考えられる。

平滑筋細胞の収縮-緩和試験については、まず表1に示した条件experiment 1では、10⁻⁵Mのアセチルコリンに対してどの試験片も反応を示さなかった。

図5に、条件experiment 1と2の収縮率(contraction%)と緩和率(relaxation%)を、式(1)で定義したβに対して、平均値をプロットで、計測値の最大-最小値をエラーバーで示した。experiment 1ではβが0.4以下になると収縮率が0以下に落ちていることがわかる。同様にexperiment 2においてもβが0.4以下になると収縮率が0以下になり、緩和率も急激に落ちている。この領域でのビデオ映像によれば、β=0.2や0.4ではノルエピネフリンに対して全く収縮せず、アセチルコリンに対してもおきな変化はないまま時間の経過につれ重りがもたらす張力によって僅かずつ伸びた。また、2・4節で記した準備段階における収縮-緩和能力の確認では、ノルエピネフリンに対しては、全ての試料が収縮反応をしめしたが、アセチルコリンに対しては、β=0.2だけ緩和反応を示さなかった。これは収縮と緩和の機能は同時に失われるものではないことを示唆している。以上より、収縮-緩和の機能を保持する平滑筋細胞の限界細胞体積分率β_{crit}は0.4以上～0.6未満になると考えられる。

以上に述べた結果から見る限り、内皮細胞の方がわずかに高い浸透圧に耐えうると結論づけられる。通常血管内は、生理状態により大きく浸透圧が変化する血液が流れており、直に浸透圧変化に曝されるのは内皮細胞であって中膜に多く存在する平滑筋細胞ではないことを考えると、 $\beta_{\text{cri}}^s > \beta_{\text{cri}}^e$ であることは合理的である。

4. 結 論

生化学的毒性が無視できる凍害防御剤を前提とした前処理過程について、細胞の機能を評価基準にすることにより、細胞が耐えうる限界の浸透圧をブタ頸動脈の内皮細胞と平滑筋細胞について測定し、これを細胞体積分率により表現した。すなわち、ブタ頸動脈の内皮細胞の膜透過性と平滑筋細胞の収縮-緩和能力の測定に基づき限界細胞体積分率 β_{cri} を推定した結果、内皮細胞は $0.2 \leq \beta_{\text{cri}}^e < 0.4$ 、平滑筋細胞は $0.4 \leq \beta_{\text{cri}}^s < 0.6$ であることがわかった。この結果に基づき、凍結過程を通じて β_{min} の値が β_{cri} 以上であるような凍害防御剤初期濃度を目標濃度にした前処理過程をおこなうと、よりダメージが小さい凍結過程が得られる可能性があると考えられる。

文 献

- (1) Meryman, T.H., Cryobiology (1966), 213, Academic Press.
- (2) 白樫・棚澤, 機論61-587, B(1995), 286.
- (3) 白樫・棚澤, 機論63-612, B(1997), 2793
- (4) 白樫・棚澤, 日本機械学会第74期通常総会講演会講演論文集1, (1997), 280.
- (5) 白樫・棚澤, 第33回伝熱シンポジウム講演論文集3, (1996), 629.
- (6) 例えば, Song, Y.C., Charles, J.H. and Pegg, D.E., Cryobiology, 31(1994), 317.
- (7) Fujikawa, S., Cryobiology, 32(1995), 444.
- (8) Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T., Cryobiology, 21(1984), 407.
- (9) Wusteman, M., Buza, A., Boylan, S., Hayes, A. and Pegg, D.E., Cryobiology, 32(1995), 428.
- (10) Pegg, D.E., Hunt, C.J. and Fong, L.P., Cell Biophysics, 10(1987), 169
- (11) 筏 義人編, 生体適合材料, (1993), 222., 日本規格協会.
- (12) 折茂 肇編, 血管壁細胞の機能とその制御機構, (1990), 3., 共立出版