

霊長類 ES/iPS 細胞用緩慢法凍結保存液の開発

今松 伸介¹, 安 成皓², 馬場 憲三³, 岡崎 宏悟¹, 田川 陽一²

¹ リンフォテック, ² 東工大・院・生命理工, ³ 日本ジェネティクス

〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259 B51

E-mail: ytagawa@bio.titech.ac.jp

Home Page: <http://www.tagawa-lab.bio.titech.ac.jp>

霊長類 ES/iPS 細胞は、凍結耐性が低く、通常の緩慢凍結法では効率よく凍結保存することができないため、国内ではガラス化凍結法が広く用いられている。しかしながら、ガラス化凍結法は、手技的に熟練を要し、凍結細胞の輸送は液体窒素中で行わなければならないなどの短所がある。現在、より操作が容易で効率の良い凍結保存法や、新規の凍結保存液の開発が望まれている。そこで我々は、操作が簡便な緩慢凍結法で霊長類 ES/iPS 細胞の高効率な凍結保存が可能で、かつドライアイスで輸送ができる凍結保存液の開発を試みた。

1. 目的

霊長類の ES/iPS 細胞は、無限の増殖能力と多様な組織細胞への多分化能を併せ持つことにより、遺伝形質など均一な特性をもつ種類の細胞を無尽蔵に供給することが可能である。特にヒト ES/iPS 細胞は、基礎研究に加え、再生医療や創薬への広範な応用が期待されている。これらの研究を進めるために、細胞を貯蔵及び輸送する手段として、高効率な凍結保存法の確立は必須である。

マウス ES 細胞は、10% DMSO / ES 細胞用培地で簡易的な緩慢法凍結で十分凍結保存が可能である。しかし、霊長類の ES/iPS 細胞は、マウス ES 細胞と異なり、凍結耐性が低いため、通常の緩慢凍結法では、解凍後の生着コロニー数が極めて少なくなることが知られている^[1]。それを解決する方法として、国内では、液体窒素で急速凍結する、ガラス化凍結法が広く用いられている。しかしながらガラス化凍結法は、ガラス化保存液の細胞に対する強い毒性のため、凍結する際には、細胞をガラス化保存液に懸濁してから液体窒素に浸漬するまでに要する時間を 10~30 秒程度という短時間に行わなければ、解凍後の生着コロニー数が極めて少なくなる。また、緩慢凍結法よりは解凍後の生着コロニー数は改善されるが、それでもまだ少ないこと、さらには、凍結細胞の輸送は、液体窒素中で十分に低温を維持した状態で行わなければ、解凍後の生存率が極端に低くなる等の問題もある。現在世界各地で、緩慢法、及びガラス化法の凍結保存液の開発^{[2][3]}や凍結法の改

良^{[1][4][5][6]}が行われているが、より操作が容易で効率の良い凍結方法や、新規の凍結保存液の開発が望まれている。そこで筆者らは、操作が簡便な緩慢凍結法による霊長類 ES/iPS 細胞の高効率な凍結保存が可能で、かつドライアイスで輸送ができる凍結保存液の開発を試み、開発品で霊長類 ES 細胞の凍結保存が可能か否かを検討した。

2. 方法

コンフルエントになったサル ES 細胞を酵素処理により培養容器から剥離した後、開発品を用いて緩慢凍結法により凍結保存した。コントロールとして、一つに既存のガラス化保存液でガラス化凍結法、もう一つに海外では一般的な、10% DMSO を含む霊長類 ES/iPS 細胞用培地で緩慢法によりそれぞれ凍結保存した。その後、各々最適条件により解凍・播種し、生着コロニー数を比較した。

3. 結果

解凍後の生着コロニー数を測定した結果、開発品は、既存のガラス化保存液と比較し約 2 倍、10% DMSO を含む培地と比較し約 4 倍生着コロニー数が多いことが示された（図 1）。また、開発品で凍結した細胞を液体窒素中からドライアイスに移して 24 時間保存した後、同様に解凍・播種したところ、十分な生着コロニー数を

得られることが確認できた。

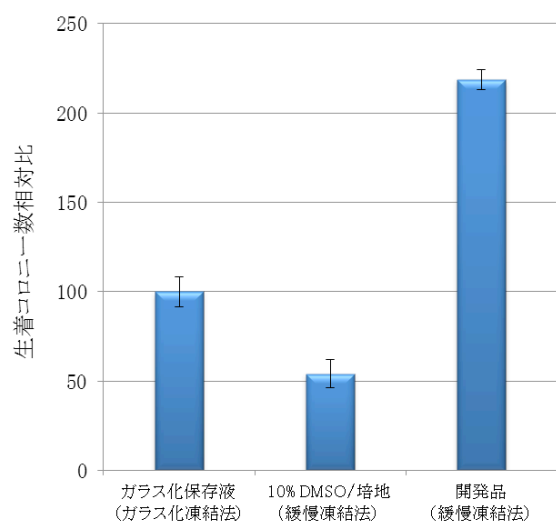


図 1. 各凍結保存液の解凍後生着コロニー数相対比

4. 今後の展望

霊長類 ES 細胞の高効率な凍結保存、および凍結細胞のドライアイスによる輸送が可能であることから、本開発品は種々の研究を進めていく上で有用な凍結保存液であると考えられる。また、本開発品は、異種成分を含まず、GMP レベルで製造可能であり、十分な品質管理を行っているため、研究用途だけでなく再生医療等にも対応できると考えている。



参考文献

- [1] Reubinoff, B.E. *et al.*: Human Reprod., 16, 2187 (2001)
- [2] Ha Y. S. *et al.*: Human Reprod., 20, 1779 (2005)
- [3] Holm, F. *et al.*: Human Reprod., 25, 1271 (2010)
- [4] Heng, B.C. *et al.*: Biotechnol Appl Biochem., 41, 97 (2005)
- [5] Li, X. *et al.*: Stem Cell Dev., 17, 1079, (2008)
- [6] Rajala, K. *et al.*: PLoS One., 5, e10246, (2010)