

# 霊長類ES/iPS細胞の凍結保存

今松 伸介

細胞を取り扱う研究において、細胞の凍結保存は、①細胞株の維持に要する時間、労力、経費の節約、②長期継代に伴う細胞の変化を防止、③細胞を他機関へ輸送、などを行う上で必須の技術として広く利用されている。現在では、世界中の細胞バンクでさまざまな株化細胞が凍結保存されているだけでなく、畜産業や生殖医療における生殖細胞、受精卵の凍結保存など、その応用は多岐にわたっている。

水は水になると容積が約10%膨張する。細胞の約70%は水であるから、培養細胞を培養液中でそのまま凍結すると、細胞内や細胞外の水分が結晶化し、細胞膜や細胞内小器官などの細胞構造が物理的に破壊されてしまい、解凍後に細胞は生存することができない。そのため、細胞の凍結保存を考える上では、細胞内および細胞周辺部での水分の結晶化を抑え、細胞の物理的な損傷を防ぐことが特に重要となる。

## 緩慢凍結法

培養細胞を凍結保存する手法として、多くの細胞で緩慢凍結法が幅広く利用されている。緩慢凍結法は、5～20%前後のジメチルスルフォキシド (DMSO)、グリセロールなどの凍結保護剤を添加した溶液に細胞を浸漬し、緩慢に冷却して細胞を凍結する方法である。緩慢に冷却することで細胞外の溶液中の水分が徐々に結晶化し、それに伴い細胞内との浸透圧差が生じて、細胞内が徐々に脱水される。やがて細胞外でさらに水分の結晶化が進むことで細胞内および細胞周辺部の溶液が、十分に濃縮され、液体窒素中の超低温下でも、細胞内および細胞周辺部に氷の結晶が形成されないガラス化状態となる。ガラス化状態とは特定の分子配列をもたずに分子の運動が抑えられた状態のことであり、この場合、溶液の粘度が極度に高くなって安定化した状態となる。ガラス化状態では固く大きな氷の結晶は形成されないため、細胞構造の破壊は起こらない。初期胚の凍結保存はこの手法を用いていた。

一般的な細胞株の保存では、プログラムフリーザーを用いることはほとんどない。研究室によって、発泡スチロールの箱や市販の細胞凍結ボックスを使用するなど、簡易的な緩慢凍結法が用いられている。

## ガラス化凍結法

前述のように、多くの細胞に簡易的緩慢凍結法が用いられているが、細胞の種類によっては、緩慢凍結法では解凍後の生存率が非常に低くなってしまう場合がある。そのような細胞に対しては、ガラス化凍結法が用いられている。ガラス化凍結法は、高濃度のDMSO、アセトアミド、プロピレングリコールなどを組み合わせた溶液を用い、細胞を液体窒素に直接浸漬し、急速に冷却することで、水分を結晶化させずにガラス化状態で凍結する方法である。しかし、その高い溶質濃度のため、浸透圧による細胞への毒性が非常に強い。そのため、凍結、融解の際には迅速な操作が要求される。初期胚は細胞質の割合が非常に大きく、さらに全能性を維持させるために凍結は非常に慎重に行う必要がある。現在では、マウス、ウサギ、ウシ、ブタなどの受精卵や初期胚の凍結保存や、ヒトの不妊治療のための卵子や受精卵の凍結保存にも利用されている。

## 霊長類ES/iPS細胞の凍結保存

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、遺伝物質など均一な特性をもつ多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、細胞を貯蔵およ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細胞培養液で簡易的な緩慢法凍結で十分である。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きわめて少なくなることが知られている<sup>1)</sup>。それを解決する方法として、国内ではガラス化凍結法による凍結保存が広く用いられている。しかしながらガラス化凍結法は、前述の通り、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きわめて少なくなる。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などの問題もある。現在世界各地で、緩慢法、およびガラス化法の凍結保存液の開発<sup>2,3)</sup>や凍結法の改良<sup>1,4-6)</sup>が行われているが、より操作が容易で効率のよい凍結方法や、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。

コンフルエントになった霊長類ES細胞を酵素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培地で、緩慢凍結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。その結果、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。

### 今後に向けて

霊長類ES細胞の高効率な凍結保存、および凍結細胞

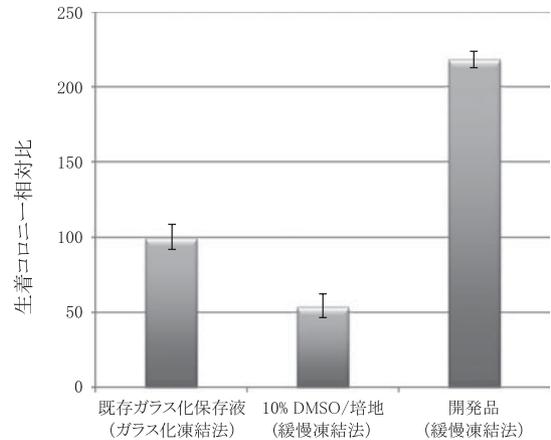


図1. 各凍結保存液の解凍後生着コロニーの相対比

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や生殖医療にも対応できる可能性があると考えている。

### 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 Cells Dev.*, **17**, 1079 (2008).
- 6) Rajala, K. *et al.*: *PLoS One*, **5**, e10246 (2010).