



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	初代ラット大脳皮質由来神経細胞の凍結保存条件に及ぼす凍結速度依存性
Author(s)	内田, 努; 本村, 寿太郎; 永山, 昌史 他
Citation	低温生物工学会誌, 53(2), 161-166
Issue Date	2007-12-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/36104
Type	journal article
File Information	uchida-8.pdf



初代ラット大脳皮質由来神経細胞の 凍結保存条件に及ぼす凍結速度依存性

北海道大学大学院工学研究科
内田 努, 本村寿太郎, 永山昌史, 郷原一寿

Effects of Cooling Rate on Cryopreservation Conditions of Primary Rat Cortical Cells

Tsutomu UCHIDA, Jutaro MOTOMURA, Masafumi NAGAYAMA, and Kazutoshi GOHARA

Graduate School of Engineering, Hokkaido University, N13 W8 Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan

Developments of cryopreservation techniques on primary rat cortical cells were carried out to observe the effect of cooling rates. Primary rat cortical cells were dispersed in the cryopreserving medium including 5 vol% dimethylsulfoxide, and then they were frozen by various cooling rates ranged from -3 K/min to -150 K/min. The survival ratio was estimated qualitatively by using the phase-contrast microscope. The feasibility of the neural activity was verified by measuring its spontaneous action potential with a multi-electrode array system. Based on these characterizations, the lower cooling rate of the dispersed sample was more feasible for the cryopreservation of the primary rat cortical cells.

(Received ***; Accepted ***)

緒 言

細胞や組織の凍結保存技術は、古くは生物の低温障害に対する研究に始まり、現在では冷凍食品から再生医療に関するものまで幅広く研究されてきている「古くて新しい問題」である¹⁾。産業に直結した問題であるがために、様々なスクリーニングによってある細胞種に対する適切な凍結方法を見つけるなど技術開発が主として行われてきており、そのメカニズムなど基礎的な分野はまだ十分解明されていないのが現状である。従って凍結保存できる細胞種は限られており、生物の中枢を司る神経細胞や、循環

器系の中心となる心筋細胞など多くの細胞種で、現在でも凍結保存技術の開発が待たれている。多くの凍結保存可能な種類の細胞は増殖能を有しており、凍結解凍において減少した細胞数も解凍後の培養に対して大きな影響を与えることはない。しかし神経細胞や心筋細胞は細胞分裂による増殖能がほとんど無いため、高度な凍結保存技術の開発が必要とされるのである。

動物から調製された細胞は、その生物学的なメカニズムを解明する研究などにおいて広く用いられている。近年の生命科学の研究では動物試験を極力少なくする方向で検討されており²⁾、創薬や再生医療分野などで初代培養細胞の需要が今後増大することが予想されている。特に神経細胞の凍結保存は学術面、産業面において重要である。例えば、神経細胞は少量の毒性物質に対しても反応を示すことから、創薬時のスクリーニングに用いることは非常に有効

第53回低温生物工学会研究報告**.

[Key words: Neuron, Cryopreservation, Cooling rate, Action potential; 神経細胞, 凍結保存, 凍結速度, 活動電位]

であると考えられている。従ってこうした需要の高い細胞を凍結保存する技術開発は、世界中の需要先に対する均質な細胞の安定供給にとって非常に重要である。凍結する利点として、調製した初代細胞をコンタミネーション(細胞の汚染)させずに長期間保存できることや、必要時に必要な量だけ取り出して使用できることなどが挙げられる。また、凍結時には細胞の代謝が極端に抑えられるので、生物にとっての時間を止められるかもしれないという興味を抱くこともできる³⁾。

細胞を凍結する際には、細胞内の氷晶生成を抑制することが重要である。凍結解凍によって細胞が損傷を受ける要因はいくつか考えられている^{1,4)}。例えば、細胞内に生成した氷結晶が細胞内部の複雑な構造体に物理的な影響を及ぼすことが挙げられる。また、細胞外に生成した氷結晶が細胞膜に物理的な影響を与えたり、細胞外の氷結晶成長に伴って細胞内部の溶液が濃縮される浸透圧ショックのような化学的な影響もある^{4,5)}。氷結晶が生成される場所については、凍結する際の冷却速度の違いによってある程度制御できる^{4,6)}。急速凍結(凍結速度:数百℃/min 程度)と緩慢凍結(凍結速度:1℃/min 程度)の両者において、凍結過程で生成する氷結晶により細胞は上記のような影響を受ける。しかし、急速凍結では細胞内まで凍結しているのに対して緩慢凍結では細胞外のみが凍っているように、凍結速度が異なると細胞が受ける氷結晶の影響も変化する。また細胞凍結の際には通常、凍結解凍によるストレスを軽減して細胞蘇生率を向上させるため、凍結保護剤と呼ばれる物質が添加される。これまでグリセリン(glycerol)やジメチルスルフォキシド(dimethylsulfoxide, DMSO)など多くの物質が凍結保護剤として用いられてきた⁷⁾。そして、有効な保護剤の種類は細胞種によっても異なることが分かっている⁸⁾。

通常細胞の凍結保存技術の可否は、主として解凍後の細胞の蘇生率で評価されている。また細胞機能の評価法として、細胞を培養・分化させ特異タンパク質の発現等を調べる方法があるが、評価まで長時間かかり、その上細胞自身も傷つけてしまう欠点があった。さらに神経細胞や心筋細胞等の電氣的活動を行う初代培養細胞は、解凍後にユーザーの使用する試験機で培養でき、自発的に電氣的活動を行うと

いう機能が保存されなければならない。しかし、現在までそうした凍結保存・品質評価技術が確立しているとは言い難い。

本研究は、分散された初代細胞をその機能を損なわずに凍結保存する技術の開発とメカニズムの解明を目的としている。特に需要の高い神経細胞や心筋細胞を対象に、凍結速度と凍結保護剤について注目して研究を進めている⁹⁾。ここでは初代神経細胞を対象に、凍結速度の違いが細胞の蘇生率に及ぼす影響を検討した。さらに解凍した細胞を多電極基板上で培養することで、同時に多数の細胞の機能を簡便に調べる評価法を開発した。

材料および方法

まず凍結方法の違いによる凍結速度を見積もるため、細胞凍結に用いる培養液をクライオチューブ中に1ml入れたものを試料として、熱電対による温度計測を行った。簡単な冷却方法で冷却速度を広範囲に変化させるため、液体窒素又は-80℃の温度を保てるDeep freezerを用いて凍結させた(①Deep freezer 中断熱材内放置, ②Deep freezer 中放置, ③液体窒素液面直上保持, ④液体窒素中浸漬)。その結果、凍結速度はそれぞれ Table 1 のようになり、冷却速度が2桁異なる手法を得ることができることが確認された。なお保存期間は、各方法で用いた冷媒の温度で保持した。

Table 1. Cooling rate and cryopreservation temperature for each freezing process

Freezing procedures	Cooling rates	Storage temperatures
① stored in the insulation box in the deep freezer	-3℃/min	-80℃
② stored in the deep freezer	-10℃/min	-80℃
③ kept at just above liquid N ₂ pool	-30℃/min	-197℃
④ kept in liquid N ₂ pool	-150℃/min	-197℃

凍結実験に用いた試料は、SD ラット新生児(1~3日令)の脳皮質由来の初代神経細胞である。培養液は DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) +10vol%ウシ胎児血清(fetal bovine serum: FBS)を

用いた。本研究で用いた初代神経細胞および培養液は、(株)プライマリーセルより提供された。この培養液に凍結保護剤 (5vol%DMSO) を加えた凍結用培養液に、細胞密度が 1×10^6 cells/ml となるように分散調整し懸濁させた。この懸濁液 1 ml をクライオチューブに入れ、上記のような様々な凍結方法で凍結した。そして -80°C 、又は -197°C で 1 週間保存した後、 37°C で湯煎して急速解凍した。解凍後凍結保護剤が細胞に影響を及ぼさぬよう、速やかに通常の培養液に置換した。なお、DMSO を加えずに凍結させた対照実験も行った (冷却方法は②)。

解凍後の神経細胞は、細胞培養用ウェル上で温度 37°C 、湿度 100%、 CO_2 を 5% 含有した 1 気圧の空気的环境下で温度や pH を一定に保って培養した。そしてその蘇生状況は、培養開始後の形態変化を位相差顕微鏡で観察して行なった。接着・伸張した細胞は解凍後蘇生した細胞であると考え、未凍結で接着した細胞面積に対する凍結後蘇生・接着した細胞面積によって、蘇生の程度を定性的に評価した。

また蘇生した神経細胞の機能の正常性を評価するため、培養基板上に 64 点の微小電極を有するシャーレ (多電極培養基板) 上に細胞を培養し、その自発発火を計測した。この方法は、神経細胞の細胞外活動電位を計測する手法のひとつである¹⁰⁾。細胞外記録法では、細胞外でのイオンの量的変化が引き起こす電位差を記録するので、得られる電位振幅は細胞内記録法の数十 mV より小さな値、通常数十 μV のオーダーとなる^{11, 12)}。そのため、計測系のノイズレベルも 10~15 μV 程度に抑えた。本研究で用いた細胞の活動電位を測定するシャーレには、ガラス基板の中央部に一辺 50 μm の四角い白金黒電極が 64 個埋め込まれ、またシャーレの中心から十分離れた周辺部には 4 個の基準電極が設置されている。このシャーレ中央部に細胞を培養することで、機械的な損傷を与えることなく活動電位の測定ができる。細胞の接着を促進するため、シャーレ上にコラーゲンまたは poly-L-lysine など薄くコーティングした。神経細胞の活動電位の測定には、MED64 System (アルファメッドサイエンス社製) を用いた。また神経細胞の活動電位の信号幅は数 ms のオーダーであるので、この装置では 20 kHz で測定を行った。

用いた初代神経細胞が本研究の培養条件で正常に

機能を発揮することを確認するため、懸濁液の一部を凍結させずに培養したものについて、細胞接着の様子や自発発火の確認を対照実験として行なった。

結果および考察

未凍結の初代神経細胞の培養実験で観察すると、培養開始時には全て球状で浮遊していた細胞が、数時間~数日で基板上に接着し、突起を伸ばして成長している様子が観察された。また細胞外電位測定を行った結果、培養開始後 2 週間程度で発火活動を開始した。未凍結細胞の活動電位は、振幅 $34.2 \pm 3.7 \mu\text{V}$ 、幅 $2.3 \pm 0.5 \text{ ms}$ 程度と測定された。誤差は活動電位が測定された約 20 個の電極での平均値からの最大偏差を表す。この電位は細胞外記録法を用いて測定される振幅^{12, 13)}と同程度で、活動電位の信号幅も数 ms のオーダーであることから神経細胞の活動電位であると判断した。そこで、この値を本研究で用いた神経細胞の活動電位の基準値とした。

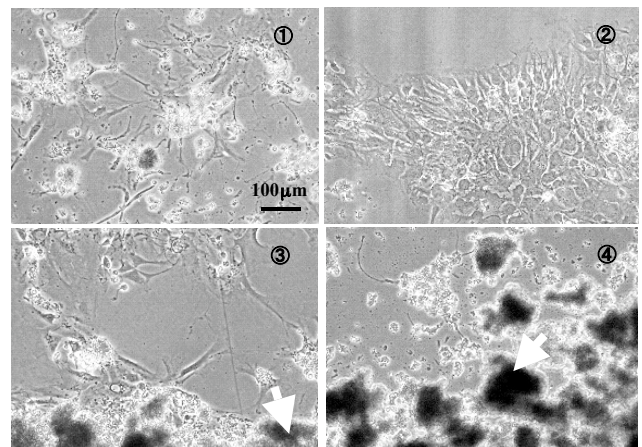


Fig. 1. phase-contrast images of neurons at 9 days after culture. These images represent typical morphology of cells cryopreserved in the following 4 cooling rates; ① $-3^\circ\text{C}/\text{min}$, ② $-10^\circ\text{C}/\text{min}$, ③ $-30^\circ\text{C}/\text{min}$, ④ $-150^\circ\text{C}/\text{min}$. Cells unable to adhere to substrate form cell aggregations (arrows in ③ and ④).

①~④の各方法で凍結保存した試料の、解凍後 9 日目の培養状況を Fig. 1 に示す。凍結解凍後の細胞では、未凍結のものに比べて基板に貼り付けない細胞 (Fig. 1 において周辺部が白く光っている丸い細胞) の割合が多いことが観測された。凍結保存が可能である細胞でも、凍結・解凍プロセスの中で数

10%程度蘇生できないことが報告されている¹⁴⁾ため、本研究で用いたプロセスにおいても、神経細胞に何らかの損傷を及ぼしたものと考えられる。すなわち、この蘇生率の低下を少しでも小さくすることが、本研究の目的である。これら接着できなかった細胞は、培養 1 週間程度で塊状になり不透明になる (Fig. 1 ③, ④中矢印で示された状態)。基板に接着している細胞も、正常に蘇生していれば伸長するが、そうでない物は球状のままである。以上のような、凍結解凍後培養した神経細胞の形態観測から、各凍結保存方法による細胞の蘇生の程度を定性的に見積もった。その結果、最も蘇生の程度が高かった凍結方法は①で、低かったのは④であった。すなわち神経細胞は、凍結速度が遅いほど高い割合で蘇生したことがわかった。また培養時の神経細胞の形態変化は、蘇生率の高い条件で凍結した場合は対照実験である未凍結細胞の形態変化に非常によく似ていた。このことから、蘇生率の高い条件による凍結保存細胞の正常性の高さが支持される。

なお②の方法で凍結保存した細胞について、培養 6 日目に神経細胞特異タンパク質 (microtubule associated protein 2: MAP2) の蛍光染色を行なった⁹⁾。その結果、細長い突起を伸ばした細胞の多くが神経細胞であることが確認された。その他の細胞は、グリア細胞など増殖能の高い細胞であると考えられる。

また保存温度については、 -80°C においてもある程度の液体状態の水が存在し、長期保存する間に生化学反応がゆっくり進行したり、過剰に脱水されたりして、蘇生率が低下するといわれている^{8, 15)}。本研究では便宜上冷却方法により保存温度が異なっているが、保存期間が 1 週間程度と比較的に短いため、このような保存期間中に起こる反応の影響が認められない程度小さいと考えられる。しかし、その違いによる蘇生率への影響については今後の課題である。

ちなみに凍結保護剤を加えずに凍結した試料については、ほとんど接着する細胞はみられなかった。これは、凍結解凍の過程で損傷したか、或いは蘇生したが基板に対する接着能力が弱くなったものだと思う。培養液中には 10vol%FBS が含まれているが、本研究の実験条件の範囲内では 10vol%濃度の FBS は凍結保護作用を発揮しなかった、と結論できる。血清の凍結保護作用は、より高濃度の添加が必要なのかもしれない¹⁵⁾。

次に、蘇生した神経細胞の機能の正常性を確認するため、活動電位の測定を行った。一例として Fig. 2 には多電極培養基板上に培養した、凍結解凍された神経細胞の位相差顕微鏡像を示す (凍結方法①による凍結保存細胞の、解凍後培養 16 日目の様子)。この図中、円で示した電極で測定された活動電位を、Fig. 3 に示す。このとき測定された活動電位は、平均すると振幅 $23.5 \pm 2.1 \mu\text{V}$ 、幅 $2.3 \pm 0.5 \text{ ms}$ であり、未凍結細胞の活動電位と比較して振幅が若干小さくなっていたが、一分間の平均発火回数が約 600 回/min と十分活発に活動していることが示された。なおこれらの値の違いが凍結保存による影響かどうかについては、培養日数や細胞密度などが十分制御できておらず、なおかつ細胞外電位による測定のため定量的な比較はできていない。

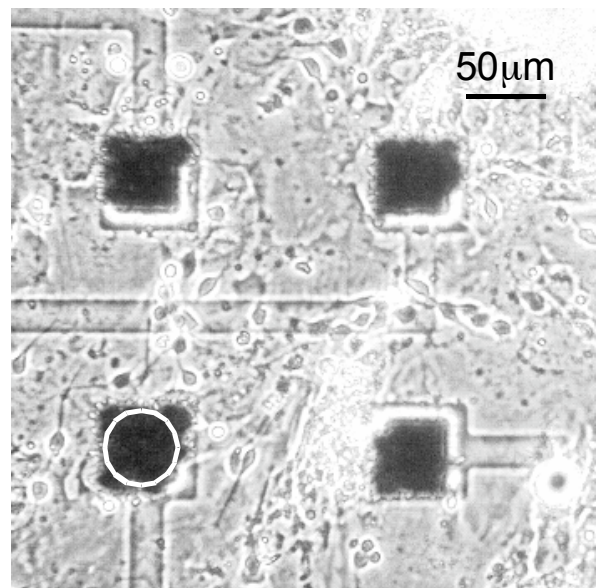


Fig. 2. phase-contrast images of neuronal cells cultured on the multi-array electrode. The cells were cryopreserved in the condition of ①, and then were thawed. Dark 50 μm squares correspond to electrodes. Neurons show spherical cell shape with diameter of approximately 10 μm . Action potential measured by the electrode (marked by circle) is shown in Fig. 3.

凍結解凍された神経細胞の凍結方法の違いによる自発発火の様子も観察実験の結果と整合しており、①, ②では培養 2 週間目以降に自発発火が確認された。これらの神経細胞で得られた活動電位の強度も頻度も、対照実験である未凍結細胞のものに匹敵しており、細胞の正常性が示唆される。③については、

自発発火と思われる信号がほぼ同時期に検出できたが、強度も頻度も十分ではなかった。これは、正常に機能を発揮できるような神経細胞の蘇生率が低かったことを示唆する。④については、電極基板に張り付くことのできた細胞自体が少なく、自発発火は検出されなかった。

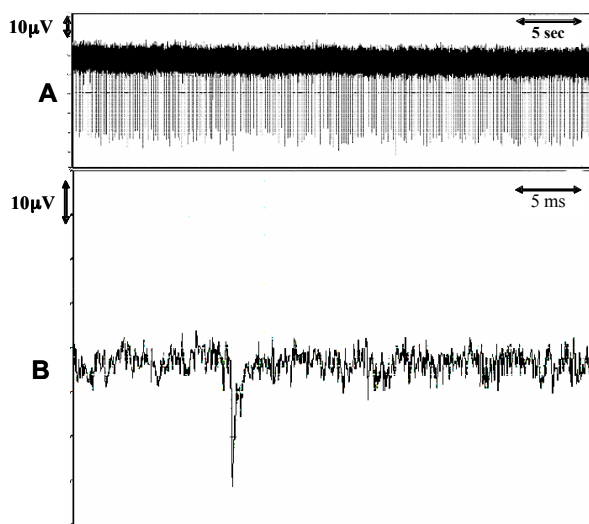


Fig. 3. Spontaneous action potential of cryopreserved neuronal cells (freezing condition①) on the multi-array electrode at 16 days after culture. The action potential was measured by the electrode (marked by circle in Fig. 2).

A: action potentials were generated at constant rate during 40 seconds.

B: Higher magnification of one of these signals.

以上の結果をまとめると、Table 2 のようになる。①の凍結方法により保存された初代神経細胞は、解凍後の発達状況が未凍結の細胞と類似しており、自発発火も確認されたことから、機能を維持したまま神経細胞が比較的高い確立で凍結保存できることがわかった。また、5%DMSO を凍結保護剤として用いた時、凍結速度が遅いほど蘇生率が高かった。

Table 2. Summary of cryopreserved primary rat cortical neuronal cells in different cooling rates.

	<i>Microscopic observations</i>	<i>Spontaneous action potential</i>
① $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Same as control	Same as control
② $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Same as control	Fewer number
③ $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Fewer number	Sometimes
④ $-150^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Not recovered	Not measured

一般に凍結保護剤の緩慢凍結（細胞外凍結）に及

ぼす効果としては、凝固点降下により氷結晶生成の量や速度を抑制し、細胞内からの過剰な脱水や細胞外氷結晶による機械的損傷などを軽減するとされている⁴⁾。これに加えて DMSO による細胞凍結時の保護メカニズムは、細胞内の水と DMSO が置き換わることによって凍結の際におこる細胞内の溶液濃縮を軽減する、あるいは DMSO が細胞膜の疎水性の部分に留まって膜を安定化させるためと考えられている^{4,16)}。本研究で凍結速度依存性を検討した結果、凍結速度が遅いほど蘇生率が高かった。従って、急速凍結した試料においては過冷却の増大により氷結晶の成長速度が大きく、また DMSO の細胞内への浸透時間が短いなどの理由で、DMSO による保護メカニズムが十分発揮できなかったと考えられる。緩慢凍結法により細胞を凍結させた場合、氷結晶の成長速度がある程度抑制されるため、凍結に伴って生じる細胞内外の溶液濃度の変化速度も抑えられ、また DMSO による膜の保護作用が機能したと考えられる。今後、氷結晶の成長に伴う溶液の濃度変化や力学的影響について観測し、メカニズムを明らかにしていく必要がある。

ま と め

分散した初代ラット大脳皮質由来神経細胞を凍結保存し、その機能の正常性を位相差顕微鏡観察および電気的活動を確認することで行った。培養用培地に凍結保護剤として 5% dimethylsulfoxide を加え、 $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ～ $-150^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の範囲で冷却速度を変化させた。1 週間保存後急速解凍して培養した結果、本研究の条件内では冷却速度が遅いほど蘇生率が高いことがわかった。また未凍結細胞と同等の自発発火が確認され、機能的にも保存されていることが確認された。

謝 辞

本研究の一部は、北海道大学先端科学技術共同研究センターの（株）プライマリーセル社との共同研究プロジェクト、および科学研究費補助金事業（課題番号 17340125）により行われた。

文 献

- 1) 棚澤一郎：われわれは生体組織の凍結保存について何を知らないか．低温生物工学会誌，**44**，10-12 (1998)
- 2) Marris, E.: Grey matters. *Nature*, **444**, 808-810 (2006)
- 3) 白樫了：「なまもの」を長くもたせる—冷凍・冷蔵・解凍技術．「バイオに学びバイオを越える工学からバイオへのアプローチ」，渡辺正 編，日本評論社，東京，p.123-141 (2004)
- 4) 酒井昭：「凍結保存—動物・植物・微生物—」，朝倉書店，東京 (1987)
- 5) 浅野茂隆，小澤和恵，藤正巖：「移植と人工臓器」岩波書店，東京 (2001)
- 6) 村上輝夫：「生体工学概論」，コロナ社，東京 (2006)
- 7) 上平恒，逢坂昭：「生体系の水」，講談社サイエンスフィク，東京 (1989)
- 8) 桑野和可：海藻細胞の凍結保存．第 53 回低温生物工学会セミナー及び年会講演要旨集，p.2 (2007)
- 9) Motomura, J., Uchida, T., Nagayama, M., Gohara, K., Taira, T., Shimizu, K. and Sakai, M.: Effects of additives and cooling rates on cryopreservation process of rat cortical cells. *In* "Physics and Chemistry of Ice", W. F. Kuhs ed., Royal Society of Chemistry, London, p.409-416 (2007)
- 10) Gross, G. W.: Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **26**, 273-279 (1979)
- 11) Marco-Jiménez, F., Garzón, D. L., Peñaranda, D. S., Pérez, L., Viudes-de-Castro, M. P., Vicente, J. S., Jover, M. and Asturiano, J. F.: Cryopreservation of European eel spermatozoa: Effect of dilution ratio, fetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. *Cryobiology*, **53**, 51-57 (2006)
- 12) Jinbo, Y., Robinson, H. P. C. and Kawana, A.: Simultaneous measurement of intracellular calcium and electrical activity from patterned neural networks in culture. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **40**, 804-810 (1993).
- 13) Otto, F. Görtz, P. Fleischer, W. and Siebler, M.: Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays. *J. Neurosci Methods.*, **128**, 173-181 (2003)
- 14) Li, Y. Lu, R. H., Luo, G. F., Pang, W. J. and Yang, G. S.: Effects of different cryoprotectants on the viability and biological characteristics of porcine preadipocyte. *Cryobiology*, **53**, 240-247 (2006)
- 15) 許南浩，日本組織培養学会，JCRB 細胞バンク：「細胞培養なるほど Q&A」，羊土社，東京，p.166-169 (2003)
- 16) Sum, A. K. and Juan, J.: Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipids bilayers. *Biophys. J.*, **85**, 3636-3645 (2003)