



Title	Dimethyl sulfoxideによる分散ラット心筋細胞の凍結保護機構の実験的検討
Author(s)	内田, 努; 宮村, 謙一郎; 永山, 昌史 他
Citation	低温生物工学会誌, 58(1), 59-63
Issue Date	2012-04-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51700
Rights	利用は著作権の範囲内に限られる.
Type	journal article
File Information	CaC58-1_59-63.pdf



Dimethyl sulfoxide による分散ラット心筋細胞の凍結保護機構の実験的検討

北海道大学大学院工学研究院 応用物理学部門
内田 努, 宮村 謙一郎, 永山 昌史, 郷原 一寿

Experimental Investigations of Cryopreservation Mechanisms on Dispersed Rat Cardiac Myocytes with Dimethyl Sulfoxide

Tsutomu UCHIDA, Kenichiro MIYAMURA, Masafumi NAGAYAMA and Kazutoshi GOHARA

*Division of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, N13 W8 Kita-ku, Sapporo
060-8628 Japan*

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is one of the useful cryoprotective agents for a variety of cells and tissues allowing prolonged storage at subzero temperatures. Since most of the optimum DMSO concentrations for the different cells and tissues cryopreservations are similar, we predict the reason for the optimum DMSO concentration by measuring the thermodynamic properties of culture medium including DMSO and by observing the toxicity of DMSO on the neonatal rat cardiac myocytes. The melting point measurements suggest that the larger DMSO concentration medium has lower melting points, which would prevent the cell damage by ice reformation during the thawing process. However, such medium has higher toxic effect on the cryopreserved cells. These two contrary factors can predict the optimum concentration of DMSO in the medium for the cryopreservation of cells including the cardiac myocytes.

(Received Jul. 29, 2011; Accepted Nov. 7, 2011)

緒 言

近年動物実験の代替法として、心臓を構成する心筋細胞の需要が増加している。しかし心筋細胞は分裂能が低いため、計画的・安定的供給手段として一般的な凍結保存法の適応は困難であるとされている¹⁾。同様な理由で凍結保存が困難な細胞種も存在するため²⁾、凍結保存メカニズムの解明と一般的技術の確立とが望まれている。宮村ら¹⁾は、dimethyl sulfoxide (DMSO) を凍結保護剤として、新生子ラ

ット心筋細胞の凍結保護実験を行った。-80℃まで緩慢凍結を行い一週間保存後、通常培養して細胞機能の健全性を調べた結果、DMSO を 5~10%含む凍結液での保存が最も高い生存率(約 50%)で、DMSO を 10%含む凍結液の試料が最もコントロールに近い接着、伸長、拍動等の機能を保持していた。

DMSO は分子式(CH₃)₂SO で親水性であり、分子の大きさが直径 4 Å 以下と小さいため、細胞膜を透過すると考えられている。DMSO に細胞凍結保護機能があることは 1959 年に Lovelock and Bishop³⁾によって明らかにされたが、その後多くの細胞の凍結保存に有用であることが確認されている⁴⁾。細胞凍結に際しての DMSO 至適濃度は、ラット心筋細胞で 5~10%¹⁾⁵⁾⁻⁷⁾、ラット神経細胞で約 10%²⁾、ブタ白血球で

第 56 回低温生物工学会研究報告 11.

[Key words: Dimethyl sulfoxide, melting point, cryotoxy; DMSO, 融点, 細胞毒性]

10%⁸⁾など細胞種が異なっても 10%前後であることが多い。一方 DMSO には様々な細胞毒性も報告されており^{4), 9), 10)}, 生殖細胞などの細胞凍結などにおいては, DMSO の使用量を極力抑える努力がなされている^{11), 12)}。

そこで本研究では, DMSO の凍結保存に対する至適濃度が, 細胞種が異なっても比較的普遍的である理由を明らかにし, 細胞凍結保存時の DMSO による保護作用機序を明らかにする事を目標とした。分裂能の低い細胞は毒性試験の感受性が高いことが期待されるため, 培養液中に分散させたラット心筋細胞の凍結保存の至適 DMSO 濃度が 10%前後にある¹⁾理由を, ①水溶液の熱物性測定と②細胞への毒性観測とから明らかにすることを試みた。

材 料 と 方 法

1. 実験材料

先行研究¹⁾と同様, 生後 2~4 日齢の新生子ラット心室由来心筋細胞 ((株)プライマリーセル社製) を実験に用いた。新生子ラットから摘出された心臓から分離した心室組織片をコラゲナーゼ処理し, 培養液 ((株)プライマリーセル社製, 心筋細胞用培養メディアウム) 中に細胞濃度 2.0×10^5 cell/mL で分散させた。DMSO (Sigma-Aldrich Co. LLC.社製, 純度 99.7%) を純水又は培養液中に溶解させ, 体積濃度 $C_{DMSO} = 0 \sim 20\%$ の範囲の水溶液および凍結液試料を作成した。

2. 凍結液の熱特性測定

1. で作成した DMSO 水溶液, および心筋細胞凍結液 (10~15 μ L) について, 示差熱量計 (DSC: 真空理工社製 BSC-2S/MTS-9000) で +20~−25°C の範囲で温度変化 (降温時 −2°C/min, 昇温時 0.5~3°C/min) させ, それらの凍結点 T_f , 融点 T_m , 融解潜熱 ΔH_m を測定した。 T_f , T_m , ΔH_m は, Fig. 1 に示すような DSC 曲線上で定義する。また純水 (蒸留・イオン交換水, 電気伝導率: 0.09 μ S/cm) を同様に測定し, 融点 (0°C), 融解潜熱 (6.0 kJ/mol) の基準とした。各試料の T_m , ΔH_m の値は, 昇温速度を変化させて純水の融点が 0°C となる条件で比較した。また, 市販の凍結液 (セルバンカー 1, 日本全薬工業 (株) 社製) も比較のため測定した。

3. DMSO の細胞毒性測定

凍結保存前後で凍結液に置換する過程で細胞が受ける毒性を評価するため, 未凍結の分散心筋細胞 (細胞密度 2×10^5 cells/mL) を 4°C で遠沈させ, 凍結液 ($C_{DMSO} = 0 \sim 20\%$) と置換した。軽いピペッティング後 4°C において 10~15 min 保持し, DMSO を含まない培養液と再び置換し, 通常条件 (37°C, 湿度 100%, 5%CO₂ 含有空気中) で 7 日間培養した (各濃度での実験数 $n = 1 \sim 3$)。そしてその培養期間における心筋細胞の接着・伸展機能や, 拍動機能などを先行研究¹⁾と同様に測定し, 凍結液に置換しないコントロール区 ($n = 3$) との比較で機能の正常性を評価した。

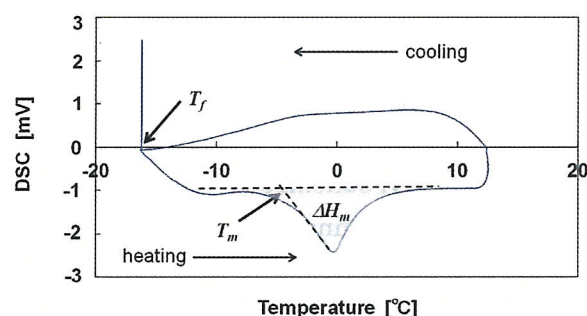


Fig. 1. Typical DSC curve for the solution. T_f , T_m , and ΔH_m are the frozen temperature, the melting temperature, and the melting enthalpy, respectively.

結 果 と 考 察

1. 凍結液の熱特性測定

DMSO 水溶液, および凍結液の T_f と T_m の C_{DMSO} 依存性を, Fig. 2 に示す。DMSO 水溶液は, 先行研究⁴⁾と同様に T_f , T_m とともに C_{DMSO} が増加するとともに低下した。 T_f は −15~−25°C の範囲であり, 本実験の冷却速度でいずれの C_{DMSO} においても十分な過冷却が起きていることが示唆された。また T_m は, DMSO 水溶液と凍結液との C_{DMSO} 依存性がほぼ並行であり, 培養液中の溶質による融点降下 (約 −2.1°C) が DMSO を添加しても維持されることがわかった。 C_{DMSO} を [mol/kg] 単位に換算して, 凍結液における T_m と C_{DMSO} との回帰直線を調べた結果, 0~2.2 mol/kg の範囲でほぼ直線的に減少し, (1) 式のようになった (相関係数 $R^2 = 0.997$)。

$$T_m [^\circ\text{C}] = -3.5 C_{DMSO} [\text{mol/kg}] - 2.1 [^\circ\text{C}] \quad (1)$$

すなわち DMSO 添加による水溶液の T_m 変化は, 水のモル凝固点降下 (約 −1.85°C kg/mol) より 2 倍程度大きかった。また測定濃度範囲では, DMSO は水

溶液中の溶質とは相互作用が小さく、主に水と相互作用することで融点を低下させることが示唆された。

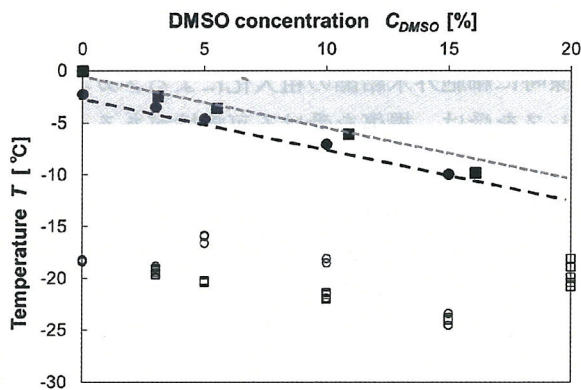


Fig. 2. DMSO concentration C_{DMSO} dependence of the frozen temperature T_f (open symbols) and the melting temperature T_m (solid symbols) for DMSO solutions (squares) and for frozen solution (DMSO including medium, circles). Hatched temperature range indicates the maximum ice crystal growth temperature region for foods¹³⁾.

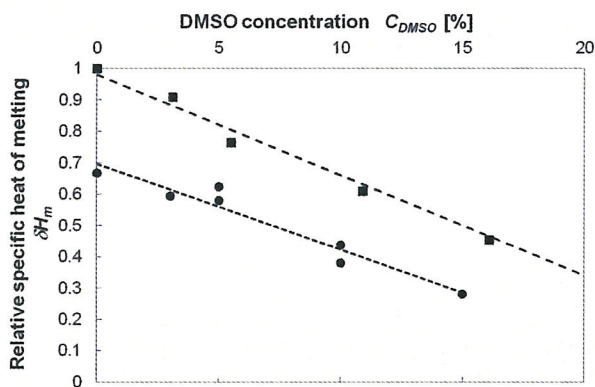


Fig. 3. DMSO concentration C_{DMSO} dependence of the relative melting enthalpy ΔH_m for DMSO solutions (squares) and for frozen solution (circles).

一方 DMSO 水溶液、および凍結液の比融解潜熱 $\delta H_m = \Delta H_m(\text{試料}) / \Delta H_m(\text{純水})$ の C_{DMSO} 依存性を、Fig. 3 に示す。この図より、DMSO 水溶液、凍結液とも C_{DMSO} が増加するとともに δH_m はほぼ線形に低下することがわかった (各々 $R^2 = 0.99, 0.94$)。すなわち、上記 T_m で考察したように、DMSO を添加すると水の活量が低下することが示唆された。また凍結液の δH_m は、 C_{DMSO} が 15% 以上になるとほぼ市販の凍結液 ($\delta H_m \approx 0.35$) 並みになることがわかった。

冷却速度 $-2^\circ\text{C}/\text{min}$ の T_f が $-15 \sim -25^\circ\text{C}$ の範囲であることから、先行研究¹⁾における心筋細胞の凍結も同程度の過冷却状態で凍結したと考えられる。DMSO は細胞内に浸透すると考えられるから、この

凍結条件では細胞外凍結が優先的に生じ、凍結に伴って脱水された細胞が細胞内凍結を起こさず保存されたと考えられる。すなわち、凍結時には細胞生存率に対する C_{DMSO} 依存性はさほど大きくないと推測される。これに対し T_m は、 $-2 \sim -10^\circ\text{C}$ の範囲で C_{DMSO} 依存性が明瞭であった。 C_{DMSO} が 5% 以上であれば T_m は約 -5°C 以下となる。食品の最大氷結晶生成帯が $-1 \sim -5^\circ\text{C}$ である¹³⁾ことから類推すると、 C_{DMSO} が 5~10% 以上であれば細胞外の氷結晶が急速に再結晶を起こす温度以下で、試料中の氷が融解すると考えられる。

2. DMSO の細胞毒性測定

コントロール区の心筋細胞の機能については、Fig. 4(a)に示すように培養 1 日目には基板に接着し、個々の心筋細胞が拍動を始めた。その後、隣接する心筋細胞同士が同期拍動をはじめた。心筋細胞以外の細胞は増殖し、培養 3 日目には基板をほぼ埋め尽くした (単層形成: Fig. 4(b))。この時期には、視野内の全ての心筋細胞が同期して拍動することが確認された。培養期間を通じた拍動数測定において、その最高拍動数は、単層を形成する直前の培養 2 日目に約 130 回/min を記録した。

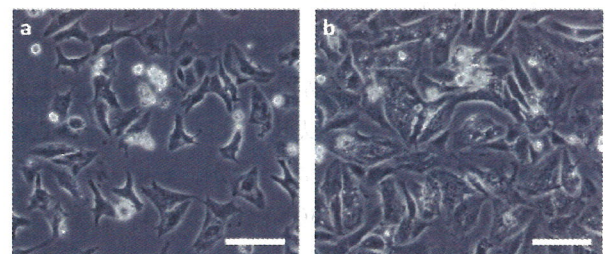


Fig. 4. Microscopic observation of dispersed rat neonatal cardiac myocytes. (a) 1 day in culture: adhering cardiac myocytes start to beat. (b) 3 days in culture: the surface of the base is covered completely by cells to form the cell sheet. The beating of cardiac myocytes is synchronized in the cell sheet. Each scale bar represents 100 μm .

凍結液に浸漬した細胞においても、コントロール区と同様に培養 1 日目に接着・伸展した。さらに心筋細胞同士が接触すると同期拍動した。しかし、同期拍動の開始時期は C_{DMSO} が高いほど遅れ (Table 1)、かつ少数の心筋細胞間で同期する傾向にあった。その場合でも、培養日数が経つにつれて細胞が伸展し、多数の細胞で同期するようになった。その後、細胞単層を形成すると基板全体が一様に同期拍動する事

を確認した。細胞単層形成日については、 C_{DMSO} が 5～20 %の範囲では、コントロール区とほぼ同じかやや遅れる傾向にあった (Table 1)。すなわち DMSO の毒性評価実験において、細胞の同期拍動開始日、および細胞単層形成日がいずれもコントロール区と比較して同じか遅れる傾向にあることがわかった。なお、コントロール区と $C_{DMSO}=0\%$ 区とを比較すると、細胞の機能には影響していないことから、培地交換の作業自体は、結果に影響を及ぼしていないことを確認した。

Table 1 C_{DMSO} dependence of the starting date of synchronized beating after culturing, and that of the formation date of the cell sheet

C_{DMSO}	Starting date of synchronized beating / Formation date of the cell sheet		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
0%	day 1 / day 3	day 2 / day 3	day 1 / day 3
5%	day 1 / day 4		
10%	day 1 / day 2	day 2 / day 3	day 1 / day 3
15%	day 2 / day 4		
20%	day 2 / day 4	× / day 6	

×: The synchronized beating was not observed during the experiment.

さらに、培養期間中の心筋細胞の最高拍動数を測定した結果、最高拍動数を記録した日は、いずれもコントロール区とほぼ同じ培養 2 日目であったが、 C_{DMSO} が高くなる程、最高拍動数は低下することがわかった。 C_{DMSO} が 10 %以下ではコントロール区の最高拍動数の 80～90%であったが、 $C_{DMSO}=15\%$ 、20%ではそれぞれ 60%、30%程度となり、濃度が高くなるにつれて最高拍動数が低下した。すなわち本研究の実験条件下では、細胞が死滅するほどの毒性は発揮されなかったが、 C_{DMSO} が 10 %以上では心筋細胞の機能に顕著な障害が出ることがわかった。

3. 緩慢凍結による分散ラット心筋細胞の凍結保存結果の考察

緩慢凍結による分散ラット心筋細胞の凍結保存において得られた DMSO 濃度依存性¹⁾について、凍結液の熱物性測定、および細胞に対する DMSO の毒性試験の 2 つの実験結果から考察する。

凍結液の熱物性測定結果より、 C_{DMSO} が 10%以上では T_m が最大氷結晶成長温度帯以下になることが示唆された。つまり、DMSO が高濃度であるほど解

凍時の氷結晶粗大化を抑制する効果があり、特に C_{DMSO} が 10%以上でその効果が顕著に表れることが期待される。逆に C_{DMSO} が 10%以下の凍結液による保存の場合、凍結時は細胞内凍結を免れた細胞も、解凍時に細胞外氷結晶の粗大化によるメカニカルストレスを受け、損傷を受ける可能性がある。

細胞に対する DMSO の毒性試験については、培養前に 4℃で 10～15min 程度凍結液に浸漬させた場合、 C_{DMSO} が高いほど拍動開始日が遅れ、拍動数も低下し、細胞が単層を形成する日も遅れるなど、心筋細胞の機能に障害が生じることがわかった。これらの障害は、 C_{DMSO} が 10%を超えると顕著になった。培養中の新生子ラット心筋細胞に対する DMSO の毒性試験⁷⁾では、4℃において C_{DMSO} が 10%以上の培養液に 20min 暴露された細胞は、拍動が急激に低下しており、本研究で得られた結果と定性的に一致していた。またブタ白血球⁸⁾、プラナリアの走行性⁹⁾、マウスの脾臓細胞種¹⁰⁾、魚類精子¹¹⁾、出芽酵母¹²⁾などで DMSO の毒性が報告され、いずれも 5～15%以上で異常が見いだされている。

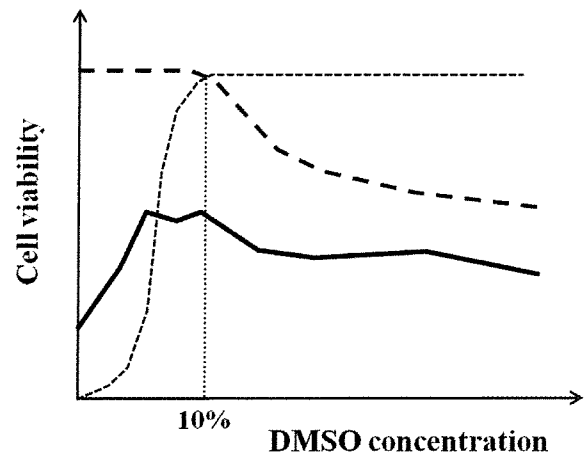


Fig. 5. Schematic diagram of C_{DMSO} dependence of the viability of cryopreserved cardiac myocytes (thick solid line)¹⁾. The viability increases with C_{DMSO} if the recrystallization of intercellular ice is prohibited by reducing the melting point (dotted line). However, the higher C_{DMSO} would exhibit the larger cytotoxic effect (dashed line).

これらの結果から、解凍時の DMSO による氷結晶粗大化抑制効果と、細胞の DMSO 毒性耐性との複合要因により、緩慢凍結による分散ラット心筋細胞の凍結保存生存率の C_{DMSO} 依存性が得られることが示唆された (Fig. 5)。前者は細胞種によってほとんど変化がないと考えられるため、DMSO の至適濃度の細胞依存性は、多くの場合細胞の DMSO 耐性の違い

に起因すると考えられる。その耐性の範囲が多くの場合 5~15%であるため、凍結保存に対する DMSO の至適濃度が、細胞種が異なっても比較的普遍的であると考えられる。細胞耐性が細胞種によらないことは、DMSO が細胞膜を通過して細胞内に溶解することと関係があると考えられる。

ま と め

培養液中に分散させたラット心筋細胞の凍結保存条件に対する至適 DMSO 濃度が 10%前後にある理由を明らかにするため、水溶液及び凍結液の熱物性測定と細胞への DMSO 毒性観測とを行った。示差熱量計による凍結液の測定結果から、5~10%以上の DMSO 濃度では凝固点降下により融点を最大氷結晶生成帯以下に下げ、凍結細胞が融解時に細胞外氷結晶の再結晶によるメカニカルストレスを受けないようにすることが示唆された。一方凍結液への浸漬試験結果から、DMSO は細胞の機能を阻害することが確認され、その影響が濃度 10%以上で顕著になることが示唆された。これら二つの効果を合わせることで、至適 DMSO 濃度が 10%前後にある事が定性的に説明された。

謝 辞

本研究は、(株)プライマリーセル社より試料提供を受け、科学研究費補助金(基盤 B: 23350001)より一部援助を受けて行われた。DSC 測定は、(独)産業技術総合研究所の技術協力を得て行われた。

文 献

- 1) 宮村謙一郎, 永山昌史, 郷原一寿, 平俊夫, 清水恭子, 酒井雅人, 内田努: ラット心筋細胞の凍結保存におけるジメチルスルホキシドの有効性評価, 低温生物工学会誌, **56**(2), 111-117 (2010)
- 2) 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 (Ed. by W. F. Kuhs)", Royal Society of Chemistry, London, 409-416 (2007)
- 3) Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. H.: Preservation of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, *Nature*, **183**, 1394 (1959)
- 4) Yu, Z.-W. and Quinn, P. J.: Dimethyl sulphoxide: A review of its application in cell biology, *Biosci. Rept.*, **14**, 259-281 (1994)
- 5) Alink, G. M., Verheul, C. C. and Offerijns, F. G. J.: The effect of cooling rate and of dimethyl sulfoxide concentration on low temperature preservation of neonatal rat heart cells, *Cryobiology*, **13**, 295-304 (1976)
- 6) Yokomuro, H., Mickle, D. A. G., Weisel, R. D. and Li, R.-K.: Optimal conditions for heart cell cryopreservation for transplantation, *Mol. Cell. Biochem.*, **242**, 109-114 (2003)
- 7) Hak, A. M., Offerijns, F. G. J. and Verheul, C. C.: Toxic effects of DMSO on cultured beating heart cells at temperature above zero, *Cryobiology*, **10**, 244-250 (1973)
- 8) Koch, E., Larak, M. and Ellendorff, F.: Comparative studies on in vitro reactivity of fresh and cryopreserved pig lymphocytes, *Cryobiology*, **28**, 405-412 (1991)
- 9) Pagan, O. R., Rowlands, A. L. and Urban, K. R.: Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria, *Neurosci. Lett.*, **407**, 274-278 (2006)
- 10) Lawson, A., Ahmad, H. and Sambanis, A.: Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions, *Cryobiology*, **62**, 115-122 (2011).
- 11) 宮木廉夫: 魚類精子の凍結保存技術について, 冷凍, **85**, 37-41 (2010)
- 12) Momose, Y., Matsumoto, R., Maruyama, A. and Yamaoka, M.: Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer tolerance to freeze-thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryobiology*, **60**, 245-261 (2010)
- 13) 松本信二: 食品加工貯蔵学, 本間清一, 村田容常編, 東京化学同人, 東京, pp. 141 (2004)