



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | ラット心筋細胞の常温保存研究 : ガス印加の影響                                                          |
| Author(s)        | 奥平, 俊樹; 永山, 昌史; 郷原, 一寿 他                                                          |
| Citation         | 低温科学, 71, 81-89                                                                   |
| Issue Date       | 2013-03-31                                                                        |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/52356">https://hdl.handle.net/2115/52356</a> |
| Type             | departmental bulletin paper                                                       |
| File Information | LTS71_009.pdf                                                                     |



# ラット心筋細胞の常温保存研究 —— ガス印加の影響 ——

奥平 俊樹, 永山 昌史, 郷原 一寿, 内田 努

2012 年 9 月 20 日受付, 2012 年 12 月 19 日受理

細胞を生きたまま保存することができれば, 一つの個体から多くの実験試料を採取し安定供給することができ, 産業分野に大きく貢献できる. しかし心臓を構成する心筋細胞など需要が多いにもかかわらず保存が困難な細胞も存在する. そこで本研究では, 分散された初代ラット心筋細胞の保存条件を, キセノンなどのガスを印加し室温以上の温度まで保存温度を引き上げる技術について検討した. 9.4~35°Cの範囲で種々のガスを 0.5 MPa 印加して培養液中に分散させた心筋細胞を 72 時間保存し, 保存後の細胞を生理条件下で培養してその機能の正常性を評価した. その結果, 不活性ガス, 窒素ガス, 炭化水素ガスなどを印加した場合は, ガスを印加しなかった保存細胞との違いが見られず, ガスの印加効果が本実験条件内では見られなかった. しかし酸素を含んだ混合ガスを印加したところ, 高温まで分散状態が保たれたが, その後の培養試験で多くの細胞が劣化または死滅することがわかり, 高濃度酸素が保存期間中に細胞の接着機能に影響を及ぼすことがわかった.

## Effect of gas adding on the preservation of dissociated neonatal rat cardiomyocytes at room temperatures

Toshiki Okudaira, Masafumi Nagayama, Kazutoshi Gohara, Tsutomu Uchida

If we can preserve the cells, we contribute significantly to the industrial demands by the stable supply of a number of experimental samples from one individual. However, some cells exist in high demand although it is difficult to preserve, such as the cardiomyocytes that make up the heart. In this study, we have examined the preservation technique by applying gases to rise the storage temperature limit of the dispersed primary rat cardiomyocytes. We evaluated the health of its functions under physiological conditions by culturing the cells after the storage by applying 0.5MPa gases for 72 hours at temperatures ranged from 9.4 to 35°C. As a result, we observed no difference between the preserved cells with and without applying inert gas, nitrogen gas and hydrocarbon gas in the present experimental conditions. However, we found the significant negative effect by applying the mixed gas containing oxygen during the culture test although the dispersed condition was kept during the preservation period at higher temperature. It is considered that the dissolved oxygen would inhibit the adhesion function of cardiomyocytes.

### 1. Introduction

心筋細胞は心臓を構成する細胞であり, 近年個体を用いた動物実験の代わりとして創薬や医療の分野で薬理学的解析等に用いられるようになってきた (Simpson et al., 1982). そのため心筋細胞を安定に供給する需要が生まれ, 長期保存技術が検討されている. 現状では, 動物から調整された初代分散細胞を冷蔵 (4~10°C) 条件下で 24 時間程度保存できる. より長期に保存するため

には冷凍保存が一般的である. 冷凍保存が可能な細胞は一般的に分裂能が高く, 凍結過程で細胞数が一時的に減少しても生き残った細胞が増殖するので培養すれば元の細胞数に回復するという特徴を持っている. 心筋細胞についても 1950 年代から凍結研究が進められている (Smith, 1957; Yokomuro et al., 2003) が, 分化した心筋細胞は分裂能をほとんど有しておらず (Tamamori-Adachi et al. 2003), 冷凍保存が困難な細胞であるとされている. そこで Uchida et al. (2011) は, 心筋細胞を冷蔵保存より高い室温でより長期間保存する可能性を調べ, 20°C以下の一定温度で 72 時間保存した細胞を撒種・培養した際の細胞の接着, 拍動の様子が, 保存をせず撒種・培養した場合とほぼ同じであったことを示し

た．ところが保存温度が20°C以上の場合、分散していた細胞は保存期間中に凝集してしまった．心筋細胞は活性があると細胞同士が接着する性質を持っているが、保存期間中に細胞同士が接着して凝集してしまったということは、この温度条件下では細胞の活動を抑制できなかったと考えられる．このように凝集した細胞を保存期間終了後に撒種・培養したが、接着や拍動などが正常に行われなかった．従って室温以上で細胞を保存するためには、保存期間中の凝集を防ぐ、すなわち細胞の生命活動を抑制することが必要であると考えた．

常温で生命活動を抑制する手段として、キセノン (Xe) ガスなどの麻酔ガスを添加する方法が提案されている．たとえば Xe をカーネーションや野菜に印加し、生命活動を抑制する研究がおこなわれている (橋本・大下, 1996; Oshita et al., 1996; 1999; 大下他, 1996; 1997; 松島他, 2000a; 2000b; 安藤他, 2008)．Xe は比較的低压でもクラスレートハイドレートを生成するガスとして知られており、細胞内の水を構造化することで生命活動を抑制しているのではないかと考えられている．そこで本研究では、動物分散細胞に対して Xe をはじめとする様々なガスを印加し、保存期間中の細胞の活動を抑制して凝集を防ぐことができないか、またそれにより Uchida et al. (2011) で示された保存温度の上限が室温以上に引き上げられないか調べた．

## 2. Experimental Procedures

### 2.1 Experimental Materials

#### (1) Preparation of dispersed cells of neonatal rat cardiomyocytes

細胞は、(株)プライマリーセルにて調整された、新生子ラット心室由来心筋細胞を使用した．心臓は生後2-4日齢の新生子ラットから摘出されたものを使用した．細胞の分散処理として、心臓から分離した心室に対し、コラゲナーゼで37°C・15分間の酵素処理を3回行なった．得られた分散細胞を培養容器に撒き、接着性の高い非心筋細胞を容器に接着させることにより、懸濁液から非心筋細胞を除去した (Kakinuma et al., 2000)．最終的に培養液中に  $2.0 \times 10^5$  cells/ml の濃度で分散させた細胞懸濁液を調製した．心筋細胞の培養液はダルベッコ変法イーグル培地：ハム F 12 (1:1) 混合培地に、ウシ胎児血清 10%, ペニシリン 10 units/ml, ストレプトマイシン 10  $\mu$ g/ml を加えたものである．

#### (2) Preservation procedures and conditions

上述の細胞懸濁液を、クライオチューブ (Nunc 社製) に 1 ml ずつ分注した．その後、クライオチューブを高圧容器 (伊藤計器製) 中に静置し、大気を置換せず

容器ごと保存温度  $9 \sim 35^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$  の条件下に置き、72時間保存した．保存中の温度・圧力条件は、高圧容器に取り付けられたブルドン管式圧力計、熱電対 (Type T) により計測し、データロガー (Graphtech, GL400) で記録した．使用したガスはキセノン (Xe; 99.995%), アルゴン (Ar; 99.995%), 窒素 ( $\text{N}_2$ ; 99.99%), 及び窒素・酸素混合ガス ( $\text{N/O}$  (50);  $\text{N}_2 : \text{O}_2 = 49.6\% : 50.4\%$ ) で、いずれもエア・ウォーター社製である．保存温度20°Cにおいてはメタン ( $\text{CH}_4$ ; 99.99%), エタン ( $\text{C}_2\text{H}_6$ ; 99.9%), プロパン ( $\text{C}_3\text{H}_8$ ; 91.2%), 窒素・酸素混合ガス ( $\text{N/O}$  (5);  $\text{N}_2 : \text{O}_2 = 95.13\% : 4.87\%$ ), 圧縮空気 (Air;  $\text{O}_2$  濃度約21%) を、35°Cではクリプトン (Kr; 99.9%), ヘリウム (He; 99.995%) を印加した実験も比較実験として行った．実験方法のブロックダイヤグラムを Figure 1 に、各ガス条件での実験回数と温度条件を Table 1 に示した．

### 2.2 Evaluation methods of normality on preserved cells

各温度・ガス条件下で保存した細胞は、培養ディッシュに  $1.0 \times 10^5$  cells/mm<sup>2</sup> の密度で撒き、生理的条件 (温度37°C, 湿度100%, 5%CO<sub>2</sub> 含有空気) 下で7日間培養した．保存細胞 (「ガス印加区」と呼ぶ) の正常性を評価するため、同じロットで同じ温度条件下でガスを印加せず保存した「非処理区」細胞 (Uchida et al., 2011), 及び同じロットで保存せずすぐに培養を開始した「コントロール区」細胞についても上記と同様の条件下で7日間培養した．なお、それぞれの区分は Figure 1 に示した．そして各種ガス印加区の心筋細胞の拍動機能の正常性と生存率を指標として、以下の方法から評価した (宮村他, 2010; Uchida et al., 2011)．

#### (1) Cell viability

トリパンブルー (SIGMA 社製) を用いて、保存終了後の細胞を染色した．トリパンブルーにより染まっていない細胞を生存細胞として、各視野20個程度の細胞について血球計算盤を用いて測定し、1試料につき8回の測定値の平均から生存率を求めた．各実験における複数回の実験データのうち、最大値と最小値を平均値からの偏差として表した．

#### (2) Microscopic observation of cells during cultivation

保存後7日間にわたって培養し、その形態変化の様子を位相差顕微鏡 (OLYMPUS 社製, IX 71) にて観察した．観察中の温度変化を防ぐため、ステージ上は  $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に調整した．そして、心筋細胞の接着・伸展・増殖の様子を、コントロール区、非処理区 (Uchida et al., 2011) とガス印加区細胞とで比較した．

#### (3) Measurements of synchronized beating rate

ガス印加区細胞の拍動機能の回復程度を定量化するた

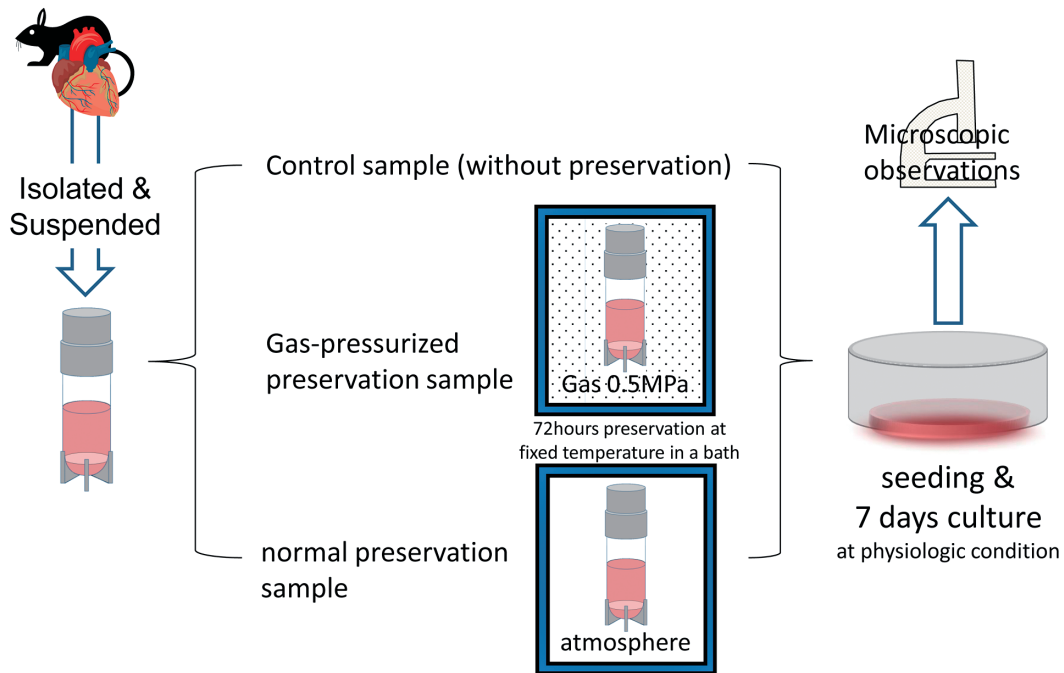


Figure 1 : Schematic diagram of experimental procedures

Table 1 : Experimental conditions and frequencies of experiment

| Gas                           | Storage Temperature [°C] |          |          |          |          |
|-------------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
|                               | 9.4±0.1                  | 19.2±0.8 | 21.9±0.5 | 28.2±0.1 | 35.0±0.1 |
| Xe                            | 2                        | 2        | 2        | 2        | 2        |
| Ar                            | 2                        | 2        | 2        | 2        | 3        |
| Kr                            |                          |          |          |          | 2        |
| He                            |                          |          |          |          | 2        |
| N <sub>2</sub>                | 1                        | 3        | 2        | 2        | 1        |
| N/O (5)                       |                          |          | 2        |          |          |
| Air                           | 1                        | 1        | 2        |          |          |
| N/O (50)                      | 1                        | 2        | 2        | 2        | 1        |
| CH <sub>4</sub>               |                          |          | 2        |          |          |
| C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> |                          |          | 2        |          |          |
| C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> |                          |          | 2        |          |          |

めに、顕微鏡を用いた形態観察時に、複数の細胞による同期的な拍動（同期拍動）数の日変化を観測した。なお同期拍動数は、対物レンズ×10を用いて顕微鏡観察を行い、各区細胞についてそれぞれ任意の4視野でカウントし平均した。また、各条件において複数回の実験データのうち、最大値と最小値を平均値からの偏差として表した。

### 3. Results

#### 3.1 Effects of temperature and variety of gases on the morphology of dispersed cell just after the 72-hours preservation

各種ガスを0.5 MPa印加した状態で、培養液中に分散させた心筋細胞を72時間一定温度で保存を行った。保存期間中に細胞がどのような変化を生じたかを確認す

るため、保存終了時の細胞を培養用ウェルに撒種し、顕微鏡観察を行った。Table 2にそれらの結果をまとめた。

撒種直後の顕微鏡観察から、保存期間中の細胞の状態変化について検討した。Figure 2には、(a) 非処理区、(b) Xeガス印加区、および(c) N/O (50) ガス印加区において、9.4、21.9、および35.0°Cの各温度で72時間保存したあとの分散状況を示した。Table 2およびFigure 2(b)より、各ガス印加区とも保存温度が20°C以下の場合は全て細胞は分散状態を保っていた。先行研究(Uchida et al., 2011)より、これはコントロール区と同じ状態であることが示されている。保存温度が21.9°Cの場合は、各ガス印加区とも弱く凝集しており、軽いピペティングでかなりの部分が分散した。28°C以上の温度で保存した場合、細胞同士はピペティングでは分散しないほど強く凝集してしまい、培養を開始しても分散しなかった。すなわち保存温度が20°Cを超えると、保

Table 2 : Summary of observation results

| Storage Temp/°C               | Treat gas      | Cell condition after storage | Cell viability /%               | Observation of cell growth      | Observation of cell beating                               | Observation of beating condition              | maximum relative synchronized beating rate/% |
|-------------------------------|----------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| control                       |                | dispersed                    | 100±4.2                         | confluent                       | whole synchronized beat                                   | periodical                                    | 100 ±13.2                                    |
| 35.0                          | non treat      | strongly aggregated          | —                               | grow around the cohesion        | beating within the cohesion                               | non periodical (fibrillation, intermittently) | 60.1±22.9                                    |
|                               | Xe             |                              | —                               |                                 |                                                           |                                               | 45.7±11.8                                    |
|                               | Ar             |                              | —                               |                                 |                                                           |                                               | 76.1±23.7                                    |
|                               | Kr             |                              | —                               | 41.2±22.1                       |                                                           |                                               |                                              |
|                               | He             |                              | —                               | 35.1±21.4                       |                                                           |                                               |                                              |
|                               | N <sub>2</sub> |                              | —                               | 65.2±22.7                       |                                                           |                                               |                                              |
|                               | N/O (50)       | dispersed                    | 59.4±4.5                        | small adherence, no growth      | no beat                                                   | none                                          | 0                                            |
| 28.2                          | non treat      | strongly aggregated          | —                               | grow around the cohesion        | beating within the cohesion                               | non periodical (fibrillation, intermittently) | 61.0±21.8                                    |
|                               | Xe             |                              | —                               |                                 |                                                           |                                               | 67.8±22.2                                    |
|                               | Ar             |                              | —                               |                                 |                                                           |                                               | 60.3±22.3                                    |
|                               | N <sub>2</sub> |                              | —                               |                                 |                                                           |                                               | 55.4±19.0                                    |
|                               | N/O (50)       | dispersed                    | 63.0±5.0                        | small adherence, little growth  | partly autonomic beating                                  | none                                          | 0                                            |
| 21.9                          | non treat      | relatively aggregated        | 77.4±10.7                       | grow widely around the cohesion | beating within the cohesion, then whole synchronized beat | non periodical (elongation of interval)       | 81.5±25.6                                    |
|                               | Xe             |                              | 72.5±7.3                        |                                 |                                                           |                                               | 79.5±11.0                                    |
|                               | Ar             |                              | 69.7±10.7                       |                                 |                                                           |                                               | 87.2±10.9                                    |
|                               | N <sub>2</sub> |                              | 70.4±6.4                        |                                 |                                                           |                                               | 80.4±17.3                                    |
|                               | Air            |                              | 65.0±4.0                        |                                 |                                                           | non periodical (fibrillation, intermittently) | 66.1±16.5                                    |
|                               | N/O (50)       | dispersed                    | 68.5±7.5                        | little growth                   | locally synchronized beat                                 | locally periodical                            | 34.4±41.3                                    |
|                               | 19.2           | non treat                    | dispersed                       | 83.9±12.1                       | confluent                                                 | whole synchronized beat                       | periodical                                   |
| Xe                            |                | 78.1±1.4                     |                                 | 84.2±2.2                        |                                                           |                                               |                                              |
| Ar                            |                | 72.7±1.6                     |                                 | 90.6±3.1                        |                                                           |                                               |                                              |
| N <sub>2</sub>                |                | 85.0±4.5                     |                                 | 80.4±17.3                       |                                                           |                                               |                                              |
| N/O (5)                       |                | 82.7±0.8                     |                                 | 60.1                            |                                                           |                                               |                                              |
| Air                           |                | 81.8±0.4                     |                                 | confluent, but slowly           | 76.4                                                      |                                               |                                              |
| N/O (50)                      |                | 71.5±3.5                     |                                 | widely spread but not confluent | locally synchronized beat                                 | locally periodical                            | 49.2±31.3                                    |
| CH <sub>4</sub>               |                | 75.7±1.7                     |                                 | confluent                       | whole synchronized beat                                   | periodical                                    | 84                                           |
| C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> |                | 74.6±1.3                     |                                 |                                 |                                                           |                                               | 107                                          |
| C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> |                | 72.0±2.3                     | 79                              |                                 |                                                           |                                               |                                              |
| 9.4                           | non treat      | dispersed                    | 88.5±5.5                        | confluent                       | whole synchronized beat                                   | periodical                                    | 101.9±12.4                                   |
|                               | Xe             |                              | 85.3±6.0                        |                                 |                                                           |                                               | 102.7±5.1                                    |
|                               | Ar             |                              | 80.9±2.0                        |                                 |                                                           |                                               | 101±5.9                                      |
|                               | N <sub>2</sub> |                              | 90.8±8.8                        |                                 |                                                           |                                               | 97.4±2.1                                     |
|                               | Air            |                              | 92.3±3.9                        |                                 |                                                           |                                               | 86                                           |
|                               | N/O (50)       | 75.4±2.2                     | widely spread but not confluent | locally synchronized beta       | locally periodical                                        | 75.9±2.1                                      |                                              |

存期間中に細胞の活動を抑制しきれず凝集を始めてしまうことがわかった。凝集の程度が高温ほど強いことから、保存温度が高いほど活発に活動していたと推測される。Table 2 にも示す通り、これらの結果は何も印加せず保存した非処理区の結果 (Figure 2 (a): Uchida et al., 2011) と一致した。これに対し N/O (50) ガス印加区では、全ての温度範囲で分散状態を保っていた (Figure 2 (c))。

保存終了後の細胞の生存率を調べるため、トリパンブルー染色による計測を行った。Figure 3 には Xe, Ar, N<sub>2</sub>, N/O (50) の各ガス印加区における細胞生存率 (生存細胞数密度/全細胞数密度) の温度依存性を示した。ここで 100% はコントロール区の生存率 (Uchida et al., 2011) を示す。またデータの示されていない 28°C 以上の試料については、強固に凝集してしまっていて生存率の計測が不能であったことを示す。この図からわかるとおり、全体的に高温ほど生存率が低下する傾向がみら

れ、その傾向は非処理区 (Uchida et al., 2011) と有意な差が見られなかった。N/O (50) ガス印加区については、温度依存性は定性的に同じだが、生存率自体はいずれの温度でも他のガス印加区及び非処理区よりも低いことがわかった。さらに他の条件では凝集してしまった 20°C 以上の保存温度条件下でも、細胞が分散していることがわかった。また 19.2°C 保存区での細胞生存率の O<sub>2</sub> 濃度依存性を、N<sub>2</sub>, N/O (5), Air, および N/O (50) の各ガス印加区を比較して調べたところ、O<sub>2</sub> 濃度が高くなるにつれて減少していることがわかった (Figure 4)。

### 3.2 Normality of beating properties of preserved cells

保存期間中に受けた細胞機能のダメージを定性的に見積もるため、保存終了後ウェルに撒種した細胞を生理的条件下で 7 日間培養し、細胞の接着・伸長及び拍動状況の変化を観察した。細胞の接着・伸長状況については、

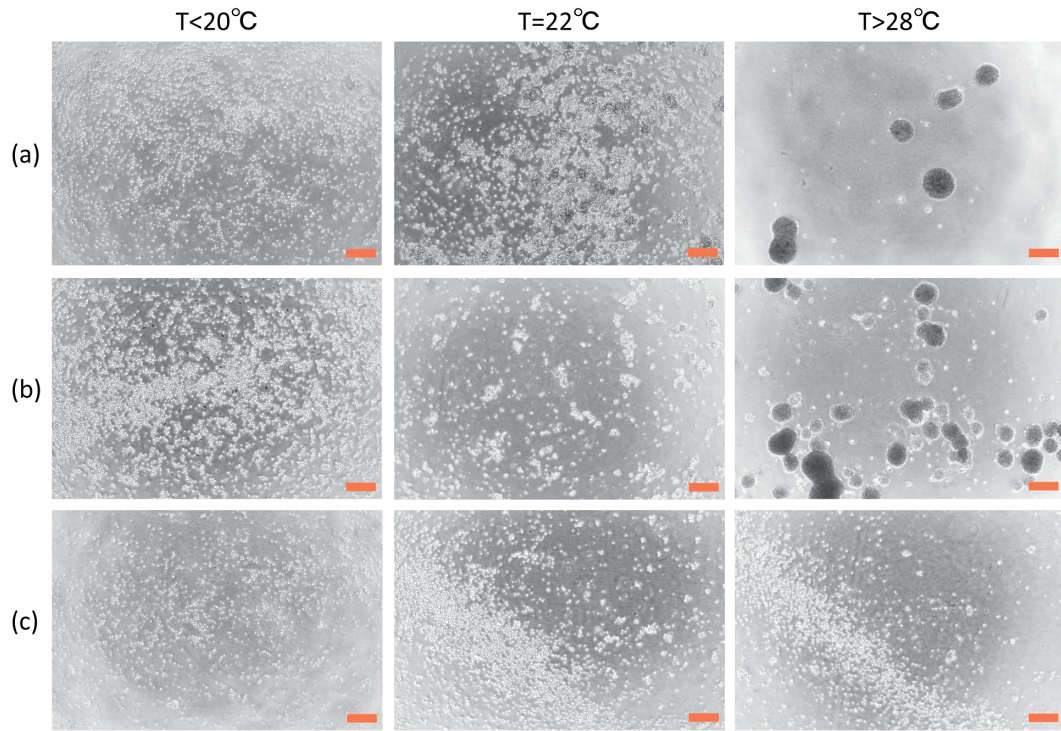


Figure 2 : Microscopic observations of dispersed cells just after the 72-hours preservation at 9.4°C (left column), 21.9°C (middle column), and 35.0°C (right column), respectively, under (a) non-gas adding, (b) 0.5MPa Xe adding, and (c) 0.5MPa N/O (50) adding samples. Each scale bar indicates 200 $\mu$ m.

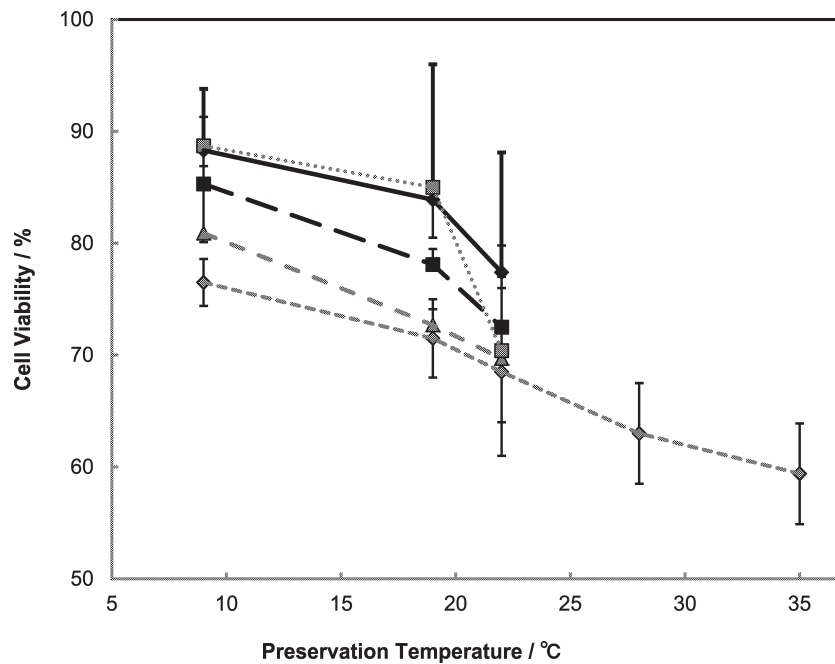


Figure 3 : Viability of preserved cells under non-gas adding (thick solid line with circles), 0.5 MPa Xe adding (thick dashed line with solid squares), 0.5 MPa Ar adding (thin dashed line with solid triangles), 0.5 MPa N<sub>2</sub> adding (thin dotted line with solid squares) and 0.5 MPa N/O (50) adding (thin dashed line with solid diamonds). Each error bar indicates the standard deviation of 8 measurements in each sample. The preservation samples at 28.2°C and 35.0°C were impossible to measure the viability due to the tight aggregation.

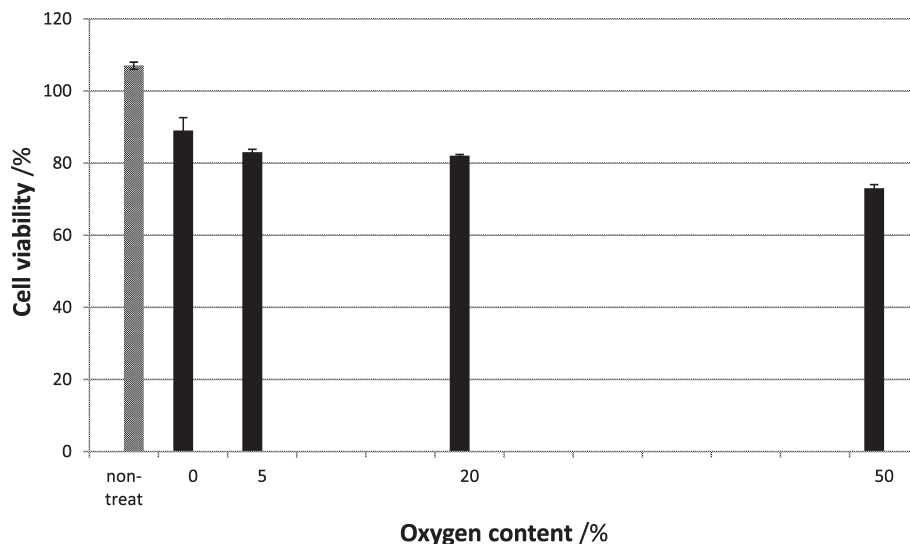


Figure 4 : Viability of preserved cells at 19.2°C under 0.5 MPa pressurized-gases containing various O<sub>2</sub> concentrations

Figure 5 に (a) 非処理区, (b) Xe ガス印加区, および (c) N/O (50) ガス印加区において, 培養 4 日目の顕微鏡観察像を保存温度の違いとともに示した.

Table 2 および Figure 5(b) より, Xe ガス印加区では, 撒種時分散状態だった 20°C 以下の保存温度条件での細胞は, 撒種後すぐに接着・伸長をはじめ自律拍動を開始した. 培養日数が経過するとともに細胞によるウェル底面占有面積は増加し, 拍動は隣接する心筋細胞と同期し始めた. 培養開始後 2~3 日でほぼ全面が細胞に覆い尽くされ (コンフルエント状態), 拍動も観察範囲全

域で同期するようになった. 先行研究 (Uchida et al., 2011) より, これはコントロール区と同じ状態であることが示されている. 温度 21.9°C の条件下で保存された細胞も, ほぼ 20°C 以下の条件で保存されたものと同様であったが, 28°C 以上の条件で保存された試料では, 凝集した細胞塊そのものが接着し, その周囲から少し細胞が伸長する様子が観測された. また培養日数が経過すると, 細胞塊の一部が同期拍動する塊も観測された. しかしその拍動は塊間には伝搬せず, 塊ごと独立に拍動していた. このことから, 保存期間中に凝集した細胞の多く

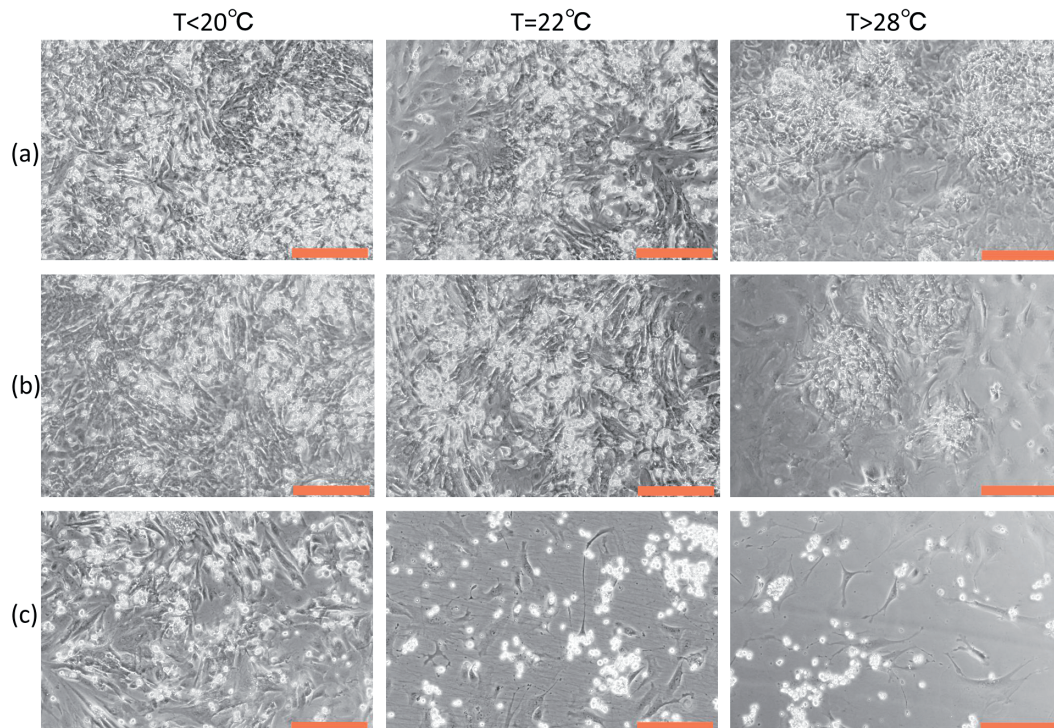


Figure 5 : Microscopic observations of preserved cells after 4-days cultivation under physiological conditions (37°C, 100% humidity and 0.1 MPa air including 5% CO<sub>2</sub>). Each sample is the same as shown in Figure 2. Each scale bar indicates 200  $\mu$ m.

は死滅していると思われたのだが、少なくとも細胞塊中の細胞も一部生存していたことがわかった。しかしその細胞の伸長・拍動の様子は、通常の分散細胞とは異なるものであり、心筋細胞の機能としてはかなり劣化していると考えられた。Table 2 にも示す通り、これらの結果は  $O_2$  含有ガス印加区以外の他のガス印加区とも定性的に一致しており、何も印加せず保存した非処理区の結果 (Figure 5(a): Uchida et al., 2011) と一致した。

これに対し N/O (50) ガス印加区においては、培養日数が経過しても伸長する細胞は少なく、培養液の交換に伴って細胞数が減少している様子が観測された (Figure 5(c))。拍動も自律拍動する細胞は観測範囲内でいくつか観測されたが、他のガス印加区及び非処理区の試料と比べて明らかに少ない数であった。そして  $28^\circ\text{C}$  以上の保存温度では、細胞塊の中で拍動する様子は見られたが、培養 7 日までの間に観察範囲全体で同期する拍動

は見られなかった。

### 3.3 Measurements of synchronized beating rates

保存細胞の拍動機能への影響をより定量的に見積もるため、強く凝集した試料を除き、培養開始から 7 日目までに観測された同期拍動数の変化を比較した。各試料の同じロットにおけるコントロール区の最大同期拍動数で規格化して示すと (Figure 6), N/O (50) ガス印加区を除く全てのガス印加区において、培養開始 0～1 日目に同期拍動が観測され、コンフルエント状態になるまで同期拍動数は増加した。これらの試料は、コンフルエントになった頃に最大同期拍動数を記録した後、徐々に減少していく様子が観測された。この日変化は、先行研究 (Uchida et al., 2011) で得られた非処理区の結果とほぼ同様な結果であり、コントロール区とも保存期間をシフトすると一致することがわかる。すなわち Xe, Ar,

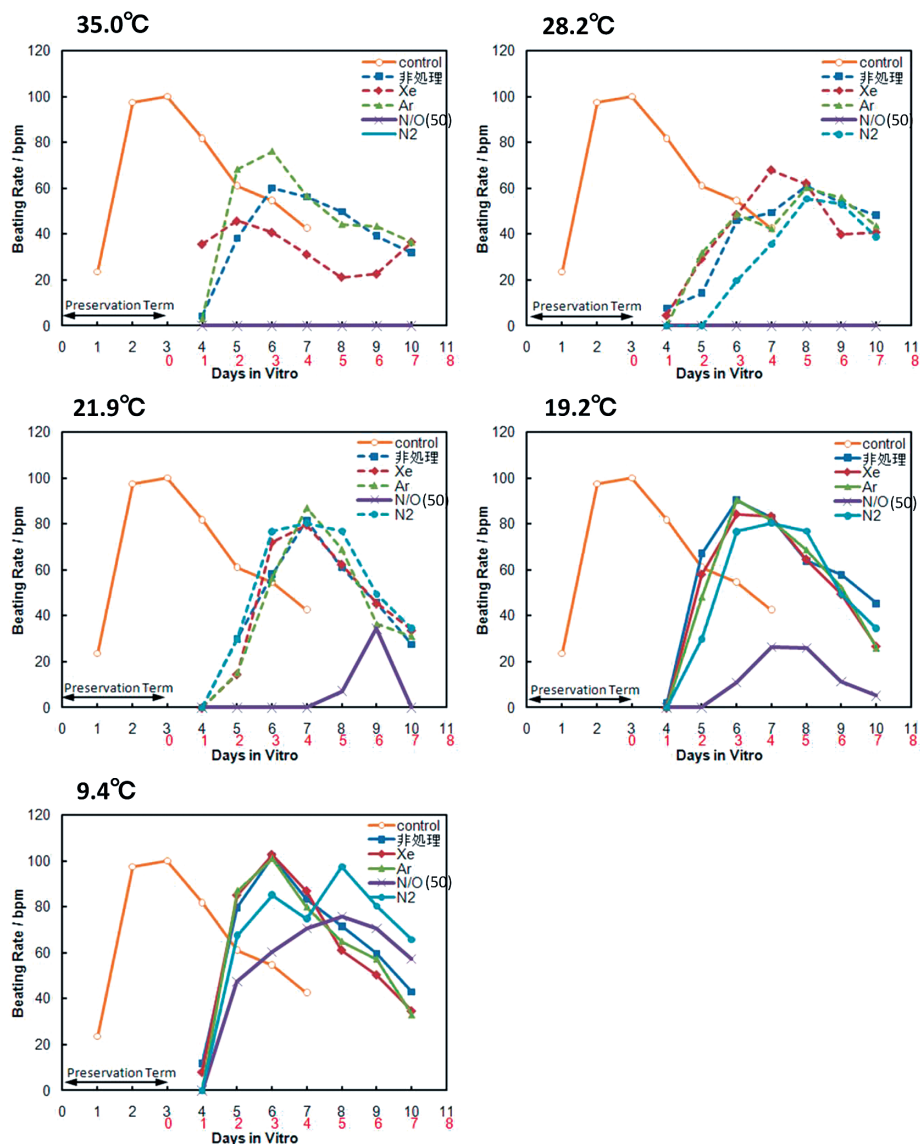


Figure 6 : Daily variation of the synchronized beating rate of preserved cells (normalized by the maximum rate in the control sample observed in 3-days cultivation, shown in solid yellow line). The cultivation of preserved cells started on day 3 but the synchronized beating was observed after one day in culture.

N<sub>2</sub> ガス 0.5 MPa 印加条件下で保存温度 20°C 以下で 72 時間保存した細胞の拍動機能は、充分保存されていたことが示された。これに対し同じガス印加区でも保存温度が 28°C 以上であった場合は、凝集によりコントロール区とは異なった成長をして、拍動機能も劣化していた。

N/O (50) ガス印加区の試料については、保存温度が高いほど拍動開始日が遅れ、最大拍動数は低下し、最大拍動数となる日も遅れるなど拍動機能が著しく劣化していたことが明らかになった。19.2°C にて保存した N<sub>2</sub>, N/O (5), Air, および N/O (50) の各ガス印加区試料について、同じロットでのコントロール区で得られた最大同期拍動数の値で規格化した最大同期拍動数の割合（同期拍動回復率）を O<sub>2</sub> 濃度の違いにより比較したところ、O<sub>2</sub> 濃度が高いほど同期拍動回復率が低下することがわかった (Figure 7)。

#### 4. Discussion

Xe, Ar, N<sub>2</sub> ガス 0.5 MPa 印加条件下で 72 時間の心筋細胞保存を行ったが、20°C 以下の温度条件下では分散状態を保ち、保存後の生存率は 70% 以上、成長状況もコントロール区、及び非処理区と遜色なかった。21.9°C では弱い凝集が見られたが、それ以上の温度では強い凝集がみられ、その後の培養時もコントロール区と同じような成長は見られなかった。これらの結果は、非処理区の温度依存性とほぼ同じであった。すなわち Xe, Ar, N<sub>2</sub> を 0.5 MPa 印加して 72 時間保存しても、保存温度が 20°C 以上であればガスを印加しなかった場合と同様に、細胞同士の凝集を防ぐことができなかった。このことは、他の不活性ガスや炭化水素ガスを用いても同様であった。従って、生花や野菜でみられた生命

活動を抑制する効果は動物分散細胞に対しては見られず、クラスレート生成ガス・非生成ガスを問わずガスを印加しても心筋細胞の保存温度の上限値を引き上げることができなかった。

一方 N/O (50) ガス印加条件下で保存した細胞は、他のガス印加区とは異なる結果が得られた。元々 O<sub>2</sub> 濃度をあげたガスの印加試験は、保存期間中に細胞が酸素欠乏になることを危惧して実施したものであった。その結果、保存期間中の分散状態は保存温度 35°C まで保たれており、保存期間終了後の生存率も O<sub>2</sub> 濃度の影響は小さかった。このため本研究の目的である保存温度の引き上げに最も適した条件であると期待された。しかし保存終了後の培養試験において、O<sub>2</sub> 含有ガス印加区の試料は全て接着、伸長状態が他と比べて劣化していた。培養日数が経過すると細胞数が徐々に減少していったことから、O<sub>2</sub> 含有ガス印加区では細胞の接着、伸長機能は回復できなかったことが示唆される。当然拍動状態も劣化していた。19.2°C で保存した O<sub>2</sub> 含有ガス印加試験において、同期拍動回復率が O<sub>2</sub> 濃度の高い試料ほど低下していたことから、細胞の接着、伸長機能を抑制していたのは O<sub>2</sub> である可能性が高い。従って O<sub>2</sub> 含有ガス印加条件は、保存期間中の細胞同士の接着を抑制したが、ガスを除去したあとも細胞の接着機能に影響を残し、その後の培養試験において著しい細胞品質の低下を生じることがわかった。これらの影響も保存温度が低下すると徐々に弱まることから、保存期間中の温度が細胞活動を抑制する最も大きい要素の一つであることが確認された。同時に O<sub>2</sub> 含有ガスの効果が細胞保存の品質変化に現れたことから、Xe ガスをはじめとする他のガスが保存期間中の細胞に大きな影響を及ぼしていなかったことは、溶存したガスが細胞に到達していなかったわけでは

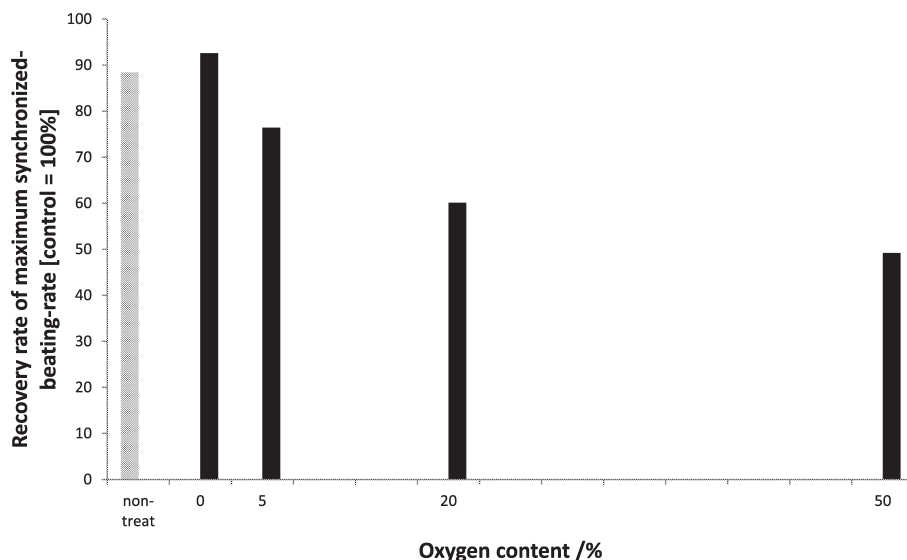


Figure 7 : The recovery rate of maximum synchronized beating rate of preserved cells at 19.2°C under 0.5 MPa pressurized-gases containing various O<sub>2</sub> concentrations during 7-days cultivation (normalized by the maximum rate in the control sample).

ないことが裏付けられた。そして、保存期間中の細胞凝集にガス種依存性がほとんどなく、温度条件にのみ依存していることが明らかになった。

O<sub>2</sub> 含有ガスが細胞にどのような影響を及ぼしていたかについては、現時点では明らかではない。しかし上記のような実験結果の考察から、培養液中に高濃度に溶存した O<sub>2</sub> が細胞に作用し、細胞の接着機能を長期間抑制する作用があると考えられる。

## 5. Conclusions

心筋細胞の常温保存条件を緩和する技術の開発のため、麻酔ガスである Xe を始め不活性ガスの Ar, Kr, He, 炭化水素ガスの CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>, 空気成分の N<sub>2</sub>, 圧縮空気, 及び O<sub>2</sub> 濃度を 5 %, 50% にした模擬空気を 0.5 MPa 印加した条件で保存実験を行った。9 ~ 35°C の温度条件で各ガス印加区で保存された心筋細胞について、72 時間保存後の細胞の状態の観察、トリパンブルーによる細胞生存率を調べた。また各試料とも生理的条件下で 7 日間培養を行い、心筋細胞の機能の通常性を伸長観察と同期拍動回数の測定などから評価した。

その結果、Xe, Ar, N<sub>2</sub> ガスについては、ガスを印加せず保存した非処理区とほとんど同じ結果になり、ガス印加が保存温度の引き上げに効果がないことが明らかになった。その他のガスについても、19.2°C, 35.0°C で実験を行い、結果が定性的に一致することを確認した。これに対し、O<sub>2</sub> 含有ガス印加区では保存期間中の細胞凝集を室温以上の温度まで抑制することがわかったが、その後の培養試験において細胞の接着、伸長機能に劣化がみられ、保存細胞の品質は低下した。

以上の結果から、ガス印加により細胞の保存条件は変化し得ることが示唆されたが、本実験の条件の範囲内では単に麻酔ガスによって保存温度を引き上げることができないことがわかった。

## Acknowledgments

本研究の一部は、(独)科学技術振興機構 (JST) 地域イノベーション創出総合支援事業重点地域研究開発支援プログラムシーズ発掘試験「ガス印加法による細胞の常温保存技術の開発 (No.01-099)」の援助を受けて行われた。本研究で用いた心筋細胞試料は、(株)プライマリーセル社より提供していただいた。

## References

安藤寛子, 鈴木徹, 川越義則, 牧野義雄, 大下誠一: キセノンガスをを用いた野菜組織内の水の構造化とクラスレート水

和物の形成—NMR によるプロトン緩和時間の観察—, *日本冷凍空調学会論文集*, **25**(4), 299 (2008).

橋本篤, 大下誠一: 水の構造化を利用した野菜の貯蔵, *農業機械学会誌*, **58**, 38-41 (1996).

Kakinuma, Y., Miyauchi, T., Yuki, K., Murakoshi, N., Goto, K. and Yamaguchi, I.: Mitochondrial Dysfunction of Cardiomyocytes Causing Impairment of Cellular Energy Metabolism Induces Apoptosis, and Concomitant Increase in Cardiac Endothelin-1 Expression, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **36**, S201-S204 (2000).

松島卯月, 大下誠一, 中西友子, 松林政仁, 瀬尾康久, 川越義則: カーネーション切り花内の水に対する無極性ガスの影響, *農業機械学会誌*, **62**(5), 70-78 (2000a).

松島卯月, 大下誠一, 瀬尾康久, 川越義則: 無極性ガスを利用したカーネーション切り花の保存, *農業機械学会誌*, **62**(6), 73-80 (2000b).

宮村謙一郎, 永山昌史, 郷原一寿, 平敏夫, 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 (Cryobiology and Cryotechnology)*, **56**(2), 111-117 (2010).

Oshita, S., Seo, Y., Kawagoe, Y., Koreeda, K., and Nakamura, K.: Extension of vase-life of cut carnations by structured water, *Acta Horticulturae*, **440**, 657-662 (1996).

大下誠一, 橋本篤, 瀬尾康久: 水の構造化による農作物の貯蔵 (第 1 報), *農業機械学会誌*, **58**, 31-38 (1996).

大下誠一, ラハマン, M. A., 川越義則, 瀬尾康久, 橋本篤: 水の構造化による農作物の貯蔵 (第 2 報), *農業機械学会誌*, **59**, 29-35 (1997).

Oshita, S., Seo, Y. and Kawagoe, Y.: Relaxation time of protons in intracellular water of broccoli, *The Electronic Journal of CIGR*, **1**, October (1999).

Simpson, P., McGrath, A. and Savion, S.: Myocyte Hypertrophy in Neonatal Rat Heart Cultures and Its Regulation by Serum and by Catecholamines, *Circulation Research*, **51**, 787-801 (1982).

Smith, A.: problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0°C, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, **147**, 533-544 (1957).

Tamamori-Adachi, M., Ito, H., Sumrejkanchanakij, P., Adachi, S., Hiroe, M., Shimizu M., Kawauchi J., Sunamori M., Marumo F., Kitajima S., and Ikeda M.: Critical Role of Cyclin D1 Nuclear Import in Cardiomyocyte Proliferations, *Circulation Research*, **92**, e12-e19 (2003).

Uchida, T., Nagayama, M., Taira, T., Shimizu, K. and Sakai, M., Gohara, K.: Optimal temperature range for low-temperature preservation of dissociated neonatal rat cardiomyocytes, *Cryobiology*, **63** (3), 279-284 (2011).

Yokomuro, H., Mickle, A. G. D., Weisel, R. and Li, R.: Optimal conditions for heart cell cryopreservation for transplantation, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **242**, 109-114 (2003).