

学位論文

新規プログラムフリーザーを用いた  
間葉系幹細胞の凍結保存法の開発

四方 花佳

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻

顎口腔頸部医科学講座 歯科矯正学分野

主指導教員：谷本 幸太郎 教授

# 2014 年

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 緒言   | 1  |
| 試料ならびに方法   | 5  |
| I. CAS-LAB1 プログラムフリーザーがヒト滑膜由来 MSCs の生存および増殖能に及ぼす影響 | 5  |
| 1. 細胞採取と培養   | 5  |
| 2. 凍結方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                      | 6  |
| 3. 保存液の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                       | 8  |
| 4. 細胞生存率、および細胞増殖能の算定                               | 8  |
| 5. 有意差検定   | 9  |
| II. 解凍時の磁場付与がラット骨髄由来 MSCs の生存および増殖能に及ぼす影響          | 10 |
| 1. 細胞採取と培養   | 10 |
| 2. 凍結方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                      | 10 |
| 3. 保存液の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                       | 11 |
| 4. 解凍方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                      | 12 |
| 5. 細胞生存率、および細胞増殖能の算定                               | 12 |
| 6. 有意差検定   | 13 |
| III. 凍結保存ラット骨髄由来 MSCs の骨再生誘導能の検討                   | 14 |

|  |        |
|--|--------|
| 1.細胞の凍結  | 14     |
| 2.細胞の解凍  | 14     |
| 3.ラット頭頂骨欠損モデルの作製                                       | 15     |
| 4. 頭頂骨欠損部への細胞移植  | 16     |
| 5. MSCs 移植後の骨再生能の CT による評価                             | 18     |
| 6. MSCs 移植後の骨再生能の組織学的観察                                | 19     |
| 6-1 組織切片の作製  | 19     |
| 6-2 骨欠損部における骨再生量の算定                                    | 19     |
| 6-3 破骨細胞数の算定   | 20     |
| 7. 有意差検定   | 20     |
| <br>IV. MSCs 移植部位における骨分化および、細胞増殖マーカーの免疫組織学的<br>検討      | <br>21 |
| 結果   | 23     |
| I. CAS-LAB1 プログラムフリーザーがヒト滑膜由来 MSCs の生存および増殖能<br>に及ぼす影響 | <br>23 |
| 1. 凍結方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                          | 23     |
| 2. 凍結保存液の違いによる、解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                        | 24     |
| II. 解凍時の磁場付与がラット骨髄由来 MSCs の生存および増殖能に及ぼす影<br>響          | <br>25 |
| 1. 凍結条件の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                          | 25     |
| 2. 細胞保存液の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                         | 26     |
| 3. 解凍方法の違いによる、解凍後の細胞生存率と増殖能の検討                         | 27     |
| III. 凍結保存ラット骨髄由来 MSCs の骨再生誘導能の検討                       | 28     |

|  |    |
|--|----|
| 1.凍結保存 MSCs 移植後の骨再生能の X 線 CT による観察結果                                 | 28 |
| 2. MSCs 移植後の骨再生能の組織学的観察  | 32 |
| 3.再生骨面積、および TRAP 陽性細胞数の経日的変化   | 39 |
| IV. 凍結保存 MSCs 移植部位における骨分化マーカー (アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、PCNA)の免疫組織化学的検討 | 40 |
| 考察   | 47 |
| 1.ヒト滑膜由来、およびラット骨髄由来 MSCs について  | 47 |
| 2. 凍害について  | 48 |
| 3. 細胞保存液について   | 50 |
| 4.凍結時の磁場付与について   | 52 |
| 5.解凍時における磁場付与について  | 53 |
| 6.使用したメンブレンについて  | 54 |
| 7.頭蓋骨欠損への MSCs 移植について  | 55 |
| 総括   | 58 |
| 参考文献   | 60 |
| 謝辞   | 67 |

## 緒言

近年、再生医療は歯科・医科ともに広く臨床活用されており、特に骨組織における再生医療は数多く研究されている。歯科領域では、口蓋裂患者の顎裂部顎堤形成術が必要であるが、口唇裂・口蓋裂患者に対する骨再生医療の応用例はほとんど報告がない。現在、主として行われているのが新鮮自家腸骨海綿骨細片移植である<sup>1)</sup>。しかしながら、腸骨採取は侵襲的であり、採取時の患者の精神的負担や、採取量の不足、術後の疼痛や歩行困難など多くの問題がある<sup>2)</sup>。他家骨移植も検討されるものの、感染症や免疫拒絶などの観点から問題は残る。このことから、安全で信頼性が高く、かつ患者負担を軽減するための新たな手法が検討されている<sup>3,4)</sup>。Chin ら<sup>5)</sup>は、患者の顎裂部に recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) を移植することにより、良好な骨架橋が形成されたと報告している。また、結城ら<sup>6)</sup>は比較的小さな顎裂を有する患者に骨再生誘導法 (guided bone regeneration ; GBR) を適用し、骨欠損部の修復に対して良好な結果を得たと報告している。このように、口唇裂・口蓋裂患者に対する成長因子の投与や組織誘導法の応用が少数報告されているものの、細胞移植治療についての臨床応用例は少ない。

骨髄中に存在する未分化間葉系幹細胞(以下 MSCs)は、骨芽細胞や軟骨細胞に分化が可能とされており、生体外で培養を行った MSCs を移植することにより、

組織再生を促す研究が近年盛んに行われている<sup>7)</sup>。口蓋裂患者の顎裂閉鎖への MSCs 移植も臨床応用が期待されるが、その際、欠損部が大きい場合や再手術を要する場合には MSCs を再度骨髄より採取する必要があるが、患者に再び大きな負担がかかることから、採取した細胞を再利用できるように細胞の長期保存が必要であると考えられる<sup>8)</sup>。

組織や細胞の長期保存には凍結保存法が用いられているが、凍結保存は半永久的な保存が期待できる理想的な方法であり、これまでに胚細胞<sup>9)</sup>、精子<sup>10)</sup>、赤血球<sup>11)</sup>、動脈<sup>12)</sup>、骨髄<sup>13)</sup>、歯根膜<sup>14)</sup>、腓ランゲルハンス島細胞<sup>15)</sup>、大動脈弁<sup>16)</sup>、皮膚<sup>17)</sup>などの組織において凍結保存後の臨床応用が報告されている。また、副甲状腺<sup>18)</sup>、骨組織<sup>19)</sup>、軟骨<sup>20)</sup>、末梢神経<sup>21)</sup>などの組織の凍結保存に関する報告もなされている。しかしながら、一般に組織や細胞の凍結保存中には凍害が生じ、解凍後の細胞生存に大きな影響を与える。凍害とは、生体組織の凍結時に、細胞内外の浸透圧が変化すると同時に細胞内に存在する水分子が結晶化し、クラスターを形成することにより細胞膜が破壊される現象である<sup>22)</sup>。従来行われてきた凍結保存法では、十分に水分子のクラスター化を抑制することができず、解凍後の細胞生存率とその後の増殖能が低下することが問題であった。細胞の凍結保存に関しては、一次凍結のプロセスが重要であると考えられると同時に、一次凍結終了後に行う二次凍結の保存温度のも重要である。二次凍結にお

いて-130 °Cより高温では細胞内で氷の再結晶化が生じ、細胞生存率に大きな影響を与える可能性が高い<sup>23)</sup>。

我々は、これまでに細胞の凍結時に磁場を付与し、細胞内の氷結晶形成を阻害することを目的に、プログラムフリーザー-cell alive system(以下 CAS, 株式会社アビー, 千葉)を用いて凍結保存の可能性を探求してきた。すでに歯根膜細胞<sup>24)</sup>、歯髄細胞<sup>25,26)</sup>、および骨芽細胞については、その性状を損なうことなく凍結保存が可能であり、解凍後の高い細胞生存率とその細胞増殖能が維持されていることが明らかとなった<sup>27)</sup>。

一方、凍結した細胞の解凍時には、再氷晶化と呼ばれる細胞内氷晶が大きくなる現象が生じる。これと同時に細胞外の氷の融解が先行することにより、相対的に細胞内が高浸透圧化となり、細胞内へ水分が移動すると希釈性ショックと呼ばれる現象が生じる。この現象は、凍結時の凍害以上に細胞の生存に大きな影響を及ぼす。従来より、細胞の解凍には、急速解凍が適しており、再氷晶化と希釈性ショックを防ぐには急速加熱がよいとされているが、解凍時に何らかの工夫を行った報告は皆無である<sup>28)</sup>。

そこで、本研究では新規プログラムフリーザー (CAS-LAB1, 株式会社アビー) を使用し、凍結時の凍害を防止するだけでなく、解凍時における磁場の付与が MSCs の生存に与える影響をヒト滑膜由来 MSCs、およびラット骨髄由来 MSCs

を用いて検討した。

さらに、動物実験として CAS-LAB1(株式会社アビー)を用いて7日間凍結保存を行ったラット骨髄由来 MSCs を吸収性メンブレンに定着させ、ラット頭頂骨に作製した骨欠損部に移植し、8、16、24 週に組織学的観察を行い、解凍後の MSCs の骨組織再生能について検討を行った。



## 試料と方法

### I. CAS-LAB1 プログラムフリーザーがヒト滑膜由来 MSCs の生存および増殖能に及ぼす影響

#### 1. 細胞の採取と培養

大阪大学医学部附属病院整形外科および関連病院において、靭帯損傷などによる滑膜炎を持つ膝関節損傷患者より提供された滑膜組織から MSCs の単離を行い、初代 MSCs 用無血清培地 STK-1<sup>®</sup>(DS Pharma Biomedical Co., 大阪)にて初代培養を行った。増殖した細胞がコンフルエントに達した後、0.1%トリプシン(DIFCO., Detroit, MI, USA)とエチレンジアミン 4 酢酸 4 ナトリウム(EDTA, 和光純薬工業, 大阪)を含むリン酸緩衝液(phosphate buffered saline: PBS, 日水製薬, 東京)により 10 分間処置して細胞を剥離した後、十分にピペッティングを行ってから直径 10 cm の細胞培養用シャーレ (CORNING., New York, NY, USA)に細胞密度  $3 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> となるように播種し、MSCs 用無血清培地 STK-2<sup>®</sup>(DS Pharma Biomedical Co)にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて、2 日ごとに培地交換を行いコンフルエントになるまで約 2 週間培養し、2~3 代目の細胞を実験に使用した。

#### 2. 凍結方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

実験 I -1 で採取し継代した 2~3 代目の細胞を細胞密度  $3.0 \times 10^5$  cell/ml となるよう 10% ジメチルスルホキシド(以下 Me2SO)含有バンバンカー<sup>®</sup> (日本ジェネティックス, 東京)に混合した後、Kojima らの報告<sup>29)</sup>に従い、最終到達温度  $-30$  °C、磁場強度 0.1 mT、植氷時間 15 分、凍結速度 $-0.5$  °C/分(図 1)に設定した新規プログラムフリーザー(CAS-LAB1, 株式会社アビー) (図 2)を用いて凍結した後、 $-150$  °Cのディープフリーザー内に保存した群(CAS 群)、また、プログラムフリーザーを使用せずに、直接ディープフリーザーに投入し凍結した群(Direct 群)を設定し、両群ともに 7 日間保存後、 $37$  °Cの恒温槽内で解凍した。

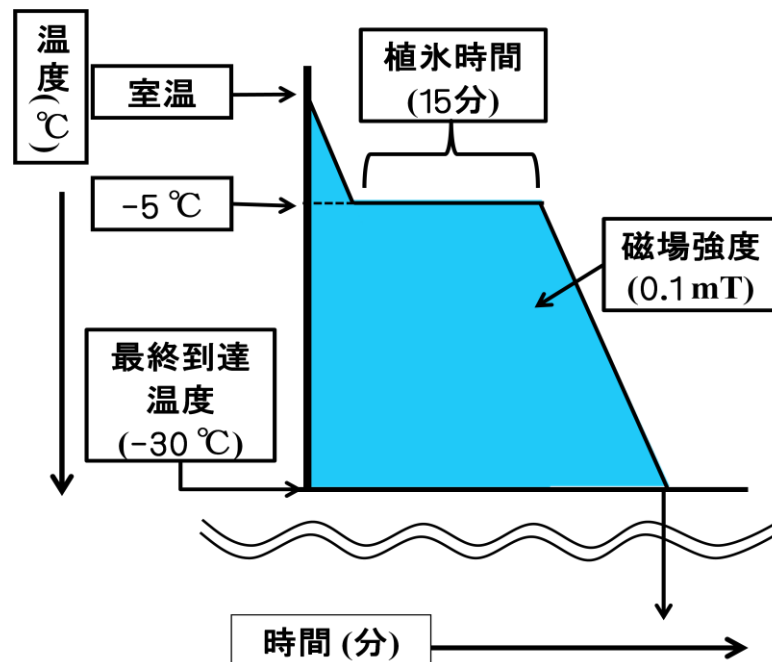


図 1 一次凍結の設定条件



図2 新規プログラムフリーザー(CAS-LAB1)



図3 ディープフリーザー

### 3. 保存液の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

実験 I -2 と同様に、継代 2~3 代目の細胞を細胞密度  $3.0 \times 10^5$  cell/ml となるよう回収した。凍結保存液は 10%Me2SO 含有バンバンカー® (日本ジェネティックス) を使用した群(10%Me2SO 群)と Me2SO を含有しない Cell Reservoir One(ナカライテスク, 京都)を使用した群(Cell Reservoir One 群)の 2 群に設定した。ついで、最終到達温度  $-30$  °C、磁場強度 0.1 mT、植氷時間 15 分、凍結速度  $-0.5$  °C/分に設定した CAS-LAB1 フリーザーにて凍結後、 $-150$  °C のディープフリーザー内に 7 日間保存後、 $37$  °C の恒温槽内で解凍した。

#### 4. 細胞生存率、および細胞増殖能の算定

細胞生存率として、細胞を解凍直後に 4%トリパンブルー(TRIPAN BLUE SOLUTION Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)染色を施し、ヘマサイトメーター(エルマ販売株式会社, 東京)を用いて生存細胞数を算定後、全細胞数に対する細胞生存率を算出した。解凍後 STK-2®(DS Pharma Biomedical Co)中に細胞を播種し、 $37$  °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて培養を行った。7 日間培養後、0.1% トリプシン(DIFCO)と EDTA(和光純薬工業)を含む PBS(日水製薬)により 5 分間処置して細胞を剥離し、ヘマサイトメーター(エルマ販売株式会社)により細胞増殖数を計測し、播種前後の細胞数の比を百分率で算定し、これを細胞増殖能とした。

## 5. 有意差検定

各条件下の細胞生存率および細胞増殖能について、統計ソフトウェア Statview<sup>®</sup> (Abacus Concepts, INC., Berkeley, CA, USA)を用いて  $t$  検定により有意差の有無を検討した。

## II. 解凍時の磁場付与がラット骨髄由来 MSCs の生存および増殖能に及ぼす影響

### 1. 細胞採取と培養

4 週齢雄性 Fischer 344 ラット(日本チャールズ・リバー, 横浜)より摘出した大腿骨の両端からシリンジにて、10%fetal bovine serum(FBS; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)、10 ml/l antibiotic antimycotic solution(Sigma Aldrich Co)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; 日水製薬)を約 10 ml 注入し、骨髓液の摂取を行った。次に、採取した骨髓液に DMEM(日水製薬)を加え懸濁後、1,500 rpm で 5 分間遠心分離を行った。その後、上清を取り除き DMEM(日水製薬)を加え、直径 10 cm の細胞培養用シャーレ(CORNING)に細胞密度  $3 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> となるように播種し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて、2 日ごとに培地交換を行いコンフルエントになるまで約 1 週間培養した。

細胞がコンフルエントに達した後、0.1%トリプシン(DIFCO)と EDTA(和光純薬工業)を含む PBS(日水製薬)により 10 分間静置した。その後、細胞が単離するように十分にピペッティングを行って継代培養し、2~3 代目の細胞をそれぞれの実験に供した。

## 2. 凍結方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

実験Ⅱ-1で採取し、継代した2~3代目の細胞を細胞密度 $3.0 \times 10^5$  cell/mlとなるよう、10% Me2SO 含有バンバンカー<sup>®</sup> (日本ジェネティックス)に混合した後、最終到達温度-30℃、磁場強度0.1 mT、植氷時間15分、凍結速度-0.5℃/分条件でCAS-LAB1プログラムフリーザー(株式会社アビー)を用いて凍結する群(CAS群)と、磁場を付与しないプログラムフリーザー(図4)にて凍結する群(磁場なし群)を設定した。その後、両群とも-150℃のディープフリーザー内で7日保存した後、37℃の恒温槽内で解凍した。



図4 プログラムフリーザー

## 3. 保存液の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

実験2と同様に、継代2~3代目の細胞を細胞密度 $3.0 \times 10^5$  cell/mlとなるよう回収し、凍結保存液として10%Me2SO 含有バンバンカー<sup>®</sup> (日本ジェネティックス)を用いた群(10%MeSO 群)、2.5%Me2SO 含有バンバンカーを用いた群

(2.5%Me2SO 群)、さらに Me2SO を含有しないバンバンカーを用いた群(Me2SO 不含有群)の 3 群に設定した細胞保全液に混合した後、最終到達温度-30 °C、磁場強度 0.1 mT、植氷時間 15 分、凍結速度-0.5 °C/分の条件で CAS-LAB1 プログラムフリーザー(株式会社アビー)にて凍結した。その後、-150 °Cのディープフリーザー内で 7 日間保存後、37 °Cの恒温槽内で解凍した。

#### 4. 解凍方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

実験 II-1 で採取し、継代した 2~3 代目の細胞を 10% Me2SO 含有バンバンカー<sup>®</sup>(日本ジェネティックス)に細胞密度  $3.0 \times 10^5$  cell/ml となるように混合した後、CAS-LAB1 フリーザー(株式会社アビー)にて最終到達温度-30 °C、磁場強度 0.1 mT、植氷時間 15 分、凍結速度-0.5 °C/分の条件で凍結した。その後、-150°Cのディープフリーザー内に 7 日保存し、CAS-LAB1 フリーザー(株式会社アビー)を用いて 37 °C、磁場強度 0.1 mT を付与し解凍する群(CAS 解凍群)と、37 °C恒温槽にて通法に従い解凍する群(normal 解凍群)を設定した。

#### 5. 細胞生存率、および細胞増殖能の算定

細胞生存率として、細胞を解凍直後に 4%トリパンブルー(Sigma Aldrich)染色を施し、ヘマサイトメーター(エルマ販売株式会社)を用いて生存細胞数を計測後、



全細胞数に対する細胞生存率を算定した。解凍後、10%FBS(Biological Industries)と 10 ml/l antibiotic antimycotic solution(Sigma Aldrich)を含む DMEM(日水製薬)中に細胞を播種し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて培養を行った。培養開始 7 日後に、0.1%トリプシン(DIFCO)と EDTA(和光純薬工業)を含む PBS(日水製薬)により細胞を剥離し、ヘマサイトメーター(Sigma Aldrich)により細胞増殖数を計測後、播種前後の細胞数の比を百分率で算定し、これを細胞増殖能とした。

## 6. 有意差検定

実験Ⅱ-2、およびⅡ-4における細胞生存率および細胞増殖能については、統計ソフトウェア Statview<sup>®</sup> (Abacus Concepts)を用いて *t* 検定法により各群の比較を行った。

また、実験Ⅱ-3については、分散分析の後、Fisher 法により多重比較検定を行い、各群の有意差の有無について検討した。

### Ⅲ. 凍結保存ラット骨髄由来 MSCs の骨再生誘導能の検討

#### 1. 細胞の凍結

実験Ⅱ-1と同様に、4週齢雄性 Fischer 344 ラット(日本チャールズ・リバー)より採取、継代培養を行った細胞を用いて、以下の4つの条件で凍結を行った後、-150℃のディープフリーザーで7日間保存した。下記4群に加えて未凍結群をコントロール群とした、計5群をMSCs移植群として検討を行った。

- ① 10%Me2SO含有バンバンカー<sup>®</sup>(日本ジェネティックス)に細胞を投入後、磁場を付与しないプログラムフリーザーにて凍結した群(磁場なし群)
- ② Me2SO不含有バンバンカーに細胞を投入後 CAS-LAB1プログラムフリーザーを用いて、凍結した群(Me2SO不含有CAS群)
- ③ 2.5%Me2SO含有バンバンカーに細胞を投入後、CAS-LAB1プログラムフリーザーを用いて凍結した群(2.5%Me2SO-CAS群)
- ④ 10%Me2SO含有バンバンカー<sup>®</sup>に細胞を投入後、CAS-LAB1プログラムフリーザーを用いて凍結した群(10%Me2SO-CAS群)

#### 2. 細胞の解凍

実験Ⅲ-1にて凍結した Me<sub>2</sub>SO 不含有 CAS 群、2.5%Me<sub>2</sub>SO-CAS 群、10%Me<sub>2</sub>SO-CAS 群は、凍結保存 7 日後に、CAS-LABI フリーザー(株式会社アビー)を用いて 37 °C、磁場強度 0.1 mT の条件で解凍し、磁場なし群については、37 °Cの恒温槽にて解凍した。各群の細胞を細胞培養用 24well ディッシュ (CORNING)中にて、直径 9 mm と、直径 6 mm に形成した吸収性バリアメンブレン(GC membrane, GC., 東京)上にそれぞれ  $5.0 \times 10^4$  個、 $2.2 \times 10^4$  個の MSCs を播種し、24 時間培養し定着させた。

### 3. ラット頭頂骨欠損モデルの作製

4 週齢雄性 Fischer344 ラット(日本チャールズ・リバー)45 匹を、ジエチルエーテル(ナカライテスク)にて浅麻酔後、ソムノペンチル<sup>®</sup> (共立製薬, 東京)を腹腔内注射し、全身麻酔を施した。ついで、頭頂部の剃毛、皮膚切開を行い、骨膜を剥離した後、歯科用低速エンジン(永田電機工業, 東京)と直径 6 mm のトレフィンバー(インプラテックス, 東京)およびフィッシャーバー(松楓, 京都)を用いて、直径 6 mm、深さ 0.5 mm の骨欠損を作製した(図 5)。

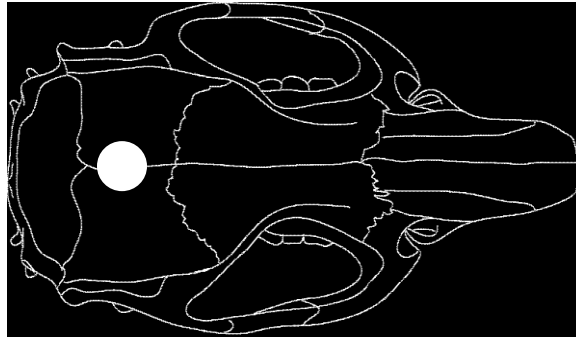
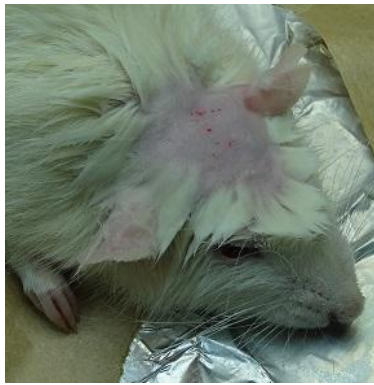


図5 骨欠損部の模式図



①剃毛



②皮膚切開



③滑膜切開



④トレフィンバーを用いた  
骨欠損の作製

図6 骨欠損の作製手順

#### 4. 頭頂骨欠損部への細胞移植

MSCs を播種した直径 9 mm のメンブレンを頭頂骨欠損部上底に、直径 6 mm のメンブレンを下底にそれぞれ静置し(図 7)、メンブレン間に組織が介在しない状態とした(図 8)。



⑤ラット頭蓋骨頭頂部の骨欠損部



⑥下底の 6 mm のメンブレン移植



⑦上底の 9 mm メンブレン移植

図 7 ラット頭頂骨欠損部への MSCs 移植

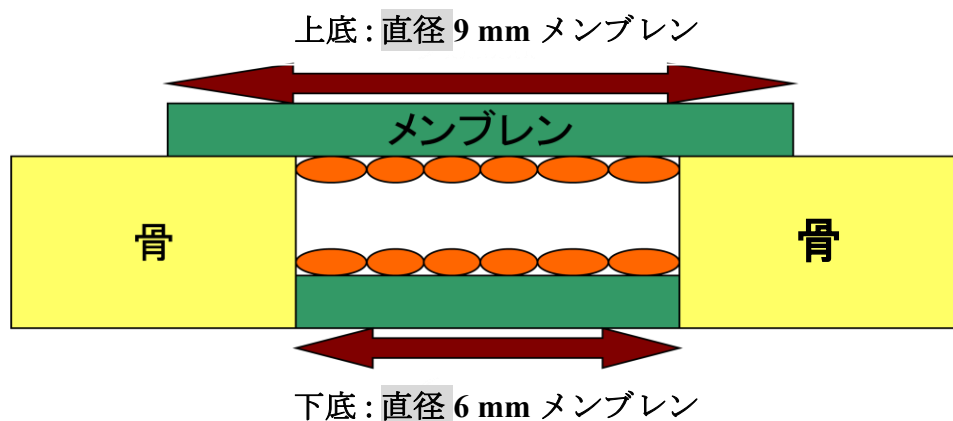


図 8 頭頂骨欠損部への MSCs メンブレン移植の模式図

#### 5. MSCs 移植後の骨再生能の CT による評価

MSCs 移植後、8、16、24 週に各群のラットをジエチルエーテル(ナカライテスク)にて浅麻酔後、ソムノペンチル<sup>®</sup>(共立製薬)を腹腔内注射した後、安楽死させ、10%中性ホルマリン溶液により灌流固定を行った後、頭頂骨を摘出した。高分解能 in vivo X 線マイクロ CT スキャナー SkyScan1176-HT(東陽テクニカ, 東京)(図 9)を用いて摘出した頭頂骨の X 線 CT 撮影を行い、同部の骨再生状態の評価を行った。



図9 高分解能 in vivo X線マイクロCT スキャナーSkyScan1176-HT

## 6. MSCs 移植後の骨再生能の組織学的観察

### 6-1 組織切片の作製

実験Ⅲ-5にて摘出したラット頭頂骨の、浸漬固定を行った後、14% EDTA(和光純薬工業)を用いて1ヶ月間脱灰を行い、脱水を経てパラフィン包埋を行った。その後、ロータリーマイクロトーム(Microm315, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて、厚さ7 $\mu$ mの前頭断連続切片を作製した。

### 6-2 骨欠損部における骨再生量の算定

再生骨面積の測定を行うため、各群の骨欠損部の最大断面積部分を含む任

意の切片を 35  $\mu\text{m}$  ごとに計 25 切片抽出し、ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色(武藤化学株式会社, 東京)を施した。再生骨量の算出は、オールインワン蛍光顕微鏡(BZ-8100, KEYENCE, 大阪)を用いて細胞移植部位の組織学的観察を行い、画像解析ソフト NIH Image (National Institute of Health., Bethesda, MD, USA) により再生骨面積の測定を行った。

### 6-3 破骨細胞数の算定

各群の骨欠損部の最大断面積部分を含む任意の切片を 35  $\mu\text{m}$  ごとに計 25 切片抽出し、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 染色を施した。TRAP 陽性の多核細胞数を算定した。TRAP 染色は、TRAP/ALP 染色キット(和光純薬工業)を用い、ヘマトキシリン(武藤化学株式会社)による対比染色を行った。

## 7. 有意差検定

各群における再生骨量および TRAP 陽性細胞数の有意差の有無について、統計ソフトウェア Statview<sup>®</sup> (Abacus Concepts)を用いて分散分析の後、Fisher 法により多重比較検定を行った。



#### IV. MSCs 移植部位における骨分化および、細胞増殖マーカーの免疫組織学的検討

10%Me2SO-CAS 群、磁場なし群それぞれの群より無作為に抽出した組織切片を、脱パラフィン、親水化した後、一次抗体として Anti-Human ALP(Alkaline Phosphatase 以下 ALP)ウサギモノクローナル抗体 (Abcam, 東京; 0.01 M PBS で 1/200 に希釈)、Anti-Mouse OPN(Osteopontin 以下 OPN)マウスモノクローナル抗体 (株式会社免疫生物研究所, 群馬; 0.01 M PBS で 1/1000 に希釈) 、Anti-Human PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen 以下 PCNA)マウスモノクローナル抗体 (CST ジャパン株式会社, 東京; 0.01 M PBS で 1/1000 に希釈) を用い、4℃にて一昼夜反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として ALP にはウサギ IgG 抗体(ヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO (R), ニチレイバイオサイエンス, 東京)、OPN ならびに、PCNA には抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories, INC Burlingame, CA, USA) を用いて 20 分間反応させた。以上の過程は、全て簡易湿潤箱内で行った。免疫組織像を観察するために、PBS により洗浄後、DAB substrate kit (diaminobenzidine: Vector Laboratories, INC.) にて切片の染色を行い、免疫染色後、ヘマトキシリン(武藤化学株式会社)による対比染色を行った。その後、蒸留水で洗浄した後、封入を行い、光学顕微鏡にて骨欠損部における新生骨周辺の

骨分化、および細胞増殖マーカーの検出を免疫組織学的に行った。

## 結果

### I. CAS-LAB1 プログラムフリーザーがヒト滑膜由来 MSCs の生存および増殖能に及ぼす影響

#### 1. 凍結方法の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

最終到達温度 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、磁場強度 $0.1\text{ mT}$ 、植氷時間 $15\text{ 分}$ 、凍結速度 $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C/分}$ に設定した CAS-LAB1 フリーザーにて凍結した CAS 群では、解凍直後の細胞生存率は約  $63.8\%$ を示した。一方、直接  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに投入した Direct 群では、約  $53.0\%$ と CAS 群と比較して低い値を示したが、両群間に有意差は認められなかった(図 10)。

また、解凍後 7 日間培養した細胞増殖能は、CAS 群では  $94.1\%$ を示したのに対し、Direct 群では  $96.1\%$ を示したが、両群間に有意差は認められなかった(図 11)。

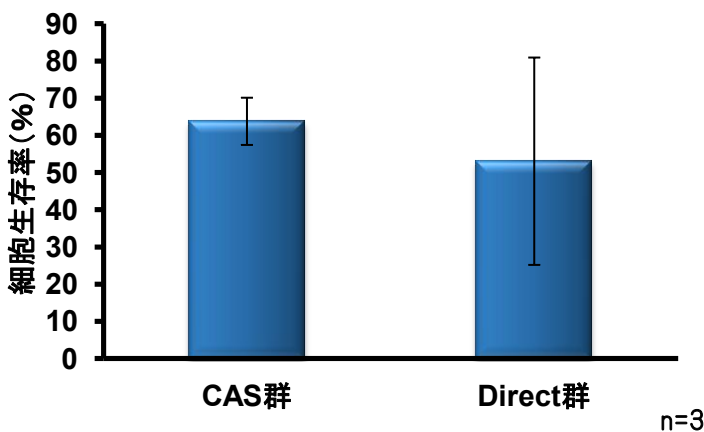


図 10 解凍直後の細胞生存率

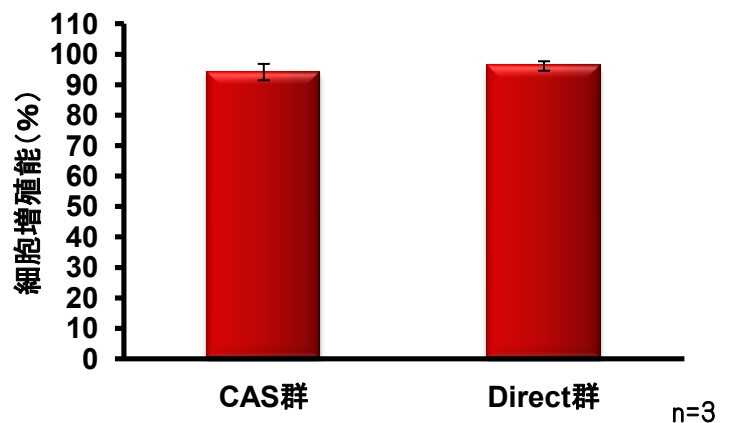
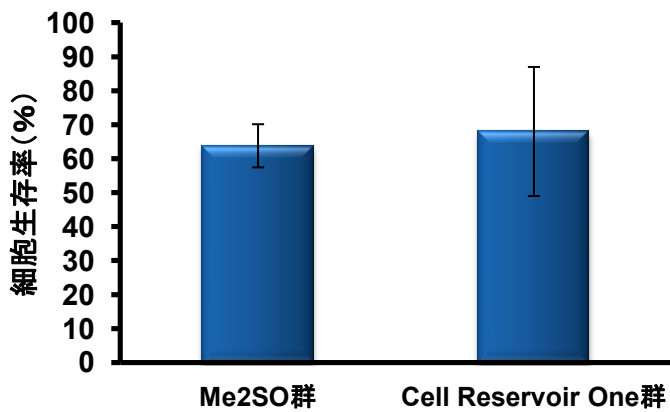


図 11 解凍後 1 週間の細胞増殖能

## 2. 凍結保存液の違いによる、解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

凍結保存液として10%Me2SO含有バンバンカーを用いたMe2SO群と、Me2SOを含有しないCell Reservoir Oneを用いたCell Reservoir One群をCASを用いて凍結し、解凍した直後の細胞生存率は、それぞれ63.8%、68.0%を示したが両群間に有意差は認められなかった(図12)。

一方、7日間培養後の細胞増殖能ではCell Reservoir One群で70.4%、Me2SO群では94.1%となり、Cell Reservoir One群と比較しMe2SO群は有意に高い値を示した(図13)。



n=3

図12 解凍直後の細胞生存率

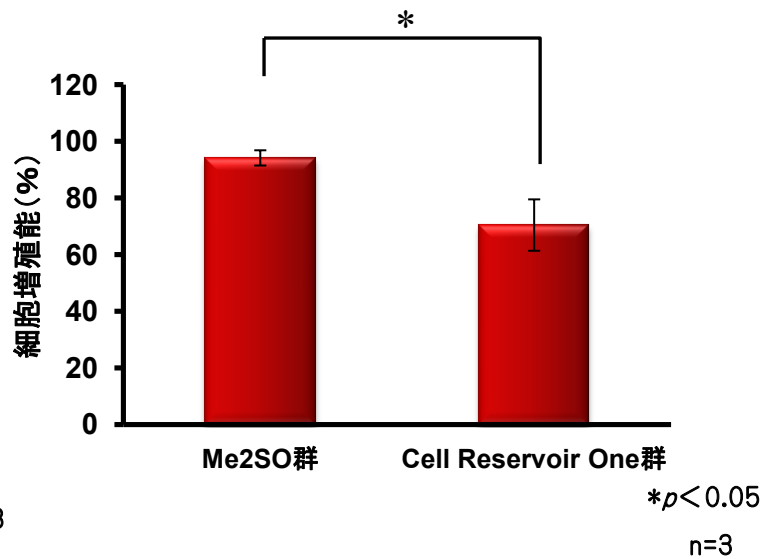


図13 解凍後1週間の細胞増殖能

## II. 解凍時の磁場付与がラット骨髄由来 MSCs の生存および増殖能に及ぼす影響

### 1. 凍結条件の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

10%Me2SO 含有バンバンカーおよび CAS-LAB1 フリーザーを用いて、最終到達温度-30 °C、磁場強度 0.1 mT、植氷時間 15 分、凍結速度-0.5 °C/分の条件下で凍結した CAS 群において、通法による解凍直後の細胞生存率は 75.3%を示した。一方、磁場を付与しないプログラムフリーザーを用いて凍結を行った磁場なし群では細胞生存率は 52.8%を示し、磁場なし群と比較し CAS 群が有意に高い値を示した(図 14)。また、解凍後 7 日間培養後の細胞増殖能は、CAS 群において 151.6%となったのに対し、磁場なし群では 29.4%と CAS 群が磁場なし群と比較し有意に高い値を示した(図 15)。

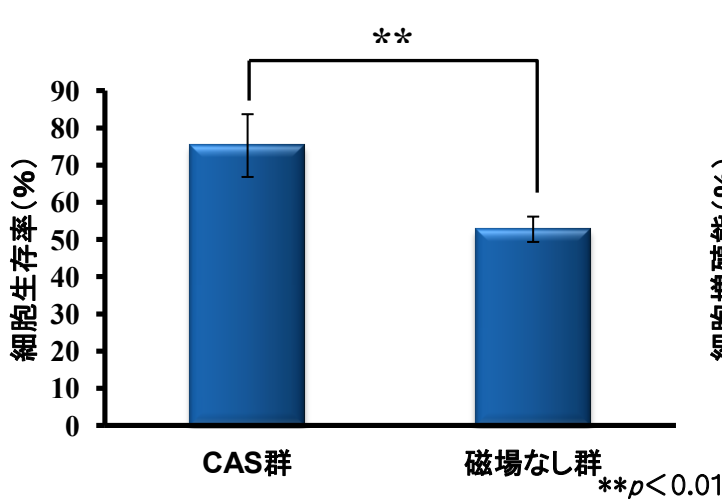


図 14 解凍直後の細胞生存率  $n=3$

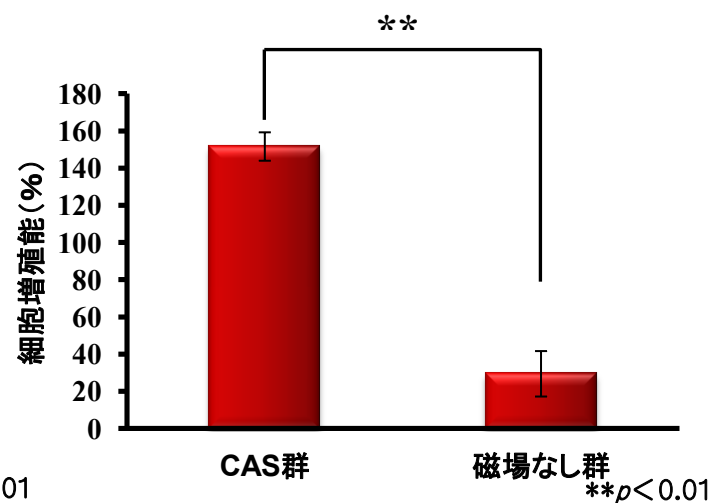


図 15 解凍後 1 週間の細胞増殖能  $n=3$

## 2. 細胞保存液の違いによる解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

CAS-LAB1 で凍結した 10%Me2SO 群の通法による解凍直後の細胞生存率は 75.3%であったのに対し、2.5%Me2SO 群、Me2SO 不含有群の細胞生存率は、それぞれ 33.1%と 20.0%であり、10% Me2SO 群が他の 2 群と比較し有意に高い値を示した。また、2.5% Me2SO 群と Me2SO 不含有群においては、Me2SO 不含有群が 2.5% Me2SO 群と比較して有意に低い値を示した(図 16)。

さらに、解凍後 7 日間培養後の細胞増殖能は、10% Me2SO 群は 151.6%であったのに対し、2.5%Me2SO 群では 97.2%、Me2SO 不含有群では 18.3%を示した。細胞増殖能においても 10% Me2SO 群が他の 2 群と比較して有意に高い値を示した。(図 17)。

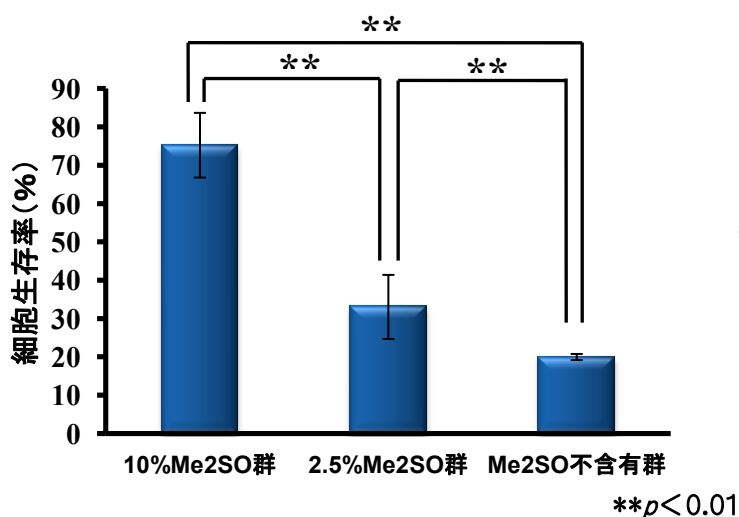


図 16 解凍直後の細胞生存率

n=3

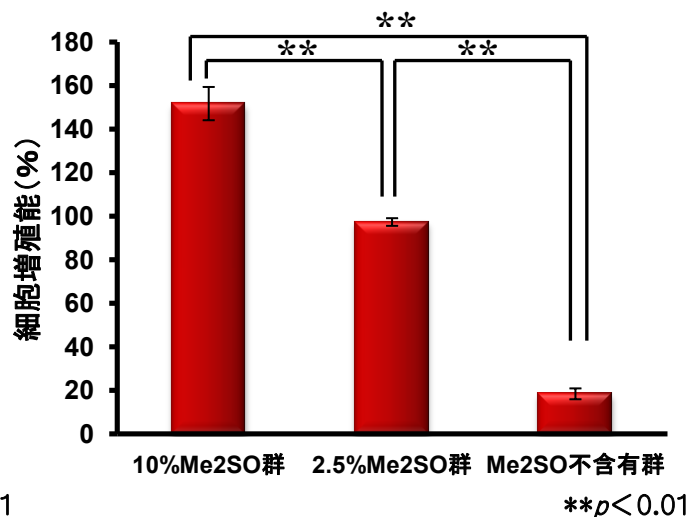


図 17 解凍後 1 週間の細胞増殖能

n=3

### 3. 解凍方法の違いによる、解凍後の細胞生存率と増殖能の検討

新規プログラムフリーザーCAS-LAB1にて37℃、磁場0.1mTを付与しながら急速解凍したCAS解凍群において、解凍直後の細胞生存率は80.0%を示した。また、37℃恒温槽にて解凍したnormal解凍群では75.3%を示したが、両群間に有意な差は認められなかった(図18)。

これに対し解凍後7日間培養後の細胞増殖能はCAS解凍群で232.5%を示した。一方、normal解凍群は151.7%でありCAS解凍群はnormal解凍群と比較し有意に高い値を示した(図19)。

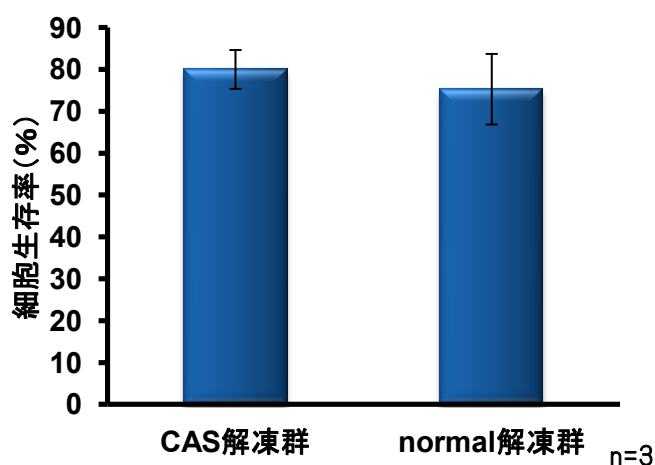


図18 解凍直後の細胞生存率

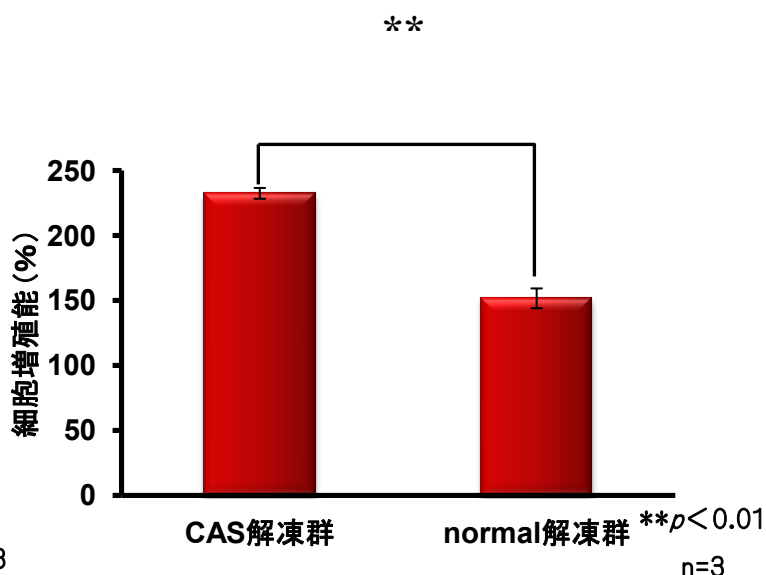


図19 解凍後1週間の細胞増殖能

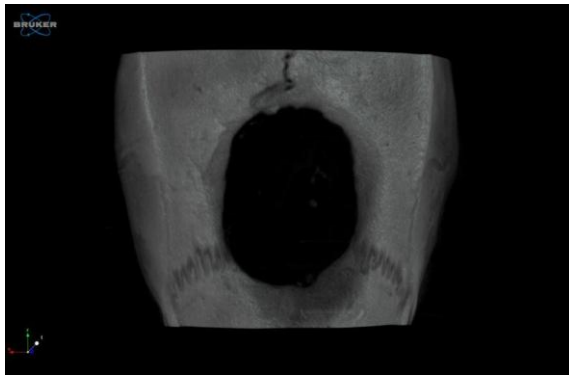
### Ⅲ. 凍結保存ラット骨髄由来 MSCs の骨再生誘導能の検討

#### 1. 凍結保存 MSCs 移植後の骨再生能の X 線 CT による評価

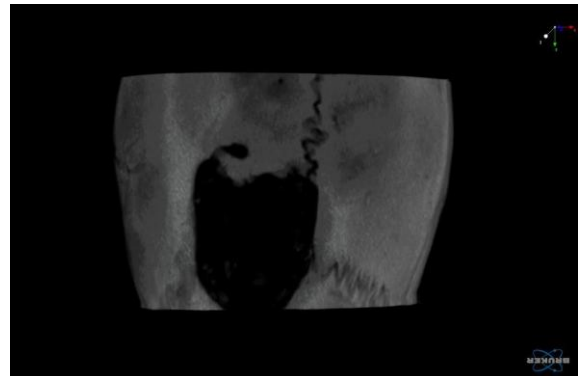
MSCs 移植後 8、16、24 週にそれぞれのラットの頭頂骨欠損部の CT 撮影を行った結果、移植後 8 週では、いずれの群においても欠損部の再生骨はほとんど観察されなかった(図 20)。

これに対し、16 週のラット頭頂部 X 線 CT 画像では、全ての群で 8 週と比較して骨再生量の増加が認められた(図 21)。MSCs 移植後 24 週においては、Me2SO-CAS 群および未凍結群に 16 週と比較して骨再生量の増加が認められ、また 10%Me2SO-CAS 群においてはその再生骨量は未凍結群とほぼ同等であった(図 22)。一方、磁場なし群においては 16 週と比較し 24 週では骨再生量の増加が認められなかった。

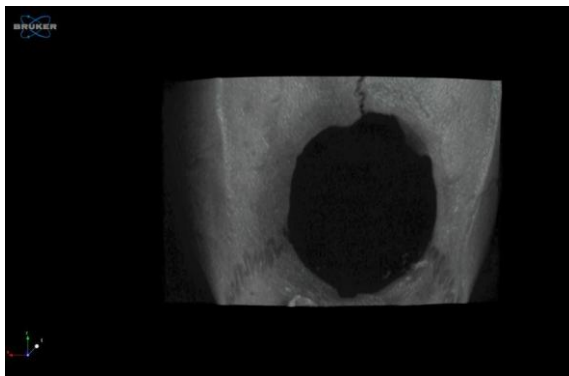




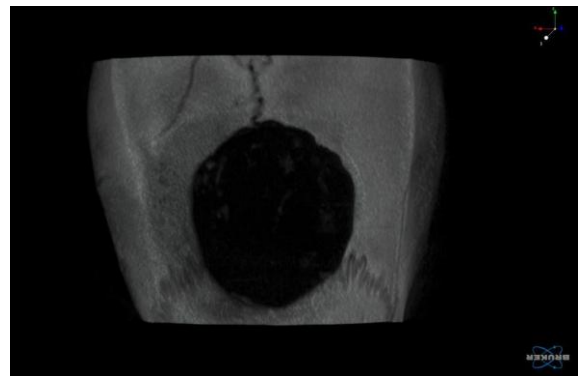
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群

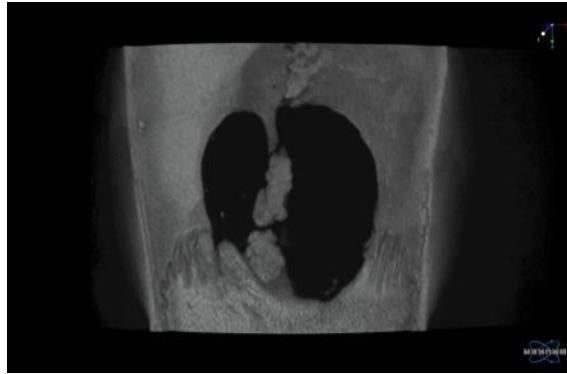


2.5%Me2SO-CAS 群

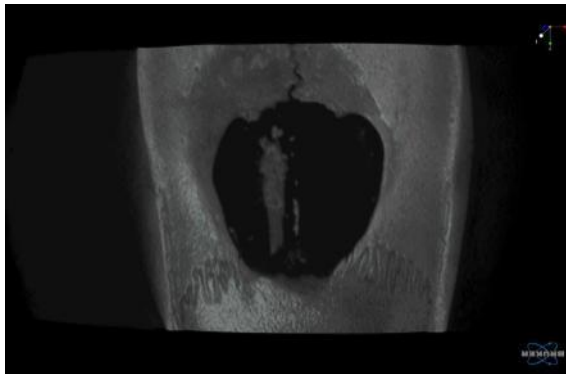


10%Me2SO-CAS 群

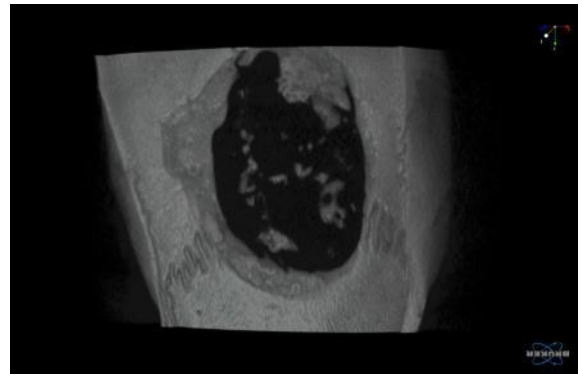
図 20 MSCs 移植後 8 週の X 線 CT 画像



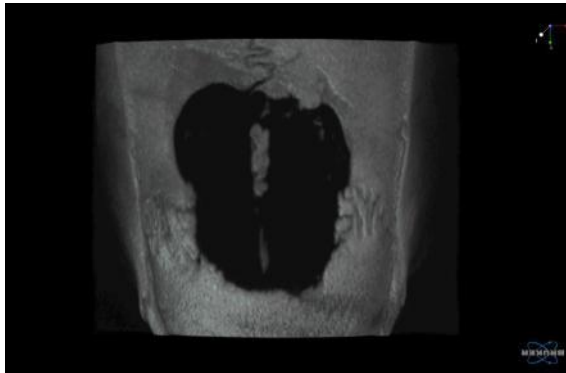
未凍結群



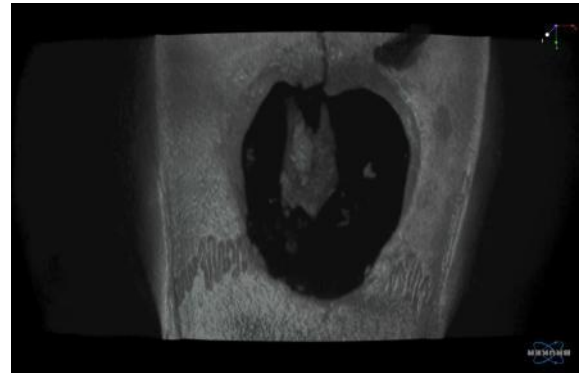
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群



2.5%Me2SO-CAS 群

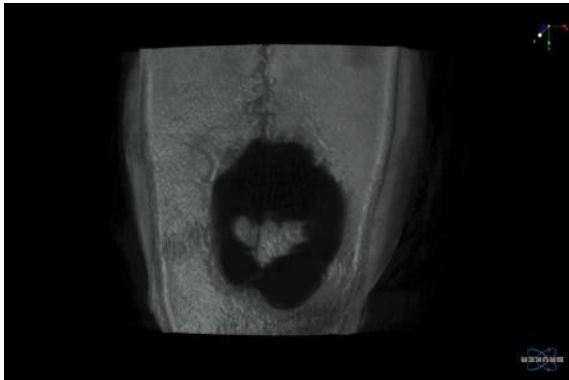


10%Me2SO-CAS 群

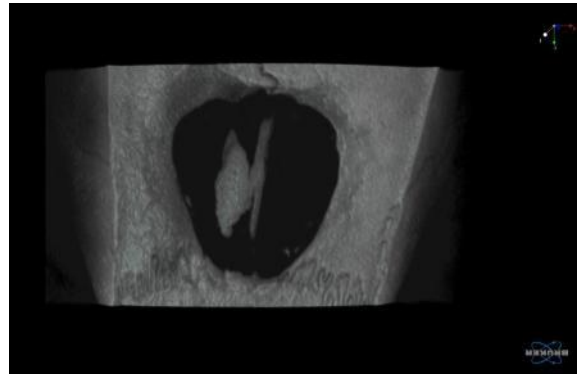
図 21 MSCs 移植後 16 週の X 線 CT 画像



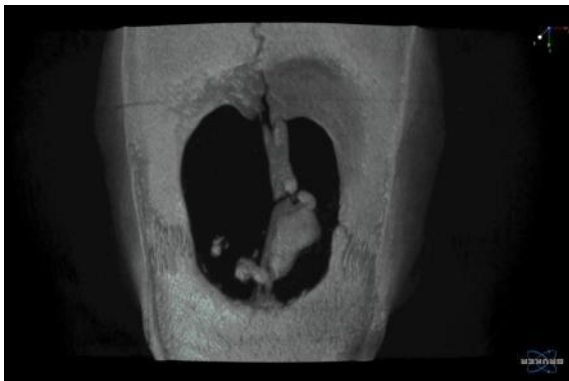
未凍結群



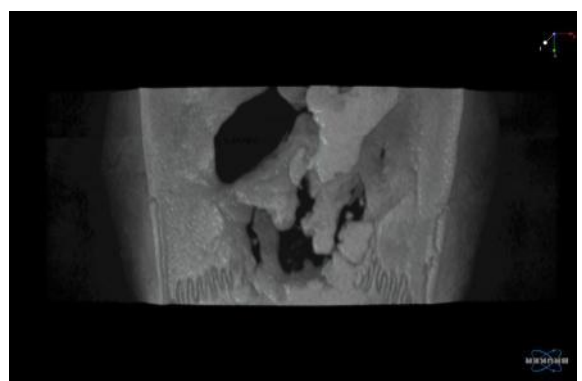
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群



2.5%Me2SO-CAS 群



10%Me2SO-CAS 群

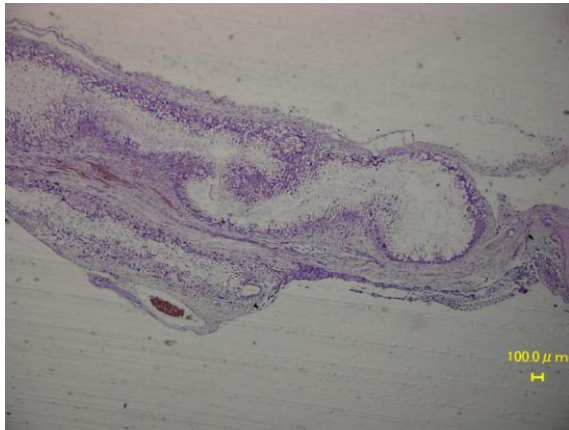
図 22 MSCs 移植後 24 週の X 線 CT 画像

## 2. MSCs 移植後の骨再生能の組織学的観察

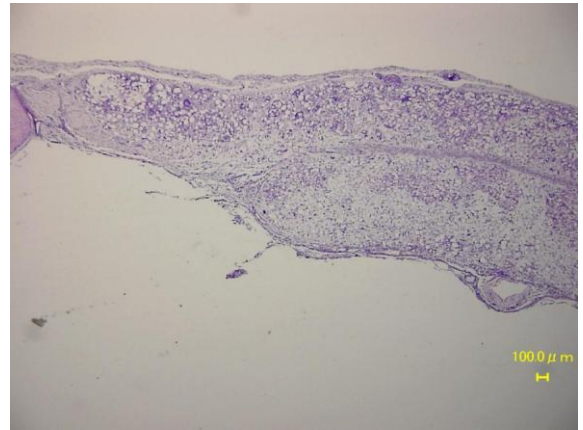
移植 8 週では、いずれの群においても欠損部に幼弱な再生骨組織がわずかに認められた(図 23)。移植後 16 週には、全ての群で再生骨組織は 8 週と比較して増加していたが、その量に差はほとんど認められなかった(図 24)。

MSCs 移植後 24 週になると再生骨組織の量は 16 週と比較し、さらに増加した(図 25)。Me2SO 群では Me2SO の含有率が高くなるほどその量は増加し、10%Me2SO-CAS 群は最大値を示した。また、10%Me2SO-CAS 群では未凍結群とほぼ同等の再生骨量が認められた。これに対し、磁場なし群では 16 週から 24 週にかけて骨再生量は増加を示さず、Me2SO 不含有 CAS 群、2.5%Me2SO-CAS 群および 10%Me2SO-CAS 群と比較して有意に低い値を示した(図 26)。

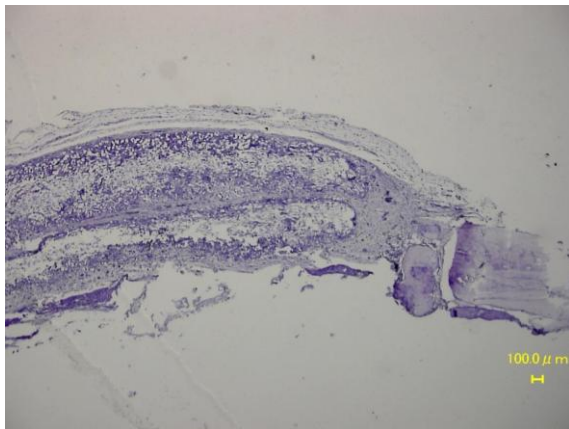
TRAP 陽性細胞数は、10%Me2SO-CAS 群において、8 週、16 週および 24 週と経時的に増加が認められた。一方、Me2SO 不含有 CAS 群、2.5%Me2SO-CAS 群および磁場なし群においては、TRAP 陽性細胞数は、16 週から 24 週にかけて減少した(図 27-30)。



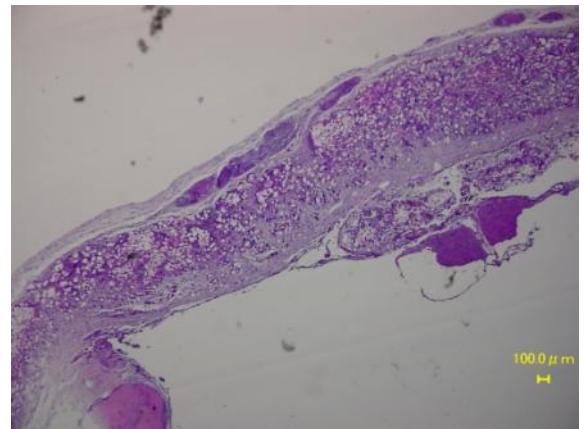
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群

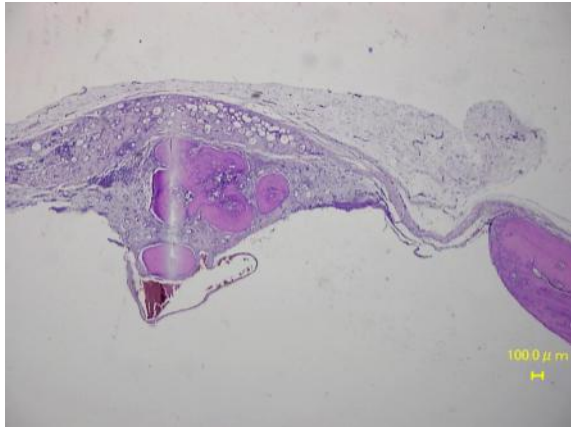


2.5%Me2SO-CAS 群

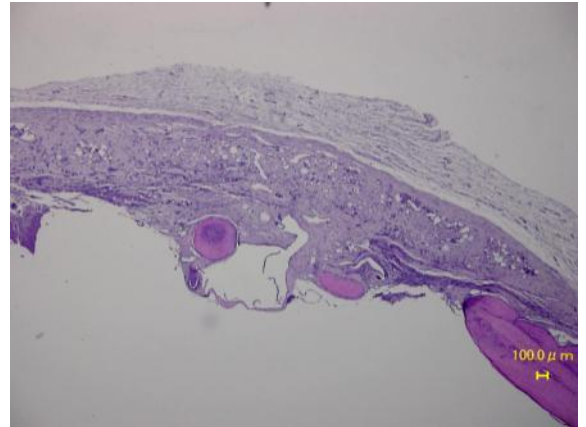


10%Me2SO-CAS 群

図 23 移植後 8 週のラット頭頂部 MSCs 移植部の H-E 染色像



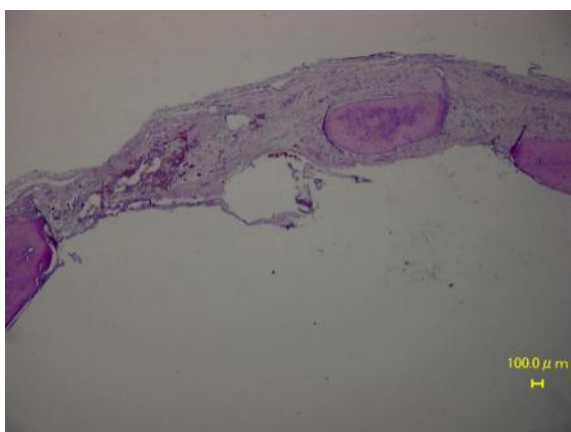
未凍結群



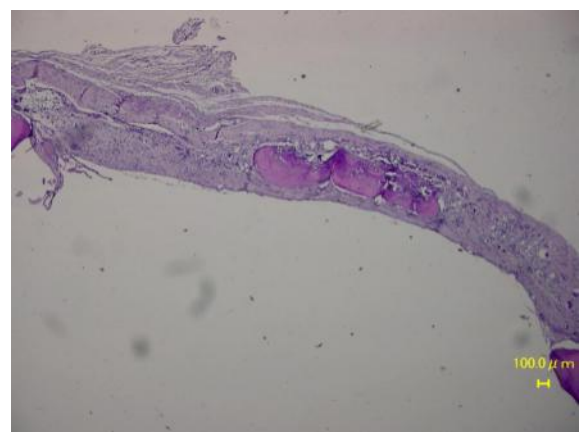
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群



2.5%Me2SO-CAS 群



10%Me2SO-CAS 群

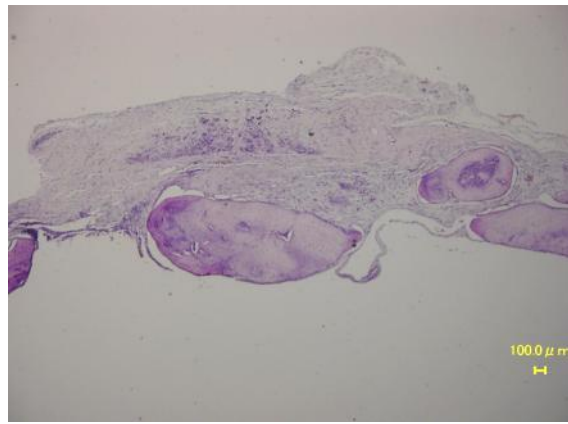
図 24 移植後 16 週のラット頭頂部 MSCs 移植部の H-E 染色像



未凍結群



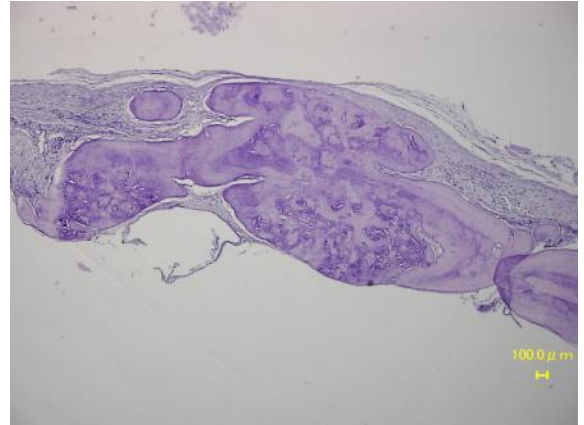
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群



2.5%Me2SO-CAS 群



10%Me2SO-CAS 群

図 25 移植後 24 週のラット頭頂部 MSCs 移植部の H-E 染色像

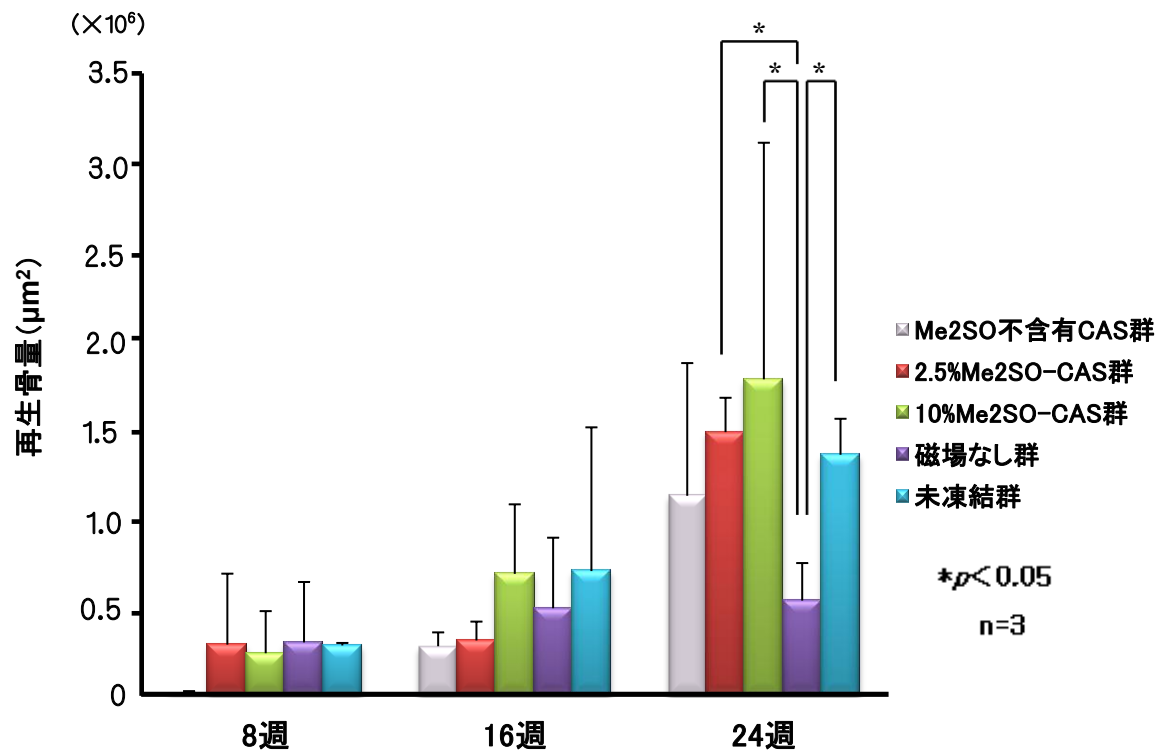
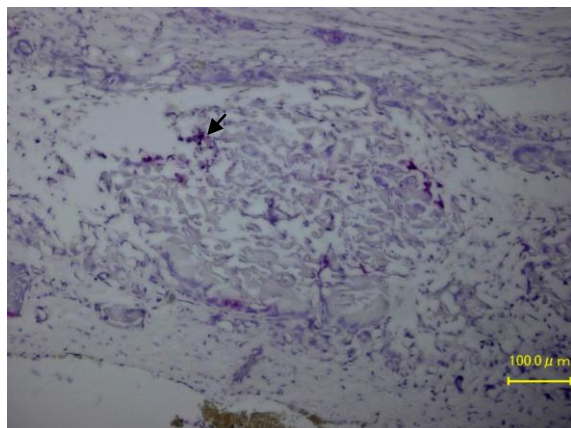
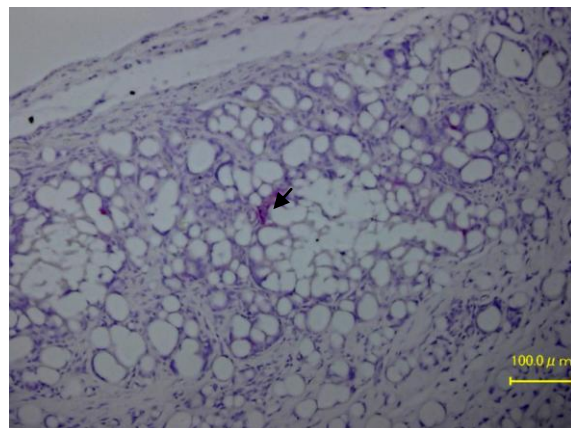


図 26 再生骨量の経時変化

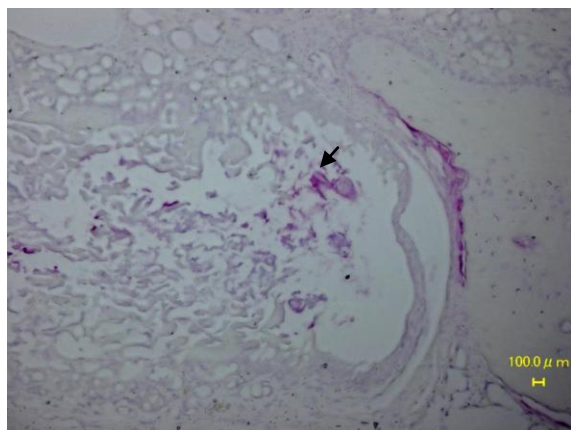




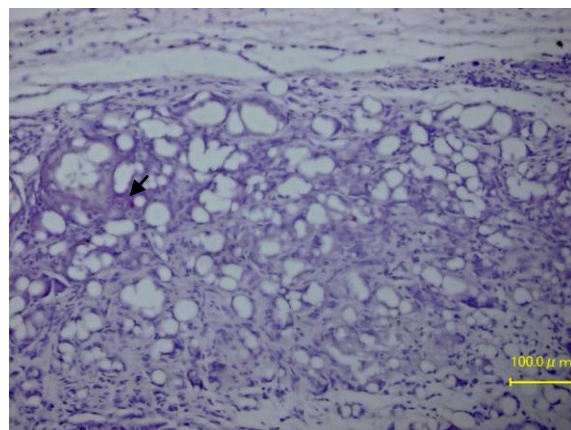
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群

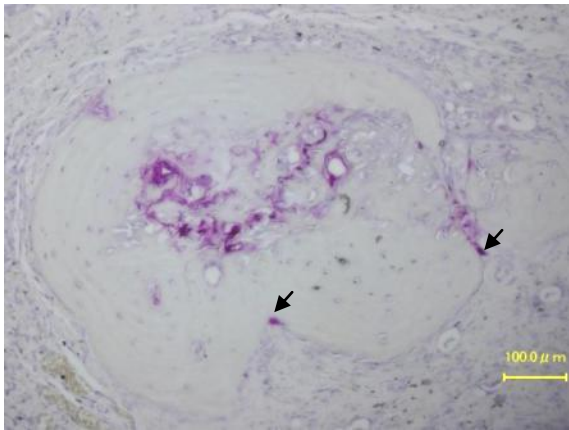


2.5%Me2SO-CAS 群

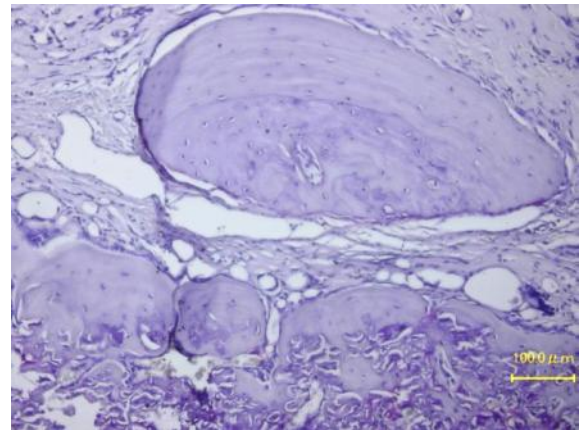


10%Me2SO-CAS 群

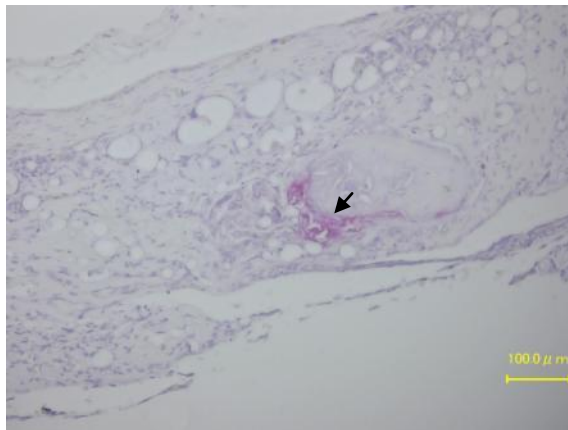
図 27 MSCs 移植後 8 週の TRAP 陽性細胞  
(矢印: TRAP 陽性細胞)



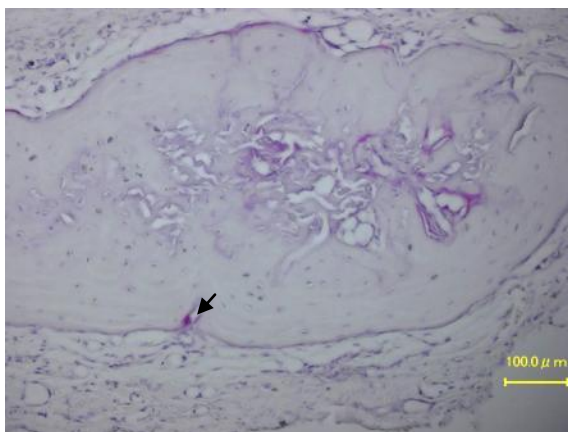
未凍結群



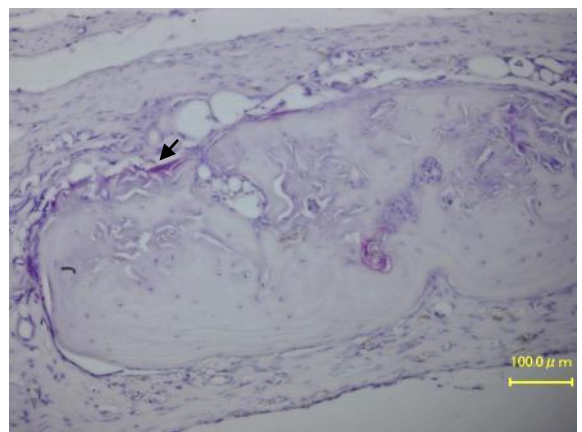
磁場なし群



Me2SO 不含有-CAS 群

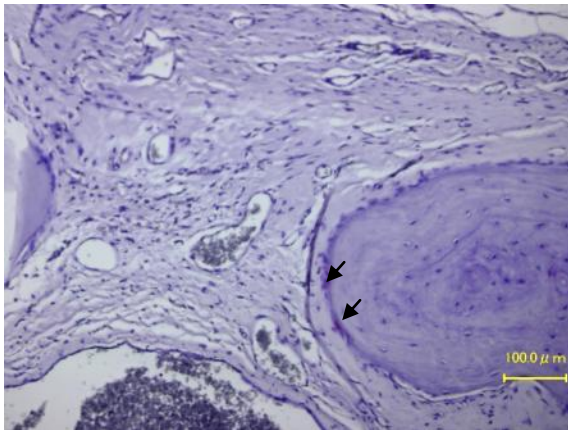


2.5%Me2SO-CAS 群

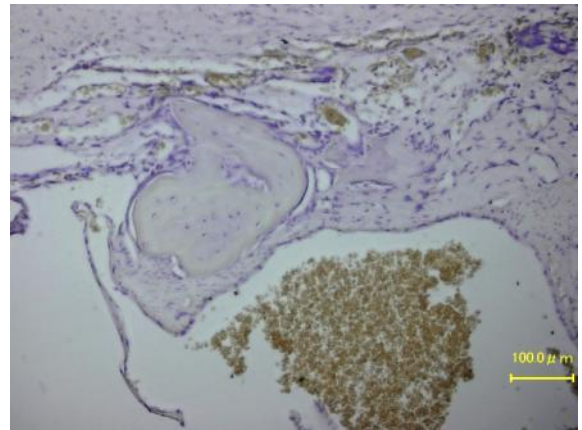


10%Me2SO-CAS 群

図 28 MSCs 移植後 16 週の TRAP 陽性細胞  
(矢印: TRAP 陽性細胞)



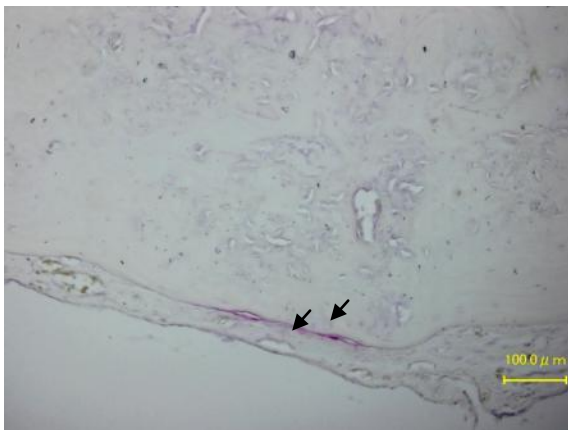
未凍結群



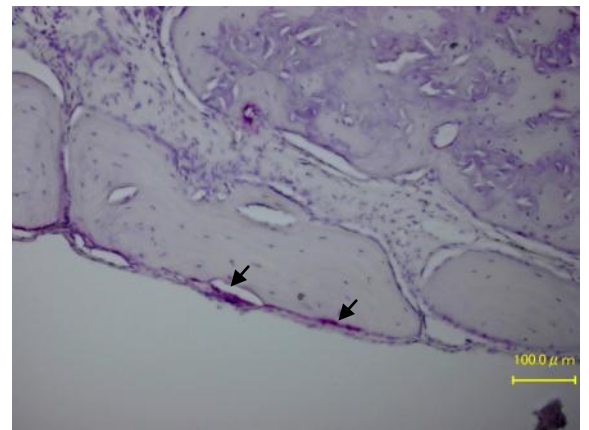
磁場なし群



Me2SO 不含有 CAS 群



2.5%Me2SO-CAS 群



10%Me2SO-CAS 群

図 29 移植後 24 週の TRAP 陽性細胞  
(矢印: TRAP 陽性細胞)

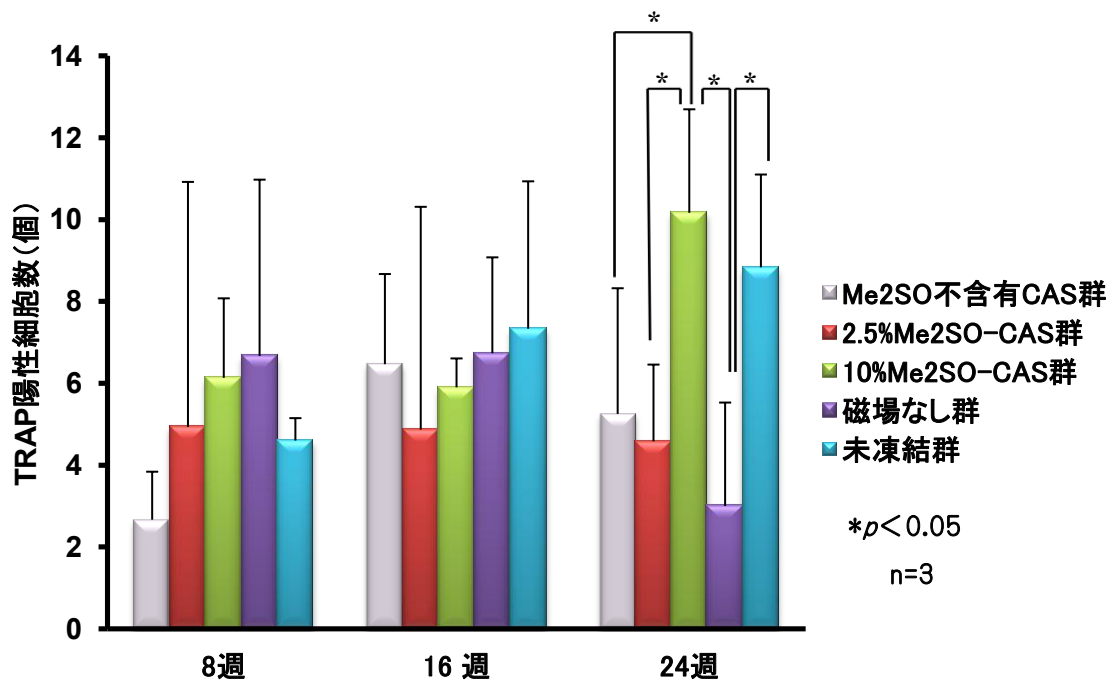
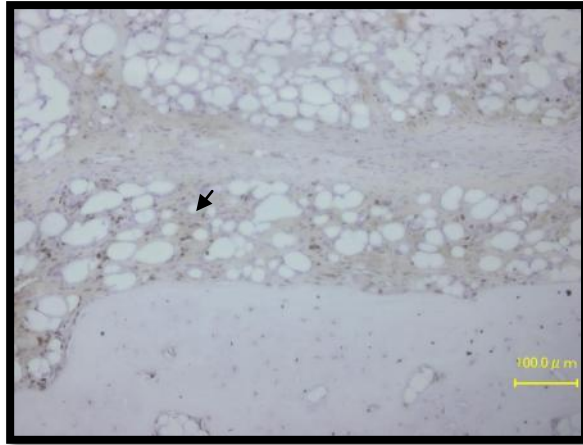


図 30 TRAP 陽性細胞数の経時変化

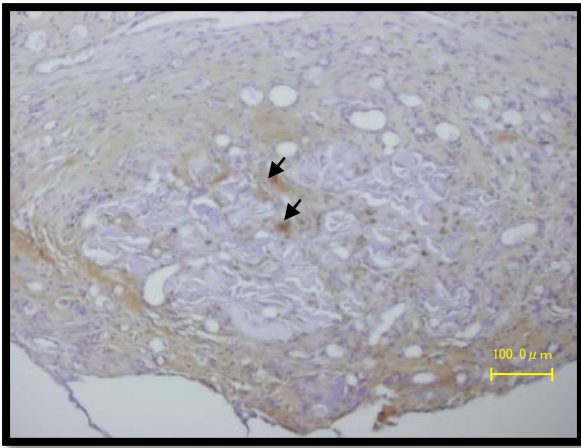
#### IV. 凍結保存 MSCs 移植部位における骨分化マーカー(アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、PCNA)の免疫組織化学的検討

##### 1. PCNA 陽性細胞の変化

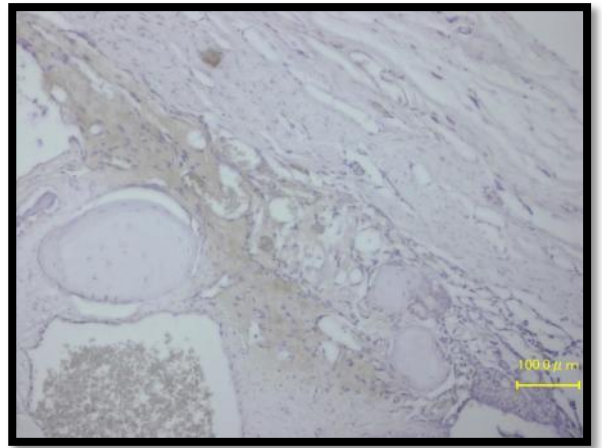
PCNA 陽性細胞は、磁場なし群において細胞移植後 8 週に観察され、その後、16 週に増加を示したがその後、24 週に減少を示した(図 31)。また、10%Me2SO-CAS 群においても、移植後 8 週から 16 週で増加を示し、16 週から 24 週に減少した (図 32)。



移植後 8 週

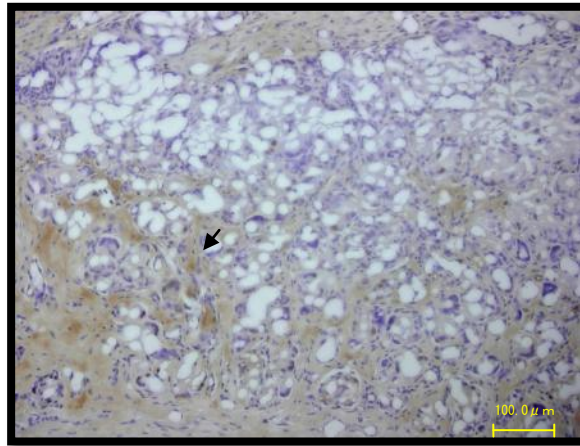


移植後 16 週

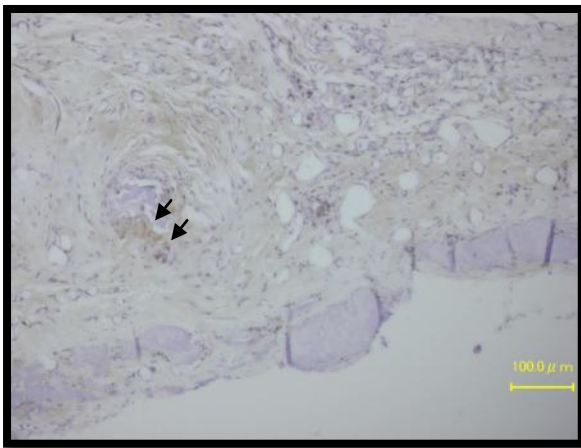


移植後 24 週

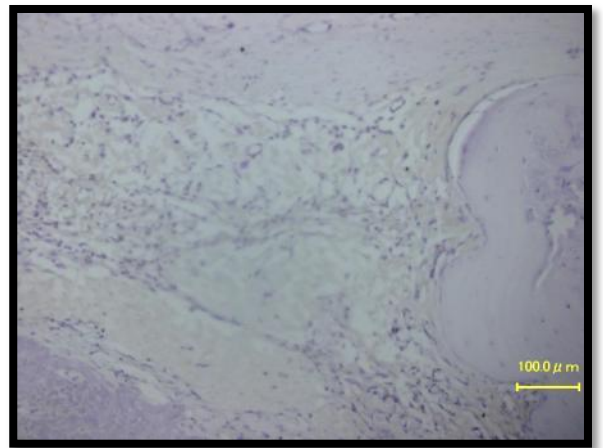
図 31 磁場なし群における PCNA 陽性細胞  
(矢印: PCNA 陽性細胞)



移植後 8 週



移植後 16 週

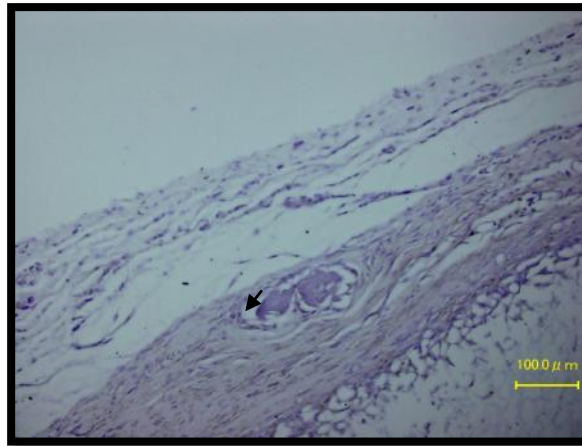


移植後 24 週

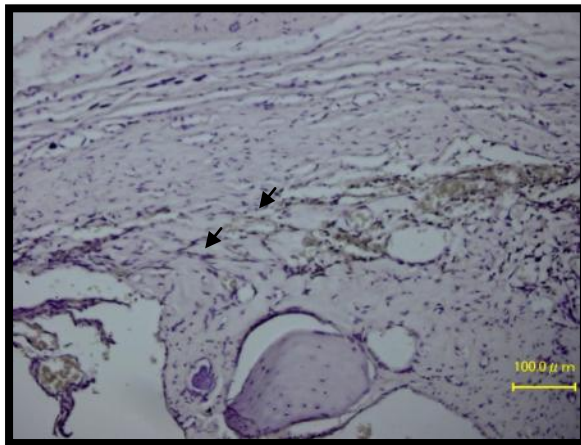
図 32 10%MeSO-CAS 群における PCNA 陽性細胞  
(矢印: PCNA 陽性細胞)

## 2. ALP 陽性細胞の変化

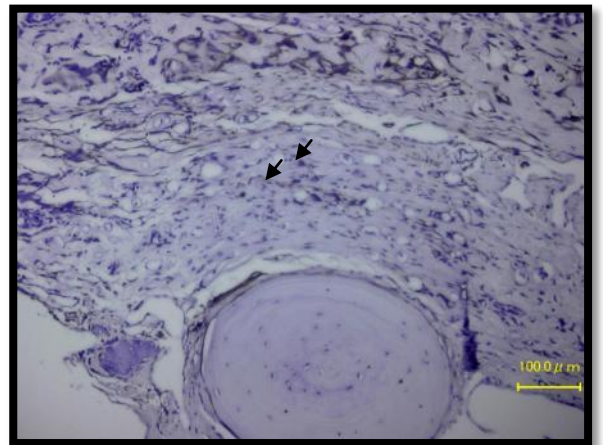
ALP 陽性細胞は、磁場なし群において移植後 8 週から 16 週に増加した。しかしながら、16 週から 24 週では変化を示さなかった(図 33)。一方、10%Me2SO-CAS 群においては、移植後 8 週から少数が観察され、その後 16 週、24 週と経時的に増加を示した(図 34)。



移植後 8 週



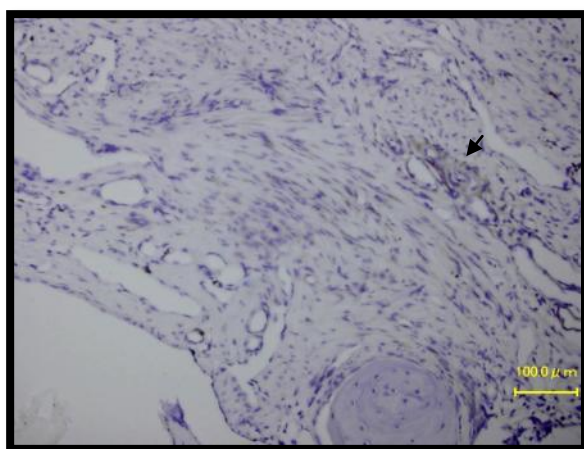
移植後 16 週



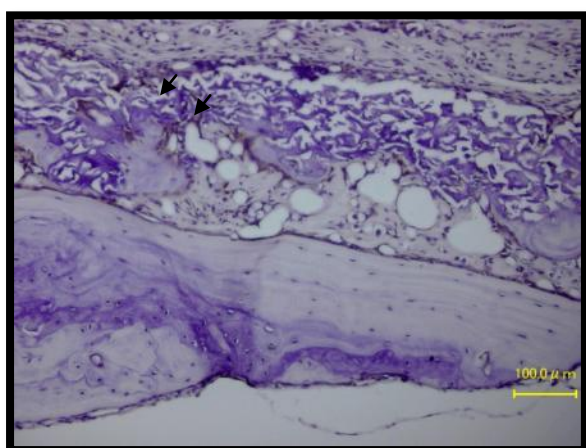
移植後 24 週

図 33 磁場なし群における ALP 陽性細胞  
(矢印: ALP 陽性細胞)

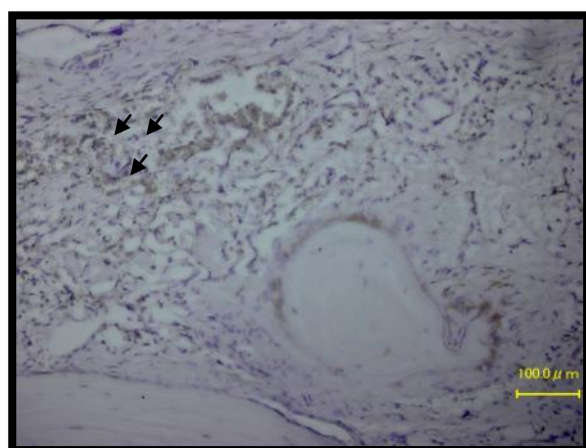




移植後 8 週



移植後 16 週



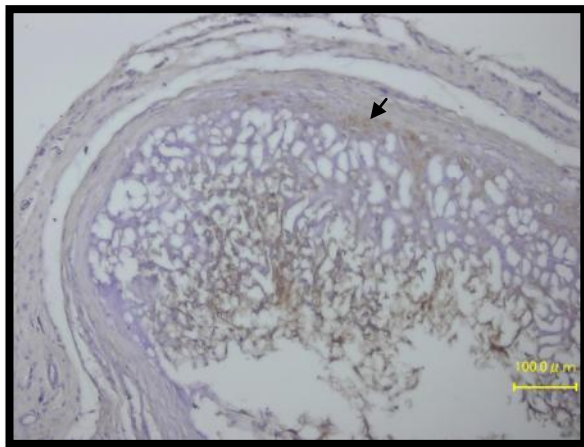
移植後 24 週

図 34 10%Me2SO-CAS 群における ALP 陽性細胞  
(矢印: ALP 陽性細胞)

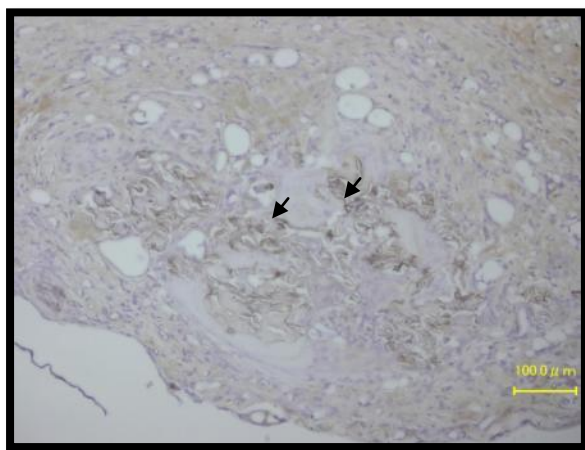
### 3. OPN 陽性細胞の変化

OPN 陽性細胞は、磁場なし群において移植後 8 週にわずかに観察され、移植後 16 週にはその数を増した。しかしながら、移植後 24 週には観察されなかった(図 35)。一方、10%Me2SO-CAS 群において移植後 8 週、16 週、24 週と経時

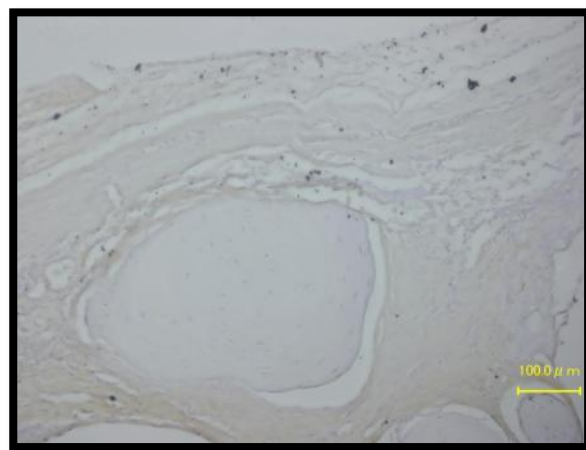
的に増加した(図 36)。



移植後 8 週

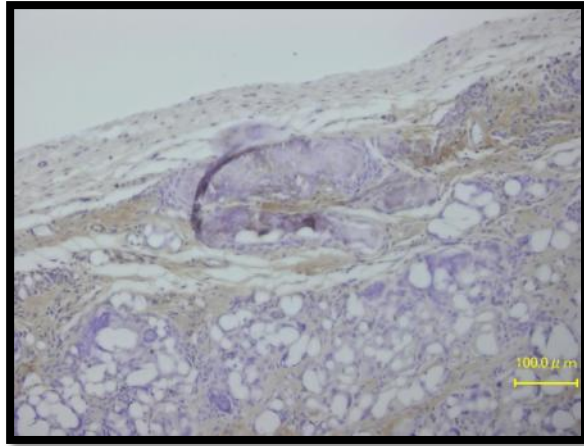


移植後 16 週

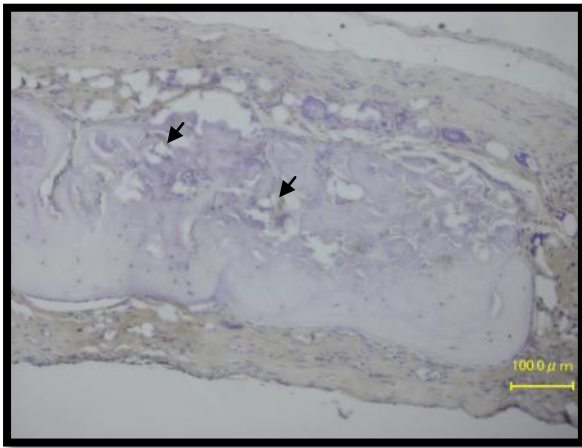


移植後 24 週

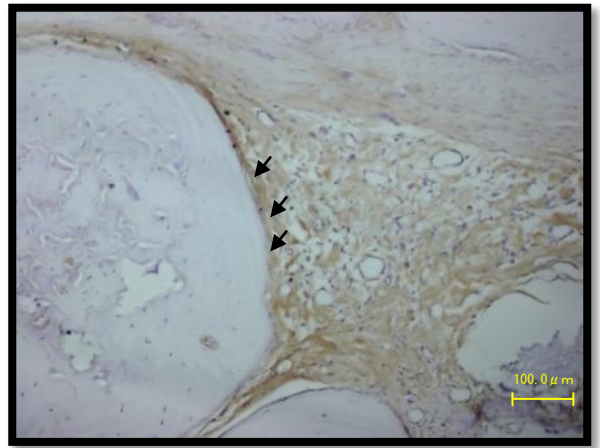
図 35 磁場なし群における OPN 陽性細胞  
(矢印: OPN 陽性細胞)



移植後 8 週



移植後 16 週



移植後 24 週

図 36 10%Me2SO-CAS における OPN 陽性細胞  
(矢印: OPN 陽性細胞)

## 考察

### 1. ヒト滑膜由来、およびラット骨髄由来 MSCs について

MSCs は生体の間葉組織から採取でき、自己細胞を利用できることから、再生医療の細胞源として期待されている。中でも滑膜から分離した滑膜幹細胞は、自己血清を用いた培養での増殖能が高く、軟骨分化能が高いことから半月板再生治療における細胞源として注目されている<sup>30,31)</sup>。軟骨組織を対象とした組織修復を目的とした細胞治療では、細胞の集積の維持、細胞増殖、分化機能の安定化、および移植部位における強度確保のためにスキャフォールドが必要となる。しかしながら、スキャフォールドの多くは動物由来材料、あるいは高分子化学材料を含有し、長期使用時の生体に及ぼす影響や安全性は不明な点が多い<sup>32)</sup>。これらの問題を解決する新たな細胞治療システムとして、ヒト滑膜由来 MSCs および細胞自身の生産するマトリックス(ECM)のみから構成された三次元人工組織(Tissue Engineered Construct 以下 TEC)が大阪大学医学部附属病院にて、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究プロジェクトにより開発された。TEC の ECM 自体がスキャフォールドの役割をなし、また、ECM は細胞接着因子を豊富に含むため、移植部に短時間で接着する。ブタに対する TEC の移植実験では、良好な軟骨修復が得られており<sup>33)</sup>、現在、臨床応用に向けた臨床研究が計画されている<sup>34)</sup>。本研究では、ヒト滑膜由来 MSCs の継代培養に無血清培地を使用した。

血清には数万の化合物が含まれ、ロット間の差が大きく、感染やアレルギーを惹起する可能性がある。また、血清には増殖・分化を抑制する因子が存在し、高レベルの増殖分化は不可能であると考えられているため、高レベルの分化が得られる無血清培地法を使用した。しかしながら、無血清培地による培養では細胞株の樹立が困難である。そのため、異なる個体由来の MSCs を実験に用いたが、ヒト由来の MSCs は性質の個体差が大きいため、実験 1-1 では結果のばらつきが大きくなったものと考えられる。骨髄中に含まれる MSCs の割合は総有核細胞数の 0.001~0.01% と非常に低いとされている。すなわち、骨髄 1 ml 中には約 100 万個の種々の細胞が含まれているが、MSCs は 10~100 個程度である。MSCs は高い組織修復能力を有しているが<sup>35)</sup>、大きく損傷した組織の修復には、より多くの細胞が必要であることから、継代培養が行われるが、継代を重ねると細胞の分化能力が低下することが知られている<sup>36,37)</sup>。これらのことから、本研究においては、Fischer344 ラット大腿骨より採取した骨髄由来 MSCs については、細胞増殖の効率と分化能を考慮して継代数 2~3 までの細胞を用いることとした。また、臨床応用を行う上では、継代数 2 までの細胞が望ましく、細胞の採取と移植までに時間差がある場合は、継代数を可及的に抑えるために、細胞の長期保存が必要となる。

## 2. 凍害について

現在、再生医療分野における組織や細胞の長期保存には、凍結保存が広く適用されている。凍害発現機序は凍結速度によって異なると報告され<sup>38,39)</sup>、凍害を防止するには、氷晶形成を最小限に抑えることが最も有効であると考えられている。氷晶形成の防止ために、現在用いられている凍結方法には、緩徐凍結法(二段階凍結法)と急速凍結法(ガラス化法)がある。

緩徐凍結法は、毎分 1℃あるいはそれ以下の緩徐な速度で-30℃前後まで凍結した後、第二段階として-130℃以下の温度で保存する方法である。はじめに細胞周囲の溶液が凍結することにより細胞外液濃度が上昇し、細胞内外の浸透圧の差を生じて細胞内の水分が細胞外へ移動し、脱水により細胞は収縮する。その結果、細胞内の塩基濃度の上昇、あるいは細胞膜の不可逆的变化により細胞が障害される<sup>23)</sup>。これに対して急速凍結は、試料を凍結保存液に投入後、直ちに液体窒素などを用いて-130℃以下の温度で急速に凍結する方法である。急速凍結法で凍結した場合は、凍結温度下での溶液系の粘度が高くなり、分子運動が極度に制限された状態になり、氷晶が形成されない。しかしながら、氷晶が形成されないようにするためには溶液中に添加する凍害防止剤を極度に高濃度にする必要があり、8M 以上のグリセロールや Me<sub>2</sub>SO 濃度が必要とされるが、この濃度ではどのような保護物質でも、細胞に対する薬物毒性が優位に強くなる。

また、細胞内液は細胞外に移動することなく氷晶を形成し、細胞内微細構造が機械的に破壊されることとなる<sup>40)</sup>。これを回避するには、氷晶が形成されやすい温度域を短時間で通過させ、粗大な氷晶形成を防ぐ必要がある。また、凍結しても細胞を壊死させないためには、細胞の収縮を引き起こさないように凍結する水分を可能な限り取り除いておく必要があるが、細胞を-20~-35℃で細胞外凍結の状態にしておくことによって細胞内の水分が細胞外に移動し、細胞内には凍結しやすい水分がほとんどなくなると言われている<sup>41)</sup>。本研究においてヒト滑膜由来 MSCs の解凍直後の細胞生存率と細胞増殖能は、CAS-LAB1 プログラムフリーザーを用いた群と、直接ディープフリーザーに投入した群との間に有意差を認めなかった。これは使用した細胞保存液であるバンバンカーが本来プログラムフリーザーを必要とせず、直接ディープフリーザーに投入するだけでもある程度の細胞生存率が期待できるよう開発されたものであるためと考えられた。

### 3. 細胞保存液について

細胞を凍結する場合、細胞外の水分が凍り、それに伴い細胞外 Na 濃度および浸透圧が上昇し、細胞内が脱水状態となる。この細胞内脱水に伴う凍害を防止するものが凍害防止剤である。凍害防止剤には細胞膜透過型凍害防止剤と細胞

膜非透過型凍害防止剤がある。前者の代表的なものには、Me<sub>2</sub>SO、グリセリン等があり、後者の代表的なものにはスクロース、トレハロース等がある。

本研究のヒト MSCs 凍結実験では、細胞保存液として Me<sub>2</sub>SO と Me<sub>2</sub>SO 不含有 Cell Reservoir One を使用した。Me<sub>2</sub>SO は、有機化合物や無機化合物を溶解させる非プロトン性極性溶媒細胞膜透過型凍害防止剤であり、代表的な凍害防止剤として使用されている<sup>42)</sup>。Me<sub>2</sub>SO は細胞膜を通過して水分子と結合し、細胞内水分が氷晶形成に取り込まれることを防止し、凍害を防止する。凍害防止剤以外にも、医薬品の反応溶媒や電子部品の洗浄などにも用いられており、他の溶剤より安全性は高いが、高濃度になると細胞毒性を発現すると言われている<sup>43)</sup>。本研究では、実験Ⅱ-2において、Me<sub>2</sub>SO 含有量が少なくなるにつれ、細胞生存率と増殖能の低下が見られた。Me<sub>2</sub>SO の含有量を 10%以上とした場合の凍害防止効果は検討していないが、細胞への安全性を考慮すると 10%程度の含有率が適度であるものと思われる。一方、Cell Reservoir One は絹タンパク質セリシンを主成分としている。セリシンは、親水性の高いアミノ酸から構成されており、ディフェンスプロテインとして細胞等や生体成分の安定化効果を持ち、凍結時の脱水ストレスを防ぐ細胞保存液である<sup>44)</sup>。このような機能的な違いから、ヒト滑膜由来 MSCs の凍結時に Me<sub>2</sub>SO と比較して Me<sub>2</sub>SO 不含有 Cell Reservoir One の凍害防止効果が弱く、凍結時に細胞が傷害され、解凍後の細胞



増殖能に影響したものと考えられる。また、Me<sub>2</sub>SO の濃度を可及的に下げることができれば、細胞毒性のさらなる軽減が可能であると考えられる。実際、5% Me<sub>2</sub>SO と 0.2M トレハロースの混合液にて心筋細胞の凍結を行い良好な結果を得たとの報告や<sup>45)</sup>、5% Me<sub>2</sub>SO と 4% hydroxyethyl starch (HES)の混合液を用いて造血幹細胞の凍結を行い良好な結果を得たとの報告があり<sup>46)</sup>、MSCs の凍結保存に使用する凍害防止剤の選択ならびに Me<sub>2</sub>SO 濃度について、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

#### 4. 凍結時の磁場付与について

従来のフリーザーによる細胞の凍結時には、水分子のクラスター化を十分に抑制することができず、解凍後の細胞生存率とその後の増殖能が低下することが問題であった。一方、水分子の凍結時にパルス磁場を細胞組織体に付与することにより、分子内に確率共鳴的にゆらぎ微振動の共鳴増幅が生じる<sup>47,48)</sup>。この共鳴した揺らぎにより、水分子は過冷却状態から凝固点を経て凍結点に至る過程において凝固と潜熱融解を繰り返し、微細な氷結晶を生成しながら凍結すると考えられている。このことから、CAS フリーザーによる細胞の凍結時には磁場により細胞内の水分子にゆらぎ微振動が生じ、クラスター形成が抑制されることにより、凍害が防止される可能性が考えられる。本研究において、実験

II-1 に示す通り、CAS 群と磁場なし群を比較すると細胞生存率とその後の増殖能は CAS 群が有意に大きい値を示した。しかしながら、解凍直後の細胞生存率は約 75%であり、何か他の因子を加えることにより、さらに生存率の向上を図ることができると考えられた。

## 5. 解凍時における磁場付与について

凍結した細胞の解凍時には、細胞外の水分子が細胞内より先に溶け始め、浸透圧が低下し、水分子が細胞内に流入することにより、細胞が膨張して傷害される。これは希釈性ショックと呼ばれる。この現象は、凍結時の細胞萎縮と同様に解凍時の細胞生存率に大きな影響を及ぼす。また、凝固相から液相への移行に時間がかかると、融解と凍結の平衡状態が生じ、細胞内氷晶が大きくなる再氷晶化が生じる<sup>49)</sup>。解凍時に再結晶化が発生した場合は、凍結時と同様に再結晶と融解を繰り返して氷晶が大きくなり細胞を障害する。再結晶化と希釈性ショックを防ぐには急速に加熱し、細胞の融解を短時間に行う必要があることから、37 °Cの恒温槽で解凍することが望ましいとされる<sup>50)</sup>。本研究は、解凍時に磁場を付与することで、水分子の再氷晶化を抑制し、細胞生存率と増殖能を向上させることを目的とした。その結果、実験 II-3 において CAS 解凍群の細胞生存率は、normal 解凍群と比較して、有意差はないものの、約 5%向上した。ま

た、細胞増殖能は normal 解凍群と比較して CAS 解凍群で有意に大きい値を示したことから、解凍時における磁場の付与が有効であることが示された。本実験では、凍結時に設定した磁場強度 0.1 mT を解凍時にも適用したが、今後、解凍時の至適磁場強度について検討する必要があると考えられる。

## 6. 使用した吸収性メンブレンについて

骨の再生には、細胞、足場となる支持体、増殖、および分化誘導因子の 3 つの条件が必須とされている<sup>51)</sup>。そのうち支持体に関する検討は数多く行われており、ハイドロキシアパタイトブロック、ポリテトラフルオロエチレン (e-PTFE) などの非吸収性膜や<sup>52)</sup>、乳酸グリコール酸共重合体、コラーゲンゲルなどの生体吸収性の人工材料が検討されている<sup>53~56)</sup>。本研究では、乳酸グリコール酸共重合体である吸収性組織誘導再生膜のバリアメンブレンを用いた。その理由としては、臨床応用に際して、支持体除去のための二次手術が不要であり、患者の負担が少なくなることが挙げられる。その吸収機序は TCA 回路による加水分解であり、吸収には 2~3 ヶ月を要する。また、バリアメンブレンを用いるに際して、2 つの役割を想定した。一つは、外側の上皮が欠損部内部に侵入するのを阻止するためのスペーサーとしての役割であり、もう一つは MSCs の支持体としての役割である。今回、MSCs 移植を行ったラットは、4 週齢と小さく頭頂骨

欠損作製時に骨膜をメスで切除した。その結果、欠損部に骨膜、上皮の侵入は観察されなかったことから、スペーサーとしての役割は十分果たしたものと考えられる。

## 7. ラット頭蓋骨欠損への MSCs 移植について

これまでに報告されているラット頭蓋に作製する骨欠損部の大きさについては、直径 2~8 mm の範囲で変動しており<sup>57-61)</sup>、明確な基準は示されていない。しかしながら、欠損部の大きさが小さい場合には生体の治癒が生じ、移植した細胞の組織再生能を評価することが困難となることから、骨再生を評価するにはラットにおいて直径 5~8 mm の欠損が適していると考えられている<sup>62)</sup>。本研究では、従来の研究や解剖学的な制限に基づいて、自然治癒を最小限に留めるために直径 6 mm の骨欠損を作製した。

各群における再生骨量は移植後 24 週において 10%Me2SO-CAS 群が最大値を示した。また、未凍結群と 10%Me2SO-CAS 群との間に有意差は認められず、凍結保存後も骨分化能が保たれていることが明確に示された。一方、磁場なし群は、16 週から 24 週にかけて骨再生量はほとんど変化を示さなかった。移植後 8 週の時点では各群に差は見られなかったことから、磁場なし群では移植後の細胞増殖能が低下しているものと考えられた。これは実験 II-1 の細胞凍結と同様

の結果であり、細胞実験の結果が改めて動物実験でも証明された。また、TRAP 陽性細胞数は 16 週から 24 週にかけて未凍結群と 10%Me2SO-CAS 群において増加を示したものの、磁場なし群、2.5%Me2SO-CAS 群および Me2SO 不含有群においては減少を示したことから、これらの群における骨代謝への何らかの影響が生じているものと考えられた。

また、本研究では、凍結保存後の MSCs 移植部位における骨関連因子、および細胞増殖マーカーの発現について免疫組織学的に観察を行った。細胞増殖のマーカーであり、細胞分裂期の G<sub>1</sub> 期から S 期にかけて発現する PCNA 陽性細胞は 10%Me2SO-CAS 群において 16 週から 24 週にかけて減少を示したことから、凍結後に移植した MSCs が移植部位においてある程度増殖した後、骨分化へ移行しているものと考えられた。次に、幼若な骨芽細胞の指標である ALP 活性は骨形成の初期に上昇し、骨形成が進み、カルシウム含有量が一定の値に達すると、減少すると報告されている<sup>6)</sup>。本研究では、ALP 活性は 10%Me2SO-CAS 群において移植後 8 週からわずかに観察され、16 週から 24 週にかけて経時的増加を示したことから、移植した MSCs が幼弱な骨芽細胞へ分化していると考えられた。

一方、磁場なし群では 8 週から 16 週にかけて ALP 活性は増加を示したものの、16 週から 24 週にかけては変化を示さなかったことから、骨芽細胞への分化能が

低下していることが示された。また、成熟骨芽細胞の指標であり、硬組織形成初期に現れる基質タンパクである OPN については、10%Me<sub>2</sub>SO-CAS 群において経時的に増加を示し、成熟骨芽細胞へと分化が進んでいることが示された。

しかしながら、磁場なし群においては、16 週から 24 週にかけて減少を示したことから、幼若骨芽細胞と同様に成熟骨芽細胞への分化にも影響を与えることが示唆された。これらの結果から、細胞保存液として 10%Me<sub>2</sub>SO を用いて CAS フリーザーで MSCs の凍結を行った場合に、増殖能、および分化能が最も高く維持され、移植後の骨再生に有効に働くことが示された。

## 総括

口蓋裂患者の有効な顎裂閉鎖療法となっている新鮮自家腸骨海綿骨細片移植の問題点である腸骨採取時の外科的侵襲や、それに伴う歩行障害などの患者への負担の軽減を目的として、凍結保存した MSCs による骨再生について検討を行い、以下のような結果を得た。

1. ヒト滑膜由来 MSCs において、Me2SO 群と Cell Reservoir One 群との間に解凍直後の細胞生存率の有意差は認められなかったが、細胞増殖能は Me2SO 群が有意に高い値を示した。
2. ラット骨髄由来 MSCs において、解凍直後の細胞生存率、および細胞増殖能は CAS 群が磁場なし群と比較して有意に大きい値を示した。
3. ラット骨髄由来 MSCs において解凍直後の細胞生存率、および細胞増殖能は 10%Me2SO 含有バンバンカー使用群において、それ以下の濃度を用いた場合と比較して有意に高い値が認められた。
4. ラット骨髄由来 MSCs の解凍後の細胞増殖能は、解凍時に磁場を付与することにより有意に高まることが明らかとなった。
5. ラット頭蓋骨欠損部に凍結保存した MSCs を移植した結果、10%MeSO-CAS 群は未凍結群と同等の再生骨量を認めたが、磁場なし群の再生骨量は有意に

小さい値を示した。

6. 10%Me<sub>2</sub>SO-CAS 群の移植部位における ALP、および OPN の発現は経時的に増加を示した。一方、磁場なし群において、ALP は 16 週から 24 週にかけて変化が認められなかった。PCNA については両群において経時的に減少を示した。

以上の結果より、磁場を利用したプログラムフリーザーは、MSCs の凍結保存に有用であることが明らかとなった。また、解凍時にも磁場を付与することにより、その効果はさらに高まることが示された。凍結後の MSCs の移植により、未凍結群と同等の骨再生が誘導されたことから、今後、再生医療分野における様々な治療に対して有用性が高いことが示された。



## 参考文献

1. 飯野光喜, 幸地省子, 松井桂子. 顎裂部に対する自家腸骨海綿骨細片移植術 X線 CTによる骨架橋の評価. 日口蓋裂会誌, 1994; 19: 22-31.
2. 川上慎吾, 日浦賢治, 住谷光治, 他. 顎裂部への自家腸骨海綿骨移植の予後に関する研究: デンタル X線写真ならびに CTを用いた解析. *Orthod Waves Jpn Edit*, 2000; 59: 12-20.
3. 高本 滋, 坂巻寿, 柴田弘俊. 骨髄採取の合併症とその対策 全国集計結果中心に. *日輸血会誌*, 1993; 39: 1040-1043.
4. 後藤新吾, 秋山芳夫, 外山佳孝, 他. 両側性口唇口蓋裂の腸骨移植術と舌弁を使用した治療経験について. *愛知学院大歯会誌*, 2007; 45: 639-642.
5. Chin M, Nq T, Tom W K. Repair of alveolar clefts with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) in patients with cleft. *J Craniofac Surg*, 2005; 16: 778-789.
6. 結城美穂, 河田俊嗣, 谷本幸太郎, 他. 骨再生誘導法により顎裂部の閉鎖を行った唇顎裂患者の一治験例. *日口蓋裂会誌*, 2003; 28: 250-260.
7. 大串 始, 有馬靖佳, 竹谷健. 間葉系幹細胞研究(臨床研究からみた同種間葉系幹細胞移植) 特集:幹細胞治療Ⅱ基礎研究の進歩と展望. *日臨*, 2011; 69: 2121- 2127.
8. Ishikawa M, Suzuki M, Nakamura T, et al. Effect of growth phase on survival of bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. *Ann Bot*, 2006; 97: 453-459.
9. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 1983; 305: 707-709.
10. Justice T, Christensen G. Sperm cryopreservation methods. *Methods Mol Biol*,

2013; 927: 209-215.

11. Schmid P, Huvard MJ, Lee-Stroka AH, et al. Red blood cell preservation by droplet freezing with polyvinylpyrrolidone or sucrose-dextrose and by bulk freezing with glycerol. *Transfusion*, 2011; 51: 2703-2708.
12. Huber AJT, Brockbank KGM, Riemann I, et al. Preclinical evaluation of ice-free cryopreserved arteries: Structural integrity and hemocompatibility. *Cells Tissues Organs*, 2012; 196: 262-270.
13. Motta MR, Benini C, Bandini G, et al. Autologous bone marrow transplantation with marrow cryopreserved for ten years. *Bone Marrow Transplant*, 1993; 12: 177.
14. 河田俊嗣, 本川雅英, 松田弥生, 他. 失敗症例から学ぶ矯正歯科を伴う歯の移植治療 歯の銀行の役割. *広島大学歯学雑誌*, 2012; 44: 61-66.
15. 平泉 泰, 小島靖彦, 野手雅幸. 臍ラ島細胞の凍結保存に関する研究 凍結保存ラ島細胞の生物学的機能と移植効果. *移植* 1991; 26: 218-229.
16. O'Brien MF, Stafford EG, Gardner MA, et al. Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up. *Ann Thorac Surg*, 1995; 60: S65-70.
17. 仲沢弘明. 注目の領域 重症熱傷に対する治療戦略 早期手術とスキンバンクの役割. *医学のあゆみ*, 2011; 238: 1143-1149.
18. Borot S, Lapierre V, Carnaille B, et al. Results of cryopreserved parathyroid autografts: a retrospective multicenter study. *Surgery* 2010; 147: 529-535.
19. 宮島玄陽, 相川 淳, 高相晶士, 他. 広範な骨欠損に対し非生体ドナーから採取した凍結保存同種骨を用いて人工膝関節全置換術を施行した1例. *神奈川整災外会誌*, 2012; 25: 77-80.
20. 金 郁哲, 浪江和生, 荒井義之. 凍結保存同種骨軟骨移植. *低温医*, 1996; 22: 321-335.

21. 林 淳也. 凍結保存同種神経移植 ニホンザル尺骨神経の研究. 慈恵医大誌, 2008; 123: 87-97.
22. 桑野和可. 海藻細胞の凍結保存. 低温生物工会誌, 2008; 54: 15-20.
23. 隅田幸男. 組織凍結保存の基礎知識 Cryobiology for transplant surgeons. 低温医, 1996; 22: 187-199.
24. Kaku M, Kamada H, Kawata T, et al. Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking. Cryobiology, 2010; 61: 73-78.
25. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, et al. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. Stem Cells, 2010; 28: 1099-1106.
26. Abedini S, Kaku M, Kawata T, et al. Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. Cryobiology, 2011; 62: 181-187.
27. Koseki H, Kaku M, Kawata T, et al. Cryopreservation of osteoblasts by use of a programmed freezer with a magnetic field. Cryo Letters, 2013; 34: 10-9.
28. 中嶋俊介, 辻 隆之, 高本眞一. 組織凍結保存の現状. 低温医, 1996; 22: 336-341.
29. Kojima S, Kaku M, Kawata T, et al. Cryopreservation of rat MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field. Cryobiology, 2013; 67: 258-63.
30. 園本格士朗, 山岡邦宏, 田中良哉. 間葉系幹細胞による関節リウマチの骨軟骨再生へのアプローチ. 産業医大誌, 2014; 36: 141 -146.
31. 堀江雅史, 宗田 大, 関矢一郎. 滑膜由来間葉系幹細胞による膝半月板再生. 炎症と免疫, 2013; 21: 148-156.
32. 厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業 プリオン病及び遅発

性ウイルス感染症に関する調査研究班 プリオン病感染予防ガイドライン,  
2008年版

33. 尾形 衛, 片貝大輔, 中村憲正. B407 滑膜由来間葉系幹細胞ベース組織再生材料(TEC)を用いて修復した成熟ブタ軟骨の摩擦特性(生体材料). 日本機械学会バイオフィロントニア講演会公演論文集, 2008; 19: 8~30.
34. 井村眞智子, 片貝大輔, 安藤 渉. 滑膜由来間質細胞から生成した組織再生材料(TEC)の軟骨修復への応用 修復軟骨の動的・静的圧縮特性. 日臨バイオメカ会誌, 2008; 29: 135-140.
35. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. J Biomed Mater Res, 1999; 48: 913-927.
36. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. Res Vet Sci, 2011; 91: 18-24.
37. 勝部好裕, 寿 典子, 大串 始. 骨再生医療へ向けた間葉系幹細胞培養の初期培養の検討. 日整会誌, 2005; 79: S944.
38. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science, 1970; 168: 939-49.
39. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol, 1984 ; 247: 125-42.
40. 奥 祐一郎. 脱水冷凍における組織内熱・物質輸送と損傷機構の研究. 学位論文(九州工業大学), 2013.
41. 酒井 昭. 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 1956; 14: 17-24.
42. 隅田幸男. Tissue Bank の現況と将来 (第6回米国 Tissue Bank 学会および Me2SO の近況). 低温医, 1982; 8: 49-52.

43. 環境省 化学物質ファクトノート 2012 版 12]ジメチルスルホキシド.
44. 宮本 義孝, 大石 幸一, 湯川 博. ヒト脂肪組織由来幹細胞における細胞凍結保存液の検討. 低温生物工学会誌, 2010; 56: 55-58.
45. 圓本剛司, 本村 昇, 中嶋俊介. 単離心筋細胞の凍結保存. 低温医, 1996; 22: 251-256.
46. 角南一貴, 原田実根. CP-1 による幹細胞保存. 低温医, 1998; 24: 171-174.
47. Iwasaka M, Onishi M, Kurita S, et al. Effects of pulsed magnetic fields on the light scattering property of the freezing process of aqueous solutions. J Appl Phys, 2011; 109: 07E320 - 07E320-3.
48. 大西雅也, 岩坂正和, 栗田 学, 他. 水溶液凍結プロセスにおけるパルス磁場効果の解明. 日生体磁気会誌, 2010; 23: 158-159.
49. 高松 洋. 電解質の濃度変化による単離細胞の障害と凍結損傷(セミナー「生体の温度・水分センサーの機能と構造」). 低温生物工学会誌, 2007; 53: 39-45.
50. 隅田 幸男. 【低温医学 新しい技術と臨床応用】結解凍した血球性細胞・造血幹細胞・胚・組織の臨床使用(解説/特集). 医学のあゆみ, 2002; 201: 811-818.
51. 緒方克哉, 中村典史. 顎裂部への自家海綿骨細片と HA 顆粒混合移植術の術後評価. 日口蓋裂会誌, 2000; 25: 215-223.
52. 大堀ことは, 横山敦郎, 川崎貴生, 他. 非吸収性膜がアパタイトブロックの骨膜下埋入後の骨形成に及ぼす影響. 補綴誌, 2002; 46: 712-721.
53. 横矢重俊, 水沼秀之, 福岡真一, 他. 生体吸収性材料ポリ-L-乳酸メッシュと骨髄海綿骨細片移植による無歯顎、高齢者の顎骨再生の経験. 日口科誌, 2002; 51: 481-482.
54. 小園 知, 伊藤由美, 根岸秀幸, 他. 骨髄間葉系幹細胞を用いたハイブリッ

- ト型人工骨に関する研究 生体吸収性材料  $\beta$ -TCP 内での培養間葉系幹細胞の骨形成における bFGF の効果について. 神奈川歯学, 2002; 37: 41.
55. 富田直秀. 整形外科医に必要なバイオメカニクス基礎知識と最近の話題 生体吸収性材料の現状と展望. 関節外科, 2002; 21: 124-127.
  56. 松峯昭彦, 内田淳正, 原田英光, 他. 骨・軟骨研究の新展開と臨床応用への展望、最新の骨研究に迫る-解明が進む分子機構と骨疾患、そして再生医療へ. 東京 羊土社, 2002; 153-169.
  57. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. Cleft Palate Craniofac J, 1995; 32: 311-317.
  58. Bosch C, Melsen B, Gibbons R, Vargervik K. Human recombinant transforming growth factor- $\beta_1$  in healing of calvarial bone defects. J Craniofac Surg, 1996; 7: 300-310.
  59. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical size bone defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg, 1998; 9: 310-316.
  60. Blom E. J, Klein-Nulend J, Yin L. Transforming growth factor- $\beta_1$  incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteoinductivity in rat calvarial bone defects : Clin Oral Implants Res. 2001; 12: 609-616.
  61. Pryor M.E, Polimeni G. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet rich plasma preparation : histologic and histometric observations. J Clin Periodontol, 2005; 32: 966-972.
  62. Schmitz J P, Hollinger J O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res, 1986; 205: 299-308.
  63. Reddi A H. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development.

Coll rel res, 1981; 1: 209-226.

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御教示、御支援ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科応用生命科学部門（歯科矯正学）谷本 幸太郎教授に心より感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり、御助言、御校閲いただきました同研究科基礎生命科学部門（口腔生理学）杉田誠教授、同研究科統合健康科学部門（口腔発達機能学）天野秀昭教授、ならびに同研究科応用生命科学部門（口腔外科学）武知正晃准教授に深謝申し上げます。

本研究の計画、遂行において貴重な御助言を頂くと共に、直接ご指導を賜りました神奈川歯科大学歯科矯正学講座 河田俊嗣教授、顎口腔頸部医科学講座 歯科矯正学 加来真人講師、ならびに小島俊逸助教、貴重な御助言を頂きました松田弥生博士、角 明美博士に感謝申し上げます。また、本研究結果の一部は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構NEDOのプロジェクト内の成果によるものであり、株式会社ツーセル 辻 紘一郎先生、長谷川森一先生、広島大学口腔生化学講座名誉教授 加藤幸夫先生に深謝致します。また、遂行にご理解、ご協力を頂いた顎口腔頸部医科学講座 歯科矯正学の皆様、ならびに関係者各位に厚く御礼申し上げます。最後に、勉学、研究の機会を与えていただきました広島大学矯正学講座名誉教授 丹根一夫教授に心より御礼申し上げます。