

## K562 細胞の新しい凍結保存法

### A new simple cryo-preservative method of K562 cell

知念良教、長岡研五  
Yoshinori Chinen, and Kengo Nagaoka

保健管理センター  
Health Care Service Center  
(2012年5月16日原稿受理、2012年7月18日採用決定)

#### 要約

細胞を冷凍保存する方法には液体窒素法、ディープ・フリーザー法がある。これらの方法に変わりうるものではないが、第3の方法を開発した。世界的に広く使用されている培養細胞 K562 を市販の家庭用冷凍冷蔵庫 (-20°C前後) で数カ月保存し、その後再び解凍して、再生させることができる新しい技術を報告する。

手順は3段階で、細胞浮遊液にまず diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) を 1 mM の濃度で添加し 8 時間培養して耐凍能を誘導し、ついで高張ブドウ糖液による脱水、その後グリセリンを 20% 含有する保存液と 3 : 2 の割合で混合して浮遊させ、-20°C で冷凍保存をする。グリセリンの終濃度は 8 % となる。この方法は安全で、安価であり、特別な器具、特別な訓練も必要としない手軽で有用な手段である。K562 細胞のような研究用細胞を 100 日程度保存するときを使うものとして存在意義があると考えられる。研究をさらに発展、洗練させることができれば、これ以外にも様々な応用、例えば輸血用血液の保存、が期待される。

#### キーワード

K562 細胞、冷凍保存、diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA)、  
グリセリン

## 目的

各種の動植物細胞を長期間凍結保存し、必要に応じて解凍・再生して使用に供する事は、いろいろな研究分野あるいは臨床の場に於いて日々行なわれている技術である<sup>1, 2)</sup>。液体窒素法 (-196°C) とディープ・フリーザー法 (-80°C) がある。これらの技術は安定し、確立されていて、信頼性が高い。

しかしながらいずれの方法に於いても、難点が無いとはいえない。例えば、液体窒素の交換が煩雑である、器具が高額で維持費がかさむ、あるいは不慮の事故で操作従事者に凍傷などの障害を生じる恐れがある、等々である。もし市販の家庭用冷蔵庫のフリーザー (-20°C前後) を用いて細胞の長期保存が可能ならば、その利点は計り知れない。

我々は比較的的操作が簡単・安価・安全な方法を考案したので報告したい。

## 材料と方法

冷凍庫：市販の家庭用冷蔵庫 (National NR-453 EB-G) のフリーザー内で保存した。

温度を実測したところ -18~-20°C の間で変動した。

試薬：D-ブドウ糖、グリセリン、Dulbecco のリン酸緩衝生理食塩水 (カルシウム、マグネシウム非含有、pH 7.4、リン酸濃度 9.59 mM。以下 PBS と略す)、RPMI-1640 培養液 (RPMI)、Gibco 社ウシ胎児血清 (FCS)、diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA)、ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA)、dimethylsulfoxide (DMSO) 等、市販試薬を使用した。

滅菌操作：グリセリンは 125°C で 2 時間乾熱滅菌した。DTPA、EDTA は PBS で溶解し、フィルター (直径 33 mm、孔径 0.45 μm) で濾過・滅菌した。1 M ブドウ糖液、その他の水溶性試薬もフィルターで濾過・滅菌した。

細胞：K562 細胞は 10% FCS 加 RPMI で継代培養し実験に用いた。

耐凍性の誘導：細胞を DTPA で処理することにより耐凍性を誘導することができた。このプロセスは必須である (表 1)。

脱水：DTPA 処理細胞浮遊液と 1 M ブドウ糖液を 2 : 1 の体積比で混合し、37°C で 30 分間作用させ、細胞を脱水した。この操作により細胞内氷晶の形成・成長をある程度防止することができ、細胞障害を抑えられる。

凍害保護液：脱水細胞の浮遊液に、凍害保護液 (10% FCS 加 RPMI にグリセリンを 20% 添加したものを) を 3 : 2 の体積比で混合してよく攪拌し、37°C で 30 分間作用させた後、フリーザー内に静置し冷凍した。グリセリンの終濃度は 8% になるが、この濃度が最適であった。

冷凍保存：ねじ口試験管 (12 ml) 1 本あたり上記の処理をした細胞浮遊液 2~3 ml を入れ、キャップを堅く締め、フリーザー内で保存した。細胞浮遊液は 1.5 ml 以上であることが望ましい。1.0 ml 以下では保存成績が悪化した。

解凍・順化：すばやく解凍後、洗浄液 (10% FCS 加 RPMI にグリセリンを 4% 添加したもので 2 回洗浄したあと、順化液 (組成は洗浄液と全く同一であるが、使用目的が異なるため名称を別とした) に浮遊させた。

再生：インキュベーターで 1 日培養 (順化) した後は、添加グリセリンは不要である

ばかりかむしろ有害なので、新鮮な培養液（グリセリンを含まず）に置換する必要がある。

表 1. 3つの操作の有無による凍結細胞の生存率への影響

操作1 DTPA 処理	操作2 脱水	操作3 凍害保護液	凍結 保存 解凍 → 結果 洗浄 浮遊	生存細胞の割合 (%)		
				実験1	実験2	実験3
—	—	—		0	0	0
—	—	+		0	0	0
—	+	—		0	0	0
—	+	+		0	0	0
+	—	—		0	0	0
+	—	+		0	0	0
+	+	—		0	0	0
+	+	+		72	65	60

＋は操作あり、－は操作なし、を示す。

DTPA 処理とは、K562 細胞浮遊液に DTPA(1 mM)を添加し 37℃で 8 時間培養することを示す。

凍害保護液としては、10%FCS 加 RPMI にグリセリンを 20%添加したもの(体積比)、を用いた。

冷凍保存期間は 25 日。

実験1、実験2、実験3は同じ実験を 3 回繰り返したことを示す。

## 結果

死滅細胞：細胞浮遊液中の生存細胞と死滅細胞はトリパンブルー液を用いて染色後、顕微鏡下でカウントした。

グリセリンと DMSO の比較：DMSO は他の冷凍保存技術において使用されることがあるので、1～50%の濃度で試用してみたが、生存率が悪く、我々の方法には適していない。

DTPA の濃度と処理時間：0.1 mM 以下では効果が無く、0.5～1.0 mM が適当で、1.5 mM 以上では死滅細胞の割合が増加した。処理時間は、4 時間以内では効果が小さく、7～10 時間が適当で、15 時間以上では死滅細胞の割合が増加した。

DTPA と EDTA の比較：EDTA も耐凍性を誘導できるが、DTPA の方がよりすぐれていた。

保存期間と生存率：(表 2) に示す。

表 2. 凍結細胞の生存率の経時的変化

凍結保存期間	10日	25日	50日	100日
実験 1	95%	71%	45%	18%
実験 2	90%	73%	52%	13%
実験 3	81%	62%	35%	8%

生存細胞は 2、3 日の休止期を経て再び活発に増殖を開始する。その細胞は鏡検上形態的には凍結保存前の細胞との差異はみられない。

## 考察

冷凍対策処理を受けていない細胞が冷凍保存・解凍操作で死滅するのは細胞内で形成された氷晶が、核構造、核膜、細胞内器官・線維、細胞骨格、細胞膜を機械的に破壊するからであるとされている。生命活動に重要な高分子、特にタンパク質の変性・破壊をもたらし、その結果、細胞の生命維持に死活的に重要な過程、例えばエネルギー産生、細胞内イオン濃度の補正、障害を受けた高分子の修復機構等、の機能が障害されるからであるとも考えられる。他に、細胞内浸透圧の上昇、復温時のフリー・ラジカルの発生等、も関与しているようである。

解凍細胞の浮遊液をトリパンプルー液と混和して鏡検すると、様々な細胞像が観察される。通常の細胞と全く変わらないように見える細胞と障害された細胞が混在している。例えば細胞の膨化・巨大化・変形・budding、細胞の縮小と fragmentation、さらには細胞核の偏位（細胞周辺部へ圧迫されているように見える）、核膜の境界不鮮明化、細胞内に水泡（空泡）・赤みを帯びた顆粒の出現、細胞膜の輝き（細胞とバックグラウンドとのコントラスト）の低下、細胞の破裂、細胞質の流出等、が観察された。

我々の方法に関して、いくつかの課題がある。① DTPA、EDTA は金属キレーターとして作用しているのか<sup>3)</sup>、別の作用機序により保護作用を発揮するのか、耐凍能を誘導できるさらに優れた試薬がないか等。② 順化液への浮遊直後は生存しているが、その後数日間に徐々に死滅する細胞があり、その細胞死の機序の解明と対処法はないか等々、である。

## まとめ

K562 細胞を $-20^{\circ}\text{C}$ で保存し、解凍後、再生させることができる技術を報告した。この方法を行うための特別な訓練は必要なく、安全、安価である。液体窒素法、ディープ・フリーザー法に変わりうるものではないが、第 3 の方法として研究用細胞を 100 日程度保存するときには有用な手段として存在意義があると考えられる。これ以外にも、さらに様々な応用、例えば輸血用血液の保存、への発展が期待される。

**謝辞：**この研究に関し、恩師・故桜美武彦氏の多大な援助とアドバイスに深謝いたします。京都工芸繊維大学・保健管理センターの廣岡直美、辻順子看護師のサポートにも深謝いたします。

## 文献

- 1) 隅田幸男：結解凍した血球性細胞・造血幹細胞・胚・組織の臨床使用.  
医学のあゆみ、**201**(11):811-818, 2002.
- 2) 海老根東雄：心臓血管外科における凍結保存自己赤血球・血小板の応用.  
医学のあゆみ、**201**(11):819-825, 2002.
- 3) The Merck Index 10th Edition, Merck & Co.Inc.,1983.

## SUMMARY

Liquid nitrogen (-196°C) and deep freezer (-80°C) are utilized to preserve various cells. Though not better than these methods, a new technique was developed. This method is able to preserve a cell, K562, in home refrigerator/freezer at around -20°C for several months.

The technique is composed of three steps. (1) Incubation of the cell with diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) for 8 hours, (2) dehydration of the cell by hypertonic solution of glucose, and (3) incubation of the cell with a preserving medium containing glycerin. Final concentration of glycerin in the preserving medium before freezing is 8%. This method is safe, simple, cheap, and do not need expensive experimental apparatuses. It is very easy to carry out and thus needs no trainings.

## Keywords

K562 cell、cryo-preservation、diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA)、glycerin

