

幹細胞培養における凍結処理の細胞活性への影響についての検討



RINKU MEDICAL CLINIC

小村 泰雄 吉村 悠矢 柳田 咲
(りんくうメディカルクリニック)

目的

脂肪由来幹細胞を用いた再生医療は、慢性疼痛や変形性関節症の治療、しわ・たるみ改善など様々な角度からアンチエイジングに応用されている。脂肪採取後の管理や細胞培養の方法は提供機関により異なるため、投与される幹細胞の活性度や細胞数に差があると考えられるが明らかではない。今回我々は、凍結保存された細胞を解冻しそのまま投与する場合と、解冻後に回復培養を挟んで投与する場合の活性度の違いについて明らかにすることを目的とし、比較検討を行った。

方法

測定条件

同一時期の提供者2名から採取した脂肪由来幹細胞を、幹細胞培養培地(タカラバイオ)を用いて培養した(Fig.1)。それぞれの細胞について、解冻直後の細胞を検体①、解冻後に回復培養を行った細胞を検体②とした(Fig.2)。細胞を洗浄後、生細胞50000cellsに調整し、Cell Counting Kit-8※を用いてNAD活性を測定し、比較検討を行った。

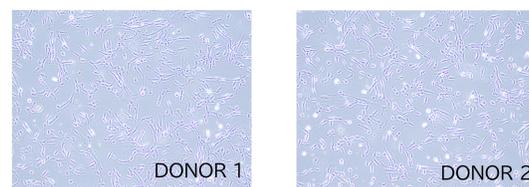


Fig.1 幹細胞の様子

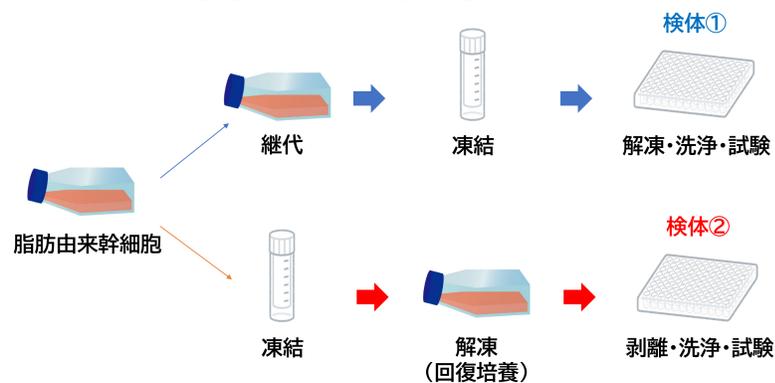


Fig.2 検体作製方法

※Cell Counting Kit-8

テトラゾリウム塩(WST-8)と電子伝達物質(1-Methoxy PMS)が含まれている。WST-8は、NADHから1-Methoxy PMSを介して電子を受け取ることで還元され、WST-8ホルマザン(極大吸収波長450 nm)を生成する。本来は細胞数の測定を目的として使用されるが、本研究においては上記の原理により細胞の呼吸活性を測定することで活性比較の指標とした。

結果

測定結果

450nmの吸光度について、検体①を1.0とした相対比で表した(Fig.3)。450nmの吸光度はWST-8ホルマザンの量を反映しており、WST-8ホルマザンが多いほどNADHが多い、すなわち代謝活性が高い状態と言える。よって本研究において、回復培養後の細胞の代謝活性は解冻直後の3倍以上であることが確認された。つまり、細胞の代謝活性は凍結により3分の1以下に低下することが示唆された。

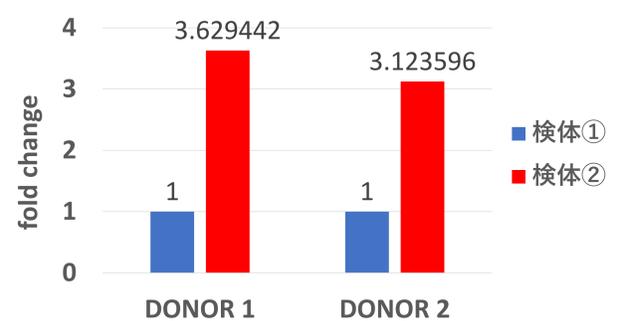
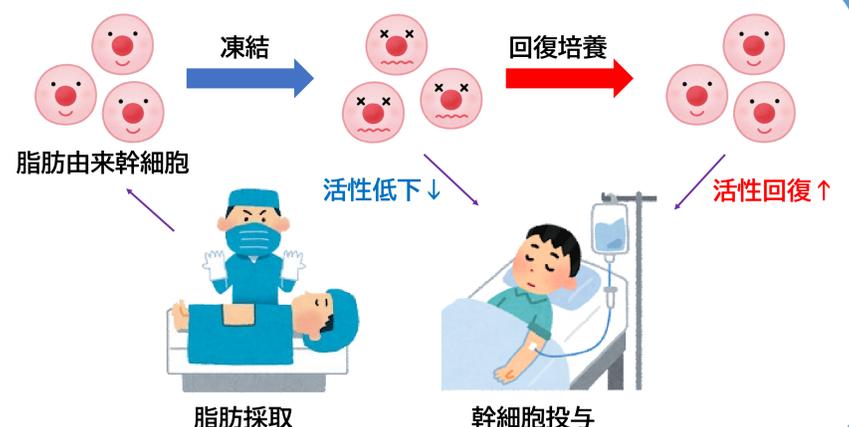


Fig.3 CCK-8測定値(OD450)

考察

脂肪由来幹細胞を用いた再生医療を提供する医療機関の中には、細胞製造の外部委託や投与スケジュール調整等の事情により、投与直前に凍結細胞を解冻して治療に用いる機関も少なくない。しかし本研究結果から、解冻直後の細胞は凍結のダメージにより細胞の活性が3分の1以下に低下していることが示され、このことが治療効果に影響を与える可能性は否定できない。今回は少数例での検討であったため、今後さらなる追加検討及び他の条件における代謝活性についても検討していく必要がある。また、サイトカイン等分泌物の定量により治療効果への影響についても検討が可能である。



筆頭演者: 小村 泰雄

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業などはありません