

DMSOフリーで高細胞生存率の細胞保存液

SOFORO Cryo

DMSO
-free

Serum
-free

Protein
-free

Xeno
-free



SOFORO Cryo

目次

1. はじめに	2
2. 特 徴	3
3. 成分および性状	3
4. 用 途	3
5. 使用方法	4
6. 凍結保存実績	5
7. 接着性・増殖性評価	6
8. 分化能評価	7
9. スフェロイド凍結保存効果	8
10. SOFORO Cryoのメカニズム解析	9
参考文献	10

1. はじめに

再生医療とは、病気やけがによって失われた機能を人体が持つ細胞や再生能力を利用して治療することです。そのメリットは、既存の医薬品では治療が難しい疾患に対しても効果を発揮できる点にあります¹⁾。また、日本における再生医療等製品の承認数も徐々に増えており、特に細胞移植の市場が今後伸びていくことが予測されています²⁾。

細胞の凍結保存は細胞の維持や輸送などにおいて必須の技術であり、そこで用いられる凍結保護剤は凍結保存時に形成される氷晶を抑制することで細胞への損傷を低減させる役割があります³⁾。凍結保護材で最も多く用いられているジメチルスルホキシド(DMSO)は高い凍結保護効果を持つ一方で毒性や幹細胞の分化への影響が懸念されていることから⁴⁾、DMSOフリーの保存液が求められています。

SOFORO Cryoは、細胞毒性や分化への影響が低い凍結保護成分として糖脂質であるソホロースリピッド(SL)に着目し、これを用いた細胞保存液として開発されました。**SOFORO Cryo**の凍結保存効果の評価は、凍結保存後の細胞生存率に加え、凍結融解後の接着性や増殖性、分化能についても評価を行いました。また、2次元培養細胞だけでなく、3次元培養で形成させたスフェロイドの凍結保存効果も確認しています。

SOFORO Cryo

2. 特 徴

- ソホロースリピッド配合の細胞用凍結保存液
- 細胞の性質に影響がなく、凍結保存が可能
- DMSO、動物由来の成分、血清を一切含まない
- 培養培地と1:1で混ぜるだけで凍結保存が可能
- 細胞毒性が低く、解凍後そのまま培地中に添加可能

3. 成分および性状

成 分：

グリセリン、ソホロースリピッド、無機塩類

性 状：

無色透明液体

pH:7.0~8.0

4. 用 途

細胞の凍結保存

SOFORO Cryo

5. 使用方法

細胞の凍結工程：

1. 細胞を遠心分離にて回収します。
2. 上澄み液をアスピレーターにて除去後、培養培地と**SOFORO Cryo**を1:1となるように加え^{※1}、やさしくピペッティングします^{※2}。
3. 混合させた細胞懸濁液をクライオチューブに分注し、-80℃ディープフリーザーで凍結保存します^{※3}。
4. -80℃で凍結した細胞は液体窒素でも保存できます。

※1 終濃度が $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個 / mLになるように調製してください

※2 細胞種によってはピペッティング後に室温で15分～30分静置することで細胞に浸透し、良好な結果が得られる場合があります

※3 細胞種によっては市販の凍結保存容器あるいはプログラムフリーザーにて緩慢凍結を行うことで良好な結果が得られる場合があります

細胞の解凍工程：

1. 凍結しておいた細胞のクライオチューブを37℃恒温槽中にて振りながら速やかに融解します。
2. 融解後、やさしくピペッティングし、培養培地に添加し、通常の方法で培養します。

6. 凍結保存実績

SOFORO Cryoの保存実績について、まとめたものを表1に示します。

表1 SOFORO Cryoにて保存実績のある細胞一覧

細胞種	生存率	備考
bMSC (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞)	80-95%	
aMSC (ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞)	80-95%	2年以上凍結保存確認済
ヒトiPS細胞	80-90%	
HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞)	70-80%	2年以上凍結保存確認済
SIRC (ウサギ角膜上皮細胞)	85-95%	2年以上凍結保存確認済
TIG-103株 (正常ヒト皮膚線維芽細胞)	85-95%	
HeLa細胞	85-95%	2年以上凍結保存確認済
ヒトメラノーマG361株	80-90%	
マウスメラノーマB16株	75-85%	
NHDF (正常ヒト皮膚線維芽細胞)	90-95%	2年以上凍結保存確認済
HEK293 (ヒト胎児腎細胞)	90-95%	2年以上凍結保存確認済
CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞)	80-90%	
Hep-G2 (ヒト肝臓がん由来細胞)	80-90%	

SOFORO Cryo

7. 接着性・増殖性評価

7-1 凍結融解後の細胞接着性評価

SOFORO Cryo によって凍結保存したヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞について、シャーレへ播種 16 時間後の接着効率を他社品と比較した結果を図 1 に示します。DMSO フリーでありながら DMSO 含有製品と同等の接着性が確認されました。

-80℃で凍結融解後に細胞を播種し16時間後に接着効率を確認

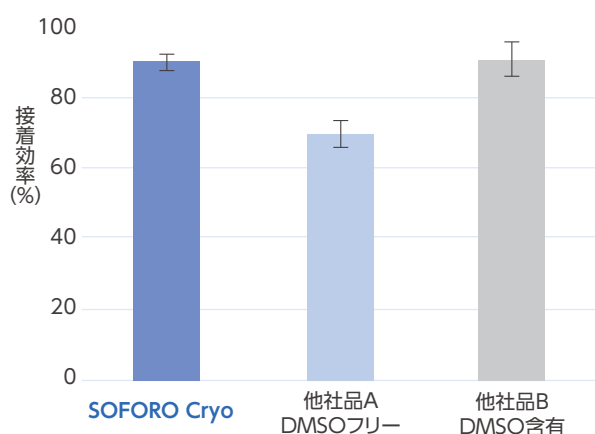


図1. 細胞接着性評価

7-2 凍結融解後の細胞増殖性

SOFORO Cryo によって凍結保存したヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞について、融解後に遠心による洗浄工程を行わずに培地へ添加し、細胞の増殖を確認した結果を図 2 に示します。融解後の洗浄工程を行っていないにもかかわらず、未凍結の細胞と同程度に増殖していることが確認されました。

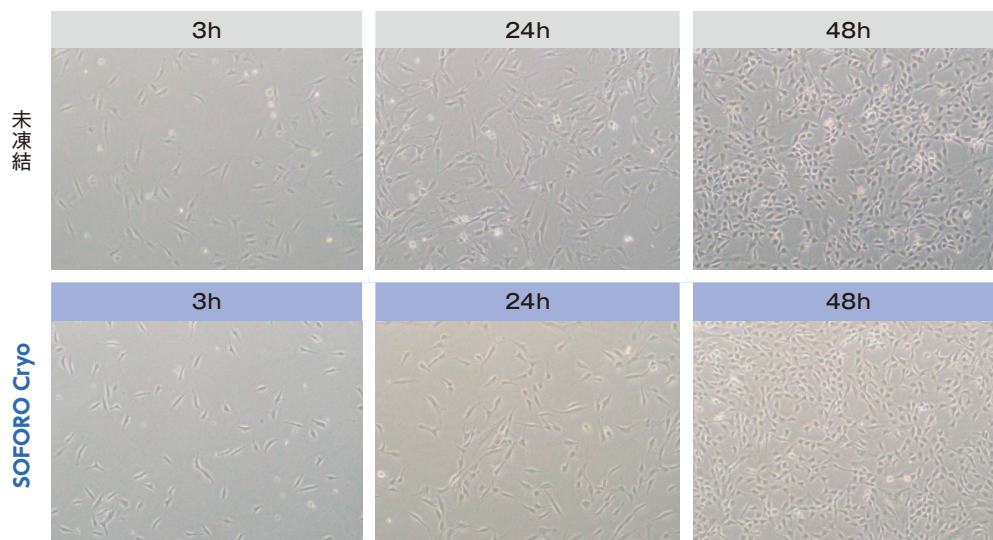


図2. 細胞増殖性の様子

SOFORO Cryo

8. 分化能評価

SOFORO Cryo によって凍結保存したヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞について、脂肪細胞および骨芽細胞へ分化させた場合の影響を評価しました。脂肪細胞はオイルレッド染色、骨芽細胞はアリザリンレッドで染色し、顕微鏡での観察、吸光度による定量評価した結果を図3に示します。**SOFORO Cryo** によって幹細胞を凍結保存しても分化能に影響がないことが確認されました。

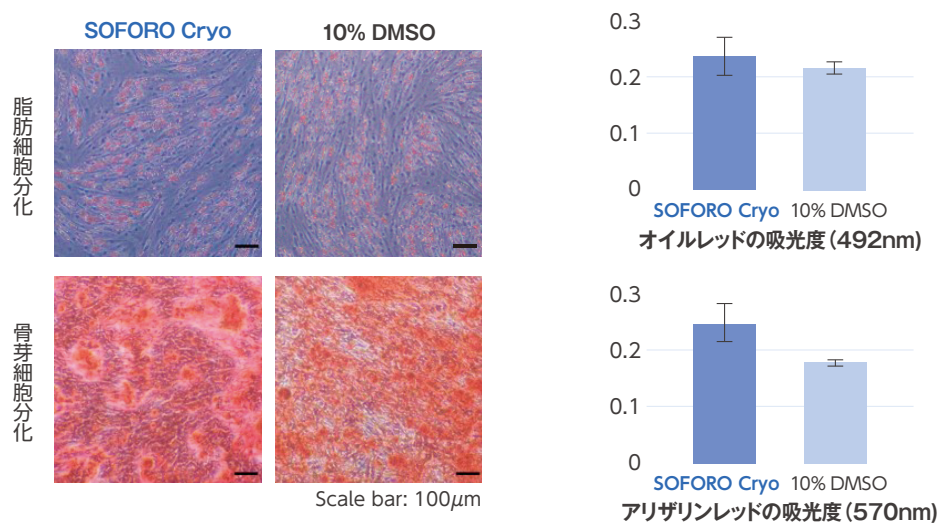


図3. 分化能評価

SOFORO Cryo

9. スフェロイド凍結保存効果

低吸着U底96ウェルプレートを用いて、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 1×10^5 個のスフェロイド（細胞凝集塊）を作製し、**SOFORO Cryo** によって凍結保存が可能かどうか評価を行いました。細胞生存率は凍結融解後のスフェロイドを酵素処理し、シングルセルの状態のものをトリパンブルー染色にて計測を行いました。その結果を図4に示します。この結果より、**SOFORO Cryo** でスフェロイドの凍結保存が可能であることが確認されました。

また、凍結融解後のスフェロイドの凍結切片を作製し、蛍光観察を行いました。その結果を図5に示します。図5より、融解後のスフェロイドの構造が維持されているのが確認されました。

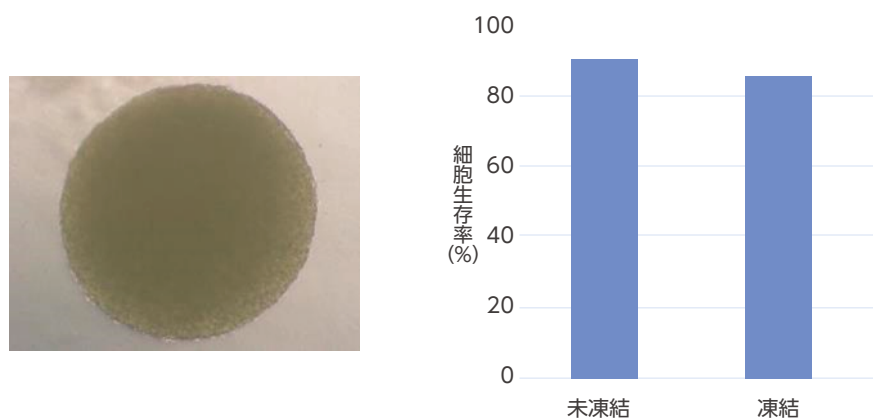


図4. スフェロイドの凍結保存(左図がスフェロイド、右図が評価結果)

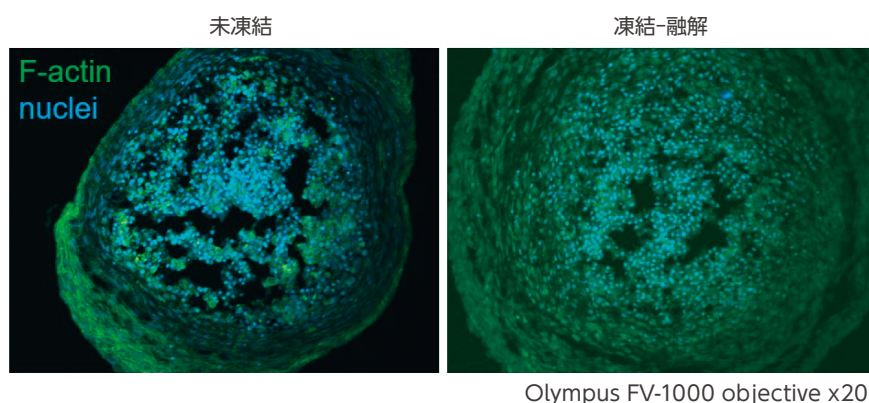


図5. スフェロイドの中心部の観察

10. SOFORO Cryo のメカニズム解析

10-1 ソホロースリピッドの氷晶抑制効果

走査型プローブ顕微鏡 (AFM5000/AFM5300、日立ハイテクサイエンス製) の冷却ステージにて試験試料 (水、水+ 0.1% ソホロースリピッド、水+ 10% DMSO) を凍結させ、顕微鏡で観察した結果を図 6 に示します。水を単体で凍結した場合にはサイズの大きい氷晶が形成されていますが、ソホロースリピッドを添加することにより、DMSO と同様に氷晶サイズが抑制されていることが確認されました。

※本試験は大阪大学ナノテクノロジー設備共用拠点の支援で実施 (課題: A-17-OS-0053)

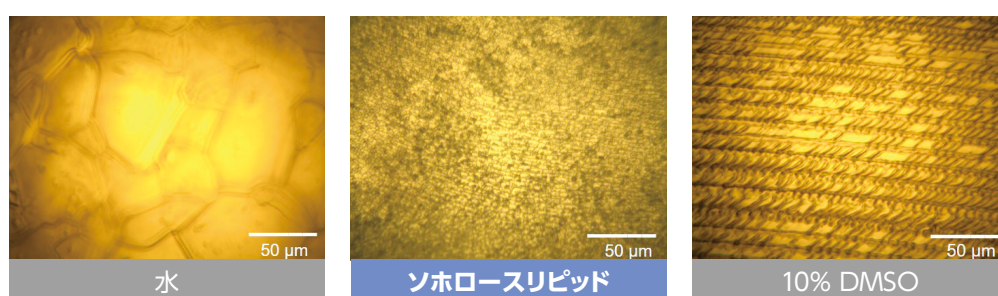


図6. ソホロースリピッドの氷晶抑制効果

10-2 ソホロースリピッドの細胞に対する毒性評価

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を 96 well プレートで培養し、各界面活性剤を混合させた培地を添加しました。48 時間培養後に MTT アッセイを行い、細胞生存率を算出した結果を図 7 に示します。他の界面活性剤と比較して、ソホロースリピッドの細胞毒性が低いことが確認されました。

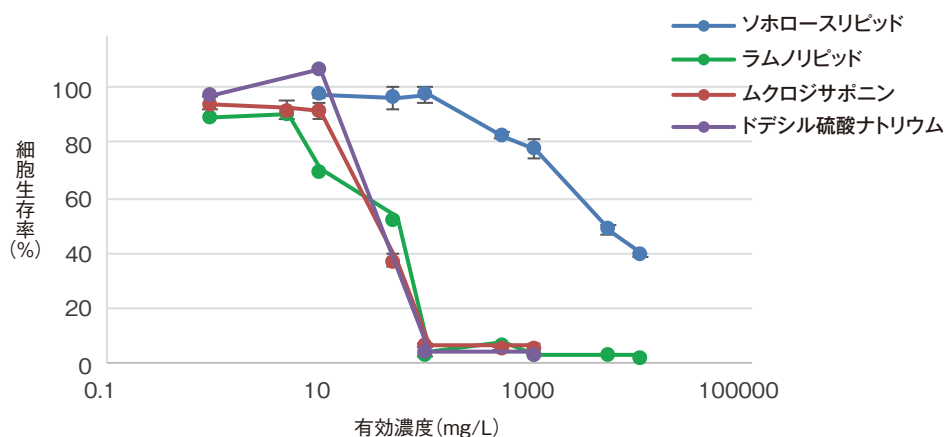


図7. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞に対する各界面活性剤の毒性

SOFORO Cryo

10-3 凍結保護剤の細胞に対する毒性評価

凍結保護剤の DMSO または **SOFORO Cryo** に配合されているグリセリンの毒性を評価するために細胞毒性評価を行いました。ヒト正常新生児線維芽細胞を 96 well プレートで培養し、DMSO またはグリセリンを段階希釈させた培地を添加しました。48 時間培養後に WST-8 アッセイを行い、細胞生存率を算出した結果を図 8 に示します。グリセリンが DMSO より低毒性であることが確認されました。

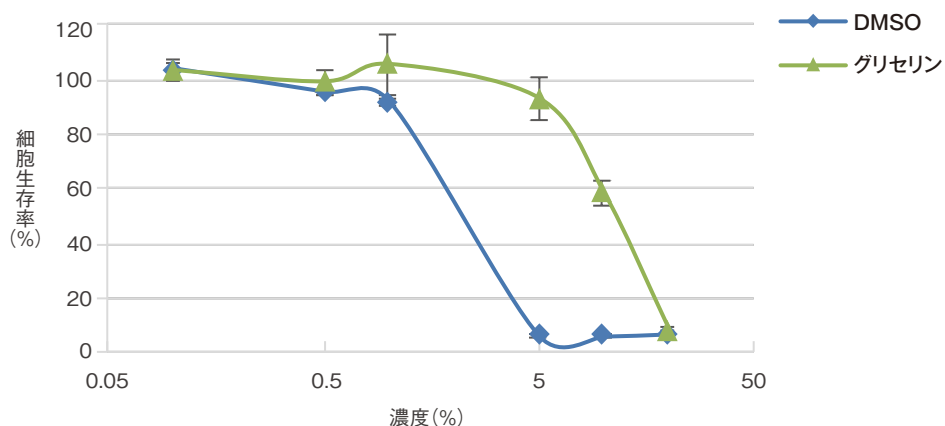


図8. ヒト正常新生児線維芽細胞に対する溶剤の毒性

10-4 安全性試験

ソホロースリピッドについて動物試験による安全性データを次に示します。

急性毒性：LD₅₀(経口)マウス：12.5 g/kg(比較食品、ビタミンC：LD₅₀値 11.9 g/kg)
眼に対する重篤な損傷/刺激性：無刺激あるいは軽度の刺激(Draize法)

● 参考文献

- 1) 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 平成 30 年度「再生医療等製品とその競合技術の比較調査報告書」
- 2) 内閣官房 令和元年度補正予算調査事業「医薬品・再生医療・細胞治療・遺伝子治療関連の産業化に向けた課題及び課題解決に必要な取組みに関する調査報告書」
- 3) Tie Chang and Gang Zhao「Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges」
Adv. Sci. 2021, 8, 2002425
- 4) Z W Yu, P J Quinn「Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology」
Biosci Rep. 1994 Dec;14(6):259-81.

サラヤ株式会社

〒546-0013 大阪市東住吉区湯里2-2-8
<https://www.saraya.com/>

お問い合わせ先 TEL.06-6797-2525

(受付時間：平日 9:00～18:00)