

過冷却保存および高静水压印加による 脱細胞化手法の確立

2020 年度

善明 大樹

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	善明 大樹
主 論 文 題 名 : 過冷却保存および高静水压印加による脱細胞化手法の確立				
脱細胞化組織は生体組織から細胞を除去することで得られる三次元的な細胞外マトリクス(ECM)である。脱細胞化組織作製法の一つである高静水压印加処理法は、薬剤残存のリスクがなく大型の三次元組織や臓器に適用できるメリットがある。しかしながら、高レベルの静水压を印加した際は ECM が損傷し、低レベルで印加した際は細胞除去が不十分という問題が存在する。そこで、過冷却保存に着目した。過冷却は凝固点以下で液体状態のことを指し、氷晶による物理的損傷が生じない。凍結保護剤フリーで過冷却保存した場合、ECM は保持したまま細胞内外の浸透圧差により細胞にダメージが生じると考えられる。本研究では、過冷却保存と静水压印加を複合化することにより、既存の手法よりも低レベルの静水压印加で脱細胞化効果を向上させることを目的とした。具体的には、過冷却状態で保存可能なデバイスを開発し、細胞懸濁液および三次元培養体を過冷却保存後静水压を印加することによる影響について検討した。 第 1 章では本研究の背景および研究目的について記載した。 第 2 章では本研究で開発した、細胞懸濁液および三次元培養体を過冷却状態で保存可能なデバイスについて示した。また、過冷却デバイスの性能およびチャンバ内で静置した溶液の温度制御方法について検討した。さらに、過冷却チャンバ内に白金電極を挿入することで、試料に対する凍結状態と過冷却状態の判別を電気インピーダンスにより評価可能であるか検討した。 第 3 章では細胞懸濁液を凍結保護剤フリー下で過冷却保存することによる影響について検討した。過冷却デバイスを用いて細胞懸濁液を凍結状態、冷蔵状態、および過冷却状態で 0~36 時間保存した。保存後、細胞生存性、初期接着性および細胞増殖性について比較し、考察した。 第 4 章では過冷却保存と静水压印加の複合化が細胞構造および細胞機能に与える影響について検討した。過冷却チャンバ内で細胞懸濁液を過冷却保存後 100, 150, 200 MPa の静水压を印加し、細胞膜の微細構造、細胞生存性、初期接着性、および細胞増殖性について非保存群および冷蔵保存群と比較した。 第 5 章では細胞含有コラーゲンゲルに対する過冷却保存と静水压の複合化を印加が与える影響について検討した。細胞含有コラーゲンゲルを作製し、過冷却チャンバ内で過冷却保存後 100, 150, 200 MPa の静水压を印加した。印加後、細胞生存性、ゲル内部の DNA 残存率、およびコラーゲン繊維の構造について非保存群および冷蔵保存群と比較した。 第 6 章では本研究の結論および今後の課題について述べた。				

Thesis Abstract

No. _____

Registration Number	☒ “KOU” ☐ “OTSU” No. _____ *Office use only	Name	ZEMMYO, Daiki
Thesis Title Establishment of decellularization method by supercooling preservation and application of high hydrostatic pressure			
Decellularized tissues are extracellular matrices (ECMs) obtained by removing cells from living tissue. High hydrostatic pressure (HHP), which is one of the decellularization methods, can be applied to large three-dimensional tissues without the risk of residual drug. However, ECM is damaged when a high level of HHP is applied, and cell removal is insufficient when a low level of HHP is applied. Supercooling is the liquid state below the freezing point, and does not cause physical damage. By preserving the tissue in a supercooled state without a cryoprotectant, it is considered that cells are damaged due to osmotic pressure inside and outside the cells while retaining the ECM. In this research, the effect of decellularization by combining supercooling preservation and application of HHP is investigated. Specifically, the device that can be preserved in a supercooled state is developed, and the effects of applying HHP after preserving the cell suspension and three-dimensional collagen gel are examined. Chapter 1 describes the background and purpose of this research. Chapter 2 explains the supercooling device developed in this study and the performance of it. Furthermore, it is examined whether the frozen state and the supercooled state of the solution preserved in the device can be determined by the electrical impedance measurement. Chapter 3 describes the effects of supercooling preservation of cell suspensions under cryoprotectant-free conditions. Cell viability, initial adhesion, and cell proliferation are evaluated. Chapter 4 explains the effects of the combination of supercooling preservation and HHP on cell structure and cell function. After supercooling preservation of cell suspension, 100, 150, and 200 MPa of HHP are applied. Chapter 5 describes the effect of applying supercooling preservation and HHP on cell embedded collagen gel. Cell embedded collagen gels are manufactured and preserved in supercooling state. After preservation, 100, 150, and 200 MPa of HHP are applied, and then cell viability, DNA remaining inside the gel, and collagen fiber structure are evaluated. Chapter 6 presents conclusions of this study and future works.			