

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：51401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05850

研究課題名(和文)再生医療用細胞の超急速冷凍保存技術を志向した超流動ヘリウムによる高度冷却法の研究

研究課題名(英文) Study on Hyper Rapid Cooling Technique using Cryogenic Fluid to Living Cells for Regenerative Medicine

研究代表者

野澤 正和 (NOZAWA, Masakazu)

秋田工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：60447183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療用細胞の凍結・融解後の生存率向上のため、極低温流体による浸漬冷却時の冷却速度を改善を試みた。浸漬冷却時に冷却試料表面に発生する、沸騰状態の抑制のため、容器表面を金属メッシュで覆い、表面形状の変化による伝熱特性の変化を明らかにした。金属メッシュで覆うことで、冷却開始直後に発生する膜沸騰時の容器表面の温度上昇を抑制できることが確認できた。また、非定常熱伝導方程式より、液体窒素と液体ヘリウムによる冷却時の温度変化を比較を行った。液体ヘリウムによる冷却のほうが、液体窒素に比べて、冷却開始からの温度低下は早くなるが、冷却速度に大きな違いは無いことが確認できた。

研究成果の概要(英文)：The temperature distribution of the simulated living tissue is measured for the improvement of the cooling rate during cryopreservation when the surface condition of the test sample is changed by covering the stainless steel mesh. The variation of the transient temperature with mesh by the directly immersion in the liquid nitrogen is measured. The temperatures on the sample surface and the inside of the sample are measured by use of type T thermocouples. It is confirmed that on the sample surface there is the slightly temperature increase than that in the saturated liquid nitrogen at the atmospheric pressure. It is found by the comparison of the degree of superheat with or without the mesh that the surface temperature of the test sample with the mesh is lower than that without the mesh. On the other hand, the time series variations of the temperature located in the center of the sample does not change with or without the mesh.

研究分野：熱工学

キーワード：急速冷却 極低温流体 凍結保存 沸騰抑制 伝熱特性

1. 研究開始当初の背景

再生医療分野における、iPS/ES 細胞の長期保存において、凍結保存技術の改善は必須といえる。特に、ヒト iPS/ES については、凍結保存における凍結、融解後の生存率が低く、生存率改善のための凍結保存技術が求められる。凍結保存における細胞の生存率は、冷却速度や凍結保護物質の種類や濃度に依存する。その中で、高冷却速度を実現することが、生存率改善の一つの手段である。現在、高冷却速度を実現するためには、一般的に液体窒素による浸漬冷却が用いられている。一方、浸漬冷却時には冷却対象表面で激しい沸騰が発生することになる。つまり、発生した蒸気により、伝熱が阻害され、結果として伝熱特性が低下する。よって、浸漬冷却時の伝熱特性の改善が求められる。

このような背景において、高冷却速度を実現するためには、2 つの改善方法がある、一つは、液体窒素よりもさらに低温の流体を用いることである。液体窒素よりも低温の流体として、液体ヘリウムや液体水素が挙げられる。また、液体ヘリウムにおいては、温度が 2.17 K 以下では超流動ヘリウムとなり、高い冷却の実現が期待できる。もう一つは、浸漬冷却時に発生する沸騰状態の抑制である。沸騰状態の抑制として、いくつかの改善策が挙げられるが、試料表面の形状を変化させることが改善方法の一つである。

2. 研究の目的

本研究では、凍結保存における急速冷却時の冷却速度の改善のために、液体ヘリウムを用いて浸漬冷却した場合の、伝熱特性を把握し、その優位性と実現可能性について検討する。次いで、試料表面の沸騰状態の抑制のため、試料表面を金属メッシュで覆った場合の伝熱特性の変化を明らかにする。具体的には、

3. 研究の方法

実験装置の全体の概略図を図 1、試験部の概略図を図 2 に示す。生体組織を模擬した試料として濃度 1.5 wt% の寒天を使用し、 $\phi 8.2 \times 45$ の容器に満たした。寒天を模擬生体組織として利用したのは、寒天と同様に生体組織の細胞は約 75% が水分であり、また入手と製造が容易であることから採用した。温度センサは、T 型熱電対を使用した。T 型熱電対は、低温領域の起電力特性に優れていて、液体窒素温度においても、高い精度で温度計測を行うことができる。寒天内部中心部と寒天容器の外側に設置した。内部の熱電対は、寒天に挿入する際に実験ごとのズレを少なくするために、セラミックの棒で円筒容器上部から 31 mm、容器表面から 4 mm の深さの位置に固定した。表面の形状を変化させるために、三種類のメッシュを用意した。1 inch あたり 30, 60, 200 mesh のステンレス製のメッシュを使用し、各メッシュの空孔のサイズはそれぞれ 0.597, 0.283, 0.067 mm である。また、メ

ッシュの厚さはそれぞれ、0.25 mm, 0.14 mm, 0.04 mm である。メッシュの厚さは、使用されているワイヤーの直径とした。使用した寒天容器とメッシュを図 3 に示す。寒天容器表面に巻くメッシュは、結束バンドを用いて、容器表面に設置した温度センサを覆うように固定した。温度計測には、メモリーハイコダでデータの取得を行い、液体窒素は、77 K の飽和状態を真空断熱容器に入れて使用した。

4. 研究成果

(1) 浸漬冷却時の非定常温度変化

図 4 に、浸漬冷却時の非定常熱伝導時の温度変化を示す。計算は、誤差関数を用いた非定常熱伝導方程式を用いて計算した。

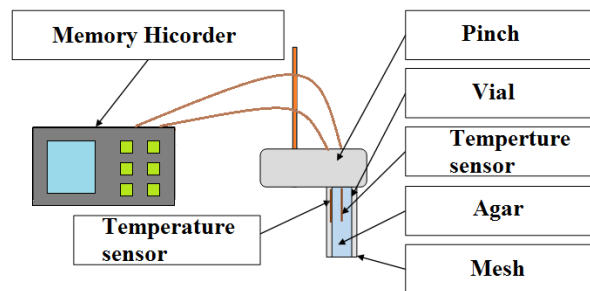


図 1 実験装置全体の概要図

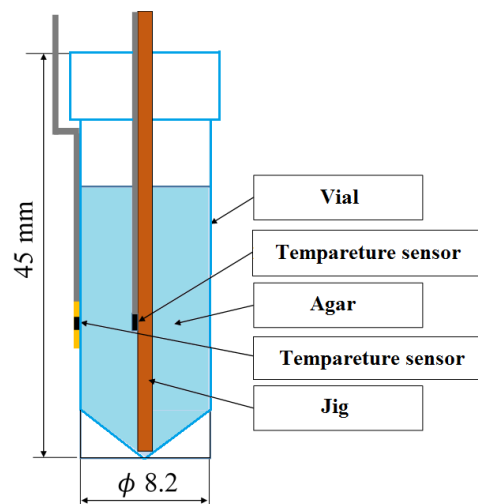


図 2 試験部の概要図

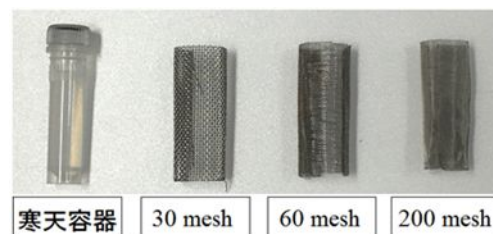


図 3 寒天容器とメッシュの写真

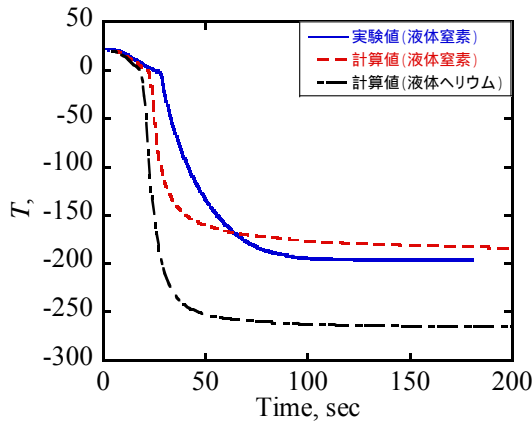


図 4 非正常温度変化の比較

$$\frac{T - T_1}{T_0 - T_1} = \text{erf}\left(\frac{x}{2\sqrt{at}}\right)$$

ここで、 T_0 は初期温度 (20)、 T_1 は冷媒の温度 (液体ヘリウム 4.2 K、液体窒素 77 K)、 x は試料表面からの位置 (4 mm)、 t は時間、 a は熱拡散係数である。

結果より、液体窒素に比べ、液体ヘリウムによる浸漬冷却のほうが、速やかに冷却が可能であることが分かった。一方、両条件とも、0 から急激に温度が低下するが、この領域の平均冷却速度は、両条件とも約 1200 /min 程度であることが分かった。

(2) 寒天容器内部と寒天容器表面の温度変化

各メッシュの寒天容器内部の温度変化を図 5 に示す。縦軸が温度 T 、横軸が時間 t を表している。約 0 以下では、温度が急激に低下していることが分かる。これは、細胞内の水分が 0 に達したため氷へと相変化し、物性が変化したためと思われる。水の熱伝導率が 0.569 W/mK であるのに対し、氷の熱伝導率は、2.2 W/mK となっており、氷への相変化により、熱伝導率は約 4 倍増加する。

各メッシュの寒天容器表面の温度変化を図 6 に示す。縦軸が温度 T 、横軸が時間 t を表している。どのメッシュにおいても、冷却開始直後に液体窒素付近まで温度が急激に低下していることが分かる。しかし、すぐには液体窒素温度の定常状態にはならず、液体窒素温度よりもわずかに高い温度で細かい温度変動を経た後に、液体窒素温度に達している。この範囲では、寒天容器表面で沸騰現象が起きていると考えられる。この領域の温度変動を拡大したグラフを、図 7 に示す。縦軸は温度 T から過熱度 ΔT に変更し、液体窒素温度からの温度差として示している。横軸は同様に時間 t を表している。メッシュ無しの場合では、過熱度が 0 秒から 40 秒の間で急激に上昇して、その後低下していることが分かる。過熱度が上昇している範囲

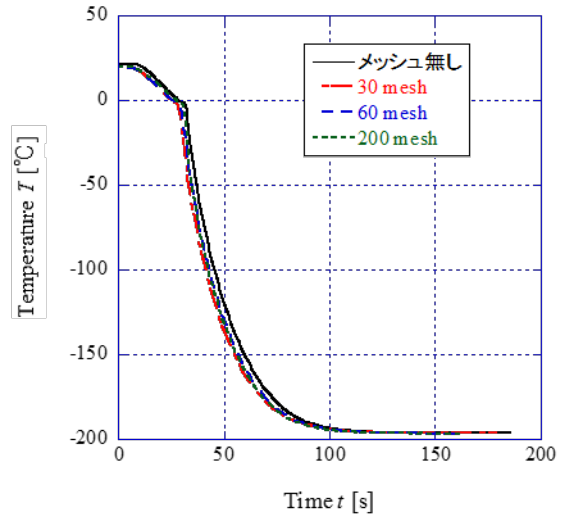


図 5 寒天容器内部の温度変化

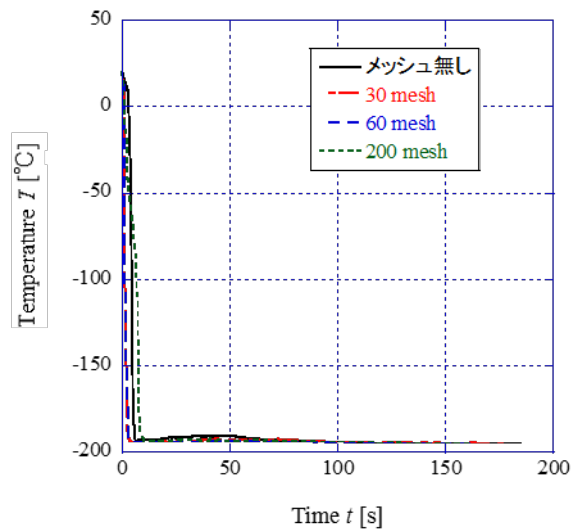


図 6 寒天容器表面の温度変化

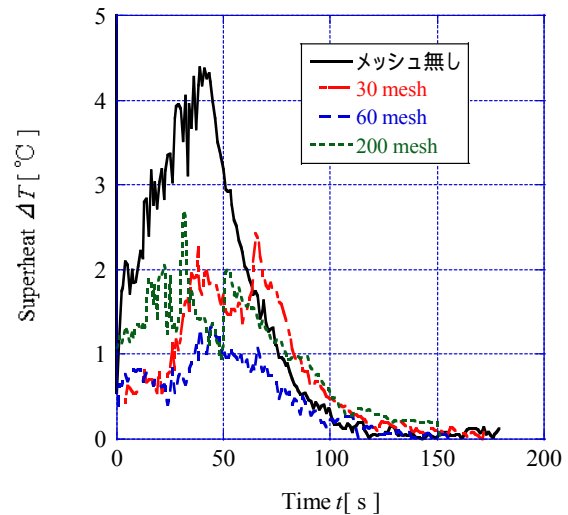


図 7 寒天容器表面の過熱度と時間の関係

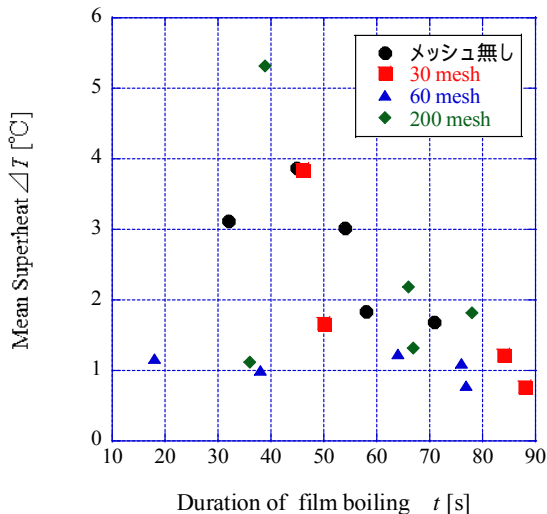


図 8 寒天容器表面の膜沸騰時の平均過熱度と膜沸騰時間の関係

では、膜沸騰が発生しており、低下している範囲では核沸騰へ遷移していると考えられる。この膜沸騰が液体窒素の流動を阻害している、冷却対象の冷却を妨げていると考えられる。メッシュを巻いた場合には、メッシュを巻いていない場合と比べて過熱度が全体的に低くなっていることが分かる。そのためメッシュを巻くことによって、膜沸騰をある程度抑制することができると考えられる。

(3) 寒天容器表面の過熱度と表面形状の関係

冷却時に発生する膜沸騰現象のメッシュによる影響について考察する。図 8 に寒天容器表面の膜沸騰時の平均過熱度と膜沸騰時間の関係を示す。縦軸が平均過熱度 ΔT 、横軸が膜沸騰の持続時間 Δt である。ここで、膜沸騰の持続時間は液体窒素浸漬後に過熱度が上昇した部分から過熱度が最大値に達するまでの時間としている。沸騰時間が長くなることにしたがって、過熱度が低くなる傾向にあることが分かる。30 mesh では、メッシュを巻いていない場合よりも過熱度が低くなることもあるが、メッシュが比較的粗いため、メッシュ無しの場合と同様の傾向になることが多かった。60 mesh は、安定して低い過熱度となっており、冷却対象表面の沸騰を抑え、冷却速度を向上させる目的としては、最も有望だと考えられる。対して 200 mesh では、実験ごとのばらつきが多くなっている。これは、他のメッシュに比べて目が細かいため、液体窒素の侵入が阻害されるため、良好な冷却ができなくなることが多くなるためと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Masakazu Nozawa, Sho Hatakeyama, You Sugimoto and Hiyu Sasaki, “Effect of surface condition to temperature distribution in living tissue during cryopreservation”, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, Vol278, Conference1, 2017

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 杉本 陽、大久保 航、野澤 正和、「生体組織の凍結保存における冷却速度促進に関する研究」、日本機械学会 東北学生会第 48 回学生員卒業研究発表講演会、707、平成 30 年 3 月、福島

2. Masakazu Nozawa, Sho Hatakeyama, You Sugimoto and Hiyu Sasaki, “Effect of surface condition to temperature distribution in living tissue during cryopreservation”, 2017 Cryogenic Engineering Conference, July 2017, Madison, USA

3. 畠山 翔、杉本 陽、佐々木 斐裕、野澤 正和、「凍結保存における模擬生体組織を用いた温度分布の計測」、日本機械学会 東北学生会第 47 回学生員卒業研究発表講演会、705、平成 29 年 3 月、宮城

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野澤 正和 (NOZAWA Masakazu)

秋田工業高等専門学校 創造システム工学科 機械系

准教授

研究者番号：60447183

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()

(4) 研究協力者

畠山 翔 (HATAKEYAMA Sho)

杉本 陽 (SUGIMOTO You)

佐々木 斐裕 (SASAKI Hiyu)

大久保 航 (OHKOB0 Wataru)