

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650305

研究課題名（和文） 組織と臓器の超速解凍技術

研究課題名（英文）

Ultra-rapid defrosting techniques of cryopreserved tissues and organs

研究代表者 中村 真人 (NAKAMURA MAKOTO)

富山大学 大学院理工学研究部（工学） 教授

研究者番号：90301803

研究成果の概要（和文）：

生きた組織や臓器を長期凍結保存する技術の必要性が高まっているが、未だ有効な技術がない。細胞と異なり大きな組織や臓器の凍結では凍結と解凍の両工程で傷害が起きる。凍結過程の技術開発が進みつつあるが、解凍過程は全く有効な手だてではない。そこで、電磁誘導で金属が発熱する仕組みを利用して血管内部から高速で解凍する方法を考案した。電磁調理器の改造、電磁波で発熱する人工赤血球の開発を行い、可能性検討を試みた。

研究成果の概要（英文）：

The necessity for the technologies of cryopreservation of living tissues and organs is increasing. We have not yet effective means for cryopreservation of tissue and organ especially for the defrosting process, where the cryo-injury process advances both during freezing process and during thawing processes. Then, we devised and challenged to develop an ultra-rapid defrosting technique, in which tissues can be defrosted extremely rapidly from the inside of the blood vessels by electro-magnetic induction. In this study, the electromagnetic induction heating cookers were converted and the production of the artificial red blood cell which generates heat by electromagnetic induction was challenged.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：臓器保存、再生組織、凍結保存、解凍、人工赤血球

1. 研究開始当初の背景

・背景・動機①：凍結保存技術の必要性：2008年国際移植学会、世界保健機構が臓器売買、移植ツーリズム、移植臓器の商業化に反対するイスタンブール宣言を発表した。移植用臓器の慢性的絶対的な不足は世界的な問題になっている。問題の本質は他人から臓器をもらう必要があるところにある。臓器は科学の力で作るべきとの考えから、細胞から組織・臓器を作って治療に用いようと組織工学・再生医療の研究開発が始まった。先達の数多くの研究の積み重ねにより、培養皮膚や

培養軟骨などが工学的に作製できるようになり、臨床応用もできるようになってきた。もし、来るべき再生医療の時代に、これらの生きた組織や臓器を長期保存できれば、臓器不足の問題解決や組織工学・再生医療の産業化にも絶大な貢献ができると想定される。
・背景・動機②：組織・臓器の凍結保存技術：生きた組織や臓器を長期保存するには、凍結保存が理想である。しかし、凍結保存は、まだ確立された細胞のみに限られ、組織や臓器では全く確立されていない。申請者らは、自作した可視化装置を用いて、細胞や組織の凍

結現象を可視化する研究に取り組み、凍結傷害の要因を観察してきた。可視化実験を通して確認できた凍結傷害のメカニズムをまとめると、細胞内・細胞外の氷晶形成による細胞の凍結傷害、特に組織や臓器の凍結では大きさがあるゆえ空間的な温度差が伴い、凍結・解凍の部位による時間差が生じる。そのため、組織構造における細胞間や細胞と細胞外マトリクス間の結合が傷害され、組織構造がダメージを受ける。しかもこれらの傷害現象は、凍結と解凍の両過程で起きる。したがって、氷晶形成や凍結の時間差を防ぐには、組織や臓器全体を「瞬間凍結」、さらに「瞬間解凍」する必要がある。

・背景・動機③：CAS (Cell Alive System) 法：近年、瞬間凍結の方法として、CAS 法が開発され注目されている。電磁波をかけて組織内の水分子を振動させながら温度を下げ、過冷却状態を作り出し、そこで電磁波を止めて、一気に全体を凍結する。この方法で組織全体の瞬間凍結を実現し、それによって組織はガラス化して氷晶が生じないと、食品業界で効果が謳われている。しかし、解凍の過程では、電子レンジでの解凍でもわかるように、電磁波をかけても凍結した水分子は振動せずすぐには融解しない。結局表面からの加熱しかできないため、融解には時間がかかり、氷晶の成長の問題や、大きな組織や臓器を加熱する場合に必然的に生じる表面と内部の大きな温度差、解凍の時間差による組織傷害は、依然未解決のままである。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、そこで、本研究では、組織や臓器の凍結解凍の新技术として、電磁誘導で金属が発熱する仕組みを利用して血管内部から高速で解凍する方法を考案し、『組織と臓器の超速解凍法』としてその可能性を検討することを目的とした。

○超速解凍法の概要(案)

組織・臓器のかん流保護液に、金属微粒子入りのマイクロビーズを人工赤血球として加えたものを用いる。これで臓器をかん流し、金属微粒子を組織全体に分布させてから凍結する。解凍過程では、凍結させた組織に電磁誘導をかける。すると金属微粒子がジュール熱で一斉に発熱する。金属微粒子は組織全体に毛細血管レベルで分布しているので、組織の内部全体に分散した熱源となる。その結果、凍結した組織・臓器全体が急速に内部からも加温解凍できるという図式である。

3. 研究の方法

本研究期間内に、(1) 凍結過程の評価システムの整備・検討、(2) 金属微粒子を含有する人工赤血球の作製、(3) 電磁誘導による熱源としての作用を証明すること、(3) 超速解凍への有効性を示すことを目標とした。

(1) 凍結過程の評価システムの整備・検討
申請者らはこれまで高速ビデオカメラを装着した顕微装置を自前でセットアップし、細胞、生体組織が瞬間的に凍結する過程を可視化してきた。本研究を進めるにあたって、凍結および解凍現象の評価を行う方法を確立する必要性を考え、そのための準備作業を行った。

評価法の確立のために、①現象の可視化、②組織細胞の生存率の評価方法の探索、を行い、評価法を確立することを目指した。具体的には、①として、これまで自作して進めてきた装置の課題を改良することを目指した。②としては、サンプルとして培養皮膚をサンプルに、凍結現象の可視化、生存率の評価を試みた。

(2) 金属微粒子を含有する人工赤血球の作製

人工赤血球の作製を目指して、インクジェットを利用したインクジェット式微粒子作製法を開発してきた。この技術と簡易作製装置を、改良を進めながら利用した。この手法、装置では、インク材にナノ粒子を加えることで、ナノ粒子入り微粒子が作製できる。

金属材料として、発熱性や温熱療法に利用されていることから鉄が材料として適していると考えた。ナノ磁性材料は材料のサイズ、電磁波の強度により温度の挙動が異なることが既に報告されていることから、本研究では入手可能であった直径 250nm、10nm のサイズの磁性ナノ粒子 (nanomag®-silica plain 250nm、10nm、コアフロント、東京) を準備し、実験に用いた。

インクジェット式微粒子作製装置でアルギン酸ナトリウム溶液をベースにしたインク溶液に上記ナノ粒子を懸濁混和し、インクジェットで吐出して赤血球サイズの微粒子の作製を試みた。

(3) 電磁誘導による熱源としての作用の検討

本実験では、電磁誘導で加温効果が認められるかを検証するにあたって、まず、実験の準備として、電磁誘導を負荷する装置が必要であった。そのための装置として、市販の IH ヒータ (efeel IHK700 アイリスオーヤマ、宮城) を購入し、装置の電気回路部を分解し改造して、この装置のコイル機構を利用して電磁波をかけられる装置とした。

実験ではまず磁性ナノ粒子を材料として、作製した電磁誘導負荷装置で加温効果があることを実験した。実験に伴い、温度計測のために熱電対を準備したが、電磁波の影響で熱電対自体の発熱が考えられたため、放射赤外線計測による非接触温度計を新たに準備し、実験を繰り返した。さらに、発熱の温度分布をサーモグラフィにて観測した。

4. 研究成果

(1) 凍結過程の評価システムの整備・検討

① 可視化装置の改良

当初の高速ビデオカメラを用いた自作装置では、温度計測ができない、温度制御もできない、その結果、実験の再現性を保てない装置という課題があった。また、ハロゲンランプを用いた光源であったため、熱の発生は避けようがなく、その結果、温度計測も不可能であった。そこで、これらの課題を解決するため、装置を改良して、温度を計測できるようにし、また温度制御ができる装置に改良した。また、光源も、LED照明を導入して、熱がかからない装置になった(図1)。

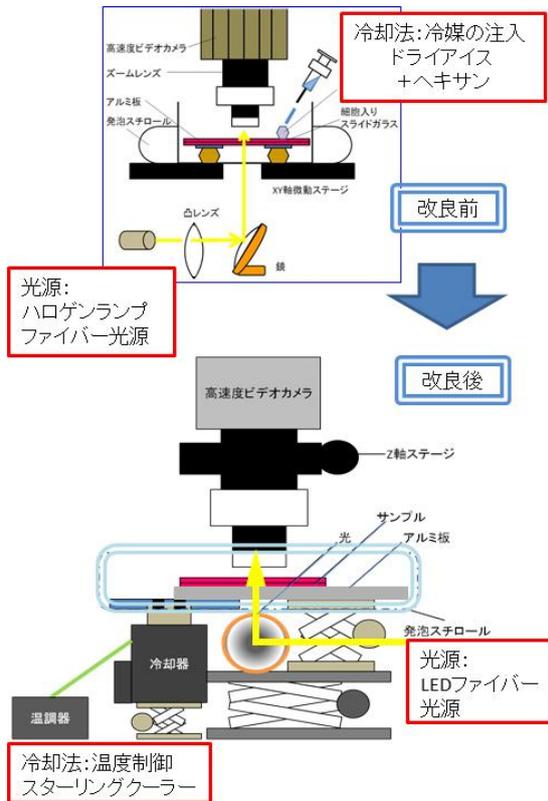


図1、観察装置の改良

スターリングクーラーの導入で温度計測と温度制御が可能になったが、冷却の仕組みから予想外に振動が激しく、顕微鏡観察では駆動ができないという問題がわかった。現在、冷却システムの見直しを行い、他の研究費を利用して、継続して装置の改良を進めている。

② 組織細胞の生存率の評価方法の探索

サンプルとして市販された培養皮膚(JEIS, JTEC、愛知)をサンプルとして、凍結現象の可視化、生存率の評価を試みた(図2)。気相に接する培養(図2-A)によってケラチノサイトは正常皮膚と同じように角質化していき、13日間の培養で組織切片を作ってみ

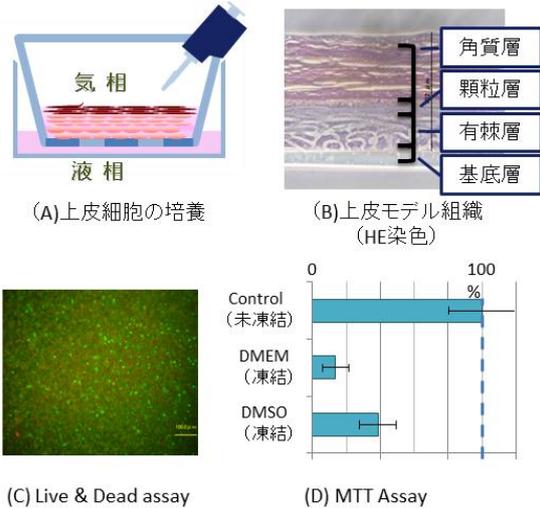


図2、培養皮膚上皮モデルによる評価法の探索

ると正常皮膚と同様な構造を呈していた(図2-B)。十分3次元組織モデルとして利用可能であると判断した。しかし、この組織の凍結によるダメージをいかに評価するか、が問題で、生存率判定でよく用いられている蛍光染色を利用するLive & Dead Assayでは、3次元組織であるがゆえに、表面からの観察のみでは観察が困難で、蛍光の重なりも多く定量評価は困難であることが判明した(図2-C)。そこで、代謝活性を測定するMTT assayを実施した(図2-D)(*参照)。Controlを100%として、通常の培地で凍らせたものと凍結保護材であるDMSOを添加し凍結したものを評価すると、その活性が定量化できた。ただし、代謝活性は直接の生死判定ではないこと、また温度の影響を受けることなどの問題がある。(この判定のために分光光度計を購入した。)臓器のような大きな組織になった場合の生死判定、機能判定は今後の課題である。

(* MTT Assay について

MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)は細胞の活性を評価する際にしばしば用いられる試薬である。MTTは細胞内部にあるミトコンドリア中にある脱水素と反応してホルマザンを産生する。ホルマザンは非水溶性の結晶で、生成後は沈殿する。これをイソプロパノール(またはやDMSO)などの有機溶媒で溶解させると赤紫色の溶液となり、570 nm(535 nm)の吸光度によって、ホルマザン産生量(=ミトコンドリア酵素活性≒細胞のviability≒細胞生存率)を測定することができる。死細胞では完全に失活しているので、これを指標に生存率や細胞数を評価するのに用いられている。

(2) 金属微粒子を含有する人工赤血球の作製

前述のインクジェット式微粒子作製法でアルギン酸ナトリウム溶液を基材として、磁性ナノ粒子入りの微粒子を作製した。装置を改良しつつ、作製微粒子のサイズを自由に制御することができるようになった。そして作製した 250nm 磁性ナノ粒子入りの微粒子を図 3 に示す。インクジェット式微粒子作製法では、インクジェットの均一な微小液滴作製能力の利用、自在なサイズコントロール、液滴の濃縮作用を持つことを特徴としており、そのおかげで、作製した微粒子はほぼ均一なサイズで、大きさも赤血球サイズ ($8\mu\text{m}$) とほぼ等しいサイズのものを作製することができた (図 3-B)。磁性ナノ粒子を添加したため、作製した微粒子も磁性を持ち、微粒子を集めたディッシュの下から磁石を動かすと、それに合わせて微粒子が操作できた (図 3-C)。また、SEM 像では、通常アルギン酸ナトリウム溶液のみで作製した微粒子に見られる微粒子表面を基として、磁性ナノ粒子と思われる微粒子の集塊、もしくはそれらがネットワーク化したような月面のクレーター状の隆起を呈している様子が観察された (図 1 D)。微粒子作製過程でのナノ粒子の凝集が影響しているものと考えられる。

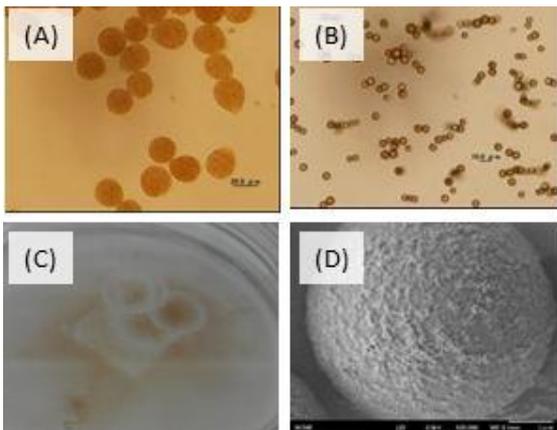


図 3、磁性ナノ粒子入り微粒子の作製。(A) 直径 $20\sim 25\mu\text{m}$ の微粒子、(B) 直径 $6\sim 9\mu\text{m}$ の微粒子、(C) 外部磁石による作製した微粒子の操作、(D) 作製した微粒子の SEM 像

(3) 電磁誘導による熱源としての作用の検討

電磁調理器の改造を改造して作製した電磁誘導負荷装置を用いて電磁誘導実験を実施した。実験のセットアップを図 4 に、実際の装置を図 5 に示す。

実際にこのような実験計画とセットアップを想定して、実験装置を自作して実験に臨んだ。熱電対で温度計測を行おうとしたが、電磁誘導による熱電対自体の発熱が疑われたので、放射赤外線温度計を購入し、それによって非接触で距離を取っての計測を行うことにした。しかしそれでも、サンプルはす

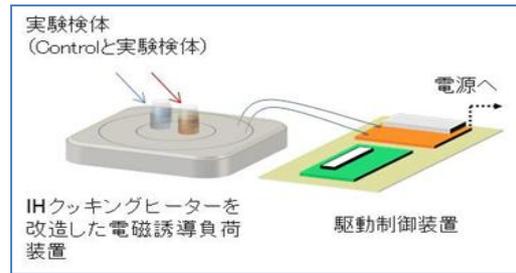


図 4、電磁誘導実験のセットアップ

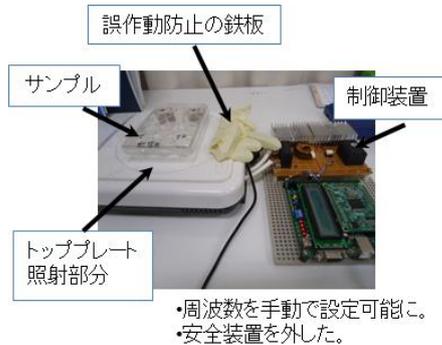


図 5、作製した電磁誘導装置

べての場所で、電磁誘導を開始すると同時に温度上昇がみられ (図 6)、原因探索が余儀なくされた。サンプルとして、水だけの場合、不織布など他の非伝導体の場合でも実験を行ったが、すべてに温度上昇がみられ、原因探索を要した。

電磁誘導装置自体、特に装置のコイルからの発熱が強く疑われ、サーモグラフィにより観測したところ、心配した通り、コイルの発

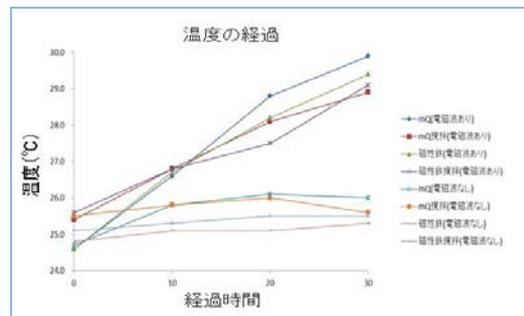


図 6、計測した 12 ウェルサンプルの各部位での温度変化

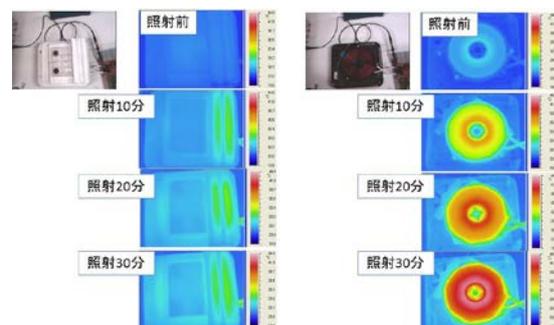


図 7、サーモグラフィによる電磁誘導装置の温度分布の観察

熱が著しく、クッキングヒーター内部に設置してある誤作動防止用鉄板も発熱があり、それらの発熱がサンプルに及んでいることが判明した(図8)。発泡スチロールなどで断熱を行ったが、磁性粒子の発熱現象はまだ認められるに至っていない。

(4) 実験のまとめ、考察、今後の方針

(3)の電磁誘導実験では、電磁調理器を改良した電磁誘導負荷装置を作製し実験を行ったが、コイルの発熱、装置自体の発熱のため、期間内に磁性粒子の電磁誘導による発熱を示せる結果は得られなかった。その原因を考察し、問題点を挙げると、①磁性ナノ粒子の量がわずかで発熱量に乏しい、②市販の電磁調理器はコイルの発熱が鍋に伝わっても構わない構造であり、この実験には適さない、③電磁調理器は電磁波の周波数領域が鍋の発熱に最適化されており、ナノ粒子に最適な電磁波周波数ではなかったこと、などがあげられる。実際に温熱療法でマグネタイト微粒子が臨床応用されている以上、その微粒子とその電磁誘導装置を合わせれば、必ず発熱する微粒子システムを作れるはずであるので、今後は実機と実際のナノ粒子の利用を考えたい。それと、大きな発熱効果を得るためには、磁性ナノ粒子をたくさん使うことも必要である。人工赤血球となる磁性微粒子を大量生産する方法の開発が必要である。

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) Iwanaga S, Saito N, Sanae H, Nakamura M. Facile fabrication of uniform size-controlled microparticles and potentiality for tandem drug delivery system of micro/nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Apr 19;109C:301-306. [Epub ahead of print] [学会発表] (計11件)

1) 竹田朋恵, 齊藤典彰, 岩永進太郎, 中村真人, 培養用人工酸素運搬体としてのヘモグロビンゲルビーズの作製、生体医工学会第50回日本生体医工学会大会、2011年4月、東京

2) 竹田朋恵, 齊藤典彰, 岩永進太郎, 中村真人, インクジェット技術による微粒子の作製、富山大学コラボフェスタ2011新技術紹介ポスター発表会、2011年9月、富山

3) 竹田朋恵, 齊藤典彰, 岩永進太郎, 中村真人, インクジェット再生医工学: 培養用ヘモグロビンゲルビーズの作製、第49回日本人工臓器学会、2011年11月、東京

4) 竹田朋恵, 齊藤典彰, 岩永進太郎, 中村真人, 培養用ヘモグロビン含有ゲルビー

ズの作製、平成23年度生体医工学会北陸支部大会、2011年12月、金沢(研究奨励賞受賞)

5) Y. Yoneda, H. Toda, S. Iwanaga, H. Teranishi, M. Nakamura Cryopreservation of bio-fabricated 3D bio-constructs: Visualization of the freezing process of cell embedded hydrogel structures, 2nd international conference of international society for Biofabrication, Biofabrication 2011 in Toyama, October, 2011.

6) 米田裕香, 奈須野雅明, 戸田英樹, 寺西葉月, 岩永進太郎, 中村真人, 組織・臓器の凍結保存の研究、日本バイオマテリアル学会北陸若手研究者発表会 2011年12月、福井

7) 竹田朋恵, 齊藤典彰, 岩永進太郎, 中村真人, 赤血球サイズのヘモグロビン含有マイクロゲルビーズの作製、第11回日本再生医療学会総会2012年6月、横浜

8) T. Takeda, S. Iwanaga, N. Saitou, M. Nakamura. Production of hemoglobin-containing micro-gel beads as oxygen carriers for cell culture TERMIS World congress, Wien, Austria, Sep. 2012

9) 竹田朋恵, 岩永進太郎, 齊藤典彰, 中村真人, ヘモグロビン含有アルギン酸ゲルビーズの作製: 培養用酸素運搬体としての評価、第一回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会、2012年12月、金沢

10) ランチョンセミナー講演: 中村真人, 細胞組み込み型ヒト人工組織の3次元に向けた戦略. 第11回日本再生医療学会総会2012年6月13日 横浜

11) シンポジウム講演: 未来を担う再生医療・組織工学最前線: 「組織工学のためのバイオマテリアルの進歩と実用化への期待」、中村真人, 竹田朋恵, 早苗秀敏, 荒井健一, 岩永進太郎, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012年11月27日、仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 真人 (NAKAMURA MAKOTO)
富山大学大学院理工学研究部 (工学) 教授
研究者番号：90301803

(2) 連携研究者

岩永 進太郎 (IWANAGA SHINTAROH)
東京大学生産技術研究所 研究員
研究者番号：70587972

(3) 連携研究者

戸田 英樹 (TODA HIDEKI)
富山大学大学院理工学研究部 (工学) 講師
研究者番号：10520687