

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：21301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700500

研究課題名(和文) 微小液滴を用いた新しい凍結保存技術の開発 - 凍結前処理から冷却・保存まで -

研究課題名(英文) Development of a New Cryopreservation Method Using Microdroplet Liquid

研究代表者

君塚 道史 (Kimizuka, Norihito)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：90553446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新たな凍結保存方法として、生体をシリコンオイル中に懸濁する方法を開発した。この懸濁処理を行う事で、例えば100 μ mオーダーの生体であれば-20 $^{\circ}$ C付近まで過冷却状態を維持できる事が明らかとなった。また、この懸濁処理後に緩慢凍結を行うと、行わなかった場合に比べ、生存率は向上する傾向にあった。一方、新たな凍結方法として最小100 μ m程度の固体粒子として生体を凍結する装置を開発した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new cryopreservation method where living organisms to be frozen are suspended in silicon oil. When processed in suspension in this manner, living organisms in a 100-micrometer-order size, for example, were found to be maintained in a supercooled state down to nearly -20 $^{\circ}$ C. Furthermore, this suspended processing followed by slow freezing tended to increase the survival rate compared to the processing without slow freezing. Besides, as a new cryopreservation method, we also developed a device for freezing living organisms as solid particles in an approximate minimum size of 100 micrometer.

研究分野：生体および食品の保存

キーワード：凍結保存

1. 研究開始当初の背景

生体の凍結保存を成功させる為には、細胞内外における氷結晶の生成および成長の制御が重要となる。申請者はこれらを実現すべく、(1) 凍結保護剤で浸漬処理を行った生体をシリコンオイル等に懸濁して凍結する方法【懸濁凍結法】(2) 先の懸濁物または細胞が含まれた凍結保護水溶液の微細液滴を連続して液体窒素中に滴下する【微小液滴凍結法】の2つを新たな凍結処理法として着想するに至った。本手法を用いる事で、保存対象物のガラス化、過冷却の低下と維持、過度な凍結濃縮の抑制など種々の効果を期待する事ができる。

2. 研究の目的

生体の凍結保存を成功させる為には、細胞内外の氷結晶生成を考慮した上でガラス状態に導く事が重要となる。しかしながら、凍結保護剤の種類や濃度、更には凍結解凍時の温度プログラムの決定など、考慮すべき多数の因子が存在し、これらの制御が保存を成功させる上での障害となっている。一方で氷結晶を直接制御する方法としては、高圧の利用や噴霧による急速冷却、電場、磁場、超音波等の利用[1]など、種々の方法が検討されている。しかしながら、何れも効果や汎用性の面から一般的に利用されてはいない。本研究では、従来法とは異なる方法で細胞内外の氷結晶生成および成長の制御が可能な凍結保存法の確立を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 懸濁凍結法の検討

・ 臍島組織

雄の Lewis rats (250 ~ 300 g) より分離した臍島を試料として用いた。分離精製後、37 (CO₂ 濃度 5.0%) のインキュベータ内に保存し、適宜培地の交換を行いながら分離後、7日以内に用いた。

・ 懸濁法の探査

臍島を 100 ~ 150 個/30 ~ 50 μ L 程度となる様に液体培地を除去し、臍島の凍結保存に対して一定の効果が示されている[2]、CP-1 水溶液(極東製薬工業製)に浸漬後、粘度の異なるシリコンオイル TSF451-10, TSF431, TSF451-200, TSF451-500 (モメンティブジャパン製)またはフッ素系化合物液体 HFE-7600 (住友 3M 社製)を 0.5ml 添加し、「指弾き」(混和後、マイクロチューブを指で弾く)および「ボルテックスミキサー」により分散媒への懸濁を試みた。処理後の状態および凍結解凍時の形態観察については、冷却加熱ステージ(LINKAM 社製)を取り付けたデジタルマイクロスコープ(KEYENCE 社製)を用い、倍率 100 ~ 1000 倍にて評価を行った。

・ DSC による結晶化温度の測定

良好な懸濁状態にある試料については、

DSC (示差走査熱量計) を用いて結晶化温度を測定した。尚、冷却昇温速度は ± 3.0 /min、試料量は 20 ~ 30mg とした。

・ 過冷却保存試験

懸濁処理した臍島は、-20 ~ -25 付近まで過冷却状態を維持する事が確認された為、懸濁試料 0.6ml (臍島数 100 ~ 150 個程度) をマイクロチューブに入れ、-10 のインキュベータにて 24 時間保持し、蛍光染色により生存率の測定を行った。

・ 凍結保存試験

冷凍庫凍結区についてはマイクロチューブ、液体窒素凍結区については精子凍結保存用ストローを用いた。試料をそれぞれ 0.3ml ずつ入れ(臍島数は何れも 100 個程度)、凍結を行った。凍結解凍時の温度履歴の測定は、T 熱電対およびデータロガーを用いた。尚、本試験の冷却速度は冷凍庫(-70)であれば -10 /min 程度、液体窒素浸漬であれば -1500 /min 程度となった。解凍操作については何れも +37 の湯浴中で行った。

・ 蛍光染色による生死評価

遠心操作によりシリコンオイルから臍島のみを分離し、生理食塩水による洗浄後、既報[3]に従い FDA-PI 染色を行った。染色後の臍島は蛍光顕微鏡にて、490/545nm のフィルターにより生死識別を行った。尚、得られた画像は図 1 に示した様に便宜上、生細胞は緑(545nm)、死細胞は赤(490nm)とし、全細胞数に対する生細胞数の比から生存率を求めた。

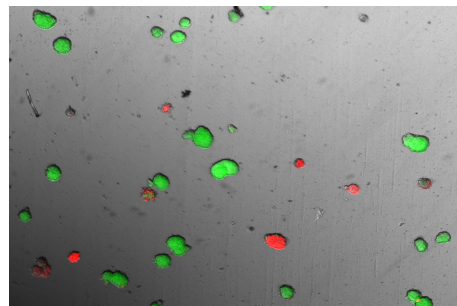


図 1 蛍光顕微鏡写真

(2) 微小液滴法の検討

・ ゾウリムシ (Paramecium caudatum)

レタスジュース法により 35 にて培養した定常期初期の個体を試料として使用した。

・ 凍結保護物質の選定

凍結保護物質として用いられている、細胞膜透過型凍結保護物質(12種)および非透過型凍結保護物質(10種)を用いて、各種濃度の水溶液を調整し、ゾウリムシ培養液溶と等量混合した。1時間後の生存率から薬害の少ない保護物質を選定した。

・微小液滴凍結装置

シリンジポンプ、シリンジ、シリンジ針で構成される液滴作成部とデュワー瓶およびLN₂などの冷媒で構成される凍結部からなる微小液滴凍結装置を試作した。(図2)具体的には、医療用シリンジに保存対象の溶液を入れ、これをマイクロシリンジポンプに装着する事で排出量の制御を行った。一方、液滴のサイズについては排出ノズルである注射針の規格(24~34G)を選択する事で変更を可能とした。また、冷却については伝熱を促進する為、デュワーグラスコ内にフロート攪拌子を設置した。

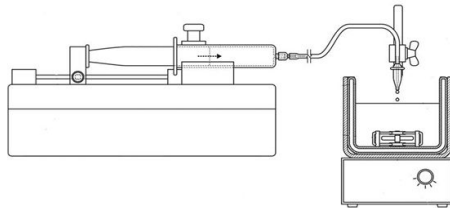


図2 微小液滴凍結装置

・凍結解凍試験

凍結保護物質に浸漬処理後、図2に示した微小液滴凍結装置にて、凍結操作を行った。解凍操作については何れも+37の等張液中で行った。

・微小固体の評価

作成した微小固体粒子の状態を評価すべく、射出後から観察時までLN₂温度の維持が可能な専用ステージを試作した。これを用いて結晶および非晶状態を顕微ラマン(日本分光社製)にて評価した。

4. 研究成果

(1) 懸濁凍結法の検討

ボルテックスミキサーを用いて懸濁処理を行うと、何れの分散媒も形態上の損傷が確認された。しかしながら、図3に示す様に指弾き処理では殆ど損傷は確認されなかった。実用化を考慮すれば、これを採用する事は難しいが、本研究では以後、簡便法として指弾きによる懸濁処理を採用する事とした。一方、処理を指弾き法に限定して、分散媒の種類から懸濁の良否を比較すると、TSF431が最も良好であった。これについては僅かに存在する培地の粘度とTSF431の粘度が近い為、分散し易かったと考えられる。

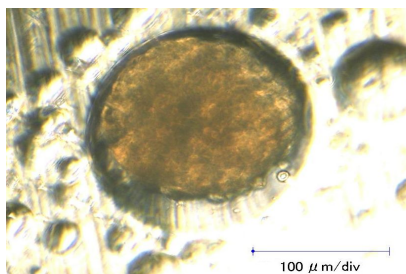


図3 懸濁処理後の臍島(一例)

このTSF431で懸濁された試料をDSC測定すると、-20付近までは結晶化に伴うピークは見られず、-25~40付近で複数の発熱ピークが見られた。また、加熱冷却ステージを用いた顕微鏡による観察では、主に-25付近で臍島の結晶化が観察され、-40付近では10~50μm程度に懸濁された培地(臍島は含まれていない)の結晶化が観察された。一方で、懸濁処理自体が臍島に与えるダメージをFDA-PI染色で確認すると、生存率は71%であり、懸濁処理前の生存率82%に比べ、10%程度の低下が認められた。これは処理により、機械的な損傷を受けた事が主な要因と考えられる。以上の結果から、生存率は若干の低下を伴うものの、分散媒としてTSF431、分散方法として指弾き処理を用いる事で臍島の懸濁処理は可能である事が分かった。更に、懸濁処理を行う事で-20付近まで臍島を過冷却状態のまま維持できる事が確認された。

表1 前処理および冷却条件と生存率

試料No	前処理条件		冷却条件			生存率 % (生存数/全数)
	CP1処理	懸濁処理	常温 (冷却なし)	-10℃ (過冷却)	-70℃ (冷凍庫)	
Control1 (分離のみ)	-	-	0	-	-	82 (138/168)
Control2 (分離+懸濁)	-	0	0	-	-	71 (108/153)
1	-	0	-	0	-	68 (98/144)
2	0	-	-	-	0	30 (41/137)
3	0	0	-	-	0	61 (76/124)
4	0	-	-	-	0	14 (22/162)
5	0	0	-	-	0	13 (20/150)

表1に種々の前処理と冷却条件を組み合わせ凍結した際の生存率を示す。過冷却保存(試験区No.1)の生存率を見ると、懸濁処理のみ(Control2)と大差は無い。この結果から臍島は過冷却状態でも生存可能であることが示唆された。過冷却状態で臍島を保存した報告はこれまでに無い為、保存期間の延長およびインスリン分泌機能等から今後より詳細な評価を行う必要がある。また、CP-1にて処理後、-70冷凍庫にて凍結を行った試験区についても、懸濁処理(No.2)を行った方が非懸濁処理(No.3)に比べ生存率は高い結果となった。これについては、臍島の周囲がシリコンオイルである為、細胞外凍結は殆ど無く、非懸濁処理に比べ過度な凍結濃縮を生じなかった事が一因として考えられる。一方、液体窒素浸漬による凍結については、懸濁(No.4)および非懸濁(No.5)ともに生存率に大差は無く、-70冷凍庫にて凍結を行った試験区に比べ、生存率は大きく低下した。これはシリコンオイルを分散媒として用いて冷却時の潜熱量を低減しても、ストローによる凍結では臍島のガラス化は困難であり、結果として細胞内凍結を生じた事が低下の要因として考えられる。

(2) 微小液滴法の検討

ゾウリムシに対する各種凍結保護水溶液の薬害を浸漬後 1 時間後の生存率から調べた。その結果、透過型ではエチレングリコール、プロピレングリコールおよび DMSO、非透過型ではデキストランの生存率が高かった。一方で、凍結保護物質として汎用されている、グリセリン、グルコースは低濃度であっても生存率は 0% となった。従って、本研究では薬害が少なく、粘性の低いエチレングリコールを用いて、各種条件での射出実験を行った。結果、市販されているシリンジの中でも口径の小さな 34G (130 μm) を用いた場合であっても、外見上ゾウリムシを損傷させずに射出する事が可能となった。



図 4 射出により作製した微小固体の例

以上の検討で得られた最適条件にて前処理後、種々の凍結解凍実験を行っているが、未だ生存した個体は得られてはいない。そこでこの要因を解析すべく、試料の設置から観察まで LN₂ 温度の維持が可能な専用冷却ステージを試作し、これを用いて粒子の結晶状態を顕微ラマンにて観察した。結果、図 5 に示す様に氷 (Ih) に由来するピークが見られなくなるのは、エチレングリコールであれば 4.0mol/L 以上、スクロース水溶液の粒子であれば 1.0mol/L 以上であり、固体粒子の直径は何れも 100 μm 未満であった。従って、本装置で射出可能な最小粒径および使用した凍結保護水溶液の濃度を考慮すれば、何れの粒子も非晶状態となっていない事が生存した個体を得られない要因と考えられる。今後は 100 μm 未満の生体を対象に本凍結法の有効性を検証する予定である。

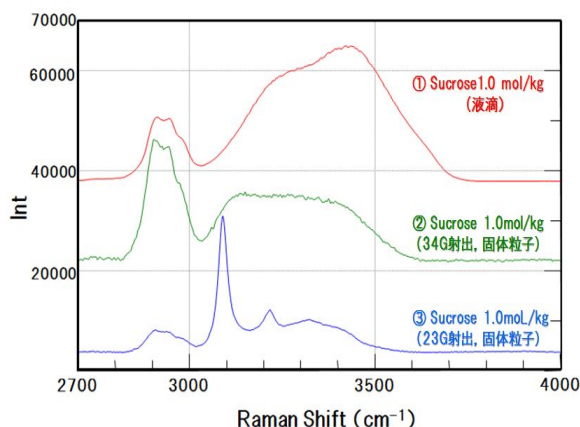


図 5 微小粒子のラマンシフト

<引用文献>

- [1] 多田幸生. 超音波を利用した凝固制御による生体組織のガラス化保存技術の開発, 科研費課題番号 18560195 (2007)
- [2] 坏尚武. 臍島凍結保存, 移植, 43(5), 357 (2008)
- [3] Jones, K., *J. Histochem. Cytochem*, 33, 77 (1985)

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)

[学会発表](計 4 件)

小林りか、君塚道史、渡辺学、鈴木徹, 低温貯蔵中における食品モデルゲル中の氷結晶成長挙動および不凍部分の密度変化の観察, つくば国際会議場, 日本食品工学会第 15 回 (2014 年度) 年次大会 (茨城県筑波市) 2014/08//07

小林りか、君塚道史、渡辺学、鈴木徹, 過冷却を経た凍結によって生成する氷結晶の X 線マイクロ CT を用いた 3 次元評価, 東海大学 (高輪キャンパス), 2013 年度日本冷凍空調学会年次大会 (東京都港区) 2013/09/10

君塚道史、渡邊欣嗣, 微小液滴を用いた凍結保存技術, 関西大学, 第 58 回低温生物工学会セミナー・年会 (大阪府吹田市) 2013/06/22

君塚道史、高橋弘樹、茂木巖, 強磁場下における水溶液の相変化, 北海道工業大学, 2012 年度日本冷凍空調学会年次大会 (北海道札幌市) 2012/09/12

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称: 冷却ステージ

発明者: 金森浩、君塚道史

権利者: 東北電子産業

種類: 特願

番号: 特開 2015-4770

出願年月日: 平成 25 年 6 月 13 日

国内外の別: 国内

名称: 生物試料の凍結保存方法及び凍結装置

発明者: 君塚道史

権利者: 宮城大学

種類: 特願

番号: 特開 2014-221021

出願年月日: 平成 25 年 5 月 14 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

君塚 道史 (KIMIZUKA NORIHITO)

宮城大学・食産学部・准教授

研究者番号: 90553446