

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560203

研究課題名(和文) 高静水圧下における細胞の不凍結冷却保存効果を検証するためのin-situ観察装置

研究課題名(英文) In-situ observation system for examination of nonfreezing preservation of living cells under high hydrostatic pressure.

研究代表者

吉野 雅彦 (Yoshino, Masahiko)

東京工業大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40201032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高圧環境において凝固点降下を利用し細胞を0℃以下で凍結させずに保存する効果を検証するため、静水圧と温度を同時に制御しながら、チャンバー内の細胞を光学顕微鏡でin-situ観察が出来る装置を開発した。負荷圧力、温度制御、観察能力など十分な性能を有していることを確認した。メダカの卵を試料として様々な圧力下での凍結状況を観察した。また試験した卵の孵化状況から損傷を評価した。これらの実験に基づき、圧力と温度によって孵化限界が定まること、また圧力と温度の履歴が孵化限界に影響することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For experimental study on nonfreezing preservation of living cells under high hydrostatic pressure, an experimental device for in-situ observation of a chamber that can control hydrostatic pressure and temperature (lower than 0℃), was developed. It was confirmed that the device has enough performance of load pressure, temperature-control, and in-situ observation. Living eggs of killifish were employed for freezing experiment. Freezing processes of eggs were observed under various hydrostatic pressure using the developed device. Also, damage of eggs were evaluated by hatch status of the eggs. It was found from the experiments that a hatch limit depended on the pressure and the temperature, and that the pressure and temperature history influenced the hatch limit.

研究分野：加工学

キーワード：生物生体工学 生体物性 細胞保存 冷却 高圧 過冷却 卵

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の冷凍保存の課題:

細胞や胚などの極低温保存では、凍結・解凍による損傷が発生する。これは細胞や胚の中の水分が結晶化することにより体積膨張し、細胞組織を破損するためである。そのため細胞内の水分を結晶化させないよう緩慢凍結法やガラス化法などが開発されている。しかし緩慢凍結法は iPS 細胞や受精卵などには適さず、またガラス化法では細胞へ毒性が問題となる。このような問題を避けるために不凍保存技術の開発が必要である。

(2) 静水圧の影響:

水に静水圧を掛けると凝固点が低下することが知られており、1000 気圧 (100MPa) 下では凝固点は約 -10°C にまで低下する。生体活動は -5°C ~ -10°C の間で停止するため、静水圧を負荷した状態で -10°C まで冷却すれば細胞や胚を非凍結のまま長期間保存できる可能性がある。

(3) 発想に至った経緯:

申請者はこれまで最高 4000 気圧までの高静水圧環境内で、各種材料の機械加工を行い、その場観察などにより高静水圧が材料に及ぼす影響を研究してきた。その実験技術を利用すれば、高静水圧環境下で細胞を冷却していく過程を観察する装置の開発は可能であり、その学術的貢献は大きいとの発想に至った。

2. 研究の目的

高静水圧環境において凝固点降下を利用し細胞を 0°C 以下で凍結させずに保存する効果を検証するため、静水圧 (0~200MPa) と温度 (室温~ -20°C) を同時に制御しながら、チャンバー内の試料 (細胞) を光学顕微鏡で in-situ (その場) 観察が出来る装置を開発する。

3. 研究の方法

3.1 装置の設計および試作

(1) 圧力容器: 圧力容器はステンレス製で、内径 30mm 程度のチャンバーを有し、最高 2000 気圧 (200MPa) までの耐圧性を有することを設計要件とする。圧力チャンバーは圧力媒体コンバータにつながり、その先に高圧ポンプが接続されている。圧力容器の上下に観察用窓 (サファイヤ製) を有し、上部から照明光を入射し下部から微分干渉顕微鏡でチャンバー内部を観察する。チャンバー内部に細胞容器、温度センサー、温調用ヒーターがある。これらのセンサーおよびヒーターは配線プラグを通して外部の温度コントローラーに接続される。高圧容器の外部に熱電素子を付け、これで容器全体を冷却しながら、内部のヒーターで正確に内部温度をコントロールする。

(2) 高圧ポンプ: 申請者が開発した既存の最高 4000 気圧 (400MPa) の高圧ポンプを利用する。

(3) 圧力媒体コンバータ: 高圧ポンプの作動流体はタービンオイルなので、それを圧力容器内に導入すると冷却時の流動性が低下寿命実験条件の制御が困難になると考えられる。そこで高圧容器内には低温用高圧媒体として利用されているフロリナートを充填し、圧力媒体コンバータにて高圧ポンプの圧力を高圧容器内に伝える。チャンバー内に PDMS 製の細胞容器を設置し、内部に水 (培養液) を充填し、細胞を封入する。PDMS は柔軟でなので圧力を細胞に伝えることができ、また透明なので光学観察にも適している。圧力媒体コンバータはステンレス製で容量 100ml 程度のもを新規に設計開発する。

(4) 顕微鏡: チャンバー内部の細胞を観察する顕微鏡はワークディスタンスが数 cm (容器設計に依る) になるため、長焦点距離の対物レンズを使用し、必要な倍率が取れるよう本装置組み込みの顕微鏡として専用設計する。反対側の窓から入射する照明光についても同様に設計する。光学部品を適宜購入し、微分干渉顕微鏡を構成する。また観察画像は CCD カメラにて撮影しパソコンに取り込み記録する。

(5) その他計測器: 容器内温度は白金性温度センサーと動ひずみ計を用いて計測する。データロガーにて温度、圧力を取り込みパソコンに記録する。

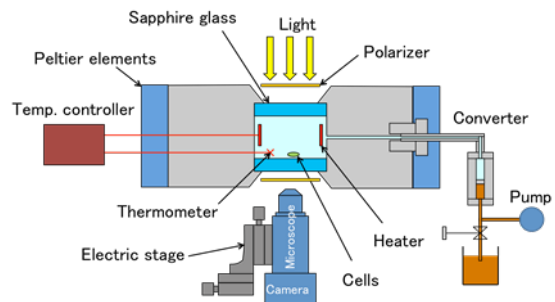


図1 装置構造図

3.2 装置の性能評価

完成した装置の耐圧性、温度の調整機能を確認し、圧力 2000 気圧 (200MPa)、室温~ -20°C の範囲で自在に制御できることを確認する。また本実験においては最終的に到達する静水圧と温度だけでなく、それに至る圧力-温度履歴が重要と考えられる。様々な温度圧力履歴を正確に辿れるよう装置の制御法を確立する。さらに培養液、細胞等の抽入の操作性、顕微鏡観察の機能についても評価し、必要に応じて適宜改修する。

3.3 高静水圧・氷点下での細胞の観察

実際に細胞を圧力容器内に入れ、高静水圧・氷点下での細胞の挙動を in-situ 観察し、本装置が所定の性能を満たしていることを示すと同時に、静水圧・温度が細胞の活動に及ぼす影響を検討する。また所定の時間氷点下に保持した後、室温に戻したときに細胞の状態についても観察する。観察実験には動物

の卵細胞、単細胞生物、さらに乳酸菌なども用いる。

4. 研究成果

4.1 装置の設計および試作

図2に開発した装置の外観写真を示す。上部に圧力容器があり、観察用窓、圧力ポンプ、圧力コンバータ、観察用微分鑑賞顕微鏡などを有している。設計通り2000気圧の耐圧性能があることを実際に圧力を負荷して確認した。圧力容器の外周に熱電素子を取り付け、外部より容器全体を冷却する。なお冷却能力が予定より弱かったため、それを補うために別途チラーを用いて熱電素子の放熱を助ける構造とした。容器内部に温度センサーと発熱体を入れ、コンピュータでPID制御した。図3に試験的に圧力容器を冷却した時の温度変化を示すが、正確に容器内の温度を制御できることが確認できた。ワークディスタンス1cm以上ある光学系を設計し、微分干渉顕微鏡を開発した。顕微鏡は電動のXYステージおよび超精密Zステージに載せ、遠隔で操作できるようにした。最高200倍の倍率で観察できることを確認した。図4に本装置を用いてゾウリムシ、メダカの卵、乳酸菌などの観察例を示すが、本装置により高静水圧環境下での冷却する過程をin-situ観察できることを確認した。

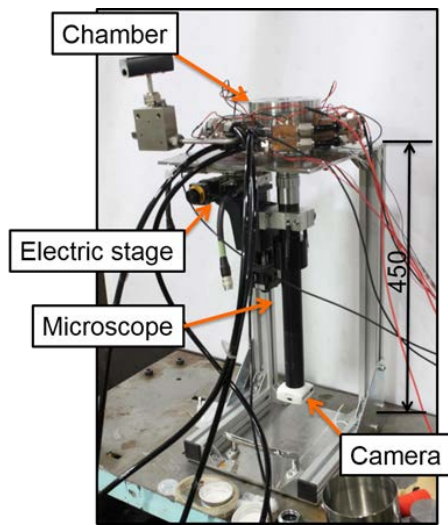


図2 開発した装置外観写真

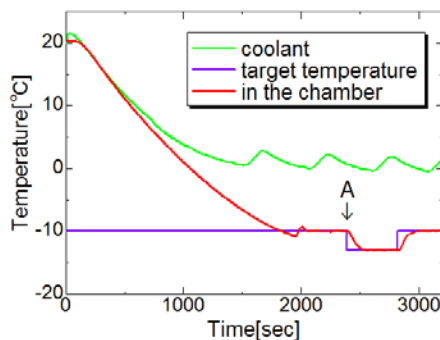
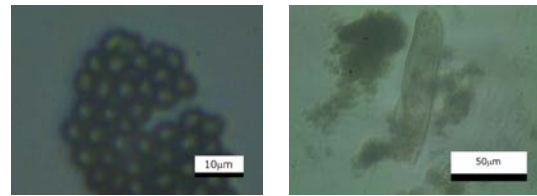


図3 冷却時の温度変化の例



(a)イースト菌 (b)ゾウリムシ
図4 観察した単細胞生物の例

4.2 装置内温度の検討

当装置は圧力媒体として低温でも凍結しないフロリナーとを用いているため、生物試料は水を充満したPDMS製細胞容器に封入し、フロリナーの満たされた圧力容器内に設置している。圧力容器内温度は細胞容器の外に設定した温度センサーで計測するため、細胞容器内温度との温度差が問題となった。そこでマルチフィジックス解析ソフトのCOSMOLを用いて、圧力容器を実験と同条件で外周より冷却する場合の圧力容器内の温度変化をシミュレートした。図5に解析より得られた温度分布の一例を示す。また図6に冷却過程における温度センサーと細胞容器内温度の変化を示す。これより当実験条件では温度差は0.1°C以下であり、正確な温度測定が可能であることを確認した。

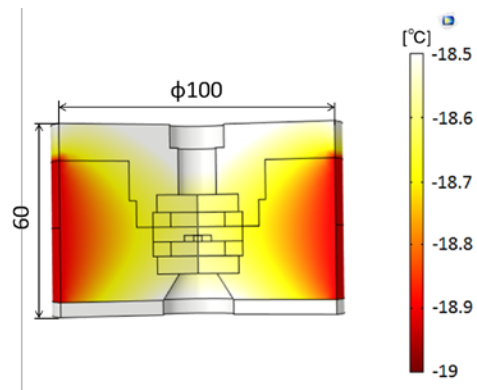


図5 容器内温度分布の解析例

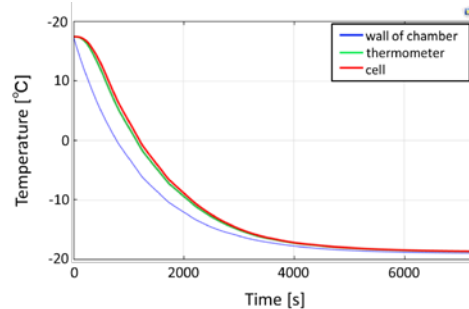


図6 冷却過程における温度センサーと細胞容器内温度の変化

4.3 メダカの卵の冷却実験

当装置を用いてメダカの卵を様々な圧力下で冷却する実験を行った。図7に0MPa(大気圧)で冷却した場合のメダカの卵の様子を示す。約-10°Cで卵が凍結したことが判る。

また 10℃に戻し解凍した後、卵内の構造が変化していることが判る。これは凍結による脱水のため損傷が起こったものと考えられる。

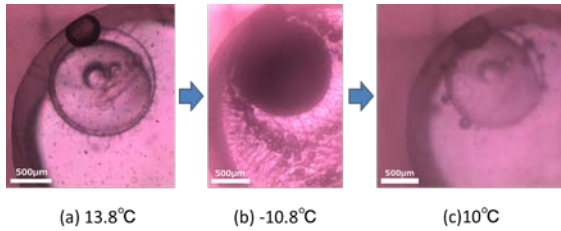


図7 0MPaでのメダカの卵の凍結状況

図8に30MPaに加圧し冷却した場合のメダカの卵の凍結の様子を示す。(a)加圧・冷却前、(b)加圧後-14℃に冷却、(c)10℃に加熱・除圧時である。約-14℃で凍結していることが判る。さらに解凍後には卵内に凍結による損傷が見られる。

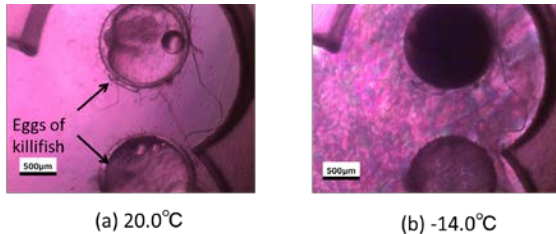


図8 30MPaにおけるメダカの卵の凍結状況

図9に種々の圧力で冷凍実験を行ったときの凍結温度の変化を示す。これらの実験より卵が凍結する温度は水の凝固点より約10℃低いことが分かった。これはカプセル内の体積が非常に小さいことによる過冷却と考えられる。損傷は見られるが、過冷却と圧力の効果により-10℃から-20℃の範囲で卵を不凍結状態で保持できることが分かった。

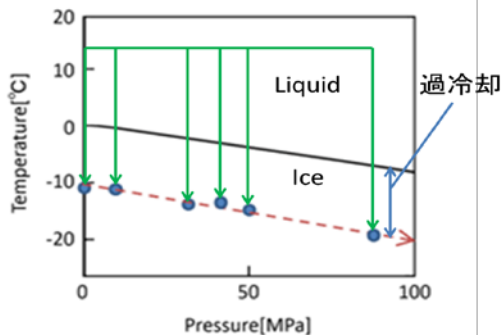


図9 種々の圧力における卵の凍結温度

4.4 メダカの卵の加圧実験

メダカの卵に及ぼす静水圧の影響を検討

した。メダカの卵を圧力容器内に設置し、常温のまま所定の圧力まで加圧した。図10に75MPaを120分負荷した卵を示す。これを見ると圧力を負荷する前後でメダカの卵の内部の胚の部分が確認できなくなっている。これは圧力によって卵の内部に損傷が起こり、内部の構造が変化したためであると考えられる。除圧後、メダカの卵は成長せず、孵化することにはなかった。

図11に10MPaで加圧した卵を示す。卵には目立った変化は見られず、損傷は確認できなかった。除圧後に卵は成長し孵化した。

以上より、メダカの卵は50MPaまでの静水圧なら生存できることが確認された。

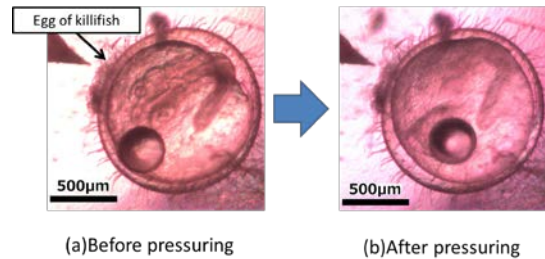


図10 75MPaで加圧した卵

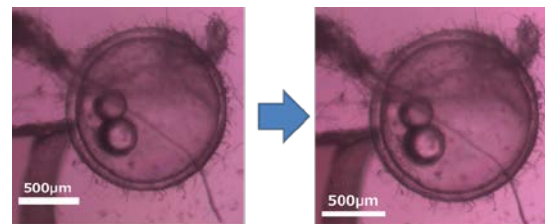


図11 50MPaで加圧した卵

4.4 メダカの卵の孵化実験

種々の圧力、温度に保持したメダカの卵を、実験後常温常圧の水槽に戻し、孵化するかどうかにより卵の損傷状況を判定した。図12に20MPa、-5℃で加圧冷却実験時の温度履歴の例を示す。また図13にその実験前後の卵の様子を示す。

同様に様々な圧力温度で加圧冷却実験を行い、これらの卵はその後水槽で育成し、孵化状況を観察した。図14に加圧後冷却した場合の孵化状況を示す。○印は孵化したもの、×印は孵化しなかったものである。両者の境を曲線で示すが、孵化の限界曲線は圧力の上昇とともに温度も上昇することが判る。

一方、図15に、卵を冷却した後加圧した場合の孵化状況を示す。温度が低下するに従い、限界圧力は上昇することが判る。この限界曲線は図12のものと同様であるが、図13の方が低温側に寄っている。すなわち孵化限界曲線は、圧力と温度の履歴によって変わることが分かった。これより圧力温度履歴も

重要な要因であり、これらを制御することによりメダカの卵の損傷を防ぎながら非凍結低温保存することが可能になると考えられる。今後、さらに詳細なデータを収集する必要がある。

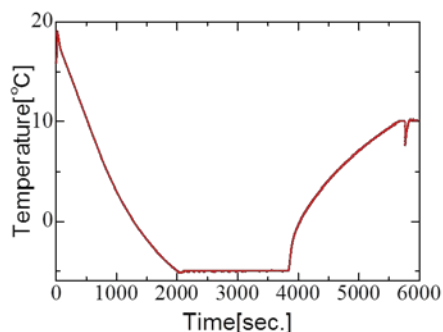


図 12 20MPa、 -5°C で加圧冷却実験した時の温度履歴

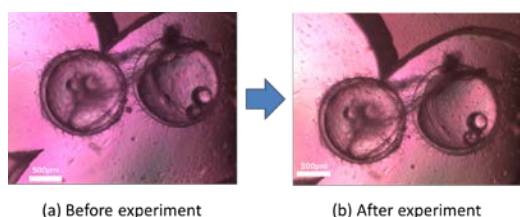


図 13 20MPa、 -5°C で加圧冷却実験した前後の卵

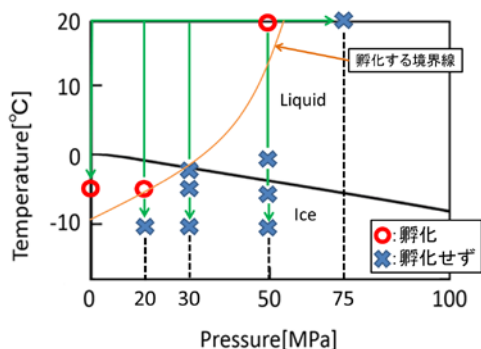


図 14 加圧後冷却した卵の孵化状況

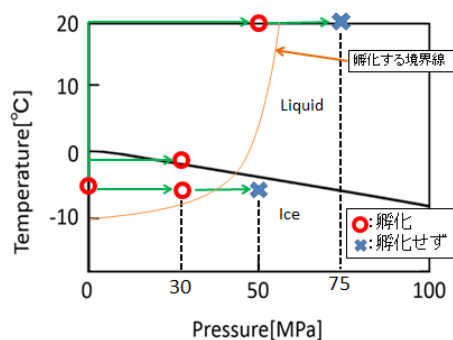


図 15 冷却後加圧した卵の孵化状況

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)

1) Waichiro Saiki, Yuki Inoue, Motoki Terano¹, Masahiko Yoshino: Experimental Device For Non Cryopreservation Of Living Cells Under High Hydrostatic Pressure, International Forum on MicroManufacturing & Biofabrication ' 15, IFMM' 15&IFBF' 15, Toyama, Japan, May 19-20, (2015)

2) 佐伯 和一郎, 吉野 雅彦, 寺野 元規: 高静水圧を利用した細胞の氷点下不凍結保存方法の検討, 関東学生会第 54 回学生員卒業研究発表講演前刷集, 講演番号 1701, 2015/3/20 横浜国大 (神奈川)

3) 佐伯 和一郎, 井上 優樹, 寺野 元規, 吉野 雅彦: 高静水圧下において不凍結冷却された細胞の in-situ 観察, 日本機械学会 2015 年度年次大会講演論文集 [2015. 9. 13-16, 札幌] S0210101

4) 山下 恭平, 寺野 元規, 吉野 雅彦: 高静水圧を利用した細胞の不凍結冷却法の検討, 関東学生会第 55 回学生員卒業研究発表講演前刷集, 講演番号 109, [2016/3/10 東京工業大学 (東京)]

[その他]

ホームページ等

<http://www.yocky.mes.titech.ac.jp/kenkyuzyosei.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 雅彦 (Yoshino Masahiko)
東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 40201032

(2) 連携研究者

寺野 元規 (Terano Motoki)
東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号: 90708554

(3) 連携研究者

山本貴富喜 (Yamamoto Takatoki)
東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 20322688