

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26450364

研究課題名（和文）微細水滴における過冷却現象を利用した新規な生細胞の保存方法の確立

研究課題名（英文）Application of supercooled water in W/O emulsion prepared by microchannel for cryopreservation

## 研究代表者

岩本 悟志 (Iwamoto, Satoshi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00373233

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：-40℃付近まで過冷却状態を保持できる単分散微細水滴に乳化の前後が同時に撮影できるシステムを構築し最適条件で微生物の内包を可能とした。生細胞のモデル細胞として酵母を内包し、ほぼ100%に近い内包率を実現した。また保存に適した温度帯を決定した。研究成果は、論文3報、国際学会プロシーディングスに3報の外部発表を行なった。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in microencapsulation to water droplets of budding yeasts in a high including rate. It is easy to predict the crystallization temperature for W/O emulsions with narrow size distribution. This method is not inferior in cell viability as compared with a conventional one.

研究分野：界面科学

キーワード：エマルション

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の生体機能を維持させたまま長期保存する需要は、細胞を利用した研究の進展と共に拡大している。細胞を長期保存する方法として、組織の温度を下げることで代謝を抑え、必要酸素量を少なくする極低温での凍結保存が最も確実であると考えられるが、凍結および融解過程で障害を受け、細胞の機能や生存率が低下することが多い。そこで、細胞の凍結障害を抑制するため、細胞内での氷結晶の成長を抑制する目的で、凍結防御剤を添加する必要がある。一般的に、凍結防御剤として工業用有機溶剤のジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロールやトレハロースなどが用いられている。DMSOは高い凍害防御能を持つが、ある程度以上の濃度では細胞に対して毒性を持つため、解凍後は速やかに取り除く必要があり、また細胞によっては分化を誘導するなどの問題点がある。

### 2. 研究の目的

生細胞を長期保存する方法としての凍結保存は有効であるが、培養液中での氷結晶の形成や凍結防御剤による障害を受け、生細胞の機能や生存率が低下することが多い。0℃以下でも氷結晶が生成しない水の過冷却現象を積極的に利用して、凍結防御剤を用いない生存率の高い新規な生細胞の保存方法を提案する。具体的には、-40℃付近まで過冷却状態を保持できる単分散微細水滴に生細胞のモデル細胞として酵母を内包し、保存に適した温度帯を決定する。

### 3. 研究の方法

(1) 微生物の内包に特化した MC 乳化モジュールの開発 (担当: 岩本)  
微生物の内包や生細胞の内包に特化した MC 乳化モジュールを開発する。具体的にはオートクレーブなどの滅菌操作が可能なモジュールの開発を行う。

(2) 微生物の内包率向上のための MC 乳化システムの改良 (担当: 岩本)  
現在、応募者が有する MC 乳化装置では、装置の試料回収側のみを観察しつつ乳化を行っている。しかし、供給側の懸濁液の様子が観察できず、MC の目詰まりなどを把握できていない。従って、現在ある乳化装置を改良し、液体培地を供給する側にも観察システムを追加し、供給側と回収側を同時に観察することで、液体培地の供給側と回収側を同時に観察でき微生物の内包に適した培地の供給流速や圧力などの最適化を図ることが、可能になる。

(3) 微細水滴への微生物の内包 (担当: 岩本)

(1) および(2)で作製したモジュールおよび乳化システムを用いて、実際に微生物の内包を行う。内包する微生物や生細胞に関しては連携研究者の中川智行教授の指示を受ける。中川智行教授は、酵母をモデル細胞として細胞のストレス応答など、遺伝子・分子細胞学レベルでの様々な細胞機能の研究を実施しておりこの分野について造詣が深い。

(4) DSC による微細水滴内の氷核形成温度の測定 (担当: 岩本)

微生物が内包された微細水滴を含んだエマルジョンを DSC により熱分析する。過冷却などの温度帯まで保てるかを調べ、保存に適した温度帯を検索する。

(5) 微細水滴に内包された微生物生存率の算出 (担当: 中川)

通常の液体培地をもちいて凍結および融解を行いその後、生存率を算出する。微細水滴に内包された微生物の生存率を算出し、比較検討を行う。

(6) 微細水滴への内包が、微生物に与えるストレス応答の評価 (担当: 中川)

微生物が内包された微細水滴内を現在、応募者が開発中の冷却ステージで観察を行い。微生物の形態変化を観察することでストレス応答を評価する。

### 4. 研究成果

(1) 微生物の内包に特化した MC 乳化モジュールの開発  
微生物の内包や生細胞の内包に特化した MC 乳化モジュールを開発した。医療用のガンマ

メッキ済みのチューブやコネクタを用い、またアルコール殺菌が可能なモジュールを応用し、コンタミネーションが起きない MC モジュールを開発できた。

( 2 ) 微生物の内包率向上のための MC 乳化システムの改良

MC 乳化装置を改良し、液体培地を供給する側にも観察システムを追加し、供給側と回収側を同時に観察するシステムを完成した。このシステムで液体培地の供給側と回収側を同時に観察し、微生物の内包に適した培地の供給流速や圧力などの最適化を行った。

( 3 ) 微細水滴への微生物の内包

( 1 ) および ( 2 ) で作製したモジュールおよび乳化システムを用いて、実際に微生物の内包をおこなった。ほぼ全ての液滴に微生物を内包することが可能になった。

( 4 ) DSC による微細水滴内の氷核形成温度の測定

微生物が内包された微細水滴を含んだエマルションを DSC により熱分析した。過冷却は、 $-30^{\circ}\text{C}$ まで保てた。

( 5 ) 微細水滴に内包された微生物生存率の算出

メチレンブルー染色法を用いて生存率を算出した。調製した 2 つのエマルションを  $-10^{\circ}\text{C}$  で保存したところ、多分散エマルションでは氷結晶が生じたが、単分散エマルションでは 1 週間後でも氷結晶が認められなかった。過冷却状態での保存に適した分散相について検討するため、対数期と定常期の状態の酵母分散培養液を用いて酵母内包 W/O 型エマルションを調製し、低温保存前後の液滴径変化と生存率の測定を行った。その結果、いずれの分散相においても、高い酵母内包率で均一な液滴径の W/O エマルションを調製することができた。調製した酵母内包 W/O 型エマルションを低温で保存したところ、液滴安定性に差は観察されなかったが、生存率には変化が見られた。分散相として定常期の状態の酵母分散培養液を用いて調製した W/O 型エマルションで高い生存率が維持できた。

更に、過冷却状態での保存に適した連続相について検討するため、連続相として n-デカンもしくはシリコン油を用いて酵母内包 W/O 型エマルションを調製し、低温保存前後の液滴径変化と生存率の測定を行った。いずれの連続相においても、高い酵母内包率で均一な液滴径の W/O エマルションを調製することができた。一方で、調製した酵母内包

W/O 型エマルションを低温で保存したところ、連続相によって異なる液滴安定性と酵母の生存率を示した。連続相として n-ヘプタンもしくはシリコン油を用いて調製した W/O 型エマルションでは、高い液滴の安定性を示した。一方で、保存後の酵母の生存率は、連続相として n-デカンもしくはシリコン油を用いて調製した W/O 型エマルションに内包した酵母が高い値を示した。また、これらの酵母の生存率は、酵母培養液にグリセロールを添加し  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した従来法に基づく試料と同程度の値であった。

( 6 ) 微細水滴への内包が、微生物に与えるストレス応答の評価

蛍光タンパク質を有する GFP 酵母で低温時における細胞小器官のダメージについて検討したが、この項目については、継続して検討を行う。

## 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 3 件 )

Peanparkdee, M., Iwamoto, S., Borompichaichartkul, C., Duangmal, K. and Yamauchi, R.: Microencapsulation of bioactive compounds from mulberry (*Morus alba* L.) leaf extracts by protein-polysaccharide interactions. Int. J. Food Sci. Tech. 査読有 51: 649-655, 2016.

Peanparkdee, M., Iwamoto, S. and Yamauchi, R.: Microencapsulation, A review of applications in the food and pharmaceutical industries. ( 総説 ) Reviews Agricultural Science 査読有 4: 56-65, 2016.

Peanparkdee, M., Iwamoto, S. and Yamauchi, R.: Preparation and release behavior of gelatin-based capsules of antioxidants from ethanolic extracts of Thai Riceberry bran, Food and Bioprocess Technology, 査読有 受理済

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

山根克己, 岩本悟志, 中川 智行, 山内 亮: 微細水滴を用いた微生物の新規な低温保存の検討 . 第 66 回日本生物工学会大会講演要旨集: 250, 2014.

Iwamoto, S., Yamane, K., Nakagawa, T. and Yamauchi, R.: Application of supercooled water in W/O emulsion prepare by microchannel for cryopreservation, 10th European Congress of Chemical Engineering, Abstracts 736, 2015 .

Nishizaki, T., Yamane, K., Iwamoto, S. and Yamauchi, R.: Observation of mono disperse W/O emulsion prepared by microchannel at subzero temperature. 10th European Congress of Chemical Engineering, Abstracts 1617, 2015 .

山根 克己, 岩本悟志, 中川 智行, 山内 亮: 微細水滴に内包した出芽酵母の生存率向上のための連続相の検討. 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集: 225, 2015.

Peanparkdee, M., Iwamoto, S. and Yamauchi, R.: Encapsulation of extract from Thai riceberry bran using gelatin, 24<sup>th</sup> International Conference on Bioencapsulation. Abstracts P35, 2016 (Portugal).

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/%7Eshokko/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岩本 悟志 ( IWAMOTO, Satoshi )

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号 : 00373233

### (2)連携研究者

中川 智行 ( NAKAGAWA, Tomoyuki )

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号 : 70318179