

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19028

研究課題名(和文)超瞬間凍結によるクライオバイオロジーの新展開

研究課題名(英文)Novel methodology in cryobiology "superflash freezing"

研究代表者

秋山 佳丈(Akiyama, Yoshitake)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：80585878

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):細胞をそのまま凍結すると、細胞内外で生成する微小な氷の粒が生成し、これらが細胞膜や細胞小器官を傷つけるため、細胞は死滅してしまう。そのため、従来の全ての凍結保存法は、氷の粒の生成を防ぐため、凍結保護剤(有機溶媒等の化学物質)を添加することが必須だった。それに対し、我々はインクジェットによる細胞印刷技術により、細胞を微小液滴に内包し超瞬間的に細胞を凍結する技術を開発した。そして、世界で初めて凍結保護剤を用いずに動物細胞を凍結保存することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、世界で初めての凍結保護剤不要の動物細胞凍結保存を、インクジェット技術を利用した超瞬間凍結により実現した。本研究は、主に研究に用いられる3種類の細胞において実証したが、今後はより多くの細胞への適用が望まれる。特に、凍結保護剤の影響が懸念されるヒトiPS細胞やその分化細胞、凍結保護剤の添加が望ましくない生殖医療における精子や卵子、輸血用の血液細胞などが挙げられ、臨床医療を含めた多くの医学および生物学分野への応用が期待される。

研究成果の概要(英文):All the current methods require at least one cryoprotectant agent (CPA) to ensure water around the cells vitrifies not to form ice crystals, which can damage cells. To the best of our knowledge, a CPA-free cell cryopreservation method has not been established. Here, we demonstrated CPA-free cryopreservation by ultrarapid cooling using inkjet printing.

研究分野：バイオエンジニアリング, 生体医工学, マイクロナノメカトロニクス

キーワード：超瞬間凍結 凍結保存 低温生物学 凍結保護剤フリー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

凍結保存は、生きた動物細胞を用いる生物や医学に関する多くの研究分野及び臨床医療において欠かせない技術のひとつである。理想的には、これら動物細胞の凍結保存は、培養している培地でそのまま行いたい。しかし、細胞をそのまま通常凍結すると氷晶が生成し、これが細胞膜や細胞内小器官を破壊するためほとんど全ての細胞は死滅してしまう。そのため、細胞内外の水分子を結晶化させるのではなく、ガラス化する必要がある。これは、理論的には超急速凍結により可能であるが、これには臨界冷却速度以上での冷却が必要であり、技術的に困難だった。そのため、従来の細胞凍結保存技術において、Dimethyl Sulfoxide (DMSO) やグリセロールなどの凍結保護剤 (Cryoprotectant Agent, CPA) の添加が行われていた。しかし、一般に CPA には細胞毒性があるだけでなく、例えば DMSO には多能性幹細胞の stemness に影響を与えるなど、使用が望ましくない。

もし、生体試料を通常培養している培地中でそのまま凍結保存出来れば理想である。これは、理論的には、超急速凍結により細胞や周りの培地中の水をガラス化すれば可能である。古くより超急速凍結によるガラス化を利用した生細胞の凍結保存の可能性は示唆されていたが実現されていない。最近では、インクジェットやスプレーによる微小液滴を利用した細胞の超高速凍結も報告されているが、CPA の低濃度化に留まっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、インクジェットにより微小液滴内に細胞を内包し瞬間凍結することで、CPA フリーの細胞凍結保存法の確立を目指す。また、これまでもインクジェットやスプレーによる微小液滴を利用した細胞の高速凍結は行われてきたが、液滴サイズは最小でも数 nL 程度であり、CPA の低濃度化に留まっていた。そこで、著者らは、最小で 40 pL の液滴を吐出可能なインクジェットヘッドを用いて、液体窒素で冷却した基板へ細胞を吐出することで、瞬間的に細胞を凍結する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 超瞬間凍結装置

インクジェットを用いて、微小液滴中に細胞を内包し吐出することで、凍結保護剤を用いずに細胞をそのまま凍結する技術を確認した (図 1)。本装置は凍結用の冷却チャンバー部、2 軸自動制御ステージ(xy 平面)、インクジェットヘッド部で主に構成されている。また本装置はクリーンブース(AI 型, AS ONE)内に静置しており、装置周辺のほこりを軽減した。詳細は、文献[1]に記載されている。

#### (2) 細胞生存率の評価

凍結後は、37 °C に温めておいた培地にガラス基板ごと細胞を浸漬することで急速解凍し、その生存率を、生死判定試薬 (生細胞のみを染色する CalceinAM と死細胞のみを染色する PI) により評価した。

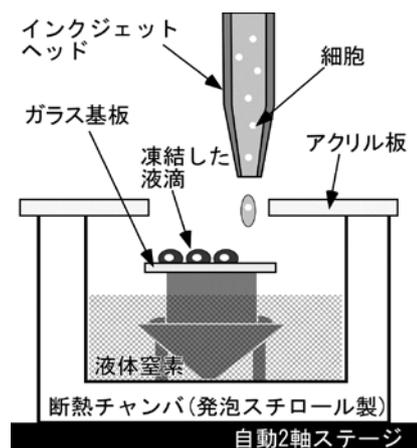


図 1 超瞬間凍結装置概要

### 4. 研究成果

#### (1) ガラス化の検証

細胞を用いた凍結保存の検証に先立ち、インクジェットヘッドにより吐出された液滴がガラス化されていることを以下の 2 つ手法により検証した。

まず、高速度カメラを用い、本システムによる着滴凍結時の液滴の輝度変化を対照実験と比較することで、ガラス化について評価した。まず、ガラス化する対照実験として、グリセロール 20% 含有リン酸緩衝液を液体窒素で冷却した基板へ吐出したところ、輝度変化は見られなかった。次に、結晶化する対照実験として、ドライアイスで冷却した基板への吐出を行った。ドライアイスの温度は、水のガラス転移温度よりも高いため、液滴は必ず結晶化する。その結果、予想通り輝度は上昇した。最後に、培地を液体窒素で冷却した基板へ培地を吐出したところ、輝度が上昇しなかった。以上から、本システムにより凍結された液滴は結晶化していない、すなわちガラス化していることが示された。

次に、顕微ラマン分光により、瞬間凍結した微小液滴の凍結状態を評価した。水の OH 伸縮振動領域 (3100 cm<sup>-1</sup> 付近) におけるラマンスペクトルにピークがあれば結晶化しており、無ければガラス化していると考えられる。その結果、200 pL の液滴ではピークが観察されたのに対し、40 pL の液滴にはピークが確認できなかった。従って、本システムで凍結された液滴は、ガラス化していると考えられた。

#### (2) 細胞生存率の評価

本凍結手法の有効性を解凍後の細胞の生存率に基づき評価した。以下に、マウス筋芽細胞

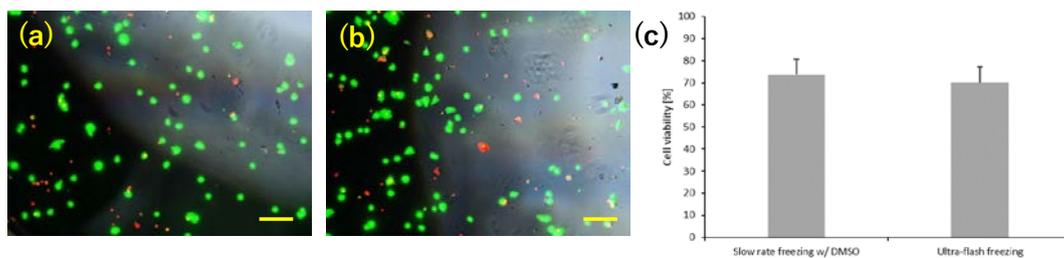


図 2 細胞の生存率 (a)従来法による細胞, (b)超瞬間凍結による細胞, (c)生存率の比較概

C2C12 におけるデータを示す。従来法として DMSO 10% 添加による緩慢凍結法および CPA を用いずに超瞬間凍結法により凍結した細胞を、それぞれ解凍し 3 時間培養後を評価した。蛍光画像と位相差画像を合成した画像および生存率を図 2 に示す。超瞬間細胞凍結後直ちに解凍した際の生存率は 70.1% であり、緩慢凍結後解凍した際の生存率は 73.7% であった。これらの生存率の結果に差異はほとんど無く、超瞬間細胞凍結法は有用であると考えられる。

また、マウス繊維芽細胞 3T3 およびラット間葉系幹細胞でも同様の結果が得られた。特に、ラット間葉系幹細胞においては、DAPI で染色された核の周囲が、抗 CD73 マーカーおよび抗 CD146 マーカーにより染色されたことから、未分化状態を維持している事も確認できた。

### (3) 解凍工程の自動化

ここまで、本装置にて凍結後の解凍操作は手動で行っており、室温中で基板を運搬することによる昇温が確認された[2]。この昇温により液滴温度がガラス転移温度を超え、細胞内外の水分子が急速に結晶化することで、解凍後の生存率の低下や、液滴間の昇温差による生存率の分散の原因となると考えられる。そこで、次に解凍後の細胞生存率向上と分散値の低下を目的とした、高速で凍結液滴の解凍を可能にする自動解凍装置を開発し、熱流体シミュレーションとハイスピードカメラによる観察を元に評価を行った。

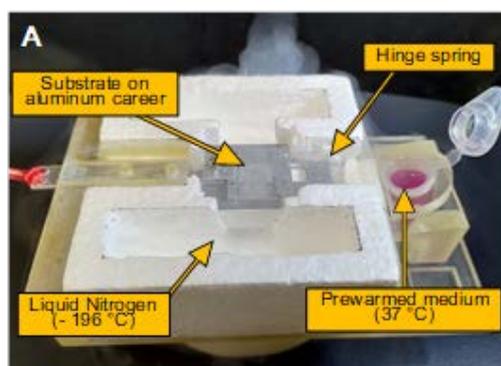


図 3 自動解凍装置

まず、自動解凍装置は、3D プリンター (Agilista, Keyence) とアルミ板、ばねヒンジを用いて作製した (図 3)。液滴の解凍速度を高めるために、基板の着滴面側を初めに解凍液に浸漬させる必要があった。そのため、ばねヒンジを用いて基板を載せたアルミニウム製キャリアを半回転させる機構を作製し、回転によって基板を解凍液に投げ落とした。

次に、作製した自動解凍装置の基板回転速度を、高速度カメラ (EX-ZR1000, CASIO) により 1000 fps にて撮影したところ、約 20 ms で解凍工程を終えていることが分かった。そこで、この結果を基に熱流体シミュレーションを行い、解凍工程における温度上昇を評価した。従来法では、基板持ち上げ直後から昇温が確認されており、約 1 秒でガラス転移温度を超えた。一方、自動解凍装置を用いた際は、基板が投げ落とされる 20 ms 後でも約 -190 度を保っていた。

本自動解凍装置により、マウス繊維芽細胞 3T3 を用いて細胞の生存率により評価した。これまでの超瞬間凍結法における生存率は、従来法と比べ 10% 程度低かったが、超瞬間凍結法と本解凍装置を平行することで、同等の生存率を得ることが出来た。

このように、世界で初めて CPA を用いない動物細胞の凍結保存技術を確認した。そして、さらに解凍工程についても自動化することで、CPA を用いた従来法と同等の生存率を達成することができた。今後、CPA の添加が問題となるような多能性幹細胞や凍結困難な血球細胞等への本技術を展開していきたい。

### <引用文献>

- [1] Y. Akiyama, M. Shinose, H. Watanabe, S. Yamada, Y. Kanda, Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(16):7738-7743 2019.
- [2] 渡部広機, 瀧澤秀世, 秋山佳丈 “凍結保護剤フリーで凍結された細胞の長期保存に向けた脱ガラス化の抑制”, *低温生物工学会誌*, 66(1), 41-44, 2020.
- [3] 渡部広機, 秋山佳丈 “超瞬間細胞凍結法のための自動解凍装置開発と伝熱解析による評価”, *日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会(Robomech)*, 1P1-P07, 2020.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akiyama Yoshitake, Shinose Masato, Watanabe Hiroki, Yamada Shigeru, Kanda Yasunari	4. 巻 116
2. 論文標題 Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7738 ~ 7743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1808645116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 秋山佳丈	4. 巻 50(9)
2. 論文標題 超瞬間凍結による新しい細胞保存技術の開発に向けて	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 484 ~ 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 秋山佳丈, 渡部広機	4. 巻 18
2. 論文標題 超瞬間凍結による凍結保護剤フリー細胞保存における冷却基板の影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学とマイクロ・ナノシステム学会誌	6. 最初と最後の頁 29-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 秋山佳丈, 渡部広機	4. 巻 1
2. 論文標題 凍結保護剤フリーで凍結された細胞の長期保存に向けた脱ガラス化の抑制	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 41-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 秋山佳丈	4. 巻 78
2. 論文標題 超瞬間凍結技術を用いた凍結保護剤フリーの細胞保存法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 24-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡部 広機, 瀧澤 秀世, 山田 茂, 諫田 康成, 秋山 佳丈
2. 発表標題 インクジェット技術による超瞬間細胞凍結保存法のhiPS細胞への応用
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部 広機, 瀧澤 秀世, 山田 茂, 諫田 康成, 秋山 佳丈
2. 発表標題 インクジェット技術による超瞬間細胞凍結保存法の間葉系幹細胞への応用
3. 学会等名 第28回インテリジェント・ナノ材料シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠瀬真人, 秋山佳丈
2. 発表標題 インクジェット技術を利用した細胞瞬間凍結保存法における凍結状態の評価
3. 学会等名 日本機械学会 2018年度年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋山佳丈
2. 発表標題 インクジェットを利用したCPAフリー細胞凍結保存法の確立
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考