

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：51401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K03995

研究課題名(和文) 極低温流体による生体細胞の機能的冷却時に発生する沸騰現象の熱・流体・物質伝達機構

研究課題名(英文) Heat, fluid and substance transfer mechanism of boiling phenomenon in cryogenic fluid during functional cooling of living cell

研究代表者

野澤 正和 (NOZAWA, Masakazu)

秋田工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：60447183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：凍結保存技術の凍結・融解後の生存率の向上を目指して、液体窒素浸漬冷却時に冷却対象周囲に発生する膜沸騰による蒸気挙動の制御を試みた。冷却対象表面の膜沸騰の様子を可視化観測を行った。得られた可視化画像を、輝度値の変化の画像解析を行うことで、容器表面の形状を変化させた場合の影響について考察を行った。冷却対象表面を60meshのステンレスメッシュで覆った場合、何も覆わない場合と比較して、発生する蒸気量が抑制されることが確認できた。また、温度計測により、冷却対象表面の伝熱特性の変化は、対象内部の深さ1 mm以内には影響を及ぼすことが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果により、液体窒素浸漬冷却のような高冷却速度の凍結保存において、容器表面の形状を微細な凹凸のある構造にすることで、現状よりも高い冷却速度を得るための方法の一つになることが確認できた。また、表面形状の変化による、外部の伝熱特性の変化が内部への伝熱に及ぼす影響も計測することができたため、これらの知見は、凍結保存用の容器の設計に役立てることができると言える。

研究成果の概要(英文)：Recently, ES/iPS cells have attracted attention in the field of regenerative medicine. However, there is a problem that the survival rate after freezing and thawing is low. It is known that the survival rate is improved in the high cooling rate. Therefore, high speed cooling by liquid nitrogen is necessary. However, the film boiling occurs when the cooling object is immersed directly in liquid nitrogen, and as a result, the cooling rate is suppressed. It was found in our past research that the cooling rate is increased by covering the cooling object by a stainless steel mesh. However, it was not clarified how the mesh could suppress film boiling. In order to investigate the boiling state, visualization of film boiling on the surface of cooling object was performed using a high-speed camera and a cryostat. It was confirmed from the image analysis for results of the film boiling that the size and frequency of the vapor bubble were changed with the surface condition.

研究分野：熱工学

キーワード：沸騰制御 熱工学 凍結保存 伝熱促進

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療分野における、iPS/ES 細胞の長期保存において、生体組織や細胞の凍結保存技術の改善は必須といえる。特に、ヒト iPS/ES 細胞については、マウスのもと比較して、凍結・融解後の生存率が低く、生存率改善のための凍結保存技術が求められる。凍結保存における細胞の生存率は、冷却速度や凍結保護物質の種類や濃度に依存する。その中で、高冷却速度を実現することが、生存率改善の一つの手段である。現在、高冷却速度を実現するためには、一般的に液体窒素による浸漬冷却が用いられている。一方、浸漬冷却時には冷却対象表面で激しい沸騰が発生することになる。つまり、発生した蒸気により、伝熱が阻害され、結果として伝熱特性が低下する。よって、浸漬冷却時の伝熱特性の改善が求められる。

この伝熱特性の改善のため、膜沸騰熱伝達を促進し、速やかに核沸騰熱伝達に移行させる必要がある。これまで、冷却対象である容器表面を金属のメッシュで覆うことで、膜沸騰時の液温上昇を抑制できることが分かった。つまり、容器表面の状態を変化させることで、周囲の伝熱特性が改善され、結果として、容器内部への伝熱特性にも影響を与えることが示唆された。したがって、容器表面の伝熱特性の更なる改善のため、機能的な冷却方法の確立が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、生体細胞の凍結保存において、凍結・融解後の生存率の向上を目指し、冷却対象の表面形状の変化による伝熱特性への影響について明らかにした。具体的な実施内容を以下にまとめる。

①液体窒素とガスヘリウムを用いた機能的な冷却技術について、熱・流体・物質伝達の観点から考察を行う。

②金属メッシュによる表面形状の変化によって冷却対象近傍に生じる、蒸気膜挙動の変化を明らかにする。

③容器表面での伝熱特性が、容器内の表面からどれくらいの深さまで影響が及ぶかを確認する。

3. 研究の方法

①伝熱特性計測実験

実験装置の全体の概略図を図 1、試験部の概略図を図 2 に示す。生体組織を模擬した試料として濃度 1.5 wt% の寒天を使用し、 $\phi 8.2 \times 45$ の容器に満たした。寒天を模擬生体組織として利用したのは、寒天と同様に生体組織の細胞は約 75% が水分であり、また入手と製造が容易であることから採用した。温度センサは、T 型熱電対を使用した。T 型熱電対は、低温領域の起電力特性に優れていて、液体窒素温度においても、高い精度で温度計測を行うことができる。寒天内部中心部と寒天容器の外側に設置した。内部の熱電対は、寒天に挿入する際に実験ごとのズレを少なくするために、セラミックの棒で円筒容器上部から 31 mm、容器表面から 4 mm の深さの位置に固定した。表面の形状を変化させるために、三種類のメッシュを用意した。1 inch あたり 30, 60, 200 mesh のステンレス製のメッシュを使用し、各メッシュの空孔のサイズはそれぞれ 0.597, 0.283, 0.067 mm である。また、メッシュの厚さはそれぞれ、0.25 mm, 0.14 mm, 0.04 mm である。メッシュの厚さは、使用されているワイヤーの直径とした。使用した寒天容器とメッシュを図 3 に示す。寒天容器表面に巻くメッシュは、結束バンドを用いて、容器表面に設置した温度センサを覆うように固定した。温度計測には、メモリーハイコーダでデータの取得を行い、液体窒素は、77 K の飽和状態を真空断熱容器に入れて使用した。

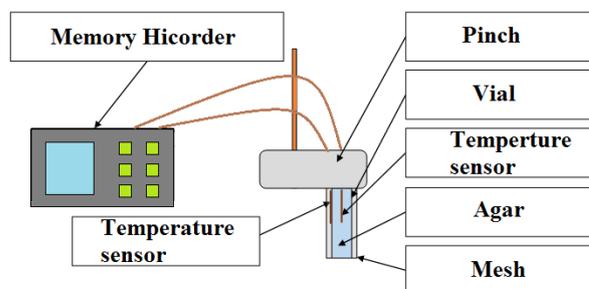


図 1. 実験装置全体の概要図

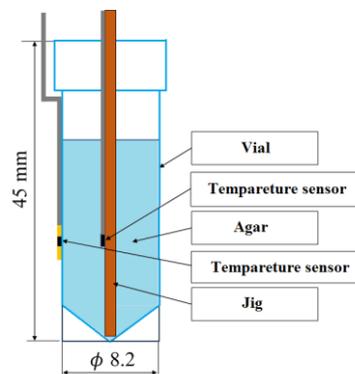


図 2. 試験部の概要図

②可視化実験

図 3 に実験装置の模式図を示す。装置はクライオスタット、光源、高速度カメラ、アクリル製治

具で構成される。冷却対象は、図 4-(a)に示す、銅角棒 (10×10×48mm) を用いた。表面を覆う金属メッシュとして、昨年までの研究で最も冷却速度が向上した、1inch あたり 60mesh のステンレス製メッシュ(図 4-(b))を用いた。光源は 150W のメタルハイドライドランプを用いた。図 5-(a)に示すクライオスタットには可視化観測を可能にするため、可視化用光学窓が 3 つ備わっている。解析は銅角棒の側面に発生する蒸気泡を対象とする。しかし、液体窒素への銅角棒の浸漬後には銅角棒全面から大量に蒸気泡が発生し、それらが解析を行いたい面での膜沸騰の状態の観測解析を妨げる。それを避け、側面のみから発生する蒸気泡を可視化、撮影するために図 5-(b)に示すアクリル製の治具を用いた。また、銅角棒を自由落下させて実験を行なうが、底面積が小さい銅角棒が直立するのは困難である。そのため、治具の銅角棒を投入する部分は、銅角棒のサイズと近くっており(13×20mm)、銅角棒を直立させる役割も担っている。

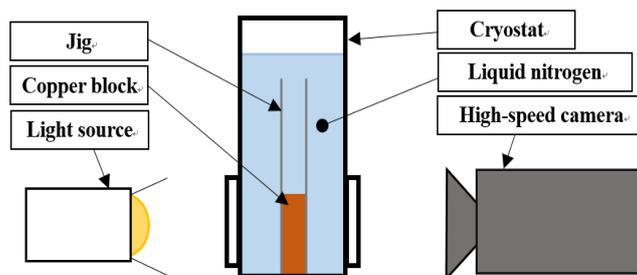


図 3 可視化実験の模式図



(a)銅角棒 (10×10×48mm)



(b)ステンレスメッシュ

図 4 試料

4. 研究成果

①ガスヘリウムを用いた冷却時の温度変動



(a)クライオスタット



(b)アクリル製治具

図 5 実験装置

液体窒素にガスヘリウムを注入することで、強制蒸発による液体窒素中の温度上昇の抑制効果

をねらう。ガスヘリウムによる沸騰抑制効果が、どの程度の規模の沸騰現象にまで適用できるかについて検討を行った。図6に温度変動の時系列変化を示す。今回は、ガスヘリウムの注入方法として、冷却対象浸漬前に注入した場合（With He Gas）と、冷却対象浸漬後に注入した場合（He Gas before immersion）で比較を行った。参考のため、ヘリウムガス注入無しの条件も計測を行った。図において、0 sec が液体窒素に浸漬開始した時間である。ガスヘリウム注入により、膜沸騰時の温度が抑制されることが確認できた。ガスヘリウム無しの場合は、 -194°C 近傍で温度が変動しているが、ガスヘリウム中により、温度変動は抑制されていることが分かる。冷却対象浸漬前に注入した場合は、15 sec～28 secの区間に温度変動が確認できるが、冷却対象浸漬後に注入した場合は、温度変動が抑えられていることが確認できた。

②冷却対象近傍に生じる、蒸気膜挙動の変化

図7, 8に撮影された浸漬後の膜沸騰の様子を示す。図は撮影された動画の中でメッシュ有りの場合とメッシュ無しの場合の特徴を最も顕著に表しているものである。

白の破線で示している箇所が銅角棒の位置である。可視化用光学窓が丸いため、周囲に丸い縁がある。また、中央の縦に大きく入っている黒い線は、アクリル製治具の輪郭である。銅角棒の周囲以外の箇所にある気泡はクライオスタット自体、もしくは可視化用光学窓とクライオスタットの境目から発生している気泡である。

撮影した動画を解析することでメッシュが有る場合と無い場合で蒸気泡の発生や成長に大きな違いや特徴があることがわかった。解説のために、銅角棒下端から銅角棒上端までの間を白の実線で4つの領域に分割する。

図7に示すメッシュ無しの場合、(1)の領域から大量の蒸気泡が発生している。その蒸気泡は、(2)の領域でも発生している蒸気泡と合体し、大きくなる。(3)の領域でも(2)と同様に成長するが、周期的に下端から発生した蒸気泡と合体し、大きな蒸気泡を生じる。(4)の領域では成長した蒸気泡が、上端から発生する蒸気泡と合体して、左側へと吸い込まれるようにして上昇していく。全体を通して、周期的に大きな蒸気泡を生じながら、蒸気は銅角棒の近傍で成長しつつ上昇していくと言える。

図8に示すメッシュ有りの場合、メッシュ無しの場合と比較して、(1)の領域で発生する蒸気泡の量は少ない。(2)の領域では蒸気泡が合体し始め、メッシュに沿って縦長の気泡となっていることがわかる。(3)の領域でも、蒸気泡は成長を続けるが、大きくなったことで蒸気泡の大部分がメッシュの外側にはみ出している。(4)の領域では(3)よりも蒸気泡が大きくなり、銅角棒から離脱するが、上端から発生している蒸気泡と合体することでメッシュ無しの場合と同様に左側へと吸い込まれていく。全体を通して、蒸気泡は、常にメッシュに沿って成長していくことで、成長を抑制されるが、上部ではメッシュ無しと同様な蒸気法の成長が確認された。

可視化画像による蒸気挙動を定量的に評価するために、撮影した画像を用いて、輝度値による解析を行った。背後から照明を当てているため、画像では蒸気泡が黒く表示される。つまり、蒸気泡がある箇所は輝度値が低くなり、蒸気泡が無い箇所は輝度値が高くなる。よって、解析領域における輝度値ごとのピクセル数を求めることで気泡の量を定量的に解析することができる。銅角棒の上端から20 mm下の部分の銅角棒表面から長方形の領域を解析領域とした。この領域で約6000ピクセルである。本来ならば輝度値は0~255あるが、主に変化の確認できた0~125までの輝度値の値を用いている。

輝度値による解析の結果を図9, 10に示す。縦軸がピクセル数、横軸が時間である。グラフの右側にあるカラーバーは、輝度値を示している。輝度値が低いほど青色に近づき、輝度値が高いほど赤い色に近づく。つまり、グラフ上で青色に示されている領域が大きければ、蒸気泡の量や大きさが大きいと言える。メッシュ無しの場合とメッシュ有りの場合のグラフを比較すると、メッシュ無しの方がメッシュ有りの場合よりも青色で示されている領域が大きいことから、メッシュが無い場合の方が蒸気泡が大きいと言える。また、青い領域のピークを比較すると、メッシュ無しの方がピークの高さにばらつきがあり、発生する蒸気泡の大きさにムラがあると思われる。

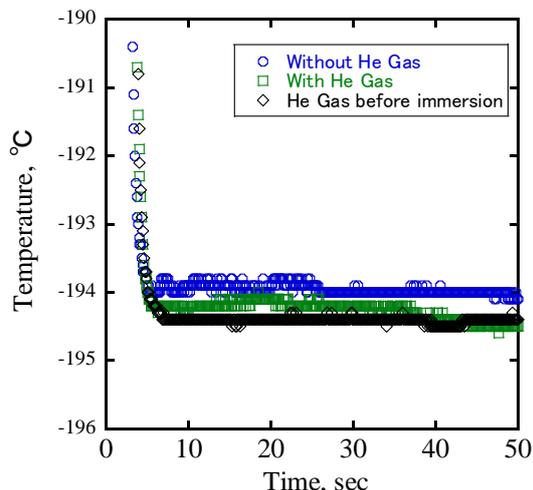


図6. ガスヘリウムの注入による温度変動

る。一方でメッシュ有りの場合はメッシュ無しの場合より突出したピークが無く、高さが比較的安定していることから、蒸気泡のサイズに大きな違いがないと思われる。

③容器表面での伝熱特性が、容器内の表面からどれくらいの深さまで影響が及ぶかの検討

容器表面から 1 mm の深さの位置での計測により、以前の実験で確認できなかった、膜沸騰から核沸騰に遷移する際の温度変化をとらえた。メッシュを巻いたものはメッシュなしと比べて、相変化後の冷却速度がより上昇する傾向にある。今回の結果より、容器から 1 mm 以内の深さの領域であれば、表面の伝熱特性の影響が及ぶと考えられる。

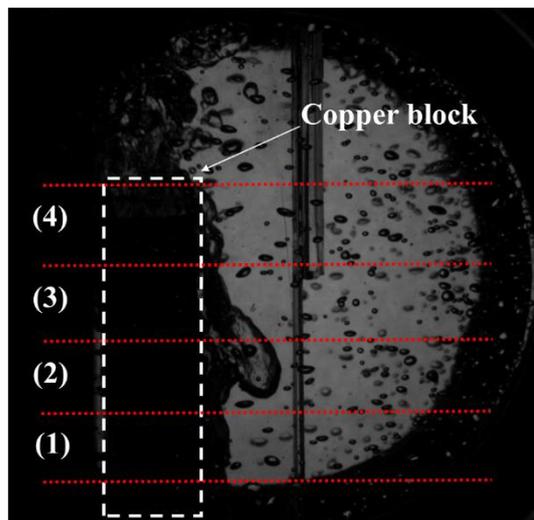


図 7. 沸騰時の様子(メッシュ無し)

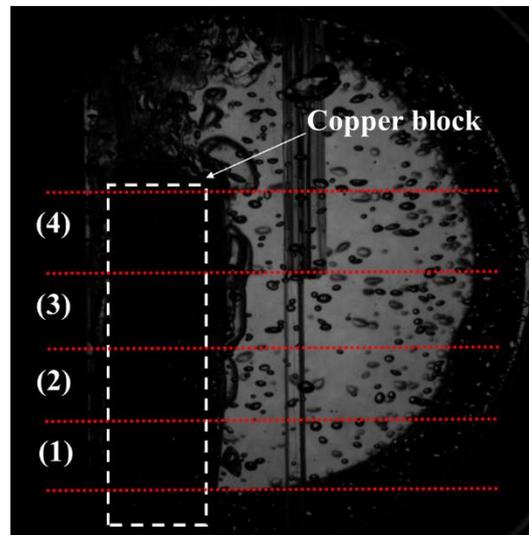


図 8. 沸騰時の様子(メッシュ有り)

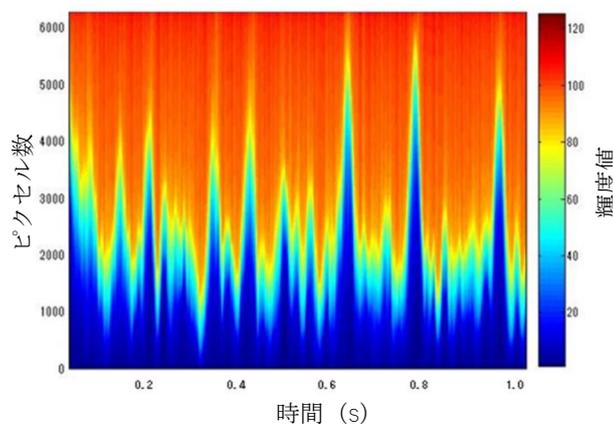


図 9. 輝度値の時間変化(メッシュ無)

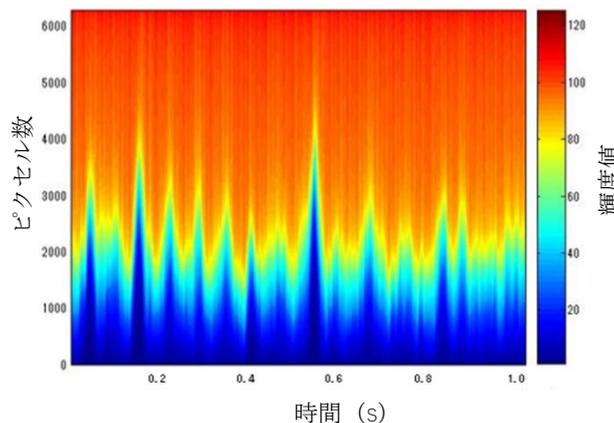


図 10. 輝度値の時間変化(メッシュ有り)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Masakazu Nozawa , Shuhei Funaki , and Niko Savela	4. 巻 1857
2. 論文標題 Improvement of cooling rate during cryopreservation of living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6. 最初と最後の頁 12001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1742-6596/1857/1/012001	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masakazu Nozawa, Shuhei Funaki and Niko Savela
2. 発表標題 Improvement of Cooling Rate during Cryopreservation of Living Cells
3. 学会等名 10th Asian Conference on Applied Superconductivity and Cryogenics (ACASC), 2nd International Cryogenic Materials Conference in Asia (Asian-ICMC), and the CSSJ meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船木 周平, 野澤 正和
2. 発表標題 急速冷却による生体組織の凍結保存時の伝熱特性の改善
3. 学会等名 令和元年度東北地区高等専門学校専攻科産学連携シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船木 周平, 野澤 正和
2. 発表標題 生体組織の凍結保存における冷却速度と沸騰状態の関係
3. 学会等名 日本機械学会2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石黒博、野澤正和
2. 発表標題 細胞の繰り返し凍結・融解後の形態変化と生存性
3. 学会等名 63回低温生物工学会大会 & セミナー
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------