

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K14662

研究課題名（和文）グリーンな細胞凍結保存プロセス設計のための細胞内水ダイナミクスの解明に関する研究

研究課題名（英文）Experimental study on molecular dynamics of water to design greener cryopreservation process of cells

研究代表者

松浦 弘明 (Matsuura, Hiroaki)

東京大学・生産技術研究所・特別研究員

研究者番号：50847994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞内の水分子ダイナミクスに着目し、これを誘電分光を用いて測定した。まず細胞懸濁液の誘電スペクトルの取得に適した実験装置を構築し、また細胞のスペクトルの解析により水分子ダイナミクスを反映する誘電緩和時間を評価する手法を確立した。この手法を用いて、浸透圧の異なるスクロース水溶液に懸濁させた細胞について行った測定では、細胞脱水による細胞内水分子ダイナミクスの分布の変化が明らかになった。また、 $-39^{\circ}\text{C}$ までの氷点下における測定では、細胞内外の凍結による誘電スペクトルの変化等が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目した細胞内の水分子ダイナミクスは、細胞内の氷の核生成頻度に関連していると考えられ、その実験的な評価手法の整備により、様々な現象が関わる複雑な細胞凍結保存プロセスについての理解につながりうるという学術的意義に加えて、細胞内の水分子ダイナミクスを指針の一つとして細胞凍結保存プロセスの効率化が実現されれば、細胞の凍結保存が不可欠な再生医療や免疫療法、不妊治療等の拡がりに寄与するという社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, the molecular dynamics of water in cells was investigated by the dielectric spectroscopy, with the aim to have a better knowledge about how the intracellular water molecules behave with the existence of cryoprotective agents used in cryopreservation of cells. An experimental setup for the dielectric spectroscopy of cell suspensions was built to obtain dielectric spectra for the frequency range from 40 Hz to 43.5 GHz. Using this setup, measurements were performed on Jurkat cells suspended in sucrose aqueous solutions of different concentrations at a temperature of  $25^{\circ}\text{C}$  to evaluate the effect of cell dehydration. By the analysis of dielectric spectra, the difference in the distribution of molecular dynamics of water due to the dehydration was shown. In addition, dielectric spectra for cells suspended in cryoprotective solutions were obtained at the temperature range of  $10^{\circ}\text{C}$  to  $-39^{\circ}\text{C}$ , which leads to understanding of the water behavior in cryopreservation processes.

研究分野：熱工学

キーワード：バイオ熱工学 誘電分光 水分子ダイナミクス 細胞凍結保存 凍結保護物質

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の凍結保存は通常 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下の極低温環境に細胞をおく事で、水を媒介とした生化学反応を抑える手法であり、再生医療や免疫療法、不妊治療などに欠かせない技術である。凍結の過程で細胞内に氷の結晶が生成されると、細胞に対して致命的な損傷を与え得るため、これを抑えるために凍結保護物質の添加が凍結操作前に行われる。しかし、一般的に用いられている保護物質であるジメチルスルフォキシド(DMSO)については、その問題点として細胞毒性のため解凍時に速やかに除去する必要があることや、細胞の分化能への影響などが指摘されており、DMSOに代わる新規な凍結保護物質が求められている。

自然界にはクマムシのように極低温を耐える生物が存在し、その体内に高濃度の糖や糖アルコール等が蓄えられることが知られている。これらの物質は、環境負荷の小さな溶媒であるグリーンソルベントとして注目される天然深共晶溶媒と呼ばれる液体を構成するものであり、その凍結保護作用との関連が指摘されている。このような新規な凍結保護物質を利用した細胞凍結保存プロセスを設計・最適化するためには、凍結保護物質による保護メカニズムの解明が重要であり、そのためにプロセス中における細胞内の現象についてのバイオフィジカルな理解が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞内の氷の核生成頻度と関連があると考えられる細胞内の水分子のダイナミクスを、誘電分光と呼ばれる技術を用いて測定することで、細胞凍結保存プロセスの設計・最適化に寄与する知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

まず、細胞内の水分子ダイナミクスを観測するための広帯域誘電分光システムの構築と誘電スペクトルの解析方法についての検討を行う。この技術を用いて、凍結保護物質を含む溶液に懸濁した細胞(モデル細胞としてヒト白血病T細胞由来のJurkat細胞を用いる)の誘電スペクトルの取得を行い解析することで、凍結保護物質による細胞内の水分子ダイナミクスへの影響を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞懸濁液の誘電スペクトル取得に関する検討:

同軸プローブを用いた周波数領域反射法による誘電分光で細胞内水分子ダイナミクスの測定を行うため、図1のような細胞懸濁液試料に適した試料容器を作成した。この容器下部の穴から同軸プローブを挿入し、また容器上部の穴に試料を滴下することで、プローブ先端と試料が接触する構造とした。

同軸プローブは、マルチポート同軸スイッチを介して周波数帯域の異なる3台の計測器(自動平衡ブリッジ法によるインピーダンスアナライザ(40 Hz-110 MHz)とRF I-V法によるインピーダンスアナライザ(1 MHz-3 GHz)、ベクトルネットワークアナライザ(10 MHz-43.5 GHz))に接続した。ベクトルネットワークアナライザを用いたネットワーク解析法では、原理上特性インピーダンスから離れた領域の測定が難しく、数100 MHz以下の周波数領域に対して不適であるために、RF I-V法によるインピーダンスアナライザによってこの周波数領域をカバーした。これにより40 Hz から 43.5 GHz の広帯域を連続的にスキャンし、誘電スペクトルを得ることができるようにした。

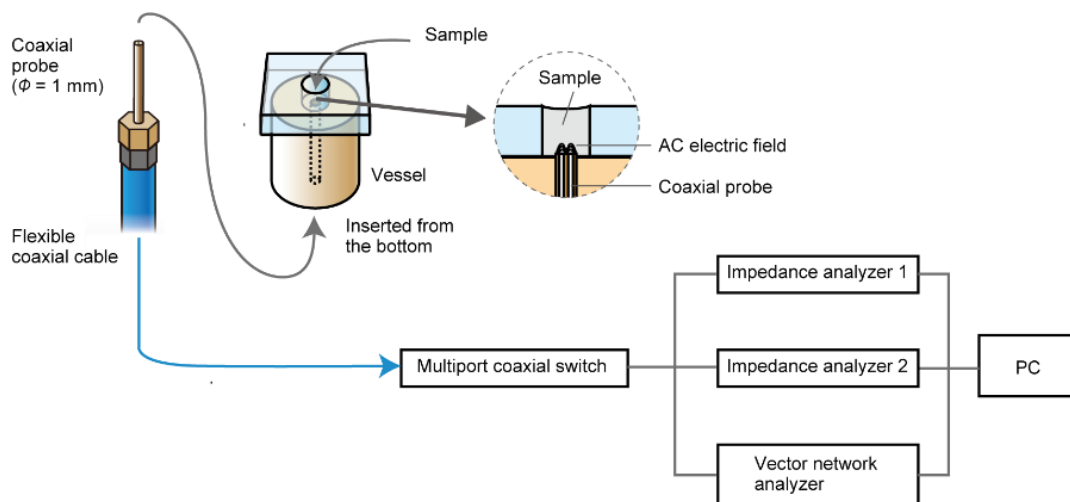


図1: 誘電分光システム。

(2) 直流導電率成分の寄与を除いた細胞懸濁液の誘電率虚部スペクトル取得についての検討:

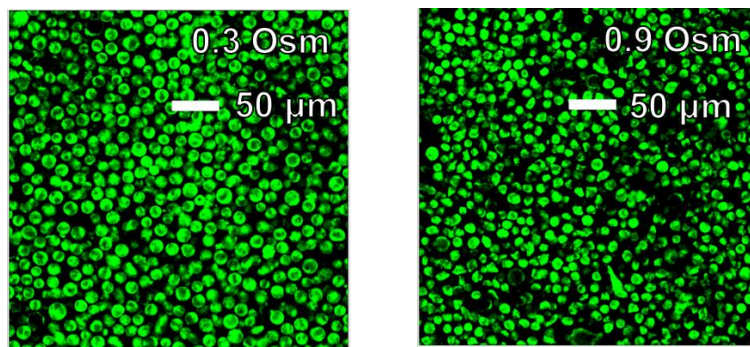
細胞懸濁液などの導電性を示す試料の誘電分光においては、誘電率虚部のスペクトルの数 GHz までの周波数領域に直流導電率成分の寄与があらわれ、この周波数領域で観測される水分子のローダイナミクスの評価を困難にすることが知られている。この直流導電率成分は誘電率実部にはあらわれないが、誘電スペクトルの解析を行う上では実部よりもピークを持つ形となる誘電率虚部のほうが扱いやすい。そこで、直流導電率成分を含まない解析に適した誘電率虚部を求めるため、Kramers-Kronig の関係に基づき、実験で得られた誘電率実部のスペクトルを Debye 型緩和の関数により外挿したスペクトルについて Hilbert 変換を行う方法を確立した。

(3) 細胞内水分子のダイナミクス評価のための誘電スペクトル解析方法の検討:

細胞に対する実験では、実際には高細胞密度の細胞懸濁液を試料にすることになるが、得られる誘電スペクトルは細胞内と細胞外(分散媒に相当)の情報が混ざったものとなる。とくに細胞内について調べるため、懸濁液の誘電率に関する Bruggeman-Hanai の関係を適用することについて検討した。Bruggeman-Hanai の関係を用いるためには懸濁液の誘電率と分散媒の誘電率のほかに、懸濁液中の分散質(細胞)の体積分率が必要となるが、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察と画像処理によりこれを算出するための方法について検討した。細胞懸濁液および懸濁液の分散媒(細胞懸濁液を遠心分離した際の上澄み溶液)のみの誘電スペクトルをそれぞれ独立に取得し、これらに対して Bruggeman-Hanai の関係を用いることで、細胞の誘電スペクトルを算出するための手法を確立した。また、得られた細胞の誘電率虚部スペクトルについて、Debye 型緩和の重ね合わせのモデルを用いて解析することで、分子ダイナミクスに関連する誘電緩和時間を求める方法を確立した。

(4) 脱水された細胞内の水分子のダイナミクス評価:

細胞凍結保存では、凍結過程で細胞が適度に脱水されることが重要であり、保護物質がこの脱水に影響を与えたと考えられている。そこで、ヒト T 細胞性白血病由来の Jurkat 細胞を複数の浸透圧のスクロース水溶液に懸濁し、25 °C において誘電スペクトルを取得することで、脱水した細胞内の水分子のダイナミクスを調べた。図 2 に等張、高張のスクロース水溶液にそれぞれ懸濁した細胞の蛍光顕微鏡像を示す。Bruggeman-Hanai の関係を用いて算出した細胞のスペクトルは図 3 のようになり、これを Debye 型緩和の重ね合わせのモデルを用いて解析した結果、水分子由来の緩和が 2 つの寄与の和で表された。同様の結果は、中性子準弾性散乱測定による文献にもみられたものである。また、脱水された細胞内では水分子ダイナミクスの分布が変化し、遅いダイナミクスの水分子が多くみられることを明らかにした。



(左) 等張 (細胞は脱水されない) (右) 高張 (細胞は脱水される)

図 2 スクロース水溶液に懸濁した Jurkat 細胞の蛍光顕微鏡像。

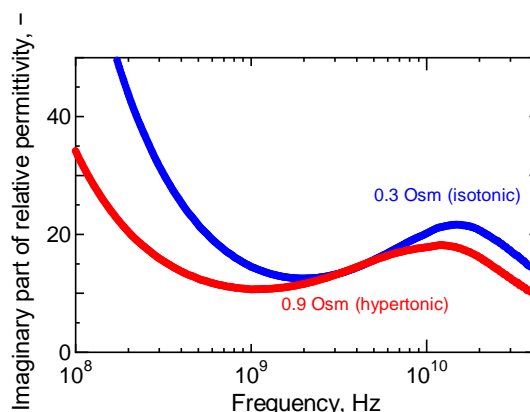


図 3 スクロース水溶液に懸濁した Jurkat 細胞の誘電スペクトル (25 °C).

(5) 氷点下での誘電スペクトル取得のための検討:

25 °C で行ってきた測定について、その温度範囲を低温側に広げるために−40 °C まで冷却可能な恒温水槽を導入し、これを新たに作成した温度制御用の銅製試料容器ホルダーと接続することで、−39 °C まで試料を冷却した状態で誘電スペクトルを取得可能にした。低温における測定に向けて、これまで25 °Cで行っていた校正をより低温(10 °C)で行うために、誘電率既知のスタンダードとして水、2-プロパノール、エチレングリコール、空気を用いる校正方法を確立した。

(6) 氷点下における細胞内水分子ダイナミクスの測定:

細胞凍結保存プロセスにおける細胞内水分子ダイナミクスの影響を調べるため、Jurkat 細胞を細胞培養液(RPMI1640)と凍結保護物質を含む溶液に細胞を懸濁させ、遠心分離した後に上澄みの溶液を取り除くことで高密度の細胞懸濁液を用意し、−39° C まで冷却して誘電スペクトルを測定した。冷却に伴って細胞内外の凍結による誘電スペクトルの変化等の観測により、細胞凍結保存の過程における細胞内の水分子の性質についての理解に寄与しうる知見が得られた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuura Hiroaki, Shirakashi Ryo	4. 巻 61
2. 論文標題 Exclusion of DC conductivity effect from dielectric loss spectrum using Kramers-Kronig relations for evaluation of slow dynamics of water molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 068003 ~ 068003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ac6afe	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 -

〔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 松浦弘明, 高野清, 白樫了
2. 発表標題 誘電分光による凍結保護物質水溶液中の細胞内水分子ダイナミクスの測定に関する研究
3. 学会等名 第57回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松浦弘明, 高野清, 白樫了
2. 発表標題 誘電分光を用いた25°Cにおける凍結保護物質水溶液中の細胞内水分子ダイナミクスの測定
3. 学会等名 第41回日本熱物性シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松浦弘明, 高野清, 白樫了
2. 発表標題 誘電分光による細胞内水分子ダイナミクスの測定（浸透圧変化による細胞脱水の影響）
3. 学会等名 第58回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦弘明, 高野清, 白樫了
2. 発表標題 誘電分光による細胞内水分子ダイナミクスの測定に関する研究(氷点下での誘電スペクトル取得と解析)
3. 学会等名 第59回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

松浦 弘明 (Hiroaki Matsuura) - マイポータル - researchmap  
<https://researchmap.jp/akimatsuura>

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