

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560193

研究課題名(和文)再生組織・臓器の時間停止と再起動：凍結・解凍技術への挑戦

研究課題名(英文)Challenging study for time stop and restart of regenerative tissues: Freeze and thaw technology

研究代表者

中村 真人(Nakamura, Makoto)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：90301803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：組織工学・再生医療では、作製した組織・臓器の時間を止め、長期保存を可能にする凍結保存技術が必要とされている。そこで、瞬間凍結や解凍の過程を可視化し、有効法を探索した。凍結可視化装置と評価システムを改良した。凍結保護液の効果可視化を確認できた。200μm幅の平滑筋組織ファイバーを作製し凍結現象を可視化した。細胞ごとに時間差をもって凍結する現象を確認できた。生存率は6割で、3次元組織の凍結現象の可視化法、細胞生死の評価法など課題が分かった。電磁誘導下での過冷却瞬間凍結法の実験用装置を試作し実験準備にかかった。

研究成果の概要(英文)：In tissue engineering and regenerative medicine, some effective technologies for preservation of engineered tissues for a long time is very much desired. Then, we explored effective cryopreservation methods by observing the moment of freezing and defrosting with high speed camera. We developed a custom-made high speed microscope system, which can control and measure temperature simultaneously. And the engineered fine cell fibers were tested. The effects of cryoprotect agents were confirmed by visualization, and the time difference of the freezing was seen for every cell. And it was found that 60% of cells were recovered after defrosted, using cryopreserving agents, too. Visualization was effective but there are still several issues to solve in visualization of 3D tissues and the evaluation of cell viability. We have just setup the experimental system for visualization of the moment freezing by electro-magnetic induction method for near future.

研究分野：再生医工学

キーワード：凍結保存 解凍 生存率 可視化 組織保存

1. 研究開始当初の背景

再生医療・組織工学の進歩により、いくつかの組織や臓器が培養技術で作り出せる時代になった。世界中で研究が盛んにおこなわれており、今後、様々な臓器でも培養組織、培養臓器が作製できるようになると見込まれている。

しかし、そのような培養組織・培養臓器を実際に使う段においては、生きた組織臓器は消費期限が短く作り置きもできない。例えば、培養皮膚では、細胞を培養し使用するまでに約2週間の時間がかかる。また、こうして作製した培養皮膚は、培養3日以内に、遅くても1週間以内に使用しなければならないという使用期限がある。再生医工学を進歩させ、せつかく作製した人工組織であっても、作製に時間がかかり、保存期限が非常に短いということでは、現場での使用は極めて限られる。そこで、本研究は、再生医工学技術で作製した組織・臓器の時間を止め、長期保存を可能にする凍結保存技術への挑戦を行う。

組織や臓器の凍結保存技術は医療や生命科学の分野ではとても重要な技術であるにもかかわらず、細胞の凍結保存はできて組織や臓器の凍結保存技術は未だ確立されていない。細胞の凍結保存においては、凍結時に細胞外部や内部に氷晶が形成され、それにより細胞が傷害されてしまうことが指摘されている [1]。凍結保護液やプログラムフリーザーなどの開発により、細胞の保存はかなりできるようになった。しかし、組織や臓器の場合は、細胞内部、外部の氷晶形成に加え、空間的温度差が避けられず、部位による凍結の時間差が生じる。そのため、組織構造が傷害される要因が大きいと予想される。

2. 研究の目的

そこで、我々は、組織や臓器での凍結現象を詳細に評価する必要があると考え、これまでに、高速度ビデオカメラを用いた可視化装置を作製し、凍結現象の高速度カメラ撮影を行ってきた。それにより、有効な凍結法を科学的に検証して有効な手法の発見につなげることを目指してきた。近年、電磁波負荷による過冷却を使った瞬間凍結法が進められているが、効果があるとは言われながら、十分な評価ができていない状況がある。今後、そのほかにも有効な手法の開発が行われると予想されるが、それらの有効性を科学的に評価する必要がある。凍結現象を詳細に客観的に評価するには、凍結現象をしっかりと可視化する必要があると考える。

本研究では、高速ビデオ観察できる現有の装置をさらに改良し、客観的な評価をできるようにすることを目指した。そして、まだ有効な方法が見つからない組織の凍結保存法に対して、凍結保護剤、瞬間凍結法などの手法を試行できるように考えた。

また、凍結保存が細胞の生命活動をストップさせる技術とすれば、細胞の生命活動を再

スタートする技術が解凍という過程である。個々の細胞であれば、凍結した細胞浮遊液を37の恒温槽で振とう培養すれば、すぐに解凍されて復活する。しかし、組織や臓器の場合、大きさがあるため、外部から加温してもすぐには解凍されない。電子レンジをかけたところで、溶けた場所は加温されるが、凍結部位の加温はできない。さらに、0からマイナス20の間では、氷晶が再結晶して大きく成長するという現象も報告されている。したがって、凍結した組織や臓器の解凍技術もまた重要な研究課題である。

3. 研究の方法

本研究は、以下の内容を進めた。

- (1) 可視化装置の改良
- (2) 凍結保存液での凍結現象の可視化
- (3) パターニングと鑄型培養による極細培養組織の凍結の可視化
- (4) 電磁誘導装置の試作

これまでに高速度ビデオカメラを用いた可視化装置を作製し、浮遊状態の細胞の凍結現象の可視化に成功してきたが、ありあわせの危機を集めた手作りの実験装置には温度を計測したり、冷却速度を制御したりすることが出来ないという問題点があった。そこで、この問題を解決するために、まず観察装置の改良を行った。

装置を用いての客観的な評価として、凍結保存液を用いてその効果を可視化した。

また、組織モデルとして、これまで培養皿上に培養した細胞を用いてきたが、より温度が全体に伝わりやすくするために、細胞のパターニング技術により極細の細胞培養構造物を作製し、凍結現象可視化実験を行った。

電磁波負荷による過冷却を使った瞬間凍結法を可視化で評価するために、電磁誘導装置を試作した。まだアンプをそろえねば実験ができないが、実験の準備が進んだ。

当初予定していた解凍技術については、次の研究課題として延期した。

4. 研究成果

- (1) 可視化装置の改良

温度計測、温度制御及び凍結中の結露の問題点を改善するために、いままでの凍結可視化装置に、顕微鏡用大型試料冷却加熱ステージ(10083L、ジャパンハイテック株式会社、福岡、日本)を導入した。この冷却ステージは、寒剤として液体窒素を用い、チャンバー内を灌流させることでサンプルを冷却が出来る。さらにチャンバー内に白金の熱電対が備わっており、チャンバーの温度を確認でき、灌流させる液体窒素の量をコンピューターで制御することで0.01/min~50/minの速度の範囲で温度制御をしながら冷却・加熱をすることが可能である。冷却中の結露の問題に関しては、ステージ内と観察部分のガラス面に気体の窒素を充満させることで防ぐことが出来る。

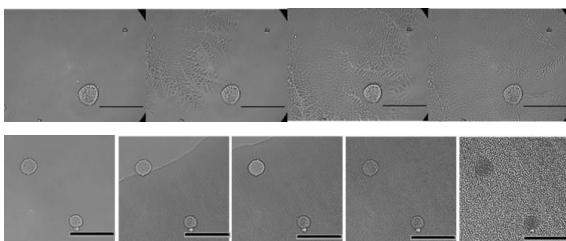
写真はセットアップした改良装置である。導入した冷却ステージ付きのチャンバーとステージと制御コントローラー、および外観図を示す。なお、計測した温度データは、データロガーで記録した。



図、可視化装置のセットアップ

(2) 凍結保存液での凍結現象の可視化

使用したサンプルとして培養した細胞(マウス平滑筋細胞 P53LMAC01)の細胞懸濁液を調整した。調整した細胞懸濁液を 10 μ l をスライドグラスに乗せ、カバーグラスで挟んだ。DMEM(再簿培養液)での懸濁と、凍結保護液(セルバンカー)の結果を示す。



図：培地での凍結(上)と保護液下での凍結(下)

細胞周囲の氷晶の大きさが明らかな異なり、保護液の方が氷晶は細かい。細胞内の凍結も観察できた。

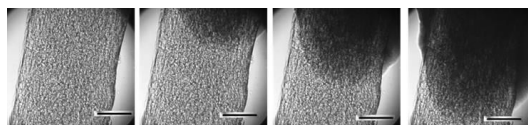
保存液は明らかに表彰を細かくしていることが分かる。

(3) パターニングと鋳型培養による極細培養組織の凍結の可視化

PDMS 樹脂で幅 200 μ m の溝を作り、そこで平滑筋細胞 P53LMAC01 を 24 時間培養した。その培養サンプルを用いて、セルバンカーを添加し、極細の組織の凍結の可視化実験を行った。

培養により、幅 200 μ m の平滑筋ファイバーが作製できた。それを用いた凍結実験の結果を示す。

3 次元の組織であるため、観察は非常に困難であったが、試行錯誤の末、動画が撮影できた。



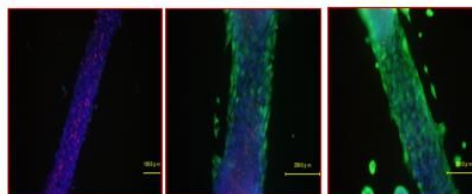
図：凍結保存液(セルバンカー)中の細胞培養構造物の凍結現象

凍結過程では、筋ファイバーの長軸に沿って凍結が進行していくのが観察できた。これは、短軸においても同様に温度差があり進行していくことを示している。凍結現象の場所による時間差は 200 μ m 程度では全く解消しきれないと憂いことが分かる。セルバンカーの効果で、細胞外の凍結では氷晶はきわめて細かいことも確認できた。

また、解冻した細胞のファイバーの Live & Dead Assay を行った。解冻直後では、Carcein の緑は全く見られなかったが、24 時間後はしっかりと現れていた。このことより、解冻の研究をする場合、解冻直後では通常の生死判定では細胞の生死評価不可能で、12 時間~24 時間培養してからの生死判定が重要であることが分かった。

結局筋ファイバーでは、生存率は約 6 割、組織の凍結保存の課題、3 次元組織の可視化法、細胞の生死の評価法など課題が分かった。

解冻直後 解冻12h後 解冻24h後



図：解冻後の細胞の生死判定(Live & Dead Assay)

(5) 電磁誘導装置の試作

電磁波負荷による過冷却を使った瞬間凍結法を可視化で評価するために、電磁誘導装置を試作した。まだアンプをそろえねば実験ができないが、実験の準備が進んだ。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1) 長谷部優希, 中村真人, 凍結可視化装置による組織の凍結保存に向けた基礎研究、Cryopreservation Conference 2014、2014 年 10 月 23-24 日(岡崎)

2) 中村真人, 特別講演: 3 次元組織モデルをいかに作るべきか? 第 27 回日本動物実

駿代替法学会、2014年12月5日(横浜)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 中村 真人(NAKAMURA
MAKOTO)

富山大学大学院理工学研究部(工学)教授
研究者番号：90301803