

[研究助成 (A)]

インクジェット超瞬間凍結による凍結困難バイオリソースの 凍結保存への挑戦

Experimental attempt of cryopreservation for uncryopreservable bioresources
by inkjet printing based superflash freezing

2201001



研究代表者

信州大学 学術研究院繊維学系

教授

秋山佳丈

[研究の目的]

細胞の凍結保存技術は、細胞を取り扱う多くの研究分野及び臨床医療において必要不可欠な技術のひとつである。細胞をそのままゆっくりと凍結すると、凍結過程において細胞内外の水分子が結晶化し、これが細胞膜や細胞小器官を傷つけることにより、細胞に致命的ダメージを与える。そのため既存の凍結手法では、ジメチルスルホキシド (DMSO) やグリセロールなどの凍結保護剤を添加し、細胞内部の水分子の結晶化を抑制しガラス化状態にすることで凍結保存を実現していた。しかし凍結保護剤自身の細胞毒性や、凍結過程における脱水によるダメージが問題視されていた。

それに対し、著者らは、冷却速度はサイズを小さくすればするほど向上すること、そして、臨界冷却速度以上で冷却することで純水であってもガラス化できるという物理化学的根拠に立ち戻った。そして、超瞬間的に凍結することで世界で初めて凍結保護剤を用いずに動物細胞凍結保存することに成功した。その一方で、凍結保存において冷却工程同様に解凍工程も重要であるにもかかわらず、十分な検討を行えていなかった。これまでの解凍は、凍結細胞を含む液滴を載せた凍結基板を、予温した培地に手動で投げ込むことで行っていた。そのため、操作者

の熟練度により解凍速度が安定せず、生存率の低下やばらつきが大きくなる原因となっていた。

そこで、本研究では、超瞬間凍結保存法を他の多くのバイオリソースへ適用できるようにするために、解凍工程を自動化することで、再現性と生存率を向上させることを目的とした。

[研究の内容、成果]

1. インクジェット超瞬間細胞凍結法

超瞬間凍結に用いた装置および方法について、以下に簡潔に述べる。マウス繊維芽細胞 NIH 3T3 細胞懸濁液 (1.0×10^7 cells mL^{-1}) をインクジェットヘッド内に充填し、約 40 pL の微小液滴内に細胞を内包した状態で吐出し、液体窒素で冷却されたガラス基板に着滴、超瞬間凍結させた。ガラス基板は、シリコンウェハに載せられた状態で、液体窒素が入った断熱チャンバー内に設置したアルミニウム製ベース上に置かれた。また、吐出の際に、ガラス基板を含む断熱チャンバーを自動ステージで移動させることで、液滴が重ならないようにした。なお、従来の解凍操作では、凍結液滴を基板に載せたまま、シリコンウェハを冷やしたピンセットで持ち、基板ごと 37℃ の解凍用培地に投げ入れた。

2. 自動解凍装置の開発

Fig. 1 に、自動解凍装置の写真と概要図を示す。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。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用培地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用培地に投げ落とした。

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) を用いて測定した。ばねヒンジが画面の中心になる様にカメラを設置し、十分に光が照射された状態で

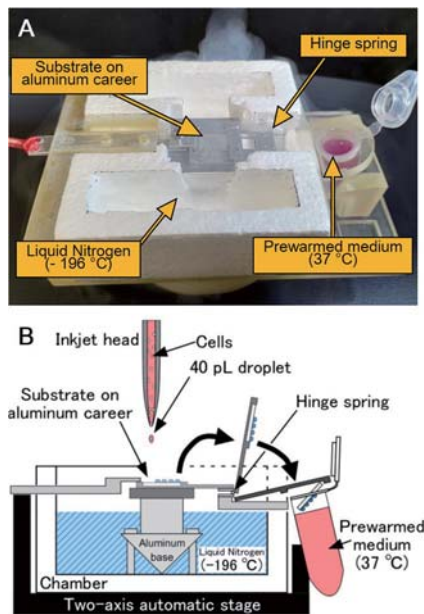


Fig. 1 Automatic thawing apparatus for the cryoprotectant-free cryopreservation of cells

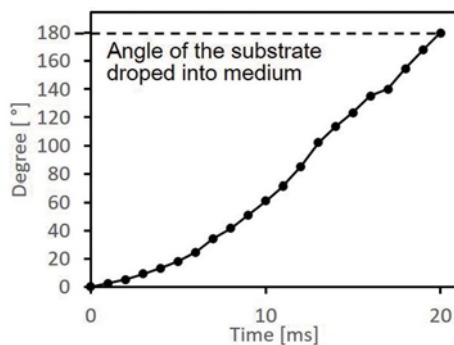


Fig. 2 Rotational angle of the aluminum carrier

1000 fps にて撮影した。撮影された動画から画像処理により、各時間でのガラス基板を載せたアルミニウム製キャリアの回転角度を算出した (Fig. 2)。その結果、アルミニウム製キャリアが液体窒素冷却面から離れてから、20 ms で回転を終え、基板を解凍用培地に投げ落としていることが確認された。これにより自動解凍装置を用いた際の基板運搬時間は約 20 ms であり、各加速度は $0.23^{\circ}/\text{ms}^2$ 、角速度は $11.1^{\circ}/\text{ms}$ であることが確認された。

次に、自動解凍装置での解凍工程における液滴の温度変化について評価する必要があるが、基板表面の液滴は非常に微小であり、その温度測定を直接行うことは非常に困難である。そのため有限要素法による熱流体解析ソフトウェア (COMSOL Multiphysics ver. 5.5) を用いて、液滴の温度変化を計算した。解析モデルの概要を Fig. 3A に示す。温度変化を確認する液滴のサイズは、高速度カメラで撮影することで計測した。ばねヒンジによる基板の回転速度は、高速度カメラで撮影した画像から算出し、基板と基板周囲の初期温度は -190°C とし、周囲の温度は 20°C とした。

回転開始後 0 ms, 10 ms および 20 ms の温度分布を Fig. 3B から D に示す。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°C を保っていた。液滴が

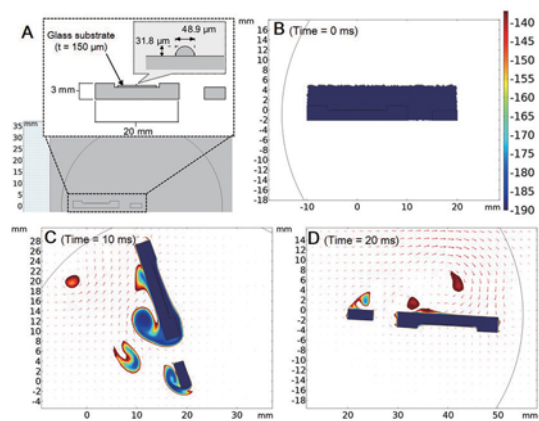


Fig. 3 Thermal flow simulation of the droplet on substrate

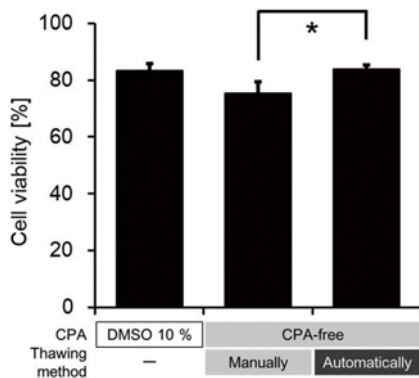


Fig. 4 Cell viabilities achieved via the conventional method using 10% DMSO and by superflash freezing followed by manual or automatic thawing

運搬中に昇温をしなかった理由として、液滴周囲に冷やされた空気の層が形成され、回転中は層を避ける様に室温の空気が流れたためであると考えられる。以上より、開発した自動解凍装置は、凍結液滴がガラス転移温度を超えずに低温を保ったままの状態、解凍用培地に投入し解凍することが可能であることが分かった。

そして、超瞬間凍結した細胞をこの自動解凍装置を使って解凍し、その生存率を比較した。Fig. 4 に示すように、手動で解凍した場合は若干、DMSO 用いた従来法より生存率が低くなっていたものが、自動解凍装置により同等の生存率となった。また、自動解凍装置により標準偏差を表すエラーバーが小さくなっており、再現性も向上したことが確認できた。

3. 衝撃液滴離脱による超瞬間解凍法

自動解凍装置により従来法同等の生存率を確認できたが、現手法は、液体窒素温度まで冷却された基板も共に予温した培地に浸漬しており、この冷却されている基板によって解凍速度が低下させられている可能性がある。この影響を除くことが出来れば、さらなる解凍速度の上昇とそれによる生存率向上が見込まれる。

そこで、基板を必要としない衝撃による液滴離脱を用いた超瞬間解凍法を検討した。これまでの解凍操作では、凍結液滴が載った基板をアルミニウム製トランスポータに載せた状態で、

ばねヒンジにより回転させて、解凍用培地にその慣性で基板ごとを落下させていた。試しに、トランスポータ上面に直接液滴を載せて回転させ、フレームにぶつけたところ、その衝撃で凍結液滴が離脱することが確認できた。この離脱した液滴を解凍用培地へ直接落下させれば、基板の影響を受けないさらに高速な解凍が可能となる。

まず、蛍光色素を用いて液滴離脱前後でトランスポータ上の液滴を観察し、離脱率を算出した。Uranine を終濃度 1.0 mM で溶解したリン酸緩衝液を、約 40 もしくは 200 pL の微小液滴として 1500 滴インクジェットヘッドから吐出し、冷却されたトランスポータに着滴させた。その後、着滴した液滴を USB カメラとズーム鏡筒 (Z16APO, Leica) を用いて蛍光観察した。そして、離脱操作後すぐにトランスポータ上を再度蛍光観察し、液滴数を画像解析ソフトウェア (ImageJ Fiji, NIH, USA) によりカウントした。

離脱前後のトランスポータ上面の液滴分布を Fig. 5 に示す。吐出直後は約 1500 滴の液滴が確認されたが、トランスポータの回転による離脱操作後に再び同じ場所を確認したところ、40 pL で 6 個、200 pL で 13 個とほとんど確認されなかった。これにより、本装置は、衝突の衝撃ではほぼ全ての液滴を離脱できることが確認できた。

次に、液滴の落下速度をハイスピードカメラと画像解析を用いて算出した。まず、ハイスピードカメラを用いて 40 および 200 pL それぞれの離脱後の落下を撮影した。次に、運動解析ソフトウェア (DIPP-Motion V/2D, DITECT) を用いて液滴を追跡し、それらの速度を算出した (Fig. 6)。それぞれの平均落下速度は 40 pL で 5.1 m/s, 200 pL で 5.0 m/s であったことから、液滴の落下距離、すなわちトランスポータと予温した培地間の距離は約 5 mm なので、落下時間は液滴サイズによらずおよそ 1 ms の非常に短時間の現象であることが確認できた。

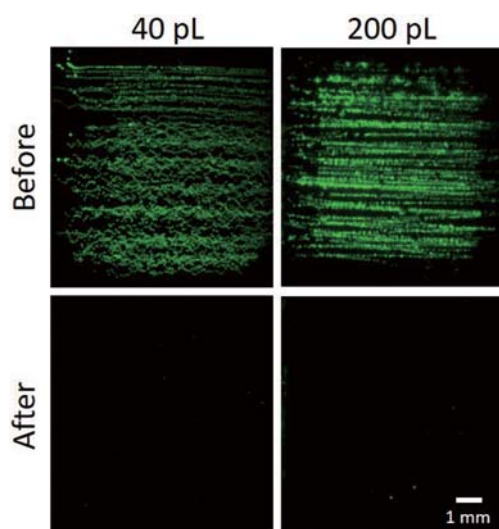


Fig. 5 Fluorescence images of the frozen droplets on the aluminum transporter before and after the impact-induced droplet releasing

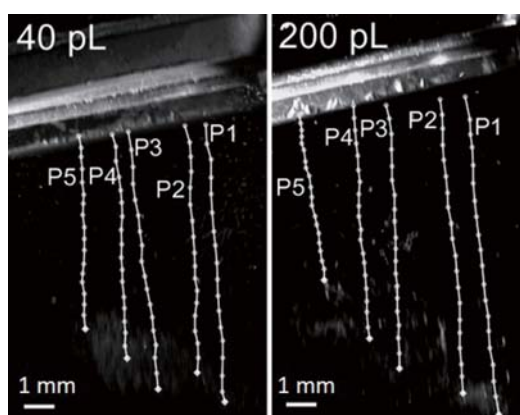


Fig. 6 Sequential images of the falling droplets released by an impact

最後に、衝撃離脱法における解凍後の細胞生存率を測定し、比較した。衝撃離脱法で解凍した場合の生存率は 40 pL で 72.9 %, 200 pL では 79.3 % と共に 70 % 以上の生存率を実現した。しかし、基板を用いた場合と比較すると、200 pL では生存率が約 20 % 上昇したのに対し、40 pL では約 10 % 減少した。これは、40 pL の液滴は落下中に室温の空気に晒され昇温し、脱ガラス化したためだと考えられる。これに対してサイズの大きい 200 pL では、脱ガラス化が液滴の外層にのみ限定され、落下時の昇温は生存率に影響を与えなかった上に、基板無し解凍による解凍速度向上の恩恵を受け生存率が向上

したのだろう。

以上のように、衝撃離脱法により解凍速度を低下させていた基板を用いない解凍を実現できた。特に、200 pL の液滴の解凍は、液滴のみの解凍によりその生存率が大幅に上昇し、凍結保護剤を用いた従来法変わらないレベルにまで達した。

[今後の研究の方向, 課題]

本研究において、凍結工程のみならず解凍工程も含めて検討することで、凍結保護剤を用いずに安定して従来法同等の生存率を達成できるようになった。衝撃離脱法については、40 pL 液滴の落下中の昇温が懸念されるが、200 pL については非常に有効であることも確認できた。このように高い生存率を安定して達成できるようになったので、現在各種バイオリソースの凍結保存に取り組んでいるところである。

以下に簡単にその進捗を纏める。微生物については、製品評価技術基盤機構 (NITE) の協力の下、いくつか藻類にチャレンジした。その結果、生存率は低いもののこれまでに凍結保存の報告のない微生物の凍結保存に成功しており、その再現性を確認しているところである。また、血球の中でも凍結どころか冷蔵保存によっても機能低下が見られる血小板について、凍結解凍実験を行った。その結果、本手法で凍結解凍したラット血小板も、未凍結のものと同様にアドレナリン刺激により仮足が出現することを確認できた。さらに、ヒトの間葉系幹細胞 (MSC) や人工多能性幹細胞 (iPSC) については、細胞の生存を確認できたが、従来法と比べて生存率が大きく低下してしまった。

今後は、これらの対象に対しても凍結保護剤フリーの凍結保存実現に向けて、液滴のさらなる微小化や自動解凍装置の改良などにより、さらなる凍結および解凍速度の向上を目指す必要がある。今後も研究を進めていき、最終的には本手法を一般的な凍結保存法として確立したい。

〔成果の発表，論文等〕

- ・ 渡部広機，湯浅裕太，秋山佳丈，凍結保護剤フリー細胞凍結保存のための衝撃液滴離脱による超瞬間解凍法，*低温生物工学会誌* **67**(2) : 121-124, 2022.
- ・ H. Watanabe, Y. Akiyama, Improved and reproducible cell viability in the superflash freezing method using an automatic thawing apparatus, *Cryobiology* **96** : 12-18, 2020.
- ・ 渡部広機，諫田泰成，秋山佳丈，インクジェット超瞬間凍結法のヒト幹細胞への応用，第 21 回日本再生医療学会総会，2022.
- ・ 渡部広機，湯浅裕太，秋山佳丈，凍結保護剤フリー細胞凍結法の高生存率化に向けた液滴単独落下解凍とその評価，第 66 回低温生物工学会，2021.
- ・ 渡部広機，湯浅裕太，秋山佳丈，インクジェットを用いた超瞬間細胞凍結法における生存率の凍結解凍速度への依存性，日本機械学会 2021 年度年次大会，2021.
- ・ H. Watanabe, Y. Akiyama, Development of automatic thawing apparatus for cryoprotectant-free cryopreservation, *Cryo2020*, 2020.
- ・ 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，2020.