

小児癌治療を支える磁場下過冷却凍結技術の開発

森口 尚史^{*}・三原 誠^{*}

The Development of Supercooling System under Magnetic Field for the Treatment of Cancer in Children

Hisashi MORIGUCHI,^{*} Makoto MIHARA^{*}

1. はじめに

小児癌の中でも小児白血病は治療技術の発達にともない、その5年生存率は70%~80%にまで向上している。しかし、化学療法や放射線治療によって、低身長などの発達障害あるいは生殖機能不全や不妊症を患っている小児癌患者は97%~98%にものぼる。

このように最近では、小児癌患者の更なる予後改善とともに、その患者の現在はもちろん、10年あるいは20年後といった将来のQuality of Life（生活の質）の向上をも射程に入れた革新的な治療戦略を開発することが望まれている。

その治療戦略の柱は現時点では臓器（細胞）移植治療になるだろう。しかし、その治療法の成否は移植臓器（細胞）をいかに効率良く安定的に凍結保存できるか否かにかかっているといっても過言ではない。

2. 斬新な臓器（細胞）凍結保存法の開発ニーズ

最近までに卵巣組織の凍結保存については国内外で多くの研究者が熱心に研究している。しかし、それにも関わらず、卵巣を細断する過程での物理的損傷と移植後の虚血障害などによって解凍後の妊娠成功率は2%~5%とまだ非常に低い。

そこで、次の段階として、卵巣を組織ではなく、臓器ごと凍結する方法が研究されている。しかし、成功例はほとんどない。その問題点として、液体窒素による従来型の凍結法では卵巣全体を瞬間的に凍結することが出来ず、氷晶

の拡大と凍結濃縮が惹起され、細胞が破壊されてしまうことが考えられる。

一方、最近、全く新しい凍結方法として、凍結対象に変動磁場を付与し、安定的に過冷却現象を発生させる凍結法が注目されている。ここでいう過冷却現象とは液体から固体への相変化が凝固点を下回っても起こらない状態のことである。この方法は、変動磁場によって促進された過冷却状態から瞬間凍結によって凍結濃縮を防ぐことで細胞の破壊を抑制するとされている[1]。しかし、変動磁場と過冷却現象の相関性は全く証明されておらず、仮説の域に留まっている。

そこで本論文では、変動磁場の周波数をパラメータとして生理食塩水の凍結実験が行われ、過冷却に有効な条件の解明が進められた後、実際のラット卵巣やラット脾臓組織等あるいはヒトiPS細胞を磁場下過冷却凍結し、評価された我々の1連の研究開発状況について報告する[1, 2]。

3. 磁場下過冷却凍結装置の概要

冷却装置であるスターリングエンジンの冷却部に底面はアルミ製、側面は超高分子ポリエチレン製の冷却槽（内径：50 mm、深さ：70 mm）が取り付けられ、内部にエタノールが満たされた。冷却槽は断熱材で覆われ、その外側にコイルが巻かれた。また、ファンクション・ジェネレータで交流電流が与えられ、コイル内の試験体には 0.12 ± 0.2 mTの磁場が付与された。なお、スターリングエンジンの振動が過冷却解消要因となることが懸念されたため[3, 4]、試験体をスタンドで固定し、冷却槽と非接触的に保持された。本装置全体図は図1に示された。

^{*} 東京大学医学部附属病院形成外科・美容外科
Plastic and Reconstructive Surgery, The University of
Tokyo Hospital

- スターリングエンジン(ツインバード社製,SC-UD08)を使用
- エンジン冷却部に超高分子ポリエチレン製の冷却槽を取り付けエタノールを冷却
- ファンクション・ジェネレータで交流電圧(10Vp-p)を付与し,コイル内に磁場を発生

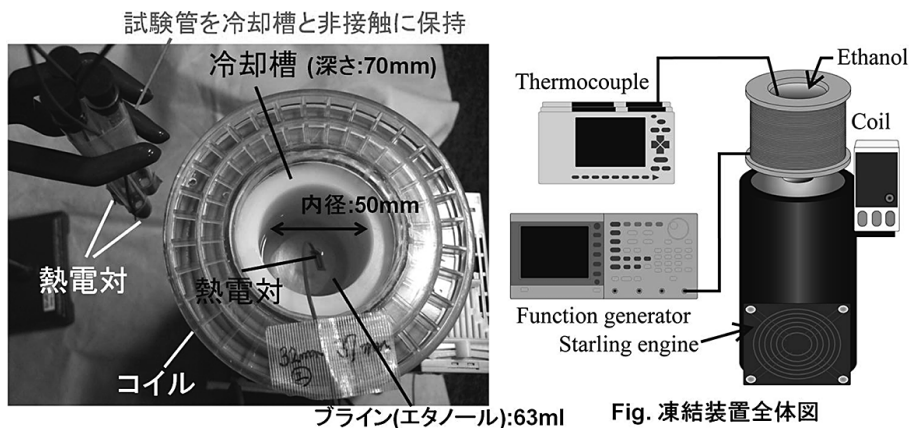


図 1 医工連携による磁場下過冷却発生装置の開発

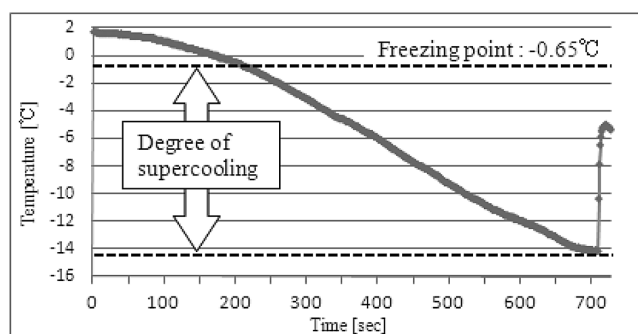


図 2 過冷却現象と過冷却度の定義

4. 生理食塩水の凍結実験

過冷却の程度を測る指標として,凝固点と過冷却解消直前の温度の差の絶対値が過冷却度と定義された(図2)[2]. 磁場強度を 0 または $0.12 \pm 0.2 \text{ mT}$ とし, 磁場周波数が 50 Hz, 200 Hz, 2 kHz, 20 kHz または 200 kHz の変動磁場が生理食塩水 1 ml (凝固点: -0.65°C) に付与され, 一定冷却速度 $-1.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で過冷却が解消するまで冷却された. 各周波数において 15 回ずつ測定が行われた[2].

5. 生理食塩水の凍結実験の結果

1 ml の生理食塩水に, 磁場なし (0 Hz), または磁場周波数 2 kHz の変動磁場が付与され, 過冷却度が測定された[2]. その結果, 磁場周波数 50 Hz~200 kHz の間では 200 Hz, 2 kHz, 20 kHz, 200 kHz の磁場環境下において有意に生理食塩水の過冷却が促進され, 変動磁場の付与によって過冷却度が上昇することが明らかになった(図3). さらに, 磁場下では過冷却度の標準偏差が小さいことから, 過冷却現象の安定化にも寄与することが示唆された(図4).

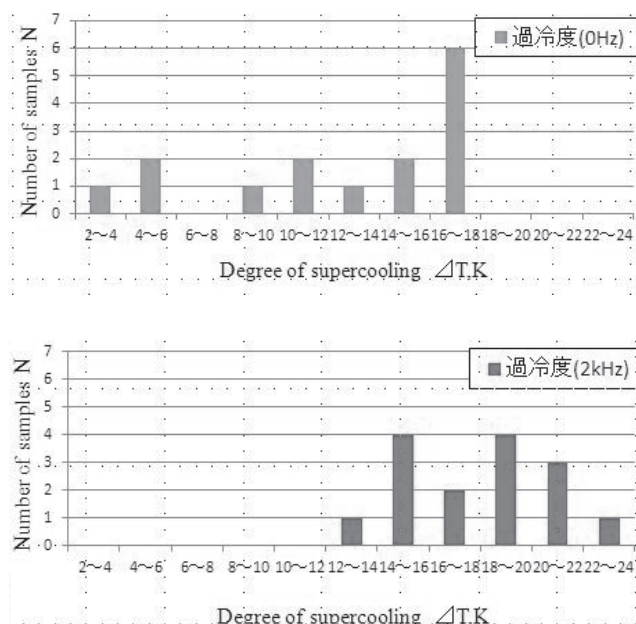
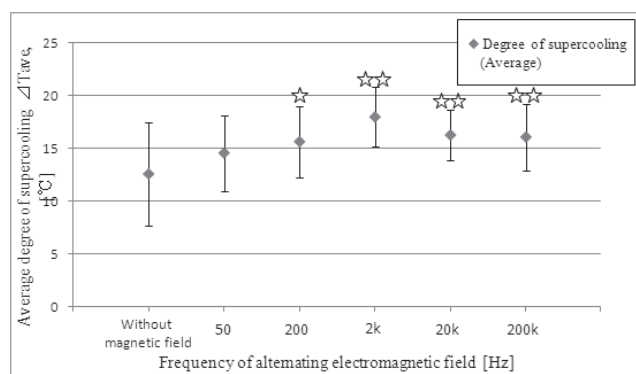


図 3 生理食塩水過冷却度ヒストグラム



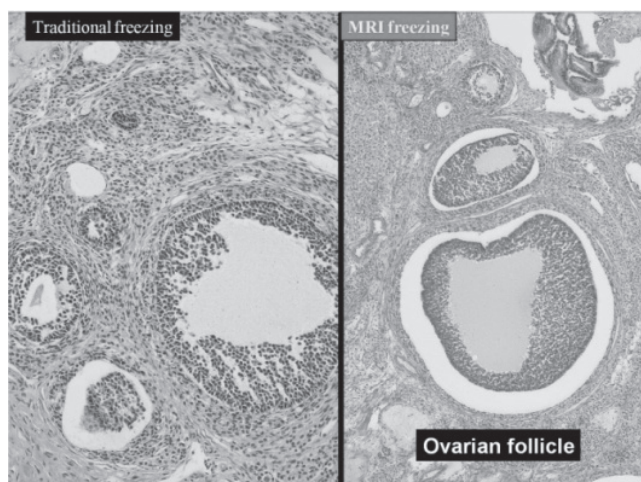
各周波数条件における過冷却度の平均と標準偏差をまとめたグラフである。
 *90%の片側ウェルチ検定により磁場無しと比べて母平均に有意差がある
 **95%の片側ウェルチ検定により磁場無しと比べて母平均に有意差がある

図 4 生理食塩水過冷却度 (標本平均, 標準偏差)

6. 磁場下過冷却凍結実験（ラット臓器・組織）

そこで、上記の装置を用いて、最も過冷却度が上昇した磁場周波数 2 kHz の変動磁場が付与されながら、ラット卵巣、ラット脳組織、ラット小腸組織、ラット肺組織、ラット卵巣組織、ラット膵臓組織、ラット精巣組織の磁場下過冷却凍結実験がなされた。

その結果、コントロール群としての通常凍結群に比べて、磁場下過冷却凍結群では臓器・組織破壊が抑制されていた[1, 2, 5]（図 5、図 6）。



上図左)通常の凍結;
卵巣組織(黄体)は、組織破壊を来している。

上図右)磁場下過冷却凍結;
卵巣組織(黄体)の組織破壊は最小限になっている。

図 5 ラット卵巣の凍結（凍結解凍後の組織科学的検討）

7. 磁場下過冷却凍結解凍実験（ヒト iPS 細胞）

ヒト皮膚細胞から 4 つの多能性関連遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）の導入によってヒト iPS 細胞が樹立されてから[6]、およそ 3 年が経過した。

ヒト iPS 細胞は再生医学・医療への応用および画期的な薬のスクリーニングツールとしての期待が大きい。もちろん、小児癌患者および難治性の小児疾患患者に対しても、ヒト iPS 細胞を利用することで画期的な治療法が見つかるのではないかと期待されている。ただし、ヒト iPS 細胞の癌化を避け、長期的かつ安定的に凍結保存する方法は、いまだ開発されておらず、「iPS 細胞バンク」を構築する上で大きな課題となっている。

最近、我々は磁場下過冷却装置が、その課題を解決するための技術となる可能性を示した。たとえば図 7 のように、ヒト iPS 細胞の解凍後 1 継代目では、通常凍結法群では冷却解凍後のコロニー数が減ったが、SC 群（磁場下過冷却凍結群）では順調に増殖した。その後、継代をかさねるごとに、コロニー数は両群とも増殖したが、細胞破壊を

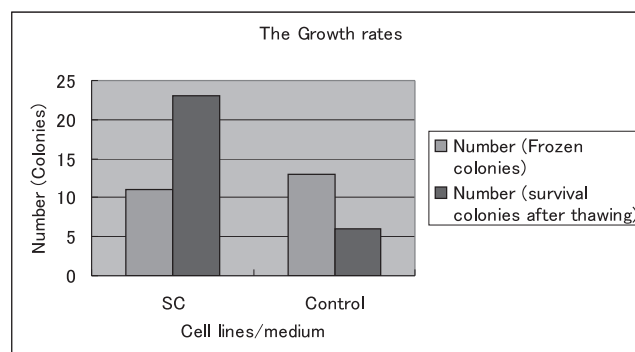


図 7 ヒト iPS 細胞の磁場下過冷却凍結保存の有効性

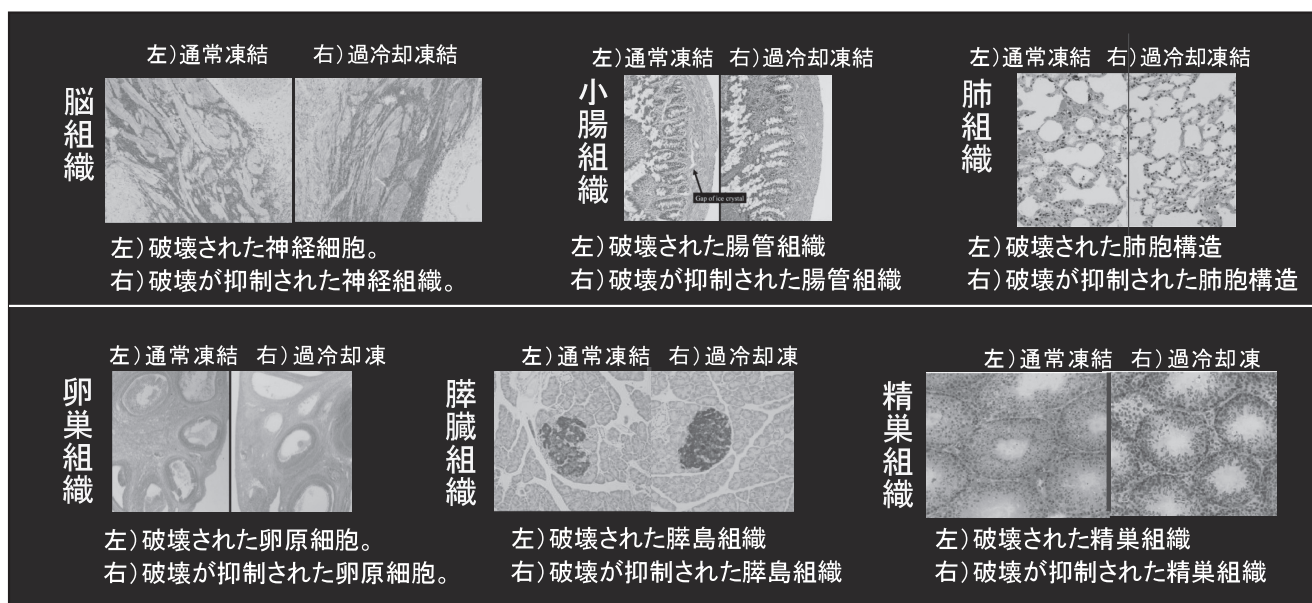


図 6 ラットの各組織凍結（凍結解凍後の組織科学的検討）

来たしていない SC 群のヒト iPS 細胞の方が臨床応用の際に、より好ましいと考えられる (論文審査中)。

8. 過冷度と氷結晶成長の関係

三原らの研究によって、これまでのような液体窒素やプログラムフリーザーを用いた臓器凍結方法とは全く異なる、磁場下凍結技術が発表された[1]。三原らは、変動磁場の付与によって過冷却が安定するため、体積の大きい組織でも組織破壊を抑制した凍結が可能になることを示唆している[1]。現時点でも変動磁場と過冷却の相関性については、まだ不明点が多いが、過冷度と純水中の氷結晶の体積の関係性について、時間のべき乗関数として表わされることが明らかになっている[7]。すなわち、臓器(組織)凍結において、高い過冷度からの瞬間凍結によって凍結濃縮による細胞内外の浸透圧変化が抑制され、組織破壊が抑制されたという仮説が考えられる。しかしながら、過冷却現象は非常に不安定で確率的な現象で、衝撃や異物混入等の外的要因によって過冷却状態が解消される[8]。そのため、過冷却現象のコントロールは極めて困難だと考えられていた。しかし、本論文でも紹介したように、最近の研究によって、変動磁場が過冷却現象の促進と安定化に寄与することが証明されている[2]。この研究成果は、臓器凍結研究のみならず、原子・分子の物性研究においても重要な役割を果たすと考えられる。今後は磁場の強度や周波数だけでなく、凍結温度や凍結スピードも詳細に検討する必要がある。

9. まとめにかえて

本論文では、まず、小児癌患者に対する革新的な治療法の開発基盤となりうる磁場下過冷却凍結法に関する最新の基礎的検討を紹介した。特に変動磁場が過冷却現象の促進と安定化に寄与することが証明されつつある点は特筆事項であると思われる。また、ラットの卵巣やラットの各種組織あるいはヒト iPS 細胞の磁場下過冷却凍結実験から、変動磁場の過冷却凍結に対する有効性が示唆された。

今後は、特にヒトの細胞・組織・臓器ごとに最適な冷却条件および解凍条件の解明を更に進め、磁場下過冷却凍結装置の臨床応用を実現すべく、トランスレーショナルリサーチ(橋渡し研究)を実施する予定である。

文 献

1. Mihara M, Nakagawa T, Noguchi S, et al.: MRI Magnetic Resonance Influenced, organ freezing method under magnetic field. ACSC. **1**(1): 34-37, 2009.
2. Niino T, Nakagawa T, Noguchi S, et al.: Whole ovary cryopreservation applying supercooling under magnetic field. ACSC: in press.
3. Inaba H, Takeya K, Nozu S: Fundamental study on continuous ice making using flowing supercooled water. JSME Int J Ser B. **37**: 358-393, 1994 (in Japanese).
4. Shichiri M, Araki Y: Nucleation mechanism of ice crystals under electrical effect. J Crystal Growth. **78**: 502-508, 1986.
5. Nakagawa T, Mihara M, Noguchi S, et al.: Development of pathology specimen preparation method by supercooling cryopreservation under magnetic field. ACSC: in press.
6. Takahashi, K. Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. **131**: 861-872, 2007.
7. Teraoka Y, Saito A, Ohkawa S, et al.: Volume of ice crystal growing in supercooled water. JSARE. **20** (2): 199-203, 2003 (in Japanese).
8. Saito A, Ohkawa S, Une H: Research on outer factor affecting the freezing of supercooled water. JSARE. **8**(2): 151-160, 1991 (in Japanese).

森口 尚史 (モリグチ ヒサシ)

大学院修了後、2000 年から東京大学助教授、2006 年から東京大学特任教授、ハーバード大学医学部マサチューセッツ総合病院研究員などを経て、東京大学医学部附属病院形成外科・美容外科にてヒト iPS 細胞バンク研究に従事している。博士号(学術; 東京大学)。専門分野は、臨床疫学・幹細胞生物医学・トランスレーショナルリサーチ。



三原 誠 (ミハラ マコト)

大学卒業後、虎の門病院外科レジデントなどを経て、2006 年から東京大学医学部附属病院形成外科・美容外科助手(2009 年から助教)として臨床及び研究に従事している。他に、ハーバード大学医学部マサチューセッツ総合病院客員研究員・コロンビア大学医学部客員研究員なども兼務している。

