mm オーダ細胞の凍結保存を目的とした解凍過程の観測*

氏平政伸^{*1}, 山口 亮^{*2}, 谷下一夫^{*3}

Observation of Thawing Process for Cryopreservation in Milliscale Cell

Masanobu UJIHIRA, Ryou YAMAGUCHI and Kazuo TANISHITA

The purpose of this study is to investigate a method of thawing a milliscale biological cell used for cryopreservation. The rewarming system was equipped with a heater and copper block immersed in liquid nitrogen (-196°C), and regulated the warming rate of the test section from 0.1 to $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ over the temperature range -196 to 0°C . A killifish embryo was placed at the tip of the test section (a truncated cone) with a drop of 15% dimethylsulfoxide-water and cooled to -196°C . To avoid recrystallization, it was rewarmed at a rate of $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -7°C and at various rates from -7 to 6°C . After thawing, the morphology of the embryo was observed. As a result, a warming rate of $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was found to be optimum for morphological preservation. The warming rate should be rapid up to the extracellular melting point and slow during thawing.

Key Words: Biological Engineering, Freezing, Heat Transfer, Medical Engineering, Cryopreservation, Killifish Embryo

1. はじめに

生体の凍結保存技術の確立は、医療や生物工学における重要課題の一つである。現在では、 μm オーダの小さな細胞や組織における凍結保存技術はほぼ実用段階に入っているが、mm オーダ以上の大きな細胞や組織、あるいは器官の凍結保存は達成されていない⁽¹⁾。凍結保存においては、凍結過程と解凍過程が表裏一体となって解凍後の生存率を決定する。ところが、これまでの生存率に関する議論は、凍結過程における細胞内の脱水制御と氷晶成長の抑制(凍結方法)にウエイトが置かれてきた⁽⁷⁾。したがって、さらなる生存率向上のためには、冷却方法だけでなく解凍方法にも細心の注意を払う必要がある。

液体窒素中で保存された細胞を解凍する際には、細胞内氷晶の粗大化(再結晶化)による損傷を避けなければならない(図1)。そのため、再結晶化しやすいとされている温度範囲の $-100\sim 0^{\circ}\text{C}$ を、なるべく速く通過することが望ましい。例えば、Bank⁽²⁾によると、イ

ースト細胞においては -40°C 以上では30分以内に細胞内水の再結晶化により細胞の生存率が低下する。また、Whittingham⁽³⁾によると、緩速凍結⁽⁷⁾されたマウス胚の融解の際に、脱水収縮した細胞内と細胞外液の濃度差が大きいと復水速度が上昇し損傷する。

Fig.1 Injury of the cell during freezing and thawing process

* 原稿受付 1996年6月3日.

*¹ 正員, 北里大学医療衛生学部 (〒228 相模原市北里1-15-1).

*² 慶應義塾大学大学院 (〒223 横浜市港北区日吉3-14-1).

*³ 正員, 慶應義塾大学理工学部.

実際の急速解凍は、凍結保存細胞が封入されたストローやクライオチューブ(容器)を約 37°C の湯浴中に入れることで行われる。ストローとクライオチューブは、細胞の汚染を防ぎ、培養液や凍結保護物質とともに凍結・解凍させるために用いる。μm オーダの小さな細胞や組織では、熱容量が小さいため細胞内外の融解がほとんど同時に起こるので、良好な成果が得られている。しかし、mm オーダの比較的大きな細胞や組織の場合、熱容量が大きいため表層部から深部に向かって融解するので、凍結過程での物質移動や機械的変形などの履歴が無視できない。その結果、細胞膜の局所的な物質透過性の変化や、復元に至る形状の変化で損傷すると考えられる。これらのことから、解凍のポイントとして次の 3 点が挙げられる。(1) 永晶の粗大化の回避、(2) 融解時の細胞膜の局所的透過性の変化や形状の変化による損傷の緩和、(3) 解凍後の凍結保護物質の除去。(1) については、急速解凍が望ましく、それとは反対に、(2) においては緩速解凍が望ましいことから、解凍速度について適切な条件を見つけた必要がある。(3) については、徐々の希釈により解決できる。

我々はこれまで、mm オーダのヒメダカ受精卵を利用し、細胞外凍結(緩速冷却)における凍結保護物質の最適濃度と保持温度の条件を求め、損傷緩和の機構を考察した⁽⁴⁾⁽⁵⁾。凍結保存を目指すために、解凍過程における損傷について調べる必要がある。解凍過程における損傷を低減するには、凍結過程の履歴をできる限り忠実に逆にとどることが有効と考えられるが、その制御に関しては不明な点が多い。本研究では、mm オーダ細胞の液体窒素中(−196°C)での保存を実現するための凍結・解凍装置の検討を行った。具体的には、細胞外凍結における緩速冷却の制御、その次段階(液体窒素中)における細胞内の氷晶成長を抑制可能な冷却速度の達成、そして、昇温速度の制御である。さらに、この装置を用いて凍結・解凍後のヒメダカ受精卵のようすを観察し解凍過程における損傷の低減方法を探った。

2. 実験方法

2.1 測定対象と凍結保護物質 本実験では測定対象として、過去の我々のデータ⁽⁴⁾⁽⁵⁾との比較、それに加え単純な形状および取扱いの容易さからヒメダカ受精卵(*Oryzias latipes*, orange-red variety, φ1.3 mm 球形)の初期桑実胚(morula)から胞胚期(blastula)の発生過程のもの⁽⁶⁾を用いた。発生過程上問題のない卵は、20~25°C の室温において 10~15 日で孵

化した。卵の保存(損傷)の評価方法は、生存と生体機能をともに考慮して孵化率を用いた。孵化率を次のように定義する。 $\{\text{孵化率}(\%)\} = (\text{実験後 20 日以内に室温において孵化した稚魚の数}) / (\text{実験に用いた受精卵の数}) \times 100$ 。

凍結保護物質には、これまでの細胞外凍結時の損傷のデータを検討するため、Dimethylsulfoxide (DMSO)を用いた。DMSO 濃度は、蒸留水中の 0%、保護効果が最大である濃度の 15% (w/w) に設定した。

2.2 実験と装置に求められる条件 液体窒素(−196°C)での凍結保存を実現するための凍結・解凍装置を検討するに当たり、孵化率に影響を与える昇温速度範囲を知り、実験条件を決定するため、解凍過程における昇温速度の影響と凍結保護物質の作用について予備的に調べた。

材料としてヒメダカ受精卵を用い、観察装置⁽⁴⁾を用いた。細胞外液には、蒸留水と 15% DMSO を用いた。保持温度は孵化率が比較的良好な条件⁽⁵⁾として設定し、蒸留水では −2°C、15% DMSO では −15°C とした。受精後 5~6 時間後の卵を DMSO 溶液に浸し 30 分間保持した。2°C の冷却水を流し、観察部の温度が 6°C になったとき、ペルチェ素子を電源装置で駆動した。冷却速度 1°C/min で細胞外凍結で各保持温度まで冷却し 15 分間保持した。さまざまな昇温速度で 6°C まで戻し、融解のようすを適宜写真撮影した(昇温速度: 0.3 から 30°C/min)。

図 2(a), (b) に蒸留水中での解凍過程で、昇温速度が 0.3 と 3°C/min のようすをそれぞれ示した。これらの図中の温度は凍結ホール(直径 10 mm の顕微鏡観察窓)縁⁽⁵⁾の銅板温度であり、卵の下方 2 mm 以内の部分となる(図には写っていないが下部の角)。図 2(a)においては、ヒメダカ受精卵(細胞外凍結)は水に囲まれているが、卵と氷との間に融解した水の層(0.1 mm 程度)ができたため、卵殻が復元している。氷の融解は卵表面から外側へ向かって起こっている。図 2(b)においては、ヒメダカ受精卵(細胞外凍結)の上側約 4 分の 3 は水に囲まれているが、下側約 4 分の 1 は卵が融解した水中にさらされている。氷と水の界面(扇形)は明りょうであり、氷の融解は下から上へ向かっている。図 2(a)より、蒸留水中で昇温速度が 0.3°C/min の(遅い)場合は氷は卵殻の回りから融解し、卵は復元の際にほとんど変形しなかった。それに対し、図 2(b)より、3°C/min の(速い)場合は、卵は卵殻の融解した水中における復元により大きく変形した。

図 3(a), (b) に 15% DMSO 中での解凍過程のよ

(a) Warming rate 0.3°C/min, 0.5°C

(a) Warming rate 0.3°C/min, -4°C

(b) Warming rate 3°C/min, 2°C

(b) Warming rate 30°C/min, -5°C

Fig. 2 Thawing process after extracellular freezing in distilled water

Fig. 3 Thawing process after extracellular freezing in 15% DMSO

うすを示した。図3(a)においては、ヒメダカ受精卵の外側には氷と融解した溶液が混在し、氷と溶液の界面は不明瞭(複雑)である。図3(b)も図3(a)と同様であるが、融解した溶液の割合が多い。図3(a), (b)より、15%DMSO中で昇温速度が0.3°C/minの(遅い)場合も30°C/minの(速い)場合も、卵殻の回り全体から融解した。そして、細胞内凍結した卵としない卵の融解時の変形の様子が変わらなかったことから、卵変形による損傷である。

図4に、蒸留水と15%DMSO中での解凍過程における昇温速度と孵化率の関係を示した。縦軸に孵化率、横軸に昇温速度をとった。蒸留水中で昇温速度が0.3°C/minの(遅い)場合は卵殻の回り全体から融解するため損傷は少ないが、3°C/minの(速い)場合は卵の変形により孵化率が低下した。15%DMSO中で昇温速度が0.3°C/minの(遅い)場合も30°C/minの(速い)場合も、卵殻の回り全体から融解するため卵の変形が少なく高い孵化率を示した。このことから、DMSOは細胞外凍結からの解凍過程におけるヒメダカ受精卵の変形による損傷の緩和に効果的に働いてい

Fig. 4 Relation between warming rate and hatching rate after extracellular freezing

る。

以上より、凍結保護物質の使用が、卵腔内の濃縮に伴う凝固点降下を招き、急速解凍時の変形による損傷を緩和する。このことから、本実験の凍結・解凍装置における昇温速度範囲は少なくとも0.1~100°C/

Fig. 5 Experimental system for freezing and thawing

min で調べる必要がある。

2.3 実験装置 図5に凍結・解凍のための実験装置の概要図を示す。細胞外凍結から液体窒素に入れる際の生存を保持可能な冷却速度は、過去の研究より少なくとも $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上必要である⁽⁷⁾⁽⁸⁾。そこで、先端形状が円すい台($\phi 3.5\text{ mm}$)のプロープ先端にヒメダカ受精卵を液滴(1滴: $9\text{ }\mu\text{l}$)とともに付着させ、冷却・昇温部位(凍結ドーム, 半球形状: $R5\text{ mm}$)に固定し凍結・解凍した。凍結ドームは、銅ブロック($25\times 25\times 15\text{ mm}$)の上部に設けられ、デュワービン内の液体窒素に漬けた銅棒($\phi 30\text{ mm}$)に密着させることで冷却した。銅ブロック上面には、 $\phi 0.23\text{ mm}$ のニクロム線で製作した板状のヒータ($25\times 25\times t1\text{ mm}$)を密着させ、直流電源を用いて電圧を変化させ冷却・昇温速度を調節した。この制御はプログラム調温計(CHINO KP1000)で行い、プロープ先端の $\phi 0.1\text{ mm}$ のC-C熱電対で制御温度を測定した。

室温(20°C)の水から液体窒素(-196°C)に浸した場合と、約 0°C の水から液体窒素に浸した場合の応答を調べた結果を図6に示す。これらの開始温度(温度範囲)は、水からの冷却においては超急速冷却法⁽⁷⁾に合せた。そして、水からの冷却の温度範囲は、水からの冷却とできるだけ合わせるために氷を保持できる一番高い温度(約 0°C)とした。それぞれ縦軸に熱電対の出力、横軸に経過時間をとった。これより、水からの冷却のほうが、水からの冷却よりも潜熱の影響が小さいため、著しく冷却速度が大きくなることがわかった。このことを踏まえて、本実験系の特性として、ヒメダカ受精

Fig. 6 Cooling response of the experimental system from water (20°C) to ice (-196°C) and from ice (0°C) to ice (-196°C) Fig. 7 Characteristics of the experimental system; a 15% DMSO-water drop ($9\text{ }\mu\text{l}$) with the killifish embryo

卵を含んだ 15%DMSO の水滴(1滴: $9\text{ }\mu\text{l}$)の細胞外凍結で -15°C から液体窒素に浸した場合の冷却速度を調べた結果を図7に示す。ここでの 15%DMSO と -15°C の設定は、2.2節の条件と同じにした。縦軸に熱電対の出力、横軸に経過時間をとった。液滴先端(tip)と、プロープ先端(root)で同時に温度を測定した。これより、液滴において温度平均で約 $8000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度が得られることがわかった。

以上より、 $0\sim -130^{\circ}\text{C}$ の温度範囲で冷却速度が最大約 $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、また昇温速度が最大約 $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、また、 $0\sim -20^{\circ}\text{C}$ で細胞外凍結をさせた後液体窒素に浸すことで冷却速度が約 $8000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ まで到達可能なシステムを実現した。

2.4 実験手順 顕微鏡観察により受精後5~9時間後の卵を分類し、1個を DMSO 15%溶液に浸し30分間保持した。その卵を液滴($9\text{ }\mu\text{l}$)とともにプロープ

の先端につけ、6°Cに保たれた凍結ドーム中において、冷却速度1°C/minで(-5°Cでプローブ先端の細胞外液に植氷)-15°Cまで冷却し、15分間保持した。プローブをすみやかに液体窒素(-196°C)に浸し15分間保持した。さまざまな昇温速度で6°Cまで戻し、ようすを室温で観察し適宜写真撮影した。

昇温速度は2・2節を参考とし、5 000、100、10、1、0.3、0.1°C/minの6種類とした。5 000°C/minは、液体窒素中で保存したプローブを一気に室温のDMSO 15% (w/w)に浸けることで達成した。100~0.1°C/minにおいては、細胞内氷晶の再結晶化による損傷をできる限り速い昇温速度が望ましい。そして、装置の特性により、その融点付近における温度のオーバーシュート为避免制御を安定化する必要も生じる。これらより、-196~-7°Cまでは本実験系の最高

昇温速度である100°C/minで昇温し、その後6°Cまでそれぞれの速度で昇温した。

3. 結果および検討

昇温速度が、5 000と100°C/minにおける解凍直後のようすを図8(a)、(b)にそれぞれ示した。同様に、0.3°C/minにおける解凍直後のようすを図9(a)、解凍60分後のようすを図9(b)に、0.1°C/minを図10(a)、(b)にそれぞれ示した。これらの図中に添えた温度はヒメダカ卵を含んだ液温度である。また、これらの実験結果と図の対応を表1にまとめた。

図8(a)は、凍結過程で細胞外凍結によって脱水されたヒメダカ受精卵を、5 000°C/minで融点を越えて室温まで急速解凍した直後のようすである。卵殻は形態を保持しているが、その内側の卵黄膜(細胞)が収縮して輪郭が不明りょうになったことで卵細胞の崩壊を判断できる⁽⁴⁾⁽⁵⁾。著しく急速な昇温が、細胞膜の局部的透過性の変化や、卵殻が卵黄膜から離れる際の変形等の機械的損傷を招くことで卵の崩壊に至ると考えられる。昇温速度100°C/minにおける解凍直後のようすも5 000°C/minの場合と同様であり、卵黄膜が収縮し輪郭が不明りょうなことから卵は崩壊してい

Table 1 Correspondence between results and figures

Warming Rate (°C/min)	0 min after thawing	60 min after thawing
5000	Fig. 8(a)	-----
100	Fig. 8(b)	-----
0.3	Fig. 9(a)	Fig. 9(b)
0.1	Fig. 10(a)	Fig. 10(b)

(a) Warming rate 5 000°C/min, 25°C, 0 min

(a) Warming rate 0.3°C/min, 25°C, 0 min

(b) Warming rate 100°C/min, 25°C, 0 min

(b) Warming rate 0.3°C/min, 25°C, 60 min

Fig. 8 Thawing process after preserving in liquid nitrogen

Fig. 9 Thawing process after preserving in liquid nitrogen

(a) Warming rate 0.1°C/min, 25°C, 0 min

(b) Warming rate 0.1°C/min, 25°C, 60 min

Fig. 10 Thawing process after preserving in liquid nitrogen

る [図 8(b)]. 昇温速度 10°C/min と 1°C/min における解凍直後のようすは (図示していない), 100°C/min の場合と比べて卵黄膜の形態保存の程度がよかった。しかしながら, 解凍直後から卵黄膜の収縮が始まり, 60 分後に卵は完全に崩壊した。そして, 10°C/min と比べ 1°C/min の場合のほうが卵黄膜の形態保存の程度がよかった。昇温速度 0.3°C/min においては, 解凍直後の卵黄膜の形態 [図 9(a)] が卵殻の内側にはっきりと確認でき, 実験前のようす⁽⁹⁾とあまり変わらないことから, 形態保存が比較的良好と判断できる。そして, 解凍後 60 分経ってもその状態が保持された [図 9(b)]. 昇温速度 0.1°C/min においては, 解凍直後から卵黄膜の収縮が観察され [図 10(a)], 60 分後には卵が完全に崩壊した [図 10(b)]. これらの, 形態保存の程度 (保存時間) は細胞膜の損傷の程度を表すことから, これまで述べた機械的損傷の程度と関係ある。よって, 5 000°C/min から 0.3°C/min までは昇温速度の低下により機械的損傷の程度も小さくなり, それ以下 (0.1°C/min) では逆に大きくなることがわかった。

次に, これらの結果の解釈を試みる。昇温速度が 0.3°C/min 以上の細胞の損傷要因は融点付近での昇温速度が比較的高速だったため, 昇温速度が 5 000°C/

min の場合と同じように, 細胞膜の局所的透過性の変化と, 卵殻が卵黄膜から離れる際の変形等の機械的な損傷が考えられる。一方, 0.1°C/min で昇温したもの [図 10(a), (b)] では, 細胞膜の局所的透過性の変化による損傷は比較的小さいが, 昇温速度が遅すぎたため細胞内で氷晶の再結晶化がおり微細構造が損傷したと考えられる。

昇温過程において, mm オールド細胞の受ける損傷を回避するための手段を考えてみる。昇温時の損傷はおもに, (1)再結晶化による細胞内氷晶の成長, (2)細胞膜の局所的透過性の変化 (局所的濃度分布も含む), によると考えられる。(1)については, 本実験において液 1 滴を使用したように体積をできるだけ小さくし, また昇温装置側の出力を調節することで達成できる。しかし, この方法では (2) に対するリスクは増大する。また, もっと大きな細胞や組織の凍結保存を目指す場合にも, 組織の深部と表層部での温度差がますます拡大し, 解凍時の損傷が大きくなる。よって, これらの問題点を克服する解凍方法として, 凍結保存された組織の外側からだけでなく内側からも解凍することが考えられる。内側からも解凍することによって解凍時の細胞内外での溶液濃度の差 (局所的分布も含む) を少なくし, かつ組織の深部と表層部の温度差を小さくすることで損傷の程度が少なくなる。

4. ま と め

(1) 凍結過程においては, 0~-20°Cまで細胞外凍結の後, 液体窒素に浸すことで冷却速度が約 8 000°C/min まで到達可能であり, また, 解凍過程においては-130~0°Cの温度範囲で昇温速度が最大約 100°C/min である凍結・解凍装置を実現した。

(2) 液体窒素中で凍結保存された mm オールド細胞を解凍する際には, 再結晶化による細胞の損傷を小さくするため細胞外液の融点まではなるべく速く, その後は, 融解時の細胞膜の局所的透過性の変化や形状の変化による損傷の緩和のため比較的ゆっくりと昇温することが必要である。ヒメダカ受精卵を凍結後, -7°Cまで 100°C/min で昇温し, さらに, 6°Cまで 0.1 から 5 000°C/min の昇温速度で解凍した場合, 0.3°C/min で昇温した細胞が最も損傷が少なく, 解凍 1 時間後においても卵黄膜の形態が保存された。0.3°C/min よりも急速昇温された細胞はおもに機械的損傷で, 急速昇温された細胞は主に細胞内氷晶の再結晶化による微細構造の損傷と考えられる。

文 献

- (1) 棚澤一郎, 機誌, **93**-864 (1990), 28-29.
 - (2) Bank, H., *Cryobiology*, **10**(1973), 157-170.
 - (3) Whittingham, D. G. (Zeilmaker, G. H. 編), *In : Frozen Storage of Laboratory Animals* (1981), 21-32, Gustav Fisher Verlag.
 - (4) Ujihira, M., Aizawa, N. and Tanishita, K., *Bio-medical Materials and Engineering*, **4**-2 (1994), 115-125.
 - (5) 氏平政伸・相澤直樹・山口亮・谷下一夫, 機論, **61**-588, B (1995), 3066-3074.
 - (6) 岩松鷹司, 愛知教育大学研究報告, **25** (1976), 67-89.
 - (7) 酒井昭編, 凍結保存, (1987), 1-23, 朝倉書店.
 - (8) 上田進一・高橋恒夫・藤川清三, 凍結及び乾燥研究会会誌, **36** (1990), 97-104.
-