【論文】

磁場下過冷却凍結保存法のための凍結槽一体型磁場印加用コイルの開発

Development of a Magnetic Field Generating Coil Combined with the Cooling Bath for Supercooled Freezing under the Magnetic Field

須永康太郎(学生会員), 桑名健太(正会員), 土肥健純(正会員)

Kotaro Sunaga, Kenta Kuwana and Takeyoshi Dohi

Abstract

In this paper, we developed a magnetic field generating coil for finding out an effective magnetic field for supercooled freezing of biological tissues under the magnetic field. The range of the frequency and the magnetic flux density of the inducing magnetic field was expanded by reducing the resistance compared with the previous coil. The upper range of the frequency increased from 2 kHz to 10 kHz and that of the magnetic flux density increased from 0.3 mT to 2.0 mT. We evaluated the magnetic field dependency of the degree of supercooling of the porcine ovarian tissues using the developed coil. In supercooled freezing, it is reported that the growth of the ice crystals, which is a cause of cell destruction, was suppressed with the increase of the degree of supercooling. This result indicates that increasing the degree of supercooling may enable to prevent cell destruction. Therefore we evaluated the effect of the magnetic field by measuring the degree of supercooling. As a result of the measurement, the averages of the degree of supercooling at 10 kHz frequency of 2.0 mT magnetic field increased the most from 9.1 ± 1.7 °C for without magnetic field to 10.5 ± 1.7 °C.

Key Words

Organ Preservation, Coil, Supercooling, Magnetic Field

1. 背景・目的

小児がんは化学療法や放射線療法の発達により全体の7割が治癒可能となっているが、これらの治療法は副作用として生殖機能の低下・喪失をもたらす。これに対して、治療前に血管付精巣・血管付卵巣を取り出して凍結保存し、治療後に移植することで妊孕性を温存する方法が提案され、移植技術の開発が進められている^{1,2)}。この方法の実現には、血管付精巣・血管付卵巣を凍結保存する技術が必要である。成人に対しては精子や卵子、受精卵・胚の凍結保存があるが、思春期前の小児に対しては適用することができず^{1,2)}、血管付精巣・血管付卵巣を凍結保存する技術の開発が求められる。

生体組織の凍結では、細胞内外での氷晶の成長による細胞膜の破壊が問題となる³⁾。生体組織の凍結法として、現在は緩慢凍結法⁴⁻⁶⁾とガラス化法⁷⁻¹⁰⁾が用いられているが、複雑な組織に対してはガラス化法が適切と報告されている¹¹⁾。ガラス化法は、細胞を高濃度の凍結保護剤に浸漬し、液体窒素で急速に冷却することで、水分を結晶化させずにガラス化状態で凍結する方法である。この手法においては対象全体に凍結保護剤を浸透させる必要があるが、厚みのある組織に対しては全体に凍結保護剤を浸透させられず¹⁰⁾、血管付精巣・血管付卵巣に対しては適用できない。

これに対しわれわれは、過冷却凍結に着目し、研究を行ってきた¹²⁻¹⁴⁾。過冷却凍結は、過冷却現象を利用して対象全体を瞬時に凍結する方法である。Fig.1 に過冷却凍結時の温度変化を示す。対象を冷却していくと、液体が凝固点以下の温度になっても液体の状態を保つ過冷却状態になる。その後、過冷却状態が偶発的に解消し、急激な温度上昇を伴って瞬時に凍結する。この凍結を過冷却凍結という。過冷却凍結においては、過冷却解消時に温度が凝固点まで上昇し、凝固点と過冷却解消直前の温度との差は過冷度と呼ばれる。30 × 30 × 20 mm の充填絹豆腐の過冷却凍結において、過冷度が大きいほど氷晶が微細化し、細胞

2015 年 11 月 11 日受付

2016 年 2 月 5 日掲載決定

東京電機大学

〒120-8551 東京都足立区千住旭町 5

Tokyo Denki University

5 Senjuasahi-cho, Adachi-ku, Tokyo 120-8551, Japan

Fig.1 Time response of temperature during supercooled freezing

破壊と関連のあるドリップ量も減少することが報告されている¹⁵⁾。細胞においても同様に、過冷度の増加に伴う氷晶の微小化により細胞破壊が抑制されると予想される。そこでわれわれは過冷度の増加に着目して研究し、原理は明らかになっていないものの交流磁場を印加することで過冷度が増加することを実験的に確認した¹⁶⁾。

そこで本研究では、生体組織の過冷度の磁場周波数・磁束密度依存性を評価するために、磁束密度範囲の拡大に向けて、発熱を低減したコイルを開発する。また、開発したコイルを用いて磁場下過冷却凍結における生体組織の過冷度を計測し、過冷度の磁場周波数・磁束密度依存性を評価する。

2. 磁束密度範囲の拡大に向けたコイルの発熱低減の方法

磁束密度範囲の拡大に向けて、コイルの発熱を低減する方法について考える。

コイルの発熱量は電力に依存し、発熱量を低減するためにはコイルの電力を低減する必要がある。電力には熱や動力として消費される有効電力と、励磁電流や回転磁界を作る無効電力の2種類の電力がある¹⁷⁾。本研究ではコイルの発熱に重点を置き、有効電力の低減を行う。

有効電力 P_e は抵抗 R と電流の実効値 I_{rms} を用いて次の式で表される¹⁸⁾。

$$P_e = RI_{rms}^2 \quad (1)$$

式(1)から抵抗 R または電流の実効値 I_{rms} を下げることで有効電力を低減できると考えられる。一方で、コイルによって発生するコイル内部の磁束密度 B は、真空透磁率 μ_0 、電流 I 、単位長さ当たりの巻数 n を用いて次の式で表される。

$$B = \mu_0 In \quad (2)$$

式(2)から電流を下げると磁束密度が減少するので、磁束密度範囲の拡大という目的に反する。そこで本研究ではコイルの抵抗を低減することにより有効電力を低減する。

コイルの抵抗 R は抵抗率 ρ 、導線長さ l 、導体断面積 S を用いて次の式で表される。

$$R = \rho \frac{l}{S} \quad (3)$$

式(3)から導線長さの短縮と導体断面積の増加によって抵抗を低減できることがわかる。

3. 凍結槽一体型磁場印加用コイルの設計・試作

前述の方法に沿ってコイルの設計・試作を行う。

磁場印加用コイルの要求仕様は次のように定めた。

- ①血管付精巣・血管付卵巣を凍結可能なサイズの凍結槽を格納可能
- ②2.0mT 発生時にも冷却効率を維持可能

Fig.2(a)に従来コイルの構成を示す。従来コイルでは、抵抗に影響する導線長さや導体断面積について考慮した設計がされていなかった。そのため、従来コイル使用時は磁束密度が 0.3 mT を超えると凍結対象の冷却効率が低下した。新コイルでは要求仕様を満たす範囲内でできるだけ抵抗を小さくするために、導線長さを短縮し、導体断面積を拡大する方針で設計を行った。

3.1 導線長さの課題に対する設計

従来コイルはコイル長さが長いと巻数が多かった。また、従来コイルは断熱材が巻かれた凍結槽を囲うように設置されており、コイルと凍結槽との間に断熱材と芯材が存在することでコイル径が大きかった。さらに電源装置への接続ケーブルとして長さ 2 m のケーブルを使用していた。これらは全て、抵抗増加の因子の1つである導線長さの増大に繋がっていた。そこで、新コイルではコイル導線長さの短縮に向けて巻数の低減とコイルの細径化を行った。Fig.2(b)に新コイルの構成を示す。新コイルはソレノイドコイルで構成する。ソレノイドコイル内の磁場は均一であると仮定し、試料全体がコイル内に収まる範囲でコイル長さを短くした。また、新コイルはコイルの細径化を実現するために、断熱材を介さず導線を凍結槽に直接巻きつけた。さらに、将来的に血管付精巣・血管付卵巣を凍結する際に十分なスペースが確保できる範囲で、コイルの芯となる凍結槽を細径化した。ただし、凍結槽底部の径は冷却機吸熱部の径に依存するため従来凍結槽と同じ径とした。Fig.3 に凍結槽の寸法を示す。凍結槽の材料には従来と同じくポリエチレンを用いた。さらに新コイルは電源装置に直接接続し、

(a) Previous (b) Proposed

Fig.2 Comparison of the coil and the cooling bath

Fig.3 Dimensions of the cooling bath

配線による抵抗を低減した.

3.2 導体断面積の課題に対する設計

導体断面積の増加に向けて導線を変更した。導体断面積を増加する際には、磁束密度に関連する単位長さ当たりの巻き数、周波数特性に関連する表皮深さについて考える必要がある。まず、コイルの単位長さ当たりの巻数について考える。式(3)を変形させて、要求磁束密度を $B = 2.0 \times 10^{-3}$ T、電流上限を 2 A に設定し、真空透磁率 $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ H/m を代入すると必要な単位長さ当たりの巻数 n は次のようになる。

$$n \cong \frac{B}{\mu_0 I} = \frac{2.0 \times 10^{-3} [\text{T}]}{4\pi \times 10^{-7} [\text{H/m}] \times 2 [\text{A}]} = 796 [\text{卷/m}] \quad (5)$$

n の逆数をとるとコイルの線径 d_0 が求められ次のようになる.

$$d_o \leq \frac{1}{796 \times 10^{-3} [\text{卷}/\text{mm}]} = 1.26 [\text{mm}] \quad (6)$$

続いて表皮深さについて考える。高周波電流においては、電流が導体の表面付近のみにしか流れなくなり、実質的に断面積が小さくなる。表皮深さとは導体表面から電流が流れることができる深さのことで、周波数が高くなるほど小さくなる。平面状導体の場合の表皮深さ t は、透磁率 μ_0 、比透磁率 μ 、導体の導電率 σ 、周波数 f を用いて次の式で表される。

Table 1 Skin depth of the copper wire

Frequency [Hz]	Skin depth [mm]
20	14.83
200	4.69
2k	1.48
20k	0.47
200k	0.15

Fig.4 The cross section of the wire

$$t = \frac{1}{\sqrt{\pi f \mu_0 \mu \sigma}} \quad (7)$$

ここで、 $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ H/m、一般的な導線に用いられる銅導体 ($\mu = 0.999991$, $\sigma = 5.76 \times 10^7$ [$\Omega^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$]) を例にとり、周波数に対する表皮深さを計算すると Table 1 のようになる。本研究では従来コイルがコイルとして機能しなくなる周波数(自己共振周波数)である 200 kHz 以下において表皮効果が発生しないようコイルを設計する。Table 1 から 200 kHz 以下の周波数において表皮効果を生じさせないためのコイル導線における導体部分の直径 d_i の上限は次のようになる。

$$\begin{aligned} d_i &= 2 \times (200\text{kHz 時の表皮深さ}) = 2 \times 0.15 [\text{mm}] \\ &= 0.3 [\text{mm}] \end{aligned} \quad (8)$$

式(6)と合わせて導線を選定する際の条件は次のようになる。

$$d_o \leq 1.26 [\text{mm}] \cap d_i \leq 0.3 [\text{mm}] \quad (9)$$

従来コイルで使用していた導線は $d_o = 1.1 \text{ mm}$, $d_i = 0.5 \text{ mm}$ であり、条件を満たさない。導体径を細く維持しつつ導体断面積を増加するために、従来コイルで使用していた撚り線を、新コイルではリッツ線に変更する。Fig.4 に示すように、リッツ線は通常の撚り線と異なり素線が一本毎に絶縁された構造になっており、素線の導体径が d_i に相当する。この構造により、表皮効果の生じない導体径を維持しつつ導体断面積を増やすことが可能となる。本研究では $d_o = 1.0 \text{ mm}$, $d_i = 0.24 \text{ mm}$ のリッツ線(古川電機工業株式会社;TEX-ELZ 7/0.24)を選定した。これにより導体断面積が従来の導線の 0.14 mm^2 から 0.34 mm^2 に増加した。

また、断面積の増加と同じ効果をもたらす並列化についても検討した。新コイルは、コイルの抵抗を下げるために導線を並列接続して重ねて巻き、コイルを 3 層にした。Fig.2(b)に新コイルの巻き方を示す。Fig.2(b)の拡大図に示した 1, 2, 3 の断面はそれぞれコイルの各層を表している。

Fig.5 Coil united the cooling bath

Table 2 Characteristic of coil

	Previous	Proposed
Size [mm]	H300 × D12.5	H60 × D67
Wire Diameter [mm]	1.1	1.0
Wire Turns [-]	213	59 × 3
Self-Resonant Frequency [Hz]	200×10^3	4×10^6

(a) Resistance

(b) Inductance

Fig.6 The relationship between the frequency and (a)the Resistance, (b)the Inductance

3.3 凍結槽一体型磁場印加用コイルの試作

Fig.5 に新コイル外観を示す。磁場下過冷却凍結を行う際には、冷却時の外気温の影響を避けるために凍結槽とコイルに断熱テープ (MISUMI 社; HOPET3-30-10, HOPET10-30-10) を巻く。

Table 2 にコイルの仕様を示す。従来コイルも新コイルもピッチ間隔が線径と同じになるよう隙間なく巻いた。Fig.6 にコイルの抵抗とインダクタンスの周波数特性を示す。抵抗とインダクタンスは LCR メータ (nF 社; ZM2375) で計測した。新コイルは全周波数において抵抗を従来コイルの 8 % 以下まで低減し、インダクタンスを 10 % 以下まで低減した。インダクタンスが低減すると、コイルが機能する限界の周波数である自己共振周波数が大きくなり、結果として新コイルの自己共振周波数は従来の 200 kHz から 4 MHz まで拡大した。

4. 凍結槽一体型磁場印加用コイルの特性評価

発生可能な磁束密度、同じ磁束密度を発生した際の有効電力、磁場下で冷媒を冷却した際の冷却速度・冷媒温度均一性を従来コイルと新コイルで比較することで、試作したコイルの特性を評価した。

4.1 発生可能な磁束密度の比較

従来コイルと新コイルで、発生可能な磁束密度を比較する。

一定電流を出力することが可能なバイポーラ電源 (nF 社; BP4610) から発生した定電流をコイルに流し、凍結時に試料を設置する位置の磁束密度をガウスメータ (東陽テクニカ社; 410 型ガウスメータ) で計測した。Fig.7 に磁束密度計測セットアップの概略図を示す。試料の凍結槽底面からの位置は両コイルで 10 mm と共通である。凍結槽内壁からの位置は、凍結槽の径を変更した関係から両コイルで異なり、従来コイルでは中心に向かって 22 mm, 新コイルでは 10 mm とした。また、コイル表面の温度上昇を計測するためコイル表面に K 熱電対を設置した。磁束密度を 0 mT から 2.0 mT まで 0.1 mT 刻みで増加させた。このとき同時に電流の実効値と磁束密度の関係を計測した。これを DC, 20 Hz, 200 Hz, 2 kHz, 10 kHz の 5 種類の周波数で行った。

磁場を発生した結果、従来コイルでは発生した磁束密度が 1.0 mT を超えるとコイルの温度が 50 °C を超えたため、過冷却凍結には不適切と判断し、従来コイルは 1.0 mT が最大磁束密度と判断した。また 0 ~ 120 V_{p-p} の電圧範囲において、従来コイルは 2 kHz で 0.8 mT までの磁場しか発生できなかった。また 10 kHz では 0.1 mT 以上の磁場を発生できなかった。新コイルについては、全ての周波数で 2.0 mT まで磁場を発生させることができた。Fig.8 に同じ磁束密度を発生させた際の電流の実効値を示す。DC 時, 20 Hz, 200 Hz, 2 kHz 時の全てで、新コイルは全ての磁束密度において従来コイルよりも小さい電流で同じ磁束密度の磁場を発生させることができた。

新コイルが従来コイルよりも大きな磁束密度を発生できたのは、インダクタンスの低減により周波数の増加に伴うインピーダンスの増加を抑え、電流が流れやすくなったからであると考えられる。また、式(2)を見ると、単位長さあたりの巻数が増加すると同じ磁束密度を発生させるために必要な電流が小さくなることからわかる。この式の通り、単位長さあたりの巻数が増えた新コイルでは同じ磁束密度を発生させるために必要な電流が小さくなることが確認できた。

以上の結果より、新コイルは発生可能な磁束密度の上限が従

Fig.7 Measurement setup of the magnetic flux density

来の 0.3 mT から 2.0 mT まで拡大し、磁場周波数の上限が従来の 2 kHz から 10 kHz まで拡大した。

4.2 磁場を発生した際の有効電力の比較

同じ磁束密度を発生した際の有効電力を、従来コイルと新コイルで比較した。

式(1)から、同じ磁束密度を発生した際の電流の実効値と抵抗が分かれば、その際の有効電力を求めることができる。4.1 で計測した電流の実効値と、事前に計測した抵抗値を用いて、有効電力を算出した。

Fig.9 に同じ磁束密度の磁場を発生した際の有効電力を示す。新コイルは全ての周波数において、従来コイルに比べて磁束密度の増加に伴う有効電力の増加を抑えた。Table 3 に全周波数における低減率を示す。新コイルは、DC から 2 kHz の全ての周波数で従来コイルに比べて発熱の指標となる有効電力が 97%以上低減した。Fig.10 に新コイルにおける磁場周波数と有効電力の関係を示す。磁場周波数の増加に伴い新コイルの有効電力は増加したものの 3 W 未満に抑えられた。従来コイルでは 0.5 mT 未満の磁束密度発生時に 3 W に達したことから、新コイルでは広い磁束密度範囲で有効電力を抑えられることがわかる。

Fig.8 The relationship between the magnetic flux density and the actual value of current

Fig.9 The relationship between the magnetic flux density and the effective power

Table 3 Reducing rate of the effective power

	Reducing rate [%]
DC	97.4 ± 0.2
20 Hz	97.8 ± 0.4
200 Hz	97.9 ± 0.4
2 kHz	98.4 ± 0.3

Fig.10 The relationship between the magnetic flux density and the effective power (Propose)

4.3 冷却速度・冷媒温度均一性の比較

冷却特性として、コイルで磁場を印加しながら冷媒を冷却した際の冷却速度と冷媒温度均一性を、従来コイルと新コイルで比較した。

Fig.11 冷却速度・冷媒温度均一性計測のセットアップを示す。スターリング冷却機(ツインバード工業社 SC-UE15R)に設置した凍結槽に、冷媒として無水エタノールを入れ、試料を設置した。従来コイル使用時と新コイル使用時では凍結槽の径が異なるため、無水エタノールを従来コイル使用時は 160 mL、新コイルは 120 mL 使用し、試料を浸漬させる深さを統一した。試験管には、過冷却凍結の影響による冷媒の温度変化を防ぐため、試料の代わりにシステムの冷却温度範囲内では凍結しない無水エタノールを 1 mL 入れた。冷却速度の制御は測温抵抗体で計測した温度を基に、コントローラ(CHINO 社;KP1000C)を用いて行った。冷却速度は、測温抵抗体に輪ゴムで固定した K 熱電対で計測した温度から算出した。冷媒の上部と下部の温度差を解消するために、送液ポンプ(ヤマト科学工業社;7520-40)を用いて 80 mL/min で冷媒を底面付近から吸い上げ、液面付近から放出して環流した。しかし、磁場印加時はコイルの発熱により冷媒温度が不均一になる可能性がある。そこで、凍結槽底面から 5 mm(冷媒下部)と 30 mm(冷媒上部)の位置に K 熱電対を設置して冷媒温度を計測し、その温度差から冷媒温度均一性を評価した。磁場の印加は、パイポーラ電源(nF 社;BP4610)から発生した電流を、コイルに流すことで行った。Table 4 に示す条件で磁場を印加しながら $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の設定で 60 分間冷却した。磁場周波数は、0.1 mT 以上の磁束密度を発生可能かつ発熱の指標となる有効電力が最大となる周波数に設定し、従来コイルでは 2 kHz、新コイルでは

(a) Previous

(b) Proposed

Fig.11 Cooling of cooling medium

Table 4 Magnetic field conditions in the experiment of cooling the cooling medium

	Magnetic flux density [mT]
Previous (2kHz)	w/o, 0.3, 0.5, 0.8
Proposed (10kHz)	w/o, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0

10 kHz とした。

Fig.12 に冷却速度の時間変化を示す。従来コイル使用時は磁場なし、0.3 mT 印加時に冷却速度が一定値に収束しつつあるのに対し、0.5 mT、0.8 mT 印加時に 50 分付近から冷却速度が低下した。一方で新コイル使用時は、全ての磁束密度において冷却速度が一定値に収束した。

Fig.13 に冷媒温度差の時間変化を示す。従来コイル使用時は 0.5 mT、0.8 mT 印加時に冷媒上下部の温度差が時間の経過につれて拡大した。一方で新コイル使用時は、全ての磁束密度で冷媒上下部の温度差を 1 °C 以内に抑えた。

従来コイル使用時に冷却速度の時間応答がばらつき、冷媒温度差が拡大したのは、コイルの発熱量が冷却機の限界吸熱量を

(a) Previous

(b) Proposed

Fig.12 Time response of the cooling rate

(a) Previous

(b) Proposed

Fig.13 Time response of the temperature difference

上回ったからであると考えられる。新コイル使用時に冷却速度の時間応答が均一で、冷媒温度差が解消されたのは、コイルの発熱量が下がり、またコイル自体も冷却できる構造になっているためコイルの発熱量が冷却機の限界吸熱量の範囲内に収まったからだと考えられる。ただし、新コイルにおいても冷却速度が設定した値に到達しなかったのは、環流する際に一度冷媒が凍結槽外に出されて室温に晒され、外気から熱を吸収するためと考えられる。今後、冷媒を凍結槽から出さずに冷媒温度を均一化する方法を検討する。

以上の結果より、新コイルは冷却特性が均一な磁束密度の上限が従来の 0.3 mT から 2.0 mT まで向上した。

5. 生体組織を用いた磁場下過冷却凍結実験

試作したコイルを用いて生体組織を磁場下で過冷却凍結し、過冷却の磁場周波数・磁束密度依存性を評価した。試料には 5 mm 角に切断したブタ卵巣切片を使用した。

Fig.14 にブタ卵巣凍結の実験セットアップを示す。ブタ卵巣切片には K 熱電対を固定し、試験管内で生理食塩水に浸漬させた。冷却速度は $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ に設定し、環流速度は 80 mL/min に設定した。磁場条件は DC, 20 Hz, 200 Hz, 2 kHz, 10 kHz の 5 種類の磁場周波数に対して、磁束密度が 0.5 mT, 1.0 mT, 1.5 mT, 2.0 mT の 4 種類の 20 種類、および磁場なしの計 21 種に設定し、各磁場条件で 20 個の試料を過冷却凍結した。ブタ卵巣切片の過冷却度を算出するにあたり、ブタ卵巣切片上部、ブタ卵巣切片下部、生理食塩水の温度を計測した。過冷却解消直前の温度と過冷却解消直後の温度との差を、ブタ卵巣切片上部とブタ卵巣切片下部で算出し、上部と下部の平均値をブタ卵巣切片の過冷却度とした。

Fig.15 に磁場周波数と過冷却度の関係を示す。1.0 mT, 2.0 mT 磁場印加時は全周波数で磁場なし時に比べて過冷却度が増加し、10 kHz 時に最大となった。一方で、0.5 mT, 1.5 mT 磁場印加時は全周波数で磁場なし時に比べて過冷却度が減少し、0.5 mT 磁場印加時は 20 Hz, 1.5 mT 磁場印加時は 200 Hz で過冷却度が最小となった。

Fig.16 に磁束密度と過冷却度の関係を示す。全磁場周波数において 1.0 mT, 2.0 mT 磁場印加時に磁場なし時に比べ過冷却度の

平均値が増加し、1.0 mT 磁場印加時に比べ 2.0 mT 磁場印加時の方が増加量は大きかった。一方、全磁場周波数において 0.5 mT, 1.5 mT 磁場印加時に磁場なし時に比べ過冷却度の平均値が減少し、1.5 mT 磁場印加時に比べ 0.5 mT 磁場印加時の方が減少量は大きかった。

また、それぞれの磁場条件における過冷却度の平均値に対し、有意水準 5 % のウェルチの t 検定による有意差検定を行った結果、1.0 mT, 10 kHz 時の過冷却度と、2.0 mT, 10 kHz 時の過冷却度は、磁場なし時に比べ有意に増加していることを確認した。

Fig.15 The relationship between the frequency of applying magnetic field and the degree of supercooling (w/o = without magnetic field)

Fig.14 Experimental setup of freezing the porcine liver

Fig.16 The relationship between the magnetic flux density of applying magnetic field and the degree of supercooling (0 mT = without magnetic field)

過冷度の磁場周波数・磁束密度依存性を評価した結果、磁場なし時に比べて過冷度が有意に増加する磁場条件と、有意に減少する磁場条件が存在することを確認した。したがって、過冷却凍結において磁場を印加する際には、適切な磁場条件を選定しなければ過冷度が減少することもある。また過冷度に有意差の認められた磁束密度の組み合わせの数は、DC 時に 1 通り、20 Hz、200 Hz、2 kHz 時に 3 通り、10 kHz 時に 6 通りとなり、磁場周波数が大きいほど磁束密度の変化に対する影響が大きくなることを確認した。本研究で設定した磁場条件において、過冷度は磁場なし時の $9.1 \pm 1.7^\circ\text{C}$ から 10 kHz、2.0 mT 磁場印加時の $10.5 \pm 1.7^\circ\text{C}$ まで増加した。この過冷度の増加による細胞破壊の抑制効果を確認するために、今後細胞観察による評価が必要となる。磁場なし時の試作したコイルが発生できる磁場条件範囲内では、磁束密度・磁場周波数を大きく設定することが過冷度の増加に繋がるというような単純な傾向は示されず、今後は磁場条件と過冷度との関連性について理論的に考察する必要がある。

6. 結論

本研究では、生体組織の過冷却凍結における過冷度の磁場周波数・磁束密度依存性の評価に向けて、凍結槽一体型磁場印加用コイルを試作した。

発生可能な磁束密度を計測した結果、従来コイルは 2 kHz において 0.8 mT 以上の磁場を発生できず、また 10 kHz において 0.1 mT 以上の磁場を発生できなかったが、新コイルは DC、20 Hz、200 Hz、2 kHz の全周波数で 2.0 mT の磁場を発生した。同じ磁束密度を発生した際の有効電力を評価した結果、新コイルは従来コイルと比較して有効電力を DC 時に $97.4 \pm 0.2\%$ 、20 Hz 時に $97.8 \pm 0.4\%$ 、200 Hz 時に $97.9 \pm 0.4\%$ 、2 kHz 時に $98.4 \pm 0.3\%$ 低減した。冷却速度・冷媒温度均一性を評価した結果、従来コイルは 0.5 mT 以上の磁束密度で冷却速度の時間応答にばらつきが生じたが、新コイルは 2.0 mT まで時間応答が均一であった。また、従来コイルは 0.5 mT 以上の磁束密度において、冷媒上下で 1°C を超える温度差が生じたが、新コイルは 2.0 mT まで 1°C 以内に抑えた。このように凍結槽一体型磁場印加用コイルは過冷度の計測が可能な磁場周波数の最大値を従来の 2 kHz から 10 kHz まで拡大し、磁束密度の最大値を 0.3 mT から 2.0 mT まで拡大した。

凍結槽一体型磁場印加用コイルを用いてブタ卵巣切片を磁場下過冷却凍結した結果、計測した過冷度は全磁束密度において 1.0 mT、2.0 mT 磁場印加時に磁場なし時に比べて増加し、0.5 mT、1.5 mT 磁場印加時に磁場なし時に比べて減少した。過冷度が最大となった磁場条件は 10 kHz、2.0 mT で、磁場なし時の $9.1 \pm 1.7^\circ\text{C}$ から $10.5 \pm 1.7^\circ\text{C}$ まで増加した。

本研究の結果、凍結槽一体型磁場印加用コイルの開発により磁場下過冷却凍結時の磁場周波数・磁束密度範囲を拡大できることを確認した。また、拡大された磁場周波数・磁束密度範囲内において、ブタ卵巣切片の過冷度が増減することが確認され、過冷度の増加には適切な磁場周波数・磁束密度の設定が必要であることが示された。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科学研究費補助金 22240061, 及び私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 S1512001 の助成を受けたものである。

参考文献

- 1) Kanit S, 中川毅史, 野口修平, 三原誠, 小児がん男児の妊孕性温存～超微小血管外科技術を用いた精巣移植・精巣凍結の可能性～. *Academic Collaborations for Sick Children* 2009; 1(1): 16-19.
- 2) Ong WC, 中川毅史, 野口修平, 三原誠, 超微小血管外科技術応用による血管柄付卵巣移植. *Academic Collaborations for Sick Children* 2009; 1(1): 4-7.
- 3) 藤川清三, 細胞内氷晶形成による生体膜の障害. 凍結及び乾燥研究会会誌 1978; 24: 31-33.
- 4) Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P, Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972; 178(4059): 411-414.
- 5) Donnez J, et al, Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364(9443): 1405-1410.
- 6) Ma XH, et al, Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. *Cryobiology* 2010; 60(2): 184-191.
- 7) Rall WF, Fahy GM, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313(6003): 573-575.
- 8) Ishijima T, et al, Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev* 2006; 52(2): 293-299.
- 9) Moon JH, et al, Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod* 2008; 23(8): 1760-1770.
- 10) Wusteman M, Robinson M, Pegg D, Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. *Cryobiology* 2004; 48(2): 179-189.
- 11) Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker M.J, Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003; 7(6): 623-633.
- 12) 藤澤亮介, 山下紘正, 正宗賢, 中川毅史, 三原誠, 土肥健純, 組織凍結保存装置における過冷却に関する基礎的研究. *Organ Biology* 2010; 17(2): 190.
- 13) 林田貴之, 三原誠, 正宗賢, 桑名健太, 土肥健純, 交流磁場下過冷却現象による臓器・生体組織凍結保存装置開発及び基礎評価. *生体医工学* 2011; 49(1): 166.(O2-13-2)
- 14) 守屋拓朗, 桑名健太, 正宗賢, 土肥健純, 過冷却凍結による生体組織凍結における冷媒の還流の効果の検証. *Organ Biology* 2012; 19(2): 206.
- 15) 小林りか, 兼坂尚宏, 渡辺学, 鈴木徹, 食品凍結時の過冷却現象が氷結晶の形態およびドリップロスに及ぼす影響. *日本冷凍空調学会論文集* 2014; 31(3): 297-303.
- 16) 新野豊太郎 他, 磁場による過冷却現象を利用した卵巣の凍結保存に関する研究. *Journal of Japan Society of Computer Aided Surgery* 2009; 11(3): 226-227.
- 17) 前川幸一郎, 荒井聰明, 送配電 新訂版. 東京:東京電機大学出版局, 1987.
- 18) 宇野辛一, 磯部直吉, 交流回路. 東京:東京電機大学出版局, 1991.