

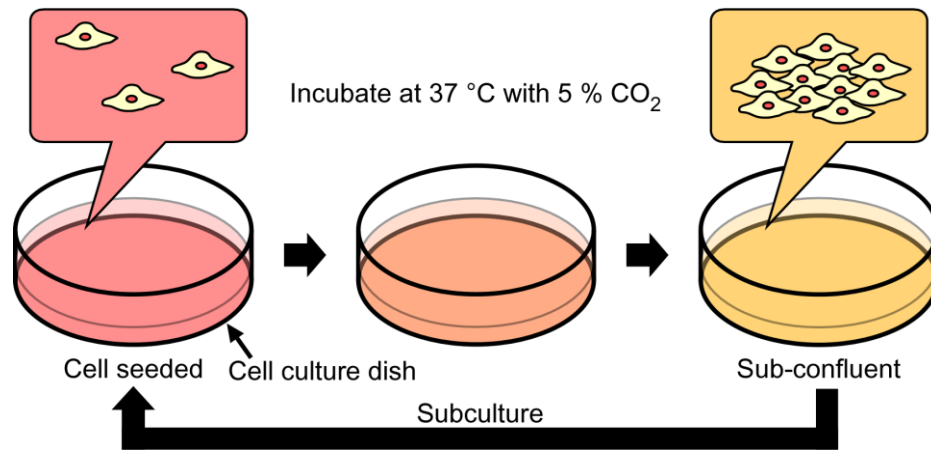
# 凍結保護剤を用いない 細胞の凍結保存技術

信州大学 繊維学部 機械・ロボット学科  
教授 秋山 佳文

2023年8月3日

# 細胞の維持

## <継代培養>

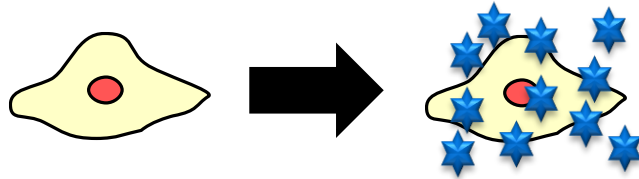


- × 老化・遺伝子浮動
- × コンタミネーション
- × コスト過多
- × 希少細胞

## 細胞凍結保存

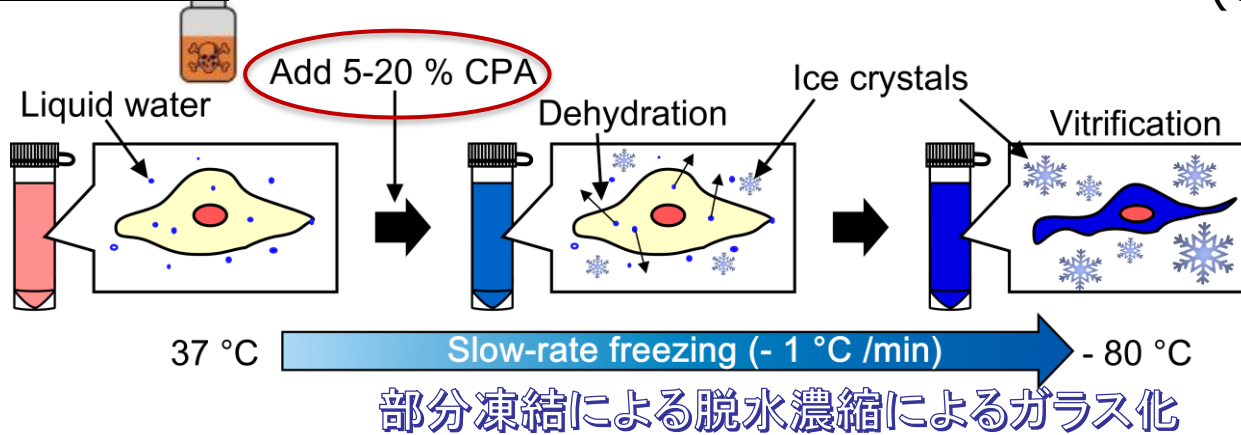
- バイオバンク  
株化細胞, 微生物の保存
- 畜産業界  
種の保存、家畜増産のための  
精子・卵・受精卵の保存
- 生殖医療  
精子や卵子の凍結保存
- 再生医療分野  
ヒトES/iPS細胞の臨床用バン  
キング構想

## 単純凍結



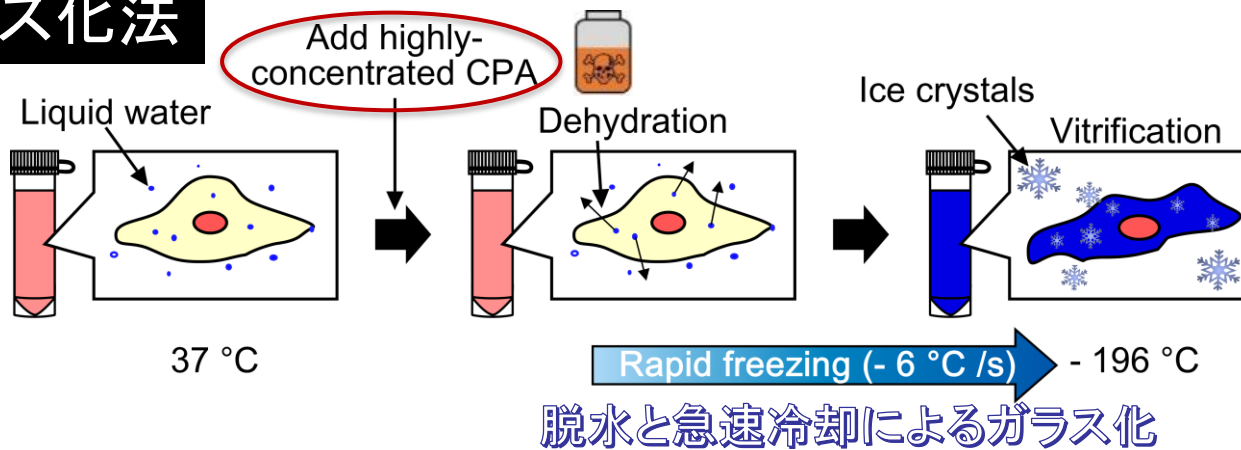
氷晶による細胞膜、  
細胞小器官の破壊

## 緩慢凍結法



\* 凍結保護剤: DMSOやグリセロール等  
(Cryoprotectant agent, CPA)

## ガラス化法



### CPAによる凍結保存の問題

- CPAの細胞毒性
- CPAの分化誘導効果(幹細胞)
- 脱水によるダメージ

# 従来技術とその問題点

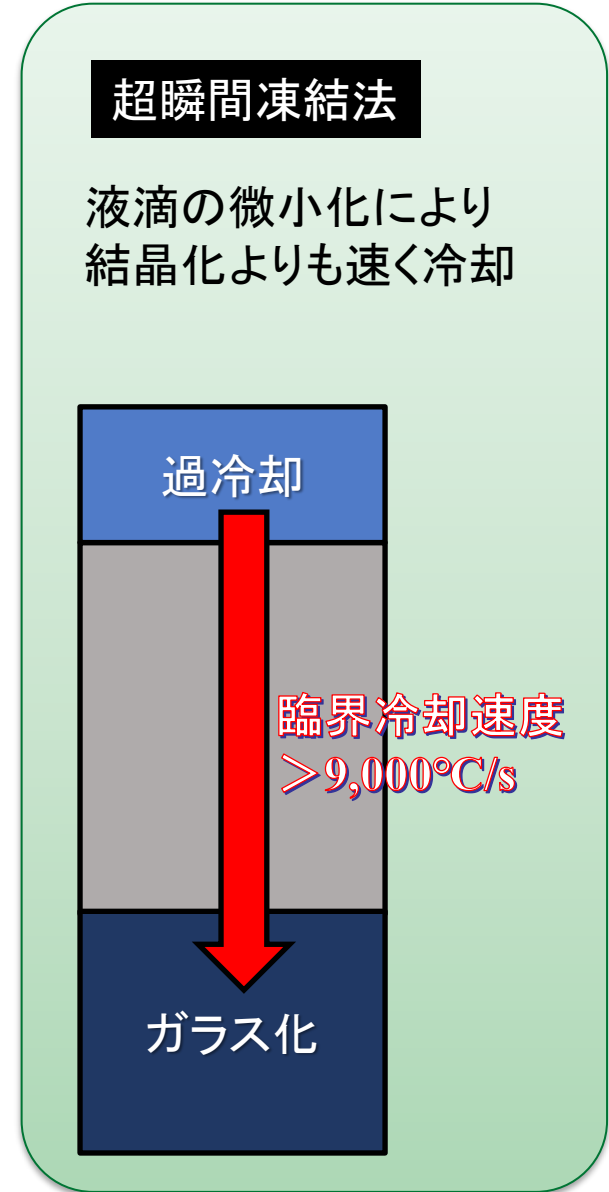
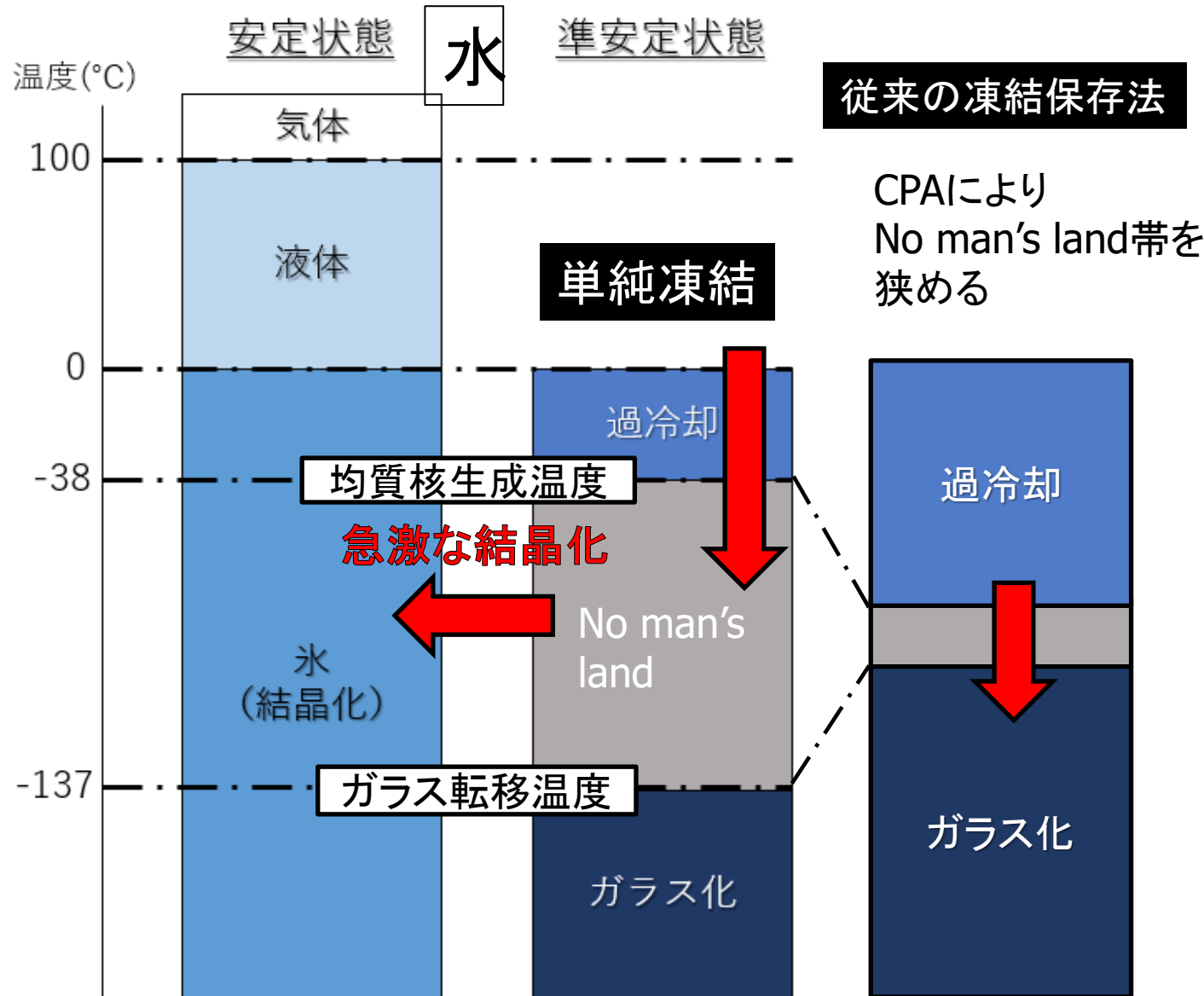
既に実用化されているものには、凍結保護剤による緩慢凍結法や急速ガラス化法等があるが、

凍結保護剤自身の毒性

脱水による細胞ダメージ

等の問題があることは認識されているが、代替法がないため広く利用されている。

凍結保存成否 : No man's land帯における氷晶生成をいかに回避し, ガラス化するか?



Y. Suzuki., Low Temp. Sci. (2006) 64, 103-113

物体を早く冷却するには？

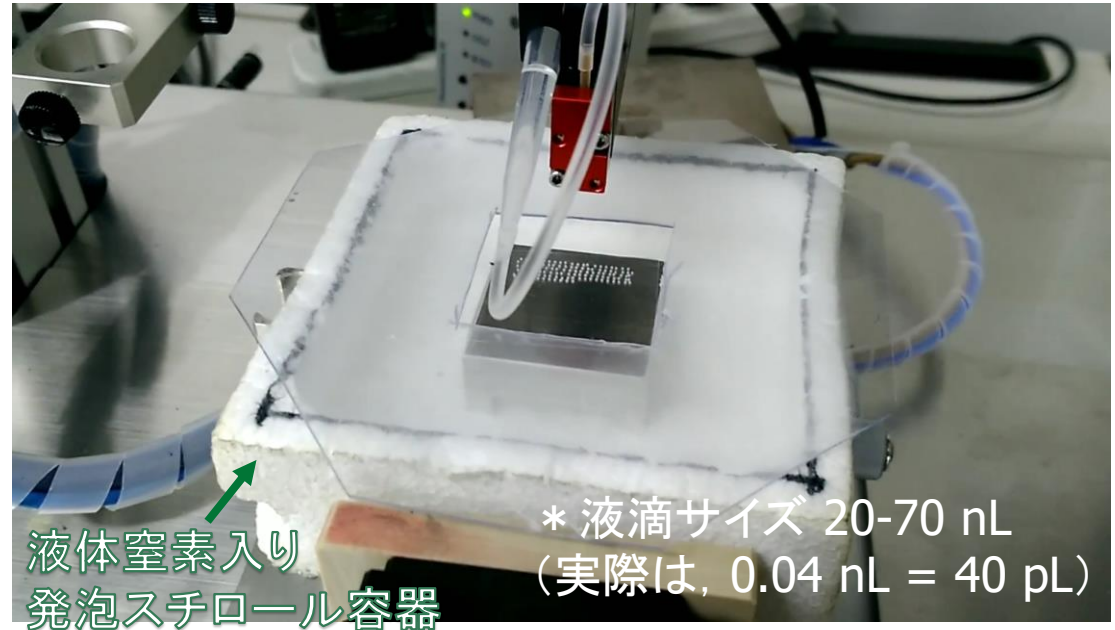
$$\text{熱容量} \propto \text{体積} = L^3$$

$$\text{伝熱量} \propto \text{面積} = L^2 \quad (L \text{ は代表長さ})$$

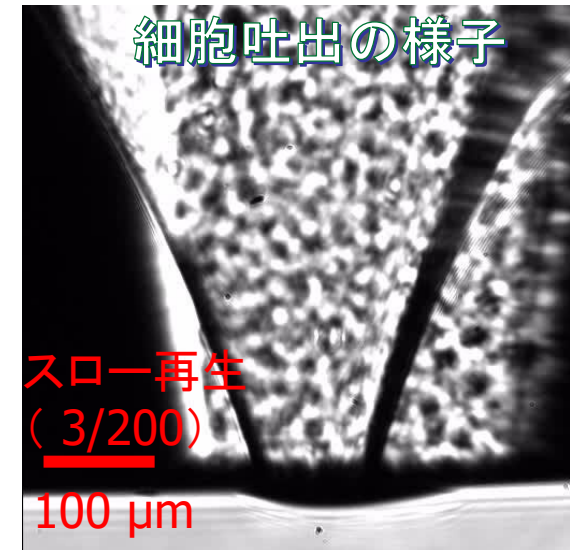
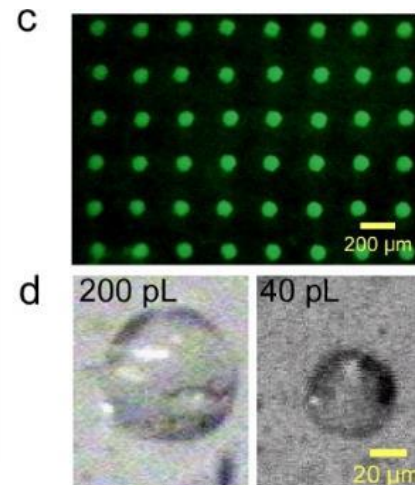
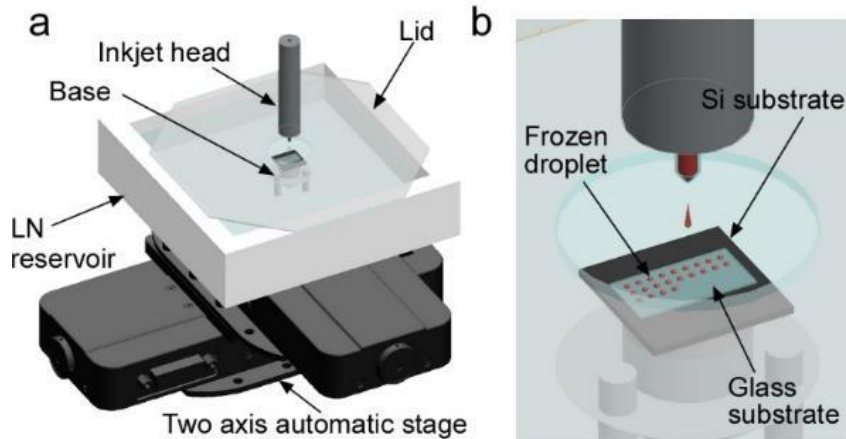
$$\text{冷却時間} \propto \frac{\text{熱容量}}{\text{伝熱量}} \propto \frac{L^3}{L^2} = L$$

Lを小さくすると、冷却時間が小さくなる  
=冷却速度が上がる。

(=スケール効果)

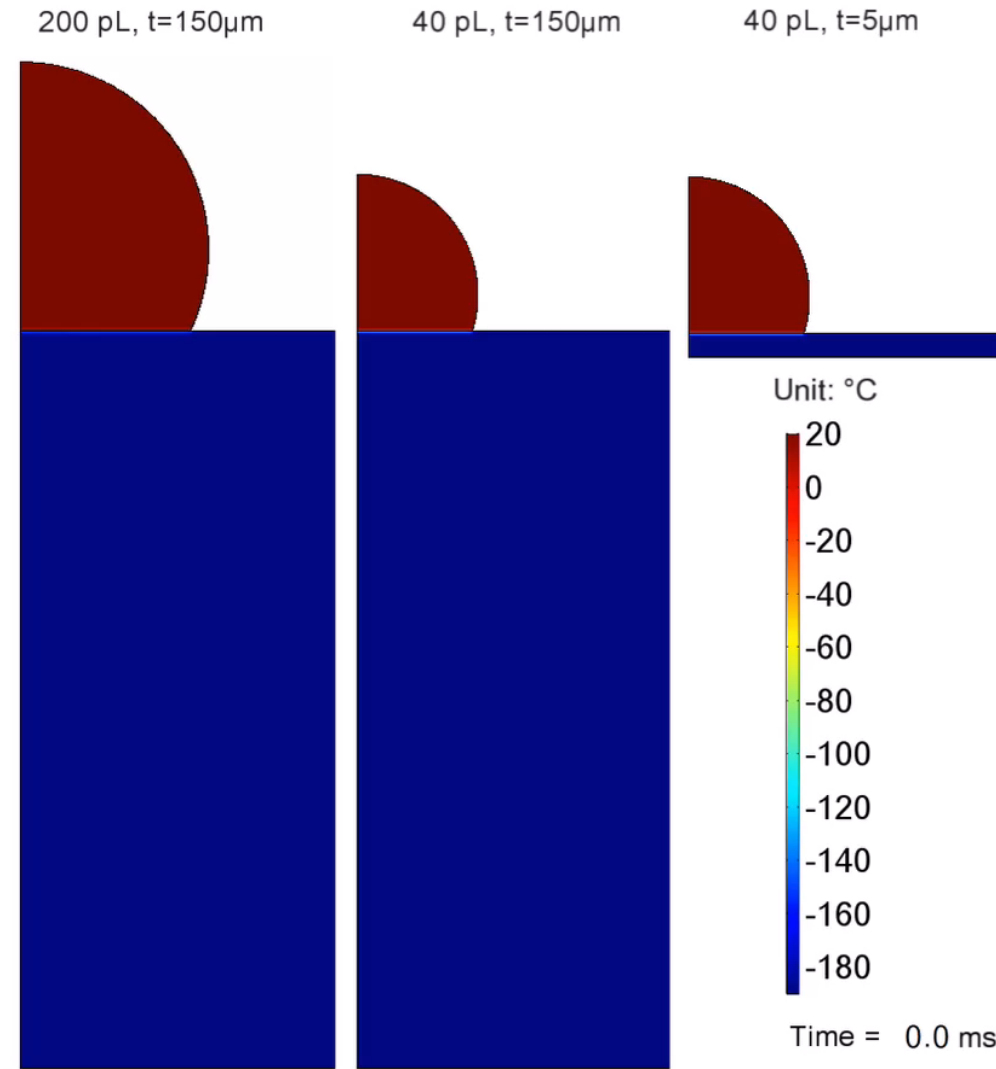


## 超瞬間凍結装置の構成

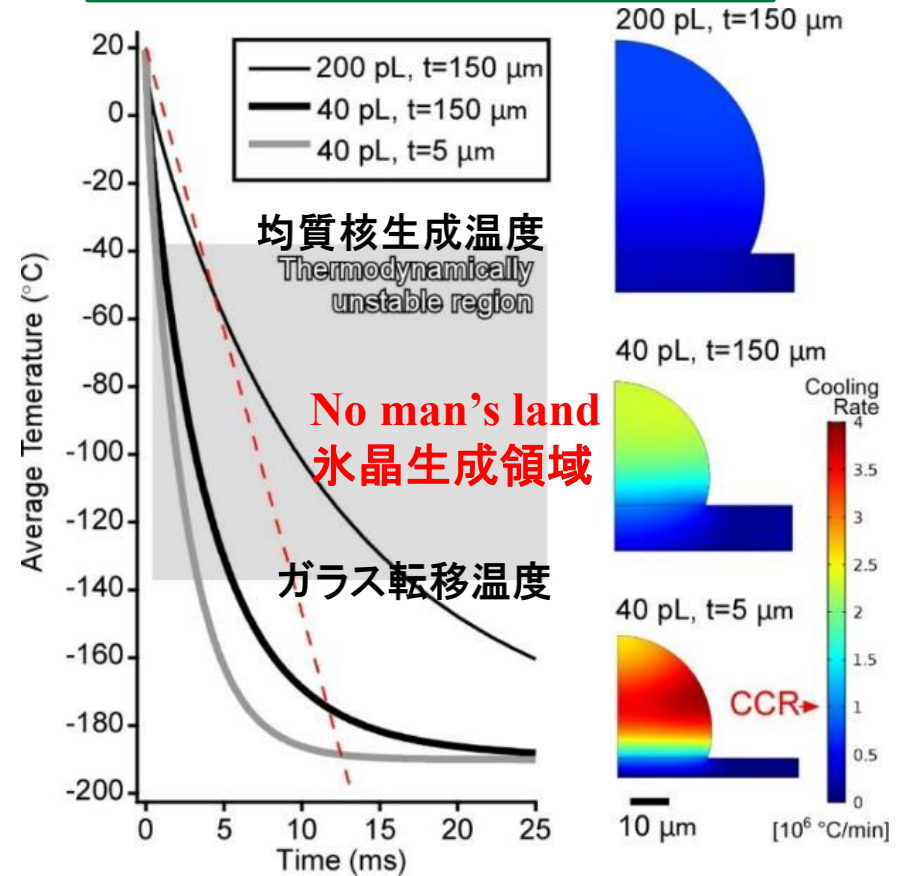




## 温度変化の比較



## 液滴全体の平均温度の変化



冷却速度 (-38 ~ -137°C間)

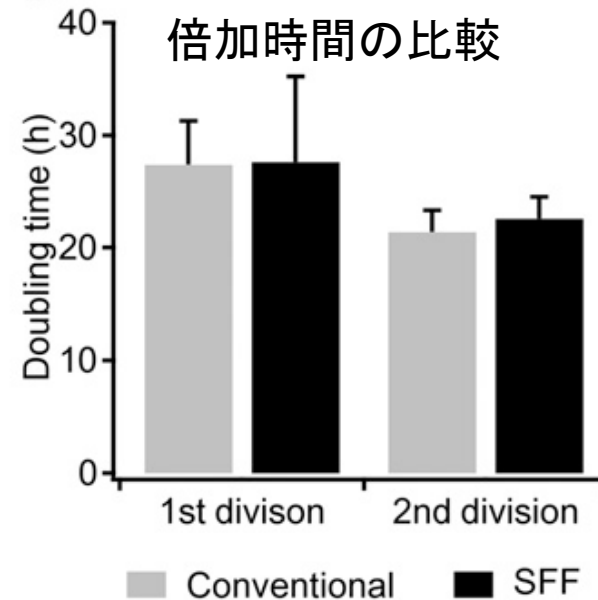
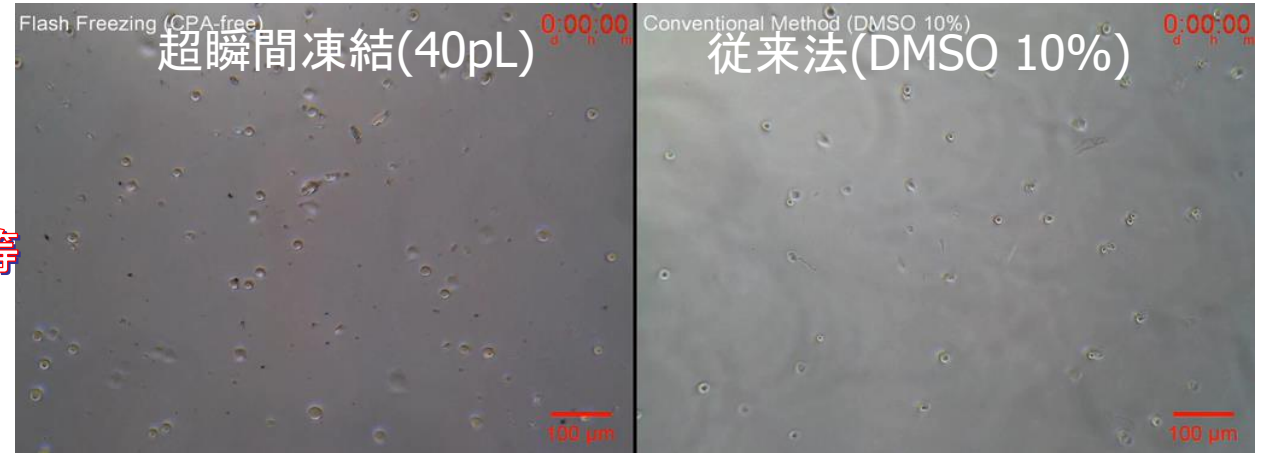
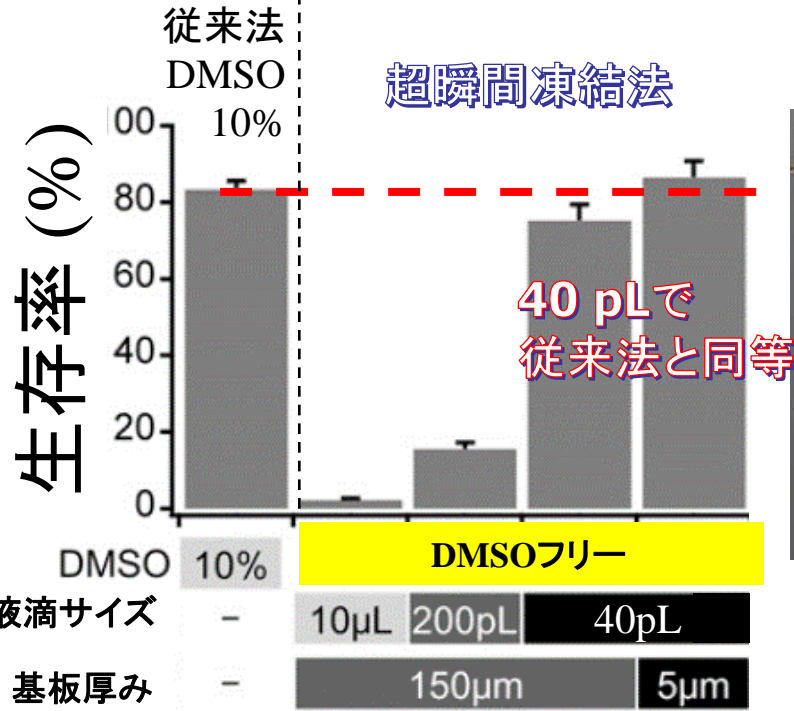
× 200 pL (t=150 μm):  $0.72 \times 10^4$  °C/s

**細胞の臨界冷却速度 CCR:  $1.0 \times 10^4$  °C/s**

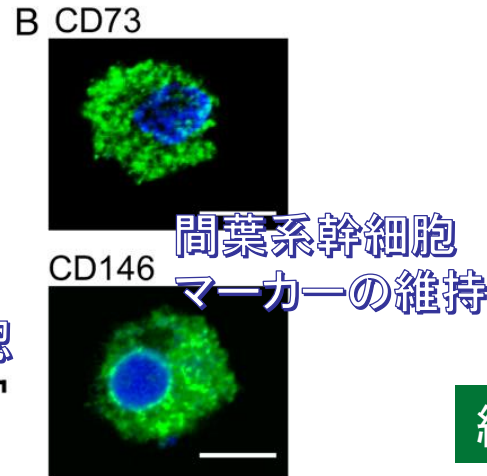
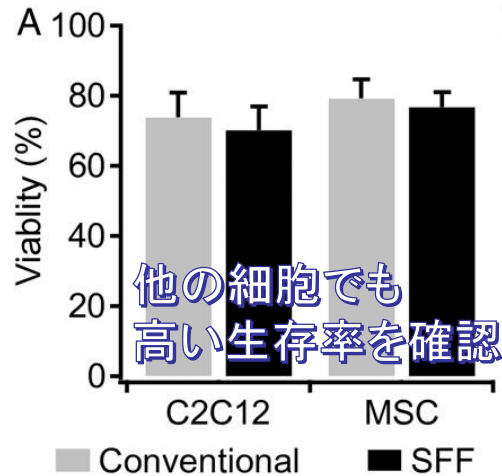
○ 40 pL (t=150 μm):  $2.2 \times 10^4$  °C/s

○ 40 pL (t=5 μm):  $3.67 \times 10^4$  °C/s

タイムラプス観察(解凍後60時間)



細胞: マウス繊維芽細胞株 NIH-3T3



緩慢凍結法(DMSO 10%)と同等の生存率を達成

C2C12: マウス筋芽細胞株, MSC: ラット間葉系幹細胞

Y. Akiyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2019) 116, 7738-7743



# 新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の懸念点であった凍結保護剤を用いずに動物細胞を凍結保存技術を開発した。
- 従来は、超急速な冷却速度が達成できなかったため氷晶（氷の粒）が生成し細胞にダメージを与えていた。この氷晶生成を防ぐために凍結保護剤が必須であったが、インクジェット液滴の利用により冷却速度を毎秒1万℃程度にまで向上できたため、凍結保護剤フリーで凍結保存することが可能となった。
- 本技術の適用により、凍結保護剤や脱水に弱いなどの理由で凍結保存できなかった細胞を凍結保存できるようになることが期待される。

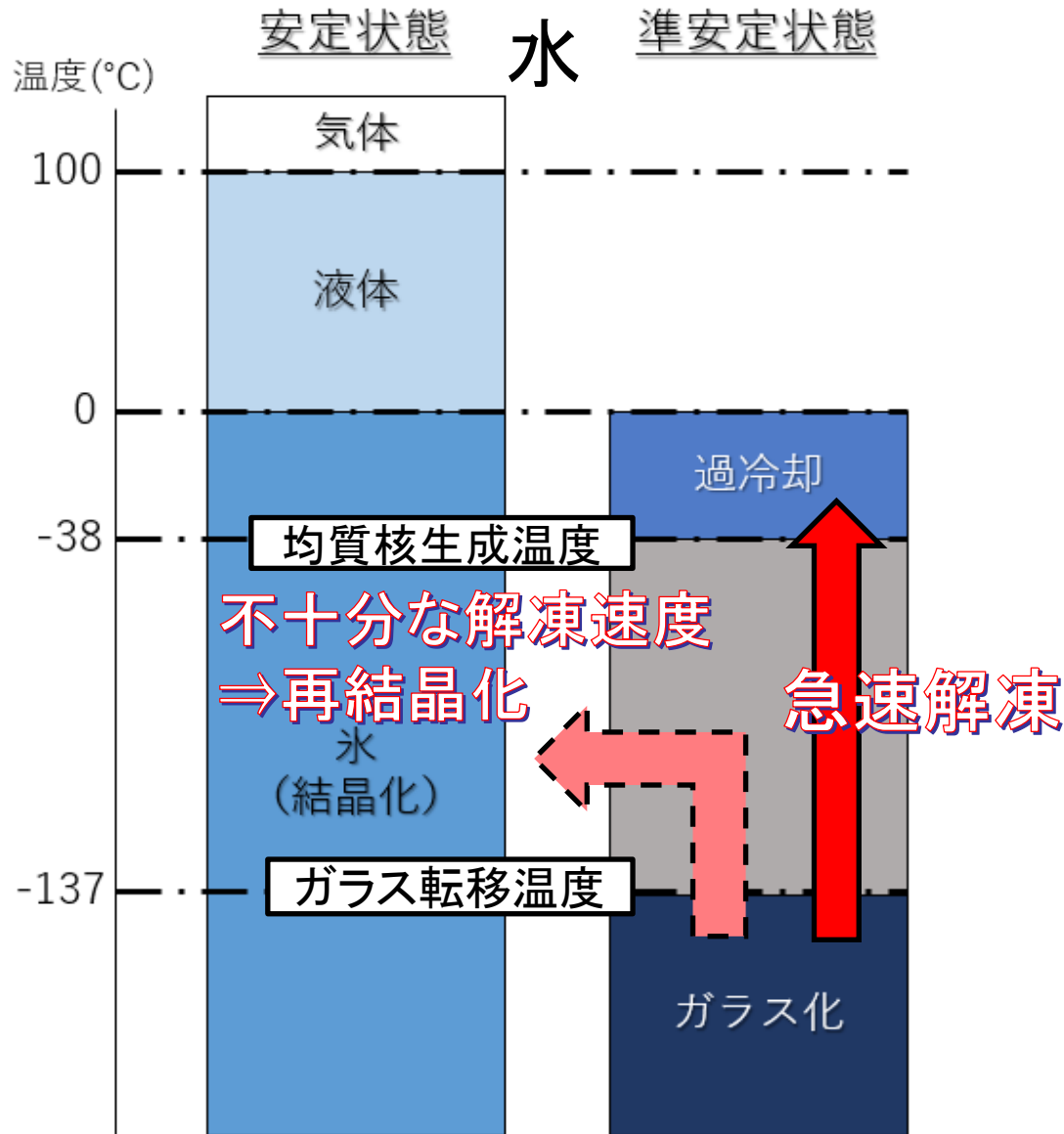
# 想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、凍結保護剤の影響を受けやすい多能性幹細胞や希少な細胞に適用することで、凍結保護剤フリーのメリットが活かせると考えられる。
- また、生殖医療（卵子や精子の保存）や微生物の種の保存といった分野や用途に展開することも可能と思われる。

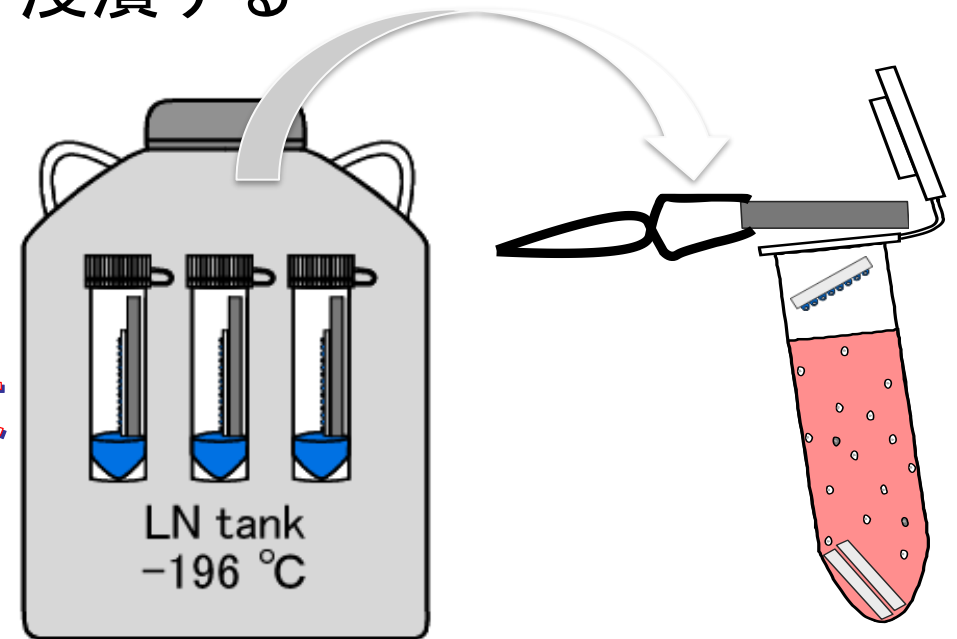
# 実用化に向けた課題

- 解凍も含めた工程の自動化技術を確立することで再現性を向上させる必要あり。自動解凍装置を開発済み。
- 凍結細胞の増加に向けて高密度吐出が可能なことを確認済み。今後、処理速度のさらなる向上に向けてマルチヘッド化が望まれる。
- 細胞生存率のさらなる向上のために、インクジェット液滴のさらなる微小化が望まれる。ただし、微小化液滴の安定した凍結技術の確立する必要あり。液滴の落下中凍結防止のため、ヘッドヒーターを開発済み。

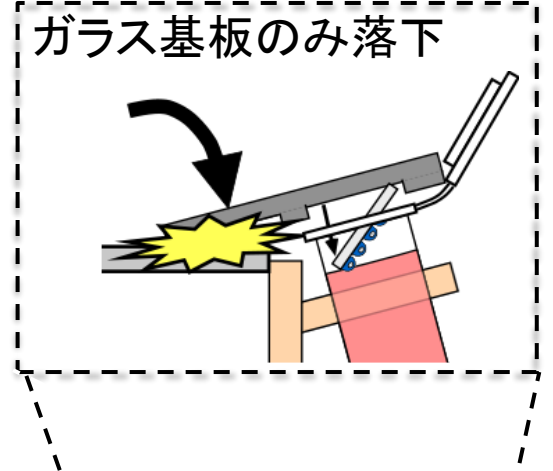
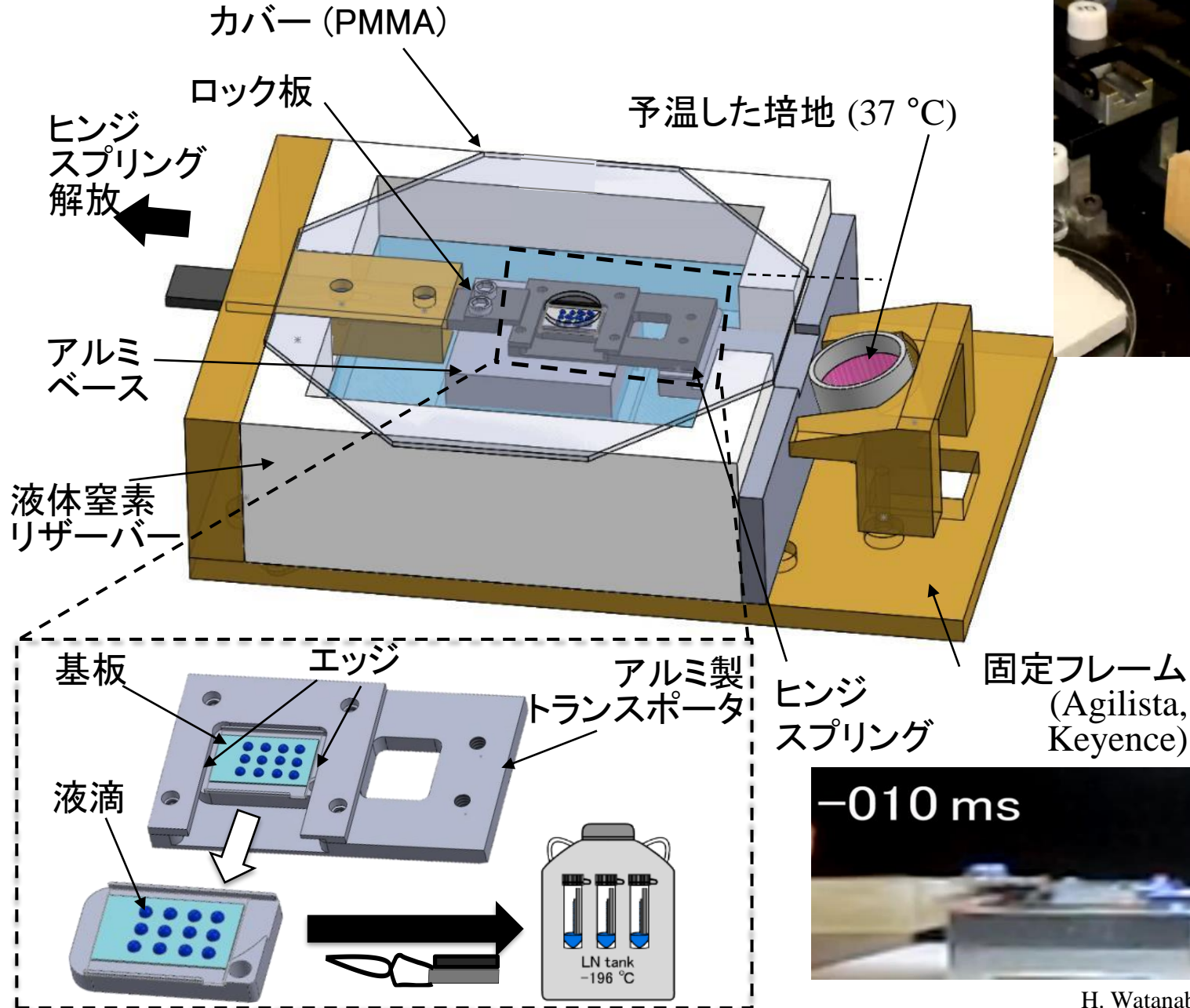
# 急速解凍の重要性



従来の解凍法：  
予温した培地に凍結基板ごと  
浸漬する



手技による生存率の  
バラツキ大



H. Watanabe & Y. Akiyama, Cryobiology(2020) 96, 12-18



## 熱伝導方程式

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_p u \cdot \nabla T = \lambda \nabla^2 T$$

$\rho$ : Density

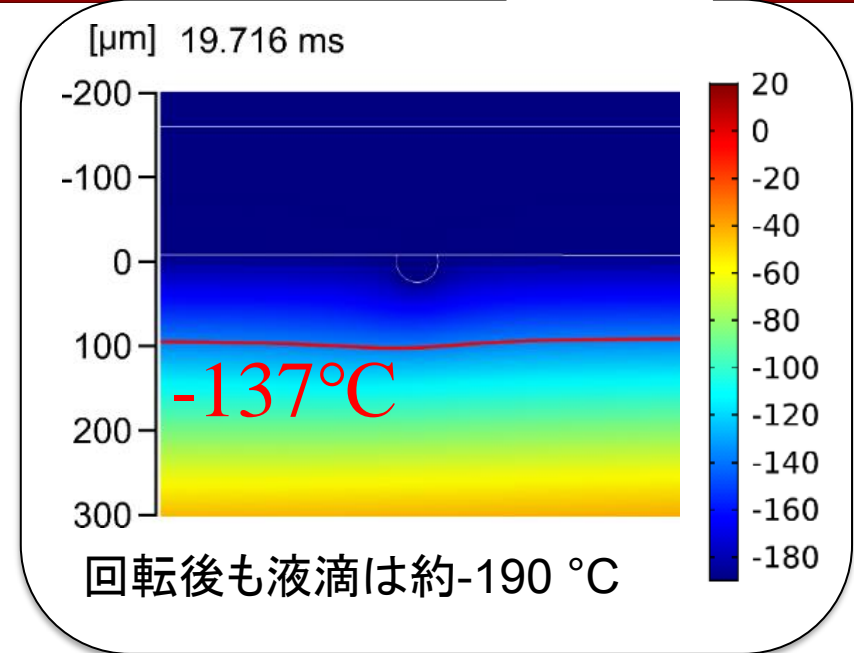
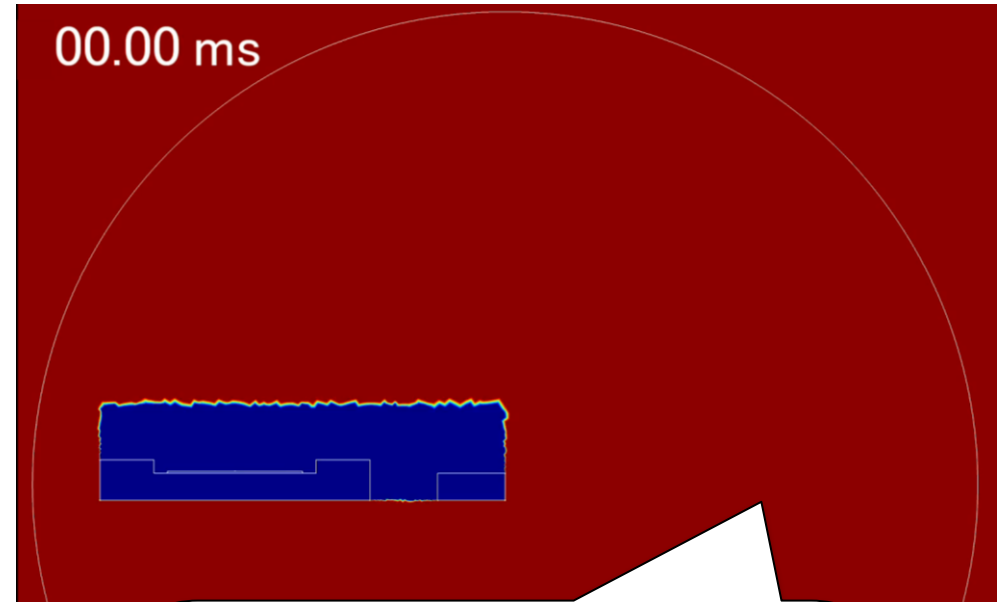
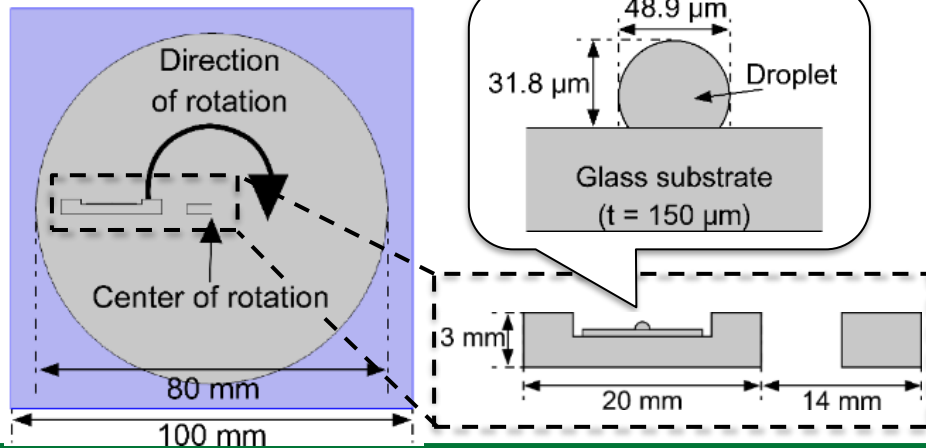
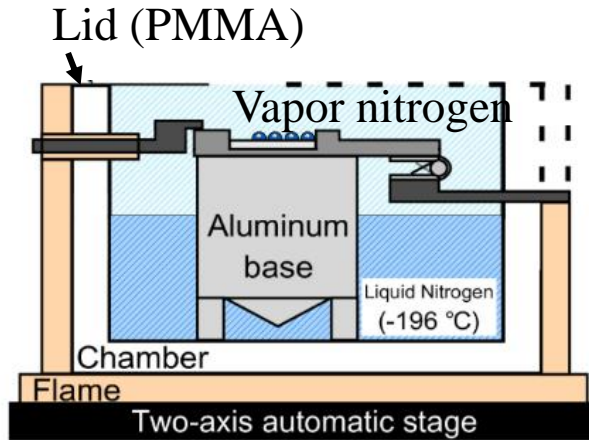
$C_p$ : Specific heat capacity at constant pressure

$T$ : Temperature       $u$ : Velocity field

$t$ : Time

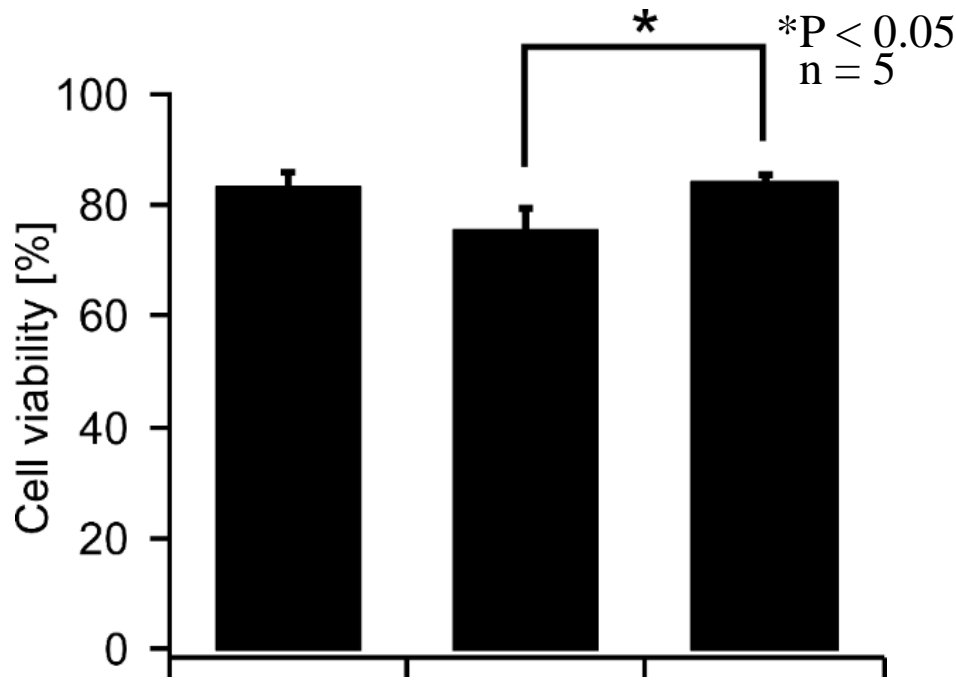
$\lambda$ : Thermal conductivity

## 解析モデル

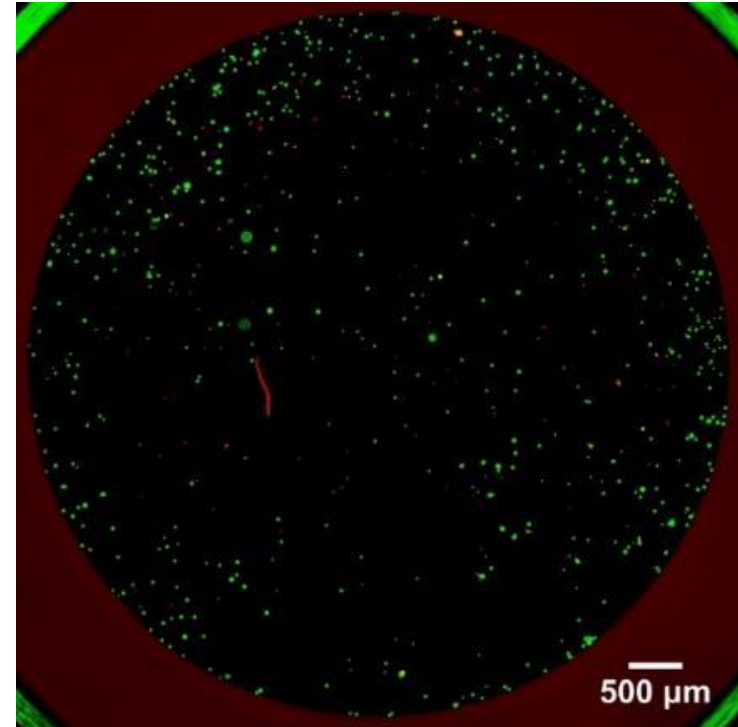


回転後も液滴は約-190 °C

H. Watanabe & Y. Akiyama, Cryobiology(2020) 96, 12-18

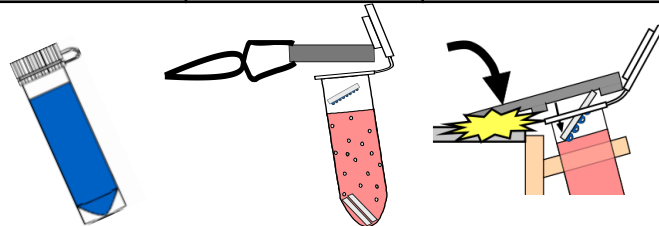


自動解凍装置により  
生存率・再現性が向上



	10 % DMSO	Manual	Automatic
Operation time	—	~ 3 s	20 ms
Viability (%)	83.4	75.3	84.0
S. D. (%)	2.3	4.1	1.3

S. D. : Standard Deviation

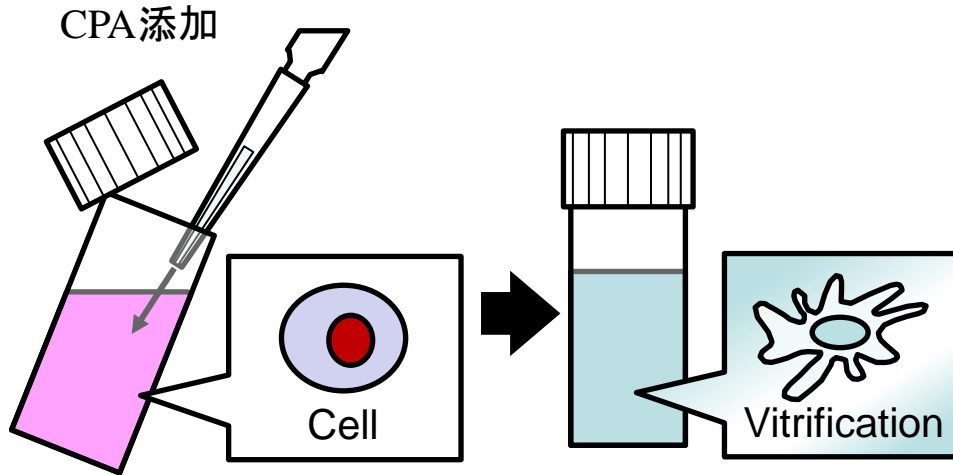


細胞種 : NIH-3T3  
 培地 : DMEM(10 % FBS & 1 % AB)  
 吐出培地 : DMEM(25.7% Percoll, 10%FBS, 1 % AB)  
 着滴基板 : Glass (t = 150 μm)  
 細胞吐出頻度 : 1 cell / 5 droplets  
 (1.0 × 10<sup>7</sup> cells / mL)  
 1操作あたりの吐出液滴数 : 1480 droplets / substrate  
 染色液 : Double Staining Kit CS01 ; Dojindo  
 解凍後3時間培養し, 15分間の細胞染色

H. Watanabe & Y. Akiyama, Cryobiology(2020) 96, 12-18

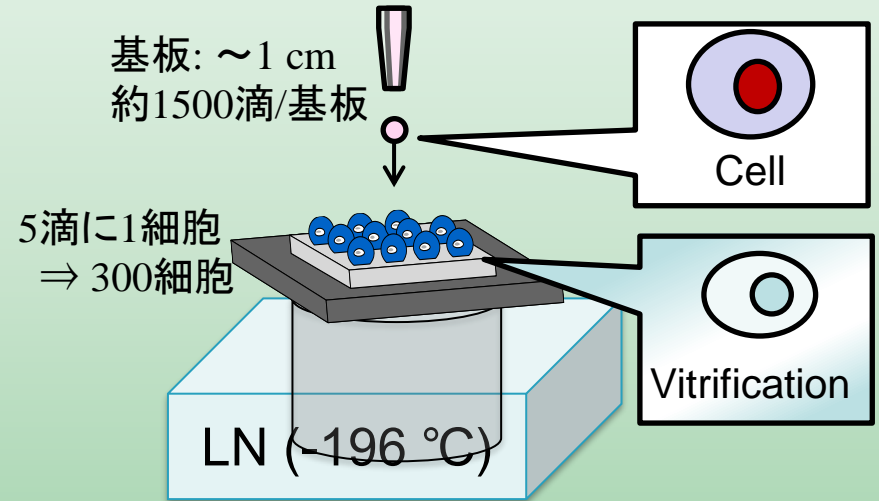
## 従来方式(急速凍結法)

細胞数:  $> 1.0 \times 10^6 \sim$  個/操作



## 超瞬間凍結法

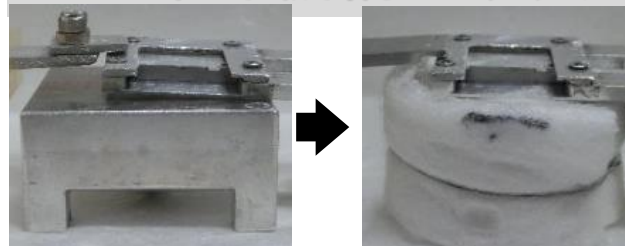
細胞数:  $< 300$  個/操作



## 高効率化に向けて

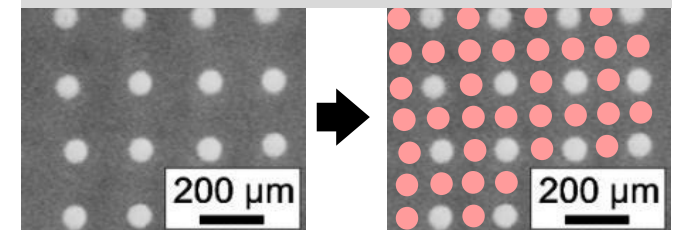
- ① 長時間の低温維持
  - 冷却機構の改良
- ② 細胞数の増加
  - 吐出密度の増加
  - 吐出面積の拡大
  - 細胞濃度の増加

① 長時間の低温維持  
 $\Rightarrow$  冷却機構の改良



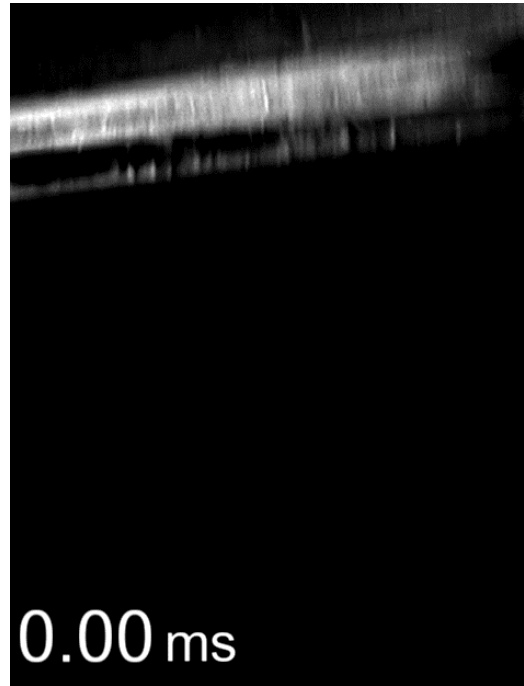
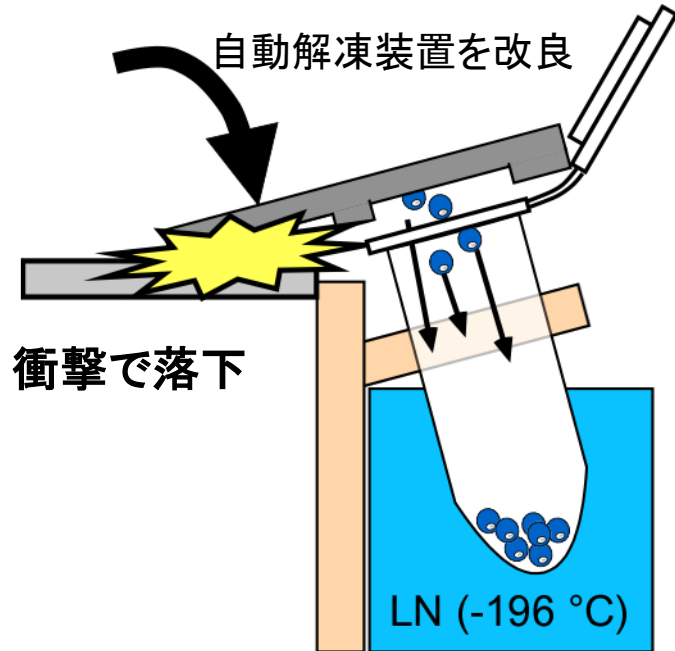
細胞凍結装置, 特願2021-073792 (R3.4.26)

② 細胞数の増加  
 $\Rightarrow$  吐出密度の増加

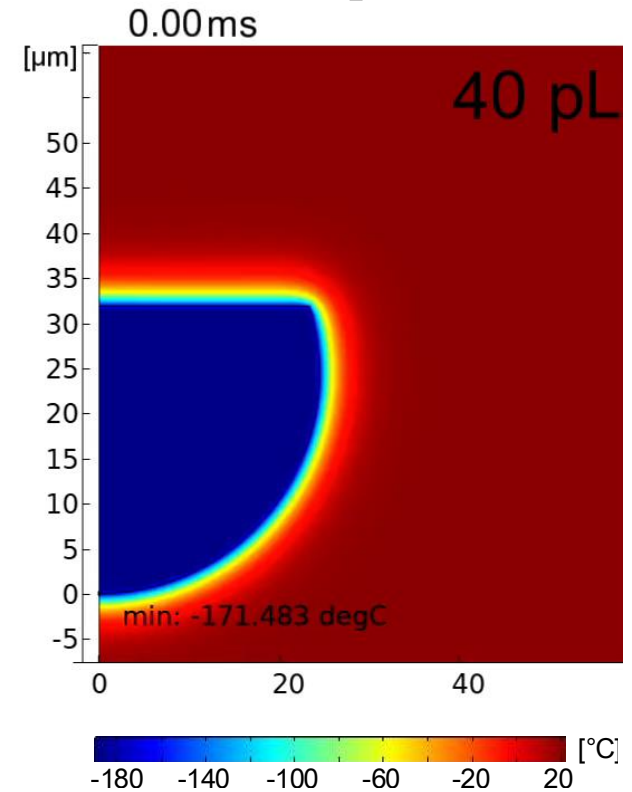


# 保存性の向上(液滴のみ保存)

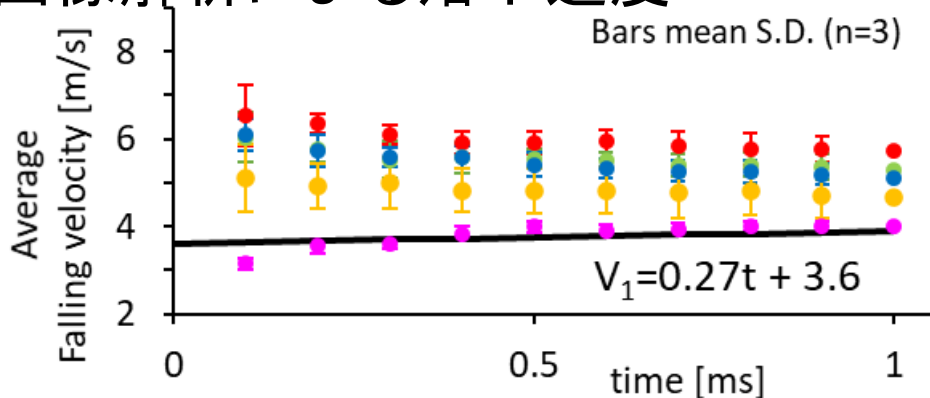
## 凍結液滴のみをバイアルに高密度保存



室温の空气中を落下する  
凍結液滴(40 pL)



## 画像解析による落下速度



MEMRECAM HX-3  
(10000 fps), nac

落下時間 (< 2 ms) の間の  
温度維持 (< -170°C) を確認

H. Watanabe & Y. Akiyama, Cryobiology(2020) 96, 12-18

渡部広機 他, 低温生物工学会誌, 2022

凍結細胞内包液滴の取扱方法およびそれに用いる装置, 特願2020-180254

# 企業への期待

- 処理細胞数の増加については、インクジェットプリンター同様に装置化により克服できると考えている。
- 装置の自動化や製品化技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、再生医療等における細胞凍結保存技術分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。



## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞凍結装置及び細胞凍結方法
- 出願番号 : 特願2023-030921
- 出願人 : 信州大学
- 発明者 : 秋山 佳丈、渡部広機

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞凍結装置
- 出願番号 : 特願2021-073792
- 出願人 : 信州大学
- 発明者 : 秋山 佳丈、渡部広機、  
湯浅裕太

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 凍結細胞内包液滴の取扱方法及びそれに用いる装置
- 出願番号 : 特願2020-180254
- 出願人 : 信州大学
- 発明者 : 秋山 佳丈、渡部広機

# お問い合わせ先

株式会社信州TLO 

**T E L 0268 – 25 – 5181**

**F A X 0268 – 25 – 5188**

**e-mail info@shinshu-tlo.co.jp**