

世界初！凍結保護剤を用いない生きた動物細胞の凍結保存に成功

国立大学法人 信州大学
国立医薬品食品衛生研究所

ポイント

- 従来の凍結保存法は凍結保護剤に依存しており、これを用いない凍結保存は理想的ではあるが、誰もなし得ていなかった。
- この実現に向けて、インクジェットによる細胞印刷技術を用いて、細胞を超瞬間的に凍結する技術を開発した。
- 超瞬間凍結された動物細胞やラット間葉系幹細胞の生存率は、凍結保護剤を用いた従来法と同等であった。
- 今後は、凍結保護剤の悪影響が懸念される細胞や従来の凍結保存法では保存できなかった細胞への応用が期待される。

概要

信州大学・繊維学部の秋山佳丈准教授および国立医薬品食品衛生研究所・薬理部の諫田泰成薬理部長らの研究グループは、従来必須だった凍結保護剤を用いずに、哺乳類の培養細胞をそのまま凍結保存する技術の開発に成功しました。

細胞をそのまま凍結すると、細胞内外で生成する微小な氷の粒（氷晶）が生成し、これらが細胞膜や細胞小器官を傷つけるため、細胞は死滅してしまいます。そこで、従来の凍結保存法は、全ての場合において凍結保護剤と呼ばれる有機溶媒等の化学物質を添加することで、氷晶の生成を防いでいました。我々は、インクジェットによる細胞印刷技術により、細胞を微小液滴に内包し、液体窒素で冷却されたガラス基板上に吐出することで、超瞬間的に細胞を凍結する技術を開発しました。この超瞬間凍結法により、氷晶の生成を防ぐことが可能となり、凍結保護剤を用いずに従来法と同等の細胞生存率を得ることができました。

従来からこのような超高速凍結による細胞凍結保存の可能性は示唆されていましたが、物理的に達成不可能と思われていました。本成果は、これまでの細胞凍結保存の既成概念を壊し、世界で初めて凍結保護剤を用いずに、動物細胞を凍結保存することに成功したもので、今後の低温生物学の新たな可能性を示すものです。

なお、本研究結果は、米国科学アカデミー紀要 Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) オンライン版に平成31年4月1日以降に掲載予定です。また、本論文は、同誌のハイライト (This Week in PNAS) に選ばれました。

<背景>

生きた生体試料の凍結保存技術は、細胞（iPS細胞やES細胞を含む各種細胞株）の系統維持、生殖医療や畜産などにおける精子や卵子保存、微生物の系統維持など、生物、医学、農業など非常に幅広い分野において活用されています。このような細胞を単純にそのまま凍結した場合、水が結晶化し氷の粒（氷晶）を形成してしまい、これが細胞膜や細胞内小器官を破壊し、細胞に致命的ダメージを与えてしまうため、細胞は死滅してしまいます（**図1上**）。生きたまま凍結保存するためには、凍結する際に、細胞内および周辺の水を結晶化させるのではなく、液体同様にランダムな分子構造のまま固体化（ガラス化^{*1}）する必要があることが知られています。そこで、現在用いられている凍結保存法は、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^{*2}を添加することで、この氷晶の生成を防いでいます。例えば、緩慢凍結法では、凍結保護剤を10%程度加えた状態で、ゆっくりと冷却します。それにより、主に細胞外の水のみが徐々に凍結します。その結果、冷却が進むにつれて、細胞外液の濃度が高まり細胞は脱水され、最終的にガラス化されます（**図1中**）。しかし、凍結保護剤自身の細胞毒性や、細胞の未分化状態への影響など報告されており、理想的には凍結保護剤の添加を避けることが望ましいと言えます。そこで、本研究では、超高速で冷却（超瞬間凍結）することで、従来誰もなし得なかった凍結保護剤を必要としない細胞の凍結保存法に挑戦しました（**図1下**）。

<研究成果>

従来、細胞をガラス化するために必要な冷却速度（臨界冷却速度）は、毎秒1万℃程度だと言われていたのですが、そのような冷却速度で凍結することは困難でした。これまでも、スプレーやインクジェットによる微小液滴を利用した急速冷却による細胞の凍結保存が試みられてわけていますが、凍結保護剤の添加は必須でした。我々は、インクジェットによる細胞印刷技術において、これまでよりもさらに小さい200および40ピコリットル^{*3}の液滴とし、液体窒素で冷却したガラス基板上に吐出する装置を開発しました。**図2（左）**に示すように、ガラス製のインクジェットヘッドのノズルから吐出された液滴は、液体窒素で冷却されたアルミニウム製の土台の上に設置されたガラス基板の上に着滴します。液体窒素は発泡スチロール製容器にて保持されており、この容器ごと、2軸の自動ステージの上に設置してあります。この自動ステージとインクジェットヘッドは同期して動くように、パーソナルコンピュータによって制御されており、任意の位置に液滴を吐出することができます。その一例として、**図2（右）**に格子状に吐出した蛍光色素溶液の様子を示します。

次に、実際に開発した装置による冷却速度が臨界冷却速度を超えているのかどうか、COMSOL Multiphysics（計測エンジニアリング）による伝熱解析により推測しました。まず、200ピコリットルの液滴で、通常のガラス基板（150マイクロメートル^{*3}厚）の場合は、毎秒7千℃強と臨界冷却速度を下回りました。一方、40ピコリットルの液滴の場合は、通常基板において毎秒2万2千℃と臨界冷却速度を上回り、冷却速度をさらに高めるために極

薄ガラス基板（5マイクロメートル厚）としたところ、毎秒3万7千°Cにまで達しました。以上のように、液滴サイズを40ピコリットルとすることで、凍結保護剤フリーの細胞凍結に必要な臨界冷却速度毎秒1万°Cを達成できることが確認できました。また、本プレスリリースでは触れませんが、顕微ラマン分光や高速度カメラによる観察によっても、40ピコリットルの場合、液滴がほぼガラス化していることを確認しました。

そこで、実際にマウス繊維芽細胞株 3T3 を用いて凍結実験を行い、その生存率を従来法であるDMSOを用いた緩慢凍結法と比較しました。その結果を図3に示します。比較のために行った緩慢凍結法における3T3細胞の生存率は83.4%でした。まず、200ピコリットルを通常基板に吐出した場合の生存率は、15.6%と大きく緩慢凍結法を下回りました。これは、伝熱解析における冷却速度が不十分であるという結果と一致します。次に、40ピコリットルの液滴を通常基板に吐出した場合は、75.3%とほぼ同等でした。さらに極薄ガラス基板とすることで、86.5%まで上昇しました。以上から、通常基板および極薄ガラス基板問わず、液滴サイズを40ピコリットルとすることで、凍結保護剤フリーの細胞凍結保存法を確立することに成功しました。

最後に、本手法をマウス筋芽細胞株 C2C12 およびラット初代間葉系幹細胞*⁴に適用し、汎用的に用いることが出来ることを確認しました。まず、C2C12において、生存率が従来法と同等であることを確認しました。次に、間葉系幹細胞においても、生存率が従来法と同等であることを確認し、さらに、未分化状態についても評価を行いました。その結果、間葉系幹細胞2つの未分化マーカー（CD73 および CD146）が共に、本手法による凍結解凍後も発現を維持されていることが確認できました。以上により、本手法が動物細胞の凍結保存に一般的な株細胞だけでなく、初代培養や幹細胞にも用いることができる可能性が非常に高いことが示されました。

<今後への期待>

本研究では、世界で初めての凍結保護剤不要の動物細胞凍結保存を、インクジェット技術を利用した超瞬間凍結により実現しました。本研究は、特に、マウスの細胞株および間葉系幹細胞において実証しましたが、今後はより多くの細胞への適用が期待されます。特に、凍結保護剤の影響が懸念されるヒトiPS細胞やその分化細胞、凍結保護剤の添加が望ましくない輸血用の血液細胞などが挙げられ、創薬や再生医療などへの応用が期待されます。また、従来の凍結手法では凍結保存のできない細胞や微生物も数多く存在しており、このような細胞種への適用も期待されます。また、現状では一度に処理できるサンプル量は限られていますが、今後は、凍結装置の自動化と大型化により大量の細胞を処理できるようにすることで、実用化を目指します。

プレスリリース 平成31年4月2日午前4時
(米国東部時間 4月1日午後3時)



<論文情報>

【著者】Yoshitake Akiyama, Masato Shinose, Hiroki Watanabe, Shigeru Yamada, Yasunari Kanda

【論文タイトル】“Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by super-flash”

【掲載誌情報】米国科学アカデミー紀要 Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)、DOI: 10.1073/pnas.1808645116

Web サイト: <https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1808645116>

<本研究成果に関するお問い合わせ先>

秋山 佳文 (あきやま よしたけ)

国立大学法人 信州大学 繊維学部 機械・ロボット学科

Tel : 0268-21-5517

E-mail : aki@shinshu-u.ac.jp

諫田 泰成 (かんだ やすなり)

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

Tel : 044-270-6640

E-mail : kanda@nihs.go.jp

<謝辞>

本研究を遂行するにあたり、ラマン分光による凍結状態に評価については鈴木芳治博士(独立行政法人 物質・材料研究機構)にご助言いただきました。また、インクジェット技術については山口修一博士および上野明氏(マイクロジェット株式会社)に、伝熱解析は橋口真宜氏(計測エンジニアリングシステム株式会社)に、高速度カメラによる凍結過程の観察は城敬之氏および鈴木祐介氏(フォトロン株式会社)に、顕微ラマン分光は掛川恵子技術職員(信州大学)のサポートを頂きました。心より感謝申し上げます。

また、本研究の一部は、日本学術振興会 科学研究費補助金 (25560222、26709013、17K19028)の助成を受けて行われました。

<用語解説>

*1 ガラス化

水における氷のように、通常の固体は分子が結晶構造をとっているのに対し、分子が結晶構造をとらずに固体化すること。窓などに使われるガラスは、二酸化ケイ素を主成分とする混合物がガラス化したもの。

*2 凍結保護剤

凍結保存する際に、氷晶の生成を抑制し、細胞を保護するために添加される化学物質の総称。一般には、ジメチルスルホキシド (DMSO) やグリセロールなどが用いられる。ジメチルスルホキシドは、硫黄原子を含む有機溶媒のひとつ。

*3 マイクロメートル、ピコリットル

1 マイクロメートルは、千分の1ミリメートル。

1 ピコリットは、1兆分の1リットル。1辺が10マイクロメートル (100分の1ミリメートル) の立方体の体積が、ちょうど1ピコリットルとなる。

*4 間葉系幹細胞

骨髄中に多く存在する幹細胞の一種で、自己複製能を有しており、脂肪や骨、筋肉など多数の細胞に分化できる。

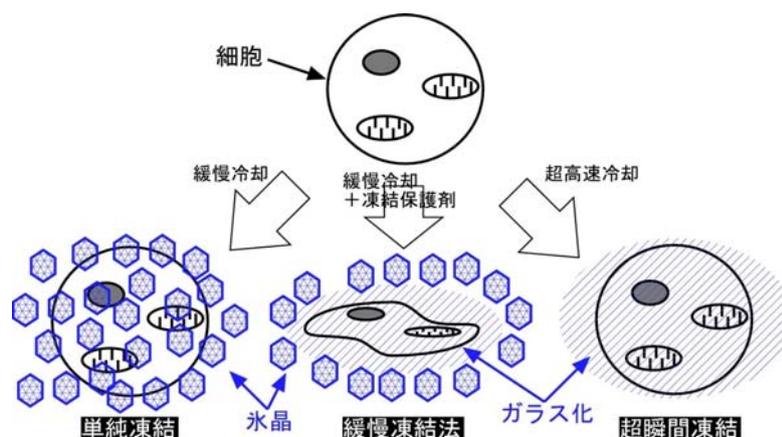


図1 凍結方法と凍結状態。

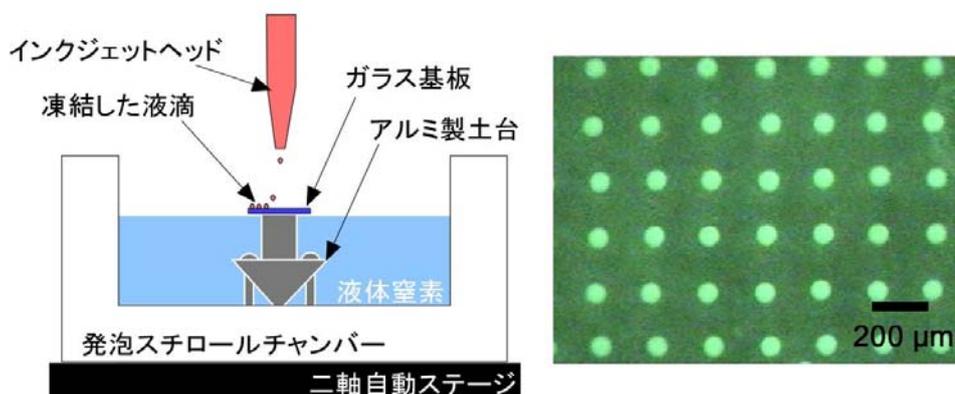


図2 超瞬間凍結装置の概要 (左) と格子状にパターンニングされた液滴 (右)。

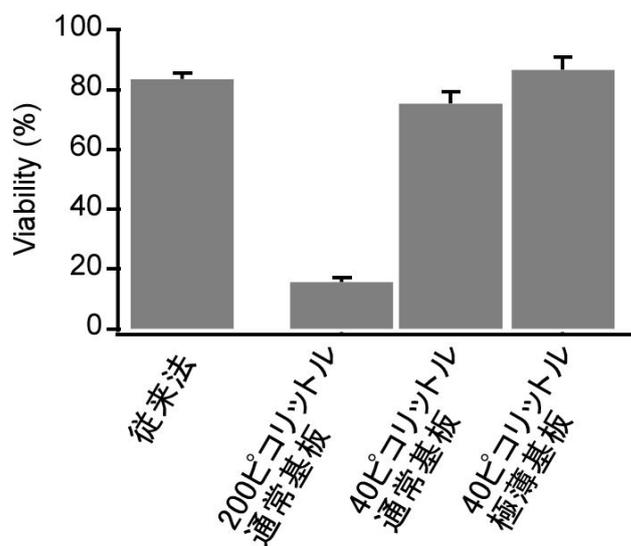


図3 各凍結条件における細胞の生存率。