

# 超音波を利用した凝固制御による生体組織のガラス化保存技術の開発

著者	多田 幸生
著者別表示	Tada Yukio
雑誌名	平成19(2007)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2006-2007
ページ	35p.
発行年	2007-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00049452">http://doi.org/10.24517/00049452</a>



---

超音波を利用した凝固制御による  
生体組織のガラス化保存技術の開発

---

18560195

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 多田 幸生

金沢大学大学院自然科学研究科 准教授

金沢大学附属図書館



1300-04382-2

EN

6

3

## 1. はしがき

医療技術やバイオテクノロジーの発達に伴って生体細胞・組織を凍結保存する技術の確立が求められている。凍結保存は原理的には、低温化と活性水分の低減により生化学反応の抑制を図るものである。しかし、凍結の過程で細胞内外に形成される氷晶が各種の機械的損傷や膠質的損傷を発生させる要因となる。このような凍結に伴う損傷を完全に回避するためには、細胞内の水が結晶化せず、液体構造がそのまま固定化されるガラス化現象を発現させるのが理想的である。

生体細胞をガラス化する方法として、高濃度の凍害防御剤の添加と超急冷を組み合わせた方法がある。しかし、防御剤の化学的作用（毒性）が著しく高くなるため、適用できる細胞は限られている。これに対して、外部力で過冷却度を増進させることができれば、毒性の問題がなく、解凍後の生残率を大幅に向上させることができると考えられる。なかでも超音波は内部への適用性に優れており、緩速冷却と超音波の作用を組み合わせることで組織体全域を任意の過冷却状態にできるので、組織体についてもガラス化できる可能性がある。その場合、ガラス化のための寸法の制約（Bi数の制限）を大幅に緩和でき、ガラス化法の適用範囲の拡大に繋がることが期待できる。

以上の観点から本研究では、超音波を利用した凍結過程における核生成の能動的制御を追究した。すなわち、超音波の照射により、超音波キャビテーションによる衝撃波を発生させ、それにより水素結合で凝集している水分子のクラスターを解離させ、過冷却の促進を図ろうとするものである。これにより、最終目標としてガラス化を目指すものである。具体的には、生体模擬組織として寒天ゲルを供試した凍結実験を行い、過冷却度および氷晶の生成状態を超音波出力および冷却速度と関連づけて実験的に追究し、凍結保存技術としての可能性について検討した。本報告書は、研究計画に基づいて実施された超音波音場における組織体の凍結実験、生体細胞の凍結実験に関する2年間の成果をまとめたものであり、次のような章構成からなる。

- 第1章 超音波を利用した生体組織のガラス化技術
- 第2章 組織体凍結に及ぼす超音波照射の影響
- 第3章 組織体凍結に及ぼす間欠超音波の影響
- 第4章 生体細胞の凍結における氷晶と細胞の相互作用
- 第5章 研究の総括

## 2. 研究組織

- 研究代表者： 多田 幸生（金沢大学大学院自然科学研究科准教授）
- 研究分担者： 瀧本 昭（金沢大学大学院自然科学研究科教授）
- 研究分担者： 大西 元（金沢大学大学院自然科学研究科助教）
- 研究分担者： 義岡 秀晃（富山商船高等専門学校准教授）

## 3. 交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	1,300,000円	0円	1,300,000円
平成19年度	2,100,000円	630,000円	2,730,000円
総計	3,400,000円	630,000円	4,030,000円

#### 4. 研究発表

##### (1) 雑誌論文

- (1) 多田幸生, 瀧本昭, 相良夕梨子, 林勇二郎, 食品の凍結・解凍における伝熱と損傷のシミュレーション, 第43回日本伝熱シンポジウム講演論文集, II (2006), pp.505-506.
- (2) Y.Tada, A.Takimoto, H.Onishi and A.Oomori, Proceedings of Cryo2006, Trapped and Swept Phenomenon of Biological Cells during Freezing, pp.165.
- (3) Y.Tada, A.Takimoto and Y.Hayashi, Active Control of Ice Formation by Utilizing Ultrasonic Irradiation, Proceedings of 13th International Heat Transfer Conference, SOL-05.
- (4) 多田幸生, 瀧本昭, 塚本春樹, 大西元, 生物試料の内の氷晶形成に及ぼす超音波照射の影響, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2007 講演論文集, pp.251-252.

##### (2) 学会発表

- (1) 多田幸生, 瀧本昭, 相良夕梨子, 林勇二郎, 食品の凍結・解凍における伝熱と損傷のシミュレーション, 第43回日本伝熱シンポジウム, 2006年6月1日, 名古屋国際会議場.
- (2) Y.Tada, A.Takimoto, H.Onishi and A.Oomori, Cryo2006 (Society of for Low Temperature Biology), Trapped and Swept Phenomenon of Biological Cells during Freezing, 2006年7月26日, Hamburg Chamber of Conference.
- (3) Y.Tada, A.Takimoto and Y.Hayashi, Heat Transfer and Damage during Freezing of Food, 5th World Congress of Biomechanics, 2006年8月3日, Munich University of Applied Science.
- (4) Y.Tada, A.Takimoto and Y.Hayashi, Active Control of Ice Formation by Utilizing Ultrasonic Irradiation, 13th International Heat Transfer Conference, 2006年8月14日, Sydney Convention and Exhibition Center.
- (5) 多田幸生, 瀧本昭, 塚本春樹, 大西元, 生物試料の内の氷晶形成に及ぼす超音波照射の影響, 日本伝熱学会東海・北陸信越伝熱セミナー, 2007年9月22日, 飛騨地域地場産業振興センター.
- (6) 多田幸生, 瀧本昭, 塚本春樹, 大西元, 生物試料の内の氷晶形成に及ぼす超音波照射の影響, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2007, 2007年11月24日, 京都大学.

## 第1章

# 超音波を利用した生体組織のガラス化技術

## 1. 超音波照射による過冷却促進の原理

超音波照射による過冷却促進の原理を図1に示す。水分子は酸素原子1個と水素原子2個からできており、酸素原子と水素原子の結合電子対は酸素原子側に偏っているため、酸素原子はいくぶん陰性（マイナス）に、逆に水素原子は陽性（プラス）に帯電している極性分子となっている。このような水の性質のため、バルク中の水分子は水素結合により複数個が結びつき、水の分子塊（クラスター）を形成している。したがって、なんらの手段によりクラスターサイズを小さくできれば、核生成が抑制されると考えられる。そこで本研究では、超音波の付与により、超音波キャビテーションによる衝撃波を発生させ、それにより水素結合で凝集している水分子のクラスターを解離させ、過冷却の促進を図ることを意図した。過冷却の促進と生体細胞のガラス化の関係を図2に示す。過冷却の促進はガラス化のための臨界冷却速度を小さくし、ガラス化のための寸法（Bi数）の制約の緩和に繋がることが理解される。

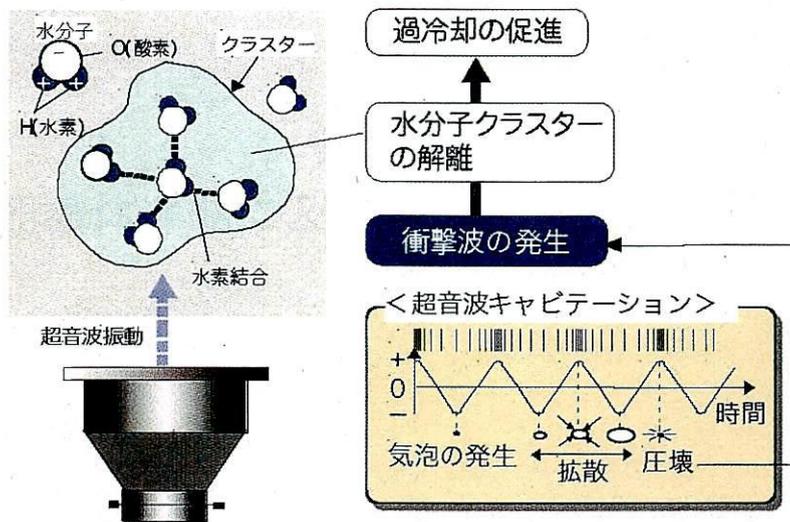


図1 超音波を利用した過冷却促進の原理

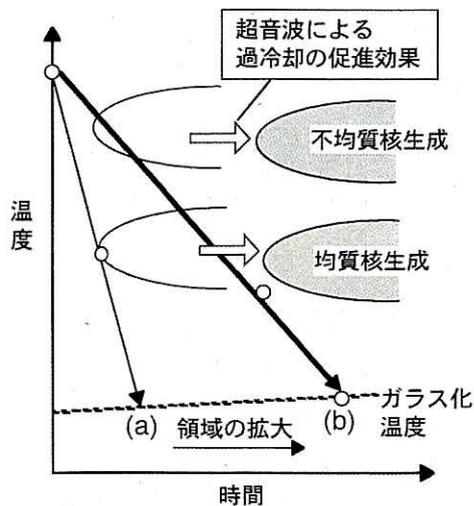


図2 過冷却の促進と生体細胞のガラス化

## 第2章

### 組織体凍結に及ぼす超音波照射の影響

## 1. 緒言

生体細胞の凍結保存は低温化と活性水分の低減により生化学反応を抑制し、生存状態の長期維持を図るものであるしかし、低温化の過程で細胞内外の水分の凍結とそれに伴う細胞レベルのマイクロ現象が生じ、これが各種の機械的・膠質的損傷に繋がる。特に細胞内外の氷晶の成長は組織の形態変化や破壊をもたらす、また、細胞の脱水は含有成分の濃縮に伴う膠質的損傷に繋がる。従来、凍結損傷を抑制するために急速冷却が用いられるが、Bi数の制限のため適用物体の寸法に制約が生じる。そこで、低冷却速度で氷晶を微細化させる技術の開発が重要な課題となる。

以上の観点から本研究は、超音波照射による氷晶形成の制御を追究する。すなわち、細胞内外の領域で超音波キャビテーションを発生させ、それにより(1)細胞の過冷却の能動的解除、(2)細胞内外の水結晶の破碎・微細化、(3)氷核生成数の増加を図る。これにより、早い段階で細胞内過冷却を能動的に解除して細胞の脱水による膠質的損傷を防ぎ、さらに細胞内外の氷晶を破碎・微細化することにより機械的損傷の軽減を図るものである。

本研究室では超音波音場における模擬試料(寒天)および馬鈴薯の凍結実験を行い、凍結特性が超音波出力ならびに冷却速度と関連づけて明らかにしてきた<sup>(1)(2)</sup>。しかし、試料を凍結する際に生ずる過冷却の影響については考慮していなかった。そこで、本報は温度履歴の計測と凍結状態のマイクロ観察を同時に行い、模擬試料(寒天)内に生ずる過冷却度および氷結晶の生成状態を超音波出力と関連づけて実験的に追究したものである。

## 2. 実験装置および方法

実験装置の概要をFig.1に示す。アクリル製の円筒容器(内径34mm, 外径54mm)内に試料を設置し、低温恒温槽で所定の温度( $T_s$ )に調温された冷却液を循環させることにより試料を冷却した。同時に、ファンクションジェネレーターで発生させた正弦波をパワーアンプで増幅し、容器底部に取り付けたランジュバン型ボルト締め振動子を駆動することにより28kHzの超音波を照射した。

供試試料には生物試料を模擬したものとして寒天(2wt%)を用いた。試料は直径5mm, 高さ15mmの円柱状とし、円筒形のパラフィン製試料ホルダーに装てんし、周囲を発泡スチロールで断熱することで一方向冷却とした(Fig.2)。また、試料内に素線径0.2mmのT型熱電対を表面から2mmの位置に挿入した。氷結晶構造の可視化には蛍光観察法<sup>(3)</sup>を用いた。試料に蛍光試薬としてアクリジンオレンジ( $C_{17}H_{20}ClN_3$ , 0.2mg/ml)を予め浸透させておき、凍結後、マイクロスライサー<sup>(4)</sup>を用いて所定の試料断面を露出させ、励起波長490nm, 観察波長520nmの条件で観察した。凍結により排出された蛍光試薬は氷結晶間の未凍結溶液中に排出・蓄積されるため、氷結晶の境界のみが明るく観察され、輪郭の識別が可能となる。実験は冷却液温度(-10,-16°C)、および超音波出力(振動子の駆動電力, 0~15W)を種々変化させて測定を行い、試料温度の経時変化の測定および凍結状態の顕微鏡観察を行った。

## 3. 実験結果と考察

### 3.1 冷却曲線

試料の温度の経時変化をFig.3に示す。冷却により試料内部の温度が低下し、凝固点温度に達しても未凍結な過冷却状態となる。その後、過冷却が解消し、凝固潜熱を放出しながら凍結が進行する。過冷却状態にある0°C~-5°Cの温度区間について、試料の平均冷却速度を算出した結果をFig.4に示す。照射する超音波の出力が増加するにつれて試料の冷却速度が低下することが判る。これは超音波の吸収に伴う発熱の作用によるものと考えられる。結晶成長速度の低下は氷結晶サイズの増加に繋がるので、この作用は氷晶の微細化を阻害することになる。また、このことから、超音波が試料に入射し、伝播していることが間接的に確認される。次に、過冷却解消時の温度と凝固点温度との差を過冷却度 $\Delta T$ とし、Fig.5に示す。超音波出力の増加につれて過冷却度はやや減少する傾向を示す。これより、組

織体表層部において超音波による過冷却の解除の可能性が窺えるが、超音波に伴う冷却速度の変化を考慮して今後検討する必要がある。

### 3.2 凍結状態のミクロ観察

熱流と垂直な断面について試料の凍結状態を観察した結果を Fig.6 に示す。超音波を付与しない場合 (Fig.6(a)), やや細長い断面の水結晶が形成されている。これと比較して、5W の超音波を付与した場合には、全体的により微細な水結晶が形成されていることが判る (Fig.6(b))。また、小さな水結晶は連続して分布する傾向が見られる。Fig.7 に氷晶径のヒストグラムを示す。水結晶の成長方向は熱流方向と必ずしも一致しないことから、水結晶の代表寸法として結晶周囲上において最も短い断面距離（短径）を用い、微細化の指標とした。超音波出力を増加すると、40 $\mu$ m 以上の水結晶の頻度は減少するのに対して、10～30 $\mu$ m 程度の相対的に小さな水結晶の頻度は逆に増加し、頻度分布は氷晶径が小さい方にシフトした分布へと変化する (Fig.7(b)(c))。しかし、さらに超音波出力が増加すると、10～20 $\mu$ m 程度の小さな水結晶の頻度が減少し、30～50 $\mu$ m 程度のより大きな水結晶の頻度が増加する (Fig.7(d))。

### 3.3 水結晶構造と操作条件

平均氷晶径を超音波強度との関係で Fig.8 に示す。深さ 1mm の断面に注目すると、超音波強度の増加につれて水結晶が微細化し、超音波照射の有効性が認められた。超音波強度がさらに増加すると、氷晶径は増加に転じ、粗大化を引き起こす。これは、Fig.4 に示されたように、試料内を伝播する超音波の吸収に伴う発熱の作用が増大し、それにより凝固前線での局所冷却速度が低下したことが主な原因と考えられる。また、深さ 2mm の断面では、1mm の断面と比較して超音波照射による微細化の効果は低下し、適用寸法に制限があることが示唆される。

## 4. 氷晶形成に対する超音波の作用機序

水結晶の構造は凝固前線における局所冷却速度  $R_c$  と関係し、水結晶が結晶の 1 次アーム間隔で規定されるとすれば、それは  $R_c^{-0.5}$  に比例する<sup>(5)</sup>。過冷却解消後、凍結が進行し、0 $^{\circ}$ C～-5 $^{\circ}$ C の温度区間を通過する際の平均冷却速度で  $R_c$  を近似し、平均氷晶径との関係で Fig.9 に示す。深さ 2mm の断面では、超音波を照射しない通常の凍結の場合 (0W), 氷晶径は概ね  $R_c^{-0.5}$  に比例している。5W 以下の超音波照射下で凍結させた場合、実線で示される通常の凍結特性とほぼ一致していることが判る。すなわち、伝熱支配の凍結挙動を示しており、超音波の効果は音響流による試料表面の熱伝達の促進や音波吸収に伴う発熱などにより局所冷却速度が変化し、それにより氷晶径が変化していると考えられる。他方、深さ 1mm の断面では、実線の値よりも氷晶径が小さくなる実験値が見られる。すなわち氷晶の微細化の機構として、超音波キャビテーションによる氷晶の破碎・微細化と 2 次核生成、1 次核生成数の促進などの作用が生じている可能性が示唆される。

## 5. 結言

- (1) 超音波音響場における寒天の凍結実験を行い、組織体表層部において超音波照射による氷晶の微細化の効果を明らかにした。
- (2) 超音波照射による過冷却の解除効果が組織体凍結において認められた。
- (3) 冷却熱流束に対して超音波出力が大きすぎると、音波吸収による発熱作用が顕在化し、氷晶の粗大化が生ずる。
- (4) 組織体表層部での氷晶の微細化の機構として、音響流や音波吸収などによる冷却速度の変化以外の要因が関与している可能性が示された。

#### 参考文献

- (1) 多田・他 3 名, 第 42 日本伝熱シンポジウム講演論文集, **I** (2005),137.
- (2) 多田・他 3 名, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2005 講演論文集, (2005), 29.
- (3) 都・相良, 日本冷凍空調学会論文集, 19-4(2002), 375.
- (4) 多田・他 3 名, 第 41 日本伝熱シンポジウム講演論文集, **III** (2004), 811.
- (5) Okamoto, T. and Kishimoto K., J.Crystal Growth. **29**(1975), 137.

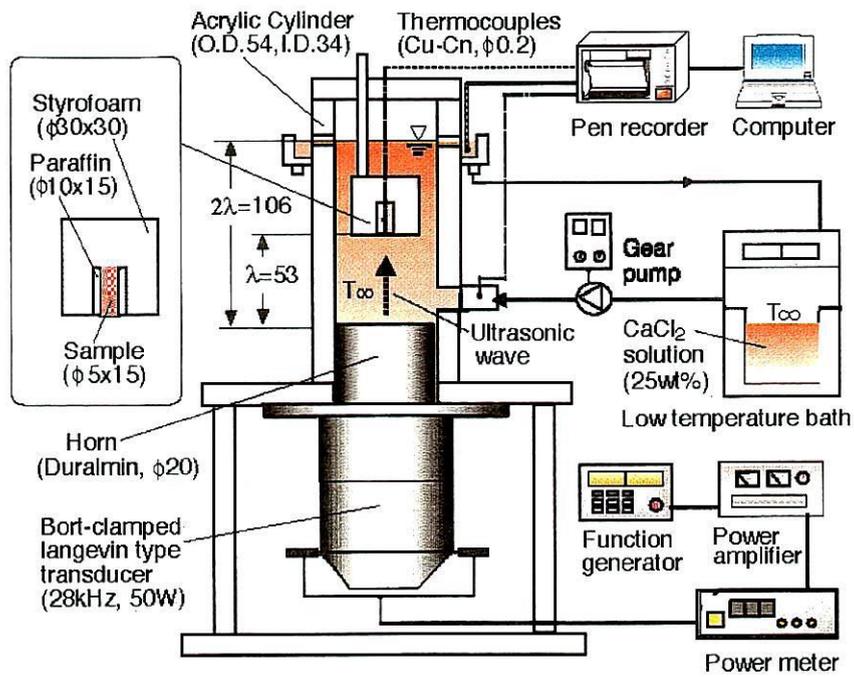


Fig.1 Experimental apparatus

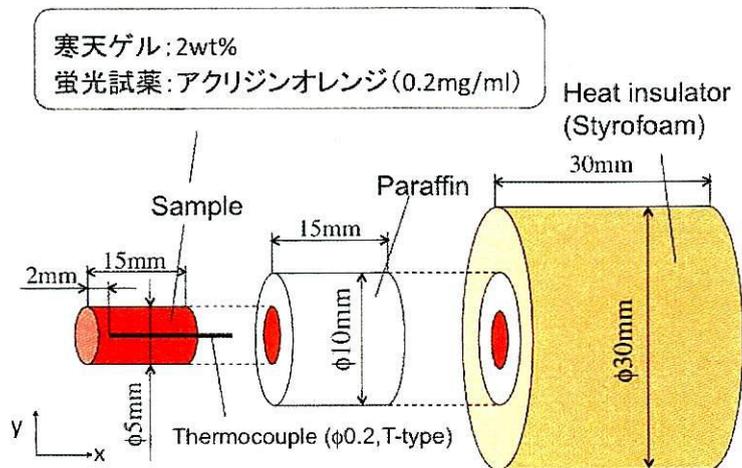


Fig.2 Timewise variation of temperature

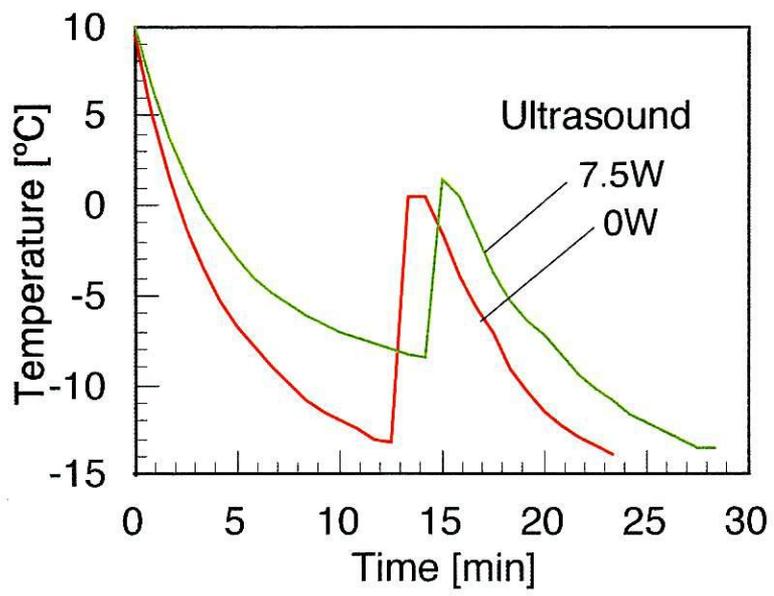


Fig.3 Timewise variation of temperature

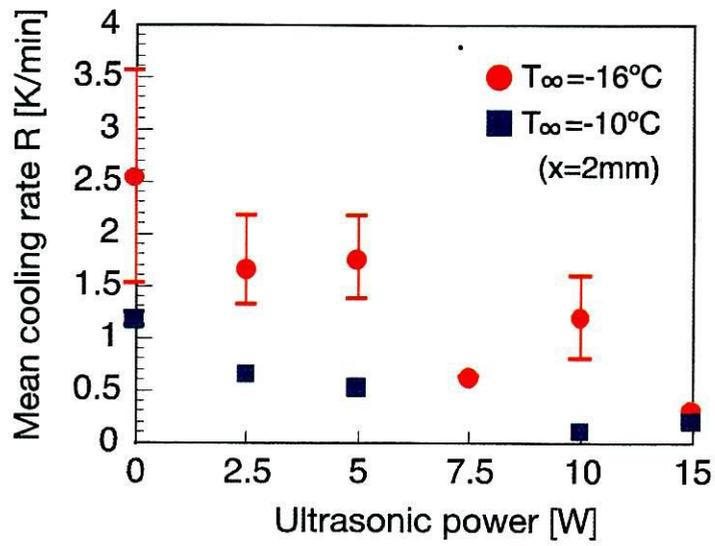


Fig.4 Mean cooling rate ( $0^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ )

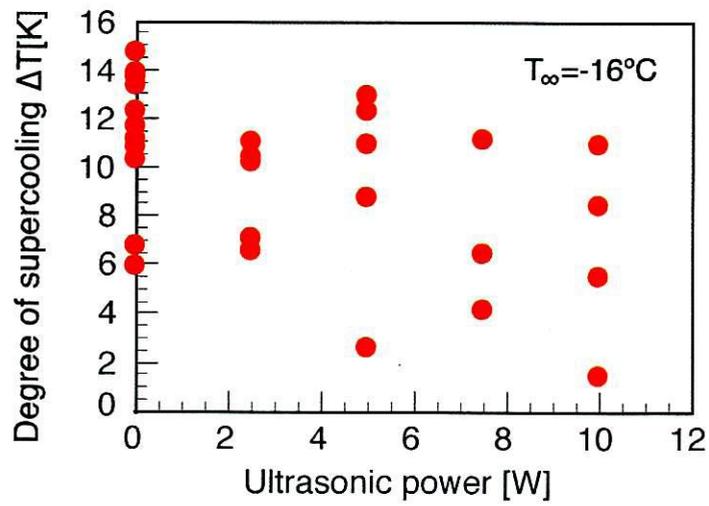


Fig.5 Degree of supercooling

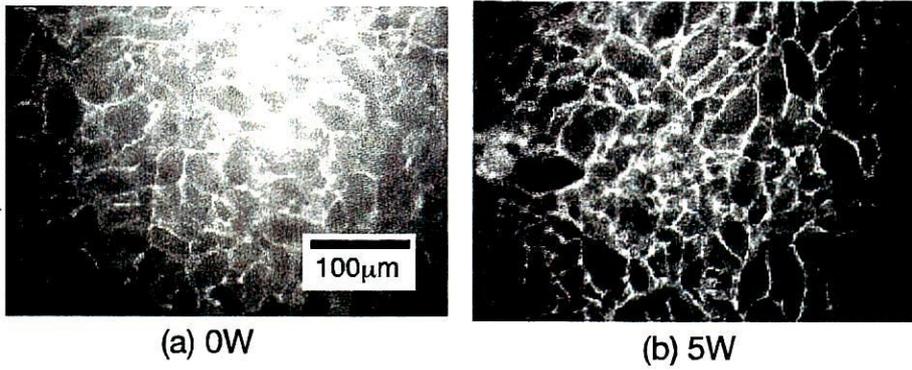


Fig.6 Fluorescence micrograph of ice structure formed in agar gel ( $T_{\infty} = -16^{\circ}\text{C}$ ,  $x=1\text{mm}$ )

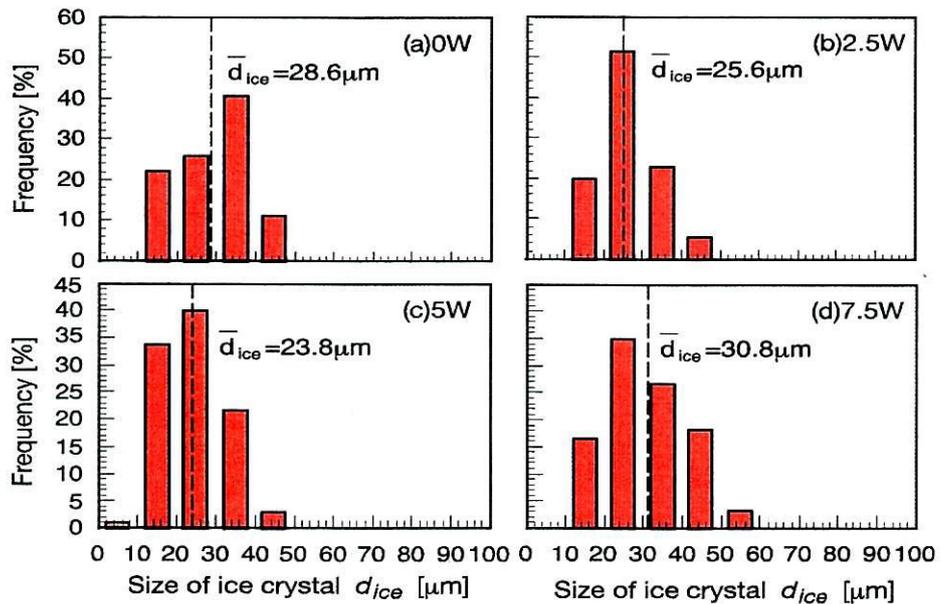


Fig.7 Distributions of ice structure size in ultrasound field ( $x=1\text{mm}$ )

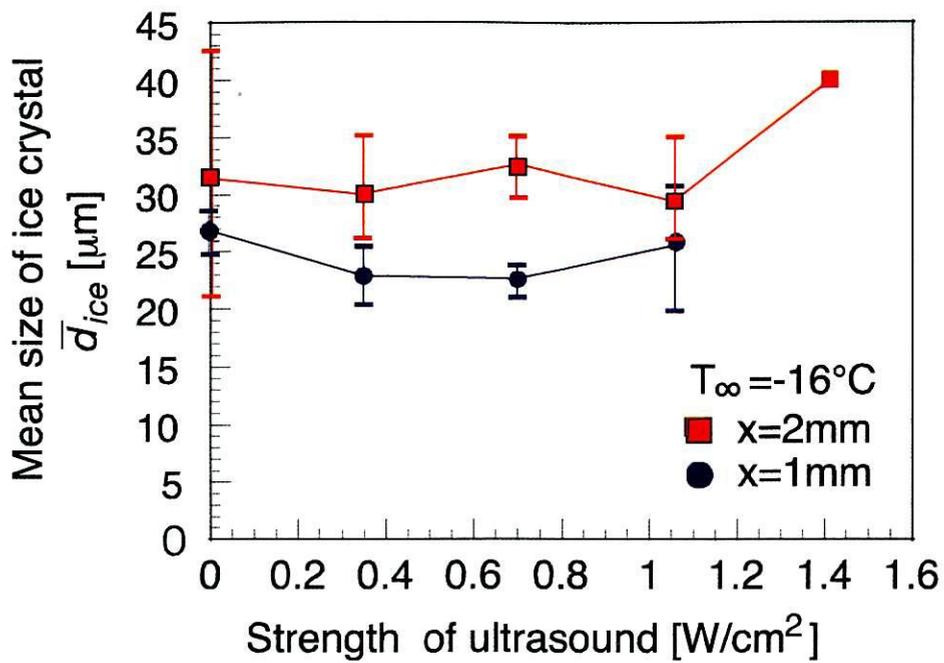


Fig.8 Size of ice crystal formed in ultrasound field

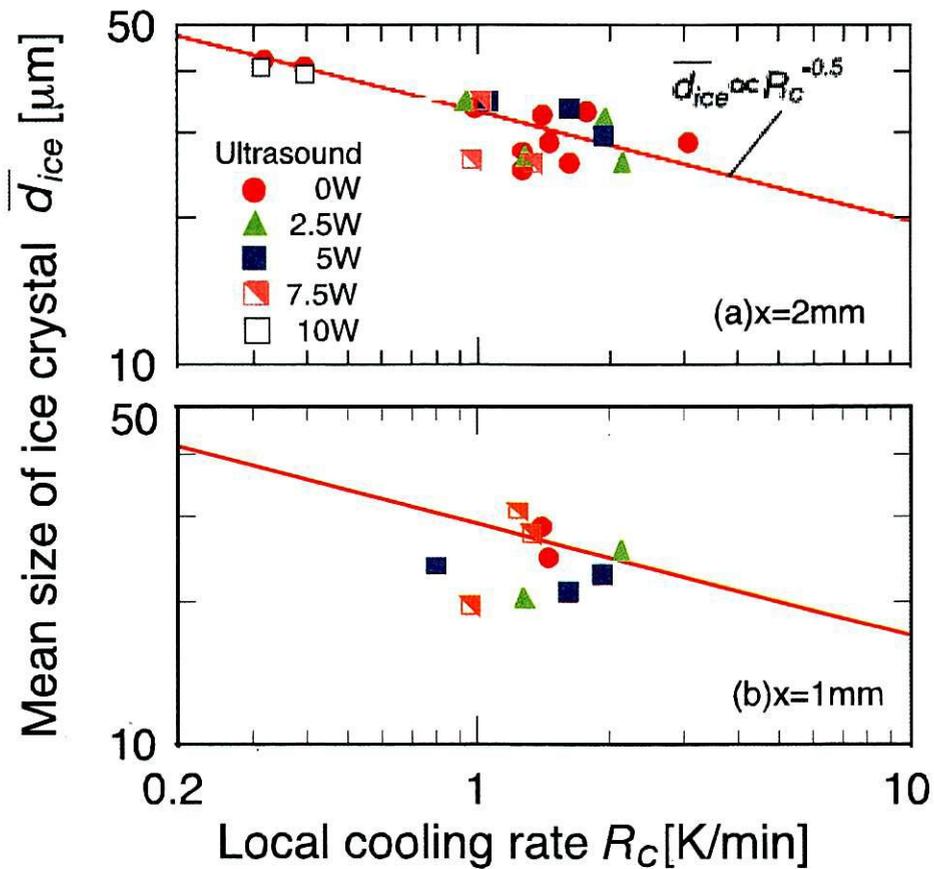


Fig.9 Effects of local cooling rate on mean ice crystal size

### 第3章

## 組織体凍結に及ぼす間欠超音波の影響

## 1. 緒言

生体・食品の凍結保存において、細胞内外に形成される氷結晶の微細化が凍結損傷の軽減につながる。その手段として急速冷却を行うのが一般的であるが、Bi 数の制限のため適用寸法の制約が生じる。このため、低冷却速度下での氷結晶の微細化技術の開発が重要な課題となる。以上の観点から、本研究は内部への適用性に優れた超音波に注目し、超音波キャビテーションによる過冷却の能動的解除、氷結晶の破碎と2次核生成、氷核生成数の増加などの作用により氷結晶の微細化を追求するものである。著者らはこれまでに超音波音場における模擬試料（寒天ゲル）および馬鈴薯の凍結実験を行い、凍結特性を超音波出力ならびに冷却速度と関連づけて検討してきた<sup>(1)(2)</sup>。また、前報では超音波照射による氷結晶の微細化が組織体表層部において生じることを示した<sup>(3)</sup>。しかし、微細化の作用は十分ではなく、また、超音波出力をさらに増加させると音波吸収に伴う発熱の作用が大きくなり、逆に氷結晶は肥大化することが明らかにされた。そこで、本報は超音波の照射方式に着目し、間欠照射の周期、照射時間、および照射温度帯が組織体中の氷結晶形成に及ぼす影響を実験的に追究したものである。

## 2. 実験装置および方法

実験装置の概要を Fig.1 に示す。試験部はアクリル製の円筒容器（外径 54mm, 内径 34mm）であり、低温恒温槽で一定温度に維持された 25wt%CaCl<sub>2</sub> 水溶液を循環させ、試験部内に設置した試料を冷却する。同時に、ファンクションジェネレータで発生させた正弦波をパワーアンプで増幅してランジュバン型振動子に印加し、試験部底部から上方に向かって 28kHz の超音波を照射した。

供試試料には、生物試料を模擬した含水材料として、寒天ゲルを用いた。蒸留水に蛍光試薬としてアクリジンオレンジ (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>) および 2wt% の寒天を溶解させ、ゲル固化させて作製した。作製した試料は円筒型のパラフィン製のホルダーに装てんし、その周囲を断熱材で囲むことで一方向冷却した。凍結後、マイクロスライサーを用いて所定の試料断面を露出させ、蛍光観察法<sup>(4)</sup>を用いて氷結晶構造を可視化・観察した。

超音波照射方式として、Fig.2 に示されるように、①全温度帯について連続照射、②過冷却解除方式として、-10°C まで冷却し一定の過冷却度を与えた後、(1) 連続照射する  $\alpha$  方式、(2) 一定の周期で超音波照射の on-off を繰り返す  $\beta$  方式、(3) 短時間連続照射する  $\gamma$  方式、の 4 種類を用いた。実験は冷却液温度を -20°C とし、超音波出力 0 ~ 10W、 $\beta$  方式における Duty 比 = 0.5、on-off を繰り返す間欠周波数  $f_p = 0.1 \sim 1$ Hz、の条件で行い、試料温度の経時変化の測定および凍結状態の顕微鏡観察を行った。

## 3. 実験結果と考察

### 3.1 冷却曲線

試料の温度の経時変化を Fig.3 に示す。10W 出力の超音波を全温度帯に連続照射した場合、冷却により試料の温度が低下し、凝固点温度に達しても未凍結な過冷却状態となる。その後過冷却が解消すると、凝固潜熱を放出し凍結する。これに対して、過冷却状態 (-10°C) から超音波を照射した  $\alpha$  方式では潜熱放出に伴う温度上昇は見られず、温度降下が緩やかとなる。すなわち、表層部から部分的に過冷却を逐次解消しながら凍結が進行していると考えられる。このような凍結様式の違いは主に過冷却領域の大きさに起因し、超音波照射の開始温度が低くなるにつれて、過冷却域が短くなり、逐次凍

結型となる。次に、 $-10^{\circ}\text{C}\sim-14^{\circ}\text{C}$ の温度帯を通過する際の平均冷却速度を Fig.4 に示す。超音波出力の増加は音波吸収による発熱作用を増大させるため、冷却速度の低下に繋がることが判る。また、 $\beta$ 方式を用いると音波吸収に伴う冷却速度の低下を抑制できることが確認される。

### 3.2 凍結状態のミクロ観察

熱流と垂直な断面について試料の凍結状態を観察した結果を Fig.5 に示す。超音波を照射しない場合 (Fig.5(a))、やや細長い断面の水結晶が形成されている。これと比較して、 $\beta$ 方式で超音波を間欠照射した場合には、全体的により微細な水結晶が形成されていることが判る (Fig.5(b))。水結晶の成長方向は熱流方向と必ずしも一致しないことから、水結晶の代表寸法として短径を用い、微細化の指標とした。Fig.6 に氷晶径のヒストグラムを示す。試料表層部では微細な氷晶が形成され、内部ほど熱的寸法効果のため氷晶径は大きくなっている。

### 3.3 氷結晶構造と操作条件

試料深さ方向の2箇所断面について平均氷晶径を算出した結果を Fig.7 に示す。 $\alpha$ 方式の結果を Fig.7(a) に示す。超音波出力が増加するにつれて氷晶径はやや減少するが、超音波出力をさらに増加させると氷結晶は肥大化する。そこで、照射時間を短くした $\gamma$ 方式の結果を Fig.7(b) に示す。照射時間を短くしても表層部で微細化効果は得られず、また試料内部への影響は小さくなる。次に、 $\beta$ 方式の結果を Fig.7(c) に示す。これより間欠照射による氷結晶の微細化が見出される。これは、超音波出力の集中化によるキャビテーション効果の増大と休止期間における冷却作用の向上の複合効果によるものと推察される。また、on-offを繰り返す周波数が高い方が表層部の氷結晶は微細化する傾向を示している。

### 3.4 性能評価

氷結晶の構造は凝固前線における局所冷却速度  $R_c$  と関係し、氷結晶のサイズが結晶の1次アーム間隔で規定されるとすれば、それは  $R_c^{-0.5}$  に比例する<sup>(5)</sup>。そこで、 $-10^{\circ}\text{C}\sim-14^{\circ}\text{C}$ の温度区間を通過する際の平均冷却速度で  $R_c$  を近似し、平均氷晶径との関係で Fig.8 に示す。 $\alpha$ 方式 (5W) および $\beta$ 方式を用いた場合、実線で示される通常の凍結特性よりも氷晶径がやや小さくなっており、超音波照射が有効であると言える。また、冷却速度を一定とすると、 $\beta$ 方式が最も氷晶径が小さいことから、間欠照射の有効性が認められる。

## 4. 結言

超音波照射による氷晶の微細化効果の向上の点から間欠照射の有効性が示された。試料内の温度分布と超音波照射の関係について調べ、より効果的な超音波照射方式の追究が今後の課題である。

### 参考文献

- (1) 多田・他3名, 第42日本伝熱シンポジウム講演論文集, I (2005), 137.
- (2) Y.Tada, et al., Proc. of 13th International Heat Transfer Conference, (2006), SOL-05.
- (3) 多田・他3名, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2007 講演論文集, (2007), 251.
- (4) 都・相良, 日本冷凍空調学会論文集, 19-4(2002), 375.

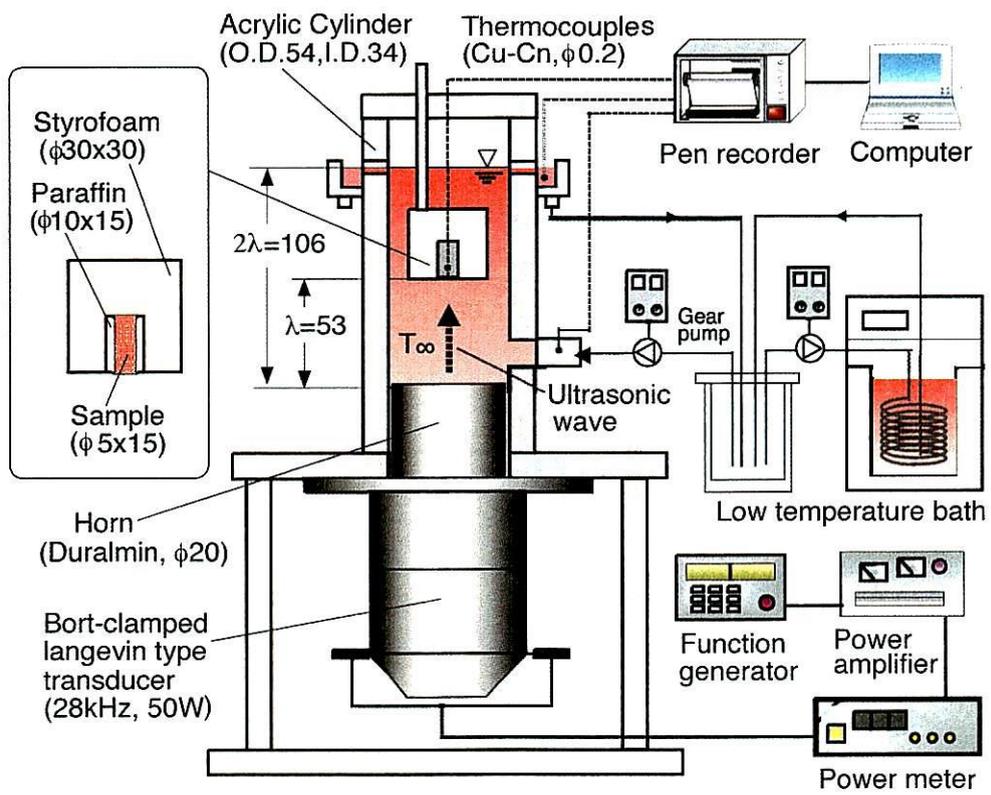


Fig.1 Experimental apparatus

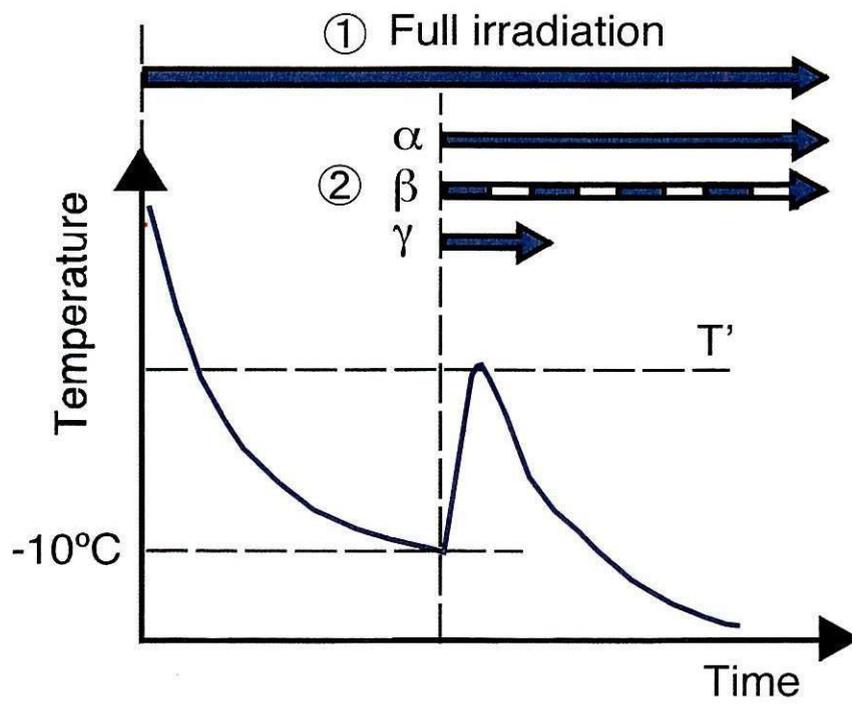


Fig.2 Method of ultrasonic irradiation

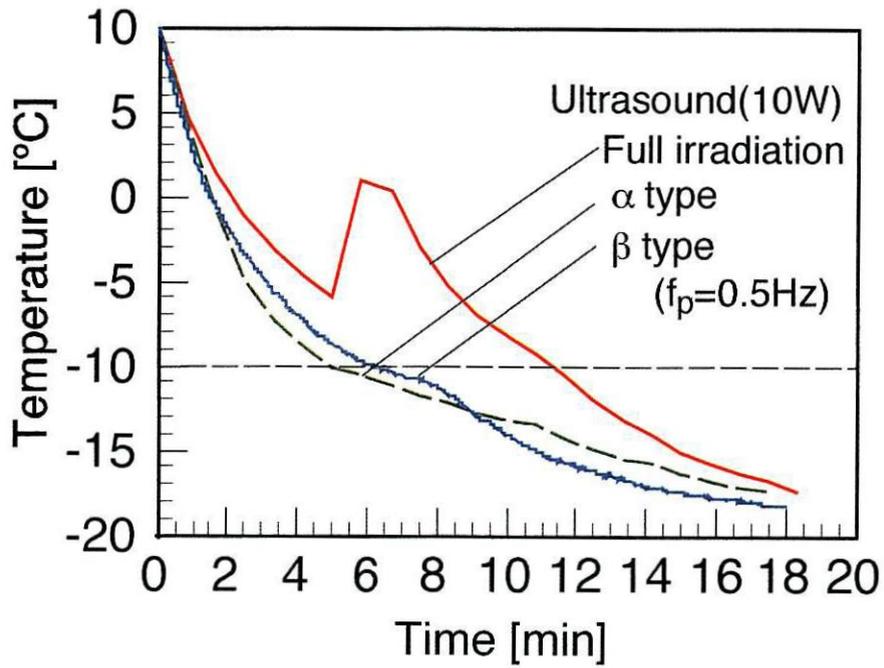


Fig.3 Timewise variation of temperature ( $x=2\text{mm}$ )

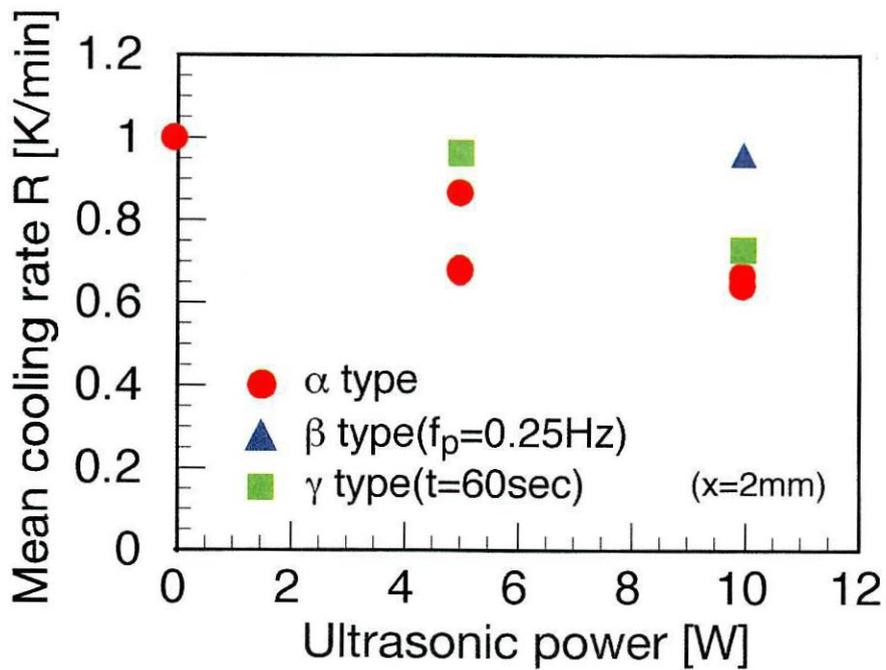


Fig.4 Mean cooling rate ( $-10^\circ\text{C} \sim -14^\circ\text{C}$ )

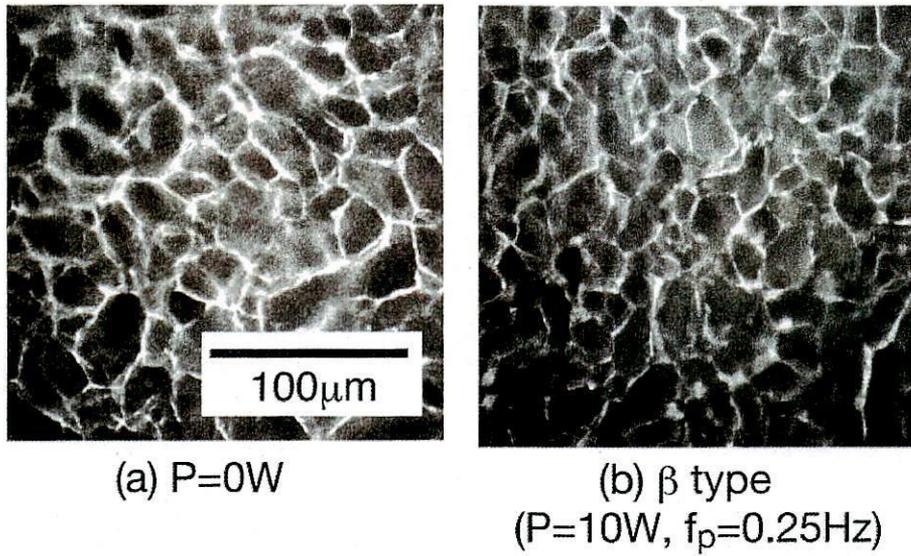


Fig.5 Fluorescence of micrograph of ice structure ( $x=1.5mm$ )

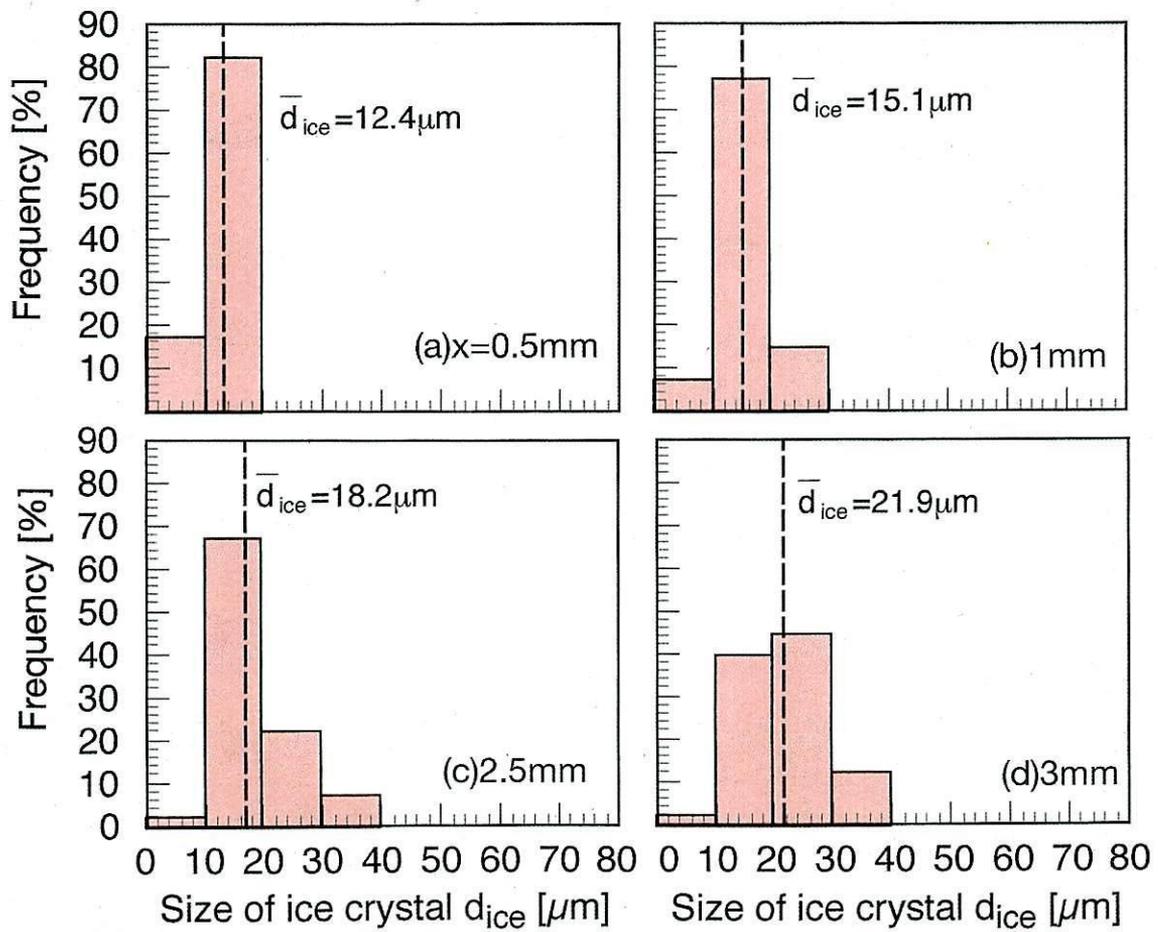
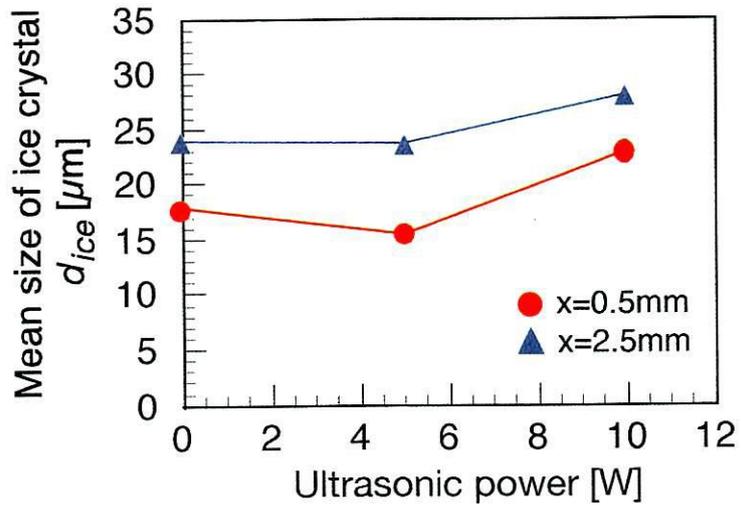
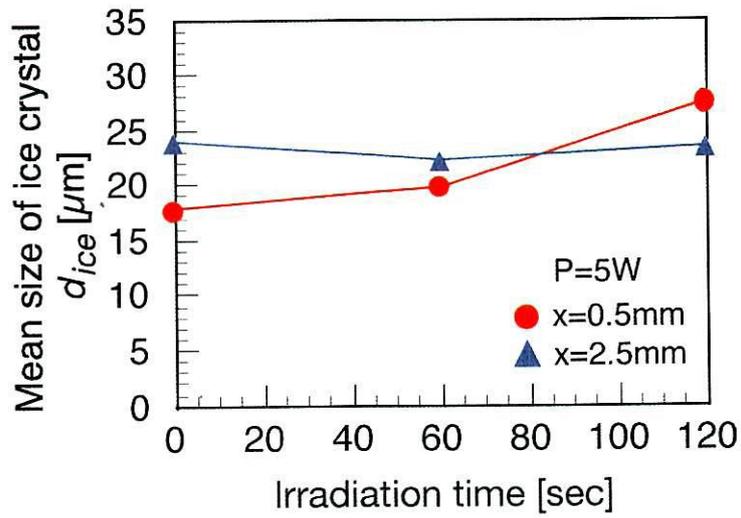


Fig.6 Distribution of ice structure size ( $\beta$  type,  $P=10W, f_p=0.25Hz$ )

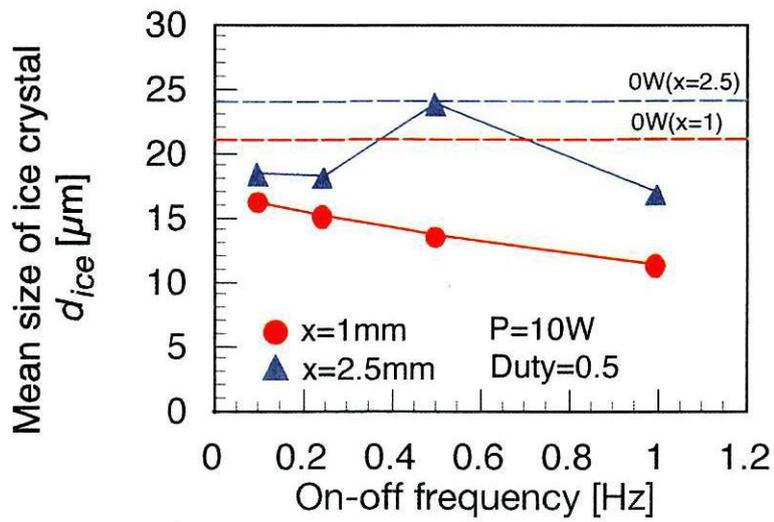


(a)  $\alpha$  type



(b)  $\beta$  type

Fig.7 Size of ice crystal formed in ultrasound



(c)  $\beta$  type

Fig.7 Distribution of ice structure size ( $\beta$  type,  $P=10\text{W}$ ,  $f_p=0.25\text{Hz}$ )

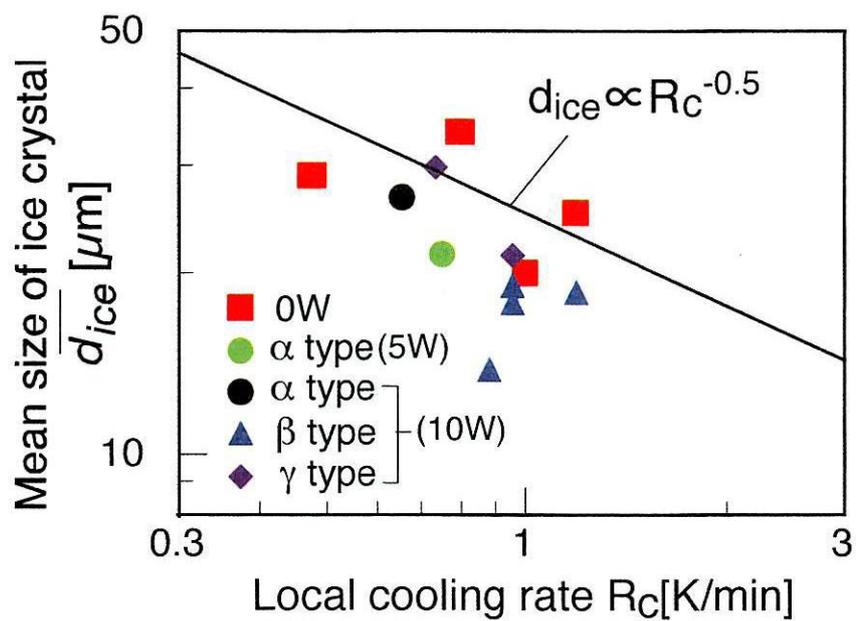


Fig.8 Evaluation of ultrasonic irradiation ( $x=1\text{mm}$ )

## 第4章

# 生体細胞の凍結における氷晶と細胞の相互作用

## 1. 緒言

医療技術やバイオテクノロジーの進歩に伴って、生体細胞や組織を保存する技術の確立が生物学、医学、工学などの分野で追求されている。なかでも、低温化と活性水分の低減により生体高分子の生化学反応を抑える凍結保存は、長期保存の手段として特に有効である。しかしながら、凍結の過程で細胞レベルのミクロ現象が生じ、これが生残率を低下させる要因となる。特に、赤血球などの浮遊細胞の場合には、凍結進行中に未凍結溶液中に細胞が閉じ込められ、細胞が密集して互いに機械的に押し合う packing effect による損傷、および細胞外氷晶の機械的作用による損傷などを受けるとされているが<sup>(1)(2)</sup>、その発生メカニズムは未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、懸濁浮遊細胞の凍結実験を行い、氷結晶による細胞の捕捉/掃き出し挙動を含めた細胞-氷結晶間の相互作用を冷却速度および凍害防御剤の効果と関連づけて実験的に追究した。また、青木ら<sup>(3)(4)</sup>によって提示されている粒子の掃き出し/捕捉モデルを細胞に適用し、理論的検討を行った。

## 2. 実験装置および方法

実験は方向性凝固観察法<sup>(2)</sup>を用いて行った。実験装置を図1に示す。低温窒素ガスとヒーター加熱によりそれぞれ一定温度に維持された低温 ( $T_L$ ) および高温 ( $T_H$ ) の銅ブロックが顕微鏡ステージに設置されている。試料をのせたスライドガラスを銅ブロック上に設置すると、スライドガラス上には、二つのブロック温度と間隔で規定される直線温度勾配  $G=(T_H-T_L)/d$  が実現される。スライドガラスを固定し、モータとマイクロメータを用いて二つの銅ブロックを同時に一定速度  $V$  で移動させることにより、試料全域で一定の冷却速度  $R=(G \cdot V)$  を実現するものである。供試試料として 0.154mol/l の等張 NaCl 水溶液にイースト菌を懸濁したものをを用いた。実験は、イースト菌の数密度一定 ( $644 \text{ 個}/\text{mm}^2$ ) のもとで、凍結界面の進行速度 (銅ブロックの移動速度  $V=0.83 \sim 80 \mu \text{ m/s}$ )、温度勾配 ( $G=12 \sim 30^\circ\text{C}/\text{mm}$ ) を種々変化させて行い、凍結の様相を顕微鏡を通して CCD カメラで観察・記録した。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 凍結の様相

凍結の様相を図2に示す。固液界面の前方の溶質濃度が温度に対する平衡温度よりも小さくなる。いわゆる組成的過冷却が生じ、それによって界面が不安定化し、セル状の氷結晶が発生・成長する。他方、細胞は水溶液の凍結に伴って掃き出され、氷結晶間の未凍結溶液中に集積されることが判る。その結果、脱水による損傷や細胞同士の密着・圧迫による損傷を受けることが予想される。

### 3.2 氷結晶と細胞の形態学相互作用

マッシュ域における凍結パターンを氷結晶による細胞の掃き出し/捕捉現象の観点から分類し、図3に示す。凍結パターンは、(1)細胞が平坦な界面の前方に掃き出され、界面と共に移動する掃き出し・移動型 (Sweep1)、(2)細胞が氷結晶のアーム側面に掃き出される掃き出し・集積型 (Sweep2)、(3)細胞が氷結晶に捕捉される捕捉型 (Trap)、(4)(2)と(3)の中間的な形態 (Sweep & Trap) に大別された。図4に、細胞の掃き出し/捕捉挙動の発生確率と凍結界面速度の関係を示す。図4(a)に、温度勾配  $G=16^\circ\text{C}/\text{min}$  の場合の結果を示す。これより、界面進行速度の増加に伴い、細胞の掃き出し確率が減少し、捕捉確率が増加することが判る。4(b)に示す温度勾配  $G=24^\circ\text{C}/\text{min}$  の場合も同様な傾向が

見られるが、界面進行速度が  $52\mu\text{m/s}$  以上の条件では、界面進行速度の増加に伴い、細胞の捕捉確率が減少に転じる。これは、冷却速度の増加に伴い、氷結晶の先端の曲率半径の減少が生じ、細胞が結晶先端部と相対する確率が減少する。このため細胞は界面進行速度のより遅い結晶側面と相対することになり、捕捉されにくくなるためと考えられる。氷結晶の先端と側面の成長速度を図5に示す。一次アーム先端方向の成長速度は、凍結界面速度に対応する。氷結晶一次アーム側面方向の成長は、先端方向の成長速度に比べ、非常に小さいことが判る。したがって、氷結晶側面では細胞は捕捉されにくいと考えられる。

#### 4. 凍結における細胞の捕捉 / 掃き出し現象の理論解析

##### 4.1 解析モデル

解析モデルを図6に示す。青木ら<sup>(3)(4)</sup>によって提示されている粒子の掃き出し/捕捉モデルを細胞に適用した。すなわち、凍結界面の進行に伴い、界面上に存在する細胞が掃き出される条件は、凍結界面の進行により隙間が小さくなるとともに細胞に働く左向き力(斥力)が働くことが必須となる。細胞に働く力として、電気二重層力( $F_{el}$ )と van der Waals 力( $F_{vdw}$ )、粘性抵抗力( $F_{\mu}$ )を考える。

$$F_{el} = 2\varepsilon_0\varepsilon_r\kappa\pi R_{cell} \left[ 2\phi_{cell}\phi_{ice} \frac{\exp(-\kappa D)}{1 - \exp(-2\kappa D)} + (\phi_{cell}^2 + \phi_{ice}^2) \frac{\exp(-2\kappa D)}{1 - \exp(-2\kappa D)} \right] \quad (1)$$

$$F_{vdw} = -\frac{AR_{cell}}{6D^2} \quad (2)$$

$$F_{\mu} = 6\mu\pi RV \left( \frac{R_{cell}}{6D} \right) \quad (3)$$

【 $\varepsilon_0$ : 真空の誘電率,  $\varepsilon_r$ : 液の比誘電率,  $1/\kappa$ : 電気二重層厚さ,  $R_{cell}$ : 細胞半径,  $\phi_{cell}$ : 細胞の表面電位,  $\phi_{ice}$ : 氷の表面電位,  $D$ : 細胞と凍結界面の距離,  $\mu$ : 粘性係数,  $V$ : 凍結界面速度】

したがって、凝固界面と細胞の間隙に水溶液が供給されなくなる臨界距離  $D_c$  に対応する臨界面速度  $V_c$  は次式で表される。

$$V_c = \frac{D_c}{6\mu\pi R_{cell}^2} (F_{el} + F_{vdw}) \quad (4)$$

##### 4.2 計算結果

細胞に作用する力の計算値を細胞の直径との関係を図7に示す。細胞径の増大に伴って、電気二重層力および van der Waals 力は、直線的に増大するのに対して、粘性抵抗力は指数関数的に引力として増大する。その結果、これらの力の総和は、細胞径の増大に伴い、斥力から引力に遷移する。すなわち、細胞は氷結晶に捕捉されることになる。図5より結晶先端部とアーム側面とでは成長速度が異なるので、本研究では氷結晶先端位置に注目し、細胞の掃き出し / 捕捉マップを作り、その結果を図8に示す。これより、掃き出し / 捕捉の遷移条件は、凍結界面の進行速度によりほぼ決定されることが判る。また、

計算結果は実験結果と概ね一致しており、モデルの妥当性が認められる。なお、マッシュ域の幾何形状に依存する細胞と氷結晶の衝突確率を導入することで、本モデルをマッシュ全域に適用できると考えられる。

## 5. 結言

1. 凍結界面の進行速度が小さくなるにつれて細胞は外部氷晶に押し出され、氷結晶間の未凍結水溶液中に集積される。
2. 冷却速度が大きくなるにつれて、氷結晶の一次アーム間隔小さくなるが、同時に先端半径も減少し、細胞の捕捉確率が増加から減少へと遷移する界面進行速度が存在する。
3. 凝固界面上の細胞に作用する力として、電気二重層力、van der Waals 力、粘性抵抗力を考慮したモデルにより、凍結時における細胞の掃き出し / 捕捉現象を予測できることが示された。

## 参考文献

- (1) T.Nei, Cryobiology, 4-6(1968), pp.303.
- (2) H.Ishiguro and B.Rubinsky, Cryobiology, 31(1994), pp.483.
- (3) K.Aoki, M.Akahori, Y.Tanaka and K.Hoshino, Proc.1st International Forum on Heat Transfer, (2004), pp.181-182.
- (4) 青木, 赤堀, 原, 田中, 第 40 回日本伝熱シンポジウム講演論文集 (2003), pp.655.

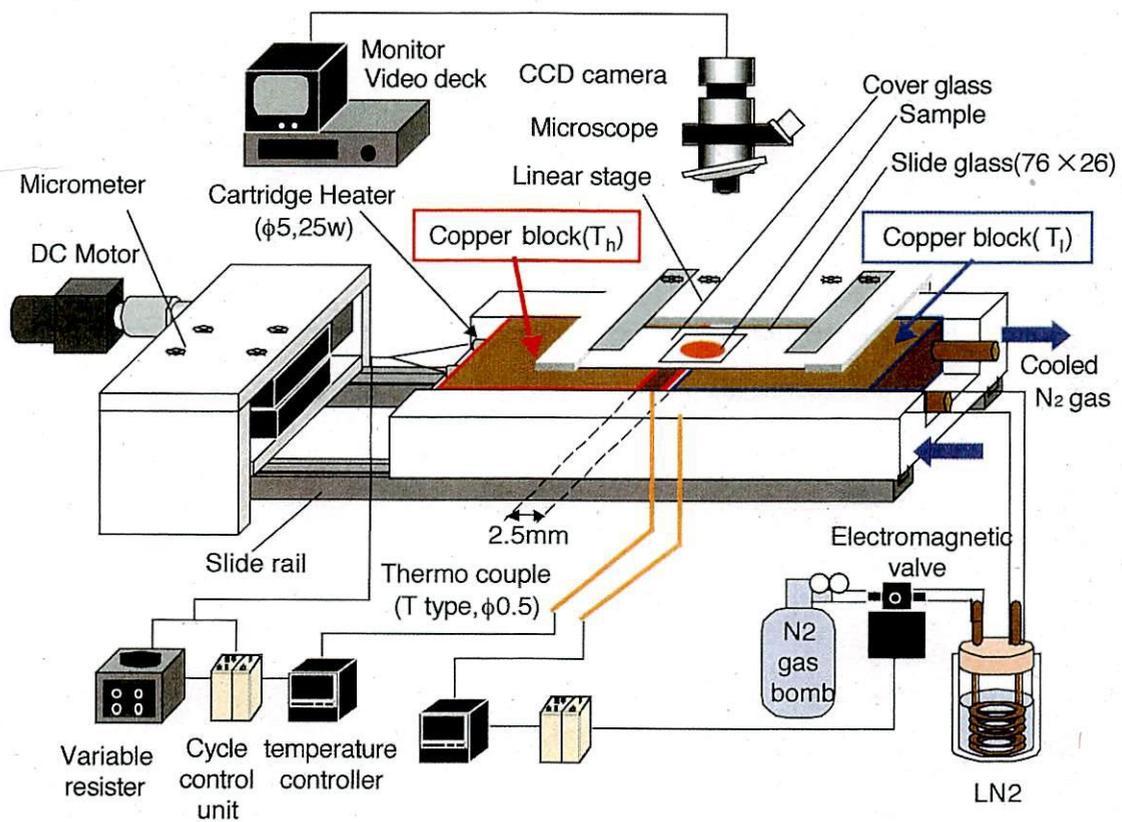


図1 実験装置(方向性凝固観察法)

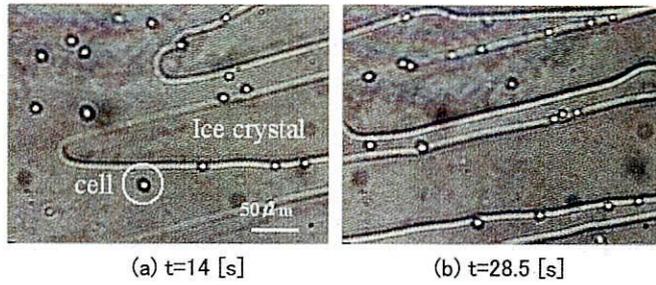


図2 凍結の様相( $R=7.7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $V=8\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$ )

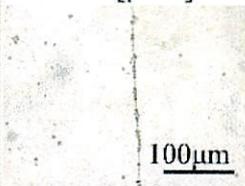
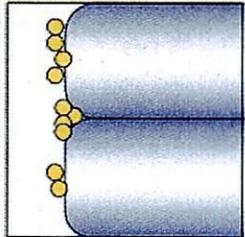
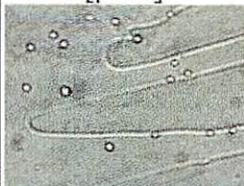
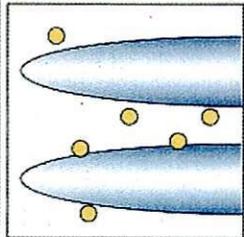
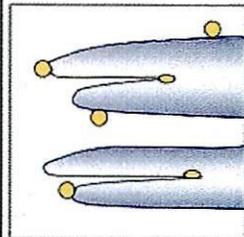
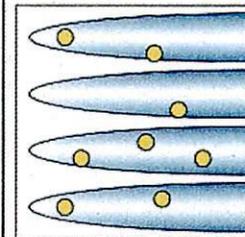
Sweep		Trap	
<p><b>Sweep1</b>  <math>G=20\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{mm}]</math>  <math>R=2\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{min}]</math>  <math>V=1.6\text{ }[\mu\text{m}/\text{s}]</math></p>  <p>100μm</p>  <p>平坦な界面や、 氷結晶の隙間に 細胞が集まる。</p>	<p><b>Sweep2</b>  <math>G=16\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{mm}]</math>  <math>R=7.68\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{min}]</math>  <math>V=8\text{ }[\mu\text{m}/\text{s}]</math></p>   <p>細胞が一次アームの側面に掃き出される。</p>	<p><b>Sweep &amp; Trap</b>  <math>G=20\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{mm}]</math>  <math>R=9.6\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{min}]</math>  <math>V=8\text{ }[\mu\text{m}/\text{s}]</math></p>   <p>細胞にぶつかって氷結晶の形状が影響を受ける。</p>	<p><b>Trap</b>  <math>G=24\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{mm}]</math>  <math>R=75\text{ }[^{\circ}\text{C}/\text{min}]</math>  <math>V=52\text{ }[\mu\text{m}/\text{s}]</math></p>   <p>細胞が捕捉される。</p>

図3 細胞の掃き出し/捕捉パターン

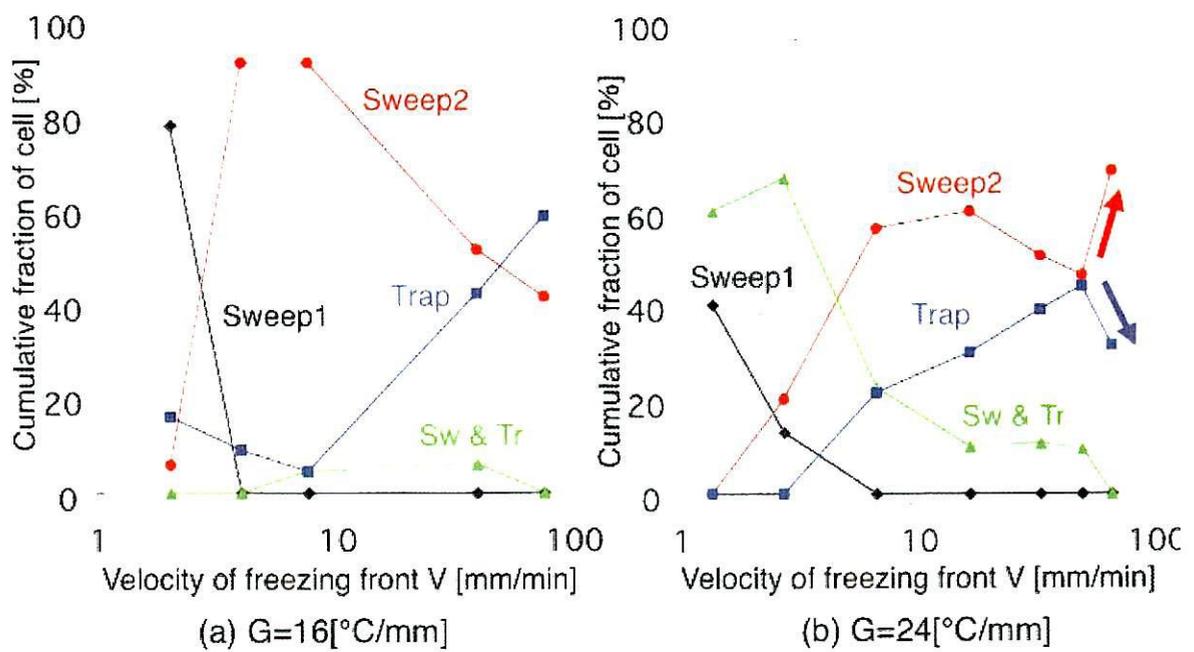


図4 細胞の掃き出し/捕捉挙動と凍結界面速度の関係

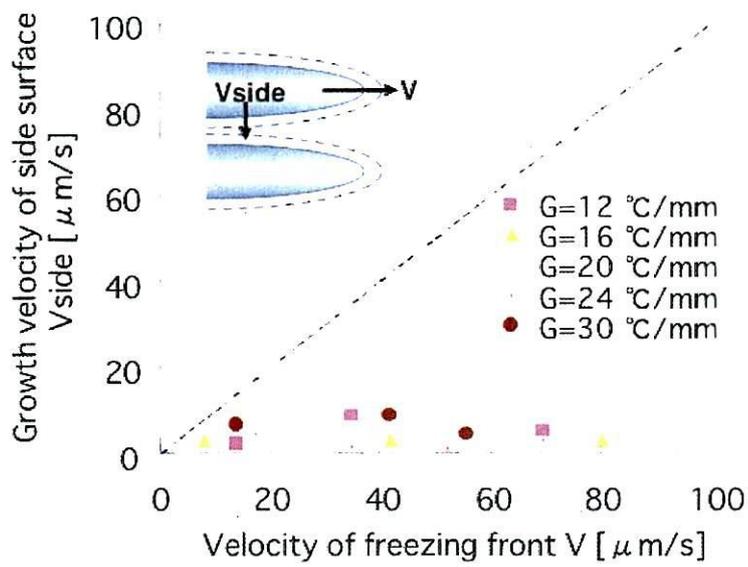
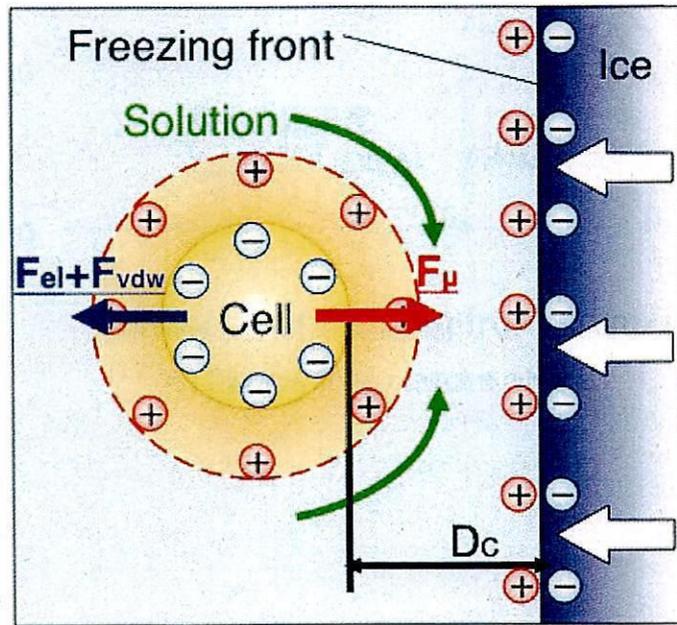


図 5 氷結晶の先端と側面の成長



Freezing velocity  $V$

図 6 細胞の掃き出し/捕捉モデル

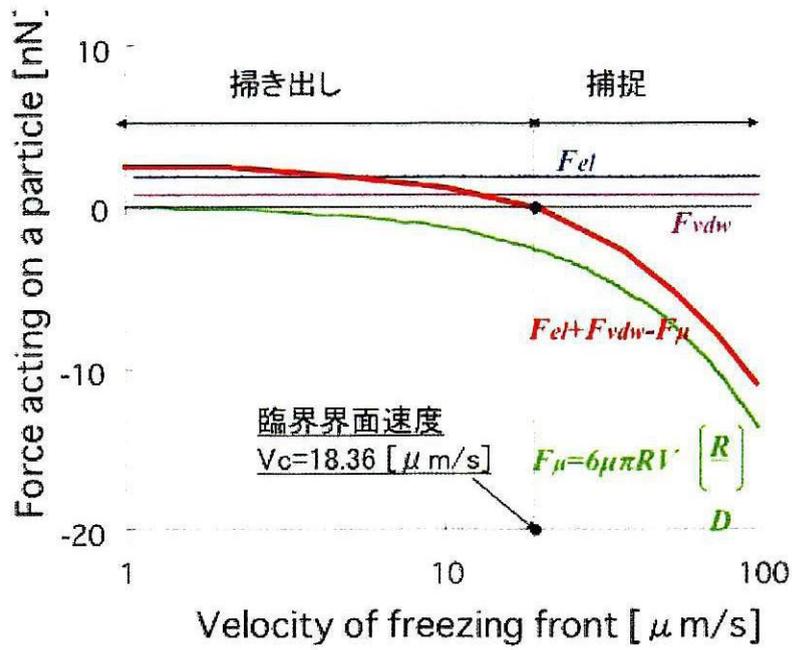


図7 細胞に作用する力細胞直径の関係

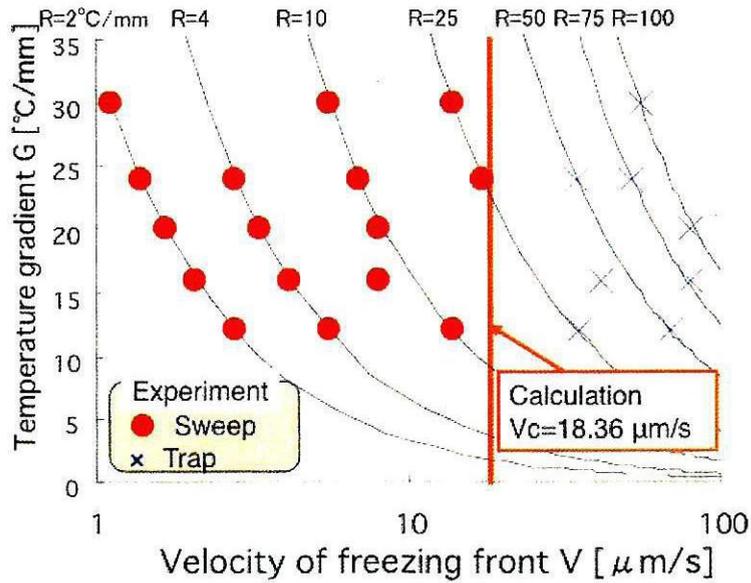


図8 細胞の掃き出し/捕捉マップ

## 第5章 研究の総括

凍結損傷を軽減する手段として生体細胞・組織のガラス化に注目し、超音波照射が生体組織の凍結に及ぼす影響について実験的に追究した。具体的には、生体模擬組織として寒天ゲルを供試した超音波音場における凍結実験を行い、過冷却度および氷晶の生成状態を超音波出力および冷却速度と関連づけて調べ、以下の結論を得た。

1. 本装置では超音波照射による過冷却の促進効果は認められなかった。この原因として、(1) 本実験系での冷却速度は数 K/min 程度の範囲であったため、氷核形成のための時間が十分長いことが考えられる。今後、冷却速度をより大きくした条件で過冷却度を測定する必要がある。また、(2) 超音波の周波数が低く、氷核の生成周期と比較して超音波キャビテーションの発生周期が長く、氷核生成を阻止できなかった可能性が考えられる。また、(3) 超音波出力が不足していることも原因と考えられる。これらのことを踏まえて、今後、装置系について見直しが必要である。

2. 組織体のガラス化は実現できなかったが、組織体表層部において超音波照射による氷晶の微細化の効果が認められた。この現象は凍結損傷軽減の点から有効である。また、音響流に基づく氷晶の微細化の効果は小さく、氷結晶の微細化は主に超音波キャビテーションの効果であることが示された。

3. 超音波出力をさらに増加させると音波吸収による発熱作用が大きくなり、逆に氷結晶の肥大化を招く問題点があることが判った。この対策として、超音波の照射と休止を繰り返す間欠照射方式を用いると、氷晶を微細化する効果の向上を図れることを見出した。

4. 凍結損傷軽減の技術として実用化するためには、数十 mm 程度のサイズの試料に対して、その全域にわたって氷晶を 10 $\mu$ m 以下のサイズまで微細化させる必要があると予想されるが、本研究の実験範囲では達成されていない。原因として、低温度域では超音波キャビテーションの効果が抑制されることが挙げられる。したがって、超音波出力の向上が必要である。さらにその際には、音波吸収に伴う冷却速度の低下を防ぐため間欠照射など超音波照射方式の工夫が必須となる。本研究の結果は、このような実用化へ向けての方向性を提示していると言える。氷晶の微細化に効果的な超音波照射方式の確立が今後の課題である。