

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560222

研究課題名(和文) インクジェットによる細胞瞬間凍結保存法の開発

研究課題名(英文) Flash cell freezing by inkjet printing toward cryopreservation

研究代表者

秋山 佳丈 (Akiyama, Yoshitake)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号：80585878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の凍結保存法は細胞株の長期間維持および輸送において必須の技術である。本研究では、インクジェット技術を用いて、細胞を数百ピコリットルの微小液滴中に内包し、液体窒素を用いて瞬間凍結することで、凍結保護剤を用いずに細胞を凍結することを試みた。本手法で得られた細胞の生存率は20%程度と従来法と比べ十分でなかったが、液滴をさらに微小にすることで、十分な生存率が得られることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cryopreservation is to enable cell stocks to be stored semi-permanently. It is invaluable when dealing with cells with limited life span. We propose a novel cell cryopreservation method without cryoprotectant agent (CPA) by putting cells inside of picoliter droplets using inkjet printing, which inhibits the generation and growth of ice crystals to damages cell membrane and organelles. The viability of the flash freezing was around 20%, while the viability of the slow-rate freezing without DMSO was almost zero. The result indicates that inkjet-based-flash freezing could be a promising approach for CPA-free cryopreservation.

研究分野：バイオエンジニアリング

キーワード：細胞凍結保存 インクジェット

### 1. 研究開始当初の背景

従来の細胞株だけでなく iPS および ES 細胞においても、細胞の凍結保存は、細胞株の維持・輸送において必須の技術であり、世界中のセルバンクのみならず、生殖医療や畜産業など多岐に渡る分野で用いられている。培養細胞を凍結保存する手法としては、緩慢凍結法およびガラス化凍結法が挙げられるが、どちらも凍結保護材の毒性や凍結時に生成する水の結晶による細胞の破壊により一部の細胞は壊死してしまうため、現在もその改良が続けられている。

一方、単一細胞のハンドリングのため手法としてインクジェット技術に着目し、細胞を正確に高速でプリントする手法の確立を行っている。その中で、インクジェットヘッドにより細胞と共に吐出される液滴はわずか1ナノリットル程度あり、比表面積がバルクの状態と比べて極めて大きく、瞬時に熱交換が行える点に着目した。すなわち、この状態で冷却すれば、瞬時に細胞を凍結し氷晶の生成を抑制できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

細胞の凍結保存法は細胞株の長期間維持および輸送において必須の技術であり、iPS 細胞や ES 細胞の樹立によりその重要性はさらに増している。具体的な凍結手法としては、緩慢凍結法およびガラス化凍結法が挙げられるが、どちらも氷晶(氷の粒)の生成を抑制するために添加する凍結保護剤の毒性や生成した氷による細胞の破壊などにより、解凍後の生存率は十分ではない。凍結保護剤を用いずに細胞凍結時のダメージを抑えるには、細胞内で生成する氷晶の成長を抑える必要がある。そのため本研究では、凍結時の細胞懸濁液の液量を小さくすることで、冷却速度を飛躍的に上げ瞬間的に凍結することで、細胞内で生成する氷晶の成長を抑え細胞へのダメージの抑制する。それにより、凍結保護剤を用いずかつ氷の生成を抑えた全く新しい細胞凍結保存法の創出を目指す。

### 3. 研究方法

#### (1) 細胞瞬間凍結装置

本研究では細胞の凍結を行うために、インクジェット技術を応用した瞬間凍結装置を開発した。本装置は冷却用のチャンバー部、2軸自動ステージ、インクジェットヘッドで構成される(図1)。液体窒素の蒸発速度を抑えるために熱伝導性の低い発泡スチロールを液体窒素チャンバーとして用い、その上にアクリル板を載せた。ただし、吐出のためにアクリル板の中央には穴を設けた。液体窒素を含むチャンバー内にアルミベースを設置し、その上にカバーガラスを載せ、そして、インクジェットによって細胞懸濁液を吐出し、瞬間凍結を行った。カバーガラスに吐出する利点としては、細胞と液体窒素が直接接触しないので、液体窒素中に含まれる細菌や不純物

などによるコンタミネーションの防止ができることや、細胞の移動が容易に移動できることである。また、インクジェットの吐出とステージの移動は、PCにより制御されており、任意の位置に吐出することが可能である。また、冷却面からインクジェットヘッドのノズル先端の間の距離は20mmとし、ノズル先端の凍結を防いだ。以上により、液体窒素付近の温度による急速凍結が可能となった。

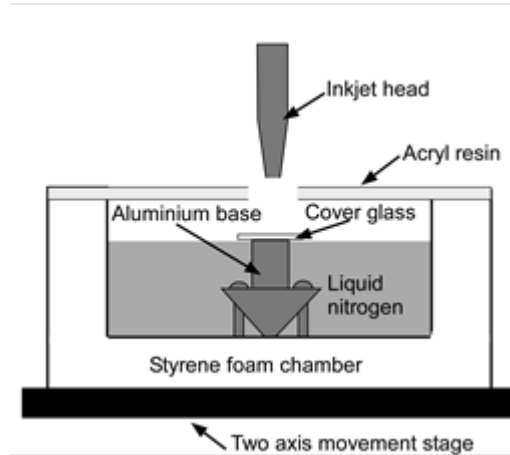


図1 細胞瞬間凍結システム概要

#### (2) 細胞凍結と評価

今回マウス皮膚由来線維芽細胞株である NIH-3T3 (理研セルバンク) を使用した。培養液には Fetal Bovine Serum 10%, Penicilline-Streptomycin Solution 1% を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium を使用した。細胞懸濁液 ( $1.0 \times 10^6$  個/mL) を調整し、瞬間凍結装置によって凍結した。今回インクジェットヘッドにより吐出された液滴サイズは、約 800 pL であった。その後、凍結状態の細胞を 37℃ に温めた培養液 (2 mL) にカバーガラスごと浸すことで、急速に融解した。その後、1日培養し、Calcein AM と Ethidium homodimer-1 (PK-CA707-30002, タカラバイオ) を用いて染色を行い、蛍光観察による生死判定を行った。この実験では、凍結融解による細胞生存率への影響を見るため、凍結状態の保存期間については設けていない。また、生存率の評価を行うために、インクジェットで吐出のみを行った細胞、本装置で瞬間凍結を行った細胞、10% DMSO を添加して緩慢凍結を行った細胞、DMSO を添加せずに緩慢凍結を行った細胞、DMSO を添加せずにそのまま凍結を行った細胞、といった条件での細胞の生死判定を行い、それらの生存率を比較した。ただし、凍結期間は1日とした。また、生存率は、ディッシュ内の100個の細胞をランダムにカウントし、その内の生細胞数割合とした。この場合においては、凍結時に多くの細胞の破裂が起きてしまうため、凍結前に細胞数を  $1.0 \times 10^6$  個/mL に調製し融解後、1 mL の細胞懸濁液

のうち 100  $\mu\text{L}$  分注しディッシュに播種することで、全体の細胞数を  $1.0 \times 10^5$  個とし、ディッシュ内全体の生細胞数を数えることで評価を行った。

また、液滴サイズの違いによる細胞の生存率についても比較した。今回、本装置でピペットマンを用いて 10  $\mu\text{L}$  の細胞懸濁液を凍結した場合、インクジェットを用いて 800 pL の細胞懸濁液を凍結した場合の 2 つの異なる液滴サイズの場合での細胞生存率についても評価を行った。ただし、10  $\mu\text{L}$  の細胞懸濁液を凍結した場合においても、凍結時における細胞の破裂が多く見られたため、凍結前に細胞数を  $1.0 \times 10^6$  個/mL に調製し、細胞懸濁液を 10 滴凍結させることで、全細胞数を  $1.0 \times 10^5$  個とし、ディッシュ内全体の生細胞数を数えることで評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 瞬間凍結後の細胞の生存率

各条件におけるそれぞれの条件での細胞生存率の結果を図 2 に示す。インクジェットの吐出のみの生存率は 98.0 % であった。このことから、インクジェットの吐出による生存率への影響は無視できる。また、凍結保護剤を添加せずに行った緩慢凍結や凍結においては、それぞれ 0.0 % と 0.6 % であった。インクジェットによる瞬間凍結（細胞懸濁液約 200 pL）の生存率は、15.6 % であった。凍結保護剤を添加せずに行った場合において、単純に凍結を行った場合よりも、液滴体積を微小化することによって瞬間凍結を行うことで、大幅に生存率が向上することが確認できた。しかし、従来法である緩慢凍結法の生存率 83.5 % と比べ、本手法における生存率は約 1/5 と低くなった。すなわち、これは瞬間凍結において、冷却速度の高速化が不十分であり、細胞内外に生成する氷晶を抑制することができなかったことを示している。今後、生存率を高め凍結保存法として確立するためには、液滴体積をさらに小さくし冷却速度を上げることで、生存率の向上が望まれる。

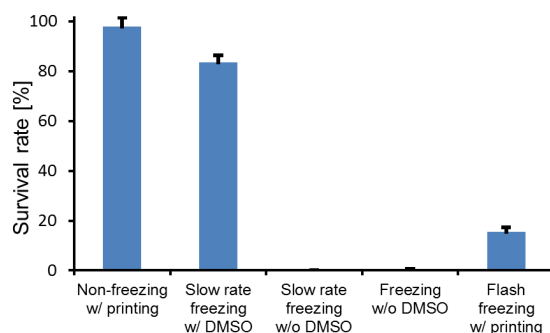


図 2 各条件における細胞の生存率

##### (2) 液滴サイズと細胞の生存率

次にインクジェットの吐出の条件を変更し、液滴体積を約 200 pL と約 800 pL の条件で凍結融解実験を行った。また、比較実験として、

ピペットマンによる 10  $\mu\text{L}$  の細胞懸濁液の凍結融解実験も行った。各液滴体積における細胞の生存率を、図 3 に示す。200 pL の生存率は 15.6 %、800 pL の生存率 12.0 %、10  $\mu\text{L}$  の生存率は 2.2 % であった。これらの結果から、液滴体積を小さくするほど、すなわち冷却速度が上昇するほど、生存率の向上する傾向が確認できた。

本実験で用いた細胞の直径は約 15  $\mu\text{m}$  であり、細胞を球形と仮定すると体積は約 1.8 pL となる。すなわち、細胞は現在の液滴体積の 1/100 以下であるため、さらなる液滴の微小化が可能である。今回の得られたグラフから、液滴体積の減少により、指数関数的に生存率が上昇する傾向が見取れるため、液滴の微小化によって大幅な生存率の向上が期待できる。また、さらに冷却速度を上げる手法として、液滴体積を小さくすることに加え、冷却面に接する面積を広くする必要がある。例えば、冷却面であるカバーガラスの親水化処理や液滴速度を高めることが挙げられる。以上により、着滴時に液滴がより広がりやすい環境を作り出し、冷却面に接する液滴の面積が広くなり、冷却速度を高めることが可能となる。

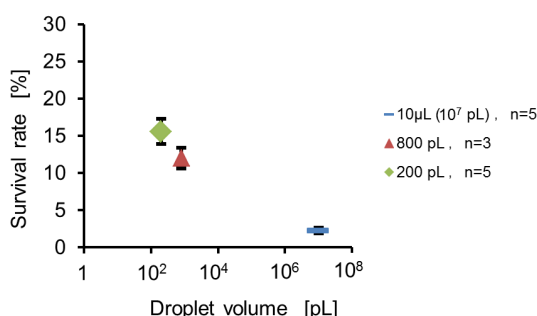


図 3 液滴体積と細胞の生存率

##### (2) 高速度カメラによる凍結の観察

凍結の様子を高速度カメラ (SA-Z, フォトン) により、2 万 frame/s で観察した。着滴から凍結までの様子を図 4 に示す。着滴直後は透明だった液滴が、約 3.7 ms 後にうっすらと白くなったため、ここで液滴が凍結したと判断した。一方、液量 1 nL の液滴はカバーガラスに着滴後、高さ 25  $\mu\text{m}$  となる。凝固を伴う簡易的な一次元系熱伝導方程式の解であるノイマン解を用いると、液滴の凍結に要する時間は約 1 ms となる。また、この解は高さ方向しか考慮していないので、二次元または三次元系では凍結時間はより短くなると考えられる。それに対し、今回得られた凍結時間は、3.7 ms と遅かった。この原因としては、インクジェットにより吐出する液滴の体積が非常に小さいため、過冷却が起こり、水の凍結温度の低下や、水分子が多結晶化、もしくはガラス転移が生じている可能性がある。

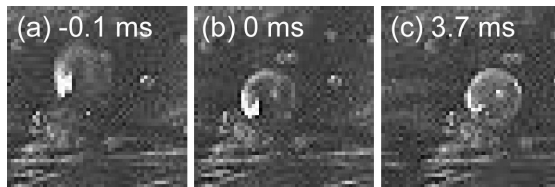


図 4 液滴凍結の連続写真，(a)着滴直前，(b)着滴の瞬間，(c)凍結によりうっすらと白くなった液滴．

### (3) 牛胎児血清の影響

FBS には凍結保護作用があると報告されており，瞬間凍結においても FBS の添加が生存率の向上に繋がるか検証を行った．BS 10 %と FBS 20 %の条件における生存率についての結果を図 5 に示す．FBS 10 %の場合の生存率は 15.6 %であり，FBS 20 %の場合の生存率においては 18.8 %であった．この結果から FBS の濃度を上げることによって 3.2 %生存率の向上が確認できた．( $p < 0.05$ , t 検定)このことから，瞬間凍結法においても，FBS には凍結保護作用があるといえる．しかし，大幅な生存率の向上には繋がらなかったため，さらに FBS の濃度を高くするなど検討が必要である．一方，細胞毒性がなく凍結保護作用を示す物質としては，ラクダアミド やトレハロース等の糖，不凍タンパク質 などが挙げられる．これらの物質についても，瞬間凍結保存法における効果を評価することで，生存率の向上を今後も目指したい．

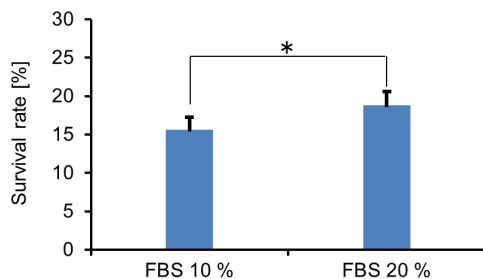


図 5 各 FBS 濃度における瞬間凍結および解凍後の細胞生存率

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

R. The, S. Yamaguchi, A. Ueno, Y. Akiyama, K. Morishima, Rapid Single Cell Printing by Piezoelectric Inkjet Printer, Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application, 57-74, 2014, 査読無  
DOI: 10.1007/978-4-431-55139-3\_3 .

〔学会発表〕(計 8 件)

秋山佳文 微細加工を利用したバイオハイブリッドロボティクスに向けた取り組み，バ

イオイオロボティクス特別講演会 2015.2.23, 信州大学工学部(長野市) .

篠瀬真人,秋山佳文,インクジェットによる細胞瞬間凍結における液滴サイズの細胞生存率への影響,日本機械学会 第 27 回バイオエンジニアリング講演会,2015.1.10,新潟コンベンションセンター(新潟市) .

Y. Akiyama, Three-dimensional Biofabrication toward Biohybrid Microdevices, The 15th International Union of Materials Research Societies, International Conference in Asia (IUMRS-ICA), 2014.8.28, Fukuoka University (Fukuoka).

竹下知寛, The Ryanto, 浅野豪文, 森島圭祐, 秋山佳文, 凍結保護剤フリーの細胞凍結保存法の検討, 日本機械学会関西学生会平成 25 年度学生員卒業研究発表講演会, 2014.3.17, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(堺市) .

竹下知寛, The Ryanto, 森島圭祐, 秋山佳文, インクジェットによる瞬間凍結後の細胞生存率の評価, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, 2013.12.5, イーグレひめじ(姫路市) .

R. The, S. Yamaguchi, A. Ueno, Y. Akiyama, K. Morishima, Study in Automation of One Cell per One Droplet Printing by Image Processing, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 2013.11.25, タワーホール船堀(東京都江戸川区) .

R. The, S. Yamaguchi, A. Ueno, Y. Akiyama, K. Morishima, Automation of Piezoelectric Inkjet-Based One Cell Per One Droplet Printing by Image Processing, IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2013.11.3, Tokyo (Japan).

R. The, S. Yamaguchi, A. Ueno, Y. Akiyama, K. Morishima, Automation of Piezoelectric Inkjet-Based One Cell Per One Droplet Printing by Image Processing, IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS), 2013.10.21, Freiburg( Germany).

〔その他〕

ホームページ等

<http://biohybrid.chips.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

秋山 佳文 (AKIYAMA, Yoshitake)  
信州大学・学術研究院繊維学系・准教授  
研究者番号：80585878

### (2)研究分担者

森島 圭祐 (MORISHIMA, Keisuke)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号：60359114