

研究終了報告書

「ナノ・ヒーティングによる生体組織凍結保存技術の創出」

研究期間：2017 年 10 月～2021 年 3 月

研究者：井藤 彰

1. 研究のねらい

人体を自在に凍結保存することができれば、医療技術の発展した未来に治療の望みを求めることができたり、宇宙における人類の活躍の場が飛躍的に広がったりするとされているが、依然として SF の話である。現在、人体はもちろん臓器や組織も冷凍保存する技術は確立されていない。臓器移植における臓器の保存可能期間は、心臓や肺で 4 時間、肝臓や脾臓で 8 時間、腎臓で 36 時間であり、多くの場合は移植に間に合わずに廃棄されている。臓器や組織の凍結保存が技術的に可能になれば、世界的に年間数百万人もの患者の健康を改善したり、命を救ったりすることができると考えられる。一方で、臓器・組織よりも下層レベルである細胞においては、細胞を生きた状態（解凍後に増殖・機能発現可能な状態）で冷凍保存するガラス化法がすでに開発されている。冷凍時や解凍時に細胞内に氷の結晶（氷晶）が生じてしまうと細胞が破壊されてしまう。ガラス化法は、ガラス化溶液（凍結保護液）内の細胞を、液体窒素で素早く凍結させることで細胞内に氷晶を形成させずに凍結し、それよりもさらに 10 倍速い速度で加温して解凍することで氷晶を形成させずに解凍する方法である。しかしながら、大容量の細胞および分厚い組織・臓器においては、特に細胞や組織にダメージのない方法で急速加温して解凍する技術がなかった。

我々は本プロジェクト開始までに、ガン細胞特異的に結合する機能性磁性ナノ粒子を開発し、交流磁場を照射することで腫瘍組織を加温して殺傷するガン温熱療法の開発を行ってきた。本研究ではこれらの技術を基盤として、磁性ナノ粒子を交流磁場で発熱させることによる熱制御法を開発し、磁性ナノ粒子の発熱によるナノスケール・サーマルマネジメントを基盤とした移植用臓器・組織・細胞の凍結保存技術「ナノ・ヒーティング法」を創出することを研究のねらいとした。本研究は、交流磁場照射装置の製造に実績のある第一高周波工業（株）との共同開発によって装置の試作を行い、最終目標は磁性ナノ粒子を用いた臓器・組織・細胞の凍結保存技術の完成であり、再生医療や移植医療の臨床現場での実用化を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、磁性ナノ粒子が交流磁場中で発熱する原理を利用した「ナノ・ヒーティング」技術による無細胞(A)・細胞(B)・組織(C)・臓器(D)といった各レベルで検討を行い、生体組織の冷凍保存/解凍技術を開発した。具体的には以下の成果をあげた。

研究テーマ A) ナノ・ヒーティングにおける凍結/解凍のスペクトル学的理解

磁性ナノ粒子を細胞凍結保護液に分散させてガラス化凍結し、凍結サンプルに交流磁場を照射したところ、磁性ナノ粒子は発熱し、周波数・装置出力・磁性ナノ粒子の濃度に依存的な発熱プロファイルを示した。ナノ・ヒーティングにより、細胞凍結液の容量に依存せずに均一かつ急速に加温することが可能であり、加温速度の低さに起因する再結晶による氷晶形成を誘導することなく細胞凍結液を解凍することに成功した。

研究テーマ B) ヒト iPS 細胞の冷凍保存/解凍技術の開発

本研究では、ナノ・ヒーティング技術を駆使して、再生医療の実現化に重要である大量培養した iPS 細胞を生存率および機能性を高く維持したまま冷凍保存/解凍することを目的とし、37℃のウォーターバスで解凍する従来法と比較して大容量の iPS 細胞の冷凍保存に成功した。さらに、バイオリアクターを用いた大量培養法によって作製された iPS 細胞の細胞凝集塊をナノ・ヒーティングによって冷凍保存することに成功した。

研究テーマ C) 膵島の冷凍保存/解凍技術の開発

移植可能な生体組織における凍結保存の戦略として、糖尿病の治療に有用なインスリンを分泌する膵臓内の内分泌組織である膵島を用いた検討を行った。大容量のマウス膵島の冷凍保存では、37℃のウォーターバスで解凍する従来法においてはほぼ全ての細胞が死滅したのに対して、ナノ・ヒーティング法では生存率が有意に高かったことから、マウス膵島の冷凍保存に成功したと考えられる。

研究テーマ D) 肝臓の冷凍保存/解凍技術の開発

臓器の凍結保存戦略として、肝臓を用いた検討を行った。血管を介して磁性ナノ粒子入りの細胞凍結保護液を還流することでラット肝臓に導入し、交流磁場を照射することで磁性ナノ粒子を発熱させたところ、解凍に十分に有効な発熱速度が得られた。それに伴い、肝細胞の生存率が向上することを確認した。

これらの結果から、iPS 細胞の大量冷凍保存技術を確認し、臓器・組織の冷凍保存技術に関してはナノ・ヒーティングの proof of concept を示す成果をあげたと考えられる。

(2) 詳細

研究テーマ A) ナノ・ヒーティングにおける凍結/解凍のスペクトル学的理解

磁性ナノ粒子の発熱量は、交流磁場の周波数および磁場強度に比例する。周波数可変型の交流磁場照射装置(図 1 左)を作製し、凍結保護液中での磁性ナノ粒子の発熱を調べたところ、周波数依存のかつ出力依存的に加温速度は増大し、さらに磁性ナノ粒子の濃度依存的に加温速度をコントロールできることが分かった(図 1 右)。

コイル
内径 52 mm, 全長 90 mm



発振可能周波数: 100 kHz, 150 kHz, 200 kHz
最大出力: 10 kW, 40 mT

$$P = \mu_0 \chi'' f H^2$$

P : 発熱量, μ_0 : 真空の透磁率,
 χ'' : 交流磁化率の虚部
 f : 交流磁場の周波数, H : 交流磁場の磁場強度

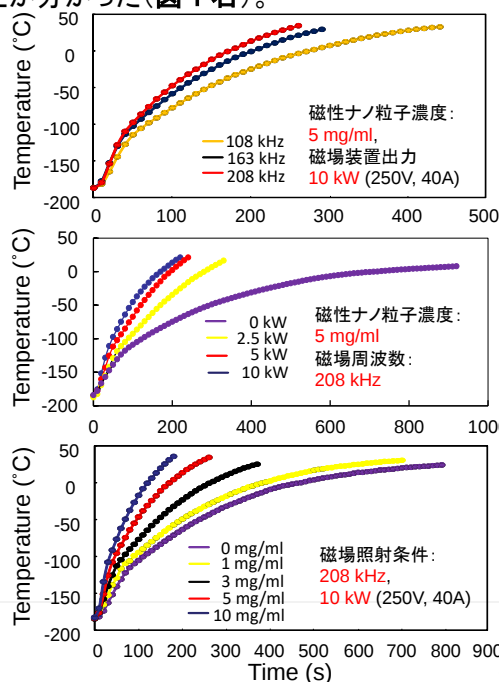
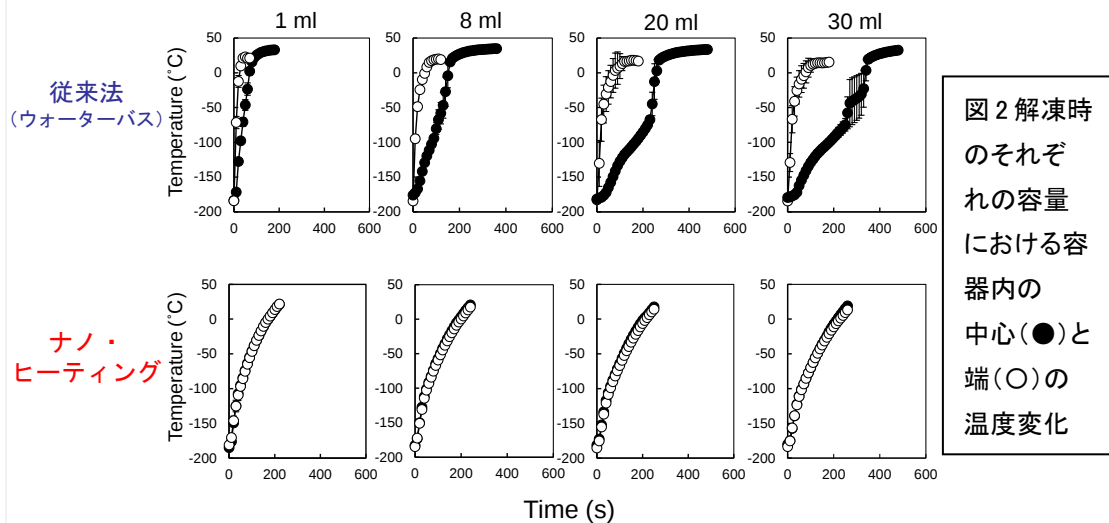


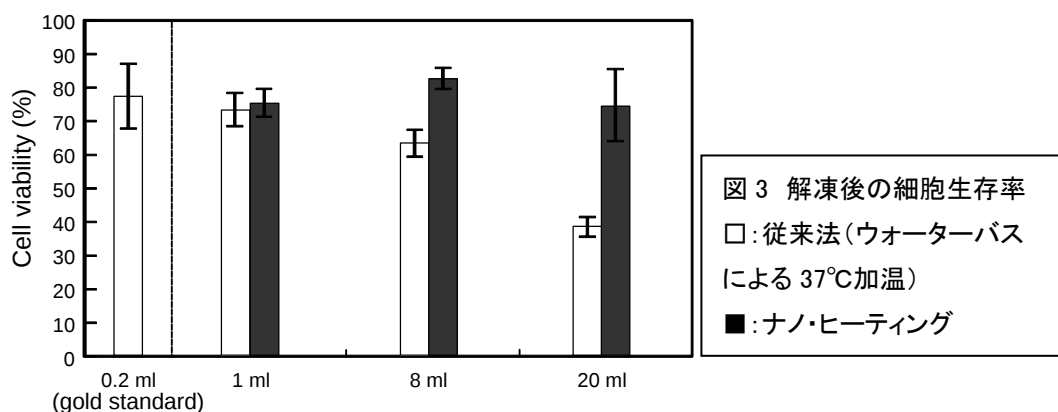
図 1 本研究で作製された交流磁場装置(左)と磁性ナノ粒子の発熱に伴う細胞凍結保護液の温度上昇(右)

また、ナノ・ヒーティングは大容量の細胞凍結保護液であっても、容器内を均一かつ容量非依存的に加温できることが分かり、スケールアップ可能な加温技術として有用であることを実証した(図2)。



研究テーマ B) ヒト iPS 細胞の冷凍保存/解凍技術の開発

ヒト iPS 細胞 (1×10^6 cells/mL) を用いて、磁性ナノ粒子を幹細胞用凍結保護液 (StemCell Keep) に分散させて交流磁場を照射したところ、磁性ナノ粒子 5 mg/mL を含むガラス化凍結細胞を 200 kHz, 10 kW で磁場照射することにより、サンプルの容量 (1 mL ~ 20 mL) に依存せずにガラス化凍結細胞を均一にかつ急速に加温することが可能であり、再結晶を誘導することなく解凍することに成功した。その結果、大容量であっても氷晶を形成させずに融解することに成功し、ヒト iPS 細胞を高い生存率(図3)および未分化性/多分化能を維持して凍結保存することに成功した。さらに、ヒト iPS 細胞をバイオリアクターで培養した際の大容量の細胞凝集塊のガラス化凍結保存も同様にナノ・ヒーティング法で高い生存率および未分化性/多分化能が達成された。この技術により、従来 0.2 mL の容量でしかガラス化凍結保存できなかったヒト iPS 細胞を、その 100 倍量である 20 mL (細胞数も 100 倍) で凍結保存することに成功した。



研究テーマ C) 膵島の冷凍保存/解凍技術の開発

移植可能な生体組織における冷凍保存/解凍の戦略として、糖尿病の治療に有用な直径 200 μ m ほどの細胞凝集組織である膵島をターゲットとした。動物実験に先立って、インスリン分泌細胞であるマウスインスリノーマ MIN6 細胞を膵島モデルとして使用し、磁性ナノ粒子 (5

mg/mL)が懸濁された細胞凍結保護液(VS55)に細胞を入れてガラス化凍結後、交流磁場照射(200 kHz, 10 kW)によるナノ・ヒーティングで解凍プロセスを行ったところ、高い生存率およびインスリン分泌能の維持を示した。さらに、マウスから膵島を単離し、ガラス化凍結後にナノ・ヒーティングを行った(図4)。従来法(ウォーターバスによる37℃加温)では容器中心の温度上昇が十分でなく(加温速度が、再結晶を抑制して解凍可能な加温速度である Critical Warming Rate を下回り)ほぼ全ての組織細胞が死滅したのに対し、ナノ・ヒーティングでは有意に細胞生存率が高く、20 mLの大容量においても、0.2 mL容量でウォーターバスにより急速解凍した対照群と同等の細胞生存率を示した。さらに、ナノ・ヒーティング後の細胞を糖尿病モデルマウスの腎皮膜内に移植したところ、血糖値を正常レベルまで減少した。

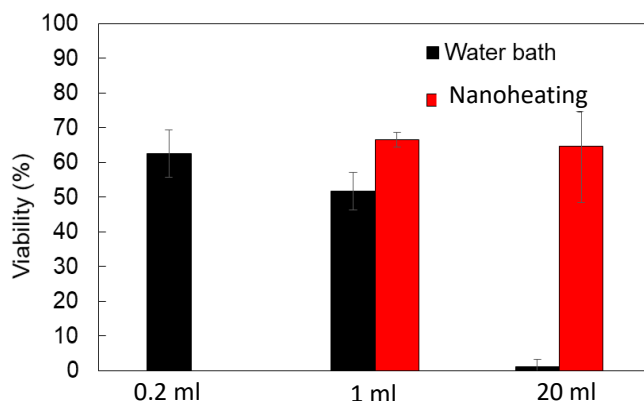


図4 解凍後の生存率
黒:従来法(ウォーターバスによる37℃加温)
赤:ナノ・ヒーティング

研究テーマD)肝臓の冷凍保存/解凍技術の開発

移植に有用な臓器における冷凍保存/解凍の戦略として、血管網が発達して血管透過性に優れた肝臓をターゲットとした。ラットを脱血し、さらに磁性ナノ粒子が入った凍結保護液(VS55)を血管に流して肝臓内に磁性ナノ粒子を導入したところ、数分の還流で肝臓全体に磁性ナノ粒子が充填された(図5上)。肝臓を外科切除して磁性ナノ粒子入りのVS55に浸して、液体窒素で凍結した後にナノ・ヒーティングを行ったところ、肝臓中心部の温度上昇速度がCritical Warming Rateを上回った。一方で、磁性ナノ粒子を還流せずにナノ・ヒーティングを行うと、肝臓中心部の温度上昇速度がCritical Warming Rateを下回った。さらに、ナノ・ヒーティングによって、アポトーシス細胞が減少し、肝細胞の生存率が向上することを確認した。

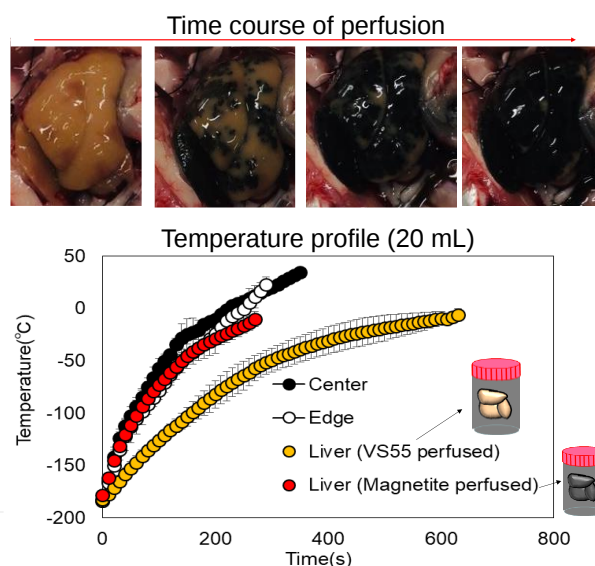


図5 肝臓におけるナノ・ヒーティング
上)ラット肝臓内への磁性ナノ粒子入り凍結保護液の還流
下)ナノ・ヒーティングにおける温度上昇プロファイル。
Center: 肝臓無し容器の中心温度
Edge: 肝臓無し容器の端温度
Liver (VS55 perfused): 肝臓有り・マグネタイト還流無しの中心温度
Liver (Magnetite perfused): 肝臓有り・マグネタイト還流有りの中心温度

3. 今後の展開

本研究では、Critical Warming Rate を超える加温が 1～30 mL 容量で達成され、ナノ・ヒーティングがスケールアップ可能なテクノロジーであることが示された。ナノ・ヒーティングをさらにスケールアップするには、より大きな誘導加温コイルが必要になる。以前、我々はがん温熱療法用に直径 30cm のコイルを開発した。30cm コイルでは、360kHz での渦電流損失によりアガロースゲルファントムの非特異的加熱が発生したが、交流磁場照射の周波数を 100～200kHz に下げることとで非特異的発熱を低減し、磁性ナノ粒子を特異的に加温することに成功した。このことから、ナノ・ヒーティング自体は大容量にも対応可能だと考えられる。しかしながら、Critical Cooling Rate を達成することは、大容量サンプルのガラス化にとって困難な可能性がある。大まかな計算では、半径 2cm 以下のガラスバイアル中の凍結保護液では、液体窒素への含浸で 4.9°C/min 以上の Critical Cooling Rate を達成できる。したがって、液体窒素含浸法では 4cm 以下の試料で適応可能だと考えられる。本研究ではガラスバイアルを使用した。熱伝導率が高くないことが知られている。ほとんどの金属は交流磁場で熱を発生するため、ナノ・ヒーティングには使用できないが、酸化アルミニウムなどの比較的高い熱伝導率の容器の使用が今後考えられる。さらに、液体窒素含浸法ではなく、臓器の血管を介した還流法を冷却に利用した新しい凍結法の開発が、大きな臓器の保存には必要となってくるだろう。また、伝熱工学の専門家の知見を取り入れて、凍結保存システム全体の改善を行っていくことが必要である。

ナノ・ヒーティングの実用化においては、磁性ナノ粒子を分離するためのダウンストリームのプロセス開発が重要になってくる。基礎研究において、磁気分離で大部分は分離可能であり、かつ磁性ナノ粒子の細胞毒性は見られなかったが、臨床研究で使用するためには残留した磁性ナノ粒子の安全性の確認(安全性試験)が必須となる。

臓器へのナノ・ヒーティングとして肝臓を調べたが、基礎研究としてさらなる検討が必要になってくるだろう。特に凍結保存後に生存率のみならず肝機能がきちんと保たれているかを調べることは、肝移植において非常に重要になってくる。肝機能は多岐にわたるが、臨床医との共同研究等で移植に資する肝機能レベルが保たれているかを検討することや、ブタなどの中動物を用いた移植実験を行って有効性を調べていく必要がある。

4. 自己評価

iPS 細胞を用いた再生医療は日本の科学技術イノベーションを担う研究領域であり、iPS 細胞の凍結保存技術は再生医療の実現における重要課題だと考えられる。本研究で開発された iPS 細胞の凍結保存におけるナノ・ヒーティングは、日本の先導する iPS 細胞研究の一環と認められて JST から特許出願されており、さらに国際誌にオープンアクセス可能な論文として掲載された意義は大きいと考えている。組織や臓器の凍結保存におけるナノ・ヒーティングの研究は未だ完成されていないが、本研究において proof of concept は示されたと考えている。臓器や組織の凍結保存が技術的に可能になれば、世界的に年間数百万人もの患者の健康を改善したり、命を救ったりすることができると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Ito Akira, Yoshioka Kantaro, Masumoto Shinya, Sato Keiichiro, Hatae Yuki, Nakai Tomoki, Yamazaki Takashi, Takahashi Masazumi, Tanoue Shota, Horie Masanobu. Magnetic heating of nanoparticles as a scalable cryopreservation technology for human induced pluripotent stem cells. Scientific Reports. 2020, 10(1):13605.

doi: 10.1038/s41598-020-70707-6.

iPS 細胞の凍結保存はガラス化法で行われるが、容量が大きくなると溶かす時に容器中心部の加温速度が遅くなることから、氷晶が形成して凍結細胞が死んでしまう。そこで、凍結保護液に磁性ナノ粒子を分散させて、液体窒素に浸漬することで凍結し、解凍時は交流磁場照射によって磁性ナノ粒子を発熱させることで急速かつ均一に加温する方法を開発した。その結果、大きな容量であっても氷晶を形成させずに凍結保護液を融解することに成功し、iPS 細胞を高い生存率で凍結保存することに成功した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

・化学工学会第 51 回秋季大会 2020.9.24-26 オンライン開催

井藤 彰「磁性ナノテクノロジーによるヒト iPS 細胞の凍結保存」

中井友規・金子真大・堀江正信・井藤 彰「磁性ナノ粒子を用いた生体組織の凍結保存」