

## 生体の凍結保存に関する研究

Cryopreservation of Living Organs

棚 沢 一 郎\*・永 田 真 一\*・木 村 直 宏\*  
Ichiro TANASAWA, Shin-ichi NAGATA and Naohiro KIMURA

## 1. 研究の意義

生物のからだ全体,あるいは一部の器官や組織などを,生命機能をまったく損わずに長時間にわたり保存する技術の確立は,バイオエンジニアリングにおけるもっとも重要かつ興味ある課題の一つである。特に,最近話題となっている臓器移植に関して言えば,その普及が遅れている理由の一つは,需要と供給の時間的・空間的なアンバランスであるが,もし提供者から摘出された臓器の長時間保存が可能になった暁には,大きな障害の一つが取り除かれることになる。

生物の器官や組織の保存には,いろいろな方法が試みられているが,期間が長期にわたる場合には,極低温での凍結保存(cryopreservation)がもっとも有望であると考えられている。周知のとおり,極低温では生体組織の代謝活動は停止し,凍結前の状態を半永久的に維持することも原理的には可能なはずである。実際,バクテリア類,精子,卵細胞,受精卵,赤血球,骨髄,角膜あるいは皮膚などの凍結保存技術はすでにある程度確立している。しかし,これらはいずれも単細胞あるいは単純な形態・構成をもった組織であって,もっとスケールの大きいもの,あるいは複雑な構造をもつ生体についての凍結保存技術はまだ確立していない。

筆者らは,生体組織の凍結保存技術に関する基礎的知見の拡大を目的として,各種の生命維持器官を備え,かなり複雑な構成をもった微小生物であるミジンコ(daphnia)を用いて凍結保存実験を行いある程度の成果を得ている。さらに,この実験で得られた知見を応用して,動物の血管などの凍結保存実験を行いつつある。これが成功すれば,動物体内の何種類かの組織の凍結保存が可能になるものと考えられる。本報では,これらの実験のうち,主としてすでに成果が得られているミジンコの凍結保存実験の結果について述べることにするが,その前に凍結保存を成功させるのに必要ないくつかの制

\*東京大学生産技術研究所 第2部

御パラメータについて説明しておきたい。

## 2. 最適冷却速度

生体組織を冷却し凍結させる場合,組織を構成している細胞の内外で起こる現象は,冷却速度によって大きく変化する。おおざっぱに言って,凍結保存を可能とする冷却速度は二つある。図1はそれを定性的に示したもので,横軸には冷却速度,縦軸には生存率がとってある。この図によれば,B点およびD点で生存率が高い値となっているが,そこで生ずる現象は次のようである。

まずD点に相当する冷却速度では,細胞内外の水は瞬間的に凍結し,結晶構造が認められないアモルファス相に近い状態で固化(ガラス化,vitrification)する。この場合には細胞は損傷を受けない。

一方,細胞の集合体である組織を比較的ゆっくりと冷却していくと,細胞の外部にある水溶液がまず凍結してそこに結晶ができる。さらに冷却を続けると,細胞膜の内外の浸透圧の差により細胞内の水の一部が外部に移動し,細胞外の氷晶の表面で凍結する。これを細胞外凍結(extracellular freezing)といい,図1のB点はこれに対応する。細胞外凍結では,細胞内の水分が外部に浸出するために,細胞自体は収縮するが,同時に細胞内電解質が濃縮されて,細胞膜に障害(塩害)を生ずる可能性がある。また,細胞膜の収縮および外部で成長する氷晶による物理的な力に起因する損傷も考えられる。これらの障害(凍害)を防ぐには,最適な冷却速度を知るとともに,後に述べるように障害を防止するための物質(凍害防御剤,cryoprotectant)の選定と適切な使用が必要である。逆に冷却速度をガラス化に至らない程度に速くすると,細胞膜を通しての水の移動が間に合わず,脱水が十分に起こる前に細胞内で氷晶が生成する。このような細胞内凍結(intracellular freezing)が生じると,氷晶により細胞膜が損傷を受けやすい。

これまでの報告によれば,ヒトのリンパ球,骨髄などを毎分0.1~10°Cの速さで細胞外凍結させた場合,50~

研 究 速 報

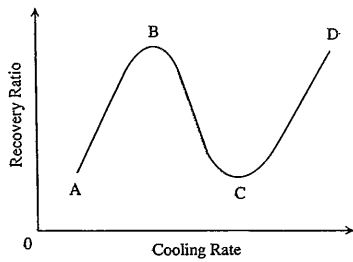


図1 凍結保存における冷却速度と生存率の定性的な関係

100%の生存率が得られ、また赤血球を毎分1000°C以上の速度で急速凍結させた場合100%に近い生存率が得られている。しかし、どのような細胞についてどのような凍結速度が最適であるのか、すなわち図1に示したような生存率 vs. 冷却速度曲線の実際の形がどのようになるかについては、ごく少数の対象についてしか知られていない。

3. 最適融解速度

凍結保存した組織を加熱融解して復活させる過程についても当然伝熱学的な配慮が必要である。この場合の問題は二つある。一つは、再結晶により生成する大きな氷片による損傷、もう一つは細胞内への急速な水の浸入によるショックである。前者は急速凍結（ガラス化）の場合、後者は低速冷却による細胞外凍結の場合に生じやすいと考えられている。

凍結のプロセスのみを考えれば、冷却速度をできるだけ大きくして（もっとも、これについては対象組織のスケールと伝熱速度上の制約があるが）、いわゆるガラス化が起こるようにすればよい。しかし、凍結時の氷晶の肥大化を防止することはかなり難しい。これらの問題に対処するには、対象とする組織それぞれに適した融解速度を知り、それを実現するような制御が必要である。

4. 凍害防御剤

前述のように、細胞の凍結に伴う障害を凍害と呼び、凍害を防止（あるいは緩和）するために用いられる物質を凍害防御剤という。1948年に C. Polge が実験中に誤ってグリセリンを保存液として用い、これが試料の凍結保存の状態を著しく改善することを発見して以来、多くの物質が凍害防御剤として用いられるようになった。

凍害防御剤には、細胞膜透過型と細胞膜非透過型の2種類があり、後者は前者よりも分子量が大きい物質からなっている。

凍害防御剤の作用のメカニズムについては、さまざま

な説明がなされているが、正確なことは判っていないのが現状である。また、細胞の種類ごとに有効な物質の種類や濃度が異なっている上に、このような物質の多くは、多かれ少なかれ細胞の対する毒性をも併せもっているので使用に際しては注意が必要となる。

現在、生体組織の凍結保存に用いられている代表的な凍害防御剤は、グリセリンおよびジメチルスルフォキシド（DMSO）である。両者ともに比較的分子量の小さい細胞膜透過型の物質である。これらの物質が細胞内に入り込むことによって、細胞内に形成される氷晶の成長が抑制され、また水和水の脱水に伴うタンパク質の変性を防ぐ効果が生ずるといわれている。

筆者らは、グリセリン、DMSO、トレハロースなどの水溶液をそれぞれ単独にあるいは混合して凍害防御剤として用いている。

5. ミジンコの凍結保存実験

5-1. ミジンコについて

図2はミジンコの構造を示したものである<sup>1)</sup>。ミジンコは、日本各地の池や沼に棲息する甲殻綱さい脚亜綱（えらの働きをする足をもつ生物）に属し、主として藻類を食用とする。体長は1～3mmであるが、体内外に諸種の器官・組織を持ち、複雑な構造をしている。

筆者らがミジンコを実験試料として選んだ理由は、体長が比較的小さいこと、単細胞生物に較べて身体組織構成が複雑であること、生死の判別が容易であること（透明なので心臓の鼓動が観察できる）、繁殖力が大きく飼育が簡単であることなどである。

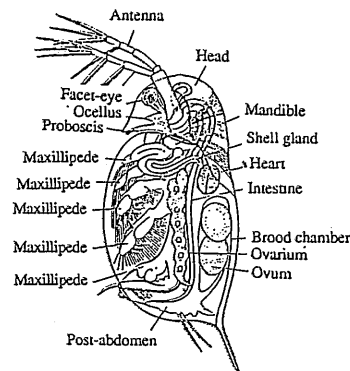
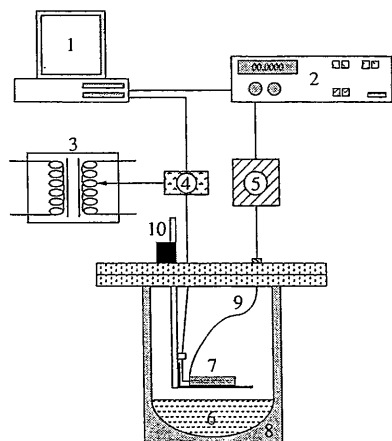


図2 ミジンコの構造

5-2. 実験の装置と方法

図3に実験装置の概略を示す。これは液体窒素を冷却剤として用いた一種の小型プログラム・フリーザで、試



1:Personal Computer    6:Liquid Nitrogen  
 2:Digital Voltmeter    7:Control Vessel  
 3:Transformer            8:Dewar Flask  
 4:Switch                  9:Thermocouple  
 5:Cold Junction         10:Sliding Guide

図 3 実験装置

験体の温度変化をきわめて精度よく制御できるようになっている。底のほうに液体窒素を溜めたデュワー瓶⑧の中にミジンコを入れる容器⑦を置き、その温度および温度変化をパーソナル・コンピュータ①によって自由に制御できるようになっている。最低到達温度は、容器を液体窒素のプール⑥中に浸漬することにより $-196^{\circ}\text{C}$ となる。

ミジンコにはあらかじめ凍害防御剤としてグリセリンを吸収させておけるが、本実験ではその濃度を0~20%の範囲とした。このようなミジンコの数十個体をグリセリン水溶液10mlとともにコントロール容器に入れ、まず $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度で氷点まで冷却し、続いて種々の冷却速度( $0.1\sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )で $-35^{\circ}\text{C}$ まで冷却した。途中 $-2\sim 3^{\circ}\text{C}$ で植氷を行った。 $-35^{\circ}\text{C}$ 到達後は液体窒素中に投入して保存した。

融解はほとんどの場合 $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の加熱速度で行った。解凍終了後、氷点近くの温度で保存し、顕微鏡下で生存数を数えた。触覚、肢、心臓のいずれかが働いているものを生存と判定した。

5-3. 実験結果

図4に実験結果を示す。この実験では、ミジンコに凍害防御剤(グリセリン)を吸収させる時間を1時間に限定している。

この結果では、グリセリン濃度が15%の場合の生存率が高く、10%のものがそれに次いでいる。また、 $0.1\sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度の全範囲にわたって高い生存率を示している。

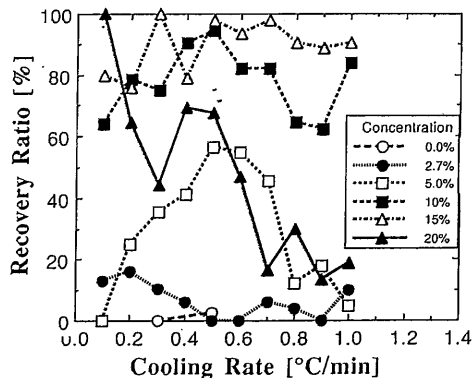


図 4 ミジンコの凍結保存実験の結果

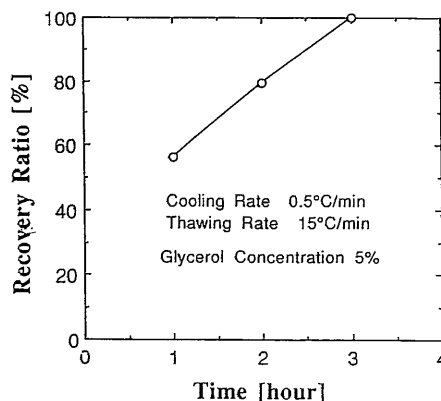


図 5 5%グリセリン水溶液による実験結果

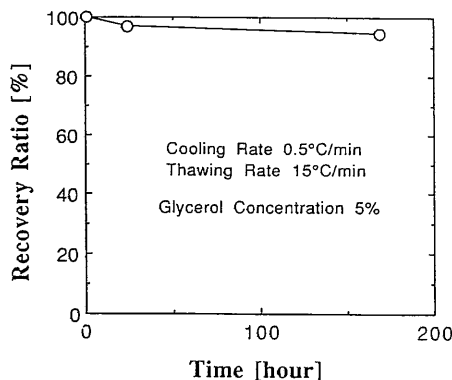


図 6 液体窒素中での凍結保存時間による生存率の変化

これに対して、グリセリン濃度20%での結果は冷却速度の増大とともに右下りに低下しており、高濃度溶液が必ずしも有効でないことを示している。また、5%溶液では冷却速度が $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のところ極大値が現われて

研 究 速 報

グリセリンといえども、生体に対して何らかの害毒を及ぼすと考えられるところから、低濃度（5%）の溶液を用いた実験を別に行った。図5はその結果の一例で冷却速度は0.5°C/minである。横軸には凍結前に室温状態でグリセリンを吸収させる時間ととってある。この結果によれば、低濃度グリセリン溶液を用いる場合には、吸収時間を十分にとる必要があることがわかる。

図6は、溶体窒素中での凍結保存時間と生存率の関係を示したものである。最長保存時間は7日間であるが、この間に著しい生存率の低下はないことがわかる。

#### 5-4. 解凍蘇生後の問題

前述のように、本実験では液体窒素温度である時間凍結保存したミジンコを解凍し、その時点で心臓・手足などの運動の有無により生死を判定し、生存率を求めた。しかし、こうして生存したミジンコについて引き続き観察を続けたところ、それらは解凍後平均して約4時間で死滅することがわかった。

筆者らは、最初その原因は体内に吸収されているグリセリンの毒性によるものと考え、低濃度溶液の使用および解凍後の除去（あるいは希釈）を試みたが、一方顕微鏡による観察の結果、死因はミジンコの身体組織の一部の破壊にあることがほぼ確実と思われるようになった。

その後筆者らは、凍結条件に改良を加えることによって若干の進展を得ている。たとえば、凍結防御剤として

グリセリン、ジメチルスルフォキシドおよびトレハロースの混合物を用いることにより、解凍蘇生後の生存期間を3~4日まで延長することに成功している。ミジンコの寿命から考えて、これはかなり有望な結果と言えるが、最終的には蘇生したミジンコが次の世代のミジンコを産み落とすところまでいって初めて100%の成功と言っているのではないかと思う。この意味ではミジンコの凍結保存技術は未完成である。

#### 6. ま と め

多細胞で複雑な構造をもつ微小生体を対象にした凍結保存技術の確立を目指して、ミジンコを用いた実験を行った。凍害防御剤として10~15%のグリセリン水溶液を用い、-35°Cまでの冷却速度を0.2~1.0°C/minとして凍結を行い、液体窒素中に保存した後に15°C/minの速度で加熱解凍したところ、きわめて高い蘇生率を得た。

この研究の結果のうちで重要な点の一つは、最適冷却速度がある幅を持っているということである。これにより、寸法が大きく多様な細胞組織からなる生体組織の凍結保存の可能性が高まることになる。

(1992年6月29日受理)

#### 参 考 文 献

- 1) 水野：「淡水プランクトン学入門」東海大学出版会（1986）。