

機械システム調査開発  
25-D-2

高速凍結技術の医療応用への可能性の  
検討に関する調査開発  
報 告 書

平成26年3月

一般財団法人 機械システム振興協会  
委託先 特定非営利活動法人 ECML21

## 序

我が国経済は、世界経済の減速、長期のデフレ、エネルギー供給制約のなか、消費と投資の低迷、労働生産性の伸び悩みという厳しい環境にあり、震災地域の復旧・復興の対応も引き続き求められています。加えて、新興諸国の進出や海外市場におけるグローバルな競争の激化により、海外需要獲得の道のりも平坦ではない状況です。こうした中、現在、成長戦略に沿ってデフレ経済から成長経済への移行を目指す様々な試みがされていますが、この動きをより確実なものにするには、社会変革を実現する新たな機械システムの実現が重要な鍵となっています。

一般財団法人機械システム振興協会では、このような社会情勢に対応し、各方面の要請に応えるため、長年培ってきた多様な技術革新の芽を育てるための経験を生かし、新たな技術・システムの社会への導入を図るための機械システムに関する調査開発事業を実施しております。また、当協会に機械システム開発委員会（委員長：政策研究大学院大学名誉教授 藤正 巖氏）を設置し、同委員会のご指導・ご助言のもと、これらを効果的に推進しています。

この「高速凍結技術の医療応用への可能性の検討に関する調査開発」は、上記事業の一環として、特定非営利活動法人ECML21に委託して実施した成果であり、関係諸分野における機械システム振興が展開されていくうえで、本調査開発の成果が一つの礎石として皆様方のお役に立てれば幸いです。

平成26年3月

一般財団法人機械システム振興協会

## はじめに

「高速凍結技術の医療応用への可能性の検討に関する調査開発委員会」は、一般財団法人機械システム振興協会様のご高配、そして特定非営利活動法人ECML21のご尽力で平成24年10月31日より発足し、同年度には医療面における冷凍、保存、解凍技術に関する研究開発の可能性を推定する作業を行った。本委員会はそれを踏まえて、平成25年度に一連の実証実験を行ったが、その研究成果をまとめたのが本成果報告書である。平成25年度は、平成25年7月4日、8月5日、10月30日、平成26年1月28日と4回の委員会を開催した。取り上げられた話題は、血液冷凍保存への応用、病理検査やバイオバンク分野への応用、外科手術やホモグラフト分野への応用、脳疾患分野への応用などであった。具体的には、以下のような研究成果をまとめることができた。

### 1. 高速凍結技術の医療応用に向けた実証実験

#### (1) 血液分野

①小規模医療機関での応用を想定した血液分野検証実験 血液成分である赤血球とヒト単核球（リンパ球）と培養細胞株の溶解後の形態学的な差、または生存率について気槽式冷凍庫と比較検証を行った。赤血球に関しては有意差は見受けられなかったが、リンパ球及び培養細胞株においては統計学的な有意差はなかったもののエタノール式凍結法でも良好な数値が得られた。

②輸血用血液製剤と血液分野における応用可能性検証実験 エタノール式凍結法で血漿製剤及び冷凍赤血球を凍結し、凍結時間と製剤品質について従来の気槽式凍結装置と比較した。どちらの製剤も従来の凍結方法に比べて凍結時間が短く、製剤の品質向上の可能性が確認できた。

③血液学・免疫学的分野への応用可能性検証実験 エタノール式凍結法は、マウス脾臓細胞の凍結や凍結後の細胞表面抗原の解析には必ずしも適さず、RNAの安定性は従来凍結法と同程度であるが、凍結融解に弱い細胞の保存などで優れている可

能性が考えられる。

## (2) ホモグラフト分野

ホモグラフト分野における応用可能性検証実験及び物理特性評価方法の開発 ヤギの大動脈血管壁を用い、非凍結、エタノール式凍結法、液体窒素、空冷式冷凍庫の4群で脱水率、引っ張り応力、各種弾性率等のパラメータについて総合的な評価検証を行った。ほぼ全ての数値においてエタノール式凍結法は良好な数値を示した。高速凍結技術の精密な物性評価という世界でも初めての報告をすることができた。

## (3) バイオバンク及び神経内科分野（ブレインバンク）を含む病理分野

①バイオバンクにおける応用可能性検証実験 エタノール式凍結法と液体窒素による方法とで凍結される資料の質に差異があるかをRNA integrity を指標に脳腫瘍試料3例、腎腫瘍試料3例を用いて検討したところ、2つの凍結方法の間で差はみられなかった。

②神経内科分野における応用可能性検証実験 エタノール式凍結法をはじめとする複数の凍結法による筋組織の形態を観察した。この結果、液体窒素またはエタノール式高速凍結機器で冷却したイソペンタン内で筋組織を攪拌しながら凍結した場合に最も良好な形態保持が得られた。

③術中迅速診断及び分子病理学的診断における応用可能性検証実験 エタノール式凍結法を用いた新凍結技術が病院における病理学的検索に有用か検討した。新凍結法では大きなひび割れ、裂け目が起きにくく、核の染色性が良い傾向が認められた。今後解凍方法についても検討する必要がある。

④病院の日常的病理診断における応用可能性検証実験 切片作成方法の中で凍結部分のみをエタノール式凍結法に替え比較実験を行った。エタノール式凍結法で使用した装置は、従来機（ $-70^{\circ}\text{C}$ ）に比し高温（ $-20^{\circ}\text{C}$ 以上）であったためか、非劣性を十分に示せない点もみられたが、抗原性の保持、微細構造は良好であった。

## 2. 保存、解凍技術に関する基礎調査研究

伝熱工学を観点としたエタノール式高速凍結装置の技術的向上可能性と効果的な解凍技術 エタノールを冷媒とした方法は伝熱工学の観点からも利に適っており、さらに流体を攪拌することで伝熱効果を高めることが可能である。解凍技術についても同様のことがいえ、さらに電磁波の応用も効果的であろう。

## 3. 高速凍結技術の医療応用研究ネットワークの構築 新たな分野における応用可

能性を目指し、バイオ関係企業及び製薬関係企業とのネットワークを構築中である。

**4. 高速凍結技術及び解凍技術について実証実験結果データベースの構築** 各医療分野の検証データ及び本調査開発に係る各種資料について網羅的に集約するためのデータベースのprotocolsを構築した。Web 上で展開するため、迅速に情報を更新でき、またSSL通信、IDとパスワード認証、コンテンツのダウンロード不可によってデータ流出に対応している。

本委員会に対しては、医療分野における凍結技術の応用という全く新たな分野といっても過言でないパイオニア的な領域に大きな期待が寄せられているが、1年間という短い期間に、これだけの成果をあげることができたのは、ひとえに委員各位の絶大な熱意と尽力のたまものである。「平成25年度 高速凍結技術の医療応用への可能性の検討に関する調査開発成果報告書」を発行するにあたり、各委員、一般財団法人機械システム振興協会ならびに特定非営利活動法人ECML21事務局のスタッフに対して心からの謝辞を表すものである。本委員会は今後も新たな社会貢献と産業支援の形態を視野に置いた研究を推進する所存である。

平成26年3月

高速凍結技術の医療応用への可能性の検討に関する調査開発委員会  
委員長 黒岩 義之

# 目 次

序

はじめに

1. 調査開発の目的	1
2. 調査開発の実施体制	2
3. 調査開発の内容	5

## 【本 編】

4. 調査開発の成果	11
第1章 エタノール式凍結法の実証に用いた凍結機について	11
1-1 実証に用いた2種類の凍結機	11
1-1-1 フリーザー型気槽式凍結機	11
1-1-2 液槽を直接冷却する凍結機	11
1-2 伝熱工学を観点としたエタノール式凍結技術の技術的向上可能性 と効果的な解凍技術	13
1-2-1 伝熱のメカニズム	13
1-2-2 エタノールを用いた凍結技術	15
1-2-3 解凍技術	18
1-2-4 過冷却による非凍結冷却保存技術	19
第2章 各医学分野におけるエタノール式凍結技術の応用可能性検 証実験	21



2-1-2-5	解凍技術の現状と期待	37
2-1-2-6	おわりに	38
2-1-3	血液学・免疫学的分野への応用可能性検証実験	39
2-1-3-1	実験の目的	39
2-1-3-2	実験内容	40
2-1-3-3	実験結果	40
2-1-3-4	考察	45
2-2	病理分野	46
2-2-1	病院の日常的病理診断における応用可能性検証実験	
凍結装置間の比較	凍結実証実験成果報告と期待	46
2-2-1-1	凍結切片作成法（帝京大学医学部附属溝口病院の現況：アセトンを用いた従来法）	46
2-2-1-2	エタノール式凍結機を用いた比較実験	47
2-2-1-2-1	材料	47
2-2-1-2-2	方法	47
2-2-1-2-3	免疫組織化学	48
2-2-1-2-4	電子顕微鏡観察（透過型電子顕微鏡）	48
2-2-1-2-5	評価法	49
2-2-1-2-6	結果	49
2-2-1-2-6-1	切片評価	49
2-2-1-2-6-2	免疫組織化学評価	50
2-2-1-2-6-3	透過型電子顕微鏡評価	51
2-2-1-3	まとめ、今後の展望	51
2-2-2	術中迅速診断及び分子病理学的診断における応用可能性検証実験	53
2-2-2-1	従来までの凍結方法による術中迅速診断、免疫組織化学	53
2-2-2-1-1	ドライアイス・アセトン法	53
2-2-2-1-2	液体窒素法	53
2-2-2-1-3	液体窒素・メチルブタン法	53

2-2-2-2	従来法とエタノール式凍結法の比較	54
2-2-2-2-1	目的	54
2-2-2-2-2	材料と方法	54
2-2-2-2-3	結果と考察	55
2-2-2-2-3-1	結果 1	55
2-2-2-2-3-2	結果 2	55
2-2-2-2-3-2-1	症例 1	56
2-2-2-2-3-2-2	症例 2	56
2-2-2-2-3-2-3	症例 3	57
2-2-2-2-3-2-4	症例 4	57
2-2-2-2-3-2-5	症例 5	58
2-2-2-2-3-3	結果 3	58
2-2-2-2-3-3-1	症例 6	58
2-2-2-3	解凍技術の病理検査への応用について	59
2-2-3	バイオバンクにおける応用可能性検証実験	60
2-2-3-1	バイオバンクとは	60
2-2-3-2	エタノール式凍結法と液体窒素凍結法の比較	60
2-2-3-2-1	結果	61
2-3	神経内科分野	63
2-3-1	神経内科及びブレインバンクとは	63
2-3-2	神経内科分野における凍結技術予備検証	64
2-3-3	神経内科分野におけるエタノール式凍結法の検証実験	65
2-3-4	検証結果	67
2-4	ホモグラフト分野	68
2-4-1	高速凍結の生体血管壁材料物性への影響	68
2-4-1-1	ホモグラフトとは	68
2-4-1-2	ホモグラフトの物理特性比較検証実験	69
2-4-1-2-1	脱水率	69
2-4-1-2-2	物理特性変化の定量的診断	70
2-4-2	ホモグラフト分野における凍結技術の今後の展望	73

第3章 解凍技術の基礎調査	75
3-1 解凍技術の必要性	75
3-2 解凍技術の現状	75
3-3 医療現場で求められる解凍技術	76
第4章 エタノール式凍結技術の実証実験に関するデータベースの プロトタイプ構築	78
4-1 データベースの目的	78
4-2 データベース基本ソフトウェア構成	78
4-3 特徴	78
4-4 基本機能とセキュリティ	79
4-4-1 セキュリティ	79
4-4-2 メンバー登録	79
4-5 データベースの構成	79
4-5-1 ログイン画面	79
4-5-2 メンバー登録画面	80
4-5-3 データベースのホーム画面	80
4-5-3-1 日程	81
4-5-3-2 委員会資料	81
4-5-3-3 研究テーマ別データ及び研究所の紹介	83
4-5-3-4 その他	83
4-6 データベースの今後	83
第5章 調査開発の成果（まとめ）	84
5. 調査開発の課題と今後の展開	90
執筆者リスト	95