

機械システム調査開発
24-D-5

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25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

わが国経済の安定成長への推進にあたり、機械情報産業は、世界経済の減速、長期間のデフレ、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事業環境にあるうえに、震災地域の復旧・復興の加速化を求められており、過酷な状況に置かれています。加えて、新興国の勃興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く、一層の厳しさを増しています。こうした中、社会生活における環境、防災、都市、住宅、福祉、教育等、直面する問題の解決を図るためには、先端設備投資等の促進やイノベーション基盤の強化、エネルギー制約克服のための省エネ・自家発電導入支援等に加えて、ますます多様化、高度化する社会的ニーズに適応する機械情報システムの研究開発が必要であります。

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、一般財団法人機械システム振興協会では、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。

これらを効果的に実施するために、当協会に機械システム開発委員会（委員長：東京大学名誉教授 藤正 巖氏）を設置し、同委員会のご指導・ご助言のもとに推進しております。

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ます。関係諸分野に関する施策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25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の御尽力で平成24年秋より発足した。ちなみにECMLとはエコ(Ecology)、コア・メディカル(Core Medical)、リンク(Link)の略称である。本委員会の平成24年度の目標としては、医療面における冷凍、保存、解凍技術に関する有用性の研究開発に関する可能性を推定し、見定めることにある。将来的には、その可能性について、産業、医療、工学研究者、公的組織がNPO活動を通して連携を図り、社会貢献と新たな産業支援の形態を視野においた研究を推進することにある。

これまでに2012年10月31日、12月11日、2013年1月29日と3回の委員会を開催することができた。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期待が寄せられている。初回の「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委員会」は、BS-TBS(BSチャンネル)による「未来への贈り物」の取材を受け、委員会風景や委員会後のインタビューなどが2012年11月24日22時に放映され、「医療分野における冷凍技術の必要性と課題」というユニークな話題が、社会的にも関心を呼ぶことになった。

これまでの3回の委員会では、株式会社テクニカンの山田社長が開発した高速凍結技術“TUST”の話題に端を発して、現状と課題、そして新しい高速凍結技術や解凍技術への期待に関して、さまざまな分野の専門家からの意見を聞き、委員全員で熱心な議論を交わすことができた。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、「血液冷凍保存の可能性」については、日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター長の南先生と横浜市立大学附属病院輸血部の上條准教授から、有限な医療資源である血液の有効利用に関して夢と実用性のある研究プロジェクトが提示された。「病理分野での可能性」については、横浜市立大学大学院医学研究科病理学の青木教授と大橋教授、帝京大学医学部附属溝口病院の川本教授から講演があり、「病院の日常的病理診断」、

「横浜市立大学先端医科学研究センターバイオバンク」、「基礎研究応用」など、幅広い病理分野のプロジェクトに関する重要な言及がなされた。その他、帝京大学外科の杉山教授から日本低温医療学会の最新情報及び外科領域における可能性、東北大学山家先生からホモグラフト領域における可能性、横浜市立大学大学院医学研究科神経内科学の田中教授から脳疾患分野における可能性について、それぞれ有益な話題が提供された。

「平成 24 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、さまざまな異分野からの有益な情報やご意見を惜しまず寄せていただいた各委員の御尽力に心からの謝辞を表すものである。

平成 25 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

1. 調査開発の目的

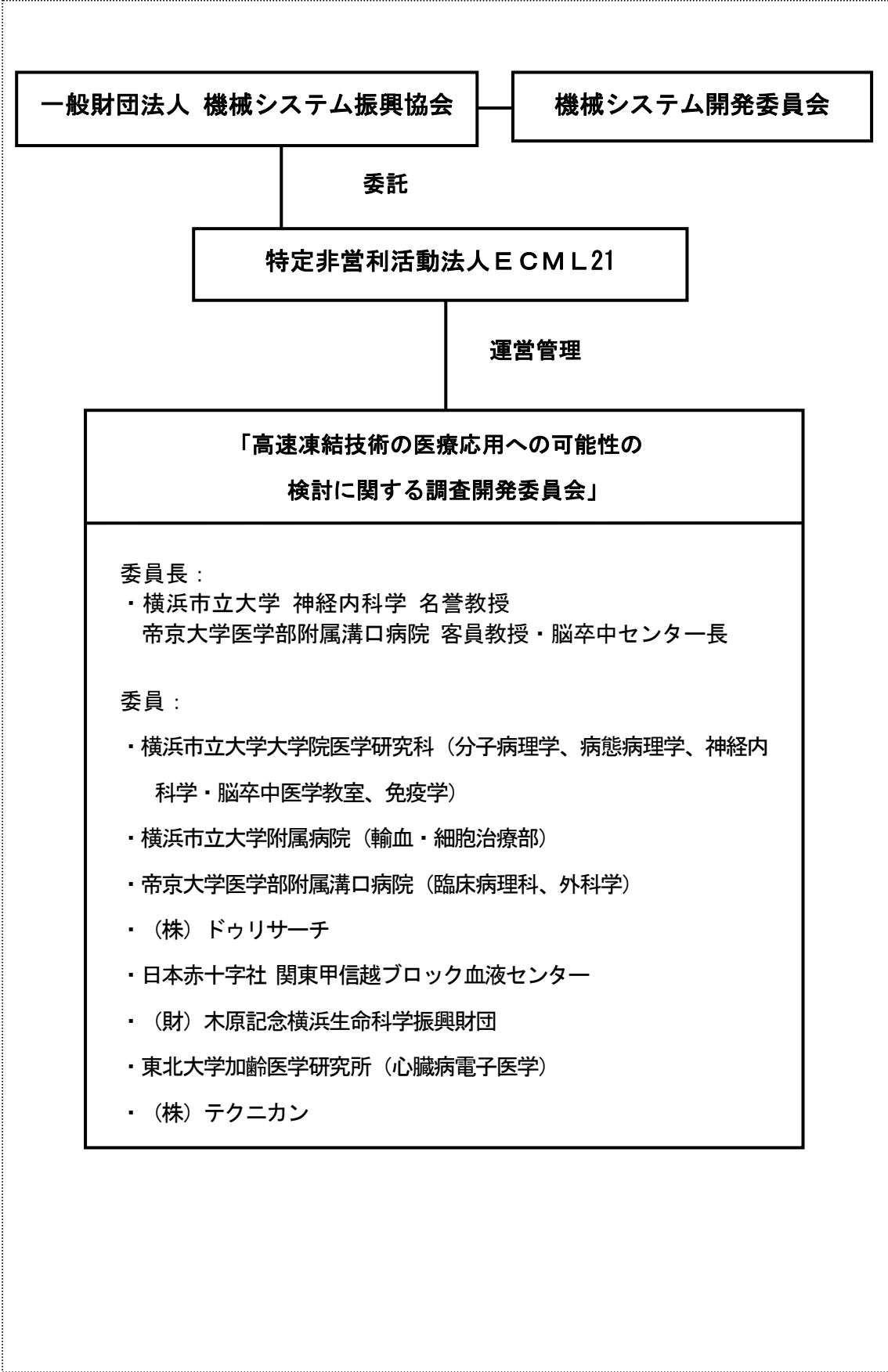
これまで100年近い歴史を持つ日本の冷凍技術は、特に食肉や鮮魚などの生鮮食品の保存において、保存期間の長期化さらに鮮度の維持と大きな進化を遂げ、まさに世界をリードする産業になりつつある。そのため、国内のみならず海外の主要国においても特許を取得し、国際競争力のある最新技術も誕生しており、特に、エチルアルコールを用いた高速凍結技術は、凍結する対象物を0℃から-80℃のエチルアルコールに浸すことで、通常の凍結スピードの10倍以上で急速凍結が可能となり、解凍も通常の5倍程度の速さで実現できるものである。この凍結法は、凍結時の結晶が通常の凍結よりも微細で細胞内の組織破壊を起こしにくく細胞生存率を高めることができることが特徴である。

一方、医療現場においては、その保存法として広く用いられるのは-196℃の液体窒素（以下、「LN₂」という。）凍結保存方法であるが、凍結による細胞破壊のため単細胞レベルでの使用が主であり、臓器などの生体レベルでの冷凍保存は難しい。また、LN₂の沸点温度が-196℃ということで非常に気化しやすいという特質があり、取扱いを誤れば窒息を招く恐れとともに、保管状況次第では気化した際に爆発を起こすなどの可能性もある。高いランニングコストも課題となっている。

そこで、本調査開発では、LN₂凍結保存方法に換わる新たな凍結保存技術として、“エチルアルコールを冷却媒体とした高速凍結保存技術”（以下、「エチルアルコール凍結保存技術」という。）の医療分野への応用の可能性の検討及びその有用性の検証を行う。

2. 調査開発の実施体制

本調査開発の実施については、（一財）機械システム振興協会内に「機械システム開発委員会」を設置し、また、特定非営利活動法人ECML21への委託事業として、ECML21内に医療関係者、医学系、工学系研究者、高速冷凍機器メーカーなどで構成される「高速凍結技術の医療応用への可能性検討調査開発委員会」を設置、その指導の基に調査開発を推進する。



機械システム調査開発委員会委員名簿

(順不同・敬称略)

委員長	東京大学 名誉教授	藤 正 巖
委 員	東洋大学 総合情報学部 教 授	大 場 善次郎
委 員	東京大学 工学系研究科 教授	佐久間 一 郎
委 員	東京工業大学大学院 総合理工学研究科 教授	廣 田 薫
委 員	芝浦工業大学大学院 工学マネジメント研究科 教 授	渡 辺 孝

「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」委員名簿

(委員/アドバイザー・敬称略)

委員長	横浜市立大学 名誉教授 帝京大学医学部附属溝口病院 神経内科学 客員教授・脳卒中センター長	黒岩 義之
委員	横浜市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授	青木 一郎
委員	横浜市立大学大学院医学研究科 病態病理学 教授	大橋 健一
委員	横浜市立大学附属病院 輸血・細胞治療部 部長・准教授	上條 亜紀
委員	帝京大学医学部附属溝口病院 臨床病理科 教授	川本 雅司
委員	帝京大学医学部附属溝口病院 外科学 教授	杉山 保幸
委員	横浜市立大学大学院医学研究科 神経内科学・脳卒中医学教室 教授	田中 章景
委員	横浜市立大学大学院医学研究科 免疫学教室 教授	田村 智彦
委員	(株) ドゥリサーチ研究所 代表取締役	西尾 治一
委員	日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター 所長	南 陸彦
委員	(財) 木原記念横浜生命科学振興財団 事業企画担当	三宅 善敬
委員	東北大学加齢医学研究所 心臓病電子医学 教授	山家 智之
委員	(株) テクニカン 代表取締役	山田 義夫
事務局	特定非営利活動法人ECML 2 1	後藤 貴徳
事務局	同上	大山 嘉則
事務局	同上	杉谷 弘文
事務局	同上	戸谷 尚三
事務局	同上	濱田 庄市
事務局	同上	三宅 義政
事務局	同上	村田 秀臣
事務局	同上	矢山 裕美
事務局	同上	君島 美智子
事務局	同上	杉谷 和弘

3. 調査開発の内容

1-1 エチルアルコールを用いた冷凍技術の医療分野への応用展開に関する調査

医療分野での生体保存とはいかなるものかを明確にし、その上で、エチルアルコール凍結保存技術の医療分野への応用展開の可能性について、コスト面だけでなく、現在用いられているLN₂凍結保存方法と比較し医学的な面での優位性（凍結時間・保存期間・解凍時の細胞生存率など）に関する調査を行う。

なお、エチルアルコール凍結技術としては、(株)テクニカンが保有する高速凍結技術「TUST」を用いる。

1-2 凍結対象物の調査検討

高速凍結は凍結する対象物によって適正凍結温度が異なるため、以下の分類毎に冷凍・保存法の確立を目標として分析・調査を実施する。

1-2-1 各血液成分保存分野

現状、赤血球、全血、血小板については凍結保存法が確立されていない。赤血球と血小板の有効期限切れのものに関しては有効な再利用法がなく廃棄されるのみである。一方、凍結方法がある臍帯血や自己輸血に関しては保存期間の延長を目指す。表1-2-1-1に、現状の血液保存法と課題を示す。

表 1-2-1-1 現状の血液保存法と課題

保存成分	現在の有効期間	現在の保存温度	保存の問題点	期待する効果
赤血球(赤血球LR)	採血後21日	2～6℃	遠心分離機などの設備が必要である。	凍結による保存期間の延長
全血	採血後21日	2～6℃	赤血球・血小板・血漿分離保存が一般的である。	凍結による保存期間の延長
血小板	採血後4日	20～24℃	分離設備が必要、また要振とうである。	凍結による保存期間の延長
血漿	採血後1年	-20℃以下		凍結による保存期間の延長
自己輸血(凍結)	最長10年	-20℃以下	大掛かりな設備が必要、取り扱いが複雑である。	

1-2-2 ホモグラフト分野

ホモグラフトは、皮膚、心臓弁、大血管、末梢血管、骨、靭帯、臍島、器官、気管支、網膜、羊膜、歯といった生体組織を冷凍保存したものを示す。現状、組織保存バンクにおいてLN₂冷凍方法による凍結保存が行われている。今回は、心臓弁、大血管を中心に、それぞれの部位に対してTUSTの適合性の調査を実施する。

1-2-3 病理分野

細胞・組織の検査を行う細胞診・生検組織診、手術中に検査を行う術中病理診断、手術で摘出された手術標本病理診断、死因や病因を調べるための病理解剖などがある。組織保存にはホルマリン漬けやLN₂冷凍方法(-80℃以下)が用いられているが、組織細胞の大きさの変化や形状の変化などのデメリットがある。急速凍結で、組織細胞の変化を押えることが可能になれば、遠隔地の患者でも専門の病理検査を受けることが可能になる。そこで、TUSTでの細胞の変化率について検証、応用展開の可能性について調査する。

1-2-4 受精卵分野

動物精子・受精卵の凍結保存は広く一般的に行われているが、豚などの受精卵は脂肪分が多く凍結の成功率は極めて低いままである。この分野で急速凍結の技術進歩は獣医学の進歩及び畜産業界の全体の発展へとつながる。そこで、TUSTを用いて凍結保存の成功率を上げることを目標に取り組む。

1-2-5 その他の分野

iPS細胞、DNA、ワクチン、抗がん剤など、バイオや製薬分野の保存技術への応用の可能性を検討する。とりわけバイオ分野においては、抗がん剤やワクチンの保存に冷凍保存の可能性に着目しており、製薬分野への展開が期待できる。

1-3 今後の展開の方向

本調査開発の初年度として、第2章で示す対象分野に対して行ったエチルアルコール凍結技術による分析・調査結果を以下の観点からとりまとめるとともに、各医療分野での適用可能性の有無、新たな冷凍保存手法及び各技術開発要素の整理、実用化の

ための環境整備などを検討し、今後の調査開発の方向を示す。

- エチルアルコール凍結技術で対応可能であって、従来の冷凍保存方法でも対応可能な場合は、従来の冷凍保存方法との比較（利便性やコストなど）
- エチルアルコール凍結技術で対応可能であって、従来の冷凍保存方法では対応不能な場合は、実用化への課題の整理
- エチルアルコール凍結技術及び従来の冷凍保存方法ともに対応不能な場合は、技術的課題とその対応可能性の整理

上記に対する対応策の検討を行った。

4. 調査開発の成果（まとめ）

ここでは、平成 24 年度「高速凍結技術の医療分野応用への可能性への検討に関する調査開発」の成果を簡潔にまとめることにする。主な内容は次のとおりである。

1 高速凍結技術について

1-1 エチルアルコールを用いた高速凍結技術とは

液体凍結とは、冷やす温度の低さが凍結の質に繋がるという従来の冷凍に対する考え方を、液体のもつボリュウムカロリーに焦点を当て、温度ではなくスピードが最も重要であるという観点から開発に至った技術である。この液体凍結技術により、製品細胞の破壊を防ぐことによる高品質な凍結品の作成、物流の簡素化によるコスト削減、電力消費問題の改善などを実現することが可能となった。テクニカンの「凍眠シリーズ」とは製品をエチルアルコールに浸漬させて凍結する手法であり、「TUST」とは「凍眠」よりもさらに早いスピードでより精度の高い凍結品を創ることが可能な液体凍結装置である。今後医療分野においてこの凍結技術を活用する上での重要な課題は、凍結する部位に対する適切な温度帯を探すことである。この液体による高速凍結技術を用いて、医療分野における凍結技術の発展に役立てることを期待している。

2 各医療分野における凍結技術の現状と課題

2-1 血液

2-1-1 医療機関から見る血液凍結技術

ヒトをはじめとして生物がその生命活動を維持するために、血液は生物にとって必須の構成要素である。血液は単一の成分から構成されているのではなく、さまざまな成分からなる複合体である。おおまかに血漿成分（液体成分：約 50～60%）と、血球成分（固形成分：約 50～40%）の二つに大別される。主な機能は、細胞に必要な各種栄養素・成分を体中に届け、老廃物・不要物を回収すること、外部からの侵入・感染などに対して身体を防御することである。血液成分のごく一部は遺伝子組み換え技術の発達により、半人工的な生産が可能となった（特殊な凝固因子、造血因子）。血液成分のうち、血漿、赤血球の一部、造血幹細胞（臍帯血、末梢血幹細胞）などは現在も一時凍結、融解後に使用されてい

るが、本技術の開発により、さらに高品質、保存期間の延長が図れることが可能であれば、採取細胞数の減少によってドナーの負担を減らすことが可能となる。また合わせて融解方法、保管容器の開発も将来は課題となると考える。

2-1-2 血液製剤における凍結技術

輸血用血液製剤のうち、凍結を必要とする製剤は、血漿を凍結する「新鮮凍結血漿」と赤血球を凍結する「冷凍赤血球（中間製品）」がある。これらは塩化ビニル製のバッグに血液成分を入れて凍結する。各々の凍結条件は異なり、新鮮凍結血漿は -20°C 以下で凍結して有効期間は採血後1年間、冷凍赤血球は -65°C 以下で凍結して最長10年間保管する。凍結は、どちらも気槽式の凍結装置を使用するが、バッグ内の血液成分が凍るまでに時間がかかる。血液製剤は、血液成分の機能を可能な限り保つ必要があるが、保存とともに低下する。新鮮凍結血漿では、出血の予防や止血に必要な一部の凝固因子活性が重要であるが、それが低下する。冷凍赤血球では、解凍後の赤血球の溶血が著しい。これらが高速液体凍結技術によって軽減することができれば、輸血用血液製剤の品質を現在よりも向上できる可能性がある。また、製造作業の効率化を図れる可能性がある。

2-2 病理分野

2-2-1 病院の日常的病理診断における凍結技術

一般的な病理検査では、採取された検体を処理し、プレパラートに乗せ顕微鏡で観察する。その作り方は原則としてホルマリンで固定後にパラフィンで包埋する切片、通称FFPE切片である。一方、凍結切片は術中迅速を筆頭に、脂肪の存在確認のため、凍結切片が適する抗原局在の確認のため、及び筋肉組織の観察などに応用されている。FFPEは病理診断の基本となる品質を有しているが、作成までに数時間以上を必要とする。一方で凍結切片は検体採取から15分程度で診断を下すことが可能であるために手術中の術式変更などの重大局面で用いられている。ただし、品質はFFPEに劣り、誤診の一因ともなっている。凍結技術の改革によりFFPEに劣らない品質が得られれば、日常の病理診断は迅速さと正確さを手に入れられることができ、医療の進歩に大きく貢献することが期待される。

2-2-2 凍結技術を用いる病理検査

日常凍結技術を利用する病理学的検査としては、術中迅速診断、免疫組織化学、遺伝子検査などがある。術中迅速診断は手術中緊急な場合に癌などの腫瘍性疾患の確定診断、リンパ節転移の有無、切除断端などの判定、評価を行っている。免疫組織化学は通常はホルマリン固定、FFPE材料を用いて室温で行われているが、どうしても使用する抗体が未固定、凍結材料にしか反応しないものがある。代表的なものが腎生検、皮膚生検における免疫グロブリン、補体沈着の有無を見る検査（蛍光抗体法）である。また、悪性リンパ腫の診断において必要な細胞表面マーカーの検査においても抗体が凍結材料にしか反応しないものがある。遺伝子検査、研究分野においては主に研究試料の保管のために凍結技術が用いられる。凍結した組織から作成した組織標本において一番問題になるのは、細胞、組織の形態保持が通常病理診断に gold standard として用いられるホルマリン固定、FFPE材料に比べて著しく劣っている点である。

液体窒素と同様に瞬間凍結させる能力はあるが、亀裂が生じるほど温度が低すぎず、コストがかからない、扱いやすい技術が病理診断分野では求められている。

2-2-3 バイオバンクにおける凍結技術

バイオバンクは診療を通じて得られた患者試料を将来の研究のために保存・保管するシステムである。したがって、多様な研究に対応できる形で保存保管することが必要である。研究のために利用する試料の適切な保存・保管の基準というのはいまだ定まってない。液体窒素による急速凍結と -80°C 超低温槽での保存が一般的には最善と考えられているが、実際に検証された例は少ない。分子生物学的研究が現在の研究のトレンドであるのでDNA、RNAの解析に耐えうる事が最重要と見なされている。しかし、今後の研究のトレンドは予想困難で、蛋白レベルでの研究が主流となっていく可能性もある。また、形態学的観察との対応が重要になっていく可能性もある。ヒト試料を用いた研究では、実験動物を用いた研究とは異なり、実験のスケジュールに合わせて試料を用意することは不可能である。予め収集・保管しておく必要がある。それを考えるとき、高い品質を保ちつつ、もっとも汎用性の高い適切な保存様式・基準を追求していくことは極めて重要と考えられる。今後、その基準を急速凍結法の応用も含め、検討していきたい。

2-3 外科分野

悪性腫瘍に対して凍結・融解操作を加えると、腫瘍細胞が直接破壊されることに加えて、破壊された腫瘍細胞から遊出する物質が腫瘍抗原となり、担癌生体の抗腫瘍免疫機構を賦活して治療効果がもたらされる可能性もある。しかし、凍結・融解操作により得られるのは可溶性抗原であり、必ずしも望ましい免疫応答が惹起されるとは限らない。近年、凍結治療における免疫学的応答も含めた抗腫瘍機構が基礎的、臨床的に解明され、2010年には小径腎癌に対する冷凍凝固治療が保険診療で認可されて、着実に臨床症例が積み重ねられている。また、高度先進医療あるいは自由診療として乳癌や肺癌、肝腫瘍、骨腫瘍に対する凍結治療も試みられている。進行癌に対する凍結治療は癌を駆逐できるほどのものではなく、むしろ tumor dormancy therapy のカテゴリーに分類されるものかもしれないが、抗腫瘍効果が得られる戦略の一つとしており、今後の展開が期待されている。

2-4 神経内科分野

21世紀の医学上の最大の課題はアルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする神経難病の克服である。これまでのところ、これらに対する根本治療法は開発されておらず、更なる治療開発研究を推進する必要がある。この課程においては患者の脳や脊髄といった剖検組織を解析することが必須である。特に、RNAや蛋白を解析する場合には凍結組織を系統的に集積、保管するシステムが重要であり、国内でもブレインバンクの構築が行われている。現在のところ、脳や脊髄の凍結にはドライアイスによる迅速凍結法が用いられているが、どのような凍結方法が組織の形態及びRNAや蛋白のクオリティを最も保つことができるかという検証はなされていない。また、長期にわたって安定的に一定温度の凍結状態を保てるような冷凍技術の開発も望まれる。

2-5 ホモグラフト

医療技術の進展に伴い、生体親和性の高い素材の必要性はますます高まっており、組織の修復には、人工、あるいは生物系の素材や組織が不可欠になる。特に心臓血管系の素材は、かなり大きな繰り返し応力が素材に加わるので、人工的な素材にとってはかなりハードルの高い厳しい耐久性が求められる分野である。

ホモグラフト（同種組織）とは、心停止下のドナーから摘出される組織であり、最終的には臨床で厳しい評価にさらされる。移植組織では、冷却過程で氷結結晶の大きさなどに

より細胞組織の破綻が起これば、機能を維持できないので、病理組織的に、マクロ・ミクロの組織は保存されているか検討する必要がある、そのメカニカルな特性が維持されていなければ、臨床使用には耐えないことになる。したがって、新しい凍結保存法が提案される場合にも、凍結前後で、その組織形態はもとより、物理特性は保存されているのかなどについても精密に検討される必要がある。

— 禁無断転載 —

機械システム調査開発 24-D-5

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25年3月

作成 一般財団法人 機械システム振興協会
東京都港区芝大門一丁目9番9号

TEL 03-6848-5036

委託先 特定非営利活動法人 ECML21
東京都文京区音羽一丁目17番11号
花和ビル6階

TEL 03-3947-0181