

凍結保存用チューブの構造

凍結保存用チューブの正しい選択方法についての検討

臨床研究、細胞培養、バイオ医薬品研究およびバイオバンクなどで使用される貴重なサンプルの保存には、再現性かつ継続性のある結果を確保するために、サンプルの保存や取り扱いに注意し、コンタミネーションやサンプルの分解を防ぐことが重要です。極めて低い温度での凍結保存では、貴重な生体サンプルおよび核酸やタンパク質などの細胞成分は長期間にわたり停止状態で維持されます。長期保存の成功は、個々のサンプル調製に大きく依存します。例えば、培養組織と細菌株では複雑性が異なるため調製方法や保存方法も異なります。また化合物の場合は室温でも保存可能です。このため、サンプルを安全に保存・維持するためには、適切な凍結用バイアルの選択に十分配慮することが必要です。

凍結用バイアルには、スクリュー付きのアウターキャップタイプとインナーキャップタイプや、底形状が丸底と自立型など、多くの異なるバリエーションがあり、アプリケーションや研究者のニーズに見合った保存用チューブを選択することが可能です。一方で、サンプルの保存方法にあわせて適切な機能をもったチューブを選ぶことは必要不可欠です。

例えば、哺乳類細胞を液体窒素(LN₂)中で1年間保存する場合、チューブは-196°Cでの使用に適したクラスのもので、液体窒素によるクロスコンタミネーションを防ぐための信頼性の高いガasketを有していることが必須です。チューブまたはバイアルを慎重に選択することで、コンタミネーションやサンプル分解により結果の一貫性が損なわれることを回避し、チューブの選択ミスに由来する失敗によってもたらされる unnecessary コストを最小限に抑え、良好な操作性を実現します。

このホワイトペーパーでは、サンプル保存の適切な方法を紹介し、保存用チューブの各々の特性およびそれらがサンプルの取り扱いおよび長期にわたるサンプル品質に与える影響を考察します。



サンプルの保存方法と温度

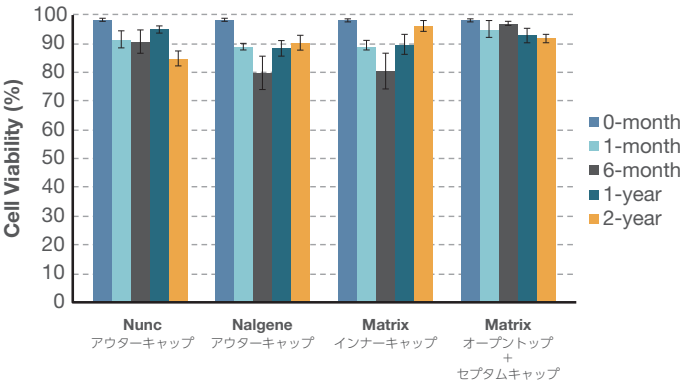
表1では、ライフサイエンス分野における一般的なサンプルを示します。各サンプルには最適な保存方法があります。凍結保存の方法によりチューブの選択は変わるため凍結保存用チューブの構造を詳細に検討する前に一般的なサンプルの保存方法を紹介します。

表1. ライフサイエンス分野における一般的なサンプル

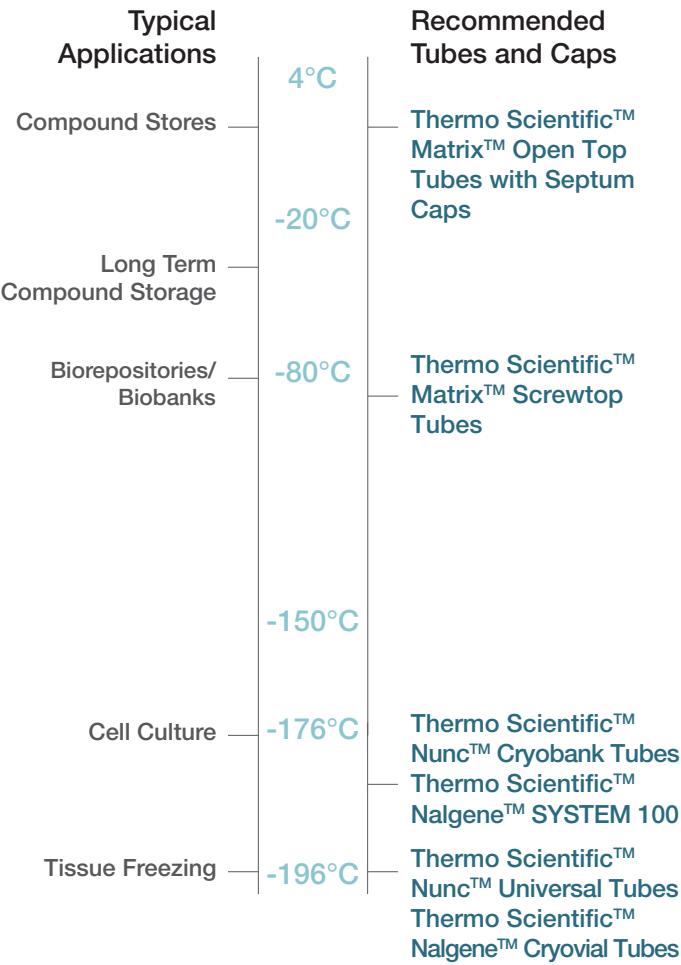
微生物 (細菌、古細菌)	哺乳類細胞 (幹細胞を含む)
ウイルス	胚
核酸	タンパク質
組織	化合物
抗体/ハイブリドーマ	細胞溶解物 (Cell lysate)
血液	植物細胞
血清	尿
精子/卵子	唾液

凍結保存には、0℃を下回る温度で生命を維持し、酵素または化合物の活性や時間の影響を抑制または停止させる技術があります。適切な保存器具と冷却方法が選択されれば、図1および図2に示すように、凍結した細胞などのサンプルの生存率を数年間維持することができます。例えば、ヒト胚、卵子および精子に加え、副甲状腺、静脈、心臓弁および大動脈組織など、いくつかの組織を凍結保存することが可能となります。DNAやRNAなどの核酸サンプルを遺伝子ライブラリー用に保存すること、化合物、微生物およびウイルスを研究用に保存すること、さらに血液、血漿、尿および組織をバイオバンクに集積することが可能となっています。

図1. Thermofisher Nunc, Nalgene, Matrix 凍結保存用チューブで長期間保存、融解後の細胞の生存率 (Viability)

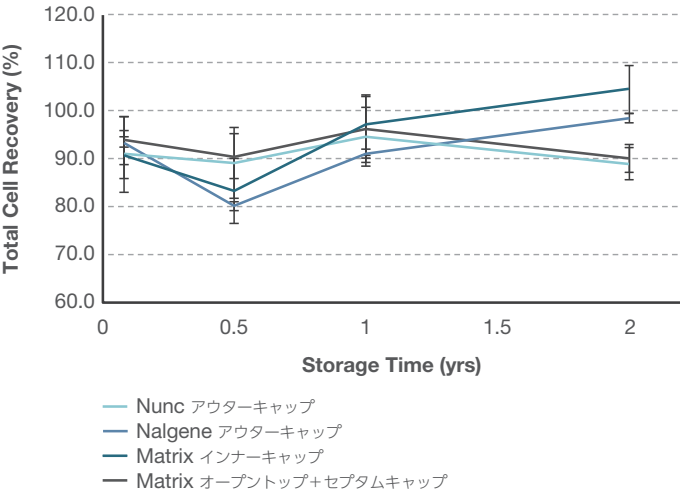


細胞は 10% DMSO を含む凍結保存液中に調製。液体窒素（気相）中で保存



Note: For direct storage in liquid nitrogen, Cryobank tubes / Cryovial should be enclosed in Thermo Scientific™ Cryflex tubing.

図2. Thermofisher Nunc, Nalgene, Matrix 凍結保存用チューブで長期間保存、融解後の細胞の復元率 (Recovery)



細胞は 10% DMSO を含む凍結保存液中に調製。液体窒素（気相）中に保存

生体サンプルを安定化させるためにはさまざまな技術が利用可能ですが、サンプルの使用目的に適合した方法を選択することが必要です。一般的に、細胞が大きく、サンプルの複雑性が高いほど、ゆっくりと均一に凍結させることがより重要です。原生生物、哺乳類および植物の細胞は、液-固相変化中の損傷に対して特に敏感であり、均一で制御された冷却を必要とするのに対し、細菌および孢子形成真菌の大部分は、理想的とはいえないような冷却条件にも耐えることができます。

一方、胚などの多細胞構造体の凍結保存／融解を成功させるためには、単一細胞よりもさらに厳格な工程管理が必要となります¹。長期凍結生体サンプルの高い復元率を実現させるためには、-130℃以下の保存温度が必要です。一般的に、核酸、タンパク質および細胞溶解物では、中期保存には-20℃、長期保存には-80℃における非常に迅速な瞬間凍結が適しています。化学物質は、長期にはジメチルスルホキシド(DMSO)中で-20℃、短期には4℃または室温において保存することが必要です。サンプルによって最適な保存温度は変動するため、個々のサンプルの適切な保存温度を検討する必要があります。正しい凍結保存プロトコルによりサンプルの品質が維持されてはじめて、その後のダウンストリームでのアッセイの妥当性が保証されます。

凍結保存用チューブ

保存工程の中で、その重要性がしばしば見落とされているのが、凍結用または保存用のチューブの選択です。品質のよくない原材料が使用されているチューブや、処理中の操作性 (handling) が悪いチューブはコンタミネーションの原因となる可能性があります。器具やサプライヤーの選択は、あらゆる凍結プログラムに極めて大きな影響を与えます。専門知識が豊富なサプライヤーを選択することで、あらゆる凍結保存アプリケーションのニーズに適合する高品質な製品を確実に入手することができます。

保存用チューブを選択する際には、以下の点を考慮することが必要です。

- 凍結耐性およびチューブの構造
- 凍結および融解時の操作性
- チューブの滅菌状態ならびにチューブからの溶出物または浸出物
- 保存するサンプルの種類とチューブ樹脂の適合性
- 識別性とトレーサビリティ

上記の検討順序は、保存するサンプルの重要性とワークフロー適合性に依存します。すなわち、それぞれのサンプル保存のニーズに基づいて優先順位を決定する必要があります。

凍結保存用チューブは、操作中および低温保存中のサンプルを外部環境から保護します。保存、回収および操作時のサンプルの生存率維持に適した容器を選択することが必要です。容器の漏れはサンプルのコンタミネーションにつながり、サンプルの取り扱い中および移動中に物理的な損傷を生じさせる可能性があります。そのため、操作性を維持しつつ、堅牢性、気密信頼性を最大化するようにして製造されたチューブを選択することが極めて重要です。

サンプルをLN₂中で保存する場合には、特別にデザインされたチューブを使用しなければなりません。-100℃以上での保存には、さまざまな種類のチューブが利用可能ですが、保存温度に関わらず蒸発が真の脅威であるため、ガasketを考慮に入れることが必要です。加温速度もチューブ選択に影響を与えます。

チューブの材質と凍結耐性

当社が提供するチューブおよびキャップなどのポリプロピレン製凍結用チューブには、多くの種類、形状およびサイズがあります。チューブの形状は保存や操作性に影響を与え、使用できる凍結ワークステーション、ラックおよびトレーに適合している必要があります。

丸底およびコニカルバイアルはサンプルの回収を改善できるようにデザインされています (図3)。自立型のスカート構造を取り付けることで丸底およびコニカルバイアルを自立させることが可能になります。また一部のバイアルは、より安全な移動および取り扱いのために、チューブラックに固定できるよう特別にデザインされた形状の底部 (星型フィン) になっています。効率的なデータ収集を可能とするために、サンプルの識別性およびトレーサビリティを容易にするチューブデザインも、チューブ選択において考慮すべき重要な事項の一つです。

図3. Nalgene / Nunc 凍結保存用チューブ



チューブ底形状は、自立型のスカートタイプと星型フィン。非自立型の丸底。キャップタイプはインナーキャップタイプ、アウターキャップタイプ。両タイプ共に目盛、書き込みスペース (White patch) がついているチューブがあります

インナーキャップとアウターキャップ

チューブには、スクリュー付のインナーキャップタイプ、アウターキャップタイプのキャップのあるチューブ（図4）と、スクリューがなく、セプタムを押し込む構造のセプタムキャップのチューブがあります。-80℃以下での保存用には、スクリュー付きのチューブを使用するのが理想的です。

インナーキャップタイプの凍結用チューブは、キャップとバイアルの外径が同一であり、温度変化に伴って同等に膨張するため、より気密性が高いといわれています。また、収縮が極めて小さいため、これらの容器がLN₂中に設置された場合、チューブの収縮によるサイズの変化によって気密性が損われることはないと証明されています。

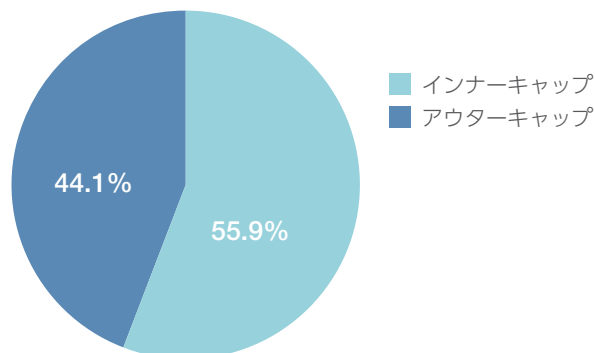
実際、インナーキャップタイプを選択するかアウターキャップタイプを選択するかは、それぞれの好みやチューブの取り扱い方法によります。最良の無菌操作が行われれば、いずれのモデルも良好な性能を示します。図1に示すように、インナーキャップ、アウターキャップのいずれのタイプを使用しても、1ヵ月間、6ヵ月間および1年間の保存後に融解したサンプルは、80%以上の細胞生存率が維持されていました。この試験ではすべての凍結用チューブが同一の方法で調製、操作および保存（液体窒素の気相中）されており、このことからキャップタイプの違いが2年後の細胞生存率（Viability）または復元率（Recovery）に有意な影響を与えないことが示されます（図2）。キャップタイプのデザイン間に、既知の耐性差は存在せず、いずれのタイプも同等に良好な気密性を実現します。いずれのデザインでも過剰なねじ締めによって、密閉性に問題が生じる可能性があります。キャップの開閉を自動化する場合、適切なパラメーター設定によりキャップタイプによる影響を排除することが可能です。研究者にキャップのタイプの好みと使用状況を質問した社内調査より、55.9%がインナーキャップタイプ、44.1%がアウターキャップタイプを好んでいることが判明しました（図5）。キャップ間の差がこのような小さいことから、特にどちらかが優先的に使用されているということではなく、いずれのタイプも同等に使用されていることが示されます。

図4. ポリプロピレン製凍結保存用チューブ：
インナーキャップタイプとアウターキャップタイプ



図5. インナーキャップとアウターキャップのどちらを好みますか？

A	インナーキャップ	33	55.9%
B	アウターキャップ	26	44.1%



サンプルの保存、凍結保存を行う研究者に、インナーキャップとアウターキャップのどちらを好むかを調査した。すべての回答は匿名で回収された。

キャップガスケット

保存中の密閉性をより強固にするために、チューブとキャップの間にガスケットを使用して気密性を向上させることができます。ガスケットは柔らかい素材で作られているため、圧縮されて接合面の形状に適合することができ、キャップとチューブ表面の接触面を埋めることができます。このガスケットには、アウターキャップの内側またはインナーキャップの外側に設置するシリコンゴムのO-リングタイプと、架橋型熱可塑性エラストマー (TPV) をチューブに直接成形させた一体型タイプがあります。

シリコンゴムのO-リング、TPV 一体型いずれのタイプのガスケットにおいても、キャップを閉める際には注意深い操作が必要です。ねじを締めすぎると過剰な圧縮力とねじれが同時に生じ、ガスケット素材がキャップとチューブの接合面から押し出されます。露出したガスケット表面は劣化するリスクが高く、漏れの原因となる可能性があります。

シリコンゴムのO-リングは、キャップとチューブの間に2つの接触面を有するにもかかわらず効果的な密封が得られ、また取り外しが可能であるという利点があります。しかし、シリコンベースのポリマーは気体透過性を増大させる可能性があるため、室温で長期間放置するとサンプルの水分損失につながる可能性があります。一部のチューブではキャップの内側にリムを設けて、O-リング素材が押し出されるのを防ぎ、確実に漏れを防ぐことで気体透過を低減します。

熱可塑性エラストマー (TPE) の一種であるTPVは、シリコンゴムの伸縮性および圧縮性と同時に、熱可塑性プラスチック同様の高い成形能を備えています。つまり、TPVガスケットはプラスチックのチューブまたはキャップと一体成形することができ、圧縮の影響を受けるキャップおよびチューブとガスケットの接触面数を一面に減らすことができます。このデザインにより、ガスケットの押出も最小限に抑えられ、締め過ぎおよび室温における気体透過性に関連するリスクが低減します。

ケーススタディ:TPVガスケットの気密性

サーモフィッシャーが実施した試験では、TPVガスケットで密閉されたチューブの気密性を検討しました。インナーキャップおよびアウターキャップのチューブ (0.2 mL、0.5 mL、1.0 mLおよび1.8 mL) の試験を行います。新しいチューブと、オープン内で劣化させることにより5年間使用した状態を再現したチューブを試験に使用します。一貫性を維持するために、すべてのチューブへのキャッ

プ装着はThermo Scientific™ 8-Channel Handheld Decapperを使用しました。これらのチューブについて、1回以上の凍結／融解サイクル中の漏れ(表2)、およびLN₂中に一晚設置した後の融解工程中および同工程後の蒸発(表3) の試験を行いました。この試験では、チューブを考える劣化の条件に曝露させて、ガスケットに最大限のストレスを与え、製品仕様の範囲を超えることで損傷を誘発させました。その結果、すべてのタイプのチューブ(異なるタイプのキャップおよびサイズ、新しいチューブおよび劣化チューブ) において、3.3%未満の漏れ損傷しか観察されませんでした。このことから、TPVガスケットは信頼性が高く、チューブからの物質の漏出または外部からチューブへの漏入は容易に発生しないことが示唆されました。

さらに、新しい(経時変化または長期保存条件による影響を受けていない) チューブにおいて、蒸発は、0.93%未満。長期間の曝露後損傷を誘発させた劣化チューブでは0.43%未満であることも示されました。1%未満の蒸発は非常に軽度であり、TPVタイプのガスケットにより蒸発が大きく低減されることを示しています。また、ポリプロピレンがある程度の気体透過性を有することから、ポリプロピレンチューブ自体からの蒸発が、本試験において観察された蒸発の一因となっている可能性があることにも留意する必要があります。

表2. 凍結・融解に伴うチューブの漏出試験

	新しいチューブ	劣化チューブ
チューブ	TPV	TPV
Matrix 0.2 mL インナーキャップチューブ	0%	0%
Matrix 0.5 mL インナーキャップチューブ	1.6%	0%
Matrix 1.0 mL インナーキャップチューブ	0%	3.3%
Nunc 1.8 mL インナーキャップチューブ	0%	3.3%

表3. 30日間のサンプルの蒸発

チューブ	新しいチューブ		劣化チューブ	
	サンプルの損失 (mg) (平均)	サンプルの損失 (%) (平均)	サンプルの損失 (mg) (平均)	サンプルの損失 (%) (平均)
Matrix 0.2 mL インナーキャップチューブ	1.86	0.93%	0.86	0.43%
Matrix 0.5 mL インナーキャップチューブ	0.30	0.06%	1.47	0.29%
Matrix 1.0 mL インナーキャップチューブ	0.77	0.08%	1.47	0.15%
Nunc 1.8 mL インナーキャップチューブ	0.50	0.03%	1.96	0.11%

チューブの操作性 (handling)

一貫性のある結果を得るためには、管理された保存プログラムに従って慎重で標準的な無菌操作プロトコルが極めて重要です。凍結保存操作は、生体サンプルに極めて大きな影響を与えます。チューブ損傷の原因となる過剰充填やスクリー部分への充填物の接触を防ぐために、チューブにサンプルを慎重に充填する操作は極めて重要です。一般的に、標準的なチューブは0.5～2.0 mLのサンプル保存用にデザインされていますが、その他にも多様なサイズのチューブがあります。一般的にはチューブのサイズに関わらず、容器容量の85%以上には充填しません。水性化合物が凍結時に膨張するための空間を残し、密閉の完全性が確実に維持されるようにすることが重要です³。また、どのようなタイプの凍結保存容器を使用しても、慎重な無菌操作に大きな差はありませんが、キャップの脱着時におけるチューブおよびキャップの持ち方が研究者によって異なることを考えると、チューブのデザイン自体が操作に影響を与える可能性があります。

チューブに内容物が充填されると、取り扱い方法によっては、ねじ部分に負荷がかかり破損してしまう可能性があります。凍結／融解のサイクル中にねじ付近に水が存在すると、氷形成時の膨張によりチューブが破裂する可能性もあります⁴。

凍結保存のいずれのプロトコルでも重要な問題となるのはコンタミネーションです。チューブの取り扱い方法がコンタミネーションの発生に大きく関与します。ねじがチューブの内側に位置するインナーキャップタイプでは、チューブ内に接触するリスクはおのずと低くなるため、無菌操作は容易です。ただしキャップを取り外す際は、キャップのスクリーに触れないようにするか、またはキャップのスクリー上に物質が付着した状態にしておかenように、注意が必要です。

ねじが外側に位置するアウターキャップタイプのチューブのキャップを取り外す場合には、チューブ外側のねじ上に液体が付着しないように注意する必要があります。ねじ上に付着した過剰な液体がチューブの内容物を汚染する懸念はありませんが、チューブをLN₂中に保存する際の交差汚染の原因となる可能性があります。コンタミネーション

のリスクを最小限に抑えるために、アルコールを浸み込ませたガーゼですべての外面を拭き取ることを推奨します。

キャップ開閉の自動化

研究室での他のすべての管理と同様に、工程管理は効率を改善するだけでなく、ヒューマンエラーまたは呼吸や動作により生じる数百万の粒子に起因するコンタミネーションの低減にも役立ちます。ハンズフリーでキャップ開閉したりロボットアームでチューブを選んで移動させることで、サンプルの品質を維持することができます。

例えば、Thermo Scientific™ Capit-All™ Screw Cap Tube Capper/Decapperは、手袋、皮膚またはその他の非滅菌表面とキャップの接触をすべて排除できるようにデザインされています。キャップの脱着を自動化することで、実質的にコンタミネーションのすべてのリスクが排除されます。さらに、自動化ではインナーキャップとアウターキャップが区別されないため、どちらを選択するかはそれほど重要ではなくなります。さらに有利な点として、Capit-Allなどの装置はコンタミネーションを防ぐための機能を備えています。例えば、手動によるキャップ装着工程とは異なり、装置を使用すれば、システムを通して不活性ガスを注入することにより、サンプルの品質に影響を与える可能性のある大気水、蒸気および空気を不活性ガスに置換することが可能です。

チューブの滅菌性

コンタミネーションを回避するには、製造段階におけるチューブおよびバイアルの注意深い滅菌が不可欠です。ガンマ線照射またはその他の保証された滅菌方法が用いられているチューブを使用してください。異なる滅菌水準の製品が存在しますので、それぞれのニーズに見合った製品を選択することが可能です。原則として、標準的にはSterility Assurance Level (SAL) 10⁻³のチューブを使用し、極めて貴重なサンプルにはSAL 10⁻⁶のチューブを使用する必要があります。

SAL 10^{-6} とは、購入したチューブが製造段階で何らかの形で汚染されている確率が100万分の1であるということを意味します。極めて貴重なサンプルを保存する場合には、保存チューブの材質が高品質のものであり、保存サンプルが材質の副産物により変化、劣化または損傷することが決してないように十分注意を払うことが必要です。保存するサンプルの種類によって、RNase/DNaseフリー、CEマークおよびエンドキシン/パイロジェンフリーなどの保証を考慮する必要があります。

チューブの製造者は、GMPガイドラインに準拠またはISO Quality Standard 9001などの相応の認証を取得していることが望ましいです。チューブの製造、組立および梱包は、ISO 7(Class 10,000)クリーンルームにおいて行い、しかもクリーンルームへの無菌的移動前にコンタミネーションから回避されていることを確認する必要があります。そのため、輸送および保存には不正開封防止加工された、再び閉じることのできるセーフティーロックされた袋を使用しなければなりません。

Thermo Scientific チューブは、パイロジェンフリー、ヌクレアーゼフリー、エンドキシンフリーであることが保証されています。チューブはバージングレードのポリプロピレン樹脂を使用して製造されており、多くの化学溶媒、塩基性および酸性物質に耐性があり、樹脂の純度の高さゆえに溶出物および浸出物は当然少なくなっています。

識別性とトラッキング

サンプルのトラッキングは必ずしもサンプル品質の重大な懸案事項となるわけではありませんが、適切なトラッキングによりサンプルが保存期間中モニターされ、回収において正しく識別されることが保証されます。

多くのチューブは白色の書き込みスペースを有し、さらに目視同定を容易にするためのカラーコード化されたキャップおよびキャップインサートがあるチューブもあります。レーザーエッチングが施されたユニークな二次元コードにより信頼性の高いサンプル識別が可能となり、さらに一次元のバーコードにより、迅速な手動識別を行うなかで選択エラーが発生するリスクを除外できるため、安心です(図6)。

さらに高度なサンプルトラッキングのためには、コードをカスタム化してさまざまな量のデータを持たせることが可能です。また、個別ラベリング用に白い書き込みスペースがあるため、凍結ボックス中でのサンプル識別エラーリスクが排除されます。

図6. サンプルトラッキング用さまざまなコード付チューブ



目視可能な数字のついたバーコード付チューブ



目視可能な英数字のついた二次元コード付チューブ (チューブ底面)



一般的な 12 × 12 セル Data-matrix (ECC200: 歪み補正付)



結論

最良の凍結保存用チューブの選択は、最終的には、保存するサンプルの複雑性、実験のスケールや手動工程であるか自動工程であるかという因子に左右されます。考慮すべきチューブの特性は非常に多く存在しますが、保存工程でサンプル品質を最高の状態で維持し、後に発生する可能性のあるサンプルへのリスクを低減するには、初期の段階で適切なチューブ選択に時間を費やすことが重要です。どのようなダウンストリームの実験でも、信頼性の高い一貫性のある結果の入手はサンプルの品質に依拠しています。

サンプル保存、凍結保存という、実験ワークフローの中で必要不可欠でありながら見過ごされがちな工程が、実験結果およびデータ品質に多大な影響を及ぼしていることに疑いの余地はありません。究極的にはサンプル保存が、実験の成功または失敗を左右する決定的要因となることも考えられます。高価で、貴重または希少なサンプルを使用する場合、そのようなリスクは許容できるものではありません。

40年間にわたり、安全なサンプル保存を行うにあたって、それがどんなに過酷な条件であってもThermo Scientific ブランドに多くの研究者が信頼を寄せ続けています。幅広いポートフォリオの各凍結保存用容器には、高純度の樹脂、高レベルの滅菌性保証および厳格な品質管理基準の利点が活かされています。これにより、研究者にとって最も使い勝手が良く、確実にサンプル品質を維持できる製品の提供が可能となります。

参考文献

1. DNA Storage and Quality. http://www.ogt.com/resources/literature/403_dna_storage_and_quality. Accessed April 27, 2016.
2. Scholz, EC. The Problem of Contamination: Open vs . Closed vs . Semi-Closed Vitrification Systems. www.intechopen.com
3. Cryogenic Preservation. 2012:1-16.
4. Scott, R, Granchelli, J. Gasket material and seal integrity in Storage Tubes.

Find out more at thermofisher.com/samplestorage

General laboratory use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2016 Thermo Fisher Scientific Inc.
All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写、転載を禁じます。
記載の社名および製品名は、当社または各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は2016年現在の内容です。予告なく変更することがあります。
最新情報は当社Webページにてご確認ください。標準販売条件はこちらをご覧ください。 www.thermofisher.com/jp-tc
研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。

CCP05-A1812-S

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

TEL: 03-6832-9270 FAX: 03-6832-9271

 facebook.com/ThermoFisherJapan

 @ThermoFisherJP

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC