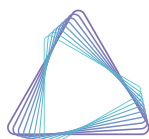


保管、自動化、ロジスティクス

ホワイトペーパー

LN2フリーザーからの無意識の 曝露によるサンプルの昇温：

手動と自動化システムでの温度、時間、 ワークフローの比較



AZENTA
LIFE SCIENCES

azenta.com

要旨

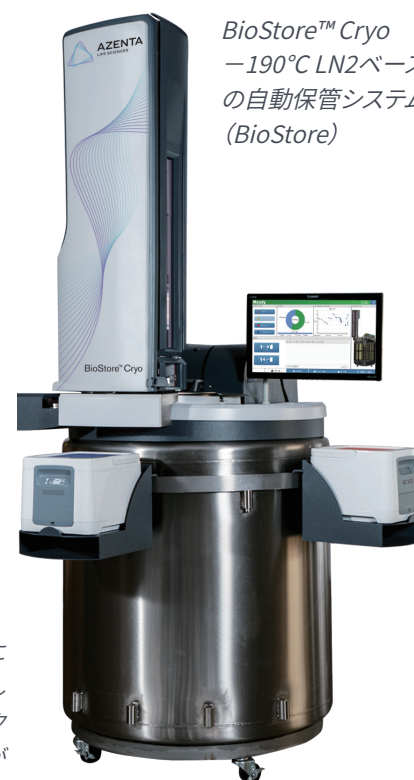
液体窒素気相フリーザー (LN2) でのサンプルの保管は非常に一般的で、バイオバンキングや細胞治療業界全体で行われています。これらのフリーザーが選ばれているのは主に、 -150°C 以下の保管環境を維持し、水のガラス転移温度 (Tg) である -135°C 以下にサンプルを保つためです。この低温保管により、サンプルの生存性が保たれます。

懸念されるのは、ルーチンのラック曝露時に、イノセントサンプル (意図せず解凍したサンプル) が発生するとどうなるかです。何千ものイノセントサンプルの曝露が、保管期間中に複数回発生する可能性があります。ガラス転移相によるコンスタントな解凍・凍結は、不可逆的なダメージを与え、解凍後のサンプルの機能性に影響を及ぼす可能性があります。

これらの実験では、クライオボックスの手動操作と自動操作でのイノセントサンプルのワークフロー、時間、昇温速度を実証し、比較しています。



1、4、7、10、13段目の棚にクライオボックスを収納したラック。各クライオボックスには、中央にバイアルが1本入っています。



BioStore™ Cryo
-190°C LN2ベース
の自動保管システム
(BioStore)

はじめに

手動式LN2フリーザーを用いた通常のワークフローを用い、標準ラック内の5つの異なる棚位置にあるサンプル (水) を、フリーザーからラックを取り出す (引く) 時にモニターします。この実験を、同一のセットアップと場所で、BioStore -190°C LN2ベースの自動保管システム (BioStore) を使用して繰り返しました。

材料

- BioStore -190°C LN2ベースの自動保管システム (BioStore)
- Chart MVE 1500シリーズLN2 -190°C蒸気フリーザー (ARD) (ラック付き)
- Azenta 10 x 10クライオボックス (蓋付き) 5個
- Azenta 2mLクライオバイアル5本、各クライオボックスの中心に1本ずつ配置
- すべてのバイアルに水2mLを充填
- 水の深さの中間に36 AWG T型熱電対を取り付け
- TracerDAQソフトウェアを使用し、測定計算TC-Tempデータ収集ユニットで1.0ヘルツでサンプリング

手順

- 2mLバイアルに水2mLを入れ、細型熱電対を取り付ける
- クライオボックスの中心にバイアルを置き、蓋をしてから、ラックの1段目（最上段）、4段目、7段目、10段目、13段目に挿入する
- 一番上のボックスのサンプル温度が $-180^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ になるまでバイアルをモニタリングする
- BioStoreシステムでラックを10回取り出す
- ラックを手動で持ち上げてフリーザーの横に10回取り出す
- BioStoreシステムで、1、3、5、7、14段目の棚だけラックを個別に5回取り出し
- クライオボックスは、取り出したり、動かしたり、触れたりしない

結果

全般的なワークフローの比較

手動式LN2フリーザーからサンプルを取り出すワークフローは、ラボやユーザーによって、さらには日によっても異なる場合があります。全プロセスを手作業で行っているため、無意識の曝露、取り出した時間や在庫状態を自動的にモニタリング・記録していません。

手動式LN2フリーザーからクライオボックスを取り出す手順は、通常以下の通りです。

1. 階段を上る
2. 蓋を外す
3. 中に手を入れてカルーセルを回し、必要なラックを探し出す
4. ラックを持ち上げて取り出す
5. ラックをフリーザーの向かいに置く、または階段を降りてベンチや床の向かいにラックを置く
6. ラックピンを取り外す
7. 必要なクライオボックスを探し出し、取り出す
8. ラックピンを元に戻す
9. ラックを持ち上げ、それから降ろしてフリーザー内に戻す
10. フタを元に戻す
11. 階段を降りる

BioStoreシステムからクライオボックスを取り外す通常の手順。

1. サンプルIDまたは場所をPCに入力し、オーダーを送信する
2. プロンプト（ラックが上がる）されたら、ドアを開け、クライオボックスを移動させる
3. ラックが自動的に下がってフリーザーに戻る

作業時間の比較

手作業でクライオボックスを取り出す場合、フリーザー内の位置や作業者のスピードや正確さによって、要する時間がそれぞれ異なることがあります。以下は推定値です。

- 2分 - クライオボックスを見つけて取り出すのにかかる時間
- 30秒～2分 - ラックがLN2フリーザーの外に曝露される時間

自動化により、このワークフローを標準化し、管理できるようになります。BioStoreでのクライオボックスの取り出しは、ボックスの場所によって異なりますが、ラックの曝露は管理されています。

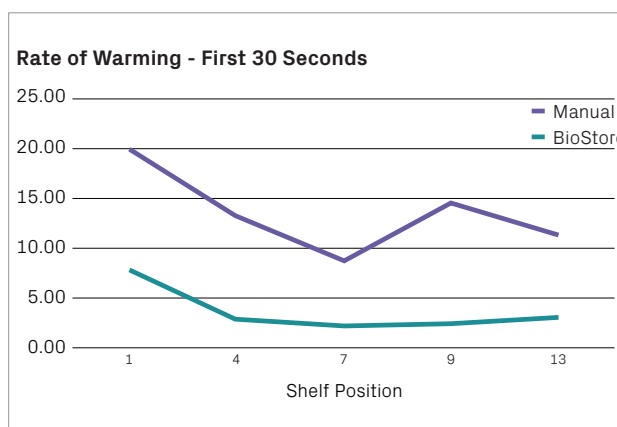
- 30秒～90秒 - クライオボックスを見つけて取り出すのにかかる時間
- 15秒～30秒 - ラックがLN2フリーザーの外に曝露される時間

自動化により、手作業が大幅に削減されます。さらに、すべての操作と曝露が管理、モニタリング、記録されます。

サンプルの昇温速度

解凍後のサンプルの機能性を確保するためには、イノセントサンプルの昇温を最小限にすることが非常に重要です。そのため、ユーザーは、イノセントサンプルがLN2の低温環境の外にある時間を制限するためにあらゆる手を打つ必要があります。これは通常、フリーザーからラックを取り出した後、できるだけすばやく作業することで行います。自動化により、ラックの曝露時間が短縮しますが、ラックの周りに断熱材を入れることでも、サンプルの昇温を低減することができます。

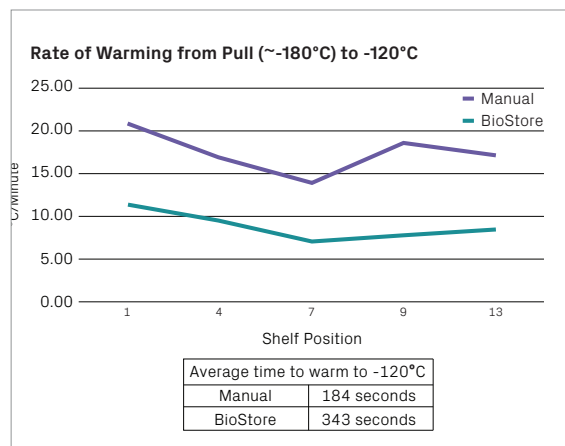
通常、手動のワークフローでは、ラックは30秒を超えてフリーザーの外にありますが、比較のために、下のグラフでは、各イノセントサンプルについて、手動および自動でのラック引き出しに伴う最初の30秒間の室温暴露を表しています。



すべての棚の昇温速度を平均すると、BioStoreのサンプルは、手動に比べて曝露後30秒間の昇温速度が70%遅くなっています。棚1の昇温速度が最も大きいですが、BioStoreでは、下の方の棚でも比較的直線的な昇温速度であるのに対し、手動ラックでは棚によって大きく違います。

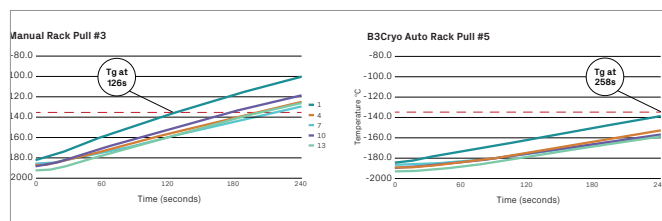
注記:手動ラックでの昇温はさらに環境にも影響されることがあります。棚13(そしておそらく棚板14も)は、ラックが置かれている表面の影響を受けており、発泡断熱材が最も熱透過性が小さいことがわかりました。一般的なHVAC換気口からの室内気流も、手動のラックの昇温に約30%影響します¹。

各棚での引き出しから-120°C(ガラス転移温度過ぎ)までの昇温速度と-120°Cに到達するまでの平均時間を以下に示します。

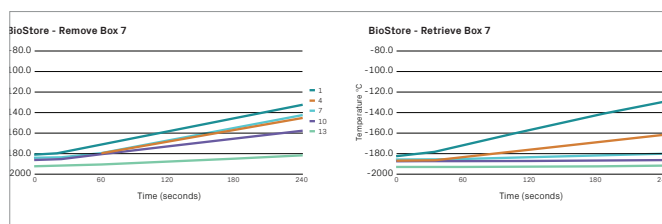


サンプル温度

以下は、手動とBioStoreの両方のワークフローで2分間曝露したときの、5点のイノセントサンプルすべての温度です。



サンプル温度



上記は、BioStoreシステムを使って棚1(一番上段)と棚7からクライオボックスを取り出したときの、5点のインセントサンプルすべての温度を示します。下段のサンプルでは、ラック全体をLN2フリーザーから取り出した場合と比べて、昇温がかなり少ないことが注目されます。また、インセントサンプルの昇温を防ぐため、必要なクライオボックスを取り出すのに必要な最小限の高さまでしかラックを持ち上げない方がよいでしょう。

結論

- BioStoreシステムを使用すると、クライオボックスを取り出すワークフローの手順が手動と比べて大幅に簡素化します。
- ラックからの取り出し後の最初の30秒間は、BioStoreでは手動と比較してサンプルの昇温速度が70%遅くなります。
- インセントサンプルがTgまで昇温するのに、BioStoreでは手動に比べて51%長く時間がかかります。
- 下段の棚にあるサンプルは、より上段の棚にあるボックスにアクセスする間、フリーザー内にとどまることで、BioStoreシステム内での過度の昇温が遅くなります。
- ラックからの取り出しを手動で行う場合、昇温の速度、環境変数、および誘因を十分に理解してください。貴重な試料を常にTg以下に安全に保つために、SOPを作成し、定期的に監査してください。
- ラックがLN2フリーザーに戻された後も、サンプルは昇温を続けること¹、またサンプル量が異なると、昇温速度も異なることを理解してください。(例: 1mLバイアルは2mLバイアルより約60%速く昇温します)²。

参考文献

1 Warhurst, J., Fink, J., Holmes, T. et al.(2015 May).Protection of innocents: continued sample warm up after return to a cryogenic environment (below -150°C) following a transient ambient picking operation.Oral presentation presented at annual International Society of Cellular Therapy conference, Las Vegas, NV.

2 Salvetti, M., Fink, J. Barlett, A. et al.(2015, May).Thermal excursions of cryogenically frozen vials (below -150°C) and the risk of rising above Tg,H2O: analyzing warm-up rates from cryogenic storage to both dry ice and ambient temperature environments.Poster presented at annual International Society of Cellular Therapy conference, Las Vegas, NV.