

生体の凍結保存プロセスに関する研究

Study on Designing a Process of Cryopreserving Bio-material

白 檉 了*・棚 澤 一 郎**

Ryo SHIRAKASHI and Ichiro TANASAWA

本稿は生体の凍結保存プロセスの設計法について、熱物質輸送の立場から考察した研究の紹介である。凍結保存プロセスは凍結過程と、それに先立つ前処理過程に分けられる。前処理過程においては、凍結によってもたらされる損傷を避けるため、凍害防御剤水溶液に生体を浸漬させるが、生体中の細胞が高い浸透圧に曝されるのを避けるため、凍害防御剤水溶液の濃度は細胞の最小体積分率と体積緩和時間により決められたプロセスで徐々に高められて目的濃度に到る必要がある。一方、凍結過程では冷却速度と凍害防御剤水溶液の濃度を、凍結に伴う力学的損傷と高浸透圧による細胞の過濃縮を避ける様に決定する必要がある。

1. はじめに

今日、生体間の生体組織移植が外科的治療法として、しばしば用いられている。生体組織の移植の需要が増える一方で、供給が追いつかず、摘出された生体組織が短期間しかもたないことから、生体組織の保存技術の必要がでてきた。凍結による保存法はその究極ともいえる方法であり、飽和液体窒素温度（ -196°C ）では半永久的に保存できることができる。現在、角膜や血液、精子などの凍結保存はある程度の成功を納めており、一部実用化もされているが、サイズの大きい生体組織については一般的な実用化には至っていない。また、単一の細胞についても最適な凍結保存条件を設計する方法は確立されていない。本稿では、最適な凍結保存プロセスの設計法の開発をめざした研究の一部を紹介する。

2. 生体凍結保存の概観

生体は細胞群とそれを幾何的に支持する繊維によって構成されている。通常、生体は全重量の80%近くが水分であることより、凍結過程は凍結に起因する細胞内外の化学ポテンシャル差がもたらす細胞膜を通じての水分の輸送現象と、氷晶の生成に伴う体積膨張によって特徴づけられる。

細胞を冷却すると細胞外凍結が優先的に起こり、それに伴う細胞外の化学ポテンシャルの低下により細胞の内外に化学ポテンシャル差が生じる。このポテンシャル差を駆動

力として細胞内で過冷された自由水が細胞膜を通じて細胞外へ流出する。Photo. 1¹⁾に筋繊維細胞を急冷却、及び、緩冷却したときの写真を冷却前の状態とともに示す。速度が速く、細胞内に自由水が存在しているうちに核生成温度に達すると細胞内凍結を起こし細胞にとっては致命的な破損が生ずる。(Photo. 1: 上段右) 冷却速度が遅いと細胞内の自由水は全て外部に流出し、細胞は過収縮をおこし、(Photo. 1: 上段左) 内部のイオン濃度が上昇するために細胞内の高分子の構造が不可逆変化をおこし致命傷に至る。そこで、細胞内の自由水を極力排出し、かつ細胞内の高分子の結合構造を変化させないために、凍害防御剤(C.P.A.)と呼ばれる溶質を加えた水溶液に生体をあらかじめ浸漬して、細胞内の自由水と凍害防御剤を置き換えたのち冷却-凍結をおこなうことにより上述のような凍害を防ぐのが一般に取られている方法である。従って、凍結保存は凍害防御剤を細胞内に吸収させる前処理過程と、それに続く凍結過程に分けられる。

これらの現象はFig. 1に示すような細胞膜輸送と2成分系の変相変化を含んだ熱物質輸送現象としてとらえることができる。

3. 研究の目的

生体組織の凍結保存の成否の評価は様々な方法²⁾が試みられているが、本質的には生体組織がもつ機能を凍結-解凍後も保持しているか否かという点で判断される。生体組織が必要とする機能は大きく分けて生体組織の幾何構造を保持する機能と細胞の生理学的機能に分けられる。前者の

*東京大学生産技術研究所 第2部

**東京大学名誉教授

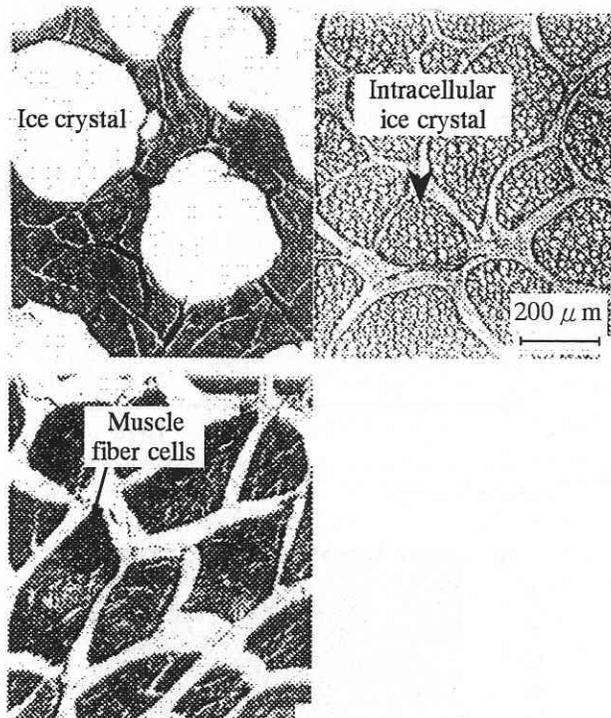


Photo 1 Cross section of muscle fibers freezed in various cooling rate (upper left: low cooling rate, upper right: before freezing, lower: high cooling rate)

ると考えられる。そこで、細胞死の原因である細胞のサイズについて生理学的機能を維持出来る許容値を調べておく必要がある。一方、生体を凍結させる際、制御可能なパラメータは細胞膜透過に関する限り C.P.A. 濃度と温度以外には考えにくい。組織を凍結する場合は個々の細胞が最適に凍結される時間-空間履歴を実現するようにさらに工夫する必要があるが、細胞の生死が生体組織の凍結の成功-失敗の鍵となることから、最適条件を見つけた手順を確立しておく必要がある。

本研究では、凍結前処理である C.P.A. 水溶液への浸漬と凍結過程の最適条件を細胞の体積変化を生死の評価パラメータとして、C.P.A. 濃度を変数とするマップ上で最適条件を提示する計算方法を提案した。また、得られた単一細胞についての最適前処理-凍結過程条件から、凍結保存が可能な最大の生体組織サイズを推定した。さらに、許容細胞サイズに関する知見をブタの頸動脈を試料として、内皮細胞と平滑筋細胞の2種類の細胞に大浸透圧をかけた時の viability を、それぞれ対象となる細胞の機能に基づき測定して限界耐浸透圧=等価細胞サイズとして表現した。

4. 凍結プロセス設計の概略

生体の凍結保存は凍結プロセスと解凍プロセスに大別できる。各々のプロセスはさらに前処理-凍結過程、解凍-後処理過程に分けられる。ある程度以上の大きさを持つ生体組織を凍結保存する場合、上記の過程のうち解凍過程ではマイクロ波加熱や通電加熱によりある程度、大きさに依らない均一な操作ができる。また、解凍後の後処理過程は前処理過程の設計方法が確立すれば同様に設計できることを考えると、凍結プロセスの設計法を確立することが差し当たって重要であると考えられる。

生体を凍結する場合に問題となるのは、1) 組織-単一細胞にかかわらずそれぞれの細胞について最適な制御パラメータ (C.P.A. の種類、濃度、前処理の C.P.A. 添加の濃度変化履歴、冷却速度) が存在すること、2) 組織細胞の場合は凍結過程において緩慢冷却をする以外に生体組織内部の物理量を均一に保つことが出来ないこと、の2点である。こうした問題に対処する為の凍結プロセス設計手順の概略を以下に記す。凍結対象がきまると C.P.A. の物性と C.P.A. に対する生体の特性を測定する。即ち、前者は C.P.A. の平衡状態図と粘性係数、後者は凍結対象を構成する細胞の膜透過係数 (L_p, σ, ω)³⁾、細胞内における C.P.A. の拡散係数と Toner らによる細胞内核生成モデル⁷⁾ のパラメータである。これらの測定値に基づき本研究の主題である、前処理過程の“細胞収縮緩和時間-最小体積分率マップ”、凍結過程の“凍害評価マップ”を作成する。この2つの図より凍結対象を構成する細胞についての最適制御パラメータが決定される。これら2つのマップで評価関数と

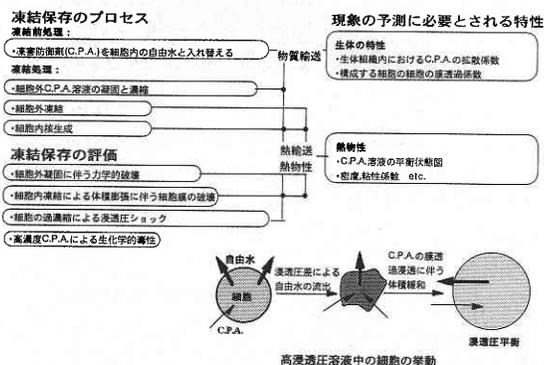


Fig. 1 Mechanism of Cryopreservation from the view point of heat and mass transfer

機能が喪失される主要因は細胞外の水分凍結に伴う体積膨張による組織の力学的破壊であり、後者の場合は細胞死である。細胞死は1) 水分の凍結に伴う力学的破壊、2) 非等浸透圧環境下における過収縮-過膨張、3) 凍害防御剤 (C.P.A.) に起因する生化学的毒性が主要因であると言われている。これらのうち3)を除けば凍結の前後での細胞のサイズの大小が細胞死の評価基準として考えられる。現実の細胞死の測定 (viability assessment) は生命の定義によって大きく左右されてしまうほど一般的には困難である。しかし、医用目的の凍結保存の場合は前述の必要とする“細胞の生理学的機能”が喪失されたかどうかによって

して用いられるのは、緒言で述べた細胞死の原因の 2) と 3) を考慮した細胞体積である。本章の冒頭で述べた 1), 2) の問題点を考慮すると、組織細胞を凍結する場合は緩慢冷却における viability が高くなるように制御パラメータを選択することが望ましい。

5. 細胞収縮緩和時間-最小体積分率マップ

本章では前処理プロセスを決定する細胞収縮緩和時間-最小体積分率マップの基本概念と計算方法について述べる。

5.1 基本概念 いま、細胞の初期体積に対する割合を β , C.P.A. 水溶液に浸漬した時間を t とすると、細胞体積は膜透過性の高浸透圧溶液中では Fig. 2 に示すように一度収縮してある時刻 (t_{min}) で最小細胞体積分率 (β_{min}) を示した後、溶質の侵入により膨張してある時刻 (t_{rex}) でほぼ元の体積にもどる。一時に目的の C.P.A. 濃度に細胞を曝すと目的の C.P.A. 濃度が高い場合は、許容浸透圧を超えてしまいダメージを受ける。従って、最小体積分率 (β_{min}) を許容範囲に保ちつつ徐々に濃度をあげていくことが望ましい。この際、細胞の代謝を最小限にするにはできるだけ低温・短時間である方がよい。Fig. 3 のマップでは横軸を浸漬前の細胞内 C.P.A. 濃度、縦軸を浸漬する C.P.A. 濃度として β_{min} と t_{rex} を図示している。図中の右下半分は細胞外濃度が細胞内濃度より低い領域であるので計算されていない。浸漬する C.P.A. 濃度をステップ状にあげる場合は最小細胞体積分率 (β_{min}) の線と交差する t_{rex} 値とこれに相当する縦軸の値から Fig. 4 に示すようなプロセスが決定される。組織細胞の場合は前処理過程の最後に拡散の緩和時間だけ長めに浸漬する必要がある。

5.2 解析方法 β_{min} と t_{rex} を求める為、単一細胞を一定の温度、C.P.A. 濃度の環境においた時の体積の変化を Kedem-Katchalsky の膜透過モデル³⁾を用いて計算した。即ち、C.P.A. を a, 電解質を e, 細胞内を i, 細胞外を o, 細胞の体積を V_{cell} とすると支配方程式は以下の様に表せる。但し、C は濃度、J はフラックス、(L_p, σ, ω) は膜透過係数を示す。

$$\frac{d(C_a^i V_{cell})}{dt} = S_{cell} J_a \quad \frac{d(C_a^o V_{cell})}{dt} = 0 \quad \frac{dV_{cell}}{dt} = J_v$$

$$J_a = RT \omega_a (C_a^o - C_a^i) + C_a^m J_v (1 - J_a)$$

$$C_a^m = (C_a^o - C_a^i) / \ln(C_a^o / C_a^i) \quad (1)$$

上式より種々の C.P.A. 濃度について β_{min}, t_{rex} を計算した。計算のパラメータとしてグリセリンとエチレングリコールの赤血球膜透過係数 (L_p, σ, ω) 既存の値を用いた。

5.3 細胞収縮緩和時間-最小体積分率マップの計算結果と考察

5.2 で示した計算方法にしたがって赤血球の膜透過係数⁴⁾⁵⁾をもちいてグリセリン ($C_3H_5(OH)_3$, 分子量92) と

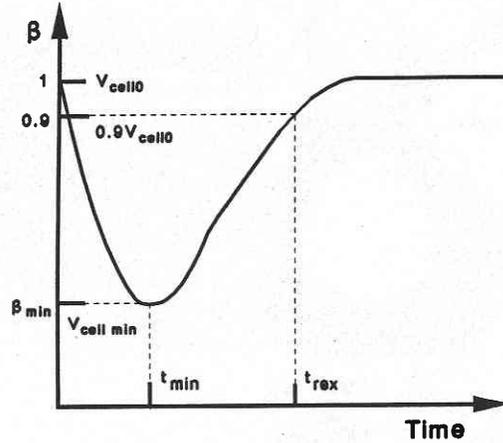


Fig. 2 Change of cell volume ratio immersed into membrane permeable C.P.A.

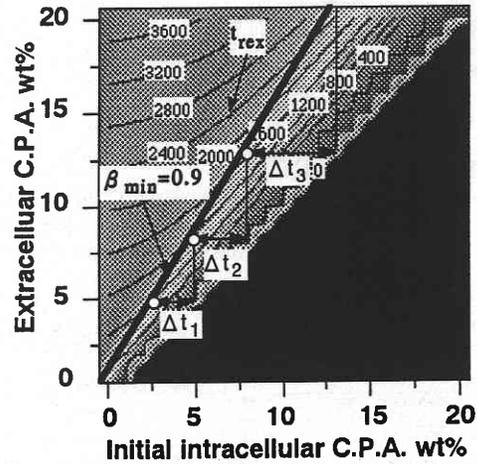


Fig. 3 Schematics of relaxation time - minimum cell volume ratio map

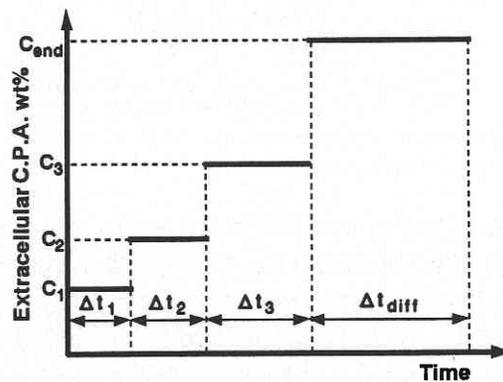


Fig. 4 Stepwise change of extracellular C.P.A. concentration during pre-freezing process

エチレングリコール ($C_2H_4(OH)_2$, 分子量62) について計算した結果をそれぞれ Fig. 5 に示す。温度は298Kとして、計算に使用した膜透過係数は Table 1 に示す。

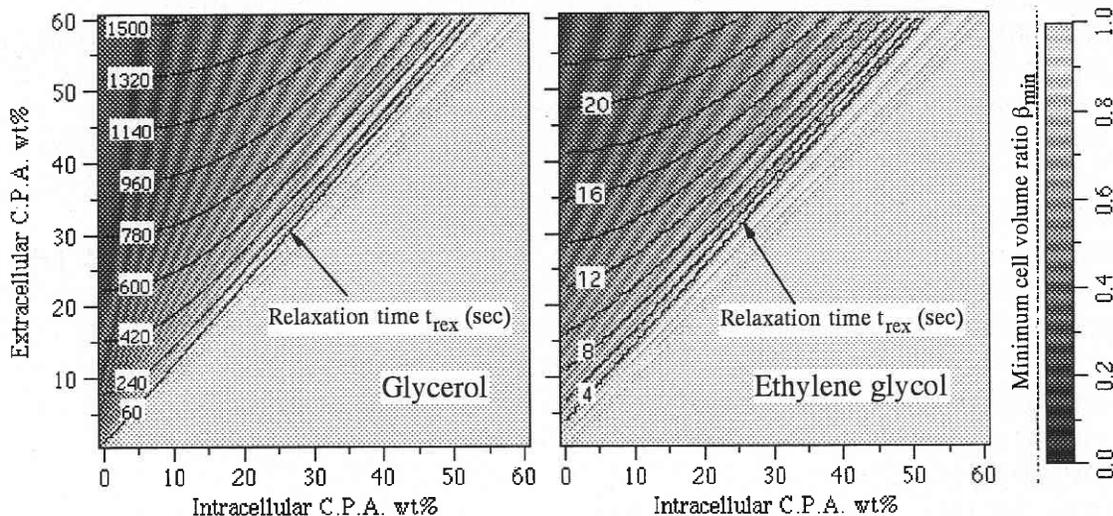


Fig. 5 Relaxation time - minimum cell volume ratio map

Table 1 Membrane permeabilities of erythrocyte

| | L_p ($m^3/(N \text{ sec})$) | ω ($mol/(N \text{ sec})$) | σ |
|-----------|---------------------------------|------------------------------------|----------|
| グリセリン | 0.92×10^{-12} | 1.68×10^{-11} | 0.88 |
| エチレングリコール | | 8×10^{-10} | 0.62 |

膜透過係数のうち溶質透過係数 ω は体積流入がないときの C.P.A. の細胞内への流入速度を示している。一方、反発係数 σ が 1 の場合は C.P.A. は細胞膜を透過せず 0 に近づくほど透過度が高まり、0 で水と同様に透過する。Fig. 5 で緩和時間 t_{rex} を比較するとエチレングリコールの方が短時間で緩和することがわかる。インクの濃淡で示されている β_{min} の値もエチレングリコールの方が高濃度側に寄っていることがわかる。これらは ω , σ の値の差が反映されているものと考えられる。Fig. 6 に細胞をある濃度の C.P.A. 水溶液に直接つけた時の β_{min} の値と緩和時間 t_{rex} を示す。グリセリンの場合、浸漬溶液の濃度が 10 wt% 以上になると β_{min} が 0.3 以下になってしまうが、エチレングリコールの場合は β_{min} が 0.3 になるには 40 wt% 以上の高濃度でないと起きない。

組織細胞を同様の手順で処理する場合、浸透圧ストレスが最も大きい場所は直接溶液に触れる外側であるので、濃度の上昇のさせ方は単一細胞と同様で問題ないと考えられる。但し、手順の最後に以下に示す組織内 C.P.A. 拡散の緩和時間 (t_{diff}) 程度、組織を最終 C.P.A. 濃度の溶液に浸漬する必要がある。

$$t_{diff} = \frac{L^2}{D} \quad (2)$$

ここで、D は組織内における C.P.A. の拡散係数、L は組織の代表長さを表す。

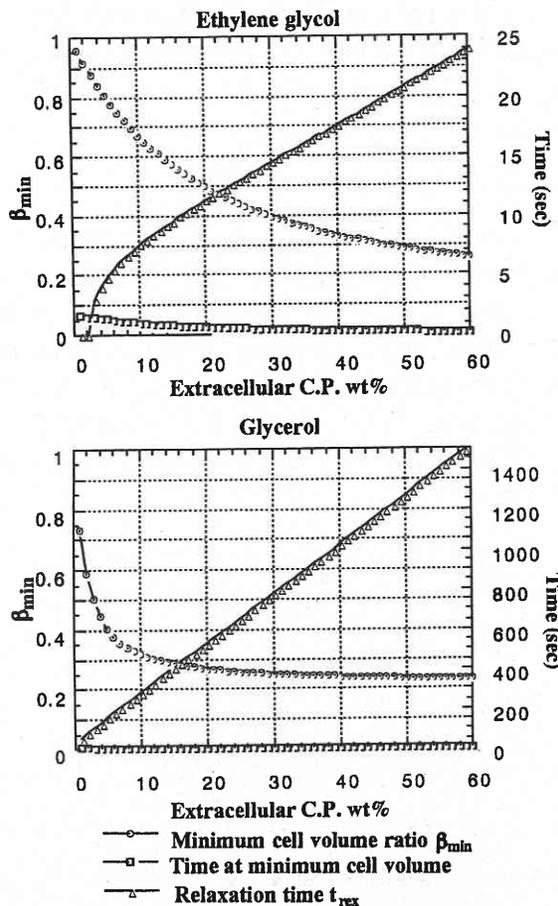


Fig. 6 β_{min} and t_{rex} at initial intracellular C.P.A. wt% = 0.

6. 凍害評価マップ

本章では凍結過程のプロセスを決定する凍害評価マップの基本概念と評価関数である凝固に伴う膨張を含む正味細

胞体積分率の計算方法について述べる。

6.1 基本概念 前処理後、細胞内は最適凍結プロセスで定められた C.P.A. 濃度になっている必要があるが、凍結プロセスではこの初期 C.P.A. 濃度と最適な冷却速度を決定する。凍結過程の制御パラメータを冷却速度と初期 C.P.A. 濃度として、急速冷却による細胞内の自由水の凝固に伴う膨張を次節で定義する正味細胞体積分率 ϕ で評価し、緩慢冷却による高浸透圧による細胞の過収縮（浸透圧ストレス）を既に定義した β_{min} で評価する。即ち、縦軸を冷却速度、横軸を凍結前の細胞内 C.P.A. 濃度として ϕ と β_{min} をプロットする。この凍害評価マップにおいて実現可能な冷却速度と初期 C.P.A. 濃度を決定して、決定された C.P.A. 濃度を目的濃度として前処理をおこなうのが前処理-凍結過程の設計手順である。

6.2 解析方法 凍害評価マップはある濃度の C.P.A. 溶液中で浸透圧平衡状態にある単一細胞を一定速度で冷却したときの細胞の挙動より計算される。細胞膜透過については式¹⁾と同様の支配方程式を用いる。低温（0℃以下）における細胞膜透過係数（ L_p, σ, ω ）の実測値はほとんどないが、測定温度域の値を外挿してアレニウス型の以下の式で表す。

$$L_p = L_{p0} \exp\left(-\frac{\Delta E_L}{RT}\right), \quad \omega_s = \omega_{s0} \exp\left(\frac{\Delta E_\omega}{RT}\right) \quad (3)$$

但し、 ΔE は活性化エネルギー、 L_{p0} と ω_0 は定数である。

温度が下がり相変態図の固-液線に至ると細胞外の C.P.A. 濃度（ $C(T)$ ）は熱平衡状態図にしたがって変化する⁶⁾。細胞内凍結は以下の式に示す Toner らの核生成モデル⁷⁾に従い凍結が起こるとした。但し、 $(A^{SCN}/A_0^{SCN}) = (S/S_0)$ 、 $(A^{VCN}/A_0^{VCN}) = 1$ 、 $(f^{VCN}(\theta)/f_0^{VCN}(\theta)) = 1$ とし、核生成確率が 1 になったとき細胞内核生成が起きるとした。

$$P = P^{SCN} + P^{VCN} (1 - P^{SCN}) \quad (4)$$

$$\ln(1 - P^{VCN}) = \frac{1}{B} \int_{T_f}^T v_w I^{VCN} dT \quad (5)$$

$$\ln(1 - P^{SCN}) = \frac{1}{B} \int_{T_f}^T S I^{SCN} dT \quad (6)$$

$$I^i = \Omega^i \exp\left\{\frac{-\kappa^i}{\Delta T^2 T^\sigma}\right\} \quad (7)$$

$$\Omega^i = \Omega_j^i \left(\frac{T}{T_0}\right)^{1/2} \left(\frac{\eta_0}{\eta}\right) \left(\frac{A^i}{A_0^i}\right) \left(\frac{f^i(\theta)}{f^i(\theta_0)}\right)^{1/6} \quad (8)$$

$$\kappa^i = \kappa_j^i \left(\frac{T_f}{T_{f0}}\right)^4 \left(\frac{f^i(\theta)}{f^i(\theta_0)}\right) \quad (9)$$

$$f^{SCN}(\theta) = (1 - \cos \theta)^2 (2 + \cos \theta) / 4 \quad (10)$$

$$\theta = 677.54 X_s + 21.53 \quad (11)$$

但し、

I: 核生成頻度 A: 凍結に関与する分子数 θ : 細胞膜表面と液相の接触角 P: 核生成の確率分布関数 X_s : 細胞内溶質モル分率 η : 粘性係数 S: 細胞膜表面積 v_w :

細胞体積 B: 冷却速度 (K/sec)

添字: subscript o: isotonicity f: thermal equilibrium superscript SCN: surface catalyzed nucleation VCN: volume catalyzed nucleation

以上の方法により評価関数 β_{min} は前処理と同様にして計算できる。細胞内凍結の影響を含む ϕ の計算については次節で述べる。

6.3 凝固に伴う体積膨張の影響を含む正味細胞体積分率 ϕ 細胞内核生成が細胞にとって致命的になる大きな理由の一つとして凝固に伴い体積が膨張し細胞の許容サイズをこえて細胞膜を破壊してしまうことがあげられる。凍結後の固相部の体積と凍結前の体積の比は以下のように表せる。

$$\frac{\rho_{liq}^* F_w}{\rho_{sol}} = \left[\frac{m_{all}^{3*} k_{g_{all}}}{k_{g_{liq}}} \right] = \left[\frac{m_{sol}^3}{m_{all}^{3*}} \right] \quad (12)$$

但し、 ρ は密度、 F_w は質量固相率、* は凍結前の状態を示し添字の sol, liq はそれぞれ固相、液相を示す。ここで F_w は平衡状態図より、

$$F_w = \frac{C(T) - C^*}{C(T)} \quad (13)$$

であらわせる。同様に凍結後の液相体積分率は、

$$\frac{\rho_{liq}^* (1 - F_w)}{\rho_{liq}} = \left[\frac{m_{all}^{3*} k_{g_{liq}}}{k_{g_{liq}}} \right] = \left[\frac{m_{liq}^3}{m_{all}^{3*}} \right] \quad (14)$$

と記述できる。したがって、凍結に伴う体積膨張率は式 (13) と (14) の和として表せる。

$$\alpha = \frac{\rho_{liq}^* F_w}{\rho_{sol}} + \frac{\rho_{liq}^* (1 - F_w)}{\rho_{liq}} = \left[\frac{m_{sol}^3 + m_{liq}^3}{m_{all}^{3*}} \right] \quad (15)$$

以上より正味細胞体積分率 ϕ は細胞中の非浸透成分の体積分率を ϵ_p として、

$$\phi = \alpha \beta_{min} + (1 - \alpha) \epsilon_p \quad (16)$$

で与えられる。

前処理-凍結過程ともに計算は式 (1) の連立微分方程式が主体をなしている。

6.4 凍害評価マップの計算結果と考察 Fig. 7 に 6.2, 6.3 で説明した方法を用いて計算した凍害マップを示す。低温での膜透過係数のデータが存在しないため、式 (3) に示すアレニウス型の温度依存性を持つとして常温近辺のデータから求めた活性化エネルギーを用いて計算した。膜透過係数が低い場合は低濃度では冷却速度が遅いと細胞内凍結が起こらず β_{min} の値は小さくなり、冷却速度が速いと細胞内核生成に伴う水分の膨張により正味細胞体積分率 ϕ の値が大きくなっている。また、高濃度に移るにつれ低冷却速度における β_{min} の値が大きくなってきている。

膜透過係数が低い場合の結果は Fig. 8 で示す永田、棚澤⁸⁾ のミジンコの凍結保存の生存率を定性的によく表し

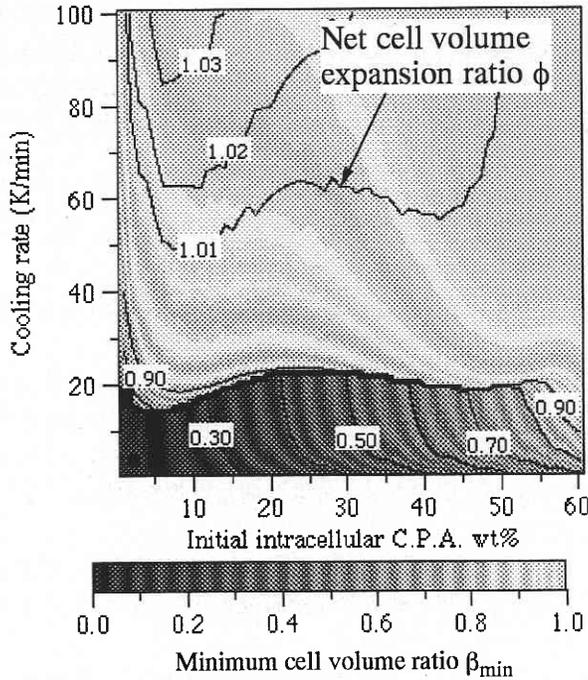


Fig. 7 Freezing process estimation map ($\Delta E_{\omega} = 29.3 \times 10^3$ (J/mol), $\Delta E_{Lp} = 20.0 \times 10^3$ (J/mol), $\sigma = 0.88$, $\omega_0 = 8.83 \times 10^{-8}$ (mol/(N sec)), $L_{p0} = 2.78 \times 10^{-10}$ (m³/(N sec))

ている。膜透過係数が高い場合も冷却速度がより速い領域では細胞内の自由水の流出が間に合わず細胞内核生成がおき、膜透過係数が低い場合と同様の傾向になると考えられる。

冷却速度が十分速い場合、組織細胞の中心部ほど冷却速度が速くなると考えられる⁶⁾。これは組織内の C.P.A. 溶液が凝固する時、C.P.A. 溶液は潜熱を放出しつつ温度を下げるので見かけの熱拡散係数が小さくなり、凝固が完了すると急に大きな熱拡散係数になるので、組織中心部では熱がなかなか伝わらず、時間遅れをもって急激に熱を奪われるのが原因である。凍害評価マップから決定された冷却速度 (v_{Tc}) と生体組織の熱拡散係数 (k) より、組織全域で凍害を起こさない最大サイズ L_{cri} は熱輸送方程式を離散化して変形することにより、以下のように求められる。但し、 ΔT は中心温度と組織外側の温度差を表す。

$$L_{cri} = \sqrt{k\Delta T/v_{Tc}} \quad (17)$$

7. 細胞限界浸透圧の測定

本章では細胞が耐えうる浸透圧を、必要とされる機能に基づき評価し、限界浸透圧を推定する方法について述べる。対象とした細胞は豚頸動脈中の内皮細胞と平滑筋細胞である。

多くの血管移植手術において、人工血管で代替がきかな

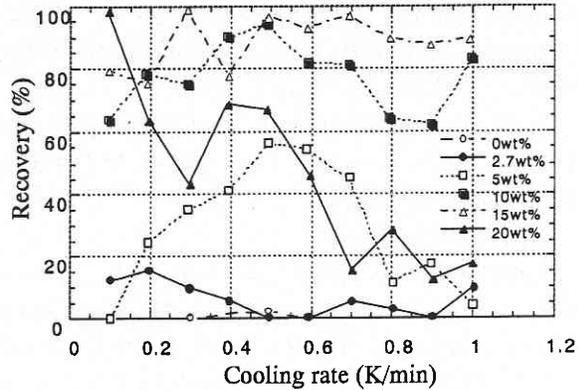


Fig. 8 Recovery ratio of dafnias after freezing

い理由は、血管壁を通じての物質透過性や抗血栓効果を持つ内皮細胞や収縮-弛緩により血管断面積を調整し血流量を能動的にかえる平滑筋細胞の生化学的機能を再現できないことにある⁹⁾。これらの機能を内皮細胞の膜透過能力については色素排除法¹⁰⁾により測定し、平滑筋の収縮-弛緩能力については薬物を使用して測定して viability を評価した。

7.1 内皮細胞の色素排除法試験方法 濃度の異なる電解質溶液に頸動脈を浸漬して浸透圧平衡になるまで放置する。イオンは非電解質物質に比べて透過率が極端に低く、細胞膜を透過しないと仮定できるので、電解質濃度により細胞が受ける浸透圧は異なる。標準電解質溶液濃度を C_0 (mol/m³) としてそのときの細胞体積を V_0 (m³) とすると濃度 C (mol/m³) の細胞体積 V (m³) 及び細胞体積分率 β (m³/m³) の浸透圧平衡での値は

$$C_0 V_0 = CV \quad V = (C_0/C) V_0 \quad \beta = C_0/C \quad (18)$$

のように記述できる。浸漬放置後、内皮細胞については色素排除法試験、平滑筋細胞については収縮-緩和試験を適用して viability を測定した。

色素排除法試験とは正常な細胞膜は透過しない色素が細胞膜の物質選択透過機能が損失された試験細胞の内部に入り込む現象を利用して細胞を染色することにより、細胞の生死を判別する方法である。内皮細胞は血管内壁に単層に配置された細胞なので血管内に色素を流して染色した後、管軸方向に切り開いて顕微鏡観察した。viability は顕微鏡観察像をビデオにとり染色された部分とそれ以外の部分を 2 値化してダメージを受けた染色部の面積分率より評価した。

試験は電解質溶液への浸漬とその後の測定に分けられる。このうち前半は平滑筋細胞についての測定と共通である。試料の採取から測定前までは以下の手順でおこなった。

1. 屠殺場で採取した死後 1 時間以内のブタ頸動脈をその場で洗浄処理した後、培養液 (Dulbecco's Modified Eagle

Medium (D-MEM) 或いは血清入り PBS (リン酸緩衝液 (Phosphate Buffer Powder, pH 7.2 WAKO)) に漬けて 0°C にて実験室に持ち帰る。

2. 試料の頸動脈を遠沈管に入った 5 種類の濃度 ($\beta = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0$; pH = 7.2) の 0 ~ 5°C の PBS 水溶液に 30 ~ 40 分浸漬する。

3. それぞれの測定に入る。

内皮細胞の色素排除法試験方法は Pegg らの方法¹¹⁾を参考にした。色素として蛍光色素 PI (Propidium Iodide SIGMA) をもちいた。Fig. 9 に色素を注入する装置の概略を示す。内圧は流路中の注射器を加圧することにより加え、ペリスターポンプにて溶液を循環させた。実験手順を以下に示す。

1. 5 本の頸動脈を装置に装填し 80 ~ 100 mmHg の内圧下で Propidium Iodide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を血管内に送り込む。

2. K-H 溶液 (Krebs-Henseleit solution) にて血管内壁の余分な色素成分を除去し、頸動脈を軸方向に切り開きスライドガラスで挟み観察用試料をつくる。

3. 蛍光顕微鏡を用いて G 筋起の落射光で観察用試料をビデオ撮影する。

4. ダメージを受けた部分のみ発光するので、2 値化して発光部の面積 (画素数) をはかる。(画面上の最低レベルをあわせておく)

7.2 平滑筋細胞の収縮-緩和試験方法 平滑筋細胞は交感神経伝達物質のノルエピネフリン (=ノルアドレナリン) に反応して収縮をおこし、同じく神経伝達物質のアセチルコリンにより緩和するという性質を持っている。試験では血管をリング状に切断して一定の張力を半径方向にかけて上記の物質の水溶液中に浸漬することで管径の変化を撮影して求め、その収縮率と緩和率を測定して平滑筋細胞の収縮-緩和能力を評価した。

電解質水溶液への浸漬は 7.1 と同じ手順で収縮緩和の試

験方法は Pegg らの方法¹¹⁾を参考にした。Fig. 10 に装置系を示す。K-H 溶液には常に 95% O₂-5% CO₂ ガスを吹き込み続けた。供試血管は Fig. 11 に示すように両端に針金を通して片方を固定、もう一方に重さ 2g の重りをつり下げて一定の張力を加えた。実験手順を以下に示す。

1. K-H 液で約 1 時間洗浄する。

2. 輪切りにした血管全体 (約 3 mm) を 3×10^{-6} M ノルエピネフリンで収縮させ、ついで 2×10^{-4} M アセチルコリンを加えて平滑筋を弛緩させて収縮緩和能力があることを確認する。

3. K-H 溶液で約 20 分洗浄して平衡状態に戻し、4. に移る前に撮影して Fig. 11 で示す長さ L をはかり L₀ とする。

4. 10^{-6} M または 3×10^{-6} M のノルエピネフリンに浸漬して平滑筋を収縮させて約 5 分間後血管を撮影して L の長さをはかり L_{NE} とする。

5. 10^{-5} M または 2×10^{-4} M のアセチルコリンに浸漬して平滑筋を緩和させて約 5 分間後血管を撮影して L の長さをはかり L_{Ach} とする。

6. 以下の式より収縮率 (contraction%) と緩和率 (relaxation%) をきめる。

$$\text{contraction\%} = \frac{L_0 - L_{NE}}{L_0}, \quad \text{relaxation\%} = \frac{L_{Ach} - L_{NE}}{L_0 - L_{NE}} \quad (19)$$

7.3 細胞限界浸透圧の測定結果と考察 Fig. 11 に浸透圧平衡に相当する β の値を横軸にして蛍光発光した内皮細胞の面積率を示す。Fig. 11 によれば内皮細胞は $\beta = 0.2$ のときはダメージが大きいのが 0.4 になると急激にダメージが減っていることがわかる。したがって、内皮細胞の限界等価浸透圧 β_{ecri} は 0.2 ~ 0.4 にあると考えられる。

平滑筋細胞の収縮緩和試験は Table 2 に示す条件でおこなった。

実験 1 では 10^{-5} M アセチルコリンに対してどの試験片も反応を示さなかった。

Fig. 12 に実験 1 と 2 の収縮率 (contraction%) と緩和率 (relaxation%) を等価浸透圧 β に対してプロットする。実験 1 では β が 0.6 以下になると収縮率が急激に落ちていることがわかる。同様に実験 2 においても β が 0.6 以下になると収縮率が落ちはじめ、緩和率も急激に落ちている。ピ

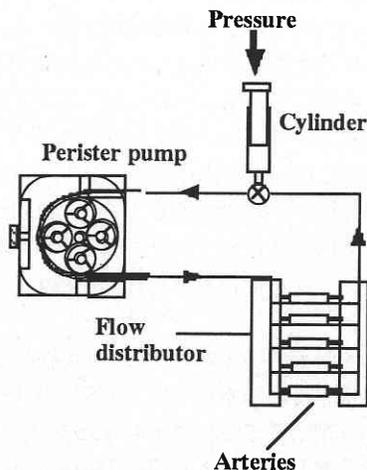


Fig. 9 Experimental apparatus for P.I. stain

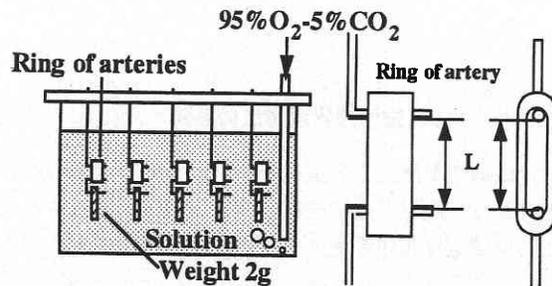


Fig. 10 Experimental apparatus for measuring contractivity

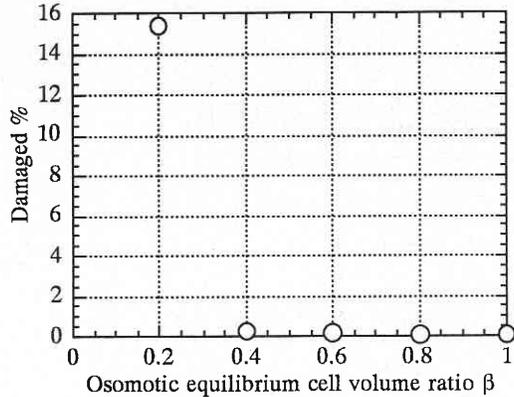


Fig. 11 Damaged % of endothelial cells

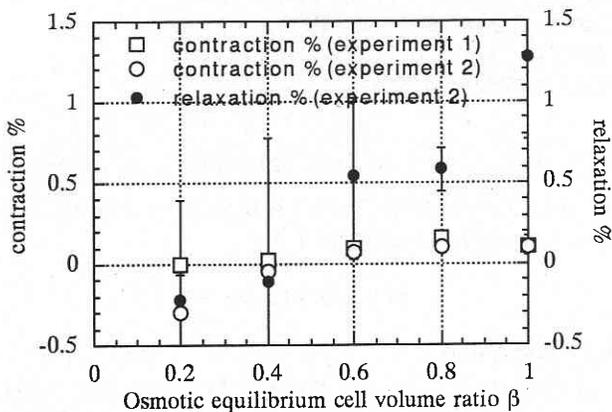


Fig. 12 Contraction % and relaxation % of smooth muscle

デオの映像をみると $\beta = 0.2$ や 0.4 はノルエピネフリンに対して全く収縮せず、アセチルコリンに対してもおおきな変化はないまま時間の経過につれ重りがもたらす張力によって僅かずつ伸びているように見える。また、7.2で記した実験手順1と2の準備段階における収縮-緩和では全ての試験片が収縮反応をしめすが、アセチルコリンに対しては $\beta = 0.2$ のみ緩和反応を示さなかった。これは収縮と緩和の機能は同時に失われるものではないことを示唆している。以上より収縮-緩和の機能を保持する平滑筋細胞の限界等価浸透圧 β_{scri} は $0.5 \sim 0.6$ になると考えられる。

本実験から見る限り内皮細胞の方が高い浸透圧に耐え得ると結論づけられる。通常の血管の状態は管内に生理状態により大きく浸透圧が変化する血液が流れていて、直に浸透圧変化に曝されるのは内皮細胞であって中膜に多く存在する平滑筋細胞ではないことを考えると、 $\beta_{scri} > \beta_{ecri}$ であることは合理的といえる。

8. 結 論

生化学的毒性を無視し、浸透圧ストレスと細胞内核生成による膨張が細胞死の要因であるとして細胞体積分率 β 、

Table 2 Condition of smooth muscle contractivity experiment

| | Immersed time (min) | Nor-epinephrine (M) | Acetylcholine (M) |
|--------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| experiment 1 | 60 - 70 | 10^{-6} | 10^{-5} |
| experiment 2 | 30 - 40 | 3×10^{-6} | 2×10^{-4} |

正味細胞体積分率 ϕ を評価関数とする凍結プロセスの設計方法を提案した。また、細胞の機能を評価基準にして細胞が耐えうる限界の浸透圧を豚頸動脈の内皮細胞と平滑筋細胞について測定した結果以下の結論を得た。

(1) 細胞収縮緩和時間-最小体積分率マップを作成してマップに基づき最小細胞体積分率 β_{min} を一定にできるようなプロセスが計算できた。

(2) 凍害評価マップを作成して初期 C.P.A. 濃度と冷却速度をパラメータにした viability の定性的傾向が説明できた。

(3) ブタ頸動脈の内皮細胞の膜透過性と平滑筋細胞の収縮-緩和能力の測定に基づき限界等価浸透圧 β_{cri} を推定した結果、内皮細胞は $\beta_{ecri} = 0.2 \sim 0.4$ 、平滑筋細胞は $\beta_{scri} = 0.5 \sim 0.6$ であることがわかった。

(4) (1), (2) より組織細胞を凍結保存する場合は対象のサイズから均一に冷却できる冷却速度 v_{Tc} を推定して v_{Tc} より低い冷却速度で β_{min} の値が β_{cri} 以上であるような C.P.A. 濃度を目標濃度にした前処理プロセスをおこなうと最適な凍結プロセスとなると考えられる。

(5) 常温から凍結温度近傍までの細胞の膜透過係数 (L_p , σ , ω) の値がプロセスを大きく左右すると思われる。

(1996年12月24日受理)

参 考 文 献

- 1) H.T. Meryman, Ed., Cryobiology, Academic press, (1966), 323
- 2) Song, Y.C., Charles, J.H. and Pegg, D.E., Cryobiology, 31 (1994), 317
- 3) S.G. Schultz, (鈴木泰三ほか2名訳), 生体膜輸送の基礎, (1982), 71., 東京化学同人
- 4) A. Katchalsky, Peter F. Curran, (青野 修ほか2名訳), 生物物理学における非平衡の熱力学, (1988), 123., みすず書房
- 5) Diller, K.R., McGrath, J.J., ed., LOW TEMPERATURE BIOTECHNOLOGY, ASME, (1988), 273
- 6) 白樫, 棚澤, 機論 B61, 587 (1995), 286
- 7) Toner, M., Carvalho, E.G., J. Appl. Phys., 67-3 (1990), 1582.
- 8) 永田, 棚澤, 凍結及び乾燥研究会会誌 Vol. 37, (1991), 34
- 9) 筏 義人編, 生体適合材料, (1993), 222., 日本規格協会
- 10) 今堀和友, 山川民夫監修, 生化学辞典第2版, (1992), 東京化学同人
- 11) Song, Y.C., Pegg, D.E. and Hunt, C.J., Cryobiology, 32 (1995), 405