



Title	トレハローストランスポーター発現細胞を用いた緩慢凍結保存メカニズムの研究 : 細胞内トレハロースの効果とガラス状態の重要性
Author(s)	内田, 努; 古川, 真帆; 松尾, 董 他
Citation	低温科学, 84, 109-119
Issue Date	2026-03-10
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.84.109
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99023
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p109-119_LT84.pdf



トレハローストランスポーター発現細胞を用いた緩慢凍結保存メカニズムの研究 ～細胞内トレハロースの効果とガラス状態の重要性～

内田 努¹⁾, 古川真帆²⁾, 松尾 董²⁾, 黄川田隆洋^{3,4)}, 鈴木芳治⁵⁾, 佐々木海渡⁵⁾

2025 年 9 月 19 日受付, 2025 年 10 月 24 日受理

細胞の凍結保存技術は、畜産業、水産業分野のみならず、医療分野でも活用されている「生命の時間を止める」技術である。しかし未だ凍結保存できない細胞種は多く、また凍結保存された細胞の品質も十分に保証されていない。そのため、細胞の凍結保存メカニズムを科学的に解明する必要がある。本稿では、細胞との親和性が高く水和力が強いが、細胞内へ自発的に浸透できないトレハロースを凍結保護剤として用い、そのトレハロースを細胞内へ輸送できる機能を有した細胞を使って行った、凍結保存メカニズムを解明する研究成果の一部をまとめた。特に細胞内トレハロースの細胞保護効果とガラス化との関係について紹介した。

Studies on the mechanism of slow-freezing cryopreservation using trehalose transporter-expressing cells: The importance of intracellular trehalose and the glassy state

Tsutomu Uchida¹, Maho Furukawa², Sumire Matsuo², Takahiro Kikawada^{3,4}, Yoshiharu Suzuki⁵ and Kaito Sasaki⁵

Cell cryopreservation is a technique that "stops the time of life", which is utilized not only in the livestock and fisheries industries but also in the medical field. However, many kinds of cells cannot be cryopreserved yet, and the quality of cryopreserved cells cannot be fully guaranteed. Therefore, it is necessary to reveal the mechanism of cell cryopreservation scientifically. This paper summarizes some of the results of studies aimed to reveal the mechanism of cryopreservation using trehalose, which has high affinity for cells and strong hydration properties but cannot spontaneously penetrate into cells, as a cryoprotectant. The researches were conducted using cells that exhibiting the trehalose transporter on the cell membrane. In particular, we focused on the cryoprotective effect of intracellular trehalose and its relationship to vitrification.

キーワード：凍結保存, トレハロース, 凍結保護作用, ガラス化
cryopreservation, trehalose, cryoprotective effect, glassy state

1. Introduction

細胞の凍結保存技術は、家畜精子の凍結保存にグリセリ

ンが有効であることが1949年に発見されたことから、世界中で積極的に研究が始まったといわれている (Polge et al., 1949)。現在では主に生殖細胞の凍結保存が行われ、動

連絡先

内田 努

北海道大学 大学院 工学研究院 応用物理学部門

〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目

Tel & Fax: 011-706-6635

Email: t-uchida@eng.hokudai.ac.jp

1) 北海道大学 大学院 工学研究院

Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, Japan

2) 北海道大学大学院 工学院

Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, Japan

3) 農業・食品産業技術総合研究機構 生物資源研究所

Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

4) 東京大学大学院 新領域創成科学研究科

Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa, Japan

5) 東海大学理学部 物理学科, マイクロナノテクノロジーセンター

Department of Physics, School of Science, and Micro/Nano Technology Center, Tokai University, Hiratsuka, Japan

物の生育産業（水産・畜産業）に利用されたり、希少種の保存に利用されたりしている（e.g. 酒井, 1987）。最近では、ヒトの生殖細胞の凍結保存も行われている（日本生殖医学会, 日本産婦人科学会）。またこの技術は、生命の時間を止めることのできる唯一の技術ともいえる。しかしながら凍結保存のメカニズムはまだ科学的に十分解明されているとはいえず、脳の神経細胞や心臓の細胞、血中細胞など、需要が高い細胞の安全な保存技術は確立していない（Smith, 1957; Alink et al., 1976; Koch et al., 1991; Tamamori-Adachi et al., 2003; Yokomuro et al., 2003; Motomura et al., 2007; Holovati et al., 2009; Miyamura et al., 2010; Higgins et al., 2011; Uchida et al., 2012）。

細胞内には多くの水が存在し、単純に細胞を凍結させるとその水が氷結晶となり、細胞を破壊してしまう。すなわち、細胞の凍結保存は細胞内外水の凍結をいかに制御するか、という問題に帰着する（Mazur et al., 1972; Mazur, 1984; Meryman, 2007）。そこで凍結保存技術では、適切な凍結速度の制御と凍結保護剤（Cryoprotectant Agent: CPA）の添加による結晶化制御が重要となる。

凍結速度は大きく分けて「緩慢凍結法」と「急速凍結法」が知られている。緩慢凍結法では、細胞を含んだ水溶液をゆっくりと冷却していき、「細胞外水を先に凍結させることで細胞内水を脱水し、細胞内の溶質濃度を上げて凝固点降下することを利用して凍結を抑制、ガラス化することで細胞が生き残る」というメカニズムが一般的に知られている（Mazur et al., 1972; Mazur, 1984; Meryman, 2007）。この手法は、一度に大量の細胞（1mLの溶液中に数百万～数千万個の細胞）を凍結保存させることができるため、産業利用技術に用いられている。しかしこの時利用するCPAは、グリセリンやジメチルスルホキシド（DMSO）などの化学薬品で、細胞毒性などがあることが報告されている（Karow et al., 1967; Yu and Quinn, 1994; Lawson et al., 2011）。そのため再生医療などに利用するためには、より安全なCPAの開発が望まれている。一方急速凍結は、高濃度のガラス化剤をCPAとして細胞内外に添加し、氷結晶の生成を抑制する技術である（Rall and Fahy, 1985; Work, 2010）。試料全体の水を一気にガラス化する必要があるため、種の保存など稀少細胞や比較的体積の大きい卵細胞などの凍結保存に用いられている。ただしこの手法についても、CPAの細胞毒性のリスクが懸念されている。

我々は、天然CPAとして期待されているトレハロースを用い安全な凍結保存法を開発するとともに、産業利用されている緩慢凍結法のメカニズムを解明する研究を進めている。トレハロースは分子が大きいため、自発的には細

胞内へ輸送されない。そのため凍結液中に添加しただけではCPA効果が低いとされていた。そこで、トレハロース輸送タンパク質を細胞膜に発現させた細胞（Kikawada et al. 2007）を用いた実験系を構築し、通常では細胞内に取り込まれないトレハロースを細胞内へ輸送するとその凍結保護効果が有意に向上することを見出した（Uchida et al., 2017; 2019）。その後、細胞内へトレハロースを輸送した細胞内の水がガラス化しているか否かについての研究を、本研究集会参加者と共同で進めている。本論文ではこれまでの研究成果を概説し、今後の展望を述べる。

2. トレハローストランスポーター発現細胞の凍結保存

2.1 実験方法

研究に用いた細胞は、ネムリユスリカの幼虫から抽出されたTrehalose transporter（TRET1）を遺伝子導入で細胞膜に発現させたチャイニーズハムスター卵母細胞（CHO-TRET1細胞）である。TRET1は細胞内外のトレハロース濃度差に駆動され、トレハロースを選択的に高速・大量に双方向輸送することのできる膜タンパク質である（Kikawada et al. 2007）。発現を抑えた細胞（CHO-vector細胞）と同時に実験を行うことで、同じ細胞・同じ条件下において、細胞内にトレハロースがある状態とない状態を比較することができるユニークな実験系となっている。

細胞培養には、Nutrient Mixture F-12 HAM（Sigma-Aldrich）に10% FBS（Thermo Fisher Scientific）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（100 U/mL penicillin G and 100 mg/mL streptomycin, Thermo Fisher Scientific）、0.8% Hygromycin B solution（ナカライテスク）、1% Gluta MAX-1（Thermo Fisher Scientific）を混合した培地を使用し、310K、湿度100%、5% CO₂に調整したCO₂インキュベータ（MCO-18AiC, Sanyo）を用いた。

トレハロースはEnd toxin-freeの高純度薬品（（株）林原、現（株）ナガセヴィータから提供）で、培養液に0～1000 mMの濃度で加えた後200 nmメッシュで滅菌処理したものを凍結液とした。凍結液1 mL中に、細胞を10⁵～10⁶ cell/mLの濃度で分散させ、クライオチューブ（Thermo Fischer Scientific）に分注した。そして凍結前にCO₂インキュベータ内に静置して、細胞内へのトレハロース輸送や細胞からの事前脱水を行った。そして253K～液体窒素温度の範囲で一定温度に制御された条件下に試料を投入し、試料を凍結して1週間保存した。この時、凍結温度を変えることで凍結速度を変える効果を調べた（Uchida et al., 2017）。

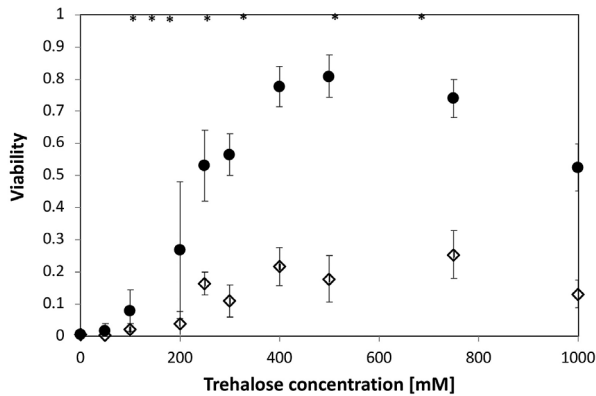


図1：CHO-vector細胞(◇)とCHO-TRET1細胞(●)の193Kにおける凍結・融解後細胞率のトレハロース濃度依存性。CHO=vector細胞は凍結液置換後すぐに、CHO-TRET1細胞は凍結前に2時間310KのCO2インキュベーター内でトレハロース含有凍結液に浸漬させた後、実験に供した。*印は、2種類の細胞の生存率が、統計的に有意な差がある条件 ($p < 0.01$) を示す。(Remade from Uchida et al., 2019)

Figure 1: Viabilities of cryopreserved CHO-vector cells (open diamonds) and CHO-TRET1 cells (solid circles) at various extracellular trehalose concentrations. The cells were incubated for 2 h at 310K prior to the sample setting in the deep freezer (193K). After 1-week storage, the frozen sample was thawed and incubated with fluorescence dyes. The viability of each condition is the mean $\pm$ SD of epifluorescence microscopic measurements. The asterisks mark cases with significant difference of viabilities between CHO-vector cells and CHO-TRET1 cells at the same freeze-thaw conditions ($p < 0.01$). (Remade from Uchida et al., 2019)

比較として、193Kのインキュベーターで凍結する際、直接クライオチューブを投入する場合と別に、凍結処理容器(BICELL, 日本フリーザー)に入れて凍結速度を変えた実験も行った。

保存した試料を310Kの恒温槽内に投入して急速解凍し、凍結液を培養液に置換したのちダブルステイン法(ナカライテスク)で蛍光染色し、蛍光顕微鏡(IX-71, Olympus)観察して生存率を求めた。またより精度を高め実験の効率を上げるため、フローサイトメトリー(MUSE™, Cytex)を使った実験も行った。さらに生き返った細胞の健全性を確認するため、生存率を測定したものと同一条件で凍結した細胞を通常培養し、生き残った細胞の健全性(接着能、増殖能)の確認を行った。

生存率の確度を高めるため、異なる細胞株を用いて同様の実験条件で凍結融解実験を、少なくとも3回繰り返した。そして各実験条件の生存率を、平均値 $\pm$ 標準偏差(SD)で示した。ダブルステイン法で蛍光染色をしても発色しない細胞は測定不確かさとして見積もったが、いずれもSD値より小さかった。

統計分析は、Tukey-Kramer 検定 (Microsoft Excel 2010

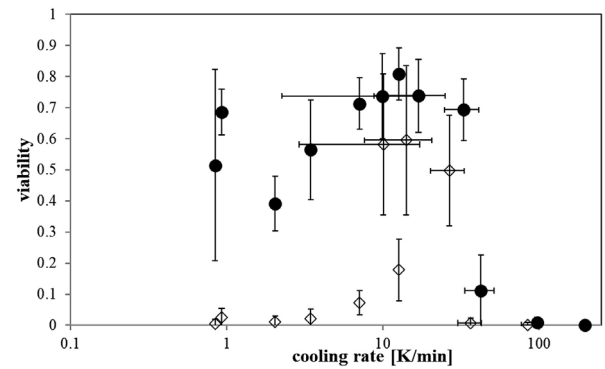


図2：CHO-vector細胞(◇)とCHO-TRET1細胞(●)の凍結・融解後生存率の凍結速度依存性, remade from Uchida et al. (2019)

Figure 2: Viabilities of cryopreserved CHO-vector cells (open diamonds) and CHO-TRET1 cells (solid circles) at various cooling rates. Experimental procedures and legends are similar to Fig. 1. (Remade from Uchida et al., 2019)

および BellCurve for Excel) による分散分析) を使用して、99% の信頼度で行った。

2.2 凍結・融解後生存率のトレハロース濃度依存性

図1にCHO-vector細胞(◇)とCHO-TRET1細胞(●)を0～1000 mMの異なるトレハロース濃度で193K条件下で凍結保存した際の生存率を示す (Uchida et al., 2017; 2019). CHO-vector細胞はどの濃度でも生存率が20%以下となり、ほとんど死滅していた。しかし、CHO-TRET1細胞は400～500 mM濃度を中心に高い生存率を示した。これらの結果から、細胞内へトレハロースを輸送することで細胞の凍結保存効果が顕著に増加することが示された。すなわち、トレハロースは天然CPAとして効果が大きいことが確認された。しかしその濃度には至適濃度が存在し、高濃度では逆効果になることがわかった。

2.3 凍結・融解後生存率の凍結速度依存性

2.2で求めた至適濃度である500mMのトレハロースを含む凍結液で、凍結温度を253～77K(液体窒素温度)まで変化させて凍結したときの、CHO-vector cellとCHO-TRET1 cellの生存率の凍結速度依存性の結果を図2に示す (Uchida et al., 2017; 2019)。

30K/minよりも速い凍結速度では、生存率に対する凍結速度依存性は、vector細胞もTRET1細胞も生存率が低く、急速凍結ではこの手法での凍結保存が難しいことを示している。一方それより低速の緩慢凍結では、TRET1細胞はばらつきがあるものの概ね高い生存率を示し、凍結保存が可能であることがわかった。一方Vector細胞は、10

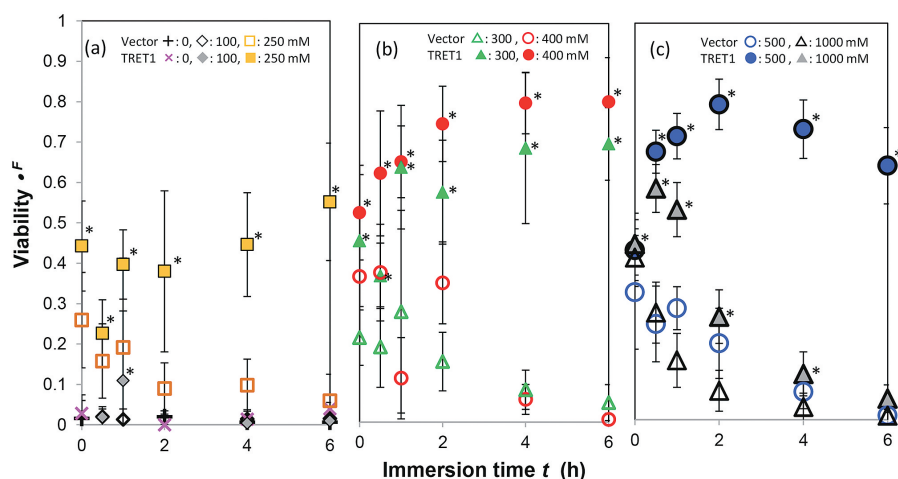


図3：CHO-vector細胞（白抜き印）とCHO-TRET1細胞（黒塗り印）の凍結・解凍後の生存率 η^F の浸漬時間依存性。凍結液中のトレハロース濃度C0毎に凡例を変えてあり、(a) 300 mM 未満の低濃度、(b) 300 ~ 400 mMの中濃度、(c) 500 mM以上の高濃度で分けて表示している。*印は、2種類の細胞の生存率が、統計的に有意な差がある条件($p < 0.01$)を示す。(Uchida et al., 2019)

Figure 3: Freeze-thaw viability η^F vs immersion time t of CHO-vector cells (open symbols) and CHO-TRET1 cells (solid symbols). (a) At the lowest extracellular trehalose-concentration C0 conditions: 0, 100, and 250 mM. (b) At the intermediate C0 conditions: 300 and 400 mM. (c) At the highest C0 conditions: 500 and 1000 mM. Asterisk marks above the symbols of η^F_T mean that there is a significant difference between η^F_T and η^F_V at the same trehalose concentration ($p < 0.01$ by the Tukey-Kramer test). (Uchida et al., 2019)

～30K/minの狭い範囲で生存率が高くなるが、それより低速になると生存率が低下することがわかった。Mazur et al. (1972) の二因子仮説によれば、急速凍結下では細胞内凍結の抑制が、緩慢凍結下では高濃度溶液への長期曝露が、細胞の生存率を決定するとしている。これをもとにすると、細胞内トレハロースは30K/min以下の緩慢凍結であれば、有効に細胞内凍結を阻害して凍結保存を達成できることを示している。細胞内へトレハロースが取り込まれないVector細胞では、凍結過程で生じる凍結濃縮相に細胞が暴露され細胞が損傷してしまうが、TRET1細胞ではそこでもトレハロースを取り込み、濃度差を緩和して細胞の損傷を抑制していると考えられる。Vector細胞で10～30K/minの範囲で生存率が高かったのは、細胞が凍結濃縮相へ暴露されている時間が短く、その間にある程度の脱水が進んで細胞内凍結もある程度抑制されたからではないかと考えられる。しかし30K/min以上の凍結速度では、細胞内にトレハロースが取り込まれていないとしても、細胞内氷晶形成を阻害できなかったのではないかと考えられる。

2.4 凍結・融解後生存率の凍結前浸漬時間依存性

CHO-TRET1細胞にトレハロースを輸送するのにかかる時間を2時間として2.2, 2.3の実験を行ったが、実際どれ

くらい輸送されるのか、またその浸漬時間によって凍結前の細胞の状態がどのようになっているのかを明らかにするため、凍結・融解後生存率の凍結前浸漬時間依存性や、CHO-TRET1細胞中へのトレハロース輸送量の実測などを行った(Uchida et al., 2019)。

図3は、様々な濃度でトレハロースを添加した凍結液に0～6時間、CO₂インキュベータ内で浸漬させた後、193Kで凍結させ1週間保存した後解凍して生存率を計測した結果を示す。この図から、トレハロースが輸送されないCHO-vector細胞については、いずれの濃度でも浸漬時間0時間が最高生存率を示し、浸漬時間が長いほど生存率が低下していることがわかった。これに対しCHO-TRET1細胞は、低トレハロース濃度条件下では浸漬時間が長いほど生存率が向上する傾向がみられた。図1で高い生存率を示した400mMトレハロース含有液中では、生存率は浸漬時間約4時間で最高生存率を示し、それ以上の時間でもその生存率を維持した。500mM以上の濃度条件下では、最高生存率を示す浸漬時間が濃度とともに短くなり、それより長い浸漬時間条件での生存率は時間とともに低下することがわかった。これらの実験から、トレハロースの細胞内への輸送量には限界があり、その濃度と等張になる凍結液濃度以上の濃度の溶液中では逆に細胞に害を及ぼしている可能性が示唆された。

そこでCO₂インキュベータで浸漬させたCHO-TRET1細胞またはCHO-vector細胞を使って、実際に細胞中へ輸送されたトレハロース量を定量した。インキュベータから取り出した細胞をリン酸緩衝塩 (PBS) で3回洗浄して細胞外のトレハロースを除去した後、コントロールとしてソルビトールを0.1 mgを含むエタノール0.5 mLを加え、細胞を粉砕し細胞内液を採取した。この試料を高速液体クロマトグラフィー (HPLC: LC-10A, 島津製作所) で分析した。この測定の詳細はWatanabe et al. (2002)に記載されている。その結果、予想通り400mM、4時間浸漬条件下で最高値(約80 pg/cell)を示し、それより高濃度液に浸漬させても輸送量は増えないことがわかった。(図4)

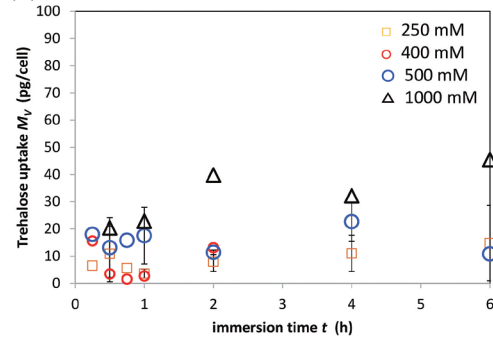
これらの結果から実験条件によっては、必要以上に高濃度溶液に浸漬してしまって凍結前に細胞が弱ってしまっているのではないかと考えた。そこで、浸漬期間中のCHO-TRET1細胞またはCHO-vector細胞のアポトーシス(細胞の自発的な死)の割合(アポトーシス率)を計測した。輸送トレハロース量の測定と同様に、一定の濃度(0, 100, 250, 500, 750 mM)の凍結液に一定時間(0.5, 1, 2, 4, 6時間)浸漬させた細胞を取り出し、フローサイトメトリー (Muse™, Cytex) を用いて、Annexin-Vと7-Aminoactinomycin D (7-AAD) 核染色色素からなる二重染色液 (Annexin V & Dead Cell Kit, Cytex) により初期、後期のアポトーシス率を測定した。

図5に示すように、CHO-vector細胞はトレハロース濃度や浸漬時間が増加するとともにアポトーシス率が増加することがわかった。これに対しCHO-TRET1細胞は400mM未満の濃度条件下ではあまりアポトーシス率に変化がなかったが、高濃度条件下ではCHO-vector細胞と同様、トレハロース濃度と浸漬時間とともにアポトーシス率が増加した。

以上の結果から、CHO-TRET1細胞にはトレハロース輸送量の上限が存在し、細胞外濃度400mMの時に2～4時間で最大量を輸送して細胞内外が等張になると考えた。すなわち、それ以上のトレハロース濃度条件下ではCHO-TRET1細胞といえども細胞外の方がトレハロース濃度が常に高く、浸透圧差による脱水ストレスを受けて凍結前に細胞が弱っていたことがわかった。

そこで、細胞中へのトレハロース輸送過程と、細胞外への脱水過程のいずれのプロセスが凍結保存効果に重要であるかを検討するため、簡単なモデルを使って生存率との関係を考察した (Uchida et al., 2019)。CHO-vector細胞は、細胞外に濃度 C_0 のトレハロースが存在する環境で浸透圧差が生じて脱水するため、細胞の体積が V_0 から δV だけ

(a) CHO-vector



(b) CHO-TRET1

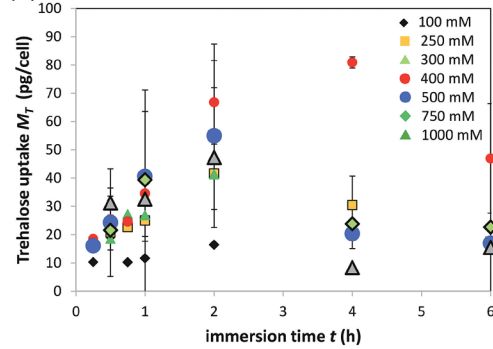


図4：細胞中に輸送されたトレハロース量の浸漬時間依存性 (a) CHO-vector細胞 M_v , (b) CHO-TRET1細胞 M_T
Figure 4: Amount of trehalose taken into CHO-vector cells (M_v) and CHO-TRET1 cells (M_T) vs immersion time t . Extracellular trehalose concentration conditions: 100, 250, 300, 400, 500, 750, and 1000 mM. (Uchida et al., 2019)

減少するというモデルを考えた。一方CHO-TRET1細胞は、細胞内外のトレハロース濃度差によって細胞外から細胞内へトレハロースを C_{in} だけ輸送するので、この浸透圧差が減少するとした。これらの仮定から、最終的な体積変化率 $(V_0 - \delta V) / V_0$ は、(1)式で与えられる。

$$\frac{(V_0 - \delta V)}{V_0} = \frac{C_{out}}{(C_0 - C_{in}) + C_{out}} \quad (1)$$

ここで、 C_{out} は細胞外培地中に含まれる電解質濃度であり、PBS水溶液を参考に $C_{out} = 154$ mMとした。

これらの結果をグラフにあらわしたものが、図6である。比較のため、2時間浸漬条件で -80°C 凍結させた細胞の生存率を η_T^F として重ねて示している (■)。細胞内へ輸送されるトレハロース量は、もし細胞に限界が無ければ細胞外濃度 C_0 が高いほど多くなるはずである (m_{in} , 点線)。しかし実際には図4に示すように、(図6では C_{in} , ●) 約400 mMより低い濃度ではこの法則に従うが、それ以上になると一定かやや低下する。(ここで C_{in} が高濃度条件下でやや低下しているのは、細胞のアポトーシスによって計測値

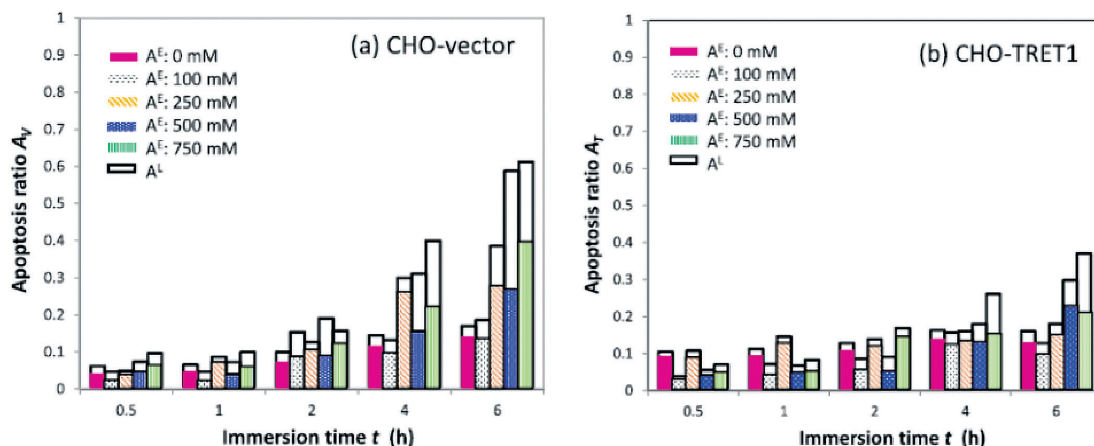


図5：凍結前にCO₂インキュベータ内で凍結液に浸漬させた細胞のアポトーシス率のトレハロース濃度・浸漬時間の長さ依存性。(a) CHO-vector細胞 A_{V} , (b) CHO-TRET1細胞 A_{T} . 式アポトーシス率 A^{E} (黒塗り印) に後期アポトーシス率 A^{L} (白抜き) を重ねて示している。(Uchida et al., 2019)

Figure 5: Apoptotic ratios of CHO-vector and CHO-TRET1 cells under various C0 conditions and immersion times. Bottom of each bar shows the ratio of early apoptosis (A^{E}). Added white bar on top shows corresponding ratio of late apoptosis (A^{L})

が過小評価されてしまった結果であると考えている。) この時、脱水により細胞の大きさがどれくらい収縮したか ($(V_0 - \delta V) / V_0$, $\diamond$) を計算したところ、 C_0 が400 mMまではほとんど変化なく、脱水の影響がみられない可能性が示唆された。これに対し高濃度環境下では脱水により細胞の大きさが収縮するであろうことが示された。凍結前の凍結液浸漬過程におけるアポトーシス率と $\delta V / V_0$ 値との相関が良かったことから ($R^2 = 0.84$), CHO-TRET1細胞は400 mM以下ではトレハロース導入量に応じて生存率が向上するが、それ以上では脱水ストレス等により生存率が低下してしまうことが示唆された。このことから、細胞の緩慢凍結保存メカニズムとして必須とされていた脱水プロセスが、実際にはどのような機序で生存率向上に寄与しているのか、見直す必要があると考えた。

3. 高圧ガラス化法でのトレハローストランスポーター発現細胞の凍結保存

TRET1発現細胞を用いた研究から、細胞内へトレハロースを500 mM程度の濃度で輸送すれば、生存率が向上することがわかった。しかしこの濃度でも、凍結する温度(凍結速度)によって生存率が大きく変わるため(図2参照)、トレハロースが細胞内の水をどのように制御して生存率向上に寄与しているかについての知見は得られていない。また前述のように、細胞内水を脱水することが細胞の凍結保存に必須ではないことが示唆され(Uchida et al., 2019), 凍結条件下で細胞内水がガラス状態になっている

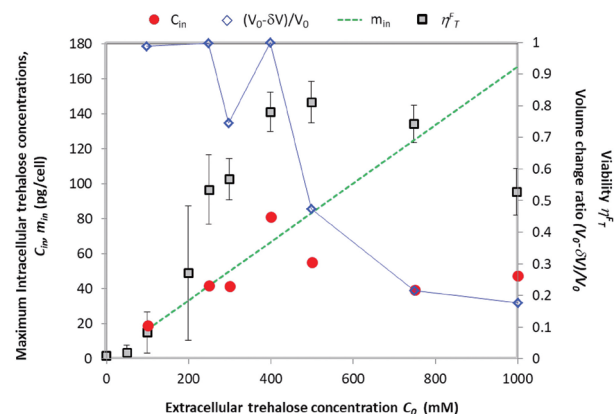


図6：モデルから求めた細胞からの脱水率 $(V_0 - \delta V) / V_0$ ($\diamond$ 印) の細胞外トレハロース濃度 C_0 依存性。比較のため、細胞内トレハロース量(モデル：点線、実測：●印)およびCHO-TRET1細胞の凍結解凍後の生存率 η_{T} (□印) を示した(Uchida et al., 2019)

Figure 6: Comparison to model of trehalose uptake. C_{in} is the maximum amount of intracellular trehalose measured in the CHO-TRET1 cell. m_{in} is the maximum amount of trehalose expected to inflow into the cell when equilibrated to C_0 , assuming no limit for uptake. $(V_0 - \delta V) / V_0$ is the volume change ratio of the cells, owing to dehydration. η_{T} is the freeze-thaw viability of CHO-TRET1 cells at various C_0 conditions for a 2-h immersion time. (Uchida et al., 2019)

のが問題として注目された。

そこで本研究では細胞内外の水の構造変化を、高圧下で凍結させる技術(Mishima and Suzuki, 2001; Suzuki and Mishima, 2002)を使って積極的に制御して、水の構造が細胞の凍結融解生存率に及ぼす影響を調べた。もし細胞内の水のガラス化が重要なのであれば、氷Ihより体積変化の少ない高圧氷やガラスを生成させれば、細胞の生存率が向上するはずだと考えた。

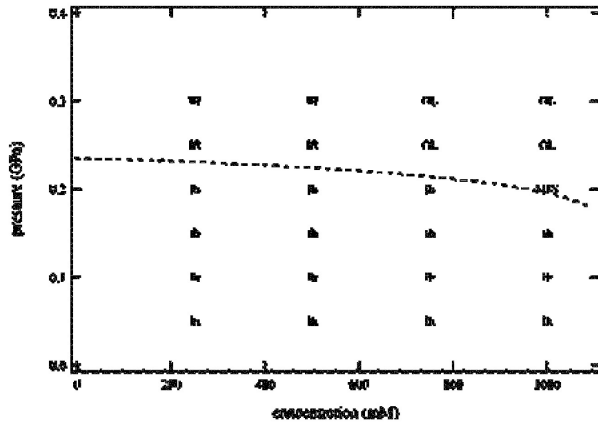


図7：トレハロース含有凍結液のPLCV法による固相のトレハロース濃度－圧力相図 (Ih: 氷Ih, III: 高压氷, GL: HDA様ガラス) 点線は、氷Ih相と高压氷相との境界を表す (Uchida et al., 2024)
Figure 7: Phase diagram of trehalose aqueous solution by PLCV (Ih: ice Ih, III: high-pressure ice, GL: HDA-like glass, MIX: mixture of III and GL) (Uchida et al., 2024)

3.1 実験方法

実験に用いた細胞は、2章と同様のCHO-TRET1細胞とCHO-vector細胞である。これらの細胞を、培養液にトレハロースを400 mM溶解させた凍結液中に、 10^6 cells/mLの濃度で分散させ実験に供した。実験装置のある東海大まで輸送する前の細胞の生存率は、 0.86 ± 0.10 であった。

本研究で用いたガラス化手法は、Suzukiら (Mishima and Suzuki, 2001; Suzuki and Mishima, 2002; Suzuki and Takeya, 2020; 2022) によって開発されたPressure Liquid Cooling Vitrification (PLCV)法である。インジウムの容器中に液体試料 (約2 cm³) を入れ、室温でプレス機により実験圧力 P_{exp} まで加圧後、 P_{exp} に保った状態のまま液体窒素で冷却し、40 K/minの冷却速度で77Kに冷却した。77Kで圧力を1気圧まで開放し、77Kに保ったまま試料を回収、保存、輸送した。

はじめPLCV法でトレハロース水溶液がガラス化する圧力・濃度条件を調べ、その条件でCHO細胞が圧力に耐えられるかの予備実験を行った後、凍結保存実験を行った。トレハロース濃度を250 ~ 1000 mM、圧力を0.05 ~ 0.3 GPaの範囲で行った予備実験から、トレハロース水溶液の固相としては、通常の氷相 (Ih)、高压氷相 (IIIと予想される)、および非晶質相 (高密度ガラス (HDA) 様のガラス) の3種類が観測され、Ih相は750 mM以下の濃度では0.2 GPa以下、1000 mMでは0.15 GPa以下で観測された (図7: Uchida et al., 2024)。

また室温条件で1000 mM凍結液中に分散したCHO-TRET1細胞を0.3 GPaまでの圧力をかけて減圧後にトリパ

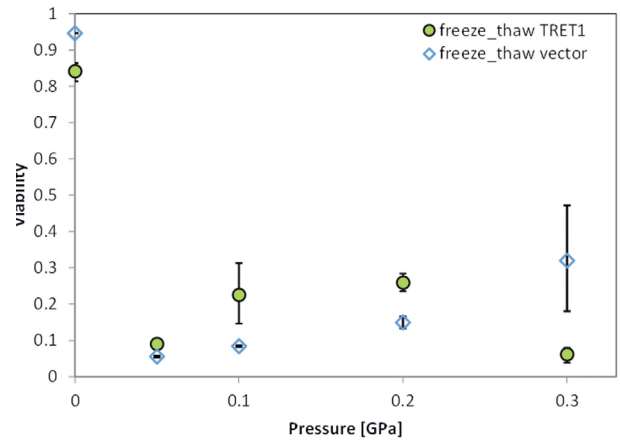


図8：PLCV法に依るCHO-vector細胞 (◇) とCHO-TRET1細胞 (●) の生存率の圧力依存性。コントロールとして、未加圧の細胞の凍結・解凍後生存率をy軸(0 GPa)上に示した。 (Uchida et al., 2024)

Figure 8: Pressure dependence of viability of CHO-vector (open diamonds) and CHO-TRET1 cells (solid circles) after PLCV operation. Data of 0 GPa show the viability of each control cell (no pressurization) (Uchida et al., 2024)

ンプルー染色で生存率を調べたところ、0.3 GPaでは加圧前より2割程生存率が下がったが、0.2 GPa以下では加圧前と誤差範囲内で一致した。これらの予備実験の結果から、本実験ではトレハロース濃度1000 mM、圧力は0.3 GPa以下で行った。2章の結果 (図3; Uchida et al. 2019) から、CHO-vector細胞に対しては凍結液に置換後すぐに実験を開始し、CHO-TRET1細胞に対しては0.5時間浸漬させてから開始することで、細胞に対しての浸透圧ストレスをなるべく軽減させた。

3.2 PLCV法によるCHO細胞の凍結解凍生存率の圧力依存性

一定圧力条件下で室温から液体窒素温度まで冷却すると、0.3 GPaではガラス化または高压氷相の生成により試料体積が若干減少する一方、0.2 GPa以下では氷Ih相の生成により大きな体積増加が見られた。このことから、少なくとも細胞外水は0.3 GPa条件下でガラス化していることが確認できた。またこれらの傾向は、CHO-TRET1細胞でも同様であることを確認した。

凍結回収したサンプルを解凍後、細胞の生存率を測定した (図8: Uchida et al., 2024)。コントロールとして、加圧せず凍結解凍した試料の結果を0 GPa (y軸上) に示した。コントロールの生存率が0.8以上であるのに対し、PLCV法により凍結した試料の生存率は全体的に低かった。その中でも圧力依存性を見てみると、CHO-TRET1細胞は0.3

GPaではほぼ全滅なのに対し, 0.2, 0.1 GPa条件下では比較的高い生存率を示した。ただし0.05 GPaでは再び低い生存率となった。CHO-vector細胞は, 高圧ほど生存率が高い, という傾向を示した。

CHO-vector細胞の生存率の圧力依存性は, 細胞外トレハロースの凍結に及ぼす影響を反映していると考えられる。すなわち, 細胞外トレハロースによる凍結保護効果は, 細胞外氷相が高圧相あるいはガラス相になると高まると言える。しかし細胞内にはトレハロースは輸送されていないので, 凍結によって氷結晶が生成されている可能性がある。一方でCHO-TRET1細胞の結果は, 細胞外凍結に加え細胞内にもトレハロースがあることによる影響を反映しているはずである。0.3 GPa加圧下のCHO-TRET1細胞については, 細胞内水も高圧氷やガラス相になり氷Ih相の形成が抑制されるので生存率が高まると期待されたが, 細胞の生存率はほぼゼロになってしまった。すなわち細胞内水の結晶化を抑制することだけでは, 生存率を向上させるどころかむしろ低下してしまうことが示された。また細胞外で氷Ih相が形成される0.2 GPa以下の圧力条件下で, 両細胞とも高圧の方が生存率が高くなった。このことから, 氷Ih結晶が生成する条件下では, 圧力が高いほど生存率を高める要因があることが示唆された。

0.3 GPa条件で凍結した細胞についてCHO-vector細胞で生存率が高く, CHO-TRET1細胞で生存率が低下した要因として, 解凍時の固-固相転移や, 微細結晶の再結晶現象が考えられる。Suzuki & Takeya (2022) によると, 0.023 mol/mol (約1.5M) のトレハロース水溶液をPLCV法で0.3 GPaの圧力下で凍結した場合, 77Kではアモルファス相であるが, 約160Kで結晶化が起こる。この時の微細結晶の粒径は, 3~8 nm程度と見積もられている。つまりトレハロースを含むことによってより微細な結晶が生じると考えられる。PLCV法で形成された細胞内ガラス相(細胞内には0.5M程度のトレハロースが導入される(図4: Uchida et al., 2024)ことから, 高圧氷相が生成されている可能性が高い)が, 昇温時に急激に再結晶や氷Ih相への相変化を起こしたのかもしれない。特に細胞内で氷相転移や再結晶が起きることで, 致死の状態になったことが考えられる。

Vector細胞は細胞内にトレハロースが導入されないため, 細胞内水は氷Ih相になっている可能性がある。昇温時でも固-固相転移が起きなかったのではないだろうか。0.2 GPa以下の条件における生存率の圧力依存性は, 細胞内外とも氷Ihが形成されていることが考えられるため, 少なくとも昇温時に固-固相転移は起きていないと思われる。そのため, 何か高圧ほど生存に有利な条件が

あったのではないかと。例えば形成される氷Ih結晶粒径が高圧ほど小さく, 再結晶成長速度がトレハロースによって抑制されていれば, 生存率が高まる可能性もあろう。今後, 形成される結晶の特性についても調査が進めば, 詳細を明らかにできるだろう。

ちなみに, 加圧下で解凍したらこの現象が抑えられるかと考えて, 加圧したまま解凍してみる実験を行った。しかし結果は, 圧力を維持したまま解凍しても, 生存率は低くなってしまった。解凍後の細胞を顕微鏡観察した結果, 細胞自身の形態は保たれていた。つまり, 細胞内で氷Ih結晶が再結晶していても, 細胞を破壊するほどの大きさにはなっていないようである。

解凍時の結晶化, 再結晶化プロセスが凍結保存された細胞の生死に影響を及ぼすということは, 先行研究(Mazur, 1966; 1977; 1984; Mazur et al., 1972; Hey and Macfarlane, 1998; Meryman, 2007; Ishiguro and Horimizu, 2008; Seki and Mazur, 2009; 2012; Klemhans et al., 2010)でも報告があるが, 本研究の結果から元の固相状態の違いがこれらのプロセスの影響度を定める要因である可能性が示唆された。従って, 通常の凍結保存においてもガラス化することより, 凍結によって生じた固相の融解中での変化を抑制することの方が, 生存率の向上に重要であると考えられる。

4. まとめと今後の課題

細胞の凍結保存(特に緩慢凍結の場合)のメカニズムとして, 「凍結時に細胞外氷晶の生成により細胞内水が脱水され, 細胞内の残存水は凍結濃縮やCPA的作用により結晶化せずガラス化する」ということが提唱されている(Mazur, 1984; Mazur et al., 1972; Meryman, 2007)。すでに産業化されている技術であるので, この仮説は一般的に認知されているが, ニューロンや心筋細胞, 血中細胞など需要の高い細胞で凍結保存技術が確立していない物が多い(Smith, 1957; Alink et al., 1976; Koch et al., 1991; Tamamori-Adachi et al., 2003; Yokomuro et al., 2003; Motomura et al., 2007; Holovati et al., 2009; Miyamura et al., 2010; Higgins et al., 2011; Uchida et al., 2012)。また産業化されている細胞についても, 長期に保存された細胞の品質が低下する現象も報告されている(Miyaki, 2010; Miyaki et al., 2005)。すなわちこの仮説は, 必ずしも科学的に検討されているわけではないと言える。そればかりか, 凍結時の脱水がいつ, どの程度起こると凍結保存ができるかなどの定量性や, 細胞内水がガラス化しているか否かの直接観測などはほとんどされていない。私たちはこの課題に「水の凍結

制御」という立場から挑戦しており、本稿では細胞内に天然CPAの一つであるトレハロースを輸送することのできるユニークな細胞を用い、細胞内トレハロースのCPA効果を確認するとともに、脱水の効果やガラス化の影響などを調べた成果の一部を報告した。

脱水の効果については、現在水チャンネルタンパク質(AQP)を細胞膜に発現させた細胞(Kato et al., 2014)を用いて研究を進めており、凍結時の脱水がいつ、どの程度起こると凍結保存ができるかについて知見を得はじめている(Matsuo et al., 2025; 松尾ほか, 2025)。緩慢凍結では、細胞膜を通した脱水速度も温度低下速度より早く、図2の現象を説明できることがわかってきた。AQPを通した脱水速度はさらに速いため、80K/min以上の凍結速度で生存率が低下している条件において、効果を発揮することがわかった。今後、細胞膜の透水性の温度依存性等を明らかにし、脱水の効果を定量化していく必要がある。

一方ガラス化については、個々の細胞内での水の状態を検出する技術が開発できておらず、巨視的な観測結果から類推するに留まっている。通常、細胞内の水がガラス状態か氷晶形成されたかを判断するには、光学顕微鏡によるフラッシング現象(Asahina, 1966)を利用する。しかし可視光の波長以下の微細な氷晶とガラス状態とを区別することはできない。X線や中性子線回折等の固体の構造を解析する手法は、その空間分解能や感度が単一細胞の中の水と外の水との区別をつけられるほど高くはない。そこで顕微分光法(Yu et al., 2019; Pi et al., 2019)が、現時点では直接観測の可能性が高く、細胞内の水の状態をある程度把握できるところまで来ているので、今後はそうした技術を導入して、個々の細胞の生死と結び付けた計測を行っていく予定である。

謝辞

本研究は、科学研究費(26105009, 17K1883407, 22K1867802)、および(公財)秋山記念生命科学振興財団2023年度研究助成よりFinancial supportsを受けた。トレハロース(エンドトキシンプリー)は林原(株)(現:(株)ナガセヴィータ)から提供いただいた。HPLC測定は、農研機構の白鳥氏、水谷氏に協力いただいた。また本研究は、北海道大学低温科学研究所共同研究(22S002, 23S002, 24S002, 25S001)における有意義な議論を経て推進された。

参考文献

- Asahina, E. (1966) Freezing injury in egg cells of sea urchin. In: Asahina, E. (ed) *Cellular Injury and Resistance, in Freezing Organisms*, Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 211–229.
- Alink, G.M., C.C. Verheul, and P.G.J. Offerijns (1976) The effect of cooling rate and dimethyl sulfoxide concentration on low temperature preservation of neonatal rat heart cells, *Cryobiology*, **13**, 295–304.
- Hey, J.M., and D.R. Macfarlane (1966) Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 1. A comparison of mechanisms, *Cryobiology*, **33**, 205–216.
- Hey, J.M., and D.R. Macfarlane (1998) Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2. Ice crystal growth kinetics, *Cryobiology*, **37**, 119–130.
- Higgins, A.Z., D.K. Cullen, M.C. LaPlaca, and J.O.M. Karlsson (2011) Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells, *J. Neurosci. Methods*, **201**, 9–16.
- Holovati, J.L., M.I.C. Gyongyossy-Issa, and J.P. Acker (2009) Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality, *Cryobiology*, **58**, 75–83.
- Ishiguro, H., and T. Horimizu (2008) Three-dimensional microscopic freezing and thawing behavior of biological tissues revealed by real-time imaging using confocal laser scanning microscopy, *Int. J. Heat and Mass Transfer*, **51**, 5642–5649.
- Karow, A.M. Jr., O. Carrier Jr., and W.C. Holland (1967) Toxicity of high dimethyl sulfoxide concentrations in rat heart freezing, *Cryobiology*, **3**, 464–468.
- Kato, Y., T. Miyauchi, Y. Abe, D. Kojic, M. Tanaka, N. Chikazawa, Y. Nakatake, S.B.H. Ko, D. Kobayashi, A. Hazama, S. Fujiwara, T. Uchida, and M. Yasui (2014) Unprecedented cell-selection using ultra-quick freezing combined with aquaporin expression, *PLoS One*, **9** (2), e87644.
- Kikawada, T., A. Saito, Y. Kanamori, Y. Nakahara, K. Iwata, D. Tanaka, M. Watanabe, and T. Okuda (2007) Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **104**, 11585–11590.
- Kleinmans, F.W., S. Seki, and P. Mazur (2010) Simple, inexpensive attainment and measurement of very high cooling

- and warming rates, *Cryobiology*, **61** (2), 231–233.
- Koch, E., M. Larak, and F. Ellendorff (1991) Comparative studies on in vitro reactivity of fresh and cryopreserved pig lymphocytes, *Cryobiology*, **28**, 405–412.
- Lawson, A., H. Ahmad, and A. Sambanis (2011) Cryotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions, *Cryobiology*, **62**, 115–122.
- Matsuo, S., K. Yamazaki, M. Yasui, Y. Abe, and T. Uchida (2025) Cooling-rate dependence of the cryopreservation of aquaporin-overexpressing cells with a non-permeable cryoprotectant, *Cryobiology*, **119**, 105237.
- 松尾堇, 安井正人, 阿部陽一郎, 内田 努 (2025) AQP4過剰発現細胞の脱水速度の温度依存性の測定, *Cryobiology and Cryotechnology*, in press. (in Japanese with English Summary)
- Mazur, P. (1966) Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing, In: Meryman, H.T. (ed) *Cryobiology*, Academic Press, New York, 213–315.
- Mazur, P. (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology*, **14**, 251–272.
- Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications, *Am. J. Physiol.* **247**, C125–C142.
- Mazur, P., S.P. Leibo, and E.H.Y. Chu (1972) A two-factor hypothesis of freezing injury, *Exp. Cell Res.* **71**, 345–355.
- Meryman, H.T. (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice, *Transfusion*, **47**, 935–945.
- Mishima, O., and Y. Suzuki (2001) Vitrification of emulsified liquid water under pressure, *J. Chem. Phys.*, **115**, 4199–4202.
- Miyaki, K., S. Nakano, H. Ohta, and H. Kurokura (2005) Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution, *Fish Sci.*, **71**, 457–458.
- Miyaki, K. (2010) Cryopreservation of fish spermatozoa, *Refrigeration*, **85**, 295–299. (in Japanese with English Summary)
- Miyamura, K., M. Nagayama, K. Gohara, T. Taira, K. Shimizu, M. Sakai, and T. Uchida (2010) Evaluation of viability of cryopreserved rat cardiac myocytes and effects of dimethyl sulfoxide concentration on cryopreservation, *Cryobiology and Cryotechnology*, **55** (2), 111–117. (in Japanese with English Summary)
- Motomura, J., T. Uchida, M. Nagayama, K. Gohara, T. Taira, K. Shimizu, and M. Sakai (2007) Effects of additives and cooling rates on cryo-preservation process of rat cortical cells, In: Kuhs, W.F. (ed) *Physics and Chemistry of Ice*, Royal Society of Chemistry, London, 409–416.
- (公社) 日本産婦人科学会, [https://jsog.or.jp/medical/865/\(25/9/13訪問\)](https://jsog.or.jp/medical/865/(25/9/13訪問))
- (一社) 日本生殖医学会, <https://jsrm.or.jp/index.html> (25/9/13訪問)
- Pi, C.H., G. Yu, P.I. Dosa, and A. Hubel (2019) Characterizing modes of action and interaction for multicomponent osmolyte solutions on Jurkat cells, *Biotech. Bioeng.*, **116**, 631–643.
- Polge, C., A.U. Smith, and A.S. Parkes (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature*, **164**: 666.
- Rall, W.F., and G.M. Fahy (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degree C by vitrification, *Nature*, **313**, 573–575.
- 酒井昭 (1987) *凍結保存: 動物・植物・微生物*, 朝倉書店.
- Seki, S., and P. Mazur (2009) The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure, *Cryobiology*, **59**, 75–82.
- Seki, S., and P. Mazur (2012) Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution, *PLoS ONE*, **7** (4), e36058.
- Smith, A. (1957) problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0°C, *Proc Royal Soc London, Ser B, Biological Sciences*, **147**, 533–544.
- Suzuki, Y., and O. Mishima (2002) Raman spectroscopic study of glassy water in dilute lithium chloride aqueous solution vitrified under pressure, *J. Chem. Phys.*, **117**, 1673–1676.
- Suzuki, Y., and S. Takeya (2022) Transformation process of ice crystallized from a glassy dilute trehalose aqueous solution, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **24**, 26659–26667.
- Suzuki, Y., and S. Takeya (2020) Slow crystal growth of cubic ice with stacking faults in a glassy dilute glycerol aqueous solution, *J. Phys. Chem. Lett.*, **11**, 9432–9438.
- Tamamori-Adachi, M., H. Ito, P. Sumrejkanchanakij, S. Adachi, M. Hiroe, M. Shimizu, J. Kawauchi, M. Sunamori, F. Marumo, S. Kitajima, and M. Ikeda (2003) Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferations, *Circ Res*, **92**, e12-e19.
- Uchida, T., M. Furukawa, T. Kikawada, K. Yamazaki, and K. Gohara (2017) Intracellular trehalose via transporter TRET1 as a method to cryoprotect CHO-K1 cells, *Cryobiology*, **77**, 50–57.
- Uchida, T., M. Furukawa, T. Kikawada, K. Yamazaki, and K.

- Gohara (2019) Trehalose uptake and dehydration effects on the cryoprotection of CHO-K1 cells expressing TRET1, *Cryobiology*, **90**, 30–40.
- Uchida, T., S. Masuto, T. Kikawada, M. Yasui, and Y. Abe (2024) Mechanism of slow-freezing cryopreservation using trehalose as a cryoprotectant agent, *Cryobiology and Cryotechnology*, **70** (1), 7–15.
- Uchida, T., Y. Suzuki, K. Sasaki, and T. Kikawada (2024) Cryopreservation of CHO-TRET1 cells using Pressure Liquid Cooling Vitrification method, *Cryobiology and Cryotechnology*, **70** (2), 83–93.
- Uchida, T., K. Miyamura, M. Nagayama, and K. Gohara (2012) Experimental investigations of cryopreservation mechanisms on dispersed rat cardiac myocytes with dimethyl sulfoxide, *Cryobiology and Cryotechnology*, **58** (1), 59–63. (in Japanese with English Summary)
- Watanabe, M., T. Kikawada, N. Minagawa, F. Yukuhiro, and T. Okuda (2002) Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures, *J. Exp. Bio.*, **205**, 2799–2802.
- Wowk, B. (2010) Thermodynamic aspects of vitrification, *Cryobiology*, **60**, 11–22.
- Yokomuro, H., A.G.D. Mickle, R. Weisel, and R. Li (2003) Optimal conditions for heart cell cryopreservation for transplantation, *Mol. Cell Biochem.*, **242**, 109–114.
- Yu, G., R. Li, and A. Hubel (2019) Interfacial interaction of sucrose during cryopreservation detected by Raman spectroscopy, *Langmuir*, **35**, 7388–7395.
- Yu, Z.-W., and P.J. Quinn (1994) Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology, *Biosci. Rept.*, **14**, 259–281.