



Title	凍結細胞の温度変動による応答特性に関する研究
Author(s)	奥田, 淳
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/103198
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

凍結細胞の温度変動による応答特性に関する研究

奥田 淳

2025年7月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第1章 序論	4
1.1 緒言	4
1.2 細胞製品の流通多様化	6
1.3 細胞製造性を考慮した工程設計の重要性	7
1.4 本研究の目的と構成	8
第2章 温度変動による細胞生存性への影響の解釈	10
2.1 緒言	10
2.2 実験材料および方法	15
2.2.1 hiPSC の培養条件	15
2.2.2 hiPSC の凍結保存液への懸濁	16
2.2.3 hMSC の培養条件および凍結保存液への懸濁	16
2.2.4 hiPSC への温度サイクル処理	17
2.2.5 生存性評価指標と測定方法	19
2.2.6 hMSC への温度サイクルによる影響評価	21
2.2.7 凍結保存液のガラス転移温度の評価	24
2.2.8 統計解析	25
2.3 実験結果	26
2.3.1 サイクル回数が hiPSC の生存性指標に与える影響	26
2.3.2 温度域による hiPSC の生存性指標への影響	26
2.3.3 hMSC への温度サイクルによる影響評価	29
2.3.4 凍結保存液のガラス転移温度の評価	32
2.4 考察	33
2.5 小括	37

第3章 温度変動により生じる細胞応答の解釈	38
3.1 緒言	38
3.2 実験材料および方法	40
3.2.1 ヒトiPS細胞の培養	40
3.2.2 フローサイトメトリー測定試料の温度サイクル処理	40
3.2.3 ラマン分光法による測定	41
3.2.4 データ処理	44
3.2.5 フローサイトメトリーによるミトコンドリア膜電位の評価	47
3.3 実験結果	48
3.3.1 ラマン分光法による解凍後のシトクロムシグナルの変化の解析	48
3.3.2 ラマン分光法による温度サイクル時のDMSOシグナルの変化の解析	49
3.3.3 温度サイクルによるミトコンドリア膜電位の変化	51
3.4 考察	52
3.5 小括	57
第4章 総括	58
略語一覧	64
指標	65
参考文献	66
謝辞	75

第1章 序論

1.1 緒言

低温保存は細胞の懸濁液や組織を長期的に保存する唯一の有効的な手段である (Isasi & Knoppers, 2009; Karlsson & Toner, 1996). 細胞製品においては、凍結保存液(Cryo-protective solution, CPA)を用いて細胞を緩慢に凍結する手法が最も広く用いられている。この方法では、CPAに細胞を懸濁し、温度をゆっくりと低下させる。緩慢な冷却により、細胞外に氷晶が先に形成され、それに伴い細胞外の溶質濃度が上昇し浸透圧差が生じることで、細胞内から水分が脱水される。この脱水により、細胞内の氷晶形成が抑制され、細胞内構造の機械的損傷リスクが軽減されると考えられている (Mazur, 1963, 1984; Mazur et al., 1972). 凍結保存液の主成分としてはジメチルスルホキシド(DMSO)が広く使用されており、DMSOは細胞膜を透過し、細胞内にも一部が取り込まれる。冷却過程では、細胞内外に氷晶が形成され、氷の存在しない部分は溶質濃縮によって形成される高濃度の液相(Vitreous solution)として存在する。この液相は、ガラス転移温度(T_g)を下回る温度においては 10^{12} Pa·s を超える高粘性状態を維持する (Hubel et al., 2014). これは、細胞内外の水分子が拡散運動を停止し、種々の生体反応を抑制することによって長期保存を可能にする条件である。特に、DMSOを主成分とする凍結保存液の場合、その T_g はおよそ -120°C 付近に存在するとされており、細胞製品を安定に長期保存するためには、この T_g を下回る温度、すなわち実用的には液体窒素温度領域での保管が必要とされる (Meneghel et al., 2019). 保存に関連する温度帯と細胞内外の環境を図 1 に整理する。

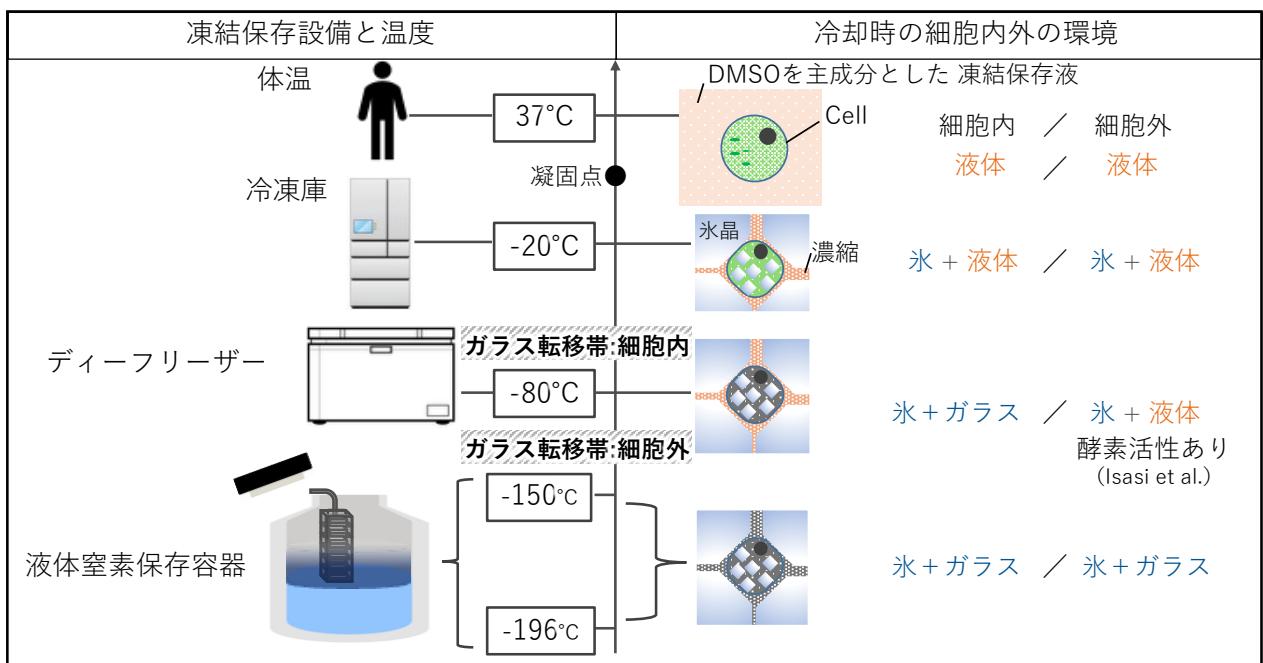


図 1 各種保管設備の温度帯における細胞内外の環境

細胞製品の長期保存には液体窒素温度領域が適用され、主には液体窒素の気相中で試料を保管する容器が使用されている (“USP General Chapter <1044> Cryopreservation of Cells,” 2014). この保管方式では、細胞を充填したバイアルやバッグを単位として、複数をまとめたラック単位で収納・管理されているのが一般的である。出荷時には必要な試料のみを取り出すのが理想だが、実運用では出庫対象の容器が収納されているラックごと一時的に取り出され、これにより他の非出庫容器も一時的に温度上昇にさらされる。このような一連の入庫・出庫操作による細胞の温度上昇は Transient warming events, TWEs と呼ばれており、凍結細胞の劣化リスクと考えられている。ヒト胎盤由来の間葉系幹細胞／間葉系間質細胞(Mesenchymal Stromal / Stem Cells, 以下 MSC)を用いた研究において、このような温度の上昇が大きいほど、またその回数が多くなるほど、最終的な生存率や接着能、代謝活性や遺伝子発現の調節が変化することが報告されている (Pogozhykh et al., 2017). これらの変化は治療における有効性、すなわち品質の劣化を引き起こ

す可能性があり、保管・輸送における温度管理とは単に保存容器内の温度を維持することにとどまらず、この温度変動についても管理することが求められる。

1.2 細胞製品の流通多様化

近年、幹細胞を用いた治療法の進展に伴い、これら細胞製品の大量製造に向けた技術開発が進められている (Yamamoto et al., 2024; Yamamoto & Kino-oka, 2021)。患者ニーズに応じた多拠点への配送や、共同バンクの活用などが構築される中、サプライチェーンの効率化と流通形態の多様化が進むことが予想される (Criswell et al., 2022)。製造から投与までに複数回、拠点間を輸送されるようになると、物流上の中継や輸送回数が増加するため、凍結保管される細胞の容器間の移し替えが発生することから(図 2)，温度管理上のリスクは高まることが想定される。このような背景から、細胞製品の普及には、製造工程のスケールアップのみならず、製造後の流通工程における品質保持技術の確立が不可欠である (Meacle et al., 2016)。

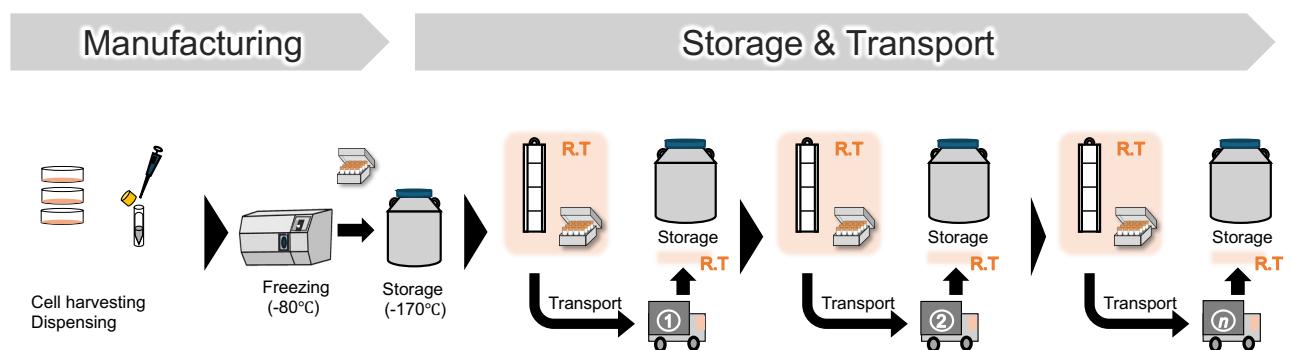


図 2 保管、輸送において繰り返し発生する温度変動

1.3 細胞製造性を考慮した工程設計の重要性

細胞製造における工程設計を検討する際の有効な考え方として、「細胞製造性 (cell manufacturability)」の概念がある (Kino-oka et al., 2019). この考え方は、製造における種々の変動(原料変動, 操作ばらつき, 外部環境など)を踏まえたうえで, 生物学的見地と工学的見地を橋渡しし, 工程全体を体系的に構築・管理することの必要性を示している. 一方で細胞製造においては, 実運用で避けがたい温度変動 (TWEs) による品質劣化を考慮した工程設計については, 体系的に行うための指針は示されてこなかった.

このような TWEs に起因する品質劣化を許容範囲内に抑える設計を可能にするには, 次の 2 つの理解が不可欠である. 第一に, 温度変動という物理化学的入力が, 細胞の生存性や機能性といった品質指標(出力)にどのように影響するかを定量的に把握すること. 第二に, その入力が細胞内部で引き起こす応答, すなわち物理化学的入力がどのように生物学的出力へと変換されるのかという“細胞応答”を, 科学的根拠に基づいて理解することである. これら「入力と出力の関係の理解」と「細胞応答の理解」は, 細胞製造性を踏まえた工程設計の前提条件であり, TWEs による品質劣化は従来の細胞製造工程では十分に考慮されてこなかったポイントである. これらを明らかにすることは, 細胞製造性に基づいた合理的な設計を体系化する一助となる.

1.4 本研究の目的と構成

本博士論文では、TWEs による品質劣化を考慮した工程設計に資する応答特性を理解することを目的とし、ヒト iPSC (hiPSC) またはヒト MSC (hMSC) の凍結保存・輸送中の温度変動による応答特性を対象に研究を行なった。図 3 と図 4 に、入出庫操作における入力・出力・細胞応答の整理と博士論文の構成をそれぞれ示した。

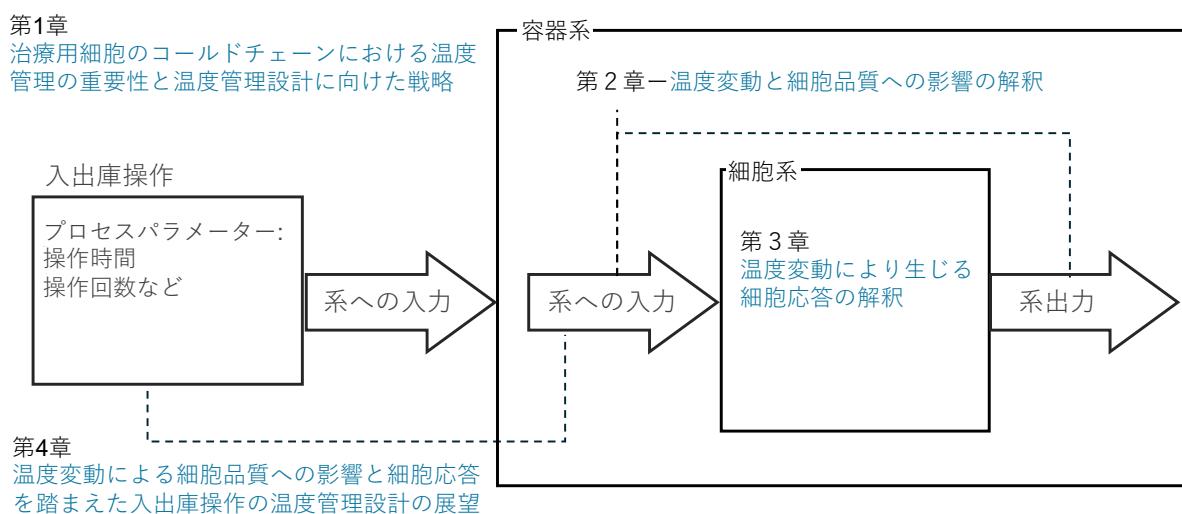


図 3 入出庫操作における入力・出力・細胞応答の整理

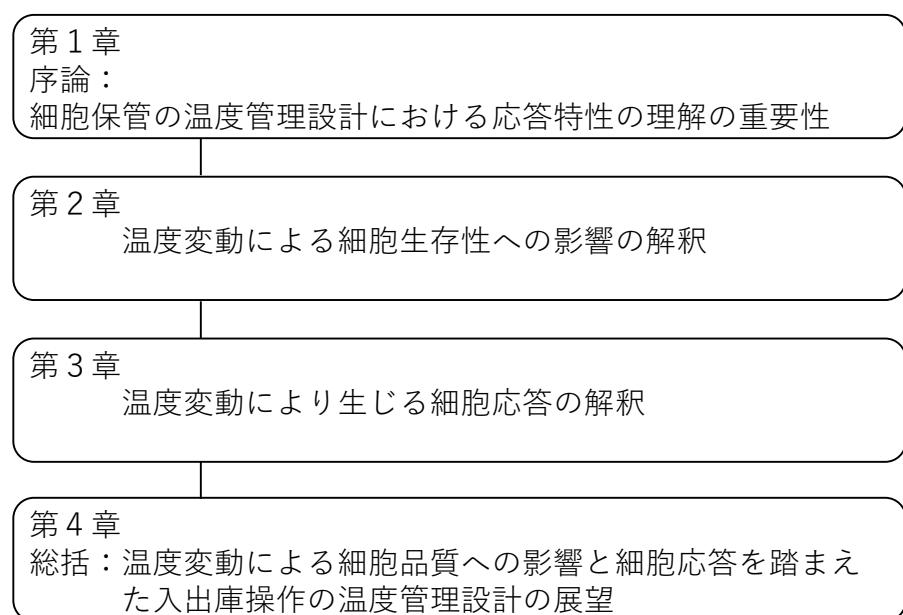


図 4 博士論文の構成

第1章では、細胞製品の長期保存と流通における TWEs が品質に及ぼす影響を踏まえ、これらを考慮した工程設計の必要性を示した。その上で、細胞製造性(cell manufacturability)の概念に基づき、温度変動という物理化学的入力と、それに伴う細胞応答および品質変化(出力)との関係を体系的に理解することの重要性を述べた。

第2章では、TWEs が凍結細胞の生存性に与える影響を評価するための実験系を構築し、異なる温度変動条件下で生存性の定量的变化を明らかにした。これにより、入力(変動温度域、変動回数)と出力(生存性変化)の関係を整理した。

第3章では、TWEs 下における細胞内部の物理化学的変化と細胞応答のメカニズムを解明することを目的とし、ラマン分光法とフローサイトメトリーを用いて、細胞内外の環境変化とそれに伴う細胞死誘導に関わる挙動を解析した。

第4章の総括では、第2章および第3章で得られた知見を踏まえ、TWEs による品質劣化を考慮した温度管理設計の考え方を整理した。具体的には、投与の際に満たすべき品質指標のボーダーラインを設定し、出庫操作による入力条件を設定する手法について展望を述べた。

第2章 温度変動による細胞生存性への影響の解釈

2.1 緒言

本章では、幹細胞製品の流通過程における品質保持の課題に着目し、凍結細胞が温度変動に曝されることによる生存性の変化を実験的に検証することを目的とした。

幹細胞は、継代回数により分化傾向や機能性に変動が生じることが知られている (Lukacheva et al., 2023)。長期培養中、hMSC は複製による老化を起こしやすい。これは DNA 複製の各サイクル、そしてそれに伴う各細胞分裂で起こるテロメアの短縮によって引き起こされ、通常は酵素テロメラーゼの不活性化に起因する (Campisi, 2013; Victorelli & Passos, 2017)。このように、実験に必要な細胞数を確保するための長期間の培養においては老化の問題が生じ、同一の由来の細胞から準備できる細胞量には限りがあることを考慮する必要がある。

細胞治療に利用されている hMSC のステータスは、正常な核型、培養容器面への接着、増殖速度、特定の表面抗原マーカーの発現、骨形成、軟骨形成、脂肪形成方向への分化能など、いくつかの特徴によって定義される (Barkholt et al., 2013; Dominici et al., 2006)。これらのステータスは、培養条件、同一ドナー由来であっても異なる臓器または同一臓器における部位の違い、ドナーに関連する遺伝的変数によっても変化する (Semenova et al., 2015; Shin et al., 2021; Stanko et al., 2014)。このように、幹細胞の由来による変動が生じることを考慮する必要がある。

これに対してヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)は、長期培養においても未分化性と分化能を維持しやすく、再現性の高い実験材料として利用されている (Konagaya et al., 2015; Martins-Taylor & Xu, 2012; Nakagawa et al., 2014)。長期間の培養が可能であれば同一の由来の細胞を利用することができる。本研究の対象は実験に必要な細胞量を確保する上で、安定して再現性を取りやすい

hiPSC を材料として選択した。

温度変動に関する複数の研究が、凍結保存中の末梢血単核球、MSC の生存率を低下させることを示してきた (Angel et al., 2016; Germann et al., 2013; Mrowiec et al., 2012; Pogozhykh et al., 2017; Vysekantsev et al., 2005; Xu et al., 2021, 表 1)。これらの研究は、生存性のみならず、接着率の低下 (Pogozhykh et al., 2017)、抗原特異的免疫応答の低下 (Angel et al., 2016)、複数の研究が温度変動による影響を示している。一方で、hiPS を対象に行われた報告は無く、同様の影響が存在するかは不明である。凍結保存中の温度変動による細胞生存性への影響は、変動する温度域が広くなるほど、あるいは温度変動の回数が増えるほど、生存性が低下する傾向が示されている (Pogozhykh et al., 2017)。しかしながら、どの温度帯が影響を与える域であるのかについては、十分に分かっていない。温度帯については液体窒素温度 (-196°C) を起点とした時の到達温度が -150°C, -100°C, -80°C と、到達温度が上昇するほど hMSC の生存率が低下し、これにはアポトーシスの関与が示唆されている (Pogozhykh et al., 2017)。温度上昇による細胞の生存率低下のメカニズムには細胞内の氷晶成長による応力が原因と挙げられており、ガラス転移温度を超える温度上昇により生じることが考察されている (Vysekantsev et al., 2005)。ここで、10%DMSO を含む商用 CPA を用いた不死化されたヒト T 細胞の凍結保存のガラス転移に関する研究において、細胞内のガラス転移温度 ($T_{g,i}$) が -60 ～ -40°C、細胞外のガラス転移温度 ($T_{g,e}$) が -120°C 付近に存在することが示されている (Meneghel et al., 2019)。 $T_{g,i}$ 付近への温度変動は細胞内のガラス転移温度を超えると細胞内氷晶の形成が進行すると考えられ、臍帯由来の hMSC を用いた研究においてもその温度域での生存性低下が示されている (Xu et al., 2021)。他方で、 $T_{g,i}$ から $T_{g,e}$ の温度域を到達温度とする温度変動においては、発生する物理現象と細胞への影響についての理解がされ

ておらず、細胞に影響を与える具体的な温度域は特定されていない(図 5)。また、物理現象とは別に、実用的な一時保管においてはその温度帯にあるドライアイス(-78.5°C)での保冷や、-80°C設定のディープフリーザーが使用されるケースがあることも温度管理の設計においては考慮する必要がある (Pogozhykh et al., 2017)。以上より、本研究では実験に使用する CPA の T_g を把握した上で、液体の水分子が存在しなくなる $T_{g,i}$ および $T_{g,e}$ を下回る-150°Cを起点とし、 $T_{g,e}$ および実運用で発生する-80°C付近への温度変動を対象に細胞生存性への影響を調べることとした。

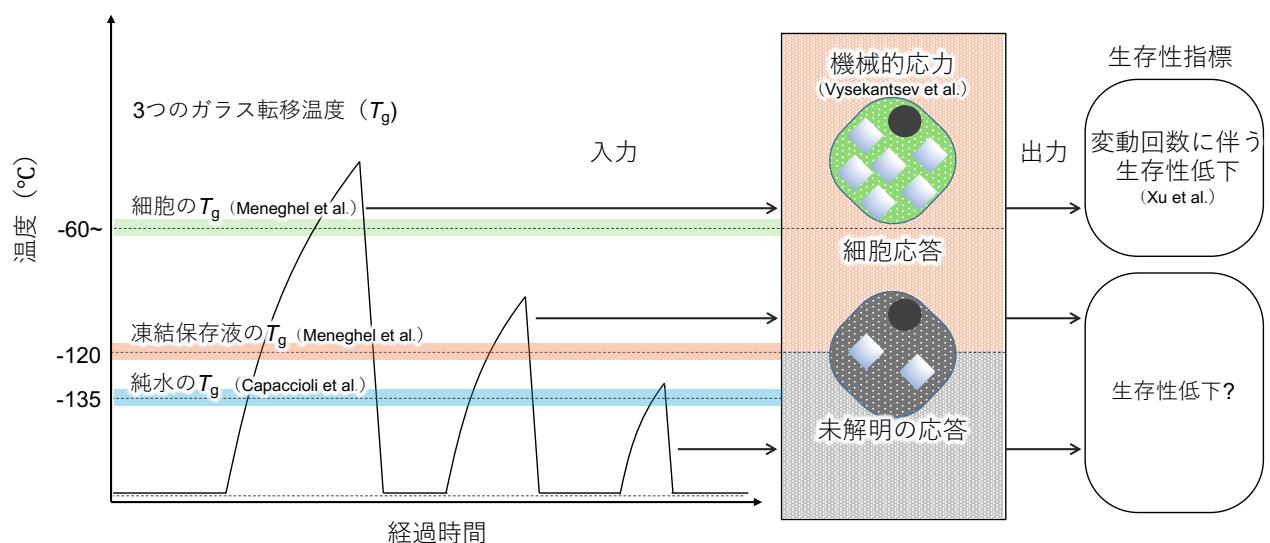


図 5 細胞内外の状態変化を起こす温度帯

TWEs による細胞への影響を調べる研究においては、これまで凍結された細胞の入った容器を室温に暴露することにより温度サイクルを与える手法が取られてきた (Pogozhykh et al., 2017; Xu et al., 2021)。凍結細胞を室温に暴露すると、熱伝導の違いにより容器内に温度の勾配が生じるため、細胞の到達温度を正確に制御することは困難である。本研究では、純粋に設定した温度への変動による影響を理解するために、空間温度を制御する装置(プログラム制御式凍結装置)を用い、プログラム下で温度サイクルをかけ試験を実施することとした。

生存の評価については、温度変動による生存性への影響にはアポトーシスの関与が示唆されており (Pogozhykh et al., 2017)，遅発的な細胞死が生じる可能性がある。遅発的な影響を含めた定量的な生存性の評価を行うために、凍結前の細胞に対する解凍直後の細胞数から算出される回復率と、播種してから 24 時間における接着率を含めた評価指標が確立された (Kagihiro et al., 2018)。本研究においてはこの評価指標を適用することとした。

さらに、細胞種間の応答特性の違いを理解すること、また hMSC を対象とした TWEs に関する先行研究 (Pogozhykh et al., 2017; Xu et al., 2021) と比較して考察を行うため、hMSC の生存性への温度サイクルの影響評価を合わせて行うこととした。

表 1 温度変動による細胞への影響を調べた研究

細胞種	温度変動範囲	温度変動回数	細胞への影響	使用した凍結保存液	文献
胚性肝・ 神経組織細胞	77 K～173 K (-196～-100°C)	最大 10 回	5 回および 10 回のサイクルで生存率が低下.	10% DMSO 含有 CPA	Vysekantsev et al., 2005
末梢血単核球 (PBMC)	<138 K～213 K (<-135～-60°C)	400 回	生存率, 回復率, 抗原特異的免疫応答が低下.	Cryomedium IBMT I (Procyrotect, スイス)	Germann et al., 2013
末梢血単核球 (PBMC)	<143 K～213 K (-130～-60°C)	最大 350 回	生存率, 回復率, T 細胞機能がサイクル数の増加に 伴い低下.	Cryomedium IBMT I (Fraunhofer IBMT, ドイツ)	Angel et al., 2016
末梢血単核球 (PBMC)	123 K～193 K (-150～-60°C)	98 回	アポトーシス增加により生存率低下. カスパーゼ阻害剤により緩和.	メディアベースカクテル, CryoStor® CS5, CS 7.5 + カスパーゼ阻害剤 (BioLife Solutions, 米国)	Cosentino et al., 2007
胎盤由来 MSC	77 K～193 K (-196～-80°C)	最大 50 回	生存率, 代謝機能, アポトーシス誘導がサイクル数増 加とともに変化. 接着や遺伝子発現にも影響.	10% DMSO + 10% FBS 含有 培地	Pogozhykh et al., 2017
臍帯由来 MSC	77 K～213 K (-196～-60°C)	最大 400 回	生存率, 回復率, 接着, 脂肪分化が 200 回から低 下. 100 回でミトコンドリア障害, 50 回で増殖・骨分化 に影響.	CELLBANKER® 2 (日本全薬工業)	Xu et al., 2021
臍帯血ユニット	93 K～193 K (-180～-80°C)	10 回	コロニー形成単位数が 8%減少.	CryoSure-Dex40 (WAK-Chemie, ドイツ)	Mrowiec et al., 2012

2.2 実験材料および方法

2.2.1 hiPSC の培養条件

本研究では、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) より提供を受けたヒト人工多能性幹細胞株 1383D2 (1383D2 cell line; Kyoto University, Kyoto, Japan) を使用した。細胞は、laminin-511 E8 フラグメント (iMatrix-511; Nippi Inc., Tokyo, Japan, 0.25 µg/cm²) でコーティングしたポリスチレン製培養ディッシュ上に播種し、商用培地 (StemFit AK02N; Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan) を用いて、37°C, 5% CO₂ 加湿環境下で培養した。

継代は、以下の手順に従って行った。播種には、10 µM の Rho キナーゼ阻害剤 (Y-27632; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Ltd., Osaka, Japan) を含む培地を用い、生細胞密度 7.5×10^3 cells/cm² で播種した。翌日以降は、ROCK 阻害剤を含まない培地に交換し、培地交換は播種日を day0 として day1, day3, day4 のそれぞれにおいて実施した。

細胞が 80~90% のコンフルエンスに達した day4 に、細胞の剥離・回収を行った。まず、0.5 mmol/L の EDTA/PBS (-) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Ltd.) で室温 10 分間処理し、続いて 10 µM の ROCK 阻害剤を含む TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を添加し、37°C で 7 分間インキュベートした。処理後、細胞をピペッティングにより剥離し、遠心分離 (180×g, 3 分) により回収した。回収後、10 µM ROCK 阻害剤を含む新しい培地で再懸濁し、次回培養に用いた。

細胞数は、トリパンブルー染色後に自動細胞カウンター (TC20; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により計測し、生細胞密度を調整した。

2.2.2 hiPSC の凍結保存液への懸濁

本研究では、市販の凍結保存液(STEM-CELLBANKER GMP grade; Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Fukushima, Japan)を使用した。本保存液は 10% DMSO を主成分とする凍結保存用溶液である。細胞は、培養時と同様の手順で剥離および回収を行い、遠心分離(180×g, 3 分)後に、新たに調製した凍結保存液に 1×10^6 cells/mL の濃度で懸濁した。細胞懸濁液には、単一細胞化に伴うアポトーシスを抑制する目的で、10 μM の Rho キナーゼ阻害剤(Y-27632; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Ltd., Osaka, Japan)を添加した。懸濁後の細胞はクライオバイアル(Corning Inc., NY, USA)に 0.5ml を分注した。

凍結処理は、懸濁後直ちに凍結用容器(CoolCell; Corning Inc.)にクライオバイアルを設置し、 -80°C のフリーザーで 3 時間以上保管した後、24 時間以内に液体窒素気相中に移し、使用時まで保存した。細胞株としての使用時には、 -80°C もしくは液体窒素保存から取り出したクライオバイアルを 37°C の水浴中で迅速に解凍し、新しい培地 3 mL を加えて懸濁した後、遠心分離(180×g, 3 分)により回収した。回収後の細胞は 1×10^6 cells/mL の濃度で再懸濁し、培養へと供した。

2.2.3 hMSC の培養条件および凍結保存液への懸濁

プログラム制御型凍結装置を使用した温度サイクルが細胞生存性に及ぼす影響を、骨髓由来 hMSC (Lonza 社製, Lot# 19TL337479)を用いて評価した。培養には MSCGM BulletKit™ 培地 (Lonza 社製)を使用し、細胞は播種密度 5.0×10^3 cells/cm²で培養後、凍結保存を行った。凍結保存液には STEM-CELLBANKER® GMP grade(10% DMSO, ZENOGEN PHARMA 製)を使用し、2ml のクライオバイアルに細胞懸濁液 0.5ml を分注した。解凍後は、 2.5×10^3 cells/cm²の密度

で再播種し, 37°C, 5% CO₂のインキュベータ内で培養した. 剥離操作には Trypsin-EDTA 0.25% (Life Technologies), 洗浄には PBS (Life Technologies)を使用した.

2.2.4 hiPSC への温度サイクル処理

温度変動の影響評価にあたり, 細胞に対する温度変動操作は, プログラム制御式凍結装置 (CryoMed controlled-rate freezer; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を用いてバ イアルの環境温度を制御することで行った. -150.0°C から-80.0°C の温度範囲において, 繰り返 し回数による影響を調べるため, 10, 20, 30, 50, 70 回の変動回数条件を設定した. これに加え, 温度範囲の違いによる影響を評価するために, 以下の 4 条件(各 30 回繰り返し)について温度サ イクルを処理した.

1)-170.0°C~-150.0°C

2)-150.0°C~-130.0°C

3)-150.0°C~-115.0°C

4)-115.0°C~-80.0°C

なお, 条件 1)については CPA の T_g 未満の条件として設定した. 条件 2)は純水のガラス転移温 度とされる-136°C (Capaccioli & Ngai, 2011)を超える温度帯として設定した. 条件 3)は 10 %DMSO を主成分とする CPA の T_g が-120°C付近に存在することから (Faltus et al., 2021; Fonseca et al., 2016; Meneghel et al., 2019), これと同等かわずかに上回る到達温度となるよう設定 した. 条件 4)は T_g よりも高い温度域のみの温度変動をターゲットとして設定した. また, 繰り返し回 数による評価のために取得した-150.0°C~-80.0°C の温度範囲のデータについても合わせて比

較した。

いずれの条件においても、細胞懸濁液を封入したクライオバイアルを -150.0°C に保持した凍結装置内に設置し、指定された温度変動プログラムを適用した。すべてのプログラムにおいて、昇温速度は $4.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、降温速度は $-40.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ とし、目標温度到達後は10分間保持して次のステップに移行した。温度サイクルの代表的なプログラム例を以下に示す。

- 1) -150.0°C にて10分間保持
- 2) $4.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -80.0°C まで昇温
- 3) -80.0°C にて10分間保持
- 4) $-40.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -150.0°C まで降温
- 5) -150.0°C にて10分間保持
- 6)ステップ2～5を所定の回数分繰り返し

実際のバイアル内の温度挙動を把握するため、温度の上昇しやすい内壁付近に熱電対を位置させた状態で、液体窒素に浸漬して固定したバイアルと、同様の方法で中心付近に固定したバイアルとを合わせて温度サイクル単回での温度挙動を測定した(図6)。中心付近は内壁付近に追随する形で温度が上昇・降下する様子が確認され、最大値は内壁付近で -81.1°C 、中心付近では -81.2°C と、到達温度の差異は 0.1°C であった。降下時の最小値は内壁付近で -150.1°C 、中心付近では -149.3°C であり、差異は 0.8°C であった。

温度変動処理終了後、クライオバイアルは液体窒素気相中(約 -150°C)にて保管し、以降の評価実験に供した。

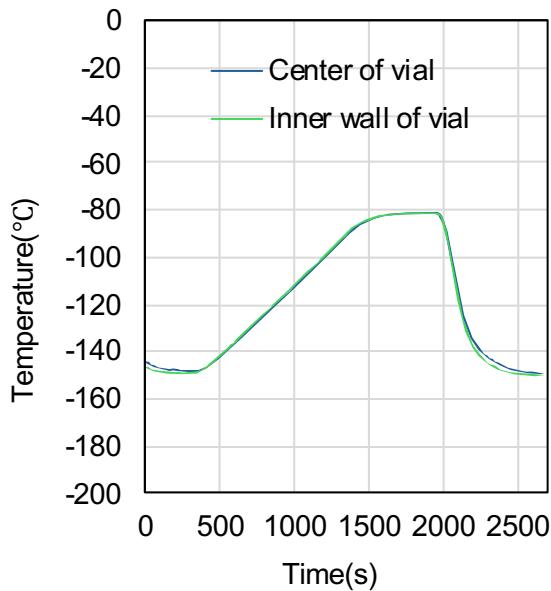


図 6 環境制御方式の温度サイクルにおけるクライオバイアル中心および内壁の温度挙動

2.2.5 生存性評価指標と測定方法

温度変動後の細胞生存性の評価にあたり、本研究では、鍵廣らにより定義された評価指標である回復率(β)および接着率(α)を用いた (Kagihiro et al., 2018). さらに、回復率(β)および接着率(α)を合わせた生存性の総合的な指標として、生存ポテンシャル(P)を導入した。

凍結前の生細胞数(n_1)は、トリパンブルー染色後に自動細胞カウンター (TC20; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により測定した。細胞数を測定後、細胞懸濁液をクライオバイアルに分注し、 -80°C のフリーザーに 3 時間以上保管後、24 時間以内に液体窒素気相中に移送して保存した。

凍結・解凍後の回復率(β)は、凍結前の生細胞数(n_1)に対する、解凍後の生細胞数(n_2)の割合として以下の式(1)で定義される。

$$\beta = \frac{n_2}{n_1} \quad (1)$$

解凍後の細胞(n_2)は、37°C の水浴で迅速に解凍し、新鮮な培地で 7 倍に希釈後、遠心分離(180×g, 3 分)により回収し、再懸濁後、トリパンブルー染色および自動細胞カウンターにより測定した。

接着率(α)は、凍結・解凍後に播種した生細胞数(n_2)に対する、培養 24 時間後に接着した生細胞数(n_3)の割合として定義され、以下の式(2)により算出した。

$$\alpha = \frac{n_3}{n_2} \quad (2)$$

播種は、laminin-511 E8 フラグメント(iMatrix-511; Nippi Inc., Tokyo, Japan)でコーティングされた 8 ウェルプレート上に、 2.5×10^3 cells/cm²の密度で行い、培地には 10 μM の Rho キナーゼ阻害剤(Y-27632)を添加した。37°C, 5% CO₂の加湿環境下で 24 時間培養後、接着した細胞数を位相差顕微鏡(×10 倍)により視認・計数した。本研究では、凍結・解凍後 24 時間の接着細胞数を評価するため、角形の 8 well プレートを使用し、center, upper, corner の 3 領域から接着細胞数をカウントし、その平均値から接着細胞数を求めた。この手法は、角型容器(T-flask)は丸型容器(Petriperm dish)に比べて容器内の接着細胞分布のばらつきが小さく抑えられる特性を踏まえたものである(Kino-Oka & Prenosil, 2000)。ただし、播種時の液流による位置ムラは完全には避けられないため、3 箇所からの測定による平均値を用いた。

さらに、細胞の機能的生存性の指標として、凍結前の生細胞数(n_1)に対する 24 時間後の接着生細胞数(n_3)の割合を生存細胞ポテンシャル(P)と定義し、以下の式(式 3)で算出した。

$$P = \frac{n_3}{n_1} \quad (3)$$

以上の評価指標により、温度変動が細胞の生存性に与える影響を総合的に評価した。一連の実験手順と評価指標の概略を図 7 に示す。

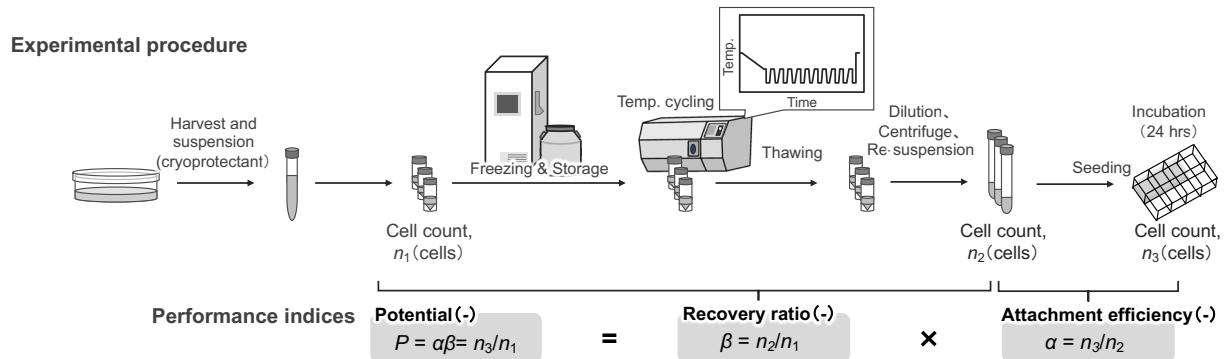


図 7 実験手順および評価指標 (β , α , P) の概略

2.2.6 hMSC への温度サイクルによる影響評価

hMSC への温度サイクル処理は 2 通りの手法により実施した。1つ目の手法(① プログラム制御型凍結装置を使用した hMSC の温度サイクル影響評価)では、hiPSC との細胞種間の違いを評価するために、iPSC と同様にプログラム制御型凍結装置(CryoMed controlled-rate freezer)を用いた。2 つ目の手法(② 室温暴露による hMSC の温度サイクル影響評価)では、室温暴露により温度サイクル処理がなされた先行研究との比較を行うために、デュワー瓶中の液体窒素に浸漬した細胞の入ったバイアルを室温雰囲気に暴露することで温度サイクルを与えた。

① プログラム制御型凍結装置を使用した hMSC の温度サイクル影響評価

プログラム制御型凍結装置を使用した温度サイクルが細胞生存性に及ぼす影響を評価した。温度サイクル処理はプログラム制御型凍結装置(CryoMed controlled-rate freezer)を用いて実施し、 -150°C を起点に設定した到達温度まで昇温後、再び -150°C まで冷却するサイクルを最大 100 回まで実施した。到達温度は -80°C に加え、参考のために -100°C , -50°C についても実施した。各温度帯の試験における変動回数は表 2 に示す通りである。

表 2 到達温度ごとに実施した試験条件(サイクル回数)

到達温度帶(°C)	サイクル回数
-100	30, 70, 100
-80	70, 100
-50	10, 20, 30, 50, 70, 100

昇温速度は 4°C/min, 冷却速度は 40°C/min とし, 各ステップでの保持時間は 10 分とした.

生存性評価には, 回復率(β), 接着率(α), 生存ポテンシャル(P)の 3 指標を用い, 各条件について $n = 4$ で測定した.

② 室温暴露による hMSC の温度サイクル影響評価

温度サイクル処理は先行研究 (Pogozhykh et al., 2017)に倣い, クライオバイアルの中心温度をモニターしながら室温に一時暴露する方法により行った. 0, 10, 20, 30, 50, 70, 100 回の温度サイクルを付与し, 回復率(β)および接着率(α)を測定した.

液体窒素の入ったデュワー瓶に, クライオケーンにセットしたクライオバイアルを 60 秒以上沈めることで-196°C ± 0.5°Cまで冷却し, 室温に 90~120 秒間曝すことでクライオバイアルの中心温度が-80°C ± 0.5°Cまで上昇したことを確認し, 再度液体窒素中に沈めることを繰り返し行った. クライオバイアルの温度測定はバイアルの中心付近に熱電対(帝人エンジニアリング, T 型熱電対, 素線径 0.32mm, JIS C1602 クラス 3)を設置し, データロガー(Graphtec, GL860)により記録した. 室温は平均 23.7°C(最大 25.9°C, 最小 22.9°C)であった. 試験において得られたクライオバイアルの中心温度と, 室温の温度プロファイルを図 8 に示す.

なお, 温度測定についてはバイアルの内径の中心付近に熱電対を位置した状態で液体窒素

に浸漬し、バイアル内部の液体を凝固させることで固定した。さらに、参考のために温度の上昇しやすい内壁付近に熱電対を位置させた状態で、液体窒素に浸漬して固定したものについて、中心付近に設置したバイアルと合わせて室温暴露による温度サイクル単回の挙動を測定した(図9)。バイアル中心温度が約-196°Cから上昇し-82.6°Cに到達した時点で、内壁付近では-66.2°Cを記録し、バイアルの中心と内壁付近では 16.4°C の温度差が確認された。

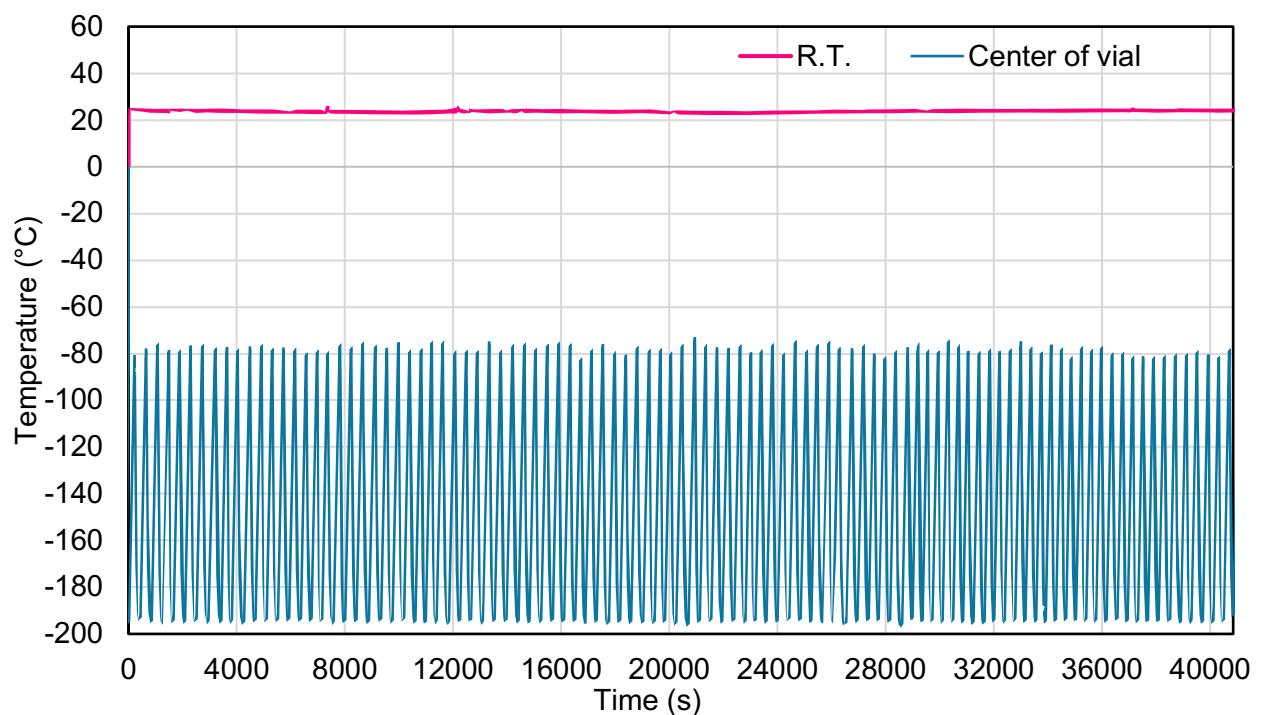


図 8 室温暴露による温度サイクル処理時の温度プロファイル

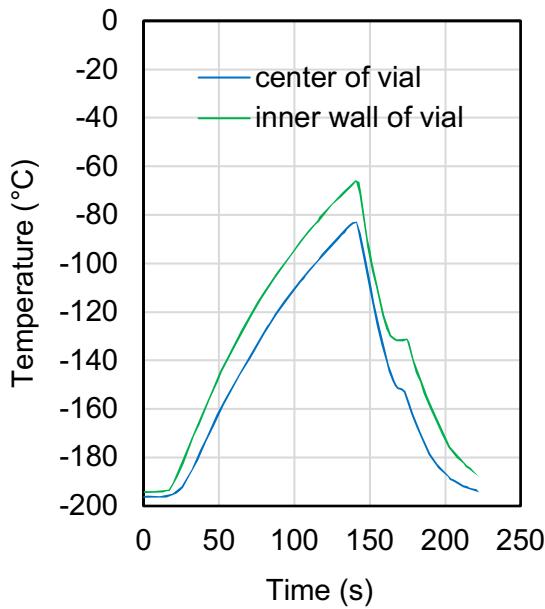


図 9 室温暴露時のクライオバイアル中心および内壁の温度挙動

温度降下時の一時的な上昇が見られたが、これはバイアルに付着した結露水の凝固熱によるものと考えられる。

2.2.7 凍結保存液のガラス転移温度の評価

ガラス転移(T_g)は、融解や結晶化のように明確な潜熱(エンタルピー変化)を伴うイベントではなく、冷却により分子の運動性が失われる現象で、これに伴い比熱容量が変化する。そのため、示差走査熱量測定(DSC)においては熱流曲線の鋭いピークとしてではなく、ベースラインのシフトとして観測される。このシフトは、アモルファス状態から粘性を有する液相への移行に対応し、通常は加熱曲線において吸熱方向へのシフトとして現れる。ガラス転移温度の求め方には、ガラス状態と過冷却液体状態のベースラインの差が $1/2$ となる中間点を取る方法(JIS K7121:2012 プラスチックの転移温度測定方法)と、熱流曲線を一次微分して得られたピークの頂点温度を T_g とする方法(JIS K6240:2011 原料ゴムー示差走査熱量測定(DSC)によるガラス転移温度の求め方)がある。

知られている。本研究では、DMSO を主成分とする凍結保存液に対し、類似組成の T_g を測定した研究例 (Meneghel et al., 2019) に倣い、後者の微分ピークにより決定する手法を採用した。

測定には、研究に使用した凍結保存液(STEM-CELLBANKER GMP grade, 日本全薬工業)を使用した。測定には、示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimeter, DSC8000; Perkin Elmer) を用いた。温度較正は、シクロヘキサン(結晶-結晶転移点:-87.1°C, 融点:6.7°C) およびインジウム(融点:156.6°C) を用いて実施した。

各測定には約 25 mg の CPA を取り、50 μL の Perkin Elmer 製 DSC 用アルミニウムパンに封入して使用した。DSC 測定は開始温度 20.0°C からスタートし、-10.0°C/min の速度で -150.0°C まで冷却し、続いて +10.0°C/min の速度で 20.0°C まで加熱した。対照としては空のアルミニウムパンを用いた。各サンプルについて、冷却-加熱サイクルを 3 回繰り返して測定を行った。 T_g は加熱過程における熱流データから求め、熱流の一次導微分を温度に対してプロットし、-120°C 付近に現れるピークの最大値をガラス転移温度と定義した。データ処理には 500 ポイントの Savitzky-Golay フィルタを用いた平滑化処理を行った。

2.2.8 統計解析

標準偏差を含む平均値を示すために、独立した実験を 3 回以上行った。群間の差の評価には一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、Tukey の多重比較検定を用いて群間の有意差を判定した。各群の平均値間における差異について、 $p < 0.05$ のとき統計的に有意と判断した。

2.3 実験結果

2.3.1 サイクル回数が hiPSC の生存性指標に与える影響

温度サイクル回数が評価指標である接着率(α)、回復率(β)、生存細胞ポテンシャル(P)に与える影響を検討するため、-150°Cから-80°Cまでの温度域を 10, 20, 30, 50、および 70 回のサイクル処理を加えた凍結細胞について評価を行った。その結果、接着率(α)は温度サイクル回数の増加に伴い低下し、20 回を超えると有意な変化は見られなかった(図 10)。また、生存細胞ポテンシャル(P)も接着率(α)の低下に伴って減少傾向を示した。一方、回復率(β)は温度変動回数の増加による変化は認められなかった。

2.3.2 温度域による hiPSC の生存性指標への影響

温度サイクルが評価指標に与える影響について、温度域ごとに評価するため、温度範囲を-170.0～-150.0°C、-150.0～-130.0°C、-150.0～-115.0°C、および-115.0～-80°C 4 条件として各条件につき 30 回の温度サイクルを処理し、生存性指標を評価し、前項における-150.0～-80.0°C、30 回の温度サイクルの条件(2.3.1 サイクル回数が hiPSC の生存性指標に与える影響)の結果と合わせて比較した。その結果、接着率(α)は、-150.0～-115.0°、-115.0～-80°C、-150.0～-80.0°C の範囲において、他の条件と比較して低下が認められた。生存ポテンシャル(P)は、-150.0～-80.0°C の条件において有意な低下を示した(図 11)。一方、回復率(β)はいずれの温度範囲においても、コントロール条件との差は統計的に有意ではなかった。

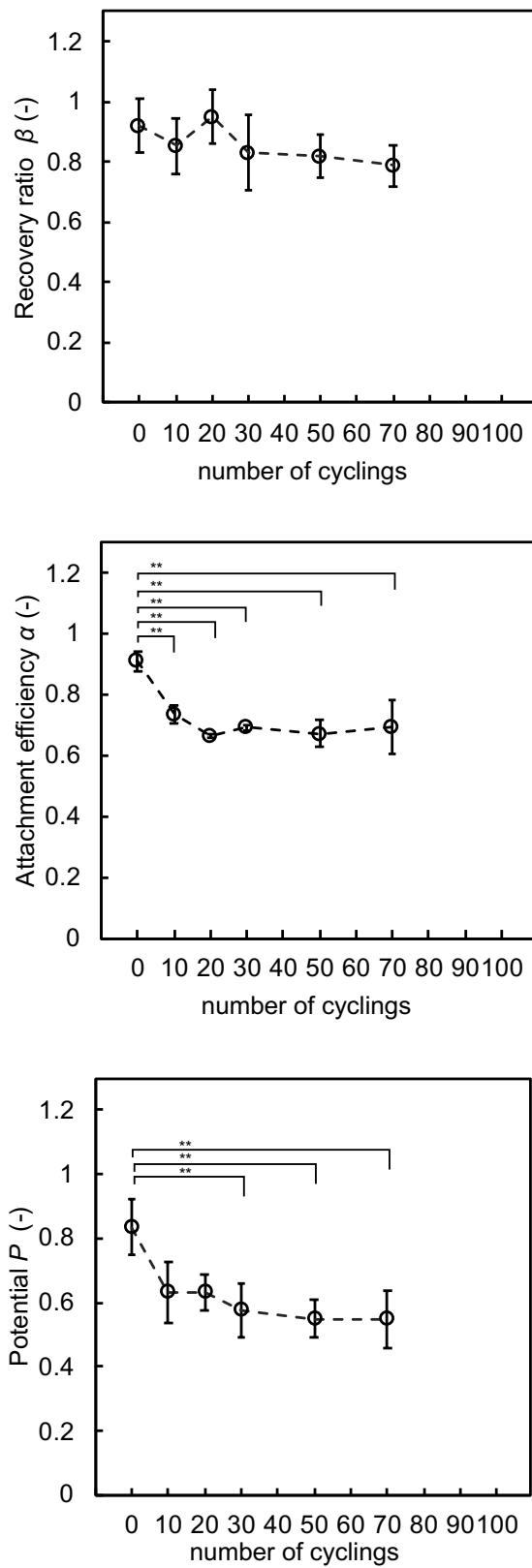


図 10 サイクル処理後の hiPSC の生存性指標の評価

各データは 4 実験の平均値 \pm 標準偏差として示す. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey's test).

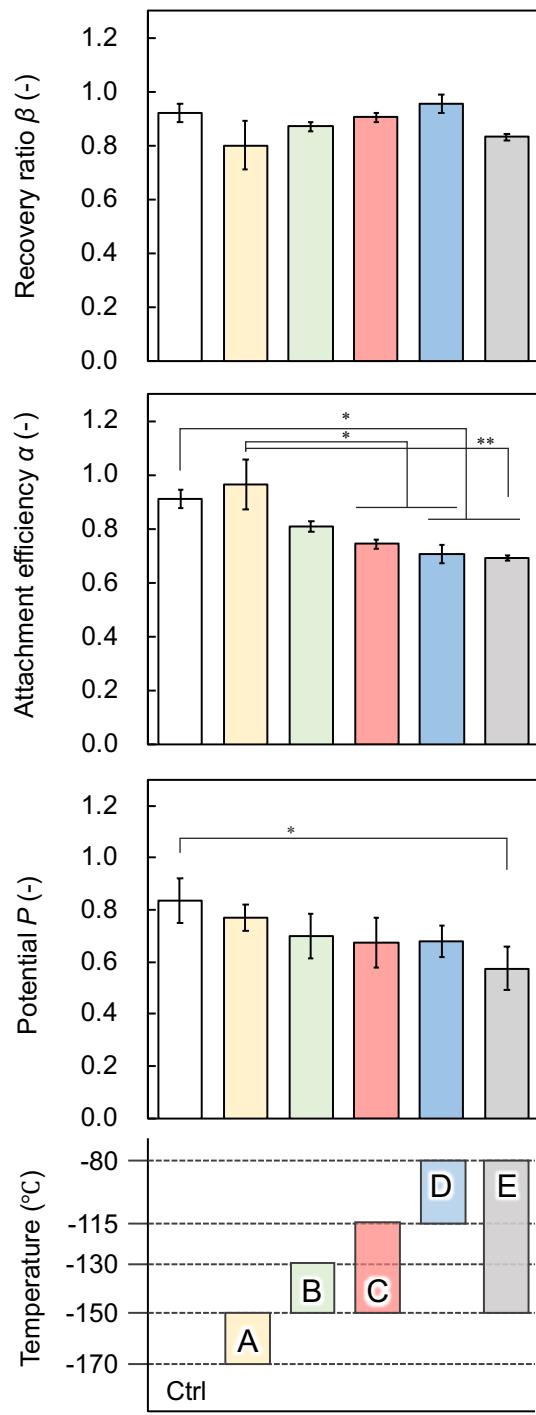


図 11 各温度域における温度サイクルによる hiPSC の生存性指標の評価

各データは 4 実験の平均値 \pm 標準偏差として示す. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey's test).

変動温度域は A:-170.0~-150.0°C, B:-150.0~-130.0°C, C:-150.0~-115.0°C, D:-115.0~

-80°C, E:-150.0~-80.0°C. Ctrl はコントロール(サイクルなし)を示す.

2.3.3 hMSC への温度サイクルによる影響評価

① プログラム制御型凍結装置を使用した hMSC の温度サイクル影響評価

hMSC に対するプログラム制御型凍結装置を使用した温度サイクルが評価指標である接着率(α)、回復率(β)、生存細胞ポテンシャル(P)に与える影響を検討するため、-150°Cから-80°C、-150°Cから-100°C、-150°Cから-50°Cの温度域をそれぞれ最大 100 回の温度サイクル処理を加えた凍結細胞について評価を行った。その結果、回復率(β)は、-100°C および-80°C の温度帯では温度サイクル回数が増加しても明確な低下は認められなかつたが、-50°C の温度帯ではサイクル回数の増加に伴う低下傾向が概ね確認された(図 12)。

接着率(α)については、いずれの温度帯においてもサイクル回数に伴う低下は認めらなかつた。

生存ポテンシャル(P)は、回復率(β)と同様に、-100°C および-80°C では明確な低下は認められなかつたが、-50°C では温度サイクル回数の増加とともに低下した。

② 室温暴露による hMSC の温度サイクル影響評価

hMSC に対する室温暴露による温度サイクルが評価指標である接着率(α)、回復率(β)、生存細胞ポテンシャル(P)に与える影響を検討するため、-150°Cから-80°Cの温度域を 10, 20, 30, 50, 70, 100 回の温度サイクル処理を加えて評価を行った。その結果、回復率(β)は、温度サイクル回数の増加に伴い低下し、100 サイクルにおいて 0.53 まで低下した(図 13)。

接着率(α)については、ばらつきが大きいものの、いずれの温度帯においてもサイクル回数に伴う低下は認められなかつた。

生存ポテンシャル(P)は、回復率(β)の低下に伴い変化した。

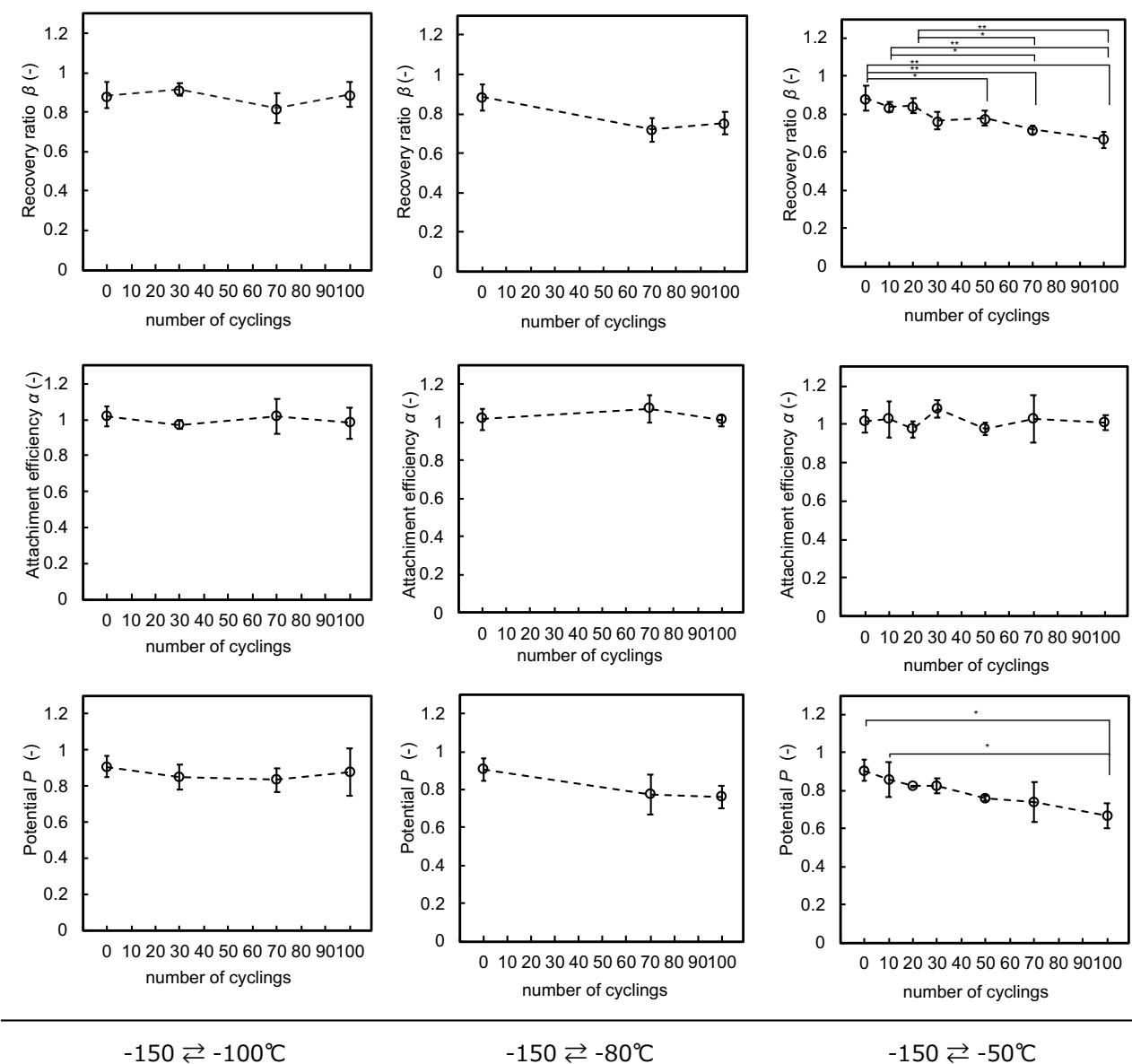


図 12 溫度サイクル処理後の hMSC の生存性指標の評価(プログラム制御型凍結装置使用)

各データは 4 実験の平均値± 標準偏差を示す. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey's test).

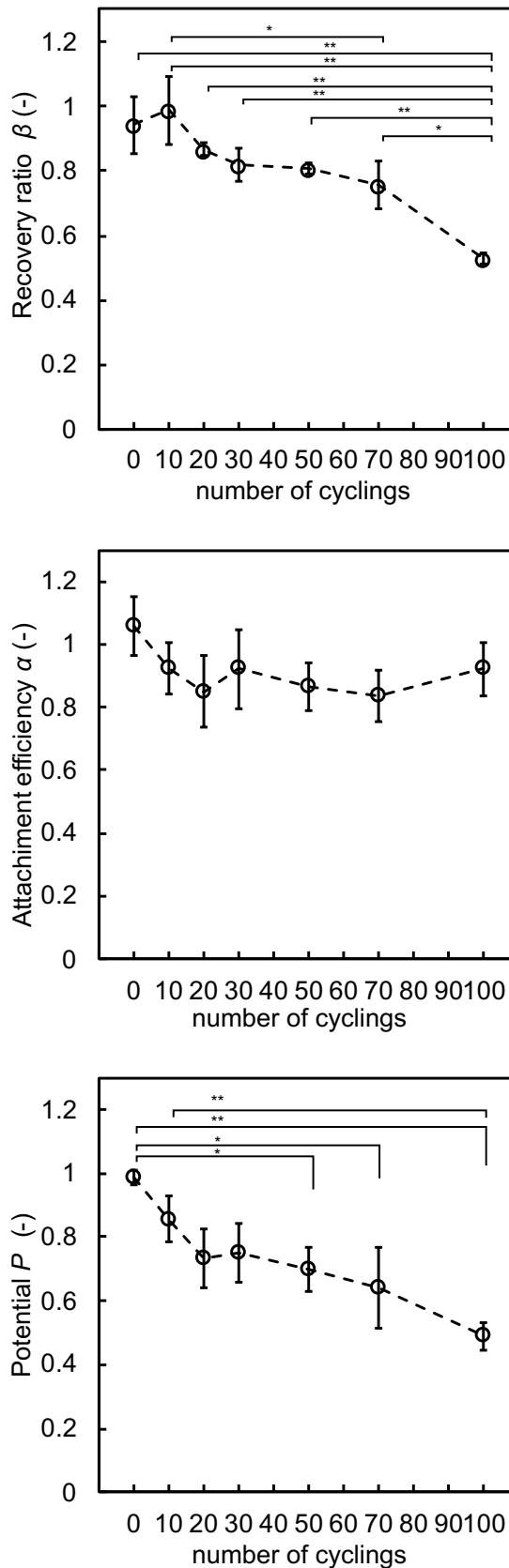


図 13 溫度サイクル処理後の hMSC の生存性指標の評価(室温暴露)

各データは 3 試行の平均値± 標準偏差を示す. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey's test)

2.3.4 凍結保存液のガラス転移温度の評価

加熱過程における熱流変化のトレースから、約 -120°C 付近にシフトが観察され、熱流の一次微分において明瞭なピークが確認された。このピーカップを本研究における CPA の T_g と定義した。独立に行った 3 回の冷却-加熱サイクルにおける T_g の測定結果は $-116.6^{\circ}\text{C} \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ (平均 \pm 標準偏差) であった。凍結保存液(CPA)の加熱時における DSC トレースおよびその一次微分について取得した代表的なデータを図 14 に示す。

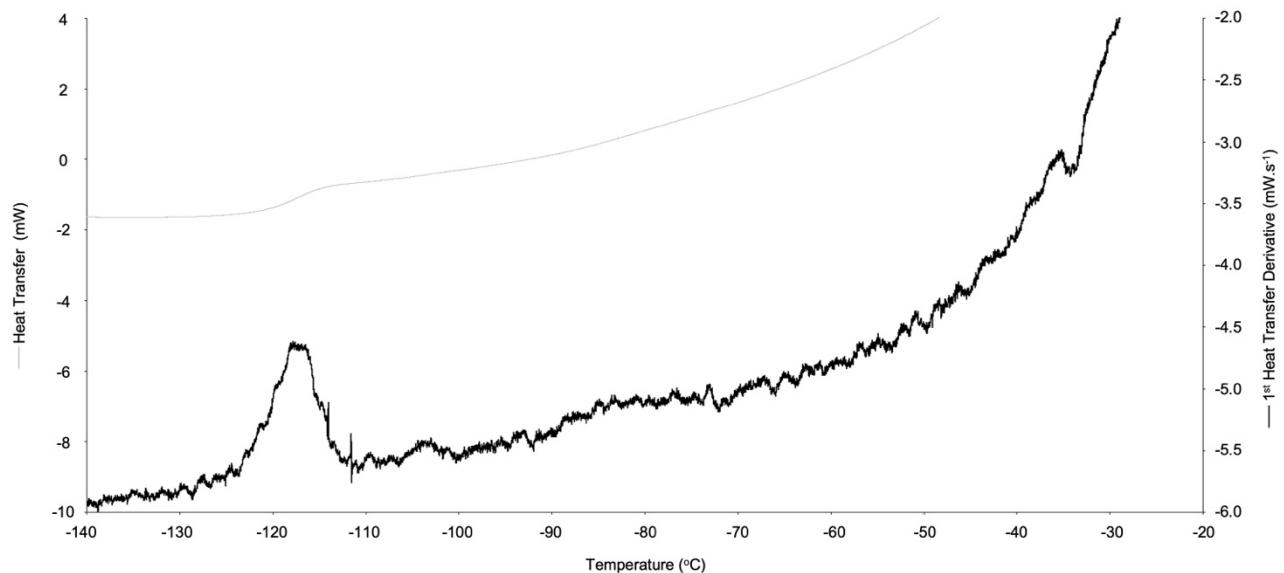


図 14 凍結保存液の加熱時における熱流およびその一次微分

グレーの線は凍結保存液の加熱時における DSC 測定による熱流を表し、黒線はその一次微分を示している。

2.4 考察

温度サイクルが凍結細胞の生存性に与える影響について、hiPSCを用いて評価を行った結果、温度サイクル回数の増加に伴い接着率(α)が低下し、生存細胞ポテンシャル(P)も同様の傾向を示した。一方、回復率(β)は温度サイクル回数や温度範囲のいずれの条件においても大きな変動を示さなかった。接着率(α)は、播種細胞数に対する播種後 24 時間時点の接着細胞数の割合、回復率(β)は凍結前の細胞数に対する解凍直後の生細胞数の割合である。得られた結果から、温度サイクルによる細胞への影響は、膜損傷等による即時的な死滅というよりは、解凍後に発現する遅発的な細胞応答として、接着能の低下に現れる傾向があると考えられる。

特に接着率(α)は、温度サイクル回数が 10 回に達した段階で大きく低下し、20 回以降は顕著な追加変動が見られなかったことから、細胞劣化に関わる閾値的な応答が存在する可能性が示された。この結果は、運用において許容できる温度サイクル回数の上限設定に関する実用的な示唆を与えるものである。

一方で、先行研究 (Pogozhykh et al., 2017)では、 -196°C から -80°C の範囲で繰り返された温度サイクルにより、hMSC の接着率および回復率が温度サイクル回数の増加とともに段階的に低下を続ける傾向が報告されており、本研究とは異なる応答傾向が示されている。本研究では、hiPSC を用いた条件において、回復率(β)は低下が認められなかつた一方で、接着率(α)は温度サイクルの回数に応じて低下し、20 回を超えるとそれ以上の変化は認められなかつた。この応答性の違いは hiPSC と hMSC の細胞種の違いか、温度制御の方式の違い(環境温度制御か、室温暴露か)により生じている可能性が考えられる。

この応答性の差異を検証するため、骨髓由来の hMSC を用いて以下の 2 つの実験を実施した。

① プログラム制御型凍結装置を使用した hMSC の温度サイクル影響評価(環境温度制御)

② 室温暴露による hMSC の温度サイクル影響評価

①の結果では、-150°Cから-80°Cの温度サイクルにおいてはいずれの指標も 0 回と比較して明

確な差異は認められなかった。すなわち、hMSC は hiPSC とは異なり、温度サイクルによる接着率

(α)の低下を示さず、回復率(β)の変化も小さかった。この応答の違いについて、細胞種による膜

組成、膜流動性についての研究例から考察する。hiPSC の細胞膜は高流動状態から、分化の過程で硬化を起こすことが知られている (Matsuzaki et al., 2018)。細胞膜の硬化は脂質酸とコレステ

ロールの組成、含量の違いによってもたらされ、細胞種によって組成が異なる (Kashirina et al., 2020)。さらに、細胞膜に着目した凍結耐性に関する研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞に比べて

hMSC の膜流動性が低いことが明らかになっており、低流動であることから DMSO の細胞内への

流入を抑え、活性酸素の生成を低減することで高い凍結耐性を示すことが考察されている

(Mizuno et al., 2022)。この hMSC が凍結耐性を示す機序は、本研究における hiPSC で見られた

接着率(α)の低下が hMSC では見られなかった要因なのかも知れない。また、細胞の種類や由来

によって細胞膜の水の透過を調節するアクアポリンの発現量が異なることも示されており

(Verkman, 2005)、膜を介した物質移動への影響が考えられる。このように、細胞種による細胞膜

組成の違いは、応力耐性や細胞内外の物質透過に影響している可能性がある。なお、-150°Cか

ら-50°Cの温度サイクルでは変動回数増加に伴う回復率(β)の低下が認められた。この結果は先

行研究 (Xu et al., 2021)と一致しており、細胞内のガラス転移温度付近への温度上昇による氷結

晶成長に起因しているものと考えられる。

②の結果では、接着率(α)の低下を示さず、回復率(β)は温度サイクル回数の増加に伴って概ね連続的に低下し、100サイクル後には0.53に達した。連続して低下する点については、先行文献と傾向が一致した(Pogozhykh et al., 2017)。一方で、接着率(α)については明確な低下傾向は確認されず、傾向が異なった。この差異は、同じhMSCであっても由来となる組織やドナーの違い、培養条件によって特性が異なることに起因する可能性がある(Semenova et al., 2015; Shin et al., 2021; Stanko et al., 2014)。

また、バイアルの中心付近と内壁付近で測定した温度プロファイルでは、バイアル中心温度が約-196°Cから上昇し-82.6°Cに到達した時点で、内壁付近では-66.2°Cを記録し、バイアルの中心と内壁付近では16.4°Cの温度差が確認された(図9)。このような局所的な温度上昇により、中心部が-80°Cへ到達した際には部位によっては細胞内ガラス転移温度($T_{g,i}$; -60~-40°C)付近まで温度が上昇する可能性があり、これにより氷晶の形成や熱膨張による内部応力が繰り返し生じることで、細胞へのダメージが蓄積されると考えられる。このことから、②において見られた回復率の連続的な低下は、ガラス転移温度付近での脱ガラス化に伴う細胞内氷晶の成長に起因している可能性が考えられた。

なお、本研究では2mLバイアルに0.5mLを分注して凍結・解凍を行った。一方、先行研究では1.8mLバイアルが使用されており、バイアルの外形寸法は概ね同等であるが、充填量が不明なため、内容液の体積や分布による熱伝導特性の違いが、結果に影響を及ぼした可能性がある。比較にあたってはこの点に留意する必要がある。

以上の結果から、細胞種、由来の違い、また付与される到達温度帯によって応答特性が異なることが明らかとなった。本研究における加温上限をバイアル内で均一に-80°Cに制御した点は先

行研究との大きな違いであり、設定した温度変化による応答特性を正確に評価することができた。

したがって、本研究で観察された温度サイクルによる接着率(α)の変化は hiPSC 固有の応答であり、設定された細胞内ガラス転移温度($T_{g,i}$; -60~-40°C)を超えない温度域での温度変化の影響を純粋に評価した結果であると解釈される。

純水の T_g は約-136°Cであるとする解釈が広く受け入れられている (Narten et al., 1974). 水溶液では塩類や糖類などの溶質の存在により分子運動が抑制され、 T_g は上昇することが報告されている (Capaccioli & Ngai, 2011). このことから、純水の T_g は水溶液における T_g の理論的下限を示す指標と位置づけられる。本研究に使用した凍結保存液(STEM-CELLBANKER GMP grade)には DMSO, 糖類, 塩類などの溶質を含むことから、測定された凍結保存液の T_g (-116.6°C)は、純水との比較において妥当な値と考えられる。

hiPSC へ影響を及ぼす変動温度域については、まず-150~-170°Cの温度サイクルでは純水の T_g も下回っており、液相とガラス相の状態変化は起こらないと推察され、接着率への影響も確認されなかった。次に-150~-130°Cでは、純水の T_g は超えるが凍結保存液の T_g (-116.6°C)には達しておらず、ガラス状態が維持されていると考えられる。この温度域でも接着率の低下は見られなかった。一方で、-150~-115°Cおよび-150~-80°Cの温度サイクルでは、凍結保存液の T_g を超えるため、ガラス状態から液相への移行(脱ガラス化)が生じたことが考えられる。この範囲では接着率の低下が顕著に認められ、脱ガラス化に伴う細胞応答が生存性低下を引き起こしていることが示唆された。さらに、凍結保存液の T_g を超える-115~-80°Cにおいても同様に接着率の低下が認められたことから、この細胞応答は T_g の通過自体ではなく、液相へと移行した後の温度サイクルに起因していると考えられる。

2.5 小括

本章では、凍結保存中の TWEs による温度変動が細胞の生存性に及ぼす影響を定量的に評価するため、接着率(α)、回復率(β)、および生存細胞ポテンシャル(P)の 3 つの指標を用いて温度サイクルによる影響の解析を行った。hiPSC を用いた評価の結果、回復率(β)は温度サイクルの影響を受けにくい一方で、接着率(α)は温度サイクル回数および温度範囲の拡大に伴い低下し、細胞内の応答を伴う遅発的な品質劣化が発生することが示された。

特に -115°C を超える温度サイクルを繰り返すことで接着能の顕著な低下が生じることから、凍結保存液のガラス転移温度(T_g)を超えることによる物理化学的変化が関与している可能性が示唆された。また、温度サイクル回数が 10 回を超えると接着率に大きな変化が生じ、20 回以降は変動が収束する傾向も確認された。この知見は、運用上許容される温度サイクル回数の上限設定に対して実用的な判断基準の考え方を示唆を与えるものである。

さらに、従来の室温曝露型の温度サイクル試験とは異なり、本研究では空間温度を制御することで、温度サイクルの影響を温度帯ごとに正確に切り分けて評価することが可能となった。このような厳密な温度制御環境下で得られた本結果は、温度サイクルを含む保管・輸送工程における操作条件の設計を考える上で有効な基礎データとして活用することができる。

第3章 温度変動により生じる細胞応答の解釈

3.1 緒言

前章において、凍結細胞への温度サイクルが hiPSC の接着率(α)や生存細胞ポテンシャル(P)に影響を与えることが明らかになったが、これらの変化は細胞内で生じる応答過程を経た結果として表出するものである。すなわち、温度変動という物理化学的入力が、細胞内部にどのような変化を引き起こし、どのようなプロセスを経て細胞死や接着能低下に繋がるのか、その応答機構の理解が温度管理を設計する上で不可欠である。

細胞死の初期段階では、ミトコンドリアが中核的な役割を果たしており、特にシトクロム c の酸化および放出がアポトーシス誘導の重要なトリガーとなることが報告されている (Joshua C. Goldstein et al., 2000; Yuan et al., 2014)。報告によるとこれらの反応は細胞死誘導の刺激を受けてから非常に短い時間内(数分以内)に起こることが示唆されている。凍結細胞における遅発的な細胞死の理解には、生体内の反応が開始する解凍後早期の細胞内動態を可視化することが極めて重要であると考えられる。

このような細胞内応答を分子レベルで評価するためには、非標識かつ分子固有のシグナルを取得可能なラマン分光法が有効な手段である。とりわけ、シトクロム c の酸化状態や DMSO の細胞内挙動を指標とする解析は、温度変動が引き起こす細胞内部の物理化学的変化を捉える上で有用であり、これまでにいくつかの研究でもその有効性が報告されている (Chen et al., 2020; Kitt et al., 2017; Okada et al., 2012; Okotrub & Surovtsev, 2015)。

しかしながら、従来のラマン分光法では、高強度のレーザーによる細胞に対するダメージを避ける必要があり、十分な信号を得るには長時間の測定が必要であった。CPA 中の DMSO の細胞

毒性による生存性に対する影響が時間依存的に進行することから (Kagihiro et al., 2018), 特に解凍後の細胞においては、測定中に影響が生じることが考えられ、取得されるデータにバイアスがかかるという問題があった。このような測定時間と分解能のトレードオフの課題を克服する技術として、大阪大学において高速・高解像・高感度なラマン顕微鏡システムによる凍結固定生体試料の測定法が開発され、2024年に報告された (Kenta Mizushima et al., 2024)。この装置では、スリットスキャン方式と試料冷却ステージを組み合わせることで、凍結状態のまま、短時間で高精度なラマン画像の取得が可能となっている。本研究では、この開発された手法を適用して、hiPSCにおける温度サイクル中および解凍直後のシトクロム c および DMSO の挙動を可視化することで、細胞応答の初期段階における分子動態を解明することを目的とした。また、細胞死の主要な指標の1つとしてミトコンドリア膜電位の変化が知られている (Kroemer et al., 2007; Tokar et al., 2012)。この指標はシトクロム c の酸化に対してより下流で起きていると考えられている (Joshua C. Goldstein et al., 2000)。

以上より、本研究では細胞死における初期反応とそれに続く挙動を評価するために、ラマン分光法の適用と、フローサイトメトリーによるミトコンドリアの膜電位の解析を併用し、温度サイクルにより誘発される細胞死メカニズムを多面的に評価した。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 ヒト iPS 細胞の培養

ラマン分光法およびフローサイトメトリーに用いた hiPSC(1383D2 細胞株; 京都大学 CiRA 由来)の培養条件および凍結保存液への懸濁は、第 2 章と同様の手法で実施した(2.2.1, 2.2.2 を参照)。剥離、回収後の細胞を凍結保存液(STEM-CELLBANKER GMP grade; Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Fukushima, Japan)に懸濁し、ラマン分光法での測定に供した。

3.2.2 フローサイトメトリー測定試料の温度サイクル処理

懸濁液をクライオバイアルに分注したものを凍結保存用容器(CoolCell; Corning Inc.)に設置して凍結したのちに、第 2 章と同様の条件(2.2.4 を参照)に基づき、 -150°C ～ -80°C の温度範囲で 10, 30, 50, 70 回の温度サイクルをプログラム制御型凍結装置(CryoMed controlled-rate freezer; Thermo Fisher Scientific)を用いて実施した。昇温速度は $4.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、降温速度は $-40.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ とし、目標温度到達後は 10 分間保持して次のステップに移行した。

3.2.3 ラマン分光法による測定

ラマン測定は、確立されたカスタムメイドのスリットスキャン式ラマン顕微鏡システム (Kenta Mizushima et al., 2024)を用いて実施した。この装置は、サンプルステージに組み込まれた試料用クライオスタット(THMS600, Linkam 製; 倒立顕微鏡用にカスタマイズ)を搭載した、独自構築のラマン顕微鏡である。細胞懸濁液は石英カバースリップ上に載せ $20\mu\text{m}$ のスペーサーとともにもう一枚の石英カバースリップにより挟み込んだものを試料とし、サンプルホルダーに設置して観察した。光学系の詳細は文献 (Kumamoto et al., 2022)に記載されている。

励起には 532 nm 連続波レーザー (Millennia eV, Spectra Physics または Verdi 532 nm , Coherent)を使用し、試料上でのレーザー強度は $3.0\text{ mW}/\mu\text{m}^2$ に設定した。これは、5 回連続測定を行っても細胞形態にブレビング形成や膨潤、収縮などの変化が見られないことを確認した上で決定した。レーザー光は円筒レンズでライン状に成形され、倒立型顕微鏡 (Ti-E, Nikon) および $60\times/0.95\text{ NA}$ 乾燥対物レンズ (CFI Plan Apo Lambda 60XC, Nikon)を用いて試料に集光された。

後方散乱で回収されたラマン散乱光は同一対物レンズを通じてロングパスエッジフィルターによりフィルタリング後、スリット幅 $60\mu\text{m}$ の分光器 (CLP-300 または MK-300, Bunkoukeiki) に導入され、 600 本/mm の回折格子を通して分光された。一次元スペクトルは冷却 CCD カメラ (PIXIS 2048B または PIXIS 400B ReXcelon, Teledyne Princeton Instruments) により記録された。2 次元ハイパススペクトル画像の取得にはガルバノミラーによる走査を用い、走査ピッチは $1.0\mu\text{m}$ とした。焦点ドリフト補正には Nikon 製 PFS システムを使用し、測定中のレーザーフォーカス位置を安定化させた。

温度サイクル処理の設定条件は図 15 に示す通りであり、温度プログラムを以下に示す。

1. Hold @ 4.0°C 10 min
2. -1.0°C/min to -80.0°C
3. Hold @ -80.0°C 10 min
4. -40.0°C/min to -150.0°C
5. Hold @ -150.0°C 10 min
6. 4.0°C/min to -80.0°C
7. Repeat steps 3–6 for 9 times
8. 50.0°C/min to 4.0°C
9. Hold @ 4.0°C

解凍後の迅速測定(Measurement 1)では、レーザー強度 3.0 mW/ μm^2 、スリット幅 55 μm 、300 Lines/mm の回折格子、走査ピッチ 1.0 μm とし、取得時間は露光と読み出しを含めて約 80 秒であった。ラマン波数軸の補正には、エタノールの既知ピーク(434, 884, 1,454, 2,930 cm^{-1})を用いた。

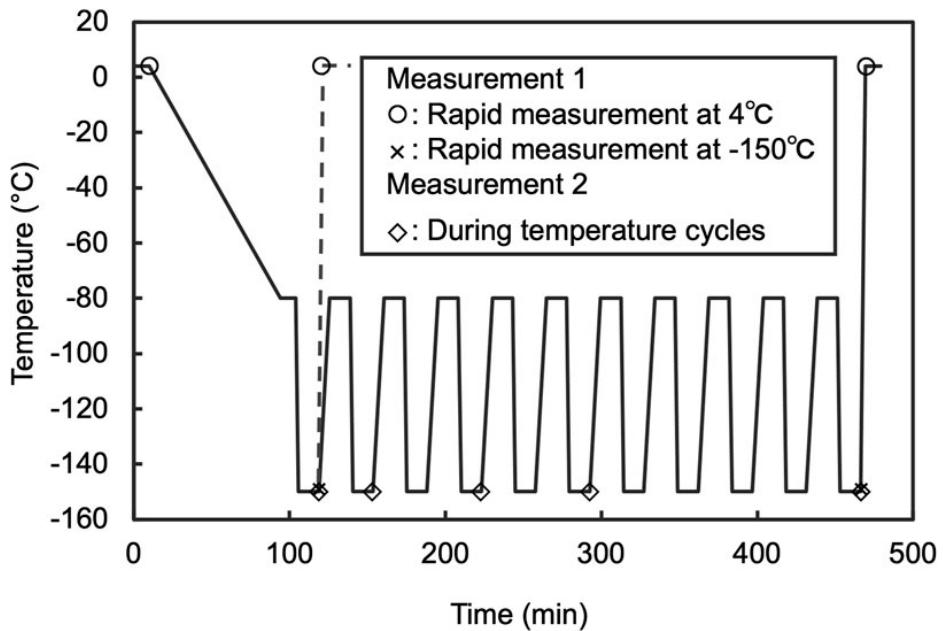


図 15 ラマン分光観察に用いた試料クライオスタッフの温度プログラム

Measurement 1 では、解凍直後のシトクロムのシグナルを評価した。10 回の温度サイクル後のステップとして 4°C まで $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温し、 4°C 到達直後に測定を開始した。10 回の温度サイクル後に測定した条件を「freezing+, Temp. cyclings +」、凍結前との比較のために試料を 4°C に冷却・10 分間保持した状態で測定した条件を「Freezing -, Temp. cyclings -」とした。温度サイクルの有無による比較のため、冷却を開始して -150°C への到達後に温度サイクル無しで 4°C まで昇温し、到達直後に測定した条件を「Freezing +, Temp. cyclings -」とした。Measurement 2 では、測定開始前に -150°C で 10 分間保持するステップを設けた後に測定した。測定は 1, 3, 5, 10 回目のサイクルにおいて実施した。

3.2.4 データ処理

取得したラマンスペクトルデータは、MATLAB (R2023b, MathWorks) を用いた独自の解析プラットフォームで処理した。スペクトルから宇宙線を除去し、CCD バイアスを 0 として背景補正を行った。対象成分 (DMSO, シトクロムなど) の解析は、表 3 に示される波数範囲に基づいて行なった。各バンドのピークは、カスタムメイドの Python プログラムを使用して適切な関数モデルにフィットし、解析された。ベースラインは、対象ピークの指定された数範囲の 2 点を結ぶ直線として定義された。ピーク面積は、ベースラインとピーク間の領域の積分値により決定された。

細胞由来シグナルの定量化のための細胞領域は、明視野画像と vCH ($2,881 \text{ cm}^{-1}$) から得られたラマン画像 (図 16A, B) に基づき決定された (Czamara et al., 2015)。明視野像および $2,881 \text{ cm}^{-1}$ に由来する vCH (Czamara et al., 2015; Ikemoto et al., 2021; Okotrub & Surovtsev, 2015) より作成したラマン画像から行い、氷の vOH ($3,125 \text{ cm}^{-1}$) と DMSO の CS 伸縮振動 (675 cm^{-1}) から氷相および液相の分布を画像として抽出し、その局在を確認した (図 16C, D)。得られた信号の定量には、 δCH バンド ($1,447 \text{ cm}^{-1}$, Czamara et al., 2015) を内部標準として用い、対象物質のピーク面積をこれで正規化した。なお、 δCH バンドはそのラマンイメージから細胞内で均一に分布している様子が確認できたため基準ピークとして選定した (図 17)。基準ピークには、シトクロムの既知のシグナル (Okotrub & Surovtsev, 2015) は含まれていない。DMSO のラマンイメージは、 675 cm^{-1} における DMSO 由来 CS 伸縮振動のピーク強度と、 $1,447 \text{ cm}^{-1}$ における δCH ピーク強度の比を使用して作成された。

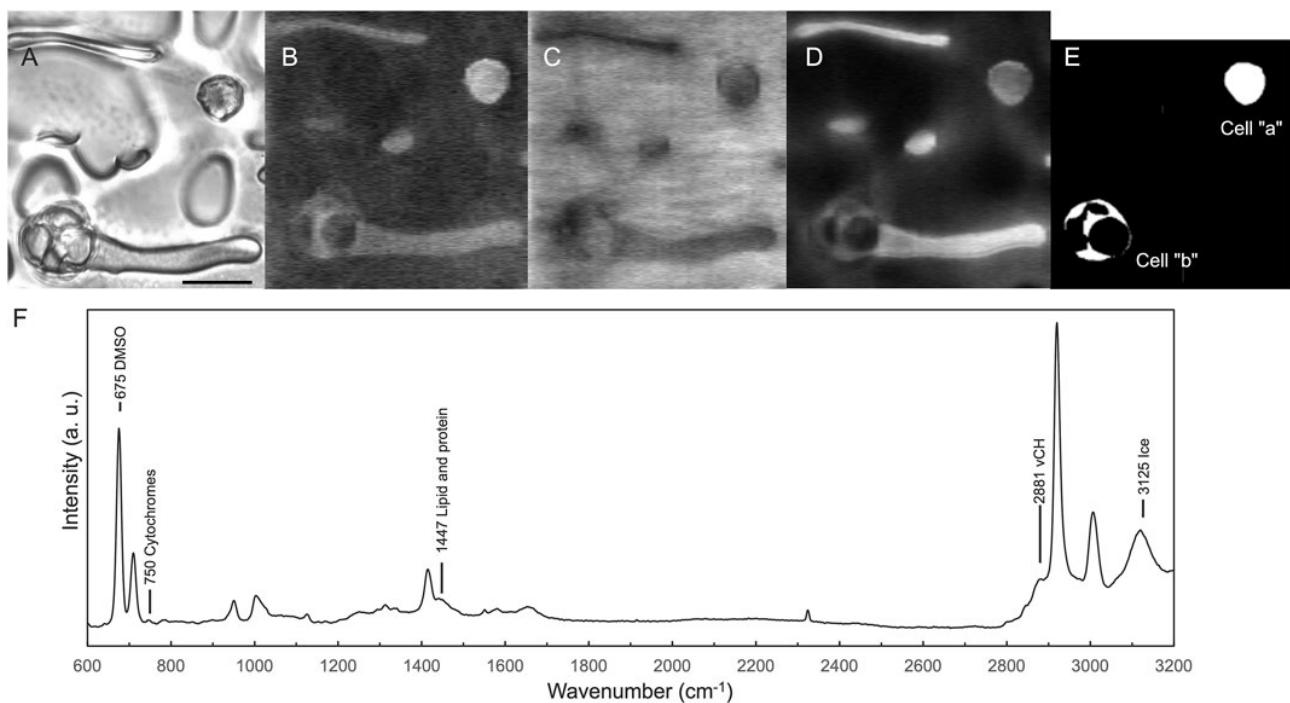


図 16 データ解析に用いた領域の選定およびピーク面積の正規化手順

(A) -150°C で取得した明視野像, (B) Raman 画像 ($2,881 \text{ cm}^{-1}$ における νCH 信号強度に基づく). (C) 氷相の位置を示す画像 ($3,125 \text{ cm}^{-1}$ の νOH 信号に基づく), (D) 液相(DMSO)の位置を示す画像, 673 cm^{-1} の CS 伸縮信号に基づく (Li et al., 2018). (A)および(B)から目視により細胞領域 (細胞 a および b)を選定し (E), 各領域から平均スペクトルを抽出した (F). 抽出された平均スペクトルから得られた DMSO 675 cm^{-1} およびシトクロム 750cm^{-1} のピーク面積は、細胞由来の δCH ($1,447 \text{ cm}^{-1}$)のピーク面積で除して正規化した (F). スケールバー: $20 \mu\text{m}$.

表 3 ラマンデータ解析に用いたスペクトルレンジ

Substance	Wavenumber (cm^{-1})	Assignments
DMSO	663.1- 695.4	Symmetric CS stretching (Li et al., 2018)
Lipid and protein	1429.0- 1503.8	δ (CH) (Ikemoto et al., 2021)
Cytochromes	750.7- 765.0	Pyrrole breathing v15 (Okotrub & Surovtsev, 2015)

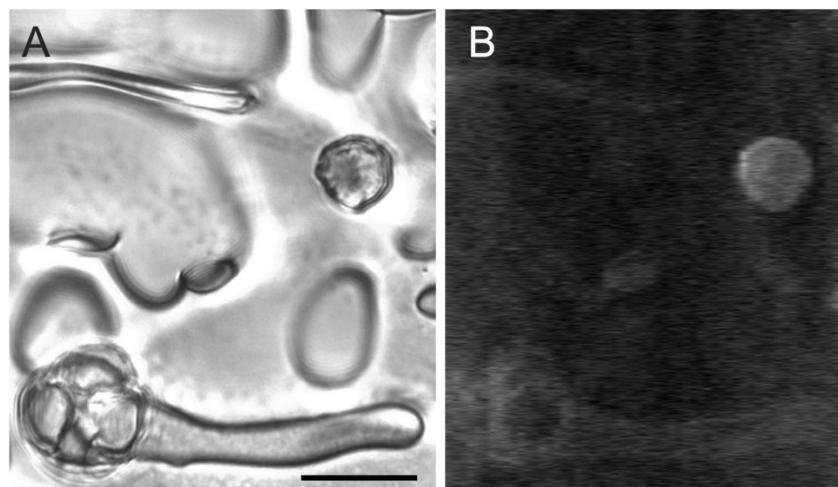


図 17 明視野像とラマンイメージ ($\nu\text{CH } 1,447 \text{ cm}^{-1}$)

3.2.5 フローサイトメトリーによるミトコンドリア膜電位の評価

温度サイクル処理後の細胞におけるミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)の蓄積を評価するため、フローサイトメトリー解析を実施した。解析には 10 μM の ROCK 阻害剤を含む培地を使用した。細胞は解凍後、この培地に懸濁し、37°C で 2 時間インキュベートした後、細胞濃度が $3.3 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ となるよう希釈した。その後、細胞懸濁液にミトコンドリア膜電位特異的染色試薬(テトラメチルローダミンエチルエステル:TMRE, 200 nM, Abcam)を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。続いて、死細胞染色試薬(SYTOX Red:SR, 5 nM, Thermo Fisher Scientific)を加え、同様に 37°C で 15 分間インキュベートし測定を行なった。染色された細胞の蛍光強度は、フローサイトメトリーシステム(CyFlow Cube 6; Sysmex Partec)を用いて検出された。励起/蛍光波長は、TMRE が 488 nm/536 nm, SR が 638 nm/675 nm であった。散乱光パラメータにより細胞破片を除外し、1 試料につき 5,000 イベント以上のデータを取得し、FCS Express 6 ソフトウェア(De Novo Software)を用いて解析を行った。

3.3 実験結果

3.3.1 ラマン分光法による解凍後のシトクロムシグナルの変化の解析

細胞死に関与するとされるシトクロム c のシグナルに対する温度サイクルの影響を調べるために、凍結・温度サイクル後に解凍し 4°Cに保持した細胞のシトクロム由来のシグナルをラマン顕微鏡システムにより測定し、温度サイクルを伴わない条件と比較した。

凍結および温度サイクルを行っていない条件(図 18A「Freezing -, Temp. cyclings -, 4°C」)において細胞領域から取得された平均スペクトルでは、750, 1,127, 1,314, 1,585 cm⁻¹においてシトクロムに由来するピーク (Okada et al., 2012)が確認された。これに対して、温度サイクルを施し解凍した条件(図 18A「Freezing +, Temp. cyclings +, 4°C」)では、これらのピーク強度が顕著に低下していた。

さらに、凍結は行ったが温度サイクルを伴わなかった場合と比較しても、温度サイクルを施したサンプルではシトクロムの正規化されたシグナル強度が有意に低下していた(図 18B「Freezing +, Temp. cyclings +, 4°C」の「Freezing +, Temp. cyclings -, 4°C」に対する比較)。

また、-150°Cでの測定では、温度サイクルの有無に関わらず、750, 1,127, 1,314, 1,585 cm⁻¹のピークが確認された(図 18A)。-150°Cで取得されたシグナルと比較すると、4°C で測定された温度サイクル後のサンプルのシグナルは小さく(図 18A)、シグナル強度も低い結果となった(図 18B)。

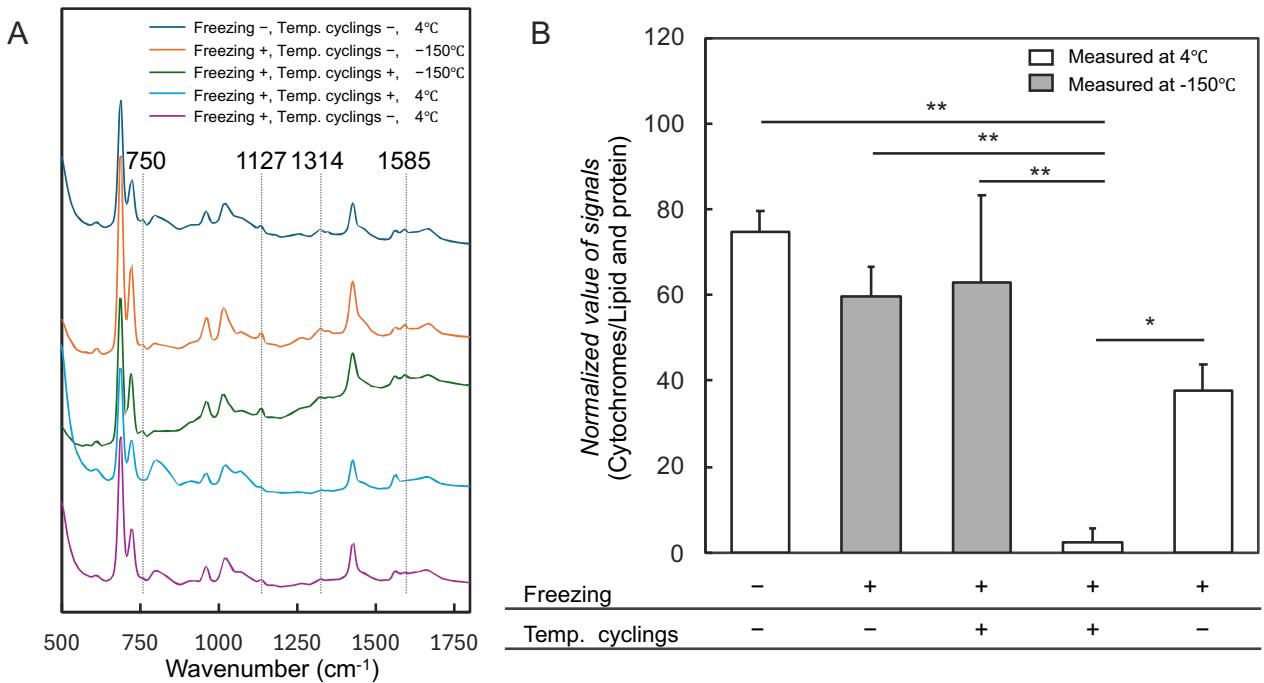


図 18 温度サイクル後の 4°C および−150°C でのシトクロムシグナルの比較

(A) は細胞領域から取得された平均スペクトルであり、750, 1,127, 1,314, 1,585 cm^{-1} に観測されるピークはシトクロム c の振動モードに対応する。 (B) はこれらのピークの正規化値を示す。記号「−」は凍結および温度サイクル処理なし、「+」はこれらの処理を行ったことを示す。データは 3 実験の平均±標準偏差で示され、 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (Tukey's test) を示す。

3.3.2 ラマン分光法による温度サイクル時の DMSO シグナルの変化の解析

温度サイクルに伴う DMSO の動態を観察するため、細胞を含む領域に対してラマンイメージングを実施した。得られたラマンイメージからは、温度サイクル 0 回の条件と比較して、5 回および 10 回の変動後に細胞内の DMSO シグナル強度が高まっている様子が確認された(図 19A, cell “a” および cell “b”)。正規化された DMSO シグナルの 0 回に対する相対比は、cell “a” および cell “b”

において 5 回目まで増加し, cell “b”は 5 回後以降 1.1 程度のシグナル比で一定であったのに対し, cell “a”では 10 回まで上昇傾向が続き, 1.2 を超えた. これに対し, cell “c”では増加傾向は見られなかった. (図 19B)

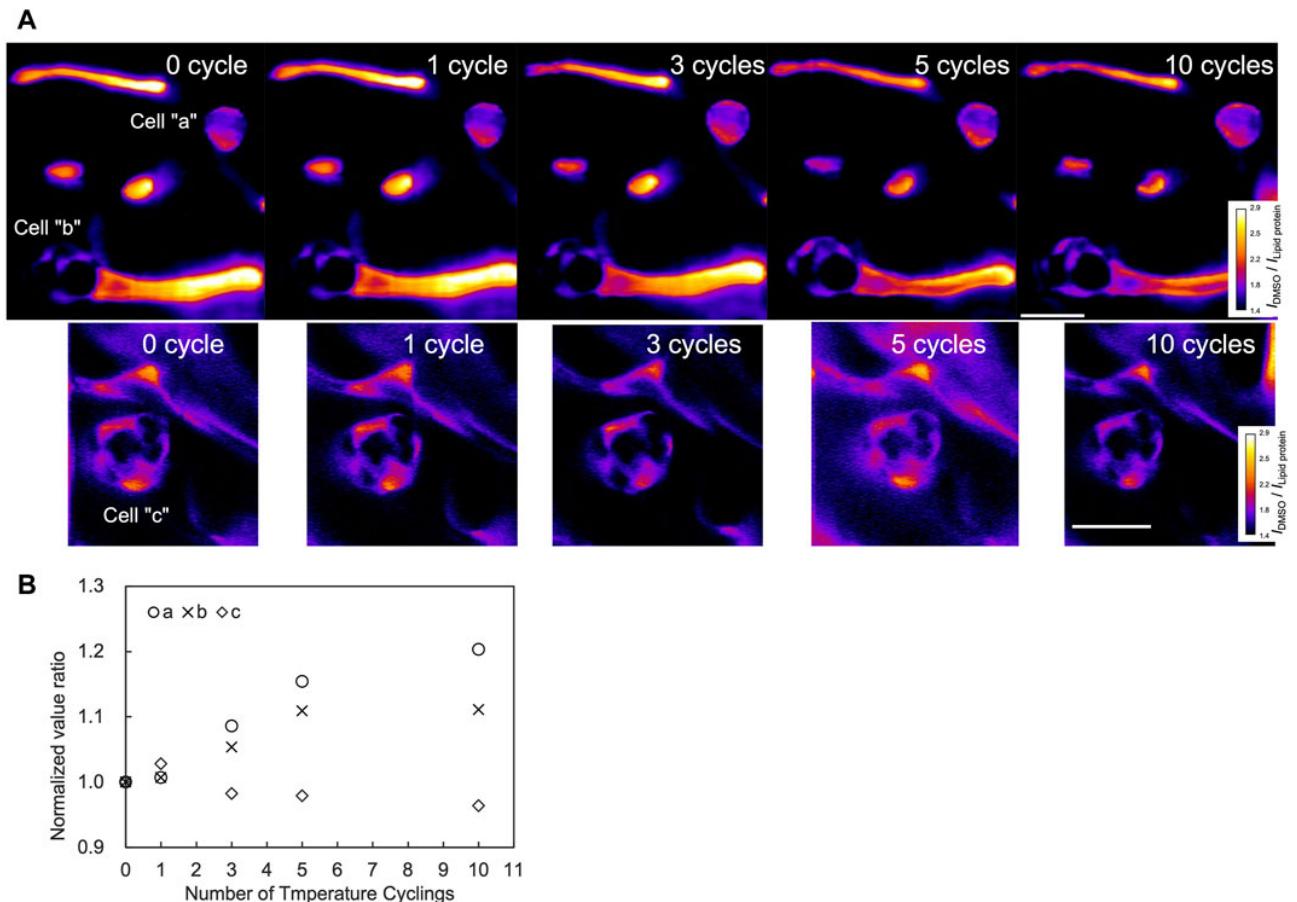


図 19 溫度サイクルに伴う DMSO のラマン画像とシグナル定量

(A) は 3 つの細胞を含む領域で取得された DMSO ラマンイメージ. カラーバーは DMSO シグナル強度 (I_{673}/I_{1472}) を示す. スケールバー : 20 μm . (B) は各回数の正規化したシグナルを, 0 回目の値で正規化したシグナル比を示す.

3.3.3 温度サイクルによるミトコンドリア膜電位の変化

温度サイクルがミトコンドリア機能に及ぼす影響を評価するため、 $\Delta\Psi_m$ および細胞膜の完全性を TMRE および SYTOX Red (SR) 染色を用いたフローサイトメトリーにより解析した。30 回以上の温度サイクルを施した条件では、 $\Delta\Psi_m$ の低下を示す TMRE-/SR- および TMRE-/SR+ の細胞の割合が増加した（表 4）。一方で、健康な細胞を示す TMRE+/SR- の割合はコントロール（サイクルなし）の 78.5% から 30 回の温度サイクル後に 67.2% まで減少し、それ以降の変動回数の増加による変化は見られなかった。

また、細胞膜の破綻を示す TMRE+/SR+ の細胞割合は、30 回以上の温度サイクル後も低い水準を維持した。

表 4 温度サイクル (-150～-80°C) によるミトコンドリア膜電位および細胞膜完全性の変化

		TMRE+, SR-	TMRE-, SR-	TMRE-, SR+	TMRE+, SR+
Control (no cycle)		78.5 ± 7.7	5.3 ± 3.7	7.6 ± 4.8	8.6 ± 4.7
Temperature cycles	10cycles	76.1 ± 3.9	3.9 ± 1.3	5.2 ± 1.4	13.8 ± 3.8
	30cycles	67.2 ± 3.3*	7.7 ± 0.7	21.3 ± 2.7**††	3.8 ± 0.4††
	50cycles	67.7 ± 3.3*	11.2 ± 2.1*††	16.4 ± 2.0*††	3.4 ± 0.7††
	70cycles	68.6 ± 5.1*	11.5 ± 0.5*††	17.5 ± 4.5**††	2.4 ± 0.3††

-150～-80°C の温度域で温度サイクルを付与した。TMRE+:高いミトコンドリア膜電位を示す。TMRE-:低いミトコンドリア膜電位を示す。SR-:高い細胞膜完全性を示す。SR+:細胞膜完全性の低下を示す。データは 4 回の独立試行の平均値 ± 標準偏差を示す。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (no cycle 群との比較), $†p < 0.05$, $††p < 0.01$ (10cycles 群との比較); Tukey の多重比較検定。

3.4 考察

温度サイクルによって細胞の生存性が低下することは複数の研究で報告されているが、その作用機序の詳細は十分に解明されてこなかった。今回の本研究では、凍結および温度サイクル後に 4°C で解凍した hiPSC において、シトクロムのラマンシグナルが顕著に減少していることを確認した。このシグナル低下は、既報のシトクロム c の酸化において見られた各波数(750, 1,127, 1,314, 1,585 cm⁻¹)におけるシグナル減少 (Okada et al., 2012)と一致した。一方で、脂質とタンパク質(1,447 cm⁻¹)のバンドは依然として観測されており、そのレベルが変化していないと考えることは合理的であることから、シグナルの減少はシトクロムの酸化に起因するものと考えられる。-150°C の時点では温度サイクルの有無に関わらずシグナルが検出されており、解凍直後の条件で減少していたことから温度サイクルによる酸化は解凍してから測定完了までの極めて短時間に起こっていることが示唆された。

UV の照射や Act D の添加によるアポトーシス誘導の初期段階では、受容体によりトリガーされたシトクロム c のミトコンドリアからの放出は 5 分程度かけて徐々に進行することが知られている (Joshua C. Goldstein et al., 2000)。本研究では、細胞内での物質移動や酵素反応に水分子が必要であるという点 (Alexander M. Klibanov, 2001)を鑑み、氷が融解した直後から反応が進行すると仮定した。先行研究では、10% DMSO を含む CPA 中の凍結細胞は、-100°C からの昇温過程で-60°C 付近から細胞外氷がわずかに融解し始めると報告されている (Pogozhykh et al., 2017)。この融解開始温度を反応開始と考えると、4°C での測定に要した約 80 秒および-60°C から 4°C までの昇温時間 96 秒を合計し、シトクロム c の酸化は融解開始後 3 分以内に完了していると推定され、シトクロム c の放出に先行して起こっているものと考えられる。

この酸化はカルジオリピンの過酸化反応を介してミトコンドリアからのシトクロム c 放出を促進し (Brown & Borutaite, 2008; Kitt et al., 2017; Okotrub & Surovtsev, 2015), その結果としてミトコンドリア膜電位の低下が引き起こされる (Yuan et al., 2014). 本研究でも, 解凍後約 2 時間でフローサイトメトリーにより TMRE 蛍光強度の低下が確認されており, この結果と一致する. シトクロム c の放出はアポトソームの形成とカスパーゼ活性化を誘導する経路に繋がる (Kole et al., 2011). これらの細胞死誘導の経路は, 2章により明らかとなった温度サイクルによる接着率(α)の低下=遅発的な応答として表れた原因と考えられる.

DMSO の挙動に着目したラマン分光では, 温度サイクルを繰り返すことで細胞内の DMSO ラマンシグナルの増加が観察された. DMSO を含む CPA は, T_g 以下では 10^{12} Pa·s を超える高粘性状態にあるが (Fonseca et al., 2016; Hubel et al., 2014), T_g を超えると 100 mPa·s まで急激に低下し流動性が著しく増加する (Erickson, 2009). さらに液相の熱膨張係数は氷よりも高く, 周囲の氷相に比して液相の膨張と移動が加速される (Rabin & Bell, 2003; Xu et al., 2021). DMSO は細胞膜を透過するため (Edashige, 2017), このような熱力学的変動により細胞内に侵入し, ラマン分光によりその濃度上昇が検出されたものと考えられる.

DMSO の細胞内濃度が上昇することは, シトクロム c オキシダーゼの活性化を促進し, シトクロム c の酸化を誘導する (Desai et al., 1988). したがって, DMSO の浸透とこれにより誘導する解凍後の酸化反応が, ミトコンドリア機能低下と細胞死を引き起こす一連の応答につながった可能性がある. 2章の接着率の低下が, 特に CPA のガラス転移温度 ($T_g = -116.6^\circ\text{C}$) を超える温度範囲 (-150~ -115°C) での温度サイクルにおいて顕著であり, 脱ガラス化を起こす変動温度域と遅発的な細胞死を起こす温度域が一致したことまた, DMSO の移動をきっかけに一連の細胞死に繋が

ったことを示唆している。

なお、これらの知見は、結合水の放出 (Wolfe et al., 2002) や氷の再結晶化 (Vysekantsev et al., 2005) といった他の物理化学的要因による細胞損傷の可能性を否定するものではない。むしろそれらと併せて、ミトコンドリア機能への影響を介した遅発的な細胞死メカニズムが主要な原因であると考えられる。

以上の結果から、温度サイクルによって誘導される細胞内応答は、膜を介した物質の移動をトリガーとした極めて短時間内の酸化反応により開始され、ミトコンドリアの損傷を介して細胞死に至る一連のプロセスであると考えられる。本研究では、ラマン分光とフローサイトメトリーにより得られた結果に基づき、温度サイクルが引き起こす細胞応答経路を模式図で提案した(図 20)。

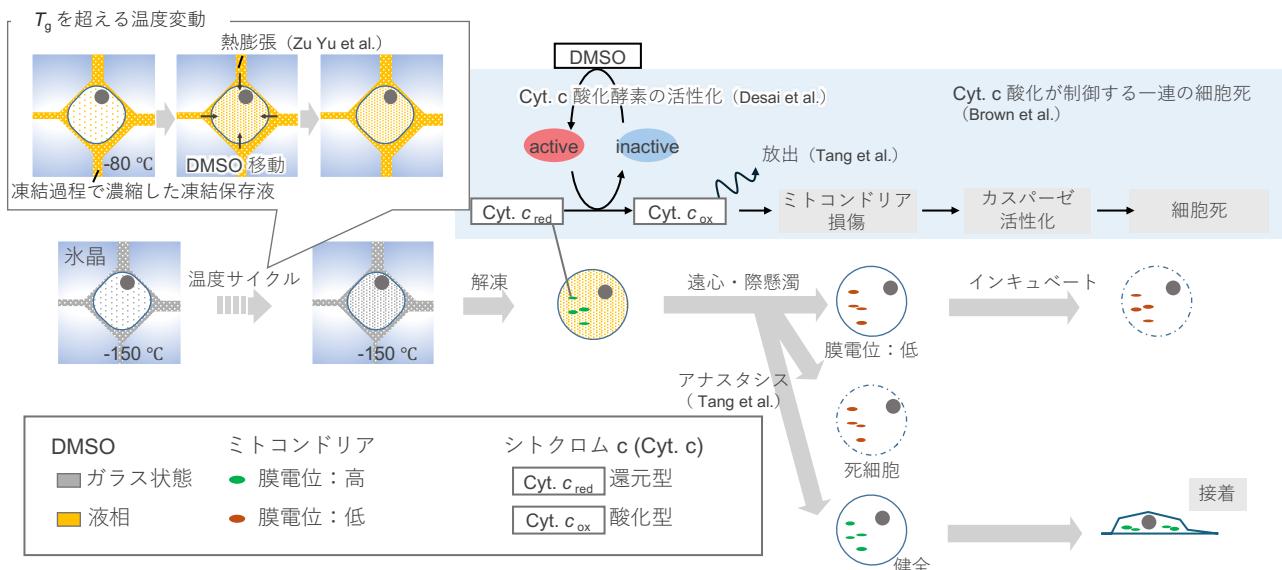


図 20 温度変動によって誘導される hiPSC における細胞応答の模式図

研究結果に基づき導き出された細胞応答の仮説を示している。温度変動により凍結保存液(CPA)

のガラス転移温度(T_g)を超えると、細胞外の濃縮 DMSO は流動性を持った液相となる。熱膨張とともに、この DMSO が一部の細胞内へ移動する。解凍後、細胞内に移行した DMSO はシトクロム c オキシダーゼを活性化させ、シトクロム c の酸化を引き起こす。シトクロム c が酸化されると、一部の細胞ではミトコンドリア膜電位の喪失が生じ、接着不全や細胞死に至る。本仮説において DMSO の移行とシトクロム c 酸化の関連は Desai らの研究 (Desai et al., 1988) に、また、シトクロム c の酸化・放出、ミトコンドリア膜電位の崩壊との関係は先行研究 (Brown & Borutaite, 2008; Joshua C. Goldstein et al., 2000) の知見に基づいている。

この一連の応答は、全ての細胞に一様に発生しているわけではなく、個々の細胞で異なる程度・タイミングで進行している可能性がある点について言及しておきたい。DMSO の蓄積に関しては、温度サイクルによって濃度が継続的に上昇する細胞、数回で上がり止まる細胞、ほとんど変化が見られない細胞が存在していた。細胞を取り巻く環境は氷相または濃縮液相によって構成されており、DMSO の流入は細胞近傍の組成・状態に強く依存することが示唆される。

一方で、シトクロムのシグナルは、DMSO 蓄積に差があるにもかかわらず全ての細胞で消失しており、微量の DMSO 移動があれば酸化反応が進行する、あるいは測定による誤差の範囲で観察がされなかった DMSO の変化が実際には存在していた可能性がある。

さらに、フローサイトメトリーの結果からは、ミトコンドリア膜電位が喪失した細胞 (TMRE-) は 30 サイクルまで増加し続けたが、割合としては約 30% にとどまった。また、接着率 (α) の低下は 20 サイクルまでに進行し、その後収束した。これらの知見は、全細胞が同様に細胞死へ向かうわけではなく、一部の細胞が回復あるいは影響を受けずに生存する経路をたどっている可能性を示している。この回復現象：アナスタシスについても近年報告がされている (Tang & Tang, 2018)。

このように、温度サイクルに対する細胞の応答は、DMSO 移動という共通トリガーに始まりつつも、細胞ごとの局所環境に応じて、酸化反応からミトコンドリア損傷、接着不全に至るまでの進行度が異なる非同期的かつ不均一な応答として現れることが示唆された。

3.5 小括

本章では、温度変動に伴う細胞内部の応答を明らかにするため、ラマン分光法およびフローサイトメトリーを用いて hiPSC の凍結・温度サイクル・解凍後の変化を解析した。その結果から、温度変動により細胞内に移行した DMSO が解凍後にシトクロム c の酸化を誘導し、ミトコンドリア膜電位の低下を通じて細胞死に至る可能性が示された。反応初期におけるシトクロム c の酸化は、氷の融解開始から約 3 分という極めて短時間で完了しており、温度サイクルによる遅発的劣化において、この応答が先行していることが明らかとなった。以上より、温度変動に対する細胞応答の主因がミトコンドリア機能障害を介した細胞死である可能性が示唆された。

また、温度変動が凍結保存液のガラス転移温度を超える条件で特に大きな影響を及ぼすこと、ならびに DMSO の物理化学的性質の変化が細胞応答に寄与していることも示唆された。これらの知見は、保管中の細胞の温度変動における到達温度や変動回数といった温度管理設計を行う上で、考慮すべき重要な細胞応答の理解に資するものである。

第4章 総括

本博士論文では、TWEs による品質劣化を考慮した工程設計に資する応答特性を理解することを目的とし、hiPSC または hMSC の凍結保存・輸送中の温度変動による応答特性を対象に研究を行なった。

第1章では、細胞製品の長期保存と流通における TWEs が品質に及ぼす影響を踏まえ、これらを考慮した工程設計の必要性を示した。その上で、細胞製造性(cell manufacturability)の概念に基づき、温度変動という物理化学的入力と、それに伴う細胞応答および品質変化(出力)との関係を体系的に理解することの重要性を述べた。

第2章では、TWEs が凍結細胞の生存性および接着性に与える影響を評価するための実験系を構築し、異なる温度変動条件下での細胞品質の定量的变化を把握した。これにより、入力(変動温度域、変動回数)と出力(生存性変化)の関係を整理した。

第3章では、温度サイクル中に生じる細胞内外の物理化学的変化と細胞応答のメカニズムを解明することを目的とし、ラマン分光法とフローサイトメトリー等を用いて、細胞内環境の変化とそれに伴う応答の挙動を解析し、温度サイクルに伴う液相中の DMSO の移動と、細胞死の初期応答となるシトクロム c の酸化、ミトコンドリアの膜電位の低下といった一連の細胞応答の理解の核となる事象を捉えることに成功した。

以上より、TWEs による入力と出力の関係性を理解し、その物理化学的入力と生物学的な出力への変換に関する応答メカニズムを提案した。これらにより、TWEs による応答特性を解釈した(図 21)。

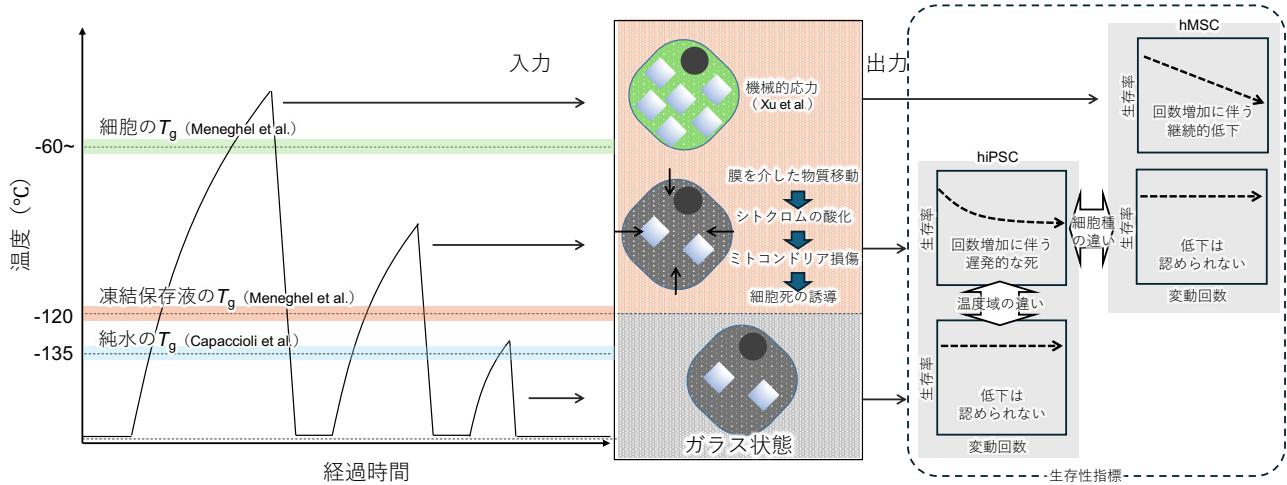


図 21 温度変動による細胞応答の概念図

本研究で観察された温度変動に伴う DMSO の膜透過、シトクロム c の酸化、ミトコンドリア膜電位の低下といった一連の応答は、脂質二重膜構造やミトコンドリアといった多くの細胞に共通する構造に基づく現象であり、一般的に起こり得る応答と考えられる。一方で、使用したモデルは実際に投与される細胞ではなく、その中間体である hiPSC 懸濁液であり、最終製品として臨床応用されている細胞種との違いを踏まえる必要がある。第 2 章に示したように、hiPSC と hMSC では応答に差が見られた。-150°Cから-80°Cまでの温度サイクルを最大 100 回繰り返し評価した結果、hiPSC で観察された接着率(α)や生存ポテンシャル(P)の低下は hMSC では認められなかった。この差異は、細胞膜の流動性やアクアポリンの発現量などが細胞種・分化段階によって異なることに起因する可能性があり (Verkman, 2005)，設計においてはこうした細胞種間の性質の違いを考慮する必要がある。

なお、到達温度を細胞内のガラス転移温度($T_{g,i}$, -60~−40°C)付近となる-50°Cまでとした条件、また先行研究に合わせて室温暴露による-80°Cへの温度サイクルを付与した条件では、回復率(β)

および生存ポテンシャル(P)が低下し、先行研究 (Xu et al., 2021)と同様にサイクル回数依存的に低下を継続する傾向となったことから、 $T_{g,i}$ が細胞応答を左右する重要な管理温度であることを裏付けた。

また、本研究では細胞外のガラス転移点($T_{g,e}$)を超える温度変動によって生存性低下が認められ、その機序が提案された。この点を踏まえると、使用する凍結保存液(CPA)の組成により $T_{g,e}$ が異なることにも留意する必要がある。したがって、温度管理設計においては、使用する材料の物性に応じて応答特性に違いが生じる可能性があることを考慮することが求められる。

これらの知見から、保管中の入出庫操作における温度管理は生存性の低下を引き起こすことを踏まえ、然るべき時点で適切な品質を確保できるよう基準を定めた工程設計が必要になる。具体的には、投与の際に満たすべき品質指標のボーダーラインを設定し、これを満たすように出庫操作による入力条件を設定すること、この範囲を下回る場合は適切な管理条件を設定することで、製造から投与に至るまでの流通における温度変動による品質劣化を許容範囲内とすることが求められる(図 22)。

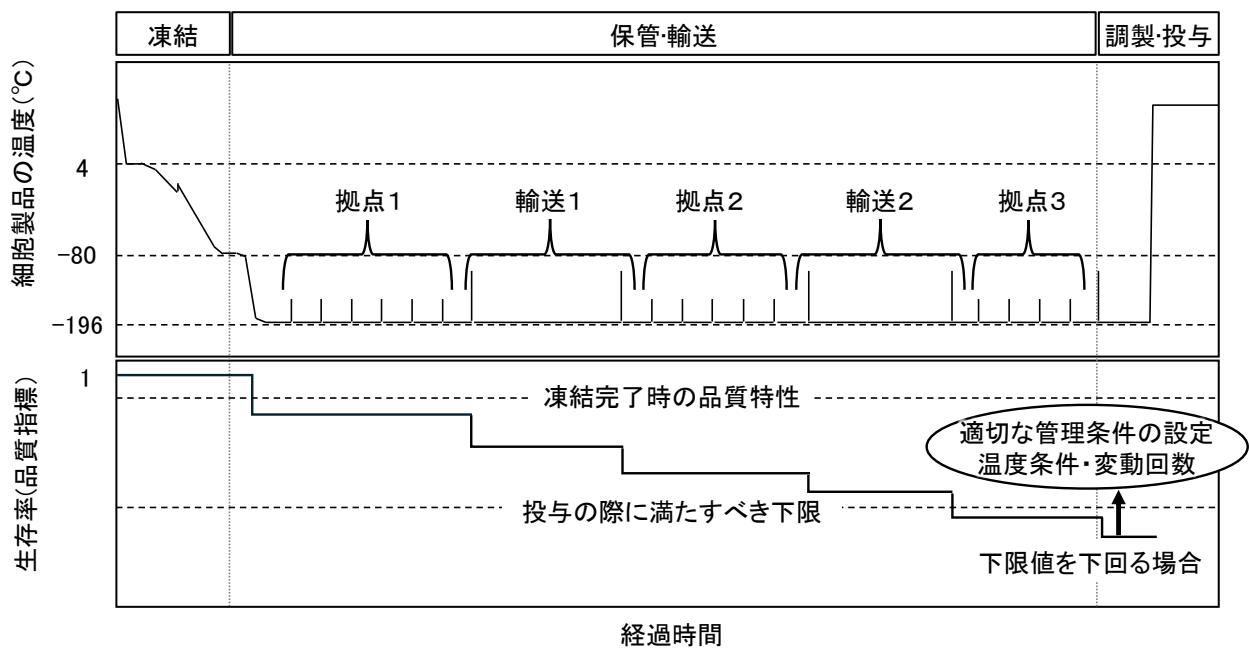


図 22 凍結保存における品質劣化と満たすべき品質を示した概念図

ここまでに、細胞系への入力となる到達温度と変動回数といったパラメーターが出力である細胞の生存性に与える影響を理解することの重要性、ガラス転移を起点とした細胞死に関わる細胞応答を理解することの重要性、さらに使用する細胞種と材料の違いによってこれらの応答特性が変化することを考慮する必要性について述べた。ここからは、これらの理解に基づいた温度管理設計について展望を述べる。

保管中の細胞の温度管理設計を考える上で、すべての保管中の細胞温度を直接モニターすることは現実的に困難であることを留意する必要がある。細胞への入力となる到達温度は、作業による室温への曝露時間や環境温度といった物理的パラメーターの動作出力として決定される。また、細胞への入力となる変動回数は、出庫回数によってその発生頻度が決定する。したがって、細胞の温度変動を引き起こす室温への曝露時間(操作時間)と取り出し回数(操作回数)をプロセスパラメーターとして設計・管理することが重要である。

上述の留意点と、本研究で得られた知見を踏まえ、出庫操作における温度管理設計の考え方を提案する(図 23)。この設計は以下の3つのステップにより構成される。

① 応答特性の理解

② 管理条件の決定

③ 操作条件の決定

ステップ①は入力への応答性と、細胞応答についての理解である。入力への応答性には、細胞への入力となる到達温度および変動回数について、出力としての生存性への影響、その影響と満たすべき下限との関係を理解することが重要である。また、細胞種による感受性の違いにも留意する必要がある。細胞応答については、対象とする温度変動域における熱力学的入力が、どのように細胞の出力(生存性や接着性の変化)へと変換されるかを理解する。このステップでは、細胞内外のガラス転移温度($T_{g,i}$, $T_{g,e}$)を超えることにより生じる状態変化を考慮することが重要である。また、CPA の組成によって T_g が変化することにも留意する必要がある。

ステップ②では、①の理解に基づいて管理条件となる到達温度および変動回数の上限を決定する。ステップ③では、②で設定した管理条件を満たす操作条件を決定する。このステップでは、直接モニターすることが困難な細胞温度に対し、操作条件(操作時間、操作回数)を管理することで管理条件を満たすための活動と位置付けられる。ここで、操作による出庫対象の容器系への入力への変換、容器系への入力から細胞系への入力への変換を理解することが重要である。操作による容器系への入力の変換は、操作中に暴露される室温などの環境温度との差異により時間依存的に生じる熱伝導によって容器内の到達温度へと変換される。本研究においては検証できていないが、この操作時間は実用的には一度に出庫するバイアルの本数が増加することや、出庫

対象の識別のためのラベルの読み取りなどの所用時間を含むため、これらの操作手順を定めるこ
とも温度管理設計に含まれる。

以上により、製品品質の維持に資する温度管理設計を論理的に構築する枠組みを提示した。
本研究は、凍結細胞の温度変動への応答特性について理解を深め、その知見に基づいて管理
対象とすべき操作パラメーターを明確化することで、保管・流通工程における温度管理を工学的
に設計する戦略を見出した。本研究で用いた細胞種および条件はモデルケースであり、今後はよ
り多様な細胞種や運用環境への応用を通じて、設計指針の汎用性と実効性を高めていくことが期
待される。本研究で構築された温度変動に対する細胞応答の理解に基づいた設計の考え方は、
再生医療等製品の品質保証に向けた実務的・科学的両面からの有効なアプローチとなり得る。本
研究はその第一歩を示したものであり、今後の標準化や指針策定への展開が期待される。

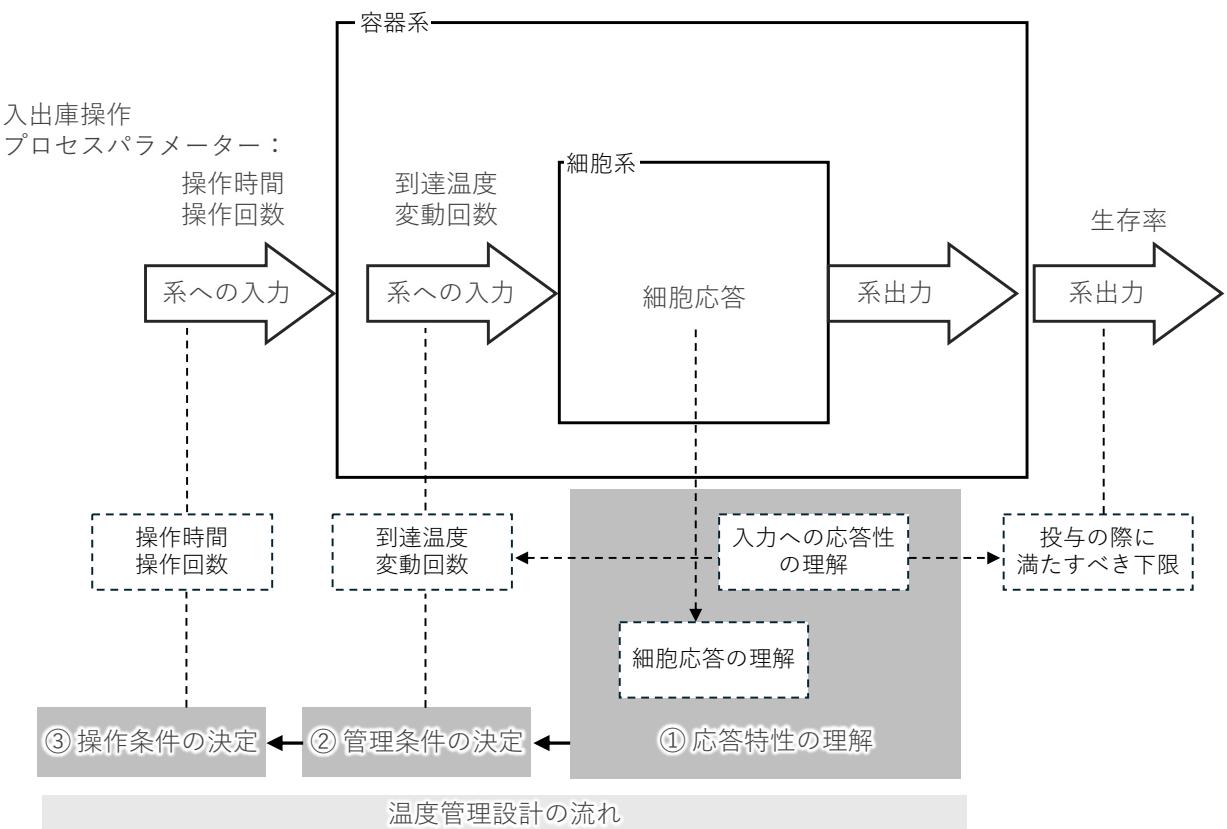


図 23 細胞製造性を考慮した温度管理設計の概念図

略語一覧

略語

hiPSC: Human Pluripotent stem cell, ヒト人工多能性幹細胞

hMSC: Human Mesenchymal stromal / stem cell, ヒト間葉系幹細胞／間質細胞

CPA: Cryo-protective solution, 凍結保存液

TWEs: Transient warming events, 一過的な温度上昇

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, エチレングリジアミン四酢酸

PBS: Phosphate buffered salts, リン酸緩衝生理食塩水

ROCK: Rho-associated protein kinase, Rho 関連タンパク質キナーゼ

SR: SYTOX Red

TMRE: テトラメチルローダミンエチルエステル

指標

α 接着率 (-)

β 回復率 (-)

P 生存ポテンシャル (-)

$\Delta\Psi_m$ ミトコンドリア膜電位 (-)

T_g : Glass transition temperature, ガラス転移温度

$T_{g,i}$: Intracellular glass transition temperature, 細胞内のガラス転移温度

$T_{g,e}$: Extracellular glass transition temperature, 細胞外のガラス転移温度

参考文献

- Alexander M. Klibanov. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409, 241–246. <https://doi.org/10.1038/35051719>
- Angel, S., Von Briesen, H., Oh, Y. J., Baller, M. K., Zimmermann, H., & Germann, A. (2016). Toward Optimal Cryopreservation and Storage for Achievement of High Cell Recovery and Maintenance of Cell Viability and T Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14(6), 539–547. <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0046>
- Barkholt, L., Flory, E., Jekerle, V., Lucas-Samuel, S., Ahnert, P., Bisset, L., Büscher, D., Fibbe, W., Foussat, A., Kwa, M., Lantz, O., MačIulaitis, R., Palomäki, T., Schneider, C. K., Sensebé, L., Tachdjian, G., Tarte, K., Tosca, L., & Salmikangas, P. (2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies - Bridging scientific observations and regulatory viewpoints. In *Cytotherapy* (Vol. 15, Issue 7, pp. 753–759). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.005>
- Brown, G. C., & Borutaite, V. (2008). Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1777, Issues 7–8, pp. 877–881). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.024>
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 75, pp. 685–705). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Capaccioli, S., & Ngai, K. L. (2011). Resolving the controversy on the glass transition temperature of water. *Journal of Chemical Physics*, 135(10). <https://doi.org/10.1063/1.3633242>
- Chen, Z., Liu, J., Tian, L., Zhang, Q., Guan, Y., Chen, L., Liu, G., Yu, H.-Q., Tian, Y., & Huang, Q. (2020). Raman micro-spectroscopy monitoring of cytochrome c redox state in Candida utilis during cell death under low-temperature plasma-induced oxidative stress †. *Cite This: Analyst*, 145, 3922. <https://doi.org/10.1039/d0an00507j>
- Criswell, T., Swart, C., Stoudemire, J., Brockbank, K., Floren, M., Eaker, S., & Hunsberger, J. (2022). Shipping and Logistics Considerations for Regenerative Medicine Therapies. In *Stem Cells*

- Translational Medicine* (Vol. 11, Issue 2, pp. 107–113). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/stcltm/szab025>
- Czamara, K., Majzner, K., Pacia, M. Z., Kochan, K., Kaczor, A., & Baranska, M. (2015). Raman spectroscopy of lipids: A review. In *Journal of Raman Spectroscopy* (Vol. 46, Issue 1, pp. 4–20). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jrs.4607>
- Desai, S. D., Chetty, K. G., & Pradhan, D. S. (1988). *Dimethyl sulfoxide elicited increase in cytochrome oxidase activity in rat liver mitochondria in vivo and in vitro.* 66, 147–155.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cyotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Edashige, K. (2017). Permeability of the plasma membrane to water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: Its relevance to vitrification. In *Reproductive Medicine and Biology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 36–39). John Wiley and Sons Ltd.
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12007>
- Erickson, H. P. (2009). Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. In *Biological Procedures Online* (Vol. 11, Issue 1, pp. 32–51). <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>
- Faltus, M., Bilavcik, A., & Zamecnik, J. (2021). Vitrification ability of combined and single cryoprotective agents. *Plants*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/plants10112392>
- Fonseca, F., Meneghel, J., Cenard, S., Passot, S., & Morris, G. J. (2016). Determination of intracellular vitrification temperatures for unicellular micro organisms under conditions relevant for cryopreservation. *PLoS ONE*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152939>
- Germann, A., Oh, Y. J., Schmidt, T., Schön, U., Zimmermann, H., & von Briesen, H. (2013). Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. *Cryobiology*, 67(2), 193–200.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.012>

Hubel, A., Spindler, R., & Skubitz, A. P. N. (2014). Storage of human biospecimens: Selection of the optimal storage temperature. In *Biopreservation and Biobanking* (Vol. 12, Issue 3, pp. 165–175).

Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/bio.2013.0084>

Ikemoto, K., Hashimoto, K., Harada, Y., Kumamoto, Y., Hayakawa, M., Mochizuki, K., Matsuo, K., Yashiro, K., Yaku, H., Takamatsu, T., & Tanaka, H. (2021). Raman spectroscopic assessment of myocardial viability in langendorff-perfused ischemic rat hearts. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 54(2), 65–72. <https://doi.org/10.1267/ahc.21-00016>

Isasi, R. M., & Knoppers, B. M. (2009). Governing stem cell banks and registries: Emerging Issues. *Stem Cell Research*, 3(2–3), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.05.003>

Joshua C. Goldstein, Nigel J. Waterhouse, Phillippe Juin, Gerard I. Evan, & Douglas R. Green. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology*, 2, 156–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35004029>

Kagihiro, M., Fukumori, K., Aoki, T., Ungkulpasvich, U., Mizutani, M., Viravaidya-Pasuwat, K., & Kino-oka, M. (2018). Kinetic analysis of cell decay during the filling process: Application to lot size determination in manufacturing systems for human induced pluripotent and mesenchymal stem cells. *Biochemical Engineering Journal*, 131, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.11.019>

Karlsson, J. O. M., & Toner, M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. In *Biomotrials* (Vol. 17).

Kashirina, A. S., López-Duarte, I., Kubánková, M., Gulin, A. A., Dudenkova, V. V., Rodimova, S. A., Torgomyan, H. G., Zagaynova, E. V., Meleshina, A. V., & Kuimova, M. K. (2020). Monitoring membrane viscosity in differentiating stem cells using BODIPY-based molecular rotors and FLIM. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70972-5>

Kenta Mizushima, Yasuaki Kumamoto, Shoko Tamura, Masahito Yamanaka, Kentaro Mochizuki, Menglu Li, Syusuke Egoshi, Kosuke Dodo, Yoshinori Harada, Nicholas I. Smith, Mikiko

- Sodeoka, Hideo Tanaka, & Katsumasa Fujita. (2024). Raman microscopy of cryofixed biological specimens for high resolution and high sensitivity chemical imaging. *SCIENCE ADVANCES*, 10(50). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adn0110>
- Kino-oka, M., Mizutani, M., & Medcalf, N. (2019). Cell manufacturability. *Cell and Gene Therapy Insights*, 5(10), 1347–1359. <https://doi.org/10.18609/cgti.2019.140>
- Kino-Oka, M., & Prenosil, J. E. (2000). Development of an on-line monitoring system of human keratinocyte growth by image analysis and its application to bioreactor culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(2), 234–239. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000120\)67:2<234::AID-BIT13>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000120)67:2<234::AID-BIT13>3.0.CO;2-H)
- Kitt, J. P., Bryce, D. A., Minteer, S. D., & Harris, J. M. (2017). Raman Spectroscopy Reveals Selective Interactions of Cytochrome c with Cardiolipin That Correlate with Membrane Permeability. *Journal of the American Chemical Society*, 139(10), 3851–3860. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b00238>
- Kole, A. J., Knight, E. R. W., & Deshmukh, M. (2011). Activation of Apoptosis by Cytoplasmic Microinjection of Cytochrome. *Journal of Visualized Experiments*, 52, 1–4. <https://doi.org/10.3791/2773>
- Konagaya, S., Ando, T., Yamauchi, T., Suemori, H., & Iwata, H. (2015). Long-term maintenance of human induced pluripotent stem cells by automated cell culture system. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16647>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). *Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006.-Irrespective>
- Kumamoto, Y., Li, M., Koike, K., & Fujita, K. (2022). Slit-scanning Raman microscopy: Instrumentation and applications for molecular imaging of cell and tissue. *Journal of Applied Physics*, 132(17). <https://doi.org/10.1063/5.0102079>
- Li, R., Yu, G., Azarin, S. M., & Hubel, A. (2018). Freezing Responses in DMSO-Based Cryopreservation of Human iPS Cells: Aggregates Versus Single Cells. *Tissue Engineering -*

Part C: Methods, 24(5), 289–299. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0531>

Lukacheva, A. V., Gorb, A. I., Musorina, A. S., Kriger, D. V., Poljanskaya, G. G., & Bobkov, D. E. (2023). Replicative Senescence in Human Embryo Bone Marrow MSCs is Characterized by Changes in Cell Motility and Subcellular Localization of Rac1 and RhoA GTPases. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 49, S224–S240. <https://doi.org/10.1134/S106816202312018X>

Martins-Taylor, K., & Xu, R. H. (2012). Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. In *Stem Cells* (Vol. 30, Issue 1, pp. 22–27). <https://doi.org/10.1002/stem.705>

Matsuzaki, T., Matsumoto, S., Kasai, T., Yoshizawa, E., Okamoto, S., Yoshikawa, H. Y., Taniguchi, H., & Takebe, T. (2018). Defining Lineage-Specific Membrane Fluidity Signatures that Regulate Adhesion Kinetics. *Stem Cell Reports*, 11(4), 852–860. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.010>

Mazur, P. (1963). *Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), C125–C142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>

Mazur, P., Leibo, S. P., & Chu, E. H. Y. (1972). A TWO-FACTOR HYPOTHESIS OF FREEZING INJURY Evidence from Chinese Hamster Tissue-culture Cells. In *Experimental Cell Research* (Vol. 71).

Meacle, F., Salkin, J., Rice, M., & Harris, I. (2016). Key considerations of cell and gene therapy cold chain logistics. *Cell and Gene Therapy Insights*, 2(2), 223–236. <https://doi.org/10.18609/cgti.2016.025>

Meneghel, J., Kilbride, P., Morris, J. G., & Fonseca, F. (2019). Physical events occurring during the cryopreservation of immortalized human T cells. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217304>

- Mizuno, M., Matsuzaki, T., Ozeki, N., Katano, H., Koga, H., Takebe, T., Yoshikawa, H. Y., & Sekiya, I. (2022). Cell membrane fluidity and ROS resistance define DMSO tolerance of cryopreserved synovial MSCs and HUVECs. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02850-y>
- Mrowiec, Z. R., Mrowiec, Z. R., Angelina, A., Laluf, J., Yildirim, C., Verter, F., & Todd, D. (2012). Adres do korespondencji: Transient warming events and cryogenic storage of cord blood mononuclear cells for stem cell transplantation Wpływ krótkotrwałego oddziaływania temperatury pokojowej na zamrożone komórki jednojądrzaste z krwi pępowinowej przeznaczone do transplantacji. *PRACA ORYGINALNA Journal of Transfusion Medicine*, 4(5), 153–158. <http://www.thermoge->
- Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M., Yoshida, Y., Toyoda, T., Osafune, K., Sekiguchi, K., & Yamanaka, S. (2014). A novel efficient feeder-Free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep03594>
- Narten, A. H., Eta, /, Sivakumar, T. C., Mayer, E., & Pletzer, R. (1974). The glass-liquid transition of hyperquenched water. In *15. Washburn, E. W. in International Critical Tables of Numerical Data* (Vol. 64, Issue 9). Oxford University Press.
- Okada, M., Smith, N. I., Flotildes Palonpon, A., Endo, H., Kawata, S., Sodeoka, M., Fujita, K., & Riken, D. (2012). Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis. *PNAS*, 109(1), 28–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107524108/-DCSupplemental>
- Okotrub, K. A., & Surovtsev, N. V. (2015). Redox State of Cytochromes in Frozen Yeast Cells Probed by Resonance Raman Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 109(11), 2227–2234. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.10.033>
- Pogozhykh, D., Pogozhykh, O., Prokopyuk, V., Kuleshova, L., Goltsev, A., Blasczyk, R., & Mueller, T. (2017). Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem*

Cell Research and Therapy, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0512-7>

Rabin, Y., & Bell, E. (2003). Thermal expansion measurements of cryoprotective agents. Part I: A new experimental apparatus. *Cryobiology*, 46(3), 254–263. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00042-7)

Semenova, E., Grudniak, M. P., Machaj, E. K., Bocian, K., Chroscinska-Krawczyk, M., Trochonowicz, M., Stepaniec, I. M., Murzyn, M., Zagorska, K. E., Boruczkowski, D., Kolanowski, T. J., Oldak, T., & Rozwadowska, N. (2015). *Mesenchymal Stromal Cells from Different Parts of Umbilical Cord: Approach to Comparison & Characteristics.* <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10157-3/Published>

Shin, S., Lee, J., Kwon, Y., Park, K. S., Jeong, J. H., Choi, S. J., Bang, S. I., Chang, J. W., & Lee, C. (2021). Comparative proteomic analysis of the mesenchymal stem cells secretome from adipose, bone marrow, placenta and wharton's jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>

Stanko, P., Kaiserova, K., Altanerova, V., & Altaner, C. (2014). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomedical Papers*, 158(3), 373–377. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.078>

Tang, H. M., & Tang, H. L. (2018). Anastasis: Recovery from the brink of cell death. In *Royal Society Open Science* (Vol. 5, Issue 9). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsos.180442>

Tokar, T., Turcan, Z., & Ulicny, J. (2012). Boolean network-based model of the Bcl-2 family mediated MOMP regulation. <http://arxiv.org/abs/1212.5010>

USP General Chapter <1044> Cryopreservation of Cells. (2014). *USP 41 – NF 36*.

Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: Unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118(15), 3225–3232. <https://doi.org/10.1242/jcs.02519>

Victorelli, S., & Passos, J. F. (2017). Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. In *EBioMedicine* (Vol. 21, pp. 14–20). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.027>

Vysekantsev, I. P., Gurina, T. M., Martsenyuk, V. F., Petrenko, T. F., Kudokotseva, E. V., Koschchiy, S.

V, & Groshevoy, M. I. (2005). PROBABILITY OF LETHAL DAMAGES OF CRYOPRESERVED BIOLOGICAL OBJECTS DURING STORAGE. *CryoLetters*, 26(6), 401–408.

Wolfe, J., Bryant, G., Koster, K. L., Wales, S., & JWolfe, S. (2002). WHAT IS “UNFREEZABLE WATER”, HOW UNFREEZABLE IS IT AND HOW MUCH IS THERE? *CryoLetters*, 23, 157–166.

Xu, Y., Li-Ying Chan, L., Chen, S., Ying, B., Zhang, T., Liu, W., Guo, H., Wang, J., Xu, Z., Zhang, X., & He, X. (2021). Optimization of UC-MSCs cold-chain storage by minimizing temperature fluctuations using an automatic cryopreservation system. *Cryobiology*, 99, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.010>

Yamamoto, R., & Kino-oka, M. (2021). Design of suspension culture system with bubble sparging for human induced pluripotent stem cells in a plastic fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(2), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.04.010>

Yamamoto, R., Sakakibara, R., Kim, M. H., Fujinaga, Y., & Kino-oka, M. (2024). Growth prolongation of human induced pluripotent stem cell aggregate in three-dimensional suspension culture system by addition of botulinum hemagglutinin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 137(2), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.11.010>

Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., Marshall, C., Cai, Z., Wang, L., & Xiao, M. (2014). Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447>

本報に関する論文

Okuda, J., Watanabe, N., Nakamura, T., Mizushima, K., Xi, H., Kumamoto, Y., Fujita, K., & Kino-Oka, M. (2024). The impact of repeated temperature cycling on cryopreserved human iPSC viability stems from cytochrome redox state changes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1443795. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1443795>

謝辞

本研究を遂行するにあたり、格別なご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 紀ノ岡正博教授に心より感謝申し上げます。また、本論文の審査にあたり、的確なご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科 大政健史教授、内山進教授に感謝申し上げます。

研究活動に関するご指導、ご助言のみならず、研究室生活全般にてお世話になりました大阪大学大学院工学研究科の金美海准教授、水谷学講師、山本陸助教に厚く御礼申し上げます。

さらに、ラマン分光法の研究への多大なご指導とご協力を賜りました大阪大学大学院工学研究科物理学系専攻の藤田克昌教授、熊本康昭准教授、水島健太氏、Heqi Xi 氏に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多くのご協力を下さった大阪大学大学院工学研究科生物プロセスシステム工学領域および共同研究講座の先生方、事務補佐員の皆様、学生諸氏、日頃より大変有意義なご助言を賜りました宇野友貴氏に心より御礼申し上げます。

本研究の立ち上げからご指導、ご助言を賜りました秋田大学大学院理工学研究科の堀口一樹准教授にも深く感謝申し上げます。

また、共同研究成果を博士論文として使用することを快諾頂き、論文執筆の時間的余裕を許容くださいました岩谷産業株式会社 小池国彦常務執行役員、入学当時の上司である宮崎淳元常務執行役員、業務面で快く協力を賜りました同社関係各位にも厚く御礼申し上げます。

最後に、幼い頃に顕微鏡を与え、実験を通じて学ぶ楽しさを教えてくれた父 奥田潔、私の意思を常に肯定的に捉え、自由な成長を育んでくれた母 奥田容子、大学院での研究と会社業務の両立を理解し支えてくれた妻 奥田未希と息子、娘に心から感謝の意を表します。