



Title	噴霧真空凍結乾燥法を用いた凍結乾燥赤血球の製造プロセス最適化に関する研究
Author(s)	此尾, 友花
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105488
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

噴霧真空凍結乾燥法を用いた凍結乾燥赤血球の
製造プロセス最適化に関する研究

此 尾 友 花

2026 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

緒言	2
1.1. 輸血医療における血液製剤安定供給の課題	2
1.1.1. 現代輸血医療の役割と赤血球製剤の重要性	2
1.1.2. 赤血球製剤の貯蔵限界に起因する品質および供給上の課題	5
1.1.3. 少子高齢化に伴う長期的な需給バランスの悪化	6
1.1.4. 課題克服に向けた長期常温保存製剤の開発動向	6
1.2. 凍結乾燥の原理	11
1.2.1. 凍結工程における細胞損傷要因	13
1.2.2. 乾燥工程における細胞損傷要因	15
1.2.3. 従来の棚式凍結乾燥法におけるプロセス上の課題	18
1.3. 噴霧真空凍結乾燥 (μPD) 法の提案	19
1.3.1. μPD 法の原理と特徴 (超高速自己凍結・プロセス効率)	19
1.3.2. μPD 法による凍結乾燥の先行研究	22
1.4. 本研究の目的	22
第2章 μPD 法を用いた赤血球凍結工程の基礎的検証	24
2.1. 本章の目的	24
2.2. 実験・評価方法	25
2.2.1. 試料の準備	25
2.2.2. 凍結保護剤の添加	25
2.2.3. 3つの凍結工程(μPD 法・緩慢凍結法・液体窒素浸漬凍結法)	26
2.2.4. ラマン分光分析による結晶状態の評価方法	26
2.2.5. 溶血率の算出	28
2.2.6. 形態の観察	28
2.3. 結果	28
2.3.1. 液体窒素浸漬法、μPD 噴霧凍結法、および緩慢凍結法による赤血球溶血率の比較(凍結融解)	28
2.3.2. 凍結融解後の赤血球形態	30
2.3.3. 凍結試料の氷晶状態の評価	31
2.4. 考察	33
2.4.1. 緩慢凍結における化学的ストレスの影響	33
2.4.2. ラマン分光分析による氷晶構造の同定	33
2.4.3. μPD 法と LN ₂ 法の溶血率差に関する考察	34
2.5. 本章のまとめ	34

第3章	細胞保護剤(トレハロース)導入の最適化による溶血抑制.....	36
3.1.	本章の目的	36
3.1.1.	凍結乾燥プロセスにおける細胞へのストレスとその保護.....	36
3.1.2.	保護剤としてのトレハロース	37
3.1.3.	細胞内保護の必要性.....	38
3.1.4.	トレハロース導入の課題	38
3.1.5.	新規細胞膜透過性ペプチド (CPPs) の活用と CPPs の具体的な作用機序...	39
3.2.	実験・評価方法.....	40
3.2.1.	赤血球の分離.....	40
3.2.2.	高浸透圧インキュベーション(従来法)	40
3.2.3.	細胞膜透過性ペプチド (CPPs) 法 (新規導入法)	41
3.2.4.	トレハロース導入効率の評価	41
3.2.5.	赤血球の溶血率評価.....	42
3.2.6.	光学顕微鏡を用いた赤血球の形態観察	42
3.2.7.	凍結融解実験 (高浸透圧インキュベーション法で処理サンプルのみ実施)	42
3.2.8.	凍結乾燥条件① (初期評価：高浸透圧インキュベーション法で処理サンプル)	42
3.2.9.	凍結乾燥条件② (最適化の試み：高浸透圧インキュベーション法で処理サンプル)	43
3.2.10.	凍結乾燥条件③ (新規 CPPs 法の適用)	43
3.2.11.	再水和方法.....	44
3.3.	結果	44
3.3.1.	高浸透圧インキュベーション法によるトレハロース導入定量	44
3.3.2.	トレハロースの有無が凍結融解後の溶血率に与える影響.....	47
3.3.3.	凍結方法の違いによる溶血率の違い	49
3.3.4.	トレハロースの有無が μ PD 噴霧凍結乾燥後の溶血率に与える影響	50
3.3.5.	凍結方法の違いによる凍結乾燥後の溶血率比較	52
3.3.6.	CPPs 濃度がトレハロース導入効率と溶血に与える影響.....	53
3.3.7.	凍結乾燥方法と CPPs 濃度の違いによる凍結乾燥後の溶血率比較.....	57
3.4.	考察	60
3.4.1.	従来法と新規法のトレハロース導入効率の比較	60
3.4.2.	凍結・乾燥プロセスにおける赤血球の生存評価	61
3.5.	本章のまとめ	62
第4章	乾燥プロファイルが赤血球品質に与える影響評価と緩慢凍結乾燥法との比較	64
4.1.	本章の目的	64
4.2.	実験・評価方法.....	64

4.2.1.	材料.....	64
4.2.2.	赤血球の分離.....	64
4.2.3.	保護剤含有バッファーとの混合.....	65
4.2.4.	噴霧凍結乾燥 (μPD) 装置.....	65
4.2.5.	μPD・緩慢凍結・乾燥工程(第一バッチ).....	65
4.2.6.	μPD・緩慢凍結・乾燥工程(第二バッチ-追加実験).....	66
4.2.7.	含水率測定.....	67
4.2.8.	凍結乾燥物の微細構造観察および氷晶サイズの推定.....	67
4.2.9.	再水和.....	67
4.2.10.	溶血率測定.....	67
4.2.11.	赤血球形態観察.....	67
4.2.12.	溶解速度測定.....	67
4.3.	結果.....	68
4.3.1.	凍結乾燥後の赤血球の物理化学的特性-各条件での最終含水率.....	68
4.3.2.	凍結乾燥物のマクロ・ミクロ構造と推定氷晶サイズ.....	69
4.3.3.	再水和後の赤血球の品質評価-各条件での溶血率.....	72
4.3.4.	光学顕微鏡による再水和後の細胞形態.....	73
4.3.5.	μPD における一次乾燥時間短縮の検討結果(第二バッチ実験).....	74
4.4.	考察.....	75
4.4.1.	μPD[1] (高温・短時間乾燥) 条件がもたらす細胞損傷メカニズム.....	75
4.4.2.	μPD[3] (長時間一次乾燥・短時間二次乾燥) における細胞損傷メカニズム解明と残留水分に関する考察.....	76
4.4.3.	μPD[2]および Shelf[2]’における細胞損傷の抑制要因に関する考察.....	76
4.4.4.	μPD[1]と μPD[2]における含水率の逆転現象に関する考察.....	77
4.4.5.	一次乾燥時間の最適化による乾燥負荷の低減と溶血率の相関.....	78
4.5.	本章のまとめ.....	79
第 5 章	凍結乾燥赤血球の長期保存安定性における凍結法と保護剤濃度の影響.....	81
5.1.	長期保存安定性評価の必要性.....	81
5.2.	本章の目的.....	82
5.3.	実験・評価方法.....	83
5.3.1.	凍結乾燥赤血球試料の作製.....	83
5.3.2.	凍結方法.....	83
5.3.3.	乾燥工程.....	83
5.3.4.	長期保存準備.....	84
5.3.5.	評価方法.....	84
5.3.6.	含水率の測定.....	85

5.4.	結果	85
5.4.1.	バッファー添加直後（凍結乾燥前）の赤血球評価.....	85
5.4.2.	保存温度および保存期間が形態・含水率、溶血率に与える影響	87
5.5.	考察	95
5.5.1.	凍結乾燥法（ μ PD 法・緩慢凍結法）の優位性.....	95
5.5.2.	糖濃度の保存安定性への寄与	98
5.5.3.	含水率と溶血率の相関と保存条件の最適化.....	99
5.6.	本章のまとめ	102
第 6 章	結論.....	104
6.1.	本研究の概要	104
6.2.	今後の展望	105
	謝辞	107
	参考文献.....	109
	本研究に関する業績	117
	学術論文	117
	学会発表	117
	受賞.....	118

緒言

1.1. 輸血医療における血液製剤安定供給の課題

1.1.1. 現代輸血医療の役割と赤血球製剤の重要性

現代医療において、輸血は、救急医療や外科手術の際に生命を救うための不可欠な手段として重要な役割を担っている。大量出血を伴う急患の命を救うためには、輸血治療が欠かせない¹。産科においても、予期せぬ大量出血に対応するための生命維持手段として、また、貧血治療の一環として、輸血が用いられる²。輸血は、失われた血液を補充するだけでなく、生体機能、特に酸素運搬能力を回復させ、ショック状態から患者を救い出す上で極めて重要である。さらに輸血は、血液疾患（血液内科）やがん治療などの慢性疾患においても広く活用されている^{3,4}。

輸血医療は、採取した血液をそのまま投与する全血輸血ではなく、赤血球、血漿、血小板といった特定の成分に分けて使用する成分輸血へと進化してきた。これにより、個々の患者の病態に応じて、より適正かつ効果的な治療が可能となっている。例えば、Table1.1に示す通り、赤血球製剤は重度の貧血治療に、血小板製剤は血小板減少症による出血リスクの低減に、新鮮凍結血漿製剤は凝固因子の補充にそれぞれ用いられる。その中でも、特にFigure1.1に示す赤血球製剤（約5640万単位）は、血小板製剤（約820万単位）や血漿製剤（約1420万単位）と比較して、世界で最も大量に輸血されている血液成分である⁵。赤血球とは、血液の細胞成分であり、Figure1.2に示すように直径が7-8 μm ほどの両面中央が凹んだ円盤状の細胞である。この独特な形状は、球形に比べて表面積を大きく確保できるため、ガス交換の効率を最大化する上で極めて合理的である。さらに、赤血球の構造を詳しく見ると、その表面は脂質二重層からなる赤血球膜によって覆われており、その内側にはスペクトリンなどのタンパク質から構成される網目状の膜骨格が張り巡らされている。この強靱かつ柔軟な膜構造のおかげで、赤血球は自身の直径よりも細い毛細血管を通り抜ける際に自在に形を変え、通過後には再び元の形状に戻るといった高い変形能を有している。また、成熟した赤血球は核やミトコンドリアを持たず、細胞内部の固形成分の約97%をヘモグロビンが占めている。ヘモグロビンは酸素と結合する赤い鉄分を含むタンパク質であり、肺から取り込んだ酸素を全身の組織へ運び、代わりに代謝産物である二酸化炭素を肺へと運搬して排出する役割を担う。輸血医療において赤血球が重要視されるのは、こうした高度な膜構造とヘモグロビンによって支えられた酸素運搬能力の回復に直結するためである。

Table 1.1 Types of Blood Products

Types of Blood Products	Storage temperature	Retention period	Indications
Red Blood Cells, Leukocytes Reduced, NISSEKI (RBC-LR)	2~6 °C	Within 28 days of blood collection	Suitable for treating insufficient red blood cells in the blood or the loss of their function
Irradiated Platelet Concentrate, Leukocytes Reduced, Bacterial Screened, NISSEKI (Ir-PC-LRBS)	20~24 °C Store with gentle shaking	Within 6 days of blood collection	For use in diseases with thrombocytopenia
FreshFrozenPlasma,Leukoc ytesReduced,NISSEKI120 (FFP-LR120)	Below -20 °C	Within one year of blood collection	Blood Coagulation Factor Replacement
Whole Blood, Leukocytes Reduced, NISSEKI (WB-LR)	2~6 °C	Within 21 days of blood collection	For use in general transfusion indications



Figure 1.1 Red Blood Cell Products (Japanese Red Cross Society,2024,"Blood Product Data Table for Transfusion ",Japanese Red Cross Society Website (Retrieved October 31, 2025,<https://www.jrc.or.jp/mr/img/01-RBC-LR-1.jpg>)

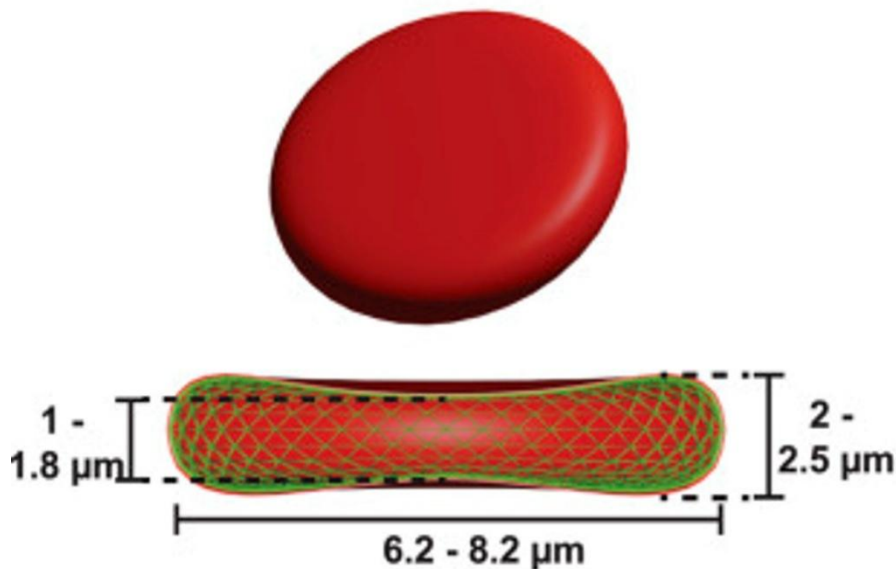


Figure1.2 Schematic Diagram and Size of Red Blood Cells⁶

1.1.2. 赤血球製剤の貯蔵限界に起因する品質および供給上の課題

しかしながら、赤血球製剤の貯蔵期間中における品質管理は、輸血効果と安全性に直結する課題である。現在、赤血球製剤は 2～6 °C の低温で最大 28 日間貯蔵されている。この低温保存は、細菌の増殖を抑制と赤血球のエネルギー代謝遅延を目的としている。この保管条件には二つの課題が存在する。第一に、温度逸脱に対する脆弱性である。Ramirez-Arcos 等は、1～6 °C の保管条件下ではほとんどの細菌は生存・増殖できないものの、稀な汚染が存在した場合、短時間の温度上昇であっても安全性リスクが決定的に高まることを示し、厳格な時間制限(30 分ルール)の必要性を指摘している⁷⁾。第二に、低温保存そのものが引き起こす品質劣化である。保存期間の長期化に伴い、赤血球は貯蔵病変と呼ばれる機能低下を起こす。貯蔵病変は、様々な機能的・代謝的变化として現れる。Hancock 等は、主要な品質低下指標として、溶血の進行、カリウム濃度の上昇、および ATP・2,3-DPG(2,3-diphosphoglycerate)の枯渇を挙げている⁸⁾。ATP レベルは貯蔵期間中に全体的に低下し、赤血球膜の形状維持と変形能に影響を与え、毛細血管通過性の低下や輸血後の循環からの早期除去につながる。2,3-DPG はヘモグロビンの酸素親和性を調節し組織への酸素供給を促進する分子であるが、より高温での貯蔵はグルコース消費を増加させ、最終的に 2,3-DPG の枯渇を招く。溶血は赤血球膜の破壊により遊離ヘモグロビンが上清中に放出される現象であり、品質劣化の重要な指標である。これらの制約により、保存期限切れによる製剤廃棄や、災害時・遠隔地における温度管理の困難さが実用上の問題となっている。

この限られた保存期間は、災害やパンデミックなどの緊急時における血液製剤の安定供給と、ロジスティクス（輸送・在庫管理）における決定的な弱点となる。例えば、血液センターから医療機関への通常ルートが寸断された場合、以下の問題が生じる。

- 1) 被災地域での需要が急増する一方で、被害を免れた地域の在庫を迅速に移動させることが困難になる。
- 2) 交通網の遮断や電力停止により、適切な低温管理（2～6 °C）が維持できなくなるリスクが高まる。一時的な温度上昇は貯蔵病変を加速させ、赤血球の変形能低下、ATP・2,3-DPG の急速な減少、ひいては溶血を引き起こす。特に輸送時においては、保冷コンテナの性能維持や電力供給の確保が困難となり、温度逸脱による品質劣化の危険性が高い。また、被災地の病院や臨時救護所では、輸血用血液専用の冷蔵庫(自記温度記録計付き)の確保が難しく、不適切な温度での保管を余儀なくされる可能性がある。これにより、有効期限内であっても品質劣化のため廃棄せざるを得ない事態が発生する。
- 3) 適切な低温管理下にあっても、28 日間という保存期間の制約により、使用されないまま有効期限を迎える製剤が発生する。緊急事態に備えて在庫を積み上げると、この期限切れによる廃棄量が増加する。実際、この廃棄損失は平時においても一定量発生しており、日本輸血・細胞治療学会の令和 5 年度の調査を元に輸血用血液製剤の廃棄量について年間廃棄総単位で評価すると、赤血球に関して小規模医療機関では 29075 単位が廃棄され廃棄

量全体の 41%を占めた。赤血球製剤の廃棄要因についても調査されており、施設の規模にかかわらず、「有効期限切れ」が最多の要因であった(日本輸血・細胞治療学会,「令和 5 年度 輸血用血液製剤の使用状況と廃棄状況に関する調査報告」,日本輸血・細胞治療学会ウェブサイト, (2025 年 11 月 5 日取得, <https://yuketsu.jstmct.or.jp/wp-content/uploads/2024/05/9e8423574f599411fca1dde5eb445cee.pdf>))。血液製剤は、人の善意による無償の献血で得られた血液を原料としている。過剰な在庫による廃棄の増加は、献血者や国民の理解を得ることを困難にする。一方で、在庫を抑制しすぎると緊急時の供給不足を招く。これらの課題は、「救命に必要な血液を、必要な時に、必要な場所へ、安全な品質で届ける」という輸血医療の根幹を揺るがすものであることを強く示唆している。

1.1.3. 少子高齢化に伴う長期的な需給バランスの悪化

さらにわが国において、平時の需給バランスを、将来的にさらに悪化させるのが、少子高齢化に伴う長期的な人口動態の変化である。献血可能人口が漸減する一方で、輸血を必要とする主要な疾患群の罹患率が高い高齢者人口は増加しており、将来的な供給量と需要量の乖離が予測されている。Akita らは高齢化社会が進むことで、16 歳から 69 歳の献血者数が減少する一方で、50 歳以上の高齢者の割合増加が血液製剤の需要増加を引き起こし、結果として供給不足を招くと主張している。献血の不足は毎年増加すると予測されており、2050 年には 167 万単位に達するとされている⁹。

1.1.4. 課題克服に向けた長期常温保存製剤の開発動向

輸血用血液製剤を備蓄できず、有事の補給も困難という構造的な欠陥は、災害医療および防衛医療における共通の喫緊の課題として国際的に認識されている。特に、低温管理が不要な長期保存血液製剤は、この問題を根本的に解決する鍵となる。実際に、止血に不可欠な血漿については、すでにフランス、ドイツ、南アフリカをはじめとする複数の国々で、長期保存が可能な凍結乾燥血漿が実用化されている^{10,11}。これは、室温で数年間の保存が可能であり、戦場やへき地、災害現場など、低温輸送や冷蔵庫の確保が困難な環境における輸血の常識を変えてきた¹²。この先行事例は、低温保存に依存しない血液製剤の可能性を示している。したがって、最も需要が高く、貯蔵期間が採血後 28 日間と限られる赤血球製剤についても、安定供給を実現するためには、同様に長期かつ常温での保存を可能にする技術革新が不可欠である。

この課題を解決するための目標は、長期常温保存可能な赤血球製剤の実用化である。この困難な目標を達成するため、現在、研究開発は一つの方法に留まらず、複数のアプローチで進められている。長期常温保存に向けた代表的手法長期常温保存可能な赤血球代替製剤を実現するためのアプローチは、大きく二つに分類され则认为る。

① 細胞型人工赤血球（HBOCs：Hemoglobin-Based Oxygen Carriers）について

赤血球そのものを用いず、酸素運搬分子であるヘモグロビンを抽出・加工し、脂質膜などで被覆したナノ粒子や溶液として製剤化するアプローチである¹³。1964年にThomasが、ポリマー膜でヘモグロビンをカプセル化する概念を提唱した¹⁴。そして、1990年代以降、Sakaiらのグループが数十年にわたり研究を主導しており¹⁵、高純度ヘモグロビンを脂質二分子膜に高濃度で内包させたヘモグロビン小胞体（HbVs: Hemoglobin Vesicles）調製技術確立した¹⁶。HbVsは出血性ショックモデル(ラット)を用いた動物実験において酸素運搬機能を代替し、救命効果を示した¹⁷。

Sakaiらは、HbVsが脱酸素化処理によりヘモグロビンの自己酸化を防ぐことで、室温（25℃）での長期保存が可能であることを実証した。嫌気的条件下で室温保存した場合、2年以上にわたり粒子サイズやメトヘモグロビンレベルに有意な変化がなく、リポソーム構造を維持できることが報告されている。脂質成分の安定性評価では、25℃で2年間保存後も無傷の脂質が86.7%残存していた。さらに、25℃で2年間保存後のHbVsに高せん断速度（1500 s⁻¹）を適用する試験を実施した結果、ヘモグロビン漏出の有意な増加は観察されなかった。約13.3%の脂質が分解されていても、構造的安定性は維持されることが示された。また、HbVsは高い緩衝能力を持つため、脂質分解生成物である遊離脂肪酸が生成されたにもかかわらず、pHは2年間にわたり約6.5に維持された¹⁸。これらの知見は、HbVsが緊急時の使用を想定した液体製剤として、冷蔵設備なしでの長期保存が可能であることを示している。

Taguchiらによって、投与されたHbVsは、天然赤血球と同様に主に肝臓・脾臓の細網内皮系に取り込まれ、数日程度で分解・排泄されることが動物モデルで確認されている。この半減期（数日）は、輸血までの繋ぎとしての役割に適していると評価されている¹⁹。さらに、近年、健康成人を対象とした第Ⅰ相臨床試験が実施され、少量投与における安全性（重篤な有害事象なし）と薬物動態（ヘモグロビンの半減期など）が評価され、良好な結果が得られたことが報告されている²⁰。

② 凍結乾燥赤血球（FDRBCs：Freeze-Dried Red Blood Cells）について

生きた赤血球から水分を除去し、細胞機能を維持したまま乾燥状態で長期保存を目指すアプローチである。水分除去により細胞の代謝活動が停止し、タンパク質の変性や脂質の酸化といった劣化反応が抑制される。クマムシやネムリユスリカのような脱水耐性生物（Anhydrobiotes）が乾燥状態で数年から数十年にわたり生存できることは、適切な保護機構により細胞の長期常温保存が可能であることを示唆している²¹。この手法は、天然赤血球の構造と機能の維持を目指す点が、HbVsとは異なる特徴である。また、水分除去による軽量化と常温保存により、災害地や戦場、遠隔地など、コールドチェーン（低温物流網）の整備が困難な場所への輸送・配備を可能にする。

血液の乾燥に関する研究は、血液の長期保存の必要性が高まった第二次世界大戦期（1940年代）に軍事的な背景から始まった。戦地での輸血需要から、冷蔵不要で長期保存

可能な乾燥血漿（FDP: Freeze-Dried Plasma）の研究・大量生産が加速した。この時期、赤血球の長期保存は技術的に困難であり、ほとんどの赤血球は廃棄された^{22,23}。1950年代になりようやく、赤血球の超低温保存（グリセロールを用いた凍結保存）が成功した²⁴。その後 Meryman は 1960 年代初頭に、デキストランを細胞外保護剤として用いたヒト赤血球の凍結乾燥保存に関する詳細な報告を行った。彼の研究では、赤血球から最大 92%の水分除去という技術的成功が示され、再水和された赤血球をラットに輸血した際の一時的な生存も確認された。しかし、その凍結乾燥プロセスが引き起こす赤血球膜の脆弱化は、再水和時における浸透圧ショックへの耐性を奪い、大規模な溶血を引き起こした。これにより、赤血球の半透過性機能を保持し、実用的な製剤とするための根本的な課題は解決されないまま残された²⁵。これに対し、MacKenzie と Rapatz ら（1971 年）は、この課題を克服する道筋を示した。彼らは、保護剤として特定のポリエチレングリコール（PEG）とクエン酸ナトリウム緩衝液（または血漿との混合物）を組み合わせることで、凍結乾燥後のヒト赤血球が再水和後に半透過性の機能を示す挙動を回復できることを初めて実証した²⁶。この処理を経た赤血球は、遠心分離、等張性緩衝液への再懸濁、さらに新鮮な自己血漿への再懸濁といった、輸血製剤化に必要なプロセスに耐えることができたと報告されているが、具体的な溶血率数値は報告されていなかった。

そして、これらの初期の試みは、当時の技術的限界に直面し、赤血球の乾燥技術への取り組みは 1970 年代後半に一時的に放棄される結果となった²⁷。この背景には、同時期にグリセロールを用いた超低温保存法が、長期保存の確実な手段として確立されたことが挙げられる。この手法の普及により、技術的難易度の高い乾燥法を追求する動機が一時的に失われたと言える。赤血球の凍結乾燥の研究が再燃するのは、1990 年代以降、トレハロースなどの新しい保護剤の導入と軍事ロジスティクスの要求が高まってからである。赤血球の凍結乾燥製剤化への取り組みは、1990 年代初頭に Goodrich らによって再開された²⁸。Goodrich らは、凍結乾燥後 1~2%の低水分含有量の赤血球を再水和させ、代謝的・細胞的・レオロジー的特性を許容範囲内で維持することに成功したと報告した²⁹。しかしながら、詳細な電子顕微鏡観察により、凍結乾燥後の赤血球の多くで、脂質二重層の途切れや不連続性といった膜病変が確認され、さらに Goodrich らの研究結果は、他の研究者による再現が成功していない²⁷。

その後、2000 年代以降、研究の焦点は、脱水耐性を持つ天然の生物（Anhydrobiotes）のメカニズムを赤血球に適用することへと移行した。特に、乾燥した状態で数年間生存できる生物（緩歩動物、酵母、バクテリアなど）が体内に蓄積するトレハロースなどの二糖類が着目されはじめた²¹。トレハロースは、乾燥によって膜の相転移温度（ T_m ）が上昇し、膜が硬いゲル状に変化する現象（損傷の原因）を抑制する。水分子の代わりにリン脂質の極性頭部群と水素結合を形成し、膜を乾燥しているが水和された状態（液体結晶相）に保つ³⁰⁻³²。トレハロースは赤血球膜を容易に透過しないため、研究者たちはインキュベーションによる内因性取り込み等の手法を試みた。例えば、Török ら（2005 年）は赤血球を

37°Cで 7 時間インキュベーションし、トレハロースを赤血球内に導入し、凍結乾燥後、55%の生存率（溶血率に基づく）と代謝酵素の維持を報告している³³。さらに、赤血球の基本的な構造を維持するため、様々な保護剤の組み合わせと乾燥条件の最適化が試みられた。Yu らは、グルコース、トレハロース、マンノース、ラクトースおよび親水性ポリマー（PVP）を組み合わせ、最適な保護剤の組み合わせを調査した。糖類と PVP を含む凍結乾燥溶液を用いた結果、安定した細胞回収率を得たことを報告した³⁴。

また、凍結乾燥プロセス条件の最適化についても検討されている。Rindler らは、細胞外へ HES（ヒドロキシエチルスターチ）とマルトースを添加し、凍結乾燥プロセスにおける真空乾燥温度（棚温度）が、赤血球の溶血率に与える影響を実験的に調査した³⁵。Figure 1.3 は、異なる棚温度（-45° C から -25° C）で凍結乾燥し再水和した赤血球の回収率を示している。-35° C で最も高い回収率（約 15%）が得られ、これより高温でも低温でも回収率は低下した。この結果は、溶血を最小化する最適な乾燥温度が存在することを示しており、プロセスの細かなパラメータが細胞生存率に大きく影響することが明らかとなった。

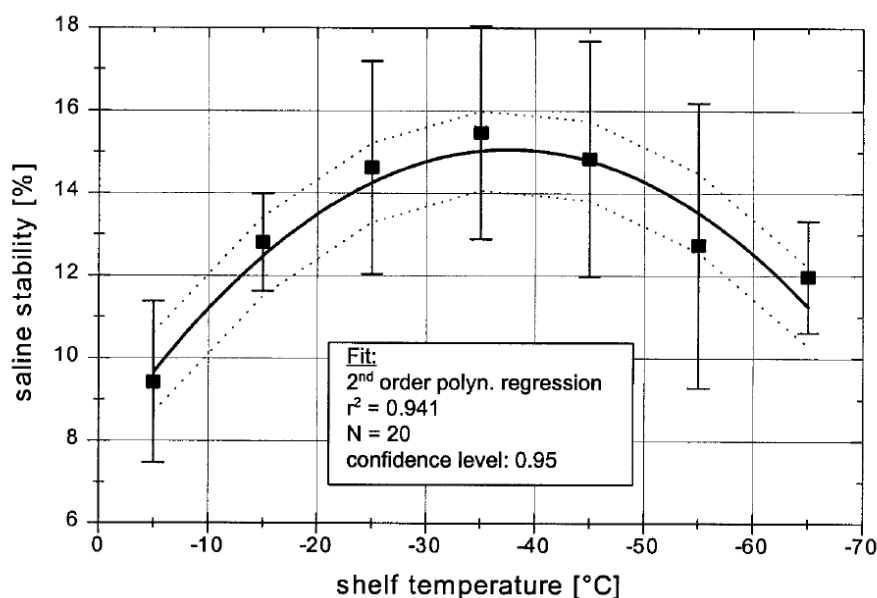


Figure 1.3 Effect of shelf temperature on recovery rate after freeze-drying and rehydration³⁵

さらに、Arav らは、従来の不均一な冷凍による機械的損傷と浸透圧ストレスを最小限に抑えることを目的に、指向性凍結（Directional Freezing: DF）法に基づく MTG（Multi-Thermal-Gradient）装置を使用した。本装置は、空間的に固定された温度勾配内を試料が一定速度で通過することで、氷晶の成長方向と冷却速度を精密に制御することを可能にする。彼らは、トレハロースとヒト血清アルブミン(HSA)を赤血球外側へ添加することで、75%の回収率を達成した(Figure 1.4)³⁶。この回収率は、ほかの先行研究と比較して顕著に

高い。しかし、ここでは含水率が 35%以上と高いため、常温での長期保存安定性や軽量化という凍結乾燥の利点が十分に活かされていない。また、1 回あたり 1mL/ガラス管という少量処理が必要であり、実用化に向けた大量製造プロセスの確立が課題である。

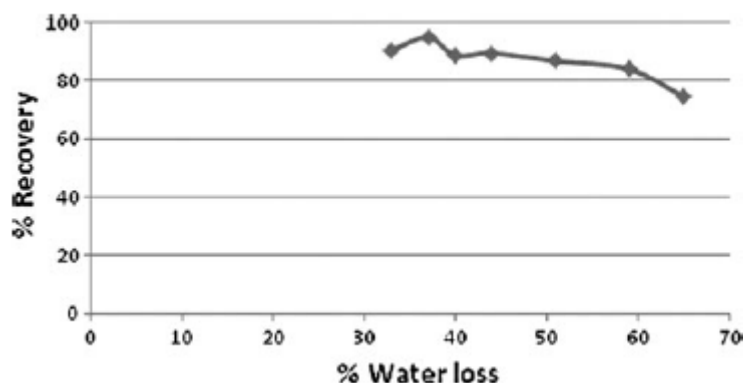


Figure 1.4 RBCs recovery rate and water loss rate ³⁶

一方、過去には実用化に向けた取り組みも進められてきた。米国海軍医療研究開発コマンド（U.S. Naval Medical R & D Command）研究進捗報告書政府文書によれば、1990 年代初頭、CryoPharm Corporation は凍結乾燥赤血球の製剤化に成功し ³⁷、健康成人を対象とした臨床試験を実施した ³⁸⁻⁴⁰。初期の試験では、凍結乾燥・再水和させた自己赤血球を、ドナー本人に再輸注する試験が実施された。その際には、凍結乾燥・再水和プロセスにより細胞膜が損傷を受け、再輸注された赤血球は循環血液中から即座に排除されるという課題が明らかになった。しかし、その後、保護剤組成とプロセス条件の根本的な改善により、1992 年には凍結乾燥赤血球が正常な非凍結乾燥赤血球と同等の期間、生体内で循環することが実証された。この研究では、凍結乾燥後の赤血球が 4°C で少なくとも 49 日間品質を維持し、さらに Arrhenius 予測に基づけば、6～12 ヶ月の保存期間が期待されることが報告されている。また、同特許には、水分含有量が約 3 重量%まで乾燥した細胞について、常温保存では最長 2 週間で分解が観察されたことが記載されている ³⁷。また、4°C での中期保存の可能性が示されていたものの、コールドチェーンが完全に不要となる常温条件での長期保存安定性は実証されていない。加えて、同研究では最終的な細胞回収率が 12～16% に低下していた。

前述したように、赤血球の長期常温保存に向けた二つのアプローチは、それぞれ異なる進展を示している。人工赤血球（HBOCs）は、戦後（1960 年代）に概念が提唱され、既に健康成人を対象としたヒト初回投与（第 I 相）臨床試験を成功させて、室温で 2 年以上の保存安定性を実証している。一方、凍結乾燥赤血球（FDRBCs）は、その起源が第二次世界大戦期（1940 年代）に遡るにもかかわらず、未だ実用化に至っていない。この進展の差異は、両アプローチの本質的な違いに起因すると考える。HBOCs は精製ヘモグロビンを人工的なナノ粒子に封入する手法であり、細胞の生死という生物学的制約を回避してい

るが、その役割は投与後数日程度の半減期に基づく暫定的な酸素運搬、すなわち輸血までの繋ぎの医療に限定される^{13, 19, 20}。これに対し、FDRBCs は天然の赤血球膜および表面抗原を維持しており、再水和後の生体内循環において、自己血と同等の最大 120 日間にわたる生存および機能維持を可能とするポテンシャルを有している。

また、赤血球が本来有する生理機能の維持という観点からも、FDRBCs は本質的な優位性を持つ。HBOCs はヘモグロビンを細胞外へ取り出す構造上、不可逆的な酸化によるメトヘモグロビンの形成を回避し得ない。天然赤血球に備わるメトヘモグロビン還元酵素系や各種抗酸化酵素群を欠くため、血管緊張の調節異常や炎症反応の誘発、さらにはヘモグロビン分子の解離に伴う組織への溢出、それに起因する腎毒性や神経毒性のリスクを内包している¹³。対照的に FDRBCs は、細胞構造を維持したまま保存することで、これらの酵素系や 2,3-DPG 代謝系を細胞内に保持した状態で利用可能である。さらに、約 8 μm という天然のサイズを維持することは、約 250 nm の HBOCs で懸念される血管外移行を物理的に遮断し、生体本来の安全な酸素輸送メカニズムを再現することに直結する。

加えて、粘性および流体力学的挙動においても、FDRBCs の優位性は顕著である。微細な HBOCs 粒子は血漿中に均一に分散するため、天然赤血球がサイズと変形能によって形成する軸流形成を再現しにくい。この分散挙動は、ヘモレオロジーの原理に基づき、血管壁付近の血漿層（周辺流）の動態を変化させ、血管抵抗や壁面すり応力に影響を及ぼす物理的要因となる。一方、FDRBCs は再水和後に天然のサイズと形状を復元することで正常な軸流を形成し、周辺流による摩擦低減などの流体力学的な血流調節機構を維持し、生体にとって最適な血液粘性を担保し得る。

このように、FDRBCs は生物学的機能の再生という点において HBOCs を超えるポテンシャルを有するものの、細胞膜の完全性保持という極めて困難な課題に直面してきた。Meryman の初期研究以来、溶血の抑制はトレハロースや指向性凍結といった技術の導入によっても完全には達成されていない。FDRBCs の実用化には、コールドチェーンが不要となる数%以下の低含水率での高生存率達成と、大規模生産プロセスの確立という二つの課題がある。本研究は、従来と異なる原理を持つ高速凍結乾燥技術（ μPD 法）の赤血球への適用とそのプロセス条件の体系的最適化により、低含水率条件下での赤血球生存率の向上を目指す。本研究で得られる知見は、将来の大規模生産プロセス開発の基盤となることが期待される。FDRBCs の研究は 80 年以上の歴史を持つが、本研究はその実用化に向けた重要な一歩となるものである。

1.2. 凍結乾燥の原理

凍結乾燥は、1. 凍結、2. 一次乾燥（昇華）、そして 3. 二次乾燥（脱離）という 3 つの主要な段階で構成される低温脱水操作である⁴¹。まず、凍結工程は材料を三重点以下まで冷却する重要な第一段階であり、その凍結方法は最終製品に重大な影響を及ぼす⁴²。特に、

冷却速度は形成される氷結晶の大きさに影響を与え、これがその後の乾燥工程に影響する。遅い凍結はより大きな氷結晶を生じさせ、乾燥製品に大きな細孔を形成し、昇華を促進する可能性がある。つまり、凍結工程は単に材料を冷やすだけでなく、冷却速度や温度の制御を通じて、形成される氷結晶の特性を調整し、最終的な乾燥効率、エネルギー消費、製品の細胞構造の健全性、および品質に直接影響を与える制御の鍵となる段階である⁴³。

次に、一次乾燥段階では、凍結乾燥機内の圧力を大幅に低下させて真空状態を作り出す。その後、凍結した材料に制御された量の熱が供給される。この熱が氷の昇華に必要なエネルギーを供給する。昇華とは、物質が中間の液体相を経由せずに固体（氷）から気体（水蒸気）へと直接相変化する現象である。これは、温度と圧力を厳密に制御することで実現される。水の場合、液相が存在し得ない境界条件である三重点は、温度 0.0100°C (273.16 K)、圧力 611.73 Pa ($6.037 \times 10^{-3}\text{ atm}$) である。系をこの三重点よりも低圧の状態に保ち、熱エネルギー（昇華潜熱）を供給することで、物質中の氷は液相を経由することなく直接気相へと相転移（昇華）する⁴⁴。生成された水蒸気は吸引され、極低温に保たれた表面である凍結乾燥機内に設置された凝縮器に回収される。この段階で材料から水分の大部分（通常約 95%）が除去される。この工程全体を通じて、製品の融解や構造崩壊を防ぐため、材料の温度を臨界崩壊温度(critical collapse temperature, T_c)以下に維持することが極めて重要である。 T_c は、凍結乾燥中に材料の構造が崩壊し始める温度であり、これを超えると氷晶の骨格構造が軟化・融解し、製品の多孔質構造が失われる。その結果、再水和時の溶解性低下や細胞へのダメージが生じるため、一次乾燥中は棚温度を T_c 以下に制御する必要がある⁴⁵。

最後に二次乾燥について述べる。一次乾燥終了の時点では、一部の凍結していない水分子が材料表面に吸着されたまま残っている場合がある。二次乾燥段階では、この残留水分を除去することを目的とする。温度を徐々に上昇させ、真空状態を維持またはさらに圧力を下げる。これにより、結合した水分子が材料から脱離（放出）される。この最終工程は、乾燥製品の長期安定性を確保するために不可欠である。Figure 1.5 は凍結乾燥の全工程の例を模式的に表したものである。

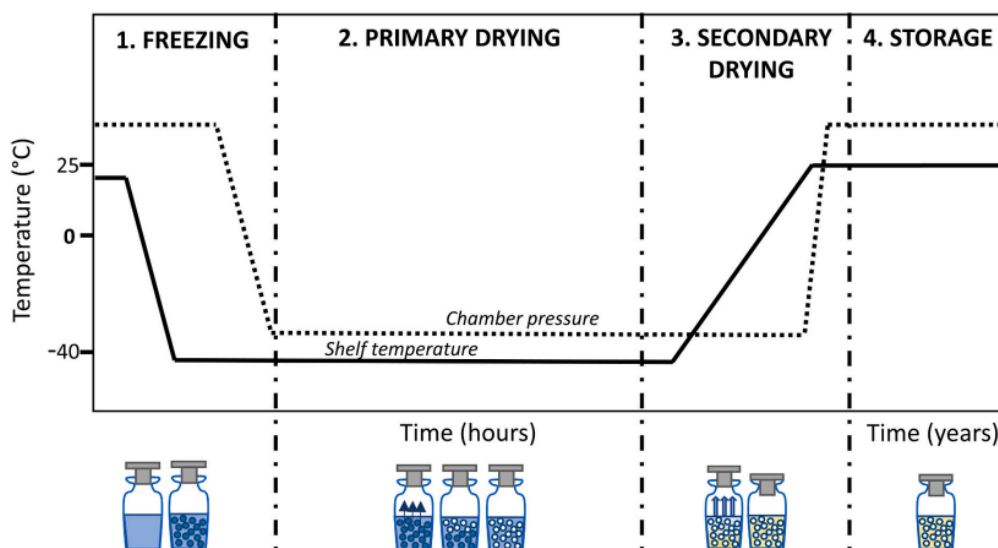


Figure 1.5 Profiles of shelf temperature and chamber pressure during the freeze-drying process⁴⁶

1.2.1. 凍結工程における細胞損傷要因

凍結工程における主な細胞損傷は、冷却速度および凍結速度に大きく依存する。本論文では、物理現象としての冷却速度（Cooling rate）を単位時間あたりの温度変化（熱移動）と定義し、相変化を伴う凍結速度（Freezing rate）を試料内での氷晶形成および成長の速度と定義して使い分ける。一般に、これらの速度は細胞生存率の観点から、緩慢凍結(Slow freezing)、急速凍結(Rapid freezing)、超急速凍結(Very rapid freezing)の三つの領域に分類される(Figure 1.6)。

緩慢凍結領域(冷却速度が遅い場合)では、溶質効果による損傷が支配的となる。細胞懸濁液が凍結する際、冷却速度に対して凍結速度（氷晶の進行）が十分に遅ければ、まず細胞外の水分が氷となり、残された未凍結溶液中の溶質（塩類など）濃度が上昇する。この浸透圧の上昇に対応して、細胞内の水分が流出し、細胞は脱水・収縮する。この濃縮された溶液への曝露は、タンパク質の変性や細胞膜への損傷など、様々な化学的・物理的ストレスを引き起こす。さらに、温度が低下するにつれて細胞外の氷が増加し、細胞は氷晶間に形成される狭いチャネル（水路）に閉じ込められる。このチャネルが狭まることで細胞が物理的に圧迫され、変形することが損傷要因となる⁴⁷。

急速凍結領域(冷却速度が速い場合)では、細胞内氷晶形成(intracellular ice formation, IIF)による損傷が支配的となる。細胞膜は、ある温度以上では外部からの氷晶の侵入を防ぐ障壁として機能する。しかし、急速冷却下では細胞は水の外滲出を十分な速さで行うことができない。そのため、細胞内の水が過冷却状態になり、最終的に細胞内部で氷晶が核

形成・成長する。細胞内で形成された氷晶は、細胞膜や細胞内小器官を物理的に破壊し、細胞死をもたらす。さらに、急速冷却で形成された微小な氷晶は、加温（融解）過程、特にゆっくりとした加温中に、より大きく安定な氷晶へと成長する（再結晶化）。この再結晶化によって氷晶が致命的なサイズに達することが、生存率を著しく低下させる要因となる⁴⁸。

ただし、さらに冷却速度を極端に高めた超急速凍結領域では、試料内の分子運動が極度に抑制され、氷の結晶化が起こる前に液体がガラス状態（アモルファス・ガラス）に固化する現象が観察される。このガラス化により氷晶形成が完全に回避されるため、理論上は細胞損傷を最小化できる。細胞内凍結を引き起こす冷却速度は、細胞種によって大きく異なる。Mazur は、マウス卵子/胚では、わずか 2~3°C/分の冷却速度で細胞内凍結が予測・観察されるのに対し、ヒト赤血球では、1,000~5,000°C/分という非常に速い冷却速度が臨界冷却速度（これより速く冷却すると細胞内凍結が起こる速度）として観察されることを報告している⁴⁷。この大きな違いは、主に水の透過係数、その活性化エネルギー、細胞の表面積と体積の比、および核形成温度の違いに起因する。ヒト赤血球は、水の透過係数が高いため、他の細胞種に比べて非常に速い冷却速度でなければ細胞内凍結を回避できない。しかし、Mazur らによる凍結/融解実験は、凍結後すぐに融解しており、乾燥過程を含まない点に注意が必要である。

Rindler らは、凍結/融解実験で最適とされた冷却速度が、必ずしも凍結乾燥プロセス全体において最高の生存率をもたらすわけではないことが報告している⁴⁹。彼らの実験では、凍結/融解実験において、融解過程における失透（物質がガラス状態（アモルファスな非晶質固体）から結晶状態へと変化する現象）や再結晶化が主要な損傷要因となるため、これらを回避できる中程度の冷却速度（220 K/min）で最大の細胞回復率（約 82%）が得られた。一方、凍結乾燥では、融解過程が存在せず、代わりに真空乾燥中の脱水ストレスが主要な損傷要因となる。高速冷却（4200 K/min）により形成される微細でほぼ均質なマトリックス構造が、乾燥中の細胞を機械的に保護するため、凍結/融解実験とは対照的に、高速冷却で最大の細胞回復率（約 48%）が得られた。したがって、凍結乾燥プロセスにおける最適冷却速度は、凍結/融解実験とは独立に、乾燥後の細胞回復率を指標として決定する必要がある。

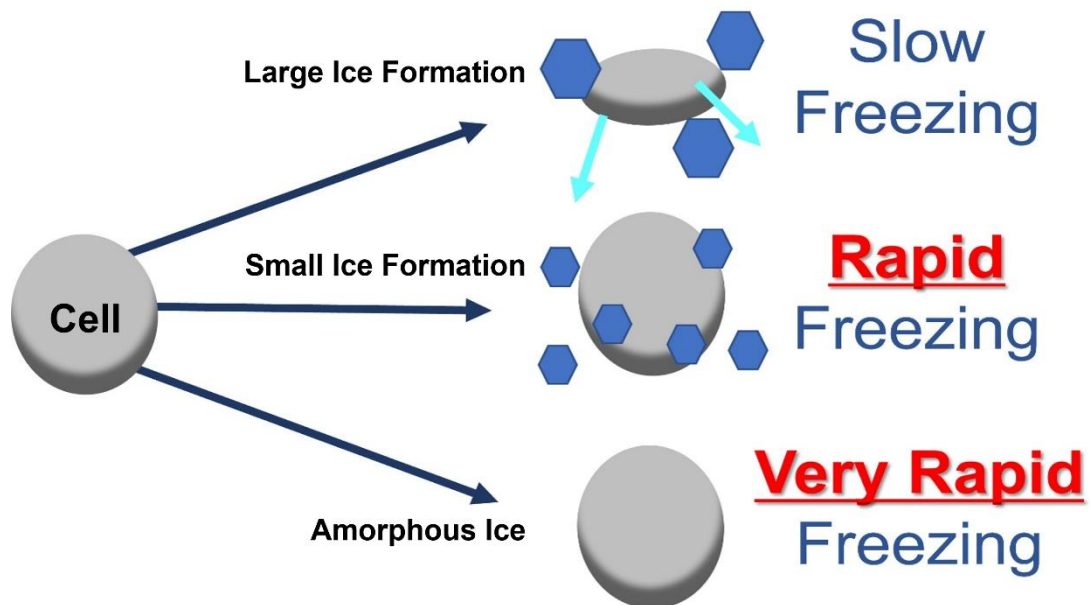


Figure 1.6 Differences between intracellular ice formation and osmotic effects as a function of cooling rate⁴⁷

1.2.2. 乾燥工程における細胞損傷要因

次に乾燥過程における細胞損傷のメカニズムについて述べる。Figure 1.7 に細胞膜リン脂質の乾燥時のイラストを示す。通常的环境下では、細胞膜のリン脂質の頭部群は、水分子によって水和され、水素結合を形成して頭部群を互いに分離する。リン脂質間の適切な距離は維持され、膜は柔軟で、常温以下のゲル-液晶相転移温度(T_m)を持つ。この T_m 以上では、細胞膜は液晶相であり、 T_m 以下になるとゲル状に変化する²¹。乾燥の際には、水分が除去されることで、リン脂質の頭部群の周りの水和シェルが失われ、パッキング密度が増加する。この距離の減少により、ファンデルワールス力が高まり、リン脂質間の相互作用が増大する。その結果、 T_m が上昇し、膜は液晶相からゲル相へと相転移する⁵⁰。この相転移は膜全体で不均一に進行するため、液晶相とゲル相の境界領域において膜構造の欠陥が生じ、細胞内成分の漏出を引き起こす可能性がある⁵⁰。これに加えて、乾燥によって露出したリン脂質のヘッドグループは、本来であれば離れているべき隣接膜領域（例：細胞膜の異なる部位や、膜の内外葉）と直接接触し、不適切な膜融合を誘発する⁵¹。この異常な融合は膜の完全性を破壊し、細胞内成分の漏出をもたらす。加えて、細胞内の水分が失われると、水、タンパク質、その他の分子間の水素結合が破壊されるため、タンパク質の折り畳み構造も乾燥によって損なわれる³⁰。

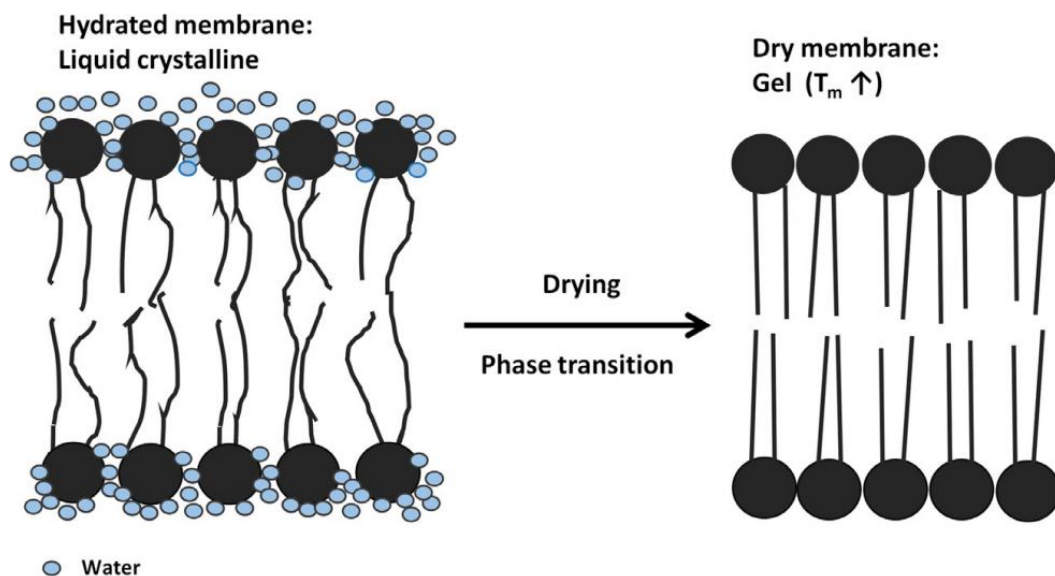


Figure 1.7 Structural Changes of Cell Membrane Phospholipids during Dehydration

Hydrated state (Left), Phospholipid head groups are hydrated by water molecules, and the membrane maintains a liquid crystalline phase. **Dehydrated state (Right)** The hydration shell is lost, leading to increased packing density. The transition temperature (T_m) rises, and the membrane undergoes a phase transition to a gel phase.⁵²

凍結および乾燥過程における損傷を防ぐために、様々な化学物質を添加剤として用いることで細胞への損傷を抑制できることが知られている。凍結と乾燥はタンパク質と細胞に対して異なるストレス要因を有するため、それぞれに異なる保護戦略を適用する必要がある。添加剤(保護剤)の中でも、特に有効だとされている物質がトレハロースである。トレハロースによる保護メカニズムは、主に水置換仮説とガラス化という 2 つの理論によって説明される。

まず、水置換仮説について述べる。これは、トレハロースがその小さな分子サイズと分子内に持つ多数の水酸基 (-OH) を介して、リン脂質の極性頭部と直接水素結合を形成するというメカニズムである。これにより、本来であれば水分子が担っていたリン脂質間の距離を保つ役割をトレハロースが代替し、乾燥状態においても細胞膜が擬似的な水和状態を維持する。その結果、リン脂質分子の密な充填やそれに伴うファンデルワールス力の増大が抑制され、膜の液晶相が保たれる。乾燥中の相転移温度 T_m の上昇は、乾燥時、特に再水和時の膜構造の不安定化と溶質漏出を引き起こすが、トレハロースは、完全水和膜では約 10°C、乾燥二重層膜では最大 80 °C も T_m を低下させることで、この相転移に伴う膜損傷と漏出を抑制できると言われている⁵³。これは、乾燥状態においても細胞膜が液晶相を維持し、乾燥・再水和時の相転移が起こらないことを意味する³⁰。

もう一つの重要なメカニズムが、ガラス化である。脱水に伴い溶質が濃縮されると、ト

レハロースは極めて粘性の高い液体となり、最終的にアモルファスなガラス状態へと遷移する。この高粘性のガラスマトリックスが、膜を含む生体分子全体の運動性を物理的に拘束する。その結果、膜同士の接近や融合、およびそれに伴う内容物の漏出が効果的に抑制される⁵¹。

さらに、一次乾燥で昇華しきれなかった非凍結水（結合水）を除去する二次乾燥工程においても、特有の損傷要因が存在する。Török らは、凍結乾燥プロセス中に定期的にサンプルを取り出し、残存含水率と再水和後の溶血率との関係を調査した³³。一次乾燥段階のように残存含水率が高い状態（ $>0.3 \text{ g H}_2\text{O/g dry weight}$ ）では、再水和時の溶血率は約 75%と極めて高くなる。乾燥が進行し二次乾燥段階に入り、残存含水率が $0.05\sim0.3 \text{ g H}_2\text{O/g dry weight}$ の範囲まで低下すると、再水和時の溶血率は約 42%まで改善し、この範囲で生存率が最も高くなる。しかしながら、さらに乾燥を進めて残存含水率を $0.03 \text{ g H}_2\text{O/g dry weight}$ 未満まで低下させると、逆に溶血率は再び上昇する傾向を示す。この過乾燥による損傷は、ヘモグロビンをはじめとするタンパク質の立体構造の安定に不可欠な、ごく少数の水和水まで除去してしまうことに起因すると考えられる。以上のことから、凍結乾燥プロセスにおける至適含水率は $0.05\sim0.3 \text{ g H}_2\text{O/g dry weight}$ の範囲に存在することが示された。一方、凍結乾燥製剤の長期保存安定性においては、残存含水率が重要な因子となる。水はガラス転移温度（ T_g ）を低下させる⁵⁴。 T_g を超える温度で保存すると、分子運動性の増大により、凍結乾燥リポソームの融合や漏出などの劣化反応が大きく加速することが報告されている⁵⁵。したがって、長期保存安定性の観点からは、残存含水率を低減することで T_g を保存温度よりも高く維持することが望ましい。しかし、 T_g が保存安定性の絶対的な閾値として機能するわけではなく、 T_g 以下の温度でも劣化反応は進行することが示されている⁵⁵。さらに、Török らの結果が示すように、過度な乾燥は細胞構造の損傷を引き起こすため、長期保存安定性と細胞生存率という、時に相反する要求を両立させる精密なプロセス制御が求められる。以下の Table 1.2 に凍結乾燥プロセスにおける各段階での損傷要因と、それに対応する保護戦略の概要にまとめる。

Table 1.2 Damage and Protective Strategies at Each Stage of the Lyophilization Process

Process Stage	Damage Incurred	Damage Mechanism	Corresponding Protective Strategy/Technology
Freezing	Physical Damage, Osmotic Stress	•Physical compression and deformation of cells by ice crystal growth •Increased extracellular osmotic pressure and cellular dehydration due to solute concentration	•Control of optimal cooling rate •Addition of cryoprotectants
Primary Drying (Sublimation)	Dehydration Stress	•Phase transition and leakage of cell membranes •Protein denaturation and aggregation	•Addition of protectants (water replacement, vitrification)
Secondary Drying (Desorption)	Extreme Dehydration Stress	•Excessive removal of "bound water" from biomolecules •Structural collapse above the glass transition temperature (T_g)	•Precise control of temperature, time, and pressure •Maintenance of optimal residual moisture content

1.2.3. 従来の棚式凍結乾燥法におけるプロセス上の課題

細胞の凍結乾燥は、冷却速度、保護剤の選定、乾燥温度、そして残存含水率といった多数のパラメータが複雑に絡み合う多因子プロセスである。従来、これらのパラメータ最適化は、主に棚式凍結乾燥法を用いて行われてきた。この方法は、温度制御された棚の上にサンプルを充填したバイアルを多数配置し、バッチ単位で処理を行うものである。具体的には、まず棚の温度をプログラムに従って降下させ、サンプルを緩やかに凍結させる。その後、チャンバー内を減圧し、棚の温度を制御しながら一次乾燥（昇華）および二次乾燥

(脱離)を行うことで、最終的な乾燥製剤を得る。この方法は一度に多数のサンプルを処理できるスループットの高い手法であるが、特に細胞のような繊細な対象物を扱う上で、いくつかの根本的な課題を抱えている。主な課題は、「熱移動の不均一性」と「乾燥層の形成による物質移動抵抗の増大」に起因する。棚からの熱伝導によって乾燥が進行するにつれて、容器内のサンプルには多孔質な乾燥層が形成される。この乾燥層が水蒸気の移動抵抗として作用し、乾燥時間を著しく長期化させる。さらに、厚みのあるサンプル全体に均一に熱を伝えることは困難であり、サンプル内部に温度勾配が生じやすい。この不均一なプロセスは、品質への悪影響だけでなく、生産性に関する課題も引き起こす。まず、不均一な氷晶形成である。サンプル内の場所によって冷却速度が異なるため、氷晶のサイズや分布が不均一になる。これは、細胞への物理的ダメージの度合いにばらつきを生じさせ、結果として品質のばらつき（細胞生存率の低下や溶血率の増加、最終生成物の構造や残存含水率の不均一性）を引き起こす⁵⁶。これは、再水和性や保存安定性の低下に直結する。生産性面では、バッチ処理であるため、生産効率に限界があり、大規模生産へのスケールアップが困難であるという課題も指摘されている。さらに、乾燥層の抵抗に起因する長い乾燥時間（数十時間～数日）は、単位時間あたりの生産量を著しく低下させ製造コストの増大に直結する。この長時間プロセスでは、サンプル（製剤）だけでなく、多数のバイアルや装置の棚（シェルフ）全体を冷却・加熱し続ける必要があり、プロセス全体のエネルギー効率の観点からも、特に大量供給が求められる赤血球製剤のような製品においては、大きな課題となりうる（輸血用赤血球製剤の1単位は140mL）。

1.3. 噴霧真空凍結乾燥（μPD）法の提案

1.3.1. μPD 法の原理と特徴（超高速自己凍結・プロセス効率）

上記のような従来法が抱える課題を克服するアプローチとして、本研究では株式会社アルバックが開発した μPD（Micro-Powder Dry）法に着目した。μPD 法は、原料溶液を真空雰囲気中に噴霧し、液滴が落下する過程で水分が急速に蒸発する際に蒸発潜熱が奪われることによって自己凍結が生じ、球状粉末を生成する噴霧真空凍結乾燥法である（概略図を Figure 1.8 に示す）。本手法のプロセスは、まず液体試料を真空チャンバー内（数 Pa 程度）に噴射することから始まる。噴射された液滴は、まず液柱を形成し、それが表面張力によって均一な径の球状の液滴となり、液滴表面から水分が急速に蒸発する。この際、気化熱（蒸発潜熱）が奪われることで液滴自身の温度が凝固点以下まで急激に低下し、瞬間的に凍結して微細な凍結粒子となる（自己凍結）。この μPD 法の特徴である超急速冷却は、細胞内外の氷晶形成を微細なレベルに抑制し、緩慢凍結法で課題となる化学的損傷や大きな氷晶による物理的ダメージを効果的に回避できる可能性がある。計算上約 10,000°C/sec という超高速冷却を実現する。生成液滴の冷却挙動は、以下のエネルギー収支式と質量欠

損式によって記述される。

1. エネルギー収支式(熱収支)

液滴の内部温度が均一であると仮定すると、温度変化速度 $\frac{dT}{dt}$ は以下の式で表される。

$$mCp\frac{dT}{dt} = L\frac{dm}{dt} \quad (1.1)$$

m : 液滴の質量 [kg], Cp : 水の比熱 [J/(kg·K)], T : 液滴の絶対温度 [K], L : 水の蒸発潜熱 [J/kg],

$\frac{dm}{dt}$: 蒸発による質量変化率 [kg/s]

2. 質量欠損式 (Hertz-Knudsen の式)

真空中での蒸発速度は、気体分子運動論に基づくヘルツ・クヌーセンの式によって決定される。

$$\frac{dm}{dt} = -A \cdot P_{\text{sat}}(T) \sqrt{\frac{M}{2\pi RT}} \quad (1.2)$$

A : 液滴の表面積 [m^2], $P_{\text{sat}}(T)$: 温度 T における水の飽和水蒸気圧 [Pa], M : 水のモル質量 (0.018 kg/mol), R : 気体定数 (8.314 J/(K·mol))

3. 冷却速度の液滴径依存性

上記の式から、冷却速度 ($\frac{dT}{dt}$) は以下の関係に従う。

$$\frac{dT}{dt} \propto \frac{A}{m} \propto \frac{d^2}{d^3} = \frac{1}{d} \quad (1.3)$$

ここで、 d は液滴の直径である。すなわち、冷却速度は液滴径に反比例する。液滴を微細することで、単位体積あたりの蒸発面積（比表面積）が増大し、超急速冷却が可能となる。

4. 純水における計算例

本モデルを用いた数値シミュレーション（初期温度 20 °C）の結果、純水液滴の冷却速度は以下の通り算出される。

液滴径 100 μm : 約 4,960 °C/s, 液滴径 50 μm : 約 10,200 °C/s

この計算上の冷却速度は、1.2.1 節で述べたヒト赤血球の臨界冷却速度（1,000～5,000°C/min）を大きく上回っており、理論上は細胞内氷晶形成（IIF）を回避し、ガラス転移を誘導できる領域にあると考える。しかし、ナノ秒・マイクロ秒オーダーで進行する

個々の液滴内の凍結現象を直接観察し、冷却速度の実測値を得ることは現時点では技術的に困難である。したがって、本研究では SEM 画像等の形態観察から得られる氷晶痕跡の有無やサイズに基づき、理論計算値との整合性を検討することで、IIF の発生有無や凍結状態を間接的に推論・推定することとした。

μ PD では、凍結粒子は、温度制御された棚（トレイ）上に堆積され、その後、昇華乾燥（一次・二次乾燥）される。本手法では試料を微粒子として凍結するため、単位質量あたりの表面積（比表面積）が極めて大きくなる。この特性が昇華乾燥工程における効率的な熱・物質移動を促し、乾燥時間の大幅な短縮を可能にする。さらに、落下中の液滴凍結によって均一な球状微粒子が形成されるため、最終製品の品質、特に再溶解性にも良い影響を与えることが期待され、粉碎・分級といった後工程を大幅に削減できる利点も持つ。したがって、 μ PD 法は細胞へのダメージを最小限に抑えつつ、迅速な凍結行程を実現する、極めて有望な手法であると考えられる。

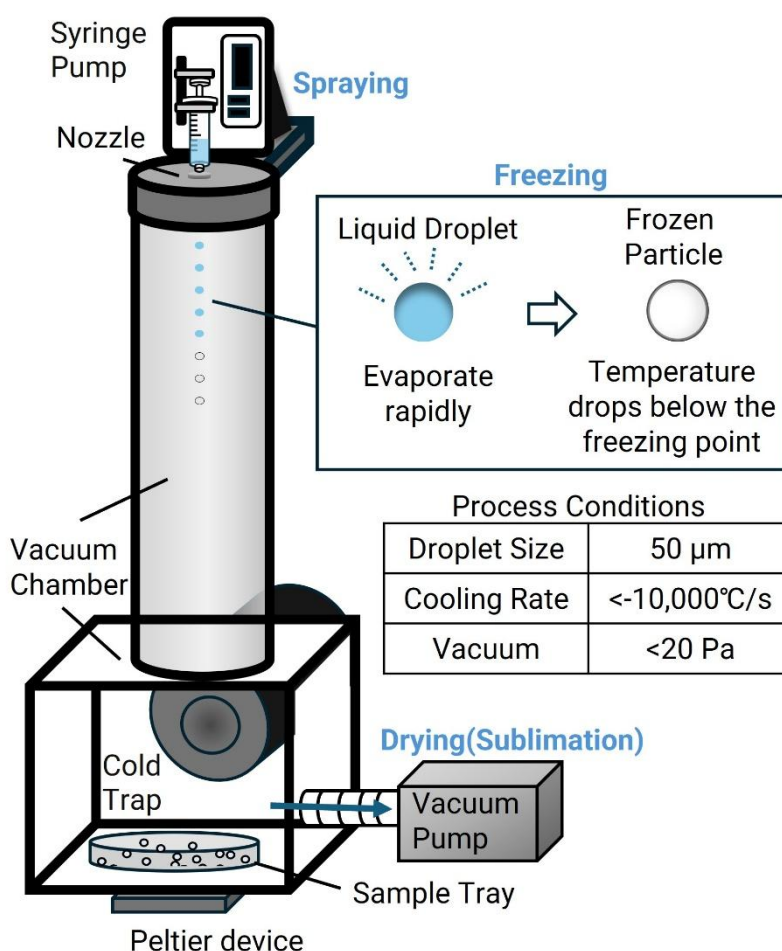


Figure 1.8 Schematic diagram of the Micro Powder Dry (μ PD) system.

1.3.2. μ PD 法による凍結乾燥の先行研究

μ PD 法は、その原理から乾燥効率と品質向上の両面で大きなポテンシャルを持つが、赤血球のような脆弱な細胞試料への応用や、その膜保護効果を最大化するためのプロセス設計については、未解明な点や最適化が十分に進んでいない点が多く残されている。この技術は、本研究で対象とする細胞だけでなく、他の熱に不安定な生物学的製剤の乾燥にも応用が試みられている。例えば、野澤らは μ PD 法を用いて、ウイルス不活化処理を施した乾燥血漿の調製に成功している⁵⁷。血漿には熱に弱い血液凝固因子が多数含まれるが、 μ PD 法は真空中で熱負荷をかけずに超高速で水分を昇華させる原理であるため、これらのタンパク質成分へのダメージを最小限に抑え、活性を維持したまま粉体化できることが示された。この研究は、 μ PD 法が複雑かつ繊細な生物学的製剤の品質を維持しつつ、工業的スケールでの量産化も視野に入れた優れた技術であることを示唆している。しかし、血漿のようなタンパク質溶液と、赤血球のような細胞懸濁液とでは、凍結乾燥プロセスが与える影響は大きく異なる。 μ PD 法の超高速自己凍結プロセスは、細胞に対して保護的な効果と損傷的な効果の両方をもたらす。例えば、微細な氷晶形成は物理的ダメージを低減する可能性がある一方で、冷却速度が速すぎると致死的な細胞内凍結を誘発するリスクも伴う。したがって、 μ PD 法を用いて高品質な凍結乾燥赤血球を実現するためには、その特有のプロセス（超高速凍結、高比表面積での乾燥）が細胞に与える影響を深く理解し、それに基づいたプロセス条件の最適化が不可欠であるが、そのための体系的な指針は未だ確立されていない。

1.4. 本研究の目的

本研究では、従来の棚式凍結乾燥法における課題である、不均一な乾燥プロセスや長時間の熱負荷による品質劣化を克服する手法として、噴霧真空凍結乾燥法である μ PD (Micro-Powder Dry) 法を導入する。本研究の主目的は、 μ PD 法の全工程（前処理、凍結、乾燥、保管）を対象とし、各段階における物理的ストレスおよび生物学的パラメータを系統的に解析・最適化することで、赤血球の損傷メカニズムを解明し、高生存率と保存安定性を両立するための基盤的製造プロトコルを提示することである (Figure 1.9 参照)。

この主目的を達成するため、本研究では以下の具体的な検証課題を設定する。

第二章では、 μ PD 法の最大の特徴である微小液滴による超高速自己凍結プロセスに着目する。従来の緩慢凍結法と比較して、極めて高い冷却速度が氷晶形成および赤血球膜の物理的損傷に与える影響を評価し、凍結工程における μ PD 法の基礎的な適合性を検証する。

第三章では、凍結および乾燥ストレスに対する耐性を付与するため、細胞保護剤であるトレハロースの細胞内導入効率の向上を試みる。高浸透圧負荷による細胞損傷を最小限に

抑えつつ、効率的にトレハロースを導入する手法として、細胞膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptides(CPPs)) の有効性を検討し、導入条件が凍結乾燥後の溶血率に及ぼす影響を明らかにする。

第四章では、乾燥・再水和工程における物理的損傷の低減を目的とする。 μ PD 法によって形成される微細粉末の特性を活かし、乾燥工程の温度プロファイルが残留水分量や赤血球の膜構造に与える影響を解析する。これにより、乾燥および再水和時の相転移に伴う損傷を抑えるための至適プロセス条件を特定する。

第五章では、本研究で確立したプロトコルに基づき製造された凍結乾燥赤血球の長期保管安定性を評価する。一定期間(3 か月)における、凍結乾燥物の残留水分量と細胞機能維持の相関を検証し、 μ PD 法を用いた凍結乾燥赤血球の実用化に向けた保存安定性に関する知見を得る。

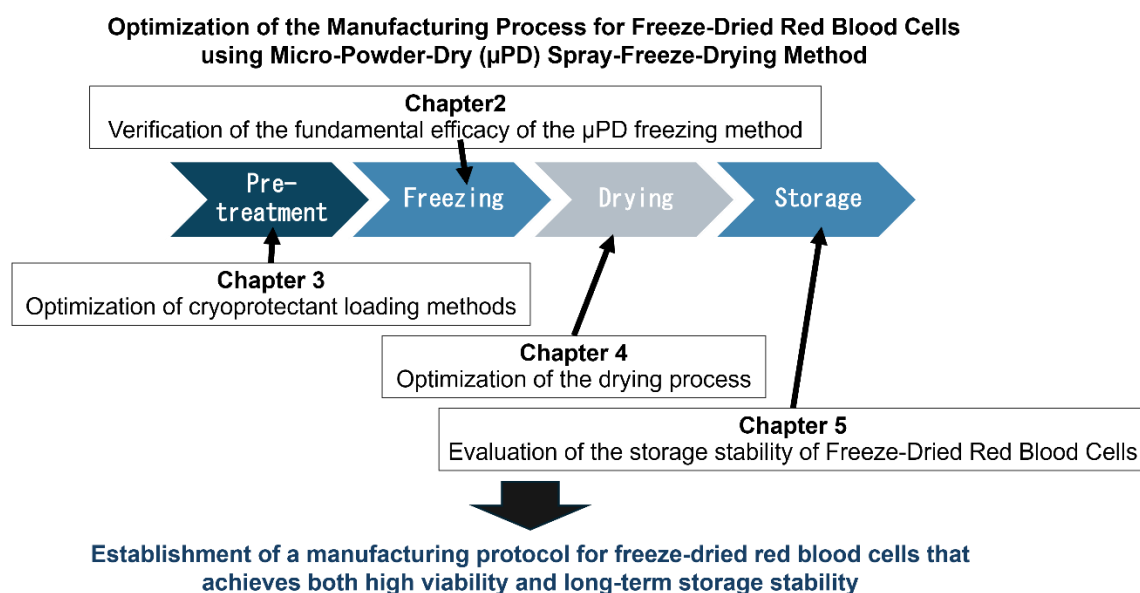


Figure 1.9 The approach of this research

第2章 μ PD 法を用いた赤血球凍結工程の基礎的検証

2.1. 本章の目的

赤血球のような動物細胞の凍結乾燥には、凍結プロセスそのものが細胞に致命的な損傷を与えるという根本的な困難が伴う。細胞が凍結時に受ける損傷のメカニズムは、冷却速度に大きく依存し、二つに大別される。一つは、緩慢凍結（例： $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ）の過程で生じる化学的ストレスである。この場合、まず細胞外の水分が凍結し、周囲の未凍結溶液中の溶質濃度が上昇する。結果として生じる浸透圧差により細胞内の水分が過度に流出し、細胞が不可逆的な収縮を起こすことで損傷に至る。もう一つは、急速凍結時に生じる物理的ストレスである。この場合、細胞内の水分が細胞外へ流出する時間的余裕がなく、細胞内で直接氷晶が形成される。この細胞内氷晶が細胞膜や細胞小器官を物理的に破壊し、細胞死を引き起こす。ただし、冷却速度が極めて高い場合（例： $10^4\sim 10^6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 以上）には、水分子が結晶構造を形成する時間的余裕がなくなり、液体状態から直接アモルファス（非晶質）なガラス状態へと固化するガラス化が生じる可能性がある。ガラス化状態では氷晶が全く形成されないため、理論上は氷晶による物理的損傷を完全に回避でき、細胞保護に極めて有利とされている。これらの損傷を回避するためには、二つの損傷メカニズムの影響を最小限に抑える最適冷却速度を見出す必要がある。本研究では、この課題に対する新たなアプローチとして、真空中での液滴噴霧による自己凍結現象を利用したマイクロパウダードライ（ μ PD）法に着目した。この超高速冷却は、細胞外の溶質濃縮が進行する時間を与えず、かつ細胞内での大きな氷晶の成長も抑制することで、従来の凍結法では避けられなかった損傷を回避できる可能性がある。

本章の目的は、赤血球の凍結プロセスにおいて μ PD 法が実現する超高速冷却が、従来の緩慢凍結法（棚式凍結乾燥法）および液体窒素浸漬法（ LN_2 法、急速凍結の代表的手法）と比較して細胞損傷をどの程度抑制できるかを定量的に評価し、 μ PD 凍結法の基礎的な有効性を検証することにある。

この目的を達成するため、以下の3つの項目について評価を行う。

1. μ PD 法、緩慢凍結法、および LN_2 法で凍結した赤血球について、融解後の溶血率を測定し、細胞生存率を比較する。
2. 各手法により凍結した後の赤血球の形態変化を光学顕微鏡により観察・比較する。
3. 凍結試料のラマン分光分析を行い、細胞保護メカニズムの要因として考えられるガラス化（水のアモルファス固化）の有無を調査する。

2.2. 実験・評価方法

2.2.1. 試料の準備

本研究で用いた血液サンプルは、インフォームドコンセントを得た 30 代の健康な成人男性ボランティア(n=3)から採取した。全血にリンパ球分離液を重層し、遠心分離 (700 ×g, 室温, 30 分) を行うことで赤血球を分離・回収した。回収した赤血球はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: Phosphate Buffered Saline) を用いて洗浄・希釈し、懸濁液全体に対して赤血球の体積が 10%を占めるように調整した (以後、便宜上ヘマトクリット値 10%(10 %Hct) と表記する)。

2.2.2. 凍結保護剤の添加

凍結時の細胞損傷を軽減するため、凍結保護剤としてデキストラン 40 (平均分子量 40,000、Sigma-Aldrich) を最終濃度 10% (w/v)となるように添加した。デキストランは、グルコースを基本単位とする多糖類であり、グリセロールなどの低分子量凍結保護剤 (CPA) の代替となる非透過性 CPA として評価されている⁵⁸。以下の特性により赤血球を凍結ストレスから保護すると考えられる。

(1) 溶液粘度の上昇による氷晶成長の抑制

デキストランを含む凍結保護溶液は、冷却時に非常に粘性が高くなり、これにより氷の形成速度が低下する。この効果により、急速冷却時における水分損失と浸透圧ストレスが軽減され、氷晶成長による物理的損傷が抑制される⁵⁹

(2) 細胞膜の直接的保護

緩慢凍結過程では、細胞外で優先的に氷が形成され、残存する未凍結溶液中の溶質 (NaCl、KCl など) の濃度が上昇する (いわゆる溶液効果)。この高濃度の溶質による浸透圧ストレスおよび化学的損傷は、細胞死の主要な原因の一つである。デキストランは高分子量 (平均分子量 40,000 Da) のポリマーであり、赤血球 (RBCs) に浸透しないため⁵⁸、その保護作用は細胞外で発揮される。デキストランは、ポリビニルピロリドン (PVP) などの他の高分子 CPA と同様に、細胞表面をコーティングして物理的バリアを形成すると考えられている⁶⁰。このバリアが、高濃度となった電解質などの溶質の細胞内への侵入を抑制し、溶液効果による損傷を軽減すると期待される。

(3) ヘモグロビン漏出の抑制

高分子 CPA は、表面エネルギー障壁を形成することでヘモグロビンの拡散を妨げる⁶¹。また、細胞膜が損傷し、欠損した部位において、細胞内溶物 (ヘモグロビン) と細胞外溶液との間に代わりとなる界面を構築すると考えられる。このポリマーによって形成された表面エネルギー障壁が膜の欠陥を実質的に隠蔽し、ヘモグロビンが細胞外へ容易に拡散・漏出するのを妨げる。これが、デキストランが示す高い溶血抑制効果の重要なメカニズム

の一つである。実際、30 %w/v デキストランを用いた凍結保存では、遊離ヘモグロビン(溶血率)が全赤血球ヘモグロビンのわずか 13%に抑制されている⁵⁸。これらの複合的な保護効果により、デキストランは凍結プロセスにおける赤血球の生存率向上に寄与すると考えられる。

2.2.3. 3つの凍結工程(μPD 法・緩慢凍結法・液体窒素浸漬凍結法)

μPD 法(急速凍結)の具体的な凍結方法を以下に説明する。赤血球懸濁液(5-10 mL)を真空チャンバー内に噴霧し、蒸発潜熱を利用して自己凍結させた。この方法による冷却速度は数百〜数千 °C/sec と見積もられ、本研究における主要な急速凍結法として用いた。噴霧プロセスは、初期の高流量でノズル先端を迅速に通過させ、続く本噴霧で均一な凍結粒子を得るための目的で、共通のノズル口径(50 μm)を用い、以下の 2 段階の流量条件を適用した。この流量条件はシリンジポンプを用いて制御を行った。

- ・初期高流量噴霧: 懸濁液の最初の 0.5 mL に対して噴霧流量を 10 mL/min と設定した。
- ・本噴霧: 残りの懸濁液を対象に、噴霧流量を 1 mL/min と設定した。

噴霧により生成した氷粒子は、装置下部のペルチェ素子上に設置した回収皿で捕集した。

緩慢凍結法(Slow 法・比較対象)の具体的な凍結方法を以下に説明する。

赤血球懸濁液 1.0 mL をガラス瓶(液高約 4 mm)に分注し、ペルチェ素子を用いて管理された冷却速度(1 °C/min)で凍結させた。温度計はガラス瓶へ入れて、時間経過と温度を記録した。

液体窒素浸漬凍結法(LN₂ 法・比較対象)の具体的な凍結方法を以下に説明する。

赤血球懸濁液 1.0 mL をガラス瓶(液高約 4 mm)に分注し、液体窒素中に 3 分間浸漬し、急速凍結を行った。温度計はガラス瓶へ入れて、時間経過と温度を記録した。

2.2.4. ラマン分光分析による結晶状態の評価方法

凍結試料中に含まれる水の物理的状態、すなわち結晶(氷晶)状態か非晶質(ガラス・アモルファス)状態かを判定するため、ラマン分光分析を用いた。この判定は、水の O-H 伸縮振動に由来するラマンスペクトルのピーク位置と形状に基づいて行う。

結晶氷とガラス状態では分子間相互作用の程度が異なるため、O-H 伸縮振動のエネルギーが変化する。先行研究で示されているように(Figure 2.1 参照)⁶²、両者のスペクトルは明確に異なる特性を示す。結晶性の氷は約 3,100 cm⁻¹に鋭いピークを示すのに対し、ガラス状態ではこのピークが約 20 cm⁻¹高波数側へシフトし、かつブロード化する。このピークシフトとブロード化は、ガラス状態における分子間相互作用の多様性と不規則性に起因する。本研究においても、このピークシフトの有無を基準として、作製した凍結試料がガラス状態にあるか否かを判定した。測定には、ラマン分光計(Wasatch Photonics 社製, WP 532 XL, 励起波長 532 nm)を用い、凍結後の試料を液体窒素による冷却下でラマンスペクトルを取得した。

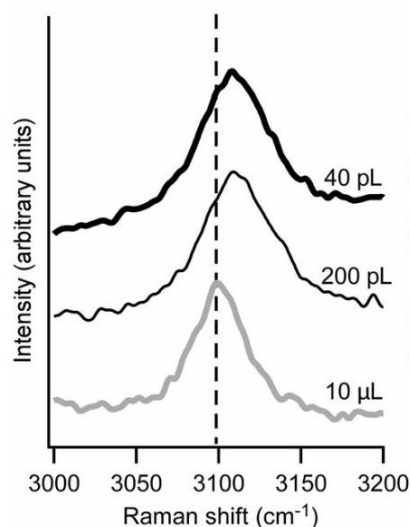


Figure 2.1 Determination of the Physical State of Water by Raman Spectroscopy Raman spectrum of frozen water. While a peak is seen at approximately 3100 cm^{-1} in the crystalline state ($10\text{ }\mu\text{L}$), it shifts to a higher wavenumber in the glass state (40 pL , 200 pL) ⁶².

ラマン分光測定は、液体窒素で冷却した金属製チャンバー上で行った。このチャンバーはポリスチレン製断熱容器内に設置し、サンプルは測定中このチャンバー上で低温に保持した。Figure2.2 に概略図を示す。各凍結サンプルの調製および移動は以下の通りである。液体窒素浸漬および緩慢凍結サンプルは、凍結完了直後、ガラスバイアルごと速やかに冷却チャンバー上へ移した。μPD サンプルは、凍結プロセス完了後に装置内を大気圧に戻し、ペルチェ素子上の回収皿から回収した。回収操作には液体窒素で予冷したスパチュラを用い、凍結粒子をガラスバイアルへ素早く移した後、バイアルを冷却チャンバー上へ移動させた。その後、各サンプルについてラマン分光測定を行い、結晶状態を分析した。

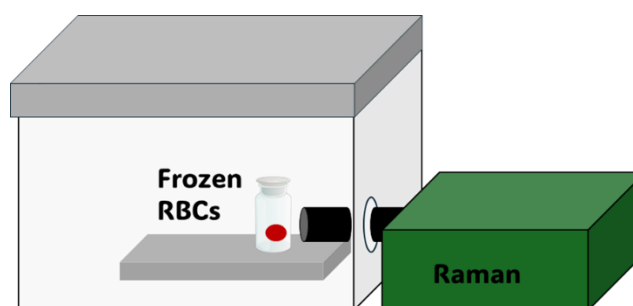


Figure 2.2 Experimental setup for Raman analysis of frozen RBCs, illustrating the sample placement within a cooled chamber.

2.2.5. 溶血率の算出

赤血球の溶血率は、トレハロース導入前後および再水和後のサンプルについて、Drabkin 法を用いて定量的に評価した⁶³。Drabkin 試薬は、市販のキット（Sigma-Aldrich 社製）を製造元の指示に従い調製した。Drabkin 試薬 1 バイアルを精製水 1,000 mL に溶解し、これに 30% Brij L23 溶液（Sigma-Aldrich 社製）を加え、よく混合した。不溶性の粒子が残存する場合は、ろ過（50 μm のフィルターを使用）して除去した。調製した Drabkin 試薬 5.0 mL に、赤血球懸濁液 20 μL を加え、室温で 15 分間放置した。この操作により、細胞が溶解し、ヘモグロビンが Drabkin 試薬と反応して安定なシアンメトヘモグロビンが形成される。シアンメトヘモグロビンは、540 nm の最大吸収波長を持つ。この吸光度を分光光度計（F-7100, 株式会社日立製作所）で測定し、事前に Hemoglobin Colorimetric Detection Kit（Thermo Fisher Scientific 社製）を用いて作成した検量線からヘモグロビン濃度を算出した。

溶血率は得られた各濃度とサンプルの体積に基づき、以下の式を用いて算出した。

$$\% \text{溶血率} = 100 \times \frac{\text{上清ヘモグロビン濃度} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{上清の体積}(\text{mL})}{\text{全体ヘモグロビン濃度} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{全体の体積}(\text{mL})} \quad (2.1)$$

2.2.6. 形態の観察

融解後の懸濁液の一部をスライドガラスに滴下し、光学顕微鏡（Olympus 製, BX53）下で観察した。赤血球の形態は、正常形態（双凹円盤状）、変形（収縮など）、ゴースト化（細胞膜が破裂し、ヘモグロビンが流出した後に残存する無色の膜構造）などを判断した。これにより、凍結融解処理による細胞損傷の程度を定性的に評価した。正常形態を保つ細胞の割合が高いほど、凍結保護剤の保護効果が高いことを示す一方、ゴースト化細胞の増加は細胞膜の破裂による不可逆的な損傷を示唆する。

2.3. 結果

2.3.1. 液体窒素浸漬法、μPD 噴霧凍結法、および緩慢凍結法による赤血球溶血

率の比較(凍結融解)

各種凍結融解法が赤血球の溶血率に与える影響を評価した結果を Figure 2.3 に示す。凍結処理を行わない未凍結コントロール（Before Freezing）の溶血率は 4%であり、ベースラインとなるダメージは十分に低いことが確認された。

全ての凍結処理群においてコントロールを上回る溶血が確認され、その程度は冷却速度に大きく依存した。最も高い細胞損傷を示したのは緩慢凍結群（After Slow Freezing-Thawing）で、溶血率は 80%に達した。これに対し、LN₂浸漬による急速凍結群（After LN₂ Freezing-Thawing）の溶血率は 20%であり、緩慢凍結と比較して 60 ポイント低い値を示した。

一方、本研究で新たに評価した μ PD 噴霧凍結群（After μ PD Freezing-Thawing）の溶血率は 58%であり、LN₂浸漬法ほどではないものの、緩慢凍結と比較して 22 ポイント低い値を示した。これらの結果は、デキストラン存在下においては、急速凍結法がより効果的に赤血球の溶血を抑制することを示している。特に LN₂浸漬法が最も優れた保護効果を示す一方で、 μ PD 噴霧凍結法も緩慢凍結法より有意に優れており、実用的な凍結方法として有望であることが示唆された。

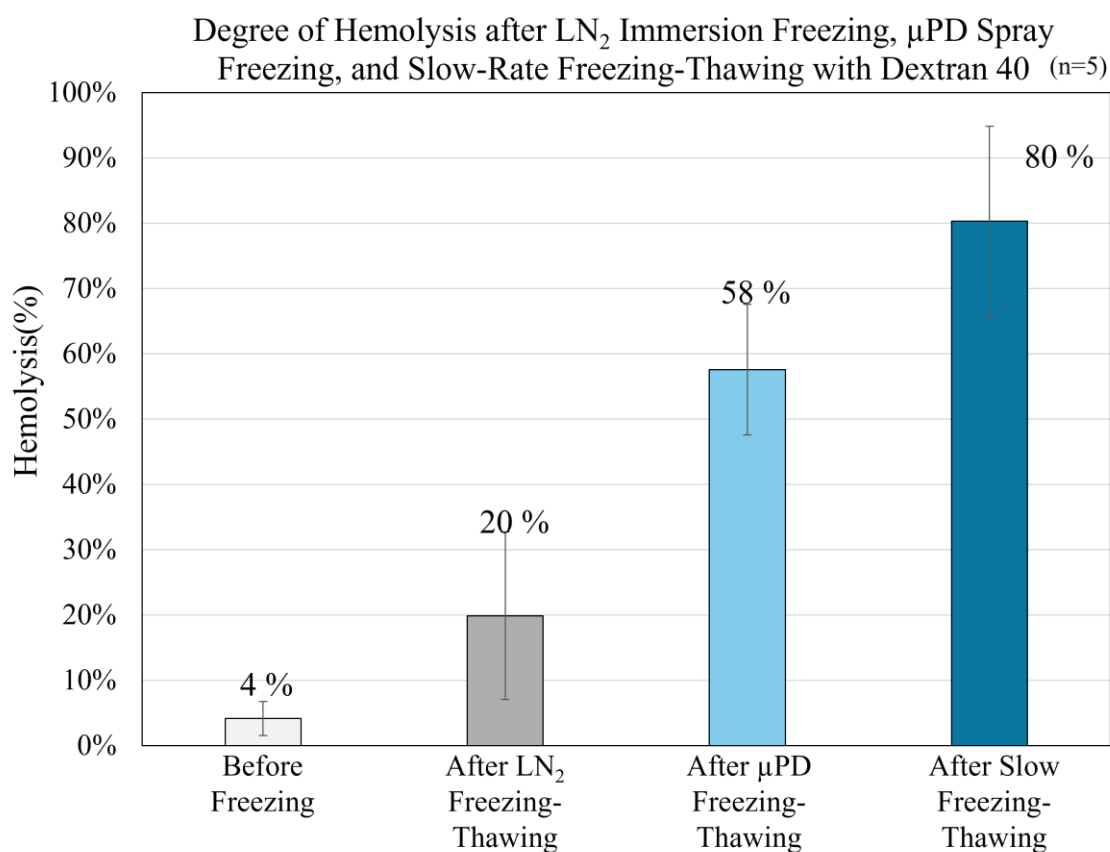


Figure 2.3 Effect of Various Freezing and Thawing Methods on the Hemolysis Rate of Red Blood Cells Results are shown from left to right: unfrozen control, LN₂ immersion freezing, μ PD spray freezing, and slow freezing. Data are shown as mean $\pm$ standard deviation (n=5).

2.3.2. 凍結融解後の赤血球形態

各種条件下で凍結融解した後の赤血球の形態を、光学顕微鏡を用いて観察した結果を Figure 2.4 に示す。未凍結コントロール (Figure 2.4・A) では、大多数の赤血球が正常な双凹円盤状を維持しており、細胞膜の破裂やゴースト化はほとんど観察されなかった。

LN₂浸漬凍結後 (Figure 2.4・B) では、正常形態を保つ細胞が依然として多く観察されたが、わずかなゴースト化細胞 (膜構造のみが残存した無色の環状構造) が散見された。これは、溶血率 20%の結果とよく対応しており、大部分の細胞が膜構造の完全性を保持していることを示唆している。

これに対し、μPD 噴霧凍結後 (Figure 2.4・C) では、ゴースト化細胞の割合が増加し、変形した細胞も多数観察された。正常形態を保つ細胞の割合は顕著に減少しており、溶血率 58%の結果と対応している。

最も高い細胞損傷は緩慢凍結後 (Figure 2.4・D) で観察された。この試料では、ゴースト化細胞が支配的であり、正常形態を保つ細胞はほとんど認められなかった。多くの細胞膜が破裂し、内容物が流出した状態が明らかであり、溶血率 80%という高い値に直結している。

以上の形態観察結果は、冷却速度の違いが細胞膜の破裂挙動に直接影響し、最終的な細胞損傷程度を決定することを視覚的に証明していることを示唆している。

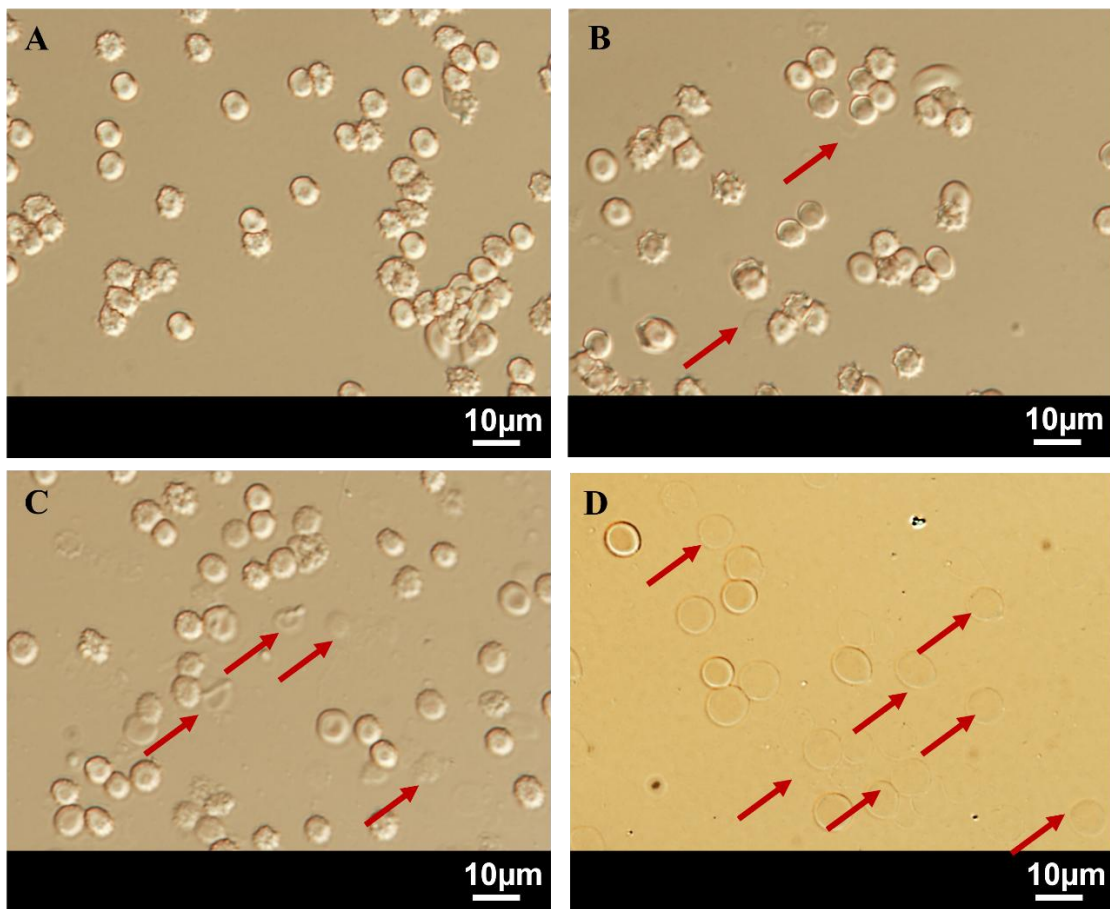


Figure 2.4 Optical Micrographs of Red Blood Cells After Various Freezing and Thawing Methods (A) Pre-freeze control, (B) After LN₂ immersion freezing, (C) After μPD spray freezing, (D) After slow freezing. Scale bar indicates 50 μm.

2.3.3. 凍結試料の氷晶状態の評価

凍結試料中の水の物理的状态を評価するため、ラマン分光測定を実施した(Figure 2.5 参照)。三つの凍結方法すべてで、結晶水の指標とされる約 3,100 cm⁻¹付近にピークが観察された。3,100 cm⁻¹におけるピーク強度は、液体窒素浸漬凍結(LN₂-freezing)が最も高く、次いで緩慢凍結(Slow-freezing)、μPD 凍結(μPD-freezing)が最も低い値を示した。

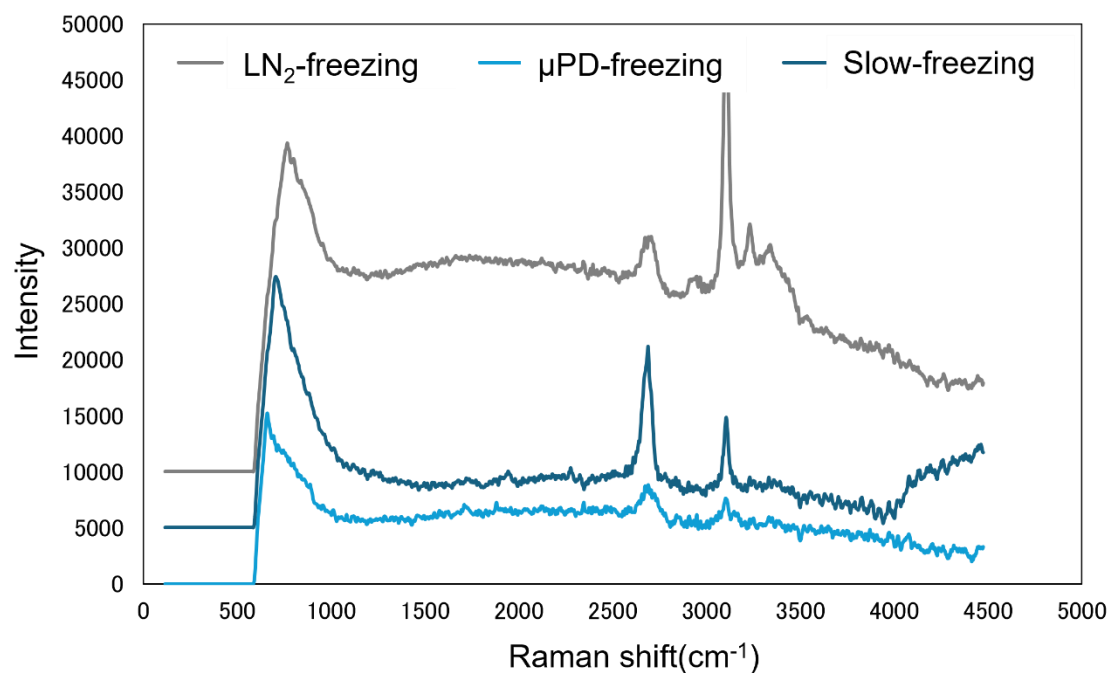


Figure 2.5 Raman Spectra of Samples Prepared by Various Freezing Methods Shows the spectra for each sample: Slow-freezing, μPD-freezing, and LN₂-freezing. A peak characteristic of crystalline ice was observed in all samples.

Figure 2.6 に 3 つの凍結手法の冷却速度プロファイルを示す。μPD 法は、計算値で 4200 °C/s という冷却速度を示し、 10^{-5} オーダーから急激に温度が低下し始めた。LN₂法は、実測値で 3.25° C/s であり、約 10 秒経過した付近から急激な温度降下が始まり、最終的に -190° C 付近まで到達した。緩慢凍結法は、実測値で 0.31° C/min であり、 10^3 秒（約 16 分）以上の時間をかけて緩やかに温度が低下した。

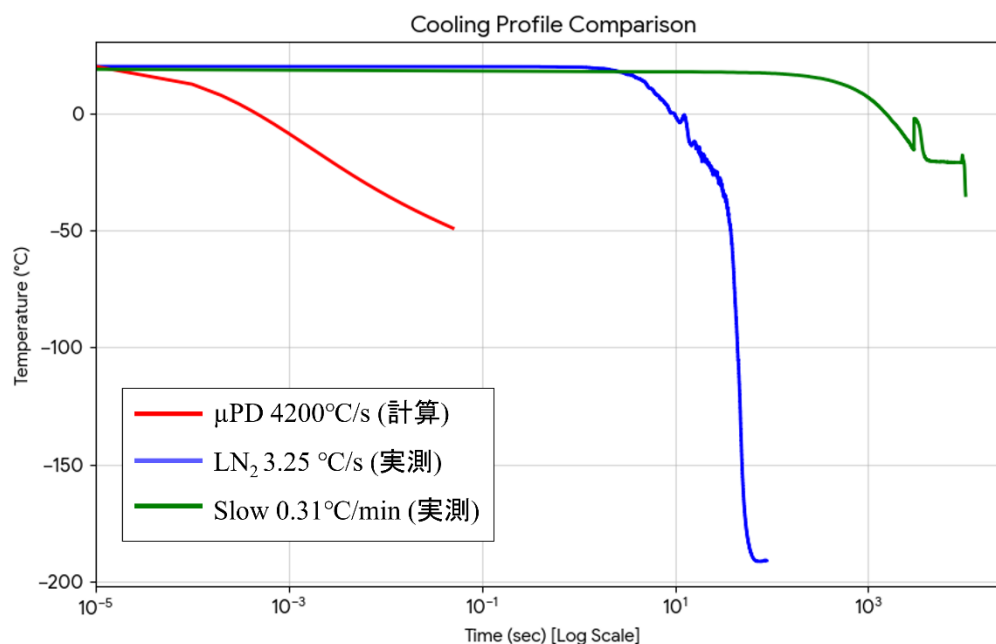


Figure 2.6 Comparison of cooling profiles for different freezing methods. The graph shows the temperature decrease over time for the μ PD method (calculated), LN_2 immersion freezing (measured), and slow freezing (measured).

2.4. 考察

本章の結果、溶血率は LN_2 浸漬凍結 (20%) が最も低く、次いで μ PD 噴霧凍結 (58%)、緩慢凍結 (80%) の順に増加し、冷却速度が速いほど細胞保護効果が高いことが示された。この結果から、各冷却速度は異なる主要な損傷メカニズムを生じさせていると示唆される。

2.4.1. 緩慢凍結における化学的ストレスの影響

緩慢凍結 ($0.31^\circ\text{C}/\text{min}$) において溶血率が 80% に達し、形態観察で細胞のゴースト化が確認された事実は、デキストラン添加系においても、低速冷却条件下では溶質濃縮による損傷を回避不能であることを示している。この条件下では、細胞外氷晶の成長に伴い未凍結画分の溶質濃度が臨界点を超え、細胞内外に生じた浸透圧差が脱水を強制した結果、細胞膜の不可逆的な破綻を招いたと結論付けられる。

2.4.2. ラマン分光分析による氷晶構造の同定

ラマン分光分析の結果、全手法において結晶水の指標である $3,100\text{ cm}^{-1}$ 付近にピークが検出された。この強度は LN_2 浸漬法で最大、 μ PD 法で最小であった。 μ PD 法では理論計算値 $4200^\circ\text{C}/\text{s}$ という超急速冷却により、 $3,100\text{ cm}^{-1}$ のピーク強度は他手法と比較して最低値を示した。これは、熱力学的に氷晶の核生成および成長が最も抑制されたことを物理的

に証明している。LN₂ 浸漬法では 3,100 cm⁻¹において最も鋭く高いピークを示した。実測冷却速度が 3.25 °C/s に留まるため、水分子の規則的な配列（結晶化）が進行したことを反映している。急速凍結群で見られたブロードなスペクトル形状は、完全なアモルファス状態ではなく、ナノメートルオーダーの微細氷晶の混在、あるいはハンドリング時の昇温による失透（再結晶化）が生じた結果であると特定される。

2.4.3. μ PD 法と LN₂法の溶血率差に関する考察

理論上の冷却速度 (μ PD: 4200 °C/s $\gg$ LN₂: 3.25 °C/s) および氷晶抑制能（ラマン強度）で勝る μ PD 法の溶血率（58%）が、LN₂ 法（20%）を下回った要因は以下の 2 点に集約される。LN₂ 法において、結晶化度は高いものの、顕微鏡観察において形態を最も維持していた。これは 3.25 °C/s の冷却により、細胞膜を物理的に貫通しない微細な氷晶として固定されたためである。

対して μ PD 法では、結晶量そのものは少ないものの、残存した氷晶が特定の条件下で膜への物理ストレスとなったことを示唆している。デキストランの添加は液滴の粘度上昇と蒸気圧降下を招く。 μ PD 法の冷却原理である蒸発潜熱が、液滴表面での溶質濃縮層形成によって阻害され、液滴内部の実効冷却速度が理論値から乖離したことが、58%という溶血率に直結したと判断される。ただし、本章で得られた溶血率の数値は、限られた試行回数に基づく現時点での傾向を示すものである。測定系における個体差やハンドリングに伴うばらつきの影響を排除し、各冷却手法間の有意差を厳密に評価するためには、今後は検体数をさらに増やした統計的検証が不可欠である。

2.5. 本章のまとめ

本章では μ PD 法の赤血球保存における有効性を、物理的および生物学的指標の両面から包括的に検証した。まず冷却性能に関しては、 μ PD 法は理論計算に基づく 4200 °C/s という極めて高い冷却速度を達成しており、これは液体窒素（LN₂ 法）浸漬法の 3.25 °C/s と比較して約 1,300 倍に相当する。この圧倒的な冷却能はラマン分光分析の結果とも整合しており、結晶氷の指標となる 3,100 cm⁻¹付近のピーク強度が全手法の中で最小であったことから、従来の LN₂ 法を凌駕する氷晶抑制能を有することが物理的に実証された。次に損傷メカニズムの解明において、緩慢凍結（0.31 °C/min）では溶血率が 80%に達し、化学的ストレス（溶質濃縮と脱水）が主因であることが特定されたが、 μ PD 法を含む急速凍結ではこの時間領域を迅速に通過することで化学的ストレスを回避し、損傷因子を微細氷晶による膜干渉といった物理的ストレスへと転換させていることが明らかとなった。一方で、 μ PD 法の溶血率（58%）が LN₂ 法（20%）に及ばなかった事実は、保護剤であるデキストランを含有する液滴において、高粘度化や蒸気圧低下に伴う蒸発冷却効率の低下が実効的な障壁となっていることを示している。

結論として、 μ PD 法は物理的な氷晶抑制において既存手法を圧倒する性能を保持してお

り、今後は保護剤組成の最適化を通じて、この高い理論冷却性能を直接的に生存率へと反映させることが、実用化に向けた次なる焦点となる。なお、本研究で提示した各プロセスにおける物理的パラメータの有効性については、さらなる検体数を用いた統計的解析を実施し、その再現性と信頼性を担保することで、より高精度な製造プロトコルの確立を図る必要がある。

第3章 細胞保護剤(トレハロース)導入の最適化による溶

血抑制

3.1. 本章の目的

第3章では、従来の高浸透圧インキュベーション法が持つ細胞へのダメージという課題を克服し、より効率的で汎用性の高いトレハロース導入手法を確立する。この目的のため、本研究では、分子シミュレーションに基づいて開発された新規の細胞膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptides; CPPs) を活用し、高浸透圧法と CPPs 法を比較検証した。本章では、まず、従来法の限界を実験的に定量評価し、課題を明確化する。その上で、CPPs を用いたトレハロース導入を実施し、その導入効率と細胞への影響を評価する。最終的に、 μ PD 法および LN₂ 凍結乾燥法後の赤血球生存率を指標として、CPPs 法の有効性と、その適用における課題を検証することを目的とする。

3.1.1. 凍結乾燥プロセスにおける細胞へのストレスとその保護

第一章で示した通り、赤血球の凍結乾燥プロセスは、細胞に対して凍結と乾燥という二つの異なるストレスを与える。凍結工程における大きなストレス原因の一つは、氷晶形成による機械的損傷である。冷却過程において水が氷へと相転移する際、形成される氷の結晶が細胞に物理的なダメージを与える。冷却速度が比較的遅い場合、氷晶は主に細胞外に形成される。これにより細胞外の溶質が濃縮され、後述する浸透圧ストレスを引き起こす⁶⁴。一方、冷却速度が速すぎると、細胞内の水が凍結を逃れる時間がなくなり、細胞内で氷晶が形成される (細胞内凍結)。この細胞内氷晶は、赤血球の繊細な細胞膜や内部構造を直接的に穿孔・破壊し、不可逆的な損傷をもたらす⁶⁵。乾燥工程での脱水もまた、細胞に物理的ダメージを引き起こす。細胞膜を構成するリン脂質は、通常、水分子との水素結合によって安定した流動性を保っている。乾燥によってこの水和殻が失われると、リン脂質間の距離が縮まり、ファンデルワールス力や疎水性相互作用が増加する。これにより、リン脂質が凝集・相分離を起こし、膜の構造的完全性が損なわれる。この現象は、乾燥によってリン脂質の相転移温度 T_m (T_m 以下ではゲル相、 T_m 以上では液晶相) が上昇し、膜がゲル相へと変化することで、ゲル相と液晶相の混在部分から細胞内の成分が漏出することに繋がる^{21,30,50}。赤血球は、これらの凍結・乾燥ストレスに対して特に脆弱な構造的特徴を持つこの膜の損傷が一定レベルを超えると、細胞内のヘモグロビンが流出する溶血が起こる。溶血の発生とその程度を評価することは、赤血球の健全性や機能への影響を理解する上で中心的な役割を果たし³⁰、溶血率の抑制が保存技術開発の主要な目標となる。

3.1.2. 保護剤としてのトレハロース

前節で述べた致命的なストレスから細胞を保護するため、保護剤の使用が不可欠となる。これまで多くの生物学的物質の保存に用いられてきたトレハロースは、その有効性が広く認められている保護剤の一つである。トレハロースは、 α -D-グルコピラノシル- α -D-グルコピラノシドと呼ばれる非還元性の二糖類（分子量342）である⁶⁶。自然界に広く存在し、特に脱水状態で数十年間生存し、再水和後すぐに活動を回復する能力を特定の植物細胞や動物細胞に与えることで知られている。この現象は乾眠として知られ、多くの植物や動物が、体内に高濃度の二糖類を蓄積することで、ほぼ完全な脱水状態でも生存する能力を持っている^{67,68}。

トレハロースの保護作用を説明する主要なメカニズムの一つが、ガラス転移仮説である⁶⁹。凍結乾燥または脱水プロセスにおいて、細胞内から水分が除去されるにつれて、トレハロースは細胞内での濃度が上昇し、高粘性の非晶質（アモルファス）ガラス状態を形成する。このガラス状マトリクスは、タンパク質、細胞膜、核酸といった生体分子の動きを物理的に固定し、構造的な変性や凝集を防ぐことで、その高次構造を長期にわたり安定的に保持する役割を果たす。この保護作用において極めて重要な物理的パラメータが、ガラス転移温度（ T_g ）である⁷⁰。 T_g は、非晶質状態が硬いガラス状から柔軟なゴム状（ラバー状態）へと変化する温度を示し、高い T_g を持つ物質は、より高温でもガラス状態を維持できる⁷¹。乾燥トレハロースの T_g は、研究によって75° Cから120° Cと幅があるが、これは試料の残留水分の影響によるものであり、その高い T_g が、常温での長期保存を可能にする保護効果の一因となっている⁷⁰。

もう一つの主要なメカニズムは、水置換説である⁷²。凍結乾燥や凍結の過程で水分子が失われると、膜脂質の極性ヘッドグループに結合していた水分子が減少する。水置換説によれば、二糖類（特にトレハロース）は、脱水時に脂質を取り巻いていた水分子の代わりに、脂質の極性ヘッドグループと直接相互作用する。この相互作用により、あたかも水和状態を保持しているかのように、脂質分子間の適切な間隔が維持される。この間隔の維持により、脂質のアシル鎖は液晶状態を保つことが可能となり、脱水に伴う膜の構造変化やゲル相への移行が抑制される。一般に、脱水は脂質二重層のゲル-液晶相転移温度（ T_m ）を急激に上昇させるが、二糖類はこの T_m 上昇を低減することが報告されている^{73,74}。しかしながら、トレハロースが他の糖類、特に分子構造が類似するスクロースよりも優れた保護効果を示す理由に関しては、単なる水素結合の強さだけでは説明できない。トレハロースの α, α -(1 $\rightarrow$ 1)グリコシド結合に起因するクラムシェル型コンフォメーション(Figure 参照)は、脂質界面での配向性と相互作用の特異性をもたらし、他の二糖類が達成できない程度の脂質膜保護をもたらすと考えられている⁷⁵。

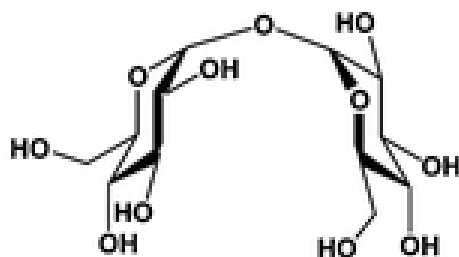


Figure 3.1 Structure of α, α -trehalose⁷⁵

3.1.3. 細胞内保護の必要性

トレハロースは、その大きな分子サイズと極性のため、細胞膜を透過しにくい非透過性保護剤であり⁶⁹、基本的には細胞外からの保護作用を発揮する。緩やかな冷却速度の場合、トレハロースが細胞外に存在することで、細胞外の溶質濃度が増加し、これに伴い細胞外液の浸透圧が上昇する⁷⁶。この浸透圧差により、細胞内の水が細胞外へ移動して細胞の脱水が引き起こされ、氷晶の形成が抑制される。また、乾燥過程では、トレハロースが細胞膜のリン脂質と水素結合することで、前節で述べた通り、膜の構造変化や相分離を防ぎ、その安定性を維持する⁷²。

しかし、細胞外トレハロースのみでは、細胞内部の生体分子を直接保護することができない。細胞内にトレハロースが存在することで、複数の保護メカニズムが機能する。まず、トレハロースは、溶液の凝固点を低下させるだけでなく、水の構造を安定化させるコスモトロピック物質⁷⁷として作用する(自身の周囲にある水分子を秩序化させ、周囲の水素結合ネットワークの構造を変化させることで、氷を形成できなくする物質)。これにより、水の凍結が抑制され、細胞内においても氷晶の核形成が妨げられ、形成される氷晶のサイズを濃度依存的に減少させる⁶⁹。氷晶のサイズが微細化することで、氷晶による細胞や組織の物理的破壊が軽減される。

さらに、細胞内トレハロースは、脱水過程で失われる結合水の代わりとなり、細胞内のタンパク質⁷⁸、DNA、および細胞内小器官の立体構造を安定化させることが報告されている⁷⁹。この直接的な生体分子の保護により、脱水ストレスから細胞内の機能成分が保全され、再水和後の細胞機能の回復が可能になると考えられる。

3.1.4. トレハロース導入の課題

前述のとおり、細胞内へのトレハロース導入は、細胞を凍結乾燥ストレスから守る上で極めて有効であるが、トレハロースは細胞膜を透過できない。そこで、近年では細胞膜透過性の課題を克服するため、トレハロースを細胞内に効率的に導入する様々な手法が先行

研究で開発されている⁸⁰。

哺乳類細胞へのトレハロース導入における最初期のアプローチの一つとして、脂質膜のゲル-液晶相転移を誘導することで細胞膜の透過性を高める手法が開発された⁸¹。この原理に基づき、Satpathy ら³³は浸透圧ストレスを利用した赤血球へのトレハロース導入に成功している。彼らの報告によれば、細胞外のトレハロース濃度が等張条件を大幅に超える溶液中での 7 時間にわたるインキュベーションにより、細胞内トレハロース濃度を最大 40 mM にまで高めることが可能であった。しかしながら、この高浸透圧インキュベーション法にはいくつかの課題が存在する。高張溶液への長時間曝露は、細胞の形態変化や生存率の低下を招く可能性が指摘されており、導入効率と細胞損傷の間にトレードオフが生じている。

そこで、本研究では、高浸透圧法に代わる新規なアプローチとして、細胞膜透過性ペプチド (Cell-Penetrating-Peptides, CPPs) の適用を検討した。CPPs は、分子シミュレーションに基づいて設計された人工ペプチドであり、細胞膜を効率的に透過でき、かつ異なる細胞種や様々な物質 (タンパク質、核酸、小分子など) の導入に応用可能な汎用的なツールである。本研究では、CPPs によるトレハロース導入が、先行研究で課題とされた細胞へのダメージを最小限に抑えつつ、より効率的なトレハロース導入手法となり得るかを検証する。

3.1.5. 新規細胞膜透過性ペプチド (CPPs) の活用と CPPs の具体的な作用機序

細胞透過性ペプチド (CPPs) は、細胞膜を通過し、様々な分子 (貨物) を細胞内へ送達する能力を持つ短いペプチドの総称である^{82,83}。小さな蛍光色素から、タンパク質、核酸、さらにはナノ粒子までも CPPs に結合することで、これらの分子を細胞内へ導入できる^{84,85}。CPPs は通常、高い正電荷を持つアミノ酸 (リジンやアルギニン) が豊富であったり、疎水性残基と親水性残基が交互に並んだ両親媒性の配列を持っていたりする⁸⁶。CPPs の細胞膜透過に関する正確なメカニズムは未だ完全には解明されておらず、単一のコンセンサスには至っていない。現在、主に二つの説が提案されている⁸⁶。

第一に、エネルギー依存性のエンドサイトーシスである⁸⁷。これは、細胞膜の内側へ向かう陥入により、CPPs と貨物を含む小胞が形成され、その小胞が細胞内へ取り込まれるプロセスである。このエネルギーは ATP 加水分解により供給される。マクロピノサイトーシス、クラスリン媒介エンドサイトーシス、カベオラ媒介エンドサイトーシスなど複数の透過経路が存在する^{88,89}。

第二に、エネルギー非依存性の直接透過である。これは、CPPs が小胞を形成することなく、直接細胞膜を横断する経路である。このプロセスは、CPPs の陽電荷と細胞膜の負電荷 (グリコサミノグリカンなど) との間の静電相互作用によって駆動されると考えられている⁹⁰。分子動力学シミュレーションは、CPPs が局所的な膜変形や一時的な細孔形成を

誘導し、その細孔を介して鎖状に細胞内へ侵入する可能性を示している。この直接透過メカニズムは、CPPs の濃度が高い場合に起こりやすいことが示唆されている^{91,92}。CPPs が有する高い導入効率、比較的短時間での輸送、および比較的低い細胞毒性は、先行研究における高浸透圧インキュベーション法の課題を克服する上で極めて有利であると考えられる。

これまでに CPPs を用いてトレハロースをヒト赤血球に導入し、凍結乾燥を試みた直接的な研究事例は確認されていない。

本研究ではトレハロースの導入に成功したことのある、分子シミュレーションに基づいて開発された新規の細胞膜透過性ペプチド (CPPs) を活用した。リジン (K)、アルギニン (R)、トリプトファン (W)、ヒスチジン (H) の 7 つのアミノ酸から構成されている KRKRWHW は水素結合および π - π 結合を介してトレハロースと結合するように設計された。この CPP s は、哺乳類細胞 (マウス胚性線維芽細胞、MEF) に対してほとんど細胞毒性を示さず、高い細胞透過効率を達成した⁹³。

本章では、まず、従来法 (高浸透圧インキュベーション法) によるトレハロース導入量および細胞への影響を定量的に評価することで、従来法の限界点を見極め、課題を明確化する。その上で、CPPs を用いたトレハロース導入を実施し、その導入効率と細胞への影響を評価する。最終的に、 μ PD (微噴凍結乾燥) 法および LN₂ (液体窒素) 凍結乾燥法後の赤血球生存率を指標として、CPPs 法の有効性と、その適用における課題を検証することを目的とする。

3.2. 実験・評価方法

3.2.1. 赤血球の分離

成人男性のボランティアからインフォームドコンセントを得た上で、静脈血を採血した。採血には、抗凝固剤を添加した注射器または採血管を用いた。採取した全血から、リンパ球分離溶液 (d=1.119) (ナカライテスク株式会社) を用いて遠心分離 (700×g で 30 分間、室温) により赤血球を分離した。血漿層とバフィーコート層を除去し、赤血球回収した。

3.2.2. 高浸透圧インキュベーション(従来法)

トレハロース細胞内導入緩衝溶液を先行文献⁹⁴を参考し、以下のように調製した。グルコース (24.1 mM (林化学))、アデニン (0.43 mM)、塩化ナトリウム (33.3 mM)、マンニトール (8.9 mM)、リン酸二水素カリウム (1.06 mM)、およびリン酸水素二カリウム (5.6 mM) を純水に溶解し、pH を 7.4 に調整した。

この溶液に最終濃度が 800 mM となるようにトレハロース（ナカライテスク社製）を添加した。分離した赤血球を上記の緩衝溶液に懸濁し、最終ヘマトクリット値が 10%となるように調整した。この懸濁液をガラスプレートに 15 mL ずつ分注し、37°C、5% CO₂の細胞培養器内で、3 時間、6 時間、9 時間および 16 時間インキュベートした。赤血球への損傷を調査する対照実験として、トレハロースを含まない同上の緩衝溶液でもインキュベーションを行った。

3.2.3. 細胞膜透過性ペプチド（CPPs）法（新規導入法）

細胞膜透過性ペプチド（CPPs）として、GenScript 社に委託合成した「KRKRWHW」（純度 98%以上）を用いた。CPPs は使用時まで−20°Cで冷凍保管し、使用直前に室温にて融解した。PBS（タカラバイオ社製）で懸濁した分離赤血球（最終ヘマトクリット値 10%）に対し、Table 3.1 に示す 6 条件となるよう CPPs およびトレハロース溶液を添加した。その後、37°C、5% CO₂条件下で 4 時間インキュベートした。なお、全条件において外液のトレハロース濃度は 300 mM で統一した。解析にあたっては、条件 5（only PBS）を陰性対照（Negative Control）として溶血率の変化を算出した。また、条件 6（CPPs 7.5 mM のみ）を設定することで、本実験で用いた CPPs 濃度域における膜損傷リスクの有無を検証した。

Table 3.1 CPPs concentration conditions

1	2	3	4	5	6
CPPs 30mM, Trehalose 300mM	CPPs 15mM, Trehalose 300mM	CPPs 7.5mM, Trehalose 300mM	Trehalose 300mM	Control(onlyPBS)	CPPs 7.5mM

3.2.4. トレハロース導入効率の評価

細胞内に導入されたトレハロースの定量は、アントロン法⁹⁵を用いて行った。トレハロースを導入した赤血球および導入していない対照赤血球の両方について、以下の手順で分析を行った。トレハロース導入後の赤血球懸濁液 0.5 mL を、350×g、3 分間の条件で遠心分離し、沈殿した赤血球ペレットを回収した。このペレットに 80%メタノール 4 mL を加えて混合し、細胞を溶血させるとともに、トレハロースを抽出した。この溶液を 85°Cのウォーターバスで 45 分間インキュベートした後、200 x g、10 分間遠心分離することで、不溶性画分を沈殿させた。上清（トレハロース抽出液）を慎重に回収し、真空オーブン（SIBATA 社製、BV-001 型）で一晩乾燥させた。乾燥物を純水 4 mL で再溶解し、アントロン反応のサンプルとした。この反応は、硫酸酸性溶液中で糖が青緑色に呈色する呈色反応である。トレハロース水溶液 3 mL とアントロン試薬 6 mL を混合し、100°Cの沸騰浴で

3 分間反応させた後、氷水で急冷した。その後、630 nm の波長における吸光度を分光光度計（HITACHI、F-7100）で測定した。トレハロース濃度は、事前に作成した検量線と照合して算出した。

3.2.5. 赤血球の溶血率評価

赤血球の溶血率は、トレハロース導入前後および再水和後のサンプルについて、Drabkin 法を用いて定量的に評価した⁶³。

3.2.6. 光学顕微鏡を用いた赤血球の形態観察

赤血球の形態学的観察には、以下の光学顕微鏡を使用した。オリンパス社製の光学顕微鏡（BX51）、キーエンス社製の光学顕微鏡（VHX-X1）を用い、明視野観察法で評価した。

3.2.7. 凍結融解実験（高浸透圧インキュベーション法で処理サンプルのみ実施）

トレハロース導入後、細胞外のトレハロースを取り除くために、赤血球の洗浄を行った。まず、トレハロース導入後の赤血球懸濁液を遠心分離し、上清を慎重に除去した。その後、沈殿した赤血球に PBS を加えてピペッティングで再懸濁し、再度遠心分離を行った。この洗浄操作 2 回行い、上清を除去した。最後に、沈殿した赤血球を凍結緩衝溶液に再懸濁し μ PD 噴霧凍結実験・LN₂ 浸漬凍結を行った。 μ PD で噴霧された液滴は、凍結チャンバー内で氷粒子となり、-20 °C に設定したペルチェ素子上の回収皿に回収された。LN₂ 浸漬凍結法において、6 mL のガラス製バイアル瓶へ 0.5 mL の赤血球緩衝溶液を入れ、バイアル瓶を LN₂ 中へ 5 分間浸漬させ、凍結した。凍結したサンプルは、37°C のウォーターバスに 5 分間浸して融解した。融解後のサンプルは溶血率測定、顕微鏡観察で用いた。

3.2.8. 凍結乾燥条件①（初期評価：高浸透圧インキュベーション法で処理サンプル）

この乾燥条件は、他の生物試料の凍結乾燥で安定した結果が得られた条件を参考に設定した。この条件は、高浸透圧インキュベーション法で処理したサンプルに適用し、LN₂ 凍結法と μ PD 凍結法の両方を用いて初期評価を行った。LN₂ 凍結法では、サンプルをガラスバイアル瓶に収容し、液体窒素に 5 分間浸漬させて急速凍結させた後、 μ PD 装置内のペルチェ素子上で Table 3.2 条件にて真空乾燥を行った

Table 3.2 Drying Condition①

Step (Process)	Freezing	Primary Drying		Secondary Drying
Shelf Temperature	-20 °C	-10 °C	0 °C	20 °C
Drying Time	-	1hr	17hr	5hr

3.2.9. 凍結乾燥条件②（最適化の試み：高浸透圧インキュベーション法で処理サンプル）

赤血球の先行研究で最も安定した乾燥が可能であると報告されている条件³⁵に基づき、新たな乾燥条件②を検討した。この条件では、一次乾燥の棚温度をより低温の-35°Cに設定することで、凍結乾燥プロセス中の赤血球へのダメージを最小限に抑えることを試みた。Rindler らは棚温度が-35°Cより高い場合、乾燥中に構造的損傷が発生する可能性が高まると報告している。具体的には、ガラス転移、結晶化、または崩壊温度といった損傷温度を超えることで、細胞に致命的なダメージが生じるためである。一方、棚温度をさらに-35°Cより低く設定しても、安定性は改善されず、むしろ低下することが報告されている。これは、棚温度の低下に伴い、水分輸送の駆動力が減少するためである。水分輸送の駆動力が不十分になると、特に拡散抵抗が非常に高い細胞内領域において、細胞内の脱水が不完全になる可能性がある。したがって、-35°Cは、構造的損傷のリスクと細胞内脱水の不完全性というリスク双方を回避しながら、細胞内の十分な脱水を達成するために必要な水分輸送の駆動力を維持できる、最適なバランス点として機能する³⁵。

この条件は、トレハロースの有無が凍結乾燥後の赤血球に与える影響を検証するために、 μ PD 噴霧凍結法にのみ適用した。具体的なプロセスは Table 3.3 に示す通りである。

Table 3.3 Drying Condition②

Step (Process)	Freezing	Primary Drying	Secondary Drying
Shelf Temperature	-35 °C	-35 °C	20 °C
Drying Time	-	36 hr	36 hr

3.2.10. 凍結乾燥条件③（新規 CPPs 法の適用）

CPPs 法で処理したサンプルに対しては、LN2 凍結法と μ PD 凍結法の両方を用いて凍結を行った。その後、高浸透圧法で得られた知見を応用し、別の乾燥条件で評価を行った。

この凍結乾燥条件は、一次乾燥および二次乾燥の温度を段階的に上昇させることで、乾燥プロセス中の細胞へのダメージを最小限に抑えつつ、効率的な乾燥を試みることを目的とした。具体的なプロセスは以下の Table 3.4 に示す通りである。

Table 3.4 Drying Condition③

Step (Process)	Freezing	Primary Drying	Secondary Drying
Shelf Temperature	-35 °C	-35 °C	-35°C to 20 °C
Drying Time	-	24 hr	+10 °C per 1hr

3.2.11. 再水和方法

凍結乾燥後の赤血球粉末は、37° C に加温した純水を用いて再水和した。再水和には 37° C に予熱した超純水が用いられ、ピペッティングによって操作された。添加する水の体積は、乾燥前のサンプル体積と同等量とした。再水和温度として 37° C を選択した根拠は、TÖRÖK らによる先行研究の報告に基づくものである。TÖRÖK らの研究では、凍結乾燥 RBCs を 4° C、23° C、30° C、37° C、および 40° C の各温度で再水和し、生存率を比較した結果、37° C において最も高い生存率が達成されたと報告されている³³。

3.3. 結果

3.3.1. 高浸透圧インキュベーション法によるトレハロース導入定量

細胞内トレハロース濃度は、導入時間の経過に伴い増加した(Figure 3.2 参照)。最も高い濃度は導入時間 16 時間後に確認され、52 mM に達した。3 時間後には、6.3 mM、6 時間後には 13.7 mM、9 時間後には 17.3 mM のトレハロース導入濃度であった。

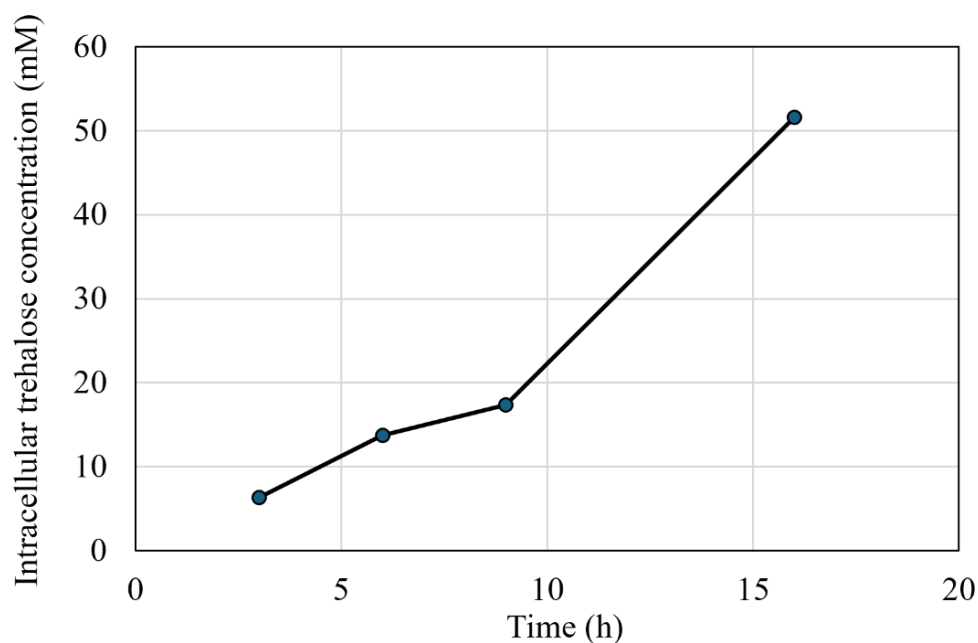


Figure 3.2 Intracellular trehalose concentration in RBCs at 3, 6, 9, and 16 hours post-loading(n=1).

赤血球の形態変化を評価するため、トレハロース導入後 0、3、6、9、および 16 時間の時点でサンプルを採取し、光学顕微鏡で観察した(Figure 3.3 参照)。インキュベーション時間が増えるにつれて、異形な赤血球が多く観察された。高浸透圧環境に赤血球が曝された際の浸透圧勾配に従った細胞外への水の急速な流出であると考ええる。この水の損失は、細胞容積の減少を引き起こし、その結果、赤血球は特徴的な形態変化、すなわち表面に多数の突起を持つ収縮した状態へと変化する⁹⁶。

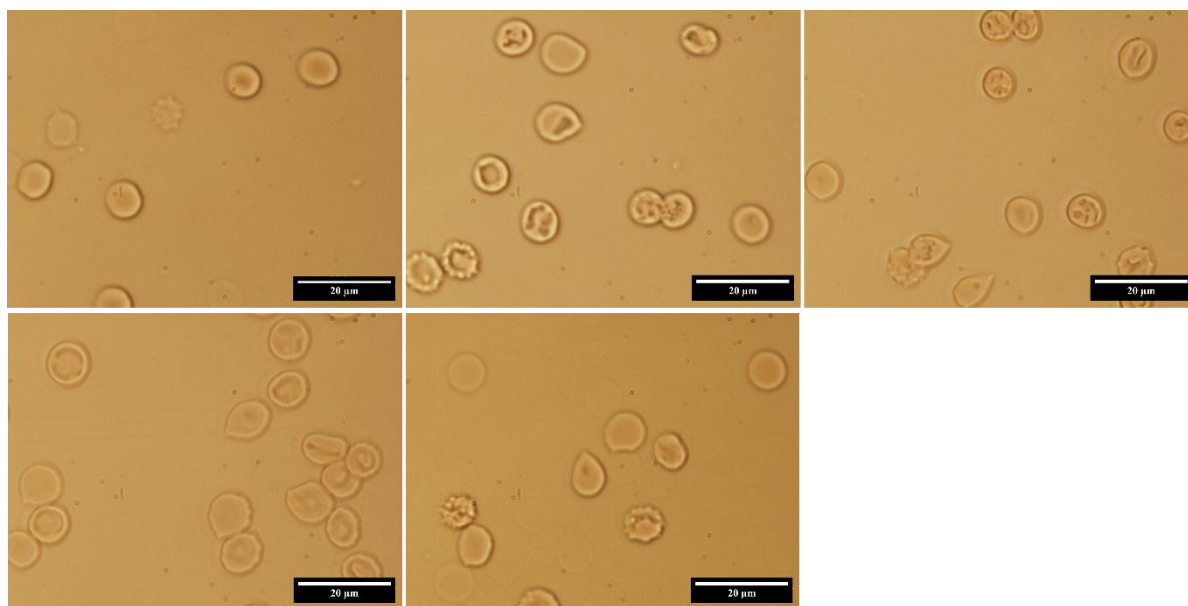


Figure 3.3 Optical micrographs of RBCs showing morphology (Top row, left) before incubation, and after (Top row, center) 3 h, (Top row, right) 6 h, (Bottom row, left) 9 h, and (Bottom row, right) 16 h of trehalose loading.

一方、溶血率は、実験の主要な評価項目である初期;トレハロース導入前（0時間）、中間（6時間）、最終;導入後（16時間）の高浸透圧条件下における溶血率を定量的に把握することを目的として測定した(Figure 3.4 参照)。トレハロースを添加していない対照群では、16時間後の溶血率の増加はわずか 3.1p.p. (1.8%から 4.9%)にとどまった。一方、トレハロースを添加した群では、溶血率は 16.9 p.p.上昇し (4.9%から 21.8%)、対照群と比較して顕著な溶血が確認された。この結果は、高浸透圧環境が赤血球に与えるストレスが、時間経過とともに蓄積し、細胞の健全性を著しく損なうことを示唆している。

Brocker らは、高浸透圧ストレスは哺乳類の細胞および組織に以下の多様な影響を引き起こすことを主張している⁹⁶。細胞からの水分の急速な流出を促進し、その結果、細胞の収縮と細胞内脱水を引き起こし、細胞の収縮は、細胞骨格に大きな機械的ストレスを与える。さらに細胞内の水分損失は、活性酸素種（ROS）の生成を増加させ、酸化ストレスを直接的に誘発する。酸化ストレスによって、ヘモグロビンの酸化、細胞の抗酸化能力の消耗、膜リン脂質の過酸化、および膜タンパク質の分解といった一連の損傷が複合的に作用し、赤血球が極度の酸化炎症にさらされると、その膜の柔軟性が失われ、過度に膨張した結果、最終的に溶血（細胞の破裂）に至る⁹⁷。

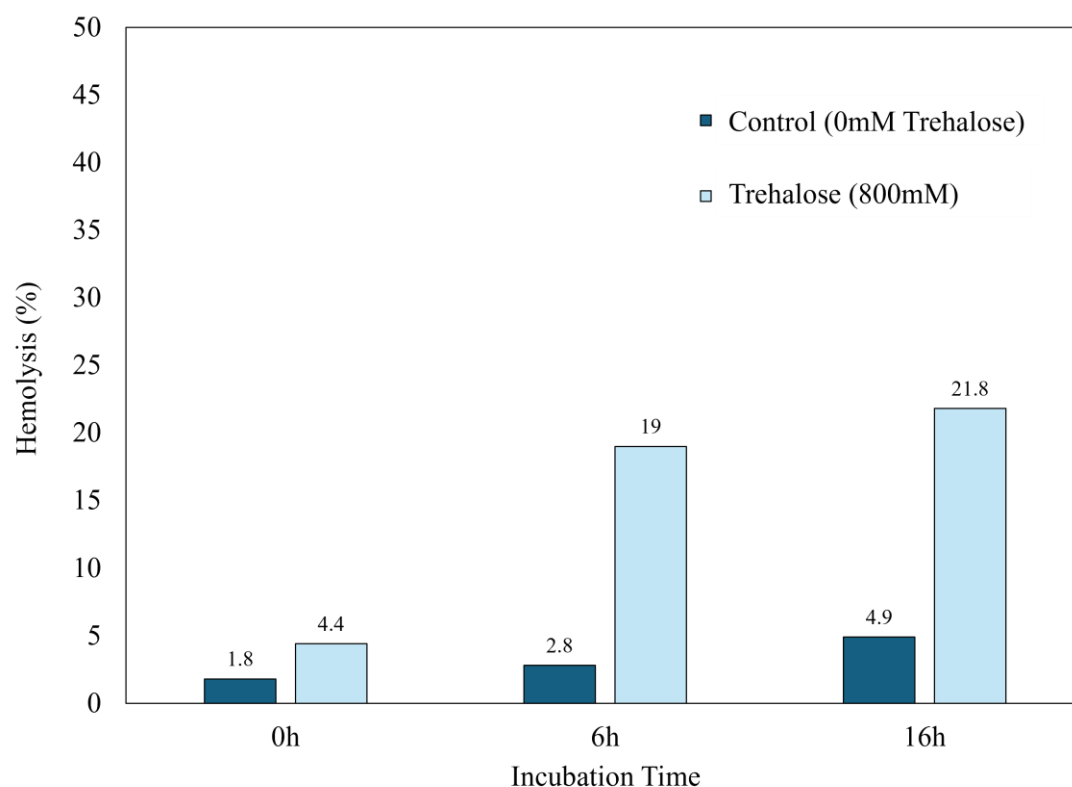


Figure 3.4 Time Course of Hemolysis Rate during Hyperosmotic Incubation (at 6 h and 16 h)(n=1).

3.3.2. トレハロースの有無が凍結融解後の溶血率に与える影響

トレハロースの導入時間と濃度が、 μ PD 噴霧凍結融解後の赤血球の溶血率に与える影響を評価した。トレハロース導入前 (0 時間)、中間 (6 時間)、および導入後 (16 時間) の時点による μ PD 噴霧凍結融解後の溶血率と顕微鏡観察の違いを示す(Figure 3.5・Figure 3.6 参照)。 μ PD 噴霧凍結融解後、トレハロースを導入していない対照群 (0 時間) の溶血率は、92%と非常に高い値を示した。これは、トレハロースによる保護がない状態では、赤血球が凍結融解ストレスに耐えられないことを示唆している。

一方、高浸透圧インキュベーションによりトレハロースを導入した群では、細胞内トレハロース濃度に応じて異なる結果が得られた。細胞内濃度が 25.8 mM であった 6 時間インキュベーション群では、溶血率が最も低い値 79%となった。しかし、最も高い 52 mM のトレハロースが導入された 16 時間インキュベーション群では、6 時間サンプルよりも凍結融解後の溶血率が高い結果 84%となった。これら両群の差については、本実験系における個体差や測定精度のばらつきの範囲内である可能性も否定できないが、少なくとも細胞内へのトレハロース導入が、未導入 (0 時間) と比較して μ PD 噴霧凍結融解後の生存率を一

定程度向上させる傾向は確認された。

しかし、生存率の向上効果はトレハロース濃度に単純に比例するわけではなく、特定の至適濃度が存在する可能性、あるいは導入工程そのものが細胞に与える影響を考慮する必要がある。16 時間という長時間のインキュベーションは、細胞内に高濃度のトレハロースを導入できる一方で、高浸透圧条件下で細胞から水分を過剰に奪い、細胞膜に物理的な損傷を与える事前損傷を引き起こしている可能性が考えられる。実際に、インキュベーション後の溶血率自体が時間経過とともに増加していたことから、16 時間群では凍結融解ストレスに加えてこの累積的なストレスが加わり、結果として 6 時間群と比較して溶血率が好転しなかったと考えられる。

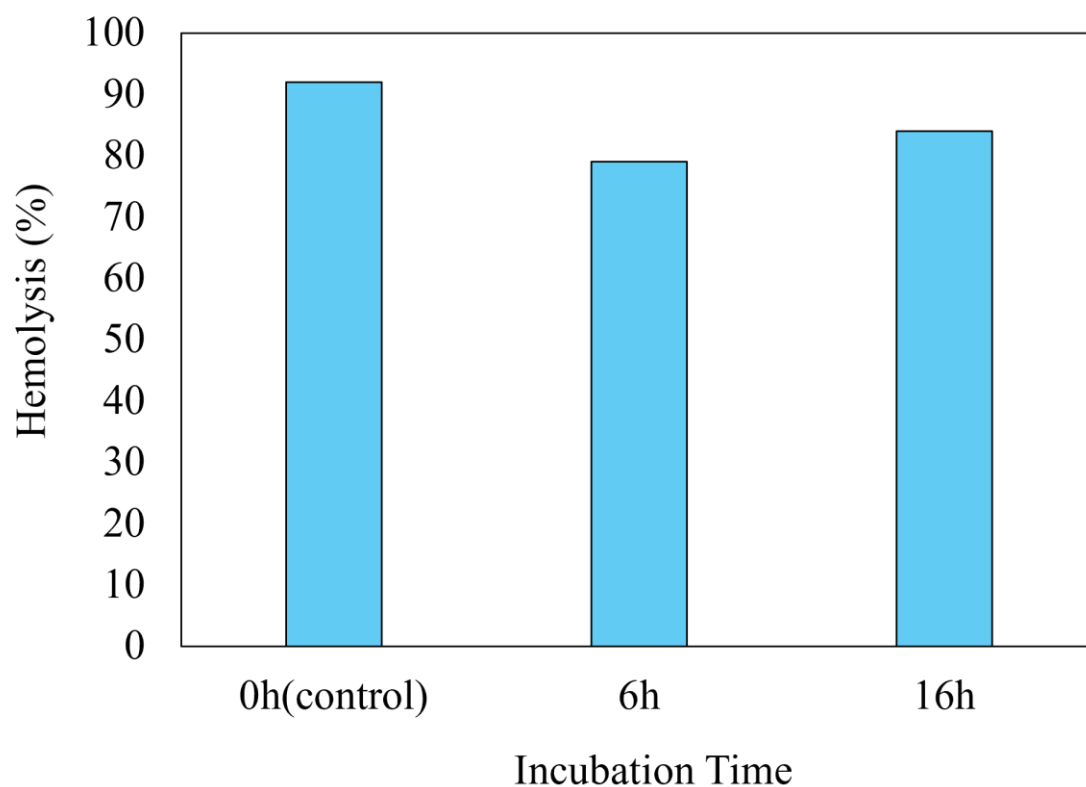


Figure 3.5 Hemolysis rate of red blood cells after μ PD spray freezing-thawing, following hyperosmotic incubation for 0 (pre-incubation), 6, and 16 hours(n=1).

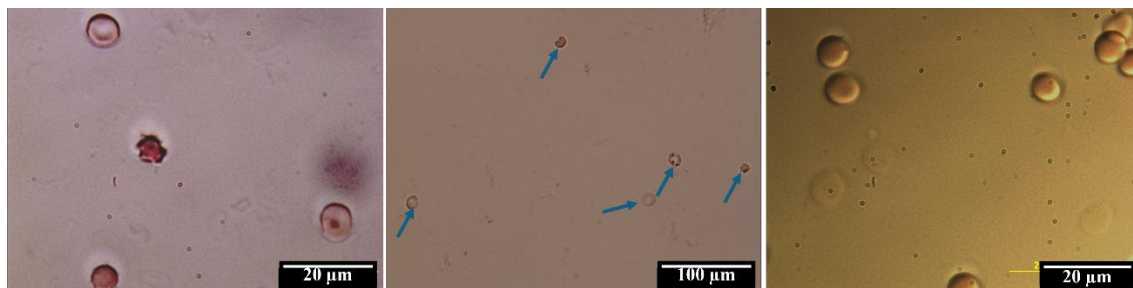


Figure 3.6 Optical micrographs of red blood cells (RBCs) after μ PD spray freezing-thawing. The cells were subjected to hyperosmotic incubation for (Left) 0 h (pre-incubation), (Center) 6 h, and (Right) 16 h prior to freezing.

3.3.3. 凍結方法の違いによる溶血率の違い

高浸透圧インキュベーションによる 16 時間トレハロース導入後、 LN_2 凍結法と μ PD 凍結法それぞれの凍結融解後の溶血率を比較した。 LN_2 凍結法を用いた場合、溶血率は 77% であった (Figure 3.7 参照)。一方、 μ PD 凍結法では、溶血率は 84% となり、 LN_2 凍結法がわずかに溶血を抑制する結果となった。光学顕微鏡での凍結融解後の赤血球の形態観察画像を Figure 3.8 に示す。その結果、両凍結手法のサンプルとも、形態的に大きな違いは観察されなかった。

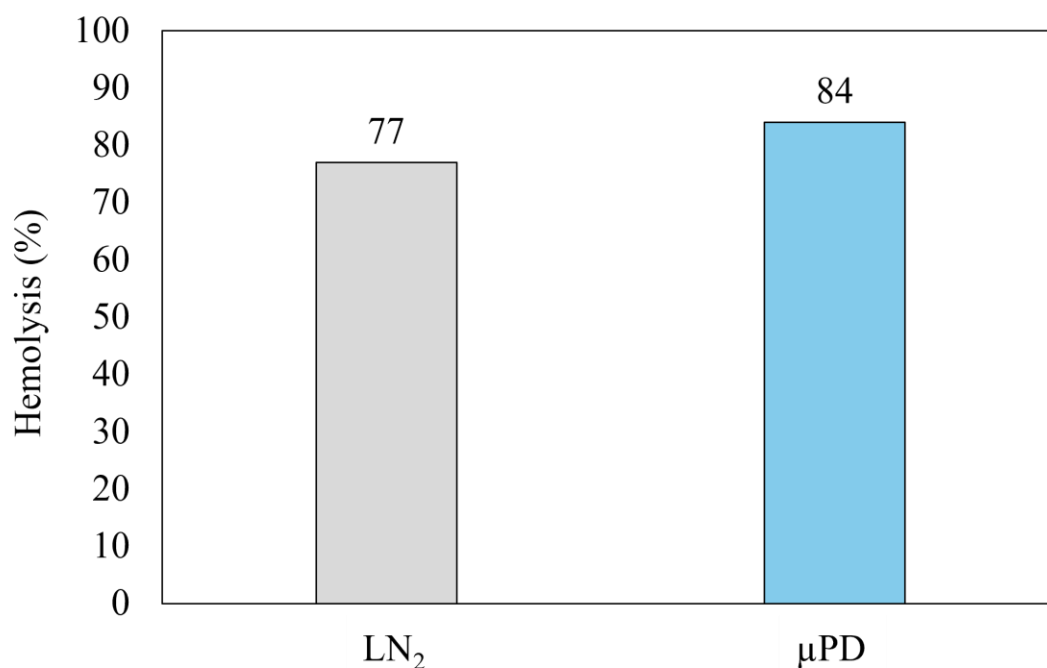


Figure 3.7 Comparison of hemolysis rates between LN₂ and μPD freezing methods for samples subjected to 16 hours of hyperosmotic incubation (n=1).

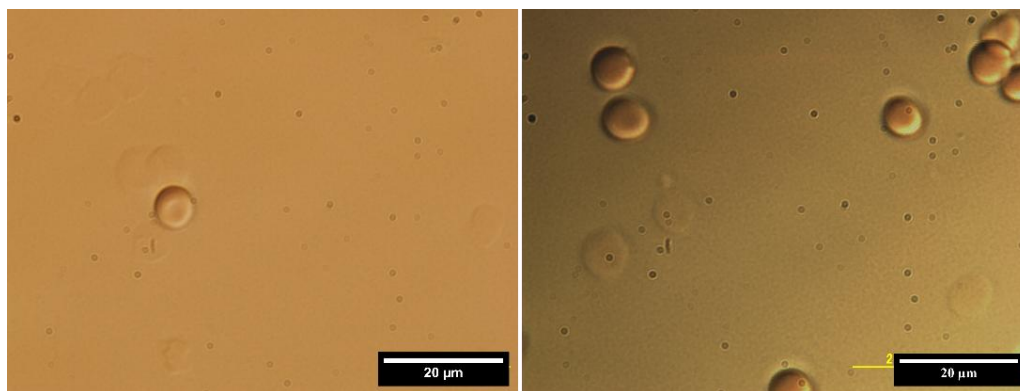


Figure 3.8 Post-thaw morphology of RBCs frozen using (Left) the LN₂ method and (Right) the μPD method.

3.3.4. トレハロースの有無が μPD 噴霧凍結乾燥後の溶血率に与える影響

トレハロース導入の有無が、μPD 噴霧凍結乾燥後(乾燥条件②)の赤血球の溶血率に与える影響を検証した (Figure 3.9 参照)。16 時間のトレハロース導入後の凍結乾燥前の溶血率は 20%であった。μPD 噴霧凍結乾燥および再水和後、トレハロースを導入した赤血球の溶血率は 78%となった一方、トレハロースを導入していない赤血球の溶血率は 89%に達し

た。両群間には 11%の溶血率の差が確認された。この実験で導入された細胞内トレハロース濃度は 67 mM であった。顕微鏡観察画像を Figure 3.10 に示す。

本実験の結果、細胞内トレハロースの有無が、 μ PD 噴霧凍結乾燥後の赤血球の溶血率にわずかな差をもたらすことが明らかになった。乾燥工程において、トレハロースは細胞内の水分が蒸発する際に、その水分子の代わりに細胞膜のリン脂質やタンパク質と水素結合を形成する。これにより、乾燥による細胞膜の構造的損傷やタンパク質の変性を防ぎ、細胞の機能を維持する。さらに、高濃度のトレハロースは、非晶質のガラス状態を形成し、細胞全体を物理的に固定する。これにより、細胞の分子運動が抑制され、乾燥ストレスによるダメージを効果的に軽減できた可能性が考えられる。

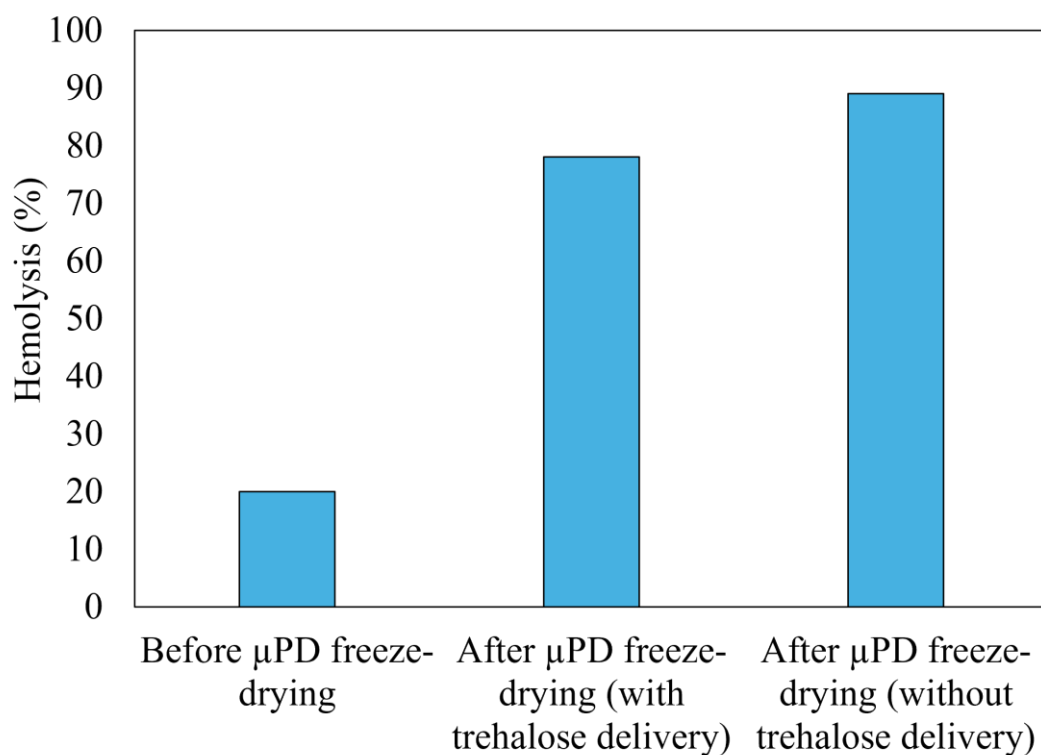


Figure 3.9 Effect of Trehalose Loading on the Post-Lyophilization Hemolysis Rate of Red Blood Cells(n=1).

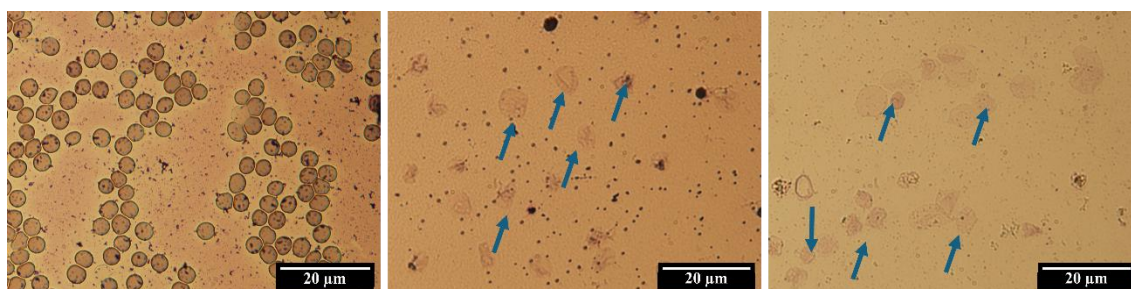


Figure 3.10 Comparison of RBCs: (Left) After 16h trehalose loading (incubation). (Center) Lyophilized-rehydrated *with* trehalose loading. (Right) Lyophilized-rehydrated *without* trehalose loading (control).

3.3.5. 凍結方法の違いによる凍結乾燥後の溶血率比較

本実験では、高浸透圧インキュベーション後の赤血球を異なる凍結方法（LN₂ 凍結乾燥と μ PD 噴霧凍結乾燥）で処理し、乾燥条件①を利用した凍結乾燥後の溶血率を比較した。LN₂ 凍結乾燥後の赤血球と μ PD 噴霧凍結乾燥後の赤血球の溶血率グラフと光学顕微鏡観察画像をそれぞれ Figure 3.11・Figure 3.12 に示す。サンプルは 16 時間のインキュベーション後、溶血率は 13%であった。LN₂ 凍結乾燥後の赤血球溶血率は 78%、 μ PD 噴霧凍結乾燥後の赤血球溶血率は 81%となった。この結果から、どちらの凍結乾燥手法も、凍結乾燥前の状態と比較して溶血率が大幅に上昇することが明らかになった。また、光学顕微鏡観察により、凍結乾燥再水和後の赤血球は、凍結乾燥前と比較して細胞の立体性が大きく失われていることが確認された。

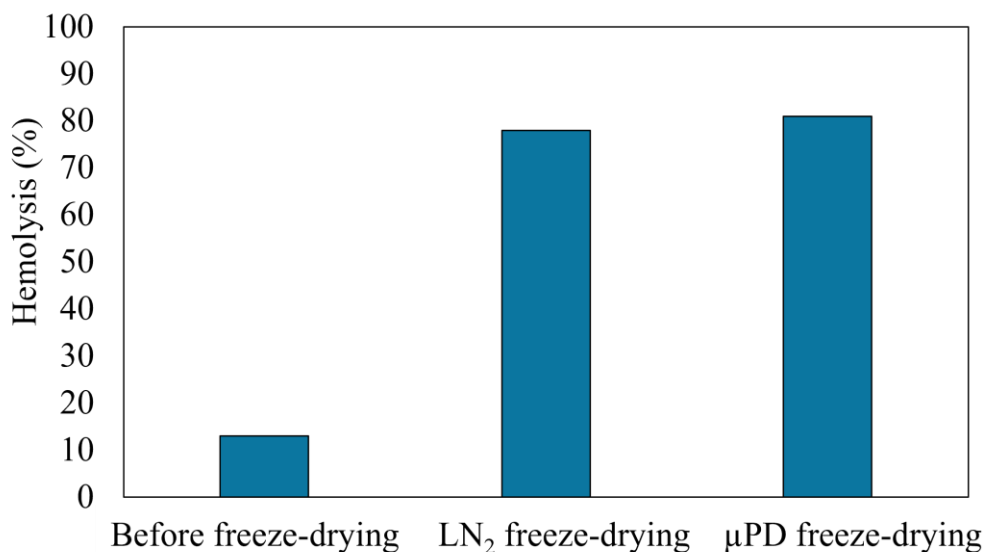


Figure 3.11 Hemolysis Rate of Red Blood Cells After Rehydration Following Two Different Lyophilization Methods(n=1).

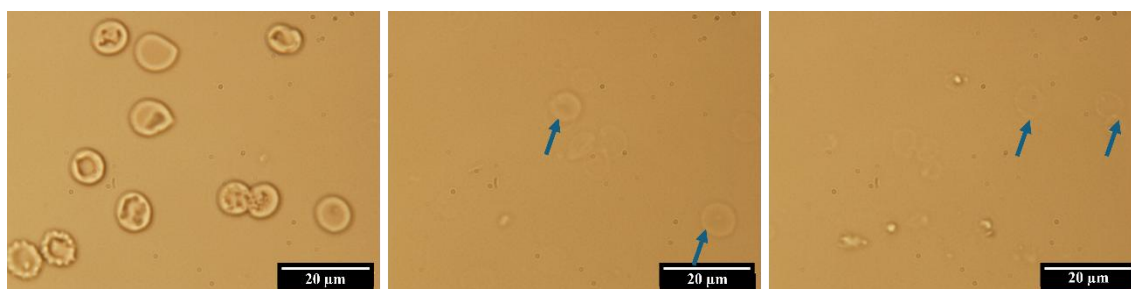


Figure 3.12 Optical micrographs of red blood cells (RBCs): (Left) After incubation (pre-lyophilization). (Center) After lyophilization-rehydration using LN₂ freezing. (Right) After lyophilization-rehydration using μPD freezing.

3.3.6. CPPs 濃度がトレハロース導入効率と溶血に与える影響

6 つの異なる条件におけるトレハロース導入実験の結果を Table3.5、Figure 3.13 に示す。トレハロースは CPPs を用いて効率的に赤血球内に導入されたが、その導入効率は CPPs の濃度に依存することが確認された。最も高い CPPs 濃度 (30 mM) とトレハロース濃度 (300 mM) の組み合わせで、最も多くのトレハロース(6.8mM)が細胞内に導入された。CPPs 濃度が低下するにつれて、細胞内に導入されるトレハロース濃度も減少した。CPPs の数が増えることで、赤血球膜に作用するペプチドの量が増加し、これにより、より多くの細胞膜の透過経路が形成され、トレハロースが細胞内に流入しやすくなったためと考え

る。一方で、CPPs 7.5 mM を用いた条件(2.7mM)では、トレハロース単独の群(3.4mM)と比較して、細胞内へのトレハロース導入濃度がほぼ同等であった。これは、CPPs 7.5 mM という濃度が、効果的な膜透過経路の形成に必ずしも十分ではなく、この濃度範囲ではトレハロースの浸透圧効果による自然な導入が CPPs による促進効果と相同程度であることを示唆している。

CPPs 濃度の上昇に伴い、溶血率も増加する傾向が見られた。CPPs 濃度が最も高い 30 mM の条件では、細胞内に高濃度のトレハロースが導入された一方で、細胞溶血率も最も高い結果(58.3%)となった。対照実験として、CPP のみを添加した群 (CPPs 7.5 mM) では導入濃度 0.9mM、PBS のみの群 (Control) では、0.61mM と細胞内へのトレハロース導入はほとんど見られず、溶血率も低く抑えられた。このことから、CPPs が細胞膜の透過性を高める過程で、トレハロースが共存することが、細胞膜への損傷を増大させ、溶血を引き起こす可能性が示唆される。

具体的には、CPPs の作用によって細胞膜の透過性が高まった状態で、細胞外の高濃度トレハロースが細胞内に流入すると、細胞内の浸透圧が急激に変化する。この急激な浸透圧の変動が細胞膜に過度なストレスを与え、最終的に膜の破裂、すなわち溶血を引き起こしたと推測する。

Table3.5 The Hemolysis and Intracellular Trehalose Level(Concentrations) of each conditions

	CPPs 30mM, Trehalose30 0mM	CPPs 15mM, Trehalose30 0mM	CPPs 7.5mM, Trehalose30 0mM	Trehalose30 0mM	Control (only PBS)	CPPs 7.5mM only
Hemolysis (%)	58.3	15.8	9.7	6.0	4.5	4.8
Intracellular Trehalose Level(mM)	6.8	5.2	2.7	3.4	0.6	0.9

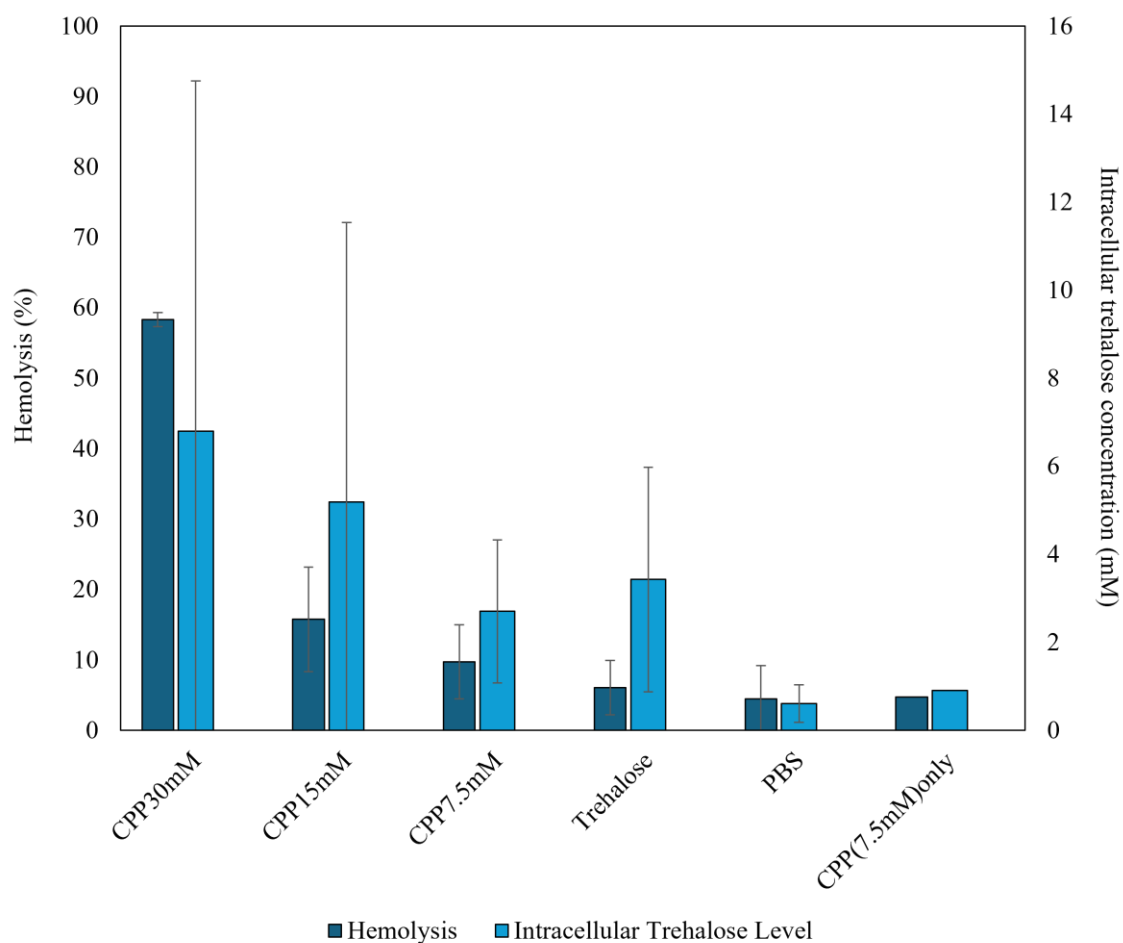


Figure 3.13 Intracellular trehalose concentration and hemolysis rate in CPPs-mediated trehalose loading into red blood cells. Data are expressed as mean $\pm$ SD (CPPs 30 mM: n=3, 15 mM: n=5, 7.5 mM: n=5, Trehalose: n=6, PBS: n=6, CPPs only: n=2).

また、CPPs およびトレハロースの導入条件が赤血球の形態に与える影響を、光学顕微鏡観察により評価した (Figure 3.14)。トレハロースや CPPs を添加していない PBS のみの対照群では、赤血球は正常な円盤状形態を保っていた。CPPs とトレハロースを共存させた群では、CPPs の濃度が高くなるにつれて、赤血球の形態に変化が観察された。特に、CPPs 濃度が最も高い条件では、細胞の溶血が顕著に見られた。

これらの観察結果は、CPPs の濃度依存的な溶血を示唆しており、定量的な溶血率評価と一致する傾向が見られた。

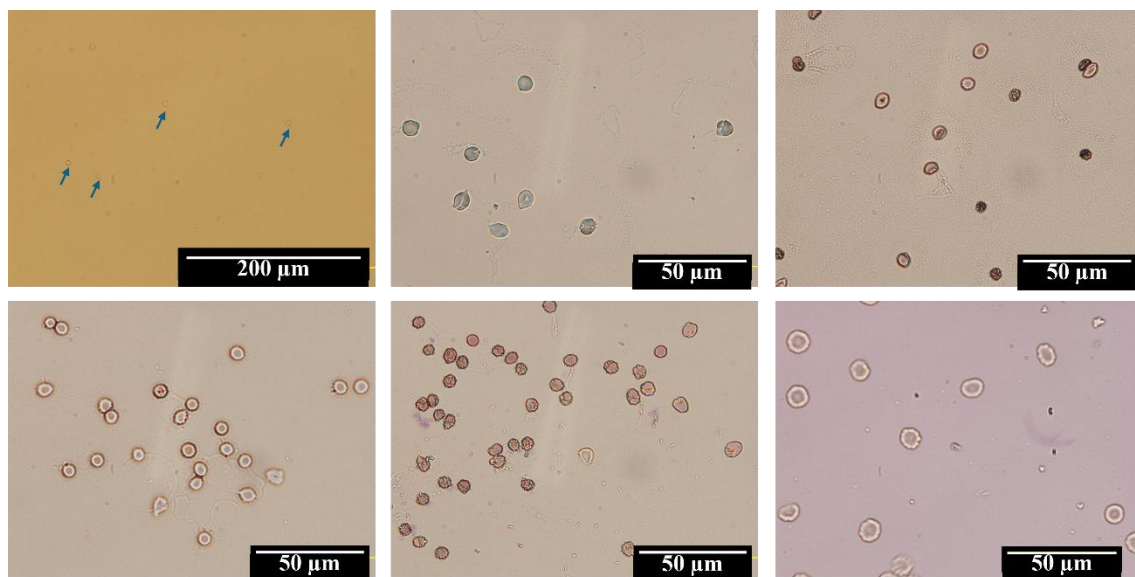


Figure 3.14 Morphological changes of red blood cells (RBCs) during trehalose loading using CPPs. Top row: Co-incubation with 300 mM trehalose and varying CPPs concentrations: (Left) 30 mM CPPs, (Center) 15 mM CPPs, (Right) 7.5 mM CPPs. Bottom row: Control conditions: (Left) 300 mM trehalose alone, (Center) Control (no CPPs or trehalose), (Right) 7.5 mM CPPs alone.

3.3.7. 凍結乾燥方法と CPPs 濃度の違いによる凍結乾燥後の溶血率比較

CPPs 法においてトレハロース導入後の凍結乾燥実験では、高い溶血率を示した CPPs 30 mM の条件ではなく、次にトレハロース取り込み量が多かった CPPs 15 mM のサンプルを使用した。この判断は、高浸透圧法 16 時間後の溶血率に近い値であり、導入量と細胞の溶血度のバランスを考慮した。本研究では、異なる CPPs 濃度が LN₂凍結乾燥法および μ PD 凍結乾燥法後の赤血球溶血率に与える影響を評価した。このグラフ (Figure 3.15)は、異なる 4 つの CPPs 濃度における、LN₂凍結乾燥法と μ PD 凍結乾燥法後の赤血球溶血率を示している。 μ PD 凍結乾燥法では、CPPs 濃度が 7.5 mM のときに最も低く、PBS のみ(CPPs なし、トレハロース無し)のサンプルが最も高かった。また、LN₂凍結乾燥法では、CPPs 濃度が 15 mM のときに最も低い溶血率を示した。しかし、 μ PD 法で最も低い溶血率を示した 7.5 mM の CPPs 濃度では、LN₂凍結乾燥後の生存率は最も高い結果となった。

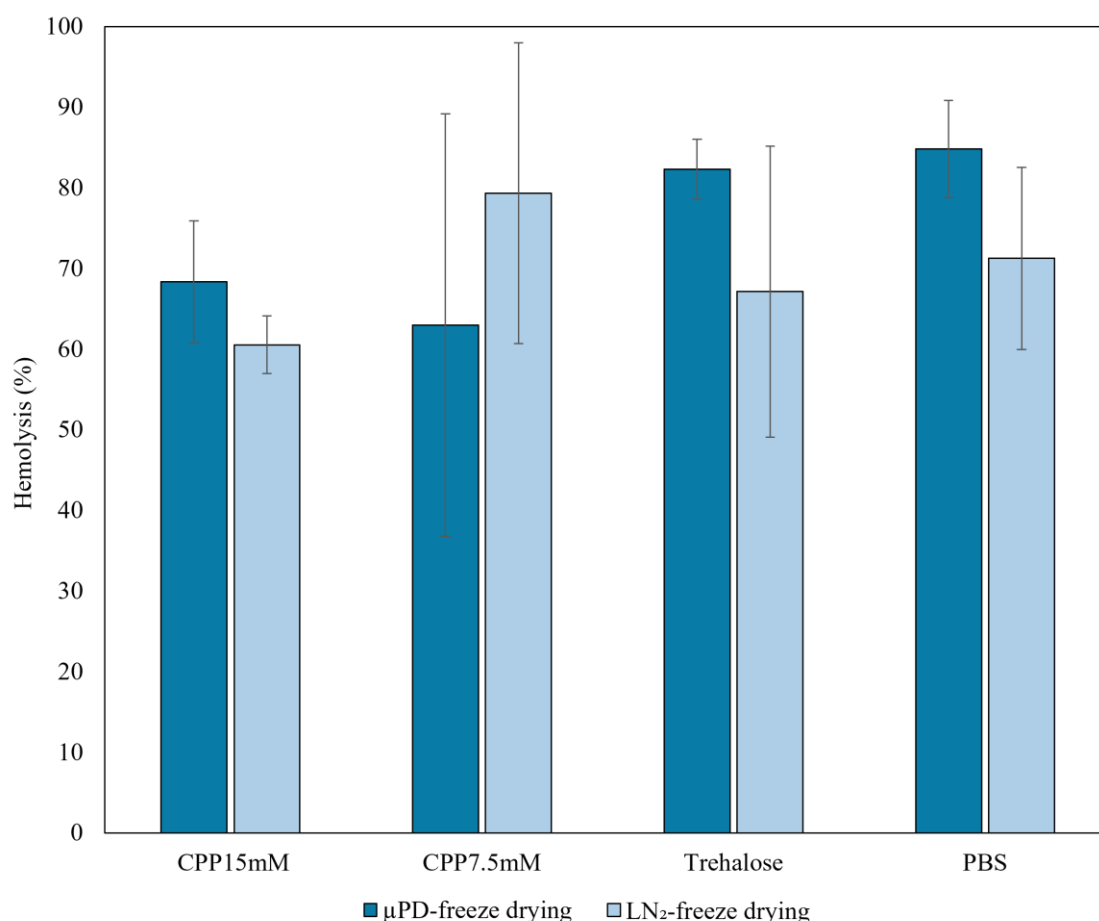


Figure 3.15 Post-Lyophilization Hemolysis vs. CPP Concentration for Two Different Lyophilization Protocols (n=4)

続いて、凍結乾燥前の赤血球の形態を、異なる 4 つのインキュベーション条件で比較した (Figure 3.16 参照)。トレハロースおよび CPPs を添加していない対照群では、赤血球は正常な円盤状形態を保っていた。一方、CPPs とトレハロースを共存させた群、トレハロースのみを添加した群では、形態の変形や凝集が観察された。

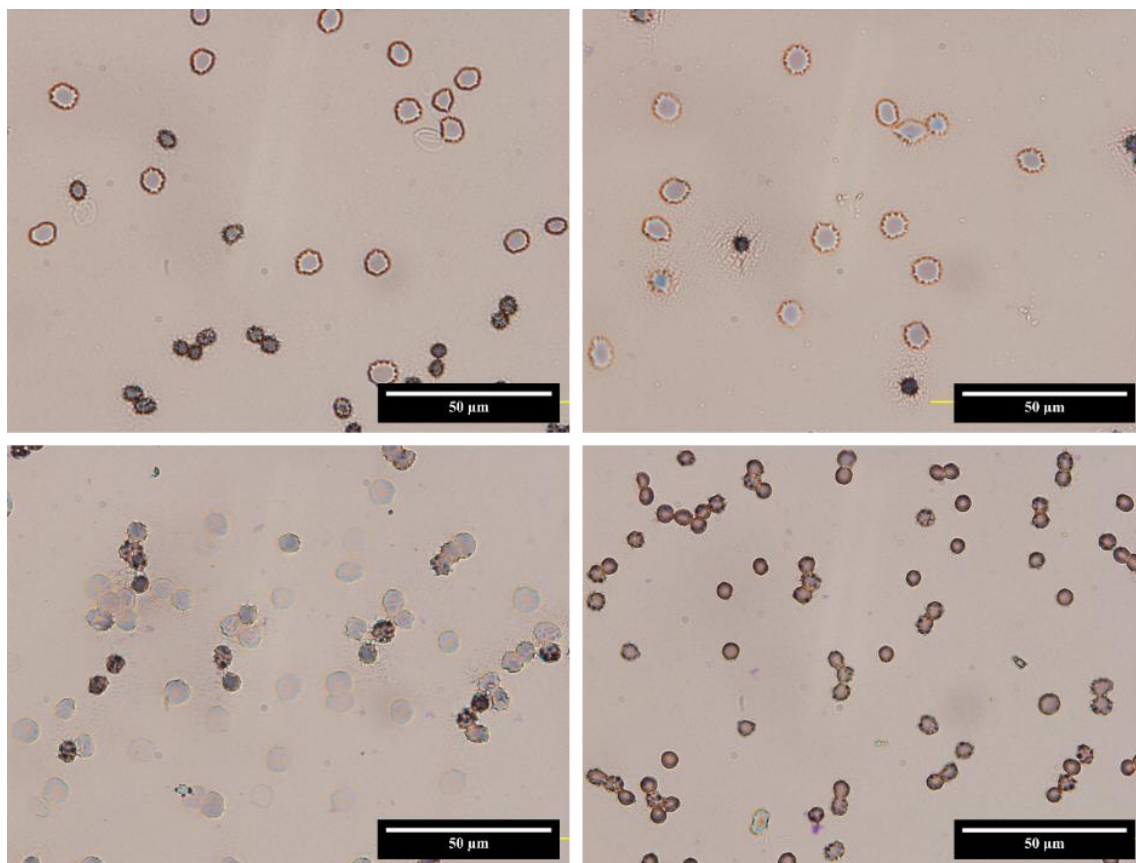


Figure 3.16 Optical micrographs of red blood cells (RBCs) before lyophilization (after incubation) under various loading conditions. Top row (co-incubation): (Left) 15 mM CPPs + 300 mM Trehalose, (Right) 7.5 mM CPPs + 300 mM Trehalose. Bottom row (controls): (Left) 300 mM Trehalose alone, (Right) Control (no CPPs or trehalose).

次にこれらのサンプルを μ PD (微噴凍結乾燥) 法および LN_2 液体窒素) 浸漬凍結乾燥法で処理した後、再水和を行い、形態を観察した。 μ PD 法凍結乾燥後の画像を Figure 3.17 に、 LN_2 浸漬凍結乾燥後の画像を Figure 3.18 に示す。凍結乾燥前のサンプルと比較すると、両手法ともに赤血球の立体性は大きく失われ、細胞膜の損傷が示唆された。しかし、 μ PD 凍結乾燥サンプルの方が、 LN_2 凍結乾燥サンプルよりも形態学的損傷が大きいことが観察された。

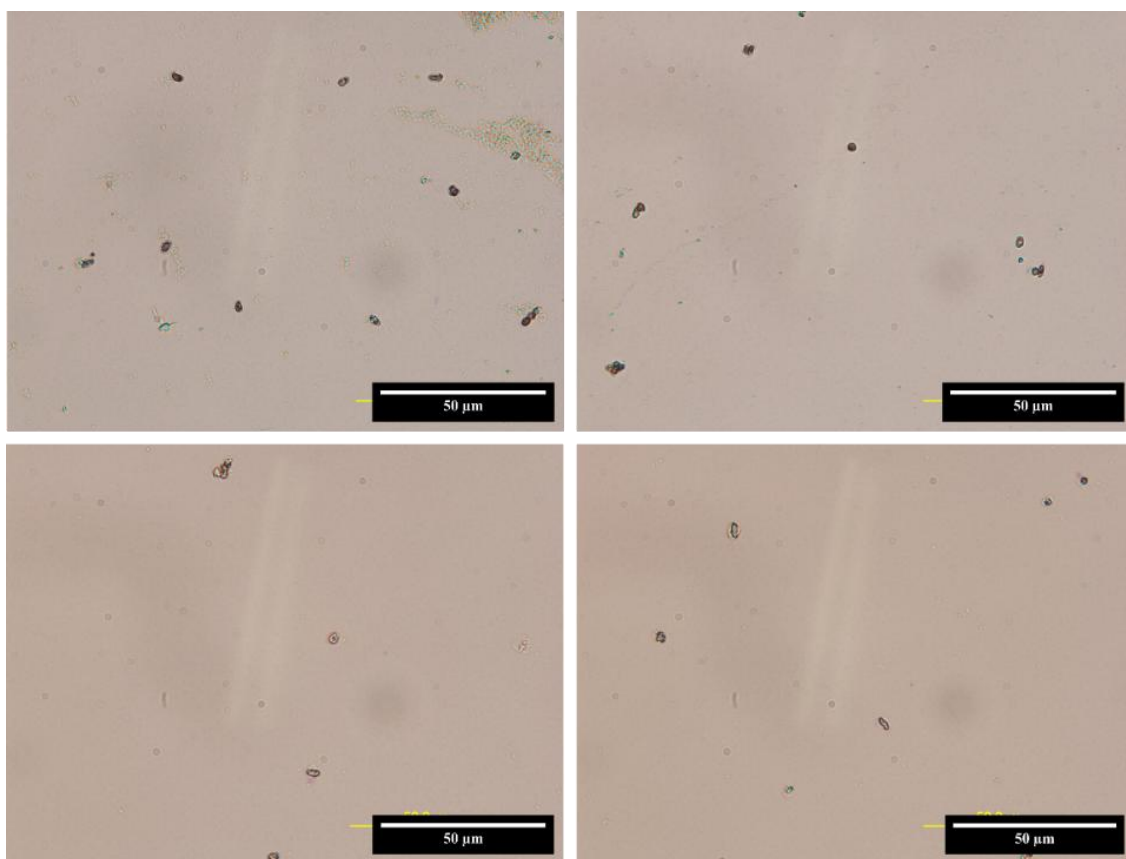


Figure 3.17 Optical micrographs of red blood cells (RBCs) after μ PD spray-lyophilization and rehydration. The cells were incubated under various conditions prior to lyophilization: Top row (CPPs + Trehalose): (Left) 15 mM CPPs + 300 mM Trehalose, (Right) 7.5 mM CPPs + 300 mM Trehalose. Bottom row (controls): (Left) 300 mM Trehalose alone, (Right) Control (no CPPs or trehalose).

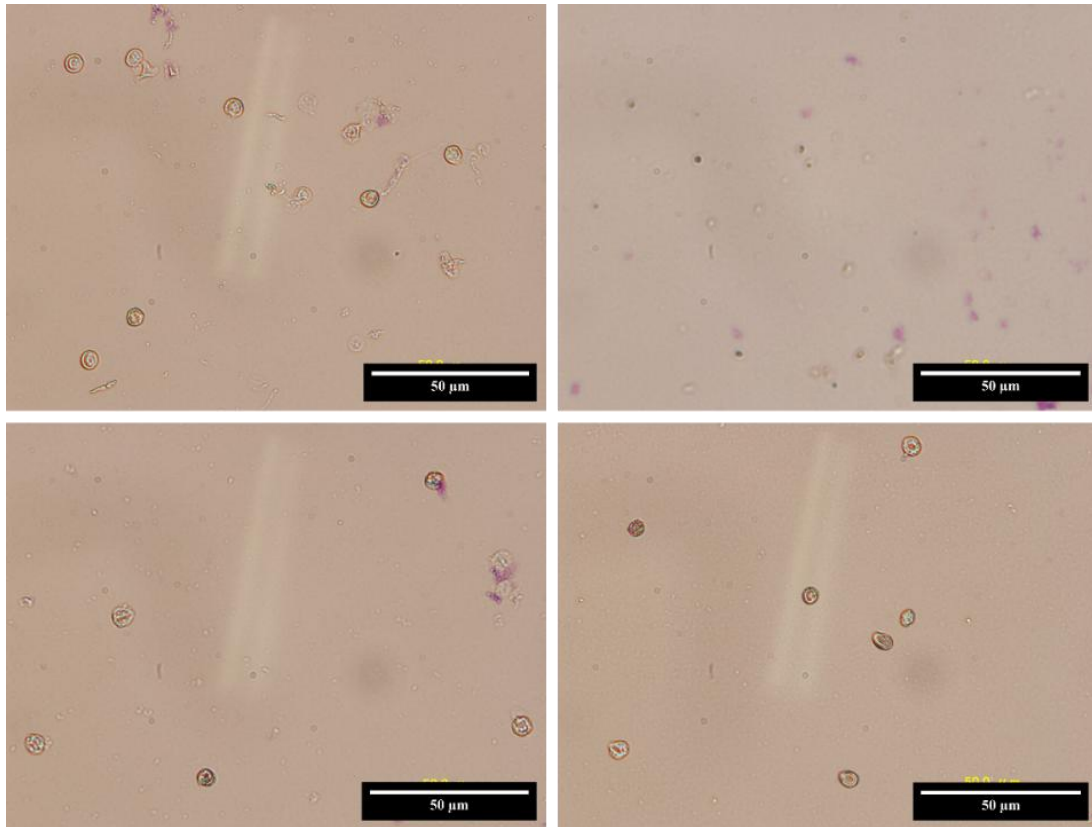


Figure 3.18 Optical micrographs of red blood cells (RBCs) after LN₂ lyophilization and rehydration. The cells were incubated under various conditions prior to lyophilization: Top row (CPPs + Trehalose): (Left) 15 mM CPPs + 300 mM Trehalose, (Right) 7.5 mM CPPs + 300 mM Trehalose. Bottom row (controls): (Left) 300 mM Trehalose alone, (Right) Control (no CPPs or trehalose).

3.4. 考察

3.4.1. 従来法と新規法のトレハロース導入効率の比較

本章では、従来の高浸透圧インキュベーション法における細胞損傷という課題を克服すべく、細胞膜透過性ペプチド (CPPs) を用いた新規導入手法の確立を目的とした。赤血球を対象に、高浸透圧法と CPPs 法を比較検証した事例は本研究が初である。高浸透圧インキュベーション法では時間経過に伴いトレハロースが段階的に導入され、6 時間で 13.7 mM、16 時間で 51 mM の導入が確認された。一方、CPPs 法では 4 時間のインキュベーションにおける導入量は 2.7~6.8 mM の範囲に留まった。同時点 (4 時間) での比較では、高浸透圧法が CPPs 法を上回る導入効率を示した。

導入量が類似する条件での溶血度 (Table 3.6) を比較すると、両手法の細胞毒性の差は

顕著であった。高浸透圧法が 800 mM という高濃度の外部トレハロースを作用させているのに対し、CPPs 法は 300 mM と比較的低濃度である。しかし、高浸透圧法では約 50 mM のトレハロースが導入された時点でも溶血度が 21.8% に維持されているのに対し、CPPs 法ではわずか 6.8 mM の導入量で溶血度が約 60% に達した。この結果から、CPPs 法は低濃度導入であっても細胞膜に対して極めて深刻な損傷を与えていることが明らかとなった。この高い溶血度の原因を探るべく、CPPs 単体 (7.5 mM) の毒性を検証したところ、溶血度は 4.7% (Table 3.6 参照) と低く維持された。これは、低濃度域において CPPs は赤血球膜に直接的な致命的ダメージを与えないことを示唆している。

本研究では、高濃度 CPP 条件における溶血メカニズムを以下のように推論する。先行研究によれば、CPPs の膜透過挙動は濃度に依存し、数 μ M の低濃度域では膜損傷の少ない経路で取り込まれるが、閾値を超えるとエネルギー非依存的な直接透過へと移行する⁹¹。高濃度下では正電荷を持つ CPPs と負電荷を持つ膜成分との静電的相互作用が過剰となり、膜の局所的な不安定化や「バレルステーブモデル」に代表される物理的な穿孔を誘発すると考えられている。本実験の 30 mM という条件は、この膜損傷閾値を遥かに上回る高濃度であったため、過剰な CPPs が赤血球膜の脂質二重層構造を物理的に崩壊させ、著しい溶血を招いたと結論付けられる。

Table 3.6 Comparison of cell damage with equivalent trehalose loads

	Incubation, 6hours	CPPs 30 mM,4hours	CPPs 15 mM	CPPs 7.5 mM	Trehalose only	CPPs 7.5 mM only
Intracellular Trehalose Level	13.7 mM	6.8 mM	5.2 mM	2.7 mM	3.4mM	0.9 mM
Hemolysis	19%	58%	15%	9.7%	6.0%	4.7%

3.4.2. 凍結・乾燥プロセスにおける赤血球の生存評価

凍結乾燥および再水和後の評価において、高浸透圧法は導入直後の溶血度が 13% と低値であったが、最終的な溶血度は μ PD 法で 81%、LN₂法で 78% に達した。対照的に、CPPs 法 (15 mM 条件) では導入直後の溶血度が 15.8% であったが、最終的な溶血度は μ PD 法で 68.3%、LN₂法で 60.5% に留まった。この数値の逆転は、導入直後の膜損傷の有無が、必ずしも乾燥工程後の生存率を規定する因子ではないことを示している。通常、初期損傷が少なければプロセス耐性も高いと推測されるが、高浸透圧法における初期 13% から最終約 80% という急激な溶血の進行はこの前提を覆すものである。これは、即時の溶血を引き起こさない程度の浸透圧ストレスであっても、67 mM という比較的高濃度のトレハロース

導入過程で、細胞膜の脂質二重層や細胞骨格に微細な構造変化が生じたためと考えられる。この膜の脆弱性が、氷晶形成や脱水収縮といった物理的ストレスに晒された際、致命的な膜崩壊を一気に誘発したと結論付けられる。本結果は、細胞内トレハロース濃度が高ければ保護効果が向上するという単純な比例関係を否定している。高浸透圧法で達成された 67 mM という濃度は高いガラス化形成能を持つが、それでも約 80%が溶血した事実は、乾燥工程の物理的破壊力が、トレハロースによる熱力学的保護効果を上回ったことを意味する。一方で、CPPs 法では 2.7~5.2 mM という低導入量ながら、 μ PD 法において 62.9~68.3%の溶血度に抑え、高浸透圧法を最大約 13%上回る生存率を得た。これは、赤血球のプロセス耐性において、トレハロースの絶対量よりも、導入プロセスが細胞膜に与える侵襲性の低さが重要であることを支持している。ただし、これら両手法間で見られた溶血率の差異（約 13%）については、個体差や実験環境に起因するデータのばらつきを含んでいる可能性も否定できない。したがって、導入プロセスがプロセス耐性に与える寄与をより厳密に結論付けるためには、今後はさらなる検体数を用いた統計的解析を実施し、手法間の有意差を明確にする必要がある。

以上のデータから、トレハロース導入効率（高濃度化）のみを追求する手法には限界があり、導入量が少なくとも細胞膜への物理的・生理的負荷が少ない手法（CPPs 法等）の方が、最終的なプロセスを経た後の生存率維持に有利であることが示された。すなわち、赤血球生存率を決定する主要因は、細胞内のトレハロース濃度ではなく、導入から乾燥に至る全工程で細胞が蓄積する総ストレス量である。

なお、CPPs 法においては膜透過挙動の精密な制御に課題が残り、本研究が目標とする導入量の劇的な向上には至らなかった。また、高浸透圧法についても、導入過程における細胞への累積的な浸透圧ストレスがプロセス耐性に悪影響を及ぼす懸念が本章の比較検証により浮き彫りとなった。

以上の知見、および将来的な社会実装における経済性やプロセスの簡素化を考慮し、第 4 章および第 5 章では、特定の導入手法の比較ではなく、 μ PD 法による乾燥工程そのものの物理的解析、および赤血球の損傷抑制に特化した至適条件の探索に注力することとした。これにより、導入から乾燥・保管に至る全工程の最適化を目指す。

3.5. 本章のまとめ

本章では、新規導入試薬として細胞膜透過性ペプチド（CPPs）の一種である KRKRWHW を採用し、ヒト赤血球内へのトレハロース導入および、その後の凍結乾燥プロセスにおける細胞保護効果を系統的に検証した。本研究は、赤血球膜に対してトレハロースを透過させるための新たなアプローチとして CPPs 法を確立し、外部濃度 300 mM、インキュベーション時間 4 時間という条件下において、2.7~6.8 mM のトレハロース導入を実現した。さらに、確立した手法を用いてトレハロースを導入した赤血球に対し、 μ PD

法および液体窒素 (LN₂) を用いた 2 種類の凍結乾燥、およびその後の再懸濁プロセスを適用した。得られた結果を溶血率の変化として定量的に評価したところ、CPPs 法は高浸透圧法と比較して、より少ないトレハロース導入量 (2.7~5.2 mM) でありながら、凍結乾燥後の溶血度を 60.5~68.3% に抑制し、高浸透圧法を最大 13% 以上上回る溶血率を維持することが示唆された。これらの検証を通じて、赤血球の凍結乾燥耐性を決定付ける主要因は、細胞内トレハロースの絶対量ではなく、導入プロセスにおいて細胞膜が蓄積する総ストレス量であることを明らかにした。以上の知見に基づき、CPPs を用いた低侵襲なトレハロース導入が、赤血球の凍結乾燥における生存率維持に寄与することを実証し、本章の結論とした。なお、本章で提示したプロトコルの有効性については、限られた試行回数に基づく現時点での評価であり、統計的な信頼性を担保するためには、今後さらなる検体数を用いた検証が不可欠である。また、本手法の再現性を高めるため、膜透過挙動に影響を与える微細な環境因子の特定も次なる課題である。

第4章 乾燥プロファイルが赤血球品質に与える影響評価と 緩慢凍結乾燥法との比較

4.1. 本章の目的

μPD 法を用いて赤血球の高品質な凍結乾燥を実現するためには、乾燥条件の最適化が不可欠であるが、そのための体系的な指針は依然として確立されていない。特に、一次・二次乾燥における温度と処理時間の組み合わせは、凍結乾燥後の赤血球の最終含水率や細胞へのダメージへ影響すると考える。そこで本章の目的は、棚式凍結乾燥法(緩慢凍結乾燥法)が抱える課題を解決し、赤血球の高品質な凍結乾燥を実現しうる μPD の優位性を検証するため、μPD を用いた噴霧凍結乾燥法と従来の代表的な手法である緩慢凍結乾燥法とを比較し、RBCs を対象とした場合の乾燥工程（特に一次乾燥および二次乾燥における各温度と各処理時間の設定）が細胞膜の完全性に与える影響を定量的に評価することだ。具体的には、処理後の RBCs の最終的な含水率、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた形態維持の評価、そして溶血率測定による細胞膜損傷の度合いといった複数の指標を用いて、凍結乾燥方法の違い、並びに一次乾燥および二次乾燥における各温度とそれぞれの処理時間が RBCs 膜の損傷に及ぼす影響を系統的に比較・検討する。

4.2. 実験・評価方法

4.2.1. 材料

デキストラン 40（平均分子量 40K, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Japan）、D-グルコース（Hayashi Pure Chemical Ind.,Ltd, Japan）、D-(+)-トレハロース二水和物（nacalaitesque, Japan）は購入品をそのまま使用した。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（TAKARA BIO INC., Japan）は、タブレットを純水に溶かし作成した。Drabkin 試薬は Sigma-Aldrich 社より購入した。

4.2.2. 赤血球の分離

健康な成人ボランティア（男性、30 歳代）から、本研究の目的と手順を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た上で ヘパリン採血管にて全血を採取した。採取した全血から、リンパ球分離溶液（ $d=1.119$ ）（ナカライテスク株式会社）を用いて遠心分離（ $700\times g$ で 30 分間、室温）により赤血球を分離した。上清の血漿および Buffy コート（白血球層）、分離溶液を注意深く除去した。

4.2.3. 保護剤含有バッファーとの混合

洗浄後の濃厚 RBCs を、最終濃度がデキストラン 2.2% (w/v)、D-グルコース 2.5% (w/v)、D-(+)-トレハロース二水和物 0.42% (w/v) となるように調製した。これらの成分は、細胞の凍結乾燥プロセスにおいて一般的に用いられる保護剤である⁵²。330mM リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH [7.4]) と混合し、赤血球懸濁液を調製した。最終的なヘマトクリット値は 1% となるように調整した。

4.2.4. 噴霧凍結乾燥 (μPD) 装置

本研究で使用した噴霧凍結乾燥 (μPD : Micro-Powder-Dry) は、株式会社アルバックの LyoMoment を使用した。

4.2.5. μPD・緩慢凍結・乾燥工程(第一バッチ)

赤血球懸濁液はシリンジポンプ (YMC CO., LTD.・YSP-201) を用いて、噴霧流量 1mL/min でスプレーノズルから真空チャンバー内(数 Pa 以下)へ噴霧した。噴霧された液滴は真空中で自己凍結し、乾燥棚上のサンプルパン (アルミニウム製、半径 4.5cm) に堆積した。スプレー後、チャンバー内は 20 Pa 以下に維持された。以下の 3 種類の乾燥条件を設定した。

- ・条件 μPD[1] (20°C/5h): 堆積した凍結粒子を、棚温度 20°C で 5 時間保持し乾燥させた。本条件は、急速乾燥を目的とした。

- ・条件 μPD[2] (-30°C/7h → 20°C/7h): 一次乾燥として棚温度 -30°C で 7 時間保持した。その後、昇温速度約 1°C/分で 20°C まで昇温し、二次乾燥として同温度でさらに 7 時間保持した。

- ・条件 μPD[3] (-30°C/12h → 20°C/3h): 一次乾燥と棚温度 -30°C で 12 時間保持した。その後、昇温速度約 1°C/分で 20°C まで昇温し、二次乾燥として同温度でさらに 3 時間保持した。

比較のため緩慢凍結を行い、その後乾燥を行った。赤血球懸濁液 (ガラスバイアル、容量 6cc、充填量 1 mL) を μPD 凍結乾燥機 (LyoMoment) の棚に設置し、以下の条件で処理した。この条件は、噴霧ではなく、液体状態から棚上で直接凍結・乾燥させる方法である。

- ・凍結工程: 棚温度を初期温度 20 °C から冷却速度 1°C/分で -30°C まで冷却し、同温度で 1 時間保持した。

- ・条件 Shelf[2]' (-30°C/7h → 20°C/7h):

一次乾燥工程: チャンバー圧力を減圧し、棚温度 -30°C で 7 時間保持した。

二次乾燥工程: 昇温速度 1°C/分で棚温度を 20°C まで昇温し、同温度、チャンバー圧力 10 Pa

以下でさらに 7 時間保持した。

4.2.6. μ PD・緩慢凍結・乾燥工程(第二バッチ-追加実験)

μ PD 法における一次乾燥時間の短縮が赤血球の品質に与える影響を評価するために追加実験を行った

- ・条件 μ PD[4] ($-30^{\circ}\text{C}/3.5\text{h} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}/7\text{h}$): 一次乾燥と棚温度 -30°C で 3.5 時間保持した。その後、昇温速度約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で 20°C まで昇温し、二次乾燥として同温度でさらに 7 時間保持した。
- ・条件 Shelf[4]' ($-30^{\circ}\text{C}/3.5\text{h} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}/7\text{h}$):
一次乾燥工程: チャンバー圧力を 10 Pa 以下に減圧し、棚温度 -30°C で 3.5 時間保持した。
二次乾燥工程: 昇温速度 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で棚温度を 20°C まで昇温し、同温度、チャンバー圧力 10 Pa 以下でさらに 7 時間保持した。

Figure 4.1 にこれまで説明した全条件の乾燥プロファイルを図示する。

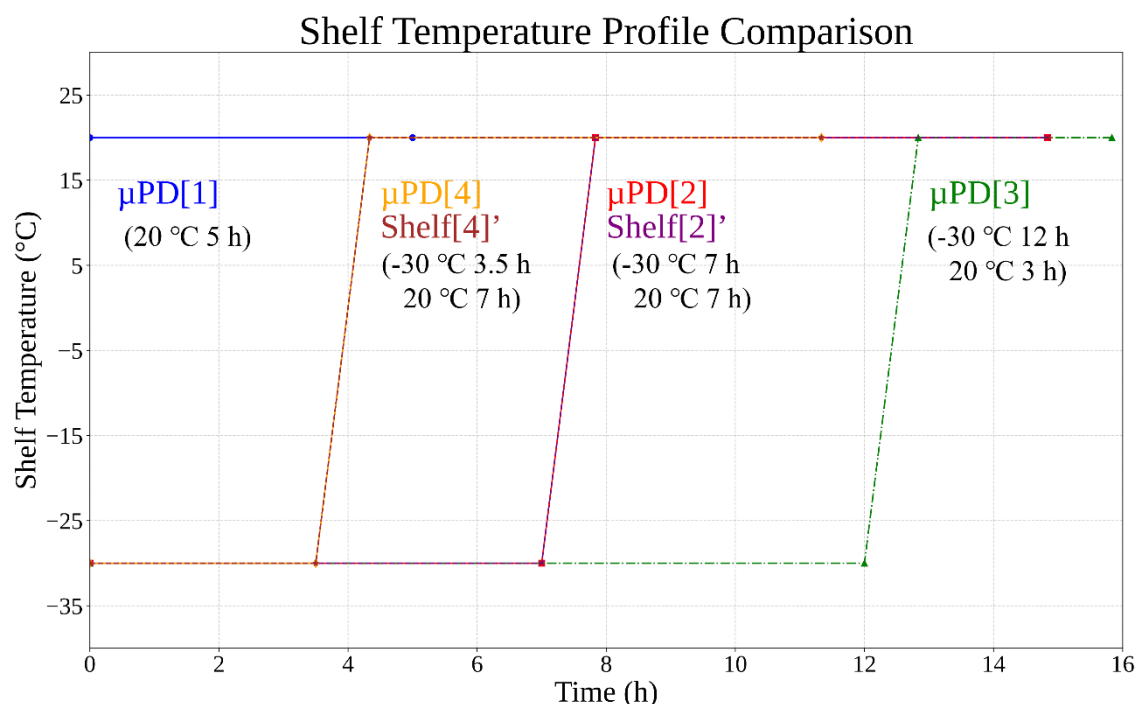


Figure 4.1 Different temperature programs applied during the μ PD (Micro-Powder Dry) process (μ PD[1], μ PD[2], μ PD[3]) and the conventional shelf freeze-drying process (Shelf[4]', Shelf[2]'). Note that μ PD[4] and Shelf[4]' are data obtained from a different batch than the other conditions.

本研究では、凍結乾燥後のサンプルの物理的特性、微細構造、再水和性、および機能的特性を評価した。

4.2.7. 含水率測定

凍結乾燥後のサンプルの含水率は、カールフィッシャー滴定装置（京都電子工業株式会社、MKA-610）を用いて容量滴定法により測定した。各サンプルにつき3回測定し、その平均値を算出した。

4.2.8. 凍結乾燥物の微細構造観察および氷晶サイズの推定

凍結乾燥後のサンプルの微細構造は、走査電子顕微鏡（SEM, S-4800, HITACHI）を用いて観察した。サンプルは導電性両面テープを用いて試料台に固定し、スパチュラでサンプルをテープに載せた後、(QAM-4-STs、ULVAC Inc.)を用いてルテニウム（Ru）をコーティングした。観察は加速電圧 5 kV の条件で行った。凍結乾燥後のサンプル内部に形成された多孔質構造は、一次乾燥中に昇華した氷晶が残した空隙（ポア）であると解釈し⁹⁸、これらの空隙のサイズから元の氷晶のおおよそのサイズを推定した。

4.2.9. 再水和

各凍結乾燥サンプルは、評価前に 37°C に予熱した PBS (pH [7.4]) を乾燥重量 50mg に対し 1mL の割合で加えた。ピペッティングにより穏やかに懸濁し、37°C で 5 分間静置することで再水和を行った。

4.2.10. 溶血率測定

再水和後の赤血球懸濁液を遠心分離（2,000×g で 3 分間、室温）し、得られた上清中の遊離ヘモグロビン濃度を Drabkin 法により測定した。

4.2.11. 赤血球形態観察

再水和後の赤血球懸濁液の一部をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを載せ、光学顕微鏡（VHX-X1、キーエンス社）を用いて観察し、代表的な画像を撮影した。

4.2.12. 溶解速度測定

μPD[2]および Shelf[2]'乾燥条件下で調製された粉末の溶解プロファイルを評価した。（μPD[2]および Shelf[2]'の乾燥条件は、セクション 4.3.2 に記載されている。）溶解試験

は、各サンプルについて正確に秤量した粉末を所定量の PBS 溶解媒体に添加することにより開始した。これにより、粉末中の成分が媒体中に溶解する過程を追跡した。溶解挙動の評価のため、以下の時間点でアリコートを採取した。

- ・ μ PD[2] サンプル：0 分 (PBS 添加直後)、1 分、2 分、3 分。

- ・ Shelf[2]' サンプル：0 分 (PBS 添加直後)、1 分、5 分、10 分。

採取されたアリコートは遠心分離を行い、得られた上清の吸光度を UV-Vis 分光光度計を用いて 540 nm で測定した。この波長は、赤血球由来の主要な光吸収成分（ヘモグロビン）の吸収極大の一つであり、溶液中の溶解成分の濃度変化を反映するものと判断した。各時間点における溶解成分の量を吸光度から定量した。この定量において、実験に用いた粉末中の全ての光吸収成分が溶解媒体中に完全に溶解したと仮定した場合の吸光度を、溶解量の基準値（すなわち、100%溶解時の吸光度）として設定した。この基準値を用いて、各測定時間における吸光度を質量に換算した。得られた溶解量は、時間に対するプロファイルとして提示した。

4.3. 結果

4.3.1. 凍結乾燥後の赤血球の物理化学的特性-各条件での最終含水率

Figure 4.2・Table 4.1 に、各凍結乾燥条件 (μ PD[1]、 μ PD[2]、 μ PD[3]、および Shelf[2]') における赤血球の最終含水率をまとめる。含水率については、 μ PD[1]条件 (20°C/5h) で 5.78%と本研究で試みた条件の中で最も低い値を示した。 μ PD[2]条件 (-30°C/7h $\rightarrow$ 20°C/7h) では 6.55%であり、 μ PD[1]よりもやや高い含水率であった。一方、 μ PD[3]条件 (-30°C/12h $\rightarrow$ 20°C/3h) では 7.86%と、 μ PD 条件の中では最も高い含水率を示した。緩慢凍結乾燥である Shelf[2]'条件 (-30°C/7h $\rightarrow$ 20°C/7h) の含水率は 7.30%であり、 μ PD[2]よりもやや高く、 μ PD[3]に近い値を示した。

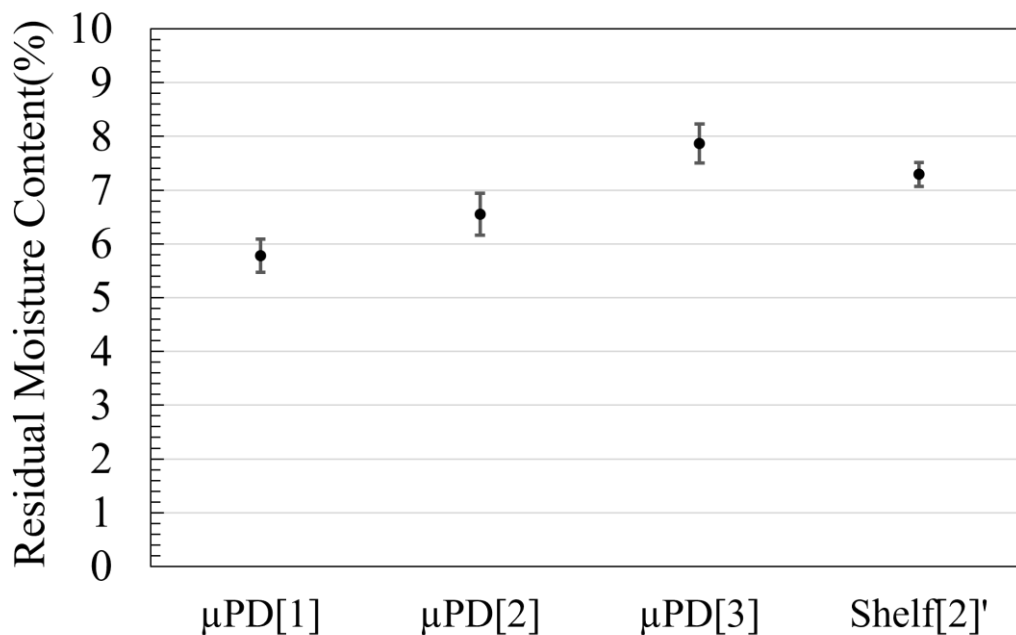


Figure 4.2 This graph shows the moisture content of freeze-dried samples prepared under μ PD[1], μ PD[2], μ PD[3], and Shelf[2]' conditions. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Table 4.1 Moisture content of freeze-dried samples under different drying conditions

Condition Name	μ PD[1]	μ PD[2]	μ PD[3]	Shelf[2]'
Temperature/Time	20 °C/5 h	-30 °C/7 h 20 °C/7 h	-30 °C/12 h 20 °C/3 h	-30 °C/7 h 20 °C/7 h
Moisture Content	5.78 %	6.55 %	7.86 %	7.30 %

4.3.2. 凍結乾燥物のマクロ・ミクロ構造と推定氷晶サイズ

各条件下で得られた凍結乾燥サンプルの全体構造を Figure 4.3 に示す。 μ PD で処理したサンプルは、直径 50 μ m 程度の比較的小さな粒子が観察された。一方、緩慢凍結乾燥を行った Shelf[2]'のサンプル (Figure 4.3 右下) は、バイアル内では一つの大きな塊状のケーキ (cake) を形成していたが、SEM 観察のためにスパチュラ等で一部を採取しカーボンテープに載せる過程で崩れ、結果として不規則な形状のフレーク状または比較的小さな塊状の構造として観察された。これは、 μ PD 法で得られた球状粒子の構造とは異なる特徴であった。

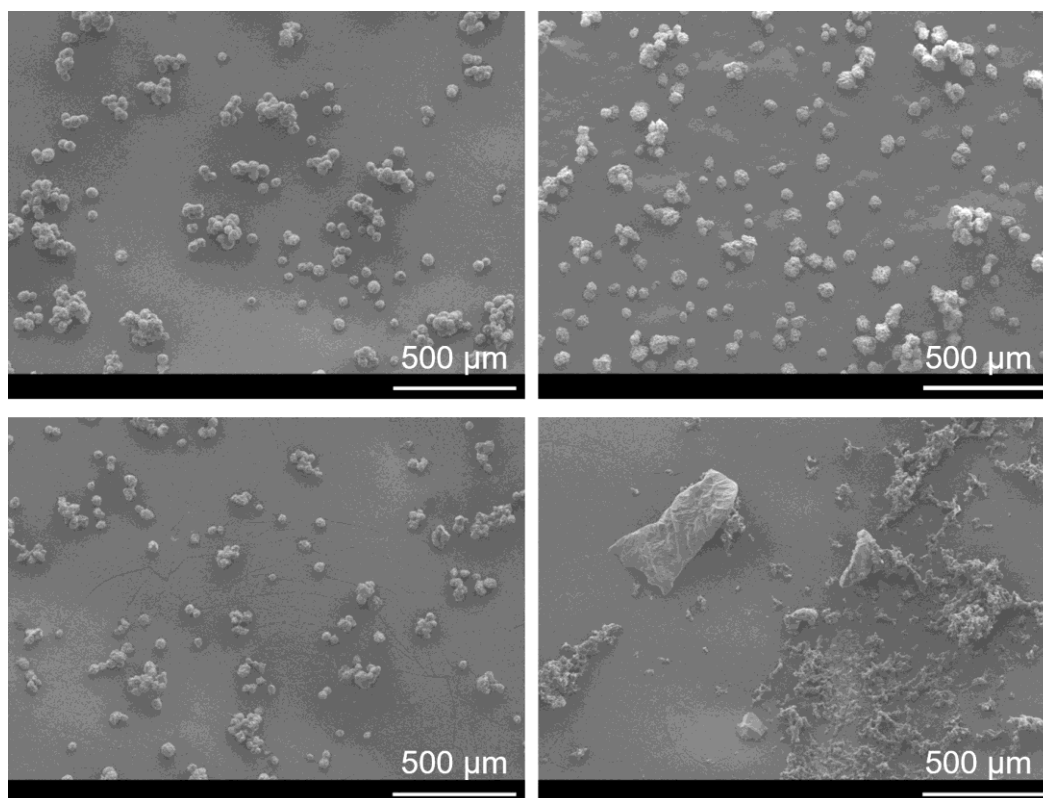


Figure 4.3 Scanning electron microscope (SEM) images showing the overall morphology of freeze-dried samples. (Shows the overall morphology of freeze-dried samples obtained under different drying conditions. Top left: μ PD[1], Top right: μ PD[2], Bottom left: μ PD[3], Bottom right: Shelf[2]'. Scale bar indicates 500 μ m.)

また、凍結乾燥後のサンプル内部構造内部微細構造（空孔構造）を Figure 4.4 に、推定氷晶サイズを Table 4.2 に示す。 μ PD[1]条件下で処理したサンプルでは、内部に微細な空隙が多数観察され、その平均推定氷晶サイズは約 2 μ m であった。 μ PD[2]条件下では、空隙はやや大きく、平均推定氷晶サイズは約 4 μ m であった。 μ PD[3]条件下では、さらに大きな空隙が形成されており、平均推定氷晶サイズは約 6 μ m であった。一方、緩慢凍結乾燥を行った Shelf[2]'のサンプルでは、顕著に大きな空隙構造が観察され、平均推定氷晶サイズは約 13 μ m と、 μ PD 法で得られたサンプルよりも大幅に大きかった。これらの結果は、採用した凍結乾燥方法および乾燥条件が、形成される氷晶のサイズ、ひいては乾燥後の製剤の微細構造に対して顕著な影響を与えることを形態学的に示している

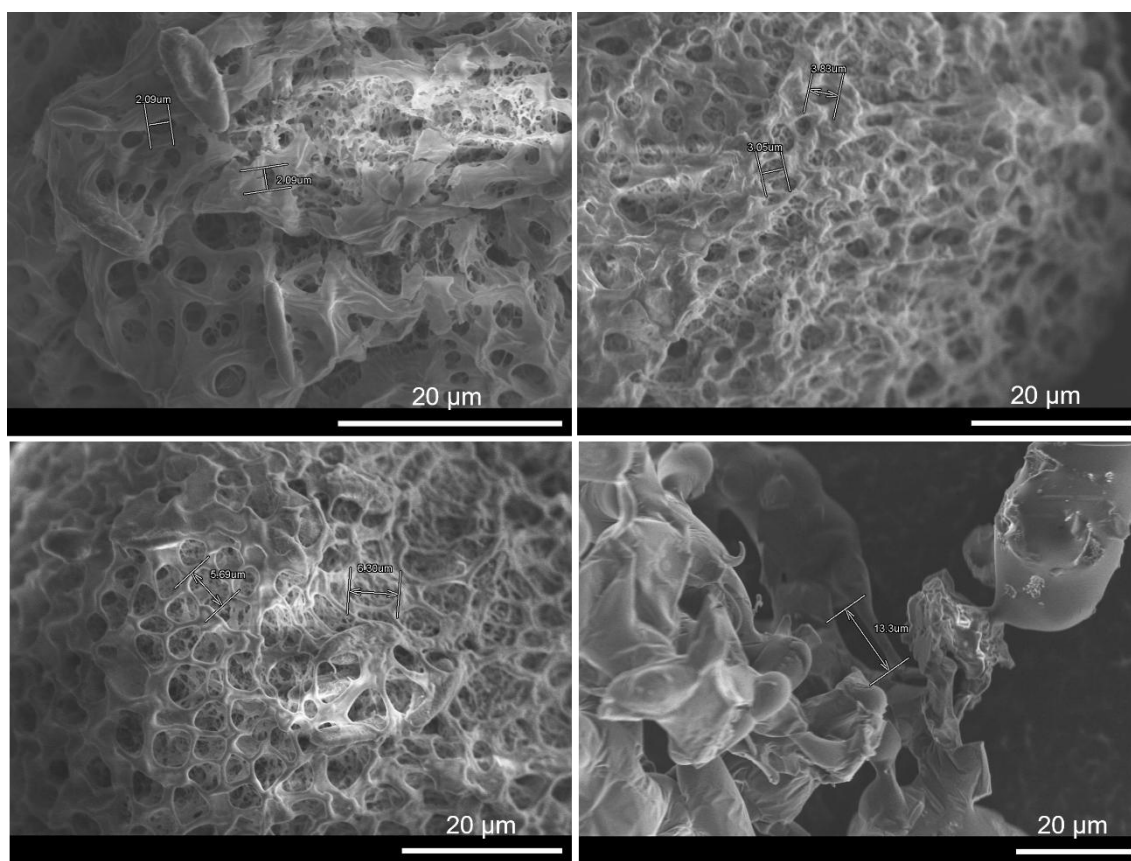


Figure 4.4 Scanning electron microscope (SEM) images showing the internal porous structure and estimated ice crystal size of the freeze-dried samples. These images show the internal microstructure and pore morphology of samples obtained under different drying conditions. These pores are interpreted as voids left by ice crystals that sublimated during primary drying, from which the original ice crystal sizes were estimated. The lines within the images indicate examples of the measured pore sizes. Top left: μ PD[1], Top right: μ PD[2], Bottom left: μ PD[3], Bottom right: Shelf[2]'. Scale bar indicates 20 μ m.

Table 4.2 Estimated ice crystal size from pore dimensions in freeze-dried samples

Condition Name	μ PD[1]	μ PD[2]	μ PD[3]	Shelf[2]'
Pore (Ice Crystal) Size	2 μ m	4 μ m	6 μ m	13 μ m

4.3.3. 再水和後の赤血球の品質評価-各条件での溶血率

Table 4.3、Figure 4.5 に各条件での溶血率を示す。溶血率に関しては、Shelf[2]’条件で63.2%と本研究で評価した中で最も低い値を示した。μPD[2]条件では66.6%であり、Shelf[2]’に次いで比較的低い溶血率を維持していた。これに対し、μPD[1]条件では79.3%、μPD[3]条件では83.0%と、他の2条件と比較して高い溶血率であった。特にμPD[3]条件は、試みた条件の中で最も高い溶血率であった。

Table 4.3 Post-rehydration non-hemolysis rate for each condition

Condition Name	μPD[1]	μPD[2]	μPD[3]	Shelf[2]’
Temperature /Time	20°C/5h	-30°C/7h 20°C/7h	-30°C/12h 20°C/3h	-30°C/7h 20°C/7h
Hemolysis	79.3%	66.6%	83.0%	63.2%

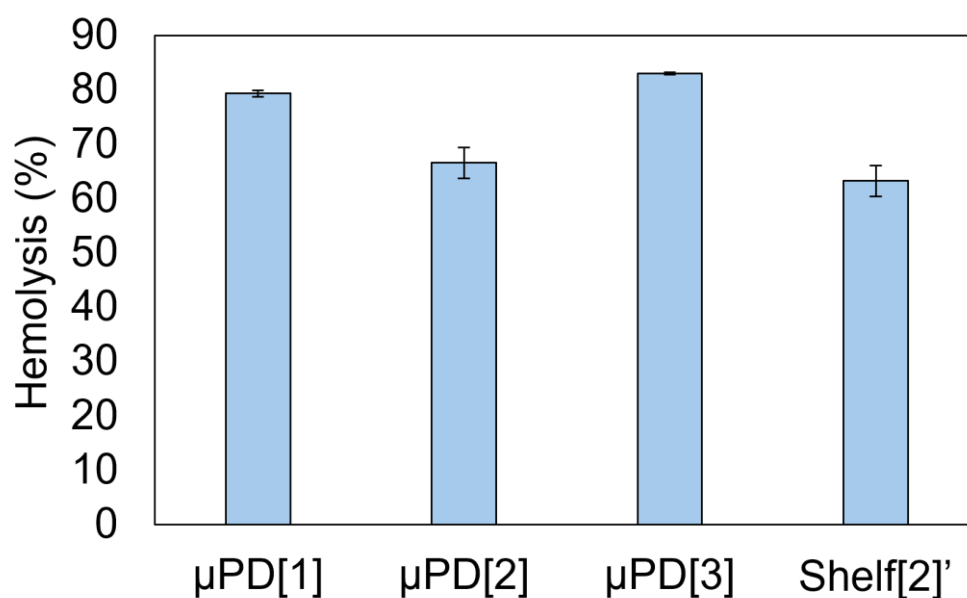


Figure 4.5 Graph of post-rehydration hemolysis rate under each condition, error bars indicate mean $\pm$ standard deviation (n=2)

4.3.4. 光学顕微鏡による再水和後の細胞形態

Figure 4.6 に、各凍結乾燥条件で処理し再水和した後の赤血球の光学顕微鏡写真を示す。健康な人間の赤血球は、特徴的な円盤状の形をしており、外部応力を受けていないときもこの形態を維持する。そのサイズはおよそ直径 7.5~8.7 μm 、厚さ 1.7~2.2 μm である。赤血球の細胞質には、循環におけるガス輸送に不可欠なヘモグロビン分子が含まれており、このヘモグロビンが光と相互作用し、特に酸素化されたヘモグロビンが赤色光を反射するため、ヘモグロビンを含む赤血球全体が赤く見える^{99,100}。μPD[1]で処理した赤血球は、一部に正常な円盤状の形態を留めている細胞も観察されたが、多くは細長い、あるいは棒状といった特異な変形を示し、細胞の破片やゴースト細胞（溶血により内容物が流出した細胞膜）も散見された。これは、乾燥工程での凝集、さらには急激な脱水に伴う物理的負荷が細胞膜に深刻な形態学的損傷を与えたことを示唆している。μPD[2]で処理した赤血球では、μPD[1]と比較して、中央部が淡く抜けた正常な円盤状の形態を持つものの、大きさがやや小さい赤血球の割合が多いように見受けられた。ただし、一部にはゴースト細胞や軽微な変形を示す細胞も観察された。μPD[3]で処理した赤血球では、観察される細胞においてヘモグロビン色素の放出が顕著であり、視野の大部分で細胞の断片やゴースト細胞が占めていた。Shelf[2]'で処理した赤血球では、比較的多くの細胞が正常な円盤状の形態を維持していたが、大きさが小さい細胞や、一部にゴースト細胞も混在していた。

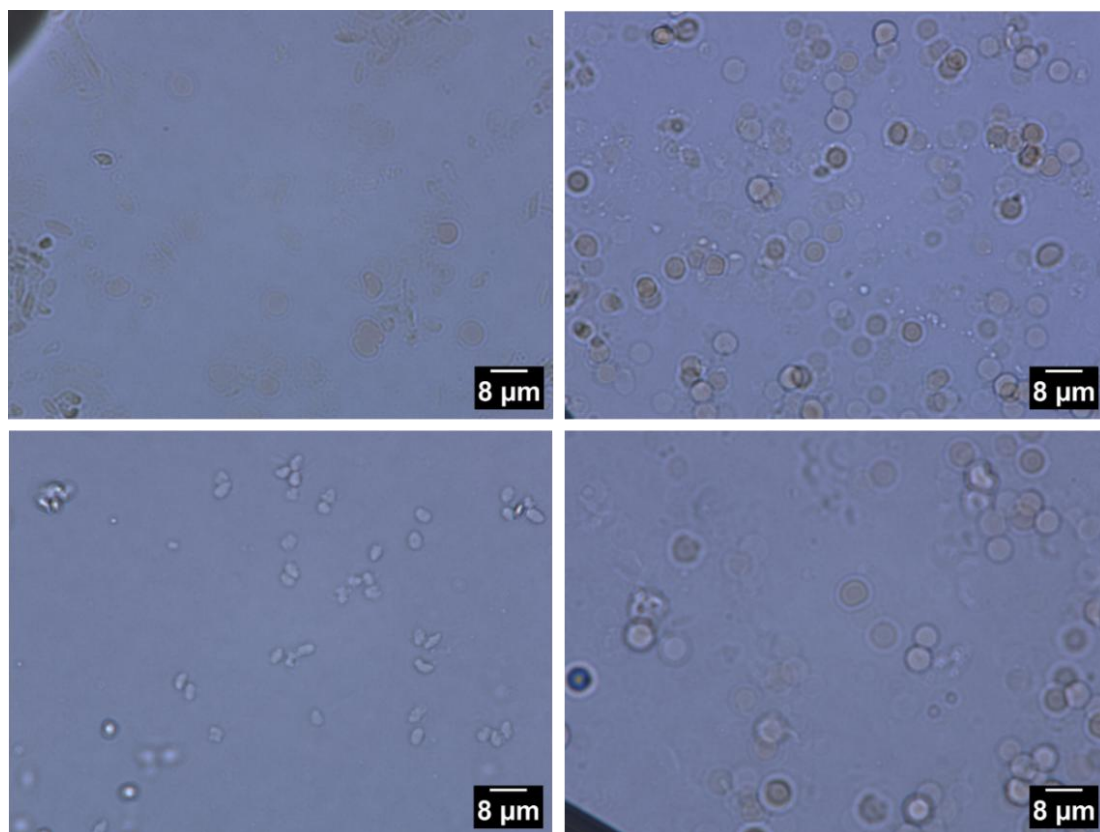


Figure 4.6 Optical microscope images of red blood cells after rehydration. Top left: μ PD[1], Top right: μ PD[2], Bottom left: μ PD[3], Bottom right: Shelf[2]'. Scale bar indicates 8 μ m.

4.3.5. μ PD における一次乾燥時間短縮の検討結果(第二バッチ実験)

凍結乾燥プロセスにおける処理時間は、生産効率を左右する重要な要素である。1 バッチあたりの処理時間が短縮されれば、一定期間内により多くの製品供給が可能となり、コスト効率の改善にも繋がる。そこで本追加実験では、 μ PD 法を用いた赤血球の凍結乾燥において、プロセスの主要な時間規定段階である一次乾燥の時間短縮が、生産効率の向上に寄与するかどうかという観点から、最終製品の品質（含水率および溶血率）に与える影響を評価した。本検討では、 μ PD 法における一次乾燥時間を 7 時間（ μ PD[2]）および 3.5 時間（ μ PD[4]）に設定し、比較対照として一次乾燥時間を 3.5 時間とした緩慢凍結乾燥（Shelf[4]）も同時に評価した。各条件下で得られた凍結乾燥赤血球の最終含水率および溶血率の結果を Table 4.4 に示す。

Table 4.4 Analysis of Primary Drying Time Optimization in μ PD (Batch Experiment 2)

Condition Name	μ PD[2]	μ PD[4]	Shelf[4]'
Temperature/Time	-30°C/7h 20°C/7h	-30°C/3.5h 20°C/7h	-30°C/3.5h 20°C/7h
Moisture Content	6.82%	6.11%	18.56%
Hemolysis	71.4%	74.5%	73.6%

4.4. 考察

4.4.1. μ PD[1]（高温・短時間乾燥）条件がもたらす細胞損傷メカニズム

本研究における μ PD[1]条件は、極めて低い含水率（5.78%）を達成するという点で顕著な成果を示した。この条件下で溶血率が 79.3%となったことは、高温・短時間乾燥が細胞に与える物理的ストレスのメカニズムを深く理解する上で重要な知見をもたらした。このメカニズムを解明するため、まず μ PD 法における微細液滴の挙動に着目した。噴霧された微小液滴が自己凍結する過程で、細胞内にも微細な氷晶が形成されたと推測される。

この推測は、 μ PD[1]の SEM 画像（推定氷晶サイズ約 2 μ m）によって裏付けられる。細胞膜は水分子を透過させる性質を持つが、比較的高い温度下で急速に昇華したことによる多量の水蒸気発生は、膜の透過速度を上回り、そのため、細胞膜によって囲まれた内部空間では、この水蒸気の逃げ場が限られ、細胞内圧が急上昇し、細胞外との間に大きな圧力差が生じた。このような急速な圧力上昇が細胞膜の耐容限界を超えた場合、細胞膜が過度に膨張し、最終的に破裂することで溶血に至った可能性が高い。光学顕微鏡観察において、 μ PD[1]処理後の赤血球が細長い、あるいは棒状といった特異な変形を示し、細胞の破片やゴースト細胞が多数散見されたことは、このような急激な物理的ストレスによる膜破壊を裏付けている。

細胞膜の保護機能における含水率の重要性に関する新たな示唆が得られた細胞膜の構造と機能の維持には、ある程度の結合水が不可欠であるとされる。 μ PD[1]では、急速かつ高温での乾燥により、これらの保護的な水分までもが過度に除去され、細胞膜が本来持つべき流動性や強度を失い、脆弱化した可能性がある¹⁰¹。赤血球の真空乾燥において残留水分量が低下するにつれてメトヘモグロビン(metHb)形成が増加し、それに伴い溶血も増加すること報告されている。本研究の μ PD[1]における含水率 5.78%は、他条件と比較しても最も低い含水率であり、細胞膜の安定性維持には不十分であった可能性がある。

4.4.2. μ PD[3]（長時間一次乾燥・短時間二次乾燥）における細胞損傷メカニズ

ム解明と残留水分に関する考察

μ PD[3]条件では、含水率は7.86%と μ PD[2](6.55%)やShelf[2]'(7.30%)よりも比較的高いにも関わらず、溶血率は83.0%と全条件で最も高かった。主な原因として、一次乾燥中の過度な氷結晶成長・再結晶化と、それに続く不十分な二次乾燥が複合的に作用した可能性が考えられる。 μ PD[3]では、一次乾燥を -30°C で12時間と、 μ PD[2]（同7時間）よりも長時間行った。この長時間の低温暴露が、初期に形成された氷晶の成長や再結晶化を促し、より大きな氷晶へと変化させた可能性がある。Hagiwara らは、氷晶サイズが大きくなる主な理由は、オストワルド熟成の原理によって説明される再結晶化という現象が進行するためであると述べている¹⁰²。再結晶化（氷晶サイズの増大）の進行速度は、温度に強く依存する¹⁰³。この論文の実験結果では、乾燥は行わないが最も低い温度である -50.5°C でさえ、20時間の保存後に氷晶の平均サイズが増加することが観察されており、低温での長時間処理が氷晶成長を促進するという本研究の考察を強力に支持している。

SEM 画像（推定氷晶サイズ $6\mu\text{m}$ ）で観察された空孔サイズが μ PD[2]（同 $4\mu\text{m}$ ）よりも大きかったことは、この大規模な氷晶成長の直接的な証拠であり、細胞膜に対するより大きな機械的応力とその結果生じる細胞構造の物理的破壊を示唆する。光学顕微鏡画像で、 μ PD[3]処理後のサンプルにおいてヘモグロビン色素がほとんど確認できず、視野の大部分が細胞の断片やゴースト細胞で占められていたことは、このような深刻な物理的ダメージを反映している。

さらに、 μ PD[3]における 20°C での二次乾燥時間は3時間と、 μ PD[2]やShelf[2]'（いずれも7時間）と比較して短かった。この不十分な二次乾燥により、結合水だけでなく、氷晶周囲に濃縮された非凍結画分中の水分などが十分に除去されず、結果として含水率が比較的高止まりしたと考えられる。

4.4.3. μ PD[2]およびShelf[2]'における細胞損傷の抑制要因に関する考察

前述の μ PD[1]および μ PD[3]条件下で観察された著しい溶血とは対照的に、 μ PD[2]（ $-30^{\circ}\text{C}/7\text{h} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}/7\text{h}$ ）およびShelf[2]'（ $-30^{\circ}\text{C}/7\text{h} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}/7\text{h}$ ）条件では、本研究内で比較するとそれぞれ66.6%および63.2%と最も低い溶血率を示し、含水率もそれぞれ6.55%、7.30%であった。まず、両条件で相対的に細胞損傷が抑制された要因として、一次乾燥と二次乾燥のバランスの最適化が挙げられる。両条件ともに一次乾燥を -30°C で7時間、二次乾燥を 20°C で7時間とする比較的穏やかな乾燥プロファイルを採用したことで、 μ PD[1]で見られたような急速昇華に伴う物理的ストレスや、 μ PD[3]で懸念された長時間の低温暴露による過度な氷結晶成長、あるいは二次乾燥不足といった極端な条件を回避できたと考

えられる。次に、氷晶のサイズと形態の適切性について考察する。 μ PD[2]で形成された推定氷晶サイズは約 4 μm であり、これが細胞への機械的ストレスをある程度抑制した可能性がある。

一方、Shelf[2]'では推定氷晶サイズが約 13 μm と μ PD[2]より大きかったにも関わらず、本研究中では最も低い溶血率を示した。この結果は、緩慢凍結乾燥における比較的緩慢な凍結プロセスが、主に細胞外に大きな氷晶を形成し、細胞内凍結を抑制することで膜損傷を軽減したという一般的なメカニズムが部分的に機能した可能性を示唆している⁴⁷。この点において、 μ PD 法は微細な液滴の特性を活かし、より均一な氷晶形成を制御できる可能性を秘めており、今後のプロセス改良において氷晶サイズの最適化が重要な鍵となることを示唆している。保護剤であるトレハロースの保護効果も重要な要因である。本研究ではトレハロースを保護剤として添加しており、これが細胞膜の安定化やガラス状態形成に一定の寄与をしたと考えられる。Török ら (2005) は、細胞内にトレハロースをローディングし、約 1.5°C/min の冷却速度で緩慢凍結後、一次乾燥-30°C、二次乾燥で棚温度を 6 時間かけて-30°Cから 20°Cまで上昇させるプロトコルを用いることで凍結乾燥後の赤血球で約 45%の溶血率を達成したと報告している³³。一方で、彼らの研究では細胞内にトレハロースを導入しなかった場合で約 60%の溶血が観察されている。本研究の μ PD[2]および Shelf[2]'における溶血率（それぞれ 66.6%および 63.3%）は、Török らの報告値（細胞内導入なしで約 60%溶血）と近い値を示した。この比較は、 μ PD プロセスによる微細液滴を用いたこの独自のアプローチが、Török らの手法とは異なる凍結・乾燥プロファイルにおいても、既存の凍結乾燥手法に代わる有望な選択肢となる可能性を秘めている。

今後は、保護剤の濃度、種類、細胞内への導入方法を含めた製剤設計の最適化が、より低い溶血率を達成するための重要な課題となる。

4.4.4. μ PD[1]と μ PD[2]における含水率の逆転現象に関する考察

本研究の結果において、 μ PD[2] (-30°C/7h $\rightarrow$ 20°C/7h) は μ PD[1] (20°C/5h) と比較して 20°Cでの二次乾燥時間が 2 時間長い (μ PD[2]: 7 時間, μ PD[1]: 全工程で 5 時間) にも関わらず、最終含水率が μ PD[1]の 5.78%に対して μ PD[2]では 6.55%と、むしろやや高い値を示した。この一見矛盾する結果は、両条件における凍結および一次乾燥プロセスの違いが、乾燥後のマトリックス構造とそれに続く二次乾燥効率に影響を与えたことを示唆しており、 μ PD プロセスにおける乾燥メカニズムに関する重要な知見を提供した。

μ PD[1]では、明確な低温での一次乾燥工程を経ずに 20°Cという比較的高温で急速に乾燥が進行した。この条件下では、噴霧された微小液滴が自己凍結する際に形成される初期の微細な氷晶（推定約 2 μm ）が大きく成長する前に昇華したと考える。 μ PD 法で形成される球状粒子は、従来の棚式凍結乾燥(緩慢凍結乾燥)におけるバルク状の乾燥品とは異なり、個々の粒子表面からの効率的な水蒸気放出が可能である。この μ PD 法特有の特性が、

5 時間の処理時間でも比較的低い含水率まで効率的に水分が除去された主要因である可能性が考えられる。

一方、 μ PD[2]では、 -30°C で 7 時間という一次乾燥工程を経ている。この間、初期に形成された氷晶がオズワルド熟成などにより成長・再結晶化し、より大きな氷晶（推定約 $4\ \mu\text{m}$ ）へと変化したことが SEM 観察からも示唆される。大きな氷晶が昇華した後に残る空孔自体は大きくなるものの、大きな空孔の内壁の面積だけでは、元々微細な氷晶が無数にあった場合の総表面積に及ばず、有効な比表面積が減少し、二次乾燥段階での結合水の脱着効率が低下した可能性が考えられる。二次乾燥は主に結合水の脱着プロセスであり、その速度は製品温度、圧力、そして乾燥マトリックスの微細構造（比表面積、細孔径分布、経路の屈曲度など）に強く依存する¹⁰⁴。したがって、 μ PD[2]では二次乾燥時間が長かったにも関わらず、 μ PD[1]よりも構造的に水分の抜けにくい状態が生じた結果、含水率がやや高くなったことが示唆される。

この結果は、最終的な含水率が単に二次乾燥の温度と時間だけで決まるのではなく、それに先立つ凍結プロセスや一次乾燥プロセスが形成するマトリックスの微細構造に大きく左右されることを示しており、凍結乾燥プロセスの設計において極めて重要な考慮点である。特に、 μ PD 法においては、一次乾燥における氷晶成長を適切に制御し、微細な多孔質構造を維持すること、あるいは個々の球状粒子特性を最大限に活かすような乾燥プロファイルを選択することが、効率的な二次乾燥と低含水率達成のための鍵となることが明らかになった。

4.4.5. 一次乾燥時間の最適化による乾燥負荷の低減と溶血率の相関

本研究では、 μ PD 法を用いた赤血球凍結乾燥プロセスにおいて、工程全体の時間を決める主要なステップである一次乾燥時間の短縮が製品品質および生産効率に与える影響を詳細に評価した。具体的には、一次乾燥時間を 7 時間とした μ PD[2]条件（対照）、3.5 時間とした μ PD[4]条件、そして同様に一次乾燥時間を 3.5 時間とした緩慢凍結乾燥 Shelf[4]条件を比較検討した。まず、 μ PD 法内での比較（ μ PD[2] vs. μ PD[4]）において、一次乾燥時間を 7 時間から 3.5 時間に半減させた μ PD[4]条件では、最終含水率は μ PD[2]の 6.82% から 6.11%へと若干低下する結果が得られた。一方で、溶血率は μ PD[2]の 71.4%から μ PD[4]の 74.5%へとわずかな低下が見られたものの、その差は 3.1 ポイントと比較的小さかった。この結果は、 μ PD 法においては、検討した範囲内であれば一次乾燥時間を大幅に短縮しても、含水率を悪化させることなく、また溶血率の急激な上昇を招くことなく処理できる可能性を示している。 μ PD 法特有の微細な粒子構造とそれに伴う広い表面積が、比較的短い一次乾燥時間でも効率的な昇華を可能にし、二次乾燥への移行をスムーズにした結果、含水率が低く抑えられたと考えられる。

次に、同一一次乾燥時間（3.5 時間）における μ PD 法と緩慢凍結乾燥法の比較（ μ PD[4]

vs. Shelf[4]') では、より顕著な差が観察された。最終含水率において、 μ PD[4]が 6.11%であったのに対し、Shelf[4]'は 18.56%と 3 倍以上の高い値を示した。これは、同一の一次乾燥時間では、 μ PD 法が緩慢凍結乾燥法に比べて格段に効率よく水分を除去できることを明確に示している。 μ PD 法では微細な球状粒子として乾燥が進むため、水蒸気の物質移動抵抗が小さく、効率的な昇華が可能であるのに対し、緩慢凍結乾燥法ではバルク状の凍結体からの昇華となるため、乾燥効率が劣ったと考えられる。一方で、溶血率については、 μ PD[4]が 74.5%、Shelf[4]'が 73.6%と、ほぼ同等の値であった。このことは、 μ PD 法が緩慢凍結乾燥法と同等レベルの細胞保護効果を維持しつつ、はるかに短い一次乾燥時間で優れた乾燥効率を発揮できるという、その実用的な優位性を強く裏付けている。以上の考察は本実験で得られた数値的傾向に基づくものであるが、測定精度の限界やサンプルの個体差を考慮すると、 μ PD 法と緩慢凍結法が同等の生存率を維持していると結論付けるには、さらなる統計的裏付けが必要である。今後は、試行回数の増加とともに、乾燥効率と生存率が両立する臨界条件の特定を試みる。

これらの結果を生産効率の観点から考察すると、 μ PD 法は大きな利点を持つ可能性が示唆される。特に、一次乾燥時間を従来の棚式(緩慢)凍結乾燥法で必要とされる時間よりも大幅に短縮しても、棚式と同等レベルの溶血率を維持しつつ、より低い含水率を達成できる点は注目に値する。医薬品や生物学的製剤の凍結乾燥プロセスにおいて、処理時間は製造コストや生産キャパシティに直結する。本研究で見られたように、 μ PD 法によって一次乾燥時間を例えば半分に短縮できれば、1 バッチあたりの総処理時間が大幅に削減され、結果として単位時間あたりの生産量を増大させることが可能となる。これは、特に大量供給が求められる赤血球製剤のような製品にとっては、実用化に向けた大きなアドバンテージとなりうる重要な知見である。

4.5. 本章のまとめ

本章では、噴霧凍結乾燥 (μ PD) 法を用いた赤血球製剤開発を目指し、主要な乾燥プロセスパラメータ (一次・二次乾燥の温度と時間) が凍結乾燥赤血球の品質 (最終含水率、溶血率、細胞形態) に与える影響を系統的に評価し、従来の棚式(緩慢)凍結乾燥法と比較検討した。その結果、 μ PD 法の乾燥条件は赤血球の品質に決定的な影響を与えることが明らかになった。高温短時間乾燥 (μ PD[1]) や不適切な一次・二次乾燥バランス (μ PD[3]) は著しい細胞損傷を引き起こしたが、一次乾燥を $[-30^{\circ}\text{C}/7\text{h}]$ 、二次乾燥を $[20^{\circ}\text{C}/7\text{h}]$ とした μ PD[2] 条件では、緩慢凍結乾燥法 (Shelf[2]') と同程度の溶血率を達成するという良好な結果が得られた。特筆すべきは、 μ PD 法によって形成される微細な球状粒子が、より小さな推定氷晶サイズ (μ PD[2]で約 4 μm 、Shelf[2]')で約 13 μm) をもたらし、凍結乾燥プロセスにおける氷晶形成制御の新たな可能性を示唆した点である。

さらに、 μ PD 法における一次乾燥時間の短縮検討では、 μ PD 法が従来の棚式(緩慢)凍結乾燥法に対し、生産効率の観点から明確な優位性を持つことが示された。具体的には、一次乾燥時間を 3.5 時間に半減させた μ PD[4]条件が、同時間の一次乾燥を行った緩慢凍結乾燥 (Shelf[4]')と比較して、大幅に低い最終含水率 (μ PD[4]: 6.11% vs Shelf[4]': 18.56%) を実現しつつ、同等の溶血率 (μ PD[4]: 74.5% vs Shelf[4]': 73.6%) を維持できることが示された。

以上のことから、 μ PD 法は、そのプロセスパラメータを適切に制御することにより、赤血球の凍結乾燥において棚式(緩慢)凍結乾燥法に匹敵する細胞保護効果をもたらし、かつプロセス効率化の面で極めて有望な技術であることが実証された。本章で得られた知見は、高品質な凍結乾燥赤血球製剤の実用化に向けた重要な基盤となる。なお、本章で得られた各乾燥条件における溶血率の差異については、限られた試行回数に基づく現時点での評価であり、統計的信頼性の確保が今後の課題である。今後はさらなる検体数を用いた検証を通じて、 μ PD 法特有の乾燥メカニズムが赤血球の生存に与える影響をより精緻に解析していく必要がある。

第5章 凍結乾燥赤血球の長期保存安定性における凍結法と保護剤濃度の影響

5.1. 長期保存安定性評価の必要性

前章（第4章）までに、真空微噴凍結乾燥（ μ PD）法が、従来の緩慢凍結法と比較して、凍結乾燥プロセスにおける赤血球への初期ダメージを顕著に抑制できる可能性が示された。 μ PD法は、試料を微小な液滴として真空中に噴霧し、急速に凍結・乾燥させることで、氷晶成長による物理的破壊を最小限に抑えることを目的としている。しかし、 μ PD法の実用化、すなわち実際の臨床現場での使用を想定した場合、製造直後の品質だけでなく、流通や備蓄を想定した長期保存安定性の検証が不可欠である。

凍結乾燥製剤の品質劣化には、保管条件が重要な役割を果たす。特に水分活性、酸素、温度、その他などが、細胞生存率の低下における主要な要因として知られている¹⁰⁵。凍結乾燥体は、たとえ初期品質が優れていても、保存中に複数の劣化機構が進行する。

完全な脱水は技術的に困難であり、凍結乾燥製剤には通常1～10%の残留水分が存在する。この残留水分は、保管中の化学的劣化反応を媒介する重要な因子である。水分活性が高くなると、メイラード反応（糖とタンパク質またはペプチドとの非酵素的褐変反応）¹⁰⁶、タンパク質の凝集、膜脂質の酸化などの劣化反応が加速される。残留水分は、製品を室温で保存した場合には、急速な分解を引き起こすのに十分な量で存在することがあり¹⁰⁷、医薬品の場合、保管には1%以下の水分含有量が最も望ましいとされている¹⁰⁵。水分の存在は、処方ガラス転移温度（ T_g ）を保管温度以下にシフトさせ、分子運動性の増大や結晶化を引き起こす可能性がある¹⁰⁷。特に二次乾燥（吸着した未凍結水の除去）が不十分な場合、この影響は顕著となる。さらに、赤血球の細胞膜を構成するリン脂質のエステル結合が加水分解されると、リゾホスファチジルコリンと遊離脂肪酸が生成される。これらの生成物は親水性・疎水性のバランスが元のリン脂質と異なるため、安定したラメラ構造（脂質二重層）がミセル構造へと転移する。ミセル構造は秩序性が低く、膜の完全性が低下するため、膜透過性が増加する。その結果、イオン濃度勾配の喪失と細胞膜機能の損傷が生じる¹⁰⁸。

細胞膜の構成要素であるメチレン中断ポリ不飽和脂肪酸は、極めて酸化されやすい¹⁰⁹。大気中の酸素との接触により、不飽和脂肪酸の過酸化が進行し、脂質ヒドロペルオキシドやアルデヒド類などの二次生成物が形成される。これらの酸化生成物は、膜構造と機能の崩壊を引き起こし¹¹⁰、再水和時の溶血率増加の主要因となる。脂質酸化は凍結乾燥プロセス中だけでなく、保管中にも継続的に進行することが知られており¹¹¹、長期保存安定性を考える上で特に重要な劣化経路である。

保存温度の上昇は、分子運動性を高めることで上記の劣化反応を加速させる。組換えヒ

ト血清アルブミン (rHSA) を用いた研究では、凍結乾燥サンプルの保管温度 (50° C) と保管時間に伴い、タンパク質の凝集が有意に増加することが示されている¹¹²。温度の影響は定量的にも明確に示されている。乳酸菌の一種である *Lactobacillus curvatus* N19 を用いた研究では、4° C での保管時に対し、25° C での保管時の不活化速度定数は約 214 倍に増加した¹¹³。この差異は、保管温度の管理が製剤安定性に決定的な影響を及ぼすことを示している。

5.2. 本章の目的

本章では、前章までに確立した μ PD 法の最適条件を基盤として、実用的有用性を評価するための主要な指標の一つとして、長期保存における物理化学的安定性に着目し、体系的な試験を実施した。具体的には、凍結乾燥法(噴霧凍結乾燥(μ PD)法・緩慢凍結乾燥法および保護液組成(糖類濃度: 0, 5, 10 w/v%)をパラメータとして計 6 種類の凍結乾燥赤血球試料を調製した。糖濃度 0 w/v%条件は PBS 単独であり、外部保護剤による化学的保護を排除した状態で、 μ PD 法の物理的保護効果を純粋に評価するための基準条件として設定した。一方、5 w/v%および 10 w/v%条件は、従来の凍結乾燥研究で保護効果が報告されている糖質混合物 (デキストラン、グルコース、トレハロース) を添加した条件であり、細胞膜の安定化に寄与するトレハロース、ガラス転移温度を上昇させ保存安定性を高めるデキストラン、および浸透圧調整に寄与するグルコースを組み合わせることで、多角的な化学的保護効果を期待し、凍結乾燥直後から保存期間中にかけて、化学的保護との相乗効果を検証することを目的とした。これら 6 種類の試料について、保管温度として冷蔵条件 (2°C) および室温条件 (約 28°C) という二つの異なる温度環境を設定し、最長 3 ヶ月間保存した。冷蔵条件は、実際の医療現場での標準的な保管環境を想定したものであり、室温条件は、災害時や遠隔地医療など、冷蔵設備が利用困難な状況を想定した条件として設定した。評価項目として、各保管時点 (凍結乾燥直後(保管無し)、1 ヶ月後、2 ヶ月後、3 ヶ月後) において、以下の 3 つの指標を測定した。第一に、再水和後の溶血率を定量評価することで、赤血球膜の機能的完全性の保持度を評価した。溶血率は、臨床応用における最も重要な品質指標であり、輸血後の赤血球生存率と直接的に相関する。第二に、凍結乾燥体の含水率を測定することで、残留水分量の経時変化を追跡した。含水率は、化学的劣化反応の進行速度を規定する重要な物理化学的パラメータであり、保存安定性を予測する指標として有用である。第三に、再水和後の細胞形態を光学顕微鏡により観察し、定性的に評価した。形態観察により、溶血率という数値データでは捉えきれない、細胞膜の微細な損傷や凝集状態を評価することができる。

これらの多角的な評価を通じて、保存条件 (温度、期間) が品質に及ぼす影響を体系的に解析し、 μ PD 法による凍結乾燥赤血球の実用化に向けた最適保管条件を提案することを本章の目的とした。さらに、保護剤濃度と保存安定性の関係を明らかにすることで、 μ PD

法に最適化された保護剤設計の指針を得ることも重要な目的である。

5.3. 実験・評価方法

5.3.1. 凍結乾燥赤血球試料の作製

ヒト全血を $700\times g$ で 30 分間遠心分離し、上清（血漿）およびバフィーコート（白血球層）を除去することで、赤血球濃厚液を得た。保護液は、PBS (pH 7.4) を基本バッファーとし、これに所定濃度 (0 w/v%, 5 w/v%, 10 w/v%) の糖類混合物を溶解して調製した。糖類混合物の組成は、デキストラン（分子量 40,000、Sigma-Aldrich）、グルコース（Sigma-Aldrich）、トレハロース（二水和物、和光純薬工業）を重量比 22:20:3 で混合したものとした。この組成は、先行研究において赤血球の凍結乾燥保護効果が報告されている配合に基づいている³⁴。0 w/v%条件は、糖類混合物を添加せず、PBS 単独とした。調製した保護液に、前述の赤血球濃厚液を添加し、最終ヘマトクリット値が 1 %となるように調製した(赤血球懸濁液)。

5.3.2. 凍結方法

凍結乾燥法の効果を比較検証するため、以下の 2 種類の方法を適用した。

(A) 緩慢凍結法(Slow 法)

前項で調製した赤血球懸濁液 1 mL を、6 mL 容量のガラスバイアルへ分注した。バイアルは密栓せず、開放状態のままプログラム可能なペルチェ冷却装置に設置した。サンプルは、初期温度 20 °Cから 1 °C/min の冷却速度で-30°Cまで冷却され、引き続き同温度にて 120 分間保持するように設定した。凍結完了後、次項に示す乾燥工程に供した。

(B) 真空微噴凍結乾燥法(μ PD 法)

真空微噴凍結乾燥 (μ PD) 装置（詳細は第 1 章参照）を使用した。本装置は、真空チャンバー（到達真空度 約 4 Pa）、冷却トラップ (-80 °C)、および制御システムから構成される。赤血球と保護液の混合試料 (20 mL) がシリンジに充填され、このシリンジは噴霧チャンバー内に設置されたシリンジポンプに装着された。チャンバー内が 10 Pa 以下まで減圧された後、試料は微小液滴(ノズル径：50 μ m) として噴霧された。噴霧された液滴は、真空中で瞬間的に凍結するとともにチャンバー底部の回収皿に捕集され、引き続き一次乾燥工程に移行した。

5.3.3. 乾燥工程

乾燥は Table 5.1 に示す条件で実施した。一次乾燥(-30°C, 7 時間)および二次乾燥(20°C, 7 時間)の全工程中、チャンバー内圧力は 10 Pa 以下に維持された。

Table 5.1 The Drying Condition

	Primary Drying	Secondary Drying
Temp. (°C)	-30 °C	20 °C
Time(h)	7h	7h

乾燥終了後の処理は、μPD 凍結乾燥サンプルについては、チャンバー内を Ar ガスにて大気圧まで復圧した後、サンプルが堆積した状態の回収皿を直ちにグローブボックス（湿度 20%以下に制御）へ移動させた。その後、サンプルを手動でガラスバイアル（容量 6 mL (cc)）へ充填した。一方、緩慢凍結乾燥法サンプル（バイアル内凍結）については、乾燥終了後にバイアルの栓を閉じた。その後、すべての試料は、次項に示す方法に従い速やかに密封保存された。

5.3.4. 長期保存準備

凍結乾燥完了後の試料は、酸化劣化の主要因である酸素との接触、および大気中の水分による吸湿を完全に遮断するため、真空密封包装が行われた。各試料バイアルはラミネートフィルム袋に封入され、真空包装機を用いて袋内を真空引きした後、ヒートシールにより密封された。保管条件として、以下の 2 種類の温度条件が設定した。冷蔵保管は、ポータブル冷蔵庫（Anker）を用い、温度約 2°Cで実施した。室温保管は、換気ファン付きの Box を用い、実験室環境温度—冷房付き（28°C）で実施した。両条件ともデータロガーにより温度・湿度を記録したところ、冷蔵条件は平均 2.7°C・相対湿度 77.5%、室温条件は平均 25.5°C・相対湿度 58.3%であった。保管期間は 3 ヶ月間とし、分析用試料は 1 ヶ月後、2 ヶ月後、および 3 ヶ月後の各時点で採取した。

5.3.5. 評価方法

凍結乾燥試料の再水和は、以下の手順で実施した。保存容器から試料を取り出し、元の体積に相当する PBS(pH 7.4, 37°Cに予熱)を添加した。再水和後の試料は、以下の評価を行った。

再水和後の赤血球懸濁液 10 μL をスライドガラス上およびセルカウンター上に滴下し、カバーガラスで封入後、光学顕微鏡(VHX-X1, 株式会社キーエンス)を用いて観察した。また、溶血率測定のため、残りの赤血球懸濁液を遠心分離(2000×g で 3 分)し、上清を回収した。分光光度計(F-7100, 株式会社日立製作所)を用い、上清中のヘモグロビン由来の吸光度(波長 540 nm)を測定した。総ヘモグロビン濃度を反映する吸光度は、遠心分離前の赤血球懸濁液の一部を蒸留水で完全に溶血させた試料から同様に測定した。

5.3.6. 含水率の測定

各乾燥試料の含水率は、カールフィッシャー水分測定装置(MKA-610, 京都電子工業株式会社)を用いて測定した。各試料バイアルから、凍結乾燥体約 50 mg を精密に秤量し、試料を水分計の反応容器に迅速に投入した。

5.4. 結果

5.4.1. バッファー添加直後（凍結乾燥前）の赤血球評価

まず、長期保存試験に供する前の、6 試料の初期特性を評価した。Figure 5.1 は、凍結乾燥前の赤血球の形態を示している。0w/v%(PBS), 5w/v%, 10w/v%のいずれの保護液においても、溶血率は 0 %であった。

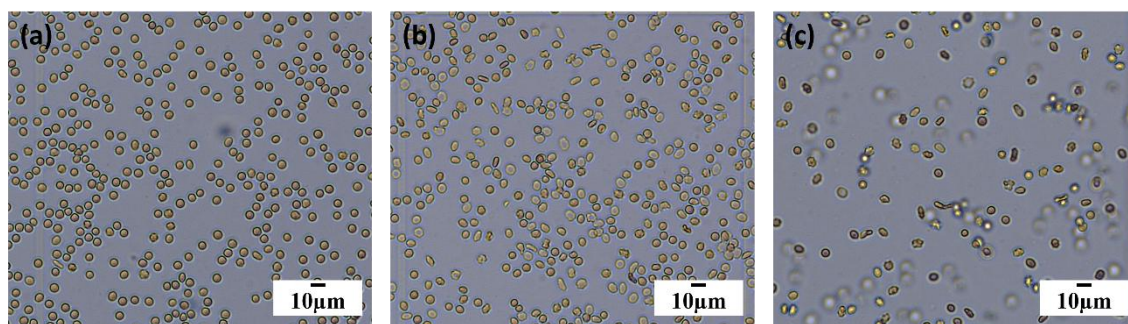


Figure 5.1 RBCs Morphology before Lyophilization. Microscopic images of RBCs immediately following the addition of buffer solution at concentrations of (a) 0 w/v% (PBS), (b) 5 w/v%, and (c) 10 w/v%.

一方、Figure 5.2 は凍結乾燥・再水和直後の形態を示す。緩慢凍結法では、すべての糖濃度（PBS, 5w/v%, 10w/v%）において細胞の形態はほとんど失われ、溶血が確認された。対照的に、μPD 法では、0w/v%(PBS)および 5w/v%の条件で多数の赤血球細胞の形態が残存していた。しかし、μPD_10w/v%の条件では、緩慢凍結(Slow)群と同様に細胞の多くが破壊されており、高濃度の糖が μPD プロセスにおいて悪影響を及ぼしたことが示唆された。

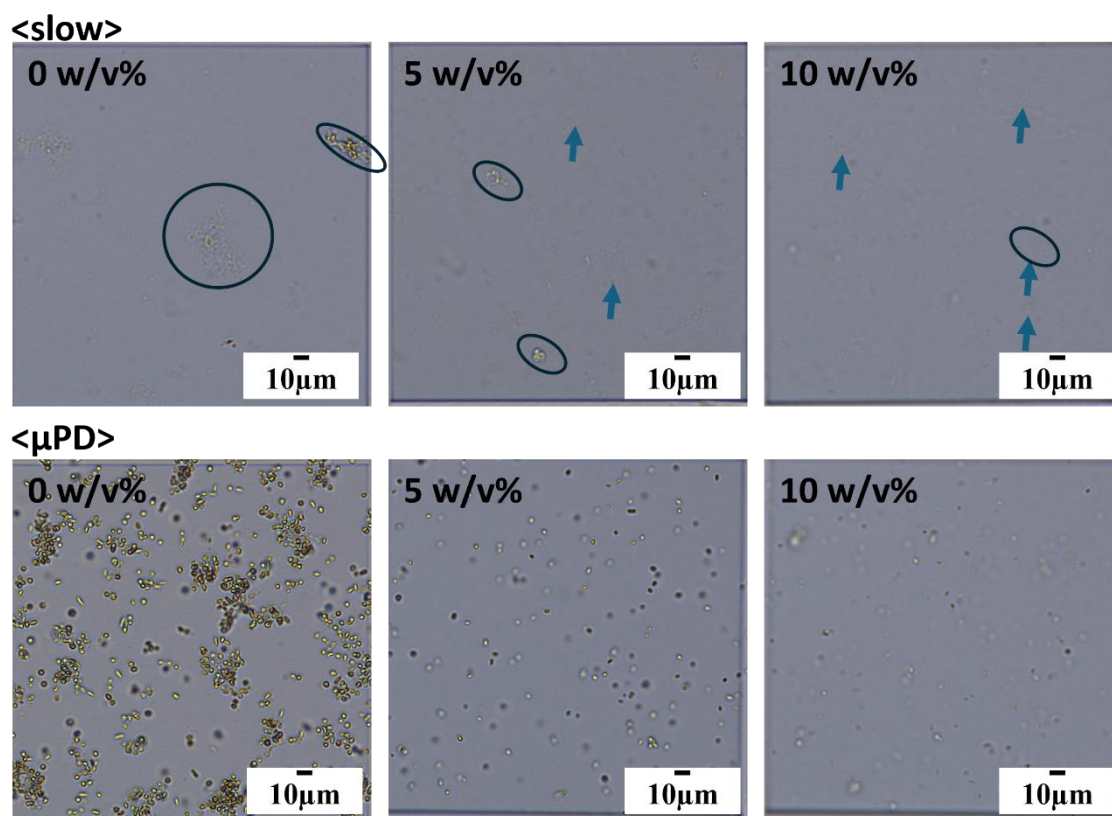


Figure 5.2 Morphology of Rehydrated Red Blood Cells (RBCs) Immediately After Freeze-Drying. The images compare the effects of different buffer concentrations (0 w/v% PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) and two drying methods, Slow Freezing/Drying (Slow) and Micro Powder Drying(μ PD), on RBC morphology following rehydration.

溶血率と含水率のデータ Table 5.2、Table 5.3 にまとめる。溶血率に関しては、全ての糖濃度条件において μ PD 法が緩慢凍結法を下回り、特に μ PD_PBS で最も低い値を示した。一方、含水率に関して、 μ PD 群では糖濃度の上昇に伴い含水率が上昇する傾向（5.9% → 12.1%）が見られたのに対し、緩慢凍結(Slow)群では逆に糖濃度の上昇に伴い含水率が減少する傾向（10.9% → 6.8%）が確認された。

Table 5.2 Hemolysis Percentage Immediately After Freeze-Drying

Hemolysis%	PBS	5w/v%	10w/v%
slow	80.4	75.1	76.9
μ PD	69.0	69.5	70.4

Table 5.3 Moisture Content Immediately After Freeze-Drying

Moisture Content%	PBS	5w/v%	10w/v%
slow	10.9	7.1	6.8
μPD	5.9	6.2	12.1

5.4.2. 保存温度および保存期間が形態・含水率、溶血率に与える影響

次に、1～3 か月の保存試験の結果を示す。Figure 5.3、Figure 5.4、Figure 5.5、Figure 5.6、Figure 5.7、Figure 5.8 へ保存条件・期間における再水和後の顕微鏡画像を示す。緩慢凍結(Slow)群において、5w/v%および 10w/v%の条件では凍結乾燥直後の試料と同様、保存期間・温度によらず、赤血球の形態はほとんど確認できなかった。一方、Slow_PBS条件では、細胞の形態は保たれていないものの、細胞の破片や残骸が他の緩慢凍結条件より比較的多く観察された。μPD 群において μPD_10w/v%条件は緩慢凍結(Slow)群と同様、正常細胞はほとんど確認できなかった。対照的に、μPD_PBS および μPD_5w/v%の試料では、3 か月の保存期間後も、冷蔵・室温の両条件で細胞の残存が確認された。

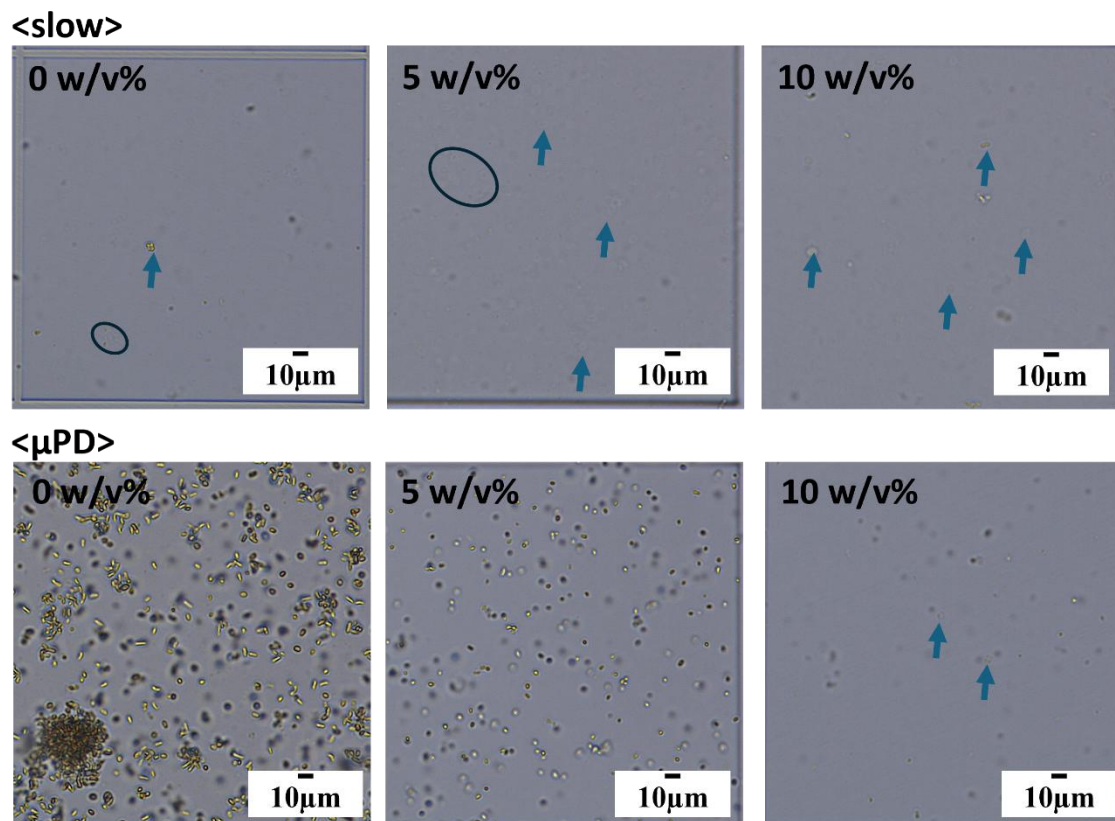


Figure 5.3 Morphology of Rehydrated Red Blood Cells (RBCs) After One Month of Refrigerated Storage. The images compare the effects of different buffer concentrations (0 w/v% PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) and two drying methods, Slow Freezing/Drying (Slow) and Micro Powder Drying (μ PD), on RBC morphology following rehydration, after the freeze-dried samples were stored at refrigerated temperature for one month.

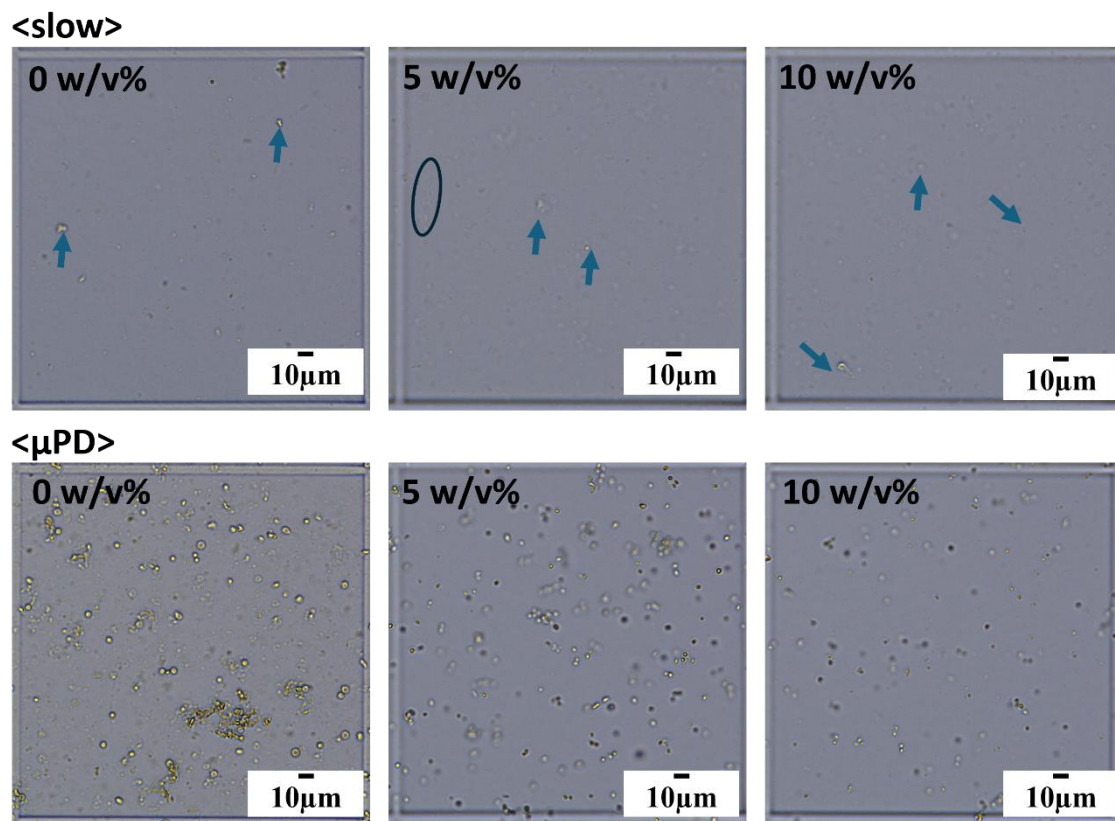
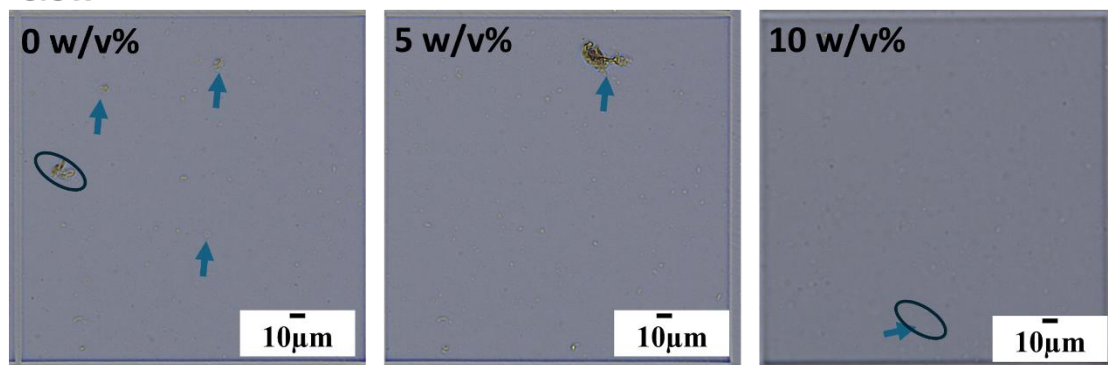


Figure 5.4 Morphology of Rehydrated Red Blood Cells (RBCs) After One Month of Room Temperature Storage. The images compare the effects of different buffer concentrations (0 w/v% PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) and two drying methods, Slow Freezing/Drying (Slow) and Micro Powder Drying (μ PD), on RBC morphology following rehydration, after the freeze-dried samples were stored at room temperature ($\sim 28^{\circ}\text{C}$) for one month.

<slow>



<μPD>

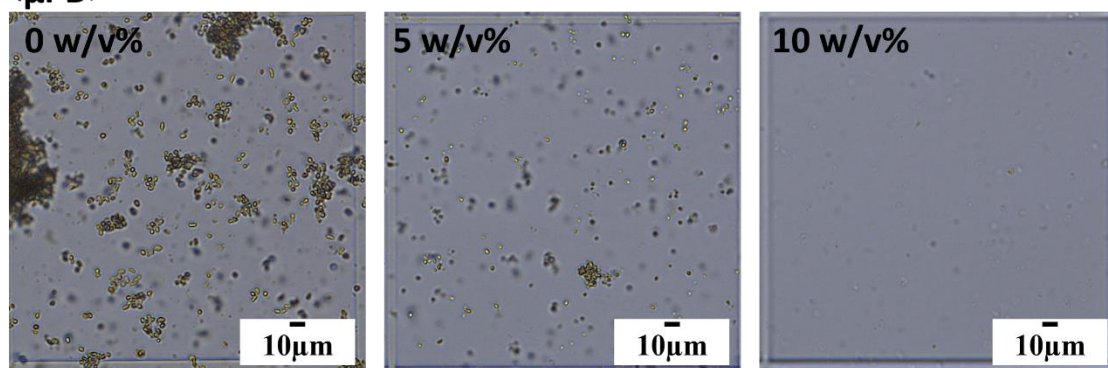
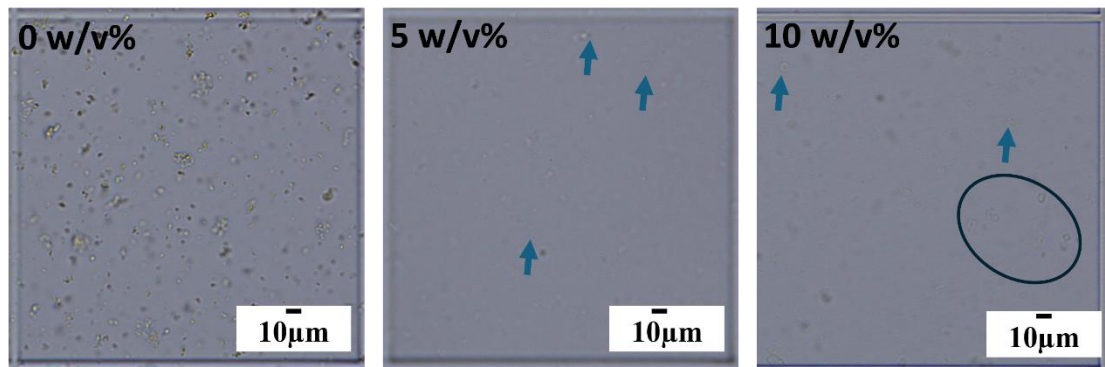


Figure 5.5 Morphology of Rehydrated Red Blood Cells (RBCs) After two Month of Refrigerated Storage. The images compare the effects of different buffer concentrations (0 w/v% PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) and two drying methods, Slow Freezing/Drying (Slow) and Micro Powder Drying (μPD), on RBC morphology following rehydration, after the freeze-dried samples were stored at refrigerated temperature for two months.

<slow>



<μPD>

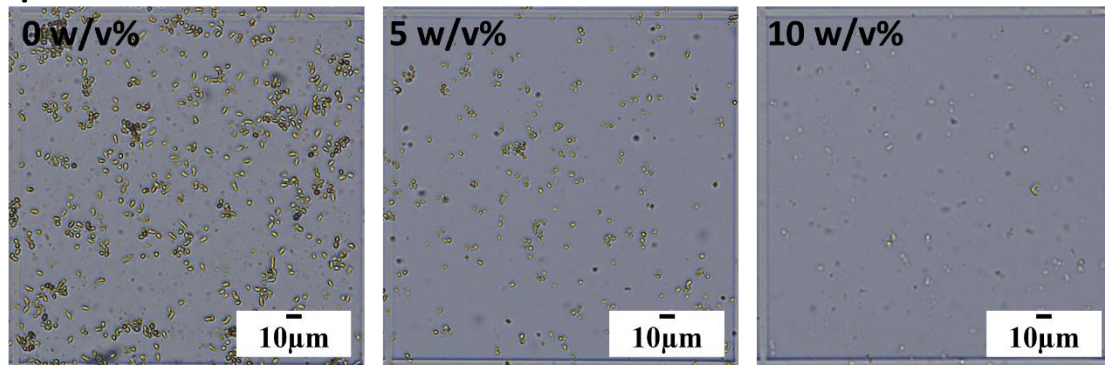
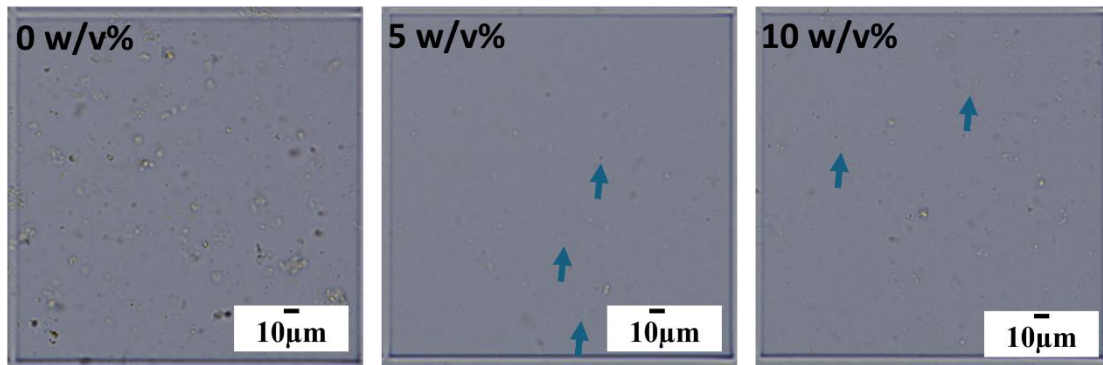


Figure 5.6 Morphology of Rehydrated Red Blood Cells (RBCs) After Two Months of Room Temperature Storage. The images compare the effects of different buffer concentrations (0 w/v% PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) and two drying methods, Slow Freezing/Drying (Slow) and Micro Powder Drying (μPD), on RBC morphology following rehydration, after the freeze-dried samples were stored at room temperature ($\sim 28^{\circ}\text{C}$) for two months.

<slow>



< μ PD>

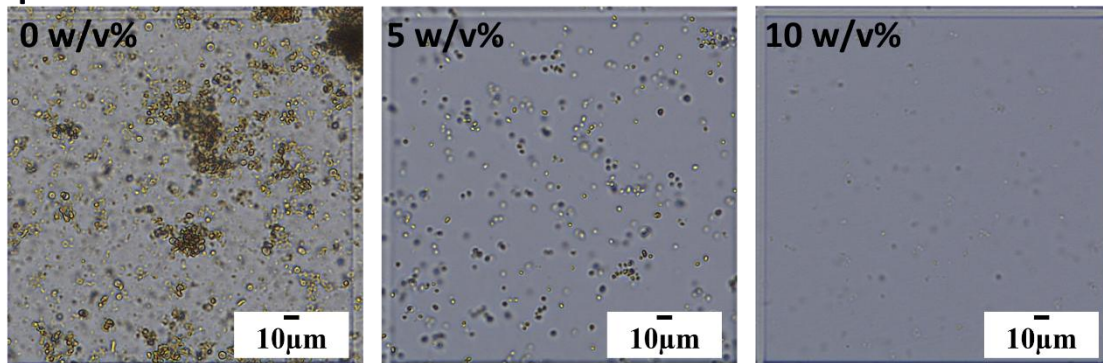
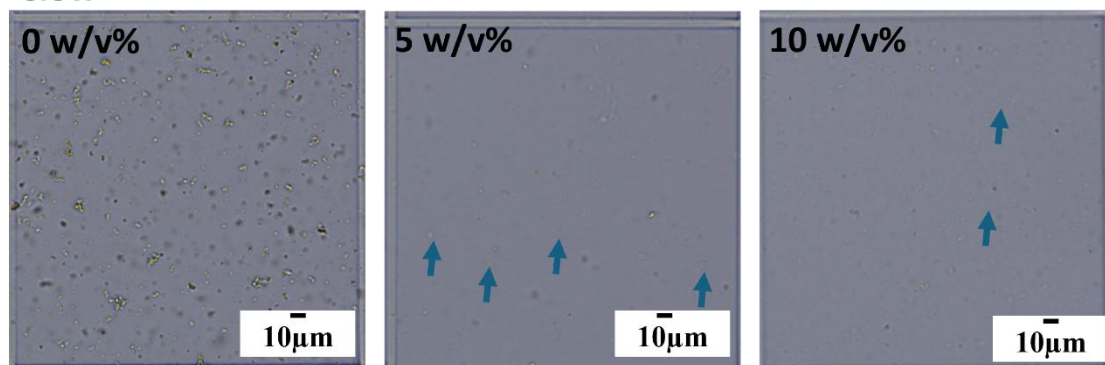


Figure 5.7 Morphology of Rehydrated Red Blood Cells (RBCs) After Three Months of Refrigerated Storage. The images compare the effects of different buffer concentrations (0 w/v% PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) and two drying methods, Slow Freezing/Drying (Slow) and Micro Powder Drying (μ PD), on RBC morphology following rehydration, after the freeze-dried samples were stored at refrigerated temperature for three months.

<slow>



<μPD>

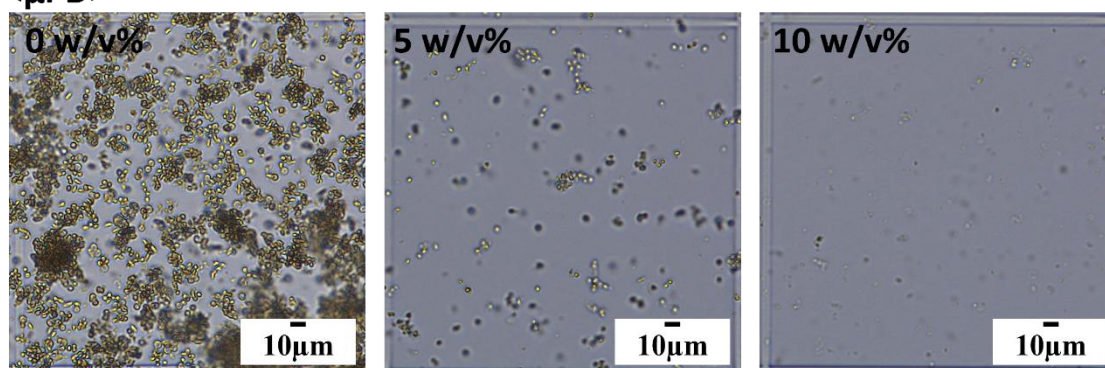


Figure 5.8 Morphology of Rehydrated Red Blood Cells (RBCs) After Three Months of Room Temperature Storage. The images compare the effects of different buffer concentrations (0 w/v% PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) and two drying methods, Slow Freezing/Drying (Slow) and Micro Powder Drying (μPD), on RBC morphology following rehydration, after the freeze-dried samples were stored at room temperature (~28°C) for three months.

Figure 5.9 は赤血球の凍結乾燥条件 (μPD および緩慢凍結(slow)) および長期保管条件(直後、1 か月、2 か月、3 か月 (室温、冷蔵) 保管)、さらに保護剤濃度 (0 w/v%、5w/v%、10w/v%) が、溶血率に与える影響を定量的に示している。示された溶血率の評価結果から、μPD の PBS 単独条件が、全期間を通じて、相対的に低い溶血率を示す傾向が認められた。この結果は、μPD が保護剤の保護作用に大きく依存せず、赤血球の膜安定保持において、物理的因子が寄与している可能性を議論する上での一助となるデータである。一方、μPD 法において、5 w/v%および 10 w/v%の保護剤を添加した群では、PBS 単独群と比較して溶血率が上昇する傾向が観察された。特に μPD_10 w/v%条件では、2 か月および 3 か月の長期保管後に溶血率の顕著な上昇が見られ、高濃度の保護剤添加は、本件等の条件下において、長期安定性の顕著な改善には繋がらなかった。これに対し、緩慢凍結凍結/乾燥プロトコルにおいては、保護剤を添加しない PBS 単独条件よりも、5 w/v%および 10 w/v% の保護剤を添加した群の方が全体として低い溶血率を維持しており、従来の凍結乾燥法に

おける保護剤の保護効果が確認された。ただし、Slow_PBS 群の 2 か月(室温)および 3 か月保管において溶血率の一時的な減少が認められた。凍結乾燥された赤血球が、保管中に自発的に安定性を回復させるような既知の物理化学的メカニズムは存在しないため、真の安定性向上とは考えにくい。そのため、これは n=1 による検討であるため、個別の測定値における軽微な変動がグラフ上に現れた可能性も考えられる。

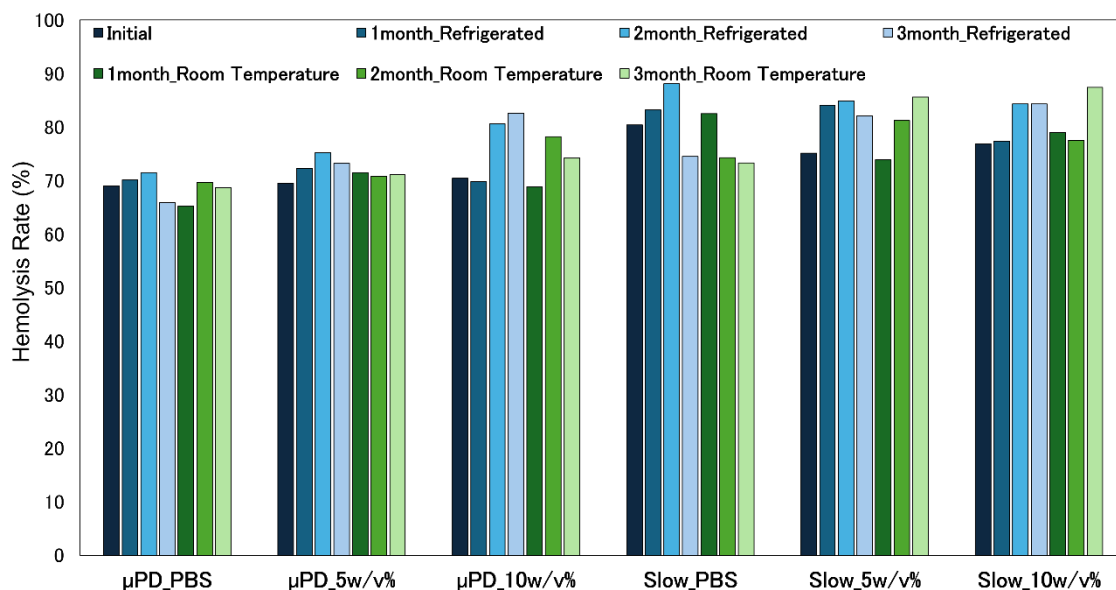


Figure 5.9 Comparative Analysis of Red Blood Cell (RBCs) Hemolysis Percentage Following Lyophilization, Storage, and Rehydration. The bar chart provides a quantitative assessment of the percentage of hemolysis observed in rehydrated red blood cells (RBCs), illustrating the efficacy of various preservation protocols against damage induced by lyophilization and subsequent storage. The data systematically compares the interactive effects of three key experimental variables. The Drying Protocol (Slow Freezing/Drying vs. Micro Powder Drying (μ PD)) and the Excipient/Buffer Concentration (0 w/v% PBS control, 5 w/v%, and 10 w/v%) define the groupings on the x-axis. The color coding of the bars distinguishes the Storage Stability conditions, assessed at multiple time points (Immediately Post-FD, 1, 2, and 3 months) under two distinct thermal conditions (Refrigerated and Room Temperature)(n=1).

Figure 5.10 にしめす凍結乾燥直後の初期含水率は、乾燥プロトコルによって異なる傾向が見受けられた。 μ PD 法においては、保護剤濃度が 0 w/v% (PBS) から 10 w/v%へと増加するに従い、初期含水率が高くなる挙動が観察された。一方、緩慢凍結法では μ PD 法とは対照的に、保護剤濃度が高いほど初期含水率が低値を示す傾向があった。

μ PD_PBS 条件は、本検討の範囲内において、全期間を通じて最も低い含水率を維持し

た。当該条件の初期含水率は約 5.8%であり、3 か月間の室温保管後においても 5.5%と同水準の値を維持した。

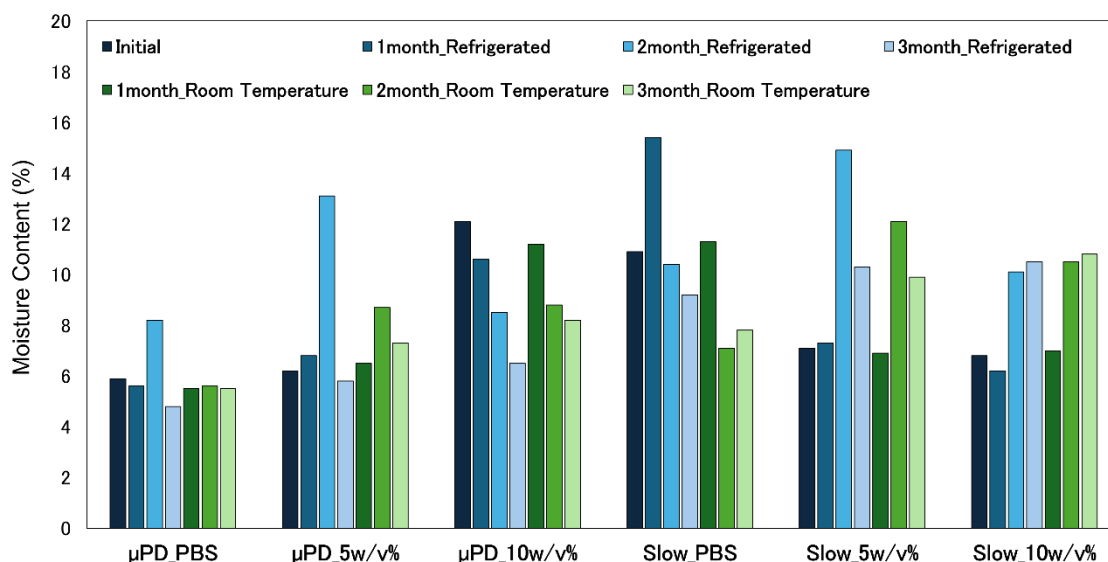


Figure 5.10 The bar chart provides a quantitative assessment of the Moisture Content (%) in the lyophilized red blood cell (RBCs) products, illustrating the impact of various preservation protocols on the physical stability of the lyophilisate during extended storage. The data systematically compares the interactive effects of three key experimental variables. The Drying Protocol (Micro Powder Drying (μPD) vs. Slow Freezing/Drying) and the Excipient/Buffer Concentration (PBS, 5 w/v%, and 10 w/v%) define the groupings on the x-axis. The color coding of the bars distinguishes the Storage Stability conditions, assessed at multiple time points (Initial, 1, 2, and 3 months) under two distinct thermal conditions (Refrigerated and Room Temperature)(n=1).

5.5. 考察

5.5.1. 凍結乾燥法（μPD 法・緩慢凍結法）の優位性

Figure 5.11 は、保管条件の区別なく、凍結乾燥プロトコルおよび保護剤濃度に基づき全 42 サンプルを分類し、含水率 (x 軸) と溶血率 (y 軸) の相関を示したものである。全体として、含水率の増加に伴い溶血率も上昇する正の相関が認められた。各条件の分布からは、以下の傾向が示唆された。

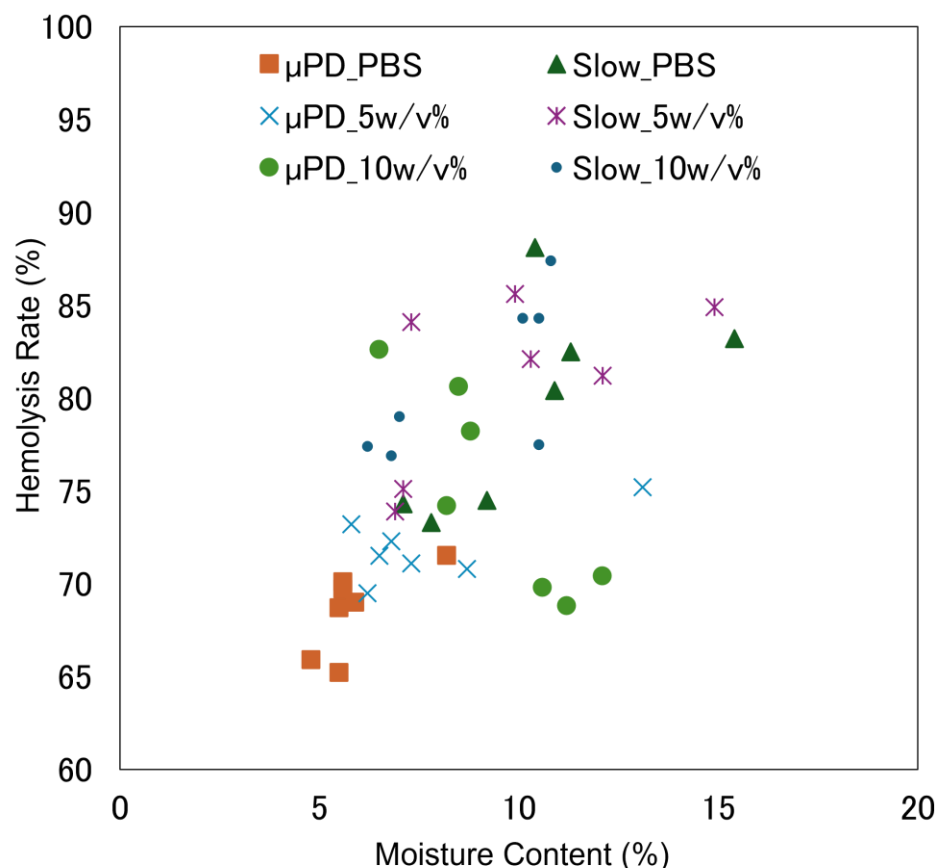


Figure 5.11 Correlation between hemolysis rate and moisture content. The plot shows the relationship between water content (X-axis) and hemolysis rate (Y-axis) for all samples measured at each time point (Initial, 1, 2, and 3 months) under two distinct storage conditions (Refrigerated and Room Temperature). Legend: ■ μPD_PBS, ▲ Slow_PBS, × μPD_5w/v%, * Slow_5w/v%, ○ μPD_10w/v%, ● Slow_10w/v%.

条件別の詳細な検討では、以下の知見が得られた。

μPD_PBS (■) は含水率 (約 5-8%) および溶血率 (約 65-72%) とともに低値を示す領域に集中しており、本検討の範囲において最も安定した挙動を示した。特筆すべきは、この優れた結果が保護剤 (糖類) の添加なしに達成されたことである。これは、μPD 法の超急速冷却による物理的保護が、従来の凍結乾燥で重視されてきた化学的保護 (糖類の膜安定化作用) よりも本質的に重要であることを強く示唆している。液滴が瞬間的に凍結される過程で、細胞膜が極めて迅速に冷却固化され、浸透圧ストレスに起因する不可逆的な構造変化が回避されることによって本結果をもたらしたと考える。

一方、Slow_PBS (▲) は中程度の含水率 (約 7-15%) で、より高い溶血率 (約 74-88%) を示した。緩慢凍結では、凍結過程に細胞外の水が先に凍結するに伴い、未凍結の溶液中の溶質濃度が濃縮される。このため、細胞膜を隔てて極端な浸透圧勾配が形成され、細

胞からの著しい脱水と収縮が生じる。この化学的・浸透圧的ストレスにより、膜骨格タンパク質の構造が不可逆的に変化し、細胞膜の機械的強度が失われる。一度形成された膜損傷は、その後の乾燥工程や保管期間中には修復されず、3 ヶ月の保管を通じて溶血率は高位に維持されたと考えられる。

Slow_PBS の含水率が 7-15%の広い範囲に分散していることは、緩慢凍結法による乾燥ケーキの構造が空間的に不均一であることを示唆している。緩慢凍結では、凍結過程で水が氷晶として析出するに伴い、塩類は共晶点で結晶化し、脆い共晶構造を形成する。この共晶構造は乾燥中の温度上昇時に機械的強度を失いやすく、乾燥工程中に試料内の一部が崩壊（コラプス）する可能性がある。コラプスが生じた領域では、水蒸气流路が閉塞され、その部位の脱水が不十分なまま乾燥終了時を迎える。その結果、試料の部位によって乾燥の進行度が大きく異なり、サンプル内での含水率が不均一に分布している可能性がある。しかし同時に、異なる試料間での凍結・乾燥条件のばらつきも考慮すべきである。緩慢凍結法では液滴サイズ、冷却速度、乾燥シェルフ温度の管理が難しく、試料ごとに微妙な条件差が生じやすい。本研究では各試料から採取した粉碎サンプルについて含水率を測定しており、この値が各試料の平均的な含水率を代表していると仮定している。しかし、含水率が 7-15%の広範囲に分布しているという事実は、サンプル内不均一性、試料間での条件ばらつき、またはこれら両者の組み合わせにより、実験条件に大きく依存する含水率値が確保されたことを示唆している。

5w/v%という糖濃度が、 μ PD 法の超急速冷却による物理的保護と、糖による化学的保護の間に最適なバランスを形成したと考えられる。糖添加に伴う冷却速度低下（ラウールの法則に基づき計算すると約 0.3%）が、5w/v%条件では細胞内氷晶の成長を顕著化させるほどの悪影響をもたらさず、同時に糖が細胞膜のリン脂質頭部と水素結合を形成することで、乾燥中の膜構造を部分的に安定化させたと推定される。 μ PD_5w/v%（×）も、 μ PD_PBS（■）と同じく左下の比較的低含水率・低溶血率領域に位置していた。

これに対して Slow_5w/v%（*）は中程度の分散を示し、含水率 7-15%の範囲で溶血率は約 74-85%であった。興味深いことに、 μ PD_10w/v%（○）では他の条件とは異なる傾向が観察された。すなわち、負の相関（含水率が低いほど溶血率が高い）が見られ、この条件の特殊性が示唆された。 μ PD_10w/v%での物理的損傷は、ラウールの法則に基づいた機構で説明できる。10w/v%という高濃度の糖類添加により、溶液の飽和蒸気圧が著しく低下し、結果として液滴の蒸発速度が 5w/v%条件よりもさらに低下する。蒸発潜熱の計算に基づくと、この低下は液滴の冷却速度をさらに約 0.6%低減させる。このわずかな冷却速度の低下が、細胞内での氷晶成長を促進し、膜骨格に対する物理的損傷をもたらした可能性が考えられる。

全体として、緩慢凍結法（Slow 法）による試料（*、●、▲プロット）はグラフの右上領域、すなわち「高含水率・高溶血率」のエリアに広く分布しており、急速凍結法（ μ PD）による試料との相違を示した。この対照的な分布は、赤血球の凍結乾燥において、冷却速

度という物理的因子が細胞の初期損傷を規定する支配的な要素であることを示唆している。特に注目すべきは、保護剤を含まない μ PD_PBS が最も安定した挙動を示した点である。これは、 μ PD 法による超急速冷却が凍結段階での膜構造保持に極めて有効に作用しており、従来の凍結乾燥で不可欠とされる保護剤による化学的保護（糖類の膜安定化作用）の必要性が、本プロトコル内では相対的に低下している可能性を提示している。

5.5.2. 糖濃度の保存安定性への寄与

凍結乾燥直後の含水率に対する糖濃度の影響は、採用した凍結乾燥法によって対照的な傾向を示した。 μ PD 法では、糖濃度の上昇に伴い含水率が増加する傾向が認められたのに対し、緩慢凍結法では逆に糖濃度の上昇に伴い含水率が低下した。この相反する傾向は、両手法における乾燥効率を決定づける支配的物理化学的因子が根本的に異なることを示唆している。

μ PD 法では、乾燥後の含水率が糖濃度に依存して増加することは、乾燥プロセスのボトルネックが構造維持ではなく水分除去効率にあることを示唆している。 μ PD 法で形成される高比表面積の微粒子は、安定な骨格構造を有しており、その維持は問題ではない。むしろ、問題は保護剤である糖類が結合した水分子の除去の困難性にある。具体的には、一次乾燥・二次乾燥のサイクルは、試料に含まれる自由水（蒸気圧勾配により容易に昇華される水）を主に除去する。しかし、糖類のヒドロキシ基（-OH）とヘモグロビンおよびリン脂質の極性基との間に形成される水素結合による結合水は、乾燥サイクルでは除去されない。糖濃度が高いほど、この結合水の総量が増加し、結果として含水率が上昇する。

ラウールの法則に基づいて考えると、高濃度の糖類は溶液全体の水蒸気圧を低下させ、蒸発速度（すなわち冷却速度）を低下させる。その結果、液滴の冷却速度が低下し、細胞内での氷晶成長が促進される可能性がある。大きな氷晶は比表面積が小さいため、乾燥プロセス中での水分脱離の効率が低下し、結果として水分保持が加速される可能性も考えられる。さらに、高濃度の糖類添加は、凍結乾燥後の乾燥ケーキ構造内での水分分布を不均一にする可能性がある。微粒子表面での糖の濃縮、または微粒子内部と表面での糖濃度勾配の形成により、特定領域での強い水分保持が生じた可能性がある。

一方、緩慢凍結法では糖濃度の上昇に伴い含水率が低下する傾向が見られた。これは緩慢凍結法における乾燥効率の支配的因子が「乾燥ケーキの構造維持能力」にあることを示唆している。緩慢凍結法では、凍結過程で水が氷晶として析出する際、塩類や糖類は共晶化し、脆い固体構造を形成する。この構造は乾燥中の温度上昇に対して機械的強度が低く、乾燥中に部分的に崩壊（コラプス）する可能性がある。コラプスが生じると、乾燥ケーキ内の気孔構造が破壊され、水蒸気の流路が閉塞される結果、脱水が不十分に終わる。高分子保護剤（特にデキストラン、分子量 40,000）を添加すると、乾燥後のケーキ構造の機械的強度が向上する。これは、高分子が乾燥ケーキの骨格を補強し、自重やわずかな温度上

昇での崩壊を防ぐ効果を持つためである。結果として、安定した気孔構造が維持され、水蒸气流路が確保され、効率的な昇華が実現し、より低い含水率が達成された。PBS 単独の場合は構造強度が最も低く、コラプスのリスクが最も高い。したがって含水率は最も高く（10.9%）留まった。

この機構の相違は、 μ PD 法と緩慢凍結法における乾燥プロセスの本質的な違いを反映している。 μ PD 法は微粒子の高い比表面積を活かした効率的な昇華に最適化されているのに対し、緩慢凍結法は乾燥ケーキの脆弱性という異なる課題をもつ。保存期間中にこれらの構造的特性がさらに経時変化することで、材料の安定性が左右されることになる。

5.5.3. 含水率と溶血率の相関と保存条件の最適化

Figure 5.12 に 6 種類の凍結乾燥方法・バッファー条件（ μ PD_PBS, Slow_PBS など）を区別せず、全 42 サンプルを保管条件(保管期間・温度)のみで分類し、含水率と溶血率の関係を示した散布図を示す。本解析では、凍結乾燥プロトコルの差異を超えて、保管条件が製剤品質に及ぼす普遍的な影響を抽出することを目的とした。

凍結乾燥直後（Initial, ■）のデータ群（全 6 点）は、グラフの左下に集中せず、含水率 5.8%~12.1%（範囲 6.3 ポイント）、溶血率 69%~80.4%（範囲 11.4 ポイント）の広範な分布を示した。理想的には、凍結乾燥直後のサンプルは低含水率・低溶血率の領域に集中することが望ましいが、本実験ではそのような収束は観察されなかった。この結果は、初期品質が凍結乾燥プロトコル（乾燥速度、一次乾燥温度、二次乾燥時間など）および使用バッファーの種類に強く依存することを明確に示している。特に含水率については約 2 倍の差異が生じており、乾燥の進行度が条件間で大きく異なることが示唆される。含水率の高いサンプルは、残留水分による化学的・物理的劣化のリスクが高く、保管安定性に不利であることが予想される。

保管期間が経過するにつれて（Initial ■ → 1 ヶ月 ▲/× → 2 ヶ月 ＊/○ → 3 ヶ月 +/◆）、プロット群は全体としてグラフの右方向（高含水率）および上方向（高溶血率）へ移行する傾向があった。Table 5.4 に保管期間ごとに、全 6 条件の平均値を算出した数値を示す。平均含水率は、Initial 時点の 8.2%から 1 ヶ月後 8.3%、2 ヶ月後 10.3%、3 ヶ月後 11.2%へと段階的に上昇した。同様に、平均溶血率も Initial 時点の 73.6%から 1 ヶ月後 75.1%、2 ヶ月後 77.9%、3 ヶ月後 79.1%へと一貫して増加した。この経時的な上昇傾向は、凍結乾燥赤血球製剤が保管中に吸湿および品質劣化を継続的に受けることを示している。

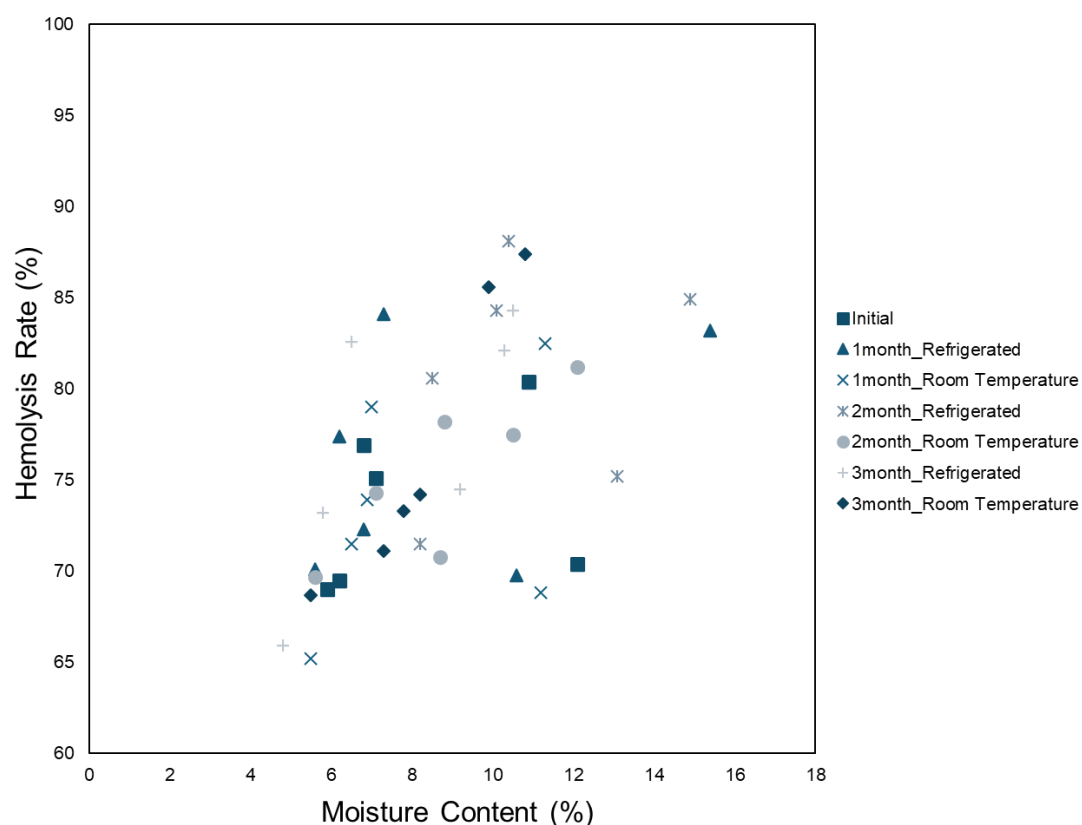


Figure 5.12 Temporal and thermal evolution of hemolysis rate during extended storage. The plot demonstrates the relationship between moisture content (X-axis) and hemolysis rate (Y-axis) across storage intervals and temperature regimens. Data are stratified by storage duration and thermal condition: Initial (■), 1 month [Refrigerated (▲), Room Temperature (×)], 2 months [Refrigerated (*), Room Temperature (○)], and 3 months [Refrigerated (+), Room Temperature (◆)]. Samples are categorized by drying method and excipient concentration: μ PD_PBS, Slow_PBS, μ PD_5w/v%, Slow_5w/v%, μ PD_10w/v%, and Slow_10w/v%.

Table 5.4 Average moisture content and average hemolysis rate of freeze-dried red blood cell samples grouped by storage period. (Values represent the average of all 6 experimental conditions.)

Storage Period	Average Moisture Content (%)	Average Hemolysis Rate (%)
Initial	8.2 %	73.6 %
1 Month	8.3 %	75.1 %
2 Months	10.3 %	77.9 %
3 Months	11.2 %	79.1 %

本実験では、すべてのサンプルをガラスバイアルに封入後、キャップで密閉し、さらにシーリングフィルムで蓋部分をシールした。その後、吸湿剤とともに真空パックに保管することで、外部環境からの吸湿を最小限に抑える対策を講じた。そのため、バイアル内に残存する微量の水蒸気が、保管中に凍結乾燥ケーキ表面へ徐々に吸着することで、総水分量が増加した可能性や含水率測定時のハンドリングが測定値に影響を及ぼした可能性を考慮すべきである。本実験では、真空パックからサンプルを取り出し、バイアルを開栓してカールフィッシャー法による含水率測定を実施した。この過程において、凍結乾燥ケーキが一時的に大気に曝露される。凍結乾燥製剤は極めて吸湿性が高く、多孔質構造と大きな比表面積を有するため、短時間の大气曝露でも急速に水分を吸着することが知られている。特に、保管期間が長いサンプルほど、PBS 成分や糖類の結晶化により表面物性が変化している可能性があり、測定時の吸湿速度が異なることで、見かけ上の含水率差が拡大した可能性がある。ただし、すべてのサンプルは同一のプロトコルで取り扱われたため、この効果が系統的に保管期間に依存する理由は明確ではない。

また、各保管時点（1, 2, 3 ヶ月）において、冷蔵保管（▲, ＊, +）と室温保管（×, ○, ◆）のプロット群を比較すると、両者に明確な差は見られなかった。2 つの温度条件のデータは、ほぼ同一の領域に混在して分布していた。これは、本実験の 3 ヶ月の期間内では、保管温度（2°C vs 28°C）が溶血率に対して支配的な影響を与えていないことを示唆している。一般的に、化学反応速度は温度上昇に伴い指数関数的に増加する（アレニウスの法則）ため、室温保管では劣化が加速されることが予想される。しかし、本実験ではそのような明確な温度依存性が観察されなかった。この結果の解釈として、以下の可能性が考えられる。

第一に、本実験で用いた凍結乾燥赤血球の主要な劣化メカニズムが、温度にあまり依存しない物理的過程（例：構造緩和、相分離）である可能性である。

第二に、冷蔵条件（2°C）においても、凍結乾燥製剤のガラス転移温度を大きく下回る温度ではないため、分子運動性が十分に抑制されず、劣化速度の低減効果が限定的であった可能性が挙げられる。本製剤の T_g について、本研究では直接的な測定には至っていない。しかし、一般的にトレハロースの無水状態での T_g は約 100°C 以上、含水率 10 % 付近では常温付近まで低下することが報告されている。本実験における冷蔵と室温での劣化速度に顕著な差が見られなかった要因として、残留水分による T_g の低下が、室温のみならず冷蔵条件下においても分子運動を十分に抑制できない領域に達していた可能性が考えられる。今後は DSC（差示走査熱量計）等を用いた実測により、 T_g と含水率の相関を厳密に定義することが、熱安定性の閾値を特定する上で不可欠な課題である。

第三に、観察期間（3 ヶ月）が、温度差の効果を検出するには不十分であった可能性がある。より長期の保管実験（6 ヶ月以上）により、温度効果が顕在化する可能性は排除できない。したがって、現時点での温度依存性なしという結果は、本実験条件における 3 ヶ月という短期間に限定された暫定的な知見である。より長期間（6 ヶ月以上）の保管、あるいはガラス転移温度に接近する高温域での加速試験を実施することで、温度効果が顕在

化し、本製剤の真の熱安定性が明らかになると考えられる。

さらに、本実験で観察された経時的な含水率の上昇および溶血率の変動は、限られたサンプルサイズに基づく結果であり、測定環境の湿度変化やハンドリングによるばらつきの影響を完全には排除できていない。個々のプロットの微増が真に製剤の劣化を示すものか、あるいは測定誤差の範囲内であるかを厳密に判定するためには、今後、統計的に十分な検体数を用いた再現性の確認が不可欠である。

5.6. 本章のまとめ

本章では、真空微噴凍結乾燥 (μ PD) 法および従来の緩慢凍結法 (Slow 法) により調製した凍結乾燥赤血球について、異なる保護剤濃度 (0 w/v% PBS、5 w/v%、10 w/v%) および保管条件 (2°C冷蔵・28°C室温、最長3ヶ月間) 下での品質変化を系統的に評価した。その結果、以下の重要な知見が得られた。 μ PD 法は、緩慢凍結法と比較して、凍結乾燥赤血球の初期品質および保存安定性の両面において顕著な優位性を示した。特に、 μ PD_PBS 条件 (保護剤無添加) は、全 42 サンプル中で最も低い含水率 (5.8~8%) および溶血率 (65~72%) を維持し、3 ヶ月間の保管後も安定した品質を保持した。この結果は、超急速冷却による物理的保護機構が、従来重視されてきた化学的保護 (糖類添加) よりも重要であることを実証している。 μ PD 法の優位性は、微小液滴の真空中噴霧により達成される極めて高い冷却速度に起因する。この超急速冷却により、細胞内氷晶の成長が効果的に抑制され、赤血球膜の構造的完全性が凍結段階で保護されると考える。対照的に、緩慢凍結法では、凍結過程における細胞外溶液の濃縮に伴う極端な浸透圧勾配が形成され、細胞膜に不可逆的な損傷が生じる。この初期段階での決定的な損傷は、その後の保護剤添加や保管条件の最適化によっても本質的には回復されない。

興味深いことに、 μ PD 法においては保護剤濃度の増加が必ずしも品質向上に寄与しないことが明らかとなった。 μ PD_5w/v%条件は、 μ PD_PBS 条件と同等の良好な結果を示したものの、 μ PD_10w/v%条件では含水率の顕著な上昇 (12.1%) および溶血率の増加が観察された。これは、高濃度の糖類添加がラウールの法則に基づく溶液蒸気圧の低下を引き起こし、液滴の蒸発冷却速度を低減させることで、細胞内氷晶成長を促進した結果と推定される。さらに、 μ PD 法では糖濃度の上昇に伴い凍結乾燥直後の含水率が増加する傾向が認められた。これは、糖類のヒドロキシ基とヘモグロビンおよび膜脂質の極性基との間に形成される水素結合による結合水が、二次乾燥工程でも除去されにくいためと考えられる。この知見は、 μ PD 法における保護剤設計において、単純な濃度増加ではなく、冷却速度への影響と水分保持特性を総合的に考慮した最適化が必要であることを示している。

全 6 条件の平均値解析から、保管期間の延長に伴い含水率 (8.2% → 11.2%) および溶血率 (73.6% → 79.1%) が一貫して増加することが確認された。この経時的劣化は、厳重な密閉処理 (真空パック、吸湿剤併用) を施したにもかかわらず観察され、バイアル内スベ

ースからの水蒸気吸着、蓋の微小な透湿性、または測定時のハンドリングに起因する吸湿が関与している可能性が示唆された。

含水率と溶血率の間には明確な正の相関関係が認められ、含水率の管理が保存安定性確保の鍵となることが示された。残留水分は、ガラス転移温度 (T_g) の低下を介して分子運動性を増大させ、膜脂質の酸化、タンパク質の変性、膜構造の不安定化を促進する。したがって、実用化に向けては、二次乾燥条件のさらなる最適化、より高度な防湿機能を備えた包装形態（アルミラミネート袋等）の採用や、不活性ガス置換による経時的な吸湿の完全な遮断を検討する必要がある。これにより、過酷な外部環境下においても低含水率を維持し、長期保存安定性を担保することが、実地医療や災害現場でのストックを実現するための必須条件となる。

本実験の3ヶ月間の観察期間内では、冷蔵 (275 K) と室温 (301 K) の間で溶血率に明確な差異は観察されなかった。両条件の温度差は約 26 K (相対差として約 10%未満) に留まっており、アレニウスの法則から予想される劣化速度の加速を顕在化させるには、本検討の温度域および観察期間は十分ではなかった可能性が高い。したがって、本結果は温度管理の不要性を証明するものではなく、常温保管の妥当性を検証するためには、40～50℃といったより高温領域でのシビアな加速試験による T_g (ガラス転移温度) 付近での挙動確認が不可欠である。今後はさらなる検体数の確保と、より長期的かつ多角的な機能評価（変形能や代謝活性等）を通じて、 μ PD 法を用いた凍結乾燥赤血球の保存安定性をより強固に実証していく必要がある。

第6章 結論

6.1. 本研究の概要

現代の輸血医療は、赤血球製剤の28日間という短期保存限界と、厳格なコールドチェーン（低温物流網）の必要性という構造的な課題を抱えている。この課題は、災害医療やへき地医療だけでなく、将来的な血液需給バランスの悪化に対する深刻な脅威である。本研究は、この問題を根本的に解決し得る長期常温保存可能な凍結乾燥赤血球（FDRBCs）の製造を実現するため、従来の棚式（緩慢）凍結乾燥法が抱える品質とプロセス効率の課題を克服する技術として、噴霧真空凍結乾燥（ μ PD）法に着目し、その製造プロトコルの体系的な最適化を通じて、凍結乾燥過程における赤血球へのダメージを最小化し、要求される輸血性能を充足させるための技術的基盤を確立することを目的とした。

本研究は4つの段階的な検証を通じて、 μ PD法の実用化に向けた包括的な知見を提供した。以下、各章で得られた主要な成果を総括し、本研究全体の結論を述べる。

第2章では、 μ PD法の超高速自己凍結（ $>10,000^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ）の基礎的有効性を凍結融解実験により検証した。結果として、 μ PD法は緩慢凍結で生じる致命的な化学的ストレス（溶質濃縮と浸透圧勾配）を根本的に回避し、溶血率を大幅に低減させる明確な優位性を示した（溶血率： μ PD法58% vs 緩慢凍結法80%）。ラマン分光分析により、いずれの急速凍結法においても結晶水の特徴的なピークが観察された。可能性の一つとして、失透による微細氷晶形成が示唆される。一方、 LN_2 浸漬法との比較から、保護剤（デキストラン）の添加に伴う溶液粘性上昇や蒸気圧低下により、 μ PD法の実効冷却速度が低下するという μ PD法特有の課題も特定された。

第3章では、前処理工程としてのトレハロース導入法の最適化に取り組み、従来の高浸透圧インキュベーション法が16時間もの長時間処理で深刻なダメージ（導入後の溶血率約21.8%）を与えることを定量的に明らかにした。また、新規の細胞膜透過性ペプチド（CPPs）法との比較から、重要な知見が得られた。すなわち、導入直後の低い溶血度が必ずしも凍結乾燥後の低い溶血度を保証しないことが明確になり、さらに高浸透圧法では導入直後13%の低い溶血率が凍結乾燥後には78~81%へと急増するのに対し、CPPs 7.5 mM条件では導入直後の溶血率9.7%にもかかわらず凍結乾燥後62.9%の比較的良好な生存率を維持した。これらの結果から、細胞内トレハロース濃度そのものよりも、導入から乾燥に至る一連のプロセスにおいて細胞が蓄積する総ストレス量が、最終的な赤血球生存率を決定する主要因であると考えた。プロセス全体を通じた総ストレスの最小化が赤血球保存の根本的な原理であることが示唆された。

第4章では、凍結乾燥後の生存率を左右する乾燥プロファイルの最適化とプロセス効率を検証した。 μ PD法は乾燥条件を適切に最適化することで、従来の棚式（緩慢）凍結乾燥法と同等の細胞保護効果（溶血率： μ PD_PBS 66.6% vs Shelf_PBS 63.3%）を達成可能である

ことが示された。特に重要な知見として、 μ PD 法の微細な球状粒子構造が極めて高い比表面積を有することで、同一の一次乾燥時間（3.5 時間）での含水率が緩慢凍結乾燥法（18.56%）に比べて μ PD 法（6.11%）で 3 倍以上低いという、プロセス効率における顕著な優位性が実証された。さらに、一次乾燥時間を 7 時間から 3.5 時間に半減させた μ PD 条件（ μ PD[4]）においても、緩慢凍結乾燥法と同等の溶血率（74.5% vs 73.6%）を維持しつつ、より低い含水率を達成できることが示された。このことは、 μ PD 法が生産効率の面で従来法に対して明確な優位性を有することを意味し、実用化に向けた大規模生産への適用可能性を強く示唆している。一方、含水率と溶血率の逆転現象（ μ PD[1]と μ PD[2]）の観察から、最終的な含水率が単なる二次乾燥の温度と時間だけでなく、それに先立つ凍結・一次乾燥プロセスが形成するマトリックスの微細構造に大きく左右されることが明確になった。

第 5 章では、3 ヶ月間の長期保存安定性試験を実施し、 μ PD 法は冷蔵（2°C）・室温（28°C）の両保管条件下で 3 ヶ月間にわたり緩慢凍結法に対し一貫して高い安定性を維持したことが示された。特に顕著な知見として、保護剤を一切添加しなかった μ PD_PBS 条件が全 42 サンプル中で最も優れた品質安定性（最低の含水率 5.8~8.0%、最低の溶血率 65~72%）を示したことが挙げられ、この結果は μ PD 法の超急速冷却（物理的保護）が緩慢凍結時に避けられない致命的な化学的ストレス（浸透圧勾配）による不可逆的な膜損傷を根本的に回避し、細胞膜の構造的完全性を物理的に保護したことを強力に裏付けている。一方、 μ PD 法では糖濃度の上昇に伴い含水率が増加する傾向（PBS 5.9% → 10w/v% 12.1%）が観察され、これは糖類に結合した水分子の二次乾燥での除去困難性に起因すると思われる。

6.2. 今後の展望

本研究は μ PD 法を用いて、赤血球の物理的損傷および保護メカニズムを多角的に検証し、同手法の赤血球凍結乾燥への適合性と、実用化に向けた至適条件の一端を明らかにしたが、いくつかの限界を有する。第一に、再水和後の溶血率が依然として 66~79%と高く、臨床応用に必要とされる生存率に達していない。第二に、本研究では形態的完全性（顕微鏡観察）と溶血率でのみ評価を行い、赤血球の酸素運搬能力（酸素親和性）や変形能といった生物学的機能を評価していない。これらは臨床輸血において最も重要な指標であり、本研究の大きな不足である。第三に、長期保存試験は 3 ヶ月に限定されており、常温での 6 ヶ月以上の保存安定性が未確認である。

以上の課題を克服し、 μ PD 法による赤血球製剤を臨床応用可能なレベルへと引き上げるため、今後は以下の 3 点に重点を置き研究を展開する。第一に、細胞内へ細胞膜安定化作用を持つ添加剤のスクリーニングを進め、乾燥および再水和時の物理的ストレスから膜を保護する処方確立し、目標とする生存率 80%以上の達成を目指す。第二に、多角的な生物学的機能評価の実施である。形態観察にとどまらず、赤血球の酸素運搬能力（P50 値）、エ

エネルギー代謝（ATP, 2,3-DPG レベル）、および微小循環通過に不可欠な変形能（Deformability）を定量的に評価する。さらに、in vivo 試験（動物実験）を通じて、輸血後の体内循環動態や安全性（副作用の有無）を検証し、生体機能としての有効性を証明する。第三に、実用化を見据えた長期保存安定性の確立である。常温流通を実現するため、残留水分量とガラス転移温度（ T_g ）の相関を厳密に解析し、常温環境下でも分子運動を抑制できる乾燥条件と、防湿・脱酸素機能を備えた最適な包装形態を決定する。加速劣化試験および6ヶ月以上の長期保存試験を行い、実地医療や災害現場でのストックに耐えうる保存安定性を実証する。

謝辞

本研究の着想から実験遂行に至るまで、長きにわたり並走していただきましたアルバック未来技術協働研究所の上松 天 様、石川 諒 様、ならびに元同研究所の國吉 望月 様に心より感謝申し上げます。とりわけ上松様には、化学実験の経験が浅く不慣れであった私に対し、基礎から根気強くご指導を賜りました。皆様との議論や、現場での実践的なアドバイスは、本研究の骨格を形成する上で不可欠なものでした。また、研究に向き合う真摯な姿勢を通じ、研究者としての在り方を深く学ばせていただきました。

本論文の主査をお引き受けいただきました大阪大学大学院工学研究科の 倉敷 哲生 教授に心より感謝申し上げます。本論文の審査にあたり、貴重なお時間を割いてご精読いただき、大局的な見地から有益なご助言を賜りました。

副査として本論文をご精読いただきました、中川 貴 教授、永井 秀典 教授、ならびに清野 智史 准教授に心より感謝申し上げます。先生方からは、それぞれの専門分野に基づいた多角的な視点から貴重なご助言を賜り、本研究の視野を大きく広げていただきました。特に、清野 智史 准教授には、研究生活の様々な局面において親身にご相談に乗っていただき、多大なるご配慮を賜りました。先生の優しさとユーモアに救われ、最後まで研究を続けることができました。その深いご恩に心より感謝申し上げます。

株式会社アルバックならびにアルバック未来技術協働研究所の皆様にも多大なるご支援をいただきました。とりわけ西橋 勉 様、清田 淳也 様ならびに佐藤 誠一 様には、研究に関する議論はもとより、食事の席などで気さくに接していただきました。皆様の温かいお人柄と楽しい語らいに触れ、張り詰めた気持ちを幾度となく和ませていただきました。また、戸田 晋太郎 様、竹内 将人 様をはじめとする皆様には、常に温かい励ましと有益なご助言をいただき、充実した研究環境を与えていただきました。心より感謝申し上げます。

また、大阪大学医学系研究科 産婦人科学教室との共同研究を通じて、臨床応用を見据えた医学的知見をご教示いただきました。工学的視点のみならず、臨床現場の視点からも本研究を捉え直す貴重な機会をいただき、心より感謝申し上げます。

研究室 OB の岡本 彬仁さんには、4 年間にわたり苦楽を共にし、多くのことを学ばせていただきました。岡本さんと共に駆け抜けたあの日々がなければ、今の私はありません。心からの感謝を表します。また、研究室の学生の皆様には、議論を通じて様々な刺激をいただくとともに、互いに支え合うことで、かけがえのない充実した時間を過ごすことができました。皆様のおかげで本研究を成し遂げることができ、心より感謝申し上げます。

最後に、幼少の頃より私の歩む道を常に尊重し、長い学生生活を誰よりも近くで温かく見守り続けてくれた両親に、深甚なる感謝の意を表します。そして、本研究の途上で生涯のパートナーとなり、いかなる時も私を信じ、常に前を向く活力を与え続けてくれた夫に、心からの感謝を捧げます。

参考文献

1. A. Saviano, C. Perotti, C. Zanza, et al. : “Blood Transfusion for Major Trauma in Emergency Department”, *Diagnostics* 14, 708 (2024).
2. E.I. Obeagu, G.U. Obeagu and J.O.C. Ezeonwumelu : “Safety and Efficacy of Blood Transfusions in Pregnant Women”, *Elite Journal of Haematology* 2, 96 (2024).
3. G.C.M. Oliveira, et al. : “Red blood cell transfusion practice and cardiac comorbidities in patients with myelodysplastic syndromes”, *Transfusion* 61, S185 (2021).
4. B. Chin-Yee, N. Chin-Yee, A. Taylor and J.M. Hsia : “Red blood cell transfusion and associated outcomes in patients referred for palliative care: A retrospective cohort study”, *Transfusion* 61, 1430 (2021).
5. World Health Organization : “Global status report on blood safety and availability 2021” (World Health Organization, Geneva, 2022).
6. S. Himbert and M.C. Rheinstädter : “Structural and mechanical properties of the red blood cell’s cytoplasmic membrane seen through the lens of biophysics”, *Front. Physiol.* 13, 953685 (2022).
7. S. Ramirez-Arcos, H. Perkins, Y. Kou, et al. : “Bacterial growth in red blood cell units exposed to uncontrolled temperatures: challenging the 30-minute rule”, *Vox Sang.* 105, 100 (2013).
8. V. Hancock, R. Cardigan and S. Thomas : “Red cell concentrate storage and transport temperature”, *Transfus. Med.* 21, 325 (2011).
9. T. Akita, J. Tanaka, M. Ohisa, et al. : “Predicting future blood supply and demand in Japan with a Markov model: application to the sex- and age-specific probability of blood donation”, *Transfusion* 56, 2750 (2016).
10. C. Martinaud, S. Ausset, A.V. Deshayes, A. Cauet, N. Demazeau and A. Sailliol : “Use of Freeze-Dried Plasma in French Intensive Care Unit in Afghanistan”, *J. Trauma Acute Care Surg.* 71, 1761 (2011).
11. A.E. Pusateri, W.W. Malloy, D. Sauer, et al. : “Use of Dried Plasma in Prehospital and Austere Environments”, *Anesthesiology* 136, 327 (2022).
12. E. Glassberg, R. Nadler, S. Gendler, et al. : “Freeze-Dried Plasma at the Point of Injury: From Concept to Doctrine”, *Shock* 40, 444 (2013).
13. A. Sen Gupta : “Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules”, *Shock* 52, 70 (2019).
14. T.M. Chang : “Semipermeable Microcapsules”, *Science* 146, 524 (1964).
15. H. Sakai, S. Takeoka, H. Yokohama, H. Nishide and E. Tsuchida : “Encapsulation of Hb into unsaturated lipid vesicles and γ -ray polymerization”, *Polym. Adv. Technol.*

- 3, 389 (1992).
16. T. Kure and H. Sakai : "Preparation of Artificial Red Blood Cells (Hemoglobin Vesicles) Using the Rotation–Revolution Mixer for High Encapsulation Efficiency", *ACS Biomater. Sci. Eng.* 7, 2835 (2021).
 17. K. Takase, et al. : "Liposome - encapsulated hemoglobin rescues hemorrhagic shock heart through anti - ischemic and anti - arrhythmogenic effects on myocardium in repetitive 65% bleeding rat model", *Artif. Organs* 48 (2025).
 18. T. Kure, R. Ochiai and H. Sakai : "Stability of Liposomal Membrane of Hemoglobin-Vesicles (Artificial Red Cells) for Over Years of Storage Evaluated Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry", *Langmuir* 40, 12264 (2024).
 19. K. Taguchi, T. Maruyama and M. Otagiri : "Pharmacokinetic properties of hemoglobin vesicles as a substitute for red blood cells", *Drug Metab. Rev.* 43, 362 (2011).
 20. H. Azuma, T. Amano, N. Kamiyama, et al. : "First-in-human phase 1 trial of hemoglobin vesicles as artificial red blood cells developed for use as a transfusion alternative", *Blood Adv.* 6, 5711 (2022).
 21. W.F. Wolkers, F. Tablin and J.H. Crowe : "From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells", *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131, 535 (2002).
 22. P.J. Schmidt : "John Elliott and the evolution of American blood banking, 1934 to 1954", *Transfusion* 40, 243 (2000).
 23. H.T. Peng, K. Singh, S.G. Rhind, L. da Luz and A. Beckett : "Dried Plasma for Major Trauma: Past, Present, and Future", *Life (Basel)* 14, 619 (2024).
 24. A.U. Smith : "Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells", *Lancet* 2, 910 (1950).
 25. H.T. Meryman : "Drying of Living Mammalian Cells", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 85, 729 (1960).
 26. A.P. MacKenzie and G.L. Rapatz : "Freeze-drying preservation of human erythrocytes", *Cryobiology* 8, 384 (1971).
 27. K.L. Scott, J. Lecak and J.P. Acker : "Biopreservation of red blood cells: past, present, and future", *Transfus. Med. Rev.* 19, 127 (2005).
 28. R.P. Goodrich, S.O. Sowemimo-Coker, C.R. Zerez and K.R. Tanaka : "Preservation of metabolic activity in lyophilized human erythrocytes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89, 967 (1992).
 29. S.O. Sowemimo-Coker, R.P. Goodrich, C.R. Zerez and K.R. Tanaka : "Refrigerated storage of lyophilized and rehydrated, lyophilized human red cells", *Transfusion* 33, 322 (1993).

30. J.H. Crowe, J.F. Carpenter and L.M. Crowe : "The role of vitrification in anhydrobiosis", *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73 (1998).
31. J.H. Crowe, et al. : "Stabilization of Dry Mammalian Cells: Lessons from Nature", *Integr. Comp. Biol.* 45, 810 (2005).
32. L.M. Hays, J.H. Crowe, W. Wolters and S. Rudenko : "Factors Affecting Leakage of Trapped Solutes from Phospholipid Vesicles during Thermotropic Phase Transitions", *Cryobiology* 42, 88 (2001).
33. Z. Török, G.R. Satpathy, M. Banerjee, et al. : "Preservation of Trehalose-Loaded Red Blood Cells by Lyophilization", *Cell Preserv. Technol.* 3, 96 (2005).
34. J. Yu, J.H. Liu, L.Q. Pu, et al. : "Freeze-drying of Human Red Blood Cells: Influence of Carbohydrates and Their Concentrations", *Cell Preserv. Technol.* 2, 270 (2004).
35. V. Rindler, S. Lüneberger, P. Schwindke, I. Heschel and G. Rau : "Freeze-Drying of Red Blood Cells at Ultra-Low Temperatures", *Cryobiology* 38, 2 (1999).
36. A. Arav and D. Natan : "Freeze Drying of Red Blood Cells: The Use of Directional Freezing and a New Radio Frequency Lyophilization Device", *Biopreserv. Biobank.* 10, 386 (2012).
37. R.P. Goodrich and R.W. Hackett : "Lyophilized and reconstituted red blood cell compositions", U.S. Patent No. 5,178,884 (1993).
38. Cryopharm Corporation : "Freeze-Dried Human Red Blood Cells" (Research Progress Report to U.S. Naval Medical Research and Development Command, Contract No. N00014-90-C-0053, DTIC AD-A238431, 1991).
39. Cryopharm Corporation : "Freeze-Dried Human Red Blood Cells" (Research Progress Report to U.S. Naval Medical Research and Development Command, Contract No. N00014-90-C-0053, DTIC AD-A244838, 1992).
40. Cryopharm Corporation : "Freeze-Dried Human Red Blood Cells" (Research Progress Report to U.S. Naval Medical Research and Development Command, Contract No. N00014-90-C-0053, DTIC AD-A257017, 1992).
41. A.P. MacKenzie : "The physico-chemical basis for the freeze-drying process", *Dev. Biol. Stand.* 36, 51 (1976).
42. G. Bano, R. De-Luca, E. Tomba, A. Marcelli, F. Bezzo and M. Barolo : "Primary Drying Optimization in Pharmaceutical Freeze-Drying: A Multivial Stochastic Modeling Framework", *Ind. Eng. Chem. Res.* 59, 5056 (2020).
43. N. Coşkun, S. Sarıtaş, Y. Jaouhari, M. Bordiga and S. Karav : "The Impact of Freeze Drying on Bioactivity and Physical Properties of Food Products", *Applied Sciences* 14, 9183 (2024).
44. J.S. Gangurde, K.B. Erande and L.M. Shevale : "Freeze Drying: A Review", *World*

- Journal of Pharmaceutical and Life Sciences 5, 84 (2019).
45. M.J. Pikal and S. Shah : “The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase”, *Int. J. Pharm.* 62, 165 (1990).
 46. A. Merivaara, J. Zini, E. Koivunotko, et al. : “Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm”, *J. Control Release* 336, 480 (2021).
 47. P. Mazur : “Freezing of living cells: mechanisms and implications”, *Am. J. Physiol.* 247, C125 (1984).
 48. 関信輔 : “細胞内氷晶形成メカニズムの解明と細胞内氷晶形成回避における融解速度の重要性”, *低温生物工学会誌* 63, 77 (2017).
 49. V. Rindler, I. Heschel and G. Rau : “Freeze-Drying of Red Blood Cells: How Useful Are Freeze/Thaw Experiments for Optimization of the Cooling Rate?”, *Cryobiology* 39, 228 (1999).
 50. J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.F. Carpenter and C. Aurell Wistrom : “Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars”, *Biochem. J.* 242, 1 (1987).
 51. J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.E. Carpenter, et al. : “Anhydrobiosis: Cellular Adaptation to Extreme Dehydration”, *Comprehensive Physiology* (John Wiley & Sons, Ltd, 2011) p. 1445.
 52. U. Rockinger, M. Funk and G. Winter : “Current Approaches of Preservation of Cells During (freeze-) Drying”, *J. Pharm. Sci.* 110, 2873 (2021).
 53. S.B. Leslie, S.A. Teter, L.M. Crowe and J.H. Crowe : “Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells”, *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 7 (1994).
 54. J. Horn and W. Friess : “Detection of Collapse and Crystallization of Saccharide, Protein, and Mannitol Formulations by Optical Fibers in Lyophilization”, *Front. Chem.* 6, 4 (2018).
 55. B. Higl, L. Kurtmann, C.U. Carlsen, et al. : “Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix”, *Biotechnol. Prog.* 23, 794 (2007).
 56. M. Badal Tejedor, J. Fransson and A. Millqvist-Fureby : “Freeze-dried cake structural and physical heterogeneity in relation to freeze-drying cycle parameters”, *Int. J. Pharm.* 590, 119891 (2020).
 57. 野澤泰代, 伊藤雄大, 土橋遼 : “凍結保存が不要で緊急輸血に使用可能なウイルス不活化乾燥血漿”, *日本災害医学会雑誌* 30, 36 (2025).
 58. C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand-Arvier, P. Labrude and C. Vigneron : “In Vitro Study of the Protective Effect of Trehalose and Dextran during Freezing of Human Red Blood Cells in Liquid Nitrogen”, *Cryobiology* 35, 173 (1997).

59. T. Takahashi, A. Hirsh, E. Erbe and R.J. Williams : “Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes”, *Biophys. J.* 54, 509 (1988).
60. R. Rajan and K. Matsumura : “Development and Application of Cryoprotectants”, *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation*, ed. by M. Iwaya-Inoue, M. Sakurai and M. Uemura (Springer, 2018) p. 339.
61. R.J. Williams : “The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity”, *Cryobiology* 20, 521 (1983).
62. Y. Akiyama, et al. : “Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, 1285 (2016).
63. D.L. Drabkin and J.H. Austin : “Spectrophotometric Studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin”, *J. Biol. Chem.* 112, 51 (1935).
64. S. Henkelman, F. Noorman, J.F. Badloe and J.W.M. Lagerberg : “Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine”, *Vox Sang.* 108, 103 (2015).
65. A.T. Anastasiadi, V.L. Tzounakas, A.G. Kriebardis, K.E. Stamoulis, J. Seghatchian and M.H. Antonelou : “When I need you most: frozen red blood cells for transfusion”, *Transfus. Apher. Sci.* 59, 102786 (2020).
66. A. Patist and H. Zoerb : “Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems”, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 40, 107 (2005).
67. F. Fonseca, C. Béal and G. Corrieu : “Preservation of mammalian cells—learning nature’s tricks”, *Nat. Biotechnol.* 19, 317 (2001).
68. M. Watanabe, T. Kikawada, N. Minagawa, F. Yukuhiro and T. Okuda : “Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures”, *J. Exp. Biol.* 205, 2799 (2002).
69. A. Murray, P. Kilbride and M.I. Gibson : “Trehalose in cryopreservation. Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities”, *RSC Med. Chem.* 15, 2980 (2024).
70. K.D. Roe and T.P. Labuza : “Glass Transition and Crystallization of Amorphous Trehalose-sucrose Mixtures”, *Int. J. Food Prop.* 8, 559 (2005).
71. L. Weng and G.D. Elliott : “Distinctly Different Glass Transition Behaviors of Trehalose Mixed with Na₂HPO₄ or NaH₂PO₄: Evidence for its Molecular Origin”, *Pharm. Res.* 32, 2217 (2015).
72. J.H. Crowe, L.M. Crowe and D. Chapman : “Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose”, *Science* 223, 701 (1984).
73. K. Koster, M.S. Webb, G. Bryant and D.V. Lynch : “Interactions between soluble

- sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid”, *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 143 (1994).
74. J. Wolfe and G. Bryant : “Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems”, *Cryobiology* 39, 103 (1999).
 75. F. Albertorio, V.A. Chapa, X. Chen, A.J. Diaz and P.S. Cremer : “The α, α -(1 $\rightarrow$ 1) Linkage of Trehalose is Key to Anhydrobiotic Preservation”, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 10567 (2007).
 76. G. Marcantonini, D. Bartolini, L. Zatini, et al. : “Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin”, *Molecules* 27, 3254 (2022).
 77. C. Branca, S. Maccarrone, S. Magazù, G. Maisano, S.M. Bennington and J. Taylor : “Tetrahedral order in homologous disaccharide-water mixtures”, *J. Chem. Phys.* 122, 174513 (2005).
 78. N. Grasmeijer, M. Stankovic, H. de Waard, H.W. Frijlink and W.L.J. Hinrichs : “Unraveling protein stabilization mechanisms: vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system”, *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 763 (2013).
 79. H. Guo, et al. : “Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity”, *Sci. Rep.* 2, 746 (2012).
 80. S. Stewart and X. He : “Intracellular Delivery of Trehalose for Cell Banking”, *Langmuir* 35, 7414 (2019).
 81. G.M. Beattie, J.H. Crowe, A.D. Lopez, V. Cirulli, C. Ricordi and A. Hayek : “Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage”, *Diabetes* 46, 519 (1997).
 82. V. Sebbage : “Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications”, *Biosci. Horizons* 2, 64 (2009).
 83. B. Hasannejad-Asl, F. Pooresmaeil, S. Takamoli, M. Dabiri and A. Bolhassani : “Cell penetrating peptide: A potent delivery system in vaccine development”, *Front. Pharmacol.* 13, 942544 (2022).
 84. T. Teesalu, K.N. Sugahara, V.R. Kotamraju and E. Ruoslahti : “C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 16157 (2009).
 85. L. Porosk and Ü. Langel : “Approaches for evaluation of novel CPP-based cargo delivery systems”, *Front. Pharmacol.* 13, 968038 (2022).
 86. L.M. Moreno-Vargas and D. Prada-Gracia : “Exploring the Chemical Features and

- Biomedical Relevance of Cell-Penetrating Peptides”, *Int. J. Mol. Sci.* 26, 59 (2025).
87. R. Shiraishi, et al. : “Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates”, *Artif. DNA PNA XNA* 1, 133 (2010).
 88. S. Mayor and R.E. Pagano : “Pathways of clathrin-independent endocytosis”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603 (2007).
 89. P. Lundin, H. Johansson, P. Guterstam, et al. : “Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates”, *Bioconjug. Chem.* 19, 2535 (2008).
 90. D. Derossi, et al. : “Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent”, *J. Biol. Chem.* 271, 18188 (1996).
 91. F. Madani, et al. : “Mechanisms of Cellular Uptake of Cell - Penetrating Peptides”, *J. Biophys.* 2011, 414729 (2011).
 92. S. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer and R. Brock : “A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell - penetrating Peptides”, *Traffic* 8, 848 (2007).
 93. Y. Wei, C. Li, L. Zhang and X. Xu : “Design of novel cell penetrating peptides for the delivery of trehalose into mammalian cells”, *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1911 (2014).
 94. G.R. Satpathy, Z. Török, R. Bali, et al. : “Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization”, *Cryobiology* 49, 123 (2004).
 95. W.W. Umbreit, et al. : “Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism”, *Nature* 157, 606 (1946).
 96. C. Brocker, D.C. Thompson and V. Vasilou : “The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease”, *Biomol. Concepts* 3, 345 (2012).
 97. T. Maruyama, M. Hieda, S. Mawatari and T. Fujino : “Rheological Abnormalities in Human Erythrocytes Subjected to Oxidative Inflammation”, *Front. Physiol.* 13, 837926 (2022).
 98. A. Hottot, S. Vessot and J. Andrieu : “A Direct Characterization Method of the Ice Morphology. Relationship Between Mean Crystals Size and Primary Drying Times of Freeze-Drying Processes”, *Drying Technol.* 22, 2009 (2004).
 99. H.L. Lujan and S.E. DiCarlo : ““Seeing red” reflects hemoglobin’s saturation state: a discovery-based activity for understanding the science of pulse oximetry”, *Adv. Physiol. Educ.* 46, 461 (2022).
 100. M. Diez-Silva, M. Dao, J. Han, C.T. Lim and S. Suresh : “Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease”, *MRS Bull.* 35, 382 (2010).
 101. T. Kanias and J.P. Acker : “Mechanism of hemoglobin-induced cellular injury in

- desiccated red blood cells”, *Free Radic. Biol. Med.* 49, 539 (2010).
102. T. Hagiwara and R.W. Hartel : “Effect of Sweetener, Stabilizer, and Storage Temperature on Ice Recrystallization in Ice Cream”, *J. Dairy Sci.* 79, 735 (1996).
 103. T. Hagiwara : “Ice Recrystallization in Sucrose Solutions Stored in a Temperature Range of -21° C to -50° C”, *Food Sci. Technol. Res.* 11, 300 (2005).
 104. M.J. Pikal, S. Shah, M.L. Roy and R. Putman : “The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure”, *Int. J. Pharm.* 60, 203 (1990).
 105. K. Makinen, B. Berger, R. Bel-Rhliid and E. Ananta : “Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products”, *J. Biotechnol.* 162, 356 (2012).
 106. L. Kurtmann, L.H. Skibsted and C.U. Carlsen : “Browning of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Cultures in Relation to Loss of Viability during Storage”, *J. Agric. Food Chem.* 57, 6736 (2009).
 107. W. Abdelwahed, G. Degobert and H. Fessi : “Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage”, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 87 (2006).
 108. B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust and J.P. Benoit : “Physico-chemical stability of colloidal lipid particles”, *Biomaterials* 24, 4283 (2003).
 109. H.P. Castro, P.M. Teixeira and R. Kirby : “Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 172 (1995).
 110. A.W. Girotti and J.P. Thomas : “Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts”, *J. Biol. Chem.* 259, 1744 (1984).
 111. I. Coulibaly, R. Dubois-Dauphin, J. Destain, M.L. Fauconnier, G. Lognay and P. Thonart : “The Resistance to Freeze-Drying and to Storage Was Determined as the Cellular Ability to Recover Its Survival Rate and Acidification Activity”, *Int. J. Microbiol.* 2010, 625239 (2010).
 112. H. Goshima, K. Forney-Stevens, M. Liu, et al. : “Addition of Monovalent Electrolytes to Improve Storage Stability of Freeze-Dried Protein Formulations”, *J. Pharm. Sci.* 105 (2015).
 113. L.B. Gul, A.H. Con and O. Gul : “Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation”, *Cryobiology* 96, 122 (2020).

本研究に関する業績

学術論文

原著論文（査読有り）

1. 此尾 友花, 上松 天, 村上 裕彦, 本多 秀峰, 瀧内 剛, 木村 正: "凍結乾燥赤血球の開発のための噴霧真空凍結乾燥法の検討", 低温生物工学会誌, 68 (2022) 55.
2. Tomoka Konoo, Sora Uematsu, Tsutomu Nishihashi, Hirohiko Murakami, Hidemine Honda, Tsuyoshi Takiuchi, Tadashi Kimura: "Freeze-drying of Red Blood Cells Using Ultrafast Cooling by Spraying into a Vacuum", Chemistry Letters, 52 (2023) 887.
3. 此尾友花, 上松天, 石川諒, 佐藤誠一, 倉敷哲生: "赤血球における新規真空凍結乾燥(μ PD)法の検証 ―従来法との比較及び長期保存の可能性に関する予備的検討―", 表面と真空 採択通知有(2025 年 11 月 25 日)

学会発表

国際会議(査読無し)

1. Tomoka Konoo, Mizuki Kuniyoshi, Hidemine Honda, Shota Suzuki, Junya Osaki, Tsutomu Nishihashi, Tsuyoshi Takiuchi, Tadashi Kimura, Tetsusei Kurashiki, Lyophilization of RBCs with Trehalose Loaded by Cell-Penetrating Peptides, The Society for Cryobiology's 61st annual meeting (CRYO2024), July 2024, Washington D.C., USA.
2. Tomoka Konoo, Mizuki Kuniyoshi, Hidemine Honda, Shota Suzuki, Sora Uematsu, Ryo Ishikawa, Seiichi Sato, Tetsusei Kurashiki, Optimizing Drying to Reduce Red Blood Cell Damage in Vacuum Freeze-Drying, 23rd International Vacuum Congress (IVC-23), Sep. 2025, Sydney, Australia.

国内会議(査読無し)

1. 此尾友花, 上松天, 村上裕彦, 本多秀峰, 瀧内剛, 木村正, 常温で長期間保存可能な赤血球製剤の開発, 第 67 回低温生物工学会大会, 2022 年 6 月, オンライン開催.
2. 此尾 友花, 本多 秀峰, 上松 天, 川合 健太郎, 瀧内 剛, 木村 正, 超高速真空凍結乾燥法による赤血球保存技術の検討, 化学工学会 岡山大会 2022, 2022 年 12 月, 岡山.
3. 此尾 友花, 上松 天, 川合 健太郎, 本多 秀峰, 瀧内 剛, 木村 正, 真空中への噴霧による細胞の長期常温保存技術の開発 -赤血球の噴霧真空凍結乾燥-, 第 31 回微粒化シンポジウム, 2022 年 12 月, 千葉.

4. 此尾 友花, 上松 天, 宮下 真美子, 西橋 勉, 本多 秀峰, 瀧内 剛, 木村 正, 赤血球保存としての噴霧凍結乾燥法の検討, 第 13 回 CSJ 化学フェスタ, 2023 年 10 月, 東京.
5. 大崎 淳矢, 國吉 望月, 此尾 友花, 鈴木 翔太, 本田 秀峰, 瀧内 剛, 木村 正, 倉敷 哲生, 赤血球の凍結乾燥後における含水率と生存率の関係, 第 76 回日本生物工学会大会, 2024 年 9 月, 東京.
6. 大崎 淳矢, 國吉 望月, 此尾 友花, 鈴木 翔太, 瀧内 剛, 倉敷 哲生, 凍結乾燥後の赤血球製剤における含水率と生存率の関係調査, 第 14 回 CSJ 化学フェスタ, 2024 年 10 月, 東京.

受賞

1. 優秀講演賞

此尾 友花, 上松 天, 川合 健太郎, 本多 秀峰, 瀧内 剛, 木村 正, 真空中への噴霧による細胞の長期常温保存技術の開発 -赤血球の噴霧真空凍結乾燥-, 第 31 回微粒化シンポジウム, 2022 年 12 月, 千葉.

2. BEST POSTER PRIZE

Tomoka Konoo, Mizuki Kuniyoshi, Hidemine Honda, Shota Suzuki, Sora Uematsu, Ryo Ishikawa, Seiichi Sato, Tetsusei Kurashiki, Optimizing Drying to Reduce Red Blood Cell Damage in Vacuum Freeze-Drying, 23rd International Vacuum Congress (IVC-23), Sep. 2025, Sydney, Australia.