プログラムフリーザーによる培養細胞の凍結保存に関する研究

吉屋 誠・木村 義孝・角田左武郎
南雲 正男・榎本 昭二

Studies on cryoconservation of cultured cells by programmed freezer

Makoto YOSHIYA・Yoshitaka KIMURA・Saburo KAKUTA
Masao NAGUMO・Shoji ENOMOTO

緒 言

近年、培養技術の向上に伴い数多くの細胞株が樹立され、それらは免疫学的¹⁻³⁾ならびに癌の細胞レベルの解析^{4,5)}等において、われわれに幾多の情報をもたらしてきた。しかし培養細胞は実験室内で常にカビあるいは雑菌による contamination の危険にさらされており、細胞株相互の contamination の可能性もあるといわれている。また培養細胞は継代中に性質が少しずつ変化し、origin となった細胞の本来の特性が失われると考えられている^{6,7)}。

一般に培養細胞を用いて再現性のある実験を行うためには、細胞の持っている種々の性状を変化させることなく保存する必要がある。このような目的から、培養細胞の長期保存に凍結保存法が一般に用いられている⁸⁻¹⁰⁾。凍結による細胞の保存はすでに血球^{11,12)}、精子¹³⁾等に応用されているが、口腔領域でも将来歯胚の長期保存などに利用しうる可能性も考えられる。

今回われわれは凍結、解凍を自由に制御できるプログラムフリーザーを用い、Ca 9-22 細胞、HeLa S-3 細胞および RTG 細胞の凍結保存ならびに解凍後の生存性、増殖性に関して検討し若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 使用細胞株

使用した細胞は1972年歯肉扁平上皮癌より樹立された

昭和大学歯学部第2口腔外科学教室（主任：榎本昭二教授）

The second Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Showa University (Chief: Prof. Shoji Enomoto)

受付日：昭和56年1月25日

Ca 9-22 細胞¹⁴⁾、黒人子宮頸癌に由来する HeLa S-3 細胞¹⁵⁾ および 1971 年ラット歯胚より株化された RTG 細胞¹⁶⁾ の 3 種の細胞株を用いた。

2. 培養液および保存液

培養液は 20% 牛血清添加 Eagle's minimum essential medium (ニッスイ、以下 MEM と略す) を用い、5% CO₂ ふ卵器で静置培養した。凍結保存液には、この培養液に凍結防止剤として di-methyl sulfoxide (Sigma, DMSO と略す) を所定濃度加えて用いた。

3. 細胞浮遊液の調整

凍結を行う前日に培養液を交換した細胞株を凍結直前に 0.05% trypsin-PBS で細胞浮遊液とし、MEM で 2 回洗浄した後再浮遊した。あらかじめ DMSO は MEM との等量溶液を氷水中で作成し、この細胞浮遊液にこれも氷水中で所定濃度加えて、最終的に 1×10⁶/ml の細胞浮遊液になるように調整した。これを 2 ml の注射用アンプルに 1 ml ずつ分注溶封して凍結実験に用いた。

4. 使用器械

プログラムフリーザーは Planner 社製の R201/200R を用いた。これは -180°C から +25°C の範囲で凍結および解凍を制御できるように設計されている。凍結の一部および凍結後の保存は、-80°C に調整したディープフリーザー（エバラ、ESL 100）を用いた。

5. 凍結および解凍方法

凍結はプログラムフリーザーで -2°C/分および -10°C/分の条件、ドライアイス・アセトン溶液およびディープフリーザーに直接投入して凍結する 4 種の方法で行った。

解凍はプログラムフリーザーで +2°C/分および +10°C/分の条件と 37°C 恒温水槽で急速解凍する方法で行った。したがってこれらの凍結および解凍の条件を組み合わせ、表 1 のように 5 種類の方法でそれぞれの細胞株につき検討した。以後それぞれの方法をこの表に記載した記号で表わす。

表 1 凍結および解凍方法

凍 結 方 法	解 凍 方 法	記 号
ドライアイス・アセトン溶液	37°C 恒温水槽	D-R
ディープフリーザー	37°C 恒温水槽	d-R
-2°C/分 プログラムフリーザー	37°C 恒温水槽	2-R
-2°C/分 プログラムフリーザー	+2°C/分 プログラムフリーザー	2 P
-10°C/分 プログラムフリーザー	+10°C/分 プログラムフリーザー	10 P

図 1 プログラムフリーザーによる DMSO 濃度の検討 (HeLa S-3 細胞)

図 2 ディープフリーザーによる DMSO 濃度の検討 (HeLa S-3 細胞)

6. 評価の方法

それぞれの方法で解凍したアンプルを直ちに開封して小試験管に移し、1,000rpm, 5分遠沈した上清の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を Wróblewski¹⁷⁾らの方法に準じて測定した。沈渣の細胞は MEM で再浮遊して 0.3% trypan blue dye exclusion で viability を検討した。さらにこの細胞浮遊液を直径 17mm のプラスチックシャーレ (マルチウェルプレート Falcon 社) で secondary culture を行った。すなわち 1 ウェルあたり 1×10^5 個の細胞をまき、経時的に倒立型位相差顕微鏡 (Nikon MD) で観察した。

7. 凍害防止剤 DMSO の検討

保存液に添加する DMSO 濃度を決定するために HeLa S-3 細胞を使って予備実験を行った。すなわち DMSO を加えずに培養液のみで保存した場合 (0% DMSO と表わす) と、DMSO を 10% および 20% 加えた保存液について、-2°C/分 プログラムフリーザーあるいは -80°C ディープフリーザーに直接入れて凍結した。1 週後および 4 週後に急速解凍して、上清中の LDH 活性および secondary culture を行い検討した。図 1 および図 2 は DMSO を添加しない場合の上清の LDH 活性を 100% として表わした結果である。いずれの方法においても、10% DMSO を加えた保存液が最も LDH 活性が低く 1 週後および 4 週後ともに 30% 前後であった。また写真 1 および写真 2 は、4 週間 -80°C に保存した HeLa S-3 細胞を 48 時間 secondary culture した位相差顕微鏡写真である。いずれの方法でも DMSO を添加しない場合は細胞破壊が著しく一部ウェル底面に付着しているがほとんど増殖していない。10% DMSO ではウェル全面に数石状に増殖し、分裂像も数多くみられた。また 20% DMSO を加えてプログラムフリーザーで凍結した場合は、ウェル底面の半分程度に増殖しており、20% DMSO を加えてディープフリーザーに直接入れて凍結した場合には、ウェルの約 1/3 に付着増殖している細胞が認められた。

以上の結果から、プログラムフリーザーによる場合でも、ディープフリーザーによる場合でも凍害防止剤として DMSO を 10% 加えた保存液が、上清中の LDH 活性が最も少なく解凍後の secondary culture の位相差顕

写真 1 プログラムフリーザーによる DMSO 濃度の検討 (HeLa S-3 細胞)
4 週間凍結保存後 secondary culture 2 日目 ($\times 100$)

写真 2 ディープフリーザーによる DMSO 濃度の検討 (HeLa S-3 細胞)
4 週間凍結保存後 secondary culture 2 日目 ($\times 100$)

写真 3 10% DMSO の影響, 位相差顕微鏡映画からの写真 (HeLa S-3 細胞, $\times 200$)

微鏡による観察の結果も良好であった。したがって本実験においては 10% DMSO を用いて行った。

さらに凍害防止剤 DMSO の細胞に対する直接的影響を HeLa S-3 細胞を用いて位相差顕微鏡映画 (Nikon MD, Bolex H-16) で観察した。細胞を TD-15 型培養ビンで培養し培養液と 10% DMSO を含んだ保存液を還流置換したところ、写真 3 でみられるように置換して 3 分後には形態的な変化が現われ、10 分後には細胞相互の接触が完全に消失し球形を呈した。

実験結果

1. Ca 9-22 細胞

保存液上清中の LDH 活性は 1 週後で D-R が 162, d-R が 140, 2-R が 144, 2 P が 146, 10 P が 164 となり、4 週後では D-R が 186, d-R が 150, 2-R が 150, 2 P が 165, 10 P が 165 であった (図 3)。また trypan blue dye exclusion では凍結前は 92% だったが、4 週後で D-R が 50%, d-R が 50%, 2-R が 64.9

図 3 Ca 9-22 細胞における保存液上清中の LDH 活性

図 4 Ca 9-22 細胞における trypan blue dye exclusion

写真 4 Ca 9-22 細胞の 4 週間凍結保存後 secondary culture 4 日目 (×100)

図 5 HeLa S-3 細胞における保存液上清中の LDH 活性

図 6 HeLa S-3 細胞における trypan blue dye exclusion

写真 5 HeLa S-3 細胞の 4 週間凍結保存後
secondary culture 3 日目 (×100)

図 7 RTG 細胞における保存液上清中の
LDH 活性

図 8 RTG 細胞における trypan blue
dye exclusion

写真 6 RTG 細胞の 4 週間凍結保存後
secondary culture 6 日目 (×100)

%, 2P が 53.9%, 10P が 53.8% を示した (図 4). 写真 4 は 4 週間保存後解凍し secondary culture 4 日目の位相差顕微鏡写真であるが, 2-R の方法が最もよくウェルのほぼ全面に増殖していた.

2. HeLa S-3 細胞

LDH 活性は, 1 週後 D-R が 864, d-R が 412, 2-R が 320, 2P が 352, 10P が 534 で 4 週後では D-R が 762, d-R が 468, 2-R が 171, 2P が 543, 10P が 474 となっており 2-R が著明に低い値を示した (図 5). trypan blue dye exclusion では凍結前が 98% に対して 4 週後で D-R が 50%, d-R が 41.2%, 2-R が 76.2%, 2P が 37.1%, 10P が 77.2% であった (図 6). 写真 5 は 4 週間保存後の secondary culture 3 日目の位相差顕微鏡所見である. 2-R の方法の場合にはすでにウェル全面に数石状に増殖しているものの, 他の方

3. RTG 細胞

LDH 活性は 1 週後で D-R が 286, d-R が 244, 2-R が 170, 2P が 248, 10P が 266 となっており, 4 週後では D-R が 282, d-R が 267, 2-R が 249, 2P が 267, 10P が 291 で 4 週後では 1 週後のデータより差が小さかったが 2-R の値が低い値を示した (図 7). trypan blue dye exclusion では凍結前が 95% に対して, 4 週後で D-R が 37.7%, d-R が 50%, 2-R が 62.1%, 2P が 33.3%, 10P が 31.3% となっており (図 8), Ca 9-22 細胞および HeLa S-3 細胞と同じ傾向を示した. 4 週間凍結保存後の secondary culture の所見では培養後 2~3 日ではほとんど差が認められず, すべて球形を呈してウェル底面に付着していた. 培養 5 日目ぐらいから徐々に細胞が拡がりはじめ増殖を示した. 写真 6 は secondary culture 6 日目の所見であるが 2-R の方法はウェルの約 80% を占めており, 他の細胞の場合と同様に最も良く増殖している状態が観察された. 10P では Ca 9-22 細胞の 4 日目の状態よりさらに悪く, ほとんどの細胞が球形でウェルに付着したままであった.

考 察

細胞培養の技術は, 近年免疫学¹⁻³⁾をはじめ癌の研究等のいろいろな分野で不可欠なものとなっている. 培養細胞を用いて再現性のある実験系を組むためには, その細胞の保持している性状を変化させることなく保存維持する必要がある. しかし培養細胞は継代中に徐々に性状の変化が生ずると考えられており^{6,7)}, 継代培養のわずらわしさと継代に伴う種々の性状の変化を避けるために, 凍結による保存が一般に利用されている⁸⁻¹⁰⁾.

細胞の凍結保存は 1900 年代に入ってそのメカニズム, 凍害および解凍後の変化等が盛んに研究され, さらに凍

害防止剤の出現とともに急速な進歩をとげた^{11,12)}. 1949 年 Polge, Smith および Parkes¹³⁾ が凍害防止剤による精子の凍結保存を発表して以来, 血球細胞をはじめ数多くの研究報告^{11,12,20,21)}があり広く応用されている. 口腔領域でも現在歯牙移植²²⁾に利用されているが, 将来は歯胚そのものの保存にも応用できるものと考えられる. しかしまだ凍結および解凍による細胞の障害が大きな問題とされている.

一般に凍結における細胞障害は, 形成される氷の結晶による機械的損傷および脱水現象とそれに伴う塩類濃度の変化によるものと考えられている. 急速に凍結した場合は細胞内に生じる氷の結晶による細胞破壊が考えられ, 緩徐凍結の場合は細胞外凍結による脱水および塩濃度の上昇が細胞障害の主役と考えられている^{20,23)}. これらの細胞の障害を防ぐ目的で種々の凍害防止剤が使用されているが, 細胞膜透過性の glycerol, DMSO, ethylene glycol 等と非透過性の dextran, PVP, lactose, glucose, sucrose 等の 2 種類が主に用いられている^{18,19,24)}. これらのうちでも glycerol と DMSO が最も多く用いられており, Niwayama²⁵⁾らは DMSO の方が glycerol と比較して膜透過性が速いと報告している. また黒木ら²⁶⁾はやはり glycerol と比べて L-1210 細胞の解凍後の生存率および移植率ともに DMSO の方が確実な保護作用を有すると述べている. 他方骨髓細胞を用いての実験²⁷⁾で細胞膜非透過性の dextran を高濃度に添加して良好な成績を得ている報告もあり, 凍害防止剤については種類, 濃度, 使用法ならびに凍結-保存-解凍方法についてさらに今後の研究が必要なものと思われる.

今回われわれは凍害防止剤として DMSO を用いたが, 濃度は予備実験の結果により 10% とした. 市川の報告²⁷⁾でも 10~15% 程度の DMSO の濃度では, 解凍後に培養した細胞内の LDH 活性が低くなるが致死的影響はないと報告している. しかし写真 3 のように 10% DMSO を含む保存液を添加すると, 数分で形態的な変化が現われ 10 分後には細胞相互の接触が完全に消失し増殖の停止がみられた. このことは Alink²⁸⁾による電顕的観察で 2.5% DMSO では形態的变化は認められないが, 10% DMSO では核内クロマチンの凝集と細胞膜およびミトコンドリアの破壊が起こるとの報告と一致しており, DMSO は細胞に対して短時間でなんらかの直接的影響を及ぼすものと考えられる. さらに DMSO は発熱性であることから, 一般に行われているように^{19,20)} DMSO の操作は氷水中で施行する必要がある. 凍結時は可及的に短時間の操作で行う必要があると思われる. また市川は細胞膜透過性の DMSO が解凍後に培養した細胞内 LDH 活性に影響していると述べており²⁷⁾, 解凍後の細胞は直ちに培養液で洗浄し, DMSO を可及的に早く除去することが望ましいと思われる. 今回 DMSO の濃度については HeLa S-3 細胞で検討し, 10% 前後

図9 凍結によるアンプル内の温度変化

が良い結果を得たが、DMSOが細胞膜透過性で解凍後も細胞内に残留することから考えると、細胞の種類によってDMSOに対する感受性および濃度の影響に差があることも十分に推測される。

凍結時の冷却速度に関しては種々の報告がある。Rowe³¹⁾は0.1°C/分で非常にゆっくり凍結すると大きな氷晶が細胞外に生じ、細胞の脱水と塩類濃度の上昇のため細胞は死に至り、1~10°C/分で凍結した時は氷晶の成長は遅く、脱水も起こりにくいため高い生存率を得ると報告している。また1分間に10°C以上の急速凍結では細胞内に氷の結晶が生成され、細胞は著しく致命的障害を受け、さらに速い瞬間凍結の時は細胞内に氷晶を作らず無定状態(vitreous ice)となるため細胞障害は少ないと述べている。一般に溶液を緩徐凍結すると液相から固相になる時に過冷却となり、潜熱の放出によって凍結プラトーを生じ移行相(aqueous-ice transformation)の状態を経過する。この移行相を1~2°C/分の一定速度で短時間に通過した時に、最も高い細胞の生存率を得るといわれている。しかし従来の凍結方法ではアンプル内の冷却速度を一定に制御することは非常に困難である。Pawtelら³²⁾の報告にもあるようにチャンバーとアンプルとの温度差は、移行相で非常に大きく現われるが、今回われわれが用いたプログラムフリーザーではセンサーを保存アンプルと同じ条件のアンプルに入れ、電磁弁を-2°C/分の時は1分間に150回、-10°C/分の時は200回開閉させることにより、図9のように-5°Cから-15°Cの間をほとんど直線的にすることができた。

解凍に関しては急速に暖めた場合には、氷晶の成長速度の大きい範囲を急速に通過するため、氷の結晶は細胞に害を与える程大きくならず細胞は生存するが、緩徐解凍の場合には氷晶が細胞に有害となる大きさに成長する

と考えられている³³⁾。このことは諸家の報告に裏づけられており、われわれの結果と一致している。

凍結保存による培養細胞への影響はviabilityの面からはdye exclusion, lysosomal enzyme および cytoplasmic enzyme、生物学的性状をみるためには secondary culture、移植率、コロニー形成能、形態の変化、組織適合性、薬剤耐性および染色体などを指標として調べられているが、これらのうちいくつかを使って総合的に判定しなければならない。

今回の実験においては細胞の生死の判定に trypan blue dye exclusion を用いたが、本法は操作が非常に簡単で短時間にできることから広く利用されている。しかし細胞障害が著しく、破壊され塵と化した細胞は除外される点が trypan blue dye exclusion の不利な点と思われる。この点から細胞の viability を知るには、cytoplasmic enzyme の活性を測定するのが最も合理的と考えられる。しかも保存液中の LDH 活性を測定する方法は比較的容易で、trypan blue dye exclusion との併用は非常に有用と思われる。図4のCa 9-22細胞、図6のHeLa S-3細胞にみられるようにD-Rまたは2-Rが1週後に比べて4週後の生存率が上昇しているのは、凍結保存中に破壊されてしまう細胞の多いことが推測される。しかし図8のRTG細胞におけるD-Rのように、1週後の方が4週後よりも生存率が高くなっており、細胞によって耐凍性に明らかな差があるものと考えられる。

また保存液中のLDH活性値の面からみると図3のようにCa 9-22細胞においては凍結、解凍の方法による差はわずかに認められ、1週から4週の間にいずれの方法でも軽度上昇している。つまり凍結時の細胞破壊の方が保存中に破壊される量に比べて非常に大きいものと考えられる。

secondary culture による判定は定量性に乏しいが写真4~6にみられるように単位面積あたりの細胞数を適当に選ぶことにより、効果判定に十分に利用できるものと考えられる。すなわち、植え込み細胞数と細胞の増殖性の違いを考慮して培養時間を選択することにより、凍結保存方法による明らかな差違を認めた。しかしDMSOは細胞膜透過性を持ち培養後の細胞内LDH活性に影響する点から考えると、さらに長時間の凍結保存と長期培養の結果を観察する必要があると思われる。

以上のように trypan blue dye exclusion、上清中のLDH活性および secondary culture により凍結保存方法の検討を行ったが、総合的に判断していずれの細胞においても-2°C/分で凍結させ、37°C恒温水槽で急速に解凍する方法が最も良い結果を得た。しかしディープフリーザーに直接入れて凍結する方法も、単に細胞の長期保存を目的とする場合には十分に利用できるものと考えられる。

結 語

われわれはプログラムフリーザーを用いて Ca 9-22 細胞, HeLa S-3 細胞および RTG 細胞を凍結保存し, 解凍後の生存性を LDH 活性, trypan blue dye exclusion で, 増殖性を secondary culture で経時的に検討し以下のような結果を得た.

1. 凍害防止剤 DMSO の濃度は 10% が最も良い結果を得た.
2. 培養細胞に対する 10% DMSO を含む保存液の影響は, 置換後数分で現われることが観察された.
3. 凍結方法は -2°C /分プログラムフリーザーによる緩徐凍結が最も良い結果を得た.
4. 解凍は 37°C 恒温水槽による急速解凍が最良であった.
5. ディープフリーザーで凍結させ, 37°C 恒温水槽で解凍する方法も細胞の長期保存という面では有効であった.

本論文の要旨は第34回日本口腔科学会総会(昭和55年5月16日 於岡山)において発表した.

引 用 文 献

- 1) 藤林孝司, 佐藤 修, 藤村長久, 他: 口腔癌患者の細胞性免疫反応に関する研究 第3報 Microcytotoxicity assay. 臨床免疫 9: 1111 1977.
- 2) 堀越 勝, 勝村浅樹, 藤林孝司, 他: 培養癌細胞(Ca 9-22)に対するリンパ球の細胞障害作用に関する研究. 日口外誌 23: 619 1977.
- 3) 佐藤 修: 口腔癌患者リンパ球の cytotoxicity における effector cell の研究. 日口外誌 24: 1029 1978.
- 4) 木村義孝: 歯肉癌由来細胞株 (Ca 9-22) の乳酸脱水素酵素に関する研究. 口病誌 45: 20 1977.
- 5) 勝村浅樹: 口腔癌患者のリンパ球による Cell-Mediated Cytotoxicity に関する研究. 日口外誌 26: 643 1980.
- 6) 中井準之助, 他: 組織培養. 第1版, 朝倉書店, 1976, 168頁.
- 7) Torrey, J. G.: Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. Physiol Plant 20: 265 1967.
- 8) 佐藤春郎, 林 順子, 佐藤 博: 可移植性腫瘍系の低温保存と癌細胞の生物学的特性. 低温医学 1: 195 1975.
- 9) 佐藤春郎, 郷内俊克, 佐藤 博: 細胞凍結と Cryoimmunology, 癌細胞の免疫学的ならびに遺伝学的な変化. 低温医学 3: 21 1977.
- 10) 多和敏一, 涌本 昇, 藤田 厚, 他: 液体窒素による多和肉腫およびその培養細胞株の凍結保存に関する研究. 歯基礎誌 20: 238 1978.
- 11) 吉本良三, 他: 赤血球冷凍保存の経験. 低温医学 2: 13 1976.
- 12) Spector, J. I., Yarmala, J. A., Marchionni, L. D., et al.: Viability and function of platelets frozen at 2 to 3°C per minute with 4 or 5 percent DMSO and stored at -80°C for 8 month. Transfusion 17: 8 1977.
- 13) Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164: 666 1949.
- 14) 堀越 勝, 木村義孝, 名倉英明, 他: 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立(第1報). 日口外誌 20: 100 1974.
- 15) Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res 12: 264 1952.
- 16) 堀越 勝, 名倉英明, 木村義孝, 他: ラット胎児の歯胚由来細胞株 (RTG) の樹立. 口病誌 46: 211 1979.
- 17) Wróblewski, F., La Due, J. S.: Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc Soc Exp Biol Med 90: 210 1955.
- 18) 隅田幸男: 凍害防止剤(1). 医学のあゆみ 66: 49 1968.
- 19) 隅田幸男: 凍害防止剤(2). 医学のあゆみ 66: 103 1968.
- 20) Lovelock, J. E.: The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta 10: 414 1953.
- 21) Lovelock, J. E.: Het mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta 11: 28 1953.
- 22) 山根稔夫: 歯の銀行—低温保存歯牙の臨床的利用価値について. 日本歯科評論 367: 104 1973.
- 23) Meryman, H. T.: The relationship between dehydration and freezing injury in the human erythrocyte. in Cellular injury and resistance in freezing organisms. Asahina, E. ed. The Institution of low temperature science Hokkaido Univ, Sapporo, 1967, p231.
- 24) 鈴木 博: 赤血球の冷害保護剤: グリセロールと各種溶質の組合せによる至適凍害保護剤の検討. 低温医学 1: 3 1975.
- 25) Niwayama, G., Johnson, C. F., Grace, J. T., et al.: The kinetics of dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol in cultured cells during preincubation and washing for cell storage. Cryobiology 3: 385 1967.
- 26) 黒木登志夫, 佐藤春郎, 佐藤 博: 細胞の凍結保存法—生命の半永久的保存は可能か. 医学の

- あゆみ 69: 406 1969.
- 27) 市川洋一: 移植のための骨髓細胞凍結保存, 低温医学 1: 125 1975.
- 28) Alink, G.M., Verheul, C.C., Agterberg, J., et al.: Viability and morphology of rat heart cell after freezing and thawing of the whole heart. *Cryobiology* 15: 44 1978.
- 29) 福西孝信, 他: 長期リンパ球凍結保存の研究, 低温医学 1: 119 1975.
- 30) 曾和 正, 他: 顆粒球の低温保存, 低温医学 2: 315 1976.
- 31) Rowe, A.W.: The significance of the aqueous-ice phase transformation during controlled rate cooling of biological specimens. in *Culture injury and resistance in freezing organisms*. Asahina, E. ed. The institute of low temperature science Hokkaido Univ, Sapporo, 1967, p21.
- 32) Pawtel, B., Lukomska, B., Szmurlo, W.F., et al.: Programmed freezing of macrophages. *Acta Med Pol* 19: 183 1978.
- 33) 酒井 昭: 培養細胞の液体窒素中での凍結保存, 組織培養 4: 219 1978.