方向性凝固過程における氷結晶と赤血球の 微視的挙動に対するヘマトクリットの影響*

石 黒 博^{*1}, Boris RUBINSKY^{*2}

Influence of Hematocrit on Behavior of Ice Crystals and Human Red Blood Cells during Directional Solidification of Cell Suspensions

Hiroshi ISHIGURO and Boris RUBINSKY

The microscopic structure during directional solidification of human red blood cell suspensions with a hematocrit of 10% was investigated, using three different solutions: physiological saline, physiological saline with 20% v/v glycerol, and physiological saline with 20% v/v glycerol and 20 mg/ml antifreeze proteins, and to understand the influence of hematocrit it was compared with the result for the hematocrit of 1% reported previously. The ice crystal structure and the ice-cell interaction were found to be different between the three solutions. This result is basically similar to that for the hematocrit of 1%. While the hematocrit of 1% rarely causes cell-cell interaction in all the solutions, the hematocrit of 10% remarkably causes cell-cell contacts and the resultant cell-cell interaction in physiological saline alone. These results show that the degree of cell-cell interaction depends upon the morphological characteristics of ice crystals, the manners of the ice-cell interaction, and the hematocrit strongly.

Key Words: Medical Engineering, Biothermal Engineering, Solidification, Cryopreservation, Human Red Blood Cells, Hematocrit, Ice Crystal Structure, Ice-cell Interaction, Cell-cell Interaction

1. 緒 言

生体や食品などを含めた生物の凍結保存技術の開発は、医療やバイオインダストリーなどの将来の発展に大きく寄与する可能性を秘めている。生体の凍結保存の対象は、臓器、組織、細胞などさまざまである。臓器や組織は、細胞の集合体とみなすことができるが、単一細胞に比べ、機能や構成が複雑で、現在のところ、細胞より大きなレベルでの凍結保存は、ごく一部を除いてほとんどが不可能である。現在、医学、農学、工学などの分野で、生物細胞の凍結保存が、実用されているが、その技術は経験的な面が強い。したがって、凍結保存の発展のためには、工学的な手法による基礎的研究が重要であり、それにかかわる研究は、熱工学の分野にとっても、新たな要素を含んでおり、大いに挑戦的である。

凍結・融解後の細胞の生存率は、細胞自体の性質、凍結保護物質の条件、冷却と加温の熱的条件に依存する。冷却速度に対する生存率の分布は、一般的に、ガラス化の領域を除くと、最適冷却速度に対して最大生存

率を示すベル形の形状を有する。凍結・融解過程を経験する細胞は、物理的、化学的な種々なストレスにさらされるが、最適冷却速度より高い冷却速度では、細胞内の氷晶形成による細胞の膜構造の機械的損傷が致命的であると理解されている。一方、最適冷却速度より低い冷却速度での損傷原因としては、(1)細胞内外の水溶液中の電解質の濃縮効果、および、(2)氷結晶が細胞に及ぼす機械的作用が挙げられるが、その支配的な寄与や損傷機構の問題についての明確な結論はできていない。したがって、凍結保護物質による細胞の保護機構も十分には解明されていない。

さらに、人間の赤血球の凍結保存では、凍結・融解後の赤血球の生存率が、ヘマトクリット(懸濁液中の赤血球の体積割合)の増加とともに、減少することが明らかにされ、その損傷原因が議論された^{(1)~(3)}。Nei⁽¹⁾は、凍結過程で変形し、低温で硬化した細胞同士の圧迫や異常な接触により機械的損傷が生じると仮定した。後に、Mazur⁽²⁾も、細胞に対する機械的作用として、氷による寄与と他の細胞による寄与のうち、ヘマトクリットの増加により細胞同士の相互作用が重要化するとし、その内容について詳しく考察している。一方、Pegg⁽³⁾は、あくまで、細胞損傷に対する溶液効果を強く支持し、ヘマトクリットの増加による細胞内氷晶形

* 原稿受付 平成6年3月23日。

^{*1} 正員、筑波大学構造工学系(〒305 つくば市天王台)。

^{*2} カリフォルニア大学バークレー校機械工学科(Berkeley, CA 94720, U. S. A.)。

成および溶液効果の促進により、現象の説明を行った。しかし、実験結果としては、溶血率とマクロなパラメータの関連がほとんどであり、現象の正確な理解のためには、ミクロなレベルでの研究が必要である。

一方、著者らは、細胞の損傷機構や凍結保護物質の保護機構の解明には、細胞懸濁液の凍結過程における、細胞を含めた細胞まわりの未凍結水溶液や氷の状態などの微細構造についての理解が必要であるとの立場から、赤血球を含む各種水溶液の方向性凝固過程における氷結晶の形態学的特性、および、氷結晶と赤血球の相互作用の特性を調べた^{(4)~(6)}。その結果、氷・赤血球間の相互作用が、細胞の生存に対して影響を及ぼし得ることを示すとともに、その相互作用の様式を、氷結晶が赤血球に対して「硬い」または「柔軟性のない」特性をもつ場合と、「柔らかい」または「柔軟性のある」特性をもつ場合に分類することを提案した。

このような背景において、本研究では、既報に引き続いて、種々の水溶液を用いた赤血球懸濁液の方向性凝固過程における微細構造(氷結晶の形態および氷結晶と赤血球の相互作用)に対するヘマトクリットの影響を明らかにする。さらに、機械的作用の観点から赤血球の損傷の可能性について議論する。赤血球懸濁液のヘマトクリットは既報^{(4)~(6)}の1%に対して10%とし、水溶液は、3種類で、生理食塩水、グリセロールを含む生理食塩水、および、グリセロールと不凍たんぱく質を含む生理食塩水を用いた。

なお、臓器や組織が細胞の集合体であるという観点からも、細胞の数密度が高い場合の知見は重要であると考えられる。

2. 記 号

G : 温度こう配 $^{\circ}\text{C}/\text{m}$

H : 冷却速度 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$

H_t : ヘマトクリット

V : 実験試料の移動速度 m/s

P. S.: 生理食塩水の赤血球懸濁液

P. S.+Gly.: グリセロールを添加した生理食塩水の赤血球懸濁液

P. S.+Gly.+AFP: グリセロールと不凍たんぱく質を添加した生理食塩水の赤血球懸濁液

3. 実験試料

実験試料は、人間の赤血球懸濁液である。ヘマトクリットの影響を調べるために、ヘマトクリットは既報での1%より大きく、かつ、凍結過程の状態が光学顕

微鏡により観察できるように、10%とした。懸濁液のための水溶液は3種類で、生理食塩水(0.154 mol/l NaCl)、グリセロール(20% v/v)を含む生理食塩水、および、グリセロール(20% v/v)と不凍たんぱく質(20 mg/ml)を含む生理食塩水を用いた。不凍たんぱく質は、Ocean pout (*Macrozoarces americanus*)の血清から抽出、精製された不凍ポリペプチドである⁽⁶⁾。

実験試料である赤血球懸濁液は、既報⁽⁶⁾と同様の方法で準備された。著者である石黒の鮮血は、等張の緩衝生理食塩水と遠心分離器により洗浄され、分離された赤血球は、 4°C で保存された。採血後5日以内の赤血球を、室温状態で、生理食塩水、および、グリセロールを含む生理食塩水に添加した。さらに、不凍たんぱく質を添加することにより、グリセロールと不凍たんぱく質を含む生理食塩水の赤血球懸濁液を準備した。なお、必要な段階に応じて、懸濁液を、かくはん、混合後、浸透圧平衡のために、約30 min、放置した。

4. 実験方法

試料の凍結には、方向性凝固法を用いた。この方法では、結晶成長に影響をもつ固液界面での温度こう配とその伝ば速度を独立に制御できる。本研究では、既報^{(4)~(6)}同様、方向性凝固過程の連続的な観察・記録のために、図1に示す方向性凝固ステージを装着した光学顕微鏡、およびビデオシステムを用いた。ステージは、間隔2.4 mmの二つの銅ブロックからなり、それらは、冷媒の貫流による冷却とマイクロヒータの加熱により、おのおの、一定温度に制御される。凍結界面が2ブロックの間に位置するように、設定温度を試料の凝固温度より高い度 T_h と低い温度 T_c に設定した。ガラス製のマイクロスライドとカバースリップの間に挟まれた試料を、銅ブロック上で高温側から低温側へ移動させることにより、連続的な冷却を行った。なお、試料内では、二つのブロック温度と間隔で定まる直線温度分布がほぼ実現され、冷却速度 H は、試料中の温度

図1 方向性凝固ステージ

こう配 G と試料の移動速度 V の積である。また、試料の逆方向への移動により加温できる。

実験では、P. S. に対して $T_h=15^\circ\text{C}$, $T_c=-33^\circ\text{C}$, P. S. +Gly. に対して $T_h=6^\circ\text{C}$, $T_c=-42^\circ\text{C}$, P. S.+Gly.+AFP に対して $T_h=5^\circ\text{C}$, $T_c=-43^\circ\text{C}$ とし一定の温度こう配 ($G=20.0^\circ\text{C}/\text{mm}$) で、試料の移動速度を変化 ($V=0.50\sim 2.50\text{ m/min}$) させることにより冷却速度を変化 ($H=10.0\sim 50.0^\circ\text{C}/\text{min}$) させた。なお、試料の厚さは、氷結晶と赤血球の相互作用が、観察できるように薄く (数 μm 程度) 設定された。

5. 実験結果および考察

赤血球懸濁液中で成長する (1) 氷結晶の形態学的特性、および、(2) 氷結晶と赤血球間の相互作用の特性は、(i) 赤血球外の未凍結水溶液や細胞内水溶液の溶質の濃度 (細胞まわり化学的雰囲気), (ii) 氷結晶や未凍結水溶液が赤血球に及ぼす力 (細胞まわりの力学的雰囲気) を規定し、最終的には赤血球の生き残りの成否に影響を及ぼす重要な因子である。本報では、3 種類の水溶液、P. S., P. S. +Gly., P. S. +Gly. +AFP に対する (1), (2) の特性について述べる。以下の写真において、左側が低温側、右側が高温側に相当する。写真中、粒状に見えるものが赤血球で、変形した粒状に見えるものは、変形した赤血球である。また、固液界面をわかりやすくするために写真 (図 2 ~ 4) 中の氷結晶に説明を付けた。

5.1 生理食塩水の場合 $Ht=10\%$ の赤血球を含む生理食塩水中で成長する氷結晶の基本的形態は、 $Ht=1\%$ の場合⁽⁴⁾⁽⁵⁾ 同様、cellular である。cellular 界面は、組織的過冷却による平坦な固液界面の不安定化の結果である。図 2 に、凝固過程における氷結晶の先端近傍、および、先端から離れた低温領域での氷結晶と赤血球の状態を示す。

試料の移動速度の比較的低い図 2 (a-1), (a-2) [(a-1) は (a-2) より約 0.25 mm 低温側にある] では、cellular 氷結晶は、多くの赤血球を押しよけながら成長し、低温領域程その氷結晶の幅は広く、未凍結水溶液の溝の幅は狭くなる。赤血球は、氷壁から反発力を受けることにより、氷結晶間の未凍結水溶液の溝中に集積され、多くの赤血球が詰め込まれ、互いに密着している様子が明確である。さらに、溝中の赤血球は濃縮された未凍結水溶液にさらされるために、脱水、収縮する。溝中の赤血球のいくらかは、溝からはみ出しており、氷壁からの圧迫のためであると考えられる。また、いくらかの赤血球は、氷結晶とガラス板の間に挟まれたり、引き延ばされたりし、変形する。氷結晶とガラス板

の間の赤血球は、未凍結水溶液中の元の赤血球に比べ、直径が大きく、扁平化している。

試料の移動速度の増加に対する cellular 氷結晶の形態の変化の特性の一つは、氷結晶の先鋭化であり、これは、 $Ht=1\%$ の場合と同様である。移動速度を約 2 倍、約 4 倍に増加させた場合の結果を、おのおの、図 2 (b-1), (b-2), (b-3), (c-1), (c-2) に示す。図 2 (b-3), (b-2), (b-1) は、この順で約 0.25 mm 間隔で

図 2 凍結過程における氷結晶と赤血球の状態 (P. S., $Ht=10\%$)

低温側に向かっているが、多くの赤血球は、図 2 (a-1), (a-2) 同様、成長する cellular 氷結晶に押しのけられ、氷結晶間の未凍結水溶液の溝中に集積され、低温側ほど、赤血球は互いに詰め込まれている。しかしながら、氷結晶の先端付近で、固液界面はわずかな波状変形を示す。これは、氷の成長速度が局所的に大きい部分での組織的過冷却による不安定化のためであり、さらに、赤血球自体が濃度場のかく乱源や氷結晶成長の直接的な障害物となり得ることによる固液界面の不安定化の促進のためであると考えられる。また、試料の移動速度が低い図 2 (a-1), (a-2) に比べ、氷結晶に押しのけられ、氷結晶間の水溶液の溝中に集積される赤血球の割合が減少し、氷結晶とガラス板の間にはさまれる赤血球の割合が増加している。

この移動速度の増加に対する変化の傾向は、より移動速度の高い図 2 (c-2), (c-1) [(c-1) は (c-2) に比べ、約 0.25 mm 低温側にずれている] で、より強く現れている。すなわち、cellular 氷結晶の先端では、熱力学的に不安定な過冷却水溶液のために、形態学的に不安定な固液界面が赤血球の存在のために、分岐点に赤血球を伴い、分岐を生じる。この分岐結晶の成長方向は、cellular 氷結晶の成長方向と同じである。赤血球は、cellular 氷結晶間の未凍結水溶液の溝中に集積、詰め込まれたり、氷結晶とガラス板の間にはさまれたりしているが、分岐により生じた氷結晶間の溝にも多くの赤血球が捕らえられ、氷に閉じこめられている。これらの赤血球は、低温領域程、氷壁により圧迫されていると考えられ、赤血球の外観は不明りょう化する。また、試料の移動速度が大きいほど、赤血球が動かされる程度が小さいのに対し、氷結晶の固液界面の変形の度合いが大きくなる。

比較のために、図 3 に、 $Ht=1\%$ の場合の氷結晶先端から約 0.25 mm 離れた低温領域における氷結晶と赤血球の状態を高倍率で示す。氷結晶間の未凍結水溶液の溝中に集積されている赤血球は、その数が少ない

図 3 Cellular 氷結晶間の未凍結水溶液中の赤血球 (P.S., $Ht=1\%$) $H=8.94^\circ\text{C}/\text{min}$, $G=21.3^\circ\text{C}/\text{mm}$, $V=0.42\text{ mm}/\text{min}$

ため、互いに接することなく、一列に並んでいる。これは、 $Ht=10\%$ の場合に多くの赤血球が溝中で互いに接触する様子と非常に異なる。

生理食塩水の赤血球懸濁液の方向性凝固過程では、氷壁の赤血球に対する強い機械的な作用により、赤血球は cellular 氷結晶間の未凍結水溶液の溝中に集積され、詰め込まれる。その結果、ヘマトクリットが大きい場合、これらの赤血球は互いに密着し、赤血球間でも強い機械的作用を及ぼし合い、この効果は、ヘマトクリットの増加に対して、大きくなると考えられる。

5.2 グリセロールを含む生理食塩水の場合 グリセロールを含む生理食塩水の赤血球懸濁液 ($Ht=10\%$) 中を成長する氷結晶の基本的形態は、既報⁽⁴⁾⁽⁵⁾ の $Ht=1\%$ の場合同様、樹枝状(dendritic)で、生理食塩水の場合の cellular 構造に比べ、二次以上のアームを伴う、より高次の結晶構造である。その樹枝状氷結晶と赤血球の状態を試料の移動速度に対して図 4 に示

(a-1) 0.50 mm

(a-2) 0.25 mm

(a-3) 先端

(a) $H=10.0^\circ\text{C}/\text{min}$, $G=20.0^\circ\text{C}/\text{mm}$, $V=0.50\text{ mm}/\text{min}$

(b-1) 0.25 mm

(b-2) 先端

(b) $H=30.7^\circ\text{C}/\text{min}$, $G=20.0^\circ\text{C}/\text{mm}$, $V=1.54\text{ mm}/\text{min}$

図 4 凍結過程における氷結晶と赤血球の状態 (P. S. + Gly., $Ht=10\%$)

す。氷結晶の先端近傍や低温領域を含め、氷結晶は、低移動速度の図4 (a-1), (a-2), (a-3) [(a-1)は(a-2)より, (a-2)は(a-3)より約0.25 mm 低温側にある]の場合に、比較的粗大な構造であるのに対し、試料の移動速度の増加とともに、図4 (b-1), (b-2) [(b-1)は(b-2)に対して約0.25 mm 低温側にある]に示すように、形状、寸法、方向性がより規則的になるとともに、長さスケールの減少や高次アームの発生など、微細化する。アームの発生は、凍結界面近傍の液相の組織的過冷却に基づく、局所的に平たんな界面の不安定化の結果であり、グリセロールの添加は、等しい冷却条件に対して、組織的過冷却とそれによる不安定化を促進する効果がある。

一方、凝固過程において、赤血球は、樹枝状氷結晶の成長により、動かされることは、ほとんどなく、図4に示されるように、赤血球は、凍結前同様、分散したままである。この相互作用の形態学的詳細は、高ヘマトクリットのため、直接、明りょうには観察できなかったが、これは、既報⁽⁴⁾⁽⁵⁾(Ht=1%)で明らかにされたように、例えば、図5に示すように、固液界面が赤血球と出会うと、界面は赤血球の形状に従って柔軟に変形し、赤血球を包み込むように成長したり[図5 (a)], 樹枝状に分岐したりする[図5 (b-1), (b-2)は、赤血球による氷結晶の分岐の時系列変化を示す]ためである。この氷結晶と赤血球の相互作用の機構は、定性的には、熱力学的に不安定な状態にある固液界面の成長に対する赤血球の存在の影響として理解される。

(a) $H=21.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $G=25.0^{\circ}\text{C}/\text{mm}$, $V=0.86\text{ mm}/\text{min}$

(b-1) 分岐の初期段階 (b-2) 分岐したアームの成長

(b) $H=40.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $G=25.0^{\circ}\text{C}/\text{mm}$, $V=1.62\text{ mm}/\text{min}$

図5 固液界面と赤血球の形態学的相互作用
(P. S.+Gly., Ht=1%)

この固液界面と赤血球の相互作用の特性は、グリセロールを添加しない生理食塩水の場合と著しく異なり、氷・細胞間の機械的相互作用が弱いことを示唆していると考えられる。さらに、氷・細胞間の相互作用により、赤血球が寄せ集められることがないため、赤血球同士の接触が発生し難く、細胞・細胞間の機械的相互作用は起こり難い。この結果は、グリセロールが、氷・細胞間の機械的作用とそれによる細胞・細胞間の機械的作用を緩和する効果を有することを示す。

5.3 グリセロールと不凍たんぱく質を含む生理食塩水の場合

グリセロールと不凍たんぱく質を添加した生理食塩水の赤血球懸濁液(Ht=10%)中を成長する氷結晶は、針状(spicular)であり、Ht=1%の既報⁽⁶⁾と同様の特性である。この針状の構造は、生理食塩水の場合やグリセロールを添加した生理食塩水の場合のアーム構造とは著しく異なり、氷結晶の形態に対しては、不凍たんぱく質の影響が支配的であり、氷結晶の柱面への不凍たんぱく質の付着とそれによる α 軸方向への氷成長の抑制のためと考えられる。図6 [(a)~(d)の順で約0.25 mm 間隔で低温領域から氷結晶先端に向かう]に、凍結過程における氷結晶と赤血球の例を示す。図6中、右斜め上方に伸びる直線状に見えるものが、針状氷結晶で、その間に未凍結水溶液が存在する。また、粒状に見えるものが、赤血球である。図6 (d)の固液界面先端近傍では、まず、一部の針状氷結晶が、高温側に成長し、次に、その結晶の側面から新たな氷結晶が発生する。針状氷結晶間の未凍

(a) 0.75 mm

(b) 0.50 mm

(c) 0.25 mm

(d) 先端

図6 凍結過程における氷結晶と赤血球の状態
(P. S.+Gly.+AFP, Ht=10%)
($H=20.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $G=20.0^{\circ}\text{C}/\text{mm}$, $V=1.03\text{ mm}/\text{min}$)

結水溶液は過冷却状態にあると考えられるため、新たな氷結晶は、高温側、低温側の両方向に急速に伸び、針状結晶となる。針状の氷結晶は、低温領域程、ちゅう密であり、未凍結水溶液の割合が小さい。

赤血球は、針状氷結晶の成長に対応して、間欠的に、押し動かされたり、引きずり動かされたりする。すなわち、図6(d)に示す凍結界面の先端近傍では、多くの赤血球が未凍結水溶液のほうへ押し出されるように動かされる。これは、高温側に向かって成長する氷結晶の直接の作用、または、氷生成時の体積増加により誘起されると考えられる未凍結水溶液の高温側への排出流れによると考えられる。また、一部の赤血球は、低温側へも動かされ、これは、針状氷結晶の側面から、新たに、発生する針状結晶の低温側への成長のためである。しかしながら、凍結の進行とともに、赤血球は、針状氷結晶の間に捕らえられ、動かなくなる。例えば、図6(c)では、いくらかの赤血球の動きがあるが、図6(b)、(a)のすべての赤血球は、氷結晶にはさまれ、静止している。凍結の進行とともに、赤血球は、氷結晶からの直接の作用により、変形し、破壊にまで至る。

これらの氷結晶、および、赤血球との相互作用の特性は、本研究の範囲内では、試料の移動速度に依存せず、同様であり、生理食塩水の場合やグリセロールを添加した生理食塩水の場合と異なる。

Ht=1, 10%, いずれの場合も、針状氷結晶は直線的で、その方向性は強く、その太さは赤血球の大きさより小さい。さらに、氷結晶の未凍結水溶液の幅は、おおむね赤血球の大きさ程度であるため、未凍結領域で分散している赤血球は、氷結晶の成長とともに、直線的に再配列させられる。したがって、個々の赤血球は、直接、氷結晶との強い機械的作用をもつが、赤血球同士の接触とそれによる赤血球間の機械的作用は生じ難い。

6. 氷結晶と細胞間の相互作用に基づく、細胞に対する機械的作用の可能性

凍結過程において、赤血球が受ける機械的作用は、基本的には、氷結晶からもたらされるが、氷結晶が、直接、赤血球に及ぼす作用(氷結晶・細胞間の相互作用)、および、細胞同士の接触による作用(細胞・細胞間の相互作用)に分けられる⁽²⁾。

氷結晶・細胞間相互作用および細胞・細胞間相互作用が、圧縮、せん断、変形などの機械的作用を細胞に及ぼす機構として、以下の内容が考えられる。固液界面近傍の水溶液中の細胞は、(1)界面張力による反発力、(2)水溶液の凝固時の体積膨張による力を受け、

これが、水が細胞に及ぼす力の基本である。細胞が氷結晶間の未凍結水溶液中にある場合には、氷成長(固液界面の前進)による水溶液溝の幅の減少が、氷結晶・細胞間相互作用を発生しやすくするが、(3)細胞の脱水を伴わない細胞外水溶液の希薄化(例えば、水の拡散)による氷成長、(4)水溶液の凝固時の体積膨張による水溶液の溝外への排出は、その相互作用の発生を促進させる。また、(5)赤血球自体が細胞内に固形分[生体内の状態と等しい浸透圧(等張)の条件では、赤血球中の水溶液の体積に対して約40%]を含むため、氷成長による細胞外水溶液の濃縮に対して赤血球が単に脱水収縮して変形するのは別様に赤血球は変形させられ、さらに、凝固時の体積膨張は変形を促進させる。例えば、この変形のために、浸透圧脱水して体積が減少した赤血球の表面積は増加し得る。さらに、細胞・細胞間相互作用は、細胞・細胞間の接触と、氷結晶から細胞への機械的作用により引に起こされるが、(6)赤血球が浸透圧により脱水収縮し、細胞膜表面が、変形、粗面化し、さらに、低温で脆弱化した状態で、赤血球同士の圧迫、せん断は、細胞の損傷原因となり得る。

この氷結晶・細胞間相互作用、および、細胞・細胞間相互作用による機械的作用の可能性は、Ht=10%の本研究の結果やHt=1%の既報^{(4)~(6)}の結果が示すように、赤血球懸濁液の水溶液の種類、ヘマトクリットや冷却速度による定まる、氷結晶の空間スケールを含めた形態学的特性や氷結晶と赤血球との相互作用の特性に、直接、依存する。このことは、細胞損傷に重要な影響をもつ因子の一つは、凍結過程における未凍結水溶液の割合⁽²⁾よりも、むしろ、赤血球まわりの水溶液溝の大きさであることを示唆している。P. S., P. S.+Gly., P. S.+Gly.+AFP に対して、氷結晶による赤血球の移動、赤血球による氷結晶分岐の際の赤血球の変形などの点から、氷結晶・細胞間相互作用は、P. S., P. S.+Gly.+AFP で大きく、P. S.+Gly. では小さいと考えられる。特に、P. S.+Gly.+AFP では、赤血球が氷結晶との作用で破壊にまで至っている。したがって、既報⁽⁴⁾⁽⁵⁾で提案した氷結晶と細胞の相互作用の様式分類に基づく、Ht=10%の場合も、Ht=1%の場合同様P. S. と P. S.+Gly.+AFP は「硬い」または「柔軟性のない」特性のグループに属し、P. S.+Gly. は「柔らかい」または「柔軟性のある」特性のグループに属するといえる。ヘマトクリットが小さい場合には、いずれの懸濁液においても細胞同士の接触が生じ難く、細胞・細胞間相互作用は発生し難い。それに対して、ヘマトクリットが大きい場合、P. S. では、赤血球は詰め込まれるため、細胞・細胞間相互作用が大きい。P. S.+

Gly.+AFP では、赤血球が氷結晶に沿ってほぼ一列に再配列されるため、細胞・細胞間相互作用は小さく、P. S.+Gly. では、赤血球は凍結前後でほとんど動きがなく、分散したままであるので、細胞・細胞間接触とそれによる相互作用は生じ難い。しかし、ヘマトクリットの増加とともに、細胞・細胞間相互作用の効果が増加すると考えられる。

7. 結 論

3種類の異なる水溶液を用いた人間の赤血球懸濁液(P. S., P. S.+Gly., P. S.+Gly.+AFP)の方向性凝固過程における(1)氷結晶の形態学的特性、および、(2)氷結晶と赤血球の相互作用の特性に対するヘマトクリットの影響を調べ、以下の結論を得た。

(1) 氷結晶の基本的形態は、P. S. の場合、cellular 構造で、P. S.+Gly. の場合、樹枝状(dendritic)構造、P. S.+Gly.+AFP の場合、針状(spicular)構造である。これらの構造の試料の移動速度に対する変化の傾向は、基本的に、Ht=1%の場合と同様である。

(2) P. S. の場合、cellular 氷結晶は赤血球を押し、のけながら成長し、多くの赤血球は氷結晶間の未凍結水溶液中に集積されるが、Ht=10%では細胞群として詰め込まれるため、赤血球が互いに密着する。したがって、氷結晶・細胞間相互作用だけでなく、細胞・細胞間相互作用も大きい。

(3) P. S.+Gly. の場合、樹枝状氷結晶の成長に対して、赤血球は動かされることなく、凍結前同様、分散したままで、赤血球同士の接触は生じ難い。したがって、氷結晶・細胞間相互作用は小さく、細胞・細胞間相互作用も起こり難い。

(4) P. S.+Gly.+AFP の場合、氷結晶先端近傍

では、赤血球は針状氷結晶により動かされるが、凍結の進行とともに結晶間に完全に捕らえられる。その際、赤血球はほぼ一列に再配列されるため、個々の赤血球は氷結晶から、直接、強い機械的作用を受けるが、細胞同士の接触が生じ難く、細胞・細胞間相互作用も生じ難い。

(5) 氷結晶と細胞の相互作用の様式は、Ht=1%の場合同様、P. S. と P. S.+Gly.+AFP は「硬い」または「柔軟性のない」特性のグループに属し、P. S.+Gly. は「柔らかい」または「柔軟性のある」特性のグループに属する。

(6) いずれの水溶液においても、ヘマトクリットの増加とともに、細胞・細胞間相互作用は、細胞が受ける機械的作用に対して、その寄与度を増すと考えられるが、その程度は、赤血球懸濁液中を成長する氷結晶の空間的スケールを含めた形態学的特性や氷結晶と赤血球の相互作用の様式に大きく依存する。

なお、今後、細胞損傷の観点から、氷結晶・細胞間相互作用、細胞・細胞間相互作用に関する多くの研究が重要である。

著者らは、本実験の準備および結果の議論にご協力いただいた江藤 Kurt 武志君に感謝の意を表す。

文 献

- (1) Nei, T., *Cryobiology*, **18**(1981), 229.
- (2) Mazur, P. and Cole, K., *Cryobiology*, **22**(1985), 509.
- (3) Pegg, D. E., *Cryobiology*, **18**(1981), 221.
- (4) 石黒・Rubinsky, B., 機論, **60** 572, B(1994), 1349.
- (5) Ishiguro, H. and B. Rubinsky, *Proc. 10th Int. Heat Trans. Conf.*, Brighton, UK, Ed. by Hewitt, G. F., 4(1994), 43.
- (6) 石黒・Rubinsky, B., 機論, **60** 579, B(1994), 3748.