高濃度塩化ナトリウム水溶液による細胞の体積変化と損傷*

高松 洋^{*1}, 川原 智^{*2}
黒川 壮志^{*3}, 本田 博司^{*1}Osmotic Volume Change and Cellular Injury by
Hypertonic Sodium Chloride SolutionHiroshi TAKAMATSU^{*4}, Satoshi KAWAHARA,
Takeshi KUROKAWA and Hiroshi HONDA^{*4} Kyushu University, Inst. Advanced Material Study, 6-1 Kasugakoen, Kasuga-shi, Fukuoka, 816-8580 Japan

It has been believed that exposure to hypertonic solution during freezing is the major cause of the post-thaw cellular injury after freezing at low cooling rates. To develop a fundamental understanding of cell damage due to the hypertonic solution; we have developed a new perfusion technique that isolates the effect of exposure to hypertonic solutions from other effects associated with ice crystals. Using human prostatic adenocarcinoma cells, we characterized the post-hypertonic survival as a function of hypertonic solute concentration, the time of exposure, and the rates of increase and decrease in concentration. Also measured were the membrane permeability and the osmotically inactive volume of cells that are required for the description of osmotic change in cell volume.

Key Words: Freezing, Biological Cell, Cryopreservation, Solution Effect, Osmotic Injury, Viability, Permeability

1. 結 論

細胞懸濁液や生体組織を比較的低い冷却速度で凍結すると、まず、細胞外で氷晶が形成され、凍結の進行とともに細胞外の電解質液が濃縮される。そのため細胞内外に浸透圧差が生じ、結果として細胞が脱水収縮する。このような電解質液の濃縮が生体の凍結障害の主な原因であると考えられ、塩害あるいは溶液効果 (solution effect) と呼ばれている。Lovelock⁽¹⁾は高濃度の電解質液と混合した赤血球の溶血率と凍結解凍後の溶血率とを比較し、細胞損傷の原因として初めて溶液効果を提案した。Pegg-Diaper⁽²⁾は塩化ナトリウムおよびグリセロール水溶液を用いた赤血球の凍結実験に基づき、凍結時の溶液の組成変化により細胞膜の性質が変化した結果、解凍の際に細胞膜の透過性が高くなることが細胞損傷の原因であると推測した。その後、彼ら⁽³⁾は、凍結解凍に対する細胞の耐性は懸濁液の電解質濃度に依存すると推測し、細胞膜に対する電解質の化学的影響を示唆した。これに対し Maryman⁽⁴⁾は、細胞がある体積以下に脱水収縮するような浸透ストレス

を受けると損傷するという最小体積仮説を提案した。一方、Wiest-Steponkus⁽⁵⁾ および Steponkus-Gordon-Kamm⁽⁶⁾は、凍結時の収縮過程で細胞膜の性質が変わるため、解凍時の再膨張過程において十分な表面積増加に耐えられなくなるという仮説を提案した。以上のように、細胞の凍結障害の原因が高濃度電解質溶液にあるとする様々な仮説がある一方で、氷晶による圧迫やせん断などの機械的ストレスが凍結障害の原因であることを示唆する結果も報告されている⁽⁷⁾⁽¹¹⁾。

凍結実験では氷の影響を排除できないため、溶液効果のみの影響を求めることは不可能である。そこで、Zade-Oppen⁽¹²⁾, Armitage-Mazur⁽¹³⁾および Gao et al.⁽¹⁴⁾は、細胞を高濃度の電解質溶液と混合する実験を行い、細胞損傷に及ぼす電解質濃度や暴露時間の影響を検討した。しかし、いずれの場合にもマイクロピペットを用いて細胞塊を濃度の異なる溶液と混合するため、細胞まわりの濃度変化は凍結の際の濃度変化とは全く異なる。また、それらの実験結果から、高濃度電解質液が細胞損傷に与える影響に関して統一的な知見も得られてはいない。したがって、凍結障害に及ぼす溶液効果の定量的評価のみならず、それが具体的には高濃度の電解質液による化学的效果なのか、あるいは細胞の収縮・再膨張といった機械的效果なのかという根本的原因も明らかでない。この原因を明らかにすることは、実際の凍結保存の際に用いられる凍害防御剤の役目を

* 原稿受付 2001年7月2日。

^{*1} 正員, 九州大学機能物質科学研究所 (〒816-8580 春日市春日公園6-1)。^{*2} (株)マツダ車体技術部 (〒735-0028 広島県安芸郡府中町新地3-1) [元: 九州大学大学院総合理工学研究所]。^{*3} 学生員, 九州大学大学院。

E-mail: takamatsu@cm.kyushu-u.ac.jp

明らかにする上でも、また、凍結保存が難しい細胞や組織の凍結法を開発する上でも重要である。

溶液効果の本質を理解する上で特に興味深い疑問は、細胞の損傷が濃度の変化速度すなわち細胞の体積変化速度に依存するかどうか、また、細胞の損傷に重大な影響を及ぼすのは凍結時の脱水収縮と解凍時の再膨張のいずれであるか、という二点である。そこで、細胞まわりの濃度および温度を任意に変えて観察する装置および実験法を考案した。この方法を用いると、細胞まわりの温度と濃度環境を氷がない状態で凍結解凍過程と同じように与えることも可能であり、溶液効果を定量的に求めることができる。この装置を用いた最初の実験として、高張液による浸透圧変化を受けた細胞の生存率を測定し、細胞の損傷に対する高濃度電解質の濃度の影響、暴露時間の影響、および濃度変化パターンの影響を明らかにした。また、細胞の浸透的挙動を支配する細胞膜の水に対する透過率および浸透に不活性な体積を測定した。本報告では、これらの実験結果から、細胞の体積変化が生存率に及ぼす影響について得た知見について報告する。

2. おもな記号

- A : 細胞の表面積 (m^2)
 c : 溶質のモル濃度 (mol/m^3)
 d : 細胞の直径 (m)
 L_p : 細胞膜の水に対する透過率 ($\text{m}/\text{Pa}\cdot\text{s}$)
 o : 浸透圧濃度 (Osm/m^3)
 R : 一般ガス定数 ($\text{J}/\text{mol}\cdot\text{K}$)
 T : 温度 (K)
 t : 時間 (s)
 V : 細胞の体積 (m^3)
 V_b : 浸透に不活性な細胞の体積 (m^3)
 ϕ : 浸透係数
 ν : 溶質1分子から生ずるイオン・分子の数
 π : 浸透圧 (Pa)

添え字

- 0 : 初期状態
 e : 細胞外
 i : 細胞内

3. 試料および方法

3.1 実験装置

図1に実験法の概略を示す。直径が $20\ \mu\text{m}$ 程度の単離した細胞をメッシュで保持し、その周囲に二台のシリンジポンプを用いて低流速で液を流す。シリンジ1に等張（浸透圧が生理食塩水と等しい）液を、シリ

Fig. 1 Experimental procedure

Fig. 2 Setup of test section

ンジ2に高張（浸透圧がそれより高い）液をそれぞれ充填し、シリンジ1のみから液を供給すると細胞を等張液で灌流でき、さらに突然シリンジ2に切り替えると細胞周囲の液をステップ的に高張液にすることができる。また、全流量を一定に保ったままシリンジ1とシリンジ2の流量比を時間とともに変えると、溶液濃度を任意に変えることができる。

図2にテスト部の構造を示す。テスト部は、流路形状（図1参照）を切り抜いた厚さ $50\ \mu\text{m}$ のシリコンゴムシートが二枚のガラス板（ $76\ \text{mm} \times 52\ \text{mm}$ ）に挟まれた構造になっており、流路中央の幅 $10\ \text{mm}$ 、長さ $10\ \text{mm}$ の部分が細胞保持部である。このゴムシートは、流路側壁とシールの両方の役目を果たす。細胞保持部にはナイロン製のメッシュ（ $10\ \text{mm} \times 10\ \text{mm}$ 、線径 $30\ \mu\text{m}$ 、間隔 $40\ \mu\text{m}$ ）を置き、そこに細胞懸濁液を滴下

する。下側のガラス板には液の出入口が設けてあり、入口はポンプに取り付けられた二本のシリンジおよび試薬注入用のシリンジに、出口は廃液用ビーカーにキャピラリーチューブで連結されている。また、テスト部の温度を制御するため、冷却液流路と箔状ヒータを内蔵する厚さ 12.5 mm の温度調節ステージが上側のガラス面に密着している。これらを倒立顕微鏡のステージ上に設置し、温度調節ステージ中央に設けられた直径 10 mm の穴からの透過光で観察する。

Walczak-Diller⁽¹⁵⁾は、大きさが約 100 μm のラ島細胞をメッシュで保持するチャンバを用いて DMSO 水溶液を灌流した場合の細胞の体積変化を観察している。本研究の方法はこれにヒントを得たものであるが、テスト部の構造は全く異なり、対象とする細胞のサイズもはるかに小さい。さらに、細胞に緩やかな濃度変化を与えられる点が本実験法の最大の特長である。

3・2 実験試料

実験には、著者ら⁽¹⁶⁾が細胞の圧迫変形実験に用いたものと同じヒト由来の前立腺癌細胞株 PC-3 を用い、HEPES バッファー液による懸濁液を実験試料とした。そして NaCl を加えて高張液の濃度を調整した。NaCl 濃度にかかわらず HEPES の濃度は 0.02 M (mol/kg- H_2O) であり、NaOH を少量添加することにより常温での pH を 7.4 に調整してある。本研究では 0.15 M NaCl の HEPES バッファー水溶液を等張とみなした。この溶液の浸透圧濃度を浸透圧計 (VOGEL OM802) で測定した結果は 280 Osm/kg- H_2O であった。実験はすべて常温 (23℃) で行った。なお、細胞は平均直径が約 19 μm のほぼ球形である。

3・3 生存率測定実験

3・3・1 暴露時間に関する実験法 細胞を突然高張液に暴露し、所望の時間維持した後、再び元の濃度に戻す実験を行い、実験前後の細胞の生存率をトリパンブルーによる色素排除試験法で測定した。具体的方法は以下のとおりである。

まず、テスト部に 0.15 M NaCl 水溶液を 2 分間灌流する。その後、約 500 μl のトリパンブルー水溶液 (0.2 %) をシリンジを用いてテスト部に注入し、20x 対物レンズによる 10 カ所の観察画像をデジタルカメラを用いて記録する。その後、再びテスト部に 0.15 M NaCl 水溶液を 2 分間灌流した後、突然高濃度の NaCl 水溶液を流し液の濃度をステップ的に増加させる。高濃度の液の供給を所望の時間続けた後、再度ステップ的に元の濃度に戻し、約 13 分間灌流の後、トリパンブルー水溶液を注入する。そして、実験前と同じ観察個所の画像を再びデジタルカメラを用いて記録する。

実験パラメータは高張液の NaCl 濃度 (2.0, 3.8 M) および高張液への暴露時間 (3, 7, 12, 25, 40 分間) である。なお、テスト部における液の流速は約 1 mm/s である。

3・3・2 濃度変化速度に関する実験法 濃度の増加および減少速度の影響を明らかにするため、細胞に以下の三通りのパターンの濃度変化を与え、生存率をそれぞれ測定した。一つ目は濃度をステップ的に増加した後、緩やかに元の濃度に戻すパターン (急増漸減)、二つ目は緩やかに増加した後ステップ的に戻すパターン (漸増急減)、そして三つ目は増加も減少も緩やかに行うパターン (漸増漸減) である。具体的には以下に示す。

前項 3・3・1 の実験と同様、テスト部にトリパンブルーを注入して画像を記録した後、0.15 M NaCl 水溶液を 2 分間灌流する。その後、ステップ的あるいは一定の増加速度で溶液の濃度を増加させる。最終濃度に到達後、12 分間その濃度を維持し、再びステップ的あるいは一定の減少速度で減少させ元の濃度に戻す。約 13 分間、等張液を灌流した後トリパンブルー水溶液を注入して画像を記録する。NaCl の最終到達濃度は 2.0 M または 3.8 M、濃度の変化速度は 1 M/min または 0.1 M/min である。この濃度変化は、凍結が平衡状態を保ちながら進行すると仮定した場合、それぞれ約 5 K/min および 0.5 K/min の冷却速度に相当する。また、2.0 M NaCl 水溶液の凍結温度は約 -8℃ であり、3.8 M は共晶点組成にほぼ等しい。

3・3・3 生存率の測定 実験前後の生存率は、トリパンブルーで染色された細胞の個数と細胞の総個数の比で定義し、記録した 10 枚の画像をそれぞれ実験後に計数して求めた。そして、実験後の生存率を実験前の生存率で規格化した。

3・4 細胞の浸透的体積変化の計算

3・4・1 細胞の体積変化のモデル 種々の濃度変化を受けた細胞の損傷に対する実験結果を理解するには、細胞の浸透的挙動を把握しておく必要がある。細胞の内側と外側の浸透圧差により水のみが細胞膜を透過すると仮定すると、細胞の体積変化は次式で表すことができる^(17,18)。

$$\frac{dV}{dt} = -L_p A (\pi_e - \pi_i) = -L_p A R T (o_e - o_i) \quad \cdots (1)$$

ここに、 V は細胞の体積、 t は時間、 L_p は水の透過率、 A は細胞の表面積、 R は一般ガス定数、 T は絶対温度、 π は浸透圧、 o は浸透圧濃度 (osmolarity) であり、添え字 e および i はそれぞれ細胞の外側と内側を表す。また、浸透圧濃度は次式で求められる。

$$o = \sum_{j=1}^n \phi_j \nu_j c_j \quad \dots\dots\dots (2)$$

ここに ϕ は浸透係数 (osmotic coefficient), ν は溶質 1 分子から生ずるイオンまたは分子の数, c は溶質のモル濃度であり, 添え字 j は溶質の種類を表す. 細胞が初め等張液 (浸透圧濃度 o_0) 中において直径 d_0 , 体積 V_0 であり, その後, 周囲の液の濃度が o_e に変化する場合を考える. 細胞内の溶質の保存より

$$o_i(V - V_b) = o_0(V_0 - V_b) \quad \dots\dots\dots (3)$$

を得る. ここに V_b は浸透に不活性な体積 (osmotically inactive volume) であり, 細胞内の自由水以外の体積を表す. 体積変化の過程で水の透過に寄与する細胞膜の面積は一定に保たれると仮定すると式(1)は次式のように書き表される.

$$\frac{d(V/V_0)}{dt} = \frac{6}{d_0} L_p RT (o_i - o_e) \quad \dots\dots\dots (4)$$

V_b および L_p が与えられると式(4)を式(3)とともに数值的に解くことにより細胞の体積変化が求められる.

3.4.2 浸透パラメータの決定 本実験に用いた細胞の L_p を以下のようにして求めた. まず, トリパンプルーにより実験前の細胞の生死を確認した後, 0.15 M NaCl 水溶液を灌流する. そして, 突然 0.3 M NaCl 水溶液を流し, 60x 対物レンズを用いた観察画像を 5 秒毎にデジタルカメラで記録する. 実験終了後, 記録画像より個々の細胞の投影面積を測定し, 球形を仮定して細胞体積を求める. 細胞の最終平衡体積より V_b を決定し, 式(3)と式(4)を解いた計算結果と測定した細胞体積の時間変化とが一致する L_p を個々の細胞に対して求めた.

Fig. 3 Osmotic volume change of a cell

なお, 本実験で用いた細胞の場合, ガラス面に懸濁液を滴下し数分経つと細胞はガラス面に軽く接着し, その一部は液を流しても動かなかった. したがって, 細胞の面積を求める場合には, 実験はメッシュ無しの状態で行った.

4. 実験結果

4.1 細胞の浸透パラメータ

図 3 は NaCl 濃度を 0.3 M にステップ的に変えた後の細胞の体積変化の測定例である. この場合, 約 40 秒で体積変化はほぼ終了し平衡状態になる. 図中の実線は, 実験結果に合うような L_p と V_b/V_0 の値および d_0 の測定値を与えて式(4)をルンゲ・クッタ・ギル法により数值的に解いた結果である. この場合には, $L_p = 9.0 \times 10^{-14}$ mPa/s, $V_b/V_0 = 0.39$ とすれば実験結果をよく表すことができる. 53 個の細胞について測定した結果の平均値は $L_p = 8.4 \times 10^{-14}$ mPa/s (標準偏差 2.1×10^{-14} mPa/s), $V_b/V_0 = 0.39$ (標準偏差 0.12) であった. この透過率の値はヒトの赤血球の値の約 1/10, 白血球の値の約半分である⁽²⁰⁾.

4.2 生存率に及ぼす濃度変化の影響

図 4 は濃度をステップ的に増加減少させた後の生存率を, 高張液への暴露時間に対して示している. 記号は, それぞれの条件で 5 回行った実験結果の平均値, エラーバーは標準偏差を表す. 濃度が 2.0 M の場合, 生存率は暴露時間とともに低下し続ける. 一方, 3.8 M の場合には, わずか 3 分の暴露で約半数が損傷し, 暴露時間の増加とともに生存率はさらに低下する.

図 5(a)および図 5(b)は種々のパターンの濃度変化後の生存率を表しており, それぞれ到達濃度が 2.0 M と 3.8 M の場合の結果である. この場合もそれぞれ 5 回の実験結果の平均値を表しており, エラーバーは標準偏差を示す. 図 5(a)と図 5(b)を比較すると, 濃度変化

Fig. 4 Cell viability as a function of time of exposure to hypertonic solution

パターンにかかわらず 3.8 M の場合の生存率は 2.0 M の場合より明らかに低い。濃度変化速度が 1 M/min の場合には、2.0 M と 3.8 M のいずれの場合も、急増漸減と漸増急減の生存率には有意差が見られない（確率 $p > 0.3$ ）。これに対して、濃度変化速度が 0.1 M/min の場合には、漸増急減の生存率のほうが急増漸減より高い（ $p < 0.001$ ）。図中には、各条件に対応するステップ変化（急増急減）の場合の生存率の推定値を破線で示してある。図 4 が示すとおり生存率は暴露時間に依存する。したがって、ここでは各濃度変化パターンにおける濃度の時間積分値がステップ変化と等しくなる暴露時間を求め、それに対する値を図 4 より内挿して求めた。それらの値は 2.0 M と 3.8 M のいずれの場合も濃度変化速度にかかわらず急増漸減の場合とほぼ等しい。この結果は、濃度が比較的緩やかな速度 0.1 M/min で増加すると急増する場合より生存率が高くなること、および濃度の減少速度には生存率が依存しない

Fig. 5 Cell viability after exposure to hypertonic solution with various patterns of changes in concentration

いことを示唆している。なお、漸増漸減の場合には、細胞が高濃度の液にかなり長時間暴露されるにもかかわらず、漸増急減の生存率との有意差は認められない。

5. 考 察

0.1 M/min の場合のみ漸増急減の場合の生存率が急増漸減の場合より高いという本実験の結果は、細胞の損傷が体積の収縮速度に依存することを表している。そこで、細胞の体積変化を浸透パラメータの測定値 $L_p = 8 \times 10^{-14}$ mPa/s, $V_b/V_0 = 0.4$ および $d_0 = 19$ μ m を用いて算出した。図 6 は最終濃度が 3.8 M の場合の体積の時間変化を、図 7 は体積の変化速度 $-dV/dt$ を示している。計算結果によるとステップ変化の場合、わずか数秒で細胞はほぼ平衡体積に達し、1 M/min の場合には約 120 秒で最終体積にほぼ等しくなる。これに対し、0.1 M/min の場合には 120 秒後でも細胞の収縮はまだ最終状態の 50% 程度である。一方、体積変化速度は、ステップ変化の場合には濃度変化直後が最大であり、その値は 165 μ m³/s であった。これに対し、1 M/min の場合には 18 秒後、0.1 M/min の場合

Fig. 6 Calculated change in cell volume

Fig. 7 Calculated change in the rate of volume reduction

には 46 秒後にそれぞれ極大値 $79 \mu\text{m}^3/\text{s}$ および $15 \mu\text{m}^3/\text{s}$ をとる。これは、細胞膜を透過する水の体積流束に換算すると、それぞれ 70 nm/s , 13 nm/s になる。なお、最終濃度が 20 M の場合もステップ変化の場合を除いて上記の結果と全く同じになる。本計算は、実験で求めた L_p の値が高濃度の場合にも適用できるという仮定に基づいている。また、実際には直径および L_p の値にばらつきがあるため体積変化速度の最大値も個々の細胞で異なると考えられるが、 0.1 M/min と 10 M/min の場合で脱水速度の最大値に大きな差があることは本計算結果より明らかである。Mukdrew-McGann⁽²⁾は、凍結時に浸透圧差によって流出する水による一種の摩擦抵抗により細胞膜が破壊された結果、細胞内凍結が生ずるという仮説を提案しており、水の流束がある程度以上になると膜の損傷が生ずると考えている。本実験結果はこの仮説を一部支持することになると考えられる。しかし、漸増急減の場合の生存率を 0.1 M/min と 10 M/min の場合で比較すると 0.1 M/min の方がわずかに高いものの有意差は認められない。これは、 0.1 M/min の方が高張液への暴露時間がはるかに長いことに起因していると考えられ、高張液による細胞の損傷を上記のメカニズムのみで説明できるわけではない。

図 4 に示した結果、すなわち細胞の損傷が高張液の濃度および暴露時間に依存するという結果は、ヒトの赤血球を用いた Zade-Oppen⁽¹²⁾の実験結果と同様である。また、細胞の収縮速度が遅いほうが生存率が高いという結果は、DMSO の添加を数段階に分割した場合と一度で行った場合の細胞膜の損傷を比較した Mukdrew-McGann⁽²⁾の結果と定性的には同じである。したがって、これらの結果については、ピペット操作による機械的ストレスや濃度の不均一を排除した本実験においても再確認することができた。しかし、細胞の損傷が、等張液へ戻す際の濃度減少速度にはあまり依存しないという結果は、ヒトの精子を用いて単段または多段で等張液に戻した Gao et al.⁽¹⁴⁾の結果とは異なる。また、細胞の再膨張の際に、表面積増加に耐えられる増加率に限界があるとする Wiest-Steponkus⁽⁶⁾の仮説にも反している。このような結果の違いは、実験法の違いにも原因がある可能性があるが、細胞の種類に依存するところが最も大きいと考えられる。

60x 対物レンズを用いた本実験での観察によると、 0.1 M/min の場合には比較的球形に近い形状で収縮が進行していたのに対して、濃度を急激に増加させた場合の方が細胞の変形の程度が著しかった。細胞の圧迫変形に関する著者ら⁽⁶⁾の実験結果は、細胞の損傷が細胞

骨格の変形に起因することを示唆している。したがって、細胞損傷が収縮速度へ依存する原因には、細胞骨格の変形能と変形速度、および細胞骨格と細胞膜の接着強度が関連している可能性もある。いずれにせよ、生存率が細胞の脱水収縮速度に依存するという本実験の結果は、細胞の損傷が細胞膜の機械的損傷によるものであることを表していると考えられる。一方、生存率が暴露時間に依存する図 4 の結果は、細胞の損傷が化学的要因によるものであることを示唆している。したがって、溶液効果にはその両方の効果が含まれると考えられる。

以上の結果は、全て常温での実験で得られたものであり、透過率をはじめとする細胞膜の性質が強い温度依存性を示すことは明らかである。したがって、今後は、低温下での同様の実験、および凍結を模擬した実験が必要である。

6. 結 言

細胞の凍結障害に及ぼす電解質溶液の濃縮の影響を明らかにするため、細胞を保持したまま周りの NaCl 水溶液の濃度を任意に変えて観察する装置および実験法を考案した。この方法を用いて、細胞株 PC-3 の浸透パラメータの測定および高張液による浸透圧変化を受けた細胞の生存率の測定を行い、以下の結論を得た。

1. 本実験で用いた細胞の 23°C における細胞膜の水透過率は約 $8 \times 10^{-14} \text{ mPa/s}$ 、浸透に不活性な体積は等張液中の細胞体積の約 40 % である。
2. 高張液へ暴露した後、等張に戻した細胞の生存率は、暴露前より低下する。
3. 濃度の増減をステップ的に行った場合、生存率はわずかな暴露時間で急に低下し、暴露時間の増加とともに徐々に減少する。また、濃度が高いほど生存率の低下は大きい。
4. 細胞の生存率は、濃度の増加速度がある程度小さければ急増した場合より高くなるが、濃度の減少速度には依存しない。したがって、細胞の損傷の程度は細胞の収縮速度に依存する。
5. 細胞は、体積変化に起因する細胞膜の機械的損傷と高濃度電解質による化学的損傷の両方を受け、その程度は濃度と濃度変化速度に依存する。

本研究は科学研究費補助金（基盤研究 (C) 課題番号 13650226）の補助を受けた。また、細胞培養について九州大学医学研究院の内藤誠二教授および九州大学生体防御医学研究所の住本英樹教授にご指導いただいた。ここに記して謝意を表す。

文 献

- (1) Lovelock, J. E., The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing, *Biochim. Biophys. Acta* **10** (1953), 414-426.
- (2) Pegg, D. E. and Diaper, M. P., On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes, *Biophys. J.*, **54** (1988), 471-488.
- (3) Pegg, D. E. and Diaper, M. P., The unfrozen fraction of freezing injury to human erythrocytes: a critical examination of the evidence, *Cryobiology*, **26** (1989), 30-43.
- (4) Meryman, H. T., Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes, *Nature*, **218** (1968), 333-336.
- (5) Wiest, S. C. and Steponkus, P. L., Freeze-thaw injury to isolated spinach protoplasts and its simulation at above freezing temperatures, *Plant Physiol.*, **62** (1978), 699-705.
- (6) Steponkus, P. L. and Gordon-Kamm, W. J., *Cryo-Letters*, **6** (1985), 217-226.
- (7) Nei, T., Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near zero temperatures. I. Microscopic observation of hemolyzing erythrocytes during the freezing and thawing process, *Cryobiology*, **4** (1967), 153-156.
- (8) Mazur, P., Rall, W. F., and Rigopoulos, N., Relative contribution of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen erythrocytes, *Biophys. J.*, **36** (1981), 653-675.
- (9) Mazur, P. and Rigopoulos, N., Contribution of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate, *Cryobiology*, **20** (1983), 274-289.
- (10) Ishiguro, H. and Rubinsky, B., Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification, *Cryobiology*, **31** (1994), 483-500.
- (11) Takamatsu, H. and Rubinsky, B., Viability of deformed cells, *Cryobiology*, **39** (1999), 243-251.
- (12) Zade-Oppen, A. M. M., Posthypertonic hemolysis in sodium chloride systems, *Acta Physiol. Scand.*, **73** (1968), 341-364.
- (13) Armitage, W. J. and Mazur, P., Osmotic tolerance of human granulocytes, *Am. J. Physiol.*, **247** (1984), C373-C381.
- (14) Gao, D. Y., Ashworth, E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., and Crister, J. K., Hyperosmotic tolerance of spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermatolysis, *Biol. Reproduction*, **49** (1993), 112-123.
- (15) Walcerz, D. B. and Diller, K. R., Quantitative light microscopy of perfusion and freezing processes, *J. Microscopy*, **161** (1991), 297-311.
- (16) Takamatsu, H., Kumagai, N. and Rubinsky, B., The effect of temperature on the viability of deformed cells, HTD-Vol. 368, BED-Vol. 47, Advances in Heat and Mass Transfer in Biotechnology, ASME, (2000), 55-58.
- (17) Mazur, P., Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, *J. Gen. Physiol.*, **47** (1963), 347-369.
- (18) McGrath, J. J., Preservation of biological material by freezing and thawing, in Shitzer, A. and Eberhart, R. C. (Eds.), Heat Transfer in Medicine and Biology, Vol. 1, Plenum Press, New York, (1985), 185-238.
- (19) 鈴木泰三・星猛・鈴木裕一 (訳), 生体膜輸送の基礎, 東京化学同人 (1982).
- (20) House, C. R., Water Transport in Cells and Tissues, Edward Arnold (publishers) Ltd., London, (1974), 165.
- (21) Muldrew, K. and McGann, L. E., Mechanisms of intracellular ice formation, *Biophys. J.*, **57** (1990), 525-532.
- (22) Muldrew, K. and McGann, L. E., The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury, *Biophys. J.*, **66** (1994), 532-541.

付 録

本実験では、水の透過に対する抵抗は全て細胞膜にあると仮定して細胞膜の透過率を求めた。そこで、細胞表面と周囲液との間の物質伝達の影響および周囲液の流れの影響を検討しておく。

細胞膜を透過する水の流束は次式で表される。

$$J_w = L_p RT \phi \nu \Delta C_m \quad \cdots \cdots \cdots (A \cdot 1)$$

ここに、 J_w は膜を透過する水の流束、 ΔC_m は膜両面の溶質のモル濃度差 (mol/m^3) である。一方、細胞表面と周囲液との間の水の移動は次式で表される。

$$J_w = k_c \hat{v} \Delta C_i \quad \cdots \cdots \cdots (A \cdot 2)$$

ここに、 k_c は物質伝達率、 $\hat{v}$ は水のモル容積、 ΔC_i は膜表面と液バルクの間の濃度差である。一様流中に置かれた球まわりの物質伝達率は次式で見積もることができる^(付1)。

$$\frac{k_c d}{D} = (4 + 1.21 Pe^{2/3})^{1/2} \equiv A \quad \cdots \cdots \cdots (A \cdot 3)$$

ここに、 D は拡散係数、 $Pe (= Re Sc)$ は物質伝達のペクレ数である。液の流速を 1 mm/s 、細胞直径 d を $20 \mu\text{m}$ とすると常温では $A = 3.3$ となる。式(A・1)～(A・3)より次式を得る。

$$\frac{\nu \Delta C_m}{\Delta C_i} = \frac{D \hat{v}}{L_p RT \phi d} A \quad \cdots \cdots \cdots (A \cdot 4)$$

上式に $D = 1.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $\hat{v} = 1.8 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{mol}$ 、 $R = 8.314 \text{ J/mol/K}$ 、 $T = 300 \text{ K}$ 、 $\phi = 1$ を代入し、さらに $d = 2 \times 10^{-5} \text{ m}$ 、 $A = 3.3$ 、 $L_p = 8 \times 10^{-14} \text{ m/Pa/s}$ とすると $\nu \Delta C_m / \Delta C_i = 22.3$ となる。したがって、水の透過に対する細胞外の抵抗は細胞膜の数%程度であると考えられる。

(付1) Sherwood, T. K., Pigford, R. L. and Wilke, C. R., Mass Transfer, McGraw-Hill, (1975), 215.