

そして脊髄損傷といった広い範囲での疾患に対する細胞療法である。これにより 10 数年に及ぶ mES 細胞を使ったインシュリン産生細胞、ドーパミン産生細胞、心筋細胞そして血液系の前駆細胞への分化制御研究が口火を切った。そしてこれらの研究が hES 細胞をそれぞれの細胞に分化させる研究に道筋をつけた。hESC の分化を制御するシグナル経路については今のところあまり理解されていないがいくつかの細胞系列ではある程度、体性幹細胞を濃縮することに成功している。

細胞分化制御に加えて、hESC の創薬といった産業応用のためには現行法をスケールアップする必要がある。この分野ではバイオプロセッシングのみならず商業利用に適合した細胞の生産という点で相当の努力を要求している。その上、細胞利用に特異的な問題に加えて効果的な凍結保存、備蓄そして輸送の方法は研究と医療の双方に必要とされるであろう。

胚性幹細胞と幹細胞株の樹立

胚性幹細胞

hESC は前着床胚の内部細胞塊(inner cell mass:ICM)に由来する多能性細胞である。この細胞は次に挙げる 2 つの特徴で定義される。1 つは長期間にわたる培養で自己増殖し続けるということ、もう 1 つは 3 胚葉細胞由来のさまざまな分化細胞になる娘細胞を非対称分裂により生み出す能力があることである。hESC は形態的に細胞質に比して核の占める割合が大きく、一般に扁平なコロニーをディッシュ上で形成する (図 1)。表現型としては mESC と違い特異的な胚抗原である SSEA-1 を発現していないが、ICM のように SSEA-3 と SSEA-4 を発現している。そしてヒトの奇形腫由来(embryonal carcinoma:EC)細胞を認識する TRA-1-60、TRA-1-81 といった一連の抗体により認識される。hESC はまた CD9 と CD133(どちらも他の幹細胞に発現している)、Thy1、MHCclassI(主要組織適合複合体クラス I)そして細胞内転写因子である Oct3/4 を発現している。定量的には差があるものの長期培養下でこれらの分子の発現が維持されている。

未分化 hESC はアルカリフォスファターゼ(ALP)そしてテロメラーゼ活性が高く、長期培養下でも正常な核型を維持している。ただ時々、EC 細胞によく見られる、第 13,17 染色体の 3 染色体性が報告される。また長期間にわたる継体培養の後、第 2,12 染色体に異常がみられるとの報告もある。

胚性幹細胞株の樹立

幹細胞研究や hESC 株樹立に対する方針について EU メンバー内や世界中の国々において統一された見解はない。このような方針は往々にして複雑であり度々変わりものである。例えば現在ドイツにおいては、1991 年に制定された胚保護法(Embryo Protection Act)によって hESC 株の樹立は禁止されている。最近になって幹細胞法(2002)が制定され 2002 年 1 月以前に樹立されたものも含む hESC について樹立等、特定の基準を満たしていると確認

されたものでなければ輸入及び使用を禁ずるとされた。オーストリアでは変動的なものの hESC の樹立やそれを使用した研究は禁じられている。一方、スイスでは幹細胞研究法が 2005 年に制定されたので最近ではイギリスと似た方針を打ち出し hESC 研究を認める方向である。最近の幹細胞研究の動向についての概要は国際幹細胞研究会 (International Society for Stem Cell Research:ISSCR) のホームページで閲覧することができる。
(www.isscr.org/public/regions/index.cfm)

イギリスではインフォームドコンセントを受けた提供者から研究目的で譲り受けた“倫理的適合”胚を使って hESC が樹立されている。人工授精(in vitro fertilization: IVF)や着床前診断(pre-implantation generic diagnosis:PGD)の結果得られる医療目的では使用できない胚や余剰胚もある。これら一連の作業にはヒト受精及び胚に関する委員会 (human fertilization and embryology authority:HFEA) の認可が必要で、彼らは査察や認可制度を通して倫理的に高いレベルの作業を保証している。

当初、hESC は受精後 5-8 日の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたが、いまではプロトコルが改良され桑実胚や発生を停止させた胚そして分割球細胞 1 つより樹立できるようになっている。初期に樹立された幹細胞株の多くは動物抗体(ギニアピッグ補体等)を使った抗体処理を受けている。その後、細部細胞塊を X 線照射やマイトマイシン処理で不活化したマウス線維芽細胞と動物由来血清を含む培地中で培養することによって hESC は樹立される。これら線維芽細胞はヒト (そしてその他の動物の) ESC の増殖に必要とみられていて支持細胞 (feeder cells) とか単にフィーダー (feeders) と呼ばれている。このようにして形成された ICM-hESC のコロニーは物理的に断片化され新鮮な不活支持細胞上に移される。一定の条件下、細胞株はこのようなコロニー形成とそれに引き続く物理的断片化そして定期的な支持細胞上への継体培養の後に樹立される。

これら細胞株の医療応用という点からすると、細胞株樹立過程における動物由来物質の使用には問題がある。最近は、医療応用に適した幹細胞供給という観点に立って、細胞株は胚全てをヒト支持細胞と無血清培地中で培養することにより樹立されてきている。一度、細胞株が樹立されると将来的に細胞株が研究や医療に使えるよう凍結保存される。これらは英国幹細胞バンク(the UK Stem Cell Bank)の業務の一部である。

英国幹細胞バンク(the UK Stem Cell Bank)

英国最高医務責任者による 2000 年の報告を受けて上院議特別委員会は hESC 利用の際の科学的、倫理的な問題点を調べ数々の勧告をした。特別委員会は hES 細胞の英国国内への輸出入や使用に関して監視や認可を行えるような監督機関を置くことを勧告した。これを受けて Patel 卿が委員長となり英国幹細胞バンクとヒト幹細胞株に関する運営委員会が 2002 年に設立された。この委員会は監督機能に加えてヒト幹細胞株の使用についての履行規範制定と英国幹細胞バンクの設立を任務としている。

英国幹細胞バンクの役割

運営委員会の支援を受けながら幹細胞バンク(www.ukstemcellbank.org.uk)は2003年に国立生物標準制御機構(National Institute for Biological Standards and Control :NIBSC)に設立された。NIBSCは医療利用目的の生物由来産物の標準化と制御を通して公衆衛生を保証する国際的に知られた英国政府の科学研究機関である(www.nibsc.ac.uk)。幹細胞バンクは医学研究審議会(Medical Research Council:MRC)とBBSRC(Biological Sciences Research Council)により資金供給をうけ、次の業務を行う。

- 倫理的規範に従った胚、胎児そして成体幹細胞株の、精査された信頼性の高い備蓄を達成する。そしてそれを英国や諸外国の研究者に利用可能たらしめること。
- 医療応用の出発物質としての原種の提供をすること
- 幹細胞バンクより提供された細胞株が使用者の意図に相応した安全基準を満たしていることを保証すること。
- UKSCB(英国幹細胞バンク)において調整された細胞バンクが提供者によって寄託された細胞株と同一の特性を持っていることを示すこと。
- 広い範囲での使用に対して幹細胞の適性が保持され続けているということを保証するため、長期間の培養における細胞株の特性や能力を査定すること。
- 細胞株に関連した性能データを開示し培養法、安全性検査、特性解析、保存方法の最適化を行うこと。

幹細胞バンクは幹細胞株を管理監督し科学界にこれらの細胞を使用可能とする。一方、運営委員会は細胞株がインフォームドコンセントを通し倫理的基準を満たして調達されているか、また生物医学会にとって価値ある資産に相当する細胞株であるかということを保証するため、幹細胞を幹細胞バンクに預ける際のすべての申請書についての審査承認をする。運営委員会は幹細胞バンクから細胞の配分を受けるために提出された全ての申請を、倫理的な使用に則した一連の基準に照らし合わせて査定する。そして全ての細胞株の申請は同様に処理される。

研究と臨床治療のための幹細胞株

研究および医療目的から細胞供給の要望があることから幹細胞バンクは”研究用”と”医療用”の2つの”グレード”の細胞株を準備することになった。現在、幹細胞バンクは非”医療用”の細胞株を提供している。なぜなら”医療用グレード”の細胞株は、その前提としてEUの優良製造規範(Good Manufacturing Practice:GMP)かそれに相当した基準を順守した設備で樹立される必要があるからである。それに加えて、英国とEUの組織と細胞令(EU Tissues and Cells Directive 2004/23/EC:EUTCD)は医療応用を意図するhESCは親による指示(parent directive)だけでなく技術添付書の条件を満たすことを求めている。

幹細胞バンク内では、”医療グレード”の基準を満たす細胞株は”研究グレード”の基準も

満たしている。これにより必要のない重複を取り除くことができる。どちらも GMP 基準を順守した(空調を含んだ)クリーンルームで貯蔵される。そして“研究グレード”の細胞株は”医療グレード“に相応する品質設備の元で管理される。2つのグレードの違いは主に”医療グレード“の細胞株により厳しい安全基準が課せられるということと幹細胞バンクが医療目的で細胞株を譲渡する際に EUTCD の医療査察に妥当なレベルの提供者情報を必要とする点である。

幹細胞株の管理

国立の幹細胞バンクの設立は高品質の幹細胞備蓄を提供することにより科学界が自由に細胞を受け取ることを可能とし幹細胞の樹立に伴う胚の数を最小限に抑えるという意味を持つ。最終的に HEFA は胚を研究に使うことを制限するため手数料を設定する。そして免状付与の正式な条件として、細胞株を幹細胞バンクに預けることを英国の研究室に要求する。幹細胞樹立に使用される胚数に対する英国幹細胞バンクや他組織の影響について評価をするのは時期尚早である。現在まで運営委員会は英国及び海外から 60 あまりの幹細胞株を幹細胞バンク備蓄のために認可してきた。最近の推定では世界中で 400 あまりの幹細胞株が樹立されており、そのほとんどは研究目的にのみふさわしい品質である。

最近までこれらの細胞株の特徴近似性を調べるための系統調査はほとんどなされてこなかったが、英国幹細胞バンクが技術的拠点として系統調査の支援をし現在完了中である。この調査は、国際幹細胞主唱(International Stem Cell Initiative;www.stemcellforum.org.uk)が全世界の専門家集団と共に行っている。その目的はかなりの数の細胞株(世界中の 17 研究室からの 66 細胞株)の特定条件下における特徴を調査することである。もし幹細胞株が大体似た表現型であり、重要なことであるが同様な分化能力を持っていることが示され、しかも細胞株が UKSCB のようなセンターを通して自由に手に入れることができれば、一般の研究目的用にさらに細胞株を樹立することが必要であるといった強い主張はなくなるだろう。それでも特に遺伝病や発生生物学的研究のため前着床(Preimplantation Genetic Diagnosis:PGD)胚から新しい細胞株を樹立する必要性は残りはするが。

医療的な観点からは、幹細胞株は治療目的に安定な分化細胞を産生するために必要となる。こういった細胞は組織適合性抗原を持っているため HLA 型が適合している必要がある。移植による拒絶問題を克服するため体細胞核移植といったいくつかの対策が練られてきたが、暫定的にいえば HLA 型の適合した幹細胞株の備蓄が移植には必要である。一般的な理論的、経済的な視点による疑問は、患者が最大利益を享受する為に一体いくつの HLA の相違した細胞株が必要なのかということである。

Taylor らによる最近の報告は臓器移植に適用されるデータを元に、これを解決しようと試みている。それによると、少なくとも 150 余の型に対応した提供者がいれば HLA 適合に実

行的な最大効果が見込めると推論している。この数には全体的な hESC 細胞株樹立効率は考慮にいれられてないし、いろいろな外的要因によっても影響を受ける。報告されている成功率の算出法が変われば計算はもっと難しくなる。さらにそれぞれの治療方法に求められる様々な系列の細胞を作り出す能力が細胞株によって変わってくるので、必要とされる HLA 適合幹細胞株の数はもっと増えるのである。

細胞貯蔵と品質管理

継体培養された細胞株に遺伝子変異が入っている傾向があることはよく知られた事実である。均一な細胞を分取したバンクを構成することにより望ましい共通の表現型の細胞株を保持しておくことができる。これにより、求められる特性を持つ機能的同一細胞を含む原資を研究者が共有することができる。したがって複数の研究グループや長い間一人の研究者によって行われてきた研究成果を直接比較することが可能になる。

細胞株を長期間培養すると汚染の危険性が増大する。細胞培養液はカビや細菌の増殖を助長するし、抗生物質を恒常的に使うと増殖がよく際され細胞に悪影響を及ぼす。このような汚染は大抵、培養液の濁りによりたやすく認識できる。しかし周囲の環境から混入してくるマイコプラズマあるいは細胞培養液中の構成物質や他の細胞株に由来するウイルスによる些細な汚染も細胞の特性に影響を与える。よって周期的に汚染のないよく特性を調べ上げた細胞のストックを使うことにより、その細胞株から得られた結果の信頼性を上げることができる。

幹細胞バンクの標準化と品質管理の必要性については理解されてきている、そして GCCP(good cell culture practice)の手引きが容易に手に入るようになっている。UKSCB (英国幹細胞バンク)はこれら、よく知られた原則を基本にした貯蔵システムを導入している。委託者の代表試料をほかの研究者に分与するのに適した凍結細胞のストックを準備する手順は図 2 に示している。

ある程度増殖させるけれども原則的に 1 つの凍結保存しか調製されない造血細胞のような初代培養細胞と違い、幹細胞株は細胞バンクに必要な数の細胞を満たすため、数週間 (8 – 26 週の範囲内) にわたって培養される必要がある。要は、幹細胞の初期母数を増やすために増殖と継体を繰り返すことにより 3 つの一括ストックが順次調整されるのである。委託者から得られた最初の凍結保存物から PMB(Pre-Master Bank)と指定された少量の細胞貯蔵が調整される。これは最初に貯蔵された時点における細胞株の無菌性と特性を定めるための品質管理検査に使われる。もし委託者より一回の培養で十分な量の凍結貯蔵が提供されればそれが PMB として扱われる。これはまた長期アーカイブとして凍結保存される。この備蓄から分取されたものは MCB (Master Cell Bank)として定められる。MCB は将来的にその細胞株を使って行われる研究すべてに対する標準点となるべき凍結細胞株を分注したストックであることを意味する。MCB を使って広範囲にわたる特徴試験と品質管理試

験が行われる。これらの試験には核型、DNA 分析、アイソザイム分析、形態的な査定と表面マーカー、その他既知の分子マーカー分析を含む。細菌やマイコプラズマの汚染等の無菌テストと共に増殖特性や生存率の計測そして機能的な査定も公開手順の一部である。MCB は将来的に細胞貯蔵が調整される際の元種ともなる。MCB が存在する限りは同継体数でしかも特性が明らかになっている配給用細胞備蓄がいつも存在するので MCB のストックが配給されることはない。

DCB (Distribution Cell Bank) は1つあるいは限定数の MCB ストックから調整された多数の細胞備蓄である。DCB からのストックが配給され研究及び産業用に用いられる。この備蓄もまた PMB と MCB 双方との共通性を保証するため、広範囲にわたる検査を受ける。一度 DCB が尽きてしまうと新たな DCB が MCB より調製される。このように段階的な貯蔵法の採用によって同じ継体数の細胞が何十年にも渡って入手できることを保証する。

ヒト胚性幹細胞の培養

hESC の細胞培養には基本的な細胞培養法と同じ部分が多々ある。しかし多くの培養法の違いが hESC 細胞と体細胞(体性幹細胞を含む)間だけではなく hESC と他の哺乳類由来 ESC 間にある。このような違いの一部は細胞凍結に関連した現在われわれが抱えている問題に影響を及ぼしている。ESC は有糸分裂が不活化された線維芽細胞よりなる支持細胞層上で増えていく。通常 mESC と霊長類由来 ESC 株にはマウス胎児由来の低継体数あるいは継続維持された線維芽細胞株を使う。これは研究用の hESC のルーチン培養にも当てはまるが、ここではヒトの不活化支持細胞を用いる。なぜなら医療用途に相応した“医療グレード”細胞株を作ることを目的として支持細胞にはヒトの分裂不活化細胞が導入されているからである。hESC 培養には無血清培地さらに支持細胞なしの培養システムの成果も含まれる。

初代培養細胞と哺乳類の細胞株は細胞種によって単一細胞浮遊培養法や単層細胞接着法で培養される。これらの細胞を増やすためバイオリアクターといった自動培養システムや一般的な細胞培養ディッシュやフラスコだけでなく多孔プレートを使用したりしていろいろな方法がある。骨髄や臍帯血由来の成体間葉系幹細胞は単層細胞接着法により増えていく。しかし、ヒト(そしてほかの動物の)ESC は大体 3×10^4 から 5×10^4 個の hESC 細胞からなる、細胞がお互いにきつく集合し底面接着しているコロニーという未分化状態でのみ増殖する。普通 ESC を増やすとき、付着細胞株は物理的に付着面から剥離され酵素分解法により単一細胞にされる。そしてこの状態で継体されたり凍結防止剤(cryoprotectant:CPA)処理され凍結保存される。事実上コロニー状となるが、mESC 株は繰り返し継体培養され未分化浮遊単一細胞としてうまく具合に凍結保存される。その一方、hESC(及び霊長類 ESC)は今のところ単一細胞として継体や凍結保存ができない。霊長類の幹細胞は単一細胞にして蒔き直すと非常にコロニー形成率が悪くなるし、hESC の場合は分化や細胞死を引き起こす。実

験的な証拠はあまりないが、細胞数にして 100-150 あまりの塊が凍結保存に最適な大きさであると報告されている。hESC をコロニー片として凍結保存する必要性が、広く hESC に適応した凍結保存法に重要な影響を及ぼしている。

細胞同士の接触や最適な断片の大きさを維持するため hESC は機械的に分解されて継体されていく(図 3)。これは少なくとも細胞株を樹立する初期の段階においては基本的な hESC の継体法である。酵素分解は多くの細胞株において試されているが単一浮遊細胞になることを避けるため、処置に厳格な制御を必要としている。hESC を機械的に分解するためコロニーは培養プレートか多孔プレート上で増やさなければならない。このような処置は“医療グレード”の細胞には適していない。なぜならこれは現行の規制体制においてこれは“蓋をしていない処理”と規定され、このような処理には厳格なレベルの空調が義務づけられているからである。このことは凍結保存にも影響する。なぜならこのような労働集約的で無菌作業を要する処理は新たに運搬上の問題を引き起こすからである。

ヒト胚性幹細胞の凍結保存

hESC の凍結保存には 2 つの方法がある。造血幹細胞を含むほとんどの細胞や組織と同じく、最初の試みは経験則に従っており、似た細胞にうまく用いられている方法を適用することを基本としていた。hESC の場合そのような 2 つの細胞“候補”は mESC と胚である。これらを元に一般的な凍結法とガラス化法を使う hESC 用のプロトコールが開発された。これららの方法を適用する際、凍結保存自体の問題を調べ理解するというより幹細胞の現用貯蔵維持の必要性という点に注意が向けられている。

徐冷による凍結保存

hESC 細胞株を徐冷により凍結保存する方法は mESC のために開発されたプロトコールを元にして確立された。この mESC のプロトコールは初代培養細胞と継続細胞株に使われているプロトコールを適用したものである。最初に mESC ではコロニーが酵素処理され単一浮遊細胞になる。そして通常 5-10% の DMSO (dimethyl sulfoxide) を含んだ牛胎児血清含有培地からなる CPA 液に浸される。-80 度フリーザーに設置された受動冷却装置を使うため、通常 1 分あたり 1-2 度で冷却していくようなプロトコールが開発されている。細胞は凍結チューブあるいは多孔プレート中のままといった、様々な方法で-80 度保存される。だいたいの急速解凍による細胞の回復率は 90% 以上で、生き残った細胞は培養することで未分化コロニーを形成する。

細胞塊として凍結保存しなければならない hESC では、mESC に効果的な徐冷法で明らかに失敗した。初期の Reubinoff らによる検討では、通常徐冷プロトコールを使った凍結融解後の回復率(彼らは融解後 2 週間で回復したコロニー数を数えて算出した。)は 16% であった。回復したコロニーは典型的な hESC のコロニーと比べても小さかったし、有意な分化傾向が見受けられた。Zhou らもまた融解後 9 日目のコロニー数の回復をもとに、若干良

い回復率であるものの、23%という似たような結果を報告している。これもまた凍結保存していない対照群に比べてコロニーの増殖率は低下していたし、生き残ったコロニーは分化傾向が強かった。双方とも 10%DMSO を CPA として用いていた。Ha らによる研究では DMSO、glycerol や ethylene glycol (EG) を、そのみと DMSO 入りとで比較した。その結果、5%DMSO, 10%EG, 50%胎児牛血清という最も好ましい割合でも回復率はちょうど 30%に留まった。これらの限定された研究では受動冷却装置の冷却速度はほとんど制御しないかあるいは記録していないで行われていたが、冷却速度を制御した実験でも同じような結果が得られた。Richard らは一般に用いられている細胞凍結溶液の凍結能力を-1 度/分で比較した。冷却速度は液体窒素に試料を入れる前の温度である-30 度に到達するまで制御した。この温度は 5 分という平衡時間を考慮に入れても液体窒素に入れる温度としては高すぎるという批判もあるが、冷却温度の制御によって以前より溶解後の回復率が良くなることはなかった。

徐冷中の損傷

未分化 mESC は connexin43 とか 45 といったギャップジャンクションタンパクを発現していて、電顕でギャップジャンクション自身もこれらの細胞で確認されている。しかし mESC は継体や単一浮遊細胞の徐冷でも難なく生き残る。よってこれらの違いはコロニー成長や細胞増殖中に形成されるギャップジャンクションにあるのではなく、徐冷中にもギャップジャンクションが存在し続けるという点にある。細胞間の氷形成は培養単層細胞や昆虫の唾液腺由来の細胞列など様々な細胞や組織において見出されている事実である。Berger と Urik はギャップジャンクションを通して隣り合う細胞の間に氷が形成されるとの考えを提案した。そして Acker らはこの考えはギャップジャンクションを形成する MDCK とギャップジャンクションをもたない V-79W の細胞単層における氷の成長を比較した実験結果を説明できると主張した。彼らはぎっしり詰まった細胞単層における氷の形成と成長がギャップジャンクションの有無で有意な違いがあることを見出したのである。

一定の条件下でギャップジャンクションが細胞間にあることが細胞間の氷がより成長しやすくなるという彼らの観察は、少なくとも hESC は徐冷後の回復が良くないことの部分的な説明にはなるであろう。細胞塊の断片中に発生するランダムな氷の核形成、およびギャップジャンクションを介した氷の増殖、あるいは細胞間での氷の成長に引き続く周辺領域における表面触媒作用、による細胞間の氷の増殖が hESC の断片損傷を引き起こし細胞断片の破壊につながる。そしてそれが溶解後の細胞増殖、分化そしてアポトーシスに影響を及ぼすのである。

Ji らは接着したままの hESC コロニーや可溶化した基底膜基質に覆われたコロニーそのものを徐冷プロトコールに適用することにより生存率が上昇することを示した。凍結保存する 1-2 日前から細胞にトレハロースを添加することで生存率はさらに上昇する。最近になって、Heng らは原型を保った接着 hESC コロニーの生存率の低下は Ji らの結論によって推

論されるような壊死によるものよりも、亜致死となる冷凍損傷に起因するアポトーシスによるものと仮定している。彼らは大多数の hESC は哺乳類細胞のアポトーシス重要因子である caspase-3 が細胞を溶解後に 90 分間、37 度で維持していると発現することを報告した。細胞死の割合は細胞を 4 度で保存することによって可逆的に遅くなるのが彼らの仮定を支持している。

多くの最近の研究は細胞を撒く (seeding) 際の方法によって生存レベルが上昇することを示唆している。Ware らは溶解後の hESC の生存における seeding の効果について調べた。生存率は冷凍保存前の対照と比べたコロニー数と大きさの組み合わせにより計算された。細胞断片は 10% DMSO 存在下、冷却速度 0.3-3 度/分で凍結された。高い生存率 (~80%) は細胞を seeding したときにのみ 1.8 度/分より低い冷却速度で得られた。生存率に対する Seeding の温度影響はよく調べられてはいない。Yang らは seeding を -10 度、そして冷却速度を 0.5 度/分で行った最近の一連の研究において同じような結果を報告した。このような状態での生存率の上昇は細胞塊の中の氷の成長が低下することを反映している。なぜなら氷は周りの細胞外培地に囲まれながら核化する傾向があるからである。

ガラス化法による細胞凍結

このような最近の研究にもかかわらず、またガラス化法に伴う現実的な難しさにもかかわらず細胞株を樹立している多くのグループはガラス化法を採用してきた。ガラス化法は氷の形成や結晶化を介さないで凝固化する方法である。粘性が高いと氷の成長と核化を抑えることができるので、この溶液が十分に濃縮されていること、そしてサンプルが十分に早く冷却される系があって初めてガラス化法が達成される。冷却が進むにつれて事実上全ての分子の動きが止まるまで粘性が高くなり溶液はガラス化する。この状態においてこの系は固形化しているが分子構造的には液体のままである。

ガラス化法は冷却速度がどうであろうと氷の形成を避けるために十分なレベルにまで溶液の濃度を上げること、または氷の核化を防ぐために十分に早い冷却速度をとることにより達成される。しかし温めた時に氷の結晶化や不透明化といった准安定化状態を生み出してしまふ。これが細胞障害にとっての深刻なリスクを負わせることになるもののガラス化法は卵子や胚を含む様々な組織や細胞にうまく適用されている。

3 グループによる比較実験によりガラス化法が優れた hESC の凍結保存法として採用されている。2 つのグループは未分化コロニーの回復はガラス化法において 75% を超えていたが徐冷法によっては 5% しかなかったと報告した。これらの研究で報告されたガラス化のプロトコールはもともと牛の卵子や胚のために開発され Reubinoff らが hESC に適用するために修正した方法を基礎としていて非常に似ている。

そしてこの方法は ESI International によって制作された hESC 培養のマニュアルに載っていて、彼らのウェブサイトからも得ることができる (www.escellinternational.com)。また

若干の修正を加えた詳細な記述も他所を得ることができる。基本的に、このプロトコールは hESC コロニーの断片を DMSO と EG が共通の構成物として含まれている濃度の違う 2 つの CPA ガラス化溶液に薄いほうから濃いほうへ段階的に浸すようにしている。スクロース濃度の違い、血清の有無そして使用される緩衝液といったように媒体溶液の組成はまちまちである。コロニー断片は 2 つのガラス化溶液に連続的に浸されていく。ガラス化液につける時間は 37 度でそれぞれ 60,25 分と短い。どの程度、細胞やコロニー断片中に CPA が浸透しているのか、そしてこれらの構成物の hESC に対する本質的な毒性を決定するような研究は今のところなされていない。ただし、ESC と EC 細胞において DMSO は分化を引き起こすことは知られている。

これらの溶液を用いてガラス化を行うために急速冷凍が必要とされるが、OPS(open pulled straw)を用いた液体窒素への直接投入によってなされる。これは Vajta らによって牛の胎児に用いるために開発された方法で~20ul の量を毛細管現象によって取り込めるように精細な管を使用する。もし液体窒素中に直接浸すと、冷却速度は 20,000 度/分に達すると報告されている。管は通常、失透を避けるために液体窒素下で液相窒素貯蔵庫に移される。

溶解中での氷の結晶化を避けるために、スクロースが入った暖かい培養培地に管の先を直接つけることによってできるだけ早く暖められる。一度コロニー断片が溶解されると、その培地中に吐き出され、スクロースの濃度を落とした浸透液からなる CPA 洗浄液に段階的に浸されていく。これに代わる方法として CPA 液に段階的に浸すことなく直接増殖溶液に入れても顕著に有害な影響がないことが分かっている。

未分化コロニーを形成する細胞塊断片を比較的高い回復率を保つようなガラス化法は技術的に難しいがやりがいのある仕事である。融解後のコロニー断片の生存率と成長コロニーの分化の点において、実際の事例では文献で報告されているものよりも実質的に低い値しか示さないといった報告もある。Reubinoff らによる元の報告でも 30%以下の未分化コロニーしか報告されていない。またこの方法には微生物学的及び運搬上の問題もある。

Richards は未滅菌液体窒素から内容物の滅菌状態を守る大きなサイズの滅菌密封管を使用した。そして hESC のコロニー断片は OPS 法で用いられたのと同じ量のサンプルを使ってうまくガラス化することを示した。近年になって、straw in straw 法を使ってマウス胚がうまくガラス化されることも報告された。2 重封入と同じこの方法はヒト胚や hESC には用いられていない。物流的に、実験室の設備外で現行の方法を実行するのは難しい。また上記のような改良によっても大量の hESC に対してこの方法を適用するのは難しい。典型的にはそれぞれの管には 8-12 このコロニーを含ませることができる。そしてそれらがガラス化溶液を通して管の中に埋め込まれ液体窒素の中に投入されながらストックが調整されるのである。この手順は非常に労働集約的で施行者依存的である。またガラス化溶液につけていく時間が非常に短いので作業による差を排除するのが難しい。それと同時に管を使うということは UKSCB が準備している貯蔵サイズには適しているが自動化は技術的に困難である

貯蔵と移送

hESC の凍結保存バンクは何年にもわたって維持されなければいけないし、ガラス転移する温度以下で長い間保存する必要がある。これは特に失透と氷結晶の成長の効果による損傷を防ぐために必要なガラス化処理したものについて大切なことである。配偶子、胚それに今ではそれに加えて hESC は窒素液相にサンプルを保存することで効果が出てくるのである。自己骨髄投与者における B 型肝炎の発生原因が液化窒素貯蔵冷凍庫からの汚染であることが分かっているので液相への貯蔵には問題がある。これに関して英国厚生省の諮問団からの勧告がある。彼らは医療用途の細胞貯蔵は液体窒素の液相そのものよりも気相（もっと正確にはガス）において保存されるのが“より安全”という勧告を導き出した。これは血液幹細胞にのみに対する勧告であるがその他の細胞や組織にも適用されていて、気相貯蔵は精子や胚においても推奨されている。

気相保存は一般的な徐冷法で凍結保存されたほとんどのものに実質的な問題はない。しかし液体窒素気相容器に存在する気相温度勾配はガラス化物質の貯蔵を損害させる恐れがあるため、それが液体窒素の液相にガラス化サンプルを貯蔵し続ける原因となっている。アルミニウム棚を用いた設備など熱的な処置ができる材質や液体窒素貯蔵容器内に熱分路を作ることにより、少なくとも-160 度という温度が容易に得られるように容器内の温度勾配を劇的に抑えることができることが示された。この液体窒素ジャケット分画を装備したいわゆる“定温”及び“乾燥”容器といわれる装置の導入は気相貯蔵を簡単にした。そして英国幹細胞バンクを含む多くの細胞組織バンクは保管されているサンプル間の汚染の危険性を減少させるために気相容器への移行を行った。

ガラス化法を適用する際の特に不便な点は、ガラス化したサンプルをガラス化温度以下の温度で移送する必要があることである。これによりガラス化した hESC を固形 CO₂（ドライアイス）で移送することは不可能で、乾燥した状態で-196 度の温度を維持できるような値の張る荷送業者に頼む必要がある。

凍結保存法改良の必要性

現在 hESC に適応させたガラス化法は普通満足の得られるレベルの回復を示すが運送状の重要な問題もある。そして管の利用は細胞貯蔵を小さいスケールに制限する。適当な量にスケールアップすることでさえ異なった解決法を要求する。Heng らはこのことに関して一つの解決法を提示した。接着コロニーのための新しいデザインのプレートである。しかしながらその方法は凍結保存バイアルや袋でさえも現在直接液体窒素に浸透させるのに使っているものよりさらに低い冷凍速度でガラス化可能な溶液を必要とする。これに対する戦略や不透化防止についての議論は他に譲りたい。ちなみにその戦略の一つは高い濃度で浸

透化した CPA を細胞毒性を減少させるポリマーによって置き換えることである。これは胚にうまく適用できているが CPA の hESC における毒性について述べた仕事は今のところない。

徐冷法では移送問題は少ないが、多くの場合回復度合いが低いし融解過程を生き延びた細胞に有意な細胞分化の傾向が見受けられる。トレハロースといった糖類の添加とコラーゲンやラミニンといった細胞外基質タンパクの添加によりコロニー断片の回復率に若干の改善がみられたし融解後の細胞分化の度合いも減少した。しかし細胞凍結の過程に影響を与える低温生物学的な多様性研究を方法論的なやり方に適用するような研究はない。

そのような方法論的なものの 1 つは血小板と血液幹細胞にうまく使われている。この方法では凍結保存のプロトコルを最適化するため最初に浸透性ストレスの影響を CPA の毒性と区分した。そして CPA の毒性の効果が調べられる前に水と CPA に対する膜透過性のデータをもとにして“安全な”添加溶出プロトコルを示した。最後に安全な添加/溶出プロトコルにおける冷却と加温毒性の影響が調べられ、最適化されたプロトコルが作製された。このような方法は徐冷法による凍結保存だけでなく、ガラス化法にも適用できる。なぜならこの手順の最初の段階においてガラス化溶液の組成物の多くが使用されているからである。

凍結保存後の細胞の生存率査定法がどんな研究にも必要とされている。これは膜統合性試験、代謝検定、細胞や組織の機能を追行する能力の測定やそれらの組み合わせからなる。たとえば臍帯血幹細胞の研究では CD34 陽性細胞の膜統合性試験とコロニー形成試験が細胞凍結の査定法として用いられている。

現在 hESC は単一細胞というよりも大きさの定まっていない細胞塊として凍結保存される。これは特に凍結前のコントロールと比べてながら標準化の査定をする際、溶解後の生存率をトリパンブルーや 7AAD といった定量化法を適用するため単一になった細胞を使用する際、その検定を困難にする。一度溶解されると、適当な条件下で細胞塊は分化する能力を維持するとともに、多能性のある未分化幹細胞として分裂前には培養器に付着していなければならない。MTT や Alamer Blue といった代謝試験は ESC の増殖に必要な繊維芽支持細胞層が存在するという点と培養培地以外の溶液に例え短い時間でもさらすとコロニーの自律的な分化を引き起こすという点から困難である。

凍結保存後いくつかの断片は部分的にも完全にも分解してしまう。その他の断片は付着した後、部分的に分化してしまう。一方、多くの断片は付着せずに浮遊し続けるが、膜統合性試験で生存していると評価される。分化せずに付着するようなコロニーでさえ細胞分裂がほとんど起こらなく、コロニー断片のサイズが大きくなる期間を往々にして経験する。この期間は通常の細胞培養実験に必要な期間を超える数週間以上に渡って続くため細胞のダブリングタイムを計算するのが事実上不可能である。

機能的な定義として OCT4 といった多能性マーカーを使うのにも問題がある。この転写因子の細胞凍結における効果についての最近の研究によると徐冷中に多能性がなくなること

を示唆している。しかしこの研究では細胞溶出物を検出に用いる PCR 法を使っていたので、彼らの観察が事実なのかそれとも一時的な遺伝子発現の減少を見たに過ぎないのかは分からない。

結論

hESC を使った細胞療法や組織工学の目的を達するには多くの技術的、微生物学的そして規制の問題を解決していく必要がある。規制当局は倫理的な出所の幹細胞株だけを要求するだけでなく、提供者の選別やスクリーニングのプロトコールについても妥当性を求めてきている。幹細胞バンクだけでなく細胞株樹立の設備も厳しい規制指針を順守する必要がある。細胞株は微生物学的に安全なレベルでなければならないし、他の細胞や組織移植と同等の品質管理を要求している。培養過程中に使用する動物由来組成物や異種の支持細胞の存在はこれを除去しなければならない。そして細胞増殖と分化法は医療目的のため大量の細胞の生産を促している。このような背景を鑑みると、凍結保存の問題は小さくはないし、細胞凍結法開発の将来的な方向は hESC のスケールアップと増殖方法の開発に依存している。しかしながら英国幹細胞バンク及び細胞療法や細胞工学産物の生産に必要なさらに大きな貯蔵庫に備蓄された原種の保存には、凍結保存の多様性の影響についての信頼のける理解が必要とされるであろう。なぜならもし最適化された細胞凍結のプロトコールがこの重要な資源のために確立されれば、そのプロトコールは hESC 株に適用されるからである。

謝辞

この総説を準備するのに手助けをしてくれた UKSB のスタッフ特に Lesley Young, Lyn He に感謝します。

参考文献

- 1 Evans MJ, Kaufman M: Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–156.
- 2 Bongso A, Fong C-Y, Ng SC, Ratnam S: Isolation and culture of inner mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 1994;9:2110–2117.
- 3 Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergeil JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–1147.
- 4 Reubinoff BE, Pera MF, Fong C-Y, Trounson A, Bongso A: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* 2000;18:399–404.
- 5 Thompson H: Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery. *Trends Biotechnol* DOI:10.1016/tibtech.2007.03.003.
- 6 Lerou PH, Daley GQ: Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 2005;19:321–331.
- 7 Cohen S, Leshanski L, Itskovitz-Eldor J: Tissue engineering using human embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 2006;420:303–315.
- 8 Strulovici Y, Leopold PL, O'Connor TP, Pergolizzi RG, Crystal RG: Human embryonic stem cells and gene therapy. *Mol Therapy* DOI:10.1038/mt.sj.6300125.
- 9 Zhang S-C, Li X-J, Johnson MA, Pankratz MT: Human embryonic stem cells for brain repair. *Phil Trans R Soc B* DOI:10.1098/rstb.2006.2014.
- 10 Fukuda H, Takahashi J: Embryonic stem cells as a cell source for treating Parkinson's disease. *Exp Opin Biol Ther* 2005;5:1273–1280.
- 11 Heit JJ, Kim SK: Embryonic stem cells and islet replacement in diabetes mellitus. *Ped Diabetes* 2004;5:5–15.
- 12 Caspi O, Gepstein L: Regenerating the heart using human embryonic stem cells – from cell to bedside. *IMAJ* 2006;8:208–214.
- 13 Bhatia M: Hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Annals N Y Acad Sci* DOI: 10.1196/-annals.1392.007.
- 14 Smith AG: Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:435–462.
- 15 Henderson JK, Draper JS, Baille HS, Fishel S, Thompson JA, Moore H, Andrews PW: Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20:329–337.
- 16 Hoffman LM, Carpenter MK: Characterisation and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol* 2005;23:699–708.

- 17 Cowan CC, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA: Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004;350:1353–1356.
- The Banking and Cryopreservation of Human Transfus Med Hemother 2007;34:293–304 Embryonic Stem Cells 303
- 18 Pickering SJ, Braude PR, Patel M, Burns CJ, Trussler J, Bolton V, Minger S: Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. *Reprod Biomed Online* 2003;7:353–364.
- 19 Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharensko V, Verlinsky Y: Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004;9:623–629.
- 20 Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M: Derivation of human embryonic stem cell lines from developing and arrested embryos. *Stem Cells* 2006;24:2669–2676.
- 21 Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R: Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006;444:481–485.
- 22 Bongso A, Tan S: Human blastocyst culture and derivation of embryonic stem cell lines. *Stem Cell Rev* 2005;1:87–98.
- 23 Healy L, Hunt C, Young L, Stacey G: The UK Stem Cell Bank: its role as a public research resource centre providing access to well-characterised seed stocks of human stem cell lines. *Adv Drug Del Rev* 2007;57:1981–1988.
- 24 House of Lords Stem Cell Research Select Committee: Stem cell research – report. 2002. www.parliament.the-stationery-office.co.uk/pa/ld200102/ldselect/ldstem/83/8301.htm.
- 25 Medical Research Council: Code of practice for the use of human stem cell lines. 2006. www.mrc.ac.uk/Utilities/Documentrecord/index.htm?d=MRC003132.
- 26 Medicines and Healthcare Regulatory Agency (MHRA): Rules and Guidance for Pharmaceutical Manufacturers and Distributors 2007. London, Pharmaceutical Press, 2007.
- 27 EU Directive 2004/23/EC: On setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2004/l_102/l_10220040407_en00480058.pdf.
- 28 EU Directive 2006/17/EC: Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement, and testing of human tissues and cells. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_038/l_03820060209en00400052.pdf.

- 29 EU Directive 2006/86/EC: Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_294/l_29420061025en00320050.pdf.
- 30 Guhr A, Kurtz A, Freidgen K, Loser P: Current state of human embryonic stem cell research: an overview of cell lines and their use in experimental work. *Stem Cells* 2006;24:2187–2191.
- 31 The Steering Committee for The International Stem Cell Initiative: The International Stem Cell Initiative: towards benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nature Biotech* 2005;23:795–797.
- 32 Taylor CT, Bolton EM, Pocock S, Sharples LD, Pedersen RA, Bradley A: Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 2005;366:2019–2025.
- 33 Stojkovic M, Lako M, Strachen T, Murdoch A: Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* 2005;128:259–267.
- 34 Drexler HG, Uphoff CC: Mycoplasma contamination of cell cultures. Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002;39:75–90.
- 35 MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufman M, Milch H, Drexler HG: Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 1999;83:555–563.
- 36 Stacey G: Fundamental issues for cell-line banks in biotechnology and regulatory affairs: in Fuller BJ, Lane N, Benson EE (eds): *Life in the Frozen State*. London, CRC Press, 2004, pp 437–452.
- 37 Sandra C, Balls M, Bowe G, Davies J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W, Patlewicz G: Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim* 2005;33:261–287.
- 38 Lee JB, Song JM, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kang SM, Kwon JN, Kim MK, Roh SI, Yoon HS: Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction* 2004;128:727–735.
- 39 Pera MF, Laslett A, Hawes SM, Tellis I, Koh K, Nguyen L: Isolation and characterisation of human ES cells: in Notarianni E, Evans MJ (eds): *Embryonic Stem Cells. A Practical Approach*, Oxford, Oxford University Press, 2006, pp 238–259.
- 40 Amit M, Itskovitz-Elder J: Feeder-free culture of human embryonic stem

cells. *Methods Enzymol* 2006;420:37–49.

41 Pittenger MF, Mbalaviele G, Black M, Mosca JD and Marshak DR: Mesenchymal stem cells; in Koeller MR, Palsson BO, Masters JRW (eds): *Human Cell Culture. Vol V. Primary Mesenchymal Cells*. London, Kluwer, 2001, pp 189–207.

42 Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE: Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005;23:220–229.

43 Brook FA: Procedures for deriving ES cell lines from the mouse; in Notarianni E, Evans MJ (eds): *Embryonic Stem Cells. A Practical Approach*. Oxford, Oxford University Press, 2006, pp 7–40.

44 Suemori H, Sasai Y, Umenda K, Nakatsuji N: ES cell lines from the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*); in Notarianni E, Evans MJ (ed): *Embryonic Stem Cells. A Practical Approach*. Oxford, Oxford University Press, 2006, pp 294–319.

45 Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000;227:271–278.

46 Udy GB, Evans MJ: Microplate DNA preparation, PCR screening and cell freezing for gene targeting in embryonic stem cells. *Biotechniques* 1994;17:887–894.

47 Robertson EJ: Embryo derived cell lines, in Robertson EJ (ed): *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. Oxford, IRL Press, 1987, pp 71–112.

48 Ure JM, Fiering S, Smith AG: A rapid and efficient method for freezing and recovering clones of embryonic stem cells. *Trends Genet* 1992;8:6.

49 Heng BC, Kuleshova LL, Basted SM, Liu H, Cao T: The cryopreservation of human embryonic stem cells. *Biotechnol Appl Biochem* 2005;41:97–104.

50 Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO: Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human Reprod* 2001;16:2187–2194.

51 Zhou CQ, Mai QY, Li T, Zhaung GJ: Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1050–1055.

52 Ha YS, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SY, Kim AH, Moon SY: Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Human Reprod* 2005;20:1779–1785.

53 Richards M, Fong CY, Tan S, Chan WK, Bongso A: An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22:779–789.

- 54 Simon AM, Goodenough DA: Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 1998;8:477–483.
- 55 De Maio A, Vega VL, Contreras JE: Gap junctions, homeostasis and injury. *J Cell Physiol* 2002;191:269–282.
- 56 Sathananthan H, Pera M, Trounson A: The fine structure of human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2002;4:56–61.
- 57 Wong, RCB, Pebay A, Nguyen LTV, Koh KLL, Pera MF: Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22:883–889.
- 58 Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M, Oyamada M: Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells *in vitro*. *Exp Cell Res* 1996;229:318–326.
- 59 Baharvand H, Matthaei KI: The ultrastructure of mouse embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2003;7:330–335.
- 60 Acker JP, Larese A, Yang H, Petrenko A, McGann LE: Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology* 1999;38:363–371.
- 61 Berger WK, Uhrik B: Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to-cell propagation of intracellular ice in chains from salivary glands. *Experientia* 1996;15:843–850.
- 62 Acker JP, Elliot JAW, McGann LE: Intracellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores. *Biophys J* 2001;81:1389–1397.
- 63 Irimia D, Karlsson JO: Kinetics and mechanisms of intracellular ice propagation in a micropatterned tissue construct. *Biophysics J* 2002;82:1858–1868.
- 64 Toner M, Cravalho EG, Karel M: Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *J Appl Phys* 1990;67:1582–1593.
- 65 Acker JP, McGann LE: The role of cell-cell contact on intracellular ice formation. *Cryo Lett* 1998;19:367–374.
- 66 Ji L, de Pablo J, Palacek SP: Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng* 2004;88:299–312.
- 67 Heng BC, Ye CP, Lui H, Toh WS, Rufaihah AJ, Bay BH, Ge Z, Ouyang HW, Lee EH, Cao T: Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *J Biomed Sci* 2006;13:433–435.
- 68 Heng BC, Ye CP, Lui H, Toh WS, Rufaihah AJ, Cao T: Kinetics of cell death of frozen-thawed human embryonic stem cell colonies is reversibly slowed down by exposure to low temperatures. *Zygote* 2006;14:341–348.
- 69 Ware CB, Nelson AM, Blau CA: Controlled-rate freezing of human ES cells.

- Biotechniques 2005;38:879–883.304 Transfus Med Hemother 2007;34:293–304 Hunt
- 70 Yang PF, Hua TC, Wu J, Chang ZH, Tsung HC, Cao YL: Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling. *CryoLett* 2006;27:361–368.
- 71 Pegg DE, Diaper MP: Freezing versus vitrification: basic principles; in Smit Sibinga CT, Das PC, Meryman HT (eds): *Cryopreservation and Low Temperature Biology in Blood Transfusion*. Vol 24. Dordrecht, Kluwer, 1990, pp 55–69.
- 72 Taylor MJ, Song YC, Brockbank KGM: Vitrification in tissue preservation: new developments; in Fuller BJ, Lane N, Benson EE (eds): *Life in the Frozen State*. London, CRC Press, 2004, pp 603–641.
- 73 Vajta G, Nagy ZP: Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification: *Reprod Biomed Online* 2006;12:779–796.
- 74 Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callensen H: Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Rep Dev* 1999;51:53–58.
- 75 Hunt CJ, Timmons PM: Cryopreservation of human embryonic stem cell lines; in Day JG, Stacey G (eds): *Cryopreservation and Freeze Drying Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. Vol 368. Totowa, Humana Press, 2007, pp 261–270.
- 76 Adler S, Pellizzer C, Paparella M, Hartung T, Bremer S: The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicol In Vitro* 2006;20:265–271.
- 77 Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callensen H: Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo Lett* 1997;18:191–195.
- 78 Steyaert SR, Leroux-Rouls GG, Dhont M: Infections in IVF: review and guidelines. *Human Reprod Update* 2000;6:432–441.79 Tomlinson M, Sakkas D: Is a review of standard procedures for cryopreservation needed? Safe and effective cryopreservation – should sperm banks and fertility centres move toward storage in nitrogen vapour? *Human Reprod* 2000;15:2460–2463.
- 80 Hawkins AE, Zuckerman MA, Briggs M, Gilson RJ, Goldstone AH, Brink NS, Tedder RS: Hepatitis B transmission nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Methods* 1996;60:81–88.
- 81 Mazzilli F, Delfino M, Imbrogno N, Elia J, Dondero F: Survival of micro-organisms in cryostorage of human sperm. *Cell Tissue Banking* 2006;7:75–79.
- 82 Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fieldin A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG, Lynch DC, Hepenstall J, Brink NS: Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995;346:137–140.
- 83 NHS Executive: *Guidance Notes on the Processing, Storage, and Issue of Bone*

Marrow and BloodStem Cells. London, Department of Health, 1997.

84 Rowley SD, Byrne DV: Low-temperature storage of bone marrow in nitrogen vapour-phase refrigerators: decreased temperature gradients with an aluminium racking system. *Transfusion* 1992;32:750–754.

85 Hunt CJ, Pegg DE: Improved temperature stability in gas phase nitrogen refrigerators: the use of a copper heat shunt. *Cryobiology* 1996;33:544–551.

86 Heng BC, Bested SM, Chan SW, Cao T: A proposed design for the cryopreservation of intact and adherent human embryonic stem cell colonies. *In Vitro Cell Biol Dev – Animal* 2005;41:77–79.

87 Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO: Studies on replacing most of the cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 2001;43:21–31.

88 Wu CF, Tsung HC, Zhang WJ, Lu JH, Tang ZY, Kuang YP, Jin W, Cui L, Liu W, Cao YL: Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose. *Reprod BioMed Online* 2005;11:733–739.

89 Kim SJ, Park JH, Lee JE, Kim JM, Lee JB, Moon SY, Roh SI, Kim CG, Yoon HS: Effects of type IV collagen and laminin on the cryopreservation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22:950–961.

90 Armitage WJ: Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiology* 1986;23:116–125.

91 Hunt CJ, Pegg DE, Armitage SE: Optimising cryopreservation protocols for haematopoietic cells: a methodological approach for umbilical cord blood. *Cryo Lett* 2006;27:73–85.

92 Wood EJ, Liu J, Derrow CW, Smith FO, Williams DA, Critser JK: Osmometric and permeability characteristics of human placental/umbilical cord blood CD34+ cells and their application to cryopreservation. *J Haematother Stem Cell Res* 2000;9:161–173.

93 Pegg DE: The development of cryopreservation methods for cord blood stem cells. *Br Blood Trans Soc Newslett* 1996;44.

94 Pegg DE: Viability assays for preserved cells tissues and organs. *Cryobiology* 1989;26:212–231.

95 Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE: Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34+ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on the recovery after freezing and thawing. *Cryobiology* 2003;46:76–87.

96 Katkov II, Kim MS, Bajpai R, Altman YS, Mercola M, Loring JF, Terskikh AV, Snyder EY, Levine F: Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* 2006;53:194–205.