

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360083

研究課題名(和文)凍結手術と凍結保存への適用を目指した成熟神経細胞の凍結に関わる基礎的特性

研究課題名(英文)Fundamental Characteristics of Freezing of Mature Nerve Cells Related to Cryosurgery and Cryopreservation

研究代表者

石黒 博 (ISHIGURO, HIROSHI)

九州工業大学・生命体工学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30176177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：凍結手術と凍結保存への適用を目指し、特徴的な形態を有する神経突起を有する成熟神経細胞に対して、凍結・融解過程のミクロ挙動、凍結・融解後の細胞の形態変化と生存性を調べた。特に、凍結・融解後に、神経突起の数珠状化と短小化が起こることを見出し、凍結条件に対するその特性を明らかにした。さらに、凍結保護物質の添加により、当該形態変化が大幅に低減すると共に、生存性が大幅に向上することを定量的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Understanding of freezing characteristics of mature nerve cells is important from the viewpoint of application: cryosurgery and cryopreservation, but also fundamentally because of the unique morphology of the nerve cells with neurites. Microscopic behaviors of freezing and thawing of the mature nerve cells were investigated. Beading and shortening of neurites after freezing and thawing were found and such morphological changes were quantified under various freezing conditions. Next, the effect of a common cryoprotectant, 10v/v% dimethyl sulfoxide (DMSO), on the freezing and thawing behaviors of the cells was investigated. The results show that DMSO largely reduced such morphological change of neurites and largely improved the post-thaw cell viability.

研究分野：工学 機械工学 熱工学

キーワード：熱工学 生体熱工学 凍結手術 凍結保存 成熟神経細胞 凍結融解挙動 生存性 形態変化

## 1. 研究開始当初の背景

生体の凍結は、凍結手術と凍結保存に応用されるが、技術としての応用範囲や適用条件の拡大、高精度化と信頼性向上のためには、生体熱工学からの寄与が必要である。神経ネットワークの構成要素であり、神経突起という特徴的な構造をもつ成熟神経細胞の凍結の研究は、(1)凍結手術の合併症、(2)神経系の基礎研究、および、創薬分野での薬物の効能や毒物の影響を調べるための薬・毒物スクリーニング用の細胞供給を目的とした凍結保存の応用上の点から重要で、早期遂行が期待される研究課題である。さらに、(3)成熟神経細胞は神経突起を有し、特徴的な形態の細胞という基礎的観点からも興味深い。本研究課題では、実践的にも学術的にも重要な成熟神経細胞の凍結・融解挙動や凍結・融解後の生存性に関する基礎的特性を明らかにする。なお、当該研究は、今後、神経ネットワークの凍結、神経組織・脳組織の凍結保存などの研究へと繋がる潜在性を有する。

## 2. 研究の目的

成熟神経細胞のモデル細胞である神経突起を有する分化型 PC12 細胞 (附着状態) に対して、生理食塩水中で、凍結・融解挙動を調べると共に、凍結・融解後の細胞の形態変化と生存性を明らかにする。また、当該形態変化の形成メカニズムの観点から、電解質の高張水溶液に対する細胞の形態応答を調べる。さらに、凍結・融解特性に対する凍結保護物質 (ジメチルスルホキシド (DMSO)) の効果を詳細に解明する。

具体的には、

(1)成熟神経様細胞である分化型 PC12 細胞の作製方法を確立するために、培地中の血清濃度に対する未分化型 PC12 細胞の増殖・分化特性を実験的に解明する。次いで、この特性に対して、反応速度論的モデル化を展開し、数学的記述を行うと共に、各変化過程の反応速度定数を実験結果に基づいた逆問題解析により算出する。

(2) (1)で準備した分化型 PC12 細胞の生理食塩水中での凍結・融解の微視的挙動 (凍結様式、氷結晶と細胞の形態、両者の相互作用)、および、凍結・融解後の形態変化 (神経突起、細胞骨格) と生存性を、冷却条件に対して定量的に解明する。

(3) (2)で見出された凍結・融解後の神経突起の特徴的な形態変化 (数珠状化、短小化) の形成メカニズムについてのより良い理解のために、凍結・融解過程にける要因の一つである浸透圧ストレスに注目し、高張 NaCl 水溶液による浸透圧ストレスに対する分化型 PC12 細胞の応答 (細胞の形態の時系列変化や細胞骨格の変化) を調べると共に、凍結の場合との比較・検討を行う。

(4)分化型 PC12 細胞の凍結保存を念頭において、汎用的な凍結保護物質である DMSO を添加した生理食塩水中で、凍結・融解挙動を観

察し、凍結・融解後の細胞の形態変化と生存性を定量的に調べると共に、(2)の結果との比較により、凍結保護物質添加の効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)実験材料

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞株を用いた。PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF) の作用により神経突起を伸展させ、交感神経細胞様に分化する。継代培養過程で必要に応じて分化誘導し、実験試料とした。

### (2)実験装置と方法

#### ①未分化細胞の増殖と分化

未分化型 PC12 細胞の継代培養においては、5v/v%牛胎児血清 (FBS) と 5v/v%馬血清 (HS) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を培地とし、ディッシュ (60mm) 上にて、37°C、10 v/v%CO<sub>2</sub> 環境下で培養し、6~8 日ごとに植え継いだ。分化に関しては、前述の培養過程で、0.05v/v%FBS、0.05v/v%HS、と 100ng/ml NGF を添加した DMEM を培地に替え、分化型 PC12 細胞の割合が全細胞数の約 80%を超えるものを試料とした。

#### ②生理食塩水中での分化型 PC12 の凍結・融解

チャンバースライド上の生理食塩水中の分化型 PC12 細胞を、方向性凝固ステージを用い、概ね冷却速度  $H=1\sim 100^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の範囲で凍結し、加温速度  $W=20\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で加温した。凍結・融解過程は、正立顕微鏡により観察された。凍結・融解後の細胞の生死判別は、PI を用いた細胞膜の色素排斥能評価により行われ、細胞骨格 (中間径フィラメントの主要タンパク質の Neurofilament L) の形態は、免疫細胞化学染色により行った。

#### ③高張 NaCl 水溶液による浸透圧ストレスに対する分化型 PC12 細胞の応答

チャンバースライド上の生理食塩水中の分化型 PC12 細胞に対して、細胞回りの NaCl 濃度の段階的変化による濃縮・希釈 (等張 0.15M→高張 2.0M→等張 0.15M) 過程において、細胞の形態変化を時系列で観察・記録し定量的に評価した。②の方法を用い、希釈後の細胞骨格の形態変化も調べた。

#### ④DMSO を添加した生理食塩水中での分化型 PC12 の凍結・融解

2 枚のカバースリップ間に設置したカバースリップ (コラーゲンコーティング) 上の分化型 PC12 細胞を、一様温度分布冷却・加温ステージ (リンカム社製) 上の 10v/v%DMSO を添加した生理食塩水中で、凍結・融解した。なお、細胞の凍結・融解挙動の観察、融解後の細胞の形態変化、生存率などの計測法などは、②の場合と同様である。

## 4. 研究成果

(1)未分化型 PC12 細胞の増殖・分化特性とその反応速度論的モデル

### ①未分化細胞の増殖・分化特性

未分化細胞の増殖・分化特性として、未分

化・分化型 PC12 細胞数の時系列変化に対する、NGF 添加の有無と血清濃度  $C$  の影響を定量的に明らかにした。本研究の範囲内では、NGF 無添加の場合、未分化細胞は、低血清濃度 ( $C \leq 0.5v/v\%$ ) では、上手く増殖せず生細胞数は減少したが、高血清濃度 ( $C \geq 2.0v/v\%$ ) では安定的に増殖し、濃度が高い方がより盛んに増殖した。NGF 添加 (100ng/ml) の場合、未分化細胞の安定な増殖と分化は、低血清濃度 ( $C \leq 0.02v/v\%$ ) では実現しなかったが、高血清濃度 ( $C \geq 0.1v/v\%$ ) では実現し、その定量的特性を明らかにした。

### ②増殖・分化の反応速度論的モデル化

①の実験結果の現象論的検討に基づいて、未分化細胞の増殖と分化における細胞数の時系列変化を反応速度論的に定式化し、数学的に記述するモデルを提案し (図 1)、基礎方程式とその解析解を求めた (表 1)。その解の中に含まれる、細胞の増殖と分化の速度定数であるモデル定数のパラメータスタディにより、モデル特性 (未分化細胞数、分化細胞数、全細胞数、分化率の時系列変化に対するモデルパラメータの影響) を詳細に解明した。

### ③増殖・分化の反応速度定数

本モデルを①の実験結果に対して適用し、細胞数の時系列変化の実験値とモデルによる計算値に基づいた逆問題解析からモデル定数を決定する (表 2) と共に、計算値が実験値の特性を良く模擬できることより、モデルの妥当性を示した。さらに、本モデルで定義・提案した細胞の増殖・分化の速度定数を細胞固有の特性値として見なし、本モデルを通して、細胞数の時系列変化とその血清濃度依存性などの細胞の増殖・分化特性を数学的に記述できることを示した。

### (2)生理食塩水中での分化型 PC12 の凍結・融解特性と生存性

#### ①凍結挙動

凍結様式は、定性的に冷却速度が低い場合には細胞外凍結であり、冷却速度の増加に対して、細胞内凍結の発生頻度が増加する。細胞外凍結では、温度低下に従って細胞外氷結晶が成長し、氷結晶間の未凍結水溶液の濃縮により細胞内外に浸透圧差が形成され、細胞体は明瞭に脱水・収縮・変形すると共に、神経突起でも脱水・収縮する。細胞内凍結は、細胞体で優先的に発生し細胞内を伝播し、冷却速度の増加に対して、神経突起の根元、さら

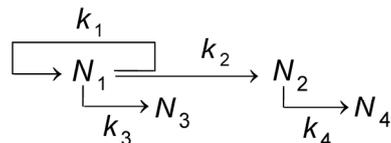


図 1 細胞の増殖・分化の数学モデルの反応形態  
 $N_1$ :未分化細胞の数,  $N_2$ :分化細胞の数,  $N_3$ :未分化死細胞の数,  $N_4$ :分化死細胞の数,  $k_1$ :未分化細胞の増殖の速度定数,  $k_2$ :未分化細胞の分化の速度定数,  $k_3$ :未分化細胞の死滅の速度定数,  $k_4$ :分化細胞の死滅の速度定数

表 1 細胞の増殖・分化の数学モデルの解析解  
 $\eta_1$ :未分化細胞の初期数に対する未分化細胞数割合,  
 $\eta_2$ :未分化細胞の初期数に対する分化細胞数割合

$k_i = \text{const.}$ ( $i=1, 2$ )	$\eta_1 = \exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\}$ (1)
	$\eta_2 = \frac{k_2}{k_1 - k_2} \cdot [\exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - 1]$ (2)
$k_3 = 0,$ $k_4 = 0$	$\eta_t \equiv \eta_1 + \eta_2$
	$= \frac{1}{k_1 - k_2} \cdot [k_1 \cdot \exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - k_2]$ (3)
	$\gamma \equiv \frac{\eta_2}{\eta_t} = \frac{k_2 \cdot [\exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - 1]}{k_1 \cdot \exp\{(k_1 - k_2) \cdot t\} - k_2}$ (4)

表 2 細胞の増殖・分化の速度定数

$C, v/v\%$	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0
$k_1, 1/\text{day}$	0.317	0.607	0.572	0.452	0.483
$k_2, 1/\text{day}$	0.387	0.493	0.317	0.156	0.211

には、根元から先端に向かう離れた位置まで氷結晶の形成が及ぶ (図 2 中、矢頭で示す)。

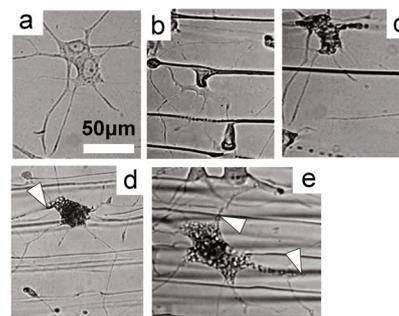


図 2 生理食塩水の場合の凍結挙動

a)未凍結状態, b) $H=5.4^\circ\text{C}/\text{min}$ , c) $H=33.6^\circ\text{C}/\text{min}$   
d) $H=68.4^\circ\text{C}/\text{min}$ , e) $H=92.3^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $H$ :冷却速度

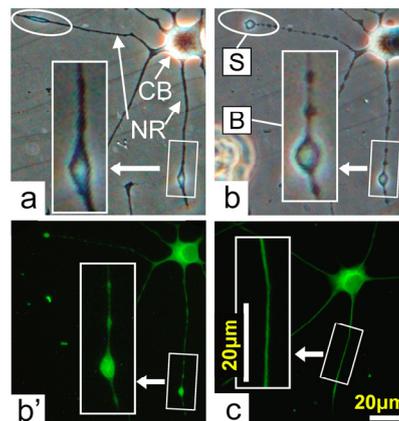


図 3 生理食塩水の場合の凍結・融解後の細胞と細胞骨格の形態変化

a)凍結前の細胞, b) a の凍結・融解後の形態変化, b') b の免疫化学染色, c)未凍結コントロール (免疫化学染色), (冷却速度  $H=5.0^\circ\text{C}/\text{min}$ , 最低到達温度  $T_L=-2.0^\circ\text{C}$ , 加温速度  $W \sim 30^\circ\text{C}/\text{min}$ ), CB:細胞体, NR:神経突起, B:数珠状化, S:短小化

## ②凍結・融解後の形態変化

凍結・融解後、神経突起における数珠状の膨らみの形成（数珠状化）や突起長さの短縮（短小化）、細胞体の輪郭の不明瞭化などの形態変化が生じる（図3）。神経突起の細胞骨格においても、中間径フィラメントの数珠状化や湾曲などの変形が生じた。以上の変化は、冷却速度にはあまり依存性せず、最低到達温度の低下に対して助長される傾向を示した。これは、本実験条件の最低到達温度が生存率の変化する比較的高い温度範囲にあり、凍結様式は主に細胞外凍結であるためである。

## ③生存率

凍結・融解後の細胞の生存率は、冷却速度にはあまり依存せず、最低到達温度の低下により単調に減少し、ほぼ $-11^{\circ}\text{C}$ で生存率が零となる（図4）。この特性は、②と同様、主に細胞外凍結に起因する。

(3)高張 NaCl 水溶液による浸透圧ストレスに対する分化型 PC12 細胞の形態的応答

チャンバースライド上の生理食塩水中の分化型 PC12 細胞に対して、 $0.1\sim 2.0\text{M}$  NaCl 水溶液を滴下・混合し、細胞回りの NaCl 濃度を段階的に変化させた。まず、生理食塩水の等張状態から、NaCl 濃度が約  $1.0\text{M}$  の高張

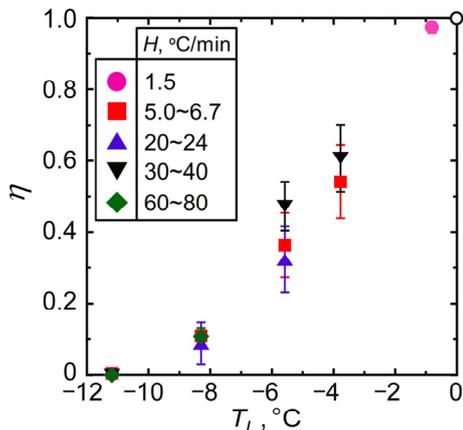


図4 生理食塩水の場合の凍結・融解後の細胞の生存率

$\eta$ :生存率,  $H$ :冷却速度,  $T_L$ :最低到達温度, 加温速度  $W\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$

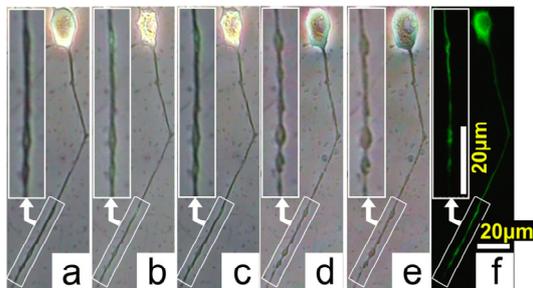


図5 高張 NaCl 水溶液に暴露した場合の細胞と細胞骨格の形態変化

a)等張状態の細胞, b) 高張( $1.0\text{M}$ )状態で約 4min 経過, c)高張後,希釈過程で約 1.5min 経過( $\sim 0.8\text{M}$ ), d)希釈過程で約 4min 経過( $\sim 0.2\text{M}$ ), e) 等張状態に戻った後,約 3min 経過, f) e の免疫細胞化学染色

状態に1ステップで変化させ、高張状態に約 10分 $\sim$ 13分程維持した後、3 $\sim$ 5ステップ（平均変化  $0.06$  or  $0.20\text{M}/\text{min}$  で、融解速度  $0.21$  or  $0.69^{\circ}\text{C}/\text{min}$  に相当）で等張状態へ戻した。等張から高張を経て等張へ戻る NaCl 濃度変化において、定性的に凍結・融解の場合と同様の形態変化（細胞の形態や細胞骨格の変化）が生じた（図5）。従って、浸透圧ストレスが凍結・融解後の細胞の形態変化に大きな影響を及ぼすと考えられる。

(4)分化型 PC12 細胞の凍結・融解特性と生存性に対する DMSO の効果

## ①凍結挙動

凍結様式は、DMSO の有無に依らず、冷却速度が低い場合には細胞外凍結であり、冷却速度の増加に従って、細胞内凍結が発生し易くなる傾向を示した。

## ②凍結・融解後の形態変化

凍結・融解後の神経突起の形態変化（数珠状化と短小化）は、生理食塩水中の場合と比べ大きく軽減した。神経突起の細胞骨格についても、中間径フィラメントの変化が、生理食塩水の場合と比べ大きく軽減した（図6）。

## ③生存率

凍結・融解後の細胞の生存率は、生理食塩水中の場合と比較して大幅に上昇し、冷却速

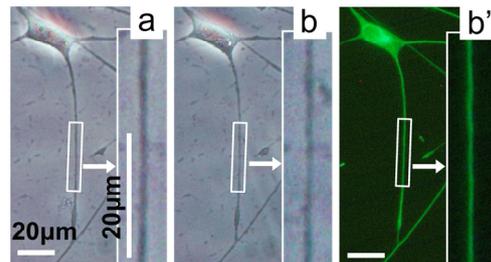


図6 DMSO を含む生理食塩水の場合の凍結・融解後の細胞と細胞骨格の形態変化

a)凍結前の細胞, b) a の凍結・融解後の形態変化, b') b の免疫化学染色, (冷却速度  $H=5.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 最低到達温度  $T_L=-37.1^{\circ}\text{C}$ , 加温速度  $W\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )

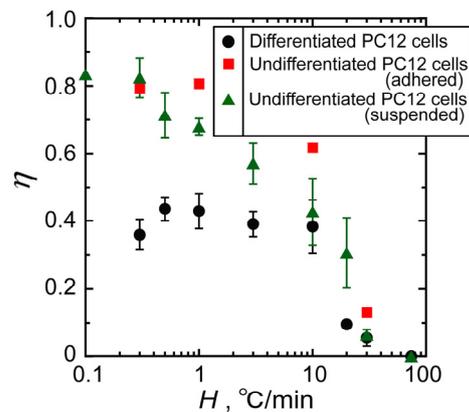


図7 DMSO を含む生理食塩水の場合の凍結・融解後の細胞の生存率

$\eta$ :生存率,  $H$ :冷却速度, 最低到達温度  $T_L=-80.0^{\circ}\text{C}$ , 加温速度  $W\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$

度に対して逆 U 字型の分布 (H~1°C/min で生存率~0.5) を示した (図 7). なお、分化型 PC12 細胞の生存率は、未分化型と比べ低く、PC12 細胞は分化により凍結耐性が低下するため、より高度の凍結保存技術が望まれる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① UEMURA, M. and ISHIGURO, H., Freezing Behavior of Adherent Neuron-like Cells and Morphological Change and Viability of Post-thaw Cells, *Cryobiology*, Vol. 70, No. 2, 122-135, 2015, 査読有

② 石黒 博, 野澤正和, Slow-freezing Injury による細胞死滅の数学的モデル化の提案 (最低到達温度に対する生存曲線の反応速度論的モデルの展開), *低温生物工学会誌*, 60 巻 1 号, 47-52, 2014, 査読有

③ 植村 真, 石黒 博, 基質に付着した分化型 PC12 細胞の凍結・融解特性と生存性, *日本機械学会論文集*, 79 巻 808 号 B 編, 2786-2797, 2013, 査読有

④ 石黒 博, 野澤正和, 細胞外凍結による細胞死滅の数学的モデル化と予測 (二因子仮説に基づく反応速度論的モデルの展開), *低温生物工学会誌*, 58 巻 2 号, 159-164, 2012, 査読有

⑤ 石黒 博, 植村 真, 未分化細胞の増殖を伴う分化の反応速度論的定式化による数学モデルの提案とその神経細胞への適用, *日本機械学会論文集*, 78 巻 790 号 B 編, 1279-1291, 2012, 査読有

⑥ UEMURA, M. and ISHIGURO, H., Proposal of Reaction Kinetic Model for Cell Differentiation with Cell Growth, *Proc. of 2012 Summer Bioengineering Conference*, 2012, ASME, CD-ROM, SBC2012-80152, 査読有

[学会発表] (計 19 件)

① 石黒 博, 他 3 名, 高温ストレスに曝された付着培養細胞の挙動と特徴的な形態変化 (デジタルホログラフィー顕微鏡による時系列計測), 第 52 回日本伝熱シンポジウム講演論文集, CD-ROM, F111, P2, 2015, 査読無 (2015.6.3, 福岡国際センタ, 福岡県・福岡市)

② 石黒 博, 他 3 名, 高温ストレスに曝された付着培養細胞の特徴的な形態変化の定量的特性 (デジタルホログラフィー顕微鏡による時系列計測), 第 52 回日本伝熱シンポジウム講演論文集, CD-ROM, F112, P2, 2015, 査読無 (2015.6.3, 福岡国際センタ, 福岡県・福岡市)

③ 石黒 博, Freezing Behavior and Mechanisms of Injury of Cells and Tissues (細胞・組織の凍結挙動と損傷の機序), 日本低温医学会認定第 5 回凍結手術認定医講習会 講師, 第 41 回日本低温医学会総会, 2014 (2014.11.13, 名古屋大学, 愛知県・名古屋市)

④ 植村 真, 石黒 博, 基質に付着した神経様細胞の凍結・融解後の形態変化と生存性に対する DMSO の効果, 第 59 回低温生物工学会セミナー及び年会講演要旨集, 14, 2014, 査読無 (2014.6.28, 九州大学, 福岡県・福岡市)

⑤ 植村 真, 石黒 博, 基質に付着した神経様細胞の凍結・融解後の形態変化と生存性に対する凍結保護物質の影響, 第 51 回日本伝熱シンポジウム講演論文集, CD-ROM, F132, P2, 2014, 査読無 (2014.5.21, アクトシティ浜松コンgresセンタ, 静岡県・浜松市)

⑥ 石黒 博, 野澤正和, Slow-freezing Injury による細胞死滅の反応速度論的モデルの展開 (最低到達温度に対する生存曲線のグリセロール濃度依存性), 第 51 回日本伝熱シンポジウム講演論文集, CD-ROM, F133, P2, 2014, 査読無 (2014.5.21, アクトシティ浜松コンgresセンタ, 静岡県・浜松市)

⑦ 石黒 博, 他 4 名, 培養細胞の移動・形態特性に対する高温ストレスの影響 (デジタルホログラフィー顕微鏡による時系列計測), 第 51 回日本伝熱シンポジウム講演論文集 CD-ROM, F134, P2, 2014, 査読無 (2014.5.21, アクトシティ浜松コンgresセンタ, 静岡県・浜松市)

⑧ 石黒 博, Freezing Behavior and Mechanisms of Injury of Cells and Tissues (細胞・組織の凍結挙動と損傷の機序), 日本低温医学会認定第 4 回凍結手術認定医講習会 講師, 第 40 回日本低温医学会総会, 2013 (2013.11.29, 今池ガスビル, 愛知県・名古屋市)

⑨ 石黒 博, 他 4 名, 高温ストレス下における細胞の時系列形態変化特性 (デジタルホログラフィー顕微鏡による実時間三次元的計測), 日本機械学会 2013 年度年次大会 DVD-ROM 論文集, No.13-1, J025035, P5, 2013, 査読無 (2013.9.9, 岡山大学, 岡山県・岡山市)

⑩ ISHIGURO, H., and NOZAWA, M., Proposal of Reaction Kinetic Model for Cell Death due to Extracellular Freezing based on Two-Factor Hypothesis, *Abstracts of 50th Annual Meeting of Society for Cryobiology*, 70, 2013, 査読有 (2013.7.30, ワシントン DC, 米国)

⑪ 石黒 博, 野澤正和, Slow-freezing Injury による細胞死滅の数学的モデル化の提案 (最低到達温度に対する生存曲線の反応速度論的モデルの展開), 第 58 回低温生物工学会セミナー及び年会講演要旨集, 57, 2013, 査読無 (2013.6.23, 関西大学, 大阪府・吹田市)

⑫ 石黒 博, 野澤正和, 最低到達温度に対する Slow-freezing Injury による細胞死滅の反応速度論的モデルの展開, 第 50 回日本伝熱シンポジウム講演論文集 Vol.2, 456-457, 2013, 査読無 (2013.5.30, 仙台トランスシティ, 宮城県・仙台市)

⑬ 石黒 博, 野澤正和, 細胞外凍結による細胞死滅の反応速度論的モデルの一般性 (冷却速度の無次元変数と相似変数の提示), 第 50 回日本伝熱シンポジウム講演論文集

Vol.2,454-455,2013, 査読無(2013.5.30, 仙台トランスシティ, 宮城県・仙台市)

⑭植村 真, 石黒 博, 分化型 PC12 細胞の凍結・融解後の形態変化と浸透圧ストレスの関連性, 第 50 回日本伝熱シンポジウム講演論文集 Vol.2,452-453,2013, 査読無(2013.5.30, 仙台トランスシティ, 宮城県・仙台市)

⑮石黒 博, Freezing Behavior and Mechanisms of Injury of Cells and Tissues (細胞・組織の凍結挙動と損傷の機序), 日本低温医学会認定第 3 回凍結手術認定医講習会 講師, 第 39 回日本低温医学会総会, 2012 (2012.11.22, イイノカンファレンスセンタ, 東京都・千代田区)

⑯植村 真, 石黒 博, 分化型 PC12 細胞の凍結・融解後の形態変化, 日本機械学会 2012 年度年次大会 DVD-ROM 論文集, No.12-1, J024042, P5, 2012, 査読無(2012.9.10, 金沢大学, 石川県・金沢市)

⑰石黒 博, 野澤正和, 二因子仮説に基づく細胞外凍結による細胞死滅の反応速度論的モデル化, 日本機械学会 2012 年度年次大会 DVD-ROM 論文集, No.12-1, 2012, J024041, P5 査読無(2012.9.10, 金沢大学, 石川県・金沢市)

⑱石黒 博, 野澤正和, 細胞外凍結による細胞死滅の数学的モデル化と予測(二因子仮説に基づく反応速度論的モデルの展開), 第 57 回低温生物工学会セミナー及び年会講演要旨集, 10, 2012, 査読無(2012.6.1, つくば国際会議場, 茨城県・つくば市)

⑲石黒 博, 野澤正和, 細胞外凍結による細胞の損傷・死滅の数学モデルの提案と生存曲線の予測(反応速度論的モデル化の展開) 第 49 回日本伝熱シンポジウム講演論文集 23-24, 2012, 査読無(2012.5.30, 富山国際会議場, 富山県・富山市)

[図書] (計 4 件)

①石黒 博, 冷凍空調便覧 新版・第 6 版 IV 巻 食品・生物編(分担)日本冷凍空調学会編(担当部分: 第 6 章「低温生物学総論」, 6・4 節「生物の凍結保存」, 6・4・2 項「組織・器官の凍結挙動」), 281-285, 2013, 査読有

②石黒 博, Freezing Behavior and Mechanisms of Injury of Cells and Tissues (細胞・組織の凍結挙動と損傷の機序), 日本低温医学会 日本低温医学会認定 第 5 回凍結手術認定医講習会テキスト, 12-15, 2014

③石黒 博, Freezing Behavior and Mechanisms of Injury of Cells and Tissues (細胞・組織の凍結挙動と損傷の機序), 日本低温医学会 日本低温医学会認定 第 4 回凍結手術認定医講習会テキスト, 12-15, 2013

④石黒 博, Freezing Behavior and Mechanisms of Injury of Cells and Tissues (細胞・組織の凍結挙動と損傷の機序), 日本低温医学会 日本低温医学会認定 第 3 回凍結手術認定医講習会テキスト, 8-13, 2012

石黒 博 (ISHIGURO HIROSHI)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号: 30176177

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者