

培養細胞凍結保存に対するラクトアミドの凍結保護作用

Cryoprotective Effect of Lactamide on Deep Freezing of Cultured Mammalian Cells

佐藤朋花* 矢内信昭*
Tomoka SATO and Nobuaki YANAI

Dimethylsulfoxide (DMSO) is the most commonly used cryoprotectant agent in cryopreservation of cultured mammalian cells, but DMSO has been reported to cause differentiation of some cell lines by DNA methylation and associated histone modifications. To avoid side effects of DMSO in cryopreservation, other agents may be more appropriate for maintaining stable differentiation of cultured cell phenotypes through cryopreservation. All cryoprotectants should be highly soluble in water with low cell toxicity. As such cryoprotective agents those have been shown to be effective in animal sperm preservation, some amides (8 kinds) were examined on cryopreservation of cultured mouse endothelial cell line. Among the amides examined, acetamide and lactamide were effective cryoprotectants for cultured mammalian cells, and the most effective concentration of lactamide was 1.5 M, with an even lower cryoprotective ability than 1M DMSO. Since, successful cryopreservation of cultured cells is hampered by osmotic stress; the adequate ionic concentration was examined by dilution of phosphate-buffered saline (PBS) in the preparation of the 1.5M lactamide solution. The most effective concentration was 0.4 × PBS, which minimized osmotic stress during cryopreservation of cultured cells. Since the addition of high molecular weight materials in media for cryopreservation improves the viability of cells, the effects of bovine serum albumin (BSA), hydroxyethyl-starch (HES), and dextran were examined. As a result, the best combination of lactamide-based media for cryopreservation was 1.5 M lactamide in 0.4 × PBS with 1% BSA.

1. 緒言

培養細胞の凍結保存は、組織培養研究の過程で、一時的に培養を中断して保存する場合や同一のロットを多数作成して実験を再現させる場合に必須の技術である。細胞の凍結保存に際しては、細胞の生存率を落とさないように、凍結保護剤、凍結保存液、凍結方法、融解方法などが検討され、細胞内外での氷晶形成による細胞障害を抑える工夫がなされてきた。凍結保護剤を用いなければ、培養細胞は-10℃から-20℃で、細胞内の凍結がおこり、破壊されてしまう。現在、最も多く用いられている凍結保護剤はジメチルスルホキシド (DMSO) で¹⁾、緩慢凍結と急速融解によって、良好な細胞生存率をたやすく達成することができている。

DMSOは、凍結保護剤として用いられる他に、培養細胞の分化誘導剤として用いられてきた²⁻⁵⁾。培養細胞の中には、DMSOによって分化が促進されたり抑制されたりすることがあり^{6,7)}、DMSOを用いた凍結保存によって、多かれ少なかれ細胞の分化形質を変化させる可能性がある。この分化形質の変化は、おそらくはDMSO内のメチル基により、タンパク質や核酸のメチル化が促進されるから⁷⁾であろう

と考えられている。細胞の分化誘導は、DNAのメチル化とクロマチン構造の変化に大きく依存しており^{8,9)}、分化の研究に用いる細胞や一定の安定した遺伝子発現状態を維持したい場合、細胞の凍結保存にDMSOを用いることを避けた方がよいと考えられる。培養細胞のより再現性の良い凍結保存のために、DMSO濃度を下げる試みも行われている¹⁰⁾。

凍結保存の際、用いる凍結保護剤としては、水溶性が高く、凍結する際に高濃度に濃縮できて、細胞毒性がないことが重要である¹⁾。細胞膜を通過する低分子の凍結保護剤としてDMSO以外に、エタンジオール (エチレングリコール)、プロパンジオール (トリメチレングリコール)、メタノール、ジメチルアセトアミド、グリセロール等が用いられ、凍結保護作用が報告されている^{11,12)}。また、細胞外にとどまって凍結保護作用を示すものとして、分子量の大きいポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルスターチ (HES)、デキストラン、アルブミンなどが報告されている^{11,12)}。これらの凍結保護剤の中で、グリセロールは10%濃度でDMSOの代替として赤血球の保存などでしばしば用いられているが、細胞生存率

*宮城学院女子大学食品栄養学科

は、DMSOを用いた場合の方がはるかに優れている。我々も、グリセロール、エチレングリコール、ポリエチレングリコールでのDMSO代替を試みたことがあるが、細胞生存率は50%以下で、時として細胞毒性も観察され、実用的な保存液とすることができなかった。

家畜繁殖の分野での動物の精子や受精卵の凍結保存は、培養細胞での凍結保存と同様に様々な工夫がなされ、緩慢凍結法以外にも少ない液量での急速凍結によって氷晶をアモルファスな状態とするガラス化法などが発達している。精子保存のための凍結保護剤として検討された中に、アセトアミドとラクトアミドが効果的であるという報告がある¹³⁻¹⁶⁾。精子保存に用いられているガラス化法は、液量が少ない状態でのみ可能であり、培養細胞に適応した場合はごく少量の細胞しか保存できない。アセトアミドとラクトアミドともに、水溶性が高く細胞毒性が少ないので、培養細胞を用いた緩慢凍結においても凍結保護剤としての可能性が予想される。本研究では、アミド化合物に精子に対する凍結保護作用があるということ参考にして、哺乳類の培養細胞に対して凍結保護作用を持つ低分子で水溶性の高いアミド化合物を検索し、細胞に対しメチル化の影響を与えない凍結保護液を開発することを目的とした。

2. 材料と方法

1) 細胞の培養

凍結保存する哺乳類培養細胞として、マウス血管内皮細胞株 (MSS31) を用いた¹⁷⁾。MSS31細胞は、牛胎仔血清 (FBS: fetal bovine serum) を2%添加したD-MEM/F12培地 (invitrogen) にさらに10 μ g/mLトランスフェリン、1 μ g/mLインスリン、10ng/mLエビダーマルグロースファクター (EGF)、0.39 μ g/L亜セレン酸ナトリウムを添加した培養液で、100mm組織培養用プラスチック培養皿 (住友ベークライト) を用い、炭酸ガスインキュベーター (5% CO₂, 37°C) 中で培養した。3日毎に培地交換し、細胞の継代は20 μ g/mLトリプシン、0.2%EDTA-PBS (PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline、リン酸緩衝塩類溶液) 溶液で細胞を剥がし、新しい培養皿へと継代した。細胞数を計測する際は、コールターカウンター (Z2、COULTER) を用いて算出した。MSS31細胞は、一般的な繊維芽細胞株に比較すると凍結に弱く、凍結前の細胞の状態や凍結の手順に影響を受けて、凍結保存のロット毎に細胞生存率が変化する性質を持っているため、凍結保存の条件検討に都合が良いと考えられる。

2) 凍結保存

MSS31細胞を1 $\times 10^6$ 個/mL程度の密度で凍結保存した。冷却速度が速過ぎると、細胞内の水が多く残り、氷晶の形成を招くことから、緩慢凍結とし、凍結保存温度は-80°Cとした。1.5mLプラスチックチューブ (セラムチューブ、住友ベークライト) に1.0mLの細胞懸濁液を入れ、温度変

化の緩衝剤としてイソプロパノールを用いた凍結保存容器 (BICELL、日本フリーザー) 中にプラスチックチューブを入れ、-80°Cの超低温槽に入れ徐々に温度を下げ、そのまま-80°Cで保存した。凍結保存液には各種のアミド化合物、DMSOを用いた。それぞれ、PBSを用いて2M濃度で調整して原液とし、PBSを使った細胞懸濁液に対して原液を同量用いることで、凍結保存溶液での最終濃度を1Mとした。用いたアミド化合物は、アセトアミド、アクリルアミド、プロピオンアミド、メタクリルアミド、イソブチルアミド、ラクトアミド、ニコチンアミド、イソフタルアミドの8種類とした。ただし、メタクリルアミドとイソフタルアミドは、常温で2M溶液を作成できないことから、それぞれ常温での飽和溶液を原液として用いた。アセトアミド、ラクトアミドの濃度依存性を調べる際には、それぞれ4M濃度のPBS溶液を作成し、適宜希釈して用いた。1.5Mラクトアミド保存液の浸透圧を変更する際には、1.5Mラクトアミド水溶液と2倍濃度のPBSを用いて作成した1.5Mラクトアミド溶液とを用いて、混合比を変化させることで異なる希釈のPBS溶液となるように調整した。細胞膜を通過しない高分子化合物として牛血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin、分子量68kDa)¹⁸⁾、デキストラン (平均分子量180~210kDa)¹⁹⁾、ヒドロキシエチルスターチ (HES)²⁰⁾ を用いた。緩衝作用のある分子として、HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) または、PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)) を用いた。HEPESは、1M溶液を作り、NaOHでpHを7.2に調整した。PIPESは、1M溶液を作り、KOHでpHを7.2に調整した。

3) 細胞の融解

細胞を-80°Cの超低温槽で1日以上、10日以内の凍結保存を行った後、37°Cに加温した水道水を用いて、凍結サンプルを急速融解した。融解後の細胞懸濁液は、ただちに10倍容量のPBSを用いて希釈した後、1,500rpmで5分間の遠心により凍結保存液を除き、プラスチックチューブ1本に凍結保存した細胞 (約1 $\times 10^6$ 個) を再度1mLのPBSに懸濁し、細胞の生存率を求めた。

4) 細胞生存率

細胞生存率の算定は、凍結融解後にカルセインアセトキシメチルエステル (Calcein-AM、カルセインAM) とヨウ化プロピジウム (PI、propidium iodide) による二重染色によって行った²¹⁾。急速融解した細胞懸濁液に、カルセインAMとヨウ化プロピジウム原液を加え、最終濃度を0.33 μ MカルセインAM、1.33 μ Mヨウ化プロピジウムとし、37°C、15分間インキュベートした。染色した細胞は、スライドガラスに滴下し、カバーガラスを用いて、蛍光顕微鏡下、490nmの励起光で蛍光を観察した。生細胞は、カルセインAMを取り込み、細胞内で代謝され、カルシウ

ムイオンと結合し、緑色の蛍光を発する。死細胞は、ヨウ化プロビジウムを取り込み、DNAが染色され、核が赤色の蛍光を発する。細胞生存率は、全細胞数に対するカルセインで染色された細胞数を百分率で表し、細胞生存率とした。

3. 結果と考察

マウス血管内皮細胞株MSS31細胞の凍結保存に際し、従来より細胞の凍結保存に用いられてきたDMSO添加での細胞生存率と比較することにより、各種アミド化合物に凍結保護作用があるかを調べた (表1)。凍結に用いた細胞数は、 1×10^6 個/mL程度の密度である。凍結する細胞の密度が高すぎると、細胞間の氷晶形成が進んで細胞が狭い空間に閉じ込められたようになり、細胞同士の接触による機械的なストレスが細胞膜に影響を与える可能性があるため、細胞密度の検討が必要ではあるが、今回は、全ての場合でこの細胞密度を用いた。検討したアミド化合物は、アセトアミド、アクリルアミド、プロピオンアミド、メタクリルアミド、イソブチルアミド、ラクトアミド、ニコチンアミド、イソフタルアミドの8種類であった。DMSO、各アミド化合物をPBSを用いて1M溶液として細胞を凍結保存した (表1)。メタクリルアミドとイソフタルアミドに関しては、1/2飽和溶液を用いて凍結した。1MのDMSO溶液を用いた場合の細胞生存率が約45%であったのに対し、アセトアミドで約33%、ラクトアミドで約19%であった。生存率はそれほど高くはないが、アセトアミドとラクトアミドに凍結保護作用のあることが分かった。アセトアミド、ラクトアミドともに高い溶解性を持っており、溶媒として良く用いられている物質である。アセトアミドとラクトアミド以外のアミド化合物では、細胞生存率が5%以下

であり、凍結保護作用はなかった。メタクリルアミドとイソフタルアミドは、溶解度の低いことから予め凍結保護作用が低いであろうと予想されていたとおりに、低い生存率であった。

アセトアミドとラクトアミドに関して、濃度依存的に凍結保護作用が変化するかを調べるために、それぞれ0~2Mの範囲での細胞生存率を調べた (表2)。アセトアミドの凍結保護作用は0.5Mで最も高く、ラクトアミドの凍結保護作用は1.5Mで最大であった。0.5Mアセトアミドの細胞生存率は約28%であったのに対し、1.5Mラクトアミドでは約37%で、検討したなかでは最も凍結保護作用が高かった。凍結保護剤としての機能に必要な要素として、氷点降下を起こす、水溶性が高い、細胞膜を安定化させる、低温で析出しない等が考えられるが、何よりも細胞毒性が低いことが必要であり、ラクトアミドの濃度依存的な効果は、これらのバランスから成立していると考えられる。

培養細胞の凍結保護に際しては、90%程度の細胞生存率が保たれていることが実用的に必要とされている。1.5Mラクトアミドでの細胞生存率では、まだまだ不十分であり、細胞生存率の改善を図るため、凍結保存の際に細胞外の氷晶形成を調節して凍結保護作用があるといわれている高分子化合物の凍結保護増強作用を調べることとした。調べた高分子化合物は、凍結保存の際の添加物として実績のある牛血清アルブミン (BSA)、デキストラン、ヒドロキシエチルスターチ (HES) である。1.5Mラクトアミド-PBS溶液に、BSA、デキストラン、HESをそれぞれ0.5%、1.0%添加して凍結保存した結果、BSAを添加した場合に凍結保護作用の増強がみられ、細胞生存率は50%近くになった (表3)。デキストランとHESを添加した場合は、細胞生存率が低下し、従来報告されていたような凍

表 1 : 各種アミド化合物の凍結保護作用

物質 (分子量)	PBS	DMSO (78.13)	アセトアミド (59.07)	アクリルアミド (71.08)	プロピオンアミド (73.09)	メタクリルアミド* (85.10)	イソブチルアミド (87.12)	ラクトアミド (89.09)	ニコチンアミド (122.12)	イソフタルアミド* (164.16)
生存率* (%)	1.2±0.6	44.9±9.2	32.7±2.9	0	1.7±1.2	4.1±1.6	2.4±0.7	19.3±6.7	0.7±1.2	0.7±0.6

メタクリルアミドとイソフタルアミド以外は、PBSを溶媒とした1M溶液とした。*メタクリルアミドとイソフタルアミドについては、50%飽和溶液 (PBSに対する飽和溶液) を用いた。*生存率は3本の凍結プラスチックチューブでの値を平均し、平均値±標準偏差で表した。

表 2 : アセトアミドとラクトアミドの濃度依存的凍結保護作用

アセトアミド濃度 (M)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00
生存率* (%)	9.5±3.4	26.1±3.3	17.0±4.1	6.3±2.7	6.8±3.2	1.0±0.5	1.8±1.6	0.5±0.8
ラクトアミド濃度 (M)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00
生存率* (%)	9.9±7.3	14.9±0.6	25.8±4.2	27.9±3.9	28.9±4.9	37.4±1.2	28.9±5.7	26.1±10.4

*生存率は3本の凍結プラスチックチューブでの値を平均し、平均値±標準偏差で表した。

結保護作用の増強はラクトアミドとの組み合わせではみられなかった。おそらくは、培養細胞の凍結保護作用には高分子の炭水化物がそれほどの効果を持たないのではないかと考える。凍結保護作用を増強させる工夫の一つとして、組織培養に用いる牛胎仔血清をDMSOの使用と組み合わせで行うことがあるが、血清での凍結保護作用の増強が含まれているアルブミンによるものであれば、血清のアルブミン濃度が4~5%であることから、今回用いた濃度よりもさらに高い濃度で用いることにより凍結保護作用が増強される可能性がある。

DMSOを用いた従来の凍結保存法では、保存液の基本が培地だったり血清だったりして、あらためてpHの調整を行うことがなかったが、ラクトアミドを用いた細胞生存率の改善にpHの安定が少しでも寄与するかを確かめるため、HEPESとPIPES添加の効果を調べた。これらの緩衝液は、それぞれ1960年代に提唱されたGoodの緩衝液のひとつで、炭酸ガスインキュベータの二酸化炭素によるpHの変化を抑えるために、広く組織培養で用いられてきた。また、細胞透過性が低いことから、細胞内の生理的な条件に対する影響は低いと考えられている。それぞれpH7.2とした緩衝液を最終濃度25mMで添加し、1.5Mラクトアミド-PBSで凍結保存後の細胞生存率を調べると、両者ともにわずかながら細胞生存率を低下させ、凍結保護作用の増強にはならなかった(表3)。

ラクトアミドの凍結保護作用は1.5Mの濃度で最大であ

った。細胞の生理的な浸透圧と比較して著しく高い濃度であるが、ラクトアミドは、細胞膜を通過すると考えられているため、細胞を1.5Mの溶液に浸しても、濃度ほどの膜浸透圧効果を細胞にもたらさないとと思われる。しかしながら、添加したラクトアミドは、凝固点を降下させる以外に、溶液の浸透圧を大きく変えることから、一時的にせよ、細胞に対して浸透圧ショックを起こす可能性がある。細胞を凍結させる際の浸透圧による細胞内外の水の出入りは、生存率の大きく影響を与える可能性があり^{12,22)}、1.5Mのラクトアミド溶液を作成する際の基本溶液であるPBSの濃度を変え、細胞に対する実質的な浸透圧を変化させての凍結保護作用を調べることとした。濃度の異なるPBSで作成して、浸透圧を変化させ、凍結後の生存率を調べた結果、0.4倍濃度のPBSで作成した1.5Mラクトアミド-PBSが最も凍結保護作用が高かった(表4)。

以上の結果より、0.4倍濃度のPBSで作成した1.5Mラクトアミド-PBSに0.5%または1.0%のBSAを添加すると細胞生存率が改善すると予想し、従来法である10% DMSOの場合と凍結保存後の細胞生存率を比較した(表5)。0.4倍濃度のPBSで作成した1.5Mラクトアミド-PBSで約45%だった細胞生存率は、1.0%のBSAを添加することにより約66%に改善し、1MDMSO(約52%)と比較しても高い凍結保護作用を示した。凍結保護作用をさらに増強させて、90%以上の生存率をもたらすためには、ラクトアミド以外の細胞膜透過型凍結保護剤の追加組み合わせや、細胞外

表3: 1.5M ラクトアミド凍結保護作用に対する添加物の効果

添加高分子	ラクトアミドのみ	0.5% BSA	0.5% HES	0.5% Dextran	1.0% BSA	1.0% HES	1.0% Dextran	25mM HEPES	25mM PIPES
生存率* (%)	38.3±2.7	49.0±9.1	37.3±2.8	33.8±3.2	49.5±2.2	31.4±4.0	38.1±2.0	31.9±2.2	36.6±4.0

*生存率は3本の凍結プラスチックチューブでの値を平均し、平均値±標準偏差で表した。

表4: 1.5M ラクトアミド凍結保護作用に対するPBSによる浸透圧変化の効果

溶媒*	水	0.2×PBS	0.4×PBS	0.6×PBS	0.8×PBS	1.0×PBS	1.2×PBS
生存率# (%)	20.6±7.0	29.4±2.5	36.4±0.4	25.5±10.9	23.6±2.2	24.3±10.0	18.2±4.9

*1.5M ラクトアミド溶液は、それぞれの希釈倍率のPBSを溶媒として作成した。#生存率は3本の凍結プラスチックチューブでの値を平均し、平均値±標準偏差で表した。

表5: PBSにて浸透圧を調整した1.5M ラクトアミドにBSAを添加した凍結保存液の凍結保護作用

凍結保存液	1M DMSO-PBS	1.5M ラクトアミド 0.4×PBS	1.5M ラクトアミド 0.4×PBS +0.5% BSA	1.5M ラクトアミド 0.4×PBS +1.0% BSA
生存率* (%)	52.0±3.6	45.6±8.5	55.8±2.4	66.7±8.9

1.5M ラクトアミド溶液は、0.4倍に希釈したPBSを溶媒として作成した。*生存率は3本の凍結プラスチックチューブでの値を平均し、平均値±標準偏差で表した。

でのガラス化を促進できるようにBSAの濃度を5%程度まで上げることや凍結保護作用が報告されている高分子を組み合わせてみる工夫が必要であろう。また、DMSO使用の場合ではそれほど問題にならないが、ラクトアミドの高濃度使用のような場合には、融解する際の細胞洗浄液による溶液の急激な希釈によるショックについても今後の検討が必要であろう。

4. 要約

ジメチルスルホキシド (DMSO) は、培養哺乳類細胞凍結保存の凍結保護剤として一般的に用いられているが、DNAメチル化やヒストンの修飾によって、一部の細胞では分化を引き起こすことが知られている。凍結保存時の培養細胞の安定した分化形質保持には、メチル化を起こすDMSO以外の凍結保護剤の使用が必要である。細胞毒性が低く、動物精子凍結保存に効果的であることが示されたアミド化合物が、同様に哺乳類の培養細胞の凍結保存での凍結保護作用があるかを(8種類のアミド化合物で)培養マウス血管内皮細胞を用いて調べた。調べたアミド化合物の中で、アセトアミドとラクトアミドの2種類が培養細胞に対しての凍結保護作用があり、最も効果的だったのは、濃度が1.5Mのラクトアミドであった。培養細胞の凍結保存に際しては、浸透圧ストレスを避ける必要があるため、1.5Mラクトアミド溶液を作成する際の溶媒を各希釈率のリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) とし、浸透圧を変えた凍結保存液で凍結細胞の生存率を調べた。その結果、0.4倍濃度のPBSが浸透ストレスを最小にし、生存率を高く保つことができた。凍結保存培地に高分子量材料を追加すると細胞の生存率が改善することが知られているので、牛血清アルブミン (BSA)、ヒドロキシエチルスターチ、デキストランの効果調べた。その結果、ラクトアミドを用いた凍結保存培地は、0.4×PBSを用いた1.5Mラクトアミド溶液に1%のBSAを添加した場合、DMSOの凍結保護作用に匹敵する凍結保護作用を示すことが分かった。

5. 謝辞

本研究は、2012年度宮城学院女子大学特別研究助成金により進められた。

6. 引用文献

- 1) Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183, 1394-1395 (1959)
- 2) Lyman GH, Preisler HD, Papahadjopoulos D. Membrane action of DMSO and other chemical inducers of Friend leukaemic cell differentiation. *Nature*, 262, 361-363 (1976)
- 3) Krystosek A, Sachs L. Control of lysozyme induction in the differentiation of myeloid leukemic cells. *Cell*, 9, 675-684 (1976)
- 4) Edwards MK, Harris JF, McBurney. Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Mol.Cell Biol.*, 3, 2280-2286 (1983)
- 5) Young DA. Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322, 759-765 (2004)
- 6) Katkov, I., *et al.* Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of *Oct-4* pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology*, 53, 194-205 (2006)
- 7) Iwatani M, *et al.* Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*, 24, 2549-2556 (2006)
- 8) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, 16, 6-21 (2002)
- 9) Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev.Genet.*, 3, 662-673 (2002)
- 10) Liu Y, *et al.* Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. *Biotechnol.Prog.*, 26, 1635-1643 (2010)
- 11) Walter Z, *et al.* Methods for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. *Przegl.Lek.*, 56, 34-39 (1999)
- 12) Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol.Biol.*, 368, 39-57 (2007)
- 13) Hanada A, Nagase H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J.Reprod.Fert.*, 60, 247-252 (1980)
- 14) Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology*, 48, 831-841 (1997)
- 15) Kashiwazaki N, *et al.* Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *J.Reprod.Dev.*, 52, 511-516 (2006)
- 16) Okuda Y, *et al.* Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp.Anim.*, 56, 29-34 (2007)
- 17) Yanai N, Satoh T, Obinata M. Endothelial cells create a hematopoietic microenvironment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen. *Cell Structure and Function*, 16, 87-93 (1991)
- 18) Liu Y, *et al.* Effect of various freezing solutions on

cryopreservation of mesenchymal stem cells from different animal species. *Cryo.Letters*, 32, 425-435 (2011)

- 19) Quan GB, *et al.* Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose. *Cryobiology*, 62, 135-144 (2011)
- 20) Stolzing A, *et al.* Hydroxyethylstarch in cryopreservation - mechanisms, benefits and problems. *Transfus.Apher.Sci.*, 46, 137-147 (2012)
- 21) Kaneshiro ES, Wyder MA, Wu YP, Cushion MT. Reliability of calcein acetoxymethyl ester and ethidium homodimer of propidium iodide for viability assessment of microbes. *J. Microbiol. Methods*, 17, 1 (1993) .
- 22) Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1.Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34 (+) cells to dimethylsulphoxide. *Cryobiology*, 46, 61-75 (2003)