

矯正歯科治療に伴う小臼歯・智歯の便宜抜歯の凍結 —低温生物学—

河 田 俊 嗣

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔機能修復学講座歯科矯正学

(主任：河田俊嗣)

(受付：2016年2月19日)

Freezing of premolar and wisdom teeth extracted for orthodontic treatment—cryobiology—

Toshitsugu KAWATA

(Chief: A prof Toshitsugu KAWATA)

Division of Orthodontics of Oral Function and Restoration Graduate School of Dentistry

Kanagawa Dental University Japan

Abstract

Refrigeration and cryopreservation of cells

The deterioration and aging of cells progress when they are left at a normal temperature. Long-term maintenance of viable cells at a normal temperature for several years is difficult. Cells are comprised of water accounting for 70-80%, or 80-90% in some cases. When cells are cooled, water changes to ice, and the volume increases 1.1-fold. When large ice crystals are formed in cells in tissue, the cells are pressed, destroyed, and frozen in states of extra- and intracellular freezing. When these are thawed, tissue fluid flows out of cells and drips, and cells die. Therefore, when intracellular freezing is prevented and extracellular ice crystals are small, the mechanical damage of cells decreases. The freezing point of pure water is 0°C, but that of tissue fluid decreases with an increase in various solvents dissolved in it. Amino acids and minerals are dissolved in water in cells, and the freezing point of cells varies among cells to be frozen. The range of the freezing temperature of the first step is considered to be 0 to -5°C. The temperature zone of ice crystal formation is termed the 'zone of maximum ice crystal formation', and ice crystal formation maximizes as the time taken to pass through this zone prolongs. Rapid freezing passing this zone within a short time keeps ice crystals small, and this is now considered to facilitate a high survival rate, rather than slow freezing.

緒 言

細胞凍結に対する著者の考え方

水が氷る現象は、まだよくわかっていないことが多い。同じ氷の中に封入された細胞であっても以下の3つのパターンに分類できる。

- ・完全に細胞内部まで凍結した細胞は、解凍後に死細胞となる。

- ・部分的に細胞内部まで凍結した細胞は、解凍後に一部ダメージを受けた細胞となる。

部分凍結細胞は、回復に1-2週間程度を要する。

- ・細胞内が全く凍っていない細胞は、解凍後に生細胞となる。

細胞の周囲だけ凍結する状態 グレーシングに似た作用

以上、著者らは細胞凍結を3つのパターンに分け、

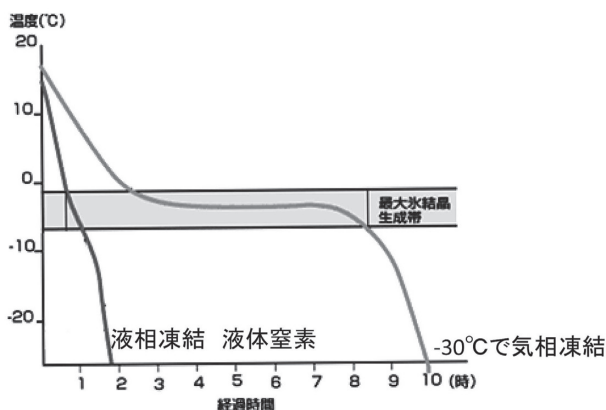


図1 現在考えられている急速凍結と緩慢凍結との凍結の行程の差

冷凍で保存する場合、凍結によって生じる氷が細胞にどのような影響を与えるかが問題となる。細胞は、その7～8割、多い場合は8～9割以上を水分である。細胞を冷却していくと、この水分が固体の水へと変化する。水が氷になると体積が1.1倍に膨張する。組織の細胞中に大きな氷の結晶ができると細胞は破壊され、細胞外凍結と細胞内凍結の状態のまま凍結される。解凍すると壊れた細胞から出た組織液がドリップとして流出し、細胞死となる。すなわち、細胞内凍結を回避し、細胞外凍結の氷の結晶が小さければ、細胞へのダメージは小さくなる。

氷結点は純粋な水であれば0℃であるが、様々な溶媒が溶け込んだ溶液の場合は濃度が高いほど氷結点は低くなる。細胞中の水分にはアミノ酸やミネラルなどが溶け込んで、細胞の氷結点は凍結標的細胞ごとに異なる。その1時凍結温度の幅は、-1～-5℃の範囲といわれている。

氷結晶が生成する温度帯は「最大氷結晶生成帯」と呼ばれ、この温度帯を長い時間をかけて通過するほど、氷結晶は最大化する。このような緩慢凍結よりも、最大氷結晶生成帯を短時間に通過させて氷の結晶を小さく留める急速凍結が、高生存率な凍結方法と現在考えられる。

読者の方々には細胞凍結の概念を整理する。

1. 細胞の変化に関わる要因について

細胞の変化の要因として、①微生物の繁殖、②細胞内や外の酵素による分解、③細胞自体の酸化などの化学変化、④乾燥などの物理作用（いわゆるグレーシングをしないと冷凍やけになる）⑤細胞自体の呼吸や蒸散など生理活性作用等が、細胞へ与える悪影響と考えられる。また、生細胞の呼吸や水分等の蒸散は、常温、冷蔵、冷凍の順で少なくなるが凍結しても継続していると考えられている。

冷蔵・冷凍による細胞保存方法では、細胞本来の特性はさほど変化させずに酵素や微生物による分解・腐敗を常温と比較して抑制し、酸化・乾燥や生理活性作用をあわせて抑制する必要がある¹⁾。

2. 低温が微生物の増殖を抑える

微生物について

一般に微生物は温度が下がるほど増殖が抑制される。そのことで、微生物の細胞内の酵素活性が低下する。たとえば、細菌の多くは中温細菌と呼ばれ10℃以下では増殖しにくく、0℃になると活動が極めて制限される。反対に牛乳に代表される低温細菌は、62～65℃で30分間攪拌することで乳細胞は守られ、殺菌（消毒）が可能となる。

さらに冷蔵から冷凍へ細胞の温度を下げていくと、

水分は凍結されて氷となる。よって、微生物が利用できる水分が減少することで活動はさらに低下する。乾燥によって微生物の増殖が抑制されるのと同じ意味である。冷凍によっては、微生物が殺菌できないため、細胞に付着した微生物が存在すれば、解凍後に再び活動を開始する。

3. 温度が低いほど細胞劣化は遅くなる

1) 酵素について

酵素は低温に強く、一部の酵素は-30℃でも作動するとされている。完全に作用を停止させるには-35～-40℃以下にする必要があるが、低温にすればするほど冷凍が高コストとなる。

2) 酸化と乾燥について

細胞へのダメージとして酸化などによる化学作用と乾燥などの物理作用も温度が高いほど進行が早く、温度が低いほど進行が遅い。細胞自身の呼吸や細胞表面からの蒸散など細胞自体の生理活性作用も温度が低くなるほどゆっくりとなり、細胞の活動を低下させ冬眠状態となる。このように細胞変化に関わる様々な要因は共通して低温では作動しにくくなり細胞の長期保存が可能となる。

4. 適正な冷凍温度と細胞内水分量について

細胞の品質は低温なほど変化しにくいといっても、その保管のために低温を保つには冷却エネルギーが過

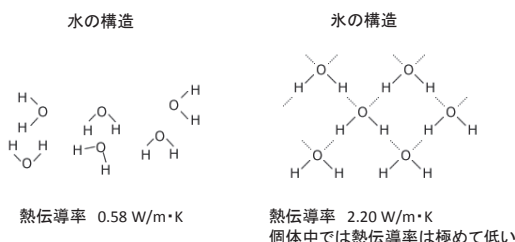


図2 水と氷の構造 膨張率 1.1 倍の膨張

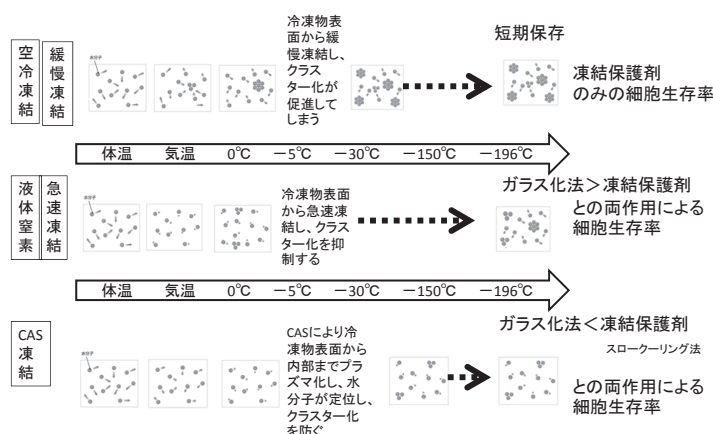


図3 凍結時の細胞に及ぼす影響

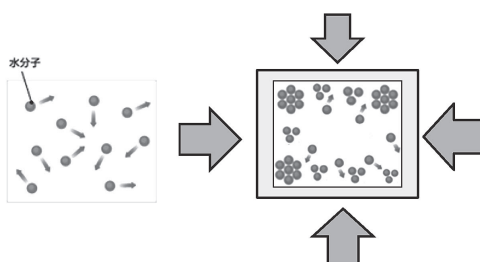


図4 緩慢冷凍は冷凍物表面から凍結し、クラスター化が促進してしまう

度となり、コストの問題が発生する。一般的に品質保持期間は、 -20°C より -30°C 、さらに -50°C が延長されるといわれている。しかし、低温になるほど高コストとなるため、冷凍食品の保存は、12カ月間の保存が可能となる -18°C 以下が、世界的な基準となっている²⁻⁵⁾。

5. 凍結の法則について

冷凍で保存する場合、凍結によって生じる氷の結晶が細胞にどのような悪影響を与えるかが問題となる(図1)。細胞は、多くて8~9割以上を水分が占める。細胞を冷却していくと、この水分が固体の水に変化する。水が氷となると体積が1.1倍に膨張する(図2)。細胞中や細胞外に大きな氷の結晶ができると細胞は破壊される。その状態のまま凍結され、解凍後に細胞死

と判明する。このことを凍結時の細胞死と考える(図3, 4)。また、細胞を長期保存中に氷の再結晶化が進行するが、温度が低い程、再結晶は緩やかであるといわれている。このことを再結晶時の細胞死と考える(図5)。解凍時は、氷の表面に凍結と解凍が繰り返おき、そのことで細胞破壊が進行する。このことを解凍時の細胞死となる(図6, 7)。凍結から解凍までの何れかで細胞内まで凍結し細胞死となった細胞から出た水分が細胞液(ドリップ)として流れ出す。よって、凍結時、長期保管時、解凍時の3度細胞死の危険にさらされるが、細胞死に大きく関係するのは、凍結時、次いで解凍時、最後に長期保管時と考えられる(図3, 5, 6)。

6. 氷結点について

水が氷の結晶に変わる温度は氷結点と呼ばれてい

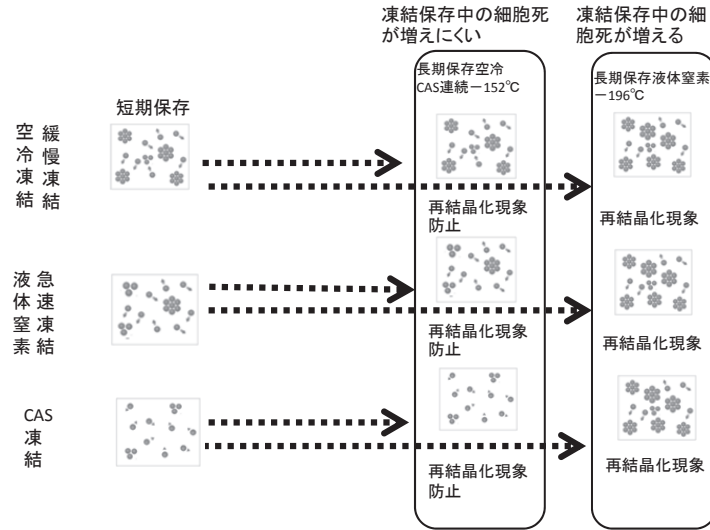


図5 凍結中の細胞に及ぼす影響

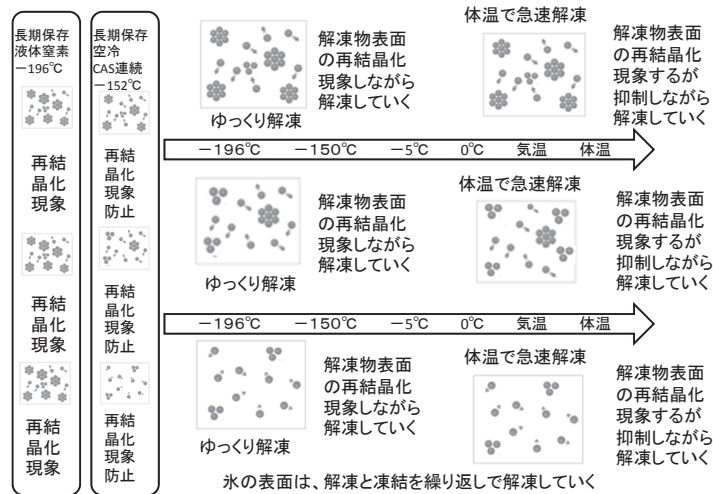


図6 解凍時の水分子の移動

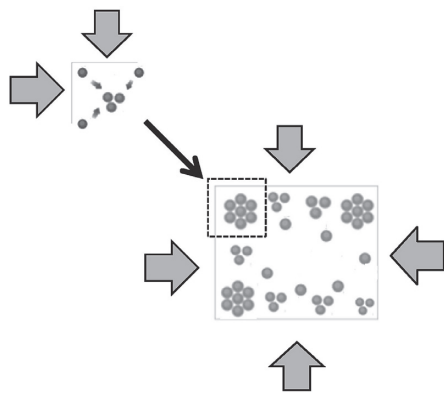
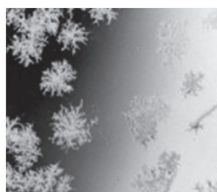


図7 解凍時の水分子の移動

る。氷結点は純粋な水であれば0°Cである。しかし、細胞と何かの溶液との濃度が差で、高いほど氷結点はより低くなる。細胞中の水分には多くのアミノ酸やミネラルなどが溶け込んでいて、一般的に細胞内の氷結点はそれぞれ異なるが、0°Cより低く-1～-5°Cの範囲が一般的に考えられている。氷結晶が増大する温度帯は「最大氷結晶生成帯(0～-5°C)」と呼ばれ、この温度帯を長い時間をかけて通過するほど、氷結晶は大きく成長する。一方、急速冷凍は最大氷結晶生成帯を短時間に通過させて氷の結晶を極力小さく留め、急速冷凍した細胞は緩慢冷凍より高生細胞率と考えられる(図1)。

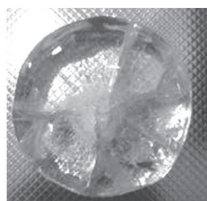
7. 過冷却水の凍り方について

純粋な液体が凍る過程は、現在では次のように進むと考えられている。過冷却状態の液体中で、偶然に数



<http://www.afpbb.com/articles/-/2842449?pid=8128073>

過冷却水が氷瞬間



<http://lineq.jp/q/27651240>

緩慢冷凍

図8 過冷却水と緩慢冷凍の水方

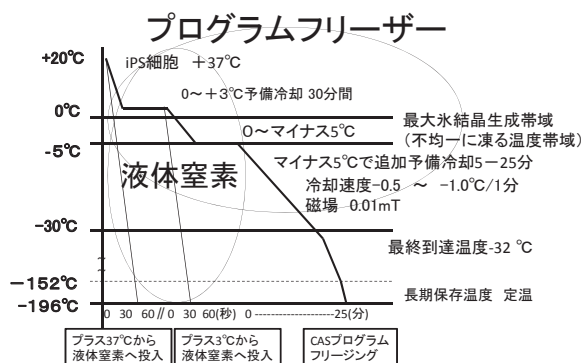
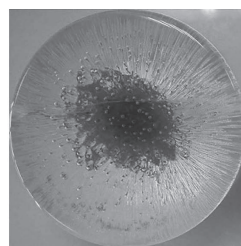


図10 iPS細胞の凍結保存技術および輸送技術の構築
iPS細胞の凍結保存技術「体温から凍結まで」

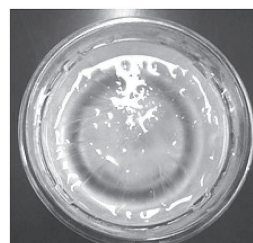
十分子～数万分子程度の大きさの水結晶のかけらが作られることがある。ほとんどの場合は、氷のかけらは小さく、周囲の分子と衝突を繰り返す間に融解するが、偶然にも微小氷結晶と相互に接近して形成された場合に融解せずに結合して過冷却水時下では急速に大きな氷結晶が形成されていく。すなわち、氷結晶が形成される速度より融解する速度を上回ると、氷結晶は次第に成長する(図8)。

8. CAS と DMSO 添加による細胞凍結について

DMSO などの凍結保護剤を加えるのは、氷の結晶の成長を阻害する目的がある。氷の結晶が水の層に沿って大きく成長すると、そのとがった氷の結晶の尖塔が細胞に傷害を与える。しかし冷却中に氷結晶の成長速度を遅らせると、小さな氷の結晶核が多数形成され、結果的に細胞破壊が抑制される。DMSO 分子には、その周囲に水分子を強く引き付ける作用がある。そのため成長中の氷の結晶と DMSO 分子の水分子吸引力作用とが拮抗して、氷の結晶の成長速度を遅らせる。また、振動を与えず毎分 0.5 ～ 1.0℃ のスピードで冷却していくと過冷却の状態となり凍らず、-10℃ 付近で一気に凍らせる瞬間冷凍は生細胞率が向上する(図7, 8)。しかし、過冷却水を安定して形成することは極めて困難である。さらに、過冷却状態の水は非常

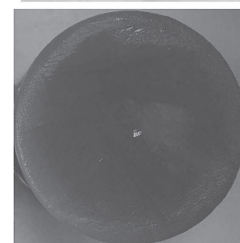


緩慢冷凍



過冷却水の凍結

http://www.tennoji-h.oku.ed.jp/tennoji/yossi/2008_Konishi/img_4347.jpg



CAS凍結

図9 過冷却水の凍結、緩慢凍結、CAS凍結

に不安定で、不純物や振動など何らかの起始点から一旦凍り始めると全体が瞬時に氷結する。このとき、無数の氷の微結晶が同時に生まれるため、個々の氷の結晶は大きく成長することができない(図9)。

一方、CAS 凍結は安定して過冷却水を容易に作り出すことができる(図9, 10)。-8℃～-20℃時には、-30℃まで過冷却状態を形成することが可能であるが、厳密には何度で凍るとする温度管理は困難である。どうしても、凍る温度を一定化させたい場合は、任意の温度で細胞に外部から大きな振動を与えると冷凍はスタートする。CAS 凍結は、-5℃以下の過冷却状態から外部からの温度の低下で氷晶の尖塔の成長を融解させアイルクリスタルを成長させないで凍り、氷結晶が無数に現れる。よって、未凍結なアモルファス状態を氷の中に多数含まれていると考え、DMSO の効果を十分発揮させている可能性がある。

さらに、液体窒素などで凍らせる場合、必ず凍結アンプルの表面から瞬時に凍り始めるが、アンプル内部の特に中心部が全て凍るまでには数秒～数十秒の時間がかかる。この間に、氷の結晶が成長するとされる。冷凍細胞自体の中心部までを0℃付近まで冷却を進めてから、液体窒素で凍らせると生細胞率が著しく向上する。

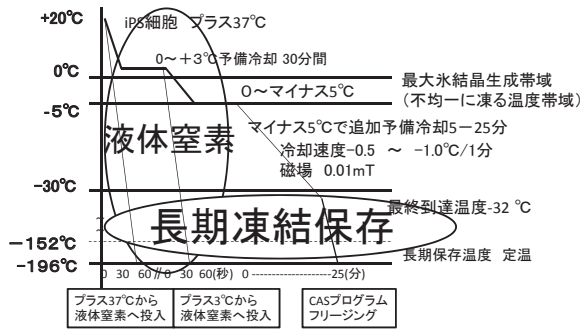


図 11 iPS 細胞の凍結保存技術および輸送技術の構築
iPS 細胞の凍結保存技術「凍結から長期凍結保存」

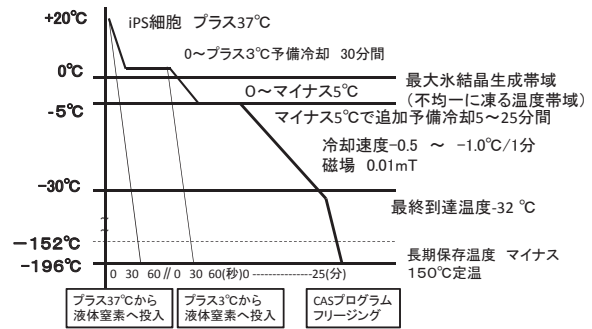
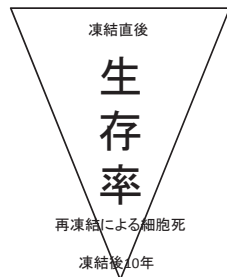


図 12 iPS 細胞 CAS 凍結保存のための具体的な行程表

液体窒素(-196°C)による長期保管



液体窒素(適正温度?)による長期保管

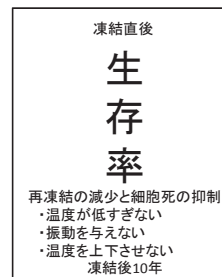


図 13 iPS 細胞の凍結保存技術および輸送技術の構築
iPS 細胞の凍結保存技術「凍結から長期凍結保存」

9. 細胞の長期凍結保存について

細胞凍結長期保存中の温度は、 -130°C 以下で長期保存されることが望ましい (図 11)。凍結中に氷の再結晶化が進行するが、温度が低い程、再結晶は緩やかであるといわれている (図 12)。長期保存の適正温度は、冷凍細胞やアンプル内部の液によることが大きいことと、10 年の超長期の保存で年々生細胞数の減少は、温度が低すぎることによって再結晶とは別に長期保存中の細胞の凍結と、さらに氷晶の再結晶化が原因と考えられる (図 13)。

10. 細胞の解冻について

すばやく解冻するのは、凍結保護剤として加えている DMSO などが細胞に対して有害であるため、すぐに除かねばならないからである。また細胞の代謝機能を速やかに回復させて、凍結時に生じたダメージを修復させるという意味もある。一方では、解冻時に氷の表面を凍結と解冻が繰り返し起き、そのことで細胞破壊が起きることによって解冻時の細胞死となる (図 14)。出た水分が細胞液として流れ出し、凍結時、長期保管時、解冻時の 3 度細胞死の危険にさらされるが、細胞死に大きく関係するのは、凍結時、次いで解冻時、最後に長期保管時と考えられる (図 3, 5, 6)。

11. 凍結保存歯の自家歯牙移植

智歯移植前に移植床のスペースを確保した症例 広島大学病院倫理委員会 許可番号:第疫-32号 許可日:平成 25 年 4 月
<症例の概要>

患者は 18 歳女性。右側第一大臼歯部のカリエスを主訴に来院した。

<初診時口腔内所見>

右側上顎第一大臼歯は残根状態であり、第二大臼歯の近心傾斜が認められた。また、同部位には健全な智歯が存在していた (図 15A, B)。

<治療方針>

様々な治療方針が考えられるが、上位 3 つの選択肢を記す。

治療方針

プラン 1

右側上顎第三大臼歯抜歯冷凍保存

右側上顎第二大臼歯遠心移動

右側上顎第一大臼歯抜歯

上顎右側第三大臼歯抜歯冷凍保存の解冻と移植

プラン 2

右側上顎第一大臼歯抜歯

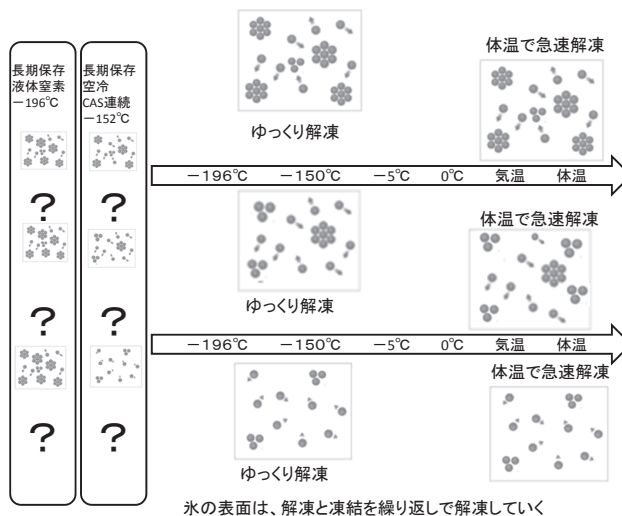


図 14 解凍時の水分子の移動



図 15 A：初診時の口腔内所見
B：初診時のデンタル X 線写真所見

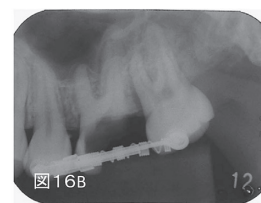


図 16 A：上顎右側第三大臼歯抜歯後より上顎右側第二大臼歯の遠心移動完了 動的矯正治療期間3ヵ月
B：動的矯正治療終了時のデンタル X 線写真所見

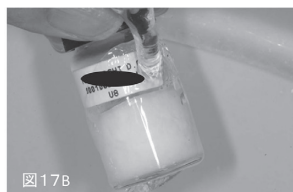
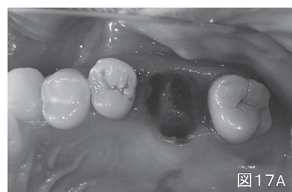


図 17 A：レシipient 部位の抜歯窩
B：ドナー歯を水道水の流水下で急速解凍

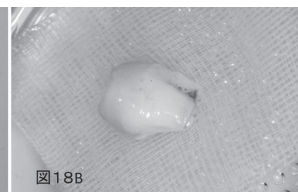
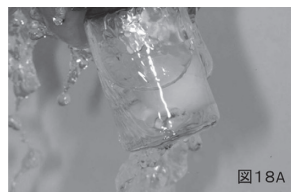


図 18 A：ドナー歯を流水下で急速解凍終了
B：解凍されたドナー歯

矯正力による第二大臼歯の近心移動
 矯正力による第三大臼歯の近心移動
 プラン 3

右側上顎第一大臼歯抜歯
 自然に第二大臼歯の近心移動と第三大臼歯の近心移動

咬合の微調整のための矯正力
 本患者の年齢を考慮して、ブリッジ、インプラント治療説明するも、除外した。
 今回選択された治療方針

右側上顎第一大臼歯は抜歯適応となり、同部に智歯の移植を行うこととした。しかしながら、第二大臼歯の近心傾斜により智歯の移植スペースが不足して

いることから、まず智歯を抜歯して凍結保存を行い、MTMにより第二大臼歯を遠心移動した後、智歯の移植を行う計画とした。

<治療経過>

右側上顎智歯の抜歯を行い、凍結保存を行った。その後、右側上顎右側側方歯群を固定源とし、上顎右側第二大臼歯の遠心移動を行なった。移動開始3ヵ月後に智歯移植と手術のスペースが十分に確保されたため(図 16A, B)、上顎右側第一大臼歯残根を抜去し(図 17A)、凍結保存歯解凍の後(図 17B, 18A と B)、同部に凍結保存歯の移植を行った(図 19)。移植直後のデンタル X 線写真を示す(図 20)。移植3ヵ月後(図 20)、移植歯は歯根未完成歯であったため歯髄処置は

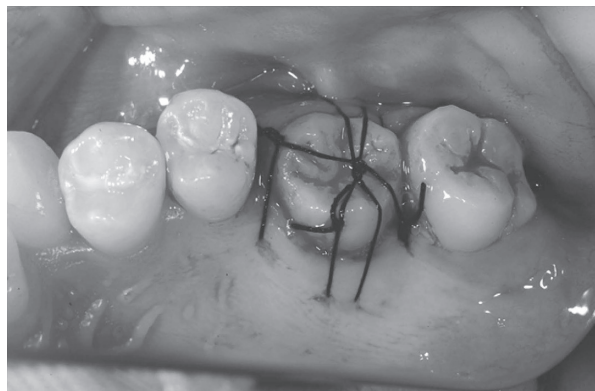
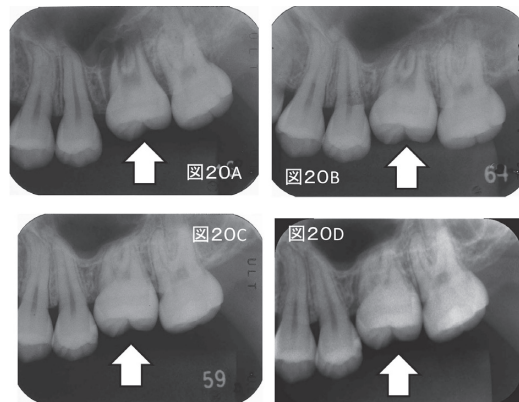


図 19 ドナー歯をレシピエント部位へ移植



自家歯牙移植歯

図 20 A: 移植直後のレントゲン写真
B: 移植後3カ月のレントゲン写真
C: 移植後1年のレントゲン写真
D: 移植後1年9カ月のレントゲン写真

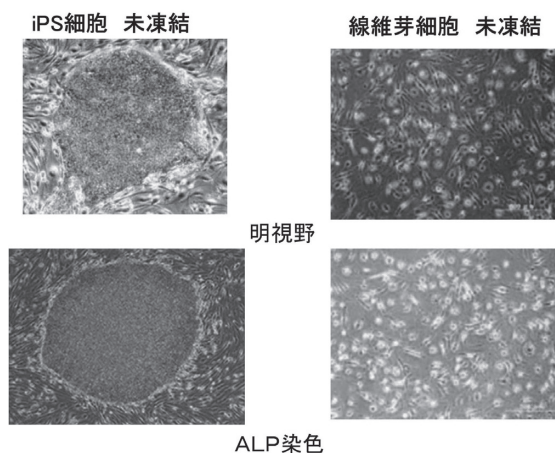


図 21 未凍結 iPS 細胞と線維芽細胞について
判定 (○ △ ×) 3つが○で完全な iPS とする
(○) iPS コロニー
(○) 細胞同士がコンパクトに密集 (Cell-Cell interaction)
(○) ALP 染色分化と未分化が混在している

行なわず経過を観察した。現在、移植後1年が経過しており、歯根膜腔の確認、根尖閉鎖と歯髓腔の閉鎖が認められ順調な経過をたどっている (図 20)。

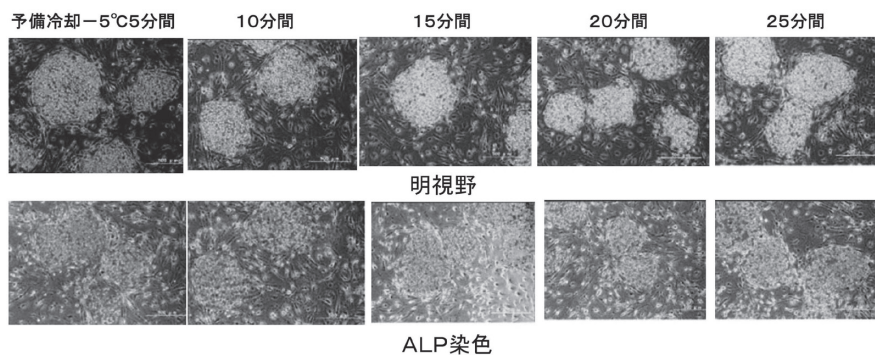
12. iPS 細胞の CAS 凍結実験について

実験方法 (公益財団法人先端医療振興財団先端医療センター研究所 再生医療基盤研究グループリーダー 川真田 信先生と研究員の皆様) 共同研究

iPS 細胞は、川真田先生よりご提供いただいた。CAS 凍結保存の行程表は、図 10, 11, 12 に示す⁶⁻¹⁴⁾。未凍結は典型的な iPS は、コロニー形成と ALP 活性が十分認められた。なお、比較対象として歯根膜線維芽細胞を示す (図 21)。

本実験は、iPS 細胞を CAS 凍結した後に解凍は水道水の流水下で容器ごと急速解凍した。iPS 細胞は、① iPS コロニーが維持されているか、② 細胞同士がコンパクトに密集 (Cell-Cell interaction) が維持されているか、③ ALP 染色 分化と未分化が混在していることの3条件が全て満足のいく結果であれば完全な iPS の凍結保存とした。

結果、iPS 細胞の CAS 凍結保存は、全ての条件においてコロニー形成は維持されていたが、細胞同士コンパクトに密集については一部細胞が離開しているように観察された (図 22 上段)。ALP 染色による分化と未分化とが混在していたが、染色性に若干の低下が



凍結液:バンバンカー2 (血清タイプ+慈フィールド株式会社)

図 22 予備冷却-5°C 保持時間による差
 判定 (○ △ ×) 3つが○で完全な iPS とする
 () iPS コロニーの維持
 () 細胞同士がコンパクトに密集 (Cell-Cell innteraction)
 () ALP 染色分化と未分化が混在している

表 1 予備冷却-5°C 保持時間による評価

	5分	10分	15分	20分	25分
iPSコロニーの維持	△	○ and/or △	△	△	△
細胞同士がコンパクトに密集 (Cell-Cell innteraction)	△	△	△	△	△
ALP 染色 分化と未分化が混在している	△	△	△	△	△

(○ △ ×) 3つが○で完全な iPS とする

認められた (図 22 下段)。本実験の結果は、ほぼ全ての項目において不十分な結果となった (表 1)。完全な凍結とは、iPS 解冻 24 時間以内にその細胞で実験可能な状態を指す。iPS 解冻後 1-2 週間でほぼ完全な状態に戻るものと、1-2 週間でも戻らないか性格が変わってしまった細胞は凍結と解冻の条件を再考する必要がある (図 23)。

本実験の工程表は、我々の行っている「歯の銀行」健康な歯を抜歯して、同じ患者さんのために凍結保存するものである¹⁵⁻²⁵⁾。よって、歯根膜細胞の凍結保存の好条件と合致させている。iPS 細胞 CAS 凍結実験の結果から、完全な iPS の凍結保存のとならなかつたが、死細胞は 1 つも発見されなかつた。また、非凍結 iPS の細胞同士がコンパクトに密集 (Cell-Cell innteraction) が明瞭であるのに対し、CAS 凍結後に解冻した細胞の密集がほどけているように観察されたことは、考察の域を出ないが細胞同士コンパクトに密集している細胞間に氷柱が形成されたと考えられる。さらに我々は、詳細に条件を変更する実験を行うことで満足のいく iPS 細胞の CAS 凍結保存が可能である

と考える²⁶⁻²⁸⁾。

13. iPS 細胞の輸送について

iPS 細胞を完全な状態で凍結保存されている場合は、ドライアイスでできるだけ振動を与えず輸送するとよい。しかし、冷蔵で輸送する場合は体温か 0°C 付近まで温度を下げて輸送することが考えられるが、現在において体温での輸送は高コストとなりやすい (図 24)。

語意の説明

- ・CAS セル・アライブ・システム アビー社の登録商標
- ・DMSO ジメチルスルホキシド (*Dimethyl sulfoxide*, DMSO)
- ・過冷却水 たとえば液体が凝固点 (転移点) を過ぎて冷却されても固体化せず、液体の状態を保持する現象
- ・氷晶 (アイスクリスタル) 氷の結晶のこと。特に、六角柱、六角板、樹枝状などの形をした、小さな氷の粒子のこと。
- ・グレーシング 食品の鮮度を保つために、氷の膜でコーティングすること。方法は、一度凍らせた非冷凍物を冷水にさっとくぐらせ、再び冷凍庫に入れて凍らせる。

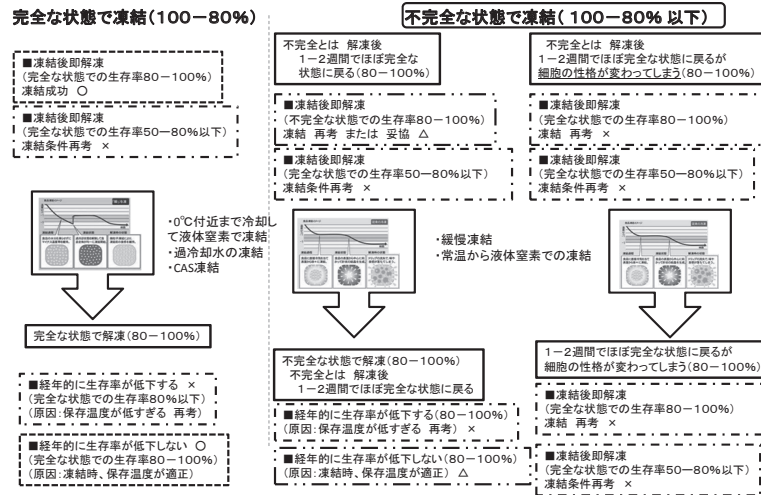


図 23 iPS 細胞の凍結保存技術および輸送技術の構築

iPS 細胞の凍結保存技術「体温又は室温から凍結まで」

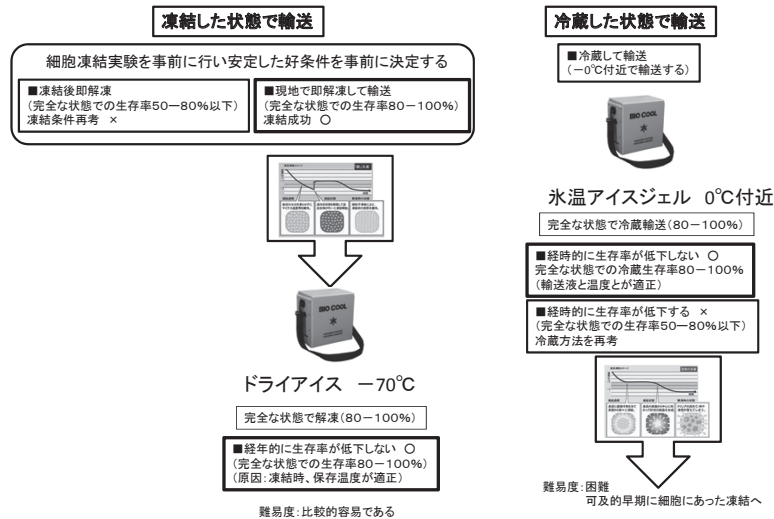


図 24 iPS 細胞の凍結保存技術および輸送技術の構築

iPS 細胞の輸送技術

謝 辞

本稿は、さまざまな研究者のお力を頂きました。株式会社アビー 代表取締役社長 大和田哲夫様、広島大学病院 講師 加来真人先生、公益財団法人先端医療振興財団 細胞医療法研究開発センター事業総括 川真田 信先生と 教室員の皆様に深謝いたします。

本総説に関しては、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

1. 原 龍幸編著. 食品加工学. 建帛社, Sep 30, 206, 2005.
2. Li B, Sun DW. Novel methods for rapid freezing

and thawing of foods - a review. Journal of Food, Engineering 54: 175-182, 2002.

3. James SJ, James C, Evans JA. Modelling of food transportation systems - a review. International Journal of Refrigeration 29: 947-957, 2006.
4. Narrod C, Roy D, Okello J, Avendano B, Rich K, Thorat A. Public-private partnerships and collective action in high value fruit and vegetable supply chains. Food Policy 34: 8-15, 2009.
5. James SJ, James C. The food cold-chain and climate change. Food Research International 43: 1944-1956, 2010.
6. Koizumi S, Kaku M, Kawata T. Freezing with a magnetic field prevents frostbite in mouse hind legs.

- Biomed Res **27**: 2016 in press.
7. Kaku M, Shimasue H, Ohtani J, Kojima S, Sumi H, Shikata H, Kojima S, Motokawa M, Tahsin Raquib Abonti, Kawata T, Tanne K, Tanimoto K. A case of tooth autotransplantation after long-term cryopreservation using a programmed freezer with a magnetic field. *Angle Orthod* **85**: 518-524, 2015.
 8. Kojima SI, Kaku M, Kawata T, Motokawa M, Sumi H, Shikata H, Abonti TH, Kojima ST, Yamamoto T, Tanne K, Tanimoto K. Cranial suture-like gap and bone regeneration after transplantation of cryopreserved MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field in rats. *Cryobiology* **15**: 60-67, 2015.
 9. Koseki H, Kaku M, Kawata T, Kojima S, Sumi H, Shikata H, Motokawa M, Fujita T, Ohtani J, Tanne K. Cryopreservation of osteoblasts by use of a programmed freezer with a magnetic field. *Cryo Letters* **34**: 10-19, 2013.
 10. Kojima S, Kaku M, Kawata T, Sumi H, Shikata H, Abonti TR, Kojima S, Fujita T, Motokawa M, Tanne K. Cryopreservation of rat MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field. *Cryobiology* **14**: 199-205, 2013.
 11. 河田俊嗣. 再生医療のための細胞バンキングシステム—実現可能な歯の再生から日本 MEAW 研究会へご提案したいこと—MEAW 研究会雑誌 **20** : 13-26, 2013.
 12. Kawata T, Abedini S, Kaku M, Koseki H, Kojima S, Sumi H, Motokawa M, Fujita T, Ohtani J, Ohwada N, Tanne K. Effects of DMSO (Dimethyl sulfoxide) free cryopreservation with program freezing using a magnetic field on periodontal ligament cells and dental pulp tissues. *Biomed Res* **23**: 438-443, 2012.
 13. 河田俊嗣, 本川雅英, 松田弥生, 寺尾明子, 加来真人, 藤田 正, 大谷淳二, ABENDINI Sara, 笹本智子, 丹根一夫. 失敗症例から学ぶ矯正歯科を伴う歯の移植治療—歯の銀行の役割—*廣大歯誌* **44** : 61-66, 2012.
 14. Abedini S, Kaku M, Kawata T, Koseki H, Kojima S, Sumi H, Motokawa M, Fujita T, Ohtani J, Ohwada N, Tanne K. Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues. *Cryobiology* **62**: 181-187, 2011.
 15. Kamada H, Kaku M, Kawata T, Koseki H, Abedini S, Kojima S, Sumi A, Motokawa M, Fujita T, Ohtani J, Ohwada N, Tanne K. In-vitro and in-vivo study of periodontal ligament cryopreserved with a magnetic field. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **140**: 799-805, 2011.
 16. Kawata T, Kaku M, Fujita T, Junji Ohtani, Motokawa M, Tanne K. Water molecule movement by a magnetic field in freezing for tooth banking. *Biomed Res* **21**: 351-354, 2010.
 17. Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Jeng JH, Kawata T, Huang HM. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod* **36**: 1336-1340, 2010.
 18. Kaku M, Kamada H, Kawata T, Koseki H, Abedini S, Kojima S, Motokawa M, Fujita T, Ohtani J, Tsuka N, Matsuda Y, Sunagawa H, Hernandez RA, Ohwada N, Tanne K. Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking. *Cryobiology* **61**: 73-78, 2010.
 19. 河田俊嗣, 神谷貴志, 白井憲一, 加来真人, 国松 亮, 上田 宏, 栗原英見, 岡崎正之, 西村英紀, 藤井理史, 丹根一夫. 歯牙歯冠移植—その可能性と課題—*歯界展望* **115** : 1104-1108, 2010.
 20. 加来真人, 河田俊嗣, 羽田裕二, 二木由峰, 内田禎子, 丹根一夫. 冷凍保存歯の自家歯牙移植—歯の銀行による歯牙移植—第2報— *ザ・クインテッセンス* **29** : 151-157, 2010.
 21. 河田俊嗣, 神谷貴志, 加来真人, 丹根一夫. 自家歯牙による審美修復—「歯の銀行」の役割. *Dental Diamond* **35** : 76-80, 2010.
 22. 河田俊嗣, 内田禎子, 大谷淳二, 佐野良太. アンチエイジングと再生歯科医療. *アンチエイジング歯科学会雑誌* **3** : 16-22, 2010.
 23. 河田俊嗣, 神谷貴志, 加来真人, 国松 亮, 上田 宏, 栗原英見, 岡崎正之, 西村英紀, 白井憲一, 藤井理史, 内田 隆, 丹根一夫. 新たな審美修復材料—歯の銀行の役割—. *廣大歯誌* **41** : 121-125, 2009.
 24. 河田俊嗣. ポスト「ティースバンク」歯の再生医療—トランスレーショナルリサーチ—. *接着歯学* **24** : 215-216, 2007.
 25. 河田俊嗣, 加来真人, 釜田寛子, 本川雅英, 大谷淳二, 小跡弘幸, 二木由峰, 田井雅子, 柄 なつみ, 丹根一夫. 凍結がヒトの歯の象牙質に及ぼす影響. *廣大歯誌* **39** : 144-147, 2007.
 26. 松村和明, 玄 丞然: iPS/ES 細胞の大規模保存システムの開発 (特集 “数” と “純度” が勝負の再生医療—組織工学的視点からのアプローチ)— (組織工学・化学工学からのメッセージ). *再生医療* **9** : 349-354, 2010.
 27. 玄 丞然, 松村和明. 不凍ポリアミノ酸を用いたヒト iPS 細胞の凍結保存 (AYUMI 医工学からみたヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞, ES 細胞) マテリアル戦略). *医学のあゆみ* **238** : 1212-1214, 2011.
 28. 山海 直, 大和田哲男, 京野廣一. 卵巣の凍結保存技術は, がん患者, とくに若い女性に対し, 治療に対する意欲を与え QOL を向上させるものである. このような卵巣の凍結保存, 移植による機能復帰に成功することは大きな意味をもっている. 卵巣凍結技術の改変により肝臓, 腎臓, 心臓など様々な臓器の凍結保存が可能になるかもしれない. *哺乳動物卵子学会誌* **27** : 101-105, 2010.