

## ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存について—Ⅲ 液体窒素による凍結保存について

土屋 仁

### Cryopreservation of free-living Conchocelis of *Poriphyra yezoensis*—Ⅲ Cryopreservation by liquid nitrogen

Hitoshi TSUCHIYA

#### はじめに

前報<sup>1)</sup>で筆者は、ノリのフリーリビング糸状体に凍害防御剤を添加して、 $-85^{\circ}\text{C}$ で凍結・保存したところ、7日目に最高46%の生存率が得られたが、長期間保存すると生存率が低下することを報告した。

そこで、凍結時の生存率の向上と保存期間中の生存率の低下防止を目的に、前報で生存率が高かった凍害防御剤を用いて予備凍結を行い、その後液体窒素中での保存について試験を実施した。

また、陸上植物では直接液体窒素中で凍結しても細胞が生存することから液体窒素による超急速冷却についての試験を実施し、若干の知見を得たので報告する。

#### 材料と方法

##### 材料

供試したフリーリビング糸状体(以下、糸状体と言う)は、ナラワスサビノリ(品種名KN)を用いた。

##### 方法

糸状体の調整方法、融解方法、凍害防御剤の除去方法および糸状体細胞の生死の判定は、前報<sup>1)</sup>と同様に行った。

凍害防御剤は、前報で最も生存率が高かったDMSOとグルコースおよびPEGを組み合わせ、添加後の濃度が各々10%、8%、10%となるような混合液(以下、DGPと言う)を作製し、糸状体懸濁液に添加するまで $5^{\circ}\text{C}$ で保存した。

糸状体懸濁液へのDGPの添加操作は、 $5^{\circ}\text{C}$ に冷却した薬品保冷庫中で行った。DGPの添加は、250ml容

ビーカーに糸状体懸濁液を40ml入れ、マグネチックスターラで緩く攪拌しながら、25ml容自動ピュレットで約25分間かけてDGP60mlを滴下した。

DGPを添加した糸状体懸濁液(以下、DGP糸状体液と言う)は、直ちに2ml容のクライオチューブに1mlづつ分注し凍結操作を行った。

#### 凍結と保存試験

試験区は、下記により3区を設け、保存開始後17日目と400日目に融解して生存率を調べた。

1区：DGP糸状体液を $-40^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結し、その後液体窒素中で保存。

2区：DGP糸状体液を $-40^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結し、その後 $-85^{\circ}\text{C}$ で保存。

3区：DGP糸状体液を $-85^{\circ}\text{C}$ で凍結保存。

予備凍結は、 $-40^{\circ}\text{C}$ まで低下するプログラムフリーザー(東京理化学MPF-40)を用い、メチルアルコール中で緩速冷却法で凍結した。温度降下の設定は、 $0^{\circ}\text{C}$ ～ $-10^{\circ}\text{C}$ の間は $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ とし、 $-10^{\circ}\text{C}$ ～ $-20^{\circ}\text{C}$ は、DGP糸状体液が凍結する温度帯と考えられることから $0.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ とし、 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $-40^{\circ}\text{C}$ は、 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ に設定した。

緩速冷却中のDGP糸状体液の凍結温度を調べるため、DGP糸状体液の温度変化の計測と凍結の有無を観察した。温度変化の計測は、クライオチューブのキャップに孔を開け自記温度記録計(チノー製ALハイブリッド記録計)の感温部をDGP糸状体液中に差し込み温度降下を記録した。

予備凍結後は、直ちに液体窒素を入れた $-196^{\circ}\text{C}$ の保存容器(MVE社製SC20/20)中と $-85^{\circ}\text{C}$ に設定したディープフリーザー中に保存した。

3区は、予備凍結操作を行わずクライオチューブを

-85℃のディープフリーザー中に直接入れて凍結し、そのまま保存した。

予備凍結後に液体窒素中で凍結保存したときの生存率の変化を調べるため、予備凍結終了時にその一部を融解して生存率を調べた。

液体窒素は、約6ヵ月毎に補充し-196℃の温度を保持した。

**超急速冷却と液体窒素中での保存試験**

超急速冷却法による糸状体細胞の生存の有無と凍害防御剤の効果を調べるため、DGP糸状体液の区と凍害防御剤を添加しない区を設けた。その方法は、それぞれの溶液1mlを5℃下でクライオチューブに分注して、そのクライオチューブを液体窒素を入れた保存容器中に直接入れて凍結・保存し、保存開始後17日目と400日目に融解して生存率を調べた。

**結 果**

**予備凍結と液体窒素中での保存試験**

表1に予備凍結後と凍結保存中の各区の生存率を示

した。

予備凍結終了時の生存率は60%であった。17日目の生存率は、-40℃まで予備凍結後に液体窒素中で保存した1区が57%と最も高く、予備凍結後-85℃で保存した2区は38%であった。また、直接-85℃で凍結と保存をした3区は19%と最も低い生存率となった。

保存開始後400日目の生存率は、1区では17日目とほぼ同じ60%の生存率を示すが、2区と3区では生存率の低下が認められ、特に3区では9%に低下した。

緩速冷却時の温度降下は、-17℃までは設定通りの降下を示したが、-17℃で凝固が始まり、それと同時に温度が-10℃まで急速に上昇し、その後再び温度が降下し約70分後に-40℃となった(図1)。

**超急速冷却と液体窒素中での保存試験**

DGP糸状体液を直接-196℃で凍結保存した1区の生存率は、17日目では14%を示し、400日目では17日後とほぼ同じ15%であった。DGPを添加しなかった2区は、17日目と400日目とも生存細胞は認められなかった(表2)。

表1 予備凍結と液体窒素での保存試験結果

	凍結温度	予備凍結時の生存率(%)	保存温度	生存率(%)	
				17日目	400日目
1区	-40℃	60	-196℃	57	60
2区	-40℃	60	-85℃	38	31
3区	-85℃	-	-85℃	19	9

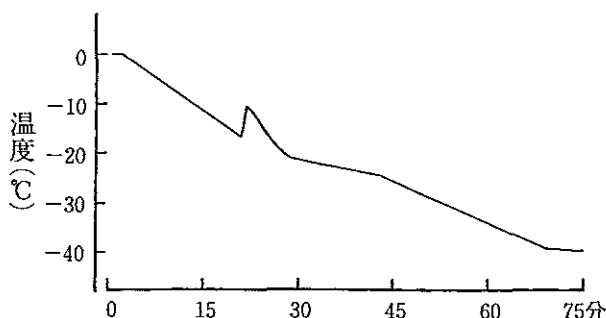


図1 プログラムフリーザーによる緩速冷却時のDGP糸状体液の温度降下

表2 液体窒素による超急速冷却試験結果

	凍害防御剤	凍結・保存温度	生存率(%)	
			17日目	400日目
1区	DGP	-196℃	14	15
2区	なし	-196℃	0	0

**考 察**

**予備凍結と液体窒素中での保存試験**

藤吉<sup>3)</sup>らは、ナラワスサビノリ糸状体にDMSOとソルビトールの混合液を凍害防御剤として用いた試験で、

予備凍結時の冷却速度は、0.5℃/分と1.0℃/分ともに50%以上の生存率が得られ、予備凍結温度については-40~-50℃で生存率が高いとしている。また酒井<sup>2)</sup>は、陸上植物の培養細胞の予備凍結は、通常-35~-40℃まで0.5~1.0℃/分で緩速冷却する方法が取ら

れているとし、 $-50\sim-60^{\circ}\text{C}$ まで冷却すると凍結脱水がさらに進み生存率が低下する場合が多く、また $-20\sim-30^{\circ}\text{C}$ まででは、液体窒素中で急冷すると凍結水が細胞内に残っているため細胞内凍結を起こし生存率が低下するとしている。今回の試験では、凍害防御剤の組成や濃度が相違するが、冷却速度の設定はほぼ同様であり、DGPを用いたこれまでの試験で最も高い生存率が得られた。また予備凍結温度は、予備凍結後の生存率と液体窒素で急冷後の生存率に差が認められなかったことから、 $-40^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結すると脱水過多や細胞内凍結は起こらないと考えられた。

凍結温度については、水澤<sup>4)</sup>がDMSOを5%添加した液の予備凍結時の温度変化を調べた結果、 $-5^{\circ}\text{C}$ で凝固熱と考えられる昇温が認められている。今回の試験では $-17^{\circ}\text{C}$ で結氷するのが観察され、同時に凝固熱によると考えられる昇温現象が起こり、 $-10^{\circ}\text{C}$ まで上昇した。凍害防御剤の組成や濃度で凍結温度に相違が見られ、DGP糸状体液の凍結温度が低いことから緩速冷却の開始温度は、凍結が始まる温度に近い $-15^{\circ}\text{C}$ 前後からが良いと思われる。

液体窒素を用いた超低温保存中の生存率の変化について、酒井<sup>5)</sup>は $-150^{\circ}\text{C}$ 以下の温度では、生化学反応はほとんど休止状態におかれるとしており、藤吉<sup>6)</sup>らはナラワスサビノリ糸状体にDMSO10%とソルビトール12%の混合液を添加し緩速冷却後に液体窒素中で12か月間保存して45%の生存率が得られ、保存期間中の生存率はほとんど低下しなかったとしている。今回の試験も同様に、予備凍結後に液体窒素中で保存した区の生存率は、400日後でも60%を示し保存期間中の生存率の低下は認められなかったことから、長期間の凍結保存には液体窒素温度が必要と考えられた。

著者は、フリーリビング糸状体の凍結保存について、I報<sup>7)</sup>でDMSOを10%添加した糸状体を $-85^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、保存20日目で生存する細胞が得られたことを報告した。II報<sup>1)</sup>では、凍害防御剤と凍結方法について試験を行い、最高で46%の生存率が得られたが、 $-85^{\circ}\text{C}$ の保存温度では保存中に生存率が低下することを報告した。今回の報告では、液体窒素で保存すると保存中の生存率低下は認められないことを報告した。

これら試験結果から、予備凍結法による凍結保存で高い生存率を得るには、最終濃度でDMSO10%、グルコース8%、PEG10%となる凍害防御剤を用い、 $5^{\circ}\text{C}$ 前後の低温下で糸状体懸濁液に30分前後かけて添加し、添加後速やかにクライオチューブに分注する。これをプログラムフリーザーで $-15^{\circ}\text{C}$ から $-40^{\circ}\text{C}$ まで

は $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で特に緩速冷却し、液体窒素中で保存する。また融解は、液体窒素から取り出したクライオチューブを $30^{\circ}\text{C}$ の湯浴中で結晶がなくなるまで振とうして急速融解し、融解後にフィルターで凍害防御剤を濾別する方法が良いと考えられた。

#### 超急速冷却と液体窒素中での保存試験

超急速冷却による凍結保存については、酒井<sup>5)</sup>がDMSOで処理したカーネーションの莖頂を直接液体窒素で凍結した結果では、生存率は20%以下であったとし、また酒井<sup>2)</sup>は近年はグリセリン、DMSO、エチレングライコールから構成するPVS液で処理後プラスチックストローに詰めて液体窒素中で超急速冷却する方法で、オレンジの培養細胞で80%の生存率が得られたとしている。今回のDGP糸状体液をクライオチューブに入れ、液体窒素で直接凍結・保存した1区では、保存後400日目に15%の生存率を示し、カーネーションの莖頂と同様に20%以下となった。さらに生存率を向上させるには、細胞内への透過性が高い高張な凍害防御剤を用いて浸透的に脱水し、冷却速度を早めるために少容量のストローに収容して液体窒素中に入れ、超急速冷却により細胞内の残存水と媒液をガラス化させる方法の検討が必要と考える。

この超急速冷却法は、緩速冷却装置の整備やその操作が省けるため、生存率を向上できれば凍結・保存方法としては簡便で有用な方法と思われる。

#### 要 約

- 1) ミキサーで切断したノリのフリーリビング糸状体を用いて、プログラムフリーザーによる予備凍結と液体窒素での保存試験を行い、高い生存率を得るための凍結保存方法について検討した。
- 2) 緩速冷却は、降下速度を $1.0^{\circ}\text{C}\sim 0.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ に設定して $-40^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結を行い、60%の生存率が得られた。
- 3) 予備凍結後に液体窒素で保存した結果、400日後でも60%を示し、生存率の低下は認められず長期間の保存が可能であった。
- 4) 予備凍結法による凍結保存で高い生存率を得るには、最終濃度がDMSO10%、グルコース8%、PEG10%となる混合液を $5^{\circ}\text{C}$ 下で糸状体懸濁液に30分前後かけて添加し、添加後速やかにクライオチューブに分注する。これをプログラムフリーザーで $-15^{\circ}\text{C}$ から $-40^{\circ}\text{C}$ まで $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で緩速冷却し、液体窒素中で保存する。融解は、液体窒素から取り出し $30^{\circ}\text{C}$ の湯浴中で急速融解し、融解後にフィル

- ターで凍害防御剤を濾別する方法が考えられた。
- 5) 凍害防御剤を添加後に直接液体窒素中で凍結する超急速冷却法では、15%の生存率が得られた。さらに生存率を向上させるには、細胞内への浸透性が高い凍害防御剤の検討などが必要と考えられた。

## 文 献

- 1) 土屋 仁 (1992) : ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存について-Ⅱ. 千葉県水産試験場研究報告, 50, 37~43.
- 2) 酒井 昭 (1990) : 植物細胞の液体窒素温度における生存の機序と保存法の問題点. 月刊海洋, 22 (3), 113~120.
- 3) 藤吉栄次・山崎誠・鬼頭鈞 (1993) : ナラワスサビノリ糸状体の超低温保存における予備凍結条件の検討. 水産増殖, 41(4), 547~551.
- 4) 水澤 博 (1987) : 凍結保存. 酒井 昭編, 朝倉書院, 東京, 74~76.
- 5) 酒井 昭 (1987) : 凍結保存. 酒井 昭編, 朝倉書院, 東京, 159~165, 200~206.
- 6) 藤吉栄次・山崎誠・鬼頭鈞 (1993) : ナラワスサビノリ糸状体の超低温保存. 水産増殖, 41(1), 85~87.
- 7) 土屋 仁 (1989) : ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存について. 千葉県水産試験場研究報告, 47, 35~36.