

ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存についてⅡ 凍害防御剤と凍結方法について

土屋 仁

はじめに

筆者は、前報¹⁾でノリのフリーリビング糸状体を -85°C で凍結保存することが可能であったが、実用化するには、生存率の向上や、長期凍結保存の可能性についての検討が必要であることを報告した。

そこで陸上植物細胞の凍結傷害と耐性²⁾、培養細胞やプロトプラストの凍結保存³⁾で試みられている凍害防御剤の種類や凍結方法を検討した。

これらを参考にして、フリーリビング糸状体の凍結保存について凍害防御剤に関する試験として、(1)凍害防御剤の種類や組み合わせによる効果、(2)長期間の凍結保存による生存率の変化、(3)凍害防御剤の接触時間と生存率、(4)凍害防御剤の添加濃度と生存率、(5)凍害防御剤の添加速度と生存率、の5項目について、また凍結方法に関する試験として冷却速度と生存率についての試験を実施し、若干の知見を得たのでここに報告する。

材料と方法

1. 供試材料および試験方法

供試したフリーリビング糸状体の調整方法、凍害防御剤の添加方法、凍結・融解方法および生死の判定方法は、以下により行った。

(1) 糸状体の調整方法

供試した糸状体は、1976年に九十九里海域で試験繁殖したナラワササビノリ(品種名KN)の葉状体から果胞子を取り、このフリーリビング糸状体を恒温室で 22°C 、明期14時間、暗期10時間の条件で継代培養したものを使用した。これをあらかじめ市販のミキサーに約1分間かけて5~6細胞程度に切断し、 $5\mu\text{m}$ のミリポアフィルターを用いて切断時の海水を濾別した。その後 $0.42\mu\text{m}$ のミリポアフィルターでろ過した海水(以下、ろ過海水と言う)で5回程度洗浄した後、糸状体懸濁液とし試験に供した。

(2) 凍害防御剤の添加方法や凍結・融解方法

糸状体懸濁液をマグネチックスターラーでゆるく攪拌しながら、凍害防御剤を5分~10分かけて滴下した。

この液を10ml容ネジ口ガラス瓶(以下、凍結容器と言う)に容積の1/2程度入れて、 -85°C の冷凍庫に収容して凍結させた。

融解および凍害防御剤の除去については、約 30°C の湯浴中で溶液の結晶がなくなるまで凍結容器を振とうし、融解後ただちに $5\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで凍害防御剤を濾別し、フィルター上の糸状体をろ過海水で3~4回洗浄して凍害防御剤を除去した。

(3) 糸状体細胞の生死の判定

細胞の生死の判定は、洗浄した糸状体をProvasoliのES培地に入れ、 24°C 明期14時間に設定した恒温器で静置培養し、2日以内に染色して検鏡により生細胞と死細胞を判別した。判別に当たっては、まず糸状体懸濁液を良く攪拌して、その一定量をスライドグラス上に滴下してカバーグラスを乗せた後に、エリスロシン溶液をカバーグラスの片側に滴下し、反対側からろ紙で培養液を吸い取り染色し、赤く染色される細胞を死細胞とした。

生存率の算出に当たっては、顕微鏡下で生細胞と死細胞の合計が200~400細胞になるまで細胞の計数を行い、試験終了時の生存率を試験開始時の生存率で以下のように補正した。

$$\text{生存率} = \text{試験終了時の生存率} \div \text{試験開始時の生存率}$$

2. 凍害防御剤の処理に関する試験

(1) 凍害防御剤の種類や組み合わせと生存率

凍結保存による細胞の生存率は、凍害防御剤の種類や濃度に大きく左右される⁴⁾。そこで陸上植物で凍害防御効果が認められる薬剤の中から、ジメチルスルホキシド(以下、DMSOと言う)、ショ糖、グルコース、ポリエチレングリコール6000(以下、PEGと言う)を選び、DMSO、ショ糖、グルコースの単一やDMSOとグルコース、DMSOとグルコースとPEG、DMSOとショ糖の組み合わせで、表1に示す試験区を設定し、凍結5日後に融解して生存率を調べた。

DMSOの添加は、DMSOの原液を直接糸状体懸濁液に5%と7%(V/V)となるように滴下した。DMSO 5%(V/V)+グルコース 10%(W/V)とDMSO 10%(V/V)+グルコース 5%(W/V)は、添加濃度の2倍

の濃厚液を作製して滴下した。DMSO 10% (V/V) + グルコース 8% (W/V) + PEG 10% (W/V) (この混合液を以下、DGPと言う) は、まず300mlの海水にPEGを100g入れて攪拌・溶解させた後に、グルコース80gとDMSO 100mlを加え、最後に海水を加えて600mlに調整して完全に溶解させ、糸状体懸濁液 4 mlに対して6 mlを滴下した。DMSO 5% (V/V) + ショ糖10% (W/V) とDMSO 10% (V/V) + ショ糖 5% (W/V) は、DMSO + グルコースと同様に濃厚液を作製して滴下した。ショ糖10% (W/V) およびグルコース10% (W/V) は、添加濃度の2倍の濃厚液を作製して滴下した。

(2) 長期間の凍結保存による生存率の変化

-85℃で長期間凍結保存したときの生存率の変化を調べるため、凍害防御剤の種類や組み合わせと生存率との関係を試験した試料を引き続き-85℃で保存して、125日後と490日後に融解して生存率の変化を調べた。

(3) DGPの接触時間と生存率

DMSOを含む溶液中に長時間保持することは細胞の生存率の低下につながる。また微量のDMSOは、細胞の増殖を阻害するとされている。そこで(1)の試験で最も生存率が高かったDGPとの接触時間と生存率について試験を実施した。

その方法は、50ml容ビーカーに糸状体懸濁液を8ml入れ、攪拌しながら凍害防御剤の濃厚液12mlを滴下して、設定濃度になった後に約20℃の室温に静置し、添加完了直後から1時間ごとに5時間後までの生存率を調べた。

(4) DGPの添加濃度と生存率

DGPの接触時間と生存率の試験で糸状体にDGPを順次添加していくと、設定濃度になる前に細胞の偏平化が認められた。このことは凍結防御剤の添加により、凍結前の細胞に傷害を与えて生存率を低下させる大きな要因と考えられた。

そこでDGPの濃厚液を用いてDMSO 1.3% + グルコース1.0% + PEG 1.3% からDMSO 13.3% + グルコース10.0% + PEG 13.3% までの10段階の濃度に区分して、凍結前と凍結後の生存率を調査した。

その方法は、凍害防御剤が各々の濃度になった時点で、一部を取りそのまま海水で洗浄して生存率の調査を、残りは凍結容器に入れ直接冷凍庫に入れて凍結し、7日後に融解して生存率を調査した。

偏平細胞の出現率は、各々の濃度になった時点で凍害防御剤を添加した状態の糸状体懸濁液をスライドグラス上に滴下して、染色せずに検鏡により偏平化した細胞を調査した。

なお偏平細胞の調査に当たっては、小型や細い細胞では偏平化の有無が確認しにくいいため、大型の細胞を検鏡対象とした。

(5) DGPの添加速度と生存率

陸上植物では、添加時の浸透圧による細胞への傷害とDMSOの希釈熱の放出による温度上昇を最小限にする目的から凍害防御剤を低温で徐々に添加する方法がとられている³⁾。そこで凍害防御剤を添加する速度が糸状体の生存率におよぼす影響を調べるため、DGPを事前に作製して5℃の薬品保冷庫で冷却させ、この濃厚液を糸状体懸濁液に一度に添加する区と時間をかけて滴下する区を設けた。時間をかけて滴下する方法は、50ml容のビーカーに10mlの糸状体懸濁液を入れ、ゴムチューブを付けた20mlメスピペットにDGPを15ml分取し、このゴムチューブをピンチコックで挟み、滴下する速度が毎分0.4ml程度となるように調節した。

生存率の測定は、凍害防御剤を添加後、室温で約5分間放置してから実施した。

3. 緩速冷却による生存率

-85℃の冷凍庫に直接凍結容器を入れると急激な温度降下を生じて、生存率が低下する⁵⁾ことが考えられた。

そこで緩速冷却の効果を調べるため、発泡スチロール製の収容箱を用いて緩速冷却試験を実施し、生存率と冷却速度の関係を調べた。緩速冷却による糸状体の凍結試験は、DGPを添加した糸状体懸濁液を入れた凍結容器を2本作製し、1本は発泡スチロール製の収容箱中に入れてから、他の1本は直接-85℃の冷凍庫に入れて凍結し、6日後に融解して生存率を調べた。

冷却速度を調べるため、図1に示すようにキャップに孔を開けた凍結容器にDGPを5ml入れ、自記温度記録計の測温体をキャップの孔からDGP溶液中に入れ、この容器を発泡スチロール製の収容箱中と対照区として直接冷凍庫に入れ、凍結容器中の降下温度とそれに要した時間を調べ冷却速度を算出した。

結 果

1. 凍害防御剤の処理に関する試験

(1) 凍害防御剤の種類や組み合わせと生存率

表1に凍害防御剤の種類と組み合わせによる試験結果を示した。特にDGPが31.8%と高い生存率を示し、次にDMSO 5% + グルコース10%が22.1%となり、数種の凍害防御剤を組み合わせた試験区が、単一の凍害防御剤で凍結するより生存率が高かった。

対照区の海水だけでは、生存する細胞は認められず、

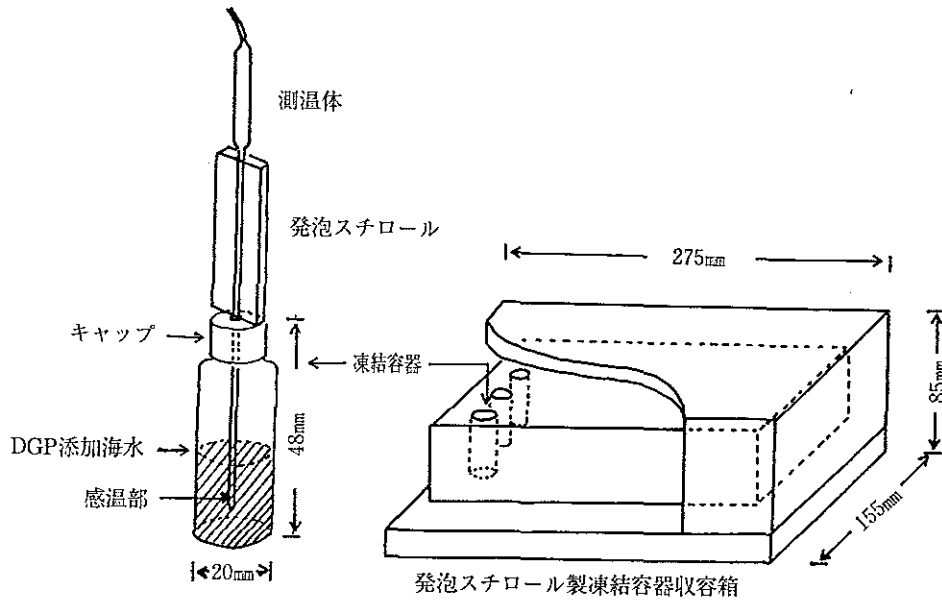


図1 緩速冷却装置

表1 凍害防御剤の種類による効果の試験区および試験結果

試験区	凍害防御剤の添加濃度%と組み合わせ	生存率%
1	DMSO 5 %	1.3
2	DMSO 7 %	4.8
3	DMSO 5 % + グルコース 10 %	22.1
4	DMSO 10 % + グルコース 5 %	17.2
5	DMSO 10 % + グルコース 8 % + PEG 10 %	31.8
6	DMSO 5 % + ショ糖 10 %	15.1
7	DMSO 10 % + ショ糖 5 %	8.0
8	ショ糖 10 %	18.4
9	グルコース 10 %	18.3
10	海水	0.0

その後の培養によっても増殖は認められなかった。

また顕微鏡観察では、生存する細胞は、DMSOを添加した1区と2区では小型の細胞が生存するだけで生存率が5%未満であったが、他の区では図2-1, 2-2に示すように大型の細胞や殻胞子嚢細胞の生存も認められ、生存率も高かった。

(2) 長期間の凍結保存による生存率の変化

図3に凍結期間と生存率の関係を示したが、生存率は各試験区とも凍結期間が長期化するほど低下した。

490日間の凍結期間では、DGPとグルコース10%が生存率10%以上を示した。

DGPを用いた凍結の生存率は、凍結期間が5日間では32%であったが、125日間では21%に低下し、490日間では13%となった。グルコースでは、5日間では18%であったのが125日間では15%、490日間では13%となった。凍害防御剤の種類によって生存率の低下に差が認められ、特にDMSOを凍害防御剤として添加した区が生存率の低下が顕著に現れた。

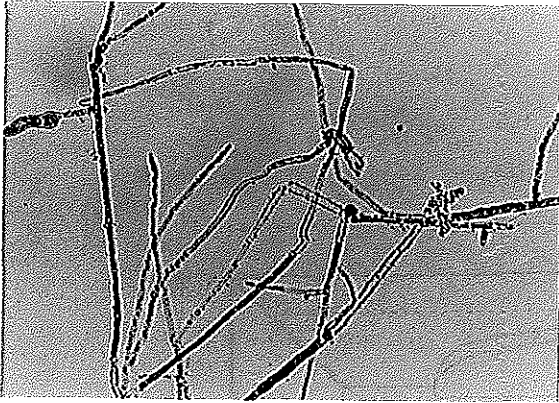


図 2-1 DGPで凍結・融解後の糸状体の生存

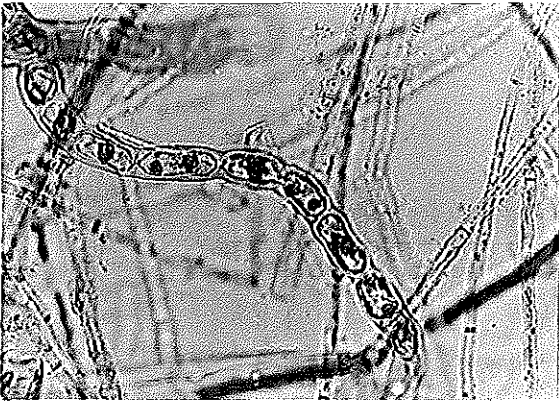


図 2-2 殻胞子囊細胞の生存

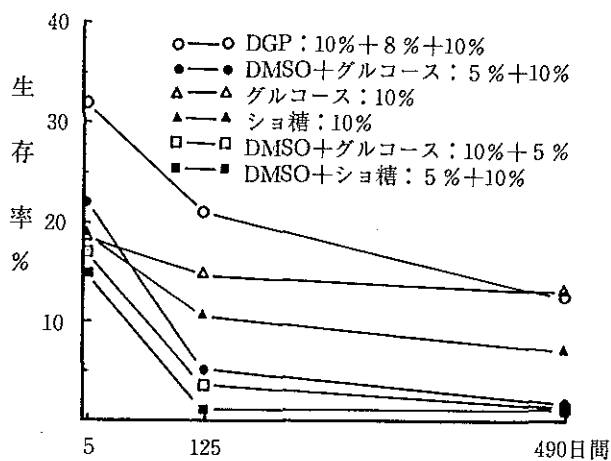


図 3 凍結期間と生存率

(3) DGPの接触時間と生存率

図 4 にDGPを添加した後の、経過時間ごとの生存率の変化を示した。添加直後の生存率は76%を示し、1時間後には62%に、2時間後には47%となり、その後生存率は徐々に低下して5時間後には42%となった。

このことからDGPを添加した後の生存率は、短時間で低下する結果となった。

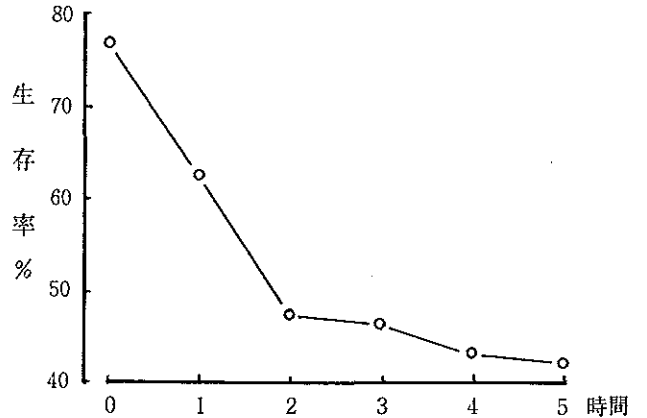


図 4 DGP (10%, 8%, 10%) 添加後の経過時間と生存率

(4) DGPの添加濃度と生存率

図 5 にDGPの添加濃度と、凍結前および凍結後の生存率の関係を示した。

凍結前の生存率は、DGPの添加濃度が高くなるほど低下し、DMSO 9.3% + グルコース 7.4% + PEG 9.3%の濃度までは次第に低下するが、この濃度以上では60~70%を示しほぼ横ばいとなった。

凍結・融解後の生存率は、DMSO 5.3% + グルコース 4.2% + PEG 5.3%までは5%未満と低めを示すが、DMSO 6.7% + グルコース 5.4% + PEG 6.7%から高くなり始め、DMSO 10.7% + グルコース 8.6% + PEG 10.7%が最大値の生存率46%を示し、これ以上の高濃度区では再び低下した。

この結果から、添加濃度が低いと凍結前の生存率は高いが、凍結による生存率の低下が著しく現れた。添加濃度を高くすると凍結前に生存率は低下するが、凍結による生存率の低下が少なくなった。凍結前と凍結後の生存率の差は、添加濃度が低いほど差が大きく、DMSO 10.7% + グルコース 8.6% + PEG 10.7%を添加した区が最も少なく、凍害防御効果が最も高い結果となった。

細胞の偏平化の状態を図6の写真に、またDGPの濃度と偏平細胞の出現率との関係を図7に示した。この偏平化する細胞の出現は、DMSO 6.7%+グルコース5.4%+PEG 6.7%から認められ、添加濃度が高くなるにしたがって増加し、DMSO 13.3%+グルコース10.6%+PEG 13.3%では60%の細胞が偏平化し、凍結前の生存率の変化とはほぼ同様の結果となった。

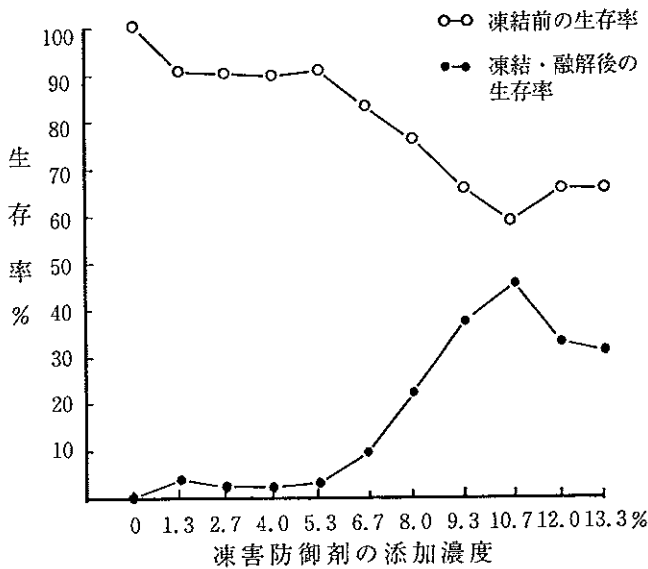


図5 DGP添加濃度の差による生存率の変化
凍害防御剤の添加濃度：D10%+G 8%+P10%の液を糸状体懸濁液に添加した時のDの濃度を示す。

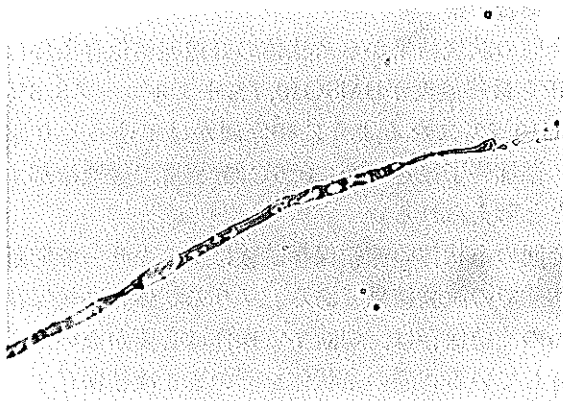


図6 DGP添加による細胞の偏平化

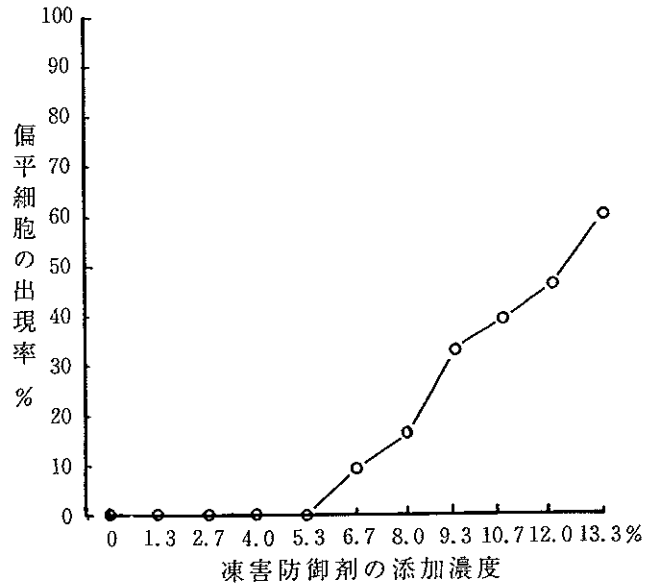


図7 DGPの添加濃度と偏平化した細胞の出現率
凍害防御剤の添加濃度：図5と同様

(5) DGPの添加速度と生存率

糸状体懸濁液にDGPを毎分0.4ml程度の速度で滴下した区は、滴下終了までに約40分間かかり、69%の生存率を示した。一度にDGPを添加した区は、57%の生存率を示した。一度に添加した区と約40分間で添加した区との差は12%であり、時間をかけて滴下することにより、凍結前の生存率が高まる結果となった。

2. 緩速冷却による生存率

緩速冷却による凍結では生存率が41%を示し、対照区では27%となり、緩速冷却による効果が顕著に現れた。

図8に緩速冷却区と対照区の温度降下の状況を示した。0℃から設定温度の-85℃に到達するまでの冷却速度は、緩速冷却では-0.6℃/分となり対照区が-2.4℃/分で、緩速冷却が4倍降下速度が遅い結果となった。なお凍害防御剤の凝固熱と考えられる冷却速度の横ばいが、-12℃で見られた。

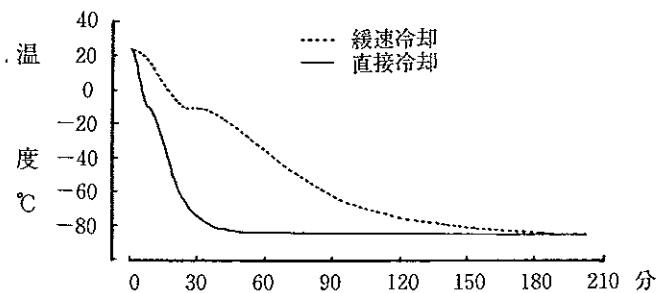


図8 緩速冷却による温度降下

考 察

1. 凍害防御剤の処理に関する試験

凍害防御剤の添加による生存率は、単一の薬剤より数種の薬剤を組み合わせた場合が高く、中でもDGPが最も好適であった。

陸上植物では、DMSO（5～10%）が最も効果が高く、グルコースやグリセリンなどの物質との組み合わせで用いたほうがより効果が現れ、グルコースやポリエチレングリコールは、単独では防御効果がきわめて低いが、DMSOと組み合わせることによって、より効果がみられることが多いとしており、今回の試験結果と一致した。

アマノリ属の糸状体の凍結保存については、右田がアサクサノリのフリーリビング糸状体と貝殻糸状体を使って海水による凍結保存の試験を実施し、フリーリビング糸状体では -20°C で緩速冷却すると98%の生存率であったが、 -40°C ではほとんどの細胞が凍死したと報告している。今回の試験から、凍害防御剤を添加して -85°C で凍結すると生存率が最高で46%を示したことから、凍結保存には凍害防御剤の添加が必須と考えられた。

菅原が、活発に分裂している細胞は小型で液胞化が進んでおらず、細胞質は密で凍結に対して有利と考えられる、と報告している。今回のDMSOを用いた試験結果では小型の細胞だけが生存した点で一致した。

-85°C の凍結保存温度では、保存期間が長期化するほど生存率が低下し、特にDGPでは5日後の生存率が32%であったのが、490日後には13%まで低下し、グルコース10%区と同じ生存率を示した。 -85°C でさらに長期間保存すると、DGPよりグルコース10%区の生存率が高まることが予測される。酒井は、液体窒素を利用した -150°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、今回の試験期間よりさらに長期間の凍結保存を実施するには、凍結初期の生存率が高いDGPを用いて、凍結後に液体窒素により保存する方法の検討が必要と思われる。

DGPの接触時間と生存率の試験結果から、凍害防御剤を設定濃度まで添加した後は、極力短時間で凍結する事が重要と考えられた。このことは、凍害防御剤の添加1時間後では生存率が76%から62%に、2時間後では47%に低下し、凍害防御剤と接触する時間が長くなるほど、高張液によって偏平化する細胞が増加して生存率が低下するためと考えられた。

DGPの添加濃度と生存率では、DMSO10.7%+

ルコース8.6%+PEG10.7%が46%を示し、今回の試験で最も高い生存率となったが、DGPの添加濃度を高めていくと、凍結前にすでに細胞の偏平化が起こり生存率の低下が認められた。反面、凍害防御剤の効果は、細胞の偏平化が起きる濃度以上まで添加しないと凍結後の生存率が低めになる結果であった。

添加速度による生存率は、一度に添加した区と約40分間かけて添加した区との差が12%であった。このことから、一度に添加するより時間をかけて添加する方が生存率は高くなるが、凍害防御剤の添加濃度による生存率低下よりも生存率に与える影響が少ないと考えられた。なお添加時の温度上昇については、DGPを冷却したと添加液量が糸状体懸濁液2 mlに対して3 mlであることから温度上昇の影響はなかったと考える。

2. 緩速冷却による生存率

-0.6°C で緩速冷却した区が、急速に冷却した区に比べて生存率が高かったことから、凍結保存には緩速冷却は重要な手法と考えられた。

緩速冷却については、菅原が陸上植物の培養細胞や組織の凍結保存での最適な冷却速度は、そのほとんどが $0.5\sim 2.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の範囲に入っているとしており、同様の結果であった。

また -12°C 付近で温度降下の横ばいが認められるが、これは凍害防御剤を添加した糸状体懸濁液の凝固熱によると考えられた。 -12°C 付近で凝固すると考えると、緩速凍結する温度の範囲は -85°C までの必要はなく、菅原が陸上植物で予備凍結温度は、 $-30\sim -40^{\circ}\text{C}$ の範囲としているが、同様に -40°C 程度までで良いと考えられる。

3. 総合考察

今回の試験結果から糸状体の好適凍結保存条件は、DGPを最終濃度がDMSO10.7%+グルコース8.6%+PEG10.7%になるように40分間かけてゆっくり添加し、添加終了後速やかに $0.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 程度で緩速冷却することと考えられる。

今回の糸状体の凍結保存試験は、ミキサーで切断した状態での試験結果である。ノリ糸状体の系統保存のための凍結保存は、切断する操作は必要がないため、培養している状態の糸状体をそのまま凍結保存することが可能である。その場合は、切断時の傷害が回避できることから生存率がさらに向上すると思われる。

さらに生存率を向上させるには、陸上植物の凍結保存で実施されている、凍結前の細胞のハードニング、各種凍害防御剤、プログラムフリーザーによる緩速冷

却、液体窒素での長期保存、融解方法等についての検討が必要と思われる。

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、凍害防御剤の種類・長期保存による生存率の変化・添加速度・添加濃度・緩速冷却などの試験を行い、最良の凍結保存の方法について検討した。
- 2) 凍害防御剤は、DMSOとグルコースおよびPEGを組み合わせた区が生存率が高く、最高で46%を示した。
- 3) -85°C で長期間の凍結保存による生存率の変化を調べた結果、保存期間が長くなるほど生存率が低下した。また凍害防御剤の種類によって、生存率の低下に差が生じたが、DGPとグルコースが13%を示し試験した中では生存率が高かった。
- 4) DGPを添加後に静置して、経過時間ごとの生存率を調べると、1時間後には低下が見られ、時間が経過するに従って順次低下した。このことからDGP添加後速やかに凍結することが必要と考えた。
- 5) DGPの適正添加濃度については、凍結前の生存率と凍結後の生存率から、DMSO 10.7%+グルコース8.6%+PEG 10.7%が最良と考えられた。
- 6) DGPを添加していくと設定濃度前に細胞の偏平化が起こり、偏平化した細胞がエリスロシンで染色されることから、凍害防御剤を添加した時点での傷害が生存率を低下させる大きな要因と考えられた。

- 7) 凍害防御剤の添加速度は、一度に添加するより約40分かけて添加した方が、凍結前の生存率が高かった。
- 8) 緩速冷却した結果、冷却速度は $0.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ を示し、生存率は対照区より高めを示したことから、緩速冷却の効果が認められた。
- 9) 凍結保存で最大の生存率を得るにはDMSO 10.7%+グルコース8.6%+PEG 10.7%をゆっくり滴下し、滴下終了後速やかに $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以下の降下速度で -40°C まで緩速凍結を行い、生化学反応がほとんど休止状態となる -150°C 以下で保存する方法が考えられた。

文 献

- 1) 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.
- 2) 吉田静夫 (1987)：凍結保存。酒井 昭編, 朝倉書院, 東京, 30~38.
- 3) 菅原康剛 (1987)：凍結保存。酒井 昭編, 朝倉書院, 東京, 170~175.
- 4) 酒井 昭 (1982)：植物の耐凍性と寒冷適応。学会出版センター, 東京, 152~154.
- 5) 酒井 昭 (1982)：植物の耐凍性と寒冷適応。学会出版センター, 東京, 55~60.
- 6) 右田清治 (1967)：凍結アサクサノリ糸状体の生存と殻胞子放出。長崎大学水産学部研究報告, 22, 34~43.
- 7) 酒井 昭 (1987)：凍結保存。酒井 昭編, 朝倉書院, 東京, 159~165.