

## 藻類の凍結保存

桑野和可

はじめに

藻類を用いて研究を進めようとする場合、研究者は常にその藻類の保存に注意を払い続けなければならない。多くの場合、藻類の保存は成長をやや抑えながら培養しつづける保存培養によって行われている。培養による保存は、特別な設備を必要とせず、操作も簡単で、培養可能なものなら基本的にどんなものでも保存できるため広く普及している。しかし、定期的な植え継ぎや培養液交換が必要とされるため、培養株数の増加や保存期間の長期化に伴ってメンテナンスのための労力確保が大きな問題となる。植え継ぎや培養液交換の際には他の培養株やカビなどを混入させてしまう可能性があり、ミスラベルの危険性も否定できない。また、長期間にわたり人工的な条件下で培養することで、培養株がもともと持っていた性質を失ってしまうという可能性も指摘されている。保存培養で生じるこれらの問題は液体窒素を用いた凍結保存により大幅に軽減できる。液体窒素による凍結保存は最も信頼できる長期保存法の一つで、動物、陸上植物、微生物などの分野ではすでに実用化されている。藻類についても近年取り組み例が増えてきており、実用レベルで凍結保存できるものも出てきた。

液体窒素による凍結保存の特徴

液体窒素の沸点は  $-196$  であり、この温度では細胞内外にあるすべての水が結晶化して氷となっているか、ガラス化した状態になっている。ガラス化とは、分子が規則正しい結晶構造をとらないで固体と同程度の硬さになる現象をいい、ガラス化した珪酸塩は“ガラス”としてよく知られている。液体窒素温度で凍結保存されている細胞が長期間安定なのは、単に温度が低いからではなく、 $-130$  以下になると液体状態の水が消失することによる。これが  $-30$  や  $-80$  の

フリーザーで凍結保存する場合と決定的に異なる点である。 $-30$  や  $-80$  で凍結保存する場合には、わずかではあるが液体状態の水が細胞の内外に残存するため、ゆっくりと生化学反応が進行し、徐々に生残率は低下する。これに対し、液体窒素温度では生残率の低下は実質的に無視しうる程度の速度のため半永久的保存が可能であると考えられている。

細胞は一旦液体窒素温度まで冷却されてしまえば安定であるが、冷却時および解凍時には傷害を受ける。液体窒素による凍結保存法の開発は、冷却時および解凍時の傷害を小さくすることに力が注がれてきた。そして現在最も普及しているのが二段階凍結法と呼ばれる方法である。

二段階凍結法による凍結保存

この方法では、第一段階として細胞懸濁液を毎分  $1$  程度のゆっくりした冷却速度で一旦  $-40$  程度まで緩速冷却し、その後、第二段階として液体窒素温度まで急冷する(図1)。細胞懸濁液をゆっくりと冷却していくと、まず細胞の外で氷ができる。氷ができるためには氷晶の核(氷核)となるものが必要で、この過程での氷晶形成は細胞外にあるほこりやバクテリアなどが氷核となって生じる。細胞内には氷核となりうるものが存在しないため、細胞内の水は凍らず、過冷却状態になっている。細胞外に氷晶が形成されると、細胞内の過冷却水は細胞内外の水の蒸気圧が平衡になるように細胞外に移動して凍る。この過程は温度依存性であるため、温度低下につれて細胞は次第に脱水される。このような凍結脱水をともなう過程で細胞は傷害を受けるが、その詳しいメカニズムについてはまだ十分に明らかにされていない。この過程で受ける細胞の傷害の程度は細胞の持つ耐凍性によって異なる。一般にそのまま液体窒素温度までゆっくりと冷却し続けた場合、細胞は過度に凍結脱水され生

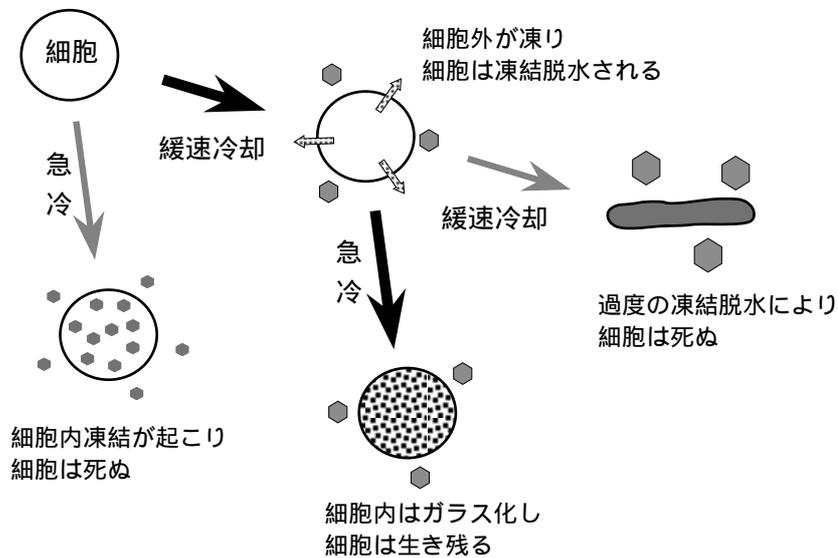


図1 冷却速度による水の挙動の違い

残ることができない。

一方、緩速冷却のステップなしに室温から液体窒素温度まで急冷すると、細胞内の水は細胞外に移動する時間がないため細胞内に留まったまま氷となる。この場合、氷核となるのは温度低下に伴い自発的に形成される水分子自身のクラスターである。細胞内に氷晶が形成されると、その成長に伴い細胞は致命的な傷害を受け、生き残ることができない。しかし、氷晶の成長は高分子化合物の高濃度溶液中では抑制される。適度に凍結脱水された細胞は、細胞内がさまざまな物質の高濃度水溶液となっているため、液体窒素温度まで急冷しても氷晶の成長が抑制され、細胞内はガラス化し、細胞は生存することができる。二段階凍結法は、緩速冷却の際に生じる過度の凍結脱水を避けながら同時に急冷による細胞内凍結も避ける方法なのである。

#### 冷却および保存条件

二段階凍結法では、緩速冷却の最終到達温度が非常に重要である。最終到達温度が低すぎれば、細胞は過度に凍結脱水されることになり、緩速冷却時の傷害が不必要に大きくなる。一方、最終到達温度が高すぎれば、細胞の凍結脱水が不十分になり、急冷時に細胞内凍結を起こし、細胞

は致命的な傷害を受けてしまう。特に、最終到達温度が最適温度から高温側へずれると、そのずれ幅がたとえわずかでも著しい生残率低下を引き起こす傾向があるので注意が必要である。最適な最終到達温度は細胞の種類によって異なる可能性があるが、藻類に関してはまだ検討例は少ない。これまでの研究では、 $-40^{\circ}\text{C}$  に設定した場合に高い生残率が得られることが多い。

最終到達温度に至るまでの冷却速度も生残率に影響する。冷却速度が大きすぎると、細胞内の過冷却水が細胞膜を透過して細胞外へ出る十分な時間がないために細胞内凍結を起こしてしまう。一方、冷却速度が遅すぎると、細胞は長時間ストレスを受けることになり、この場合にも生残率は低下する。しかし、冷却時間が5～6時間延長されても、生残率はほとんど低下しなかったという報告もあり、数時間程度の冷却時間の延長による影響は比較的小さい。プログラムフリーザーを使って正確に冷却速度を制御できる場合には毎分0.5～1の冷却速度に設定されることが多い。プログラムフリーザーを使わなくても発泡スチロール製の箱を用いて冷却速度を低くすることで緩速冷却することも可能である。

緩速冷却が終了したら直ちにサンプルの入っ

ている凍結保存用バイアルを液体窒素中に浸し、急冷する。この時、バイアルが浮いてしまうと、冷却速度にムラがでてしまうので、バイアル全体が液体窒素中に浸るようにする。アルミニウム製のバイアルホルダーにバイアルを固定してから液体窒素中に浸せば、バイアルが浮くのを防ぐことができる。ただし、サンプルの温度上昇を防ぐため、この操作は特に手早く行う必要がある。

液体窒素温度まで急冷した後、サンプルは保存用液体窒素容器で長期保存する。この際、サンプルは液体窒素中に浸っている必要はないが、細胞内でガラス化している水が再結晶することがないように常に  $-150$  以下に保っておかなければならない。

#### 凍害防御剤

緩速冷却の際、最終到達温度、つまり  $-40$  程度の温度まで細胞を生かしておけるかどうか凍結保存の成否を分ける。特別に耐凍性の高い細胞でない限り、培養液中の細胞を  $-40$  付近まで生かしておくことはできない。そこで、ジメチルスルフォキシド(DMSO)をはじめとする凍害防御剤が使われる。DMSO は最も代表的な凍害防御剤で、動物や陸上植物の細胞をはじめ、さまざまな細胞の凍結保存に使われている。しかし、DMSO は万能ではなく、DMSO が有効でない場合には別の凍害防御剤を試さなければならない。DMSO 以外に、グリセロール、エチレングリコール、プロリン、サッカロース、ソルビトール、ポリビニルピロリドン、デキストランなどが凍害防御剤として使われている。凍害防御剤がどのような機構で細胞を凍害から守るかということについてはまだ明らかになっていない。実際、凍害防御剤の効果は細胞の種類によって変わり、ある細胞で有効だった凍害防御剤が他の細胞にも有効であるとは限らない。そのため、対象とする細胞ごとに適切な凍害防御剤の種類と濃度を検討しなければならない。凍害防御剤は単独で用いられる場合もあるが、複数の凍害防御剤を組み合わせることにより、生残率が改善される場合がある。藻類の凍結保存に使われてきた凍害防御剤については Taylor and

Fletcher (1999) や Kuwano and Saga (2000) に詳しく記載されている。

凍害防御剤の添加は、細胞に対する凍害防御剤の毒性をできるだけ低く抑え、また添加時のショックを小さくするため、アイスバス中で冷却しながらゆっくりと(通常約 15 分かけて)行われる。その後、細胞外の液と細胞内を平衡させるため、45 分 ~ 1 時間ほどアイスバス中に保持し、それから緩速冷却する。

#### 解凍および凍害防御剤の除去

二段階凍結法で凍結した細胞には内部にガラス化した水が含まれている。ゆっくり解凍した場合には、このガラス化した水が脱ガラス化し、細胞内で再結晶することによって細胞に致命的傷害をあたえる。これを防ぐため、サンプルは急速に解凍しなければならない。通常、30 ~ 40 のウォーターバスの中で解凍する。

解凍した細胞懸濁液には高濃度の凍害防御剤が含まれており、培養するためには凍害防御剤を取り除かなければならない。通常、培養液で希釈することによって凍害防御剤を取り除く。急激な浸透圧変化を避けたため、希釈はゆっくりと行うのが一般的である。

#### 生残率の評価

解凍後、サンプルの一部を用いて生残率を測定する。生残率の評価は細胞増殖に基づいて行われるのが理想的であるが、簡便で迅速な評価法として細胞染色による生死判別も広く行われている。ニュートラルレッド、エリスロシン、FDA (fluorescein diacetate) などが染色剤として使われる。ただし、細胞染色による生死判別は細胞分裂能を直接評価する評価法ではないため、解凍したサンプルが増殖するかどうか実際に培養して確かめる必要がある。

#### おわりに

生物学の爆発的な発展は、研究分野の多様化とともに、研究対象となる生物の多様化ももたらしている。さまざまな研究に藻類が使われており、今後、藻類の果たすべき役割はますます大きくなっていくものと思われる。こうした中、

藻類のカルチャーコレクションに対する期待は大きい。カルチャーコレクションは研究の発展を支える土台であり、研究の効率化と継続性を保障する。凍結保存技術はこうしたカルチャーコレクションの整備に大きく貢献できるはずである。使いたいときに使いたい藻類がすぐに入手できる、そんな状況が実現するためにも、さまざまな藻類で凍結保存が試みられることが期待される。

#### 文献

- Kuwano, K. and Saga, N. 2000. Cryopreservation of marine algae: Applications in biotechnology. p. 23-40. In: M. Fingerman and R. Nagabhusanam (eds.) Recent Advances in Marine Biotechnology. Volume 4: Aquaculture. Part A, Seaweeds and Invertebrates. Science Publishers Inc., New Hampshire.
- Taylor, R. and Fletcher, R.L. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae - a review of methodologies. J. Appl. Phycol. 10: 481-501.

(長崎大学大学院生産科学研究科)