



Title	L 細胞の凍結乾燥
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 藤永, 蕙 他
Citation	低温科学. 生物篇, 19, 117-126
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17657
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p117-126.pdf



L 細胞の凍結乾燥*

根井外喜男

(低温科学研究所 医学部門)

藤永蕙

(医学部 細菌学教室)

(昭和36年7月受理)

精子の凍結保存にグリセリン添加の有効なことが唱えられてから (Polge 等¹⁾, 1949), 種々の細胞の長期保存にこの方法が広く用いられるようになった。腫瘍細胞もまたその例にもれず、実験的並びに実用的な立場から行なわれたグリセリン又は糖加凍結保存の報告は枚挙に遑ないほど多数にある。

しかし腫瘍細胞の凍結乾燥については、凡そ10年ほど以前に一しきり論議をわかつた程度で、近年余り詳細な報告には接しない。即ち、Gye 及び Mann 等^{2),3),4)} (1949), Warne 等^{5),6)} Passey and Dmochowski^{7),8)} (1950), Dmochowski and Millard⁹⁾ (1950), Hirschberg and Rusch¹⁰⁾ (1950) などはいずれもマウスの腫瘍細胞を凍結乾燥し動物に接種して細胞の増殖をみとめたという。当時供試試料がウイルス性の腫瘍細胞であることから、凍結乾燥に対するウイルス並びに細胞の抵抗性に関する問題で議論があった。

我々は、マウスの皮下組織細胞に由来するが分離以来既に多年に亘って試験管内での培養継代が重ねられたL細胞を用いて、凍結乾燥を試みたので、その成績を報告する。

I. 実験方法

1. 使用材料

細菌学教室保存のL細胞を0.5%ラクトアルブミン、10%犢血清加Earle氏緩衝液(以下Earle液と略称)に凡そ1週間培養し、トリプシンで処理して(最終濃度0.01%),細胞濃度90~500万/mlになるようEarle液に再浮遊し実験に用いた。この再浮遊したものに、更にPVP、グリセリン、ブドウ糖、グルタミン酸ソーダ等を媒質として加えたものも使用した。

2. 乾燥方法

乾燥装置は低温科学研究所に於いて常時使用している放射状多岐管式乾燥機で、中央に液体窒素で冷却する凝縮器があり、油廻転真空ポンプは排気量100 L/min、到達真空度 2×10^{-3} mmHgのものを用いた。乾燥容器は内容積凡そ50 ccのすり合わせガラス製のものである。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第594号

試料の量、容器、凍結方法、乾燥方法等については、いずれもいろいろな条件を組合せて実施したから、実験成績の項で個々の例を述べることにして、ここでは概括して、大まかなねらいだけを記載しておく。

1) 自動凍結：ガーゼ、濾紙等に少量(0.05~0.1 ml)の試料を浸みこませ、液状のままに急激に減圧すると蒸発の潜熱によって自動的に試料は凍結するので、引続き乾燥に移る。

2) 急速凍結：2種の方法を行なった、1つはガーゼに浸みこませたものを液体窒素中に投入して急速に凍結させ、引続き通常の凍結乾燥を行なうもの。他は径約2 cmの小さなシャーレを予め液体窒素で冷却しておき、それに試料を滴下して急速に凍結させ、そのまま乾燥に移るものである。

3) 緩慢凍結：小シャーレに0.2 ccの試料を入れ、 -20°C まで $1\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度で緩慢に凍結させ、乾燥を行なうものである。

乾燥後の再生には、Earle 原液或いは PVP (poly vinyl pyrrolidone)、グリセリン、ブドウ糖等を加えた Earle 液を用いた。

対照として行なった凍結融解実験では、融解はすべて 37°C にあたためた Earle 液を加えて行なった(急速融解)。

3. 結果判定

1) Trypan blue 染色による生細胞数の算定：

2% Trypan blue 保存液を使用時4倍にうすめて、試料2に対し1の割合に加え、直ちに Fuchs-Rosenthal の計算盤を用いて顕微鏡下で生死の細胞数を算えた。Trypan blue で多少染まっているものはすべて死細胞とした。算定には凡そ100乃至200の細胞をかぞえ、そのうちの生細胞の百分率を以て表わし、同一例でこの算定を3度くりかえして平均値を示した。

2) 培養試験：

処理された試料(多くの場合0.5 ml又は1 ml)に、細胞数が30万/mlくらいになるよう Earle 液を加えて、試験管内で培養し(37°C)、細胞のガラス壁への定着及び増殖の状態を3週間に亘って観察した。

II. 実験成績

L細胞の凍結乾燥の成否を確かめることを先決問題としたので、細かな基礎的吟味は後廻しとして、従来の他の細胞についての経験上、比較的良好と思われる幾つかの因子を組合せて実験を行なってみた。いずれも全くの試みの程度であって、各条件での例数はひじょうに少ないが、大体の傾向はつかめたと思われるので、その結果をまとめて、予報的に報告することにした。従って実験方針に多少不統一のきらいはあるが、実験を試みた順序に従ってデータを記載する。なお試料中の細胞数は多いほど好結果が期待できるであろうと考え、実験を進めるに従い次第に高濃度にしてみた。

実験 I (24/I, '61) 試料中細胞数; 90 万/ml

試料 (量, 容器)	凍 結 融 解		Trypan blue 染色による 生 細 胞	培 養		
	凍	結		融 解	定着	増殖
無処理対照			% % 79.2 (100)	+	+	
1) 0.1 ml, ガーゼ	超急速凍結, -196°C, 1分		37°C Earle 液で 急速融解 "	2.7 (3.4)	-	-
2) 0.2 ml, 皿	緩慢凍結 (1°C/min) -20°C → -196°C, 1分			15.8 (20.0)	+	-

試料 (量, 容器)	凍 結 乾 燥			Trypan blue 染色による 生 細 胞	培 養	
	凍	結	乾 燥 復 水		定着	増殖
1) 0.1 ml, ガーゼ	減圧自動凍結		7 秒 Earle 液	0	-	-
2) " "	超急速凍結, -196°C, 1分		10 分 "	0	-	-
3) 0.2 ml, 皿	急速凍結, -196°C, 1分		1時間 Earle 液	0	-	-
4) " "	緩慢凍結 (1°C/min) -20°C → -196°C, 1分		" "	0	-	-

実験 II (27/I, '61) 試料中細胞数; 160 万/ml

試料 (量, 容器)	凍 結 融 解		Trypan blue 染色による 生 細 胞	培 養		
	凍	結		融 解	定着	増殖
無処理対照			% % 95.1 (100)	+	+	
1) 0.2 ml, 試験管	緩慢凍結 (1°C/min) -10°C, 30分		4 倍量 37°C Earle 液	84.6 (89.0)	+	+
2) " "	" -20°C, 30分			81.0 (85.2)	+	-
3) " "	" -30°C, 30分			81.7 (85.9)	+	-
4) 0.2 ml, 試験管	緩慢凍結 (1°C/min) -10°C 直後 → -196°C, 1分		4 倍量 37°C Earle 液	14.8 (15.6)	+	-
5) " "	" -20°C 直後 → -196°C, 1分			84.5 (88.8)	+	-
6) " "	" -30°C 直後 → -196°C, 1分			33.8 (35.5)	+	-
7) 0.2 ml, 試験管	急速凍結, -196°C, 1分		4 倍量 37°C Earle 液	8.0 (8.4)	+	-

凍 結 乾 燥 過 程 (凍結中)			Trypan blue 染色による 生 細 胞	培 養		
試料 (量, 容器)	凍 結 乾 燥	復 水		定着	増殖	
1) 0.1 ml, ガーゼ	減圧自動凍結, 直後		4 倍量 37°C Earle 液	% % 70.2 (73.8)	+	-
2) " "	減圧自動凍結, 25 秒後			17.6 (18.5)	+	-

実験 III (8/II, '61) 試料中細胞数; 200 万/ml

試料 (量, 容器)	凍 結 乾 燥			Trypan blue 染色による 生 細 胞	培 養	
	凍 結	乾 燥	復 水		定着	増殖
無 処 理 対 照				90.0 (100)	+++	+++
1) 0.2 ml, 皿	緩慢凍結, -30°C, 30 分	室温 2 時間	10%グリセリン加 Tris-buffer	0 (0)	±	-
2) " "	" "	" "	10% PVP 加 Tris-buffer	75.2 [△] (82.7)	±	-
3) 0.1 ml, ガーゼ	減圧自動凍結	室温 10 分	2.5% PVP 加 Earle 液	70.3 [×] (77.4)	±	-
4) 10% PVP 加試料 0.1 ml, 濾紙上○	減圧自動凍結	室温 5 分	2.5% PVP 加 Earle 液	0 (0)	±	-
5) " "	" "	" 8 分	" "	68.5 [×] (75.3)	干	-
6) 10% PVP 加試料 0.1 ml, ガーゼ	" "	" 10 分	" "	55.8 [×] (61.5)	±	-
7) " "	" "	" 15 分	" "	71.5 [×] (78.7)	±	-
8) 0.1 ml, ガーゼ	減圧自動凍結	室温 10 分	10%グリセリン加 Earle 液	3.8 (4.2)	干	-
9) " "	" "	" 20 分	" "	3.7 (4.1)	干	-
10) 10%グリセリン加 試料 0.1 ml, ガーゼ	減圧自動凍結	室温 10 分	10%グリセリン加 Earle 液	2.0 (2.2)	±	-
11) " "	" "	" 20 分	" "	0 (0)	±	-
12) " "	" "	" 30 分	" "	11.9 (13.1)	±	-
13) 0.1 ml, ガーゼ	急速凍結, -196°C, 1 分	室温 20 分	10%グリセリン加 Earle 液	2.7 (2.8)	+	-
14) " "	" "	" 60 分	" "	0 (0)	±	-
15) 0.1 ml, ガーゼ	急速凍結, -196°C, 1 分	室温 30 分	10% PVP 加 Earle 液	24.1 [×] (26.5)	干	-
16) " "	" "	" 60 分	" "	8.7 [△] (9.6)	干	-

この時に用いた PVP は米国製

○; 4)と5)に用いた PVP 液は酸性であった。

×; 生細胞に数えたもので, Trypan blue で染まらないが, 正常細胞とは形態的にやや異なり, 正円で凹凸がない。

△; 死細胞に数えたが, Trypan blue の染り方のうすいものがあつた。

実験 IV (22/II, '61) 試料中細胞数; 500万/ml

試料 (量, 容器)	凍 結 乾 燥			Trypan blue 染色による 生細胞	培 養	
	凍 結	乾 燥	復 水		定着	増殖
無処理対照				91.4 (100)	##	##
1) 0.2 ml, 皿	緩慢凍結 (1~2°C/min) -20°C	室温 1 時間	Earle 液	0 (0)	±	—
2) " "	"	"	"	0 (0)	±	—
3) " "	"	"	2% PVP-Earle 液	100 (109.5)	干	—
4) " "	"	"	"	98.9 (108.0)	干	—
5) 2% PVP 加試料 0.2 ml	緩慢凍結 (1~2°C/min) -20°C	室温 1 時間	Earle 液	0 (0)	±	—
6) " "	"	"	"	0 (0)	干	—
7) " "	"	"	2% PVP-Earle 液	99.2 (108.2)	干	—
8) " "	"	"	"	98.2 (108.0)	干	—
9) 5% ブドウ糖加試料 0.2 ml	緩慢凍結 (1~2°C/min) -20°C	室温 1 時間	Earle 液	2.5 (2.7)	干	—
10) " "	"	"	"	12.7 (13.9)	干	—
11) " "	"	"	5% ブドウ糖- Earle 液	0.3 (0.3)	干	—
12) " "	"	"	"	0.6 (0.7)	干	—
13) " "	"	"	2% PVP-Earle 液	99.0 ^x (108.0)	干	—
14) " "	"	"	"	99.0 ^x (108.0)	干	—
15) " "	"	"	10% PVP-Earle 液	3.7 [△] (4.1)	干	—
16) 1% グルタミン酸 加試料 0.2 ml	緩慢凍結 (1~2°C/min) -20°C	室温 1 時間	Earle 液	0.8 (0.9)	±	—
17) " "	"	"	"	0.8 (0.9)	±	—
18) " "	"	"	2% PVP-Earle 液	98.8 (108.0)	干	—
19) " "	"	"	10% PVP-Earle 液	86.5 (94.5)	干	—
20) 2% PVP 加 Earle 試料				88.3 (96.6)	##	##
21) 5% ブドウ糖加 Earle 試料				77.2 (84.4)	++	+

×; 生細胞に数えたもので, Trypan blue で染まらないが, 正常細胞とは形態的にやや異なり, 正円で凹凸がない。

△; 死細胞に数えたが, Trypan blue の染り方のうすいものがあった。

実験 V (15/III, '61) 試料中細胞数; 500万/ml

凍 結 融 解				Trypan blue 染色による 生細胞	培 養	
試料 (量, 容器)	凍 結	融 解	定着		増殖	
無 処 理 対 照				80.6%	##	##
1) 0.2 ml, 試験管	緩慢凍結, -20°C, 1時間	37°C Earle 液にて融解		33.4	##	干
2) 10%グリセリン加 試料 0.2 ml, 試験管	"	"		79.4	##	##
凍 結 乾 燥				Trypan blue 染色による 生細胞	培 養	
試料 (量, 容器)	凍 結	乾 燥	復 水		定着	増殖
1) 0.2 ml, 皿	緩慢凍結, -20°C	1.5時間	2% PVP-Earle 液	0%	干	—
2) " "	"	"	"	0	干	—
3) " "	"	"	2% PVP-Earle 液 遠心後 Earle 液お きかえ	0	+	—
4) " "	"	"	"	0	+	—
5) 2% PVP 加試料 0.2 ml, 皿	緩慢凍結, -20°C	1.5時間	2% PVP-Earle 液	0	干	—
6) " "	"	"	"	7.7	干	—
7) " "	"	"	2% PVP-Earle 液 遠心後 Earle 液お きかえ	2.7	+	—
8) " "	"	"	"	17.0	+	—

以上の成績を各実験条件でそれぞれとりまとめて整理してみると、次のようなことになる。

1. 凍結融解

1) 急速凍結

(i) ガーゼに 0.1 ml 浸みこませて減圧自働凍結させ、その直後に融解したものでは、生細胞がかなりみられるもの (74%)、又は 0 のものがあり、前者で細胞の定着はあったが、増殖はみとめられなかった。(ii) -196°C の液体窒素に直接投入した後融解したものでは、3~8% の生細胞数があり、定着もあったが増殖はなかった。

2) 緩慢凍結

小シャーレ又は試験管に 0.2 ml の試料をとり、1°C/min くらいの冷却速度で緩慢に凍結すると、-10°, -20°, -30°C でいずれも 80% 台の生細胞及び培養での定着をみ、中には僅かながら増殖するものもあった。-20°C まで凍結した後急速に -196°C まで冷却してもかなり高率に生細胞をみとめた。グリセリンを加えた試料では、もちろん -20°C で高率の生細胞、培養での定着、増殖をみとめた。

要するに、グリセリンを加えなくても、Earle 液に浮遊させたままの細胞は、-20°C くら

い(凍結乾燥の過程では試料は大体この程度の温度に保持される)までの緩慢冷却に堪えて僅かながら増殖可能であることがわかった。

2. 凍結乾燥

1) 乾燥媒液

試料に予めPVP, ブドウ糖, グルタミン酸ソーダを加えて乾燥しても特に好結果は得られなかった。

2) 凍結条件

ガーゼでもシャーレでも -196°C まで急速凍結して乾燥したものよりは, ガーゼでの自動凍結或いはシャーレでの -20°C までの緩慢凍結後乾燥したものの方が成績がよいようであった。特にシャーレに入れて緩慢凍結を行なうことは, 量を多く扱える上に, 一定した操作が実施できるので, 実験IVとVはすべてこの凍結条件によった。

3) 乾燥条件

すべて室温で行なったので温度による影響はわからない。乾燥に要する時間は試料の量或は凍結の仕方によっても異なる。乾燥時間が長くなるほど生細胞数が減少するというほどのはっきりした傾向もつかめなかった。

4) 復水条件

Earle液, グリセリン加 Earle液, ブドウ糖加 Earle液を乾燥試料に加えて復水させたものはいずれも同程度で結果は良くなかったが, PVP単独又はPVP加 Earle液で復水したものは, かなり高率の生細胞がみとめられた。しかしその形態的所見は正常生細胞とやや異なっており, また培養で増殖をみたものは1例もなかった。

要するに凍結乾燥では, 予備凍結は -20°C までの緩慢凍結とし, 乾燥後の復水にPVPを用いたものが, 比較的結果が良いように思われた。

III. 考 察

従来, 多くの生細胞の凍結融解にあたっては, 緩慢凍結(緩慢といっても限度があつてあまり遅すぎてもいけない)で急速融解を行なうのが, 細胞障害を少なくする条件であるとされている。

ところが細胞の凍結乾燥では, この凍結の条件が必ずしも重要視されず, 比較的無雑作に扱われている場合が多い。これは従来凍結乾燥が可能な試料は, ウイルスとか細菌のように外部の諸条件に対してかなり抵抗の強いものであつて, 凍結条件での冷却速度の差など, それほど大きく影響しなかったからかもしれない。しかし抵抗が弱くて障害を受け易い細胞になるほど, そういった点までもよく吟味して実験を行なう必要がある。

本実験でも用いた減圧自動凍結乾燥法は, Meryman¹¹⁾が精子の凍結乾燥に使つて成功したと称する方法であつて, その冷却速度は $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ くらいになるが, 直接液体窒素中に投入して超急速凍結を行なったものよりはやや遅く, 到達温度もせいぜい $-20^{\circ}\text{C}\sim-25^{\circ}\text{C}$ である。根

井は他の共同研究者と共に本法を用いて、角膜の凍結乾燥¹²⁾には成功したが、血球¹³⁾に於いても精子¹⁴⁾に於いてもいずれも失敗に帰した。ただこの減圧自働凍結乾燥法は、凍結の始まる前に蒸発によって或る程度脱水され(我々の測定によれば、全脱水量の約20%)、そこで始めて凍結が起るという特殊な条件が、或いは何らかの好影響を与えるのではないかと想像されたが、凍結後あまり乾燥の進行しないうちに融解してみると、既にかかなりの障害をうけていることからみても、それほど期待はかけられないかもしれぬ。

冷却速度の比較では、急速冷却(500°C/min以上と推定される)にくらべて緩慢冷却(1~2°C/min)のものは一般に好成績を示すようで、このような傾向は他の多くの細胞と同様であるといつてさしつかえないであろう。

乾燥過程の条件としては、今回は何等特別な吟味を行なわなかったので、ふれないでおく。

媒質の問題については、最初の出発材料に添加した場合と、復水の際の溶液に加えた場合といろいろ工夫してみたが、その結果は、PVP、ブドウ糖、グルタミン酸ソーダ等を試料に加えて乾燥しても、加えないものと殆んど差はなかった。むしろ復水液に加えた場合を検討してみると、殆んど例外なくPVPだけが有効なように見うけられた。

ただ問題は、このPVPを復水液に用いた場合の細胞所見で、Trypan blue染色で染まらず一応生細胞としてかぞえてはおいたが、正常細胞とは形態的にやや異なることである。染色性からはかなり高率に生細胞をみとめたとはいうものの、培養の結果乾燥試料からは1例も細胞の増殖をみとめなかったことから、これらの細胞はやはり正常状態にはなく、何らかの障害をうけているものではないかと想像される。そこで念の為、もう1度PVPの添加がTrypan blueの染色性にどのような影響を与えるかを検討してみた。

試料はTrypsin処理後1日放置して死細胞を多くしたもので、Trypan blueでの染色では生細胞が67.9%となっているものを用い、これにPVPを2%になるように加えて染色してみたところ、染まらない細胞の割合がふえて、生細胞が98.1%ということになった。但しこの場合、PVPを加えてから1日おいても、細胞の形態的所見は変わらなかった。

この結果からみると、PVPの存在が細胞を染まりにくくして、みかけ上生細胞が多くなったように思われるが、実験IVの乾燥媒質にPVPを加えてEarle液だけで復水したものでは生細胞がないこと、対照のPVPを加えただけのもので生細胞数が増していないこと、更に実験VでPVPで復水後Earle液におきかえたものでかえって生細胞が多いことなどからみれば、PVPによる染色性の変化とはばかりもいえないように思う。この点に関してはもう少し検討してみなければならない。

培養で細胞の増殖することを期待するためには、ある程度以上の数の生細胞を植えることが必要で、特に多少でも増殖障害がおきていると予想されるものでは、なるべく細胞数を多くして増殖の可能性を大きくした方がよいと考え、細胞数を90万/mlから最後には500万/mlまで増して使ってみたが、その差はみとめられなかった。

IV. 結 論

試験管内で培養されたL細胞の凍結乾燥を試み、乾燥媒質、凍結条件、乾燥条件、復水媒液等を種々検討した結果、比較的良い成績と思われたのは緩慢凍結後乾燥しPVP加Earle液で復水再生したものであるが、それもTrypan blueでの染色で生細胞とみなされる細胞がかなり高率にみられた程度で、培養の結果は細胞の増殖が全然みとめられなかった。

文 献

- 1) Polge, C., Smith, A. U. and Parkes, A. S. 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, **164**, 666.
- 2) Gye, W. E., Begg, A. M., Mann, I. and Craigie, J. 1949 The survival of activity of mouse sarcoma tissue after freezing and drying. *Brit. J. Cancer*, **3**, 255-267.
- 3) Gye, W. E. 1949 The propagation of mouse tumours by means of dried tissue. *Brit. Med. J.*, **i**, 511-515.
- 4) Mann, I. and Dunn, W. J. 1949 Propagation of mouse carcinoma by dried tissue. *Brit. Med. J.*, **ii**, 255-257.
- 5) Warner, P. T. J. C. P. and Gostling J. V. T. 1950 *Brit. J. Cancer*, **4**, 380-395.
- 6) Warner P. T. J. C. P., Gostling, J. V. T. and Thackray, A. C. 1950 The rate of grafts of sarcoma 37 mince after exposure to low temperature and freeze-drying. *Brit. J. Cancer*, **4**, 396-404.
- 7) Passey, R. D. and Dmochowski, L. 1950 Freezing and desiccation of mouse tumors. *Brit. Med. J.*, **ii**, 1129-1134.
- 8) Passey, R. D., Dmochowski, L., Lasnitzki, I. and Millard, A. 1950 Cultivation in vitro of frozen and desiccated mouse tumour tissues. *Brit. Med. J.*, **ii**, 1134-1136.
- 9) Dmochowski, L. and Millard, A. 1950 Cellular transmission of mouse sarcomata with frozen-dried tumour tissues. *Brit. Med. J.*, **ii**, 1136-1137.
- 10) Hirschberg, E. and Rusch, H. P. 1950 Comments on recent experiments with frozen and dried tissue as evidence for the virus etiology of tumors. *Cancer Res.*, **10**, 335-337.
- 11) Meryman, H. T. and Kafig, E. 1959 Survival of spermatozoa following drying. *Nature*, **184**, 470-471.
- 12) 根井外喜男・竹内光彦 1961 角膜の凍結乾燥. *低温科学, 生物篇*, **19**, 95-105.
- 13) 根井外喜男 未発表.
- 14) 根井外喜男・永瀬 弘 1961 牛精子の凍結乾燥. *低温科学, 生物篇*, **19**, 107-115.

Résumé

L cells, derived from mouse subcutaneous tissue and cultured successively in vitro for many years, were used as experimental materials for freeze-drying. One week cultured cells were suspended in Earle's balanced solution, to which lacto-albumin and calf serum had been added, after digestion with trypsin and the prepartate was freeze-dried.

As a result of examining drying media such as PVP, glucose, glutamic acid and glycerol, freezing conditions and reconstituting media same as drying media, the utilization of a slow rate of cooling as a preliminary freezing procedure and PVP as a reconstituting

medium seemed to be rather useful, but successful results could not be obtained.

The cells, freeze-dried and reconstituted with PVP, were slightly different from normal cells in morphological appearance, while they were non-stainable with trypan blue. Cell growth in subculture could not be found in any case of freeze-drying using several media as noted above.