



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	HeLa 細胞の凍結様式と融解後の生死
Author(s)	島田, 公夫; SHIMADA, Kimio; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 21-26
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17765
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p21-26.pdf



HeLa 細胞の凍結様式と融解後の生死*

島田 公夫・朝比奈英三

(低温科学研究所)

(昭和 45 年 8 月受理)

I. 緒 言

哺乳動物細胞の凍結保存については、すでに、数多くの報告があるが、その凍結過程を観察した例は、きわめて少ない。

数少ない観察のなかで、著名なものは、Smith らのウサギの網膜上皮とハムスターの精巣組織を使った実験である¹⁾。彼女らは、おもに、グリセリンの凍害保護効果を知る目的で、これらの細胞の凍結過程と、融解後の形態的变化を、顕微鏡で観察し、グリセリンで処理された細胞では、凍結融解後、形態学的変化を示さないことを報告した。

HeLa 細胞は、人の上皮組織由来の培養細胞としてよく知られ、その凍結保存に関しても Scherer と Hoogasian²⁾ によって発表されて以来、多くの報告があるが、われわれの知る限りでは、その凍結過程の観察はまだなかった。そこで、HeLa 細胞をガラス面上に単層培養すれば、凍結融解後も、細胞は最初の位置を変えないことを利用して、冷却速度のちがいによっておこるいろいろな凍結様式を観察し、その融解後における細胞の生死を調べてみた。

前報^{3,4)}では、MTK 肉腫-III と呼ばれるシロネズミの腹水腫瘍細胞を使って、この凍結様式と融解後の生死の関係を調べ、細胞外凍結をおこした細胞³⁾と、細胞内凍結をおこした細胞⁴⁾でも、細胞内の氷晶が、顕微鏡では見えない程小さく、いわゆる半透明な凍り方をしている細胞⁴⁾は、融解後、生存することを報告した。しかし、腫瘍細胞の生死を、凍結融解後の細胞がネズミの腹腔内で増殖するかどうかによって決めたので、細胞外凍結、あるいは細胞内凍結をおこした個々の細胞の融解後の、形態的变化や生死を、一貫して追うことができなかった。

この実験では、HeLa 細胞がガラス面に付着するのを利用して、同一視野内の細胞の凍結前—凍結中—融解後—培養後の形態を顕微鏡で追い、個々の細胞の凍結様式と融解後の生死を直接結びつけることができた。

なお、今回の実験に際し、材料の HeLa 細胞を提供して下さった本学理学部附属染色体研究施設の高木信夫博士に深く感謝する。

II. 材料と方法

材 料： HeLa 細胞株のクローン系である HeLa-S 3 (Puck) 細胞を使用した。この細胞は、

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1112 号

1969年10月に染色体研究施設の株より分離して以来、当実験室で継代培養を続けている。培養液には、20% 仔牛血清を含む TC-199 培養液 (千葉県血清研究所) を使い、10 ml の TD-フラスコによる単層培養法で、培養している。なお、培養液には、100 単位/ml のペニシリンと、100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンが含まれている。

実験材料の作製： 実験には、カバーグラス上に単層培養された HeLa 細胞を用い、これは次のような方法で得た。

TD-フラスコに単層培養した HeLa 細胞を、培養液を捨てたあと、2 ml の 0.2% トリプシン液を加えて分散し、さらに、2 ml の仔牛血清を追加してから遠心管に移した。ついで、1000 rpm で5分間遠心して HeLa 細胞を集め、細胞濃度が約 1×10^5 個/ml になるように、培養液に浮遊した。この細胞浮遊液 1 ml を、底に 1.8 cm \times 1.8 cm のカバーグラスが敷いてある内径 2.7 cm、高さ 2.0 cm のペトリ皿に取り、蓋をした。このペトリ皿 3 個を、さらに、磨合せの蓋のついた内径 8.0 cm、高さ 4.0 cm の腰高ペトリ皿に収め、ビニールテープで封をして、38°C の孵卵器内で培養した。

1日後、HeLa 細胞が付着したカバーグラスをペトリ皿から取り出し、凍結しようとする細胞を倒立顕微鏡で観察した。このカバーグラス上の培養液を濾紙でよく吸い取り、仔牛血清中に約 20 分間放置して、細胞の媒液を、培養液から仔牛血清に変えた。この実験で、媒液に仔牛血清を用いたのは、予備実験において、培養液を媒液として、細胞を凍結したところ、生存する細胞が得られなかったからである。このため凍害に対してある程度の保護効果が知られている血清を用いた。媒液の交換後、カバーグラスを取り出し、濾紙で余分の血清を吸い取った。凍結中に、氷の昇華を防ぐために、シリコン油 (信越化学, KF 96, 2 cstks) で細胞層の表面をおおって、次の方法で冷却した。

凍結方法と観察： 凍結様式のちがった細胞は、以下に述べるように、凍結開始温度と、最終の冷却温度を変えることによって得られた。また、細胞の凍結過程の観察には、すべて冷凍顕微鏡を使用した。これは、 -30°C まで冷却できる冷凍箱内に組込まれた倒立顕微鏡で、箱外より電動式で操作する⁵⁾。

1) 細胞外凍結。単層の HeLa 細胞が付着したカバーグラスを、冷凍顕微鏡のステージに置き、 -3°C で植水して、試料の凍結を開始した。ついで、 $1^\circ\text{C}/\text{分}$ で冷凍顕微鏡の温度を下げながら、媒液と細胞の凍結過程を観察した。凍結が開始してから 12 分後、試料の温度が -15°C まで冷えたところで冷却をやめ、カバーグラスを取り出し、室温の空气中で試料を融解した。

2) フラッシングによる細胞内凍結。細胞をやや急速 (たとえば $10^\circ\text{C}/\text{分}$) に冷却すると、通常、まず、細胞外凍結がおこり、間もなく個々の細胞が次々と瞬間的に暗化するのが見られる。これは、細胞の内部に微氷晶が一面にできたため、ほとんどの透過光線が散乱されるからで、これをフラッシングと呼ぶ⁶⁾。今回の実験の場合は冷凍顕微鏡を、あらかじめ、 -30°C に冷却しておき、そのステージに HeLa 細胞の付着したカバーグラスを置いた。間もなく、カバーグラス上に自発凍結がおこり、ほとんど同時に、HeLa 細胞はフラッシングをおこした。このときから 5 分後、試料の温度が -28°C のとき、これを取り出し、 38°C の TC-199 培養液に速かに移して、試料を急速融解した。

3) 半透明な細胞内凍結。HeLa 細胞の付着したカバーグラスを、液体窒素中 (-196°C) に入れて急速冷却し、試料を凍結した。液体窒素中に 15 秒間置いたあと、 -30°C に冷却しておいた冷凍顕微鏡で、HeLa 細胞を観察し、半透明な凍り方をしているのを確かめた。ついで 4 分後に、 -28°C から 38°C の TC-199 培養液に、速かにカバーグラスを移し、試料を急速融解した。

凍結融解後の HeLa 細胞の観察と培養： 以上のように凍結融解した HeLa 細胞を、倒立顕微鏡で観察したあと、再び、培養液のはいったペトリ皿に移して、次の方法では培養した。容器は実験試料の作製の項で述べた二重のペトリ皿を使った。ただし、今度は、生存細胞数の減少によっておこる培養液の pH のアルカリ側への変動を少なくするために、腰高ペトリ皿の底に無処理の HeLa 細胞を、同時に培養した。凍結融解された細胞との接触を防ぐために、小孔をあけた金属板を適当な高さに置き、その上に、小さなペトリ皿を乗せて、この中で、凍結融解後の HeLa 細胞を培養した。こうすると、ペトリ皿内部の炭酸ガス濃度が調節されて、pH の変動を防ぐことができた。このようにして 1 日間培養したあと、凍結のとき顕微鏡の視野内にあった細胞を観察し、個々の細胞の形態的变化と、増殖の有無を調べた。

なお、HeLa 細胞の形態観察は、すべて、位相差顕微鏡装置を使って行なった。

III. 結 果

1. 細胞外凍結

カバーグラス上に単層培養された HeLa 細胞は、扁平で、紡錘形をしているものが多いが形は変化に富み、その大きさは、短径 $10\sim 15\mu$ 、長径 $20\sim 40\mu$ である。細胞質には顆粒が多く、核は円形で、休止期では複数の仁が見られる。核は仁を除けばほぼ透明で、細胞質と区別できる (図版 I-1)。

この HeLa 細胞を、カバーグラス毎冷凍顕微鏡のステージに置き、 -3°C で植氷すると、細胞の媒液、すなわち血清の凍結が始まる。 0°C に比較的近い温度で凍結が開始すると、媒液中の水はゆっくり成長し、大きな氷晶ができる。そして、氷晶の間には、濃縮された血清がみえる。

いっぽう、細胞は、媒液中の氷晶の間にはさまれて収縮し、細胞内の形態は観察できなくなる。ひきつづき温度を下げていくと、細胞の外形は球形に近づき、その大きさは、温度の低下とともに減少する (図版 I-2)。これは、細胞内の水が細胞膜を通過して外部に移動し、氷になるためである。このように、細胞の媒液の氷点に近い温度で凍結が始まり、ゆっくりと冷却された細胞は、脱水されて縮小するが、その内部は凍結しない。 -15°C まで冷却した HeLa 細胞を、室温の空气中でゆっくり融解すると、細胞の大きさはほぼ凍結前にもどり、核と細胞質の境界には顆粒が集まって、凍結前にくらべて、境界がいくぶんはっきり見える。核の形態には変化がないが、細胞は凍結中の脱水のためか、さらに扁平になり、縁が膜状に薄く見えるものもある (図版 I-3)。

これらの細胞を 1 日間培養すると、細胞質に空胞のある細胞が凍結前にくらべて多くなるが、正常にガラス面上に伸び、増殖して数がふえる (図版 I-4)。この結果、HeLa 細胞を血清

中で細胞外凍結すると、 -15°C までの冷却では、細胞は凍害を受けないことがわかった。

2. フラッシングによる細胞内凍結

-30°C に冷却した冷凍顕微鏡で、試料を植氷することなく自発的に凍らせると、媒液中の氷晶の大きさは、細胞外凍結の場合にくらべて小さくなり、氷粒の数はふえる (図版 II-6)。HeLa 細胞は媒液の凍結に少しおくれるが、ほとんど同時にフラッシングをおこす (図版 II-6)。

フラッシングをおこした細胞を急速融解すると、細胞は破壊されて、細胞質が流出し、表面沈澱反応 (surface precipitation reaction) をおこす。また、核膜がはっきり見えるようになる (図版 II-7)。さらに 1 日間培養しても、これらの細胞は回復せず、細胞の形骸は残るが、さらに変質して、仁は白く抜けて見え、増殖もまったく見られない (図版 II-8)。

3. 半透明な細胞内凍結

試料を液体窒素中で急速凍結したあと、 -30°C に冷却した冷凍顕微鏡に移して観察すると細胞の媒液中の氷晶は、2 よりもさらに細かな、多数の氷晶からできていることがわかる (図版 III-10)。HeLa 細胞は、凍結前にくらべて、コントラストが強くなって見えるが、細胞内に氷晶は観察できない。これは細胞が非常に急速に凍結された結果、細胞内にできた氷晶が、顕微鏡では見えない程小さいためと思われる (図版 III-10)。このように、凍結しても形態的に正常な細胞と変わらないような細胞を、われわれは、半透明凍結細胞 (translucent frozen cell)²⁾ と呼んでいる。HeLa 細胞では、この半透明な凍り方をした細胞は、 -30°C 付近で数分間は外観上安定で、可視的な氷晶はあらわれてこない。しかし、急速融解しても、フラッシングをおこした細胞と同じように、融解直後に細胞質が流出して、表面沈澱反応がおこり、核膜がはっきり見えるようになる (図版 III-11)。1 日間培養しても、形骸を残すだけで、回復せず、増殖もしない (図版 III-12)。

IV. 考 察

今回の実験によって、HeLa 細胞の、凍結前—凍結中—融解後—培養後の形態を顕微鏡で観察して、冷却速度によって変わる細胞の凍結様式と融解後の生死を、同一の細胞をそれぞれ追うことによって、直接結びつけることができた。

この結果では、細胞の媒液に仔牛の血清を使った場合、細胞外凍結した細胞だけが、融解後、生存した。Scherer らは、HeLa 細胞を人血清に浮遊して冷却し、 -70°C の凍結で 1~3% の細胞が生存すると報告した²⁾。彼らが、細胞浮遊液の凍結に 5 分間を要したことを考えると、生存した細胞は、おそらく、細胞外凍結をしていたものであろう。

フラッシングをおこした HeLa 細胞は、シロネズミの腹水腫瘍細胞で観察された結果³⁾ と同様、融解後、生存しなかった。Smith らは、ウサギの網膜上皮とハムスターの精巣組織で、グリセリン溶液で処理されたこれらの細胞は、凍結融解後、形態的变化を示さないと報告した¹⁾。しかし、彼女らの図版を検討すると、細胞内に氷ができて暗化した細胞は、融解後、形態的に変化し、凍害を受けているように見える。

いっぽう、シロネズミの腹水腫瘍細胞で見られた、半透明な凍り方をした細胞の生存⁴⁾ は、HeLa 細胞では確かめられなかった。これは、媒液の影響なのか、それとも、HeLa 細胞の場

合には顕微鏡では見えない程小さな氷晶でも、融解させるまでの処理中に急速に成長して、細胞を破壊してしまうのか、今のところわかっていない。

V. 摘 要

カバーガラス上に単層培養した HeLa 細胞を使い、同一視野内にあらわれた細胞の、凍結前—凍結中—融解後—培養後の形態を顕微鏡で観察し、細胞の凍結様式と融解後の生死を直接結びつけることができた。

媒液が仔牛血清の場合、細胞外凍結した細胞だけが、融解後、生存した。細胞内凍結した細胞では、細胞内の氷晶が顕微鏡で明らかに認められるものはもちろん、認められない程微小な場合でも、融解後、生存しなかった。

文 献

- 1) Smith, A. U. and Smiles, J. 1953 XI. Microscopic studies of mammalian tissues during cooling to and rewarming from -79°C . *J. Roy. Micr. Soc.*, **73**, 134-139.
- 2) Scherer, W. F. and Hoogasian, A. C. 1954 Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa). *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **87**, 480-487.
- 3) Asahina, É. and Emura, M. 1966 Types of cell freezing and the post-thawing survival of mammalian ascites sarcoma cells. *Cryobiology*, **2**, 256-262.
- 4) 朝比奈英三・久田洋子・江村牧人 1967 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存. 低温科学, 生物篇, **25**, 81-101.
- 5) 朝比奈英三 1969 凍結 (日本生物物理学会編集: 細胞生物物理研究法 I). 吉岡書店, 京都, 233-253.
- 6) Asahina, É. 1966 Freezing injury in egg cells of sea urchin. In Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms. (É. Asahina ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 211-229.
- 7) Asahina, É, Hisada, Y. and Emura, M. 1968 Microscopic observations of innocuous intracellular freezing in very rapidly cooled tumor cells. *Contr. Inst. Low Temp. Sci., B* **15**, 36-50.

Summary

HeLa cells in a same visual field under a phase contrast microscope were followed throughout the observation during freezing, thawing and post-thawing incubation to clarify the relation between types of freezing and survival of the cells.

HeLa cells cultured on cover-slips were frozen at various rates of cooling, after the culture medium was changed to calf serum. Frozen-thawed cells were cultured for one day to observe their survival.

Cells seeded at -3°C and frozen slowly to -15°C survived extracellular freezing with slow thawing. Cells cooled rapidly to -30°C froze intracellularly, and the internal ice crystals could be observed under the microscope. These cells could not survive after rapid thawing. Cells cooled very rapidly to liquid nitrogen temperature (-196°C), when observed at -30°C , appeared to be intact as unfrozen cells. However, they were proved to freeze intracellularly, since ice crystals gradually appeared within the cells during slow rewarming. Though the frozen cells appeared intact as unfrozen cells, they could not survive after rapid thawing.

図版説明

図版 I. 細胞外凍結をおこした HeLa 細胞, 同一視野にあるものを示す。 ×900

1. 凍結前。HeLa 細胞は、カバーガラス上に単層培養されている。細胞質は顆粒に富み、核は円形で、複数の仁が見られる。細胞 a は、以下の各図において同一細胞である
2. 凍結中。 -3°C で植氷して凍結してから 10 分後。試料の温度は -12°C 。媒液中に大きな氷晶ができ、その間に、濃縮した血清と、球形に収縮した細胞が見える。細胞内の形態は観察できない
3. 融解直後。室温の空气中でゆっくり融解すると、細胞はほぼ凍結前の大きさにもどる。凍結中の脱水のためか、細胞の縁が薄くなっている。核内の形態は凍結前と変わらない。
4. 培養後。細胞は凍結前にくらべて大きくなる。細胞質に空胞のある細胞が目立つが、核の形態は凍結前と同様で、生存している

図版 II. フラッシングによる細胞内凍結をおこした HeLa 細胞, 同一視野を示す。 ×900

5. 凍結前。細胞 b は、以下同一細胞
6. 凍結中。 -30°C で自発凍結してから 4 分経過。試料の温度は -28°C 。媒液中の氷晶は、細胞外凍結の場合より小さく、数も多い。フラッシングをおこした細胞は、細胞内に一面に氷粒ができ、暗化して見える
7. 融解直後。急速融解された細胞は、破壊され、細胞質が流出して、表面沈澱反応をおこす
8. 培養後。細胞は形骸を残すだけで回復しない。核も変質し、仁は白く抜けて見える

図版 III. 半透明な細胞内凍結をおこした HeLa 細胞, ほぼ同一視野を示す。 ×900

9. 凍結前。細胞 c は、以下同一細胞
10. 凍結中。液体窒素中で、急速凍結してから 3 分経過。 -30°C で観察。試料の温度は -28°C 。媒液中の水は、フラッシングの場合より、さらに細かな多数の氷晶からなる。細胞は、凍結前より、ややコントラストが強く見えるが、細胞内に、可視的な大きさの氷晶は認められない
11. 融解直後。急速融解された細胞は、破壊され、細胞質を流出して、表面沈澱反応をおこす。また、核膜がはっきり見えるようになる
12. 培養後。細胞は形骸を残すだけで回復しない。仁は白く抜けて見える





