



Title	液体窒素温度で急速凍結された HeLa 細胞の生存
Author(s)	島田, 公夫; SHIMADA, Kimio; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 91-93
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17775
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p91-93.pdf



液体窒素温度で急速凍結された HeLa 細胞の生存*

島田 公夫・朝比奈英三

(低温科学研究所)

(昭和 45 年 8 月受理)

前報¹⁾において、シロネズミの腹水腫瘍細胞を急速凍結すると、この細胞が、細胞内凍結の状態²⁾で生存していることを報告した。それによると、細胞内凍結で生きている細胞は、形態的に凍結前の細胞と変わりなく、半透明に見え、細胞内の氷晶は、顕微鏡でも観察できないくらい十分に小さい。

最近、われわれは HeLa 細胞を使って、この細胞でも、シロネズミの腹水腫瘍細胞と同じ結果が得られるかどうかを試みた。しかし、細胞の媒液に仔牛血清を使用し、カバーガラス上に培養した HeLa 細胞を、急速凍結してみたところ、凍結前と同様に見える半透明な細胞内凍結を観察したが、この細胞は、急速融解後、生存しなかった²⁾。

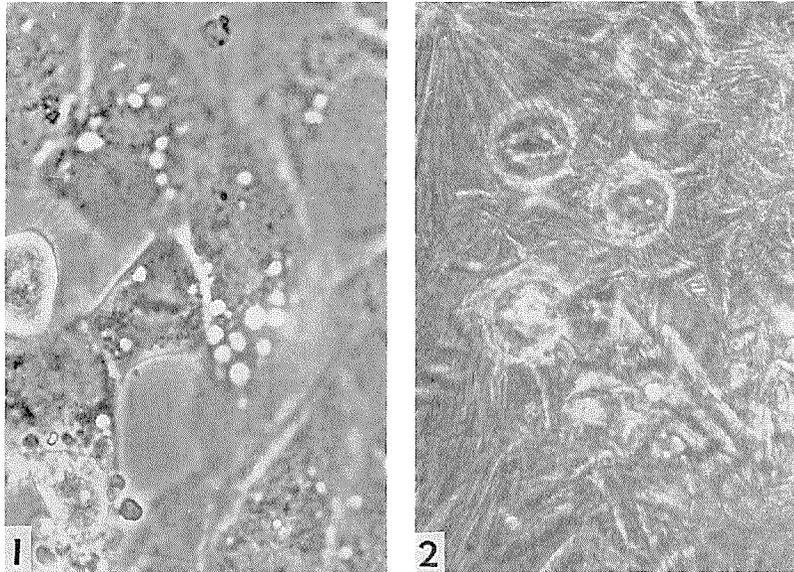
今回、HeLa 細胞の媒液に蔗糖を含む溶液を使って、細胞を急速凍結融解し、生存するかどうか調べたところ、生存細胞を得たのでここに報告する。

この実験に使った HeLa 細胞は、HeLa-S3(Puck) という系統で、1969 年 10 月に本学理学部付属染色体研究施設の細胞株から分離して以来、当実験室で継代培養を続けている。実験には、カバーガラス上に単層培養された HeLa 細胞を用いたが、これは、前報²⁾で述べたように、二重のペトリ皿を使った。内側のペトリ皿の底にカバーガラスを敷いて、その中に、細胞濃度が約 1×10^5 個/ml の細胞浮遊液 1 ml を入れて、38°C の孵卵器内で培養した。こうすると、1 日後、HeLa 細胞はガラス面に付着した。培養液には、100 単位/ml のペニシリンと 100 μ g/ml のストレプトマイシンを含んだ 20% 仔牛血清-TC 199 培養液 (千葉県血清研究所) を使用した。

凍結に先立ち、カバーガラス上に培養された HeLa 細胞の培養液を濾紙でよく吸い取り、カバーガラスを蔗糖を含む溶液中に浸けて、媒液の交換を行なった。蔗糖を含む溶液としては、0.3 M、0.6 M の蔗糖水溶液、0.35 M、0.7 M の蔗糖を含む TC-199 培養液、および、1 M の蔗糖を含む Hanks 液を用いた。媒液を以上のような組成の蔗糖を含む溶液に変えてから、それぞれ、カバーガラス毎液体窒素中に入れて急速冷却し、細胞を凍結した。ここに 30 秒間置いたあと、カバーガラスを 38°C に温めた TC-199 培養液に入れて、細胞を急速融解した。融解後の細胞を、再び、二重のペトリ皿を使って培養し、1 日後、その形態を顕微鏡で観察し、生存する細胞を調べた。

HeLa 細胞は、媒液に蔗糖を含む溶液を使えば、上記のいずれの組成の場合も、急速融解後、少数の細胞は生存することがわかった。急速凍結融解によって生存していた細胞は、凍結

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1122 号



第1図 急速凍結された HeLa 細胞 (位相差顕微鏡で観察)

1. 液体窒素中で急速凍結され、急速融解後、生存した HeLa 細胞。視野の中央は、分裂中期の細胞。細胞質には空胞が目立つ。媒液に 0.7 M の蔗糖を含む TC-199 培養液を使って凍結。×1,000
2. 液体窒素中で急速凍結され、 -30°C の冷凍顕微鏡に移された HeLa 細胞の凍結状態。凍結後 2 分経過。試料の温度は、 -29°C 。媒液中の氷晶は細かく、不規則な樹枝状。細胞のなかには凍結前とほぼ同様に見えるものもある。媒液に 0.3 M の蔗糖水溶液を使って凍結。×450

前にくらべて、細胞質に空胞が多くなるが、その他に形態的变化は認められず、分裂して増殖する細胞も観察できた (第1図-1)。

つぎに、HeLa 細胞の媒液を 0.3 M の蔗糖水溶液に変え、これをカバーグラス毎液体窒素中に入れて急速冷却した。液体窒素中に 15 秒間置いてから、カバーグラスを -30°C に冷却した冷凍顕微鏡³⁾に移して、媒液と細胞の凍結状態を観察した。媒液中の個々の氷晶は非常に細かく、全体としては不規則な樹枝状 (irregular dendrites)⁴⁾に見えた (第1図-2)。細胞のなかには、形態的にはほぼ凍結前と同様に見えるものもあったが、細胞内に可視的な大きさの氷晶があるかどうかは、はっきりしなかった (第1図-2)。これらの細胞を、冷凍顕微鏡に移してから約 3 分後に、 -29°C から直ちに 38°C の TC-199 培養液に移して急速融解し、ついで、二重のペトリ皿を使って 1 日間培養したが、生存する細胞はなかった。また、媒液に 0.7 M の蔗糖を含む TC-199 培養液を使って、同様な実験を行なったが、結果は、0.3 M の蔗糖水溶液の場合と同じであった。

以上のように、蔗糖を含む溶液を媒液にを使って、HeLa 細胞を液体窒素中で急速凍結した場合、液体窒素から直ちに 38°C の培養液に移して急速融解した細胞は、一部生存したが、 -30°C 付近でいったん観察した細胞は生存しなかった。したがって、急速凍結で生存した細胞が、半透明な凍り方をしていたかどうかを確かめることはできなかった。

酒井は、桑の耐凍性がまだ低い季節に、その皮層細胞を、1 M のグルコースで処理してか

ら、液体窒素に入れて急速冷却し、ついで、35°C の水中で急速加温すると、すべての細胞は生存するが、いったん、-30°C に5分間放置したあと、急速加温すると、すべての細胞が死ぬことを報告した⁵⁾。この結果を、彼は、急速冷却中、細胞内に細胞に害を与えない程度の微氷晶ができていて、-30°C に置くと、それが細胞に有害な大きさにまで生長するためと考えた。われわれの実験で、急速凍結された HeLa 細胞を、-30°C 付近で観察してから、急速融解すると、細胞が生存しないのも、細胞内氷晶の成長という考え方で説明できるかもしれない。

終わりに、実験材料の HeLa 細胞を提供して下さった染色体研究施設の高木信夫博士に感謝する。

文 献

- 1) 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**, 81-96.
- 2) 島田公夫・朝比奈英三 1970 HeLa 細胞の凍結様式と融解後の生死. 低温科学, 生物篇, **28**, 21-26.
- 3) 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.
- 4) Luyet, B. J. 1966 Anatomy of the freezing process in physical systems. *In* Cryobiology (H. T. Meryman *ed*), Academic Press, London, 115-138.
- 5) 酒井 昭 1968 超低温における植物細胞の生存 VII. 低温科学, 生物篇, **26**, 1-11.