HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海産繊毛虫 Euplotes の過冷却による細胞崩壊
Author(s)	丹野, 皓三
Citation	低温科學. 生物篇, 30, 99-102
Issue Date	1972-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17801
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p99-102.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

短　　報

Kouzou TANNO 1972 Cytolysis in a marine ciliate, *Euplotes*, following supercooling. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 30.***

海産繊毛虫 *Euplotes* の過冷却による細胞崩壊*

丹　野　皓　三
(低温科学研究所)

(昭和47年9月受理)

グリセリン等の凍害防御物質を加えることにより生物を凍結させて生存させる事は多くの細胞において可能である[1]。凍結保存は原生動物においても可能であり，*Tetrahymena* や *Paramecium* で成功している[2]。

著者の用いた海産の繊毛虫 *Euplotes* (種名未同定) もグリセリンを5% 海水に加えた液の中で凍結させることにより −10°C で24時間の凍結に100% 耐えさせることが出来る (未発表)。ところがたまたま −10°C で凍結することなく過冷却のままにおかれるとこの繊毛虫は一時間内外の間に細胞崩壊することを見いだしたので報告する。

材料の *Euplotes* は1969年の冬に北海道の忍路で採集した海水から分離した。一個体から培養を始め，クローンにしたものを実験材料に用いた。直径5 cm のプラスチック容器の中に濾紙で二度濾過した海水100 ml と魚粉を主とした熱帯魚のつぶ餌を100 mg 加え +25°C で24時間置くと，海水はバクテリアと，未同定の非常に小さい原生動物が増殖するために白濁する。この白濁した海水50 ml に濾過した海水を50 ml 加え，この中に1 ml 中に500匹になるように *Euplotes* を浮遊させた。これに100 mg の熱帯魚のつぶ餌を加え +25°C で24時間培養した。*Euplotes* は24時間に3.4±0.2倍 (5例の平均) に増殖した。増殖曲線の上で，この時期は対数期であった。

培養液から *Euplotes* を分離するには次の様にして行なった。まず培養器の底に沈んでいる熱帯魚のつぶ餌をスポイドで静かにとり去る。次に先端のくびれた遠心管に浮遊液を入れ，手まわし遠心器でかるく遠心すると，*Euplotes* は遠心管の先端に集まる。これを海水に再浮遊させ遠心して洗うことを数回くりかえした。

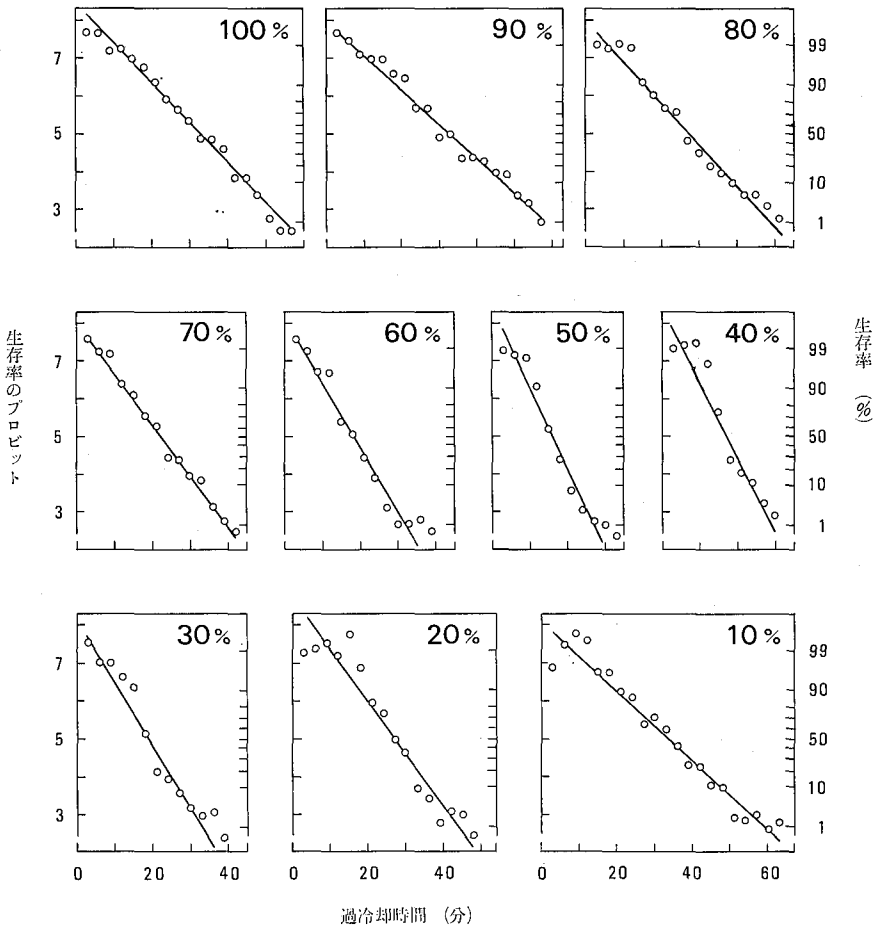
この様にして得た繊毛虫の浮遊液1 ml をマグネットスターラーでかくはんしながら蒸溜水を毎分0.155 ml づつマイクロチューブポンプを用いて加えた。所定の海水濃度に達したら60分間室温においた。約0.03 ml の中に *Euplotes* が200～800匹になるように調整し，これを −10°C で過冷却させた。過冷却中の蒸発を少なくするために直径2 cm の円形カバーグラスでふたつきの小さなシャーレを作製した。

時たま資料が凍結する場合があったが，凍結すると不透明になるので過冷却状態の資料と

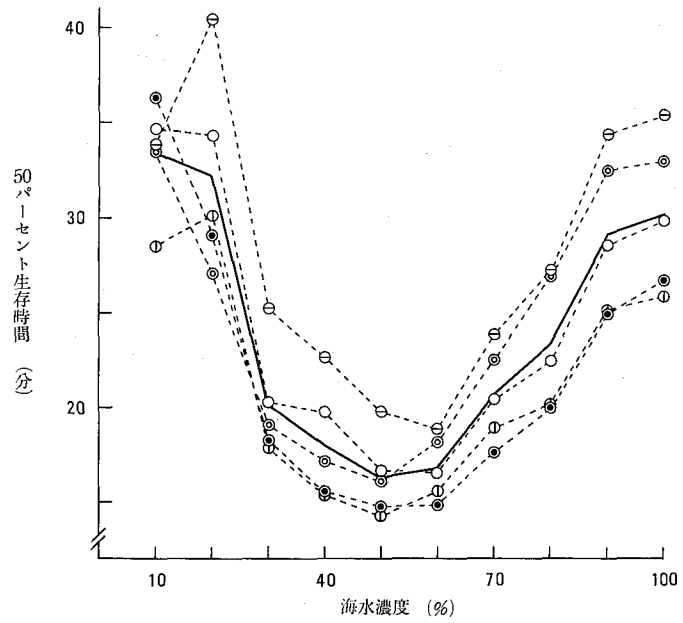
* 北海道大学低温科学研究所業績　第1210号

容易に区別することでき，これを除外した。所定の時間過冷却させたあと室温にもどし実体顕微鏡で観察した。まず細胞崩壊した細胞の数を数えてからホルマリンを一滴加え浮遊している個体を固定してから全個体数を数えた。

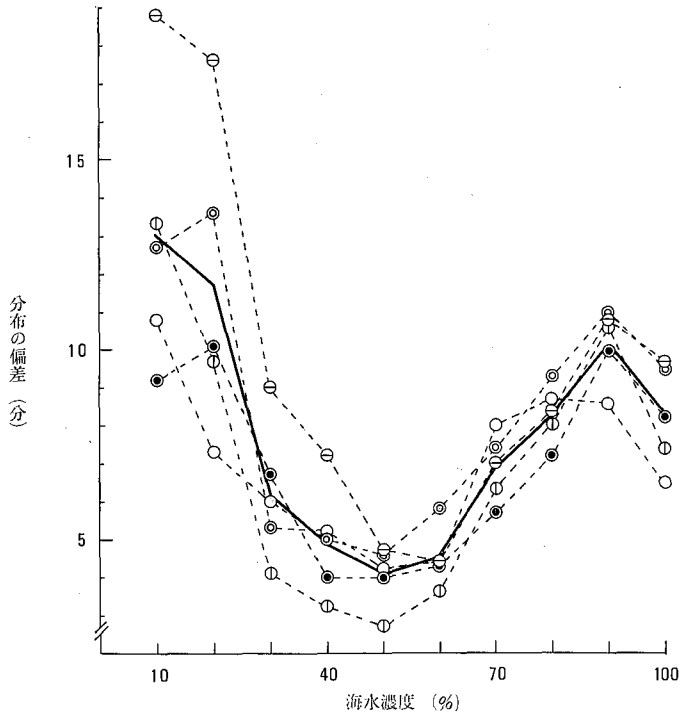
過冷却状態の時間経過に伴う *Euplotes* の細胞崩壊の増加の様子を100% から10% までの種々の海水濃度で観察した。その結果を第1図に示した。いづれの海水濃度においても生存率のプロビットが過冷却時間の増加に対して直線的に減少した。この事は *Euplotes* の過冷却の害に対する感受性が過冷却時間に対して正規分布を示すことをあらわしている。正規分布は平均値と偏差で表現されるから，平均値すなわち50% の個体が細胞崩壊をおこすに要する過冷却時間を第2図に，偏差を第3図に示した。5例の実験はいづれも50～60% の海水中で過冷却した場合に50% 生存時間が最も短かく（第2図）又偏差も小さい（第3図）。従って50～60% 海水中で過冷却した場合に *Euplotes* は最も早く細胞崩壊を起こすことを示している。いまの



第1図 −10°C で過冷却した場合の *Euplotes* の生存率
それぞれのグラフの右肩の数字は *Euplotes* を浮遊させた海水の濃度を表わす



第2図　−10°C で過冷却した場合に 50% の個体が生存している過冷却時間と浮遊液である海水の濃度との関係
5種の異なる丸印はそれぞれ異なる資料であることを示す



第3図　−10°C で過冷却した場合の生存時間の偏差と浮遊液である海水の濃度との関係
異なる丸印はそれぞれ第2図に対応する

ところこれらの現象を説明するための充分な資料を持っていない。ただ，*Euplotes* を低濃度の海水に入れると，単位時間あたりの収縮胞の作動回数が増加し，50% 海水あたりで最大に達し，それより低い濃度の海水中では細胞の体積が急に増大して行く事実及び −10°C にさらされると収縮胞が作動しなくなる事実がある。これは過冷却による細胞崩壊を説明するのに重要な手がかりを与えるものと思われる。

文　献

1) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling. Edward Arnold, London, 462 pp.
2) Wang, G. and Marquardt, W. C. 1966 Survival of *Tetrahymena phyriformis* and *Paramecium aurelia* following freezing. *J. Protozool.*, **13**, 123–128.