



Title	下毛目織毛虫 <i>Pleurotricha</i> sp. のシスト形成過程での耐凍性
Author(s)	松坂, 理夫; MATSUSAKA, Tadao
Citation	低温科学. 生物篇, 32, 29-31
Issue Date	1975-03-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17815
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p29-31.pdf



Tadao MATSUSAKA 1974 Freezing Resistance of the Hypotrichous Ciliate *Pleurotricha* sp. during Cyst Formation. *Low Temperature Science, Ser. B*, 32.

下毛目織毛虫 *Pleurotricha* sp. の シスト形成過程での耐凍性*

松 坂 理 夫
(低温科学研究所)
(昭和49年11月受理)

原生動物のシストが低温・高温・乾燥等の悪条件に強い耐性を持っていることは古くから知られており、織毛虫 *Pleurotricha* sp.¹⁾ 及び *Colpoda maupasi*²⁾ のシストもその例外でないことは既に報告された。これら二つの報告は完成されたシストについての結果であり、シスト形成の途上にある細胞について耐凍性を調べた報告は見当たらない。本報では *Pleurotricha* sp. のシスト形成過程における耐凍性の変化と、0.5M NaCl に対する反応に違いが見られたので報告する。

実験材料は前報¹⁾と同様な方法で培養し、10倍濃度の Osterhout 液 (encyst 液) に入れてから 20°C で 24 時間後 (24-シスト) と 48 時間後 (48-シスト) の細胞を主に用いた。この織毛虫は上記の条件で encyst 液に入れてから 16~20 時間で 90% 前後の細胞が球形となり最外層の包囊を分泌し始める。24-シストでは少なくとも最外層の包囊は形成されており外部形態は完成したシストと同様であるが、まだ明瞭な収縮胞を持ち、光学顕微鏡による観察では不透明で黒く見える細胞質を持っている。48-シストは細胞質が半透明になり、収縮胞も認められず光学顕微鏡では完成したシストと全く区別がつかない。これらの若いシストの他に encyst 液に入れてから 20 時間以前の球形にはなっているが、包囊のない細胞も一部の実験に用いた。

凍結は径 3 cm のプラスチック製ベトリ皿に試料を含む encyst 液 1 ml を入れ、過冷却を防ぐ為に始めから氷を浮かせて -10°C にセットした Sharp の冷凍器に 2 時間入れて行った。更に低い温度の凍結には -10°C 2 時間の凍結後 -20°C 1 時間、-35°C 1 時間の段階的凍結を行った。液体窒素凍結の場合は上述の方法で -35°C 1 時間の凍結の後液体窒素に投入し沸騰のおさまるまでおいた。融解はそれぞれの温度からとり出し 25°C の孵卵器中において行った。

生存率は前報¹⁾と同様 excyst 率で表わした。融解直後に 0.1% (w/v) ベビーフード煮出汁 (excyst 液) に入れ換え 25°C においたもの、融解したまま 1 週間 25°C においてから excyst 液に入れ換え 25°C に保ったものの二種類で excyst 率を比較した。又前者も 1 週間後に新しい excyst 液に入れ換え、その後に excyst する個体数も数えた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1353 号

第1表 若いシストの凍結融解後の EXCYST 率

シストの区別	A				B				
	凍結条件	使用したシストの数	48時間以内のexcyst数	% excyst	48時間以内のexcyst数	excyst数計	% excyst		
24-シスト	対 照	86	56	65.1	2	58	67.5	融解後1週間 excyst液中	
	-10°C	98	1	1.0	28	29	30.8		
	-20°C	54	0	0	0	0	0		
48-シスト	対 照	53	53	100	—	—	100		
	-20°C	55	6	12.7	0	6	12.7		
	-35°C	97	10	10.3	4	14	14.4		
	L. N ₂	72	0	0	0	0	0		
24-シスト	対 照	75	—	—	63	63	84.0		融解後1週間 excyst液中
	-10°C	81	—	—	22	22	28.4		
	-20°C	70	—	—	0	0	0		
48-シスト	-20°C	72	—	—	4	4	5.6		
	-35°C	117	—	—	4	4	3.4		
	L. N ₂	91	—	—	2	2	2.2		

同一の試料から24時間後(24-シスト)及び48時間後(48-シスト)にとったシストを用いた。A欄は融解直後にexcyst液に入れた。B欄は融解後1週間経過してから新しいexcyst液に入れた材料を示す。凍結条件は-10°C 2時間→-20°C 1時間→-35°C 1時間→液体窒素の段階凍結である。

第2表 0.5M NaClに1時間入れた若いシストの反応及びその後のEXCYST率

シストの区別	使用したシストの数	原形質分離したシストの数	自発的に原形質復帰したシストの数	24時間以内のexcyst数	% excyst
24-シスト	26	23	23	0	0
48-シスト	35	34	1	21	60.0
48-シスト(対照)	43	—	—	28	65.1

シスト形成過程の細胞で24-シストよりも若いものは栄養体と同様、-10°Cの凍結融解に耐える個体はなく、すべて自己分解した。24-及び48-シストの凍結融解後の生存率の一例を第1表に示した。24-シストは-10°Cの凍結融解の直後にexcyst液に入れてもexcystできる個体はごくわずかしかないが、これらのexcyst液を1週間後に新しいものと取り換えた後、及び融解後1週間経過してからexcyst液に入れたものでは約30%がexcystした。このことは24-シストでは、この実験で用いた-10°Cの凍結融解の条件でも、ほとんどすべての細胞が致命的ではないにしても何らかの傷害を受けていることを示している。その傷害は細胞を25°Cで1週間放置することで約30%の個体は回復可能であることをも示しているようである。しかし-20°C1時間の凍結には耐えられる細胞はなかった。一方、48-シストは同一の実験条件下では少なくとも-20°C及び-35°Cでの凍結に対しては同程度のexcyst率を示した。また48-シストでは-20°C1時間の凍結に耐えられる細胞の多くは液体窒素温度の凍結にも耐えられるものと考えられる。48-シストに関する限り、融解直後にexcyst液に入れた方が(A欄)生存率が高いが(第1表)、別の試料からとった48-シストを用いた実験では全く逆の傾向を示す。

ものもあり、この違いにはあまり意味はないと考えられる。

前報¹⁾で示したように栄養体と完成したシストでは高張溶液に対する反応が異っていた。24-及び 48-シストについても高張溶液に対する反応に違いがあるかどうか、更に高張溶液処理が excyst 率に影響を及ぼすかどうかをみるために 0.5 M NaCl に室温で 1 時間入れ、その後 encyst 液に戻してから excyst 液に移して excyst 率を調べた。第 2 表に示したように 24-, 48-シストのいずれもが 0.5 M NaCl に入れた直後にほとんどすべてが原形質分離を示した。しかし、48-シストは少なくとも 0.5 M NaCl に入れてあった 1 時間の間は原形質分離したままであったのに、24-シストは 0.5 M NaCl に入れてから 5 分以内にすべてが自発的に原形質復帰してしまい、そのうち 2 個体は自己分解してしまった。これらのシストを再び encyst 液に戻してから excyst 液に移し excyst 率を調べたところ、48-シストは対照とほぼ同じ 60% が excyst したが、24-シストで excyst した個体はなかった。このことは 0.5 M NaCl が 24-シストには有害であるのに 48-シストには害がないことを示しており、これらの若いシストの高張塩溶液に対する耐性の違いと、耐凍性の違いがよく一致している。このことは、これらのシストを急速凍結させた場合に、細胞内に生ずる氷晶の大きさが 24-シストの方が大きい³⁾こと等とともに、繊毛虫のシスト形成に伴う耐凍性の増大機構を知るうえで興味ある事実である。

文 献

- 1) 松坂理夫 1971 下毛目繊毛虫 *Pleurotricha* sp. の栄養体と嚢子の耐凍性. 低温科学, 生物篇, **29**, 113-119.
- 2) Bychenkova, V. N., Lozina-Lozinskii, L. K. and Namatov, T. 1969 Microscopic observations of the processes of freezing and thawing in *Colpoda maupasi*. *Zool. Zh.*, **48**, 1772-1779. (Biological abstract, **51**, 1970 による)
- 3) 松坂理夫 未発表.