



Title	海産繊毛虫 Euplotes の凍結保存
Author(s)	丹野, 皓三; TANN0, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 34, 27-33
Issue Date	1977-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17825
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_p27-33.pdf



海産繊毛虫 *Euplotes* の凍結保存*

丹野 皓三

(低温科学研究所)

(昭和51年10月受理)

I. 緒 言

原生動物の凍結保存は他の多くの細胞の場合¹⁾と同様に、グリセリン等の凍害防御物質を用いることにより可能な種類もある。しかしその大部分は胞嚢を形成する種類²⁾や高濃度の凍害防御物質を用いることができる寄生性の原生動物³⁻⁶⁾にかぎられる。自由生活を営む原生動物で栄養期に凍結保存が可能なものは現在のところ *Tetrahymena* だけであり⁷⁾, *Paramecium* について多くの研究者が凍結保存を試みているが成功していない⁷⁻⁹⁾。

本実験に用いた海産の繊毛虫 *Euplotes* は2.5倍高張海水にも数時間耐えられるので、凍結のさいの塩の濃縮にもはたして耐えられるかどうかについて検討した。

II. 材料及び方法

材料の *Euplotes* (種名未同定) は北海道の忍路で採取した海水から分離した¹⁰⁾。直径10 cmのプラスチック容器の中に煮沸後冷却した海水300 mlと魚粉を主とした金魚のつぶ餌を0.5 g加え30°Cで24時間置くとき海水は未同定のバクテリアが増殖するために白濁する。この白濁した海水に1 ml中に10匹になるように定常期の *Euplotes* を植えた。これを30°Cで培養した。培養日数と耐凍性の関係を調べる実験以外は培養を始めてから4~5日目の耐凍性の最も高まる対数期のものを用いた。培養液から *Euplotes* を分離するには次の様にした。まず棉花で培養液を濾過し、濾液を手まわし遠心器でかるく遠心した。遠心管の底に沈んだ *Euplotes* 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。

通常この *Euplotes* をグリセリン、DMSO、又は蔗糖を含む海水1 mlに浮遊させ、室温に10分間おいた。内径10 mmの試験管にこの試料を入れ、-10°Cの冷凍箱内の気相又は液相にひたした。気相の場合を緩慢凍結、液相の場合を急速凍結と呼ぶ事にする。試料の温度が-5°Cに達した時点で液体窒素で冷却した針金を用いて植氷した。凍結を開始してから-10°Cに達するのに要する時間は緩慢凍結では120分、急速凍結では20分であった。-28°Cの気相で冷却した場合には凍結してから-10°Cに達するのに12分であった。所定の時間凍結状態においてから室温にもどし観察した。融解後3時間以上生存していた個体はすべてその後の培養が可能であった。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1813号

III. 結 果

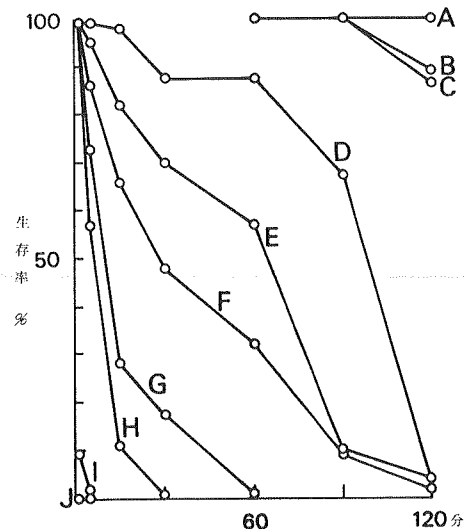
凍害防御物質の室温での影響： 海水に蔗糖又はグリセリンを所定の濃度に溶かし、室温 (22~25°C) での *Euplotes* に対する影響をみた。まず蔗糖海水液の影響についてのべる。10% の蔗糖を含む海水に 2 時間 *Euplotes* を浮遊させても、障害を受けるものはなかった (第 1 図)。15 又は 20% の液に *Euplotes* をおいた場合は、90 分までは影響がなかったが、120 分後に一部のものが細胞崩壊を始めた。25% の蔗糖海水液中では、生存率は 60 分まであまり低下しなかったが、その後急速に低下した。30% 以上の濃度では濃度が増すにつれ、*Euplotes* は急速に害を受ける様になり、55% の蔗糖海水中では、1 分後に全ての個体が死亡した (第 1 図)。

蔗糖海水に *Euplotes* を移してから 10 分後の収縮胞の動きを観察した (第 1 表)。海水中の蔗糖濃度が高まるにつれ収縮胞の最大体積は小さくなり、収縮胞の収縮間隔は長くなった。その結果収縮胞の排水速度は急速に小さくなり、海水中の蔗糖濃度が 15% 以上になると、収縮胞は作動しなくなり (第 1 表)、*Euplotes* の生存率の低下がみられた (第 1 図)。

Euplotes の行動には水底を這う運動と水中を遊泳する運動とがある。海水中の蔗糖濃度が 25% 以上になると遊泳するものがなくなる (第 2 表) のと平行して生存率の著しい低下がみられた (第 1 図)。

次にグリセリンの *Euplotes* に対する室温での害をみた。*Euplotes* は蔗糖海水よりも約 0.2 モルほど高濃度のグリセリン海水に耐えられた (第 2 図)。これは一般に知られているように、おそらく蔗糖がほとんど細胞に透過しないのに対し、グリセリンがある程度透過するため、グリセリン媒液の方が蔗糖媒液の場合よりも細胞からの脱水の程度が緩和される結果によるものと思われる。

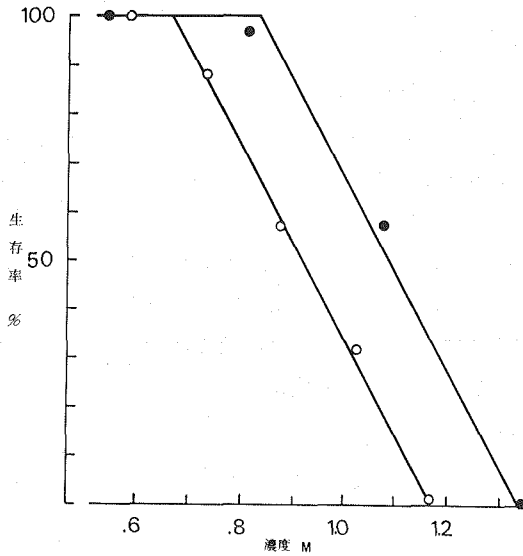
凍結時の浮遊個体密度と凍結融解後の生存率： 一般に凍結時の細胞濃度が凍結融解後の生存率に影響がある場合が知られている。*Euplotes* の場合も同様な結果がみられた (第 3 表)。1 ml 中の細胞数が数千個体までは影響がないが、数万個体になると著しい生存率の低下がみられた。
培養日数と凍結融解後の生存率： 定常期の *Euplotes* を 1 ml に 10 個体の割合で植えて 30°C



第 1 図 *Euplotes* の蔗糖海水中における生存率
A: 10% 蔗糖海水 (w/v%), B: 15%, C: 20%,
D: 25%, E: 30%, F: 35%, G: 40%, H:
45%, I: 50%, J: 55%
縦軸: 海水にもどしてから 3 時間後の生存率
横軸: 蔗糖海水に *Euplotes* をおく時間

第 1 表 蔗糖海水中での収縮胞の活動

海水中の蔗糖濃度 (%)	実験数	排水速度 ($\times 10^{-5} \mu\text{l}/\text{min}/\text{cell}$)	収縮胞の最大値 (μl)	収縮の間隔 (min)
0	20	9.7 \pm 6.9	50.3	6.5
5	20	1.7 \pm 1.0	15	8.7
10	20	0.6 \pm 0.2	15	24.5
15	20	0		
20	20	0		



第2図 *Euplotes* の蔗糖海水又はグリセリン海水における生存

○：蔗糖海水
●：グリセリン海水

縦軸：*Euplotes* を媒液に60分間浮遊させた後正常海水にもどし3時間後の生存率
横軸：海水中の蔗糖又はグリセリンの濃度

第2表 蔗糖海水中の運動性

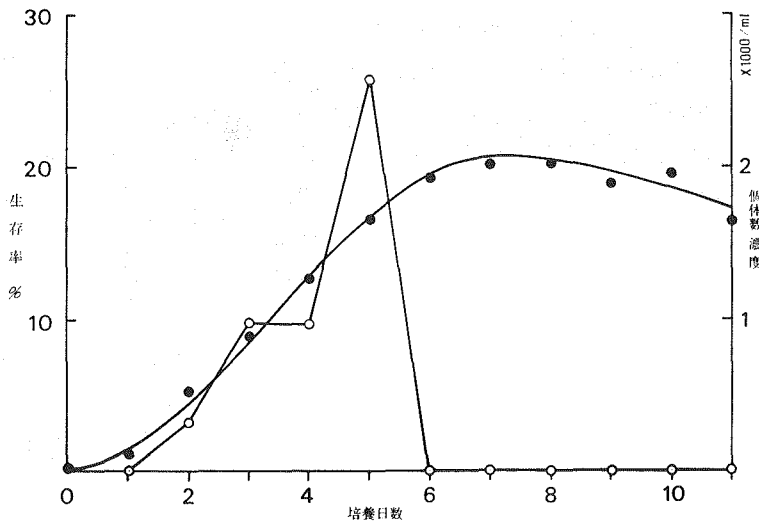
海水中の蔗糖濃度 (%)	遊泳している虫の1分間の回転数 (20匹の平均)
0	123.4 ± 16.6
5	117.0 ± 14.2
10	108.5 ± 14.7
15	74.0 ± 9.0
20	38.7 ± 11.5
25	0

(1.6%の個体が繊毛を弱く動かすが遊泳できない。)

第3表 浮遊個体数と凍結融解後の生存率の関係

凍結前の浮遊個体数	生存率* (%)
35	24.3
69	21.7
273	23.4
458	22.3
2290	22.1
4580	17.0
22900	4.4
45800	3.3

* 27.5%蔗糖液1mlに虫を浮遊させ緩慢凍結をし、-10°Cに達してから1時間後室温で融解した



第3図 *Euplotes* の増殖曲線と、耐凍性の培養日数による変化

●：30°Cにおける増殖曲線
○：27.5%の蔗糖を含む海水1mlに *Euplotes* を浮遊させ、-10°Cで1時間緩慢凍結し、融解後の生存率

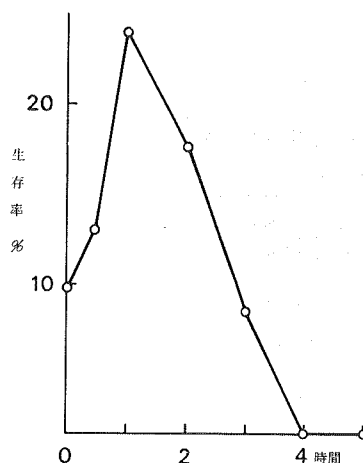
で培養を始めると、6日ほどで約2000個体に増殖し定常期に達する(第3図)。植えてから1日ないし2日目の誘導期の *Euplotes* は、多数の食胞が細胞内全域をみだし、回転楕円体に近い形にふくらんでいる。対数期になるとバクテリアで白濁していた培養液の濁りがうすくなり、細胞内の食胞の数は少なくなり、*Euplotes* の形態は偏平楕円体になる。定常期に達すると細胞の大きさは長さで対数期の2/3ほどに小さくなり、やがて死滅期には異状な形態をした個体が多数あらわれて来る。どの時期の *Euplotes* も凍害防御物質を用いないで海水中で凍結すると、短時間でも -10°C に達すると生存できるものはない。27.5%の蔗糖海水中で凍結すると最も高い生存率が得られる。培養日数の異なる *Euplotes* を27.5%の蔗糖海水中で緩慢凍結し、 -10°C に達してから1時間後に融解し、室温に3時間置いてから生存率を調べた(第3図)。凍結融解後の生存率は誘導期に低いが、対数期に移行するに従い高くなり、対数期の終り近くなると急速に低下した。定常期と死滅期のものは、この方法での凍結に耐えるものはなかった。

誘導期の材料が対数期のものにくらべて耐凍性が低い原因のひとつとして、細胞内の食胞が誘導期に多数みられる事実が考えられる。そこで食胞が細胞内にまだ十分に発達している対数期の初期のものを海水で数回洗い室温で飢餓状態におき、耐凍性の変化をみた(第4図)。その結果、飢餓状態においてから1時間後に食胞の消失に伴い耐凍性の著しい高まりが見られた。しかし1時間以上飢餓状態におくと急速に耐凍性は低下し、4時間後には -10°C の凍結に耐えられるものはなかった。

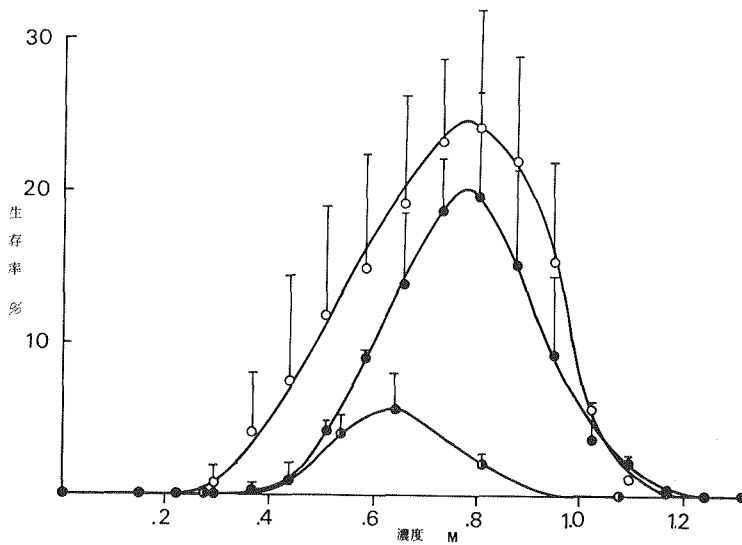
凍害防御物質の最適濃度: 凍害防御物質として蔗糖, グリセリン, DMSO, について調べた。蔗糖が最も凍害を防ぐのに効果があった(第5図)。いずれの場合も緩慢凍結の方が急速凍結よりも融解後良い生存率を示した。 -28°C の気相で -10°C まで急速に凍結すると、生存率はさらに低下し、いずれの場合も生存率は0に近くなった。海水中の蔗糖濃度が10%(約0.3モル)以上になると凍害に対する防御効果を示し、緩慢, 急速いずれの凍結でも27.5%(約0.8モル)で最大の効果を示した。海水中の蔗糖濃度が27.5%以上に増すと、凍結融解後の生存率は急速に低下した。

グリセリンを含んだ海水は同じ濃度の蔗糖海水よりも室温では無害なのに(第2図), 凍結融解後の *Euplotes* の生存率はグリセリン海水よりも蔗糖海水中で凍結した方が高かった。特に急速凍結の場合にはいずれの濃度のグリセリン海水中でも生存するものはなかった。

1.5モルまでの種々の濃度のDMSOを海水に溶かし、その中で *Euplotes* を -10°C まで1時間急速又は緩慢に凍結した。融解直後に多数の個体が遊泳する場合もあったが、増殖するものはまったくなかった。



第4図 耐凍性に対する飢餓の影響
培養3日目の *Euplotes* を培養液から海水に移し飢餓状態においた
縦軸: 27.5%蔗糖海水1mlの中で緩慢凍結し -10°C に達して1時間後融解した。さらに融解後3時間室温においてからの生存率
横軸: 室温の海水中で飢餓状態においた時間



第5図 凍害防御物質の濃度と耐凍性

- ：蔗糖海水中での緩慢凍結
- ：蔗糖海水中での急速凍結
- ◐：グリセリン海水中での緩慢凍結
-10°Cに達してから1時間後に融解した。
実験は三回の平均値と標準偏差で示す

凍害防御物質を含む海水に *Euplotes* を入れて室温におく時間は10分間であったが、それ以上においても凍結融解後の生存率は小さくなる場合さえあり、高くなることはなかった。

27.5%の蔗糖海水中で *Euplotes* を凍結した場合に最も高い生存率 (24.1±7.8%) を得ているが、これを4週間 -10°Cに凍結状態のままおき融解すると生存率は12.5±10.2% (3回の平均) に低下した。しかしこれを培養すると、すべての場合に増殖可能であった。

-15°C以下の温度で凍結した場合、前述の凍害防御物質を種々の濃度に加えて試みたが生存する *Euplotes* はまったくなかった。

IV. 考 察

栄養期の原生動物のうち、他の動物に寄生する種類が方法によっては凍結保存が可能なのに対し、自由生活をするものの大部分のものが凍害防御物質を用いても凍結保存が不可能なのはなぜか。この事について考察した。

海産の原生動物の一部と寄生性のものをのぞき、栄養期の原生動物はすべて収縮胞を持ち、細胞内の浸透圧を遊離アミノ酸の増加により常に環境より高く保つ機構を持っている¹¹⁻¹⁴⁾。この機構は細胞内のナトリウムイオンの濃度を制御する機構に密接に関係している¹⁵⁾。環境の浸透圧を高めていくと、やがて収縮胞が活動しなくなり、細胞崩壊を始める。この理由により収縮胞を有する原生動物に対してはあまり高濃度の凍害防御物質を用いることができない。そのため凍結保存が困難となっている。本実験に用いた *Euplotes* も収縮胞を有しており、そのためあまり高濃度の凍害防御物質を用いることができなく、従って -15°C以下の凍結保存がで

きなかった。一方収縮胞を持たない種類では、4倍濃度の海水の中でも増殖できるほど高張な環境に適応できるものが多い¹⁶⁾。高等動物に寄生する原生動物も収縮胞を有していないので、比較的高濃度の凍害防御物質を用いることが可能で、従って凍結保存に成功している³⁻⁶⁾。

摘 要

海産の繊毛虫 *Euplotes* を凍結保存する目的で、海水に溶かした蔗糖、グリセリン、及び DMSO のそれぞれの凍害に対する保護効果を検討した。このうちで最も効果があったのは蔗糖であった。内径 10 mm の試験管に 27.5% の蔗糖を 1 ml の海水に溶かした中に対数期の *Euplotes* を浮遊させ、これを緩慢凍結で -10°C に達してから 1 時間凍結した場合に、最も高い生存率 ($24.1 \pm 7.8\%$) が得られた。この条件で -10°C に 4 週間おいた後の生存率は $12.5 \pm 10.2\%$ に低下したが、すべての場合に培養をふたたび続けることができた。 -15°C 以下の温度で凍結したものは前記の保護物質を用いても生存するものはなかった。

文 献

- 1) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling. Edward Arnold, London, 462 pp.
- 2) Marquardt, W. C., Wang, G.-T. and Fennell, Dorothy I. 1966 Preservation of *Colpoda steinii* and *Vahlkampfia* sp. from an ice tunnel in Greenland, *Trans. Am. Microscop. Soc.*, **85**, 152-156.
- 3) Weinman, D. and McAllister, J. 1947 Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence: observations on the storage of helminths and leptospiras. *Am. J. Hyg.*, **45**, 102-121.
- 4) Levine, N. D., McCaul, W. E. and Mizell, M. 1959 The relation of the stage of the population growth curve to the survival of *Tritrichomonas foetus* upon freezing in the presence of glycerol. *J. Protozool.*, **6**, 116-120.
- 5) Levine, N. D. and Anderson, F. L. 1966 Frozen storage of *Tritrichomonas foetus* for 5.6 years. *J. Protozool.*, **13**, 199-202.
- 6) O'connell, K. M., Hutner, S. H., Fromentin, H., Frank, O. and Baker, H. 1968 Cryoprotectants for *Crithidia fasciculata* stored at -20°C , with notes on *Trypanosoma gambiense* and *T. conorhini*. *J. Protozool.*, **15**, 719-724.
- 7) Wang, G.-T. and Marquardt, W. C. 1966 Survival of *Tetrahymena pyriformis* and *Paramecium aurelia* following freezing. *J. Protozool.*, **13**, 123-128.
- 8) Efimoff, W. W. 1924 Über Ausfrieren und Überkaltung der protozoen. *Arch. Protistenk.*, **49**, 433-446.
- 9) Wolfson, C. 1935 Observations on paramecium during exposure to subzero temperatures. *Ecology*, **16**, 630-639.
- 10) 丹野皓三 1972 海産繊毛虫 *Euplotes* の過冷却による細胞崩壊. 低温科学, 生物篇, **30**, 99-102.
- 11) Kaneshiro, E. S., Dunham, P. B. and Holz, G. G. Jr. 1969 Osmoregulation in a marine ciliate, *Miamiensis avidus*. I. Regulation of inorganic ions and water. *Biol. Bull.*, **136**, 63-75.
- 12) Kaneshiro, E. S., Holz, G. G. Jr. and Dunham, P. B. 1969 Osmoregulation in a marine ciliate, *Miamiensis avidus*. II. Regulation of intracellular free amino acids. *Biol. Bull.*, **137**, 161-169.
- 13) Rifkin, J. L. 1973 The role of the contractile vacuole in the osmoregulation of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, **20**, 108-114.

- 14) Drainville, G. and Gagnon, A. 1973 Osmoregulation in *Acanthamoeba castellanii*—I. Variations of the concentrations of free intracellular amino acids and of the water content. *Comp. Biochem. Physiol.*, **45 A**, 379-388.
- 15) Bunham, P. B. and Stoner, L. C. 1967 Regulation of intracellular sodium concentration by the contractile vacuole in *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, **14**, 34.
- 16) Tartar, V. 1965 Fission and morphogenesis in a marine ciliate under osmotic stress. *J. Protozool.*, **12**, 444-447.

Summary

A marine ciliate, *Euplotes*, could not survive freezing to -10°C in sea water. When the marine ciliate was frozen at -10°C in saccharose sea water, survival was obtained after freezing for at least 4 weeks. Addition of glycerol to sea water was also effective in preserving the marine ciliate from frost injury at -10°C , but DMSO was not. A culture before peak population, a rate of cooling of $0.08^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and 27.5% saccharose in sea water, all those gave best survival. No survival was obtained after freezing down to -15°C in any condition.