

## *Paramecium caudatum*の凍結保存法の確立

佐々木 大, 芳賀 信幸 (石巻専修大・理工)

### Method for cryopreservation of *Paramecium caudatum*

Hajime SASAKI and Nobuyuki HAGA (Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki)

#### SUMMARY

*Paramecium* has a limited life span of several hundred fissions after conjugation. We usually employ a low-temperature culture for long-term preservation of *Paramecium* stocks. However, stocks cannot escape their fate of senescence and clonal cell death. Thus, the establishment of a cryopreservation method for *Paramecium* is one of our earnest dreams. Although many investigators have tried, nobody has yet had success with cryopreservation. We report here a method that has been recently established in our laboratory. During the course of experiments we examined many variables, including cryoprotectants, culture age, composition of the pretreatment solution, freezing temperature, speed of thawing, and conditions for maintenance of cells after thawing. We have found a method that results in an average survival rate of 3.8% after 7 days cryopreservation at  $-84^{\circ}\text{C}$ . We hope further improvements will enable us to keep *Paramecium* for much longer periods in near future.

[目的] ズウリムシ(*P. caudatum*)におけるクローン寿命は500-700回分裂であり, 株の長期保存を目指す場合, 分裂させないことが課題である。現在, 株の保存は, 低温条件下で培養し分裂を抑制するという方法がとられているが, 低温条件下でも分裂出来るため, 老化を完全に止めることはできない。その為, 凍結保存法は古くから研究されてきた。*P. aurelia* complexについては1971年にEllen M. Simonによって

凍結に関する報告がされているものの<sup>1)</sup>, *P. caudatum*については未だ報告例は無い。そこで, 今回我々は *P. caudatum*の凍結保存の確立を目的とした。

#### [方法]

##### 1. 株

実験には主に金沢で採集されたKNZシリーズ(金沢大学・遠藤)のかけ合わせの子孫であるTAZ0460(O<sup>3</sup>)

を用いた。実験系を確立した後、北海道平取町で採取した株の自系接合による子孫であるBHIII S1#1 (O<sup>3</sup>), 宮城県亘理町で採取したMKWp.2(E<sup>12</sup>), 多くの突然変異を併せ持つREM27-1(O<sup>3</sup>), TAZ0460(O<sup>3</sup>)と同じ手順で作られたTAZ0462(E<sup>3</sup>)についても調査した。

## 2. 培養

培養はレタスジュース法で行い<sup>2)</sup>, 実験には試験管培養で定常期1日目の細胞を, 新しい試験管に約3,000細胞植え継ぎ, レタスジュースを10 ml加え, 24時間後の細胞を使用した。

## 3. 凍結方法

凍害防御剤にはDMSO (WAKO)を使用した。細胞浮遊液400  $\mu$ l (4,000 cells/ml)と10% DMSO 400  $\mu$ lを混ぜ合わせる。混合から7時間後, キャピラリー( $\phi$  1 mm)に15  $\mu$ l程度(20 cells/ $\mu$ l)吸い取り, 安定性を保つためにダンボールに差し込み, -84°Cのディープフリーザに直接入れることで凍結した。

## 4. 解凍方法

凍結後24時間後に解凍し, ディープフリーザから出してすぐに35°Cに設定したウォーターバスに5秒浸けるとい方法で解凍した。また, 解凍後はアルブミン1 mg/mlの入ったExhausted medium (試験管培養で定常期3日目の細胞浮遊液を0.22  $\mu$ mのフィルターで滅菌した溶液)中に吹き出し, 24時間静置した。

## [結果]

### 1. 対数増殖期及び定常期における生残率の変化

試験管培養で定常期1日目の細胞を, 新しい試験管に約3,000細胞植え継ぎ, レタスジュースを10ml加えた後, 24時間ごとに細胞数を計測し, 凍結保存を行った。これにより, 対数増殖期から定常期に至るまでの生残率を調査することにした。この結果, 培養開始24時間後に凍結した系で平均生残率が3.8%と最も高く, 培養開始48時間以降では平均生残率は0.1%未満であった。

### 2. DMSO遊泳時間の差による生残率の変化

DMSOと混合後, 1時間後から解凍後も生き残る細胞が現れ始め, 1時間後で約0.1%, 2時間後で1.0%, 3時間後で2.9%, 5時間後で7.5%, 7時間後で3.7%, 9時間後で3.9%の生残率であった。

### 3. 解凍までにかかる時間によって生じる生残率の変化

ディープフリーザからウォーターバスで解凍するまでの時間で生残率に違いが現れるかについて調べた。キャピラリーは室温25°C中では完全に解凍できるまでに10~12秒ほどかかる。そこでウォーターバスを用いて, ディープフリーザから出して1秒以内と5秒後で解凍した場合と, 室温で自然解凍した場合の3つについて生存率の変化を調べたところ, 1秒以内では生残率は5.9%, 5秒後では2.2%, 自然解凍では生残細胞は得られなかった。

## 4. 解凍後の溶液の影響

解凍後に細胞を泳がせる溶液をExhausted mediumとK-DS, 培養液の3種類を用いて生残率に違いが現れるかについて調べた。その結果, Exhausted mediumでの平均生残率が約7.0%と最も高く, 続いてK-DSで4.8%, 培養液で最も生残率が低く2.0%であった。

## 5. 解凍後の細胞増殖と接合活性

実験で生き残った細胞の約8割が細胞増殖を行い, その後形成された全てのクローンで接合活性を確認することが出来た。

## 6. 長期間凍結

最大で7日間の凍結を行った。平均生残率は1日凍結で1.5%, 2日凍結で1.3%, 3日間凍結で2.6%, 7日間凍結では2.6%であった。

[考察] 今回得られた結果より, 対数増殖期の細胞をDMSO濃度5%に5~9時間遊泳させた後, キャピラリーに充填し, ディープフリーザで凍結させ, 解凍には35°Cに設定したウォーターバスで急速解凍し, 解凍後24時間Exhausted medium中で静置する, という方法が凍結保存に最適な条件であることが示唆された。しかし, 生残率は実験毎の誤差が大きいため, 今回検討していない条件が細胞の生き残りに影響を与えている可能性が考えられる。

## [文献]

- 1) Simon E. M., (1971) *Paramecium aurelia*: Recovery from -196°C. *Cryobiology*, 8, 361-365.
- 2) Hiwatashi K., (1968) Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. *Genetics* 58, 373-386.