

技術ノート

細胞・組織の凍結保存のための簡単なフリージング装置

菅原 康剛*

培養細胞や組織を用いて研究している者にとって、細胞株の維持のための定期的な継代操作は大へんわずらわしい。その上、この継代培養中にしばしば生じる細胞の遺伝的な変異、再分化能や生理的性質の変化や消失のトラブルは特にやっかいである。これらの問題を解決する一つの有効な方法が細胞や組織の凍結保存法である。生細胞の凍結保存では、一般に保存温度が低いほど細胞の保存性がよく、また、近年液体窒素を容易に入手できるようになってきたことから、たとえば、動物培養細胞、受精卵、初期発生胚では液体窒素（ -196°C ）中での長期保存法がすでにほぼ日常化しているといえる。植物培養細胞では、現在までにおよそ30種以上の植物種で、その液体窒素中での保存が報告されているが、今後さらに多くの細胞株について凍結保存を試み、より一般的で確実な方法を確立していく必要がある。とくに最近では、このために必要な装置や器具が多数市販されるようになり、この種の実験が身近なものとなってきた。しかし、装置によっては相変らず高価で、本格的に研究をする以外にはなかなか手がでない。

ここでは、自分の持つ細胞株の凍結保存を試してみた人のために、著者らが使用している簡単なフリージング装置を紹介したい。

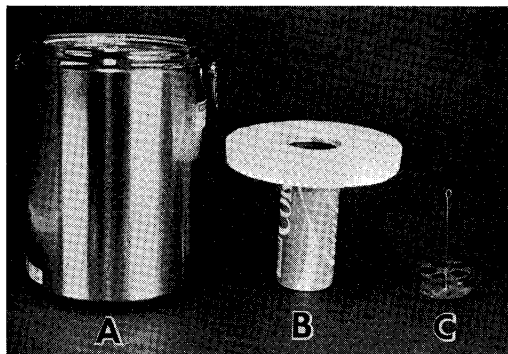
この装置は魔法ビン（ジュワービン）、冷却筒、試料ホルダーの三部分からなる（第1図）。魔法ビンはガラスあるいはステンレス製で、容量が1.5~2.0 lのもの（ここでは1.74 lのタイガー・アイスジャー（IJS-170P）を使用した）、冷却筒には清涼飲料水のアルミ缶を、飲み口のついた蓋の部分のカン切りで切り取って使用する。冷却筒は魔法ビンの口のサイズに合わせて細工した発泡スチロール（厚さ25mm）に固定する。また、冷却筒の底には、試料ホルダーが直接触れないようにするために断熱材（紙でよい）を入れておく。試料ホルダーに

は熱伝導をよくするため銅板（厚さ0.35mm程度）を用い、使用する試料容器の形やサイズに合わせハンダを使って工作する（第1図C）。試料の温度は熱電対を用いて測定する。熱電対は銅-コンスタンタンが使用しやすい。銅・コンスタンタンの素線（径0.2~0.5mm）は容易に入手できるので成書¹⁾等に従って作成する。なお、素線の被覆にはテフロンチューブ（径1.0mm）を用いるとよい。熱起電力は2~5mVの入力可能な記録計を用いて測定する。記録計のペンの位置と実際の温度との対応関係は、あらかじめ標準温度計を用いて調べておく。

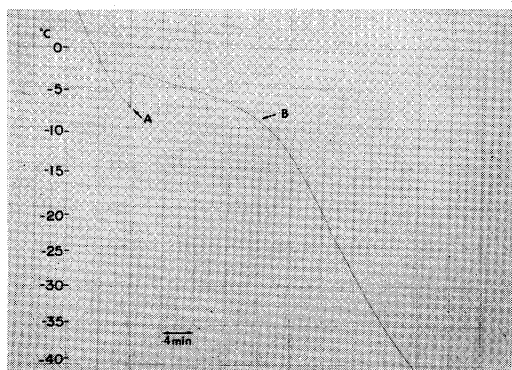
試料の凍結に先立ち、まず魔法ビンにエタノール（またはメタノール、アセトンなど）を入れ（ここでは700 ml）、これにドライアイスの小塊を突沸しないように攪はんしながら徐々に加える。温度が十分に下がり、気化炭酸ガスによるバブリングが終ったら（およそ 20°C の室温で270gのドライアイスが必要とする）、大きめのドライアイスの小塊をさらに300~350g加え、冷却筒のついた発泡スチロールの蓋をする。室温にもよるが、このドライアイス量で少くとも3~4時間の実験が可能である。

冷却筒が冷えたら、試料容器を試料ホルダーにのせて冷却筒に入れ、発泡スチロールの蓋をする（第2図）。試料容器としてガラスバイアル（Wheaton 200）あるいはポリプロピレン製のミニチューブ（Cryule Vial）を用いる。試料容器にはそれぞれ2mlの凍結試料を入れ、さらに、この容器の一本には熱電対をさし込んでおく（第2図）。なお、凍結試料の調製法は成書^{2,3)}を参考にするとよい。試料の温度が -8°C 位に達したら、試料容器をとり出し、それにドライアイスの小塊をかるく触れさせ植氷する。この操作は素早くし、この間の試料の温度上昇を最小限にする。植氷後、試料容器を冷却筒に戻し、冷却をつづける。第3図に、この装置を用いて凍結した時の試料の温度変化を示した。試料の過冷却はA点で（植氷によって）破れ、その後、凍結による多量の潜熱の放出がBあたりまでみられる。なお、潜熱の急激な放出による細胞の生存率の低下は、動物の培養細胞の凍結保存でしばしば論じられるが、植物細胞ではほとんど

* Yasutake SUGAWARA: A Simple Freezing-Device for Cryopreservation of Plant Cells and Tissues
埼玉大学理学部生体制御学科（〒338 浦和市下大久保 255）
Department of Regulation Biology, Faculty of Science,
Saitama University (255 Shimo-okubo, Urawa, 338)



第1図 フリージング装置の各部
A:魔法ピン, B:冷却筒, C:試料ホルダー

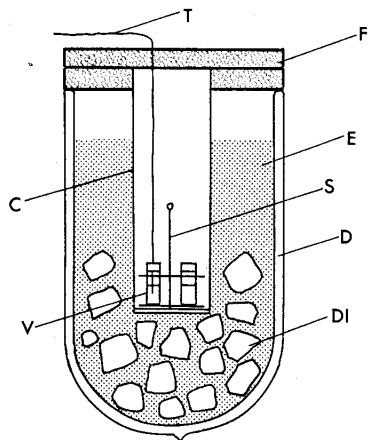


第3図 フリージング装置による凍結曲線(説明は本文中)

どみられない。潜熱の放出後、試料の温度は -10°C から -40°C 位まではほぼ直線的に低下し、この間の平均冷却速度は $1\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 付近になる。

植物培養細胞の凍結保存では、いわゆる予備凍結法(二段階凍結法)が最もよく用いられ、この方法によって多くの細胞を液体窒素中で生存させることができる⁴⁾。この凍結法では、細胞は植水後、途中の温度までゆっくり($0.5\sim 2.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$)冷却され(予備凍結)、その後、できるだけ急速に液体窒素温度まで下げられる。そして、凍結融解後の細胞の生存率が最も高い(至適の)予備凍結温度は、ほとんどの細胞で $-30\sim -40^{\circ}\text{C}$ にある。

第3図の凍結曲線から明らかなように、この装置によって、培養細胞の凍結保存に必要な予備凍結温度まで十



第2図 フリージング装置の構造
F:発泡スチロール, E:エタノール,
S:試料ホルダー, D:魔法ピン, DI:
ドライアイス, V:試料容器, C:冷却
筒, T:熱電対

分に下げることができる。また、この装置の冷却筒と試料容器の間の断熱度を変えるか、あるいは冷却筒内の試料の位置を上下することによってさらに冷却速度を変えることも可能である。そして、試料容器の冷却筒中での位置や数、試料の量を変えない限り、常に同じ冷却速度を得ることができる。さらに、市販のプログラムフリーザーでは、凍結を終え、次の凍結時までには冷却槽(筒)を放置あるいは加熱し、槽(筒)の温度を上げる必要があるが、この装置ではその必要はなく、短時間で何度も凍結をくり返すことができる。このため、この装置のドライアイス消費量は少く、一日の実験に必要なドライアイス量はせいぜい $1\sim 2\text{kg}$ で、液体窒素を使用する市販のプログラムフリーザーにくらべかなり経済的である。

(1985年12月21日受理)

文 献

- 1) 佐々木正治, 1977. 実用温度測定, p. 79-157, 省エネルギーセンター, 東京.
- 2) 竹内正幸, 1979. 新植物組織培養(竹内正幸ほか編), p. 374-379, 朝倉書店, 東京.
- 3) 上村松生, 酒井 昭, 1983. 植物組織培養の技術(竹内正幸ほか編), p. 154-159, 朝倉書店, 東京.
- 4) 菅原康剛, 1982. 細胞工学, 1: 292-297.