

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：44523

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651249

研究課題名(和文) 過冷却状態を利用した新規凍結保存技術の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic studies of improved cryopreservation using supercooling technology.

研究代表者

吉田 徹 (YOSHIDA, Toru)

武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・准教授

研究者番号：00378952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は過冷却状態を含む各種凍結方法の違いにより、小型水生節足動物であるアルテミアの水和凍結胚の孵化率がどのように変動するかを測定し、細胞や組織レベルでの凍結障害の評価を実施した。その結果、電磁場エネルギー下による凍結では有意な孵化率の変動を認めなかったが、過冷却凍結を含む凍結速度の違いにより、孵化率の大きな変動を確認した。特にアルテミアシストの場合は、 -0.5 /min程度の比較的緩慢な凍結速度により、十分な水和処理を行った場合でも孵化率は高く保持される、トレハロースやDMSO処理で孵化率の上昇が認められる、クライオ対応走査型電顕による観察で胚組織の損傷が抑えられていることなどを確認した。

研究成果の概要(英文)：The cysts of *Artemia franciscana* (*A. franciscana*) were hydrated and their hatching rates were measured in order to estimate possible damages of cells and tissues by various freezing speeds. We observed that the hatching rates of hydrated cysts declined shortly at rapid frozen (submerged in liquid nitrogen), but high hatching rates maintained at slow freezing rate (0.5C/min), and that improved hatching ratio of decapsulated hydrated cysts by the treatment of cryoprotectants such as trehalose and dimethyl sulfoxide (DMSO). We also evaluated that the surface of frozen hydrated cysts using a scanning electron microscope attached with cryo-transfer system (Cryo-SEM), and found fine structural discrepancy in the section of embryos between two freezing speeds.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：凍結保存 過冷却 磁場凍結 アルテミア 凍害防御剤 トレハロース

1. 研究開始当初の背景

凍結保存中の細胞や組織の損傷を出来るだけ抑えるため、食品保存や生物資源保全の分野では、主として急速凍結保存技術が従来より使われているが、凍結もしくは解凍時に起こる凍結障害を完全に防ぐことは極めて困難である。このため、生体移植で使われる臓器保存などでは、凍結を避けた低温保存に頼らざるを得ないほか、長期間安定して生殖細胞を保存する必要がある育種分野などでは、ガラス化法などが利用されている。しかしながら、ガラス化法においても凍結に伴って添加する凍害防御剤の細胞毒性が大きな問題となっており、この優れた凍結方法の拡張性を妨げてきた。

このような凍結技術の現状を打破していくため、これまで不可避であった過度な凍結濃縮や氷晶形成を防げるような技術開発が望まれるだろう。そこで本研究では、過冷却凍結技術など、凍結速度をコントロールすることで、新規性のある凍結保存技術の開発に向けた基礎的研究を行った。また、過冷却状態を実現する手段として、電磁場エネルギーの照射による効果についても合わせて検討を行うこととした。最後に、細胞や組織の凍害評価を簡便かつ正確に検討するため、小型水生節足動物である *Artemia franciscana* (以下 *A. franciscana*) の水和凍結胚の孵化率を指標としたバイオアッセイ系の構築を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、過冷却凍結保存技術をはじめ、凍結速度をコントロールすることで、凍結濃縮や氷晶形成を抑え、細胞組織や個体レベルの生物資源確保に道筋をつける基礎的研究を行うことを目的とする。具体的には、*A. franciscana* のノープリウス幼生の孵化率を指標とした簡便かつ鋭敏なバイオアッセイ法を確立させ、その凍結水和胚を様々な凍結速度で凍結することで、凍結障害の軽減の可能性を検証していく。

3. 研究の方法

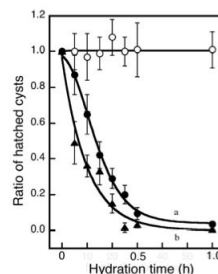
小型の水生節足動物 *A. franciscana* のシストは乾燥重量で 15% に及ぶトレハロースを貯蔵する耐乾性に極めて優れた特性を示す生物モデルであり、乾燥シストの凍結耐性については著しいものがあるが、乾燥シストを水和させることで、著しい耐凍感受性を獲得する。このため、マイクロチューブ内に一定数の乾燥シストを採取し、水和状態を調整した水和胚を様々な凍結方法によって凍結解凍させ、その後の孵化数を測定することによって、非常に優れた凍害評価系として利用することを考えた。

凍結方法としては、プログラムフリーザーを用いた任意の凍結速度による緩速凍結、市販のフリーザー(電磁場照射型のフリーザーを含む)を用いた急速凍結、液体窒素を用いた瞬間凍結、専用の過冷却凍結庫を用いた過冷却凍結などを用いて検討を行った。解凍は 37℃ ヒートブロック上で出来る限り速やかに行った。凍結解凍後の凍害評価は *A. franciscana* 水和胚の孵化率を目視あるいはデジタルカメラで撮影後に粒子解析ソフトなどを援用することにより、統計的に有意となりうる十分なノープリウス幼生数の正確なカウントを行った。

A. franciscana 乾燥シストはキチンで覆われた固い卵殻を持つため、必要に応じて酸アルカリ処理を行い、脱殻させた水和胚を作成することで、トレハロースなどの凍害防御剤が胚内部に浸潤可能な状態にした後、凍結解凍を行い、孵化率の改善が認められるかどうかについても調べた。また、水和胚の凍結状態は、示差走査熱量測定による凍結試料の熱学的測定によって確認したほか、凍結解凍後の胚で孵化率の違いが生じた場合には、胚表面や内部をクライオ対応走査電顕によって詳細な観察を行い検証した。

4. 研究成果

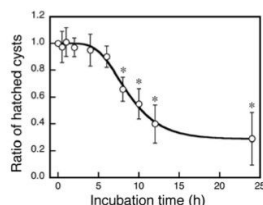
A. franciscana の乾燥シストの水和時間を調節することによって、様々な凍結感受性胚を作製し、水和凍結胚の凍結解凍後の孵化率を測定して正確な凍害評価法を確立した。具体的には、1 時間水和させた凍結胚の凍結耐性は速やかに失われ、従来法である急速凍結の場合は、孵化率 0% であった。しかし、プログラムフリーザーを用いて極めて緩やかな緩速凍結を行ったところ、ほぼ 100% の孵化率を維持することが分かった(研究成果図 1 出典：雑誌論文)。



研究成果図 1 Hatching ratio of frozen hydrated cysts at three different freezing rates. Hydrated cysts in various developing stages were frozen in liquid nitrogen, at $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with a super-cold freezer, and at $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with a programmable freezer. White circle is slow freezing ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), black circle is rapid freezing ($-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) and black triangle is ultra-rapid freezing (in liquid nitrogen). $p < 0.05$ (a; $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ vs $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, b; $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ vs liquid nitrogen), one-way ANOVA with Tukey's HSD). Each hatching ratio was standardized to that of dried frozen cysts and represents approximately 3000 embryos.

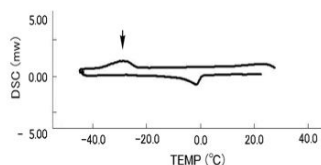
水和時間をさらに延長して緩速凍結を行った実験では、6 時間にわたる水和処理で孵化率は約 60%、自然孵化時間に相当する 24 時間にわたる水和処理でも、孵化率は約 40% 弱程度を維持することが分かった(研究成果図 2 出典：雑誌論文)。これらの成果は、凍結速度により、*A. franciscana* の胚組織が受ける凍結障害に大きな差が生じ

ることを示している。また、その原因として、胚内部に蓄えられたトレハロースや乾燥耐性を示す LEA タンパク質などの関与が想定される。



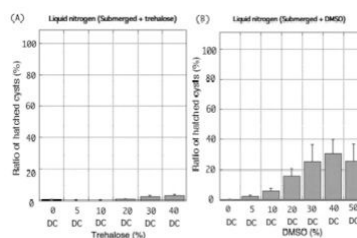
研究成果図2 Hatching ratio of frozen hydrated cysts in various developing stages with slow freezing after extended hydration periods (up to 24 h). * $p < 0.05$ (vs 0 h, one-way ANOVA with Dunnett's test). Each hatching ratio was standardized to that of dried frozen cysts and represents approximately 3000 embryos.

次に、過冷却専用庫で作り出した過冷却温度別の植氷凍結による凍害評価実験を行った。その結果、アルテミアの水和胚を凍結させることなく、過冷却状態を保ったまま-5から-8まで保持後、植氷により強制的に凍結させたところ、過冷却保持温度に応じた孵化率の有意な変化が認められた。さらに、凍結速度ごとに示差走査熱量測定を行い、過冷却凍結による水和凍結胚内部の相転移エンタルピーの相対的な減少を確認した(研究成果図3 出典：雑誌論文)。これらの熱学的データを加味すれば、少なくとも凍結速度によりアルテミア水和胚内部の氷晶状態が異なる可能性を示しており、従来の凍結方法と比べ過冷却凍結の優位性を示唆するものと考えられる



研究成果図3 Thermogram of frozen hydrated cysts after 15 min hydration for slow freezing (-0.5°C/min). Dried cysts (15 mg) were hydrated in artificial seawater for the 15-min hydration time period and analyzed with a DSC. Vertical axis represents heat flow (mW), and horizontal axis represents temperature (°C).

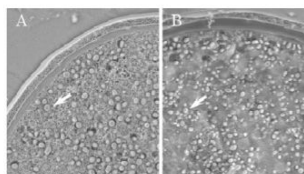
本研究で合わせて検討した電磁場エネルギー照射による凍害評価については、市販フリーザー作り出す変動磁場下や、ネオジム磁石を配置した定常磁場下での様々な磁場強度を照射した場合の凍害評価について検討した。研究期間全体を通じて相当数の実験を繰り返し行ったが、*A. franciscana*の水和凍結胚の孵化率を指標とした今回のアッセイ系では、統計的に有意なデータは得られなかった。しかしながら、冷凍食品などへの波及効果については、様々な官能基準によって評価が異なるため、本研究の成果だけでもって電磁場エネルギーの作用を必ずしも否定するものではないと考えている。



研究成果図4

Hatching ratio of decapsulated cysts pre-treated with cryoprotectants. Decapsulated hydrated cysts were pre-treated with 0~40 % of trehalose (A) or 0~50 % of DMSO (B), and submerged in liquid nitrogen. Each hatching ratio represents approximately 3000 embryos. DC, decapsulated cysts.

最後に、凍結速度の違いによるアルテミア孵化率変化は有意性を備えた明確な成果であると考えられたため、*A. franciscana*のシストを脱殻した水和凍結胚を用い、各種凍害防御剤による相乗効果を検討したところ、トレハロース処理やDMSO処理によって孵化率の改善が濃度によって認められた(研究成果図4 出典：雑誌論文)。なお、*A. franciscana*のシストの脱殻状態については、クライオ対応走査型電子顕微鏡で確認を行った。さらに凍結速度による水和凍結胚内部の状態を調べるため、胚断面を観察したところ、凍結速度の違いにより細胞質内の微細構造の違いが認められ(研究成果図5 出典：雑誌論文)。孵化率の違いに対する合理的な説明が得られた。以上より、様々な凍害防御剤や不凍タンパク質などを今後検討していく凍害評価手段として、脱殻したアルテミアの水和凍結胚の有用性が示された。



研究成果図5 Partial cross sections of hydrated cysts. Hydrated cysts were frozen at -0.5°C/min with a programmable freezer (A), or submerged in liquid nitrogen (B), and defrosted. The circular sections were revealed by cutting knife in the cold preparation chamber, and captured by Cryo-SEM (1000X). The typical yolk platelets (arrows) were distributed in throughout the sections.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

吉田 徹、田中翠、坂上万里、福尾 恵介、福田 満 脱殻処理を施したアルテミア水和凍結胚による凍害評価法 低温生物工学会誌 Vol. 59, No. 2, 121~125, 2013.

吉田 徹、鮫島 由香、田中 翠、鹿住 敏、福田 満、福尾 恵介 アルテミア水和凍結胚の孵化率を指標とした凍害評価法 低温生物工学会誌 Vol. 58, No. 2, 195 ~ 199, 2012

Toru Yoshida, Yasuhiro Ariei, Katsuhiko Hino, Ikuo Sawatani, Midori

Tanaka, Rei Takahashi, Toru Bando, Kazuhisa Mukai, and Keisuke Fukuo. High Hatching rates after cryopreservation of hydrated cysts of the brine shrimp *A. franciscana*. *CryoLetters* 32 (3), 206-215 (2011)

〔学会発表〕(計 4 件)

吉田徹 田中翠 坂上万里 福尾恵介 福田満 脱殻したアルテミア水和凍結胚による凍害評価 第 58 回低温生物工学会 2013 年 6 月 22 日～23 日(大阪)

鮫島由香、田中翠、鹿住敏、福田満、福尾恵介、吉田徹 アルテミア脱殻水和胚をモデル系とした冷凍食品品質向上のための工夫 第 11 回日本栄養改善学会近畿支部学術総会 2012 年 12 月 2 日(日) (兵庫)

吉田徹、鮫島由香、田中翠、鹿住敏、福田満、福尾恵介 アルテミア水和凍結胚の孵化率を指標とした凍害評価法 第 57 回低温生物工学会 2012 年 5 月 31 日～6 月 1 日(茨城)

鮫島由香、田中翠、山本遥菜、福田満、福尾恵介、吉田徹 異なる凍結速度による *A. franciscana* 凍結胚の孵化率推移とその氷晶状態 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日～16 日(神奈川)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 徹 (YOSHIDA, Toru)

武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・准教授)

研究者番号：00378952

(2) 研究分担者

福尾 恵介 (FUKUO, Keisuke)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：40156758

福田 満 (FUKUDA, Mitsuru)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：90098517