

腔トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*)

の凍結保存に関する研究

—耐凍剤及び植氷についての検討—

宇賀 昭二 松村 武男

神戸大学医学部医動物学教室

(昭和54年5月2日 受領)

緒 論

従来、寄生原虫株の継代には、動物を用いる法、培地を用いる法、及び組織培養細胞を用いる法等が行われてきている。しかし、これらのどの方法を用いても、その維持には、多くの手間と費用が必要とされ、更に頻回の継代により、原虫の感染性や病原性、あるいは生化学的性状に変化が生ずる懸念がある。

そこで、これらの不安を解消する手段として、凍結保存が考えられ、1939年、Coggeshall (1939) が、マラリア原虫を用いた凍結保存の成功を報告して以来、既にその他の原虫についても多数の報告がされてきている (Smith, 1961 ; Miyata, 1975)。

比較的凍結が困難とされてきたトリコモナスに関しては、McEntegart (1954) が、凍害防止物質として10%の glycerin を用いることにより、 -79°C に6か月間保存後、活発な運動性を有する虫体を得たと報告したのが最初である。その後、Diamond (1964) は、Lovelock と Bishop (1959) が、人と牛の赤血球の凍結保存に用いて有効だと報告した dimethyl sulfoxide (以後 DMSO と略記) を凍害防止物質に用いて、トリコモナスの凍結を試みている。また、Miyata (1973) は、glycerin 及び DMSO を用い、トリコモナスの凍結保存を行う際に、 -25°C のフリーザーで1~2時間予備凍結し、 -75°C まで冷却するという方法を用いて、70%以上の生存原虫を得たと報告している。

通常、生物材料を凍結する際、 0°C ~ -30°C の間を臨界温度と称し、この間の凍結操作が不相当であつた場合、この材料はその生存性を著しく減ずると言われてい

る。一般に生物材料を懸濁させた希釈液を凍結する場合、 -10°C 前後で過冷却による急激な一過性の温度上昇の生ずることが知られているが、原虫の凍結に際し、この温度上昇を考慮した報告はまだない。しかし、Whittingham (1972) は、マウス卵子の凍結実験において、植氷 (seeding) を行い、この温度上昇を阻止し、良好な結果を得たと報告している。

そこで筆者らは、トリコモナスの凍結保存を行うに当たり、植氷が凍結、融解後の生存率を著しく改善し得る手段となるのではないかと考え、以下の実験を行うとともに、凍結、融解速度、及び凍害防止物質の至適濃度等について検討した。

実験材料及び方法

a) 実験材料

本実験に用いた腔トリコモナスは、1977年トリコモナス症の患者より分離し、SYS 培地 (Table 1) に10%の非働化馬血清を加えた培地で継代を繰り返しているも

Table 1 The composition of modified SYS medium

Bacto-peptone	2g
Glucose	1g
Yeast extract	2g
L-cystine	1g
NaCl	0.8g
Distilled water	100ml

Inactivated horse serum at a final concentration of 10% was added to the medium just before use.

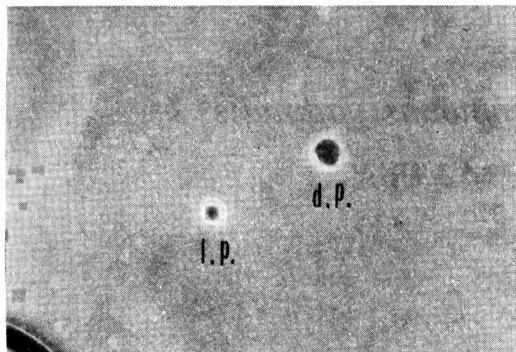


Fig. 1 Light microscopic appearance of *T. vaginalis* after thawing. It is observed that the live protozoa (l. p.) possesses clear cytoplasmic structure while the dead one (d. p.) obscure and rough surface structure.

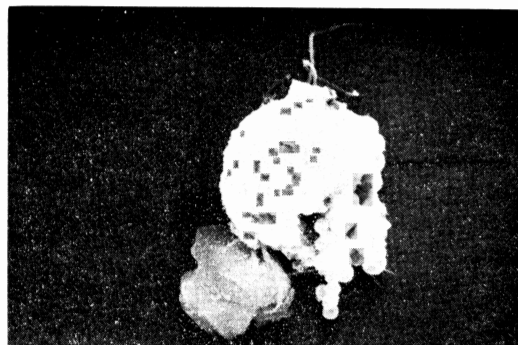


Fig. 2 Fine structure of dead *T. vaginalis* after thawing, observed by scanning electron microscope. The structure seen in the lower part of protozoa seems to be an artifact. Magnification $\times 4,000$.

Table 2 The effects of the concentration of cryo-protective agents and cooling speed on the survival rate of the *T. vaginalis*

Used medium	Concentration of c. p. a* (%)	Cooling speed		
		131C/min	11C/min	1C/min
SYS+HS†10%+Glycerin	5	0	1	2
	10	0	1	4
	15	0	4	6
	20	0	3	3
SYS+HS 10%+DMSO	5	0	40	55
	10	0	53	60
	15	0	43	49
	20	0	2	3

* c. p. a.: Cryo-protective agent. † HS: Inactivated horse serum.

The numbers in this table show per cent of *T. vaginalis* surviving after freezing and thawing, among 200 protozoa which are counted under a phase contrast microscope at random.

のである。凍結を行うに当たっては、培養開始後48時間目の虫体を用いた。これらを2,000rpm, 5分間遠心分離し、上清を除いた後に0.1mlのSYS培地を添加、懸濁させたものをトリコモナス原液とした。この原液0.01~0.02mlを別に用意した種々の濃度の凍害防止物質を含む1mlのSYS培地に添加、実験に供した。凍結はスクルーキャップ付ポリプロピレンチューブ(12.5×42m/m, NUNC社製)に約1mlの原虫懸濁液を入れて行つた。

b) 実験方法

37C~-60Cの間の冷却には、主にドライアイス・アルコールを用いた。すなわち、アルコールに凍結用チュ

ーブを浸漬した後、ドライアイス・アルコールの薄片を滴下する方法であり、冷却速度はcryo-thermometer(Bailey社製)を用いて確認した。この方法で-60Cまで冷却させ、以後は液体窒素ガス中にて20C/minの速度で-196Cに凍結した。少なくとも24時間凍結後、融解し、200匹の原虫を数え、そのうち運動性を有している原虫のみを生存原虫として算定した。

原虫の電子顕微鏡(以下電顕と略)観察のために、材料をグルタルアルデハイド(2.5%, 4Cにて1時間)、オスミウム酸(2%, 4Cにて30分)で2重固定後、脱水、臨界点乾燥し、走査型電顕(日立, S-700型)によつて観察を行つた。

実験結果

凍結、融解後の生死の判定は位相差顕微鏡を用いて行った。Fig. 1に示すごとく、生存原虫は明るく明瞭な細胞質を有しているのに対し、死滅原虫は暗化した不鮮明、不均一な球状を呈していた。それらを走査型電顕で観察したところ、死滅原虫の細胞膜は破壊され、細胞質内部の多数の顆粒状物質が認められた (Fig. 2)。

凍害防止物質として glycerin, DMSO とその濃度及び冷却速度について検討したところ、SYS 培地に 10% の DMSO を添加し、1C/min の速度で冷却したものが、融解後高い生存率を示した。Glycerin を用いた場合はほとんど生存原虫を得られなかった (Table 2)。上記の実験より、1C/min の冷却速度で好結果が得られることを知ったが、これはドライアイス・アルコールの

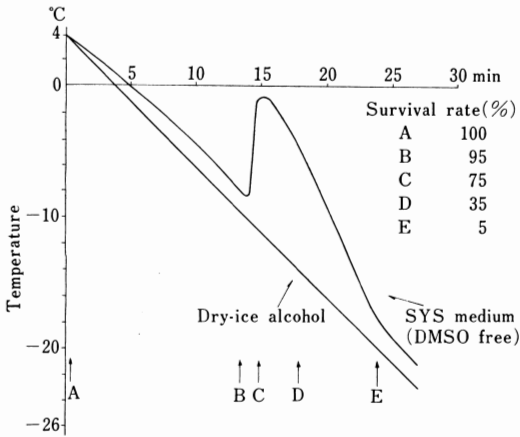


Fig. 3 Curve of temperature elevation due to super-cooling and change of survival rate of *T. vaginalis*. The legend is described in the text in detail.

Table 3 The relationship between DMSO concentration and goes-up curve due to super-cooling

Concentration of DMSO(%)	Lowest temp. before T. E.	Freezing point	Temp. of goes-up
0	- 6.5	-1.2	5.3C
5	- 9.4	-2.5	6.9C
10	-11.3	-4.0	7.3C
15	-14.3	-5.7	8.0C

T. E. : Temperature elevation.
SYS was used for basic medium.

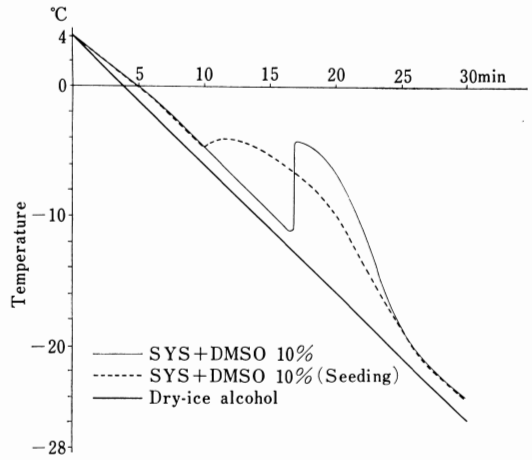


Fig. 4 Change of cooling curve due to seeding. The legend is described in the text in detail.

温度であり、SYS 培地の冷却曲線を調べてみると、-10C 前後で急激な温度上昇を示し、少なくとも 0C ~ -20C の間では、ドライアイス・アルコールのような 1C/min の冷却曲線は得られなかった (Fig. 3)。この現象は、DMSO の濃度が高くなるに従い、上昇開始温度が低下し、氷点も低下するにもかかわらず、上昇幅が増大する傾向を示した (Table 3)。そこで筆者らは、この急激な温度上昇が原虫の生存に悪影響を及ぼしているのではないかと仮定し、凍害防止物質を含まない培地で、Fig. 3 に示すごとく、A, B, C, D, 及び E 点の原虫生存率を経時的に観察したところ、D 点、すなわち上昇後氷晶が急速に固化する過程で、原虫生存率の急速な低下を認めた。そこで、この温度上昇を阻止し、1C/min の冷却曲線に近づけるべく、以下の方法で植氷を行った。SYS 培地に DMSO を 10% 加えた場合の冷却曲

線は、Fig. 4 に示した。植氷を行わない場合はいつたん -11.3C まで低下し、少なくとも 2 秒以内 (より短時間内に起こると考えられるが、thermometer の測定限界があり、これ以内の測定は不可能であった) に -4.0C に急上昇する。そこで氷点の少し下の温度、すなわち -5C 前後であらかじめ作っておいた SYS 培地に、10% の DMSO を添加した液の氷小片 (約 5 mm 角) を投入したところ、Fig. 4 に破線で示すような曲線が得られた。

以上の結果を基にして、SYS 培地に DMSO を 10% 添加し、-5C で植氷を行って凍結した群と、植氷を行わずに凍結した群の融解後の生存率の比較を Table 4 に示した。この表では、融解の速度が原虫の生存率に

Table 4 Effects of seeding and thawing conditions to survival rate of *T. vaginalis*

Freezing	Thawing (warming rate)	Survival rate (%)
A	in 37C water	60
B	(81C/min)	79
A	in 4C water	24
B	(23C/min)	45
A	at room temp	29
B	(16C/min)	36

A: Cooling rate is 1C/min without seeding.

B: Cooling rate is 1C/min with seeding.

及ぼす影響についても併せ実験した。すなわち、それぞれの群を、37C の温湯中で融解 (融解速度は 81C/min)、4C の冷水中で融解 (融解速度は 23C/min)、及び室温に放置して融解した結果 (融解速度は 16C/min)、① それぞれの融解方法においても植氷群が、植氷を行わなかった群より高い生存率を示した。② 37C の温湯中で急速に融解した時、植氷を行わなかった群で 60%、植氷を行った群では 79%、と最良の結果が得られた。

考 察

液体窒素を用いた脛トリコモナスの凍結保存を行い、融解後活発な前進運動を呈する原虫を得た。凍結速度は 1C/min で好結果が得られ、凍結用スクリュウキャップを直接液体窒素に浸漬した場合、glycerin, DMSO 共その保護効果は認められなかった。すなわち、131C/min (直接液体窒素に浸漬した場合) の速度で凍結した場合、

すべての原虫が死滅し、走査型電顕による観察においても細胞膜の著しい破壊の後が認められた (Fig. 2)。このことは、急速に生じた細胞内の氷晶の増大による物理的破壊であろうと考えられる (島田・朝比奈, 1970; 島田ら, 1971; 根井, 1971)。

本実験では、耐凍剤として DMSO を用いたが、融解後の原虫は、運動性を有しているものの中にも若干暗化し、細胞質の色が不均一なものが多く、これらが正常な増殖力を有しているか否かについては検討の余地が有ると思われる。一方、glycerin を用いた場合、本実験の方法では、融解後の生存率は DMSO に及ばなかったものの、融解後の生存原虫、及び運動性を消失したものの中でも、顕微鏡による観察ではまったく正常原虫と区別し得ないものも多く、このことよりして、glycerin 平衡法、時間、及び凍結方法を検討すれば、glycerin や未知の耐凍剤 (宮田, 1975) が、DMSO に代わり用いられることが考えられる。

Whittingham らは、マウス卵子の凍結保存で緩慢融解 (4~25C/min) が必須であると報告している。しかし、筆者らの行ったトリコモナスの融解では、37C の温湯中に直接浸漬する方法 (81C/min) で好結果が得られ、他の研究者の報告とほぼ一致した結果が得られた。このことは、哺乳類卵子と原虫との違いもあろうが、むしろ、その大きさに依存するものと考えられる。このことは、また凍結速度についても同様であり、個々の有する耐凍能を別にすれば、凍結しようとする個体が小さくなるに従い、凍結速度が早まる傾向があるように思われる (根井, 1977)。

トリコモナスの凍結速度として有効だとされている 1C/min は、その凍結過程で生ずる温度上昇をも含めたものでなく、でき得ればその全過程を、1C/min の速度で凍結するのが好ましいと考えられ、その手段として、本実験で用いた植氷は、融解後高率の生存原虫を得るための有効な方法となり得ることが考えられる。更に、この方法は、本実験で用いたトリコモナスのみならず、他の原虫の凍結保存にも利用し得ると考えられる。

結 論

液体窒素を用い、脛トリコモナスの凍結保存を試みた。凍害防止物質として glycerin, dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いた結果、10% DMSO を用いた時、60% の生存原虫を得たが、glycerin には保護効果は認められなかった。凍結速度は、1C/min が良かったが、これはアルコールの冷却温度であり、実際に原虫を含ん

だ希釈液の冷却曲線を見てみると、 -10°C 前後で、過冷却による急激な温度上昇が認められ、これが原虫の生存性に悪影響を与えることが考えられたため、“植氷 (seeding)” を行つた。すなわち、本操作は、希釈液の氷点付近の -5°C で、氷小片を添加するものであり、これにより温度上昇を阻止するとともに、融解後、80%の生存原虫が得られた。以上の結果から、植氷は、本実験に用いたトリコモナスのみならず、他の原虫の凍結保存にも適用し得るものと考えられる。

文 献

- 1) Coggeshall, L. T. (1939) : Preservation of viable malaria parasites in the frozen state. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 42, 499-501.
- 2) Diamond, L. S. (1964) : Freeze-preservation of protozoa. *Cryobiology*, 1, 95-102.
- 3) Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. H. (1959) : Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*, 183, 1394-1395.
- 4) McEntegart, M. G. (1954) : The maintenance of stock strains of trichomonads by freezing. *J. Hyg.*, 52, 545-550.
- 5) Miyata, A. (1973) : On the cryo-biological study of the parasitic protozoa. (1) Studies on the freezing conditions of trichomonads in a -25°C and -75°C freezer. *Trop. Med.*, 15, 141-153.
- 6) 宮田 彬 (1975) : 腔トリコモナスの凍結保存——数種の凍害保護剤の効果について——. 凍結及び乾燥研究会誌, 21, 66-72.
- 7) Miyata, A. (1975) : Cryo-preservation of the parasitic protozoa. *Jap. J. Trop. Med. Hyg.*, 3, 161-200.
- 8) 根井外喜男 (1971) : 低温生物学概説, 2章. 細胞の凍結 (朝比奈英三), 21頁, 東京大学出版会, 東京.
- 9) 根井外喜男 (1977) : 微生物の保存法, 19章. 病原原虫の保存法 (常松之典), 383頁, 東京大学出版会, 東京.
- 10) 島田公夫・朝比奈英三 (1970) : HeLa 細胞の凍結様式と融解後の生死. *低温科学 生物篇*, 28, 21-29.
- 11) 島田公夫・浅田 実・朝比奈英三 (1971) : 急速凍結によつて HeLa 細胞内に生じた氷晶の電子顕微鏡観察. *低温科学 生物篇*, 29, 83-89.
- 12) Smith, A. U. (1961) : Biological effects of freezing and supercooling. *Monogr. Physiol. Soc.*, No 9, Edward Arnold Ltd., London, 110pp.
- 13) Whittingham, D. G., Leibo, S. P. and Mazur, P. (1972) : Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178, 411-414.

AbstractSTUDIES ON THE CRYO-PRESERVATION OF *TRICHOMONAS VAGINALIS*
—EFFECTS OF CRYO PROTECTIVE AGENT AND “SEEDING” OF ICE—SHOJI UGA AND TAKEO MATSUMURA
(*Department of Medical Zoology, Kobe University*
School of Medicine, Kobe)

Cryo-preservation of *Trichomonas vaginalis* (abbreviated to *T. vaginalis*) according to the use of liquid nitrogen was performed. Glycerin or dimethyl sulfoxide (abbreviated to DMSO) was used as a cryo-protective agent. The results obtained showed that 60% of *T. vaginalis* survived due to 10% DMSO in SYS medium, but not due to 10% glycerin in the same medium. Although better cryo-protective effect to the survival of *T. vaginalis* was obtained only by the cooling-speed of dry-ice alcohol at a rate of 1C per minute, a rapid temperature elevation was shown at the point of -10°C in SYS medium. As this effect lowered remarkably the survival rate of *T. vaginalis*, an addition of small ice pieces in the cooling media (so-called “seeding”) was tried at -5°C (equivalent to the freezing point of SYS medium). According to the “seeding”, the temperature elevation due to super-cooling was prevented and subsequently about 80% of *T. vaginalis* survived after thawing in 37°C water.

Thus, it was suggested that the “seeding” method in SYS medium was not only effective for the stable cryo-preservation of *T. vaginalis*, but also applicable for that of other protozoan species.