

ルーメンプロトゾアの凍結保存に関する研究

The Study on Cryopreservation of the Rumen Protozoa

Masayuki Goto¹、Masako Tatsuzaki²、Tethuya Suzuki¹、Hitoshi
Koizumi³、and Naomi Takahashi¹

明治大学農学部動物栄養学研究室¹、農林水産省成田検収所²、

キューピー（株）³

〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1¹

Laboratory of Animal Nutrition Physiology, School of Agriculture Meiji
University¹

Animal Quarantine Service of Narita Branch, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries, Japanese Government.²

Kewpie Corporation³

Protozoa (ciliates) living in the rumen of ruminant animals are a typical example of large, motile, single-cell organisms.

We have studied for over 13 years to establish methods for pure isolation, cryopreservation, and passage culture of *Dasytricha ruminantium* (Dr) in particular, among various protozoa.

As a result, pure isolation of Dr became possible to allow constant supply of research materials by taking advantage of the finding that the addition of fructose (Fru) to a rumen fluid induces Dr alone to adhere to the tube wall.

We employed a super-rapid freezing method by polyvinylpyrrolidone (PVP) and successfully preserved the isolated Dr and other protozoa by cryopreserving for three years, achieving a survival rate of 100%. Thawed Dr grew at the rate 1.5 to 2.0 times faster in 24 hours when they were incubated inside a double-layered incubator made with dialytic membranes (molecular weight 100,000) alongside with nutrients added to the external compartment, including concentrated juice of scrap leaves of leguminous plants, bovine rumen and reticulum wall extract, and bovine serum. Morphologic observation revealed no abnormalities in the cilia; no damage was observed after the freezing and thawing process.

Key words: Rumen Protozoa, *Dasytricha ruminantium* (Dr)、超急速凍結、長期継代培養、Dr の分離

緒言

近年、生物材料の凍結保存は、細胞資源¹⁾、遺伝子バンク^{2) 3)}などの生命科学の基礎技術の一画として、目覚ましい発展を遂げている。しかし、ルーメン内に生息するプロトゾアについては、物質生産や変換を目的とするバイオテクノロジー時代の貴重な遺伝資源であるにもかかわらず、これまでに分離、継代培養などが困難なために遅れている。また、凍結保存法も確立されていないので、American Type Culture Collection (ATCC) の機関にも収集されていない。プロトゾアは、ルーメン内で細菌と共存共栄し^{4) 5)}、宿主動物が食べる餌の質や量によって、その種類も変動することが知られている^{6) 7)}。したがって、一度に同一種類のプロトゾアを大量に保存し、年間を通して実験の継続と再現性を高める手段として、凍結による保存の目的で実験を試みた。

プロトゾアは、種類によって耐凍性が異なる。特に、Dr は他のプロトゾアに比べて、細胞膜が弱い為に耐凍性も低い。したがって、凍結融解した後の機能障害の有無について Dr を培養して確認した。

ここで、述べるプロトゾアの保存が、一方では哺乳動物における大型の単一細胞としての卵子、運動単一細胞としての精子などが確立されている凍結保存法と対比して、興味深いものがある。さらに、このプロトゾアで得られた知見がこれらの生殖細胞のみならず、組織などの保存法の改良に資することがあり得るならば幸いである。

材料と方法

動物の飼育管理

ヤギ(ザーネン種・雌・50kg 前後)のルーメンにカニューレ装着手術を施したものをを用いた。飼料は、朝夕舎内において市販の濃厚飼料 200g、日中は舎外でチモシー乾草 600g を給与した。

ルーメン内容物の摂取と調整

朝の飼料給与前にルーメン内容物をカニューレから直接採取し、二重ガーゼで処理、濾液を遠心管に移し、39℃温浴内で 30 分保温して、浮遊した微細飼料残渣を除き、ルーメンジュース(RJ)として実験に供した。なお RJ を 1000rpm/分 遠心処理し、下層のプロトゾア区分を除いた上澄液をルーメンリッカー(RL)とした。

手動式による凍結方法

哺乳動物の精子や卵子の凍結保存法^{8) 9) 10)}の開発初期の段階で行なわれたのと同様の手動式装置を用いた。すなわち、外界の温度の影響を防ぐ目的で 300ml 容ガラスビーカーの周りを発砲スチロールで被い、蓋部には温度計と凍結用チューブ(K チューブ: 日本フリーザー(株))が支持できるように数箇所小穴を開けておき、凍結用容器とした。この容器の中に、冷凍庫内で十分冷却したエタノールを加え、スターラーで攪拌しながら常温のエタノールと共に所定の温度に調整した。つまり、このエタノールの温度変化が凍結チューブ内の試料に直接影響することになる。

1. ルーメンプロトゾアの凍結保存に関する研究

1) 各種凍害保護剤の有効性

方法： RJ 1 ml に対し、各種凍害保護剤として、細胞膜透過可能なジメチルスルフォキシド(DMSO)、エチレングリコール(EG)、グリセリン(GL)、アセトアミド(AA)などと、細胞膜不透過のグルコース(GC)、スクロース(SC)などを、等量凍結用チューブに加え、(最終濃度 0.7M、1.5M：ただし、GC、SC は 0.5M)5 分平衡した。次いで、 -10°C まで、 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で手動による凍結を行なった後、 -30°C 、 -90°C の冷凍庫内で 24 時間凍結した。なお、融解は、 39°C 温浴内で急速融解した後、RL で希釈、エオジン Y 染色して生存率を求めた。

結果 Table1 に示したように DMSO、EG は、 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -10°C まで下降すると、62~89%の生存率を示した。

しかし、 -30°C と -90°C における生存率は、同程度であるにもかかわらず、 -10°C から -30°C に下降すると激減した。これは、この範囲内にプロトゾアの危険温度域があるものと推定された。

GL、AA、GC、SC は、プロトゾアの低温による耐凍性が低く、凍害保護剤としての有効性はなかった。

2) 融解速度の検討

方法： 融解は、急速、緩速、超緩速の 3 通りとした。

①急速・・・ 39°C 温浴中で融解

②緩速・・・ 20°C 室内 (30 分平行)

→ 39°C 温浴中で融解

③超緩速・・・ 0°C 氷水中 (30 分平行)

→ 20°C 室温 (30 分平行)

→ 39°C 温浴中で融解

結果 Table2 に示したように融解速度は、

緩速よりも急速融解した場合の方がプロトゾアの生存率が高かった。

Table 1 保護剤及び凍結温度がプロトゾアの生存率に及ぼす影響

		-10°C	-30°C	-90°C
DMSO	0.7M	87.5	62.4	56.2
	1.5M	61.8	40.1	38.3
EG	0.7M	88.9	6.5	4.4
	1.5M	76.8	1.6	0
GL	0.7M	16.3	8.7	0.7
	1.5M	12.6	9.7	2.6
AA	0.7M	26.9	0	0
	1.5M	22.1	0	0
GC	0.5M	3.3	0	0
	0.5M	0.9	0	0

※ -10°C までの凍結速度は $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (手動式)、

-30°C 、 -90°C 冷凍庫内での凍結速度は $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$

Table 2 生存率に及ぼす融解速度

融解条件	生存率
急速融解	52.5
緩速融解	22.9
超緩速融解	12.0

※凍結試料は、RJ に 0.7M DMSO (最終濃度) を同量加え、直接 -30°C 冷凍庫内で 24 時間凍結したものをを用いた。

3) 危険温度域の検討

多くの細胞には、危険温度域があり、その温度は細胞の種類によって異なる。

¹¹⁾ 危険温度域の通過速度は、緩速より急速の方が生細胞の回収率が高いといわれている¹²⁾。プロトゾアの危険温度の範囲を検索するのにプログラムフリーザー(TNP-82：日本フリーザー株)を用いた。方法： 危険温度域については、K チューブに RJ 1ml、0.7M DMSO 1ml (最終濃度)を加え、カプトンテープで封管、凍結チューブをチャンバー内に入れ、1.5℃/分の速度で-10℃、-20℃、-30℃まで凍結した。その後、39℃温浴中で急速融解し、RLで希釈後、エオジン Y で染色して生存率を求めた。

結果

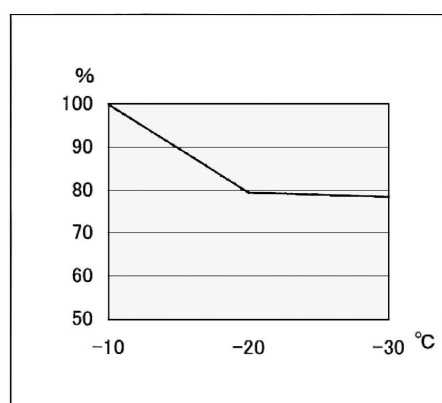


Fig 1 ルーメンプロトゾアの危険温度域

ルーメンプロトゾアの危険温度域は、Fig 1 に示したように、-10℃と-20℃の範囲であることが判明した。

4) 危険温度域における凍結速度の検討

プロトゾアの危険温度域-10℃から-25℃の範囲内で、凍結速度を変化させ、生存率を比較した。

方法： 前回と同様に RL1ml に対し 0.7M DMSO (最終濃度)を用いた。凍結は全てプログラムフリーザーを用い、-10℃まで 1.5℃/分の速度で予備凍結した。次いで、-25℃まで 0.2℃/分、0.5℃/分、1.5℃/分、3.0℃/分に変化をさせた速度で本凍結

し、10 分平衡した。39℃温浴中で急速融解し、RLで希釈後、エオジン Y で染色して生存率を求めた。

結果 Table 3 に示したように、危険温度域の通過速度を上げると、生存率は高くなり、3.0℃/分が最も高い生存率を示した。

危険温度域の通過速度を上げることににより、氷晶形成を起こすことなく、細胞内外の溶液はガラス化状態となって安定するために、危険温度域は速やかに通過させることが細胞の生存にとって必要であると解せられた。

Table 3 危険温度域における凍結速度がプロトゾアの生存率に及ぼす影響

凍結速度	生存率
0.2℃/分	63.0
0.5℃/分	74.7
1.5℃/分	78.1
3.0℃/分	91.1

このように、ルーメンプロトゾアは家畜卵、初期胚の場合と近似の凍結速度の採用により、保存可能な事が示唆された。

5) プロトゾアの超急速凍結

これまでの実験では、-10℃まで手動で予備凍結した後、冷凍庫内で凍結保存を行ってきた。しかし、手動による温度下降は不安定で、しかも手間もかかる。また、冷凍庫内の凍結速度は、緩慢なためにプロトゾアの危険温度域(-10℃~-20℃)を早く通過させることができないために生存率が上がらなかった。

そこで、これらの問題を解決する目的で液体窒素(LN₂)による超急速凍結を試みた。

方法： 凍害保護剤として 0.7M DMSO、分子量 4 万の 15%PVP (最終濃度) 1ml を凍結用チューブ (T-309-2：東邦(株))に移し、39℃温浴中で 5 分平衡した。次

いで、 LN_2 の蒸気相で 20 分平衡した後、 LN_2 に浸し急速凍結した。24 時間 LN_2 内で凍結後、 39°C 温浴中で急速融解し、RLで希釈し生存率を求めた。

結果 超急速凍結によるプロトゾアの生存率は、Table 4 に示した。DMSO、PVP のいずれも高い生存率を示したが、DMSO は、プロトゾアの活性保持能力が低かった。DMSO は毒性が強いため希釈洗浄の回数を増やしても、体内から DMSO が除去されず、時間と共に活性が低下し、死細胞が増加した。したがって、培養などの代謝実験には不向きであった。

Table 4 超急速凍結による
プロトゾアの生存率

	生存率
0.7M DMSO	92.0
15% PVP	99.8

※PVP の分子量 4 万を用い、 LN_2 内で 24 時間凍結後、直ちに急速融解

6) 超急速凍結法によるプロトゾアの長期保存

方法：凍結方法は 5) と同様とした。 LN_2 で 24 時間凍結したものを -90°C 冷凍庫内に移し、1 ヶ月、1 年、3 年間保存し、急速融解して生存率を比較した。

結果 Table 5 に示したように LN_2 から -90°C 冷凍庫内に移し保存したところ、高い生存率を維持した。

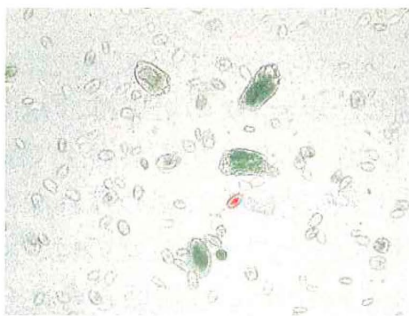


Fig 2. PVP (分子量 4 万) を用い、 LN_2 で 2 時間凍結後、 -90°C 冷凍庫内で 3 年保存した各種プロトゾア (中央の赤く染まっているのが Dr の死細胞)

しかし、死細胞の 0.2% のプロトゾアを観察すると、Dr 単一種類であった。この Dr は、他のプロトゾアに比べ、細胞膜が薄く、浸透圧にも弱いのが特徴である。

Table 5 プロトゾアの長期保存

凍結日数	生存率
1 ヶ月	99.8
1 年	99.8
3 年	99.7

※ LN_2 で 24 時間凍結後、 -90°C 冷凍庫内で 1 ヶ月、1 年、3 年保存し、生存率を比較した。

ルーメン内での Dr は、プロトゾア全体の 2% と少なく¹³⁾、日周変化という独自の生活様式を持っている^{14) 15)}。すなわち、動物が飼料を摂取すると第二胃壁に接着していた Dr は、ルーメン内に移り胃壁や飼料片に接着、その後 2 時間ほどで第二胃へ再び移行する。今回の凍結実験に用いたプロトゾアは、ルーメン内容物が一番安定している飼料給与前に採取した為に、Dr の数が最も少ない時間帯の試料を凍結したために死細胞も少なく、凍結による影響も少なかったものと解せられた。

7) Dr 単一細胞の超急速凍結及び 継代培養

わずか 0.2% 死細胞の Dr ではあるが、その生存率を上げることによって、プロトゾア全体の生存率を伸ばすことにつながる。したがって、Dr の分離ならびに PVP の分子量を変化させて超急速凍結を行ない、さらに継代培養を試みた。

① Dr の分離法

ルーメン内には約 60 種のプロトゾアが生息している。多種類のプロトゾアの中から Dr だけを分離する試みはあるが^{16) 17)}

¹⁸⁾、他種の混入、熟練、時間的な問題など、困難な点が多い。そこで、我々はルーメンから Dr を純粋に、しかも多量に分離する方法を試みた。

方法： Dr を二胃から一胃へ移動させるためには、山羊に朝の飼料給与後 2 時間たってからルーメン内容物を採取した。そして、遠心管(50ml 容)に RJ 50ml とフルクトース (Fru) を 56mM の濃度になるよう加えた。次いで、39℃で 30 分インキュベートした後、管内の溶液を吸引し、管壁に凝集接着した Dr を確認して、塩類溶液

② PVP の分子量の差による凍結が Dr の生存率に及ぼす影響

方法：純粋分離した Dr を用い、5) と同様凍結方法とした。

凍害保護剤の PVP は、分子量を 1 万、4 万、22 万、36 万と変化させ、超急速凍結を行った。

結果 分子量を変えて超急速凍結法を行った結果を Table7 に示した。分子量 22 万以上の PVP を用いて Dr を凍結すると 100%の生存率を保持した。

Table 7 PVP の分子量の差による Dr の生存率

Mw	生存率
1 万 15%PVP	0
4 万 15%PVP	90.3
22 万 15%PVP	100
30 万 15%PVP	100

※凍結は LN₂ で 24 時間凍結、融解は急速融解

③ 凍結 Dr の長期継代培養

貧毛目のいくつかの種類のプロトゾアについては、培養が報告されているが^{19) 20)}、全毛目である Dr の培養についての報告は皆無に等しい²¹⁾。

方法： 凍害保護剤は 15%PVP (最終濃度) とし、分子量 36 万を用い超急速凍を

で管壁の Dr をスプレー洗浄(洗浄液は捨てる)。Dr を集め、凍結実験に供した。結果 Table6 に示したように回収率 90% 以上、純度 100%の Dr が分離された。

Table 6 Dr の分離

回収率	純度(%)
90 以上	100

行った。24 時間後、急速融解して継代培養を行った。

培養方法は、透析膜を用いた二重構造の培養容器内での単一 Dr の長期培養を試みた。すなわち、培養器の二重構造の内側は透析膜 (MW.10 万)、外側はアクリル管とした。透析膜は直径 15.3mm、長さ 140mm を用い、その上下をスクリーキャップ付ガラス管の切断面に挿入した。透析膜の内側には、希釈 RL (RL : B-9 = 4 : 1) と凍結融解した Dr を加えた。外側の管には、培地としてマメ科植物のクズ葉圧搾濃縮液 2.9%、第一胃壁抽出上澄液 3.75%、第二胃壁抽出上澄液 1.87%、牛血清 1.56% を B-9 (塩類溶液) に加えたものを用い、39℃温浴中で培養した。なお、培地は 24 時間毎に交換しそのつど Dr をカウントした。

結果

凍結融解した単一 Dr の培養は、Fig 3、Fig 4 に示した。バクテリア共存下で有効な増殖を示し、凍結障害は認められなかった。7 日以降の培養で下降したのは、細胞の密度とキャパシティの関係と考えられる。

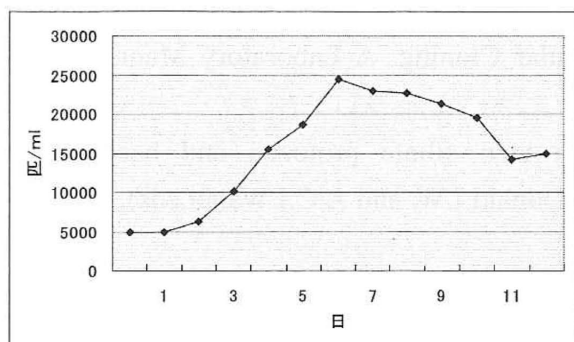


Fig.3 凍結 Dr の継代培養



Fig.4 凍結融解した単一 Dr の培養 7 日目

考 察

凍結精子を実際、人工授精に使用する際の限界生存率の目安は35%とされている。ルーメンプロトゾアについて分子量4万のPVPで超急速凍結、急速融解すると、99.8%の高い生存率を示した。しかし、プロトゾアの場合は、種類、形態、大きさに関係なく、限界生存率の目安は100%でなければ研究材料としては使用出来ない。したがって、この時の凍結による死細胞0.2%はDr単一種であったが、分子量を22万以上のPVPを用いて凍結すれば、生存率100%を保持した。

このことは、PVPの分子量が高いと粘度も高まり、更に網目構造も高密度になって、水の保持力も強まり、細胞膜の安定化に結びつき、生存率が高まったと考えられる。

以上のことから、ルーメンプロトゾアの凍結保存法は、有効かつ実際面での応用が期待されるであろう。

Drを培養する上で、特にDrは、細胞膜が薄く、浸透圧にも弱いために栄養素を直接与えて培養すると、ハレーションを起こして死んでしまう。従って、栄養素を透析膜からゆっくり通して取り込ませることが培養上重要な要素となる。

外培地の栄養素は第一胃壁、第二胃壁抽出液さらに分裂促進物質が含まれるマメ科のクズ葉圧搾濃縮液、牛血清が必須である。全毛類の培養は、プロトゾアの培養の中でも最も難しいものとされている。そのDrを凍結し長期継代培養が成功したことは、今後のルーメン研究の発展に大いに寄与できるものと思われる。

謝辞

プロトゾアの凍結実験を始めるきっかけは、尾川先生との出会いからでありました。実験の初期段階からいろいろときめ細かく御指導して頂いたおかげで、プロトゾアの凍結保存法の確立ができました。この場を借りて心から厚くお礼申し上げます。

文献

1. Whittingham, D.G. and W.K. Whitlen. : Long-term storage and aerial transport of frozen mouse embryos. J. Reprod. Fert., 37, 433-435, 1974.
2. Hanahan, D. and M. Meselson. : Plasmid screening at high colony density. Gene, 10,

63-67,1980.

3. Maniatis,T.,E.F.Fritsch and J.Sambrook. : Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.1982.
4. Coleman,G.S., : The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria, in digestion and metabolism in the ruminant, (McDonald,I.W. and A.C.I.Waner,eds), 149-164 Univ.New England Publ.Unit,Armidale. 1975.
5. Stumm,C.K.,H.J.Gijzen and G.D.vogels, : Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. Br.J.Nutr. 47, 95-99, 1982.
6. Hungate,R.E., : The rumen and its microbes.Academic press,New York. 1966.
7. Nakamura,K.and S.Kanegasaki : Densities of ruminal protozoa of sheep established Under different dietary condition. J,Dairy Sci. 52, 250-255, 1969.
8. Itabashi,H.and T.Kurihara, : Maintenance of rumen microbial populations in an improved artificial rumen. Jap.J.Ecology 22, 262-265, 1972.
9. Hino,T.and M,kametaka, : Gnotobiotic and axenic culture of a rumen protozoan,Entodinium caudatum. J.Gen.Appl.Microbiol. 23, 37-48, 1966.
- 10.Clake,R.T.J.and R.E.Hungate, : Culture of the rumen holotrich ciliate dasytricha ruminantium schaberg. Appl.Microbiol. 14, 340-345, 1966.
- 11.Mazur,P.Cryobiology. : The freezing of biological systems. Science 168, 939-949, 1970.
- 12.Mazur,P. : The freezing of mammalian embryos.Elsevier excerpta medica north-holland,New York.18-48, 1977.
- 13.Holler,H and J.Harmeyer, : Zentralbl.Veterinaarmed.,reihe B 11, 244-252, 1964.
- 14.Waner,A.C.L., : Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diets once daily. J.Gen.Microbiol. 45, 213-235, 1966.
- 15.Abe,M,T.Iraki,N.Tobe and H.shibui, : Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. Appl.Environ.Microbiol. 41, 758-765, 1981.
- 16.Gutierrez,J. : Experiments on the Culture and Physiology of holotrichs from the bovine rumen. Biochemical Journal 60, 517-522, 1955.
- 17.Heald,P.J.and Oxford,A.E. : A convenient method for preparing massive suspension of virtually bacteria free ciliate protozoa of general Isotricha and Dasytricha for manometric studies. Nature,London 169, 1055-1056, 1952,
- 18.Williams,A.G. : An improved technique for the isolation of holotrich protozoa from rumen contents by differential filtration with defined aperture textiles. J.Appl.Bacteriol. 52, 267-270, 1982.
- 19.Iritani,A. : Problems of freezing spermatozoa of different species. Proc. 9th Int.Cong.Anim.Reprod.A.I,Madrid,vol.1, 115-132, 1980.
- 20.Nagashima,H.,Kato,Y.,Yamakawa,H.and Ogawa,S. : Survival of pig hatched blastocysts exposed below 15°C. Jpn.J.Anim.Reprod. 34, 123-131,1988.
- 21.Kashiwazaki,N.,Ohtani,S.,Miyamoto,K.and Ogawa,S. : Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. Vet.Rec. 16, 256-257, 1991.