

凍結保護物質 (DMSO) に対する魚卵の耐性^{*1}

有井啓二^{*2}・鈴木 徹^{*2}・高井陸雄^{*2}・小嶋秩夫^{*2}

TOLERANCE OF FISH EGGS TO DIMETHYLSULPHOXIDE AS THE CRYOPROTECTANT^{*1}

Keiji Arii^{*2}, Toru Suzuki^{*2}, Rikuo Takai^{*2}, Tsuneo T. Kozima^{*2}

The cryopreservation of organic tissues in living condition has been studied by many researchers. However, no treatment which has been proposed in available literature is successful to preserve fish eggs alive.

In order to perform the cryopreservation of fish eggs, it is necessary to reveal the optimum concentrations of cryoprotectants and their effective application procedures.

Dimethylsulphoxide (DMSO), a very popular and effective cryoprotectant, was chosen in this study. The mortality of rainbow trout eggs (eyed stage) which were immersed in solutions of various DMSO concentrations at 10°C was related to the time of exposure.

The concentration of DMSO in the eggs was calculated for various permeability coefficient of DMSO through the egg membrane.

The results suggested that the tolerance of the eggs to DMSO depended upon only its concentration in the eggs and the mortality of eggs became significant when the concentration of DMSO increased near 1~2.5 [mol/l]. The appropriate permeability coefficient explaining the experimental results was $2.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-6}$ [cm/sec] in this study.

近年、様々な生体の細胞や組織についてその機能を損なわずに保存する“凍結保存法”が試みられている。しかし、成功例はある種の微生物、ほ乳類の精子、卵子等の単純で小さいものに限られている。

魚類では、精子の凍結保存が数種の魚類について可能となっている。しかし魚卵の凍結保存はニジマス^{1), 2), 3)}、ニシン⁴⁾、ゼブラダニオ⁵⁾などの魚種で試みられてきたが、未だ成功例はない。その原因は、細胞組織が非常に大きいこと、厚い卵膜に覆われていること、卵黄が多量に存在する⁶⁾ ことにあると言われているが確かではない。

一般的に細胞を凍結保存するには、試料の入った生理的塩類溶液中に DMSO (ジメチルスルホキサイド) やグリセリンなどの凍結保護物質を加えて凍結する方法がとられる。これは凍結保護物質が細胞内に浸透し、冷却時に細胞内液を容易にガラス転位させる作用があり、細胞内溶液に氷晶が生成しない事が凍結保存を可能にする要因の一つと考えられているからである⁷⁾。冷却時の細胞内溶液のガラス転位にとっては、凍結保護物質の細胞内濃度が高いほど好都合ではあるが、凍結保護物質自体に若干毒性があるため、使用にあたっては死滅しない限界濃度範囲内で操作する事が必要である。細胞の冷却過程では、初めに細胞外に氷晶が生じ、残存する細胞外溶液

^{*1} Received November 11, 1991.

^{*2} Laboratory of Food Engineering, Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, 5-7 Konan 4-chome, Minato-ku, Tokyo 108 (東京水産大学食品工学講座).

は濃縮された状態となる。これにともなって、細胞膜を介して細胞内の水の流出や、凍結保護物質の細胞内への移動が起こり、細胞内液の濃度は濃縮される方向に経時的に変化する。この細胞内液の濃度の変化は、冷却速度や、細胞膜の水や凍結保護物質の透過性で決まると考えられるが、これまでほとんど定量的な取扱いはされてこなかった。

小さな細胞では、ガラス転位が容易に起こるが、魚卵のような非常に大きな細胞では、熱平衡に達しにくいだけでなく、体積当たりの比表面積が小さく凍結保護物質の細胞内への移行が困難なために、ガラス転移が起こりにくい。これが魚卵の凍結保存を困難にしている原因の一つと考えられる。従って、魚卵の凍結過程では、特に凍結保護物質の細胞内濃度がどのように変化するか、また、その濃度で細胞がどの程度ダメージを受けるかといった事をより一層的確に知る必要がある。

そこで、本報告では、ニジマスの発眼卵を種々の濃度の DMSO 溶液中に浸漬し、DMSO の卵膜透過性を含めて、DMSO が魚卵に与える影響を調べた。

試料及び試薬

魚卵 使用したニジマスの卵は、山形県遊佐ニジマスセンターから提供を受けた夏卵で、生体機能活動停止の確認が容易な発眼卵を用いた。以後これを卵と呼ぶ。

保存溶液 DMSO 以外の要因による影響を抑えるため、卵を入れる生理的塩類溶液は卵巢内溶液と同じ組成のものとし、この溶液を保存溶液とした³⁾。この組成を Table 1 に示す。

Table 1. Composition of artificial medium solution used for eggs from rainbow trout.

Constituent	Concentration (mmole)
NaCl	145.5
KCl	3.4
CaCl ₂	3.0
MgSO ₄	0.5
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	20.0
Bovine serum albumin (BSA)	5 (mg/ml)
Citric acid up to pH 8.40 at 0°C	

予備実験 1 [mol/l] DMSO の入った保存溶液に卵膜を除去したニジマスの発眼卵を入れ、その影響を観察した。その結果、浸漬後 3 時間経過しても死亡は確認できなかった。これは、卵内に DMSO が浸透して卵内 DMSO 濃度が 1 [mol/l] に達したとしても害の無いことを示唆している。このような状況から、以下に述べる本実験では 1 [mol/l] 以上の DMSO 濃度の保存溶液を用いて卵への影響を調べることにした。

実験方法

あらかじめ 10°C の保存溶液に 2 時間漬けておいた卵を、所定量の DMSO を加えた保存溶液 (以下 DMSO 溶液) に入れ、卵を入れた瞬間から死亡するまでの時間を計測した。卵の状態は実体顕微鏡のステージにシャーレを置き、シャーレに外部より温度調整 (10±1°C) した DMSO 溶液を循環させ連続的に 3 時間観察した。卵の死亡の確認方法は、実体顕微鏡下で心臓、胸鰭の動きが停止したことにより判断した。

以上の操作を 5~7 個の卵を用いて 2, 2.5, 3, 4 [mol/l] の DMSO 各濃度溶液で行った。

結果及び考察

DMSO 溶液の濃度が 2 [mol/l] の時には観察時間内に死亡した卵は確認できなかった。しかし、その他の DMSO 濃度の溶液に浸漬した卵では観察時間内に死亡が認められた。

浸漬した卵の全数に対する死亡した卵の割合を死亡率とし、Fig. 1 に、各 DMSO 溶液について、浸漬時間と死亡率との関係を示す。2 [mol/l] 以外のいずれの DMSO 濃度でも、死亡率は浸漬時間の経過とともに、シグモイド型の曲線を示しながら増加した。また、死亡率が 50% に達するまでの時間は、DMSO 溶液の濃度が 4 [mol/l] のとき 21 分、3 [mol/l] のとき 44 分、2.5 [mol/l] のとき 70 分、2 [mol/l] のとき 3 時間以上となり、DMSO 濃度が低くなるにつれて長くなった。

この結果を説明するため、卵内 DMSO 濃度と死亡率との関係に着目し、次のような 2 つの仮定からなるモデルを考えた。

第一の仮定は、

仮定 1. 卵内 DMSO 濃度の増加速度は、卵内外の濃度差、比表面積、卵膜の DMSO の透過係数 k [cm/sec] に比例するとする。すなわち、卵内の DMSO 濃度の時間的变化は、

$$\frac{dC_{in}}{dt} = \frac{kA(C_{out} - C_{in})}{V} \quad (1)$$

と表わせる。ここで C_{in} [mol/l] はある時間における卵内 DMSO 濃度、 C_{out} [mol/l] は卵外の DMSO 溶液濃度である。ただし、 C_{out} は時間によって変化しないとする。また、卵の体積は V [cm³]、卵の表面積は A [cm²] であり、試料の卵を球形とすると、その半径 (0.3 cm) から求められる。

(1) 式を解くと、卵内 DMSO 濃度の時間変化は、

$$C_{in} = C_{out}(1 - e^{-ktA/V}) \quad (2)$$

となり、 C_{in} は時間の経過につれて C_{out} に指数関数的に近づく。

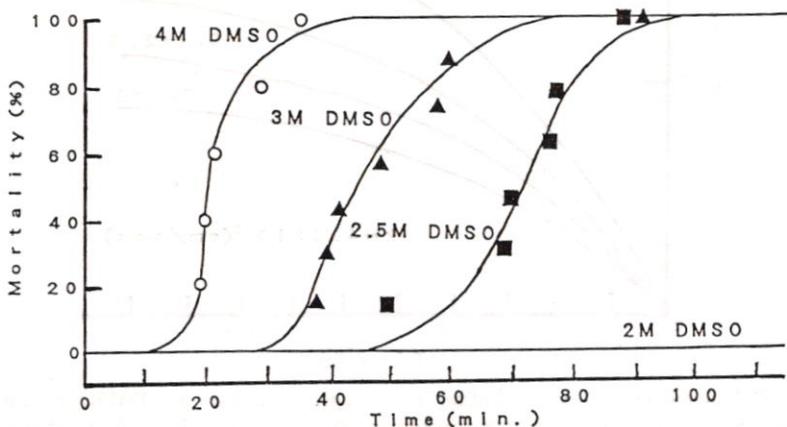


Fig. 1. The change of mortality at various concentrations of DMSO.

第二の仮定は、

仮定 2. 卵の死亡率は、卵内 DMSO 濃度のみ依存し、卵内組織の DMSO 暴露時間とは無関係とする。また、卵には DMSO に耐えることのできる卵内 DMSO 濃度、すなわち臨界濃度 (C_{cr}) が存在し、卵内 DMSO 濃度が臨界濃度 (C_{cr}) に達すると急激に死亡率が上昇する。これによって、死亡率 $M(C_{in})$ は次のような関数で表すことができる。

$$\begin{aligned} M(C_{in}) &= 0 \quad [\%] & C_{in} < C_{cr} \\ M(C_{in}) &= 100 \quad [\%] & C_{in} \geq C_{cr} \end{aligned}$$

これは、Fig. 2 に示すようなステップ状の関数となる。

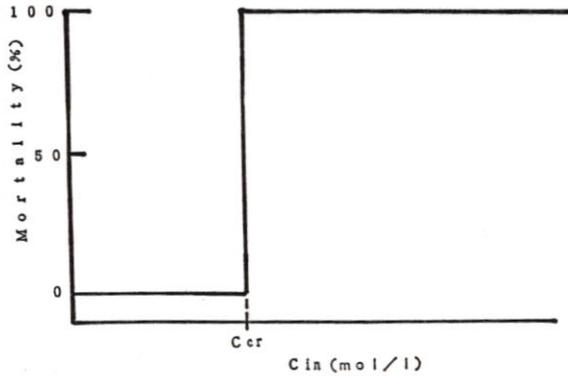


Fig. 2. The assumed relationship between mortality and DMSO concentration (C_{in}) in eggs.

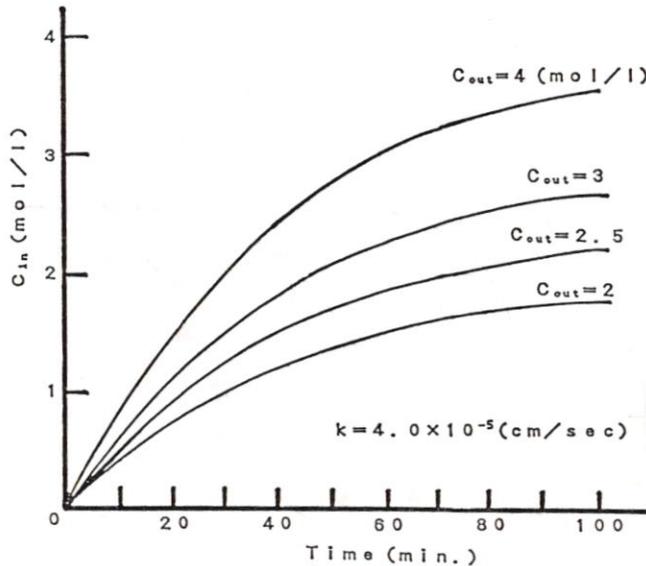


Fig. 3. Calculated DMSO concentration in the eggs. Solid lines are DMSO concentration curves in the eggs $C_{in}(t)$ as a function of the immersing time when assumed permeability is 4.0×10^{-5} (cm/sec), which were calculated by using Eq. (2).

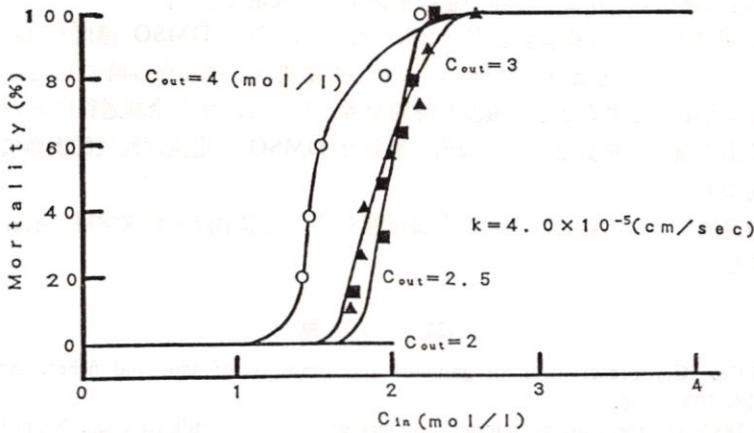


Fig. 4. The relationship between the mortality and C_{in} , DMSO concentration in the eggs. In this case the permeability is assumed to be 4.0×10^{-5} (cm/sec).

このモデルでは、浸漬した DMSO 溶液の濃度 (C_{out}) が高いほど、 C_{cr} に達する時間が短くなるため、卵の死亡率が早く上昇することになる。しかし、卵の死亡率と卵内濃度との関係は、異なる濃度の DMSO 溶液を使った場合でも、Fig. 2 と同じ様な一つの線を与えることが期待される。また、このモデルは k と C_{cr} と 2 つの未知なパラメータを含むが、それらの値を適当に選ぶことによって実験結果を比較的良好に表すことができる。

筆者らは、卵膜を除去した卵を用いた予備実験の結果から、卵の死亡臨界濃度が $C_{cr} \geq 1$ [mol/l] であることを確かめこれを前提とした。次に種々の k の値を仮定して卵内 DMSO 濃度 C_{in} の時間変化の様子が、卵外 DMSO 濃度 (C_{out}) によってどの様に変わるかを (2) 式を使って計算した。その一例として $k = 4.0 \times 10^{-5}$ [cm/sec] の場合を Fig. 3 に示す。

さらに、Fig. 3 の「時間-卵内 DMSO 濃度」曲線を使って、Fig. 1 の「時間-死亡率」の関係を「卵内 DMSO 濃度-死亡率」の関係に書き直した。

このようにして求めた「卵内 DMSO 濃度-死亡率」の関係が仮定 2 で述べた条件に合致するように k の値を探した。その結果、 k はおよそ $2.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-5}$ [cm/sec] の範囲にあると考えられ、同時に C_{cr} も $1 \sim 2.5$ [mol/l] の範囲にあることが推算された。 $k = 4.0 \times 10^{-5}$ [cm/sec] の場合の結果を Fig. 4 に示す。このように、実際の卵の「卵内 DMSO 濃度-死亡率」の関係は、Fig. 2 で示したステップ状とは異なり、シグモイド曲線に近い形となった。これは、卵細胞の DMSO に対する耐性に個体差があるためとも考えられるが、本実験からでは十分明らかにすることはできなかった。

また、推算した卵膜の DMSO 透過係数は、卵レシチン膜の水に対する透過係数が 4.3×10^{-4} [cm/sec]、卵黄リン脂質膜のグリセロールに対する透過係数が 4.5×10^{-6} [cm/sec]⁹⁾ であることから考えても、妥当な値であるといえる。

以上より、ニジマス発眼卵では、①DMSO 溶液の DMSO 濃度が 2 [mol/l] より高い場合は死亡する卵が現れるが、2 [mol/l] では現れなかった。②DMSO の卵膜透過係数はおよそ $2.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-6}$ [cm/sec] であると推定された。また、③この結果に従えば卵内の DMSO 濃度が 1 ~

2.5[mol/l] 付近に達すると死亡する卵が急増加すると推定できる。

これらの結果はモデル計算にもとずいたものであり、卵内 DMSO 濃度を直接定量していないため断定的なことは言えない。しかし、これらの結果は、凍結保存時の前処理として魚卵を DMSO 溶液に浸漬処理するときの濃度や時間を考える上で、また冷却過程において最適な冷却速度を考える上で重要な指針となる。卵内の微量な DMSO の定量は比較的困難であり、今後に残された課題である。

最後に試料提供ならびに懇切なる助言と御指導を頂いた本学資源育成学科 羽曾部正豪博士に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Zell, S. 1978. Cryopreservation of gametes and embryos of salmonid fishes. *Ann. Bio. anim. Biophys.* 18: 1098-1099.
- 2) Haga, Y. 1982. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 48: 1569-1572.
- 3) Harvey, B. and Ashwood-Smith, M. J. 1982. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology.* 19: 29-40.
- 4) Wittingham, D. G. and Rosenthal, H. 1978. Attempts to preserve herring embryos at subzero temperatures. *Arch. Fisch. Wiss.* 29: 75-79.
- 5) Harvey, B. 1983. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio reio* to -196°C . *Cryobiology.* 20: 440-447.
- 6) 隆島史夫, 羽生 功. 1989. 水族繁殖学. 東京, 緑書房. p. 184-185.
- 7) 酒井 昭. 1987. 凍結保存. 東京, 朝倉書店. p. 19-20.
- 8) Stoss, J. and Donaldson, E. 1983. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture.* 31: 51-65.
- 9) 花井哲也. 1974. 化学の領域増刊 103 号, 続・生体膜と膜透過. 東京, 南江堂. p. 34-35.

凍結保護物質 (DMSO) に対する魚卵の耐性

有井啓二・鈴木 徹・高井陸雄・小嶋秩夫

現在不可能な魚卵の凍結保存を試みる上で、凍結保護物質に対する魚卵の耐性を知る必要がある。凍結保護物質として DMSO を選び、ニジマスの発眼卵をいくつかの濃度の DMSO 溶液に浸漬し、DMSO 溶液濃度と死亡率の関係を調べた。卵の死亡が卵内に透過した DMSO の量に依存すると考え、卵膜の DMSO 透過係数を仮定し、卵内 DMSO 濃度の時間的変化を推算した。実験で得られた卵の死亡率と推算した卵内 DMSO 濃度とから、卵膜の DMSO 透過係数はおよそ $2.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-5}$ [cm/sec] であり、卵内の DMSO 濃度がおよそ 1~2.5[mol/l] に達したとき、死亡率が急激に上昇することが推定できた。