

# メダカ胚における氷核生成温度降下度と平衡凝固点降下度の関係

## Relationship Between Ice Nucleation Temperature Depression and Equilibrium Melting Points Depression of Medaka (*Oryzias latipes*) Embryos

君塚 道史†  
 Norihito KIMIZUKA

鈴木 徹\*  
 Toru SUZUKI

† 344-0115 埼玉県春日部市米島 741-29

\* 東京海洋大学 海洋学部 食品生産科学科 (108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology  
 (4-5-7 Kounan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477)

### Summary

We measured the ice nucleation temperature depression,  $\Delta T_f$ , and equilibrium melting points depression,  $\Delta T_m$ , of Medaka (*Oryzias latipes*) embryos with different cryoprotectant (ethylene glycol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, glycerol aqueous solutions) treatments. Our obtained results showed the good relationship between the  $\Delta T_f$  and  $\Delta T_m$  all samples. In addition the value of  $\lambda$ , which can be obtained from the linear relationship,  $\Delta T_f = \lambda \Delta T_m$ , were confirmed to show correlation with the value of  $\lambda$ , as obtained by the W/O emulsion method.

**Key words:** Ice nucleation, Intracellular freezing, Cryoprotectant, Cryobiology, Supercooling, Medaka embryos

### 1. 緒言

生体の凍結保存では、氷結晶による細胞の機械的な損傷（主として細胞内における氷結晶の生成）を抑制する事が保存を成功させる上で最も基本的な事柄とされている。その為、凍結保存の前には高濃度であっても比較的葉害の少ない、glycerol, ethylene glycol 等の多価アルコールを浸漬処理により細胞内に導入する事が一般的な手法として用いられている。これらの物質は主に細胞膜透過型凍結保護物質として知られ、①ガラス化、凝固点降下、過冷却の促進および

氷晶形成量の減少、②細胞内における水蒸気圧の低下による脱水、塩濃縮の抑制、③タンパク質および膜構造の安定化、等がその効果として示されている<sup>1)</sup>。中でも細胞内凍結の抑制に対し重要な効果は①であるが、言い換えればこれは、可能な限り低濃度で細胞内における氷核生成を抑制する事、即ちガラス化または過冷却の状態を維持する事が透過型凍結保護物質に求められる主要な効果とも解釈することができる。しかしながら、凍結保護物質の効果は細胞・生体組織における生存率等での評価が主であり、実際に平衡凝固点および氷核生成温度測定などが

† Fax:+81 3-5463-0585 E-mail: ttn83z328n@mx8.ttcn.ne.jp

ら過冷却を評価した研究は少ない。本研究ではメダカ胚における透過型凍結保護物質の過冷却能力を評価する為、水溶液系（液滴またはW/O型エマルジョン）で成立する事が知られている<sup>2)</sup>、氷核生成温度降下度、 $\Delta T_f$ と平衡凝固点降下度、 $\Delta T_m$ の直線関係における勾配、即ち $\Delta T_f = \lambda \Delta T_m$ における $\lambda$ を各保護物質の過冷却能を示すパラメータとして着目し、これにより透過型凍結保護物質の過冷却能評価を行った。本研究ではまず、熱分析により種々濃度にあるアルコール類水溶液に浸漬したメダカ胚の氷核生成温度と平衡凝固点の測定を行い、上記の直線関係がメダカ胚でも成立する事、更には $\lambda$ が使用する凍結保護物質の種類毎に異なる事、即ち処理に用いる保護物質の種類がメダカ胚の過冷却に影響を及ぼす事を確認した。次に得られた胚の $\lambda$ とエマルジョン法にて得られた水溶液の $\lambda$ を比較する事で、水溶液の $\lambda$ が細胞・生体組織の過冷却能を予測する上で有効であるか検討を行った。

## 2. 材料および方法

### 2.1 凍結保護物質水溶液の調製と浸漬処理

ethylene glycol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, glycerol (和光純薬工業社製 試薬特級)を用いた。これらをHPLC用蒸留水にて、1.0, 2.0, 3.0, 4.0[mol/Kg]に調製したものを凍結保護物質水溶液として使用した。尚、浸漬処理は凍結保護物質水溶液 50ml中に胚を5~7個前後入れ、60分間スターラーで緩やかに攪拌しながら室温にて浸漬処理を行った。

### 2.2 メダカと胚について

メダカ(*Oryzias latipes*)は水温約27℃、日照13時間で飼育したものを使用した。胚についてはこれより得られた、胞胚期から囊胚期のもの(受精後6~20時間)<sup>3)</sup>を使用した。

### 2.3 顕微鏡観察

凍結前後の胚の状態観察は光学顕微鏡(オリンパス工業社製, BX51)を用いた。この際、胚は特に染色処理等を行わず観察を行った。

### 2.4 氷核生成温度、平衡凝固点の測定

胚の氷核生成温度および平衡凝固点の測定については全て熱流束型熱量計(島津製, DSC-

50)を使用した。DSC用測定セルに浸漬処理の終了した胚のみ(1個)を入れ、冷却過程は-3.0[℃/min]で-40℃まで、昇温過程は+3.0[℃/min]で+20℃まで走査し、氷核生成温度、 $T_f$ ならびに平衡凝固点、 $T_m$ の測定を各浸漬濃度について4回行った。尚、DSC曲線上からの各温度の読取りについてはFig.1に示す様に、発熱ピークの立ち上がり時の温度を $T_f$ 、吸熱ピーク立ち上がり時における曲線の接線と、基線の外挿線が交わる点(補外開始温度)を $T_m$ とした<sup>4)</sup>。

## 3. 結果および考察

### 3.1 メダカ胚のDSC曲線

Fig.1に未処理のメダカ胚におけるDSC曲線の一例を示す。氷核生成温度は-20.8℃、平衡凝固点は-2.8℃にある事が分かる。尚、ここで全ての結果は示さないが、未処理の場合であれば $T_f$ は-15~-20℃付近、 $T_m$ は2~-3℃付近にある事が分かった。本研究ではこれら未処理の胚より得られた4回の測定の平均値から、 $T_f^0$ ならびに $T_m^0$ をそれぞれ-19.9℃、-2.6℃として各浸漬処理を行った胚の $\Delta T_f$ ならびに $\Delta T_m$ を求めた。

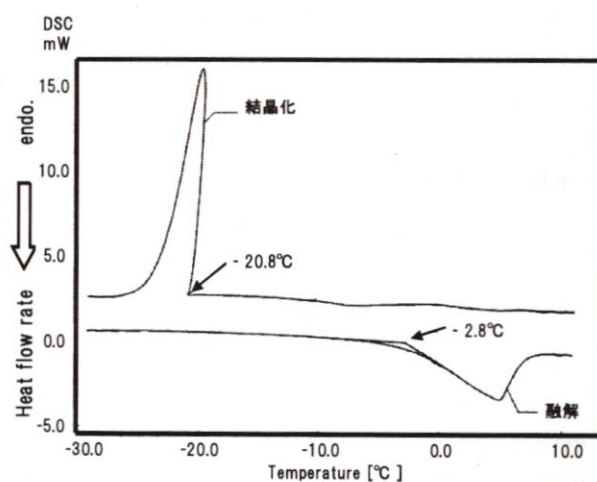


Fig.1 DSC curves obtained from Medaka embryo. The upper curve shows cooling; the lower curve shows warming.

### 3.2 メダカ胚の凍結・解凍後の状態

未処理の胚の氷核生成温度が-15~-20℃付近である事が確認された為、-15℃付近まで冷却し、DSC曲線上に結晶化に伴う発熱ピークが確認さ

れない状態で昇温した未処理の胚 (写真 a) と、 $-25^{\circ}\text{C}$  付近まで冷却し、発熱ピークが確認された状態で昇温した未処理の胚 (写真 b) を調製し、凍結の有無と胚の状態について光学顕微鏡にて観察を行った。結果を Fig.2 に示す。画像から胚の最も外側にある卵膜については凍結の有無に関わらずその存在を確認する事ができるが、胚の内部については凍結により著しく損傷している事が分かる。この結果から DSC 曲線上の冷却過程において発熱ピークを生じた個体は、これと同様な損傷状態にあると考えられ、結晶化に伴う発熱ピークの有無が生死の判断指標の一つになり得る事が示唆された。尚、参考ではあるが、 $-15^{\circ}\text{C}$  付近まで冷却し発熱ピークが確認されなかった未処理の胚の中には、成魚にまで成長する個体も確認された。

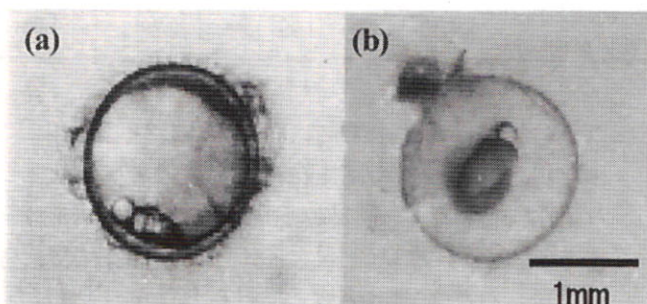


Fig.2 Photomicrographs of a Medaka embryo. (a) unfrozen embryo (b) frozen embryo

### 3.3 浸漬処理胚における $\Delta T_f$ , $\Delta T_m$ , $\lambda$ の関係

次に各浸漬処理を行った胚の DSC 測定から、氷核生成温度,  $T_f$  と平衡凝固点,  $T_m$  を求め、氷核生成温度降下度,  $\Delta T_f = T_f^0 - T_f$  と平衡凝固点降下度,  $\Delta T_m = T_m^0 - T_m$  の関係として eq.1 に示す直線関係が成立するか確認を行った。

$$\Delta T_f = \lambda \Delta T_m \quad (1)$$

ここで  $T_f^0$ ,  $T_m^0$  は、それぞれ未処理の胚の氷核生成温度,  $-19.9^{\circ}\text{C}$  と平衡凝固点,  $-2.6^{\circ}\text{C}$  となる。Fig.3(a)~(d) に各凍結保護物質水溶液に浸漬したメダカ胚の  $\Delta T_f$  と  $\Delta T_m$  の関係、Fig.4 にはこれらの結果と比較する為、筆者らが以前にエマルション法により求めた<sup>5)</sup> 各凍結保護物質水溶液の均質核生成温度,  $\Delta T_h$  と平衡凝固点,  $\Delta T_m$  の関係を示す。

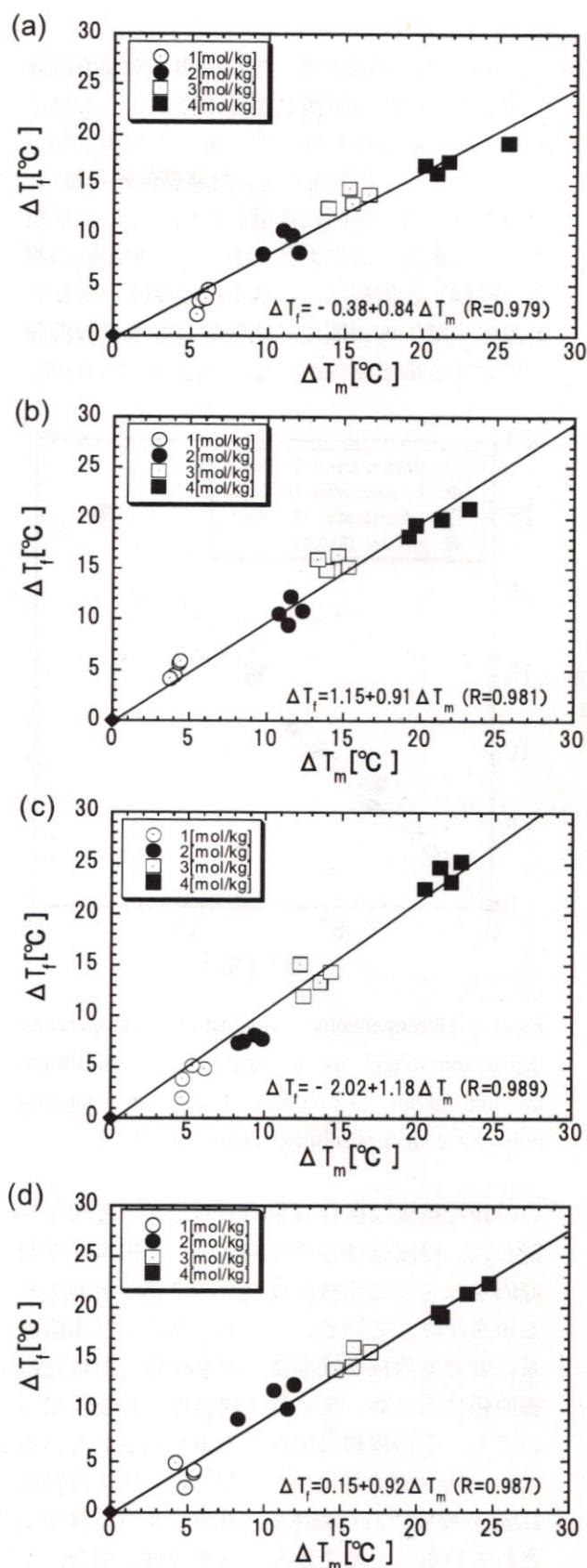


Fig.3 Nucleation temperature depression ( $\Delta T_f$ ) as a function of equilibrium melting points depression ( $\Delta T_m$ ) in Medaka embryos. (a) ethylene glycol (b) 1.3-propanediol (c) 1.4-butanediol (d) glycerol

Fig.3(a)~(d)の結果から、何れの場合も浸漬溶液の濃度と共に胚の平衡凝固点は降下し、これに応じて核生成温度も降下する事が明らかとなった。この事から本研究で用いた凍結保護物質は、浸漬処理により胚内に透過していることが示唆された。また、メダカ胚であっても水溶液の場合 (Fig.4) と同様に、氷核生成温度降下度と平衡凝固点降下度の間には比較的良好な直線関係が成立する事が明らかとなった( $R=0.97\sim 0.98$ )。

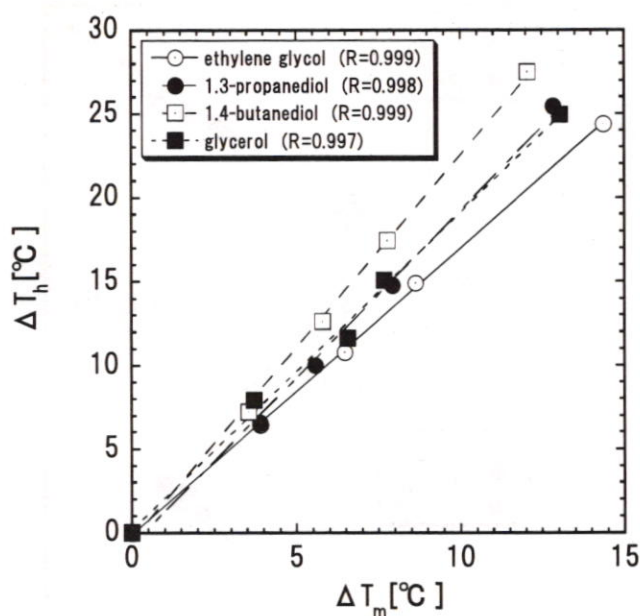


Fig.4 Homogeneous nucleation temperature depression ( $\Delta T_h$ ) as a function of equilibrium melting point depression ( $\Delta T_m$ ) in aqueous polyhydric alcohol solutions. (Ref. 5)

このような結果は保存対象物のサイズ・種類等を限れば、浸漬処理された細胞・生体組織の平衡凝固点ならびに氷核生成温度の予測が可能であることを示唆している。一般的に水および水溶液系における氷核生成温度は液滴体積の対数と直線関係にある事、更に核生成温度の再現性についても、その体積に依存する事が示されている<sup>6)</sup>。一方メダカ胚について見ると、その直径は1.2mm程度であり個体差は非常に小さい事が示されている<sup>3)</sup>。したがってメダカ胚の場合、生体組織ではあるものの、その氷核生成温度は平衡凝固点との間に一定の再現性を生じたものと考えられる。また、本研究で用いた胚は発生段階が比較的初期であった為、細胞の分化が殆ど

進行しておらず一つの液滴として見なせた事や、凍結保護物質が均一に拡散出来るような状態であった事も氷核生成温度の再現性が高かった理由として考えられる。一方、各直線関係より得られる過冷却能、 $\lambda$ についてはTable 1に示す様に ethylene glycol < 1.3-propanediol < glycerol < 1.4-butanediol の順となり、本研究で用いた凍結保護物質の中では、1.4-butanediol による処理がメダカ胚の過冷却を最も促進する事、(平衡凝固点の割に、低い氷核生成温度が得られる事) が明らかとなった。

Table 1  $\lambda$  of aqueous solutions and embryos

	$\lambda(\Delta T_f/\Delta T_m)$			
	ethylene glycol	1.3-propanediol	1.4-butanediol	glycerol
embryos	0.84	0.91	1.18	0.92
aqueous solutions (W/O emulsion)	1.70	1.99	2.29	1.89

以上の結果から、水溶液に限らず生体組織を用いた場合であっても、凍結保護物質の種類により過冷却能はそれぞれ異なり、その評価は可能である事が示されたと言える。また、メダカ胚から得られた $\lambda$ と水溶液系で得られた $\lambda$ を比較すれば、両者は略同様な傾向にある事が分かった。この事から細胞・生体組織の $\lambda$ についても水溶液から予測が可能である事、即ち水溶液系での $\lambda$ が細胞内凍結を抑制する上での一つの指標となる事が示されたと言える。最近筆者らは、低分子から高分子に至るまで種々の水溶液から得られる $\lambda$ が主に水中における溶質の自己拡散係数に依存する事を示した<sup>7)</sup>。従って、本研究における結果は間接的ではあるものの、透過型凍結保護物質の過冷却能を評価する上で自己拡散係数等の水溶液物性を示すパラメータが、その指標に成り得る事を示唆している。尚、得られたメダカ胚の $\lambda$ は、何れの場合も水溶液の $\lambda$ の約1/2倍程度であるが、これは不均質核生成(異物による触媒効果)により過冷却が促進しなかった為と考えられる。

#### 4. 結論

メダカ胚を各種透過型凍結保護物質で浸漬処

理した場合、水溶液系と同様に氷核生成温度降下度、 $\Delta T_f$ と平衡凝固点降下度、 $\Delta T_m$ の間に一次の直線関係が成立する事が確認された。更にこの直線関係から得られた胚の $\lambda$ とエマルション法にて得られた水溶液の $\lambda$ は同様な傾向にある事が明らかとなった。従って、凍結保護物質により処理された細胞・生体組織の $\lambda$ は、その保護水溶液の $\lambda$ から予測可能である事が示唆されたと言える。

## 文 献

- 1) 酒井昭：「凍結保存」, pp. 3-56, 朝倉書店, 東京 (1992).
- 2) D. H. Rasmussen and A. P. Mackenzie: "Water Structure at the Water Polymer Interface", (ed. by H. H. G. Jellinek), pp. 126-145, Plenum Press, New York (1972).
- 3) 岩田鷹司編：「メダカ学」, pp.144-272, サイエнтиスト社, 東京 (1993).
- 4) 神戸博太郎：「熱分析」, pp.71-87, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1986).
- 5) N. Kimizuka and T. Suzuki: J. Phys. Chem. B., **111**, 2268(2007).
- 6) E. K. Bigg: Proc. Phys. Soc. B., **66**, 688(1953).
- 7) N. Kimizuka, C. Viriyarattanasak and T. Suzuki: Cryobiology., **56**, 2268(2008).