Microb. Resour. Syst. **40**(2): 93-103, 2024

受賞総説

難保存性担子菌，動物細胞および藻類培養株の長期保存法と管理技術の開発と普及
（2024 年度日本微生物資源学会技術賞受賞）

佐藤真則

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクロジーセンター（NBRC）特許生物寄託センター
〒292-0818　千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

Development of long-term preservation techniques for difficult-to-preserve basidiomycetes and appropriate management techniques during transport of animal cells

Masanori Sato
International Patent Organism Depositary, Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba, 292-0818, Japan

はじめに

生物資源の適切な保存や管理は，基礎，応用，開発のあらゆる研究分野において重要な基盤技術の一つである．そのなかでも凍結保存法は最もよく用いられている生物資源の長期保存法の一つであり，多様な微生物や培養細胞等の保存に利用されている．一方で凍結に対する感受性はさまざまで，対象となる生物資源ごとに適切な保存法を開発し，保存状態の評価を行う必要がある．ここでは，凍結保存が困難な生物資源の保存技術の開発と凍結保存中の温度変化に影響を受ける生物資源に対する管理技術の開発について述べる．具体的には一般的な凍結保存法では保存が困難な担子菌株に対し，多孔性担体のバーミキュライトを培養基材として用いた保存性を向上させた凍結保存法の開発と，動物がん細胞株を用いた輸送時の不適切な温度変化による生物資源への悪影響の検証による標準的な細胞輸送に必要な管理技術の開発について述べる．なお受賞講演で発表した微細藻類の簡便な生死判定法の開発についてはここでは割愛した．

E-mail: sato-masanori2@nite.go.jp

難保存性担子菌の凍結保存法の開発

1）背景

凍結保存は細胞を凍結し代謝活動を停止させ細胞を休止状態にすることで長期の生存を図る保存法であり，微生物の多くや動物細胞といった生物資源の品質を保持しながら長期保存が可能である．たとえば担子菌を含む糸状菌では，菌糸の生育した寒天ディスクを10％グリセロール溶液に入れて緩慢凍結を行う ‘disk 法’ が一般的に用いられている（Challen & Elliot, 1986; Danell & Flygh, 2002; Elliot, 1976; Stalpers *et al*., 1987; Hoffmann, 1991; Hwang, 1960; Ito & Nakagiri, 1996; Croan *et al*., 1999; Ryan & Ellison, 2003）．しかし，たとえば菌根菌と呼ばれるマツタケやハツタケといった産業上有用な種が属するグループでは，disk 法では生存率や品質を保持した状態での凍結保存が困難なものが少なくない．このような菌株は継代培養によって維持されるが，継代培養による菌株の保存は，マンパワーが必要になるだけでなく，死滅や形質変化（Ryan & Smith, 2004; Sakurai *et al*., 2019; Smith, 1991），他の微生物等による汚染のリスクがあるため，安定した凍結保存法の開発が求められている．これまでこの問題を解決するために種子，おがくず，チャコールフィルター等のような培養基材を用いて凍結保存性を向上させる報告があったが（Kitamoto *et al*., 2002; Mata *et*

al., 2000; Stielow *et al*., 2012; Uzuhashi *et al*., 2020), われわれはそのなかで，継続的に長期凍結保存に関する検証が行われていた Homolka *et al*.（2001）が開発したパーライト法［Homolka's perlite protocol: HPP, 図 1（1）］を土台として改良を行った．HPP はパーライトと呼ばれる保水性，通気性に優れた多孔性担体を 5%（v/v）グリセロールを添加した培地とともにクライオチューブに添加し，そこに菌体を加えてクライオチューブ内で菌体をそのまま培養し，これを緩慢凍結法により凍結保存する方法である．培養前の段階でクライオチューブを使用し凍結保護剤もあらかじめ添加しているため，凍結時に菌糸を傷つけることなく操作が簡便な方法である（Homolka *et al*., 2001, 2003, 2006, 2007, 2010; Homolka & Lisá, 2008）．HPP は広範囲の担子菌類の凍結保存を可能にしているが，われわれは NBRC に保管されている 2000 株近い担子菌株のうち，Homlka らが検証していなかった菌根菌（一部腐生菌含む）のなかで disk 法による凍結保存で問題があったさまざまな凍結感受性をもつ NBRC 株（123 株）を選別し，それらに HPP を適用してその保存性について検証した．そして HPP では凍結保存が難しかった表 1 に示した 10 株と *Amanita pantherina* NBRC 23788 と *Amanita rubescens* NBRC 8266 を加えた 12 菌株を凍結感受性モデル菌株として選定し（Sato *et al*., 2019），その株を用いて HPP 法の改良を行った．

2）HPP の改良

まず HPP の原報（Homolka *et al*., 2001）では凍結保護剤存在下で培養していたが，グリセロールの培養中の菌の生育への影響を考慮するとともに複数の凍結保護剤の検討を可能とするために，凍結保護剤の添加を凍結チューブ内での培養後に添加することとし，その浸漬時間の最適化について検証した．HPP で凍結保存性が良く，かつ disk 法では難保存性の *Volvariella volvacea* NBRC 31104 を用いて凍結保護剤への浸漬時間を検証したところ，凍結処理の 48 時間前に凍結保護剤を添加すれば同等の凍結保護効果が得られることがわかったため（Sato *et al*., 2012），これを凍結保護剤の検討の条件とした．次に HPP で使用された 5% グリセロールのほかに，グリセロールまたはジメチルスルホキシド（DMSO）とトレハロースを各濃度で組み合わせて凍結保護剤の効果を検証することで凍結保護剤の改良を行った．グリセロールと DMSO の効果を 5% および 10% 濃度で比べたところ，明らかに DMSO の凍結保護効果が高く，その最適濃度は 5% であった．

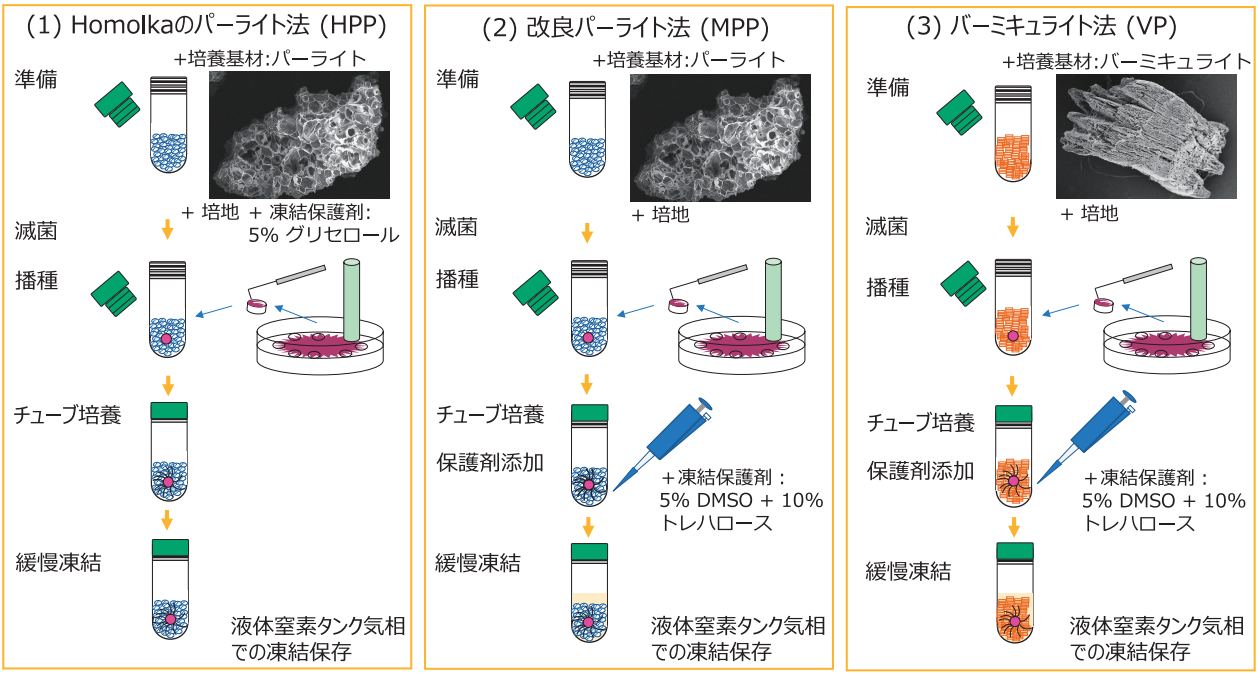

図 1　担子菌培養株に対する 3 種類の凍結保存法の概略

（1）Homolka のパーライト法（Homolka *et al*., 2001），（2）改良パーライト法（Sato *et al*., 2019），（3）バーミキュライト法（Sato *et al*., 2020）

表1 Homolkaのパーライト法（HPP），改良パーライト法（MPP），バーミキュライト法（VP）の5年間凍結後の生存率の比較

菌株名	培養条件			生存率：%		
	培地 No.	チューブ培養期間（週）	凍結融解後培養期間（週）	HPP	MPP	VP
Amanita citrina NBRC 8261	26	6	6	0（10）	60（5）	100（10）
Amanita spissa NBRC 8263	7	5	6	0（10）	100（5）	100（10）
Kobayasia nipponica NBRC 30352	26	5	4	N.D.	100（5）	100（10）
Lactarius akahatsu NBRC 33156	7	6	6	N.D.	100（5）	80（10）
L. akahatsu NBRC 33157	7	6	6	N.D.	100（5）	100（5）
Lactarius hatsudake NBRC 32794	7	5	4	20（10）	100（4）	100（5）
L. hatsudake NBRC 33155	7	5	4	30（10）	100（5）	100（10）
Sarcodon aspratus NBRC 32814	26	6	6	N.D.	100（5）	100（10）
S. aspratus NBRC 32815	26	6	6	20（10）	100（5）	100（10）
T. flavovirens NBRC 33143	26	5	3	0（10）	100（5）	100（10）

培地 No.：NBRC 培地番号（https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/cultures/culture-list.html）
チューブ培養期間（週）：凍結保存前に凍結チューブ内で菌糸を培養した期間，凍結融解後培養期間（週）：凍結融解後の生残性試験を行った期間，生存率：括弧内の生残性試験に用いたサンプル数に対して目視レベルで菌糸の増殖を確認できたサンプル数の％を生存率として示した．N.D.：no data

またトレハロースの効果を0%，5%，10%濃度で比べたところ，凍結保護効果は濃度依存的に高くなり10%添加した場合が最も効果が高かった．以上のことから終濃度5% DMSO（v/v）+10%（w/v）トレハロース（5D10T）となる凍結保護剤が最適であった．以上凍結保護剤添加のタイミングと凍結保護剤の改良を行い，改良パーライト法（modified perlite protocol: MPP）を開発した［図1（2）］（Sato *et al.*, 2019）．MPPは，HPPでは全く凍結保存できなかった凍結感受性モデル株12株のうち9株で凍結保存半年後の生存率を80%以上に改善することができた．しかし，*Amanita citrina* NBRC 8261のような一部の菌株の生存率が不安定であったことから培養基材に焦点を当てさらに改良を行った．

3）バーミキュライト法の開発

増殖の遅い担子菌のなかにはパーライト上の生育があまり良くなく，生存率も良くないケースがあった．そこで菌糸の生育がパーライトよりも良い多孔性担体があれば生存率の改善につながる可能性があるかもしれないと考え，鹿沼土，ゼオライト，軽石，バーミキュライトを培養担体として用い，凍結感受性モデル菌株12株について凍結チューブ内の菌糸の増殖試験を行ったところ，鹿沼土，ゼオライト，軽石では菌糸の増殖がパーライトよりも顕著に劣ったが，バーミキュライトでは，12菌株中6菌株で，明らかにパーライトよりも旺盛な菌糸の増殖が観察され，残りの6菌株についてもパーライトとほぼ同等の増殖を示した．バーミキュライトは，ひる石を高温で加熱風化処理し膨張させたアコーディオン状の空隙層構造の多孔性担体で，保水性，通気性，保肥性があることで知られる．そこで5種の凍結感受性モデル株に対し，パーライトとバーミキュライトをそれぞれ培養基材に用いて培養し，菌糸を伸長させた凍結チューブに凍結保護剤を入れないで凍結後2週間後の復元率を調べたところ，パーライトを培養基材として用いた場合では*Amanita spissa* NBRC 8263と*Lactarius hatsudake* NBRC 33155で生存率が確認されたが，バーミキュライトを培養基材として用いた場合には，パーライトの場合で生存率が確認された2株に加え*Amanita citrina* NBRC 8261と*Sarcodon aspratus* NBRC 32814を含む4株で生存率が確認された（Sato *et al.*, 2020）．なお，培養基材を添加しない場合にはこれらの菌株の生存率は確認されなかったことから，パーライトやバーミキュライトには凍結保護効果があり，その効果はバーミキュライトのほうがより多くの菌株に有効である可能性が示唆された．そこで，培養基材をバーミキュライトとし，凍結保護剤を5%（v/v）DMSO+10%（w/v）トレハロースとする方法をバーミキュライト法（vermiculite protocol: VP）と命名し（Sato *et al.*, 2020），さらに検証を行うこととした．またMPPでは凍結2週間後の生存率が不安定であった*Amanita citrina* NBRC 8261においてもVPでは100%の生存率を示した．改めて3つの方法の概略を図1に示す．

VPの手順は以下のとおりとなる．約0.2 gのバーミキュライトを2 m*l*容のクライオチューブに入れ，0.8 m*l*の培地を入れた後オートクレーブ滅菌を行う．バーミキュライト上での培養は，滅菌したバーミキュライトと培地の入ったクライオチューブに直径5 mmの滅菌済みストローで打ち抜いた菌体付き寒天片を1つ入れてそこで培養を行い，目視レベルで増殖が確認できるまで培養する．次にDMSO 15%（v/v）+トレハロース30%（w/v）をチューブ1本当たり0.4 m*l*ずつ添加し，静かにピペッティングし，最終濃度をDMSO 5% + トレハロース10%（5D10T）にする．それを48時間4℃に静置した後クライオチューブを簡易凍結容器に入れ1分間に約1℃の速度で緩慢凍結を行った後，液体窒素タンク気相で保存を行う．復元は30℃で急速融解し5 m*l*の培地でリンスしてからプレートに菌糸が生育したバーミキュライトをおいて培養する．

4）バーミキュライト法の長期保存性について

凍結感受性モデル菌株10株をHPP，MPP，VPによって約5年間液体窒素タンク気相で凍結保存した後の生存率を示したデータを表1に示す．HPPでは検証した6株で*L. hatsudake* NBRC 33155が30%，*L. hatsudake* NBRC 32794と*S. aspratus* NBRC 32815が20%の生存率しか確認できず，それ以外の3株では生存率が確認できなかった（Sato *et al.*, 2021）．これに対してMPPでは*A. citrina* NBRC 8261の生存率が60%であった以外は検証したすべてのサンプルで100%の生存率が確認された．続いてVPでは*L. akahatsu* NBRC 33156で80%の生存率で，それ以外の9株ではすべての菌株のすべてのサンプルで100%の生存率が確認された．このことから，生存率の観点ではMPP，VPのどちらも凍結感受性モデル菌株に有効であることがわかった．次に，MPPとVPまたは，HPP，MPP，VPで菌糸伸長についてコロニー直径を比較することで検証した．まず，表2に示した7株について，MPPとVPとでコロニー直径を比較したところ，t-検定で*A. citrina* NBRC 8261，*A. spissa* NBRC 8263，*L. akahatsu* NBRC 33156，NBRC 33157，*S. aspratus* NBRC 32814の5株でVPのほうが5%または1%の有意水準で有意にコロニー直径が大きかった．次に表3に示したように，HPPとMPPとVPとでコロニー直径を比較したところ，3株ともHPPのコロニー直径に比べMPPとVPのコロニー直径が明らかに大きく，ANOVAによる分散分析でも，3株すべてにおいて1%の有意水準で統計学的有意差が観察された．群間分析でHPPとMPPのコロニー直径を比較したところ，*L. hatsudake* NBRC 33155で5%の有意水準で有意にコロニー直径が大きかった．また，HPPとVPでは*L. hatsudake* NBRC 32794，

表2　改良パーライト法（MPP）とバーミキュライト法（VP）の5年間凍結後のコロニー直径の比較

菌株名	コロニー直径（平均±標準偏差）		p値
	MPP	VP	
A. citrina NBRC 8261	47.3±21.1（3）	81.1±5.8（10）	＜0.001**
A. spissa NBRC 8263	38±5.4（5）	48.7±4.7（10）	＜0.001**
K. nipponica NBRC 30352	68.8±2.9（5）	63.8±10.1（10）	0.303
L. akahatsu NBRC 33156	19.2±11.8（5）	40.3±14.3（8）	0.019*
L. akahatsu NBRC 33157	20.8±1.3（5）	30.9±5.3（10）	＜0.001**
S. aspratus NBRC 32814	21±9.4（5）	55 ±3（10）	＜0.001**
T. flavovirens NBRC 33143	30.4±5.3（5）	26.5±1.9（10）	0.056

コロニー直径：測定に用いたサンプル数を括弧内に示した．Student's t-test，*：P＜0.05，**：P＜0.01

表3　Homolkaのパーライト法（HPP），改良パーライト法（MPP），バーミキュライト法（VP）の5年間凍結後のコロニー直径の比較

菌株名	コロニー直径（平均±標準偏差）			ANOVA	*p*値		
	HPP	MPP	VP	*p*-value	HPP vs. MPP	HPP vs. VP	MPP vs. VP
L. hatsudake NBRC 32794	14.8±17.7（2）	34.1±11.2（4）	55.4±16.2（4）	0.008**	0.08	0.007**	0.116
L. hatsudake NBRC 33155	14.7±6.4（3）	33.2±10.9（5）	60.1±20（9）	＜0.001**	0.049*	＜0.001**	0.014*
S. aspratus NBRC 32815	13.5±2.1（2）	22 ±13.9（5）	62.8±7.4（10）	＜0.001**	0.55	＜0.001**	＜0.001**

コロニー直径：測定に用いたサンプル数を括弧内に示した．Turkey-Kramer法による検定，*：P＜0.05，**：P＜0.01

NBRC 33155, *S. aspratus* NBRC 32815 のすべてで1%の有意水準で有意にコロニー直径が大きかった. 最後に MPP と VP では *L. hatsudake* NBRC 33155 と *S. aspratus* NBRC 32815 の2株で前者が5%, 後者が1%の有意水準で有意にコロニー直径が大きかった. HPP, MPP, VP でコロニー直径の差が顕著であった4菌株のコロニー形態を図2に示す.

以上のことから, MPP と VP は難保存性の担子菌に対して少なくとも5年間の長期保存性を有し, HPP に比べ復元割合を改善させる保存法であると考えられた. さらに融解後の菌糸増殖は MPP よりも VP がさらに優れた方法であることが明らかとなった. このことは, バーミキュライト法が難保存性の担子菌に対する有効な凍結保存法であることを示している.

5) バーミキュライト法の注意点と今後の課題

このようにバーミキュライト法の優位性について示すことができたが, 本法を各実験室で実施する際に注意していただきたい点と今後の課題を以下に述べる.

(1) 凍結チューブについて

検証で使用した凍結チューブはオートクレーブが可能な製品を使用しているが［Nunc, cat. 351934(tube), 363436(cap)］, この製品以外のポリプロピレン製γ滅菌済の製品をオートクレーブ滅菌して使用する場合, 菌株の種類によっては増殖阻害が起こるケースがあったので, 場合によって実験前に対象菌株の増殖テストを行ったほうがよいかもしれない. Homolka らが試験を行った増殖が非常に早い木材腐朽菌ならばほとんど影響がないようだが (Homolka *et al.*, 2006), 担子菌のなかで増殖が遅いものを対象にする場合には特に注意が必要である. 以前われわれが滅菌済の凍結チューブに培地を入れてオートクレーブを掛けた後に菌株を

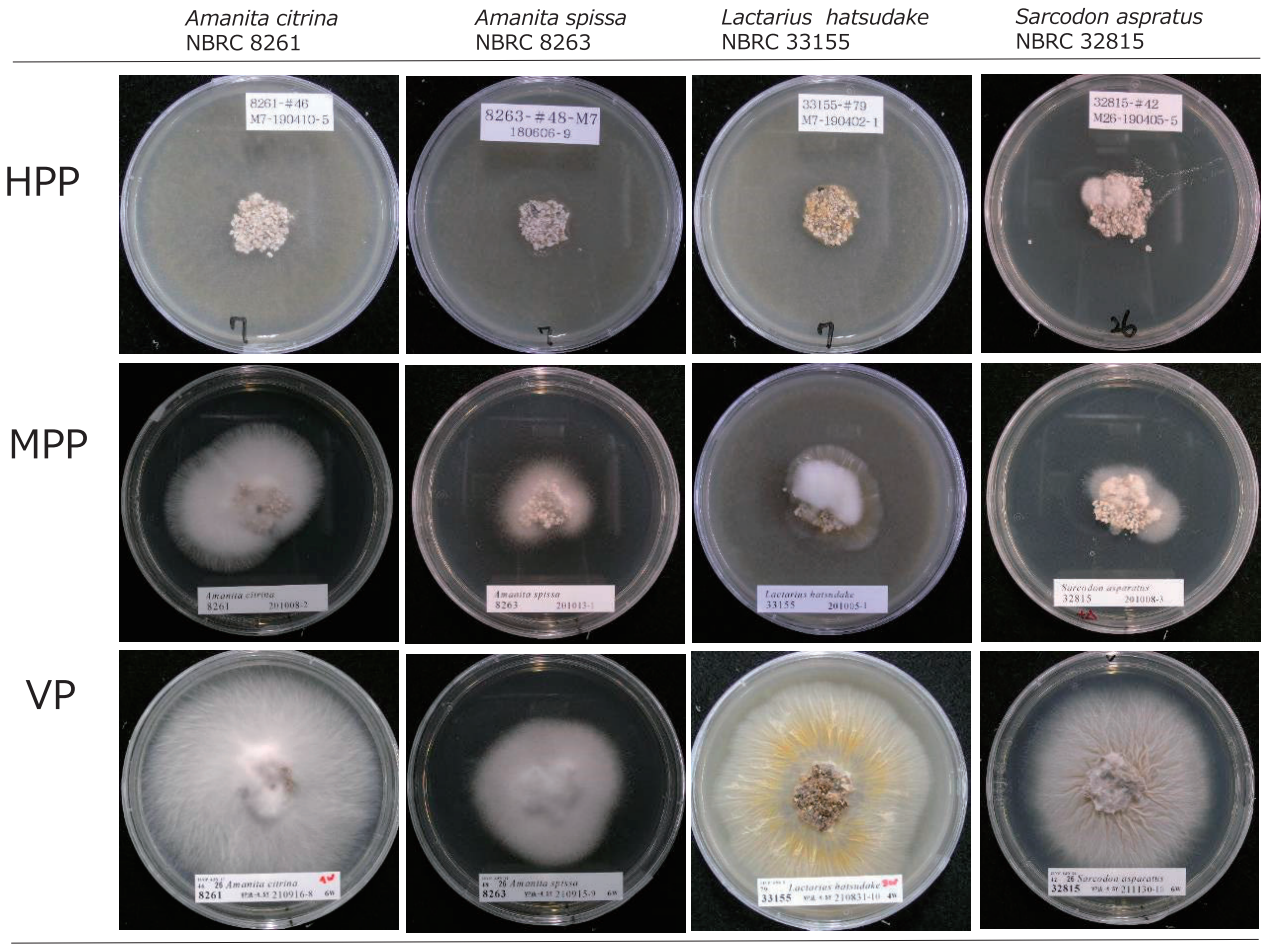

図2 Homolka のパーライト法 (HPP), 改良パーライト法 (MPP), バーミキュライト法 (VP) の5年間凍結後のコロニー形態の比較. 縦軸は3種類の保存法, 横軸は担子菌培養株を示す. 培養期間は表1に示した.

培養したところ，全く増殖しないケースがあった．一方培地やバーミキュライトをあらかじめ別滅菌して，無菌的に滅菌済み凍結チューブに添加して同様の検証を行った場合には，菌糸の増殖阻害は起こらなかった．このことから培地を入れて滅菌済凍結チューブをオートクレーブすることで培地中に何らかの増殖阻害因子が溶出または作られ，それが菌糸の増殖を阻害することが考えられる．したがって前述のチェックを行って菌糸の増殖に悪影響がある場合には，培地とバーミキュライトを別滅菌し，安全キャビネット内で混合するとよいだろう．この方法は簡便性を犠牲にすることになるが，難凍結保存性の担子菌の保存のメリットとのトレードオフで選択肢の一つになると考える．

(2) 凍結保護剤の選択

われわれの以前の検証で，難凍結保存性の担子菌のうちいくつかの *Amanita* 属と *Sarcodon aspratus* において，12%グリセロールが強い毒性を示すことが確認された（Sato *et al*., 2019）．一方これらに対してDMSO 5%は凍結保護性を保ちつつ毒性も観察されなかったため，今回の検証に使用した．しかし，このような毒性試験をすべての菌株に対して行っているわけではない．一般的にはグリセロールよりもDMSOの毒性が高いといわれているため，使用する菌株に対する凍結保護剤の毒性試験を行っていただきたいのと，復元時には凍結保護剤を除去するためにリンスを行ったほうがよい．次にこれに関連して，凍結保護剤は添加の工程で15％（v/v）DMSO＋30％（w/v）トレハロース0.4 m*l*の凍結保護剤を入れているが，この工程は微生物にとって大きなストレスになっているのではないかという指摘をいただいた．それを受けて，10％（v/v）DMSO＋20％（w/v）トレハロース0.8 m*l*の凍結保護剤を入れる予備検証を行ったところ，より少ない浸透圧ストレス下で同様の保護効果が得られた，これは一例だがほかにも改善の余地があると思われる．

6) さらに改良して対象菌株を拡大するために

(1) 凍結速度の検討

凍結保存時にプログラムフリーザーを使用することは，より最適に凍結保存を行うために有効な手段とされているが，これについては検証していない．Homolkaらはプログラムフリーザーを用いた1℃/1分間の速度で冷却する方法をとっていたが（Homolka *et al*., 2001），われわれはその工程で簡易凍結装置（Mr. Frosty™）を用いて1分間に約1℃の速度で緩慢凍結を行うことで十分な結果を得られたため，それ以上の検討を行っていない．今後この方法でも凍結保存が難しい場合には，この凍結速度を検討する余地があると思われる．

(2) 復元時の菌体洗浄

復元時に凍結保護剤を除去するために，担子菌の培養に用いる培地を用いて菌体洗浄を行うが，この工程についての最適化の検証を行っていない．もう一つの長期保存法の乾燥法については，復元液についての検証がなされており，手法や微生物によって最適化されている．本法においても微生物の種類によってはその濃度や種類を変えることで，さらなる保存性の向上を見込める可能性がある．

(3) 子実体形成能の検証

これまでは担子菌の凍結保存に対する効果と菌糸の増殖の観点から方法の評価を行ったが，最も大切な長期保存後も子実体形成能を維持しているかどうかについて十分な検証ができていない．今後の検証でこの点においても有効性が示され，難保存性の担子菌の保存法として普及し，さらなるカルチャーコレクション業務の向上や関連研究や産業の発展に貢献することを期待したい．

凍結保存中の温度変化に影響を受ける生物資源に対する管理技術の開発

1) 背景

産業，学術，医療の各分野で広く利用される動物細胞を含む生物材料は，液体窒素タンク気相（−170℃）のような水のガラス転移温度−130℃以下（Friedler *et al*., 1988; Mazur, 1963; Mazur *et al*., 1972; Meryman, 1974）で保存することで，生存率，増殖能，各種細胞機能を維持することが可能である（Gao & Critser, 2000）．一方動物細胞では，凍結サンプルの移動や取り出しのような日常管理における温度変動が融解後の増殖や細胞品質に悪影響を及ぼすことが報告されている（Vysekantsev *et al*., 2005; Smith *et al*., 2007; Germann *et al*., 2013; Angel *et al*., 2016; Yang *et al*., 2016; Pogozhykh *et al*., 2017; Xu *et al*., 2021; Carrell *et al*., 1996）．末梢血単核球（PBMC）（Germann *et al*., 2013; Angel *et al*., 2016）や多能性幹細胞（MSC）（Xu *et al*., 2021; Carrell *et al*., 1996）では，液体窒素保存中のサンプルの出し入れによる温度上昇と下降の繰り返し（温度変動）によって，解凍後や一晩の回復後の細胞生存率の低下が引き起こされることが報告されており，さらにPBMCにおいては，特定の抗原に対する免疫

応答の低下も報告されている（Germann *et al*., 2013; Angel *et al*., 2016）．またこれら日常管理の温度変動以外にも，ドライアイス入り容器での凍結輸送中の不適切な温度変化（以降，凍結ストレスとする）による凍結試料への悪影響も報告されている（Smith *et al*., 2007, Henderson *et al*., 2019）．一部を除くほとんどの動物細胞はドライアイスを冷媒とした凍結状態での輸送が可能であるが，凍結サンプルの温度が上昇してしまう不適切な条件では，輸送中に－60℃から－20℃またはそれ以上の温度にさらされる可能性があり，融解後の動物細胞の生存率や増殖ならびに細胞品質に悪影響があるとの報告がある（Smith *et al*., 2007）．特許微生物寄託センターにおいても，ドライアイスがほとんど入っていない状態で到着した動物細胞寄託株の融解直後の生存率や細胞接着率が非常に低かった事例がある．輸送中の凍結ストレスにより融解後の細胞増殖に悪影響があることは，細胞培養の管理における重大な問題となりうる．細胞培養では推奨播種濃度の範囲が狭く，継代間隔も指定されていることが多いため，不適切に管理された細胞は推奨播種濃度より薄く播種されたことになり，その後の細胞増殖やその後の継代スケジュールに悪影響が出る．さらに培養期間が長引くことにより，分裂回数が有限な正常細胞では細胞老化も問題となる．このような事態を避けるために凍結ストレスに対する動物細胞への悪影響に関する情報が必要であるが，悪影響が生じる温度や静置時間の目安や，細胞の種類による感受性の差の有無に関する情報がほとんどない．そこで，凍結ストレスが動物細胞に与える悪影響について詳細に検証し，エビデンスに基づいた動物細胞の輸送形態の標準化への有益情報を提言することで，カルチャーコレクション事業の着実な運用に貢献するために検証を実施した．

2）検証概要

凍結ストレス処理温度には，動物細胞の致死温度である－20℃と－80℃（ドライアイスの昇華温度の－78.6℃に近い温度）の中間である－50℃，－80℃と－50℃の中間である－65℃，コントロールとして－80℃を設定した．そして静置時間は，国内輸送を想定した1～3日，国際輸送では3～7日とした．これらの条件を組み合わせて－80℃ 7日間，－65℃ 1，3，7日間，－50℃ 1，3，7日間の計7条件を輸送中の凍結ストレスのモデルとした．使用した動物がん細胞株については，Google Scholar で上位20位以内に検索された（許 , 2008）接着性動物がん細胞株7種類（CHO-K1，COS-1，HeLa，HepG2，MCF7，MDCK，293T）と浮遊性動物がん細胞株2種類（HL-60，Jurkat）併せて9種類をモデル株として使用した．実験条件の概要は図3に示した．同一 lot で凍結サンプルを作製した各動物がん細胞株を液体窒素タンク気相に凍結保存し，各実験条件に静置した後実験まで液体窒素タンク気相で凍結保存した．実験では，37℃で融解後トリパンブルー排除法により生存率を測定し，各条件で同じ細胞濃度になるように播種して2日後の細胞数を測定した．各実験のより詳細な条件については参考文献を参照していただきたい（Sato *et al*., in press）．

3）凍結中の温度変化によって動物細胞株が受ける悪影響についての検証

まず融解直後のトリパンブルー排除法（Tennant, 1964）（図3）による生存率を比較したところ，液体窒素タンク保存の場合の生存率と各種凍結ストレスを与えた場合の生存率とでほとんど差はなかった．一方，融解2日後の細胞数を比較したところ，液体窒素タンク保存時に比べ各種凍結ストレスを与えた場合では細胞数の減少が多くのがん細胞株で観察された．そこでその違いを可視化するためにヒートマップを作成した．ヒートマップは液体窒素タンク保存の場合の細胞数を分母にし，凍結ストレスを与えた場合の細胞数を分子として比を取り，細胞株ごとに表示して図4にマトリックス化した．その際に，ヒートマップを4段階で示した．そして最もきつい凍結ストレスである－50℃ 7日間処理の比の降順でソートを行った．結果として，－80℃ 7日間ではすべての細胞株で全く影響は観察されなかった．一方，－65℃と－50℃を比較すると，－65℃では最も静置時間の長い7日間でもほとんどの細胞株で影響がなかったのに対し，－50℃では1日間でも9株中4株の細胞株において7割から5割程度に細胞数の比が減少した．そして静置時間が3日間になると半数以上の5株で細胞数の比の減少が確認され，特に COS-1，HL-60，293T では対照区に比べ3割から4割程度まで減少した．7日間静置で影響はさらに大きくなり，CHO-K1 を除く8株で細胞数の比の減少が確認され，半数以上の5株で細胞数の比が半分以下に減少し，HL-60 と 293T ではその比の減少が2割以下となり深刻な影響が観察された．このことから凍結ストレスは－65℃と－50℃では受ける悪影響は大きく異なり，－50℃に置かれることで動物がん細胞株は融解後の増殖に悪影響を受けることがわかった．一方で，この悪影響は細胞株によって違いが見られた．

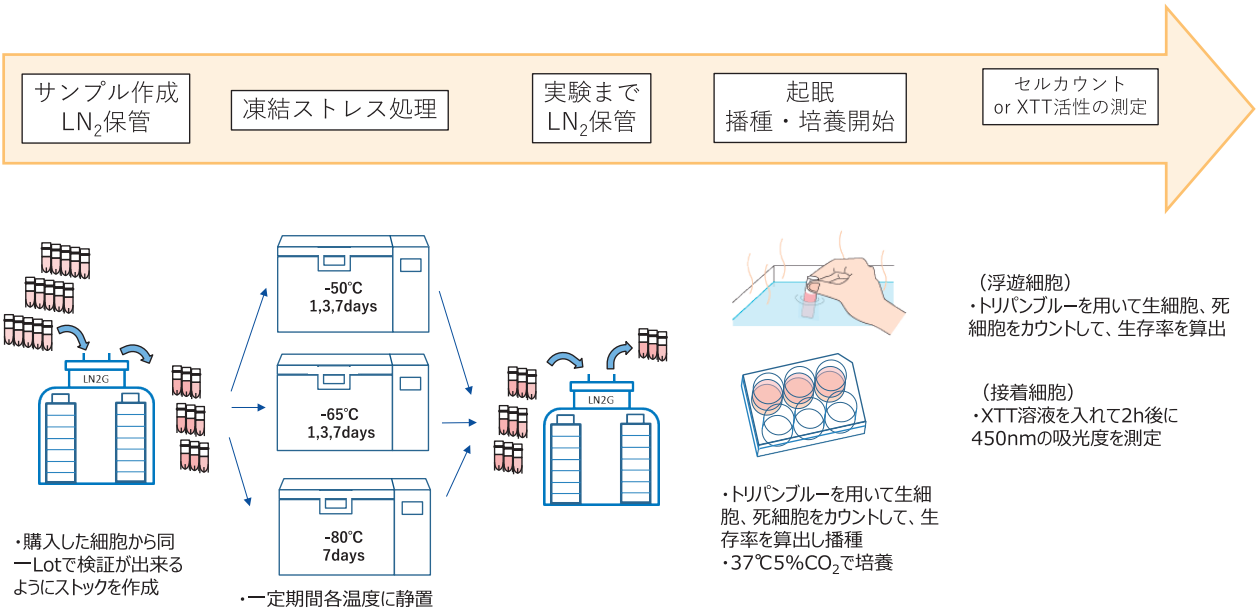

図 3　凍結ストレスが動物がん細胞株に与える悪影響の検証実験の概略

No.	静置温度 / 静置時間 / 細胞株名	-80℃	-65℃			-50℃		
		7 days	1 days	3 days	7 days	1day	3days	7days
1	CHO	1.30	1.21	1.14	1.34	1.23	0.92	0.78
2	HeLa	0.79	1.15	1.07	0.88	1.09	0.87	0.74
3	MDCK	0.95	1.24	1.30	1.02	0.98	1.14	0.69
4	HepG2	0.92	0.95	0.88	0.88	0.96	0.83	0.67
5	MCF7	1.04	1.09	0.96	0.85	0.75	0.53	0.44
6	Jurkat	1.02	0.99	1.05	0.95	0.82	0.52	0.38
7	COS-1	0.77	0.78	0.88	0.74	0.55	0.36	0.28
8	HL-60	0.97	0.89	1.03	0.83	0.56	0.43	0.20
9	293T	1.11	1.03	0.96	0.72	0.62	0.27	0.11

比：各保存条件の細胞数/LN_2保存の細胞数
0.76以上
0.51～0.75
0.26～0.50
0.25以下

図 4　ヒートマップによる 9 株の動物がん細胞株の凍結ストレスに対する融解後 2 日目の細胞数への影響の視覚化
対照区である液体窒素保存時の融解後 2 日目の細胞数を分母とし，凍結ストレスを掛けた各試験区の同一条件の細胞数を分子として比を取って表に示した．ヒートマップの色は，1～0.76 の比は緑色，0.75～0.51 の比は黄色，0.5～0.26 はオレンジ色，0.25～の比は赤色で示した．CHO-K1：チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株，HeLa：ヒト子宮頸部癌由来細胞株，MDCK：イヌ腎臓由来細胞株，HepG2：ヒト肝癌由来細胞株，MCF7：ヒト乳癌由来細胞株，Jurkat：ヒト T 細胞白血病由来細胞株，COS-1：アフリカミドリザル腎臓由来細胞株，HL-60：ヒト骨髄性白血病由来細胞株，293T：ヒト胎児腎臓由来細胞株

マトリックスの上部にある CHO-K1 や HeLa ではほとんどの試験区で影響を受けなかった．一方 HL-60 や 293T では大きく影響を受けており，細胞株の違いによっても凍結ストレスに対する感受性が異なることが示唆された．

まとめとして，動物がん細胞株は凍結が維持されていても凍結ストレスによって細胞生存率は低下し，－65℃と－50℃の細胞への悪影響の差は非常に顕著であったことから細胞を－50℃付近に置くことは著しく生存率を低下させる可能性があることを認識すべきであることが明らかとなった．今回明らかに影響が認められた－50℃ 3 日間や－50℃ 7 日間の条件は，国内の

遠方や僻地間の輸送ならび海外輸送時に起こりうる環境であり，注意が必要であるのはもちろんのこと，−50℃ 1日間の条件でも9株中4株で細胞増殖に悪影響があったことは，通常の国内輸送でも十分悪影響が出る恐れがあることを示している．これらを踏まえて，細胞の輸送においては，輸送時の凍結ストレスについての十分な認識と十分なドライアイスの充填，輸送中の保管容器内の温度変化の経時的なモニタリング，ならびに迅速な輸送が細胞の性状の維持に重要であると考えられる．

4）今後の課題

今回の結果から，動物がん細胞株は凍結ストレスによって融解後の増殖に悪影響を受け，その感受性は細胞の種類によって異なっていることが明らかになったが，現段階ではこれらの結果がすべての動物細胞に普遍的に適用できるかどうかについては情報が不足している．また今回の結果からは，動物種と凍結ストレスに対する感受性の違い，あるいは接着細胞と浮遊細胞との感受性の違い，同一動物の由来の違いと感受性の違いといった普遍的な判断に役立つ情報を得られるまでにはいたっていない．したがって，今後より多様な動物細胞株に対する情報の蓄積を行い同様の評価を行うことが必要であろう．また今回の検証ではがん細胞株のみを対象としたが，さまざまな学術研究や医療分野，創薬分野等で一般的に利用されている正常細胞での評価も不可欠であると考えられる．その際には，一般的に行われている細胞に対する品質管理の視点からの評価も併せて行う必要がある．今後もこれらの情報を蓄積し，それらの情報を統合してデータベース化したうえで外部に発信し，社会実装に向けた取組を進めてゆきたい．

まとめ

生物資源の適切な保存や管理において凍結保存法は最もよく用いられている方法の一つであるが，生物種や細胞の種類の違いによって，凍結に対する感受性はさまざまで，対象となる生物資源ごとに適切な保存法を開発し，保存状態の評価を行う必要がある．今回示した，凍結保存が困難な生物資源の保存技術の開発の成果は，いまだ凍結保存が困難であり継代培養による維持や保存に依存している微生物株に対する凍結保存法の開発への貢献が期待されるとともに，カルチャーコレクション関係者を含め生物資源を扱っている研究者にとって有益な情報となることを願っている．また，凍結保存中の温度変化に影響を受ける生物資源に対する管理技術に関する成果は，動物細胞を適切に輸送するうえで重要なデータであるのはもちろんのこと，実験室で−80℃の超低温槽が使用できない環境や，頻繁な開閉による温度の不安定化の注意点として認識すべきデータである．これらの凍結保存技術と関連技術の向上によりカルチャーコレクションは保存のキャパシティの拡大を図ることができ，輸送法の改良により利活用の促進が可能となる．今後も凍結保存技術の改良を進め，生物資源の系統保存事業に貢献していきたい．

謝　辞

はじめに，この研究開発を始めた当時全くの門外漢であった私に対等に接してくださり，現在に至る長きにわたり私の心の師匠である鳥取大学 中桐　昭先生に感謝いたします．また東京農業大学 鈴木健一朗先生には数多くのご指導いただき感謝いたします．また動物細胞の研究開発では名古屋大学 荒木聡彦先生にご指導をいただき感謝いたします．また今回の総説で触れませんでしたが，子実体形成能検証に関する共同研究でお世話になりました多木化学株式会社の秋津教雄様，株式会社北研の佐藤慎哉様，後藤史和様，森産業株式会社の田中徳男様に感謝いたします．また中川恭好バイオテクロノジーセンター所長はじめ歴代の所長の皆様ならびに荒田芙美子次長ならびに歴代幹部の皆様に感謝いたします．また松尾康範現特許微生物寄託センター長はじめ歴代センター長に感謝いたします．また稲葉重樹様，森　浩二様，田村朋彦様はじめ研究の相談に乗っていただいた歴代特許センター職員の皆様ならびに実際の実験に携わっていただいた，仲田弥生様，野口麻里子様はじめ歴代特許センター職員の皆様に感謝いたします．本研究開発は特許庁委託研究開発事業として行われました．

文　献

Angel, S., von Briesen, H., Oh, Y.J., Baller, M.K., Zimmermann, H. & Germann, A. 2016. Toward optimal cryopreservation and storage for achievement of high cell recovery and maintenance of cell viability and T cell functionality. Biopreserv. Biobank. **14**: 539–547.

Carrell, D.T., Wilcox, A.L. & Urry, R.L. 1996. Effect of fluctuations in temperature encountered during handling and shipment of human cryopreserved

semen. Andrologia **28**: 315–319.
Challen, M.P. & Elliot, T.J. 1986. Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. J. Microbiol. Methods **5**: 11–22.
Croan, S.C., Burdsall, H.H. & Rentmeester, R.M. 1999. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. Mycologia **91**: 908–916.
Danell, E. & Flygh, G. 2002. Cryopreservation of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. Mycol. Res. **106**: 1340–1342.
Elliot, T.J. 1976. Alternative ampoule for storing fungal cultures in liquid nitrogen. Trans. Br. Mycol. Soc. **67**: 545–546.
Friedler, S., Giudice, L.C. & Lamb, E.J. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil. Steril. **49**: 743–764.
Gao, D. & Critser, J.K. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. ILAR. J. **41**: 187–196.
Germann, A., Oh, Y.J., Schmidt, T., Schön, U., Zimmermann, H. & von Briesen, H. 2013. Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. Cryobiology **67**: 193–200.
Henderson, M.K., Goldring, K. & Simeon-Dubach, D. 2019. Advancing professionalization of biobank business operations: A worldwide survey. Biopreserv. Biobank. **17**: 71–75.
Hoffmann, P. 1991. Cryopreservation of fungi. World J. Microbiol. Biotechnol. **7**: 92–94.
Homolka, L. & Lisá, L. 2008. Long-term maintenance of fungal cultures on perlite in cryovials – an alternative for agar slants. Folia Microbiol. (Praha) **53**: 534–536.
Homolka, L., Lisá, L., Eichlerová, I. & Nerud, F. 2001. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. J. Microbiol. Methods **47**: 307–313.
Homolka, L., Lisá, L. & Nerud, F. 2003. Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: comparison of two different freezing protocols. Folia Microbiol. (Praha) **48**: 219–226.
Homolka, L., Lisá, L. & Nerud, F. 2006. Basidiomycete cryopreservation on perlite: Evaluation of a new method. Cryobiology **52**: 446–453.
Homolka, L., Lisá, L. & Nerud, F. 2007. Basidiomycete cultures on perlite survive successfully repeated freezing and thawing in cryovials without subculturing. J. Microbiol. Methods **69**: 529–532.
Homolka, L., Lisá, L., Eichlerová, I., Valášková, V. & Baldrian, P. 2010. Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. Fungal Biol. **114**: 929–935.
Hwang, S.W. 1960. Effects of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. Mycologia **52**: 527–529.
Ito, T. & Nakagiri, A. 1996. Viability of frozen cultures of basidiomycetes after fifteen-year storage. Microbiol. Cult. Coll. **12**: 67–78.
Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S. & Yamanaka, K. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. Mycoscience **43**: 143–149.
Mata, G., Salmones, D. & Ortega, P.M. 2000. Viability and mushroom production of *Lentinula edodes* and *L. boryana* strains (fungi: basidiomycetes) after cryogenic storage of spawn stocks. World J. Microbiol. Biotechnol. **16**: 283–287.
Mazur, P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the lilelihoood of intracellular freezing. J. Gen. Physiol. **47**: 347–369.
Mazur, P., Leibo, S.P. & Chu, E.H. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. Exp. Cell Res. **71**: 345–355.
Meryman, H.T. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **3**: 341–363.
Pogozhykh, D., Pogozhykh, O., Prokopyuk, V., Kuleshova, L., Goltsev, A., Blasczyk, R. & Mueller, T. 2017. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. Stem Cell Res. Ther. **8**: doi: 10.1186/s13287-017-0512-7.
Ryan, M.J. & Ellison, C.A. 2003. Development of cryopreservation protocol for the microcyclic rust-fungus *Puccinia spegazzinii*. CryoLetters **24**: 43–48.

Ryan, M.J. & Smith, D. 2004. Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. Mycol. Res. **108**: 1351–1362.

Sakurai, K., Yuasa, M., Ohji, S., Hosoyama, A., Sato, M., Fujita, N. & Kawasaki, H. 2019. Gene mutation in *Ganoderma lucidum* during long-term preservation by repeated subculturing. Biopreserv. Biobank. **17**: 395–400.

Sato, M., Sukenobe, J. & Nakagiri, A. 2012. Cryopreservation of cryosensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. CryoLetters **33**: 86–94.

Sato, M., Inaba, S., Sukenobe, J., Sasaki, T., Inoue, R., Noguchi, M. & Nakagiri, A. 2019. A modified perlite protocol with a mixed dimethyl sulfoxide and trehalose cryoprotectant improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. Mycologia **111**: 161–176.

Sato, M., Inaba, S., Noguchi, M. & Nakagiri, A. 2020. Vermiculite as a culture substrate greatly improves the viability of frozen cultures of ectomycorrhizal basidiomycetes. Fungal Biol. **124**: 742–751.

Sato, M., Inaba, S., Okazaki, N. & Nakagiri, A. 2021. Long-term cryopreservation of basidiomycete strains with Homolka's perlite protocol followed by storage in an ultra-low-temperature freezer and vapor-phase liquid nitrogen tank. Microb. Resour. Syst. **37**: 13–20.

Sato, M., Nakata, Y., Noguchi, M., Araki, S. & Matsuo, Y. (in press) Verification of the decrease in cell recovery after freezing and thawing due to suboptimal shipping using nine cancer cell lines and the differences in impacts between the cell lines. CryoLetters.

Smith, D. 1991. Filamentous fungi, *In* Kirsop, B.E. & Dayle, A. (eds.), Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: A Manual of Laboratory Methods, second edition. Academic Press, New York.

Smith, J.G., Joseph, H.R., Green, T., Field, J.A., Wooters, M., Kaufhold, R.M., Antonello, J. & Caulfield, M.J. 2007. Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions. Clin. Vaccine Immunol. **14**: 527–537.

Stalpers, J.A., Hoog, A.D.E. & Vlug, I.J. 1987. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. Mycologia **79**: 82–89.

Stielow, J.B., Vaas, L.A.I., Göker, M., Hoffmann, P. & Klenk, H.P. 2012. Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. Mycologia **104**: 324–330.

Tennant, J.R. 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. Transplantation **2**: 685–694.

Uzuhashi, S., Aoki, T. & Tanaka, D. 2020. Potential use of seeds for long-term cryopreservation of oomycete cultures. Microb. Resour. Syst. **36**: 49–55.

Vysekantsev, I.P., Gurina, T.M., Martsenyuk, V.F., Petrenko, T.F., Kudokotseva, E.V., Koshchiy, S.V. & Groshevoy, M.I. 2005. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. CryoLetters **26**: 401–408.

Xu, Y., Chan, L.L., Chen, S., Ying, B., Zhang, T., Liu, W., Guo, H., Wang, J., Xu, Z., Zhang, X. & He, X. 2021. Optimization of UC-MSCs cold-chain storage by minimizing temperature fluctuations using an automatic cryopreservation system. Cryobiology **99**: 131–139.

Yang, J., Diaz, N., Adelsberger, J., Zhou, X., Stevens, R., Rupert, A., Metcalf, J.A., Baseler, M., Barbon, C., Imamichi, T., Lempicki, R. & Cosentino, L.M. 2016. The effects of storage temperature on PBMC gene expression. BMC Immunol. **17**: doi: 10.1186/s12865-016-0144-1.

許　南浩 2008. 第1章 3. 研究によく使われる細胞, 黒木登志夫（監）, 許　南浩, 中村幸夫（編）, 実験医学別冊 改訂細胞培養実験ハンドブック, p. 31–36, 羊土社, 東京.