

VII-125 南極高地における生物・環境試料の超長期自然条件保存のための 温度制御技術

近畿大学大学院 学生員 ○竿尾 博司
近畿大学理工学部 正員 江藤 剛治
近畿大学理工学部 正員 竹原 幸生

1. 生物・環境タイムカプセル計画

生物・環境試料の保存を目的とした計画として、生物・環境タイムカプセルプロジェクト(BEST Capsule 2001 Project)と名付けられた計画がある。BESTCapsule 2001 Project は千年先の未来に向けて、できるだけ多くの種類の生物のDNAと、今世紀を代表する生物試料を、地球環境試料と関連づけ生きたまま自然界に凍結保存し、10年、100年単位で遺伝子レベルでの地球環境影響評価に役立てると共に、1000年先の未来の人々に貴重な科学的遺産として残すことを目的としている。生きた生物・環境試料の保存理由はDNAには確かに生物の情報が含まれているが、周囲の環境による変化を記録できないためである。実際、外科手術痕などはDNAのデータには残らないことや同種の植物が環境によって違った様相を示す例がある。

生物・環境試料は温度、圧力、化学変化等、周囲の環境変化により容易に変化する可能性がある。そのため千年単位で生きた試料を保存するには、高度な保存技術の開発と低温で安定した保存場所を必要とする。また保存場所は現在において埋設可能であり、未来においても、回収可能と推測できる場所が望ましい。

2. 保存場所ドームF

地球上で最適な保存場所は南極のドームFの頂上である。ここは標高3,810mで、氷面化20mの温度は -58°C で年間の気温変動は観測限界以下、年純降水量はわずか20~30mm(ラスベガス並)で、1,000年で30mしか埋没しない。氷床の移動は水平・鉛直ともに観測限界以下、地震等もほとんどない。日本も既に観測基地を持っており、この計画に対応可能な国の一つである。しかし、動物の生殖細胞の保存には若干温度が高い。それには、最高でも -100°C 、できれば液体窒素温度(-196°C)が望ましい。

3. 低温中の細胞の変態

細胞や組織を凍結保存する場合、融解後の細胞の生存率は冷却速度によって大きく左右される。その原因の一つは、凍結によって細胞の内外に生じる氷の状態が冷却速度の影響を大きく受けるからである。通常の冷却速度では、細胞の内部にも氷ができる(細胞内凍結)。細胞の内部で粗大化した氷は、細胞を内部から破壊して致命的な傷害を与える。これらの理由により、実用的には細胞や組織を凍結保存する場合は、比較的大きい冷却速度を選び、細胞内凍結を防ぐ。さらに冷却速度を上げると、細胞内に氷ができるにしても、一つ一つの結晶は次第に小さくなる。冷却速度が毎秒 1000°C を越えるような超急速冷却(液体窒素等で冷却)では、細胞内の水は過冷却されガラス化(vitrification)を起こすか、たとえ凍結しても完全な氷の状態をとらないでいる。そのために、細胞の構造は破壊されずに生きた状態を保つことができる。昇温過程では脱ガラス化(devitrification)による細胞内氷晶の形成や、再結晶(recrystallization)による粗大化が起こり、細胞は内部から破壊されてしまう。

本研究の直接的なねらいは、純水の過沸騰、過冷却の例に見られるように、無振動で液体窒素温度から、非常に低い速度で昇温させた場合、このような脱ガラス化温度、再結晶温度を上げることができるかどうか調べることである。このようにミクロな局所的な変態の生じる温度をある程度上昇させることができれば、南極ドームF温度(-58°C)で保存できる生物種が増える。

また細胞の破壊は、温度勾配、水とマトリックスの密度差、分子拡散による細胞内の水の移動によっても

Key Words : specimen bank, natural preservation, cryogenic preservation, Antarctica

連絡先 : 〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1 (近畿大学)

起こると考えられる。例えば、保存容器内の温度変化により、試料内部に温度勾配が生じると、上部の大気に循環が起こり、これが水の移動の大きな原因になる。南極におけるタイムカプセルの場合、保存温度を長期にわたり一定に保つので、これらの温度勾配の影響も避けることができる。

4. プレショックフリージング

本研究では、南極における動物生殖細胞の超長期保存の可能性について研究する。その方法として、プレショックフリージングという手法を検討する。この手法は、本来氷の状態が急変する温度に達しても氷の状態が安定に保たれる場合がある。この現象を利用して、本来動物生殖細胞の凍結保存に適さない温度においても凍結保存を可能にしようとするものである。この技術が利用できると、地球上での全ての生き物の生殖細胞を超長期にわたって自然界保存できることになる。

細胞を保存する際の温度変化を fig.1 に示す。このような温度変化を実現する方法の例を示す。

- ① 細胞内凍結を防ぐため、超急速凍結を行う。これは細胞を直接液体窒素に入れることで行う。
- ② 0℃から 40℃付近でガラス化崩壊に伴う再結晶を起こすが、-58℃でも再結晶を起こす可能性がある。そのため振動を与えず、温度を緩やかに上昇させる。
- ③ -58℃で長期間細胞を保存する。
- ④ 液体窒素を再注入し、徐々に温度を下げっていく。
- ⑤ 液体窒素に直接入れる。

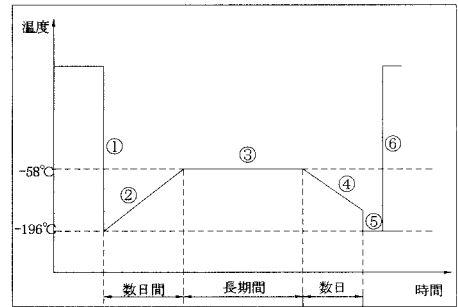


Fig.1 温度変化

5. 温度制御

上記の実験の第一段階として、無振動で安定した温度状態を作る手法を開発する。実験は円形液体窒素デューワーを改良し用いる (fig.2)。ふたなし、ふたをした時、密閉した時、氷入り銅製容器、冷凍庫等、ふたを変化させ温度が安定した時の状態を比較すると、装置内にはそれぞれ非常に安定した線形的な温度形状が出来る (fig.3)。この分子拡散による温度勾配を利用して、ふたを変化させ温度コントロール (fig.1) を行う。

時間が経過すると共に液体窒素は、量が減少するため再充填する必要がある。しかし液体窒素は温度差が大きいものに触れると沸騰を起こす。そのため、注入する管を二重銅製管にし、デューワー①、② (fig.2) の液体窒素に注入装置を浸けておき、銅の熱伝導率を利用し低温に保つ。また注入する際、振動が伝わるため消波板の下部から液体窒素を注ぐことで振動が伝わりにくく安定状態も壊さないようになっている。

結果として、fig.3 に示すような安定した温度勾配を作ることができた。例えば、銅製容器 (fig.3) は中に氷水を入れてふたとして用いた。ふたの下面は理想的には 0℃になる。実際には、これよりやや低い温度にな

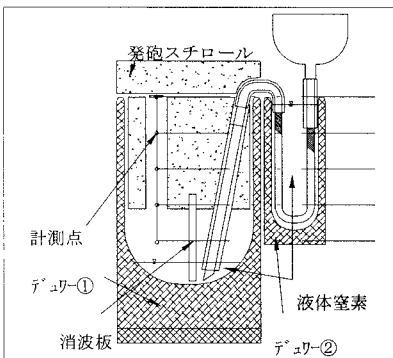


fig.2 実験装置

っている。計測点 5 の温度は約 -130℃になる。これは、安定した温度勾配ができた時点で蒸発により、液体窒素面が下がったためである。

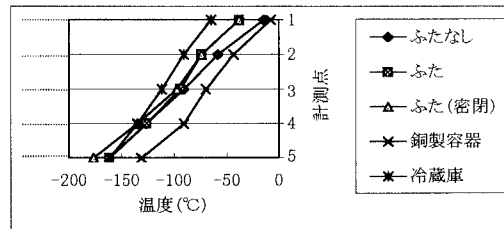


fig.3 安定状態の温度分布

液体窒素面からの試料設置点までの高さおよび、ふたを変えることで、安定した温度を作ることができる。