



Title	生物の凍結過程の分析 : 植物細胞のフラッシュ型凍結の一様式に就いて
Author(s)	朝比奈, 英三
Citation	低温科学, 4, 85-96
Issue Date	1948-10-30
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/17463">http://hdl.handle.net/2115/17463</a>
Type	bulletin (article)
File Information	4_p85-96.pdf



[Instructions for use](#)

Eizo ASAHINA 1948 Analysis of the Freezing Process of Living Organismus. V. Freezing Process of the "Sap Drop Type" of Flashing in Plant Cells, with Reference to the Plasmolysis Resulted from Ice formation in the Cell. *Low Temperature Science* 4. (With English résumé p. 94).

## 生物の凍結過程の分析. V.

### 植物細胞のフラッシュ型凍結の一様式に就いて<sup>1)</sup>

朝比奈英三

(低温科學研究所 生物學部門)

充分過冷却された細胞が何等かの方法でその内部に植氷<sup>2)</sup>されると細胞全體が突然乳濁した様に暗くなる。之はその瞬間微細な氷晶が細胞に充滿した爲であつて所謂フラッシングと呼ばれている。植物細胞ではこのフラッシュ型凍結に二つの様式があつて、一つは凍結後細胞は濃縮された細胞液を主とする多數の液滴とその間を埋める氷晶で満たされているもの……即ち液滴式であり、他の一つは殆んど球形に近い無数の氷の微粒が一樣に透明な大きな氷塊の中に象眼された状態で保たれているもの……即ち氷粒式である。<sup>3)</sup>前者の様式は表皮細胞で從來より知られているもので、後者は蔬菜の柔細胞で普通に見られる(朝比奈前報)。即ち Molisch ('97) はヒゲカビヤムラサキツユクサの雄蕊の毛で液滴式と思われる凍結を起させ、又 Chambers and Hale ('32) 及び Luyet and Gibbs ('37) 等は玉葱の球莖の鱗葉の表皮細胞で同じ様式の凍結を報告しているが、特に後者は凍結の進行を映畫に再現しその後の細胞内の變化を詳しく述べている。

著者は種々の材料で生きた細胞の凍結過程を観察中、今迄の研究者等と同様な材料を用いて典型式な液滴式のフラッシングを起させ、Luyet 等がその装置の關係から殆んど明らかになし得なかつた凍結過程を詳らかにする事が出来た。今茲に主としてムラサキツユクサの雄蕊の毛による觀察の結果を記載し<sup>4)</sup>同時に氷による原形質分離についても若干述べて見たい。

本文に入るに先立ち常に御懇導を得ている青木廉教授、有益なる御教示を賜つた理學部坂村徹教授に感謝したい。又材料の入手に御配慮を得た添田徹氏、文献の参照に助力せられた中野健司氏にも茲に深謝する。

- 1) 北海道大學低温科學研究所業蹟 第 68 號。本研究の費用は服部奉公會及文部省科學研究費の援助を受けた。
- 2) Inoculation of ice.
- 3) Flash-type  $\begin{cases} \text{Sap drop-subtype} \\ \text{Ice particle-subtype} \end{cases}$
- 4) 玉葱の表皮細胞の凍結様式は必ずしも液滴式ではなく、冷却速度の大小其他の條件により氷粒式のフラッシング又は本質的に之と異なる脱水型の外部凍結等も現はすので、この凍結過程については別の機會に述べたい。

## I 材料及び方法

材料は北海道大學構内に採培されているムラサキツユクサ<sup>1)</sup>を用いた。本種の雄蕊の毛は即ち一連の細胞そのもので、外被としてはこまかい縦しわをもつ薄い透明なクチクラ層があるに過ぎない。のみならず細胞中に充満した美麗な紫色の液胞とその外側にきわめて明らかに認められる活潑な原形質流動とはこの細胞の生理状態を知るのに甚だ好都合である。

材料は當日の午前9時乃至10時に採り1時間後には実験を始めた。花糸を根本より切り取り、その全體をカバーガラスにつけて流動パラフィン中に封じて懸滴とする。毛の細胞はこの状態で常温で少くとも2日間は健全である。原形質流動に異常の無い事を確かめた検體を10分乃至1時間 +5°Cに保つてある恒温箱内に置いた後低温室内の温度調節装置を施した顯微鏡下で観察した。<sup>2)</sup> 又出來た氷を識別する爲に偏光顯微鏡を併用した。

## II 観察結果

### 1. 冷却速度の大きな場合

相當大きな冷却速度で冷して行つても<sup>3)</sup> -10°C迄では細胞の凍結は始まらない。引續いて之を除々に冷して行けば-17°C迄過冷却する事も出來、且數日乃至十數日間この状態で保つこともきはめて容易であつた。

Molisch は水で封じたムラサキツユクサの毛で -2°C<sup>4)</sup> 迄冷しても定常的な原形質流動が見られたと述べてゐるが、著者は -1°C 附近でさへ之を認める事は困難であつた。しかし -17°C 迄の過冷却状態に於いて少くとも初めの2,3時間は原形質流動の停止以外に何等の變化も認められなかつた(第1圖)。-10°Cに6時間保つた場合は細胞を常温に戻すと常に完全に回復するが、一日以上では總ての細胞が原形質の凝固を示し且夫々の細胞の末端部<sup>5)</sup>では次の細胞との接合部を除いて原形質は細胞膜から分離する傾向があつた。

數分間過冷却状態に置くと細胞の外面に多數の小さい氷粒が現はれる事がある。他の植物ではこの様な氷晶はしばしば内部からの脱水によつて發達する事が知られているが、ムラサキツユクサでは細胞が水の透過性の低いクチクラの外被をかぶつてゐる爲か、細胞の外面に氷が發達すると言う例は殆んど認められなかつた。

懸滴を4°C/minの速度で冷却し<sup>6)</sup> -2°Cに達した時花糸の切端に植氷する。先づこの附近に附

- 1) 添田徹氏によれば本種は *Tradescantia virginica* である。
- 2) 観察と同時に懸滴の温度を測定した。過冷却を破る爲には顯微解剖針の先につけた小氷片で植氷した。尙之等の方法及装置は著者の前報に詳述してある。
- 3) 試みた最大の速度は -1°C と -3°C の間で 8°C/min.
- 4) 載物台上の氣温を測定したものである。
- 5) 雄蕊の毛の基部に向ふ端を細胞の基端としその反對側を末端と呼ぶ。
- 6) 室温 -9°C に於て冷却中、-1°C より -3°C 迄冷へるのに 30 秒かかる如く調節する。

着した水分が凍り小氷粒がポツポツとその表面に現われる。之に續いで花糸の細胞が凍り、次に毛の細胞に移る。従つて毛はその附根の細胞より順次に凍つて行く。凍結に際し潜熱の放出により温度は上昇し、又細胞の體積が膨脹する爲毛は流動パラフィンの中で大きくゆれ動く。根本に近い細胞は1ヶが1/5秒位で凍結し、次の細胞が凍る迄に夫々20秒近い休止期がある。この休止期は細胞の凍結が毛の末端に向つて進むにつれ短かくなり、末端の附近では殆んど瞬間的であるが常に最後迄はつきりと認められる。

細胞の凍結は總て典型的のフラッシングであつて、一つの細胞がフラッシュすると次の細胞に接する場所即ちこの細胞の末端部に透明な氷が現われる。之が次第に大きく發達し境界の細胞膜を次の細胞の内部に向つて押出すやうに見えるるとたん突然この局部から次の細胞のフラッシングが起る。しかしこの時境界の細胞膜には少くとも外觀上は何等の傷害も認められない。

成熟した毛の細胞のフラッシングは總て液滴式である。即ち $-8^{\circ}\text{C}$ でフラッシュさせた一例をとつてその過程を述べると、上述の如く凍結は細胞の基端より始まり、末端に向つて急に暗幕でも引かれた様に細胞全體が濃く乳濁暗化してしまう。これは細胞の中が微細な氷晶と非常に小さな濃色の粒で密に満されてしまつたからである(第5圖)。この粒は扁光を通さぬ事及び融解に至る迄の行動より見て液體である事は疑いない。そしてこのほど同大な不整形の液滴は多くはさしわたし $1\mu$ 以下であつて濃縮された細胞液の色(濃紫色)を呈している。

フラッシュしてしまつた後の變化並びに融ける時の経過は Luyet 等が玉葱で見た結果と甚だ良く似ている。即ち無数の液滴は急速に接合して大きくなりその間を埋める細かい氷晶は連なつて見えるようになる。この爲細胞の乳濁度は減りフラッシング直後30秒乃至1分間で細胞の中ははつきりと明るくなる。滴液は次第にまろくなり數分後には徑 $5\mu$ 位の球に近いものが多くなり、之が多數重つて脈状になるものもある。これが更に大きく發達するとその内部にしばしば顆粒状の物質<sup>1)</sup>を含む液滴も現れて来る。もはや氷晶はよく連続した1個又は數個の透明な氷塊となり、散在する多數の液滴はこの内部に埋まるか、又は此と細胞膜との間に挟まつている(第6圖)。時間の経過と共に此等の變化の速度は急激に減るが、液滴の接合は依然として進み一様な氷がその間を埋めて細胞の内部はますます透明になる。この様にして最初無數にあつた微少な液滴は遂には大きな不定形の液胞となり1個又は數個に分れて透明な氷の間に挟まれる(第7圖)。尙毛の末端に近い細胞では他の細胞よりも液滴の接合が遅れる傾向がある。又液滴の大きさはフラッシングが高温で起る程大きく、その後の細胞内の變化も高い温度に保たれる程速やかに行われる。例えば $-1.2^{\circ}\text{C}$ でフラッシュさせた細胞を $-1.4^{\circ}\text{C}$ に保つてをいた時には30分で第9圖の如き状態に達した。

1) 凝固した原形質や液胞中に含まれていた物質であらう。

凍結した細胞の融解速度は或範圍<sup>1)</sup>では融解の過程に本質的な變化を與へない。凍つた細胞を暖めて行くと液滴は次々に接合し細胞の内部はどんどん明るくなる。(第2及第3圖)液滴が接合する時、小形のものは何れも互に平行に細長く伸びて隣合ふ液滴と合一してから又短くなるものが多い。これは凍結してゐた時間が短い<sup>2)</sup>細胞によく見られ、液滴の伸びる方向はこの細胞が凍る際氷晶が伸びた方向に關係がある。このようにして細胞の中は遂に1個又は數個の大きな氷塊とその間に入り込んだ濃色の液胞とに區別される。やがて氷は細胞及液胞の周圍から融けはじめ、濃縮されてゐた紫色の液は融けて出來た水中に擴散して行く。凍結してゐた時間の短い細胞では融解後色素は一樣に擴がり一見常態のものと殆んど變らなく見えるがその紫色はやゝ淡く、細胞核も原形質流動の痕も既に凝固している(第4圖)。しばらくたつて<sup>3)</sup>見ると核は變形し細胞質はすべて凝固して細胞の底に沈んでいる。之は明らかに原形質の構造が壊れてしまつた事を示してゐる。此等の原形質の沈澱は細胞液の色素をとつて所々に濃淡の差を生じその色は次第に赤味を帯びてくる。數日間凍らせてあつた細胞でも融解直後、色素は一樣に内部に擴がり、柔細胞に見られる様に細胞外に擴散する事はない。此はこの細胞の表面が兩端の狭い面積で他の細胞に接してゐる他はクチクラ層に接着してゐる爲であらう。

フラッシングは同一の細胞で少くとも7回位はくりかえす事が出来る。くりかえしが多くなる程連結した細胞の各がフラッシンして行く間隔は短くなる。又フラッシングの結果生じた液滴も最初のフラッシングの時に比べると形が一層不規則となり、數は少なく大型となつて來る(第11圖)。従つて細胞の乳濁度は減り明るく見える。3,4回くりかえすと最早之以上くりかえしてもフラッシングの外観にはこれ以外の變化は見られない。しかし15回くりかえした細胞でも<sup>4)</sup>充分過冷却させてからフラッシンさせれば第2回目の場合と殆んど區別出來ぬ凍結過程を再現する事が出来る。

## 2. 冷却速度の小さい場合

フラッシングが瞬間的に終るのは細胞の内容が充分過冷却している事を意味している。それでこの過冷却の程度を小さくする事によつて細胞内の凍結をやゝのろく進行させその過程を觀察した。

懸滴の溫度が $-1^{\circ}\text{C}$ より高ければ花糸の切端に植氷しても、その表面に氷粒を生ずる場合があるに過ぎない。 $-1^{\circ}\text{C}$ で始めて花糸の細胞がやゝのろいフラッシングで次に凍つて行く。更に毛の細胞では $-1.2^{\circ}\text{C}$ 以下に冷した時、始めて凍結が起る。<sup>5)</sup>そして根本の細胞より順次に

1) 最大は $-10^{\circ}\text{C}$ より1分で、最少は $-2^{\circ}\text{C}$ より10分で全く融解を終了させる。

2) 通常10分以内。

3) 例へば $+5^{\circ}\text{C}$ で1時間半の後。

4) この場合凍結及融解のくりかへしは殆んど連続的に短い時間の経過をなるべく短かくした。

5) 勿論之等の溫度は細胞そのものの溫度を表はすとは限らない。

一つ一つ 30 秒位の間隔を置いて凍結して行く。こゝで冷却速度を甚だ小さくしてやると、細胞の凍結はしばしば中絶してしまう。そうなると凍結が次に移る際細胞の末端に現はれた透明な氷は今度はそのまゝの位置で發達を續ける。この爲この部分は甚だしく膨脹し同時に次の細胞はそれ自身が凍り出す迄は脱水されて收縮して行く (第 12 圖)。この様な現象は冷却速度が小さくなくても一旦フラッシングの移行が中斷された時は必ず現われて来る。

-1.2°C 乃至 -1.4°C では 1 つの細胞の凍結は 0.5 秒乃至 1 秒間かかる。氷は急速凍結の場合と同じ過程を経て細胞の基端に現はれ、直ちに分岐して先づ細胞膜の内側に接して伸びて行き細胞の末端に達する。この時氷は細胞の内部に向つても伸びるが、之は上述の細胞膜に沿ふ氷が伸びるにつれて出來た氷の各部分より改めて發進するのである。内部に向ふ氷を側面から見ると平行な櫛の齒状でその間に紫色の細胞液を挟んで伸びて行く。氷が伸び終ると液胞は分斷されて無数の濃紫色の小滴となる。従つて細胞の基部を除き出來た液滴は細胞の長軸に直角又は斜めに並列する場合が多い (第 8 及第 9 圖)。かかる液滴は凍結後間もなく融かすと再び同じ方向に平行に伸びて互に接合を始める。又凍結直後の細胞では細胞膜の直ぐ内側には紫色の液滴が殆んど挟在しない場合が少くない。核は始め細胞膜に沿つて氷が伸びる時は明らかにその内側に入るが、内部に向つて氷が伸びると同時に暗化して凍結直後にはもう凝固した様な外貌を呈している。

毛の根本にある細胞をゆるやかに凍らせるとしばしば次のような興味深い現象が見られる。先づ細胞膜に接して伸びた氷は、殆んど分枝することなくそのまゝ内部に向つてのろく成長 (發達) してゆく。<sup>1)</sup> この爲紫色の液滴は散在することなく總て一つの液胞のまゝ細胞の中心部に壓縮され所謂液胞收縮<sup>2)</sup> と同じ形を呈する (第 10 圖)。寫眞に示したものは基部は通常の液滴式の凍り方に似ているが、かかる場合でも收縮した液胞は常に基端に接し末端からは相當離れているのが特徴である。この後、更に液胞は收縮を續け、此をとりまく氷は増大して特に細胞の末端部では甚しい。之は後に述べる氷による原形質分離とは明瞭に異り液胞の收縮と同時に核は變形凝固し又液胞に接する氷はその外層よりも明らかに暗く見へ、少くとも原形質の一部は凍っていると考へられる。此を融かすと液胞は膨脹して元來の大きさの  $\frac{4}{5}$  位迄に恢復するが、原形質層はすべて凝固しその内部にあつた紫色の細胞液は細胞の中一面にむらなく擴がる。

フラッシングをくり返す場合の凍結過程は最初の凍結の場合とは當然異つて来る。即ち氷の發達はやはり細胞の基端より始まるが、此は細胞膜に沿うことなく分枝した氷頭が細胞の末端に向つて開きつゝ細胞の全幅を埋めて進み、中心部の凍結が周圍より遅れる事はない。

1) -2.2°C では氷が基端に現われてから一應伸び終る迄に長さ約 500  $\mu$  の細胞で 2 秒至 3 秒かかる。

2) 坂村 (34) による。

従つて凍結によつて生じた液滴は細胞の長軸に對して直角又は斜めに平行して並ぶことはなくむしろ細胞膜に接して集まる例が少ない(第11圖)。過冷却の程度を甚だ小さくして凍結をくり返させると、細胞の基端に現はれた數頭の氷はあまり擴がらず殆んど平行したまゝで直線的に伸び細胞の中心部を通つて末端の細胞膜に衝突する。この瞬間あだかも袋の中に長い棒でも入れたやうに細胞は一時引伸ばされる。細胞液は氷が伸びる時周囲に排除され、その結果細胞の長軸を貫く太い透明な氷の周りに濃い紫色の液部が現われる。

細胞の凍結が移り行く途中で中絶した時冷却速度を極端に落してしまうと、數分乃至數十分の間に生きた細胞の内部に透明な氷がゆつくりと現われる事がある。これは凍つた細胞との接合點即ち細胞の基端に氷が生じこのまゝ發達するか、或ひは分枝して細胞膜に沿ひきはめて徐々に伸びて行く。そして所々に肥厚部を作つたり、末端部に基端部と同様な大きな氷塊を發達させたりする。<sup>1)</sup> 氷が出来るのは細胞膜と原形質との間なので、氷の發達につれ原形質膜は恰度通常の原形質分離の如く細胞膜から離れ、液胞を包んだまゝ收縮して行く(第13圖)。この時氷に接する分離面は一般に凹型又は平面をなし決して凸形にはならない。かゝる状態の細胞を急に冷すと過冷却が破れて原形質體はフラッシングを起す。

上述の現象は毛の基部の細胞には特に起り易く(第14, 15圖)原形質の分離が細胞の中程で始まつた時は此處で原形質體がくびれて遂にCleavageを起すようになる。又細胞の末端部で原形質が分離している時、往々この細胞をとび越して次の細胞からフラッシングが先端の細胞に向つて次々に起つて行く場合もある。

氷によつて原形質の分離を起こした細胞を暖めて行くと氷の融解と共に原形質膜は直ちに凸形となつて復歸を始め(第16圖)分離の程度に應じ、數分乃至數十分で完全に復歸する、分離してゐる間は著しく顆粒狀に見えた原形質の流れ(第14圖參照)や核<sup>2)</sup>も異常なく恢復し、前者は原形質復歸の完了前に既に活潑に流れている。分離していた時間が短いと<sup>3)</sup> Cleavageを起こした細胞でも例外なく原形に復歸し、その後も對照の細胞に比べて異常がない。

### III 考察及び論議

Molisch は過冷却状態のムラサキツユクサの雄蕊の毛の細胞が細胞膜のところどころでしばしば原形質の分離を起すと述べている。<sup>4)</sup> 之は恐らく氷によるものであろうが著者の場合は植氷せず細胞内部に氷を生じさせる事は、冷却速度を著しく大きくしない限り全く不可能であつた。

1) この場合はその次の細胞からの脱水は殆んど形の上認められない。

2) 軽度の Systrophe の如く見へる。

3) 少くとも  $-3.6^{\circ}\text{C}$  で10分間。

4) オリーグ油浸又はそのままカバーガラスに挟み  $-5^{\circ}\text{C}$  ~  $-9^{\circ}\text{C}$  に冷却している。

凍結の過程に於て細胞の中で最初に氷が現われる場所は細胞膜と原形質膜との間である。しかも其の所は必ず細胞膜を隔て、氷に接し、この氷は次に凍るべき細胞より盛に脱水して成長しつつあるのが常である。それ故に恐らく何等かの方法で膜を貫いて植氷が行はれ、たとへ1点ではないとしてもこの植氷点より細胞内の凍結が始まることは否定出来ない。甚しく過冷却すると細胞の内容も凍結に對して非常に不安定になつて來るから、小野田 (31) の考えたように壓力や振動等も始めて凍結開始の要因として問題となるかも知れない。しかし少くとも  $-2.6^{\circ}\text{C}$  迄では氷に接した細胞をマイクロニードルで烈しく振つたり突いたりしてみたが凍らせる事は出来なかつた。細胞内に現われた氷が先づ細胞膜に沿つて末端迄擴がるのは細胞膜と原形質膜との間をのびて行くからである。それ故この氷はその内部、主として液胞より引出された水が凍つたものと考へられる。原形質膜の外側を細胞の末端に向つて氷が伸びつつある最中に之を基點として更に内部へ向つて直線的に平行した多數の氷頭が伸びる。この爲凍結直後の分斷された細胞液滴は細胞の長軸に直角又は斜めに配列されるのであろう。この場合植氷点に近い部分では殆んど完成した氷殻上の各點から内部に向つて多數の氷頭が集中するので、細胞の基端附近では必ずしも液滴が平行にならぶとは限らない。冷却速度が大きいと原形質の過冷却は破れやすく原形質膜の内外に於ける凍結開始のズレは小さくなる。事實急速なフラッシングに於ては、凍結は植氷点より暗幕を引くように全細胞を埋めて末端に達する。しかし直ぐ之を融かしてみると、液滴の接合が細胞の長軸とやゝ斜めに平行して起るものがあるところよりみて、その過程はのろい凍結の場合と本質的に異なるものではあるまい。

Chambers 等は  $-10^{\circ}\text{C}$  でタマネギの表皮細胞を凍らせた時細胞質と核は壊れるが、トノプラストは犯されずに分斷されて多數の液胞が現はれると述べた。<sup>1)</sup> 著者の觀察でもタマネギでは分斷された液胞が融解後しばらくはその形を保つてゐるが、再合して完全に原形を復した事はなかつた。この現象は高調溶液で豫め原形質分離を起させた細胞をゆるやかに凍らせてから急に融かすと容易に見る事が出来、フラッシングと全々異つた凍結過程を経て生じたものである。ムラサキツユクサでも毛の根本の細胞等で見られた氷による液胞收縮の現象は凍結に對するトノプラストの或る抵抗性を現はすものであるが、フラッシングに於いて分斷された液胞が未だ正常なるトノプラストを持つてゐるとは考へられない。凍結によつて大きく數ヶに分割された液胞は融解後再び合して細胞全體に擴がる様に見へるが、(第4圖) 實は濃縮された細胞液(少くとも未だ色調の變らぬその色素)が氷が溶けて出來た水中に擴散するに過ぎず、原形質はすべて凝固しやがて細胞の底に沈澱して行くのが見られる。

細胞液が急速に凍ると細かい氷晶に挟まれた小液滴に別れる事は Molisch の觀察以來きはめて常識的に考へられ勝ちであるが、之は細胞液そのもの性質とは言ひ難い。細胞液を外にし

1) Luyet 等もかかる液胞が融解後短時間は或程度の半透過性を保つていゝと言ふ。



ぼり出してその小滴を流動パラフィンに封じ $-5^{\circ}\text{C}$ で凍らせると、多くの柔細胞に見られるやうな水粒式に近いフラッシングを起し液滴式にはならない。一方細胞<sup>1)</sup>の中では如何に冷却して凍らせても少くとも $-17^{\circ}\text{C}$ 迄では常に液滴式であつた。

凍結した細胞内の氷は甚だ不安定な状態にある<sup>2)</sup>、フラッシング直後は細胞内の變化が最も急速に進むが之は未だ凍結の過程が進行しつつある爲でもある。即ちフラッシングにより液胞の内容が一應氷と液滴とに分離した後も細胞の體積膨脹は未だ明らかに認められ、同時に液胞は縮少し氷の増大は更に細胞内の明るさの増加となつて現はれる。これ以後の液胞の變形接合は上述の如き過程の外に Luyet 等が指摘したように氷の再結晶に伴ふ部分的融解を必要とするであろう。凍結による原形質の分離の際に見られる細胞内の透明な大氷も例へば Cleavage の際などは細胞の兩端より中央部へきはめて短時間に移動する。

細胞の死は凍結の過程に於て起る。Iljin ('34) は一般の植物の細胞内凍結の場合は細胞の外の水と液胞内の氷とに挟まれて原形質が壓死するのだと主張しているが、液胞収縮式の凍結の場合は内側に氷が出来なくとも細胞は死んでしまう。Luyet 等もフラッシングに於ける細胞の死は細胞液の凍結の結果細胞質層が致命的に傷つけられるものとし、必ずしも原形質自體が凍るとは考えてゐない。しかし凍結と共に起る原形質の凝固はその凍結様式……液滴式若くは液胞収縮式……の如何にかゝはらず、又凍結時間の長短にかゝはらず全く不可逆的であり融解によつても新な變化は認められないから、それ自身が凍ると考へても決して不自然ではない。Scarth 等 ('38) はミズキの枝の表皮細胞で氷が原形質内に出来ることを觀てゐるし、蛙の筋肉細胞でも原形質自體の凍結が細胞を殺すと言われている(Chambers and Hale '32)<sup>3)</sup>。Iljin ('33) は又キャベツの表皮を用い外部凍結によつて脱水されて縮少した細胞が、その融解による急激な吸水の爲疑原形質分離を起して死ぬことを報じ、後に Scarth 等は此が極端に速く融かした場合にのみ見られる事を指摘してゐる。ムラサキツユクサの雄蕊の毛では夫々の細胞の周圍にクチクラの外被があり水の出入の大部分はその兩端部に限られるから條件が相當異なるが、フラッシングの移行が或細胞で中斷された時は次の細胞から甚しい脱水が行われる<sup>4)</sup>。しかし之を急速に( $-10^{\circ}\text{C}$ より $0^{\circ}\text{C}$ 迄1分)融かしても例外なく恢復し、疑原形質分離や原形質破裂は起らない。

又 Luyet 等はフラッシングがくり返せる事を以て細胞質層が未だ一部の半透過性を保つてゐる證據とした。確かに數回若くは十數回同一の細胞をフラッシュさせても、氷は隣の細胞から移

1) 死んだ場合も含む。

2) 従つて凍結より固定迄の時間は組織學的な標本の状態に重大な影響を與へる。(Luyet and Gibbs '37)

3) この後 Chambers はその巧みなマイクロテクニクによつて表皮細胞の液胞のみを凍らせしかもその細胞を生かして置く事に成功した。(Luyet and Gibbs '37 の引用による)

4) この場合は水の出入は大部分その基端のみで行われる。又細胞は最初の長さの 2/3 以下にもちぢむ。

つて来る前に必ず一旦停止する。しかし僅々 2, 3 回のフラッシングをくりかへした後ゆるやかに凍らせると、最初の凍結の時とは全々異り氷は細胞の中心部を末端に向つて直線的にのび、紫色の液状部はその両側に分けられる。故に最初の凍結の融解後、細胞膜がその耐凍性に變化を受けているであらうとは考へられるが、細胞質層本來の構造は既に完全に破壊されているのである。

凍結による原形質の分離は高調溶液による原形質分離と全く同意義のものと考えられる。<sup>1)</sup> 従つて Chambers 等が筋肉細胞で指摘したように、原形質膜はそれがそこなはれずにある限り、或程度過冷却した内部への植氷を阻止する能力がある事は明らかである。

Scarth は harden された植物細胞が内部凍結を起しにくいのは、細胞外の氷が原形質體から脱水をする爲内部の液の水點が降下するものと考へているが、ムラサキツユクサの場合では一旦原形質分離を起してから温度の低下に對して原形質體の收縮速度はあまりにも遅く脱水による見かけ上の水點の低下が之に追つていないとは考へられない。

### 摘 要

1. ムラサキツユクサの雄蕊の毛の細胞を急速に凍らせると液滴式のフラッシングを起す。此は次の如き過程を経ると考へられる。

- a. 外接せる氷より細胞膜を貫いて植氷が行はれる。
- b. 先づ細胞膜と原形質との間に氷が出来直ちに分枝して伸長する。此は主として液胞よりの脱水により發達し、原形質體の全體を氷殻を以て覆ふに至る。
- c. 上述の氷が伸びつゝある最中新にその氷を基點として多數の細かい第二次の氷頭が細胞の内部に向つて直線状にのびる。この時原形質は凍結凝固し、その構造は全く破壊され細胞は死んでしまう。
- d. トノプラストも同時に破壊され液胞は微細な氷晶に貫かれ、その間に挟まれた細胞液は更に分斷されて濃縮された無数の液滴となる。この爲細胞の内部は乳濁した様に暗化する。

2. フラッシング終了後も細胞の内部は甚だ不安定な状態にあつて時間と共に變化する。

- a. 液滴は相互に接合して大形となり、氷晶は太く連つて行き、遂に不整形の液胞を挟み込んだ透明な氷塊となる。
- b. 上述の變化はフラッシング直後に於て最も速やかで、時間のたつ程のろくなる。又温度の高い程急速にすゝむ。
- c. フラッシング直後の液滴の大きさはフラッシュする時の温度が低い程小さい。

1) Chambers 等がタマネギで見たトノプラストと細胞膜との間に出来る氷はやや性質が異なるが、之は液胞收縮を起したものである。

3. フラッシュした細胞が融ける場合は先づ2のaに類似した過程が進む。氷が融けて細胞内に水が出来ると濃縮されてゐた細胞液は次々にその中に擴散して細胞の中はすべて一樣な色調となるが、細胞膜の外に内容がもれる事はない。原形質はすべて凝固していきがて細胞の底に沈澱する。
4. フラッシングは數回若くは十數回くりかへす事が出来るが、此は原形質膜又はトノプラストの殘存を意味するものではない。
5. 細胞のフラッシングは何回くりかへしても常に液滴式であるが、細胞からしぼり出した液汁は氷粒式のフラッシングをする。
6. 流動パラフィン中の細胞は $-10^{\circ}\text{C}$ の過冷却状態で少くとも6時間は健全である。同じ状態で1日以上置くくと冷死してしまうが、過冷却は $-17^{\circ}\text{C}$ で十數日置いても破れない。細胞を凍結させるには冷却速度を著しく大きくするか又は植氷せねばならない。
7. 高調溶液の代りに氷を用ひて完全な原形質分離とその復歸を起こすことが出来る。
8. 毛の細胞でフラッシングの移行が中絶すると最後に凍つた細胞の末端に透明な氷が發達し、未だ凍らぬ次の細胞は脱水されて甚だ收縮する。收縮した細胞は隣接した凍結細胞の融解によつて必ず恢復し死ぬことはない。
9. 毛の根本の細胞ではのろい凍結の際しばしば氷による液胞收縮が見られる。

#### 文 献

- 朝比奈英三 生物の凍結過程の分析。II. 植物柔組織の凍結過程の顯微鏡的觀察。低温科學, 3 (印刷中)
- Chambers, R. and H. P. Hale 1932 The Formation of Ice in Protoplasm. Proc. Roy. Soc. London, B, 60, 336.
- Ijtin, W. S. 1933 Ueber den Kältetod der Pflanzen und seine Ursachen. Protoplasma, 20, 105.
- \_\_\_\_\_, 1934 The Point of Death of Plant at Low Temperatures. Bull. Assoc. russe Rech. Sci. Prague, 1, 1.
- Luyé, B. J. and M. C. Gibbs, 1937 On the Mechanism of Congelation and of Death in the Rapid Freezing of Epidermal Plant Cells. Biodynamica, No. 25.
- Molisch, H. 1897 Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen. Jena.
- 小野田直之 1937 二三植物細胞の流動パラフィン中に於ける凍結の顯微鏡的觀察 III. 植物及動物, 5, 2179.
- 坂村 徹 1934 植物細胞滲透生理. 東京.
- Siminovitsh, D. and G. W. Scarth, 1938 A Study of Mechanism of Frost Injury of Plants. Canad. J. Res., C, 16, 467.

#### Résumé

As with rapid cooling, so-called flashing takes place in many plant cells, we can, in thus flashed cells, distinguish two phases. In many parenchymatous cells, one of such phases consists

of minute spheres of ice, the other of a mass of homogeneous ice packing the space between them. While in epidermal cells, instead of the minute ice spheres, numerous droplets of cell sap are usually disseminated in the masses of ice. The former type of flashing shall be called the "ice particle type", and the latter the "sap drop type". In rapid freezing, the cell of the staminal hair of *Tradescantia* represents the typical "sap drop type" flashing. At a temperature of  $-10^{\circ}\text{C}$ , the hair cells imbedded in a drop of liquid paraffin could be kept in supercooled state with out death at least for 6 hours. And when the supercooled condition at  $-10^{\circ}\text{C}$  continued during a day or more, the cells always died without freezing. An inoculation of ice was necessary to congeal the cell interior unless the degree of supercooling was considerably high.

Recording the temperature with a small thermojunction, the freezing process of the hair cells was observed under the microscope in a specially regulated cold chamber, inoculating with ice at various degrees of supercooling and of cooling rates. The freezing process observed is as follows; The contact of ice which has been formed in a cell, whether it be alive or not, is effective to inoculate the ice crystal into the next cell. The ice is formed, at first, between the protoplast and the cell wall at one end of the cell and grows around out side of the protoplast to the other end extracting water from the very protoplast. During this proceeding of the ice crystal, a large number of fine crystals grow inward from the ice previously formed on the outside of the protoplast. Consequently, the structure of the cytoplasmic layer is entirely destroyed, and the death of the cell takes place. The vacuole, being coarsened by the fine crystals, is divided into numerous globules of concentrated cell sap. Thus the frozen cell becomes intensely opaque (Fig. 5).

For a considerable period after the flashing, the frozen cell is by no means in a stable state. The globules of condensed sap gradually fuse into larger drops. After a long storage in the frozen condition, a few of transparent ice masses imbedding the condensed sap in irregular forms appear in the cell (Fig. 7). Such a change in both of sap droplets and ice crystals is the most active immediately after the flashing. However, the lower the temperature at which a frozen cell is kept, the slower is the change.

On thawing, at least at the beginning of the process, the sap droplets in flashed cells behaves likewise as in the frozen cells. Fusing gradually into larger drops, the sap diffuses into the surrounding melted ice (Fig. 3.). A uniformly coloured mass fills finally the entire cell (Fig. 4). But the pigment of the sap does not diffuse out of the cell as observed in many other plant cells. With the proceeding of thawing, the coagulated protoplasm gradually sinks to the bottom of the cell.

When the flashing began at one cell, it slowly progresses to one cell after another over the whole hair unless the rate of cooling is not so large. Sometimes its progression ceases at a certain cell. In such case, a large mass of homogeneous ice usually grows at the end of the last frozen cell withdrawing the water from the next unfrozen cell which, consequently, undergoes a remarkable dehydration and contraction (Fig. 12). On thawing, the dehydrated cell, however, recovers its normal appearance with active streaming of protoplasm. When a cell is put to congeal many times consecutively, the cell can flash 10 times or more, although the

tonoplast as well as the external layer were entirely destroyed at the first flashing.

At a very small rate of cooling, the ice formed between the protoplast and the cell wall gradually increases in size withdrawing the water from the protoplast (Fig. 13, 14). This results in the plasmolysis without any injurance to the cell, and, on thawing, the complete deplasmolysis takes place (Fig. 16).

When the freezing is relatively slow, an ice formation limited only to the outside of the tonoplast, sometimes, is observed in the cell of the basal end of the hair. The cytoplasm and nucleus was disintegrated, but the tonoplast was pushed inward assuming a "Vakuolenkontraktion" appearance (Fig. 10).

In the cells of the staminal hair, the "sap drop type" of flashing is always visible, even in repeated flashing, while the sap released from the cell usually flashes in the "ice particle type."

### 圖 版 説 明

- 第 1 圖 版 ムラサキツユクサ雄蕊の毛の凍結
- 第 1 圖 過冷却状態の細胞.  $-5^{\circ}\text{C}$
- 第 2 圖  $-5^{\circ}\text{C}$  にてフラッシュ後 5 分,  $-6^{\circ}\text{C}$
- 第 3 圖 同上. フラッシュ 20 後分, 融解中,  $-1^{\circ}\text{C}$
- 第 4 圖 同上. フラッシュ後 26 分, 融解後,  $+2^{\circ}\text{C}$
- 第 5 圖  $-8^{\circ}\text{C}$  でフラッシュ後 3 分,  $-8^{\circ}\text{C}$
- 第 6 圖  $-6^{\circ}\text{C}$  にてフラッシュ後 3 時間 30 分,  $-10^{\circ}\text{C}$
- 第 7 圖  $-10^{\circ}\text{C}$  にてフラッシュ, 同温度に保ちて 7 ヶ月後,  $-10^{\circ}\text{C}$
- 第 8 圖  $-1.8^{\circ}\text{C}$  でフラッシュ後 5 分,  $-1.5^{\circ}\text{C}$
- 第 9 圖  $-1.2^{\circ}\text{C}$  でフラッシュ後 30 分,  $-1.4^{\circ}\text{C}$
- (第 1—5, 8, 9 圖  $\times 100$ , 第 6, 7 圖  $\times 400$ )
- 第 2 圖 版 ムラサキツユクサ雄蕊の毛の凍結
- 第 10 圖 液胞収縮型の凍結.  $-1.4^{\circ}\text{C}$  結で凍結後 4 分,  $-2.6^{\circ}\text{C}$
- 第 11 圖 反復フラッシング.  $-9^{\circ}\text{C}$  でフラッシュ, 20 分後融解, 直ちに  $-1.6^{\circ}\text{C}$  で再度フラッシュ後 10 分,  $-6^{\circ}\text{C}$
- 第 12 圖 フラッシングが A 細胞で停止し B 細胞に移らぬ爲これより脱水して A 細胞の末端に氷塊が発達する. A 細胞が  $-1.2^{\circ}\text{C}$  にてフラッシュ後 23 分,  $-1.4^{\circ}\text{C}$
- 第 13 圖 凍結原形質分離. 開始より 17 分後,  $-2.1^{\circ}\text{C}$
- 第 14 圖 凍結原形質分離. 開始より 50 分後,  $-1.7^{\circ}\text{C}$
- 第 15 圖 凍結原形質分離. 開始より 1 時間 23 分後,  $-1.6^{\circ}\text{C}$
- 第 16 圖 同上. 原形質復帰. 2 分間にて融解せしめ 9 分後,  $+2^{\circ}\text{C}$
- (第 10, 12, 14—16 圖  $\times 100$ , 第 11, 13 圖  $\times 400$ )

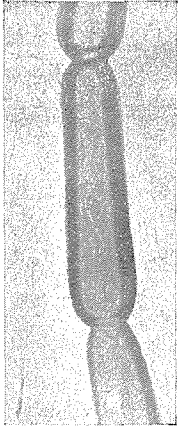


Fig. 1

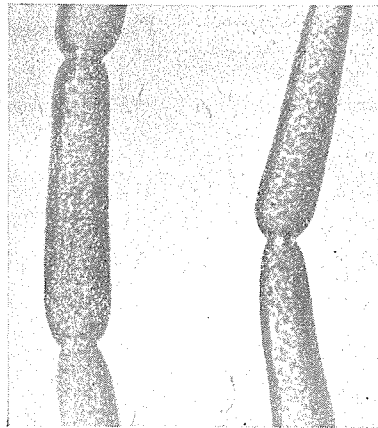


Fig. 2

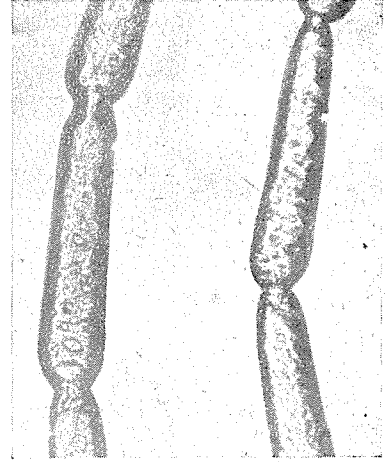


Fig. 3

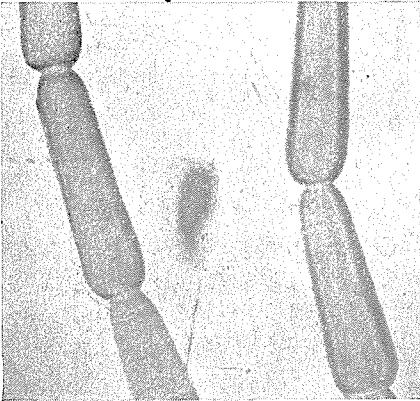


Fig. 4

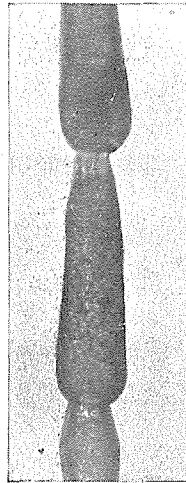


Fig. 5

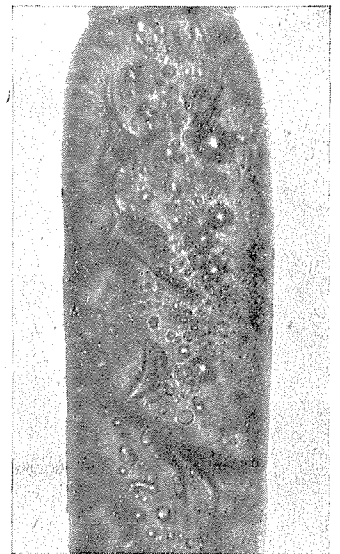


Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8

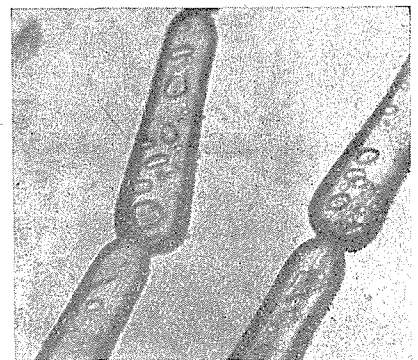


Fig. 9

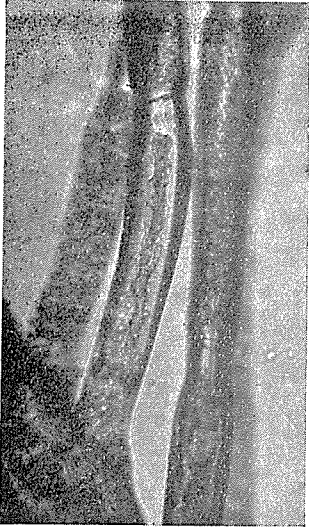


Fig. 10

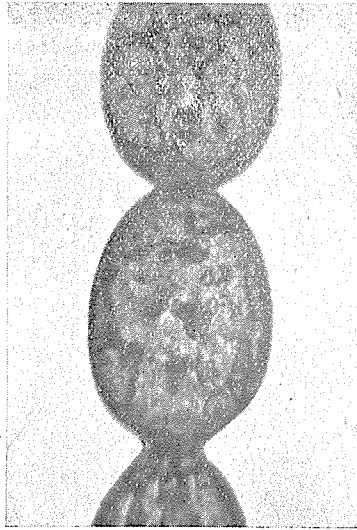


Fig. 11

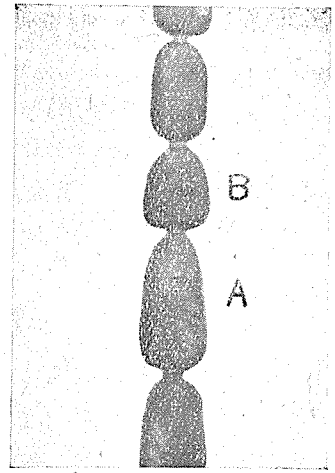


Fig. 12

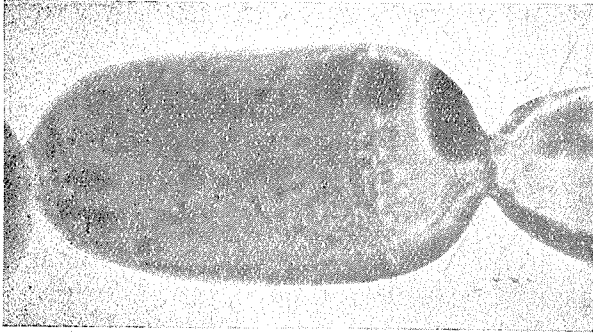


Fig. 13

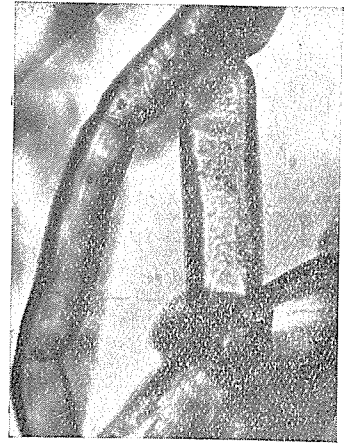


Fig. 14



Fig. 15



Fig. 16