



Title	超低温における植物組織の生存
Author(s)	酒井, 昭
Citation	低温科学. 生物篇, 16, 41-53
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/17607">http://hdl.handle.net/2115/17607</a>
Type	bulletin (article)
File Information	16_p41-53.pdf



[Instructions for use](#)

## 超低温における植物組織の生存 II\*

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

### I

前報<sup>9)</sup>において、耐凍性の大きい植物組織を細胞外凍結の状態温度を下げてゆくと、細胞は漸次脱水され、ある程度以上脱水された後は、たとえ液体窒素(約 $-190^{\circ}\text{C}$ )中に入れてから取出しても、生物は害を受けない事を報告した。この事は、かように極度に脱水された細胞内には、凍り易い状態にある水がもはや存在しないので、超低温まで急激に冷却してからゆつくり融解させても、細胞内が凍らない結果、細胞は害を受けないものと考えられる。さらに液体窒素中にさらされる時間が1分間でも60日間でも殆んど差がない。また細胞内凍結が起らないような冷却速度で冷却した場合は、室温から $-94^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、その温度に90分間おいてから融解しても殆んど害が認められなかつた。かように細胞内凍結が起り易い温度範囲を細胞内凍結が起りにくい条件で冷却して、細胞内に凍り易い水がなくなるとされる温度範囲( $-30^{\circ}\text{C}$ 前後)を超えた後は少なくとも長期間にわたらない限り、温度の絶対値の大きさは生物に対してあまり意味がないものと考えられる。

また前報<sup>9)</sup>では皮層組織のうすい切片を Luyet<sup>4)</sup> の急速冷却—急速加温の方法を用いて、室温から急激に液体窒素中に入れ、室温でゆつくりあたためた時は切片中の全細胞が原形質分離をする能力を失っていたが、 $30^{\circ}\text{C}$ の水中で急激に切片をあたためた時は殆んど全ての細胞が原形質分離をする能力を有していた。従つて急速冷却—急速加温した時は切片中の多くの細胞が所謂硝子化して致命的な細胞内凍結を受けなかつたものと考えられる。本論文では前報につづいて、次のような補足的実験を行つた。急速冷却—急速加温の方法については、液体窒素中に急速冷却後、取出して加温する時の条件、予備凍結してから急速冷却後、加温する時の条件、及び各濃度のエチレングライコール溶液(E.G.)で処理してから、急速冷却した後の加温条件が生存率にどのような影響を与えるかについて調べてみた。また高張平衡塩溶液で脱水してから、超低温にさらした場合についても比較してた。予備凍結による脱水方法については予備凍結で凍り易い状態にある水がなくなる温度範囲の決定、有効なる予備凍結時間の決定、液体窒素中から取出して融解させるまでの温度条件等について調べてみた。

御校閲して頂戴いた朝比奈教授に謝意を表わします。

\* 北海道大学低温科学研究業績 第452号

## II

材料はクワ (*Morus bombycis* Koidz.) 品種タキノカワの1月と3~4月(採集後 $-4^{\circ}\text{C}$ に貯蔵した材料)の枝の1年生枝条を用いた。皮層組織の縦断切片を使用する時には、この切片を流動パラフィンでカバーガラスの間に封ずるか、または先端をとがらした細い絹巻銅線の先端にワセリンで切片を固定して液体窒素又は液体酸素( $-183^{\circ}\text{C}$ )中に入れて急速に冷却した。また枝の小片(長さ約1.5 cm, 直径0.6~0.8 cm)を使用する時には、いろいろの温度で予備凍結してから、錘を枝の小片につけて液体窒素又は液体酸素中に入れた。生死の判定は前報のように中性赤で染めてから高張平衡塩溶液中で原形質分離させて行つた。枝の小片の融解後、 $0^{\circ}\text{C}$ においた材料を時間をおつて同一方法で生存率を調べてみると、漸次生存率は低下するが、1日以上おいた時は生存率の低下は非常に少なくなってくる。融解直後には、或る程度害を受けた細胞も原形質分離すると思われるが、 $0^{\circ}\text{C}$ に1日おく事によつて害を受けた細胞は原形質分離しなくなるためと考えられる。枝の小片の生死の判定は融解後 $0^{\circ}\text{C}$ に1日おいてから行つた。

## III

## 1. 急速冷却—急速加温による方法

**実験 1.** 液体窒素から取出す時の加温速度の影響 クワの皮層組織から切り取つた約 $2 \times 1 \text{ mm}$ の1細胞層の薄い切片の端を細い針金の先端にワセリンで固定して液体窒素中に急激に入れた。1分後、液体窒素から取出した瞬間にいろいろの条件であたためてみた。

第1表に示したように、 $20^{\circ}\text{C}$ 以下の水中であたためた時には全細胞が死んでいたが、 $30^{\circ}\text{C}$ ~ $35^{\circ}\text{C}$ の水中で急激にあたためた時には半数以上の細胞が生存していた。急速に液体窒素中に冷却した組織切片が生きているためには、急速に加温する事が必要である事が判つた。次に予め組織切片を予備凍結した場合には加温速度が生存率にどのような影響を与えるかを調べてみた。

第1表 液体窒素中に急速冷却した組織切片を色々の加温速度であたためた時の生存率

加温条件	$10^{\circ}\text{C}$ の空中	$10^{\circ}\text{C}$ の水中	$20^{\circ}\text{C}$ の水中	$30^{\circ}\text{C}$ の水中	$35^{\circ}\text{C}$ の水中
生存率 (%)	0	0	0	50	70

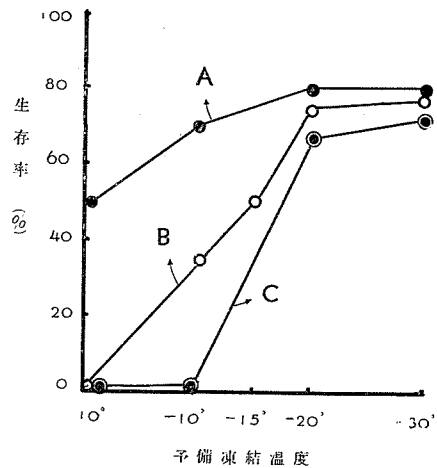
材料: クワの皮層組織の縦断切片 方法: 針金の先端に切片を固定して冷却

**実験 2.** 各温度で予備凍結した場合の加温速度の影響  $-10^{\circ}\text{C}$ で植氷して過冷却を破つた組織切片を細い金属線の先端にワセリンで固定して、 $-10^{\circ}\text{C}$ ~ $-30^{\circ}\text{C}$ の各温度に4時間予備凍結後、液体窒素中に5分間入れてから、加温速度を変えるために、 $30^{\circ}\text{C}$ の水中、 $5^{\circ}\text{C}$ 及び $10^{\circ}\text{C}$ の空気中にそれぞれ取出した。用いた材料は耐凍性が大きいので、予備凍結しない切片でも $30^{\circ}\text{C}$ の水中で急速加温した時には50%の生存率を示したが、 $5^{\circ}\text{C}$ で加温した時には生存細

胞はなかつた。しかし $-10^{\circ}\text{C}$ で予備凍結した場合には、たとえ $5^{\circ}\text{C}$ で加温しても、35%の生存率を示す。予備凍結しない場合や $-10^{\circ}\text{C}$ で予備凍結した場合には、液体窒素中から取出す際の加温速度が生存率に大きい影響をもっているが、 $-20^{\circ}\sim-30^{\circ}\text{C}$ で予備凍結した場合には、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以上の温度で予備凍結した場合とちがつて、加温速度の差が生存率に対して殆んど影響を与えていない。さらに液体窒素中から取出して $-10^{\circ}\text{C}$ の空气中で加温した場合においては、 $-10^{\circ}\text{C}$ で予備凍結した時は生存細胞がないが、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で予備凍結した場合には70%以上の生存率を示している。これらの事は $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で予備凍結した場合には細胞内に凍り易い状態の水が非常に少ないために加温速度が小さくても、致命的な細胞内凍結が起りがたい事を示している。用いた材料は耐凍性が大きいので、この際細胞外凍結による害は起らないものと思われる。

**実験3.** エチレングライコール (E.G.) で処理した場合の加温速度の影響 組織切片を処理する

E.G. の濃度がたかまるにつれて、細胞に致命的な結果を与えるような細胞内凍結が起きにくくなる。だから、液体窒素中から取出す時の加温速度の影響は無処理の場合よりも少なくなると考えられるのでこれを確かめてみた。組織切片を各濃度の E.G. 溶液 (約 $15^{\circ}\text{C}$ ) 中に10分間入れてから、濾紙で拭つて、流動パラフィンでカバーガラス ( $1.5\text{ cm}^2$ ) の間に封じて、室温から液体窒素中に急速に入れて5分間後に約 $15^{\circ}\text{C}$ の空气中に取出して、組織切片の生存率を調べた。この実験では液体窒素中から室温に取出しているし、カバーガラスの間に切片が封じてあるから、加温速度は非常に小さいので、無処理の対照は全ての細胞が死んでいる。然し E.G. で処理した場合には、2 M の時が50%、3 M の時には70%の生存率を示している。さらに処理濃度がたかまると、生存率は低下するので、4.0 M 以上の高濃度では E.G. の害作用があらわれるものとみなされる。3 M で処理した細胞のたかい生存率は細胞内に E.G. が入つたため



**第1図** 組織切片を各温度で予備凍結後、急速に液体窒素中に入れて、色々な条件で加温した時の生存率

- A:  $30^{\circ}\text{C}$  の水中で加温
- B:  $5^{\circ}\text{C}$  の空中で加温
- C:  $-10^{\circ}\text{C}$  の空中で加温 (1時放置)

材料: 皮膚組織の縦断切片

方法: 針金の先端に切片を固定した冷却予備凍結時間: 4時間

**第2表** エチレングライコールの溶液で組織切片を処理してから、液体窒素中に急速冷却後、 $15^{\circ}\text{C}$ の空气中に取出した時の生存率

エチレングライコールの濃度	0	0.5 M	1.0 M	1.5 M	2.0 M	3.0 M	4.0 M	5.0 M
生存率 (%)	0	10	20	30	50	70	50	30

材料: 皮膚組織の縦断切片 方法: 切片を流動パラフィンでカバーガラスの間に封じて冷却

に、液体窒素中に入れても、細胞内が凍らなくなっているのか、或いは急速冷却した時に細胞内に微細結晶が出来るが、E.G.のある量が入っている時には、温水中で急速しないで室温でゆつくりあたためても、その微細結晶が細胞に有害な影響を与える程度にまで成長する時間がないのかもしれない。それをたしかめるために加温速度を変えて生存率を調べてみた。もしも予備凍結で細胞内に凍り易い水がなくなる程度にまで脱水した場合と同様に、E.G.で処理したために、細胞内に凍結が起らない様な条件が出来ているならば、加温速度に大きい差を与えても、生存率は変わらないはずである。

**実験4.** E.G.で処理した場合の加温速度の影響 3.0 M の E.G. 溶液で 15°C で 10 分間処理した組織切片を実験3と同じ方法で液体窒素中に 5 分間入れてから、加温速度を変えるために、30°C の水中と 0°C 及び -12°C の空気中 (20 分後に室温に取出す) 加温した場合の生存率を比較してみた。

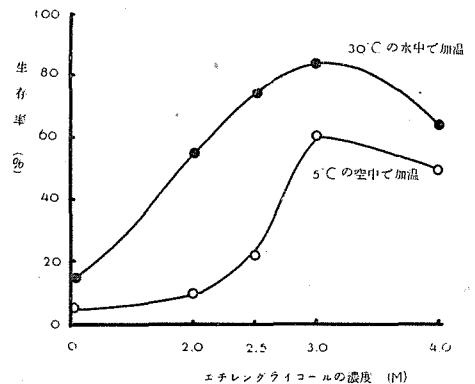
第3表から明らかな様に 3 M E.G. 溶液で処理しても、液体窒素から取出す時の加温速度によつて生存率がかなり異なる事が判つた。さらに処理する E.G. の濃度と加温速度を変えた場合を調べてみた。

**実験5.** E.G. の濃度及び加温速度の影響 前と同じ方法で E.G. の各溶液で処理された組織切片を液体窒素から一部は +30°C の水中で、一部は 5°C の空気中であたためた時の結果を第2図に示した。5°C の空気中であたためた場合、2.5 M 以下の低濃度で処理された切片は 15% 以下の低い生存率を示すにすぎないが、3 M 溶液では 60% の生存率を示している。5°C の空気中でも、30°C の水中で加温した場合でも処理する E.G. の濃度がますますつれて、生存率はたかまり、両者とも 3 M で最高に達し、4 M 以上では低下する。また切片は 5°C の空気中でゆるやかに加温するよりも、30°C の水中で急速に加温した方がはるかに高い生存率を示すが、処理する E.G. の濃度がたかまると、あたためる速度の差は低濃度の場合よりも小さくなる。用いた材料では細胞に害を与えないと考えられる E.G. の 3 M 溶液で処理した場合でも、加温条件によつて生存率がことなるし、第3表の結果と併せ考えて E.G. が細胞内に入る事によつ

**第3表** エチレングライコールで処理した組織切片を液体窒素中から取出す際の加温速度の影響

加温条件	30°Cの水中	0°Cの空中	-12°Cの空中
生存率 (%)	65	35	5

材料： 皮膚組織の縦断切片  
 方法： 切片を流動パラフィンでカバーガラスの間に封じて冷却  
 エチレングライコールの濃度： 3 M



**第2図** 各濃度のエチレングライコール溶液で処理した組織切片を液体窒素中に急速に入れた後、色々な条件で加温した時の生存率

材料： 皮膚組織の縦断切片  
 方法： 切片を流動パラフィンでカバーガラスの間に封じて冷却  
 加温条件： 5°Cの空中及び30°Cの水中

て細胞内が凍らなくなるとは考えられない。急速冷却によつて微細結晶が細胞内に出来るが、細胞内の E.G. の濃度がまずにつれて、その微細結晶が細胞に害を与える程度に成長するのに多くの時間を要するので、E.G. の低濃度又は無処理のものよりも加温速度があまり問題とならないものと考えられる。

## 2. 高張塩溶液中で脱水する方法

**実験 6.** 高張塩溶液中で脱水後、急速冷却—急速加温する実験 針金の先端に固定した組織切片を液体窒素中に入れて急速冷却するまえに、2.0 M 及び 3.0 M の平衡塩溶液中に室温で 10 分間入れて脱水してから、濾紙で拭つて液体窒素中に入れた。5 分後に 30°C の水中で急速にあたためた。この場合 3.0 M の高張塩溶液中で脱水してから液体窒素中に入れないで、直ちに 30°C の水中であたためた時は全細胞が生存していた。第 4 表に示すように、塩溶液中で脱水した場合は予想に反して全く生存細胞がないのに、無処理の方は 30% の生存率を示している。これは前者は高張塩溶液中で原形質分離しているので、細胞膜と原形質膜の間の液が凍結し易い事がある原因と考えられる。だから 3 M 平衡塩溶液中に 2 M, 又は 3 M となるように E.G. を溶かして、原形質分離で出来た空所を外液である 3 M 平衡塩溶液と 2 M E.G. 溶液の混合液で充たすようにした。この場合外液中の  $Ca^{++}$  の濃度が高いので、E.G. は細胞内に透過しない。第 5 表から明らかな様に、高張塩溶液中に E.G. を 2 M, 3 M になる様に溶解しても、第 4 表と同じように、高張塩溶液中に入れたものは一つの細胞も生存していなかつた。3 M の高張塩溶液中で強度に脱水してあるから、細胞内は高張塩溶液中に入れる前よりも凍結しがたい状態にあると思われるが、結果は全細胞が死んでいる。従つて原形質分離で出来た空間を充している外液の凍結が細胞に有害な影響を与えるか、または凍結によつて起る外液の濃縮が細胞に害を与えるのかもしれない。

**第 4 表** 各濃度の高張平衡塩溶液中で脱水後急速に液体窒素中に入れた組織切片を 30°C の水中で急速に加温する時の生存率

処理する塩溶液の濃度	対照 (0)	2.0 M	3.0 M
生存率 (%)	30	0	0

材料：皮層組織の縦断切片

方法：切片を針金の先端に固定して冷却

**第 5 表** 各溶液中で処理後、急速に液体窒素中に入れた組織切片を急速に加温する時の生存率

処理溶液	対照 (無処理)	エチレングライコールの 2 M 溶液	3 M 平衡塩溶液 + 2 M エチレングライコール	3 M 平衡塩溶液 + 3 M エチレングライコール
生存率 (%)	30	60	0	0

材料：皮層組織の縦断切片

方法：針金の先端に切片を固定して冷却

\* エチレングライコールの 2 M 溶液のみで処理したもの

\*\* 3 M 平衡塩溶液中に 2 Mol なるようにエチレングライコールを溶解した液

加温条件：30°C の水中

### 3. 細胞外凍結による脱水方法

前報<sup>9)</sup>では各温度で予備凍結(16時間)後、液体窒素中に入れてから $-30^{\circ}\text{C}$ の部屋に取出して1~2時間おいてから、 $0^{\circ}\text{C}$ の部屋に取出した。この方法では桑の皮層組織は $-30^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で予備凍結した場合には、80%以上の生存率を示すが、 $-20^{\circ}\text{C}$ で予備凍結した場合には20~30%、 $-25^{\circ}\text{C}$ では60%の生存率を示した。本報では有効な予備凍結時間、予備凍結の温度、液体窒素から取出して融解するまでにおかれる温度条件について更に実験した。

**実験7.** 有効な予備凍結時間 切片を $-10^{\circ}\text{C}$ で植氷して細胞外凍結を起させてから流動パラフィンでカバーガラスの間に封じて $-30^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結させた。また枝の小片を使用して $-10^{\circ}\text{C}$ で植氷してから $-30^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結した。材料の温度が $-30^{\circ}\text{C}$ になつてから、その温度に1, 4, 16, 及び24時間おいてから、液体酸素中に5分間入れておいた。その後、 $-30^{\circ}\text{C}$ の部屋に取出して1時間おいてから室温に取出して生存率を調べた。第6表に示した様に枝の小片の場合でも、切片の場合でも、温度が大体外囲温度\*になつたのち、より長い時間その温度におく必要がない事が判つた。

第6表  $-30^{\circ}\text{C}$ で各時間予備凍結した材料を液体窒素中に入れてから、 $-5^{\circ}\text{C}$ の空中に取出した時の生存率

	$-30^{\circ}\text{C}$ での予備凍結時間時間			
	24時間	16時間	4時間	1時間
皮層組織切片	90*	100	90	90
枝の小片	90	85	100	90

材料：枝の小片(長さ1.5 cm, 直径：0.6~0.8 cm)

\* 皮層細胞の生存率

**実験8.** 予備凍結温度の決定 組織切片を流動パラフィンでカバーガラスの間に封じて $-10^{\circ}\text{C}$ まで冷却した時、個々の切片を植氷して過冷却を破つた後、 $-10^{\circ}\text{C}$ ~ $-30^{\circ}\text{C}$ の各温度で4時間予備凍結してから液体酸素中に5分間入れておいた後、 $-5^{\circ}\text{C}$ の部屋に取出した。その温度に1時間おいてから室温に移して生存率を測定した。第7表にその結果を示した様に、 $-20^{\circ}$ 、 $-25^{\circ}$ 、 $-30^{\circ}\text{C}$ の間に生存率の差はないが、 $-15^{\circ}\text{C}$ 以下では生存率は著しく低い。更に枝の小片について同様に予備凍結温度を変えて生存率を調べたが、切片の場合と同様 $-20^{\circ}$ 、 $-30^{\circ}\text{C}$ の間には殆んど差が認められない。前報<sup>9)</sup>の場合の $-20^{\circ}\text{C}$ における30%、 $-30^{\circ}\text{C}$ における80%の値と比較するとかなり大きい差がある。前報の場合よりも用いた材料の条件が良かった事の外に、前報では液体窒素から出して $-30^{\circ}\text{C}$ の空气中に1~2時間おいてから、 $-5^{\circ}\text{C}$ の部屋に取出したが、今回は液体酸素中から取出して $-5^{\circ}\text{C}$ の部屋においた。液体酸素から取出して融解させるまでの温度条件の差が生存率に影響を与えるかどうかを次に調べた。

\* 切片の場合には、切片を入れたシャーレ中の小温度計の示度で、枝の小片の場合には髓部に小温度計を挿入して、その示度から大体それらが外囲温度に達したかどうかを知つた。

第 7 表 各温度で 4 時間予備凍結後、液体酸素中に入れてから  
-5°C の空中に取出した時の生存率

予備凍結温度	-10°C	-15°C	-20°C	-25°C	-30°C
生存率 (%)	5	30	85	90	90

材料：皮層組織の切片

方法：切片をカバーガラスの間に流動パラフィンで封じて、-10°C に冷却した時、各切片を植氷して過冷却を破つてから各温度に 4 時間予備凍結してから液体酸素中に入れて冷却した

第 8 表 各温度で 4 時間、予備凍結後液体酸素中に入れてから、  
-5°C の空中に取出した時の生存率

予備凍結温度	対照 (無処理)	-15°C	-20°C	-30°C
生存率 (%)	0	40	90	100

材料：枝の小片

実験 9. 液体酸素から取出して融解するまでにおかれる温度の影響 枝の小片を -20°C と -30°C で 16 時間予備凍結してから、液体酸素中に 5 分間入れた後、取出してそれぞれ 5°C, -10°C, -20°C 及び -30°C の各温度の空气中に 4 時間おいてから、5°C の部屋に取出した。第 9 表から判る様に、-30°C で予備凍結した場合は液体酸素から取出しておかれる温度に関係なく殆んど同じ生存率を示すが、-20°C で予備凍結した場合には、液体酸素から取出して -30°C に 4 時間おかれた時、-30°C 以外の他の温度におかれたものと比較して生存率がかなり低下している。また -30°C で予備凍結した方が -20°C で予備凍結したものより生存率が常にたかい。液体酸素から取出しておく温度が -30°C より低い場合についてさらに調べてみた。第 10 表に示した様に -30°C で予備凍結した場合には前と同様に、液体酸素から取出してどの温度においても生存率は殆んど変わらないが、-20°C で予備凍結して -30°C においた場合には -45°C, -70°C においた場合よりも生存率が低下している。-20°C においた場合は実験を失敗したので比較出来なかつた。-20°C で予備凍結した場合、液体酸素から取出して放置する温度によつて生存率が変わる理由の一つとして、液体酸素から取出して加温する速度が関係すると

第 9 表 -20°C と -30°C で予備凍結後、液体酸素中に入れてから  
取出して融解するまでの間におかれる温度の影響

個体番号	予備凍結温度 (°C)	液体酸素から取出して 4 時間放置しておく温度			
		5°C	-10°C	-20°C	-30°C
No. 1	-20	35*	40	40	5
〃	-30	60	65	60	60
No. 2	-20	65	75	60	30
〃	-30	85	85	80	80

\* 皮層細胞の生存率



第10表 -20°Cと-30°Cで予備凍結後、液体酸素中に入れてから取出して、融解するまでの間におかれる温度の影響

予備凍結温度 (°C)	液体酸素から取出して4時間放置しておく温度			
	-20°C	-30°C	-45°C	-70°C
-20	—	40	70	70
-30	80*	75	80	85

\* 皮層細胞の生存率

も考えられるのでこれをしらべてみた。

**実験10.** -20°C, -30°Cで予備凍結した場合における液体酸素から取出す時の加温速度の影響 -20°Cと-30°Cで予備凍結してから、液体酸素中に入れ-30°Cの部屋に取出して35分、3時間、及び16時間その温度においてから5°Cに移した。-30°Cで予備凍結した場合は液体酸素から取出して35分後でも、16時間後でも生存率は変わらないが、-20°Cで予備凍結した場合には35分後には生存率は-30°Cで予備凍結した場合と変わらないが、-20°Cに3.5時間おくと生存率は低下する。それ以降16時間までおいても生存率はあまり変わらない。液体酸素から取出して35分経過すれば枝の小片の温度は-30°Cになっているものと考えられるが、害は35分以内には起らないで、-30°Cにもつとより長い時間おかれてから害が生ずる事から、液体酸素から取出して加温する時の速度が原因ではないようである。

次にある温度におくと数時間内に害が現われるような温度範囲があるかどうかが問題となる。これについては別の実験<sup>10)</sup>で枝の小片を細胞外凍結状態(-10°, -15°, -20°, -25°, -30°及び-70°C)において生存率の変化を期間を追って調べた結果、用いた材料では少なくとも4日間各温度においても、生存率の差は見出されなかつたから、数時間以内に生存率が低下する様な温度範囲があるとは考えがたい。-30°Cで予備凍結した場合には起らないで、-20°Cで予備凍結した場合には生存率の低下が起るので-15°Cで予備凍結した場合について更に調べてみた。

**実験11.** -15°Cで予備凍結後、液体酸素から取出しておかれる温度の影響 -15°Cで予備凍結(4時間)後、液体酸素中に5分間入れてから、-10°C, -20°C, -30°C, 及び-70°Cに3時間おいた後室温に取出した。第12表に結果を示した様に、-15°Cで予備凍結した場合は4個体とも、液体酸素中から出して-20°C, -30°Cにおいた場合は、-10°C, -70°Cにおいた場合よりも生存率が皆低下している。-20°Cで予備凍結した場合は前の実験とちがつて-30°Cにおく時丈生存率が低下する様な傾向はみられなかつたが、-15°Cの場合と同様に

第11表 -20°Cと-30°Cで予備凍結後、液体酸素中に入れてから、-30°Cの空中に取出した時の生存率

予備凍結温度 (°C)	液体酸素から取出して-30°Cの空中に放置しておく時間		
	35分	3.5時間	16時間
-20	80*	45	30
-30	90	80	80

\* 皮層細胞の生存率

液体酸素中から取出して-30°Cの空中に放置してから、5°Cの空中で融解後、生存率を測定した。

第12表 -15°Cと-20°Cで予備凍結後、液体酸素中に入れてから  
取出して融解するまでの間に放置しておく温度の影響

予備凍結温度 及び個体番号	液体酸素から取出して4時間放置しておく温度			
	-10°C	-20°C	-30°C	-70°C
-15°C				
No. 3	25*	5	0	25
No. 4	40	0	30	50
No. 5	70	40	35	70
No. 6	40	5	5	25
-20°C				
No. 1	60	35	15	45
No. 2	75	45	30	50

\* 皮層細胞の生存率

-10°C, -70°Cにおいた方が-20°C, -30°Cにおくより生存率の低下は少ない傾向がみとめられる。

以上の結果から、-20°C以上での予備凍結、液体酸素中での冷却、液体酸素から取出して-20°C~-30°Cにある時間おく事の三つの条件が重なって始めて生存率の低下が起る。-30°C以下で予備凍結した時には液体酸素から取出してどの温度においても生存率の低下がおきない事から考えて、-20°C以上で予備凍結した場合には細胞内にまだ少量の凍り易い水が残っている事がその原因の様に考えられるが、これ丈のデータからは今の所説明がつかない。

#### IV

高張塩溶液中で予め細胞内の水を脱水しておけば、急速冷却—急速加温法で液体窒素中で処理した場合、予想に反して結果は対照よりも悪かつた。Luyet<sup>4)</sup>(1938)はタマネギの表皮細胞を5~15%の食塩水中で予め脱水してから、液体空気中に入れて取出した時、表皮細胞が原形質分離した事を報告している。その際彼は液体空気中において、原形質分離で出来た空間には氷を認めたが原形質膜内には氷の形成を認めなかつた。しかしこれに対してJensen<sup>9)</sup>(1942)が同一材料、同一方法で追試してみたが、正常な原形質分離をする細胞を認めなかつた。彼は更に1.0Mグリセリン溶液で処理してから同じ方法で追試したが、やはり液体空気にさらした細胞は正常な原形質分離をしなかつたと報告している。本実験はタマネギとちがつて耐凍性の大きい材料であり、3Mのような高濃度で脱水したのに、無処理とちがつて、液体窒素から取出した細胞は全く原形質分離しなかつた。したがってJensenがLuyetの結果を批判しているように、高張塩溶液中で脱水する方法では植物細胞を超低温にまで冷却して生存させる事は出来ないと思われる。

細胞を液体窒素や液体酸素中に入れても生存していたという事実は細胞内に致命的な凍結

が起きなかつた事を裏付けている。しかも致命的な細胞内凍結は急速冷却してから加温速度を大きくする事によつてある程度は防ぐ事が出来る。現在の所、液体窒素中に急速冷却する場合には、細胞内に細胞に害を与えない程度の微細結晶(結晶核やそれのある程度発達したものと考えられる)が多数生ずると考えられているし、それを裏付ける様な証拠も得られている<sup>7),8)</sup>。液体窒素や液体酸素中に急速冷却した場合、細胞内に生じた微細結晶が加温速度の大きさの如何によつて、細胞に害\*を与えらるる程度にまで成長するかどうかが問題で、それによつて害の程度が決まるものと考えられる。またその場合に、細胞内の状態が微細結晶が成長しにくい時には加温速度は前の場合のように問題とならなくなる。-10°C以下で予備凍結したり、E.G.で処理した場合には無処理の場合よりも加温速度が問題とならないのはこのためであろう。この傾向はE.G.の濃度が高まるにつれて増大する。E.G.は短時間内に細胞内に透過し、水を結合する力が強いので、結晶の成長をおくらせたり、妨げたりする傾向が強いためと考えられる<sup>5)-6)</sup>。しかしE.G.の濃度が3Mになると確かに加温速度の影響はより低濃度の場合よりも少なくなるが、やはりある程度の差は存在している。この差は加温速度の差が大きくなる程増加する。しかし細胞外凍結の度合が進んで、細胞内に凍り易い状態の水が殆んどなくなつてくると、加温速度は生存率に殆んど影響を与えなくなる。用いた材料では4M以上のE.G.溶液中に入れると細胞は害を受けるが、動物細胞<sup>6),7)</sup>は一般に7~8M程度の高濃度溶液中に入れても害を生じない場合が多い。植物細胞は動物細胞よりもグリセリン、エチレングライコールの高濃度によつて害を受け易い。

-30°Cで予備凍結した場合とちがつて、-20°Cまで予備凍結した場合には、なお細胞内には少量の凍り易い水が残っているものと思われるから、液体酸素中に投入した時、前にのべたように細胞内に微細結晶が生ずるが、細胞内は強度に脱水されているし、耐凍性の大きい細胞であるから、液体酸素から取出してゆつくり加温しても、その微細結晶が細胞に害を与える程度にまで成長するのに長い時間を要すると思われる。従つて液体酸素から取出す条件によつては殆んど害を受けない場合もあるだろう。これは耐凍性の大きい材料に特徴的で耐凍性の小さい材料では見られがたい現象であろう。朝比奈<sup>12)</sup>(1958)の最近の結果の様に、耐凍性のあまり大きくない材料\*\*では-30°Cまで予備凍結した場合には全部生存していたが、-20°Cで予備凍結した場合には全部の細胞が生存していなかつたという結果が得られる。-30°Cまで予備凍結した場合、細胞内には凍り易い状態の水が存在しないという直接の証拠も、また-30°Cまで予備凍結してから液体酸素中に入れた時、どんな種類の細胞内凍結も起きなかつたという直接的証拠もないが、これを裏付ける間接的証拠は前報及び本報においていくつか報告した。

Scholander<sup>11)</sup>(1953)等はlichen, chironomusの幼虫等を用いて-35°Cまでの各温度に凍結した時の体内に形成された氷の量と、凍らないで残っている水の量を測定したが、その結果

\* 細胞に害を及ぼすようになる微細結晶の大きさについては今の所何も判っていない。細胞内に凍結が起きてもそれが細胞に致命的な影響を与えらるるとは限らない。

\*\* カキの鰓、イラガ前蛹は動物細胞中では耐凍性が大きい方であるが、冬の木細胞よりは耐凍性が小さい。

-10°Cで約90%の水が凍結し、温度が低下するにつれて漸次体内に凍らないで残っている水の量は減少し、約-30°Cに達するとその量は3~5%になる。使用したどの材料についても同じ傾向を示した。篠崎(1957)も最近イラガの前蛹を用いて同じ傾向の結果を得ている。これらの場合、凍らないで体内に残っている水の量を-20°Cと-30°Cとで比較すると、その差は極めて僅かであるから、こうした測定方法で凍り易い状態の水がなくなる温度を明確に決める事はむずかしい。今迄の実験結果と併せて、多くの動植物細胞では細胞内に凍り易い状態の水がなくなる温度は約-30°Cとみなされる。ともかくこの温度は生物にとって大きい意義をもっている。これより高い温度範囲では、冷却条件によつては致命的な細胞内凍結が起る危険が多いが、この温度範囲以下では急速に冷却しても、かような危険はない。

### 摘 要

1. クワの皮層組織の縦断切片を液体窒素中に急速冷却してから取出す時は、25°C以上の湯中で急速に加温する時だけ細胞は生存出来る。しかし予めエチレングライコール中で処理した場合にはその濃度がまずにつれて、加温速度の影響は前の場合よりも少なくなる。加温速度の差が非常に大きい時は、たとえ3M溶液中で処理した場合でも、加温速度によつて生存率がかなり異なる。また予め-10°Cまで細胞外凍結で脱水してから液体窒素中に入れた場合においても、加温速度の影響は対照よりも少なくなる。さらに予備凍結による脱水が進行して、細胞内に凍り易い水が殆んどなくなる程度になつた時は、たとえ加温速度の差が大きくても生存率には殆んど影響しなくなる。

2. 高張塩溶液中で予め原形質分離してから、急速冷却—急速加温する場合には無処理とちがつて生存細胞は全くない。

3. 枝の小片や切片を-15°C、-20°Cで予備凍結した後液体窒素中に入れてから取出して-10°、-20°、-45°、及び-70°Cの各温度に2~4時間おいた場合、-20°~-30°Cにおいて、殊に-30°Cにおいて生存率の低下が起るが、他の温度においた場合にはかような低下が起らない。しかし-30°Cで予備凍結した場合にはどの温度においてもかような生存率の低下が起きない。

4. 細胞外凍結状態で冷却していつた場合、細胞内の凍り易い状態の水がなくなる温度は約-30°Cである。この温度範囲以下では温度の絶対値の大きさは少なくとも凍結が長期間にわたらない限り、生物に対して大きい意義を有しない。

### 文 献

- 1) 朝比奈英三・青木 藤 1958 耐凍性昆虫を超低温で凍結生存させる一つの方法。低温科学, 生物篇, 16, 55.
- 2) 朝比奈英三 1948 超低温で生存する動物細胞の凍りかたについて。低温科学, 生物篇, 16, 65.
- 3) Jensen, A. B. 1942 Studien über die Kälteresistenz von Pflanzenzellen. Protoplasma, 36, 195.

- 4) Luyet, B. J. and G. Thoennes 1938 Démonstration des propriétés isotropiques de masses cellulaires vitrifiées à la température de l'air. Comptes Rendus séances Acad. Sci., Paris, **206**, 2002.
- 5) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio 1952 Effect of Glycerol in limiting ice formation in tissues subjected to low temperatures. *Biodynamica*, **7**, 107.
- 6) Luyet, B. J. and F. Gonzales 1952 Protective action of glycerol against freezing injury in embryonic tissues of chick. *Biodynamica*, **7**, 101.
- 7) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio 1954 Effect of the rewarming velocity on the survival of embryonic tissues frozen after treatment in ethylene glycol. *Biodynamica*, **7**, 213.
- 8) Luyet, B. J. 1957 On the growth of the ice phase in aqueous colloids. *Proc. Royal. Soc., Ser. B.* **147**, 434.
- 9) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. *低温科学, 生物篇*, **14**, 17.
- 10) ———— 1958 植物細胞の細胞外凍結による (I). 連続的凍結状態において害が早く現われる温度範囲の決定. *低温科学, 生物篇*, **16**, 35.
- 11) Scholander, P. F., W. Flagg, R. J. Hock and L. Irving. 1953 Studies on the physiology of frozen plants and animals in arctic. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **42**, Suppl. **1**, 1.

### Résumé

Using a mulberry tree in frost hardy state, studies were made on the survival of plant tissue at super-low temperatures.

1) The thin sections from the cortical tissue of twig were rapidly cooled down in liquid N<sub>2</sub> and then rewarmed in water at 10°, 20°, 30° and 35°C respectively. All the cells in the section rewarmed in water below 20°C were completely damaged, while 50 percent of the parenchyma cells rewarmed in 30°C water and 70 percent of them in 35°C water were found to be alive (Table. 1).

After having been treated in ethylene glycol solutions of various concentrations (0.5M ~4.0 M), thin sections are rewarmed in the air at room temperature after their removal from the liquid N<sub>2</sub> bath; the percentages of survival of the cells in these sections are as follows: 0 in the case of the normal control (untreated), 20 at 1.0 M, 50 at 2.0 M, 70 at 3.0 M, 50 at 4.0 M and 30 at 5.0 M. (Table. 2). As the concentration of the protective agent was gradually increased, the percentage of survival rose after both rapid (in 30°C water) and slow rewarming (in 5°C air), but the rise began at lower concentration and was steeper after rapid than after slow rewarming in low concentrations of ethylene glycol (Fig. 2). The difference between the effects of the two rewarming velocities on frozen cells was quite obvious even after the treatment with high concentrations of ethylene glycol (Table. 3). When treated with higher concentrations than 4 M solution of ethylene glycol, some toxic effects were found on these cells.

After having been previously dehydrated by extracellular freezing at different temperatures, the tissue sections were rapidly frozen in liquid O<sub>2</sub> and then were rewarmed rapidly in water at 30°C or rewarmed slowly in the air at 5°C and -10°C. The survival percentage of the normal control not refrozen was nil at the slow rewarming velocities and 50 at rapid rewarming. After prefreezing at -10°C, survival was nil in -10°C air

and 35 Percent in 5°C air in the case of the slow rewarming velocities, but 70% at the rapid rewarming (in 30°C water). However, after prefreezing at  $-20^{\circ}$  and  $-30^{\circ}\text{C}$  by which most of easily freezable water in the cell may be drawn from the cell interior by extracellular freezing, the survival value was more than 70 percent irrespective of the rewarming velocities (Fig. 1).

2) All the cells in the thin sections which had been previously dehydrated by the hypertonic balanced salts solution (3 & 3 M) were killed after rapid freezing irrespective of the rewarming velocity. In the untreated cells (normal control), 30 percent of the parenchyma cells were capable of plasmolysis normally when warmed rapidly (Table 4).

3) When the tissue pieces from the same twig prefrozen for 4 hours at  $-15^{\circ}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-30^{\circ}\text{C}$  were immersed in liquid  $\text{O}_2$  and then allowed to stand for 1~5 hours in the air at  $-10^{\circ}$ ,  $-20^{\circ}$ ,  $-30^{\circ}$ ,  $-45^{\circ}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$  respectively, the survival values of the cooled pieces prefrozen at  $-15^{\circ}$  or  $-20^{\circ}\text{C}$  and then held for 1~5 hours at  $-20^{\circ}$  and  $-30^{\circ}\text{C}$  diminished considerably below that of the pieces held at  $-10^{\circ}\text{C}$  or below  $-40^{\circ}\text{C}$ . In pieces prefrozen at  $-30^{\circ}\text{C}$ , the decrease of the survival value was scarcely noted irrespective of the temperatures at which pieces were held after immersion in liquid  $\text{O}_2$  (Tables 9, 10, 12).

4) A definite temperature zone in which easily freezable water in the cell can be drawn from the cell interior by extracellular freezing seems to lie around  $-30^{\circ}\text{C}$ . Below this temperature, the intensity of cold seems not to exert any important effect upon living organisms at least in the short period of freezing.