HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	微生物の凍結　III : 大腸菌細胞の凍結障害の機構
Author(s)	根井, 外喜男; 荒木, 忠; 松坂, 理夫
Citation	低温科學. 生物篇, 24, 35-48
Issue Date	1967-02-10
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17711
Type	bulletin (article)
File Information	24_p35-48.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Tokio NEI, Tadashi ARAKI and Tadao MATSUSAKA 1966 Freezing of Microorganisms. III. The Mechanism of Freezing Injury in *E. coli* Cells. *Low Temperature Science, Ser. B, 24.* (With English Summary p. 46)

微　生　物　の　凍　結　III

大腸菌細胞の凍結障害の機構*

根井外喜男　荒木　忠　松坂理夫

(低温科学研究所　医学部門)

(昭和41年10月受理)

I. 緒　　言

動物細胞及び植物細胞について行なわれた凍結実験は，枚挙に遑がないくらい多数に上る。微生物細胞もその例に洩れないが，この場合はいろいろの条件で凍結処理をしても，その後の細胞の生存の有無しかみていないものが多い。細胞が小さくなるほど，形態的観察が難しくなって，光学顕微鏡ではもはや細胞内部の微細な変化を見分けることができないからであろう。従って，細菌などは，電子顕微鏡を用いない限り，細胞レベルでの凍結の状態を観察し凍結の機構を明らかにすることは不可能であった。例えば，細菌細胞内に氷晶ができるかどうかの実証すらなく，長い間問題となっていたほどである。

これを解決するには，通常の試料作製法では不充分で，どうしても特殊な方法を用いねばならない。最近になって漸く Rapatz and Luyet[1] が，凍結置換法によって作った電子顕微鏡観察用標本で細菌細胞内氷晶形成をみとめたと報告した。この原著はまだ発表されていないため内容の詳細を知ることはできないが，形態的に観察した結果の記載だけのようである。

われわれは，かねてから微生物細胞の凍結障害の機序を明らかにすべく研究を続けてきたが，今回は，大腸菌を用いて，特に凍結の際に見られる形態的な変化と，それと同じ条件で処理された試料の機能的な変化とを比較対照することによって障害の実相をつかみ，更に細胞水分が凍結に際して演ずる役割についても種々の角度からの吟味を行ない，最終的には大腸菌細胞の凍結障害の本質を明らかにしようとしたものである。

II. 材料と方法

材料：研究室保存の *E. coli* 菌株を用いた。培養条件は3種，即ち普通寒天培養，細首フラスコの首まで満したブイヨンでの振盪培養（これは次に述べる好気培養に対して嫌気培養という意味で行なったものであるが，収量が少くて困るためにやむを得ず振盪培養を行なった），及び三角フラスコのブイヨンの通気培養である。いずれも 37°C で6時間又は24時間培養を行なった。培養菌はこれを集め，3回蒸溜水で洗い，同じく蒸溜水で 300 mg/ml くらいの菌液

* 北海道大学低温科学研究所業績　第815号

とした。

凍結融解法： 上記のようにして作った菌液 0.02 ml を 20×25 mm の大きさの銅板（厚さ 0.2 mm）又はアルミ箔（厚さ 20 μ）2 枚の間に挟み，更に外からなるべく均一に押さえて，薄層の試料を作った。凍結には次の 3 条件を用いた。

(1) −25°C のフリーザー中に静置して空気冷却を行なった。熱電対を試料中に挿入して測定した冷却速度は凡そ 50°C/min くらいであった。

(2) −25°C の iso-pentane 中に投入して比較的急速な凍結を行なった。その冷却速度は概ね 2,000°C/min であった。

(3) 液体窒素で−150°C まで冷却した iso-pentane 中に投入して急速凍結を行なった。冷却速度は 10,000°C/min 以上であった。

以上の各温度に 10 分間おいてから，生菌数の測定には室温の蒸溜水中に投入して比較的急速な融解を行ない，形態的観察の為には後述のような凍結乾燥法を行なった。

また別に，特に緩慢凍結を行なうのには，浮遊液 0.2 ml を試験管（内径 1 cm）にとり，アルコール槽に浸し，液体窒素を加えながら一定速度で所要の温度まで冷却した。

形態的観察： 凍結状態及び凍結融解後の細胞の形態をみるため，2 種の電子顕微鏡標本を作った。

(1) 噴霧凍結法　特別に製作した冷却装置を用いた。即ち特製の噴霧銃に試料を 1 滴とり予め液体窒素で希望温度まで冷却した試料筒の膜面（コロジウム膜にカーボンを蒸着して補強）に向けて，真空中で噴射する。噴射された小液滴は膜面に散らばって付着し，直ちに凍結する。これを予め −100°C 以下に冷却してある顕微鏡試料室中の冷却台に移す，このような操作の後始めて電子線を照射して観察を行なう。最初液滴の氷の層が厚い間は内部の細胞を判別することはできない。適当に温度を上げると（−80 ～ −90°C），真空中で氷の昇華が始まり細胞がみえてくる。以上は特に凍結状態での乾燥過程の観察に用いられる方法であるが，この外，試料室に移す前に噴霧凍結用冷却装置内で凍結乾燥を完了させてしまう場合もある。これは乾燥後の形態だけを目標にしたときである。

また一旦観察したものを付属装置に戻し，シャドウをかけた上で試料室に移して観察することもできるし，更に試料室内に備えつけられた冷却ステレオ装置を利用して，試料の立体像を撮影することも可能である。その詳細は別報[2] に譲る。

(2) 超薄切片法　前述のように 2 枚の金属板に挟んだ薄層試料を凍結させた後，それぞれの温度のところで 2 枚の金属板をはがして同じ温度に保った乾燥容器に移し，更に凍結乾燥機に接続して −25 又は −50°C 以下（−150°C 凍結のもの）に保ちながら乾燥を行なう。約 5 時間乾燥した後，いずれも 2% OsO_4 アルコールで固定し，Epon に移して包埋し Porter-Blum のミクロトームで超薄切片を作った。

(3) 凍結融解後標本　前記の条件で凍結した試料を室温に放置して融解させ，その 1 滴をコロジウム膜にとったもの，及び通常の切片作製法に従って，切片にしたものをそれぞれ観察した。

以上3種の標本についての使用電子顕微鏡はいずれも同一のもので，日本電子製の6ASであった。

生残菌検査法： 所定の温度に10分間おいた凍結試料を，室温の蒸溜水4 ml中に投入して急速に融解する。それを適宜の生菌数になるように稀釈して寒天平板に注入し，発育したコロニー数を数えて，対照の生菌数に対する比率として生残率を算出した。

細胞膜の透過性： 原形質分離の現象をめやすとして，*E. coli* における細胞膜の透過性についての吟味を行なった。即ち高張液として1M蔗糖液を用い，これにさらした菌をそのまま固定し，切片標本にして電子顕微鏡で観察した。また細胞の水に対する透過性を知るために同じく1M蔗糖液を用い，脱水復水による細胞活性の障害（死滅）をしらべた。そのための方法として次の4つの条件を組み合わせて処理をした。

(1) 急速脱水 細菌浮遊液 0.3 ml を 5.7 ml の蔗糖液（2M蔗糖液 3.0 ml＋蒸溜水 2.7 ml）に瞬間的に加える。

(2) 緩慢脱水 菌液 2.0 ml に5秒に1滴の割合で漸次2M蔗糖液 2.0 ml を加える。

(3) 急速復水 蔗糖加菌液 0.3 ml を 5.7 ml の蒸溜水に瞬間的に加える。

(4) 緩慢復水 蔗糖加菌液 0.5 ml に 9.5 ml の蒸溜水を滴加した。

III. 結　　果

各種凍結条件による *E. coli* 細胞の形態的機能的変化

寒天培養の *E. coli* について，−25°C 緩慢凍結，−25°C 急速凍結，及び −150°C 急速凍結の3種の凍結条件での形態的機能的変化をしらべた。

1. 凍結融解細胞の生残率

その成績は第1表に示す通りである。まず −25°C の緩慢凍結では培養時間に拘らず，ほぼ同じくらいの生残率，即ち87%前後の値を示した。これに反し，−150°C での急速凍結では，培養時間によってかなりの差があり，6時間で36%，24時間で53%で，いずれも −25°C の緩慢凍結に比較して，はるかに低い値であった。−25°C 急速凍結のものは，ほぼこの両者の中間の値を示した。

第1表 寒天培養菌の−25 又は−150C° 凍結処理後の生残率

培養時間 (時間)	凍結融解後の生残率		
	−25°C 緩慢凍結 (50°C/min) (%)	−25°C 急速凍結 (1,000°C/min) (%)	−150°C 急速凍結 (10,000°C 以上/min) (%)
6	86.5±8.1	—	36.4± 8.8
24	87.8±9.7	76.7±7.6	53.2±11.1

2. 凍結状態での細胞の形態

前項の実験結果で，凍結条件によって生残率の異ることがわかったので，その障害の機構を知るために，各条件での細胞の凍結状態を形態的にしらべた。それには電子顕微鏡による

2つの方法が用いられた。

(1) 噴霧凍結装置による直接観察法　この方法は，次の超薄切片法及び凍結融解後の生残菌測定の場合とは凍結の方法が異なるので，到達温度は等しくても試料自身の冷却速度は多少異るものと思われる。また凍結状態を観察するとはいっても，細胞周囲の氷が厚ければ電子線を通さず細胞自身をみることはできないので，凍結時の形態をそのまま保持するものと見做して凍結乾燥後の細胞を観察することにした。これら本法を用いての凍結細胞観察の詳細については別報[2]に譲る。

まず対照の正常状態（常温で乾燥）の細胞の形態は，既によく知られているように，円滑な辺縁と，ほぼ均一な内部構造をもった桿状のもので，屢々やや dense な(電子密度の高い）粒子や，或は逆に透明な部分を含むことが多い（図版 I-1)。−25°C で凍結したものでは，細胞は極端に収縮しており，凹凸が甚しく，時にはねじれたようにさえなっている。従って透明な部分もあれば，折れ重なって dense な部分もある（図版 I-2)。−150°C 急速凍結の試料では，その所見が全く異り，次の3種の形態の細胞が入りまじってみえる。(a) 一見正常と思われる形態，但し一般に density が高く，対照のような内部構造はわからない。(b) −25°C の場合と同じような収縮像。(c) 大きさや形は (a) のものと似ているが細胞内部が網状或は蜂窩状に見えるものなどである。この (c) のものは急速凍結の場合にのみみられ，それが細胞表面の変化ではなくて，内部の構造であることは，ステレオ装置によって確認された。このような構造は，急速凍結によって細胞内部にできた氷晶が真空中で昇華し，氷の抜け跡がそのまま残ったものであろうと推定された（図版 I-3～6)。

なおこれら3種の形態の細胞が，同一液滴内に同時にみられることは比較的少なく，一つの液滴内はどれか1種の形態のもので占められるということが多い。これは，液滴によって凍結の際の凍り方に差違があり，例えば過冷却度或は冷却速度などが異なるからであろうと想像される。

(2) 超薄切片による観察法　噴霧凍結法と同様，凍結乾燥によってその試料の凍結状態がほぼ保たれているという前提のもとに用いられたものである。−25°C 凍結のものはその温度に於て，−150°C 凍結のものは−50°C 以下の温度で，それぞれ凍結乾燥した後，型の如く切片としたものである。対照の正常菌は，凍結乾燥によらない常法で得られたもので，これは従来報告されている通りの構造を示した。即ち二重膜に包まれた内部構造は，ほぼ均一でやや透明であり，その中に多数の dense な小粒子や微細な filament を含んでいる（図版 II-7)。

−25°C 緩慢凍結の試料では，個々に遊離した細胞は殆どみられず，数個乃至数十個の細胞が凝集して一個の大きな集塊を作っている。この集塊をよく観察すると，細胞壁と思われるやや透明な網状構造のものでしきられた個々の細胞は，いずれも極端に収縮しており，density が非常に高くて対照にみられたような内部構造は全然みとめられない（図版 II-8)。

−150°C 急速凍結の試料では，2種の細胞，即ち (a) 極端に収縮して金平糖状を呈し，極めて dense で内部構造の全然みとめられないものと，(b) 周縁がやや凹凸しているが，内部に多数の孔のあいたものとがみられる。この空洞の数や大きさは細胞によつてさまざまで，大き

くて数の少ないもの，小さくて数の多いものなど，いろいろの段階がある。これらはやはり凍結の際にできた氷晶の昇華後の抜け跡と思われるもので，本来の細胞の内部構造は完全に乱されて原形を止めていない（図版 II-9，10）。

こうした空洞が氷晶形成によるものであることを裏付けるために，−150°C 凍結後，試料を−25°C のフリーザー中に長時間放置した。1日のものでは余りはっきりしなかったが，3日間おいたものでは，凍結直後のものに比較して，はるかに空洞の大きくなっていることをみとめた（図版 II-11）。これは，−150°C 凍結でできた細胞内氷晶が，−25°C という比較的高い温度におかれたために，融合或いは成長して大きくなったものと思われる。このことは，これらの空洞が，標本作製時の artefact ではなくて，明らかに細胞内にできた氷晶の跡を示すものであるといえよう。

3. 凍結融解後の細胞の形態

前項は，凍結状態の細胞がそれぞれの凍結条件によって全く異なる所見を呈することを示したものであるが，次に凍結融解後の試料についてしらべてみたのでは，いずれの細胞にも殆ど特別な変化はみとめられなかった。切片標本でも非切片標本でも，膜構造，内部構造を問わず欠損とか変形とか目につくほどの変化は見あたらなかった。特に −150°C 凍結で明らかに細胞内凍結がみとめられ，一方機能的にも死滅というはっきりした変化を示している細胞にさえ何等形態的な変化がみられないことは注目すべき点であろう。

4. 凍結融解後の細胞の膜機能

通常植物細胞などでは，細胞膜の semipermeability を示すものとして原形質分離（plasmolysis）という現象がみられ，光学顕微鏡でよく観察される。

しかし細菌のような微小細胞では観察が困難なためか，比較的大型の細菌を除いて原形質分離に関する報告は少ない[3]。一般にグラム陽性菌にくらべてグラム陰性菌は原形質分離を起こしやすいといわれている。われわれも電子顕微鏡によってこの現象を観察することとし，本実験では，特に凍結処理後の細胞膜機能をしらべる一手段として，1M 蔗糖液を用いた。即ち無処置或は凍結融解菌を 1M 蔗糖液に浸しそのまま固定し，型の如く超薄切片を作り電子顕微鏡で観察した。その結果は図版 III-14，15，16 に示す如く，無処置の正常菌では，すべて原形質分離を起こし，原形質が細胞の長軸にそう中心線に集まって，ほぼ一様な高い density を示していた。細胞壁は概ね原形を保っているがやや鮮明さを欠く。次に −25°C での緩慢凍結試料では，原形質分離を起こさずに蒸溜水中の正常菌体と同一の形態や内部構造を示すものがごく僅かに混っている外は，すべて対照正常菌と同じはっきりした原形質分離の像を示した。−150°C 凍結の試料では，原形質分離を起こしたものと起こさないものとがほぼ同数の割合で混在していた。この比率は，同じ条件で凍結融解した試料中の生残菌と死滅菌のそれにほぼ等しい。このように，凍結融解後の細胞では，形態的には無処置の対照と殆ど違わないのに，生残率はかなり減少し，またその生残率とほぼ平行して膜機能の障害即ち semipermeability の低下消失がみられたわけである。

好気培養菌と嫌気培養菌の比較

以上の実験の結果，凍結条件によって細胞障害の程度が異なり，しかも形態的所見と機能的所見のほぼ平行することから，凍結による細胞死滅の主因をなすものは，細胞内氷晶形成であろうと推定された。緩慢凍結では細胞の収縮，急速凍結では細胞内凍結と，いずれにしても細胞水分の移動が重要な役割を演ずるものと思われる。この点に目やすをおきながら，凍結障害の機構を一層検討するため，同一菌株から出発した好気培養菌と嫌気培養菌との比較を行なった。両者は凍結に対する抵抗性の異ることが知られているからである[4]。

1. 凍結融解後の菌の生残率

好気培養菌と嫌気培養菌の凍結融解後の生残率は第2表に示す通りである。

第2表 好気培養菌と嫌気培養菌の −25 又は −150°C 凍結後融解した場合の生残率

試料 培養条件	培養時間 (時間)	凍結融解後生残率 −25°C 緩慢凍結 (50°C/min) (%)	−25°C 急速凍結 (1,000°C/min) (%)	−150°C 急速凍結 (10,000°C 以上/min) (%)
好気	24	88.5 ± 3.5	—	50.4 ± 4.4
嫌気	6	83.4 ± 11.1	27.6 ± 3.4	13.6 ± 3.3
嫌気	24	85.5 ± 3.4	—	7.8 ± 3.1

液体培地での好気培養のものは，凍結条件の如何に拘わらず，寒天培養（好気培養，第1表参照）のものとほぼ等しい成績であった。ところが嫌気培養のものは，−25°C 緩慢凍結では同じ程度の85% 前後の生残率を示すのに，−150°C 急速凍結ではるかに低い13% 乃至7% を示した。このことは，嫌気培養菌は特に急速凍結によって障害をうけやすいことを示している。−25°C 急速凍結のものは，寒天の場合と同じ様な傾向で中間の値を示した。

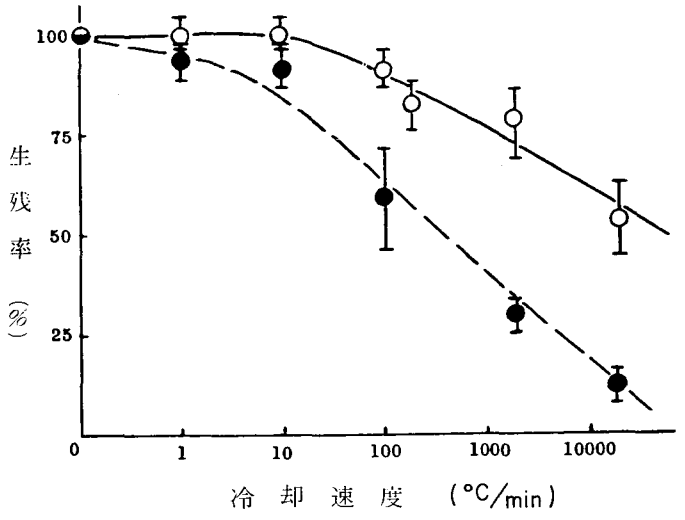
2. 凍結状態での細胞の形態

本実験では，噴霧凍結法は用いられず，切片による観察だけが行なわれた。まず無処置対照菌での比較では，両種菌の間に形態的に何らの差違もみとめられなかった。即ち好気，嫌気両種菌のいずれも，寒天培養菌の項で述べたと同様の微細構造を示した（図版 IV-17, 19）。−25°C 凍結のものでは，これもまた寒天培養のものと全く同様の収縮像を示し，同種菌の間に差がみとめられなかった。しかし −150°C 凍結のものでは，かなり顕著な差が現われた。個々の細胞の所見として，金平糖状に収縮した dense な細胞と，それよりはかなり大きくしかも内部に蜂窩状に孔のあいた細胞の2種があることは，これまた寒天培養のものと同様であったが，この2種の細胞の出現の比率が，好気培養菌と嫌気培養菌とでかなり異っていた。空洞をもった細胞が前者では少ないのに，後者では殆ど大部分を占めていたのである（図版 IV-18, 20）。従って嫌気培養菌は好気培養菌にくらべ，急速凍結に際して細胞内凍結を起こし易く，その結果として生残率の低下をきたしたものと考えられる。

3. 細胞に対する冷却速度の影響

凍結の際の細胞水分の脱水と細胞内氷晶生成，及びそれと細胞障害の関係を更に吟味する

目的で，凍結時の冷却速度の影響をもう少し詳しくしらべた（到達温度 −25°C)。その結果は第1図に示すように，10°C/min くらいまでの冷却速度では，好気培養，嫌気培養ともに，生残率は殆どおちないが，それを過ぎるあたりから，次第に低下してくる。殊に嫌気培養のものではそれが著しい。



第1図 冷却速度と凍結融解後の生残率との関係
○ 好気培養菌，● 嫌気培養菌

この場合の実験は，試験管内で行なわれたものであるが，一方，2枚の銅板に挟んだ少量の試料で−25°C 緩慢凍結の場合は，冷却速度が凡そ 50°C/min で，しかも殆どすべての細胞が収縮像を示していた。比較的遅い冷却速度では，まず細胞外凍結がおこるため，細胞水分が脱水され外部の氷による圧縮も加わって，収縮したものと思われる，この時の生残率が 85% 前後であるから，約 15% の細胞は，細胞外凍結だけで死滅したことになる。

また 10°C/min より小さな冷却速度では，殆ど生残率に影響はないので，同じように細胞外凍結といっても，細胞水分の脱水が早くなるほど細胞の障害をきたすのであろうと想像される。更に，ごく冷却速度の大きい場合は，恐らく細胞内凍結が主役をなすのであろうが，その外にも急速脱水による障害が加わっているものと考えられる。

いずれにせよ，急速凍結になるほど，嫌気培養菌は障害をうけ易いことが再確認された。

4. 細胞水分の移動と膜の透過性

以上のような結果から，細胞水分の移動が凍結による細胞障害に重要な関係をもつものと思われたので，更にこの点の追究を行なった。

先ず，凍結以外の方法で細胞水分の脱水復水を行ない，それが細胞活性に及ぼす影響を検討した。具体的には高張溶液にさらした後低張溶液に戻すのであるが，その間の脱水復水の速度をいろいろと変えるよう工夫した。その結果は第3表に示す通りである。

第3表 菌生残率に及ぼす脱水復水速度の影響*

脱水 (1M 蔗糖液)	復水 (蒸溜水)	処理後の生残率 好気培養菌 (%)	嫌気培養菌 (%)
緩慢	緩慢	93.7± 8.3	93.1± 4.2
	急速	89.7± 3.7	52.5±10.8
急速	緩慢	95.0±12.1	37.7±20.7
	急速	98.3± 8.3	34.9±18.0

* 脱水復水の条件については実験方法の項参照

好気培養菌では4条件とも活性に殆ど影響がないのに，嫌気培養菌では，脱水でも復水でも，それぞれ速度の大きい場合に著しい生残率の低下をみた。このように急な細胞水分の移動によって障害をうけやすいということは，嫌気培養細胞が水に対して透過性の低いことを示すものと考えられる。従って，このような透過性の低い細胞では，凍結の際にも，細胞水分の急速脱水（細胞周囲に先にできた氷のためにおきる細胞水分の脱水）によって障害をうけやすいであろうし，また透過性が低いために，細胞水分の脱水が冷却速度に追いつかず，かなりの水分が残っているうちに過冷却が破れて，細胞内氷晶形成を起すということも考えられるであろう。嫌気培養菌が急速凍結で障害の大きいことの理由の一つとして，このような水の移動の面からの説明がなされるであろう。

5. 脱水細胞に於ける凍結

予め脱水された細胞を同じような条件で凍結処理をした場合，どのような結果がみられるかを形態的機能的に検討した。それには，高張溶液であってもそれに遊浮しただけでは生菌に影響のないものでなければならない。本実験では0.25 M 食塩水が用いられた。

この0.25 M 食塩水浮遊液から超薄切片を作り，電子顕微鏡で観察すると，原形質分離が起こり明らかに脱水されていることがわかる。但しその程度は1M 蔗糖液の場合よりも弱く，原形質の収縮が僅かなので，顆粒や filament などの本来の細胞内部構造が判別できる（図版 IV-21）。このような細胞を −150°C で急速凍結した場合は，図版 IV-22 に示すように，かなり特異な像がみられる。即ち周縁が皺になった収縮像で，対照でみられた細胞壁と原形質との間のすきまはなくなり両者は密着している。原形質もやや density を増し，細胞全体として小さくなった感じである。しかも −150°C 凍結の場合にはどの培養条件の細胞でも必ずみられた細胞内空洞が，この場合にはみられない。このことは，予めある程度脱水された細胞では，かなり急速な凍結でも細胞内凍結がおきないこと，更に脱水が進むとともに周囲の氷による圧迫

第4表 予め脱水した細胞の −150°C 凍結融解後の生残率

	対照（蒸溜水浮遊液） (%)	0.25 M 食塩水浮遊液 (%)
好気培養菌	53.2±11.1	82.3± 5.1
嫌気培養菌	18.5± 5.0	45.7±10.6

のため細胞全体の収縮が起こることを示しているものと思われる。

次にこの条件で処理した細胞を培養して生残率をしらべると，第4表に示すように，予め脱水された細胞は，対照の脱水されていない蒸溜水浮遊液のものに比較して，はるかに生残率の高いこと，即ち凍結に対して抵抗の強いことがみとめられた。これは高張食塩水による細胞水分の脱水の結果，細胞内氷晶形成を抑制し，ひいては細胞障害の起るのを防いだものと考えられる。このように，高張浮遊液での脱水細胞の急速凍結後の生残率は，好気培養菌では緩慢凍結の場合の生残率 (85%) に近いところまで上ったが，嫌気培養菌では45% でまだかなり低かった。この点については，定型的な空洞を作らなくても多少細胞内凍結のものが混っていたためか，或は食塩溶液の濃縮による害などが考えられる。

IV. 考　　察

動物細胞や植物細胞が低温にさらされた時におきる変化については，これまでの多数の研究で，形態的機能的ないろいろの角度から詳しくしらべられている。凍結による細胞障害についても，その機序に関する多くの業績がある。しかし，その凍害の原因についての解釈は，まだ決定的な段階にまでは達しておらず，種々の異論がある。即ち，これまでに，氷晶による機械的障害を始めとして，細胞水分の脱水による害，濃縮塩溶液による塩害，及び細胞内凍結による障害，など幾つかの原因があげられている。

一方，細胞の種類により，また凍結時の条件により，実際に現われる細胞障害にはいろいろの差があるということから考えると，いずれか一つの理由ですべての場合の説明をするのは無理であり，恐らくこれら原因と考えられる諸要因が，単独或いは幾つかの組合せで，作用するのではなかろうかと，想像される。

微生物の凍結についても，既に多数の実験結果が報告されている。特に酵母などは，そのうちでも比較的形の大きいことから，形態機能両面からの追究が行なわれ，細胞障害の機序についてもかなり明らかにされた[5-7]。しかし同じ微生物でも，もつと形の小さな細菌などでは，形態的観察が困難だという理由もあって，他の大きな細胞ほど究明が進んでいなかった。例えば細菌のような微小な細胞の内部にも氷晶が形成されるものかどうかの実証すらなかったのである。幸い最近同じような線に沿った研究[1]が行なわれ，電子顕微鏡標本による観察の結果，細胞内凍結が確認されたようであるが機能的な障害との関係については，まだ検討されていない。

われわれもまた多年，微生物の凍結による細胞障害の機構を研究してきたが，今回はその一環として，大腸菌を用い，各種条件下での細胞の変化を追究し，細胞障害の原因になると思われる諸要因の分析を行なった。

それには，先ず形態的な立場から，凍結時及び凍結融解後の細胞の状態をしらべた。この目的には専ら電子顕微鏡が用いられ，特に試料作製法として二つの方法が採用された，一つは特別に製作された噴霧凍結装置による細胞そのままの乾燥過程及び乾燥後の形態観察であり，他は凍結乾燥法により調製した試料の超薄切片の観察である。凍結にもなるべく極端に異な

った条件をえらぶようにして吟味した結果，比較的高い温度でゆっくり凍結させた場合には，極度に収縮した像がみられるのに反し，低い温度で急速に凍結させた場合には，外観はほぼ原形を保っているが，細胞の内部に多数の空洞がみとめられた。このような所見は，酵母においてみとめられたそれにかなり似ている（厳密な意味では，凍結条件は一致しないが，傾向としてはほぼ同一）。

こうした変化についての説明としては，これまでにも種々の細胞について述べられたように，緩慢凍結では，まず細胞外凍結が起こるために細胞水分が脱水されて，細胞の収縮をきたすこと，急速凍結では，脱水する暇がないために，外部の凍結とほぼ同時に細胞内にも氷晶ができるものと解釈されている。

特に細胞内にみられる空洞は，凍結過程で細胞内部にできた氷晶が，真空中で昇華した後に残ったいわば氷の抜け殻であろうと想像されるが，これが真実氷であったかどうかの直接の証明はない。かつて述べた[8]ように，凍結状態のまま電子回折によって氷晶の回折像を求めることを企て，いろいろ実験を進めたことはあるが，細胞周囲の氷晶を全部昇華させた後で，しかも細胞内からの昇華の始まらぬ（或は細胞内氷晶のまだ残っている）時機をとらえて，高分解能の回折像をとることは至難の業であり，まだ成功していない。しかし，−150°C 凍結試料を −25°C に長時日放置すると，各細胞内の空洞がいずれも大きくなることをみとめたので，間接的ではあっても，これが氷晶であったことを示すものと考えられる。標本作製中の artefact でないことは，−150°C 凍結の場合にしかみられぬことからも明らかである。

次に，凍結処理後の細胞活性をしらべるために，融解後培養による生菌数の測定を行なった結果は，−25°C 凍結（冷却速度約 50°C/min）のものでは，培養条件の如何に拘らず，いずれも 85% 前後の生残率を示した。一方この条件での凍結の形態的所見では，細胞はすべて収縮しており，細胞内凍結のものは見当らなかった。従ってこの場合の 15% の死滅は，細胞内凍結以外の原因，即ち凍結の過程で起こる脱水による害，脱水の結果細胞内の塩類が濃縮されるために起こる塩害，或は周囲の氷晶による機械的障害（蒸溜水浮遊液を用いているから，外部の氷晶が直接細胞の表面に接することが考えられる）などのいずれかに起因するものと思われる。また冷却速度の吟味で，50°C/min のものは，すべて収縮像で 85% の生残率を示し，1°C/min のものは，これも当然すべて収縮像を示し且つ生残率は 100% であった。冷却速度が異っても，等しく細胞外凍結で到達温度が同じならば，脱水の程度も，それによる塩害も，また氷による機械的障害も（冷却速度によって氷のパターンは多少違うが），殆ど同じ筈であるのに，冷却速度によって生残率に差があることは，脱水の際の速度によるものではないかと思われる。このことは，特に抵抗の弱い嫌気培養菌が高張糖溶液による急速脱水で容易に死滅することからも想像される（この場合には，塩害や氷晶による害は考える必要がない）。

次に −150°C での急速凍結について考えてみる。この場合には，生残率はかなり低く，ほぼそれに比例する数の細胞が細胞内凍結をおこしていることをみとめた。ただ定量的にそれほど厳密な比較のできないことは，このような実験方法をとる限り，形態的観察の場合の定量性がやゝ低いということによる。例えば，2 枚の金属の間に挟んだ試料では，部位によって厚み

に多少の差があり，それが凍結速度の差となり，ひいては部位による形態的所見の多少の違いになるからである。実際に標本をみていると，場所によって細胞内凍結の細胞の非常に多いところと，比較的少ないところと，いろいろ混っているのがわかる。しかし，それにしても，試料全体としてのかなりはっきりした傾向をつかむことはできる。とりわけ好気培養菌と嫌気培養菌との比較の場合にはその差が明瞭であり，生残率が低下しただけ細胞内凍結の細胞の数が多くなっていた。

こうした関係からだけでも，細胞内凍結が急速凍結の場合の細胞障害の主因となることが知られたが，その細胞内凍結に細胞水分が重要な役割を演ずることについて，更にいろいろの検討が行なわれた。例えば高張溶液による脱水と低張溶液中での復水で，嫌気培養菌は障害をうけやすいことがわかり，このことから，この菌の水に対する透過性の低いことがみとめられた。従って実際の凍結過程では，ある程度以上冷却速度が大きくなると，好気培養菌では速かに細胞水分が脱水されるため細胞内に氷晶はできないが，嫌気培養菌ではその脱水がおくれかなり低い温度になっても，凍結するに充分なだけの水分が残っているために，その結果として細胞内に氷晶ができるようになるものと思われる。そしてこの細胞内凍結が結局は生残率の低下をきたすことになる。好気培養菌と嫌気培養菌とでは，細胞としての諸性状にどんな差があるかは知らないが，以上のように水に対する透過性の違いからだけでも，凍結障害の差が説明できるように思う。細胞水分の脱水速度が細胞内氷晶形成の可能性と深い関係をもつことについては，既に Mazur[9] も指摘した通りである。

更にこの点の検討を進めるため，好気嫌気両種培養菌を高張塩溶液に浮遊し，予め細胞水分をある程度脱水して凍結実験を行なった。その結果は，急速凍結でも細胞内凍結がみられず従って生残率も蒸溜水浮遊液（予備脱水しないもの）に比較してはるかに高かった。即ち細胞水分の脱水は，細胞内凍結を防ぎ生残率の低下を抑制したわけで，凍結に於ける細胞水分の意義をよく示したものと思われる。

さてこのように，凍結過程ではっきりした形態的変化をおこし，融解後に著しい生残率の低下を示すような凍結処理細胞でも，融解後の形態的所見では，無処置の正常細胞と殆ど差違がみとめられなかった。−25°C の緩慢凍結で極端に収縮した細胞でも，一旦細胞の外に出た水分が融解過程で再び細胞の中に戻り，細胞の形態も旧に復するということは肯ける。しかもこのような場合，それが極端に速い脱水復水でない限りは，細胞としての活性を保持していてもいい筈である。ところが −150°C の急速凍結で，細胞内部が殆ど大小無数の氷晶で占められ細胞構築成分が分断され押しつぶされた形で，細胞構造が完全に乱されたと思われるようになったものでも，これを融解した後，切片或は非切片標本でみると，殆ど正常細胞と異ならず，細胞膜の欠損とか細胞内構造の破壊などはみとめられなかった。これらの細胞は semipermeability を失い，且つ増殖機能まで失っているにも拘らず，形態的変化がみとめられないということは，これらの機能障害が，電子顕微鏡のレベル以下の微細な形態変化によることを示すものであろうか，この点については更に今後の仔細な検討に俟たねばならない。

摘 要

凍結による微生物細胞の障害の機序を知るために，大腸菌の浮遊液を用いて，種々の条件で凍結させ，凍結のまま或は凍結融解後の細胞の状態を形態的機能的にしらべた。

その結果は，大腸菌は，−25°C 緩慢凍結で細胞は収縮するが，融解後の生残率の低下は極めて少ない。−150°C の急速凍結では細胞内氷晶形成がみられ，融解後の生残率の低下も著しい。このことから，大腸菌細胞の凍結障害の主因をなすものは，細胞内氷晶形成であろうと考えられた。

凍結に於ける細胞水分の意義を明らかにするために，特に大腸菌の好気培養菌と嫌気培養菌の比較を行なった。急速な細胞水分の移動によって死滅しやすいことから，嫌気培養菌の水に対する透過性の低いことがみとめられ，嫌気培養菌が急速凍結で容易に細胞内凍結をおこし生残率の低下をきたすことも，この点から説明された。また予め脱水しておけば，細胞内凍結を防ぎ生残率の低下を抑制することも実証され，細胞水分が凍結障害に重要な役割を演ずるものであることが確認された。

文 献

1) Rapatz, G. and Luyet, B. 1963 Electron microscope study of the formation of ice in bacteria upon freezing of their suspensions. Paper presented at the Biophysical Society Meeting. (Rapatz からの私信による).
2) Nei, T. 1966 電子顕微鏡用特殊冷却装置とその応用. 低温科学, 生物篇, ***24***, 67–73.
3) Cota-Robles, E. H. 1963 Electron microscopy of plasmolysis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, ***85***, 499–503.
4) Harrison, A. P. and Cerroni, R. E. 1956 Fallacy of "crushing death" in frozen bacterial suspension. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, ***91***, 577–579.
5) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程. 農化, ***28***, 91–94.
6) Nei, T. 1959 Effects of freezing and freeze-drying on microorganisms. *In* Recent Research in Freezing and Drying (A. S. Parkes and A. U. Smith, *eds.*). Blackwell Sci. Publ., Oxford, 78–86.
7) Mazur, P. 1961 Manifestation of injury in yeast cells exposed to sub-zero temperatures. *J. Bacteriol.*, ***82***, 662–672.
8) Nei, T. 1962 Electron microscopic study of microorganisms subjected to freezing and drying: Cinematographic observations of yeast and coli cells. *Exptl. Cell Res.*, ***28***, 560–575.
9) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, ***47***, 347–369.

Summary

The mechanism of cell injury by freezing in microorganisms was investigated from a morphological and physiological point of view.

A water suspension of *E. coli* cells was frozen slowly at −25°C and rapidly at −150°C. Thin-sectioned and non-sectioned specimens prepared by freeze-drying were observed with the electron microscope.

The cells became extremely shrunken and showed a high survival rate in freezing

at −25°C, while the other cells retained their original size and shape but contained many small cavities which have a high possibility of being previously occupied by ice in freezing at −150°C and they also showed a lower survival rate. From these results, it was assumed that the main cause of cell injury in rapid freezing might be the intracellular ice formation.

A comparison of aerobic and anaerobic cells, which are quite different in resistivity against rapid freezing, was made to account for the relationship between cell water and intracellular freezing. It was confirmed from the data which showed a high susceptibility to rapid removal of cell water that the anaerobic cells have a low permeability to water. The high possibility of intracellular ice formation and death of the anaerobic cells in freezing at −150°C can thus be explained by such a low permeability of these cells.

In the cells, previously dehydrated by exposure to hypertonic solution, intracellular freezing was hardly seen resulting in a decrease in the survival rate.

These results show that the removal of cellular water plays an important role in freezing injury in microorganisms.

図 版 説 明

図版 I 噴霧凍結乾燥菌

1. 無処置対照 (空気乾燥)
2. −25°C 凍結，収縮像
3. −150°C 急速凍結，正常像と細胞内凍結像が混在
4. −150°C 急速凍結，収縮像と細胞内凍結像が混在
5. と 6. −150°C 急速凍結，細胞内凍結と思われる網状或は蜂窩状構造

図版 II 凍結乾燥切片

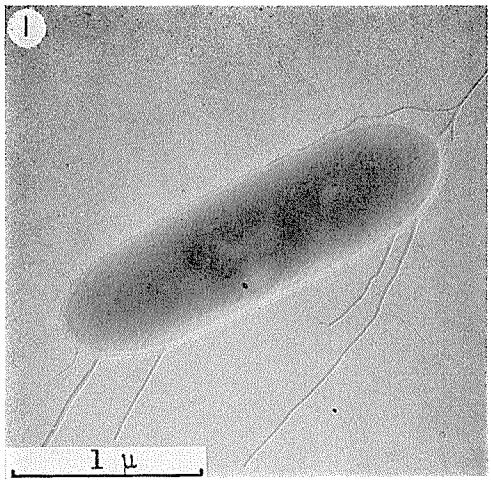
7. 無処置対照 (非凍結乾燥)
8. −25°C 凍結，多数の細胞が凝集して一集塊を作ったもの。個々の細胞は透明な隔壁で区別される。いずれも極端に収縮
9. と 10. −150°C 急速凍結，細胞内氷晶の昇華した跡と思われる多数の空洞がみられる。空洞の数や大きさは細胞によってまちまち。金平糖状に収縮し内部の dense な細胞も混在する
11. −150°C 凍結後 −25°C に 3 日間置いたもの。9 や 10 の写真に比較して空洞がはるかに大きくなっている

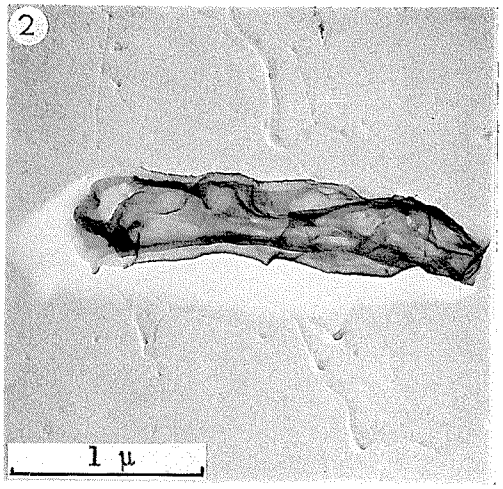
図版 III

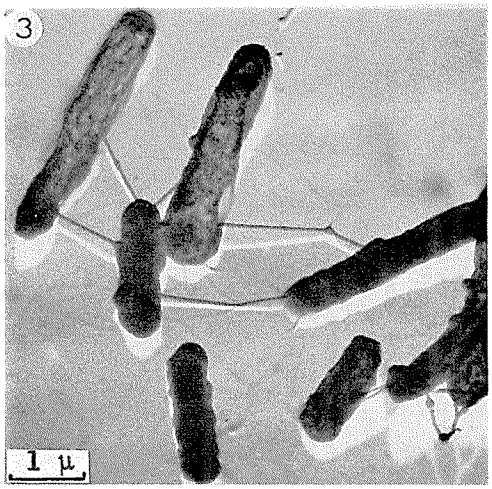
12 と 13. −150°C 凍結後融解。そのまま空気乾燥したものと切片にしたもの。対照 (無処置) の 1 と 7 に比較して大差ない
14. 無処置対照菌を 1 M 蔗糖液で原形質分離させたもの
15. −25°C 凍結融解，ほぼ対照に近いくらい原形質分離をおこしている
16. −150°C 凍結融解，原形質分離をおこさないものが半数くらいある

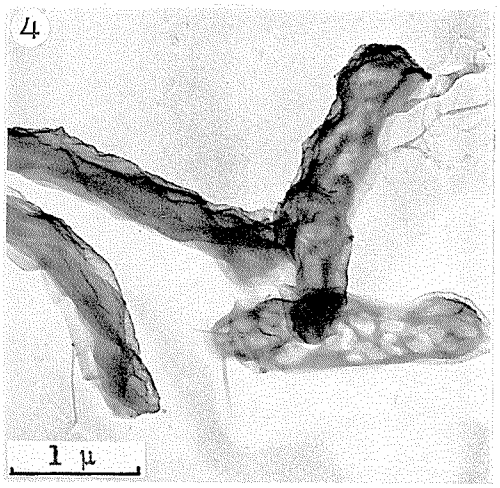
図版 IV

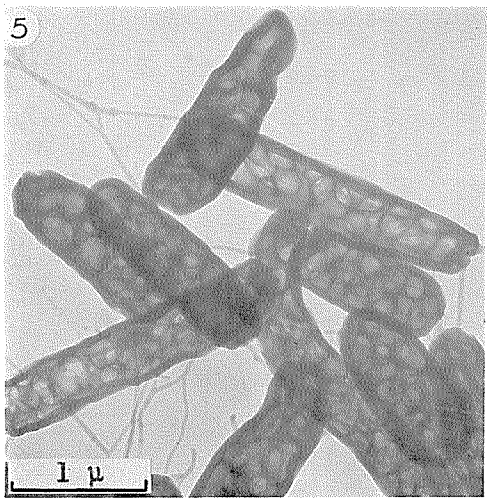
17. 好気培養菌，無処置対照
18. 好気培養菌，−150°C 凍結乾燥，収縮像が半数くらい混在
19. 嫌気培養菌，無処置対照
20. 嫌気培養菌，−150°C 凍結乾燥，18 に比較して細胞内凍結をおこした細胞の数は，はるかに多い
21. 0.5 M 食塩水浮遊菌 (非凍結)，原形質分離がみられる
22. 0.25 M 食塩水浮遊菌を −150°C 凍結乾燥したもの，収縮像で dense

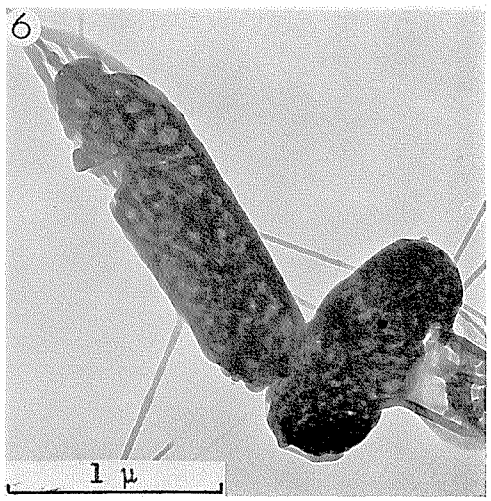

1
1 μ

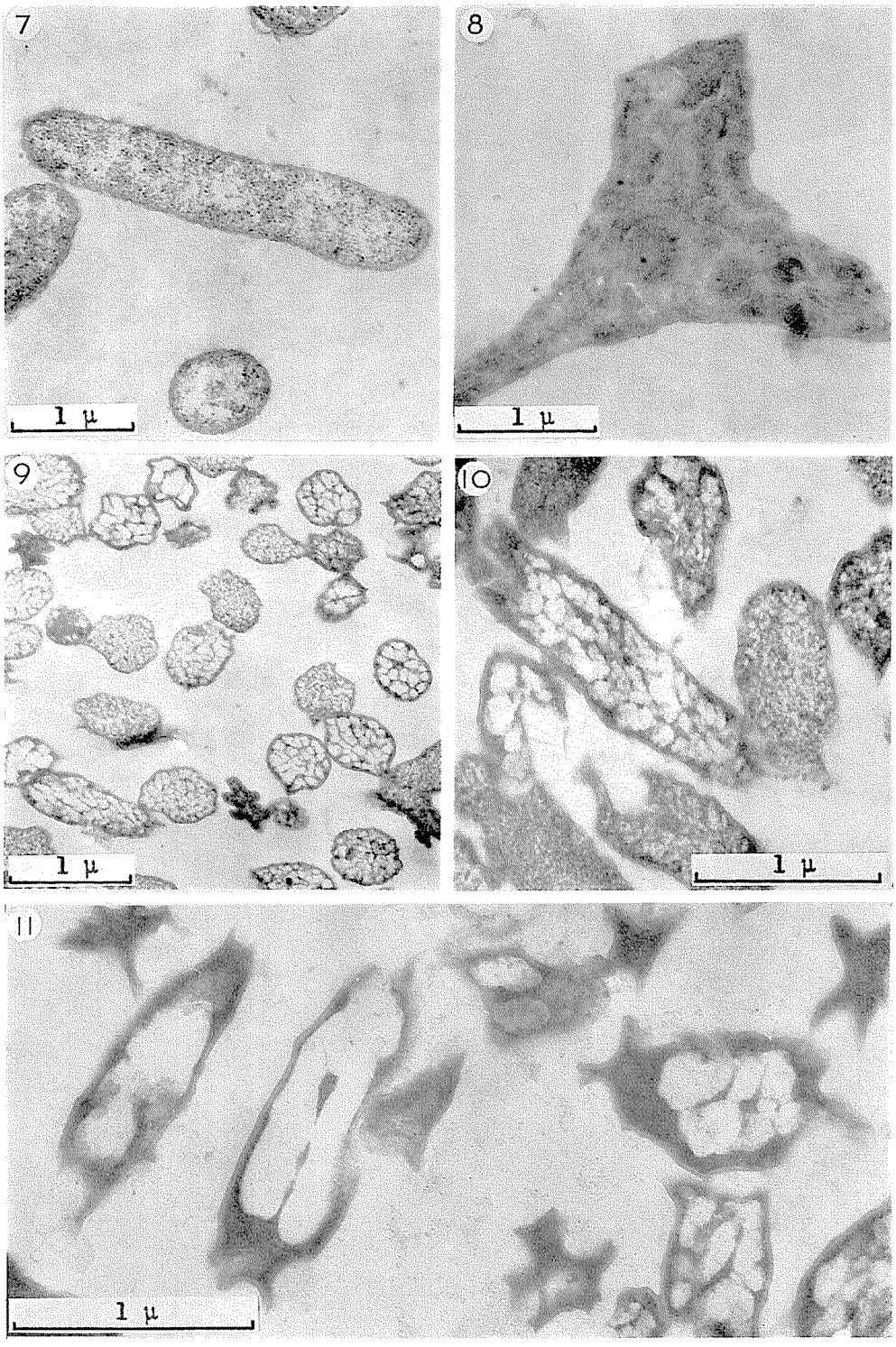

2
1 μ

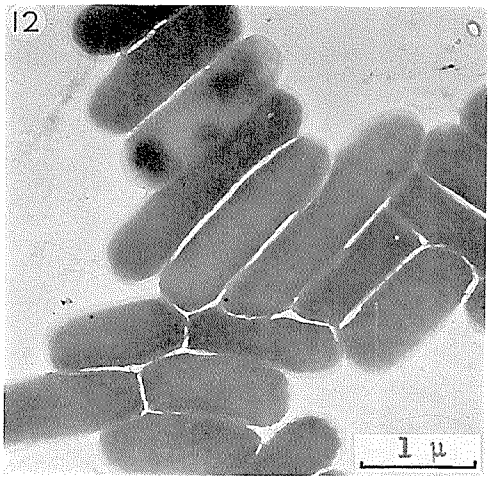

3
1 μ

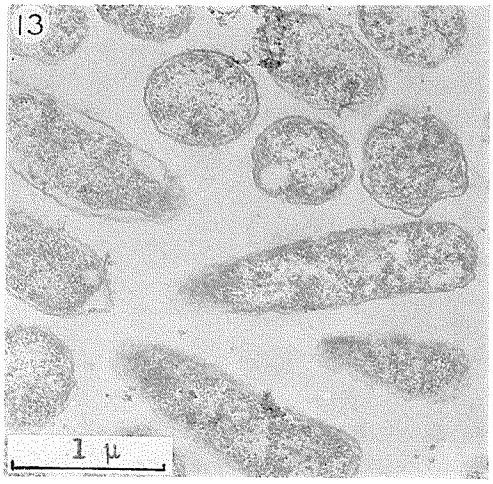

4
1 μ

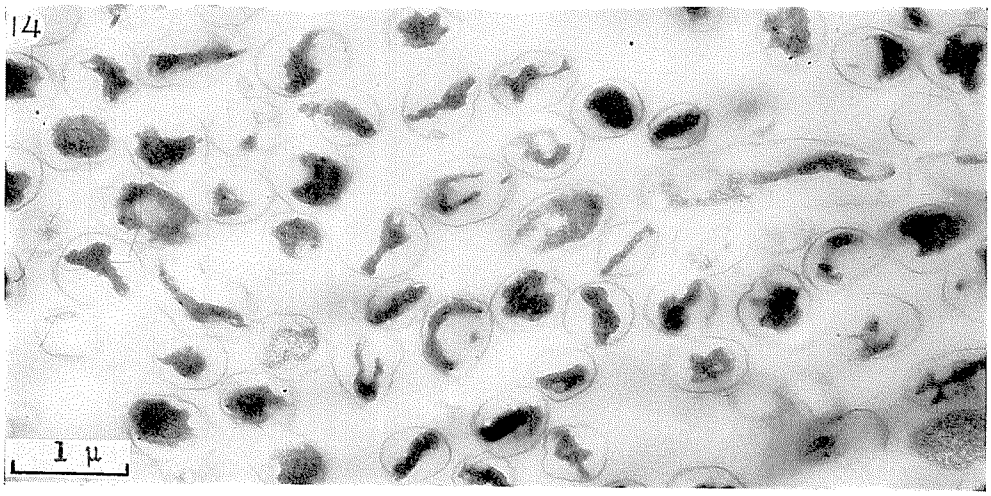

5
1 μ

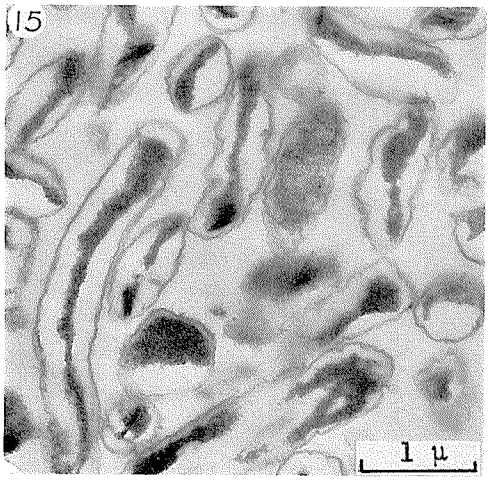

6
1 μ

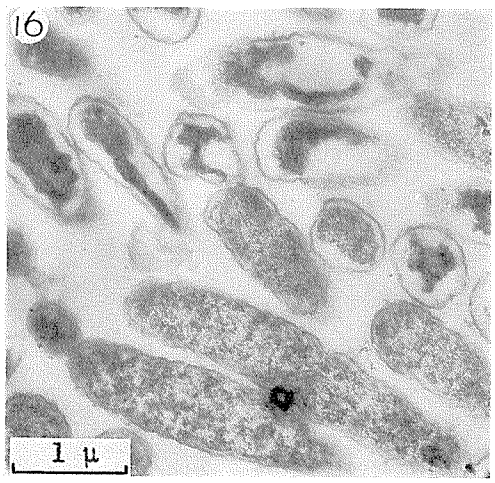

7
1 μ
8
1 μ
9
1 μ
10
1 μ
11
1 μ

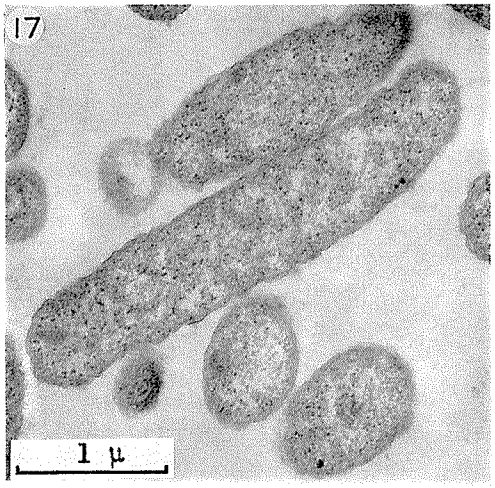

12
1 μ

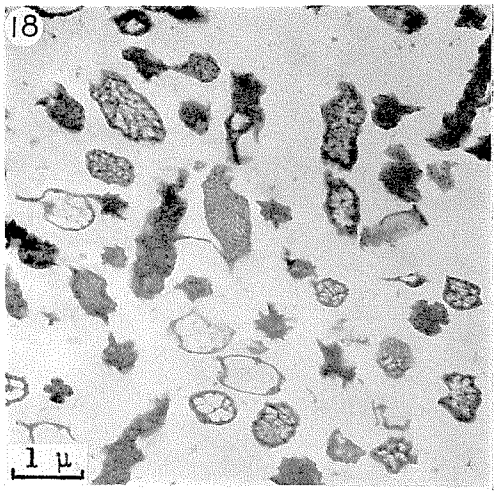

13
1 μ

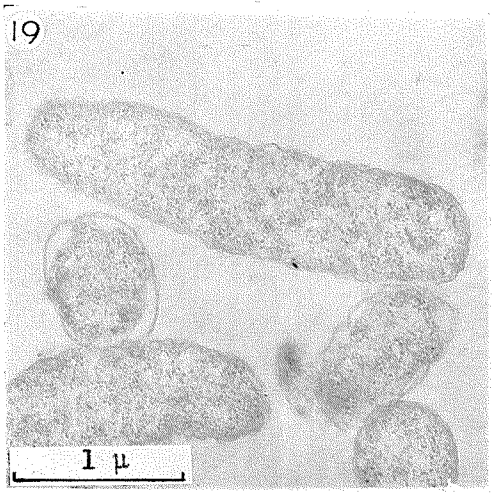

14
1 μ

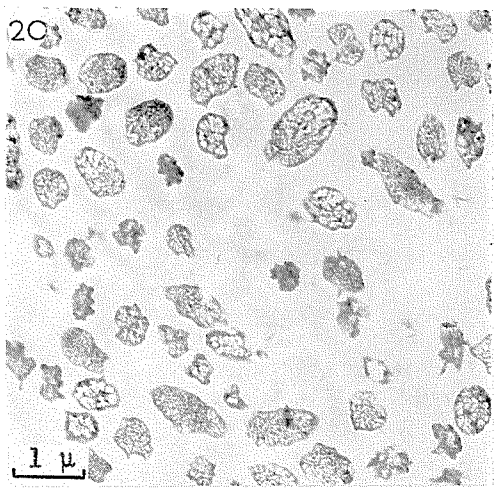

15
1 μ

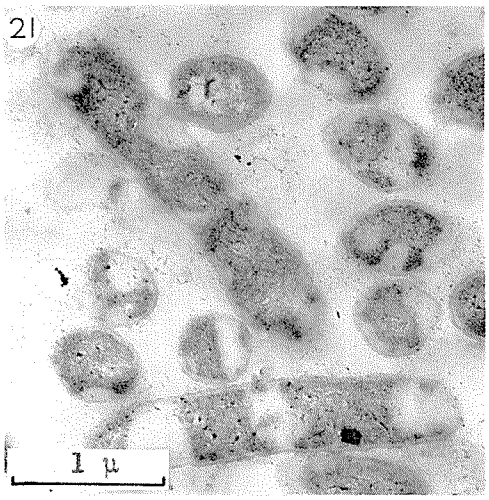

16
1 μ

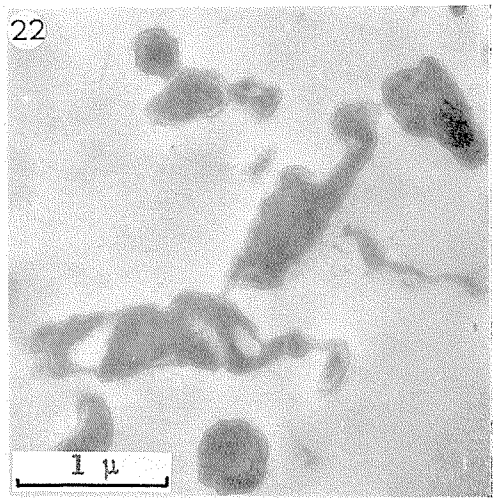

17
1 μ


18
1 μ


19
1 μ


20
1 μ


21
1 μ


22
1 μ