



Title	超低温における植物組織の生存 : 生存率におよぼす冷却および加温速度の影響
Author(s)	酒井, 昭; 吉田, 静夫
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 9-19
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/17716">http://hdl.handle.net/2115/17716</a>
Type	bulletin (article)
File Information	25_p9-19.pdf



[Instructions for use](#)

## 超低温における植物組織の生存 VI\*

生存率におよぼす冷却および加温速度の影響

酒井 昭・吉田 静夫

(低温科学研究所 植物凍害科学部門)

(昭和42年9月受理)

### I. 緒 言

前報<sup>1-3)</sup>で述べたように、耐凍性のたかい木の枝の皮層細胞では、急速に冷却し、急速に加温することによって皮層細胞を超低温で生存させることは比較的容易である。

超低温における生物の生存の機構を明らかにするために、前報<sup>1-3)</sup>につづいて予備凍結法と急速冷却、急速加温法を併用して一連の実験を行なった。本論文では、とくに生存率におよぼす冷却および加温速度の影響、細胞内にできた氷晶核の生長速度がもっとも大きい温度範囲の決定および細胞外凍結によって細胞内の凍りうる水がほとんど脱水される温度等について調べた。

### II. 材料と方法

実験材料としてクワ (*Morus bombycis* Koidz.) の皮層柔細胞を用いた。同一系列の実験には、同一の枝の同一部分の皮層柔細胞のみを用いた。各実験には10個の縦断組織切片を使用した。組織切片は厚さ1細胞層(20~30 $\mu$ )、幅1~2 mm、長さ1~3 mmのものを使用した。

組織切片は0.05 mlの水でカバーガラス(18×18 mm)の間にマウントしていろいろの方法で冷却した。加温は30°Cの温水中(急速加温: 24,000°C/分)か、0°Cの空中(緩慢加温: 120°C/分)で行なった。最大の冷却速度と加温速度をうるためには、組織切片を細いピンセットでつまみ、室温から急速に液体窒素中に入れ、のち急速に30°Cの温水中で加温した。組織切片の温度は0.1 mm銅-コンスタンタン熱電対を用い電磁オシログラフで自記させた。なお、冷却速度は特別にことわらないばあいには、-5°Cから、最低温度より5°Cだけ高い温度までの平均速度で表わした。

細胞をいろいろな程度に脱水する時は、組織切片は-5°Cで凍結後、徐々に温度をさげ、各温度で20分間予備凍結した。これらの予備凍結された組織切片はいろいろな温度に冷やされたイソペンタンの槽中、または液体窒素中に入れられた。このばあいの冷却速度は6000°C/分をこえるので、最近Mazur<sup>4,5)</sup>によって指摘されたように、冷却中に脱水がすすむことはほ

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第845号

とんどないものと思われる。

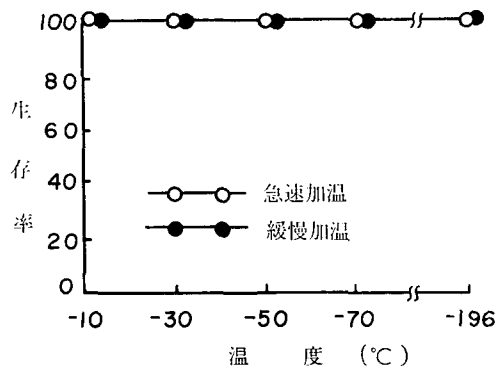
細胞の生死の判定は生体染色と原形質分離の方法でおこなった。すなわち、あらかじめ中性赤で染色後、2倍の高調平衡塩溶液と水とで原形質分離と復帰とを2回繰返したのち、なお中性赤でそまっており、しかも正常に原形質分離しているものを生存しているものとみなした。

### III. 結 果

#### 1. 生存率におよぼす冷却および加温速度の影響

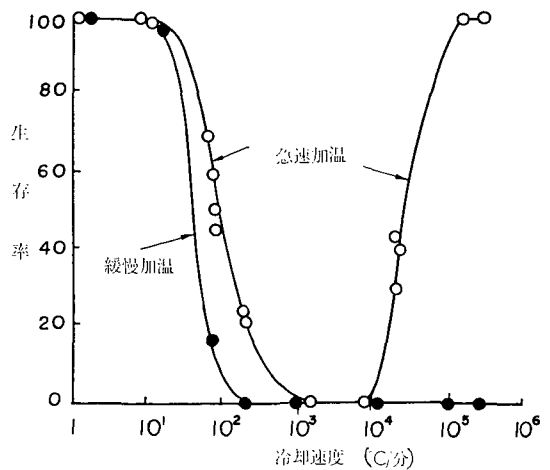
ゆっくり冷却した細胞の生存率におよぼす加温速度の影響を調べるために、カバーガラスの間に水でマウントされた組織切片が $-5^{\circ}\text{C}$ で凍結後、 $14^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度で $-10$ 、 $-30$ 、 $-50$ および $-70^{\circ}\text{C}$ まで冷却された。また $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷却された組織切片は液体窒素素中に入れられた。いろいろの温度で凍結された組織切片が $30^{\circ}\text{C}$ の水中と $0^{\circ}\text{C}$ の空中で急速および緩慢にとかさされた。第1図に示すようにどの凍結温度から急速にとかした細胞もまったく害を受けなかった。

ことなつた速度で冷却された細胞の生存率におよぼす冷却および加温の影響をさらに詳細に調べるために、水でマウントしたり、マウントしない組織切片を異なった冷却速度で $-75^{\circ}\text{C}$ まで冷やし、その後、 $0^{\circ}\text{C}$ の空中か、 $30^{\circ}\text{C}$ の水中であたためた。えられた結果を第2図に総括して示す。1~ $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のおそい冷却速度のときには、はやくあたためても、ゆっくりあたためても、すべての細胞が生存していた。冷却速度が $50^{\circ}\text{C}/\text{分}$ から $2,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ にますにつれて、生存率は徐々に低下し、ついに0になった。しかし、冷却速度が $10,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ をこえ、しかも急速に加温されたばあいには、生存率は冷却速度の増加するにつれてまし、 $200,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度では全細胞が生存していた。なお、このばあい、組



第1図 細胞の生存率におよぼす融解速度の影響

組織切片はカバーガラスの間に水でマウントして $-5^{\circ}\text{C}$ で凍結後、 $14^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度で各温度まで冷却後、 $30^{\circ}\text{C}$ の水中に入れて急速に、または $0^{\circ}\text{C}$ の空中で緩慢に融解された



第2図 冷却速度と生存率との関係

横軸上に示された冷却速度で $-75^{\circ}\text{C}$ まで冷却された。その後、 $0^{\circ}\text{C}$ の空中か、 $30^{\circ}\text{C}$ の水中で加温された

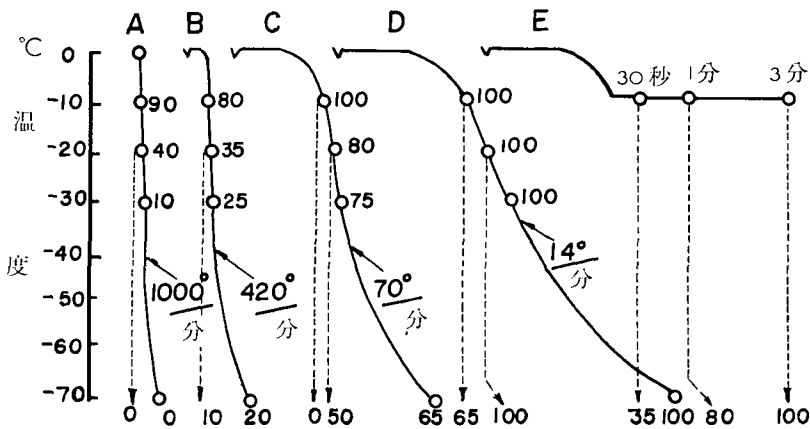
織切片は組織氷点(約 $-2.5^{\circ}\text{C}$ )から $-55^{\circ}\text{C}$ までの温度範囲を0.003秒以内に通過している。

$15^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度のばあいには、生存率は加温速度によってかなり異なり、ゆっくり加温したばあいには、はやく加温したばあいよりも常に生存率が低かった。急速加温のばあいとちがって、ゆっくり加温するばあいには、冷却速度がましても生存率はたかまらなかった。

$14\sim 1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の中間的冷却速度においては、冷却速度がまずにつれて生存率は漸次低下する。こうした冷却速度で $-70^{\circ}\text{C}$ まで冷却するとき、どの温度範囲で細胞が殺されるかを明らかにするために、カバーガラスの間に水でマウントした組織切片が $14^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $70^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $420^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の各冷却速度で冷却中、 $-10$ 、 $-20$ および $-30^{\circ}\text{C}$ の各温度に達したとき、組織切片を $30^{\circ}\text{C}$ の水中に急速に入れて冷却を中断した。このばあい、温度はオッシュログラフで測定した。なお、この実験では、組織切片はわずかの過冷却後凍結していた。したがって、各冷却曲線は凍結後の冷却曲線とみなされる。また、上に述べた冷却速度で $-20^{\circ}\text{C}$ および $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷却後、ただちに組織切片を液体窒素中に入れ、ついで $30^{\circ}\text{C}$ の水中で急速加温した。第3図に結果を総括して示す。

第3図の冷却曲線にそってその右側に記された数字は、各冷却速度で冷やされた組織切片の各温度における生存率を示す。また矢印をもった破線は各温度から液体窒素中に入れたことを示し、矢印の下の数字はその生存率を示す。

第3図の冷却曲線A, B, CおよびDにおいて、組織氷点から $-20^{\circ}\text{C}$ まで冷却するに要する時間はそれぞれ1, 2, 7および57秒である。冷却曲線A ( $1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )とB ( $420^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )においては、生存率は $-10^{\circ}\text{C}$ から $-20^{\circ}\text{C}$ までの温度範囲において急速に低下する。また、 $420^{\circ}\text{C}/\text{分}$ と $1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度で $-20^{\circ}\text{C}$ までに冷却後、液体窒素中に入れたとき殆んど細胞が死



第3図 冷却速度と生存率減少過程との関係

組織切片はカバーガラスの間で水でマウントして冷却した。組織切片をしたしている水は冷却直後に凍結した

曲線にそって右側に記されている数字は各温度における生存率で、各温度に達したとき、 $30^{\circ}\text{C}$ の水中に入れて冷却を中断して生存率を調べた。矢印をもった破線は各温度から液体窒素中に入れたことを示し、矢印の下の数字はそのばあいの生存を示す

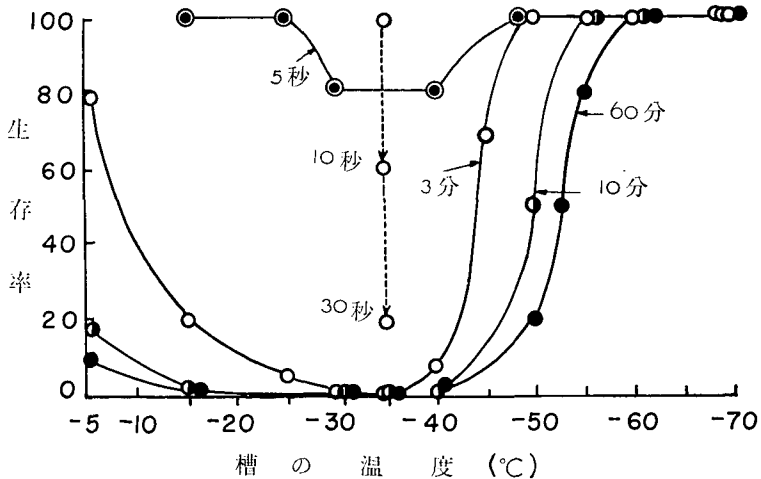
んだ。しかし、70°C/分の冷却速度のばあいには、-20°Cから液体窒素中に入れたとき、50%の生存率を示したし、-70°Cまで冷却したときの生存率は65%であった。14°C/分の冷却速度のばあいには、-20°Cから液体窒素中に入れても、-70°Cまで冷却しても全細胞が生存していた。しかし、-10°Cまで冷却後、液体窒素中に入れたものは65%の生存率しか示さなかった。曲線Eに示すように、凍結後、14°C/分の冷却速度で-10°Cまで冷却後、-10°Cの温度に30秒、1分および3分間おいてから液体窒素中に入れたところ、3分間以上-10°Cにおいたものでは、液体窒素処理後全細胞が生存していた。同様な実験を-5°Cで行なったところ、-5°Cで5分間以上おいたばあいにも液体窒素処理後全細胞が生存していた。

以上の実験結果から、14~1,000°C/分の冷却速度で-70°Cまたはそれ以下まで冷却後、細胞を生存させるためには、組織氷点と-10°Cの温度範囲を凍結状態でゆっくり冷すことが必要であることがわかった。

## 2. 液体窒素中に急速冷却した細胞の生存率におよぼす加温速度の影響

液体窒素処理後の加温の過程で、どの温度範囲で細胞が害されるかをしるために、-10°Cで5分間予備凍結後、液体窒素中に入れられた組織切片が、-5°Cから-70°Cまでの各温度にたもたれたイソペンタン槽中に3秒、3、10および60分間入れておかれたのち、30°Cの水中で急速に加温された。第4図に結果を総括して示す。

第4図からあきらかなように、生存率はある温度範囲において急速に低下していることがわかる。生存率が低下する温度範囲はイソペンタン槽中に入れておく時間の長さによってことなる。イソペンタン槽中に60分、10分および3分間入れておいた細胞のばあいには、生存率



第4図 液体窒素中に急速冷却された細胞の生存率におよぼす加温条件の影響

-10°Cで5分間予備凍結された組織切片が急速に液体窒素中に入れられた。液体窒素処理後、各温度に冷やされたイソペンタン中に3秒、3、10および10分間入れておかれた。その後、いずれも30°Cの水中で急速に加温された。図中の矢印をもった破線は液体窒素から-35°Cのイソペンタン中に急速に移してから10および30秒間その温度においたことを示す

はそれぞれ  $-60 \sim -50^{\circ}\text{C}$ 、 $-55 \sim -45^{\circ}\text{C}$  および  $-45 \sim -40^{\circ}\text{C}$  の温度範囲で急速に低下している。なお、5秒間各温度に冷やされたイソペンタン中に入れておかれた細胞では  $-40 \sim -30^{\circ}\text{C}$  の温度範囲で生存率がわずかに減少したにすぎない。また、 $-60^{\circ}\text{C}$  以下の温度では、60分間イソペンタン槽中においても生存率はまったく低下しなかった。オッシログラフで調べたところ、 $-60^{\circ}\text{C}$  のイソペンタン中から  $-30^{\circ}\text{C}$  のイソペンタンに移し、その温度に達するまでに要する時間は約3秒であった。組織切片を液体窒素から  $-30^{\circ}\text{C}$  のイソペンタン中に移し、その温度に達した時、ただちに  $30^{\circ}\text{C}$  の水中で加温したときは、全細胞が生存していた。しかし組織切片を液体窒素から  $-35^{\circ}\text{C}$  のイソペンタン槽中に移して、30秒経過すると組織切片中の大部分の細胞はそのあいに殺された。

急速冷却された細胞の生存率におよぼす加温速度の影響を調べるために、水でマウントされた組織切片が  $-10^{\circ}\text{C}$  で5分間予備凍結された。急速に液体窒素中に入れたのち、 $-60^{\circ}\text{C}$  のイソペンタン中に移された。その後、組織切片は  $-60^{\circ}\text{C}$  からいろいろな加温速度であたためられた。その結果を第5図に示す。 $-55^{\circ}\text{C}$  から  $-2.5^{\circ}\text{C}$  までの温度範囲を約2.2秒以内で、すなわち  $1,200^{\circ}\text{C}/\text{分}$  以上の速さであたためられた時には全細胞が生存していることがあきらかになった。

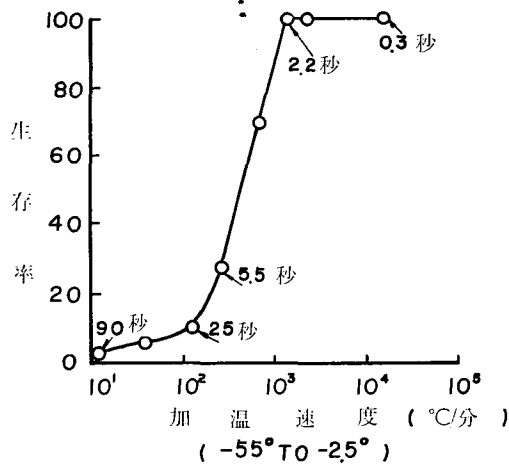
液体窒素から除去後の加温の過程

で、細胞が害される温度をしるために、水でカバーグラスの間にマウントされた組織切片が  $-10^{\circ}\text{C}$  で5分間予備凍結後、液体窒素中に入れられた。液体窒素から除去後、組織切片は  $0^{\circ}\text{C}$  の空中で加温された。そのばあいの冷却速度は  $160^{\circ}\text{C}/\text{分}$  であった。各温度に到達後、組織切片はただちに  $30^{\circ}\text{C}$  の水中に入れて急速加温された。なお、組織切片の温度は  $0.1\text{ mm}$  銅-コンスタンタン熱電対を用いオッシログラフで追跡された。

第6図に示すように、細胞の生存率は  $-40^{\circ}\text{C}$  から  $-30^{\circ}\text{C}$  まで温度が上昇する6秒以内に、90%から20%まで急速に低下した。

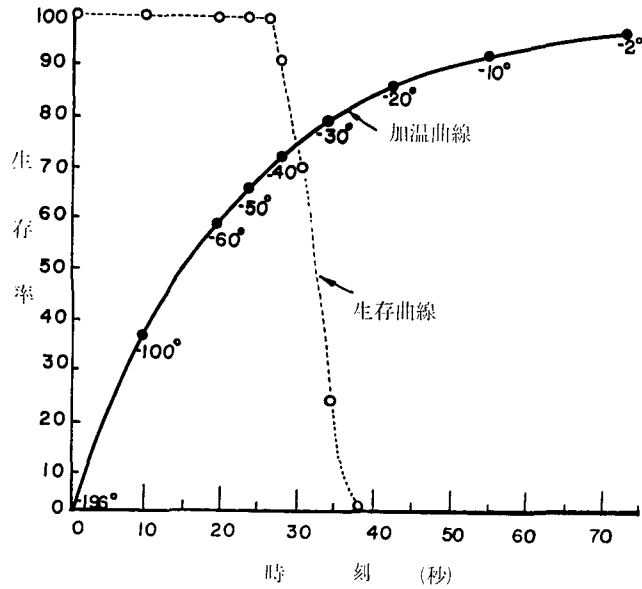
### 3. 予備凍結後、細胞内の凍りうる水がなくなる温度

第4図とほぼ同じ結果が  $-20^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された細胞についてもえられた。ただし、 $-20^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された細胞では、 $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結されたものよりも、液体窒素処理後、 $-20^{\circ}\text{C}$  以上の温度におかれたばあいの生存率ははるかに高い。いずれにしても、液体窒素処理



第5図 液体窒素中に急速に浸した細胞の生存率におよぼす加温速度の影響

水でマウントされた組織切片が5分間、 $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された。急速に液体窒素中に入れたのち、 $-60^{\circ}\text{C}$  のイソペンタン中に移された。 $-60^{\circ}\text{C}$  にたもたれた組織切片は、その後、いろいろな速さであたためられた。曲線にそって矢印で示されている時間は、それぞれの加温速度で  $-55^{\circ}\text{C}$  から  $-2.5^{\circ}\text{C}$  まであたためるのに要した時間を示している。



第6図 急速に液体窒素中に入れられた細胞の加温過程における生存率の低下

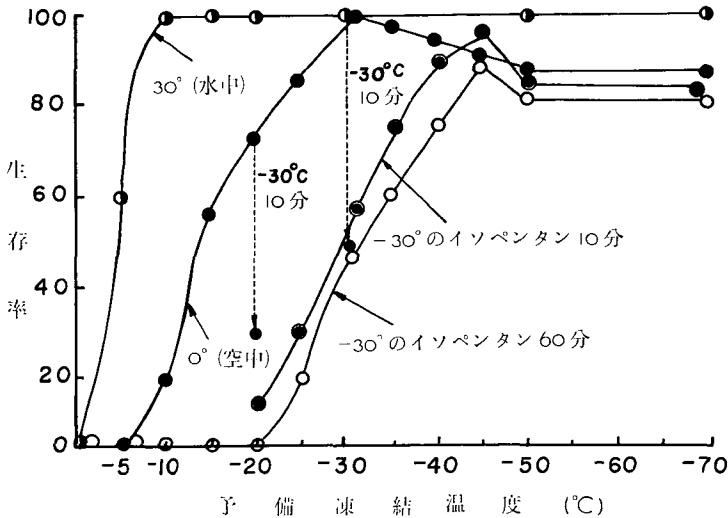
カバーガラスの間に水でマウントされた組織切片は5分間  $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された。ついで液体窒素中に急速に入れたのち、 $0^{\circ}\text{C}$  の空中であたためられた。各温度に到達後ただちに  $30^{\circ}\text{C}$  の水中に入れて急速加温された。なお、温度はオックスログラフで追跡された。図中の実線曲線はオックスログラムである

後、 $-35\sim-40^{\circ}\text{C}$  の温度におくと1分以内にほとんど全細胞が死んだ。このことは、 $-20^{\circ}\text{C}$  で予備凍結した細胞でも、なお細胞内に凍りうる水があるていど残っていて、液体窒素中に急速冷却する過程で、細胞内に氷晶核ができ、それが加温の過程で、とくに、 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$  の温度範囲で成長して細胞に害をあたえたものと考えられる。それ故に、細胞外凍結によって充分に脱水された細胞では、液体窒素中に入れて急速に冷却しても、さらに液体窒素処理後、 $-30^{\circ}\text{C}$  の温度に60分間おいても、細胞は害されないはずである。

この問題を調べるとともに、いろいろな温度で予備凍結された細胞の生存率におよぼす加温条件の影響を調べるために一連の実験を行なった。水でマウントされた組織切片は  $-5^{\circ}\text{C}$  で凍結後、ゆっくり所定温度まで冷却され、そこに10分間おかれた。その後、各温度で予備凍結された組織切片はことなった条件で加温された。第7図に結果を総括して示す。

$30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速に加温するときには、 $-10^{\circ}\text{C}$  以下の温度で予備凍結された細胞は液体窒素処理にたえた。また、 $0^{\circ}\text{C}$  の空中で加温するときには、 $-25^{\circ}\text{C}$  以下の温度で予備凍結された大部分の細胞は生存していた。しかし、液体窒素処理後、 $-30^{\circ}\text{C}$  の温度に60分間おいたときには、 $-30^{\circ}\text{C}$  以上の温度で予備凍結された細胞の生存率は  $0^{\circ}\text{C}$  の空中でゆっくり加温された細胞の生存率よりもかなり低かった。しかし、 $-45^{\circ}\text{C}$  以下の温度で予備凍結された細胞においては、液体窒素処理後、 $-30^{\circ}\text{C}$  に60分間おいても生存率はほとんど低下しなかった。

これらの実験事実から、用いた皮膚細胞では、細胞外凍結によって約  $-45^{\circ}\text{C}$  以下の温度ま



第7図 いろいろな温度で予備凍結後、液体窒素中に入れた細胞の生存率におよぼす加温条件の影響

組織切片はカバーガラスの間に水でマウントして各温度で予備凍結された。液体窒素処理後、いろいろな条件で加温された。図中の矢印をもった破線は、 $-20^{\circ}\text{C}$  および  $-30^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された組織切片が液体窒素処理後  $-30^{\circ}\text{C}$  に10分間おかれたのちの生存率の低下度合を示し、液体窒素処理後ただちに  $0^{\circ}\text{C}$  の空中で加温されたものとの比較を示す

加温条件： $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速加温、 $0^{\circ}\text{C}$  の室中で緩温加温、および  $-30^{\circ}\text{C}$  のイソペンタン中に10分または60分間おいたのち、 $30^{\circ}\text{C}$  の水中に入れて急速加温

で冷却しなければ細胞内の凍りうる水は脱水されないことがわかる。

#### IV. 考 察

$-5^{\circ}\text{C}$  で凍結後、ゆっくり冷却するばあいには、すくなくとも  $-120^{\circ}\text{C}$  まで細胞外凍結状態で温度をさげても、その後、さらに液体窒素中に入れても細胞は生存していた。このばあい、 $0^{\circ}\text{C}$  の空中でゆっくりあたためても、凍結状態のものを直接  $30^{\circ}\text{C}$  の温水中に入れて急速にとかしてもすべての細胞が生存していた。Krasavtsev<sup>6)</sup> は  $-30^{\circ}\text{C}$  以下で凍結している組織切片を  $30^{\circ}\text{C}$  の水中に入れて急速にとかすと細胞は殺されると述べているが、本実験ではくりかえしこのことをたしかめてみたが、冬の木の皮層細胞は急速にとかしても死なない。しかし、前報<sup>1-3)</sup> で報告したように、室温から  $-20^{\circ}\text{C}$  以下の温度で冷やされているイソペンタン中に組織切片を直接浸して急速冷却するときには全細胞が死んだ。以上の事実から考えて、用いた皮層細胞では、死は急速冷却のために致死的な細胞内凍結をおこしたばあいに限られるものと考えられる。この意味で、この材料は生存率から害の機構を考えるのに好都合であるし、また、得られた結果の解釈が簡単化する利点がある。

Mazur<sup>4,5)</sup> は酵母細胞を用いて、温度および冷却速度の函数としての細胞内に残存する水の百分率を計算によって求めた。彼の計算によれば、 $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$  以上のおそい冷却速度の場合には



細胞内の水は細胞外に形成された氷と蒸気圧の平衡を保ちながら冷やされている。しかし、 $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上のはやい冷却速度のばあいには、上のような蒸気圧の平衡を保って脱水されないので、細胞内の水は過度に過冷却され、早晚致命的な細胞内凍結をおこすものと考えられる。ここで用いた皮膚細胞では、冷却速度が $50^{\circ}\text{C}/\text{分}$ から $1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ まで増加するにつれて生存率は徐々に低下し、 $1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ において0になる。この生存率の連続的低下は細胞内凍結する細胞の割合が連続的に増していることを示している。つぎの事実もまたこの考察を支持しているように考えられる。上に示した有害な冷却速度のばあいにおいても、もし細胞が約 $-20^{\circ}\text{C}$ までゆっくりと冷却されるか、あるいは $-5^{\circ}\text{C}$ または $-10^{\circ}\text{C}$ の温度で5分間、または3分間、凍結状態におかれたときには、それらの温度以下では冷却速度は生存率にほとんど影響をおよぼさなかった。

$10,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度で急速加温のばあいには、冷却速度が増すにつれて、生存率は漸次たかまり、 $200,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度においては全細胞が生存できる。こうした事実は前報<sup>1-3)</sup>で述べたように、細胞内にできた氷晶の大きさと説明できる。すなわち、冷却速度がまずにつれて、細胞内にできる氷晶の大きさは小さくなり、やがては細胞にとって無害の大きさになるものと考えられる。したがって、急速に冷却されたこれらの細胞を急速に加温するときには細胞は害をうけなくなる。しかし、ゆっくりと加温するばあいには、冷却中細胞内にできた微氷晶は加温の途中で生長して細胞を殺すようになるものと考えられる。

中間的冷却速度のばあいには、急速加温しても細胞の生存率は低い。これは冷却中、大部分の細胞内にできた氷晶が大きいため、冷却中に細胞に害をあたえたものと考えられる。

最近、こうした考えを支持するいくつかの直接的証拠が電子顕微鏡的研究によってえられた<sup>7)</sup>。組織切片が室温から $-60^{\circ}\text{C}$ 以下に冷やされたイソペンタン中に入れて急速に冷却されたとき全細胞が生存していたし、これらの細胞を $-79^{\circ}\text{C}$ でエタノールで凍結置換後、超薄切片を作って電子顕微鏡で調べたところ、これらの細胞には電子顕微鏡で認められるほどの大きさの氷晶ができていないことがたしかめられた。しかし、室温から $-20\sim-45^{\circ}\text{C}$ の温度に冷やされたイソペンタン槽中に組織切片を入れて急速に冷却したときには、ほとんどの細胞が死んでいたし、電子顕微鏡で調べたところ、これらの細胞の大部分には凍結置換後形成された氷晶のあとと考えられる空所が細胞内に多数みとめられた。

さらに、液体窒素中に入れて急速冷却された組織切片を、液体窒素から取出して $-10\sim-70^{\circ}\text{C}$ の間の各温度に冷やされているイソペンタン中に急速に移し、そこにいろいろの時間おいてから調べたところ、 $-50^{\circ}\text{C}$ 以下の温度では10分間、 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下の温度では16時間おいても細胞は生存していたし、これらの細胞内には電子顕微鏡で、凍結置換後形成された氷晶のぬけがらと考えられる空所は認められなかった。しかしながら、 $-45^{\circ}\text{C}$ 以上、ことに $-30^{\circ}\text{C}$ の温度では、1分間さらしただけでも、細胞内に多数の大きい空所が認められた。今後、細胞に致命的となる氷晶の大きさをきめる仕事が残されている。なお、細胞内にできる氷晶の生長の機構については現在のところまだよくわかっていない。

液体窒素への急速冷却後、空中でゆっくりあたためるばあいに、予備凍結後なお細胞内に

凍りうる水が残っているときには、液体窒素への急速冷却中に細胞内にできた氷晶核がそれにつづく加温の過程で生長して細胞を殺すはずである。いろいろの温度で予備凍結後、液体窒素中に入れられた細胞の生存率は液体窒素から除去後の加温速度によって非常にことなる。それ故に予備凍結後、液体窒素中に入れられた細胞がほとんど全部生きているからといって、細胞内の凍りうる水がその予備凍結温度で細胞外凍結によって脱水されたと考えることはできない。しかしながら、液体窒素処理後、 $-30^{\circ}\text{C}$ の温度に60分おくばあいには、それらの細胞の生存率から細胞内の凍りうる水が脱水されうる温度をあるていど知ることは可能である。用いた皮層細胞ではこの温度は約 $-45^{\circ}\text{C}$ である。この方法の妥当性を電子顕微鏡的な方法と熱量計による方法とで調べる予定である。しかし、通常の熱量計による方法では、ことに非常に低温度で、しかも皮層組織のような材料では、細胞内の凍りうる水が脱水される温度を知ることはむずかしいかもしれない。

約 $-70^{\circ}\text{C}$ までの凍結に耐える植物はそれ以低のどんな低温にも耐えるし<sup>8)</sup>、また、液体窒素処理後、植物を生存させるのに必要な予備凍結温度は、植物の耐凍度に応じて、約 $-15^{\circ}\text{C}$ から約 $-70^{\circ}\text{C}$ まで異なっている<sup>9,10)</sup>。耐凍度が高いものほど予備凍結温度は高い。これらの実験においては、液体窒素処理後、枝は $-30^{\circ}\text{C}$ の部屋に3時間おいてから $0^{\circ}\text{C}$ の空中で融解したので、予備凍結後、もしも細胞内に凍りうる水が残っているならば、これらの細胞は加温の過程で害されるはずである。したがって、効果的予備凍結温度まで冷却されると、細胞内の凍りうる水のほとんどが脱水されていると考えてもさしつかえない。以上の考察から、耐凍性の高い細胞では、耐凍性の低い細胞よりもより高い温度で細胞内の凍りうる水が脱水されてしまうと考えられる。Hardeningすると効果的予備凍結温度はかなり高まる。したがって、Hardening中に細胞内の水の状態の変化がおこるものと考えられる。これが溶質の増加や原形質の構造の変化の結果としておこるものとおもわれるが、この問題については今後さらに研究をすすめる予定である。

## V. 摘 要

超低温における生物の生存の機構を明らかにするために、予備凍結法と急速冷却、急速加温の方法を併用して一連の実験を行なった。とくに、生存率におよぼす冷却および加温速度の影響と、冷却および加温の過程で、被害を生ずる温度が調べられた。

1.  $1\sim 15^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のおそい冷却速度のときには、どの温度まで冷却しても、また加温速度が速くても、おそくても全細胞が生存していた。冷却速度が $15^{\circ}\text{C}/\text{分}$ から $1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ に増大するにつれて、生存率は次第に低下し $2,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度においては全細胞が死んだ。しかし、こうした中間的冷却速度のばあいには、組織氷点から $-10^{\circ}\text{C}$ までの温度範囲を凍結状態でゆっくり冷却すると以後の冷却速度にかかわらず大部分の細胞は生存できた。しかし、 $10,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度で、しかも急速加温のときには、冷却速度がまずにつれて生存率はたかまり、 $200,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度で全細胞が生存できた。この冷却速度では、細胞は組織氷点と $-55^{\circ}\text{C}$ の温度範囲を約0.003秒で通過している。また、 $15^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の冷却速度のばあいには、生存率

は加温条件によってことなり、急速加温の方が緩慢加温よりつねに生存率がたかかった。

2. 液体窒素中に急速冷却後の加温過程においては、 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$  の温度範囲で細胞の生存率は急に低下した。 $-30^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された細胞でも、液体窒素処理後  $-30^{\circ}\text{C}$  の温度に10分間おくことによって生存率は急に低下した。この事実は  $-30^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された細胞内にはまだ凍りうる水が残存していることを示している。

3. カバーガラスの間に水でマウントして  $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された組織切片では、液体窒素から除去後  $-50^{\circ}\text{C}$  と  $-2.5^{\circ}\text{C}$  の温度範囲を2秒以内、すなわち  $1,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$  以上の加温速度であたためれば全細胞が生存できた。

以上の事実は、急速冷却、急速加温した細胞では、細胞の害にとって主要な要因は細胞内に氷晶ができるか否かではなく、できた氷晶の大きさが問題であることを示している。

## 文 献

- 1) Sakai, A. 1966 Survival of plant tissue at super-low temperatures. IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol.*, **41**, 1050-1054.
- 2) 酒井 昭 1966 超低温における植物組織の生存. IV. 急速冷却, 急速加温した細胞の生存の機構. 低温科学, 生物篇, **24**, 1-13.
- 3) Sakai, A. 1967 Survival of plant tissue at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 119-130.
- 4) Mazur, P. 1966 Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*, **2**, 181-192.
- 5) Mazur, P. 1967 Physical-chemical basis of injury from intracellular freezing in yeast. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 171-189.
- 6) Туманов, И. И. и Красавцев, О. А. 1966 Выяснение условий, необходимых для витрификации растительных клеток. *Физиология Растений*, **13**, 144-161.
- 7) 大塚宏二・酒井 昭 1967 急速冷却した植物細胞内にできる氷の電子顕微鏡的研究. 低温科学, 生物篇, **25**, 21-28.
- 8) 酒井 昭 1967 超低温における植物組織の生存. V. 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係 2. 低温科学, 生物篇, **25**, 1-7.
- 9) Sakai, A. 1965 Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperatures and degree of frost hardiness. *Plant Physiol.*, **40**, 882-887.
- 10) Krasavtsev, O. A. 1967 Frost hardening of woody plants at temperatures below zero. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 131-141.

## Summary

The survival of the cortical cells as a function of cooling and rewarming rates was investigated. When cooling was carried out slowly at 1 to  $15^{\circ}\text{C}$  per minute, all cells continued to remain viable even when rewarmed either rapidly or slowly. Thereafter, the survival rates gradually decreased to zero as the cooling rate increased from about

15 to 2,000°C per minute. In the intermediate cooling rates, when the cells were cooled at rates lower than 14°C per minute, from  $-2.2^{\circ}\text{C}$  to about  $-10^{\circ}\text{C}$ , these cells could survive subsequent rapid cooling and rewarming.

However, at cooling rates above 10,000°C per minute and with rapid rewarming, the effect of the cooling rate was reversed and the survival rate rose, reaching a maximum at about 200,000°C per minute. As the cooling rate rose above 15°C per minute, the survival rates became increasingly dependent on the rewarming rate, with rapid rewarming becoming less deleterious than the slow.

The temperature range at which damage easily occurred during rewarming following removal from liquid nitrogen, in which the growth rate of ice crystallization was greatest, was  $-30$  to  $-40^{\circ}\text{C}$ . The survival rates even in the prefrozen cells at  $-30^{\circ}\text{C}$  decreased considerably by keeping them at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes after removal from liquid nitrogen. This fact indicates that intracellular freezable water still remains to some degree even in the prefrozen cells at  $-30^{\circ}\text{C}$ . Furthermore, after removal from liquid nitrogen when the cells were passed rapidly through a temperature range between  $-50$  and  $-2.5^{\circ}\text{C}$  within about 2 seconds, namely at rates greater than 1,000°C per minute, all retained their viability.

These results obtained can be explained in terms of the size of the crystals formed within the cells.