



Title	馬鈴薯塊莖の再凍結曲線の型について
Author(s)	青木, 廉; AOKI, Kiyoshi
Citation	低温科学, 3, 207-217
Issue Date	1950-12-15
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17435">https://hdl.handle.net/2115/17435</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_p207-217.pdf



# 馬鈴薯塊莖の再凍結曲線の型について\*

青 木 廉

(低溫科學研究所 生物學部門)

(昭和 22 年 11 月受理)

## I

一度完全に凍結した細胞は融解後、非可逆的の障害を受けてゐることは多くの研究者達によつて色々な立場から觀察され又論じられてもゐる。従つて組織に於いても凍結が充分の場合には、凍結した後の性質は新鮮なものと根本的に異なつてゐる。此の差は凍結曲線の型の上にも明瞭に現はれて來るもので、此の事實は組織の凍結様式が互にかなり異なつてゐることを示すに他ならない。尙この再凍結曲線の型の初凍結曲線よりのずれは初凍結の程度に支配されるもので、初凍結が不完全な程、兩者の間に差が少い(青木)。

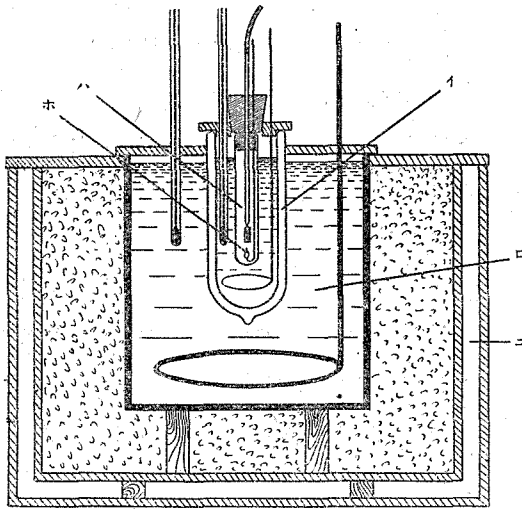
一方凍結の過程から推して、凍結に際し組織内に生ずる氷結晶の大きさ、特に組織内に於ける氷の分布状態は其の時の凍結條件、主として冷却速度及び冷却温度等によつて左右されることは現在迄の多くの研究によつて間接的にではあるが明かである。斯様な場合、凍結組織の融解を急速に行へば、融解直後に於ける組織内の水の分布状態は融解前の氷の分布状態と平行してゐると考へられる。従つて凍結條件が異なれば、一定の急速融解直後の組織内に於ける水の分布状態も當然異なる譯で、斯様な組織を再び凍結させた場合、水の分布状態の差異が再凍結曲線の型の上に現はれて來ないものであらうか？ 若し初凍結の際の冷却速度の大小と再凍結曲線の型との間に明瞭な平行關係が存在することになれば、逆に再凍結曲線の型から、凍結組織内に於ける氷の分布状態の推測も或る程度可能になると考へられる。本報告は斯様な考へで、初凍結の際の冷却速度と再凍結曲線の型との關係を調べた結果である。

## II

材料は馬鈴薯(品種名男爵)の塊莖である。實驗は十二月上旬より三月に涉つて行はれた。前の實驗では温度測定に Beckmann 温度計を用ひたが(青木)、これはかなり簡便な方法である。然し何分水銀溜が大きいので、組織片を大きく採らねばならず、従つて同一塊莖より採つた組織片に就いての比較が出来ない場合が多かつた。勢ひ塊莖による個體差がどうしても大きく出て來る。

\* 北海道大學低溫科學研究所業績 第 43 號。本研究は文部省科學研究費によるものである。

此の個體差に基く差異を最小限度に止める必要上、同一塊莖より多くの組織片を採るには、其の個々の大きさを小さくしなければならぬ。此の小さい組織片に就いて温度變化を測定するために本實驗では熱電對を用いた。熱電對は徑 0.5 mm の銅とコンスタンタン線の先を鐵附けにし、先端部を残し、他は徑 3 mm の硝子管の中に蜜蝋で封じ込み、先端の露出部（組織内に挿入する部分）には絶縁ラックを塗附し、更に上を薄く蜜蝋で蔽うたものである。熱電位差は理研製ダルソンバール型檢流計（感度  $4.3 \times 10^{-9}$  アンペア）で測定、途中 240  $\Omega$ 、又必要に応じて 440  $\Omega$  の抵抗を挿入した。抵抗 240  $\Omega$  挿入の場合 1°C はスケール上の 27 目盛に相當する。いつも 0°C がスケールの目盛 150.0 になる様に調節した。それより目盛が大きい程低い温度



第 1 圖

を示すことになる。此の實驗では凍結曲線の相對的型を問題にしてゐるので以下測定値は皆スケールの読みをそのまま示し、攝氏温度に換算してゐない。

冷却には寒劑(NaClと細氷)を用いた。第 1 圖に示す様に、間を真空にしてゐない二重瓶(イ)の中に所要温度の寒劑を入れ、それを更にそれより數度低い寒劑(ロ)の中に漬けて置き、實驗中絶えず(イ)の中の寒劑を攪拌する。攪拌が充分であれば、7~8 時間は樂に 0.5°C 以内の範圍で温度は恒常に保たれる。寒劑

(ロ)の入つてゐる硝子槽(徑 20 cm, 深さ 26 cm)は木製二重箱(=)(内箱の内徑 27×27×36 cm, 内箱外箱共に目張りを充分にして斷熱をして置く)内の乾燥してある穀殻中に埋めてある。寒劑(イ)の中に保護管(徑 18 mm, 長さ 170 mm)に挿入してある試料を入れて凍結させるのである。標準の 0°C 點には第 1 圖と同様な装置を用ひ -3~-4°C の寒劑中で徐々に凍結しつつある蒸溜水の温度をとつた。

冷却速度は組織片に直接、接する媒質の厚さ及び質を變へて調節した。多くの場合直接組織に接するのは空氣層であるが、冷却速度を大とする場合には流動パラフィン、時には水銀をも使用した。又緩徐に冷却する場合には保護管(ハ)を更に太い保護管(内徑 30 mm, 長さ 170 mm)中に挿入し空氣外套を二重にして寒劑中に浸した。

使用した組織片は 5×5×14 mm の長角柱状のもので、なるべく管束の少ない部分から切り取つた。同一系列の實驗にはいつも同一塊莖より採つた組織片に就いて行つた。凍結曲線の型は使用する組織片の型及び大きさに非常に支配されるものであるから、出來得る限り同一にしな

ければならぬ。此のため 5mm 間隔に固定してある 2 枚の安全カミソリの刃を使つて切り取るのであるが、仲々均一の大さには採れず、結局多く作つたものの中から所要の大さに合ふものを撰定し、それを實驗に供した。

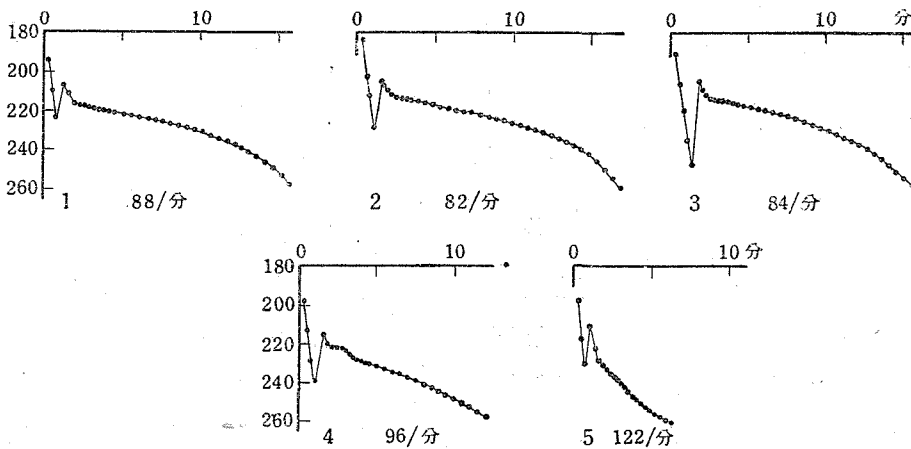
凍結組織の融解は次の様に急激に行つた。即ち熱電對につけたまゝの凍結組織を +20°C の流動パラフィン中に直接漬けて融解せしめ、組織内部の温度が +3°C になつた時、引き出し再凍結を行つた。

檢流計の示度は初め 15 秒置きに、次いで變化の小さくなつた後には 30 秒置きに記録した。冷却速度は凍結曲線の丁度 0°C と +1°C に相當する間を延長し、其の直線より 1 分間の大體の温度降下度を算出して決めた。特に冷却速度の大なる場合には概略の値を決定するのも困難であるが、極めて大きづばの比較的の値は知ることが出来る。\*

又過冷却が大き過ぎるとそれが破れた際、檢流計の振れが仲々停止せず、従つて第一氷點の判定が困難となるばかりでなく、過冷却の度を異にすると氷點も亦異なつてくるので、過冷却の程度はなるべく小さく、且大體等しくする必要がある。其のために豫め蒸溜水をたつぷり含ませた脱脂綿を針金の先端に捲きつけ、其の先を細く尖らしてそのまま凍結せしめて置く（第 1 圖のホ）。此の氷針を所要の時期に組織片の底部に接觸せしめて過冷却を破つた。

III

同一塊莖から切り取つた等しい型、等しい大さの新しい組織片 (5×5×14 mm) の正常凍結曲線を比較してみると其の間に著しい差は見られない。其の 1 例を第 2 圖の 1, 2, 3 に示し

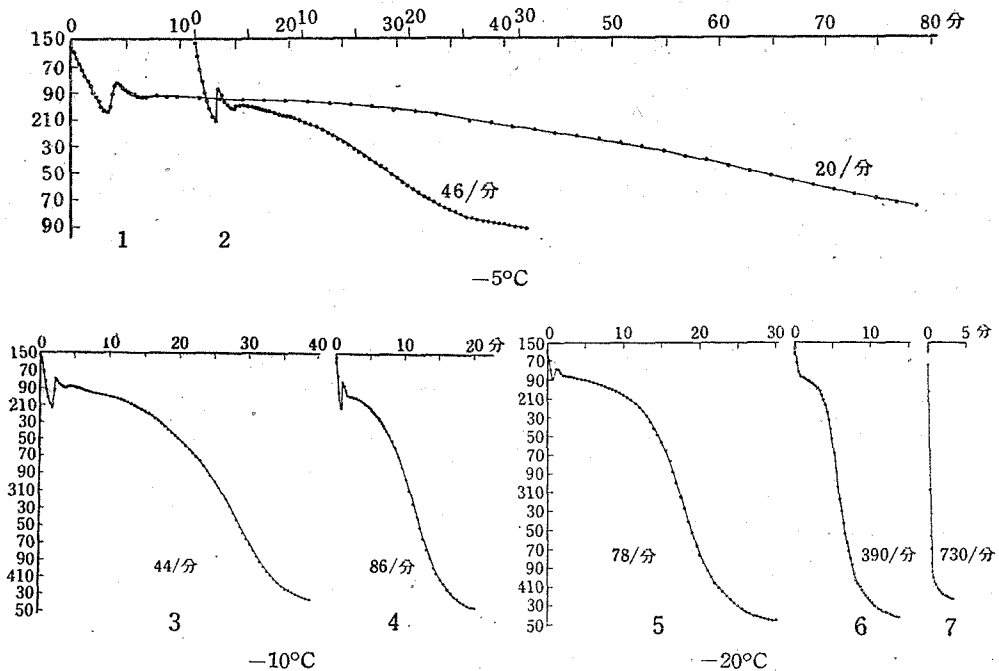


第 2 圖

\* 実際には熱電對先端部よりの熱の出入は相當大きいと見なければならぬので、見かけの値は實際の値よりかなり大きく出るものと思はれる。

であるが、曲線の型、氷点の位置共に殆ど變らない。然し組織片の大きさが變ると冷却温度は等しくとも、冷却速度は變る筈である。第 2 圖の 1, 2, 3 と 4, 5 を比較すれば明かな様に組織片が小さい程第二氷点の持續時間は短くなり、又不明瞭となる。即ち曲線の型は明瞭に變つてくる。

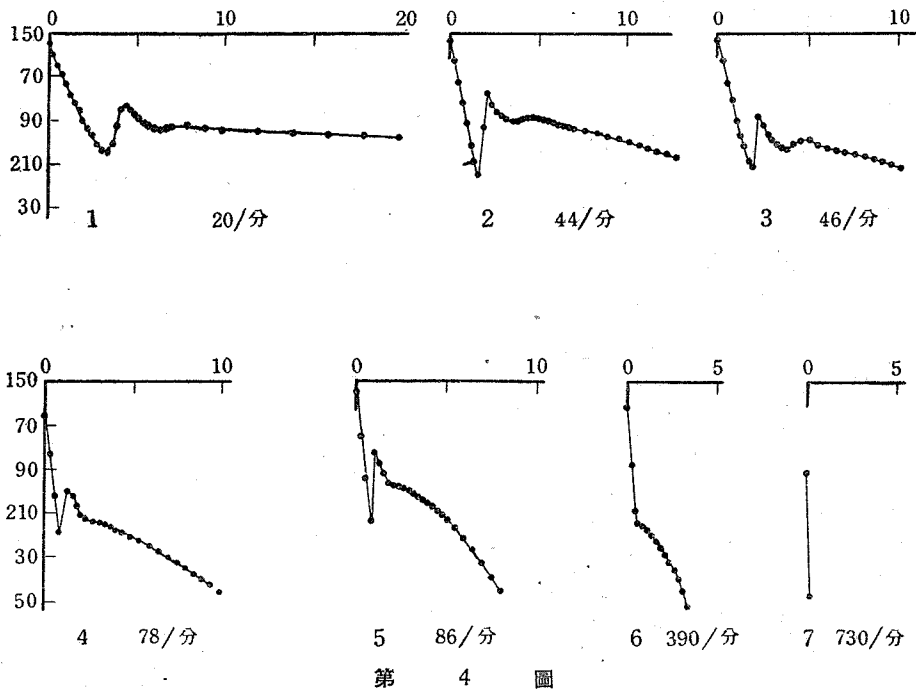
次に組織片の大き及び冷却温度を一定にし冷却速度のみを變へた場合の凍結曲線を調べてみた。冷却速度は直接組織片に接する媒質を空氣、流動パラフィン、水銀と變へて調節した。冷却温度  $-5^{\circ}\text{C}$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$  及び  $-20^{\circ}\text{C}$  の場合の 1 例を第 3 圖に纏めてある。各温度に於いて冷却速度の大きい時には第二氷点の持續時間は短縮して温度は早く降下し始める。然し  $-5^{\circ}\text{C}$  及び  $-10^{\circ}\text{C}$  の場合及び  $-20^{\circ}\text{C}$  の緩冷却の場合には冷却速度が異なると凍結曲線の型は勿論異な



第 3 圖

つてくるが、第一、第二氷点共に明瞭で、型の上に本質的の差はみられない。以上の例の内、冷却速度の一番大きいのは  $-10^{\circ}\text{C}$  で急冷却の場合の 86/分である。冷却速度がもつと大きくなり 390/分 即ち  $-20^{\circ}\text{C}$  急冷却の時 (第 3 圖の 6) には、今迄明かであつた第一氷点は認められず、第二氷点の持續時間は極端に短くなり温度は直ちに急激に降下する。従つて氷点は單なる折れ曲り点として現はれるに過ぎない。冷却速度がさらに大きくなると (約 730/分)、第一、第二氷点と識別し得る點は完全に消失し温度は初めから急激に一律に降下してしまふ (第 3 圖の 7)。以上の結果からみて組織片の型及び大きさが一定の場合には冷却温度が異なつても

冷却速度さへ等しければ氷点の出現様式は等しい。即ち凍結曲線の型は冷却速度によつて一次的に支配されるものと云へよう。冷却温度の氷点出現様式に及ぼす影響は要するに冷却温度の差に基く冷却速度の差異によるものである。實際第3圖の4と5を比較してみると、冷却速度は前者で86/分、後者では78/分と大差なく、其の冷却曲線の型も氷点出現の様式に關しては殆ど差は認められない。第4圖は凍結曲線を冷却速度の順に並べたものであるが、氷点の様式と冷却速度との間には平行的關係の存することは明かである。斯様に凍結曲線に於いて



第4圖

氷点の現はれ方は冷却速度に支配されてゐるものであるから凍結曲線を論ずる實驗の際には冷却速度を必ず一定にしなければならぬ。又氷点は冷却速度が大となると低下する傾向は明瞭であるが、此の實驗範圍内では其の間に規則性は見出されない。

凍結曲線の型は熱電對を用ひた場合と Beckmann 溫度計を用ひた場合とではやゝ趣を異にしてゐる。熱電對を用ひた時の方が一般に第二氷点が急激に現はれてくる。此の差は組織片の大きさ及び型、溫度計挿入部と組織の大きさとの相対比等の差に基因するもので複雑なものと思はれる。

-5°Cで冷却した場合と、-10°Cでの緩冷却の時、即ち冷却速度が約50/分以下の場合には第二氷点の前に僅かながら、かなりはつきりした溫度降下が先行する場合がある(第3圖の1, 2, 3)。これより冷却速度が大となると、凍結曲線は第一氷点出現直後はかなり急激に降下するが、それが或點で急に水平となる、即ち第二氷点が急激に現はれる。

## IV

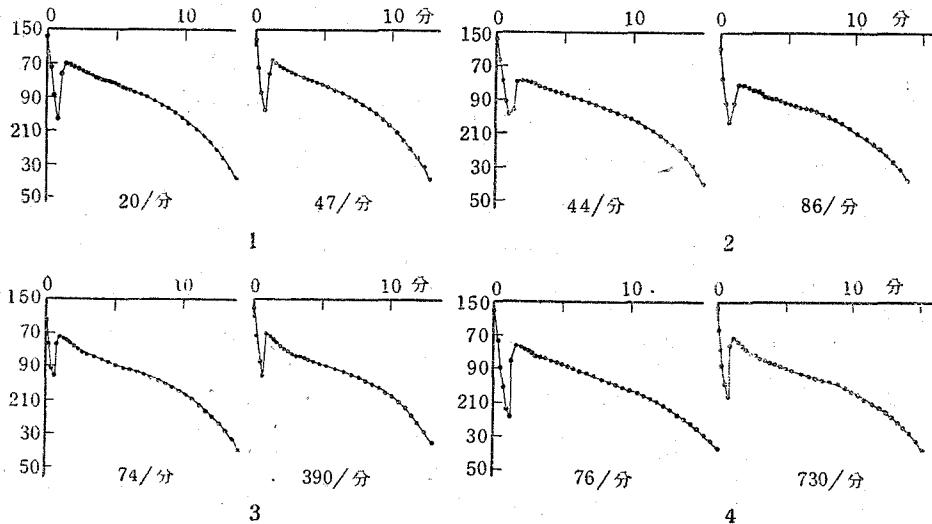
前節で述べた様に冷却速度が大となるにつれて凍結曲線に現はれる第二氷點は其の持続時間が短縮し次第に不明瞭となり遂には認められなくなつて了ふ。此は組織片では周邊部より凍結が始まり、それが次第に中心部に向つて進行して行くのであるが、冷却速度の大なる時は凍結により周邊部より遊離される潜熱の中心部に傳はるより周邊部に奪はれる方が多いためである。斯様に凍結曲線の型に著しい差の現はれる様な條件の下に、即ち異なる冷却速度の下に組織が凍結せしめられた場合、其の組織内に生じた水の分布状態の差異に就いては具體的には明かにされてゐない點が多いが、氷晶の大きさや分布状態等、等しくないことは確かである。今迄になされた多くの観察からみて冷却速度の大きい場合と小さい場合とに於ける組織の凍結様式は次の様に想像されよう。冷却速度の小さい時には先づ細胞表面<sup>\*</sup>に氷が生じ、其の結果細胞は次第に脱水されて、奪はれた水は更に細胞表面で凍結する。かくして細胞表面の氷の量は増加する。一方細胞内部は脱水の結果濃縮されるので次第に凍結し難くなる。然し冷却温度が或程度以下で、且凍結時間が長ければ細胞内部も終ひには凍結することは云ふ迄もないが、結局細胞表面に多量の氷が生ずることになる。次に冷却速度の充分大きい時には初め細胞表面に氷が生じて、脱水は僅かか、或は殆んど起らぬ内に細胞内部も凍結するので、細胞表面の氷の量の増加することは殆どないであらう。即ち急激に凍結した組織に於いては細胞表面の氷の量は緩慢凍結の組織の場合よりも少ないこととなる<sup>\*\*</sup>。若し組織の凍結に斯様の差が起つたとすれば、兩者共に等しい速度で急速融解された直後組織内に於ける水の分布状態は各、異なる筈である。緩慢凍結の後では相對的に細胞間隙に水が多く、又急速凍結の後では相對的に細胞内部に多量の水が存在することになる。即ち水の量的分布状態と云ふことのみに関しては、急速凍結後の組織はむしろ生組織に近い状態と云へよう。此の水の分布状態の差が再凍結線の上に現はれてゐないであらうか？此を確かめるために次の實驗を試みた。

先づ組織片 (5×5×14 mm) を二重の保護管に入れ徐々に凍結せしめ、其の温度が冷却温度 (寒劑温度) と等しくなつた後 +20°C の流動パラフィン中で急速融解をなし、直ちに -10°C で再凍結せしめる。急速凍結の場合は豫め所要温度に冷却してある流動パラフィン中に組織片を入れ、冷却温度と等しくなる迄放置し完全に凍結せしめる。急速融解、再凍結は前と同様な條件の下に行ふ。唯 -20°C の場合だけ流動パラフィンの他に水銀をも用ひた。冷却温度が異なると完全凍結後組織内に生ずる氷の量は異なつてくるので實驗には冷却温度を固定して冷却

\* 細胞間隙に面してゐる細胞の表面。細胞間隙中の水蒸氣は温度低下に伴ひ細胞表面に凝縮し、遂に凍結するが、其の水點は細胞内部より高いと考へられる。

\*\* 現在の處いづれの場合にも凍結後、細胞内外に生じた氷の具體的な量的關係は全く判つてゐない。

速度のみを變へた。試みた冷却温度は  $-5^{\circ}$ 、 $-10^{\circ}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$  の 3 通りである。第 5 圖に結果の 1 例を示してある。再凍結の際の冷却速度は 85~94/分である。一般に初凍結が充分の場合には、再凍結曲線は山を一つ持った単一の曲線であり、其の氷點は初凍結時の第一氷點よりも高い（青木前報及び第 5 圖参照）。此の點 Maximow (1914), Walter & Weismann (1935) 及び Luyet (1937) 等の結果と同様である。



第 5 圖

第 5 圖を一見して明かのように  $-5^{\circ}\text{C}$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$  で初凍結を行つた場合（第 5 圖、1 及び 2）、其の冷却速度の影響は再凍結曲線の上には殆んど認められず、初凍結の緩急いづれの場合も再凍結曲線は氷點を一つ有する単一の曲線に過ぎない。此等の場合、其の冷却速度の差は少く、 $-5^{\circ}\text{C}$  では 20/分と 47/分、 $-10^{\circ}\text{C}$  では 44/分と 86/分で急速初凍結時の冷却速度は緩慢初凍結の時の約 2 倍である。 $-20^{\circ}\text{C}$  の場合（第 5 圖の 3）には約 5.3 倍（緩初凍結 74/分、急初凍結 390/分）になつてゐて、始めて再凍結曲線の上にやゝ差が認められる。即ち急速初凍結の後では、再凍結曲線に於いて氷點出現後、温度の降下は等速ではなく、一時やゝ緩慢となる傾向が見られる。初凍結の冷却速度がもつと大となつて 730/分位の時にも（第 5 圖の 4）、再凍結曲線の型は 390/分の場合と略同様で著しい變型は認められない。以上の結果では初凍結の冷却速度が約 400/分以上になつて初めて再凍結曲線の単一の氷點が分離し始める傾向が認められるに過ぎず、それ以下の凍冷速度では全く差がない。

## V

異なつた冷却速度で組織を凍結せしめた後、急速に融解した場合、組織内に於ける水の分布状態は次の様な理由で等しくないと云へよう。即ち現在迄の色々の研究によると細胞内部に氷

結が起れば細胞はもはや原形質分離を起さなくなる。此の事實は各細胞の半透性が完全に消滅したことを示すに他ならない。さて生細胞の水の保持は大部分滲透壓的力によるものである。組織が凍結する際、凍結により細胞表面に奪はれた水を融解後再び細胞内に吸引するのに、半透性が既に失はれてゐる以上正常の場合の如く滲透壓的力を利用することはもはや出来ない。従つて融解後再凍結開始迄の短時間（本実験では大體3分以内）内には勿論のこと、恐らく此の水の分布状態の變化はもはや元の状態（初凍結前の状態）に戻ることは不可能と思はれる。一方初凍結時の冷却速度が異なれば組織内に生ずる氷晶の分布状態は等しくない。従つて再凍結直前の組織内に於ける水の分布状態は初凍結時の冷却速度に左右される筈である。故に、前述の実験に於いては再凍結時の各組織内の水の分布状態に差が存するにも拘らず、実験の結果からみると初凍結時に於ける冷却速度の影響は豫期した程に再凍結曲線上に現はれてこない。唯冷却速度が約 390/分 以上の場合に始めて氷點分離——凍結が始まつてから其の進行が一樣に行かぬ——の傾向がみられるに過ぎず、冷却速度がこれより小さい場合には再凍結曲線上に殆ど差が認められぬ。此の原因は実験に用ひた程度の冷却速度の範囲内に於いては組織内に於ける水の分布状態に豫期した程の差が生じなかつたと云ふことより、次の様な理由で、むしろ細胞の死に起因する凍結様式の變化にその原因を求むべきであらう。

一度凍結すると細胞は其の半透性を失ひ、又細胞質は屢々凝固を起すことは多數の人々によつて確められてゐる。従つて融解後の組織内に於いては水の移動を掣肘してゐた滲透壓的力が現はれなくなつてゐるので、再凍結の際、組織の一部に凍結が始まつた場合、其の場所への水の移動は生組織中に比して遙に容易であらう。此の點から見ても死組織に於ける凍結の進行は生組織に於けるよりも速かな筈である。融解後の死組織に於いては尙氷の接種<sup>\*</sup>の容易と云ふことを考へねばならぬ。生組織に於ける凍結にはやゝ特殊なものがあり、一般に或程度過冷却してゐる細胞が瞬間的に凍結し、其の凍結が間歇的に相接する細胞に傳播するのである。此の事實を Chambers & Hale (1935) が玉葱の鱗葉表皮細胞で、Luyet (1937) も亦同じ材料に就いて觀察してゐる。又ヒロクチコゴケ、ムラサキツユクサ、ムラサキオモトの葉の裏面の中肋附近の表皮細胞及び玉葱鱗葉内側の表皮細胞に就いて其の凍結経過の詳細な顯微鏡的觀察が小野田 (1937) によつて報告されてゐるが、やはり此等のものに於いても、凍結は細胞間を間歇的に擴がつて行くものである。馬鈴薯塊莖の柔軟組織の細胞の凍結も大體表皮細胞の場合と同様であり、最初細胞表面に氷が生じ、さらに温度が低下してから急激に細胞内部が凍結する。然し細胞の凍結は急激で、且必ずしも凍結は隣接してゐる細胞にのみ傳播するものではなく、離れた細胞にも獨立的に起る（朝比奈、未發表）。斯様に細胞は生きてゐる限り、其の外面に氷が生じて、直ちに凍結は内部に進行せず、細胞内部は尙過冷却の状態に止つてゐる。即ち細

\* inoculation, seeding.

胞の表層部で——恐らく原形質膜——氷の接種が阻止されると考へられる。處が一度凍結し融解した組織に於いては様子は大部異なる。朝比奈の觀察によると馬鈴薯塊莖の再凍結の場合には、細胞表面の凍結に引続き内部にも直ちに凍結が進む。然し此の内部凍結は生細胞に見られる様な瞬間的に起る急激なものではなく、且凍結はいつも隣接せる細胞に連続的に擴がつて行くもので、其の進行速度は初凍結の場合よりも速い(未發表)。玉葱の表皮細胞に於いても、再凍結の際には細胞内の瞬間的凍結が起りにくくなることを Luyet (1937) が報告してゐる。此等の事實から細胞表層部の正常の性質が失はれると細胞外部より内部への氷の接種が容易に、且速かになることは明かである。本實驗の初凍結は完全凍結であるため、組織の全細胞は非可逆的の障害を受けてゐるものと考へられる。従つて再凍結の際には氷の接種は細胞の境界で生組織に於ける程には阻止されることなしに擴がる。換言すれば一部に始まつた凍結は短時間内に各方面にかなり速かに進行するものであらう。従つて初凍結で組織内の水の分布状態が變化し、其のため再凍結の際、凍結過程に變化が生じたとしても其の變化が餘程著しくない限り凍結の傳播速度が大きいことによつて蔽はれて了つて見かけ上凍結曲線の上には現はれてこないのではあるまいか? 斯様に考へると初凍結時の冷却速度の差が再凍結曲線の型の上に明瞭に現はれないことも一應説明出来るであらう。

Walter & Weismann (1935) の實驗では馬鈴薯塊莖を反復凍結せしむると、凍結の度に組織の氷點は次第に上昇して行く。即ち第 1 回目の凍結で  $-1.37^{\circ}\text{C}$  の氷點が 6 回目の凍結迄に漸次上昇し  $-0.75^{\circ}\text{C}$  となり、7 回目以後 14 回目迄殆ど等しい氷點を示してゐる。此の氷點の階段的上昇を彼等は凍結の度に死細胞の數が増加するためであり、全部の細胞が死んで了ふと氷點は一定になると説明してゐる。要するに彼等の場合には不完全な凍結を繰返したことになる。故に初凍結が完全の場合、即ち第 1 回目の凍結で全部の細胞が死んで了つた場合には第 2 回目の凍結で氷點は一躍上昇して、其の後凍結を繰返しても氷點の階段的上昇はみられない筈である。事實初凍結を完全にすれば、反復凍結でも氷點は殆ど變らない。著者の例では第 1 回目  $-72.0$ 、第 2 回目  $-36.0$ 、第 3 回目  $32.0$ 、第 4 回目  $35.5$  といふ結果を得てゐる。此の結果からも本實驗の初凍結で組織全部の細胞が障害を受けてゐたことは間接に證明される。又此の再凍結の場合の氷點は初凍結時の冷却速度には支配されず、大體等しい値を示してゐる。此の事實からも再凍結の場合、組織内での凍結の進行はかなり速かであり、且連続的に行はれるもので従つて組織全體の凍結が速かに完了することは容易に窺へる。

斯様に再凍結の場合には組織内で凍結の傳播が速かなために、組織全體が比較的短時間内に連続的に凍結して了ふ。此のために組織内の水の分布状態が互に異なつてゐても、其處に餘程大きな差のない限り、再凍結曲線の型の上に變化の現はれることは餘り期待出来ない。それ故、逆に再凍結曲線の型から、初凍結時に生じた氷の分布状態の推定は困難といふことになる。

## 摘 要

馬鈴薯塊莖組織の凍結曲線の型は凍結時の冷却速度によつて決定される。通常二つの氷點が現はれるものであるが、冷却速度が大きくなると（約 390/分 即ち約 14°C/分）、一過性の第一氷點は消失し、更に 730/分（約 30°C/分）では第二氷點も完全に認められなくなる。

異なる冷却速度の下に塊莖組織を凍結せしめた後、同一条件の下で急速融解して再び凍結せしめた場合、再凍結曲線の型の上には殆ど差が現はれず、唯初凍結時の冷却速度が約 390/分（約 14°C/分）以上になつて始めて氷點の分離する傾向がやゝ認められるに過ぎない。冷却速度が異なるため當然初凍結の際、組織内に生ずる氷の分布状態が異なるにも拘らず、再凍結曲線の型に變化の現はれない原因は、一度凍結し融解した組織内に於いては凍結の進行速度が速かなために、僅かの凍結様式の變化は恐らく隠されて了ふことに存するのであらう。従つて再凍結曲線の型から、初凍結で組織内に生じた氷の分布状態の差異を推定することは困難である。

## 文 獻

- 青 木 廉 1949. 馬鈴薯塊莖の凍結曲線. 低温科學, 第 2 輯.  
Chambers, R. & H. P. Hale 1932. The formation of ice in protoplasm. Proc. Roy. Soc. London, B., 110, 336.  
Luyet, B. J. & M. C. Gibbs 1937. On the mechanism of congelation and of death in the rapid freezing of epidermal plant cells. Biodynamica, No. 25.  
Luyet, B. J. & P. M. Gehenio 1937. The double freezing point of living tissues. Ibid., No. 30.  
Maximow, N. A. 1914. Experimentelle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot., 53, 327.  
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顯微鏡的觀察. 植動., 5, 1845.  
Walter, H. & O. Weismann 1935. Ueber die Gefrierpunkt und osmotischen Werte lebender und toter pflanzlicher Gewebe. Jahrb. f. wiss. Bot., 82, 273.

Kiyoshi AOKI: On the Shape of the Refreezing Curve of Potato Tuber.

#### Résumé

This paper deals with the problem what influence the cooling rate at the initial freezing exerts upon the shape of the refreezing curve of potato tuber. The refreezing curves (Temperature-Time Curve) were constructed with the temperatures taken by thermometer every 15 seconds during which freezing the cooling rate was kept constant (3.1 ~ 3.5°C per minute), as this is an important factor to determine the shape of the curve. The tissue pieces (5×5×14 mm) which had previously been completely frozen under various cooling rates (initial freezing) were thawed quickly under the same condition, and immediately after thawing they were frozen again at the definite cooling rate (refreezing). The shapes of the refreezing curves obtained in the above manner show invariably simple curves possessing single freezing point, and any evident difference is scarcely recognized. The single freezing point on the refreezing curve, however, comes to show merely a separative tendency when the cooling rate at the initial freezing has become greater than 14°C per minute.

The freezing curve of living tissue can be understood as the expression of temperature changes accompanied by freezing in tissues. Then the shape of freezing curve must be changed correspondingly to the mode of tissue freezing. When the cooling rate at the initial freezing changes, it should be naturally expected that distribution of ice formed in tissue is different and consequently distribution of water in the tissue also different after quick thawing, and that, as a result of this, the mode of tissue-freezing must be changed at the refreezing. In spite of this expectation, clear changes did not appear on the shapes of refreezing curves. This results may be explained as follows. It is true that after quick thawing the distribution of water in the tissue is different according to the cooling rate at the initial freezing. But we must remember that the tissue cells were almost all damaged by complete initial freezing and, on the other hand, that the freezing propagates very quickly from cell to cell in damaged tissue. So that if there is any minute change in water distribution in the tissue, changes of shape of the freezing curve caused by change of the mode of tissue freezing should be covered and rendered indistinct by quick propagation of the freezing in tissue. For this reason it should be hardly expected that the distribution of ice in the tissue at the initial freezing can be inferred only from changes of the shape of the refreezing curves.