



Title	生物の凍結過程の分析 : II. 植物組織の凍結過程の顕微鏡的観察
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo
Citation	低温科学, 3, 229-246
Issue Date	1950-12-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17437
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_p229-246.pdf



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*

朝比奈英三

(低溫科學研究所 生物學部門)

(昭和 22 年 1 月受理)

I

生物體の凍結に就いては從來少なからざる研究が爲されて來たが、その多くは凍結現象の終了後の状態若くは凍結の結果現はれた事物を取扱つてをり凍結しつゝある細胞又は組織の觀察は甚だ少ない。Molisch (1897) の凍結顯微裝置に依る實驗で生物組織の凍結が顯微鏡下で觀察され、其の後主に植物を材料としてその凍結過程は大分明らかにされるに至つたがその結果に對する解釋には異論が少くなかつた。(Maximov 1914, Schander and Schaffnit 1919, Iljin 1933, Luyet and Gibbs 1937, 小野田 1937)。その原因の一つは用ひられた裝置の不完全とそれに基く技術上の問題即ち材料の過度の過冷却及び冷却速度の不定なこと等に因ると考へられる。元來凍結過程はその冷却速度に影響されるところが甚だ大きいから之が不明瞭な實驗を比較論議する事は無意味である。著者は 1943 年先づ Molisch の裝置を改良して本研究に着手したが其の後低溫實驗室内に Chambers 等 (1932) の裝置に近いものを設け得たので、生物體の各種の凍結過程を詳細に觀察する事が出來た。茲には先づ 1945 年に青木教授の仕事と平行して行つた蔬菜柔組織の凍結過程を記載する。

本文を草するに當り常に變らざる御懇導を賜りつゝある青木廉教授に親愛を以つて感謝の意を表し度い。

材料の入手に當つては北大農學部島善隣教授より御援助を賜り、又北大理學部坂村徹教授には貴重なる文獻を貸與せられ、同じく松浦一教授、猪野俊平助教授には植物形態學教室より顯微解剖器を借用するに際し御高配を忝らした。茲に記して深謝する次第である。尙本研究は文部省科學研究費によつて行はれたものである。

II

裝置は大體 Chambers 等に慣つて製作した。即ち常時室溫 -20°C ~ -25°C 程度を保つ低溫室内に、木製二重板張りの小室を設け、電熱裝置と天井の引窓により室溫を定常ならしめ

* 北海道大學低溫科學研究所業績 第 48 號。

る。小室内机上には偏光顕微鏡と通常の生物用顕微鏡及附属装置、検流計用ラムプスケール、熱電對の零點容器等を置き、室内保温用の電熱装置に連る溫度調節器は顕微鏡に接して取付ける。顕微鏡の直前上部には棚を吊り材料其他を入れる恒温箱を置く。この箱の熱源には電球を用ひ調節器により $+5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ に保つ。

生物用顕微鏡は顯微解剖臺に載せたまま透明セルロイド張りの箱内に納める。この箱には底邊に沿つて電熱線がめぐらしてあり、且箱の右側面は扉になつてゐて天井には左右に引窓がある。顕微鏡の接眼鏡、粗動及微動装置と十字載物臺等の延長ハンドルは何れも箱外に突出し、對物鏡の廻轉子は箱外より金屬線を使つて廻轉せしめる。光源ラムプの光は飽和食鹽水を充した冷却フィルターを貫いて照射せしめる。接眼鏡にはレンズにグリセリンを塗り且鏡胴に薄い鐵板の圓筒をはめ、その上に巻かれたニクロム線を電熱してレンズ上に水蒸氣が凝縮するのを防ぐ。

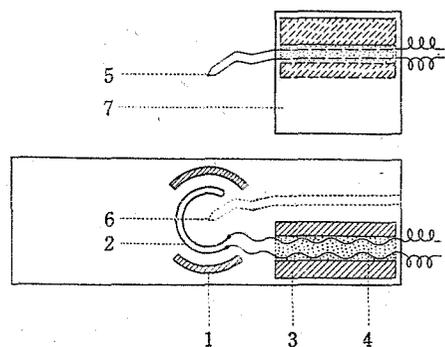
スライドガラスには特別な附属物を設けた(第1圖)。即ち懸滴ガラス用の脚として輪切にした高さ約 1cm の硝子管壁の二片を内側を向い合せてスライドガラスの中央部に固着する。この脚の中間に底面に近接して二重 U 字形に曲げた細いニクロム線を挿入し(之をマイクロヒーターと呼ぶ)、それに連る導線をスライドガラス上に蜜蠟で支持する。別に同じ幅のスライドガラスを約 $\frac{1}{3}$ の長さに切りその上に徑 0.12mm の線で作つた銅コンスタンタン熱電對を接端を 2cm 程突出させたまゝ蜜蠟で支持して置く。使用の際はスライドガラス上右側に熱電對の支持ガラスを薄板スプリングで固定し、カバーガラスを脚上に載せた時恰度熱電對の接端が懸滴に觸れる様にする。

熱電對接端には薄くワセリンを塗り懸滴脚とカバーガラスの接面には流動パラフィンを塗る。懸滴脚の左側からは顯微解剖腕をさし入れる。

熱電對の示度は反照檢流計(島津製ガルソンバル型、感度 $60 \times 10^{-10}\text{A}$)を用ひてラムプスケール上に讀み、回路内に抵抗を約 300 オーム入れて 1°C が 50 目盛に相當する様に調節する。

電熱装置には總て摺動抵抗を入れる。マイクロヒーターのみは 12 ボルト直流を用ひ、0.1 乃至 1 アムペアの電流を通ずる。

かくして實驗中はセルロイド箱の扉を外しても懸滴の溫度を $0^{\circ}\text{C}\sim -9^{\circ}\text{C}$ の範圍では任意



第1圖 スライドガラス

1. 硝子脚 2. マイクロヒーター 3. 導線支持の爲の硝子片 4. 導線を支持する蜜蠟 5. 熱電對 6. 熱電對の使用時の裝置 7. 熱電對の支持硝子

の點でやゝ恒常に近く保つ事が出來た¹⁾。

室溫²⁾が變ると零點示度が影響を受けるので、熱電對の回路内の抵抗器や開閉器を小箱内に密封して出来るだけ之を防いだ³⁾。

III

材料には各種蔬菜の根莖、莖、葉、莢果、果實、子實等を用ひた。之等は青木教授の凍結曲線の實驗⁴⁾に使つた同じ個體より 10×5(mm)乃至5×5(mm)、厚さ $\frac{2}{3}$ mm 内外の切片⁵⁾を作り外側に附着した液汁を出来るだけ濾紙で除き流動パラフィンで完全に覆つて懸滴とする。

以上の操作を室溫で行つてから材料をシャーレーに納めて低温室に運び實驗に使用する迄前記の +5°C に保つてある恒温箱内に保存する。材料がこの箱内に在る期間は通常 2時間を越えないが、少くとも 8 時間以内ではその凍結過程及び原形質分離⁶⁾に異常を認めなかつた。

實驗開始に當つてはプレパラートを懸滴脚上に裝置し熱電對接端を流動パラフィン層を貫いて材料に接する。そしてこの接端部は視野内⁷⁾の左側に位置させて置く。材料の大きさ、形等の不同の爲その冷却速度も異つて來るので、セルロイド箱底の電熱線及マイクロヒーターにより材料の冷却速度を毎回大凡 4°C/分 に調節する。冷却速度は便宜上 -1°C より -3°C 迄移行するに要する時間を測つて定めた。

次にこのプレパラートを凍らせるのであるが、このまゝでは冷却速度を著しく大きくしない限り少くとも -10°C 迄は過冷却を破る事は難かしい。それ故前述の冷却速度で -4°C に達した時植氷⁸⁾を行つて凍結を開始させる。之にはマイクロニードルの先端に良く洗つた細い綿糸を蒸溜水に浸して豫め凍りつかせておき⁹⁾、之を流動パラフィン層を貫いて材料の一端に觸れさせるのである。

偏光顯微鏡の方は上記の如き加温裝置を施してないから室溫を適當に調節して使用した。

IV

- 1) ±0.1°C 程度。
- 2) 以下室溫とは常に小室机上の氣溫を指す。
- 3) 通常一回の實驗中室溫の變化は 1.5°C を越えず、その間の零點示度の移動は常に 1 目盛以下であつた。
- 4) 青木 (本誌所載)。
- 5) 切片は總て材料の長軸に平行に切つた。この方法でシロウリ、トマト等の如き細胞が大形のもので一層乃至二層の無傷の細胞が得られる。
- 6) 1M 蔗糖溶液を使用する。
- 7) 12×10 の倍率で視野の廣さは對稱物の表面直徑 1.3mm の範圍である。
- 8) inoculation of ice.
- 9) 先端の太さ 100 μ 程度以下。

一般に組織片が凍結する場合、氷晶は先づ周囲に附着してゐる細胞液中に現はれるが、之がそのまま生きて細胞の内部に迄擴大するものではなく、細胞が或程度氷の侵入を阻止することは既にしばしば述べられてゐる。而してその極端な場合は flashing と呼ばれてゐる様に細胞が充分過冷却されて後始めて内部に瞬間的に多量の氷の發生を見る様式で、出來た氷は甚だ多數の氷晶に分れてゐるのが常である。この様な細胞凍結の様式を茲ではフラッシュ型 (flash-type) と呼ぶ。そしてフラッシュ型以外の細胞凍結の様式を總括して非フラッシュ型 (nonflash-type) と呼ぶ事にする。後者の型の細胞では内部に於ける氷の成長がそれ程急激でなく、その氷は通常數頭に分れて伸長し内部を埋め盡した後は比較的短時間で互に融合して殆んど一様に近い構造の氷となる場合が多い。又非フラッシュ型の場合は内部凍結に先立つて、既に細胞外で始まつてゐる凍結の爲に、細胞膜を通じて相當量の細胞液が脱水され外部の氷晶の成長を助ける。勿論フラッシュ型の場合でも細胞の凍結に先立つて脱水が起るがその量は非フラッシュ型の細胞に比べれば甚だ僅かである。

蔬菜の細胞の凍結様式は大體上述の二つの型に分けられるが、以下先づその代表的な例として白瓜及びキャベツに就いて夫々組織片の凍結過程をやゝ詳細に記述しよう。

尙材料の生理的條件の差異により同一種の蔬菜でもいつも同じ凍結過程をとるとは限らないが、同時季、同状態の材料では冷却速度に若干の相異があつても相等しい凍結様式を示し、且その温度變化の形式も全く同様で、凍結に伴ひ各個の現象が起る温度にも大差がなかつた (第1表)。

第1表 材料キャベツ

冷却速度	2°C/	16	25	28	30	40	50	62 秒
凍結温度 ¹⁾	最高極點	78	80	75	75	86	68	77
	細胞凍結點	96	93	92	95	90	85	84

1. キャベツ

材料：中生種、充分成長せるもの、表面より四、五層内部の葉の中肋を用ふ。細胞²⁾ 160 μ × 90 μ 内外、細胞間隙³⁾ は細く多數ある。

凍結過程：第2圖、9月22日、室温 -10°C ~ -8.5°C、冷却速度 2°C/28 秒。

植氷後數秒間に氷餅狀の氷が薄く表面を覆ふ。氷は引續き組織内にも擴がつて行き、溢出した液汁がしきりに流動し、表氷は次第に厚さを増す。細胞間隙は變形し、その中の空氣は追出され氣泡となつて表氷の下を移動する。細胞間隙中にも細かい氷晶が現はれるが、その發生は

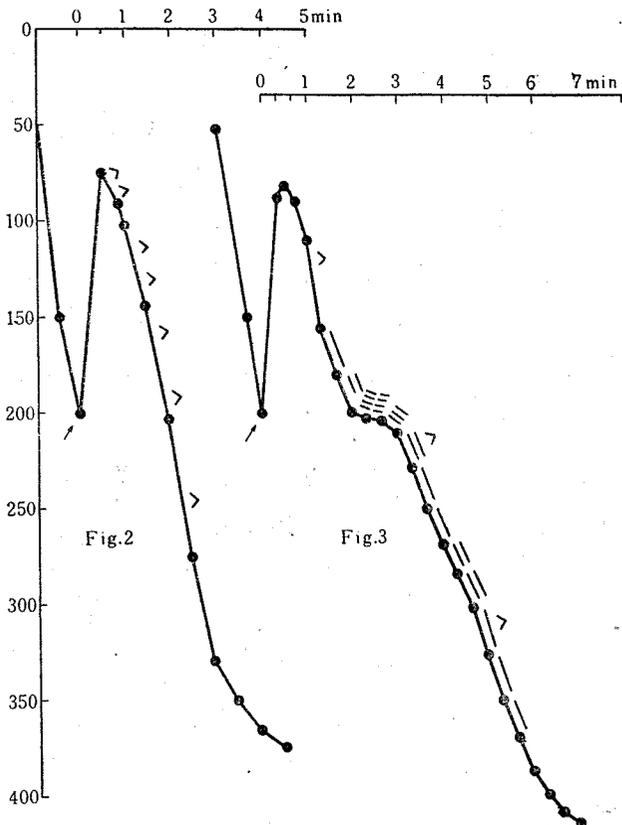
1) 凍結しつつある切片の温度をスケールの読みで表はす。0 が 0°C、50 が -1°C、100 が -2°C に相當する。

2) 柔細胞の形は廻轉橢圓體に似たものが多い故本文には便宜上長徑と短徑の概略を記載する。

3) 切片の切口に於ける状態を意味する。

むしろ突然で、表氷の伸長と連続的に氷が間隙中に入りこむのではない。

次いで氷は細胞内にも侵入する (50 秒後, 92)¹⁾。即ち細胞壁の一隅より突然鈍頭の氷が伸び始め分枝し又は分枝せずに擴大し、一つの細胞を埋め盡すのに約 3 秒を要する。この時細胞の内部は従前よりやや暗化する。かくして細胞は次々に凍つて行くが、隣接する細胞に移る時は、常に僅かの休止期を挟み、しかる後次の細胞の凍結が始まる。凍結の進むにつれ一個の細胞の凍結に要する時間は次第に短くなつてくる。又上面観では必ずしも位置的に連続せず、一つの間を置いた先の細胞が次に凍る場合もある。かかる細胞の凍結は 1 分 30 秒 (145) より 2 分後 (205) にかけて最も盛に見られ、250 に冷却する迄に殆んど終り 2 分 30 秒後 (275) では最早總ての凍結が終了し、視野内には全く動きを認めなくなる (第 2 圖参照)。



第 2 圖 キャベツ 冷速 28 秒, 室温 $-10^{\circ}\text{C} \sim -8.5^{\circ}\text{C}$
 第 3 圖 シロウリ (A) 冷速 35 秒, 室温 -8.5°C , 縦軸は温度 (スケールの読み), 横軸は時間 (分), 矢印は植氷点, \wedge 印は気泡の移動, 傍線はフラッシングを意味し, その数は頻度の大小をあらはす。

材料の温度は植氷の 30 秒後最高 (75) に達し次の 30 秒間はやや緩徐に、以後はほぼ一様に降下して下ふ。

2. シロウリ

材料 A: 相當過熟の果實, 表皮は黄色を帯び内部は柔かくなり始めてゐる。果肉 (中果皮) の中央部を用ふ。細胞 $270\mu \times 230\mu$ 内外, 細胞間隙は大きく且多い。

凍結過程: 第 3 圖, 9 月 7 日, 室温 -8.5°C , 冷却速度 $2^{\circ}\text{C}/35$ 秒。

十數秒で表凍²⁾は終る。引續き組織内にも氷が擴大されるのでその部分は暗化して行く。1

1) 植氷時より起算せる時間と其の時の材料の温度。この温度は總てスケールの読みで表はす。

2) 切片の表面が一應氷膜で覆はれた状態を指す。

分後には細胞間隙にも細かい氷晶が現はれ、気泡の変形も少しは見られる。1分20秒後フラッシングが始まる。之は細胞の内部が瞬間的に無数の微細な氷晶で埋められ乳濁状に暗化するので甚だ明瞭に識別出来る。始めの中は一つの細胞がフラッシュするのに約0.5秒を要し、ジワリと乳濁する様な感じであるが、次第に速やかとなり2分後には0.2秒以内でパッと暗化してしまふ。フラッシングの頻度も冷却につれて次第に高くなるが2分後急に増加し、次の1分間は殆んど連続的に起り以後やゝ急に衰へるが5分後迄は同一視野内に1分間八、九回の頻度で起りその後は遙に少なくなり散發しつつ更に40秒程續いて凍結は完了する。フラッシングが始まつて後、組織内に於ける気泡の動きは明瞭ではなく、殊にその移動は認め難い。フラッシングの傳搬は通常隣接細胞へ順次に移るものではなく、始めは散在した個々の細胞にフラッシングが起り、次にそれらの中間にある細胞が集團的にフラッシングを連發する。之には先づ數個の細胞よりなる一團の細胞が相接してフラッシュし、ごく短い休止の後次の一團が又フラッシュすると言ふ様に不規則な頻度を以て凍結は擴がるのである。

材料の温度は植氷後急激に上昇するが表凍が終つた後も更に昇り30秒後組織内部が暗化しつつある最中に最高(80)に達する。やがて温度は降下を始め、次に起る気泡の変形移動の際には殆ど影響が現はれないが、フラッシングが始まると明らかに降下は緩やかになり植氷後2分より3分迄の最も頻發する區間では殆んど下らなくなる。この後温度は再び相當の速さで下降するが、フラッシングの頻度が少しでも高くなるとその影響はかなり鋭敏に現はれる。即ち273と305の間では20秒に5回の頻度で、その前後の20秒に3回より多い爲傾斜が若干緩んでゐる。5分後フラッシングは殆んど終り、この後の僅少な散發は温度の變化の上には現はれて來ない(第3圖參照)。

材料 B: 未熟の果實、表面は綠色で果肉は未だ固い。細胞は A に比し僅か乍ら小形で細長く、細胞間隙は A よりやゝ少なく且小さい。

凍結過程: 第4圖, 9月15日, 室温 $-9^{\circ}\text{C} \sim -8.5^{\circ}\text{C}$, 冷速 $2^{\circ}\text{C}/33$ 秒。

最初の中は殆んど A と同様で、40秒後温度は更に高く52迄昇つておもむろに下り始める。1分20秒後(67)非フラッシュ型の凍結が始まり僅か遅れてのろいフラッシングも起り出す。温度の降下も之に伴つてぐつと緩やかになる。かくて細胞は連続的に凍つて行くがフラッシングは決して連發する事なく、大部分は非フラッシュ型の凍結である。3分後(120)細胞の凍結は甚だ衰へ温度は急に速やかに下り始める。フラッシングの速さは尋常¹⁾となるがその頻度はずつと低くなる。約4分後(200)非フラッシュ型の凍結は全く見られなくなり、4分20秒後(265)にはフラッシングも殆んど終り、5分後(345)視野内には全く動きを認めなくな

1) 0.2秒以内で一細胞が凍結する。

る。

3 キウリ

材料：食用適期の果實，表皮は綠色で未だ黃色味を帯びず，中果皮を用ふ。細胞 $230\mu \times 190\mu$ 内外，細胞間隙の程度は未熟白瓜のそれに近い。

凍結過程：8月10日，室温 -6°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/60$ 秒

様式は未熟の白瓜に似て温度が30秒後最高(715)に達して後間もなく組織内に液汁と氣泡の移動が起る。1分15秒(125)以後フラッシングが始まつて次第に盛になり，1分45秒より2分にかけて(150~160)最も相接して起るが，位置的にはバラバラで決して集團的には連發しない。温度の降下は氣泡の移動が始まると少時ゆるむが直ぐに以前の状態に戻り，その後は後述するタマネギの温度變化(第5圖)に似てフラッシングが盛になるにつれ再びゆるやかとなり，その衰へると共に又急降する。5分後(252)フラッシングは全く終り氣泡の動きも殆んど見られなくなる。

4 カボチャ(品種名 竹内)

材料：完熟後一ヶ月餘貯藏せる果實，中果皮を用ふ。細胞 $180\mu \times 120\mu \sim 120\mu \times 120\mu$ ，貯藏物質顆粒が液胞内の大部分を占む。細胞間隙は多いが小形である。

凍結過程：12月1日，室温 -9°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/32$ 秒

表凍は10秒で終り，30秒後温度は133に達しかなりゆるやかに下る。氷は組織内に侵入し約2分後氣泡の變形が見られ，間もなくその移動も始まり暗化は進んでゆくが3分30秒後(259)之等の動きは殆んど停止する。4分後(281)數個のフラッシングが見られ僅かの氣泡の移動も伴つて散發しつゝ約2分間續くがその速度は何れも遅い。又之等の現象は殆んど温度變化の上に影響を與へない。

5 タマネギ(品種名 札幌黄)

材料：完熟後約2ヶ月貯藏せる鱗莖，外側より4枚目の鱗葉を用ふ。細胞 $360\mu \times 360\mu \sim 90\mu \times 90\mu$ ，細胞間隙 大きく且長く連續す。

凍結過程：第5圖，12月22日，室温 $-9.5^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 冷速， $2^{\circ}\text{C}/37$ 秒

始めの中は過熟の白瓜に似てゐるが氷の伸長がのろく，温度も30秒で最高點(93)に達してからは白瓜より更にゆるやかに下り出す。2分30秒後(179)氣泡の動きが認められ3分後(227)始めてフラッシングが起る。之はかなりの頻度で約1分30秒間續き急に減少して1分間に2回乃至4回位となるが9分後(445)に於ても未だ散發するのが見える。温度の降下はフラッシング開始と共に急にゆるやかとなるが次第に急となり，4分30秒以後は殆んどその影響を受けない。

6 ザヤエンドウ

材料：食用適期の若い莢果の子實，子葉の内部を用ふ。細胞 $75\mu \times 70\mu$ 内外，液胞内の大部分を貯藏物質顆粒が占める。細胞間隙 小さく多數あり。

凍結過程：第 6 圖，8 月 11 日，室温 -8.5°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/38$ 秒

表凍はたちまち終り温度も 15 秒後最高 (144) に達する。30 秒後 (153) 既にフラッシングが始まり最初より隣接細胞に次々と間歇的に移り行き約 45 秒間は此の状態が續く。この間温度の降下は明らかにゆるやかとなるがフラッシングの頻度が低まるにつれ (1 分 15 秒, 180) 再び急降する。凍結は 1 分 45 秒後 (255) 殆んど終りフラッシングも起らなくなる。

尙同時期のエンドウの莢の柔組織では殆んどキャベツと同じ凍結様式を示し，表凍に 5 秒程遅れて (植氷後 15 秒) 既に細胞の非フラッシュ型凍結が連続的に始まるが，フラッシングは全く起らず 2 分 30 秒で凍結は全く終了する。

7 サ、ゲ (品種名 金時)

材料：莢食に適する若い莢果，莢の内側に當る多汁質の半透明層を用ふ。細胞 $135\mu \times 70\mu$ 内外 細胞間隙は不明瞭ではあるが相當ある様に見える。

凍結過程：8 月 23 日，室温 -8°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/30$ 秒

表凍は 5 秒位で終る。この時氷の多くは細胞壁に沿つて伸びるが，伸び終ると相接して小形の氷餅となる。30 秒後組織内に氣泡の移動が僅かづつ認められ 45 秒後フラッシングが起る。初めはのろい散發で次第に盛になり 2 分以後 4 分迄 (250 内外) 最も頻發するがその頻度はエンドウの子葉に比べやゝ劣る。位置的には連続し隣接せる細胞が一，二秒の間を置いてフラッシュして行く。温度の變化は 20 秒後 90 に昇りフラッシング開始迄は急降する。2 分後より 2 分間續くフラッシング連發時には著しくゆるやかとなり凍結が衰へると共に又急降する。

8 トマト

材料：未熟の果實，表皮も果肉も綠色で固い，中果皮を用ふ。細胞 $300\mu \times 200\mu$ 内外，貯藏物質顆粒は大形 ($15\mu \times 25\mu$ に達す) で液胞内の一隅に片よる，細胞間隙は小形で多數ある。

凍結過程：8 月 10 日，室温 -8.5°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/42$ 秒

表凍後組織内に僅か乍ら氣泡の動きが認められる。温度は 1 分後 75 に達し非フラッシュ型の凍結が始まるが更に 2 分後 (120) にはフラッシングも起る。その頻度は甚だ少なく最初は 30 秒に 1 回位で 3 分後やゝ増加するがやはり散發の程度で非フラッシュ型凍結と共にこのまま數分間續いて凍結は完了する。温度の變化は未熟の白瓜に似てフラッシングの影響は更に少ない。

尙同じ未熟のトマトでも季節過ぎて未だに色づかぬ所謂ウラナリの果實では，その凍結過程はタマネギに似て，それよりも更にフラッシングの頻度が高い。かゝる材料では細胞の大きさも大きくなり，内部の貯藏物質顆粒が甚だ減り細胞間隙が大きく，細胞の隔壁も薄くなつてゐる。

る。

9 ナス

材料：食用適期の果實，中果皮を用ふ。細胞 $135\mu \times 90\mu$ 内外，細胞間隙はほぼ細胞と同大で數も多い。

凍結過程：第7圖，8月23日，室温 -7°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/60$ 秒

表凍に引續き組織内の液汁が流動し，直ちにフラッシングが始まる。之は植氷後20秒より30秒(83)にかけて，恰度温度が最高點に達し將に下らんとする時期に最も頻發するが，温度の上には明瞭な影響は現はれない。ナスのフラッシングは之迄述べた場合とやゝ異なり，乳濁暗化の程度が少なく，其の移行も他の材料のフラッシング程間歇的ではなく非フラッシ型に類似してゐる。又位置的には全く連続で隣接細胞が順次に凍つて行く。40秒後(97)フラッシングは殆んど終り1分10秒後(138)に只1回のフラッシングが起つたが以後視野内の動きは全く終了した。

10 エンジン (品種名 五寸エンジン)

材料：食用期の根身を用ふ。細胞 $70\mu \times 50\mu$ 内外，細胞内に黄色の油滴が散在し，大きいのは徑 20μ に達す。細胞間隙は散在し細胞と同大又はそれ以上のものも少くない。

凍結過程：8月25日，室温 -9°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/22$ 秒

表凍に引つゞき組織内の暗化に伴つて氣泡の移動が始まる。この時大部分の細胞は非フラッシ型で凍る。間もなくフラッシングも起るが甚だ少數で散發するに過ぎない。1分後(272)すべての動きが止み凍結は終了する。温度は35秒後最高(125)に達するがその直後に起るフラッシングの影響は全く認められず直ちに急降してしまふ。

11 ビート (甜菜)

材料：若き根身を用ふ。細胞 $120\mu \times 90\mu$ 以下，細胞間隙 小さいが數が多い。

凍結過程：8月29日，室温 -7°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/40$ 秒

表氷の成長は遅く， $1\text{mm}/2$ 秒位の速度で伸び，表凍を終るのに20數秒を要する。その氷晶は角のまるい氷餅で他の根菜類のそれに比し小形である。温度は30秒後最高(120)に達し以後は單純に下降し，その形式はナスに近い。1分30秒後(174.5)氷は組織内にも侵入し非フラッシ型凍結を起し暗化して行く。2分30秒後(177)かすかな氣泡の動きを伴つてフラッシングが始まるが，甚だ散發的で僅か數回しか認められず，4分30秒(280)後には之も止み，6分30秒後(300)には全く凍結する。

12 ホーレン草 (品種名 西洋丸葉)

材料：未だ抽莖せざる充分生長したもの，大型の葉の中肋を用ふ。細胞 $120\mu \times 100\mu$ 内外，細胞間隙 細いが數多く連なる。

凍結過程：6月26日，室温 -7.5°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/34$ 秒

表凍は速やかに終り，間もなく組織の暗化と共に細胞間隙にも氷を生じ氣泡の變形が見られ温度は45秒後最高(95)に達する。1分後(140)細胞も凍り始めるがその氷は非フラッシュ型で，細胞の一隅又は二，三個所から大形鈍頭の氷が伸びて全細胞に擴がる。之は殆んど連続的に進み，1分40秒後(240)には氣泡の動きも止み，凍結は終了する。この間の温度の變化はキャベツの形式と殆ど變らない。

13 キクイモ

材料：若き塊莖を用ふ。細胞 $150\mu \times 45\mu$ 内外。細胞膜の兩側に 5μ 程の厚さの附着物あるものが多い。細胞間隙は不明瞭である。

凍結過程：8月30日，室温 -8°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/35$ 秒

表氷は樹枝状にのびるが表凍が終ると氷餅状に變る。1分後組織内も暗化し始め氣泡の移動が少しづつ見られ間もなく細胞内にも氷が侵入する。之はすべて非フラッシュ型の氷で2分乃至3分後(200~240)にかけて最も連続的に次から次へと隣接せる細胞が凍つて行く。4分後(320)極く稀に一，二のフラッシングを認めるがやがて凍結は完了する。温度の變化はキャベツのそれと同型でフラッシングの影響は全く現はれない。

14 ダイコン (品種名 宮重)

材料：收穫期の根身，恰度地表面の高さに當る附近の内部を用ふ。細胞 $270\mu \times 80\mu$ 内外，細胞間隙は細かく散在してゐる。

凍結過程：10月19日，室温 -8.5°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/29$ 秒

表凍は直ちに終り30秒後温度は62迄昇りおもむろに下り始める。表氷は次第に厚く，暗化して行き，その下をしきりに液汗が流れる。2分30秒後(95)組織内に氣泡の移動が始まり，4分後(106)迄甚だ盛で以後急にかすかになるが更に1分間はつき凍結は完了する。細胞の凍結は氣泡の移動に前後して始まり非フラッシュ型の氷が認められるがこの時表氷も甚だ厚く發達して來る爲一様に暗化し内部の變化は次第に不明瞭となる。温度變化の形式は次に述べるムラサキカブAと全く等しく，最高部からの降下は更にゆるやかに始まる。

15 ムラサキカブ (品種名 札幌紫)

材料A：秋播のもの，食用適期の根身。細胞 $180\mu \times 180\mu \sim 90\mu \times 90\mu$ 。細胞間隙多數見えるが細い。

凍結過程：第8圖，10月25日，室温 -8.5°C ，冷速 $2^{\circ}\text{C}/40$ 秒

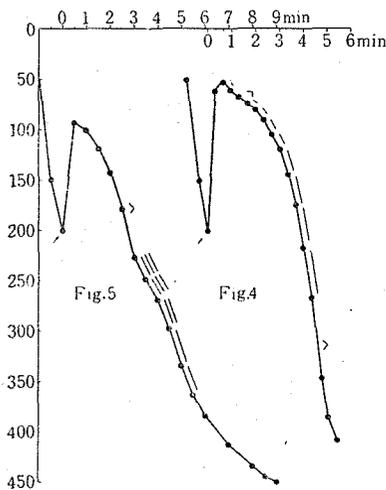
表凍は10秒以内で終る。氷は引續き組織内に侵入し次第に暗化して行くが，氣泡の動きは1分40秒後(94)初めて明らかに認められる。やがて氣泡はしきりに移動を初め(2分後，101)組織の暗化も進み約2分間續いて凍結は殆んど終る。5分30秒(337)以後視野内は

全く静止する、細胞の凍結型式はすべて非フラッシュ型で、氣泡の移動の最中に認められるがダイコンと同様に表氷が發達して來る爲甚だ見にくい。温度の變化は 30 秒後 82 に達し、おもむろに下る單純な曲線となつてゐる。

材料 B：春播のもの、收穫期を過ぎた過熟の根身。細胞 $140\mu \times 100\mu$ 内外、徑 6μ 内外の顆粒が現はれ液胞中に散在してゐる。細胞間隙 材料 A より太くなつてゐる。

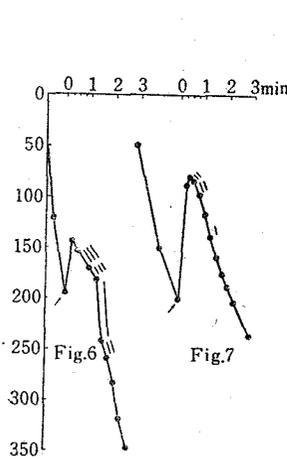
凍結過程：8 月 29 日、室温 -8°C 、冷速 $2^{\circ}\text{C}/40$ 秒

表凍は直ちに終り温度は 30 秒後最高 (85) に達する。この間組織内の暗化は次第に進み氣泡はしきりに追出される。1 分 10 秒後 (97) 細胞間隙にも細かい氷晶が次々に現はれ 2 分後 (133) にはフラッシングが起る。始めのうちのはのろく一つの細胞が 0.4 秒位かゝつて凍る。フラッシングの頻度は次第に高まり、2 分 30 秒 (164.5) より 3 分 (172) にかけて最も頻發し、3 分 45 秒後 (208) には殆んど終る。フラッシングが始まる頃より氣泡の動きは衰へ 6 分後 (285) には全く静止し茲に凍結は終了する。温度の變化はタマネギのそれに似てゐるがフラッシングの影響は更に著しく現はれ、むしろ過熟の白瓜の形式に近よつてゐる。



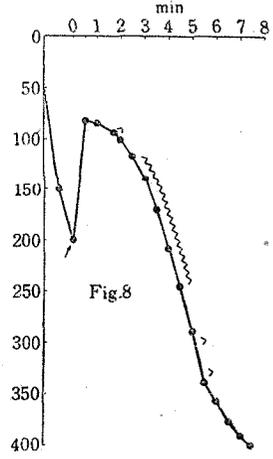
第 4 圖 シロウリ(B) 冷速 33 秒
室温 $-9^{\circ}\text{C} \sim -8.5^{\circ}\text{C}$

第 5 圖 タマネギ冷速 37 秒、室温
 $-9.5^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$



第 6 圖 エンドウ冷速 38 秒
室温 -8.5°C

第 7 圖 ナス冷速 60 秒、室温
 -7°C



第 8 圖 ムラサキカバ(A)
冷速 40 秒、室温 -8.5°C

V

前述の凍結過程を過去の知見と比較すると、多大の相異が認められる。之は從來の觀察に於ては、冷却速度が小さかつた爲、若しくはそれが大きくとも植氷しない爲甚だしく過冷却させてゐる事、及び材料には主として表皮細胞が使用されてゐた事等の理由により必ずしも同様に

論ずる事は出来ない。殊に材料の凍結温度¹⁾(第2表参照)が従來の結果より遙に高い事は明らかに上記の理由に依るものである。以下蔬菜の凍結過程を総合的に考察するに當り先づ使用された材料を大體フラッシングの頻度の順に表示して見る。この中1, 2はフラッシングが最も多く白瓜(過熟)では集團的にも起る。尙本文には記載しないが馬鈴薯塊莖も之に近い凍結様式を示す。3~6のフラッシングの頻度は之に次ぎ, 7, 8では遙に減つて非フラッシ型の凍結が混じり, 9~13は大部分が非フラッシ型でフラッシングは僅少散發するに過ぎない。但しナスは前述の如く特異なフラッシングをする。14~17は完全に非フラッシ型のみである。以上を通覽すると所謂耐寒性の大きな(hardy)植物が殆んど非フラッシ型であるのに對し, 耐寒性の無い(nonhardy)ものは總てフラッシ型に屬すると言ふ結果になる。これは甚だ興味深い事實であるが茲では單にそれを指摘するに止め詳論は後日に譲る。尙カボチャ, ビート, ニンジンの如く含水量の少ないもの及びエンドウ, ホウレン草の如く小形の切片しか得られぬものでは表面に附着してゐる細胞液が少ない爲温度の最高極點が他の材料に比べて低く現はれ

第 2 表

	材 料	温 度 ¹⁾		冷 速 ²⁾ (秒)	細胞凍結型 ³⁾
		最 高 極	細胞凍結開始		
1	シロウリ(過熟)	80	160	35	fl
2	ムラサキカブ(過熟)	85	133	40	fl
3	タマネギ	93	227	27	fl
4	エンドウ(子實)	144	153	38	fl
5	サ、ゲ(莢)	90	192	30	fl
6	カボチャ	133	281	32	fl
7	キウリ	71.5	125	60	fl
8	シロウリ(未熟)	52	73	33	fl+non
9	トマト(未熟)	75	120	42	fl+non
10	ナス	80	80	60	(fl)
11	ビート	120	177	40	non+fl
12	ニンジン	125	135	22	non+fl
13	キクイモ	—	185	35	non+fl
14	ホウレンサウ	95	140	34	non
15	ムラサキカブ	82	94	40	non
16	ダイコン	62	95	29	non
17	キャベツ	75	92	28	non

1) 数字はスケールの読みを表はす

2) -1°C より -3°C 迄下るのに要する時間

3) fl: フラッシ型, non: 非フラッシ型

1) 之は勿論眞の水點を意味するものではない。

てゐる。

植氷により切片の表面に附着した液汁が先づ凍る。之は充分過冷却された場合には甚だ急速に結氷し、それ程ではない場合、例へば液の氷點が低いビート等では羽毛状又は樹枝状の氷晶がおもむろに植氷點よりのびひろがる。

附着した液が少い時は、氷は側壁をなす細胞膜の上にそつて先づのびて行く事が多く、小野田 (1937) もアオミドロや蘚で之を觀察してゐる。しかし特に非フラッシュ型の凍結の場合にはこの事よりも、後になつて細胞の全表面に氷が析出する過程の方が著しいのを常とする。氷の伸長が進むと一旦多數の氷晶に分斷されるが之が更に成長すると相接して、完成した表氷の形は常に氷餅状となる。

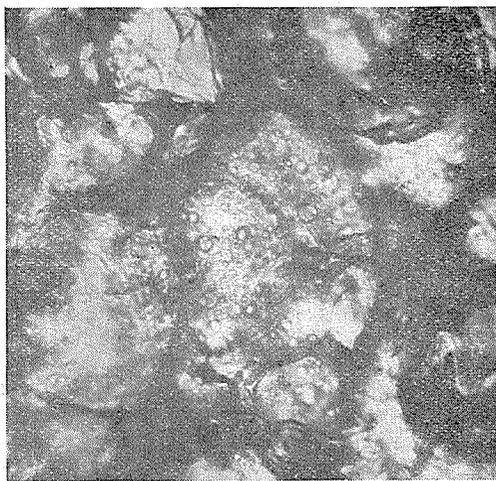
切片の温度は凍結の進行につれ放出される潜熱の爲急激に上昇するが、之は表面が一應氷膜に覆はれた後も更に續き、氷晶が組織内に侵入し、又表氷自身もその厚さを増しつゝある最中に最高の極點に達する。

凍結に當り組織内で最初に氷が現はれる場所は細胞間隙ではなくて、本實驗の條件では切片を作る際傷つけられた細胞が先づ凍る。この事は組織を中性赤で生體染色して凍らせると表凍直後の組織内の凍結は染色された細胞には全く觸れずに進行する事實からも裏書きされる。この時未だ凍つてゐない負傷細胞はしきりに脱水されその水により表氷は更に厚く發達する。又生きた細胞でもそれ自身凍結する迄は内部より脱水され、特に非フラッシュ型の凍結をする材料では甚しい。例へばダイコン、ムラサキカブ A、等では表凍後細胞が凍結してしまふ迄表氷の下でしきりに液汁の流動するのが認められ、キャベツでは表氷が各細胞の直上に大きく析出する事が稀ではない。又冷却速度を小さくすると脱水は更に甚しくなり、Maximov (1914), Iljin (1933) 等が述べた様に細胞は明瞭に收縮する。そして細胞自身も甚だ凍りにくくなつて來る。しかし非フラッシュ型凍結をする細胞でも、冷却速度が大きいと細胞の凍結が早められ、その爲生細胞よりの脱水は僅少に止められる。

組織の凍結による膨脹に伴ひ、細胞間隙は壓縮されて變形しその中の空氣は氣泡となつて追出される。勿論細胞の凍結が完了する迄は細胞間隙の内側にも氷が析出されて來るが、切片の急速凍結に於ては之は微細な氷晶を形作りむしろ少量に過ぎないから殆んど氣泡を追出すには至らない。

やがて生きた細胞も凍り始めるがその様式は既述の如くフラッシュ型又は非フラッシュ型である。この前者は急速冷却による細胞の凍結様式として從來より各種の表皮細胞で知られてゐるが、柔細胞のフラッシングは表皮細胞の場合とは相當異なつた結果を現はす。即ち表皮細胞ではフラッシングの直後細胞の内部が濃縮された細胞液を主とする無數の液滴とその間を埋める微細な氷晶によつて充されるのに對し、多くの柔細胞では殆んど球形に近い氷の微粒が一様に

透明な大きな氷塊の中に一面に象眼された状態で埋められてゐるのである¹⁾ (第9圖)。



第9圖 トマト 冷速40秒, -1°C で植氷, -1.4°C でフラッシュせる細胞を示す。周囲にある透明な細胞は凍結前既に死んでゐたもの。
 $\times 100$, -10°C に保ち2日後撮影。

非フラッシュ型の凍結については Schander 及び Schaffnit (1919) がキャベツやカブで之に似た凍結を報告してゐるが、それによると少くとも -5°C 以上では内部凍結が始まつても直ちに明瞭な害は認められぬとの事である。しかし本実験では細胞内部の凍結は何れの場合でも常に致命的であつた。

さて非フラッシュ型の凍結は通常負傷細胞の凍結の進行に僅か遅れて始まるが、その速度はのろく、トマトの如く大形²⁾の細胞では1個の細胞の凍結が終了するのに6,7秒かかる場合も少くない。氷が組織内に侵入した時から認められてゐた気泡の移動は最初は主として負傷細胞の凍結膨脹に因るものであつたが、非フラッシュ型の凍結が始まると更に著しくなる。フラッシュ型の場合は之と異り、組織内の凍結が相當に進み、気泡の移動も亦殆んど終つた後に始めて生細胞にフラッシングが起る。フラッシングが頻發すると細胞間隙の變形はやはり明らかに認められるが、気泡の移動はむしろ不明瞭である。之は気泡の周圍に在つた細胞液が既に凝固してしまつてゐる爲であらう。

細胞内で氷が成長する時は最初の中はどの細胞の中でも同じ方向に伸びる場合が多く、殊に非フラッシュ型では植氷後相當の長い間次々の細胞の中で同じ方向に氷が擴大する。フラッシュ型では始めこそ同じ方向に一つ一つ幕を引く如く個々の細胞毎に暗化して行くが、間もなく一つの細胞のフラッシングが視野の右側に向つて起ると、次の細胞では左側に向ひ或ひは又下側に

1) この凍結過程については後日詳報する。

2) $300\mu \times 500\mu$ 以上に達する。

向ふと言ふ様にその方向性は全く亂れる。同時に氷が最初現はれる場所も細胞内の一局部に限られなくなり、冷却が進むと細胞の兩側或ひは全周から暗化が發進する。之等の現象は細胞内容の過冷却が甚だ進んでゐる事を意味してゐる。

Luyet 等 (1937) はタマネギの表皮細胞に於てフラッシングが間歇的に傳搬する理由は細胞膜によつて植氷が阻止される爲であらうと述べてゐる。確かに死細胞の場合でも過冷却の程度が小さければ凍結の傳搬は必ずしも連続的ではなく、むしろごく短いとは言へ或休止期を挟むのが常である。しかし生細胞の場合には個々の細胞毎に起るフラッシングがきはめて明瞭に獨立し、冷却速度を小さくすればかなり過冷却させても上述の休止期を相當に延長させる事が出来る。それ故凍結の間歇性は生命の無い細胞膜よりも、生きてゐる原形質そのものにその作用の大部分を歸すべきであらう。動物細胞に於ても既に蛙の筋肉を材料として生きて細胞の原形質膜が内部への凍結の進行を阻止する事が明らかにされてゐる。(Chambers and Hale, 1932).

小野田 (1937) はヒロクチコマケ及びムラサキオモト、ムラサキツユクサ等の表皮を用ひてフラッシングを觀察し、凍結による體積膨張の壓力又は夫による衝動が隣接細胞の凍結を引起すと考へた。しかし表氷がはりつめてゐる時でも過冷却が甚しくない限り²⁾細胞をマイクロニードルで烈しく振動させて内部の凍結を引起せるとは限らず、まして細胞の外側に氷が接してゐないときは細胞膜を突き破つてさへ過冷却を破る事は全く不可能であつた。

生細胞の凍結は又當然切片の溫度曲線を變化させるが非フラッシン型では氷の伸長がのろい爲單位時間に發生する潜熱量は少く、頻度が大きい場合でもこの實驗の條件下では殆んど冷却速度を變更させる様なことはない、しかしこの場合は前述の如く非フラッシン型の凍結が起る前に生細胞内部からの脱水により表氷が更に厚く發達するから、溫度曲線の最高極からの下りはじめが甚だゆるやかとなる(第8圖)。之に對しフラッシン型では充分過冷却してから突然凍る爲潜熱の遊離は急激で、その頻度が大きいときは溫度の降下は突然ゆるやかになり(第3, 第5圖)、時には溫度が上昇する事さへある。著者は冷却速度を少くしてキントキサ、ゲの凍結を觀察中、熱電對接端に接した一細胞のフラッシングの際溫度が瞬間的に約 0.04°C 昇るのを認めた事がある。

尙第二表に明らかな如く同一の組織を形作る細胞の凍結様式がフラッシン型及び非フラッシン型の何れか一方のみであるとは限らず、その双方を夫々異なる程度に併せ持つものも少くない。勿論この二つの型は嚴密に區分され得るものではなく、ナスの如く中間的な性質を表はす細胞

1) 10 分間又は 60 分間に 15°C より -10°C 迄冷し、1 時間乃至 24 時間の後自然に過冷却の破れるのを待つ。

2) 白瓜の細胞では約 -6°C 以上。但し細胞内に植氷すれば約 -0.4°C 以下ならば常に凍結が始まった。

もあり、この間には當然移行型が認められる¹⁾。又この二つの型の凍結様式は必ずしも材料に固定された性質ではなく、材料の状態により變化する事は既に述べたが、更に之は人為的にも變更可能である。例へば切片をごく低調の溶液に浸す事により、キャベツ、ダイコン等の組織に過熱の白瓜に似たフラッシングを起させる事も出来る。

最後に附言すべきは之等の柔組織の全般に汎つて、之を貫いて走る管束組織の存在である。管束の凍結は常に柔組織のそれに先行する。即ち表凍後に起る氣泡の動きは先づ管束部に見られ、フラッシングもこの部分を形作る細胞で行はれて後始めて周圍に在る柔細胞に起る。

従つて管束の場合はフラッシングに伴ふ氣泡の移動も相當活撥に認められる。又管束部のフラッシングは連發する場合が多いが、柔組織に比べて細胞が少なく且小形である爲遊離潜熱量は少ないとみえ、切片の温度には殆んど影響を認めなかつた。

摘 要

1. 各種の蔬菜を材料として急速冷却による柔組織の凍結過程を記載した。方法は材料の切片を一定の速度で冷却し、 -4°C に達した時表面に植氷して過冷却を破り以後の経過を材料自身の温度變化を記録し乍ら顯微鏡下に觀察した。
2. 先づ表面に流出してゐる細胞液が凍る。通常氷は脈狀、樹枝狀等の形でのびひろがり、しばしば隔壁をなす細胞膜に汎つて發達する。伸びた氷は常に一旦分斷されしかる後更に發達して氷餅狀となる。
3. 組織内で最初に凍るのは死んだ細胞又は傷つき損はれた細胞であつて、表面に出來てゐた氷層はそれからの脱水により更に厚く發達する。
4. 凍結開始と共に材料の温度は昇り表面の凍結が終つた後更に3の過程が進行しつゝある最中に極點に達して下り始める。
5. やがて細胞間隙にも氷が現はれるが微細且少量に過ぎず、周圍の細胞が凍結すれば最早生長しない。
6. 生細胞の凍結様式には明瞭に判別出来る二つの型がある。即ちフラッシ型と非フラッシ型の凍結で、後者は死細胞の凍結の進行に伴ひやゝ連続的に始まるが、前者は生細胞以外の部分の凍結が殆んど終つた後突然起る。
7. 生細胞も亦それ自身が凍結する迄は外圍の凍結の爲脱水され特に非フラッシ型凍結をするものに甚しい。
8. 組織の凍結膨脹により細胞間隙は壓縮變形されその中の空氣は追出される。

1) 赤熟せるトマトの果肉、ビート葉柄等の柔細胞にこの例を認めた。

9. 生細胞の凍結の傳搬は一般に間歇的で殊にフラッシ型の場合は著しい。之は細胞内容が相當過冷却する迄原形質膜によつて植氷が阻まれるものと考へられる。
10. 生細胞の凍結による放熱はフラッシ型の場合に限り明瞭に溫度曲線の上に認められる。
11. 材料によつてはその凍結過程中にフラッシ型及非フラッシ型を併有する場合が少なからず、又同一種でもその生理條件により異つた型式を採る例が見られ且之を人工的にも起し得た。
12. 管束組織は一般に柔組織に先立つて凍結し、フラッシングも早く起る。
13. 何れの場合も細胞自身の凍結は致命的であつた。

文 獻

- Chambers, R. and H. P. Hale 1932. The formation of ice in protoplasm. Proc. Royal Soc. London, Ser. B, 60, 336.
- Iljin, W. S. 1933. Über den Kältetod der Pflanzen and seine Ursachen. Protoplasma, 20, 105.
- Luyet, 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.
- Maximov, N. A. 1914. Experimentelle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot., 53. 327.
- 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. 植物及動物, 5, 65.
- Schander, R. and E. Schaffnit, 1919. Untersuchungen über das Auswintern des Getreides. Landw. Jahrb., 52, 1.

Eizo ASAHINA : Analysis of the Freezing Process of Living Organisms.

II. Microscopical Observation of the Freezing Process in the Parenchyma of Plants.

Résumé

The small sections (about three cells layer) of parenchyma of common vegetables mounted in thin hanging drops of liquid paraffin were subjected to freezing in a special thermostatt in the cold chamber, and their freezing process was directly observed under the microscope. The temperature of the section was read with a thermojunction during the observation every 20 seconds. The cooling rate was regulated as about 4°C per minute between -1°C and -3°C. The tissue was prevented from excessive supercooling by inoculation of a sharp ice needle when it was cooled to -4°C.

At first the cell sap that has overflowed from damaged cells, and then the interior of the injured cells freezes. During this period very small ice crystals are formed also on the cell wall facing the intercellular space, and do not grow furthermore when the surrounding cells entirely freeze. After these freezing, living cells begin to freeze. The types of freezing of living cells are distinctly classified into two types, i. e. flash and non-flash type. The former type is sudden freezing and occurs under sufficiently supercooled condition, and thus frozen cells are filled with a large number of sap droplets or sometimes minute ice spheres, and the space between them is packed with homogeneous ice mass. On the contrary, in the non-flash type, ice growing is slow and the ice formed in the cells is only a homogeneous mass. The grade of supercooling at which the non-flash type can be seen is lower than that in the flash type. During the freezing of tissue, sudden temperature changes caused by flashing of cells were distinctly recognized on the freezing curves.

Fruits of white melon and pumpkin, scale leaf of onion, pea and legumen of bean freeze in the flash type, while midrib of cabbage and spinach and root of turnip and radish show another freezing type. In many other vegetables such as fruit of tomato, root of carrot and sugar beat, both types of freezing are simultaneously observed, however, the proportion of the two types varies in the different kinds of vegetables.

The mode of cell freezing is strikingly influenced by external and internal conditions of the material. Ice formation in living cells was always fatal in the above related experiments.