



Title	生物の凍結過程の分析 III : 植物組織の凍結曲線上の二つの氷点
Author(s)	青木, 廉; AOKI, Kiyoshi
Citation	低温科学, 4, 65-77
Issue Date	1948-10-30
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17461">https://hdl.handle.net/2115/17461</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_p65-77.pdf



## 生物の凍結過程の分析 III. 植物組織の凍結曲線上の二つの氷点\*

青 木 廉

(低温科學研究所 生物學部門)

### I

植物組織の凍結曲線に氷点が二重になつて現われる例は多い。然しその現われ方にはかなりの變異があり、二つの氷点が明瞭に分離しているものから第2氷点に相當する部分が全く認められない場合まで種々の段階がある。此等二重の氷点の内、最初に現われる第1氷点は多くの場合一過性で不安定のものであり、其の時の組織の状態（細胞の膨壓の程度、組織小片の表面の状態、老若等）によつて非常に左右される。尙一度完全に凍結した組織を融解し再び凍らせた場合の凍結曲線、即ち再凍結曲線では氷点の二重性は完全に失われて了う。丁度稀薄溶液の凍結曲線によく似た型をとるようになる。然し此の氷点の二重性と云うものは決して生きている植物組織の特性ではない。氷点と云われる處では組織内における氷生成によつて遊離される潜熱と外圍に奪われる熱量が丁度均合つていてと考えられるので、兩者が等しい期間だけ曲線は一定の溫度を示すのである。従つて凍結曲線の型及び氷点の位置即ち氷点の溫度は其の時の冷却速度に左右されるのは當然である。ジャガイモ塊莖では Maximow<sup>8)</sup> Luyet & Gehenio<sup>7)</sup> 及び青木が<sup>2)</sup>、又 Zacharowa<sup>12)</sup> はコムギの幼根で、それぞれ此等氷点が冷却溫度によつて動かされることを既に報告している。

凍結曲線に現われる此等2つの氷点については既に色々な解釋が下されているが、其の論據は不十分であり、且つ此等の解釋と矛盾する事實もかなりある。一方組織の凍結過程については、斷片的にしか知られていなかった處に氷点の解釋が一致しない原因の一つがあると思われる。こゝ數年來の朝比奈の詳しい觀察<sup>9)</sup> によつて、組織の凍結過程はかなり具體的に明らかにされ、又凍結曲線の型と組織の凍結様式との關係も或程度明らかになつた<sup>3)</sup>。此等我々によつて得られた結果を基にして凍結曲線の二つの氷点の意味を検討してみたい。

\* 北海道大學低温科學研究所業績 第66號。本研究の費用は服部奉公會及び文部省科學研究費の援助による。

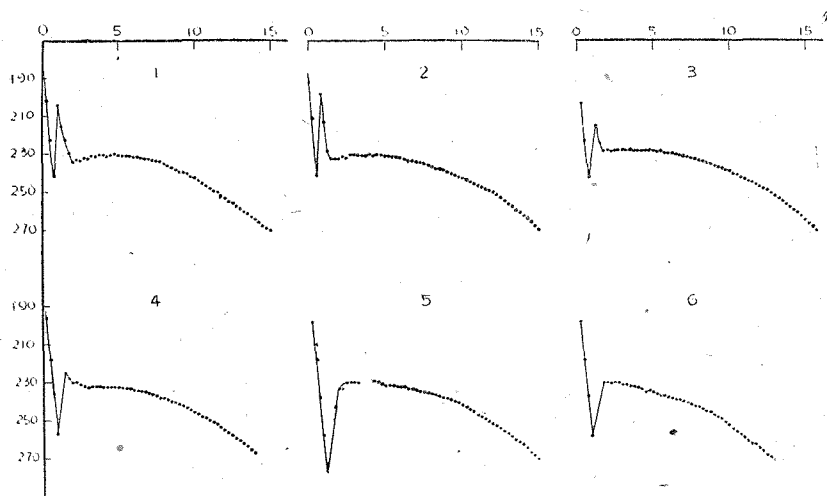
## II

Maximow<sup>8)</sup> の解釋によると組織中 (*Tussilago Farfara* の葉柄, 直徑 7~8 mm, 長さ 15 mm) に溫度計 (直徑 0.15 mm の銅—コンスタンタンの熱電對) を挿入する際破壊された細胞から流出した細胞液の凍結が第 1 氷點として現われてくるという。然し組織片を切り取る時にもやはり切口の細胞から細胞液は流出するのであつて、それは細胞間隙中に入つている。此の流出細胞液も第一氷點に關係があると述べてはいるが、其の具體的の説明は何等與えられていない。Zacharowa<sup>12)</sup> (熱電對使用) はライムギの幼根の實驗で Maximow の説を支持している。Walter & Weismann<sup>11)</sup> (水銀溫度計使用) も第 1 氷點については Maximow と同様、破壊された細胞から出た細胞液の凍結によるものとの解釋を支持している。Luyet & Geheino<sup>7)</sup> (ベックマン水銀溫度計使用) の説明では細胞間の solvent water の凍結が第 1 氷點となつて現われるのである。以上の人々は兎角第 1 氷點は少くも生きてある細胞内部の水の凍結によるものではないことを主張しているのであるが、唯 Voigtländer<sup>10)</sup> のみは第 1 氷點は組織本來の凍結開始を示すものであり、第 2 氷點は組織の共融點に相當すると説明している。然し彼は此等の氷點に關しては深く觸れていない上に、説明の根據となる實驗的事實がないので悉しいことは不明である。第 2 氷點については Voigtländer を除き上に挙げた人々の見解は根本的には一致している。即ち第 1 氷點が現われた後溫度が更に低下すると細胞間隙中に生じている氷が周囲の細胞より水を奪い成長する。いかえると氷は細胞内部から外面に出てそこで凍るもので、此の凍結が第 2 氷點として凍結曲線上に現われてくるというのである。唯 Luyet & Geheino 等は時によつては生細胞内部にも氷が生ずる場合があると付け加えているに過ぎない。

## III

今までの研究者達の實驗に於いても、亦筆者の實驗に於いても切りとられた組織小片の中心部に溫度計を挿入して、それを所要の溫度で冷すのであるから組織小片はいつも外面より冷却されることになり、然も過冷却度を一定にするために屢々氷の結晶を組織小片の表面に接觸させて過冷却を破つている。従つてこのような方法では一般に凍結は組織小片の表面より始まり内部に進行してゆくものであり、實際に Luyet & Geheino<sup>7)</sup> は馬鈴薯塊莖でこのことを觀察している。第 1 氷點は組織小片に最初に起つた凍結の現われとすれば、第 1 氷點は表層部の凍結に直接關係を有するものであり、従つて表層部の凍結に變化が起れば第 1 氷點部が何等かの影響を受けることは當然豫期されることである。豫め蒸溜水及び 1 M 蔗糖溶液で約 5 秒間洗滌した馬鈴薯塊莖の角柱状 (5×5×14 mm) の小片について得られた凍結曲線をみると實際著しい差が顯われている。蒸溜水で洗滌されたものでは第一氷點は非常に明瞭になり且其の溫度も高

くなっているのに反して蔗糖溶液（高調）で処理された場合には第1氷點は完全に消失している<sup>4)</sup>。此の場合例え組織小片を切りとる際流出した細胞液が細胞間隙中を充たしているとしても、處理時間（約5秒）及び處理を始めてから、冷却し過冷却の破れる迄に要する時間（2.5~3.0分）から推して處理により起つた流出細胞液の濃度の變化は組織小片の極く表面に限られていると思われる。此の事實は第1氷點が組織小片表面の凍結に直接關係あることを示すものである。更に組織表層部の凍結と第1氷點との關係を悉しく知るために次の實驗を行つた。馬鈴薯塊莖の小片（5×5×14mm）を豫め種々濃度の蔗糖液に20秒間漬した後、表面に附着している液を軽く拭つてから直ちに凍結曲線をとつてみた。實驗操作及び溫度測定法は前報と同様である。其の結果は圖1に示されているように蒸溜水の場合は第1氷點は非常に明瞭に、且氷點も高くなつている。蔗糖溶液0.1Mでは第1氷點は低くなつてはいるが未だ明瞭であるのに對し0.3Mにて於いては不明瞭となり、0.4M以上では完全に消失して了つている。



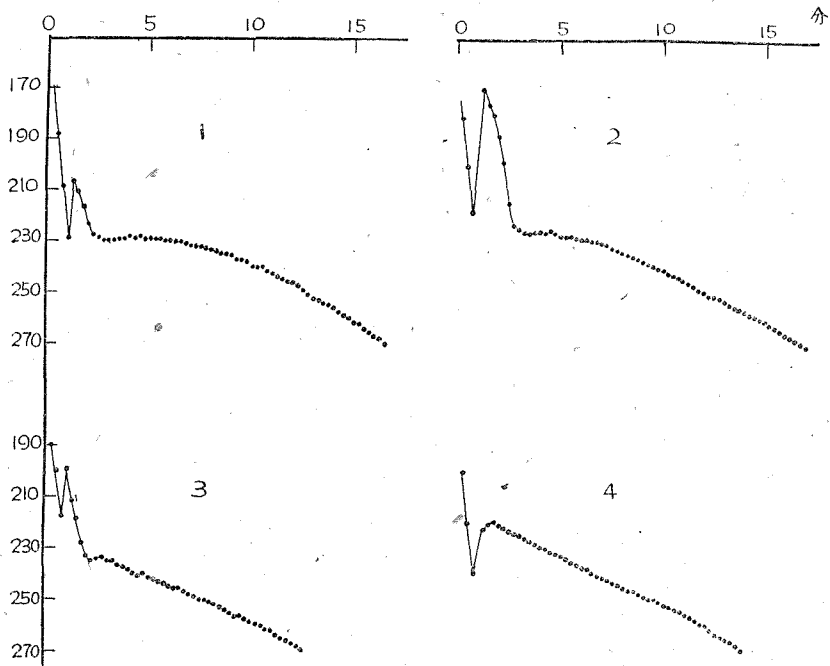
第1圖 ジャガイモ塊莖の氷點に及ぼす蔗糖液の影響

1.) コントロール； 2.) 蒸溜水 20 秒處理； 3.) .01 M 蔗糖液； 4.) 0.2 M 蔗糖液  
5.) 0.4 M 蔗糖液； 6.) 0.5 M 蔗糖液。横軸…時間。縦軸…檢流計の讀み（溫度，  
字が大きい程溫度は低い）。冷却速度…約 2.2°C/分數

此の結果は第1氷點の現われ方は洗滌液の濃度によつて即ち小片表面の液の濃度に著しく左右されることを明瞭に示している。従つて他の方法によつても小片の表面についている細胞液の濃度が變化せしめられれば洗滌實驗と同様の結果が得られるであろう。其の一つの試みとして乾燥實驗を行つてみた。馬鈴薯塊莖の小片（5×5×14mm）に熱電對を挿入したまま相對濕度約60~45%，溫度15~16°Cの空氣中に放置してから前と同様に凍結曲線をとる\*（第2圖の3と4）。其の結果は放置時間が長くなるにつれて氷點の分離は不明瞭になり、30分以上たつと完全に第1氷點に相當する部分は消えて了う。このことは周圍に鹽化カルシウムを詰めた管中

\* 小片を豫め乾燥させてから熱電針を挿入しても結果は同様であつた。

に放置した場合は更に著しく10分位で単一氷点の曲線になる。これらの場合には小片表面又は表層部細胞間隙中に流出していた細胞液は表面よりの蒸発によつて濃縮されている筈である。若し組織小片がより高い水蒸気圧の處に放置されれば逆に水蒸気は組織片表面に凝縮して丁度蒸溜水で洗つた時と同じようになり、第1氷点 は明瞭になるであろう。

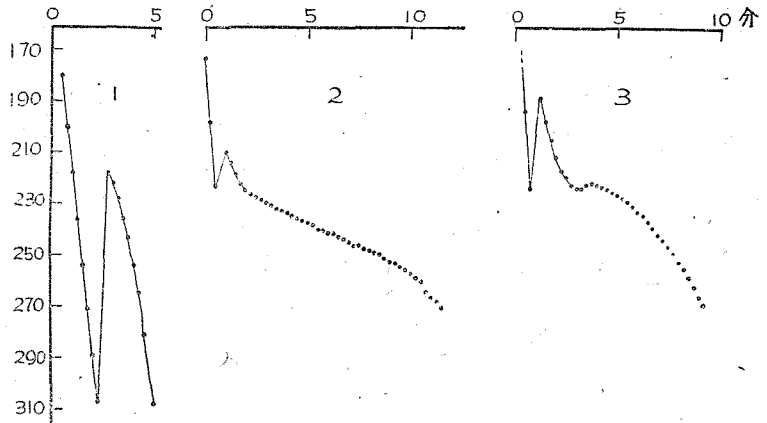


第2圖 1.) コントロール. 2.) 相對湿度100%中に15時間放置.  
3.) コントロール. 4.) 相對湿度45%中に1時間放置.  
横軸…時間. 縦軸…檢流計の讀み(溫度). 冷却速度…1及2では  
約2°C/分; 3及4では約2.3°C/分

事實蒸溜水を充分含んだ濾紙を内側に貼りつけた試験管中に小片を釣り下げて置くと6時間(室温7~8°C)たつても第1氷点 は消失しないのみか、放置時間が長くなるにつれて第1氷点 のピークはかえつて高くなり増々著しくなってくる(圖2の1と2)。この二つの實驗は組織小片の表面に流出している細胞液の濃度如何に第1氷点の現われ方がかゝっていることをよく示している。

かように第1氷点 が組織小片の表層部の凍結に著しく支配されるものならば、この表層部の状態如何は第1氷点 に非常に大きな影響を及ぼす筈である。今迄扱つた例をみると第1、第2氷点の分離の明瞭な場合、即ち第1氷点のはつきり出ているのは六面切口のある小片を用いた時のみである。第1氷点の明瞭な馬鈴薯塊莖でも小片を切りとらず、皮のついたまゝの表面無傷のものを用いた時には決して第1氷点は現われていない。又細い幼根或は莖等を用うる時は一定の長さに切りとるため、切口は兩端にあるのみで他の部分は無傷であるが、このようなもの

では一般に第1氷點は非常に不明瞭か或は全く現われない。第3圖の1に示したコムギの例では芽の葉鞘を先端から約10mmに切りとつて用いたのである。従つて切口は一方にあるのみで且つ中空の管をなしているから、熱電對の挿入によつて細胞が破壊されるような



第3圖 負傷面の大小と凍結曲線の型

1.) コムギの芽の葉鞘 (切口一端のみ) 2.) アデサイの若莖 (切口兩端) 3.) アデサイの若莖 (切口兩端、莖皮を全部むいたもの)  
横軸…時間. 縦軸…檢流計の読み (溫度). 冷却速度…1では2.4°C/分; 2及3では約3°C/分.

ことは全くないが、その代り熱電針と孔とは完全には合わないので、其の間に少量のワセリンを詰めてよく接觸させた。此の例では氷點の分離は殆んどみられず単一の曲線をなしているに過ぎない。又アデサイの若い莖を用いた場合も兩端にのみ切口があつて途中無傷のものでは第1、第2氷點の分離は不明瞭であるが、表面の皮を剥ぐと、即ち全表面に傷のある場合には2つの氷點のはつきりと區別出来るようになる (第3圖の2と3)。以上の例からみて少くも第1氷點が明瞭に現われるには其の表面に負傷面の多いことが一つの條件となつている。切りとつた組織小片より切片を作り原形質分離を起こさせてみると、表面の細胞は殆んど切斷されており、又表層部にはメスを入れる際の壓迫によつてか、押しつぶされ死んでいる細胞が非常に多數混つている。これは柔組織を主とした部分を用いたために一層著しいのかもしれない。然しいずれにせよ内部に比べて切口表層部に於いては、破壊され死んでいる細胞が非常に多いことは事實である。従つて切りとられた組織小片表面は切斷された細胞から流出した細胞液で蔽われており、表層部の細胞間隙もこの細胞液で或程度充たされていることになる。

一般に柔細胞は内部が凍結すると融解後は破壊され死んで了う。此の實驗條件の下では凍結はいつも組織小片の表面より始まり内部に向つて進行する。従つて不完全凍結させ融かした後には表層部の細胞のみが死んでいて内部には死細胞はみられない。表面からどの深さ迄の細胞が死ぬかは初めの凍結の程度によつて決まるもので、初凍結の程度のすゝむにつれて死細胞層は厚くなる。處が一方このような死細胞は生細胞に比べて非常に凍り易い、つまり細胞内部は非常に inoculate され易い状態にあるもので、その外面に氷が接觸すればすぐに凍つて了う。従つてこのような死細胞が多くなればそれだけ細胞間に於ける凍結の傳播速度は大きくなり、單位時間に多量の氷が生ずることになる。それで豫め色々の程度に凍らせた組織を一度融かし

てから凍結曲線をとつてみると、死細胞の数が多し程、いかへると凍り易い表層部が厚くなるにつれて第1氷點の温度はやや上昇し且2つの氷點の分離は不明瞭になつてくる。<sup>1) 2)</sup> この事實も組織片表層部の凍結は第1氷點に密接に結びついていることを示しているものである。

この第1氷點の一過性であるのに反して第2氷點の方は遙に安定、持続的であり、前の實驗が示すように組織小片表層部の状態に直接の関係のないことは明らかである。第1氷點に變化の現われる場合にも第2氷點は殆んど何等の變化を示さない<sup>4)</sup> (第1圖)。又小片内部の生細胞部に集團的フラツシングの起こる組織(熟したリンゴ、シロウリ、バレイショ)では第2氷點部にこれと平行した變化の認められる事實<sup>5)</sup>も第2氷點部が内部生細胞の凍結の現われであることを明らかに示している。

#### IV

組織小片から得られた凍結曲線上の2つの氷點はそれぞれ表層部及び内部無傷の細胞の凍結に由来するものであることは前節に述べた。次にこれを組織の凍結様式から説明してみよう。

柔細胞の凍結様式には急激な凍結であるフラツシュ型と緩慢な非フラツシュ型凍結とが大別出来る。<sup>6)</sup> 勿論此の他に兩者の中間型と見做される型も存在する。此等の凍結様式は細胞によつて固定されているものではなく内外の条件によつて變り得るものである。又組織の凍結様式は此等の細胞凍結の型の組合せによつて決まるものであり、組織の全細胞が同一凍結型を示す場合は殆んどないようである。このことは組織を形成している細胞が一種類でないことから考えても當然であろう。組織に凍結が始まると凍結は細胞から細胞へと傳播して行くものであるが、其の傳わりかたは凍結型によつて異なる。細胞は普通一時過冷却の状態になつてから凍るが、一般に非フラツシュ型凍結は割合高い温度即ち過冷却度の少ない處で始まり、或細胞が凍ると凍結は隣接細胞へと次々に傳播してゆく。此の非フラツシュ型凍結に比べてフラツシュ型凍結はより低い温度即ち過冷却度が大きくなつて始めて起るものであり、凍結は非フラツシュ型の場合のように隣接細胞へと連続的には傳わらず、互に無關係に獨立して起こるのが普通である。即ち過冷却度が或る大きになるとフラツシングが起こるが凍結する細胞はアトランダムに散在している。然し馬鈴薯塊莖、過熟シロウリ及び熟したリンゴ等では特殊な凍結の傳播様式をとるもので、1個の細胞がフラツシュすると次々に數個の隣接細胞が相次いでフラツシュ型凍結を起こす。此に次いで又は同時に處々に同様に又1個の細胞を基に數個の隣接細胞が連続的にフラツシュするのである。即ち位置的には非連続的に小集團をなしてフラツシングが起り、小集團内では隣接細胞へと連続的に凍結は傳播してゆく。この小集團内に於ける凍結の傳播速度は非フラツシュ型のそれに比べて非常に速い。従つて全體としてみれば凍結は時間的に連続

していることになるが、凍結細胞の頻度は時間的に不規則に變ることになる。

凍結が一つの細胞から他の細胞に傳わる時に正常の細胞においては、細胞の境界の處で凍結の傳播は一時阻止される。此の凍結の進行を阻止する部位は恐らく原形質膜と思われるが未だ明らかにされてはいない。處が一度凍結して融かされた細胞及び破壊されている細胞では凍結の進行が細胞の境界で阻止されるようなことはなく凍結は容易に進入してゆく。いかえると死細胞は非常に凍り易い状態になつているといえよう。従つてこのような細胞の間では正常の細胞間に比べて凍結は非常に速く進行する。

一般に組織の凍結曲線の型というものは、組織の凍結により單位時間に遊離される潜熱量と冷却により、外圍に奪われる熱量の差の時間的變化によつて決定されるものであるから、冷却速度が一定の場合には組織内に於ける氷生成速度が凍結曲線の型を決めることになる。組織を形成している細胞の大きさに著しい差異のない場合には1個の細胞の凍結により單位時間に遊離される潜熱量は凍結完了に要する時間に反比例する。従つてフラツシュ型凍結の場合の方が非フラツシュ型の場合より單位時間には多くの熱量が遊離されることになる。又組織小片全體として單位時間に遊離される潜熱の量は單位時間に凍結する細胞の數、即ち凍結細胞の頻度によつて決まる。

凍結曲線を見ると過冷却が破れてから非常に短時間に第1氷點に達するのであるから（明瞭に氷點の分離してゐるものでは普通約10秒間位）一時に相當多量の熱が放出されるに違いない。さて前節に述べたように組織小片の表面は流出した細胞液で蔽われているし、又表層部の細胞間隙にもこの細胞液が相當入つてゐる上に表層部には機械的に破壊された細胞が多數混在している。第1氷點の現われる前過冷却状態にある外部に流出した細胞液の凍結は勿論のこと、死細胞の凍結し易さからみて、此の表面の一點に氷が生じてから後の凍結の擴がり方は非常に速いものと考えられる、即ち一時に多量の潜熱が遊離される可能性は充分にある。

このように第1氷點は主として小片表層部に流出した細胞液の凍結に由來するものであるから、何等かの原因で流出細胞液の濃度に變化が起こればそれに應じて第1氷點の現われ方が異なつてくるのは當然である。濃度の異つた溶液で組織小片の表面を洗滌した場合及び表面を乾燥した場合、第1氷點部にのみ其の影響が著しく現われてくるのは小片表層部にある細胞液の濃度が變つたためと考えれば時間的にも容易に了解される。ここに第1氷點の不安定な原因が存するのである。一方死細胞に比べて生きてゐる細胞\*には氷は伸々入りにくい、即ち生細胞は凍りにくい状態にある。其の上小片の表層部が凍結しつつある間はその遊離潜熱のために内部の冷却速度は幾分か低下することになるので尙更内部の生細胞は凍りにくくなる。然し表層

\* 表層部のみが凍つてゐる場合内部の細胞は過冷却の状態にはなつてゐるが、そのまま温度を高めれば完全に原形質分離を起こすので生きてゐると考える。

部の凍結の完了に引續いて内部の細胞が凍り始める場合は少なく、更に温度が或點まで低下してから凍結が侵入してゆくので、其の間一時温度の下り方は急激になる。實際、馬鈴薯塊莖及び過熟リンゴ等では第1氷點に續く温度の降下部と冷却曲線の過冷却の破れる前の部とは殆んど平行になつてゐることからみると其の間、凍結は殆んど停止してゐると思われる。然しこの様に平行になつてゐる場合は割合少なく傾斜度を異にしている方が多い。これは幾分か除々にはあるが第1氷點出現後も引續いて凍結が進行しているためであらう。かように温度が下り生細胞の過冷却度が或點までくるとやがて凍り始めるが、生細胞間に於ける凍結の傳播速度は表層部に於けるものに比べて遅いのであるから、單り時間に遊離される潜熱量は表層部の場合より少ない筈である。いずれにせよ内部の生細胞が凍り始めると遊離潜熱のため温度の降下は再び緩かになり、其の程度は生細胞間に於ける凍結の傳播速度により決められるものである。それが活潑の場合、丁度遊離された潜熱と周圍に奪われる熱が等しい時には其の間、凍結曲線は水平部を呈するようになるが、前者が優る場合は一時曲線は上昇する結果第2氷點部は凸型を呈することさえある(老シロウリ、ムラサキカブ)。筆者の實驗結果ではフラツシュ型凍結が活潑に進行する場合に限り第2氷點部は水平或は凸型を呈し、非フラツシュ型凍結が主體をなしているような場合には第2氷點部は緩かな傾斜となつてくるので概して不明瞭である。従つて筆者の實驗條件下では、フラツシュ型凍結が活潑に進行する時のみ單位時間に放出される熱量と $2.1\sim 2.8^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度の下で外圍に奪われる熱量は大體等しいことになり、單位時間の發熱量の少ない非フラツシュ型凍結が主となつてゐる場合は、周圍に奪われる熱量の方が優位になつてゐると考えられる。又凍結細胞の頻度が時間的に非常に不規則に變化すると考えられる場合(過熟リンゴ及びシロウリ)には第2氷點部に不規則な振れが明瞭に認められる<sup>5)</sup>。以上述べた理由によつて組織の正常部の氷點と見做される第2氷點、即ち組織の見かけの氷點は流出細胞液の氷點より低く出るのである。

一度完全に凍結した柔細胞は融解された後には殆んど例外なく内部は破壊され死んでゐる。一方筆者の實驗條件下では組織小片は表層から凍り始め凍結は内部に向つて進行するのであるから凍結を色々の段階で中斷すれば、凍結の程度に比例して小片表層部の死細胞の數は増加する筈である。此のように種々の程度に凍らした組織小片を一度融かした後再び凍らせた場合、死細胞の増加に伴つて表層部凍結により單位時間に遊離される潜熱量は次第に増大してくるので、第1氷點の位置もそれに應じて高くなる譯である。勿論この様な表層部に於ける凍結の傳播速度にも限界がある筈であるから、破壊細胞層が次第に厚くなつても單位時間に遊離される潜熱の量は無制限に増大するものではなく、或點で最大となりそれ以上は大きくならないと考えられる。従つて第1氷點の上昇にも一定の限界が存することになる。事實不完全な凍結(中心部まで完全に凍結しない場合)をさせ融解し再び凍結せしめると第1氷點はいくらか上昇する。

此を何回か繰返えすにつれて次第に第1氷點は高くなるが或一定の値で動かなくなる(青木<sup>2)</sup> 圖7a~c). Walter & Weismann<sup>11)</sup> も同様な結果を報告しているが上に述べた考えで充分説明される. 又初凍結の程度に従つて再凍結曲線では第1第2氷點の分離は次第に不明瞭になつてくるが<sup>1)</sup>、此は次のように説明される. 第2氷點部の現われる前に初凍結を中斷した場合には、融かした後も表層破壊細胞を含む層と内部正常細胞部との境界は初凍結前の状態と殆んど變つていないであろう. 何となれば第2氷點が未だ現われていないので凍結は表層部だけに限られ内部正部には及んでいないからである. 従つて組織小片の状態は初凍結前と殆んど同じと考えられるので當然2つの氷點の分離は明瞭に現われる筈である. 然し第2氷點部が現われてから初凍結を中止した時には凍結は組織内部の正常細胞部にまで入つているが、この場合正常細胞部に於ける凍結の進行は等速に平行的に内部に向つて進むものではなく、或處では速く或處では遅いため凍つた細胞と凍らない細胞はかなり入り混つて存在しているので表層の凍結層及び内部の未凍結層の境界は非常にぼけてくる. 従つて再凍結の時には破壊細胞の凍結につれて其の内に存する生細胞は割合早く凍り始める. そのうちに温度が低下するにつれて内部の未凍結生細胞が次々と凍り始めてくる. 初凍結の程度の高い程死細胞生細胞の入り混つている層が厚くなつてくるため、即ち死細胞の間に挟まれている正常細胞の数が多くなるために死細胞部から正常細胞部への凍結の移りゆきがぼけてくるので第2氷點部の現われ方も急激でなくなるのである. 初凍結で全細胞が完全に凍結して了つた場合には内部の細胞も皆死んでいるので表層部の凍結に引續いて連続的に凍結は内部に一樣に傳播してゆくため潜熱の遊離に急激な變化がなく、従つて第2氷點は消失して了うと考えられる.

以上の説明は第1、第2氷點の明瞭に分離している場合であるが、キウリ、未熟のシロウリの様なものでは初凍結曲線に於いてさえ第2氷點は全く區別出來ず、一見再凍結曲線と同じように見える. 唯第1氷點以後の傾斜が再凍結曲線に比べてやゝ大きい點が違ふだけである. この様なものの凍結様式は始め非フラッシュ型が旺盛で、それに引續いてフラッシュ型が平行して進むと云う型である.<sup>3) 4)</sup> 非フラッシュ型凍結はフラッシュ型に比べて高い温度で始まるものであるから、表層部の凍結に引續いて過冷却度が大きくならぬうちに起こり、そのうちにフラッシュ型凍結がかなりの頻度で始まつてくる. 即ち此の場合には表層部の凍結に引續いて連続的に内部にも一樣に凍結が進行するのであるから單位時間に於ける遊離潜熱量は急激に少なくなることはなく、其の結果温度降下は漸時的となつて氷點の分離は起こらない. 従つて生細胞の凍り易さ、いかえると氷の侵入の難易が大きな條件となつている. 此の場合細胞自身が凍らなくとも細胞が非常に脱水され易い状態にある時は、細胞外面に氷が生ずれば細胞内部より水は奪われて氷はどんどん成長する譯で、氷の成長速度如何によつてはかなりの潜熱が遊離され得る筈である. 此の點からみても細胞表層部の水に對する透過性も亦一つの重要な條件である.

いずれにせよ内部の生細胞が全部凍結してしまえばもはや潜熱の遊離はないので温度の下り方は急激となり一時は殆んど直線的になつてくる。<sup>\*</sup>

大體以上のように組織の凍結様式から凍結曲線上の第1第2氷點は質的には一應説明出来るのである。實際に溫度計で測定される溫度變化は水分の凍結により遊離される潜熱の量、冷却により外圍に奪われる熱量、それに組織小片の熱傳導率等によつて決まるもので、現在我々の有するデータのみでは其の間の量的關係を明らかにするまでには至つていない。

## V

凍結曲線上の第1氷點に就いて今迄下されている解釋は大別して二つになる其の一つは破壊された細胞から流出した細胞液の凍結によるという Maximow<sup>6)</sup>, Walter & Weismann<sup>11)</sup> の主張であり、他は Luyet & Gehenio<sup>7)</sup> の intercellular solvent water (i. c. s. w.) の凍結の現われであるという説明である。前者に従えば第1氷點は人為的のものであり、後者では本來組織自身に由來することになる。第2氷點は生細胞内の水分の凍結に由るものであると云う見解は皆に支持されている。然し凍結の機序が不明のため凍結曲線上の現われと組織内の凍結との具體的關係は全く不明であつた。此處では筆者の實驗データに照して一通り考察してみたい。

Maximow の説明によると主として熱電針週邊に流出した細胞液が先づ凍り其の結果が第1氷點として現われるのである。即ち凍結は熱電對週邊部から、いしかえると組織の中心部から最初始まることになる。この考え方では III 節に述べた組織小片の洗滌實驗の結果及び熱電針挿入孔に豫め高調又は低調液を注入して置いても第1氷點の現われ方に何等影響の現われていない事實<sup>12)</sup> は説明出来ない。又熱電針挿入後長く放置して置いてから凍らせた場合に第1氷點の消失するのは流出細胞液が再び周圍の正常細胞に吸収されたためであると説明する。然し細胞液の滲透濃度及び膨壓の關係から考えて此の説明は了解に苦しむ處である。それから植物の種類によつては氷點が分離せず第1氷點が全く認められない場合があり(キヅリ等)、又切りとつた小片では氷點が分離するものでも表面が無傷の場合には第1氷點に相當する部分が全く現われない事實等も彼の考えとは矛盾している。尙彼は小片を切りとる際流出した細胞液が細胞間隙を満していることを明記しているが、この細胞液の凍結と第1氷點との關係については何等説明を加えていない。同じく流出細胞液の凍結といつても Walter & Weismann によれば、氷の結晶で組織の過冷却を破る際いくつかの細胞は破壊され細胞液が流出するが、それは或程度の過冷却の後除々に凍結するもので、それが第1氷點として現われるのであり、流出細胞液の量が少ない時には第1氷點は殆んど認められないという。この説明でも解釋出来ない次のような事實がある。innoculate せず自然に過冷却の破れた場合にも第1氷點は明瞭に現われるこ

<sup>\*</sup> 完全な直線ではなく幾分か彎曲しているが、それは冷却溫度と凍結が完了した時の溫度との差に支配される、

と、キウリのように inoculate しても第1氷點の現われぬ事實等である。Luyet & Geheuo は組織片の凍結は表面より始まるところから、單に第1氷點は i. c. s. w. の凍結によるものであるとしている。然し此の i. c. s. w. に就いては何等説明が與えられていないので具體的には判らないが、彼の使用した材料は馬鈴薯塊莖のみであり。又實際新しい切片を顯微鏡下で見ても細胞間隙内に空氣の入つてゐることは殆んどみられない。勿論この觀察のみで斷定は出來ないが、彼等のように細胞間隙を i. c. s. w. なるものが充しているとしても、III 節に述べた洗滌實驗の條件下では（處理時間5秒）極く表層部のものは別として、内部の i. c. s. w. の濃度が其の氷點を左右される程度に變化したとは考えられない。従つて高調蔗糖溶液で洗滌された小片の表層部にある細胞液の氷點は低下しているに違いない。然し一旦其の表面に氷が生ずれば凍結は最も凍り易い細胞間隙を縫つて未だ濃度の變らない、従つてより過冷却されている i. c. s. w. 中を急速に擴がると考えられる。この i. c. s. w. の凍結に引續いて生細胞内の水がそれと等しい速度で凍結しない限り單位時間に於ける凍結に伴う遊離潛熱量に變化がある譯で、従つて凍結曲線上に明らかに溫度の變化が認められる筈である。ところが今までの研究者達も述べているように、又 IV 節に述べた凍結様式からみても生細胞内の水の凍結速度は細胞外の水に於けるより遅いものであるから i. c. s. w. と細胞内の水の凍結速度は互に等しくないと考えざるを得ない。實際には高調蔗糖液で洗滌したものでは氷點の現われた以後何等明らかな溫度降下は認められないのである。これも彼等の説明では解釋出來ない事實であるが、何分説明がばくぜんとしているので悉しい批判は出來ない。

第2氷點は生細胞内の水分の凍結によるものであることには異議はない。然し多くの人々の見解では細胞内部が直接凍ることは稀で、流出細胞液が凍つても氷は細胞内に入れないために生細胞から水が奪われ細胞間隙中で氷が成長するという。それであるから細胞間隙中の氷の成長速度は細胞表層部の水に對する透過性に依存することになる。勿論前記の人々は凍結曲線をとつた實驗條件と同じような冷却速度の下で實際に前記のような現象の起ることを見ているのではない。然し朝比奈の觀察した植物組織に於いては（冷却速度  $4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ）細胞内に氷の生じなかつた例は殆んどなかつた。勿論細胞間隙中に氷は生ずるが、それが周圍に細胞から水を奪い盛んに成長するのは冷却速度の極端に遅く且冷却溫度の高い場合にカブ、ダイコン等に於いてみられたに過ぎない。そしてこのような場合には氷點の分離は一般に不明瞭である。今迄の人達の凍結曲線から推定した冷却速度は大體  $2\sim 5^{\circ}\text{C}/\text{分}$  位であるから、朝比奈の冷却速度と比べてさして著しい差異はないので、冷却速度からのみれば同じような凍結過程をとつてゐるのではないかと思われる。

斯様に今迄下されていた説明では生きてゐる細胞の水分の凍結が——それは細胞から一度奪われて細胞間隙中でのみ凍るか或は細胞内で直接凍るかは人々により異論はあるが——第2氷

點として現われるものであり、破壊された細胞から流出した細胞液或は細胞間隙中に存在していた水分の凍結によつて第1氷點が現われると云うのである。然し組織内の凍結と2つの氷點との間の具體的關係は不明のまゝであつた。組織の凍結過程が或程度明らかになつたので前述のように質的には一通り説明出来るようになつたのである。然し凍結過程の觀察にまだ不完全なところがあり、又説明の中にも矛盾している點があるがそれ等は今後の研究に俟つことにしたい。

### 摘 要

凍結曲線上の2つの氷點を組織の凍結様式から考察した。

組織小片の表層部の凍結が第1氷點として現われてくる。即ち第1氷點は小片を切りとる際切斷され又破壊された細胞より流出した細胞液及び表層部の破壊細胞の凍結に由來するものである。従つて第1氷點は一過性且不安定のものであり表層部の條件によつて容易に變化する。組織自身の凍結には直接の意義を持つものではなく單なる人為的のものに過ぎない。此に反して第2氷點は組織小片の生細胞部の凍結の現われであつて生物學的にみて重要な意味を有する。

然し植物の種類及び時期によつて其の生細胞部の凍結には非常に難易がある。凍り易い場合には第1第2氷點の分離は不明瞭になり、極端の場合には第2氷點部に相當する部分は完全に消失して去る。反對に凍り難いものでは生細胞は非常に過冷却の状態になり、其の結果凍結は急速なフラッシュ型となるため2つの氷點は明瞭に分離してくる。

### 文 献

- 1) 青 木 廉 馬鈴薯塊莖の凍結曲線. 低温科學, 2, (印刷中)
- 2) \_\_\_\_\_ 馬鈴薯塊莖の再凍結曲線の型について. 同誌, 3, (印刷中)
- 3) \_\_\_\_\_ 生物の凍結過程の分析. I 植物組織の凍結曲線の型と凍結様式との關係. 同誌, 3, (印刷中)
- 4) \_\_\_\_\_ 1946 植物組織の第1氷點. 科學, 16, 128.
- 5) \_\_\_\_\_ 1946 凍結曲線の不規則の振れ. 同誌, 16, 129.
- 6) 朝比奈英三 生物の凍結過程の分析. II 植物組織の凍結過程の顯微鏡的觀察. 低温科學, 3, (印刷中)
- 7) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio 1937 The double freezing point of living tissues. Biodynamica, No. 30.
- 8) Maximow, N. A. 1914 Experimentelle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. wiss. Bot., 53, 327.
- 9) 島善隣, 青木廉, 朝比奈英三 リンゴの凍結曲線. (未發表)
- 10) Voigtländer, H. 1909 Unterkühlung und Kältetod der Pflanzen. Chons Beit. f. Biol. d. Pfl., 9, 359.
- 11) Walter, H. and O. Weismann 1935 Ueber die Gefrierpunkt und osmotischen Werte lebender und toter pflanzlicher Gewebe. Ibid., 82, 273.
- 12) Zacharowa, T. M. 1926 Ueber den Einfluss niedriger Temperaturen auf die Pflanzen. Ibid., 65, 61.

## Résumé

The nature of the freezing point which frequently appears as doubling on the freezing curve of tissue pieces of plants, was investigated taking into deliberation the mode of tissue freezing. The measurement of temperature change during freezing was made with thermojunction every 15 seconds on the tissue piece.

The first freezing point presents only a pike and the temperature without delay rapidly decreases again. In the surface layer of the tissue piece almost all of the cells have been destroyed by cutting out the piece, and the intercellular spaces between them are filled with cell sap flowed out from these damaged cells. By condensation of the flowed cell sap in the surface layer by means of evaporation or washing with various concentrated sugar solutions, the first freezing point can be easily obliterated; in doing so it becomes indistinct with evaporation or with increasing concentration of the washed solutions. If the cell sap is diluted by either exposing in saturated water vapour or washing with dist. water, the first freezing point reversely becomes distinct. From these facts it is quite evident that the first freezing point depends solely on conditions of the surface layer of the tissue piece. Consequently it is merely artificial and can be readily changed by artificially controlling of the surface layer conditions. This condition, on the contrary, exerts no influence on the second freezing point which continues for some duration as a straight line and presents a horizontal plateau or, in some cases, convex one. In addition, the jerks appear on the second freezing point only in the case in which frequency of the cell flashing in the inner living part changes irregularly and rapidly. From these facts it is safely concluded that the freezing of the damaged surface layer of the tissue piece comes out as the first freezing point, and the freezing of the inner living part as the second one.

The separation of these two freezing points is mainly determined by the manner of freezing of the inner living part. When the inner part is very easy to freeze, the freezing continuously propagates directly from the surface layer into the inner part. In this case, as the ice formation is not blocked after completion of the surface layer freezing, the liberation of latent heat continues without interruption, so that the separation of the two freezing points becomes unclear and in extreme cases, the second freezing point does not completely come out. A single freezing point of dead tissue can be explained on this basis. On the contrary, in a tissue being hard to freeze, the inner part can be very supercooled after completion of the surface layer freezing. In this case, when freezing begins in the inner part, the flashing of cells actively occurs in high frequency, in other words, a relatively large quantity of latent heat becomes suddenly liberated, consequently the second freezing point can become clear distinguishable.