HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生物の凍結過程の分析　X．：卵細胞（ウニ）の凍結過程
Author(s)	朝比奈, 英三
Citation	低温科學, 10, 81-92
Issue Date	1953-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17545
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_p81-92.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Eizo ASAHINA 1953 Analysis of the Freezing Process of Living Organisms. X. Freezing Process of Egg Cell of Sea-Urchin. *Low Temperature Science*, **10**. (With English résumé p. 87)

生物の凍結過程の分析 X.

卵細胞（ウニ）の凍結過程*

朝比奈英三
（低溫科學研究所　生物學部門）

（昭和27年9月受理）

I

生物の凍結過程の分析にあたつて生きている細胞の凍結の直接觀察は全く記載的のものでもこの方面の資料に乏しい現在においては未だに必要である。殊に動物を對象とするこのような研究は，從來植物細胞の凍結に關する業績が決して少なくないのに比べて，むしろ甚だ稀だといつてもよいくらいである。

著者は今迄多くの植物細胞を材料として行つて來たのと同じ方法 (1) によつてウニ卵の凍結過程を觀察した。この材料は卵細胞そのものの性質にかなり特殊性がある上に，又ウニ卵自身がきわめて耐凍性に富むために原形質の凍結過程を觀察するものとしては，必ずしも適當ではなかつたが，動物細胞の凍結過程の一例として記載することにした。

材料は北海道忍路海岸産のキタムラサキウニ *Strongyrocentrotus nudus* で，補足的に同地産のエゾバフン *St. intermedius* も使用した。ウニは札幌の實驗室に運んで＋2°C 內外の冷藏庫に貯藏し，觀察の度に M/2 KCl を用いて放卵・放精させた。受精率が 85% 以下のものは使用しなかつた。ピペット中を出入させて外圍のゼリーを除いた未授精卵を海水とともにカバーグラス上にとり，濾紙で海水を出來るだけ除き，流動パラフィレでおおつて懸滴とする。この狀態で卵はやや扁平となる（第 6 圖）が，少なくとも＋5°C 內外で 24 時間は受精率が殆んど變らない。このプレパラートを低溫室內に運び溫度調節裝置を施した顯微鏡下で懸滴の溫度を測りながら觀察した。[1] この狀態では卵は勿論海水も甚だ過冷却しやすいから，凍らせるために任意の溫度に達したときマイクロニードルの先につけた氷片をさわらせて過冷却を破る—即ち植氷を行つた。この裝置では懸滴の溫度を ±0.1°C 以內の精度で定常狀態に保つことは困難であり，又示された溫度は必ずしも卵の溫度とは一致しない。今回は懸滴中に凍結が始まつて以後はなるべく一定の溫度に保つようにつとめた。

* 北海道大學低溫科學研究所業績　第 162 號.

1) 懸滴に接端をさし入れた徑 0.1 mm の銅・コンスタンタン熱電對を適當の抵抗を入れて檢流計に連ねる。ラムプスケールの示度は $^1/_{50}$°C 迄よめる。

本文に入る前に終始變らざる青木廉教授の御教導と好意ある御批判に感謝したい。

II

一般に生物細胞はきわめて過冷却しやすく，その時間さえ短かければ過冷却狀態にあることそのものは殆んど無害である。ウニ卵も −10°C で 24 時間以内過冷却されたものでは完全に孵化游泳卽迄の發生能力を保持している。今過冷却している卵の周圍の海水に植氷すると海水は瞬間的に凍結するが，冷却速度が小さいと卵は脫水されて收縮し，その外側の氷を發達させる。卽ち細胞外凍結をおこす(第 9, 10 圖)。一定溫度に保つた卵に植氷する場合 −8°C 以高では殆んどすべての卵が，又 −10°C においても 60% 以上の卵が細胞外凍結をおこす。細胞外凍結のとき，その溫度に從つて卵はいちぢるしく縮み，又不規則な形になりやすいが(第 7, 11 圖)，これは融解後吸水して完全に恢復する(第 12, 13 圖)。急激に融解すると卵はまだ收縮したままであるが，0°C においても 2・3 分以内に原形に復する。融解の速度が小さいと氷が消えたときには殆んど原形に近い大きさになつている。細胞外凍結はウニ卵にとつても害が少なく −10°C で少なくとも 1 時間以内に融解すれば，その受精率も低下しない。又マイクロニードルで卵を突いて表面沈澱膜を形成してから氷に接せしめても少なくとも −9°C で 1 時間程度の凍結ならば尋常卵との間にちがいが認められないから，このような表面沈澱膜も健全な原形質表層に近い耐凍性をもつていると考えられる(第 8 圖)。

更に低溫で外圍の海水に植氷すると，卵の內部迄凍らせることが出來るようになる。このような細胞內凍結は多くは卵が氷に接してから 30 秒以內におこり，2・3 分たつともはや改めて凍る卵は殆んどない。このとき卵細胞は瞬間的に凍結するので一つの細胞全体がパッと乳濁したように暗化する(第 1 圖)。卽ち植物細胞でよく知られたフラッシング (6) がおこる。これは細胞質內一樣に無數の微細な氷晶が生じたためで，同一溫度に保つておいても時間とともに氷晶は互に融合して大形となり，從つて氷晶の數は減り，細胞の中は明るくなつてゆく。このような變化は溫度が高い程速やかにおこり(第 1 表)，且つ變化の速度は凍結直後がもつとも大きい。[1] 氷は始めは粒狀又はそれが連つた不規則な棒狀になつて現われ，大形になるにつれ球形に近づく(第 15, 16 圖)。このようにして凍つた卵を暖めると，細胞內部の氷晶はますます融合して大形となるが，溫度が或程度以上に昇ると，氷は融けはじめ，どんどん小さくなり −4°C 以高では全く消失する。融解後卵の外形はなめらかな球形ではなくなり，所々にゆがみが出來卵膜[2] のこわれたところも認められる。卵の內部では原形質は全く凝固して粒狀の模樣が連つて更に大形の不規則な形になり，粗い組織にみえてくる。[3] これは卵の融解後數分間[4] で更に明瞭になるが，凍結溫度が充分低溫であると卵の融解直後からはつきりと現われている(第 4 圖)。

1) 例えば −9°C では凍結後 2 分間に最も急速に變化する。
2) 鐘田 (1941) の意味での卵膜である (5)。
3) Seifriz (11) の所謂 finely granular 乃至 coarsely granular の coagulation である。
4) 0°C では 5 分內外。

第 1 表 ウニ卵の細胞内凍結

方法	温度 (°C)	1卵の凍結暗化に要する時間	凍結後卵内に粒氷が現はれるまでの時間	融解後
細胞内植氷	−4～−5	0.5～2秒	5～60秒	Cytolysis*
氷に接した卵を刺す	−4～−5	1～4	5～60秒	Cytolysis*
〃	−5.4	0.5	2分	Cytolysis 又は固定
氷に接しただけでフラッシング	−8	0.2	2～5分	Cytolysis 又は固定
〃	−10	＜0.2	2.5～10分	固定
〃	−13～−14	＜0.2	4～15分	固定
**吸水卵 フラッシング	−5～−6°	0.5	3～5分	固定
**吸水卵 卵を刺す	−2.4	1～2	0.5～1分	Cytolysis*

* このときは凍結狀態のままでも Cytolysis する。

** 60%海水中に1時間浸けたもの。

このような外觀的な構造は比較的安定したものであつて，15°C の海水中においても，融解後1日以上は殘つていて，卵はなかなか崩壞しない。一旦融解した卵を再び以前と同じ方法で凍らせてみると，周圍の海水中に出來た氷が凝固した卵に接しても卵の內部凍結はおこりにくく，少なくとも −8°C 以高では氷の間に挾まれて脫水され收縮するにすぎない(第5圖)。

III

前述の卵のフラッシングが瞬間的におこることは，卵の內部の過冷却度が大きいことをあらわしている。從つて細胞內凍結の過程を更にゆつくりおこさせるためには，より小さい過冷却度において卵の內部を凍らせる必要がある。このため細胞に氷が接しているときにマイクロニードルで卵を突き刺し，或いはマイクロピペットの先についた小氷片を直接卵細胞に押しこんで，細胞內の過冷却を破つてみた。但し刺傷の方法は卵の細胞外凍結があまり進まぬうちに用いないと無効になる。[1] このとき細胞內の凍結は植氷點(又は刺傷點)にはじまり，フラッシングの場合に述べたような乳濁暗化が，まずこの點から不規則乍ら放射狀に擴がつていく。一般に −5°C より低溫では一應卵內の凍結暗化が終つてから前述のような微氷晶の融合による粒狀氷の出現が認められるが，これより僅か高溫で凍つた場合は暗化に引つづいて氷晶の大形化がすすむため，細胞內に凍結暗化がいきわたつたころには既に粒狀の氷が植氷點附近にあらわれている。過冷却度が充分小さいと，[2] 細胞質中を細い樹枝狀の氷が生長しながら引つづき幅廣く發達するため互に融合し，一見大形の氷頭が細胞質內を進んできたかのように見える場合もある(第3圖)。このようにして細胞內に現われた氷は，−6°～−7°C より高溫だと次第に消失する傾

1) −9C° で細胞外凍結がはじまつてから2分後にはもう卵を突きさしても細胞內凍結はおこらない。

2) −4°C より高溫。

向がある。

フラッシングをおこして凍つた卵が前述のように凝固して或程度固定されるのに對し，ゆつくり凍つた卵はきわめて不安定である。即ち −4°C 附近で凍つたものは，その周圍を氷でかこまれたまま多くは 1〜2 分間に Cytolysis[1] をおこし，−4°〜−5°C で凍つた卵でも同じ溫度において數分間に Cytolysis をおこすものが少なくない。又この溫度では凍結している間は Cytolysis をおこさなかつた細胞でも，融解後は凝固する場合はむしろ少なく，間もなく Cytolysis をおこすのが常である。

媒液が凍つた際にウニ卵が細胞内凍結を防いでいる能力は，卵を前もつて或程度吸水させることによつて，殆んど失われる。[2] このことを利用すると凍結過程の觀察が更に容易になる。今 60%海水中で 1 時間吸水させてから[3] 前と同じ方法で周圍の 60%海水を凍らせると，−6°C より高溫でも細胞内凍結をおこす卵が少くない。卵は約 0.5 秒位かかつて一面に乳濁暗化するが，尋常卵がフラッシングをおこした場合よりも内部が明るく表面に凹凸があらわれている (第14圖)。−6°C においては 3〜5 分位で細胞中に粒狀の氷が認められ (第 15 圖)，これはどんどん發達して大形になる (第 16 圖)。暖めると −3°C 附近で氷は全く消え，細胞内には凍結直後の暗化當時とよく似た模樣が現れる (第 17 圖)。卵膜はかなり破壞されているが，これはすでに凍結直後におこつていたものらしい (第 14 圖參照)。融解後原形質の凝固は更にすすみ，−1°C で 5 分後には前章で述べたような粗い構造がはつきりとあらわれ，これは常溫においても 1 日位は安定している。しかし吸水卵の場合でも，−4°C 附近より高溫で凍つた卵は凍結方法の如何にかかわらず數分乃至十數分で Cytolysis をおこすのが常である。

吸水卵が氷に接しているときに，マイクロニードルで刺傷すると，−2.4°C でも容易に細胞内凍結がおこる。凍結の過程は尋常卵を −5°C 位で細胞内植氷した場合とほとんど同樣であるが，卵内の氷粒の發達は更に速やかで 1 分後には細胞内はほとんど大粒の氷でみたされる (第 2 圖)。しかし吸水卵でも或程度細胞外凍結がすすめば[4] もはやその溫度において刺傷によつて細胞の内部を凍らせることは不可能である。

IV

既にアメーバで知られているように (4, 9)，原形質の凍結過程は外觀的には凍つた部分の乳濁暗化とそれに續く氷晶の融合による粒狀化として認められる。[5] この過程は形態的には植物細

1) 本文では卵が吸水膨脹して後に崩壞する樣式をさす。
2) 朝比奈英三：ウニ卵の吸水によるその耐凍性の減少 (動雜, **62**, 142, 1953).
3) この卵の受精率は對照卵と異ならない。
4) 例えば −4°C 附近では 7 分間細胞外凍結の後。
5) 筋肉細胞の凍結も觀察されているが (4)，筋肉細胞内の構造は甚だ特殊なものであるから，ここでは凍結過程を比較することは差控える。

胞でみられる液滴式のフラッシング(2)に類似したものと考えられ，細胞質内に微細な氷晶が恐らく樹枝状の進路を經て發達し，その結果細胞内に微氷晶が充滿するのであろう。このような氷の結晶形成のため，原形質はその構造を破壞されて遂には凝固するものと考えられる。凝固した原形質はその間に混在する氷晶の融合→大粒化に從つて分離壓縮されるため，以前より粗い構造[1]を示すようになるのであろう。細胞内の氷が粒狀になつて數多く現われてくることは最初樹枝狀に發達した氷が後に多數に切れたことを暗示しているのではなかろうか。二・三の膠質液の凍結過程において現われる氷晶は何れも樹枝狀にのびてかからバラバラに切れる場合が少なくない(朝比奈未發表)。

さてこの様にして凍結した細胞は必ずしも安定した狀態にはない。凍結溫度が比較的高い場合に，内部の凍つた細胞が外部も氷につつまれた狀態にあつても Cytolysis をおこして吸水膨脹しうることは，凍結による[2]原形質の變化によつて細胞内部の氷點が一時的[3]に昇つたことを意味すると思われる。細胞内にいつたん現われた氷晶が同一の溫度に保たれていても次第に消えていくことは，或程度細胞外凍結のすすんだ，即ち脫水された卵でも，[4]又稀釋海水に浸けて吸水させた卵でも同様に認められ，やはり上述の考え方を支持する現象である。

一方充分低い溫度で細胞質が凍つた場合は，細胞内に生じた構造は遙かに安定しており，融解後も常溫で1日以上もその外觀が變化しない。これは凝固した原形質が一種の固定をされたためと考えられ，吸水卵では尋常卵の場合より高溫でも，この「固定」がおこることからみて恐らく凍結速度が大きな場合におこる現象であろう。「固定」された凝固原形質は生きている狀態よりも遙かに凍りにくい狀態にあるものと想像される。即ち卵の再凍結の際には，冷却速度が特に大きくない限り，凝固原形質の大きな割れ目に氷の侵入することはあつても，それ自身を凍結させることはほとんど不可能である(第5圖參照)。

ウニ卵でみられた以上のような凍結過程及び凍結速度の相異によつておこる原形質の變性の二つの樣式は粘菌原形体を材料とした場合も全く同樣に認められ(朝比奈未發表)，恐らく原形質が凍る際に見られる一般的な現象であろう。又ゼラチンゲル(12%)の場合も −11°C より低溫で凍らせると原形質の場合より更に粗い構造に「固定」され，融解後數日間も形が變らないが，−3°C で凍らせると融解後吸水膨脹して全く舊態にもどることが知られている(10)。

V

生物細胞が過冷却された場合に受ける害の少ないことは既によく知られているが，媒液が凍結し，氷晶が過冷却している細胞に接するに及んでも多くの細胞はむしろきわめて凍りにくい

1) 極端な場合は所謂網目構造として知られている。
2) 恐らく他の方法でもおこしうるであろう。
3) 勿論凍結細胞の内部が外部と平衡狀態になるには相當の時間がかかる。
4) 例えば媒液が −8.2°C で凍結後4分30秒たつてから凍つた細胞内の氷粒は −7°C より低溫に保つても7分後には全く消失した。

ものである。適當な過冷却狀態にある細胞が氷に接すると，細胞は脫水されて收縮し,[1] その結果外圍の氷は更に發達する。いわゆる耐凍性の高い生物ではこの性質は甚だ發達し，例えばある昆蟲の組織細胞等は收縮した狀態で氷の間に挾まれていても相當の低溫において長期にわたつて生命を維持出來る (3)。このような現象は古くから植物を材料として觀察され，細胞外凍結としてひろく知られている (7)。

動物細胞でも Chambers 及び Hale はアメーバや蛙の筋肉細胞でこのことを觀察し，生きている細胞の原形質膜は內部の凍結を防ぐ力があることを强調している (4)。このような細胞の耐凍性については，Scarth 及びその門下によつて植物細胞について詳細に研究され，原形質の物理的性質特に水に對する大きな透過性が最も役立つているように考えられている (8, 12)。たしかに細胞外凍結がはじまつてから比較的短時間に細胞からの脫水は平衡狀態に達し，その溫度において細胞を突きやぶつても新しく氷の生成をみることは出來ないから，細胞からの脫水速度が大きいことは內部の凍結を防ぐために甚だ有効である。しかし媒液の凍結によつて細胞に氷が接した後或時間以內にその內部に植氷すれば常に細胞內は凍りうるのであるから，少なくとも一次的には原形質表層部の構造がこれより內部に凍結の始まることを防いでいることは疑う餘地がない。この性質はウニ卵の場合も相當に强力なもので −10°C まで過冷却させた媒液の急激な凍結に對して充分耐えるだけの能力がある。[2] このような耐凍性をしめすウニ卵表層部の構造は當然この部分における原形質內の水の狀態と密接な關係があり，卵細胞の脫水及び吸水によつて卵の耐凍性はきわめて容易に增減しうるものであるが，これについては更に稿を改めて述べたいと思う。

VI 摘　　要

ウニの未授精卵を僅かの海水とともに流動パラフィン懸滴に封じて冷却し，適當な溫度で過冷却を破つて細胞の凍結過程を觀察した。

周圍の海水が凍つても −8°C より高溫ではウニ卵はきわめて凍りにくく，脫水されて收縮するに過ぎない。このような細胞外凍結は短時間ならば卵にとつてほとんど無害である。

更に低溫で媒液が凍ると卵は甚だ急速な凍結即ちフラッシングをおこす。このとき卵內は瞬間的に全体が乳濁暗化し，しばらくすると氷が粒狀に散在してあらわれてくる。この過程は細胞內植氷又は吸水卵を用いることによつて，更にゆつくりと觀察することが出來る。氷は細胞質內に微細な樹枝狀に擴がり，發達するにつれて互に融合しまた諸方で分斷して大形粒狀になる。氷晶の形成により構造をこわされた原形質は變性凝固して更に粗い構造となる。フラッシングの場合のように急速に凝固した原形質は一種の「固定」をされてかなり安定した狀態にあ

1) このような脫水は凍結によつて濃縮された媒液によるものと考えられやすいが，植物細胞でみられる氷による原形質分離 (2) 等の例からみても，氷による直接の脫水も共に行はれるものであろう。

2) しかし −14°C で媒液の過冷却をやぶると卵は例外なくフラッシングをおこす。

る。一方卵内がゆつくり凍つた場合はそのままの溫度において細胞は氷の間にありながら數分間で Cytolysis をおこして吸水膨脹する。これは凍結によつて原形質が變化し，その氷點が昇つたためと考えられる。比較的高い溫度でいつたん凍つた卵の中の氷粒が同じ溫度おいても次第に消失していく現象も上記の考え方を支持する。

媒液の凍結した場合に過冷却狀態にある細胞が內部凍結を防いでいる機構は，第一に細胞質表層部の構造がその內部えの凍結の進行を阻んでいるからである。このような細胞表層部の耐凍性は，當然この部分における原形質內の水の狀態を變えることによつて影響され，細胞の吸水及び脫水によつてきわめて容易に變化させることが出來る。

文　献

1) 朝比奈英三 1950 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，低溫科學 **3**, 229.
2) ———— 1948 同 V. 植物細胞のフラッシ型凍結の一樣式に就いて，同 誌 **4**, 85.
3) 朝比奈英三・青木薗・篠崎壽太郎 1953 越冬イラガ幼蟲の耐凍性機構，昆蟲(印刷中).
4) Chambers, R. and H. P. Hale 1932 The formation of ice in protoplasm. Proc. Roy. Soc. London, B. **60**, 336.
5) Kamada, T. 1941 Membrane elevation of sea-urchin egg by intracellular injection. Proc. Imp. Acad. Tokyo, **17**, 142.
6) 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.
7) Levitt, J. 1941 Frost killing and hardiness of plants. (A critical review) Minneapolis.
8) Levitt, J. and D. Siminovitch 1940 The relation between frost resistance and the physical state of protoplasm. I. The protoplasm as a whole. Canad. J. Res., **18**, C. 550.
9) Molisch, H. 1897 Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen. Jena.
10) Moran, T. 1926 The freezing of gelatin gel. Proc. Loyal Soc. London, A. **112**, 30.
11) Seifriz, W. 1939 Pathological changes in protoplasm. Protoplasma, **32**, 538.
12) Siminovitch, D. and J. Levitt 1941 The relation between frost resistance and the physical state of protoplasm, II. The protoplasmic surface. Canad. J. Res., **19**, C. 9.

Résumé

The unfertilized eggs of a sea-urchin, *Strongyrocentrotus nudus*, mounted with a small amount of sea water in thin hanging drop of liquid paraffin were subjected to freezing in a special thermostat in a cold chamber, and the freezing process of the eggs was observed.

The eggs supercooled previously for 24 hours at −10°C show normal fertilizability and subsequent development. Even when the external sea water completely freezes, the eggs can be cooled without formation of ice in the cells down to −10°C at least for one hour, resulting in a remarkable dehydration and contraction of the eggs without injury (Fig. 7–11).

Intra-cellular freezing of the egg caused by the rapid freezing of external sea water at a temperature below −8°C, is always spontaneous.

This freezing process seems to be a sap drop type "flashing" of the freezing of plant cells.

For the purpose of observating the slow freezing of the cell interior, the egg was punctured with an ice-tipped pipette, or eggs swollen previously in dilute sea water were employed. In this case the propagation of the freezing in cytoplasm is observed only as a wave of opacity that starts from the inoculated point. It seems probable that the whole cell is filled with dendritic fine ice crystals which are then torn into a number of minute particles and finally become a

larger spherical ice mass (Fig. 14–16). In thus frozen egg, the structure of the protoplasm is entirely destroyed by the crystallization of the water in the cell and the cytoplasm coagulates presenting a coarsely granular appearance (Fig. 17). Such a denaturation of the protoplasm seems to elevate the freezing point of the cell interior.

When thawed, the coagulated cytoplasm in the egg which had been frozen rapidly is in a rather stable state (Fig. 4, 5), and the contracted mottoled pattern in the cell does not disappear at least for 24 hours at room temperature. On the other hand, after slow freezing of the cell interior the egg is usually cytolysed and collapses in a few minutes or more even when the egg is mounted tightly in the ice mass of frozen sea water.

The ability of the surface layer of living egg to prevent effectively the transmission of freezing to the supercooled cell interior is remarkably diminished by the imbibition of the egg in diluted sea water.

圖 版 說 明

第1圖版 キタムラサキウニ未授精卵の細胞内凍結

1. 媒液(海水)の凍結によりフラッシングをおこして凍つた卵(右下の暗色の1卵)。内部の凍らぬ卵はいづれも氷に壓されてやや扁平になつている。
2. 60%海水に1時間浸けた卵。媒液を凍らせて4分後, −2.4°C で刺傷して卵を凍らせる。それより1分後, −3.6°C で撮影。卵は氷に壓されて凍結前既に變形している。
3. −4°C 附近にて細胞内に植氷した卵。植氷後20秒, 4.8°C。この圖のみはエゾバフンウニ卵。
4. −20°C にて媒液の凍結のためフラッシングをおこして凍つた卵を融かし, 卵内の氷が消失したところ。凍結後1時間, −4.4°C。細胞質は「固定」され1種の模様があらわれている。
5. 同上。再凍結。外圍の氷は大きなワレ目には入りこむが「固定」された細胞質は甚だ凍りにくい。

(1圖 100×, 2, 3, 4, 5圖 350×, 2, 4, 5圖は位相視野)

第2圖版 キタムラサキウニ未授精卵の細胞外凍結

6. 常態の卵。懸滴の海水が少いためや扁平になつている。−3.8°C にて。
7. −3°C にて媒液に植氷, 12分後, −3.7°C。B 卵は上端を刺傷してある。
8. 同上。22分後, −3.4°C。B 卵を擴大, 表面沈澱膜をしめす。
9. 同上27分後, −4°C。A 卵の擴大。

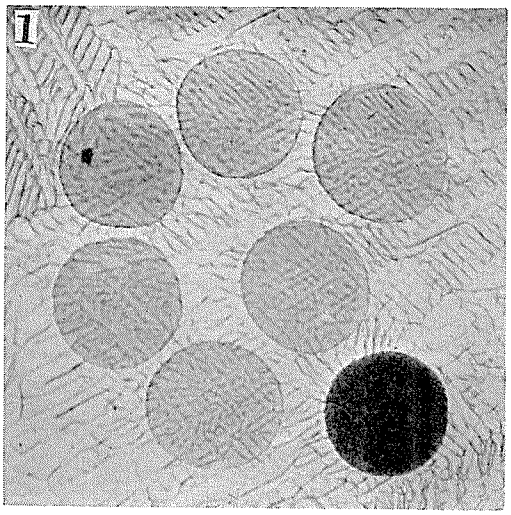
(6, 8, 9圖 350×位相視野, 7圖 100×,)

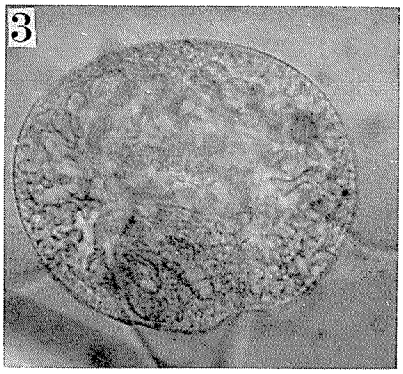
第3圖版 同じく細胞外凍結

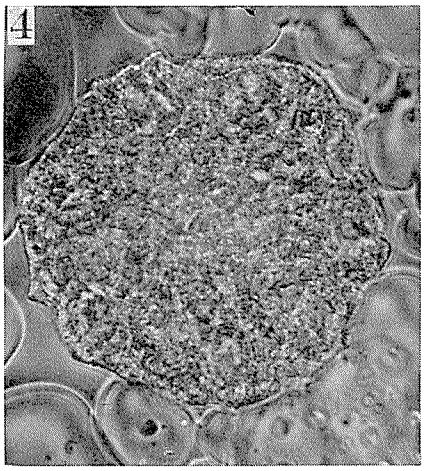
10) 9圖と同じ卵, 50分後, −8°C。
11) 7圖と同じ, 57分後, −7.8°C。卵はいずれも脫水されて收縮し, 氷におされて變形している。
12) 同上。64分後 (媒液融解後30秒), 0.6°C。卵はまだ收縮變形したまま。
13) 同上。69分後 (融解後5分30秒), 0°C。

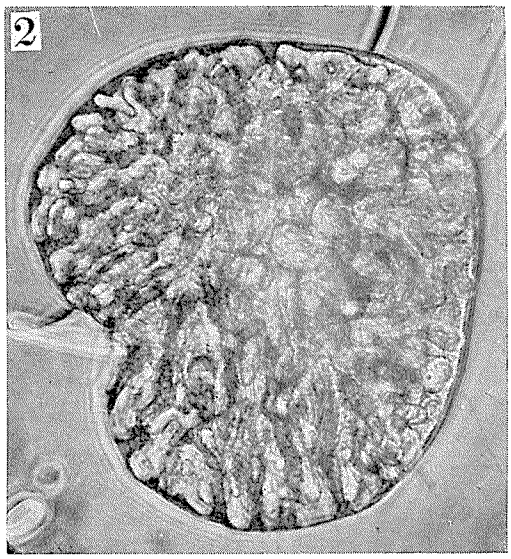
第4圖版 吸氷卵の細胞内凍結

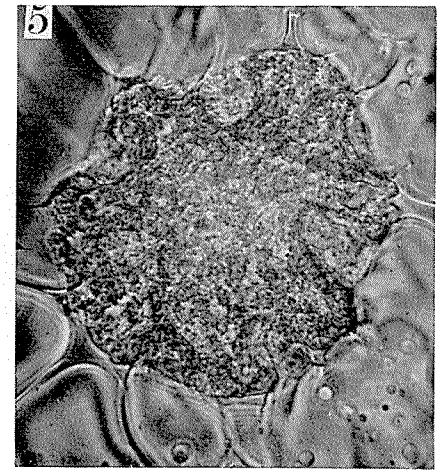
14) −6.2°C で媒液(60%海水)に植氷, その凍結のため−5.4°C 位で細胞内凍結をおこした卵。凍結より1分15秒後, −6°C。急激なフラッシングのときに比べると細胞内が明るい。
15) 同上。4分後, −6°C 微細であつた氷晶ははつきり粒狀になつて卵内に現われる。
16) 同上。13分後, −6.4°C。氷粒はますます大形となりその數は減る。これより暖める。
17) 同上。20分後, −2.8°C (卵内の氷が消失してから約1分)。これより數分で卵内の凝固した細胞質はもつと粗い模様となり常温で1日位はもう變らない。



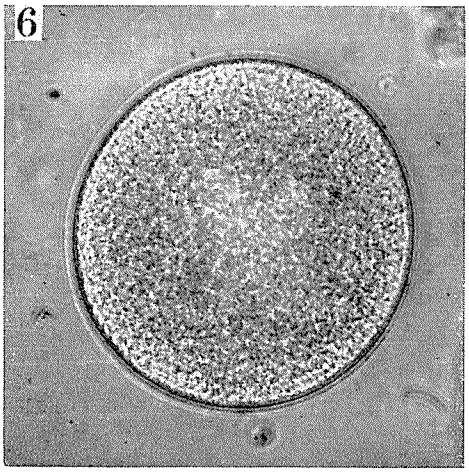


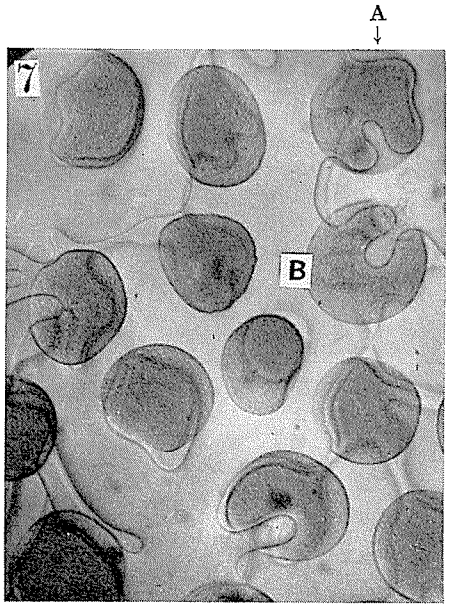


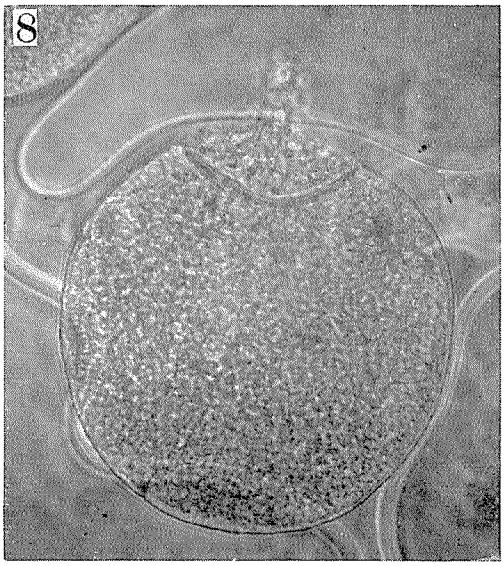


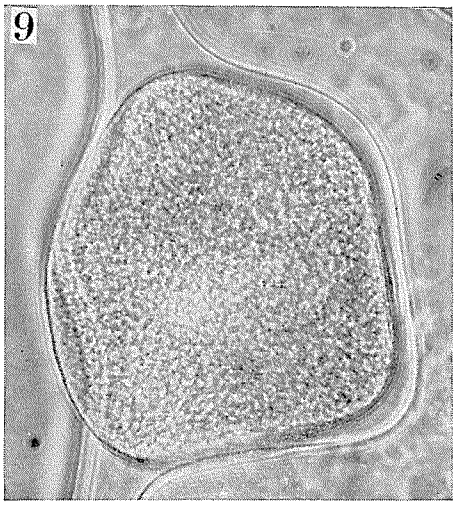


第 1 圖 版

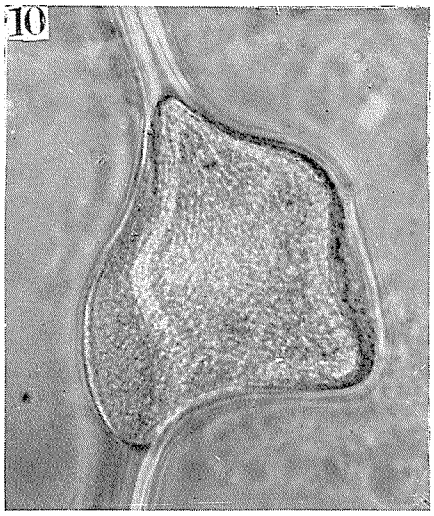


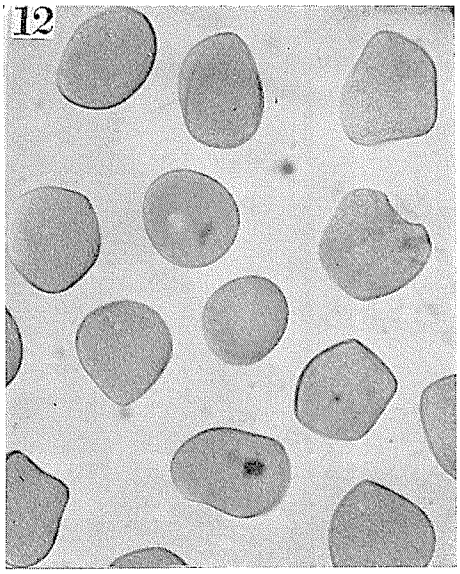


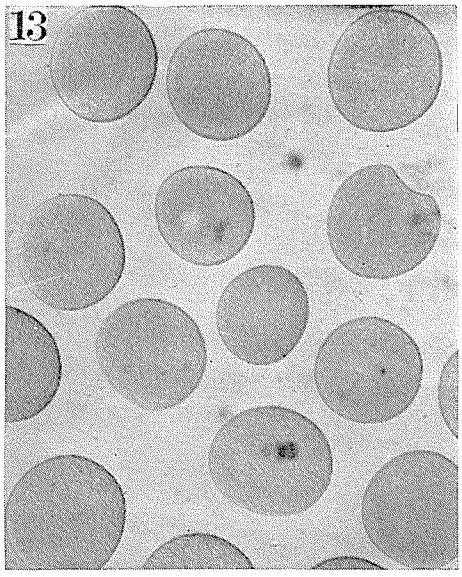




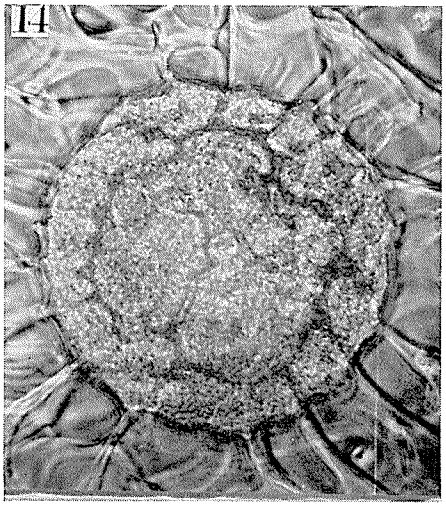
第 2 圖 版

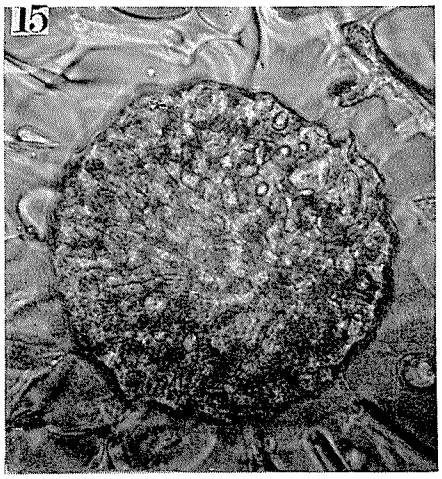


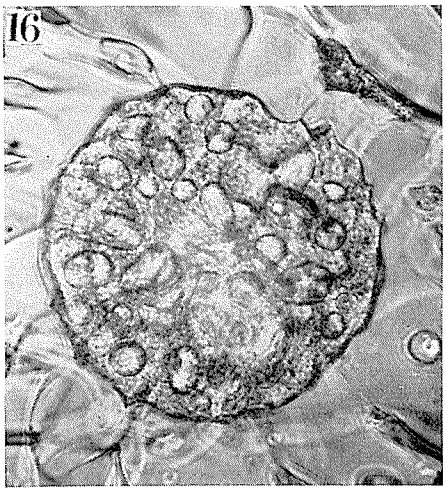


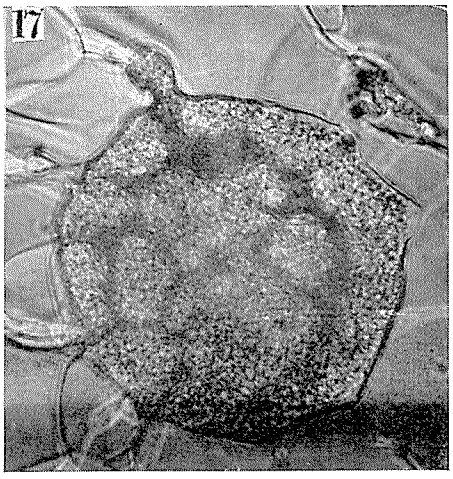


第 3 圖 版


14


15


16


17

第 4 圖 版