



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生物學的材料の凍結乾燥法 : 第7報 組織標本製作法としての凍結乾燥法について
Author(s)	兼平, 信一; KANEHIRA, Shin-ichi
Citation	低温科學, 10, 137-161
Issue Date	1953-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17551
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_p137-161.pdf



生物學的材料の凍結乾燥法

第7報 組織標本作製方法としての凍結乾燥法について*

特に凍結並びに乾燥條件の吟味

兼平 信一

(低温科學研究所 醫學部門)

(昭和27年8月受理)

I. ま え が き

近來いろいろな生物學的材料, 例えば細菌, ヴァイラス, 血清, 血漿, 及びある種の藥品, 食品類等を長期保存するためには, 凍結乾燥による方法が最も優秀であると確認された結果, これらの材料の凍結乾燥が廣く各方面で行われ, 又その方法も次第に改良されて, 今日ほぼ完成の域に達するようになった。

一方動物或は植物の組織については, 保存の目的ばかりでなく, 組織標本の作製にも供せられ, 特に従來の標本作製法には見られない數多くの利點を持つている。例えばこれまでの方法では, まず最初に種々の化學劑による固定操作が行われるため, 組織の收縮, 細胞内諸物質の消失, 變性等がおき, 或は固定液の組織内に於ける擴散速度が遅いため標本内外部像の相違が生ずるなど, 不都合な點が少なくない。ところが, 凍結乾燥法によれば, これらの障害が除かれ, 特に組織内諸種物質の化學的な變化は殆んどみられないといわれている。

Altmann (1890)¹⁾ によつて創案され, Gersh (1932)²⁾ によつて改良されて, 始めて實用的な装置並びに操作として紹介されたこの方法は, 結局一種の物理的な組織固定法ともいべきものであつて, 低温で凍結した組織をそのまま融解させることなく高度の眞空中で乾燥させた後, パラフィン, ツエロイデン等で包埋し, 標本作製に供するのであるから, この方法自体の原理は, 一般の生物學的材料の凍結乾燥法と變る所がない。

さて, Gersh (1932) の發表以來, 組織の凍結乾燥法についての關心は急に高まり, 爾來本法に關する研究も次第に盛んになつて今日に及んでいるが, これ迄の研究方向からみて, これを三つに分けて考えることが出來よう。

第一は, 主として装置に關するものであり, Taylor (1944),¹¹⁾ Wang & Grossman (1949),¹²⁾ Harvey (1950),¹³⁾ 辻等 (1950)¹⁴⁾ により凍結乾燥器に多くの改良, 簡便化がはかられた。

* 北海道大學低温科學研究所業績 第142號.

第二は、種々の材料について実際に應用された場合で、Bensley & Gersh (1933,³⁾ Bensley & Hoerr (1934⁷⁾等が動物組織に本法を利用したのを始めとし、以後主として形態學的及び種々の酵素、糖原及び放射性同位元素等に関する組織化學的研究に盛んに利用されるようになった。又植物組織に關しても、Scott (1933)⁹⁾は顯微灰像法に、Goodspeed & Uber (1934⁶⁾は、*Lilium long.*の染色絲と基質の形態の研究に利用している。

その外、Taylor (1944)¹²⁾ Weiss (1943)^{10),12)}等は動物組織の移植に關する實驗に、Strumia 等 (1948)¹⁶⁾は大きな組織をプラスチックで保存するのに利用しており、その應用範圍は極めて擴大されて來た。

第三は、この方法を實施する場合の基礎的條件(例えば凍結並びに乾燥過程に於ける種々の條件)に關する研究であるが、この方面の檢討は從來比較的看過されて來て居り、私が本研究を意圖した目的も主として、これらの條件を詳しく吟味したいと考えたことにある。それでは從來組織の凍結乾燥を實施する場合に、どの程度の注意が拂われていたかというに、これまでに發表された實驗報告を参照し、主に凍結並びに乾燥の條件について考察してみると、まず凍結の條件については割合に關心が持たれ、その中でも特に、良好な組織標本を作製するためには相當低溫度で組織の凍結を行う必要のあることが以前から提唱されている。

例えば、Hoerr (1936)⁷⁾ Simpson (1941)¹⁵⁾等は液体空氣を使用(Gersh; 1932)するよりも液体窒素で冷却された Pentane (-131°C) 或は Isopentane (-195°C) の方が形態學的に結果がよいと述べている。Koonz & Rambsbottom (1939)⁹⁾は、にわとりの肉を種々の低溫度で凍結した後、常に一定溫度(-30°C)以下に冷却し乍ら乾燥して組織内の氷結状態を比較し、その後 Taylor (1945)¹³⁾は犬の神經組織を凍結乾燥し、種々の條件で行つた試料の凍結曲線を記載している。

しかしこれらの實驗では、主として形態學的觀察が行われているのみで、組織化學的検査に對する凍結條件の影響については、検討されていないし、もちろん、組織の機能的變化についての考察は行われていない。

次に乾燥の條件を吟味した報告に到つてはその例が極めて少なく、理論的に考えた生体内鹽類の eutectic point を規準にして、乾燥過程に於いて Gersh (1932) は -20°C 以下、Hoerr (1936) は -30°C 以下に組織を冷却しなければならぬと述べており、乾燥時間についても僅かに Taylor (1945)¹³⁾が犬の神經組織について各種の冷却溫度に於ける試料の含水量から多少の知見を述べているにすぎず、乾燥過程中の組織の乾燥状態或は溫度の消長等に關する報告例が皆無であるため、乾燥終末點の明確な決定法がなく、ただ比較的長時間乾燥すればよいという程度の漠然とした知見しか得られていない。又これまでの記載では組織冷却用の寒劑溫度或は乾燥容器溫度をもつて、組織自身の溫度とみなした感があり、直接組織自身の溫度變化を測定していないし、また試料の乾燥状態も精しくしらべてない。更に凍結の條件を一定にし、乾燥の條件を種々に變えた結果を組織學的、或は機能的に比較検討した研究も見あたらない。

要するに從來は、組織を出来るだけ低溫度で急速に凍結し、乾燥も凡そ -30°C 以下で長時間

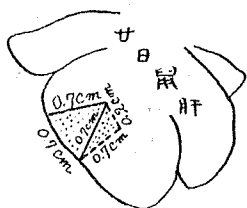
行えばよいといつた程度の比較的漠然とした規準に基づいて實施されて來た。

私は組織の凍結乾燥を行うにあたり、優秀な標本を作製するためには、これまで比較的等閑視されて來た凍結並びに乾燥過程の諸條件をもつと明確にする必要を感じ、更に従來とかく繁雜視されている本法を、出来るだけ簡易にできるよう、装置並びに操作を工夫することを目的として本法の研究を行つた。即ち一定の動物組織を材料とし、特に装置を考案して凍結並びに乾燥の條件をいろいろに變えながら従來行われなかつた組織の乾燥過程（組織溫度並びに乾燥状態）の觀察を行い、乾燥終末點を規定すると共に乾燥包埋された試料にいろいろな染色、特に二三の特殊染色を施して形態的、殊に組織化學的の檢索を行い、前記の諸條件の變化に伴う標本上の差異を組織學的な立場から比較検討した結果、若干の知見を得たので、ここに報告する。

II. 實驗方法

1. 實驗材料

頭部打撲による致死直後の二十日鼠肝を第1圖のような一定の大きさに切出して使用した。これは出来るだけ薄く、且表面積を廣くして試験試料の乾燥能率を良くするため、及び後述の乾燥過程に關し、一定の條件を附與しようと思つたからである。また肝臓を使用した理由は、一定の大きさに切り易い、或は染色に便宜などの利點があるからである。



第1圖 組織片の大きさと切出し方

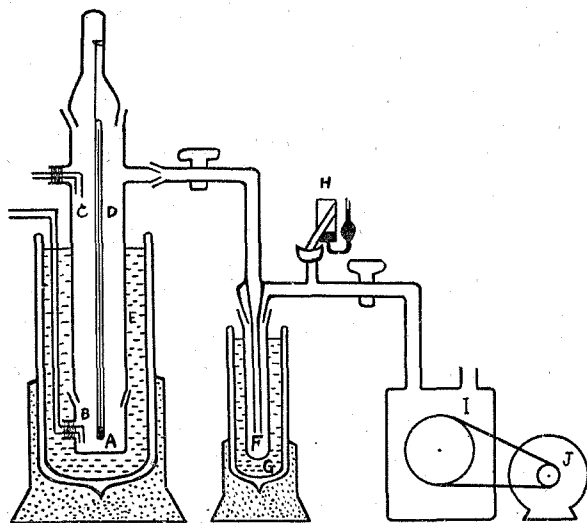
その構造は、第2,3圖の模型圖に示した通りで、殆んど全部硝子製である。

A) 眞空ポンプ：Cenco 型油廻轉式ポンプで、排氣量は毎分 200 Liter のものを使用した。

B) 眞空計：McLeod 型變法の小型廻轉式眞空計（島津製）を使用した。これは 0.1~0.001 mmHg 間の眞空度測定が可能である。本乾燥装置を用いての乾燥過程の眞空度は概

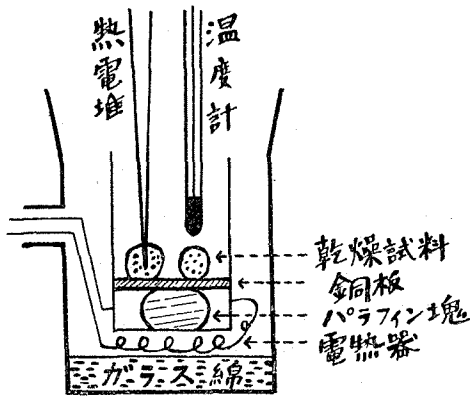
2. 實驗装置

装置は、大体 Gersh (1932) の原法に従つたが、なるべく簡便でしかも自分の實驗意圖にそうように設計自作した。



第2圖 全乾燥装置9模型圖

- A. 乾燥兼眞空包埋器 B. 電熱器線 C. 熱電堆
- D. 溫度計 E. 鹽化カルシウムブライン F. 除濕器
- G. 液体空氣 H. 眞空計 I. 眞空ポンプ J. モーター



第 3 圖 乾燥兼真空包埋器の略圖

約 0.008 mmHg であつた。

C) 除 濕 槽: 液体空気で冷却した低温凝結器を用いた。凍結組織から昇華した水蒸気はここで凝縮し、霜となつて除去される。

D) 乾燥並びに真空包埋器: 乾燥に當つて多岐管に接続出来る容量約 500 cc の硝子製圓筒状容器で、ここで凍結試料の乾燥及び乾燥試料のパラフィン等による包埋操作を行う。また乾燥過程に於ける被乾燥体の温度を適宜に保持するため、豫め任意の温度に保つてある鹽化カルシウムブラインの魔法瓶で外から冷却出来るよ

うにしてある。私は自分の實驗の都合上、次の諸點を特に工夫した。

i) 數個の組織を同時に乾燥するが、その中の 1 箇に熱電堆 (銅—コンスタンタン線) を挿入して、操作中に於ける温度経過を連続的に觀察した。

ii) 乾燥器には、更に容量約 20 cc の硝子容器を入れ、その中にパラフィン塊と、金屬板をおさめ、底には小型の電熱器をとりつけた。金屬板の上にのせた凍結組織の乾燥が終了した後はヒーターを通じてパラフィンを融解させると、試料は金屬板と共にパラフィン中に沈み、真空中で包埋されるようになってゐる。なお、パラフィンは、豫め真空中で一度溶融してなるべく泡をとつておいた方がよく、金屬板を使用したのは、パラフィン溶融時に泡立ちのため、試料が容器の外に吹き出されるのを避けるためである。また底に入れてある小型ヒーターは凡そ 200 W 位のもので、實施の際はこれに更に抵抗器を併用し、パラフィンの溶融状態を見ながら加熱の程度を加減する。

iii) 乾燥器内には、小型棒状温度計を吊り、乾燥容器内、特に試料の附近の温度を測定した。

3. 實驗操作

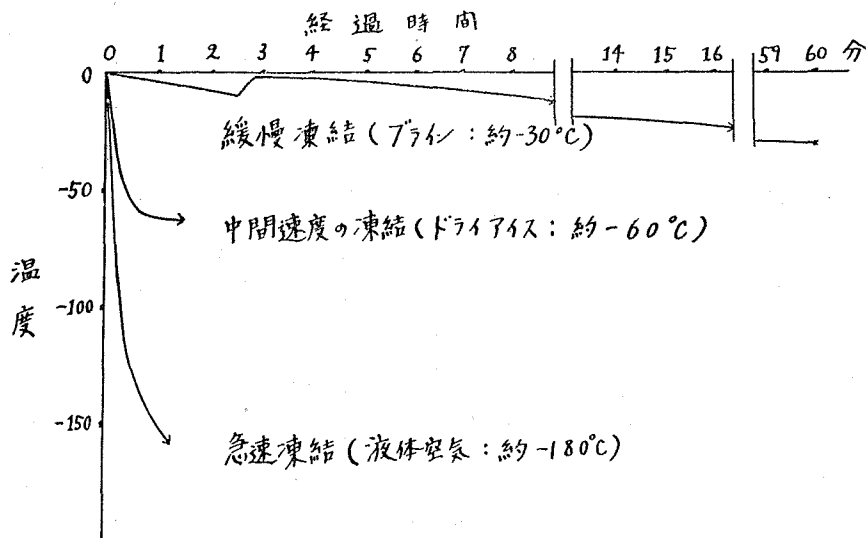
前に述べた通りの一定の大きさに切出した二十日鼠肝切片を材料とし、操作上の條件を種々に分けて行つた。實驗は各條件について、2~3 回反覆實施し、毎回同一個体から、7~8 箇の肝切片を切出して使用した。概ね冬期から春期にかけて行つたので、室温はほぼ +10°C ~ +15°C であつた。その實驗内容は次の通りである。

A) 組織の凍結條件をいろいろに變え、乾燥中の冷却保持温度は常に一定 (-30°C 以下) に保ち乍ら、乾燥した場合:

三種の極端な冷却速度により組織の凍結を行つた。その曲線は第 4 圖に示す通りである。

i) 液体空気に直接組織片を入れて凍結 (冷却速度凡そ 160°C/min.)。

ii) ドライアイス・アルコール中に、徑約 3 cm の平底試験管を入れておき、更にその中に組織片を入れて凍結 (冷却速度凡そ 60°C/min.)。



第 4 圖 組織片の凍結曲線略圖

iii) 組織片を乾燥器に入れ、その周囲を -30°C のブラインにて冷却しながら凍結(冷却速度凡そ $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$.)。

B) 一様に液体空気で凍結(冷却速度凡そ $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$.でほぼ一定)した組織をいろいろな温度で冷却しながら乾燥した場合:

大体 4 種の恒温度で組織を冷却しながら乾燥した。

- i) -30°C 附近
- ii) -20°C //
- iii) -10°C //
- iv) 室温 ($+10^{\circ}\text{C} \sim +15^{\circ}\text{C}$)

C) 対照として、凍結しない組織、及び凍結(液体空気)後一旦室温で融解した組織をそれぞれ室温にて真空乾燥した場合。

さて次に、凍結乾燥を実施する場合の具体的な操作を記載する。

凍結操作について: 組織片を凍結した後乾燥を開始するまでに、組織温が上つては困るので操作はすべて -30°C 以下の低温室で行い、試料は液体空気、ドライアイス、ブライン等を用いて、いろいろの冷却速度で凍結するのであるが、液体空気の場合は、まず真鍮製の金網籠を作り、底部に薄い銅板を敷いて、数箇の組織片を載せ、直接液体空気中に没入し、沸騰が終る迄放置しておいてから取出すのである。その際組織は白く、固く凍結して、容易に銅板から離れる。ドライアイス、ブライン等による凍結法は前述の通りで、特記すべきことはない。更に以上のような各種の凍結を行う際、同時に熱電堆を挿入しておいた同大の組織片にも、それぞれの凍結法を施し、熱電堆の尖端は常に組織の中心部にあるようにしておく。次いで、豫め -30°C 以下に冷却しておいた乾燥器に、これらの凍結した試料を入れ、(ブラインで凍結した場

合はそのまま)、これを速かに除濕装置に接合して、次の乾燥操作に移る。

乾燥操作について：乾燥器を接続したら、直ちに減圧を開始するのであるが、その前に装置内は豫め、できるだけ高真空にしておく。減圧と共に組織の温度は低下するが、乾燥の経過と共に、次第に上昇し、やがて冷却ブラインの温度と一致する。此の點では、もはや大部分の水分はなくなつたものと考えられるので、冷却をやめて室温で乾燥する。その後急に温度が上昇して室温と一致するようになる。この點を乾燥終末點と考える。

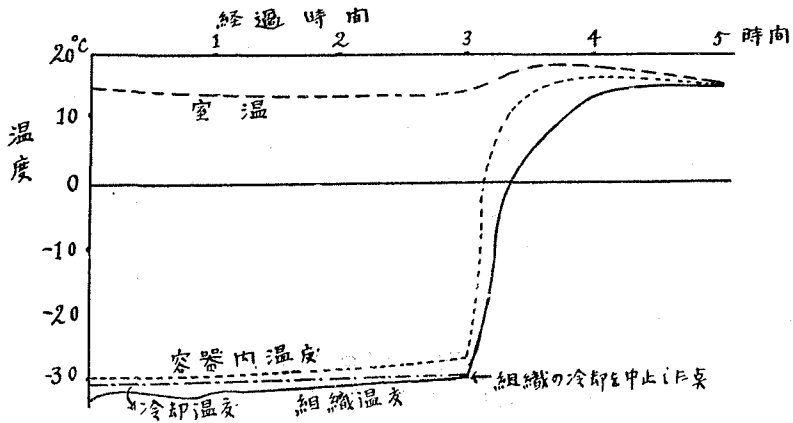
乾燥が終了した後、第2圖の小型電熱器に電流を通じると、パラフィンが融け、自動的に乾燥組織がその中に落込んで包埋されるのであるが、真空中であるから、パラフィンの組織内滲透が急速で包埋時間はせいぜい5~10分位で充分である。組織片は大抵溶融パラフィンの中で泡を出し、中には丁度沸騰した熱湯の中で肉片でも煮ているような感じのするものもある。而しこの際の温度はせいぜい+50°C内外である。5~10分位経つて乾燥器内に、徐々に空気を入れると沸騰が直ちに止み、次第にパラフィンが固つて来るから暫らく放置した後それを取り出す。それから後は通常のパラフィン包埋法と全く同じで、鑄型に入れ、ブロックにし、臺本に取付けて薄切する。薄切も任意の厚さに連続切片にして取ることが出来る。切片をガラス板に貼布する場合、凍結乾燥法によるものでは特に Dry method が採用されている。これは水をさけて切片をそのまま卵白グリセリンを薄く塗布した硝子板に載せ、丁度パラフィンが融ける迄の温度迄下からあたため乍ら指で伸す方法であるが、出来上りがどうしても皺になり易いという缺點がある。しかし従来のように切片を水に浮かしてガラス板で掬い上げる方法では組織がくずれてしまう。そこで色々工夫してみた結果、次の方法で割合に簡便に、而も綺麗に伸展することが出来た。先ず硝子板に卵白グリセリンを薄く塗布し、その上に極く少量の水を一滴落してから切片をのせ、下からパラフィンが融けない程度(+50°C以内)に少しくあたためて伸展する方法である。この際過熱のため組織の熱變性や弛緩を來たさないように注意しなければならない。次いで乾燥器に入れて乾かし、必要に応じてキシロール等で脱パラフィン操作を行つた後染色を行う。この實驗ではいろいろの條件で凍結乾燥した試料について、その結果を組織學的な立場から形態學的、特に組織化學的に觀察したことは、すでにまえがきの項で述べた通りである。

III. 實 驗 成 績

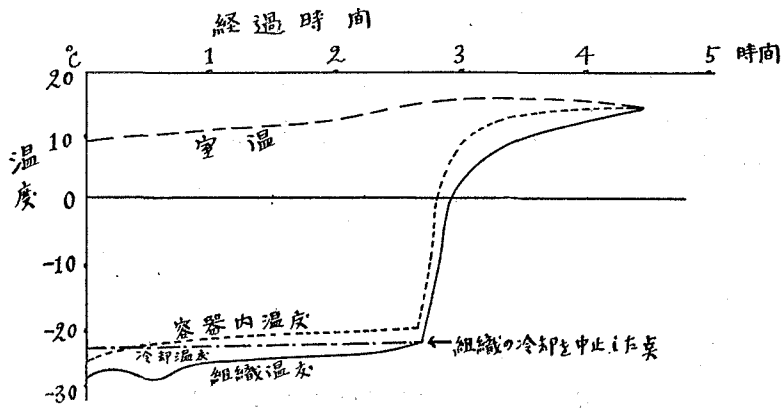
前記の各條件でそれぞれ2~3回づつ行つた實驗に於いて、試料の凍結曲線は既に前項で記載した。乾燥経過及び乾燥後の性状については、次のような成績を得た。

1. 乾燥過程に於ける試料の温度、含水度の消長

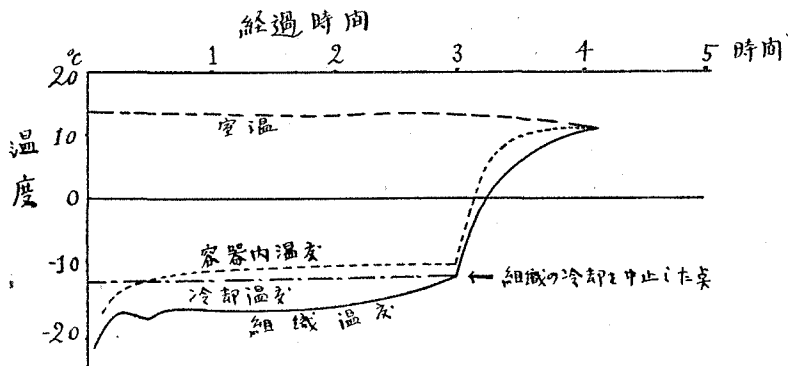
組織片の温度、乾燥器内部の温度、乾燥器外部の冷却温度及び室温等を乾燥の経過にそい、時間とともに觀測記録した結果は、第5圖~第11圖の通りである。



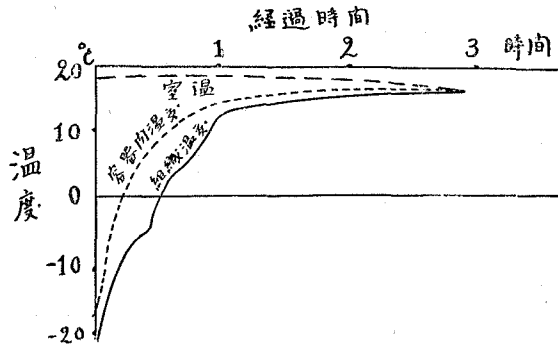
第 5 圖 乾燥經過中の組織の温度曲線
凍結：液体空氣 乾燥： -30°C 附近に冷却



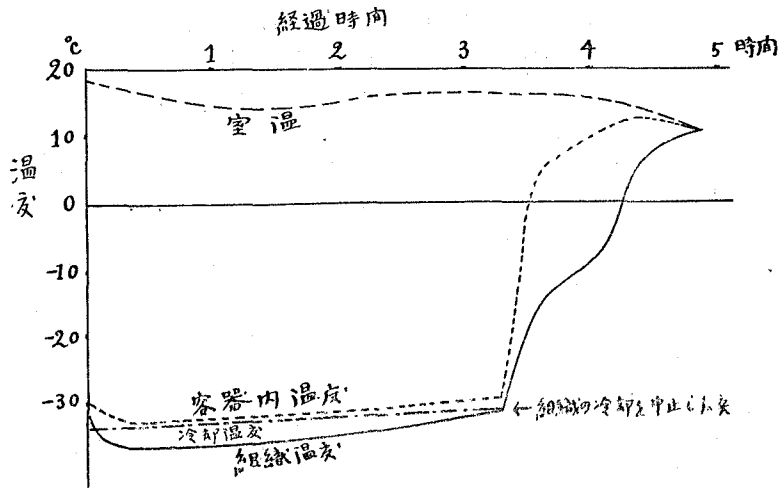
第 6 圖 乾燥經過中の組織の温度曲線
凍結：液体空氣 乾燥： -20°C 附近に冷却



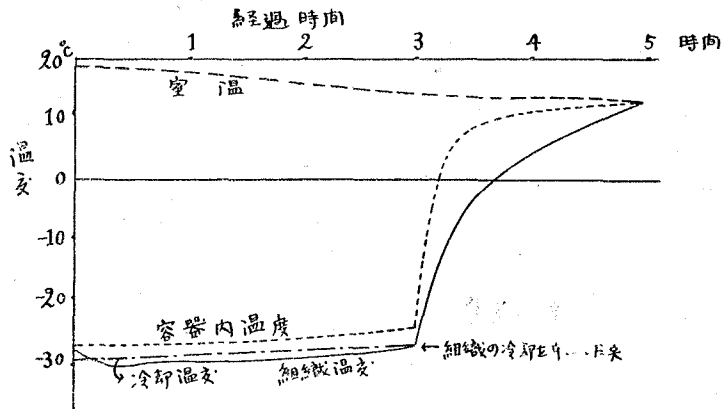
第 7 圖 乾燥經過中の組織の温度曲線
凍結：液体空氣 乾燥： -10°C 附近に冷却



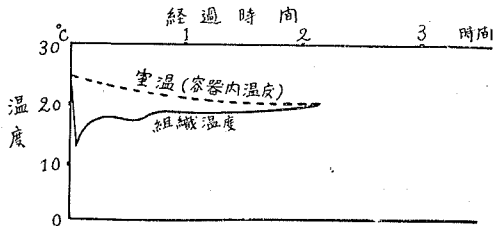
第 8 圖 乾燥経過中の組織の温度曲線
凍結：液体空気 乾燥：室温



第 9 圖 乾燥経過中の組織の温度曲線
凍結：ドライアイス 乾燥：-30°C 附近に冷却



第 10 圖 乾燥経過中の組織の温度曲線
凍結：ブライン 乾燥：-30°C 附近に冷却



第 11 圖 乾燥経過中の組織の温度曲線
組織を豫備凍結しないで室温で乾燥

そこで寒剤を除いて外部よりの冷却をやめると、組織温は急激に上昇して約 1 時間半乃至 2 時間で室温と同一の温度迄達する。この点を大体乾燥の終末点と考える。組織片とそれを冷却しておくための寒剤との温度差は、寒剤の温度が -10°C 、 -20°C 、 -30°C と、低温になるほど小さくなることもわかった。次に乾燥過程に於ける試料の含水度の消長をみるに、第 1 表の如く減圧開始後約 5~6 時間(室温で真空乾燥する場合は約 3 時間)で、完全に乾燥が終了することを知った。しかし組織温度が冷却温度に一致した点では -10°C の場合は含水度 22.4% であるが、 -30°C の場合は 92.6% で、ほとんど乾燥していないことがわかった。また組織の冷却保持を中止した後、乾燥終了迄組織片の状態を肉眼的に観察したけれどももはや何等の變化も認められないし、更に凍結試料を最初から室温で乾燥した場合でさえも、何等の融解像を認め得なかつた。その上凍結試料を室温で一旦融解させた後、室温で真空乾燥した場合でも、減圧を開始すると同時に再凍結し、そのまま凍結乾燥が續けられた。

第 1 表 残水量(組織の全含水量に對する残水量の%)

組織冷却	乾燥時間		
	3 時間	5 時間	6 時間
室温	2.9%	1.2%	不變
-30°C 附近	92.6%	~	67.7%
-30°C 附近	93.8%	冷室 冷却中 止乾燥	5.09%
-20°C 附近	30.2%		~
-10°C 附近	22.4%		~

豫備凍結を行わない資料では、組織温は最初室温から始まるが、減圧開始と同時に相當温度降下を示すけれども凍結するまでには到らず、そのまま乾燥してしまうので所謂ミイラ化し、包埋も不能に終つた。

2. 乾燥後に於ける試料の性状所見

1) 一般性状: 乾燥終了後の組織片は、液体空気で凍結したもものでは、乾燥時の冷却条件とは無關係にいずれも原形のままフワフワして薄桃色によく乾燥しており、手指で採み乍ら押しつぶしてみると容易にサラサラとくすれ落ちる。そしてドライアイス、鹽化カルシュウム、ブライント、凍結時の冷却速度が遅くなる程同様よく乾いてはいるが、押しつぶした際粒子が粗くなるようである。對照に行つた豫備凍結しない試料の室温真空乾燥では凍結しないでそのまま赤黒く固く乾燥し、丁度かつおぶしでもみるような所謂ミイラ化の状態であつた。更に液体空気で凍結した後一旦室温で融解したものの室温真空乾燥では再凍結し、上記の液体空気によ

る凍結乾燥の結果と同様の所見であつた。

2) 組織學的所見：乾燥試料の組織學的な検査にあたり、形態學的にはこれ迄行われてきたヘマトキシリン・エオジン重染色法及び弾力線維、膠質線維及び格子狀線維染色法等二三の特殊染色法を施し、また組織化學的には、グリコーゲン、フォスファターゼ、核酸、オキダーゼ等の検出法を施して従來の化學劑固定法によつて作製した標本も参照しながら、前記諸條件の變化に伴う差異を比較した所見を、特殊な染色方法、検出方法についてその詳細を説明しながら以下順を追つて記載する。

i) 形態學的所見

ヘマトキシリン・エオジン染色所見：普通に行われている P. Mayer の酸性 Hämalaun で核染色してから水溶性エオジンで原形質、細胞間物質等を染め、細胞の形、核の構造、凍結乾燥によつて生ずる氷の結晶のぬけた後の小孔、その他について細胞組織の構造的變化を觀察した結果、次のような特徴ある成績を得た。尙染色法の操作は一般の方法と全く同様である。

即ち凍結の條件を一定(本實驗では液体空氣による凍結)にすれば、乾燥過程の冷却溫度を室溫、 -10°C 、 -20°C 、 -30°C と變えても、出來上つた標本には、全く差異がみとめられない。ところが乾燥條件を一定(本實驗では組織を -30°C 附近に冷却し乍ら乾燥)にして凍結の條件を變えると、凍結速度によつて組織に構造的な差異が現われ、凍結速度のはやいもの程組織の破壊程度の少ない良好な標本の得られることがわかつた。その特徴を更に詳細に説明すれば次の通りである。

A) 液体空氣で凍結した場合(凍結速度： $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、乾燥時の冷却保持溫度を色々變えてもすべて一樣)

(1) 各方向に龜裂のあるものが多い。

(2) 細胞の輪廓が明瞭なものと、不明瞭なものがある。

(3) 細胞核は一般にフォルマリン固定のものにほぼ似たもの、それより稍弛緩した感じのもの(この形態のものが一番多い)及び結氷の跡が歴然と残つて所謂車狀核様(radkernig)をなすものの三種が區分されるが、一般に明るくて核小体等もはつきりして居り、内部構造がよく觀察出来る。

(4) 小孔は一般に少ないか或は全然存在しないが、同じ標本内でも小孔の存在する部分としない部分又は小孔の多い標本と少ない標本とがある。小孔の大きさは大体肝細胞の核の大きさを越えることがなく、而もそれが存在するときは、細胞内外に同時に認められ、その場合には細胞核も大抵車狀核様(radkernig)になつてることが多い。

更にどうしても氷の結晶の跡とは考えられない原因不明の小孔が時々標本内に散在していることがある。

(5) 全般的に眺めると普通のフォルマリン固定標本と大差なく、むしろこれより鮮明な感じがする。染色性もフォルマリン固定のそれと大差がない。

B) ドライアイスで凍結した場合 (凍結速度: $60^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, 乾燥は -30°C に冷却保持しながら施行)

- (イ) 龜裂がほとんどない。
 - (ロ) 細胞外に肝小葉の形に一致して、液体空気にによる凍結で生じたものより幾分大きい小孔が一面に存在している。
 - (ハ) 小孔はまた肝細胞体内にも認められる。
 - (ニ) 細胞核内にも小孔が認められるが、これは液体空気で出来たものよりやや大きい。
 - (ホ) 各細胞体は全部網の目状に連絡している。
 - (ヘ) 全般的にみて、核、原形質共弛緩した感じが少なく、何となく汚いような外観を呈する。
- C) -30°C 鹽化カルシウムブラインで凍結した場合 (凍結速度: $3^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, 乾燥は -30°C 附近で冷却しながら施行)








- (イ) この条件での凍結はなかなか一定し難いため、ある場合にはむしろ B) の条件で凍結した場合に近い像を示した。それ以外の場合は大体次の通りであつた。
 - (ロ) 細胞核にも、細胞原形質にも決して小孔が認められない。
 - (ハ) 楕圓形中等大の小孔が細胞外に肝小葉の形に一致して存在する。
 - (ニ) 細胞核は、ヘマトキシリンで非常に濃く染つて居り、緊密で内部構造が明らかに見えない。
 - (ホ) 標本を一見した感じは丁度網の目をみているようである。
- D) 液体空気で凍結した後、室温で融解したものをそのまま室温真空乾燥した場合 (対照用)
- (イ) 細胞核も原形質も共に輪廓が不明である上肝小葉の區別さえ判然としなない。
 - (ロ) 丸形の大体肝細胞大以下の小孔が相重つて、細胞体内外、細胞核内外を問わず丁度石鹼の泡のように不規則に存在している。

以上構造的な變化を一括して表にまとめると、次頁の第 2 表のようになる。

二三の特殊染色所見: van Gieson 染色法により、試料の膠質線維を觀察した結果、主として血管周圍に常に認められた。普通のホルマリン固定による標本では、よくみると細かく断裂した鮮明な線維が集まり、全体として膠原線維の束を作つて居るような感を呈しているのに比し、凍結乾燥法による場合は膠質線維の断裂がなく、全体として所謂ベトベトしているような感じで線維が帯状に流れており、またその程度も、凍結速度がおそくなる程強くなるように思われたが、乾燥の条件差による變化は認められなかつた。

Weigert の染色法による弾力線維の觀察では、試料の中等大以上の血管壁に、常に繊細な紫色の線維として認められ、凍結乾燥の實施条件とは、特別の關係がないように思われた。またホルマリン固定による標本にくらべて、兩者の差異、優劣も認められなかつた。格子状線維はヴィルショウスキーの變法では常に染色されなかつた。

ii) 組織化學的所見

凍結 標本 所見	急速 中間 緩慢						
組織像 略図							
細胞核 所見	氷結の跡なし 構造明瞭 正常感	左に同じ	氷結の跡なし 構造明瞭 稍弛緩	氷結の跡なし 構造明瞭 小孔あり 車状核様	氷結の跡の 小孔明瞭 車状核様	核内の氷結の跡明瞭	氷結の跡なし 構造不明 緊密感
細胞原形質 所見	氷結の跡なし	左に同じ	左に同じ	氷結の跡の 小孔あり 微粒状	氷結の跡の 小孔あり	明瞭な氷結の跡あり	氷結の跡なし
細胞外氷結 所見	原因不明の 微細な 小孔あり	氷結の跡なし	左に同じ	氷結の跡の 小孔あり	中等大の 氷結の跡 明瞭	積大形の 細胞外氷結の跡明瞭	大形の細胞外氷結の跡あり

第 2 表 凍結速度と組織の形態的變化との關係

グリコーゲン検出所見： Hotchkiss の多糖類検出法¹⁾の原理は、過沃度酸 (Periodic Acid: $HJO_4 + 2H_2O$) により、糖成分のアルキル基を酸化してアルデヒド基とした後 Feulgen の試薬と結び呈色させるものであつて、廣義には多糖類のすべてに反應するものであるが、従來はセロイデン切片でなければグリコーゲン検出は困難であつたのに、この方法で明らかにグリコーゲンと認められる多糖類を、パラフィン切片から簡単に検出することが出來た。検出法の要領は、脱パラフィン後次のとおり行う。

- A) 過沃度酸液 (過沃度酸 400 mg + 蒸溜水 450 cc + M/5 醋酸ソーダ 5 cc) に 5 分間入れる。
- B) 70%酒精で洗う。
- C) 沃度・チオ硫酸液 (沃度加里 1g, チオ硫酸ソーダ 1g を蒸溜水 20 cc に溶し, 2 N 鹽酸 0.5 cc を加えた酒精 30 cc を振盪しながら加え, 硫酸が沈澱するが靜置する。) に 5 分間入れる。
- D) 70%酒精で洗う。
- E) Feulgen 試薬に 15~45 分間入れる。
- F) 硫酸水液 (濃鹽酸 0.5 cc + 10% 異性重亞硫酸加里 2 cc + 蒸溜水 50 cc) で洗う。
- G) 水洗後脱水封入する。多糖類はすべて紫色又はフクシン色を呈する。

さてグリコーゲンの分布状態は前記の構造的變化と同様、乾燥条件には無關係であるが、凍結条件によつて多少左右されるようである。しかし實驗例による本質的差異は、むしろ試料そのものの差、つまり個体差とか採集時期とかによるものようである。その特徴を各凍結条件に分けて、もつと詳細に説明すれば次のようになる。

- A) 液体空氣による凍結 (嚴寒期に實驗)
- (1) 乾燥条件とは無關係によく染まるもの、全然そまらないもの、及び部分的によくそまる

ものの三通りが観察された。

(a) よく染つているものでは、細胞原形質が彌散性にフクシン色に染まり、細胞の輪廓が明瞭にわかる外、核が白く抜けている。またその他細胞体内に白いツブツブが見えるが機序は不明である。

(b) 部分的によく染まつているものでは、染まり方は(a)と同様である。

B) ドライアイスで凍結した場合(温暖期に實驗)ヘマトキシリン・エオジン重染色で、小孔となつていた場所及び核以外すべてフクシン色に彌散性に染まつて居り、所々に濃淡はあるが、全般的にはグリコーゲンの濃縮された感が強い。

C) -30°C ブラインで凍結した場合(温暖期に實驗)B)の場合より濃縮の度合いが強く、同様ヘマトキシリン・エオジン染色で小孔となつて表われた場所、及び核をのぞいてすべて濃いフクシン色に染つて居り、丁度赤い網の目の感じである。

D) 對照として、フォルマリン固定し、パラフィン包埋した標本の場合。

全般的に薄い紫色に染り、グリコーゲンはほとんど脱落してしまつて居るが、少しく残つて居る場所では顆粒状に細胞体の邊緣部に掃き寄せられたように存在している。而も核の存在は全く不明瞭である。

フォスファターゼ検出所見: Gomori のフォスファターゼ検出法⁸⁾の原理は Glycero 燐酸ソーダにフォスファターゼを作用させて遊離した燐に鹽化カルシウムを作用させて、燐酸カルシウムを作り、更にそれにコバルトを作用させて燐とコバルトを化合させた後、硫化アンモンで硫化コバルトの黄色或は黄褐色として検出する方法である。組織からこの酵素を検出するのに、従來はアセトン等で特別な固定法を施した後ツエロイデン包埋によつていたものであるが、凍結乾燥した組織をパラフィン切片にして簡単に検出されるようになった。

染色法の要領は脱パラフィン 100% 酒精を通した後、次のとおり行う。

A) 2% β -Glycero-燐酸ソーダ 25 cc, 27% ペロナールソーダ 25 cc, 2% 鹽化カルシウム 5 cc, 2% 硫酸マグネシウム 2 cc 及び蒸溜水 50 cc の混合液に 3 時間, $+37^{\circ}\text{C}$ に保つて浸漬する。

B) 水洗後直ちに 2% 硫酸コバルト水溶液に 5 分間入れる。

C) 水洗後直ちにうすい硫化アンモンに 5 分間入れる。

D) 水洗, 脱水, 封入する。

この酵素はグリコーゲン等のような不安定な物質と異なり、試料の個体差、試料採取の時期的關係とは、ほとんど無關係に、相當確實に検出出來た。作製標本は全般的にみて、従來の化學劑(アセトン)固定による標本に較べて染色性の強さは幾分劣るが、組織の荒廢感が遙かに少なかつた。

その成績は乾燥過程の條件による差異は認められなかつたが、凍結條件の變化に伴う差異が認められた。一般に凍結速度が早い程特に核、原形質の染色性が減退する傾向を示し、液体空気で凍結した場合には、ほとんど染つて來ない。しかし所謂 Sinusoid, 血管壁等は凍結の條件

如何にかかわらず、何れも割合に明瞭に染まつているように思われた。

核酸染色所見：Feulgenの常法に従つて、キシロールで切片のパラフィン抜き、100%酒精中に一晝夜浸漬した後、所謂デオキシリボ核酸(D.N.A)を染め従来の昇汞醋酸溶液固定による標本と變らない成績を得た。即ち核はフクシンの紫紅色に染まり、各種の條件差に基づく成績は、ヘマトキシリン・エオジン染色による形態學的所見と大差がなかつた。

オキシダーゼ検出所見：フォルマリン固定による標本と平行して調べたが、検出は毎常陰性に終つた。

IV. 考 按

1. 凍結乾燥法の實施條件について

實驗装置並びに試料の性状、大きさは大体常に一定しているから、以上の成績は總べて操作上の條件差に基づくものと考えて差支えない。まず豫備凍結を行つた試料の凍結乾燥過程に於ける温度の消長をみるに、周囲の冷却温度に比し、乾燥器内部の温度は常に多少高い。しかし組織自体の温度は冷却温よりもむしろ低い。この事實から、外部の輻射熱の影響及び水分昇華の潜熱による組織の自動的冷却が想定され、従つてそれらの温度消長を觀察することにより、試料の乾燥状態がある程度推測されると思う。

この乾燥過程に於ける組織の温度曲線を更に細かく分析して見るのに、乾燥器を多岐管に連結して減壓を開始しても組織温は、はじめの間は徐々に上昇するが5~10分で停止し、更に20~30分で一様に下降をはじめ、約10分位の最低値を示した後、次第に上昇し、約3時間でその寒剤の温度に一致する。この現象は乾燥容器内部が減圧開始後5~10分で高真空に達し、昇華が盛んになるため、周囲より受ける熱と昇華による自己冷却とが釣合つて温度の上昇がとまり、更に20~30分になると、組織片の内部よりの昇華も多くなるため一そう温度が低下するものと考えられる。これはさきに根井等²¹が血清の凍結乾燥の際に得た温度曲線とほぼ一致する。要するに乾燥過程中に於ける組織自身の温度とは昇華に伴う自己冷却と、周囲より與えられる熱(輻射或は傳導)との差によつてきまるものであるから、周囲よりの冷却温度が -10°C 、 -20°C 、 -30°C と低くなるにつれて、この冷却温度と、組織温との温度差が小さくなるわけである。

非凍結試料、及び凍結試料の室温乾燥に於ける組織片の温度消長も大体上記の傾向に一致しこれらの場合は組織を冷却しないから約3時間前後で既に乾燥終末點に到達したのである。

さて組織温が、次第に上昇してついにその冷却温度に一致するという事は、容器の上方からの輻射熱が極めて少ないとすれば、その温度での組織からの昇華がほとんど行われなくなつたか或は非常に小さくなつたことを意味するものと思われる。そこで外部からの冷却を中止すれば、組織温度は漸次上昇するが、同時にその温度に相當して蒸氣壓が大きくなるので、もしまだ水分が残つて居れば更に昇華が起る。かくして次第に温度が上昇し乍ら最後に組織温が室

温に一致する迄乾燥が続くのである。ところが第1表からも知られる通り、實際はこのような冷却中止点での組織水分量は相當多く残存しているから、ここで冷却を中止することの可否、つまり兩後の組織の融解の有無が問題になつて来る。

しかし私は、冷却中止後試料の観察を続行したが、少なくとも肉眼的には何等の融解像も認めなかつたし、乾燥試料の一般性状をみても所謂ミイラ化はみられなかつた。

更に顯微鏡的にも融解の結果と思われるような組織像を認めなかつたことは、一旦凍結した試料を明らかに室温で融解させた後室温の真空乾燥で再凍結した場合の組織像と異なることから確かであると考えている(組織標本の顯微鏡寫眞参照)。

ちなみに、中島等(1950²²)の報告をみてもほぼ同程度の真空度で 0.3 cm^3 の肝切片を凍結乾燥する場合、ほぼ -30°C に保持し乍ら5~6時間で大体乾燥されたものと考え、そこで冷却を中止し1~2時間で乾燥器の温度を室温迄上げたところをもつて經驗的に乾燥の終末点としていようであるが、これを私の實驗成績に比較してみれば、以上のような條件では組織からの脱水の大半はむしろ冷却中止後の1~2時間で行われるのではないかと考えられる。

従來乾燥過程に於ける組織の冷却の必要性が強調され、例えば Gersh は -20°C 以下、Hoerr は -30°C 以下の低温を保持しなければならぬといつているが、私の實驗結果からみればそれほど冷却しなくても組織自身の温度はかなり低温度に保たれるし、また組織學的所見から室温乾燥ですら全然融解像を認めないので、敢て實用的には長時間の冷却保持を必要としないように思われる。ただ装置や真空ポンプの関係から乾燥初期の一時的な組織温の上昇に注意し、また室温放置の場合は周囲よりの輻射を適當に遮る必要がある。しかもなお、一面理論的に組織の eutectic point を考慮すればその温度以下の相當低温度に保たれないと融解その他の状態變化の起る可能性のあることも想像される。しかし一般に、凍結乾燥に於いては、乾燥がすすんだならば、いたすらに低温に保つておくよりも、むしろ適當に温度をあげた方が乾燥の効率がよくなつて乾燥時間が短縮され、しかも被乾燥体に對しては、もはやあまり變化を來たさないと考えられているが、組織の凍結乾燥法に於いてもこの點を裏書きしたものである。

なお、乾燥試料をパラフィンで真空包埋する際に泡立ちのみられるのは、試料を高真空中で室温より高い温度であたためるわけであるから、更にその温度での残存水分その他の含有物がガス状になつて出て来るためと思われ、これについて中島等(1950²²)は、泡立ちの少ないもの程乾燥状態がよく、作製標本も良好であつたとのべている。

2. 乾燥試料の性状について

i) 一般性状及び形態學的所見についての考按

凍結乾燥を行つた組織から切片標本作製する際、本法の第一階程である豫備凍結の速度を大きくする程、氷の結晶の跡の小さな標本が得られ、而も形態學的にみて普通の諸種化學劑固定を施して作製した標本と變らない。或はそれ以上の良好なものが得られることは Gersh(1932)以来、Hoerr(1936)、Koonz等(1939)その他によつて認められ、また應用されて來たところであ

り、本実験でもそれが確認されたわけである。なお乾燥試料の肉眼的性状からみても凍結速度の速いもの程、手指で揉みつぶした際の粒子が微細であつて、凍結による氷結が極めて小さく而も一様であることが容易に想像される。

理想的な急速豫備凍結法としては、一瞬にして組織に所謂ガラス化 (Vitrification) がおこる位の凍結速度を與えるとよいのであろうが、通常用いるくらいの大きさの組織片ではこのような急速凍結は容易に望めない。まず Hoerr (1936) の法、即ち液体窒素で -195°C 近く迄冷却した Isopentane 中に直接組織を浸漬するのが現在では最適の方法といえよう。しかし私はこれ等材料の入手が困難なので急速凍結には液体空気をを用いた。そして実験の目的に従い、便宜上組織の豫備凍結の條件を所謂急速凍結、中間速度の凍結及び緩慢凍結に分けたのであるが、凍結という現象は極めて微妙であつて、條件を夫々常に一定することは仲々困難で、事實第2表にも示すとおり、組織に割合一定の凍結條件を附與している筈の液体空気にによる急速凍結の場合でさえ、いろいろな凍結像の標本が得られたことからそれが肯定される。

そこで、まず組織の凍結乾燥法に於いて、豫備凍結を実施するとき、凍結條件によつて著しく左右される組織内の氷の結晶の性状について、各々の乾燥試料をヘマトキシリン・エオジン染色した標本から吟味してみると第2表に示すとおりで、これから次の諸事項が想像される。

A) 冷却速度の遅いものでは、細胞外にのみ大きな氷の結晶の跡が認められるが、細胞核及び原形質内には氷結の跡が全く認められない。これは組織を緩慢に冷却した場合、まず細胞間隙の体液または切斷面の破壊された細胞液に小さな氷の結晶が出來、それが次第に成長増大するにつれ細胞内から水を引出すために細胞内液の濃度が高くなつて、細胞内には一そう氷ができにくくなるのであろうと想像される。かかる所見は Koontz 等 (1939) がにわたりの筋肉組織を緩慢に凍結した際に得た組織像の所謂細胞外凍結と稱している様式に一致するものと考えられる。

B) 冷却速度がそれより早くなると、所謂細胞膜の防禦作用が失われ、細胞外氷結とほとんど同時に原形質或は核内にも氷結がおこるものと思われる。このように細胞内凍結がおこる場合は、冷却速度が大きいほど小さな氷晶が多數に生ずるわけである。

C) 更に凍結速度が大きくなれば、原形質内の氷結もあまり目立たず、核の凍結像のみが認められるにすぎない。そして凍結が極端に急速に行われた場合には氷結後の小孔は全く認められない。

D) 同一條件で冷却しても、いろいろの形の凍結像をもつた標本が得られるのは、組織片の大きさから考え、内外凍結速度の差によつて部位的に氷結晶に大小の差が出来るのはもちろん細胞組織の個体差とか、試料を切出すときの解剖的な構造的差異或は豫備凍結の際の人爲的な技術上の差に基づくものと考えられる。

E) 特に急速凍結を施した場合、標本中に氷晶の跡と思われるもの以外に、機序不明の微細

な小孔がみられることがあるが、これは Hoerr (1936) の所謂脂肪の抜けた跡、凍結時のガス形成、或は組織収縮の影響等によるものと思われる。

F) なお、急速凍結を施した標本にしばしば龜裂が認められるが、これは顯微鏡的にも見えないような極く微細な氷粒の跡が伸展時に断裂の原因となるためであろうと考えている。かかる断裂は伸展時の注意である程度避けられる。

對照の液体空気で凍結し室温で一旦融解した後、室温真空乾燥して得た試料にみられる再凍結像について考えてみるに、急速凍結により試料内に一面に極く微細な氷粒が生じ、それを融解すると細胞構造は一應保たれているとしても、性状的にみれば既に無構造に近い状態になっているため、再凍結するときは細胞膜、原形質或は核の構造に無關係に、再凍結の條件に相應した氷晶が生じて來たものと思われる。

更に、二三の特殊染色による組織内の特定な構成分の検索の結果を考察してみるに、膠原線維については、フォルマリン固定法によるものではこまかに断裂した鮮明な線維が集つて一つの束を作つているが、これは化學劑による一種の artifact であつて、この線維の本來の形はやはり凍結乾燥法でみられるような雲形を呈した無定形のものではなからうかと考えられる。特に凍結の速度によつて差異の生ずる點からも、このことが想像される。

これに反して彈力線維は臟器組織の特定な定形的構成線維であるため、化學劑固定、凍結乾燥法及びその實施條件の如何にかかわらずそれが存在する限り、常に同一状態に染色されるものと考えられる。

ビルショウスキー變法による格子狀線維の検索は、凍結乾燥法による標本では毎常染色されず、その詳細については更に検討中である。

ii) 乾燥試料の組織化學的所見についての考按

實驗成績の項に於いて認められるように、通常の化學的固定法に比較して、凍結乾燥法の特徴がよく確認された。要するに組織化學的検索に凍結乾燥法の賞用される理由はここにあるものと思われる。またその實施條件については上記の形態學的検査の結果と同様、凍結條件の影響と思われるような變化は多少あつたが、乾燥の條件差は全く認められなかつた。

グリコーゲン染色は常に水を避けて行われなければならないために、從來の Best のカルミンによる染色法に従えば、乾燥試料をツエロイデン包埋する必要があるが、繁雜を免れない。ところが最近 Hotchkiss (1948)¹⁴⁾ が提唱する處の多糖類染色法を用いると、ツエロイデン包埋によらなくても、乾燥試料の肝細胞内グリコーゲンは、パラフィン切片から容易に検出出來て、しかも前記のように好結果の得られることがわかつた。ちなみに Hotchkiss の方法を凍結乾燥法に併用した報告では、Gersh (1949)¹⁷⁾ が Golgi 装置の構成蛋白に關する研究に於いて、同様乾燥試料のパラフィン切片から所謂糖蛋白を検出した實驗成績にその例をみる。

私の實驗成績では、前述のようにフォルマリン固定の標本ではグリコーゲンがほとんど脱落しているか、残留しても顆粒狀のグリコーゲンが細胞の邊緣部に掃きよせられた様に認められ

るにすぎないのに反し、凍結乾燥法によるものでは、その実施条件にかかわらず細胞原形質に彌散性に認められ、而もグリコーゲンの存在しない核の部分は歴然と白くぬけてみえた。このグリコーゲンは比較的不安定な物質であるために、試料の個体差、採取の時期等によつて検出成績が左右されるけれども、それが存在するかぎりには毎常上記の組織像で検出される。特に私の実験に於いて凍結乾燥法による肝細胞内グリコーゲン検出法の利點が、試料のパラフィン切片に新しい Hotchkiss の多糖類染色法を施すことによつても確認されたわけである。

フォスファターゼは生体内及び細胞体内に於いて、廣く無機鹽類、含水炭素、脂肪、類脂肪核酸等の物質代謝に直接、或は間接に關與し生理的にこれらの代謝が行われているところに必ず存在するばかりでなく、代謝が異常に旺盛になつた場合に増強する外、異常代謝に際しても出現するといわれて居り、²⁰⁾この意義を闡明するには、生化學的手技によるばかりでなく、特に組織學的に本酵素出現の部位條件等を明らかにする必要がある。かかる意味に於いて近時組織化學的檢索が重要視されて來た。中でも、主として動物性の所謂アルカリフォスファターゼの檢索に、多く凍結乾燥法が利用されるようになったので、私も本實驗に於いてこの酵素の檢索を試みた次第である。

一般に肝細胞では所謂 Sinusoid に多く認められ、通常、核、原形質等には見出されないといわれているが、Glycero-磷酸ソーダを含む混合液に長時間浸漬すると、核、原形質共に染つて來るようである。しかしグリコーゲン染色と異なり、どの標本に於いてもほとんど毎常のように検出できたのは、グリコーゲンのように不安定な物質ではないからであろう。

本酵素は通常組織をアセトン固定することによつて證明されているが、その約20%は操作過程中に喪失するといわれているにもかかわらず、凍結乾燥法によつて作製した標本と比較した場合、むしろ后者の染色性が幾分弱く、しかも凍結速度が大なる程、それが著しくなる傾向があつた。

かかる所見及び平行して行つた凍結乾燥組織の酸素消費量測定の実験成績²³⁾から考えても凍結によつて生体内酵素は、いろいろの機能的障害をうけることが想像される。

核酸染色では Feulgen の提唱する昇汞醋酸溶液固定法によらなくても凍結乾燥法で充分その目的を達し得ることがわかつた。唯 Feulgen の組織細胞中の所謂プラスマローゲンをプラスマールに變えるためには、切片の脱パラフィンを行つた後、純酒精中に充分浸漬する必要があるように思われる。

オキンダーゼの検出成績が常に陰性に終つたのは、その原因がパラフィン包埋にあるのではないかと考えているが、詳細は更に検討中である。

V. 結 論

Altmann-Gersh 等の創始した組織の凍結乾燥法は、近時各方面に廣く利用されるようになって來たが、私は從來比較的看過されていた凍結並びに乾燥過程の諸條件を吟味する目的で、大

体原法に倣つて簡便化した装置と方法を用い、二十日鼠肝を材料とし、主として組織學的所見からこれを追求した結果、次のような成績を得た。

各種染色法による形態學的所見からみて、組織の凍結乾燥法に於いて、凍結の條件は乾燥材料に大きな影響を與え、顯微鏡標本作製のためには凍結速度の速いもの程形態的變化が少なくまた組織本來の構成成分もそのまま保持されるので好都合であることが認められた。更に組織化學的検査に對しては、凍結乾燥法の特徴が確認された外、その検査法によつては凍結時の條件差に伴う多少の變化のあるものも認められた。一方乾燥過程での組織の冷却條件による影響は比較的少ないことがわかつた。従つて室温で眞空乾燥しても、短時間且つ簡便な操作ですみ、しかも良好な組織標本が得られた。

結局、組織の凍結乾燥に於いては凍結の條件に最も注意を要することを認めた。

稿をおわるにあたり、終始御懇切な御指導を戴いた根井教授、御校閲、助言を仰いだ武田教授ならびに染色上の點でいろいろと御便宜をはかつていただいた札幌大塚田博士に厚く御禮を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Altmann, R. 1890 Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zur den Zellen. Leipzig.
- 2) Gersh, I. 1932 The Altmann technique for fixation by drying while freezing. *Anat. Rec.*, **53**, 309.
- 3) Benschley, R. R. & I. Gersh 1933 Studies on cell structure by the freezing drying method. *Anat. Rec.*, **57**, 205, 217, 369, 58, 1.
- 4) Scott, G. H. 1933 Protoplasma, **20**, 133.
- 5) Benschley, R. R. & N. L. Hoerr 1934 Studies on cell structure by the freezing drying method. *Anat. Rec.*, **90**, 251, 449.
- 6) Goodspeed, T. H. & F. M. Uber 1934 Application of the Altmann freezing-drying technique to plant cytology. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **20**, 495.
- 7) Hoerr, N. L. 1936 Cytological studies by the Altmann-Gersh freezing-drying method. I. *Anat. Rec.*, **65**, 293.
- 8) Gomori, G. 1939 *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **42**, 23 (核酸及び核蛋白質 下巻 59~67 頁より引用).
- 9) Koonz, C. H. & J. M. Ramsbottom 1939 A method for studying the histological structure of frozen products. I. *Food Res.*, **4**, 117.
- 10) Weiss, P. 1943 Repair of peripheral nerves by grafts of frozen-dried nerve. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **52**, 326.
- 11) Taylor, A. C. 1944 Apparatus for the freezing-drying of tissues for storage. *J. Lab. Clin. Med.*, **29**, 657.
- 12) Weiss, P. & A. C. Taylor 1944 Transplantation of frozen-dried cornea in the rat. *Anat. Rec.*, **88**, 49.
- 13) Taylor, A. C. 1945 The rate of freezing-drying and rehydration of nerves. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **25**, 161.
- 14) Hotchkiss, R. D. 1948 *Arch. Biochem.*, **16**, 131 (cited from Gersh, I. 1949 A protein component of the Golgi apparatus. *Arch. Path.*, **47**, 99).
- 15) Hoerr, N. L. & G. H. Scott 1948 Frozen-dehydration method for histologic fixation. *Medical physics*, 466.
- 16) Strumia, M.M. & J. I. Hershey 1948 Imbedding of pathologic specimens in transparent plastic. *J. Lab. Clin. Med.*, **33**, 1311.

- 17) Gersh, I. 1949 A protein component of the Golgi Apparatus. Arch. Path., 47, 99.
- 18) Wang, K. J. & M. I. Grossman 1949 Histochemical study of alkaline phosphatase in tissue prepared by the freezing drying method. Anat. Rec., 104, 79.
- 19) Harvey, M. & B. H. James 1950 Anat. Rec., 107, 443.
- 20) 高松英雄 1939 フォスファターゼの組織學的並びに生化學的研究. 東京醫事新誌, 3161, 8.
- 21) 根井外喜男・田村浩一 1950 生物學的材料の凍結乾燥法 I. 北海道醫誌, 25, 200.
- 22) 中島雅男・辻井禎・直良博人 1950 凍結乾燥による顯微鏡切片標本の製作法. 科學, 20, 204.
- 23) 根井外喜男・兼平信一 1953 生物學的材料の凍結乾燥法 (第8報) 凍結乾燥組織の酸素消費について. 低温科學, 10, 163.

Résumé

Freeze-drying of tissues by the so-called Altmann-Gersh's method has been utilized extensively for biological investigations, especially for histochemical and cytological research. But the essential knowledge on the fundamental conditions of this procedure has not sufficiently been established.

This experiment was undertaken to measure precisely the temperature changes during the process of freezing and drying, and then to observe the morphological and histochemical properties of the products dried under various conditions.

The apparatus, capable of being operated with ease, was designed and employed by the writer himself. For materials to be dried mice livers were used.

As the results obtained, it was noticed that the structural nature of the products was dependent upon the pre-freezing conditions before drying: the more rapid the rate of freezing of the tissues, the less were both the size of the ice crystals and the morphological changes.

The temperature at which tissues were maintained during the drying under a high vacuum exerted no remarkable influence on the properties of the products. However, when the tissues were kept at lower temperature throughout the drying, the period required for complete drying was rather prolonged. Therefore, histological specimens for practical use were obtained by pre-freezing in liquid air and by drying under a high vacuum at room temperature.

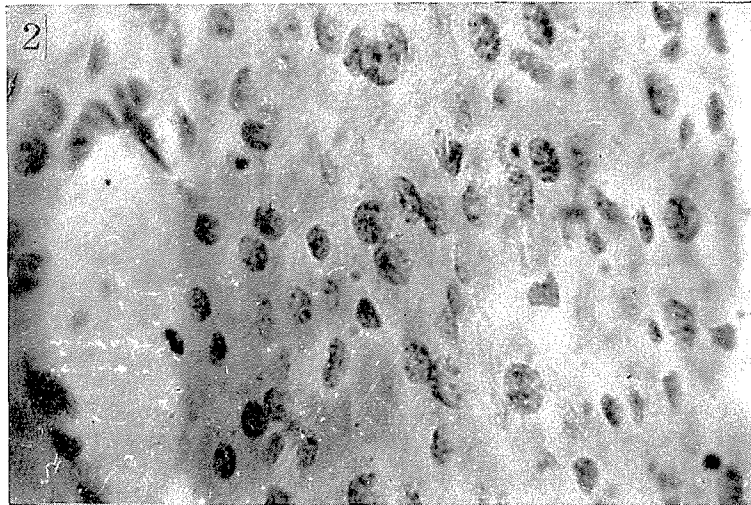
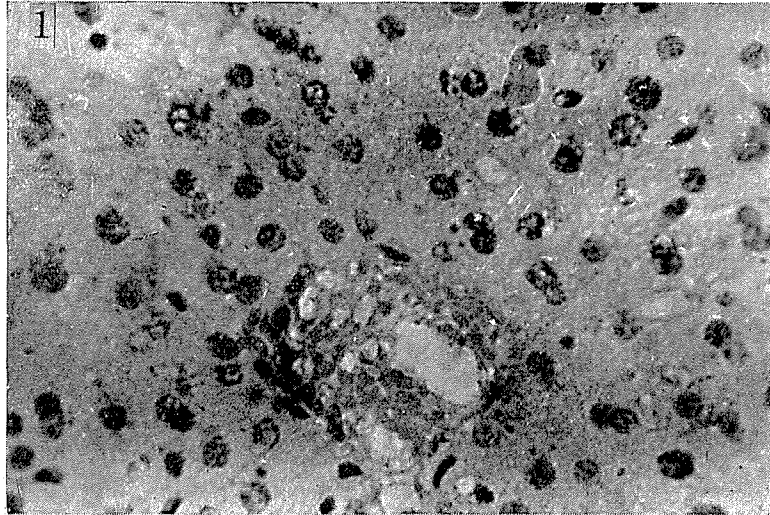
Several staining methods for histochemical investigations were tested to demonstrate glycogen, phosphatase, nucleic acid and other chemical constituents of tissue cells desiccated under various conditions.

凍結乾燥標本の顯微鏡寫眞圖

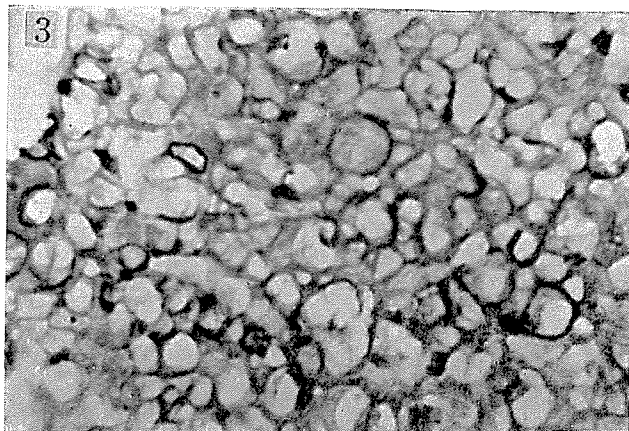
- 註 i) 試験材料は既述のとおり，すべて甘日鼠。
ii) すべて同倍率，強拡大(×600)で撮影。

圖版 I.

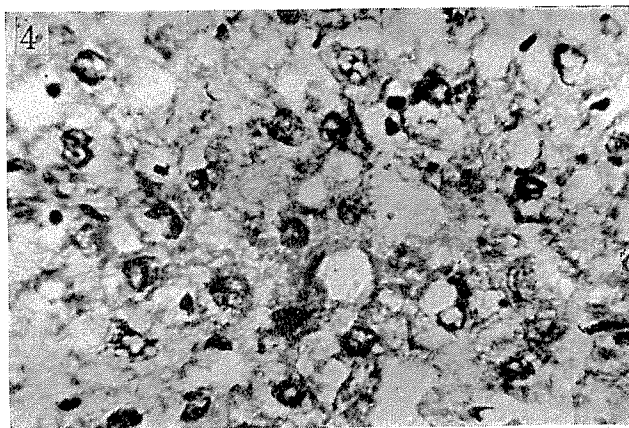
(ヘマトキシリン・エオジン染色法施行)



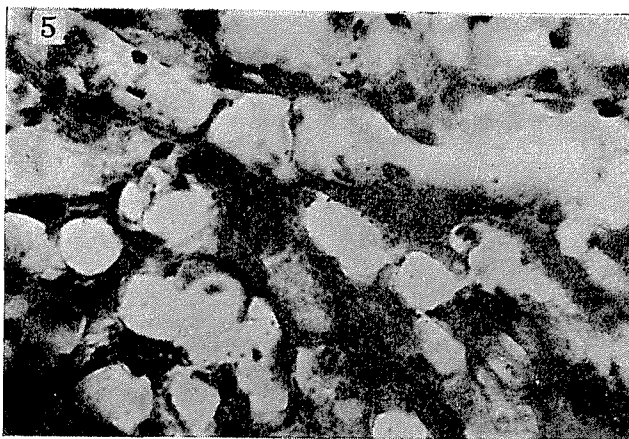
1. 液体空氣(約 -180°C)で凍結し、 -30°C 附近に冷却し乍ら真空乾燥した場合。氷結による核の破壊像が所々にみられる。中央小腔は血管。
2. 液体空氣(約 -180°C)で凍結し、室温真空乾燥した場合。氷結跡なく核の構造明瞭。



3. 液体空気 (約 -180°C) で凍結し、室温で一旦融解した後、室温真空乾燥した場合。再凍結による不規則な氷晶跡明瞭。



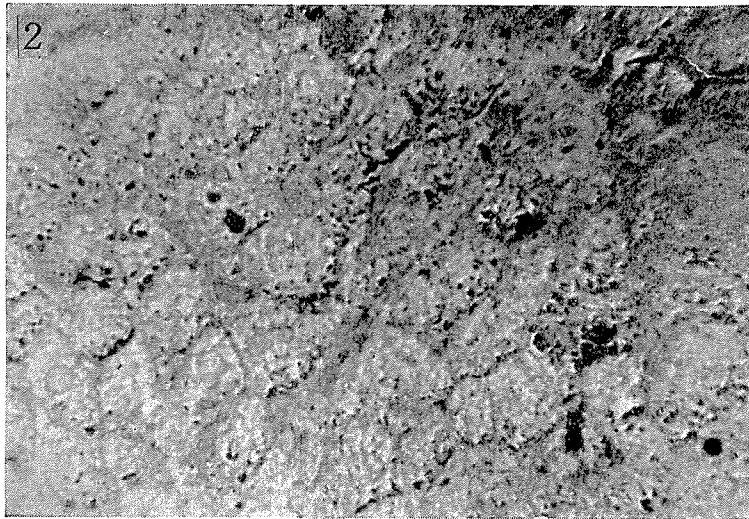
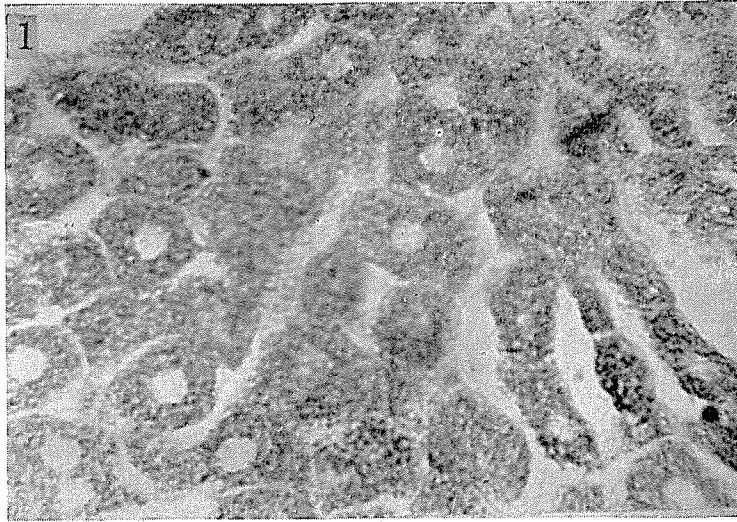
4. ドライアイス (約 -65°C) で凍結し、 -30°C 附近に冷却し乍ら真空乾燥した場合。細胞原形質内外及び核にも氷晶跡がみられる。



5. 鹽化カルシウムブライン (約 -30°C) で凍結し、 -30°C 附近に冷却し乍ら真空乾燥した場合。所謂細胞外凍結像明瞭。

圖版 II.

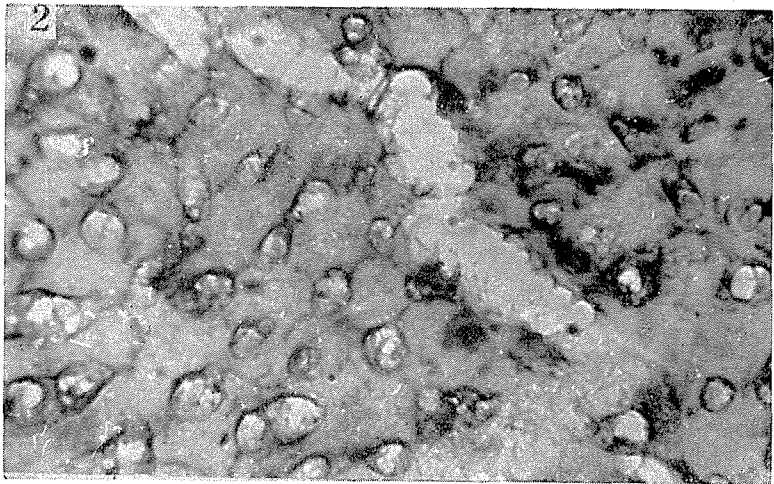
(Hotchkiss の多糖類染色法施行)



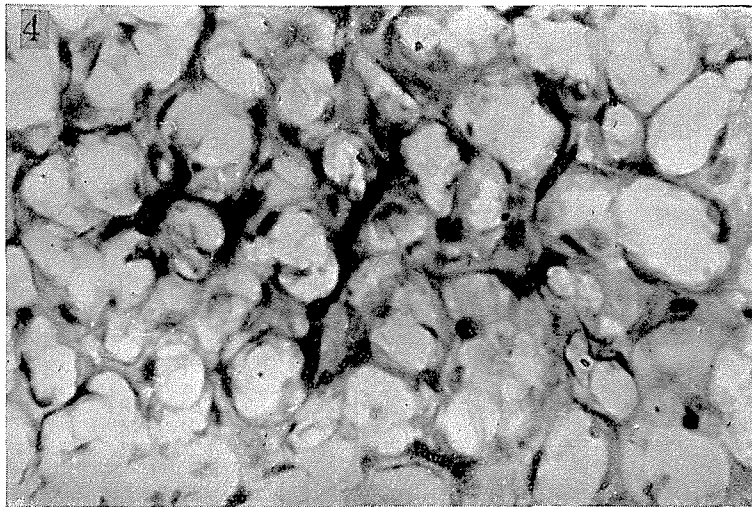
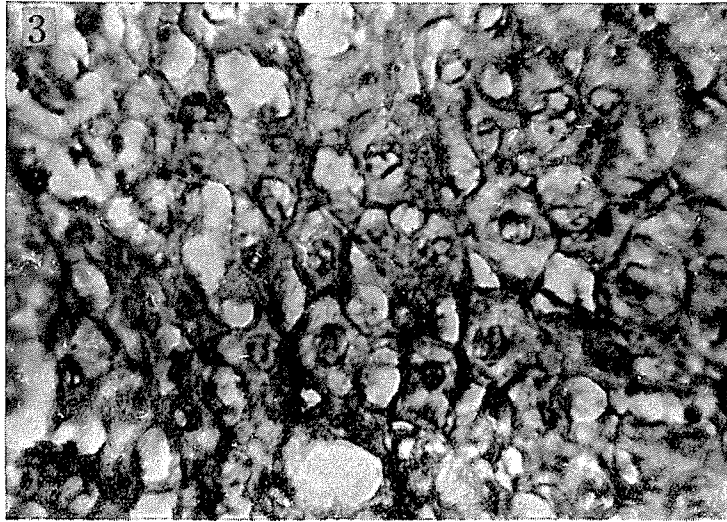
1. 液体空氣 (約 -180°C) で凍結し, 室温真空乾燥した場合。グリコーゲンは肝細胞原形質内に満散性にみられ, 核は白くぬけている。
2. フォルマリン固定で作製した標本 (対照)。グリコーゲンは殆んど脱落してしまつてゐるが, 僅かに残留しているものが顆粒状に細胞の邊緣部に掃きよせられたようにみられる。核の存在は不明。

圖 版 III.

(Gomori のフオスファターゼ検出法施行)



1. アセトン固定により作製した標本 (對照)。核, 血管周圍 (左下端), Sinusoid に明瞭に検出されている。
2. 液体空氣 (約 -180°C) で凍結し, 室温真空乾燥した場合。全般に染りが薄く, Sinusoid にのみ明瞭に検出されている。氷晶跡小孔がみられる。



3. ドライアイス (約 -65°C) で凍結し、 -30°C 附近に冷却しながら真空乾燥。核、Sinusoid に明瞭に検出されている。
4. 鹽化カルシウムブライン (約 -30°C) で凍結し、 -30°C 附近に冷却しながら真空乾燥。全般に染りが強い。