



Title	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
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 兼平, 信一 他
Citation	低温科學, 10, 163-167
Issue Date	1953-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17552
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_p163-167.pdf



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*

根井外喜男 兼平信一

(低温科學研究所 醫學部門)

(昭和27年9月受理)

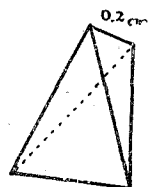
従來組織の凍結乾燥は主に組織化學的検査のための組織標本作製の一法として行われているが、そのほか長期保存可能の移植用材料としても實驗的に試みられた。例えば Weiss¹⁻³⁾は神経・血管その他の組織の凍結乾燥片を他の生体に移植し、適宜の時期にその移植された個所について形態的機能的な検討を行つている。又 Taylor⁴⁾は特に神経を用い、組織の凍結乾燥を行う場合の凍結並びに乾燥過程の種々の條件を吟味している。しかしこれらの研究のいずれに於ても、凍結乾燥された組織自身の形態的機能的觀察が行われていない。

吾々は組織の凍結乾燥法實施の際の基礎的條件を検討する目的で、種々の條件の下で作製した組織標本について形態的組織化學的に追究したが、その結果は兼平⁵⁾がさきに之を報告した。吾々は更に凍結乾燥によつて組織は如何なる機能的障害を受けるかを知るために、前實驗と平行しそれと同一材料について同時に機能的検索即ち主として組織の酸素消費量測定を行つたので、その結果について述べる。

實驗方法

1. 實驗材料 撲殺直後の廿日鼠の肝臓の一定部位、即ち中央部の前縁を圖のような一定の大きさの楔狀に剔出して使用した。特に肝臓を用いたのは比較的一定の大きさの組織片が容易に得られること、他の臓器に比し割合酸素消費量が大きいこと、且つ乾燥或は染色に便であることなどの理由による。

剔出肝臓片



他の邊はいずれも
0.7 cm

2. 乾燥装置並びに操作 乾燥器、凝結器及び油廻轉式真空ポンプより成る自製の凍結乾燥機を用いた。その装置の詳細は兼平の論文⁵⁾に譲り省略するが、先ず供試材料を種々の條件で凍結させた後、乾燥器に移して30°Cの冷却槽に浸しつ乾燥を行うのである。凝結器には液体空氣で冷却したトラップを用い、装置の到達真空度は凡そ 10^{-2} mm Hg 内外であつた。

* 北海道大學低温科學研究所業績 第150號。

3. 凍結方法

- (1) A群 (急速凍結) : 組織片を直接液体空気中に浸す。冷却速度凡そ $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- (2) B群 (中間速度凍結) : ドライアイス・アルコール (-78°C) 中に挿入しておいた試験管に投入して凍結する。凍結速度凡そ $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- (3) C群 (緩慢凍結) : 組織片を乾燥器に入れたまま、 -30°C のブライン中に浸す。凍結速度凡そ $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4. 酸素消費量測定

Warburg の檢壓計を用いた。主室には次の液、即ち 0.9% NaCl 100 cc, 1.15% KCl 2 cc, 1.22% CaCl_2 2cc, 之に更に Glucose 0.2 g 及び 2.1% NaHCO_3 (全体の 1/50 量) を加えたものを 1 cc 入れ、副室には 20% KOH 0.3 cc を入れ、ガス腔には 92% 以上の酸素を満した。 37.5°C にて 1 時間測定し、乾燥材料 1 mg 當りの 1 時間値 Q_{O_2} をもつて表わした。

なお對照には同一條件で別出した切片を Ringer 液に浸したまま乾燥終了するまでの時間即ち 5~6 時間室温に放置したもの、及び乾燥のものと同じ條件で凍結させて -30°C の低温室内に放置し測定直前に室温で融解させたものをもつて、乾燥材料との比較實驗を行つた。酸素消費量の測定には切り出したままの組織塊を用い細片としなかつたが、之は組織限界厚を考慮しながらも、むしろ正常組織に對する處置組織の比較値を求めることに重點をおいたからである。

實驗成績

前記の實驗條件のもとで測定された各組織の酸素消費量は第 1, 2, 3 表に示す通りである。

第 1 表 A 群, 液体空氣で急速凍結 (冷却速度約 $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$) した組織の酸素消費量 Q_{O_2}

實驗例 處置	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均
對照 (無處置)	4.22	4.68	3.39	3.47	3.81
凍結融解	0.91	0.81	1.22	0.44	0.85
凍結乾燥	1.37 1.32	0.85 1.41	0.45 1.23	0.65 1.15	1.05

第 2 表 B 群, ドライアイス・アルコールで凍結 (冷却速度約 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$) した組織の酸素消費量 Q_{O_2}

實驗例 處置	No. 11	No. 12	平均
對照 (無處置)	3.30	4.41	3.85
凍結融解	1.16	1.71	1.43
凍結乾燥	1.09 0.88	1.88 1.78	1.41

第 3 表 C 群, -30°C のブラインで緩慢凍結 (冷却速度約 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) した組織の酸素消費量 Q_{O_2}

實驗例 處置	No. 21	No. 22	No. 23	平均
對照 (無處置)	4.64	2.07	4.12	3.61
凍結融解	—	0.98	1.60	1.29
凍結乾燥	1.11 0.95	1.55 1.84	1.95 1.52	1.48

即ち無處置の對照である正常組織の Q_{O_2} は凡そ 3~4 であるのに反し、凍結乾燥を行つた組織はすべて 2 以下、甚だしきは 0.5 まで減少した。又同時に行つた凍結融解組織の Q_{O_2} も凍結乾燥組織とほぼ同じくらいの値を示した。

要するに凍結融解或は凍結乾燥などの處置によつて、組織呼吸が障碍され酸素消費量はかなり低下することがわかつたのである。その低下の程度を更に分けて考えてみた場合、第4表に示すように、凍結の條件によつて差があるような結果、つまり冷却速度が大きいほど酸素消費量が減少するような傾向がみえたが、しかし實驗例數が甚だ少ない上に、しいて推計學的に検討してみても有意義の差はみとめられなかつた。

第4表 凍結條件による比較

(凍結融解又は凍結乾燥組織の酸素消費量を無處置對照に對する百分率を以て示す)

凍結 處置	A 群 (%)					B 群 (%)			C 群 (%)			
	No.1	No.2	No.3	No.4	平均	No.11	No.12	平均	No.21	No.22	No.23	平均
凍結融解	21.5	17.4	36.0	12.7	21.9	35.1	38.8	36.9	—	47.3	38.7	43
凍結乾燥	32.5	18.1	13.3	18.8	26.7	26.5	42.6	35.6	26.2	75.0	47.2	49.6
	31.2	30.1	36.4	33.2		32.9	40.5		20.3	88.9	40.1	

例えば凍結乾燥に於て A 群 (急速凍結), B 群, C 群 (緩慢凍結) の分散不偏推定量は夫々 $u^2_A = 74.0$, $u^2_B = 54.37$, $u^2_C = 738.42$ となり, まず兩極端の A 群と C 群とを比較してみると (以下いずれも對應のない場合の比較) 分散比 $F = 9.9$ で兩群の分布不均一のため檢定できず, 又兩群平均値の信頼限界を求めても 26.7 ± 7.12 及び 49.62 ± 28.52 となつて有意の差を確認できなかつた。更に A 群と B 群とでは 5% の有意水準での $F = 4.96$ (F -分布表より) に對し $F_0 = 3.17$ で有意の差がみとめられず, B 群と C 群とに於ても分散比が大で檢定できなかつた。

次に凍結融解組織についてみると, A, B, C 群の分散不偏推定量は $u^2_A = 99.88$, $u^2_B = 8.88$, $u^2_C = 36.98$ となり, A 群と B 群とでは檢定不能, B 群と C 群, A 群と C 群との間には 5% の有意水準で有意の差がみとめられなかつた。

結局以上の結果から, 組織の酸素消費量は凍結融解或は凍結乾燥によつて平均 40% 乃至 20% まで低下することがわかつたが, 凍結の條件による差は 5% の危険率で有意とはみとめられなかつた。

考 按

吾々は種々の生物學的材料が凍結乾燥によつて如何なる影響を蒙るかということについて各方面から検討中であるが⁹⁾, 今回は動物組織について, 形態的檢索⁵⁾と平行して, 機能的な障害の有無を追究してみた。

處が緒言に於ても述べたように, これまで凍結乾燥組織自体について機能的な検査を行つたという報告は殆んど見當らず, 僅かに寒冷を作用させた場合の組織の酸素消費量を測定した實驗が 2, 3 あつて⁸⁻¹⁰⁾, それらによれば Q_{O_2} の減少することが知られている。

例えば兒玉¹⁰⁾ は食鹽・氷の寒劑 ($-10^{\circ}C$) 中 30 分間の凍結で 70~30% くらいの Q_{O_2} の低下

(兔、蛙の肝)をみとめている。それらに比し吾々の成績中の凍結融解による Q_{O_2} の低下率が一般に大きいのは、吾々の実験の凍結速度が大きいことと、組織塊のままの測定によるためであろう。

いずれにせよ、従来、凍結による酸素消費の減少は、凍結に伴う細胞構造の破壊、或はその結果としての呼吸に必要な物質の滲出などに基づくものであらうと云われている。事實、本実験と平行してみた凍結乾燥組織の顕微鏡的所見から考えても、凍結によつて組織細胞に種々の形態的な変化があらわれているのであるから、その組織の代謝機能にかなりの障害が起ることは當然の結果と思われる。

特にこの実験で、處置組織の Q_{O_2} の減少は凍結速度と一定の関係があるように思われたが、実験例数が少ない上に各例で実験値の變動が大きかつたため、推計學的には凍結速度の差に意義を見出し得なかつた。然しもし有意の差があるとすればこの組織の機能的検索を同じ組織像の形態的觀察と比較検討することによつて組織障害の機序が多少説明づけられるのではなからうか。即ちさきの兼平の報告⁵にみられるように、凍結速度の小さいものでは、細胞外にのみ大きな氷の結晶の跡がみられ、細胞核及び原形質内には氷結晶の跡が全くみられない。ところが冷却速度の大きいものでは、原形質或は核内にも氷結晶の跡がみとめられるが、之は細胞外凍結と同時に細胞内にも氷結が起るためと考えられる。

しかも極端に凍結速度が大きくなると、細胞内構造が多少弛緩している程度で氷晶の跡がみとめられないのは、凍結速度が大きいために極めて小さな氷晶が数多く出来たためと思われる。要するに凍結速度が大きいほど細胞内に氷晶ができるようになり、従つて細胞の障害が甚だしくなることは一般に知られている事實であり、吾々も既に微生物に於て認めているので⁷、動物組織細胞の場合も同様の機序に基づくものであらうと考えられる。

なお微生物では凍結乾燥を行うと、凍結融解のみのもより一層障害されることが知られているが⁸、本実験の乾燥組織では、凍結融解組織とほぼ同一の酸素消費量を示した。つまり組織では、乾燥の過程では殆んど障害を受けないかのような結果となつたが、これは如何に解釋すべきものであるか更に検討を要する。

摘 要

- 1). 廿日鼠の肝臓を試料として、凍結融解或は凍結乾燥を行つたところ、その組織の酸素消費量は平均すると正常組織の 40~20% に低下した。
- 2). 凍結融解と凍結乾燥とでは、その値がほぼ等しかつた。
- 3). 凍結速度が大きくなるほど酸素消費量は低下するかのようみえたが、計推學的に之を確認できなかつた。

文 献

- 1) Weiss, P. 1943 Repair of peripheral nerves by grafts of frozen dried nerve. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **52**, 326.
- 2) ——— 1943 Nerve reunion with sleeves of frozen-dried artery in rabbits, cats and monkeys. Ibid., **54**, 274.
- 3) ——— 1943 Functional nerve regeneration through frozen-dried nerve grafts in cats and monkeys. Ibid., **54**, 277.
- 4) Taylor, A. C. 1945 The rate of freezing, drying and rehydration of nerves. J. Cell. Comp. Physiol., **25**, 161.
- 5) 兼平信一 1953 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条件の吟味。低温科學, **10**, 137.
- 6) 根井外喜男・その他 酵母の機能に及ぼす低温の影響。未刊。
- 7) 根井外喜男 1951 酵母の凍結過程。科學, **21**, 94.
- 8) Lipschütz, A. und Veshnjakov, S. 1930 Üben der Sauerstoffverbrauch des isolierten Säugetier-ovariums. Pflüger's Arch., **223**, 56.
- 9) Nomura, K. 1933 Studien über Gaswechsel des Gewebes in vitro. IV. Einfluss der Kälte auf die Gewebsatmung. Cytologia, **4**, 257.
- 10) Kodama S. et al 1948 Oxygen consumption of frozen tissue strain. Rep. Inst. Physiol. Kumamoto Med. Coll.
- 11) 根井外喜男・その他 1951 生物學的材料の凍結乾燥法 (第6報) 低温科學, **8**, 179.

Résumé

In order to investigate some functions of frozen-dried tissues, oxygen consumption of operated mouse liver was measured by Warburg's manometer.

From the results obtained, it was recognized that the function of tissues was, in general, extremely injured by freeze-drying and consequently diminished to 40~20% of that of normal tissues. In particular, it was to be assumed that the oxygen consumption of materials was affected by pre-freezing conditions, in accordance with the following finding: the more rapid the rate of freezing of tissues, the more, relatively, were the materials destroyed. However, the differences observed under varying freezing conditions were not statistically significant enough.

Furthermore, the tissues frozen and thawed as control materials were also damaged, being approximately similar to the frozen-dried ones in the amount of oxygen consumption at the same freezing rate.