



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Tobacco Mosaic Virus の凍結乾燥による断裂について
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 佐々木, 芳郎 他
Citation	低温科学. 生物篇, 14, 75-85
Issue Date	1956-11-26
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17587">https://hdl.handle.net/2115/17587</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	14_p75-85.pdf



## Tobacco Mosaic Virus の凍結乾燥による断裂について\*

根井外喜男 佐々木芳郎

(低温科学研究所 医学部門)

四方英四郎

(農学部 植物病理学教室)

(昭和31年7月受理)

### 緒 言

生物学的試料，特に細胞浮游液などの電子顕微鏡標本を作る際には，乾燥の方法が問題になる。従来は一般に，試料を支持膜の上にとつてから室温かせいぜい40~50°Cくらいまでの温度で乾燥していたが，このような乾燥方法では，乾燥過程で作用する表面張力のために細胞は変形し本来の形態とは多少異なつた像を呈するものと想像される。近年この点について再検討され，生物体の自然の立体的な形態をそのまま維持するためには，凍結乾燥法を利用するのがよいといわれるようになってきた<sup>1)</sup>。

Tobacco mosaic virus (TMV) の電子顕微鏡的研究に於ては既に早くから凍結乾燥法が採用されて，室温の空気乾燥の場合とは少し所見の異なることが報告されている<sup>2)</sup>。また TMV の凍結乾燥標本に於ては，個々の virus で幾個かの部分に切断されて連鎖をなすもののあることが Rice ら<sup>3)</sup> 及び Kanngiesser ら<sup>4)</sup> によつて見出された。しかし彼等は単にこのような事実のあることだけを報告し，それ以上多くの検討を行つていない。

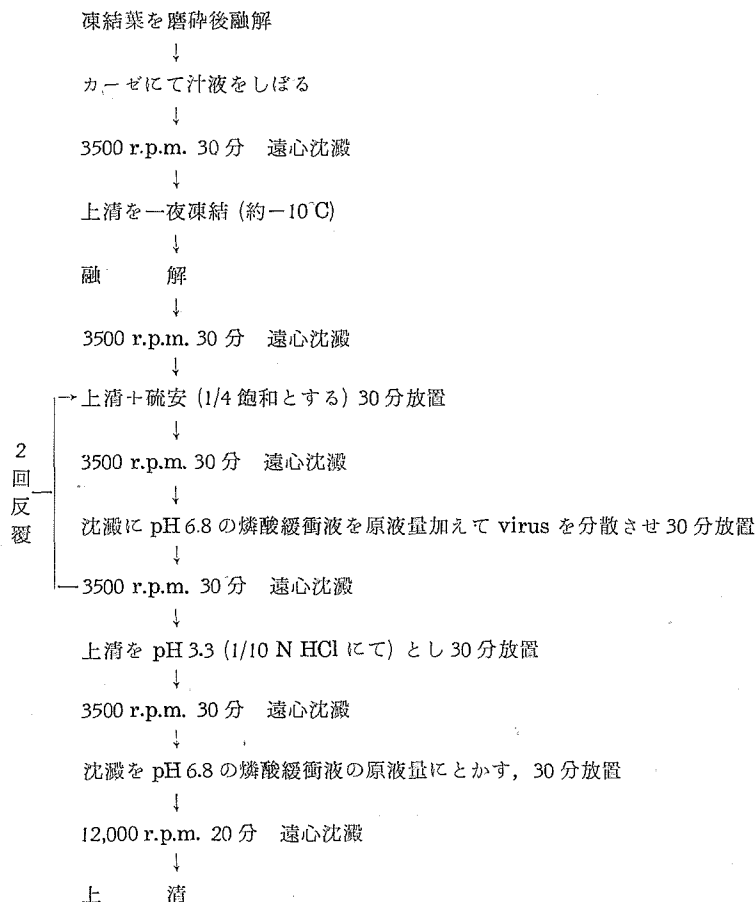
一方，TMV は加熱，超音波，紫外線等各種の物理的 化学的な処理によつて分裂その他の形態的な変化をおこすことが知られており<sup>5)</sup>，著者の1人四方も電子顕微鏡の所見からの詳細な結果を報告している<sup>6),7)</sup>。

また根井は数年来凍結乾燥法を電子顕微鏡学へ応用することについて実験して居り，その研究の一環として，Rice らと同様，凍結乾燥によつて virus が断裂するという事実を確認した。そこで著者等は更に TMV がどんな機序で切れるのかという点について検討をすすめた。

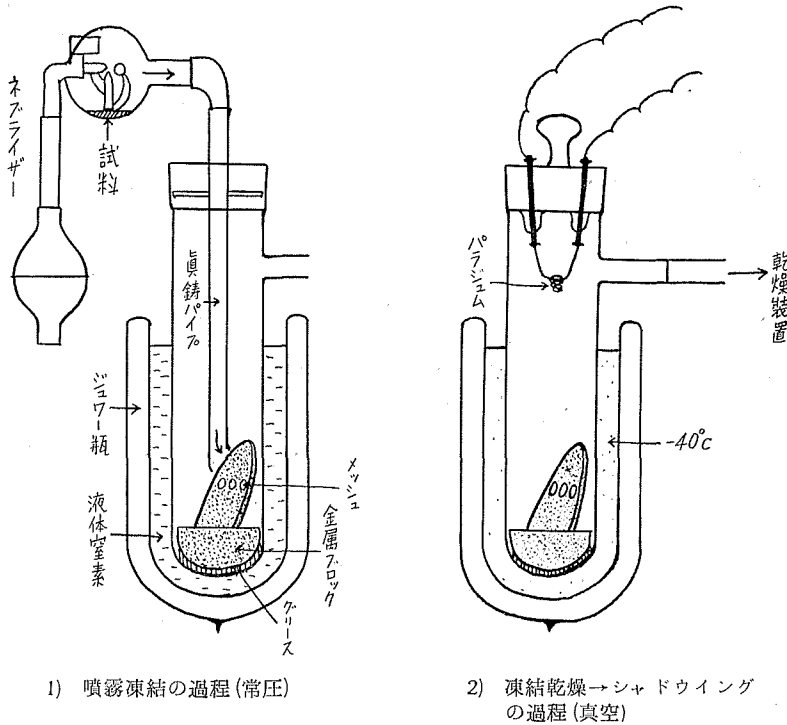
\* 北海道大学低温科学研究所業績 第357号

## 実験方法

使用材料： TMV を本葉 4~5 枚に達した若い煙草 (*Nicotiana sylvestris*) に接種し約 2 週間後に罹病葉を刈りとつて凍結貯藏しておき、次のような硫酸塩析及び等電点沈降をくりかえすところの化学的方法によつて精製し、これを実験材料として使用した。



凍結乾燥法： 第 1 図のような乾燥器を自製して用いた。先ずコロジウム膜メッシュを金属ブロックの斜面に張りつけ、このブロックを真空グリースで乾燥器の底に密着させる。次に噴霧器の導管を挿入し、乾燥器もろとも、ジュワー瓶にいれた液体窒素中に浸して  $-190^{\circ}\text{C}$  まで十分に冷しておく。そこで試料を Vaponefrin Co. 製の nebulizer で噴霧する。噴霧器は特別に考案されたものでごく微細な霧粒だけが噴出されるようになっており、この霧粒は予め冷却されている導管を通つてブロック斜面の支持膜にふりかけられる。メッシュ自身は前に述べたように液体窒素の温度に近いところまで冷却されている上に熱伝導もよくしてあるので、コロジウム膜面に衝突した微細滴は非常に急速に凍結する。この時の滴の大きさは数  $\mu$  といわれ



第1図 凍結乾燥蒸着装置とその操作過程

る<sup>1)</sup>。なおただ1回の噴霧では滴数が少なくて検鏡の際不便であるから凡そ10回くらい反復する。このようにして試料の噴霧を終れば、導管を引きぬいて蒸着装置につけかえ、凍結乾燥機に接続して直ちに減圧を開始する。 $10^{-2}$  mm Hg 以上の真空中に達したところで冷却用の液体窒素から抜き出し、それから後は乾燥過程で試料が融解するのを防ぐために  $-30^{\circ}\text{C}$  ~  $-40^{\circ}\text{C}$  くらいに冷しながら、いわゆる凍結乾燥を行う。Williams によれば  $-45^{\circ}\text{C}$ 、 $5 \times 10^{-4}$  mm Hg ならば10乃至15分で乾燥を終了するというが、我々の条件は少し違うので大体2時間くらい乾燥を続けた。なお凍結乾燥機のコールド・トラップには液体窒素を用いた。乾燥の末期には室温まで温度を上げ、十分に乾燥を完了してから、蒸着用のヒーターを加熱してシャドウを行つた。従来のように凍結乾燥後試料を一旦大気中に出して更に他の蒸着装置に入れなおすようなことはせず、乾燥機と蒸着装置とを同一容器内に納めたのは、大気中の水蒸気による乾燥試料の変形をおそれたからである(但し一部のものは乾燥後一旦とり出して別の蒸着装置でシャドウを行つた)。シャドウをつけるにはパラジウム(一部にはクロム)を用い、 $10^{\circ}$ の角度で行つた。電子顕微鏡は日本電子光学研究所製のJEM-4及び4C型を使用した。加速電圧は50KVで、大部分のものは、直接倍率10,000倍(一部7,000乃至20,000倍のものあり)で写真撮影した。

## 実験成績

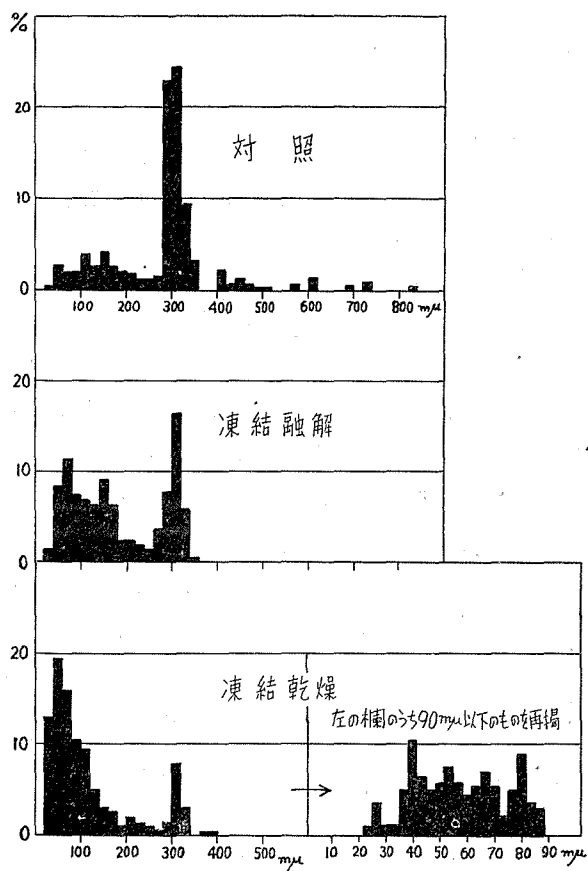
## 1. 室温空気乾燥

通常行われている方法に従つて、試料を1滴コロジウム膜上にとり室温で自然に乾燥したものは、図版1及び第2図のように大部分が300 m $\mu$ 前後の長さの桿状のvirusであつて、次に述べるような断裂像をみることはない。

## 2. 凍結乾燥

実験方法の項に記載した条件で凍結乾燥を行うと、連鎖状に切れたvirus体の点在するのみとめられる。この断裂virusの出現頻度は正確にはわからないが、そんなに多いものではなく、全体として総virus数の10%以内くらいであろうか。しかも視野によつて多少多いところもあれば少ないところもある。凍結乾燥標本ではこの定型的な連鎖状のものが現われるばかりでなく一般にvirusが切れて長径が短くなつてきているように見える。

これらのvirusは、そのシャドウの状態からみて、殆んどすべてコロジウムの膜面に密着



第2図 TMV 粒子の長さとその出現頻度

しているものばかりであつた。凍結乾燥法の特徴からいえば、立体的配位をとつて膜面から浮いているものがあつてもよい筈であるが、そのようなものは見当らなかつた。また全く同じ条件で標本を作つたつもりでも、比較的分裂像の多いものと少ないものとができて、必ずしも一定の成績は得られなかつた。

いま定型的な連鎖断裂像についてもつと詳しく観察してみると(第2図及び図版参照)

1) 断片粒子の数は一定しない。2箇から多いものは7~8箇になるものがあるが、大体5箇前後に切れたものが最も多い。

2) 各断片の個々の長さは必ずしも一定していないが、40  $m\mu$  から80  $m\mu$  くらいのものが最も多い。然もその範囲内で出現頻度は4つの山をなしている(第2図の下段右)。各断片の長さを合計すると次の表に示すようにほぼ300  $m\mu$  前後となる。

第1表 凍結乾燥による断裂粒子の長さ(特に連鎖をなしているものだけについてみる)

	No. 1 ( $m\mu$ )	No. 2 ( $m\mu$ )	No. 3 ( $m\mu$ )	No. 4 ( $m\mu$ )	No. 5 ( $m\mu$ )	No. 6 ( $m\mu$ )	No. 7 ( $m\mu$ )	No. 8 ( $m\mu$ )	No. 9 ( $m\mu$ )
第1断片	141.0	69.5	153.0	100.0	71.3	79.0	182.0	58.5	98.0
(間隔)	(114.5)	(29.2)	(62.0)	(81.6)	(重なり)	(59.0)	(169.0)	(51.0)	(18.9)
第2断片	61.0	40.3	47.0	219.5	110.8	65.6	81.6	64.2	141.5
(間隔)	(107.0)	(54.5)	(18.8)	—	(146.3)	(61.0)	(45.0)	(58.5)	(近い)
第3断片	65.6	105.0	131.5	—	54.5	60.0	65.7	52.8	64.2
(間隔)	(65.6)	(40.3)	—	—	(132.2)	(48.8)	—	(41.5)	—
第4断片	89.2	47.0	—	—	84.5	69.5	—	39.6	—
(間隔)	—	(15.0)	—	—	—	—	—	(18.9)	—
第5断片	—	49.7	—	—	—	—	—	(32.1)	—
(間隔)	—	—	—	—	—	—	—	(近い)	—
第6断片	—	—	—	—	—	—	—	51.0	—
断片数	4	5	3	2	4	4	3	6	3
各断片合計長	356.8	311.5	331.5	319.5	321.1	274.1	329.3	298.2	303.7

3) 各断片間の間隔は一定でない。即ち多くのものはほぼ揃つた間隔を示すが、中には非常に間の開いたものもあれば、一端から他端に向つて順次広くなつて行くものもある(図版3~9)。

4) 配列状態も、全く整然として1列に並んだものや、多少方向のずれているものなどさまざまである。

5) 各断片の間は完全に切りはなされているものが多いが、中には痕跡的ではあるが何かつながりになるものが見えることがある(図版7.8)。これは Stahmann ら<sup>8)</sup>も認めていて、核酸であろうと述べている。

6) 断裂しない粒子に燐酸塩の結晶と思われるものの附着していることがある(図版10)。

このような像は空気乾燥の場合には殆んどみられない。

**氷結晶について：** virus 粒子以外で視野の中に見える大小多数の粒子はメジウムに用いた磷酸塩の結晶であろうと考えられる。

これらの粒子は見事に配列して網目を作ることがある。個々の網目は正方形又は五角形や六角形を呈するが、これは恐らく氷結晶がそのまま昇華した跡を示すものと考えられる。網目の状態からもわかるように、このような氷晶(?)は、コロジウム膜上の乾燥液滴の周辺部では小さく、中心部に向つて大きくなつてゐる。各氷晶の輪廓を表現していると考えられるこれらの塩の結晶粒子の配列をもつと詳しく観察してみると、五角形、六角形の頂点に当るものは揃つて大きく、各稜線上のものは何れも小さいがほぼ等しい大きさと間隔を保つてゐる(図版 10. 11)。

### Virus 粒子断裂の機序についての検討

以上のように、凍結乾燥によつて virus 粒子がいくつか切れるという事実を確認した。そこでこのような現象はどんな機転で起るのかを検討してみた。

#### 1. 乾燥による影響

1) 空気乾燥： 室温に放置して乾燥した場合には、決してこのような断裂像をみることがないのは既に述べた通りである。

2) 真空乾燥： 室温乾燥よりもはるかに急速な乾燥を行うためと、凍結乾燥では高真空での乾燥を行つてゐるのでその対照の意味で真空による乾燥を行つてみた。即ち室温で試料を噴霧したもの、或は試料を1滴コロジウム膜上にとつたものなどを、真空装置内に納めて減圧乾燥した。その真空度上昇速度は明らかでないが、到達真空度は大体  $10^{-1}$  mmHg であるから室温  $20^{\circ}\text{C}$  にて1~2分で乾燥する。この程度の真空度では蒸発に伴う自動冷却のため凍結が起るということはない。乾燥時間は1滴とつたものでも数分で、室温空気乾燥よりはかなり短い。このようにして得られた標本ではやはり空気乾燥同様に断裂像をみることはなかつた。

#### 2. 凍結による影響

##### 1) 凍結融解

試験管内凍結融解： 試料 0.5 cc を試験管にとり、液体窒素中に浸して急速に凍結させ(約 15 秒で  $-190^{\circ}\text{C}$  に達する) 30 秒おいた後  $20^{\circ}\text{C}$  の温浴槽で融解しこれを5回くりかえしたものを通常の方法で空気乾燥し標本を作る。その結果は、1回凍結融解のものではあまり変化はみとめられないが5回くらい反覆したものでは一般にかなり virus 粒子の長径が短くなつてゐる(図版2)。その長さを測定してみると、第2図でわかるように  $200\text{ m}\mu$  以下のものが多くなり、殊に  $80\text{ m}\mu$  と  $160\text{ m}\mu$  附近に2つの山がみられた。

支持膜上凍結融解： 凍結乾燥の場合と同様、金属ブロックに張りつけたコロジウム膜メッシュを予め液体空気で冷しておき、これに試料を噴霧して微細滴を急速に凍結させる。これを室温に放置して融解させそのまま空気乾燥して検鏡すると、凍結乾燥にかなり似たような断裂像が得られる(図版 13, 14)。但し凍結乾燥の場合のように定型的な連鎖状の分裂をするも

のは少ない。また同じように支持膜上で凍結融解するにしても、凍結の際の速度によつて多少所見が異なるようである。例えばもう少し冷却速度を小さくする方法として、メッシュ上に試料を1滴とり直接或は間接に液体窒素に浸して凍結させすぐに室温で融解した場合には断裂像は殆どみられなかつた。ただもつと冷却速度を小さくしても ( $-30^{\circ}\text{C}$  の低温室に置いて比較的緩やかに空気凍結させたもの)、数日間凍結したままに放置したものでは、融解後の室温乾燥標本に断裂像がみられた。しかしこの場合の連鎖はあまり定型的ではなく不規則に乱れたものが多かつた。なお冷却速度を小さくする場合は、殆どすべて試料をピペットで1滴とつたが、これは噴霧による微細滴では凍結の起るまえに乾いてしまうおそれのあるのを避けるためである。

## 2) 凍結乾燥

最初に述べた凍結乾燥は、予め液体窒素の温度まで冷却されたメッシュに試料を噴霧した場合で、冷却速度の極端に大きいときの例であるが、今度は同じ凍結乾燥でももつと冷却速度の小さい場合を検討してみた。それには試料を1滴とつたメッシュ・ブロックを液体窒素に浸したり、或は乾燥器に納めてから周囲より冷却したりして、徐々に凍結させ凍結完了後引き続き乾燥を行つたのである。しかしこれらの凍結乾燥標本では断裂像はみとめられなかつた。

以上のような条件での試料の冷却速度は実際に測定することはできなかつたが、乾燥後の標本を鏡検して緩衝液塩類の結晶配列の状態から氷の結晶の大小を推測することによつて、ある程度冷却速度の比較をすることができた。

## 3) 凍結乾燥標本に復水させたもの

凍結乾燥によつて明らかに断裂像のみられるような標本に1滴水をのせ、そのまま室温において再び乾燥したものを鏡検すると、断裂像は相変わらず見えるが配列がかなり乱れたような感じがする (図版 12)。しかし中には定型的な連鎖も残っている。乾燥 virus 粒子が復水しても膜面に密着しているものでは殆ど位置や形態に変化がないのではなからうか。

次に試験管内凍結乾燥したもの (アンプルを使用し、試料の量、冷却速度等は前記の試験管内凍結融解の場合とほぼ同様) に水を加えて復水させ (通常種々の生物学的材料の凍結乾燥を行なう場合、元に戻すには失われただけの水を加えればよいとしている)、それを1滴とつて室温で乾燥させたものでは、無処置の対照の空気乾燥のものと同様に断裂像はみられなかつた。従つてこの程度の冷却速度では virus 粒子の断裂をきたさないものと考えられる。

## 3. その他の条件についての検討

### 1) コロジウム膜を伸縮させる試み

断裂の機転として、予備冷却で収縮していたコロジウム膜が凍結乾燥後の温度上昇で再び伸展するとき、膜面に固着し然も乾いてもろくなつた virus 粒子がその伸展力に耐えかねて切れるのであろうとの考えがある。このような膜の伸縮による影響を検討する目的で、室温乾燥の対照標本を液体空気に投入して急速に冷却し、また室温に戻すなど、急激な冷却加温を数回

くりかえしてみたが、全然変化はみとめられなかつた。

## 2) 噴霧によるか又は膜面への衝突による機械的破壊

凍結乾燥で最も見事な連鎖状断裂像をみとめるのは噴霧を行つた場合であるから、噴霧そのものによる影響の有無を吟味してみた。

まず噴霧した試料を室温で乾燥したものでは大きな液滴から乾燥したものと同様に決して断裂像のみえるようなことはなかつた。ただ噴霧試料ではとかく virus 粒子が凝塊を作り易く分散状態がよくない。その上塩類の沈着も多いのであまり良い標本は得られない。

更に噴霧による影響を検討するため nebulizer の噴出口を閉じておき凡そ 30 回噴霧をくりかえすと、微細滴は内壁に衝突してはおちて下にたまる。それから 1 滴とつて標本を作つてみて、やはり断裂像はみられなかつた。

## 考 察

Rice らや Kanngiesser らが報告したように、凍結乾燥によつて Tobacco mosaic virus が切れるという事実を吾々も確認したが、どうしてそのようなことが起るのかということについては何もわかつていないので、いろいろの角度から検討してみた。

先ず第一に乾燥即ち virus 粒子からの単なる脱水によるものではないかの考えに対しては、凍結させない場合の乾燥、即ち液滴にしる噴霧にしる試料を室温や真空にして乾燥したのではけつして断裂像をみなかつたことから、これは単に脱水過程で起る現象とは考えられず、恐らく凍結に関連したことがらであろうと想像されるようになった。また Rice らも述べたように、連鎖状をなしている数個の断片の長さを合計するとほぼ 300 m $\mu$  となることから、各断片は脱水収縮してできたものではないといえよう。

そこで次に凍結に関係した条件をいくつかあげてしらべてみた。それにはまずいわゆる凍結乾燥とは無関係に凍結だけによる影響を確かめることにした。細菌のような微生物が凍結融解によつてどんな影響をうけるかについては、これまでもいろいろしらべられており、形態的、機能的にかなりの影響をうけることがわかっている。そしてこの変化をもたらす因子として、細胞の内又は外にできる氷の結晶の状態が大きな役割をすることもみとめられている<sup>9),10)</sup> TMV は細菌などとはその性状が全く異なるので、細菌の場合に考えられる機転がそのまま TMV にも当てはまるとは思われないが、然しこの実験で実際に TMV を凍結融解した結果は、やはり影響のあることがみとめられた。例えば試験管内である量の試料をなるべく急速に凍結融解をくりかえすと、80 m $\mu$  とか 160 m $\mu$  あたりの短かな粒子の出現頻度が次第に増してくることから、これは恐らく凍結つまり氷の結晶ができることによつて virus 粒子が切断されるのであろうと考えられる。またメッシュ上にとつた試料では、凍結融解をくりかえすことは困難であるが、ただ 1 回の凍結であつても冷却速度が大きくて凍り方のごく速い場合には virus 粒子の切断特に凍結乾燥のときと全く同様の見事な連鎖状の断裂像がみられる。このことは注目

すべき事実であつて virus 断裂の機転が凍結に基づくものであろうとの考えを一層強くする。

殊に試料のとり方、冷却のし方などを加減して冷却速度をおとすと、このような断裂像をみることができなくなるという傾向は、ますます凍結に起因する影響であることを思わせる。同様の現象は凍結乾燥の場合にもみられるのであつて、予備凍結の速度が遅くなると断裂像が現われないということは、乾燥の際の影響よりもやはり最初の凍結の時の条件が大きく関係するからであらうと思われる。但しこの場合細菌などのように細胞内凍結は考えなくてもよいようである。何故ならば virus 粒子の内部には水分は殆ど含まれていないと推定されているからである<sup>11),12)</sup>。

一方凍結乾燥に於ける virus 断裂の原因として、virus 体自身或はコロジウム膜が最初は冷却のため収縮してそれが乾燥後温度上昇とともに伸展するために切れる、殊に乾燥の結果もろくなつた virus 粒子が膜の伸びによつて引きちぎられるのであるという考え方もあるが、しかし凍結融解の場合にも既に述べたように、乾燥前に温度を上げて融解したものでも断裂像がみえるとか、室温又は真空で一旦乾燥したものはいくら急激に加温冷却をくりかえしても決して virus の切れることがないとか、更には断裂した virus の各断片間の間隔は膜の熱膨脹によるとは考えられぬほどに広がっているものがあることなど、膜の伸縮が原因になるとは考え難い点が多い。ただ遺憾ながら今回の実験で作つた凍結乾燥標本では膜面から離れて立体配位をとつた virus は見当らず、すべて膜面に密着したものばかりであつた。ここでもし virus の立体像で特に膜面から離れていてしかも断裂した像が見つければ、膜の伸縮による影響は簡単に否定できることにならう。しかし凍結乾燥実施の経験上からみて、膜面から離れた状態で切れたとすれば、そのような断裂粒子は標本面から離れて飛散して了うのではないかと想像されるので、結局膜面から離れた断裂粒子をみつけるということは困難であらうと考えられる。

その外断裂の機序として、噴霧による機械的破壊なども考えられるが、凍結以外の条件ではいかに噴霧をくりかえしても決して断裂像のみられないことから、この点も否定できるように思う。

結局、凍結乾燥によつて TMV が切れるということの最大の誘因は氷晶の生成にあると考えてよいであらう。殊に予備凍結の速度を極端に大きくした場合にだけ切れるということ及び凍結融解の場合でも極めて急速に凍らせたときに断裂像がみえるということは、ますますその感を深くするものである。

ところで、長さ約 300 m $\mu$  の桿状粒子に作用してそれをいくつかに分断するためには、その原因となる周囲の氷晶はかなり小さなものと考えた方が都合がよさそうである。もし今回の実験に用いた程度の微細滴の冷却速度が Williams のいうように 10<sup>6</sup>°C/sec にも達するものならば virus 粒子の長さより十分に小さな氷晶の生成が考えられるので、virus 粒子の周囲にそれらの氷晶が作られるとき粒子自身に作用して機械的にこれを切るということも想像できないことはない、或はむしろ Luyet などの実験<sup>13),14)</sup> から想定して、この程度の急速な冷却速度で

は氷晶はできずにいわゆる *vitrification* (硝子化) が起りそうにさえ感ぜられる。ところが実際に得られた標本について、乾燥後の塩類の析出配列状態から氷晶の大きさを推定してみるとその一稜が数 $\mu$ にも達する大きなものになるので(図版 11), 決して前述の理論値ほど冷却速度は大きくないらしい。実際に吾々の場合はメッシュに膜を張つてそれを金属ブロックにのせたのであるから Williams の場合より熱伝導は小さいものと考えられる。(なおこれらの点、特に凍結乾燥の際の予備凍結で生ずる氷晶の大きさについては、別に詳しく検討する予定である) そうとすれば、多少大きな氷晶であつたとしても、周囲から粒子全体を圧迫する結果、長い桿状粒子が直接にいくつかに切り離されるか或は切れるためのき地になるものができるのであると説明しなければならなくなる。このような断裂機転の解釈には、凍結によつて塩類の粒状結晶の規則的配列のみられることなどがそのアナロジーとして役立つかもしれない。しかしそれでもまだ氷晶生成だけでこれらの断裂像ができるとは云いきれないように思う。凍結乾燥にみられる不規則な配列などは、乾燥時或は乾燥後の位置変動を思わせるからである。

その外にも問題はまだ沢山残されている。TMV の蛋白分子と結合した水は、凍結或は乾燥にあつてどのように動くのか、280~300 m $\mu$  の整数分の 1 に当るいわゆる基本粒子などと考えられているものとこの断裂粒子とはどのような関係にあるのか、これら超顕微鏡的な微細構造の問題についてはすべて想像の域を出ない。ただ各断裂切片の長さが均一でないこと、virus が数本相接して並んだものでは束になつたまま同一箇所て切れていることなど virus の断裂は virus 粒子自身に基づくというよりはやはり外部の機械的な力による現象であるように思われる。

さて電子顕微鏡標本の作製に凍結乾燥法が利用される理由は、乾燥による変形その他の artifact をできるだけ除こうとすることにある。殊に著者等が乾燥後真空を破る際の圧の変化、大気中水蒸気による吸湿変形等をさけるため特殊の凍結乾燥蒸着器を考案使用したのもその目的に副うためであるが、それでもまだ artifact を完全に除いて virus の本来の姿をとらえ得たとは思えない。乾燥過程での試料の温度をどの程度に保持すればよいかという問題なども残っている。また仮にこのようかなり理想的に近い凍結乾燥法によつて得られた像が virus の生の形態に近いものを表わしていると考えれば、断裂像こそ本来の姿であつて、従来みとめられているような長い桿状粒子は乾燥の artifact によつて連結したものであるということになるのであろうか。このへんにもまだ凍結乾燥法に対する批判の余地が大いに残されている。

すべては今後の研究にまたねばならない。

## 摘 要

TMV が凍結乾燥によつて数個の粒子に切れることを確認したので、その断裂の機構を種々の角度から検討した。

例えば、空気乾燥・真空乾燥等の乾燥方法、凍結融解・凍結乾燥に於ける凍結速度、乾燥

後の急速冷却, 噴霧方法, 乾燥後の復水等, 各種条件について吟味した結果, TMV の断裂は主として凍結の際の氷晶生成に起因するものと考えられるような成績を得た。

電子顕微鏡写真撮影には獣医学部電子顕微鏡室石井君の助力を得たことを深く感謝する。

## 文 献

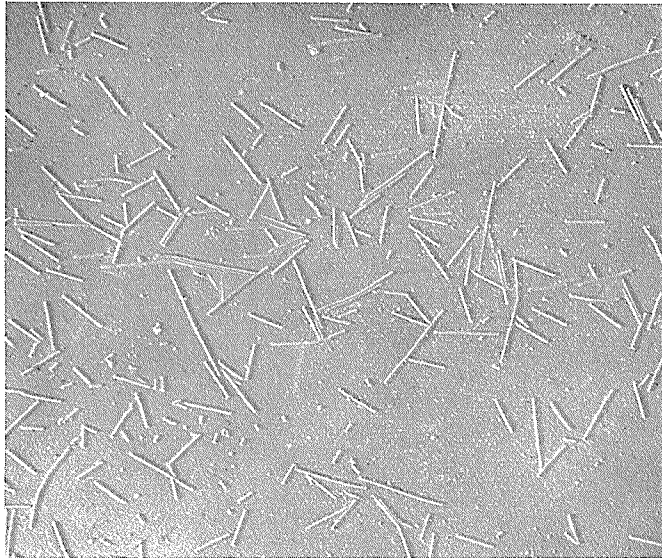
- 1) Williams, R. C. 1954 The application of freeze-drying to electron microscopy. Biological Applications of Freezing and Drying. Acad. Press, (New York).
- 2) Wyckoff, R. W. G. 1947 Electron micrographs from concentrated solutions of the tobacco mosaic virus protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 139.
- 3) Rice, R. V., Kaesberg, P. and Stahmann, M. A. 1953 The breaking of tobacco mosaic virus using a new freeze drying method. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 337.
- 4) Kanngiesser, W. and Deubner, B. 1953 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kartoffel-X-Virus in Gefriergetrockneten Tabakrohsaft. *Naturwiss.*, **40**, ii, 442
- 5) Oster, G. 1947 Studies on the sonic treatment of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Physiol.*, **31**, 89.
- 6) Fukushi, T. and Shikata, E. 1955 Electron microscopy studies on plant viruses. I. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **50**, 74.
- 7) 四方英四郎 1955 煙草モザイク病ウイルスに対する紫外線の影響. 柄内・福士両教授還暦記念論文集, 344.
- 8) Stahmann, M. A. and Kaesberg, P. 1955 Concepts and problems concerning the electron microscopy of plant viruses. *Phytopath.*, **45**, 187.
- 9) 佐藤 徹 1954 低温処理による細菌死滅の機序について. *低温科学. 生物篇*, **12**, 39.
- 10) 根井外喜男・佐々木芳郎 1955 凍結融解による細菌体の破壊. *科学*, **25**, 36.
- 11) Bernal, J. D. and Fankuchen, I. 1941 X-ray and crystallographic studies of plant virus preparations. *J. Gen. Physiol.*, **25**, 111.
- 12) Schachman, H. K. and Lauffer, M. A. 1949 The hydration, size and shape of tobacco mosaic virus. *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 536.
- 13) Luyet, B. J. and Geheuo, P. M. 1938 The survival of moss vitrified in liquid air and its relation to water content. *Biodyn.*, No. **42**.
- 14) Goetz, A. and Goetz, S. S. 1938 Vitrification and crystallization of protophyta at low temperatures. *Proc. Amer. Philos. Soc.*, **79**, 361.

## Résumé

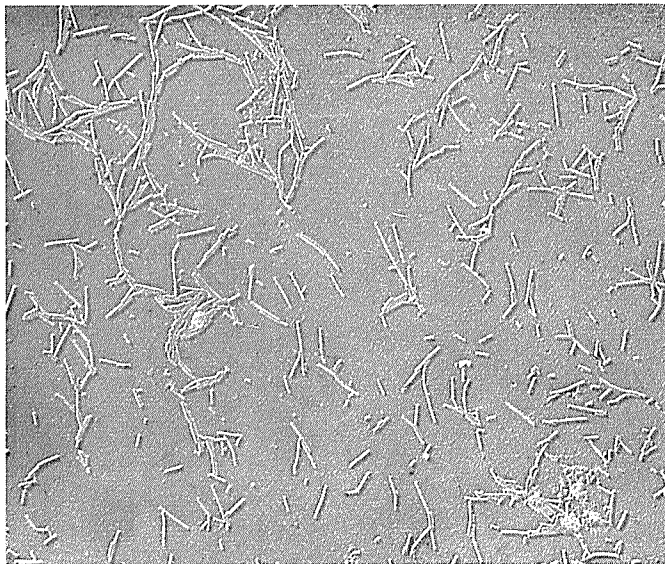
It has previously been shown that the tobacco mosaic viruses, long rods about 300 m $\mu$  in length, are apt to be broken to several pieces by freeze-drying.

The result of our experiments, in which the broken pieces were demonstrated not only in the case of freeze-drying but also in freeze-thawing, particularly when the cooling rate was extremely rapid, makes it plausible to assume that the breakage of the rods might chiefly be due to the formation of ice crystals in the surrounding medium.

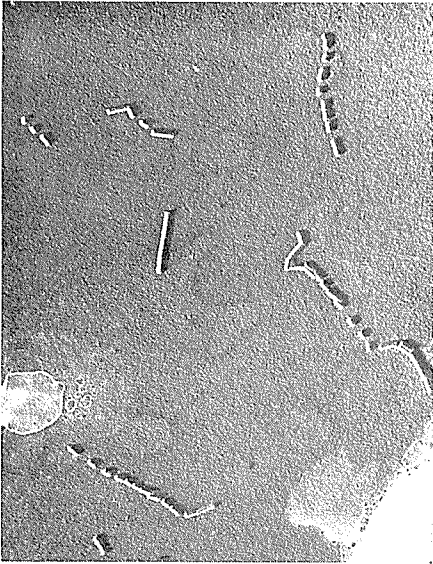




図版 1. 対 照 ×18,000  
室温空気乾燥したもの



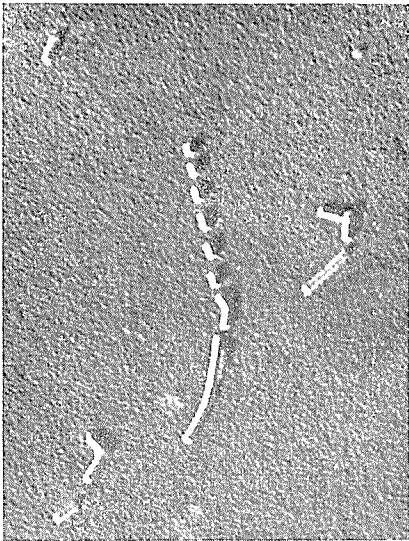
図版 2. 凍 結 融 解 ×18,000  
試験管内にて5回凍結乾燥した後  
室温空気乾燥したもの



図版 3. 凍結乾燥  $\times 25,000$



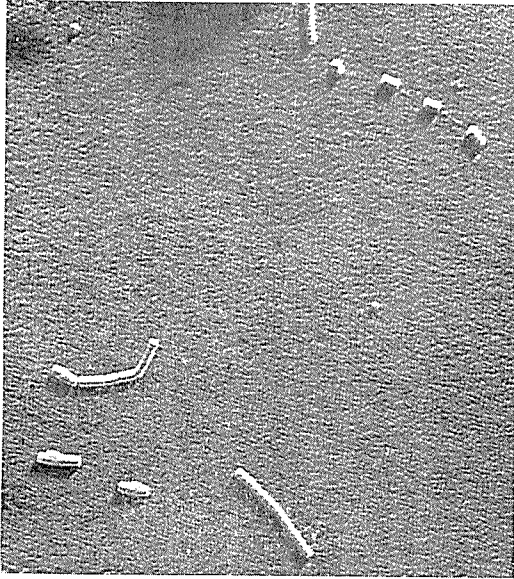
図版 4. 凍結乾燥  $\times 25,000$



図版 5. 凍結乾燥  $\times 50,000$

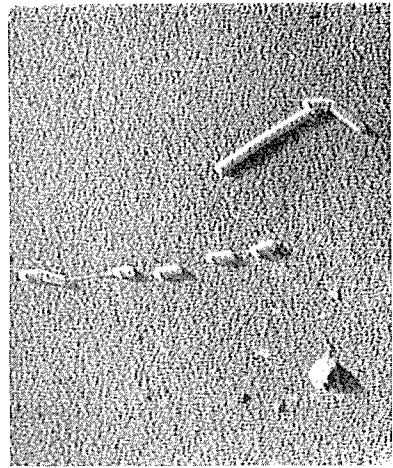


図版 6. 凍結乾燥  $\times 50,000$

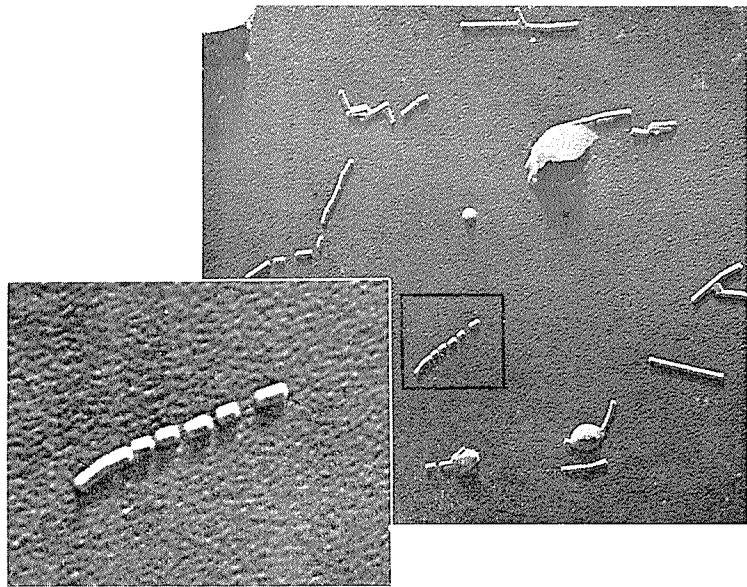


図版 7. 凍結乾燥 ×50,000

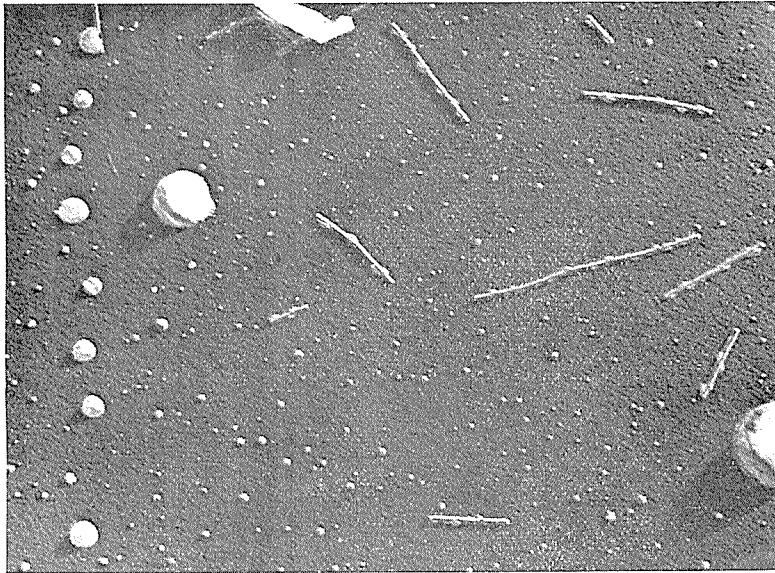
← (断裂粒子間に注目) →



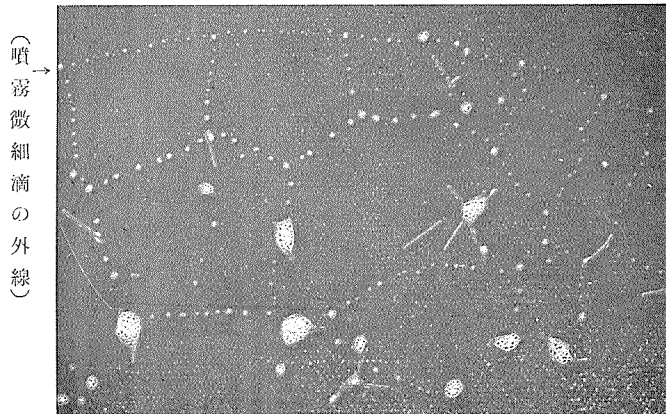
図版 8. 凍結乾燥 ×50,000



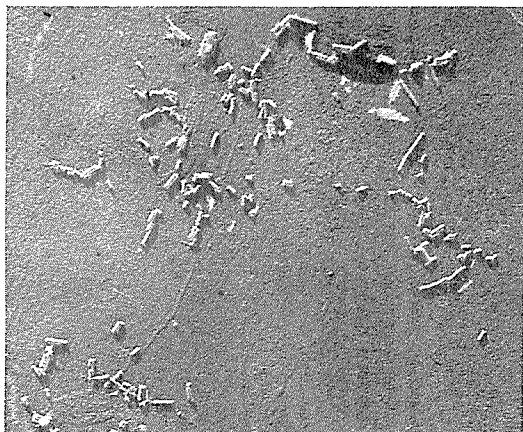
図版 9. 凍結乾燥 ×25,000 (一部拡大したものは×70,000)



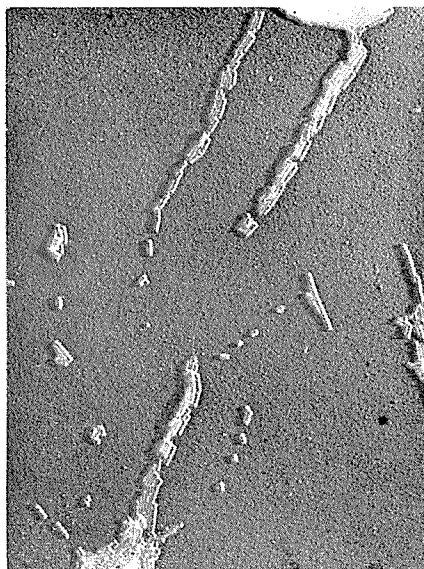
図版 10. 凍結乾燥  $\times 25,000$   
virus 粒子に附着した塩類と周囲の塩類結晶



図版 11 凍結乾燥  $\times 20,000$   
塩類結晶の配列とそれから推定される氷晶の痕跡



図版 12. 復水再乾燥 ×22,500  
膜上で凍結乾燥したものに水を  
加え、再び空気乾燥したもの



図版 13. 凍結融解 ×25,000  
コロジウム膜上で  
凍結融解したもの



×25,000  
(1部拡大したものは ×70,000)

図版 14. 凍結融解  
コロジウム膜上で凍結融解したもの