



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	超低温で生存する動物細胞の凍りかたについて
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo
Citation	低温科学. 生物篇, 16, 65-75
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17609
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p65-75.pdf



超低温で生存する動物細胞の凍りかたについて*

朝比奈英三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

I. 緒 言

近年高等脊椎動物の単離細胞又は小組織片の生きたままの凍結保存法の進歩はめざましいものがあるが、凍結する際生物細胞が受ける害の機構についてはまだわかっていないことがきわめて多い。最近発表された動物の組織及び細胞の凍結に関する二・三の総説では、凍害の主因を凍結の際媒液中で濃縮される電解質の作用に帰している^{14), 18)}。これらは Lovelock (1953 a b) が赤血球を材料として行つた実験^{9), 10)}にその根拠をおいているもので、彼の仕事は少なくとも赤血球の食塩溶液中での凍結に関する限り、その害の機構を知る手がかりになる重要な実験的資料を呈出したものと評価される。彼の説からすれば、凍害を避けるためには、その細胞を凍結させるときに塩害がおこり易い温度範囲におく時間を最少限にする必要があり、実際にも血球や精子の超低温**に及ぶ凍結保存では、このような急速冷却法が最良の結果をおさめている。しかし一方従来から動物細胞をゆつくり超低温まで冷すことによつて凍害を軽減できた実例も少なからず知られており^{7), 15), 17)}、これらを血球等の場合と同じやり方で説明することはきわめて困難である。このような実例に対する解釈の一つとしてわれわれは数年前これらの実験の条件はすべて細胞外凍結の状態を保つのに有利なものばかりであることを指摘した¹⁾。即ち媒液の凍結の際、冷却速度が小さければ液の中に含まれた親水性の溶質の濃縮層に氷の外表面がおおわれるために細胞が外部から植氷される機会が少なくなり、又細胞自身も外部での凍結の進行に伴ない脱水されてその表層部が凍りにくくなるので、たとえ植氷されても外部から凍結が連続的に内部に進行することはなかなかおこりがたい⁴⁾。凍害防止剤として著名なグリセリン等の作用は、媒液の凍結による塩濃度の増加をおさえることの他に、その顕著な氷点降下性によつて前記の氷の外表面を包む濃縮液層が細胞に対する外からの植氷を防たげる能力を高め又同時に与えられた凍結温度における氷の生成量ひいては原形質からの脱水量をへらし、且細胞内部に滲透してその過冷却能力を増し細胞内で自発凍結 (Spontaneous freezing) がおこる危険を少なくすることで或程度は説明できる。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第461号

** 温度の呼びかたは前報⁴⁾に従い、0°C→-40~-50°Cを気候的低温これより低い温度を超低温と呼ぶ。

この考え方によれば、生物細胞の凍害の主要因の一つは致命的な細胞内凍結であり、相当高度の脱水に耐えられる細胞であれば、その凍結の初期に細胞外凍結を十分に進行させて細胞内部の凍り易い状態にある水をかなり除いてしまえば、その後はこれを急速に超低温まで冷却しても細胞内凍結はおこりにくく、細胞は生存していらる筈である。この線に沿つて酒井は耐凍性の高い植物組織が -20°C 又は -30°C 附近で予備凍結させると液体窒素中での冷却に耐えることをすでに明らかにしている¹⁶⁾。又完全な1個体の動物においてもわれわれは越冬昆虫を用いて超低温への冷却実験に成功したが⁶⁾、細胞そのものの凍害をしらべる材料として昆虫の組織はそれほど好適な材料ではなかつた。筆者は前報³⁾において海産二枚貝の鰓の繊毛が、過冷却状態にあつてもかなり長期間活動できることを明らかにしたが、そのときこのような組織細胞がかなりの凍結に耐えることがわかつた。そこでこれを材料として前述の想定をたしかめ、且つこのような凍結の際の害の機構にふれる何等かの手がかりを得たいと考えた。本文はこの意図のもとに行つた一連の実験の報告である。

II. 材料と方法

材料として北海道噴火湾有珠海岸産の養殖カキ *Ostrea (Crassostrea) gigas* Thunberg を 1958年3~4月に採集したものを使用した*。又一部の補足的実験の材料として同地産のムラサキガイ *Mytilus edulis* Linné も使つた。これらの貝は 0°C に5日間保存してから殻を開いて鰓板を切りとり、約 $5 \times 5 \text{ mm}$ の大きさに切断して 0°C の恒温海水中に保存し、必要に応じて随時使用したが、切断後15日以上たつたものは使用しなかつた。この状態で鰓片の活動性は少なくとも15日間はほとんど変化なく、活動が停止するまでには 0°C で1カ月以上を要する³⁾。

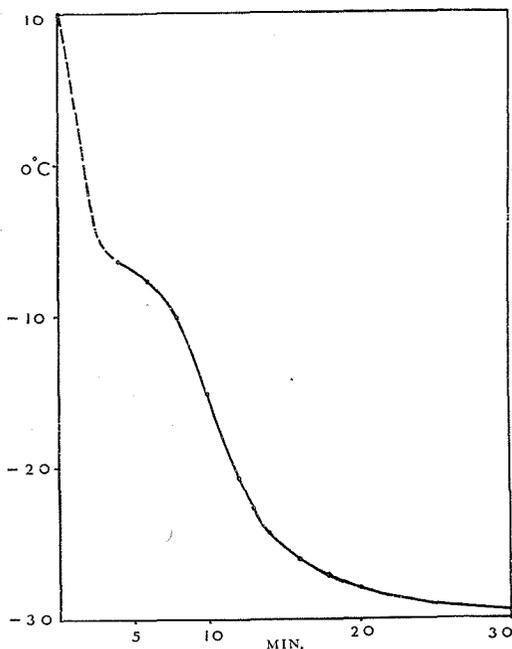
鰓片を冷却するには、内径3cmの小ペトリ皿又はプラスチック製の小さじを用いた。ペトリ皿の場合は約1cc、小さじの場合は約0.2ccの媒液を鰓片と共に入れ、これを所定の温度の空气中にさらした。媒液としてはグリセリンを容量パーセントで0~20%加えた海水を使つた。小サーミスターを用いてプラスチックのさじ上の5%グリセリン海水滴の温度を測定すると、 -30°C の室温にさらした場合、 10°C 内外から -5°C 位まで冷えるのに約3分を要し、多くは -5°C ~ -6°C で過冷却がやぶれて凍結のため一時冷却速度が低下するが間もなく急速に温度が下り20分後にはまわりの気温より 1° ~ 2°C 高い程度に冷え、以後はごくゆっくり冷却される。この場合の冷却曲線の1例を第1図に示した。小ペトリ皿の場合は材料の冷却速度はこれよりもかなりのろい。

材料の冷却はすべて -10° 、 -20° 、 -30°C 内外の低温室内でそれぞれ行いなるべく恒温箱を使用した。 -35°C 以下 -70°C までの温度での冷却には、固形炭酸を入れた魔法ピンを -30° ~ -35°C の室内で使つた。液体酸素で材料を冷すときには、常に材料を入れた小さじを急に直

* 材料の入手はすべて、水産庁北海道区水産研究所有珠臨海実験所の渋谷三五郎氏の御手をわづらわせたことに記して厚くお礼申し上げる。

接その中に浸した。この条件では、さじを入れたためにおこる液体酸素の沸とうはいつも10秒以内であつたから、約10秒後には材料はほとんどその沸点の温度(約 -183°C)まで冷却されたものと考えられる。

加温に当つては特に記載した場合の他は急速融解を行つた。これには 15°C 内外の媒液を100ccのビーカーに充して低温室内に運び、さじに凍りついている鰓片をさじごと液中に投入してかきまぜるのである。融解した鰓片は常温の室内でその活動性を顕微鏡下でしらべた。鰓片の繊毛のうち鰓板の縁部のものは粘液の附着等のため軽度の凍結の後にも活動しなくなる場合が多いので、活動性の指標としてはこの部分以外の繊毛のうごきを採用した。細胞の生存の証拠として繊毛運動の存否はきわめて明瞭であり、超低温での凍結後にも全く常態に復し、その継時性も乱れず、鰓片は冷却以前と全く同様に活潑に這うことができる。しかし鰓板の骨格をなす skeletal tube は凍結融解後もろくなりこわれ易くなることが多かつた。



第1図 海水滴の凍結曲線

縦軸、温度。横軸、時間(分)。5%グリセリン海水の約0.2ccをプラスチックのさじ上において、 -30°C の気温にさらしたときの温度変化。

III. 結 果

それぞれ3~4個の鰓片を海水と共にプラスチックのさじ上で -10°C 乃至 -50°C の気温にさらし、所定の時間毎の一つずつこれらのさじをとり出して温めた。こうして得た十数回の実験結果をまとめると第1表のようになる。前述のようにこの方法では材料を含む凍結塊がほぼ気温と同じ温度に冷却されるには約20分を要するから30分より短時間の冷却は意味がない。

第1表 凍結温度と生存期間

凍結温度 ($^{\circ}\text{C}$)	-10	-20	-30	-40	-50
生存期間*	10~12日	2.5時間	30分	<30分	<30分

* 大部分の繊毛の運動が恢復できる冷凍期間。

表示したように凍結した細胞は -30°C 以下の温度では急速に殺される。 -30°C の場合は温める速度がのろいとそれが速い場合よりも凍害がひどくなることがあるが、凍結時間を30分以内に限定して常温にもどせば少くとも或部分の繊毛は必ず運動をつづける。細胞内部の凍

結は少なくとも気候的低温の範囲ではその細胞にとって例外なく致命的であるから⁹⁾、上記の鰓片の場合もこのようなろい冷却条件の下では細胞外凍結をしている細胞が多いと考えられる。第1表の結果だけからみれば海水中で超低温まで鰓の細胞を冷却することはきわめて危険といわなければならない。そこでグリセリンを用いて耐凍性の増大をはかった。その結果は第2表及び第3表に示す。第2表の実験のみは多数の小ペトリ皿に約1ccの媒液と共に各4個ずつの鰓片を入れ、 -10°C 及び -30°C の温度にそれぞれ分けて凍結保存した。これを時日の経過に従いとり出して 15°C の室内であたためた。

第2表 グリセリン海水中での耐凍性

グリセリン (%)	0	5	10	20
生存期間* (日)				
-10°C	10	20	25	—
-30°C	—	4	7~10	10~12

* 大部分の繊毛の運動が恢復できる冷凍期間。

第2表及び後にのべる第6表の結果からみると媒液にグリセリンを加えることは著しく鰓の細胞の耐凍性を高める。従つてこの点に関する限りではグリセリンは海産動物の細胞の凍害防止剤として有効であろうという Lovelock の予想¹¹⁾はあたつたことになる。しかしこのようにグリセリンを加えた海水中で凍らせても、 -50°C 以下の温度ではきわめて害が大きく、ことに液体酸素につける予備実験では、よほど冷却速度を小さくしないと生存細胞を得ることができなかつた。そこでこの原因の一つは細胞内凍結がおこるためであろうと考え、それを除く目的で鰓片をグリセリン海水と共に予じめ -20°C 及び -30°C で凍らせておいたものをそれぞれ液体酸素で急速に冷却してみた。5分間液体酸素中においてから急速融解して細胞の生死をしらべ第3表にその結果を示した。

第3表 超低温での凍結 I. 各濃度のグリセリン海水中における予備凍結温度の影響

予備凍結(3時間)の温度($^{\circ}\text{C}$)	超低温冷却		対 照**	
	-20	-30	-20	-30
グリセリン (%)				
0	—*	—	—	—
5	—	++*	++	++
10	—	++	++	++
20	—	++	++	++

* —: 繊毛の動きを全くみとめず, ++: 大部分の繊毛が運動を恢復し, 鰓片は活潑に這う。

** 予備凍結のみで直ちに急速融解したもの。

この結果からみて -30°C で充分予備凍結させれば、繊毛細胞は超低温への急速冷却に耐えられることは明らかである。この際グリセリンの使用は、欠くことができないがその濃度は

5% あれば既に充分である。又グリセリン処理の有効になる時間を知るため鰓片を 15°C の 5% グリセリン海水に 30 分乃至 120 分のいろいろな時間入れてから夫々前実験と同じ方法 (-30°C で予備凍結→液体酸素中で凍結→急速融解) で処理してみたが、何れの場合もすべての鰓片が活潑な繊毛運動を恢復した。即ちグリセリン処理は 5% 液で 30 分行えば充分なのであった。又 -30°C における予備凍結の時間の長さも、試みた範囲 (30 分乃至 4 時間) では実験の結果に影響なく、鰓片を液体酸素に浸しておく時間は 1 分間でも 1 時間でも全く同じ結果であった。

さて予備凍結を充分行つた鰓片はこのように耐凍性が高いが、超低温からこれを加温するとき急速融解せず常温の室内に放置して融かすと生存している繊毛細胞の数は相当減り、ところどころの繊毛が打動しているにすぎない場合が多かつた。このような条件で凍つた細胞が加温される時新たに細胞内凍結がおこることは考えられないからこの際の害は恐らく細胞外凍結によるものであらうと想像される。そこでどのあたりの温度で、このような形式の凍害が最も速やかにおこるかを知るために、超低温から鰓片を加温するときの条件を色々に変えてみた。まず前実験と同じく 15°C の 5% グリセリン海水に 30 分つけた鰓片を 5 個ずつさじに入れ、直ちに -30°C の室内で 30 分予備凍結し、これを液体酸素中に 5 分間つけてから次の様な色々な方法で温めてみた。(A~D) は鰓片を入れたそれぞれのさじを約 -65°C, -50°C, -40°C, -35°C の空气中にそれぞれ 10 分間さらしてから急速融解する。(E) は -10°C に過冷却している 20% グリセリン海水中に投入する。(F) 通常の急速融解即ち 15°C の 5% グリセリン海水中に投入。対照として予備凍結のみで液体酸素に入れず直ちに急速融解する。これらの実験結果をまとめると第 4 表のようになる。

これからみると -50°~-35°C 附近が最も短時間のうちに凍害をうける温度らしくみえる。しかしこの場合はこれらの温度の空气中にわずか 10 分間おいたのであるから、これらの気温より低い温度をゆつくり通過している間に凍害がひどくなる場合も想像される。そこでこのことを確かめるために、前実験とは逆に、各 5 個の鰓片を入れたさじをつかい、-30°C で予備凍結して* 直ぐにそれぞれ -40°C 以下の各温度に 10 分間さらしてこれを急速融解してみた。この結果が第 5 表である。

第 4・5 表を総合して考えると、細胞が凍害を受けやすい温度は -40°C より低く、恐らく

* この方法で細胞内凍結による害は避けられる。

第 4 表 超低温での凍結 II. 加温条件の影響*

加 温 処 理	結 果**
(A) -65°C (10 分)→急速融解	++
(B) -50°C (10 分)→急速融解	±
(C) -40°C (10 分)→急速融解	-
(D) -35°C (10 分)→急速融解	+
(E) -10°C の 20% グリセリン海水に投入	++
(F) 15°C の 5% グリセリン海水に投入	++
対照 予備凍結のみですぐ急速融解	++

* 何れも 5% グリセリン海水中で 30 分間 -30°C で予備凍結、次に液体酸素に 5 分つけてから加温。

** ++: 大部分の繊毛の運動が恢復, +: 或一部分又はところどころの繊毛の運動が恢復, ±: ごく少数の繊毛のみがうごく, -: 全く繊毛運動をみとめず。

−40°C〜−50°Cの間で凍害が最も急速に進行するのではないかと思われる*。

さて以上の一連の実験の結果から考えると−30°Cで少なくとも30分間の凍結に耐える細胞は超低温に急冷却しても生存する可能性があるらしい。−30°Cで30分間の凍結はグリセリン処理をしない鰓の細胞にとつてほとんど凍死の限界条件に近いものであるが、融解後生存する細胞が確実にあることは既に述べた通りである。そこでグリセリンを使わずに30分間−30°Cの空气中で予備凍結した鰓片を急に液体酸素中につけて5分の後15°Cの海水中で急速融解させた。この方法による数回の実験の結果は何れも大差なく、用いたどの鰓片にも若干(約20~50)の繊毛の運動を認めることができた。又このとき生き残った繊毛細胞の運動は常温で少なくとも1日は継続していた。

Luyet の唱えたガラス化説によつてよく知られている生物の超急速凍結生存法¹³⁾は、現在においては必ずしもガラス化説によつてのみ説明できる現象ではないといわれるようになって来たが⁹⁾、とにかくこの方法によつて微少な生物材料のあるものは超低温で生存できることが知られている。そこでカキの鰓片をできるだけ小さく(1mm³以内)切断してこの方法を試みた。この小鰓片を約10個ずつそれぞれ0, 5及び20%のグリセリン海水で30分処理した後、それぞれ別個のごくうすい小ブリキ板上におき、余分の液を濾紙でできるだけ除き、常温の室内でブリキ板ごと液体酸素中に投入した。このとき液体酸素の沸とうは7秒内外つづいた。2分後にブリキ板を急いでとり出しそれぞれの濃度のグリセリン海水中で、鰓片を急速融解させた。この結果は何れの場合も組織や細胞の外形はほとんど破壊されていなかったが、繊毛のうごきは全く回復しなかつた。これは恐らく冷却速度が充分大きくなかつたためかも知れないと思われたので、表面積に比べて体積の小さいイガイの鰓糸を使つて同じ実験をくりかえしてみた。イガイの鰓の細胞はカキのそれに比べるとはるかに耐凍性が低いが、この貝の鰓板を注意してほぐすときわめて細い鰓糸を分離することができ、この鰓糸は過冷却状態でも長時間にわたつて繊毛運動を継続する⁹⁾。又この鰓糸はグリセリンに弱く、海水中のグリセリン濃度が、20%に達すると常温では1時間以内に分解をはじめめる。今回はそれぞれ5%及び20%グリセリン海水中に30分つけたものを前記のカキの小鰓片の場合と全く同じ方法で急速凍結及び融解を行つた。その結果は、5%グリセリン海水処理をした鰓糸は組織のこわれ方は20%グリセリン海水処理のものに比べてはるかに少なかつたが、繊毛の運動は全く認められなかつた。ところが後者の方では繊毛細胞が鰓糸から分離してしまつたものかなりあつたにもかかわらず、

第5表 予備凍結後にさらす温度の影響*

温 度 (°C)	時 間 (分)	結 果
−40	10	++
−50	10	+
−60	10	+

* 何れも5%グリセリン海水と共に30分間−30°Cで予備凍結してから各温度の空气中にさらし、10分後急速融解した。結果の記号は前表を参照。

* 今回の方法では、プラスチックのさじを魔法ビン内においたとき試料の温度が平衡に達するまでにはほぼ10分を要するから、後日さらにもつと適当な方法によつてこの結果を検討する必要がある。

残存している一部の繊毛（主として lateral cilia 及び一部の latero-frontal cilia）は活潑な打動をつづけその継時性にもほとんど異常が認められなかつた。

IV. 論 議

カキの鰓の繊毛細胞は切りとつた鰓についたままの状態でも相当高い耐凍性をもっているが -30°C で 30 分より長時間の凍結に耐えさせるには、5% 以上の濃度のグリセリン海水で処理する必要がある。これを -30°C で 30 分間予備凍結させると -183°C までの急速冷却にも耐えられるようになる。しかし -20°C では 3 時間に及ぶ予備凍結も細胞の超低温への急冷却生存のためには無効である。第 1 及び第 2 表からみて、少なくともグリセリン処理をした細胞が -20°C で数時間のうちに凍死することは全く考えられないから、上記の予備凍結温度の相異に従う実験の結果は、 -30°C の場合におこつて -20°C の場合にはおこらぬ何等かの過程が、その後の細胞冷却の際生存に有利になるように働いたと解釈できる。今回の実験条件で鰓片を予備凍結すれば、既に述べたように細胞外凍結がおこっているはずである。従つて上記 2 種類の予備凍結で考えられる最も明らかな条件のちがいは、凍結温度の差による細胞外の水の生成量の差、つまり細胞よりの脱水量の差であろう。 -20°C での凍結は、恐らく平衡状態に達しても細胞の内部にまだかなりの量の凍り易い状態の水を残存しているのであろう。このような細胞が更に低温まで急速に冷されると今まで凍つていなかった細胞内にも凍結がおこり細胞は瞬間的に殺される可能性がある⁹⁾。このような冷却条件での凍死を従来の塩害説で解釈することは、第 4・5 表の結果からみてとうてい不可能である。一方 -30°C で予備凍結された細胞はわずか 30 分間のうちに凍り易い状態の水をほとんど失ひ、これ以後いかに急速に冷却されてももはや細胞内には氷晶を生じないと思われる。Meryman (1956) は甚だ急速に超低温まで冷却された細胞では、たとえその内部に氷ができてその結晶が充分微小なために原形質は害を受けないですむと考へているが¹⁰⁾、もしそのような場合ならば其後の加温の速度がのろければ微小な氷も有害な大形の結晶に生長できるはずである。しかるに第 4 表によれば、充分に氷晶の大形化をゆるすと思われる加温条件（たとえば同表の D.E.）においても細胞は明らかに生存している。又氷の生長を抑制するグリセリンのような物質を全く加えない場合でも、 -30°C で細胞を予備凍結させることは其後の超低温への冷却生存に対して明らかに効果がある。従つて -30°C での予備凍結は以後の急冷却に際して細胞内凍結を防ぐ効力があり、同時に -20°C 又はそれより高温から超低温へ急冷却される際細胞のうける凍害の主因の一つは細胞内凍結であるという考え方は充分根拠のあるものであろう。

Smith (1952) が兎の卵巣の細胞で成功した -79°C での凍結生存は¹⁷⁾、40 分もかけてゆつくりこの温度まで冷却したため、細胞外凍結による脱水が充分進行する余裕があつたからであろう。このとき同じ温度に細胞を急冷却すると、たとえ媒液（血漿）にグリセリンを加えても生存するものがきわめて稀であつた事実もこの考え方を支持するものと思われる。尚彼女の実験において同じ材料を 79°C まで冷却するのに 24 時間かけた場合に生存率がおちているのは、

恐らく -40°C 以下にあるところのこの場合の凍害*の極域を通過するのに時間を要したためであろう。

次にカキの鰓の繊毛細胞が細胞外凍結の状態を受ける凍害について考えてみよう。0.2 cc 又はそれ以上もある水滴が冷却される場合にはそれ程過冷却しないうちに液中で自発凍結がおこるのが常であるから⁴⁾、その中にある組織片の細胞の凍結速度はかなりのろくなるにちがいない。それ故このようにして凍つた細胞の死はかなり低温でおこつたときでも一応細胞外凍結のみによつておこされたとみてよいであろう⁴⁾。 -30°C の気温にさらして凍らせた海水滴中の鰓片が、30分以内に融解すれば生存細胞を相当多く含んでいる事実も上記の想定を支持するものである。

さてカキの鰓片を、海水に NaCl を加えてその氷点をほぼ -10°C にした濃塩液中で**、 -10°C に保存すると、短時間内にひどく崩壊してしまうから凍結の際にも濃縮塩溶液が有害に

第6表 凍結海水中の主要陽イオン (%)
Thompson and Nelson (1956) による

凍結温度 ($^{\circ}\text{C}$)	Na ⁺	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	K ⁺
-10	42	6	2	2
-20	63	10	3	3
-30	30	33	8	9
-40	11	47	45	17

働くことは予想される。しかし一方海水が凍るときに溶存塩類の濃縮の過程は食塩単溶液の場合のように簡単なものではない。凍結しつつある海水が、いろいろの温度で平衡状態に達したときのブライン中の塩の主要陽イオン濃度を Thompson 及び Nelson (1956) の資料¹⁹⁾から概算してみると第6表のようになる。

海水が凍ると $-8.2\sim-13^{\circ}\text{C}$ で NaSO_4 はほとんど沈澱し、NaCl は -22.9°C から析出をはじめ -40°C でその大部分が除かれる。 -23°C 以下では Ca^{++} 、 Mg^{++} 、 K^{+} がましてくるが、 -40°C より高温では MgCl_2 が優占する。 -40°C 以下になると CaCl_2 が最高の成分を占め、 -50°C ではほとんどこれのみのブラインとなり、 -54°C で海水はほぼ完全に固化してしまう¹⁹⁾。

このような海水の凍結過程において、その中にある細胞がうける塩害の主要なものをもし NaCl による害だとすれば、害が最もひどくなる温度は -20°C 附近 (NaCl は160%を超える) にあつてもよさそうであるが、実際には細胞は -20°C だと -30°C におくよりも数倍長い時間生存できる。 -30°C における海水中の NaCl の量は約76%で -10°C の場合より少ないが、しかもこの中の細胞の生存時間は後者の場合の500分の1程度である。 -30°C の凍結海水中では他の溶存塩類もきわめて高濃度となるが、これらは主として MgCl_2 でこの他に KCl 、 CaCl_2 等よりなり、塩溶液の細胞に対する作用そのものは、これらが共存した方が必ずしも単塩の場合よりも害がひどくなるとは考えにくい。従つてこの場合の凍害の主因はたとえ塩害であるにしても、血液の凍結の場合に考えられるような機構⁹⁾とはいささか異なるものが想像される。そして塩害のほかにも、細胞が凍結するときを受ける著しい作用の一つとして媒液全体としての

* 細胞外凍結の状態を受ける害と思われる。

** 氷点 -1.9°C の海水に約2.2 M の NaCl を加える。

滲透圧の増加も考える必要がある。媒液の滲透濃度の増加にもとづく原形質からの脱水が凍害の主因であろうとする考えは植物学者の間ではすでに古くから唱えられており⁸⁾、たとえ周囲に塩溶液がほとんどない場合でも、細胞外凍結が進行すれば細胞は甚しく脱水されるものである⁴⁾。血球の凍害が塩害であることを唱えた Lovelock 自身も最近では動物細胞の凍害を説明するために、細胞の成分中特に凍結に際しておこる物理化学的変化に敏感なリポ蛋白質が、塩溶液のみならず脱水其他の作用によつて害されやすいことをとり上げている¹²⁾。

最後にイガイの鰓糸で成功した急速冷却による超低温での生存法について簡単にふれておこう。この方法は従来も冷却速度を極度に高められる条件以外では全く成功していない¹³⁾。カキの小鰓片での実験が失敗したことはやはり同じ理由によると考えてよいであろう。常態ではカキの場合よりもはるかに耐凍性の低いイガイの鰓の繊毛細胞が、この方法では -183°C に及ぶ超低温に耐えることや、Luyet 等の発表した多くの実験例と同様に高濃度のグリセリン溶液で処理するとはじめて冷却後の生存が可能であること等を考えると、ガラス化という問題にふれるには資料不十分であるが、恐らくこのような条件下では前述の様なこれより小さい速度の冷却の場合の凍結過程とは異なつた細胞の凍りかたを想像した方が説明しやすいであろう。

V. 摘 要

カキのえらの小片を使つてその繊毛細胞の 0°C 以下液体酸素温度(-183°C)に及ぶ耐凍性をしらべ、この結果からその凍りかたを考察した。

海水中で凍つた場合には、細胞外凍結の状態では -10°C では10日余、 -20°C 及び -30°C ではそれぞれその100分の1及び500分の1位の時間しか生存できない(第1表)。しかし海水に5%以上のグリセリンを加えた媒液で30分以上処理すると、細胞の耐凍性は著しく高まり、 -30°C での生存時間は無処理の細胞の場合の約200倍に延長する(第2表)。グリセリン処理をした細胞を -30°C で30分以上予備凍結すると液体酸素に直接投入してもほとんど大部分が生存できる。しかし予備凍結の温度が -20°C だと同じやり方で細胞は例外なく全滅してしまう(第3表)。これは後者の場合には細胞内凍結がおこつたのだとすると説明がつく。又 -30°C で30分間凍らせておけば繊毛細胞内にある水分のうち凍り易い状態にあるものは、細胞外で生長しつつある氷によつてほとんど脱水されてしまうと考えられる。この考え方を適用して、グリセリン処理をしない細胞でも液体酸素中での冷却後生存させることに成功した。

凍結温度又は加温条件をかえて、細胞外凍結をしているグリセリン処理細胞に凍害が最も速やかにおこる温度をしらべると、その極域は -40°C ~ -50°C 附近にあるらしい(第4・5表)。このような場合の凍害の主因を、従来哺乳動物の細胞で唱えられていたと同じ様式の塩害として割切るには矛盾が多く、少なくとも凍結による細胞からの脱水は一つの主要な凍害の条件と思われる。

又 Luyet 等のいわゆるガラス化法のやり方で急速冷却した場合は、カキでは失敗し、イガイの鰓糸で始めて或程度の生存細胞を得ることに成功した。このような条件下での細胞の生存

には、 -50°C 以上の気候的低温でおこる生物細胞の凍結過程とはいささか異なる様式のことを想定する必要があると思われる。

文 献

- 1) 青木 廉・朝比奈英三 1953 非常に低い温度における生物細胞の耐凍性の一機構. 科学, **23**, 147.
- 2) 朝比奈英三 1953 生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞(ウニ)の凍結過程. 低温科学, **10**, 81.
- 3) ————— 1957 過冷却状態の生物の運動. 低温科学, 生物篇, **15**, 45.
- 4) ————— 1958 a 生物細胞の凍結現象. 生物物理化学シンポジウム, **3**, 3.
- 5) ————— 1958 b 生細胞の凍結. 細胞化学シンポジウム, **8**, 1.
- 6) 朝比奈英三・青木 廉 1958 耐凍性昆虫を超低温で凍結生存させる一つの方法. 低温科学, 生物篇, **16**, 55.
- 7) Billingham, R. E. 1954 The preservation of tissues, in Biological Applications of Freezing and Drying. Edited by R. J. C. Harris. Academic Press. N. Y. 253.
- 8) Levitt, J. 1951 Frost, drought, and heat resistance. Ann. Rev. Pl. Physiol., **2**, 245.
- 9) Lovelock, J. E. 1953 a The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochim. et Biophys. Acta, **10**, 414.
- 10) ————— 1953 b The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochim. et Biophys. Acta, **11**, 28.
- 11) ————— 1954 Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. Proc. Roy. Soc. Med., **47**, 60.
- 12) ————— 1957 The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. Proc. Roy. Soc., B, **147**, 427.
- 13) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio. 1940 Life and Death at Low Temperatures. Biodynamica, Normandy, Miss.
- 14) Meryman, H. T. 1956 Mechanics of freezing in living cells and tissues. Science, **124**, 515.
- 15) Parkes, A. S. 1945 Preservation of human spermatozoa at low temperatures. Brit. Med. J. ii, 212 (Smith 1954 の引用による).
- 16) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存 I. 低温科学, 生物篇, **14**, 17.
- 17) Smith, A. U. 1952 Cultivation of ovarian granulosa cells after cooling to very low temperatures. Exp. Cell. Res., **3**, 574.
- 18) ————— 1954 Effect of low temperatures on living cells and tissues, in Biological Applications of Freezing and Drying. Edited by R. J. C. Harris. Academic Press, N. Y. 1.
- 19) Thompson, T. G. and K. H. Nelson 1956 Concentration of brines and deposition of salts from sea water under frigid conditions. Amer. J. Sci., **254**, 227.

Résumé

As a rule, the excised tissue of some marine bivalves is frost resistant. The gill pieces of oyster can withstand extracellular freezing for more than 10 days at -10°C , but only for 30 minutes at -30°C . However, if they have previously been treated for only 30 minutes with sea water containing 5% glycerol (by volume), they can survive freezing at -30°C for 4 days. Besides, on the small gill pieces treated in this way and prefrozen for 30 minutes at -30°C , the ciliary beating always regains its full activity even after a direct immersion in liquid oxygen. However, in the gill pieces treated in

quite the same way but prefrozen at -20°C , the beating never recovers after the rapid cooling. Even without any glycerol treatment, the gill pieces prefrozen at -30°C for 30 minutes, as a rule, regain some of the beating activity of their ciliary cells. In the cells of gill piece frozen extracellularly, the most injurious temperature range in which a fatal injury occurs within some ten minutes, seems to lie between -40°C and -50°C .

It is therefore reasonable to suppose that the cells prefrozen at -20°C and immersed in liquid oxygen, probably have been killed by intracellular freezing which is caused by rapid cooling. However, in the cells prefrozen at -30°C , any water may hardly crystallize even when cooled rapidly down to a super-low temperature. Since the extracellular freezing is considered to be a mode of dehydration from living cell, -30°C might certainly be regarded as a temperature at which the easily freezable water is almost entirely dehydrated from the cell interior by the formation of ice outside.

Judging from the freezing conditions in sea water, it seems unlikely that the process of injury caused by extracellular freezing on marine invertebrates is quite the same as that described by the workers on mammalian erythrocyte.

Luyet's method by extremely rapid cooling and thawing to enable survival from freezing at super-low temperature was also applied on molluscan gill pieces. This was successful only in the fine gill filament of *Mytilus*. In this case the process of cell freezing may assumably be different from that in the case noted before.