HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マリモの凍害に対する凍害防止剤の効果について
Author(s)	照本, 勲
Citation	低温科學. 生物篇, 18, 43-50
Issue Date	1960-11-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17637
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p43-50.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Isao TERUMOTO 1960 Effect of Protective Agents against Freezing Injury in Lake Ball. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 18.*** (With English résumé p. 49)

マリモの凍害に対する凍害防止剤の効果について*

照　本　　勲
(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和 35 年 7 月受理)

I. 緒　　言

植物細胞が凍死をおこす直接的な原因の一つは，低温それ自身の影響ではなく，細胞内に氷ができることである[1),2)]。これを防ぐためには

1) 媒液中の氷の生長速度が小さいこと
2) 原形質表層部が氷の侵入を阻止すること[2),3)]
3) 原形質膜の水に対する透過性が大きいこと[4)]
4) 細胞の滲透濃度が高いこと[5)]

などが役だつが，これらがまもられても更に細胞外凍結による害がおこる。この細胞外凍結の害を防ぐには，原形質構造に水を保持する力が強いことなどの条件が考えられる。

又，近年，生物一般の細胞が，凍結融解中に受ける傷害を防ぐために，糖類，グリセリン，エチレングリコール等の薬品が凍害防止剤として用いられるようになつてきた。しかしこれらの凍結防止剤が凍害を防ぐ効果について，まだ十分な解釈が少なくとも植物細胞については与えられていないのが現状である。

この論文は，植物細胞を 0°C から −38°C 付近までの低温で凍結させ，その結果おこる凍害を，原形質分離法と細胞が凍結した状態での固定像からしらべ，この時使用した蔗糖やグリセリン，エチレングリコールなど 6 種の多価アルコールの凍害防止剤としての効果を考察したものである。

II. 方　　法

材料としてマリモ *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz. の糸状体を用いた。マリモは，直径 40～80 μ，長さ直径の拾数倍という大きな節間細胞をもつ植物で，凍結に対しては強く，−20°C で 24 時間の凍結にもよく耐えることができる[6)]。マリモは，使用するまで，適宜新らしい水道水で培養し，室温 (約 20°C) に保存した。マリモの細胞の滲透価は，0.84～0.86 M (NaCl 等張) である。

凍結実験は，数拾本の糸状体を予め 1 M 平衡塩溶液に入れて，原形質分離させ，10 分後濾紙でよく媒液をふきとつてから，所要の各防止剤に入れて，原形質復帰させた細胞を用いた。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 564 号，松浦一・山田幸男両教授還暦記念論文

原形質分離剤としての平衡塩溶液は，凍害防止剤の効果のうえにほとんど影響がなかつた。この実験では，各防止剤に入れてから，細胞を凍結するまでの時間は 30 分以内とした。エチレングリコール溶液の場合には，この前処理をはぶいた。全材料とも，スライドグラス上に防止剤を媒液として凍結させ，過冷却を防ぐため予め植氷し，所要時間後室温で融解して，その細胞の生死を原形質分離法でたしかめた。分離剤として 1 M 平衡塩溶液を用いた。凍結温度は，0°C から −38°C 付近までを使つた。

凍結中の細胞の固定は，前報[7] にしたがつたが，固定温度は各凍結温度と同じ温度を用いた。

III. 結 果

1. 蔗 糖

媒液を蔗糖溶液として凍結させた場合，無処理のものにくらべて，非常に抵抗性が低下した。蔗糖液中での原形質分離の限界濃度は 1.20～1.22 M である。第 1 表は 1 M 蔗糖溶液を用いた場合で，−5°C で約 50% の細胞が凍死し，それより低温では全部の細胞が凍死してしまつた。

第 1 表 1 M 蔗糖溶液を媒液とした場合の耐凍性
(各 2 時間凍結)

処 理 温 度	−5°C	−10°C	−20°C	−33°C
融氷後の生死	50%生	死	死	死

媒液中の蔗糖濃度と，寒冷に対する抵抗性との関係は，第 2 表に示した。蔗糖が多い程抵抗性が失われることが分る。この場合，低温固定像では，原形質の破壊が認められた (図版 I-1, 2, 3)。

第 2 表 媒液である蔗糖溶液の濃度と耐凍性
(−10°C, 2 時間凍結)

蔗 糖 濃 度	脱イオン水	0.2 M	0.5 M	1 M
融氷後の生死	100%生	100%生	80～90%生	死

2. グリセリン

グリセリンは，蔗糖と同じくマリモの細胞内へ透過しない。グリセリンでの原形質分離の限界濃度は 1.44～1.46 M である。1 M グリセリンを媒液として，種々の温度で凍結させた結果を第 3 表にあらわした。

−15°C 位までの低温に対しては，ほとんど凍害をおこさないが，それより低温では，耐凍性が低下した。このマリモは，水道水中で −20°C, 24 時間の凍結でほとんど害されない[6]。

第3表　1M グリセリンを媒液とした場合の耐凍性
(各2時間凍結)

処理温度	−10°C	−15°C	−20°C	−25°C
融氷後の生死	100%	80～90%生	20～30%生	死

第4表　媒液としてのグリセリンの濃度と耐凍性
(−20°C, 2時間凍結)

グリセリン濃度	脱イオン水	0.2 M	0.5 M	1.0 M
融氷後の生死	80～90%生	50～60%生	40～50%生	20～30%生

次に，グリセリンの濃度によつて，如何に抵抗性が変るかをしらべた。

第4表からわかることは，グリセリンが媒液中に増加すればするほど，その耐凍性が低下してくることである。

この場合の低温固定像は，ほとんど凍害のおこらない −11°C の凍結で，原形質分離像をあらわしており，原形質の脱水による収縮が見られた。然し，凍死をおこした −19°C, −38°C の低温での固定像の原形質の大きさは，−11°C の凍結の場合よりかなり脱水されている。脱水の程度が，原形質の凝固をおこしたものと考えられる (図版 II-4, 5, 6)。

3. エチレングリコール

エチレングリコールは，蔗糖やグリセリンと異なり，マリモ細胞内へすみやかに透過する。たとえば，高張エチレングリコールの中に，マリモ細胞を入れると，一度高張溶液のため原形質分離をおこすが，数分後エチレングリコールは細胞内へ透過し，原形質復帰しもとの状態にもどる。植物細胞に対して，一般にエチレングリコールは耐凍性効果をもつが，この溶液で処理した場合の，寒冷に対する抵抗性を第5表にあらわした。

第5表　媒液としてのエチレングリコールの濃度と耐凍性
(−35°C, 2時間凍結)

エチレングリコール濃度	脱イオン水	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M
融氷後の生死	0～10%生	80%生	90%生	90～100%生	50%生	50～40%生

エチレングリコールの最も耐凍性を高めるのに効果のある濃度は，2M～3M 程度で，24時間凍結も同じ傾向であつた (図版 III-7, 8, 9)。

次に種々の多価アルコールで処理した場合の耐凍性の程度を比較した。その結果は，第6表にあらわした。

多価アルコールは，種類によつて影響も変り，分子量の小さなエチレングリコール，プロ

第6表 種々の多価アルコールの影響

溶質	分子量	使用濃度	溶質に対する透過性	−33°C 2時間凍結後の生死
エチレングリコール	62	1 M	+	100%生
プロピレングリコール	76	1 M	+	80～90%生
ジエチレングリコール	106	1 M	+	50～60%生
トリエチレングリコール	150	1 M	−	40～50%生
ポリエチレングリコール	400	0.5 M	−	20～30%生
対照 (脱イオン水)				0～10%生

ビレングリコールが最も大きな効果を示した。どちらも，低分子で，原形質膜を容易に透過する性質をもつが，トリエチレングリコールは透過せず，凍害防止力は前者に比較して小さかつた。ポリエチレングリコールは，原形質分離のまま凍結したものは全部凍死したが，媒液濃度0.4～0.5 M のものの耐凍性は，第6表にあらわされたように20～30% の生存を示した。

次に，5 M エチレングリコールに入れたマリモの小さな束(直径約2 cm)を −35°C，24時間凍結融解後，室温で水道水中に培養したが，約1カ月後，約50% が正常に生存し，凍結直後にくらべて生存率はすこしも減少しなかつた。従つて凍害に対する防止剤としてエチレングリコールを用いても融氷後に悪い影響はのこらぬものと思われた。

IV. 考 察

生物細胞の凍結融解中にうける傷害は，前処理としてある種の薬品を媒液に添加してやると，非常に良く防げることが最近わかつてきた。とくに糖類，グリセリン，エチレングリコールが，これらの目的に用いられてきた[8]。

例えば，哺乳動物組織[9]では，エチレングリコールやグリセリンが良い凍害防止剤としてしられている。この場合，エチレングリコールでは30% (約4.8 M)，グリセリンでは30～80% (約3.2 M～8.7 M) が最も効果があり，糖は如何なる濃度でも効果がなかつたという。又，卵巣組織にグリセリンを加えてやると，−79°C まで温度が下げられても移植に好成績を示すことができ[10]，血球の場合にもグリセリンは，同じように保護作用をもつた[8]。又，精子は，グリセリンや他の多価アルコールが媒液に含まれない時は，凍結融解によつて運動力が失われるが，これらの薬品が加えられると，凍害を防ぐことができるようになる[11]。現在までやられてきた凍害防止剤についての研究のほとんどは，動物組織において行なわれてきた。

植物組織を使つての実験は，タマネギの鱗茎表皮細胞[12]や，キヤベツ，ユキノシタの一種[13]や，クワ[14]やクチナシの枝条[15]を使つて行なわれたが，これらのものではグリセリンやエチレングリコール溶液が耐凍性を増すことが報告されてきた。動物組織と植物組織とは，構造上の相違のために，凍害防止剤の作用機作も同一なものとは限らない。この実験では，凍害防止剤として蔗糖や，グリセリン，エチレングリコールなど6種の多価アルコールを使用した。

第1表の結果より蔗糖を媒液に添加した場合は，蔗糖を加えない対照が −20℃, 24時間の凍結で，ほとんど凍死をおこさない[6]のに，非常に耐凍性が失われ，−5℃, 2時間の凍結で50%の凍死をおこした。媒液中の蔗糖濃度が増加すると，その抵抗性も更に小さくなる。すなわち，この実験で，蔗糖は凍害に対して防止作用を現わさなかつた。前報[12]のタマネギ鱗茎表皮細胞が，蔗糖溶液で耐凍性をあらわしたのは，原形質分離した状態で凍結が進行したためで，この実験と同じ状態の凍結ではない。マリモの場合には，蔗糖の防止剤としての効果は，少なくとも低張濃度の場合は，かえつて糖が多い場合の方が抵抗性が低められるといえる。耐凍性をもつタマネギ[12]やアカビート[16]の細胞における蔗糖の低張濃度の作用とは一緒に論ぜられない。

次にグリセリンでは，−10℃, 2時間の凍結では100%の生存率を示すが，−20℃では20～30%の生存しかなく，マリモ細胞に対しては，良い凍害防止剤とは考えられない。タマネギの表皮細胞で耐凍性をあらわしたのは[12]，蔗糖と同じくグリセリンも原形質膜を透過しないため，高張溶液で原形質分離を起させたためで，マリモでは，等張以下のグリセリンが媒液中にあつても，抵抗性は増さず，やや低下させるといえる。

著者は先きに，タマネギ鱗茎表皮細胞を用いて，高張溶液中にひたしてエチレングリコールを細胞内に透過させてやると，耐凍性が高まり，細胞内凍結を防ぐことを報告した[12]。エチレングリコールは，グリセリンと同じ多価アルコールであるが，最も耐凍性を高める作用が大きく，3Mで処理すると，−35℃, 2時間の凍結には優に耐えることが分つた。然し，あまり低濃度では効果が少ない。又，同じ多価アルコールであるプロピレングリコール，ジエチレングリコール，トリエチレングリコール，ポリエチレングリコールを用いて耐凍性を比較すると，最も分子量の小さなエチレングリコールが最も効果があり，プロピレングリコールが次に効果がある。共に細胞内へ容易に透過することができる。

現在まで，グリセリンなどの凍害防止剤の効果の機構については，十分に理解されてきたとはいえない。凍害防止剤については，早くからLuyetなどによつて研究されてきた[17),18),19),20)]。とくにLuyetとGehenio[21]は，組織に存在する水分がグリセリンと結合して，凍結によつてできる氷の量をへらす効果があるという。すなわち，この凍結防止作用は細胞からの脱水と関係しているという。Lovelock[22]によると，保存血液の凍害防止剤としてのグリセリンの作用は，凍結の際の電解質濃度の増加によつて起される生物細胞への傷害に対して，グリセリンが電解質濃度の増大を細胞の内外においておさえて，傷害を減少させることができるからであり，従つて，グリセリンが媒液中に存在すると，細胞内に滲透すると否とにかかわらず，細胞の耐凍性を高めることができるからだという。又，Smith[23]達は，凍結融解過程の顕微鏡的観察から，グリセリン溶液中に形成された結晶は，食塩水の中にできるような大きな槍型や長釘型の結晶にくらべると比較にならぬ程の小さな粒状の結晶であることを観察している。つまり，媒液中の防止剤は，生物細胞の周囲の液に氷晶ができても，その生長を強くおさえ，細胞内への進入を困難にすることができると考えている。

以上のべた効果についての意義は，二，三の生物細胞にあてはまつても，すべての生物細胞の凍害防止を十分に説明するとは思われない。この実験の凍結時の細胞の形態から考察した凍害防止剤の効果は，次のように考えられる。蔗糖は，原形質分離をおこすような高張溶液を媒液にした場合にのみ耐凍性があり，低張溶液の場合は，濃度が増すほど原形質表層部の氷を阻止する能力を失はせるものと思われる。無処理の対照の細胞では，凍結の際，細胞膜と原形質とがついたまま脱水収縮するが[6]，低張グリセリン溶液では，凍結に際し低温のもとで，滲透的脱水がおこり，原形質分離をするらしい。この脱水の程度が大きくなると，融氷の際ももとの状態に戻らなくなるところの不可逆的な凝固をおこす結果となる。たとえばマリモ細胞は2Mのグリセリンにつけられると，最初原形質分離していた全部の細胞も，3～4時間で，ほとんどの細胞が死んでしまうことが認められた。マリモは，タマネギの細胞の高張溶液の処理の場合とはグリセリンから受ける影響は異なるといえる。エチレングリコールは，蔗糖，グリセリンなどと異なり，容易に細胞内に透過する。−15°C付近の凍結条件では，細胞内に氷晶もできず，細胞からの脱水も明瞭でないが，更に温度が低下すると始めて明瞭に脱水，縮少が始まる。すなわち，エチレングリコールの凍害防止剤としての効果は，Luyet や Keane[19),20)] などが述べているように，最初細胞内へ溶質が透過して，原形質構造に入りこんで水を保持する能力をもつようになり，その結果凍結による脱水に耐えることができるようになると考えられる。

摘 要

マリモ細胞を使用して，蔗糖とグリセリン，エチレングリコールなど多価アルコール6種について凍害防止剤としての効果をしらべた。蔗糖の低張溶液は，防止作用認められず，かえつて濃度が増すほど凍結に対する抵抗性を失つた。グリセリンの低張溶液も，対照にくらべてほとんど防止作用なく，凍結に際し脱水がおこり，細胞は原形質分離を示した。更に温度が低下すると，脱水の程度は大きくなり，終に不可逆的な凝固を原形質がおこすようになる。エチレングリコール，プロピレングリコールなどは容易に細胞内へ透過し，原形質が水を保持する能力をもつようになり，かなりの低温での凍結によつて始めて相当量の水が細胞膜外にとられるが，−35°Cで2時間の凍結にも抵抗できるようになる。

終りに，本報文を御校閲下さつた朝比奈教授，並びに実験材料について御配慮下さつた理学部山田教授に深く感謝する。

文 献

1) Modlibowska, I. & Rogers, W. S. 1955 Freezing of plant tissues under the microscope. J. Exp. Bot., ***6***, 384.
2) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. Cont. Inst. Low Temp. Sci., ***10***, 83.
3) 照本 勳 1959 植物細胞の耐凍性に影響する媒液中の無機塩類の効果について. 低温科学, 生物篇, ***17***, 9.

4) Levitt, J. & Scarth, G. W. 1936 Frost-hardening studies with living cells. II. Permeability in relation to frost resistance and the seasonal cycle. Can. Jour. Res., C, ***14***, 285.
5) 照本 勤 1958 植物の耐凍性と滲透濃度. 低温科学, 生物篇, ***16***, 7.
6) 照本 勤 1959 マリモの凍害と乾燥害. 低温科学, 生物篇, ***17***, 1.
7) 照本 勤 1958 植物細胞の低温固定像について. 低温科学, 生物篇, ***16***, 1.
8) Smith, A. U. 1954 Effect of low temperatures on living cells and tissues, in Biological Applications of Freezing and Drying. Edited by R. I. C. Harris. NY. 1-62.
9) Tayler, A. C. & Gerstner, R. 1955 Tissue survival after exposure to low temperature and the effectiveness of protective pretreatments. I. Evaluation by growth in tissue culture. J. Cellular Comp. Physiol., ***46***, 477.
10) Parker, A. S. 1955 Radiation sensitivity of ovarian tissue at −79°C. Nature, ***176***, 1216.
11) Bunge, R. G. & Sherman, J. K. 1953 Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature, ***172***, 767.
12) 照本 勤 1957 タマネギの耐凍性について. 低温科学, 生物篇, ***15***, 39.
13) Levitt, J. 1957 The role of cell sap concentration in frost hardiness. Plant Physiol., ***32***, 237.
14) 酒井 昭 1958 木本類の耐凍性増大の過程 II. 耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係 (2). 低温科学, 生物篇, ***16***, 23.
15) Sakai, A. 1960 Relation of sugar content to frost-hardiness in plants. Nature, ***185***, 698.
16) 朝比奈英三 1950 耐凍性細胞の吸水による凍結過程の変化 (大会講演要旨). 植雑., ***63***, 245.
17) Luyet, B. J. & Gehenio, P. M. 1952 Effect of glycerol in limiting ice formation in tissue subjected to low temperatures. Biodyn., ***7***, 107.
18) Luyet, B. J. & Keane, J. F. 1952 Comparative efficiency of ethyleneglycol, glucose and sodium chloride in protecting tissue against freezing injury. Biodyn., ***7***, 119.
19) Luyet, B. J. & Keane, J. F. 1953 On the role of osmotic dehydration in the protective action of glycerol against freezing injury. Biodyn., ***7***, 141.
20) Keane, J. F. Jr. 1953 Comparative efficiency of some compounds containing the amido group in protecting tissues against freezing injury. Biodyn., ***7***, 157.
21) Luyet, B. J. & Gehenio, P. M. 1952 On the mode of action of glycerol in preventing injury by freezing in embryonic tissues of chick. Science, ***11***, 526.
22) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Bioch. et Biophys. Acta., ***11***, 28.
23) Smith, A. U., Polge, C. & Smiles, J. 1951 Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. J. Roy. Micr. Soc., ***71***, 186.

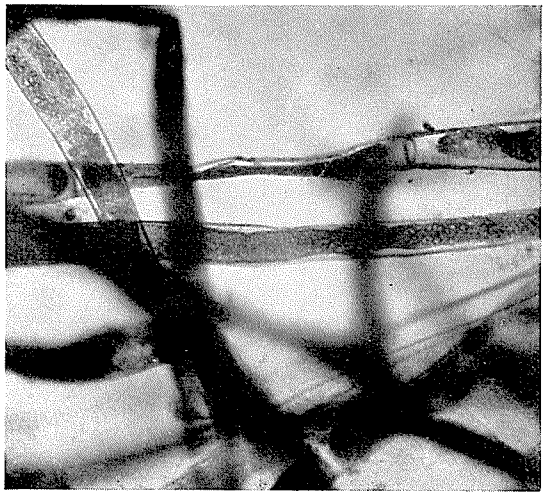
Résumé

The protective action of certain protective agents against frost injury in lake balls, *Aegagropilla Sauteri* (Ness) Kütz., were examined. The solutes tested were sucrose, glycerol, ethylene glycol, propylene glycol, diethylene glycol, triethylene glycol and polyethylene glycol.

Among the solutes examined sucrose was the least effective protective agent. When hypotonic solution was used, the higher the concentration of sucrose the greater the injury which occured in the cells. Even if the cells were frozen at −5°C for 2 hours, the percentage of survival was one half of the total number. Glycerol in hypotonic

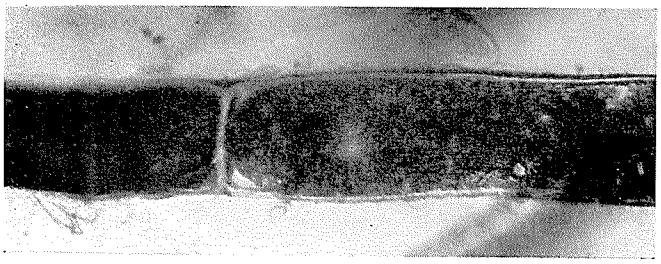
solution showed less effect in protecting cells against damage during freezing; the survival was less than that in the control. Ethylene glycol and propylene glycol are able to permeate the cells, and such cells could tolerate freezing at −35°C for 2 hours. For example in the cells treated with 2 M ethylene glycol no intracellular ice crystals were found at −15°C at least within 2 hours (Plate III–7). In this case the pattern fixed with a cold fixative suggested that the size of the cells was almost normal. It may, therefore, be reasonable to assume that ethylene glycol permeated into the cells indicates water-binding power. Diethylene glycol, triethylene glycol and polyethylene glycol were relatively poor protective agents as compared with ethylene glycol and propylene glycol.

In the cells of this green algae, it is concluded that protection occurs only when solute is able to permeate the individual cells. The most effective substance is ethylene glycol. Such solutes as sucrose or glycerol which can not permeate into the cells, have no protective effect.



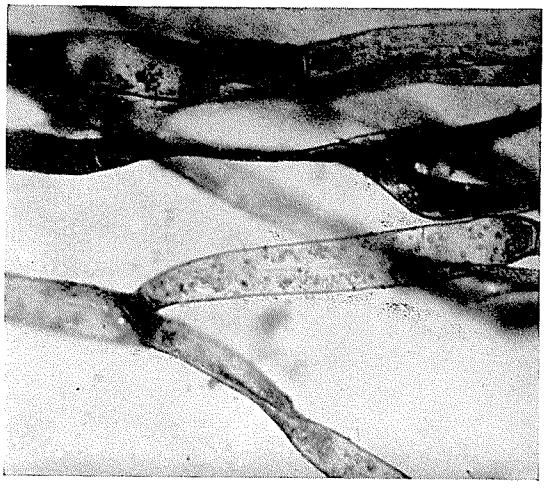
第1図　1M 蔗糖溶液で処理し，−5°C で 2 時間凍結。50% 生。(低温固定)

× 100



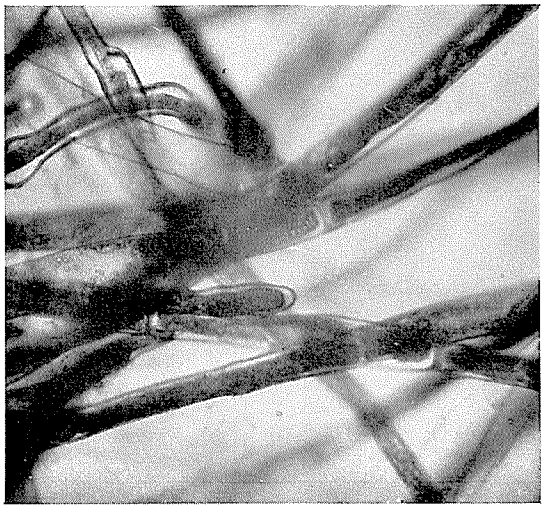
第2図　同上の細胞の生きているもの。(低温固定)

× 360

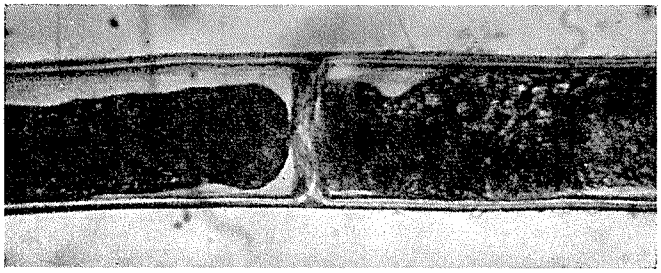


第3図　1M 蔗糖溶液で処理し，−11°C で 2 時間凍結。細胞は全部凍死。(低温固定)

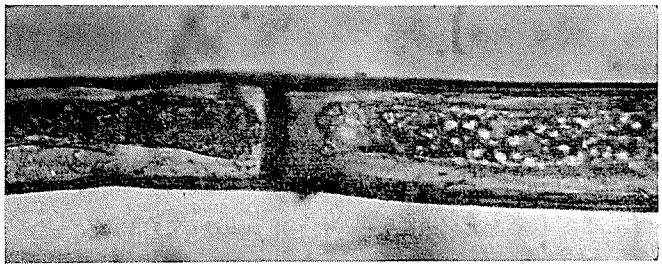
× 100



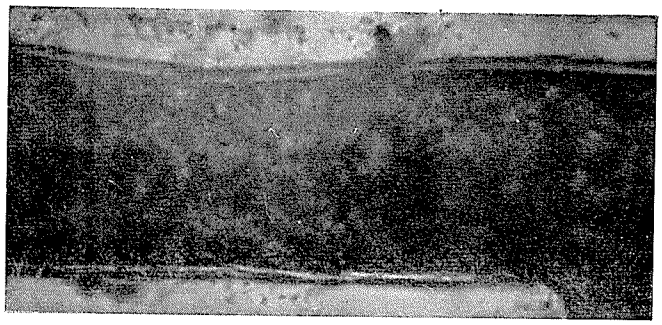
第4図　1Mグリセリン溶液で処理，−11°Cで2時間凍結。細胞はほとんど生きている。(低温固定)
× 100



第5図　同上の細胞の生きているもの。(低温固定)
× 360

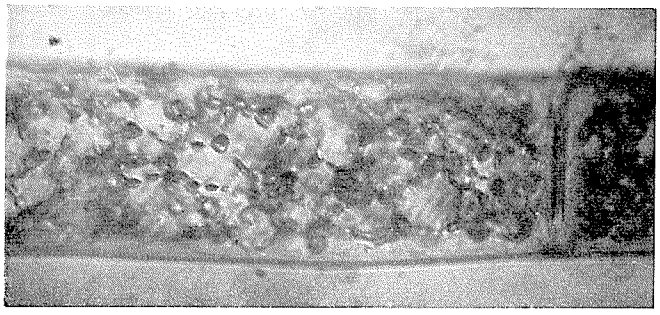


第6図　1Mグリセリン溶液で処理，−38°Cで2時間凍結細胞は凍死している。
(低温固定)　× 360



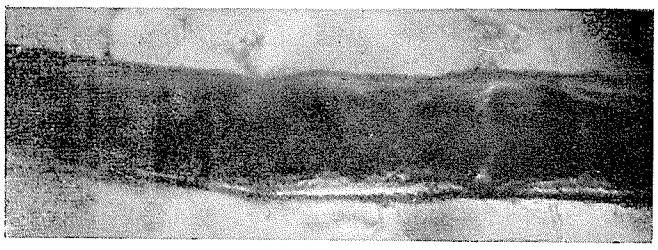
第7図　2Mエチレングリコール溶液で処理，−15°Cで2時間凍結。細胞内に氷もできず，脱水もほとんどおきてない。(低温固定)

× 360



第8図　正常なマリモの細胞。網状の葉緑体が見える。

× 360



第9図　2Mエチレングリコール溶液で処理，−32°Cで2時間凍結。脱水されたこの状態で凍結に耐える。(低温固定)

× 360

第10図　5Mエチレングリコール溶液で処理，−35°Cで24時間凍結後，室温水道水中に33日間培養。
1M平衡塩溶液(NaCl等調)で原形質分離させた状態。約50%生存していることが分る。

× 100