HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物細胞の凍害の機構　Ⅰ：凍害に及ぼす媒液の影響（１）
Author(s)	酒井, 昭
Citation	低温科學. 生物篇, 19, 1-16
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17645
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p1-16.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Akira SAKAI 1961 The Mechanism of the Frost Injury in Plant Cells I. Effect of Medium against Frost Injury (1). *Low Temperature Science, Ser. B, 19.* (With English résumé p. 15)

植物細胞の凍害の機構 I.*

——凍害に対する媒液の影響 (1)——

酒井 昭
(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和36年7月受理)

I.

植物の凍害の機構について二つの異なる意見がある。Lidforss (1907)[1]** は凍害の原因を凍結による細胞液の塩濃度の高まりによって起こる原形質の変性に求めている。このばあい細胞内に糖が多量にあると，原形質の変性が抑えられるので凍害が防がれると説明している。このような塩害説は現在も Ullich, Heber[2),3),4)] 等によつて支持されている。動物細胞でも同じ立場から Lovelock[5),6),7)] が塩害説を主張している。これに対して Maximov[1),8),9)] は凍結脱水による細胞内溶液の濃縮が凍害の原因でなく，凍結脱水による細胞表層部の障害がその原因であると主張している。Maximov[1)] はキャベツの細胞を水につけて凍結させるばあいには −5.2°C で死ぬのに，2M のグルコーズ溶液中で凍結させるばあいには，−32°C での凍結に約半数の細胞が耐えることを見出した。このばあいグルコーズは細胞内に入っていないので，この事実は塩害説では説明できない。Iljin[10)], Scarth や Levitt[11)~15)] 等は凍結による細胞内の脱水濃縮そのものが細胞に害を与えるのでなく，凍結による脱水及び融解にさいして細胞表層部が機械的ストレスにさらされることに凍害の原因を求めている。彼等は細胞内の塩濃度の高まりが凍害の一次的原因でないと主張する点では Maximov と同意見である。

Maximov[1),8),9)] の実験において使用されたキャベツの細胞は水を媒液として凍結させる時には−5.2°C で死ぬ。この事から判るように，彼の用いた細胞は耐凍度が比較的小さい。また彼の冷却方法では同じ温度で確実に植氷することができない。これらの事を考えあわせると，彼の実験では凍死が細胞内凍結によるのか，細胞外凍結によるのか区別できないように思われる。凍害の機構を考察するためには，この点をはつきりさせた実験データーに基づくことが必要である。また細胞を媒液に浸して凍結させるばあいには，媒液の凍害防止作用がその物質の細胞内えの滲透の結果あらわれたものか否かを区別できない。この事を区別するために本論文では細胞内に透過する物質は使用しなかつた。

本論文は細胞外凍結による害に及ぼす色々の媒液の凍害に対する保護作用を調べて，凍害

* 北海道大学低温科学研究所業績 第585号

** Maximov の論文 (p. 53 参照)

の機構を明らかにするために行なったものである。

凍結中の細胞の顕微鏡写真を撮影して頂き，また論文を校閲して頂いた朝比奈教授に謝意を表する。

II.

実験材料としてキャベツ (*Brassica oleacea capitata*, DC.) の葉柄の柔細胞を用いた。露地に生育しているキャベツを抽苔させたのち，茎の上部を切落して切口から多くの葉を出させ，12月初旬まで十分寒さにあわせた。同一切口から同じ時期に発芽伸長した葉は大体同一条件にあるものとみなされる。使用した葉の長さは15～20 cm であった。葉柄から切取った縦断切片をスライドグラスとカバーグラスの間に水でマウントして −10°C まで過冷却後，植氷しても全細胞が生存していた事からこれらの細胞は細胞内凍結を起しにくい状態にあることがわかる。

葉柄から切取った約1～2細胞層の薄い縦断切片をスライドグラスとカバーグラスの間に小量の媒液でマウントして小寒暖計とともにシャーレに入れて −5°C の恒温箱で冷却した。冷却30分以内に植氷して凍結させた。凍結開始30分後に −10°C の恒温箱に移した。その後30分毎に5°C 宛低い恒温箱に順次移して所定温度まで冷却した。所定温度に達してから一定時間後に約0°C の部屋に取出して融解した。また一部の実験では組織切片は0.2 cc の媒液を入れた小試験管（径 1.0 cm, 長さ 10 cm）に入れて −5°C または −10°C で植氷して凍結させた。凍結5分後に小試験管は5°C 間隔で −30°C までの各温度に冷却された50 cc のアルコール中に5分毎に順次移して所定温度まで冷却した。所定温度に一定時間おかれた後0°C の部屋に取出して融解させた。同一系列の実験には同一葉から切取った組織切片のみを用いた。また一つの実験には組織切片 10～15 個を用いた。

融解1～2時後，組織切片は中性赤溶液で染色してから平衡塩溶液中で原形質分離させた。細胞の外観に異常がなく細胞が中性赤溶液に染まり，しかも正常に原形質分離している細胞を害を受けていない細胞とみなした。必要なばあいには2倍の高張塩溶液と水で，原形質分離と復帰を2回繰返したのちなお細胞が害されていないかを調べた。耐凍性の高さはある温度で凍結させたときの細胞の生存率か，または殆んど全細胞が生きている凍結条件の最低温度で現わした。

葉の細胞中に無機塩類やグリセロールを入れるばあいには，キャベツの葉柄を0°C または15°C の部屋で低張な溶液中に3～5日間葉挿して葉の細胞中にこれらの物質を入れて細胞の滲透濃度をたかめた。

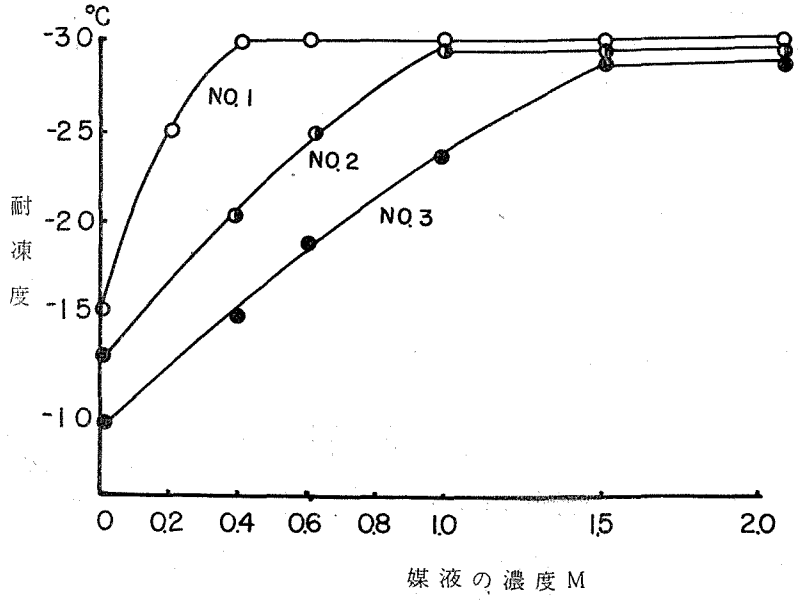
つぎの諸物質を媒液として用いた。糖：ラムノーズ，キシローズ，フルクトーズ，グルコーズ，ガラクトーズ，ソルボーズ，マンノーズ，サッカローズ，ラクトーズ及びラフィノーズ。多価アルコール：グリセロール，マンニトール，ソルビトール，トリエチレングライコール。その他の有機化合物：尿素，グリシン，アセトアマイド，ポリビニールピロリドン。無機塩

類：塩化ナトリュウム，塩化カリュウム，塩化カルシュウム，平衡塩溶液*。これらの物質が細胞内に入るか否をつぎのようにして調べた。いろいろな濃度の溶液中に組織切片を室温で一時間浸した後，細胞の滲透濃度を平衡塩溶液中で測ったが，使用したどの物質についても滲透濃度のたかまりが認められなかった。さらに組織切片を媒液に浸して −10°C で凍結，融解後，平衡塩溶液中で原形質分離させて細胞の滲透濃度を調べたが，このばあいにも細胞の滲透濃度の増加は認められなかった。したがってこれらの物質は殆んど細胞内に入らないものと考えられる。エチレングライコール，メタノールは容易に細胞内に入るのでこの実験には用いなかった。

III.

1. 凍害に対する保護作用と糖濃度の関係

耐凍性の異なる3つの葉の葉柄から切取った組織切片が異なった濃度のグルコーズ溶液に浸されて同一条件下で各温度で凍結された。これらの結果は第1図に示した。これらの細胞の滲透濃度が 0.56～0.66 M であるので，低張なグルコーズ溶液中でも凍害防止作用があることがわかる。同一の葉の細胞についてはグルコーズの濃度の高まるにつれて凍害は少なくなる。第1図から判るように −30°C で凍結に耐えるのに必要なグルコーズ溶液の濃度は，No. 1 の細胞



第 1 図　凍害保護作用とグルコーズ濃度の関係

材　　料：キャベツ葉柄の柔細胞
細胞の滲透濃度：No. 1 は 0.66 M, No. 2 は 0.6 M, No. 3 は 0.56 M である
凍結時間：16 時間

* 等張な NaCl と $CaCl_2$ 溶液を 9:1 の容積比に含む。

では 0.4 M, No. 2 の細胞では 1.0 M, No. 3 の細胞では 1.5 M である。かように耐凍性の高い細胞ではグルコーズによる保護作用が大きい。

2. 糖及び多価アルコールの凍害に対する保護作用

10 種類の糖と 3 種類の多価アルコールを用いて 2 系列の実験を行なった。これら 13 種類の物質の凍害防止作用の相対的大きさを知るために，同一系列の実験には同一の葉柄からとった切片のみを使用した。このばあい一実験には 5 個の組織切片を用いた。第 1 表にその結果を示す。

第 1 表 糖及び多価アルコールの凍害に対する保護作用の比較

	No. 1 (0.66 M)*		No. 2 (0.62 M)*		
媒液の濃度	0.4 M		0.4 M		0.8 M
凍結温度	−25°	−30°	−25°	−30°	−30°
rhamnose	100**	100	100	30	100
xylose	100	100	100	30	100
fructose	100	100	80	20	—
glucose	100	100	80	20	100
galactose	100	100	80	10	—
sorbose	100	100	90	—	100
mannose	100	100	—	—	100
saccharose	100	40	30	5	30
lactose	70	10	0	0	10
raffinose	0	0	0	0	0
glycerol	100	100	100	40	100
sorbitol	100	40	50	10	50
mannital	0	0	0	0	0

凍結時間: 16 時間

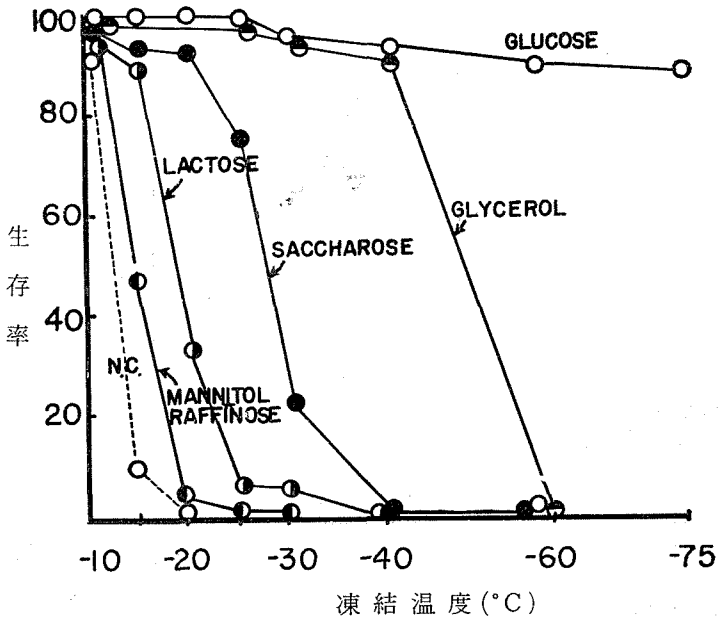
* No. 1 及 No. 2 の葉の細胞の滲透濃度

** 生存細胞の百分比

第 1 表の結果からわかるように，凍害防止作用の大きさの順位は次のようになる。

ペントーズ＼ソルビトール＼
ヘキソーズ／サッカローズ／ラクトーズ＞ラフィノーズ
マンニトール

グリセロール，ヘキソーズ及びペントーズのあいだにも凍害防止作用の差は殆んど認められない。溶解度が小さいマンニトールとラフィノーズは 0°C 附近で析出してしまう。ラクトーズは約 −5°C で析出する。したがって高濃度でも細胞に害作用を及ぼす事が少ないこれらの物質の凍害防止作用の大きさはそれらの物質の 0°C 以下の温度における溶解度に支配される傾向が認められる。第 1 表に示した実験は各物質の凍害防止作用の相対的大きさる知るために，凍結温度を −25°C と −30°C の二つの温度にかぎって行なった。各物質の凍害防止作用を知るためには



第 2 図　糖及び多価アルコールの凍害に対する保護作用
媒液の濃度はいずれも 0.4 M である
凍結時間：16 時間
対照 (N.C.) は水を媒液として凍結させたものである

もっと広い温度範囲について調べる必要がある。第 2 図は 4 種類の糖と多価アルコールについて，いずれも 0.4 M 溶液を用いて −10°C から −75°C までの温度範囲についてそれらの物質の凍害防止作用の大きさを示している。グリセロールは −40°C 以高の温度ではグルコーズのように大きな防止作用をもっているが，−60°C 以低では全く防止作用がない。5 回のいずれの実験でも全細胞が死んでいた。グリセロールの凍害防止作用が全くなくなる正確な温度範囲はまだ調べられていない。第 1 表の結果のように，サッカローズ，ラクトーズ，マンニトール及びラフィノーズと溶解度の小さくなるにつれて，それらの防止作用は減少する。

3. 各種有機物質の凍害に対する保護作用

各種有機物質について，同じように調べた結果を第 2 表に示す。グリシンは凍害防止作用がない。尿素，トリエチレングライコールの防止作用は小さい。アセトアマイドは糖より小さいが防止作用を有する。0.4 M と 0.8 M 溶液で防止作用を比較してみるとグルコーズとグリセロールでは 0.8 M のほうが防止作用が大きいが，ほかの物質では濃度が高いほうが防止作用が小さい傾向が認められる。この事はこれらの物質は糖とちがって高濃度では細胞に有害に作用することを示している。

第 3 表にポリビニールピロリドンの結果を示す。7% までの濃度では対照と比較してほとんど防止作用に差が認められないが，10% 以上の濃度ではむしろ対照より害が多くなる。

第 2 表 有機物質の凍害に対する保護作用

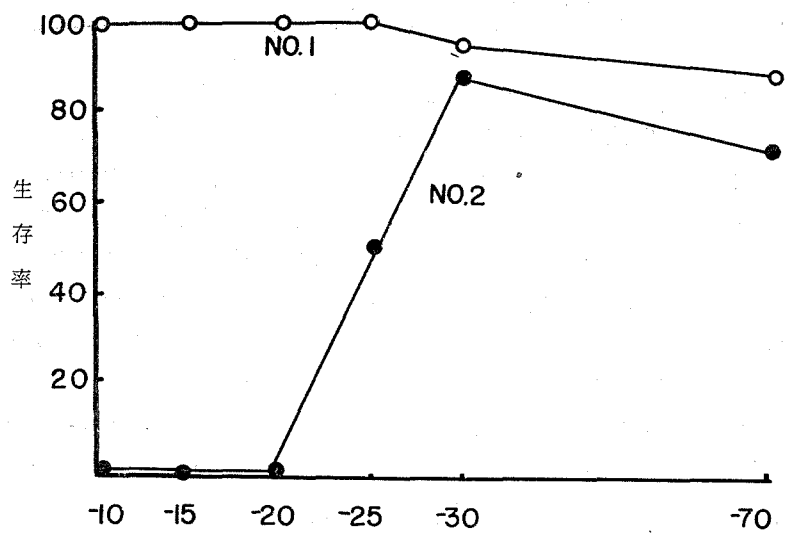
媒液の濃度	0.4 M				0.8 M	
凍結温度	−15°	−20°	−25°	−30°	−20°	−30°
水	30*	0	0	0	0	0
尿素	—	20	0	0	0	0
グリシン	0	0	0	0	0	0
トリエチレングライコール	80	20	10	0	0	0
アセトアマイド	—	70	30	0	0	0
グリセロール	100	100	100	40	100	100
グルコーズ	100	100	100	50	100	100

* 生存細胞の百分比
凍結時間： 16 時間　　細胞の滲透濃度： 0.7 M

第 3 表 ポリビニールピロリドンの凍害防止作用

媒液の濃度	0	3.5%	7%	10%	グルコーズ (0.4 M)
−15°C*	70**	60	75	0	100
−20°C*	0	0	0	0	100

* 凍結温度　　** 生存細胞百分比　　凍結時間： 16 時間

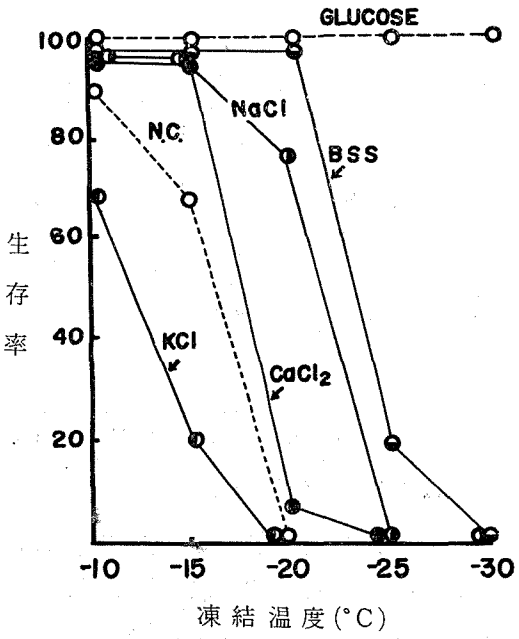


第 3 図 予備凍結温度と生存率の関係

凍結方法： 0.2 cc の 0.7 M グルコーズ溶液を含む小試験管に組織切片を入れて凍結
No. 1 は対照で予備凍結だけしたものである
予備凍結時間： 1 時間

4. 液体窒素中での生存実験

各温度で一時間予備[16),17)]凍結してから液体窒素中に一時間入れて取出して調べた結果を第3図に示す。このばあいには小試験管に 0.2 cc の 0.7 M グルコーズ溶液を入れて凍結させた。−20°C 以高の温度で予備凍結したばあいには全細胞が死んでいた。−30°C 以低の温度で予備凍結したばあいには 70〜80% の細胞が害されていなかった。融解後細胞は2倍の高張溶液と水で原形質分離と復帰を2回繰返したが細胞はなお正常な外観を示していたし，正常に原形質分離した。以上の結果から細胞がグルコーズ溶液に浸されて凍結されるばあいには，細胞内の凍りやすい水が細胞外凍結によって極度に脱水されても細胞は害を受けないことが判る。



第4図　無機塩類の凍害に対する保護作用
媒液の濃度：グルコーズ (0.4 M), NaCl, KCl 及び平衡塩溶液 (BSS) (0.2 M), $CaCl_2$ (0.13 M)。N.C. (対照)
凍結時間：16時間

5. 無機塩類の凍害に対する保護作用

塩化ナトリュウム (0.2 M), 塩化カリウム (0.2 M), 塩化カルシュウム (0.13 M) 及び平衡塩溶液 (0.2 M) について凍害防止作用を調べた結果を第4図に示す。塩化カリュウムは水の中で凍結させた対照よりも害作用が大きいが，塩化カルシュウム，塩化ナトリュウム及び平衡塩溶液中で凍結させた細胞はいずれも対照より害作用が小さい。ことに塩化ナトリュウムと平衡塩溶液は −20°C までの温度においては大きい防止作用を示しているが，グルコーズとちがって −30°C 以低では防止作用がない。

6. 無機塩類を人為的に増加させた細胞を凍結させたばあい

細胞がグルコーズ溶液に接して凍結されるばあいには，細胞が極度に脱水濃縮されても細胞は害を受けないので，凍結させるまえに葉柄を 0°C で低張な平衡塩溶液中に3日間葉挿して細胞内の滲透濃度を増加させた葉を実験に使用した。処理前の葉の細胞の滲透濃度は 0.65 M であったが処理した葉の滲透濃度は 1.05 M で約 60% 増加していた。葉挿した葉を乾かないように 0°C で 10 日間放置したが葉には全く害が認められなかった。この滲透濃度の増加は無機塩類の増加にもとづくものと考えられる。近日中に定量する予定である。この想定が正しいものとして次の実験を行なった。無機塩類で処理した葉から組織切片をとっていずれも 0.5 M グルコーズ溶液中で凍結させた結果を第4表に示す。−25°C 以高では両者の間に差が認められないが，−30°C で凍結させたばあいには，細胞中に無機塩類を増加させた細胞は対照よりも大き

第 4 表 人為的に無機塩類を増加させた葉の凍害
(0.5 M グルコーズ溶液中で凍結)

凍結温度	無処理 (0.66 M)*	平衡塩溶液を入れた細胞 (1.05 M)
−20°	100**	100
−25°	100	100
−30°	100	20

* 細胞の滲透濃度　　** 生存細胞の百分比　　凍結時間： 16 時 間

な害が現われた。

上に述べた無処理の対照の葉と無機塩類で処理した葉から，それぞれ組織切片をとって水，平衡塩溶液及びいろいろな濃度のグルコーズ溶液中で凍結した結果を第 5 表に示す。

第5表 人為的に無機塩類を増加させた葉の凍害に対する保護作用

凍結温度	凍結媒液の種類				
	水	0.2 M B.S.*	0.4 M G**	0.8 M G	1.5 M G
−20°	0***	100	100	100	100
−25°	0	40	80	100	100
−30°	0	10	40	70	100

* B.S.： 平衡塩溶液　　** G： グルコーズ
*** 生存細胞の百分比　　凍結時間： 16 時 間
無処理の葉の滲透濃度は 0.66 M で無機塩類で処理した葉の滲透濃度は 1.05 M である。

まえに述べたように，水よりも平衡塩溶液中で凍結したばあいの方が害作用が少ない。さらに細胞の中に比較的高濃度に無機塩類を入れた葉でも，外囲のグルコーズ溶液の濃度が増すにつれて害作用があらわれにくくなる傾向が認められる。

7. 糖液中での融解速度と凍害の関係

多くの動物細胞とちがって，植物細胞は一般には融解速度が大きいほど害を受けやすい。小試験管に 0.2 cc の水を入れてその中に組織切片を浸して −5°C で凍結後，害を受けない凍結温度である −10°C まで冷却してから，30°C の温湯 100 cc 中に小試験管を入れて急速に融かしたところ，害を受けていない細胞は 20% にすぎなかった (第 6 表)。

第6表 糖液中での融解速度と凍害の関係 (No. 1)

融解条件	凍結媒液の種類		
	水 (−10°C で凍結)	0.4 M. G (−10°C で凍結)	0.4 M. G (−30°C で凍結)
0°C 空 中	100*	100	100
0°C 水 中	90	100	100
30°C 水 中	20	100	100

* 生存細胞の百分比
凍結方法： 0.2 cc の媒液を含む小試験管中で凍結

第 7 表　糖液中での融解速度と凍害の関係 (No. 2)

融解の条件	凍結温度		
	−30°C	−79°C	−196°C
0°C 水中	100*	100	90
35°C 水中	90	90	80

* 生存細胞の百分比

凍結方法： 0.2 cc の 0.8 M グルコーズ溶液を含む小試験管中で凍結

このばあい 0°C の水や 0°C の空中で融解させたものは全細胞が害を受けていなかった。しかし 0.4 M グルコーズ溶液中で凍結させたばあいには，30°C の温湯中でとかしても全細胞が害されなかったし，−30°C で凍結後 30°C の湯温中でとかしても害を受けなかった。さらに第 7 表に示すように 0.8 M グルコーズ溶液中に浸して，−79°C，−190°C まで冷却後，35°C の温湯中に入れて急速に融解させたばあいにも大部分の細胞は害を受けなかった。これらの事実はグルコーズ溶液中で凍結させるばあいには，急速に融解させても細胞が害を受けにくい事を示している。

IV.

1. 細胞内の塩濃度の濃縮と凍害

本論文で用いたキャベツの細胞は，水を媒液として凍結させるばあいでも細胞内凍結を起しにくいし，−5°C で植氷して凍結後ゆっくり冷却し，ゆっくり融解させたので凍結融解後の害は細胞外凍結によるものとみなしてもよい。またここで用いたどの物質も細胞内に透過しないことを確めたので，これらの物質の凍害保護作用は細胞がそれらの溶液に浸されて凍結されたためにあらわれたことになる。水を媒液として凍結させるばあいには約 −13°C での 16 時間の凍結に耐えるのが限度であるが，ペントーズを媒液として凍結させるばあいには −30°C または −70°C で予備凍結後液体窒素中に入れて取出しても，細胞の大部分は害を受けていなかった。このばあい細胞内の凍り易い状態にある水は殆んど脱水されているので[16),17)]，細胞内は極度に濃縮されている。しかし媒液にペントーズやヘキソーズの溶液があれば，細胞はこのように極度に脱水濃縮されても害を受けない事から考えて，細胞内の塩濃度の濃縮が細胞に害を与えるとは考えられない。このことをさらに確めるために，低張な平衡塩溶液中にキャベツの葉柄を葉挿して細胞内に無機塩類を入れて滲透濃度を人為的に増加させた。このばあい滲透濃度は 0.66 M から 1.05 M に高まっていた。これらの葉から切片をとっていずれも 0.5 M のグルコーズ溶液に入れて凍結させた結果 −30°C で 16 時間の凍結では無機塩類を入れた葉の生存率は 20 であるのに入れない葉では 100 であった。さらにこのように無機塩類を細胞内に増加させた細胞をいろいろな濃度のグルコーズ溶液中に入れて凍結させた結果，グルコーズ濃度が増すにつれて細胞の生存率が漸次高まり，1.5 M グルコーズ溶液中で凍結させたばあいには −30°C での 16 時間の凍結に全細胞が害を受けていなかった。したがって比較的多量に平衡塩溶液

を入れた細胞でも，高濃度のグルコーズ溶液中で凍結させれば細胞は害を受けない。しかもグルコーズは細胞内に入らないので，細胞内の塩濃度の濃縮が凍害の原因とは考えられない。したがって凍結脱水による原形質表層の障害が凍害の原因として考えられる。ここで問題となるのは葉挿の方法で無機塩類を入れたばあい滲透濃度が高まっていることから，塩類が細胞内に入ったものと考えられるが，入った塩類の量をまだ定量していない。また塩類を入れた葉の組織切片をグルコーズ溶液中で凍結させるばあい，細胞内に入った無機塩類が凍結中に媒液に出る可能性も考えられるが，このことも確めていない。これらの問題についてさらに詳細に検討して結論を出したい。

2. 諸物質の凍害に対する保護作用

Maximov[1),8),9)] はキャベツの葉柄の表皮細胞を用いて，いろいろな有機物質の凍害防止作用を調べた。彼の調べた諸物質の凍害防止作用の大きさの順位はつぎのようである。

グルコーズ＞グリセロール＞1価アルコール＞アセトン＞マンニトール

彼は糖についてはグルコーズしか調べていない。彼の結果では −30°C 以高の温度においてもグリセロールはグルコーズよりも凍害防止作用がはるかに小さい。無機及び有機塩類については塩化ナトリュウム，醋酸，乳酸，クエン酸のナトリウム及びカリウム塩はグルコーズと同程度の凍害防止作用を有するが，塩化カリウム，蓚酸，酒石酸のナトリウム及びカリウム塩はいずれも凍害防止作用が小さい。これらの結果から彼は害作用が少なく共融点が低い物質は保護作用が大きいと結論している。

著者は Maximov が調べていない多くの有機化合物を用いてより広い温度範囲について凍害防止作用を調べたが Maximov の結論を支持する結果を得た。糖のように細胞に害作用の少い物質でも 0°C 近い温度で析出してしまうラフィノーズは防止作用が非常に小さい。糖の低温度での溶解度や共融点は 2, 3 の糖を除いては殆んど調べられていないので，凍害防止作用と共融点の関係は判らないが，一般的傾向としては 0°C 以下でも溶解度の大きい糖ほど凍害防止作用が大きい傾向が認められる。多価アルコールについても同様な事が認められる。マンニトールは 0°C 近い温度で析出してしまうので，ラフィノーズのように凍害防止作用が非常に小さい。グリセロールは約 −50°C 以下では全く凍害防止作用が認められない。これは高濃度のグリセロールによる害作用と考えられる。尿素，トリエチレングライコール，アセトアマイド等は高濃度では害作用が大きいので凍害防止作用は非常に小さい。無機塩類のうち塩化ナトリュウムと平衡塩溶液は用いた材料では −20°C 以高での凍害防止作用は大きいが，−30°C 以低では凍害防止作用は認められない。塩化カリュウムは共融点も高いし，害作用も大きいので凍害防止作用はない。しかしこの事は塩化カリュウムの性質によるのであって，カリュウムイオンそのものの特性によるのでない。Maximov[8)] の結果によれば醋酸カリュウムと乳酸カリュウムは塩化ナトリュウム，醋酸及乳酸ナトリュウムと同じていどの凍害防止作用をもっている。したがってこの事から凍害防止作用は化合物そのものの性質によるのであって，それを構成しているアニオンやカチオンの特性によるものでないことが判る。

凍害防止作用を調べるばあいには，0°C 以低約 −70°C までの全温度範囲について調べる必要がある。物質によってはある温度範囲では大きな凍害防止作用があるが，ある温度以低では全く凍害防止作用がないばあいがある。0°C から −70°C までの全温度範囲にわたって凍害防止作用を示すのは低分子の糖だけである。

3. 凍害に対する保護作用と媒液の濃度の関係

グルコーズ溶液の濃度と凍害防止作用の関係は細胞の耐凍性の高さによって異っていて，耐凍性の高い細胞ほど低濃度でも大きな凍害防止作用を示す。物質によってある温度以低では凍害防止作用がなくなる傾向が認められる。たとえば平衡塩溶液は −25°C 以低では凍害防止作用が小さくなる。しかし耐凍性の高い細胞では −25°C では全細胞が生存しているが，耐凍性のより小さい細胞では同一濃度の平衡塩溶液中で凍結させても全細胞が死ぬ。また本論文では所定温度に達してから約 16 時間凍結状態においたばあいの結果をのべた。したがって凍結時間が短いばあいには物質によって凍害防止作用がなくなる温度範囲も異なるはずである。かように物質によって凍害防止作用がなくなる温度範囲は細胞の耐凍性の大きさ，凍結持続時間によってかなり異っていて一定したものでない。Maximov は耐凍性の比較的小さいキャベツの細胞を用いているので，1 M 以上のグルコーズ溶液中で凍結させないと −20°C 以低での凍結には耐えられなかった。Levitt や Maximov の実験を追試した Åkerman[18] は糖液の凍害防止作用はそれの高張溶液中で凍結させたばあいにのみ現われると述べている。そして Levitt は細胞を高張な糖溶液中で凍結させるばあいには，細胞は原形質分離していて原形質表層が細胞膜から離れた状態で凍結されるので，凍結中または融解にさいして細胞が有害な機械的ストレスにさらされる事が少ないので細胞は害を受けにくいと説明している。すでに述べたように，耐凍性の高い細胞では凍結前に予め原形質分離しておく必要がない。耐凍性の大きい細胞を低張なグルコーズ溶液に浸して凍結させるばあいには，外液の凍結濃縮によって細胞が原形質分離するので (図版 I–1)，細胞膜と原形質表層の間に糖液の層ができるので，細胞が直接水に接した状態で凍結，融解されるばあいとちがってこの濃縮された糖液がいろいろな意味で緩衝的に働くので Levitt のいうように機械的障害を受けにくくなるとも考えられる。糖液に浸して凍結した切片を液体窒素中から 35°C の温水中に入れて急に融かしても細胞は害を受けない事実はこの考えを支持しているように考えられる。細胞膜と原形質表層間にある糖液がこのような凍結及び融解にさいしての機械的障害を少なくするほかに，原形質表層部の脱水そのものによって受ける害を防ぐことも考えられる。そのような表層部の害や糖の凍害防止作用の具体的内容は今のところ全くわからない。細胞を糖液に浸して凍結するばあい細胞外凍結による脱水の害が細胞内ではなく細胞表層部に起ると考えられるが，その害が有害な機械的ストレスのみによるのか，細胞表層部の脱水そのものによるのか，両者の全体的結果として起るのか今のところこれを判断するデーターを持っていない。

5. 細胞の耐凍性の高さと各媒液の凍害に対する保護作用の関係

約 −13°C の凍結に耐えられる冬のキャベツの細胞では，糖が細胞内に入らなくても糖液

中で細胞が凍結されれば −30°C 以低の凍結に耐えられる。一方，−20°C の凍結に耐えられるマリモ[19]では細胞内に透過するエチレングライコール，メタノール等の溶液は凍害防止作用があるが，細胞内に透過しないグリセロールや糖溶液は保護効果がない事が知られている。また耐凍性の高い冬の木の皮層細胞では，細胞が水を媒液として凍結されても −30°C 以低の少なくとも数日間の凍結に耐えられるが，細胞内に透過しない糖溶液 (0.2 M 以上の濃度) 中で凍結させるばあいには −15°C での凍結にも耐えられなくなる。0.1 M グルコーズ溶液中で凍結させるばあいには −20°C の凍結に耐える。

一方細胞内に透過するエチレングライコール，メタノール，グリセロール中で凍結させたばあいには，水を媒液として凍結させるばあいと較べて，少なくとも −30°C 以高の温度では耐凍性は殆んど低下しない。このように非常に耐凍性の大きい細胞では，マリモでも，木の細胞でも，細胞内に入らない媒液中で凍結させると耐凍性はむしろ低下する。しかし，キャベツの細胞では細胞内に透過しない溶液でも大きな凍害防止作用を示す。これらの一見矛盾した現象を調べるために，木 (Rosa pendulina) とキャベツのいろいろ耐凍性の異った時期の細胞を用いて，いろいろな媒液中で凍結させてそれらの凍害防止作用を調べた。その結果を第 8 表と第 9 表に示す。

第 8 表 細胞の耐凍性の高さと各媒液の凍害に対する保護作用の関係
(キ ャ ベ ツ の 細 胞)

細胞の状態	凍結媒液の種類 (1 M)				凍結温度及び時間
	水	エチレングライコール	メタノール	グルコーズ	
A (0.18 M)*	0**	0	0	0	− 5°×1 時間
B (0.22 M)	0	0	70	40	−10°×1 時間
C (0.25 M)	0	80	100	100	−10°×2 時間
D (0.35 M)	0	100	100	100	−30°×1 日間

* 細胞の滲透濃度 A, B, C, D と順に耐凍性が高くなる
** 生存細胞の百分比

第 9 表 細胞の耐凍性の高さと各媒液の凍害保護作用の関係
(木* の 皮 層 細 胞)

細胞の状態	凍結媒液の種類 (1 M)				凍結温度及び時間
	水	エチレングライコール	メタノール	グルコーズ	
A (0.17 M)**	0***	0	0	0	− 5°×1 時間
B (0.25 M)	0	0	70	40	−10°×1 時間
C (0.33 M)	0	60	100	100	−20°×2 時間
D (0.70 M)	100	100	100	0	−30°×1 日間

* バ ラ (*R. pendulina*)
** 細胞の滲透濃度 A, B, C, D と順に細胞の耐凍性が高くなる
*** 生存細胞の百分比

これらの表からわかるように，木の細胞でもキャベツの細胞でも耐凍性のない細胞では，いずれの媒液中で凍結させても凍害防止作用は全くない。エチレングライコール，メタノールのいずれも細胞内に入るが，室温でこれらの溶液の1.5～2倍の等張溶液中におくだけで1時間以内で死ぬ。細胞内に入らない同濃度の高張グルコーズ溶液中に入れたばあい，細胞は原形質分離するが1時間以内に死ぬ。耐凍性が大きくなるにつれて，エチレングライコール*やメタノールが細胞内に多量に入っても害を受けにくくなる。細胞内に透過する物質の凍害防止作用の大きさはその物質が細胞内に入っても害を及ぼさない濃度に支配される傾向がある。耐凍性の高さがある程度大きくなると，細胞内に入る物質[21]も入らない糖液中で凍結するばあいでも，いずれも大きな凍害防止作用を示すようになる[22]。しかし耐凍性が非常に高く，水中で凍結させても−20°C あるいは −30°C の凍結に耐えられる細胞が糖液中で凍結されると耐凍性を著しく低下する。初秋から冬にかけて木の細胞の耐凍性は著しく増加する。そのさい原形質表層部の性質，状態も著しく変るものとおもわれる。そして耐凍性の比較的小さい時期の原形質表層部に対して媒液の糖は凍害に保護的に働くが，耐凍性が非常に高い細胞の原形質表層部に対して糖はむしろ有害に働くものと解訳される。しかし糖液が保護的または有害に作用する機構はわからない。いずれにしても糖液は細胞内に入らないので，これらの作用は細胞表層部の変化によっておこるものと考えられる。

摘　　要

耐凍性の比較的高いキャベツの葉柄の細胞をいろいろな媒液に浸して，それらの凍害防止作用の大きさを調べた。

1. 高濃度でも細胞に害を与えない共融点の低い物質は凍害防止作用が大きい。有機物質の凍害防止作用の大きさの順位はつぎのようである。

ラムノーズ，キシローズ，グルコーズ，フラクトーズ，ソルボーズ，マンノーズ，ガラクトーズ ＞ グリセロール ＞ ソルビトール，サッカローズ ＞ アセトアミド，ラクトーズ ＞ ラフィノーズ，マンニトール，トリエチレングライコール，尿素 ＞ 水 ＞ ポリビニールピロリドン ＞ グリシン

無機塩類の順位は次のようである。

平衡塩溶液＞塩化ナトリュウム＞塩化カルシュウム＞水＞塩化カリュウム

2. 水に浸して凍結させるばあいには −15°C での16時間の凍結が限度があるのに，低張な糖液に浸して凍結させるばあいには −30°C または −70°C 以低での凍結にも耐えられる。しかもこのばあい細胞内に糖液が入っていない。かように糖液に浸して凍結されるばあいには細胞内が凍結によって極度に脱水されても細胞は害されない事から，細胞内の塩濃度の濃縮が凍害の原因ではなく，細胞表層部の障害がその原因と考えられる。

* エチレングライコールはメタノールよりも害作用が大きいので，細胞の耐凍性が小さいばあいにはメタノールよりも凍害防止作用が小さい。

3. 細胞を水に浸して凍結させるばあいには −10°C から 30°C の温水中に入れて急速に融かすと大部分の細胞が殺されるが，細胞を糖液中に浸して凍結させるばあいには，−196°C まで冷却後 35°C の温湯中で急速に融かしても細胞は殆んど害を受けない。したがって糖液に浸して凍結させるばあいには融解速度の大きさは細胞の生存に殆んど関係がない。

文 献

1) Maximow, N. A. 1912 Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren I. Berich. der Deut. Bot. Gesellschaft. ***30***, 52-65.
2) Ullrich, H. und Veen, P. V. 1942 Weitere Untersuchungen Über das Ausfrieren von Kolloiden und Kolloidgemischen im Hinblick auf die plasmatische Frostresistenzforschung an Pflanzen. Kolloid-Z. ***100***, 389-395.
3) Ullrich, H. und Heber, U. 1957 Über die Schutzwirkung der Zucker bei der Frostresistenz von Winterweizen. Planta, ***48***, 724-728.
4) Ullrich, H. und Heber, U. 1958 Über das Denaturieren Pflanzlicher Eiweiss durch Ausfrieren und seine Verhinderung. Planta, ***51***, 399-413.
5) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. Biochim. Biophys. Acta, ***10***, 414-426.
6) Lovelock, J. E. 1954 The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. Biochem. J., ***56***, 265-270.
7) Lovelock, J. E. and Polge, C. 1954 The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. Biochem. J. ***58***, 618-622.
8) Maximow, N. A. 1912 Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren. II. Die Schutzwirkung von Salzelösungen. Berich. der Deut. Bot. Gesellschaft, ***30***, 293-305.
9) Maximow, N. A. 1912 Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren III. Über die Natur der Schutzwirkung. Berich. der Deut. Bot. Gesellschaft, ***30***, 504-516.
10) Ilin, W. S. 1933 Über den Kältetod der Pflanzen und seine Ursachen. Protoplasma, ***20***, 105-124.
11) Scarth, G. W. and Levitt, J. 1937 The frost-hardening mechanism of plant cells. Plant Physiol., ***12***, 51-78.
12) Levitt, J. and Siminovitch, D. 1940 The relation between frost resistance and the physical state of protoplasm. Canad. J. Res., C, ***18***, 550-561.
13) Siminovitch, D. and Levitt, J. 1941 The relation between frost resistance and the physical state of protoplasm. Canad. J. Res., C, ***10***, 9-20.
14) Levitt, J. 1958 Frost, drought and heat resistance. Protoplasmatologia **VIII** (6). Springer. Vienna, Austria, 1-78.
15) Levitt, J. 1960 Freezing injury of plant tissue. Annals of the New York Acad. Sci., ***85***, 570-575.
16) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, ***14***, 17-24.
17) Sakai, A. 1960 Survival of the twig of woody plants at −196°C. Nature, ***185***, 393-394.
18) Åkerman, Å. 1927 Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen. Berlingska Boktryckeriet, Lund. 1-232.
19) 照本 勲 1960 マリモの凍害に対する凍害防止剤の効果について. 低温科学, 生物篇, ***18***, 43-50.
20) 酒井 昭 1960 木本類の耐凍性増大過程 IX. 糖類の凍害に対する保護作用. 低温科学, 生物篇, ***18***, 23-34.
21) 酒井 昭 1958 木本類の耐凍性増大過程 II. 耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質の関係 (2). ***16***, 23-34.
22) 酒井 昭 未発表.

Résumé

Using hardy cabbage leaf cells, a series of experiments to clarify the mechanism of frost injury were made.

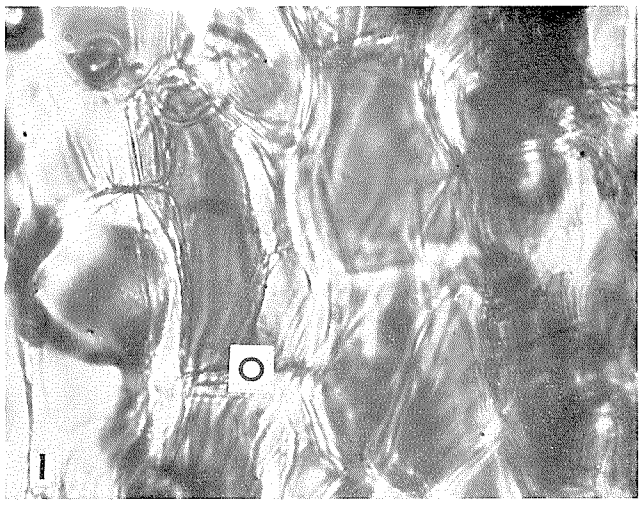
In parenchyma cells of the petiole of cabbage leaf in late fall, the osmotic concentration is about 0.65 M. Even in water their ability to prevent intracellular freezing is so remarkable that none of the cells ever undergo intracellular freezing even when they are seeded with ice at −13°C. When the tissue sections were subjected to freezing in water, the cells in the tissue could withstand freezing at −15°C for 16 hrs. However, when these cells were frozen in hypotonic glucose solution (0.4 M), they were able to survive freezing at least for a full day at both −30°C and −70°C. At least within a range of concentration below 1 M, the larger the concentration of glucose used as the medium, the higher the degree of resultant protective action (Fig. 1). Moreover, when they were immersed in liquid nitrogen for a full day after pre-freezing in glucose solution at −30°C or −70°C, the percentage survival in the parenchyma cells was about 80 (Fig. 3). In the same way the grade of ability of various neutral solutes to afford protection against frost injury was tested: rhamnose, xylose glucose, fructose, mannose, sorbose, galactose>sorbitol, sucrose>lactose, acetoamide>raffinose, mannitol, urea, triethylenglycol>glycin (Table 1, 2). In the experiments to examine whether the glucose and various other neutral solutes are able to penetrate into the cell or not during the freezing period, the cells were immersed in solutions of various concentrations of solutes ranging from 0.2 M to 1.5 M, and then they were frozen at −10°C for a full day. After thawing, the osmotic concentration of these cells was determined by the plasmolytical method, but no increase in osmotic concentration was found. The degree of protective action of glycerol in cabbage cells is about the same as that of glucose at higher temperatures than about −50°C, but at the lower temperatures glycerol solution shows no protective effect against frost injury (Fig. 2). Glycerol, too, was found not to penetrate into the cells in any of the concentrations mentioned above.

In order to increase the concentration of solutes in the cells of cabbage leaf, its petiole was put into a hypotonic balanced salt solution (NaCl: $CaCl_2$ 9 : 1) for two days at room temperature. After that treatment the osmotic concentration of the leaf cells showed considerable rise from 0.65 M to 1.05 M. The tissue sections from the leaf treated in this way could withstand freezing at −20°C for 16 hrs. in 0.2 M balanced salts solution. On the other hand, when frozen in 1.5 M glucose solution under the same conditions, the tissue sections could withstand freezing at least at −30°C (Table 5). Accordingly, it is considerd that the increase of solutes in a cell due to freezing cannot be a primary factor in increasing frost injury to cabbage cells.

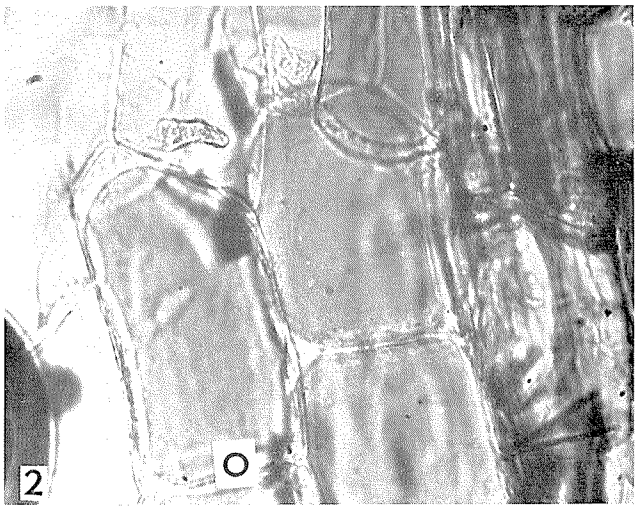
The tissue sections were cooled in a small test tube (10 cm × 1 cm) with 0.2 cc of 0.4 M glucose solution. After having been frozen at −5°C by seeding with ice crystals, tissue sections were gradually cooled down to −30°C by transfering the test tube to a series of alcohol baths of graded temperatures. After having been kept at −30°C for 10 minutes, they were immersed in liquid nitrogen for one hour, and then were thawed rapidly by

immersion in a water bath of 35°C or thawed slowly in air at 20°C. Regardless the velocity of the rewarming, about 80 percent of the cells in the tissue sections were not injured by such treatment (Table 7). Under the same experimental conditions, some tissue sections were frozen at −10°C in water instead of glucose solution, and then were thawed slowly in the air at 20°C or thawed rapidly in water at 30°C (Table 6). As a result of this experiment, the percentage survival was 100 in slow thawing, but only 20 in the rapid thawing. Difference in rewarming velocity seems not to exert any important effect upon the percentage survival of cells, provided that they are frozen and thawed in glucose solution.

When the cells were frozen on the slide glass with hypotonic glucose solution of a higher concentration than 0.2 M, most of them underwent concave plasmolysis (Phot. I.) Accordingly, to cause cells to freeze in sugar and other solutions is also very favorable to prevent intracellular freezing of the cells. It follows therefore, when the cabbage cells were subjected to freezing and thawing in media containing sugars, the cells were not injured either by intense dehydration due to extracellular freezing nor by rapid thawing, though the cabbage cells were themselves inpermeable to sugars. Accordingly, it is reasonable to consider that the frost injury of hardy cells, such as the cabbage cells here used, is caused by the bad effects that arise in the surface layer of protoplast of cells due to the removal of their water on freezing and their subsequent rehydration on thawing.



1. 凍結媒液：
0.2 M グルコーズ溶液
材 料：
キャベツ葉柄の柔細胞
−5°C で細胞外凍結中
○印は凍結中に原形質分離した細胞を示す



2. 上図の同じ細胞を融解したもの
温度　0°C