



Title	微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究 I : 酵母細胞の16mm映画撮影による動的観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 19, 79-93
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17654">https://hdl.handle.net/2115/17654</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p79-93.pdf



## 微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究 I\*

酵母細胞の 16 mm 映画撮影による動的観察

根井外喜男  
(低温科学研究所 医学部門)  
(昭和 36 年 7 月受理)

### I. 緒言

種々の生物学的試料の凍結乾燥に於ける乾燥過程の機序については、これまでも多くの学者によって、いろいろの角度から検討されている。著者も亦この線に沿っての研究を進め、その機構を明らかにしようと試みた。例えば、試料の重量変化から蒸発量の消長をもとめて乾燥過程を追及しようとし<sup>2),3),4),5)</sup>、乾燥過程の各段階での試料中の各部位に於ける残水量と生残菌との関係から微生物の乾燥機構をうかがおうとし<sup>6),7)</sup>、更には、アニリン法を利用して試料の薄片を作り、試料の凍結状態並びに氷の昇華の状況を知ろう<sup>8),9)</sup>、と企てたものである。

しかし、いずれの方法によっても、乾燥機構の全貌を知るにはまだ程遠い。

特に微生物では、その形態が微小なために、個々の細胞についての脱水昇華の状況を観察することは非常に困難である。形態的に内部構造の変化を知ろうとしても、光学顕微鏡の性能の限界を越えている為、従来行なわれている観察法では目的を果すことはできない。これを成就するためには、どうしても電子顕微鏡の力を借りる必要がある。

ところが、電子顕微鏡で観察される生物試料はすべて乾燥されたものであって、電子顕微鏡の機能から考えても、生のままの水分をもった細胞の観察などは、到底不可能のことと思われていた。従って、これまでに行なわれた凍結乾燥に関する電子顕微鏡的研究といえば、凍結時の細胞の表面のレプリカ像とか、凍結乾燥後の細胞の立体像などが観察されていたにすぎない。まして乾燥過程の動的な経過を電子顕微鏡下にとらえることなどは、夢想に近いことだった。

著者は、かねてから、凍結融解又は凍結乾燥による微生物細胞の障害、特に細胞内部微細構造の変化を電子顕微鏡的に追究していた<sup>10),11),12)</sup>。

たまたま 1954 年に我国で始めて電子顕微鏡の試料冷却装置が考案されたことを聞き、早速凍結乾燥過程観察に利用することを思い立った。翌 1955 年から実験を開始し、途中幾多の

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 591 号  
本研究は速報で既に発表された<sup>1)</sup>

困難に遭遇しながらも、ようやく今日の段階にまで到達することができるようになった。

まず最初技術的な面で拙いと考えられたのは、初期の頃に用いた冷却装置に次のような欠点があったからである。

1) 冷却装置は試料室の片側に支持されていたため、試料温度の上昇下降によって視野の移動が甚だしかった。

2) 液体空気の泡立ちによる振動が甚だしかった。

3) 試料をつけた冷却装置を試料室に装着し、液体空気で冷却してから始めて真空にするという方式であったから、微水滴である試料が凍結する前に乾いてしまう、冷却速度を大きくすることができない、常圧環境に長くおかれるため試料の汚れがひどい、などいろいろな不便があった。

その後装置に種々改良の手が加えられ<sup>13)</sup>、これらの欠陥が除かれた上、16 mm 映画の撮影装置も<sup>14)</sup> 装備されるようになったので、所期の目的である乾燥過程の観察のみならず、動的経過の記録も可能になったのである。

## II. 実験方法

### I. 装置

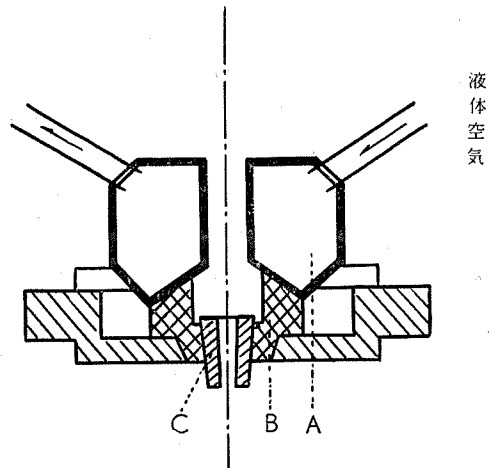
#### 1. 電子顕微鏡

日本電子光学研究所(現日本電子株式会社)製6A型電子顕微鏡を使用し、加速電圧80KVで観察した。

#### 2. 試料冷却装置

第1図は試料冷却装置の略図である、Aは冷却槽(液体空気の貯槽)で、試料挿入時には上にあげ、試料筒が支持台に納まると下げて、Bに密着させることができる。Bは皿型の断熱材ステアタイトで周囲と熱絶縁され、中心には試料支持台があって、予め冷却しておくこともできる。試料筒が挿入されて密接する部分に近く熱電対がとりつけられ、試料温度に比較的近い温度が指示されるようになっている。鏡体内を真空にした後、Aに液体空気を注入すると、密着したBは急速に冷却して、凡そ10分くらいで最低温度の $-160^{\circ}\text{C}$ くらいに達する。

試料筒には、電子線照射による汚れを防ぐために、試料をのせるメッシュを他の2枚のメッシュで両側からはさむように、予め工作されている。試料支持膜はコロジウムだけでは凍結によって破れやすいので、更にカーボンを蒸着



第1図 試料冷却装置略図

A 液体空気貯槽 B 試料支持台  
C 試料筒

した。

### 3. 16 mm 映画撮影装置

フィルムの送り装置が附属しており、カメラ・ボックスの中の通常乾板がおかれる位置にフィルムが装填されて、映像の直接撮影が行なわれる。フィルムの送り速度はパルプの外毎秒 1.5 コマ、3 コマ、6 コマの 3 種である。

## II. 試料

当研究室保存の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S. 214 株を麦汁寒天培地に 28°C 48 時間培養後、蒸留水で 3 回遠心洗滌し、凡そ 50 mg/ml くらいの蒸留水浮遊菌液として用いた。

## III. サンプリングの方法

ネプライザー(パポネフリン)に試料をとり、室温で試料筒のカーボン・コロジウム支持膜に噴霧する。かなりくりかえし噴霧しないと、附着する液滴の数が少ないから、観察に不便である。噴霧が終わったら、液滴が乾かないうちに手早く覆いのメッシュをかぶせ、液体空気中に試料筒を投入して試料を凍結させる。急速凍結の場合はこれでよろしいが、緩慢凍結を行なうのは難しい。極めて小さな液滴を比較的高い温度で凍結させて徐々に温度を下げようとしても、あまり時間がかかると凍結しない前に乾き、急速に冷すと過冷却をおこすおそれがある。特に今回の実験は東京の工場で行なったため、冷却の細かな吟味を行なうことができなかった。本報告の実験条件はすべて液体空気に試料を直接投入した急速凍結の場合のみである。

液体空気に入れられた試料筒から泡立ちがしなくなれば、充分冷却されたわけであるから試料筒を引出して、電子顕微鏡の試料室に移すのである。この時の操作もなるべく手早くしないと、空気中の水蒸気の凝結が多くて、観察の妨げになるおそれがある。試料筒自身の自然の温度上昇は真空の中では割合に遅いらしく(試料室の窓を通して外からみていると、試料筒の表面についた霜がなかなかとれないことからわかる)、凍結した液滴の融解するおそれはそれほど気にすることはない。予備排気を終えて、試料筒を試料室に入れ、試料台に挿しこんでしまえば、もはや温度上昇の心配はないからである。この状態での試料自身の温度は測定できないが、試料台の温度から推定して、恐らく -100°C 以下にはなっているものと思う。

## IV. 観察方法

次にいよいよ電子線照射による観察に移るが、凍結した液滴は氷の層が厚いために電子線を通さず、内部のものは何も判別できない。そこで、液滴中の細胞の周囲の氷を昇華させて細胞がみえるようにする必要がある。液体空気の貯槽を上げて一時冷却するのをとめ、試料全体の温度を少し上げてやるか、或いは電子線の局所的な照射によって狭い範囲内の試料温度を上げて、氷の昇華をうながすとよい。この試料全体としてはある程度冷しながら、電子線の照射によって局所的な昇華をおこさせる方法は、微細な温度調節が可能であること、1 視野での乾燥過程の観察が終っても、他の視野はまだ凍結中であるからそちらに移ることができ、1 つの試料で何回も乾燥過程をくりかえし観察できることなどで、大変好都合である。但し電子線が強すぎると、後で述べるような電子線照射による人工的な細胞障害のおそれのあること、昇華

をくりかえすと、そこから飛んだ水蒸気が試料面の他の冷えた場所に凝結するので、視野を移動させるに従って汚れが次第にひどくなるという欠点が出る。このような汚れは、照射を続けながら昇華させた場合にひどく、同じ試料面であっても、全然電子線にあたらないで昇華したところでは、殆んど汚れはない。従って乾燥過程の連続撮影を行なうためには、最初みつけた液滴で一気に成功させて了うようにねらわなければいけない。

ところが実際にその過程を映画に撮影すると、次のようないろいろな困難が伴ってくる。

1) 凍結液滴中に包埋された細胞らしきものをとらえてから、完全に乾燥が終了するまで撮影を続行しなければならない。

2) 先ず最初、細胞が見え始めるときに氷との区別がかなり困難である。周囲の氷が昇華して細胞が露出してくれば容易であるが、なるべく氷に囲まれた状態から撮影を開始したい。

3) 螢光板上で観察するのと違って、螢光板の中央にくり抜かれた 16 mm のコマ枠を通して、その下のフィルムに、盲見当で細胞をうまく撮影させねばならない。

4) 個々の液滴についての温度が測定できず、昇華の速度が予測できないので、昇華の遅い時にはフィルムを多く費し、昇華の速い時には撮影のチャンスを逸することがある。

5) 立体的な乾燥で、膜面に固着しない細胞が多いから、乾燥の途中で細胞がその位置を移動しやすい。時にはどこかへ飛んで行ってしまい、何もない視野を長く撮っていることすらある。

6) 氷の中に閉ぢこめられている時と、乾燥終了後とでは、試料の厚さや透過度がちがうので、フィルムの露出の過不足ができやすい。

7) 細胞への障害を少なくするためには、照射電流はなるべく弱い方がよろしいが、フィルムの送り速度の最も遅いのが毎秒 1.5 コマであるから、露出不足で撮影が困難になる。

以上のような困難にうちかつには、かなりの努力と熟練を要した。撮影したフィルムのうちで採用できるものは極めて僅かであった。

本実験での撮影の直接倍率は殆んど 1,000 乃至 2,000 倍、照射電流の電子流密度は試料面で  $5.6 \times 10^{-4} \text{ A/cm}^2$  であった。1 液滴についての撮影時間は、昇華速度によってまちまちで、長いものは 30 分乃至 1 時間、短いものは数分で終わった。

### III. 結 果

#### I. 蒸溜水浮遊液

##### 1. 対照 (通常の室温で空気乾燥をしたもの)

実験方法の項で述べたように、酵母の蒸溜水浮遊液をネブライザーで噴霧し、室温又は僅かに加温して乾燥した後、撮影したのが図版 I-1, I-2 である。

その所見は曾って報告<sup>12)</sup>したと同様、多くは細胞の長軸に沿うて紐状の曲りくねった電子不透過部分があり、その他の比較的辺縁に近い部分は透過性がよい。不透過部分は恐らく乾燥

によって細胞内部から水分がとられる時、表面張力によって細胞が圧縮され、内部固形成分が一方に偏って残ったものではないかと想像される。透過性のよい辺縁部には径凡そ  $0.3\sim 0.5\ \mu$  くらいの円形粒子の散在しているのがみえる。多分細胞内顆粒であろうと思う。

このような細胞の内部構造は、光学系の位相差顕微鏡によって観察した酵母の生細胞の所見とも、また超薄切片について電子顕微鏡で観察した所見ともかなり異なる。乾燥に伴う細胞の変形の結果であろうと思われる。

本実験で用いた  $5.6\times 10^{-4}\ \text{A/cm}^2$  の電子流密度では、かなり長時間照射しても、この空気乾燥の試料では、細胞の変化はみとめられなかった。電子流密度でその 100 倍くらい強い電子線を照射すると、菌体は一旦膨張した後収縮し、内部構造がより鮮明に見えてくる。

## 2. 凍結乾燥過程

試料噴霧後、急速凍結を行ない、鏡体内に移し、最初は冷却しながら観察する。

先ず弱拡大でみると、径凡そ  $20\ \mu$  から  $50\ \mu$  くらいの円形の電子不透過のものの散在しているのがわかる。このものは、噴霧によって膜面に附着した液滴が凍結してできたものであることは、その後の乾燥過程からみても明らかである。これらの凍結液滴の間に  $1\ \mu$  から  $5\ \mu$  くらいの大小不同で六角形や四角形をなすものが多数にみとめられる。これが氷晶であることは電子廻折像から証明されるし、恐らく外で凍結させてから鏡体内に挿入するまでの間に、空気中の水蒸気が試料支持膜に凝結してできたものであろうと想像される。

これらの氷晶の形態と電子廻折像、昇華の過程などについても種々興味ある所見が得られたが、その詳細については別に報告するつもりである。

液体空気の貯槽を試料台に密着させたままでおけば、試料はかなり低い温度に保たれるので(試料台で  $-140^\circ\text{C}$  以下)、氷は全然昇華せず、内部の細胞の状態を観察することはできない。そこで貯槽を上げて冷却を一時止め、しかも電子線の照射を続けると(照射電流を強くすれば昇華は促進されるが、その速度調節が難しいし、乾燥後の細胞の変形が気づかれるので、最初長時間を要しても、照射電流は最小限度にして、昇華の進むのを待つ)、やがて極めて徐々に昇華が始まる。液滴の辺縁部の氷の層が次第に薄くなると、その内部に埋れていた細胞の陰影がボンヤリと見え、輪郭が僅かに現われてくる。この段階では、目標とする細胞であるか、凹凸しながら昇華して行く氷であるか、まだはっきりしない。とにかくそれらしいと目星をつけたものをねらって、撮影を続けて行くのである。普通の乾板とちがって  $16\ \text{mm}$  では画面が小さく、しかも連続撮影であって螢光板には映らないから、細胞がうまく画面に納まっているかどうか常に注意しなければならない。

通常の乾燥方法で、試料がすべて膜面に固着しているものとは異なり、凍結乾燥ではその機構の本質から容易に想像されるように、試料はすべて立体的な形態を保ったまま乾燥するので、膜面に附着する細胞は少なく、特に蒸溜水浮遊液では細胞間を接続するものがないので、多くの細胞は氷の昇華とともに水蒸気の流れに乗って飛び去るものと思われる。このことは同じ菌濃度の浮遊液で作った空気乾燥の対照試料の 1 液滴内の細胞数が格段に多いことから想像さ

れる。

以上のようにして輪郭の出てきた細胞は、辺縁は円滑であるが、内部構造はまだ全然わからない。更に昇華が進んで細胞の周囲に接する氷がなくなっても(立体的な試料構造から考えれば、映像の上で細胞と重なっていても、それが果して細胞に接した氷晶であるかどうかは厳密には断定できない)、暫くはまだ細胞の中が不透明で微細構造はわからない。しかしやがて細胞内部からの昇華が始まるらしく、辺縁から中心に向かって次第に内部構造がみえてくる。中には確かに氷晶と思われるような形をした dense な部分の見える場合もある(図版 III-10)。細胞内からの昇華が終ったと思われる頃の所見では、細胞内部構造は蜂窩状で、いかにも氷晶の抜けがらといった感じがする。辺縁は円滑さが失われて、微細な凹凸ができ、噴火口様の孔らしいものも幾つかできている。このような変化は、螢光板の映像を肉眼で観察していたのでは見逃しやすいが、撮影したフィルムを特に注意して引伸してみると、かなり早い時期から現われ、時々泡のように吹き出している過程がよく観察される。

細胞内からの脱水がすんで透明化した後は、細胞全体が僅かに収縮する。

時々細胞表面のこうした変化なしに、細胞内部の透過性の増すことがある。この場合には多くは一時膨化し、後に少し収縮する。

多くの細胞のうちには、ごく稀に最後まで内部の透明化しないものがある。このものは細長い収縮像を呈しているので、恐らくは細胞外凍結の結果、細胞内には氷晶ができず、脱水収縮したものと思われる<sup>15)</sup>。

以上は大部分の細胞に見られる所見で、しかもそれらの細胞は乾燥の終るまで、大きな破壊や障害のなかったと思われるものである。ところが、最初から細胞膜などに欠損があったと思われるような細胞では、まだ氷晶に包まれている間に、既に細胞の一部が透過性を増し、周囲の氷晶の昇華と平行して、細胞の内部構造が次第に明瞭に見えてくる。このような場合は、周囲の氷晶が消える頃には、細胞の内部の氷晶もすべて昇華してしまうものとみえて、内部構造の見え方はそれ以上に変わらない。

乾燥後、この細胞を仔細に点検すると、大なり小なりかなりはっきりした外壁或いは内部構造の欠損、破壊があって、その部分から容易に細胞内部の氷晶が昇華してしまったものであることが想像される。このような細胞の構造的な破壊は、出発材料の細胞自身に始めからできていたものか、或いは凍結によって生じたものかはわからない。対照の室温乾燥のものではゴーストは殆んどみられないのに、凍結融解を行なったものに屢々破壊像がみられる<sup>11)</sup>ことから凍結による傷害のようにも思われるが、乾燥方法が違うのであるから、はっきりしたことはいえない。

## II. ブドウ糖及びゼラチン菌浮遊液

微生物の凍結乾燥に当っては、媒質が乾燥或いは保存に対して大きな意義をもっている。このような保護物質としての作用機転については、従来もいろいろと検討され考察されているが、その本態に関してはまだ不明の点が多い。本実験では形態的な立場から、媒質の果す役

割をしらべてみたいと考えて、先ず5%のブドウ糖溶液に予め蒸留水で洗った菌体を浮かべ、室温に数時間おいた後、試料として用いた。

#### 1. 対照(室温乾燥試料)

空気中で自然に乾燥した試料は、これを観察しようとして電子線を照射すると、ブツブツと泡立つように膨れた後多少収縮する。この時細胞と思われる陰影はやや透明化するが内部構造は殆んどはつきりしない。室温で乾燥される時、細胞は濃縮されたブドウ糖で周囲から包まれ、真空中のしかも電子線の照射によって更に脱水されようとして、泡立つものと思われる。

#### 2. 凍結乾燥過程

蒸留水浮遊液の場合と全く同様にサンプリングをする。冷却したままで観察すると、液滴の凍結像などは蒸留水の場合と差異はない。同様の操作で照射を続け、周辺から氷の昇華をはかると、細胞の輪郭がみえてくる。細胞の周囲の氷の昇華が進むに従い、細胞と細胞の間に一面に張りめぐらされた網状の構造がみえる。恐らく凍結によって氷晶の間に濃縮されてできたブドウ糖の網状構造が、氷晶のなくなった後に残されたものであろう。大体周囲の氷が昇華してしまっただと思われる時でも、この network に包まれた細胞自身は、蒸留水の場合に比較すると、輪郭や内部構造はそれほどはつきりしない。全体として多少透明化する程度である。ただ、そのまま照射を続けていると network がとけたような感じで丸い粒になったり膨れたりし、網の形もすっかり崩れてしまう。その時には細胞も変形し内部構造が多少見えてくることがある。

同様の実験は1%ゼラチン浮遊液についても行なってみたが、ほぼ似たような所見で、網状構造そのものにもはつきりした差異はみとめられなかった。

### III. 電子線照射による影響の吟味

電子顕微鏡での観察にあたって、電子線照射によって試料に人工的变化或いは産物のできるおそれのあることは、電子顕微鏡学のごく初期の時代から問題になっているところで、変化し易い生物試料の場合などには、この点に充分の注意を払う必要がある。

電子線照射の影響としては、熱的及び化学的变化があげられているが、特に電子が吸収されるために、電子の運動エネルギーが熱エネルギーに変って試料の温度が上昇し、その結果 density の高い物質などは焼けるおそれのあることが知られている。

本実験に於ても、最初からこの点に留意し照射電流はできるだけ弱く(電子流密度で  $5.6 \times 10^{-4}$  A/cm<sup>2</sup>) した。これは映画撮影の際の露出時間の関係もあって、1,000 倍の倍率の映像を 1.5 コマ/sec の送り速度のフィルムに感光させるのにギリギリの限界強度であった。使用フィルムは Sakura, F grain positive, Type 02.003 で、これより照射電流を弱くすると、露出不足になって連続撮影は困難であった。

この強度の照射電流で、蒸留水浮遊液の対照試料である空気乾燥細胞の観察をかなり長時間続けても、形態的な変化は殆んどみとめられない。電流強度を(電子流密度で 100 倍くらい)増すと、全体として細胞は収縮し、内部構造も鮮明化する。

次に凍結乾燥過程に対する電子線の影響であるが、これについては2つの場合が考えられる。1つは凍結状態からの細胞の乾燥に対して電子線が作用し、通常行なわれる真空内での単純な乾燥とは異なった条件下の乾燥にならないかということ、他は乾燥直後の細胞に及ぼす電子線自身の影響である。試料温度がかなり低くて周囲が氷に閉ざされていても、細胞のような高分子物質を含むものは特異的に電子を吸収して細胞内の温度を上昇させ、細胞内の氷晶を変形させるとか、比較的高い温度での乾燥を行なわせることにならないかとおそれた。

その点についての吟味として、氷が昇華する時の試料温度の推定を試みた。真空中での氷の昇華速度は氷の温度によってきまるもので、第1表に示す通りである。

第1表 真空中の氷の昇華速度と温度との関係

0°C	703.3 $\mu$ /sec
-10	310.7
-20	123.4
-30	46.3
-40	15.96
-50	4.983
-60	1.392
-70	0.3421
-80	0.0725
-90	0.0129
-100	0.00189
-110	0.000217
-120	0.000019

一方今回の実験データとして、液滴の間に多数見られる氷晶(水蒸気が凝結してできたと思われるもの)の1つを目やすとし、それが昇華によって次第に小さくなって行く過程を個々のコマの映像から計測し、フィルムの送り速度から割り出すと、昇華速度が計算される。それを第1表にあてはめてみると、液滴の附近の氷晶の昇華時の温度は大体 $-80\sim-90^{\circ}\text{C}$ の附近にあることがわかった。液滴の昇華はその後に始まるので、更にその中にある細胞からの乾燥が行なわれる時には、温度はもう少し高くなるものと想像される。

別に細胞自身の温度を推定してみた例がある。図版III-10に見られるように細胞の辺縁部から次第に透明化し中心部に恐らく氷晶と思われるdenseな部分を残す段階までの過程について、前と同様氷の昇華速度をもとめ、第1表にあてはめてみると、凡そ $-70^{\circ}\text{C}$ あたりに相当することがわかった。しかし細胞外に独立して存在する氷晶とちがい、細胞構造の内部にできた氷晶であるから、細胞膜その他の構造が脱水昇華の妨げとなっていることであろう。昇華がある程度抑制された状態でこのくらいであるとすれば、実際の温度は $-70^{\circ}\text{C}$ より高いことになるものと想像される。

このように細胞は周囲の氷の温度よりも高い温度で乾燥するものと思われる。それでも、通常実施される凍結乾燥で、氷の昇華が大体 $-20^{\circ}\text{C}$ 附近(試料容器を室温に露出した場合)で行なわれているのにくらべると、はるかに低い方かもしれない。電子顕微鏡体内での乾燥の時は、真空度は $10^{-4}\sim 10^{-5}$  mmHgで、試料の量は極めて少なく、短時間内に乾燥が終了するのに反し、我々が日常行なうロータリーポンプだけの凍結乾燥では、真空度 $10^{-2}\sim 10^{-3}$  mmHgで量は非常に多く乾燥に長時間を要するので、後者にくらべ前者はかなり低温で乾燥が行なわれていると想像してもよいであろう。

この乾燥過程での電子線の影響については、同じ試料の中の電子線に照射されずに乾燥された細胞をしらべてみればわかるわけである。冷却をやめて、ある程度試料温度を上げたまま

(試料支持台で  $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$ ) 照射を続けていると、1つの液滴の観察を終えて他の液滴に移る時には、その外の照射されない視野にある液滴はすべて乾燥してしまっていることが多い。このように電子線に照射されることなく乾燥した細胞も、照射されながら観察されていた細胞に比べて、乾燥直後(周囲の氷のなくなった瞬間)の所見に差のないところからみれば、乾燥過程での電子線の照射はあまり影響はないのかもしれない。

問題はむしろ乾燥後にみられる影響であろう。それには次のような検討を行なった。最初から全然電子線をあてないで、凍結乾燥した(方法は全く同様に)細胞は、周囲の氷晶が全部昇華してしまった後でも、その形態は殆んど変わらぬようである。但しこれは照射電流を極端に弱くしてみた場合で、もちろん映画の撮影はできないし、また細胞が dense で内部構造は見えない。これは、照射電流が弱いためにみえないのか、脱水の程度が少ないためにみえないのかはわからない。とにかく一夜試料室に入れて真空のまま放置し試料温度が室温にまで達しているところの乾燥充分と思われる細胞でも、ある程度以上強い電子線の照射を受けない限りは、外部形態は凍結時と変わらず内部構造は殆んどみえない。このような細胞に対し、対照の空気乾燥細胞では全然影響のないくらいな弱い電子線照射を行なっても、瞬時にして細胞は膨大し、それに伴って内部構造も見えてくる。このことは同一試料中の細胞を次々と照射してみるとよくわかることである。但しこの時にも、細くやせた細胞にはあまり膨化はみられず、円い形でいわゆる細胞内凍結を起したと思われる細胞に変化が大きくみられた。要するに、この変化は凍結乾燥が終了した後、電子線の照射によって生じたものであろうと思われる。ただ、電子線の照射によって、真空だけではとれなかった細胞水分が急激に奪われたためにおこる変化なのか、或いは温度や脱水とは無関係な電子線そのものの細胞構成成分に対する直接作用なのかは判断し難い。

この電子線の影響についての多少の吟味として、照射しない視野の凍結乾燥細胞を再び冷却し、holder の温度が  $-140^{\circ}\text{C}$  以下を示し明らかに細胞周囲に氷晶が再結晶したことを確認しておいて、電子線をあててみた。その結果は、氷晶はそのまま全然変わらないのに、細胞だけはやはり急激に膨大し内部が透明化するのをみとめた(図版 VIII-23)。このような事実からみても、細胞の変化は単に電子線の熱作用だけではないように思われた。

同じような検討をブドウ糖浮遊液についても試みた。この場合も、電子線の照射で網状構造及び時に細胞の急激な膨化をみとめた。しかし  $-140^{\circ}\text{C}$  以下に冷却すると、照射による変化を防ぐことができた。この点がブドウ糖のない場合との差違であるように思われる。

以上のような所見を個々の例で眺めている限りは、なかなかはっきりした変化としてはとらえにくい、これを総括してある程度まとめてみれば、次のように区分さるのではないかと思う。

#### 1. 対照(空気乾燥)

独特の形態を示し、電子線照射では容易に変化しない。

## 2. 凍結乾燥過程 (電子線照射のもとで凍結乾燥)

1) 周囲の氷晶が昇華した後も、ある限度までは原形のままで、辺縁円滑、内部 dense (図版 I-3, 4, II-5, 6)。もし細胞外凍結で収縮しているものならば最後まで変らない (図版 II-7)。

2) 周囲の氷晶の昇華後間もなく、或いは氷晶に包まれたまま (図版 III-9)、細胞表面に小さな膨隆がおこり (多分孔があくものと思われる)、周辺から内部に向って急速に透明化が進むその後細胞全体としてやや収縮する (図版 III-8, 9, 10, IV-12, 13)。

3) 周囲の氷晶の昇華直後に、急激に細胞の膨化がおこり、内部が透明化する、その後やや収縮する (図版 V-14, 15)。この場合は、2) のような外壁の孔らしきものは、余り見当らない。

4) 凍結時にすでに細胞に欠損があったと思われるものは、周囲の氷晶の昇華過程で、欠損部からの脱水があるらしく、その部分から透明化する (図版 VI-16, 17, 18)。

## 3. 凍結乾燥後 (乾燥過程には電子線を照射しない)

1) ごく弱い電子線照射のもとでは、2. の 1) と同様辺縁円滑、内部 dense な細胞がみられる (これが通常の凍結乾燥後の形態であろう)。他の観察と同程度の強さの電子線を照射すると、急速に細胞は膨大し内部は透明化する。その後やや収縮する (図版 VII-19, 20, VIII-21, 22)。凍結乾燥後、再び  $-100^{\circ}\text{C}$  以下に冷却しておいて、照射してもこの膨化はおこる (図版 VIII-23)。

2) 細胞外凍結をおこしたと思われるものは、乾燥後の照射で変化しない (図版 VIII-24)。

## 4. ブドウ糖浮遊液

ブドウ糖に包まれるため細胞の形態ははっきりしない。ブドウ糖は電子線照射で変化しやすいが、冷却するとその変化をおさえることができる。

## IV. 考 察

冷却装置を利用した電子顕微鏡による実験を開始してから満6年、改良途中の装置を使つての実験であり、且つ自分の研究室に電子顕微鏡の設備をもたない為、毎年東京まで出かけてはテストをくりかえしていた。その間装置の改善、実験方法の工夫など幾多の苦心を重ねてようやく今日その第1報を出すまでに至つたものである。

そもそもこの装置を用いて実験を試みた当初の意図には次の3つのねらいが含まれていた。その1つは、細胞を生のまま電子顕微鏡で観察することができないだろうかということであった。周知のように、電子顕微鏡の試料としての生物材料は、すべて乾燥されたもので、水分をもった生のままの姿をみることはできなかった。一方乾燥による細胞の変形については早くから注意が払われ、それを防ぐ為の手段として凍結乾燥法<sup>17)</sup>が利用されて、これが今日では細胞の生の形に近いものと考えられているが、真の意味の生の状態ではない。

本実験結果で示したように、乾燥の過程で、周囲の氷晶が昇華し細胞が露出した瞬間の、細胞からまだ脱水の始まらない時に、それ以上温度が上らないように固定できれば (下げすぎ

ると氷晶が再び凝結して観察の妨げになる), 水をもったままの細胞が観察できる筈である。しかし、その為にはもっと加速電圧の大きな電子顕微鏡を使用するか、形態のごく小さな細胞を試料に用いなければ、透過性が悪くて細胞の内部構造の観察は不可能であろう、また現在用いている凍結方法ではまだ冷却速度が十分に大きくないので、細胞内氷晶形成による細胞微細構造の破壊も考えられる。冷却速度を大きくして所謂 vitrification をおこさせるのが理想であろうけれど、昇華或いは観察の過程で温度が上って再結晶を起すおそれがあるのをどうして防ぐかが、また問題となってくる。

このようにして、果して細胞の映像がとらえられたとしても、かなりの厚みをもった立体構造の透過像にどれほどの意味づけができるかという疑問にも行きあたる。

とにかく現在まだこれらの問題が解決される段階には達していない。

第2の研究目標は、微生物の細胞内氷晶の有無を確認することにあつた。微生物自身が凍結するか否かについては、昔からいろいろな立場からの推論はあるが、細胞の大きな酵母<sup>14)</sup>などを除き、細菌についての確証はない。これはもちろん光学顕微鏡では観察できないからである。著者はこれを、鏡体内凍結乾燥で細胞周囲の氷晶がすっかり昇華した後に、細胞内の氷晶を電子廻折によって証明したいと考えた。しかし電子廻折像を撮影する間、細胞を凍結状態に固定しておくことの技術的困難さがまだ解決されていない。微細な温度調節に今一段の工夫を要するものと思っている。

かくして当初第3の目標に掲げていた細胞の凍結乾燥過程の観察が、他にさきがけて成しとげられる形となった。特に 16 mm 映画による直接撮影は、この乾燥過程の動的経過を分析的に考察する上に大きな役割を演ずるようになった。

今一度翻って考えてみるのに、電子顕微鏡による細胞の生の状態の観察については、これまでも多くの研究者が企図したところであろうと思う。Fernández-Morán も亦、著者と同様低温電子顕微鏡学の応用によって、乾燥しない生物試料の観察をねらっているようである。彼は冷却装置を用いて各種温度での見事な氷晶の写真を取り、既にこれを発表している<sup>18)</sup>が、生物試料については sandwich 法の報告がある<sup>19)</sup>のみである。その他生物試料についてのこの種の低温実験の報文には全然接しないので、本報告が、電子顕微鏡による細胞の凍結及び乾燥過程の観察の最初のものではないかと思う。

本文並びに写真で詳細に示したように、周囲の氷晶が昇華したばかりの時の酵母細胞は、多くは卵円形のスムーズな縁をもったもので、光学顕微鏡でみる生の細胞と同じ形態のものである。液体空气中に直接試料を投入するという凍結方法をとっており、冷却速度は相当大きいと推定されるので、他の多くの実験経験からおしても、このような凍結条件では、殆んど細胞が細胞内凍結を起すものと想像される。従って、乾燥後に見られる細胞内部構造の蜂窩状乃至は porous な形態は、恐らくこの凍結によってできた氷晶の抜けがらと見做してさしつかえないであろう。ただその孔の一つ一つが最初にできた氷晶の大きさ・形そのままであるかどうかは疑わしい。電子線照射の影響として細胞の膨化や収縮がみられるので、恐らくは乾燥後の多

少の変形が加わっているものと思う。

とにかく、この凍結実験を行なってみて、電子線によると思われる影響の意外に大きいのに驚く。くりかえし述べるように。対照の通常乾燥試料では全然変化を来さない程度の照射電流でも、いろいろの形態変化、例えば、比較的早い時期からみられる細胞周辺の小さな膨隆や噴出口、乾燥直後の僅かな収縮、更には乾燥細胞への照射による著明な膨化とその後の収縮など、がおきるとはどのように説明されるのであろうか。一般の乾燥の成績<sup>20)</sup>から推定すれば液状からの常温乾燥では概して細胞内の残存水分量は多いが、凍結乾燥したものでは残水量ははるかに少なくなる筈である。もしその事実が本実験のような試料にもあてはまるとすれば、対照の細胞より凍結乾燥細胞の方がよく乾いている筈なのに、電子線による影響が凍結乾燥細胞にだけ大きく現われるということは、単に水分の多寡だけでは解釈できない問題のようにも思われる。かりにいま水の問題として考えてみると、別の実験<sup>21)</sup>で求められた数値から、酵母細胞の全水分量を100%とすれば、その91%は $-70^{\circ}\text{C}$ までの冷却で凍結し、9%が不凍水分として残っている。 $10^{-2}\sim 10^{-3}\text{ mmHg}$ の真空度で行なった通常の凍結乾燥(約2 ccの酵母の蒸溜水浮遊液)では、乾燥量に対する残水率は1.5%前後である<sup>7)</sup>から、全水分量を100として約0.5%の水が残り、99.5%が乾いたことになる。つまり乾燥によって細胞外又は内の氷晶はもちろんのこと、細胞内の9%の不凍水分のうちの8.5%までが脱水されるわけで、更に電子線の照射によってももしその残りの0.5%の水が殆んどとられるとしても、それほど形態的に大きな変化のおきることが考えられるのであろうか。或いは水分量としては極めて微量であっても、細胞構成物質と結合して最も重要な役割をするものであるから、その脱水による変化はかなり大きなものになると考えたらよいか、今後の研究にまたねばならない。

このように電子線の影響については充分慎重な判断を下さねばならないが、それにしても周囲の氷晶の昇華後、やや間をおいて、細胞からの脱水に移り、細胞内の周辺部から次第に中心部に及ぶという経過は、凍結乾燥の本来の過程としてみとめてよいであろう。細胞からの脱水に移るまでの時間の長短は、その時の条件によってさまざまであるが、細胞内の氷晶又は不凍水分は細胞外に遊離している氷晶のように自由に飛びうるものではなく、細胞膜或いは細胞内部構造が細胞水分の奪失を抑制しているものと考えられる。

この点は、乾燥後の変化から考えれば、更によくわかるように思う。即ち、乾燥過程で既に細胞膜に大きな孔があいている場合(結果の項の最後の総括の中の2の2)に相当する場合)は最後の段階で更に温度が上って急激な脱水があったとしても(前述のように水分量だけからみれば、考えにくいことのようなではあるが)、細胞膜にそれ以上の障害を与えずに水はとり出される。しかし乾燥過程で細胞膜にあまり変化のない場合、電子線照射で急激に脱水されようとする、先ず膨化がおこり、その後で膜を通過して出るのではなかろうか。

それにしても、細胞外凍結によって収縮したと思われる細胞では、凍結乾燥による脱水の程度は、細胞内凍結のものより悪いと考えられるのに(つまり残存水分量は多いと思われる)、かえって照射による変化が現われなないということはどのように説明してよいか判断に苦しむ。

最後に、ブドウ糖やゼラチンを媒質として加えて乾燥した場合、乾燥過程で細胞間に網状構造のみられたのは当然であろうが、細胞自身にはあまり大きな変化がみられないことは、既に一般の凍結或いは凍結乾燥に於て蛋白乃至糖質の保護効果としてみとめられていることによるものであろうか、この場合の作用機転についても、細胞が乾燥後なお dense で内部構造がはっきりみえないのは、媒質が細胞周囲を包むため脱水されにくくするのか、電子線照射の影響を防禦するのか、或いは影響があっても僅かの変化ならば見え難くしているのか、この程度の観察では判然としない。媒質自身の電子線による変化として、泡立ちその他は確認されるが、細胞そのものについての変化は明らかでない。

従来、凍結乾燥の機構に関する実験では、比較的マクロな立場での観察が多かった。即ち細胞浮遊液であっても、その試料全体を1つの集合体として扱っていて、試料中の個々の細胞を目標にしていわゆる cell level で乾燥過程の追究を試みたものは殆んど皆無に近かった。著者は、緒言に於ても述べたように、いろいろの立場からの観察を行ない、それを総合して乾燥機構の本態を論じたいと企図しているものであって、従来のマクロな立場での検討にこの種のミクロな観察を織りまぜて、問題の解明をはかろうとしているものである。

## V. 結 論

試料冷却装置と 16 mm 映画撮影装置を利用して電子顕微鏡による酵母の凍結乾燥過程の動態観察を行なった。

試料として酵母浮遊液を用い、カーボン・コロジウム膜上に噴霧して液体空気急速に凍結させ、試料室に移して適宜に冷却しながら、乾燥過程を撮影した。

蒸溜水浮遊液の観察では、凍結した液滴が徐々に昇華して行くと、中に閉ぢこめられていた細胞が次第に現われてくる。周囲に接した氷晶がなくなると始めて細胞からの乾燥が始まり porous な内部構造がみえてくる。この時細胞全体としての膨化や収縮或いは辺縁にそっての小さな膨隆など、電子線の影響と思われる変化がおきる。

欠損のある細胞では乾燥とともに早期から昇華がおこって内部構造がよくみえてくる。

ブドウ糖溶液やゼラチン溶液での浮遊液では、乾燥によって細胞間に網状構造があらわれるが、乾燥過程や乾燥後の細胞の変化は著明ではない。

本実験を遂行するに当り、多年に亘って絶大な御援助をいただいた日本電子株式会社(旧日本電子光学研究所)の風戸健二社長、芦沼寛一電子顕微鏡部長始め社員の各位、特に初期の実験での及川三千雄氏、最近の実験での長浜自明氏の技術的助力に対し、衷心より謝意を捧げる。また初期に御援助いただいた日立製作所多賀工場の方々にも厚く感謝する。

## 文 献

- 1) Nei, T. 1961 Electron microscopic study of yeast cells subjected to freezing and drying: Cinematographic observations. *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 426-428.
- 2) 根井外喜男・田村浩一 1950 生物学的材料の凍結真空乾燥法. 第1報. 乾燥経過中の真空度と乾燥度及び温度の消長について. *北海道医誌*, **25**, 200-205.
- 3) 根井外喜男・中川 勇・森 玄治 1955 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. 含水量測定による乾燥過程の分析 (予報). *低温科学, 生物篇*, **13**, 59-65.
- 4) 千葉重雄 1957 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. II. *低温科学, 生物篇*, **15**, 76-94.
- 5) 千葉重雄・坂上康雄・桜田弘一 1958 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. III. *低温科学, 生物篇*, **16**, 129-138.
- 6) 根井外喜男・坂上康雄・桜田弘一・荒木 忠 1960 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. IV. 乾燥過程での試料中の部位による含水率と菌生残率との関係. *低温科学, 生物篇*, **18**, 83-89.
- 7) 根井外喜男・僧都 博・花房尙史・荒木 忠 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. VIII. 乾燥過程での試料中の部位による含水率と菌生残率との関係 (第2報). *低温科学, 生物篇*, **19**, 59-72.
- 8) 根井外喜男・浅田 実 1960 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. V. 薄片標本による形態的観察. *低温科学, 生物篇*, **18**, 91-98.
- 9) 根井外喜男・浅田 実 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. IX. 薄片標本による形態的観察 (第2報). *低温科学, 生物篇*, **19**, 73-78.
- 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) 根井外喜男・佐々木芳郎 1955 凍結乾燥菌体の電子顕微鏡像. *科学*, **25**, 86.
- 12) 根井外喜男・坂上榮治・坂上康雄・佐藤正一 1959 凍結融解又は凍結乾燥酵母菌体の電子顕微鏡的観察. *低温科学, 生物篇*, **17**, 63-69.
- 13) 渡辺 勝・岡崎伊喜夫・本庄五郎 1959 電子顕微鏡の試料加熱および冷却装置. *電子顕微鏡*, **8**, 88-90.
- 14) Takahashi, N., Ashinuma, K., Watanabe, M., Okazaki, I. and Nagahama, Y. 1960 Specimen tensile deformation device for the electron microscope. *J. Electron Microscopy*, **9**, 104-107.
- 15) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程 (第1報). *日本農芸化学会誌*, **28**, 91-94.
- 16) 荒木 忠・根井外喜男 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. VII. 凍結及び乾燥過程の試料温度の推移. *低温科学, 生物篇*, **19**, 43-47.
- 17) Williams, R. C. 1954 *The application of freeze-drying to electron microscopy. Biological Applications of Freezing and Drying*, 303-328, Academic Press.
- 18) Fernández-Morán, H. 1960 Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **85**, 689-713.
- 19) Fernández-Morán, H. 1960 The direct study of ice crystals and hydrated systems by low-temperature electron microscopy. Paper contr. to 18th Ann. Meeting of E. M. Soc. of America (Milwaukee), Aug.
- 20) 桜田弘一 1958 微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較. *低温科学, 生物篇*, **16**, 91-105.
- 21) 僧都 博・根井外喜男・尾藤方通 1961 微生物の水分とその凍結, 特に酵母並びに大腸菌の菌体水分量と生死の関係について. *低温科学, 生物篇*, **19**, 49-57.

### Résumé

The process of sublimation of the ice surrounding cells and the changing intracellular morphology were recorded by special cinematographic equipment incorporated in an electron microscope equipped for low-temperature work.

Yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*, suspended in distilled water or glucose solution, were sprayed on carbon-collodion film and rapidly frozen by immersion in liquid air. Then the specimen was transferred into the specimen chamber of the electron microscope and observed under cooling with special cooling device.

Frozen specimen contained particles with diameter of 20–50  $\mu$ , which were believed to be droplets of the yeast cell suspension, scattering throughout the field. Cells embedded in these particles can not be seen because of the opacity of the ice. As sublimation was promoted under temperature control and through the heating action of the electron beam, the cells became gradually visible and of recognizable contour. After sublimation of the ice surrounding the cell, the cell became transparent and the internal porous structure, quite different from that of the air-dried cell, was evident.

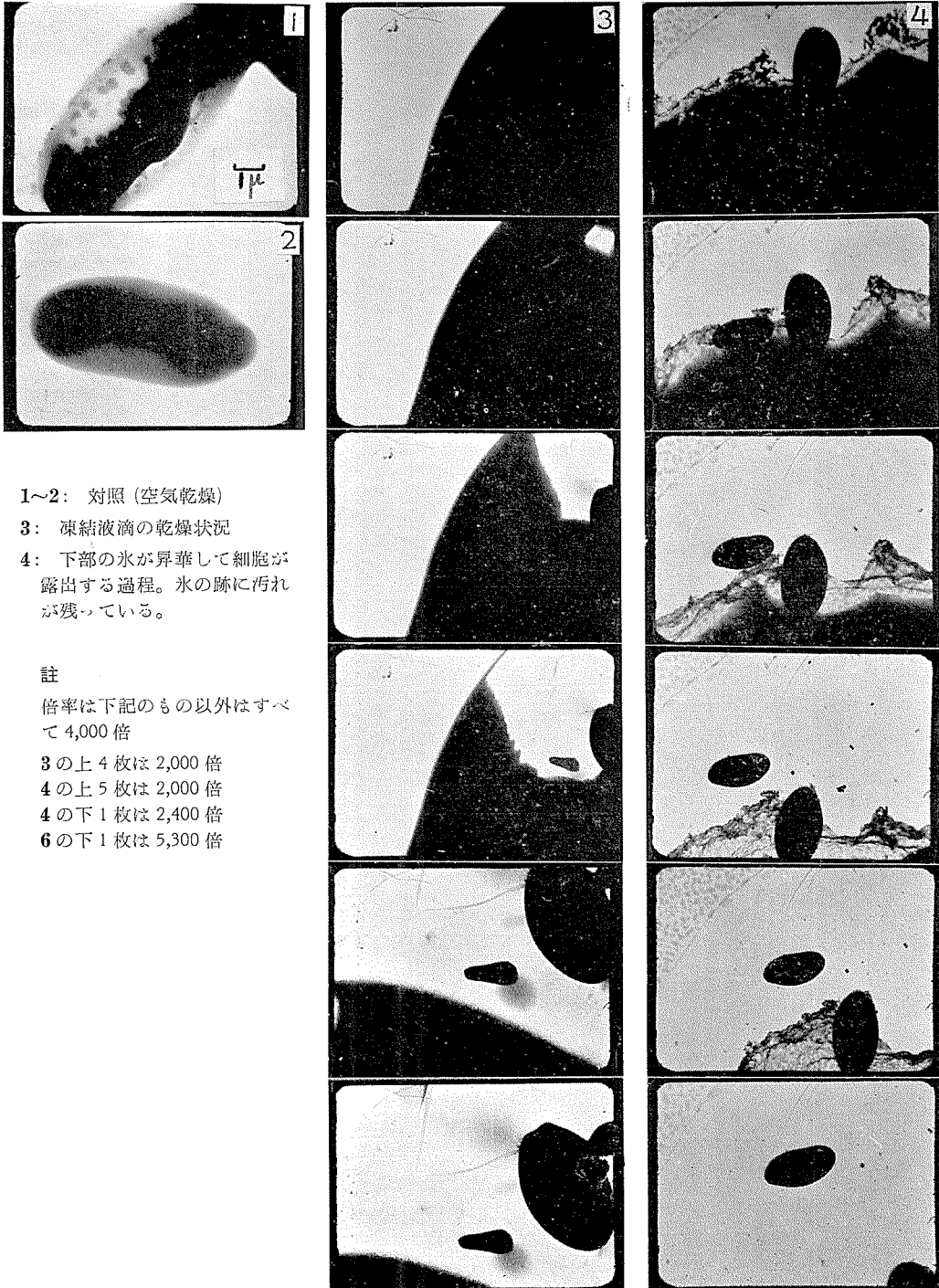
In some cases gross injury to the cell membrane was clearly evident. Such cells revealed their intracellular structure while still surrounded by ice.

It is postulated that intact cells dehydrate after sublimation of surrounding ice but that damaged cells lose water through defects in the cell wall with sublimation of the surrounding ice.

Some of the morphological changes observed after drying proved to be in part due to influence of the electron beam.

Most of the cells, suspended in glucose or gelatin solution, were still opaque after drying, showing no evidence of destruction of the cell wall. A fine network structure, due to a dried residue of glucose or gelatin, was observed in the intercellular spaces.





1~2: 対照 (空気乾燥)

3: 凍結液滴の乾燥状況

4: 下部の水が昇華して細胞が露出する過程。水の跡に汚れが残っている。

註

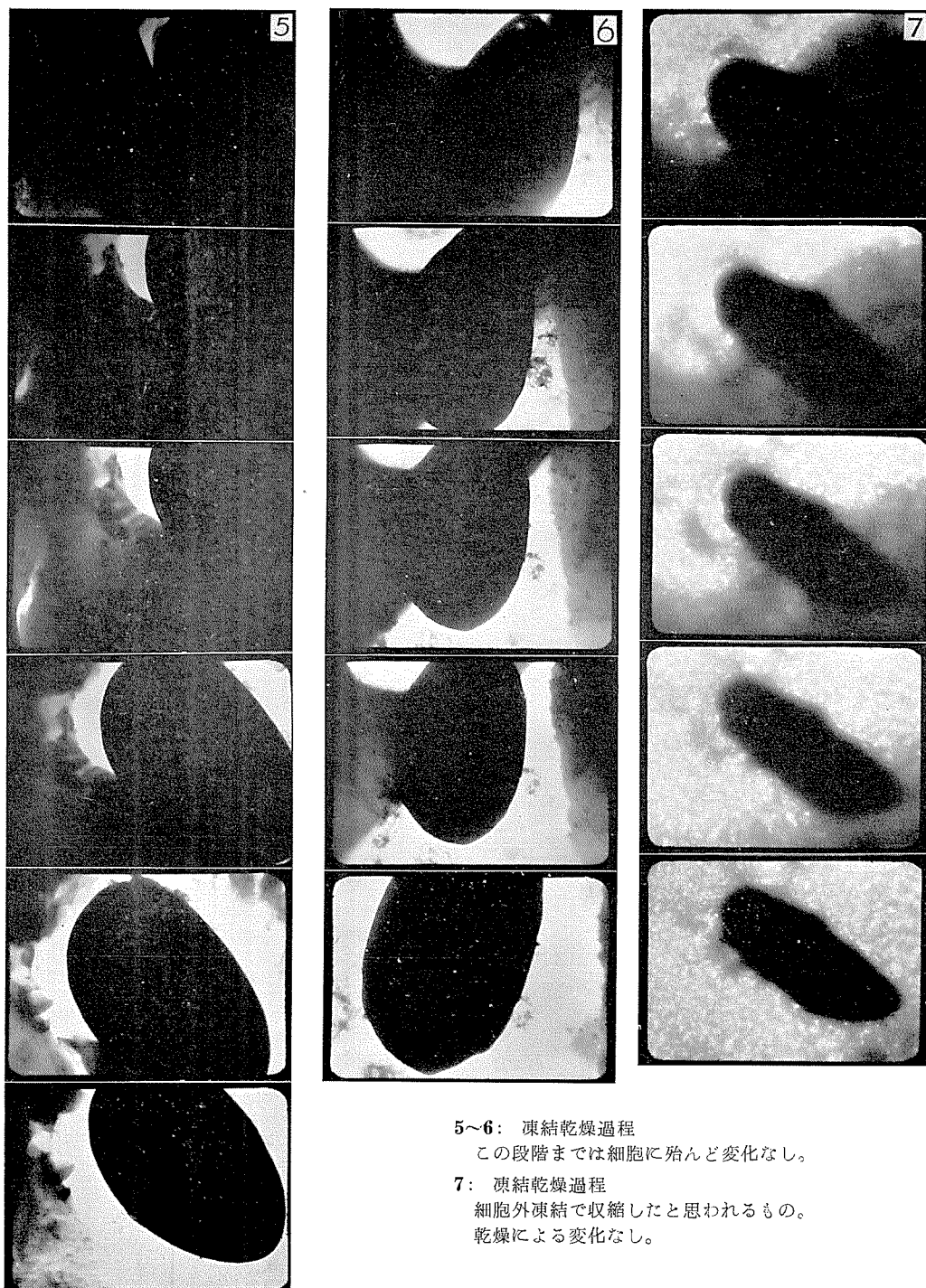
倍率は下記のもの以外はすべて4,000倍

3の上4枚は2,000倍

4の上5枚は2,000倍

4の下1枚は2,400倍

6の下1枚は5,300倍

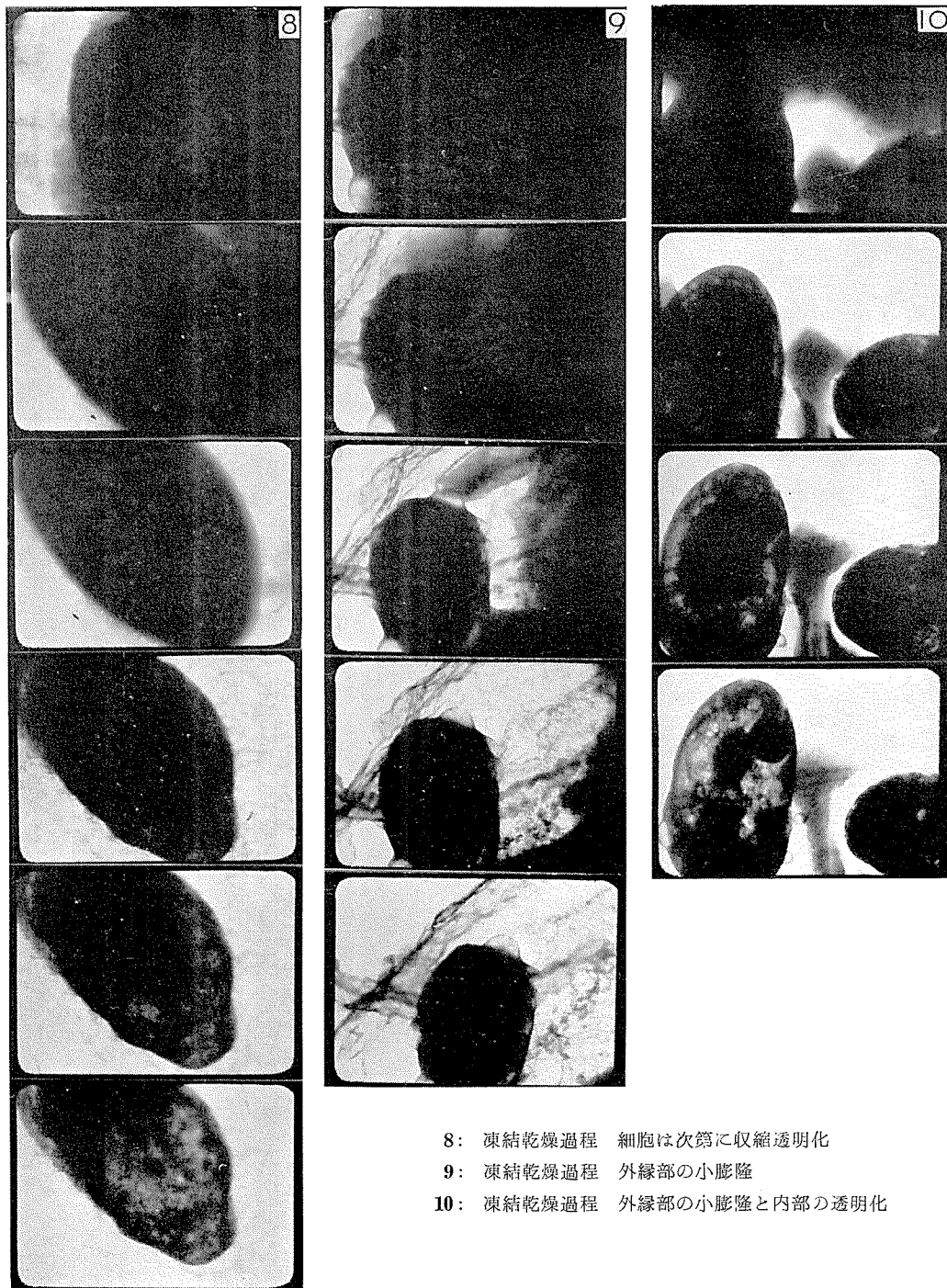


5~6: 凍結乾燥過程

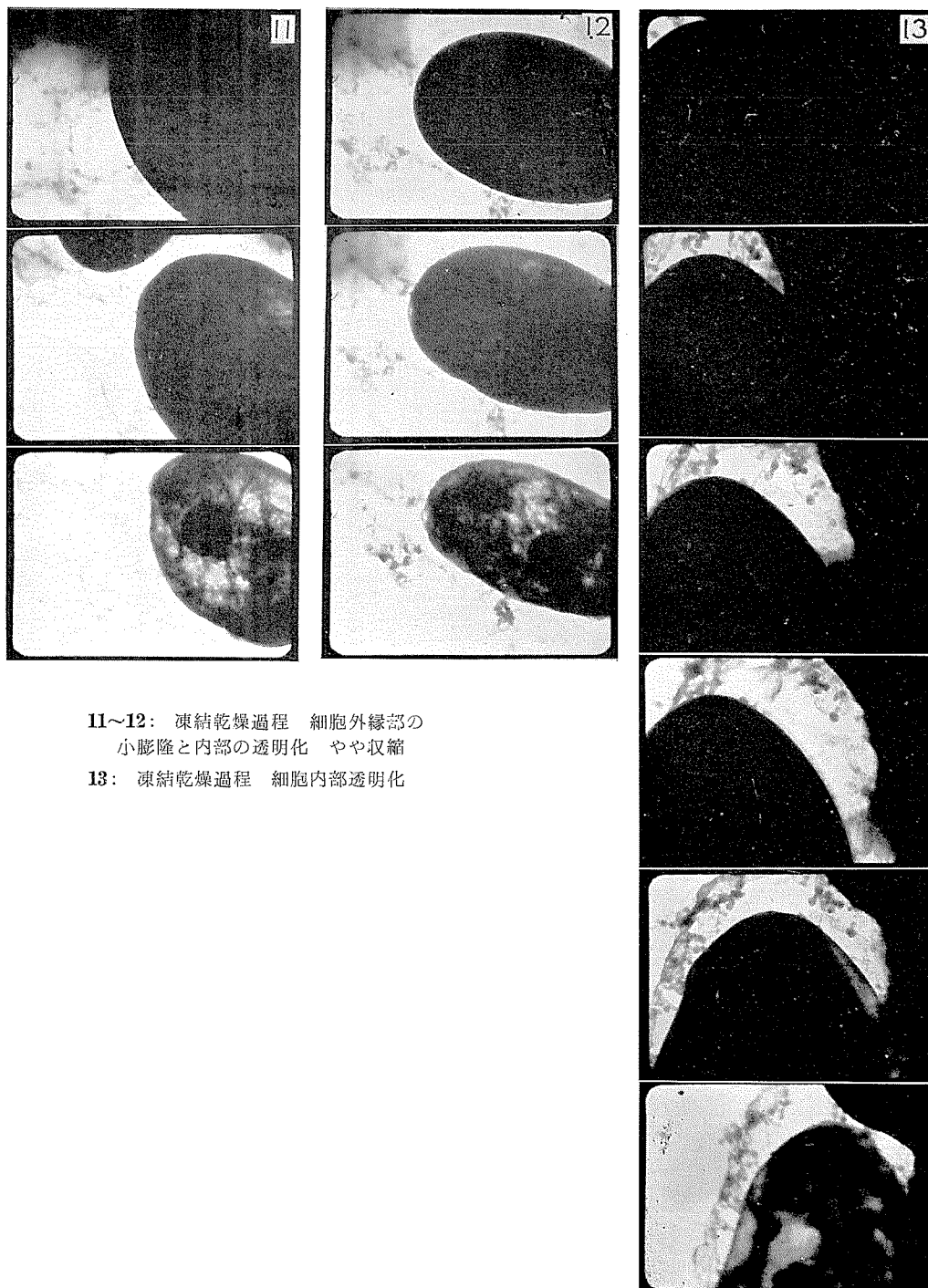
この段階までは細胞に殆んど変化なし。

7: 凍結乾燥過程

細胞外凍結で収縮したと思われるもの。  
乾燥による変化なし。

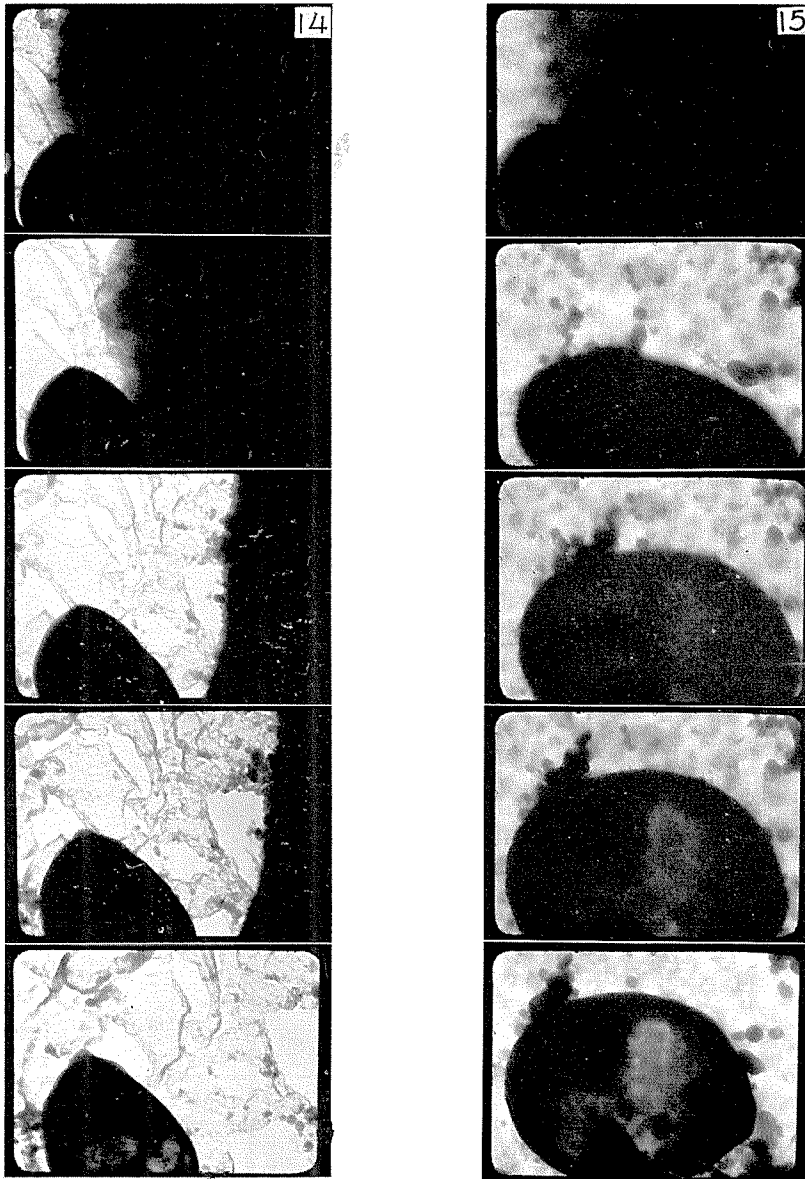


8: 凍結乾燥過程 細胞は次第に収縮透明化  
9: 凍結乾燥過程 外縁部の小膨隆  
10: 凍結乾燥過程 外縁部の小膨隆と内部の透明化



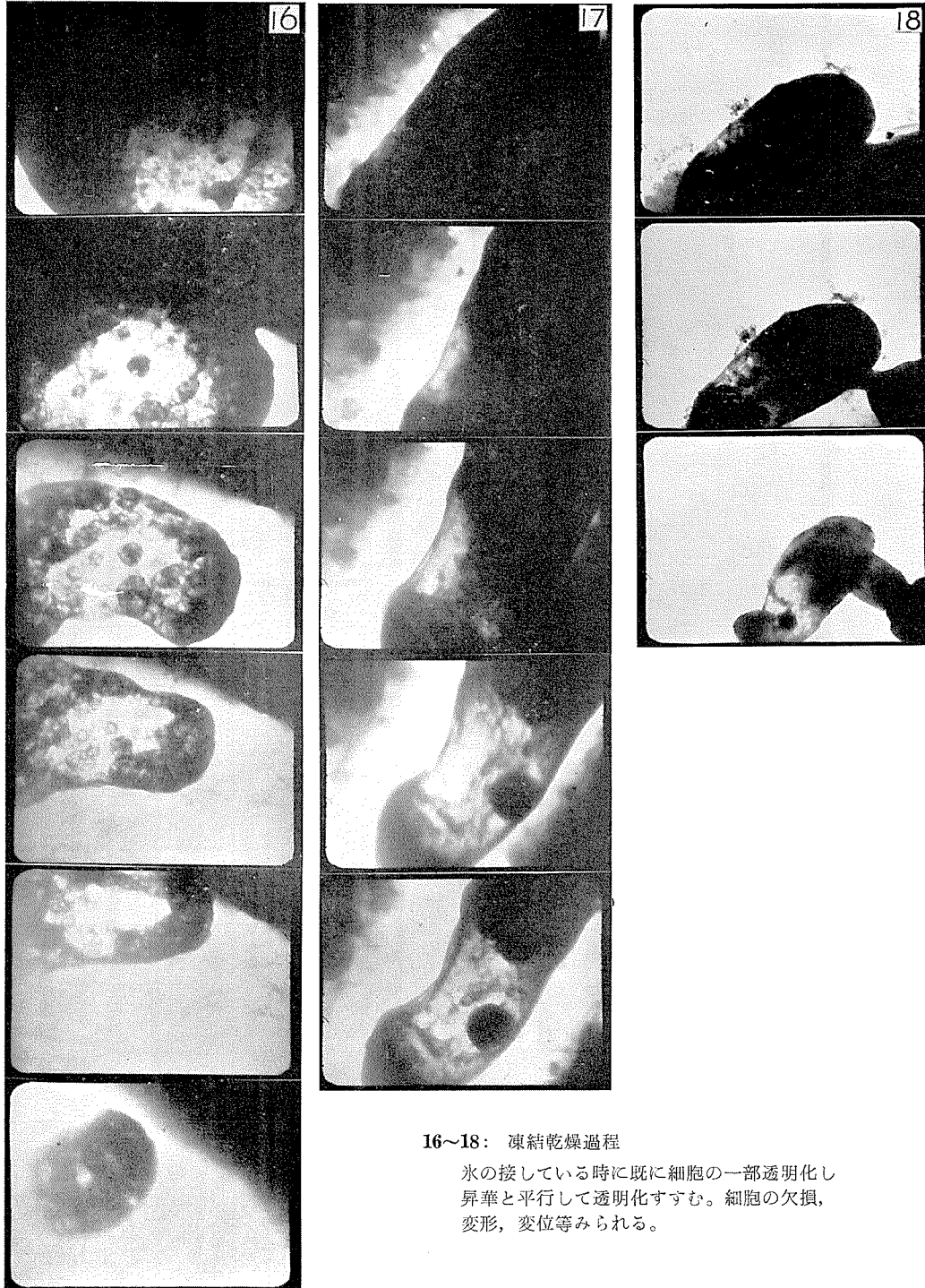
11~12: 凍結乾燥過程 細胞外縁部の  
小膨隆と内部の透明化 やや収縮

13: 凍結乾燥過程 細胞内部透明化



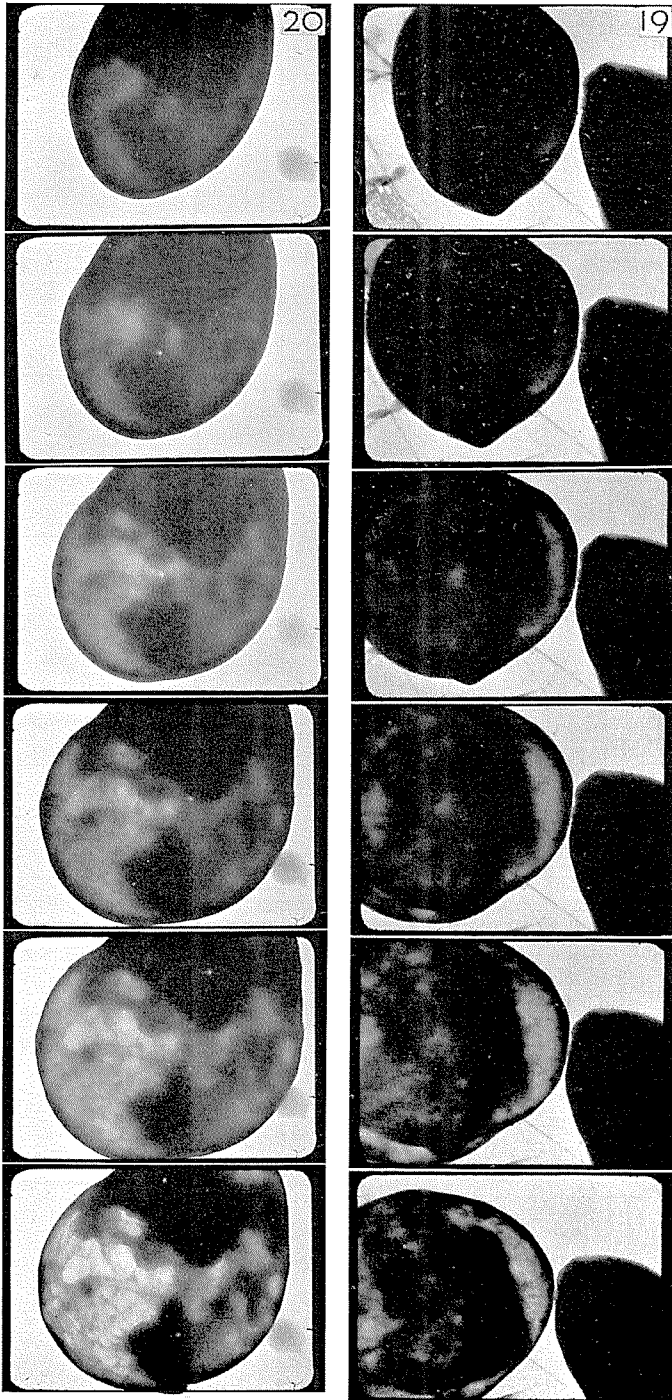
14: 凍結乾燥過程 細胞内部透明化

15: 凍結乾燥過程 細胞膨化, 透明化, 収縮



16~18: 凍結乾燥過程

氷の接している時に既に細胞の一部透明化し昇華と平行して透明化すすむ。細胞の欠損、変形、変位等みられる。



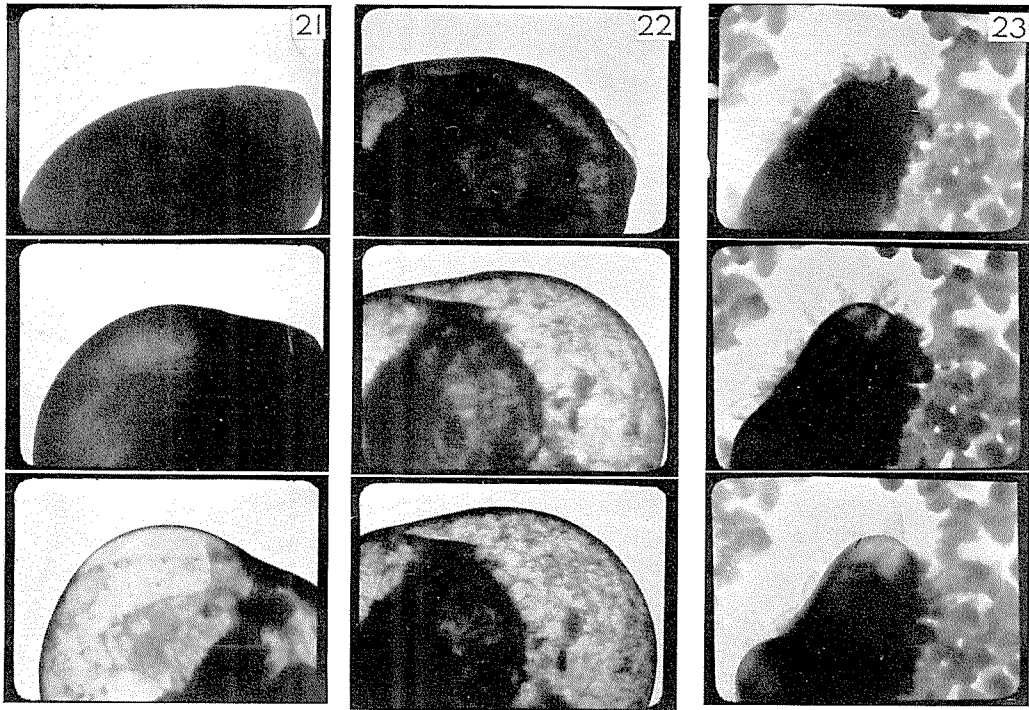
19~20 :

凍結乾燥後の電子線照射による変形。

細胞の膨化、透明化

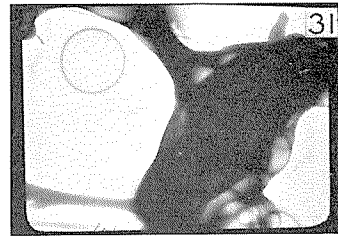
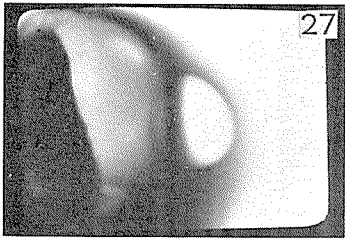
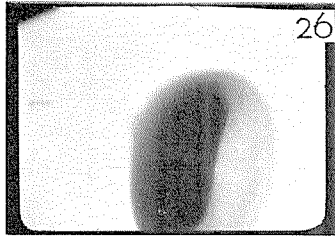
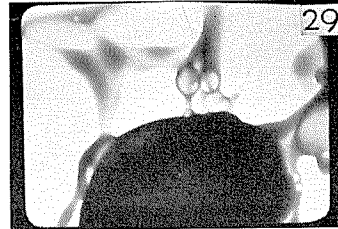
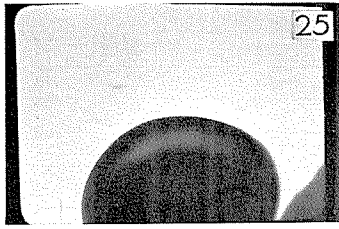
訂 正

図の 19 と 20 は左右入れちがい。

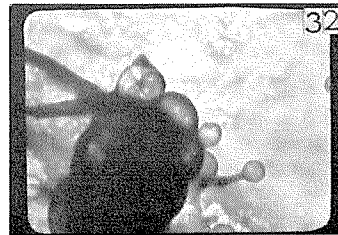


- 21~22: 凍結乾燥後の電子線照射による変化  
細胞の膨化, 透明化
- 23: 凍結乾燥後, 再び  $-140^{\circ}\text{C}$  まで冷却した  
ものに対する電子線照射の影響。周囲の氷  
晶は変わらないが, 細胞は膨化, 透明化
- 24: 凍結乾燥で収縮像を呈するものは電子線  
照射でも変化なし





25~27: ブドウ糖浮遊液  
対照 (空気乾燥)



28: ブドウ糖浮遊液の凍結乾燥  
過程

29~33: ブドウ糖浮遊液の凍結  
乾燥 乾燥後電子線照射した  
もの

