



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マリモ節間細胞の耐凍性 I
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 1-24
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17658
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p1-24.pdf



マリモ節間細胞の耐凍性 I*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 37 年 8 月受理)

I. 緒 言

水生藻類の耐凍性は多年性陸生植物に比べて一般に低いものと考えられており、その中でもアオミドロやフラスモのような淡水産のものでは海藻などに比べて非常に低く、凍結状態で生存できるものはほとんどないかのようにみられていた。著者は植物の耐凍性の機構について各種の植物細胞を材料として研究を進めてきたが、たまたま緑藻類のシオグサ科 *Cladophoraceae* に属するマリモを材料とする機会を得た。本種はその有名な原産地である阿寒湖において、比較的浅い湖岸でも越冬しており、毎冬かなりの低温にさらされる可能性がある。このことに着目して本種の耐凍性をしらべたところ、期待にたがわず自然状態の群体をなしているマリモは、恐らく -20°C より高い温度では一晚凍結されていてもほとんど致命的な被害をうけないですむと思われる結果を得た¹⁾。しかも、このような淡水産藻類としては例外的に高い耐凍性は、越冬中の樹木の細胞にみられるような多量の凍害防止物質(糖類等)の季節的な蓄積によるものではなく、主として本種の細胞特有の原形質の性質に由来するものと考えられる。その上、この性質には他の大部分の耐凍性植物でしられているような環境温度による変化がみとめられない。

このような点からみて植物細胞の耐凍性の機構を明らかにするうゑに、本種の細胞の研究から得られる知見は有力な手がかりを提供するものと思われる。本論文では、このような見地にたつて本種の細胞の耐凍性に連関する諸性質をのべ、同時に細胞の原形質に著しい影響をあたえられている無機塩類、糖類、多価アルコール類を作用させ、これによる細胞の耐凍性の変化からその機構を考察した。

この研究の始めより御懇篤な御指導を仰いだ青木廉教授、また終始有益な助言を賜わった朝比奈英三教授、並びに実験材料を御恵与下さった理学部山田幸男教授、阪井与志雄博士に深く感謝する。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 617 号

II. 材料及び方法

実験材料として淡水産藻類の一種であるマリモ *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz. の糸状体の節間細胞を用いた。マリモは、多核の細胞が一行にならびいわゆる糸状体をなしているが、その糸状体が分枝し、それが更に発達してあつい束状になり、終にはマット状または球状の形態をつくる特性をもっている^{2),3)}。マリモは構造が簡単で、細胞が大きく、その上組織がこわれにくく培養を続けることが比較的容易で、常時使用することができる。今回の実験に使用したマリモ*は新しい水道水の中に室温(約20°C)で保存した。培養中は珪藻類の繁殖することを防ぎ、マリモの細胞を健全に生育させるために時々水をかえた。マリモは直径40~80 μ 、長さ直径の10数倍の大きな節間細胞をもつが、この細胞が連なって枝状になっている糸状体を実験に使用した。

マリモ細胞の凍結過程の観察には、低温室内に、または-30°Cまで冷却できる特殊低温箱内に設置した顕微鏡を使用した。これらのばあいマリモ細胞は少量の媒液と共にシリコン油でおおって懸滴として観察した**。

細胞の生死の判定は、すべて1M平衡塩溶液を用いて、原形質分離の有無できめた。細胞の含水量の測定は、濾紙にて枝状体表面についている水分をできるだけぬぐい秤量後100°C、6時間の乾燥による減量から求めた。マリモ細胞の含水量は82.4%であった。

固定には低温固定法を用いた。すなわちマリモをカバーグラスにのせたまま種々の媒液と共にあらかじめ凍結しておき、この凍結温度と同じ温度に冷却した純エタノール・氷酢酸混合液(容積19:1)中に、そのカバーグラスごと急に投入し、更に4時間同じ温度に保って固定した⁴⁾。その後、室温の純エタノールにうつし、一晩放置脱水し、適宜染色し、顕微鏡観察を行った。

III. マリモ細胞の形態と生理学的性質

マリモの節間細胞は、直径40~80 μ 、長さ直径の10数倍という長い円筒形をしている。この細胞は約3 μ の厚さをもつ細胞膜におおわれ、その細胞内は網目状に密に配列したクロロプラストをもち、又多数の核とピレノイドとを含んでいる(図版I-1, 2, 3, II-4)。室温で1M平衡塩溶液を用いて細胞を原形質分離させると分離形は凹形となる(図版II-5)。

マリモ細胞の原形質分離の限界濃度は0.84~0.86 M (NaCl 等張)である。これは淡水産藻類の多くが約5気圧の滲透圧(約0.1 M NaCl 液に相当)をもっている⁵⁾ことと比べると非常に高い値である。また本種では低温で培養したばあいも高温で培養したばあいも、細胞の滲透濃度は不変であった¹⁾。それ故、この高滲透価は他の高等植物のような培養温度に関連した栄養物質の蓄積によるものではないと思われる。そこでマリモ細胞中の溶存成分を次にのべるよう

* 採集地、北海道阿寒湖。

** この方法の詳細は朝比奈('56)⁵⁾を参照されたい。

な方法で定量した結果、第1表のごとく無機イオンが滲透濃度の大部分を占めていることがわかった。

マリモ細胞は、淡水産のアミドロ⁷⁾やフラスモ⁸⁾のように、細胞が大きくないので単細胞から細胞液だけを集めることは困難である。そこでまずあらかじめマリモ糸状体の数グラムを脱イオン水で数回よく洗滌し、次に濾紙上にひろげて迅速に水分をとり秤量する。この材料から次の方法で細胞内溶存成分を得た。

1) コルベンに入れたマリモを熱風で約10分間乾燥する。次に脱イオン水を加えて乾燥マリモから溶解性物質を数時間溶出する。

2) 乳鉢にとったマリモに脱イオン水を入れ乳棒で十分にすりつぶし、溶解性物質を溶出する。

3) -35°C の低温で、1~2日間脱イオン水とともにマリモを凍結し(この温度では細胞は100%凍死する)、室温で融解後放置して溶解性物質を溶出するのをまつ。

4) 110°C 、6時間完全に加熱乾燥したマリモから脱イオン水をもって溶出する。

以上4方法とも、各3~4回溶出をくりかえしその合計量を第1表にあらわした。

K, Naの濃度の測定は、ランゲ式炎光光度計を使用し、糖の測定はアンスロン法により、分光光度計で測った。表から明らかなように、熱風乾燥や磨りつぶし法によると、他の方法にくらべて細胞成分の溶出は少ないことがわかる。熱風乾燥後の糸状体を顕微鏡で観察すると集団的に生存細胞がみられ、この方法で溶出させた試料を再び凍結法で凍結させ

第1表 種々な方法によるマリモ細胞液成分の比較 (Mol)

溶出方法	K	Na	糖
1. 乾燥	0.149	0.006	0.02
2. 磨りつぶし	0.170	0.008	—
3. 凍結	0.297	0.016	0.05
4. 加熱	0.296	0.038	0.05

(5, 6月定量)

たばあい、約同量の無機塩が溶出された。各法とも溶出液にはKが非常に多く含まれ、陽イオンの大部分をしめ、Naの濃度は非常に少ない。第1表からわかるように、糖の含有量は少なく、マリモ細胞の滲透圧の大部分は、イオン化した塩類、特にカリウム塩にもとづくものである。

IV. マリモ節間細胞の凍結

マリモ細胞の凍結の過程を顕微鏡下で観察した。本実験では -15°C の低温箱内の顕微鏡下に試料をセットすると、試料の温度は 0°C から -15°C まで約5分で冷えるが、いずれのばあいも -10°C 付近まで冷えたときにマリモを含む水滴の過冷却が自発的にやぶれて凍結がはじまった。マリモの周囲の水はほとんど瞬間的に凍ってしまうが、マリモ細胞の内部は凍らず、細胞外凍結の状態次第に外部の水によって細胞は脱水されていく。

細胞内部の形態は、凍結前の正常のものと大差はないが、細胞は少し縮小する(図版 III-6, 8)。この状態で -15°C に2時間おいてから、更に10分間で 0°C まで温ため融解させた。氷

の消失につれ細胞はすみやかに吸水して原形に復し、偽原形質分離のような現象は少しもみとめられなかった。この程度の冷却条件で凍死する細胞はほとんどないが、やや冷却速度が大きえばあいに、細胞が氷で包まれてしまった後、はっきりと二次的に細胞の周囲に再度氷の析出がみられ*、細胞は甚だ収縮することがあった(図版 III-7)。このようなばあいは、その細胞は必ず凍死をしていた。

植物細胞を凍らせるばあいに冷却速度が大きいと、細胞内凍結がおこることがよく知られているが⁵⁾、本実験の程度の冷却速度では、マリモ細胞に細胞内凍結をおこさせるのはひじょうに困難であり、次にのべる冷却速度を特に大きくしたばあいを除いては、今回の実験を通じてすべて細胞外凍結のみが観察された。したがってマリモは自然環境での冷却によって、細胞内に氷ができることはほとんどないと思われる。低温箱内の温度を -20°C としマリモの周囲の水をできるだけ少なくして、 -18°C まで過冷却させてから、媒液中に自発凍結**がおこったときに、初めて少数の細胞で細胞内凍結がおこった。凍結の様式は、細胞の一端から突然暗化がおこり、これが瞬間的に一細胞の全体にひろがる、いわゆるフラッシングである⁵⁾。細胞内は微小な氷晶でみだされるために突然乳濁したように暗化する。凍結細胞内の氷晶は、同じ温度に保たれていても次第に発達して大形になるので、暗化した細胞内部は時間と共に明るくなるのが常である。しかしマリモでは細胞内に濃緑色のクロロプラストが充満しているばあいが多いので、凍結時の瞬間的な暗化は識別できるが、その後の明るさの変化は、 -10°C 以上に温めない限りほとんどみとめにくい。また凍結の結果、細胞液から析出された溶存気体の気泡が氷粒の間にはさまって、はっきりとあらわれてくる(図版 IV-9)。細胞内凍結をおこした細胞は、融解後内部の構造がはっきりと崩壊している(図版 IV-10)。細胞内凍結後一旦融解させて、その内部構造が完全に崩壊したことを確認した細胞を再び冷却して凍らせたばあいでも、マリモでは甚だ細胞内凍結がおこりにくい。このようなすでに凍死しているマリモでも、媒液を 0°C 付近で凍らせた後 $4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 程度の冷却速度で冷却してゆくと死細胞は節部を除いて甚だしく収縮し、その周囲には細胞内部から引きだされた水の凍結による二次的な氷のサヤがはっきりと識別される(図版 IV-11)。多くの植物細胞では細胞膜(セルローズ膜)自身の氷の侵入を防ぐ能力はきわめて低く、いちど凍死して融解した細胞を再凍結させると氷は容易に死細胞の内部に侵入する⁵⁾。従ってマリモでは原形質膜ばかりでなく、細胞膜も氷に対する障壁として役立っているであろう。この藻類の細胞膜が特に厚い($3\sim 8\mu$)という事実もこの為の有効な要素の一つと考えられる。

次に著者の従来用いてきた低温固定の方法で凍結中の細胞を観察した⁴⁾。すなわち、カバーガラス上に水滴をおきその中に数本の枝状糸状体の細胞を封入して凍結させ、2時間後この状態のまま低温固定した。この方法でも少なくとも -20°C より高い凍結温度では直接観察と同じく凍結中の細胞は収縮はしているが、内部構造の変化はみとめられない¹⁾。

* しばしば -10°C 以下ではっきりおこった。

** Spontaneous freezing.

一方、細胞外凍結のままでも、 0°C で24時間以上たつと細胞には凍害があらわれる(照本未発表)。そのような細胞は、融解しても脱水収縮したまま凝固して、細胞膜と原形質が分離したいわゆる偽原形質分離の像をあらわすか、または融解した細胞のところどころに緑色を失った穴のようなすきまができる¹⁾。このように凍死したマリモ細胞の凝固像は、人為的に乾燥によっておこされた細胞原形質の凝固像と非常に異なる。人為的に乾燥された細胞のクロロプラストは、本来の網目状構造が完全に破壊されているが¹⁾凍死した細胞は、3~4週間後、クロロフィルを消失したあとも網目状のプラスチックの構造は、常温で長時間そのまま細胞内に存在する¹⁾。

マリモ細胞の群体が0.5~2gの小片をなしているばあいの耐凍性はほぼ -20°C 付近に限界を示し、凍結時間は2時間でも24時間でも生存率には差がない。しかし凍結時間が1日以上におよぶと、少なくとも -15°C 以下ではほぼ1週間以内に大きな凍害を受ける(照本未発表)。 -25°C 以下の凍結温度にもごく一部の細胞は耐えられる。球状のままのマリモを凍らせると -25°C または -30°C においてもある割合の細胞が生き残るがその原因の一つは冷却速度が小さいことにあるのであろう。

そこで後述するマリモの耐凍性に対する各種媒液の影響をしらべる実験ではすべてごく少量(数本)の糸状体を用い、凍結時間は2時間、凍結温度は原則として -15°C を採用した。この条件では純水(脱イオン水)を媒液としたばあい、凍死する細胞は皆無である。

V. 無機塩類の影響

マリモ細胞の原形質表層の状態を変化させると考えられる種々の陽イオン、陰イオンの耐凍性に及ぼす影響をたしかめた。

マリモは淡水産緑藻であるから、まず媒液としての各塩類溶液の有害濃度を知る必要がある。予め0.1Mから1Mまで段階的に濃度の異なる各塩溶液中に、数拾本のマリモ枝状糸状体細胞をつけ、暗黒で 20°C 、24時間放置後の細胞の生死の状態から、この限界濃度をきめた。耐凍性の実験には、同じように低張濃度から高張濃度までの各段階の溶液をつくり、数本の糸状体をこの液に10分つけた後、媒液とともにスライドグラス上において、カバーグラスをかけ、なるべく迅速に原形質分離の有無をしらべてから凍結させた。各媒液にマリモ糸状体細胞を投入してから、凍結するまでの時間は30分以内とした。凍結の方法は、マリモをのせたスライドグラスをそのまま -15°C の恒温箱中におき10分後未だ凍っていないばあい(高濃度の媒液を使用したばあい等)には、試料の一端に氷をふれて凍結せしめた。この際の凍結曲線は第1図に示したが、これによると冷却しはじめてから約15分で材料の温度は周囲の気温と等しくなることがわかる。 -15°C で2時間の凍結後、室温で融解し顕微鏡下で観察して細胞の凍死率を算定した。また主要ないくつかの塩類についてはそれを媒液として直接顕微鏡下に細胞の凍結過程を観察した。実験したイオンの種類は、陽イオン(塩酸塩)7種類、陰イオン12種類(Na塩8種類、Ca塩4種類)である。陽イオンの影響は、第3表に、陰イオンの影響につい

ては第7, 9表にその結果をあげた。

1. 陽イオンの影響

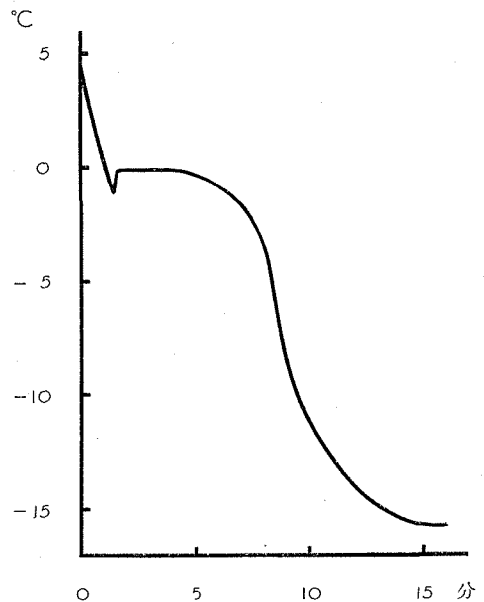
常温では, 1価のK, Na, LiはMgを除いた2価の陽イオンにくらべて低濃度(0.4~0.7 M)で害作用をあらわした。Ba, Sr, Caは1 M以内の濃度で24時間作用させても細胞への害作用は認められなかった(第2表)。

-15°Cで2時間凍死させると対照は凍害をうけないが, 塩溶液中で凍結させたばあいは耐凍性を低下させないものはCaイオンだけで, 1価のK, Na, Liと2価のBa, Mgは低濃度(0.1~0.3 M)ですでに凍害をあたえた(第3表)。Srは等張以上の濃度では凍害がないが低張になると凍害が大きい。次にこれらの単塩の害作用をへらすと考えられる平衡塩溶液(1 M NaCl 9容に2/3 M CaCl₂ 1容を加える)の影響をしらべた(第4表)。

この平衡塩溶液は1 M以下の濃度では20°C, 暗黒, 24時間の条件で無害であった。耐凍性に対する影響は, 低濃度ではNaより幾分凍害が少なく, 等張以上の高濃度になるにつれCaでの結果と同様にマリモが耐凍性を保持するのに役立つが, 0.3, 0.4 M付近では最も耐凍性がないという面白い結果になった。恐らくNaClによる凍害を防ぐためには相当多量*のCaCl₂が必要なであろう。次にCaCl₂または平衡塩溶液がマリモの耐凍性を対照以上に高める効果があるか否かをみるために更に低い温度で凍結させてみた。

第5表からわかるように, 平衡塩溶液は-20°C以下になると凍害が大きく, CaCl₂も対照以上に凍害を防ぐ効果はほとんどみられない。

上記の塩溶液のうち主要な数種のを媒液としたばあいの細胞の凍結過程のをべると, KCl: 媒液の凍結に引きつづき細胞は著しく脱水され, 不規則に扁平となり原形質は片側または長い細胞の中心線にそって縮小するが等張に近い0.8 M溶液中で凍らせても媒液の濃縮に伴う原形質分離は決しておこらない。細胞外凍結のまま-15°Cまでの冷却



第1図 スライドガラス上のマリモの凍結曲線
気温 -16°C, 媒液が水である場合。(7月の材料)

第2表 使用した塩類が細胞に致命的となる濃度(20°C, 暗黒, 24時間)

媒液の種類	有害限界濃度 (M)
KCl	0.4~0.5
NaCl	0.5~0.6
LiCl	0.6~0.7
BaCl ₂	*1.0<
SrCl ₂	*1.0<
MgCl ₂	*0.5~0.6
CaCl ₂	*1.0<

(4月の材料)

* 0.6 M以上の濃度では細胞は原形質分離した状態で生存する。

* 第4表によれば0.06 M/l以上

第3表 陽イオンの耐凍性に対する影響 -15°C, 2時間凍結後の生存率 (%)*

媒液の種類	濃 度 (M)										
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
KCl	100	100	100	30	0	0	0	0	0	0**	0
NaCl	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0**	0
LiCl	100	100	50	0	0	0	0	0	0	0**	0
BaCl ₂	100	30	0	0	0	0	0**	0	0	0	0
SrCl ₂	100	10	0	0	60	80	100**	100	100	100	100
MgCl ₂	100	0	0	0	0	0	20**	10	0	0	0
CaCl ₂	100	100	100	100	100	100	100**	100	100	100	100

* 細胞を融解後平衡塩溶液中で原形質分離させてきめた。すでに原形質分離しているものは、いちど低張液中で復帰させてから再度分離可能のものを生存とした。(4月の材料)

** 原形質分離限界濃度。

第4表 平衡塩溶液 (NaCl: CaCl₂ :: 9:1) の耐凍性に与える影響 -15°C, 2時間凍結後の生存率 (%)*

	濃 度 (M)										
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
平衡塩溶液 (NaCl等張として)	100	30	10	0	0	10	30	50	60	100**	100
NaCl	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0**	0
CaCl ₂	100	100	100	100	100	100	100**	100	100	100	100

*, ** 第3表と同じ。

(7月の材料)

第5表 CaCl₂ および平衡塩溶液の耐凍性に与える影響 各2時間凍結後の生存率 (%)

凍結温度	CaCl ₂ (M)						平衡塩溶液 (M)				
	対 照	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
-20°C	80~90	20	30	50	90	100	0	10	30	40	50
-25°C	20	0	0	10	30	60	0	0	0	0	0
-32°C	0~10	0	0	0	0	0					

(7月の材料)

では、こわれた原形質体から出たプラスチックが細胞膜に付着したような像がしばしばみられた(図版 V-12)。これを融かすとほとんどすべての細胞が凍死していた(図版 V-13)。はじめから細胞が原形質分離している高張液中での凍結では、原形質体は凍結後更に収縮するものもあるが、大部分はほとんどそのままの位置で凝固し、粗い顆粒状の構造があらわれる。またこのとき原形質分離像の凹形の部分はみられなくなり平坦になってしまう。

NaCl: 溶液の各濃度において KCl のばあいと全く同様であった(図版 V-14)。

MgCl₂: 媒液が凍結するとともに、原形質分離がおこるが、正常な凹形の分離像ではなく、原形質体の表面は不規則な凹凸を示していた(図版 VI-17)。これらの細胞は融解後少数のものは生存していた。

CaCl₂: 媒液の凍結とともに、細胞は原形質分離をおこす。分離形は凹形で、常温の平衡塩溶液中でおこすばあいとほとんどかわらない(図版 VII-18)。融解すると原形質体は直ちに凹形となり全く常態に復帰する。融解した細胞は全部生存していた。CaCl₂の濃度が特に低く0.1 M程度であると、マリモを水だけを媒液として凍らせたばあいと同様に、原形質分離をおこさないで程度収縮する(図版 VII-19)。しかし内部には明らかに変化はみとめられず融解すれば大部分の細胞は生存していた。

SrCl₂: CaCl₂のばあいとほとんど同様であるが凹形の分離はそれ程著しくない。しかし融かせば例外なく凸形にかわりすぐ復帰して凍死するものは少ない。

平衡塩溶液(NaCl:CaCl₂::9:1): 等張に近い高濃度の液中では凍結と同時に原形質分離をおこす。原形質体の表面はかなり平滑であるが、CaCl₂単液のばあいのようなはっきりした凹形は少ない。0.5 M液中でははじめ凹形であるが、間もなく凸形に近づき、とかすとほとんどが凍死する(図版 VII-20)。0.4 M以下の低張液中では、凍らせて-15°Cまで冷却しても原形質分離は全くおこらず、NaCl単液中で凍らせたときのような形態となって凍死する(図版 VII-21)。

第6表 使用した塩類が細胞に致命的となる濃度(20°C, 暗黒, 24時間)

媒液の種類	有害限界濃度(M)
NaCl	0.5 ~ 0.6
NaJ	0.2 ~ 0.3
NaBr	0.4 ~ 0.5
NaSCN	0.3 ~ 0.4
Na ₂ SO ₄	0.1 ~ 0.2
NaNO ₃	0.3 ~ 0.4
Na-Tartarate	0.05 ~ 0.06
Na-Acetate	0.3 ~ 0.4

2. 陰イオンの影響

Na塩溶液を使用したばあい、陰イオンの害

(4月の材料)

第7表 陰イオン(Na塩)がマリモ細胞の耐凍性に与える影響(-15°C, 2時間凍結)

媒液の種類	濃 度 (M)										
	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
NaCl	100	100	100	100	80	30	0	0	0	0	0
NaJ	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaBr	100	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaSCN	100	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Na ₂ SO ₄	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaNO ₃	100	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Na-Tartarate	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Na-Acetate	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(4月の材料)

は、陽イオンに比べると低濃度であらわれ、Tartarate, SO_4 , J が特に低濃度でマリモ細胞に害作用を与えた。Cl は他のものにくらべて高濃度ではじめて有害となった(第6表)。

媒液中の陰イオンがマリモ細胞の耐凍性に与える影響は、第7表にあげた。使用した8種のNa塩のうち、NaClでは細胞は0.06 M以上の媒液中で凍死し、他のイオンでは0.01 M付近に凍害の限界があるが、正確に凍害の程度を各イオンについて比較することはむずかしい。

次にCa塩についてみると、J, Brイオンは NO_3 , Clイオンにくらべて、常温での害作用が幾分大きい、Na塩に比較すると非常にすくない(第8表)。

細胞の耐凍性に対する影響は $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ では0.2~0.3 Mで凍害がいちぢるしいが、 CaCl_2 , CaBr_2 の2種類ではほとんど対照とかわらない。 CaJ_2 のみは0.1 Mの低濃度でさえ、全部のマリモ細胞を凍死させた。

第8表 使用した塩類が細胞に致命的となる濃度(20°C, 暗黒, 24時間)

媒液の種類	有害限界濃度
CaCl_2	1.0<
CaJ_2	0.7~0.8
CaBr_2	0.8~0.9
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.9~1.0

(4月の材料)

第9表 陰イオン(Ca塩)がマリモ細胞の耐凍性に与える影響
-15°C, 2時間凍結後の生存率(%)

媒液の種類	濃 度 (M)										
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
CaCl_2	100	100	100	100	100	100	100**	100	100	100	100
CaJ_2	100	0	0	0	0	0	0	0**	0	0	0
CaBr_2	100	100	50	100	100	80	100	100**	100	100	100
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	100	50	30	30	100	100	100	100**	100	100	100

*, ** 第3表と同じ。

(4月の材料)

Ca塩溶液中では、このようにマリモ細胞の耐凍性が高いが-32°Cで2時間凍結させると、何れの塩をつかっても生存するものは皆無であった。第5表で CaCl_2 のばあいを示したように、純水中での凍結に比べてCa塩が更にマリモ細胞の耐凍性を高める効果は、たとえあるとしてもきわめて僅かであると思われる。

次に以上の溶液のうち特に凍害の大きかったNaJおよび CaJ_2 を媒液として凍らせたばあいの細胞の凍結過程をのべると、

NaJ: 0.5 M 溶液中で凍結させると細胞は原形質分離せずに縮小し、細胞のまわりには細胞からとられた水によって生じた二次的な氷晶がみとめられるばあいが多い(図版VI-15)。融解後1.5 M 平衡塩溶液で原形質分離させると、原形質体は一旦縮小するものもあるが、縮小した偽原形質分離の形状で凝固する。凍結中に縮小したままですでに死んでいたものも少なくない。

CaJ_2 : 0.5 M 溶液中で凍結させると直ちに原形質分離をおこす。しかし原形質体の表面は

不規則に凹凸している(図版 VI-16)。融解するとすべて死んでおり、細胞質のところどころには穴があいたような明暗がみえる。

以上、塩溶液中での結果をまとめてみると、1 個の塩溶液中で凍らせると、何れのばあいも原形質分離をおこさないで、そのままの形で細胞外凍結が進行し、細胞の原形質は相当に脱水されて後、不可逆的に凝固するようにみえる。一方 2 個の塩溶液中で凍らせると、媒液の濃縮に伴い細胞は一般に原形質分離をおこす。分離形が凹形のばあい、または凹凸があっても原形質体の表面が比較的平滑になったばあいは、ほとんど凍害がない。しかし分離した原形質体の表面に不規則なこまかい凹凸が多いものほど凍害は大きくなるよらにみえる。これらの結果は陰イオン、陽イオンの種類にかかわらず共通におこるようにみえる。

また、塩の種類を問わず、濃度がうすいと凍結した細胞の形は純水中で凍らせたばあいに近づき、溶質による害もまた少ない。1 個の塩は何れも高濃度ほど害が大きく、一方 2 個の塩はうすい濃度において害が大きく、等張に近い濃度では害が少なくなる傾向が明らかである。

VI. 糖 類 の 影 響

生物細胞が、凍結融解中に受ける傷害を防ぐために、糖類が役立つばあいがあることが知られている。ここでは蔗糖、ブドウ糖を媒液として、マリモ細胞を凍らせた結果をのべる。

まず蔗糖溶液を媒液として細胞を凍結させると、無処理のものにくらべて非常に抵抗性が低下した。1 M 蔗糖溶液を用いたばあいでは、 -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った⁹⁾。なお、蔗糖溶液中での原形質分離の限界濃度は 1.20~1.22 M である。前報⁹⁾でのべたように 1 M 以下の濃度において媒液中の蔗糖は、濃度が高い程細胞の凍害を高めることがわかっている。1 M 蔗糖中で -5°C 凍結のばあい、低温固定像をみると原形質が収縮した状態で生存していた⁹⁾。更に 1 M 以上の高濃度で 2 時間凍結させてみたが、凍結温度が -10°C でも -15°C でも例外なくすべての細胞が凍死した。

このように蔗糖溶液を媒液としたばあい、マリモの耐凍性は 1 M 以上の高濃度でほとんど失われ、凍結の際の原形質分離の有無に関係なく凍死した。1 M 以上の高濃度のばあい、室温での蔗糖媒液の有害作用は第 10 表に示した。

これでわかるように媒液が 1.6 M 以上になると糖の害ははっきりあらわれてくる。2M 付

第 10 表 高濃度蔗糖溶液の有害濃度 生存率 (%) (20°C, 暗黒状態)

処 理 時 間	濃 度 (M)					
	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
原形質分離の有無	—	±	+	+	+	+
1 時 間 後	100	100	100	50	30	10~0
24 時 間 後	100	100	90	50	30	0

(6月の材料)

近ではほとんど10分以内にはげしい原形質の崩壊がみられる。すなわちマリモ節間細胞を2Mの蔗糖溶液に入れると、瞬時に細長い円筒形の細胞の中央部がひらたくつぶされたようになり、この部分で急激な原形質の流動がおこる。クロロプラストは一方側に流れ、間もなく中央部に原形質のない部分が出来るためリング状にみえてくる。このばあい、ヨードヨードカリ溶液に染るピレノイドが明瞭に裸出してくるのがみられる。その後、原形質体は徐々に収縮をはじめ、原形質は細胞膜からはなれ原形質分離をおこす。約10分後の細胞の状態は長い細胞の節に近い両端付近では常態に似た原形質分離をおこしているが中央部では細胞膜が相接する程に扁平となり、この扁平につぶされた円筒の内部で両側または片側に原形質体はおしつけられた状態ですでに崩壊をおこしている(図版 VIII-22, 23, 24)。

マリモ細胞の蔗糖溶液による凍害は、植物細胞としては例のないはげしいものである。そこで媒液中に無機塩があれば或いは糖による凍害を軽減できるかも知れないと考えて、1M蔗糖液にそれぞれ等張のNaClまたはCaCl₂を等量または9:1の割合に加えた糖・塩混合液中でマリモ細胞を凍らしてみた。しかしその結果は第11表に示すように糖液のみで凍結させたばあいの間に差を見出すことはできなかった。

蔗糖のかわりにブドウ糖溶液をマリモ細胞の媒液として凍結させた結果は、第12表及び

第11表 蔗糖と塩の混合液を媒液としたばあいのマリモ細胞の耐凍性
-15°C, 2時間凍結後の生存率 (%)

糖液と塩溶液との混合比	1 M 蔗糖 + 1/2 M NaCl	1 M 蔗糖 + 1/3 M CaCl ₂	1/2 M 蔗糖	1 M 蔗糖
9 : 1	0	0	10~20	0
1 : 1	0~10	10		

(8月の材料)

第12表 1Mブドウ糖溶液を媒液としたばあいのマリモ細胞の耐凍性
2時間凍結後の生存率 (%)

凍結温度	-5°C	-10°C	-15°C	-20°C
生存率	100	50	10	0

(7月の材料)

第13表 ブドウ糖媒液の濃度とマリモ細胞の耐凍性
-15°C, 2時間凍結後の生存率 (%)

濃度	脱イオン水	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0 M
生存率	100	60	50	50	20	10

(7月の材料)

第 13 表に示した。濃度 1 M では蔗糖のばあいより害が少なく、それより低濃度では大きな差はなかった。

ブドウ糖液中でのマリモ細胞の原形質分離限界濃度は 1.40~1.42 M である。ブドウ糖液の毒性は、上記蔗糖のばあいよりもはるかに低く、常温では少なくとも 2 M 溶液中で 2 時間以内には細胞の異常はみとめられなかった。2.4 M 溶液中では、一部の細胞が 2 M 蔗糖液中で示したと同じ現象をあらわした。

次に、さきに蔗糖のばあいに行なったようにブドウ糖溶液と塩溶液との混合液中で、マリモ細胞を凍らせてみたところ、蔗糖のばあいと異り塩の存在は明らかにブドウ糖液による凍害を軽減させた(第 14 表)。

第 14 表 ブドウ糖と塩の混合液を媒液としたばあいの細胞の耐凍性
2 時間凍結後の生存率 (%)

凍 結 温 度	1 M ブドウ糖 : 1/2 M NaCl		1 M ブドウ糖 : 1/3 M CaCl ₂		1/2 M ブドウ糖のみ	1 M ブドウ糖のみ
	1 : 1	9 : 1	1 : 1	9 : 1		
-15°C	80	50	90	60~70	50	10
-20°C	10	0	10	10	0	0

(8 月の材料)

1 M ブドウ糖液を媒液としたばあいの凍結過程を観察すると、凍結と同時に細胞は甚しく脱水されて細くなり、節間細胞の中央部で、もとの太さの 1/3 位になるが原形質分離は全くおこらなかった。これを融解すると原形質は、しなびたままで凝固し、一部の細胞は偽原形質分離をおこした。1 M 蔗糖液を媒液としたばあいも全く同様な細胞の凍結過程がみられた。すなわち糖液中ではかなり等張に近い濃度の溶液を用いても、2 価の塩の溶液のばあいにみられたような凍結に際しての媒液の濃縮による原形質分離はみられず、またたとえ原形質分離した状態で凍らせても細胞は必ずそのまま凝固してしまつた。ブドウ糖と CaCl₂ の混合溶液中で細胞を凍結させると、糖だけのばあいのようなはげしい細胞の収縮はおこらず、部分的には原形質分離もみられた。

VII. 多価アルコールの影響

Glycerol, Ethylene glycol などは、生物細胞にとって最も無害で、有効な凍害防止剤とされているので、マリモ細胞についても 6 種類の多価アルコールについて、その耐凍性に及ぼす影響をしらべた。

1. Glycerol

Glycerol は、蔗糖と同じくマリモの細胞内へ透過しない。Glycerol 溶液中における原形質分離の限界濃度は 1.44~1.46 M である。1 M Glycerol を媒液として、マリモ細胞を種々の温度で凍結させると、-15°C までは、ほとんど凍害をおこさないが、それより低温では明らかに凍害を受けた⁹⁾。一方この細胞は、水道水中で -20°C、24 時間の凍結でほとんど害されないこ

第15表 媒液としての Glycerol 濃度と細胞の耐凍性
-20°C, 2時間凍結後の生存率 (%)

濃 度	脱イオン水	0.2 M	0.5 M	1.0 M	1.2 M	1.4 M	1.6 M	1.8 M	2.0 M
生 存 率	80~90	50~60	40~50	20~30	0	0	30	50	50

(6月の材料)

とはすでに述べた通りである。次に媒液中の Glycerol の濃度によって如何に耐凍性が変わるかをしらべた(第15表)。

第15表の結果で興味のあることは1.6~2 Mのばあい以外、つまり1.4 M以下では Glycerol が媒液中に増加すればするほど、細胞の耐凍性が低下してくることである。このばあいの低温固定像は、ほとんど凍害のおこらない-11°Cの凍害で、すでに著しい原形質分離をあらわしている⁹⁾。しかし、凍死をおこした-19°C以下の温度での低温固定像の原形質体の大きさは、-11°Cの凍結のばあいよりかなり小さい。恐らく脱水の程度が高いため原形質の凝固をおこしたものと考えられる。

凍結中の細胞の観察の結果も全く同様であって、1 M以上の濃度の溶液中で凍らせると、凍結と同時に細胞は明瞭な凸形原形質分離をおこし、その表面はかなり平滑に見えるが(図版IX-25)、1.2 M Glycerol 溶液中で-19°C, 30分の凍結後ではすべての細胞が死んでいた。

このように Glycerol によって凍害が大きくなる原因の一つは、この物質が高濃度になると毒性をあらわすことが考えられるので、常温で高濃度溶液中にマリモ細胞をつけてみた(第16表)。

ここに示すように細胞は1.6 M以上の高張溶液中に常温で1時間おかれると生存率が50%以下に低下した。

一方、耐凍性は媒液の Glycerol の濃度が高くなるほど低下するが、凍結以前にすでに原形質分離がおこっている1.6~2 Mの液中の細胞は、凍結融解後約30~50%生存することができた(第15表)。

第16表 高濃度 Glycerol 溶液の有害濃度
生存率 (%) (20°C, 暗黒状態)

処 理 時 間	濃 度 (M)					
	1.0 M	1.2 M	1.4 M	1.6 M*	1.8 M	2.0 M
1 時 間	100	100	100	50	30	20
24 時 間	100	80	70	20	0	0

* 原形質分離の限界濃度

(6月の材料)

蔗糖, ブドウ糖, Glycerol の三者は共に非電解質であるが, すでにのべたように, マリモ細胞をこれらの溶液につけて原形質分離させるばあい, その限界濃度には明瞭な差がある (第17表)。

このような事実を説明するには現在の資料では不十分であるが, おそらくこれら3種の物質の有害作用によるのであろう。このうちの糖類をくらべると低濃度ですでに有害となる蔗糖の方が原形質分離も低濃度でおこっている。それ故これらの物質の溶液の作用で, マリモ細胞の原形質表層部に原形質分離の難易に影響するような何等かの変化がおこっていることが考えられる。

第17表 3種の非電解質の有害性とその溶液中での原形質分離濃度

種 類	常温1時間処理		原形質分離 限界濃度
	無 害	有 害 (生存率50%以下)	
蔗 糖	1.4 M	1.6 M	1.20~1.22 M
ブ ド ウ 糖	1.8 M	2.0 M	1.40~1.42 M
Glycerol	1.4 M	1.6 M	1.44~1.46 M

(6月の材料)

2. Ethylene glycol 及びその他の多価アルコール

Ethylene glycol は, 蔗糖や Glycerol と異なり, マリモ細胞へすみやかに透過する。高張 Ethylene glycol の中にマリモ細胞を入れると, 細胞は一旦原形質分離をおこすが, 細胞は原形質復帰しもとの状態にもどる。これは Ethylene glycol が細胞内へ透過するためと考えられる。植物細胞に対して, 一般に Ethylene glycol は耐凍性を高める効果をもつが, マリモ細胞の耐凍性を高めるのに最も効果的な濃度は, 2~3 M 程度で24時間凍結の結果も同じ傾向であった⁹⁾。

2 M Ethylene glycol を媒液としたばあいの細胞の凍結過程を顕微鏡下で観察すると凍結と同時に大部分の細胞は原形質分離をおこす。分離形は明瞭な凹形で, 常温の平衡塩溶液中での分離形とほとんど差がない。細胞膜から分離した原形質表面はなめらかで不規則な凹凸はみられなかった (図版 IX-27)。

第18表 多価アルコールの有害濃度
20°C, 暗黒状態, 24時間後の生存率(%)

多価アルコールの種類	濃 度 (M)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ethylene glycol	100	100	100	100	100	50	0	0	0	0	0
Propylene glycol	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Diethylene glycol	100	100	100	0	0	0	—	—	—	—	—
Triethylene glycol	100	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Polyethylene glycol	100	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(3月の材料)

次に種々の多価アルコールを種々の濃度 (1~10 M) で、室温でマリモに作用させたばあいの有害になる濃度をしらべた。方法は無機塩類の影響をしらべたばあいと同じである。

24 時間処理の結果は、Ethylene glycol では、5 M ではじめて約半数の細胞が害されるが、Propylene glycol, Diethylene glycol は 3 M 以上になるとマリモ細胞に害をあたえる。Triethylene glycol, Polyethylene glycol では、1 M でも 24 時間後生存する細胞はなかった。ただし低温では当然毒性が減少し、例えば 1 M Polyethylene glycol 溶液に入れて -3°C に保存したばあいには、少なくとも 24 時間以内には死細胞は現われなかった。これらの 5 種の多価アルコールを媒液とし、 -33°C で 2 時間凍結させてみると、何れのばあいも対照* よりも大きな生存率をえた⁹⁾。

このうち分子量の小さな Ethylene glycol, Propylene glycol が最も大きな効果を示し、これらにつづく Diethylene glycol は約 50% の生存率を示した。これらは低分子で原形質膜を容易に透過する性質をもつが、Triethylene glycol, Polyethylene glycol は、透過せず凍害防止力は前者に比較して小さかったが、これは第 18 表に示したような、この溶質自身の毒性のためかも知れない。

3. マリモ細胞の多価アルコールに対する透過性と耐凍性

前報⁹⁾によれば原形質内に透過しうる多価アルコールは、透過しないものよりも細胞の耐凍性を高めるのに効果があるようにみえる。そこでマリモ細胞の多種の多価アルコールに対する透過性の大きさと、その耐凍性との間の関連の有無を確かめるために次の実験を行なった。方法は十分多量の 2 M 多価アルコール溶液に細胞をつけると、高張のため原形質分離をおこすが、間もなく多価アルコールは細胞内に透過し、もとの正常な形にまで復帰する。細胞を最初に多価アルコール溶液につけてから復帰するまでの時間を測って、マリモ細胞に対する多価アルコールの透過性を比較した。

すなわち、Propylene glycol がもっともはやく、Ethylene glycol がこれにつき、Diethylene glycol がもっともおそく細胞内に透過することがわかる。第 19 表の結果を、これらの多価アルコールの耐凍性への影響⁹⁾とくらべると、Propylene glycol は Ethylene glycol の 2 倍以上も透過性が高いのに凍害防止作用は後者よりもすぐれてはいない。

おそらく Propylene glycol の毒性が Ethylene glycol よりも高い (第 18 表参照) ためにこのような結果となったものであろう。この二者よりも凍害防止の効力の少ない Diethylene glycol では細胞への透過性も前二者よりはるかに低い。

第 19 表 マリモ細胞の多価アルコールに対する透過性 (室温 19°C)

種 類	原形質復帰までに要する時間 (秒)
2 M Ethylene glycol	280
2 M Propylene glycol	115
2 M Diethylene glycol	654

(3 月の材料)

* この凍結状態では純水を媒液とする対照の生存率は 0~10% である。

VIII. 考 察

1. 常態のマリモ細胞の耐凍性

マリモの細胞は水と共に凍結させればあいにきわめて耐凍性が高く、 -20°C 付近までの凍結温度にたえ、ごく一部の細胞は冷却速度が特に小さいばあいには、 -30°C での凍結後も生存するものが見られる¹⁾。このような高い耐凍性は淡水産藻類としては稀有のものであり、海藻類でもアオノリ (*Enteromorpha*)¹⁰⁾、アマノリ (*Porphyra*)¹¹⁾などを除いては、この右に出るものはない¹²⁾。

本種とごく近縁と考えられる緑藻シオグサ科 (*Cladophoraceae*) のシオグサ (*Cladophora* sp.) を Molisch (1897) が顕微鏡下に観察しながら凍結させた記録があるが、このばあいには -8°C 、2時間の凍結で完全に凍死している¹³⁾。

一般に植物細胞の凍結の様式は二つに大別され⁵⁾、そのひとつは凍結が始まったばあいに、氷の形成が細胞の内部にもみられるもの、すなわち細胞内凍結であって、これはその細胞にとって常に致命的である。他の一つは氷の形成が細胞の原形質体の外部に限定されるもの、すなわち細胞外凍結であって、さらに温度が低下するにつれ凍結している細胞は、その外表部に接している氷によって脱水され次第に収縮する。このようなばあいには、凍結している植物細胞はそれぞれその細胞のもつ耐凍性にしたがって、ある温度まで冷却された後に凍害をうける¹⁴⁾。すなわち細胞外凍結による細胞の脱水縮小がある程度まで進行すると初めて有害となるのである。またこのような凍害には作用時間の影響が大きく、一般には凍結時間の長い程害が大きくなる^{10), 15)}。

植物細胞が凍るばあいにこの何れの様式をとるかということは、その細胞のおかれる物理的及び生理的条件に支配されるが、多くのばあい細胞の冷却速度の大小が最も重要な条件となる。すなわち冷却がすみやかなばあいには細胞内凍結が、反対におそいばあいには細胞外凍結がおこりやすいのである⁵⁾。マリモは自然状態では、常に多量の媒液と共に凍結されるので冷却速度は極端に小さく、細胞内凍結のおこることは全く考えられない。また実験的にマリモの少数の細胞を凍結させればあいても、著者の観察した限りではマリモ細胞は、ほとんど細胞外凍結のみを示した。このように生物細胞が細胞内凍結をおこしにくい原因は、主としてその表面の原形質膜が氷の侵入を阻止する能力に帰せられており¹⁶⁾、朝比奈は凍結中の細胞表層と氷との界面における冷却速度が、細胞の水に対する透過性と逆の関係にあることからこの機構を説明しようとしている¹⁷⁾。いずれにしてもマリモ細胞の原形質膜は氷の侵入に対する阻止膜としてきわめて効果的な構造をもっていることが想像されるが、同時にこの藻類ではその細胞膜もまた氷の侵入を阻止する能力が高いように思われる。前述のようにマリモでは、細胞内凍結によってすでに原形質構造の崩壊してしまった死細胞でも $4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 程度の冷却速度で細胞内凍結をおこさせることは困難である。これは一般の植物細胞ではほとんど知られていない現象であるが、同じ淡水産藻類のアミミドロで類似した性質が報告されていること⁵⁾はきわめて興味深い。

よく知られているように陸上の植物では、環境温度に伴う耐凍性の増減がきわめて明瞭である¹⁸⁾。すなわち秋から冬にかけてこれらの植物の地上部の細胞では、その含んでいる澱粉が減少して糖(主として蔗糖)が増加し、その細胞液の滲透濃度が増し¹⁹⁾、また原形質膜も強化されて細胞内凍結がおこりにくくなる²⁰⁾。また反対に冬から春にかけては糖の減少によって細胞の滲透価の低下、同時に耐凍性の消失がきわめてすみやかにおこる。このような細胞中の糖分含量の変化には、当然、澱粉→糖反応に関与する酵素、とくにフォスフォリラーゼの活性度の変化が予想されるが、著者はテーブルビート(赤甜菜)で低温処理によって細胞中のフォスフォリラーゼの活性が著しく増し、逆に高温処理によって全く検出できぬほどに低下することを明らかにした^{19), 21)}。一方、水生の藻類においては環境温度に伴う細胞の滲透価の変化や、その耐凍性の増減はきわめて少ないが、またはほとんどおこらぬように思われる²²⁾。この原因のひとつは恐らく藻類の細胞液中には糖がごく少量しか含まれず、細胞の滲透価を保持する主要なものが無機塩であることによるのであろう。例えば *Valonia* では 0.5~0.6 M に及ぶ大量の K を含んでおり⁶⁾、今回使用したマリモではその高い滲透価 (0.85 M) の大部分が K の塩類にもとづくものと考えられ、糖の濃度は全体の数パーセントにすぎない(第 1 表)。また実際にマリモを低温処理してもその滲透濃度にも耐凍性にも変化がおこらなかった¹⁾。

マリモのように -20°C 程度の凍結に耐えられる植物は陸上のものとしては、草本にはほとんどその例をみず、越冬樹木に近い耐凍性をしめしている¹⁴⁾。これらの植物の細胞は、今まで観察された限りでは非常に縮小して扁平となって細胞外凍結に耐えていることが知られている⁵⁾。ところがマリモの細胞の凍結過程を観察すると、たとえ -20°C の凍結状態にあっても細胞は期待される程は収縮せず、その形態もほとんど常態のものとは変わらない。この原因の一つはマリモが円筒形の単細胞の裸出した一連の糸状体で、縮小したばあいも扁平になりにくいことにもよるのであるが、あるいはマリモの原形質が、細胞外凍結による脱水に対して抵抗性の高いある特有の機構をもっていて、凍結中であっても相当量の水をその原形質内に保持しているのかもしれない。実際に非常に急激な凍結とか、高濃度の塩類や糖の溶液の作用等によってマリモ細胞が凍死するばあいには、細胞外凍結の状態になっているマリモ細胞のまわりに、二次的脱水によって生じたと思われる氷のサヤを認めることが多い(図版 VI-15)。また有害な媒液中ではマリモ細胞が凍結に際して扁平となることもしばしば観察された(図版 V-14, VIII-22)。これらの結果は、健全なマリモ細胞が細胞外凍結の状態で -20°C に冷却されても、少なくとも短時間以内にはその保持している含水量が、同温度で凍結している死細胞ほどには減少しないことを思わせる。いっばう細胞を凍結させたままでおくと短時間ならば害の少ない温度においても数日の間に凍死する細胞が増加する(未発表)。この事実は、上記の凍結にともなう脱水力に抵抗して細胞がその内部に水を保持する機構が、マリモ細胞の生命活動とむすびついているということ、換言すればこの細胞の耐凍性の高い原形質構造を維持するためには継続的な代謝が必要であることをあらわしているのであろう。

2. マリモ細胞の凍害を増大させる物質とその作用*

a) 無機塩類 Ca 塩を除いて、使用したすべての塩類が細胞本来の耐凍性(純水中で細胞が示す耐凍性の高さ)を低下させた。

1 価の塩類の溶液中では、凍結の結果おこる溶液の濃縮による原形質分離はみられない。凍結温度がある程度以上低くなると脱水のため細胞がつぶれて扁平となったり、細胞のまわりに二次的に形成された氷のサヤがはっきりとあらわれたりする(図版 VI-15)。つぶれた細胞ではしばしば原形質と細胞膜がはなれているがこれは原形質分離ではなく、そのような部分ではプラスチックのような原形質体の内容物が細胞膜に付着して残されているのをしばしばみかける(図版 V-12, 14)。よく知られているように、これら 1 価の塩類は単独のままでは生物細胞の原形質にはげしい毒作用を示し、ウニの卵等では内部細胞質の粘性を高め、同時に表層部の弾性を低下させて、もろく切断されやすくすることが知られている²³⁾。また坂村(1933)によればアオミドロを KCl や NaCl の溶液に入れるとはげしい害作用があらわれ、細胞質ははじめ膨潤し、その内部に多くの液胞ができ、最後に離液凝固する²⁴⁾、恐らく凍結のばあいには、マリモ細胞の原形質は濃縮された塩溶液の作用で原形質分離をおこしにくくなり、またもろくなっているためにある程度以上の収縮がおこれば、その歪力にたえられず崩壊をはじめるのであろう。植物細胞では原形質分離した状態で凍結させると細胞外凍結の際の不均等な歪力を原形質体がかうけずにすむために凍害を軽減できるといわれているが²⁵⁾、塩溶液の作用ですでにその表層がもろくなっている原形質体ではこのようなことは考えられない。従ってこれらの溶液中では高濃度ほど凍害が大きくなるのが当然である。

一方、2 価の塩類を媒液として凍らせたばあいには、細胞は原則として原形質分離をおこす。このことはこれらの塩類が細胞原形質の粘性をそれほど増大させないためと解釈できる。また 2 価の塩溶液中では高濃度になると細胞の凍害が減少するばあいが二、三あるが、これは原形質が 1 価の塩のばあいほどひどくもろくなっていないために、先に述べた原形質分離による凍害減少の効果が現われたものであろう。2 価の塩でも凍害に対する影響にかなり開きのあることは、このような原形質に対する作用に色々な程度の差があることを思わせる。これらの塩溶液中最も凍害の少ない CaCl_2 のばあいには、細胞は凍結と同時に典型的な凹形の原形質分離をおこす。マリモ細胞を常温で高張の平衡塩溶液に入れるとこれと同様な凹形の原形質分離をおこし(図版 II-5)、これは全く無害である。従って CaCl_2 溶液中で凍らせたばあいは原形質表層部の流動性も弾性も常態に近いものと考えられる。たとえ凍結に際して原形質分離をおこしてもその表面が不規則な凹凸をなすようなばあい(MgCl_2 , CaJ_2)には、その耐凍性も低いのが常であった。マリモと生理的に近縁のシヤジクモでは、各種の塩溶液を使って常温で原形質分離させると、Na, K の塩は最も害が大きく、Mg 塩はこれに次ぎ、Ca 塩はほとんど無害であることが知られている²⁶⁾。また 2 価の塩で凍害の大きなものに BaCl_2 があるが(第 3 表)、Ba

* 今回の実験条件では細胞内凍結はおこらないので、このばあいの凍害はすべて細胞外凍結による害と考える論議をすすめる。

塩はその常温における害作用が比較的低いにもかかわらず(第2表参照)、凍結にさいして植物細胞に大害をあたえるようにみえる。Ba 塩類による凍害の大きいことは、マリモ以外にもテーブルビート(赤甜菜)、タマネギ等でしられている²⁷⁾。

動物細胞特に血球のばあいの凍害の原因は凍結にともなう細胞内外の塩溶液の濃縮に帰せられている²⁸⁾。しかしその内部に常時 0.3 M に達する K イオンを含んでいるマリモ細胞が、これを純水中で凍らせれば -15°C でも全く害を受けないのに、0.3 M の KCl 媒液中で凍らせれば同じ濃度において約 70% の細胞が凍死してしまう事実は、凍害が原形質の脱水濃縮に伴う単なる塩害ではなく細胞外部からの作用にもとづく原形質表面構造の傷害に支配される現象であることを思わせる。

b) 糖 類 良く知られているように越冬する植物の地上部の皮層細胞では秋から冬に向って糖分(主として蔗糖)が著しく増量し、これが細胞の耐凍性増大の主因であるといわれている¹⁴⁾。またこれらの植物ではその組織の切片を凍結させるとき媒液として糖溶液を使うと細胞の耐凍性が著しく高まる^{29),30),31)}。

ところがマリモ細胞では、媒液としての糖液(蔗糖及びブドウ糖)は細胞の本来の耐凍性を高めないばかりか、かえって甚しくこれを低下させた(第12, 13表)。高濃度の蔗糖液は 1.6 M 以上では常温でもマリモ細胞にはげしい毒性を示した。もともと蔗糖は植物細胞に最も害の少ない物質のひとつとされており、ごく普通に原形質分離剤として使用されているほどであるから、このようなはげしい毒性は特記するに値するものであろう。その細胞の生理学的性質がマリモにやや近いシヤジクモでは、蔗糖を原形質分離剤として使用すると、害が大きいことが知られている²⁶⁾。またフラスモの細胞の両端をそれぞれ高濃度及び低濃度の蔗糖溶液中につけて細胞内に水を環流させると、細胞が脱水される部分、すなわち高張蔗糖液に接する部分では、原形質からのイオンの流出がおり、これが細胞に害となることが報告されている³²⁾。マリモに対する高濃度糖液の害作用も、おそらくはある種のイオンの原形質よりの離脱、流出をおこすのであろう。後述するような無機塩と糖とのマリモ細胞の凍害に対する拮抗的な作用は、この考え方を支持する事実のひとつと思われる。マリモを等張に近い 1 M 付近の濃度の糖液中で凍らせても、細胞外凍結にともなう媒液の濃縮による原形質分離はみられぬこと、また、はじめから高張媒液中で原形質分離した状態で凍結させても原形質がそのまま凝固することなどは、1 価の塩溶液中の凍害と甚だ類似しており、おそらく原形質の粘性の変化、流動性、弾性等の低下が濃縮された糖溶液の作用でおこるのであろう。

塩と糖との混合溶液を媒液とすれば、少なくともブドウ糖の凍害は軽減される(第14表)。このとき使用した塩類のうち CaCl_2 は前述のように、マリモ細胞原形質の耐凍性を保持する効果が高いのであるが、 NaCl はそれ自身だけではむしろ糖以上の凍害を細胞にあたえる(第3表)。つまりブドウ糖と NaCl の混合液は、その双方がそれぞれ単独に作用するばあいにおこる凍害を互に軽減する作用がある。すなわちこの二つの物質の害作用は現象的には拮抗的に働いたためと考えられる。

c) Glycerol 今まで各種の生物細胞で Glycerol がその凍害防止剤として効果のあることが知られている³³⁾。ところがマリモの細胞では Glycerol は糖類に次ぐ凍害をおこす。この原因として、Glycerol はマリモ細胞内に透過せず従って凍結にともなう細胞の収縮を軽減できないことと、Glycerol の高濃度溶液はマリモ細胞に非常に有害であること(第 16 表)の二つがあげられる。ここで問題になる実験結果の一つは、1.6~2 M の Glycerol 媒液中でマリモ細胞のうける凍害が、これより低濃度のばあいよりも小さくなることである(第 15 表)。すでにのべたように植物細胞を、原形質分離をした状態で凍結させれば、させないばあいよりも凍害を減少できることがある^{25),31)}。第 16 表によれば Glycerol 1.6 M 溶液は、ちょうどマリモ細胞の原形質分離の限界濃度以上に当っておりこの濃度以上での耐凍性の増大を説明するのにきわめて好都合にみえる。しかし 1.2 M Glycerol 液中で細胞の凍結過程を観察してみると、このような低張液中でも細胞外凍結のさい明瞭な凸形原形質分離がみられ、原形質体は一見平滑な外形を保ったままで収縮してゆくのであるが、 -19°C 、30 分の凍結後にはすべて凍死してしまう。したがってこのようなばあいには、凍結時における急激な原形質分離によって細胞表層にはすでにある程度の傷害があたえられ、これが凍結にともなう細胞の収縮が進行するにつれ遂には致命的な傷害に発展するものと考えられる。

3. マリモ細胞の耐凍性を高める多価アルコールとその作用

動物の細胞では、各種の多価アルコールがその凍害防止剤として役立つことが知られており³⁴⁾、植物組織でも、タマネギの鱗茎³¹⁾、キャベツ、ユキノシタの一種³⁵⁾、クチナシの枝³⁶⁾などで Glycerol や Ethylene glycol が細胞の耐凍性を増大させることが報告されている。

前述したようにマリモ細胞に対しては Glycerol はかえって凍害を高める作用があるが、他の 5 種の多価アルコールは程度の差こそあれ何れも凍害に対して防護作用があった⁹⁾。

従来、多価アルコールの凍害に対する防護作用は、この物質が細胞内によく透過し、高濃度になっても害が少ないこと、また水和が高いためこれをふくむ細胞は、凍結したばあいに脱水される程度が少なくすむことに帰せられている^{9),37),38)}。いっぽうマリモの凍害は今まで述べてきたように原形質体のある程度以上の脱水収縮によってはじめておこると考えられる。そのため多価アルコールのような親水性の物質が細胞内に滲透していれば、凍結時の細胞の脱水収縮はおさえられ凍害を軽減することはきわめて当然であろう。実際に細胞に透過しやすく、かつ毒性が少ないもの程凍害防止作用も高い⁹⁾(第 18 表)。2 M Ethylene glycol 溶液中で細胞を凍結させると凍結中原形質分離をおこすことが少なくない。このことは凍結に伴う媒液の濃縮に対してこの物質の細胞内への透過がおくれていることをしめしている。従ってこの多価アルコールは凍結時に原形質分離が全くおこらぬ程多量に細胞内部に透過していなくとも、ある程度原形質内に入っていれば凍結時の原形質からの脱水の程度を少なくさせることができるために、凍害を軽減する作用があると考えられる。また Triethylene glycol と Polyethylene glycol は細胞中に透過しないにもかかわらず、わずかながらマリモの耐凍性を高めていることを示した⁹⁾。この 2 物質の透過性に対する判定は、その高張溶液中でマリモ細胞が原形質分離をおこ

したのち、24時間*以内に原形質復帰しないことにもとづいている。しかしこのばあい、これらの化合物が原形質表層のみならず、トノプラストをも通過しない限り恐らく明瞭な原形質復帰はみられないであろう。しかも植物細胞表面の原形質膜はかなり多様な物質を透し少なくとも原形質層の一部にこれらの物質が入りうるという考え方は、現在次第に支持者をましつづめるように見える³⁹⁾。もしこのような考え方がゆるされるならば、この2種の化合物がマリモ細胞の耐凍性を増大させる効果は、やはり他の多価アルコールと同様に、これらの物質が原形質中へ滲透した結果、凍結時の細胞の収縮はほとんど防げなくとも、原形質の脱水に対する抵抗が幾分増大したということで説明される**。また上記の考え方からすると、マリモの凍害は、細胞外凍結の際その原形質全体というよりも恐らく表層部がまず脱水収縮に耐えられなくなって、こわれはじめると想像されるのである。耐凍性の高い越冬草本の細胞においても、細胞外凍結による凍害は細胞内の塩類の濃縮によるものではなく、細胞表層部の障害がその主因であることが報告されている³⁰⁾。

IX. 摘 要

この研究は、藻類の耐凍性機構を明らかにするために行なったものである。材料として、阿寒湖に生育するシオグサ科の淡水産緑藻マリモ *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz. の糸状体の節間細胞を用いた。

マリモは淡水産藻類としてはその耐凍性がきわめて高く、淡水と共に凍らせると、1日以内ならば -20°C に達する低温での細胞外凍結にも耐えることができる。これはマリモ細胞の原形質本来の性質であって、糖のような貯蔵栄養物質の増量に由来するものではない。

マリモ細胞は、常ときわめて高い浸透価(0.85 M NaCl 等張)をもち、この大部分がカリウムの塩類にもとづくもので、細胞液中の糖の濃度は全浸透価の数パーセントにすぎない。

マリモ細胞を 5°C /分程度またはそれ以下の冷却速度で凍らせたばあいには、すべて細胞外凍結をおこす。これにはマリモの原形質膜だけでなく、この藻類の非常に厚い細胞膜も外部からの氷の侵入を阻止する膜として役立っていると思われる。

マリモ細胞を、その原形質の性質に影響をあたえらると思われる各種の溶液を媒液として凍結させた。1価の塩溶液は、いずれも細胞の凍害を非常に高める。この媒液中で凍らせると、原形質の粘性やもろさが増大するように見え、凍結にともなう媒液の濃縮によって細胞の原形質分離をおこした例は全くない。また予め原形質分離させたまま凍らせても凍害は軽減できない。

2価の塩溶液中で凍らせると、それが細胞の浸透価に近い高濃度溶液ならば細胞は原形質分離をおこす。凍害の程度は1価の塩に比べると一般に低く、ことにCa塩類はマリモ本来の

* 常温では害が大きいため 0°C に24時間おいた。

** Triethylene glycol 及び Polyethylene glycol の常温における毒性は決して低くないが、低温での短時間の凍結は、高濃度の液中に細胞があるとはいえ、恐らく細胞に対するこれらの物質の有毒な作用をおさえるのに好都合であろう。

淡水中での耐凍性を全く低下させないものが多い。凍結の際の塩害が細胞に致命的となるためには、その媒液がはじめからある程度以上の塩濃度をもっている必要がある。

糖類は常温でもマリモの細胞に高濃度になると大害をあたえ、凍結に際しては著しく凍害を高める。塩と糖の混合液を媒液とすれば、糖による凍害を或程度防ぐことができる。

多価アルコールは、Glycerolを除いては何れもマリモの凍害を防ぐ作用がある。Glycerolの毒性は、塩や糖にくらべると遙かに低いがこの溶液中では凍結温度が -20°C に達すると、ほとんどの細胞が凍死してしまう。しかし1.6 M以上の高濃度のGlycerol溶液はある程度凍害に対して保護作用をあらわす。細胞内によく透過するEthylene glycolは耐凍性を高めるのに最も有効である。

これらの結果から想像するとマリモ細胞の細胞外凍結による凍害はその表層部の構造の脱水収縮に起因するものらしく、塩や糖の媒液中における細胞の耐凍性の低下は、これらの媒液の作用によって原形質表層部の脱水収縮に対する抵抗性が低下したためと考えられる。

文 献

- 1) 照本 勳 1959 マリモの凍害と乾燥害. 低温科学, 生物篇, **17**, 1-7.
- 2) Fritsch, F. E. 1948 The Structure and Reproduction of the Algae. Volume I. University Press (Cambridge).
- 3) 阪井与志雄 1952 マリモの形態, 集団形と糸状体との関連性. マリモ調査報告(昭和25, 26年度) 57-66.
- 4) 照本 勳 1958 植物細胞の低温固定像について. 低温科学, 生物篇, **16**, 1-5.
- 5) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. Con. Inst. Low Temp. Sci., **10**, 83-126.
- 6) Blinks, L. R. 1951 Physiology and biochemistry of algae. Manual of Physiology (ed. Smith, G. M.) 263-291.
- 7) Blinks, L. R. and Nielsen, J. P. 1940 The cell sap of Hydrodictyon. Jour. Gen. Physiol., **23**, 551-559.
- 8) Hoagland, D. R. and Davis, A. R. 1923 The composition of the cell sap of the plant in relation to the absorption of ions. Jour. Gen. Physiol., **5**, 629-646.
- 9) 照本 勳 1950 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.
- 10) 照本 勳 1961 ボウアオノリの耐凍性. 低温科学, 生物篇, **19**, 23-28.
- 11) 照本 勳 (未発表) アマノリ類の耐凍性.
- 12) 照本 勳 1958 藻類の凍死. 藻類, **6**, 99-106.
- 13) Molisch, H. 1897 Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen. Jena.
- 14) Levitt, J. 1956 The Hardiness of Plants. Academic Press (New York).
- 15) 酒井 昭 1956 耐凍性の持続及びそれに及ぼす温度の影響 (1). 低温科学, 生物篇, **14**, 1-6.
- 16) Chambers, R. and Hale, H. P. 1932 The formation of ice in protoplasm. Proc. Roy. Soc. Lond. **B 110**, 337-352.
- 17) Asahina, E. 1961 Intracellular freezing and frost resistance in egg-cells of the sea urchin. Nature, **191**, 1263-1265.
- 18) Levitt, J. and Scarth, G. W. 1936 Frosthardening studies with living cells. II. Permeability in relation to frost resistance and the seasonal cycle. Canad. Jour. Res., **C 14**, 285-305.
- 19) 照本 勳 1958 植物の耐凍性と滲透濃度. 低温科学, 生物篇, **16**, 7-21.
- 20) 青木 廉・朝比奈英三・照本 勳 1953 生物の凍結過程の分析 IX. 植物の耐凍性と凍結曲線の型.

低温科学, **10**, 69-79.

- 21) 照本 勳 1957 アカビートの耐凍性とフォスホリラーゼ. 低温科学, 生物篇, **15**, 31-38.
- 22) Lidforss, B. 1907 Die Wintergrüne Flora. Lunds. Univ. Årsskr. (N. F.) **2**, 1-76. (文献 14 より引用)
- 23) Harvey, E. B. 1945 Stratification and breaking of the *Arbacia punctulata* egg when centrifuged in single salt solutions. Biol. Bull., **89**, 72-75.
- 24) Sakamura, T. 1933 Beiträge zur Protoplasmaforschung an *Spirogyra*-Zellen. Jour. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., V. II, 287-316.
- 25) Levitt, J. 1958 Frost, drought, and heat resistance. Protoplasmatologia, Band VIII. (Wien).
- 26) Hayashi, T. and Kamitsubo, E. 1959 Plasmolysis in Characeae. 植物学雑誌, **72**, 309-315.
- 27) 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**, 9-19.
- 28) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochim. Biophys. Acta, **10**, 414-426.
- 29) Maximow, N. A. 1912 Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren. Ber. deut. botan. Ges., **30**, 52-65, 293-305, 504-516.
- 30) 酒井 昭 1961 植物細胞の凍害の機構 I. 凍害に及ぼす媒液の影響 (1). 低温科学, 生物篇, **19**, 1-16.
- 31) 照本 勳 1957 タマネギの耐凍性について. 低温科学, 生物篇, **15**, 39-44.
- 32) 岸本卯一郎 1955 単一植物細胞の電気的特性に関する研究 II. 滲透現象に伴う原形質膜及び細胞液の抵抗の変化について. 植物学雑誌, **68**, 25-29.
- 33) Smith, A. U. 1954 Effects of low temperatures on living cells and tissues. Biological Applications of Freezing and Drying 1. Academic Press (New York).
- 34) Taylar, A. C. and Gerstner, R. 1955 Tissue survival after exposure to low temperatures and the effectiveness of protective pretreatments I. Evaluation by growth in tissue culture. J. Cellular Comp. Physiol., **46**, 477-502.
- 35) Levitt, J. 1957 The role of cell sap concentration in frost hardiness. Plant. physiol., **32**, 237-239.
- 36) 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**, 23-34.
- 37) Luyet, B. T. and Keane, J. F. Jr. 1952 Comparative efficiency of ethylen glycol, glucose and sodium chloride in protecting tissue against freezing injury. Biodynamica, **7**, 119-131.
- 38) Luyet, B. T. and Keane, J. F. Jr. 1953 On the role of osmotic dehydration in the protective action of glycerol against freezing injury. Biodynamica, **7**, 141-155.
- 39) Brown, R. 1960 The plant cell and its inclusions. Plant Physiology (A Treatise) **1**, 3-130.

Résumé

The present paper deals with a series of experiments on the mechanism of frost-resistance in algae cells. A fresh water Cladophoraceae, *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz., well-known "lake balls" in Lake Akan in Hokkaido, was used as experimental material.

(1) Owing to a large potassium content the cell of this alga has a remarkably high osmotic concentration estimated as 0.85 M (NaCl equivalent) throughout the year. On the other hand, the concentration of sugars in cell sap is found to be very small (Table 1).

(2) When they were subjected to freezing at a cooling rate of about 5°C per minute or less, all cells underwent extracellular-freezing. In such a case not only the protoplasmic

membrane but also the very thick cell wall of this alga was found to act as a barrier to the penetration of ice crystal into the cell interior.

(3) Lake balls show an extraordinarily high frost-resistance for a fresh water alga. At -20°C a lake ball can tolerate freezing for at least 24 hours without death. Even for a longer freezing period cells are never killed at temperatures higher than -10°C . Such a high frost-resistance seems to be a character of the fundamental structure in the protoplasm of this alga, being not based on any increase in any protective substance like sugars in the cell.

(4) Cells of this alga were subjected to freezing with mediums made of various kinds of solutions. In this case, too, they underwent extracellular freezing only.

The use of monovalent inorganic salts in solution resulted in a fatal frost-injury to the cells, while bivalent ones caused less injury. Upon freezing, cells always severely contracted in solutions of the former and a fatal coagulation in cell protoplasm followed. On the other hand, in the bivalent inorganic salt solutions, the cells, as a rule, underwent plasmolysis with or without frost injury. Of the inorganic salts used, calcium ones were found to be least injurious. In spite of large amount of accumulation of potassium ion in the cell, no cells were killed by a freezing in fresh water at -15°C , whereas use of a KCl solution of concentration higher than 0.4M resulted in a fatal frost-injury to the cells at the same freezing temperature.

Sugars in solution, too, were injurious for cells; the effects of sugars in freezing cells were almost the same as those of monovalent inorganic salts. It was interesting to note that some salts were found to have an influence antagonistic to sugar-injury, at least to the frost-injury in glucose solution.

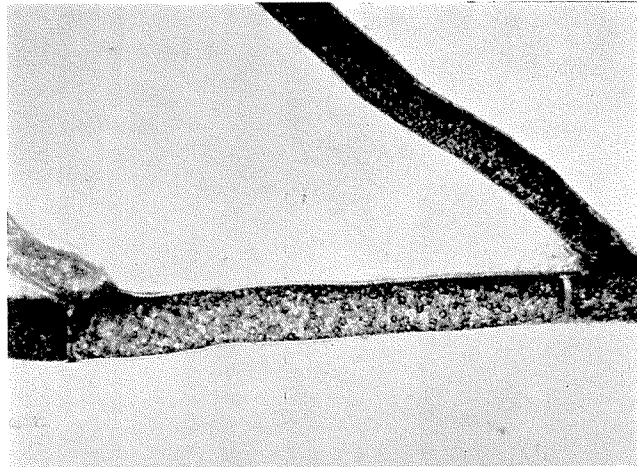
Polyhydric alcohols other than glycerol showed, as a rule, some effect in protecting cells against frost-injury. Among them ethylene glycol and propylene glycol were most effective as protective agents. They both are hygroscopic neutral compounds and are able to penetrate easily into the cells of this alga; besides they are least toxic to the cells even in a solution of a high concentration. Cells frozen in glycerol solution could not survive freezing at temperatures lower than -20°C .

(5) From the results briefly described above frost-injury in cells of this alga seems to be a mechanical one which becomes fatal when the contraction in the freezing cell has reached a certain degree.

Every agent which exerts some bad effect upon cell surface with or without apparent injury, kills cells upon freezing at a high temperature at which no normal cells are injured at all. On the other hand, some harmless polyhydric alcohols can protect cells against frost-injury, because by permeating into them they lessen the degree of contraction in a freezing cell at a given temperature.

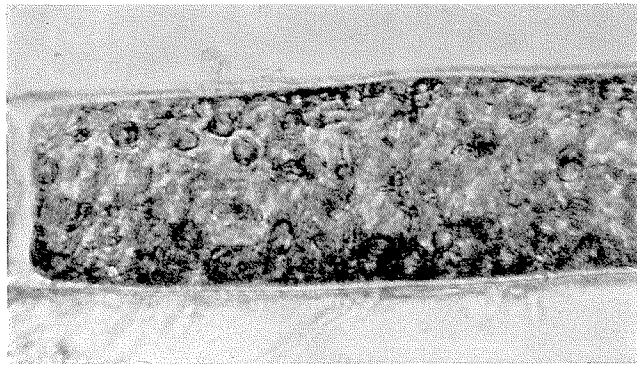
第1図 球状マリモをつくっている糸状体。クロロプラストが多量につまっている細胞と、これが少ない細胞とがある。

×127



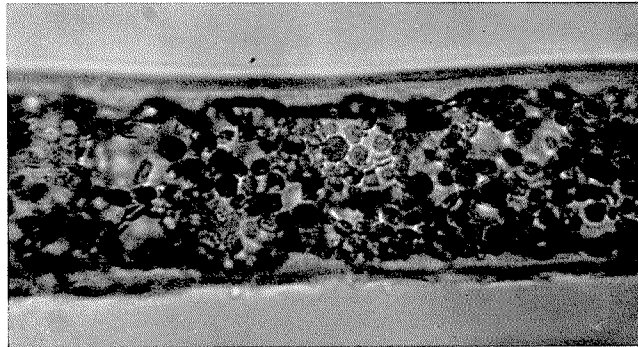
第2図 クロロプラストが密につまっている細胞。

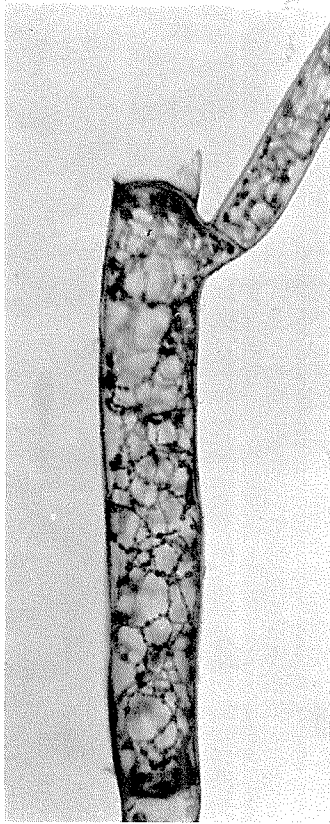
×500



第3図 クロロプラストが割合に少ない細胞。

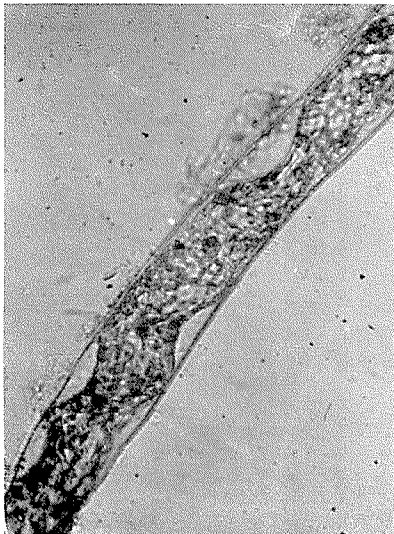
×500





第4図 クロロプラストが非常に少ない細胞。クロロプラストが網目状に連らなっているのがわかる。

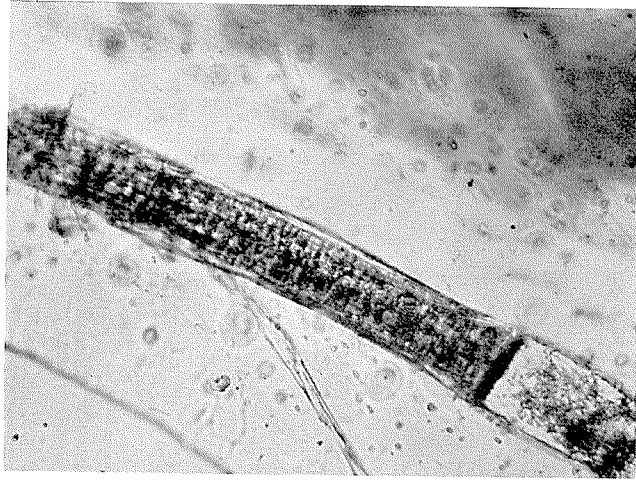
×127



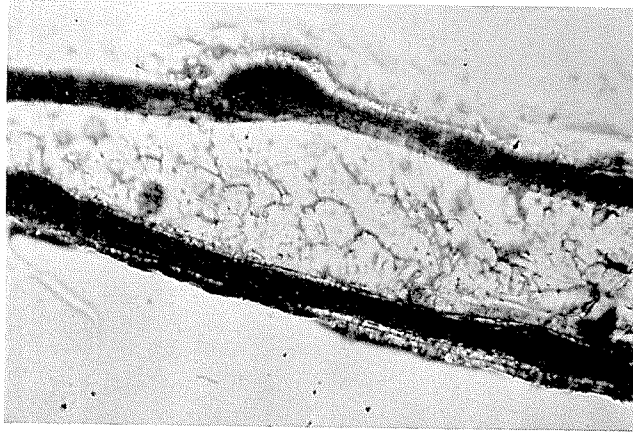
第5図 原形質分離させた細胞。1 M 平衡塩溶液に入れて7分後。

×250

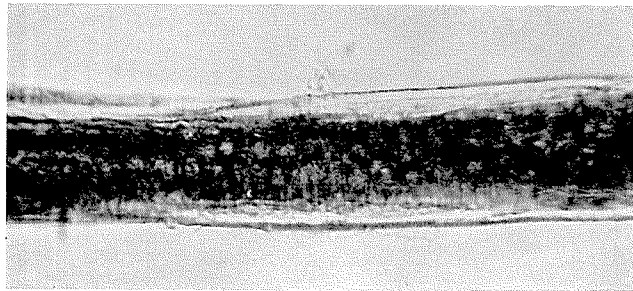
第 6 図 正常な凍結細胞。 -15°C ,
20 分後。原形質分離はおこさ
ず、収縮の程度は少ない。
×295

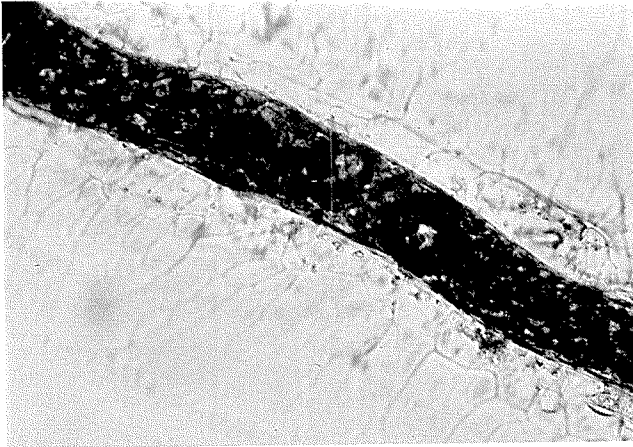


第 7 図 凍死した細胞。 -15°C 。細
胞の縮小ははげしく、そのま
わりに氷が析出している。
×147



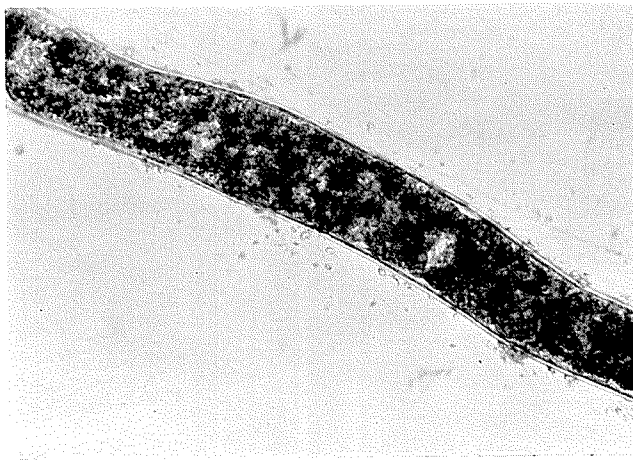
第 8 図 低温固定した細胞。 -15°C ,
2 時間後。この状態で細胞は
凍結にたえている。
×500





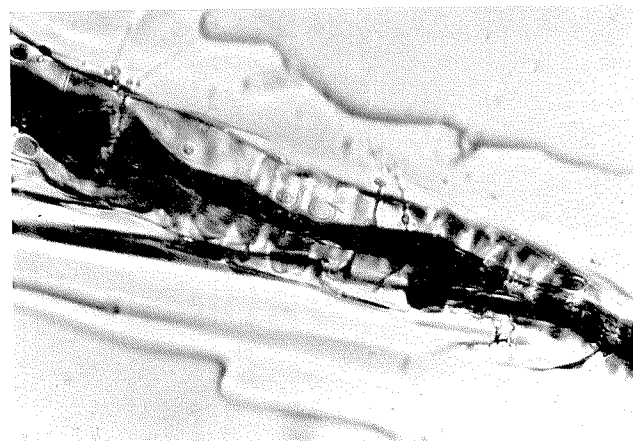
第9図 急速冷却によって細胞内凍結をおこさせた細胞。 -20°C で凍結， -15°C で2時間後。細胞内に黒くリング状にみえるものは気泡。

×295



第10図 同上，融解直後の細胞。 0°C 。原形質がすっかり破壊されている。

×295

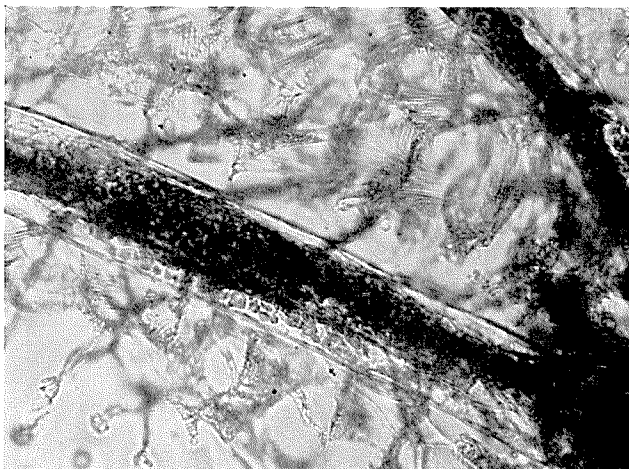


第11図 同上細胞を再び凍らせたところ。 -6°C 。細胞は脱水されて，節部を除いては細胞膜ごと甚だ細くなり，そのまわりにサヤ状に氷が発達している。

×295

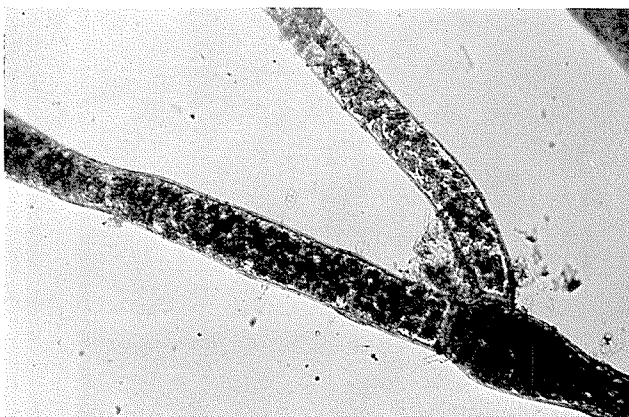
第12図 0.5 M KCl 中での凍結。
-15°C。細胞は扁平につぶれ、
内容物が細胞膜に付着してい
る。

×295



第13図 同上細胞。融解直後、0°C。
原形質は全く崩壊している。

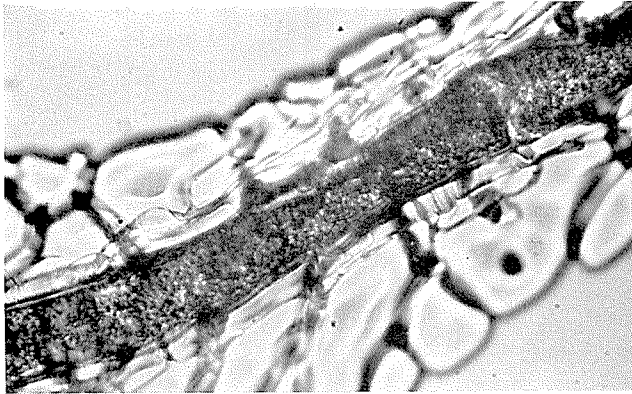
×147



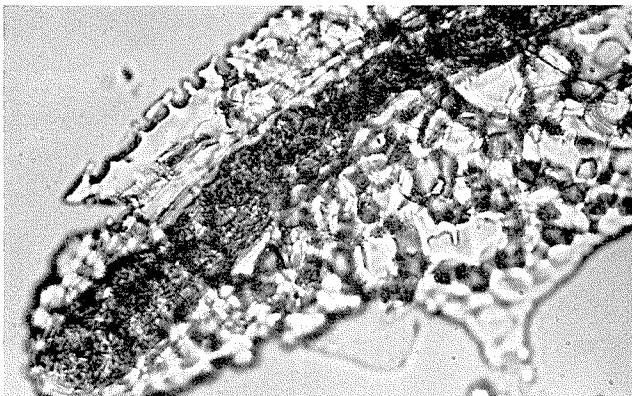
第14図 0.5 M NaCl 中での凍結。
-13°C。KClのばあいと同様
な凍り方をしている。凍死細
胞。

×295

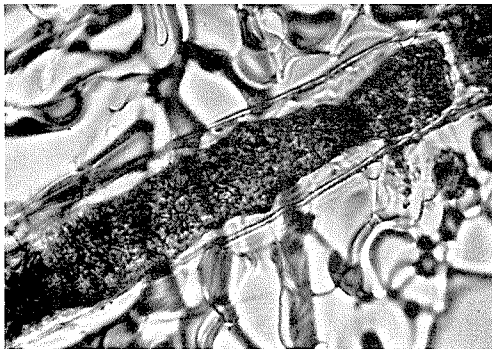




第 15 図 0.5 M NaJ 中での凍結。
-15°C。細胞のまわりに二次
的にできたサヤ状の氷が発達
している。凍死細胞。
×295



第 16 図 0.5 M CaJ₂ 中での凍結。
-15°C。凍結によって原形
質分離をおこすが、その表面
に不規則な凹凸ができる。凍
死細胞。
×295



第 17 図 0.5 M MgCl₂ 中での凍結。
-15°C。明瞭な原形質分離を
おこすがその表面にこまかい
凹凸ができる。凍死細胞。
×295

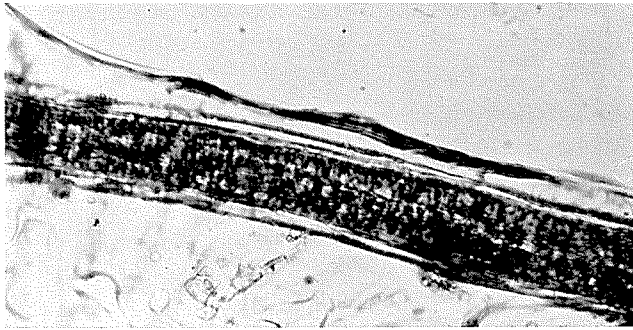
第18図 0.5 M CaCl_2 中での凍結。
 -15°C 。はっきりした凹形原
 形質分離をおこす。融解後生
 存。

×147



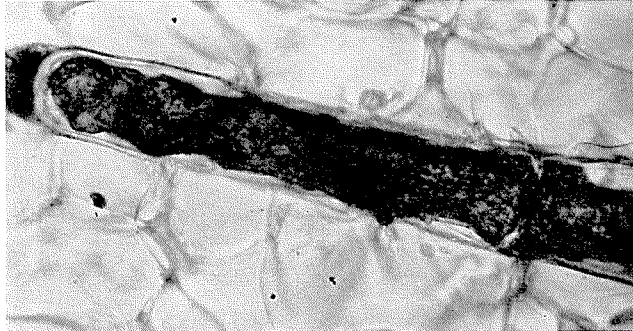
第19図 0.1 M CaCl_2 中での凍結。
 -15°C 。原形質分離はおこさ
 ず、純水中で凍結させた場合
 とよく似ている。融解後生存。

×295



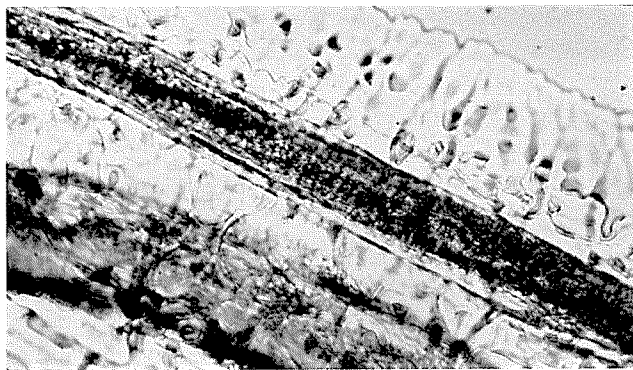
第20図 0.5 M 平衡塩溶液中での凍結。
 -15°C 。凍結と同時に凹形原
 形質分離をおこし、間もなく
 このように凸形に近づく。凍
 結後15分。

×295



第21図 0.4 M 平衡塩溶液中での凍結。
 -15°C 。大部分の細胞は
 原形質分離をおこさず、この
 細胞のように縮小されて、凍
 死する。

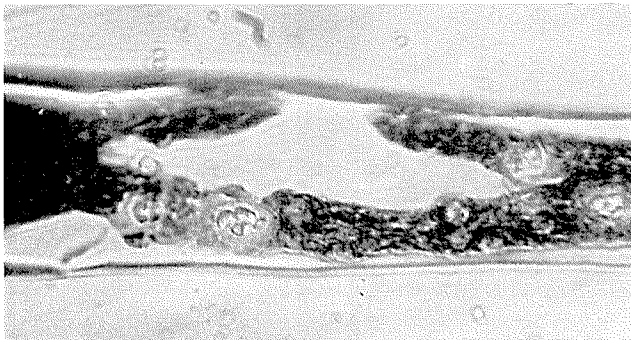
×295





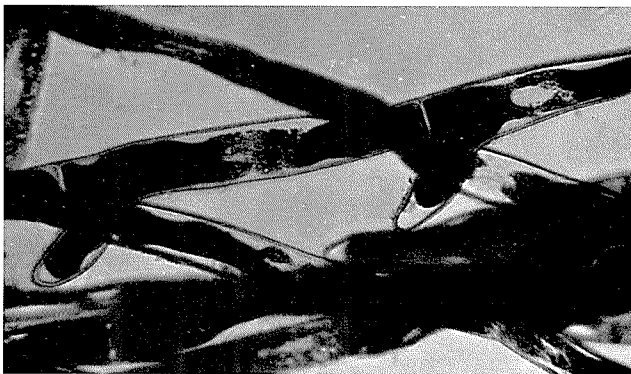
第22図 常温で2M蔗糖液中に3分
つけた細胞。細胞の中央部は
つぶれて原形質はリング状に
わかる。

×500



第23図 同上細胞。1時間後。

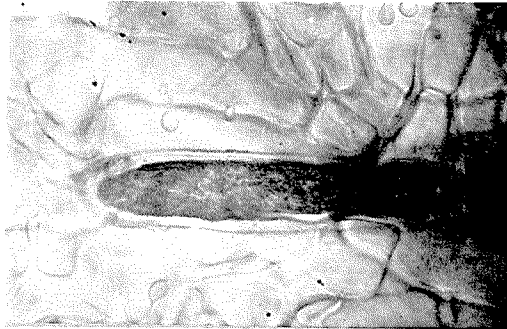
×500



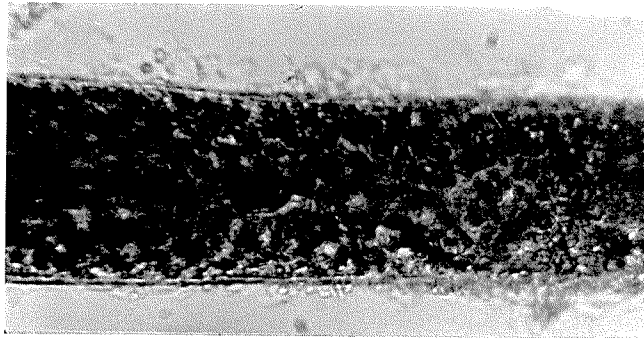
第24図 同上細胞。1時間後。細胞
の中央部では内部の原形質が
リング状にわかるが、節に
近い部分は原形質分離してい
る。

×127

第25図 1.2 M Glycerol 中での凍結。
-19°C。凍結と同時にスムーズな凸形原形質分離をおこすが、凍死する。
×295



第26図 3 M Ethylene glycol 中での凍結。-15°Cで2時間後低温固定。細胞はほとんど脱水されず正常のものと変わらない。
×500



第27図 2 M Ethylene glycol 中での凍結。-19°C。凍結に伴って原形質分離をおこすばあいには、必ず凹形である。融解後、細胞はすべて生きている。
×295

