



Title	生物細胞が細胞内凍結を防ぐ一つの機構
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 45-56
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17661
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p45-56.pdf



生物細胞が細胞内凍結を防ぐ一つの機構*

朝比奈英三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和37年8月受理)

I. 緒言

生物細胞を媒液中に浮遊させた状態で急速に凍らせると、その中の少なくとも一部の細胞は殺されるのが常である。しかもそのときの細胞の凍死はほとんど凍結がはじまってからの最初の二、三分間におこってしまうことが多い¹⁾。このような場合普通の方法では、細胞浮遊液の冷却速度は最初のごく短時間のうちだけ大きく以後は急速に小さくなるから、冷却速度の大きさと細胞の凍死との間に直接の関係のあることが想像される。著者はウニの卵細胞を材料としてこの関係をしらべ、細胞浮遊液の急速凍結のときの凍死の主因の一つが細胞内凍結であることを明らかにした²⁾。そしてウニ卵細胞では、受精卵と未受精卵において急速凍結のときの細胞内凍結にもとづく凍死率に非常な差のあることから、受精卵の性質、特に水に対する透過性の大きいことが、この細胞が外部の氷から植氷されて細胞内凍結をおこすことを防ぐのに役立っているのであろうと考えた²⁾。

しかしウニの受精卵は未受精卵と形態的にも異なり、受精膜や透明層でおおわれているから、上記の想定を確かめるためにはこれらの被膜を取りのぞいてなるべく未受精卵に近い状態にして比較実験をする必要がある。このため尿素溶液、トリプシン海水、カルシウム欠除海水等で処理してこれらの被膜を除いた受精卵と、尿素溶液処理によって細胞の水に対する透過性を高めさせた未受精卵とを使って前回と同様な凍結実験を行ない、同時にこれらの処理卵の凍結過程を顕微鏡下に観察した。又このような処理によって卵細胞からの脱水速度がどのくらい変わるかを定量的に測り、脱水速度とその細胞の耐凍性との間の関係をしらべた。

本実験にあたって名古屋大学石川優博士よりたびたび有益な助言をいただいた。ここに厚く御礼申し上げます。

II. 材料と方法

材料は北海道忍路海岸で採集したキタムラサキウニ *Strongylocentrotus nudus* で、札幌の実験室に運んで使用した。親ウニを5°C内外の温度に冷蔵しておき、実験にあたって1/2 M

* 北海道大学低温科学研究所業績 第620号

KCl 溶液を用いて放卵させた。得た卵は濾過した海水で3回洗ってから2°Cの冷蔵庫におき、90%以上の受精率を示したもののみを使用した。

以下のべる実験又は観察において受精卵と呼ぶものは、何れも凍結又は測定を行なう以前に、媒精後室温にて約30分おいた卵をさす。

凍結試験

0.5 ccの卵細胞浮遊液(少なくとも1000個以上の細胞を含む)を径2 cmの試験管にとり、これを約-20°Cの恒温に保たれているブライン中で冷却した。卵浮遊液の温度は径0.1 mmの銅・コンスタンタン熱電対の先端を浮遊液の中央部にさして測定し、増幅器を経て電子管式記録計で自記させた。

試料の冷却は急速(9°~10°C/min)及び低速(1.00°~1.25°C/min)の2種の速度で行ない、急速の場合は卵浮遊液の入った試験管をそのまま、低速の場合は適当な壁間距離をもった二重壁試験管を使用した。これらの冷却速度はほぼ-7°Cから-13°Cまで冷却されるのに要する時間から算定した*。又低速冷却の場合には試料が-3°Cまで冷却されたときごく少量の氷片を試験管内に投入して凍結を開始させた。急速冷却の場合は試料が-2°Cから-3°Cに冷却される間にほとんど必ず過冷却が破れるので植氷の必要がなかった。冷却速度が上記の範囲を外れたり、過冷却の破れる温度が低すぎた場合の実験値は採用しなかった。

このような方法で凍結させた卵浮遊液の温度が、急速冷却の場合は-18°Cに達したとき、低速冷却の場合は-19°Cに達したとき、直ちに試験管をブライン槽から引ぬいて20°Cの水中に移し、凍結している卵浮遊液を急速に融解させた。凍結曲線から判定すると卵浮遊液の凍結している時間は急速冷却の場合は3分乃至4分間、低速冷却の場合は22分乃至29分間であった。

凍結された浮遊液中の卵細胞は融解直後に時計皿に移して正常な細胞を算え、引続きその発生の進行を観察した。未受精卵の場合はこのとき媒精した。

凍結過程の観察

卵細胞の凍結過程の観察には、-30°Cまで冷却できる特殊な低温箱のなかに設置した倒立顕微鏡を使った。この顕微鏡は接眼部とその付近の一部の鏡胴のみが低温箱外に突出していて箱内にある顕微鏡のすべての可動部分は箱外より電動式で動かすことができる。この顕微鏡の載物台上には試料の温度測定用の微少な熱電対と、植氷セットがあり、双方の先端の位置を低温箱外から移動させることができる。植氷セットは透明な固形ビニール製の細い漏斗形の容器でその底から銀製の短い針が突出している。使用するときにはこの中に固形炭酸の小塊を入れると針の先端に霜をむすぶのでこれを使って試料に植氷する。又載物台下面の中央に近く小形の電熱装置が、顕微鏡の鏡基の下にやや大形の電熱装置があつてもにプレパラートの温度調節に用いられる。

* この実験条件では凍結開始後の試料の冷却速度はほぼ-10°C付近まで冷されたとき最大となり、浮遊液中のウニ卵の細胞内凍結もこのときに最もひんぱんにおこる。

媒液処理

バフソニ未受精卵を1M尿素溶液中に30秒以上つけてから海水にもどして媒精すると受精膜ができずに発生が進行することが知られている³⁾。しかもこのような尿素処理はウニ卵の表層粒を崩壊させ、細胞の水に対する透過性を受精卵と同程度にまで高める⁴⁾。キタムラサキウニ卵で試みた結果、水温18°Cでは尿素溶液での前処理の時間を8分以上にすると始めて受精膜も透明層もない受精卵を得ることができた。こうして得た裸の受精卵と、同じ前処理をした未受精卵の双方を実験に使用した。しかしこの方法は後述するように処理卵に対して無害であるとはいえなかったので、更に別に裸の受精卵を得るためトリプシン海水処理⁵⁾及びカルシウム欠除海水処理⁶⁾の二つの方法をとった。すなわちトリプシンを海水に0.1%溶解したもので卵を10分処理してから海水に戻して媒精した。これと同じトリプシン処理をしたままの未受精卵も比較のために凍結試験に使用した。又卵を媒精後1分以内にカルシウム欠除海水中に移しピペットを出入させて受精膜をとり除き更にカルシウム欠除海水で数回洗っていた。この場合は卵からの脱水量の測定にも低張及び高張のカルシウム欠除海水を用い、凍結実験もカルシウム欠除海水中で行なってから融解後正常海水に戻して発生を進行させた。

III. 結 果

凍結試験

正常の受精卵、未受精卵及び各種の媒液で処理した卵をつかい、卵浮遊液を前記二種の冷却速度で凍結させ、その結果を第1表にまとめて示した。ここに表示した卵細胞の生存率は融解直後に観察された正常卵の数によったが、尿素処理の場合を除いてこれらはどれも正常な卵割を開始することができた。尿素液処理のものは融解後正常にみえた卵の大部分が卵割をはじ

第1表 凍結融解後の卵細胞の生存率*と冷却速度

冷却速度 凍結時間 最終温度		低速冷却 1.00~1.25°C/min 22~29 min -19°C	急速冷却 9~10°C/min 3~4 min -18°C
対 照	未受精卵	88.5±2.5%	4.3±1.8%
	受精卵**	92.0±2.8%	94.1±5.4%
尿素処理	未受精卵	78.5±2.5%	51.3±3.4%
	受精卵**	—	55.7±3.9%
Ca欠除海水処理	受精卵**	—	80.6±4.6%
トリプシン海水処理	未受精卵	—	3.1±2.0%
	受精卵**	—	73.4±8.4%

* 6回の実験の平均値

** 媒精後30分

め胞胚期に達したがこの途中異常卵割するものが少なくなかった。すべての場合融解直後において正常卵でなかったものの大部分は細胞内凍結の結果を意味する後述するような原形質の凝固像をあらわしていた。

第1表に明らかなように

1. 未受精卵の大部分が低速凍結(約1°C/分)には耐えるが、急速凍結(約10°C/分)ではほとんど凍死する。
2. 受精卵は低速・急速いずれの凍結によってもほとんど害をうけない。
3. 尿素溶液で前処理すると未受精卵でも急速凍結に対して非常に抵抗性を増し、同じ処理をした受精卵との間に生存率の差がない。
4. トリプシン海水又はカルシウム欠除海水での処理によって透明層と受精膜を除いた受精卵を急速凍結させても、その生存率は正常の受精卵に比べて僅か低下するにすぎない。
5. 未受精卵が急速凍結に全く耐えられない事実はトリプシン海水での前処理によっても全く変わらない。

尚尿素処理未受精卵の生存率は低速凍結の場合でも正常の未受精卵より低いことがみとめられる。この理由の一つは尿素処理の時間が不当に長かったために細胞原形質が何等かの傷害を受けていたためかも知れない。後述する水に対する細胞の透過性が尿素処理卵は相当に高いにもかかわらず、正常の受精卵に比べると急速凍結に対する抵抗性が劣っていることも恐らくは同じ理由によるものであろう。

凍結過程の観察

ごく少量の卵浮遊液を1滴カバーグラス上にとりシリコンオイルでおおって前記の低温箱内の倒立顕微鏡のステージ上におき、熱電対の先端を試料の液滴中にさし入れた。液滴の温度がほぼ-4°Cにさがったとき植氷して凍結を開始させ卵細胞の凍結過程を観察した。試料は前記の2種類の冷却速度即ち1°C/分と10°C/分にそれぞれできるだけ近い速さで冷却させた。

1. 未受精卵

未受精卵を急速凍結させると、植氷によって細胞のまわりの海水が瞬間的に凍ってから間もなく卵細胞が次々とフラッシングをおこす。すなわち1個の細胞の全体がパツと乳濁したように暗化する⁷⁾。これは細胞内にいち様に無数の微細な氷晶ができたためである。卵細胞のフラッシングは始めのうちは非常にひんぱんに引続きおこるが急速に頻度が減り、植氷後2分位たつともう改めて凍る細胞はきわめて少ない。このようにおそくなってから凍る細胞では、瞬間的な暗化はみとめられず、細胞全体に暗色部が波のようにひろがる。このようにして未受精卵では植氷より2~3分後にはほとんどすべての卵細胞が細胞内凍結をしてしまう(図版I-3)。

細胞内凍結をした卵細胞をごく短時間のうちに急速に融解してみると、凍結によって変性凝固した原形質はまわりの氷がとけると吸水して膨張し、細胞は生きていたときよりも大形になる。前記の試験管による急速凍結試験の場合は融解後の死細胞はそのほとんどがこの吸水膨張した形態であった。細胞内凍結をおこした温度が高いと、又は時間が長くと融解後の死卵の

吸水膨張の程度は少なく、正常卵に近い大きさのまま凝固するようになる(図 I-4)。

いっぽう低速凍結の場合は、卵浮遊液に植氷すると幅の広い樹枝状の氷ができ、卵細胞を包むように生長してまわりの海水がすべて凍ってしまうが、細胞内凍結をおこす卵細胞はほとんどない。温度の低下につれて卵細胞は脱水されて縮少してゆく。このとき卵細胞はまわりの氷の成長のため圧力を受けて不規則に変形するが、未受精卵は、後述する受精卵の場合に比べてはるかに変形の程度が少なく、かなり球に近い外形を保っていることが多い(図版 II-5)。このように細胞外凍結によって縮少していた卵細胞でも、植氷後 30 分以内(終末温度 -20°C 以上)に融解すると、その大部分は全く異常なく原形にもどり、媒精すれば卵割がはじまる。

2. 受 精 卵

受精卵の凍結過程は未受精卵を低速凍結させた場合と本質的に同様で、たとえ急速に凍らせても細胞内凍結をおこすものはほとんどない。氷に包まれた卵細胞は急速に脱水されてよく縮少し、未受精卵の場合に比べるとはるかに不規則な大きな凹凸のある形や極度に扁平な形になり易い(図版 II-5)。この場合も終末温度が -20°C 以上ならば卵細胞は融解後例外なく原形を恢復し、異常なく卵割がすすんだ。

3. 尿 素 処 理 卵

未受精卵でも急速凍結に耐えて細胞外凍結をおこしやすい。脱水変形の程度は正常の受精卵に劣らず甚しい(図版 III-8)。急速凍結によって一部の細胞はフラッシングをおこしたが、これらは融解後吸水の程度が少なくほとんど暗黒にみえる程濃密に凝固していた。受精卵の場合も凍結過程は全く同様で、すべての細胞が不規則な形に又は扁平につぶれた形で細胞外凍結をおこしていた(図版 III-9)。これらを融解すると受精卵も未受精卵も大部分は正常に恢復したが、一部の卵細胞は水泡を表面からふき出して崩壊した。

4. カルシウム欠除海水処理卵

この処理で被膜を除いた裸の受精卵の凍結過程は正常の受精卵のそれとほとんど差がみとめられなかった。融解後卵は何れも卵割を行なった。

5. トリプシン海水処理卵

この処理で得られた裸の受精卵は正常の受精卵と同様に細胞外凍結をおこしやすく、よく変形縮少して急速凍結に耐えた(図版 III-7)。未受精卵はこの処理をしても急速に凍らせるときわめてフラッシングをおこし易く、又或程度細胞外凍結をおこしながら遂に細胞内凍結をしてしまった卵もいくつか観察された(図版 II-6)。

卵細胞からの脱水速度の測定

卵細胞からの脱水速度を比較するため、高張海水中で一定時間内に卵から出る水量を Hobson の写真法⁹⁾により室温(約 17°C)で測定した。まず卵細胞を 80% の濃度の低張海水中に移して平衡

第 2 表 高張海水中で 3 分以内に卵細胞より出る水の量($\times 10^3 \mu^3$)

処 理	受 精 卵*	未 受 精 卵
対 照	487	365
尿 素 溶 液	447	447
カルシウム欠除海水	443	—
トリプシン海水	458	—

* 媒精後 30 分

に達するまで吸水させた*。この卵浮遊液を1滴とって時計皿にみたした4ccの150%の濃度の高張海水中に加え3分後に顕微鏡写真をとった。高張海水によって脱水され縮少した卵の直径をこの写真によって測定し、この値から3分以内に卵から排出された水の量を算出した(第2表)。

第2表からわかるように、卵細胞からの脱水量は受精卵と未受精卵との間に大差がある。ところが尿素処理をした卵では、受精卵も未受精卵も脱水量が等しく、正常な受精卵からの脱水量には及ばないが未受精卵の値よりはるかに大きな値を示している。トリブシン海水又はカルシウム欠除海水処理によって裸にした受精卵からの脱水量も尿素処理卵の場合に等しいかほぼそれに近い。

IV. 論 議

著者は前報⁹⁾において、ウニ卵を海水とともに急速に凍らせる場合の凍死の主因は細胞内凍結であることを明らかにし、しかもこのときの細胞内凍結は、細胞をとりまく氷によって原形質が植氷される結果としておこることをのべた。

古くから知られているようにゼラチンゲルの塊の内部の水は非常に凍りにくい。Moranは12%のゼラチンを含むゲルが -3°C の凍結温度で平衡状態になったときは54.3%にも濃縮されるのに、 -3°C の空气中で冷却されると氷はゲル塊の表面にのみできて内部には進行しないことを観察した⁹⁾。又Luyet等は50%の濃度のゼラチンゲル内に作られた氷晶は、このゲルが何も他の溶質を含まないのに -15°C 以下に冷却されないとほとんど生長できないことを報じている¹⁰⁾。これらの事実はゼラチンゲルの中にふくまれた水はその分子運動が非常に阻害された状態にあることを示している。

いつぼう生物細胞の原形質は、その表層部がゲル状の構造をなしていると考えられている**。ウニの卵細胞においても、その時の細胞内の水と平衡状態にある媒液の氷点より明らかに低い温度において原形質表層部の水ははじめて凍結するように見える。実際に細胞外凍結をしてその外面が氷に接しているウニ卵を、次第に温度を下げながら氷を先端につけたマイクロピペットを使ってその原形質表層部をわずか突きやぶって植氷してやると、内部の細胞質中に容易に氷晶が生ずる事実⁷⁾は、少なくとも細胞表層部の原形質は内部のそれに比べてきわめて凍りにくい状態にあることをあらわしている。又上記の事実は細胞外凍結に伴う脱水濃縮による細胞内部の液の氷点降下が、冷却されつつある細胞自身の温度降下に追いついていなくても氷は細胞内に侵入できないことを示している。それ故氷が細胞外表部に接していても、ゆっくりと冷却されるかぎり細胞内の水は細胞外の氷の表面まで連続的に引出されてここで凍り、細胞内は濃縮されるが氷は内部にできない、つまり細胞表層部の原形質は水は透すが氷は通さない防壁をなしていることになる。勿論このような過程は細胞外凍結の初期におこるものであって、細胞外凍結による細胞からの脱水がすすめば内部細胞質も次第に凍りにくくなり、遂には細胞

* 吸水による卵の膨張はほぼ10分以内に終るが、本実験では卵を20分間80%海水に入れておいた。

** 平本によればバフンウニ卵ではこのゲル層の厚さは 3μ (未受精卵)~ 4μ (卵割直前の受精卵)である¹¹⁾。

表層部を突きやぶってやっても、もはや細胞内部に氷をつくることは不可能となる⁷⁾。

以上のように考えると、細胞表層部を突きやぶらずに細胞内部を凍らせるためには、細胞外凍結の初期において細胞を急速に冷却することによって細胞表層部に含まれている水を十分に過冷却させ、細胞の外面に接した氷によってこの部分への植氷を可能にすればよいと思われる。本実験において未受精卵を急速に凍らせるとまず細胞のまわりの海水が凍り、それについて卵細胞の細胞内凍結が頻繁におこるが、ゆっくり凍らせると卵細胞が氷に接していても細胞内凍結はおこらない事実は上記の考え方を支持するものである。

さてこの考え方が許されるならば細胞の表面付近の冷却速度を低めるような要素はすべて細胞内凍結をおこりにくくさせる結果をもたらすであろう。前述のように細胞外凍結による脱水が進行しつつある間は、細胞とその外面に接する氷との界面において、細胞から出てきた水が氷にかわるからここでは熱の発生が連続的におこっている。しかし細胞から水の出るの速度は充分速いわけではないので*、やや急速に冷却されると氷の生成に伴う温度上昇はこれに追いつかず細胞表面の温度は次第に下ってゆく。従って細胞外凍結の状態にある細胞を適当な速度で冷却してやる場合には、細胞から水の出る速度の大きい細胞程細胞内凍結がおこりにくくはらずである。

前述の凍結試験において10°C/分程度の冷却をあたえると、受精卵では凍死するものはきわめて少ないが、未受精卵はほとんどすべて凍死した。しかもこの場合の凍死はすべて細胞内凍結をおこした結果であることが凍結過程の観察によって確かめられた。急速凍結に対して受精卵がしめすこのように高い抵抗性は未受精卵のもっていない受精膜や透明層によるものではないことは、カルシウム欠除海水やトリプシン海水で処理してこれらの被膜を除いた受精卵も正常の受精卵に近い抵抗性をもつことからみて明らかである(第1表)。

いっぽうウニの卵細胞が受精によって急速に水に対する透過性を増すことはすでによく知られている^{13),14)}。石川はバフンウニ卵の吸水速度は受精後15分(室温)において未受精卵のそれの1.6倍位に達し以後1時間はほぼ一定であることを明らかにした⁹⁾。本実験においても受精30分後におけるキタムラサキウニ卵からの脱水速度が未受精卵のそれに比べて1.3倍以上増大することが測定された。又バフンウニでは未受精卵を尿素溶液で処理すると、細胞の吸水速度は受精卵のそれとほとんど等しくなることが知られている⁹⁾。キタムラサキウニ卵でも尿素処理をした未受精卵からの脱水速度は同じ処理をした受精卵の場合と等しく、正常の未受精卵のそれよりも著しく増大することがわかった(第2表)。しかもこのような尿素処理をした未受精卵では急速凍結に対する生存率が明らかに増大した(第1表)。これらの結果からみてウニ卵細胞の急速凍結に対する抵抗性がその細胞の受精によって著しく増大する主要な原因の一つは細胞からの脱水速度が増したからであると考えられる。

さて受精卵の急速凍結に対する抵抗性の増大が一部はこのようにして説明されるとしても

* 篠崎によればキタムラサキウニ未受精卵の滲透脱水のときの水に対する透過度は、水温23°Cにおいて、 $0.38 \mu^2/\text{min}/\mu^2/\text{atm.}$ である¹²⁾。

高張海水中で測定された細胞からの脱水速度の受精前後における差はそれ程大きなものではない。これは一つには脱水量の測定法が不適当なためと考えられる。前述のように脱水量の測定は卵細胞を高張海水中に移して3分後に行なったのであるが、詳細に観察すると受精卵からの脱水の大部分はこれより短時間のうちに終了してしまうらしく、3分後の測定値の差は初期の脱水量の差よりはるかに少ないものをあらわしている可能性が多い*。

さらに卵浮遊液の凍結にあたっては、1.5倍の高張海水中でおこるようなおだやかな脱水がおこるのではないということを指摘する必要がある。特に急速凍結では近々1分間に最初の濃度の5倍位の高張海水にさらされた場合に近い状態におかれることになる。従って細胞から水を引きだす力の大きさ(細胞の内外にある水の化学ポテンシャルの差)はきわめて大きいと考えられる。しかしこのように大きな力に応じて細胞が急速に脱水されるためには細胞の表層部が十分にやわらかく、しなびやすくなければならない。又細胞がやわらかければ収縮するときその外側で生長している氷におされて表面が不規則に変形しやすいから、脱水されつつある細胞の表面積も球形のままちぢむ場合よりは増大することになる。それ故細胞の表層部のかたさは細胞外凍結による脱水の速度に大きく関係するであろう。ウニ卵は受精するとその表層部がわずか1分以内に非常にやわらかくなることがわかっている¹⁹⁾。今回の観察によっても受精卵や尿素処理卵は細胞外凍結によって非常に不規則な形につぶれやすく、いっぽう細胞外凍結をしている未受精卵は相当収縮した場合でも受精卵に比べると変形の程度が少なく球に近い外形を保っていることが判った(図版II-5)。

これらの結果を総合して考えると、細胞外凍結の状態急速に冷却されるとき細胞からの脱水速度は、受精卵と未受精卵において大きな差のあることは明らかである。このとき細胞から出る水の凍結の潜熱によって細胞表層部の冷却速度が低下すると考えれば、受精卵が細胞内凍結をおこしにくい原因を細胞表層部のこのような性質の変化に帰することができるであろう。

摘 要

生物細胞の耐凍性機構の一つとして、細胞浮遊液が急速に凍結される際におこる細胞内凍結を防ぐための機構をしらべた。

実験材料としてキタムラサキウニ *Strongylocentrotus nudus* の受精卵及び未受精卵を用い、これらの正常な細胞の他に、尿素溶液処理によって細胞の水に対する透過性を増加させた未受精卵と、トリプシン海水又はカルシウム欠除海水によって受精膜と透明層を除いた裸の受精卵とを使用した。

1. これらの卵細胞の海水浮遊液を低速(約1°C/分)及び急速(約10°C/分)の2種の冷却速度で凍結させ、ほぼ-19°Cにまで冷却されたとき急速に加温して融解させた。未受精卵は低速凍結には耐えるが急速凍結ではほとんど全滅する。受精卵はいずれの冷却速度にも耐えほと

* このために測定の時間を短縮することが望ましいが、低張海水中で吸水させてある卵細胞を高張海水中に移すとしばらくは浮んでおり次第に水底に沈むため今回の方法は短時間の測定にやや不適當である。

んど害を受けない。尿素処理をした未受精卵は同じ処理をした受精卵と同様に急速冷却に対しても半数以上の卵細胞が生き残る。媒液処理によって受精卵から受精膜及び透明層を除いても急速凍結に対する高い抵抗性は正常の受精卵とほとんどかわらない。

2. 次にこれらの卵の凍結過程を顕微鏡下に観察した。未受精卵は急速に凍結させると、まず周囲にある海水が凍った後頻りにフラッシングすなわち瞬間的な細胞内凍結をおこしてそのほとんどが凍死する。フラッシングは凍結開始の最初の2分間以内にほとんど終り、これ以後に細胞内凍結をおこす卵細胞は非常に少ない。未受精卵も低速凍結では細胞内凍結はおこりにくく、そのほとんどが細胞外凍結によって脱水縮小される。しかし次にのべる受精卵の場合に比べると縮小するときの変形の程度が少なく比較的球に近い形を保っている。受精卵は急速・低速双方の凍結においてつねに細胞外凍結のみをおこす。その場合脱水縮小された卵細胞の形はきわめて凹凸が多く又扁平になりやすい。尿素処理をした受精卵・未受精卵、又媒液処理によって裸にした受精卵の凍結過程は何れも正常な受精卵の場合に近く、急速凍結させるとほとんどが細胞外凍結によって甚だ不規則な形で縮小する。

これらの凍結した卵を融解させると、細胞外凍結をしていた卵はほとんどが正常の形態にもどり発生を進行させることができる。しかし細胞内凍結をおこした卵は例外なく凝固し特徴のある凍死像をあらわす。

3. 次にこれらの卵細胞からの脱水の速度を高調海水中で測定した。未受精卵は受精卵に比べて脱水速度がはるかに低い。尿素処理をすると未受精卵でも正常な受精卵に近い脱水速度をあらわす。媒液処理によって裸にした受精卵からの脱水速度はいずれも正常な受精卵に近い。

これらの結果を総合すると、卵細胞浮遊液が急速に凍結されるとき凍死は、まわりの氷によって細胞表層部の原形質が植氷される結果おこる細胞内凍結によるものと考えられる。又受精卵が未受精卵よりも急速凍結に対して細胞内凍結をおこしにくい理由は、受精卵の原形質のもつ性質、特に水に対する透過性が高いこと、及び表層部が柔らかく変形しやすいことのために、細胞外凍結の際1個の細胞の全表面から水の出る速度、従ってここでの氷の生成する速度をはやめその結果少なくとも凍結過程の初期において細胞表層部の冷却速度を低下させ上記の植氷作用を防ぐこととなるからであると考えられる。

追 記

本実験では凍結した卵浮遊液を試験管ごと20°Cの水中に入れて融解したが、このような急速融解は少なくともキタムラサキウニでは卵細胞に有害であることが其後判明した。このため凍結融解後のウニ卵の生存率がやや低くあらわされているが、全体としての急速凍結に対する抵抗性の傾向は変らない。この問題については近く続報する。

文 献

- 1) 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.
- 2) Asahina, É. 1961 Intracellular freezing and frost-resistance in egg-cells of the sea urchin. *Nature*, **191**, 1263-1265.
- 3) Motomura, I. 1934 On the mechanism of fertilization and development without membrane formation in the sea urchin egg, with notes on a new method of artificial parthenogenesis. *Science Rep. Tohoku Imp. Univ.* IV, **9**, 33-45.
- 4) Ishikawa, M. 1954 Relation between the breakdown of the cortical granules and permeability to water in the sea urchin egg. *Embryologia* **2**, 57-62.
- 5) Sugawara, H. 1943 The formation of multinucleated eggs of the sea urchin by treatment with proteolytic enzymes. *J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ.* IV, **6**, 129-139.
- 6) Hobson, A. D. 1932 On the vitelline membrane of the egg of *Psammechinus miliaris* and of *Teredo norvegica*. *J. Exp. Biol.*, **9**, 93-106.
- 7) 朝比奈英三 1953 生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞(ウニ)の凍結過程. *低温科学*, **10**, 81-92.
- 8) Hobson, A. D. 1932 a The effect of fertilization on the permeability to water and on certain other properties of the surface of the egg of *Psammechinus millialis*. *J. Exp. Biol.*, **9**, 69-92.
- 9) Moran, T. 1926 The freezing of gelatin gel. *Proc. Loyal Soc. Lond. A*, **112**, 30-46.
- 10) Luyet, B and Rapatz, G. 1958 Patterns of ice formation in some aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 1-68.
- 11) Hiramoto, Y. 1957 The thickness of the cortex and the refractive index of the protoplasm in sea urchin eggs. *Embryologia*, **3**, 361-374.
- 12) Shinozaki, J. 1951 The permeability of the sea-urchin egg to water and to ethylene glycol. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.* VI, **10**, 113-122.
- 13) Lillie, R. S. 1916 Increase of permeability to water following normal and artificial activation in sea-urchin eggs. *Amer. J. Physiol.*, **40**, 249-266.
- 14) Iida, T. 1943 Correlative changes of capacitance and permeability following fertilization in sea urchin eggs. *J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ.* IV, **6**, 153-163.
- 15) Harvey, E. B. 1933 Effects of centrifugal force on fertilized eggs of *Arbacia punctulata* as observed with the centrifuge-microscope. *Biol. Bull.*, **65**, 389-396.

Résumé

It was demonstrated in a previous paper²⁾ that the main cause of frost-killing in a rapidly cooled cell suspension of sea urchin egg cells was intracellular freezing, and that initiation of such an intracellular freezing could be explained as a result of inoculation from the outside with ice crystals at least at a moderately low temperature. It may be therefore reasonable to suppose that a decrease of cooling rate at the interface between the cell and the surrounding ice-mass will be effective in preventing the ice seeding into the cell. The present paper deals with observations on this problem.

Egg cells of a sea urchin *Strongylocentrotus nudus*, both fertilized and unfertilized, were used as material. In fertilized eggs the rate of dehydration from eggs, measured in

a definite hypertonic sea water, was far larger than in unfertilized ones. However, if they had been previously treated with 1 M urea solution, unfertilized eggs, too, exhibited a high permeability to water (Table 2).

Small drops of egg suspension in sea water, contained in test tubes, were singly subjected to freezing both rapidly (10°C/min) and slowly (1°C/min). When these freezing suspensions were cooled to a final temperature of about -19°C they were rewarmed and thawed rapidly at 20°C; they were then observed under microscope for counting the intact egg cells (Table 1). Fertilized eggs are found to be very resistant to both rapid and slow freezing, while practically all the unfertilized eggs cannot withstand rapid freezing although they, too, can survive slow freezing. Unfertilized eggs treated with urea solution, however, show a high resistance to rapid freezing. The high resistance to rapid freezing noted in fertilized eggs seems to be not due to the existence of fertilization membrane or hyaline plasma layer both of which have been formed entirely covering the cell on fertilization, because fertilized eggs denuded by a treatment with trypsin sea water or Ca-free sea water are found to be as resistant as intact fertilized eggs to rapid freezing.

Use being made of a special refrigerator the freezing process in these egg cells was observed under a microscope. Soon after they have been surrounded by frozen sea water, unfertilized eggs are very liable to undergo intracellular freezing provided they are rapidly cooled (Pl. I-3); but when cooled slowly, they never freeze intracellularly, instead, they make a marked contraction resulting from an extracellular freezing. Even in such a contracted state, the form of the unfertilized egg cells is not remarkably changed, being as a rule, nearly spherical (Pl. II-5). In fertilized eggs, on the other hand, no intracellular freezing can be found, even if they are rapidly cooled. They always undergo extracellular freezing alone with a remarkable dehydration and contraction. Upon such a contraction, fertilized eggs, in contrast with the case of unfertilized ones, always change their cell form into a very irregular or flattened shape (Pl. II-5). The freezing process in both unfertilized eggs treated with urea solution and fertilized eggs denuded by a treatment with the artificial media, is found to be almost the same as in normal fertilized eggs. Under the present experimental conditions almost all cells survived extracellular freezing, but by intracellular they were invariably killed.

From the considerations described above, the most effective factors in fertilized sea urchin eggs to prevent an intracellular freezing may certainly be a high permeability of cells to water and a remarkable plasticity of the cell form. These two factors, by increasing the velocity of dehydration from the freezing cell, can reduce the cooling rate at the cell surface where ice formation and therefore the liberation of latent heat successively occur.

図版説明

- I-1 キタムラサキウニ受精卵。 ×200
- 2 キタムラサキウニ未受精卵。 ×200
- 3 未受精卵のフラッシング(急速細胞内凍結)。 -16°C 。 ×70
- 4 急速冷却によつてフラッシングした後融解させた未受精卵。 -20°C に達してから2分後融解。細胞内凍結をしていた時間の長いものほどよく凝固していて吸水膨張の程度が少ない。 ×200
- II-5 未受精卵(U)と受精卵との細胞外凍結。未受精卵は収縮しても球形に近い。媒液に植氷後低速冷却。 -13°C 。これらの卵は融解後生存。 ×190
- 6 トリプシン海水で処理した未受精卵の急速凍結。右下方の4細胞はフラッシングをしている。左側の2細胞は細胞外凍結がやや進んでから細胞内凍結をおこなっている。 -19°C 。 ×155
- III-7 トリプシン海水で処理した受精卵の急速凍結。細胞外凍結によつて収縮している。 -18°C 。融解後生存。 ×300
- 8 尿素処理をした未受精卵の細胞外凍結。 -14°C 。融解後生存。 ×300
- 9 尿素処理をした受精卵の細胞外凍結。 -17.5°C 。融解後生存。 ×155





