



Title	細胞組織の固定法としての凍結乾燥法の再吟味
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 101-107
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17666">https://hdl.handle.net/2115/17666</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p101-107.pdf



## 細胞組織の固定法としての凍結乾燥法の再吟味\*

根井外喜男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和37年6月受理)

### I. 緒言

凍結乾燥法は生物試料の形態的観察の場合の1つの手段として、この方法が創案された19世紀末期から既に利用されている<sup>1),2)</sup>。例えば組織学的な立場からは生の形態をそのまま保持し、特に細胞含有成分が標本作成時に移動したり消失したりするのを防ぐためにその固定法として用いられ、また細菌やウイルスの形態学では細胞や粒子の生の時の原形を保持するものとして賞用されてきた。

凍結乾燥された標本では、通常の固定法で作られたものとは異なった所見を示すこと、細菌やウイルスでは明らかに立体像を呈することなどから、凍結乾燥によるものは他の方法にくらべて、より生の状態に近いものであると見做されてはきたが、果して原形がそのまま保たれているかどうかについては確認がない。

本実験はこの点を究明するために行なわれたもので、試料として *Escherichia coli* が用いられた。これは細菌では光学顕微鏡像が明らかにされており、生の時の原形もほぼ推定されるからであった。組織では個々の細胞の外形的な変化はとらえ難いし、ウイルスでは原形が果してどんな形をしているのか想像できないという理由で、これらは用いなかった。

### II. 実験方法

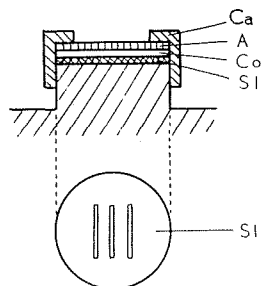
前述のように材料として教室保存の *E. coli* を用い、その普通寒天培地18時間培養のものを蒸溜水で3回洗滌し、更に蒸溜水の浮遊液とし、菌濃度は凡そ50~100 mg/mlとした。これは通常の電子顕微鏡標本を作るための菌液に比較すれば極めて高濃度のものであるが、噴霧法では1液滴内の菌数はそれほど多くないこと、また凍結乾燥法によると大部分の菌体は乾燥の途中でポンプ側に飛散する可能性があるため、このくらいの高濃度の菌液でないと不充分のように思われた。菌液は Vaponefrin nebulizer を用いて噴霧した。

凍結乾燥装置は既に報告したもの<sup>3)</sup> とほぼ同様で、Williamsの方法<sup>3)</sup> に倣ったもので原法と大差はない。ただ乾燥後一旦とり出して他の蒸着装置に移して shadowing をするのでは、

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第625号

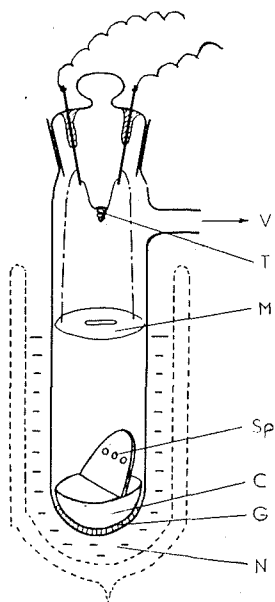
菌体の位置の移動(立体的配位をとっているので、真空を破るときに注意しないと飛散したり位置が変わったりする)や、空気中の水蒸気を吸湿するおそれがあるので、乾燥容器にそのまま蒸着装置をとりつけたものである。ただ容器が小さいので、ガラス管壁からの乱反射を防ぐためにタングステン・バスケットと試料の間に雲母板にスリットを作ったものを置いたり、shadowingの際に試料を冷したりした。

また Williams のような高速噴霧器を用いなかったので、その代わりに噴霧された試料の冷却速度ができるだけ大きくなるように工夫した。即ち試料支持台である真鍮ブロックの上部は斜角度の板になっていて(shadowing に適当な角度になるよう予め作られている)、その上面に円柱状の突起があり、実験に際し表面にメッシュを載せその上からリング状のキャップをかぶせてメッシュが真鍮ブロックによく密着するように準備しておく。メッシュはなるべくスリット・メッシュを用い、コロジウム膜を張った上さらにアルミニウムを蒸着した。これは試料の凍結に際してコロジウム膜の破れるのを防ぐと同時に、噴霧液滴から真鍮ブロックへの熱伝導をよくするためであった(第1図)。



第1図 ブロックの突起上に載せたメッシュ

Ca: キャップ A: 蒸着されたアルミニウム膜  
Co: コロジウム膜 Sl: スリット・メッシュ



第2図 乾燥容器

V: 真空ポンプ T: タングステン・バスケット M: 雲母板  
Sp: 試料 C: 真鍮ブロック  
G: 真空グリース N: 液体窒素

その他の点では Williams の装置とほぼ同様で第2図に示すように、細長いガラス容器の底に前述のコロジウム・メッシュをとりつけた真鍮ブロックを真空グリースで密着させ、これに噴霧用の真鍮パイプを挿入した上で魔法瓶中の液体窒素に浸し、所要温度まで冷却しておく。この液体窒素中で冷却する場合には、徐々に浸さないとグリースのついた部分でガラスの割れることが多いから注意を要する。

以上のように準備された装置に対して nebulizer の試料を噴霧した。1回の噴霧では膜面に附着する液滴はあまり多くないので、数回噴霧をくりかえしたが、1回毎に充分時間をおいて噴霧された液滴及び空気による膜面の温度上昇が元に復するのをまった。噴霧が終わった後は噴霧用のパイプを抜き出し、代わりに蒸着用ヒーターのついた蓋をし乾燥機に接続して減圧を開始した。同時に液体窒素をとり去って $-60^{\circ}\text{C}$ のアルコールの入った魔法瓶と置きかえた。引続き乾燥を続行すると、1.5乃至2時間でブロック上面に附着して肉眼的にも白く見えていた霜が昇華し消失した。ここまでの試料はほぼ乾燥を終了したのであろうが、念の為3時間まで乾燥を続けた。Williams は $-45^{\circ}\text{C}$ に保持して(但し $5 \times 10^{-4}$  mmHg) 10

乃至 15 分おけば充分乾燥できるといっているが、本実験では完璧を期して  $-60^{\circ}\text{C}$  で 3 時間乾燥を続けた後、徐々に  $30^{\circ}\text{C}$  まで温度を上げた。乾燥終了後は直ちに shadowing を行なったが一部には比較の目的で shadowing をしないもの或いは他の蒸着装置に移して shadowing を行なったもの等がある。対照の標本としては、同じ菌液の空気乾燥(凍結しないもの)又は緩慢凍結乾燥したものを作った。

これらの標本は日本電子製 JEM-5 L 型電子顕微鏡を用い加速電圧 80 KV 乃至 100 KV、直接倍率 5,000 乃至 10,000 倍で観察及び撮影された。

### III. 実験結果

#### 1. 対照空気乾燥菌体

噴霧後空気乾燥したものでは、液滴中の菌体はすべて 1 つの集塊となるので、個々の細胞を観察するためには、噴霧法よりもむしろ通常の sampling 法が良かった。いずれにせよ空気乾燥菌体は shadow の様子からもよくわかるように、極めて扁平で且つ電子線に対しては透過性が良い。

#### 2. 凍結乾燥菌体

実験方法の項で述べたような条件で作られた標本の凍結乾燥菌体は、前記空気乾燥菌体とは明らかに異なった形態を示した。即ち、液滴中の個々の菌体はかなりよく分散し、しかも shadow の状態から一見してわかるように立体的配位をとっている。その中には膜面に密着した菌体もあれば、接続し合って膜面から離れたような状態のものもある。それらの個々の菌体は極めて電子線の透過性が悪く空気乾燥のように菌体内部はわからない。大体に於いて廻転楕円体の形態をとっていることは shadow からわかるが、倍率を上げてよく観察すると、光学顕微鏡像或いは空気乾燥の対照像から想像されるような円滑な輪郭を示さず、表面構造はかなり粗造で細かな皺が菌体一面にみられる。これが単に表面だけのものか、かなり内部にまで亘っているものはよくわからないが、とにかく空気乾燥のものでは均一な構造しか示さないのに、それとは明らかに異なってしかもかなり多種の構造を示した。

そこで凍結乾燥によって菌体が収縮するのではないかと考えて、菌体の大きさの検討を行なってみた。先ず空気乾燥のものは乾燥時の表面張力によって圧縮されて扁平になったものと

第 1 表 空気乾燥菌と凍結乾燥菌の大きさの比較 (菌体の幅)

実験例	直接倍率	空 気 乾 燥			凍 結 乾 燥	
		測定菌数	平均の幅 $W$ (mm)	乾燥前原形菌の 推定直径* $d$ (mm)	測定菌数	平均の直径 $d'$ (mm)
No. 1	6,000×	25	$5.4 \pm 0.5$	3.4	46	$2.2 \pm 0.3$
No. 2	7,500×	23	$6.4 \pm 0.4$	4.1	27	$4.2 \pm 0.3$
No. 3	9,500×	5	$6.5 \pm 1.4$	4.1	11	$3.5 \pm 0.2$

\* 空気乾燥菌に  $2/\pi$  を掛けたもの

すれば、その扁平になった菌体の幅を  $W$  としたとき、原細胞の径  $d$  は  $W \times 2/\pi$  に等しいか、むしろそれより大きい筈である(空気乾燥で扁平になったとしても、多少の厚みはある筈だから)。ところが実際に凍結乾燥菌について測定した値  $d'$  は、それよりもかえって小さいくらいであるから、原形と考えられる菌体よりも凍結乾燥菌体はかなり収縮しているのではないかと想像される(第1表参照)。



第3図 空気乾燥菌から推定した原形菌と凍結乾燥菌との大きさの比較(模式図)

乾燥過程での試料温度は変形を防ぐという意味ではなるべく低いことが望ましいのであろうが、乾燥の効率を考えればむやみに低温にするわけにもいかない。Williams は  $-45^{\circ}\text{C}$  で、10~15分乾燥すればよいといっているが、いま液体窒素の温度で乾燥を開始してすぐ、外からの冷却をやめて乾燥容器をそのまま室温に露出しても、乾燥後の所見としては差がない。

また一方、最初の冷却時の条件として、前述のような急速凍結を行わず  $1^{\circ}\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の冷却速度で  $-196^{\circ}\text{C}$  までの緩慢凍結を行なったものでは、第9図のような極端な収縮像をみとめた。なお種々の冷却条件及び乾燥条件のもとで行なった凍結乾燥菌体の所見については別報<sup>9)</sup>に譲る。要するにこれらの結果からみても、急速凍結は明らかに細胞の原形保持に有効であることがわかる。

#### IV. 考 察

実験結果からもいえるように、本法で行なった範囲の凍結乾燥法では、菌体の大きさからみてもまた微細構造からみても、生の細胞の原形が完全にそのまま保持されているとは思われず、菌体全体としての多少の収縮が想像される。

いま凍結乾燥過程での変形の起りうる原因を考えてみるのに、凍結或いは乾燥過程での細胞の内外に於ける氷晶の生成、乾燥過程での細胞内不凍水分の脱水に伴う変化、及び電子顕微鏡観察時の電子線照射による変形の3因子があげられよう。

まずこの種細胞組織の形態的観察にあたって最もきづかれるものは、氷晶の形成による細胞構造の破壊である。この氷晶形成による影響をできるだけ小さくするためには、冷却速度を大きくして個々の氷晶をなるべく小さくすることが必要である。理想的に言えば vitrification を起させればよいのであろうが、それが可能としてもその後の乾燥過程で  $-60^{\circ}\text{C}$  或いはそれ以上に試料温度を上げた場合、果して recrystallization を起さないですむであろうか。Luyet 等<sup>5),6)</sup>も蛙の筋肉や血液を用いての実験で、超急速凍結を行なっても電子顕微鏡的に始めて観察される程度の  $0.1\sim 1.0\mu$  の細胞内氷晶形成をみとめている。我々の曾っての実験<sup>9)</sup>でも、同様の装置で作った TMV 粒子の標本で、各噴霧液滴中に  $0.5\sim 2\mu$  くらいの氷晶の跡と思われる像を得ているので、乾燥終了まで vitrify した状態を期待することは無理であろう。いずれにしても細胞内外の氷晶の生成が重要な問題であると思われる。

次に乾燥過程の末期に起ると想像されるところの細胞内未凍結水分の脱水に伴う変形について考えてみる。*E. coli* は全水分量の9%は $-60^{\circ}\text{C}$ になっても凍結しないで残っていることが確かめられた<sup>7)</sup>。ところが一方凍結乾燥では、最終段階で真空度 $2 \times 10^{-3}$  mmHgで $30^{\circ}\text{C}$ まで加温した時は、不凍水分9%のうちの77%即ち全水分量の約7%が凍らないまま乾燥過程で脱水されることになる<sup>8)</sup>。凍結状態にあつて氷晶だけが昇華している間は細胞の変形はないかもしれないが、細胞構造からその構造自身を構成している一部の水分(必ずしも液状とはいえないかもしれぬが)が移動して出る場合には多少の変形が考えられるのではなからうか。特に本法で用いたのは蒸留水浮遊液であるから、細胞周囲は蒸留水の氷だけに包まれているのであつて、この氷は細胞内からの脱水が始まる以前にすべて昇華してしまうものと思われるので<sup>9)10)</sup>、細胞内不凍水分が脱水される時には、氷に囲まれて固定された状態にあるわけではない。まして乾燥終末に次第に試料温度が上昇して室温に近づく過程では、脱水による変形を考慮しなければならぬであろう。但しこの程度の水分量の脱失によって菌体容積にどのくらいの収縮をきたすべきものかについては定量的なうらづけはない。

最後に、このようにして作られた標本を電子顕微鏡で観察する場合に電子線照射によっておこる artifact を考えてみる。生物試料の電子顕微鏡観察に当つては、電子線照射による影響を考慮して照射電流はできるだけ小さくする必要がある。本実験でももちろんこの点には充分の注意は払われているが、ただ他の実験<sup>9)10)</sup>に於いて、対照の空気乾燥菌では全然影響のないくらいの弱い照射電流でも(この時の試料面での電子流密度は $5.6 \times 10^{-4}$  A/cm<sup>2</sup>)、凍結乾燥菌体はかなりの影響をうけることが酵母並びに大腸菌でみとめられている。その変化の特徴は照射によってまず菌体の膨大がおこりその後でかえって収縮することである。事実本実験でも細胞内に多少 porous な構造のみられるものでは、暫く照射を続けて観察していると、内部構造が次第に明瞭になってくるものが多いことから、電子線による変化が考えられるので、充分注意する必要がある。

以上要するに、Williamsの方法に倣い細菌を試料として作った標本では、細胞の生の状態の完全な保持は期待できなかった。本法でさえこの程度の変形があるとすれば、通常行なわれる組織固定法としての凍結乾燥では、試料の冷却速度がかなり小さいから、氷晶生成によるところのより大きな変形が想像される。

## V. 摘 要

*E. coli* の蒸留水浮遊液を試料とし、Williamsの方法に倣って噴霧による超急速凍結後 $-60^{\circ}\text{C}$ で乾燥した標本に於いても、細胞は多少の変形を示し原形を完全に保持しているとは思われないので、組織固定法としての凍結乾燥法の実施については充分の検討を要するものと思う。

## 文 献

- 1) Gersh, I. and Stephenson, J. L. 1954 Freezing and drying of tissues for morphological and histochemical studies, in *Biological Application of Freezing and Drying*. (Edited by R.J.C. Harris) Academic Press, New York.
- 2) Williams, R. C. 1954 The application of freeze-drying to electron microscopy, in *Ibid*.
- 3) 根井外喜男・佐々木芳郎・四方英四郎 1956 Tobacco Mosaic Virus の凍結乾燥による断裂について. *低温科学, 生物篇*, **14**, 75-85.
- 4) 根井外喜男 1962 微生物の凍結の機構 II. 電子顕微鏡による大腸菌の形態的観察. *低温科学, 生物篇*, **20**, 109-120.
- 5) Menz, L. J. and Luyet, B. 1961 An electron microscope study of the distribution of ice in single muscle fibres frozen rapidly. *Biodynamica*, **8**, 261-294.
- 6) Rapatz, G. and Luyet, B. 1961 Electron microscope study of erythrocytes in rapidly frozen frog's blood. *Biodynamica*, **8**, 295-315.
- 7) 僧部 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との関係について. *低温科学, 生物篇*, **19**, 49-57.
- 8) 根井外喜男・僧部 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.
- 9) 根井外喜男 1961 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. *低温科学, 生物篇*, **19**, 79-93.
- 10) 根井外喜男 1962 同上 II. 大腸菌の16 mm 映画撮影による動的観察, *低温科学, 生物篇*, **20**, 95-100.

## Résumé

Williams' freeze-drying method was duplicated, with some modification, to ascertain whether the original size, shape and fine structure of living cells can be entirely retained after drying. According to observations on *Escherichia coli* with electron microscope, it seems that the cells were slightly shrunken and wrinkled due to freeze-drying. Some discussion is also offered on a few factors influencing the cell morphology during freeze-drying.

## 写真説明

## 図版 I

- 4 対照の空気乾燥菌。1液滴中の菌体はすべて密集している。 5,000×
- 5 同上。遊離した菌体，shadowの様子からわかるように菌体は扁平で菌体内部は無構造で電子透過性である。ただ2,3カ所電子不透過性の部分のあるのは乾燥による人工所産と思われる。 15,000×
- 6 急速凍結乾燥菌。液滴内の菌体の分散性はかなり良い，しかし相互に接続しているものが多い。同倍率の第4図の空気乾燥菌と比較すれば明らかに小さいことがわかる。 5,000×
- 7 同上。shadowからうかがえるように，一部膜面から離れて宙に浮いた状態のものもある。この倍率くらいまでのものでは皺は殆どわからない。 7,500×
- 8 同上。明らかに立体像を呈している。このものでも印画の加減をして微細構造を観察すると皺のあることがわかる。 15,000×
- 9 緩慢凍結乾燥菌。細胞には大きな皺があり変形が甚だしい。急速凍結乾燥に比してはるかに透過性のよいことから菌体は収縮し扁平になっていることがうかがわれる。 15,000×

## 図版 II

- 10, 11 急速凍結乾燥菌。菌体の輪郭は円滑でなくかなり細かな凹凸や皺のあることがわかる。それは単に表面だけでなく内部にも及んでいるように思われる。  
22,500×

