



Title	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について
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 109-120
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17667
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p109-120.pdf



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について

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

動物細胞でも植物細胞でも、同一種類の細胞でありながら冷却の条件によって凍結のし方のかなり違うことが多い。細胞外液が凍ると細胞内部にも氷晶のできる場合や、外液が凍っても細胞内部に氷晶のできない場合など、いろいろである。細胞内凍結をおこした細胞は、温度を上げて融解すると殆んど例外なく死滅するのに反し、細胞外凍結だけのものは、その温度や時間にもよるが生存するが多い。このように細胞内の氷晶形成が細胞の生物学的活性に大きな影響を与えるものであることは既に周知の事実となっている。

しかし対象が微生物のような微細な細胞になると、形態的な観察が困難になるために、まだ不明のことが多い。

微生物のうちでは、酵母が比較的形が大きく、しかも内部構造などが割合いよくわかっているので、この種の実験材料として好都合である。これまでに行なわれた実験結果、例えば凍結状態での観察¹⁾又は凍結置換法²⁾による事実として、酵母も他の多くの動植物細胞とほぼ同じように、緩慢凍結では細胞外凍結をおこす結果、凍結状態ではかなり収縮した細胞がみられるのに反して、急速凍結では細胞内凍結をおこすので大きさは正常のものと殆んど変わらないことがみとめられている。しかしその他のもっと小さな微生物では果してどんな凍結状態を示すものか、特に細胞内に氷晶ができるものかどうかについては、これまでに何らの実証がない。

大腸菌 *Escherichia coli* は従来実験に極めて便宜な細菌として低温生物学の領域に於いても広く利用されており、特にその生物学的な性質についてのいろいろな検討が行なわれてきた。また一方形態的な観察となると、菌体が甚だ微小であって光学顕微鏡の限界を越えているため、どうしても電子顕微鏡によらなければ、微細な内部構造までみることは不可能であった。ところが周知のように、電子顕微鏡の標本とするためには必ず試料を乾燥しなければならず、凍結状態のまま電子顕微鏡でみることなどは到底不可能のことと考えられていた。

この点については幸い電子顕微鏡装置の改善や工夫によって冷却装置が付属されるように

* 北海道大学低温科学研究所業績 第626号

なり、最近漸く凍結状態の細胞を直接電子顕微鏡下で観察することが可能となってきた⁹⁾が、まだこの方法では、最初の凍結条件を思うままに変えることができるような状態になっていない。

その点を満足し且つ凍結状態で試料が固定される方法としては、凍結置換法と凍結乾燥法があげられる。いずれも標本作製過程の脱水や包埋では、形態的な変化はないものとみなされて実施されている。

本実験では、後者の凍結乾燥法を用いて大腸菌の凍結状態の形態を知ろうとしたものであり、同時に乾燥時の条件をいろいろ変えることによって菌体の形状にどのような影響があるかということ、つまり凍結乾燥法そのものの形態的立場からの検討をもあわせてねらったものである。

II. 実験方法

1. 実験材料

当研究室保存の大腸菌 *E. coli* の普通寒天培地 37°C, 18 時間培養のものを集めて蒸留水で 3 回遠沈洗滌し、凡そ 50 mg/ml くらいの濃度の蒸留水浮遊液として実験に用いた。

2. 実験装置

凍結と乾燥のための装置は当研究所の工場で作製した。主要な部分は Williams⁴⁾ に倣ったが、いくつかの点で異なっており別報^{5), 6)} で図示した通りである。試料支持台は真鍮ブロックでその上面の円壘形突起にメッシュを載せキャップをかぶせて密着するようにしてある。試料自身からの熱伝導がよくなるように、スリット・メッシュを用い、コロジウム膜の上にアルミを蒸着した。このように準備された真鍮ブロックをガラス製の乾燥容器に納め、真空グリースで底に密着させておく。これに噴霧器の導管を入れ、容器全体を所定の温度になるよう外から魔法瓶に入れた寒剤に浸して冷す。十分に冷えたところで予めネプライザーにとって 5°C くらいに冷した試料を噴霧すると、霧粒は導管を通してコロジウム膜面にふりかけられ、温度が低い時はすぐに凍結する。膜面の温度上昇が気づかれるので充分時間をおきながら数回噴霧をくりかえし、終ると導管を引抜いて蒸着装置のついた蓋につけかえ、更に任意の温度になるよう魔法瓶中の寒剤を加減した上で、凍結乾燥機に接続し減圧乾燥を開始する。この噴霧後種々の条件で冷却或いは加温する場合、メッシュ上に微細滴となって附着している試料自身が所定の温度に達するのにはかなりの時間を要すると思われるので、それぞれの温度に 30 分乃至 1 時間おいた。また乾燥に要する時間は試料の保持温度によってまちまちで、真鍮ブロックの表面についた霜が肉眼的に見えなくなる時間から大体の見当はつく。-20°C 乃至 -30°C で数分、-50°C で 1 時間くらいであるが、-50°C までのものは約 3 時間、-60°C のものは約 5 時間おいてから、寒剤をとり外して室温まで上昇するのをまった。

凍結乾燥機には排気量 200 l/min, 到達真空度凡そ 2×10^{-3} mmHg の油廻転ポンプを用いコールド・トラップには液体窒素を用いた。このようにして乾燥を完了した後、あらためて拡散ポンプを作働して高真空にし、蒸着用ヒーターを加熱して chromium-shadowing を行なっ

た。なお一部の試料については、乾燥終了後一旦とり出して他の蒸着装置に移し、shadowingを行なったものもある。電子顕微鏡は日本電子製 JEM-5 L 型で、加速電圧 80 又は 100 KV、直接倍率 1,000 乃至 15,000 倍くらいの広い範囲内で写真撮影を行なった。

III. 実験結果

1. 無処置対照

1) 空気乾燥試料

室温においたメッシュに試料を噴霧し、そのまま空气中で自然乾燥した。このようにして作った標本をみると、各微細滴中の細胞は密に集合して1つの凝塊を作っている(第1図)。これでは個々の細胞の観察には不適當なので、通常のサンプリングに倣い試料を大きく1滴とり暫くおいてから適宜吸取紙で吸取ると、細胞のよく分散した好標本が得られる。そのものについてみると第2図に示すように、楕円形で両端円く、しかも扁平で内部構造の殆んどみられない透明な細胞であることがわかる。ただ両端或いは中心部に dense な部分がみえるが、これは細胞内の特別な構造ではなく乾燥時の所産であろうと思われる。鞭毛は、遠沈洗滌をくりかえしたため殆んど脱落していてみられない。

2) 真空乾燥試料

噴霧後直ちに真空装置内に入れて急速に減圧乾燥したものは、空气中での自然乾燥のものと同様凝集塊を作った。しかしこの装置で行なう範囲ではいかに急速に真空にして乾燥しても各微細滴が自働凍結をおこすということはない。凍結する場合は、後述のように全く異なった分散状態を示すものであるから、凍っていないと断言できる。噴霧しない試料を真空乾燥した標本で個々の細胞を観察すると、扁平楕円形であることは空気乾燥のものと同様であるが、内部に電子密度の大きな部分がはっきりとみとめられる。恐らく細胞内部からの急速な脱水によって細胞構成成分が一部に偏ったためであろうと想像される(第3図)。

2. 凍結試料

1) -10°C で凍結、 -10°C で乾燥した場合

前記実験方法の項で述べたように、充分時間をおいて -10°C まで冷却したコロジウム膜の上に試料を噴霧し、更に 30 分その温度に保った後同じ温度で減圧乾燥を行なった。このようにして作った標本では、大部分の微細滴は凍結しないまま乾燥したことがわかる。これは前項でも一寸ふれたように、凍結せずに乾燥したものは滴中の全菌体が1つに塊まり、しかも個々の細胞は扁平透明であるのに反し、凍結した後で乾燥したものは、細胞は個々に分散し且つ極めて dense である。この両者の差は実に歴然として間違えることはない。

このようにして凍結乾燥した細胞を仔細に観察するに、周縁はやや収縮した感じで皺のようなものがみえるが、多くのものでは内部が dense で殆んど不透明である(第6図)。稀に多少内部構造らしいものが見えることがあるが、これは本来の細胞構造なのか、或いは細胞内に氷晶ができたための構造の変化なのか、又は細胞外凍結で多少細胞自身が収縮したための変化な

のか明らかでない。しかし氷晶の抜け殻と確認できるほどの形態を呈してはいない(第5図)。

極めて稀に1つの微細滴の中に未凍結のまま乾いたものと凍結して乾いたものの混在してみえることがある。一部乾いた後で過冷却が破れて残りは凍結して乾いたものであろうか。

2) -15°C 凍結, -15°C 乾燥の場合

前項の -10°C のものと同様に -15°C まで冷却した結果, 総滴数のうちの凍結液滴の割合はかなり多くなるが, まだ未凍結のまま乾いたと思われるものがまじっている。個々の細胞の性状は -10°C のものと同様である。

3) $-10^{\circ}\text{C}\sim-15^{\circ}\text{C}$ で凍結し, -196°C まで緩慢冷却した後, -50°C で乾燥した場合

予め -10°C 又は -15°C に冷却してあるコロジウム膜に噴霧した後, 魔法瓶中のドライアイス・アルコールの温度を $1^{\circ}\sim 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ くらいの速度で下げて行き, -70°C に達した後液体窒素におきかえて約30分おき, 更に -50°C まで徐々に上げてこの温度で乾燥を行なう。この条件での結果は, かなり特異的で, 液滴内の個々の細胞はよく分散している上, 各個体は極端な収縮像を示している。明瞭な透明部分, 皺, そして細長く曲りくねった菌体等の所見は, 他の条件では殆んどみられないか, 或いはあってもそれらに比較してはるかに収縮の程度のひどいものであった(第7~10図)。稀に ghost 様の破壊像もみられた。

4) -30°C 又は -40°C で凍結し, その温度或いは -196°C まで冷却した後 -50°C で乾燥した場合

これらの条件の範囲内では結果に大差はない。未凍結, 半凍結及び凍結と思われる3種の液滴がみとめられた。そのうち未凍結乾燥のものは極めて少なく, その所見は対照の空気乾燥のものと同様である。半凍結と称するのは, 液滴全体の細胞は凝集しているに拘わらず, 個々の細胞は凍結乾燥細胞の特徴にやや近く, dense でしかも立体的な配置をしているものである(第11図)。液滴中大多数を占めるものは凍結したものであるが, 他の条件のもの例えば緩慢凍結のものでは極端な収縮像, 後述の急速凍結のものではほぼ原形を保っているのに反し, この条件のものでは比較的種々雑多な形態を示すことが多い。即ちほぼ原形を保って dense なもの(第12図), かなり内部構造が乱れて多少細胞内凍結を思わせるような形態のもの, 或いは収縮, 皺状を呈するもの(第13, 14図), 菌体の一部の欠損や破壊像を示すもの, 極端なものでは殆んど ghost に近い状態のもの等さまざまである。しかしここでも確実に細胞内氷晶の抜けがらと思われるほどのものは見当らなかった。

5) -196°C で急速凍結し, $-50^{\circ}\sim-60^{\circ}\text{C}$ で乾燥した場合

この条件では凍結せずに乾いたと思われるものはみられない。しかし液滴によって個々の細胞の形態に多少の差違はある。恐らく過冷却の破れて凍結のおきる時の温度が違うからかもしれないが, 1つの液滴の中では各細胞はほぼ同じ形態を示している。大部分の液滴ではその中の細胞の分布状態は, 緩慢凍結の場合ほどのきれいな分散を示さず, やや凝集の傾向がある。個々の細胞は一見円滑な外縁, dense な内部構造, shadow の状況からわかる立体配位を

示し、生のときの原形をそのまま維持しているかのように思われるが、空気乾燥の細胞の幅から換算推定された生の細胞の大きさと比較すると、やや収縮していることがわかる⁶⁾。実際に倍率をあげて、細胞の表面乃至内部構造を仔細に観察してみると、光学顕微鏡の所見や、対照の空気乾燥像から想像されるような円滑さはなく、全菌体の表面又は或る程度内部にまで亘る比較的細かな皺がほぼ一様にみえる(第15図)。おそらく凍結或いは乾燥の過程でできた人工的所産ではなかろうかと想像される。菌体は極めて dense なものが多いから内部構造は判然としないが、それにしても氷晶の抜けがらと思われるような porous な構造のものは見当たらない。極めて稀に目につくものでも、第16図程度で、比較的不規則な内部構造である。

- 6) -196°C で急速凍結し、 -10° , -15° , -20° , -30°C のいずれかの温度まで加温し、再び -196°C まで冷却した後 -50°C で乾燥した場合

本実験のように極めて少量の試料(噴霧による微細滴)を -196°C まで超急速冷却した場合、完全な氷晶ができなかつたり或いは vitrify (ガラス化) することも想像される。しかしそのような場合でも、かなりゆっくりした速度で相当高い温度まで加温されると recrystallization のおきる可能性があるので、むしろ積極的に氷晶を作らせることをねらって、 -10°C から -30°C の範囲内の種々の温度まで上昇させ(試料自身の加温速度は測定できないが、数分乃至数十分を要しているものと思われる)、その温度に約1時間おいた後、更に十分に氷晶を発達させる為今度は徐々に冷却して最後には液体窒素中に1時間浸しておき、型の如く -50°C で乾燥を行なった。このようにして作った標本に於いても、細胞の所見は加温しないで急速凍結したまま乾燥したものと殆んど差はない。即ち立体像の dense な細胞で、しかも比較的微細な収縮、皺をもったものが大部分を占め、稀に緩慢凍結の際の特徴であるところのかなり高度の収縮像がみられる程度で、やはり細胞内氷晶によると思われるような細胞内部構造の破壊像などはみとめられなかった(第17図)。

- 7) -196°C 急速凍結後、 -5° , -10° , -15° , -20° , -30°C に加温し、それぞれの温度で乾燥したもの

この場合は乾燥温度がそれぞれ異なるので、乾燥に要する時間にはかなりの差がある筈であるが、正確にそれを測定することはできないので、一律に2時間乾燥を行なうことにした。その結果は、やはりいずれも凍結乾燥の特徴である立体像を示していた。菌体周囲をとりまくものは蒸溜水であるから、 -5°C まで温度が上っても凍結したまま融けない筈であり、その状態で乾燥されれば立体像を示していてもいいわけである。しかし一方菌体の内部状態を考えてみるのに、もし細胞内凍結がおきていたとしても、このくらい温度が上がれば融解する可能性はありうる。大腸菌の菌体成分の eutectic point を何度くらいと考えてよいかはわからないが -10°C 乃至 -5°C ではかなり融解部分があってもよいのかもしれない。従ってもしコロジウム膜面に接した菌体であれば、非凍結試料の空気乾燥の場合と同じように扁平透明像ができてよいように思われるが、少なくとも本実験条件では、そのような像を呈するものはみとめられな

った(第18図)。

ただ最初の試料作製時に、蒸溜水浮遊菌液の外に生理食塩水をも同一試料に重ねて噴霧しておく、たまたま菌液と食塩水の液滴が重なって凍結したものでは、 -10°C までの加温でも液滴全体として融解する為、 -10°C でそのまま乾燥すると、食塩の結晶の外に空気乾燥の場合と同様の扁平透明な菌体集合像がみられた(第19図)。同一試料中でも菌液だけの液滴の乾いた部分では、上記のような立体像がみられるわけで、温度と液滴成分並びに乾燥状態の関係がよくうかがわれた。

IV. 考 察

緒言に於いて述べたように、本実験は細菌浮遊液を種々の条件で冷却した時に菌体自身はどのような形態の変化を示すか、特に細胞内に氷晶は形成されるものかどうかの検討を主な目的として行なわれたもので、その検索の手段として凍結乾燥法が採用されたのである。

1. 試料作製法としての凍結乾燥法

上記の目的に凍結乾燥法が用いられる為には、まず本法自身が凍結状態そのままを表現する理想的な方法であるか否かの吟味から行なわれなければならない。従来種々の生物学的試料の電子顕微鏡的観察に当っては、固定或いは乾燥操作による試料の変形が論ぜられ、できるだけ生に近い状態を再現するものとして凍結乾燥法が賞用されてきた。この方法で得られた像はたしかに通常行なわれている方法によって得られたものとは形態的に大きな差のあることはみとめられるが、これが果して生の細胞乃至は組織そのままであるかどうかの証明はない。この点に関しては本実験と平行して行なった凍結乾燥法の吟味実験に於いても述べたように⁶⁾、まだ最終的な結論を下すまでにはいたらない。噴霧法による最小容量の試料を液体窒素を用いての最大限の急速冷却を行なうことによって、凍結による変化をできるだけおさえ、しかも -60°C に保持することで乾燥過程での人工的变化をなるべく少なくするようにしても、なおかつ多少の収縮像と思われる変化がみとめられることから、凍結か乾燥の過程で影響をうけることが想像される。この変化が凍結処理によってできたものか、乾燥過程で生じたものかは、本実験の吟味に於いても確認するまでには至らなかった。

2. 空気乾燥と凍結乾燥の比較

両者の比較で明らかにみとめられることは、噴霧液滴内の菌体の分布状態と個々の菌体の形態的差違である。前者については、空気乾燥のものでは液滴内の菌体がすべて凝集して1つの集塊を作っているのに反し、凍結乾燥のものでは液滴の跡と思われる範囲全体に亘ってよく分散していることである。これは要するに、空気乾燥では乾燥に際して表面張力が作用し菌体が液滴の中心に集まるけれども、凍結乾燥では菌体をかこむ囲りの水は凍結したままで昇華するので、その中に閉じこめられた菌体は浮遊液として分散したままの状態を保って乾燥するものと推定される。但し蒸溜水浮遊液であるから、菌体間のつながりとなる媒質はないわけで、菌体が膜面に接しているもの或いは菌体相互が直接接し合っているもの以外は乾燥過程で膜面

から離れて真空ポンプの方向に飛んで行くものと思われる。

次に倍率を上げて個々の菌体を観察すると、空気乾燥のものでは扁平で透過性であるのに凍結乾燥のものは立体的で不透過性であることは、その shadow の様子からよくうかがわれ、特に凍結乾燥では、試料が凍結状態を保ったままで乾燥されていることが実証されたわけである。以上のように空気乾燥と凍結乾燥とでは一見してはっきりと区別され混同するおそれはない。

3. 凍結温度及び冷却速度と菌体の凍結状態との比較

まず噴霧された液滴全体として眺めてみる。 -10°C 又は -15°C に冷却されたメッシュに噴霧されたものでは凍結したと思われる液滴の数は比較的少ない。この温度では過冷却のまま乾燥のか或いはその温度に達するまでに乾いてしまうのかはわからないが、とにかく凍結せずに乾くものがかかり多い。

また -196°C まで冷却されたものでも、緩漫凍結のものと急速凍結のものでは菌の分散状態にやや差がある。前者では液滴の輪郭がはっきりわかるように1個1個の菌体が特徴ある配列をとっているが、後者では多少密集した状態でしかも不規則な配列をしている。緩漫凍結の過程を考えてみるのに、細胞間の水の凍結は膜面に接した周辺部から漸次中心部に向って進行するものと想像されるので、膜面に直接ふれている菌体以外は中心部に押しやられ、しかもそれは乾燥過程で飛散する可能性がある。従って比較的早期に凍結した部分の菌体だけが残っているのかもしれない。一方急速凍結のものでは液滴全体が殆んど同時に凍結するので、中の菌の分散状態は最初の浮遊液中の分散状態そのままを示すもので、そのうちの膜面とのつながりのあるものだけが残ったということが考えられる。

次に個々の菌体の形態を眺めてみる。緩漫凍結では明らかに菌体の収縮がみとめられるが急速凍結では微細な皺はあっても緩漫凍結ほどの極端な収縮はみられない。一方酵母についてこれまでに行なわれた実験結果⁹⁾から、緩漫凍結では細胞外凍結をおこすために菌体は収縮し急速凍結では細胞内凍結をおこすので収縮せずほぼ原形を保っているのであろうとの結論を得ている。更に凍結融解後の菌の生残率からみても、酵母⁹⁾、大腸菌⁹⁾ともに緩漫凍結の方が急速凍結より生残率が高いという事実があるので、大腸菌でも酵母と同じような凍結の機構が想定される。

ただ本実験では -30°C 乃至 -40°C 附近で凍結させた場合に比較的多く細胞の内部構造の変化或いは細胞の破壊像などがみとめられたが、もしこれが氷晶形成による変化だとすれば、このあたりの条件が最も細胞内凍結をおこしやすいということになるのであろうか。

それでは液体窒素で急速に冷却したものがかえって変化が少ないということについては、どのような説明を下したらよいのであろうか。今かりにこの極めて急速な冷却では vitrification 或いは不完全氷晶のみがおきたとしても、 -10°C 乃至 -5°C までかなり長い時間をかけて加温した場合は当然 recrystallization がおきるものと思われる。Luyet 等⁹⁾によれば、gelatin 溶液などでは、このくらい高い温度まで充分の時間をおいて上昇させた場合には recrystalliza-

tion のおきることをみとめている。本実験では、できるだけ氷晶のできやすいようにとねらって、一旦加温した試料を再び -79°C 或いは -196°C まで冷却したのであるから、もし氷晶が生成されているならば充分成長してもよい筈である。しかし実際には氷晶らしい形跡が殆んどみとめられないということは、細菌のような微小な細胞では本当に氷晶はできないものなのか或いはできたとしてもこの種の細胞の微細構造の上で形態的にはっきりした変化を示さないのであるか、わからない。とにかく吾々が行なった別の実験¹⁰⁾で、*E. coli* は菌体総重量のうち細胞水分量は 66% を占め、その水分量の 91% までが -15°C までの冷却で凍結しうることが測定されている。これほど凍りやすい水が多量に細胞内に含まれていて、しかも急速凍結で殆んど細胞外に脱水される暇のない場合には、細胞内での氷晶形成は当然考えられてもよい筈である。

他方液滴としての冷却速度を考えてみるのに、Williams⁴⁾によれば液滴容量 10^{-10} ml として凡そ $10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ であるという。彼の場合は高速噴霧法によるものであり、もし Vaponefrin nebulizer によるものがそれより大分遅いとしても、なお且つ非常に大きな冷却速度が想像されるので、或いは vitrification の可能性も一応は考慮された。しかし実際の試料について観察されたところでは、例えば同じ方法で噴霧凍結乾燥の行なわれた Tobacco mosaic virus の実験結果⁹⁾によれば、液滴内の氷晶形成の状態が膜面に残された燐酸塩の結晶の網状の配列状態からよく窺われ、しかも氷晶の形跡と思われるこの network が液滴の周辺では小さく中心に近くなるほど大きいということからも、液滴内での温度勾配と凍結の進行状況が想像されるのである。これらの事実からすれば、やはり vitrify されたままで乾燥されるという可能性は考えにくくなる。

次に緩慢凍結に於ける細胞からの脱水について考えてみる。既に述べたように空気乾燥や真空乾燥のものとは全く異なるから、凍結乾燥された細胞の形態は明らかに独特のものであることはわかる。しかも -10°C や -15°C での凍結乾燥のものより、もっと低い温度まで冷却してから乾燥したものでは細胞の収縮度が強いこと、 -196°C まで急速凍結した後は -10°C まで温度を上げてその温度で乾燥しても収縮像がみられないことなどから、緩慢凍結条件のものでみられる収縮像は、凍結の過程で細胞からの脱水に伴っておきる収縮の結果であって、乾燥過程でおきるものは殆んど考えなくてよいであろう。なおこの凍結過程で行なわれる細胞からの脱水の機構については、朝比奈の述べている¹¹⁾ように、過冷却した細胞内液と外部の氷との間の水の分子運動の差で説明できるものと思う。

なお Meryman¹²⁾ は *E. coli* の寒天培養 2 時間のもを培地とともに切り出し、液体窒素に直接或いは僅かに乾燥してから投入して凍結させ、そのまま低温でレプリカを作り電子顕微鏡で観察した結果、細胞の表面に一面に皺のあることをみとめている。試料や凍結の条件は異なるけれども、このような所見は著者のみとめたものと同様のものであるかもしれない。

4. 大腸菌と酵母との比較

凍結融解或いは凍結乾燥処理後の菌の生残率を比較すると、大腸菌は酵母よりはるかに高

い。酵母の実験で細胞内凍結をおこすものほど生残率が低い¹⁾ことからみても、大腸菌では細胞内凍結と思われる所見が少ないこと、同じ凍結条件でも酵母では細胞内凍結を多くおこすのに大腸菌では細胞外凍結をおこすものが多いことなどが、大腸菌の方が生残率が高いということの理由にあげられるかもしれない。

5. 液滴による形態的な差

前記のように実験結果の各項目で述べた所見は、与えられた条件下ではその変化のものだけが観察されたというのではなくて、種々の変化のものが混在する中で、その種のもものが比較的多くみられたということである。all or noneの結果にならないことは微生物の実験では多くみられることであって、要するに細胞の個体差にもとづくものと思われる。乾燥後の細胞の変化の程度或いは種類によって、細胞内凍結をおこしたものと細胞外凍結をおこしたものというように、はっきり区分することは必ずしも容易ではない。従って1つの試料の中でそれぞれの凍結のし方をした細胞の数の比率を定量的にしらべることは、重要な問題ではあるが、技術的な困難があつてまだ解決されていない。

また各液滴によつても所見のかなり異なる場合が多い。例えば1つの試料中であるから与えられた外部条件は全く同一の筈であるのに、ある液滴では比較的収縮細胞が多く、他の液滴では原形維持細胞が多いということがある。これは恐らく液滴によつて過冷却が破れて凍結の開始する温度が違つたために、凍結の状態に差をきたしたものであらうと思われる。-10°C或いは-15°Cまでの冷却で、凍結しないままで乾いたものと凍結後乾いたものが1試料の中で混在することからも、このことがうかがわれる。

6. 細菌細胞内の氷晶の有無を確認する方法について

既に他の報告⁹⁾に於いても論じたように、Williamsに倣いしかもほぼ理想的に近いと思われる方法によつても、果して凍結状態を完全に保持したまま乾燥されているかどうかについてはかなりの疑問がある。*E. coli*は-60°Cでもその全菌体水分の9%は凍結しないままに残っており、引続いて行なわれる乾燥でその約80% (全水分量の約7%)は脱水される¹⁰⁾ので、乾燥の際の多少の収縮変形があるかもしれないし、また凍結乾燥細胞は電子線照射により人工的变化を受けやすい⁹⁾から、観察時の変形も考慮しなければならない。ただ電子線照射は多くの場合内部構造の変化をより顕著にするように働くので、細胞内凍結による微細な構造変化も照射によつてかえつて明瞭になる可能性はある。本実験でみとめられた内部構造は、最初やや不鮮明であつたものがかなり長時間の照射観察によつてある程度はつきりしてきたものが多い。いずれにせよ、凍結乾燥法が凍結状態を忠実に表現するものか否かについて更に充分の検討を要するものと思う。

その他の検索法としては、凍結乾燥試料又は凍結置換固定試料の超薄切片像の観察が必要であるが、いずれも標本作製時の artifact の介入に充分の注意が払われねばならない。今後更にこれらの方面の検討を続ける予定でいる。

以上はいずれも凍結時の状態を乾燥後の試料の形態から推定しようとするものであるが、

細胞内の凍結の有無を確実に証明する為には、氷晶そのものの存在を直接に立証することが先決問題である。ところで、大きな細胞の中の比較的大きな氷であれば偏光顕微鏡によって確認することもできるが、微生物のように小さな細胞では光学顕微鏡の限界を越えているので今のところ電子線回折の力を借りるしかない。前報³⁾に於いても述べたように、冷却装置を具えた電子顕微鏡を利用することによってこの点の検討も行なってみたが、まだ成功するまでには至らない。今のところまだ幾つかの技術的な難点が解決されていないからである。細胞周囲の氷晶が完全に昇華し、しかも細胞内の氷からの昇華が始まらない時に、温度を固定してそれ以上昇華が進行しないように停止させた上で、細胞1個についての回折像をとり、それが氷の結晶の pattern を示すことを証明すればよいのであるが、昇華の調節、温度の調節、細胞に重なった氷のないことの確認、細胞1個の回折像を短時間に速かにとること等、多くの未解決の問題が残されている。今後の工夫にまちたい。

V. 摘 要

E. coli の蒸溜水浮遊液を試料として、噴霧法によって凍結乾燥標本を作り、電子顕微鏡を用いてその形態を観察した。凍結の条件、乾燥の条件をいろいろと加減して、特に細胞内凍結の有無を検討した結果

1. 空気乾燥(真空乾燥)のものと凍結乾燥のものとは細胞の形態が全く異なる。前者は扁平透明であるのに後者は立体的不透明である。
2. 凍結時の冷却速度によっても形態は異なり、緩慢凍結のものでは収縮像がみられ、急速凍結のものほど原形に近い像を呈する。
3. -30°C 乃至 -40°C 付近の温度で凍結したものに比較的細胞内構造の変化が強くみとめられた。
4. 液体窒素で急速凍結したものを -5°C くらいまで温度を上げて、明らかな細胞内氷晶と思われるものは認められなかった。
5. 結局、酵母に於いてみられるような明瞭な細胞内氷晶形成は大腸菌ではみとめ難く、このことは、大腸菌が酵母に比較して、凍結に対して抵抗が強く生残率が大きいということの1つの根拠になるものと思われる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Mazur, P. 1961 Manifestations of injury in yeast cells exposed to subzero temperatures. I. Morphological changes in freeze-substituted and in "frozen-thawed" cells. J. Bacteriol., **82**, 662-672.
- 3) 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.
- 4) Williams, R. C. 1954 The application of freeze-drying to electron microscopy, in Biological Applications of Freezing and Drying (Edited by R. J. C. Harris) Academic Press, New York.

- 5) 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.
- 6) 根井外喜男 1962 細胞組織の固定法としての凍結乾燥法の再吟味. 低温科学, 生物篇, **29**, 101-106.
- 7) 荒木 忠・根井外喜男 1962 微生物の凍結の機構 I. 低温処理酵母の生存について. 低温科学, 生物篇, **20**, 57-68.
- 8) 根井外喜男・荒木 忠 未発表.
- 9) Gehehio, P. M. and Luyet, B. 1959 On the existence of two ranges of recrystallization temperatures in gelatin gels. *Biodynamica*, **8**, 81-84.
- 10) 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との関係について. 低温科学, 生物篇, **19**, 49-57.
- 11) 朝比奈英三 1958 生細胞の凍結. 細胞化学シンポジウム, **8**, 1-28.
- 12) Meryman, H. T. and Kafig, E. 1955 The study of frozen specimens, ice crystals and ice crystal growth by electron microscopy. *Naval Med. Res. Inst., Res. Rep., Proj. NM 000 018. 01.* 09, 529-544.
- 13) 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について (第2報). 低温科学, 生物篇, **19**, 59-72.

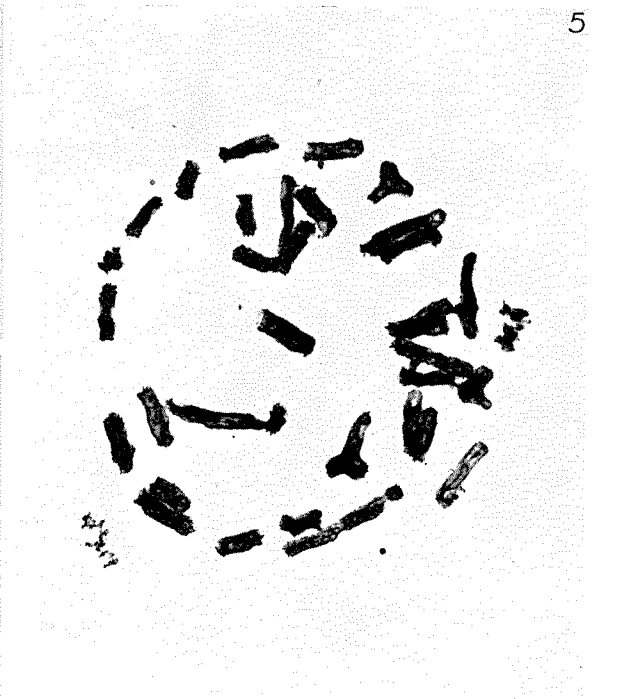
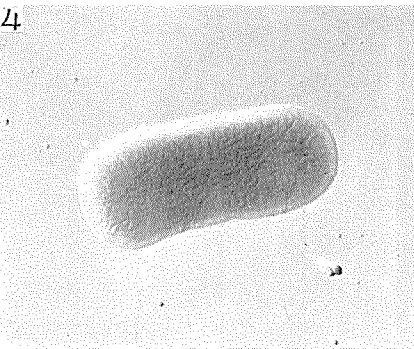
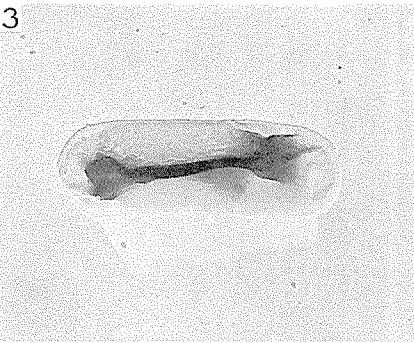
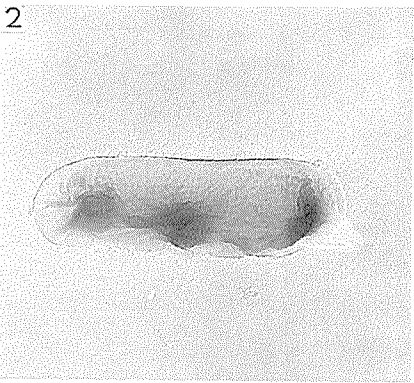
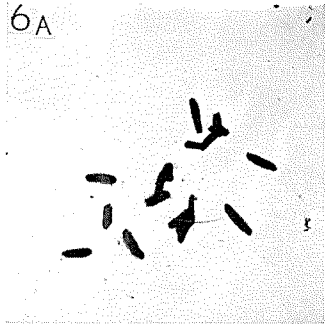
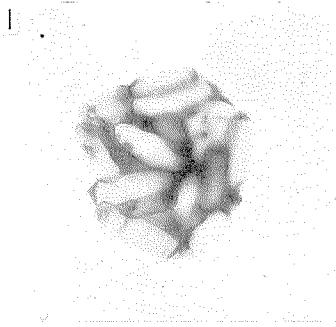
Résumé

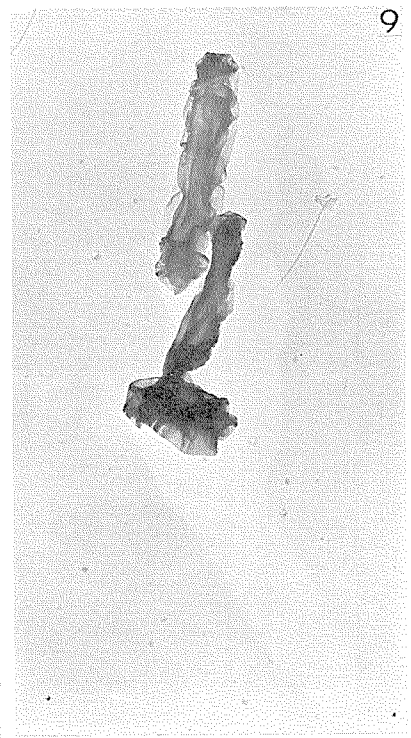
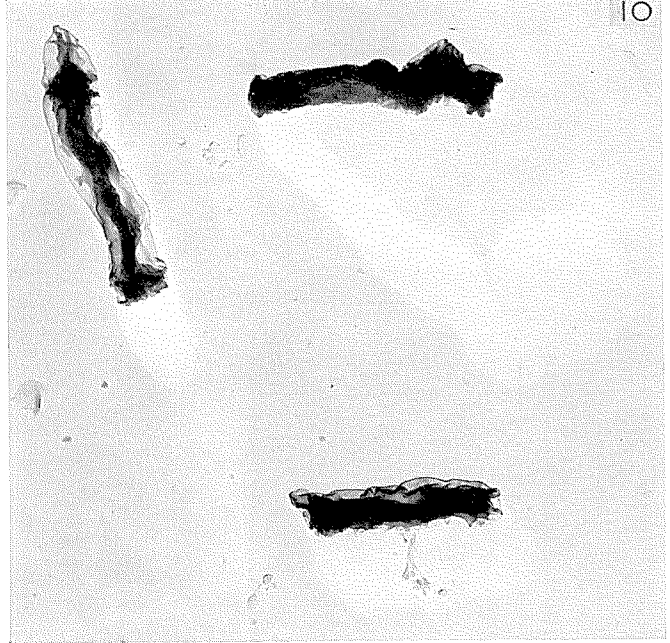
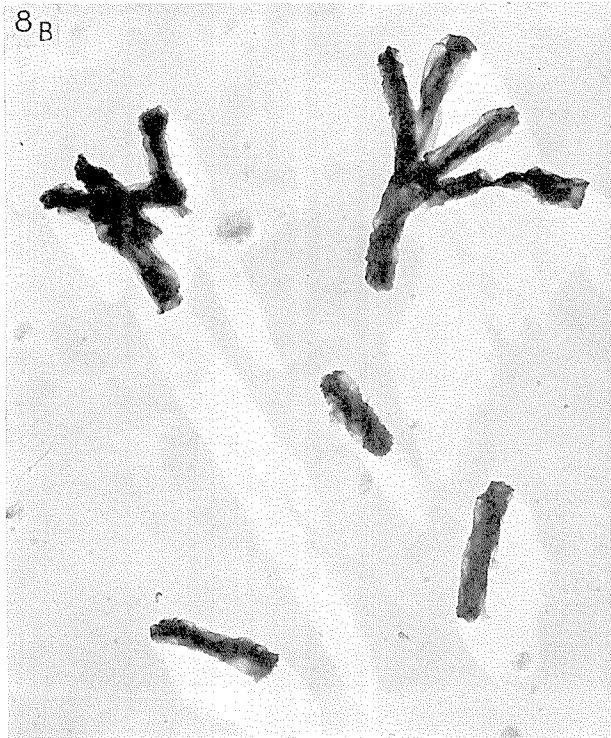
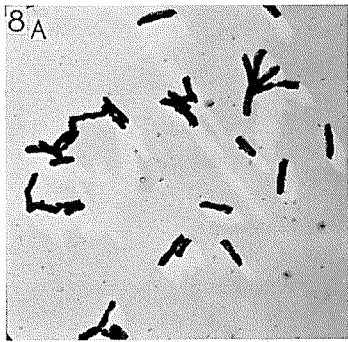
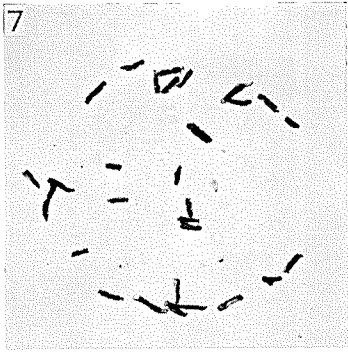
The morphology of bacterial cells following freezing and freeze-drying was investigated with the electron microscope. *Escherichia coli* was used as the experimental material; it was frozen by the spray method of Williams. The following general conclusions can be drawn.

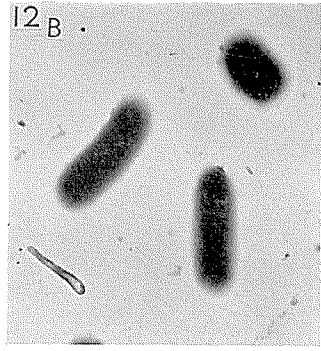
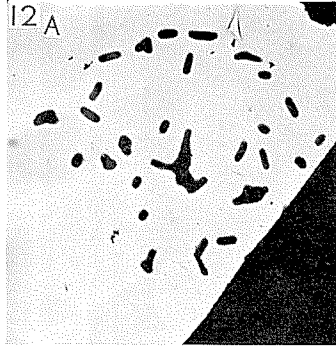
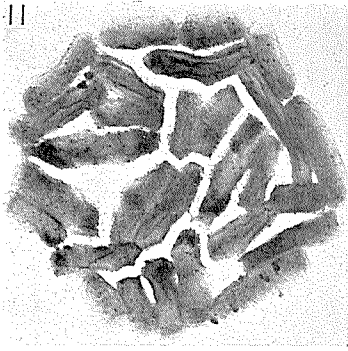
- 1) The air-dried cell differs substantially from the frozen-dried. The former is flat and transparent while the latter is unflattened and electron dense.
- 2) The morphology of the frozen-dried cells depends on the rate of cooling. Following slow freezing the cells are shrunken but they are unshrunken following rapid freezing.
- 3) Cells frozen at -30°C or -40°C show a variety of alterations including a formation of network-like internal structure.
- 4) The intracellular porous structure characteristic of ice crystal formation could not be found even in cells ultra-rapidly frozen and rewarmed to slightly below zero.
- 5) On the basis of both morphological and functional changes of *E. coli* cells compared to yeast cells, it is concluded that *E. coli* is more resistant to freezing than yeast.

図版説明

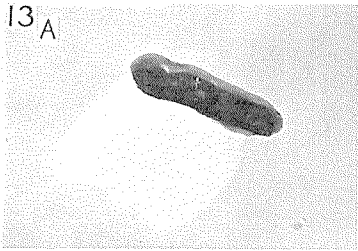
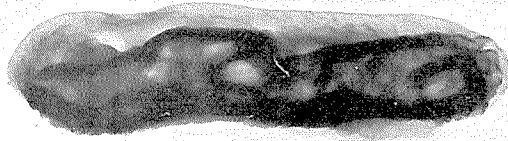
- I-1:** 対照。空気乾燥菌。液滴中の菌は集塊を作る。個々の細胞は扁平透明。 5,000×
- 2:** 対照。空気乾燥菌。扁平透明。 15,000×
- 3:** 対照。真空乾燥菌。扁平透明。2に比較して dense な部分の様子がやや異なる。 15,000×
- 4:** -10°C で凍結せずに乾燥したと思われる菌。扁平ではあるがやや dense。 15,000×
- 5:** -10°C で凍結乾燥した液滴全体。特有の分散配列をしている。個々の細胞はかなり形態的变化著明。 7,500×
- 6:** Aは液滴全体。Bはその一部を拡大。立体収縮像。 A: 2,500×, B: 15,000×
- II-7~10:** -196°C まで緩漫に冷却したもの。極端な収縮像がみられる。 7: 2,000×, 8 A: 2,500×, 8 B: 10,000×, 9~10: 15,000×
- III-11~14:** -30°~-40°C で凍結, -196°C まで冷却, -50°C で乾燥したもの。11~12は特殊な乾燥状態のもの。13~14は porous な内部構造を思わせるもの。 11: 7,500×, 12 A: 2,500×, 12 B: 10,000×, 13 A: 12,000×, 13 B: 36,000×, 14 A: 12,000×, 14 B: 36,000×
- IV-15~16:** -196°C で急速凍結したもの。表面の細かな皺。 15 A: 7,500×, 15 B: 22,500×, 16: 15,000×
- 17:** -196°C 急速凍結, -10°C まで加温, -196°C 再冷却, -50°C 乾燥。 11,000×
- 18:** -196°C 急速凍結, -10°C 乾燥。 11,000×
- 19:** -196°C 急速凍結, -15°C 乾燥。予め生理食塩水を噴霧しておいたもの。 7,500×
- 20~21:** -15°C 凍結, -79°C まで緩漫冷却した酵母。細胞内氷晶の跡と思われる porous な内部構造。表面は円滑。 7,000×



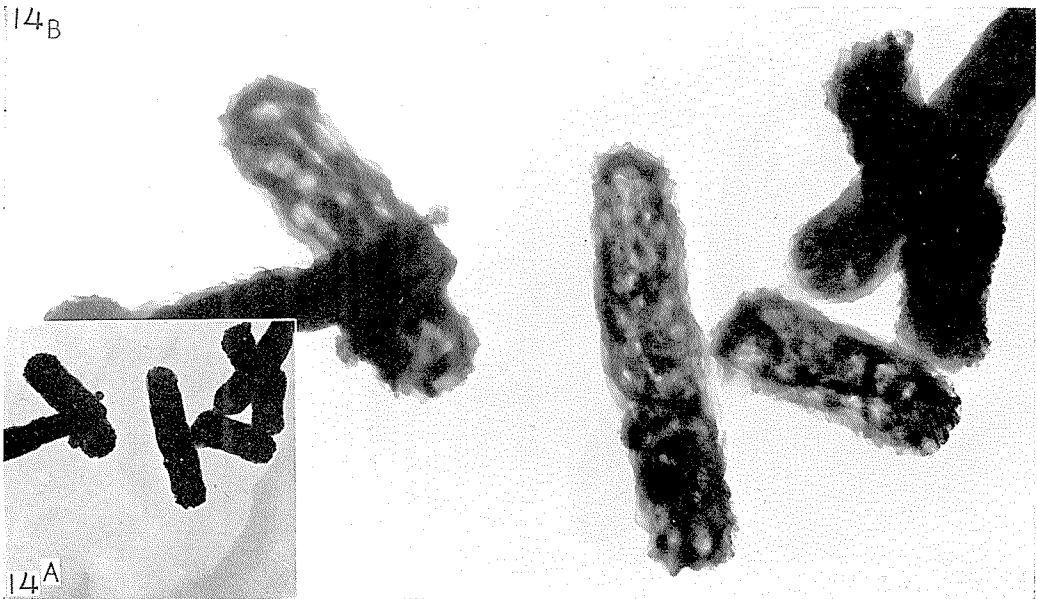




13B



14B



14A



