



Title	家兔血液の凍結による障害 III : 電子顕微鏡による形態学的観察
Author(s)	小島, 義夫; KOJIMA, Yoshio
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 129-148
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17703
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p129-148.pdf



家兎血液の凍結による障害 III*

電子顕微鏡による形態学的観察

小島 義夫

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 40 年 7 月受理)

I. 緒 言

著者は、凍結による細胞障害の機構を解明すべく保護物質を加えない微量の家兎血液についての実験を計画し、一連の定量的実験の成績を発表した。その大要をあげれば、薄層試料による急速凍結融解後の溶血度は温度によって極めて特徴的な二子山型の曲線を示し、その再現性も確かである。しかも、その曲線は 5 次乃至 4 次式によって表わされ得ることが明らかとなった¹⁾。次いで、その曲線の山と谷の点についての溶血度と血球残存率はかなり強い逆相関の関係にあることを示した²⁾。これらの事実は、温度によって細胞にかなり特異的な変化をもたらすものであることを示している。

そこで著者は、次に、低温処理後の細胞の形態学的変化を追求することを考えた。従来、形態学的研究といえば兎角試料の一部の示す傾向で表現されてきたものであるが、今回は反応現象を出来るだけ客観的事実として、定量的に把握したいと考え、細胞内氷晶の跡の認められる細胞の数を数えその出現率をもとめた。

こうして得られた成績とその他の既知事実とを比較検討し、血球細胞の凍結障害の機序について考察してみた。

II. 材料及び方法

レプリカ: 無処置対照はスライドガラスの上に 4, 5 滴の家兎血液を流し、迅速に火炎固定を施した後 2% コロジオン液を用いてレプリカを作成した。

低温処理を行なった材料については、溶血度¹⁾及び残存率の計測²⁾に用いたと同じ方法でカバーガラスとアルミ箔間にはさんだ血液 0.02 ml を、 -30 , -50 , -80 , -160°C に冷却したアイソペンタン及び -196°C 液体窒素で急速凍結せしめ、5 分間保持して後アルミ箔を剥して凍結状態のまま乾燥機で 5 時間乾燥 (容器は室温に露出) した後、コロジオン液でレプリカを作った。

メッシュに載せた各レプリカは、約 45° の角度で夫々反対方向からカーボンと白金パラジウムを真空蒸着してレプリカ像を読み易くした。これらのレプリカは、JEM-6 AS 型電子顕

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 742 号

微鏡 (以下電顕と略す) により観察し, 直接倍率 $\times 2,000 \sim \times 5,000$ で写真撮影を行なった。

切 片: 前述と同様の方法で急速凍結し, 夫々下記の要領で電顕用標本を作成した³⁾。

1) 乾燥容器を室温に露出したまま乾燥した後, -30°C の低温室内で固定 (以下この方法を室温乾燥と呼ぶ。装置と方法は根井・竹内の報告⁴⁾に準ずる)。

2) 乾燥容器を各温度のアルコール槽に浸して低温乾燥した後⁵⁾, -30°C 低温室内で固定。

3) 凍結材料を -30°C 低温室内でエチルアルコールに移し, 10日間置換 (アルコールを3回交換) 後, 低温室内で固定 (以下この方法を冷却置換と呼ぶ)。

4) 凍結材料を夫々の凍結温度に冷却したアルコール (-160°C と -196°C の場合は, -130°C 近辺に冷却したアルコール) に投入し, そのまま -79°C 超低温槽に移し, 2日間置換後固定液に移した (以下この方法を低温置換と呼ぶ)。

これらの処理法は要約して第1表に示す。何れの場合もアルコール脱水, 固定後, アクリル樹脂に移し, 包埋してブロックを作り, JEM-5型 ultramicrotome で超薄切片を作った。切片はコロジオンを張ったメッシュに載せ, JEM-4 CHD型及び JEM-6 AS型電顕で観察し, 直接倍率 $\times 2,000 \sim \times 5,000$ で写真撮影を行なった。

以上の試料の切片について, 夫々無作為的に100枚の電顕写真を撮り ($\times 2,000$), 細胞内水

第1表 切片用ブロックの作成条件

	ブロック 番 号	凍結温度 ($^{\circ}\text{C}$)	乾燥温度 ($^{\circ}\text{C}$)	乾燥時間		固 定			
				1次	2次	固 定 液	温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	時間	
凍 結	室温 乾燥	ED-10	-30	室 温	8	5	2% OsO ₄ アルコール	-30	1
		ED-11	-50	"	8	5	"	-30	1
		ED-12	-160	"	8	5	"	-30	1
		ED-13	-196	"	8	5	"	-30	1
乾 燥	低温 乾燥	ED-14	-30	$-40 \sim -30$	5	4	2% OsO ₄ アセトン	-30	1
		ED-15	-50	$-60 \sim -50$	5	5	"	-30	1
		ED-16	-160	$-80 \sim -50$	8	6	"	-30	1
		ED-17	-196	$-80 \sim -50$	9	4	"	-30	1
	ブロック 番 号	凍結温度 ($^{\circ}\text{C}$)	置換温度 ($^{\circ}\text{C}$)	置 換		固 定			
				時間	溶 媒	固 定 液	温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	時間	
凍 結 置 換	冷却 置換	ES-18	-30	-30	10日	アルコール	2% OsO ₄ アセトン	$+4$	2
		ES-19	-50	-30	10	"	"	$+4$	2
		ES-20	-160	-30	10	"	"	$+4$	2
		ES-21	-196	-30	10	"	"	$+4$	2
置 換	低温 置換	ES-38	-30	-79	48	アルコール	1% UO ₂ (CH ₃ CO ₂) ₂ アルコール	$+4$	1
		ES-39	-50	-79	48	"	"	$+4$	1
		ES-40	-160	-79	48	"	"	$+4$	1
		ES-41	-196	-79	48	"	"	$+4$	1

晶の出現頻度を計数した。無作為抽出の要領は、同一条件で作成した数個のブロックの中の1個から、約1mm間隔に5枚以下の切片をとりメッシュに載せ、1枚の切片からは10枚以上の写真を撮らないこととして計測試料抽出の均一性を期した。

III. 結 果

ここにあげた写真はすべて、直接倍率 $\times 2,000$ 又は $\times 5,000$ のものを2倍に引き伸したもので、倍率を記載した以外のものはすべてその最終倍率が $\times 4,000$ となっている。

尚、これらは主として代表的な像を選んだものであるが、ある特定条件下における血球の形態学的変化のすべてを表わすものではない。

1. レプリカ標本 (第1図～第6図)

第1図 無処置対照

赤血球は典型的な両面陥凹の平板状で、表面に多少の粒状微細構造を示した。これは多分洗滌外液の乾燥による人工産物であろう。

第2図 -30°C 凍結 (室温乾燥)

強度の脱水による細胞の収縮像がみられ、全体として丸みを失った多角形体として認められる。

第3図 -50°C 凍結 (室温乾燥)

細胞全体としての丸みは、 -30°C 処理のもの程失なわれてはいないが、皺壁がこまかな中等度の脱水を思わせる所見がみられた。

第4図 -80°C 凍結 (室温乾燥)

この温度での急速凍結では、残った細胞膜のレプリカ像は脆弱化した様子を示した。細胞によっては多数の小孔を示すものや、崩壊像が認められたが、全体としては丸みもあり、かなりの脱水による収縮像もみられる。即ち、種々の程度の脱水状態にあるものと、細胞内凍結を思わせる外面にあまり変化のないものが雑多に混在する所見が認められた。

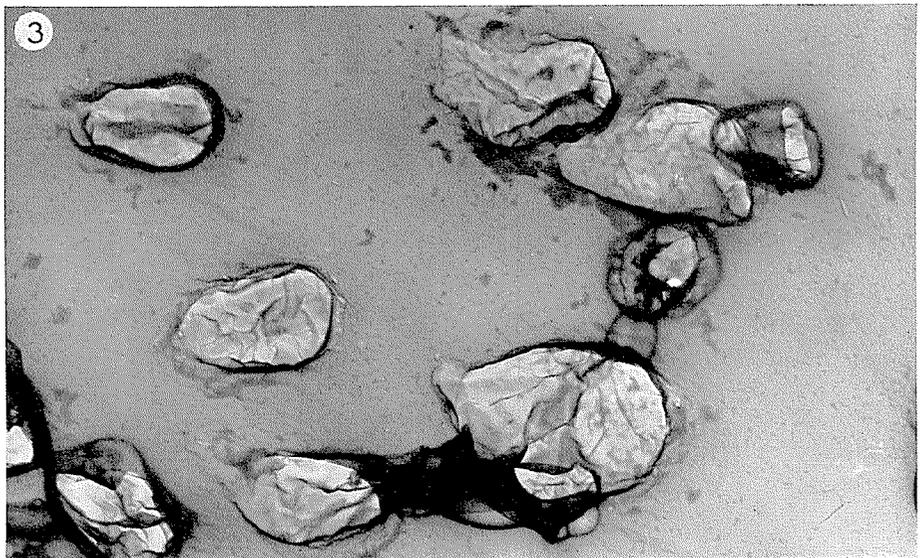
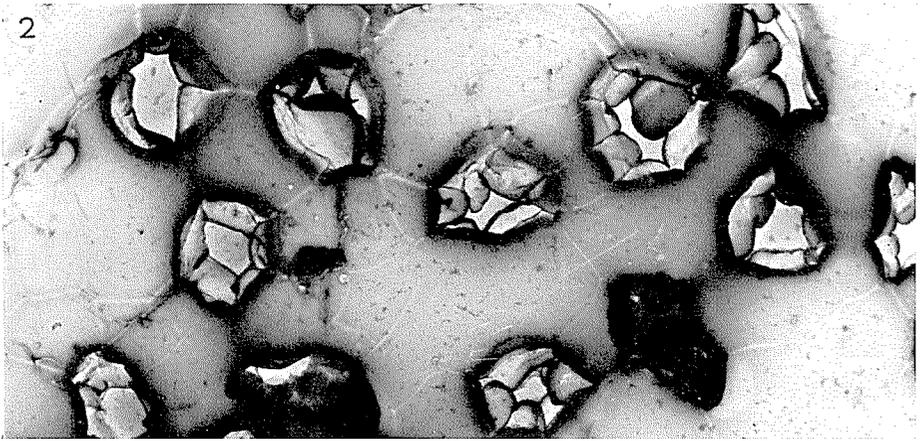
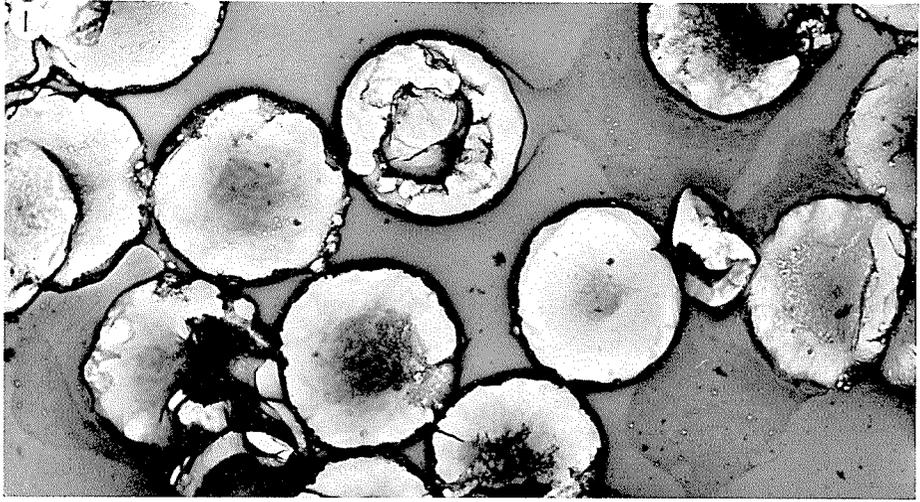
この図には脆弱化した細胞膜がみられる。左右の大きな丸みのあるものは成長した氷晶の跡と考えられる。

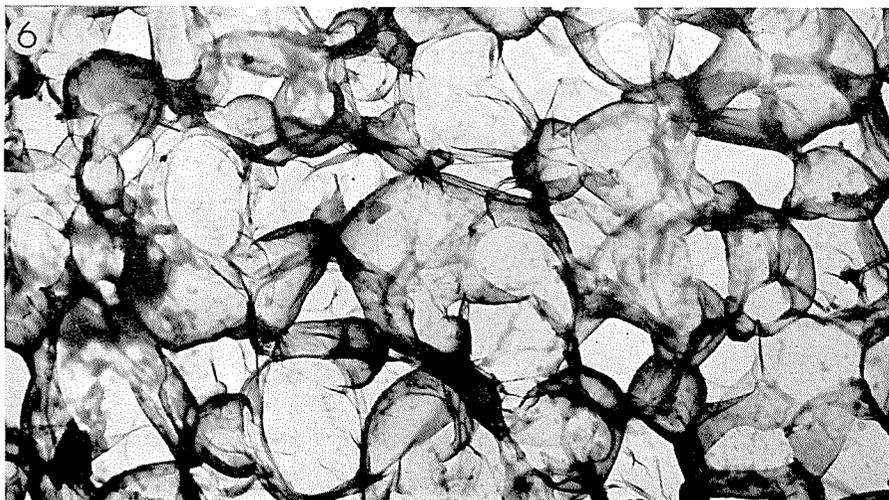
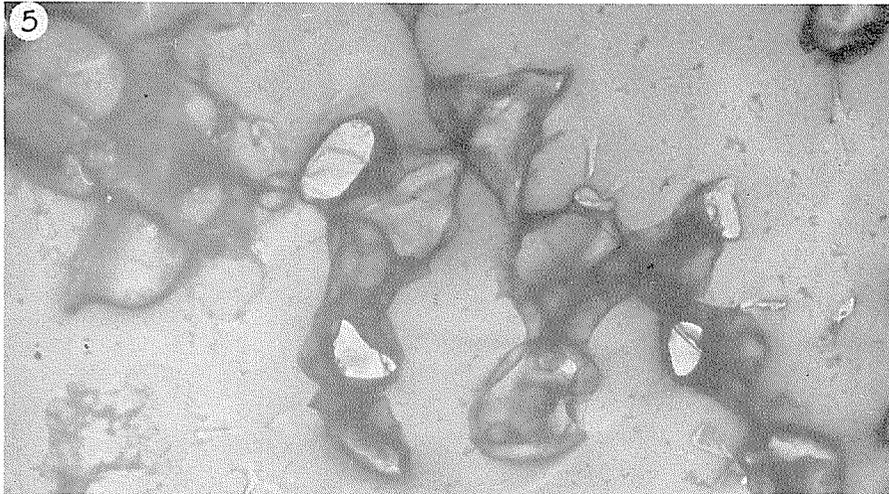
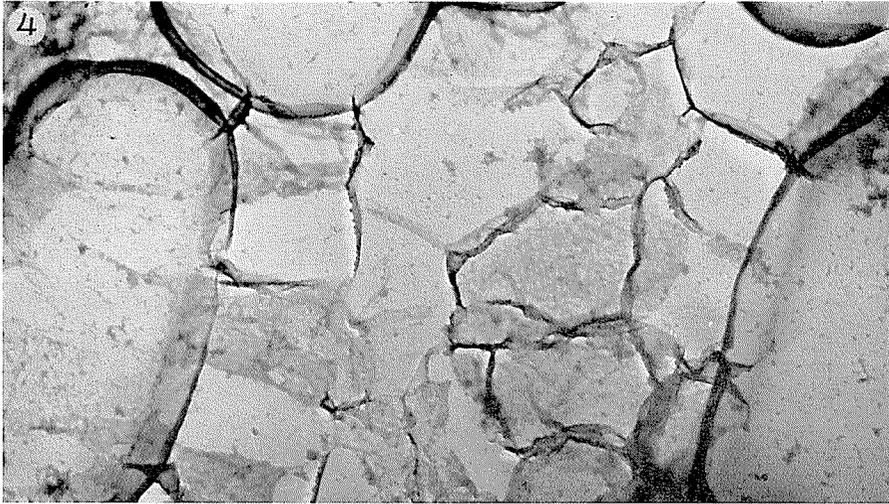
第5図 -160°C 凍結 (室温乾燥)

多くの場合、細胞全体の大きさは対照に近く保持されていたが、その辺縁はなめらかな曲線状の変形を示していた。部位によっては細胞の破裂乃至は破壊を想定させるような膜の破裂孔を示すものもあつた。

第6図 -196°C (液体窒素) 凍結 (室温乾燥)

この条件によるレプリカ像は、他の温度処理に比べて極めて特徴のある細胞の収縮像を呈するものが多かつた。即ち、何れの細胞も全体として球形に近い形態をとる傾向があつた。なかには細胞膜に小孔を有するものもみられた。





2. 切片標本 (第7図～第34図)

第7図 無処置対照 (燐酸緩衝液でpHを中性に規正した2% OsO₄水溶液固定)

赤血球は楕円形から2連球型乃至は啞鈴型の種々の形態を示して現われ、その一般的所見として、電子密度の高いほぼ均質無構造の内容から成り、強拡大で観察しても所謂 unit membrane と言われる細胞膜は見いだし難い。

第8, 9及び10図 -196°C (液体窒素) 凍結 (室温乾燥, 無染色)

凍結乾燥を一種の固定法とみなした無染色の赤血球は辺縁不規則な塊として認められ、細胞膜の周辺と血漿成分との境界も不明瞭であった。特に、アクリルその他の樹脂との馴染みが悪く、電子線照射に弱かった。切片が薄くなるにつれてコントラストの低下が強く現われ、一見暗視野像に近い様子もみられた。

第11図から第14図までは各温度で凍結した試料を室温乾燥したものである。

第11図 -30°C 凍結 (ED-10)

各細胞は高度に脱水され、辺縁が角張って認められる。切片部位によっては、細胞同志が折り重なって細くなったところもみられ、間隙の氷晶が緩かに大きく成長したことがうかがわれた。血漿成分が濃縮されて細長く管状に細胞間を連絡して認められるが (これを以下 inter-bridge と呼ぶ)、この傾向は -30°C 凍結の場合に最も強く現われた。この温度での細胞内氷晶の跡の出現は少なく、現われる場合、比較的大型の粒状又は櫛歯型のものが多かった。

第12図 -50°C 凍結 (ED-11)

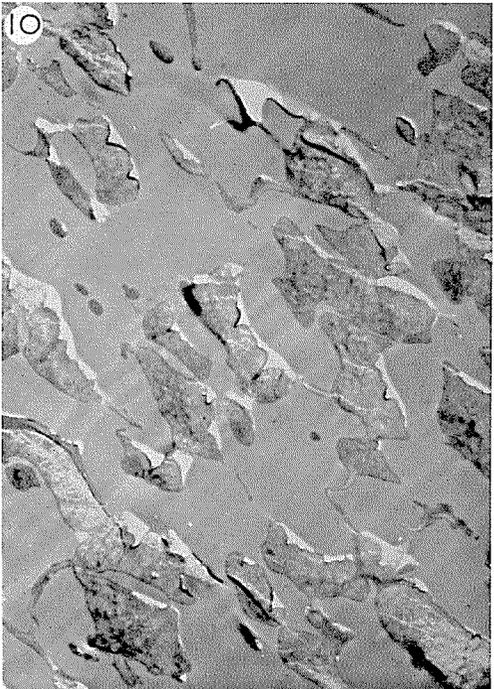
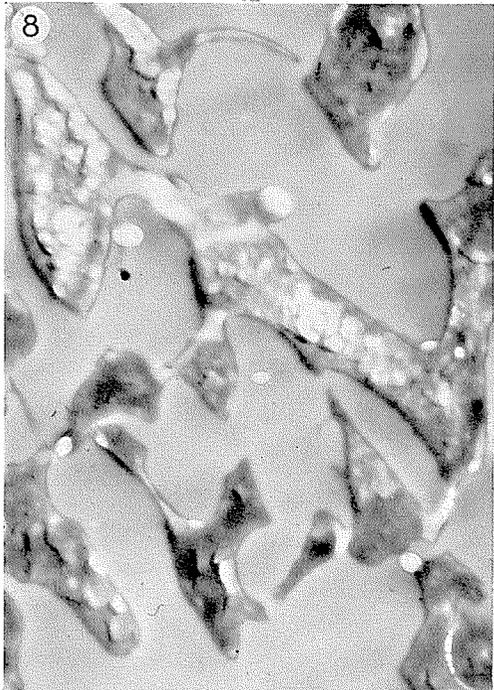
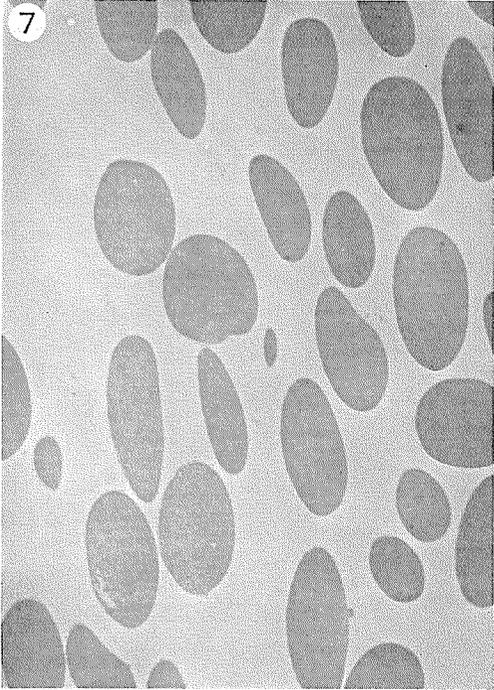
細胞は脱水されてはいるが、-30°C 凍結のものに比べれば比較的丸みを保っている。血漿成分の inter-bridge も比較的少なく、細胞間の氷晶の跡はそれ程顕著ではなく、氷の成長がゆっくり進んだことを示している。細胞内氷晶の出現率は -30°C 凍結の場合より多く、氷晶は羊歯状又は十字型の大きな粒として認められた。

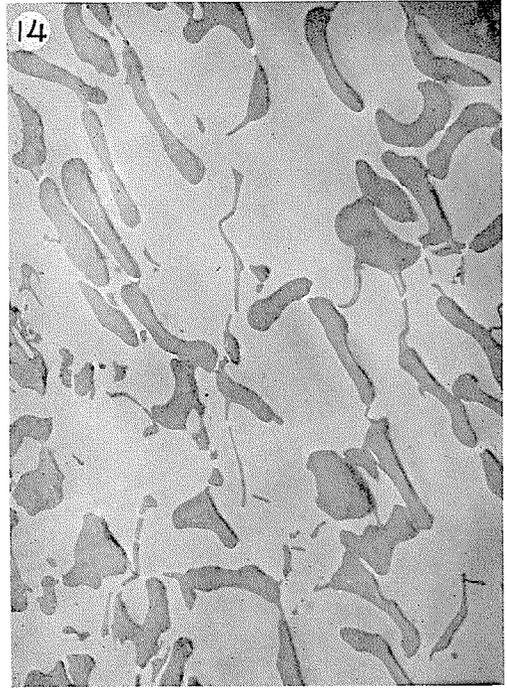
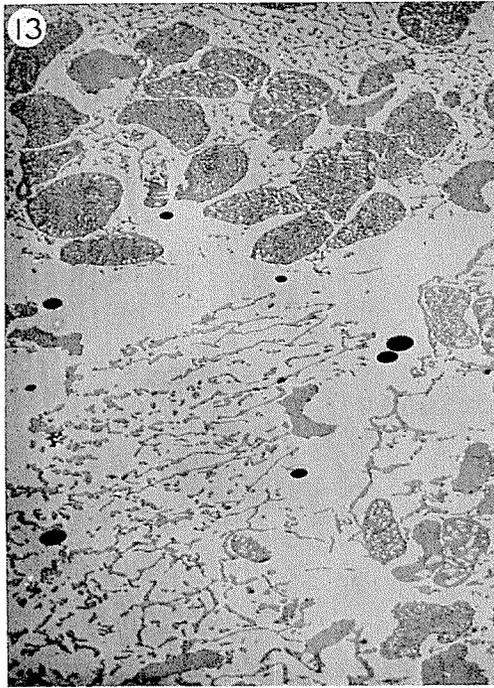
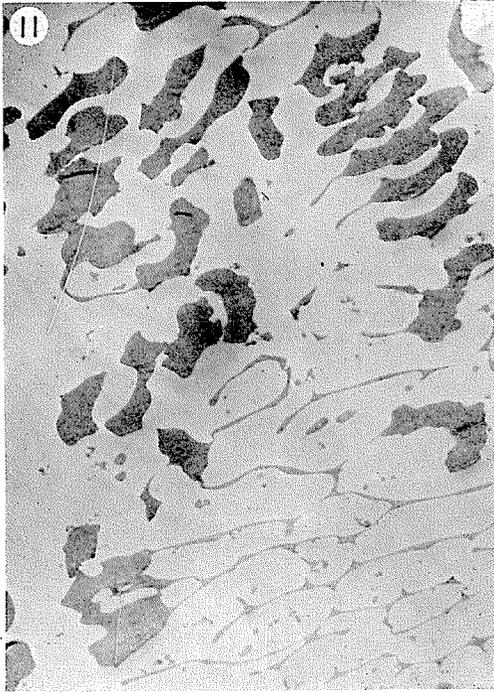
第13図 -160°C 凍結 (ED-12)

各細胞は対照に近いと考えられる外形を保っていたが、殆んどすべて細胞内氷晶の跡を示した。氷晶の跡は種々雑多であるが、主として放射状や針状型を示すものが多く、いずれも極めて微細な粒から成っていた。血漿成分は、-30°C 及び -50°C の場合にみられた様な inter-bridge を形成しないで、かなり細かな点状を示すものが多く、部位によってはこの写真にみられるように網状形に近い模様を呈した。処々にみられる電子密度の高い小楕円は、アルコール溶解後、2カ月後の OsO₄ の沈澱物と考えられる (第33図参照)。

第14図 -196°C (液体窒素) 凍結 (ED-13)

各細胞は基本的な原形を失わずに多少収縮の像を示した。しかし、かなりのものが球状収縮の像を示していた。細胞内氷晶の跡は他の温度処理に比べて最も少なかったが、形成された場合の粒子は最も大きかった。この条件における氷晶の出現部位は主として中心部に近いものであった。血漿成分の凍結の様子はむしろ -50°C における像に近く、inter-bridge も多く認められた。





第 15 図から第 18 図までは各温度で凍結した試料を低温乾燥したものである。

第 15 図 -30°C 凍結 (ED-14)

第 11 図の場合と同様に赤血球は強い収縮の像を呈し、その他の所見もほぼ等しい。部位によっては図の如く細胞内凍結を示すものがみられ、これは -50°C 凍結の場合よりも出現頻度が大であった。赤血球内にみられる電子密度の高い線状のものは電子線照射による人工産物であり、細胞実質が周囲の包埋剤の収縮によって押し縮められた為に生じたものである。

第 16 図 -50°C 凍結 (ED-15)

第 12 図と同様で、細胞はかなり強い脱水状態にあるが、総体として丸みを失わず inter-bridge が細胞間を連絡していた。細胞内氷晶の出現率は -30°C 凍結のものより低かった。

第 17 図 -160°C 凍結 (ED-16)

第 13 図と全く同様で、殆どどの赤血球が細胞内氷晶の跡を示していた。

第 18 図 -196°C 凍結 (ED-17)

第 14 図の場合にほぼ同様の所見であるが、各細胞はかなりの脱水状態にあつて、むしろ球状に近いと思われるものも多く認められた。血漿成分は図の如く、inter-bridge の形で細胞間をつなぐ場合と濃縮した球状塊を形成するものがみられた。

第 19 図から第 22 図までは各温度で凍結した試料を -30°C で冷却置換したものである。

第 19 図 -30°C 凍結 (ES-18)

この処理条件における細胞の過半数は、多少の程度の差異はあるが顕著な細胞膨化の現象を示した。即ち、凍結乾燥による場合(第 11 図及び第 15 図)のように強く脱水された形のものから、図に示す如く細胞膜の膨化に至るまで種々の段階のものがみられた。各細胞は互に膨化した細胞膜で接着し、中には境界の不明瞭な塊をなしていたものもみられた。血漿成分は千切れて大小の塊状となって認められた。この処理条件による細胞内凍結を起した赤血球の出現率は計数出来なかった。

第 20 図 -50°C 凍結 (ES-19)

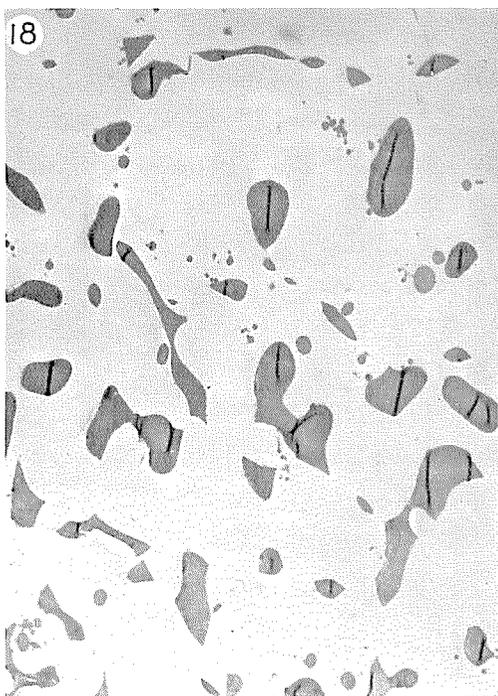
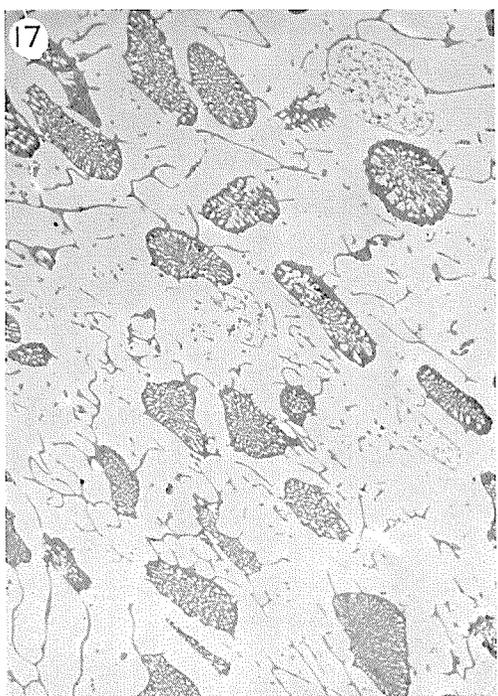
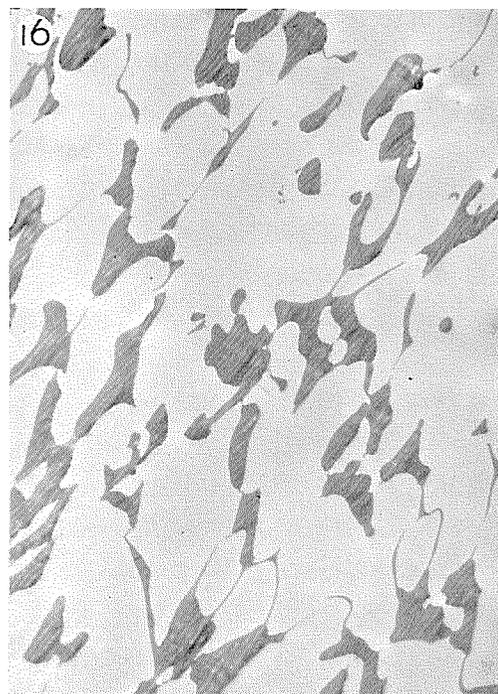
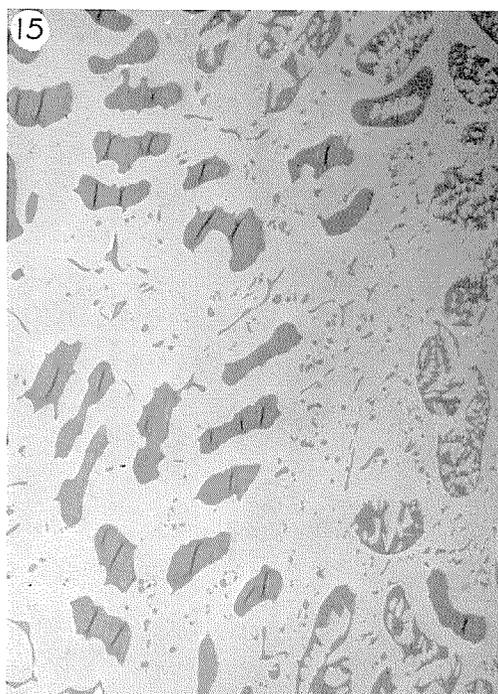
第 12 図及び第 16 図の場合とほぼ同様の所見であつた。

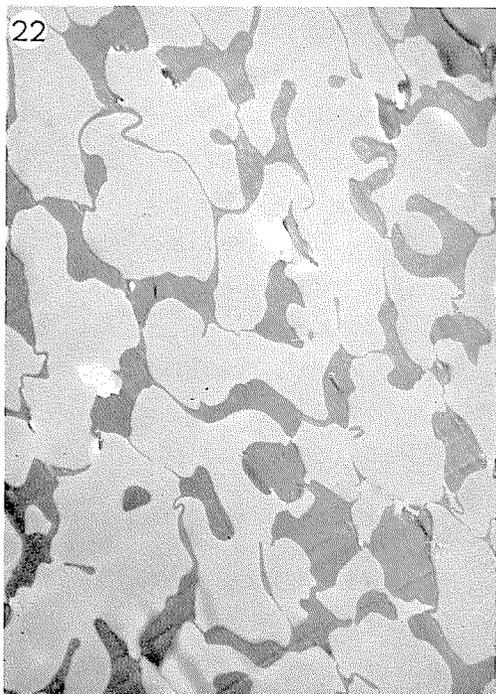
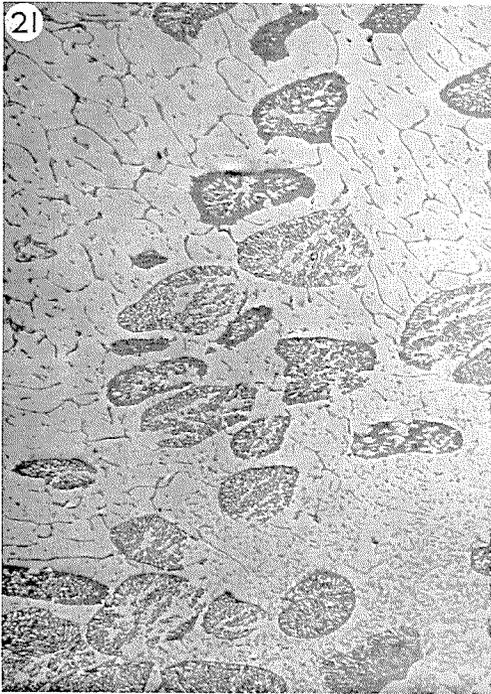
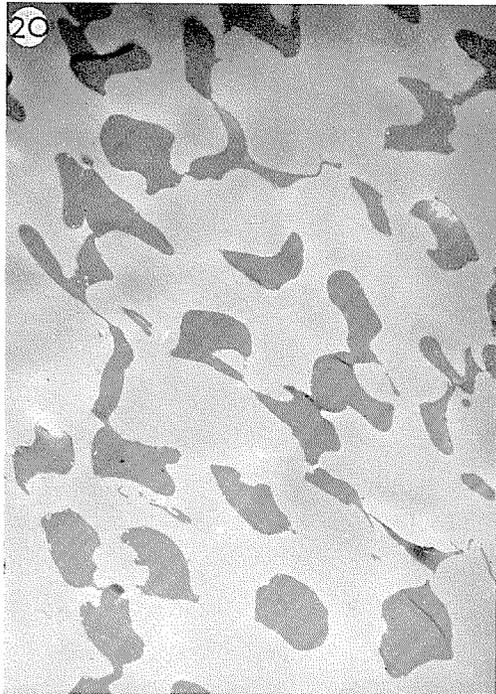
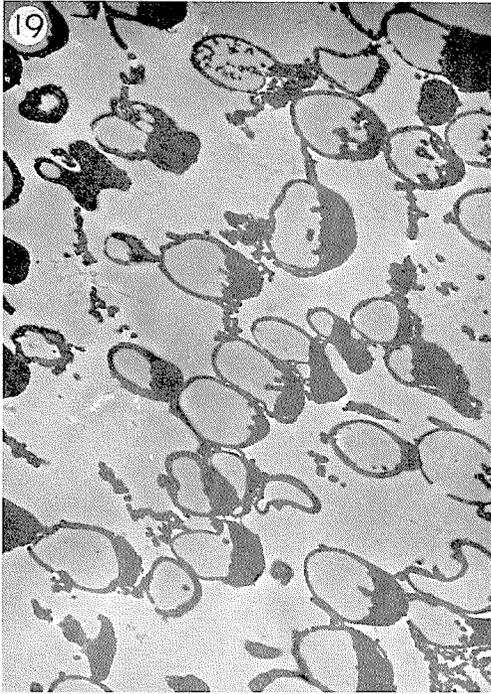
第 21 図 -160°C 凍結 (ES-20)

第 13 図及び第 17 図の凍結乾燥のものとはほぼ同様の所見であるが、それより幾分膨化し、細胞によっては破裂乃至は細胞膜の断裂の跡を示すものが多数認められた。

第 22 図 -196°C 凍結 (ES-21)

第 20 図のものによく似た所見である。





第23図から第26図は各温度に凍結した試料を -79°C で低温置換したものである。この条件による試料の場合、細胞内凍結を起こしたと考えられるものが種々の段階で崩壊していた為、その計数は不可能であった。

第23図 -30°C 凍結 (ES-38)

殆んど全ての細胞が丸みを帯びていて、脱水による角ばった像はみられなかった。あるものは2, 3個の血球が集塊をなして現われ、細胞間の interbridge も少なかった。互に密着した細胞の境界は高倍率(50,000倍)で観察しても判別出来ず、細胞膜と血漿成分との区分も不可能であった。

第24図 -50°C 凍結 (ES-39)

細胞はかなり脱水されてはいたが、丸みを失わず、辺縁部も比較的明瞭であった。細胞内に氷晶が出来たものでは細胞全体が膨化し、種々の段階で崩壊している像が認められた。血漿成分は interbridge を形成せず、かなり大きな球状塊をなして分散して認められた。

第25図 -160°C 凍結 (ES-40)

細胞内氷晶を形成したものは或んど膨化し、種々の段階に崩壊して電子密度の低い一種の生地模様をなしていた。同時に互いに密着していると考えられる塊では、帯状形態を呈していた(図の下方)。細胞内に氷晶の跡がみられないものにも、多くの場合細胞膜の断裂を想定させる変化がみられた。無論、血漿成分による interbridge は認められなかった。

第26図 -196°C (液体窒素)凍結 (ES-41)

赤血球は比較的丸みを保持して変形し、細胞内氷晶を形成したものは殆んど崩壊していた。これらの所見は総体として -50°C 凍結の場合に近いものであった。

第27図から第30図は、種々の条件で得られた切片の中で、特徴を有するもの或いは興味ある所見等を集めたものである。

第27図 -30°C 凍結 (ED-14) 低温乾燥

-30°C 凍結の場合においても細胞内凍結を起す血球がかなりの頻度で出現した。氷晶の模様は種々雑多であるが、一般に鋸歯状及び斑点状のものが多くみられ、その跡も大きかった。

第28図 -160°C 凍結 (ED-12) 室温乾燥

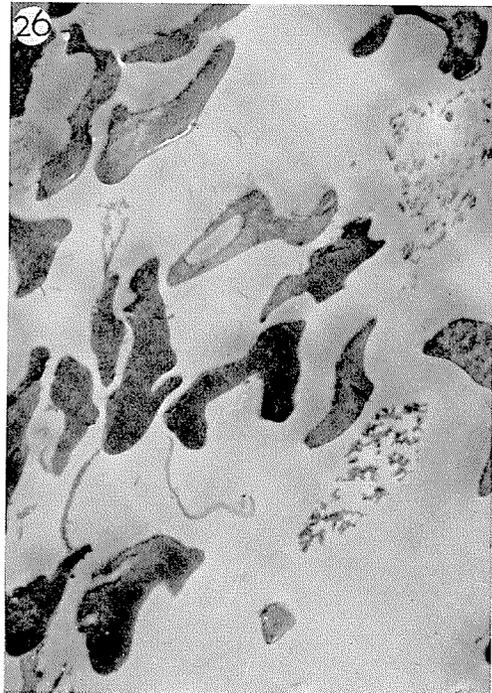
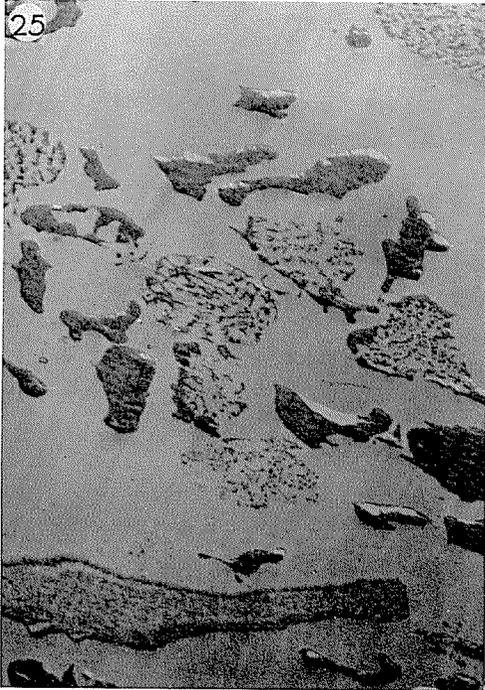
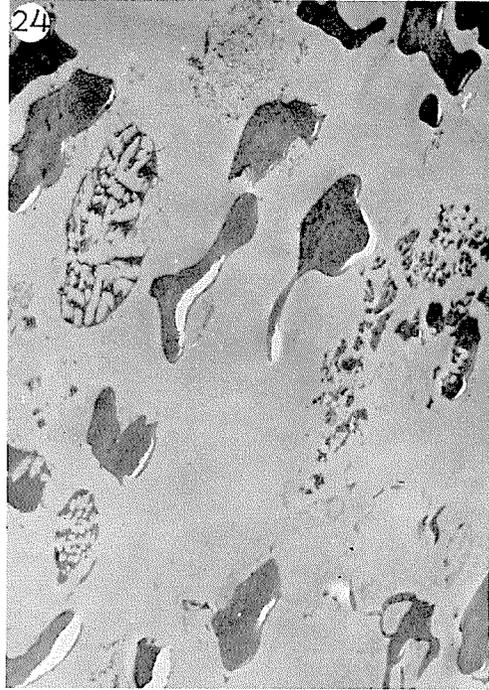
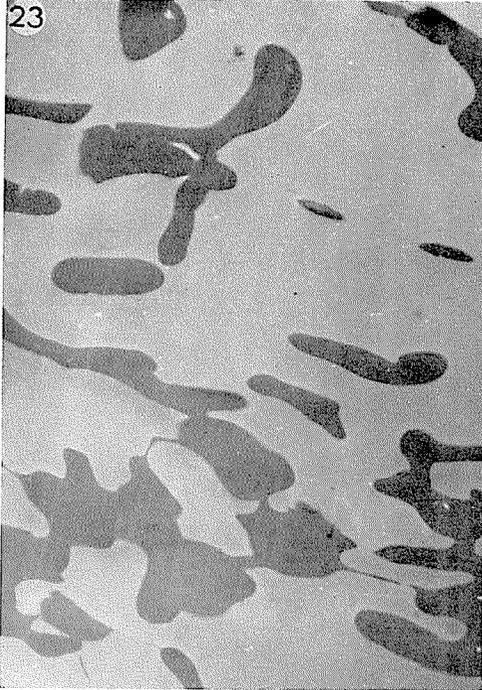
赤血球は殆んど細胞内凍結の像を示している。ここでみられる血漿成分は細長い棒状の氷晶に圧しやられて、特異な網目状の模様を形成しているが、この種の所見はかなりの高い頻度で出現した。

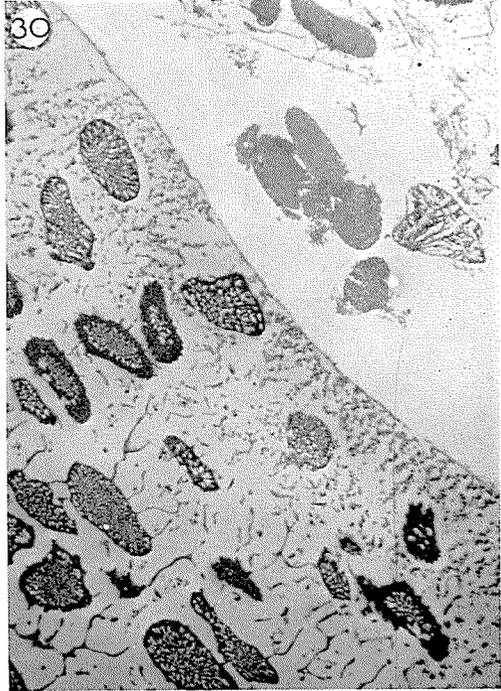
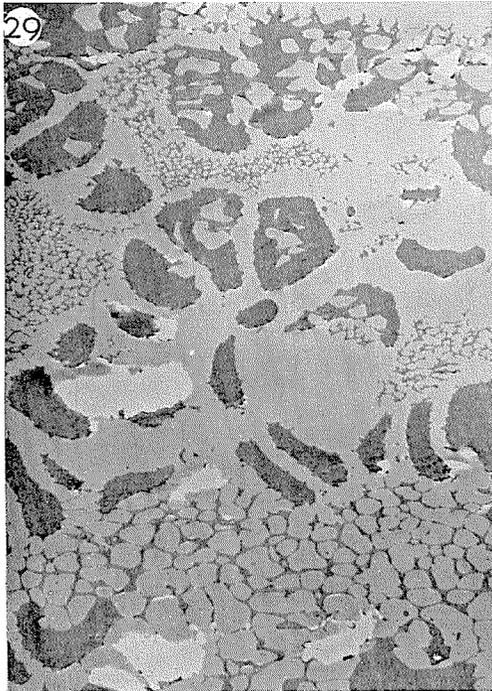
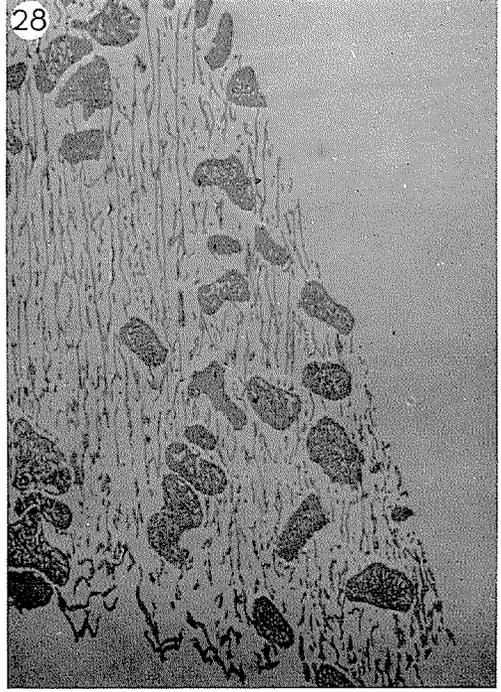
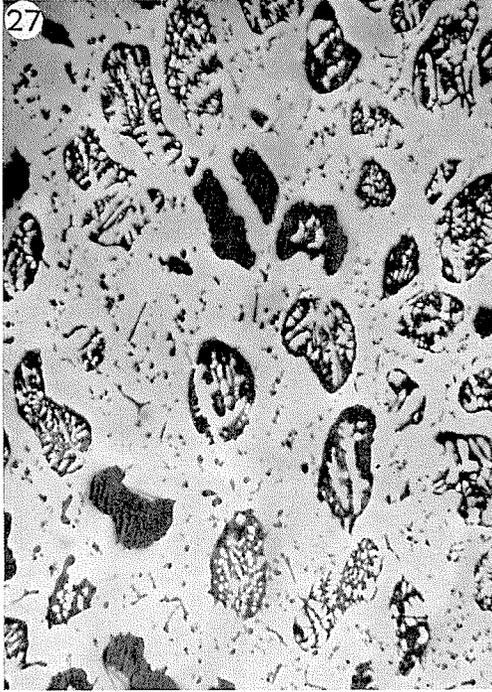
第29図 -30°C 凍結 (ED-10) 室温乾燥

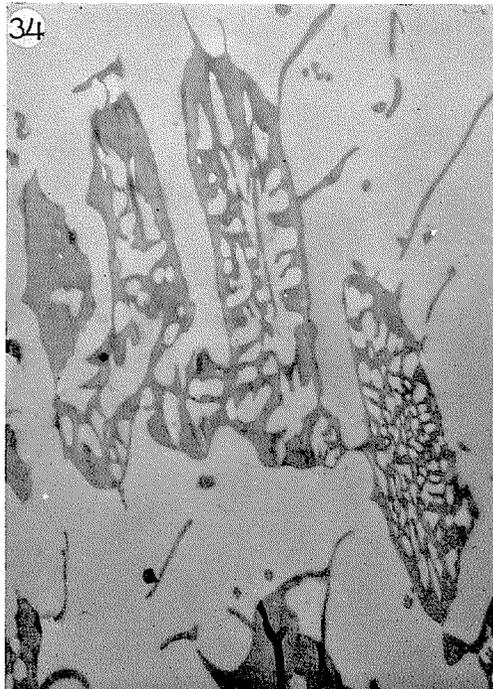
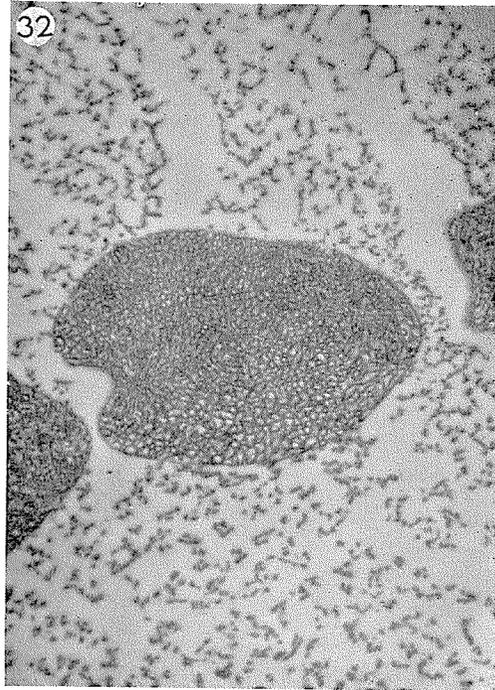
図の上方から下方に向かって血漿成分の形成する模様が網目状に大型化してみられる。この温度処理によって生じた細胞内氷晶の跡は比較的大型で丸みを帯びている。

第30図 -160°C 凍結 (ED-16) 低温乾燥

この図では、左下方約 $2/3$ を占める血液像がこの標本の作製過程を通じて細分されることなく、一塊りのものとして出来たものと考えられる。血漿成分は辺縁部では微細な顆粒状であるが、中心部に向かって次第に大きな形となり interbridge を形成している。つまり、辺縁部







では冷却速度が大きく中心部に向かう程小さくなっているようである。更に細胞内氷晶はこの周囲の血漿の凍結状態にある程度対応しているように思われる。即ち、冷却速度の大きなところでは細胞内氷晶は細かく一面に散らばっているが、冷却速度が小さくなる程細胞の周辺部位に均質に電子密度の高い層ができています。これは凍結の初期における細胞からの脱水によるものと考えられる。

第31図から第34図までは -160°C で急速凍結した際にみられる細胞内氷晶のあり方について、何れも最終倍率 $\times 10,000$ で変化の模様を示してある。

第31, 32図 低温乾燥 (ED-16)

-160°C 凍結の場合、殆どどの細胞が細胞内に細かい氷晶の跡を残していた。氷晶の模様は多くの場合放射状乃至は針状型を呈するか、或いは微細な粒状を示した。血漿成分はinterbrigeを形成することが稀で、図の様な小顆粒状を呈して分散して認められた。これら2枚の写真から、冷却速度の違い或いは切片方向によって氷晶の現われ方が多少異なってくる可能性が考えられる。

第33図 室温乾燥 (ED-12)

中央の細胞内氷晶の跡を有する赤血球の周囲に、一定の巾で細胞を包む電子密度の高い帯状構造がみられるが、これは左右の小楕円形のものと同様、アルコールに溶解した OsO_4 の沈澱物と考えられる(第13図参照)。

第34図 低温乾燥 (ED-16)

この図は、細胞内に形成されたのものと考えられる氷晶が、隣接した2つの細胞を貫通している像である。この種の所見は比較的稀にしか認められなかった。

無作為抽出による100枚の写真の中にみられる個々の細胞について、細胞内凍結の像の出現率を計数した値は第2表(考察)にあげた如くである。

同じ100枚の写真について、各1枚の写真の中で細胞内凍結の像の多いか少ないかによる多数決の方法で概算を行なった場合、表に示した値はほぼ類似の傾向を示した。しかし、 -160°C の温度の点ではかなりの変動(20%以上)を示すものがあり、電顕の蛍光スクリーン上での観察で、直感的に一視野の像の所見を読みとることの危険性を暗示していた。

表に示す如く、細胞内氷晶の出現率は -196°C で最も少なく、 -160°C で最も多かつた。

IV. 考 察

低温処理試料の電顕用標本の作成法についてはいずれ改めて検討をする予定³⁾なので、今回はその問題については触れない。

凍結後乾燥を行なった実験では、同一条件下で処理した試料の一部を室温で生食液中に急速融解し、光学顕微鏡で残存する血球を捜したが何れも皆無であった。

1. レプリカ所見とその解釈について

凍結血球を切片によらずに、細胞全体の形態或いは表面構造を見る目的でレプリカ法を用いた報告は見当たらない。僅かに、人赤血球の断面レプリカ⁶⁾と蛙の有核赤血球の切片レプリカ⁷⁾

に関する報告があるが、何れもその表面変化についての検討ではない。

本実験で得られた対照の赤血球群においては従来述べられている通りの特徴的な円板状形態をしている。

種々の温度下での凍結血球はそれぞれかなりの特徴を示している。即ち、 -30°C 凍結の場合は高度の脱水を思わせる多角形の収縮像を示し、 -50°C では脱水の度がやや少ないように思われる形態で細かな皺がみられる。 -80°C では変化の幅が大きく、その形態も多種多様であるが、かなり対照に近いものもある。 -160°C 凍結では、多くの細胞が原形に近い形を示しているが、破裂孔や小孔が出現する。 -196°C (液体窒素) では球状を想定させる細胞が多くみられた。

以上、各温度での所見は必ずしも一定して現われるものではなく、多少入りまじってみられる場合もある。又、何れの場合もここではその表面形態を観察するに過ぎず、凍結の機序について考えるとき常にその内部所見(切片)の成績と共に考察されねばならない。

2. 切片所見とその解釈について

各温度で凍結処理した赤血球の内部構造について、今回は細胞内氷晶の跡の有無と細胞の変形状態を主として観察した。そのために固定については単にコントラストの点にしぼり、内容成分の質的变化その他の追求を目的としなかった。用いた写真も低倍率に限られているが、実際にこの目的で5,000倍以上の倍率を用いても、より微細な氷晶の跡を見出すというようなこともなかった。本論文の成績にはあげなかったが、血球の膜を観察するために高倍率の像(50,000倍)を撮したが、血球の膜構造も一般細胞膜と同様に、3層の所謂 unit membrane⁹⁾ から成ることが明らかであった。但し、膜構造を観察する目的ではこの OsO_4 固定よりもホルマリン(磷酸緩衝液中性とし、Ringer 氏液を主成分としてある⁹⁾)、又は KMnO_4 溶液の方が好ましい像を示した。凍結処理後の赤血球の切片による膜の変化像については、一般に膜と基質成分とのコントラストが近づき、主として細胞内に氷晶の跡の認められる例における膜断裂の像の他、特に認むべき著変を見いだしてはいない。この問題については、凍結処理後の膜成分を集めて詳細に研究してみたい。

本実験を通して、強拡大の電顕像で、例えば -160°C 凍結処理の切片であっても、 200 \AA 以下と考えられる氷晶の跡は見だし難かった。しかしこの問題は、試料作成法(完全な低温保持を行っていないこと、切片厚が多分 200 \AA 以上であること)等の点からも、赤血球内に氷晶の占め得る最小の単位を示すこととはならない。

切片上に現われた各温度における家兎赤血球の形態は決して特殊な一定の変化に限られるものではなく、実験成績の写真に示す様な各凍結条件下での主要変化に加えて、相互の移行型の像が必ず多少は存在している。この点に充分注意を払って、各温度処理後の切片にみられる主なる変化を指摘すれば次の如くである。

a) -30°C 凍結では、細胞の高度の収縮像と多角形の外観及びかなりの細胞内凍結がみられる。

b) -50°C 凍結では細胞の収縮像と若干の細胞内凍結がみられる。細胞は全体としては

収縮しても比較的丸みを保っている。

c) -160°C 凍結では細胞は原形を保つか、多少膨化しているが、殆んど全て細胞内氷晶の跡を示す。その氷晶は微小なもので細胞内にはほぼ均一に散らばっている。

d) -196°C (液体窒素) 凍結では、上記3者に較べて細胞内に氷晶を形成するものが最も少なく、細胞は原形又は球形のままやや収縮する。氷晶は比較的大粒で細胞中心部にみられる場合が多い。

血液の凍結処理後の電顕による検索については、既に蛙の有核赤血球⁷⁾、牛⁹⁾及び家兎^{10,11)}の無核赤血球についての報告があるが、何れも定性的な一般の所見の提示とその解釈に止まり定量的な追求を行なつてはいない。しかし、それらの所見はほぼ本実験の成績に近いものがある。即ち、凍結温度の高いところでは収縮像が多く、温度が低くなると(液体窒素の温度を除き)微細な細胞内氷晶が出現してくる。

本実験ではそれらの点を考慮し、血球の溶血度、残存率、両者の相関及び内部構造について夫々定量的な測定を行ない(第2表)、溶血の機構を明らかにしたいと考えた。

第2表 家兎血液における凍結処理後の変化(アイソペンタン)

凍 結 温 度	-10°C	-20°C	-30°C	-40°C	-50°C	-80°C	-100°C	-160°C	-196°C^*
溶 血 度**	101	101	100	81	60	95		95	55
血 球 残 存 率***			15		37		27	10	38
細胞内 凍結率	室温乾燥 低温乾燥 冷却置換		11		19			69	9
				13		6		92	2
				?		16		90	8

* 液体窒素

** 10個体20例の平均値

*** 12個体48例の平均値

先ず、 -20°C 前後の完全溶血を示すところでは殆んど細胞が収縮像を示し、細胞内凍結を示すものが比較的少ないが、これについては Rapatz らも述べているように、比較的緩慢な凍結によって出来た細胞外氷晶の成長に伴ない、細胞からの脱水収縮が行なわれ、同時に細胞内外の塩溶液が濃縮されるために細胞膜の変化も起り、ひいては溶血をきたすものであらうと考えられる。この膜の塩害については Lovelock の説^{12,13)}によってその機構が説明されるであらう。

また、凍結温度が -150°C 付近では同じように血球は完全溶血を呈してはいるが、形態学的には上記の場合とかなり異なり、殆んど細胞が細胞内氷晶の跡を示している。このことはこの条件での溶血が主として細胞内凍結によることを暗示するものであらう。既にこれまでに多くの種類の細胞について、細胞内凍結が致死的事であることは実証されている^{14,15)}。Raratz らも述べているように、急速凍結のこの条件では細胞内凍結は起り易いし、その結果として当然溶血をきたすであらうことは認められてよいと思う。

その中間の -50°C 付近での凍結で溶血度がかなり低いことについては、冷却速度が中等度なので僅かの脱水がかえって細胞内凍結を起りにくくし、また塩の濃縮が充分に行なわれない

うちに critical zone を通過して、より低い温度に達するために塩害を受けないからであろう。この推論は、レプリカ及び切片で、細胞が全体として -30°C 程収縮せず、丸みを保っており、しかも細胞内凍結も比較的少ないことから認められよう¹⁶⁾。

最後に液体窒素に直接投入した場合は、最終到達温度が低いにもかかわらず溶血度は少ない。これはアイソペンタン等の冷媒を用いた場合とは異なり、液体窒素中では投入物体の周囲に気泡が生ずるために冷却速度が低下するからであろう。このことは事実、細胞内凍結の出現率の極めて低いことからもうなづけると思う。

以上を要約すると、凍結による溶血曲線が2峰性を示すことは、それぞれの山が異なった機構によるものと解釈することによって説明されるものと思う。

本実験では、細胞全体としての形態と細胞内氷晶の跡の有無に主眼点をおいて観察したが今後更に、膜の微細構造に対する影響について検索する必要があると考える。

本論文の作成にあたり、御指導御校閲をいただいた根井教授に深謝する。

V. 摘 要

家兎血液のカバーガラスとアルミ箔に挟んだ薄層微量試料を、 -30 、 -50 、 -160°C に冷却したアイソペンタン及び -196°C 液体窒素で急速凍結し、凍結乾燥法又は凍結置換法によりレプリカ及び切片を作り、その形態学的変化を調べた。

-30°C 凍結のものでは強い収縮の像がみられるものが多く、 -50°C の場合ではやや緩やかな脱水を思わせる収縮像が主に認められ、 -160°C では細胞内凍結の像が多かった。更に、 -196°C 液体窒素で凍結したものでは細胞内氷晶の像が最も少なく、細胞は原形に近いか或いは球形に収縮してみられた。これらの所見は何れもレプリカと切片による内部変化の状態がよく一致して認められた。

以上の所見は夫々の温度で主としてみられる変化で、相互にかなり移行型が入りまじっていた。これは細胞内氷晶の出現率からもわかる。

これらの所見と、溶血度、残存血球数とを組み合わせると低温処理によって起る細胞の障害の機構について論じた。

文 献

- 1) 小島義夫 1965 家兎血液の凍結による障害 I. 低温科学, Ser. B, **23**, 111-121
- 2) 小島義夫 1965 家兎血液の凍結による障害 II. 低温科学, Ser. B, **23**, 123-127
- 3) 小島義夫 未発表.
- 4) 根井外喜男・竹内光彦 1961 角膜の凍結乾燥. 低温科学, Ser. B, **19**, 95-105.
- 5) 根井外喜男 1964 凍結及び乾燥による試料の亀裂. 低温科学, Ser. B, **22**, 133-138.
- 6) Haggis, G. H. 1961 Electron microscope replicas from the surface of a fracture through frozen cells. J. Biophys. Biochem. Cytol., **9**, 841-852.
- 7) Rapatz, G. and Luyet, B. 1961 Electron microscope study of erythrocytes in rapid frozen frog's blood. Biodynamica, **8**, 295-315.

- 8) Robertson, J. E. 1959 The ultrastructure of cell membrane and their derivates. In *Biochem. Soc. Symp.*, No. 16, 3-43.
- 9) Rapatz, G., Nath, J. and Luyet, B. 1963 Electron microscope study of erythrocytes in rapidly frozen mammalian blood. *Biodynamica*, **9**, 83-94.
- 10) 根井外喜男・花房尙史・小島義夫 1963 血球の凍結乾燥についての予備的実験. 第7回凍結及び乾燥研究会記録. 16-23.
- 11) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contrib. Low Temp. Sci., Ser. B*, **13**, 1-6.
- 12) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human blood cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414-426.
- 13) Lovelock, J. E. 1957 The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, **147**, 427-433.
- 14) Mazur, P. 1965 Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. 15, s 175-182.
- 15) Asahina, E. 1965 Freezing process and injury in isolated animal cells. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. 15, s 183-187.
- 16) Luyet, B. J., Rapatz, G. L. and Gehenio, P. M. 1963 On the mode of action of rapid cooling in the preservation of erythrocytes in frozen blood. *Biodynamica*, **9**, 96-124.

Summary

Morphological observations were made on frozen erythrocytes. Thin-layered rabbit blood sandwiched between a cover glass and a sheet of aluminum foil was frozen in an isopentane bath cooled to -30 , -50 , or -160°C , or in a liquid nitrogen bath. The specimen was then dried or substituted with alcohol and embedded in methacrylate. Replica or ultra-thin sectioned specimens were observed with an electron microscope.

The most predominant change of erythrocytes frozen at various temperatures were as follows: At -30°C , most cells were extremely shrunken with irregular contours and a few cells showed intracellular cavities; at -50°C , moderately shrunken cells and a few intracellularly frozen cells were found; at -160°C , almost all of cells showed small but numerous intracellular cavities; cells frozen in liquid nitrogen were mostly similar to those frozen at -50°C . The percentage of the intracellularly frozen cells in specimens was calculated by means of random sampling.

Some discussions on the mechanism of hemolysis resulting from freezing were made from this morphological point of view.