



Title	溶液の凍結 I : 血漿中の氷晶と再結晶
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 149-156
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17704
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p149-156.pdf



溶 液 の 凍 結 I*

血漿中の氷晶と再結晶

根 井 外 喜 男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 38 年 7 月受理)

I. 緒 言

種々の crystalloid 或いは colloid の水溶液について、凍結による氷晶形成の機構、及び加温過程での再結晶の生成の機構が、Luyet 一門により、顕微鏡による形態的観察、温度の測定、比濁法による再結晶の確認等種々の方法を利用し、かなり広範囲に亘り研究された¹⁾。特に gelatin, albumin, myosin, PVP, dextrin, dextrans, gum arabic, agar, methyl cellulose, methyl glucamine, sucrose, glucose, glycerol, ethylene glycol, sodium chloride の 16 種の溶液と更に水について、氷晶形成の pattern が詳しくしらべられた結果、大別して hexagonal form, irregular dendrite, coarse spherulite 及び evanescent spherulite の 4 種に分けられると記述された²⁾。

また再結晶については、やはり Luyet の業績³⁾で、光学的に opacity を測ることによる諸種 carbohydrate 溶液についての報告がある。その後特に gelatin 溶液を用いた実験で、gelatin の濃度、凍結温度によって rosette 或いは evanescent spherulite 等の凍結の pattern がみられ、それが加温されたときにおこる再結晶の温度 (20~50% の gelatin では -12°C , 53% 以上では -37°C) 及び形態的变化について詳細に観察された結果、irruptive recrystallization と migratory recrystallization の 2 種の過程のあることが報告された。Luyet を所長とする American Foundation for Biological Research に於いては、更に引き続いて血液の液状成分である血漿、アルブミン、ヘモグロビン等について再結晶の研究が行なわれ、光学顕微鏡、電子顕微鏡、比濁法、膨脹計法、比熱法等各種の測定法を駆使することによって、いろいろの立場からの検討が進められてきた。本実験もまたこれら一連の研究の一環をなすもので、筆者が 1962 年 7 月から 10 月に亘るうちの約 2 カ月間、同研究所に滞在している間に行なったものである。

この実験の最終の目的は、赤血球の凍結障害に対して保護作用があるといわれている glucose の作用機序について、氷晶の pattern の面から検討してみたいということにあったので、種々の濃度の glucose を加えた場合の血漿の凍結と再結晶の pattern をしらべるための予備実

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 649 号

本題の 3 篇の論文は昭和 38 年に受理されたものであるが、事情により、発表が今日まで延期された。

験として、先ず対照の血漿及び glucose 溶液それぞれ単独のものについて実験を行なった。その結果については、別々に記載して、最後に全体としての総括を行なう予定である。

なお血漿のみについては、同研究所の Pribor が再結晶過程の観察を行なっているが、観察の立場が多少異なるし、まだ公表されていないので、筆者が行なった実験結果については本篇に於いて報告することにする。

II. 方 法

方法の概略：既に Luyet and Rapatz の論文^{2,7)} に実験方法が詳しく記載されており、本実験もまたその装置を用い同じ方法に準じて行なったものであるから、詳細は同論文に譲ることにする。

先ず方法のあらましを述べると、1 滴の試料を 2 枚の cover glass の間に挟み、所要の温度まで冷却された isopentane 又はアルコール槽の中に急激に挿入して凍結させ、それを低温顕微鏡の対物レンズの前において凍結の pattern を観察し、更に所要の温度まで加温した場合におこる再結晶の状態の形態的観察を行なうのである。

試 料： 尿酸カリ加牛血液を遠心して、その上清の血漿を集め、+5°C の冷蔵庫内に保存し、試料として用いた。

装 置： Rapatz and Luyet⁷⁾ の論文で紹介されている低温顕微鏡を用いた。即ち水平におかれた顕微鏡の対物レンズとコンデンサーの間に冷却槽がおかれ、槽中のアルコールは、液体窒素を通して送られる適当量の空気（別にとりつけた pneumatic regulator の作働で自動的に調節される）で冷却され、所要の温度を保つようになっている。試料を挟んだ 2 枚の cover glass はこの冷却槽の中に垂直に挿入されたままで、その凍結状態が普通光線及び偏光光線を通して顕微鏡カメラにより写真撮影された。本実験では撮影時の倍率はすべて 10×10 であった。なお偏光には人造偏光板を用い、試料の状況によっては必ずしも直交ニコルではなく、偏光子と検光子を適宜の角度に保った。

実験方法： 厚さ 150 μ の cover glass (#1) の 4 隅に spacer として厚さ 12.5 μ のアルミ箔の薄片をワセリンで付着させる。glass の中央に 1 滴試料をとり、他のもう 1 枚の cover glass をのせ、上から大きなゴム栓で押えて試料の厚さをなるべく均一になるようにする。周辺からはみ出した液はすぐ吸いとられるように予め吸取紙を敷いておく。このようにして作られた試料は、周辺部のアルミ箔の付近では箔の厚みに等しく均一であるが、中心部ではやや薄くなっている。このことはすかしてみても試料の色からわかる。

試料を間に挟んだ 2 枚の cover glass は装置の上部にとりつけられたつまみに吊り下げられ、所定の温度の冷却槽中に急速に落下挿入されることによつて凍結がおこるのである。凍結の条件としては、-50°C (又は -20°C) での凍結は、顕微鏡にとりつけられた冷却槽のアルコールを所要の温度に調節しておき、その中に試料を挿入することによつておこらせ、そのまま次の観察に移るが、-150°C での急速凍結では、凍結と観察とは分けて行なう。即ち先ず別に小さな魔法瓶に isopentane をとり、これを液体窒素で -150°C にしておき、顕微鏡の冷却槽の

上に持ってきて、その中に試料を急激に挿入して凍結させ、数分たったところで手早く魔法瓶をとり去って、試料を顕微鏡の冷却槽に移し、その後の観察に移るのである。本実験で用いた血漿はもちろんのこと、次の第2, 3篇で用いた glucose でも、 -150°C で凍結させたものは -50°C に移しても、氷晶の形態に変化のないことが確認された。従って -150°C の凍結の場合で再結晶過程に対する対照として撮影されたものは、すべて -50°C に移した後のものである。

以上のようにして -150°C 又は -50°C で凍結させたものを、次に適当な方法で温度を上げると、その加温の過程で再結晶の諸変化がおこる。ここでいう再結晶なる言葉の定義は金属の場合などとは異なり、加温過程でみられるところの氷晶の相変化の全般を示すものと考えてよいであろう。加温の方法としては次の2つの方法を採用した。1つは加温過程の全体に亘っておきる変化を大づかみに知るため、それには pneumatic regulator を切って冷却槽への液体窒素の供給をとめると、ほぼ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ くらいの速度で温度が上昇する(室温は 20°C の恒温)ので、 -50°C から -5°C くらいの間で大体どの温度でどんな変化がおきるかを、全過程に亘って観察することができた。但しこの場合は、冷却槽の温度はほぼ一定速度で上り続けであるから、試料自身についての time lag を考えると、温度や時間に関してそれほど厳密なことはいえない。その点を正確に観察するために、もう1つの方法として、試料を一旦同じ温度に保たれた魔法瓶中に移しておき、冷却槽を所要の温度に調整した上で、その温度に戻して観察するのである。大体10分乃至20分間同一温度においてそれ以上殆んど変化しなくなったところで更に次の温度に移して観察を続けるわけである。この一定温度での観察によると、試料中の変化はその温度に相当したある段階までで停止するので、各温度に亘る変化の全経過を知るのには、前に述べた方法が便宜である。

III. 結 果

第1, 2, 3篇を通じ、本シリーズの実験では、すべて同一の条件のものを3回ずつくりかえして行ない、本文ではその全体に通ずる所見を記載し、図版にはそのうちの1例を掲載した。

1. -50°C での凍結

A. 凍結による氷晶の pattern

この場合はすべて irregular dendrite の pattern を示す。試料中に比較的少数の crystallization unit の center がみとめられるにすぎず、個々の center から放射状に出ている羽毛状のものは互に重なり合うように多少曲りくねりながら四方に延びている。偏光でも普通光でもよく観察され、また見事な periodicity⁹⁾ を示すものもある。

B. 再結晶過程

加温による変化については、 -20°C までは全然みとめられないが、 -15°C になると急激な変化がみられる。即ち前記羽毛状構造の各片の周縁にそって非常に小さな粒子様のものが現われ、次第にその数を増す。一方視野全体としてやや暗くなり、periodicity もやや明確さを失ってくる。しかし偏光ではまだ処々に限局性の明るい部分が残っている。 -15°C ではそれ以

上長くおいても余り大きな変化はみられない。そこでこれを -10°C に移すと、一旦できた粒子様のものが再び減ってきて、その代り個々の羽毛状構造がそれぞれ幾つかの小区割にしまわれ、各区割は偏光でいろいろの程度の明るさを示すようになる。更に温度を上げると、最初の細かな粒子は全く消失し、その後に来た多くの小区割は境界線及び density が一層明瞭になり、はっきりと個々の氷晶に分れる。 -5°C くらいになると、それぞれの境界線のところから融解が始まる。

-20°C で凍結した試料であっても、これと全く同様の経過がみられた。

2. -150°C での凍結

A. 凍結による氷晶の pattern

-150°C で急速凍結したものを -50°C で観察すると、前述のような羽毛状の pattern もみられるが、もう少し小さな花瓣状のものが多い。定型的な periodicity を示すもの、あまりはつきりしないものなどさまざまである。また花瓣状構造の各片の間に粒子様のものの散在していることが多い。但しこれは普通光ではあまりはつきりしない。各 crystallization unit の center に当たるところに非常に微細な粒子の集団のみえることが多い。特にこれは普通光でよくみえる。その本態はわからないが、これらのものが核となつて、氷晶形成が始まったもののように思われる。

B. 再結晶過程

-50°C 凍結のものと同様、 -20°C までの加温では何の変化もないが、 -15°C になるとかなり著明な変化があらわれる。この場合は -50°C の凍結のものでみられた粒子様のものよりもう少し微細な粒子が現われ、また各花瓣の長軸の方向に対してほぼ直角に走る細い線ができて、1枚の花弁も数個の小区割に分けられる。しかも各区割は、それぞれ結晶学的に異なった軸方向をもつものとみえて、偏光で transparent であつたり、opaque であつたりする。もっと温度を上げて -10°C より高くなると、最初の小粒子は消失し、各小区割はそれぞれ遊離して融解が始まる。periodicity も次第に不明確になるが、融解が始まっても個々の氷晶にその名残りを留めている。

IV. 考 察

緒論に述べたように、Luyet 等は 16 種の溶液の凍結の pattern を hexagonal form, irregular dendrite, coarse spherulite, evanescent spherulite に分類している。要するに試料の凍結に当つて、試料中に含まれる溶質の種類、濃度、凍結の温度、速度等によって、完全な氷結晶の生成がいろいろの程度に阻害されるものと考えられている。上記 4 種の pattern では、hexagonal form が最も完全な結晶状態を示し、次第に阻害の程度を増して、evanescent spherulite が最も不完全な結晶に近いものと思われる。また Luyet が曾って述べていたような vitreous state (amorphous state) のものは、65% 以上の高濃度の gelatin gel を除いては、通常の生物試料では殆んどみることができないといわれる。精々 evanescent spherulite と呼ばれるものが、不完全な結晶に一番近いものといえよう。本実験で観察されたように、血漿ではたとえ -150°C の

急速凍結でも、凍結の pattern は殆んどすべて irregular dendrite で、比較的 hexagonal form に近いものである。

加温の過程でみられる再結晶については、Luyet はこれを irruptive recrystallization と migratory recrystallization の2つに分けて考えていた。前者は evanescent spherulite のような不完全結晶が完全結晶に変わろうとする現象で、手近かな変化として opacity の増すことから容易に判定される。純水なら -129°C 、formaldehyd は -80°C 、澱粉は -6°C でおこるといふ。要するに一部 amorphous な状態の水が、より完全な氷晶に変わろうとするところの molecular structure の上の変化であると考えられるのである。後者の migratory recrystallization とは、もう少し完全結晶に近い状態の水で、大きな氷が小さな氷をとりこんで、その size を増そうとする現象といえる。irruptive recrystallization が molecular level での変化というのに対し、migratory recrystallization はもう少しマクロな crystal size の変化といつてよいであろう。いづれにしても、より完全な結晶に移行しようとする過程のそれぞれの段階を示すものである。

血漿を試料として観察した本実験では、凍結条件の如何に拘らず、凍結による pattern はすべて irregular dendrite で第2報以下で述べるような evanescent spherulite はみられず、従つて加温による変化も後者のような高度の opacity の増加などとは異なるので、血漿では殆んど migratory recrystallization が主体で、irruptive recrystallization はあまりはつきり現われないうものといえよう。ただ initial pattern にみられる多数の粒子様のもの、或いは加温過程で一時的に現われるより小さな粒子状のもの本態は一体何であろうか、今の段階では全く不明である。

前述のように、Luyet^{3,9)} は opacity の変化から種々の溶液の再結晶温度を測定し、例えば glucose は -40.6°C 、glycerol は -64.7°C というように、はつきりした数値として表わしている。これは opacity の最大になったときの温度を示したわけだが、本実験のように顕微鏡による形態的観察では、再結晶温度は何度であるというような定量的な表現は非常に困難である。なぜならば、1つの試料の中に現われる形態的变化にも幾つかの質的に異なつたものがあり、それぞれが連続的に、しかも時には overlap しながら出沒するからである。例えば血漿に於いては、 -15°C までの加温では微粒子出現の段階で止まり、 -10°C にして始めて小区割への区分に進むというように、形態的観察だけでは定量的な表現は難かしい。

なお glucose を試料とした場合の結果との比較については、第2, 3報に於いて述べる予定である。

摘 要

1. 牛血漿を2枚の cover glass に挟み、厚さ凡そ 12μ の試料として、 -50°C のアルコール、又は -150°C の isopentane に直接浸して凍結させると、その凍結の pattern は羽毛状或いは花瓣状の irregular dendrite を示した。

2. これを加温すると、ほぼ -20°C と -15°C との間で変化が始まり、微細粒子の出現、小区割の形成などがあつて、やがて個々の大きな氷晶に移行し、 -5°C 近くで融解がみられた。

文 献

- 1) Luyet, B. 1960 On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**, 549-569.
- 2) Luyet, B. and Rapatz, G. 1958 Patterns of ice formation in some aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 1-68.
- 3) Luyet, B. 1939 The devitrification temperatures of solutions of a carbohydrate series. *J. Phys. Chem.*, **43**, 881-885.
- 4) Gehenio, P. M. and Luyet, B. J. 1959 On the existence of two ranges of recrystallization temperatures in gelatin gels. *Biodynamica*, **8**, 81-84.
- 5) Rapatz, G. and Luyet, B. 1959 Recrystallization at high sub-zero temperatures in gelatin gels subjected to various cooling treatments. *Biodynamica*, **8**, 85-105.
- 6) Persidsky, M. D. and Luyet, B. J. 1959 Low-temperature recrystallization in gelatin gels and its relationship to concentration. *Biodynamica*, **8**, 107-120.
- 7) Rapatz, G. and Luyet, B. 1957 Apparatus for cinematography during rapid freezing. *Biodynamica*, **7**, 347-355.
- 8) Persidsky, M. D. and Luyet, B. 1960 Periodicity in the freezing of aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 165-180.
- 9) Luyet, B. 1941 The vitreous state of matter and the devitrification. *Temperature, Its Measurement and Control*. Reinhold, N.Y.

Summary

Bovine plasma was examined on crystallization and recrystallization in freezing as the control material of plasma with glucose added; thin-layered specimens, placed between two cover glasses, were frozen by immersion in an alcohol bath at -50°C or in an isopentane bath at -150°C and initial freezing patterns and recrystallization process upon rewarming to the melting point were observed with a polarizing microscope.

Patterns of ice formed in the initial freezing showed irregular dendrites, having feather- or flower-like configurations.

Recrystallization process, upon rewarming, was initiated between -20°C and -15°C and showed the following changes; appearance and disappearance of fine grains and division of each petal by striae into small areas, followed by final turning to large ice particles.

図版説明

一般的事項

1. 写真は通し番号にせず、試料の異なる毎に番号を改めた
2. 写真はすべて左右2枚並べて貼布した。左側は普通光線、右側は偏光光線で撮影されたもので左側上部にのみ番号をつけた
3. 加温過程の観察では
 - 1) 番号1のものは対照として -50°C で撮影されたもの
 - 2) 各種温度で時間の記入されているものは、その温度に保持された時間を示す(各温度に10分ずつおいた)
 - 3) 温度だけで時間の記入のないものは、凡そ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の一定加温速度で上げた場合のそれぞれの温度を示す
4. 写真の倍率はすべて $\times 100$ である(接眼レンズ $\times 10$, 対物レンズ $\times 10$ を使用)

図版 I

試料 I-1, 2, 3 血漿, -50°C 凍結, -50°C 撮影, 1では花模様の crystallization center がみられるが, 2, 3では羽毛状の構造の重なり合っている pattern が普通光, 偏光ともにみられる

図版 II

試料 II-1 血漿, -50°C 凍結, 対照 -50°C , 偏光で periodicity がよくわかる
 II-2 同上, -15°C 2分, 普通光で, 条線に沿って粒子様のものの現われるのがみられる
 II-3 同上, -15°C 5分, 粒子様のもののがかなり増加してきたのが偏光でもよくわかるこの出現の場所は, periodicity と関連があるようである

図版 III

試料 II-4 同上, -15°C 10分, 3よりやや進行
 II-5 同上, -10°C 10分, -15°C では10分以後余り変化はないが, これを -10°C に移すと粒子様のものは細かな筋に変わり, 多くの小区割を作る
 II-6 同上, -6°C , 更に温度が上ると, 区割ははっきりしてくる。本来の羽毛様の部分からできた区割は大きく, 粒子様のものからできた区割は小さい

図版 IV

試料 III-1 血漿, -20°C 凍結, 対照 -20°C . このものでは試料 II-1 でみられたような粒子様のものが, 視野の一部に最初からみえた
 III-2 同上, -15°C , 上記のものは温度を上げると次第に視野全体に拡がった
 III-3 同上, -10°C , 大小の区割にはっきりと分れた。偏光ではまだ多少 periodicity の名残りがうかがわれる

図版 V

試料 III-4, 5, 6 同上, -8°C では区割が—そうはっきりし, -6°C では各氷晶の周囲に融解が始まり, -5°C では更にそれが進む

図版 VI

- 試料 IV-1 血漿, -150°C 凍結, 対照 -50°C , 普通光で crystallization unit の center と, その隣りの unit との border line とがよくわかる。center には微粒子の集団がみえる。偏光では center に花模様がみられ, その周囲は一面の粒子状のものに囲まれている
- IV-2 同上, もう少し大きな花模様がみられる
- IV-3 同上, 花模様から周辺が向って延びた羽毛様の pattern で periodicity の明らかにみられるもの

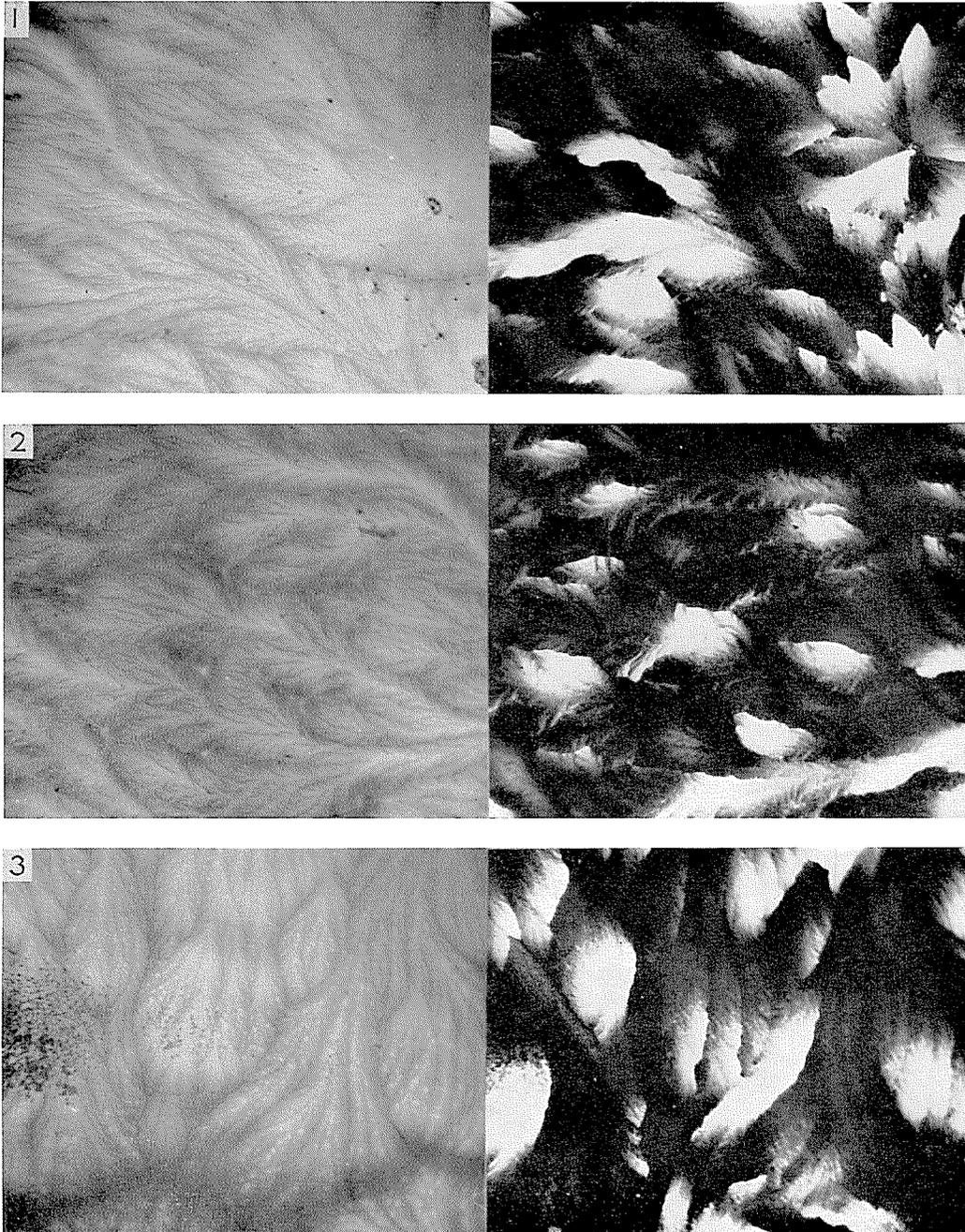
図版 VII

- 試料 V-1 血漿, -150°C 凍結, 対照 -20°C , 菊花模様の各花瓣の間, 特に center と周辺部に粒子状のものがみられる
- V-2 同上, -15°C , 小粒子が全面に現われる。同時に各花瓣が長軸に直角な細い線で小区割に区切られる

図版 VIII

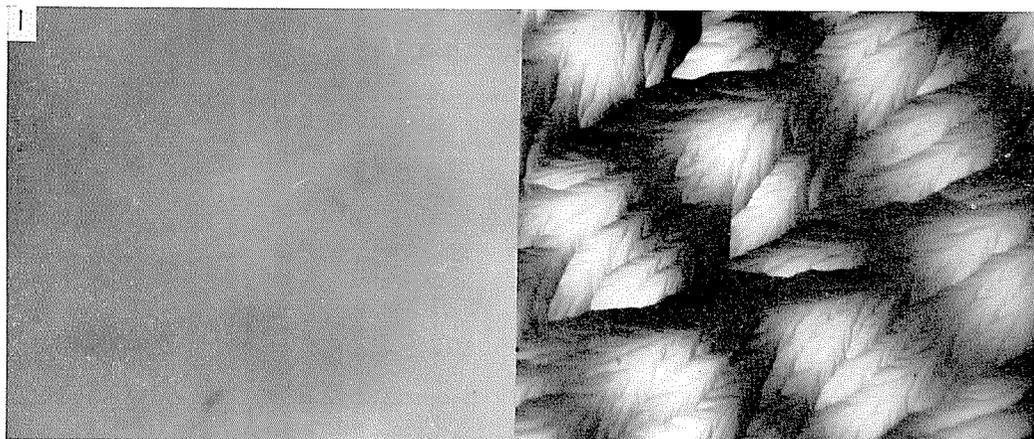
- 試料 V-3 同上, -10°C , 全体にやや opacity を増す
- V-4 同上, -5°C , 小粒子は消え, 小区割ははっきりし, やがて融解が始まる

試料 I. 血漿, -50°C 凍結

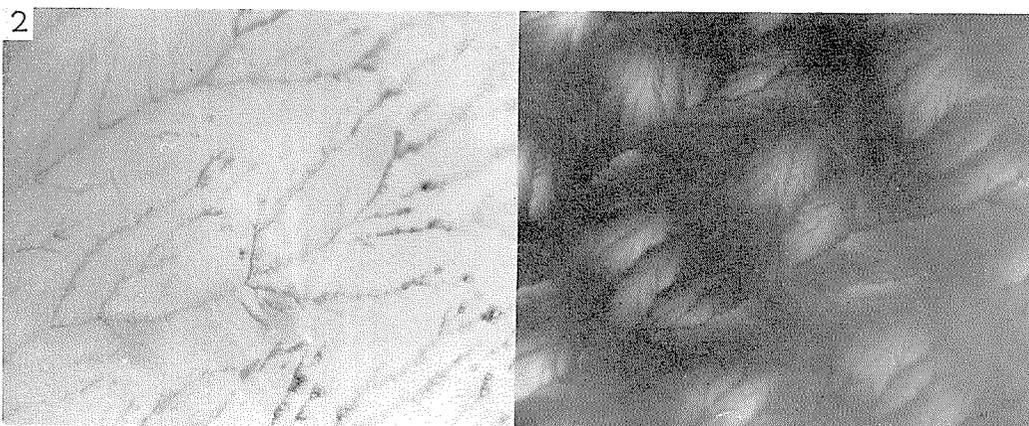


試料 II. 血漿, -50°C 凍結

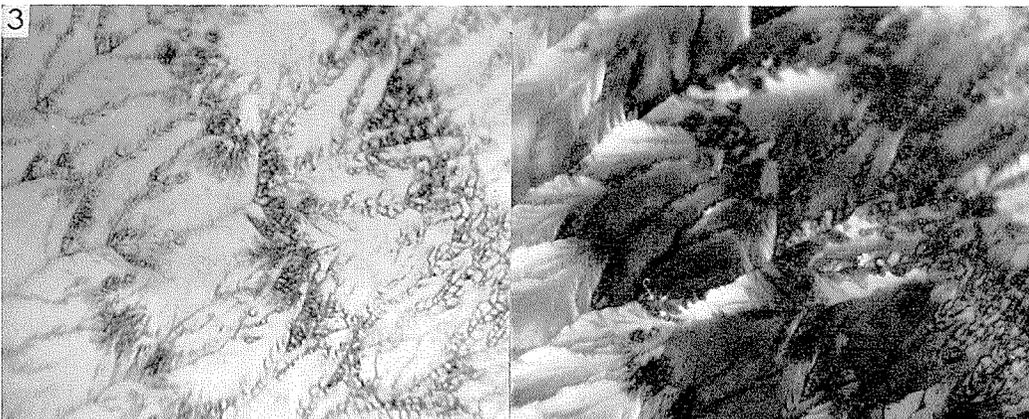
-50°C



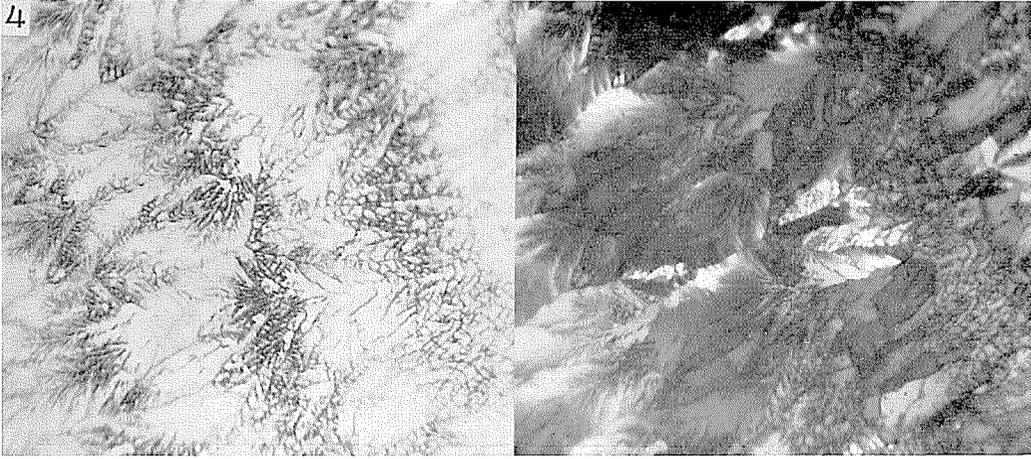
-15°C , 2 min



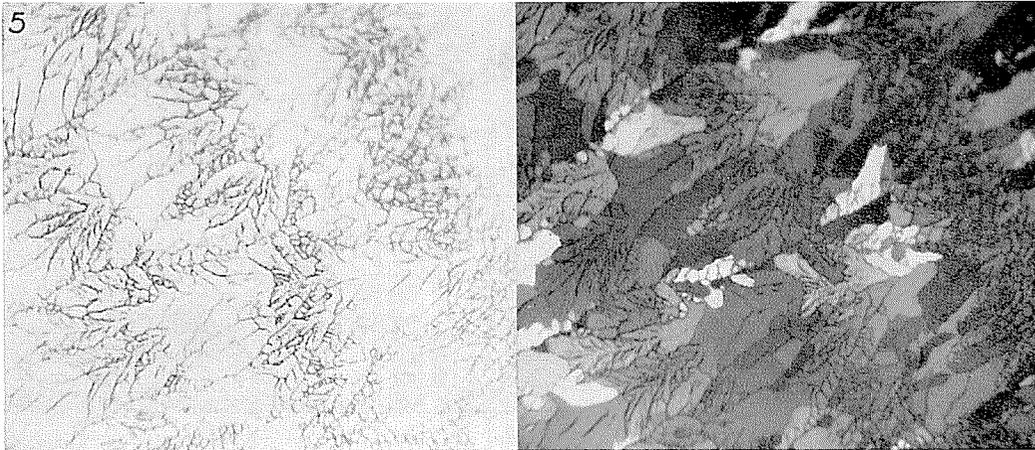
-15°C , 5 min



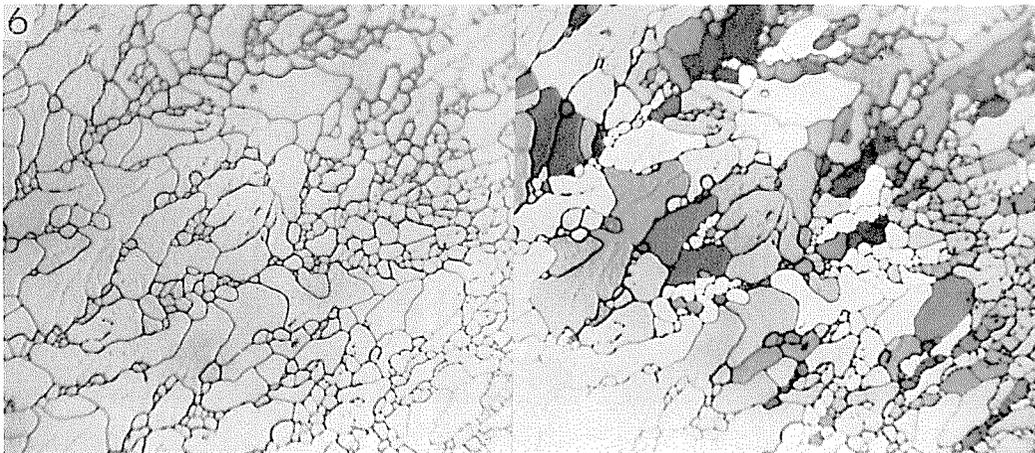
-15°C, 10 min



-10°C, 10 min

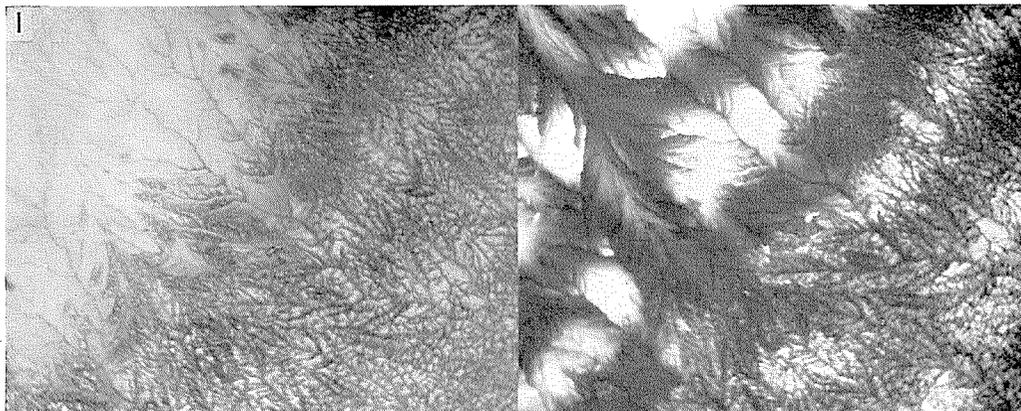


-6°C

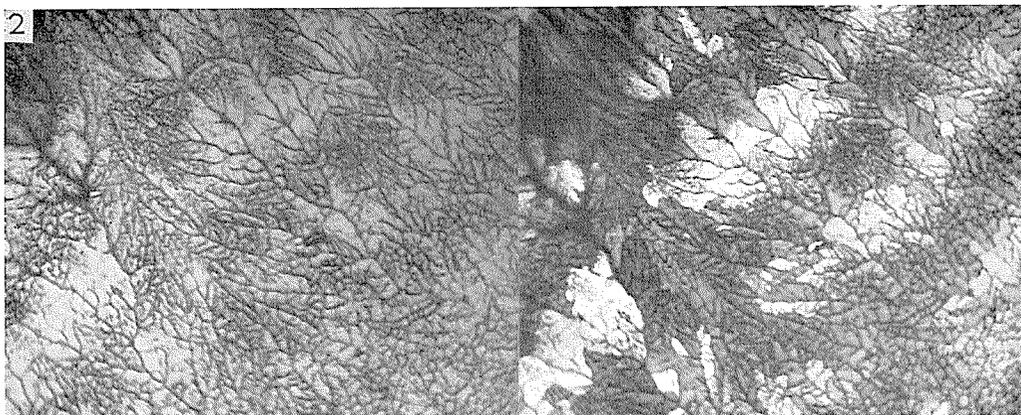


試料 III. 血漿, -20°C 凍結

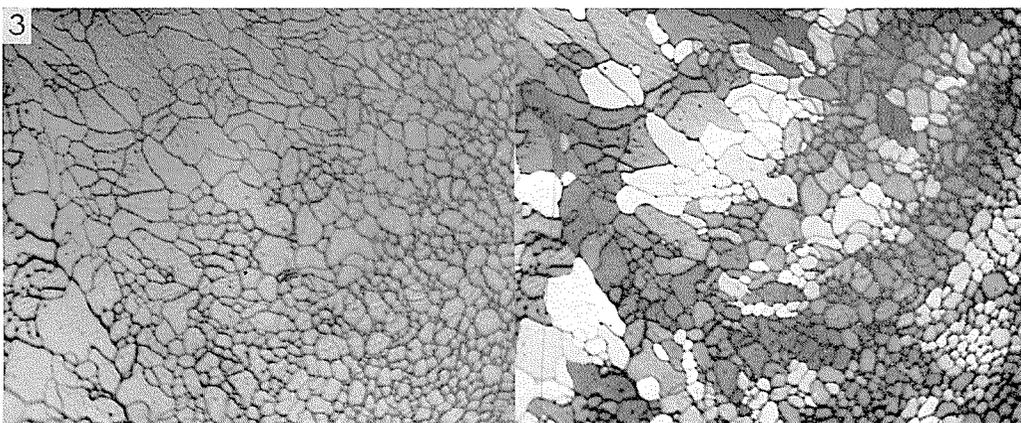
-20°C



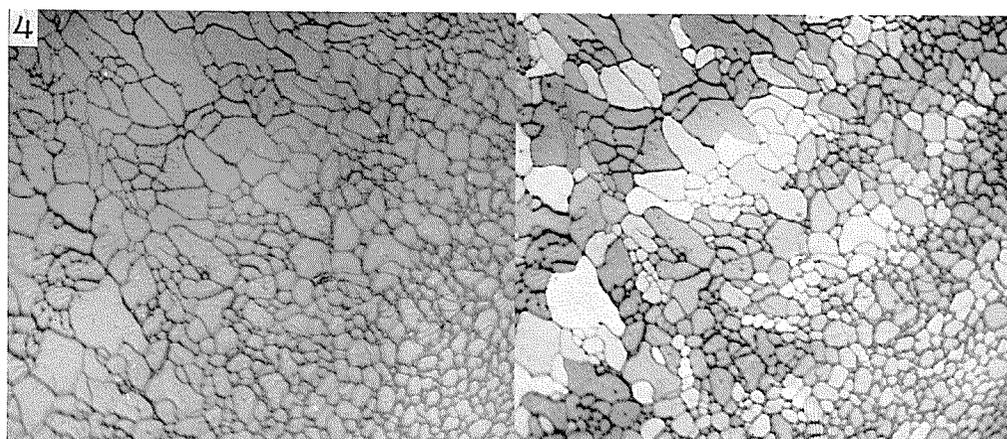
-15°C



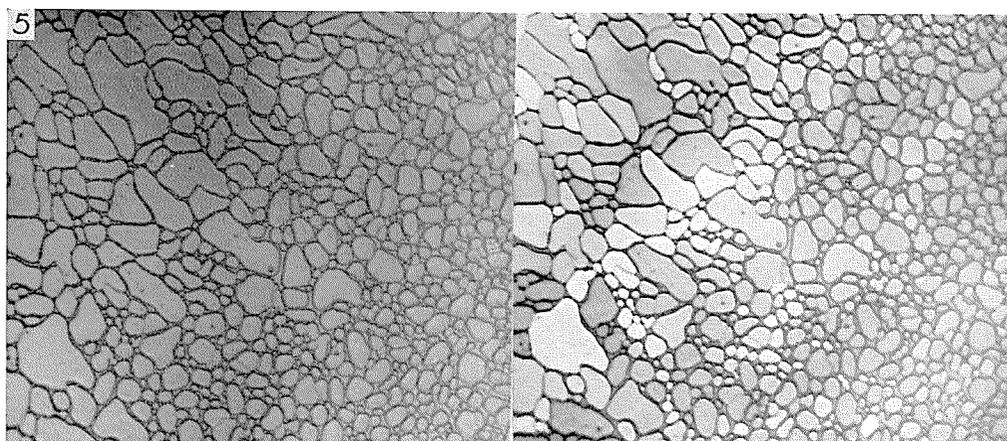
-10°C



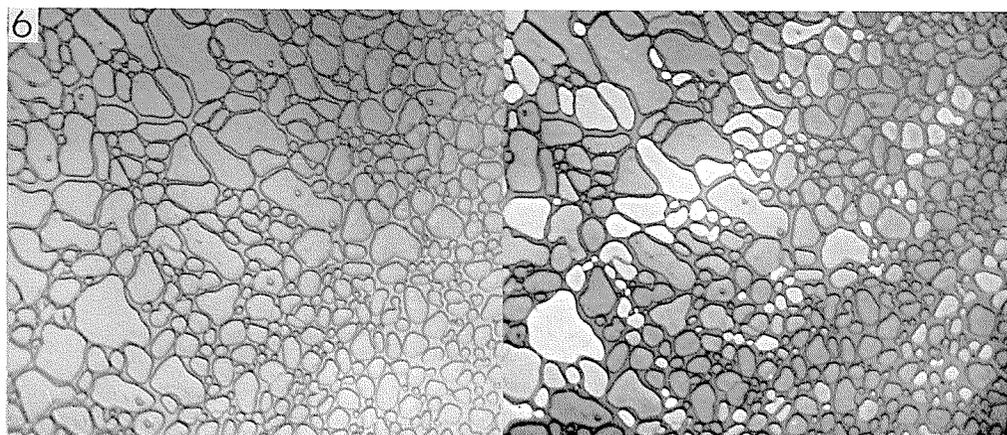
-8°C



-6°C

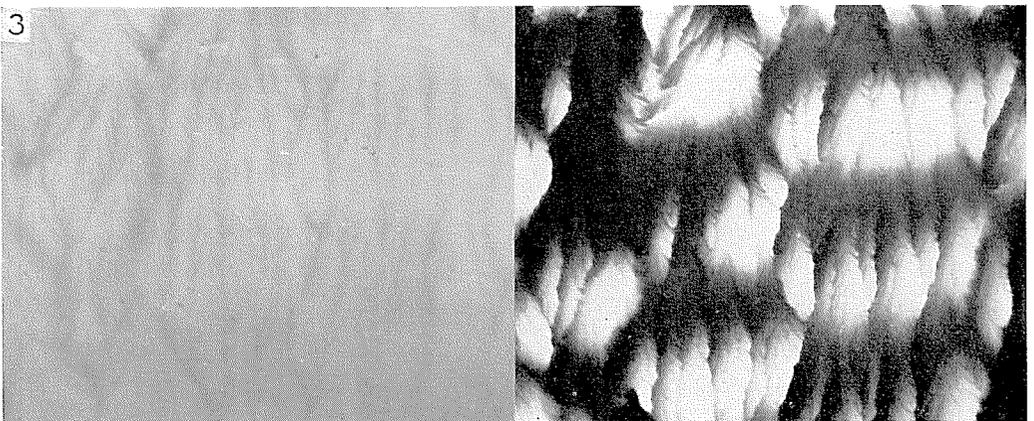
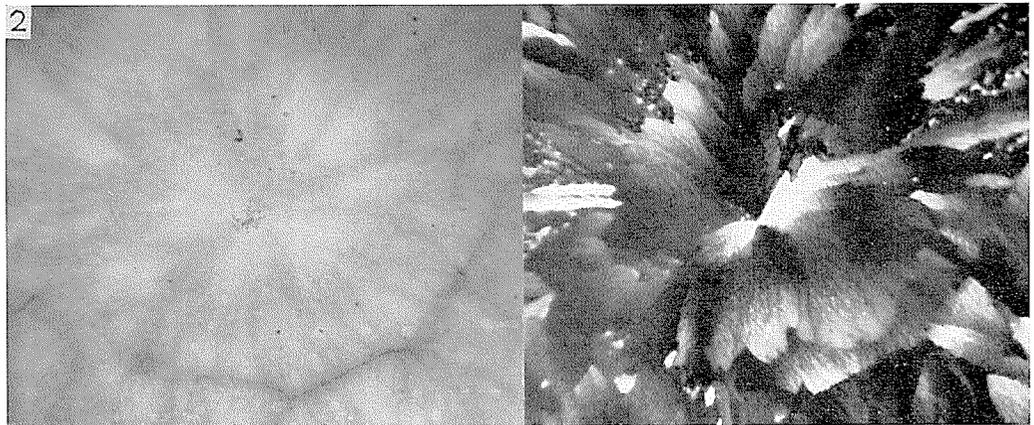
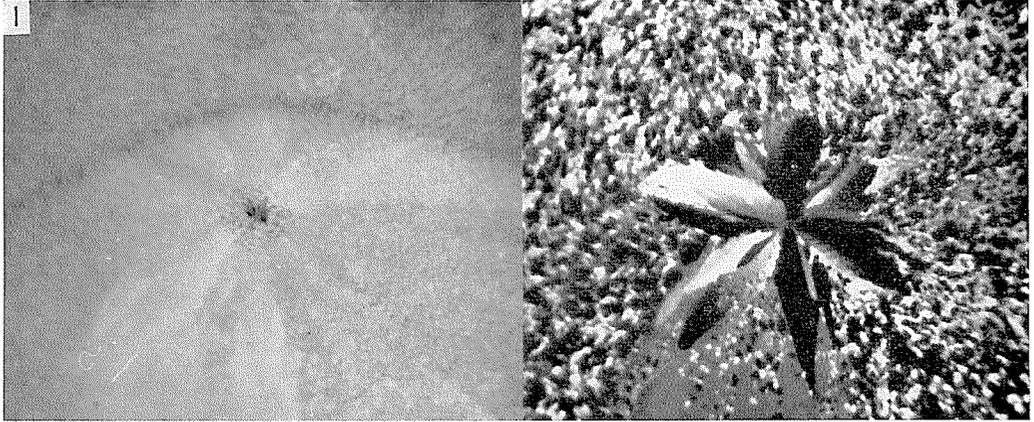


-5°C



試料 IV. 血漿, -150°C 凍結

-50°C

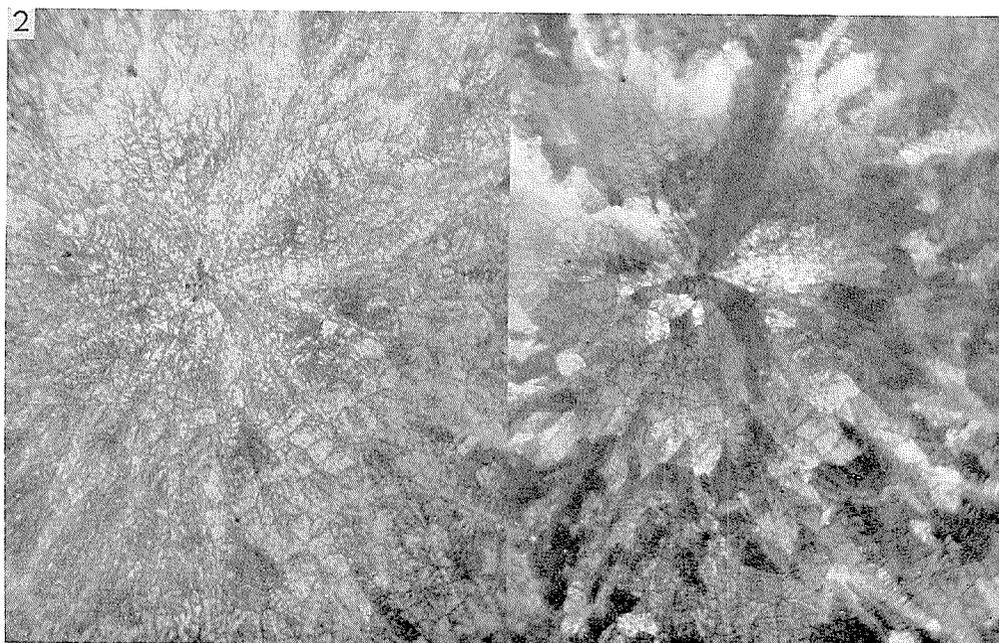


試料 V. 血漿, -150°C 凍結

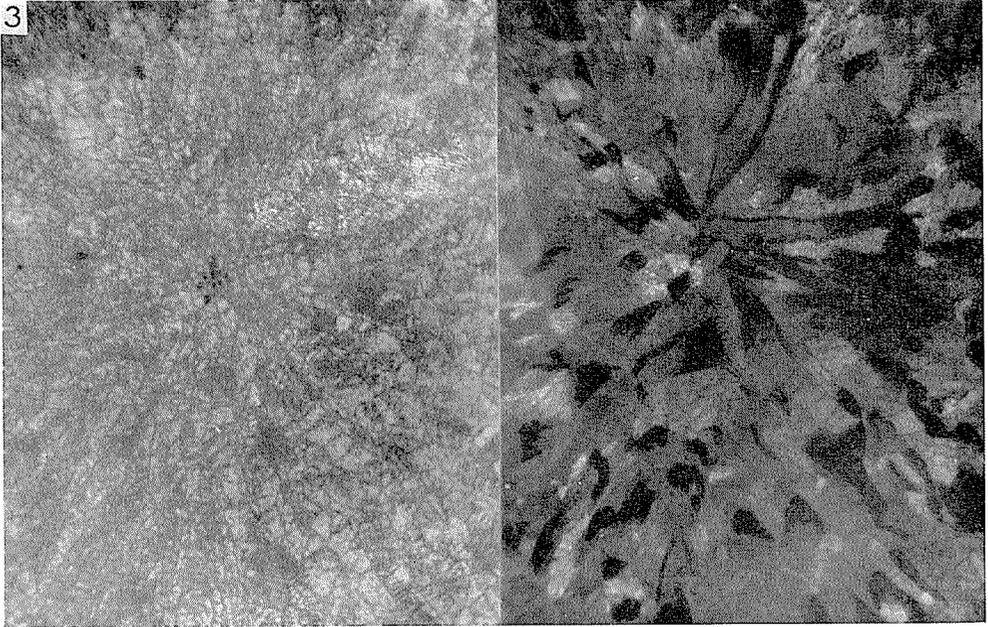
-20°C



-15°C



-10°C



-5°C

