



Title	超低温における植物組織の生存 IV : 急速冷却、急速加温した細胞の生存の機構
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 24, 1-13
Issue Date	1967-02-10
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17708">https://hdl.handle.net/2115/17708</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	24_p1-13.pdf



## 超低温における植物組織の生存 IV\*

急速冷却, 急速加温した細胞の生存の機構

酒 井 昭

(低温科学研究所 植物凍害科学部門)

(昭和 41 年 10 月受理)

### I. 緒 論

乾燥状態にある生物は細胞内に凍りうる水を殆んど含んでいないので, 室温から直接液体窒素 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) 中に入れて急速冷却しても生存している事が知られている。しかし乾燥状態に耐えられない多くの生物ではこの方法は適用できない。

細胞外凍結も細胞を脱水する有効な方法である。前報<sup>1-5)</sup>で報告したように, 細胞外凍結で十分に脱水された木の枝はその後液体窒素や液体ヘリウム中に入れても生存している。

超低温で細胞を生存させる他の方法は Luyet<sup>6)</sup>によって提出された急速冷却, 急速加温の方法である。すなわち, 氷晶核の生長速度が大きい温度範囲を急速に通過させて生物細胞を生存させようとする方法である。この仮説を実証するために, 多くの試みがなされたが, 期待された結果はある程度乾燥した水苔や凍害防凍物質で処理された哺乳動物の組織<sup>8)</sup>で得られたにすぎなかった。最近, 血液を用いてこの方法で多くの試みがなされたが, いずれの試みも成功していない<sup>11-13)</sup>。

Luyet<sup>9-10)</sup>等はまたいろいろな物質の水溶液を用いて  $-70^{\circ}\text{C}$  からの温度上昇の過程でおこる再結晶温度や転移温度を測定した。しかし生物材料では, これらの水溶液で得られた事実を支持するデータを得ていない。

前報<sup>1-2)</sup>で述べたように, 耐凍性の高い木の枝の皮層細胞では, 急速に冷却し, 急速に加温することによって皮層細胞を超低温で生存させることは比較的容易である。

以上の理由から, 超低温における生物の生存の機構を明らかにするために, 予備凍結法と急速冷却急速加温法を併用して一連の実験を試みた。

### II. 材料と方法

実験材料としてクワ (*Morus bombycis* Koidz.) の皮層細胞を用いた。同一系列の実験には同一の枝の同一部分の皮層細胞のみを用いた。各実験には 10 個の縦断組織切片を使用した。組織切片は厚さ 1 細胞層 ( $20\sim 30\ \mu$ ), 幅  $1\sim 2\ \text{mm}$ , 長さ  $2\sim 3\ \text{mm}$  のものを使用した。皮層細

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 812 号

胞の滲透濃度は原形質分離法で平衡塩溶液を用いて測定し、その値は 0.75 M であった。

組織切片は 0.05 ml の水でカバーガラス (18×18 mm) の間にマウントしていろいろの方法で冷却した。加温は 30°C の温水中 (急速加温) か 0°C の空中 (緩慢加温) で行なった。最大の冷却速度と加温速度を得るためには、組織切片を細いピンセットでつかみ、室温から急速に液体窒素中に入れ、のち急速に 30°C の温水中で加温した。組織切片の温度は 0.1 mm 銅-コンスタantan熱電対を用い高感度の電子管式試録計またはオシログラフで自記させた。なお冷却速度は -5°C から、最低温より 5°C だけ高い温度の間を通過するに要する時間で表わした。

細胞をいろいろな程度に脱水する時は、組織切片は -5°C で凍結後、徐々に温度を下げ、各温度で 20 分間予備凍結した。これらの予備凍結された組織切片はいろいろな温度に冷やされたイソペンタンの槽中、または液体窒素中に入れられた。この場合の冷却速度は 100°C/秒をこえるので、最近 Mazur<sup>14)</sup> によって指摘されたように、冷却中に脱水がすすむことは殆んどないものと思われる。

細胞の生死の判定は生体染色と原形質分離の方法で行なった。すなわち、あらかじめ中性赤溶液で染色後、2 倍の高調平衡塩溶液と水とで原形質分離と復帰とを 2 回繰返したのち、なお中性赤で正常に染まっており、しかも正常に原形質分離しているものを生存しているものとみなした。

急速冷却し、急速加温した細胞の生存に及ぼす凍害防禦物質の影響を調べる場合には、エチレングライコール、グリセリン、ジメチール・スルフォキサイド、グルコース、およびサッカロースを用いた。組織切片はこれらの 2 M 溶液中に室温で 20 分間処理した。

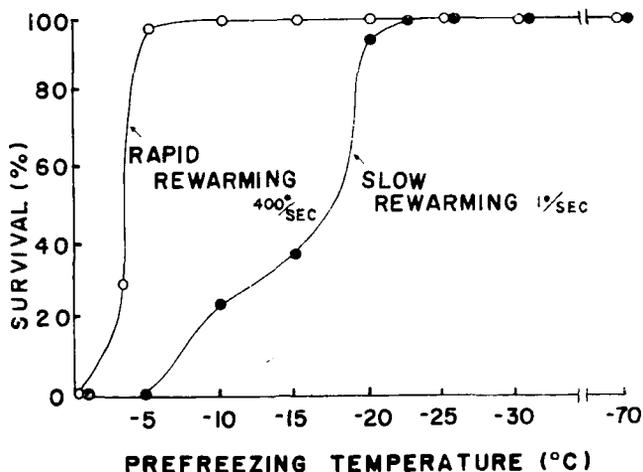
### III. 実験結果および考察

予備実験で次の事実がわかった。1) カバーガラスの間に水でマウントされた組織切片はゆっくり凍結させる場合には、少なくとも -115°C までのどの温度における細胞外凍結にも耐えた。2) どの温度で凍結させた組織切片も、30°C の温水中での急速融解に耐えた。一般に、植物細胞は急速にとかすと害を受けるといわれているが、耐凍性の高い皮層細胞は急速融解しても害を受けない。3) しかし水でカバーガラスの間にマウントした組織切片を室温から -20°C 以下に冷やされたイソペンタン中に入れて急速に凍結させた時は、以後の加温速度にかかわらず全ての細胞が害された。これらの細胞は細胞内凍結を起こしたものと考えられる。4) いくらかの動物細胞ではある温度範囲に数秒おかれると害がおこる致死温度範囲があるが、皮層細胞では少なくとも 24 時間以内に害があらわれる致死温度はない。

これらの事実から考えて、用いた皮層細胞では害は細胞内凍結によってのみおこるものと考えられる。したがって、この皮層細胞では生存率の結果から害のおこる機構を考察するのに都合がよい。また、組織切片を水でマウントしているので、溶液の時のように溶質に由来する複雑な要因を考慮する必要がない。

#### 1. 予備凍結後、液体窒素に処理した細胞の生存率に及ぼす加温速度の影響

水でマウントされた組織切片が -5°C から -70°C までの各温度で予備凍結後、20 分間、



第1図 いろいろの温度で予備凍結後、液体窒素素中に入れられた細胞の生存率におよぼす加温速度の影響

横軸は予備凍結温度を示す

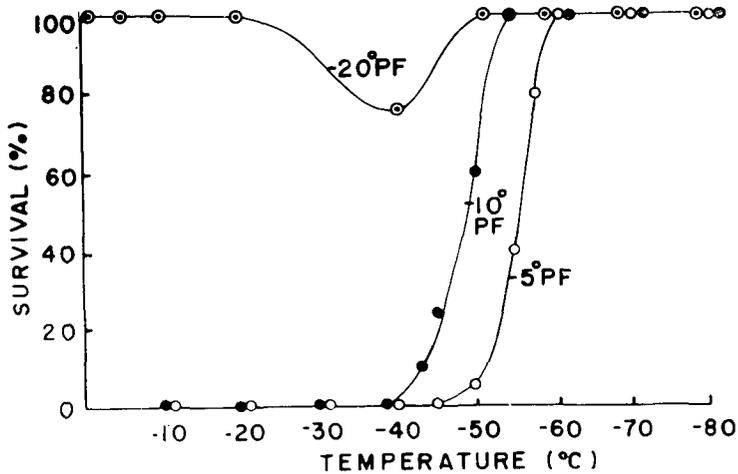
急速加温は 30°C の水中で、緩慢加温は 0°C の空中で行なった。組織切片はカバーガラスの間に 0.05 ml の水でマウントした

液体窒素素中に入れられた (冷却速度: 約 100°C/秒)。それらの組織切片は 30°C の水中で急速に加温 (加温速度: 約 400°C/秒) するか、0°C の空中でゆっくり加温 (約 1°C/秒) された。その結果、-20°C 以下の温度で十分に予備凍結された細胞の大部分は加温速度にかかわらず液体窒素素処理に耐えた。しかし、-15°C 以上の温度で部分的にしか脱水されなかった細胞では、生存率は加温速度によって著しく異った。特に -5°C で予備凍結された細胞では、0°C の空中でゆっくり加温する時には全細胞が死んだが、30°C の水中で急速に加温した時は全細胞が生きていた (第1図)。

これらの事実は -20°C 以下の温度で十分に予備凍結された細胞では、細胞中の殆んど全ての凍りうる水が細胞外凍結によって脱水されている事を示しているものと思われる。このように予め十分に脱水された細胞では液体窒素素中に浸した後、0°C の空中でゆっくり加温することによって害されない。しかし不十分に脱水された細胞では、細胞内に凍りうる水がある程度残っていて、液体窒素素中への急速冷却の過程で細胞内に出来た氷晶核がその後の緩慢な温度上昇の過程で細胞に有害な程度の大きさにまで生長するものと考えられる。

## 2. 液体窒素素処理後の加温過程で害が現われる温度範囲

次の問題は液体窒素素から除去後の加温の過程で、どの温度範囲で害がおこるかを明らかにすることである。この問題を明らかにするために、-5, -10 および -20°C の各温度で予備凍結後、液体窒素素中に浸された組織切片を、-5°C から -80°C までの温度範囲で 5°C 間隔で各温度に冷されたイソペンタン槽中に急速に移した。その後そこに 20 分間おいてから、いずれも 30°C の温水中で急速に加温した。得られた結果を第2図に示す。-20°C で予備凍結した細胞では、-30°C から -40°C までの温度範囲内で生存率が少ししか低下しなかった。しかし、



第2図 液体窒素処理後の加温過程で害の現われる温度範囲

横軸はイソペンタンの槽の温度を示す

−5°PF, −10°PF および −20°PF は組織切片をそれぞれ −5, −10 および −20°C の各温度で予備凍結した事を示す。いろいろの温度で予備凍結した細胞は液体窒素から出して急速に各温度に冷されたイソペンタンの槽中に移し、そこに20分間おかれた。その後30°Cの温水中で急速に温められた

−5°C や −10°C で予備凍結した細胞では、生存率は −60°C 以下の温度では、20分間以内には低下しなかったが、−60°C 以上の温度、特に −40°C 以上では、全ての細胞が完全に死んだ。生存曲線における特徴は −5°C や −10°C で予備凍結された細胞では、−60°C から −45°C に、または −55°C から −40°C に温度があがるにつれて生存率が急に減少することである。これらの事実は氷晶核の生長速度が細胞の脱水の程度、すなわち、細胞の濃度によって異なる事を示している。

また、生存率は −60°C 以下の温度に保たれる時間の長さとともに減少したが、しかし −10°C 以下の温度で予備凍結した細胞では、−70°C 以下の温度に保たれる時間の長さは生存率にほとんど影響を及ぼさなかった(第1表)。

これらの事実から、もし組織切片が組織の氷点と約 −60°C の間の温度範囲を急速に通過できるならば、それらの細胞は害を受けないという事が考えられる。

第1表 −60°C に保たれる時間の長さとの生存率との関係

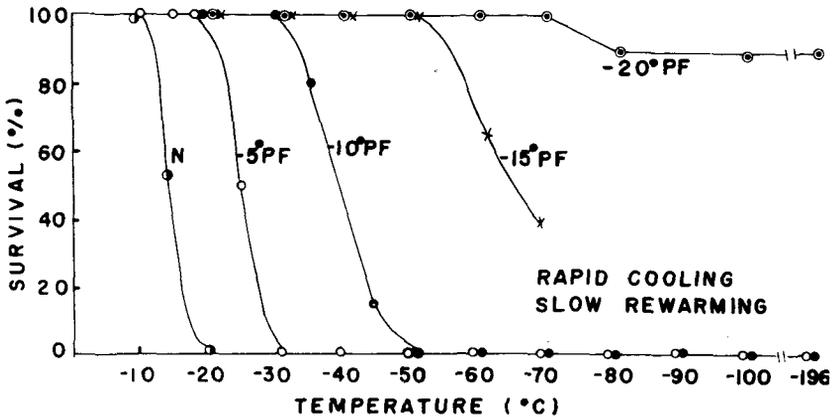
予備凍結温度 (°C)	60°C におかれる時間				
	1分	20分	1時間	6時間	16時間
−5	100*	100	90	25	0
−10	100	100	100	100	30
−20	100	100	100	100	100

\* 生存率

予備凍結された組織切片は、液体窒素から取出した後、60°C にいろいろの時間おかれた。加温は30°C の水中で行なった

## 3. 異った温度のイソペンタン槽中に急速冷却した場合の生存率

上に述べた問題をさらに検討し、また生存率に及ぼす冷却および加速度温の影響を調べるために、カバーガラスの間に水でマウントした組織切片がいろいろの温度で予備凍結後、いろいろの温度に冷やされたイソペンタン槽中に入れられた。その後 $0^{\circ}\text{C}$ の空中、または $30^{\circ}\text{C}$ の水中であたためられた。第3図に $0^{\circ}\text{C}$ の空中でゆっくりあたためられた時の結果を示す。これらの生存曲線はいろいろの温度で予備凍結された細胞が耐えられる細胞内凍結の限度を示している。なぜならば、組織切片は急速に冷やされ、 $0^{\circ}\text{C}$ の空中でゆっくり加温されたので、冷却

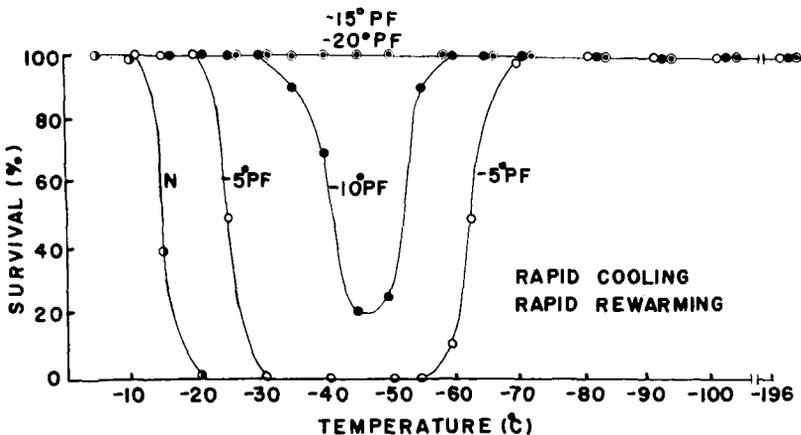


第3図 いろいろの温度に冷やされたイソペンタンの槽中に入れて急速冷却後、 $0^{\circ}\text{C}$ の空中でゆっくり加温した場合の生存率

横軸はイソペンタンの槽の温度を示す

N: 予備凍結しない組織切片 PF: 予備凍結した組織切片

イソペンタン槽中の処理時間: 10分 組織切片はカバーガラスの間に水でマウントした



第4図 イソペンタン槽中に入れて急速に冷却後 $30^{\circ}\text{C}$ の水中で急速に加温した場合の生存率

横軸はイソペンタンの槽の温度を示す

N: 予備凍結しない組織切片 PF: 予備凍結した組織切片

中に細胞内に氷晶核が出来れば、加温中にそれらが生長して細胞に致死的となるためである。生存率は細胞の脱水程度によって著しく異なるが、 $-20^{\circ}\text{C}$  以下の温度で凍結されたものでは、 $-70^{\circ}\text{C}$  以下に冷やされたイソペンタン中に直接入れて急冷しても死なない。

イソペンタン槽中での冷却後、 $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速に加温した場合には、第3図とは全く異なった U 型または V 型の生存曲線が得られた (第4図)。 $-5^{\circ}\text{C}$  と  $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結された細胞の生存曲線は  $-55^{\circ}\text{C}$  から  $-70^{\circ}\text{C}$ 、または  $-45^{\circ}\text{C}$  から  $-60^{\circ}\text{C}$  へと温度が低下するとともに急速に上昇した。

$-15^{\circ}\text{C}$  や  $-20^{\circ}\text{C}$  で予備凍結した組織切片は、 $30^{\circ}\text{C}$  の温水中で急速にあたためる時には、液体窒素を含めてどの温度への急速冷却にも耐えた。

$-60^{\circ}\text{C}$  以下の温度におく時間の長さとの生存率の関係を知るために、 $-5$ 、 $-10$ 、および  $-20^{\circ}\text{C}$  で予備凍結した組織切片を  $-60^{\circ}\text{C}$  以下に保たれているイソペンタン中に入れて急冷し、そこに 24 時間保ってからいずれも  $-30^{\circ}\text{C}$  の温水中で加温した。第2表に示すように、生存率

第2表  $-60^{\circ}\text{C}$  以下の温度に 24 時間おいた場合の生存率

予備凍結温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	温 度 ( $^{\circ}\text{C}$ )				
	$-60^*$	$-60$	$-70$	$-80$	$-196$
$-5$	100**	0	0	0	100
$-10$	100	50	100	100	100
$-20$	100	100	100	100	100
DMSO (2M)	100	50	100	100	100

\* 10 分間のみ  $-60^{\circ}\text{C}$  に保たれた組織切片

\*\* 生存率

組織切片は  $-5$ 、 $-10$  および  $-20^{\circ}\text{C}$  の温度で予備凍結後、 $-60^{\circ}\text{C}$  以下に保たれたイソペンタン中に入れて急冷し、24 時間それらの温度に保った。なお、ジメチル・スルフォキシド (DMSO) で処理したものは予備凍結しなかった。加温はいずれも  $30^{\circ}\text{C}$  の水中で行なった

は予備凍結温度によって、また  $-60^{\circ}\text{C}$  以下の温度に保たれる時間の長さによってかなり異なった。しかし、 $-10^{\circ}\text{C}$  以下の温度で予備凍結したものとジメチル・スルフォキシド (DMSO) で処理したものでは、 $-70^{\circ}\text{C}$  以下の温度におく時間の長さは生存率に何の影響も及ぼさなかった。

異った温度のイソペンタン中に組織切片を処理することは、冷却および加温速度や氷晶核の生長速度に影響を及ぼすものと考えられる。しかしイソペンタンの槽の温度の影響は細胞の脱水の程度、冷却および加温条件や組織切片を浸す媒液の種類によっても異なる。今までに得られた結果 (第3, 4 図) から、細胞の生存に関して 4 つの温度範囲が区別出来る。

1.  $-15^{\circ}\text{C}$  以上のイソペンタン槽に入れられた細胞の多くは加温速度にかかわらず生存していた。この温度範囲では冷却速度は小さいので細胞の多くは細胞外凍結をしていたものと考えられる。

2.  $-5^{\circ}\text{C}$  で予備凍結した細胞は  $-20^{\circ}\text{C}$  から  $-50^{\circ}\text{C}$  までの温度範囲では、加温速度に関係なく全細胞が死んでいた。この事実は死は冷却中または各温度に 10 分間おかれる間に細

胞内に出来た氷晶が細胞に有害となる程度にまで生長したためにおこったものと考えられる。すなわち、この温度範囲では氷晶核の生長速度が非常に大きい事を示している。

3.  $-50^{\circ}\text{C}$  から  $-70^{\circ}\text{C}$  までの温度範囲内では生存率は温度低下とともに増加するし、加温速度もまた生存率に対して著しい影響をもっている。これらの事実は、この温度範囲では、有害な影響は冷却中にはおきないことを示している。また生存率はそれらの温度におかれる時間の長さによって著しく影響されることから、この温度範囲では氷晶核の生長速度がより高い温度範囲よりもはるかに小さい事を示している。

4.  $-70^{\circ}\text{C}$  以下の温度においては生存率は加温速度によって著しく影響されるが、24時間以内では、それらの温度におかれる時間の長さは生存率に対してほとんど影響をもたない。これらの事実は  $-70^{\circ}\text{C}$  以下の温度では氷晶核の生長速度がさらにより小さい事を示している。

#### 4. 超低温における生存に及ぼす凍害除禦物質の影響

凍害防禦物質としてはジメチール・スルフォキサイド、エチレングライコール、グリセリン、グルコース、サッカロースの各2M溶液を用いた。グルコースとサッカロースを除いた他の物質は容易に細胞内に透過した。これらの溶液中で20分間処理後、組織切片は予備凍結しないで直接室温から液体窒素素中に入れられ、のち  $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速に加温された。第3表に示すように、防禦効果は用いた物質の種類によってかなり異っている。

第3表 予備凍結しないで液体窒素素中に入れられた細胞の生存率に及ぼす媒液の影響

媒液の種類	生存率
ジメチール・スルフォキサイド	100
エチレン・グリコール	100
グリセリン	0
グルコース	70
サッカロース	40
水	0

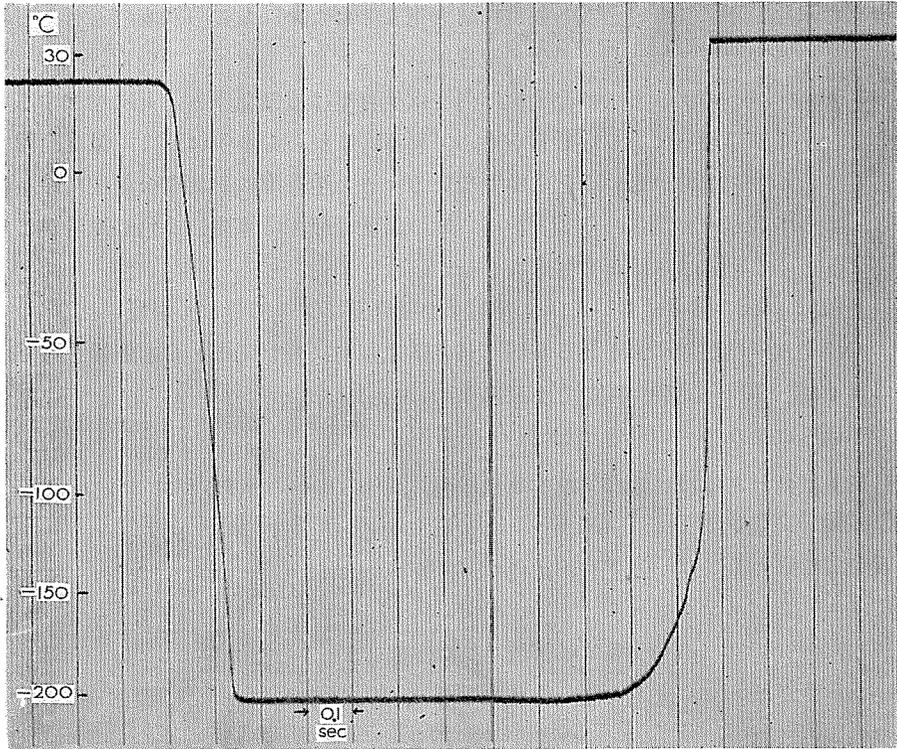
いずれも2M溶液を使用  
組織切片はカバーガラスの間にマウントして室温から液体窒素素中に入れ、のち  $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速加温した

#### 5. 水でマウントしない組織切片を急速冷却、急速加温した場合の生存率

今まで行なってきた実験では、組織切片は0.05 mlの水でカバーガラスの間にマウントして液体窒素素または冷却されたイソペンタン槽中に浸された。最大の冷却および加温速度をうるために組織切片をマウントしないで細いピンセットで保持して室温から直接液体窒素素中に入れ、急速冷却した。その冷却速度は約  $2,500^{\circ}\text{C}/\text{秒}$  であった(第5図)。液体窒素素中に入れられた組織切片はその後  $30^{\circ}\text{C}$  の水中に入れて急速にあたためるか、 $0^{\circ}\text{C}$  の空中でゆっくりあたためられた。急速冷却し、急速加温した組織切片中の全細胞が生きていたが、ゆっくり加温したものでは全ての細胞が死んだ。

#### 6. 急速冷却、急速加温した細胞の生存率と耐凍性の大きさとの関係

第4表に示すように、同一条件で急速冷却急速加温しても細胞の耐凍性の大きさによって生存率はかなり異なっている。すなわち、冬の枝の皮層細胞は  $10\sim 30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速加温すると全細胞が生きているが、12月初旬にとられた枝の皮層細胞では、 $30^{\circ}\text{C}$  で加温しても50%しか生存していない。



第5図 急速冷却後、急速加温した組織切片のオッシログラム

うすい組織切片(厚さ: 20 to 30  $\mu$ 、幅: 1~2 mm、長さ: 2~3 mm)を細いピンセットでつかみ室温から液体窒素中に入れて急速冷却し、ついで30°Cの水中に入れて急速にあたためた

第4表 急速冷却、急速加温した細胞の生存率と材料の条件との関係

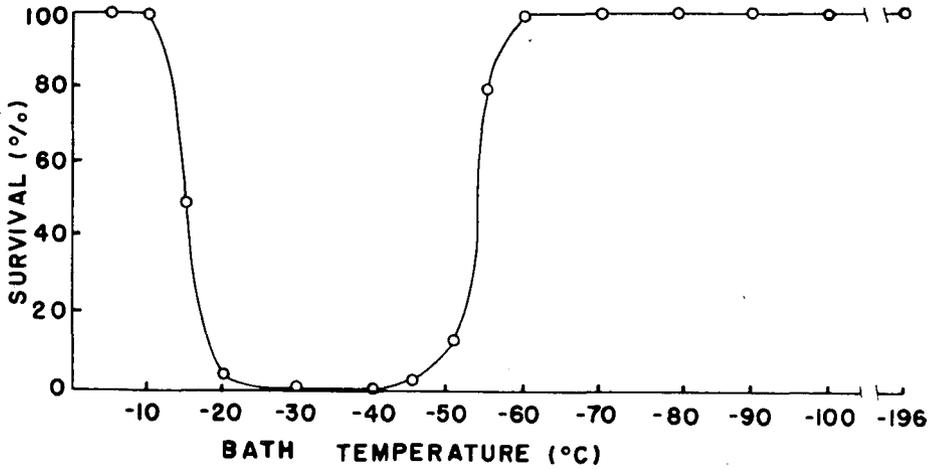
材 料	加 温 条 件 (°C)		
	空 中 (10)	水 中 (10)	水 中 (30)
12月初めの枝の皮層細胞	0*	0	50
1月中旬の枝の皮層細胞	0	100	100

\* 生存率

組織切片をピンセットで保持して液体窒素中に入れて急冷し、ついで30°Cの水中で急速にあたためた

## 7. 冷却速度と生存率との関係

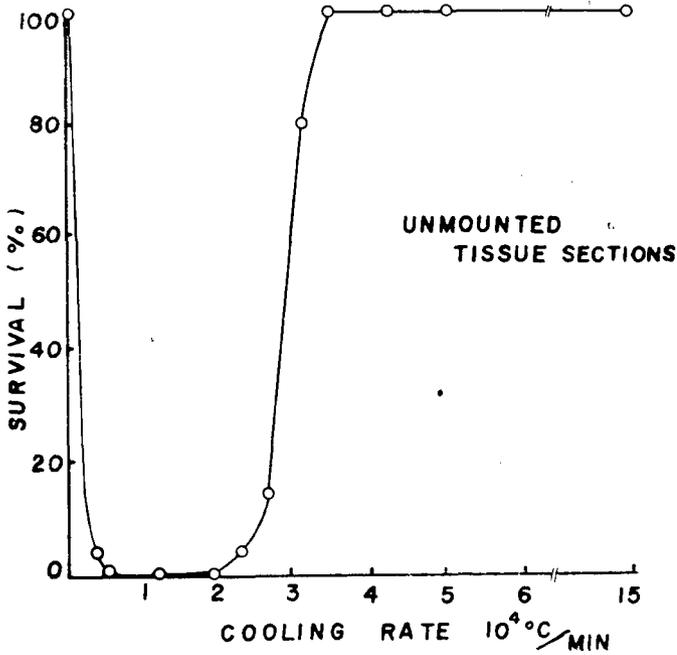
急速冷却、急速加温された細胞の生存率におよぼす冷却速度の影響を明らかにするために、水でマウントしない組織切片を $-5^{\circ}\text{C}$ から $-100^{\circ}\text{C}$ までの各温度に冷却したイソペンタン中に入れて急冷し、そこに20秒間おいてから $30^{\circ}\text{C}$ の水中に入れて急速に加温した(第6図)。 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下または $-10^{\circ}\text{C}$ 以上の槽に入れられた組織切片は全て生きていたが、 $-20^{\circ}\text{C}$ から $-50^{\circ}\text{C}$ までの温度で処理された組織切片中のほとんどの細胞は死んでいた。 $-50$ と $-60^{\circ}\text{C}$ のイソペンタンの槽中に組織切片を入れた場合の冷却速度の差はわずかであるが、生存率は両



第6図 各温度に冷やされたイソペンタンの槽中に組織切片を入れて急速冷却, 急速加温した場合の生存率

横軸はイソペンタンの槽の温度を示す

ピンセットで保持された組織切片を室温から各温度に冷却されたイソペンタンの槽中に入れて急速に冷却し, そこに20秒おいてから30°Cの水中で急速にあたためた



第7図 冷却速度と生存率との関係

横軸は冷却速度を示す

第6図で得られたデータを用いて生存率と冷却速度の関係が求められた組織切片はピンセットでつまんで冷却, 加温された

者で著しく異っている。すでに述べたように、この事実は冷却過程で細胞内に出来た氷晶核の生長速度の差から説明出来るものと思われる。

細胞の生存率と冷却速度との関係が第6図の結果から求められた。なお冷却および加温速度はオッシログラフを用いて測定した。第7図に示すように、冷却速度が3000°C/分に向って高まるにつれて生存率は急激に低下するが、その後、冷却速度が20,000°C/分をこえると、逆に冷却速度の上昇につれて生存率は著しく高まるようになる。

すでに述べたように、この問題に含まれている基礎的要因は水が細胞内に出来るか否かではなく、出来る氷の大きさが問題である。得られた結果は氷晶の大きさによって説明出来る。冷却速度が大きい時には細胞内に出来る氷晶は非常に小さいので、もしも急速に加温されるならば、それらは細胞に害を与える大きさに生長するまえにとけてしまうので、細胞は害を受けないものと思われる。中間の大きさの冷却速度の場合には、生存率は急速加温の場合でも非常に小さい。この事は冷却中に細胞内に出来る氷晶が細胞に致死的であるほど大きいものと思われる。冷却速度がより小さい場合には、氷晶はなお大きくなるはずであるが、それらは細胞外に出来るので細胞に害を与えないものと考えられる。しかしながら、本論文ではこの考慮を支持する直接的証拠は得られていない。いくらかの直接的証拠を得るため、ことに細胞に対して有害となる細胞内氷晶の大きさを知るために、電子顕微鏡を用いてこの問題をさらに調べる予定である。

急速冷却、急速加温の方法によって木の皮層細胞を比較的容易に超低温で生存させる事が出来たが、その成功の主な理由は、用いた皮層細胞が非常にうすく、小さいことと、媒液に浸さないで冷却したために非常に急速な速度で冷却、加温出来た事に求められる。またカバーガラスの間に水でマウントした場合には、予備凍結するので媒液は凍っているし、細胞液もまた細胞外凍結によってかなり脱水されているので、細胞はかなりの速さで冷却、加温された。なお本実験で示したように、この方法による成功の度合は耐凍性の大きさによってもかなり異なるが、用いた細胞はもっとも耐凍性が高いのでこの方法で生存させるのに有利に作用しているものと思われる。

同一種類の細胞では耐凍性が高いものほど糖濃度が高い。そして細胞内にできた結晶核は細胞の糖濃度が高いほど同一条件下では生長しにくいはずである。そのために急速冷却、急速加温した場合、耐凍性の高いものほど細胞に害を与えることが少ないものと考えられる。この問題については今後さらに検討してみるつもりである。

#### 8. 急速冷却急速加温による枝の生存

ヤナギの枝を急速冷却、急速加温して生存させるためにいくつかの実験を行なった。予備実験としていろいろな温度で予備凍結後、液体窒素中に入れた枝を0°Cでゆっくり融解して効果的予備凍結温度を求めた。その結果、-15°C以下の温度で予備凍結した枝は液体窒素処理に耐えることが判った。

また凍結している枝を水中で急速にとかす場合の害を調べるために、-5, -10, -15, -20 および -30°C の各温度で凍結した枝を30°Cの水中に入れて急速にとかした。

その結果、 $-15^{\circ}\text{C}$  以下の温度で凍結しているものは  $30^{\circ}\text{C}$  の水中に入れると著しい害を受けるが、 $-10^{\circ}\text{C}$  以上の温度で凍っている枝は  $30^{\circ}\text{C}$  の水中に入れても全く害が認められなかった。

急速冷却、急速加温の実験では予備凍結後細胞内に凍りうる水がかなり残っている温度、すなわち、 $-15^{\circ}\text{C}$  以上の温度で予備凍結する必要がある。一方、凍結している枝の融解の害が現われない温度は  $-10^{\circ}\text{C}$  以上である。したがって、予備凍結後なお細胞内に凍りうる水が残っており、しかも急速融解しても害を与えない凍結温度として  $-5$  と  $-10^{\circ}\text{C}$  を選んだ。用いた枝は急速冷却、急速加温するために長さ  $5\text{ cm}$ 、直径  $0.2\sim 0.3\text{ mm}$  の細い耐凍性の高い冬のヤナギの枝を用いた。

枝の上端を細い糸でしばり、枝の下端に小さいおもりをつけて  $-5$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結後液体窒素中に入れ、その後いろいろの条件で加温した。その結果を第 5 表に示す。急速冷却、急速加温した枝のうち、 $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結し、 $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速加温したものが害が少なかった。この枝は処理後 2 週間は外観的に全く正常で、皮層細胞も生存していたが、その後次第に褐変した。この枝は材部の冷却および加温速度がおそいため、材部が害されていたため、枝全体としてはやがて枯死したものと思われる。 $-5$  および  $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結し、液体窒素処理後  $0^{\circ}\text{C}$  でゆっくりあたためた枝は全て融解直後に褐変していた。このように、耐凍性の高い細い枝を用いても、急速冷却、急速加温の方法で枝を生存させることは非常に困難である。

### 摘 要

超低温における細胞の生存の機構を明らかにするために、予備凍結法と急速冷却、急速加温の方法を併用して、木の皮層細胞で一連の実験を行なった。

1.  $-20^{\circ}\text{C}$  以下の温度で予備凍結後、液体窒素中に入れた組織切片中の大部分の細胞は加温条件にかかわらず生存していた。しかし、 $-15^{\circ}\text{C}$  以上の温度で不完全に脱水したものでは  $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速に加温した場合には殆んど細胞が生存していたが、 $0^{\circ}\text{C}$  の空中でゆっくり加温した時には大部分の細胞が死んだ。

2.  $-5$  と  $-10^{\circ}\text{C}$  の温度で不完全に予備凍結後、液体窒素中に入れ、その後  $-80^{\circ}\text{C}$  以上のいろいろの温度に保たれたイソペンタンの槽中に急速に移し、そこに 20 分間おいてから  $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速に加温した。その結果、 $30^{\circ}\text{C}$  の水中で急速に加温される前に  $-70^{\circ}\text{C}$  以下のイソペンタン槽中に 20 分間おかれても害が全く認められなかった。しかし  $-5^{\circ}\text{C}$  で予備凍結したものでは、約  $-50^{\circ}\text{C}$  以上、 $-10^{\circ}\text{C}$  で予備凍結したものでは、 $-45^{\circ}\text{C}$  以上の温度にお

第 5 表 急速冷却後いろいろな条件で加温した枝の害

予備凍結温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	加 温 条 件	
	$0^{\circ}$ 空 中	$35^{\circ}$ 水 中
$-5$	××	×
$-10$	××	△
$-15$	○	×
$-20$	○	×

枝は処理後約 1 ヶ月間水挿してから害を判定した

××：融解直後枯死

×：水挿 2 週間以内に枯死

△：水挿 1 ヶ月以内に枯死

○：正 常

枝は予備凍結後、液体窒素中に入れて急速冷却し、その後いろいろの条件であたためた

かれた時、ほとんど全ての細胞が死んだ。

3. ピンセットで組織切片を保持して室温から約 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下に冷やされたイソペンタン槽中に入れて急速に冷却し、ついで $30^{\circ}\text{C}$ の水中で急速に加温した時には全ての細胞が生存していたが、 $-50^{\circ}\text{C}$ 以上のイソペンタン槽中に入れたものは大部分が死んだ。なお、 $-15^{\circ}\text{C}$ 以上のイソペンタン中に入れたものは生存していたが、これは細胞外凍結していたものと考えられる。

4. 水でマウントしない細胞では、冷却速度が $3000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ に向って増大するにつれて生存率は低下するが、冷却速度がさらに大きくなって $20,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ をこすと生存率は逆に冷却速度の増大とともに急速に増大する。

以上の事実から、急速冷却、急速加温した細胞では、細胞の害にとって主要な要因は細胞内に氷晶が出来るか否かではなく、できた氷晶の大きさが問題である。たとえ冷却中に細胞内に微細な氷晶が出来ても急速にとかず時は、それらの氷晶は細胞に有害となる大きさにまで生長する時間がないので、細胞に害を与えないが、ゆっくりあたたため時には細胞にとって致命的となるものと考えられる。

#### 文 献

- 1) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.
- 2) 酒井 昭 1958 超低温における植物組織の生存 II. 低温科学, 生物篇, **16**, 41-53.
- 3) Sakai, A. 1960 Survival of the twig of woody plants at  $-196^{\circ}$ . *Nature*, **185**, 392-395.
- 4) 酒井 昭 1962 液体ヘリウム中での木の生存. 低温科学, 生物篇, **20**, 121-122.
- 5) Sakai, A. 1965 Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperatures and degree of frost hardiness. *Plant Physiol.*, **40**, 882-887.
- 6) Luyet, B. J. 1937 The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica*, **1**, No. **29**, 1-14.
- 7) Luyet, B. J. and Gehenio, P. M. 1938 The survival of moss vitrified in liquid air and its relation to water content. *Biodynamica*, **2**, No. **42**, 1-7.
- 8) Luyet, B. J. and Gehenio, P. M. 1954 Effect of the rewarming velocity on the survival of embryonic tissues frozen after treatment in ethylene glycol. *Biodynamica*, **7**, 213-223.
- 9) Luyet, B. and Rapatz, G. 1958 Patterns of ice formation in some aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 1-68.
- 10) Luyet, B. 1960 On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **85**, 549-69.
- 11) Gehenio, P. M., Rapatz, G. L. and Luyet B. J. 1963 Effects of freezing velocities in causing or preventing hemolysis. *Biodynamica*, **9**, No. **176**, 77-82.
- 12) Rapatz, G. and Luyet, B. 1963 Effects of cooling rates on the preservation of erythrocytes in frozen glycerolated blood. *Biodynamica*, **9**, No. **179**, 125-136.
- 13) Rapatz, G. and Luyet, B. 1965 Effects of cooling rates on the preservation of erythrocytes in frozen blood containing various protective agents. *Biodynamica*, **9**, No. **197**, 333-350.
- 14) Mazur, P. 1966 Theoretical and experimental effects of cooling and rewarming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* **2**, 181-192.

### Summary

To clarify the mechanism of cell survival at super-low temperatures some experiments were made with a combination of prefreezing and rapid cooling and rewarming, using the cortical cells from the winter twigs of a mulberry tree.

Tissue sections mounted between cover glasses with water were previously dehydrated at different degrees by extracellular freezing. Almost all of the sufficiently prefrozen cells at temperatures below  $-20^{\circ}\text{C}$  could survive immersion in liquid nitrogen, irrespective of the rewarming rates. However, in the partially dehydrated cells at temperatures above  $-15^{\circ}\text{C}$ , the rewarming rate seriously influenced the survival. These facts suggest that in the partially dehydrated cells, freezable water still remains to some extent in the cells after prefreezing, and the intracellular crystallization nuclei formed in the course of rapid cooling in liquid nitrogen probably grow and cause damage during subsequent slow rewarming in air, while, in rapid rewarming, there might be no time for the crystallization nuclei to grow to a damaging size.

The tissue sections immersed in liquid nitrogen after partial prefreezing were rapidly transferred to isopentane baths at temperatures ranging from  $-5$  to  $-100^{\circ}\text{C}$  and kept there for 20 minutes before rapid rewarming. In the partially prefrozen cells, no damage was observed for 20 minutes at temperatures below  $-60^{\circ}\text{C}$ , while, above  $-60^{\circ}\text{C}$ , especially above  $-45^{\circ}\text{C}$ , all cells were completely destroyed. It was also confirmed that when tissue sections could rapidly pass through a temperature range between the freezing point of the tissue and about  $-60^{\circ}\text{C}$ , these cells suffered no damage.

The effect of cooling rate upon the survival of the cells was investigated, and the results indicated that a continued drop in survival was observed as the cooling rate rose; at higher cooling rates and with rapid rewarming, the effect was reversed and survival rose again with the increasing cooling rate.

## 低温科学生物篇第 24 輯訂正

頁	行	誤	正
12	上から 13	あたため時	あたためる時
13	上から 15	partial	slight
13	上から 17	partially	slightly
17	上から 4	したし	しかし
30	下から 18	耐えられるが	耐えられるのが
32	上から 15	高分子分質	高分子物質

### 付 録

v	積雪分科会の著者	Dumani	Doumani
vii	氷分科会-1 の座長	Bonson	Benson
ix	氷分科会の座長	L. Levi	C. S. Benson
xi	名簿, 8 人目	*●新井	●新井
xiii	同, 下から 6 人目	●石原	石原
xiv	同, 11 人目	●小泉	小泉
xviii	下から 9 行目	Hanovr	Hanover
viii	上から 2 行目	Luyet, B. J. の講演は前頁, 氷分科会-2 の同氏の講演に引続き行なわれた。	