



Title	急速冷却した植物細胞内にできる氷の電子顕微鏡的研究
Author(s)	大塚, 宏二; OTSUKA, Kouji; 酒井, 昭 他
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 21-28
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17717
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p21-28.pdf



急速冷却した植物細胞内にできる 氷の電子顕微鏡的研究*

大塚宏二・酒井 昭

(低温科学研究所 植物凍害科学部門)

(昭和42年9月受理)

I. 緒 言

前報¹⁻³⁾において、急速冷却、急速加温⁴⁾の方法で、とくに予備凍結法^{5,6)}と併用することによって、耐凍性のきわめて高い冬の木の皮層細胞を超低温にて生存させ得ることを報告した。前報¹⁻³⁾でえられた結果は細胞内にできる氷晶の大きさによって説明できる。すなわち、冷却速度がきわめて大きい時には、細胞内にできる氷晶は非常に小さいので、もしも急速に加温すれば、それらは細胞に害を与える前にとけるので細胞は害を受けないと考えられる。中間の冷却速度では、急速加温しても生存率はきわめて低い。このことは冷却の過程で細胞内にできる氷晶が致命的な大きさにまで生長すると考えれば説明できる。さらに、より小さい冷却速度では、細胞外凍結をおこす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、前報¹⁻³⁾ではこの考察を支持する直接的な証拠はえられなかった。

本報では、直接的証拠を得るために、いろいろな条件で冷却した細胞や急速冷却後、いろいろな条件で加温した細胞内にできる氷晶を調べるとともに、それらの生存率を調べてみた。

電子顕微鏡の標本作製にあたって御指導下さった北海道大学農学部四方英四郎助教授に深く謝意を表します。

II. 材料と方法

実験材料としてクワ (*Morus bombycis* Koidz.) の皮層細胞を使用した。同一系列の実験には同一の枝の同一の部分の細胞のみを用いた。組織切片は厚さ1細胞層 (20~30 μ)、幅1~2 mm、長さ2~3 mm の縦断組織切片を用いた。

最大の冷却速度を得るためには、組織切片を細いピンセットの先でつまみ液体窒素、または各温度に冷却されたイソペンタン槽中に急速に入れた。所定時間後に組織切片を30°Cの水の中に入れて急速にあたためた。

細胞の生死の判定は中性赤であらかじめ染色後、2倍の高張平衡塩溶液と水で2回原形質分離と復帰を繰返してもなお中性赤で染っており、しかも正常に原形質分離している細胞を生存しているものとみなした。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第846号

電子顕微鏡での標本作製は液体窒素、または所定の温度に冷されているイソペンタン槽中に、直径 1.5 cm、深さ 3 cm の金網のかごをつるし、細いピンセットで切片をつまみかごの中に入れて急速に冷却した。所定時間後、 -78°C のエタノール (エタノールが入ったビーカーをドライアイスの中に埋めてある) 中に急速に移した。その後、 -35°C の低温室内で、 -78°C のエタノール槽から組織切片を -78°C に冷却した 2% オスミック酸を含むエタノール (約 10 cc) 中に移し、 -78°C の恒温槽で 2~3 週間、固定と凍結置換を行なった。凍結置換後、 -10°C と常温のエタノール中で各 1 回ずつ洗滌後、エポンに包埋した。無処理の対照として、組織切片を室温で 2% オスミック酸水溶液で 4 時間固定後、通常の方法でエポンに包埋した。

Porter-Blum のマイクロトームで超薄切片を作り、JEM-6AS 型電子顕微鏡で観察した。染色には酢酸ウランと酢酸鉛を用いた。

III. 結 果

1. 無処理の細胞の切片の電子顕微鏡の所見

最初に、冷却しない無処理の細胞の切片の電子顕微鏡写真を図版 I-1 に示す。この切片中には核、仁、ミトコンドリア、葉緑体および葉緑体中にふくまれている澱粉粒がみとめられる。なお、原形質が細胞壁から分離しているのは固定液によるアーチファクトと思われる。

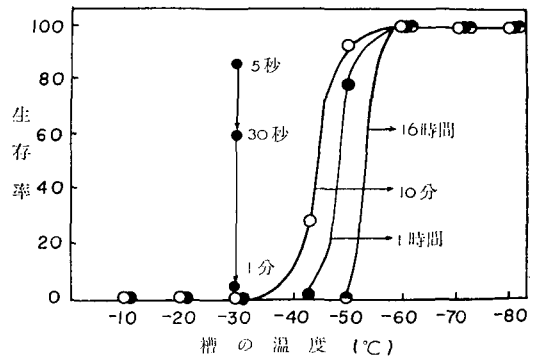
2. 液体窒素中に入れて急速冷却した細胞の生存とその電子顕微鏡の所見

最大の冷却速度と加温速度を得るために、組織切片を細いピンセットでつまみ、室温から直接液体窒素中に投入して急速に冷却した。その後、組織切片を 30°C の温水中に入れて急速に加温したが、全細胞が生存していた。

液体窒素に入れて急速に冷却後、 -78°C で凍結置換した組織切片には、直接倍率 1 万倍で観察しても急速冷却中に生じた氷晶のあととみなされる空胞はみとめられなかった (図版 II-2)。この写真は核とその周辺の細胞質の部分を示している。

2. 液体窒素中で急速冷却された細胞の加温過程における生存率の低下と、それらの電子顕微鏡的所見

液体窒素中で急速に冷却後、加温の過程で害があらわれる温度範囲をしらべるために、水でマウントしない組織切片を室温から液体窒素中に入れて急速に冷却し、その後、 -10°C から -80°C までの温度範囲で、 10°C 間隔で各温度に冷却されているイソペンタン槽中に急速に移した。そしてそこにそれぞれ 10 分間、1 時間および 16 時



第1図 急速に液体窒素中に入れて組織切片を各温度で加温した場合の生存率

ピンセットで保持した組織切片を液体窒素に入れて急速に冷却した後、各温度のイソペンタンの槽の中にそれぞれ 10 分、1 時間および 16 時間おき、 30°C の水中に入れて急速に加温した。矢印は液体窒素から -30°C のイソペンタン槽中に移して、5 秒、30 秒および 1 分間おいたことを示す

間おいてから 30°C の温水中で急速に加温した。その結果を第 1 図に示す。-60°C 以下の温度では少なくとも 16 時間それらの温度においても全細胞は生存していた。しかし -50°C 以上では温度の上昇につれて生存率が低下した。とくに -45~-30°C の温度で急速に生存率が低下し、-30°C に 1 分間おいただけで全細胞が死んだ。

急速に液体窒素中に入れた組織切片を、-40°C のイソペンタン槽中に 10 秒間おいた時は、切片の中央部付近の細胞のみが生存していたが、周辺部の細胞は全部死んでいた (第 2 図)。

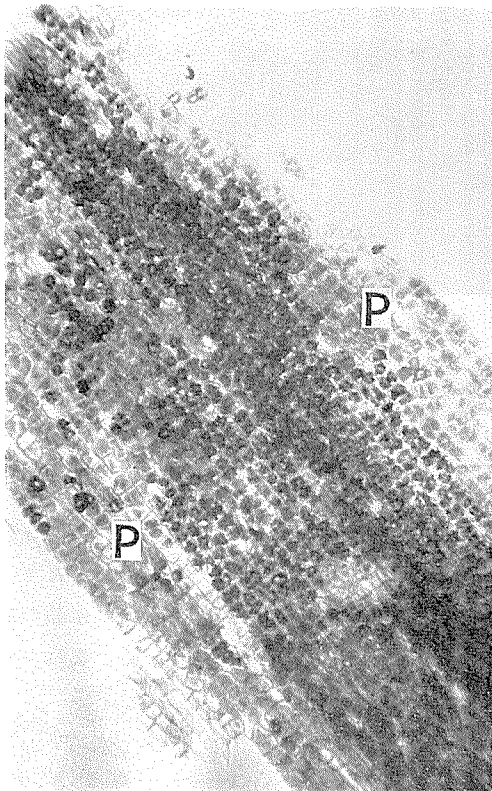
このことは組織切片内の中央部と周辺部とで加温速度がことなっていることを示しているものと考えられる。

液体窒素処理後、-50°C に 10 分間以内、あるいは -60°C 以下の温度に少なくとも 16 時間おいた場合には、組織切片中の細胞内の氷晶のあととおもわれる空胞はみとめられなかった (図版 III-3)。これにたいして、-30°C 以上の温度に 1 分間以上おいた場合には、ほとんどの

細胞に氷晶のぬけがらとおもわれる多数の空胞がみとめられた (図版 IV-4)。

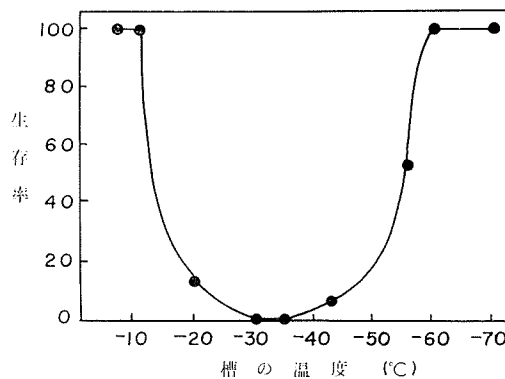
3. 各温度のイソペンタン槽中で急速に冷却された細胞の生存とその電子顕微鏡的所見

細胞の氷点付近から約 -60°C までの温度範囲を急速に通過させれば、それらの細胞は害されないはずである。このことを確かめるために、組織切片をピンセットでつまみ、室温から所定の各温度に冷却されたイソペンタ



第 2 図 液体窒素中で急速冷却後、-40°C に おいた組織切片中の細胞

組織切片を液体窒素中に入れて急速に冷却した後、-40°C のイソペンタンの槽の中に 10 秒間おいたとき、組織切片の中央部の細胞は中性赤に染まり、原形質分離しているが周辺部の細胞 (P) は死んでいる。×100



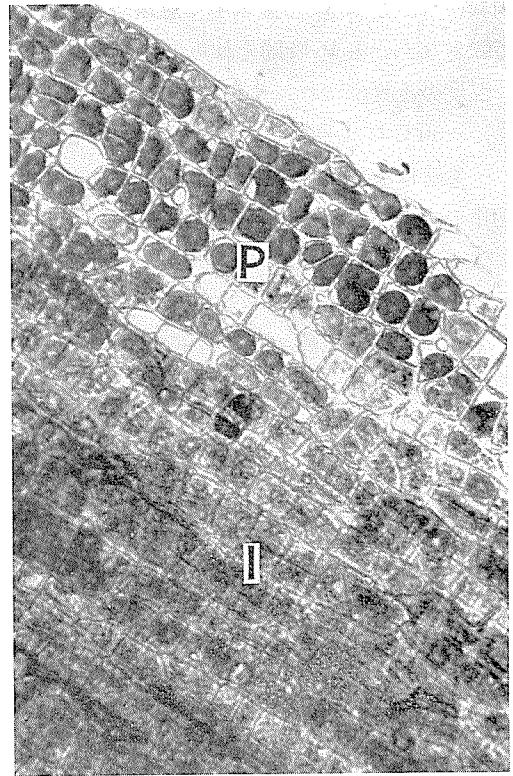
第 3 図 各温度に冷されたイソペンタンの槽の中に、室温から組織切片を入れて急速冷却、急速加温した場合の生存率

ピンセットで保持した組織切片を各温度に冷却されたイソペンタンの槽の中に入れて急速に冷却し、そこに 30 秒間おいてから 30°C の水中で急速にあたためた

ン槽中に入れて急速に冷却した。そこに 30 秒間おいてから 30°C の水中に入れて急速にあたためた。-20°C 以上の温度では、イソペンタンが細胞に害作用をおよぼすので、流動パラフィン中で冷却した。その結果を第 3 図に示す。

細胞の生存率は -10°C から -30°C にかけて温度が低下するにつれて急速に減少した。しかし、さらに -45°C から -60°C まで温度が低下する場合には、逆に著しく増加した。-40°C のイソペンタン槽中に急速に入れ、そこに 30 秒間おいた後、30°C の水中で急速に加温したときはほとんどの細胞が殺された。この場合、冷却速度の大きいと考えられる組織切片の周辺部の細胞はかなり生存していたが、その中央部の細胞は全部死んでいた (第 4 図)。

-60°C 以下の温度で急速に冷却した細胞の切片には、氷晶のあととおもわれる空胞はみとめられなかった (図版 IV-5)。しかし -30°C のイソペンタン槽中に入れて急速冷却し、そこに 30 秒間おいた細胞の切片には多数の氷晶のあととおもわれる空胞がみとめられた。また -30°C のイソペンタン槽中に入れて急速に冷却し、そこに 5 秒間おいた場合には、同一の組織切片内の細胞間や同一細胞内に大きさや形態が著しくことなる氷晶のぬけがらとおもわれる空胞がみとめられた。図版 V-7 に観察した細胞の切片のうちの代表的なものを示す。この写真であきらかなように、氷晶のあとの空胞の大きさは右から左にむかうにつれて連続的に増大していることがわかる。またコロイド溶液の凍結のさいにみとめられる樹枝状構造⁷⁾ (A) がみとめられる。



第 4 図 室温から -40°C のイソペンタン槽に入れて急速に冷却した組織切片中の細胞
切片の周辺部 (P) の細胞は中性赤に染色し、正常に原形質分離しているが、中央部 (I) の細胞は全て死んでいる
I: 切片の中央部, P: 切片の周辺部, ×200

IV. 考 察

細胞内の氷晶を凍結置換してから、間接的に観察する場合の最も重要な問題点は、電子顕微鏡で観察される氷晶のあとと思われる空胞が、細胞内にできた氷晶の大きさおよびその位置を正確に再現しているか否かである。電子顕微鏡下で観察された空胞は 1) 明らかに包埋に使ったエポンのみで満されているし、2) 約 3 万倍に強拡大しても空胞の周囲に細胞内の構造物に特有な膜構造がみとめられないし、さらに 4) 図版 V-7 にみとめられるようなコロイド溶液の

凍結に特有な樹枝状⁷⁾の凍結様式を示す多数の空胞がみとめられる。なお、このような性質をもつ空胞は冷却しない無処理の細胞にはみとめられない。さらに、本実験では -78°C に冷された2% オスミック酸を含むエタノール中で氷晶の置換とともに固定を行なっているため、凍結乾燥の場合のように、乾燥過程における結晶の生長や乾燥の終末段階時での収縮変形などはおこらないものと考えられる。そのために、凍結置換後細胞内にみとめられる空胞は冷却中に細胞内にできた氷晶の大きさ、形およびその位置をかなり正確に再現しているものと考えてよい。

耐凍性の高い木の枝の皮層細胞を急速冷却、急速加温の方法で超低温で生存させえたおもな理由としてつぎのものがあげられる。1) 用いた皮層細胞が高い耐凍性をもっていること。2) 用いた組織切片が非常にうすく、小さいし、媒液に浸さないで冷却するために、急速に冷却および加温ができること。3) 細胞の糖濃度が高いこと。

夏のクワの枝の皮層細胞は -5°C の凍結にも耐えられないし、急速冷却、急速加温して超低温で生存させることはできなかった²⁾。10月中旬になると、枝の皮層細胞は -5°C に耐えるようになったが、この材料もあらかじめジメチルサルフォキサイドやエチレングライコールなどの凍害防禦物質の2M溶液であらかじめ処理しなければ、急速冷却、急速加温によって超低温で生存させることはできなかった²⁾。しかしながら、この時期に 0°C で10日間Hardeningすると皮層細胞は -20°C の凍結に耐えられたし、液体窒素中に急速に冷却し、 30°C の水中で急速にあたためることによって生存させることができた²⁾。

以上述べた事実から、急速冷却、急速加温の方法で超低温で生存させうるためには、細胞の耐凍性がきわめて高いことが必要であることがわかる。同様のことが最近Tumanov等⁸⁾によってもたしかめられた。従来、多くの低温生物学者達はこのことを見逃していた。また急速冷却、急速加温の方法で超低温で生物を生存させる試みが成功しなかったのは、彼等が使用した材料の耐凍性が低いことに基因しているように考えられる。

耐凍性の高い木の皮層細胞では、糖や多価アルコールの濃度が高い。また細胞内にできる氷晶核は細胞の糖濃度が高いほど生長しにくいはずである。そのために耐凍性の高いものでは、同じ条件で急速冷却、急速加温した耐凍性の低いものよりも害が少ないと考えられる。Tumanov等⁸⁾は耐凍性の高い細胞では急速冷却しても、細胞内の水が凍りにくいような原形質構造ができているとのべている。

-30°C のイソペンタン槽中に入れて急速冷却した細胞では、その後急速加温しても全細胞が死んでいた。しかしながら、室温から -40°C のイソペンタン槽中に入れて急速に冷却した組織切片では、その中央部の細胞は死んでいたが、周辺部の細胞は生存していた。さらに -60°C 以下の温度のイソペンタン槽中に入れて急速に冷却した組織切片では、全細胞が生存していることから考えて、冷却速度がある程度以上大きいばあいには、冷却速度の高まるにつれて生存率が高まることわかる。酒井等⁹⁾は冷却速度と生存率との関係について最近詳細な研究を行なってこの事を確認している。

液体窒素処理後、加温の過程で -40°C に10秒間おいた組織切片では、中央部の細胞が生

存しているが、周辺部のものは死んでいた。また -60°C 以下の温度に 10 分間おくだけでは全細胞が生存していたが、 -30°C の温度では全細胞が死んでいた。以上述べたこと、ならびに電子顕微鏡による観察結果から考えて、超低温に急速に冷却した細胞では、ゆっくり加温される過程で、冷却中に細胞内に生じた氷晶核の生長がおこるものと考えられる。

本実験でえられた生存曲線は細胞内にできた氷晶核の生長速度の大小で説明できる。すなわち、 -60°C 以下の温度範囲では、冷却時にできた氷晶核の生長速度がきわめて小さいので少なくとも 16 時間それらの温度にさらしても、その後、急速に加温すれば、細胞は害を受けない。これにたいして、約 -40°C 以上の温度では氷晶の生長速度が大きいので、冷却の過程で細胞に有害となるほどに大きい氷晶ができる。それ故に、 -20°C から -40°C の温度範囲では室温からこの温度に急速に冷却した場合や、液体窒素に急速冷却後、この温度範囲において加温した場合には、その後急速に加温しても、生存率はきわめて低い。

以上の事実から、急速冷却、急速加温によって細胞を生存させるための基本的な要因は、細胞内に氷晶核ができるか否かではなく、細胞内にできる氷晶の大きさが問題であることを示している。細胞に有害となる氷晶の大きさについては、今後さらに調べる予定である。

V. 摘 要

冬のクワの皮層組織切片を液体窒素ならびに各温度に冷却されたイソペンタン槽中に入れて急速に冷却し、 -78°C のエタノール中で凍結置換した。それらの細胞の切片中に氷晶のあとと考えられる空胞が存在しているか否かを電子顕微鏡でしらべた。

1) 液体窒素ならびに、 -60°C 以下の温度に冷されたイソペンタン槽中に入れて急速に冷却したときは全細胞が生存していた。また、これら細胞内には氷晶のあとと考えられる空胞はみとめられなかった。

2) -20°C から -45°C の温度範囲では、室温からこれらの温度に冷されているイソペンタン槽中に入れて急速に冷却したとき、ほとんどの細胞が殺された。なお室温から -30°C のイソペンタン槽中に入れて急速冷却した細胞内には、多数の氷晶のあとと考えられる空胞がみとめられた。

3) 液体窒素中に入れて急速冷却後、 -80°C から -10°C までの各温度のイソペンタン槽中に組織切片を入れて加温したところ、少なくとも -60°C 以下の温度に 16 時間おいた限りでは、全細胞が生存していた。またその場合、細胞内に氷晶のあとと考えられる空胞はみとめられなかった。しかし、 -30°C 以上の温度においた場合には、1 分間おくだけで全細胞が死んでいたし、細胞内には多数の氷晶のあとと考えられる空胞がみとめられた。

えられた結果は細胞内にできる氷晶の大きさによって説明できる。

文 献

- 1) Sakai, A. 1966 Survival of plant tissue at super-low temperatures. IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol.*, **41**, 1050-1054.
- 2) 酒井 昭 1966 超低温における植物組織の生存. IV. 低温科学, 生物篇, **24**, 1-13.
- 3) Sakai, A. 1967 Survival of plant tissue at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. *In Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. Asahina, ed.), *Inst. Low Temp. Sci., Sapporo*, 119-130.
- 4) Luyet, B. J. 1937 The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica*, **1**, No. 29, 1-14.
- 5) 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.
- 6) Sakai, A. 1960 Survival of the twig of woody plants at -196°C . *Nature*, **185**, 393-394.
- 7) Mackenzie, A. P. and Luyet, B. J. 1962 Electron microscope study of the structure of very rapidly frozen gelatine solutions. *Biodynamica*, **9**, 47-69.
- 8) Туманов, И. И. и Красавцев, О. А. 1966 Выяснение условий необходимых для витрификации растительных клеток. *Физиология Растений*, **13**, 144-161.
- 9) 酒井 昭・吉田静夫 1967 超低温における植物組織の生存 VI. 生存率におよぼす冷却および加温速度の影響. 低温科学, 生物篇, **25**, 9-19.

Summary

To clarify the mechanism of survival at super-low temperatures with rapid cooling and rewarming, especially the relation between the existence of intracellular ice crystals and survival, some experiments were made with cortical cells in the twig bark of mulberry tree in winter.

Cortical cells were cooled rapidly by direct immersion into liquid nitrogen and isopentane baths cooled at various temperatures. After immersion, they were freeze-substituted with absolute ethanol at -78°C . These were then embedded, sectioned and examined under the electron microscope for the presence and distribution of cavities left after ice removal. These cortical cells were then compared with nonfrozen controls.

It was confirmed that cells remain alive and contain no ice cavities when immersed rapidly into isopentane baths kept below -60°C or into liquid nitrogen. Whereas, when immersed into isopentane baths kept at intermediate temperatures from -20 to -45°C , almost all of the cells were destroyed. It was also confirmed that many ice cavities were contained in these cells immersed rapidly into isopentane baths at -30°C . These facts seem to indicate that the water in the cortical cells was successfully prevented from freezing when cooled rapidly by direct immersion into isopentane baths below -60°C or into liquid nitrogen.

The tissue sections immersed in liquid nitrogen were rapidly transferred to isopentane baths at temperatures ranging from -70° to -10°C before rapid rewarming. Little damage was sustained when samples were held at temperatures below -50°C for 10 minutes or below -60°C for 16 hours. No cavities were found in these cells. Above -45°C , and especially above -30°C , however, all cells were completely destroyed even when exposed only for 1 minute. Many ice cavities were also observed throughout

these cells. The results obtained may be explained in terms of the growth rate of intracellular ice crystals.

図 版 説 明

図 版 I-1

冷却しない無処理の組織切片を、室温で2% オスミック酸水溶液で4時間固定後、酢酸ウランと酢酸鉛で複染色した電子顕微鏡写真

C: 葉緑体, M: ミトコンドリア, N: 核, Nu: 仁, S: 澱粉粒, W: 細胞壁, ×9,000

図 版 II-2

室温から液体窒素中に入れて急速冷却した細胞の切片の電子顕微鏡写真。核とその付近の細胞質を示しているが、氷晶のぬけがらと思われる空胞はみとめられない

C: 葉緑体, M: ミトコンドリア, N: 核, Nu: 仁, S: 澱粉粒, ×20,000

図 版 III-3

液体窒素中に入れて急速冷却後、 -60°C のイソペンタン槽中に10分間おいた細胞の切片の電子顕微鏡写真。核とその付近の細胞質を示す。氷晶のぬけがらとおもわれる空胞はみとめられない

N: 核, Nu: 仁, S: 澱粉粒, ×32,000

図 版 IV

4. 液体窒素中に急速冷却後、 -30°C のイソペンタン槽中に10分間おいた細胞の切片の電子顕微鏡写真。氷晶のぬけがらとおもわれる空胞が多数みとめられる

lc: 氷晶のぬけがらとおもわれる空胞, W: 細胞壁, ×15,000

5. 室温から -60°C のイソペンタン槽中に入れて急速に冷却した細胞の切片の電子顕微鏡写真。核とその周辺の細胞質を示す。氷晶のぬけがらとおもわれる空胞はみとめられない

N: 核, Nu: 仁, S: 澱粉粒, ×20,000

図 版 V

6. 室温から -30°C のイソペンタン槽中に入れてそこに10分間おいた細胞の電子顕微鏡写真。氷晶のぬけがらとおもわれる空胞が多数みとめられる

lc: 氷晶のぬけがらとおもわれる空胞, W: 細胞壁, ×20,000

7. 室温から -30°C のイソペンタン槽中に入れて5秒間おいた細胞の切片の電子顕微鏡写真。氷晶のぬけがらとおもわれる多数の空胞と、コロイド溶液の凍結にみられる樹枝状構造がみとめられる

A: 樹枝状構造, lc: 氷晶のぬけがらとおもわれる空胞, V: 液胞, W: 細胞壁, ×24,000

