



Title	急速凍結融解された腫瘍細胞の生存
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo; 久田, 洋子 他
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 81-96
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17722">https://hdl.handle.net/2115/17722</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p81-96.pdf



## 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存\*

朝比奈英三

(低温科学研究所 生物学部門)

久田洋子・江村牧人\*\*

(北海道大学理学部動物学教室)

(昭和42年9月受理)

### I. 緒 言

生物細胞を凍らせる場合に、冷却速度がのろいうちは細胞の外部にのみ氷ができるが一細胞外凍結—冷却速度がはやくなると細胞の内部にも氷ができる<sup>1,2)</sup>。このような細胞内凍結は凍った細胞にとってほとんど例外なく致命的である<sup>3-5)</sup>。

いつぼう Luyet 教授とその協力者等によって生物細胞を非常に速やかに凍らせ且これを非常に速やかに融かすと生存しているもののあることは古くから知られていた<sup>6)</sup>。彼等はこのような現象をはじめは原形質のいわゆるガラス化 (Vitrification) で説明せんとした<sup>7,8)</sup>。しかしその後彼等は主としてゼラチンゼリーのような生物学的材料を使ってこの問題を追求し、ごく高濃度のゼリーの場合を除いて、非常に急速に冷却されたゼリーの中にはやはり氷晶ができているが、通常の氷に比べてその凍りかたが不完全なものであるとの結論に達した<sup>9)</sup>。

いずれにしても急速冷却・融解された生物が生存できる理由は、冷却によって細胞内に出来た氷晶が十分に小形であって、これが原形質構造を破壊するほど大形に生長しないうちに融解されたものと想像され、従ってこのような場合の凍結温度は非常に低い必要があると思われる。実際にも今迄成功した急速冷却・融解による生物の生存例は、ほとんど液体空気温度又はそれより低温で急冷却し、且その温度から急融解した場合のみであった<sup>6,10,11)</sup>。

しかし最近酒井は耐凍性の高い樹木(桑)の皮層細胞を使って詳細な実験を行ない、この材料では急速冷却融解後生存させるために充分効果的な凍結温度は  $-60^{\circ}\text{C}$  以下であることを明らかにした<sup>12)</sup>。

さてこのような急速冷却によって生物細胞内にできる個々の氷晶は甚だ小さいために光の透過を防げず、細胞は凍らないときと同じ様に透明にちかくみえると考えられるが、このような細胞を直接顕微鏡下に観察した例は非常に少ない。そのなかで Rapatz 及び Luyet による蛙の有核血球の凍結の観察<sup>13)</sup>はもっとも優れたものであるが、この場合は凍結している血球が生

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 843 号

\*\* 現所属 愛知県ガンセンター

存時そのままにみえたときでも、これを急速加温の後に生存させることはできなかった(私信による)。

著者等はシロネズミの腹水肉腫を使って細胞の凍結過程を観察したとき、ごく少量の腫瘍細胞を $-20^{\circ}\text{C}$ 付近の温度で急速凍結すると、未凍の細胞と同じように透明にみえ、これを次第にあたためる過程において細胞内部に氷晶があらわれてくることを知った<sup>14)</sup>。そこでこのような凍りかたをした腫瘍細胞を $-30^{\circ}\text{C}$ 又はそれ以下の温度から急速に融かしてその後の運命をしらべたところ明らかに生存していて増殖をつづけることが判明した。本文はこのような腫瘍細胞の凍りかたと融解後の細胞の生死について述べたものである。

稿を始めるにあたって、実験材料を十分に給与して下さった北大理学部動物学教室の牧野佐二郎教授に感謝したい。

## II. 材料と方法

**材料：**使った腫瘍細胞はMTK-肉腫IIIと呼ばれるシロネズミの腹水腫瘍の細胞である。この腫瘍は北海道大学理学部動物学教室において1952年にWistar系シロネズミにはじめて人工的に作られて以来1100代以上に及ぶ累代移植を行なって保持されて来たものである<sup>15)</sup>。MTK-肉腫IIIはその染色体の形態が異なる外は吉田肉腫と非常によく似ている<sup>15,16)</sup>。この腫瘍が腹腔内に増殖したネズミの移植後の生存日数は現在では10日内外である。この腫瘍細胞はネズミの腹水中に存在する他の細胞に比べて明瞭に大きく、直径が $11\sim 17\mu$ 位ある球形でときには $30\mu$ に達するものもある。温度が高まるとかなり著しい変形運動をするが、 $23^{\circ}\text{C}$ 以低では細胞はほとんど球形である<sup>17)</sup>。通常の透過光線で見るとこの細胞はほとんど透明で数個以上の「リピッド粒」を含んでいる(図版V-20)。

**方法：**腫瘍をシロネズミの腹腔内に移植した後、3日又は4日目にガラスピペットで腹水を吸出した。腹水のなかには一面に腫瘍細胞が浮遊している。この腹水をカバーガラスの上にごく微量(約 $0.002\text{ ml}$ )おとし、別のガラス片でなすと腫瘍細胞がきれいに一層にならんだ腹水の薄層ができる。このようにして作った腹水の試料をシリコン油でうすくおおい、その凍結及び融解の過程を特製の冷凍顕微鏡を使ってくりかえし観察した。

使用した顕微鏡は倒立型で透明ビニール板製の冷凍箱内におかれ、接眼部のみが箱外に突出している。箱内にある顕微鏡のすべての可動部分は外部より電動式又は空気圧式で動かすことができる。冷凍箱内の空気は室温による影響があるが、大体 $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷却できる。顕微鏡のステージ上にある試料の温度はその試料をおおうシリコン油の中にさしこんだ小熱電対によって測定し、自動平衡記録計で連続記録した。試料温度の調節は大小2つの電熱器によって行なわれ、 $-20^{\circ}\text{C}$ 付近では短時間ならば $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 程度の恒常性を保つことができる。

試料の急速凍結には二つの方法をとった。一つは前記の試料をのせたカバーガラスをピンセットで挟み室温から直接液体窒素の中に急にさし入れる一超低温急凍結。このとき液体窒素に試料を入れたための沸とうは $1\sim 2$ 秒以内に終了する。他の一つは試料をのせたカバーガラスを $-30^{\circ}\text{C}$ に冷却してある冷凍顕微鏡のステージ上に速やかにセットする。このとき腫瘍細胞

胞を含む腹水の小滴は十数秒ないし数十秒間は凍らず、 $-30^{\circ}\text{C}$ に達するまで充分過冷却されてから突然自発凍結をおこすものが多い—急凍結。 $-30^{\circ}\text{C}$ よりはるかに高い温度で過冷却がやぶれて凍りだした場合は急凍結の資料より除外した。

超低温急凍結させた試料を観察するには液体窒素中にある試料をカバーガラスごとピンセットで挟み、できるだけやく冷凍顕微鏡にセットした。このときごく短時間室温の空気中を通過するが、セット直後の試料温度が $-30^{\circ}\text{C}$ 以上になっていることはほとんどなかった。

凍結した細胞を急速に融解するには、McCoyの培養液の約30 mlをビーカーに入れ予じめ約 $38^{\circ}\text{C}$ に温めておき、凍結してあった試料をカバーガラスごとできるだけすみやかにこの中にさし入れ、ふりうごかして融解させた。このようにして融かした試料をふくむ培養液から遠心して腫瘍細胞を集め、これをガラスピペットで約0.2 mlづつシロネズミの腹腔内に注射した。注射されたネズミからその後1日~3日におき腹水を取り、醋酸・ダーリヤ固定染色による押しつぶし法により標本を作り、未処理の腫瘍細胞を移植された動物を対照群として比較しながら観察した。

### III. 結 果

#### 1. 細胞の凍結融解の過程

**超低温急凍結：**前記の試料を液体窒素中に急にさし入れて1~2分おき、次にこれを $-30^{\circ}\text{C}$ に冷してある冷凍顕微鏡のステージにすみやかに移して観察すると、凍結している腹水の中のほとんどの腫瘍細胞は凍結する前と同様に透明にみえる(図版 II-5)。細胞をとりまく腹水の凍りかたをみると、腹水滴の周辺部以外には多数のこまかい樹枝状の模様\*や個々の氷塊の境界がみえるが(図版 II-6)、周辺部では一様に透明であるかまたはここに少数の細い樹枝状の模様がみえる(図版 IV)。

観察しながら試料の温度をゆつくり上げてゆくと、透明にみえていた腫瘍細胞が或温度まで温められると急速に暗化する。このとき同一の腹水滴のなかで、周辺部ではそこにある細胞の暗化する温度がそれ以外の場所にある細胞のそれよりも高い、つまりおくってから暗化する。1例をのべると、試料の中心部に近いところでは $-30^{\circ}\text{C}$ に試料がうつされてから8分後 $-28^{\circ}\text{C}$ 付近から暗化する細胞があらわれ、10分後 $-27.5^{\circ}\text{C}$ では同一視野にみえる細胞の半数以上のものが暗化してしまう(図版 III-9)。このときの細胞の暗化は、動植物細胞の急速な細胞内凍結のときにみられるフラッシング(細胞全体の瞬間的な暗化)ほど急速にはおこらず、温度が上るにつれいつのまにか或る細胞の周辺部が不規則に凸凹してきて(図版 II-8)それが間もなく細胞全体に拡がり $-27^{\circ}\text{C}$ ないし $-25^{\circ}\text{C}$ (17~20分後)になるまでに全細胞が暗化してしまう(図版 III-10)。このような細胞の暗化は、細胞内にできていた光の波長よりもさらに微小な氷晶が、1~2 $\mu$ 以上の大きさの氷粒に成長し、その間に濃縮された細胞成分を脈状に挟みこんだ結果であろう。加温につれて細胞内に現われてくる小氷粒の数は、特に温度が $-20^{\circ}\text{C}$ 内外又はそれより高くなると意外なほど少数である。またこのとき細胞が暗化するまでの過程で細

\* Luyet 等のいう irregular dendrites に似ている<sup>9)</sup>。

胞は明らかに収縮し、円滑な球形にみえていた腫瘍細胞は不規則なしわのある凝固塊となる(図版 III-10)。

いつぼう同じ凍結した腹水滴の周辺部を観察すると、 $-25^{\circ}\text{C}$  付近まで加温されても、ここにある腫瘍細胞の過半数のものはまだ透明にみえる(図版 IV-13)。 $-20^{\circ}\text{C}$  に近づくと暗化するものが増加し(図版 IV-15)、 $-20^{\circ}\text{C}$  以高\* ではほとんどすべての細胞が急速に暗化する(図版 IV-16)。さらに温めてゆくと、細胞内に大粒の水があらわれてくる(図版 V-18)。また細胞のまわりにある凍結した腹水は、 $-20^{\circ}\text{C}$  以高に加温されてはじめてはっきりと変形をはじめ。

**急凍結：** 試料をいきなり室温から  $-30^{\circ}\text{C}$  に移すと、前述のようにかなり過冷却がすすんで、 $-30^{\circ}\text{C}$  付近にまで冷されてから急に凍結する。顕微鏡下にみえる像は液体窒素で冷却されたときとほとんど同様であるが、透明な凍結細胞にまじって暗化した細胞がわずかず存在するが多い(図版 I-1)。凍結している腹水滴の中央部に近いところには樹枝状の模様がみえるが、周辺部は全くガラスのように透明である(図版 II-1, 2)。この両方の部分にわたって散在している腫瘍細胞のうちで周辺部にあるものは液層がうすいため偏平になってやや大形にみえる(図版 I-1)。温度を上げてゆくと透明にみえていた細胞のあるものは  $-28^{\circ}\text{C}$  位から暗化をはじめ、暗化する細胞の数は  $-28^{\circ}\text{C}$  付近では超低温急凍結させた場合に比べてはるかに少ない(図版 I-2, 3)。さらに試料の温度を  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$  位のはやきで上げてゆくと、 $-25^{\circ}\text{C}$  内外に達してはじめて胞細胞の暗化速度がはやまり、 $-20^{\circ}\text{C}$  付近では著しく急速になって(図版 I-4)、数分間で全細胞の暗化が完了する。

**やや冷却速度が小さい場合：** 試料の腹水滴が十分にうすく延ばされていない場合には、 $-30^{\circ}\text{C}$  で急凍結させても、平行に伸びたやや大形の氷晶が重なったような外観となり、その間に挟まれている腫瘍細胞は透明ではあるが、細胞外凍結をおこしてやや収縮してみえる(図版 III-11)。このような試料をゆっくり温めると、 $-20^{\circ}\text{C}$  位でこのなかの細胞は一つ残らず暗化してしまうので(図版 III-12)、これらは最初或る程度の細胞外の凍結を瞬間におこして収縮した後に透明な様式の細胞内凍結をおこしたものと考えられる(図版 II-17)。

すっかり暗化してしまった腫瘍細胞をさらに温めると、細胞内の微小な氷粒は移動再結晶\*\*をおこして大形となるので細胞内ははるかに明るくなる。こうして最後には細胞内の氷晶は少数の大粒のものとなってから融け消えてしまう。細胞をとりまく水も  $-8\sim-5^{\circ}\text{C}$  の温度でははっきり大粒の氷塊にかわる(図版 V-17)。細胞内の氷が融解消失するのに先立って細胞自体は溶け消えるように不明瞭となる(図版 V-18)。

融解直後の腫瘍細胞は大きく膨潤し顆粒のみがはっきり見え、細胞の輪郭はきわめてうすぼんやりとして細胞の内容物が外部に拡散していることを思わせる(図版 V-19)。凍結細胞で

\*  $-18^{\circ}\text{C}$  では十数秒で全細胞が暗化してしまう。

\*\* 大きさにちがいのある多数の小氷粒が同一の凍結塊にある場合、氷点より低温にあっても小さい氷粒は次第に消え、同時に大きい氷粒はさらに大きく成長する。この現象を Luyet は Dorsey (1940, 412 頁)<sup>18)</sup> にならって移動再結晶 (Migratory recrystallization) と呼んだ<sup>19)</sup>。

みられるこのような融解の過程は急凍結された細胞でも、超低温急凍結された場合でも同様に認められる。

## 2. 急速凍結後急速に融解された細胞の生死

まず予察的な資料をうる目的で次のような実験を行なった。

A. 試料を超低温急凍結させて3分後に液体窒素中より出して急速融解させた。それぞれ同じ操作をした10ケの試料から得た融解細胞を3頭のネズミに移植した。

移植されたネズミのうち1頭は10日後腫瘍細胞が腹水中に増殖しているのが明らかに観察され、15日目には対照の腫瘍動物の細胞増殖最盛期と同じ位に多量の腫瘍細胞が腹水中に充満し、この結果19日目に死亡した。しかし残りの2頭は移植10日後に若干の腫瘍細胞を腹水中に認めたが、その後減少し、以後数カ月余飼育したがネズミに腫瘍はできなかった。

B. 試料を超低温急凍結させ2分後 $-30^{\circ}\text{C}$ の冷凍顕微鏡下に移し、細胞がすべて透明な凍りかたをしていることを確かめてから2分後急速に融解させた。それぞれ同じ操作をした3ケの試料から細胞を集めて1頭のネズミに移植した。10日後、ネズミの腹水中に若干の腫瘍細胞と認められる細胞があったが、その後消失した。

C. 試料を冷凍顕微鏡下で $-30^{\circ}\text{C}$ で急凍結し、2分後に急速融解させた。このときも、70%以上の数の細胞は透明な凍りかたをしていた。それぞれ同じ操作をした3ケの試料から細胞を集めて1頭のネズミに移植した。このネズミの腹水中には5日後かなりの数の腫瘍細胞が観察されたが、その後次第に減り、15日後にはもはや発見されなかった。

BとCのネズミは其後数カ月飼育したがいずれも腫瘍死をおこさなかった。

D. 試料を冷凍顕微鏡下で $-25^{\circ}\text{C}$ で急凍結し、ゆっくり加温して5分後 $-20^{\circ}\text{C}$ まで温めてから急速融解させた。このとき試料中の細胞は透明に近いごく少数のものを除いて、ほとんどが暗化していた。それぞれ同じ操作をした4ケの試料からの細胞を集めて1頭のネズミに移植した。

E. 試料を冷凍顕微鏡下で $-22^{\circ}\text{C}$ で30秒ないし1分の過冷却後急凍結した。このなかの細胞はフラッシングをおこすか又は透明のままであった。しかしこの透明な細胞も加温につれてすみやかに暗化した。すべての細胞が明瞭に暗化するまでゆっくり加温し( $-18^{\circ}\text{C}$ 内外、約10分後)、これを急速融解した。それぞれ同じ操作をした3ケの試料から細胞を集めて1頭のネズミに移植した。このD及びEのネズミには移植後何日たっても全く腫瘍細胞が認められなかった。

これらの結果からわれわれは急冷却によって透明にみえるような凍りかたをしている細胞のなかには急速に融解させれば生存しているものがあるのではないかと想像した。それで次に更に重点的な実験を行なった。

1. 試料を室温から超低温急凍結し、さらに1分たって液体窒素中から出して急速融解させた。それぞれ同じ操作をした20ケの試料から得た融解細胞を5頭のネズミの腹腔中に分注した。

2. 試料を超低温急凍結してから1分後冷凍顕微鏡下にうつし、腫瘍細胞が透明な凍りかたをしていることを確かめた後(2分後)急速融解させた。融解直前の試料の温度は $-28^{\circ}\text{C}$ 以下であった。それぞれ同じ操作をした20ケの試料から得た細胞を5頭のネズミに分注した。

3. 試料を室温から $-30^{\circ}\text{C}$ に冷してある冷凍顕微鏡下にセットし、ほとんどの細胞が凍りかたをしたことを観察して後(2分後)急速融解させた。融解前の試料の温度は $-29^{\circ}\text{C}$ 付近にあった。それぞれ同じ操作をした16ケの試料から得た融解細胞を4頭のネズミに分注した。

4. 試料を $-30^{\circ}\text{C}$ の冷凍顕微鏡下で急凍結し、ゆっくり加温( $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ )して、はじめ透明に凍っていた腫瘍細胞がすべて暗化したのを確かめてから急速融解した。融解前の温度は約

第1表 凍結・融解された腫瘍細胞のネズミ腹腔中における増殖 I。少量の腹水の中にある全細胞中の腫瘍細胞の出現頻度(%)を示す

実験番号	処 理	ネズミ		移 殖 後 の 日 数							移植後のネズミの生存日数	
		個体番号	性	体重(g)	1	2	3	4	5	7		10
1	室温 ↓ 液体N ↓ $38^{\circ}\text{C}$	A	♂	120	1.00	0.90	2.20	3.66	2.02	1.12(+)*	5.17(++)*	19
		B	♂	100	0.76	0.53	0.46	1.70	1.00	4.91(+)	28.27(++)	16
		C	♂	110	0.45	0.95	0.27	1.16	0.94	1.34(+)	28.82(++)	19
		D	♀	90	0.79	0.42	0.60	1.02	1.39	1.47(+)	37.50(++)	16
		E	♀	80	0.54	0.34	1.30	1.63(+)	1.69(+)	6.60(++)	37.41(++)	16
2	室温 ↓ 液体N ↓ $-30^{\circ}\text{C}$ (2分) ↓ $-28^{\circ}\text{C}$ ↓ $38^{\circ}\text{C}$	F	♂	70	0.40	0.40	0.40	0.40	1.18	?	0	11
		G	♀	70	0.45	0.42	0.52	0.94	0.36	?	0.99	—
		H	♂	75	0.80	0.74	1.65	3.61	0.50	?	?	—
		I	♀	70	0.37	0.37	0.54	0.46	0.98	0.32	0.47	—
		J	♀	70	?	?	?	?	?	?	?	—

\* 観察された全腫瘍細胞中で有糸分裂像がみとめられたものの百分率, (+)は1%内外, (++)は2%以上

第2表 凍結・融解された腫瘍細胞のネズミ腹腔中における増殖 II。少量の腹水の中にある全細胞中の腫瘍細胞の出現頻度(%)を示す

実験番号	処 理	ネズミ		移 殖 後 の 日 数						移植後のネズミの生存日数		
		個体番号	性	体重	1	2	3	4	10		12	15
3	室温 ↓ $-30^{\circ}\text{C}$ (2分) ↓ $-29^{\circ}\text{C}$ ↓ $38^{\circ}\text{C}$	K	♂	60	+*	+	+	+	1.12	49.20	90<(++)**	23
		L	♂	70	+	+	+	+	7.41(++)	39.41(++)	90<(++)	17
		M	♀	70	+	+	+	+	3.16	37.36(++)	90<(++)	17
		N	♀	60	+	+	+	+	2.57	40.88(++)	90<(++)	19
4	室温 ↓ $-30^{\circ}\text{C}$ (10分) ↓ $-20^{\circ}\text{C}$ ↓ $38^{\circ}\text{C}$	O	♀	60	0	0	0	0	0	0	0	—
		P	♀	60	0	0	0	0	0	0	0	—

\* 腫瘍細胞は存在するが出現頻度が0.3%以下であることを示す

\*\* 第1表の( )\*と同じ

-20°C であった。それぞれ同じ操作をした 8 ケの試料から得た細胞を 2 頭のネズミに分注した。以上の 4 群の腫瘍細胞の移植結果は第 1 及び第 2 表に示した。

これらの表で明らかのように、急速冷却によって透明な凍りかたをしている細胞は、液体窒素沸点 (-195.67°C) で凍った場合でも (実験 1)、また -30°C の空气中で凍った場合でも (実験 3)、急速融解させればともに生存が可能である。すなわちこれらの処理をした腫瘍細胞を移植されたネズミは例外なく腹腔中に腫瘍が増殖し、この結果移植後平均 18 日でいずれも腫瘍死した。

一旦超低温急速凍結を行ない、これを冷凍顕微鏡下で 2 分間観察し、-28°C 位まで温められた状態で急速融解した腫瘍細胞 (実験 2) が、-30°C で急速凍結させたものと同様な凍りかたをしているにもかかわらず融解後増殖できなかった事実はいささか意外であったが、これについては後文で考察する。また一旦透明な凍りかたをした腫瘍細胞でも、その内部に多数の氷晶の発達による暗化をはっきりおこるまで温めてから急速融解させた場合は (実験 4)、これをネズミに移植しても腹水中に出現しない。つまりこのような方法で凍結融解させた細胞は死んだものと考えられる。この事実は予察実験の D 及び E の結果とともに、通常の様式の細胞内凍結をおこした腫瘍細胞は必ず死ぬというわれわれの前報<sup>14)</sup> の結論を支持するものである。

## IV. 考 察

### 1. 細胞の凍結様式

生きている細胞を非常に急速に凍らせると、凍結以前と同様な透明に近い状態に見えることはすでに古くから Luyet 教授等による報告があった<sup>6)</sup>。しかしこのような凍りかたに対する説明はなかなか難しい。このため Luyet 等はまずゼラチンゼリーや各種の有機化合物の水溶液の凍りかたについて長期の研究計画をたて、すでに多くの業績を発表している<sup>20)</sup>。それによると、これらの水溶液を急速に凍らせるとそのなかに氷の球晶を生じ、このときの冷却が充分急速且低温である場合は、これらの球晶は小形且ほとんど透明でこれを 'evanescent spherulite' と呼ぶ。急速に凍った透明に見える溶液中に 'evanescent spherulite' があることは、これを偏光で観察すると、「マルテーゼ十字\*」の像をあらわすことで識別できる<sup>9)</sup>。このように凍った水溶液を温めてゆくと、或温度に達すると急に暗濁する (反射光では乳濁してみえる)。これは 'evanescent spherulite' を構成していた非常に微小な氷晶が変態生長した結果、顕微鏡下に認められる程の大きさに発達したためと考えられる<sup>19)</sup>。このような様式の暗化を Luyet 等は 'irruptive recrystallization' と呼んでいるが<sup>9)</sup>、これがおこる温度は凍結している溶液の溶質によって定まり、一般に大分子である程その温度が高く、溶液の濃度の影響はむしろ少ない<sup>21)</sup>。

今回の実験に使われた腫瘍細胞も -30°C 以下の温度にごく急速に冷却されるとほとんどが透明なままで凍結すると考えられる。しかし -28°C より高温で凍らせると、充分過冷却されてから自発凍結がおこったときでも、透明な細胞にまじって暗化 (フラッシング) する細胞が増え、最初から -18°C ないし -15°C 付近で凍らせた場合は、ほとんど全細胞がフラッシン

\* 中心にある交叉部が点で、ここからはなれるほど放射状に太くなる十字形をいう。

グをおこす<sup>14)</sup>。透明なままで凍っている腫瘍細胞の内部に‘evanescent spherulite’ができていくかどうかはまだわからない。偏光を使って凍結した腹水滴を観察したが、何の部分にも「マルターゼ十字」の像は発見できなかった。これは細胞が小形であるうえ偏平になっているので氷晶があってもきわめてうすく、このため十字の像があらわれ難いのであろう。

透明な凍りかたをしている細胞は $-20^{\circ}\text{C}$ 付近まで温められると急速に暗化するが、その過程は急速凍結されたゼラチンゼリーでみられる‘irruptive recrystallization’<sup>19)</sup>とはやや異なってみえる。すなわちゼリーの場合は透明にみえていた凍結試料中に微粉状のものが無数にあらわれて乳濁暗化してゆくのに対し、腫瘍細胞の場合は加温につれて細胞の表面にしわや顆粒状のものが増えて来て、このような変化が細胞内部にまでおよぶので暗くなってみえるのである。このしわや顆粒の大きさは $1\sim 2\mu$ 位又はそれ以上ある。このような過程は Rapatz と Luyet によって蛙の血球においてもほとんど同様なものが観察されており、彼等も血球中に‘irruptive recrystallization’をみとめることはできなかったと述べている(236頁)<sup>13)</sup>。しかし Luyet の最近の報告によれば、ゼラチンゼリーを凍らせてできた‘evanescent spherulite’は $-10^{\circ}\text{C}$ まで加温されると急速に暗化するが、このとき暗化部にみとめられる氷の粒子の直径は最初から $1\sim 2\mu$ 位ある<sup>19)</sup>。従って細胞の場合も、急速冷却によって細胞内に多数の微小な氷晶ができていて、これが加温につれて認められる程度の大きさまで生長したため細胞にしわや顆粒があらわれたと考えてよいであろう。加温につれて細胞内にあらわれてくる氷粒がしばしば意外に少数であることは(図版 IV-15)、凍結した原形質内での移動再結晶が非常に急速にすすむことを暗示している。また急速凍結された蛙の血球では、加温によって暗化する場合に細胞核のまわりと細胞の周辺に沿って透明な氷層が発達することがみられているが<sup>13)</sup>、これは恐らく血球のもつ特別な細胞構造のためであって、腫瘍細胞ではこのような特に氷晶が発達しやすい場所はみとめられなかった。

透明な凍りかたをした腫瘍細胞は或程度温められると暗化する直前に収縮変形するケースが多い(図版 II-8, III-9)。この事実は一見細胞外凍結の状態をおもわせる。しかしこの場合の細胞の収縮は加温によって細胞内に氷粒があらわれてくる過程においてはじめておこり、細胞の透明な状態が安定している温度( $-30^{\circ}\text{C}$ 付近)では数十分たってもほとんど認められない。従ってこの事実は細胞内の水が或温度以上では非常に移動しやすくなることを意味しきわめて興味深い。

すでに述べたように試料の腹水の層が厚いと、 $-30^{\circ}\text{C}$ で急凍させた際にやや収縮した透明な細胞像がみえる(図版 III-11)。これは本実験のような方法で凍らせた場合でも、冷却速度がいくらか小さいと腫瘍細胞が一時細胞外凍結をおこすことを示している。すなわち細胞の外にある腹水が凍ったとき潜熱の放出のため冷却速度がおちるので直ちに細胞の内部に凍結がすすまず、この間に細胞内の一部の水が外に引出されて凍ったものと思われる。しかしその後の冷却速度が大きいので細胞が収縮してゆく途中で細胞内部も凍結してしまったのであろう。このように凍った細胞を加温すると、或温度に達したとき例外なく内部の暗化が迅速におこる(図版 III-12) 事実はこの想定をうらづけるものである。

## 2. 凍結融解後の細胞の生存

生物細胞を急速凍結させてそれが凍結前と同じ形態を保っていることを観察した報告はごく少ないが、そのように凍った細胞が生存していることを証明した実験は未だほとんど無いといってもよい。古く Luyet 等は塩溶液中で原形質分離させたタマネギの表面細胞を液体空気を充したまほうびん中で急速凍結させ、まほうびんのメッキを一部除いた窓から偏光顕微鏡で観察した<sup>8)</sup>。このとき細胞壁と収縮した原形質体との間にある塩溶液の部分は複屈折性を示し、原形質体にはそのような性質がないので、おそらく原形質の水分は凍っていない(つまりガラス化している)と考えられた。このように凍らせたタマネギの細胞を 20°C に温めた塩溶液中で急速に融かすと原形質復帰及び原形質分離をすることができたという<sup>6)</sup>。タマネギ表皮を使ったこのような実験は、その後の研究者による細胞生存の追試が不成功なため批判を受けている<sup>22)</sup>。また急速凍結によってフラッシングをおこしたタマネギの表皮細胞の原形質体は一面にこまかい氷晶に充されていても、氷と氷との隙間に濃縮された細胞液が存在するため複屈折性をみとめることはむずかしい(朝比奈未発表)。従って Luyet 等のタマネギの実験結果に対する一つの可能な解釈は、急速凍結によって液胞内には氷晶ができたが、トノプラスト(液胞膜)はそれほど凍害を受けていなかったため少なくとも一時的にはみかけ上の原形質分離が可能であったということになる。

また Luyet 等は蛙の筋肉のごく細い束を液体空気中で急速凍結後急融解させたものが少なくとも一時的には電気刺激によって収縮したことを報告している<sup>23)</sup>。彼等の最近の研究によればこのように急速に凍らせた筋肉繊維は凍結以前と同様に透明にみえ、これを -10°C まで温めると暗化('irruptive recrystallization')がみとめられた<sup>24)</sup>。

以上のようにこれまでの報告では透明な凍りかたをしていた細胞の生死は、融解後の一時的な材料の回復を観察しているだけでその後の運命については全くふれていない。われわれの腫瘍細胞の場合は、細胞の凍結の様式を実験 1 以外では直接顕微鏡下にたしかめ、急速融解後の生死はねずみの体内における増殖能力から判定している。この宿主動物への移植という方法は、移植された細胞の増殖に関して凍結以外の条件が導入されるところに問題がある。しかしわれわれの場合は、(A)すでに前報において -20°C 以上の温度における細胞内凍結は、その細胞にとって例外なく致命的であること<sup>14)</sup>、(B)今回の実験でも細胞を -30°C 以上の温度で急速凍結後 -20°C 付近まで温めて細胞内が暗化してしまってから急速融解させたものを移植しても宿主の体内には腫瘍細胞が全く発見されないこと、等の事実からこの実験においてネズミの体内での腫瘍細胞の増殖は透明な凍りかたをしていた細胞に由来するものと考えてよいであろう。これらの細胞にまじってごく少数の細胞外凍結をしていた細胞があって、これが生存していたのではないかとこのうたがいは、前記(B)の事実から否定される。すなわち(B)の実験は腫瘍細胞が細胞外凍結の状態で生き残るためにはさらに好都合な温度条件を充しているからである。

現在各種の癌細胞を凍結保存することは諸方でひろく行なわれており、最もよく知られた効果的な方法は、試料にグリセリンを加えてゆっくり凍らせる。つまり保護剤とともに細胞外

凍結をさせておくことである。しかしこの方法を本実験の試料である MTK 肉腫-III に試みた例でも、融解後の試料を移植されたネズミの体内での腫瘍細胞の増殖は、凍らせない対照の細胞を移植した場合に比べて数日おくれることがしられており、今回の急凍結させた腫瘍細胞に比べて1~2日位増殖がはやまるにすぎない<sup>25)</sup>。

ところで第1表に示した実験2の結果はいささか予想に反するものがあった。この実験で融解細胞を移植された5頭のネズミのうち4頭までは瘍腫細胞が10日間の長きにわたって腹水中に出現したにもかかわらず遂にその細胞の有糸分裂像を確認するに至らず、また原因不明のまま早期に病死した1頭を除いてどのネズミも腫瘍死をおこさなかった。実験例数が不十分なので断定はできないが、おそらく実験2の場合も腫瘍細胞は融解後に生存しているものがあり、ただその数が少なかったためにネズミの体内で増殖できなかったのではなからうか。移植された腫瘍細胞が少ない場合には動物の体内で必ずしも増殖できないことはよく知られるところである。

もし上記の考えがゆるされるとすれば第2表の実験3に比べて実験2の細胞の生存率のわるい原因はどこにあるのであろうか。実験2では試料を液体窒素から出して冷凍顕微鏡にセットするときに加温されることになるが、このとき試料が $-30^{\circ}\text{C}$ 以上になるおそれはきわめて少ない。次に試料を観察後冷凍顕微鏡から $38^{\circ}\text{C}$ の培養液に移すまでに試料温度が実験3よりもごく僅か( $1^{\circ}\text{C}$ 程度)高まった場合があったが、これも生存率を低下させる決定的条件とは考えにくい。実験2と3との間で明瞭に異なる処理、すなわち試料を最初に凍らせるときの温度がちがうことが影響しているのではなからうか。Luyet等の実験によれば、ゼラチンゼリーでは初凍後の温度が $-30^{\circ}\text{C}$ である場合に‘irruptive recrystallization’のおこる温度は $-10^{\circ}\text{C}$ 付近であるが、初凍結を $-100^{\circ}\text{C}$ で行なった場合には $-30^{\circ}\text{C}$ ですでにこれがおこる場合がある<sup>21)</sup>。蛙の血球の場合にも $-20^{\circ}\text{C}$ で初凍結し、次に $-60^{\circ}\text{C}$ に冷してから $-40^{\circ}\text{C}$ まで温めたときには、細胞はほとんど透明で未凍結のものと同じ様にみえるが、 $-40^{\circ}\text{C}$ で初凍結し、次に $-60^{\circ}\text{C}$ をへてまた $-40^{\circ}\text{C}$ まで温めると、細胞内に顆粒状の水が一面にあらわれる<sup>13)</sup>。おそらく最初の凍結温度の低いことが細胞原形質の凍りかたを変え、このようなとき原形質内にできた微小な氷晶は $-30^{\circ}\text{C}$ 付近の温度にあっても迅速に生長して大形の氷粒に変形できるのではあるまいか。実際に今回の実験でも腫瘍細胞の暗化温度を比較してみると、少なくとも凍結した腹水滴の周辺部を除けば、液体窒素中で初凍結させた細胞は $-25^{\circ}\text{C}$ より低温でも多数のものが暗化するのに対し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で初凍結させた細胞は $-25^{\circ}\text{C}$ 以上とくに $-20^{\circ}\text{C}$ 付近まで温められてはじめて暗化が著しくなる。

さて今までの知見からみて、細胞を超低温に急速に冷却すれば、それを急速融解後生かしておけることは期待されていたが、今回の実験で急冷却のときの凍結温度が $-30^{\circ}\text{C}$ 位であっても細胞が生存できた事実は意外なほど面白い。つまりこのような比較的高い凍結温度にあっても、細胞内にできた氷晶は、少なくとも1~2分間以内は、原形質構造を破壊しない程度に充分小形のままでいられると解釈できる。このような細胞内氷晶の生長(大形化)がその細胞にとって致命的となる温度をLuyet等のいう‘irruptive recrystallization’のおこる温度だと仮定

すれば、腫瘍細胞原形質の 'recrystallization temperature' は大体蔗糖其他の二または三糖類の溶液のそれ<sup>21)</sup>に近いことになる。

最近、酒井とその協力者等は、耐寒性の高い越冬期の植物組織（桑）をつかって急速冷却法による細胞の生存について詳細な実験を行ない、細胞内凍結によると思われる凍害は、 $-30^{\circ}\text{C}$  付近において最も急速にすすむことを見いだした<sup>26,27)</sup>。彼等はこの温度を急速冷却のとき植物細胞内にできた微氷晶が最も急速に生長できる温度であると考え、実際に  $-30^{\circ}\text{C}$  で急速冷却後5秒又は1分おいたクワの細胞中には氷晶のあととおもわれる空胞がみとめられることを電子顕微鏡下に明らかにした<sup>27)</sup>。今回の実験に使われた腫瘍細胞では、このような細胞内での氷の生長速度が最高となる温度がさらに高温域にずれているように思われる。

尚このように急速凍結融解させた腫瘍細胞をもととしてネズミの体内に累代移植を行なった腫瘍細胞の形態については著者の一人久田が別誌に発表しているが<sup>28)</sup>、それによるとこれらの細胞の染色体構成は凍結させない原腫瘍の細胞のそれと全く相異がなかった。この事実も本実験で行なった急速冷却による細胞内凍結が細胞の遺伝的性質に変化をあたえない程害が少なかったことを示している。

## V. 摘要及び結論

シロネズミの腹水肉腫 (MTK-肉腫 III) を使って、腫瘍細胞の非常に急速な凍結及び融解を行ない、その後の生存をたしかめた。

1. 腫瘍動物の腹水をごく微量カバーガラス上になすって腫瘍細胞層の単細胞をつくり、これを試料として凍結、融解及びこの過程での冷凍顕微鏡による観察を行なった。
2. 凍結させるために、試料を室温から急に液体窒素中にさし入れる方法——超低温急凍結——と、 $-30^{\circ}\text{C}$  の冷凍顕微鏡にセットして過冷却後自発凍結させる法——急凍結——の二つを行なった。融解には凍結している試料をできるだけすみやかに  $38^{\circ}\text{C}$  の McCoy の培養液にさし入れ、ふり動かして融かした。融かした腫瘍細胞を遠心して集め、ネズミの腹腔に移植し、その増殖を観察した。
3. 上記二つの凍結方法のちがいは、観察された凍結細胞の形態に本質的な変化をあたえない。 $-30^{\circ}\text{C}$  付近の温度で観察すると、ほとんどの細胞は凍結以前と同様に透明にみえる。加温につれてこれらの細胞は例外なく暗化するが、凍結試料の周辺部にある細胞では、それ以外の場所にあるものに比べて暗化する温度が高い。
4. 試料の腹水の層がやや厚いと急冷却の瞬間に細胞はわずかながら細胞外凍結をおこして収縮するが、その状態で例外なく透明に凍り、加温すればすべての細胞が暗化する。
5. 急冷却で透明に凍った細胞が暗化してゆく有様はゼラチンゼリー等でみられる 'irruptive recrystallization' とはやや異なり、細胞の表面が不規則に凸凹してきてこまかいしわや顆粒ができ、これが細胞内部にまで及んで暗化が完了する。また暗化のおこる過程で細胞は明らかに収縮する。
6. 上記の細胞の暗化が試料中の大多数の細胞におこる温度は試料の初凍結温度の影響をう

- け、はじめ液体窒素で凍らせた場合の方が、 $-30^{\circ}\text{C}$  で凍らせた場合よりも明らかに低い。いずれの場合も  $-20^{\circ}\text{C}$  以上では細胞の暗化は急速に完了する。細胞外にある凍結した腹水中の氷は  $-20^{\circ}\text{C}$  以上の温度ではじめてはっきりと変形する。
7. 以上の凍結融解の過程からみて、これらの細胞は明らかに細胞内凍結をおこしており、細胞内にできた多数のきわめて微小な氷晶が加温につれて顕微鏡でみとめられる程度の大きさに生長したため暗化がおこるものと解釈される。
  8. 暗化してしまった腫瘍細胞を更に温めて融解させると明瞭に崩壊する。
  9. 超低温急凍結させてそのまま 1~2 分後に急速融解させた試料、または顕微鏡下で急凍結させ、 $-30^{\circ}\text{C}$ ~ $-29^{\circ}\text{C}$  で観察後急速融解させた試料の腫瘍細胞を移植するとネズミは例外なく腫瘍死 (平均生存期間 18 日) をおこした。
  10. 超低温急凍結後  $-30^{\circ}\text{C}$ ~ $-28^{\circ}\text{C}$  の冷凍顕微鏡下で 1~2 分間観察してから急速融解させた腫瘍細胞を移植されたネズミは腫瘍死をおこさなかった。しかしこれらのネズミの腹水中には移植後 10 日間にわたって腫瘍細胞が観察された。
  11. 試料を  $-30^{\circ}\text{C}$  またはこれより高温で凍結させ、一旦透明に凍った腫瘍細胞の内部が暗化するまで加温してから急速融解し、これをネズミに移植してもネズミは健全でその腹水中には腫瘍細胞が全く発見できなかった。
  12. 以上の資料から液体窒素温度 (約  $-197^{\circ}\text{C}$ ) または  $-30^{\circ}\text{C}$  で非常に急速に冷却して透明な様式の細胞内凍結をおこさせた腫瘍細胞は生存しており、細胞内の氷晶がみとめられる程大形に生長する以前に急速に融解してしまえば、これらの細胞の少なくとも一部のものはネズミの体内で増殖する能力を保持していると考えられる。

## 文 献

- 1) Asahina, É. 1961 Intracellular freezing and frost-resistances in egg-cells of the sea urchin. *Nature*, **191**, 1263-1265.
- 2) Mazur, P. 1966 Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*, **2**, 181-192.
- 3) Asahina, É. 1956 The freezing process of plant cell. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **10**, 83-126.
- 4) Meryman, H. T. 1956 Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science*, **124**, 515-521.
- 5) Asahina, É. 1965 Freezing process and injury in isolated animal cells. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. 15, S-183-187.
- 6) Luyet, B. J. and Gehehio, P. M. 1940 Life and Death at Low Temperatures. *Biodynamica*, Normandy, Missouri, 341 pp.
- 7) Luyet, B. J. and Gehehio, 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 Thoennes, G. 1938 Démonstration des propriétés isotropiques de masses cellulaires vitrifiées à la température de l'air liquide. *C. r. Acad. Sc.*, **206**, 2002.
- 9) Luyet, B. and Rapatz, G. 1958 Patterns of ice formation in some aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 1-68.
- 10) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. I. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.
- 11) 朝比奈英三 1959 キクハガレセンチュウの耐凍性. 低温科学, 生物篇, **17**, 51-62.

- 12) 酒井 昭 1966 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. 低温科学, 生物篇, **24**, 1-13.
- 13) Rapatz, G. and Luyet, B. 1960 Microscopic observations of the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica*, **8**, 195-239.
- 14) Asahina, É. and Emura, M. 1966 Types of cell freezing and the post-thawing survival of mammalian ascites sarcoma cells. *Cryobiology*, **2**, 256-262.
- 15) 梅谷 実 1953 シロネズミの新腹水肉腫 (MTK-肉腫 III) の一般特性 (予報). 動雑, **62**, 416-420.
- 16) Tanaka, T. and Kanô, K. 1951 Cytological studies on cancer IV. General characters of the MTK-Sarcomas. New ascites tumors of rats produced by the administration of azo dye. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, Ser. VI, **10**, 289-301.
- 17) Nakahara, H. 1955 Transformation of spherical tumor cells of the MTK-sarcomas into unusual amoeboid forms. *Jap. J. Genet.*, **30**, 71-77.
- 18) Dorsey, N. E. 1940 Properties of Ordinary Water-Substance. Reinhold, New York, 466 pp.
- 19) Luyet, B. 1967 Various modes of recrystallization of ice. In *Physics of Snow and Ice* (H. Ôura, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, Part I, 51-70.
- 20) Luyet, B. 1967 On the possible biological significance of some physical changes encountered in the cooling and the rewarming of aqueous solutions. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (É. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 1-20.
- 21) Luyet, B. 1966 The problem of structural instability and molecular mobility in aqueous solutions "solidified" at low temperatures. *Biodynamica*, **10**, 1-32.
- 22) Jensen, A. B. 1942 Studien über die Kälteresistenz von Pflanzenzellen, *Protoplasma*, **36**, 195.
- 23) Luyet, B. J. and Thoenness, G. 1938 La reviviscence de fibres musculaires vitrifiées dans l'air liquide. *C. r. Acad. Sc.*, **207**, 1256.
- 24) Rapatz, G. and Luyet, B. 1959 On the mechanism of ice formation and propagation in muscle. *Biodynamica*, **8**, 121-144.
- 25) Kimura, Y. and Kikuchi, Y. 1961 Cytological studies of tumors, XXXVII. Chromosome conditions of animal tumors after deep freezing. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, Ser. VI, Zool., **14**, 576-588.
- 26) 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.
- 27) 大塚宏二・酒井 昭 1967 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. 低温科学, 生物篇, **25**, 21-28.
- 28) Hisada, Yohko 1967 Cytological studies of tumors. XLV. A chromosome study in lines of MTK-sarcoma III produced by the inoculation of rapidly frozen tumor cells. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, Ser. VI, Zool., **16**, 136-141.

### Summary

The possibility of innocuous intracellular ice formation in living cells by very rapid cooling was tested by the use of the tumor cells of MTK sarcoma III.

About 0.002 ml of the ascites containing tumor cells were dropped and smeared on a coverslip to form a monolayer of tumor cells. The freezing process of the ascites-drop prepared in this way was repeatedly observed on the stage of a special refrigerated microscope. In order to obtain the high rate of cooling, the coverslip with an ascites-drop was held with a forceps and immersed directly into liquid nitrogen. The ascites drop thus frozen was then transferred rapidly to the stage of the microscope at  $-30^{\circ}\text{C}$  to observe the frozen cells.

Immediately after transference, all the tumor cells in the ascites-drop appeared as transparent as intact unfrozen cells in ordinary transmitted light, except for a few cells in which flashing or black-out had taken place (PL. II). When they were gradually rewarmed, many tumor cells increasingly blacked out due to the intracellular formation of small ice crystals. In the central part of the frozen ascites drop the black-out in transparently frozen tumor cells invariably took place far earlier than at the edges.

When they were directly transferred from room temperature to the stage of the microscope at temperatures around  $-30^{\circ}\text{C}$ , the tumor cells also froze transparently (Pl. I). Upon rewarming, the process of black-out, i. e., intracellular recrystallization in these cells, appeared nearly the same as in cells rewarmed from the liquid nitrogen temperature.

Frozen ascites-drops containing tumor cells were thawed rapidly in physiological saline at about  $38^{\circ}\text{C}$ , and the functional survival of the frozen-thawed tumor cells was preliminarily determined by the same method as that described in our previous paper<sup>14</sup>). Of three rats receiving the injection of tumor cells frozen in liquid nitrogen and then thawed, one produced abundant newly-grown tumor cells in the ascites and died on the 19th day after the injection. In the other two rats a few tumor cells were found in the ascites on the 10th day, but thereafter the rats became healthy. This was also the case of rats injected with tumor cells frozen in liquid nitrogen or at  $-30^{\circ}\text{C}$  and rewarmed to about  $-28^{\circ}\text{C}$  and then thawed. No tumor cells were observed in the ascites of the rats injected with frozen-thawed tumor cells between  $-20$  and  $-25^{\circ}\text{C}$ .

In the next experiments a series of examination was made: (1). Tumor cells in ascites were rapidly frozen in liquid nitrogen and then rapidly thawed after 1 minute. The thawed tumor cells in saline were inoculated into 5 rats. (2). After the same freezing procedure as in experiment (1), tumor cells were transferred to the stage of the refrigerated microscope at  $-30^{\circ}\text{C}$ . Almost all of them were observed to be transparent. After 2 minutes, they were rapidly thawed. The final measurable freezing temperature of the ascites-drops was less than  $-28^{\circ}\text{C}$ . The thawed cells were inoculated into 5 rats. (3). Tumor cells in ascites were directly transferred from room temperature onto the stage of the microscope at  $-30^{\circ}\text{C}$ . The super-cooling of the ascites-drop was broken usually within more than ten seconds on the stage and instantaneous freezing of ascites was clearly observed under the microscope. Nearly all the tumor cells in the ascites-drop froze transparently. After 2 minutes, they were rapidly thawed. The final

measurable freezing temperature of the ascites-drops was about  $-29^{\circ}\text{C}$ . The thawed cells were inoculated into 4 rats. (4). After the same freezing procedure as described in experiment (3), the frozen ascites-drops were gradually rewarmed until intracellular recrystallization of ice was clearly observed in the frozen tumor cells. These cells were rapidly thawed and then were inoculated into two rats.

An abundant growth of tumor cells was observed in the ascites from all the rats in experiments (1) and (3) within about 10 days after inoculation, while in the ascites from the rats in experiment (4) no tumor cells were found. In the case of experiment (2), a few tumor cells were usually observed in the ascites from 4 of the 5 rats inoculated, during the first week after inoculation, but these tumor cells disappeared thereafter. The rats used in experiments (1) and (3) died 16 to 23 day after inoculation, while in experiments (2) and (4) no rats were killed by tumor growth.

These results suggest that some of the transparently frozen tumor cells are alive at temperatures below  $-29^{\circ}\text{C}$  at least for a few minutes. This type of cell freezing may be regarded as an intracellular freezing, since recrystallization of ice was invariably observed within the tumor cells during gradual rewarming.

## 図版説明

図版 I  $-30^{\circ}\text{C}$  で急凍結させた腫瘍細胞

1. 40秒間の過冷却後  $-30^{\circ}\text{C}$  で自発凍結した腹水試料。白い矢印は凍結した腹水滴の周縁を示す。 $-30^{\circ}\text{C}$ 。× 210
2. 1の右下部の拡大図。17分後  $-28^{\circ}\text{C}$ 。少数の細胞は暗化している。× 800
3. 1と同じ凍結試料中の中央部。26分後  $-28^{\circ}\text{C}$ 。× 800
4. 1と同じ凍結試料中の中央部。52分後  $-20^{\circ}\text{C}$ 。この温度では細胞の暗化が迅速にすすむ。× 800

図版 II 液体窒素中で急凍結させた腫瘍細胞。 $-30^{\circ}\text{C}$  に移して観察

5. 凍結試料の周辺部。凍結後10分  $-27^{\circ}\text{C}$ 。× 425
6. 凍結試料の中心部。 $-30^{\circ}\text{C}$  に移して1分後  $-30^{\circ}\text{C}$ 。× 800
7. 同じく4分後  $-29^{\circ}\text{C}$ 。× 800
8. 同じく8分後  $-28^{\circ}\text{C}$ 。× 800

## 図版 III 急凍結させた腫瘍細胞

9. II-6と同じもの、10分後  $-27.5^{\circ}\text{C}$ 。× 800
10. 同じく17分後  $-27^{\circ}\text{C}$ 。× 800
11.  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍らせた試料。液層がやや厚いので細胞外部に大形の氷塊ができ、細胞は脱水されてやや収縮したまま凍っている。凍結後2分  $-30^{\circ}\text{C}$ 。× 425
12. 同上の状態のものをゆっくり  $-18^{\circ}\text{C}$  まで加温したところ。すべての細胞が暗化する。従ってこれらの細胞は細胞内凍結をしていたことがわかる。× 425

## 図版 IV 液体窒素中で急凍結させた腹水滴の周辺部にある腫瘍細胞。× 800

13. II-6と同じ試料の周辺部。 $-30^{\circ}\text{C}$  に移して24分後  $-25.5^{\circ}\text{C}$
14. 同じく28分後  $-24.5^{\circ}\text{C}$
15. 同じく36分後  $-23^{\circ}\text{C}$
16. 同じく40分後  $-20^{\circ}\text{C}$

## 図版 V 急凍結させた腫瘍細胞の融解。× 800

17. IV-16と同じものを  $-8^{\circ}\text{C}$  まで加温したところ。細胞内の氷晶は少数の大形の氷塊にかわる。細胞外の氷も著しく変化する
18. 急凍結させた別の試料。 $-3^{\circ}\text{C}$  まで加温したところ。細胞は溶失したように不明瞭となり、細胞内にあった氷はそれぞれ1~2個の氷塊として認められる
19. 同上の6分後。融解直後の細胞。崩壊して大きくふくれ顆粒のみがはっきりする。左下方にまだ氷塊が残っている
20. ネズミからとりだしたばかりの未凍の腫瘍細胞。室温にて撮影









