



Title	超低温における植物組織の生存 VII : 耐凍性の低い植物細胞を超低温で生存させる方法
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 26, 1-11
Issue Date	1968-11-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17733
Type	departmental bulletin paper
File Information	26_p1-11.pdf



超低温における植物組織の生存 VII*

耐凍性の低い植物細胞を超低温で生存させる方法

酒 井 昭

(低温科学研究所 植物凍害科学部門)

(昭和 43 年 9 月受理)

I. 緒 言

前報¹⁻³⁾で述べたように、耐凍性の高い冬の木の枝の皮層細胞は、組織切片を媒液につけず、液体窒素中に急速冷却し、ついで 35°C の温水中で急速加温しても、すべての細胞が生存している。しかしこの組織切片をカバーガラスの間に水でマウントして急速冷却、急速加温するときにはすべての細胞が死ぬ。水のかわりに、組織切片をグルコースやジメチルスルフォキシド (DMSO) の 2M 溶液でマウントして急速冷却、急速加温したばあいには、すべての細胞が生存している^{2,4)}。ただしグリセロールに浸したばあいには、同じ方法で急速冷却、急速加温してもすべての細胞が死ぬ^{2,4)}。このように、急速冷却、急速加温のばあいにも、細胞を浸す媒液によって液体窒素処理後の生存率がかなり異なる。予備凍結法で植物組織をゆっくり冷却後超低温で生存させるためには、その植物組織が -70°C の凍結に耐えることが不可欠である⁵⁾。また媒液につけず植物組織を液体窒素中に急速冷却し、そこから取り出して 35°C の温水中で急速加温するばあいには、その細胞がすくなくとも -20°C の凍結に耐えることが必要である⁶⁾。しかし糖液につけて植物細胞を急速冷却、急速加温すれば、-5°C でいどの凍結にしか耐えない耐凍性の低い材料でも、この方法で超低温処理後生存させられるものと思う。

本論文は、急速冷却、急速加温の方法で植物細胞を超低温で生存させるばあいの溶質の凍害防御効果と、耐凍性の低い材料をこの方法で生存させる条件について調べたものである。

II. 材料と方法

実験材料としてクワ *Morus bombycis* Koidz. の冬の枝と春の開舒期の枝の皮層細胞を用いた。同一系列の実験には、同一の枝の同一の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用いた。細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た。組織切片は約 0.03 ml の各種媒液でカバーガラス (18×18 mm) の間にマウントするか、または組織切片を媒液に浸した後、媒液を濾紙で拭いさってから液体窒素中に入れて急速冷却した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 914 号

なお冷却速度および加温速度は 0.1 mm 銅コンスタンタン熱電対を用い、オシログラフで自記させて求めた。各温度で予備凍結するばあいには、 -5°C で凍結後、各温度までゆっくりと冷却し、各温度に 15 分間おいた。

溶質が細胞内に透過するか否かは、細胞を高調な水溶液中に 10 分間入れておいた後、原形質復帰しているか否かできめた。

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（等調の食塩と塩化カルシウム溶液を 9:1 の溶積比で含む）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。

III. 結 果

1. 耐凍性の高い細胞を媒液に浸して急速冷却，急速加温するばあい

耐凍性の高い冬の枝の皮層組織切片を各種溶質の 1.5 および 2 M 水溶液中に 10 分間浸したのち、カバーガラスの間にマウントして、室温から液体窒素中に入れて急速冷却し、2 分後に 35°C の温水中に入れて急速加温した。ポリエチレングライコールとポリビニールピロリドン (PVP) は各 20% 水溶液を用いた。なお用いた細胞の滲透濃度は 1.5 M であった。第 1 表に結果を総括して示す。

グルコースは等調溶液でも防御効果があるが、ラフィノース、マンニトール、イノシトールは等調溶液中ではその効果はかなり減少する。ポリエチレングライコールと PVP のそれぞれの 20% 水溶液中では、その防御効果はきわめて低く、1.0 M 平衡塩溶液ではその効果はまったく認められない。なお 0.5 M 溶液に浸したばあいには、どの溶質も効果を示さなかった。

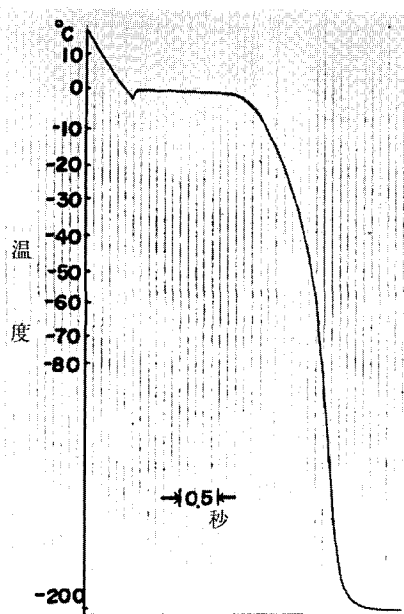
水と 1 M および 2 M グルコース溶液 0.03 ml をカバーガラスの間にマウントして室温から液体窒素中に入れて急速冷却したばあいの凍結曲線を第 1 図 (水) と第 2 図 (グルコース溶液) に示す。

水のばあいには約 0°C で凍結しているが、1 M グルコース溶液のばあいには 2 回の測定で、いずれも $-17\sim-18^{\circ}\text{C}$ まで過冷却後凍結した。2 M グルコース溶液では、凍結開始温度は 3 回の測定で -25 、 -28 および -29°C であった。なお 1 M 平衡塩溶液のばあいには 2 回とも約 -12°C で凍結を始めた。2 M グルコースのばあいには 1 M グルコースのばあいより、過冷却の破れたあとの凍結量がきわめて少ないのが特徴的である。

第 1 表 急速冷却，急速加温した細胞の生存率におよぼす各種溶質の影響
(昭和 43 年 2 月)

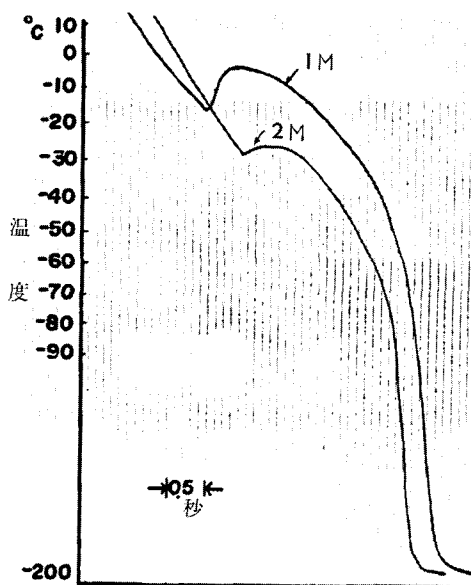
溶 質 の 種 類	生存率 (%)	
	2.0M	1.5M
グルコース	100	100
ラフィノース	100	40
マンニトール	100	70
イノシトール	100	60
ポリエチレン グライコール (20%)	20	
ポリビニール ピロリドン (20%)	20	
平衡塩溶液 (1M 溶液)	10	
水	0	

細胞の滲透濃度： 1.5 M
組織切片はカバーガラスの間に各溶液でマウントして、室温から液体窒素中に急速冷却し、 35°C の水中で急速加温した



第1図 水を急速冷却したばあいの凍結曲線

0.03 ml の水をカバーガラスの間にマウントして液体窒素中に入れた。オッシログラフで測定



第2図 1 M および 2 M グルコース溶液を急速冷却したばあいの凍結曲線

0.03 ml の 1 M および 2 M グルコース溶液をカバーガラスの間にマウントして液体窒素中に入れた。オッシログラフで測定

2. 耐凍性の低い細胞を急速冷却，急速加温するばあい

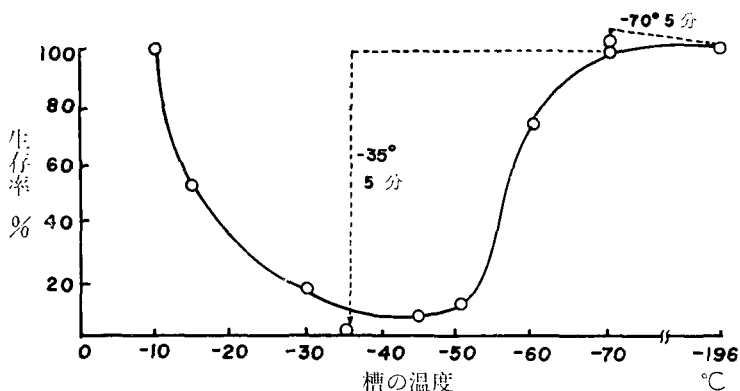
5月初旬のクワの枝の組織切片は -10°C での凍結にしか耐えないが，1.0 M グルコース溶液に浸したときは -20°C までの凍結に耐える。冬の材料とちがって，組織切片を媒液に浸して急速冷却，急速加温するばあいには，2 M のグルコース溶液に浸しても生存できない。しかし組織切片を1 M グルコース溶液でマウントしてから -5°C で予備凍結し，液体窒素中に急速冷却し，ついで 35°C の水中で急速加温したときには，全細胞が生存していた(第2表)。

第3図は組織切片を1 M グルコース溶液に浸し， -5°C で予備凍結後，各温度に冷やされたイソペンタン槽中に入れたときの生存率を示す。 -10°C のイソペンタン槽中に入れたとき

第2表 急速冷却，急速加温した細胞の生存率におよぼす糖の影響
(昭和43年5月8日)

	-5°C で予備凍結するまえに浸すグルコース溶液の濃度 (M)			
	0	0.5	1.0	1.5
生存率 (%)	0	40	100	100

組織切片をカバーガラスの間にグルコース溶液でマウントして急速冷却した。細胞の滲透濃度は0.85 Mである



第3図 耐凍性の低い細胞を1M グルコース溶液に浸し、 -5°C で予備凍結後、各温度のイソペンタン槽中に入れたばあいの生存率

材料：クワの枝の皮層細胞 (昭和43年5月8日)

条件： 35°C の水中で急速加温，組織切片をカバーガラスの間に0.03 ml のグルコース溶液でマウントして冷却

には加温速度に関係なく、すべての細胞が生存していた。また -14°C に冷やされたイソペンタン槽中に入れたときには急速加温したときの生存率が60%，空中でゆっくり加温したときのそれが40%で、生存率は加温速度によって少ししか変わらなかった。このことは細胞の運命が冷却中および -14°C の温度に5分間おかれる間にきまってしまうことを意味している。約 -50°C 以下の温度では、温度の低下につれて細胞の生存率は急速に高まり、 -70°C 以下のイソペンタン槽中に入れて急速冷却，急速加温したばあいには、すべての細胞が生存していた。しかし -70°C 以下のイソペンタン槽中に入れて急速冷却後、 -35°C の温度に5分間おいてから急速加温したものはすべて死んだ。なお、液体窒素中に入れた後、 -70°C に5分間おいたものは全細胞が生存していた。

5月中旬の開舒直前のクワの枝の皮層細胞は -7°C での凍結にしか耐えない。なお細胞の滲透濃度は0.8 Mであった。切り取った組織切片をピンセットでつまみ、室温から液体窒素中に入れて急速冷却し、ついで 35°C の水中で急速加温したが、すべての細胞が死んだ。しかし液体窒素中に入れて急速冷却する前にグルコース溶液に浸し、ついで媒液を拭いさってから急速冷却，急速加温するばあいにはかなりの細胞が生存していた。第3表に示すように等調溶液(0.8 M)より高調溶液の方がその効果は大きい。

第3表 媒液に浸さないで急速冷却，急速加温した細胞の生存率におよぼす糖の影響

(昭和43年5月22日)

	組織切片を浸すグルコース溶液の濃度 (M)				
	0	0.5	0.8	1.0	1.5
生存率 (%)	0	20	70	100	100

細胞の滲透濃度は0.8 Mである

第4表 急速冷却, 急速加温した細胞の生存率におよぼす各溶質の影響
(昭和43年5月16日)

溶質の種類 (1 M)	生存率 (%)	溶質の種類 (1 M)	生存率 (%)
グルコース	100	ジメチルスルフォキシド	50
サッカロース	100	エチレングライコール	30
エリスリトール	100	エチレングライコール→サッカロース*	80
ザイリトール	100	尿素	30
グリセロール	100	グリシン	10
ベタイン	100	ポリエチレングライコール (20% 溶液)	10
ラクトアミド	100	ポリビニールピロリドン (20% 溶液)	10
トリメチルアミン-N-オキシド	100	平衡塩溶液 (0.5 M)	10
メチオニンスルフォキシド	100	水	0

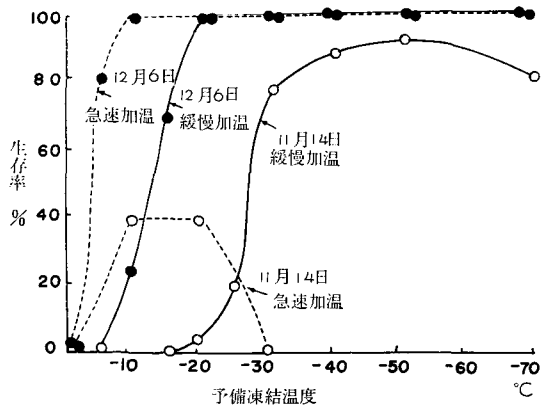
細胞の滲透濃度: 0.8 M

組織切片を室温で 20 分間各溶液中に浸したのち, カバーガラス上にとり, 媒液を充分拭いさって急速冷却, 急速加温

* 組織切片をエチレングライコールで処理してから, 媒液を拭い, 組織切片を 1 M サッカロース溶液に瞬間的に浸し, 媒液を拭って液体窒素中に入れたらいい

さらに急速冷却, 急速加温した細胞の生存率におよぼす各溶質の影響を 1 M 溶液を用いて調べた。その結果を第 4 表に総括して示す。なお, ポリエチレングライコールと PVP はいずれも 20% 溶液を用いた。DMSO, エチレングライコールは細胞内に透過したが, 他の溶質は細胞内に透過しなかった。なお, 冬の材料とちがって, 春の耐凍性の低い材料ではグリセロールは細胞内に透過しなかった。

緩慢凍結に対して凍害防御効果を有する溶質は, 平衡塩溶液を除いていずれも急速冷却, 急速加温された細胞の生存率を高めた。しかし細胞内に透過する DMSO とエチレングライコールの防御効果は, 細胞内に透過しない溶質の効果よりかなりわかった。また凍害防御効果の低い尿素, グリシン, ポリエチレングライコール, PVP の効果はきわめて低かった。なおエチレングライコールの 1 M 溶液中に 5 分間浸してから, 媒液を濾紙で拭い, 1 M のサッカロースに組織切片を瞬間的に浸して媒液をすみやかに拭いさり, 液体窒素中に入れたときは, エチレングライコールだけで処理したものより生存率がきわめて高かった。



第4図 予備凍結後, 液体窒素中に入れた細胞の生存率におよぼす加温速度の影響

組織切片をカバーガラスの間に水でマウントして予備凍結後, 急速冷却, 急速加温した

3. 予備凍結後, 急速冷却された細胞の急速融解の害

第5表 耐凍度の異なる細胞を液体窒素処理後生存させる条件

材料の耐凍度* (°C)	予備凍結法 (水につけたばあい)		急速冷却—急速加温法	
	急速加温 (35°Cの水中)	緩慢加温 (空 中)	媒液につけて 冷却するばあい	媒液につけないで 冷却するばあい
冬の最高の耐凍度 をもつ材料	-5~10°C で予備 凍結**	-20°C 以低で予 備凍結**	グルコース溶液で 処理**	室温からそのま ま**
-70		-30°C 以低で予 備凍結**	グルコース溶液で 処理**	室温からそのま ま**
-20			グルコース溶液で 処理後, -5°C で 予備凍結**	室温からそのま ま**
-10			グルコース溶液で 処理後, -5°C で 予備凍結**	グルコース溶液に つけ媒液を拭う**
-5				グルコース溶液に つけ, 媒液を拭い -5°C で予備凍 結**

材料: クワの皮層細胞

組織切片を水またはグルコース溶液につけて冷却するばあいには, カバーガラスの間にそれらの0.03 ml でマウントした

* 耐凍度の大きさは細胞外凍結の状態でも耐えられる最低温度で示す

** いずれも液体窒素に入れて急速冷却

冬の耐凍性の高いクワの枝の皮層細胞は, 水に浸して予備凍結してから液体窒素中に入れて急速冷却後, 急速加温するばあいには, -5°C で予備凍結した細胞でもかなり生存している。しかしゆっくりと加温するときには, -20°C 以下の温度で予備凍結することが必要である。11月中旬, 耐凍性はかなり高まっているが, まだ最高値に達していない材料では, -30°C 以下の温度で予備凍結後, 液体窒素中に入れ, ゆっくりと加温するときには大部分の細胞が生存している。しかし急速加温したときには生存率は非常に低く, しかも低い温度で予備凍結後, 液体窒素中に入れたものの方が生存率が低い。このことは, 耐凍性が最高値に達していないクワの皮層細胞では, -20°C 以下の温度で予備凍結した後, 急速加温すると融解の害が出ることを示している。

耐凍度のことなる細胞を液体窒素処理後生存させる条件を第5表に総括して示す。なお予備凍結法のばあいには, 組織切片を水につけて冷却するばあいのみについて記した。

IV. 考 察

1. 媒液に浸さない状態で急速冷却, 急速加温するばあい

冬の枝の皮層細胞を媒液に浸さないで急速冷却, 急速加温して液体窒素処理後生存させるばあいには, 約100,000°C/分以上の速さで冷却, 加温することが必要である⁷⁾。10月中旬のクワの枝の皮層細胞は-5°Cでの凍結にしか耐えない。この時期の細胞を同じ冷却および加温速度で処理してもすべての細胞が死ぬ。しかしこの時期の枝を0°Cで10日間Hardeningすると, 同じ条件で急速に冷却および加温しても, すべての細胞が生存している。なお, Hardening

した枝の皮層細胞は -20°C の凍結に耐えるようになる。また細胞内の糖含量は生重量当り約 80% 増加する。しかし含水量は処理によって変わらなく、生重量当り約 58% である。

また -10°C での緩慢凍結にしか耐えられない細胞はやや高調なグルコース溶液に浸し、その媒液を拭いさってから急速冷却、急速加温すればすべての細胞が生存している。このばあい、グルコースは細胞内に透過しない。高調溶液でなく等調のグルコース溶液で処理しても生存率は著しく高まる。等調溶液で処理したばあいには、細胞内の状態の変化はおこらないものと考えられる。

急速冷却、急速加温の方法で細胞を液体窒素に処理するばあい、細胞に害を与える 2 つの要因が考えられる。1 つは急速冷却中、細胞内にできると考えられる氷晶核が冷却および加温の過程で、細胞に有害になるまで生長するばあいである。他の要因は、組織氷点近くの比較的高い温度でおこると考えられる致命的細胞内凍結である。冬の材料、10 月中旬に Hardening した材料、および 1.0 M グルコース溶液で処理した材料のいずれの細胞のばあいにも、液体窒素中に入れて急速冷却し、ついで -30°C に 5 分間放置したのち急速加温したとき、またはゆっくり空中で加温したときには、すべての細胞が死んでいた。このことから考えて、急速冷却中に細胞内に細胞に害を与えない程度の微結晶ができていたものと考えられる。しかし耐凍性の高い材料でも低い材料でも、 -2°C から -60°C まで冷却するに要する時間は非常に短く約 0.07 秒であるので、Hardening しない細胞や糖液で処理しない細胞にだけ、氷晶核が細胞に有害となる大きさにまで生長するとは考えがたい。

したがって、冬と秋の材料、Hardening 処理前後、および 1 M 溶液処理前後における急速冷却、急速加温後の生存率のちがいは、組織氷点近くの比較的高い温度でおこると考えられる致命的細胞内凍結のおこりにくさに求めなければならない。実際、秋から冬にかけて、また秋に Hardening しても、細胞内凍結はおこりにくくなる⁸⁾。エチレングライコールで処理したばあいにも同様なことが認められている⁸⁾。グルコースも細胞内凍結をおさえる強い能力をもっていると考えれば、急速冷却、急速加温後グルコース処理した細胞の生存率が、無処理のものより高くなる理由は説明できる。しかし現在のところ、これを裏付ける事実はないので今後これを確かめたい。

等調のグルコース溶液で処理するよりも高調溶液で処理した方が生存率は高い。 -5°C での凍結にしか耐えない細胞では、やや高調のグルコース溶液で処理後急速冷却、急速加温しても細胞を生存させることはできない。こうした耐凍性の非常に低い細胞をこの方法で生存させるためには、あらかじめ糖液で処理し、媒液を拭ってから -5°C で予備凍結して細胞内の水の約 50%⁹⁾ を脱水してから急速冷却、急速加温することが必要である。

各種溶質の 1 M 溶液 (細胞の浸透濃度は 0.8 M) であらかじめ処理してから急速冷却、急速加温したばあい、溶質によって生存率が著しく異なる。DMSO とエチレングライコールを除けば、緩慢凍結に対して凍害防御効果の大きい溶質はいずれも生存率を著しく高める。このことは溶質によって細胞内凍結をおさえる能力に差があることを示しているものと考えられる。DMSO とエチレングライコールのように細胞内に透過する溶質はその効果が少ない。細胞を

エチレングライコールの1 M 溶液であらかじめ処理し、それが細胞内に透過して細胞が原形質復帰したことを確かめてから媒液を拭い、瞬間的に1 M 蔗糖溶液につけ、その媒液を拭って液体窒素中に急速冷却したときは、ほとんどの細胞が生存していた。この事実は細胞内に溶質が入ったことによっておこる細胞内の変化よりも細胞の表層の状態がより重要であることを暗示しているように思われる。耐凍性が低い細胞のばあいには、グリセロールは細胞内に透過しない。このばあいには、グリセロールは糖と同程度の効果を有する。なおこれらの実験では、細胞は液体窒素中に急速に入れ、そこに2分間おいてから急速加温しているのので、溶質の再結晶温度¹⁰⁾のちがいによる影響は考慮する必要がないものと思う。

2. 媒液に浸して急速冷却，急速加温するばあい

冬の耐凍性の高い皮膚細胞でも、0.03 ml の水でカバーガラスの間にマウントして液体窒素中に入れて急速冷却し、ついで急速加温したときにはすべての細胞が死ぬ。このばあい媒液としての水は $-1\sim-2^{\circ}\text{C}$ で凍結する。凍結後約1.5秒間 0°C を維持した後、急速に温度が低下し、 -20°C までの冷却速度は $33^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ 、 -60°C までのそれは $66^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ であった。このような凍結後の速い冷却速度では、媒液の水の凍結につづいて氷点下、比較的高い温度で致死的細胞内凍結がおこるものと考えられる。同じ材料を -5°C で予備凍結して細胞内の水を約50%⁹⁾脱水してから急速冷却、急速加温したときには、すべての細胞が生存していた。また組織切片を等調またはやや高調のグルコース溶液0.03 ml でカバーガラスの間にマウントして、室温から液体窒素中に急速冷却したばあいにもすべての細胞が生存していた。このばあい、低調な1 M グルコース溶液に浸したときにはほとんどすべての細胞が死ぬ。1 M と2 M グルコース溶液に浸したばあいの凍結曲線を比較すると、2 M グルコースのばあいには約 -30°C まで過冷却してから凍結を開始し、その後の凍結量も少ない。しかし1 M グルコース溶液のばあいには過冷却の破れる温度もより高く、約 -15°C で凍結後 -7°C まで温度が上昇する。もし媒液の濃度が同じで、過冷却の破れる温度が -17°C と -30°C のばあいには、媒液の凍結開始にともなって細胞内凍結をおこす機会は -30°C の方が多はずである¹¹⁾。しかし2 M グルコース溶液のばあいには細胞は原形質分離しているし、とくに原形質膜に接して濃厚な糖液の層でおおわれているので、媒液の凍結開始につづいて致死的な細胞内凍結をおこす可能性は少ないものと思われる¹²⁾。1 M 溶液のばあいには凍結開始後1秒以内に -7°C までリバンドしたのち、 -10°C まで冷却される。なお -7°C から -20°C までの冷却速度は約 $10^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ でかなり速く、媒液が充分濃縮されるまえに細胞が急速に冷却されるので、凍結につづいて -20°C まで冷却される間に致死的細胞内凍結をおこす危険があるものと思われる。なお、 -30°C 以低 -60°C までの冷却速度はいずれも約 $45^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ である。前報⁷⁾で報告したように、水でカバーガラスの間にマウントした冬の皮膚細胞を秒速 4°C 以上の速さで急速に冷却したときには、約 -20°C まで冷却されるまでに大部分の細胞が死んでしまう。凍結開始後 -10°C までゆっくり冷却するか、あるいは -5°C の温度にある時間おけば、以後の冷却速度は生存率にあまり影響を与えないことを前報⁷⁾で明らかにした。

もっと耐凍性が低い細胞でも、等調溶液に浸して -5°C で予備凍結後、急速冷却、急速加

温すれば、すべての細胞を液体窒素処理後生存させられる。これらの事実は、組織切片を媒液に浸して冷却するばあい、冷却速度が大きいときには、凍結開始につづいて致命的な細胞内凍結をおこす危険が大きい、糖液中で凍結するか、糖液に浸してから -5°C で予備凍結するばあいには、この危険が避けられることを示しているように思う。媒液につけて急速冷却するばあいには、いろいろの温度で冷却を中断して、冷却中のどの過程で害がおこるかを調べることは比較的容易であるので、この方法で被害のおこる温度範囲およびその原因を明らかにしたい。

春の耐凍性の低い細胞をカバーガラスの間に糖液でマウントし、さらに -5°C で予備凍結したばあいでも、また冬の細胞を2Mのグルコース溶液に浸したばあいでも、いずれもこれらの細胞を -70°C 以下のイソペンタン槽中に入れて急速冷却し、ついで -35°C の温度に移し、そこに5分間おいたばあいには、以後急速加温しても細胞はすべて死んでしまう。これらの実験も急速冷却中に細胞内に細胞に害を与えない程度の微結晶ができていたことを示している。

耐凍性が低くなるにつれて、急速冷却、急速加温の方法で液体窒素処理後、細胞を生存させることが困難となる。その原因は細胞内の水や糖の含量よりも、耐凍性の低い細胞では、致命的な細胞内凍結を防ぐ能力が著しく低下していることにその主因が求められるかもしれない。

-70°C までの緩慢凍結に耐える耐凍性の高い皮層細胞でも、細胞を水につけて -5°C で凍結し、 -25°C まで冷却後、 35°C の温水中で急速にとかすと融解の害を受けて死ぬ。したがって細胞を水に浸して凍結するばあいには、低い温度まで予備凍結してから液体窒素に入れた細胞を急速にとかすことはできない。

前報¹²⁾で述べたように、キャベツの細胞は水につけて -10°C で凍結したものを温水中でとかせばすべての細胞が死ぬが、糖液に浸したばあいには、 -70°C までの凍結にも耐え、 -30°C で予備凍結後液体窒素中に入れたばあいでも、さらに液体窒素から直接 30°C の温水中に入れて急速にとかしても、すべての細胞が生存していた。このように、糖溶液は著しい凍害防御効果をもっているし、また急速融解の害を防ぐ能力ももっている。したがって、耐凍性の低い細胞では、糖液に浸して -30°C 以下の温度までゆっくりと予備凍結してから液体窒素中に入れるばあいには、空中でとかしても温水中でとかしても、比較的容易に超低温処理後生存させられる。

V. 摘 要

春の萌芽期の耐凍性の低いクワの皮層細胞は、ゆっくり冷却するばあい、 -10°C での凍結にしか耐えなかった。しかし、1Mグルコース溶液に浸して -5°C で予備凍結し、 -70°C 以下のイソペンタン槽中に入れて急速冷却された細胞は、急速加温後全細胞が生存していた。また同じ時期の材料を1Mグルコース溶液に浸した後、媒液を拭って急速冷却、急速加温したときにも、すべての細胞が液体窒素処理に耐えた。 -5°C の凍結にしか耐えられない耐凍性のさらに低い細胞では、1Mのグルコース溶液に浸した後、媒液を拭って -5°C で予備凍結し、急速冷却、急速加温したとき液体窒素処理に耐えた。なお、糖、エリスリトール、ザイリトール、

ベタイン、ラクトアマイド、トリメチルアミン-N-オキサイド、メチオニンスルフォキサイドで処理し、急速冷却、急速加温したばあいも全細胞が生存していた。このばあい、ゆっくり凍結したとき凍害防御効果を示さない尿素、グリシン、ポリエチレングライコール、ポリビニールピロリドンで処理した細胞は急速冷却、急速加温後生存できなかつた。ゆっくり凍結するばあいには、 -20°C 以上の温度でかなり凍害防御効果を示す平衡塩溶液はこの方法では効果が認められなかつた。

急速冷却、急速加温の方法で液体窒素に処理するばあい、溶質によるこの防御作用の差は、媒液の凍結につづいて比較的高い温度でおこると考えられる致死的な細胞内凍結を防ぐ能力の差に帰せられるかもしれない。

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 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.
- 3) Sakai, A. 1966 Survival of plant tissue at super-low temperatures. IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol.*, **41**, 1050-1054.
- 4) Sakai, A. 1967 Survival of plant tissue at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. *In Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (É. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 119-130.
- 5) 酒井 昭 1967 超低温における植物組織の生存. V. 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係 2. 低温科学, 生物篇, **25**, 1-7.
- 6) Sakai, A., Ôtsuka, K. and Yoshida, S. 1968 Mechanisms of survival in plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. *Cryobiology*, **4**, 165-173.
- 7) 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.
- 8) 酒井 昭 1958 木本類の耐凍性増大の過程. II. 耐凍性増大と糖類および水溶性蛋白質との関係 (2). 低温科学, 生物篇, **16**, 23-34.
- 9) 吉田静夫・酒井 昭 1968 植物の凍害におよぼす融解速度の影響. II. 凍結状態での温度変動にともなう水の量の変化. 低温科学, 生物篇, **26**, 23-31.
- 10) Luyet, B. 1966 Various modes of recrystallization of ice. *In Physics of Snow and Ice* (H. Ôura, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 49-70.
- 11) Asahina, É. 1956 The freezing process of plant cell. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **10**, 83-126.
- 12) 酒井 昭 1961 植物細胞の凍害の機構. I. 凍害に対する媒液の影響 (1). 低温科学, 生物篇, **19**, 1-16.

Summary

Extremely hardy cells from winter twigs of mulberry tree can withstand rapid immersion in liquid nitrogen from room temperature and subsequent rapid rewarming in water at 35°C . The application of the rapid cooling and rewarming method for maintaining viability at super-low temperatures is limited to the hardy materials which, if cooled slowly, can resist freezing below -20°C . However, it was found that even the less hardy cells which could not resist slow freezing below -10°C could survive

immersion in liquid nitrogen and subsequent rapid rewarming, provided that they were previously treated with an isotonic or a slightly hypertonic glucose solution and were blotted to remove the glucose solution, before immersion in liquid nitrogen. The other solutes such as sucrose, erythritol, xylitol, betaine, lactoamide, trimethylamine-N-oxide, and methioninesulfoxide were found to give nearly the same protection as glucose to the cells against the injury caused by the rapid cooling and rewarming method.

In the tender cortical cells which cannot resist freezing above -5°C , it is necessary to prefreeze the cortical cells further at -5°C after treatment with an isotonic or a slightly hypertonic glucose solution for maintaining their viability in liquid nitrogen.

The protective action of these solutes may be attributed to the ability to prevent the fatal intracellular freezing in the treated cells following freezing of the medium in the process of rapid cooling.