



Title	急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 II
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo; 久田, 洋子 他
Citation	低温科学. 生物篇, 26, 61-70
Issue Date	1968-11-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17739
Type	departmental bulletin paper
File Information	26_p61-70.pdf



急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 II*

朝比奈英三

(低温科学研究所 生物学部門)

久田洋子

(北海道大学理学部動物学教室)**

(昭和43年9月受理)

I. 緒言

前報^{1,2)}においてシロネズミの腹水腫瘍の細胞を急速に凍結させると、凍結前の細胞と外見上かわりのないほぼ透明な細胞が得られ、しかもこれらの細胞は -30°C 付近の温度で少なくとも1, 2分間は生きていることを明らかにした。このような凍りかたをした細胞をゆっくり温めると、その内部に顕微鏡で認められる大きさの小氷晶があらわれてくるため細胞は暗化する。凍結細胞の暗化がはじまる温度はその細胞を最初に凍らせるときの温度により異なり、初めに液体窒素中で凍らせた細胞のほうが、初めに -30°C で凍らせた細胞よりも低い温度で暗化する¹⁾。細胞を -30°C 付近で最初に凍らせても、 -20°C より高温に温められると、細胞の暗化は非常に急速にすすむ¹⁾。逆に言えばこのような透明な凍りかたをした細胞は、 -20°C より低温では或る程度安定な凍結状態を保っていると思われる。

いっぽう従来³⁻⁵⁾の報告では、急速凍結させた細胞を生かしておくためには充分低い温度に保存する必要があると思われており³⁻⁵⁾、実際に急速凍結された植物(桑)の皮層細胞では -30°C 付近より高い温度では非常に短時間に致命的な害を受ける⁶⁾。そこで、もし急速凍結細胞の生存という事実が、このような透明な細胞の凍りかたと密接に結びついた現象ならば、急速凍結した腫瘍細胞を加温する過程で -30°C より高い温度になっても未だに透明なままで暗化しないうちに急速に融解すれば生存細胞が得られるはずである。本文はこのような考えから、 -30°C 付近で急速凍結させた腫瘍細胞をゆっくり加温する途中のいろいろな時点で急速融解してその細胞の生死をしらべた報告である。尚腫瘍細胞は通常の顕微鏡ではほぼ透明にみえるだけであるが、位相差顕微鏡を使えば内部構造がかなり識別できる。このことを利用して急速凍結前後の細胞の形態を図説した。

今回も前回の実験と同じく、北大理学部動物学教室の牧野佐二郎教授より実験材料の腫瘍をわけて頂いた。ここに記して厚く御礼申し上げる。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第920号

本報告に対して前報¹⁾を急速凍結融解された腫瘍細胞の生存. I. とする。

** 現所属 北海道大学歯学部口腔病理学教室

II. 材料と方法

材料：北海道大学理学部動物学教室に累代移植により保存されている MTK-肉腫 III と呼ばれるシロネズミの腹水腫瘍の細胞を使用した。細胞の一般的な記述は前報¹⁾にゆずるが、この腫瘍をもつネズミの生存日数は1968年3月現在で約12日である。

方法：移植後3日ないし5日にネズミの腹腔中よりガラスピペットで腹水を吸出し、カバーガラス上にごく微量(約0.002 ml)おとす。これを別のガラス片でなすと腹水中に浮遊している腫瘍細胞はきれいに一層にならぶ。このように作った腹水試料を乾燥を防ぐためシリコン油でうすくおおい特殊な冷凍顕微鏡¹⁾で観察した。尚細胞の生死を判定する実験の際はシリコン油を使わなかった。油層でおおわれぬ試料でも -30°C の空気中で十数秒以上の過冷却をすることは稀ではない。しかし露出した凍結試料は乾き易く、 -30°C 付近の温度では1時間以上、 -20°C では30分内外ではっきりした変化が認められる。約 -30°C に冷却してある冷凍顕微鏡のステージ上に試料を移すと通常十数秒ないし二、三十秒後に過冷却がやぶれ腹水の薄層は瞬間的に不透明となるのが肉眼でもわかる。凍結した試料をゆっくり温めながら細胞内におこる形態的变化を位相差顕微鏡装置を使用して観察した。試料の温度は腹水層をおおうシリコン油の中か、または直接腹水層にさし入れた小熱電対で測り、前置増幅器をつけた自動平衡記録計で連続自記させた。

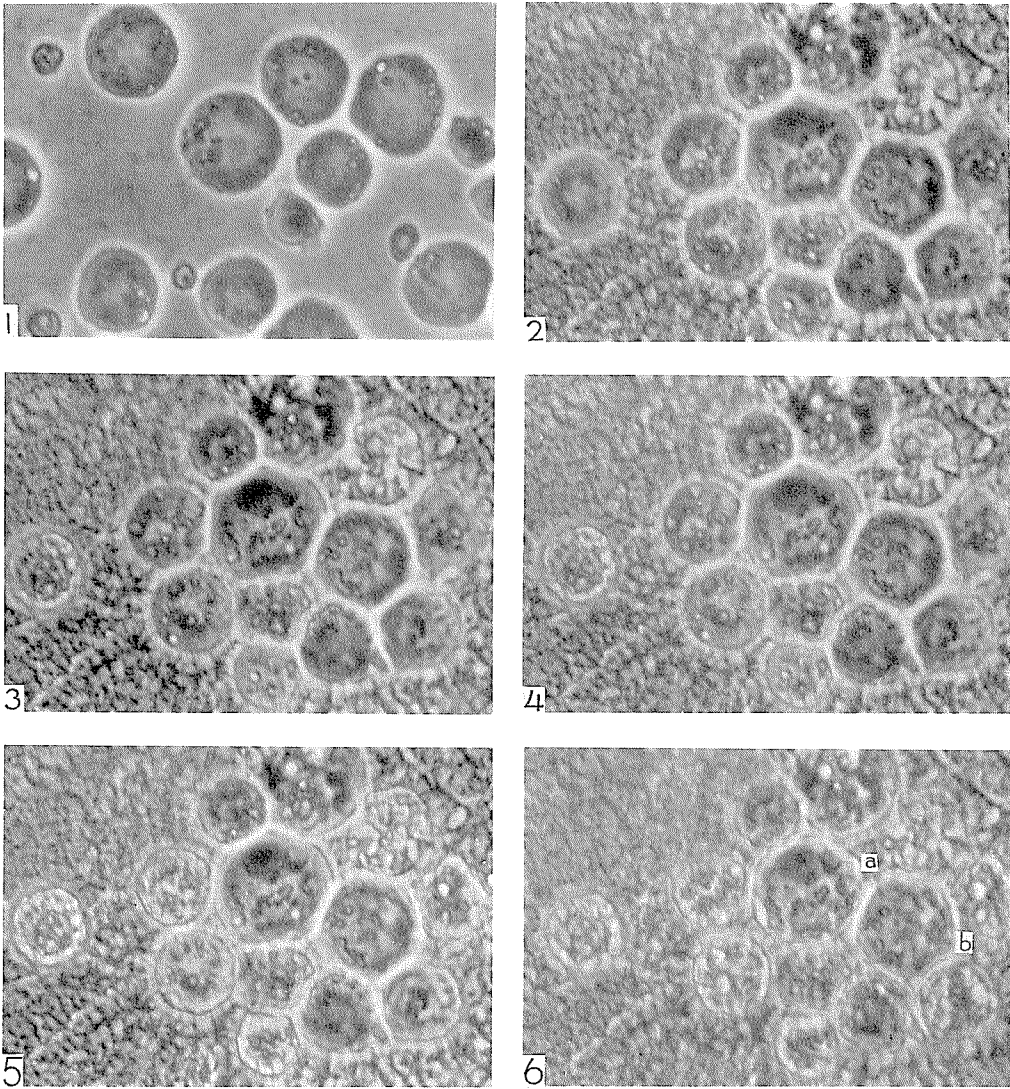
次に、このようにして急速凍結させた腹水試料を、おおよそ $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度でゆっくり加温しながら観察し、予定された温度まで温められたときに急に融解し、その中の腫瘍細胞の生死を判定した。融解には、予じめ培養液(NCTC 109 Medium)約30 mlを 38°C にあたためておき、冷凍顕微鏡のステージ上から試料をカバーガラスごと急にとり出して培養液中にさし入れ同時にふり動かして融かした。この液を遠心して細胞を集め、約0.2 mlずつの細胞浮游液をネズミの腹腔内に注入した。ネズミ1頭に対する凍結試料の数はそれぞれ2個である。これらのネズミから1日ないし3日おきに腹水を取り、醋酸ダーリヤ固定染色⁷⁾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ネズミを対照群として比較しながら細胞の形態と増殖過程を観察した。

III. 結 果

1. 細胞の凍結融解の過程

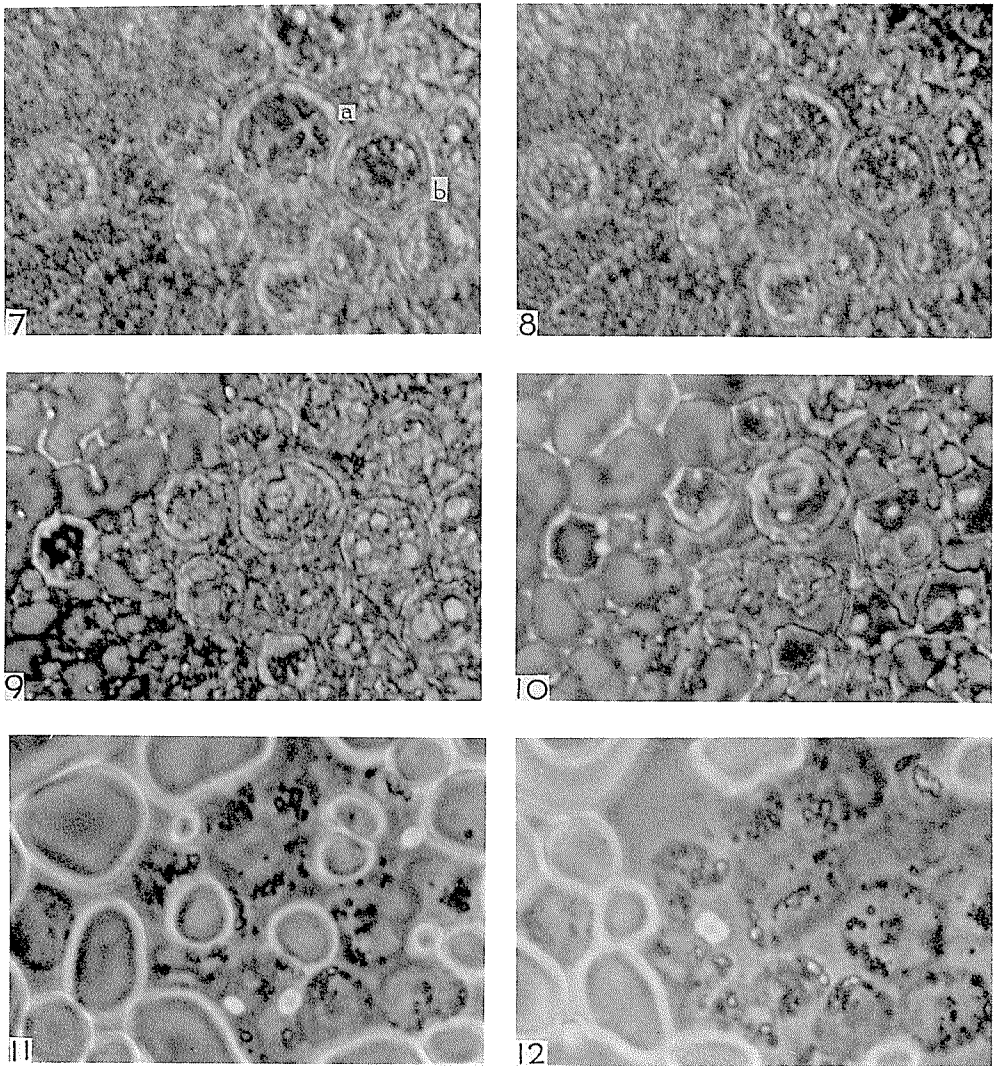
冷凍顕微鏡のステージに前記の方法で作った腹水試料をおいたとき、その試料は例外なく過冷却されるが、その過冷却状態は温度が -20°C 以上高ならばかなり安定していてゆっくり観察することができる。過冷却されている細胞は室温で観察したものと全く同じ形態で、細胞の中央部を占める大形の核の部分は明るくその内部に暗色の仁が1ないし3個みえる。また細胞の表面には比較的大形の顆粒が多数みとめられる(第1図1)。

-30°C 付近の温度で試料を観察していると、十数秒ないし数十秒後に過冷却がやぶれて試料は瞬間的に凍結する。凍結開始の時の潜熱の放出のピークが出た直後の試料の冷却速度を電



第1図 腫瘍細胞の急速凍結 ×800

1. 過冷却状態の細胞, -19.5°C
2. -30°C で急速凍結させた細胞, 凍結後9分, -29°C
3. 同じく15分後, -25°C
4. 同じく17分後, -24°C
5. 同じく23.5分後, -22°C
6. 同じく27分後, -21°C , 図の中央にある細胞 a とその右の細胞 b の内部に変化がはじまっている。



第2図 急速凍結した腫瘍細胞の融解 ×800

7. 第1図6と同じ視野, 29分後, -20°C , 細胞aは更に変化し, 細胞bの内
部にはすでに氷粒が認められる
8. 同じく30分後, -19.2°C
9. 同じく38分後, -12°C
10. 同じく41.5分後, -9.5°C
11. 同じく50分後, -4°C
12. 同じく51.5分後, -1°C

磁オシログラフで測定すると、 $-20\sim-25^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ 程度の値が得られた*。過冷却がやぶれた瞬間細胞の周囲の腹水がパッと暗化し樹枝状の凍結模様（いわゆる *irregular dendrite*⁹⁾）があらわれる。しかし細胞の形態は、1, 2 のこわれた細胞を除けばほとんど変化しない（第2図2）。このように凍った試料は $-29^{\circ}\sim-28^{\circ}\text{C}$ 付近に冷却してある限り少なくとも数十分間はほとんど変化が認められないが、 -25°C 付近までゆっくり温めると、いくつかの細胞の内部にはっきりと氷粒があらわれてくる（第1図3）。さらに加温してゆくとこのような氷粒を内部にもつ細胞は次第にふえ（第1図4, 5）、 -20°C 位になったときにはすべての細胞の内部に氷粒がみとめられる（第2図7, 8）。細胞の内部には、氷粒があらわれる直前にはじめて構造の変化が認められ（第1図6の細胞 a, b）、その後1~2分間で細胞内にはっきり氷晶があらわれる（第2図7, 8）。またこの過程で細胞は明らかに収縮し、その外縁は平滑でなくなる。 -20°C より高い温度になると、細胞の外側にある氷の移動再結晶（*Migratory recrystallization*⁹⁾）による大形化がはっきり認められ、同様に細胞内部の氷晶もすみやかに大きくなる（第2図9）。 -10°C 内外まで温められると細胞内部にみえていた氷粒が消失するため細胞の姿は一時不明瞭になるが（第2図10）、まわりの氷がさらに融解するとその位置に崩壊した細胞の姿があらわれる（第2図11）。 -10°C 付近の温度で細胞内の氷が消失するのは、細胞内の成分の凍結点がこれより低いためではなく、細胞内の氷が（恐らく一旦水の形になって）外部に移動したものと考えられ、Luyet のいう *Premelting recrystallization*⁹⁾ の一つの形式であろう。融解した細胞はその構造が全く破壊されて膨潤しているが、表面にみえていた顆粒はほぼ原位置に残っている（第2図12）。

2. いろいろの温度から急速融解させた細胞の生死

前述の観察では試料を -30°C から -20°C まで温めるときの速度を大体 $2\sim3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ にしてみたが、ほぼ -20°C 付近まで温められたときにそれまで透明にみえていた細胞のほとんどすべてに細胞内氷晶があらわれた。しかし同じ様に急速凍結させた細胞を約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の加温速度で観察すると、 -20°C 付近まで温められた直後にはまだ透明な外観を保っているものが必ずいくつか残っている。そこでこれらの細胞の生死をしらべるために次の様な実験を行なった。冷凍顕微鏡を使って約 -30°C で試料を急速凍結させ、これを観察しながらゆっくり（約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ）加温して、 -28°C より -18°C まで 2°C おきにとった予定温度にそれぞれ達したとき急速融解した。融解された細胞をネズミの腹腔にそれぞれ移植してその後の増殖を観察した結果はまとめて第1表に示す。

第1表の実験 I より実験 IV までの場合は凍結細胞を温めて融解予定温度（ $-28^{\circ}\sim-22^{\circ}\text{C}$ ）に達したとき少なからぬ数の細胞がほぼ透明な外観を保っていた。実験 V においても -20°C に達した直後はまだ透明な細胞がいくつか認められ、実験 VI で -18°C に達したときでさえ暗化しない細胞が全くないわけではない。しかし $-20^{\circ}\sim-18^{\circ}\text{C}$ の温度では1~2分以内に氷粒がはっきり細胞内にあらわれる。

* 島田未発表

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

実験番号	処 理	ネズミ 記 号	移 植 後 の 日 数			移植後のネズミ の 生 存 日 数
			2	5	11	
I	-30°C 凍結 加 温 -28°C 融解	a	<0.3 (+)*	5.34 (++)	>80 (++)	24
		b	0.41	7.82 (++)	>80 (++)	21
		c	<0.3	4.27 (++)	>80 (++)	14
		d	0.38	6.94 (++)	>80 (++)	18
		e	<0.3	2.80 (++)	>80 (++)	27
II	-30°C 凍結 加 温 -26°C 融解	a	<0.3	0.84 (+)	>80 (++)	14
		b	<0.3	2.84 (++)	>80 (++)	14
		c	0	5.13 (++)	>80 (++)	14
		d	0	5.50 (++)	>80 (++)	14
		e	0	3.15 (++)	>80 (++)	19
III	-30°C 凍結 加 温 -24°C 融解	a	0	3.53 (++)	>80 (++)	19
		b	<0.3	15.52 (++)	>80 (++)	14
		c	0	8.19 (++)	>80 (++)	18
		d	0	3.56 (+)	>80 (++)	18
		e	<0.3	1.73 (++)	>80 (++)	18
IV	-29°C 凍結 加 温 -22°C 融解	a	<0.3	<0.3 (+)	>80 (++)	16
		b	<0.3	<0.3 (+)	>80 (++)	23
V	-29°C 凍結 加 温 -20°C 融解	d	<0.3	0.75 (+)	>80 (++)	25
		e	0	0		
VI	-29°C 凍結 加 温 -18°C 融解	a	0	0	0	(27日後も全 く腫瘍細胞を 認めず)
		b	0	0	0	
		c	0	0	0	
		d	0	0	0	

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

第1表に明らかなように実験 I~IV において凍結融解後の細胞を注入されたネズミは例外なくその腹腔中に腫瘍細胞の増殖がおり、14日ないし27日後には腫瘍死をおこした。実験 V の場合は同じ処理をした細胞を植えられたネズミ 2頭のうち1頭のみ致命的な腫瘍ができたが、他の1頭には腫瘍が全く認められなかった。実験 VI では融解された細胞を移植された4頭のネズミはいずれも健全で少なくとも3カ月以上生存し、その体内には全く腫瘍細胞が発見できなかった。これらの結果から -30°C 付近の温度で急速凍結された腫瘍細胞には 1°C/分 程度の加温速度で -20°C 付近にあたためられるまでは生存できるものがあり、このと

き細胞の正常な形態とその生死との間には密接な関係があると考えられる。すなわち凍結細胞の外観が凍結前とかかわらぬほぼ透明な状態を使っている間はその細胞は生存しており、その内部に顕微鏡で認められる程度の氷粒があらわれたときにはもはやその細胞は致命的な害をうけているとみてよいであろう。

急速凍結融解後の腫瘍細胞のネズミ腹腔中における増殖の速度は、凍結時間がごく短いとはいえ、細胞外凍結の状態では保有してあった腫瘍細胞の場合¹⁰⁾に比べて決して低いものではない。

IV. 考 察

シロネズミの腹水肉腫の腫瘍細胞を液体窒素中または -30°C の空气中で急速に冷却すると媒液は瞬間的に樹枝状の模様をあらわして凍結するが、細胞の外見は凍結前とほとんど変わらずほぼ透明にみえていて、これをゆっくり温めるとはじめて細胞の内部に小氷粒が多数あらわれて細胞は暗化する¹⁾。これは Rapatz と Luyet が蛙の血球でみた場合と¹¹⁾同様な現象で、はじめの急速冷却のときに細胞内に多数の微氷晶ができ、その氷晶の個々の大きさが光の波長よりはるかに小さいため細胞への光の透過を妨げないので細胞は透明にみえるものと考えられる。そしてゆっくり温めるとこれらの微氷晶は移動再結晶をおこし、顕微鏡でみえる大きさの氷粒となって細胞内にあらわれるのであろう^{1,11)}。急速凍結の場合に細胞内にできる微氷晶を細胞の生存に無害なほど充分小さくさせるために、はじめの凍結速度を非常に大きくし、また凍結温度も甚だ低くすることが必要であるかのようにみえる。蛙の血球の場合は -150°C に急速冷却した場合も正常の細胞と同じ形態のものは得られず細胞の内部に（恐らく氷の存在のために）粒状の模様があらわれる¹¹⁾。そして媒液に予じめグリセリンを加えた場合に、はじめて急速冷却によって正常血球と同じ透明な外観のものが得られたが、生存はたしかめられなかった¹¹⁾。ところがネズミの腫瘍細胞の場合は、その細胞の本来の媒液である腹水中に浮遊させたまま急速冷却すれば正常な形態の凍結細胞が得られ、しかも凍結温度が -30°C より高くなってもこのような特殊な凍結状態が安定している点に特徴があると言えよう。

今回の実験では位相差顕微鏡を使ったため細胞の内部の変化が前報の場合¹⁾よりややくわしく観察できた。急速凍結をした直後の細胞の内部は過冷却状態にある場合とほとんど同じようにみえるが、これを温めてゆくと細胞内に氷粒があらわれる直前になって急に細胞内部の模様がうごきはじめ、 -20°C 付近の温度では1~2分後にはここに 1μ 位の大きさの氷晶がみとめられる（第1図6, 第2図7, 8）。又すでに前報¹⁾で指摘したようにこの変化の過程で細胞の外形は明らかに収縮する。これらの事実は急速凍結された細胞原形質の凍結状態が相当に安定しており、細胞内に顕微鏡で認められる程度の氷粒があらわれる直前までは細胞内の微氷晶は著しい生長をせず、従ってこれにもとづく原形質構造の崩壊はおこらないであろうことを示している。急速凍結された腫瘍細胞をくりかえし観察した結果、このような細胞内の変化——氷晶の出現、細胞の暗化——は -20°C 位まで温められると始めてごく急速におこることがわかった。このような温度は Luyet 等が急速凍結させた各種の有機化合物溶液でしらべているい

わゆる再結晶温度 (Recrystallization temperature⁹⁾) と質的に同じものとみてよいであろう。

-20°C 付近における細胞内微氷晶の著しい生長が原形質構造の崩壊即ち細胞の死を意味するという想定はこれらの凍結細胞の生死を判定することによって更に確かめられた。すなわち約 -30°C で急速凍結された細胞がたしかに透明な凍りかたをしていることを観察しながらこれを加温する過程で -28°C より -18°C までのいろいろな温度から急速融解してネズミに移植してやると、-20°C 以下の温度から融解された場合は例外なく、移植された腫瘍細胞は増殖できた。

いっぽう大塚・酒井等は冬の桑の皮層の組織切片を使って急速冷却融解による細胞の生死をしらべ、-30°C で急速凍結された細胞は 30 秒以内に全滅することをたしかめ、同時にこの温度では 5 秒間に 0.1 μ 内外か又はさらに小さい氷晶が原形質中にあらわれ、この氷が 10 分以内に 1 μ 以上の大きさの氷粒に生長することを電子顕微鏡的に明らかにした¹⁰⁾。われわれの腫瘍細胞の場合には -30°C で急速凍結後 -20°C まで 10 分かかってゆっくり加温しても、いまだに暗化せず透明にみえている細胞がある。もしこれらの細胞中にさしわたし 0.5 μ 程度の大きさの氷晶があれば可視光線の透過は当然妨げられて暗くみえる筈であるから、これらの細胞中にある氷晶の大きさは 0.5 μ よりも小さいと考えてよいであろう。従って急速凍結させた細胞の中にできた微氷晶が生長して細胞にとって致命的となる大きさは少なくとも 0.5 μ 以下であろうと思われる。

植物 (桑) の細胞の場合に比べてネズミの腫瘍細胞では、急速凍結によってその内部にできた微氷晶が致命的な大きさにまで迅速に成長できる温度がはるかに高いようにみえる。つまり一旦原形質内にできた氷の微結晶が移動再結晶をおこして大形の氷粒になることを困難にさせるような何等かの条件がこの腫瘍細胞内にそなわっているらしい。このような条件がいかなるものがあるかは今後明らかにされるべき甚だ興味ある問題である。

V. 摘要及び結論

シロネズミの腹水腫瘍の細胞を使って、急速冷却による特殊な細胞内凍結特に細胞内での移動再結晶温度と細胞の生死との連関について観察した。

1. 腫瘍動物の腹水をごく少量 (約 0.002 ml) カバーガラスの上になすって腫瘍細胞の単細胞層をつくり、これを試料としてカバーガラスごと冷却加温を行ない、また位相差顕微鏡による凍結中の細胞の観察を行なった。
2. 凍結の方法は約 -30°C に冷却してある空気中で冷凍顕微鏡のステージにのせ、自発的に過冷却のやぶれるのを待った。この方法で凍結開始直後の冷却速度は 20~25°C/秒 程度である。
3. 凍結の瞬間細胞のまわりの媒液 (腹水) には樹枝状の模様があらわれるが、その中にある細胞はほぼ透明のまま内部の形態は過冷却状態のときと変わらない。
4. このようにほぼ透明にみえる細胞の凍結状態は -28°C 付近の温度ではかなり安定していて、少なくとも数十分間は変化が認められない。

5. これらの凍結細胞をゆっくり加温すると、 -25°C 付近でいくつかの細胞の内部に小氷粒があらわれ、 -20°C を越えるとすべての細胞の内部に氷粒がみとめられる。
6. 細胞内に氷粒があらわれる直前になってはじめて細胞の内部形態の変化がはじまる。
7. -10°C 以上に温められると細胞内部にあった氷粒が消失するため細胞の形は一時不明瞭になるが、更に温められてまわりの氷が融解するともとの位置に崩壊した細胞の姿があらわれる。
8. -30°C 付近で急速凍結させた試料を約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で加温し、それぞれ -28°C より 2°C をきに -18°C までの予定された温度に達したとき、予じめ 38°C に温めてある培養液 (NCTC 109) 中に急に移動して融解させ、その中の細胞をネズミの腹腔にそれぞれ移植した。
9. -22°C 以下の温度から急速融解された細胞を移植されたネズミ 17 頭は例外なく腫瘍死をおこした。
10. -20°C まで温めてから融解された細胞を移植されたネズミ 2 頭のうち 1 頭は腫瘍死をおこした。のこりの 1 頭と、 -18°C まで温めてから融解された細胞を移植されたネズミ 4 頭はすべてその腹腔中に腫瘍細胞があらわれなかった。
11. これらの結果から急速凍結によって得られた外見の正常なほほ透明にみえる細胞は生存しており、この内部にあるごく微小な氷晶が、細胞の暗化をおこす程の大きさ ($0.5\ \mu$ 内外) 以上に生長するとき原形質の構造はこわされ細胞は殺されるのであろう。
12. このような細胞内微氷晶の生長は恐らく移動再結晶によって行なわれものと思われるが、これがすみやかに進行する温度はネズミの腫瘍細胞の場合は -20°C 以上である。

文 献

- 1) 朝比奈英三・久田洋子・江村牧人 1967 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存. 低温科学, 生物篇, **25**, 81-95.
- 2) Asahina, É., Hisada, Y. and Emura, M. 1968 Microscopic observations of innocuous intracellular freezing in very rapidly cooled tumor cells. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B, 15**, 36-50.
- 3) Luyet, B. J. and Gehenio, P. M. 1940 Life and Death at Low Temperatures. *Biodynamica*, Normandy, Missouri, 341 pp.
- 4) 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.
- 5) Doebbler, G. F., Rowe, A. W. and Rinfret, A. P. 1966 Freezing of mammalian blood and its constituents. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 407-450.
- 6) 酒井 昭・吉田勝夫 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.
- 7) Makino, S. 1957 The chromosome cytology of the ascites tumors of rat, with special reference to the concept of the stemline cell. *Internat. Rev. Cytol.*, **4**, 25-84.
- 8) Luyet, B. and Rapatz, G. 1958 Patterns of ice formation in some aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 1-68.
- 9) 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.
- 10) 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.

- 11) Rapatz, G. and Luyet, B. 1960 Microscopic observations of the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica*, **8**, 195-239.
- 12) 大塚宏二・酒井 昭 1967 急速冷却した植物細胞内のできる氷の電子顕微鏡的研究. 低温科学, 生物篇, **25**, 21-28.

Summary

In our previous work^{1,2)} it was reported that very rapidly frozen tumor cells can survive intracellular freezing. The cells thus frozen appear to be as translucent as intact unfrozen ones. These, however, increasingly darkened as a result of intracellular recrystallization of ice during slow warming. In the present paper a relation between the recrystallization temperature of intracellular ice crystals and survival in rapidly frozen tumor cells is reported using MTK sarcoma III, an ascites sarcoma of rat.

A small volume (about 0.002 ml) of the ascites containing tumor cells was dropped and smeared on a coverslip to form a monolayer of tumor cells. The ascites droplets on the coverslips prepared in this manner were frozen on the stage of a refrigerated microscope at about -30°C , where the rate of cooling of the droplets was about 20 to 25°C per second immediately after spontaneous freezing. Upon freezing an irregular dendritic pattern instantly appeared in the ascites layer surrounding tumor cells. On the other hand, tumor cells remained translucent in appearance as seen in intact unfrozen ones (Fig. 1, 1 & 2). With slow rewarming the intracellular growth or recrystallization of ice in these translucent frozen cells occurred slowly at about -25°C and promptly at temperatures above -20°C (Fig. 1, 3 & Fig. 2, 7, 8). A change in the pattern of internal structure of the frozen cells, observed under a phase contrast microscope, only took place immediately before the time of formation of visible ice crystals in the cell.

Numerous ascites droplets containing tumor cells were separately frozen in the same manner as described above. These were then rapidly thawed in warmed saline from various temperatures between -18 and -28°C in the course of slow rewarming. During the process of freezing and rewarming, all ascites droplets were under microscopic observation. The tumor cells frozen and thawed in this manner were inoculated into rats. A remarkable growth of tumor cells was observed in the ascites from all rats inoculated with tumor cells which were obtained by thawing from temperatures ranging from -22 to -28°C . No tumor cells were found in all four rats inoculated with tumor cells thawed from -18°C . Of the two rats inoculated with tumor cells which were thawed from -20°C , one succumbed to tumor growth, while the other bore no tumor cells.

These results suggest that rapidly frozen tumor cells can survive intracellular freezing even at relatively high sub-zero temperatures as long as they remain translucent in appearance. A fatal darkening or recrystallization of ice in the translucent frozen tumor cells seems to occur promptly at temperatures above -20°C .

低温科学生物篇 第26輯 訂正

頁	行	誤	正
英文目次	上から 5	Aakira	Akira
"	上から 18	npon	upon
16	第3表の 7	血精	血清
17	下から 6	長瀬	永瀬
18	上から 8	血精	血清
18	上から 11	血精	血清
18	上から 12	血精	血清
27	上から 3, 4	真冬と春さきおよび…… ……各凍結温度	真冬に 20°C で1週間 dehardening した前後 および真冬と春さき に、各凍結温度……
65	上から 1	-20~-25°C	20~25°C
65	上から 3	(第2図2)	(第1図2)
65	下から 14	2~3°C/分	1°C/2~3分
67	上から 2	かかわらぬ	かわらぬ
67	上から 2	使っている	保っている
69	上から 18	行なわれもの	行なわれるもの
74	第2表脚註	翅	翅
78	上から 2	脊走筋	背走筋
78	下から 11	脊面	背面
78	下から 19	脊面	背面
85	下から 4	快復	回復
88	上から 8	神経感覚器管	神経感覚器官