HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	急速凍結融解された腫瘍細胞の生存　III
Author(s)	朝比奈, 英三; 島田, 公夫
Citation	低温科學. 生物篇, 27, 41-45
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17749
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p41-45.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Éizo ASAHINA and Kimio SHIMADA 1969 Temperature of Instability in Rapidly Frozen Living Tumor Cells. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 27.*** (With English Summary p. 45)

急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 III*

急速凍結した原形質の安定度

朝比奈英三・島田公夫
(低温科学研究所)

(昭和44年8月受理)

I. 緒　　言

すでに前報でのべたように，シロネズミの腹水腫瘍の細胞を液体窒素中又は −30°C の温度で急速に凍らせると，細胞への光の透過を全く妨たげぬ程微小な細胞内氷晶が生じ，このような凍り方をした細胞は急速に融解されると生存している[1]。またこのような凍結細胞はゆっくり加温してゆくと，−20°C 付近の温度に達するまでは明らかに生存していた[2]。

そこでこのような特殊な細胞内凍結の状態がどの程度に安定しているかを知るために，−15°C ないし −30°C の温度範囲で，凍結細胞の生死と凍結時間との関係をしらべてみた。

今回も実験材料は北大理学部動物染色体研究施設の牧野佐二郎教授の御好意によりわけて頂いた。又久田洋子博士（現所属：北大歯学部口腔病理学教室）より腫瘍細胞の取扱いについて色々教えて頂いた。ここに記して厚くお礼申し上げる。

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肉腫の細胞を使用した。この腫瘍をもつネズミの生存日数は，1969 年現在 10 日内外である。

方法： 腫瘍細胞を移植後 3 日ないし 5 日目にネズミの腹腔中よりガラスピペットで腹水を吸出し，カバーグラス上にごく微量（約 0.002 ml）とり，これを別のカバーグラスでなすって浮遊している腫瘍細胞の単細胞層を得た。こうして作った試料を予じめ低温槽内で所定の温度に冷却してある充分な量の低粘度シリコン油** を充したコップの中に急速にさし入れて凍結させた。この処理によって試料の腹水滴は，−15°C，−20°C 及び −30°C のシリコン油中で，それぞれ 1.5～3.0 秒，1 秒及び 0.5 秒以内に凍結した。この際の温度変化は腹水滴中に微小な銅コンスタンタン熱電対を挿入して測定し，オッシログラフで自記させた。又冷却速度は第 1 表に示したものを含めてすべて試料の凍結直後のものを記した。細胞の凍結が進行中，その初期における冷却速度が主として細胞の凍結様式を左右するからである。

これらの凍結した試料をそれぞれ所定の時間だけ一定温度に保った後，約 30 ml の約 38°C

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 1001 号

** 信越化学製，KF 96, 2 cstks.

に温めてある培養液 (NCTC 109) 中に急速に移して融解させた。融解させた細胞は遠心して集め，その細胞の浮遊液を約 0.2 ml ずつ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 日おきに腹水をとり，醋酸ダ

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	凍結 温度 (℃)	凍結 時間 (分)	冷却速度	ネズミ記号	移植後の日数 3	5	7	10	12	17	ネズミの生存日数
I	−30	1	14–30℃/秒	a	1.2	14.3	−	>80	−	−	12
				b	+[1]	29.4	−	−	90.3	−	18
II		60		c	0	+	8.5	61.8[2]	93.4	−	13
III		600		d	0	+	1.6	10.8[2]	82.9	−	17
IV		1440		e	0	0	0	0	0	0	−
V	−20	1	13–18℃/秒	f	1.0	12.4	69.3	−	97.6	−	16
				g	+	4.8	−	>80	−	−	12
VI		10		h	0	0	0	0	0	0	−
				i	0	0	0	0	0	0	−
				j	0	0	0	0	0	0	−
				k	0	0	0	0	0	0	−
VII	−18	1		l	+	7.6	66.5	−	88	−	13
				m	+	49.5	81.4	−	90.5	−	16
VIII		10		n	0	0	0	0	0	0	−
				o	0	0	0	0	0	0	−
				p	0	0	0	0	0	0	−
				q	0	0	0	0	0	0	−
IX	−15	1	約 5℃/秒	r	0	0	0	0	0	0	−
				s	0	0	0	0	0	0	−
				t	0	0	0	+	78.5[3]	95.9	24
X		10		u	0	−	−	−	90	−	13
				v	0	0	0	0	0	0	−
				w	0	−	−	88	95	−	13
				x	0	−	−	93	92	−	13
XI	−30℃までゆっくり凍結し，さらに30分おいた		0.4℃/分	y	0	0	+	37.1	86.7	−	23
				z	0	0	+	1.1	1.1	90.4	20
対照	不凍			A	82.5	−	−	−	−	−	11
				B	92.5	−	−	−	−	−	12

[1] 1% 以下；[2] 移植後 9 日目；[3] 移植後 15 日目

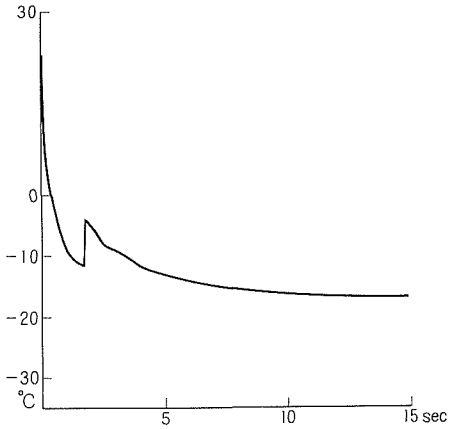
ーリヤ固定染色による押しつぶし法[3]により標本をつくり，未処理の腫瘍細胞を移植されたネズミを対照群として比較しながら腫瘍細胞の形態と増殖過程を観察した。

また同様な方法で作った試料を特殊な冷凍顕微鏡[4]を用いて観察し，−10°C ないし −30°C の各温度で凍結細胞の形態とくに細胞内における微氷晶の出現及び生長の過程をしらべた。

III. 結　　果

実験の結果は第1表に総括して示した。ここでも前報[1,2]と同様に，ネズミの腹腔中に移植すれば増殖できる腫瘍細胞は移植前において少なくとも生存していたものと想定して記述をすすめる。

−30°C で急速凍結された細胞の状態はこの温度では非常に安定していて，少なくとも 10 時間は生存できるものがある。ところが凍結されている温度が −20°C 又は −18°C になると，何れも凍結後1分間は生存できるが，10 分以内に全滅してしまう。さらに凍結温度が上って −15°C になると，1分でも 10 分間でも生存している細胞があらわれてくる。−18°C 以低の温度での凍結の場合と異なって，短時間の凍結の方が必ずしも生存率が良いわけではないという事実（第1表実験 IX, X）は，−15°C ではこれより低温度での凍結の場合とは凍結様式の異なる細胞，即ち細胞外凍結をおこす細胞があることを暗示するものである。実際にこの付近の温度で凍らせた試料の凍結曲線をとってみると，細胞を含む腹水滴の凍結は −12°C 付近ではじまり，氷の形成はほとんど −10°C 付近で行なわれ，このときの冷却速度は約5°C/秒以下であることがわかる（第1図）。このような条件では細胞外凍結をおこす細胞が混じることは当然考えられる。そこで次の実験として，試料中のほとんどの細胞が当然細胞外凍結をおこすと思われる条件で凍結させてみた（第1表実験 XI）。まず腹水と共に採取した腫瘍細胞を培養液（NCTC 109）中に加えて約 1.6×10^6/ml の細胞密度の浮遊液を作った。この浮遊液を小試験管中に 1.5 ml とり，冷凍箱内の −30°C の空気中で冷却した。この場合試料はほとんど過冷却することなく凍り，凍結直後の冷却速度は約 0.4°C/分であった。こうして凍結した腫瘍細胞は 30 分間この温度においてから室温の空気中に取り出してゆっくり融解させた。これらの細胞を2匹のネズミに移植したところ何れのネズミも腫瘍死をおこした。



第1図　ネズミ腹水の微小滴の凍結曲線
腫瘍細胞を含む腹水滴はカバーグラス上に厚さ 10 μ 内外の薄層をなす。冷媒は −16°C のシリコン油

次に上記の温度での細胞の凍結型を確認するために，腫瘍細胞を含むネズミ腹水の小滴の冷凍顕微鏡による観察を行なった。−30°C 付近の温度では顕微鏡の載物台上に試料をのせてから 20 ないし 40 秒後に自発凍結がおこり，腹水は瞬間的にこまかい樹枝状の氷にみたされるが，ほとんどの細胞は凍結前と同様に半透明のままで収縮等の変形はみられない。そして −30°C

付近に保つかぎり少なくとも1時間以上変化が認められない。−15°C ないし −20°C において凍結させた場合も，凍結細胞の形態はほぼ −30°C の場合と同様であるが，半透明な細胞にまじって，いわゆるフラッシング[5]，即ち「細胞内に無数の微氷晶が瞬間的にできたためにおこる細胞の暗化」をおこす細胞が凍結温度が高い場合ほど多くなる。又これらの温度に保っておくと短時間のうちに細胞内に小氷粒が出現して来る。凍結開始の温度が −15°C 以高になると細胞外凍結をする細胞もまじってみえ，−7°C 以高の凍結温度ではほとんど試料中のすべての細胞が細胞外凍結をおこす。

IV. 考　　察

前報で明らかにしたように腫瘍細胞を含む腹水の小滴を急速に凍らせると外見不凍の細胞と変らない半透明な細胞が得られるが，この細胞の原形質内にはきわめて微小な氷晶ができており，この微氷晶が，可視光線の透過を妨げる程の（即ち細胞の暗化として認められる程の）大きさに生長したとき細胞は殺される[2]。このことを前提として今回の実験の結果を解釈すると次のように説明できよう。

急速凍結によって得られる細胞内微氷晶を含んだ半透明な細胞の凍り方（これを細胞内透明凍結と仮称する）は，凍結時の冷却速度が 15°C/秒内外より大きければ，少なくとも −15°C 以低の終末温度ではおこることが可能である。しかし細胞の保たれる温度が高くなるほど不安定となり，−15°C では恐らく1分間以内に，又 −18°C 及び −20°C では 10 分間以内に細胞内氷晶が致命的な大きさにまで発達するものと思われる。いっぽう −30°C では，このような細胞内透明凍結をしている原形質の状態はかなり安定しており，10 時間以上も凍結細胞は生存できることがわかった。恐らく −30°C 以下の温度では，細胞内微氷晶の移動再結晶はきわめて徐徐にしか進行しないのであろう。

凍結開始の温度が −15°C 以高になると致命的な細胞内凍結をする細胞が増加するが，同時に細胞外凍結をする細胞も混じってくる。この結果，−15°C で細胞内凍結した細胞は1分以内に凍死するが，一部の細胞は細胞外凍結をしているため凍結時間が長びいても生存できるのであろう。細胞外凍結の状態では，この腫瘍細胞は耐凍性が甚だ高いことはすでに明らかにされており[6]，又第1表の実験 X, XI の結果もこれを支持するものである。

V. 摘　　要

ネズミの腹水腫瘍細胞を急速凍結させると凍結前とかわらぬ外見の凍結細胞が得られるが，このとき原形質内には可視光線の透過を妨げぬ程微小な氷晶ができている。このように凍った細胞は急速に融解されると生存している。このような原形質の特殊な凍結状態は −30°C ではかなり安定しており，少なくとも 10 時間は生存できる細胞がある。凍結温度が −15°C ないし −20°C でも冷却速度が 15°C/秒内外以上ならば，このような細胞内透明凍結はおこりうるが，きわめて不安定であって，−15°C では1分以内に，−20°C でも 10 分以内に細胞内に可視的な氷粒の生長が認められ細胞は殺される。

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. I. 低温科学, 生物篇, **25**, 81–95.
2) 朝比奈英三・久田洋子 1968 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存. II. 低温科学, 生物篇, **26**, 61–70.
3) 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.
4) 朝比奈英三 1969 凍結. 続生物物理学講座, **10** (細胞生物物理研究法 I), 生物物理学会編, 吉岡書店, 京都, 235–253.
5) Asahina, É. 1965 Freezing process and injury in isolated animal cells. Fed. Proc., **24**, Suppl. 15. 183–187.
6) Asahina, É, and Emura, M. 1966 Types of cell freezing and the post-thawing survival of mammalian ascites sarcoma cells. Cryobiology, **2**, 256–262.

Summary

Very rapidly frozen tumor cells can survive intracellular freezing provided that they are thawed very rapidly. The cells thus frozen appear to be translucent as seen in intact unfrozen ones. Such translucent intracellular freezing could be observed in rat tumor cells at temperatures below −15°C, as far as the rate of cooling is higher than about 15°C per second. However, frozen protoplasm in these cells becomes unstable with increasing temperatures. These frozen cells were killed within 1 and 10 minutes at −15 and −20°C respectively, as a result of recrystallization or a further development of fine ice crystals formed within protoplasm. The recrystallization of ice in rapidly frozen tumor cells proceeds easily at temperatures above −20°C, and with difficulty at about −30°C. Translucent intracellularly freezing cells were proved to survive for 10 hours at −30°C.

低温科学生物篇　第27輯　訂正

頁	行		誤	正
11	英文タイトル	1	Freeze Drying	Freeze-Drying
15	下から	2	無糖	庶糖
45	上から	6	4	6
64	下から	10	4	6
78	下から	16	林部	材部
110	下から	16	第3図	第2図
122	上から	2	Escherichia Coli	Escherichia coli
130	第4表		側芽	副芽
131	第6表		側芽	副芽
131	第7表		側芽	副芽
132	第8表		側芽	副芽
159	下から	7	Supercoold	Supercooled
159	下から	9	Supercoold	Supercooled
159	下から	11	低温化学	低温科学