



Title	急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 IV : グリセリンを加えた細胞の急速凍結
Author(s)	島田, 公夫; SHIMADA, Kimio; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 47-54
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17750
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p47-54.pdf



急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 IV*

グリセリンを加えた細胞の急速凍結

島田公夫・朝比奈英三

(低温科学研究所)

(昭和44年8月受理)

I. 緒言

シロネズミの腹水腫瘍細胞を、 -30°C 付近で急速に凍結すると、凍結前の細胞と形態的に変らない半透明な凍り方をした細胞が得られ、 -20°C 以下の温度では、これらのうちのいくつかの細胞は半透明のままである。

これらの細胞を、 -30°C 付近で急速凍結したあと、ゆっくり加温する途中の温度から急速融解して、ネズミの腹腔に移植すると、 -20°C 以下の温度から急速融解された細胞は増殖して、ネズミは腫瘍死した¹⁾。

このように、急速凍結によって半透明な凍り方をした細胞は生存していて、細胞の内部にあるごく微小な氷晶が、顕微鏡でみとめられるくらい大きさに成長するまでは、致命的な害を受けないと考えられる¹⁾。

さらにこの腫瘍細胞を、冷やしたシリコン油に浸けて急速に凍結すると、 -18°C 以低で半透明な凍り方をした細胞が得られ、 -30°C に保つと、10時間まで生存できることがわかった²⁾。

いっぽう、グリセリンは凍結によって細胞におこる害に対して保護効果がある³⁾。Lusena⁴⁾ はグリセリン溶液で、氷点降下と氷晶の成長を実験し、グリセリンの凍結に対する保護効果としてつぎの2つの点を指摘した。1つは、グリセリンが氷点を降下させ、それぞれの凍結温度で未凍結水 (unfrozen water) を多くすること。もう1つは、氷晶の成長をおさえて、氷晶による機械的障害を少なくすることである。

しかし冷却速度が増すと、グリセリンの付加はかえって害になることが赤血球で確かめられている⁵⁾。Rapatz と Luyet⁶⁾ はカエルの赤血球の凍結を顕微鏡下に観察し、グリセリンを加えた血球では、細胞内にできた微氷晶が、加えないものよりかなり低い温度で可視的になることをみて、グリセリンによって、氷晶が移動再結晶 (migratory recrystallization) して成長しはじめる温度が低くなると報告している。

したがって腫瘍細胞を含む腹水に、グリセリンを加えて -30°C 付近で急速凍結するとき、細胞内凍結した細胞では、可視的な氷晶がはやくあらわれ、細胞に致命的な害を与えることが予想される。いっぽう、グリセリンが氷晶の成長をおさえる作用があることから、加えない細

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1002号

胞では、 -15°C 以上の温度で凍結を開始した場合にのみ細胞外凍結をおこすのにくらべて²⁾、より低い温度で細胞外凍結をおこすことが予想される。

以上2つの観点で、グリセリンを加えた腹水腫瘍細胞の凍結を、 -30°C 付近の温度を中心にして、顕微鏡で観察しながら、凍結様式と細胞の生死を調べてみた。

今回も前回の実験と同じく、北大理学部附属動物染色体研究施設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。

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細胞を使用した。腫瘍にかかったネズミの生存日数は、現在6日から17日程度である。

方法：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0.1 ccの腹水を採取して、試験管にあらかじめとっておいた0.005 ccのグリセリンに加え、試験管をはげしく振って、腹水とグリセリンを十分に混合する。室温で少なくとも5分間放置したあとグリセリンを加えた腹水をごく微量(約0.002 cc)カバーガラスの上にとって、別のカバーガラスで薄くひきのばし、浮遊細胞の単層を得た。

こうして得られた試料を、あらかじめ適当な温度に冷やしたシリコン油(信越化学, KF 96, 2 cstks)の中に急速に浸けて凍結し、一定時間その温度に保ったあと、 38°C の培養液(TC 199)に移して急速融解した。融解した腫瘍細胞を遠心して集め、シロネズミの腹腔に移植して、細胞の生存を調べた。

なおネズミ1頭に移植した細胞数はカバーガラス3枚分である。これらのネズミから、2日ないし3日おきに腹水を取り、酢酸ダーリア固定染色による押しつぶし法により標本を作り、腫瘍細胞の増殖を観察した。

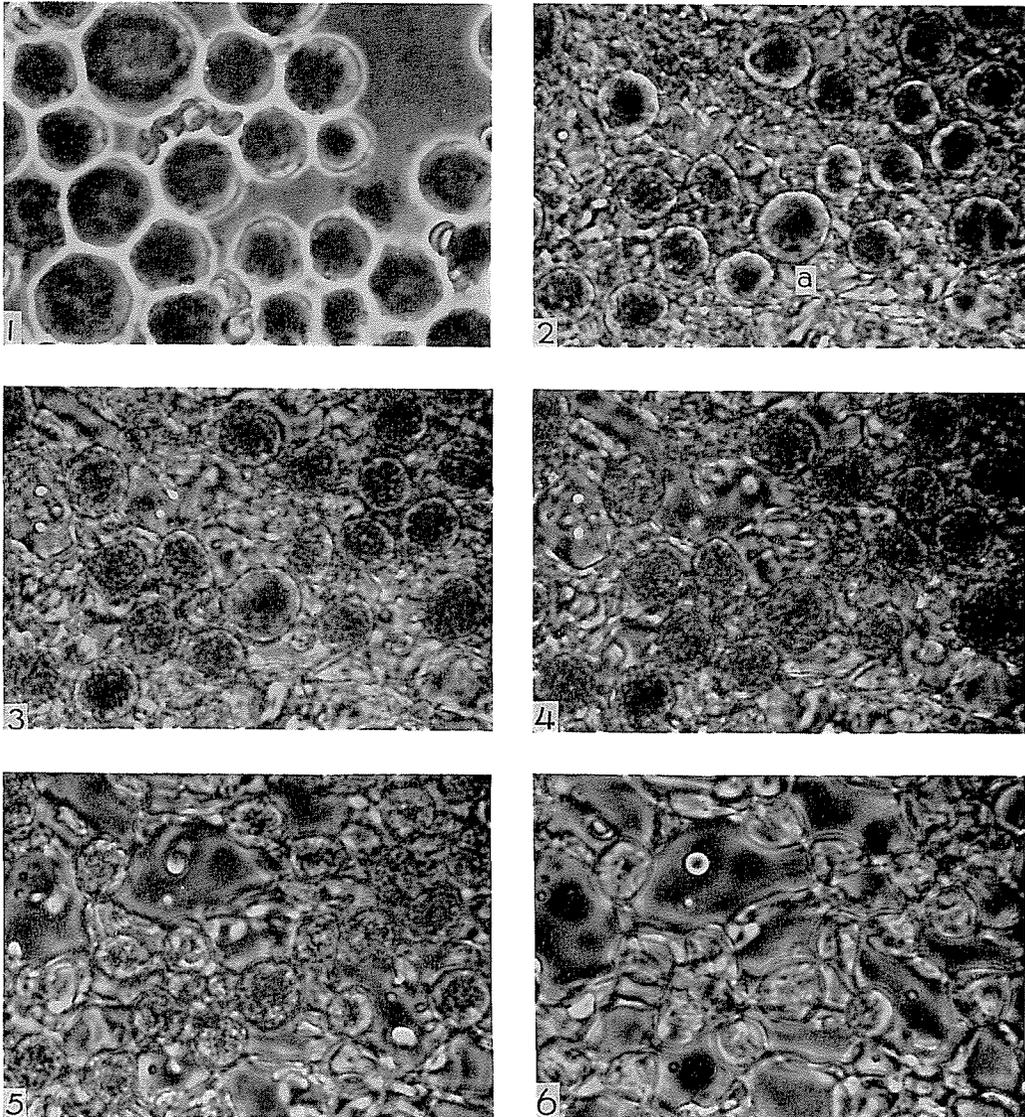
同時に試料をシリコン油で薄くおおい、特殊な冷凍顕微鏡で、グリセリンを加えた腫瘍細胞の凍結の様子と、融解にともなう細胞内の形態的变化を位相差顕微鏡装置を用いて観察した。

III. 結 果

1. グリセリンを加えた腫瘍細胞の急速凍結融解後の生死

約5%のグリセリンを加えた腫瘍細胞を、 -25°C ～ -40°C に冷えたシリコン油に急速に浸けて凍結し、それぞれの温度に1分間あるいは10分間保ったあと、急速融解して、シロネズミの腹腔に移植した。この結果 -25°C と -30°C で凍結された細胞は、例外なくネズミの腹腔中で増殖し、ネズミは移植後13日～19日で腫瘍死した(第1表, 実験I～III)。また、 -40°C で1分間凍結された細胞は生存していたが、10分間の凍結には耐えられなかった(第1表, 実験IV～V)。

-25°C ～ -40°C での凍結で生存していた細胞が、どのようなかたちで凍結していたのかを明らかにするため、次に顕微鏡下で凍結細胞を観察した。



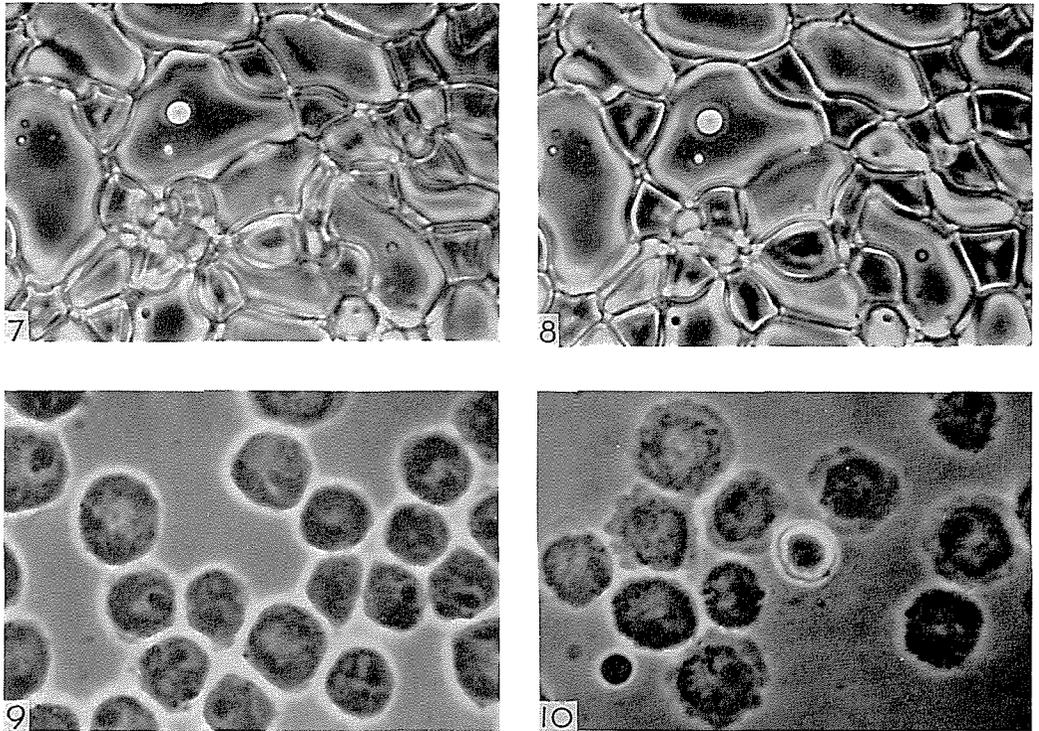
第1図 グリセリンを5%加えた腫瘍細胞の凍結融解過程 (1)。×800

1. 凍結前の過冷却状態の細胞， -15°C
2. -30°C で急速凍結された細胞，凍結後75秒， -29°C 。aの細胞は半透明に見える
3. 同じく2分後， -28.5°C
4. 同じく3分後， -28.2°C 。すべての細胞が暗化する
5. 同じく9分後， -27°C
6. 同じく20分後， -22°C

2. グリセリンを加えた腫瘍細胞の凍結融解の過程

i) 約5%のグリセリンを加えた腫瘍細胞を腹水といっしょに， -30°C で急速凍結し，平均 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ でゆっくり加温しながら，細胞内外におこる形態的な変化を観察した。

-30°C で凍結した直後，凍った媒液は樹枝状に見え，氷晶は濃縮されたグリセリンにより，細かく仕切られている。細胞は瞬間的に暗化するものもあるが，形態的に凍結前と同様



第2図 グリセリンを5% 加えた腫瘍細胞の凍結融解過程 (2)。×800

7. 第1図6と同視野, 凍結後35分, -18°C
8. 同じく41分後, -15°C
9. 同じく58分後, -6°C , 融解直後
10. -30°C のシリコン油中で急速凍結後, ゆっくり融かした細胞。視野の中央に輝いて見えるのが細胞外凍結していた細胞と思われる

第1表 グリセリンを加えた腫瘍細胞の急速凍結融解後の増殖
腹水中にあらわれ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		ネズミ 番 号	移 植 後 の 日 数				移植後のネズミの生存日数
	温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	時 間 (分)		5	7	10	14	
I	-25	1	a	/*	/	/	89.5	18
			b	0	<1	/	94.0	19
II	-30	1	c	0	0	2.4	95.0	17
			d	0	0	56.2	94.2	16
			e	2.4	28.8	92.9		13
			f	/	10.6	95.8		14
III	-30	10	g	0	0	12.0	92.7	17
			h	/	<1	11.5	91.5	17
IV	-40	1	i	0	1.6	35.0	>80	17
			j	0	/	<1	23.2	22
V	-40	10	k	0	/	0	0	20日後も 全く腫瘍細胞を認めず
			l	0	0	0	0	

* / : 腹水採取ができなかったとき

に見える半透明な凍り方をした細胞も認められる (第1図1, 2)。グリセリンを含む腹水が凍ると、それを含まない腹水にくらべて¹⁾、再結晶の速度がはやく、したがって氷晶はわずかな時間で成長する (第1図2, 4)。いっぽう腫瘍細胞は、凍結してから2分以内にほとんどの細胞内に可視的な氷晶があらわれ (第1図3)、 -28°C 付近の温度でも3分で完全に暗化してしまう (第1図4)。

この暗化は、細胞内にできた氷晶が、 0.5μ 程の大きさに成長して、可視光線の透過を妨げることによっておこると考えられる¹⁾。こうして暗化した細胞はこれまでの実験^{1,2,7)}から明らかなように致命的な障害を受ける。

さらに加温されると、細胞内の氷晶は 1μ 以上の大きさに成長し、顕微鏡的に認められる小氷粒が観察できる (第1図5)。同時に細胞内の氷の一部が外に移動しはじめて、細胞の大きさは小さくなる (第1図5)。同じ現象は何も加えられない腫瘍細胞ですでに観察され¹⁾、これは Luyet のいう Premelting recrystallization⁸⁾ の一つの形式と思われる。こうして小さくなった細胞は、細胞外の成長した氷晶と氷晶の間にとじこめられる (第1図6)。 -18°C 付近で、まず細胞内の氷晶が融解しはじめ (第2図7)、つづいて -15°C 付近では、細胞内の氷は完全に融けて細胞外の氷晶が融けはじめる (第2図8)。完全に融解された細胞は、凍結前の細胞にやや似て見えるが、核膜がはっきり見えるようになり、細胞表面の張力も失い扁平になってしまうので細胞の周囲が輝やいて見えない (第2図9)。

ii) i)と同様につくった試料を -30°C のシリコン油に急速に浸けて凍結して、1分間置いたあと、とりだして室温の空气中でゆっくり融解すると、張力を失わない凍結前の細胞と同じように見える細胞が認められた (第2図10)。この細胞は、細胞外凍結をしていたものと思われる。

IV. 考 察

シロネズミの腹水腫瘍細胞にグリセリンを加えて急速凍結すると、少なくとも -30°C で10分間の凍結では、急速融解のあとネズミの腹腔中で増殖し、ネズミを腫瘍死させた。 -30°C で凍結された細胞とその融解過程を顕微鏡で観察した結果、細胞外凍結と細胞内凍結の2つの凍結様式が同時におきていることが確かめられた。そして細胞内凍結をした細胞の内部の氷晶は、 -30°C に比較的近い温度でも、3分以内に、細胞を暗化させる程の大きさに成長する。したがって -30°C で10分間の凍結によっても生存している細胞は、細胞外凍結によって助かっているものと思われる。 -30°C で1分間の凍結のあとに生存している細胞は、おそらく外見上凍結前の細胞とかわらない半透明にみえる細胞内凍結をしていたものと、細胞外凍結をしていたものの双方がまじっているものであろう。

さらに温度を低くして、 -40°C で凍結すると、1分間の凍結では細胞が増殖するのに10分間ではできない。おそらく -40°C の凍結では、すべての細胞が細胞内凍結をおこし、少なくとも1分間は半透明な凍り方をしているものがあるが、10分以内に細胞内の氷晶は、 0.5μ 以上の大きさに成長して、細胞を暗化させるとともに、細胞に致命的な害をあたえるものと思われる。

また温度を高くして、 -25°C で凍結するとき、1分間の凍結に耐えている細胞は、細胞外凍結によってのみ助かっていると思われる。この理由は、 -25°C 付近では、細胞内凍結した

細胞は瞬時的かあるいはごく短時間で暗化してしまうからである。

すでに Rapatz と Luyet により、カエルの赤血球を使った実験で、グリセリンを 10% 加えた血液を凍結すると、赤血球内の氷晶は、 -50°C で再結晶をはじめ、可視的な氷晶が顕微鏡で観察されるようになる。いっぽう何も加えない血液を急速凍結させると、その内部での再結晶温度はわずかに -10°C であることが明らかにされている⁶⁾。

われわれは、約 5% のグリセリンを加えた腹水を -30°C 付近で凍結するとき、少なくとも 1 分以内は半透明な凍り方をしている腫瘍細胞があり、この細胞が生存していることを示した。細胞内の暗化が何も加えない腫瘍細胞にくらべて、低い温度でしかもはやくおきるのは、グリセリンが細胞内に浸透して、細胞内にできた氷晶の移動再結晶による成長をはやくするからであろう。このように、細胞内凍結をひきおこすような凍結速度で腫瘍細胞を凍結する場合、何も加えない腫瘍細胞では、 -30°C で 10 時間の凍結に耐えられるのにくらべて、グリセリンの付加は、かえって短い時間で細胞に致命的な害をあたえることが明らかになった。

また試料を -30°C で急速凍結するとき、細胞外凍結をおこす細胞があるのは、グリセリンの付加により、氷点が低下すると、氷晶の成長がおさえられることによるのであろう⁴⁾。何も加えない腹水を凍結するとき、シリコン油の温度が、約 -15°C 以上で細胞外凍結をひきおこしたのにくらべて²⁾、少なくとも 15°C 低い温度でも細胞外凍結がおこることがわかった。

V. 摘 要

1. シロネズミの腹水腫瘍細胞に、約 5% のグリセリンを加えて、 -25°C ~ -40°C で 1 分間あるいは 10 分間急速凍結したあと、急速融解して、細胞の生死を調べた。
2. -30°C で急速凍結された試料の凍結状態と、融解にともなっておこる細胞内外の形態的变化を顕微鏡で観察した。
3. -30°C の凍結では、細胞内凍結と細胞外凍結が同時におき、細胞内凍結した細胞は 3 分以内に暗化するので、1 分間の凍結では、どちらの凍り方をした細胞も助かるようにみえるが、10 分間では細胞外凍結した細胞だけが、融解後生存できる。
4. -40°C の凍結では、すべての細胞が細胞内凍結をおこすが、少なくとも 1 分間は半透明なままで生存しており、それが融解後増殖すると考えられる。
5. 細胞内凍結をひきおこすような凍結速度で凍結するとき、グリセリンの存在は細胞内での氷の再結晶温度を下げるために細胞の生存に不利である。
6. グリセリンを加えることによって、 -30°C 付近で急速凍結しても、細胞外凍結がおこることがある。

文 献

- 1) 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.
- 2) 朝比奈英三・島田公夫 1969 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 III. 低温科学, 生物篇, **27**, 41-46.
- 3) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28-36.
- 4) Lusena, C. V. 1955 Ice propagation in systems of biological interest III. Effect of solutes on

- nucleation and growth of ice crystals. *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 277-284.
- 5) Doebbler, G. F. and Rinfret, A. P. 1965 Rapid freezing of human blood. *Cryobiology*, **1**, 205-211.
 - 6) Rapatz, G. and Luyet, B. 1960 Microscopic observations on the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica*, **8**, 195-239.
 - 7) 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**, 81-96.
 - 8) 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.

Summary

We previously reported that ascites tumor cells rapidly frozen at -30°C survived intracellular freezing even for 10 hours. We showed that when thawed very rapidly these cells could resume reproduction in the peritoneal cavity of rats. In the present paper, we investigated the behavior of glycerolated tumor cells during rapid freezing and thawing using MTK-sarcoma III. Glycerol was added to the ascites containing the tumor cells to make a 5% solution. A small volume (about 0.002 ml) of the glycerolated ascites was placed on a coverglass and smeared to form a monolayer of tumor cells.

The specimens were rapidly frozen at various temperatures between -25°C and -40°C and held at these temperatures for 1 minute or 10 minutes. These were thawed rapidly by immersing in a culture medium (TC-199) at 38°C , and the cells were transplanted into the peritoneal cavity of rats to determine whether the cells survived or not.

The tumor cells frozen and thawed in this manner could survive freezing at -25°C for 1 minute and at -30°C for 10 minutes. They could also survive freezing at -40°C for 1 minute, but not for 10 minutes.

These rapidly frozen tumor cells were observed during the course of the slow rewarming under a microscope. Some of the glycerolated tumor cells blacked out immediately after the freezing. The other cells were frozen translucently and appeared intact as in the case of unfrozen ones. They also became dark within 3 minutes from the initiation of freezing.

The growth of the intracellular fine ice crystals seems to be accelerated by the addition of glycerol. At freezing temperatures above -30°C , most of the glycerolated tumor cells became dark within 3 minutes, possibly as a result of the intracellular growth of fine ice crystals which approached $0.5\ \mu$ or over in grain size. Such darkening kills the cells because the frozen cells are assumed to be destroyed by the mechanical injury resulting from the ice crystal growth within the cytoplasm.

The specimens were frozen rapidly in cooled silicone oil at -30°C and transferred to air to rewarm slowly at room temperature. After thawing some of the cells seemed to be intact under a phase contrast microscope showing its normal spherical shape. This indicates that some of the glycerolated tumor cells freeze extracellularly even at -30°C .

It was shown that intracellular freezing in glycerolated tumor cells became fatal within 3 minutes at about -30°C because of the rapid growth of the intracellular ice crystals. When the cells were frozen at -25°C for 1 minute they could survive extracellular freezing but not intracellular freezing. They could survive both extracellular

and intracellular freezing at -30°C for 1 minute, but they could only survive extracellular freezing for 10 minutes. In contrast, at -40°C the glycerolated frozen tumor cells could survive intracellular freezing for only 1 minute.

These results suggest that glycerolation is not effective in the preservation of rapidly frozen tumor cells if ice forms intracellularly.