HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	急速凍結融解された腫瘍細胞の生存　Ⅴ：生理的食塩水中の細胞の急速凍結
Author(s)	島田, 公夫; 朝比奈, 英三
Citation	低温科學. 生物篇, 27, 55-65
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17751
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p55-65.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Kimio SHIMADA and Éizo ASAHINA 1969 Rapid Freezing of Tumor Cells Suspended in Sodium Chloride Solution with or without Glycerol. *Low Temperature Science, Ser. B, 27.* (With English Summary p. 65)

急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 V*

生理的食塩水中の細胞の急速凍結

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

われわれは，シロネズミの腹水腫瘍細胞を使って，この細胞を腹水と共に −30°C 付近で急速凍結させると，凍結前の細胞と形態の変らない半透明な細胞が得られ，しかもこのように凍った細胞は，−30°C で少なくとも10時間は凍結に耐えて生存できることを明らかにした。この場合細胞内には，急速凍結のときに顕微鏡でみえない程度の微小な氷晶ができていると考えられるが，細胞が生存できることは，この微小な氷晶が移動再結晶によって大粒の氷に成長するのにかなり時間がかかることをあらわしている[1]。

また腫瘍細胞を腹水と共に凍らせた場合には，凍結によって濃縮された媒液による害がきわめて少ないことは，比較的高い温度でゆっくりと細胞外凍結をおこさせた腫瘍細胞が生存していることからも明らかである[2]。

したがって媒液としての腹水は，急速凍結された細胞を凍結生存させるために有利な条件を提供しているものと考えられる。そこで急速凍結された細胞に対する媒液の影響を調べるため，本文では，媒液に生理的食塩水を使って，腫瘍細胞を急速凍結させ，細胞の凍結融解の過程と生死を観察し，腹水中での凍結と比較した。また，食塩水中での凍結により細胞がうける害に対するグリセリンの保護効果も調べた。

なお実験材料の腫瘍細胞をわけて下さった北大理学部動物染色体研究施設の牧野佐二郎教授に深く感謝する。

II. 材料と方法

材料： 本実験に使用されたシロネズミの腹水腫瘍細胞は，北海道大学理学部動物学教室において，累代移植により保存されている MTK-肉腫 III と呼ばれる系統のものである。この腫瘍にかかったネズミの生存日数は，昭和44年7月現在，移植後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からガラスピペットで腹水を採取し，あらかじめ用意した次の3種の媒液に加えた。

1) 生理的食塩水 (NaCl 8.5 g/l, $NaHCO_3$ で pH 7.4 に調整)

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1003号

2) グリセリンを5% 含む生理的食塩水

3) グリセリンを10% 含む生理的食塩水

これらの媒液を遠心管にそれぞれ約10 cc 入れ，腹水を約0.1 cc ずつ加えた。腹水と媒液をよく攪拌したあと，約1,200 回転/分で5分間遠心して腫瘍細胞を集め，できるだけ上清を除いた。なお，細胞をグリセリンを含む媒液に浮遊させてから上清を除くまでに少なくとも10分間かかった。

このようにして，媒液としての腹水を他の溶液におきかえた腫瘍細胞の浮遊液をごく微量（約0.002 cc）カバーグラスの上にとり，他のカバーグラスでなすって薄くひきのばし腫瘍細胞の単層を得た。それからあらかじめ所定の温度に冷やされたシリコン油（信越化学，KF 96, 2 cstks）の中に急速に浸けて凍結させ，一定時間その温度に保ったあと，38°C に温められた培養液（TC-199）中で急速に融解した。

融解された腫瘍細胞を遠心して集め，シロネズミの腹腔に移植しその増殖を調べた。1頭のネズミに移植された試料は，カバーグラス3個分である。これらのネズミから2日ないし3日おきに腹水をとり，酢酸ダーリア固定染色による押しつぶし法[3]により標本を作り，腫瘍細胞の増殖を観察した。

上記の方法で作った腫瘍細胞試料を，シリコン油で薄くおおい，特殊な冷凍顕微鏡[4]で，腫瘍細胞の凍結と融解の過程における形態的な変化を位相差顕微鏡装置を用いて観察した。

III. 結　　果

1. 生理的食塩水中の細胞の急速凍結

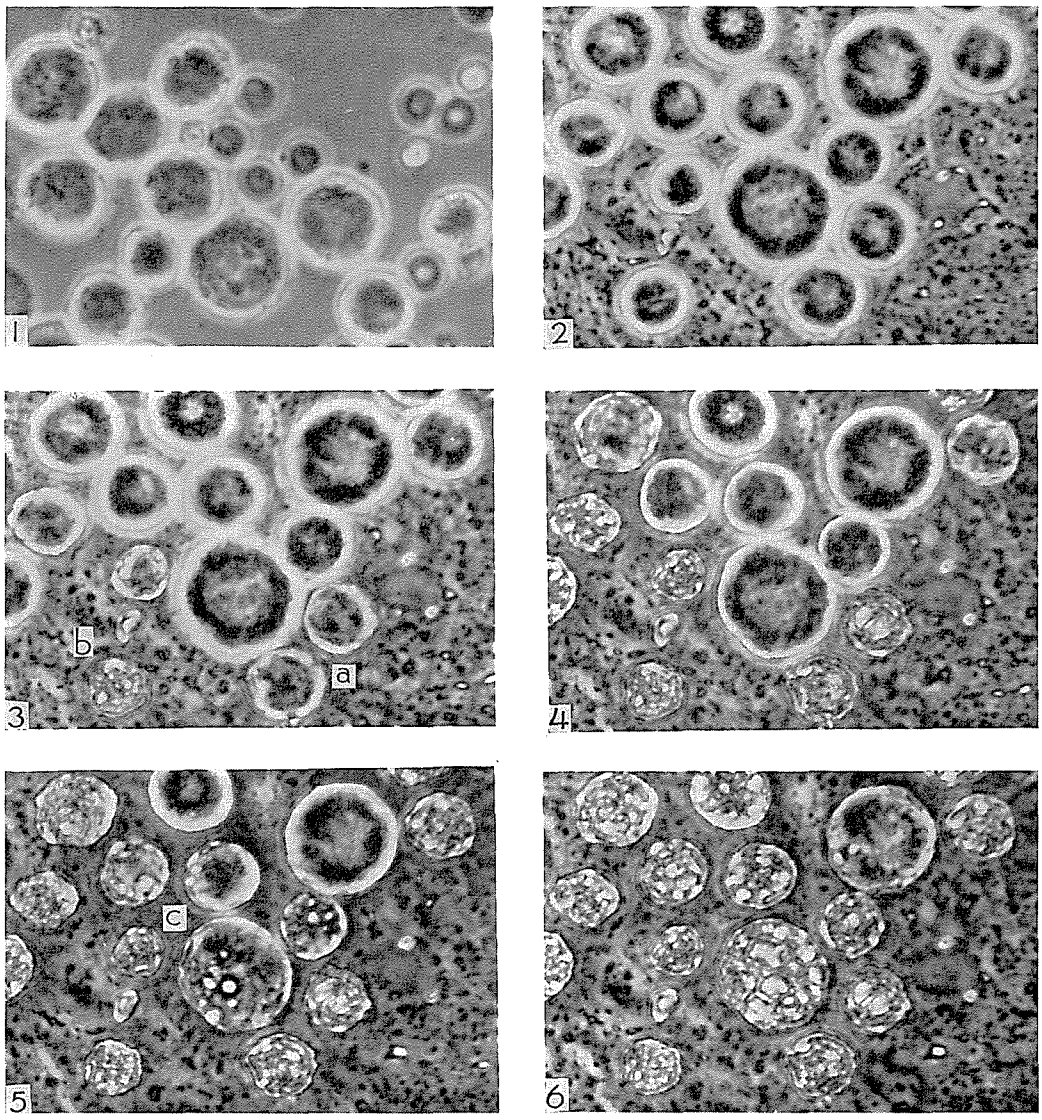
凍結融解後の細胞の生死： 媒液を生理的食塩水におきかえて，腫瘍細胞を −20°C～−40°C で

第1表　生理的食塩水中で急速凍結融解された腫瘍細胞の増殖
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 (°C)	凍結 時間 (分)	ネズミ番号	移植後の日数 5	7	10	14	移植後のネズミの生存日数
I	−20	1	a	0	0	0	0	20日後も全く腫瘍細胞を認めず
			b	0	0	0	／*	
II	−25	1	c	0	0	0	0	〃
			d	0	0	0	0	
III	−30	1	e	0	9.4	89.5		12
			f	2.4	44.5	94.8		12
			g	0	<1	4.2	84.0	17
			h	0	<1	26.1	90.4	17
IV	−30	10	i	0	0	0	0	20日後も全く腫瘍細胞を認めず
			j	0	0	0	0	
V	−40	10	k	0	0	／	／	〃
			l	0	0	0	0	

* ／：腹水が採取できなかったとき

1分間あるいは10分間急速凍結してから急速融解し，その生死を調べると −30°C で1分間凍結された細胞はネズミの腹腔中で増殖したが（第1表実験 III），−20°C，−25°C でそれぞれ1分間凍結された細胞と（第1表実験 I, II），−30°C，−40°C でそれぞれ10分間凍結された細胞は（第1表実験 IV, V），腹腔中に移植しても増殖できず，これらの条件では生存できないこ

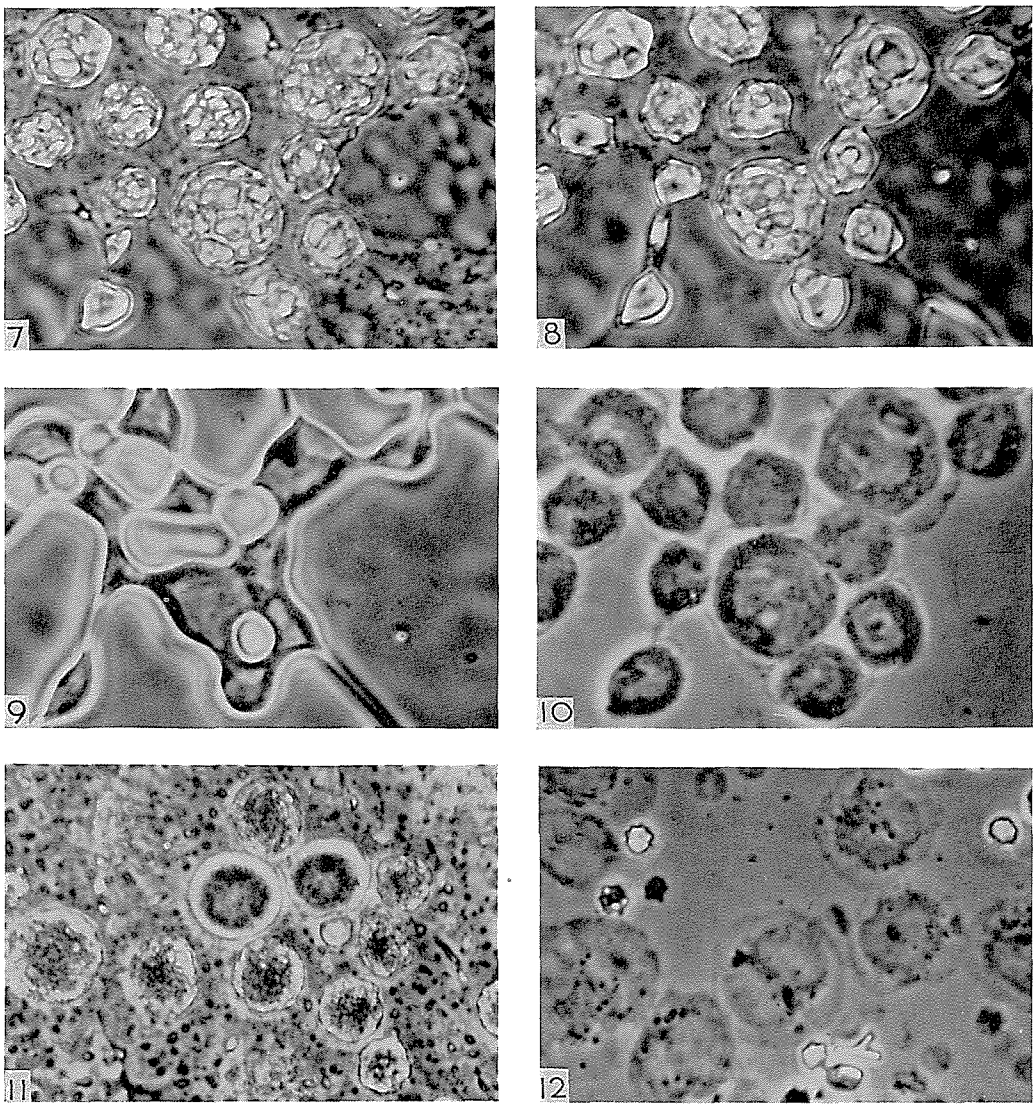


第1図　生理的食塩水中の細胞の凍結融解過程 I.　×800

1. 過冷却状態の腫瘍細胞，−5°C
2. −30°C で急速凍結した細胞，凍結後 3.5 分，−29°C
3. 同じく 21 分後，−22.5°C，細胞 a は外形が変化しはじめている。細胞 b の部内には小氷粒が観察できる
4. 同じく 30 分後，−20°C
5. 同じく 35 分後，−18.5°C，大形の細胞 c の内部にも小氷粒があらわれる
6. 同じく 39 分後，−17.5°C，細胞内の小氷粒が大きく成長してくる

とを示した。

腫瘍細胞が腹水とともに凍結されるとき，−30°C では 10 時間の凍結に耐えることができ，−20°C でも少なくとも 1 分間は生存できるのにくらべると[1]，食塩水中で凍結されるときは，比較的短い時間で致命的な害を受けるものと考えられる。このように腹水を生理的食塩水におきかえることによっておきてくる障害が，急速凍結によって細胞内にできた小さな氷晶が



第 2 図　生理的食塩水中の細胞の凍結融解過程 II.　×800

7. −30°C で凍結した腫瘍細胞，凍結後 45 分，−13°C，第 1 図 2–6 と同視野
8. 同じく 47 分後，−11°C
9. 同じく 55 分後，−6°C，細胞内の氷晶から融けはじめる
10. 同じく 60 分後，−2°C
11. −20°C で凍結した腫瘍細胞，凍結後 1 分，−20°C
12. −20°C のシリコン油に浸けて急速凍結後，室温でゆっくり融かした細胞

顕微鏡で見える程の大きさに成長するのがはやまるのか，あるいは食塩水の凍結によっておきる食塩水の濃縮が，細胞に，一般に塩害といわれている害を与えるのかを知るために，腫瘍細胞を含む食塩水の凍結を顕微鏡下で観察した。

細胞の凍結融解過程：　まず腹水腫瘍細胞を生理的食塩水とともに −30°C で凍結させた。凍結直後，媒液中に細かい氷晶ができ，濃縮された食塩水がその間隙に存在する（第 1 図 2)。細胞は凍結前と同様に半透明にみえ，−30°C 付近では比較的安定で，数分で細胞内に可視的な氷晶があらわれることはない（第 1 図 1, 2)。また媒液中の氷晶も短時間では，移動再結晶による成長を示さない。ゆっくり加温すると −26°C 付近で小形の腫瘍細胞に形態的な変化がおこり，−23°C 付近で細胞内に氷粒があらわれてくる（第 1 図 3)。−20°C 付近では，小形の腫瘍細胞のほとんどすべてのものに，細胞内小氷粒があらわれ（第 1 図 4)，これより高い温度になると，大形の細胞の中にも小氷粒が観察されるようになる（第 1 図 5)。これらの小氷粒は，温度の上昇とともに，細胞内での移動再結晶によってしだいに大きく成長し，−17°C ではすべての細胞内に小氷粒が観察できる（第 1 図 6)。いっぽう媒液内の氷晶の成長は，−18°C 付近でおこりはじめ，−15°C 付近では移植再結晶による氷晶の成長がさらに顕著になる（第 2 図 7)。−11°C 付近で細胞内外の氷晶の粒の大きさは最大となり（第 2 図 8)，これより高い温度では，まず腫瘍細胞内から氷晶の融解がはじまる（第 2 図 9)。完全に融かされた細胞を観察すると，細胞の表面が特にひどく害を受けているように見える（第 2 図 10)。

つぎに，試料を −20°C で凍結すると，細胞内が半透明にみえる腫瘍細胞が得られるが（第 2 図 11)，これをゆっくり加温すると −18°C 以高の温度では，すべての細胞内に小氷粒があらわれる。

第 2 表　5% グリセリン−生理的食塩水中で急速凍結融解された腫瘍細胞の増殖

腹水中での腫瘍細胞の出現頻度 (%) を示す

実験番号	凍結 温度 (°C)	凍結 時間 (分)	ネズミ番号	移植後の日数 5	7	10	14	移植後のネズミの生存日数
VI	−20	10	m	0	0	0	／	20日後も全く腫瘍細胞を認めず
		10	n	0	0	／	0	
VII	−25	10	o	／	0	0	／	〃
			p	0	0	0	／	
VIII	−30	1	q	／	0	0	／	〃
			r	0	0	0	0	
			s	0	0	0	0	
			t	0	／	0	0	
IX	−40	1	u	0	0	0	0	〃
			v	／	／	0	0	
X	−50	1	w	0	0	0	／	〃
			x	0	0	／	／	

また試料を，−20℃のシリコン油に浸けて急速凍結させたあと，室温の空気中でゆっくり融かすと，張力を失わない正常な形態の細胞は残存せず，すべての細胞が害を受けているように見えた（第2図12)。

このように食塩水を媒液として急速凍結させた場合には，凍結温度が−30℃でも−20℃でも共に細胞外凍結をしている細胞はみられなかった。

2. グリセリンを5% 含む生理的食塩水中の細胞の急速凍結

凍結融解後の細胞の生死： 腫瘍細胞をグリセリンを5% 含む生理的食塩水（以下5% グリセリン-食塩水）に浮遊させ，−20℃ないし−50℃に冷やされたシリコン油に浸けて急速に凍結し，1分間あるいは10分間一定の温度に保ったあと，急速融解しネズミの腹腔に移植して，その増殖を調べた。その結果これらの温度範囲では，凍結された腫瘍細胞は増殖しないことがわかった（第2表実験 VI～X)。

細胞の凍結融解過程： 腫瘍細胞を5% グリセリン-食塩水とともに，−30℃に冷やされた冷凍顕微鏡上で急速凍結すると，ほとんどの細胞は瞬間的に暗化（フラッシング）する（第3図13)。これは細胞内に生じた氷晶の成長速度がグリセリンの付加によりはやくなり，氷晶が可視光線の透過を妨げる大きさにまで成長してしまうからであろう。これらの細胞の融解過程を観察すると，細胞内外の氷晶は，生理的食塩水中での凍結にくらべると，比較的低い温度でしかもはやく移動再結晶によって成長し，加温とともに細胞内には小氷粒が観察できるようになる（第3図14)。

しかし，ごくわずかの細胞はこの凍結条件においても細胞外凍結をおこす場合があり（第3図13 e)，これを融かすと，張力を失わないで正常な形態を保っている（第3図15)。

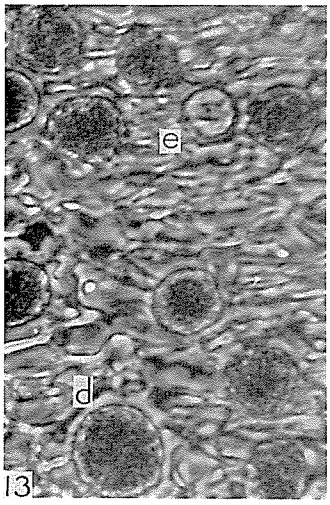
また，試料を−30℃のシリコン油に浸けて急速に凍結したあと，室温の空気中でゆっくり融解すると，張力をもっている細胞を観察できることがある（第3図16)。これらの細胞は，細胞外凍結をしていたものと考えられる。同様の実験を−20℃についても行ない細胞外凍結をしていた細胞の存在が確かめられた（第3図17)。

3. グリセリンを10% 含む生理的食塩水中の細胞の急速凍結

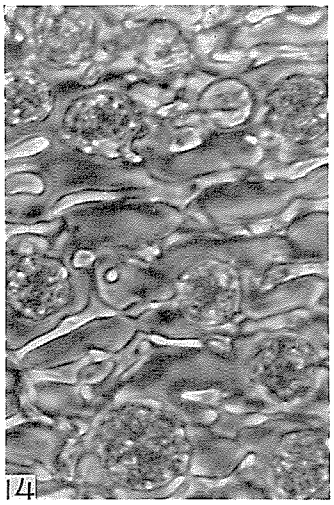
凍結融解後の細胞の生死： 媒液が5% グリセリン-食塩水のとき，−30℃以高の温度で凍結すると，一部の細胞は細胞外凍結をすることが観察されたが，それらの細胞はネズミの腹腔中で増殖できなかった。このことはグリセリンを加えると，比較的低い温度でも細胞外凍結をする細胞を生じるが，同時におこる媒液の凍結により，食塩水が濃縮されて細胞に塩害を与え，グリセリンの量が5% のときは，この塩害をふせげないことを示していると思われる。

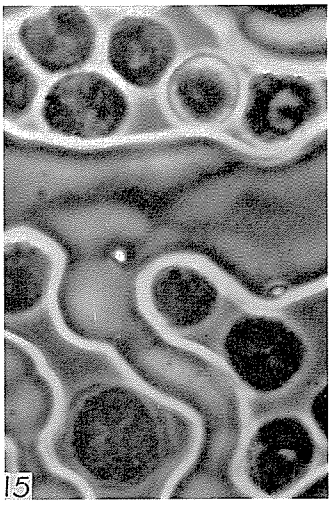
そこで，グリセリンを10% 含む生理的食塩水（以下10% グリセリン-食塩水）を媒液にして，腫瘍細胞を−20℃あるいは−30℃に冷やされたシリコン油中で急速凍結し，1分間あるいは10分間それぞれの温度においたあと，急速融解して細胞の生死を調べた。

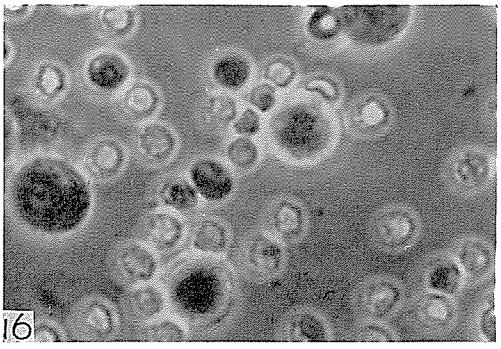
その結果，−20℃の凍結では，少なくとも10分間は生存している細胞があり，これはネズミの腹腔中で増殖した（第3表実験 XI, XII)。しかし−30℃では1分間の凍結でも生存できなかった（第3表実験 XIII)。

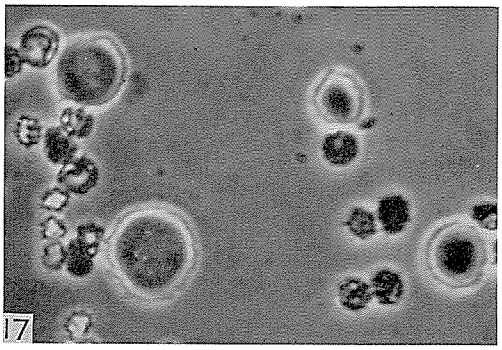


13.


14.


15.


16.


17.

第3図　5% グリセリン-生理的食塩水中の細胞の凍結と融解.　×800

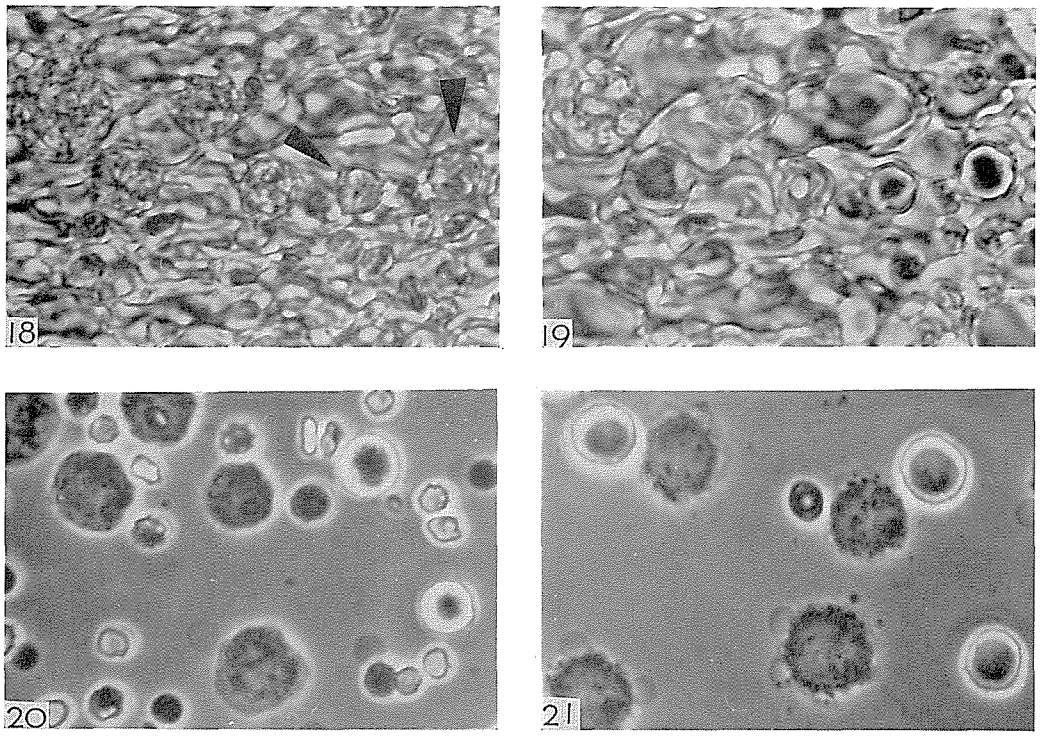
13. −30°C で急速凍結された腫瘍細胞，凍結後 1.5 分，−29°C，細胞 d は瞬間的に暗化（フラッシング）した細胞，細胞 e は細胞外凍結している
14. 同じく 8 分後，−25°C
15. 同じく 44 分後，−13°C，細胞の周囲の氷は融解して細胞外凍結していた細胞はもとの球状に戻って周囲が輝やいて見える
16. −30°C のシリコン油に浸けて凍結後，ゆっくり融かした細胞
17. −20°C のシリコン油に浸けて凍結後，ゆっくり融かした細胞

第3表　10% グリセリン-生理的食塩水中で急速凍結融解された腫瘍細胞の増殖

腹水中での腫瘍細胞の出現頻度（%）を示す

実験番号	凍結 温度 (°C)	凍結 時間 (分)	ネズミ番号	移植後の日数 5	7	10	14	移植後のネズミの生存日数
XI	−20	1	y	2.6	19.2	87.4		14
			z	<1	15.8	85.6	>80	15
XII	−20	10	A	0	0	<1	39.6	22
			B	0	0	0	0	20日後も全く腫瘍細胞を認めず
XIII	−30	1	C	0	0	0	／	〃
			D	0	0	0	0	

細胞の凍結融解過程： 腫瘍細胞を10% グセリリン-食塩水とともに −20°C で急速凍結し，その融解過程を観察すると，細胞外凍結をしている細胞があり（第4図 18, 19），それらは融解後，正常な細胞の形態を保っているように見える（第4図 20）。



第4図 10% グリセリン-生理的食塩水中の細胞の凍結融解過程. ×800

18. −20°C で凍結後 1.5 分，−19°C，矢印の細胞は細胞外凍結している
19. 同じく 3 分後，−15°C
20. 同じく 8 分後，−3°C，細胞外凍結していた細胞は，輪かくが輝やいて見え，正常な形態を保っている
21. −30°C のシリコン油に浸けて凍結後，ゆっくり融解された腫瘍細胞

試料を −30°C のシリコン油に浸けて急速凍結すると，5% グリセリン-食塩水の媒液中で凍結した場合と同様に，すべての細胞が細胞内凍結をおこしてしまう試料が多い。しかし，一部の試料では，ゆっくり融かすと球形に復元する細胞がわずかに見られ，細胞外凍結をしている細胞があることを示した（第4図 21）。

IV. 考　　察

シロネズミの腹水腫瘍細胞を生理的食塩水に浮遊させて急速に凍結すると，腹水中での凍結と同様，形態的には凍結前の腫瘍細胞と変らない半透明な凍り方をした細胞が得られた。これらの細胞を加温するときおきてくる細胞内の形態的変化も，腹水中で細胞を凍結したときと大差がなかった。しかし腹水中での凍結では，−20°C 付近ですべての細胞の内部に小氷粒がみとめられる[5]のにくらべて，生理的食塩水を媒液に使った場合には，−17°C ですべての細胞の

内部に小氷粒が観察された。

このように生理的食塩水中で凍結したときにも，半透明な凍り方をした細胞は比較的安定で，−30°C 付近では細胞内に可視的な氷粒が短時間であらわれることはなく，細胞内にできた氷晶の成長によって原形質が機械的にこわされることはないと考えられる。しかしこのように凍結した腫瘍細胞は，−30°C で少なくとも 1 分間は生存していることが確かめられたが，10 分間以上の凍結では致命的な害を受けてしまう。これは媒液の凍結によって食塩水が濃縮され，細胞に塩害を与えるものと思われる。

また，−20°C で凍結された場合も，−30°C での凍結と同様な半透明な凍り方をした細胞が得られたが，この温度では，1 分間の凍結にも耐えられないのは食塩水の共融点 (−21.8°C) に近く，しかもそれ以高の温度なので，最も高濃度の塩溶液に接したためと考えられる。Clement[6] は，大腸菌 *E. coli* を 0.85% の食塩水中で −78°C で凍結したあと，−18°C と −29°C で保存し，前者では生存率が約 10% であるのに，後者では 40% 近くなることを報告している。腫瘍細胞の場合も，おそらく共融点以低の温度で凍結されるときには，それ以高の温度で凍結されるのにくらべて塩害を受けにくくなるのであろう。

しかしながら，腹水とともに急速凍結された腫瘍細胞は，−30°C で少なくとも 10 時間は生存できる[1] のにくらべて，生理的食塩水中での急速凍結は細胞にとって不利であり，濃縮された食塩水による害は，短時間に致命的になるものと思われる。

腫瘍細胞を含む腹水にグリセリンを約 5% 加えて −30°C 付近で凍結すると，細胞内凍結をする細胞と細胞外凍結をする細胞があって，1 分間または，10 分間の凍結のあと生存しているものがあることがすでに確かめられた[7]。

生理的食塩水に 5% のグリセリンを加え，それを媒液にして腫瘍細胞を凍結した場合，−30°C ではほとんどあるいはすべての細胞は，細胞内凍結し瞬間的に細胞内の氷晶が成長して，細胞は暗化することを観察した。また，−30°C 以高の温度で凍結すると，細胞外凍結をしている細胞があることを見たが，これらの細胞は急速融解後，ネズミの腹腔中で増殖しなかった。このことから，−20°C ないし −30°C で凍結するとき，細胞内凍結をした腫瘍細胞では，細胞内の顕微鏡で認められない程の細かい氷晶が瞬間的に成長して，原形質に致命的な害を与える大きさになるものと考えられる。また，細胞外凍結をした細胞は，媒液の凍結による食塩水の濃縮がグリセリンの付加によりいくぶんおさえられたが，塩害を防ぐまでにはいたらなかったため，生存できなかったものと思われる。−40°C 以低での凍結では，おそらくすべての細胞が細胞内凍結し，瞬間的あるいはごく短時間で氷晶が成長して，原形質に機械的な障害を与えるのであろう。

このようにグリセリンの付加によって，細胞内にできた氷晶が，比較的低い温度でしかもはやく可視的な大きさに成長することは，すでに Rapatz と Luyet によりカエルの赤血球で観察されている[8]。かれらはグリセリンを 10% 加えた血液では，何も加えない赤血球の場合より 40°C も低い −50°C で細胞内の氷晶が移動再結晶により 2 時間以内に成長して可視的になると報告している。

10% グリセリン-食塩水を媒液に使用すると，−20°C の凍結によって 10 分間は生存して

いる細胞があった。生存していた細胞は，顕微鏡観察の結果から，細胞外凍結をしていたものと考えられ，グリセリンの増加が，塩害に対して保護効果を高めたものと考えられる。同じ試料が −30°C の凍結で生存できなかったのは，すべての細胞が細胞内凍結をおこしてしまったか，あるいは細胞外凍結した一部の細胞も，温度の低下によりさらに食塩水が濃縮され，10% のグリセリンでは塩害を防げなかったと思われる。

Lovelock[9] は，0.16 M の食塩水にヒトの赤血球を浮遊させて凍結するとき，グリセリンの増量は溶血率を減少させ，グリセリンの量が，2.5 M のとき溶血を最小にすると報告している。これは媒液の凍結による食塩水の濃縮がグリセリンの増量によって低められ，塩害を少なくするからだと説明している。同時に，いろいろな濃度のグリセリンを含む食塩水中で赤血球を凍結すると，凍結温度が低くなれば，溶血率は高くなり，−32°C ないし −35°C で最高となる。これは，温度の低下によって媒液中の氷量が増大し，それによって食塩水の濃度がしだいに高くなるからであるという。

細胞外凍結をした腫瘍細胞は，−20°C の凍結では，10% のグリセリンにより塩害を防ぐことができたが，−30°C でのときは，さらに高濃度のグリセリンが必要なのであろう。

V. 摘　　要

シロネズミの腹水腫瘍細胞を生理的食塩水に浮遊して急速凍結すると，半透明な凍り方をした細胞が得られたが，−30°C で 1 分間の凍結を除いて融解後生存できなかった。急速凍結においても食塩水は細胞に塩害を与えるものと思われる。

また，生理的食塩水にグリセリンを 5% あるいは 10% 加え，これらを媒液にして細胞を凍結すると，10% グリセリン-生理的食塩水中で −20°C，10 分間の凍結では生存している細胞があった。しかし，比較的はやい速度で細胞を凍結する場合，グリセリンの付加は悪い条件を細胞に与え，細胞外凍結によっても，細胞内凍結によっても生存できないことが明らかになった。

文　　献

1) 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.
2) Asahina, É and Emura, M. 1966 Types of cell freezing and the post-thawing survival of mammalian ascites sarcoma cells. *Cryobiology*, **2**, 256–262.
3) Makino, S. 1957 The chromosome cytology of the ascites tumors of rat, with special reference to the concept of the stemline cells. *Internat. Rev. Cytol.*, **4**, 25–84.
4) 朝比奈英三 1969 凍結 (日本生物物理学会編集：細胞生物物理研究法 I). 吉岡書店，京都，233–253.
5) 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.
6) Clement, M. T. 1961 Effects of freezing, freeze-drying, and storage in the freeze-dried and frozen state on viability of *Escherichia coli* cells. *Can. J. Microbiol.*, **7**, 99–106.
7) 島田公夫・朝比奈英三 1969 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 IV. 低温科学，生物篇，**27**，47–65.
8) Rapatz, G. and Luyet, B. 1960 Microscopic observations on the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica*, **8**, 195–239.
9) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28–36.

Summary

Ascites tumor cells of rat, MTK-sarcoma III, were suspended in a 0.85% NaCl solution. They were cooled rapidly to temperatures between −20°C and −40°C, and were held at these temperatures for 1 or 10 minutes. Microscopic observation revealed that the tumor cells froze translucently at temperatures below −20°C, but they could survive freezing at −30°C for only 1 minute after rapid freezing. The tumor cells seemed to suffer salt injury in concentrated NaCl solution within a short time during freezing, especially at temperatures slightly above the eutectic point of NaCl solution (−21.8°C).

The tumor cells were suspended in a 0.85% NaCl solution containing 5% or 10% glycerol. They were frozen rapidly to various temperatures from −20°C to −50°C and held at these temperatures for 1 or 10 minutes. In the presence of glycerol, almost all tumor cells blacked out immediately after rapid freezing at temperatures above −30°C. This darkening was fatal to the cells. Some extracellularly frozen tumor cells could survive freezing at −20°C for 10 minutes, but not at −30°C even for 1 minute in a 0.85% NaCl solution containing 10% glycerol. Lower concentrations of glycerol were insufficient to prevent the injury of concentrated salt solution during freezing. No tumor cells in a 0.85% NaCl solution containing 5% glycerol could survive rapid freezing at the various temperatures examined.

It was indicated that low concentrations of glycerol contained in ascites tumor cells was highly injurious to cells frozen intracellularly, since glycerol might well accelerate the recrystallization of fine ice crystals formed within the cells by rapid cooling.

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