



Title	ゾウリムシの微細構造に及ぼす細胞外凍結の影響
Author(s)	松坂, 理夫; MATSUSAKA, Tadao
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 67-72
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17752
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p67-72.pdf



ゾウリムシの微細構造に及ぼす細胞外凍結の影響

松坂理夫
(低温科学研究所)
(昭和44年9月受理)

I. 緒言

近年凍結置換法、凍結乾燥法、及び freeze-etching 法の発達によって凍結状態の細胞の電子顕微鏡レベルでの形態観察が種々の細胞でなされるようになった。しかしこれらの方法は従来の化学薬品による固定法の改良を目的として開発されたもので、生細胞の凍結障害の研究を直接の目的とした報告はまだあまり多くはない。今迄上記の方法を利用して凍結障害の問題を扱ったものも大部分は急速凍結による細胞内氷晶の跡の観察^{1,2)}であり、緩慢凍結をさせた細胞での微細構造の観察は大腸菌¹⁾、赤血球^{3,4)}などで行なわれたものしか見当たらない。更に凍結融解前後の微細構造の変化を報告したもの^{5,6)}はいくつかあるが、凍結状態と融解後の構造を比較したもの^{1,7)}は少ない。しかもこれらの報告はいずれも使用した材料の性質上実際に観察した試料の生死は判然としない。

一方、原生動物は単細胞であること、及びその細胞が大型であり取り扱いが容易である為種々な実験に有利な材料である。実際原生動物を材料とした凍結の実験も数多く報告されている⁸⁾。しかしその大部分は寄生性の材料を用いて株の保存を目的としたものであり、自由生活をする原生動物を扱った報告はアメーバ⁹⁾、ゾウリムシ及びテトラヒメナ¹⁰⁾を用いたもの等しかない。しかも後者の報告¹⁰⁾では凍結に対する保護物質を加えた場合しか実験していない。

原生動物学の分野では電子顕微鏡による観察が極く普通になっているにもかかわらず凍結の問題に電子顕微鏡を利用したものはない。著者は保護物質を加えないゾウリムシが細胞外凍結と思われる -10°C の緩慢凍結で例外なく死ぬ事を予備実験で確かめた。この条件で凍結したゾウリムシが細胞外凍結をしている事を確かめる為と、この条件で凍死した細胞の凍結中及び融解後の形態を主に電子顕微鏡のレベルで対照と比較し、細胞外凍結による凍死の機構を知る一助として本実験を行なった。

II. 材料と方法

実験材料にはゾウリムシ *Paramecium caudatum* Ehrenberg を用いた。本実験にはワラの煮出汁で 20°C で1週間から10日間培養した細胞を用いた。

凍結の方法はホロースライドガラスに培養液を一滴とり、氷を浮かせて -10°C の冷凍箱中でゆっくり凍結した。凍結させる培養液中の細胞濃度は一滴中に10~15個体になるように

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1004号

調節した。凍った状態で -10°C に 10 分間おいた後室温でゆっくり融解した。融解後の細胞の生死は繊毛運動の停止で知ることができる。多くの試料では融解後氷のなくなった直後に固定したが、1~2 の例では融解途上のまだ氷の残っているうちに固定した。

対照及び凍結融解した試料は 1/15 M の磷酸緩衝液 (pH 7.3) に 2.5% に溶したグルタルアルデヒドで固定した。凍結中の細胞の観察には同じ緩衝液で 50% にしたエチレングリコール中に 2.5% に溶したグルタルアルデヒドを用いて -10°C で 18 時間凍結置換した。固定後同じ緩衝液で十分洗滌し、2% オスミウム酸水溶液で後固定、エタノール系列で脱水、エポソ¹¹⁾ に包埋した。Porter-Blum MT-I 型ミクロトームで薄切し、酢酸ウラニル及び水酸化鉛¹²⁾ で重染、JEM 6 AS 型電子顕微鏡で観察した。

III. 結 果

実体顕微鏡による観察

凍結中の細胞の形態は試料を薄層にしたり、冷凍顕微鏡等の特殊な装置を用いなかったのでは直接観察はできなかった。しかし電子顕微鏡用の試料を作る為に凍結置換した材料の観察から、細胞が収縮し、部分的にくびれる等の変形を受けていることがわかった。

融解途上で細胞が周囲の氷から離れた直後には凍結中に受けた部分的なくびれ等の変形を保っている。その後少なくとも数分間は変形された状態を保ったまま吸水による膨潤が進行する。周囲の氷が全くなってから 5 分程で実体顕微鏡下でも自己分解が認められるようになり、細胞の 1~数カ所が特に膨れ細胞質の流出を思わせるようになる。更に時間がたつと自己分解が進み細胞の識別が困難になる。

電子顕微鏡による観察

対 照

体表は 3 枚の膜でつまれており、2 枚は互いに近接して細胞の最外層にあり、ペリクルを形成する。他の 1 枚はペリクルと細胞質との間に大きな空隙を持って細胞質をつつんでいる (図版 I-1)。ペリクルの 2 枚の膜のうち外側のものは繊毛をつつむ膜と共通であり、内側のものは細胞質をつつむ膜と繊毛の部分で連絡している。体表全体に運動器官である繊毛が多数存在し、細胞質表層のカイネトソーム (kinetosome) から発している。繊毛は他の動物に見られる繊毛や鞭毛と同様 9 対 +2 本のマイクロチューブル及びそれらをつつむ膜よりなっている。カイネトソームの間に体表に接してそれにほぼ直角に配列する毛胞が存在する。毛胞は 2 つの部分からなり、体表に接して電子密度の高い先端部とそれに接続して細胞質内部に電子密度の低い無構造の液胞状の部分がある。先端部は更に 2 つの部分にわかれ、外側に筒状の部分がありその中に釘状のものが入っている。

細胞質中にはリボゾームが多数あり、その間に小胞体、ミトコンドリア等が散在している (図版 I-1, 2)。更にこれらのオルガネラの数十倍の大きさの食胞が数個ないし十数個あり、内部に種々な消化段階のバクテリアを含んでいる (図版 I-2)。細胞のほぼ中央に大小各 1 個の核が位置し両者共二重の核膜でつまれている。大小核共二重の核膜の間にはほぼ同じ周期で電子密度の高い物質がつまっているが、核膜孔と思われるものは認められない (図版 I-3)。小核

は内部にミクロチュブルを含んでいる以外は他の動物の核と同様な形態を示すが、大核は多数のクロマチングラニューールと呼ばれる比較的小型の顆粒が散在し、それより数は少ないが大型の仁を含む特異な形状を示す。

凍結置換した試料

毛胞が最も大きな変化を示している。即ち毛胞の配列は対照のように一様でなく、液胞状の部分はゆがんで複雑な形態を示し、先端部の筒状の部分の消失したものが多い(図版 II-4)。更にこの試料では射出を示す明瞭な横紋構造を持った毛胞が細胞質中に多数認められ(図版 II-6)、凍結状態ですでに多くの毛胞が体内に射出されていることがわかる。

核や食胞もやはり大きな障害を受けている。核では数カ所で広い範囲にわたって核膜の切断消失が認められ、特に大核では形が非常に凹凸がはげしくなり膜の切断も顕著であり、クロマチングラニューールの配列も乱れている(図版 II-6)。食胞も凍結中にすでに食胞膜の大きな範囲にわたる切断が2~3カ所に見られ、細胞質と食胞内部の区別がつかない部分がある(図版 II-5)。

ミトコンドリア等の小型のオルガネラや細胞をつつむ膜系は細胞の収縮による変形は受けているが膜の切断のような害は受けていない(図版 II-4)。又細胞内に氷晶の跡と考えられる空隙は存在せず細胞外凍結をしていたと考えられる。

凍結融解した試料

この試料でも毛胞が最も大きな変化を示しており、先端部の筒状の部分はほとんど認められない。しかも本来あるべき細胞表層にではなく細胞質中にうずまっている場合が多い。毛胞の液胞状の部分も変形が著しく配列も乱れている(図版 III-7)。又凍結中の試料よりも出現頻度は少なく不鮮明ではあるが、射出による横紋構造を持った毛胞が見られる(図版 III-8)。

細胞をつつむ膜系も相当な変化を受けており、ペリクルは全く存在しないか存在していても断片しか見られない(図版 III-7)。又細胞質が流出した跡と考えられる像や流出中と思われる像もある(図版 III-9)。ミトコンドリア等の小型のオルガネラは膨潤して球形に近くなっており、基質の電子密度の低下や膜の切断等が見られる。しかし毛胞や次に述べる核、食胞のようなオルガネラ程の変化はなく、特に繊毛では単にわずかの膨潤が見られるだけで構造そのものの変化はない。

核や食胞では変形や膜の切断等の障害は小型のオルガネラより著しい傾向がある。核も食胞もその限界膜が広い範囲にわたって数カ所切断され消失しており、細胞質と核質又は食胞内部との境界がわからなくなっている部分がある(図版 III-8, 10)。

IV. 考 察

凍結中の細胞の観察から毛胞、核、食胞のような大型のオルガネラが大きな害を受けていることがわかった。これに対してミトコンドリアや小胞体のような小型のオルガネラ及び細胞をつつんでいる膜系の傷害は少なかった。又細胞内氷晶の跡と考えられる空隙もなく細胞外凍結をしていたと考えられる。これらの事実は細胞外凍結で細胞が脱水され収縮する際に大型のオルガネラの方が小型のものに比べて、大きな害を受けやすいことを示している。更にこの実

験条件では細胞全体としては死に至っているのに、毛胞や食胞の受けた障害が凍死の一つの要因になり得ると考えてもよいであろう。

毛胞は本来細胞の表層に配列しているのであるが、凍結中の試料ではほとんどが体表から離れ細胞質中にうずまっていた。しかもその多くのものは体内に射出していた。ところが融解後の試料では射出を示す横紋の見られる頻度が凍結中の試料よりむしろ低かった。しかし融解後の試料でも、毛胞先端部の筒状の部分はほとんど見られないこと、数は少ないが横紋のある毛胞が見られることから、射出された毛胞が融解後の吸水膨潤で横紋が乱れ認めにくくなったものと思われる。

ゾウリムシの毛胞の機能はまだ正確にはわかっていないが、防禦器官とも低張液に対する浸透圧調節のオルガネラ¹³⁾とも云われている。ゾウリムシと同じ全毛虫に属する種で有毒な毛胞を持つものが知られており、又防禦器官という説が正しいとすれば、ゾウリムシの毛胞にもある程度の毒性があることは考え得るだろう。もし毒性があるとすれば、凍結の際に多数の毛胞が体内に射出されることが細胞の死の一つの原因となり得るだろう。毒性が全くないとしても浸透圧調節の機能を持っているとすれば、本来の位置を離れて体内に射出されるためにその機能を失う可能性はあろう。このことは融解後の浸透圧調節が異常になり、細胞の死の一つの要因となり得ることを示している。いずれにせよ凍結中に体内射出の起きる機構はまだ不明であり、今後更に検討する必要がある。

繊毛虫では小核を人工的に取り除いても無性的な増殖は可能であり、事実そのような処理を受けた株も確立している。大核は接合の際等には消失してしまう。又アメーバ等では核を取り除くと無核の細胞質は増殖はできないが数日は生きている。従って本実験のように大小核両方が傷害を受けた場合でも、融解後増殖はできなくなるであろうが、これが死の直接の原因になることは、障害を受けて細胞内に残っている核自体が有害な作用をしないかぎり考えにくい。

食胞には種々の消化酵素が存在することはすでによく知られている^{14,15)}。本実験で食胞が凍結によって破壊され細胞質と食胞内部の境界がわからない部分が数カ所できることが知られた。このことは食胞内にある酵素が細胞質中に出る可能性のあることを示している。もしこのようなことがあれば細胞が自己融解を起こすついには死に至るであろうと考えられる。しかしこの点についてもまだ確実な証拠はなく今後更に検討する必要がある。

V. 摘 要

-10°Cの緩慢凍結でゾウリムシは殺され融解後数分で例外なく autolysis を始めることがわかった。そこで凍結中及び融解後の細胞の微細構造を対照と比較した。

凍結中、融解後いずれの細胞も毛胞が最も大きな変化を受けていた。凍結中の試料では多くの毛胞が体内射出をしており、凍結中、融解後共にその配列が大きく乱れていた。

核及び食胞にも変化があり、それぞれの限界膜が広い範囲にわたって切断され消失していた。これらの大型のオルガネラに比べてミトコンドリア、小胞体のような小型のものの変化は少なかった。

細胞内氷晶の跡と思われる空隙は認められず細胞外凍結をしていたと考えられる。

以上の事実からゾウリムシの -10°C での凍死の要因の一つとして、毛胞の体内射出、食胞の破壊による食胞内酵素の作用などがあげられるであろうと推定された。

終りにこの報告にあたり、御校閲下さった根井教授に感謝する。

文 献

- 1) 根井外喜男・荒木 忠・松坂理夫 1966 微生物の凍結 III. 大腸菌の凍結障害の機構. 低温科学, 生物篇, **24**, 35-48.
- 2) 大塚宏二・酒井 昭 1967 急速冷却した植物細胞内にできる氷の電子顕微鏡的研究. 低温科学, 生物篇, **25**, 21-28.
- 3) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contr. Low Temp. Sci.*, **B 13**, 1-6.
- 4) 小島義夫 1965 家兎血液の凍結による障害 III. 電子顕微鏡による形態学的観察. 低温科学, 生物篇, **23**, 129-148.
- 5) Trump, B. F., Young, D. E., Arnold, E. A. and Stowell, R. E. 1965 Effects of freezing and thawing on the structure, chemical constitution, and function of cytoplasmic structures. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl., 15, 144-168.
- 6) Weiss, L. and Armstrong, J. A. 1960 Structural changes in mammalian cells associated with cooling to -79°C . *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 673-678.
- 7) Sherman, J. K. and Kim, K. S. 1967 Correlation of cellular ultrastructure before freezing, while frozen, and after thawing in assessing freeze-thaw-induced injury. *Cryobiology*, **4**, 61-74.
- 8) Smith, A. U. 1961 Biological effects of freezing and supercooling. Edward-Arnold Ltd. London, pp. 116-137.
- 9) Chambers, R. and Hale, H. P. 1932 The formation of ice in protoplasm. *proc. Roy. Soc. B 110*, 336-352.
- 10) Wang, G. T. and Marquardt, W. C. 1966 Survival of *Tetrahymena pyriformis* and *Paramecium aurelia* following freezing. *J. Protozool.*, **13**, 123-128.
- 11) 串田 弘 1966 日本電子顕微鏡学会第22回学術講演会講演予稿集, 204.
- 12) Millonig, G. 1961 A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 736-739.
- 13) Wohlfarth-Bottermann, K. E. 1950 Funktion und Struktur der Paramecium-Trichocysten. *Naturwissenschaften*, **37**, 562-563.
- 14) Müller, M., 1967 Digestion. In Chemical Zoology, Vol. I. Protozoa. (Florkin, M. and Scheer, B. T. eds.), Academic Press, New York, pp. 351-380.
- 15) Elliott, A. M. and Clemons, G. L. 1966 An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, **13**, 311-323.

Summary

All specimens of *Paramecium caudatum* examined were killed by slow freezing down to -10°C and manifested autolysis in a short time after thawing. To investigate the mechanism of this death by freezing, ultrastructural changes caused by freezing were examined in the control group and in freeze-substituted and frozen-thawed specimens.

The most remarkable change observed in the frozen specimens was the intracellular discharge of trichocysts and disturbance of their orientation. Severe damages were also

observed in both macro- and micro-nuclei and food vacuoles. Mitochondrion, endoplasmic reticulum and other small organelles were slightly injured. No intracellular ice cavities were observed.

These facts suggest that the paramecia are frozen extracellularly and the intracellular discharge of trichocysts and membrane damage of food vacuoles might be the main factor of death by freezing.

図版説明

図版 I. 対照

1. 体表の一部。矢印は2枚のペリクル膜を示す。Tt: 毛胞先端部, Tv: 毛胞の液胞部, C: 繊毛, K: カイネトソーム, M: ミトコンドリア。×9000
2. 食胞 (Fv) 及び大核 (MaN) の一部。×4000
3. 大核 (MaN) 及び小核 (MiN)。Nm: 核膜, Nu: 仁, Ch: クロマチングラニュール。×25000

図版 II. 凍結置換した試料

4. 体表の一部。毛胞先端部は見られず, 液胞状 (Tv) の部分の配列が乱れている。Dt: 射出された毛胞, M: ミトコンドリア。×6000
5. 食胞 (Fv) の一部。食胞膜の欠損が見られる。×10000
6. 大核 (MaN) と射出された毛胞 (Dt)。大核の変形と核膜の欠損が目立つ。×7500

図版 III. 凍結融解した試料

7. 体表の一部。ペリクルが失われ毛胞の液胞状 (Tv) の部分の配列が乱れている。Tt: 毛胞先端部, K: カイネトソーム, M: ミトコンドリア。×7500
8. 大核 (MaN) の膜の欠損 (図右下) と射出された毛胞 (Dt) が見られる。M: ミトコンドリア。×20000
9. 細胞質の流出像。×20000
10. 食胞 (Fv) の一部。食胞膜の欠損を示す。×7500





