



Title	急速冷却された植物細胞の生存に関する要因
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 27-36
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17766
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p27-36.pdf



急速冷却された植物細胞の生存に關与する要因

酒 井 昭

(低温科学研究所)

(昭和45年8月受理)

I. 緒 言

前報¹⁻⁴⁾において、冬のクワの枝の皮層組織切片を媒液につけないで室温から直接液体窒素中に入れて超急速冷却し、ついで30°Cの水中で急速加温した時、それらの全ての細胞が生存していることを明らかにした。また超急速冷却後、凍結置換された細胞の電子顕微鏡像には直接観察1万倍でも急速冷却中に生じた氷晶のあとと考えられる空胞は認められなかった^{3,4)}。このように超急速冷却された細胞は-60°C以下の温度では氷晶の生長速度が小さく、かなり安定して生存できるが、-30°C以上では非常に不安定で全細胞が1分以内に殺された³⁻⁵⁾。なお、この場合の電子顕微鏡像は氷晶のあとと思われる多くの空胞が認められた⁴⁾。また室温から-30°Cの液槽に入れて急速冷却し、そこに5秒間おいた時も生存細胞はまったく認められなかった。この場合、同一組織切片内の細胞間や同一細胞内においても大きさや形態が著しく異なる氷晶のぬげがらと思われる空胞が多数認められた³⁻⁵⁾。

著者は前報³⁻⁶⁾において急速冷却された細胞の生存率が媒液の種類によって著しく影響されることを報告した。本文では、急速冷却された細胞の生存に關与するいくつかの要因、すなわち媒液の種類、予備凍結による脱水程度、細胞の耐凍度などについて述べる。

II. 材料と方法

クワ *Morus bombycis* Koidz. の冬の枝の皮層組織を実験材料に用いた。組織切片は通常カバーガラス(18×18 mm)の間に0.03 mlの水または他の媒液に浸して急速冷却した。急速冷却された細胞は35°Cの水中で急速に(加温速度: 秒速500°C)、または空中でゆっくり(秒速2°C)あたためられた。

組織切片の温度は0.1 mm銅-コンスタンタン熱電対を用い、電磁オッシログラフで自記させた。冷却速度は媒液の凍結開始後の冷却曲線にそって求められた。

細胞をいろいろな程度に脱水する場合には、組織切片を-5°Cで凍結後、所定温度までゆっくり冷却し、そこに10~15分間おいた。その後液体窒素またはイソペンタン槽中に入れて急速冷却した。

細胞の生死の判定は前報^{2,3)}同様、生体染色と原形質分離の方法で行なった。すなわち、凍結融解した細胞をあらかじめ中性赤で生体染色後、2倍の高調平衡塩溶液と水とで原形質分

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1113号

離と復帰とを2回繰返したのち、なお正常に染っており、しかも正常に原形質分離しているものを生存しているものとみなした。

III. 結 果

1. 急速冷却された細胞の生存率に及ぼす予備凍結温度の影響

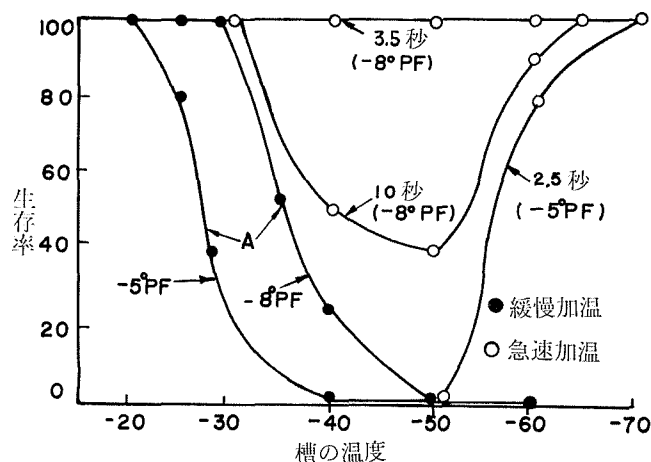
-5, -8 および -10°C で予備凍結された組織切片を -20°C から -70°C までの異なった温度に保たれたイソペンタン槽中に入れて急速冷却した。その場合の冷却初速度を第1表に示す。

急速冷却された組織切片は 35°C の水中で急速加温するか、-5°C の空中に5分間おいたのち 0°C の空中でゆっくりあたためた。第1, 2図に示すように、-5, -8 および -10°C で予備凍結された細胞はそれぞれ -20, -30 および -45°C 以高の温度の液の中に入れて急速冷却後、急速および緩慢にあたためられたが加温条件にかかわらず全細胞が生存していた。このことは、これらの細胞が細胞外凍結していたことを示すものと考えられる(第1, 2図)。-5, -8 および -10°C で予備凍結後、それぞれ細胞外凍結で生存できない温度から約 -65°C 以高の温度範囲に保たれている液中に浸され、急速冷却急速加温された細胞の生存率はそれらの温度におかれる時間の長さとともに減少した(第1, 2図)。また異なった温度で予備凍結した細胞を -50, -60 および -70°C の液の中に入れて急速冷却後害なくそれらの温度に保たれる時間を求めた。各温度に到達後、それらの温度に異なる時間おいたのち 30°C

第1表 -5°C で予備凍結された組織切片を異なった温度の液槽に入れて急速冷却した時の冷却初速度

槽の温度 (°C)	冷却初速度 (°C/秒)
-20	15
-30	60
-40	85
-50	115
-60	150
-70	160

0.03 ml の水に浸した組織切片をカバーガラスの間にはさみ -5°C で予備凍結後、異なった温度の液槽に入れて冷却した

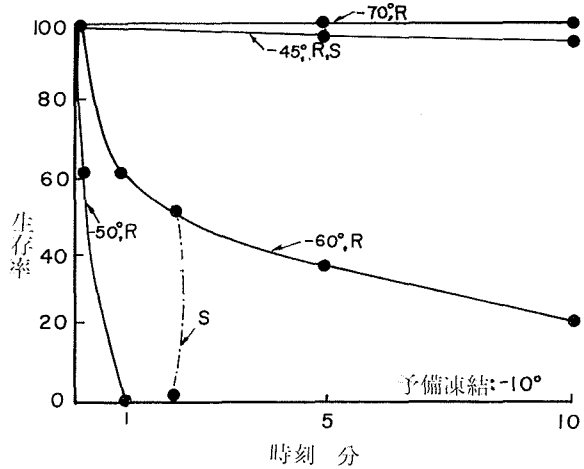


第1図 予備凍結された細胞を異なる温度の液の中に入れて冷却し、そこに異なる時間おいたのち急速または緩慢に加温した場合の生存率
A: 急速冷却後 -5°C の空中に5分間おいたのち、0°C の空中であたためた時の生存曲線
-5°PF, -8°PF: -5° および -8°C で予備凍結

の水中で急速加温した。第2表に示すように、予備凍結温度が低くなるほどそれらの温度に長い間生存できる。
 -5°Cで予備凍結され、-40°Cの液中で急速冷却された細胞は-40°Cに到達後(所要時間: 1.1~1.3秒), 3秒以内に生存率が70から10%まで低下した。また、-5°Cで予備凍結後-50°Cの液中で冷却された細胞は-50°Cまでの冷却中(1.7~2.0秒)に大部分のものが殺された。さらに水に浸して-5°Cで予備凍結した細胞では、-5°Cから-60°Cまでの温度範囲を1秒以内の速さで通過しなければ全細胞を生存させられないことがわかった。したがって、-8°C以下の温度で予備凍結した細胞と違って、-5°Cで予備凍結後-50°C以上の液の中に入れて急速冷却した細胞内にできる微氷晶の生長速度はきわめて大きいものと考えられる。

2. 急速冷却された細胞の生存率に及ぼす媒液の影響

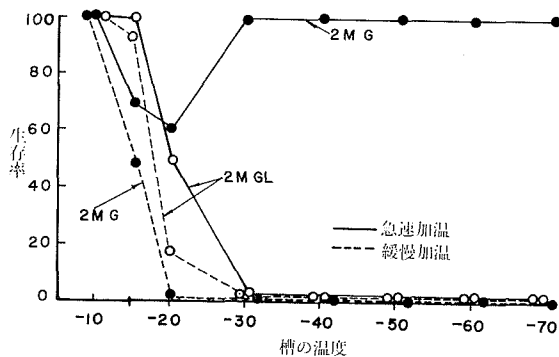
急速冷却された細胞の生存率に及ぼすグルコースおよびグリセリンの影響を調べるために、グルコースとグリセリンの各2M溶液に浸した組織切片を2枚のカバーガラスの間にはさみ、イソペンタン槽中に入れて急速冷却し、ついで35°Cの水中または0°Cの空中であたためた。なお、組織切片はグリセリン溶液中に30分間浸し、原形質分離の復帰から細胞内にグリセリンが滲透したことを確かめたのち急速冷却した。第3図に示すように、-15°Cおよび-20°Cの液の中に入れて冷却後、0°Cの空中でゆっくりあたためた時の



第2図 -10°Cで予備凍結した細胞を異なる温度の液の中に入れて急速冷却し、そこに異なる時間おいたのち、急速または緩慢に加温した場合の生存率
 R: 急速加温, S: 緩慢加温

第2表 予備凍結された細胞が急速冷却後害なく-50~-70°Cの温度に保たれる時間(秒)

予備凍結温度 (°C)	槽の温度(°C)		
	-50	-60	-70
-5	0.5>	2	—
-8	3.5	10	120
-10	10	30	60<



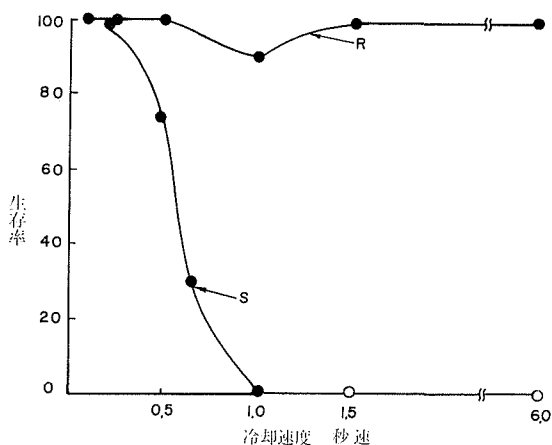
第3図 急速冷却後、急速または緩慢に加温された細胞の生存率に及ぼすグルコースおよびグリセリンの影響

2M グルコース (G) およびグリセリン (GL) 溶液で処理した組織切片を異なる温度のイソペンタン槽中に入れて急速冷却し、加温する前にそれらの温度に1分間おいた

●: グルコース, ○: グリセリン

生存率はグリセリン処理の細胞の方がグルコース処理のものより高かった。このことは、グリセリンで処理した細胞はグルコースで処理したものより、より低い温度でも、細胞外凍結をおこしやすいことを示している。しかし、グリセリンで処理した細胞は -30°C 以下の液中に入れて急速に冷却した時には加温条件にかかわらず全細胞が殺された。さらに 3M および 4M のグリセリン溶液で処理後、 -30°C 以下の液中に入れて急速冷却した場合にも生存細胞は認められなかった。これに対して組織切片を 2M のグルコース溶液に浸した場合には、 -30°C 以下の液中に入れて急速冷却したのち、急速加温した時全細胞が生存していた。しかし、 0°C の空中で加温した時には全細胞が殺された。なお組織切片を -30°C の液中に入れて冷却した時の冷却速度は秒速 10°C であった。

さらに、急速凍結後生存できる最低の冷却速度を知るために、等調溶液の 1.4M グルコース溶液に組織切片を浸し、異なった速度で室温から -35°C まで冷却した。その後 35°C の水中または 0°C の空中であたためた。第4図に示すように、媒液の凍結後秒速 0.5°C の初速度で冷却された細胞の大部分は細胞外凍結し、秒速 1.5°C 以上の速度で急速冷却された時には急速にあたためれば全細胞が生存できた。 1.4M グルコース溶液に浸した組織切片を -30°C の液中に入れて急速冷却し、その温度に少なくとも20分間保ったのち、急速にあたためた場合には



第4図 等調なグルコース溶液に浸して異なる速度で室温から -30°C まで冷却し、急速および緩慢に加温した細胞の生存率
R: 急速加温, S: 緩慢加温

は全細胞が生存していた。また -30°C の液中に入れて急速冷却したのち、 -20°C の液中に移したとき、少なくとも1分間その温度に生存できた。しかし -30°C から -15°C の液中に移した組織切片中の約半数の細胞は30秒以内に殺され、また 10°C の液中に移された場合には全細胞が30秒以内に殺された。これらの事実は、グルコース溶液に浸されたのち -30°C の液中で急速冷却された細胞は約 -30°C 以下の温度では比較的長く生存できるが、温度が高まるにつれて、ことに -15°C 以上では、きわめて短時間しか生存できないことを示している。

組織切片を 0.8M の低調なグルコース溶液に浸し、 -30°C の液中に入れて急速冷却し、その温度に1分間おいた後急速加温した時全細胞が死んだ。この死の原因を明らかにするために、組織切片を 0.03ml の異なる濃度のグルコース溶液に浸し、 -30°C の液中に入れて急速冷却、急速加温したときの生存率、冷却速度、過冷却温度などを調べた。第3表に示すように、 0.8M より低濃度のグルコース溶液に浸して冷却した場合には、全細胞が殺された。媒液の凍結後の冷却曲線にそって測られた冷却速度はグルコース溶液の濃度の低下とともに増大した。また、過冷却温度および媒液の凍結後の反転温度 (rebound point) はグルコース溶液の濃度の高まりとともに著しく低下した。 0.5M グルコース溶液に浸したときには、等調または高調溶

第3表 組織切片を異なる濃度のグルコース溶液中にひたし、 -33°C の液槽中に入れて急速冷却した時の生存率、過冷却温度、冷却速度

	水	グルコース溶液の濃度 (M)			
		0.5	1.0	1.5	2.0
生存率 (%)	0	0	30	100	100
過冷却温度 ($^{\circ}\text{C}$)	$-6\sim-7$	$-14\sim-15$	$-20\sim-21$	$-22\sim-24$	$-25\sim-28$
反転温度 ($^{\circ}\text{C}$)*	0	$-3\sim-4$	$-9\sim-10$	$-15\sim-16$	$-19\sim-22$
過冷却温度から反転温度までの経過時間 (秒)	0.05	0.15	0.38	0.55	0.7
同上昇速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{秒}$)	130	73	30	11	10
冷却速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{秒}$)	16	19	17	10	4

組織切片は0.03 mlのグルコース溶液に浸し、カバーガラスの間にはさんで急速冷却、急速加温

* 媒液の凍結開始後、温度は上昇するが、ついで下降を始める。この変曲点を反転温度とよぶ

液に浸した時よりもはるかに高い温度で凍結を開始した。第3表に示すように、凍結開始後、反転温度に達するのに要する時間は、媒液が水および0.5 M グルコース溶液の場合にはそれぞれ0.05秒および0.15秒であった。このことは、これらの細胞では媒液の凍結開始直後、細胞は非常な速さで氷晶によって植氷されることを示している。さらに、組織切片を0.5 M グルコース溶液に浸し、 -30°C の液中に入れて冷却中、所定の温度に達した時すばやく 30°C の水に移して冷却を中断した。その結果、媒液の凍結開始後0.7秒で -4°C から -22°C まで冷却されるが、その間に全細胞が殺されることがわかった。この事は、水または低調なグルコース溶液に浸して急速冷却する時、媒液の凍結開始直後に細胞内凍結をおこして殺されることを示している。組織切片を0.5 M および0.8 M グルコース溶液に浸し、 -70°C の液中に入れて冷却(秒速: 70°C)し、ついで急速加温したがやはり全細胞が殺されていた。しかし、0.5 M グルコース溶液に浸し、 -5°C で予備凍結後 -33°C の液中に入れて急速冷却したものは全細胞が生存していた。さらに、水とグルコース溶液に浸した細胞が急速冷却後生存できる時間の長さを比較するために、水と0.5 M グルコース溶液に組織切片を浸し、液体窒素中に入れて急速冷却した。その後、 -33°C の液中に移してそこに異なる時間おいてから急速加温した。その結果、水に浸した組織切片は -30°C に10秒間、グルコース溶液に浸したものでは10分間生存できた。また、水に浸した組織切片を -10°C で予備凍結後、同様な処理をしたところ -30°C で30秒しか生存できなかった。

第3図に示すように、2 M グリセリン溶液で30分間処理した細胞を -30°C の液中に入れて急速冷却後、急速加温したとき全細胞が殺された。この場合に、 -30°C の温度に到達直後に急速加温したときは大部分の細胞が生存できたが、 -30°C に2秒間置いたときには全細胞が殺された。またグリセリンで処理した細胞を -30°C の液中に入れて急速冷却したときの過冷却温度、媒液の凍結後の反転温度、冷却速度は1.5 M グルコースの値にほぼ等しい(第3表)。また、グリセリン溶液中に組織切片を5分間浸し、グリセリンが細胞内にほとんど透過していない細胞を -30°C の液中、または液体窒素中に入れて急速冷却し、ついで急速加温した時には

全細胞が生存していた。これらの事実は、グリセリンの細胞内での存在が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ことを示しているものと考えられる。

ポリビニールピロリドン (PVP) の 20% 水溶液や牛の血清に浸して急速冷却、急速加温した場合にも全細胞が死んだ。しかし、ジメチル・スルフォキシド (DMSO) の 2 M 溶液に浸し、 -30°C 以下の液中に入れて急速冷却後、急速加温した時は全細胞が生存していた。

IV. 考 察

急速冷却後細胞を生存させるのに必要な冷却速度は用いた生物材料の大きさ、媒液の種類及びその量、細胞の耐凍度、予備凍結または高調溶液による脱水の程度等の要因によって著しく異なる。冬のクワの枝の皮層細胞のように耐凍度の高い細胞でもカバーガラスの間に 0.03 ml の水に浸し、室温から -79°C または -196°C の液中に入れて超急速冷却 (秒速 150°C) した時、これらの細胞は媒液の凍結直後に殺されるようである。これを -2°C (クワの皮層組織搾汁の氷点) で凍結すると媒液は凍るが細胞はほとんど凍結しない。これを -79°C の液中に入れて超急速冷却してもやはりこれらの細胞は殺される。しかし、 -5°C で予備凍結し、 -70°C 以下の液中に入れて氷晶の生長速度の大きい温度範囲を速く通過させる時は全ての細胞が生存している。すでに述べたように、 -5°C で予備凍結した細胞を -50°C の液中に入れて急速冷却後これらの細胞を生存させることは困難である。また、 -15°C 以下の温度で予備凍結された細胞は急速加温する限りどの温度の液中に入れて急速冷却しても全ての細胞が生存できる^{3,5)}。 -2 、 -5 、 -8 および -10°C の各温度で予備凍結された細胞はそれぞれ -13 、 -20 、 -30 および -45°C の温度の液中に入れて冷却しても細胞外凍結をおこす。したがって、予備凍結温度が低くなり細胞の脱水がすすむにつれて、細胞は比較的高い温度で致命的な細胞内凍結をおこしにくくなる。 -5°C および -10°C で予備凍結された細胞は細胞の含水量のそれぞれ約 50 および 70% 脱水されているし⁷⁾、そのうえ、冬のクワの皮層細胞は多量の糖類を含有している⁸⁾。したがってこうした濃い糖液中では細胞内に生じた氷晶の生長速度はきわめておそいものと考えられる。実際、異なる温度で予備凍結後 -60°C 以下の異なる温度の液中に入れて急速冷却された細胞が生存できる時間の長さは、予備凍結温度が低くなるほど著しく長くなることを確かめた⁹⁾。

クワの皮層組織切片を 0.03 ml の水に浸してカバーガラスの間にはさみ、 -5°C で予備凍結後生存させるのに必要な冷却初速度は秒速 130°C 、平均速度は秒速 100°C であった。Mazur^{10,11)} は水に浸した酵母細胞を -70°C まで急速冷却し (平均冷却速度: $130^{\circ}\text{C}/\text{秒}$) ついで急速加温して生細胞を得たが、クワの皮層細胞とちがってその生存率はせいぜい 5~10% であった。急速冷却、急速加温された酵母細胞のこのような低い生存率は、水に浸して急速冷却されたため大部分の細胞が媒液の凍結につづいて致命的な細胞内凍結をおこしたためと考えられる。

朝比奈等^{12,13)} はシロネズミの腹水腫瘍細胞を秒速 13°C で急速凍結させた時、これらの細胞は凍結していない正常な細胞にみられるような半透明な外観を呈していたし、 -30°C では非常に安定してこの状態を保っているが、 -20°C ことに -15°C 以上では極めて不安定で短時間に可視的な氷晶が細胞内に認められることを観察している。クワの皮層細胞でも等調または高

調なグルコース溶液に浸して -30°C 以下の液の中に入れて急速冷却するときには、水に浸して急速冷却した細胞とちがって -30°C で少なくとも 20 分間は生存できる。しかし、 -15°C 以上の温度に 30 秒以上おくと全ての細胞が殺される。これは急速凍結の際に細胞内に生じた微氷晶が生長して細胞に害を与えたものと考えられる。最近、大塚は急速凍結された細胞の凍結置換後の電子顕微鏡像を調べたが、低調なグルコース溶液や水に浸して急速冷却されたものでは氷晶のあとと思われる多数の空胞がほとんど全ての細胞に認められたが、2 M グルコース溶液で処理された細胞切片中の半数以上のものには細胞内に氷晶のあとと考えられる空胞が認められなかったことを観察している (大塚未発表)。

クワの皮層組織切片を等調または高調なグルコース溶液に浸して -30°C の液の中に入れて急速冷却した時、それらの細胞は少なくとも 20 分間は生存できたが、水に浸し、 -10°C で予備凍結後 -30°C の液の中に入れて急速冷却したものでは、せいぜい 5 秒間しか生存できなかった。また、水または 0.5 M グルコース溶液に浸して -5°C で予備凍結後、液体窒素中に入れて急速冷却したのち -30°C の液の中に移したとき、水に浸したものは 10 秒間しか生存できなかったのに 0.5 M グルコース溶液に浸したものでは 10 分間生存できた。このように、急速冷却された細胞が -30°C の温度で生存できる時間は、細胞が氷でかこまれているときはきわめて短く、凍った濃い糖液の場合にはきわめて長い。すなわち、急速冷却された細胞が氷よりも凍った糖液でかこまれている時の方が細胞内の微氷晶が生長しにくいことを示している。このことは現在のところ説明しがたいが、非常に興味ある現象である。著者は最近、急速冷却された細胞が生存できる時間は媒液によって著しく異なることを示す多くのデータを得た。

動物細胞においても、急速冷却、急速加温後これらを生存させるのに糖液が有効であることが報告^{15,16)}されている。等調またはやや高調なグルコース溶液に浸した細胞が急速冷却後生存できるのはグルコースの次のような性質によるものと考えられる。

1. 媒液の凍結につづいて比較的高い温度でおこる致死的な細胞内凍結を防ぐ能力
2. 1.5~2.0 M のグルコース溶液の過冷却温度が $-22\sim-30^{\circ}\text{C}$ で、低い温度で急速凍結すること
3. 急速凍結された細胞の生存状態を安定に保つ作用
4. グリセリンやエチレングライコールとちがって、グルコース溶液の移動再結晶温度が比較的高いこと (-38°C)

前報⁹⁾のように、用いたクワの細胞では 2 M DMSO 溶液はグルコース溶液と同程度の効果が認められた。哺乳動物の細胞では糖のほか、PVP、血清、エチレングライコールのポリマーが急速冷却された細胞の生存率を高めるのに効果があることが報告¹⁵⁾されている。しかし、クワの細胞では PVP や血清にはそのような効果が認められなかった。グリセリンとちがって、24~40% PVP 水溶液の移動再結晶温度は -27°C で比較的高いことから考えて、植物細胞がこれらの溶液中で急速冷却されるときに媒液の凍結後比較的高い温度で致死的な細胞内凍結をおこしたものと考えられる。これは哺乳動物の細胞、ことに赤血球の細胞とクワの細胞との水に対する透過性の差によって説明されるかもしれない。

等調な糖液中に植物細胞を浸して急速冷却後これらを生存させられるのは耐凍性の高い細

胞に限られる。耐凍性の低い細胞は同一条件で冷却、加温しても生存させることはできない。耐凍性の低い細胞は急速冷却の際比較的高い温度で細胞内凍結をおこしやすいことが知られているので¹⁷⁾、そのことが死の原因であると考えられる。耐凍性の低い植物細胞を急速冷却、加温後生存させるためには、予め等調なグルコース溶液に浸し、 -5°C または -10°C で予備凍結することが不可欠である。

V. 摘 要

主として冬のクワの枝の皮層細胞を用い急速冷却、急速加温後それらを生存させるのに必要な要因を調べた。

1. 0.03 ml の水、低調なグルコース溶液、PVP、血清にそれぞれ浸した組織切片を2枚のカバーガラスの間にはさみ、 -30°C の液中に入れて急速冷却、急速加温したとき全細胞が殺された。これは媒液の凍結についで致命的な細胞内凍結がおきたためと考えられる。

2. 等調や、やや高調なグルコース溶液中で急速凍結された細胞にみられるように、この方法で細胞を生存させるには冷却速度のほかに、媒液の凍結開始温度が約 -20°C 以下であることが必要のようである。

3. 等調または高調なグルコースおよびジメチル・スルフォキサイド溶液に浸して急速冷却 (秒速 10°C) した細胞は急速加温すれば全細胞が生存できた。この場合、これらの細胞は急速冷却後、 -30°C に少なくとも 20 分間生存できたが、 -20°C 以上の温度では 30 秒以内しか生存できなかった。しかし、水に浸し -10°C で予備凍結した細胞は -30°C に数秒間しか生存できなかった。このことは、急速冷却された細胞が氷よりも凍った糖液でとりかまれている方がより長く生存できることを示している。

4. 等調なグルコース溶液に浸して急速冷却し細胞内凍結をおこさせた細胞を急速加温後生存させる限界冷却速度は秒速 1.5°C であった。

5. 耐凍度の低い細胞はたとえ等調なグルコース溶液に浸して急速冷却、急速加温しても生存できない。これらの細胞を生かすためにはグルコース溶液で処理後、 -5°C で予備凍結し、急速冷却、急速加温することが必要である。

6. グリセリンが多量に透過した細胞を -30°C 以下の液中に入れて急速冷却、急速加温した時は生存細胞は認められなかったが、グリセリンが透過していない細胞では全部生存していた。このことはグリセリンの細胞内における存在が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ことを示す。

以上のことから、皮層細胞を急速冷却後生存させるには、媒液の凍結後比較的高い温度でおこる致命的細胞内凍結を防ぐことが不可欠である。こうした方法で細胞を生存させる場合、その生存率に大きな関係をもつ要因は冷却速度、凍結開始温度、媒液の種類、細胞の耐凍度、細胞の脱水状態等である。

文 献

- 1) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.
- 2) 酒井 昭 1966 超低温における植物組織の生存 IV. 急速冷却, 急速加温した細胞の生存の機構. 低温科学, 生物篇, **24**, 1-13.
- 3) Sakai, A., Ōtsuka, K. and Yoshida, S. 1968 Mechanism of survival in plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. *Cryobiology*, **4**, 165-173.
- 4) 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.
- 5) 酒井 昭・吉田静夫 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.
- 6) 酒井 昭 1968 超低温における植物組織の生存 VII. 耐凍性の低い植物細胞を超低温で生存させる方法. 低温科学, 生物篇, **26**, 1-10.
- 7) 吉田静夫・酒井 昭 1968 植物の凍害に及ぼす融解速度の影響 II. 凍結状態での温度変動にともなう氷の量の変化. 低温科学, 生物篇, **26**, 23-31.
- 8) Sakai, A. 1962 Studies on the frost-hardiness of woody plants. I. The causal relation between sugar content and frost-hardiness. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 11**, 1-40.
- 9) Sakai, A. 1967 Survival of plant tissue at super-low temperatures by rapid cooling and warming. *In Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (É. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci. Sapporo, 119-130.
- 10) Mazur, P. 1966 Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*, **2**, 181-192.
- 11) Mazur, P. 1967 Physical-chemical basis of injury from intracellular freezing in yeast. *In Cellular injury and Resistance in Freezing Organisms* (É. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci. Sapporo, 171-189.
- 12) 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.
- 13) 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. 急速凍結した原形質の安定度. 低温科学, 生物篇, **27**, 41-45.
- 14) 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. グリセリンを加えた細胞の急速凍結. 低温科学, 生物篇, **27**, 47-54.
- 15) Doebbler, G. F. and Rinfret, A. P. 1962 The influence of protective compounds and cooling and warming conditions of haemolysis of erythrocytes by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 449-458.
- 16) Polge, C. 1960 Protective action of some neutral solutes during the freezing of bull spermatozoa and trypanosomes. *In Recent Research in Freezing and Drying* (A. S. Parkes and A. U. Smith, eds), Blackwell Scientific Publication, Oxford, 87-100.
- 17) Asahina, É. 1956 The freezing process of plant cell. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **10**, 83-126.

Summary

The maintenance of viability of cortical cells in rapid cooling to and rewarming from very low temperatures can be accomplished by a rapid passage through the temperature zone of growth of intracellular fine crystals which are formed during rapid cooling. Thus, innocuous intracellular freezing by rapid cooling can be induced more readily by slowing down the growth rate of intracellular fine crystals before they attain a dangerous size. The stability of the living state of rapidly cooled cells was found to be influenced remarkably by both the suspending solutions and the degree of prefreezing.

In the cells suspended in isotonic or slightly hypertonic glucose solution, innocuous intracellular freezing occurs when cooled at a rate higher than 1.5°C per sec and the living state of the rapidly frozen cells remained stable even at -30°C for 20 minutes, while prefrozen cells at -10°C in water could survive freezing at -30°C only for 5 seconds at the most. And the prefrozen cells at -5°C in water or 0.5 M glucose solution remained alive for about 10 seconds or 10 minutes at -30°C after cooling and rewarming to and from liquid nitrogen temperatures. These facts seem to suggest that when rapidly cooled cells are surrounded with ice, there is a high instability in their living state, while those surrounded with concentrated solutions of sugar remained far stable. However, in the winter cortical cells suspended in hypertonic glucose solution or water, all were killed during rapid cooling within about 0.7 sec immediately after freezing of the suspending medium at temperatures ranging from -4° to -22°C .

These rapidly cooled cells might be killed as a result of prompt formation of large ice grains throughout the cells. In less hardy cells which could survive freezing down to only -10°C , innocuous intracellular freezing seldom occurs, even when cooled and rewarmed ultra-rapidly as done in cortical tissues, since these less hardy cells are quite apt to cause fatal intracellular freezing following the onset of freezing of the suspending medium. However, even less hardy cells were found to survive rapid cooling to and rewarming from super-low temperatures, provided that they were prefrozen at -5°C or suspended in isotonic or slightly hypertonic sugar solutions.