



Title	急速凍結によって HeLa 細胞内に生じた氷晶の電子顕微鏡観察
Author(s)	島田, 公夫; SHIMADA, Kimio; 浅田, 実 他
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 83-89
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17787
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p83-89.pdf



急速凍結によって HeLa 細胞内に生じた 氷晶の電子顕微鏡観察*

島田 公夫・浅田 実・朝比奈英三

(低温科学研究所)

(昭和 46 年 9 月受理)

I. 緒 言

これまで、われわれはシロネズミの腹水腫瘍細胞¹⁾と HeLa 細胞²⁾を使い、いろいろな凍結条件下で細胞の凍り方と細胞内部の氷晶の形態を光学顕微鏡で観察してきた。これらの細胞を急速に凍結すると、半透明な凍り方をし細胞の内部に氷晶は観察されなかった。半透明に凍結した細胞のうち、シロネズミの腹水腫瘍細胞は融解後生存したが、HeLa 細胞は生存しなかった。そこで今回は HeLa 細胞を使い、急速凍結したときに生じる、光学顕微鏡では見えない程小さな細胞内氷晶をフリーズエッチング法を用いて電子顕微鏡で観察した。そして、凍結細胞の内部に生じた氷晶とそれによる細胞障害の関係について考察してみた。

凍結した生物試料の破断面のレプリカを取って電子顕微鏡で観察する、いわゆるフリーズエッチング法は Steere³⁾, Moor⁴⁾らの研究によって発展した。この方法は従来の超薄切片法による観察に比較して、生物試料を固定、脱水、包埋、染色のような処理によっておこる変性からまもること、断面だけでなく表面構造も観察できる等の利点から、細胞の微細構造の解明に利用されてきた。細胞の微細構造の観察のためには、凍結細胞の内部に生じる氷晶の発達をできるだけ抑えるのが望ましく、そのためグリセリンを試料に加えて急速に凍結することが考案された⁴⁾。逆にグリセリンを加えないで凍結した細胞では細胞内氷晶が発達しやすいので、これを利用すれば、凍結によって生じる細胞内氷晶の状態とそれによってひきおこされる細胞障害の関係を明らかにできる。

II. 材料と方法

実験に使った細胞は HeLa 細胞株のクローン系である HeLa-S3 である。この細胞は 1969 年 10 月に北海道大学染色体研究施設の株から分離して以来当研究所で継代培養を続けている。培養液には 20% 仔牛血清を含む TC-199 培養液 (千葉県血清研究所) を使い、単層培養法で培養した。培養液には 100 単位/ml のペニシリンと 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン (ともに萬有製薬) が含まれている。

大型の角型培養瓶に単層培養された HeLa 細胞を 0.2% トリプシン (NB 社) 溶液で分散

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1169 号

し、仔牛血清を加えてから遠心管に移した。800 rpm で 5 分間遠心して細胞を集め上清を捨てた。そして、細胞を次の 2 種の溶液に再浮遊した。1) 20% グリセリンを含む Dulbecco のリン酸緩衝塩類溶液 (以下 20% G-PBS)。2) 仔牛血清。細胞の浮遊液を冷蔵庫 (2°C) に 2 時間静置し、細胞が遠心管の底に集まったのを確かめてから上清をピペットで静かに吸い上げて捨てた。こうして得た高細胞濃度の細胞浮遊液を試料に使った。

0.01 ml の試料を中空の銅製試料台 (2×5×10 mm) の上に液滴状に取り、液体窒素で冷やした液体フレオン 22 (約 -150°C) あるいは液体窒素 (-196°C) に入れて凍結した。このとき、試料の温度を 44 ゲージの銅コンスタントンの熱電対で測定し、冷却曲線を電磁オシログラフ (横川電機) で記録した。冷却速度を 0°C から -60°C までの平均速度で表わした。凍結した試料をフリーズエッチング装置 (日本電子製 JEE-AFE-01 型) に移し、試料温度が -90°C、装置内の真空度が 2×10^{-5} mmHg のとき、試料をナイフで割って破断面を出し 30 秒間断面の氷を昇華させた。ついで、白金パラジウムで影を付け、炭素を破断面に蒸着してレプリカを作った。試料を装置から取り出し蒸留水に静かに入れて融かし、レプリカを水面に浮かべた。このレプリカを硫酸希釈液あるいはブリーチ (日本生協連) 水溶液で洗ってから電子顕微鏡 (日本電子製 JEM-6 AS 型) で観察した。

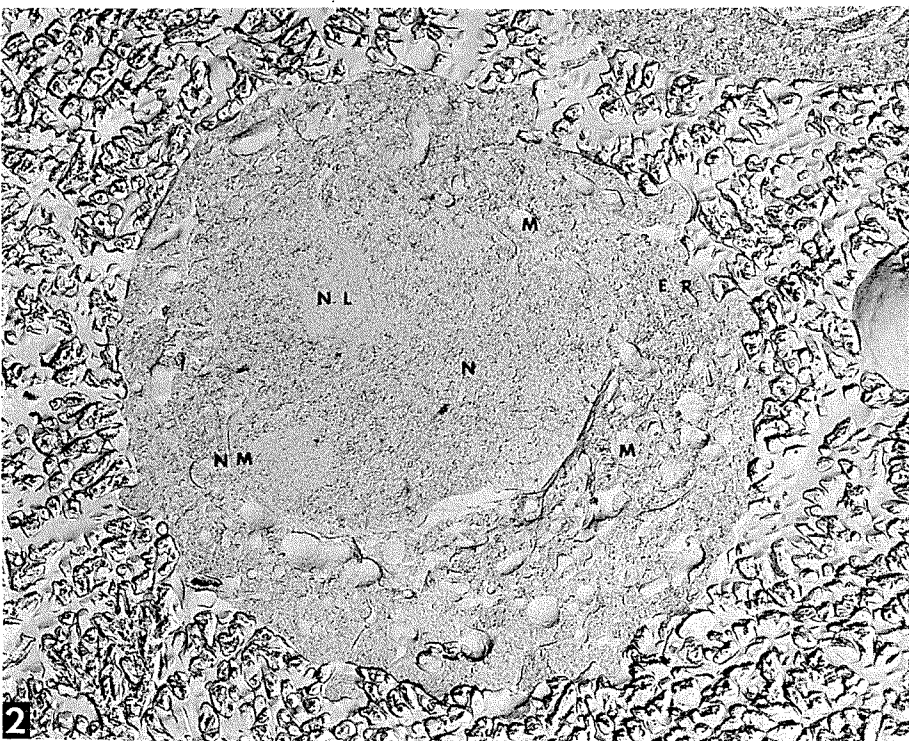
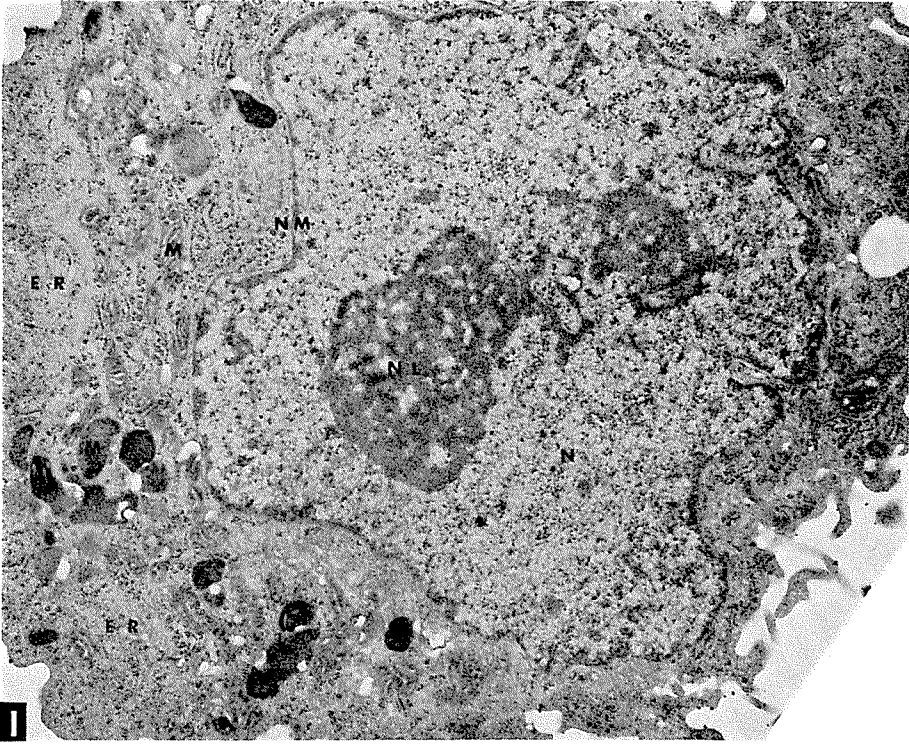
レプリカの電子顕微鏡像と比較するため超薄切片を用意した。この場合、0.1 M リン酸緩衝液 (pH, 7.0) で緩衝した 5% グルタルアルデヒドで 1 時間固定し、同じ緩衝液に溶かした 1% オスミック酸で 1 時間、後固定した。ついで、エタノールで脱水し、エポキシに包埋した。ミクロトーム (Porter-Blum MT-1 型) で薄切した切片を酢酸ウラニルおよび酢酸鉛で二重染色し、上記の電子顕微鏡で観察した。

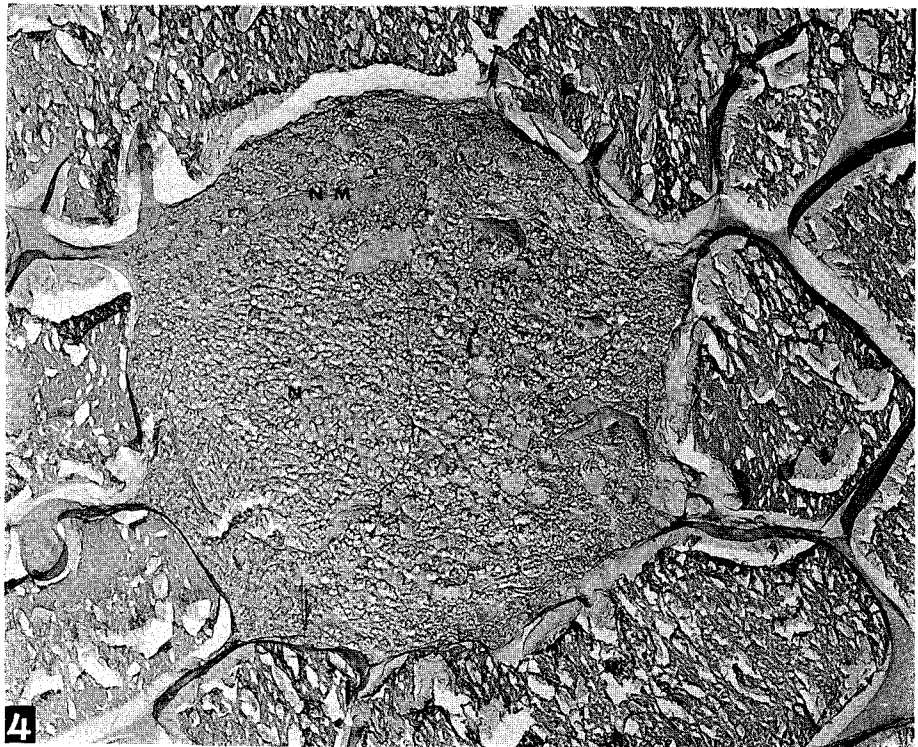
凍結後の細胞の生死は次のようにして確かめた。試料を液体フレオンあるいは液体窒素中で凍結し、1 分後これを 38°C の TC-199 培養液中で急速融解した。ついで、800 rpm で 5 分間遠心して細胞を集め培養液に浮遊した。浮遊液をペトリ皿に入れ炭酸ガス培養器 (空気中に 5% の炭酸ガスを含む) で 37°C で培養し、細胞が増殖するかどうかを調べた。

III. 結果と考察

細胞を 20% G-PBS あるいは仔牛血清に浮遊して急速に冷却すると細胞の内部に粒状の微氷晶が形成された。しかし、同一試料でも個々の細胞によって細胞内氷晶の大きさはまちまちであった。これは試料が凍結される時場所によって冷却速度が異なるためと考えられる。し

-
- 第 1 図** 超薄切片法による HeLa 細胞の電子顕微鏡像 ×11,000
凍結前の 1 細胞。ER, 粗面小胞体; M, ミトコンドリア; N, 核; NL, 仁; NM, 核膜
(細胞内器官の表示は第 2 図以下でも共通)
- 第 2 図—第 4 図** フリーズエッチング法による HeLa 細胞の電子顕微鏡像
- 第 2 図** 20% G-PBS に浮遊して液体フレオン中で凍結した細胞 ×6,000
細胞内氷晶の平均的大きさは約 0.02 μ
- 第 3 図** 仔牛血清に浮遊して液体フレオン中で凍結した細胞 ×6,000
細胞内氷晶の平均的大きさは約 0.1 μ
- 第 4 図** 仔牛血清に浮遊して液体窒素中で凍結した細胞 ×5,000
細胞内氷晶の平均的大きさは約 0.2 μ





第1表 凍結条件と細胞内氷晶の大きさ(氷粒の長径)および細胞の生死

凍 結 条 件			細胞内氷晶の 大 き さ*	細胞の生死
浮 遊 液	冷 却 方 法	冷 却 速 度		
20% G-PBS	液体フレオン	200°C/sec	約 0.02 μ	生
仔牛血清	液体フレオン	200°C/sec	約 0.1 μ	死
仔牛血清	液体窒素	35°C/sec	約 0.2 μ	死

* それぞれの条件で凍結された細胞のうち、最も細かい細胞内氷晶が生じた細胞の細胞内氷晶の平均的大きさ

たがって、今回の実験の目的である細胞内氷晶の状態とそれが細胞に与える障害との関係を厳密には明らかにすることができなかつた。しかし、細胞の浮遊液と冷却速度を変えると、それらの凍結条件と細胞内氷晶の大きさ、あるいはまた細胞の生死との間には一定の関係が見出された(第1表)。ここでは、それぞれの条件で凍結された細胞から得たレプリカの電子顕微鏡像のうち、個々の細胞内氷晶の大きさが最も小さかったものを図示(第2図—第4図)しながら、細胞内氷晶の大きさと細胞の生死について考察してみたい。

細胞内氷晶の大きさは細胞を20% G-PBSに浮遊して液体フレオン中で凍結した場合に一番小さく0.02 μ 程度であった(第2図)。仔牛血清に浮遊し液体フレオンあるいは液体窒素中で凍結した場合は、それぞれ0.1 μ 以上(第3図)、0.2 μ 以上(第4図)であった。いずれの場合にも氷晶の大きさは細胞内の場所や細胞内器官ごとに多少異なつたが、個々の氷晶の大きさは比較的均一で、細胞内の特定の場所に大きな氷粒が形成されるということではなかつた。20% G-PBSに浮遊して凍結した細胞では細胞内器官は超薄切片の電子顕微鏡像の中のそれとほぼ相対的な位置に見出された(第1図、第2図)。仁内の氷晶は核質における氷晶より細かく、核膜、ミトコンドリア膜、粗面小胞体等の膜には氷晶を認めにくかつた。このことは仔牛血清に浮遊して液体フレオン中で凍結した細胞についてもほぼ同様であったが(第3図)、液体窒素中で凍結した細胞では、細胞内氷晶の発達によって細胞内器官が変形しているように見えた(第4図)。

いっぽう、細胞は20% G-PBSに浮遊して液体フレオン中で凍結した場合だけ急速融解後生存した。先に述べたように、同一試料でも細胞によって細胞内氷晶の大きさが異なること、また細胞の浮遊液も異なることから、細胞内氷晶の大きさがどの程度までであれば細胞が生存できるか厳密には明らかではないが、少なくとも、細胞内氷晶の大きさが0.02 μ 程度であれば細胞が生存できる可能性がある。

前報²⁾でHeLa細胞の凍結融解過程を光学顕微鏡で観察し、この細胞を1,200°C/secの速度で冷却すると半透明に凍結して細胞内氷晶は観察できないことを報告した。われわれの使用した光学顕微鏡の解像力は0.85 μ 程度であつたので、今回の実験で観察された0.02 μ ~0.2 μ 程度の氷晶は光学顕微鏡では観察できない。しかし、この大きさの氷晶が細胞内に生じた場合、細胞が光学顕微鏡で半透明に見えるかどうかは明らかではない。それは、細胞内氷晶の大きさが光の波長程度のとき、光の散乱によって光が細胞を透過しなくなり、いわゆる細胞の凍結による「暗化」が見られるからである。Luyet⁵⁾は急速に凍結されて半透明に見えるゼラチンを加

温したときに見られる「暗化」は氷晶が再結晶して 1μ 程度に生長したときにおけると報告している。このことからすれば、 $0.02\mu\sim 0.2\mu$ 程度の氷晶が細胞の内部に生じた場合、細胞は光学顕微鏡では半透明に見えるかもしれない。そうであれば、半透明に凍結したHeLa細胞が融解後生存しなかったことを、少なくとも細胞内には 0.02μ より大きな氷晶が生じ、これが細胞に致命的な障害を与えたためと説明できるかもしれない。

Sharmanら⁶⁾はハツカネズミの腹水腫瘍細胞とカエルの上皮細胞では、光学顕微鏡で観察できる程の大きさの氷晶が細胞内に生じて細胞は生存すると報告している。しかし、われわれがシロネズミの腹水腫瘍細胞¹⁾とHeLa細胞²⁾を使って行なった実験は、彼の説を否定するように思われる。今回の電子顕微鏡観察でも明らかなように、HeLa細胞では 0.1μ 以上の氷晶が細胞内に生じた場合は生存しなかった。

Steere⁷⁾は数種の生物材料を使い、これらに加えるグリセリンの濃度を変えて凍結し、細胞内氷晶のでき方をフリーズエッチング法を用いて電子顕微鏡で観察している。そして、グリセリンの濃度が低いと細胞内に氷晶が生じやすく、それによって細胞は凍結障害を受けると報告している。しかし、彼はどの生物材料についても凍結後生存するかどうかは確かめなかった。

今回の実験の結果では推論の域を出なかったが、フリーズエッチング法による細胞内氷晶の観察は、凍結置換法、凍結乾燥法に比べて -90°C 付近で比較的短時間に観察試料の作製が行なわれるので、生存を確かめようとする細胞とかなり近い条件の細胞で細胞内氷晶の観察が可能であるから、より厳密に細胞内氷晶の状態と細胞の凍結障害の関係を明らかにできる。また、浮遊液の凍り方も同時に観察できるので、凍結に対して保護効果のある溶液と細胞の凍結中の関係を、形態的に明らかにする手がかりも得られるかもしれない。

IV. 摘 要

急速凍結されたHeLa細胞の内部に生じた光学顕微鏡では見えない程小さな氷晶をフリーズエッチング法を用いて電子顕微鏡で観察した。細胞を20%グリセリン塩溶液あるいは仔牛血清に浮遊して、液体フレオン(-150°C)または液体窒素(-196°C)中で急速に凍結した。浮遊液と冷却速度の違いによって細胞内には異なる大きさの粒状の微氷晶が生じた。細胞は20%グリセリン塩溶液に浮遊して液体フレオン中で凍結した場合だけ急速融解後生存し、このとき細胞内氷晶の大きさは 0.02μ 程度であった。仔牛血清に浮遊して凍結した細胞は融解後生存せず、その内部には 0.1μ 以上の氷晶が生じた。

文 献

- 1) Asahina, É. Shimada, K. and Hisada, Y. 1970 A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid freezing. *Exptl. Cell Res.*, **59**, 349-358.
- 2) 島田公夫・朝比奈英三 1970 HeLa細胞の凍結様式と融解後の生死. 低温科学, 生物篇, **28**, 21-26.
- 3) Steere, R. L. 1957 Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 45-60.
- 4) Moor, H. and Mühlethaler, K. 1963 Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, **17**, 609-628.
- 5) Luyet, B. J. 1966 Anatomy of the freezing process in physical systems. *In Cryobiology* (H.

- T. Meryman, *ed*) Academic Press, London and New York, Chapter 2, 115-138.
- 6) Sharman, L. 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.
 - 7) Steere, R. L. 1969 Freeze-etching and direct observation of freezing damage. *Cryobiology*, **6**, 137-150.

Summary

Ice crystals formed within HeLa cells during rapid freezing were too small to be visible under an ordinary light microscope. These small intracellular ice crystals were observed electron microscopically by use of the freeze-etching technic. The cells were suspended in a 20% glycerol balanced salt solution or in calf serum. Small drops of cell suspension were frozen in liquid Freon (-150°C) or in liquid nitrogen. A large number of small ice crystals was formed within the cells during rapid freezing. These intracellular ice crystals differed both in size and number according to the freezing conditions. When the cells were frozen in liquid Freon in the presence of glycerol, intracellular ice crystals were very small and the cells survived after rapid thawing. In such a case, the average size of the intracellular ice crystals was $0.02\ \mu$. Such small intracellular ice crystals appeared innocuous to the cells. On the other hand, no cells suspended in calf serum and frozen in liquid Freon or in liquid nitrogen survived after rapid thawing and the ice crystals formed within the cells were larger than $0.1\ \mu$ in diameter.