



Title	フリーズ・エッチング法における冷却条件の吟味
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 松坂, 理夫 他
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 91-105
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17788
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p91-105.pdf



フリーズ・エッチング法における冷却条件の吟味*

根井外喜男・松坂理夫・浅田 実

(低温科学研究所)

(昭和46年7月受理)

I. 緒 言

フリーズ・エッチング法は比較的最近開発された技術であるが、電子顕微鏡用の標本作製法として、幾つかのすぐれた点をもっている。ここ1, 2年で急に応用例が増してきており、今後ますます広く利用されるものと思われる。われわれは、低温生物学の領域に本法を導入するにあたって、基本的な問題であるところの冷却に関する検討が従来ほとんど行なわれていないことに気づいたので、特にその点についての吟味を行なった。

光学顕微鏡と異なり、電子顕微鏡で生物試料を観察する場合、自然状態の生のままの姿をみることは極めて困難である。通常は高真空の環境で電子線を透過させて観察するのであるから、試料は乾燥された薄層のものでなければならない。特に切片標本となると、固定・脱水・包埋・薄切・染色など幾つかの過程を通り、物理的・化学的・いろいろの処理をうけるので、人為的な変化のおきる可能性が多い。

そのような人工産物のないしかもなるべく自然のままの姿に近い標本を作る方法は、これまでにもいろいろと工夫された。凍結乾燥法や凍結置換法などがそれである。これらは、常温での空気乾燥や有機溶媒での脱水では、試料の収縮をきたしやすいので、それに代わる法として用いられたもので、試料を最初に急速凍結し、凍結状態のまま氷を昇華させるか溶媒で置換する法である。これらの方法であっても、最終的な脱水の段階でのある程度の収縮は避けられない。フリーズ・エッチング法は、それに比較してもはるかに artifact が少なく、現在用いられているすべての標本作製法のうちで、最も理想に近いものと思われる^{1,2)}。

本法発展の歴史的経過をふりかえてみると、この方法を生物試料の本来の姿をみるためのすぐれた手段として推奨したのは Steere (1957)³⁾ であろう。技術的には、それ以前の Hall (1950)⁴⁾ や Meryman (1955)⁵⁾ のアイデアや技法が基礎となっているものと思われるが、生物学的な意義を強調したのは彼で、その方法は Moor ら (1961, 1963)⁷⁾ や Haggis (1961)⁸⁾ に継がれた形となり、一層の進展をみるようになった。

本法はその名の示す通り、凍結が試料に加えられる唯一の外的条件と考えられる。ところがこの点に関する検討は従来ほとんど行なわれておらず、僅かに Moor らが酵母を試料として冷却速度を変えた凍結融解の実験で、生残率の高くなるような条件で標本を作れば形態的にも良い所見が得られるであろうと、機能から形態を推定したような意見を述べているだけであ

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1170号

る。そこでわれわれは、凍結の条件と実際の試料にみられる形態的所見との比較検討を目的として本実験を行なった。

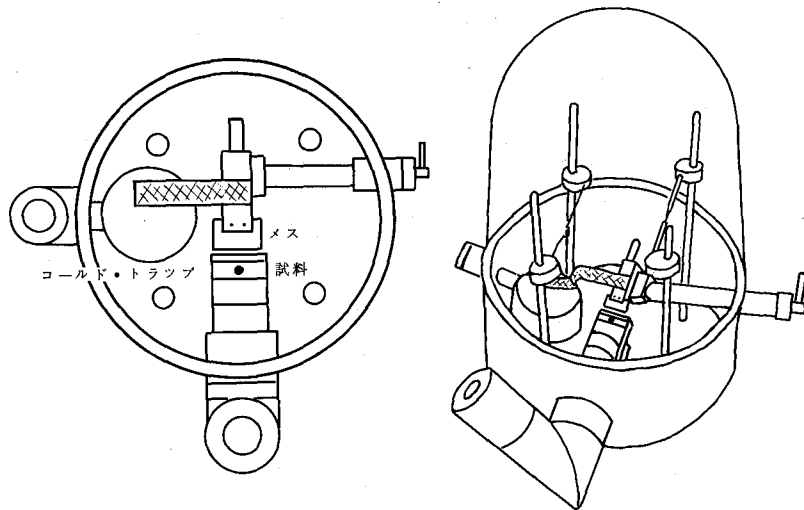
II. 方 法

実 験 材 料

1. 赤血球： ACD 加ヒト血液 (なるべく採取後 1 週間以内のものを使用) を 0.15M NaCl にて 3 回洗い, packed cell をほぼ等量の同じ液に浮遊させたもの, および 10, 20, 30, 40, 50% にグリセリンを加えた 0.15M NaCl に浮遊させたもの (低濃度から順次高濃度に移しかえる) を用いた。
2. 酵母細胞： 市販パン酵母および業室保存株 (*Saccharomyces cerevisiae*, S. 214 株) を蒸留水で洗った後浮遊液としたもの, さらに 20% にグリセリンを加えた浮遊液等を用いた。

装 置

日本電子製 JEE-FED を用いた。本機は、通常の蒸着装置の上にとりつけるもので、第 1 図に示すように、主として試料冷却台、冷却ナイフおよびコールド・トラップの 3 部分から成る。試料台とトラップは真空装置の外部に出ている受け口に液体窒素を注入して冷却するようになっており、特に試料冷却台にとりつけられた熱電対によって試料温度をみながらその温度の調節ができる。

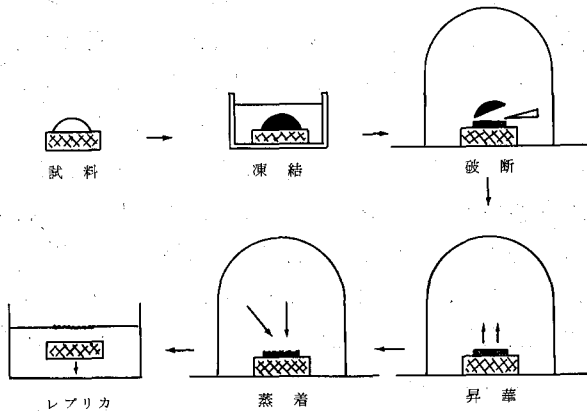


第 1 図 フリーズ・エッチング装置略図

試料の冷却速度をいろいろと変えるため、既製の試料台の外、特別に銅板を四角に折り曲げたものも使い、その上に試料をのせた。

操作 (第 2 図参照)

1. 凍結： 赤血球または酵母細胞の浮遊液を 1 滴 (大体 0.005 ml くらい) 試料台に載せ、次の 3 種の冷却速度で凍結させた。
 - 1) 緩慢凍結： 試料を -25°C の低温槽に入れ空気冷却で凍結させ、およそ 10 分後に液体窒素



第2図 フリーズ・エッチング操作の過程

第1表 試料台別冷却速度 (試料 0.005 ml)

	既製品	銅板製
液体窒素	12°C/min	10°C/min
フロン 22	10°C/min	10°C/min

前記のように台の上に1滴のせた試料の冷却速度を正確に測定することは困難なので、本表中の数は大体的見当を示したにすぎない。

2. 装置の準備: 以上のようにして凍結させた試料は、液体窒素中に浸しておき、他方、装置の準備をする。破断用のナイフ、蒸着用の白金パラジウムおよびカーボンをとりつけ、真空にして、トラップおよび試料冷却台を液体窒素で冷しておく。特に試料冷却台は冷しすぎないように -100°C くらいにする。

3. 破断: 真空を一たん破り、手早く試料を冷却台にとりつけ、再び真空にする。この時、試料台の温度を -90°C くらいにして、試料付近に付着した霜を除くことが肝要である。真空度が 10^{-6} mmHg 台に入りかけた頃、試料をほぼ -100°C くらいに保ち、冷却されたナイフを移動させて試料を破断する。ナイフで削るというよりは割るという感じであり、ナイフ・マークができるようではまずいので、同じ面に二度くりかえしてナイフはあてないようにする。

4. エッチング: 破断面のエッチングは、試料の性質、グリセリン添加の有無、濃度等によって様にはいかない。一般に氷の昇華しやすい状態のものではエッチングがよくできる。エッチングを加減する最も重要な要素は、試料の温度と真空度である。第2表からもわかるように、試料温度が -100°C くらいで真空度が 10^{-6} mmHg 台に達しておれば、時間は大体 30 秒とか1分くらいでよいようである。観察の対象によっては、エッチングを行わない場合もある。

素に移した。冷却速度は測定していないが、大体 $1 \sim 10^\circ\text{C}/\text{min}$ くらいと推定される。特に植氷はしていないので、かなり低い温度まで過冷却していた可能性はある。

2) 急速凍結: 試料台のまま液体窒素中に投入すると、発泡しながら試料は忽ち凍結する。

3) 超急速凍結: 予め液体窒素で -150°C 付近まで冷却したフロン 22 に試料台を直接浸すと、試料は瞬時に凍結する。

これら急速凍結の時の冷却速度を知るため、試料部分に熱電対 (径 0.05 mm) を接着させ、横河製フォトコーダーで記録測定した結果は、概ね第1表の通りである。

第2表 氷の温度と蒸気圧の関係

温度 (°C)	蒸気圧 (mmHg)
-70	1.9×10^{-3}
-80	4.0×10^{-4}
-90	7.0×10^{-5}
-95	2.0×10^{-5}
-100	9.0×10^{-6}
-105	3.0×10^{-6}
-110	1.0×10^{-6}

5. 蒸着： エッチングが終われば、すぐ白金パラジウムでシャドウをかけ、更にカーボンでレプリカ膜をつくる。この時輻射熱で試料温度が上がることをしないよう、これら蒸着源は適當の距離におき最小限に絞った窓のあるシャッターを用い、なるべく短時間の加熱蒸着を行なうようにする。
6. レプリカ膜の剝離、洗滌： 蒸着が終われば、真空を破り、試料を装置からとり出して、蒸溜水又は洗剤（ブリーチなど）に浸して膜を剝離させる。レプリカ膜の裏面に付着した試料をよく溶解あるいは洗滌するための溶剤の種類や濃度は、取扱う試料によっていろいろ工夫しなければならぬ。血球などはまず蒸溜水に浮べた後、硫酸水でよく洗うのがよいようである。一般に動物性にしろ植物性にしろ組織片を試料とした時は、洗滌法が難しい。特に植物性のもものではブリーチなどの洗剤を用いても容易に溶解しない。
7. 検鏡： レプリカ膜は最後に蒸溜水で洗ってからメッシュにすくい上げる。これを JEM6S で検鏡した。

III. 結 果

赤 血 球

1. グリセリンを加えないもの

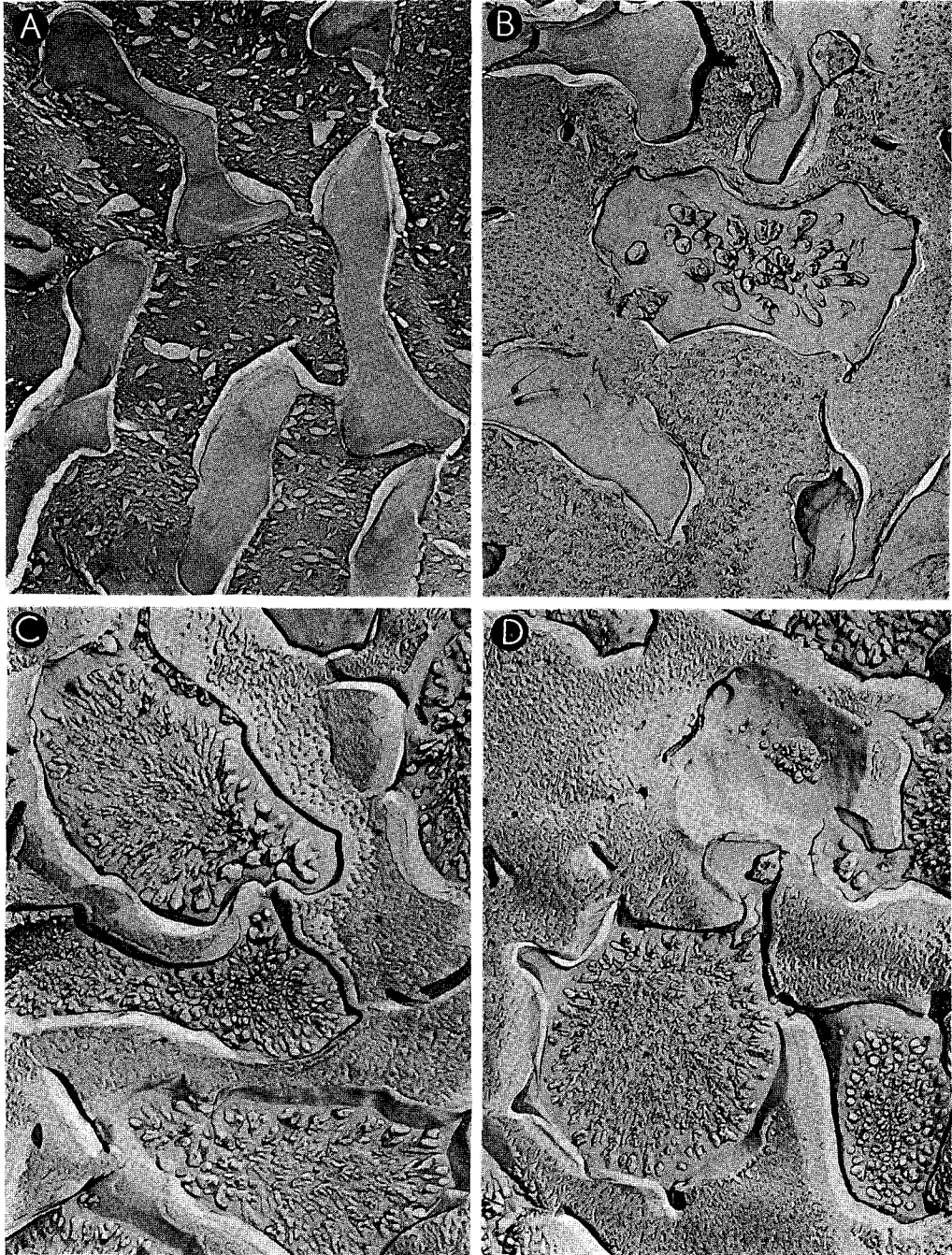
- 1) 緩慢凍結： -25°C のディープ・フリーザー中で凍結させたものでは、すべての細胞が収縮変形している。しかし細胞の内部は均一の構造で氷晶と思われるものはみとめられない（第3図 A）。
- 2) 急速凍結： 液体窒素で凍結させたものでは、多くの細胞は周縁がやや凹凸し、中心部に数個乃至十数個の不規則な形の氷粒が集団を作っているのがみられる。個々の氷粒は $0.1\sim 0.2\ \mu$ くらいの大きさである。これら細胞内凍結をおこしたと思われる細胞の外に、緩慢凍結の時と同様な細胞内氷晶のない収縮した細胞がみられる。これら両種の細胞の数の割合は一定していないが、試料内の部位によっても異なる（第3図 B）。
- 3) 超急速凍結 ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)： フレオン 22 で凍結させたものでは、ほとんどの細胞でその内部に氷晶形成をみ、個々の氷粒はかなり小さくしかも細胞の周辺部まで充満している。その氷粒をよくみると、中心部から周辺部に向うに従ってサイズがやや大きくなっているところからみて、中心部に最初氷晶ができそれが次第に周辺部に向って進行したと思われる（第3図 C, D）。

2. グリセリンを加えたもの

- 1) 10% グリセリン： 急速凍結で、細胞は多少凹凸があり、かなり微細な氷粒が細胞内にみられる。
- 2) 20% グリセリン： 緩慢凍結の時は、細胞間のグリセリン溶液はかなり大きな氷を作り、細胞は濃縮溶液の中に埋まったような状態になって種々の形態を示している。細胞の輪郭があまり明瞭でない（第5図 A）。

急速凍結では、細胞の周辺部にやや凹凸があるが、内部は全く平滑無構造である。この条件のものでは、細胞内凍結は起こらないものと思われる。

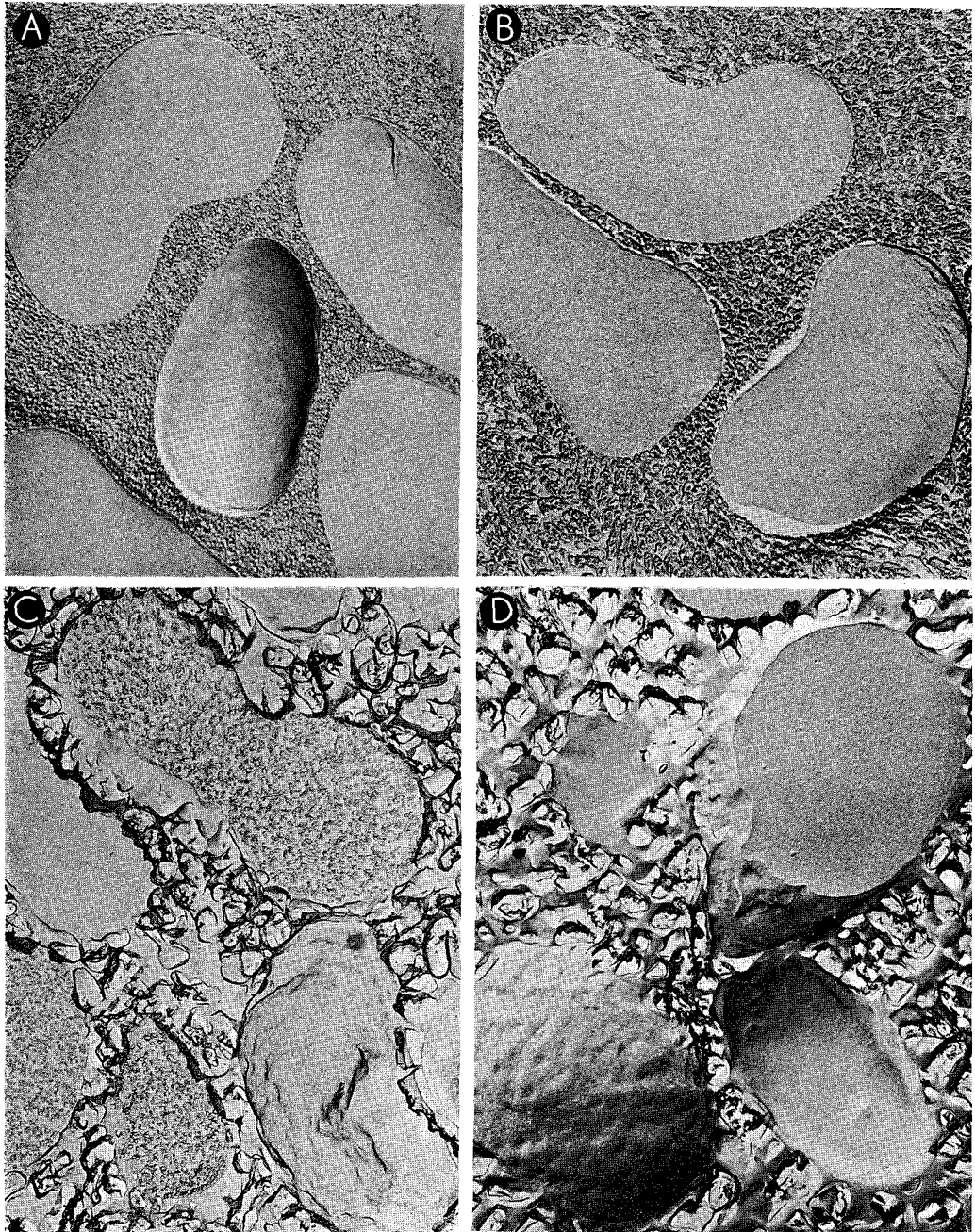
超急速凍結では、細胞内凍結をおこすものが再びふえてくる。特に、試料液滴中の部位による差を確かめるために、標本中のナイフによる破断面の周縁部から次第に中心部に向って詳



第3図 0.15M NaCl 赤血球浮遊液の凍結像。7,000×

A: 緩慢凍結, 収縮変形細胞, B: 液体窒素急速凍結, 収縮細胞とやや大きな氷粒をもつ細胞, CとD: フレオン超急速凍結, 細胞内全体の微細氷粒

細に観察すると、細胞間のグリセリン溶液中の氷粒の大きさから部位による冷却速度の差がよくわかる(第4図)。即ち周縁部では、氷粒は細かくて 0.1μ くらいであるが、中心部に向かうに従って大きくなり、 $0.5\sim 1\mu$ くらいまでになる。しかも、この周囲の氷粒の大きさに対応して、



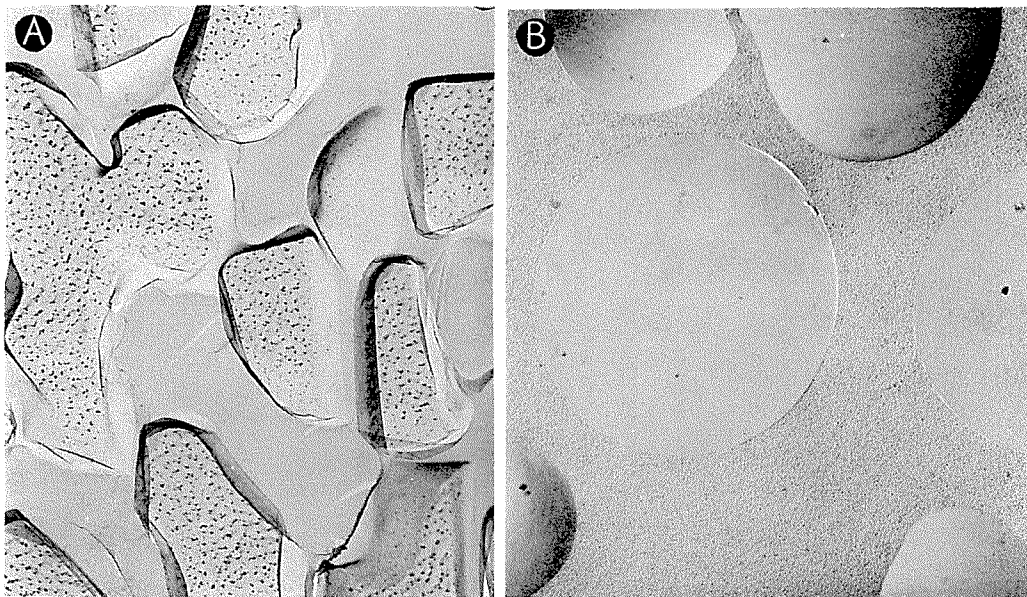
第4図 20%グリセリン加赤血球浮遊液のフロン超急速凍結。7,000×
標本の周辺部から中心部に向ってA, B, C, Dの順に観察したもの
細胞間の氷粒は小→大となり、それに対応して細胞の凍結像も異なる

細胞内の氷晶形成に一定のパターンがあるようにみえる。周縁部の30~50 μ くらいの部分にある細胞は輪郭は明瞭でほとんど凹凸がなく、細胞内部は平滑かあるいは極めて微細な粗面である(第4図, AとB)。それより内側の部位では、細胞内に微細ではあるがはっきりした氷粒がみとめられる(第4図C)。さらに内部になると、再び細胞内氷晶はみられなくなるが、細胞周縁がかなり凹凸している(第4図D)。これらの所見から想像するに、試料周縁の最も冷却速度の大きいところでは、細胞はそのまま内部の水も非晶性のいわゆるガラス様氷に近い状態で凍るが、冷却速度が少し遅くなると、それが次第にはっきりした氷粒となる。ところがさらに冷却速度が遅いと、先にできた細胞周囲の氷によって細胞内の水分が脱水されて細胞がやや収縮するとともに、細胞内部のグリセリン濃度が高まって氷晶ができにくくなるものと考えられる。

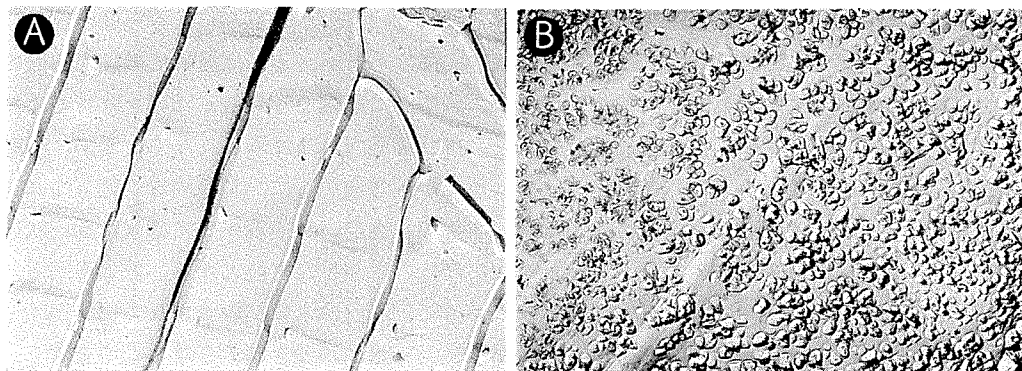
本法のように、破断面を作るためには、試料はある程度以上の量が必要となり、従って冷却速度が大きくなるほど、試料中の部位による冷却速度の差のあること、それによって凍結のパターンに違いのできることは避けられないようである。

いずれにしても、従来最も多く用いられている20%グリセリン添加でも、冷却速度が適当でないと、細胞内氷晶形成をみることがあるので、注意を要する。

3) 30%グリセリン: 緩慢凍結のものでは、水と濃縮グリセリンがネットワークを作り、細胞は濃縮液の中に埋まった状態で、ほとんどコントラストがつかない。急速凍結で、グリセリン中に氷粒のできたもの(0.2 μ くらいの氷粒である。20%グリセリンの超急速凍結の最外縁の細胞内凍結を起こさない場合の氷粒は0.1 μ くらいであるから、それよりは大きい)でも、細胞内氷晶はみられない。超急速凍結では、細胞の内外を問わず氷晶はできないが、コントラストが弱く、明瞭な像がえられない。



第5図 A: 20%グリセリン加赤血球浮遊液, 緩慢凍結, 細胞輪郭不明瞭,
B: 40%グリセリン加赤血球浮遊液, 液体窒素急速凍結, 球形細胞。7,000 \times

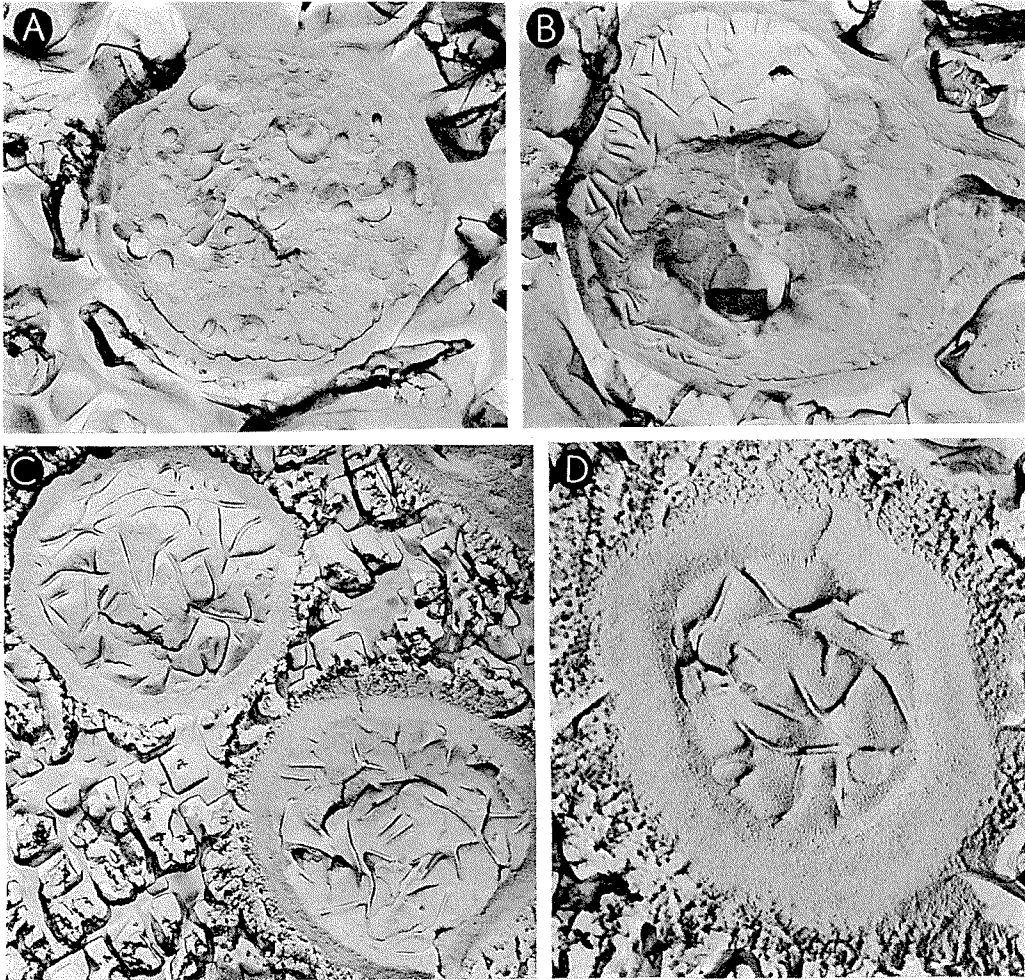


第6図 A: 0.15 M NaCl 溶液, フレオン超急速凍結, B: 20% グリセリン加
0.15 M NaCl 溶液, フレオン超急速凍結。5,000×



第7図 酵母細胞蒸留水浮遊液

A: 急速凍結, 6,500×, B: 急速凍結 (C のものの一部拡大), 30,000×, C: 急速凍結, 8,000×
D: 酵母細胞 20% グリセリン浮遊液, 緩慢凍結, 5,000×



第8図 酵母細胞 20% グリセリン浮遊液
いずれも急速凍結, A, B, C: 14,000×, D: 25,000×

凍結速度の如何にかかわらず、グリセリン濃度が30%になると、赤血球全体としての形状が変わり、中凹みの円盤状が少なくて球形のものが多くなるようである。

4) 40% グリセリン: 30%に見られた傾向はますます強くなり、急速凍結でのグリセリン中の氷粒は極めて微細になり、細胞の破断面は全く平滑で氷晶をみとめない。ほとんどの細胞が球形であり、剖面よりは剝離による膜面の見える率が多い(第5図B)。グリセリン濃度が40~50%となると、洗滌時にグリセリンがよく除去されないためか、電子線があたると泡立って黒く残るものがある。以上のいろいろの点から、グリセリン濃度が高すぎると、試料として適当でないように思われる。

赤血球を含まない対照としての溶液

1. 0.15M NaCl

短冊状の氷と、それに挟まれた紐状の濃縮塩の部分が平行したり交叉したりして、ネット・

ワークを呈している。試料中の部位によって多少の差はあるが、短冊状の氷の幅は超急速凍結で2~3 μ である(第6図A)。

2. グリセリン溶液

冷却速度および標本中の部位によって、できる氷粒に大小の差はあるが、いずれも球形で、大きいものではネット・ワークを作る(第6図B)。

酵母細胞

1. 蒸溜水浮遊液

冷却速度にかかわらず、細胞全体としては球形または楕円形を保ち、収縮はみとめられない。断面では細胞質はかなり粗で、特に空胞と思われる部分では凍結と思われる像がみとめられる(第7図, A, C)。しかし剝離面では invagination や格子状配列の顆粒⁷⁾はよくでている(第7図B)。超急速凍結では、稀に空胞内凍結がみられるだけで、他にはあまり凍結によると思われる所見は見当たらない。

2. グリセリン(20%)加浮遊液

冷却速度の差によって、細胞周囲のグリセリン溶液中の氷粒には大小の違いはできるが、細胞内の所見にはほとんど差はみとめられない(第7図D)。いずれも断面および剝離面がよくでて、従来みとめられていた細胞質内ならびに膜面の構造がよくみとめられるようである(第8図)。

IV. 考 察

緒言においても述べたように、フリーズ・エッチング法は、ごく最近利用者が急激にふえたにもかかわらず、その最も基礎になる凍結の条件、特に氷晶生成を防止する条件の吟味がほとんど行なわれていなかった。従って本実験では、この点を明らかにすることを第一の目標とした。

試料としては、たまたま別の実験目的で使用されていたヒトの赤血球がまずとりあげられた。しかも結果的にみて、この赤血球の使用がかなり興味深い所見を提供することになった。細胞の内部構造をもたないことが、細胞内の氷晶形成の有無あるいは凍結像の観察を容易にし、細胞膜の水またはグリセリンに対する透過性のよいことから、冷却速度やグリセリン濃度の検討に適切な試料として役立つものと思われる。

このような細胞自身の変化のみとめやすい赤血球を使って、実際の標本について観察してみると、まず第一に細胞の内と外とでは凍結状態のかなり違うことが目につく。グリセリンを含まない食塩水だけに浮遊させた血球では、周囲の食塩水の凍り方は冷却速度によってそれほど大きな違いはないが、細胞自身はかなり異なる。緩慢凍結で細胞は収縮し、それより冷却速度が大きくなると、細胞内に氷ができるようになり、その数も次第に増す。このような冷却速度と細胞の凍結像との関係は既に明らかにされているところ^{9,10)}で、緩慢凍結ではまず細胞間の食塩水が凍り、細胞内の水分が外にひき出されるために細胞は収縮し細胞内には氷はできにくくなると考えられるところのいわゆる細胞外凍結の像がえられる。ところが冷却速度が大きいと、細胞内水分が十分ひき出される時間的余裕のないうちに温度が下がるために、細胞内に

残った水分が凍って氷晶になるものと考えられる。特に細胞の中心部にだけ比較的大きな氷が集塊を作るのは、冷却速度がやや遅い場合で、周辺部の水分が脱水されても、中心部にはまだかなりの水分が残っていてそれがやがて凍るからであろうと想像される。冷却速度が更に大きくなると、細胞水分がまだほとんど脱水されないうちに、かなり低い温度に達してしまうために、細胞の内外にほぼ同時に氷ができるのであろう。この時の氷は小さくて数が多く、ほとんど細胞の内部全体に充満するように作られる。それを更に詳しく観察すると、細胞の中心部にまず氷核ができ、それから周辺部に向かって凍結が進行したと思われるような像の多いことがわかる。冷却速度による細胞内外のこのような凍結像の差異は、ヘモグロビンを主体とする細胞成分と単なる食塩水との違いや、生細胞の半透過性によって水が出入する結果の細胞内成分の濃度の変化に起因するものであろう。

いずれにしても、形態学の立場から考えて、細胞の収縮や細胞内氷晶形成があったのでは、試料の本来の姿を観察する目的にはそわないことになる。細胞の形態はそのまま、しかも氷晶形成をおこさないような凍結条件が必要なのであって、そのためには、昔からできるだけ急速な凍結が行なわれており、本実験でも前記のように特殊試料台をフロン中に直接浸して超急速凍結(冷却速度凡そ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)を試みたわけであるが、結果としてやはり氷晶形成は避けられなかった。超急速凍結のねらいは、非晶形のガラス様凍結、いわゆる vitrification をおこさせることにあると思われるが、フリーズ・エッチング法では試料の破断という操作を行なうため、ある程度以上の試料の量と、特定の形の試料台が必要なので、極端に速い冷却速度を採用することは困難であるから、以上のような結果からみても冷却速度を大きくすることだけで、氷晶形成を避けることはまず不可能と思われる。

そこで、次の吟味として凍結防止剤添加の問題に移ることになった。そもそもこのフリーズ・エッチング法にグリセリンを始めて用いたのは Haggis (1961)⁸⁾ であろうか。彼の引用によれば、グリセリンの添加が凍結による赤血球の溶血を防ぐという事実についての Lovelock の説明¹¹⁾ にヒントを得たものと思われる。次いで Moor⁷⁾ が酵母細胞にフリーズ・エッチング法を適用するに当たり、グリセリン添加の有無と冷却速度との関係について検討を行なった。これが本法における凍結条件の吟味についての唯一の報告と思われるので、少し詳しくこの点にふれてみたい。彼等は、凍結条件として3種の冷却速度をあげた。(1) 2 mm^3 の試料をのせた台を冷却台におく ($10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$)、(2) 0.2 mm^3 の試料を銅板にのせ、 -190°C のプロパン中に直接浸す ($100^{\circ}\text{C}/\text{sec}$)、(3)、(2)と同じ試料を液体ヘリウム II に浸す ($10,000^{\circ}\text{C}/\text{sec}$) という凍結方法である。これらの凍結試料を急速融解して培養によって生残率をしらべた結果は

試料	冷却速度別		
	1	2	3
菌液そのまま	1%	30%	~100%
20% グリセリン加菌液	70	100	100

となっている。彼らが形態学の実験に生残率という機能的な検査の結果を引用したのは、融解後生残するような試料であれば、凍結状態で何ら障害を受けておらず、従って理想的な凍結固定が行なわれたものと推定したことによる。そしてこのことは、50%以上の生残のもので電子

顕微鏡的にも実証されたといい、細胞質に氷による孔はないか、あっても 100 \AA 以下の小さな孔であると述べているが、実際の写真は示されていない。この Moor らの説明については、二つの点で問題があるように思われる。ひとつは機能と形態とを直接に結びつけて論じたことで機能が障害されない以上、形態は正常である筈だという論拠には多少の無理がある。即ち融解後の機能が正常だからといって、凍結時の形態が全く自然のままであるという保証はない。例えば微生物などで、緩慢凍結によるものは、融解後の生残率は 100% でも、凍結時は極端に収縮して本来の形態を全く失っていることが多いという事実があるからである^{10,12)}。次は、細胞内に微細ながら氷による孔のできるのをみとめている点である。フリーズ・エッチング法によって作られた標本で、原形質膜その他の膜面でしばしば数十 \AA の粒子の存在が問題にされているから、もし 100 \AA の氷粒ができるとすれば、細胞に本来存在する粒子とどのように区別できるであろうか。彼らは氷晶による holes といっているが、切片でなくフリーズ・エッチングによる標本では、孔というよりはどちらも同じような粒子としてみえるので、判別が困難だと思われる。とにかく、理想的な凍結固定をはかる場合は、細胞全体の形態として変形がなく、しかも大小にかかわらず細胞内に氷晶のできないことが必要条件であろう。これらの artifact がおきたのでは、本来の姿をそのまま観察することにはならなくなる。

ここでもう一度ふりかえって、われわれのグリセリン添加の結果を眺めてみよう。対照のグリセリンのない赤血球でみられた緩急の凍結によっておこる収縮や細胞内氷晶形成は、 10% グリセリンでは僅かしか防ぐことができなかった。通常最も多く用いられている 20% 添加でも、冷却速度を極端に大きくしない限り、氷晶のないいわゆる vitrify された状態の理想的な凍結固定は得られないものと思う。しかし、現在採用されているフリーズ・エッチングの各手法(数種の変法が考案されている)では、装置の関係から $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上の冷却速度で凍結することは容易でないから、理想的な凍結固定を行なうにはかなりの困難がある。そこで次善の策として、やや速度をおとし、周縁部の僅かな脱水によると思われる輪郭の多少の凹凸を看過することとして、細胞内氷晶形成を避けることが必要と考えられる。要するに、細胞内凍結の可能性は、細胞内のグリセリン濃度と冷却速度とのかねあいによるので、冷却速度を下げるためにはグリセリン濃度を上げればよいことになる。しかし一方、凍結以前の問題として、グリセリンの細胞に対する生物学的作用を考慮しなければならない。グリセリン濃度が高くなるに従って、溶血度が増し、残存血球も次第に円盤状から球形に変形するからである。またグリセリン濃度が高いと、氷は昇華しにくくなり、エッチングがきかず、コントラストのない映像が得られるようになる。このように、赤血球では、グリセリン濃度、冷却速度とも最適条件の幅が狭いので、完全に artifact のない標本を作ることは非常に難しく、そのためには種々の条件をよほどよく吟味しなければならないことになる。

以上は赤血球についての注意であるが、試料が酵母細胞となると大分ようすが違ってくる。本実験でもいろいろ検討してみた結果わかったことであるが、赤血球に比較すると、必要条件はかなり容易に得られ、多少のグリセリン濃度や冷却速度の大小にかかわらず、細胞の変形や細胞内氷晶形成は起こりにくい。Moor らが、氷ができないか、できても 100 \AA 以下の小さなものと報告していることが肯けるわけである。このような細胞の種類による凍結に対する

抵抗性の違いは、細胞膜の水に対する透過性の差によるのか、細胞内構成成分の差異によるのかはわからないが、例えば酵母ではグリセリンを加えなくても、赤血球のようにはっきりした細胞内の氷粒にはなりにくいようである。

細胞の種類によって、凍害のうけ方が異なることについては、既に Mazur ら¹³⁾の報告があり、冷却速度と生残率との関係が、赤血球と酵母細胞とでかなり差のあることが図示されている。彼らは、機能的な立場からしらべた細胞障害の結果を述べたにすぎないが、細胞内凍結が凍害の主因であるとの見地に立つとすれば、形態的な面でも機能的な面と同じようなことがいえるかもしれない。ヒト赤血球と酵母との比較については、Mazur が細胞の大小（容積と表面積の比）や細胞膜の水に対する透過性などから計測した結果¹⁴⁾では、凍結に際しての細胞からの脱水速度、換言すれば、細胞内凍結を起こしうる細胞内残存水分は、酵母の方が大であり、従って酵母は赤血球よりも遅い冷却速度でも細胞内凍結をおこして障害をうけるものと解釈されるわけで、このことは、その後に表示された冷却速度と生残率との関係図¹³⁾においても示されている。即ち、酵母では $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上、赤血球では $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上の冷却速度のところ、細胞内凍結によると思われる障害がみとめられている。

ところが本実験の結果では、細胞内凍結を起こしやすいはずの酵母の方が、血球よりもかえって氷粒がみえにくいということは、複雑な細胞構造があるために、まぎらわしくてわからないのか、あるいは赤血球の場合よりもはるかに微細な氷粒ができるために、判定しにくいのか、いずれであるかは明らかでない。もし細胞内の構成成分のためにまぎらわしいとすれば、赤血球だけは特殊な例で判別しやすいものとしても、他の細胞についてはこの点についての一応の吟味が必要となる。しかし実際問題としては、20%程度にグリセリンの添加があれば、それほどまぎらわしい凍結像はないらしいことが、これまでの多くの報文中の映像からも想像されるようである。

本実験では、主として凍結の条件にのみ吟味の重点をおいたが、artifactを防ぐという意味では、フリーズ・エッチング法の全過程にわたっての注意、例えば、いったん液体窒素温度まで冷却した試料を -100°C 付近まで上げる過程での変化、断面を作る時に試料に加えられる機械的な力、薄層とはいえ表面構造の凍結乾燥（エッチング）による変化、蒸着の際の輻射熱による試料の温度上昇、レプリカ膜の洗滌法等々、検討すべき点はまだ沢山残されている。今後の検討にまたねばならない。

摘 要

フリーズ・エッチング法を実施するにあたって、できるだけ artifact の少ない標本を作るための冷却速度とグリセリン濃度を吟味する目的で、主としてヒト赤血球と酵母とを試料に用いた。

その結果、赤血球では、凍結の条件に応じて、あるいは細胞の収縮、あるいは細胞内氷晶形成がみられ、これらはグリセリンの添加によってかなり防御できるが、通常用いられる 20% グリセリン添加でもなお細胞内凍結のみとめられる場合があった。

酵母細胞では、赤血球ほど顕著な変化はみられず、従って標本作製時の凍結条件はそれほ

ど厳格でなくてもよいように思われた。

結局、細胞の種類によって、凍結による artifact のうけかたに差があるので、特に影響をうけやすいものでは、厳重な条件の吟味が必要である。

文 献

- 1) 根井外喜男 1970 電子顕微鏡による生物試料の凍結及び乾燥の研究. *J. Electron Microscopy*, **19**, 6-11.
- 2) 根井外喜男 1971 Freeze-Etching 法における問題点. *細胞*, **3**, 18-25.
- 3) Steere, R. L. 1957 Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 45-60.
- 4) Hall, C. E. 1950 A low temperature replica method for electron microscopy. *J. Appl. Phys.*, **21**, 61-62.
- 5) Meryman, H. T. and Kafig, E. 1955 The study of frozen specimens, ice crystals and ice crystal growth by electron microscopy. *Naval Med. Res. Inst., Res. Rep.*, Project NM 000 018.01.09.
- 6) Moor, H., Mühlethaler, K., Waldner, H. and Frey-Wyssling, A. 1961 A new freezing-ultramicrotome. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 1-13.
- 7) Moor, H. and Mühlethaler, K. 1963 Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, **17**, 609-628.
- 8) Haggis, G. H. 1961 Electron microscope replicas from the surface of a fracture through frozen cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 841-852.
- 9) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **13**, 1-6.
- 10) Nei, T., Araki, T. and Matsusaka, T. 1967 The mechanism of cellular injury by freezing in microorganisms. *In Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms.* (E. Asahina, ed.) *Inst. Low Temp. Sci.*, Sapporo, 157-169.
- 11) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against hemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28-36.
- 12) Nei, T., Araki, T. and Matsusaka, T. 1969 Freezing injury to aerated and non-aerated cultures. *In Freezing and Drying of microorganisms.* (T. Nei, ed.) Univ. Tokyo Press, 3-15.
- 13) Mazur, P., Leibo, S. P., Farrant, J., Chu, E. H. Y., Hanna, M. G. and Smith, L. H. 1970 Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. *In The Frozen Cell* (G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, eds.) J. & A. Churchill, London, 69-88.
- 14) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, **47**, 347-369.

Summary

The most probable artifact in the freeze-etching technique is ice formation during the freezing process of the specimens. The effect of different rates of cooling and the concentration of glycerol appearing in freezing patterns was first investigated using red blood cell suspensions. In specimens without glycerol, cells were shrunken by slow freezing, but they were frozen intracellularly by rapid cooling. The size and number of ice grains formed in the cells depend upon the cooling rates. Addition of glycerol prevented the cells from such morphological changes to a certain extent. Even in 20%

glycerol suspensions, however, the cells were still filled with minute ice particles in the case of very rapid freezing.

Yeast cells showed a slight change under the same conditions when compared to erythrocytes. The most adequate usage of the cooling velocity and the concentration of glycerol on each material may bring about successful results.