



Title	急速凍結赤血球の加温過程
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 浅田, 実 他
Citation	低温科学. 生物篇, 30, 45-63
Issue Date	1972-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17797
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p45-63.pdf



急速凍結赤血球の加温過程における変化について*

根井外喜男・浅田 実

(低温科学研究所)

(昭和47年7月受理)

I. 緒 言

生細胞の凍結による障害については、これまで多くの研究が行なわれた結果、その機序が次第に明らかになってきた。凍結の条件、特に凍結の速度によって細胞の凍結の形式が違うこと、したがってそれによる細胞の障害の機構にもまた差違のあることがかなりはっきりとしてきた。たとえば緩慢凍結では細胞外凍結がおり、そのために濃縮された溶質特に塩類によって細胞膜が障害され、また急速凍結では細胞内凍結によって細胞構造が機械的に破壊されるのであろうと説明されている。

さらに極端に速い速度で凍結させたばあいには、ほとんど障害をうけずに細胞の生存していることのあることが、これまでも幾種類かの細胞で報告されている¹⁻⁶⁾。このような条件では、細胞内に氷晶はできないか、できても細胞に障害をきたさないくらい微細なものと考えられ、これがいわゆるガラス様凍結 vitrification であろうともいわれた。この細胞の生存は、急速融解をしたばあいにのみみとめられるもので、もしゆっくりと温度を上げると、死滅することが多い。これは、温度上昇の過程で充分の時間が与えられると、氷晶核は成長して大きな氷粒となり、ひいては細胞内構造あるいは細胞膜に対して機械的障害をひきおこすからであろうと推定されているが、その実証例は少ない^{7,8)}。特にこれらの凍結条件やそれに伴う変化は、研究者により、また細胞の種類によってかなり異なっているうえに、凍結像も光学顕微鏡レベルでの観察が多かったから、細胞内氷晶形成の状況は必ずしも明確にはとらえられてはいなかった。

そこで本実験では、ヒト赤血球を試料とし、超微形態追究の手段としては、電子顕微鏡を用い、他方溶血を測ることによって、形態と機能との関係を明らかにしようと試みたのである。この種の実験に赤血球が極めて好適であるのは、細胞内構造をもたないので、細胞内氷晶の有無の判定が容易であること、溶血度の測定は定量性がかなり高いことなどによる。

このような方法で行なわれた本実験は、さしあたっては急速凍結細胞の加温過程における変化を明らかにすることをねらいとしているが、同時に多年継続して行なってきた生細胞の凍結障害の機序に関する研究の一環をなすものである。

さらにいまひとつの目的は、形態学的研究における電子顕微鏡標本を作る際の凍結法の吟

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1202号

味である。最近盛に用いられる凍結破断法では凍害防止剤としてグリセリンや DMSO が添加されるが、グリセリン濃度や冷却速度と氷晶形成防止の関係が、あまりよくしらべられていない⁹⁾、古くから用いられている凍結乾燥法や凍結置換法での処理過程でも、処理温度と試料中の形態的变化との関係などが充分には検討されていない。したがってこのような立場からも、観察に便宜な赤血球を用いての実験が試みられたわけである。

II. 材料と方法

材料： ACD 加ヒト血液を生理食塩水 (0.15 M NaCl) で 3 回遠心洗滌し packed cell を等量の同じ液に浮遊させたもの、および 10% (v/v) から順次濃度をたかめたグリセリン生理食塩水で洗い、最後に 30% にグリセリンを含む生理食塩水に浮遊させた赤血球液を試料として用いた。いずれも採血後 2 週間以内のもので、洗ったものはその日のうちに使用した。

凍結： 多数の試料を同一条件で凍結し、いっぽうは溶血をしらべ、他方は凍結破断法で作ったレプリカの凍結像を電子顕微鏡で観察するのである。

前記のようにして作った血球浮遊液を 0.01 ml、特別に加工製作した試料台 (厚さ 0.3 mm の銅板を折り曲げて中空にしたもの、 $2 \times 5 \times 10$ mm) に滴状にのせ、液体窒素に直接入れるか、液体窒素で冷やしたフロン 22 (-150°C くらい) に入れて急速に凍結させた。この時の試料の凍結速度は、試料のほぼ中心部に挿入した熱電対 (0.05 mm の銅コンスタンタン) と横河製フォトコーダーで測定したところでは、液体窒素でほぼ 10^3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、フロンでほぼ 10^4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ であった。もちろん、試料は球状になった液滴であるから、この程度の冷却速度では中心部と周辺部に差のあることは当然で、その結果は凍結状態の形態的所見 (細胞媒液中の氷粒の大小) でも明らかであった⁹⁾。

フロンで凍結させたものをさらに液体窒素に移し、すべて -196°C に到達させた後、加温過程の変化をしらべるため、それぞれ所要の温度の低温槽に 30 分間置いた。

融解または凍結破断： 各温度においた試料はいったん液体窒素に移し、一部は凍結破断法による標本作製に、他は融解後溶血度の測定に廻した。いったん液体窒素温度まで冷やすのは、凍結破断法による標本を作るためと、融解の速度をすべて同じくそろえるために必要だからである。融解は予め室温に保たれた生理食塩水または 30% グリセリン加生理食塩水 4 ml の中にホルダーのまま投入して急激に振盪することによって急速に融解させた。

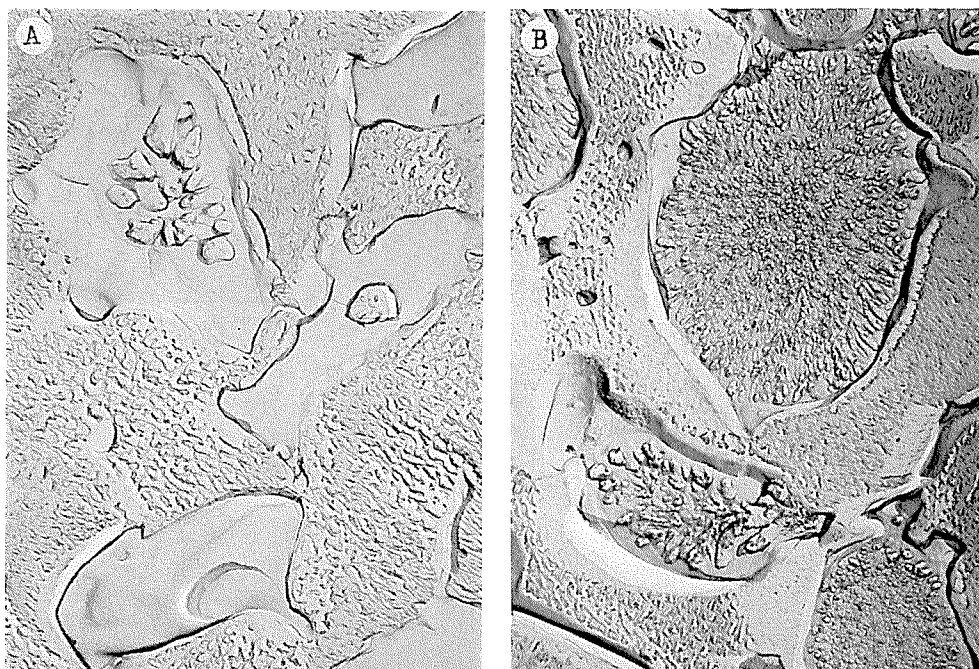
形態的観察： すべて凍結破断法によって凍結状態のレプリカを作り、電子顕微鏡で観察した。装置は日本電子製 JEE-FED を用い、真空度 $1 \sim 2 \times 10^{-5}$ mmHg、試料温度 -95°C 附近で破断およびエッチングを行ない、白金パラジウムで影をつけ、カーボンを蒸着してレプリカを作った。真空装置からとり出した後、ブリーチに浮べて試料を溶解洗滌した。電子顕微鏡は日本電子製 JEM-6AS を用い、主として直接倍率 5,000 倍で写真撮影を行なった。

溶血度測定： 融解後、遠心上清中に遊離したヘモグロビン量を、光電比色計の $540 \text{ m}\mu$ での吸光度から測定した。

III. 結 果

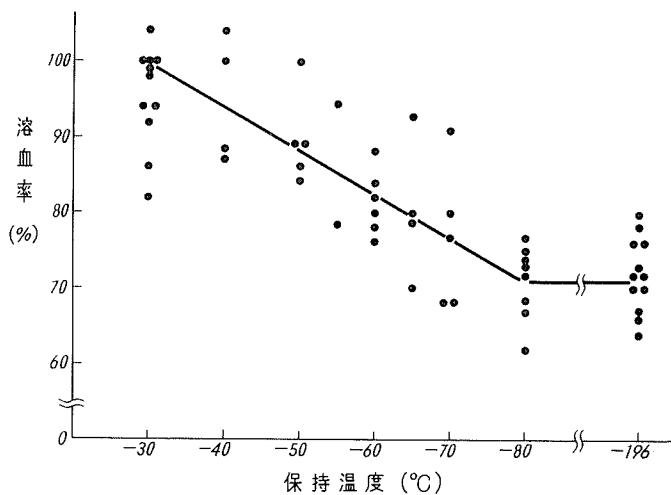
1. 生理食塩水 (0.15 M NaCl) 浮遊血球

1) 冷却速度の検討 なるべく溶血度の少ない凍結試料を得る条件をきめるため、液体窒素凍

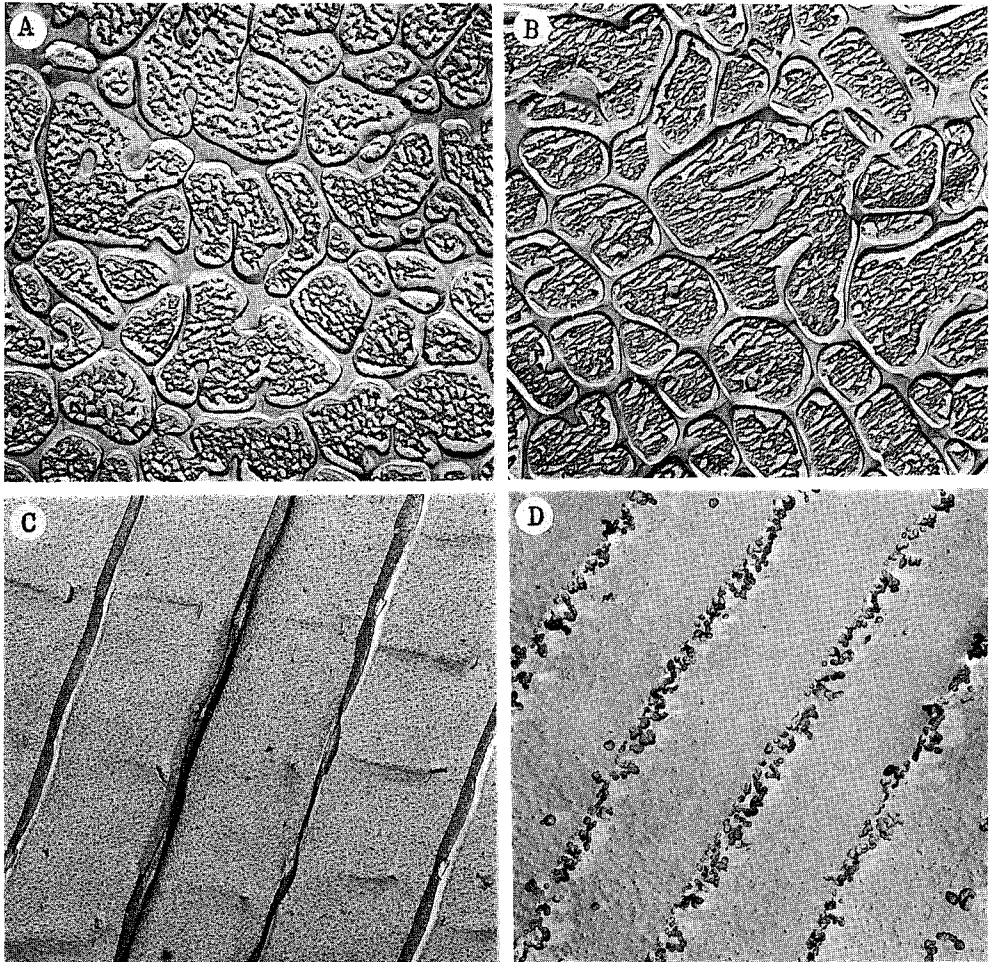


第1図 生理食塩水浮遊血球の凍結像 8,000×

Aは液体窒素凍結, Bはフレオン凍結



第2図 生理食塩水浮遊血球の液体窒素凍結のものを各温度に30分おいた後、急速融解したときの溶血曲線



第3図 ヘモグロビン溶液と生理食塩水の凍結像 8,000×

Aはヘモグロビン溶液の液体窒素凍結, BはAを -30°C に30分おいたもので, 本質的な差はみとめられない

Cは生理食塩水の液体窒素凍結, DはCを -50°C に30分おいたもので, 棚状構造が連珠状に変わっている

結 ($10^3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) とフロン凍結 ($10^4^{\circ}\text{C}/\text{min}$) の比較を行なった。これらを急速融解したときの溶血度はそれぞれ70%と100%であった。凍結像は第1図Aに示すように, 液体窒素凍結では, 細胞はいずれも周縁がやや凹凸し, 細胞の内部に全然氷晶のみえないものと, 細胞の比較的中央部に $0.1\sim 0.2\mu$ くらいの氷粒の集団のみえるものがあった。この氷のないもの(細胞外凍結)とあるもの(細胞内凍結)との数の比率は正確ではないが前者がやや多いように思われた。フロン凍結のものでは, ほとんどすべての細胞内に氷粒が充満し個々の氷粒のサイズは小さかった(第1図B)。

前記の溶血の成績は, 凍結条件の多少の差はあるにしても, Luyetら¹⁰⁾のヒト全血液で $10^3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 冷却のものが, また根井ら¹¹⁾のウサギ全血液で液体窒素凍結のものが, それぞれ溶血

率が最も低かったこととも一致するので、本実験では液体窒素凍結のものをを用いることにした。

なお 1-10°C/min の緩慢凍結のものでは、細胞はすべて極端に収縮変形して細胞外凍結を示し⁹⁾、溶血は 100% であった。

2) 加温過程の溶血度の変化 液体窒素凍結試料を -80°C から -30°C までの各温度の低温槽に 30 分おいた後、いったん液体窒素温度まで冷却してから室温の食塩水に急速融解したものの溶血度は、第 2 図に示すように、かなり点のばらつきはあるが、-80°C あたりからほとんど直線的に増加し、-30°C でほぼ 100% に達した。

3) 加温過程での形態的变化 液体窒素凍結試料は、前述のように二種の細胞の凍結像を示す。このような凍結状態のものは、-50°C はおろか -30°C に 30 分おいても、形態的にほとんど変化はみとめられなかった。

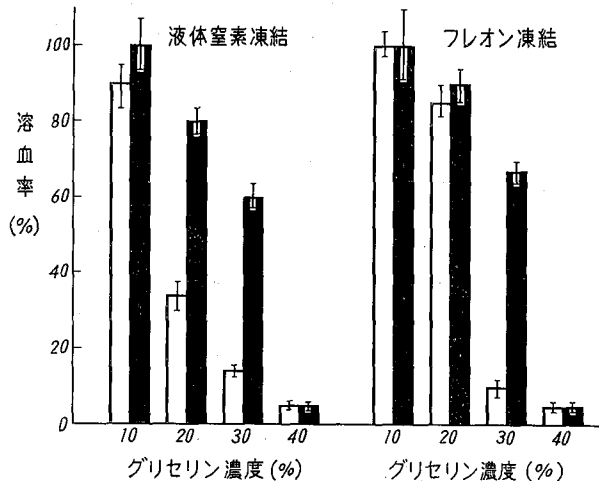
その点をさらによくたしかめるため、細胞内の変化を検討する目的でヘモグロビン溶液を、細胞外の変化を検討する目的で生理食塩水をそれぞれ単独に用いた。ヘモグロビン溶液は、蒸留水溶血をさせた血球液の上清を凍結乾燥し、得た粉末を 25% 溶液としたものである。この溶液を液体窒素で凍結させるとネットワークを作るが (第 3 図 A)、このものは -30°C においてもほとんど変化しない (第 3 図 B)。しかし生理食塩水単独のものでは、液体窒素凍結でできた棚状構造 (濃縮食塩水の凍結したものと考えられる) が (第 3 図 C)、-30°C はもちろん -50°C でも連鎖状のものに変わることがみられた (第 3 図 D)。これが加温過程でみとめられた唯一の形態的变化である。

2. 30% グリセリン加生理食塩水浮遊血液

1) グリセリン濃度と冷却速度の検討 本実験の目的に最適な条件を見出すため、10, 20, 30, 40% のグリセリンと 10³°C/min, 10⁴°C/min の冷却速度の組合せで、まず溶血度を比較してみた。その結果は第 4 図の如く、グリセリン濃度が 10% や 20% では最初の凍結での溶血度が高すぎることに、また 40% では加温して

もほとんど変化をおこさないことから、これらは不相当と考え、最初の凍結での溶血が比較的少なくて、しかも加温過程での変化の顕著な 30% グリセリン添加のものが適当と考えて、そのフロン凍結のものを出発材料として用いることにした。

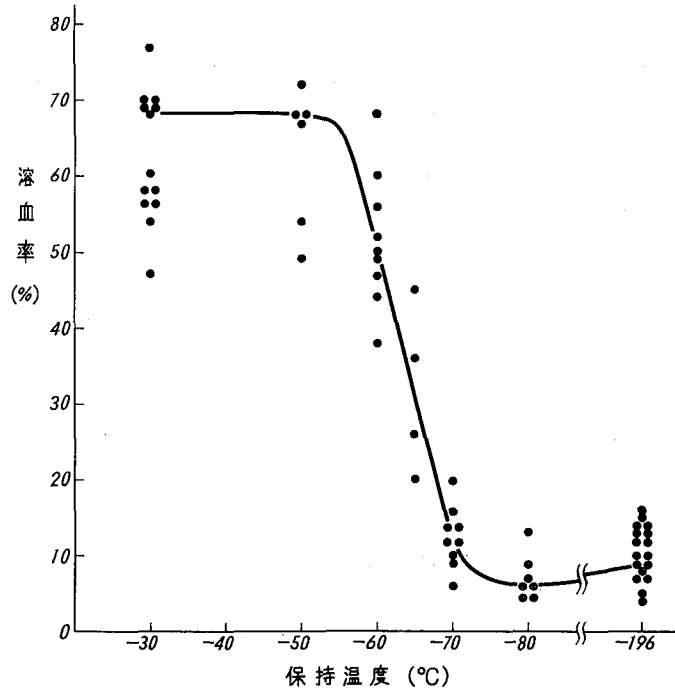
2) 加温過程の溶血度の変化 フロン凍結試料をいったん液体窒素で冷却した後、-80°C から -30°C までの各温度の低温槽に 30 分間放置し、さらにもう一度液体窒素まで急冷してから、室温の 30% グリセリン食塩水で急速融解した。その結果は



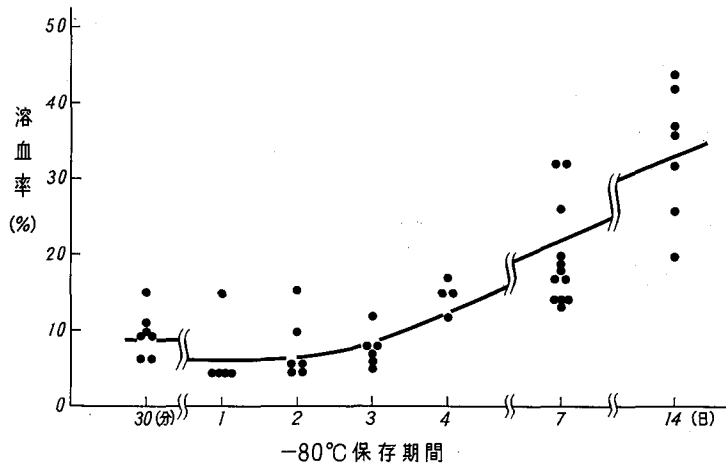
第 4 図 グリセリン濃度と凍結速度の溶血度に及ぼす影響
凍結直後 □ と -30°C 30分保存 ■ との比較

第5図に示すように、 -70°C まではほとんど変化はないが、 -60°C では急激に溶血が増し、 -50°C ではほぼ最大値の70%に近くなった。この溶血曲線は、グリセリンを加えない血球液のそれ(第2図)と比較すると、狭い温度範囲での急激な変化であることがわかる。

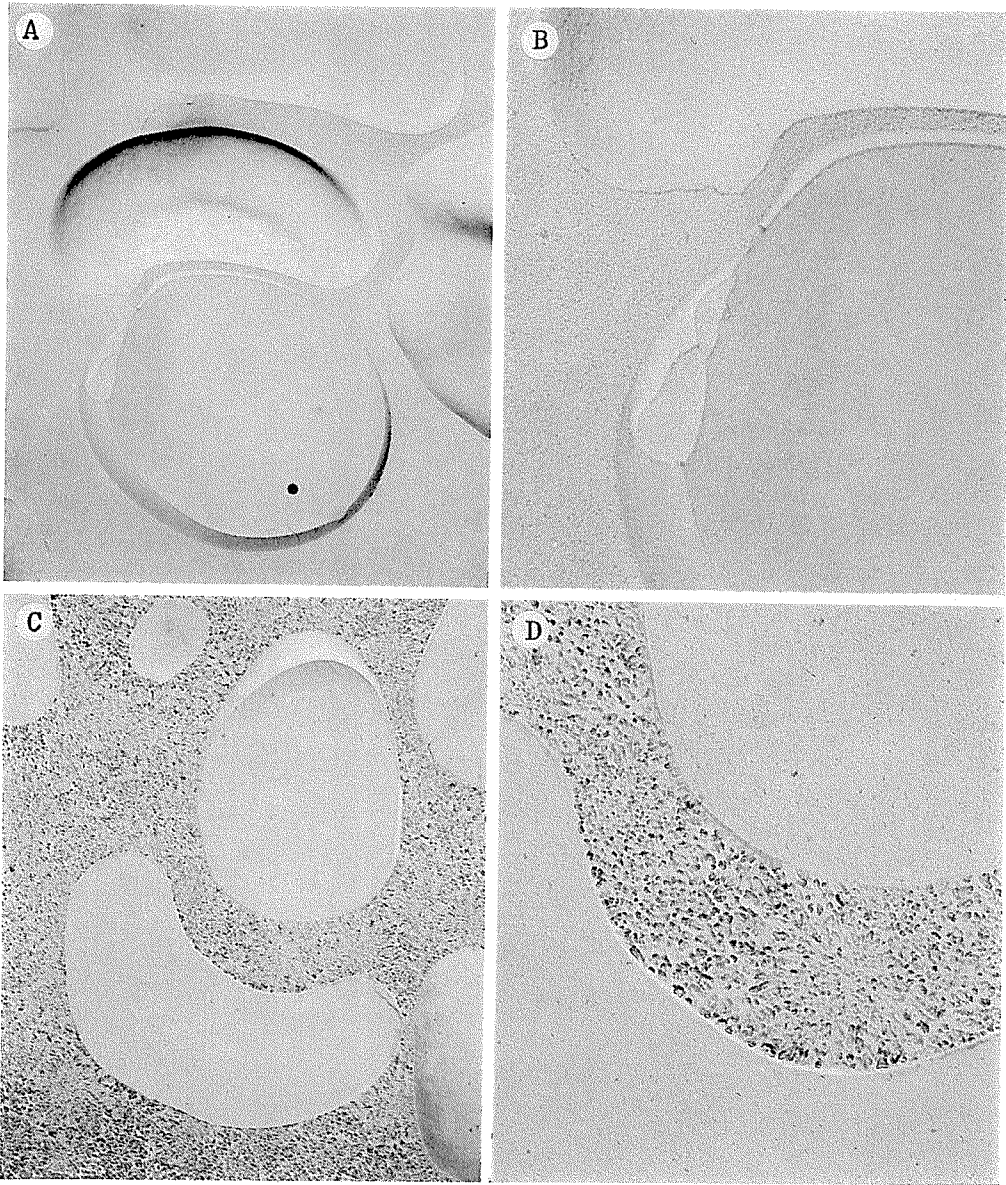
次に -80°C での長期間保存の結果をみると、4日あたりから漸く僅かの溶血増加をみる程度であった(第6図)。



第5図 30%グリセリン加食塩水浮遊血球をフロンで凍結させ、各温度に30分おいた後、急速融解させたときの溶血曲線

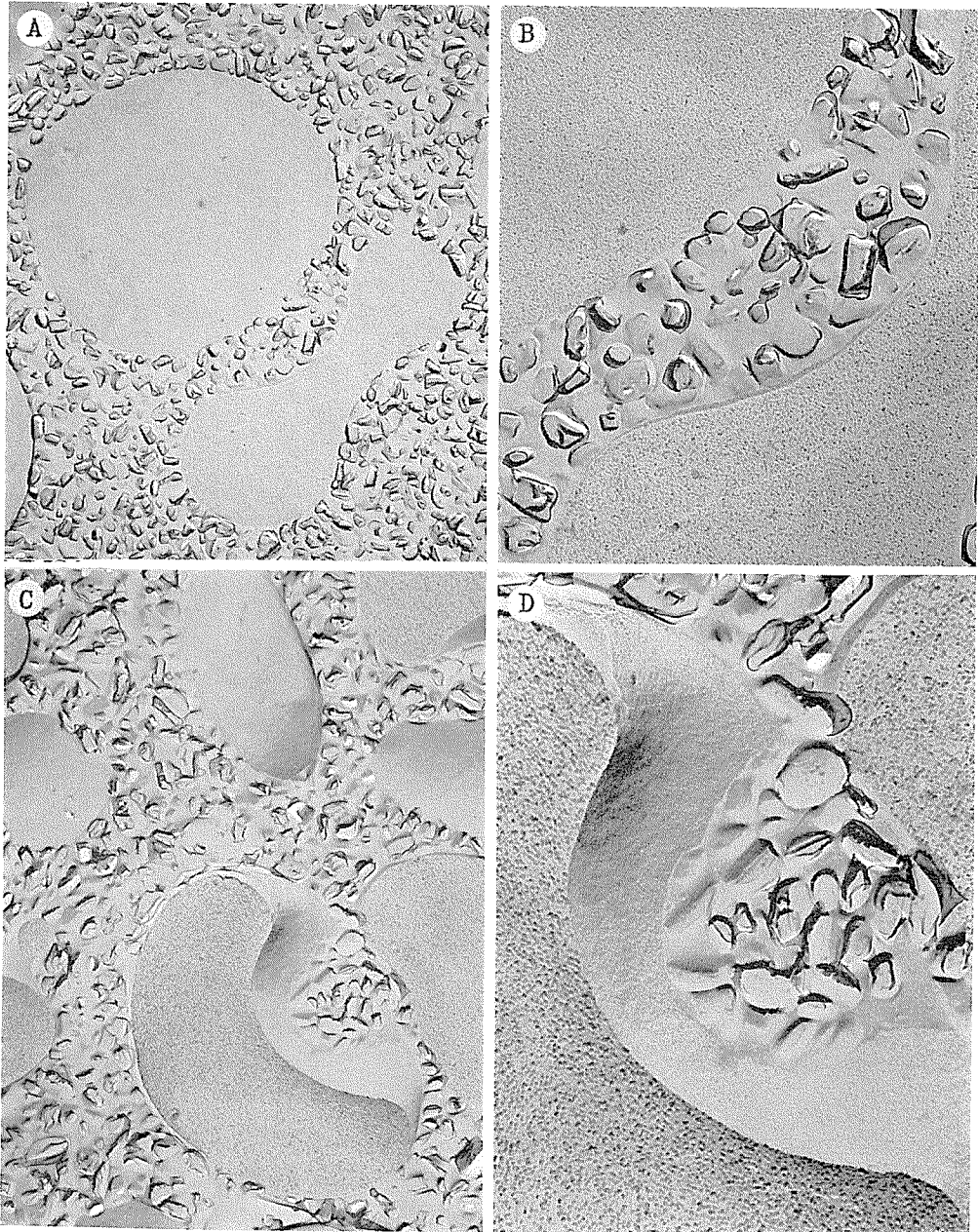


第6図 30%グリセリン加食塩水浮遊血球をフロンで凍結させた後、 -80°C に長期間おいたばあい溶血曲線



第7図 30% グリセリン加血球のフロン凍結直後の凍結像

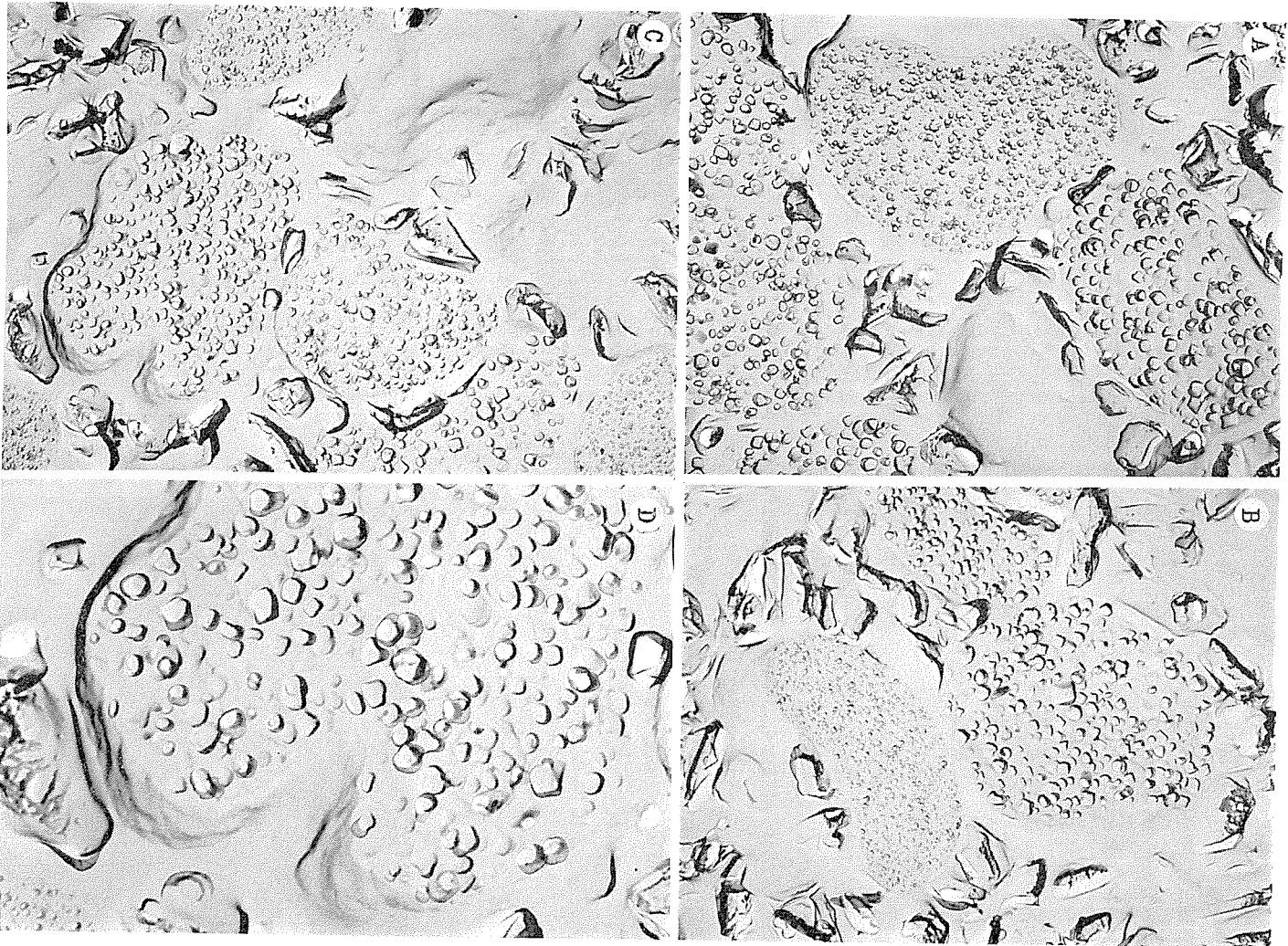
A と C は 8,000×, B と D は A と C の一部をそれぞれ拡大したもので 20,000×
 D に示すように、媒液中の氷粒がこのくらいの大きさ（フロン凍結で見られるうちの最大のもの）であっても、細胞内には氷晶はみられない



第8図 30%グリセリン加血球のフロン凍結後の加温過程での凍結像

AとBは -80°C 1時間保存, CとDは -70°C 30分保存, AとCは8,000 \times , BとDはAとCの一部をそれぞれ拡大したもので20,000 \times

Bの細胞内微細粒子が氷晶であるかどうかはわからない



第9図 30%グリセリン加血球のフロン凍結後、 -60°C 30分保存の凍結像

A, B, Cは8,000 \times , DはCの一部を拡大したもので20,000 \times

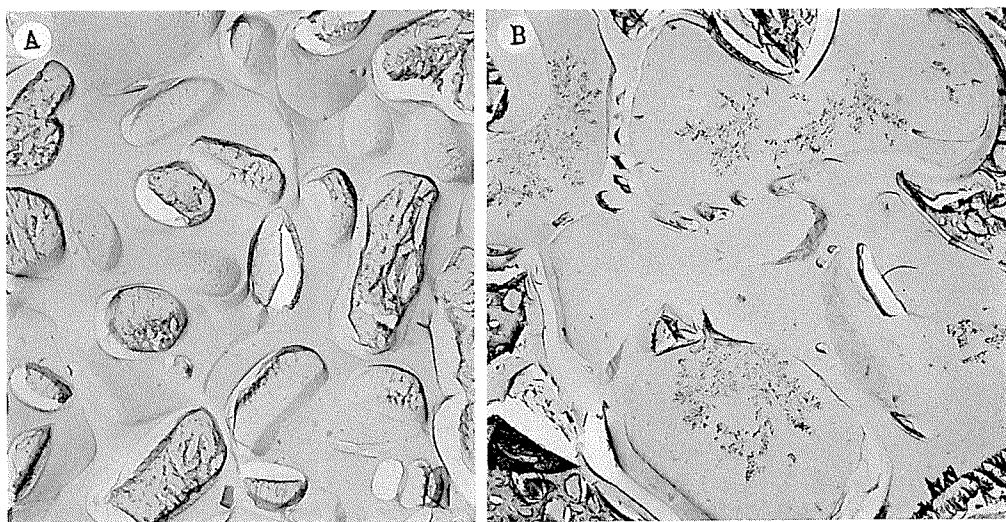
A, B, Cは細胞によって氷粒の大きさの異なること, 細胞輪郭の不鮮明なことを示す
Dの細胞内氷粒と細胞膜外表の凹凸に注目

3) 加温過程の形態的变化 凍結破断法で作った標本から各温度における凍結像の変化を追究した。出発材料の30%グリセリン食塩水浮遊血球のフロン凍結のものは、細胞外液は極めて微細な氷粒(0.01 μ 以下)で満たされているが、細胞内は均一無構造で氷晶と思われるものは全くみとめられない(第7図)。細胞の外形も正常で辺縁は平滑である。-80°C 1時間放置で細胞自身にはほとんど変化はみとめられないが、細胞周囲の媒液中の氷粒はかなり大きく0.1~0.2 μ くらいになった(第8図A, B)。-70°Cにおかれると氷粒はさらに速かに成長するとともに、細胞内にも氷晶と思われる微細粒子が一面に現われてきた(第8図C, D)。

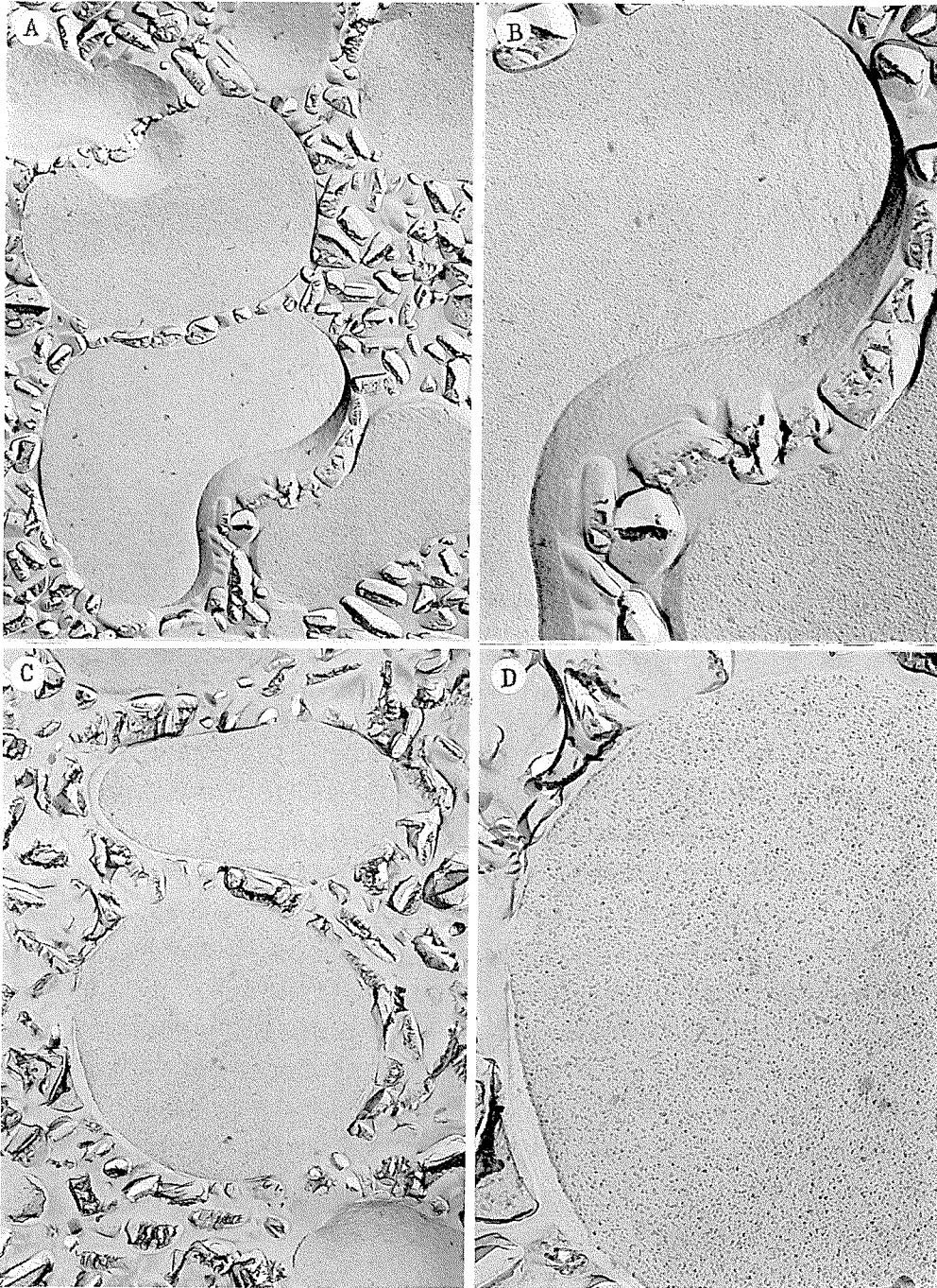
-60°Cになると凍結像はかなり変わってくる。細胞間の氷晶の跡は不規則な形となり、細胞内には明らかに氷粒がみとめられるのである。細胞の形態をもう少し仔細に観察すると、細胞内氷晶形成はほぼ100%にみられるが、個々の細胞で粒子のサイズはかなり異り、0.1~0.2 μ 以上のものと以下のものをもつ細胞の数の割合はほぼ半々であった。細胞の断面と膜の剝離面の両方が見えるような細胞でよく観察すると、細胞内氷粒の小さなものでは膜面は平滑であるが、0.2 μ 以上の大きな粒子で満たされている細胞では膜面にかんがりの凹凸がみられた。出発材料のフロン凍結のものでは、すべての細胞が全く平滑な表面構造であったことから推定すれば、このような膜面の変化は細胞内氷粒の成長にともなう影響であろうと考えられる。なおこの-60°C保存のものでは細胞の輪郭のやや不鮮明なものが多い(第9図)。

-50°Cになると様相はさらに一変し、個々の細胞の判別の困難なものが多い。恐らくこの温度では試料の一部に融解がおり、かなりの細胞が溶血しゴースト化したのではないかとと思われる(第10図A)。

-30°Cにおかれたものは、試料全般としての凍結像はむしろ最初から緩慢凍結をしたものに似ており、大きな氷晶の跡にとりかこまれるようにして細胞は集団をなしている。個々の細胞の状態をよく眺めると3種類に分けられるように思われる。即ち、1)不規則に収縮した形で



第10図 30%グリセリン加血球のフロン凍結後の加温過程の凍結像 8,000×
Aは-50°C 30分保存, Bは-30°C 30分保存

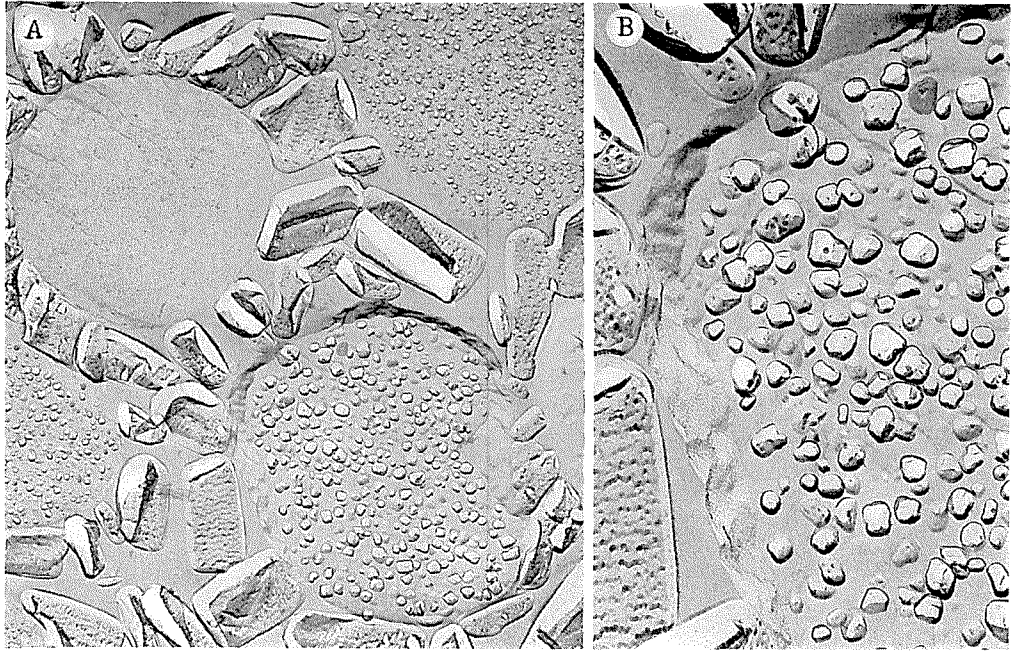


第11図 30%グリセリン加血球のフロン凍結後、 -80°C 保存過程の凍結像

AとBは1日保存, CとDは4日保存

AとCは $8,000\times$, BとDはAとCの一部をそれぞれ拡大したもので $20,000\times$

Dの細胞内微細粒子は氷晶と思われるが明らかでない



第12図 30% グリセリン加血球のフロン凍結後、 -80°C 2週間保存のものの凍結像

Aは8,000 \times 、Bはその一部の拡大で20,000 \times

Aの細胞による氷粒の大小差、Bの細胞内氷粒と細胞外壁の凹凸に注目

細胞内部に氷晶のみられぬもの、2) 細胞内の一部に樹枝状の氷晶のみえるもの、及び3) 細胞輪郭の不明瞭なもの(溶血してゴーストとなったと考えられるもの)などである。2)の樹枝状の氷は -30°C におかれた後、液体窒素温度まで冷却された時にできたものと思われる(第10図B)。

-80°C 保存のもので、時間の経過に伴う凍結像の変化を追ってみると、前述のように1時間で早くも細胞周囲の氷晶の成長がみられ、1日後には 0.5μ くらいに達するが、細胞内には極めて微細な粒子がみとめられるにすぎない(第11図A, B)。3, 4日経過すると細胞内にも氷晶と思われる粒子が明らかにみとめられるようになるが、そのサイズはほとんど 0.05μ 以下であった(第11図C, D)。2週間保存のものでは、凍結像は全体として -60°C のものに似ており、多くの細胞に氷粒がみとめられた。一つの細胞の中の氷粒の大きさはほぼ均一であるが、個々の細胞でかなり大小の差があり、いっぽうに 0.2μ 以上のものがあるかと思えば、他方 0.01μ 以下の極めて微細なものもあるほどである。 0.2μ 以上のものの細胞の数の割合は全体の半分以下である(第12図)。

3. 凍結像と溶血との関係

前述の形態的变化と溶血の結果をまとめて両者の関係を考えてみると

1) 生理食塩水浮遊血球 液体窒素凍結($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)で、収縮(細胞外凍結)と細胞内凍結の二種の細胞がみられ、急速融解後の溶血率はほぼ70%であった。この試料を加温すると、 -80°C から -30°C に亘る広い温度範囲で漸次溶血が増えて100%に達するにかかわらず、形態的な変化はほとんどみとめられず、わずかに生理食塩水だけの試料で氷の変態がみとめられたにす

ぎない。

2) 30% グリセリン加食塩水浮遊血球 フレオン凍結 (10^4 °C/min) で細胞内氷晶をみとめず、急速融解後の溶血率は10% 前後であった。これを加温すると、溶血率は変化しないのに -80°C 、 -70°C で早くも形態的变化が現われ、細胞内外の氷晶の成長がみられた。形態と溶血の関係では、細胞内氷粒が $0.1\sim 0.2\mu$ より大きくなったときの細胞数と溶血率がほぼ一致することが、 -60°C 30分、 -80°C 長期間保存でみとめられたことから、グリセリン加血球の加温過程での溶血は、細胞内氷晶がある大きさ以上に成長したためにおこるものと考えられた。

IV. 考 察

まずグリセリンを加えない生理食塩水浮遊血球の凍結について考えてみる。この試料を緩慢凍結 ($1\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) すれば、到達温度 -15°C 以下ではすべて100% 溶血することは、すでによく知られているところである。その凍結像は細胞内凍結のない収縮像⁹⁾ で、凍結による溶血の機序としては、濃縮塩害¹²⁾ のほか、氷晶あるいは細胞相互の圧縮による機械的障害¹³⁾ などがあげられている。フレオン凍結 (10^4 °C/min) では、同じように100% 溶血であっても、このばあいの溶血の主因は細胞内凍結にあるものと考えられる。液体窒素凍結 (10^3 °C/min) のものは70% 近い溶血で、凍結像では細胞外凍結 (収縮) と細胞内凍結の二種の細胞がみられるが、このいずれが溶血をおこすものかはわからない。同じように細胞内凍結とはいっても、フレオン凍結のときのように氷晶は細胞内に充満してはおらず、細胞全体としてやや収縮しているうえ、比較的大きな氷晶が中心部に集団をなしている。これはフレオン凍結のときより冷却速度がやや小さいため、細胞の周辺部の水分が細胞外に少し脱水されたときに、細胞内部に氷晶ができ、それが成長したものではないかと想像される。氷粒が直接細胞膜に接触しているような像はみあたらないから、細胞膜に障害はおこさないかもしれぬが、はっきりしたことはわからない。溶血をおこさない可能性はむしろ収縮細胞のほうにあるようにも考えられる。塩害をうけるほど極端な脱水をしないうちに臨界温度を速かに通過して -196°C まで達してしまうので溶血をおこさずにすむのかもしれない。もしそうとすれば、このような凍結試料が加温されたときにおこる溶血の増加は、塩害によるものが一番考えやすいのであろう。しかし、本実験では 0.15 M NaCl 浮遊液を用いているので、塩害を考えると、 NaCl の共融点 -21°C より高い温度ならいざしらず、 -70°C あたりからすでに影響の現われはじめることについては、説明に苦しむところである。細胞内ヘモグロビン溶液の共融点はわからないが、溶血血球からとり出したヘモグロビン溶液単独についての検討では、 -30°C においても凍結像の変わらないことから、細胞内でも凍結状態の変化はあまり考えられない。みとめられた唯一の変化は、 -50°C でもおこる食塩水単液の水の変態であるから、実際の細胞試料についても、細胞表面に接する食塩水の凍結状態になんらかの変化があって、それが細胞膜に影響したのかもしれない。いずれにせよ、このばあいの溶血増加の主因が何であるかはまだ明らかでない。

次にグリセリンを30%に加えたばあいであるが、フレオン凍結後の所見では、細胞は正常の形態を示し細胞内氷晶はみとめられないので、このような状態の凍結では溶血をきたさないものと思われる。しかしこの条件でも10% 前後の溶血をみたのは、細胞内凍結像の見落としか、

急速融解でもなおかつ多少の溶血は免れないことによるのかもしれない。

このような凍結試料を加温したばあいには、グリセリン無添加のときとはかなり違った経過を示した。グリセリンのないものでは、溶血は -80°C から -30°C までのかなり広い温度範囲で徐々に増加したのに対し、グリセリン加のものでは、 -60°C 附近で急激に増加していること、さらに形態的には前者ではほとんど変化がみとめられないのに対し、後者では顕著な凍結像の変化、就中、溶血に比例して細胞内氷晶の成長増大のみられたことである。特に細胞内氷晶が 0.1μ 以下では溶血の増加はないが、 $0.1\sim 0.2\mu$ 以上になるとその細胞数と溶血率が平行すること (-60°C 30分、 -80°C 2週間) は、加温過程の溶血に細胞内氷晶の成長が重大な影響をもっていることを思わせる。この点、グリセリンのないものとは、溶血の原因や機序が異なるものと思われる。これは両者の出発材料、つまりグリセリン添加と無添加のものの凍結直後の凍結像が前述のように全く異なることから、当然推測されるところである。

それでは次にもう一段ほり下げて細胞内氷晶形成による細胞障害の機序を考えてみよう。赤血球は他の一般の動物性細胞のように細胞内の構造物をもたない特殊な細胞であるから、細胞障害特に溶血を考えるばあい細胞膜だけの変化によるものとみなしてさしつかえないであろう。この細胞膜に対する作用として先ず外側に接しているグリセリン食塩水の凍結状態について考えてみると、温度上昇あるいは時間の経過によってかなり氷晶の変態があっても、細胞内氷晶の成長がない限りは溶血をきたさないという事実からみて、細胞膜の外部よりの影響は考慮する必要がないように思われる。次は細胞膜の内部から働らく作用についてであるが、細胞内氷晶がある大きさ以上に成長したときに障害的にはたらくことは確かなようである。しかも同じ試料の中で細胞によって細胞内氷晶の大きいものと小さいものがあるので、ある大きさ以上のものだけが溶血をおこすとすれば、氷としての総量は同じである筈だから、細胞内濃縮液による影響ということは考えにくい。結局、氷そのものによる障害の機構を見出さなければならぬことになる。そこで再び凍結像をよく眺めてみると、細胞内氷晶が小さいうちは細胞表面は平滑であるが、氷晶が大きくなるにしたがって表面の凹凸がはっきりとみとめられるという所見がある。最初の凍結時には細胞はすべて平滑であったのだから、これは当然加温過程での所産であること、しかも凹凸の大きさは、外部のグリセリン食塩水の凍結状態の如何とは無関係で、すべてのばあいに内部の氷晶の大きさに一致することから、内部氷晶の成長にともなって形作られたものと考えてよいようである。ところで、 -60°C あるいはそれよりも低い温度では細胞膜はかなり硬直している (たとえグリセリンが浸透していても) はずであるから、このような低温でこれほどの膜の形状変化があれば、当然微細構造にも変化のおきることが想像されるので、その結果としてヘモグロビンの遊出が考えられるわけである。これがいまのところ溶血の原因としてあげられる最も有力な所見である。

さてここで、本研究分野、特に急速凍結細胞の加温過程における変化に関連した文献についての考察を加えてみたい。

まず、赤血球を用いての実験では、そのほとんどが Luyet 一派によってなされたものである。Luyet ら¹⁴⁾ は、牛全血液の液体窒素凍結のものが、その加温過程の -60°C から -15°C までの間で、溶血率 23% からほぼ 100% に増加することを報告したが、溶血の機序については全

然ふれていない。Rapatz ら¹⁵⁾ は別に行なった蛙の血球を用いての実験で、専ら光学顕微鏡による形態的観察を行ない、グリセリン無添加のものでは、 -50°C 凍結のものを -10°C まで加温しても形態的变化はないが、 -150°C 凍結のものを -10°C まで上げると血球全体としての変形、核及び細胞質の顆粒化と輪状構造の形成のみとめられること、また 10% グリセリン加血球でも、 -120°C 凍結、 -40°C 加温で同様の血球内変化のみとめられることを報告し、特にグリセリンを加えることによって再結晶温度の低下することを強調した。Rapatz ら¹⁶⁾ は同様の実験を電子顕微鏡を用いて行ない、 -80°C 凍結のものを -10°C まで加温すると細胞内に大きな氷塊がみとめられたと述べているが、その対照となる -80°C 凍結の試料の写真が掲載されていないため、最初どんな凍結像を示していたかは不明である。なお、グリセリン加血球の凍結像についての電子顕微鏡観察では、Rapatz ら¹⁷⁾ の凍結破断法による人血球についての研究があり、グリセリン濃度が増すにしたがい次第に細胞内氷晶のサイズは小さくなり、8 M 濃度のものではほとんどみとめられないという。これらはいずれも形態的観察のみで、溶血との関係については全然ふれていない。Pribor ら¹⁸⁾ の牛血液を用いての実験で、 -50°C 急速凍結のものは、 -30°C に上げると溶血率が 20% くらいから 100% 近くに増すが、 -30°C でも細胞外媒液の凍結像に変化のみられない（光学顕微鏡による）ことから、この場合の溶血は再結晶とは関係のないものだろうと述べ、さらに細胞内の氷の再結晶についてはわからないと附言している。結局、これらの実験結果からは、急速凍結赤血球の加温過程における溶血の機序についての適切な情報は得られない。

赤血球以外の生細胞についての関連の研究としては、朝比奈一門の業績があげられる。シロネズミの腹水肉腫細胞の薄層試料を液体窒素または -30°C で急速凍結させたとき透明に見える（光学顕微鏡による）細胞は生きているが、これをゆっくり加温して細胞が暗化するようになると死滅することが報告され⁴⁾、さらに細胞内氷晶の成長による細胞の暗化と原形質の破壊とから考えて、細胞に致命的な氷晶の大きさは 0.5μ 以下であろうと説明された¹⁹⁾。腹水に浮遊した細胞で -30°C 急速凍結のものは、 -20°C より低い温度におかれれば半透明のまま保持されるが²⁰⁾、生理食塩水浮遊細胞では、それより不安定で短時間内に死滅するという²¹⁾。グリセリンを 5% あるいは 10% に加えても、急速凍結では細胞内凍結（暗化）がおりやすく、氷晶の成長も速かであって、細胞は死滅しやすいことがみとめられた。グリセリンの添加は移動再結晶温度を低下させるからであろうという²²⁾。これらの実験はほとんどが -30°C での凍結であり、形態的観察も光学顕微鏡によるだけであるが、その後行なわれた島田ら⁷⁾ の HeLa 細胞を用いた実験において、凍結破断法を用いてのフロン急速凍結細胞の電子顕微鏡観察により、牛血清浮遊のものは細胞内氷晶の大きさは約 0.1μ を示すが、融解後の細胞は死滅しており、20% グリセリン加 PBS のものは氷晶は 0.02μ で細胞は生存していることがみとめられた。この種の細胞では、細胞内に各種の構造物があり、細胞成分としてもヘモグロビンを主体とする赤血球のそれとはかなり異なるものと考えられるが、細胞内氷晶が 0.1μ 附近を界として、それより大きくなったときに細胞に対し障害的に働くようになるという点では、赤血球の所見とほぼ一致するので興味深いことである。

植物細胞については、酒井が早くから急速凍結細胞の生存に関心をもち、加温過程の変化

についても多くの実験を重ねた^{5,6)}。特に大塚ら⁸⁾は、クワの皮層細胞を用い、液体窒素で急速凍結した後の加温過程を形態的(切片の電子顕微鏡観察)機能的(中性紅による生態染色)に追究した結果、 -60°C から -30°C の間で10分間の放置によって順次生存率が低下すること、形態的所見では、 -60°C に加温したものは対照の窒素凍結のものと違わないのに、 -30°C にしたものでは細胞内に明らかに氷晶の跡と思われる空胞がみとめられたことから、細胞内氷晶の成長が細胞の死滅をもたらすものと推定した。掲載された写真では、 -30°C での氷晶に 1μ にも達するものがみうけられるが、細胞に有害となる氷晶の大きさについては今後の検討に俟つという記載があるだけで、この点に関する吟味はまだよくなされていない。

また Sherman ら²³⁾は、腹水腫瘍細胞や腎組織細胞を用いて、種々の条件で凍結させた際の凍結像(凍結置換法または凍結乾燥法で標本を作製した)を光学および電子顕微鏡で観察し、同時に凍結融解後の細胞機能(呼吸や増殖能)をしらべて、凍害の機構を論じている。特に光学顕微鏡でみとめられるくらいの大きさの氷晶が細胞内にできて細胞の生存することを強調しているが、定量的な裏付けが乏しい。また加温過程の条件については全然ふれていない。

以上の過去の業績からみてもわかるように、急速凍結細胞の生存についての意味づけ、さらにそれを加温していく過程でおこる細胞障害の機構については、追究が充分でなく不明の点が少なくなかった。その意味において本実験の結果は、これらの機構の解釈にかなり有意義な資料を提供したものである。

前にも述べたように、赤血球では、グリセリンなどの凍害防禦物質を加えない限り、食塩水浮遊液の急速凍結では、必ず細胞内凍結をきたし溶血をもたらした。グリセリンの添加は濃度を増すにしたがって凍害防禦作用を発揮し、凍結時の生残率は高く細胞内氷晶もみとめられなかったが、その代り加温過程での再結晶温度を低下させるので、かなり低い温度でも形態的变化が現われるようになった。グリセリン溶液の急速凍結試料の加温過程における凍結状態の相変化については、Luyet一派の熱的な測定による報告^{24,25)}があり、ガラス転移点は -105°C 附近、再結晶温度はほぼ -58°C 、融解点は30%グリセリンで -9°C 、40%で -15°C と記載されている。なお30%溶液の緩慢凍結で測った antemelting (本態は不明)は -70°C 、incipient melting は -54°C であるといわれる。しかし、われわれの実験のように血液材料で観察された限りでは、 -80°C でもかなりの氷晶の成長増大がみとめられたわけであるから、形態学を目的としたばあいは、低温処理の温度に注意すべきであろうと思われる。近時、生物試料の電子顕微鏡観察ではできるだけ artefact をさけて試料本来の姿を見たいというねらいで種々の凍結法が用いられるようになったので、その際の凍結あるいは処理の条件として、凍害防禦物質の濃度や処理温度が問題となろう。古くから用いられている凍結乾燥法では、グリセリンの添加されることはあまりないので、その点の問題は少ないにしても、一般に乾燥温度は比較的高い(-70°C より高い)ので、試料によって氷の変態のおきる可能性がある。凍結置換法では、グリセリンの使われることがあるうえ、処理時間が長い(数日間)ので、凍結置換の完了する前に氷晶が成長増大するおそれがある。凍結破断法は比較的低い -100°C 附近で破断、エッチング、蒸着の操作が行なわれることになっているが、その過程の前の段階で注意しないと温度のあがる危険がある。特に本法では 10μ 前後の粒子の存在を論議するばあいが多いので、慎重な処

理と判断が望ましい。赤血球では40%までグリセリン濃度を高めても溶血をおこさぬし*、凍結直後でも加温過程でもほとんど溶血をおこさぬので、凍害防止にこのくらいの濃度のものを用いることはさしつかえないが、赤血球以外の細胞では、グリセリンに対する感受性が強く、10~20%くらいでなければ、機能的に障害をうけるものがあるので注意を要する。凍結法を用いるばあいに、氷晶生成を防ぐ目的でなるべく高濃度のグリセリンを使うにしても、凍結以前の問題として、機能を障害するようであれば、形態的にも何らかの影響を与えるかもしれないので、よく吟味する必要がある。

以上述べたように、本実験で得られた結果は、生細胞の凍害の機序に有力な資料を提供したばかりでなく、形態学的検索に対しても貴重な示唆を与えたものと思う。

V. 摘 要

生細胞の凍結による障害の機序を明らかにする研究の一環として、急速凍結による細胞の生存、およびその細胞の加温過程における機能的形態的变化の検討を試みた。

その目的のため、ヒト赤血球の生理食塩水浮遊液を用い、そのままあるいはグリセリンを加えて液体窒素またはフレオン(-150°C)で急速凍結し、直後および-80°Cから-30°Cに亘る各種の温度に30分間おいたものについて、溶血度の測定と凍結破断法で作った標本の電子顕微鏡観察を行なった。

その結果は

- 1) 生理食塩水浮遊血球は、液体窒素凍結で収縮細胞と凍結細胞ができ、70%近い溶血を示す。このものは-80°Cより高い温度におかれると漸次溶血が増し、-30°Cで100%に達した。しかし形態的にはほとんど変化はなく、対照として観察した生理食塩水単液に-50°Cで水の変態がみられただけである。
- 2) 30%グリセリン加生理食塩水浮遊血球では、フレオン凍結で細胞内外にほとんど氷晶はみとめられず、溶血も10%にすぎなかった。これを加温すると、-80°Cで早くも氷晶の形成をみ、温度の上昇とともに成長増大した。溶血は0.1 μ 以上の細胞内氷晶の現われる-60°C附近で急激に増加し、-50°Cでは最高値に達した。この加温過程での溶血は、細胞内氷晶がある大きさに達したための機械的障害によるものと思われる。
- 3) これらの所見から、顕微鏡標本作製のために凍結法を用いるばあいの処理温度に注意する必要があることが示唆された。

文 献

- 1) Doebbler, G. F. and Rinfret, A. P. 1963 Survival of microorganisms after ultra-rapid freezing and thawing. *J. Bacteriol.*, **85**, 485.
- 2) Moor, H. and Mühlethaler, K. 1963 Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, **17**, 609-628.

* 前報⁹⁾で、40%グリセリン添加は赤血球の変形特に球形化をきたすと述べたが、これは実験上の不注意なミスによるものであったので、とり消しておく。

- 3) MacKenzie, A. P. 1970 Death of frozen yeast in the course of slow warming. *In The Frozen Cell* (G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, eds), J. & A. Churchill, London, 89-96.
- 4) 朝比奈英三・久田洋子・江村牧人 1967 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存. 低温科学, 生物篇, **25**, 81-95.
- 5) 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.
- 6) 酒井 昭 1970 急速冷却された植物細胞の生存に関する要因. 低温科学, 生物篇, **28**, 27-36.
- 7) 島田公夫・浅田 実・朝比奈英三 1971 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. 低温科学, 生物篇, **29**, 83-89.
- 8) 大塚 宏・酒井 昭 1967 急速冷却した植物細胞内にてできる氷の電子顕微鏡的研究. 低温科学, 生物篇, **25**, 21-28.
- 9) 根井外喜男・松坂理夫・浅田 実 1971 フリーズ・エッチング法における冷却条件の吟味. 低温科学, 生物篇, **29**, 91-105.
- 10) Rapatz, G., Sullivan, J. J. and Luyet, B. 1968 Preservation of erythrocytes in blood containing various cryoprotective agents, frozen at various rates and brought to a given final temperature. *Cryobiology*, **5**, 18-25.
- 11) Nei, T., Kojima, Y. and Hanafusa, N. 1964 Hemolysis and morphological changes of erythrocytes with freezing. *Contrib. Inst. Low Temp.*, Ser. B, No. 13, 1-6.
- 12) Lovelock, J. E. 1953 The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414-426.
- 13) Nei, T. 1970 Mechanism of haemolysis of erythrocytes by freezing, with special reference to freezing at near-zero temperatures. *In The Frozen Cell* (G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor, eds.), J. & A. Churchill, London, 131-147.
- 14) Luyet, B. J. and Gehenio, P. M. 1955 Effect of the rewarming velocity on the preservation of rapidly frozen blood. *Biodynamica*, **7**, 273-280.
- 15) Rapatz, G. and Luyet, B. 1960 Microscopic observations on the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica* **8**, 195-239.
- 16) Rapatz, G. and Luyet, B. 1961 Electron microscope study of erythrocytes in rapidly frozen frog's blood. *Biodynamica*, **8**, 295-315.
- 17) Rapatz, G. and Luyet, B. 1968. Electron microscopic study of erythrocytes in rapidly cooled suspensions containing various concentrations of glycerol. *Biodynamica*, **10**, 193-210.
- 18) Pribor, D. and Luyet, B. 1968 A search for the factors of injury in the rewarming of rapidly frozen blood. *Biodynamica*, **10**, 229-240.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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 V. 生理的食塩水中の細胞の急速凍結. 低温科学, 生物篇, **27**, 55-65.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Luyet, B. and Rasmussen, D. 1968 Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glycerol, ethyleneglycol, sucrose and glucose. *Biodynamica*, **10**, 167-191.
- 25) Rasmussen, D. and Luyet, B. 1969. Complementary study of some non-equilibrium phase transitions in frozen solutions of glycerol, ethyleneglycol, glucose and sucrose. *Biodynamica*, **10**, 319-331.

Summary

Hemolysis and morphological changes in the rewarming process of rapidly frozen cells were investigated by employing human erythrocytes as experimental materials and a freeze-etching technique for electron microscopy. This study is a part of a long-range program which has been carried out in our laboratory for many years to elucidate the mechanism of freezing injury to cells.

Cells, suspended in physiological saline solution and frozen in liquid nitrogen, showed two types of freezing patterns, *i.e.*, extracellularly or intracellularly frozen cells, bringing about a 70% hemolysis. When the cells thus frozen were rewarmed to various temperatures between -80°C and -30°C , hemolysis gradually increased, but no morphological change was found. The metamorphosis of ice appeared only in the specimens consisting of saline solution alone.

There was no ice formation inside or outside the cells, suspended in saline to which 30% glycerol was added (v/v) and rapidly frozen in Freon 22 cooled with liquid nitrogen down to -150°C ; the hemolysis in this case was about 10%. Ice particles became visible surrounding the cells even in the specimens maintained at -80°C in the rewarming process and grew larger with the temperature rise. Hemolysis increased intensively at around -60°C and reached its maximum level at -50°C . Based on the coincidence between the number of cells having intracellular ice particles of $0.1\ \mu$ or more and the percentage of hemolysis appearing in the specimens maintained at -60°C for 30 minutes or at -80°C for 2 weeks, it was assumed that the cause of hemolysis during the rewarming process was the growth of intracellular ice particles to a certain size.

Some problems on the probable alteration of freezing patterns in the preparations made by cryotechniques for electron microscopy were also discussed from a morphological point of view.