HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	急速凍結融解された腫瘍細胞の生存　VI ： 細胞内氷晶の電子顕微鏡観察
Author(s)	島田, 公夫; 朝比奈, 英三
Citation	低温科學. 生物篇, 30, 65-75
Issue Date	1972-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17798
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p65-75.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Kimio SHIMADA and Éizo ASAHINA 1972 Innocuous Ice Crystallization within Ascites Tumor Cells of Rat by Rapid Freezing. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 30.*** (With English Summary p. 75)

急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 VI

細胞内氷晶の電子顕微鏡観察*

島田公夫・朝比奈英三
(低温科学研究所)

(昭和47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で，半透明な凍り方をした細胞が急速融解後生存する可能性を述べてきた[1,2]。この細胞は，液体窒素中あるいは −30°C の空気中で急速に冷却された細胞で，特殊な冷凍顕微鏡[3]の下で観察すると，凍結細胞は形態的に未凍結の細胞とほぼ同様であり，細胞の内部に氷晶は認められず半透明に見えた。しかし，加温の途中で氷粒があらわれてくることから，細胞内にはおそらく微細な氷晶が生じているのであろうと考えられた。

そこで今回は，前報[4]につづいて，急速凍結された細胞の凍結中の状態を電子顕微鏡で観察し，光学顕微鏡では見えなかった微細な細胞内氷晶の形成や生長と，それが細胞の生死におよぼす影響を調べてみた。

II. 材料と方法

材料： 実験に使用したシロネズミの腹水腫瘍細胞は，MTK-肉腫 III という系統である。この腹水腫瘍は，北海道大学理学部動物学教室において，1952年に Wistar 系シロネズミの腹腔中に人工的に作られた。以来，累代移植によって保存されてきた。われわれも，実験中は累代移植による増殖中の細胞を使用したが，長期間細胞を使用しない場合は凍結保存した。この腫瘍細胞の凍結保存に関しては，すでに，Kimura ら[5]の報告があり，凍結保存によって腫瘍細胞の染色体数やその形態に変化が起らないことが知られている。われわれが行なった予備的な実験で，この細胞は本来の媒液である腹水に浮遊したまま，ドライアイス温度 (−79°C) で16カ月にわたる長期保存が可能であることがわかった。この方法は同時に試みた20% グリセリンあるいは15% DMSO を加えて凍結保存した細胞より回復が早かったので，現在は腹水に浮遊したままの細胞を −80°C で凍結保存している。なお，これらの凍結保存の場合には，今回の実験に比べると，ずっと低い冷却速度で凍結された。

凍結方法： 今回の実験では，およそ 10°C/秒～1000°C/秒の冷却速度で，腫瘍細胞を凍結した。MTK-肉腫 III を移植してから1週間前後に，シロネズミの腹腔から腹水に浮遊した状態の腫

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1208号

瘍細胞をマイクロピペットで採取した。腹水を液滴状にして銅製試料台の上に取り，液体窒素温度まで冷却した。試料を液滴状にして凍結したのは，凍結中の細胞の形態を観察する方法として選んだフリーズエッチング法のためである。この方法では，凍結した試料を割って破断面のレプリカを取るので，試料は球状あるいは柱状のほうが都合がよかった。凍結に際して，液滴の量 (2, 5, 10 μl)，冷媒 (−150°C の液体フレオン 22，液体窒素) を適当に組み合わせ，毎秒 16°C, 300°C, 500°C, 800°C の冷却速度を得た。

なお，温度測定には，直径 0.1 mm の銅-コンスタンタンの熱電対を用い，これを電磁オッシログラフ (横河電機) に継いで冷却曲線を記録した。熱電対の先は液滴状の試料のほぼ中央にさし入れた。測定は各試料について 2 回づつ行ない，0°C～−50°C の平均的な冷却速度を参考にして，だいたいの値を第 1 表に示した。

電子顕微鏡観察： 電子顕微鏡の観察のための試料は，凍結後液体窒素温度からフリーズエッチング装置 (日本電子，JEE-AFE-01 型) に移し，装置内の真空が 2×10^{-5} mmHg に上がるまで約 20 分間待った。試料の温度は −100°C 前後に保ち，レプリカを取り終るまでは −90°C より上げることはなかった。真空が得られたところで，試料をナイフで割って破断面を出し約 30 秒間フリーズエッチングを行なった。ついで，白金パラジウムと炭素を順に蒸着してレプリカを作った。このレプリカを直接倍率 3000 倍から 5000 倍で電子顕微鏡 (日本電子，JEM-6 AS 型) 観察した。

また，正常な腫瘍細胞の微細構造を観察するために，別に，グリセリンを 30% 加えて急速凍結した試料を用意し，上と同じ方法でレプリカを作り電子顕微鏡で観察した。

細胞の生存試験： 急速凍結した腫瘍細胞の融解後の生死を次のようにして確かめた。凍結した試料を液体窒素温度に 10 分間あるいは 20 分間置き，その後，直ちに 38°C の培養液中 (TC-199) で急速に融解した。融解後遠心して細胞を集め，シロネズミの腹腔に移植した。すでに述べたように，腹水を液滴状にして凍結したので，少量の場合には，試料を数多く用意してどの試料でも融解後の細胞数がだいたい同じになるようにし，シロネズミ 1 頭当り，腹水 10 μl～25 μl 分の細胞を腹腔に移植した。移植後数日おきに腹水を採取し，腹水中にあらわれるすべての有核細胞のうち，腫瘍細胞が占める割合を調べた。そして，腹水中で腫瘍細胞が増殖することが確かめられた場合，移植した細胞のなかに生存するものがあったと判断した。

III. 結　　果

1. 腫瘍細胞の微細構造

腫瘍細胞内には，細胞内小器官を構成している膜構造や，リボゾーム，グリコーゲンなどの顆粒があるので，今回の実験で問題にした非常に小さな氷晶を，これら，とくに細胞内顆粒から区別する必要があった。そこで，急速凍結過程で細胞内に生じた微氷晶を観察する前に，まず，氷晶の形成を抑えた細胞を観察した。第 1 図にグリセリンを 30% 加えて急速凍結 (冷却速度は 200°C/秒程度) した細胞のフリーズエッチング像を示した。試料にグリセリンを加えて凍結する方法は，フリーズエッチング法が生物試料の観察法として取り上げられた頃から行なわれており[6,7]，細胞内氷晶の形成を抑えて，微細構造を観察しやすくする効果がある。細胞の

断面には，核，ミトコンドリア，ゴルジ体，油滴と思われる構造のほか，小胞体の断面あるいは表面が観察できる。細胞質の膜構造以外の部分には，非常に小さな粒状のものが数多く見られる。これらが急速凍結の際に細胞内に生じた微氷晶の跡なのか，細胞内にもともとある顆粒なのかは区別できない。

つぎに，これを腹水に浮遊して急速凍結した細胞と比べてみよう。第2図に，今回の実験で一番速く凍結された細胞（冷却速度，800°C/sec）のフリーズエッチング像を示した。細胞内には，核膜の表面と見られる構造のほか，大小の形も様々な胞状構造が観察されるが，これらがどの細胞内小器官なのかはっきりしない。膜構造以外の部分には，やはり，隙間なく並んだ小さな粒が観察される。しかし，粒の大きさはグリセリンを加えた場合に比べて大きい。もし，これらが細胞内にもともとあった顆粒だとすると，グリセリンを加えた場合と同じくらいの大きさであってよいように思われる。こうした理由から，今回の実験で，腹水に浮遊して急速凍結した細胞内に観察された小さな粒は，微氷晶をあらわしていると判断してもよさそうである。

2. 急速凍結によって細胞内に生じた微氷晶

第3図から第6図には，凍結した細胞とそのまわりの氷の状態，および，細胞内氷晶の様子を観察しやすくするため，細胞の一部を拡大したものを図示した。いずれも，図示した細胞は，それぞれの冷却速度で凍結した細胞を観察したなかで，個々の細胞内氷晶が一番小さかったもので，かならずしも，それぞれの凍結条件での典型的な凍り方を示していない。なお，今回の実験で観察した細胞のなかに，細胞内氷晶が生じていない，すなわち細胞外凍結のみを起していた細胞はひとつも観察されなかった。

第3図から第6図のaで，中央にやや収縮した形あるいはほぼ円形に見えるのが細胞の断面であり，そのまわりは腹水が凍った状態をあらわしている。細胞のまわりで，帯状あるいは脈状をしているのは腹水中に生じた氷晶の境界(B)で，そこには濃縮された腹水が集まっている。帯にかこまれた部分，あるいは網目の部分が氷晶(Ic)である。氷晶の部分の面は，第3図と第4図では荒く，第5図と第6図ではやや平滑に見えている。

冷却速度の低いものから高いものへと概観してみると，細胞外に生じた個々の氷晶は，冷却速度が増すにつれて小さくなり，したがって数が増していくのがわかる。いっぽう，細胞内には，細胞内小器官の断面あるいは表面と見られる構造のほかに，非常に小さな粒が観察される。この粒は，**III.–1.** で述べたように，凍結過程で細胞内に生じた微氷晶と考えてよいだろう。そこで，第3図から第6図のaおよびbを見ながら，冷却速度の変化に対して，細胞の凍結中の形態や微氷晶の大きさがどうかわるか比較してみよう。

16°C/秒で凍結された細胞のうち多くのものは，その細胞内に0.1μ以上の粒状の氷晶が生じていたが，なかに，第3図に示したような非常に細かな氷晶の細胞が観察された。氷晶の大きさは0.05μ以下で，細胞内の場所によって大きさのばらつきはなく，個々の氷晶の平均的大きさは，直径がおよそ0.03μである。また，この速度で凍結された細胞の多くはやや収縮した形で凍結していたが，なかでもこの細胞は収縮していたほうである。この収縮は，細胞が凍結過程で細胞外凍結を起こし脱水されたことを示している。これに対して，300°C/秒から500°C/

秒で凍結された細胞は，ほぼもとの球形のまま凍結していた。しかし注意して見ると，細胞の周辺は，300°C/秒で凍結された細胞ではやや波形をしている（第4図aの矢印)。これは冷却速度が増すにしたがって滑らかになり，800°C/秒で凍結された細胞では，細胞にもともとある仮足状の突起がとびだしているだけである（第6図a)。300°C/秒以上で凍結され細胞は，凍結中に脱水されてもわずかか，ほとんどされなかったとみてよい。いっぽう，粒状の細胞内氷晶は，冷却速度が増すにつれて小さくなっていく。300°C/秒で凍結された細胞では，微氷晶はかなりはっきりとした粒状に見える。粒の大きさは場所によって少々ばらつきがあり，平均的大きさはおよそ0.1μである（第4図b)。500°C/秒で凍結された細胞の細胞内氷晶の大きさは0.05～0.1μ程度である（第5図b)。800°C/秒で凍結された細胞のなかに，非常に細かな細胞内氷晶を生じた細胞が出現した。氷晶の大きさは，16°C/秒で凍結された細胞の場合と同じくおよそ0.03μである。細胞が凍結中にほとんど脱水されず，細かく，一様な大きさの細胞内氷晶が生

第1表 凍結融解された腫瘍細胞のネズミ腹腔における増殖
少量の腹水中にあらわれる全細胞中での腫瘍細胞の出現頻度を％で示す

実験番号	冷却速度 (°C/秒)	凍結時間 (分)	ネズミ記号	移植後の日数 3	5	7	10	12	14	移植後のネズミの生存日数
I	16	10	a	＋	＋	15.1	>90	>90	>90	17
			b	0	0	0	23.8	58.0	>90	32
II	300	20	c	0	—	0	—	0	—	3週間後も腫瘍細
			d	0	0	0	0	0	—	胞は認められず
III	500	10	e	0	0	0	—	—	0	〃
			f	0	0	0	0	0	—	〃
IV	800	10	g	0	0	—	10.1	71.3	>90	20
			h	0	0	＋	22.1	>90	>90	17
V		未凍結	A	82.5	—	—	—	—	—	11
			B	92.5	—	—	—	—	—	12

＋：出現頻度1％以下

第1図～第6図 凍結細胞のレプリカの電子顕微鏡像
いずれも，急速凍結した腫瘍細胞の破断面をフリーズエッチングしてレプリカを取った ER, 粗面小胞体；G, ゴルジ体；M, ミトコンドリア；N, 核；NMS, 核膜表面；O, 油滴；B, 細胞外に生じた氷晶の境界；IC, 細胞外に生じた氷晶

第1図 腹水にグリセリンを30％加えて急速凍結した細胞 ×20,000

第2図 腹水に浮遊して急速凍結した細胞 ×20,000
冷却速度，800°C/秒

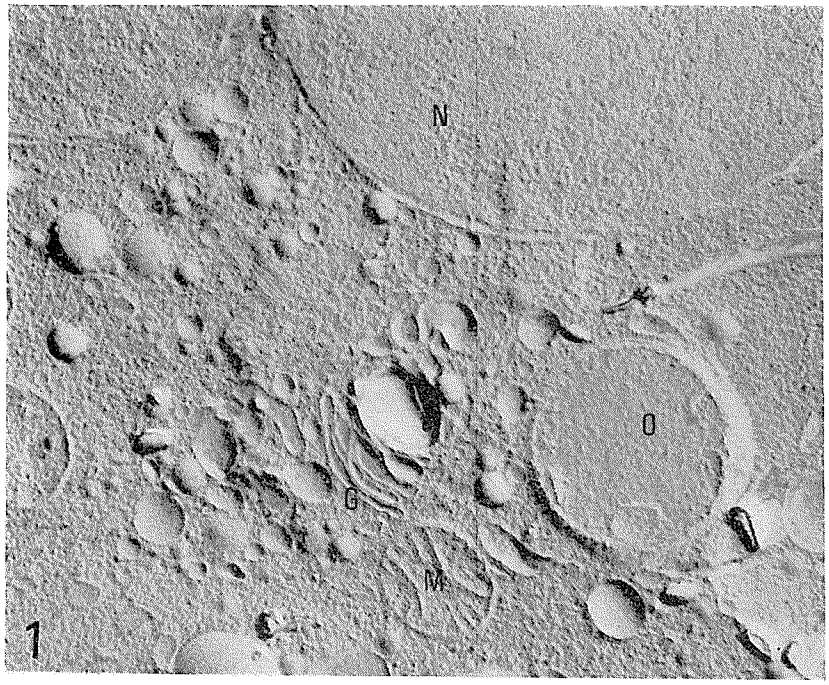
第3図～第6図 腹水に浮遊して急速凍結した細胞とその一部拡大図
いずれも，aは6,000倍，bは12,000倍

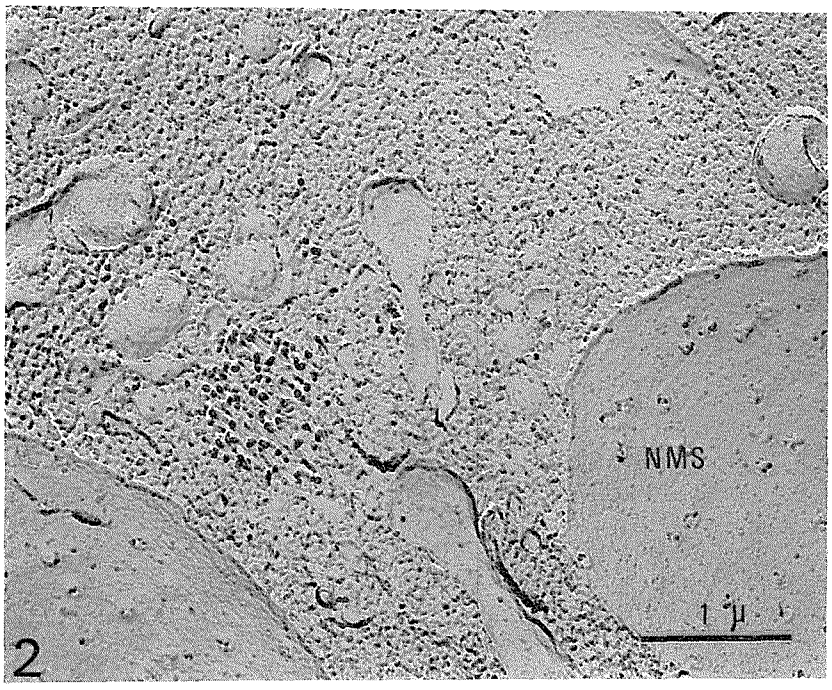
第3図 冷却速度，16°C/秒

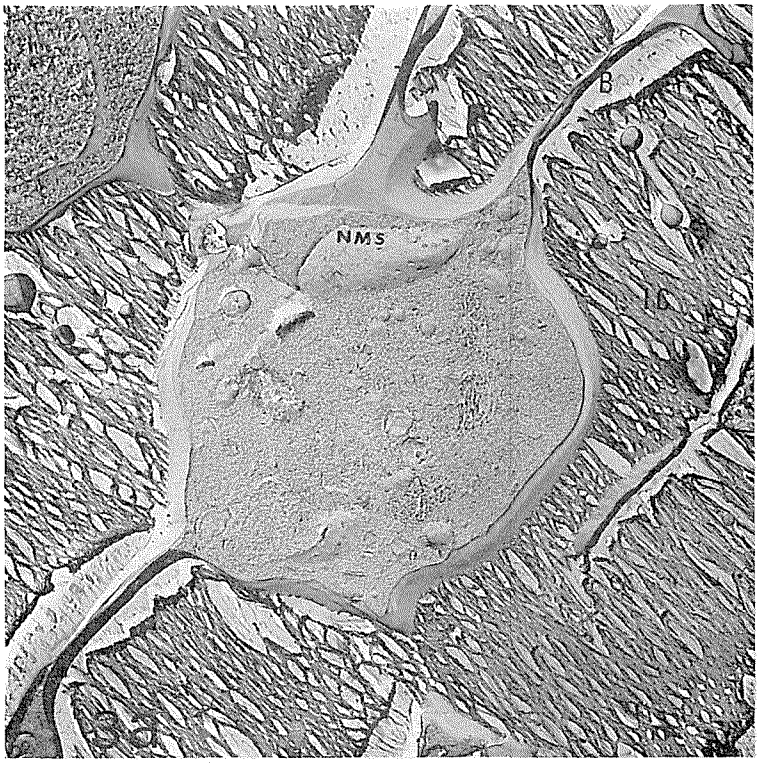
第4図 冷却速度，300°C/秒

第5図 冷却速度，500°C/秒

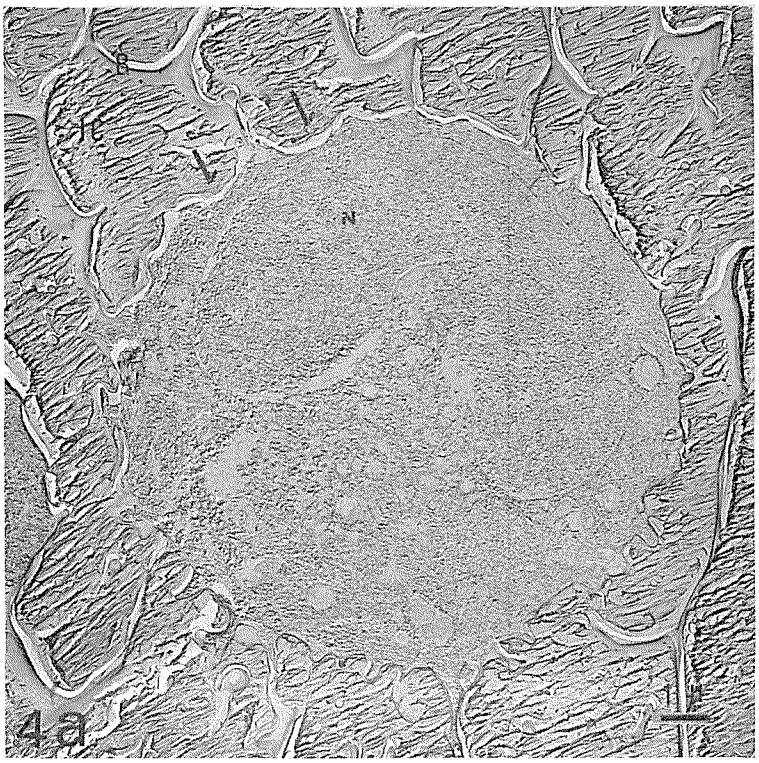
第6図 冷却速度，800°C/秒

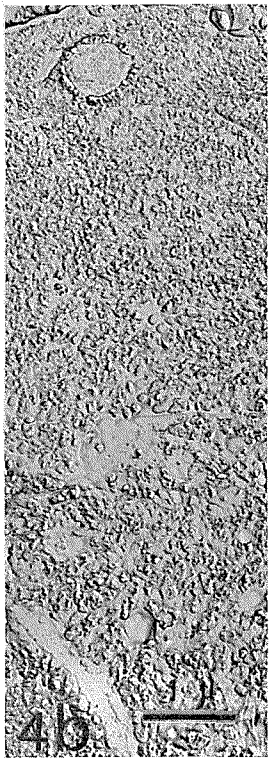

N
O
G
M
1

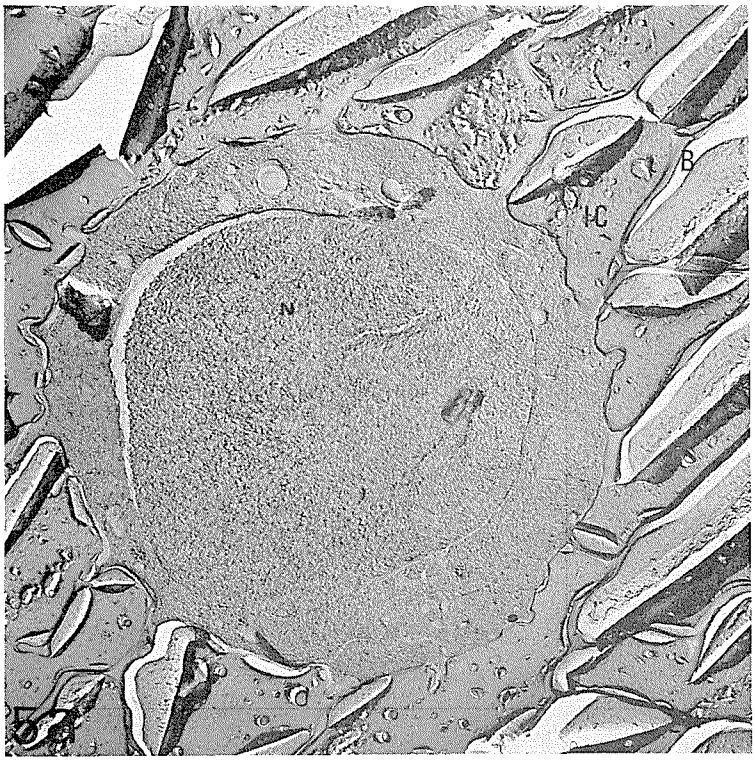

NMS
1 μ
2

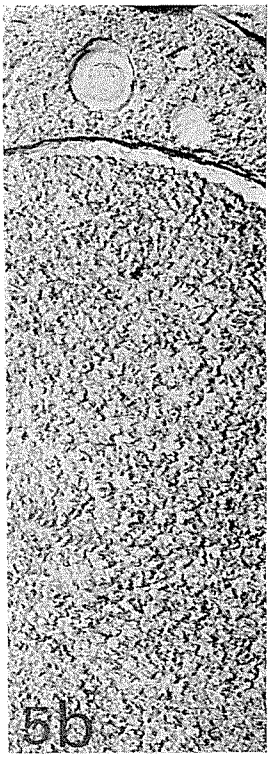

B
NMs
3a

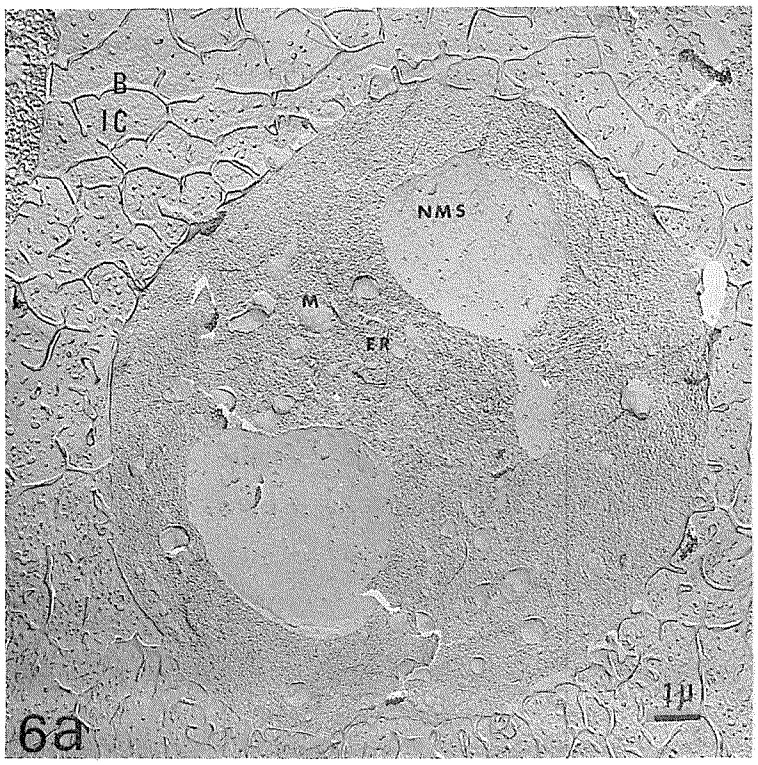
3b

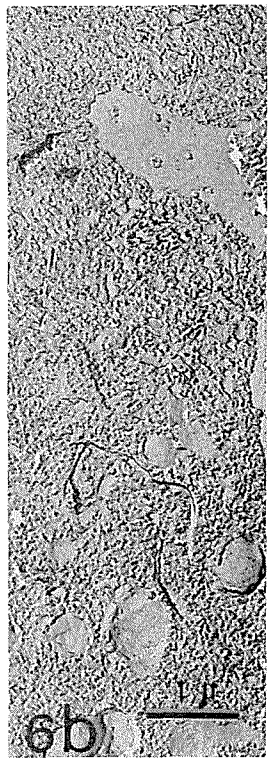

B
N
4a


4b


B
IC
N
5a


5b


B
IC
NMS
M
ER
1μ
6a


1μ
6b

じたので，細胞内には，核膜の表面，ミトコンドリア，粗面小胞体と思われる構造が，他の冷却速度で凍結した細胞より観察しやすい。

3. 急速凍結された細胞の融解後の生死

急速凍結融解後の細胞の生死は，第1表からわかるように，凍結時の冷却速度に左右される。すなわち，16°C/秒と800°C/秒の冷却速度で凍結された試料で，急速融解後，細胞の増殖が認められ，300°C/秒と500°C/秒で凍結された試料では認められなかった。増殖が認められた場合でも，腫瘍細胞が腹水中にあらわれる全細胞の90%以上を占めるようになるのには，未凍結細胞の場合に比べて多くの日数を要した。これは，おもに，凍結融解中に何割かの細胞が死んでしまうからであろう。移植試験ではその数を明らかにすることができなかったが，ともかく16°C/秒と800°C/秒で凍結された試料の中に生存していた細胞があったと言える。これに対して，300°C/秒と500°C/秒で凍結された試料では，凍結融解中にすべての細胞が死んでしまったと思われる。

IV. 考　　察

今回の実験では，およそ10°C～1,000°C/秒の範囲の冷却速度で凍結された細胞の凍結中の形態が電子顕微鏡で観察され，凍結細胞の外形や細胞内氷晶の状態が冷却速度に影響を受けることが確かめられた。

冷却速度が低い（16°C/秒）ところでは，凍結過程で細胞は幾分脱水されて収縮しており，細胞内に生じた粒状の氷晶が非常に小さい細胞が見いだされた。冷却速度が300°C/秒から800°C/秒の範囲では，細胞の脱水はわずかであり，細胞内氷晶は，冷却速度が16°C/秒の場合より，かえって大きくなった。細胞内氷晶は冷却速度が増すにつれて小さくなったが，16°C/秒で凍結された細胞で見られたような直径がおよそ0.03 μの氷晶が生じた細胞は，冷却速度が800°C/秒に上がるまで観察されなかった。

われわれは，細胞の凍結のモデルのひとつとして溶液の凍結を参考にすることができる。例えば，ゼラチンゼリーでは，氷晶の生長はゼラチン濃度が高くなる程，また冷却速度を高くして低い温度で凍結する程起こりにくいことが知られている[8,9]。溶液のように濃度が一次的に決っている場合には，溶液が凍った場合に生じるひとつひとつの氷晶の大きさは，冷却速度と凍結温度の変化に対して一定の傾向を示し，それは，今回，細胞の媒液であった腹水の凍結で見られた。しかし，細胞の凍結の場合には，冷却速度は，また，凍結過程における細胞の脱水の程度に影響し，細胞内の濃度を二次的に変えるので，溶液の凍結の場合のようにはいかない。一般に細胞は凍結過程において，冷却速度が低いうちは，細胞外の氷に細胞内の水を奪われて収縮し細胞外凍結を起こしやすい。細胞は濃縮した状態になり，細胞内に氷晶が生じにくくなる。しかし，細胞内の水が細胞外に移動する速さには限りがあるので，冷却速度が増すにつれて，細胞は水を持ったまま低温にさらされることになり，細胞内凍結を起こしやすくなる[10]。16°C/秒で凍結された細胞では，冷却速度がやや低かったので，凍結過程である程度脱水された。脱水の程度は，細胞内氷晶の形成を妨げる程ではなかったが，低い冷却速度でも氷晶の生長を抑える効果があったものと思われる。いっぽう，300°C/秒以上で凍結された細胞で

は，脱水はわずかであったので，細胞内氷晶の生長は，冷却速度が非常に高くなければおさえられなかったのであろう。

つぎに，この細胞が細胞内凍結を起こしても生存する可能性について考察してみよう。実験の結果はつぎのようであった。1). 16°C/秒～800°C/秒で凍結された細胞は，電子顕微鏡で観察した限り，いずれも細胞内凍結を起こしていた。2). 300°C/秒と500°C/秒で凍結された細胞内には，いずれも0.05μ以上の氷晶が生じ，同じ冷却速度で凍結された細胞は，融解後生存しなかった。3). 16°C/秒と800°C/秒で凍結された細胞のなかに，非常に細かな細胞内氷晶（直径およそ0.03μ）が生じた細胞が見いだされ，しかも，同じ冷却速度で凍結された細胞のなかに，融解後生存するものがあった。

MTK-肉腫III細胞では，細胞内凍結を起こしても，細胞内氷晶が十分小さければ，急速融解後生存する可能性が強い。しかし，今回の実験だけでは，細胞内氷晶の大きさが0.05μより小さければ細胞にとって致命的でないかどうかは確実ではない。それは，融解後生存を調べた細胞は，いずれも液体窒素温度から急速加温されたものであり，いっぽう，凍結細胞の形態は－100°C附近で観察されたからである。－100°C附近で0.03μに見えた粒状の細胞内氷晶は，－196°Cでは違った状態であるかもしれないし，また，急速融解の途中でもっと大きくなることも考えられるからである。

急速凍結された細胞の凍結中の形態を電子顕微鏡で観察し，細胞内氷晶の形成の有無と，細胞の凍結障害の関係を論じた報告がいくつかある。Rapatzら[11]の報告は，ヒトの赤血球に関するものであり，高濃度グリセリン溶液（8.6 M）に浮遊して急速凍結した赤血球では，細胞内氷粒の形成が認められず，このことは同じ条件で凍結した赤血球が，融解後溶血率が低いことをよく説明すると述べている。また，大塚ら[12]は，冬のクワの皮層細胞を急速凍結すると，－60°C以低では細胞内に氷晶の跡は認められず，急速融解後生存すると述べた。これに対してShermanら[13]は，グリセリン処理されたカエルの上皮細胞では，細胞内に電子顕微鏡ではっきり氷晶の跡が認められても，細胞は融解後^{3}H-チミジンを取り込んだと報告した。Rapatzらは，フリーズエッチング法を，大塚らとShermanらは凍結置換法を用いた観察であった。われわれも，前報[4]において，今回と同様フリーズエッチング法で凍結細胞を観察した。材料はHeLa細胞であり，これを20%グリセリン塩溶液に浮遊して急速凍結（200°C/秒）すると，細胞内には0.02μ程の粒状の微氷晶が観察された。同じ凍結処理をした細胞のなかに急速融解後の培養で増殖するものがあったので，HeLa細胞でも，細胞内氷晶が非常に小さければ生存する可能性があると述べた。

これまで，動物細胞で急速凍結過程が観察され，生存も確かめられた細胞は，おもにグリセリン処理された細胞であった。これに対して今回の実験では，本来の媒液である腹水に浮遊した腫瘍細胞が急速凍結された。しかも，凍結状態の観察から，細胞内氷晶が生じても十分小さければ，細胞は致命的な害を受けない可能性があることが確かめられた。

最後に，これまでの光学顕微鏡で得られた結果[1,2]と，今回の結果を比較してみたい。腹水腫瘍細胞をカバーグラスに薄く引きのばし，－30°Cの空気中で急速凍結（試料の冷却速度は20°C/秒前後）して，光学顕微鏡で観察すると，細胞内に氷粒は認められず，細胞はほぼ透明で

外見上未凍結細胞のようであった。われわれは，こうした凍り方をした細胞を“半透明凍結細胞”と呼んで，この細胞の凍結過程を，おもに −15°C から −30°C の範囲で観察した。その結果，半透明凍結細胞は細胞内凍結を起こしているが，細胞内氷晶は光の波長に比べて非常に小さく，そのために，凍結細胞は光学顕微鏡下で未凍結細胞と同様に見えるのであろうと推測された[2]。また，移植試験の結果は，この細胞のなかに急速融解後生存する細胞がある可能性を示した。今回の実験で，800°C/秒で凍結された細胞のなかに，細胞の外形がほとんど凍結前のままで，しかも，細胞内に生じた氷晶が非常に小さくおよそ 0.03 μ という細胞が見い出された。この細胞と半透明凍結細胞とで，細胞内に生じた微氷晶の状態が同じであるかどうかは興味ある問題である。しかし，凍結温度が違うことや，半透明凍結細胞が −30°C でも比較的安定で，細胞内氷晶が生長しにくいのに対して，800°C/秒で液体窒素温度まで冷却された細胞は，−30°C に 10 分間置いただけですべて死んでしまう[14]ことなどから，両者の間には違いがあるのかも知れない。ともあれ，今回の電子顕微鏡観察は，これまでの光学顕微鏡での観察を幾分補えるように思う。

V. 摘　　要

シロネズミの腹水腫瘍細胞である MTK-肉腫 III を液体窒素温度で急速凍結し，凍結細胞の形態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。細胞を浮遊させた腹水を液滴状にして凍結した。試料の冷却速度はおよそ 10°C～1,000°C/秒の範囲であった。

16°C/秒で凍結された細胞は，細胞外凍結を起こして脱水され，幾分収縮しており，そのなかに，直径がおよそ 0.03 μ の粒状の細胞内氷晶を生じた細胞があった。300°C/秒と 500°C/秒で凍結された細胞は，ほんのわずかしか脱水されず，そのため細胞内氷晶はかえって大きく，最も小さな場合でも 0.05 μ～0.1 μ であった。16°C/秒で凍結された細胞で見られたおよそ 0.03 μ の細胞内氷晶は，800°C/秒で凍結された細胞で再び観察された。この細胞の外形は，ほとんど凍結前と同様であった。

16°C/秒と 800°C/秒で凍結された細胞にだけ，急速融解後生存する細胞が認められたので，この腫瘍細胞では，細胞内凍結を起こしても，細胞内氷晶が十分小さければ，氷晶の形成は細胞にとって致命的な害にならない可能性が一段と強くなった。

文　　献

1) 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**, 81–96.
2) Asahina, É., Shimada, K. and Hisada, Y. 1970 A stable state of frozen protoplasm with invisible intracellular ice crystals obtained by rapid cooling. *Exptl. Cell Res.*, **59**, 349–358.
3) 朝比奈英三 1969 凍結 (日本生物物理学会編集： 細胞生物物理研究法 I). 吉岡書店, 京都, 233–253.
4) 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.
5) Kimura, Y. and Kikuchi, Y. 1961 Cytological studies of tumors, XXXVII. Chromosome conditions of animal tumors after deep freezing. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zoology*, **14**, 576–588.

6) Haggis, G. H. 1961 Electron microscope replicas from the surface of a fructure through frozen cells. *J. Biophys. Biochem, Cytol.*, **9**, 841–852.
7) Moor, H. and Mühlethaler, K. 1963 Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, **17**, 609–628.
8) Persidsky, M. D. and Luyet, B. J. 1959 Low-temperature recrystallization in gelatin gels and its relationship to concentration. *Biodynamica*, **8**, 107–120.
9) Luyet, B., Tanner, J. and Rapatz, G. 1962 X-ray diffraction study of the structure of rapidly frozen gelatin solutions. *Biodynamica*, **9**, 21–46.
10) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzerotemperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, **47**, 347–369.
11) Rapatz, G. and Luyet, B. 1968 Electron microscope study of erythrocytes in rapidly cooled suspensions containing various concentration of glycerol. *Biodynamica*, **10**, 193–210.
12) 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.
13) 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.
14) 島田公夫 (未発表).

Summary

Ascites tumor cells of rat, MTK-sarcoma III, were frozen rapidly to liquid nitrogen temperature and the frozen cells were electron microscopically investigated. Small ascites drops containing tumor cells were taken on the cupper-supports and cooled at various rates between 16°C/sec and 800°C/sec. The frozen drops were fructured at a low temperature (about −100°C) in vacuum, and the fructure surfaces were replicated with platinum-paradium and carbon. The replicas were observed under an electron microscope.

In the suspensions cooled at 16°C/sec, a large number of very fine ice crystals (about 0.03 μ in diameter) were formed in the cells which shrunk by dehydration during freezing. While, in the suspensions cooled at rates faster than 300°C/sec, the shapes and the sizes of the frozen cells were almost the same as unfrozen ones, that is, the cells were scarcely dehydrated during freezing. In these cells the sizes of small ice crystals formed were larger than that observed within the cells cooled at 16°C/sec, namely, 0.1 μ and 0.05 μ in the suspensions cooled at 300°C/sec and 500°C/sec respectively. Intracellular ice crystals were observed to become gradually smaller at higher cooling velocities. We found again very fine intracellular ice crystals (about 0.03 μ) in the suspensions cooled at 800°C/sec.

Frozen cells could revive after rapid rewarming, when the suspensions were cooled at 16°C/sec and 800°C/sec. These results suggest that the cells could survive intracellular freezing, if the intracellular ice crystals were too small to be injurious to the cells during freezing and thawing.