HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	急速凍結融解された腫瘍細胞の生存　Ⅶ：－２７℃で急速凍結された細胞の電子顕微鏡観察
Author(s)	島田，公夫；朝比奈，英三
Citation	低温科學．生物篇，31，41-47
Issue Date	1974-01-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17806
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p41-47.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Kimio SHIMADA and Eizo ASAHINA 1973 Electron Microscopic Observation of Frozen Tumor Cells cooled rapidly to −27°C. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 31.*** (With English Summary p. 47)

急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 VII

−27°C で急速凍結された細胞の電子顕微鏡観察*

島田公夫・朝比奈英三

(低温科学研究所)

(昭和48年9月受理)

I. 緒　　言

腹水腫瘍細胞を材料にしてはじめられた哺乳動物有核細胞の凍結過程の観察は，はじめ冷凍顕微鏡（光学顕微鏡）を使つて行なわれたが，観察中 −30°C 附近で急速凍結した細胞のなかに所謂「ガラス化」を起こしたような細胞が見つかり，こうした凍り方がある細胞にとつては無害であることが確かめられた[1]。しかし，「ガラス化」したように見えた細胞も融解過程の観察や −30°C という温度を考えると，実際には細胞内凍結を起こしているが，個々の氷晶は光学顕微鏡の分解能を越えて非常に小さいのであろうと考えられていた。いずれにしても，そのくわしい凍結の様子を光学顕微鏡で知ることは難しく電子顕微鏡による観察が必要であつた。そこで，Bachmann らによってフリーズエッチング法への応用として考案された試料の噴霧凍結法[2] (Spray-freeze-etching) にならい，少し工夫を加えて腹水腫瘍細胞の浮遊液を低温室内で噴霧凍結し，やはりフリーズエッチング法を使って凍結細胞の形態を電子顕微鏡で観察してみたので報告する。

II. 材料と方法

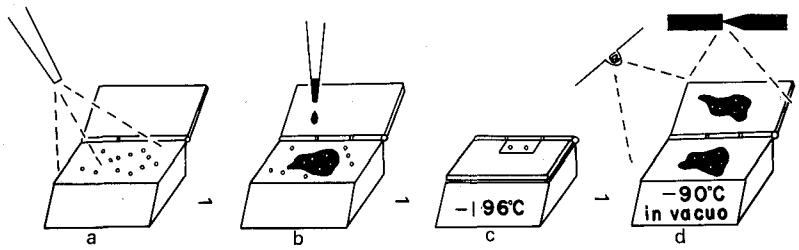
材料は MTK-肉腫 III という系統のシロネズミの腹水腫瘍細胞である[3]。
実験には移植後1週間前後のネズミの腹腔から採取した腫瘍細胞を使い，いずれも腹水に浮遊したまま凍結した。本実験では −30°C 附近で急速に凍結された細胞を観察するのが目的であったので，できるだけ速い冷却速度を得るために細胞浮遊液を霧粒状にして凍結した。この方法はすでに述べたように Bachmann らの方法を参考にしたものだが，試料の量が少なくてすむところに利点がある。

凍結は −27°C の低温室内で行なわれ，細胞遊浮液をクロマトグラフ用の噴霧器で霧粒状にして，予め低温室内で冷やしておいた真鍮製の試料台 (5×6×20 mm) に吹きつけて凍結した (第1図 a)。ついで凍結した霧粒が十分浸る位に，同じ温度に冷えたアニゾールを滴下し (第1図 b)，蝶番で留められた蓋をして試料台を液体窒素温度まで冷却した (第1図 c)。−27°C で凍結した試料は，5分以内に液体窒素温度まで冷却した。

アニゾールの融点は −37.3°C なので，−30°C 附近では凍結した霧粒を液状で包んでいる

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 1261 号

が，液体窒素温度では固化して霧粒同士の隙間を硬く埋め，また試料台とその蓋をしっかり繋ぎ留めている。アニゾールをコンクリートのセメントに，霧粒状に凍結した細胞浮遊液を小石にたとえることができる。いったん液体窒素温度まで冷やされた試料台はつぎにフリーズエッチング装置（日本電子製）に移され，試料温度 −90°C，装置内の真空度が 2×10^{-5} mmHg 程度に達したときに蓋が開かれた。このとき，試料台とその蓋の間に挟まれて薄い板状に凍結していた霧粒とアニゾールの混合試料は上下に剝離され，場所によっては霧粒中に含まれた腫瘍細胞の破断面が露出する。そこで，短時間氷を昇華した後，白金パラジウムと炭素をこの破断面に蒸着してレプリカを取った（第1図 d)。このようにして得たレプリカを，その試料面についている汚れを洗い落としてから電子顕微鏡（日本電子製）で観察した。



第1図 腹水腫瘍細胞の噴霧凍結法（説明本文）

また，温度上昇にともなう細胞内氷晶の生長を観察する場合には，いったん −27°C で上述のように霧粒状に凍結した試料を，−17°C に 30 分間保持してから液体窒素中に移し，以下同様にして凍結細胞の破断面のレプリカを取った。

なお，霧粒の大きさを測定するために，−27°C の低温室内で細胞浮遊液をカバーグラスに吹きつけ，これを冷凍顕微鏡で観察した。

III. 結果と考察

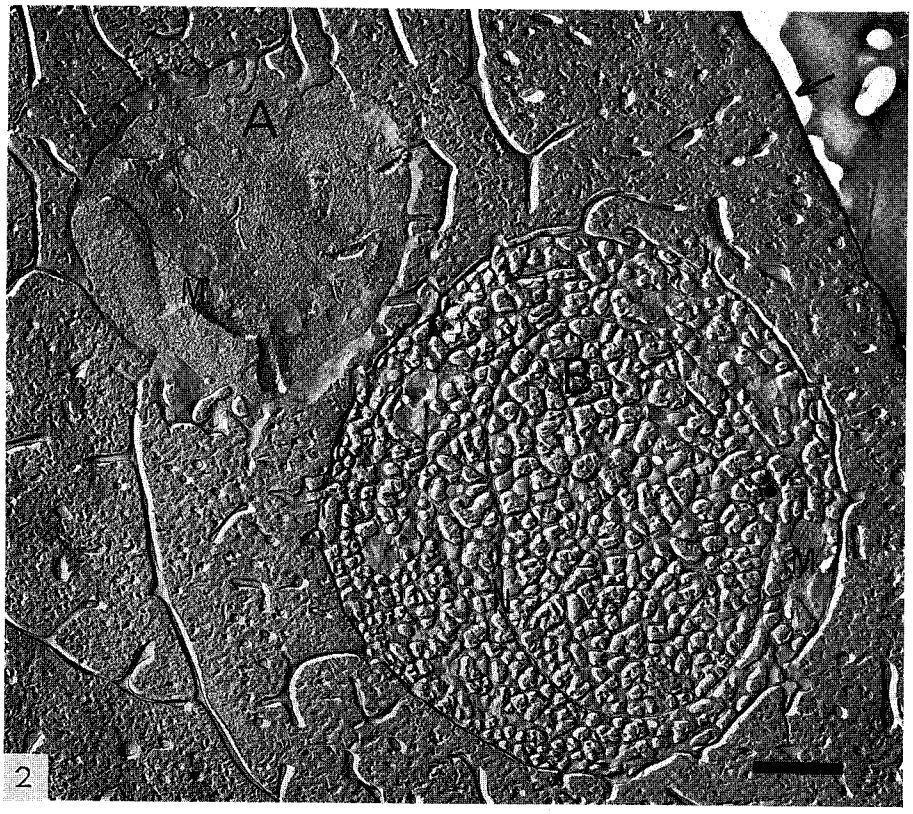
低温室内で霧粒状にして凍結された細胞浮遊液は，別にカバーグラスに吹きつけて冷凍顕微鏡で観察した結果から，粒の直径 100 μ 前後のものが多いことが確かめられた。しかし，霧粒の大きさは一定ではなく，さらに大きなものや形の変化に富んだものが混じっていたので，ひとつひとつは厳密には異なった冷却速度で凍結されたと考えられる。

第2図から第4図は，−27°C で凍結した霧粒の破断面のレプリカ像である。図はそれぞれ別の霧粒の断面であり，第2図では霧粒の縁が観察され，その外側には固化したアニゾールが認められる。図に示した A, B, C および D は腫瘍細胞である。いずれも細胞の断面があらわれており，今回観察された凍結細胞のいろいろな凍り方をおおよそ代表していて，細胞の径や

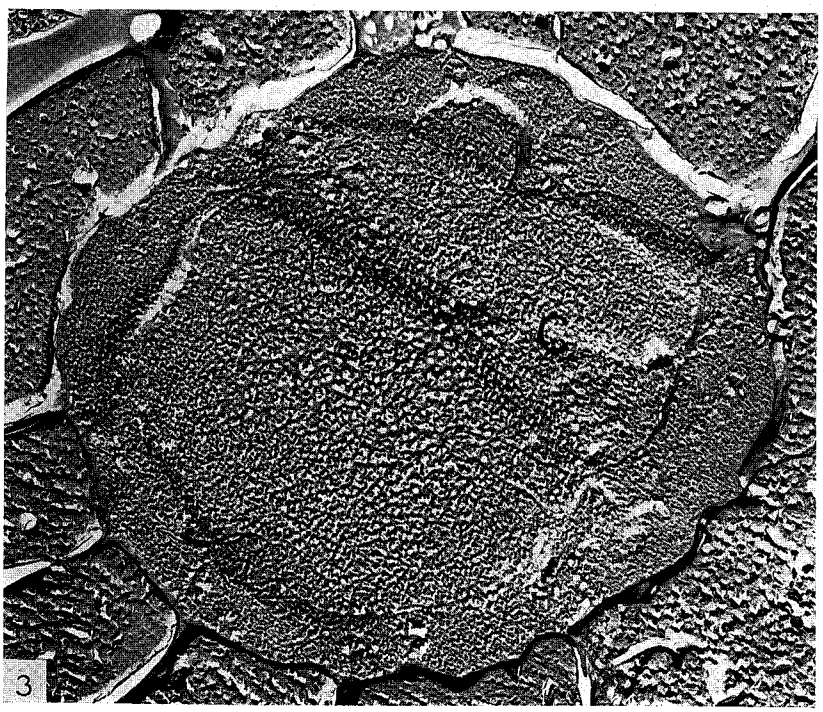
第2図—第5図 噴霧凍結した腫瘍細胞の凍り方
いずれも，フリーズエッチング法で得たレプリカの電子顕微鏡像
A, B, C および D はそれぞれ凍結細胞； M，ミトコンドリア； N，核膜（各図共通）

第2図—第4図 −27°C で凍結した細胞 × 6,000
第2図の矢印は，凍結した霧粒の縁を示す。図右下の黒線は 2 μ のスケール

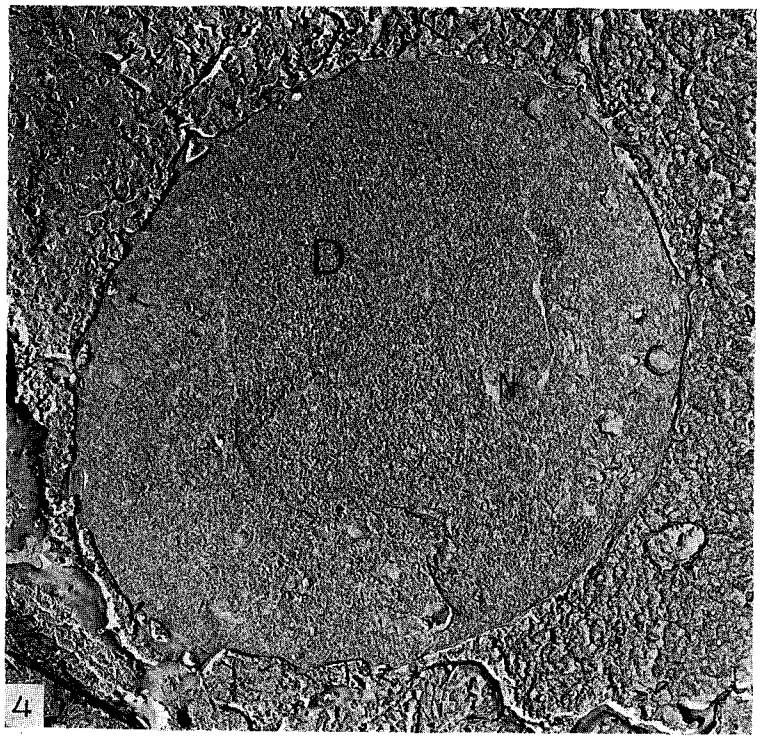
第5図 −27°C で凍結した後，−17°C に 30 分間置いた細胞 × 6,000



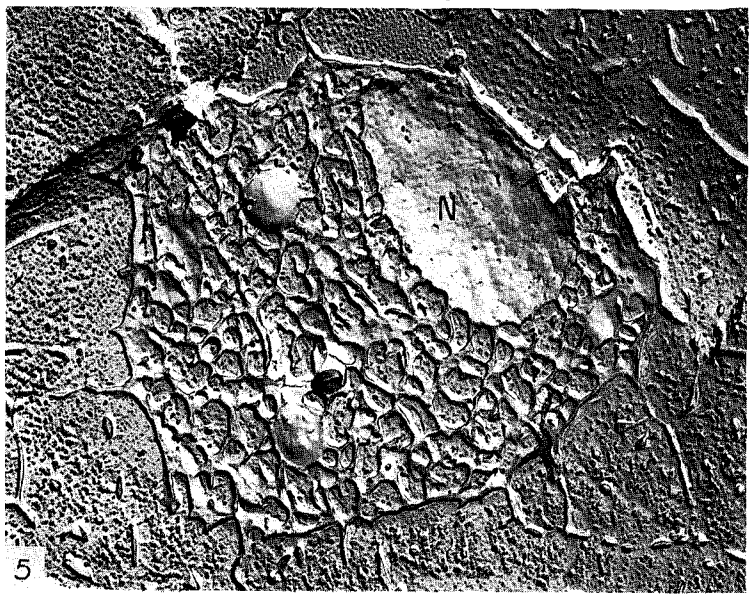
2



3



4



5

細胞内氷晶の形成状態にそれぞれ差が認められる。それぞれの細胞の断面にはまた細胞内小器官および顆粒の断面あるいは表面を示す構造が見出される。これらの内で，核膜とミトコンドリアの断面は比較的判り易い構造をして見えるが，その他の胞状構造についてはどの細胞内器官あるいは顆粒なのかを言い当てるのは難かしい。

細胞のAとBは隣合っているにもかかわらず，Aの細胞は収縮しており，細胞内に生じた氷はひとつひとつが直径0.05μ以下の非常に小さい結晶からなっている。これに対して，B, CおよびDの細胞ではAの細胞のような収縮は見られない。しかし，細胞内に形成された氷の結晶の大きさは細胞毎に異なっている。Bでは，そのひとつひとつは生長しておよそ0.5μの大きさに達しているが，CとDでは細かく，特にDの細胞内に生じた氷晶はAの細胞で観察されたものに近く見える。今回の実験では，Cの細胞に代表されるような凍り方が最も多く観察され，AおよびDのような凍り方は少なかった。

ところでAの細胞のように細胞内氷晶が非常に小さな場合には，氷晶と細胞に固有の細胞内器官や顆粒（リボゾーム，グリコーゲン等）との区別が困難になり，細胞が果して細胞内凍結を起こしているかどうか判断しにくい。しかし前報[4]で述べたように，グリセリンのような氷晶の形成を抑える物質を加えて凍結した細胞や，あるいは細胞内に氷晶が形成されない所謂細胞外凍結をした細胞とその形態を比較することによって，ある程度まで細胞内凍結を起こした細胞を区別することができる。また，いったん凍結した細胞をさらに高い温度で処理したとき，移動再結晶による細胞内氷晶の生長が起こるかどうかを調べることによつても判る。第5図は−27°Cで凍結した試料をいったん−17°Cに保持したものであり，細胞内氷晶の生長が明らかである。昇温にともなう細胞内氷晶の生長の様子は冷凍顕微鏡を使って行なった連続的な観察に詳しく述べられているが[5]，これはその観察結果と一致する。いずれにしてもAの細胞は細胞内凍結を起こしていると見てよく，こうした細胞も含めて，今回噴霧凍結法で凍結した腫瘍細胞は，観察した限りでは，いずれも細胞内凍結を起こしていた。

低温室内で試料を霧粒状にして凍結した場合，霧粒の大きさや形が変化に富んでいたことから，ひとつひとつの霧粒はおそらく異なった冷却速度で凍結したのであろうという考えはすでに述べたが，凍結した細胞の収縮の程度や細胞内氷晶の状態は，冷却速度ばかりでなく，細胞による脱水速度の違いによっても影響を受けると思われる[6]。細胞のAとBのように隣合っている細胞ではほぼ同じ速さで冷却されたと考えてよいのに凍結状態に差があらわれるのは，Aの細胞がBに比べて，凍結過程で外液の凍結の開始にともなって最初，細胞外凍結を起こし速やかに脱水されたためであろう。このような凍り方は，中間的な速度（10～20°C/秒）で凍結された試料でしばしば観察され[4]，Aのように水を奪われた細胞では細胞内凍結を起こしにくくなるが，起こした場合でも個々の氷晶は微細になる。いっぽうB, CおよびDの細胞のようにほとんどの水を持ったまま凍結した細胞では，細胞内氷晶の形成と生長はおもに冷却速度と最終凍結温度の影響を受ける。CおよびDの細胞はBに比べて細胞内氷晶は非常に細かい，したがってこれらの細胞を含んだ霧粒はA, Bを含んだものに比べて速く冷却されたと考えられる。

さて今回の実験でわれわれは，これまでに行なってきた光学顕微鏡による細胞の凍結過程

の観察のうち，光学顕微鏡では分解能の不足から細胞内氷晶の形成の様子が不明瞭であった−30°C 附近で急速凍結した細胞の形態を電子顕微鏡で明らかにしたいと考えた。光学顕微鏡観察の場合は，試料をカバーグラスに薄く引きのばし腫瘍細胞がカバーグラス上に一層に並ぶようにして急速凍結したものを観察したが，今回は方法上の制約から，試料を霧粒状にして急速凍結したものを観察した。したがって凍結条件，ことに冷却速度が同じであるかどうか判らないが，−30°C 附近で急速に凍結した細胞のいくつかを電子顕微鏡で観察することによってこの温度での可能な凍り方を明らかにし，光学顕微鏡だけでは明らかにされなかった凍結細胞の様子を推察することはできると思う。

第2図に示したふたつの細胞のうちAの細胞は凍結中に脱水されて収縮した細胞であるが，こうした凍り方は光学顕微鏡でも観察されている。朝比奈らは，−30°C で急速凍結した場合でも試料が十分薄くのばされていないときに冷却速度がやや小さくなって収縮した細胞が見られると述べている[1]。この場合，腫瘍細胞は透明に見えるが，−20°C 位まで温めると残らず暗化してしまうと言う。このふたつの観察は結びつけてもよいように思われる。光学顕微鏡で透明に見えた細胞は予想どおり細胞内凍結を起こしており，こうした細胞のなかにはAの細胞のように細胞内に生じた氷のひとつひとつの結晶の大きさが0.05 μ以下であるような細胞があるものと思われる。Bの細胞では電子顕微鏡で明らかに判かる程の大きさの細胞内氷晶が観察されたが，こうした凍り方をした細胞は光の透過を妨げて，光学顕微鏡ではおそらく細胞だけが暗くなって見えるであろう。いっぽうCとDの細胞のように凍った細胞は，光学顕微鏡下では区別がつかず，両方とも細胞内に氷粒が生じているような異質感をわれわれに与えないで未凍結の細胞のように見える所謂「ガラス化」を起こした細胞と同じではないでろうか。以上のような対応が合っていれば，これまでの光学顕微鏡観察[1,5]および前回の電子顕微鏡観察[4]の結果から，AおよびDの細胞で代表されるような凍り方が−30°C 附近での無害な細胞内凍結の様式をあらわしていると考えられる。Cの細胞では，細胞内の場所によって，氷晶の大きさが0.1 μ以上にも達しており，前回の実験結果からこうした氷晶の生長は，細胞に致命的であると考えられる[4]。

これまでの観察結果から，細胞内凍結は必しも細胞にとって致命的ではなく，細胞内氷晶の形成よりはむしろその生長が細胞に害を与えると考えた方がよいようである。−30°C 附近あるいは −196°C で急速凍結された細胞で融解後生存が確かめられた細胞と同じ条件で凍結された細胞では，フリーズエッチング法で観察した限り，細胞内の水は低温下で「ガラス化」しているのではなく明らかに結晶化を起こしていた。氷晶のひとつひとつは微粒状に見えるが，それらがどの程度に生長したとき細胞にとって致命的になるのか正確には判らない。腹水腫瘍細胞[4]と HeLa 細胞[7]では，細胞内氷晶の平均的な大きさが0.03 μあるいは0.02 μのときにはまだ生存する細胞があったが，0.05 μに達した細胞は全く助からなかった。このことから考えると，細胞内氷晶の径0.05 μのあたりが細胞の生死にとって決定的な範囲であるように思える。

IV. 摘　　要

シロネズミの腹水腫瘍細胞を −27°C の低温室内で噴霧凍結し，その凍り方をフリーズエッ

チング法によって電子顕微鏡で観察した。この観察は，これまで光学顕微鏡で行なわれてきた細胞の凍結過程の観察のうち，−30°C 附近で急速に凍結した細胞で，細胞内に生じた氷晶が非常に細かく，そのためあたかも「ガラス化」を起こしたように見えた細胞の詳しい凍結の様子を知るために行なわれた。結果は，光学顕微鏡での観察から推察されていたように，細胞内の水は確かに結晶化しており，急速凍結した細胞のなかにはひとつひとつの結晶が 0.05 μ 以下であるような細かな細胞内氷晶を生じた細胞が見出された。

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) Bachmann, L. and Schmitt, W. W. 1971 Improved cryofixation appliable to freeze etching. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **68**, 2149–2152.
3) 梅谷　実 1953 シロネズミの新腹水肉腫 (MTK-肉腫 III) の一般特性 (予報). 動雑, **62**, 416–420.
4) 島田公夫・朝比奈英三 1972 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存 VI. 低温科学, 生物篇, **30**, 65–75.
5) 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.
6) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzro-temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, **47**, 347–369.
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.

Summary

It was reported that ascites tumor cells of rat cooled rapidly to −30°C froze intracellularly, however, the frozen cells appeared to be intact unfrozen ones. Since the intracellular ice crystals considered to be too small to be visible under a light microscope. This type of ice crystalization seemed to be innocuous to the living cells, but its morphological aspects were still not known in detail.

In the present experiments, we attempted to observe the rapidly frozen cells electron microscopically using Bachmann *et al*'s spray-freeze-etching method modified by us. Cell suspension was sprayed on a cooled brass disk in a cold room at −27°C in order to freeze the cells rapidly. Numerous frozen droplets (about 100 μm in diameter) thus obtained were fractured at about −90°C in a vacuum. The fracture surfaces were replicated with platinum-paradium and carbon, and the replicas were observed under an electron microscope.

Every tumor cell froze intracellularly but the morphological appearances of the frozen cells differed from each other. Some of the cells were dehydrated in the process of freezing. Ice formed in the dehydrated cells consisted of fine granulous crystals. The sizes of the individual ice crystals in these cells were smaller than 0.05 μm in diameter. The other cells were not dehydrated on freezing and the sizes of the intracellular ice crystals were frequently larger than 0.05 μm. However, fine ice crystals similar to that observed in the dehydrated cells were also observed in some of the non-dehydrated cells which were considered to be cooled more rapidly than the others. These fine granulous ice crystals observed in both dehydrated and non-dehydrated cells seemed to be innocuous to the cells.