



Title	ウニ卵の細胞外凍結による傷害（予報）
Author(s)	高橋, 恒夫; TAKAHASHI, Tsuneo; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 32, 9-18
Issue Date	1975-03-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17812">https://hdl.handle.net/2115/17812</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p9-18.pdf



## ウニ卵の細胞外凍結による傷害 (予報)\*

高橋 恒夫

(北海道大学理学研究科)

朝比奈 英三

(低温科学研究所)

(昭和49年10月受理)

### I. 緒 言

生細胞を凍結した場合、細胞内凍結は一般にどの種類の細胞にとっても致命的であるが、細胞外凍結の場合はその細胞の性質に従い、それが受ける凍害の程度に大きな差があり生存できる場合も少くない。凍結傷害のメカニズムについては数多くの仮説が出されてきたが、それらは扱っている材料によって大きな違いがあった。凍害の原因にはいくつかの要素が存在し、それらが複雑に絡みあい、それぞれの細胞の特性によっても、さらに同一の細胞に対しても異った働き方をしていると考えられる。

ウニ卵細胞は凍結融解の間の様々な過程を観察するのに最もすぐれた材料の一つであることから、Asahinaはウニ卵における凍害の過程を冷凍顕微鏡を用いて詳細に観察してきた<sup>1)</sup>。そしてウニ卵細胞が細胞外凍結された時、細胞が傷害をうけると、2つの細胞崩壊の型を示すことを報告した。今回の予報はウニ未受精卵を用いて、2つの細胞崩壊の型と、これが生ずる要因を調べることによって、従来出されてきた凍害の仮説と比較しつつ凍結傷害のメカニズムを考察するのがその目的である。

### II. 材料と方法

**材料:** エゾバフンウニ *Strongyrocrototus intermedius* は北海道厚岸湾及び忍路湾で採取した。卵、精子は通常のKCl法で採取し、卵細胞は濾過海水で3度洗ったのち実験に用いた。実験にあたっては、受精率100%で正常に発生が進行するものを用いた。実験の大部分は北海道大学理学部附属厚岸臨海実験所で行い、一部は忍路で採取したウニを札幌の実験室に運んで行った。

**凍結融解:** 少量(0.5~1.0 ml)の卵細胞浮遊液を直径10 mmの小試験管にとり、-10~-25°Cに設定した冷凍庫内で冷却した。卵細胞浮遊液の温度は銅-コンスタンタン熱電対を浮遊液に直接入れてはかった。浮遊液の温度が-4°Cに達した時、少量の氷片を試験管内に落とし植氷して、細胞内凍結のおこるのを防いだ。この方法で-5°Cから-10°Cまでの温度域で約

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第1352号

1.0°C/min の緩速な冷却速度が得られた。融解は通常、凍結した浮遊液の入った試験管を室温中 (22°C) に放置して、約 2.5°C/min の融解速度で行った。急速融解の場合は凍結試料の入った試験管を、流水中、または温水中で振りながら融解した。

卵細胞の凍結融解過程の顕微鏡的観察は、朝比奈の冷凍顕微鏡を用いて行った<sup>2)</sup>。

**蛋白質結合 SH 基の定量：** 蛋白質結合 SH 基は Sakai の mercury orange 法<sup>3)</sup> で定量した。最初に、細胞全体又は単離した表層を、テフロン・ホモジナイザーで短時間かるくすりつぶしたあと、試料の 9 倍容量の 0.1 N 塩酸-アセトンを加えて変性させた。変性蛋白に反応液 (0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH 緩衝液, pH 7.0, と mercury orange のアセトン溶液の等容混合液) を加え室温で 1 時間反応させた。過剰の mercury orange を取り除いたあと、変性蛋白質の SH 基と特異的に結合した mercury orange を、0.01 N 塩酸-アセトンで再溶出し、その量を OD<sub>470</sub> で測定した。SH 基の量は蛋白 mg あたりの  $\mu\text{g}$  であらわした。蛋白量は Lowry 等の方法<sup>4)</sup> で定量した。mercury orange, 1-(4-chloromercuriphenylazo)-naphthol-2) は Sigma 社の製品を使用した。

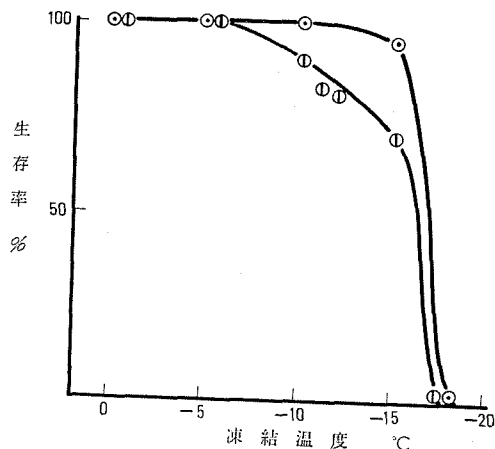
**卵表層の単離：** ウニ卵表層は Sakai の方法<sup>5)</sup> に従って単離した。ゼリー層を酸性海水 (pH 5.0) で取り除いたあと、卵細胞に 50 mM  $\text{MgCl}_2$  溶液を加えて、テフロン・ホモジナイザーでゆるやかにすりつぶした。1000 rpm で数分遠心し、沈澱物を 10 mM の  $\text{MgCl}_2$  溶液で上清がきれいになるまで洗った。単離した表層は、3 回濾過海水で洗ったのち凍結実験に用いた。

**高張食塩水処理：** 卵細胞浮遊液を少量試験管にとり軽く遠心して細胞を沈澱させ、上清をとり除いたあと、10 倍容量の各濃度の NaCl 高張溶液を加えて攪拌し、高張 NaCl 溶液浮遊液とした。又等張 NaCl 溶液 (0.54 M) にもどす時は、高張 NaCl 溶液浮遊液を再び軽く遠心して細胞を沈澱させ、上清をとり除いたあと、10 倍容量の等張 NaCl 溶液を加えて攪拌し卵を浮遊させた。

### III. 結 果

#### 細胞崩壊の 2 つの型

ウニ卵細胞を急速に冷却し凍結すると、細胞内凍結がおこり、細胞は氷晶の間で急速に暗化する。細胞内凍結はウニ卵細胞にかぎらず様々な生細胞にとって致命的であることが知られている<sup>6)</sup>。しかし卵細胞をゆっくり冷却すると、細胞はまわりを氷晶にとりこまれ、細胞外凍結を開始する。このとき細胞内の水は、原形質膜を通して外部にある氷の表面に達してここで凍る。温度が下るにつれ脱水は進み細胞は収縮する。ウニ未受精卵はその球形の形を比較的好く保ちながら収縮する。細胞を -10°C 付近まで細胞外凍結して



第1図 ウニ卵細胞の凍結温度による生存率の変化

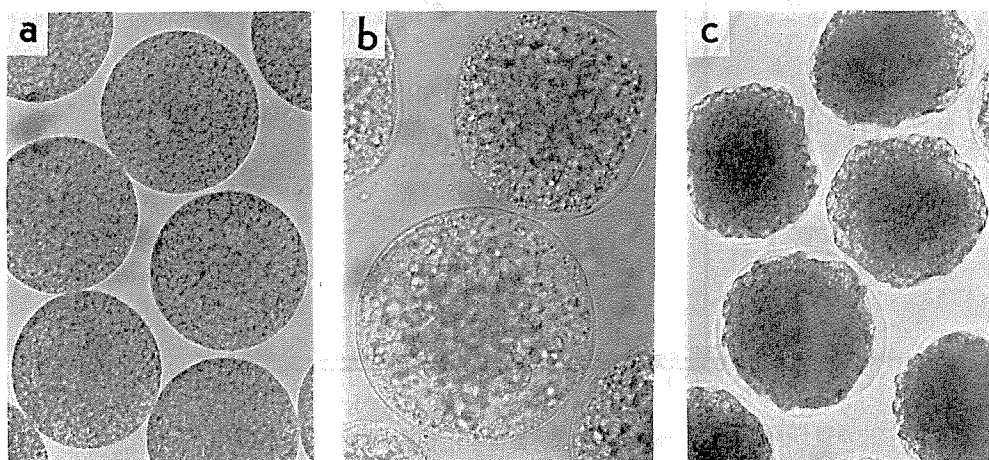
細胞外凍結した卵細胞を、1°C/min の速度で冷却し、それぞれの温度に達したらすぐに緩速融解 (2.5°C/min) した

—○— 見かけ上正常な細胞

—□— 第1卵割可能な細胞

ゆっくり融解すると、ほとんどの細胞は傷害を受けず、媒精すると受精膜を形成し、少なくとも胞胚期まで発生が進行することができた(第1図)。しかし $-10^{\circ}\text{C}$ においても凍結時間が長くなると、みかけは正常でも発生が進行しないものがでてくる。それらは融解後数時間でblisterを放出し崩壊した。

細胞外凍結したウニ卵細胞を $-15^{\circ}\text{C}$ に冷却し、一定時間おいたのち融解すると、細胞は傷害を受け細胞崩壊した。その細胞崩壊の形態は、光学顕微鏡的に典型的な2つの型を示した(第2図)。その一つは原形質が全体にわたって凝固して細胞が一様に黒くみえる型である。他方は原形質が全体に膨潤し、原形質内に無数の小胞の形成がみられるものである。これらを明視野下での色調から、前者をblack cytolysis、後者をwhite cytolysisと呼ぶことにする。冷凍顕微鏡での凍結融解過程の観察では、black cytolysisは、凍結、融解の両方の過程で出現するが、white cytolysisは融解過程でのみ出現した。



第2図 細胞崩壊の2つの型  $\times 200$

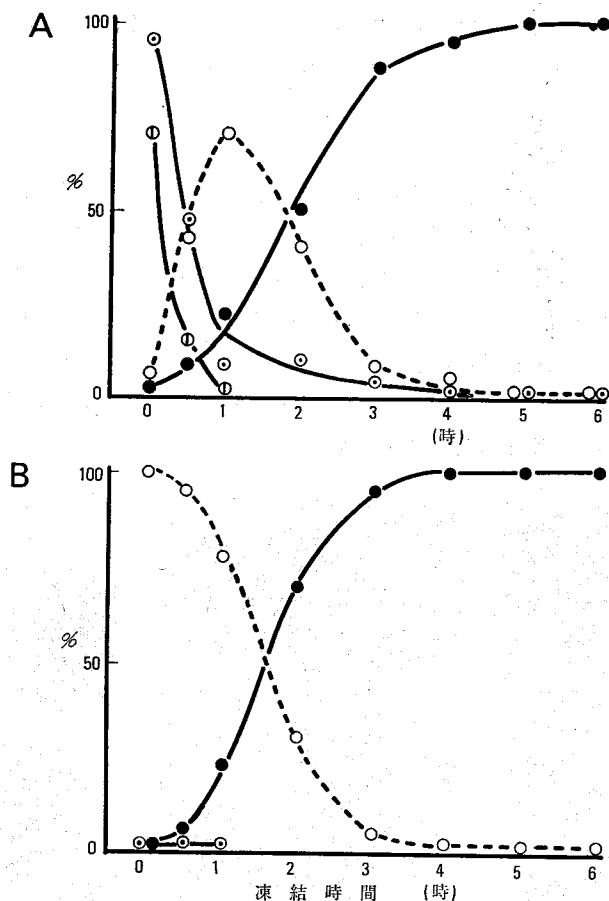
a, 正常細胞; b, white cytolysis; c, black cytolysis

### 凍結温度、時間と cytolysis

ウニ卵を細胞外凍結し $-17.5^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却すると細胞は完全に致命的な傷害を受け、すべての細胞がblack cytolysisをおこした(第1図)。細胞外凍結しているウニ卵が $-15^{\circ}\text{C}$ まで冷却されてから、凍結温度を $-15^{\circ}\text{C}$ に固定して凍結時間を変えた場合の結果は第3図に示した。凍結時間が長くなるに従ってblack cytolysisの出現率は増大する。一方white cytolysisは、凍結時間1時間でその出現率は最大となり70%に達するが、それ以上凍結させた場合には減少する。細胞外凍結細胞が $-15^{\circ}\text{C}$ に冷却された時点ですぐに緩速融解されると、95%の細胞が見かけ上正常な形態を示し、全体の70%の細胞が正常に第1卵割を行うことができた。しかし $-15^{\circ}\text{C}$ に達した時点で急速に融解すると、細胞はすべてwhite cytolysisをした。一方融解速度が早い場合でも、凍結時間が長くなるとblack cytolysisが出現した(第3図B)。

### 融解速度と white cytolysis

細胞外凍結したウニ卵を $-15^{\circ}\text{C}$ まで冷却し緩速融解すると、95%正常にみえる細胞がの



第3図 卵細胞が細胞外凍結されていた時間と融解後の cytolysis の出現率。凍結温度  $-15^{\circ}\text{C}$

A: 緩速融解  $2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$       B: 急速融解  $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$   
 —●— 見かけ上正常な細胞      —●— black cytolysis  
 —○— 第1卵割可能な細胞      - -○- white cytolysis

こるが(第3図A), 急速融解すると全ての細胞が white cytolysis をしてしまった(第3図B)。このことから white cytolysis の出現に融解速度が大きな影響をもつと考えられるので,  $-15^{\circ}\text{C}$  で細胞外凍結している細胞を第1表に記された方法で融解速度を変えて, white cytolysis の出

第1表 細胞外凍結したウニ卵細胞に及ぼす融解速度の影響\*

融 解 の 方 法	$-10^{\circ}\text{C}$ から $-5^{\circ}\text{C}$ までの融解速度 ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	正常にみえる細胞** (%)	卵割できる細胞 (%)
a) $0^{\circ}\text{C}$ の空气中に放置	約 0.5	100	73
b) 室温 ( $22^{\circ}\text{C}$ ) の空气中に放置	約 2.5	95	70
c) $0^{\circ}\text{C}$ の氷水中に放置	約 10	95	70
d) 流水中 ( $12^{\circ}\text{C}$ ) で攪拌	約 60	35	18
e) 温水中 ( $45^{\circ}\text{C}$ ) で攪拌	約 160	0	0

\* 細胞外凍結した細胞を  $-15^{\circ}\text{C}$  まで冷却し, すぐに上記の方法で融解した。

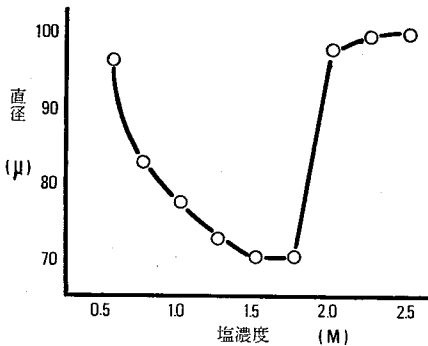
\*\* 正常な細胞以外のものはすべて white cytolysis をした。

現率の変化をみた。-10°C から -5°C までの間を 60°C/min で融解すると 65%, 160°C/min ではすべての細胞が white cytolysis をした。

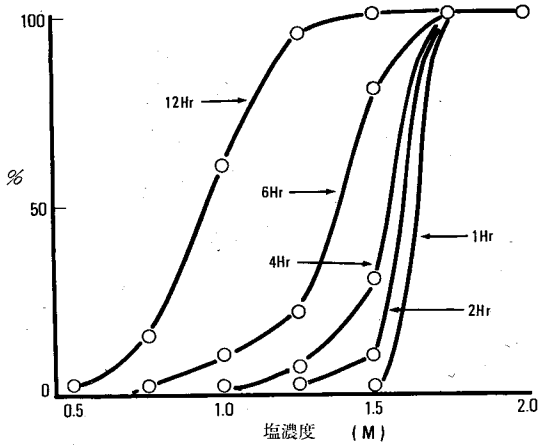
一方 -10°C と -5°C の温度範囲内でウニ卵細胞は最も急速融解の害をうけやすいことを Asahina が発見しているの<sup>1)</sup>、これを確かめるため、-15°C より -5°C までは細胞に傷害を与えないような緩速融解 (2.5°C/min) をし、その後第 1 表に示した d), e) の方法で急速融解したところほとんどの細胞は white cytolysis をおこさず正常であった。

**高張塩溶液の影響と cytolysis**

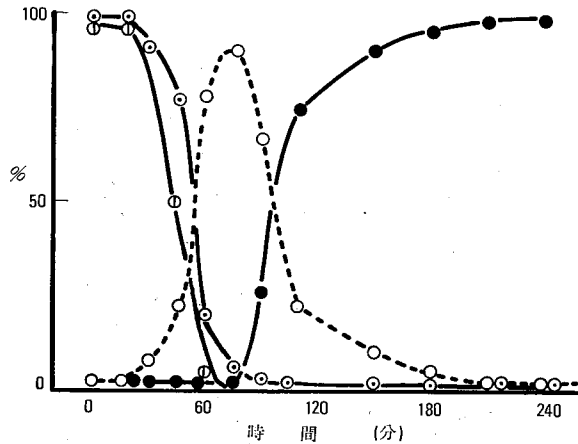
black cytolysis は高張塩溶液の影響のもとにおこされる事実が知られている<sup>7)</sup>。細胞外凍結の場合、媒液の電解質の濃度が増大し、又融解時に逆の過程をあゆむことが考えられる。そこで最初に、ウニ卵を段階的に塩濃度を増大させたそれぞれの NaCl 溶液の中に入れて、5 分以内にその形態変化を観察した。細胞は媒液の塩濃度の増大に伴って縮少し、細胞



第 4 図 卵細胞の高張 NaCl 溶液中 (5 分) での直径の変化



第 5 図 いろいろな時間高張 NaCl 溶液中におかれた卵細胞のおこす black cytolysis の出現率



第 6 図 卵細胞を 1.5 M NaCl 溶液中から等張 NaCl 溶液にうつした時の cytolysis

横軸は卵を 1.5 M NaCl 溶液に浸しておいた時間、縦軸は出現率  
 —○— 見かけ上正常な細胞      —●— black cytolysis  
 —①— 第 1 卵割可能な細胞      --○-- white cytolysis

の体積は 1.5 M で最小に達し、1.75 M までその最小体積を維持したが、それ以上塩濃度が高くなると細胞は急速に暗化しつつ膨潤した (第 4 図)。しかし高張塩溶液にひたしておく時間が長くなると、1.75 M 以下の塩濃度でも black cytolysis は出現した (第 5 図)。次に 1.5 M NaCl 高張塩溶液中に、比較的短い間細胞を浸したのち等張 NaCl 溶液に細胞を戻すと、white cytolysis が出現した (第 6 図)。しかし卵を高張塩溶液に浸している時間が長くなると、等張 NaCl 溶液に戻す過程で black cytolysis が出現し、浸しておく時間が長くなるに従ってその出現率は増大した。

### 蛋白質結合 SH 基の量

細胞外凍結の結果現われた 2 つの細胞傷害像において、ウニ卵細胞にどのような原形質蛋白の変性がひきおこされるのか、を考える一助として、最も反応性に富む SH 基に注目し、black, 及び white cytolysis をおこしたものと、未凍結の細胞の双方を使って、蛋白質結合 SH 基の量を測定した。又細胞が細胞外凍結をする時、最も害をうけやすいと考えられる細胞の表層部を取り出し、前の実験と同じように black, 及び white cytolysis をおこす条件で処理したのち SH 基を定量した。その結果いずれの場合にも、凍結前後で SH 基の量に明らかな変化は見い出すことはできなかった (第 2 表)。

第 2 表 細胞崩壊した細胞と未凍結細胞の蛋白質結合 SH 基の量の比較

凍結条件		未凍結*	凍結*	凍結 未凍結	平均
Black Cytolysis**	細胞質全体	2.472	2.543	1.029	1.039
		2.624	2.824	1.076	
		2.493	2.591	1.039	
		2.494	2.521	1.011	
		2.525	2.620	1.038	
	表層	2.331	2.344	1.006	1.009
		3.546	3.452	0.973	
		2.554	2.595	1.016	
		2.744	2.858	1.042	
White Cytolysis***	細胞質全体	2.544	2.491	0.979	0.991
		2.640	2.441	0.925	
		2.306	2.387	1.035	
		2.588	2.652	1.025	
	表層	2.898	2.999	1.035	0.996
		2.812	2.895	1.030	
		2.295	2.184	0.952	
		2.943	2.845	0.967	

\*  $\mu\text{g SH/mg 蛋白}$  (同一個体から取り出した卵で 5 回測定 of 平均値)

\*\*  $-15^{\circ}\text{C}$  で 10 時間凍結

\*\*\*  $-15^{\circ}\text{C}$  に達した時  $160^{\circ}\text{C/min}$  で急速融解

#### IV. 考 察

ウニ卵細胞を細胞外凍結し、 $-15^{\circ}\text{C}$  以下に冷却して融解すると、傷害を受けた細胞は典型的な細胞崩壊の2つの型、即ち black cytolysis, white cytolysis, を示した。これら2つの細胞崩壊の型は、ウニ卵細胞が化学的、物理的要素で傷害を受けた時に最もあられやすいタイプである。例えば Öhman は、熱、蜂毒などで傷害を受けた細胞で、black cytolysis, white cytolysis に極めて類似した cytolysis を観察し、“dark brown” cytolysis, “greenish yellow” cytolysis という表現を用いている<sup>8)</sup>。又 white cytolysis は Heilbrunn の観察した表面沈澱反応, surface precipitation reaction, と同様な現象が細胞内に生じたものかもしれない<sup>9)</sup>。

black cytolysis は高張塩溶液によっても生じることが知られている<sup>7)</sup>。今回の実験でもウニ卵は、NaCl 溶液中では濃度 1.5 M の時体積は最小に達し、1.75 M までその体積を維持することができたが、それ以上脱水がすすむと細胞は瞬時に暗化しつつ膨潤して、ほぼもとの体積に復した。この現象は細胞が脱水による強い stress を受けたために原形質構造が崩壊し、この時外液の濃い NaCl 溶液が細胞内に流入し、変性した原形質が膨潤したかの如くみえる。

生細胞の凍結傷害の機構について多くの仮説が出されてきたが、細胞外凍結による変化の最大のもは細胞の外部で氷が生長することであり、この結果細胞からの脱水がおこる。又細胞の内外にある水溶液は濃縮され、この為できた高濃度の塩溶液による害が上記の脱水の害とともに凍害の主因であると考えられてきた。

Meryman は赤血球を材料に用いて、脱水のみで凍害が説明できるとする Minimum volume theory を唱えた<sup>10)</sup>。細胞外溶液の塩濃度が高まると、細胞内の水が外に出ることにより膜を隔てて細胞内外で浸透圧平衡が達せられる。このように脱水がすすんで細胞がこれ以上収縮できない限度を越えた時、膜の透過性に不可逆な変化が生じるという。

しかしウニ卵の細胞外凍結の場合には、 $-10^{\circ}\text{C}$  では2時間の凍結に耐え<sup>1)</sup>、 $-15^{\circ}\text{C}$  においても30分間の凍結に耐えられるものが少なくない。もしこれらの凍結温度で平衡状態に近い塩濃度に細胞がさらされているとすれば、実験時の温度差を考慮したとしても 1.5 M NaCl 中で卵細胞がすでに縮少しうる体積の限界に達するとは考えられない。また第5図に示されるとおり、最小体積に達する以前の NaCl 溶液においてもその中にさらされている時間が長くなるに従って black cytolysis の出現率が増大した。このことは最小体積説のみでは説明されない。

Lovelock 等は、高塩濃度の電解質溶液によって血球の原形質膜を構成している脂質や脂蛋白が溶解されることが凍害の主因であるという説、いわゆる塩害説を提唱してきた<sup>11)</sup>。この害の特徴は、時間の影響が大きく比較的高い凍結温度で顕著にあらわれることである。 $-15^{\circ}\text{C}$  で細胞外凍結されたウニ卵細胞が凍結時間が長くなるに従って凍結中に black cytolysis をおこすこと、又 1.75 M 以下の NaCl 濃度の溶液中で時間とともに black cytolysis をおこすことは、細胞内外の濃い塩濃度に長時間さらされることにより、細胞が不可逆的な変化をうけ、原形質が変性凝固して black cytolysis をおこすようにみえる。しかし前述のように、ウニ卵が細胞外凍結の状態でも耐えうる最低温度 ( $-10\sim-15^{\circ}\text{C}$ ) において、もしも同じ温度の氷点をもつ塩溶液に浸されているとすれば、1.5 M よりもはるかに濃い塩溶液に耐えられるはずであ

る。従ってウニ卵の凍害に、いわゆる塩害が関係しているとしても、細胞外凍結状態での媒液による塩害は、凍結を伴わぬ塩溶液中に浮んだ細胞のうける害とは、或いは異った性質のものかも知れない。

-17.5°C より高い温度で短い時間凍結されると white cytolysis が出現するが、これも濃縮された濃い塩溶液によって膜が傷害をうけ、融解過程で細胞に水が浸入しやすくなることが原因の一つと考えられる。white cytolysis をひきおこすもう一つの要因として急速融解があげられる。第1表にみられるように、-15°C と -5°C との間の温度域で細胞を急速に融解すると細胞は傷害をうけ white cytolysis をおこす。この温度域で細胞をゆっくり加温してやりさえすれば cytolysis はおこらない。急速に融解すると、細胞外にある塩溶液が非常に低濃度となりこのため細胞内に水が進入しようとする。しかしこれを補償する程細胞自身のもつ水の透過性が充分高くないのでその浸透圧勾配による stress により細胞は傷害をうけ、その結果として white cytolysis を示すと考えられる。

black cytolysis は融解過程でもおこることは前述した。高張 NaCl 溶液中でのモデル実験でも、高張塩溶液に長い間浸したのちに等張 NaCl 溶液にもどす過程で black cytolysis があらわれた。これは高い塩濃度に接した脱水状態が続くことにより、原形質自身に何らかの変化がおこり、その状態で細胞が吸水すると原形質が不可逆的に変性してしまうのであろう。

凍結傷害の機構を分子レベルから説明しようとしたものに Levitt の SH-SS 説がある<sup>12)</sup>。それによると凍結細胞が脱水され縮小する時、原形質を構成する蛋白分子間の水がとられて分子が近づく。このときそれら分子のもつ SH 基が酸化されて分子間に新しく SS 結合でき、この新生 SS 結合が生じた為、融解に際して凍結中縮小していた原形質がもとの形にもどるとき、SS 結合より弱い水素結合はひきさかれて蛋白質は致命的な変性をうけるという。復水の過程で black cytolysis がおこることは、SH-SS 説に有利であるように見える。かって Asahina 及び Tanno はウニ卵の受精時に著しい耐凍性の高まりを発見し、その時の卵原形質の細胞化学的観察から、Levitt の SH 説に好意的な見解を述べた<sup>13)</sup>。しかし今回の実験で black cytolysis をおこした細胞と未凍結細胞の蛋白質結合 SH 基の値に量的な差はみられなかった。このことからウニ卵の凍結傷害と SH-SS 説とは直接結びつかないといえそうである。

## V. 摘 要

ウニ未受精卵を細胞外凍結して -15°C 以下に冷却し融解すると、傷害をうけた細胞は、2つの細胞崩壊の型、black cytolysis と white cytolysis を示した。black cytolysis は凍結過程、融解過程の両方で出現し、凍結時間が長くなるに従ってその出現率は増大した。又凍結温度が -17.5°C 以下に下がると細胞はすべて black cytolysis をおこした。一方 white cytolysis は細胞外凍結された細胞が融解される過程においてのみ出現し、凍結時間が短い時あらわれた。又融解速度が早いほど、その出現率は増大した。

細胞外凍結の場合にうける媒液の作用のモデルとして、ウニ卵を段階的に塩濃度を増大させた NaCl 溶液の中に入れてその変化を調べた。細胞は塩濃度の増大に伴って縮小し、細胞の体積は 1.5 M で最小に達し、1.75 M までその体積を維持したが、それ以上塩濃度が高くなると

細胞は急速に暗化しつつ膨潤した。しかし 1.75 M 以下の塩濃度でも、その中にさらされている時間が長くなると black cytolysis は起こった。又高張塩溶液中に比較的短い時間細胞をひたしたのち等張溶液中に細胞を戻すと white cytolysis があらわれた。さらに細胞を高張塩溶液にひたしておく時間が長くなると、black cytolysis が等張溶液にもどす過程であらわれた。

凍結によって細胞崩壊した 2 つの型の細胞と未凍結細胞を用いて、蛋白質結合 SH 基の量を測定したが、凍結及び未凍結細胞の間に明瞭な差はみとめられなかった。

以上 NaCl 単塩中での実験、凍結過程と傷害像の観察から、ウニ卵が細胞外凍結によって傷害をうける機構に少なくとも次の要因、すなわち強度の脱水と高張塩溶液による細胞膜構造の変化、さらに傷害をうけた細胞内への急速な水の進入が関係していると考えられる。しかし細胞外凍結状態でウニ卵の示す凍死限界温度は、卵細胞に致命的な塩害をもたらす媒液の塩濃度から想像される氷点温度よりはるかに低いものであった。

本実験にあたり、SH 基の定量法については東京大学生物化学科の酒井彦一博士に親切な御指導を頂いた。又北海道大学理学部附属厚岸臨海実験所の皆様に、ウニの採取をはじめいろいろ実験の便宜をはかって頂いた。ここに厚くお礼を申しあげる。終わりに終始有益な助言を頂いた竹原助教授に深く感謝する。

#### 文 献

- 1) Asahina, É. 1967 Freezing injury in egg cells of the sea urchin. In "Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms" (É. Asahina, ed.), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 211-229.
- 2) 朝比奈英三 1969 凍結 (続生物物理学講座 10), 吉岡書店, 京都, 235-253.
- 3) Sakai, H. 1968 Quantitative microdetermination of total -SH groups in proteins. *Anal. Biochem.*, **26**, 269-276.
- 4) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 5) Sakai, H. 1960 Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin egg. II. Mass isolation of the egg cell cortex and change in its -SH groups during cell division. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**, 603-607.
- 6) Asahina, É. 1965 Freezing process and injury in isolated animal cells. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. **15**, S-183-187.
- 7) Hobson, A. D. 1932 The effect of fertilization on the permeability to water and on certain other properties of the surface of the egg of *Psammechinus miliaris*. *J. Exptl. Biol.*, **9**, 69-92.
- 8) Öhman, L. O. 1945 On the lipids of the sea urchin egg. *Ark. Zool.*, **36 A**, 1-95.
- 9) Heilbrunn, L. V. 1953 An Outline of General Physiology. 3rd ed. Saunders Co., Philadelphia, 730 pp.
- 10) Meryman, H. T. 1970 The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In *The Frozen Cell* (G. E. W. Wolstenholme and M. O'connor, eds.), J. & A. Churchill, London, 51-64.
- 11) Lovelock, J. E. 1957 Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc. Roy. Soc.*, **B 147**, 427-433.
- 12) Levitt, J. 1962 A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J. Theoret. Biol.*, **3**, 355-391.

- 13) Asahina, É. and Tanno, K. 1963 A remarkably rapid increase of frost-resistance in fertilized egg cells of the sea urchin. *Exptl. Cell Res.*, **31**, 223-225.

### Summary

When the unfertilized egg cells of the sea urchin were extracellularly frozen at temperatures below  $-15^{\circ}\text{C}$  and thawed, two types of cytolysis, white and black type, were observed. Black cytolysis took place in the process of both freezing and rewarming, while white cytolysis occurred only during thawing. At temperatures around  $-15^{\circ}\text{C}$ , the number of black cytolysed cells increased in freezing cells, as the period of freezing time was lengthened. If freezing cells were cooled down to temperatures below  $-17.5^{\circ}\text{C}$ , cells invariably underwent black cytolysis.

After a short period of extracellular freezing in the egg cells, white cytolysis was very apt to occur in the process of rewarming. As the rate of rewarming was increased, the number of white cytolysed cells increased. The rewarming process was necessary to cause white cytolysis.

Since a similar effect may be expected on the egg cells in sea water between the process of freeze-thawing and that of the exposure to hypertonic and then hypotonic salt solutions, experiments were conducted at room temperatures with egg cells suspended in various concentrations of NaCl solution. Cell volume decreased to a minimum as the concentration of the media increased to 1.5 M, it remained nearly constant till the concentration approached to 1.75 M. At the concentrations above 1.75 M, cell volume increased rapidly with simultaneous occurrence of black cytolysis. Even in the media with a concentration below 1.75 M, black cytolysis gradually took place in the suspended cells if they were in NaCl solution for a long time. The number of black cytolysed cells increased as the period of suspension in NaCl solution was lengthened. Black cytolysis also appeared in the process of transferring the egg cells to isotonic NaCl solution from hypertonic ones.

The amount of protein bound SH groups was estimated with two types of cytolysed egg cells produced by extracellular freezing and thawing and unfrozen ones. However no difference was observed among these three groups of egg cells.

From these facts, at least the following factors may be involved in the cytolysis of egg cells resulting from an extracellularly freeze-thawing; irreversible change of the plasma membrane caused by intense dehydration and the effect of concentrated salt solution, and osmotic lysis by a rapid entering of water into the injured cells, although the lethal temperature of extracellularly freezing egg cells is much lower than that expected from the lethal salt concentration in the medium in which the egg cells are suspended.