HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	電子顕微鏡学における凍結技法の吟味 ： 人工産物としての氷晶形成
Author(s)	根井, 外喜男; 浅田, 実
Citation	低温科學. 生物篇, 32, 19-24
Issue Date	1975-03-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17813
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p19-24.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Tokio NEI and Minoru ASADA 1974 Investigations on Cryotechniques in Electron Microscopy: Ice Crystal Formation as an Artefact. *Low Temperature Science, Ser. **B, 32.*** (With English Summary p. 24)

電子顕微鏡学における凍結技法の吟味

人工産物としての氷晶形成*

根井外喜男・浅田　実

(低温科学研究所)

(昭和49年5月受理)

I. 緒　　言

生物試料を水をもった生のまま電子顕微鏡で観察することは難しい。通常，脱水の外，種種の物理的化学的操作を経て標本が作られる。したがって，このような操作の過程で，本来ないものが人工産物として現われてくる可能性がある。それを防ぐための工夫がこれまでにいろいろと行なわれており，そのひとつが凍結法[1]である。とりわけフリーズ・エッチング法は，試料の生の状態を瞬時に凍結固定した上，その断面のレプリカ像をみるということで，最も理想に近い方法として，近年広く利用されるようになってきた。しかし，凍結法を用いたために新たな artefact が生ずることがあってはならないので，充分凍結法の吟味を行なう必要がある。なかでも，最も注意を要するのは，凍結による氷晶の形成である。

多くの生物試料は，その構成成分の70～80%が水であるから，これがごく低い温度におかれた場合，当然水が氷に変わるという状態変化をおこす。この氷晶の形成が試料の構造を乱すことになるので，試料の本来の姿を観察するためには，このような氷晶の形成をできるだけさけなければならない。特に電子顕微鏡による観察となれば，極めて微細な構造の変化であっても問題であるから，慎重な検討を要することになる。

氷晶形成を防止する方法としては，一方には冷却速度を大きくして試料を vitrify させるようにねらうとともに，他方にはグリセリンのような凍害防止剤を加えることによって，氷晶形成の抑制をはかることが行なわれている。しかし，このような手段を構ずるとしても，試料その他の条件によって，必ずしも理想的に氷晶生成を阻止できるとはかぎらない。もしも阻止できないような場合，それが明らかに氷晶と確認できるほど大きなものであれば，議論の余地はないが，極めて微小なものであるときには，それが本来の構造物なのか，氷晶形成にともなう artefact なのかの区別が困難になる。本実験はこの点に関する吟味を行なうことを目的として実施したもので，特にフリーズ・エッチング法による標本について得た所見を基として考察を加えた。試料としては，細胞内に構造物をもたないが膜面に特有の粒子をもつ赤血球と，膜面と細胞内部の両方に特有の構造物をもつ酵母細胞をとりあげ，比較対照した。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1349号

II. 方 法

試料： 血液銀行で採取したACD加全血液をそのまま，あるいは生理食塩水（各種濃度にグリセリン添加）で洗ったヒト赤血球および蒸溜水あるいは20%グリセリン浮遊の酵母細胞 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。赤血球は採取後2週間以内のもの，酵母は培養2～3日のものをそれぞれ使用した。

標本作製法： 通常のフリーズ・エッチング法によって標本を作製した。特に，急速冷却ができるように，0.01 mlの試料の液滴，または0.003 mlのサンドウィッチ式薄層にしたものをフレオン22（−150°C冷却）で瞬時に凍らせた。冷却速度は前者でほぼ 10^4 °C/min，後者でほぼ 10^5 °C/minであった。これを日本電子製JEE-FEDの装置にとりつけ，真空度 10^{-6} mmHg，試温料度 −95°C付近で，破断または剝離し，白金パラジウムとカーボンで蒸着し，レプリカ膜を作った。これをとり出して洗滌し乾燥後，電子顕微鏡で観察した。写真は，細胞の全体像をみるために5,000倍，部分的な微細構造をしらべるために20,000倍の直接倍率で撮影した。

III. 結 果

赤 血 球

1. 全 血 液

グリセリンを加えない試料では，サンドウィッチ法による急速凍結でも明らかな細胞内氷晶がみとめられる。個々の氷晶のサイズは，細胞により大小さまざまであるが，最小のものでも300～500 Åくらいであるから，artefactであることは確認できる。

膜の剝離面では，大小の凹凸の外に，氷晶による孔と思われるものがみえる。従来も報告されている85 Åといわれる比較的均一に撒布している粒子は，後述のグリセリン加無氷晶のものとほとんど同様に観察されるが，配列がやや乱れているように思われる（図1）。

2. グリセリン食塩水浮遊赤血球

10%グリセリンでは，細胞周囲の媒液にできた氷はかなり大きく，細胞の辺縁は多少凹凸しているものが多い。細胞内部の拡大像では，図2に示す如く，図1のような個々独立した粒状物は見えないが，単に溶液のエッチング後に残された形態というには少し粗すぎるので，恐らく凍結による粗造化といえよう。

20%グリセリンでは，細胞周囲の氷晶はかなり小さく（500～1,000 Åくらい）細胞内部もやや粗面という程度で，はっきりした構造物はみとめられない。膜面はかなりスムースで，85 Åの粒子は明らかにみとめられる（図3）。

細胞内氷晶の生長をねらって，急速凍結後，−80°Cに4日間，あるいは−60°Cに1時間おいた標本についてみても，細胞外の氷晶は極端に大きく成長しているにかかわらず，細胞内には明らかな氷晶の生成はみとめられなかった。恐らくこの程度の所見では，細胞内氷晶によるartefactとはいえぬものと思われる（図4）。

さらにグリセリン濃度を高くして30%にすると，凍結直後では，細胞内外はかなりスムースな面で，氷晶と思われるものはなく，膜面の85 Åの粒子は明らかにみとめられる（図5）。こ

れを −80, −70, −60°C と次第に温度を上げてくると，周囲の氷粒の成長にやや遅れて，細胞内にも明らかに氷粒がみとめられるようになる。その過程の特に −70°C あたりに 30 分おいたもので，かなり微細な顆粒状のもの (200～300 Å) がみられるが，これらが比較的初期の段階の氷晶であろうと想像される (図 6)。

酵母細胞

1. 蒸溜水浮遊液

図 7 に示すように，断面所見において，グリセリン加試料に比してやや不規則な粗い像がみられることから，これは凍結による変化であろうとみなされる。しかし，剝離面での膜表面では，粒子の格子状配列，invagination などに特別な変化はみとめられない。

2. 20% グリセリン浮遊液

大部分の細胞では正常と思われる所見を示すが，一部の細胞で断面の細胞内部構造にやや粗い像がみられる。しかし，これが氷晶形成によるものか否かは明らかでない。このような細胞でも，膜の表面構造では特別な変化はみとめられない (図 8 a, b)。

IV. 考　　察

水は冷却されると，液体から固体の氷に変わるという物理的状態変化をおこす。その氷は，凍結の条件によるばかりでなく，水に種々の物質が加えられたときのその種類や濃度によって性質が異なる。すなわち，最も完全な結晶状の氷から次第に不完全な氷に移行し，最後にガラス様氷に至るまでの種々の段階の氷を呈するのである。水であるか氷であるか，あるいはどんな性質の氷であるかを証明するには種々の物理的方法があるが，形態的にこれを確認することは必ずしも容易ではない。氷のパターンはもちろんのこと，個々の氷晶のサイズにおいても，極限に近い微細なものになるほど判定は困難になる。まして，複雑な構造と組成をもつ生物試料の特に細胞の内部では，氷か否かの判定が難しくなることは予想される。

電子顕微鏡学において凍結技法の有効なことがみとめられて利用されるかぎり，その唯一の artefact とも気づかわれる氷晶の形成をいかにして確認するかということは，重要な問題である。それにもかかわらず，従来そのような吟味が乏しいということは，やはり問題の難しさを物語るものであろう。

関連の僅かな文献を渉猟してみると，まず Moor (1964)[2] の酵母を用いたフリーズ・エッチングの実験で，グリセリンを加えないばあい，10° C/sec の冷却速度では細胞内凍結 (倍率 26,000 倍で観察) をおこすが，10^4°C/sec になると vitrify (32,000 倍観察) しているという。さらにこの vitrify した細胞の加温過程での変化を追究し，−60°C では変化はないが，−50°C になると空胞内が粗くなる (15,000 倍観察) こと，また耐久型の細胞では −40°C まで変わらないが，−35°C で細胞質の基質が粗くなる (30,000 倍観察) ことを報告している。写真観察の上で，彼はただ粗いという定性的な表現しかしていないが，前者の凍結条件の実験で，10^4 °C/sec というような極めて急速な凍結を行なったものでは，100 Å 以上の大きさの氷晶はみとめられないといっている。Riehle (1968)[3] のグリセリン，蔗糖，食塩などの溶液についての凍結実験で，特に 5% と 10% のグリセリン液のフリーズ・エッチング像 (40,000 倍) で粒状のものを示して

いるが，別に氷晶のサイズについてはふれていない。一方，MacKenzie ら (1962)[4] は，彼の考案した collodion-sandwich 法で作った凍結乾燥薄層標本（厚さ 600～900 Å）について，20% KCl または 15% ゼラチン溶液をしらべたところ，3,000～10,000 倍で明らかな crystallization unit をみとめた。MacKenzie and Luyet (1962, 1963)[5,6] は，ゼラチンやウシ血漿についても，同様条件で明瞭に crystallization unit をみとめた。

さらに最近では，Bank and Mazur (1973)[7] が，酵母細胞の水浮遊液で，75,000°C/min の冷却速度で細胞内に氷晶をみとめない（17,000～18,000 倍での観察）が，1,500°C/min になると，フリーズ・フラクチュアでは明らかでないが（15,000 倍観察），フリーズ・エッチで氷の形成をみとめる（10,000 倍観察）という。また Bank (1973)[8] は，1,500°C/min の冷却速度で凍結した試料（水浮遊酵母）のエッチしたものでは，細胞質の断面で粗造化がみとめられ，これは細胞本来のオルガネラか氷晶かの区別がつかないと述べている。しかし空胞内では明らかに島状の氷の相と溝状の溶質の相は区別されるという，これらは大体 20,000 倍前後の写真について論ぜられたものである。彼は加温実験も行なっており，−50°C では 24 時間繰返しても確認できるほどの大きさの氷晶にはならないという。他方，Staehelin and Bertaud (1971)[9] は，急速凍結純氷のフリーズ・フラクチュアのものでは，フラクチュア・ラインしか見えぬが，エッチングすると全面に asperites が見えること，さらに 20% グリセリン溶液で，試料の表層で極めて微細な樹枝状氷晶，内部に進むにしたがって粗大な像がみえると報告している。これらは 30,000 乃至 40,000 倍の写真について観察されたものである。

以上の事実からもわかるように，氷晶か否かの判定，あるいはそのサイズを定量的にとらえることは極めて難しい。特にエッチングを行ったばあいには，氷晶の昇華があるため形態的には一層とらえ難くなり，さらに純氷でなく溶液では，氷の昇華した後に溶質を残すので，判定をより困難なものにすると考えられる。

これらは主として細胞内に形成される氷晶あるいは凍結にともなう変化の立場から論じたものであるが，他方，Moor and Mühlethaler (1963)[10] は，細胞内構造物の立場から考察を加えている。彼らは細胞質内基質として，300～400 Å の顆粒から成るマトリックスを考え，その組成の大部分はグリコーゲンで，サブユニットのサイズは 100 Å くらいと想定した。

さてこれら従来の報告を参考にしつつ，今回得られた著者らの結果を考察してみるのに，フリーズ・エッチング法で得られた所見のうちでも，特に細胞膜での剝離面については，あまり問題はないものと思われる。剝離面に現われる粒子その他の特有の構造物に，凍結条件による差違がみとめられないからである。ただ，膜面自体の凹凸などを論ずるばあいには凍結速度や温度条件が大いに影響し，細胞内外の氷粒の大小によって，膜面にさまざま皺様構造のみられることが多い（特に赤血球のばあい）ので注意を要する[11,12]。

問題はむしろ細胞の断面の観察のばあいであって，たとえば細胞質内顆粒で 100 Å 前後のものがあるとすれば，氷晶との区別は極めて困難になるものと思われる。赤血球のように細胞内構造物をもたないものでも，細胞内の最も重要な組成であるヘモグロビンは，分子量が約 67,000 で，その分子 1 個のサイズは 55×55×70 Å といわれる。もしそれが数個の凝塊を作るようなばあいは数百 Å となるので，氷晶による微細粒子と形態的に判別することは果して可能

であろうか。事実 Haggis[13] は，ヘモグロビン4分子より成ると考えられる粒子を示し，これは他のプラチナ・カーボンの粒子とは区別できるとはいっているが，氷晶による artefact との判別は必ずしも明確ではないように思われる。

このように考えてくると，実際問題として試料の観察にあたって多くの疑問が残されていることになる。フリーズ・エッチング法の実施にあたり，氷晶を作らないいわゆる vitrification をねらう目的で，急速凍結を行なうとしても，試料によってはその速度に限界があろうし，グリセリンにしても毒性を考えるとむやみに高濃度のものを用いるわけにはいかないということで，氷晶形成阻止の条件をどの程度まで満足させることができるかが問題であろう。結局，これらの点を充分考慮した上で，標本の観察にあたることが必要であるということになろう。

V. 摘　　要

赤血球および酵母細胞を試料として，フリーズ・エッチング法を用いたばあいに起りうる氷晶による artefact の可能性を吟味した結果，実験上の所見からも，考察の結果からも，細胞膜の剝離面はともかくとして，細胞の内部構造を示す断面においては，本来の構造と artefact との区別の困難なばあいのあることを知った。

文　　献

1) 根井外喜男 1973 凍結法総論 (山田外3者編： 医学生物学のための応用電子顕微鏡学, 総論), 医歯薬出版, 東京, 165–171.
2) Moor, H. 1964 Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. *Zeitschr. f. Zellforsch.*, **62**, 546–580.
3) Riehle, U. 1968 Uber die Vitrifizierung verdünnter wässeriger Lösungen. Dissertation Nr. 4271, Eigenös. Tech. Hochshule, Zürich, 1–133.
4) MacKenzie, A. P. and Luyet, B. J. 1962 A collodion sandwich film technique for the study of the growth of ice in very thin layers of aqueous solutions. Proc. 5th. Intern. Cong. Electron Micros. (Breese, S. S., *ed.*), Academic Press, New York, **2**, 2.
5) MacKenzie, A. P. and Luyet, B. J. 1962 Electron microscope study of the structure of very rapidly frozen gelatin solutions. *Biodynamica*, **9**, 47–69.
6) MacKenzie, A. P. and Luyet, B. J. 1963 An electron microscope study of the fine structure of very rapidly frozen blood plasma. *Biodynamica*, **9**, 147–164.
7) Bank, H. and Mazur, P. 1973 Visualization of freezing damage. *J. Cell Biol.*, **57**, 729–742.
8) Bank, H. 1973 Visualization of freezing damage. II. Structural alterations during warming. *Cryobiology*, **10**, 157–170.
9) Staehelin, L. A. and Bertaud, W. S. 1971 Temperature and contamination dependent freeze-etch images of frozen water and glycerol solutions. *J. Ultrastruct. Res.*, **37**, 146–168.
10) Moor, H. and Mühlethaler, K. 1963 Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, **17**, 609–628.
11) 根井外喜男・浅田　実 1972 急速凍結赤血球の加温過程における変化について. 低温科学, 生物篇, **30**, 45–63.
12) Nei, T. 1974 Freezing injury to erythrocytes: Morphological changes appearing in cellular membranes. A paper presented at the XIth Meeting of the Society for Cryobiology (London).
13) Haggis, G. H. 1961 Electron microscope replicas from the surface of a fracture through frozen cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 841–852.

Summary

Morphology of artefacts, caused by ice crystal formation which might possibly occur in the freeze-etching technique, was investigated by employing human erythrocytes and yeast cells as experimental materials.

As the results obtained, it was concluded that there was some limitation in making distinction between very tiny particles of cell-proper organelles and artificially-produced ice crystals, both appearing on the fractured faces of frozen cells.

図 版 説 明

1～6. ヒト赤血球，×50,000 下段が細胞断面，上段が膜剥離面（図中挿入の細胞全体の写真は ×5,000)

7～8. 酵母細胞，×20,000

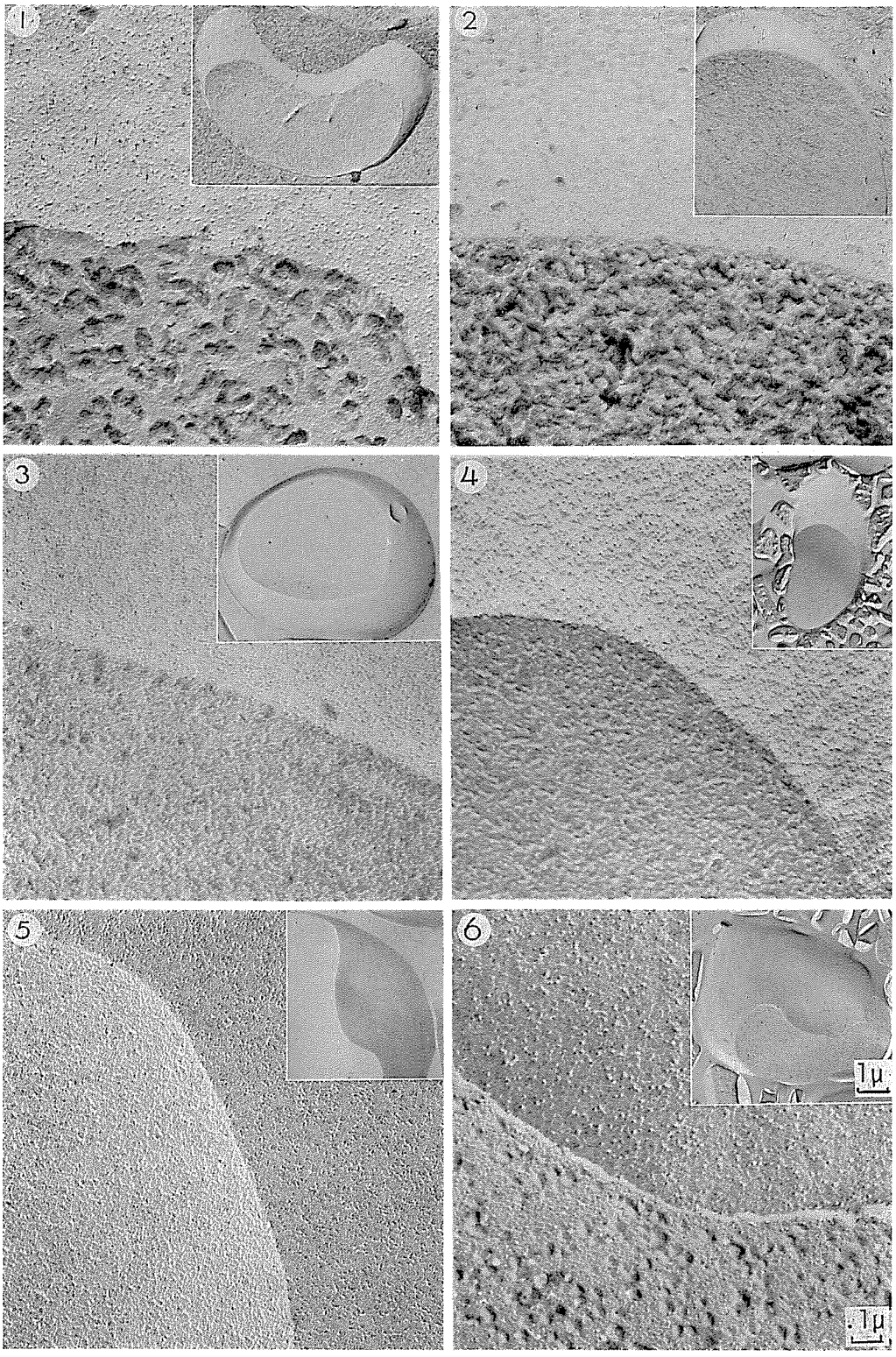
1. 全 血 液　　**2.** 10% グリセリン加食塩水浮遊

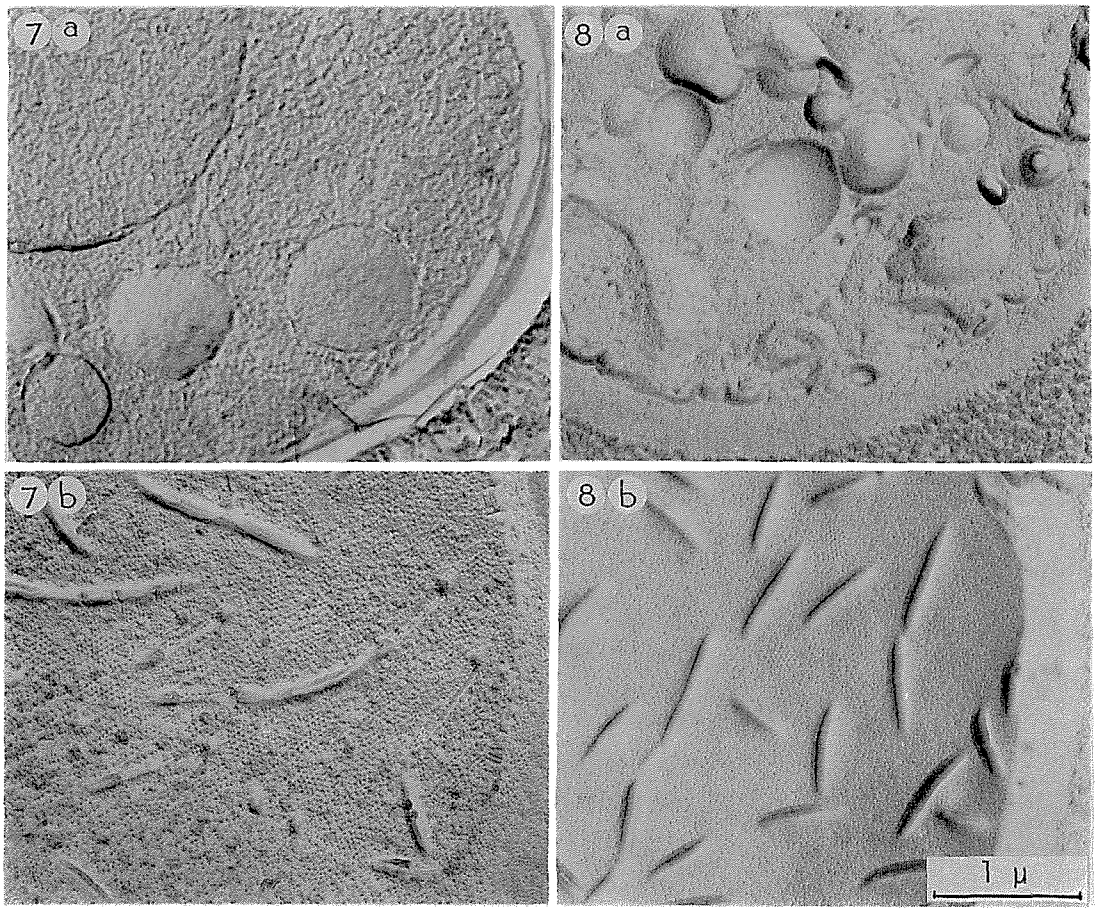
3. 20% グリセリン加食塩水浮遊　　**4.** 3. のものの −80°C 2日保存

5. 30% グリセリン加食塩水浮遊　　**6.** 5. のものの −60°C 30分保存

7a. 蒸溜水浮遊，断面　　**7b.** 7a. の膜剥離面

8a. 20% グリセリン加，断面　　**8b.** 8a. の膜剥離面


1
2
3
4
5
6
1μ
1μ


7 a
8 a
7 b
8 b
1 μ