



Title	細胞内凍結の動的な進行過程
Author(s)	島田, 公夫; SHIMADA, Kimio
Citation	低温科学. 生物篇, 35, 55-61
Issue Date	1978-03-30
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17833">https://hdl.handle.net/2115/17833</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	35_p55-61.pdf



## 細胞内凍結の動的な進行過程\*

島田 公夫

(低温科学研究所)

(昭和52年9月受理)

### I. 緒 言

生きている細胞の凍結過程を、直接顕微鏡で観察して、凍結によって細胞に生じる様々な傷害の原因を探ろうとする試みは、古くからなされてきた<sup>1-10)</sup>。こうした観察を通して、細胞は、凍結および融解速度、最終到達温度などの条件によって、その凍結の仕方に形態的な違いを生じることが明らかにされてきた。

よく知られているように、細胞の凍結の仕方には大きくわけてふたつあり、凍結中に細胞内には氷晶が形成されない細胞外凍結と、細胞内にも氷晶が形成される細胞内凍結とがある。このうち、細胞内凍結は、超急速凍結などの手段によって細胞内氷晶の粒径が非常に小さく抑えられた場合<sup>11-16)</sup>を除いては、細胞にとって致命的であり、凍結傷害の原因のひとつと考えられている<sup>8,17)</sup>。細胞内凍結の様子を最初に顕微鏡で観察した一人は、Molisch (1897年)<sup>1)</sup>のようで、彼は冷凍箱内に組込んだ顕微鏡で凍結したアメーバを観察している。以来多くの観察があり、なかでも、Chambers と Hale<sup>2)</sup>、および朝比奈<sup>3,4)</sup>は、細胞内凍結の進行過程を非常に詳しく報告している。けれども、細胞内凍結のなかには、Luyet<sup>5)</sup>らによって「フラッシング」と呼ばれた過程が含まれており、一般に極めて速い現象で、ひとつの細胞内に氷晶核が生じ、それが生長して細胞内に限なく拡がるまでの時間は、一瞬あるいは数秒の出来事である。そのため、その進行過程については、十分には明らかにされていない。

最近、筆者は「顕微鏡写真と映画の写し方」の著者である中西宥博士から16 mm 映画の写し方について御指導を受ける機会に恵まれた。そこで、映画の目を通して、細胞内凍結の進行過程を見なおしてみることにした。映画による細胞内凍結過程の記録は、すでに Modlibowska<sup>18)</sup>らによってもなされているが、今回の実験では、細胞内氷晶の進行速度や、氷晶形態の時間的变化などをさらに詳しく観察してみた。

### II. 材料と方法

実験材料には、キアゲハ休眠蛹の気管腺細胞 (Tracheal gland cells) を用いた。この腺細胞は、蛹の腹部第3節から第7節にある腹面横走気管の中央部に位置し、6~10 数個の独立した細胞が、ぶどう状に気管をとりまくようにしている。ひとつの細胞は大きく  $180 \mu$  ~  $280 \mu$  である。凍結実験には、気管ごと取り出した腺細胞を使った。まず、蛹をリンガー液の中

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第1879号

で解剖して、この腺細胞をカバーグラスに取り出し、蛹の体液を加えて別のカバーグラスで覆った。このときに、カバーグラスによって細胞が押しつぶされないよう、二枚のカバーグラスの間には両面テープをはさんだ。

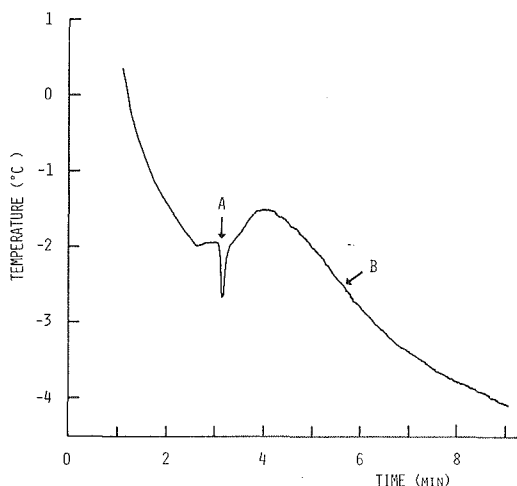
細胞の凍結過程の観察は、倒立型の冷凍顕微鏡を用いて行なった。この顕微鏡の本体は $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷える冷凍箱の中にあり、レンズ交換、焦点調節などが電動式で箱の外から調節できるようになっている<sup>19)</sup>。冷凍顕微鏡の接眼部に Arriflex 16 を取り付け、凍結過程を4コマ/秒と24コマ/秒で記録した。

試料の温度は、直径0.1 mmの銅—コンスタンタン熱電対を使って測定した。熱電対の感温部を、試料の上側カバーグラスにテープで接着し、他端をデジタル温度計(横河、2809型)とレコーダー(理科電機、B-24型)につないで記録した。

### III. 結 果

気管腺細胞は、淡黄色の細胞で、球形あるいは洋ナシ状をしており、その一端が気管に接している。細胞のまわりには、脂肪細胞が見られることがある。二枚のカバーグラスにはさまれた細胞は扁平になり、長径は $200\mu\sim 400\mu$ に達する(第2図, a)。

観察した細胞のうちから一例をあげて細胞内凍結の進行過程を説明すると、次のようになる。冷凍顕微鏡の温度を徐々に下げて、試料の温度が $-2.0^{\circ}\text{C}$ に達したとき、カバーグラスの端に液体窒素で冷やした針金の先端を接すると、植氷されて、そこから外液の凍結が始まった。試料の温度は冷えた針金に接したために一時的に $-2.7^{\circ}\text{C}$ 近くまで下がったが(第1図, 矢印 A)、外液の凍結が始まると、潜熱の放出をともなって $-1.5^{\circ}\text{C}$ まで上昇した。その後、温度は徐々に下がり、 $-2.5^{\circ}\text{C}$ に達したときに、細胞内に氷晶核が形成された(第1図, 矢印 B, 第2図 b)。このときの試料の冷却速度は

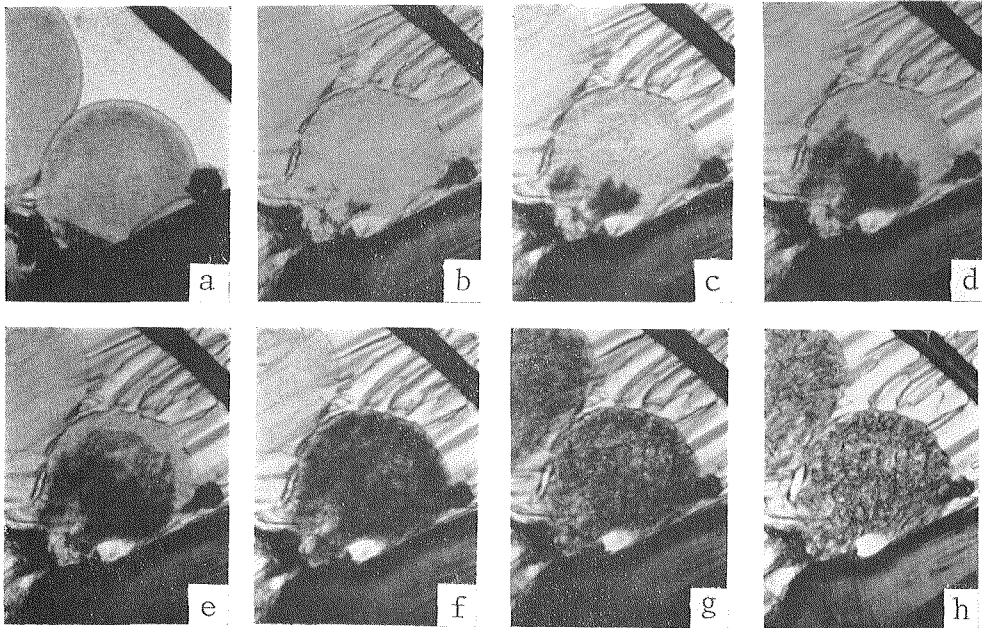


第1図 試料の冷却曲線

矢印 A: 植氷による細胞外液の凍結開始点

矢印 B: 細胞内凍結の開始点

約 $0.8^{\circ}\text{C}/\text{分}$ であった。細胞内凍結の開始に先立って、すでに外液中にできた氷は発達して、細胞を取り囲んでいる。この細胞外にできた氷の生長により、細胞は凍結前に比べて幾分縮んで見える(第2図, a, b)。細胞内にできた氷晶核は、はじめ点状で、それが急速に周囲に拡がってゆく。第2図に示した細胞では、細胞の周辺近くにふたつの氷晶核が生じているが、 $-2.0^{\circ}\text{C}\sim -4.0^{\circ}\text{C}$ の範囲で起きた細胞内凍結をいくつか観察した結果、細胞内氷晶核の形成は、ひとつの場合と複数の場合とがあった。複数の場合には、それぞれの氷晶核が、ほとんど同時か、非常に短い時間にひきつづいて形成され、ひとつの氷晶核が生じ、それがかなり生長してから、



第2図 -2.5°C付近における細胞内凍結の進行過程 ×70

a: 未凍結の気管腺細胞, 2.0°C; b: 細胞内凍結開始直後, -2.5°C  
 c: 1秒後; d:  $2\frac{1}{3}$ 秒後; e:  $3\frac{1}{6}$ 秒後; f: 6.5秒後, -2.6°C  
 g: 約20秒後, -2.8°C; h: 約40秒後, -3.0°C

新たに氷晶核が形成されることはなかった。これは、いったん、細胞内に氷晶が形成され生長しはじめると、潜熱の放出により細胞内の温度が上昇して、細胞の過冷却状態が緩和され、そのために新たな氷晶核の形成を抑えてしまうと考えてよいだろう。また、氷晶核が形成される場所は、細胞の周辺部であることが多く、細胞内氷晶核が、細胞外液中で生長した氷によって植氷されて生じるという可能性を示している。

さて、第2図にもどると、最初細胞の左下端に生じたふたつの氷晶核は、まず周囲に拡がり、ついで細胞の右上端に向かってそれぞれ独立に生長してゆく(第2図, c-e)。そして、約6秒後には、細胞全体に拡がってしまう(第2図, f)。氷晶は樹枝状に生長してゆくが、この様子は氷晶の生長とともにしだいはっきりして見える。

第2図の細胞では、細胞内氷晶の発達とともに、細胞は急速に暗化してゆき、ついには、細胞全体が黒くなって見えるようになる。けれども、-3.0°C付近でこの細胞の観察を続けると細胞内凍結がはじまってから約20秒後には、細胞はしだいに明るさを取りもどし(第2図, g)、時間の経過とともに、細胞内には粒状の氷が観察できるようになる(第2図, h)、これは、最初樹枝状に生長してできた細胞内氷晶が、移動再結晶を起して、粒状の氷晶に変わってゆくことを示している。はじめ細胞が暗化してみえるのは、細胞内にできた氷晶が非常に細かく枝分かれしているためで、光が氷晶によって散乱されて細胞を透過しにくくなるためである。細胞内氷晶が移動再結晶によって粗大化してくると、光を透過させるようになり、細胞はしだいに明るさを取りもどすようになる。

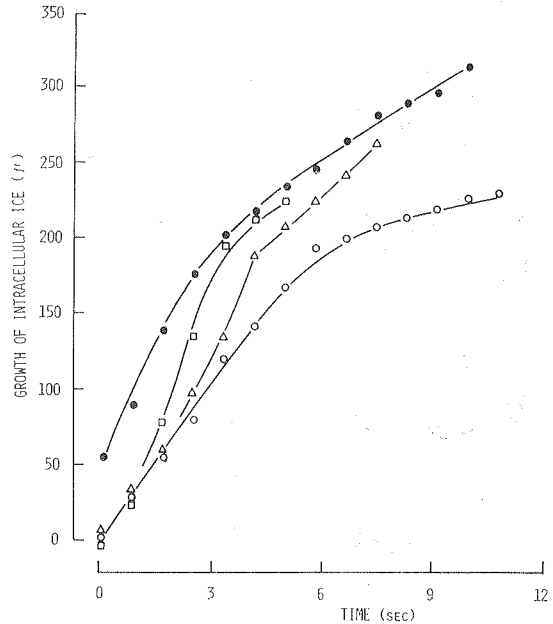
以上が、細胞内凍結の進行過程を示した一例である。

さて、細胞内に生じた氷晶は、実際どのような速度で生長し、細胞全体に拡がってゆくのであろうか。第3図は、細胞内凍結を起こした4つの細胞について細胞内氷晶の生長をフィルム解析機(大沢商会, 514型)を使って測定した結果を示している。測定は、毎秒24コマで撮影したフィルムから20コマおきにひとコマを取り出し、細胞内にできた樹枝状氷の、最初に現われた点から、生長している枝の先端までの距離を測かることによって行なった。

細胞内で氷晶が生長する様子には、ほぼ同じような傾向が見られた。つまりどの細胞でも、樹枝状の氷の伸び方は、氷晶核ができて、それが急速に伸びる初期の段階と、それに続くやや緩やかな伸び方を示す段階とに分けることができる。

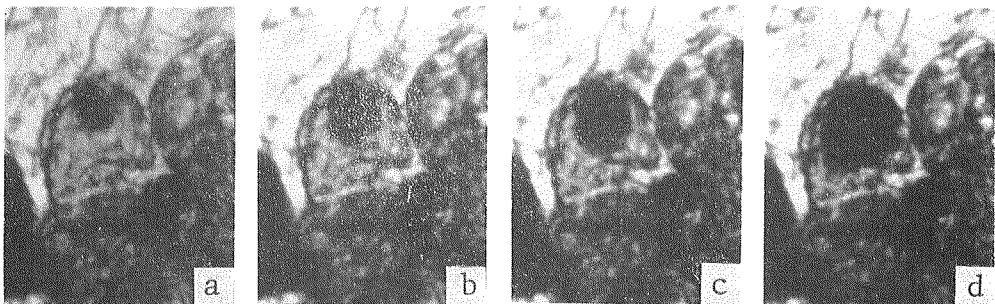
これは、細胞内凍結が開始するまで細胞は過冷却しており、いったん、細胞内に氷晶核が形成されると、それは過冷却を解消するまで急速に生長し、その後は、温度の低下とともに生長が進むことを示している。樹枝状の氷の伸び方が緩やかになるのは、この他に、細胞内氷晶の形成による細胞内液の濃縮や、細胞内器官の偏在などが考えられる。

純粋な水が凍る場合には、氷晶の生長する速さが過冷却度に比例して増すことが知られているが<sup>20)</sup>、今回の実験で取り上げた $-2.0^{\circ}\text{C}$ ~ $-2.65^{\circ}\text{C}$ の間で細胞内凍結が始まる場合には、はっきりした傾向は現われなかった。温度測定の方法から考えて、試料の温度がかならずしも細



第3図 細胞内氷晶の生長曲線

細胞内凍結を開始した温度と試料の冷却速度は、  
 ●:  $-2.0^{\circ}\text{C}$ ,  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ; △:  $-2.5^{\circ}\text{C}$ ,  $0.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$   
 □:  $-2.5^{\circ}\text{C}$ ,  $0.8^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ; ○:  $-2.65^{\circ}\text{C}$ ,  $0.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$   
 横軸は、撮影開始からの時間経過を示す



第4図  $-8.0^{\circ}\text{C}$  付近における細胞内凍結の進行過程 ×70

a を零時間とすると, b:  $\frac{2}{24}$  秒後; c:  $\frac{4}{24}$  秒後; d:  $\frac{10}{24}$  秒後

胞内凍結をはじめた細胞付近の温度を示していないからであろう。ただ、定性的に、 $-2.0^{\circ}\text{C}$ ～ $-3.0^{\circ}\text{C}$ 付近と $-8.0^{\circ}\text{C}$ 付近とで細胞内凍結を起こした細胞を比べてみると、 $-8.0^{\circ}\text{C}$ 付近で凍結した細胞の方が明らかに氷晶の生長が速く、1秒以内に細胞全体に氷晶が拡がってしまう(第2図, 第4図)。 $-4.0^{\circ}\text{C}$ 以下での観察は例数が少なく、また温度の低下とともに氷晶の伸び方が速くなるので、定量的にあつかうには高速度撮影など新しい工夫をして、細胞内凍結の様子を記録する必要がある。

#### IV. 考 察

キアゲハの気管腺細胞における細胞内凍結の進行過程を16mm映画を通して観察した結果を述べてきたが、こうした結果は、凍結によって細胞に生じる傷害の原因や、氷点下における細胞の性質を知る上で、どんな意味を持っているだろうか。

凍結中に、細胞の内部に氷晶が形成される現象は、多くの研究者によって、光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡を使った観察によって確かめられており、これが凍結によって細胞が受ける傷害の大きな原因のひとつと考えられている<sup>1-17)</sup>。けれども、これまでの研究は、すでに細胞内で生長しきった氷晶や、その後の移動再結晶による氷晶の変化を観察したものが多く、その結果を通して、細胞内氷晶の形成と細胞傷害の因果関係を明らかにしてきた。

ところで、今回の観察では、 $0^{\circ}\text{C}$ に比較的近い温度で細胞内凍結が起こる場合について、その動的な進行過程が明らかにできた。細胞内に生じる氷晶核は、細胞外で生長した氷晶によって、植氷されて形成されると考えられ、細胞内氷晶核の数は、ひとつまたは複数であった。この氷晶核は、非常に速さで発達し、樹枝状となって細胞内を拡がり、ついで小粒状の氷に変化した。細胞内氷晶の生長にともなって、細胞内にある膜構造が、どのような作用を受け、また破壊されるかという問題は、細胞内凍結によってひきおこされる傷害の機構を明らかにするうえで重要である。形態学的には、細胞内氷晶の形成や、移動再結晶による氷晶の粗大化によって、細胞内の膜構造が乱され、細胞内器官が変形したり、破壊されたりする事実が観察できる<sup>11,12,14)</sup>。このことは、細胞内凍結による傷害のおもな原因が、細胞内氷晶の形成による細胞内膜構造の機械的な破壊であることを思わせる。こうした見方に立てば、ひとつたび、細胞が細胞内凍結を起こすと、その全過程では、氷晶核の生長、樹枝状氷から小粒状氷への変化、その粗大化というように、二重三重に細胞内の膜構造が機械的に乱されることになる。けれども、細胞内氷晶の形成にともなって、同時に細胞内で脱水、塩の濃縮などが起こるので、このことを考えると、細胞内凍結による傷害が、細胞内氷晶の形成による機械的な作用によってだけひきおこされると、簡単には言いきれない。

#### V. 追 記

今回の実験には、キアゲハ休眠蛹の気管腺細胞という特殊な細胞を用いた。キアゲハの休眠越冬蛹は寒さに強く、蛹自身が凍結しても助かることが知られている<sup>21)</sup>。これに対して、休眠しない夏の蛹は、寒さ、ことに凍結には弱い。凍結に対する両者の違いを細胞学的立場から明らかにする手がかりとして、気管腺細胞を選んで冷凍顕微鏡で観察するうち、この細胞が凍

結条件によっては、 $-2.0^{\circ}\text{C}$ ～ $-4.0^{\circ}\text{C}$ という比較的氷点に近い温度で細胞内凍結を起こし、その進行過程が非常に観察しやすいことがわかった。そこで、この細胞を使って細胞内凍結の動的な進行過程を明らかにしたのが今回の報告である。

つけ加えておきたいのは、気管腺細胞が $-2^{\circ}$ から $-4^{\circ}\text{C}$ という比較的高い温度で細胞内凍結を起こすのは、実験条件によるものであって、野外で越冬している蛹の細胞が、細胞内凍結を起こす機会は、ほとんどないということである。休眠蛹そのままを $-30^{\circ}\text{C}$ 近くまでゆっくり凍結した場合には、凍結の開始にともなって多量の潜熱が放出されるのと、蛹自身の熱容量の大きさから、冷却速度は非常にゆっくりしたものになる。実際、このようにして凍結された蛹は、融解後、生きていて変態できるし、気管腺細胞にも、微細構造の上で大きな変化は認められない<sup>22)</sup>。

## VI. 摘 要

キアゲハ休眠蛹の気管腺細胞 (Tracheal gland cells) における細胞内凍結の進行過程を 16 mm 映画で記録し、それをもとに、細胞内凍結の動的な様子を観察した。

$-2^{\circ}$ ～ $-4^{\circ}\text{C}$ の範囲で細胞内凍結が起こる場合、細胞内に生じる氷晶核は、一個あるいは複数で、氷晶は、はじめ樹枝状に生長し、その後移動再結晶によって粒状の氷晶に変化する。樹枝状の氷晶は等速度では生長せず、急速に伸びる初期の段階と、それに続くやや緩やかに伸びる段階とに分けることができる。

## 文 献

- 1) Molisch, H. 1897 Untersuchungen uber das Erfrieren der Pflanzen, Jena.
- 2) Chambers, R. and Hale, H. P. 1932 The formation of ice in protoplasm. *Proc. Royal Soc. London, Ser. B*, **60**, 336.
- 3) 朝比奈英三 1950 生物の凍結過程の分析 II. 植物柔組織の凍結過程の顕微鏡的観察. 低温科学, **3**, 229-245.
- 4) 朝比奈英三 1953 生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞(ウニ)の凍結過程. 低温科学, **10**, 81-92.
- 5) Luyet, B. J. and Gibbs, M. C. 1937 On the mechanism of congelation and of death in the rapid freezing of epidermal plant cells. *Biodynamica*, No. **25**, 1-18.
- 6) Smith, A. U., Polge, C. and Smiles, J. 1951 Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. *J. R. Micr. Soc.*, **71**, 186-195.
- 7) Rapatz, G. and Luyet, B. 1960 Microscopic observations on the development of the ice phase in the freezing of blood. *Biodynamica*, **8**, 195-239.
- 8) 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.
- 9) Shimada, K. and Asahina, É. 1972 Types of cell freezing and postthawing survival of individual HeLa cells. *Cryobiology*, **9**, 51-56.
- 10) Leibo, S. P., McGrath, J. J. and Cravalho, E. G. 1975 Microscopic observation of intracellular ice formation in mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*, **12**, 579.
- 11) Moor, H. 1964 Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. *Z. Zellforsch.* **62**, 546-580.
- 12) Sakai, A., Otsuka, K. and Yoshida, S. 1968 Mechanism of survival in plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. *Cryobiology*, **4**, 165-173.
- 13) 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.
- 14) 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. 細胞内氷晶の電子顕微鏡観察. 低温科学, 生物篇, **30**, 65-75.
  - 15) Shimada K. and Asahina, É. 1975 Visualization of intracellular ice crystals formed in very rapidly frozen cells at  $-27^{\circ}\text{C}$ . *Cryobiology*, **12**, 209-218.
  - 16) 根井外喜男・浅田 実 1972 急速凍結赤血球の加温過程. 低温科学, 生物篇, **30**, 45-63.
  - 17) Mazur, P. 1977 The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, **14**, 251-272.
  - 18) Modlibowska, I. and Rogers, W. S. 1955 Freezing of plant tissues under the microscope. *J. Exp. Botany*, **6**, 384-391.
  - 19) 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.
  - 20) Fletcher, N. H. 1970 The Chemical Physics of Ice. Cambridge University Press, London, 271 pp.
  - 21) Asahina, É. 1969 Frost resistance in insects. In *Advances in Insect Physiology* (J. W. L. Beament, J. E. Treherne and V. B. Wigglesworth, eds.), Acad. Press, London, **6**, 1-49.
  - 22) 島田公夫 未発表.

### Summary

Dynamic process of intracellular freezing in the living cells was investigated by the use of cinemicrography.

As materials the tracheal gland cells of *Papilio machaon* (Lepidoptera) in pupal diapause stage were used. The cells suspended in the insect haemolymph were sandwiched between two cover glasses and placed on the stage of a refrigerated microscope.

Intracellular freezing initiated from one or several points near the periphery of a cell at a temperature between  $-2^{\circ}\text{C}$  and  $-4^{\circ}\text{C}$  soon after the external ice crystals surrounded the cell. Immediately after the initiation of intracellular freezing ice crystals with dendritic branches rapidly developed throughout the cell within several seconds. However, ice crystals did not grow with a uniform velocity in a cell. The growth rate of intracellular ice crystals was faster in early stage than in late stage of cell freezing. The dendritic ice crystals formed within a cell were, then, transformed into many fine ice particles through the migratory recrystallization.