玉ねぎ表皮組織の凍結機構に関する実験的研究*

(細胞内凍結と細胞外溶液による脱水現象)

鶴田 隆 治^{*1}, 川 水 努^{*2}
野 中 功^{*3}, 増 岡 隆 士^{*1}

Experimental Study on Freezing of Onion Skin Cells

(Intracellular Ice Formation and Dehydration with Extracellular Solution)

Takaharu TSURUTA, Tsutomu KAWAMIZU,
Isao NONAKA and Takashi MASUOKA

Microscopic observations of the freezing process of onion skin cells have been made using a directional solidification stage, in order to study the freezing mechanism of living tissue. Experiments conducted under low cooling rates show that intracellular ice formation occurs due to surface catalyzed nucleation (SCN) at the plasma membrane and proceeds cell by cell because the membrane blocks the growth of ice crystals. Since the probability of SCN increases with increase in the surface area in contact with the external ice, the tissue freezes at higher temperatures when the cell has a larger area in contact with the adjacent frozen cells. Dehydration and cell shrinkage were also observed in experiments with physiological saline simulating the effects of the vascular system in the organs. It is confirmed that a decrease of the cooling rate raises the dehydration rate and reduces the fraction of frozen cells but increases the amount of extracellular freezing.

Key Words: Biological Engineering, Freezing, Nucleation, Onion Skin Cells, Intracellular Ice Formation, Extracellular Freezing, Dehydration, Physiological Saline, Cryopreservation

1. は じ め に

生体の凍結保存に関し、精子や卵子、受精卵、血球等の小さな細胞は、超急速冷却法による非晶質状態での保存が可能であり、その技術もある程度確立している。しかし、多数の細胞群からなるスケールの大きな生体組織に、この大きな冷却速度を与えることは不可能であり、冷却速度によっては、細胞内凍結による細胞損傷や、細胞外凍結に伴う脱水・収縮のための機械的損傷あるいは塩害などの凍害が発生する⁽¹⁾⁽²⁾。したがって、これらの損傷を抑えるに最適な冷却条件を知る必要があるが、組織細胞に対する研究は少なく、その凍結機構には明らかになっていない点が多い。

特に、臓器組織のように内部に血管網を有する生体組織においては、血管内の凍結が優先的に進行するため、これと隣接する未凍結細胞の浸透圧差による脱水と収縮、ならびに血管の膨張が生じることが観察されている^{(3)~(5)}。さらには、先行する血管部の凍結が隣接細胞の細胞内凍結を誘発することも考えられ、血管網

が組織細胞の凍結挙動に及ぼす影響を調べ、その凍結過程の熱・物質伝達機構を解明することは極めて重要な課題である。

本研究は、生体組織凍結の素過程を解明するための第1段階として、組織を構成する細胞の幾何学的形状と冷却条件とが、細胞内凍結とその伝ば、細胞の脱水・収縮等にどのような影響を及ぼすのかを調べることを目的として計画されたものである。具体的には、組織細胞として玉ねぎ球根部の表皮組織を用い、その凍結過程の観察を通して、細胞内凍結に及ぼす細胞形状と冷却方向、冷却速度の影響を調べている。また、血管網がもたらす外部凍結の影響を観察するため、優先的に凍結する水溶液を細胞外に配した模擬実験を行い、外部溶液の凍結が細胞内凍結と脱水現象に及ぼす影響を調べ、検討を加えている。

記 号

A: 細胞の観察面面積 = $CX \times CY$ μm^2

CX: 温度こう配方向の細胞の長さ μm

CY: 温度こう配と直交方向の細胞の長さ μm

H: 冷却速度 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

T: 温度 $^{\circ}\text{C}$

V: 試料の低温側への移動速度 $\mu\text{m}/\text{s}$

* 原稿受付 1995年9月21日。

^{*1} 正員、九州工業大学工学部 (〒804 北九州市戸畑区仙水町1-1)。

^{*2} 正員、九州工業大学大学院[現:三菱重工業(株)広島研究所]。

^{*3} 九州工業大学大学院。

2. 実験装置および方法

実験は、Rubinsky-Ikeda⁽⁶⁾による方向性凝固観察法を用い、生体試料の凍結現象を直接顕微鏡観察することによって行った。この方法によれば、冷却速度を決定するその場の温度こう配と凍結面進行速度を独立して設定できるため、凝固現象一般の観察に適しており、赤血球懸濁液^{(6)~(9)}から組織細胞⁽³⁾⁽¹⁰⁾まで広く使用されている。図1に装置の概要を示す。銅製の高温ベースと低温ベース(63 mm×56 mm×18 mm)が平行距離 $d(=5 \text{ mm})$ だけ離れて顕微鏡ステージに設置されており、高温ベースはヒータ加熱により15~30°Cに、低温ベースは液体窒素の循環とヒータによって-30~-60°Cの範囲内で温度設定・保持される。両ベース間に試料を乗せたスライドガラスをセットすることによって試料に一次元温度分布を供し、これをアクチュエータを用いて一定速度で低温側に移動させれば、一定の冷却速度で試料が冷却されることになる。

この方法のもう一つの大きな特長は、一次元温度分布を両ベース間の絶対空間に固定できるため、その位置から逆に組織の局所温度を推定することが可能な点にある。本研究では、両ベースの温度 T_{HB} , T_{CB} を直径

Fig. 1 Directional solidification stage in cryomicroscope

1.8 mmの白金測温抵抗体によって計測しており、高温ベース端、低温ベース端におけるスライドガラス上の温度 T_H , T_C への変換には、熱画像装置を使用して得た校正データを用いている。また、スライドガラス上の温度分布が一次元的であることも確認しており、温度の推定精度は、スライドガラスの移動速度 $V=17.5 \mu\text{m/s}$ 以下において、 $\pm 1.2^\circ\text{C}$ 以下であった。

本実験におけるスライドガラスの移動速度は $V=2 \sim 10 \mu\text{m/s}$ の範囲であり、 $(-dT/dt)=(T_H-T_C)V/d$ で求まる冷却速度 H は、 $1 \sim 9^\circ\text{C/min}$ の範囲となる。細胞の凍結挙動は顕微鏡に取付けた CCD カメラによりモニタに映し出され(総合倍率190倍)、同時にビデオデッキで録画を行い、画像処理装置を用いて細胞凍結挙動と凍結温度の測定を行った。また、細胞内凍結の瞬間をとらえるため、高速度ビデオを用いた観察も行っている。

生体試料として使用する玉ねぎ球根部の表皮組織は、厚み約 $90 \mu\text{m}$ の単層構造であるため容易に観察試料になり得ること、および細胞の大きさが $50 \sim 800 \mu\text{m}$ と比較的大きくて観察しやすいこと、また年間を通じて入手可能なことから選定している。さらに、外皮から内皮に向かって細胞が小さくなることと、図2に模式的に示すように長方形の二次元的形状をしており、本研究で目的としている細胞形状と冷却方向の違いが凍結伝ば挙動に与える影響を観察するのに大変適した試料といえる。つまり、細胞セルの大きさを変わるとともに、細胞の長辺方向(Long Side)あるいは短辺方向(Short Side)に冷却方向を変えることが可能である。

なお、血管部のように、先行する外部凍結が細胞内

Fig. 2 Schematic of onion skin cells

凍結と脱水・収縮を伴う細胞外凍結に及ぼす影響を調べる実験では、表皮組織を脱気した蒸留水、あるいは生理食塩水(0.9 wt%)でサンドイッチすることにより、外部流路に隣接する状況を模擬することにした。

3. 実験結果と考察

3・1 細胞内凍結の発生と伝ば まず最初に、細胞群のみからなる試料において、細胞内凍結の発生とその伝ばがどのように進むかを、図3の観察例にみることにする。細胞の長辺が冷却方向(温度こう配方向)に位置する場合と、これに直交する場合の二例を示しており、各写真の右側が低温側である。細胞の凍結はその暗化によって確認されるが、凍結した細胞と隣接する細胞にのみ凍結が生じており、細胞ごとに低温側から順次凍結していることがわかる。これは、細胞内凍結が隣接細胞の凍結によって誘発されることを意味し、Tonerら⁽¹¹⁾⁽¹²⁾が指摘しているように、細胞膜(壁)表面における不均質核生成(SCN: Surface Catalyzed Nucleation)が隣接細胞の凍結によって引き起こされたものと推測される。

この点を確認する目的で、細胞内凍結の瞬間を1000フレーム/sの高速度ビデオ撮影によってとらえた結果を図4に示す。一連の映像から、凍結細胞に接する細胞膜(壁)の一部(図4中の矢印部)に核生成が発生し、その後の221 msの時間内において、氷晶が細胞内に急速に成長して細胞内を充滿していく様子を見ることができる。この後、ある時間をおいて次の細胞にSCNが生じ、凍結が伝ばしていくことを観察している。細胞内での結晶成長は非常に速いが、セルごとの凍結伝ばは、冷却速度に依存するものの、高速度ビデオで観察した細胞内凍結に比べてゆっくりしたものであった。

図5は、細胞内凍結率に及ぼす細胞の大きさと形状の影響を調べた結果である。これは、観察された凍結細胞の数(50~200個)と凍結時の温度を計測し、その

温度における凍結率として整理したものである。なお、1個の細胞内には温度差があり、特に長辺方向に冷却される細胞では短辺方向冷却に比べてその差は大きくなるが、細胞内凍結がSCNによって生じることを考慮して、凍結時の評価温度には細胞内での最低温度を採用している。図5中の数値Aは細胞の観察面面積(=CX×CY)、CYは温度こう配方向と直交する方向の細胞の長さを示している(図2)。細胞内溶液の平衡凍結温度は、 -0.72°C (1.2%食塩水に相当)と推定

Fig.4 High speed photomicrographs of intracellular ice formation ($H=5.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

(a) Long side freezing (b) Short side freezing

Fig.3 Microscopic appearance of freezing front

Fig.5 Effect of cell morphology on intracellular freezing

され、結果はすべて過冷却凝固となっており、細胞の面積 A が小さくなると凍結温度は低下して過冷却度が大きくなる傾向にある。しかし、細胞の長辺方向に凍結が進む○印のデータと短辺方向に進む△印とを比較すれば、面積 A が小さいにもかかわらず短辺方向に凍結が進行する△印のほうが凍結温度が高くなっていることがわかる。これは、先の SCN の観点から次のように理解することができる。すなわち、低温側にある凍結細胞と接する面積は CY の大きいほうが広い。ため、SCN の生じる確率が高くなり、より高い温度で細胞内凍結が発生するためである。したがって、細胞面積 A が同程度であれば、短辺方向に冷却するほうが凍結温度が高くなるといえる。

冷却速度が凍結温度に及ぼす影響を図 6 に示す。この図 6 の凍結温度は、全細胞の凍結温度の平均値を示しており、細胞の大きさがほぼ同程度のものに対して比較したものである。前述のとおり、短辺方向に凍結が進行するほうが平均凍結温度が高くなっていることがうかがえる。また、冷却速度が大きくなるにつれて平均凍結温度は低くなっており、Toner ら⁽¹¹⁾ の SCN の立場からの理論結果とも定性的に一致する。つまり、細胞内凍結が過冷却凝固であるため、冷却速度の遅いほうが過冷却状態におかれる時間が長くなり、核生成

Fig. 6 Effect of cooling rate on mean freezing temperature

(a) Long side freezing (b) Short side freezing

Fig. 7 Freezing front in experiment with freezing of extracellular water

の生じる確率が高くなると解釈される。

3.2 外部凍結の影響 組織中に、凍結が先行する血管等の流路がある場合を想定し、玉ねぎ細胞の上下に蒸留水、あるいは生理食塩水を配置して外部凍結の影響の観察を行った。最初に、外部溶液として蒸留水を用いたときの凍結の様子を図 7 に示す。細胞の凍結に先立って蒸留水の凍結がまず進行するため、前の結果といくぶん異なる現象が観察されている。外部溶液のない場合の図 3 と比較すれば、必ずしも低温側にある凍結細胞に隣接していなくても凍結する孤立した細胞がみられる。これは細胞群の上下面にはすでに凍結した氷が存在しており、氷との接触面が低温側細胞との接触面だけでなく、これに上下面が加わるためと考える。ただし、凍結細胞との接触面のほうが温度が低いため、核生成の生じる確率は凍結細胞と接触している細胞のほうが高く、前の結果とほぼ同様に、大部分の細胞は低温側から順次凍結している。

この外部凍結が細胞の凍結温度に及ぼす影響を、図 8 に定量的に比較して示す。図 8(a) は長辺方向と短辺方向の比較を、(b) は冷却速度の影響を短辺方向冷却

(a) Effect of freezing direction

(b) Effect of cooling rate

Fig. 8 Probability of intracellular ice formation in experiment with freezing of extracellular water

の場合を例として示している。すでに述べたように、外部凍結があると上下の細胞膜も核生成に関与することになり、凍結温度は外部溶液のない場合と比べて高くなっているが、外部凍結のないときと同様に短辺方向に冷却したほうが長辺方向よりも高い温度で細胞内凍結が生じていることも確認できる。なお、図8(b)では、冷却速度の影響は外部溶液がない場合に比べて小さくなっている。これは、上下の水によって核生成が生じやすくなったため、冷却速度の影響が顕著に現れなかったためと考える。

3・3 生理食塩水による脱水挙動 次に、外部溶液として生理食塩水を用いたときの細胞内凍結率と温度の関係を図9に示す。この場合も短辺方向に冷却するほうが細胞の凍結温度が高くなっているが、冷却速度によって細胞の凍結挙動が大きく異なっているのが観察される。すなわち、冷却速度が $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程度より大きい場合には、これまでと同様に、冷却速度の増加とともに凍結温度が低下し、すべての細胞が凍結しているのに対し、 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ より遅い冷却速度では、逆に冷却速度の低下とともに凍結温度が低下し、最終凍結率も低下する結果となった。特に、 $1.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ まで冷却速度を遅くすると、すべての細胞が未凍結のままとなっている。また、長辺方向に $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度で冷却した実験では、外部溶液である生理食塩水が凍結を開始してから経過時間の差が細胞内凍結率に現れ、時間の経過とともに最終凍結率が低下している。

冷却速度が遅い場合のこうした凍結挙動の変化は、外部溶液が生理食塩水であるため、細胞からの脱水が生じることに関連している。図10に、短辺方向に $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した際の観察写真を示すが、写真の左端に外部食塩水の凍結界面があつて、この外部の水と接する部分に脱水して原形質分離を起こしている細

胞のあることがわかる。その脱水・収縮量は、画面右側の低温側に行くにつれて多くなり、脱水した細胞は凍結しないままで、いわゆる細胞外凍結が進行していることがわかる。なお、凍結する細胞は、図10(a)にみられるように、比較的低過冷度の領域で凍結しており、この領域で脱水を開始した細胞は図10(b)のように未凍結のままとなっている。

脱水量と細胞内凍結率との関係を調べるため、未凍結細胞が観察された実験での細胞の体積変化を図11に示す。図11(a)は冷却速度 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ において冷却方向の影響を、(b)は冷却速度 $1.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ において生理食塩水が凍結を開始してから経過時間の影響を示したものであり、いずれも初期体積との比をとって示している。まず冷却方向による差をみれば、最終凍結率の低かった短辺方向冷却時の体積変化のほうが大きく、脱水量の多いことがわかる。これは、短辺方向に冷却される細胞は、全体が低温の水と接するのに対し、長辺方向に冷却される細胞は、細胞内の温度差が大きいため、短辺方向から冷却される細胞に比べて接する水の温度が高くなり、結果として短辺方向から冷却される細胞のほうが細胞内外の圧力差が大きくなって脱水量が増えるためと考える。次に、図11(a)の長

Fig. 9 Probability of intracellular ice formation in experiment with external freezing of physiological saline

(a) $t = 0 \text{ s}$

(b) $t = 262 \text{ s}$

Fig. 10 Dehydration in experiment with physiological saline ($H = 1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

Fig. 11 Dehydration rate due to extracellular freezing in experiment with physiological saline

辺方向冷却時の脱水率を、さらに冷却速度が遅くなると凍結率が0%になった図11(b)の結果と比較すると、冷却速度の低下によって脱水率が増加している。この比較からも脱水の進行によって細胞内凍結率が低下することがわかる。これは、冷却速度が小さいほど、細胞内の水が流出する時間を長く与え、脱水による濃縮が凝固点降下をもたらす、この凝固点降下によって過冷度が減少すること、ならびに細胞膜表面での不均質核生成に關与する水分子数が減少することによって凍結率が低下するためと解釈される。なお、実験時間の経過とともに脱水量が増し、凍結率が低下するのは、生理食塩水の凍結時に塩が排出されるため、その凍結界面の進行とともに外部溶液の濃縮が進み、細胞内の水が浸透圧差によって細胞外へと流出することが原因と思われる。

4. 結 論

玉ねぎの表皮細胞を用いた凍結過程の観察から、以下のような結論を得た。

(1) 冷却速度を大きくできない組織細胞では、細胞膜における表面核生成によって細胞内凍結が発生し、これが細胞ごとに伝ばする形態をとる。この表面核生成は、細胞が凍結細胞に接すると生じやすく、したがって、隣接する凍結細胞との接触面積が大きいほど、細胞内凍結の生じる確率は高く、凍結伝ばもより高い温度で進行する。

(2) 細胞外に配した蒸留水が先行して凍結すると、外部の水との接触面積が増大するため、細胞内凍

結は生じやすくなる。

(3) 外部溶液が生理食塩水の場合、冷却速度が遅いほど脱水が進行し、濃縮による凝固点降下と過冷却度の減少、ならびに核生成に關与する水分子数が減少することによって細胞内凍結は起こりにくくなる。また、生理食塩水の凍結が進行して外部溶液の濃縮が進むほど細胞の脱水も進行し、細胞内凍結も起こりにくくなる。

最後に、実験を遂行するにあたり熱心に協力された小田敦子、池田学、江越政利、佐藤達哉の各君に感謝の意を表す。また、本研究は文部省科学研究費奨励研究(A) (05855031, 04855032)の補助のもとに行なったことを記し、謝意を表する。

文 献

- (1) 棚沢一郎, 機誌, **96** 890(1993), 74-76.
- (2) Mazur, P., *Am. J. Physiol.*, **247**(1984), C125-C142.
- (3) Rubinsky, B., ほか3名, *Cryo Lett.*, **8**(1987), 370-381.
- (4) Rubinsky, B., *J. Heat Transf.*, **111**(1989), 988-997.
- (5) Rubinsky, B. and Eto, T. K., *Ann. Rev. Heat Transf.*, **3** (1990), 22-26.
- (6) Rubinsky, B. and Ikeda, M., *Cryobiology*, **22**(1985), 55-68.
- (7) 石黒博・Rubinsky, B., 機論, **60** 572, B(1994), 1349-1355.
- (8) 石黒博・Rubinsky, B., 機論, **60** 579, B(1994), 3748-3754.
- (9) 石黒博・Rubinsky, B., 機論, **60** 579, B(1994), 3755-3761.
- (10) Chaw, M. M. and Rubinsky, B., *Cryobiology*, **22**(1985), 392-399.
- (11) Toner, M., ほか2名, *J. Appl. Phys.*, **67** 3(1990), 1582-1593.
- (12) Toner, M., ほか2名, *J. Biomech. Eng.*, **115**(1993), 169-174.