

## 文 献

- 1) 阿竹 徹, 菅 宏, "新実験化学講座・基礎技術 1" (日本化学会編), p.411, 丸善, 東京(1977)
- 2) 岡崎 篤, 日本物理学会誌, **23**, 384(1968)
- 3) V. E. Bottom, R. A. Carvalho, *Rev. Sci. Instrum.* **42**, 196 (1971)
- 4) B. Sykora, H. Peisl, *Z. angew. Phys.* **30**, 320 (1970)
- 5) A. Freund, J. Schneider, *J. Cryst. Growth* **13/14**, 247 (1972)
- 6) A. Okazaki, M. Kawaminami, *Jap. J. appl. Phys.* **12**, 783 (1973)
- 7) W. L. Bond, *Acta Cryst.* **13**, 814 (1960)
- 8) 日本結晶学会誌, **18**, 55(1976)(フォトン・フェクトリー計画特集号)
- 9) A. Okazaki, N. Ohama, *J. Appl. Cryst.* 投稿予定
- 10) N. Ohama, H. Sakashita, A. Okazaki, *J. Appl. Cryst.* 投稿予定
- 11) 松尾隆祐, 熱測定, **4**, 54(1977)
- 12) A. Okazaki, M. Kawaminami, *Ferroelectrics* **7**, 91 (1974)

## 低温生物学における熱測定

根 井 外喜男\*

1. 低温生物学<sup>1), 2)</sup>

## 1.1 序 論

Cryobiology という比較的新しい学問分野がある。もとは Low temperature biology とよばれていたが、1964年に Society for Cryobiology が創設されてからはこの Cryobiology という言葉がすっかり定着して、どこの国でも通ずるようになってきた。われわれはこれを低温生物学とよんでいる。その内容は一般にはまだあまりよく理解されてはおらず、ときには極地生物学であるかのように考えられることさえある。しかし、ここでいう生物学とは、従来の狭い意味の動物学や植物学だけでなく、もっと広い意味の生物学、すなわちあらゆる生物それ自身またはそれからとり出されたものを含むといっよい。したがって動植物学はもちろん医歯薬学をはじめ農・水産・畜産学からさらに工学までも含む幅広い領域ということになる。従来の縦割りの学問系列に対しある条件下に限定されてはいるがむしろ横のつながりをもつところのいわゆる境界領域といえることができよう。昨

今の学問体系は一方には細分化しながら他方には逆に総合化されていくという傾向のひとつのあらわれであるかもしれない。

"低温生物学" という言葉のうちの "生物学" はこのように解釈したとして、頭につく "低温" とは何かということになるとその定義は必ずしも明確ではない。つまりどの程度の温度範囲をさすのか分野によってかなりまちまちだからである。たとえば低温物理学といえれば一般に -273℃ の極低温付近での問題をさすのに対し、農学での低温では常温からやや低い程度の温度をさすことが多い、というように同じ言葉でも意味するところの温度にはかなりの差がある。それでは低温生物学での低温とは一体どのくらいの温度範囲をさすのかといえば、これまで甚だあいまいなのである。今この領域で実際にとりあげられている問題について考えてみても、医学領域でよく用いられる低体温麻醉法はもちろんプラス温度範囲内でせいぜい平常の体温より 10℃ か 20℃ 低い温度にすぎないが、一方同じ医学領域での移植材料の凍結保存などでは液体窒素 (-196℃) が盛んに利用されるなど、かなり広い範囲の温度に亘るものといえよう。

## 1.2 低温に対する生体の抵抗性：凍結による破壊と保存

生物の種類によって与えられた環境の低温条件に対する抵抗性は千差万別である。一般に生物は下等なものほど抵抗が強いという傾向があるが、酵素のような物質レベルのものでさえ凍結によって失活することがある。植物にくらべると動物は概して低温に弱いし、動物のうちでも哺乳動物は昆虫などに比較してはるかに弱い。動物の細胞や組織はそのまま凍らせたのでは -20℃ くらいまでの凍結融解でたいてい破壊されてしまう。しかしグリセリンや DMSO (Dimethylsulfoxide) のようないわゆる凍害防止剤を加えて適当な凍結をすると、ほとんど障害されず生存して長期間の保存に耐える。つまり凍結は生細胞に対して破壊と保存という相反する二つの働きをするということが出来る。臨床的な立場でこの両者をそれぞれ利用するのが凍結外科と移植用材料の凍結保存である。ともに医学の領域における新しい分野としてめざましい発展をとげるようになった。

## 1.3 生体の凍結—その問題点

生体はその組成の 70~80% が水である。低温生物学でとり扱われる大部分のものは含水試料といってよい。これらの試料が低温とくに氷点以下におかれた場合に起きる現象のうち最も注目すべきものは、液体の水が固体の水に変わるといふ状態変化であろう。したがってこの状態変化にともなって起きる物理的・化学的な変化が生物試料に対してどのような影響を及ぼすかということが低

\* 東日本学園大学薬学部：北海道石狩郡当別町金沢

温生物学での大きな問題となる。生体の水は単なる純水とは異なって生体成分とそれぞれ特有の結合をもつ。すなわち生体水分には大部分の自由水の他にわずかながら(生体の種類によっても異なるが大体全水分中の10%くらい)の結合水がある。自由水は凍結水分とも定義されるように $-20^{\circ}\text{C}$ くらいまでの冷却でほとんど凍ってしまうが、結合水は不凍水分といわれるだけに通常の氷の結晶構造にはなりにくい。したがって種々の性質をもつ生物試料が、様々な冷却条件のもとでどのような凍り方をし、それが試料自身に対してどんな影響を与えるかということについて検討することが、低温生物学におけるひとつの重要な課題である。

#### 1.4 細胞の凍結の機構—凍結像と細胞障害

均質な溶液とは異なって細胞はそれぞれ特有の構造をもっており、とくに細胞膜あるいは細胞壁によって細胞内構造物を外部とへだてている。このような細胞は一般に冷却の条件とくに冷却速度によって異なった凍結像を示すのである。いまヒトの赤血球をとりあげ、1~10分くらいの比較的ゆっくりした条件で凍らせると、最初に細胞の周囲の水が凍り細胞は水分が外に引き出されて収縮する(細胞外凍結)。一方、毎分 $10^4\sim 10^5$ ℃くらいの急激な冷却を行うと、周囲の水と同時に細胞内の水も凍る(細胞内凍結)(Fig. 1参照)。次に温度を上げて融解しそれぞれの細胞の障害の程度を溶血(膜が破壊されてヘモグロビンが外に出る)をめやすにして測ってみると、緩慢凍結でも急速凍結でもほとんど100%に溶血を起こすことから細胞膜の障害されていることがわかる<sup>3, 4)</sup>。

このような冷却速度と細胞の凍結像との関係は、細胞の種類によって多少の違いはあっても基本的にはほぼ同じである。いずれにせよ凍結融解によって細胞が障害されたのでは長期保存ができないので、以前から凍害防御の方法がいろいろと工夫されその結果グリセリンやDMSOの有効なことが認められた。凍結にともなう細胞障害は

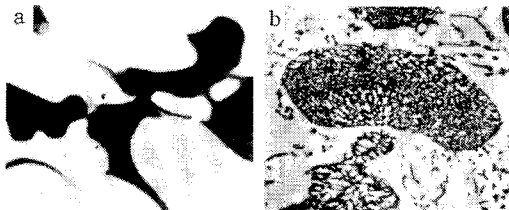


Fig. 1. Electron micrograph of slowly (a) or rapidly (b) frozen erythrocytes. (a) and (b), showing extra- and intracellular freezing, respectively.

Ultra-thin sectioned specimens, prepared by the freeze-drying method. 6,000 $\times$  (Nei<sup>2)</sup>)

主として溶質とくに塩類の濃縮によるものとの考えから<sup>5)</sup>、グリセリンが凍害防止に役立つのはその溶液における束一的性質によって塩の濃縮を妨げるからであると説明されている<sup>6)</sup>。

## 2. 低温生物学における熱測定

低温生物学において温度に関連した個々の問題をとりあげてみたい。

### 2.1 水溶液の凍結融解

水の凍結を論ずるに当たってまず最初にあげねばならぬのは結晶構造であろう。水蒸気が凝縮してできた氷晶についてX線回折、電子線回折のほかカロリメーターなどによって測定された結果について多くの研究者の報告があり、生成時の温度によってそれぞれ amorphous( $-120\sim -140^{\circ}\text{C}$ より低温)、cubic( $-80\sim -140^{\circ}\text{C}$ 付近)、hexagonal(それより高い温度)の結晶形のできることが知られている<sup>7)</sup>。

溶液の凍結においても氷晶核の生成とその成長増大とは温度と密接な関係のあることはよく知られているところであり、例えばPVP(Polyvinylpyrrolidone)についてFig. 2のような報告がある<sup>8)</sup>。この図からも、緩慢凍結では少数の核から氷晶が大きく成長し、急速凍結では小さな氷晶が数多くできることがわかる。塩類、糖類、タンパクなど多数の各種溶液について、その濃度や凍結温度によって多種多様の凍結像を示すことが顕微鏡による形態学的観察で明らかにされた<sup>9)</sup>。

低温領域における水の状態変化を追求する手段として

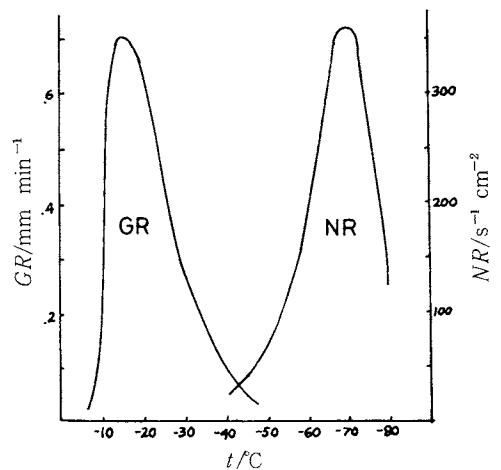


Fig. 2. Curves representing the rate of crystal growth GR and the rate of nucleation NR in terms of the freezing temperature, in a 50% solution of PVP (Luyet<sup>8)</sup>)

かなり以前からサーモグラムが電気伝導度<sup>10, 11</sup>との対比のもとに用いられている。溶液ではその濃度、冷却速度によって種々の性状の水が生成されることは前記の通りであるが、特に急速凍結試料の昇温過程についてDTA (Differential thermal analysis)を用いてサーモグラムを画かせその曲線を吟味することにより、それぞれの試料の相変化すなわちガラス転移温度、結晶化温度、融解開始温度などが求められている<sup>12~14</sup>。

## 2.2 細胞浮遊液の凍結

前述のように凍結にあたっては細胞水分が重要な役割をもつ。そのうちのとくに凍結水分量の測定のためにカロリメーターを利用した報告がある<sup>15, 16</sup>。また水溶液の場合と同様にDTAあるいはDSC(Differential scanning calorimetry)を用いて細胞とくに微生物細胞の凍結時の相変化について検討された<sup>17</sup>。その結果同一昇温条件下で得られた各種細胞のサーモグラムの分析から、細胞の種類、培養時間、栄養形と芽胞などによる差違が認められた<sup>18</sup>。

## 2.3 低温環境下の試料温度の測定

人体を対象とした低温曝露下の温度測定では、体温を

代表させるものとしてサーミスターあるいは熱電対による直腸温または口内温の測定が行われる。体表の皮膚温の測定は、体温と外気温との間に大きな差のあるときは技術的に種々の問題が起きる。熱電対ならば特殊な形態の感温部が必要であり、最近では赤外線を利用した輻射熱測定のサーモグラフィが便利である。

昆虫など小動物を用いて体内温度の測定をするため熱電対の感温部を挿入するときは体内諸器官を損傷しないよう十分の注意が必要である。

一般に凍結および融解の過程の試料温度の変化を知るためには、銅コンスタンタンの熱電対を用いて経時的に記録することが多い。試料の量、形態、性状あるいは容器の形状、冷却速度などに応じて種々の工夫を要する。試料自身の温度とはいってもある程度以上の容量をもつ以上、しかも冷却速度が大きくなるほど、試料中の部位による温度勾配が問題となる。径1mmくらいの小滴試料であっても、これを10°C/min程度の冷却速度で凍結させると、試料表面と中心部とでは氷晶の大きさがかなり違うことが知られている<sup>19</sup>。したがって正確な試料温度の推移を知るためにはなるべく多くの部位で測定することが必要である。試料表面から深部になるほど温度の下降あるいは上昇は遅れる。

実験用試料の凍結のための寒剤としては、冷凍機による空気冷却の外、ブライン、ドライアイス・アルコールあるいは液体窒素が利用される。とくに冷却速度を大きくするためにはフロンまたはプロパンを液体窒素で冷却したものや真空蒸発によって液体窒素をスラッシュにしたものが用いられる。

凍結外科領域においては、体表あるいは体内深部などそれぞれの患部に応じて種々の形の冷却用プローブが考案されており、笑気あるいは液体窒素によって冷却される。表層の場合は噴霧法や注入法も用いられる。凍結組織温度は中心部と周辺部の非凍結組織との境界部とでは大きな差があるので、温度測定には注意を要する。

## 2.4 凍結乾燥法<sup>20</sup>

低温生物学における一分野として古くから広く応用されているものに凍結乾燥法がある。本法によれば生物学的材料とくに生物活性をもつ物質あるいは細胞自体その活性を維持したまま長期保存が可能になるということで賞用されている。適当な条件下で凍結させた試料を凍結状態のまま氷を昇華させ乾燥させるもので、低温での昇華を促進しとくに試料よりの水蒸気分子の移動を容易にするため、真空の保持をはじめとして装置に種々の工夫が施されている。凍結乾燥によれば活性のみでなく試料の原形、味、香気などの保持にも役立つので、形態学をはじめ食品の領域にも広く利用されている。生細胞の凍結乾

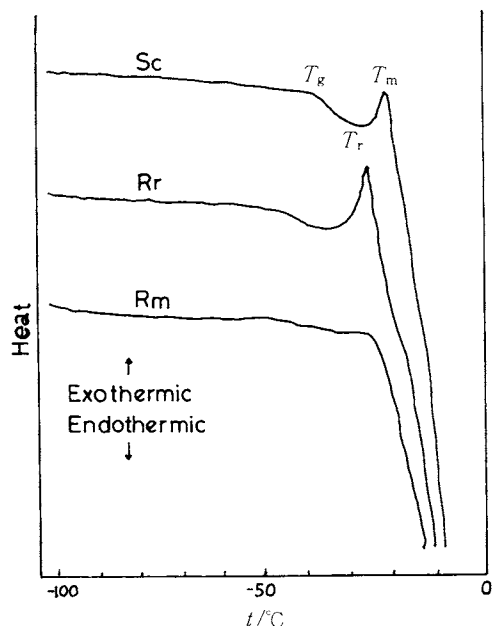


Fig. 3. Thawing thermogram of rapidly frozen cells

Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Rr, *Rhodotorula rubra*; Rm, *Rhodotorula marina*;  $T_g$ , Glass transition temperature;  $T_r$ , Recrystallization temperature;  $T_m$ , Melting temperature (Gonda *et al*<sup>18</sup>)

燥で活性が保持できるのは微生物に限られ、今のところ哺乳動物細胞などでは不可能である。凍結だけならば凍害防止剤を添加することによって細胞ばかりでなく組織のレベルまで保存が可能になったのに、乾燥では微生物細胞に限られるというのは、要するに凍結では細胞水分中の自由水が凍るにすぎないが、乾燥では結合水まで奪われることによるものと解釈されている。

さて実際に凍結乾燥の操作について考えてみると、まず装置は基本的には試料室、除湿室および真空ポンプの三部から成る。試料室としては試料の量や目的に応じて多岐管式または棚式が用いられる。除湿の目的にはコールド・トラップを使用するものが多い。水蒸気分子を捕捉して乾燥効率をあげるためには、トラップの位置、形状あるいは保持温度などが十分考慮されねばならない。試料とトラップの温度差は水の蒸気圧の差として乾燥効率に影響する。

凍結乾燥にあたり最初の試料凍結から最終の乾燥仕上がりまでの全過程を通じて幾つかの問題点がある。中でも乾燥過程での試料自身の温度あるいは熱収支などが重要な問題である。昇華が順調に進行しておれば昇華の潜熱による自己冷却のため外から冷やさなくても融けることはない。むしろ乾燥効率をよくするため外部から加熱することが多い。通常大量生産を目的とした凍結乾燥では、Fig. 4 に示すように棚温や品温が調節されるようになっている。大体乾燥過程では試料の共融点以下であればよいと考えられているが、試料によっては共融点の明らかでないものがあるし、また共融点以下であっても乾燥の前線では collapse と称する融解に似た変化のみられることがある<sup>21)</sup>。このような乾燥過程での試料の状態変化は乾燥製品の外観ばかりでなく試料自身の活性にも影響する。

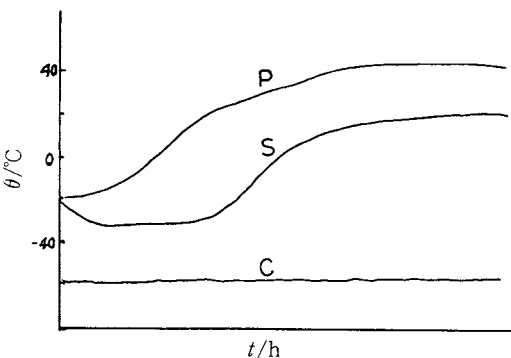


Fig. 4. Thermal diagram of the freeze-drying process  
P, Heat plate; S, Specimen; C, Cold trap

## 2.5 形態学における凍結技法<sup>22)</sup>

超微形態観察のために電子顕微鏡を利用するときは、光学顕微鏡のように試料を生のまま観察することはできなかった。真空装置に入れるため試料は予め乾燥しなければならぬからである。そこで生に近い状態の標本を作る目的で以前から凍結乾燥法や凍結置換法が利用されているが、乾燥による試料変形を防ぐためできるだけ低温(-80~-90°C)で処理する必要上標本作製に長時間を要するという欠点がある。比較的最近開発されて昨今広く応用されている凍結レプリカ法は、試料を含水状態のままなるべく急速凍結をしその破断面のレプリカを作って観察するのであるから、従来標本作製法で考えられるような artefact はなく試料の生の状態の観察として理想に近いものである。この操作でのポイントもまた-90~-100°C付近での厳密な温度調節にある。

## 3. 結 び

以上述べたように、低温生物学における温度に関連した問題だけに限定してとり上げてみても、まだ十分明らかにされていないことが多く残っている。今後さらに種類の立場からの検討が必要であろう。

## 終りに

冒頭に掲げた表題を与えられ稿を進めてはみたものの、「熱測定」はおよそ筆者の専攻からは外れた分野であった。したがって熱測定自体の技術的な記述は一切省き、むしろ広く温度に関する事項という解釈のもとに問題をとり上げてみた。その結果、記載はやや羅列的になったきらいはあるが、低温生物学という分野での問題点が奈辺にあるかが多少なりと理解されれば幸いである。

## 文 献

- 1) H. T. Meryman "Cryobiology", Academic Press, New York (1966)
- 2) 根井外喜男(編), 低温生物学概説, 東大出版会, 東京(1971)
- 3) 根井外喜男, 生体の科学, **26**, 239(1975)
- 4) T. Nei, *Cryobiology* **13**, 278 (1976)
- 5) J. E. Lovelock, *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 414 (1953)
- 6) J. E. Lovelock, *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 28 (1953)
- 7) M. Blackman, N. D. Lisgarten, *Adv. Phys.* **7**, 189 (1958)
- 8) B. Luyet, "Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms" p. 1, Inst. Low Temp. Sci. Sapporo (1966)
- 9) B. Luyet, G. Rapatz, *Biodynamica* **8**, 1 (1958)
- 10) R.I.N. Greaves, "Biological Applications of

- Freezing and Drying” (R.J.C. Harris, ed.) p. 87, Academic Press, New York (1954)
- 11) R.I.N. Creaves, *Fed. Proc.* **24**, S-253 (1965)
  - 12) L. Rey, *Ann. New York Acad. Sci.* **85**, 503 (1960)
  - 13) L. Rey, “Recent Researches in Freezing and Drying” p. 40, Blackwell Sci. Publ, Oxford (1960)
  - 14) D. H. Rasmussen, A. P. MacKenzie, *J. Phys. Chem.* **75**, 967 (1971)
  - 15) T. H. Wood, A. M. Rosenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 78 (1957)
  - 16) 僧都 博, 根井外喜男, 尾藤方通, *低温科学*, B **19**, 49(1961)
  - 17) A. P. MacKenzie, “The Frozen Cell” (G.E.W. Woilstenholme & O’Connor, ed.) p. 89, J.&A. Churchill, London (1970)
  - 18) K. Gonda, T. Ohtomo, S. Koga, *Proc. Annex. Bull. Intern. Inst. Refrigeration*, p. 19 (1973)
  - 19) T. Nei, *Cryobiology*, **13**, 287 (1976)
  - 20) 凍結乾燥の基礎と応用, *冷凍*, **48**, No.550(1975)
  - 21) A. P. MacKenzie, *Scanning Electron Microscopy/1972*, p. 273, IIT Research Inst. Chicago (1972)
  - 22) T. Nei, *Recent Progress in Electron Microscopy of Cells and Tissues*. p. 213, Igaku Shoin, Tokyo (1976)

### 第5回 ICTA Proceedings

昨年8月京都で開催された第5回国際熱分析会議のプロシーディングの在庫が少々ありますので、ご希望の方は早目に下記あてお申込み下さい。

#### THERMAL ANALYSIS

(Proceedings of the Fifth International Conference on Thermal Analysis)

1部 8,000円

申込先 三洋出版貿易株式会社

東京都中央区日本橋茅場町1-5-10 電話 03-669-3761