

生物の急速冷却による保存

Preservation of Active Life by Quick Cooling

高野 光 男*

Mitsuo Takano

1. 生物の保存と低温

地球環境は現在急速に変化しつつあり、失われゆく生物種も多いと言われる。一つの生物種の人類にとっての有用性は現時点では評価出来ないから、地球上のすべての生物種が人類の貴重な財産であり、遺伝子資源として保存されなくてはならない。

一方多く生物およびその由来物質が近年生産や近代医療のシステムに利用されるようになって来た。ここでは古典的な農業の場合と異なり、要求される場所と時間に期待される活性をもった形（生きた細胞、組織または器官）で保存され、供給される必要がある。

生きた生物は本来熱力学的に非平衡状態にあるから、これを任意の時点で時間から開放して保存することは容易でない。勿論生物の中には休眠型の細胞（種子や孢子）を自らのプログラムでつくり逆境に堪えるものもあるが、保存に利用出来る場合は少ない。

生物を可逆的に休止させる方法としては、生物の活性を止める -100°C 以下への冷却と乾燥以外にない。乾燥法として最も生物に穏和と考えられて凍結乾燥が微生物保存法として用いられてきたが、活性保存法としては与える損傷が大きすぎ、一方遺伝子資源保存の目的にもDNAに障害を与える可能性があり低温保存に比べ不適当と思われる^{1, 2, 3)}。

低温保存の問題点は凍結である。経験的に細胞内に凍結が起こればその細胞は致命的な損傷をうけることが知られてきた。ただし、Rall⁴⁾は急速冷却による細胞内凍結は細胞死に必ずしもつながらず、その後の融解過程における再結晶化が致命的であるとしている。

細胞外凍結では細胞は高い浸透圧にさらされ、溶質の濃縮がおり、さらに共晶が形成されれば死細胞となる。細胞内及び外何れの凍結も未凍結部分の浸透圧

を変化させることにより生物に大きな障害を与える。

そこで凍結の起こらない低温保存法として、過冷却保存およびガラス状態保存が注目されてきた。凍結保存が平衡状態に近い保存であるのに対し、これらは非平衡および準平衡状態の保存といえる。

2. 過冷却状態での保存

水溶液を冷却するとき融点 (T_f , 熱力学的に平衡な凝固点) に至っても通常は凍結は見られず、過冷却液となる。過冷却液は最低一つの氷核がない限り水とならない。溶液中の水分子は熱的ゆらぎにより集散を繰り返してクラスターを形成しているが、低温になるにつれこのクラスターが大きくなり、臨界サイズをこえて有効氷核となる確率が增大して凍結しやすくなり、純水では -40°C でその確率が1となって必ず凍結する。この温度は均質氷核形成温度 (T_h) と言われ、過冷却できる最低温度となる。きれいな水を油の中に分散させてエマルジョンをつくり、これを一定速度で冷却して走査型示差熱量計 (DSC) で潜熱を測定すると殆どの水滴が -40°C 付近で凍結することが確かめられた⁵⁾。

T_h まで過冷却させることは一般にバルクの水では困難で、微小な固相があればそれが不均質氷核となって凍結する。生物は細胞表面あるいは細胞間に氷核活性の構成成分を持つものが多い。これは前述のように細胞外に凍結を促して過度の過冷却による致命的な細胞内凍結を防止する意味がある。Pseudomonas属、Erwinia属の細菌に氷核活性の高いものが報告されて最近注目されている^{6, 7, 8)}。植物表面の水滴は -10°C ぐらいまで過冷却するが、この細菌がいると -2°C ぐらいで凍結するので霜害をもたらす菌として対策が立てられるようになった。この細菌の氷核活性物質は特定の遺伝子によって作られるタンパク質であることからその構造も明らかにされ、氷の構造との関連や利用法などが研究されている。

*大阪大学工学部 醱酵工学科教授
〒565 吹田市山田丘2-1

水溶液の T_h は束一的に溶質濃度の増加と共に低下する。Franks⁹⁾によれば $\Delta T_h = 2 \Delta T_f$ の関係があると言う。例えば、glycerol溶液では40%で $T_h = -70^\circ\text{C}$ となる。Rasmussenら⁵⁾は酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) けん濁液にpolyethyleneglycolを加え、これを7倍量のベニバナ油中に直径 $10\mu\text{m}$ の水滴で分散するエマルジョンとした。このときの T_h は -38°C であった。これを $-33^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ で保存すると、酵母は一分子反動的に死滅したが、低温ほど死滅速度常数は大となり明らかにアレニウス則とは異なった。この死滅速度の温度依存性は氷核形成速度によっていることが明かにされた。過冷却状態は低温ほど不安定で、細胞内凍結を誘導し生物にとって致命的となる。Mathiasら¹⁰⁾はエマルジョン安定剤としてワックスを鉱物油に加えることにより保存性が改良され、例えば酵母を -20°C で16週間保存し94%以上の生残率であったと報告している。しかし、植物茎頂組織では2日間しか保存できない¹¹⁾など、過冷却保存は実用性がある保存法とは考え難い。

3. ガラス化 (ビトリフィケーション)

水溶液がもし凍結することなく冷却できるとすれば、溶液は収縮率一定で収縮し粘度が増大する。やがてガラス転移温度、 T_g に至ると収縮率が極端に減少し、分子の並進運動は殆ど止まる。バルクの水の分子間拡散時間(隣接分子までの移動時間)、 τ は常温では 10^{-12}s のオーダーにあるが、 T_g 以下では 10^6s (1日)のオーダーとなる。これをガラス状態と言い、ガラス状態にすることをガラス化(ビトリフィケーション, vitrificationまたは透化)と称している。通常ガラス状態は粘度が 10^{15}Nsm^{-2} (10^{14} ポイズ)以上の状態として表される。ガラス転移温度で熱容量、膨張率、屈折率が大きく変化するのでこれを利用して T_g が測定されている。

過冷却液体の粘性の温度変化は次のFulcherの式で示される¹²⁾。

$$\eta = A \exp [B / (T - T_0)] \quad \dots\dots\dots(1)$$

ここで A , B , T_0 は物質によって決まる定数である。シリカの場合 $T_0 = 0$ で、 η はアレニウス則で変化するが、 $B \gg T$ であって容易にガラス化出来る。水や凍害防止剤を含む溶液は、 B はそれほど大でないが、 T が T_0 に近付くと狭い温度域で急に粘度が増大してガラス化する。水の T_0 は228K付近と考えられている。水の T_g は136K付近とみられる。ガラス化に有効な凍

害保護物質の溶液では T_g が173K以上となる。

Riehleはガラスを結晶サイズが10nm以下の微結晶にある状態と定義している¹³⁾。ポリマーの高濃度水溶液からえられるガラスの微細構造はnmサイズの微小球がぎっしり詰まった形に観察されている。この微小球は水和ポリマーが会合して界面自由エネルギーを最小にしたものと見られる。このような微結晶状態は厳密にはガラス状態と異なるのであろうが実用上はガラス状態とみてさしつかえないであろう。

4. 急速冷却によるガラス化

ガラス転移点、 T_g 以下まで凍結なしに冷却しガラス化するには二種類の方法がある。一つは氷核の形成と氷晶成長の時間的余裕を与えないほど急速に冷却する方法であり、他は均質氷核形成温度、 T_h が T_g 以下となるような溶液を、凍害防止剤(ガラス化助剤)を加えてつくりこれを冷却する方法である。

温度 T (K)における凍結のおこる速さは、次の各式¹²⁾で示される氷核生成速度 J ($\text{m}^{-3}\text{s}^{-1}$)と結晶成長速度 u (ms^{-1})の二つの因子が関係する。

$$J = (1/v) (dn^*/dt) \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$= A \eta^{-1} \exp \{B [\theta^3 (\Delta \theta)^2]^{-1}\} \quad \dots\dots\dots(3)$$

ただし、

$$\theta = T/T_f; \Delta \theta = (T_f - T)/T_f \quad \dots\dots\dots(4)$$

ここで、 v , 連続液相の体積(m^3); n^* , 有効氷核数; T_f , 融点(K); A および B , 溶液の常数。

また、

$$u = P(1+Q)^{-1} \Delta \theta \eta^{-1} \quad \dots\dots\dots(5)$$

ここで、 P , 結晶構造に関わる常数, Q , 物質の熱的性質を示す常数。

Franksらの計算¹²⁾によれば、 v が 10^{-12}m^3 以下(直径 $30\mu\text{m}$ 以下)の水滴で、 T_g に至る冷却速度が 10^6Ks^{-1} 以上であれば

$$n^* = v \int_0^\infty J dt < 1 \quad \dots\dots\dots(6)$$

となって核生成の時間的余裕なくガラス化できることになる。凍害防止剤を含まない粘度の低い液体は u が J にくらべ充分速いので、一つの核が生成すれば凍結してしまう。しかし、粘度が 0.1Nsm^{-2} 以上あれば $Q < 1$ となり、結晶-液界面での分子移動が結晶成長を律速し、冷却過程で 10^9m^{-3} の核が存在しても 0.1Ks^{-1} の冷却でガラス化ができる。glycerolなど後述の高濃度凍害防止剤添加によるガラス化がこれにあたる。

前述のような速い冷却速度は事実上は測定困難であ

り、もしガラス状態が水から得られれば 10^6Ks^{-1} 以上であったろうと推定する外ない。ガラス状態が存在したかの判定は、これを昇温してデビトリフィケーション(脱ガラス化または失透, devitrification)させ、その際立方晶水(I_c)ができたことをX線回折、電子線回折、電子顕微鏡あるいはDSCで検出する。立方晶水はガラス状態からのみ得られ、通常の水である六方晶水(I_h)からは直接生じない。ガラス化の実用上の利用、例えば生物の低温保存や、電子顕微鏡の試料作成などの目的のためには、10nm以下の微結晶の存在は問題にならない。この場合、DSCによるガラス転移、デビトリフィケーションの測定¹⁴⁾、パルスNMRによる束縛の緩い水の定量的測定¹⁵⁾が、ガラス化の程度についての情報を与えてくれるであろう。

表1 各種冷媒による冷却速度の比較. 熱電対(直径 $70 \mu\text{m}$)を用い273Kから173Kまでの冷却速度を測定²⁷⁾

冷媒	温度 (K)	冷却速度 (10^3K/s)
Freon 22	118	66
Freon 12	121	47
Freon 13	88	78
Freon 22+12 (4 : 1)	110	64
Freon 22+13 (3 : 1)	110	64
Propane	83	98
Isopentane	113	45
Propane + Isopentane + Methylcyclohexane (20:5:1)	82	96
Nitrogen, liquid	77	16
Nitrogen, solid/liquid slush	66	21

5. 急速冷却法と電子顕微鏡への応用

電子顕微鏡の試料は真空下で観察出来るように脱水固定されるので、生の生物試料を観察することは不可能であった。Adrianら(1984)¹⁶⁾はビールスの水けん濁液を200~600メッシュの銅製グリットにのせ、過剰の水を濾紙で吸いとり液体エタンまたは液体プロパンで急冷して試料をつくり、生に近いビールスの形を電子顕微鏡で見ること成功した。この時、水は300nmの厚さの膜を作っており、ガラス化に充分の冷却速度であったと思われる、視野に微結晶は全く観察されていなかった。

このように低温電子顕微鏡の技術として急速冷却がいろいろ試みられている¹⁷⁾。最も簡単には上記のよう

に冷媒中に試料をくぐり抜けさせる方法である。表1は熱電対を各種冷媒中をくぐり抜けさせたときの冷却速度を比較した例である。ここで用いた熱電対の熱容量は直径約 $30 \mu\text{m}$ の水滴に相当する。液体プロパンでは直径約 $10 \sim 20 \mu\text{m}$ の水滴であれば 10^6Ks^{-1} の冷却速度が得られることになる。前述のAdrianらは液体窒素ではうまくいかず、液体プロパンでガラス化出来たと云っている。

試料サイズを少なくして冷却速度を大きくするため、前述の薄膜凍結(thin layer freezing)^{17,18)}の例の外、噴霧凍結(spray freezing)も試みられている。これでは細胞けん濁液をノズルから冷媒中に吹きだして良好な写真が得られている^{19,20)}。

組織切片の試料には、冷媒体と試料の接触をよくするため冷媒体に研磨した金属表面を使用しそこに試料を勢いよく張り付ける急冷方法(slam freezing)が用いられた^{21,22)}。この方法は直前(ミリ秒前)まで生理的活性であった組織を試料に出来る利点があるが、衝撃で構造が壊れることもある。

これを防ぐため試料の上に冷媒(プロパン)を吹き付ける急冷方法(jet freezing)が用いられた^{23,24,25)}。この方法は冷却速度の再現性が乏しいきらいがあるので、現在では組織片よりは超薄切片試料(細胞膜標本や細胞単分子膜など)に用いられている²⁶⁾。

試料を急速に冷媒中を泳がせる急冷法(plunge freezing)は簡単に広範囲の試料に適用できる^{27,28)}。

これらの急速冷却法は何れを用いても冷媒接触界面から $20 \mu\text{m}$ だけしかガラス状態または微結晶状態が得られない。それ以上の部分では冷却速度がおそく大きな水晶体ができてしまう。

高圧下では凍害防止剤の添加の場合のように T_h を低くして氷核生成を抑えるので高圧冷却の利用により氷晶の成長を防止することが出来る²⁹⁾。

6. 凍害防止剤の添加によるガラス化

昔から生物試料の凍結にはglycerin, dimethyl sulfoxide (Me_2SO)のような物質が凍害保護剤として使用されてきた³⁰⁾。これらの物質を加えてゆっくり冷却したときの凍結(平衡凍結)では、未凍結部分で溶質がある程度濃縮すると粘度が限界まで上昇して凍結できない溶液となる。結果として氷晶の割合が少なくなり、浸透圧があまり高くないので凍害が少なくなる。

即ち、glycerol溶液の平衡凍結では温度の低下と

共に氷晶が増大して未凍部分のglycerol濃度が増し、68v/v%に至るともはや氷晶が出来なくなり、冷却するとガラス状態となる³¹⁾。このグリセリン濃度のことを非凍結濃度 (C_0) と称している。さらに、急速に約20°C/minで冷却するときガラス化する(氷晶を作らない)最低濃度をガラス化濃度 (C_g) と言う。当然ながら、 $C_g < C_0$ である。

凍害防止剤濃度を増大させると、 T_f の低下とともに均質氷核生成温度 T_h も低下する(前述のように、 $\Delta T_h = 2 \Delta T_f$)。これと共にガラス転移温度 T_g は増大するからやがて $T_g < T_h$ となる。この濃度域では溶液は凍結することなく冷却によりガラス化できる。この最小濃度が C_g となる³¹⁾。

表2 凍害保護剤のガラス化濃度 (C_g)
(Fahy³²⁾による)

凍害保護剤	C_g (モル)
Formamide HCO-NH ₂	ガラス化せず
Acetamide H ₃ C-CO-NH ₂	22.7
Methylformamide HCO-NH-CH ₃	21.4
N-Methylacetamide H ₃ C-CO-NH-CH ₃	12.6
Ethylene Glycol HO-CH ₂ -CH ₂ -OH	18.2
Propylene Glycol HO-CH ₂ -CH ₂ (OH)-CH ₃	10.4
2,3 Butanediol H ₃ C-CH(OH)-CH(OH)-CH ₃	9.9
Propylene Glycol HO-CH ₂ -CH(OH)-CH ₃	10.4
1,3 Propanediol HO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	17.3
Glycerol HO-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ -OH	15.2

各溶液 (3.2% glucoseを含む) を-20°Cに置いてから-20°C/minで-135°Cまで冷却し氷晶が認められなかった最低濃度を C_g に示した。

表2に各種凍害防止剤(ガラス化剤)の C_g をモル濃度で示した(Fahy³²⁾による)。Formamideはガラス化剤として効果を示さないが、メチル基を一つ導入したacetamideおよびmethyl formamideでは弱いガラス化能を示し C_g =約22Mとなる。メチル基を二つ導入したN-methyl formamideではガラス化能が増大して C_g が半分となった。ポリオール化合物もメチル基の導入でガラス化能が増大することは、ethylene glycol, 1,3propanediolおよびglycerolに対し、propylene glycol, 2,3butanediolおよび1,2,3butanetriolが高いガラス化能を示すことでわかる。

メチル基の導入がガラス化を促す理由については次のようにFahyは説明している³²⁾。疎水基が水に入ることにより、その周囲の水分子は互いに水素結合を強めて、籠型構造をとりエントロピーが減少する。このように拘束された水は氷核生成や結晶成長が妨げられるであろう。またメチル基の高い電子密度の効果をうけてアミノ基のHの+チャージおよびカルボニル基の

Oの-チャージが強くなり、ここに配向する水分子が安定化し、あるいはこの分子が氷晶の成長部位に結合しやすくなって凍結を妨げるのであろう。Dimethyl sulfoxideの強いガラス化能も二つのメチル基に負うものと思われる。

ガラス化剤を C_g 以上の高濃度添加すると、生物細胞に対して強い害作用が一般に見られる。これは高い浸透圧によるものだけではないことは、たとえば、同じ浸透圧を示す糖では害作用が見られない事からわかる。表2に示した物質は何れも界面活性作用があり、タンパク質や膜組織の構造を乱して害作用を示すものと思われる。このような毒性を少なくするため二種以上のガラス化剤を組合せて使用されている。例えば、dime-thyl sulfoxideの毒性はformaldehydeを同時添加することで“中和”されてその毒性は弱くなる³³⁾。この理由は明かでない。

7. 部分ガラス化 (partial vitrification)

上記のように全試料のガラス化のためには、超高速の冷却速度か高濃度の凍害保護物質の添加が要求される。前者は電子顕微鏡用の超薄切片のような極微試料に対してしか適用できない。また、後者は添加物質の害作用を考慮しなくてはならない。

ところで、液固間でほぼ平衡が保たれつつ冷却されるような緩まんな凍結では、氷と平衡にある未凍結溶液の溶質濃度は凍結前の初濃度に關係なく温度のみの関数である。そこで添加初濃度が小であっても、-40°Cまで緩まんな凍結したあとの未凍結部分ではガラス化濃度が得られる場合がある。この場合、高濃度の凍害防止剤によって受ける障害が低温では軽微であるとすれば、これから急冷して得られるガラス化は少ない障害で得られることになる。

Farrant³⁴⁾は血液の凍結保存に2ステップ凍結が有効であることを提案した。その方法はまず-20~-40°Cの気相中に試料を置いてゆっくり平衡凍結させ、ついで液体窒素中にいれて急速に-150°C以下に冷却保存するものである。細胞内とその周辺は-40°Cまでの平衡凍結によってガラス化濃度まで濃縮され、これを急冷することにより、血球部分がガラス化する。今日この方法はプログラムフリーザーを使って一般的な凍結法として広範囲の生物種の保存に利用されている。

Sakai³⁵⁾はこれより先、植物のかたい外皮組織を-20°Cまたは-40°Cにまで緩まんな冷却し(予備冷却)、次いで液体窒素で急冷することにより液体窒素保存が

可能であることを報告した。即ち、予備冷却により細胞または組織内の溶質をガラス化濃度まで濃縮していると思われる。Sakaiらはこの方法を茎頂組織にも適用し、10% dimethyl sulfoxideを添加したカーネーションやイチゴの茎頂組織を-70°Cで保存することに成功している。

Mazurら³⁶⁾は前述のように凍結後の生残率を最大にする最適冷却速度があり、これは細胞のサイズ、水の透過性および凍害保護剤の種類と添加濃度で決まることを示したが、これは細胞内およびその周囲のガラス化量を最大にする凍結速度とみることもできる。

8. 融解とデビトリフィケーション

保存目的のガラス状態の試料は使用にあたり昇温、融解しなくてはならない。ガラス転移温度 T_g 以上に昇温すると、急速な水の結晶化がおこり、これをデビトリフィケーション(脱ガラス化, devitrification)と呼んでいる。このとき鋭い発熱ピークがDSCで観察され、そのときのデビトリフィケーション温度 T_d も容易に測定できる。昇温速度一定例えば5°C/minで測定すればガラス化していた量を計算することも出来る。

T_d または $T_i - T_d$ は昇温速度 v (°C/min)の関数でBoutronら^{37, 38, 39, 40)}によれば

$$T_i - T_d = A \ln v + B \dots\dots\dots(7)$$

の関係がある。ただし、 A および B は物質の種類とその濃度で定まる常数。

Boutronらは、 $T_i - T_d = 0$ とする v を臨界昇温速度 v_{CR} とし、 v_{CR} が小であるほどガラス状態が安定であることを示している。典型的な凍害防止剤についての v_{CR} はBoutronらにより表3に示されている。

これから1,2propandiolの v_{CR} はdimethyl sulfoxide (Me₂SO) やglycerolにくらべ小さく、安定なガラス化助剤と言うことが出来る⁴⁰⁾。

表3 ガラス状態凍害防止剤の臨界昇温速度 (v_{CR} , °C/min) (Boutronら³⁹⁾による)

Water (w/w%)	1,2 Propane -diol	1,2 Butane -diol	1,3 Butane -diol	Me ₂ SO
55	260	475	920	1.7×10 ⁴
65	7.5×10 ⁸	10 ¹⁰	2.7×10 ¹²	—
Water (w/w%)	Ethylene glycol	Glycerol	1,3 Propane -diol	1,2,3 Butane triol
55	1.2×10 ⁶	2.2×10 ¹³	4.5×10 ¹³	4.5×10 ¹³

うすい濃度のガラス状態の v_{CR} は10⁶Ks⁻¹以上となるから、もし大容量試料のガラス状態を得ることに成功したとしても、これを凍結の危険なしに昇温融解することは容易でない。この目的のためには高周波加熱が有望である。一般に高周波加熱は水の融解には極めて不適当であるが、ガラス状態の水は透電係数が液体の水と殆ど同じであり急速で均一な加温が可能となる。Karow⁴¹⁾はガラス状態に保存した動物組織を均一に昇温融解するための高周波加熱装置を試作している。

9. まとめ

生物の低温保存においては凍結が与える障害が問題となる。凍結のない低温保存としては過冷却保存とガラス化保存が考えられる。過冷却状態は水/油のエマルジョンを安定につくる技術が肝要であるが、一般に長期間の保存は難しい。ガラス状態は水晶形成がエネルギーバリアーとなりうるガラス転移温度以下にまで冷却できれば、準安定状態として保存に利用できる。

通常の生理的浸透圧をもつ溶液のガラス化は10⁶Ks⁻¹以上の冷却速度が必要で、微小液滴か超薄切片にしか適用できない。冷媒体接触表面から20μm以内がガラス化できる範囲とみられる。これらの冷却技術は電子顕微鏡の無固定試料作成技術として開発された。

凍害防止剤を、5~20°C/minでの冷却で凍結しない濃度、ガラス化濃度となるように添加してガラス化する方法は、ガラス化助剤の高濃度における生物に対する毒性が問題となる。これに対しては種々の物質を組合せ添加する処方箋が工夫されている。

この技術の行く先には生きた臓器あるいは生体の保存がある。これは近代医療に著しく貢献するであろうが場合によっては好ましくない方向もある。生命から時間の枠を外す魅力にとりつかれる恐れである。現に米国には死体やその脳を液体窒素保存する企業があると聞いている。将来自分の脳が見知らぬ肉体に入ること考えるとぞっとする思いである。

文 献

- 1) Takano, M. et al. : DNA damage in *Salmonella typhimurium* by a combination of freezing and nutrition. *International Institute of Refrigeration*. Paris, C-1, 61-70 (1973).
- 2) Asada, S. et al. : Deoxyribonucleic acid strand breaks during drying of *Escherichia coli* on a hydrophobic filter membrane. *App. Environ. Microbiol.* 37, 266-273 (1979)
- 3) Asada, S. et al. : Mutation induced by drying of *Escheri-*

- chia coli on a hydrophobic filter membrane. *App. Environ. Microbiol.* **40**, 274-281 (1980).
- 4) Rall, W.F. : Innocuous biological freezing during warming. *Nature* **286**, 511 (1980).
 - 5) Rasmussen, D.H. et al. : Supercooling and nucleation of ice in single cells. *Cryobiology* **12**, 328-339 (1975).
 - 6) Kozloff, L.M. et al. : Ice nucleating activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* **153**, 222-231 (1983).
 - 7) Warren G. : Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Research*. **14**, 8047-8060 (1986).
 - 8) Obata, H. et al. : Identification of an ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties. *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 143-147 (1989).
 - 9) Franks, F. : The nucleation of ice in undercooled aqueous solutions. *Cryo-Letters*, **2**, 27-31 (1981)
 - 10) Mathias S.F. et al. : Preservation of viable cells in the undercooled state. *Cryobiology* **22**, 537-546 (1985).
 - 11) Marcellon, H. et al. : Supercooling and heterogeneous nucleation of freezing in tissues of tender plants. *Cryobiology* **16**, 74-77 (1979).
 - 12) Franks, F. : "Biophysics and Biochemistry at Low Temperature" Cambridge Univ. Press (1985).
村勢, 片桐訳「低温の生物物理と生化学」北大図書 (1989).
 - 13) Riehle, U. : The vitrification of dilute aqueous solution, Ph. D. Thesis, Federal Technical Univ., Switzerland (1968).
 - 14) 高野光男他 : グリセリン水溶液の失透熱からみた高分子凍害防止剤の効果凍結及び乾燥研究会誌 **34**, 74-77 (1988).
 - 15) Wasylyk, J.M. et al. : Partial glass formation : A novel mechanism of insect cryoprotection. *Cryobiology* **25**, 451-458 (1988).
 - 16) Adrian, M. et al. : Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* **308**, 32-36 (1984)
 - 17) Skaer, H. le B. : Low temperature and biological electron microscopy. In 'The effect of low temperature on biological systems.' Ed. by Grout, B.W.W. et al., Edward Arnold, London (1987) p.176-233
 - 18) Bachmann, L. et al. : Improved cryofixation applicable to freeze etching. *Pro. Nat. Acad. Sci.* **68**, 2149-2152 (1971).
 - 19) Plattner, H. et al. : Freeze-etching of cells without cryoprotectants. *J. Cell Biol.* **53**, 116-126 (1972).
 - 20) Heuser, J.E. et al. : Organization of acetylcholine receptors in quick frozen, deep etched and rotary replicated Torpedo postsynaptic membrane. *J. Cell Biol.* **82**, 150-173 (1979).
 - 21) Pinto, S. et al. : Quick freezing vs. chemical fixation. *Cell Biol Intern. Rep.* **4**, 625-640 (1980).
 - 22) Espevik, T. et al. : In situ liquid propane jet freezing and freeze-etching of monolayer cell cultures. *J. Microscopy* **123**, 105-110 (1981).
 - 23) Pscheid, P. et al. : Cryofixation of monolayer cell cultures for freeze-fracturing without chemical pre-treatments. *J. Microscopy* **121**, 149-167 (1981)
 - 24) Knoll, G. et al. : A simple sandwich-cryogen-jet procedure with high cooling rates for cryofixation of biological materials in the native state *Protoplasma* **111**, 161-176 (1982).
 - 25) Swales, L.S. et al. : Insect intercellular junctions : rapid freezing by jet propane. *J. Cell Sci.* **62**, 223-236 (1983).
 - 26) Hnadley, D.A. et al. The design and use of a simple device for rapid quench-freezing biological samples. *J. Microscopy* **121**, 273-283 (1981).
 - 27) Costello, M.J. et al. : The direct measurement of temperature changes within freeze-fracture specimens during rapid quenching in liquid coolants. *J. Microscopy* **112**, 17-37 (1978).
 - 28) Severs, N.J. et al. : Rapid freezing of un-pretreated tissues for freeze-fracture electron microscopy. *Biologie Cellulaire* **47**, 193-204 (1983).
 - 29) Moor, H. et al. : The influence of high pressure freezing on mammalian nerv tissue. *Cell Tissue Research* **209**, 201-216 (1980).
 - 30) 根井外喜男編「凍結・乾燥と保護物質」東大出版会 (1971). 根井外喜男編「微生物の保存法」東大出版会 (1977). 酒井 昭編「凍結保存」朝倉書店 (1987).
 - 31) Fahy, G.M. et al. : Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* **21**, 407-426 (1984).
 - 32) Fahy, G.M. et al. : Some emerging principles underlying the physical properties, biological action, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* **24**, 196-213 (1987).
 - 33) Fahy, G.M. et al. : Cryoprotectant toxicity : Biochemical or osmotic ? *Cryo-Lett.* **5**, 287-294 (1984).
 - 34) Farrant, J. et al. : Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* **14**, 273-286 (1977).
 - 35) Sakai, A. : Survival of the twig of woody plants at -196°C . *Nature* **185**, 393-394 (1960) .
 - 36) Mazur, P. : Cryobiology : the freezing of biological systems. *Science* **168**, 939-949 (1970).
 - 37) Boutron, P. et al. : Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solution of linear polyalcohols with four carbons. *Cryobiology* **23**, 453-469 (1986).
 - 38) Boutron, P. et al. : Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-dimethylsulfoxide. *Cryobiology* **15**, 93-108 (1978).
 - 39) Boutron, P. et al. : Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethylene glycol. *Cryobiology* **16**, 83-89 (1979).
 - 40) Boutron, P. et al. : Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol. *Cryobiology* **16**, 557-568 (1979).
 - 41) Karow, A.M. et al. : Electronic techniques for controlling thawing of major organs. *Cryobiology* **21**, 403-406 (1984).