

低温に関する研究(第1報)

凍結の蛙筋に及ぼす影響

岡山医科大学生理学教室(主任 故 生沼教授)

医学士 竹下 明夫

(昭和16年7月第20回日本生理学総会報告)

[昭和27年4月15日受稿]

第1章 緒言

生活体の寒冷が作用するとき生活組織に凍結が起つた時之が死滅するか乃至は零下どの位の温度まで生存し得るか、動物全体としての実験報告は別として生体より剔出した組織に就いてみれば蛙筋にては古くより実験された事で、既に Du Bois Raymond, Horvath 其他多数の人の実験の結果は -5°C の凍結は横紋筋を殺す。 -5°C より温ければ生き残ると言はれた。併し之等の温度は筋の周囲の温度で筋温を直接測定せざる憾がある。

Hermann は蛙筋を $1\frac{1}{2}$ ~ $3\frac{1}{4}$ 時間 -10°C に保ち、融解後15分刺戟反応を呈したと、Bunge に依れば蛙筋は $+40^{\circ}\text{C}$ より -4°C の間に興奮性を有している。

Jensen, Fischer は同筋にて熱電堆を使用し -3°C に凍らせば筋は殆ど興奮性を失ふがそれ以上の温度にての凍結は興奮性を失はぬ事を報じ Brünow は又同様の成績を出し更に生体中に残り血行存する時の凍結死滅温は -4.06°C と報ず。之等は皆 Ringer 氏液中にての実験であるが、T. Moran は縫匠筋を空气中にて24時間冷却凍結して -1.5°C と -2.0°C の間に死滅温度が存在すると云ふ。

之等の成績は要するに蛙に於ては剔出筋が凍結の際或一定温度の範囲内ならば融解後再生する事を認めている。然し元來死滅温度は此の温度を適用した時間に関係する。時間が永ければ零度に近い温度にて死滅し短ければそれより以下或温度迄生存し得る。故に上記の各実験者により異なるのは適用した時間が異

る為で24時間あり或は2~3時間あり、又1秒間程の短時間がある。余りに長時間とすれば真の臨界温度が出て来ない。余りに短時間であれば他の部分はその温度に達しない憾あり。

著者は之等の点に鑑み、蛙の縫匠筋を用ひて之を凍結し一定の温度を10分間作用せしめ興奮不能となる温度を測定した。更に種々の温度にて蛙筋の受ける傷害を攣縮高に依つて測定した。因に本実験は昭和15年冬期実施せられた。

第2章 縫匠筋に関する実験

1) 実験材料

実験は12月初旬より3月初旬に亘り行ひ冬眠中の「とのさまがへる」(*Rana nigromaculata*) の縫匠筋を用ひた。又蛙は中等大なる一定大きさのものを選んだ。

文献に現はれた諸家の実験方法は多くは腓腸筋を使用している。著者も始めは之の筋を用ひたが中途にして縫匠筋がより適當なるに気付き之に換えた。その理由は腓腸筋は横断面円く、厚きに反して縫匠筋は筋繊維の走行は平行し又薄い為外圍の状件に応じて一樣な温度にあると考へた為である。

2) 凍結実験

冷却装置としては口径10糎、容量1.2立を有する大なる魔法瓶を用ひこの中に氷、食塩、水より成る寒剤を貯ふ。此の温度は大凡一定ならしめ -12°C とす。

別に口径2糎、長さ7.5糎の試験管中に、0.6% R. 氏液を入れこの中央に縫匠筋竝に

温度測定用寒暖計を吊し置く。之を寒剤中に入れて冷却し凍結せしむ。目標とする温度に冷却された事が挿入寒暖計により分れば試験管を別に作りたる同温の寒剤中に入れて10分間恒温に保つ。而して後試験管を水道の流水中に置いて徐々に加温して融解した。かくして冷却より融解完了までの全所要時間は50分乃至60分で平均55分であつた。

3) 電気刺戟

筋の電気刺戟閾値並に攣縮高を測定する為に筋標本の両端を電導子に接し一端を固定し他端を描写槓杆につないだ。電気刺戟は Du Bois-Raymond 型の感応電流器を使用し単一感応開放電流を加へた。筋に刺戟を加へる場合には Ringer 液から筋全体を空气中に露出して刺戟を加へ各刺戟の間隔は持続的に Ringer 液中に浸した。実験順序として縫匠筋を剔出せば電気刺戟閾値と最大攣縮高を測定す。次に凍結操作を加へて融解後、室温に戻し再び刺戟閾値及び最大攣縮高を測定す。

此の際予備実験として正常縫匠筋に於て55分(凍結融解に要する時間)後にその刺戟閾値及び最大攣縮高が変化するや否やを検する必要がある。此の為に縫匠筋を Ringer 液に浸し55分間 +4°C の電気恒温器中に貯ふ。この操作の前後に於ける刺戟閾値と最大攣縮

高を比較したその結果は数例にて殆ど変化を示さなかつた。

第3章 実験成績

1) 0.6% Ringer 液中にて凍結の場合
0.6% Ringer 液中にて凍結して -1.0°C, -1.5°C, -2.0°C, -2.5°C, -3.0°C, -3.5°C, -4.0°C の温度にそれぞれ10分間置いた後其の刺戟閾値及び攣縮高を測定した。以下実験成績表中の〔比較〕とある処の欄は凍結後の最大攣縮高の凍結前に対する比で百分率を以て表はした。又刺戟閾値は弱刺戟から段々強めた時初めて攣縮を起した時の〔一次コイル〕と〔二次コイル〕の距離を以て示している。

第1表上段に示す如く攣縮高は -1.0°C 及 -1.5°C に凍結の場合は其の大なる低下を示さず、それぞれ平均 91%, 82% に減少する位だが、-2.0°C に凍結の際は平均 57% に減じ又電気刺戟に対する興奮性も之に応じて減じている。-2.5°C 凍結の場合は更に一層攣縮高の減少を来し平均 29.6% になり、興奮性も亦著明に減少する。

-3.0°C に凍結の筋は辛うじて興奮を示す。之の場合筋標本は融解後直ちに刺戟に反応せず。新しく換へた Ringer 液に15分間浸して測定した。6例中2例は興奮を示さなかつた

第1表 蛙 縫 匠 筋

| 凍 結 液 | 凍 結 温 | 刺 戟 閾 値 (cm) | | 最 大 攣 縮 高 | | b/a × 100 | 実 験 例 |
|------------|------------------|--------------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|
| | | 凍 結 前 | 凍 結 後 | 凍 結 前 (a) | 凍 結 後 (b) | | |
| R 氏 液 | -1.0°C (10分間) | 20~27 | 18~22 | 107~183 | 96~170 | 91 | 5 |
| | -1.5°C | 19~25 | 15~19 | 128~176 | 91~161 | 82 | 5 |
| | -2.0°C | 14~25 | 10~20 | 102~224 | 38~120 | 57 | 5 |
| | -2.5°C | 14~20 | 8~13 | 63~158 | 12~39 | 30 | 5 |
| | -3.0°C | 15~23 | 4~8 | 105~204 | 0~20 | 4 | 6 |
| 葡 萄 糖 液 | 12°~14°C(3時間) | | | 140~195 | 132~178 | 93 | 4 |
| 尿 素 液(3時間) | 9°~13°C(3時間) | | | 150~200 | 105~112 | 61 | 4 |
| 葡 萄 糖 液 | -1.0°C | 20~23 | 15~20 | 150~200 | 105~142 | 66 | 4 |
| " | -2.0°C | 16~22 | 8~15 | 80~184 | 13~86 | 33 | 5 |
| " | -2.5°C | 17~24 | 5~18 | 113~200 | 0~56 | 12 | 5 |
| 尿 素 液 | -1.0°C | 14~22 | 8~19 | 135~194 | 24~83 | 27 | 4 |
| " | -1.5°C | 18~20 | 8~11 | 178~212 | 12~35 | 10 | 4 |
| " | -2.0°C | 19~21 | (-) | 178~223 | 0 | 0 | 4 |

又2例は反応をするも描写楯杆に現はれなかつた。表中 minimal とあるは之の意味である。他の2例は僅かながら反応を示した。
 -3.5°C, -4.0°C に凍結の場合は刺戟反応を示さなかつた。即ち10分間凍結の場合 -3.0°C 迄は刺戟に反応を示した。

2) 等張葡萄糖溶液, 等張尿素溶液中にて凍結の場合

1917年 W. A. Hoyer は野鼠の筋肉を等張葡萄糖溶液中にて凍結した時の死滅温度は Ringer 液中での実験成績より 1° だけ低くかつたと云ふ。著者も蛙筋にて同様の実験をなし更に等張尿素中での場合をも試みた。

予備実験として筋標本を之等の溶液中に浸して最大攣縮高の変化無きやを検する為2時間3.7%葡萄糖溶液, 1.2%尿素溶液(0.6% Ringer 液と等張)に浸し置きて後, Ringer 液に戻し約1時間置く, 完全に興奮性が回復した場合その最大攣縮高を測定して最初の価と比較した。その結果は第1表中段の如く葡萄糖溶液中にては, 平均93%尿素溶液中にては61%に攣縮高が減ず。即ち筋は之等の溶液に浸した為若干の傷害を受けたのである。此処に於て筋標本を2時間之等の等張溶液中に置き, 同液中にて筋を冷却凍結して融解後直ちに Ringer 液に戻して1時間後其興奮性及び攣縮高を検した。

此の結果は第1表中下段の如く葡萄糖溶液中に凍結の場合攣縮高は -1°C にては平均66%, -2°にては33%, -2.5°Cにては12%に減じている。刺戟閾値も温度低下するにつれて興奮性の減弱を示している。-3.0°C, -3.5°C に凍結の結果は反応を示さなかつた。

尿素溶液中での結果は第1表下段の如く -1°Cに凍結の場合27%に減じ, -2°Cの場合には反応を示さなかつた。即ち葡萄糖溶液中にて凍結の場合筋の受ける障碍は Ringer 液中に比し増加する。尿素液中では之の障碍は更に著明に増加して -2°C にて既に刺戟に応じなかつた。

第4章 心臓凍結に就いての實驗

別出心臓に就いて古くは Heübel の実験がある。蛙の心臓を結紮別出して30秒以内に「エーテル」噴霧を以て凍結し -1° ~ -3.0°C の室内に5分乃至1時間置く。融解後結紮を解きて血液を以て充せば収縮を始めたと云ふ。Cameron, Brownlee (1914) も熱電堆を以て心臓の温度を測定し -1° ~ -3.0°C に1時間乃至5時間置いて実験した結果蛙心は生体にあつても別出した場合も -2.5°C 迄は回復するも -3.0°C には死滅すと報告した。

かく生存の限界温度は大體 -2.5°C 乃至 -3.0°C とされたが、尙収縮高と凍結温度の間に何等か關係無いか判明しない為之の点に關して著者は蛙心の凍結前後の収縮高の比較実験を試みた。

1) 實驗方法

中等大の〔とのさまかえる〕の別出心臓を用いた Straüb 氏法により Ringer 液を灌流せる心臓収縮高を記せしめ、そのまゝ Ringer 液中にて一定温度に5分間凍結し融解後再び収縮高を記せしめた。冷却の方法は前方法と同様に行つた。

2) 實驗成績

心臓の冷却経過を観察するに平均0°Cに至れば収縮は停止す。而してそれは常に収縮状に止つている。凍結が融解して元の温度に戻れば2~5分後前房がかすかに律動的に収縮を始め漸次強盛となる。更に5分後には心室又収縮を開始す。凍結の収縮高に及ぼす影響は第2表の如くなる。此の実験に於て凍結操作に要した時間は平均50分であつた。尙収縮高描写時の室温並に灌流液温は凍結の前と後に於て変化は無かつた。

第2表 蛙 心 筋

| 凍結温 | 収 縮 高 | | $\frac{b}{a} \times 100$ | 実験例 |
|--------|---------|--------|--------------------------|-----|
| | 凍結前(a) | 凍結後(b) | | |
| -1.0°C | 140~252 | 50~170 | 57 | 6 |
| -2.0°C | 143~250 | 0~50 | 9 | 5 |
| -2.5°C | 125~170 | 0~9 | 1 | 5 |

即ち -1.0°C に凍結の時は平均収縮高 57% となり -2.0°C の場合著明に減じて平均の収縮高 9% となる。 -2.5°C には僅かの収縮運動が回復するも心室部は殆んど動かず心房部僅かに搏動を呈するのみである。 1例を除いて他は殆んど槓杆に収縮運動が現れなかつた。 -3.0° に凍結の時は収縮運動は再現されなかつた。 之の場合は常に収縮状態で止つて居り且筋組織は軽度の瀾濁を呈していた。

第 5 章 神経に関する実験

神経に就いての凍結実験は乏しい。 今迄 2-3 の実験によれば完全なる凍結の結果は神経は死滅すると称するもそれが何度であるかは判然せず、本実験では之の点を明かにしようとした。

蛙の坐骨神経腓腸筋標本を作つて之を試験管中に筋肉を上、神経を下になる様に吊し神経を Ringer 液に浸す。 しかして一定温度に 5 分間冷却凍結した。 此の際 5 分間としたのは神経は細い為此の時間で充分温度の影響が組織全体に及ぶと考へた為である。 融解後は凍結後の神経を電気刺戟して筋の興奮を観察した実験の結果は凍結温度 -1.0°C の場合は全例興奮性を保持し -2.0°C の場合は 4 例中 3 例は興奮性を有するが 1 例は消失した。 -2.5°C には全例に於て興奮性を示さなかつた。

第 6 章 總括竝に考按

1) 蛙の縫匠筋心臓神経組織を凍結した場合一定温度一定時間の範囲内ならば融解後生活現象を再現する。

2) 併し之等の組織は凍結によつて生活機能は障碍され凍結温度が低い程損害は大である。

3) 縫匠筋を 10 分間、心臓及神経を 5 分間凍結によつて興奮不能を来す温度を測定したのにそれぞれ -3.0°C 、 -2.5°C 、 -2.5°C である。

4) 縫匠筋を等張葡萄糖液尿素液中にて凍

結の場合 Ringer 液中で凍結の時と比べてその損害は大となり尿素液中では特に著しい。 尿素及糖は Overton に依れば緩漫ながら原形質膜を透過する。 之の爲細胞内に水分も侵入し細胞が膨張して損傷を受ける結果となる。

筋の場合之を Ringer 液に戻しても機能が低下することは対照実験にても明かである。 かくして筋が滲透圧により損傷を受けた時更に凍結が加つた為凍結温度がそれ程低下しなくても損傷が大となり興奮不能を来したのである。

これ等凍結に依る傷害及死の原因に就いては幾多の学者により論議せられている事で今日判然としない点が多く幾多の説が存在する。 多数植物学者の説いた凍結死の原因を総括してみれば

1) 細胞中に氷が生じ水の膨張により細胞壁が破れる。

2) 氷結は害無きもそれが融ける時に害を及ぼす。

3) 氷が細胞の周囲に生じて害をなす。 之に 3 個の異なる Mechanismus がある。

a) 細胞が機械的に圧迫されて破壊される。

b) 氷結が外部に生じて細胞から水を取り細胞内の水分は減じて原形質の Kolloid 物質に変化を来す。 一方又細胞の乾燥は細胞の微細な構造をも破壊する。

c) 細胞の一番抵抗の少い細胞膜を氷が破壊する。

4) 氷結が細胞の内外に生じ損傷の二重の原因を作る。

5) 直接寒冷によつて温度が急に下る時は氷結が無くても死す事あり。

之等の説の中今日最も有力且広く信じられているのは氷結により起る細胞原形質よりの脱水現象である。 之は先づ Müller Thürgau により提唱され次で Mollisch 其他の植物学者により支持された。 之の中に更に 2 つの見解がある。 その 1 つとして Lidforss, Newton は脱水に依り塩類、酸等の濃度の増加が原形

質の Kolloid に化学的変化を与ふと言ふ。Maximow は之に反し細胞内で水が分離し氷が生じ之の機械的圧迫による原形質の損傷を主張する。又 Mollisch 及び Stiles は組織凍結に際して原形質の Kolloid 中で水が氷となり分離する為分散相と分散媒の関係が破壊されて分散相の物質は凝集を来す。之は不可逆的变化であつて為に融解後は以前の生活して居た原形質の Kolloid 状態に戻らず死を来すのであると論じている。

要するに之等は水と Kolloid の共存に於ける変化である以上この関係を追及する事は極めて重要な事である。Nagell は筋肉中に存する水は2種あると云ふ。一つは吾人の通常称する組織水にて乾燥、塩類等に依り容易に脱水されるものである。他は組織と強固に結合し容易に脱水されず、組織凍結の場合も氷らないものである。後者は結合水と称され之の量的決定をなす方法として Jensen 及び Fischer は凍結の温度曲線により Rübner は凍結時の熱量的計算より T. Moran は凍結時の筋の膨張に依る容積の変化を以て各計算している。その成績は大體6%~3.9%である。之により組織凍結に際して必ず僅少なから未凍結の水が存在する事が知られる。尙又之の未凍結の水の量に就いて Rosa は〔キャベツ〕に於て、Newton は小麦の葉に於て実験し耐寒の能力が大なるもの程著明なる増加が見られる事を報じている。

凍結の際の組織の温度と氷結の量に関して Mollisch 及び J. Lloyds は温度が零度に近い場合は相当量の未凍結部が存する事を報じている。

この見地に立つて凍結を考へれば温度が氷点以下となれば淋巴液中に先ず氷が生じ随つて残る淋巴液は滲透圧が増加する。故に細胞水の水が引き出される。之の為細胞液の濃度は増加して正常時の氷点に於ける凍結を免がれる。この事は淋巴の大部分が氷結する迄行はれる。かくして細胞液の塩類、糖、其他溶解物質の濃度上昇は細胞原形質に有害となる作用を与へる事になる。更に温度が降下すれ

ば細胞内にも氷が生じ -2°C と -3°C の間にて原形質内に於ける水の分離と氷の容積増加による機械的破壊作用が回復出来ない損害を起す。 -1°C より -2°C の間に於ける凍結はこの損傷が軽度であるから凍結後機能を現はすのであると考へられる。

翻つて本実験の如く縫匠筋と心臓及末梢神経とが凍結に対する抵抗が異なる事に就いては動物全体を凍結した実験上之と同様の傾向のある事が文献に於て幾多見られる。即ち Harris は蛙の凍結に際して神経、心臓は筋より早く死滅すると云ふ、又 Weigmann, Cameron, Brownlee 等は凍結により中枢神経よりも末梢神経は殺され難いと報じ Buccinate は鶏胚の組織培養に於ては各組織により低温に対する抵抗異り皮膚、角膜は -25°C までに耐えるも他の組織は -10°C までに耐えると報じている。之等の原因に就いては各組織に於てその構造が異なる点に原因があるのであらうかそれ以上の点は未だ不明である。

又凍傷に於て組織が壞疽に陥るのも其組織内に凍結が起る為めであると云へよう。

第7章 結 論

1) 〔とのさまがへる〕の縫匠筋を10分間心臓及坐骨神経を5分間 -1°C より -4°C に至る種々の温度に凍結して融解後それぞれの機能を検したるに、之等の組織が凍結された場合その温度が氷点下或一定の温度以上であれば融解後其機能を再現する。

2) 縫匠筋にては凍結温度が -3.0°C 以下ならば凍結融解に依つて興奮不能となる。

3) 心臓は凍結温度が -2.5°C 以下の時融解後搏動を呈さない。

4) 坐骨神経は凍結温度 -2.5°C 以下で興奮伝導性を失ふ。

擧筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜はつた恩師生沼教授並に林教授に深謝し併せて実験上種々御助言を賜つた小坂助教授に感謝する。

主 要 文 献

- 1) Du Bois-Raymond zit. nach W. Hoyer(1849).
- 2) Horvath : Verhandl. phys. med. ges. zu Warzb. Bd 4, (1873).
- 3) Hermann : Pflüg. Arch. Bd.4, (1871).
- 4) Jensen u. Fischer : Zentralbl. für Physiol. Bd. 23, (1909). Zeitschrift f. allg. Physiol. Bd. 11, (1910). Biochem. Zeitschrift Bd.20, (1909).
- 5) T. Moran : Proceed. of Roy. Soc. London Vol. 105, (1930), 107, (1931).
- 6) W. Hoyer : Pflüg. Arch. Bd. 169, (1917).
- 7) Brunow : Zeitschrift f. allg. Physiolog. Bd. 13, (1912).
- 8) Henbel : Pflüg. Arch. Bd. 45, (1889).
- 9) Boycott : Journal Physiology Bd.27, (1902). Bd. 34, (1906).
- 10) Garten Sulze : Zeitschr. f. Biology Bd. 60, (1913).
- 11) E. Hering : Pflüg Arch. Bd.99, (1903).
- 12) Belehradsek : Temperature and Living Matter (1935).
- 13) Maximow : Protoplasma Bd.7, (1929).
- 14) Rubner : Über die Wasserbindung in Kolloiden mit Besond. Rücksicht d. Muskels (1922).
- 15) H. Mollisch : Untersuchungen über das Gefrieren d. Pflanzen, Jena, (1897).
- 16) Müller Thürgau : zitt nach Maximow. Belehradsek
- 17) Lidforss : Bot. Zentralblatt 68 (1898).
- 18) Newton : zit. nach Maximow (1924).
- 19) Naegell : zit. nach Rubner (1879).
- 20) Plank : zit. nach T. Moran (1925).
- 21) J. -Lloyds : zit. nach E. C. Smith. (Proc. of the Roy. Soc. Lond. Vol. 105).
- 22) Stiles : Protoplasma Bd.9 (1230).
- 23) Luigi Bucciante : Arch. f. exp. Zellforsch. Bd.11 (1931).
- 24) Rosa : zit. nach Maximow (1921).

低 温 に 関 す る 研 究 (第 2 報)

二 三 下 等 動 物 の 乾 燥 及 低 温 に 対 す る 抵 抗

• 岡山医科大学生理学教室 (主任 故 生沼教授)

医学士 竹 下 明 夫

[昭和 27 年 4 月 15 日受稿]

第 1 章 緒 言

変温動物及び植物の或種が凍結してその生命を失はない事は早くより知られた事である。

古い実験では Pictet は魚類に就いて -8° より -15° 迄には耐えると言ひ Dnmeril は蛙は -4° 乃至 -12° に耐えたと報告す。Preyer は蛙は体内温度が -2.5°C 以上であれば生き返ると言ふ。

Bachmetjaw は蝶は完全に固くなるまで凍結した後再生したと称し Bacteria に就て Pictet Macfadyen は -190° , -200° に耐え乾

燥せる種子にては -190° にても死滅せずと報ず。而して耐寒の度に於て相異があるのは種々不明の内外の条件あるも過冷却現象が最も有力な原因と思考される。即ち生体の氷点下遙か下方に体温が冷却されても凍結しない。又は体の表面は凍つて居ながら内部では過冷却の状にあるといふ事が考へられる。

Pütter は昆虫の体中で高度に起る過冷却は微細なる原形質の蜂窩組織をなせる事や空泡の存在の為に起るので原形質の絶対的の大きさが決定的の役を為す。之の点より微生物が極度の低温に耐える事が了解されると称して