

研究ノート

電場で冷凍されたドロメの解凍後の組織細胞の電子顕微鏡観察

関田諭子・奥田一雄*

要 旨

電界を印加して冷凍したドロメは解凍時に水分流出が抑制された。このような電場の効果を明らかにするため、ドロメの組織細胞の微細形態を透過型および走査型電子顕微鏡で観察した。電場の有無にかかわらず、冷凍状態の組織細胞は氷晶形成によるスポンジ状の形態を呈した。電場なしで冷凍されたドロメを解凍すると、表皮が所々で破れ、また、体内部では、筋組織以外の組織の細胞内容物が漏出し、顕著な間隙が生じた。それに対し、電場で冷凍されたドロメは、解凍後、表皮の構造は維持され、さらに体内部にある結合組織やその他の組織は密に詰まっており、体内の間隙はほとんどなかった。

キーワード：電場、冷凍、解凍、ドロメ、微細形態

生鮮食料品を一般に使われる冷凍庫で冷凍すると、解凍時にその組織中から水分が流出し、風味と食感が失われる。これは、室温から冷凍に至る過程で食品に含まれる水が氷晶を形成して体積が増加し、それにより細胞組織を破壊するためである。氷晶の成長を抑えるために、急速凍結法などの種々の冷凍技術の開発研究が進められてきた。近年、電場を利用して食品を冷凍する技術が開発されている（吉本ら 2011、高橋ら 2014）。高知県所在の有限会社サンワールド川村は、冷凍庫内で電界を印加する冷凍新システム「NICE-01」を開発した。このシステムでは、生鮮食品を、電界を印加しながら -20°C まで冷凍するが、このように冷凍保存されたものは解凍時にほとんど水分が失われないので、生鮮食品の風味や食感、色彩を保持できるメリットがあるという。

電界印加冷凍システムを使うことで、解凍時に食品からの水分流出を防止できる理由は現在まで詳細には解明されていない。水分流出が抑制される可能性の1つとして、電界の印加によって解凍時に水分の流出が起こらないような構造が細胞組織に保持または形成されることが推量された。著者らはこの推量を確かめ

るため、サンワールド川村代表取締役の川村宗利氏と高知県工業技術センターの西村一仁氏からの依頼を受け、電場で凍結されたドロメの組織細胞の形態を電子顕微鏡で観察した。

材料と方法

材料は高知県沿岸で漁獲されたドロメ（主にカタクチイワシの仔魚）を使用した。次のA-Cの状態のサンプルを用意した。A：新鮮なドロメ、B：新鮮なドロメをそのまま家庭用の冷凍庫に入れて約 -20°C に冷凍されたドロメ、C：NICE-01（有限会社サンワールド川村、高知市）を用い、電界を印加して約 -20°C に冷凍されたドロメ。

電子顕微鏡で観察する試料は以下のように作製された。

1. 凍結置換固定による冷凍組織の切片観察：BとCのそれぞれの魚体を冷凍されたまま、 -80°C に冷却した2%OsO₄を含むアセトン溶液に浸漬し、そのサンプル瓶を -80°C のフリーザー内に45時間置いた。その後、サンプル瓶を -20°C で4時間、 0°C に2.5時間の順に置いて室温まで戻し、凍結置換固定を完了した。試料はアセトンで洗浄後、Spurr樹脂に包埋し、ウルトラミクロトーム（Ultracut UCT、ライカマイクロシステムズ株式会社、東京）で超薄切片を作製した。切片は1%酢酸ウランウム水溶液とクエン酸鉛水

2015年1月29日受領；2015年2月7日受理
高知大学教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門
〒780-8520 高知市曙町二丁目5-1

*連絡責任者 e-mail address: okuda@kochi-uac.jp
本研究内容の一部は2005年3月23日の高知新聞夕刊に掲載された。

溶液で電子染色し、透過型電子顕微鏡（JEOL JEM-1010T、日本電子株式会社、東京）で観察した。

2. 化学固定による新鮮組織と解凍組織の切片観察：BとCを室温で自然解凍し、解凍後にそれらの魚体を直ちに前固定した。Aの魚体はそのまま前固定した。前固定液は3%グルタルアルデヒドを含む0.25 Mリン酸緩衝液（pH 7.4）を用い、室温で2.5時間固定した。前固定した試料は0.25 Mリン酸緩衝液で洗浄した後、1%OsO₄を含む0.25 Mリン酸緩衝液で38時間冷蔵庫内で後固定した。後固定後、試料はアセトンシリーズで脱水してSpurrの樹脂に包埋し、上記1と同様に超薄切片を作製し、染色して透過型電子顕微鏡で観察した。

3. 解凍組織の表面観察：自然解凍したBとCの魚体を上記2と同様に前固定と後固定を行った。試料の一部は、固定前に魚体中央部をカミソリで切断することで、その切断面を露出させた。固定した試料は、

エチルアルコールで脱水し、酢酸イソアミルに置換後、臨界点乾燥装置（JCPD-3、日本電子株式会社、東京）を用い、液化炭酸ガスで臨界点乾燥した。イオンスプッター装置（JFC-1500、日本電子株式会社、東京）で乾燥試料の表面を金でコーティングし、走査型電子顕微鏡（JEOL JSM-5300LV、日本電子株式会社、東京）で観察した。

結果

1. 新鮮組織の構造

化学固定されたドロメの新鮮組織では、密な筋繊維をもった典型的な筋組織（図1、2）と上皮組織（図3）が観察された。これらは正常な細胞の形および細胞小器官の構造を示した。また、体表表皮では、約100 nmの厚さの最外層とその直下のコラーゲン層が観察された（図4）。

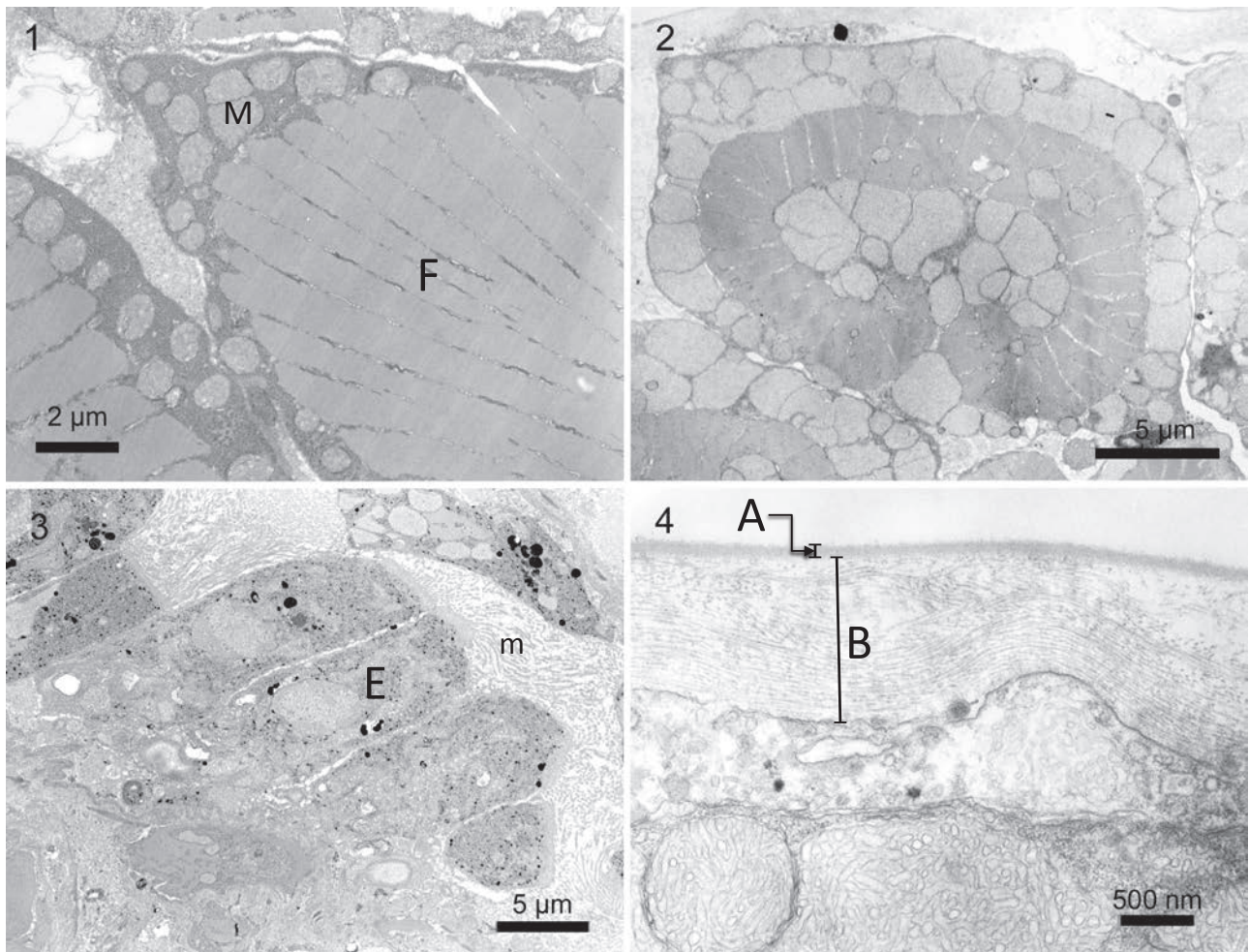


図1－4. 新鮮なドロメ組織の細胞断面。1. 多数の筋繊維（F）とミトコンドリア（M）を含む筋組織の縦断面。2. 体表部に近い筋組織の横断面。3. 上皮組織（E）と多数の微絨毛（m）。4. 一層の最外層（A）とその直下のコラーゲン繊維層（B）を示す体表皮。

2. 冷凍状態の細胞組織の構造の比較

凍結置換固定により、電場で冷凍した組織細胞（図5、6、7）と、通常の方法で冷凍した組織細胞（図8、9、10）の微細形態を比較した。

冷凍状態におけるドロメの組織では、電界印加の有無にかかわらず、いわゆる凍結傷害を受けた構造を示した。すなわち、冷凍時における脱水による細胞の顕著な収縮と細胞間の多数の氷晶の形成により、細胞組織（筋組織）はどちらもスポンジ状の構造を呈した（図5、8）。また、体表面の表皮は連続し（図6、9）、最外層とコラーゲン層（図7、10）も双方で確認できたので、冷凍状態における細胞組織の微細構造において、電場で冷凍した試料と電場なしで冷凍した試料の間の相違はほとんどなかった。

3. 解凍した細胞組織の構造の比較

電場で冷凍したドロメを解凍したとき、サンプルからの水分流出はほとんどなかった。解凍したサンプル

を化学固定し、その細胞組織を超薄切片法で観察した（図11–14）。氷晶は消失し、筋組織は再度含水して生細胞に近い構造を示した（図12）。体表付近の筋組織には筋繊維が密に観察され、体表皮が連続していることが確認された（図11）。体表皮は、最外層と直下のコラーゲン層とともに密接して構造を保持した（図13）。また、魚体の内部組織では、膜構造やマトリックスなどが細胞内に密に存在していた（図13、14）。

一方、冷凍時に電界を印加しなかったドロメは解凍後に水分の流出が認められた。解凍したサンプルを上記と同様に化学固定し、超薄切片法で観察した（図15–18）。解凍により、氷晶は消失し、筋組織は生細胞に近い形態に復帰した（図15）。しかし、体表部の構造は著しい変化が認められた。体表皮を構成する最外層とコラーゲン層が剥離していた（図16）。さらに、しばしば最外層が壊れ、その部分で最外層とコラーゲン層の間の物質が溢出した（図17）。筋組織以外の領

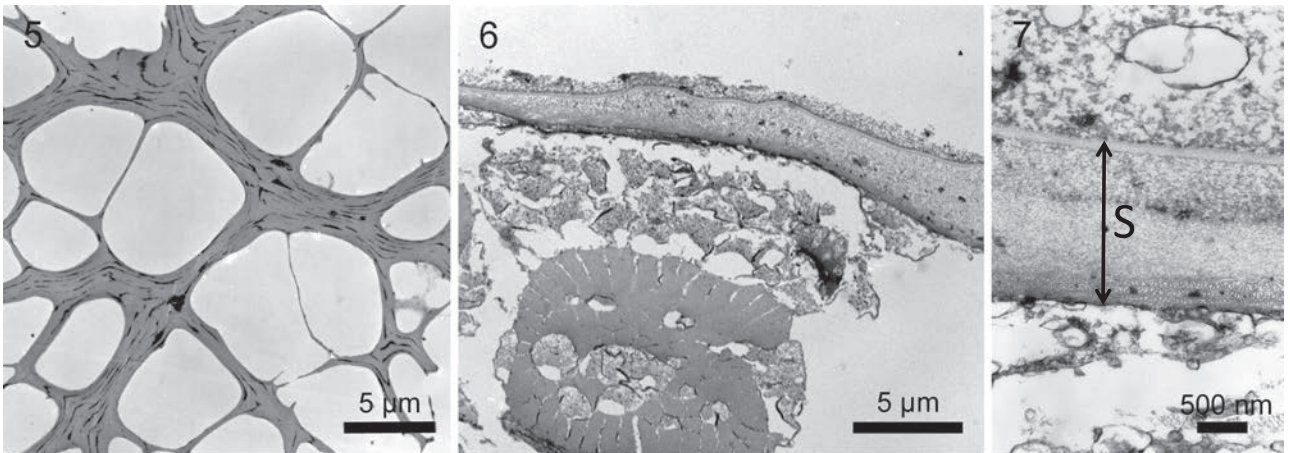


図5–7. 電場で凍結された組織の細胞断面。5. 氷晶の形成による多孔のスポンジ構造を示す筋組織。6. 体表部の断面。7. 体表皮（S）。

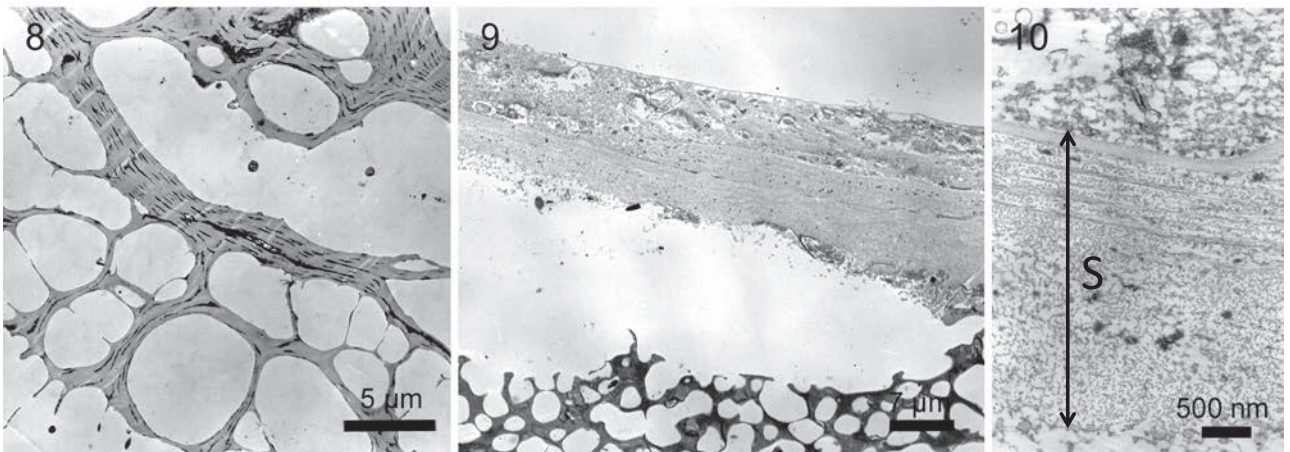


図8–10. 電場なしで凍結された組織の細胞断面。8. 氷晶の形成による多孔のスポンジ構造を示す筋組織。9. 体表部の断面。10. 体表皮（S）。

域には、おそらく魚体内部で崩壊した組織細胞から由来したと思われる細胞含有物が観察された（図18）。それらの構造は不定形に崩壊して広範囲に散在し、大量のマトリックス成分に囲まれていた。

上記の両者の構造比較を走査型電子顕微鏡を用いて行った（図19–22）。解凍試料を固定して臨界点乾燥した後、ドロメの体を輪切りにしたその断面（図19、21）およびドロメの体表面（図20、22）を観察した。輪切り像を比較すると、電場で冷凍されたドロメでは、解凍後、内部組織が密に詰まっており、組織の間に間隙がほとんどなかった（図19）。また、体全体を包む表皮は連続し、ほぼ無傷害に見えた。それに対し、電場なしで冷凍されたドロメでは、解凍後、内部組織の割断面は凹凸を呈し、組織の間には多くの間隙が顕著に見られた（図21）。また、表皮は内部組織から著しく剥離していた。体表面の構造においては、電

場で冷凍されたドロメの解凍試料では、円滑な面が連続する表皮構造を示した（図20）。最外層の内側に規則正しく配向変換するコラーゲン繊維と思われる軌跡も観察された。それに対し、電場なしで冷凍されたドロメの解凍試料の表面最外層は、著しくその構造が損傷していた（図22）。

考察

吉本ら（2011）は魚類を冷凍するときの電場の効果を調べ、氷晶形成による細胞破壊でできるアジの筋組織の空隙は、電場なしで冷凍したときよりも電場で冷凍したときの方が小さかったと報告している。また、電場は魚肉タンパク質の凍結変性を抑制する可能性もあるという（吉本ら 2011）。高橋ら（2014）によると、タコやウニを -3°C のチルド温度で電界を印加し、

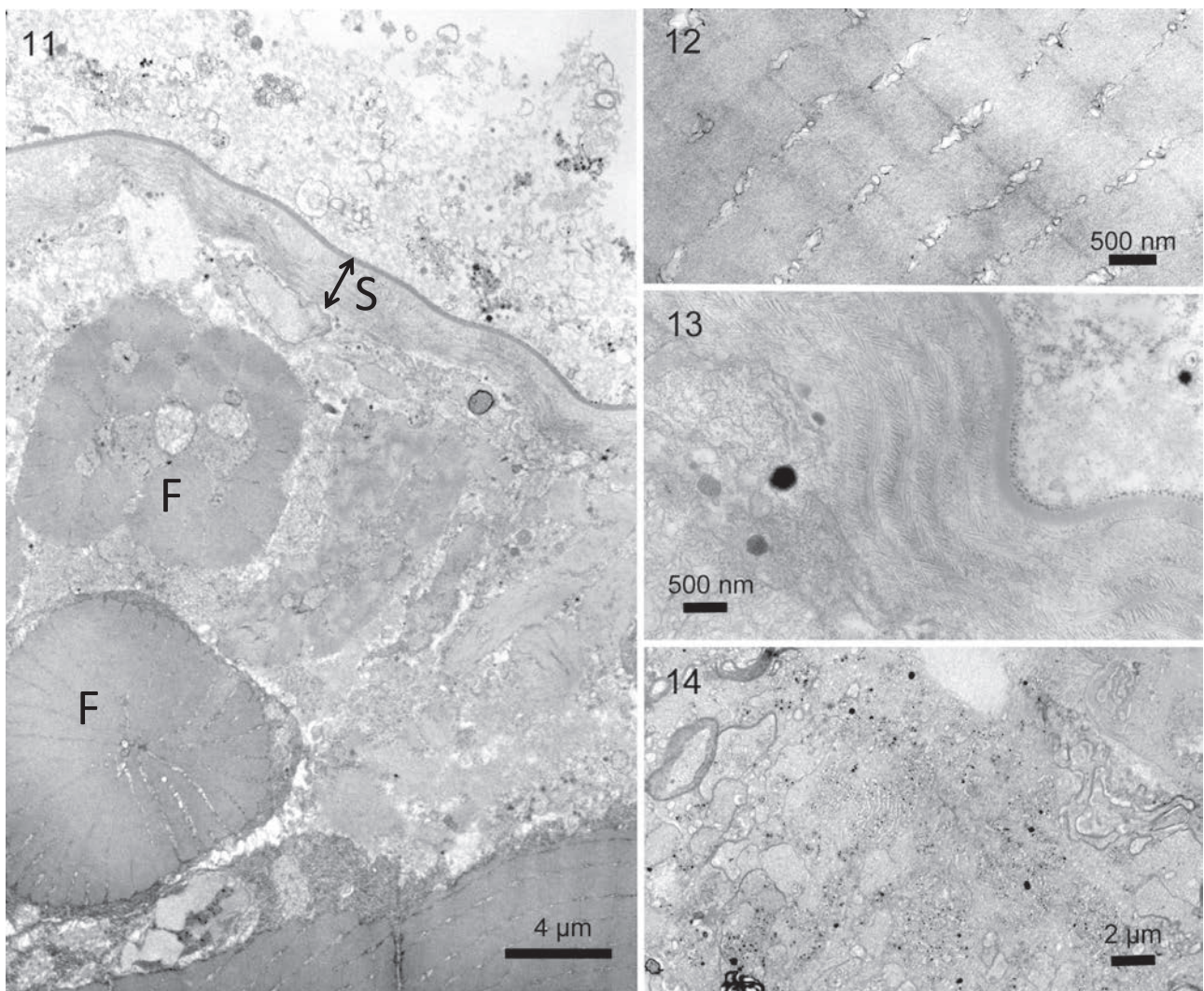


図11–14. 電場で凍結されたドロメを解凍した組織細胞の構造。11. 体表付近の筋組織（F）と体表（S）の横断面。12. 筋組織の縦断面。13. 体表の断面。14. 魚体の内部組織の細胞内構造。

-18℃で凍結したとき、解凍後のドリップ量が抑制される。実際、電場を利用した冷凍技術に関してすでに多数の特許が存在し、また、電場冷凍装置を製造・販売するメーカーとそれを導入するユーザーも数多くいる。しかし一方で、食品冷凍における磁場または電場の効果はまったくないという研究報告もある（鈴木ら2009）。冷凍の際の電場の効果を調べる有力な研究手法の1つは、細胞組織の構造を電子顕微鏡レベルで観察することであるが、これに関する研究報告は現在までにほとんどない。

本研究で用いたサンプルのうち、電界を印加して冷凍されたドロメは、解凍時において水分の流出が抑制された。本研究はこのような電界印加の効果を初めて微細形態学的に明らかにした。

冷凍状態の組織細胞の形態・構造を保存して観察するため、本研究では冷凍試料をそのまま固定するという凍結置換固定を行った。冷凍状態の試料では、電界

印加の有無にかかわらず、氷晶形成による著しい組織細胞の収縮が観察され、電場の効果を示す微細構造上の特徴はほとんど認められなかった。

しかし、解凍した試料では、電界印加の効果は明らかに細胞の微細構造に現れた。解凍後において、電場内冷凍と電場なし冷凍の試料の間でもっとも大きな相違が観察されたのは体表の構造であった。電場なしで冷凍された試料は体表が著しく破壊されていたのに対し、電場で冷凍された試料では、体表は無傷害に近い構造を維持した。また、体表の断面像においても、電場なしで冷凍された試料の体表最外層は、コラーゲン層から剥離してその構造が破壊され、体の内部の物質が体外へ溢出している箇所が多数観察された。それに対し、電場で冷凍された試料では、体表は連続的に構造を保持し、最外層とコラーゲン層の剥離もほとんどなかった。もうひとつの相違点は、体内部の組織構造の保持のされ方であった。筋組織の間に

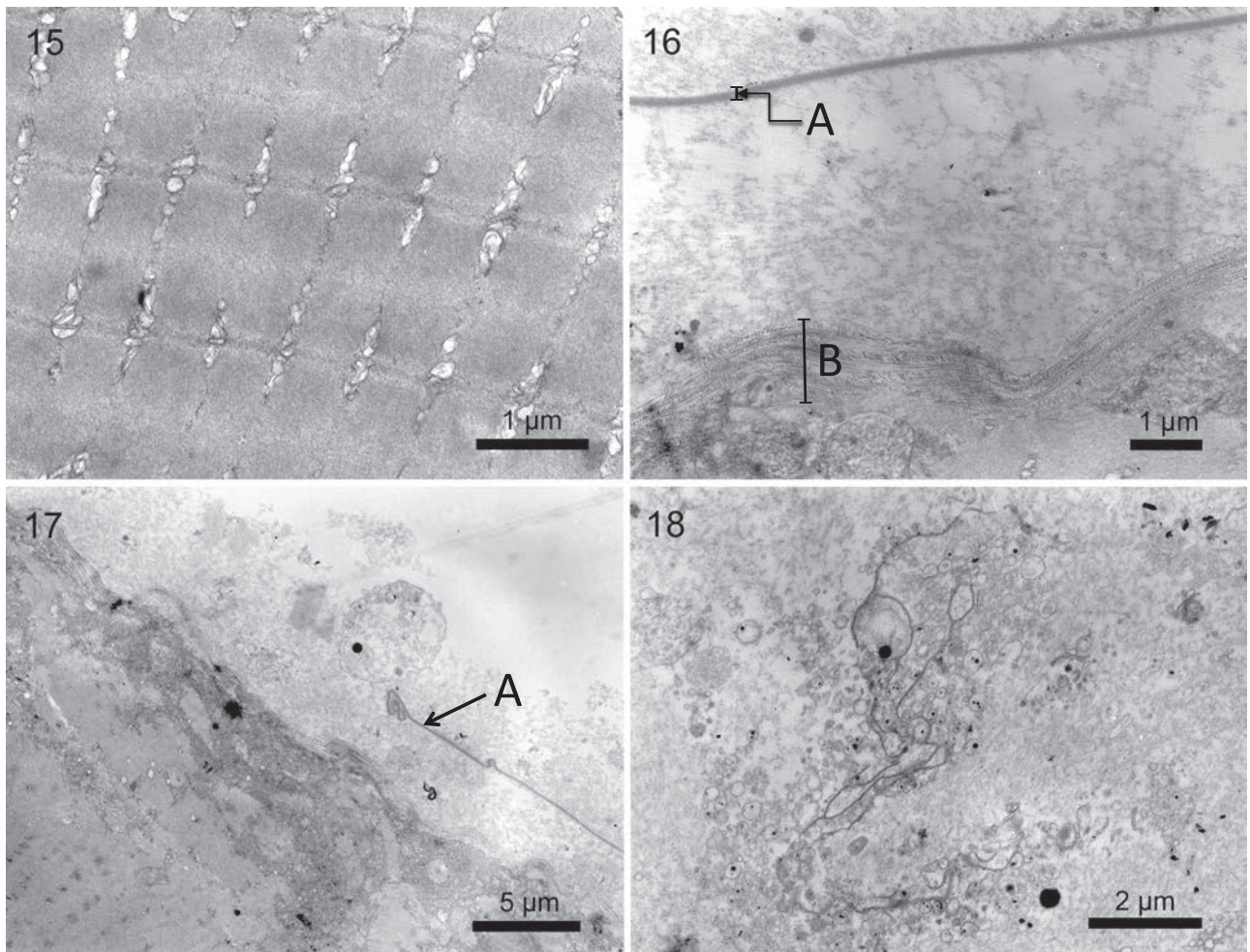


図15-18. 電場なしで凍結されたドロメを解凍した組織細胞の構造。15. 筋組織。16: 最外層 (A) とコラーゲン繊維層 (B) が剥離した体表。17. 最外層 (A) が破壊された体表。18. 魚体内部で崩壊した細胞組織から由来したと考えられる細胞含有物。

ある軟組織の構造は、電場で冷凍された試料では、解凍後、細胞小器官や膜系などの構造が密に存在していたが、電場なしで冷凍された試料では、解凍後、大量のマトリックス成分が広く分布し、その他の構造物はマトリックス成分の中で散在していた。これらの結果は電場が体内部の組織細胞の膜系や細胞間結合組織を保持する効果を持つことを示唆するが、そのメカニズムはわからない。

電場なしで冷凍された試料では、解凍時に体内部の組織の細胞膜が破れて細胞含有物質が滲出し、さらに表皮構造の破壊により、水分とともにドリップとして魚体外へ流失した可能性が考えられる。それに対して電場で冷凍された試料では、解凍時、表皮と細胞膜の構造が維持されることで氷晶から融解した水が体内部および組織細胞内に留まり、結果として、体内の組織細胞がその含有物と細胞液を保持することができると推察された。

冷凍時における電界印加の食品に及ぼすメカニズムはまだ十分には解明されていない。電界印加が生細胞の生理や生体分子の挙動等にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする基礎的な研究が必須である。電界を印加して冷却・冷凍していく種々の過程で、組織細胞の何の構造がどのように保持または変化するかを明らかにすることが微細形態学的研究における今後の課題である。

謝辞

本研究で用いた冷凍サンプルを作製・提供していただいたサンワールド川村代表取締役川村宗利氏と、川村宗利氏を著者らに引き合わせ、本研究の実施を助めていただいた高知県工業技術センターの西村一仁氏に対し、厚く御礼申し上げます。

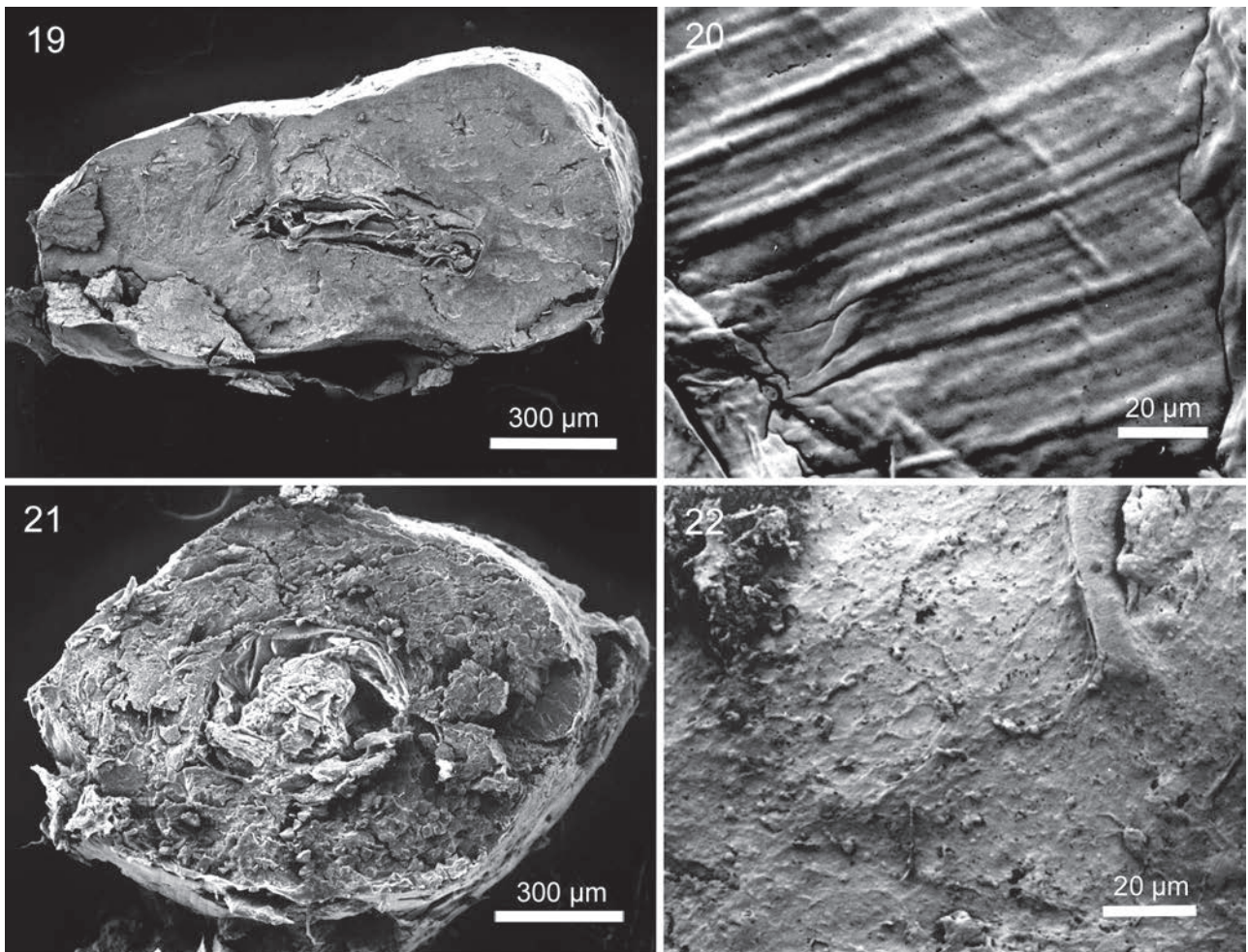


図19-22. 解凍したドロメの走査型電子顕微鏡像。19. 電場で凍結されたドロメを解凍した試料の体の輪切り像。20. 電場で凍結されたドロメを解凍した試料の体表皮表面。21. 電場なしで凍結されたドロメを解凍した試料の体の輪切り像。22. 電場なしで凍結されたドロメを解凍した試料の体表皮表面。

引用文献

- 鈴木 徹・竹内 友里・益田 和徳・渡辺 学・白檜 了・
福田 裕・鶴田 隆治・山本 和貴・古賀 信光・比留
間 直也・一岡 順・高井 皓. 2009. 食品凍結中に磁
場が及ぼす効果の実験的検証. 日本冷凍空調学会
論文集, 26(4): 371-386.
- 高橋 克幸・内野敏剛・小出章二・高木浩一. 2014.
プラズマのフードサプライチェーンへの活用. J.
Plasma Fusion Res., 90(10): 601-604.
- 吉本亮子・岡久修己・川西啓晴・山西務・豊栖佳代
子・湯浅信夫・三浦喬晴・小濱京子・鷺尾方一.
2011. 魚類の冷凍に対する交流電場の影響. 徳島県
立工業技術センター研究報告, 20: 15-19.

Electron microscopic observations of anchovy larvae “Dorome” after freezing under electric fields and thawing

Satoko Sekida and Kazuo Okuda*
Kuroshio Science Unit, Multidisciplinary Science
Cluster, Research and Education Faculty,
Kochi University, 2-5-1 Akebono-cho,
Kochi 780-8520, Japan

Abstract

Little drip was leaked from the anchovy *Engraulis japonicus* larvae called “Dorome” that were frozen at -20°C under electric fields and thawed at room temperature. To examine the effect of freezing under electric fields, fine structures of the larvae were observed using electron microscopy. Organs and tissues in fish frozen under electric fields showed sponge-like features due to the formation of ice crystals, similar to those in fish frozen under no electric fields. In fish that were frozen without application of electric fields and then allowed to thaw, the body epidermis ruptured in places, and various cellular inclusions leaked from the inner tissues, resulting in the generation of lacunae between tissues inside the fish body. In fish that were frozen with application of electric fields and then allowed to thaw, the body epidermis looked almost intact, and the connective and other tissues were closely packed within the fish body without any lacunae.

Key words: electric field, freezing, thawing, Dorome, ultrastructure