



Title	セクロピア蚕休眠蛹の耐凍性
Author(s)	朝比奈, 英三; 丹野, 皓三
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 71-76
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/17697">http://hdl.handle.net/2115/17697</a>
Type	bulletin (article)
File Information	23_p71-76.pdf



[Instructions for use](#)

## セクロピア蚕休眠蛹の耐凍性 I\*

朝比奈英三・丹野皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和40年7月受理)

### I. 緒 言

昆虫の体内にグリセリンができる事実は1956年より1957年にかけて、北米産のヤママユ *Hyalophora cecropia* (以下セクロピア蚕とよぶ) の蛹と、日本産の蚕の卵においてそれぞれ別個に発見された<sup>1,2)</sup>。当時すでにグリセリンが、生物細胞でみられる凍害に対して著しい防禦作用をもつことが知られていたため、或る人々は天然の昆虫のあらゆる耐凍性もこのような昆虫体内でのグリセリンの存在によって、ほとんど説明されるのではないかと考えたほどである<sup>3,4)</sup>。

その後研究のすすむにつれ、昆虫体内にグリセリンがあることだけでは、その昆虫の耐凍性を実現する必要且つ十分な条件にならないことがわかって来た<sup>5-7)</sup>。しかし耐凍性昆虫の多くのもにグリセリンがあることはすでに良く知られた事実であり<sup>8)</sup>、少なくとも或る種の昆虫ではグリセリン含有量の増加がその虫の耐凍性を高めることに役立っていると考えられる<sup>9)</sup>。

セクロピア蚕の蛹は大量のグリセリンをもつ大形の昆虫の代表的なものであって、我が国のシンジュサンのように樹枝に吊り下ったまゆの中で越冬するから、原産地においてもこの蛹がはげしい寒さにさらされるおそれがあり、従って耐凍性のあることが期待できる。しかし本種の凍結についてはわずかに Kanwisher の未発表データがあるのみで、彼はこの蛹が少なくとも  $-15^{\circ}\text{C}$  での凍結に耐えることをたしかめた (私信による)。

著者等は最近たまたま若干のセクロピア蚕の休眠蛹を入手する機会にめぐまれたので、これを使って本種の耐凍性をしらべるための簡単な実験を行なった。材料が少数であったためにきわめて不十分な資料しか得られなかったが、なかなか面白い結果なのでここに予報的にのべておく。

本文に入る前に、貴重な実験材料を快よくわけて下さった Yale 大学の G. R. Wyatt 教授に厚くお礼を申し上げる。

### II. 材料と方法

**材料:** 北米産のセクロピア蚕 *Hyalophora cecropia* L. の休眠蛹を10月末に Connecticut の New Haven より札幌の実験室に運び、 $2^{\circ}\text{C}$  内外の冷蔵庫に保存し、3カ月後に実験を行なっ

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第736号

た。まゆから出した蛹の重量はしばしば5gを越えるものがあり、ヤマムシ類のなかでも本種は最大級の大きさをもっている。又上記の保存条件ではほとんどの蛹が休眠を終了するおそれはない<sup>10)</sup>。

**グリセリン含量の測定：** 蛹の触角にあたる部分に針で小孔をあけると血液が小滴となつてふき出てくる。これをピペットで0.03 ccとり直接濾紙につけ、風乾後蒸留水で抽出し、この抽出液をクロモトロープ酸試薬で発色定量した\*。この方法では血液中のグリセリン以外の物質の発色のためにみかけ上グリセリンの含有量が大きくなる。このため一旦この方法で採血した蛹を1頭まるごと磨砕し、筆者等の従来<sup>12)</sup>の方法で生体重あたりのグリセリン量を測定した。更に別の個体から得た含水量の資料から血液中のグリセリン量を算定し、上記の少量の採血によって蛹からえたグリセリン量を補正した。尚このようにして採血された蛹の傷口は血液の凝固のため直ちにふさがり、蛹の其の後の生存、変態には全く異常がみとめられなかった。

**耐凍性の観察：** まゆから出した蛹を前記のように採血した後、ペトリ皿に入れ $-20^{\circ}\text{C}$ 又は $-30^{\circ}\text{C}$ の恒温箱内で冷却した。このままおくと蛹は $-20^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却されても過冷却のままであるものがあるので、何れも表面を水でぬらして植氷し、ほぼ同じ温度で凍結がはじまるようにさせた。1日間このまま凍らせておいたものを室温に出し空气中で融解させた。超低温での凍結にはガーゼで包んだ蛹を上と同じ方法で一旦 $-30^{\circ}\text{C}$ で1日間予備凍結し、その直後そのままおもりをつけて液体窒素中にしずめた。1日間たつてから液体窒素中より $-30^{\circ}\text{C}$ の低温室内にとりだして3時間おき、その後室温で融解させた。

又1個体であったが $-70^{\circ}\text{C}$ 付近での凍結を行なった。これにはその蛹を $-30^{\circ}\text{C}$ で1日予備凍結後固形炭酸を満した魔法びん内に移し、2日間たつて $-30^{\circ}\text{C}$ の室内にとりだし、さらに3時間後室温にうつして融解させた。実験中魔法びん内の気温はつねに $-70^{\circ}\text{C}$ 以下であった。

凍結後の蛹は $-20^{\circ}$ 又は $-30^{\circ}\text{C}$ の場合は、融解後1日ですでに腹部をうごかした。これらの蛹は運動がみとめられてから後 $10^{\circ}\text{C}$ の恒温箱にうつし、休眠を充分終らせるために14週間おいてから $20^{\circ}\text{C}$ の恒温箱にうつして羽化を待たせられた。凍死した蛹は室温で2~3日中に変色してくるので容易に判別される。

### III. 結 果

この昆虫が $-15^{\circ}\text{C}$ で、少なくとも1日間は凍結に耐えることがすでにわかっているので(Kanwisher 未発表)、数頭ずつの蛹を $-20^{\circ}\text{C}$ 及び $-30^{\circ}\text{C}$ で凍らせてみた。このとき各個体ごとにグリセリン含有量をしらべた。結果はまとめて第1表に示した。

蛹のグリセリン量は、従来のセクロピヤ蛹の休眠数カ月のものの値<sup>11)</sup>に比べていくぶん多いが、これは前記の定量法のためかもしれない。生体重1gあたり20mg程度のグリセリンがあれば他の鱗翅類では相当に高い耐凍性を示すものが少なくない<sup>9)</sup>。期待したようにこのセクロピヤ蛹も $-20^{\circ}\text{C}$ 及び $-30^{\circ}\text{C}$ 1日の凍結には例外なく耐えることができた。凍結融解後の蛹はすべて活発に腹部をうごかし、 $10^{\circ}\text{C}$ で休眠終了処理後1頭のこらず完全な成虫として羽化で

\* セクロピヤ蚕蛹の血液にはグリセリン以外の多価アルコールはほとんどふくまれていない<sup>11)</sup>。

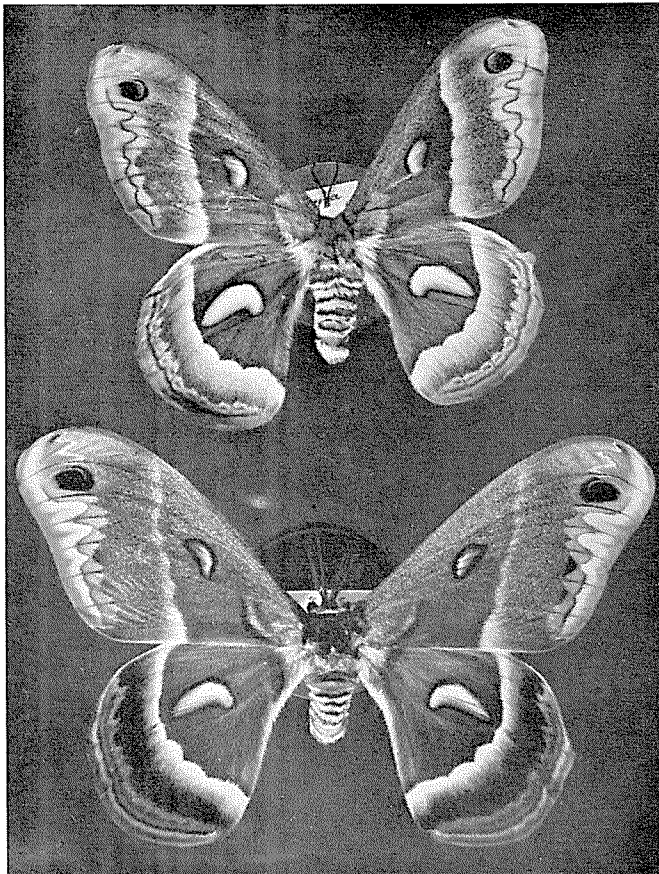
第1表 セクロピア蚕蛹の耐凍性とグリセリン含量

個体番号 (性)	生体重 (mg)	グリセリン		凍結温度** (°C)	羽化日数***
		mg/ml 血液	mg/g 生体重		
A (♀)	5,558	37.6	27.7	-20	41
B (♂)	5,324	36.0	26.6	-20	24
C (♀)	5,326	35.8	26.4	-20	26
D* (♂)	4,201	21.3	15.7	—	—
E (♂)	5,473	38.1	28.1	-30	24
F (♂)	4,611	37.6	27.7	-30	10
G (♂)	3,847	39.5	21.7	-30	15
H (♂)	3,624	24.0	17.7	-30	26
I (♂)	3,403	28.6	21.1	-30	16

\* D 個体はグリセリン定量のために磨砕した

\*\* 凍結時間はいずれも1日間

\*\*\* 蛹を融解させて1日後10°Cに14週間おき、その後20°Cの恒温に移してから羽化までの日数



第1図 凍結融解後の蛹から生れたセクロピア蚕  
上: -70°C凍結♀, 下: -20°C凍結♂

きた(第1図)。

これまでのわれわれの研究によれば、 $-30^{\circ}\text{C}$ での凍結に耐えることのできる動物は更にこれを超低温まで冷却してももはや致命的な害を受けないことが多い<sup>13)</sup>。そこで4個体(2♀♀及び2♂♂)のセクロピア蛹を、前記の凍結実験と同様に $-30^{\circ}\text{C}$ で1日予備凍結してから液体窒素中で冷却した。この結果使用した蛹は一つ残らず凍死した。

上記の実験では虫体のグリセリン含有量は測定していないが、この前の実験に使った材料と同様な生体重の2%程度のグリセリン量を期待してよいであろう。この程度のグリセリン量はイラガ前蛹やアワノメイガ幼虫が超低温にたえる時期のそれ<sup>9),14)</sup>に比べるといくらか少なめにみえるので、グリセリン量を増すことによって虫体の耐凍性を高める可能性がある。実際にイラガ前蛹ではある時期にグリセリンを体内に注射してやると、それまで $-15^{\circ}\text{C}$ 程度の耐凍性を示していたものが液体窒素中に入れても凍死しなくなる<sup>9)</sup>。又高濃度のグリセリン注射そのものは、シンジュサンのような近縁のヤママユの越冬休眠蛹で其の後の生存変態に対して無害であることがたしかめられている<sup>14)</sup>。

4個体のセクロピア蛹を使い純グリセリン量がそれぞれの蛹の生体重の約5%に相当する量のグリセリン(和光・特級, 98.5%)を微量注射器(室町化学製)で蛹の第4腹節の気門から体腔内に注射した。注射された蛹を $2^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫内に3日間おいてから前と同じ方法で $-30^{\circ}\text{C}$ で予備凍結し液体窒素中で冷却した。4個の蛹のうちの1個は液体窒素から $-30^{\circ}\text{C}$ の室内に出した直後虫体が破裂し、又他の1個は体に深いわれ目が入っているのが発見された。これはおそらく注射した孔又は他のすき間から体内に液体窒素が侵入し、蛹が温められたとき急激に膨脹して虫体を破壊したものであろう。融解後異常なくみえたのこりの2個の蛹も数日中に変色したので切開したところ心臓の動きはなくすでに死んでいた。

この方法によるセクロピア蛹の超低温生存は失敗であったが、 $-30^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で生存できる可能性は充分考えられる。そこで最後に残っていたただ1頭の蛹(♀)を使って $-70^{\circ}\text{C}$ での凍結実験を試みた。2日間 $-70^{\circ}\text{C}$ で凍らせた蛹は融解後しばらくは不動であったが室温で数日後も変色することなく、10日目になってわずかに腹部をうごかし、50日後には全く正常に腹部を屈曲させた。この個体だけは $10^{\circ}\text{C}$ での休眠終了処理を行わず、融解後引つづいて $10^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$ の室温においたが、82日目に完全な成虫となって羽化した(第1図)。

#### IV. 論 議

セクロピア蚕の休眠蛹が高い耐凍性をもっていることは、期待されていたとはいえなかなか興味深い事実である。その理由の一つはこの昆虫が $25^{\circ}\text{C}$ 位の温かい環境におかれても充分大量のグリセリンを体内に生産できるからである<sup>11)</sup>。今回の実験は $2^{\circ}\text{C}$ に保存してあった材料を使ったため確かめられなかったが、われわれのイラガやキアゲハによる実験の結果<sup>9)</sup>から考えて、おそらくセクロピア蛹もその耐凍性を獲得するために $0^{\circ}\text{C}$ に近い冷温にさらされることを必要としない生物であろう。

次にセクロピア蛹が $-70^{\circ}\text{C}$ での凍結に耐えたばかりでなく、その後全く異常ない成虫

として羽化できたことはまことに面白い。イラガやキアゲハの場合はその高い耐凍性にもかかわらず  $-40^{\circ}\text{C}$  以下の温度で凍らせると、融解後の発生の際ほとんど例外なく障害があらわれ、あるときは成虫に脱皮できず、あるときは虫体の前半しか変態しない<sup>8)</sup>。

このようにセクロピア蛹は少なくとも  $-70^{\circ}\text{C}$  までの温度での凍結に対しては完全な耐凍性をしめすにもかかわらず、液体窒素温度のような超低温に耐えないのは何故であろうか。今までわれわれが同じ方法により超低温生存に成功している他の昆虫に比べてセクロピア蛹は特に大形であるために  $-30^{\circ}\text{C}$  よりすぐ超低温に移すという方法では、このとき虫体の表層部と内部との間におこる大きな温度差の影響を充分無害なまでにおさえることが出来ないのかも知れない。又酒井(未発表)がある種の越冬植物でみているように、この昆虫の耐凍性の限度があるいは  $-70^{\circ}\text{C}$  と  $-195^{\circ}\text{C}$  との間にある可能性もないわけではない。

耐凍性以外の興味ある問題は蛹の凍結温度と発生期間の関係である。材料が少数なためにはつきりしたことはいえないが、第1表によると  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結させた蛹の方が  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結させた蛹に比べて休眠が早くおわり羽化日数が短くなるような傾向がみえる。

いずれにしてもこれらの問題は更に充分な材料を入手できたときにすべて確かめてみる事ができるであろう。

## V. 摘 要

北米産セクロピア蚕の休眠蛹を使ってその耐凍性をしらべるいくつかの実験を行なった。

1. 蛹のグリセリン含量は体重の2%内外である。
2. 蛹は  $-20^{\circ}\text{C}$  および  $-30^{\circ}\text{C}$  での1日間の凍結には例外なく耐え完全な成虫として羽化できる。
3. ただ1頭を使った実験ではあるが、 $-70^{\circ}\text{C}$  2日間の凍結に耐え完全な成虫が羽化した。
4.  $-30^{\circ}\text{C}$  で予備凍結させた蛹を液体窒素中で冷却させたところすべて凍死した。
5. 体重の5%にあたるグリセリンを注射した蛹を使って上記の予備凍結法を行なったが、いずれも超低温での冷却融解後凍死していた。

## 文 献

- 1) Wyatt, G. R. and Kalf, G. F. 1956 Organic components of insect hemolymph. *X th Int. Congr. Entomol. (Abs.) Montreal*
- 2) Chino, H. 1957 Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the bombyx silkworm. *Nature*, **180**, 606-607.
- 3) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling, Edward Arnold Ltd. London, 462 pp.
- 4) Salt, R. W. 1961 Principles of insect cold-hardiness. *Ann. Rev. Entomol.* **6**, 55-74.
- 5) 丹野皓三 1962 ムネアカオオアリの耐凍性とグリセリンの関係. *低温科学, 生物篇*, **20**, 25-34.
- 6) 丹野皓三 1963 アゲハ越冬蛹の耐凍性. *低温科学, 生物篇*, **21**, 41-52.
- 7) Sømme, L. 1964 Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. *Can. J. Zool.*, **42**, 87-101.
- 8) Asahina, É. 1965 Freezing and frost-resistance in insect. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.) Academic Press, London, 印刷中.

- 9) 朝比奈英三・竹原一郎 1964 イラガ越冬前蛹の耐凍性. 補遺 I. 低温科学, 生物篇, **22**, 79-90.
- 10) Willams, C. M. 1956 Physiology of insect diapause. X. An endocrine mechanism for the influence of temperature on the diapausing pupa of the cecropia silkworm. *Biol. Bull.*, **110**, 201-218.
- 11) Wyatt, G. R. and Meyer, W. L. 1959 The chemistry of insect hemolymph. III. Glycerol. *J. Gen. Physiol.*, **42**, 1005-1011.
- 12) 竹原一郎・朝比奈英三 1959 越冬昆虫の体内にあるグリセリンについて. 低温科学, 生物篇, **17**, 159-163.
- 13) Asahina, É. 1959 Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. *Nature*, **184**, 1003-1004.
- 14) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 昆虫の耐凍性とグリセリン. 低温科学, 生物篇, **18**, 57-65.

### Summary

The diapausing pupa of the American giant silkworm, *Hyalophora cecropia* are well known to have a large amount of glycerol. The frost-resistance of this insect was examined in a temperature range between  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-195^{\circ}\text{C}$ . The pupae could survive freezing for one day at  $-20^{\circ}$ ,  $-30^{\circ}$  and even  $-70^{\circ}\text{C}$ . After rewarming they could develop and appeared on the wing as entirely normal moths. None of them, however, could survive freezing in liquid nitrogen even by the use of prefreezing treatment at  $-30^{\circ}\text{C}$ . An artificial injection of glycerol into the pupae failed to enhance their frost-resistance.