



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, 24, 25-34
Issue Date	1967-02-10
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17710
Type	bulletin (article)
File Information	24_p25-34.pdf



[Instructions for use](#)

セクロピア蚕休眠蛹の耐凍性 II*

朝比奈英三・丹野皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 41 年 11 月受理)

I. 緒 言

さきにわれわれはグリセリンを体内に生産する昆虫として世界的に有名なセクロピア蚕の休眠蛹についてその耐凍性を予察的に報告した¹⁾。この昆虫はその体内に生体重の 2% 程度のグリセリンができた時期には、少なくとも -30°C の温度で 1 日の凍結に例外なく耐えられる。又 -70°C での凍結にも耐えられるものがありながら、予備凍結法によって液体窒素温度で生存させる試みは不成功であった。

ところで昆虫を凍らせる場合、 -30°C より低温度では冷却につれて体内に増加する氷の量はきわめて少ないことが知られている²⁻⁴⁾。したがって生物が細胞外凍結のために受ける害の主因を、その組織細胞の内外における脱水と濃縮にもとめる限り、 -30°C で凍結状態にある生物をさらに低温に冷却することは凍害を増大させる結果にはならないものと予想される。実際にも今までわれわれが扱ってきた耐凍性昆虫では -30°C での凍結に耐えられるものはすべて液体ガス温度での超低温冷却に耐えることができたので、セクロピア蚕蛹での例外はきわめて興味ある問題を呈出したことになる。本文はこのような問題を明らかにするために行なった二、三の実験の報告である。

ここで再度実験材料をわけて頂いた Yale 大学の G. R. Wyatt 教授の御好意に厚くお礼申し上げます。

II. 材料と方法

材料：北米ノース・ダコタ州産のセクロピア蚕の蛹を使用した。蛹はいずれも 1965 年 9 月中にまゆに入ったもので、10 月 20 日に札幌に空輸された後 25°C の恒温箱内に保存された。これらの蛹の平均体重は ♂ で 4.44 ± 0.52 g, ♀ で 5.74 ± 0.77 g であった。休眠がさめるのを防ぐため、蛹を採集してから実験開始まで 10°C 以下の温度にさらすことがないように注意したが、今回の材料には既に休眠を終ったものが少なからずふくまれていて、 25°C での 3 カ月の保存期間中に約 19% の蛹が羽化してしまった。

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ってふき出てくる。これをピペットで 0.08 ml とり、1 ml の純エタノールと混合した。次にこれを風

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 818 号

乾して得た残渣に改めて0.15 mlの70% エタノールを加へて遠心し上清を得た。この上清をペーパークロマトグラフィーの試料としてグリセリンを定量した⁵⁾。なおこの方法で定量した今回の材料の時期別のグリセリン含量は Wyatt が米国での材料から得た資料⁶⁾と非常によく一致していた。

今回の材料で血液の含水率は86.5%，蛹全体の含水率は70%内外であった。

虫体へのグリセリン注射： 純グリセリン量がそれぞれの蛹の生体重の3%にあたる量のグリセリン液(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。注射された蛹は25°Cの恒温箱に2日間おいてから凍結実験の材料に使用された。25°Cにおかれたセクロピア蚕の休眠蛹では体内のグリセリンは蛹化後6~7カ月の長きにわたって除々に増量することが知られているから⁷⁾、注射したグリセリンが短時日のうちに変化するおそれは全くない。

耐凍性の観察： まゆから出した蛹をペトリ皿に入れ、それぞれ定めた温度の恒温箱内で冷却した。このとき虫体がひどく過冷却するのを防ぐため水でぬらした脱脂綿の小片を蛹の表面につけて凍らせた。冷却時間は原則として24時間とし、-30°C以上の温度で虫体を凍らせた場合はそのまま室温の空気中にとり出して融解させた。-70°Cまで冷却させる場合は-30°Cで凍結させておいた虫体を10個体まとめてモルトプレンのシートでつつみ、プログラム冷却式の冷却槽内で冷却した。この際虫体に接しておかれた熱電対によって虫体付近の気温を連続記録したが、-30°Cより-64°Cまでは約0.5°C/分の冷却速度で、それ以後はかなりのろく冷却される。この冷却槽内に5時間おいてから-30°Cの空気中に移し更に2時間後室温にうつして融解させた。

超低温冷却の場合は蛹を2, 3ヶごとにガーゼに包み、まず-30°Cで20時間凍らせておき、これを固形炭酸を満した-70°Cの魔法びん中に移してさらに3時間おいた。次にこれらの虫を液体窒素をなかば満した容器の内部の空気中に吊し、30分以上たってから液体窒素中にゆっくりと沈めた。このとき液体窒素の沸とうはきわめてわずかであった。さらに2時間後虫を液体窒素中より-30°Cに移し、これ以後は-70°C凍結の場合と同様な処理で融解させた。

融解した蛹は休眠を終らせるために約10週間10°Cで保存してから25°Cに移して羽化を待った。凍結に耐えて生きていた蛹の大部分のものは融解後数日のうちに腹節をうごかすのが常であった。

III. 結 果

-20 及び -36°C での凍結： 前報によって、蛹化後数カ月たつてそのグリセリン含量が虫の血液1 ml 当り20 mg 以上に達したころのセクロピア蚕の蛹は充分-30°Cまでの1日の凍結に耐えることが示された¹⁾。しかしこのときの材料は3カ月間約2°Cの冷蔵庫に保存されており、-30°Cという耐凍度は虫の冷蔵によってもたらされたハードニング*の結果であるという

* 環境条件(特に温度)に応じて生物が原形質的に変化し、或いは防禦物質を自ら生産して、凍結に対する抵抗性をますことをフロスト・ハードニングという。

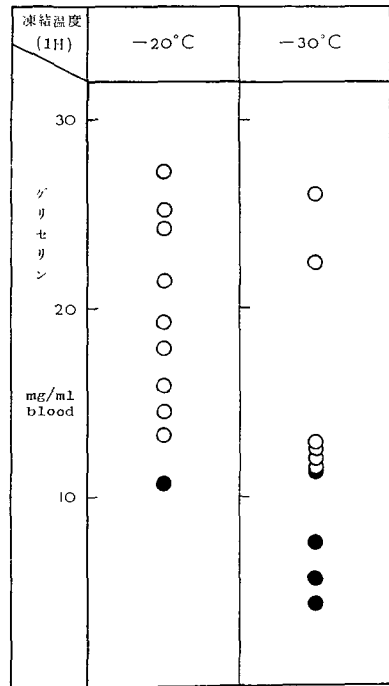
考えかたも可能である。今回の材料は採集後札幌に空輸されるまで常温におかれており、空輸中の12時間内には3~5°Cに冷されるおそれがあるが、札幌に到着後は実験開始まで少なくとも10日以上25°Cの恒温で保存されているので、低温による影響はたとえあったとしてもきわめて僅かであると思われる。いっぽうセクロピア休眠蛹は25°Cの恒温においてグリセリンが徐々に体内に蓄積されてくるが、グリセリンの増加速度はまゆに入ってから1カ月後より5カ月間位は1カ月に5 mg/ml blood位であることが知られている⁶⁾。実際に今回の材料ではグリセリン含量は、11月のはじめに10個体平均18.9±5.2 mg/ml blood、11月末に12個体平均24.8±5.9 mg/ml bloodであった。従ってこのような時期の蛹を使えば、虫の休眠状態が一様である限り、グリセリン含量とその虫の耐凍性との関係をしらべることができよう。

このような考えで、11月1日に♀各それぞれ5ケの蛹を使って-20°Cでの凍結を、又11月5日にやはり♀各各5ケの蛹で-30°Cでの凍結を試みた。虫体のグリセリン含量をはかるため、いずれの虫も凍結融解後2日たって採血した。実験の結果はまとめて第1図に示した。この測定値に関する限り虫体のグリセリン量と耐凍性との相関は明らかで、グリセリン量が11 mg/ml blood以下の虫は-20°C以下の温度での凍結には耐えられない。又-20°Cの凍結に耐えられる状態に達している虫は例外なく-30°Cにも耐えた。これらの関係は虫の♀各ともに全く同様に認められ性別による差はなかった。

-70°Cでの凍結： 前報において、セクロピア休眠蛹のなかには-70°Cでの凍結にも耐えて正常に羽化できるものがあることを述べたが、このときの実験は材料不足のためわずか1例にとどまり、しかもその材料は2°Cに3カ月以上冷蔵されていたものであった¹⁾。そこで今回は25°Cの恒温に1カ月以上おいてあった蛹を使って虫のグリセリン含量と-70°Cにおける耐凍性との関係をしらべた。

10個体の蛹のうち、5ケは対照として-30°Cで1日間予備凍結後-70°Cで5時間、次に-30°Cで2時間おいてから室温で融解させた。グリセリン定量のための蛹からの採血は凍結実験の2日前に行なった。のこりの5ケの蛹は採血後2日おいて体重の3%にあたるグリセリンを注射し、さらに25°Cに2日おいてから対照と同じ方法で凍結を行なった(第1表)。

ここに示すように、対照個体は1例をのぞいてすべて凍死したが、グリセリンを注射された個体は5ケのうち4ケまでが生存できた。-70°Cでの凍結融解後羽化した個体はいずれも



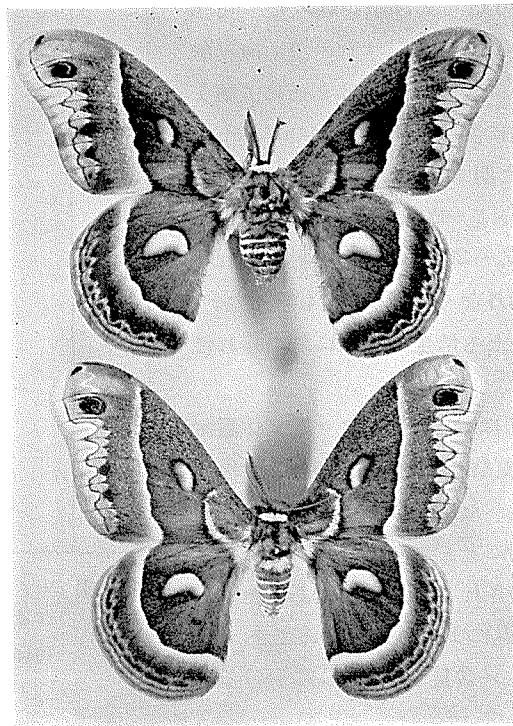
第1図 セクロピア蚕蛹のグリセリン含量と耐凍度

1966年11月1日, 5日

○: 生存 ●: 凍死

第1表 -70°C での凍結 (24, XI 1965)

	性	体 重 (g)	グリセリン		処 理	結 果
			含有量 mg/ml blood	注射量		
1	♂	3.446	9.7	0	室温 ↓ -30°C (1日) ↓ -70°C (5時間) ↓ -30°C (2時間) ↓ 室温	死
2	♂	3.571	23.6	0		生・羽化
3	♀	3.913	20.8	0		死
4	♀	4.912	28.0	0		死
5	♀	7.091	22.3	0		死
6	♂	5.050	21.9	} 体重の3%		生・羽化
7	♂	5.002	30.0			死
8	♂	5.534	27.8			生・羽化
9	♀	6.788	34.7			生・脱皮せず
10	♀	6.764	18.3			生・羽化



第2図 凍結融解させた蛹から生れたセクロピア蚕 ♂ ×1/2
上: -70°C 凍結 下: -30°C 凍結

正常な成虫となったが(第2図), 脱皮が完了せず腹部から蛹皮のとれないものが1例あった。
液体窒素温度での凍結: 前回の実験ではセクロピア蚕蛹を液体窒素温度で凍結生存させる試みは失敗に帰したが¹⁾, このときは液体窒素中から -30°C に移したとき虫体が破裂する等の方法上の失敗があったので, これらの点に注意して次の様な実験を行なった。体重の3%にあ

第2表 液体窒素温度での凍結 (10~16. IV 1966)

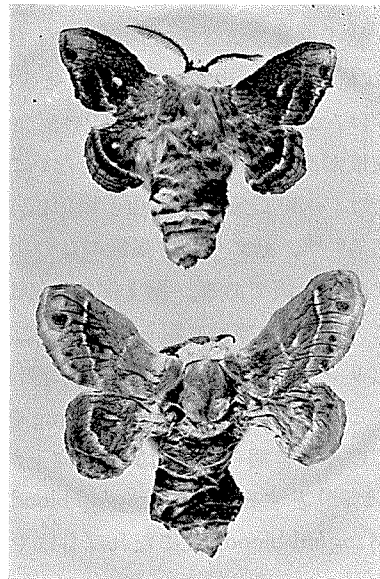
	性	体 重 (g)	グリセリン 注 射 量	処 理	結 果
a	♂	3.496	0		死
b	♂	3.697	0		死
c	♂	4.067	0	室 温	死
d	♀	4.878	0	↓ -30°C (20時間)	死
e	♀	4.876	0	↓ -70°C (3時間)	死
f	♂	3.940	} 体重の 3%	↓ 液体窒素温度 (2時間)	死
g	♂	4.246		↓ -30°C (2時間)	生・脱皮せず
h	♀	3.079		↓ 室 温	生・脱皮せず
i	♀	4.232			死
j	♀	4.701			死
k	♀	4.600			死

るグリセリンを注射した蛹を25°Cに2日おいてから-30°C→-70°C→液体窒素(約-196°C)の三段凍結を行なった。最初10個体を使って-70°Cから直ちに液体窒素中に蛹を移したところ、融解後そのすべてに裂け目が入っていることがわかった。勿論これらの蛹は凍死してしまった。そこで次には6個体(4♀, 2♂)を使い、既に方法の項に述べたようにごくゆっくりと-70°Cから超低温まで冷却した結果、融解後2ヶの生存個体を得た。別に対照として5個体(2♀, 3♂)をグリセリン注射なしに全く同様に凍結処理したが、すべて凍死してしまった(第2表)。超低温凍結より融解後生存していた前記の2個体は、休眠を終らせるために10°Cに2カ月おいてから25°Cに移した。更に25日たってこれらの蛹には成虫の体色が現われて来たが、蛹が脱皮する様子がないので、人力で脱皮させたところ外観はほとんど完全な成虫に変態していたが既に死んでいた(第3図)。

このようにグリセリン注射と予備凍結法を併用しても液体窒素温度での凍害を完全にまぬかれることは出来なかったが、とにかくセクロピア蚕蛹は現在までに観察された超低温凍結に耐えられる動物のうちの最大のものである。

IV. 論 議

蛹のグリセリン含量と耐凍性: イラガ前蛹ではまゆに入ると間もなく、グリセリンの生成に



第3図 グリセリン注射後、-30°C→-70°C→液体窒素温度の凍結を行なった蛹から生れたセクロピア蚕♀実物大

先立ってある程度の耐凍性の向上がみられ、さらにグリセリンが体内に蓄積されるにつれ急速に耐凍度が増大する⁸⁾。第1図、第1表及び第2表にあらわれた結果では、セクロピア蚕蛹においてもグリセリン含量と耐凍性との相関は明らかであって約12 mg/ml blood 以上のグリセリンをもつ虫は凍結状態において -20°C にも又 -30°C にも耐えられる。しかし休眠蛹のグリセリン含量が10 mg/ml blood 位に達しないうちは -20°C 以下の低温に全く耐えられないかどうかは第1図の資料のみからは判断できない。その理由は先にも述べたように、今回の材料の中にはすでに休眠がさめているものが20%近くも混っていたおそれがあることである。セクロピア蚕蛹の休眠を終ったものが 25°C の恒温におかれると急速にグリセリンの減量がおこるが、このときは蛹の体内で成虫への変態も同時にすすんでいる⁷⁾。従って第1図中の10 mg/ml blood 以下のグリセリン含量をしめす蛹は成虫への変態の過程にあったもの、すなわちその組織細胞が休眠中の状態から原形質的に変化してしまったものであるおそれがある。このような成虫形成の過程では虫体の耐凍性が急速に低下することが知られている⁸⁾。将来休眠状態の様な材料を蛹化期ごろまでに入手できれば、グリセリン含量が少い時期のセクロピア蚕蛹の耐凍性を明らかにすることができるであろう。

第1表及び第2表は体重の3% (約43 mg/ml blood) 程度のグリセリン含量の増加が、 -70°C 以下の温度で虫を凍結生存させるのに有効であることを示している。ここで甚だ興味深い事実は、この昆虫では -30°C の耐凍度をもつ状態が、必ずしも -70°C 又は液体窒素温度まで耐凍度が高まったことを意味しないことである。今までわれわれが観察できた耐凍性の高い昆虫では、 -30°C までその虫の耐凍度が向上した時期には超低温での凍結にも耐えられるが普通である⁸⁻¹⁰⁾。セクロピア蚕蛹のこのような性質を解釈する手がかりの一つは、この虫のグリセリン含量の値である。第1図にしめたように約12 mg/ml blood 以上のグリセリン量をもつ蛹は -30°C の凍結に耐えられる。この量はセクロピア休眠蛹の含水量を70% (実測) とし、グリセリンは体内の水分には一様に溶けていて非水物質の部分にはほとんど分布していないと仮定すると、生体重1g 当り約8.4 mg となる。いっぽうイラガ前蛹ではグリセリンが体内に増加してゆくととき明らかな耐凍性の向上がみられ、グリセリン量約15 mg/g (イラガ前蛹の含水量を61%¹¹⁾) とすると、24.6 mg/ml blood) のとき耐凍度は -20°C 程度、グリセリン量が約20 mg/g (32.8 mg/ml blood) 位になればもはや -30°C をこえて超低温におよぶ高い耐凍度を示す。従ってセクロピア蛹はイラガ前蛹に比べてグリセリン含量はるかに少ない時期にすでに -30°C での凍結に耐えられることになるが、この程度のグリセリン量では超低温に冷却されるときうける害を防ぐために不十分なかもしれない。実際にも23.6 mg/ml blood (17.5 mg/g 体重) のグリセリンをもつ1個体は、グリセリン注射なしに -70°C での凍結に耐えている。もちろんグリセリンその他の防禦物質がほとんどない昆虫でもある程度の耐凍性をあらわす例は決して少なくないが¹⁰⁾、液体ガス温度のような超低温にも耐えられる昆虫には、2種の活動期のユスリカ幼虫を例外としていずれも相当な濃度のグリセリン又は他の防禦物質が発見されている¹²⁾。 -30°C において相当な時間の細胞外凍結に耐えられる生物は超低温での凍結にも耐えられるであろうというのがわれわれの想定であるが¹³⁾、セクロピア蛹のような例外の出現は、このよ

うな場合に受ける凍害の要因が組織細胞の内外でおこる原形質からの脱水や水溶液の濃縮のみでないことを暗示しているように思われる。

セクロピア蚕蛹の超低温における凍死の原因： 生物が実験室で非常に低い温度まで冷される際にうける害の主因としては細胞内凍結がおこることがまず挙げられるが、今回の実験においては十分な時間をかけて -30°C での予備凍結を行なっているので、細胞はすでに充分脱水されていて細胞内凍結をおこすことはほとんど考えられない¹³⁾。そうだとするとセクロピア蛹が -30°C 又は -70°C の凍結に耐えながら、超低温に耐えられない理由は何であろうか？ さきに述べたグリセリン含量の問題も一つの要因と考えられるが、水溶性防禦物質の効果は凍るべき水が生物体内に残存している温度範囲において特に期待できるから、少なくとも -70°C 以下の温度での凍害には更に別な要素が加わるものと思われる。ここで従来生物の凍害の要因としてあまり重要視されていなかった熱収縮の問題がとり上げられる。

セクロピア蚕蛹を -70°C から直接液体窒素(約 -196°C)中に移すと、グリセリン注射をした個体でも、しない個体でも、虫体にヒビが入ったり破裂したりすることがしばしばあった。 -30°C で充分な予備凍結をさせた後でこのような虫体の破壊がおこる例は小形の昆虫ではほとんどなく、虫体が大形になるにつれておこり易くなる。例えば体重110 mg内外のアワノメイガ幼虫、400 mg内外のイラガ前蛹では例がなく、体重1 gに達するキアゲハ蛹ではときどき観察される(朝比奈未発表)。体重が7 gにも達するセクロピア蚕蛹では -70°C から液体窒素温度に到達するまでの冷却を30分又はそれ以上かけてゆっくり行なわないと無傷の虫体を得ることはきわめてむずかしい。大形の蛹が急に冷却される場合、その表層部と中心部との間の温度差は甚だ大きくなることが予想されるから、このときおこる虫体の表層部の収縮は、その内部にある組織の収縮に伴われることは難かしくなるであろう。この蛹の体内の組織の大部分は脂肪体からなっているが、すでに -70°C までの予備凍結で充分固化している内部組織が表皮の収縮に応じて変形できるとは考えられず、このような急速冷却のとき皮層組織又はこれに接する内部組織が機械的に破壊される可能性は非常に高い。

自然状態における昆虫の凍死の原因としては、細胞外凍結による原形質よりの脱水、細胞の内外における溶存物質の濃縮等が主なものと考えられ¹²⁾、細胞内凍結も一部の組織にはおこる場合もある¹⁴⁾。しかし実験室で昆虫を凍らせるときは、野外の条件に比べて 10^4 倍以上もの冷却速度をあたえることができるから、そのときの凍死の原因として上記の熱収縮による機械的傷害も当然予想しなければならない。

ハードニングの温度について： 昆虫は夏季にはほとんどのものが耐凍性をもたず、秋から冬に向うにつれこの性質があらわれることが多くの人々によって昔から観察されている。このため昆虫の自然又は人工的ハードニングには、軽度の冷温にしばらくさらすことが必要であるという考え方が¹⁵⁾ある。このような現象は冷却期間中に昆虫の組織細胞に原形質的な変化がおこり、且つ昆虫によってはグリセリン等の物質が体内にできてくるためであろうと思われる¹²⁾。しかしそのような虫体内の変化はそれぞれの昆虫に適合した温度において最も効果的におこると考えられ、直ちに冷温処理が昆虫の耐凍性を向上させるのに必要な条件であるとする理由は

ない。実際にイラガ前蛹では 20°C の恒温におかれたままでその耐凍度が少なくとも -15°C 程度までは向上する¹²⁾。セクロピア蚕蛹では今回の実験によって、 25°C の恒温に長期おかれていても -70°C での凍結に耐えられる程高度の耐凍性を獲得することが明らかになった。従って秋期に越冬昆虫を適度の冷温に比較的長期間（たとえば数日）おくとその耐凍性が高まる事実は次の様に説明される¹²⁾。虫体が適当な生理条件に達している場合（多くの越冬幼虫又は蛹ではこれは休眠状態にあたる）には、その虫の体内にある高分子の炭水化物が小分子のものに可逆的に変化する場合はしばしばあり、そのような小分子物質は凍害防禦物質となりうる場合が多い。そして虫体内でこの小分子物質が生産される反応の至適温度がしばしば常温より低い温度域に位置するのであろう。実際にセクロピア休眠蛹ではグリセリン生成の至適温度は 6°C 付近にあるらしく、 25°C においてあった蛹を 6°C に移すとグリセリン生成の速度はそのままにおいてあった蛹に比べて約4倍にふえる⁶⁾。又キアゲハ蛹では 10°C でのグリセリン増加速度は 20°C の場合の約3倍であり¹²⁾、イラガ前蛹では 10°C でのグリセリン増加速度は大きく、 1mg/g/日 近いが、 20°C ではグリセリンができないばかりでなくすでにあったグリセリンはグリコーゲンに再合成されるため急速に減少する¹⁶⁾。このように凍害防禦物質が虫体内に多量に蓄積された後は、環境温度が高くなるとこの物質がもとの高分子物質に再合成され易い。その上冷温処理は虫の休眠を早く終了させる効果があるので、その後の加温は変態のための急速な原形質の変化をもたらすことが多い。従って耐凍性の高まった虫を低温に保存することは、一旦獲得した耐凍性を低下させずにおくという点でも甚だ重要な意味がある。

摘 要

北米産セクロピア蚕の休眠蛹の耐凍性について、特に虫体のグリセリン含量と耐凍度との関係に重点をおいてしらべた。

1. 蛹のグリセリン含量が約 12mg/ml (血液) 以上ある場合には -20°C 及び -30°C で1日の凍結に耐えられる。しかしグリセリン生成の初期にある蛹でグリセリン量がこれより少ない場合の耐凍度は明らかにできなかった。

2. そのグリセリン量が約 20mg/ml (血液) に達した時期に、生体重の3%にあたるグリセリンを注射された蛹はほとんどのものが -70°C (5時間) の凍結に耐えて融解後完全な成虫が羽化した。また 23.6mg/ml (血液) のグリセリンをもつ1個体はグリセリン注射なしに -70°C の凍結に耐えて融解後完全な成虫となった。

3. グリセリンを注射した蛹を $-30^{\circ}\text{C} \rightarrow -70^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C}$ の三段凍結法でゆっくりと液体窒素中に浸すと、6個体のうち2個体が生存できた。しかし無処理のまま同じ方法で超低温まで冷却した蛹はすべて死んだ。超低温冷却に耐えた2個体の蛹も変態して外観は完全な成虫となったが脱皮できず蛹皮内で死んだ。

4. 体重 7g にも達するセクロピア蚕蛹のような大形の動物では、凍結した体を超低温に冷却する場合の死の主因は、すでに固化している組織の収縮による機械的破壊らしく思われる。

5. セクロピア蚕蛹は 25°C の恒温に長期保存した後に -70°C の凍結に耐えることがで

きる。従って冷温に虫体を保存することは昆虫の耐凍性を向上させるための必要条件ではない。適度の冷温が越冬昆虫の耐凍性をたかめる事実は、虫体内のグリセリン生成反応の至適温度を考慮すればほとんど説明される。

文 献

- 1) 朝比奈英三・丹野皓三 1965 セクロビア蚕休眠蛹の耐凍性. I. 低温科学, 生物篇, **23**, 71-76.
- 2) Scholander, P. F., Flagg, W., Hock, R. J. and Irving, R. 1953 Studies on the physiology of frozen plants and animals in the arctic. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **24**, Supp. 1, 1-56.
- 3) Salt, R. W. 1955 Extent of ice formation in frozen tissues, and a new method for its measurement. *Can. J. Zool.*, **33**, 391-403.
- 4) Shinozaki, J. 1962 Amount of ice formed in the prepupa of slug moth and its periodicity. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 12**, 1-52.
- 5) 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**, 159-165.
- 6) Wyatt, G. R. 1966 未発表 (私信による).
- 7) Wyatt, G. R. and Meyer, W. L. 1959 The chemistry of insect hemolymph. III. Glycerol. *J. Gen. Physiol.*, **42**, 1005-1011.
- 8) 朝比奈英三・竹原一郎 1964 イラガ前蛹の耐凍性, 補遺. I. 低温科学, 生物篇, **22**, 79-90.
- 9) 丹野皓三 1965 ホブラハバチの耐凍性. III. 耐凍性と糖含量. 低温科学, 生物篇, **23**, 55-63.
- 10) 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.
- 11) 篠崎寿太郎 1954 イラガ前蛹の凍結. 低温科学, 生物篇, **12**, 71-86.
- 12) Asahina, E. 1966 Freezing and frost resistance in insects. *In Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.), Academic Press, London, 451-486.
- 13) Asahina, E. 1959 Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. *Nature*, **184**, 1003-1004.
- 14) Salt, R. W. 1962 Intracellular freezing in insects. *Nature*, **193**, 1207-1208.
- 15) Barnes, D. and Hodson, A. C. 1956 Low temperature tolerance of the European corn borer in relation to winter survival in Minnesota. *J. Econ. Ent.*, **49**, 19-24.
- 16) Takehara, I. 1966 Natural occurrence of glycerol in the slug caterpillar, *Monema flavescens*. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 14**, 1-34.

Summary

The frost resistance of diapausing pupae of the American silkmoth, *Hyalophora cecropia* was examined with special reference to the relation of glycerol content to frost resistance.

1. Pupae with glycerol content of more than 12 mg/ml blood could survive freezing at -30°C for one day (Fig. 1).

2. An injection of glycerol (3 per cent of fresh body weight) into the pupae was found to be effective in increasing their frost resistance; glycerol injected pupae could tolerate freezing at -70°C without any injury (Fig. 2), although one of the control insects with glycerol content of 23.6 mg/ml blood survived freezing at the same temperature without glycerol injection.

3. Some of the glycerol injected pupae could be kept alive in liquid nitrogen with

gradual three-step freezing. The pupae thawed from the super low temperature metamorphosed to adult moths although they failed to shed their pupal cuticles (Fig. 3).

4. In the large body of this insect, mechanical damage in frozen tissue resulting from the difference of thermal contraction between pupal skin and underlying tissue seems to be one of the main causes of injury at the time of cooling to liquid nitrogen temperature.

5. Exposure to cold for relatively long period of time is not necessary to produce a high frost resistance in *cecropia* pupae. The role of mild chilling in increasing frost resistance in overwintering insects was discussed from current knowledge on the behavior of glycerol produced in these insects.

低温科学生物篇第 24 輯訂正

頁	行	誤	正
12	上から 13	あたため時	あたためる時
13	上から 15	partial	slight
13	上から 17	partially	slightly
17	上から 4	したし	しかし
30	下から 18	耐えられるが	耐えられるのが
32	上から 15	高分子分質	高分子物質

付 録

v	積雪分科会の著者	Dumani	Doumani
vii	氷分科会-1 の座長	Bonson	Benson
ix	氷分科会の座長	L. Levi	C. S. Benson
xi	名簿, 8 人目	*●新井	●新井
xiii	同, 下から 6 人目	●石原	石原
xiv	同, 11 人目	●小泉	小泉
xviii	下から 9 行目	Hanovr	Hanover
viii	上から 2 行目	Luyet, B. J. の講演は前頁, 氷分科会-2 の同氏の講演に引続き行なわれた。	