HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イラガ前蛹の凍結
Author(s)	篠崎, 寿太郎
Citation	低温科學. 生物篇, 12, 71-86
Issue Date	1954-12-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17571
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p71-86.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Jutaro SHINOZAKI 1954 On the Freezing of the Prepupa of Slug Moth.
Low Temperature Science, Ser. B, 12. (With English résumé p. 85)

イラガ前蛹の凍結*) **)

篠崎壽太郎
(低溫科學研究所 生物學部門)
(昭和29年12月 受理)

I.

イラガ前蛹の凍結曲線の型は，やや濃い塩溶液の凍結曲線によく似ている。強く過冷却される故もあるが，凍り始めると急激に温度が上昇する（例えば，体重300 mgの前蛹を7.8°C/分の冷却速度で冷した場合，過冷却の破れた後10秒間に15.7°C体温が上昇した)。それに続いてしばらくの間30～90秒位はほぼその温度を保ち，それからは徐々に，続いて急激に温度は下降する。この最初の急激な温度上昇は体内での氷の生成速度が非常に大きいことを示すもので，頂点に達するまでの時間が極めて短いことからみて，恐らく連続的に氷が生成されているに違いない。するとこの急激な凍結は体の何の部分に起るものであろうか？イラガ前蛹の器官又はその一部を血液と共に凍結させると過冷却度が余程大きくない限り，血液中にのみ氷が生じ細胞内部は凍結しないで，細胞に氷が接触してくると，始めて細胞外凍結を起し細胞は脱水される様になる。即ち細胞内部は凍り難いものである（朝比奈・青木・篠崎, 1953, 1954)。細胞外凍結をした細胞は融かされると元にもどるが，内部が凍つた細胞は必ず死んでしまう（植物細胞：朝比奈, 1950；ウニ卵：朝比奈, 1953；イラガ前蛹の器官：朝比奈・青木・篠崎, 1953, 1954)。ところが前蛹を一度凍らしても，又凍結状態で長期間（−20°Cで100日間）放置しておいても，融かした後は順調に変態し羽化する（朝比奈・青木・篠崎, 1953, 1954)。即ち細胞内部は凍らなかつたわけである。又熱電対を傷口から体内に挿入したばあいの過冷却点と，小試験管に入れて測つた血液のそれとが大体等しい（青木・篠崎, 1953)。この様な事実と体の構造とからみて，最初に起る凍結の主体は血液であることは想像に難くない。この推論を確めるために行つた実験が本報告である。

II.

越冬中のイラガ（*Monema flavescens****）の前蛹を使用した。繭に入つた前蛹を金網籠に

* 北海道大學低溫科學研究所業績 第278號
** 本研究は文部省科學研究費によるものである。
*** 此れ迄の報告では本種に對し *Cnidocampa* なる屬名を使用したが，此の種は最初 *Monema* として記載され，今日では此の名が正しいものと認められている。

入れ，直接外気に触れる状態で軒先に吊しておいたものを随時使用した。又実験の一部には−5°C の低温室中に保存しておいた材料を用いた。

虫を冷却する方法，温度の測定方法は前報（青木・篠崎，1953）と同様で，$CaCl_2$ と霜の混合物を寒剤（−36°～−42°C）として用いた。虫をセルロイド製の小さい籠に入れ，熱電対（径 0.2 mm 銅—コンスタンタン）を頭部陥入部に挿入し，全体を径約 3 cm の保護管内に宙吊りにして，この全体を寒剤中にひたして冷却した。温度は電流計の鏡からの反射光を光電管で受け自記させた。読み取られた温度には ±0.3°C 位の誤差があるが，本実験では此の程度の精度があれば十分その目的を達することが出来た。

III.

前蛹に於いて凍結の主体が血液であるとすれば，その量又は組成等，その凍結を左右する条件を変えてやれば，凍結曲線の型に変化が現われてくるはずである。そこで次の 4 つのばあいについて実験を行つた。

1) 前蛹から適当量の血液を抜いたばあい。
2) 前蛹から血液の大部分を抜き，抜いた量と大体等量の 0.6 M NaCl 溶液* を注射したばあい。
3) glycerin を虫に注射したばあい。
4) 体外に取り出した血液に glycerin を加えたばあい。

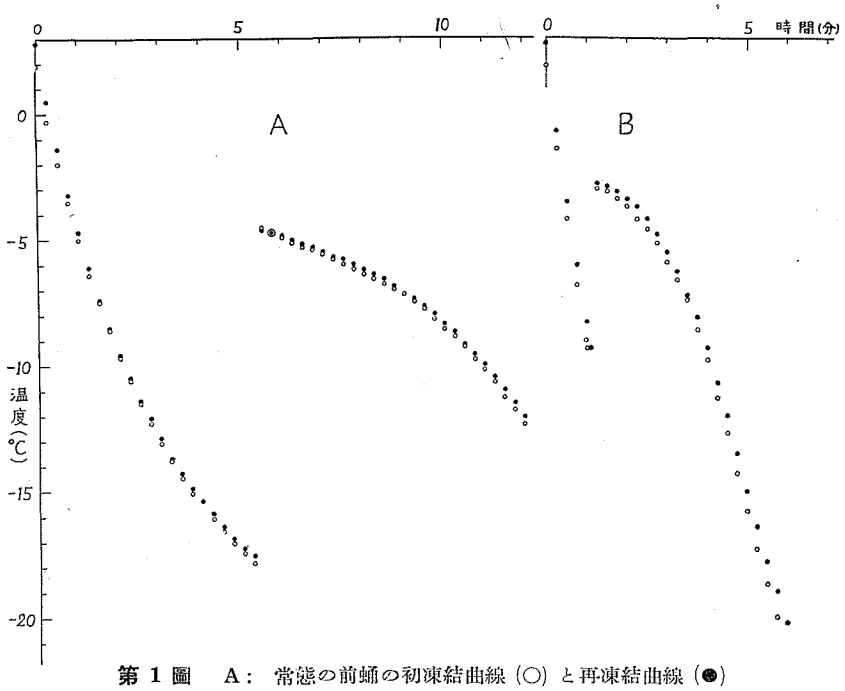
1)～3) に示された処理を施した後得られた凍結曲線と，無処理の虫で得た曲線を比較してどのような変化が生じたかを調べた。この変化が人為的に変えられた血液の状態から説明され得るならば，虫の主凍結はその血液の凍結であると考えられるであろう。更に 3) と 4) の比較，即ち体内にあるままの血液と，体外に取り出した血液に glycerin を加えると云う同一操作を加えたばあい，対照に対するそれ等の凍結曲線の変化の仕方が，若しも定性的に同じであるならば，虫の凍結の主体はその血液の凍結であると云えるであろう。

上述の実験は具体的には，次のように行つた。先づ無処理の繭から出したままの前蛹を凍結させて凍結曲線を作り，これを対照とし，次いで此の虫を十分融かしてから 1)～3) の処理を施してから再び凍結させて凍結曲線を求めて両者の比較を行つた。4) のばあいは，虫から取り出した血液を凍結して得た曲線と，この血液を融かしてから glycerin を加えて再び凍結させて得られた曲線を比較した。

かかる実験方法が成立するためには，虫あるいは血液に於て初凍結と再凍結の間に差違のないことが不可欠の条件である。この点は第 1 図及び第 1 表から明かなように凍結曲線そのものにも大差なく，過冷却点は統計的変動の許容限界内で一致する故，上述の実験方法，即ち初めの無処理のばあいの凍結曲線は対照として十分に用いることが出来る。

---

* 0.6 M NaCl 溶液の氷点は −2.1°C でこの時期の前蛹の血液の氷点とほぼ等しい。



第 1 圖　A：常態の前蛹の初凍結曲線（○）と再凍結曲線（●）
B：常態の血液の初凍結曲線（○）と再凍結曲線（●）

1)　虫から血液を抜いたばあい

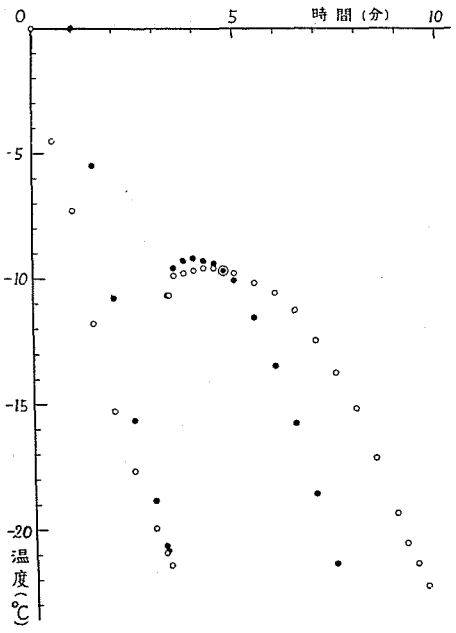
繭から取り出した前蛹の目方を torsion balance で測つてから，凍結させて初凍結曲線を求め，この虫を室温（約 20°C）で十分融かした後，体の前端部* に穿刺して孔を開けて適当量の血液を流出させ，濾紙でよく拭つてから秤量して前後の目方の差から抜いた血液量を求め，更に 30～40 分位放置して刺傷部が十分乾燥，凝固してから,** この部に vaseline を塗布し傷口からの植氷の危険をなくしてから再び凍結させた。血液の一部が抜き取られた個体は結局は殆んど死んだが，それでも相当長期間（少くとも 1 箇月間）生存していたことからみて少くとも実験を行つた当時は血抜きによる害はなかつたものと判断される。

一般に水溶液を冷却したばあい，その氷点に於て凍結を開始するのは稀で，多かれ少かれ過冷却する（凍結曲線のこの部分を以下の記載では過冷却部と呼ぶ）。過冷却状態にある水溶液が凍結を開始すると，放出された潜熱により氷点附近まで突然に温度が上昇する。この際凍結が始まつた温度を過冷却点，上昇しきつた温度を rebound point と云う。この rebound point では氷の生成により出される潜熱と外部に奪はれる熱が大体等しいため，徐々に冷却はするがしばらくの間大体一定に近い温度を保つために，凍結曲線上ではほぼ水平部として現われて来るばあいが多い。氷の生成が少くなり奪われる熱の方が多くなると共に温度は下り始め，この程度は更に急になる。この水平部の後，急速に冷却する部分を凍結部と呼ぶことにする。

---

*　頭部を体腔中に引込めたことによつて生じた体の凹部の周辺をなす体壁の襞。

**　30～40 分放置した後も目方の減少は殆んどなく，あつてもせいぜい 1 mg 位であつた。



第2圖 前蛹の初凍結曲線（○）と血液を抜いてから測定した再凍結曲線（●）。前蛹の目方： 346 mg，抜かれた血液量： 122 mg。

虫から血を抜いたことは，同時に相当量の水を抜いたことになるため，全体として虫の含水量は減少する。したがつて虫の熱容量は小さくなり，又凍結に際し生ずる氷の量も少くなるはずである。実際，血抜きをした虫の凍結曲線は対照のそれと色々な点で相違していることは第2図及び第1表から明らかである。

第2図は測定の代表例である。他の場合も，対照の曲線と実験のそれとの間で，過冷却点やrebound pointが互いに幾分ずれたりしているものもあるが，両者の曲線の違い方は皆同一傾向であつた。過冷却部の冷却する速さは血液を抜いた場合の方が大きく，これは熱容量の小さいことからも当然のことと思われる。過冷却点は対照の方が幾分低い値を示すが，それ程大きな差ではなく虫の過冷却点は血液の多少には余り影響されないようである。さて過冷却が破れると虫の温度は急激に上昇してrebound pointに到達する。この温度上昇の度合（reboundの度合）は実験と対照の間に差はなかつた。この点については後に再び述べよう。rebound pointに達した後の水平部は対照では割合明瞭に認められるが，実験では殆んど認められなかつた。凍結部の冷却する速さは，過冷却部と同様血液を抜いたばあいの方が大きかつた。

2) 虫の血液の大部分をNaCl溶液で置換したばあい

秤量後対照実験として初凍結曲線の測定を終えた前蛹を十分に融かしてから，前実験の場合と同様な方法で適当量の血液を抜いてから秤量した後，抜いた血液量を測り，次いでこの個体に注射器で0.6 M NaCl溶液を抜いた血液量と大体等しいだけ注射し，再び秤量して正確な注射量を測つた。この方法で抜いた血液量（70～150 mg）と注射したNaCl溶液量との差は大低2～3 mg位で多くても数mgを出なかつた。この個体を更に30～40分間室温に放置してNaCl溶液を体内に一様に行きわたらせてから再び凍結曲線をとつてその影響を調べた。放血，注射の傷口は乾燥した後，更にvaselineを塗布した。NaCl溶液で血液の大部分が置換された虫は，変態前に総て死滅したが，これでも少くとも1ケ月間は虫に何ら死の徴候が認められなかつた。

本実験では含水量75.2%の血液を抜き，その代りに大体等量の含水量96.5%の0.6 M NaCl溶液を注射したのであるから，NaCl溶液注射後の虫の含水量は無処理のばあいよりも増加したことになる。したがつて熱容量も前者の方が大きく，この点に関する対照と実験の関係は血

第　1　表

實驗處理		過冷却点 (°C)	初凍結と再凍結の過冷却点の間の相關係數 (r)	過冷却部の冷却する速さ (°C/min)	rebound の度合 (°C)	凍結部の冷却する速さ (°C)	冷却槽の温度(平均) (°C)	備考
未處理の前蛹	初凍結	−18.4±2.0 (−)	0.78 (+)					
	再凍結	−17.2±2.4 (16)						
未處理の血液	初凍結	−13.3±1.7 (−)	0.35 (−)					
	再凍結	−12.1±1.5 (8)						
血抜きした前蛹	對照	−18.6±4.1 (+)	0.57 (+)	4.3±0.7 (+)	9.8±3.7 (−)	3.3±0.5 (+)	−39	抜いた血液量は全体重の25～40%
	實驗	−17.0±3.6 (44)		4.6±0.9 (41)	9.8±3.2 (44)	3.7±0.6 (44)	−34	
NaCl で血液を置換した前蛹	對照	−18.5±4.4 (−)	0.47 (+)	5.9±0.6 (+)	8.6±4.0 (−)	4.0±0.4 (+)	−41	血抜量は全体重の30～40%，これと大体等量の0.6 M NaCl 注射
	實驗	−16.7±4.0 (24)		5.0±0.6 (19)	10.0±4.0 (24)	3.4±0.3 (24)	−36	
glycerin を注射した前蛹	對照	−18.4±4.6 (−)	0.59 (+)	5.7±0.7 (+)	8.0±3.4 (−)	4.1±0.6 (+)	−43	glycerin の注射量は血液量の14～20%
	實驗	−19.4±4.1* (20)		4.7±0.7 (17)	7.5±2.9 (20)	2.5±0.4 (20)	−39	
glycerin を加えた血液	對照	−9.8±2.2 (+)	0.44 (−)	6.0±1.0 (+)	6.1±2.2*** (−)	4.4±0.7 (+)	−30	使用した血液量は 80～120 mg，これに glycerin 14～20 mg を加える
	實驗	−14.9±4.2** (13)		4.7±1.2 (13)	5.1±2.8 (13)	2.1±0.4 (13)	−28	

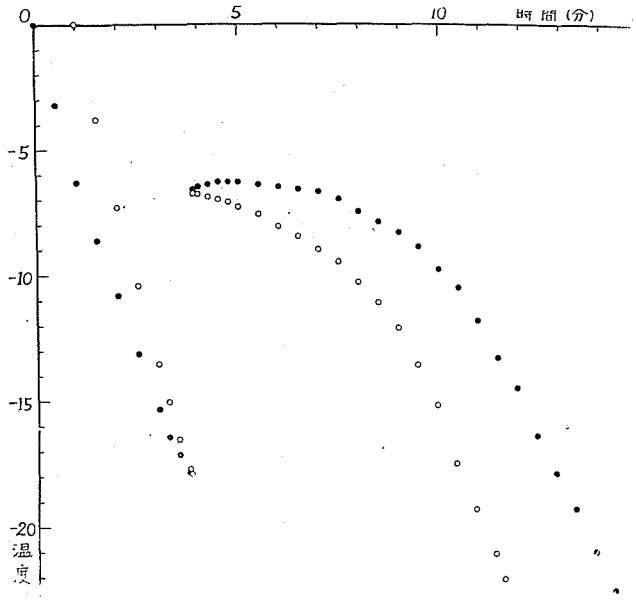
(註)　括弧内の数字は測定數を示す

(+) (−)：推計學的に差が有意なるとき (+)，有意と認められないとき (−)，r の場合はその値自身が有意であるか否かを示す。

* glycerin 注射による体液の濃度増加の結果 1.9～3.0°C 位氷点が下る。これを考慮に入れると過冷却点は −17.1 ± 4.0°C になる。

** glycerin を血液に加えた結果 3.4～4.6°C 位氷点が下る。これを考慮すると過冷却点は −10.8 ± 4.7°C となり，−9.8°C との差は有意とは云えなくなる。

*** この値は全實驗の平均で過冷却点に大きな差のあつたばあいも含まれている。過冷却点の差の少ない例で平均すると rebound の度合は夫々 6.7 ± 2.5°C と 3.2 ± 1.8°C (6 測定の平均) となり差は有意となる。



第 3 圖 前蛹の初凍結曲線(○)と血液の相當量を 0.6 M NaCl 溶液で置換してから測定した再凍結曲線(●)。
前蛹の目方： 379 mg, 抜かれた血液量： 152 mg, 注射された NaCl 溶液の量： 156 mg。

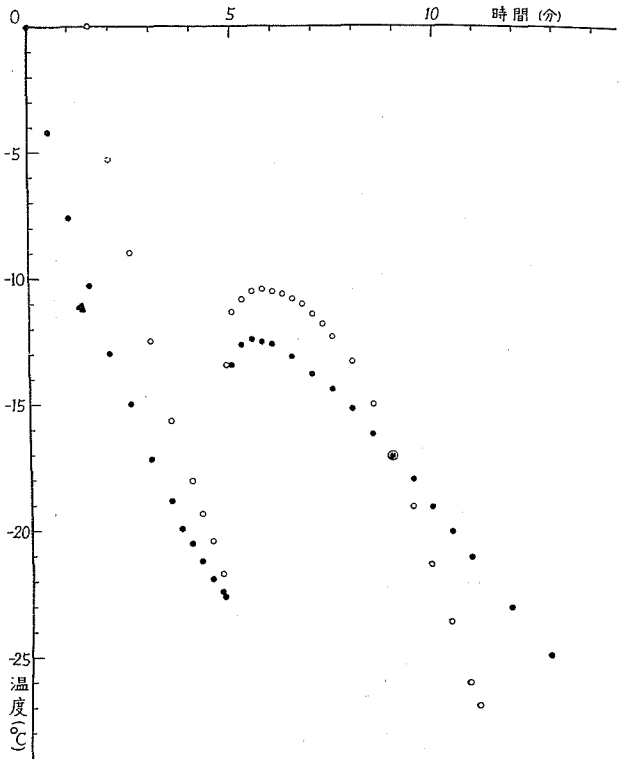
抜きのばあいとは全く逆になつており，実験結果も第3図及び第1表に見るように反対になつている。第3図以外の結果も総て同一傾向を示した。

過冷却部の冷却する速さは対照の方が大きく，上述の熱容量の大小関係から当然のことと考えられる。過冷却点は対照の方が幾分低いようではあるが，推計学的に5% の危険率でこの差が有意であるとは云い切れない。対照と実験の過冷却点には明瞭な差は無いと考えるべきであろう。rebound の度合は実験の方が幾分大きいようであるが，推計学的にはこの差も有意とは判定出来ない。凍結曲線の水平部は第3図から明らかなように NaCl 溶液注射のばあいの方が持続時間が長く，凍結部の冷却速度は対照の方が大きい。

3) 虫に glycerin を注射したばあい

秤量後初凍結（対照実験）した個体を十分融かした後，glycerin* を注射器で前蛹の腹壁から体腔中に虫の血液の大体15重量 % になるように注射した。更に正確な注射量を知るために直ちにこの虫を秤量した。注射した glycerin が成るべく体内に一様に分布するように虫を軽く指で押しながら転がした。この虫を室温下に40分位放置しておいてから冷却して凍結曲線を求めた。glycerin 注射を受けた個体のうち大多数のものは変態して蛹化したが，羽化した個体はなかつた。単に凍結しただけの個体は羽化する（朝比奈・青木・篠崎, 1953, 1954）ことから

* 武田製の特級試薬を使用。



第 4 圖　前蛹の初凍結曲線(○)と glycerin を注射してから測定した再凍結曲線(●)。
前蛹の目方：239 mg，注射された glycerin の量：21 mg。

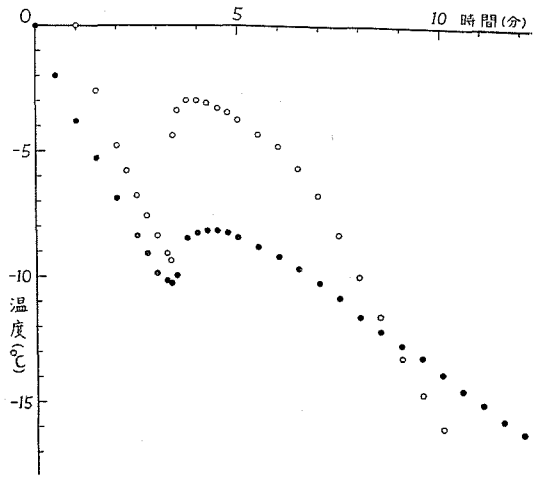
みて，glycerin 注射個体が羽化し得ないのは，glycerin の影響と思われる。ともあれ実験の際には glycerin は虫の生命には何らの悪影響も及ぼさなかつたと思われる。

glycerin は氷晶の進行を著しく阻害する作用があるので (Brann, 1918)，体腔中に glycerin が注射されたばあい，血液中での氷の伸びる速さはやはり遅くなると考えられる。又 glycerin を虫に加えることは，虫の熱容量の増加と血液の濃度増加をきたす。これ等のことから glycerin 注射により凍結曲線は色々な変化を受けるはずである。結果は第 4 図と第 1 表に示されているが，第 4 図以外の個体も同一傾向を示した。過冷却部の冷却速度は，glycerin を注射したばあいの方が小さいが，これは熱容量の増加から了解される。過冷却点の間に大きな差は認められなかつた。rebound の度合は対照の方が幾分大きいようであるが，これ又有意の差とは認められない。rebound 後の水平部は対照では認められるが glycerin 注射のばあいには殆んど認め難く，最高温度に到達した後直ちに降下が始まる。凍結部の温度降下の速さは glycerin 注射のばあいの方が小さく，しかもこの小さい速さのままで，少くとも −30°C 位まで直線的に冷却してゆく。この点については後に考察する。

4) 取り出された血液に glycerin を加えたばあい

前述のように，虫に glycerin を注射すると，その凍結曲線に顕著な影響が現われて来る。体外に取り出した血液に glycerin を加えたばあいにも同じような変化が見られるか否かを調べてみた。

虫体の前端部に穿刺して開けた孔から流出する血液を小試験管にとつて秤量して血液量を求めてから，凍結曲線をとつた。次いで凍つた血液を十分融かしてから注射器で血液の約15重量％の glycerin を加え，更にその正確な量を秤量して求めた。極めて細い針金でよく攪拌して血液と glycerin を混和し，これを30分位放置してから，その凍結曲線を再び求めた。凍結は約 −30°C の冷却槽中で行つた。その結果は第5図と第1表に示されているが，どの実験例も同じ傾向であつた。虫の凍結曲線が glycerin 注射によつて受ける変化と，血液の凍結曲線が glycerin 添加によつて生ずる変化とが定性的に全く同じであることは第4図と第5図の比較から了解されるであろう。過冷却部の冷却する速さは glycerin を加えた血液の方が小さかつた。過冷却点は，glycerin を加えたことによる氷点降下* を考慮に入れぬばあいは，glycerin を加えた方が5°C位低いが，これを考慮に入れると殆んど差異は認められない。然し −21°C の冷却槽で行つた実験では，glycerin を加えぬばあいには −13.5°C で凍結が始まつたのに，glycerin を加えたばあいには −21°C 迄過冷却し，然もその温度で10分間も過冷却が破れず測定を中止した例もあり，また加えぬときは −11°C で過冷却が破れたのに，加えたばあいは −25.5°C 迄過冷却してから凍結の始まつた例もある。これ等の事実から考えると glycerin は血液を，より低温にまで過冷却させる能力があるように思われる。rebound の度合は行つた実験総てについて見ると大差はないが，過冷却点が低くなると後に述べる理由によつて rebound の度合も大きくなるので，対照と実験で過冷却点の喰い違いの大きい例は除いて比較した方が意味があるのでこの比較を行つてみた。このばあいは第1表の註に見るように明らかな差異が認められ glycerin を加えたばあいの方が rebound の度合が小さく，したがつて過冷却の破れたときに出来る氷の量も少いものと思われる。水平部は，血液のばあいにも，熱容量が小さいためか虫のば



第5圖 血液の初凍結曲線(○)と glycerin を加えてから測定した再凍結曲線(●)。
血液量： 101 mg，加えられた glycerin の量： 15 mg。

* 約 3.4°～4.6°C である。

あいほど明瞭ではないが，認めることが出来る。然しながら glycerin を加えたばあいには殆んど存在せず，rebound 後直ちに温度が降下し始める。凍結部の冷却速度は，glycerin を加えたばあいの方が遅いことは，虫に glycerin を注射したばあいと同様である。然もこの遅い速さで −20°C 位迄は直線的に冷却して行く。

IV.

以上の実験結果は血液の状態と凍結曲線の型との間には密接な関係のあることを示すもので，虫体の凍結の主体は血液にあると云うことを暗示している。次に以上の実験で人為的に変えられた血液の状態と凍結曲線の型との関係を少し検討してみたい。

1) 虫から血液を抜くと前述のように，その含水量，熱容量が減少する。血抜きの実験に使用した虫の体重は平均 368 mg で，120 mg の血液が抜きとられ，248 mg になつた。虫の全含水量及び血液の含水量は夫々 60.9% と 75.2% であり，血液量は全体重の 41.6% であるから，虫の体の水 224 mg（うち血液に含まれる水は 115 mg）のうち 96 mg の水が抜き取られたことになる。これは最初 100 の水があつたとすると血抜き後には 57.1 になつたことになる。熱容量は 0.29，血を抜いた後は 0.18 となる。* このことが前述の凍結曲線に生じた色々の変化の一つの大きな原因となつている。

rebound の度合即ち rebound point と過冷却点との温度差は生じた氷によつて放出される潜熱と，虫の比熱と，外部に奪われる熱によつて定まる。この値は対照と実験の間に差はなかつた。定性的に考えると，対照では生じた氷の量は血抜きより多いが熱容量も大きいため大体相殺されて差が現われなかつたと考えられる。水平部が対照では認められるのに，血抜きでは殆んど存在しないことは，次のように説明される。前者では rebound に達してからも熱容量が大きく冷え難いことと，未だ相当量の氷が生成しつつあるために水平部が認められるのであり，血抜きでは，血液内の水分は rebound に際して大部分凍結してしまつたためと考えられる。凍結部の冷却する速さも血抜きの方が大きい。これも熱容量の大小で説明できる。

過冷却部の冷却する速さと，凍結部のそれを比較してみよう。後者では体内に氷を生じた結果虫体の熱容量及び熱伝導度が変つてきているために，たとえ外囲との温度差が両者で同一であつても冷却する速さは異るはずである。しかし前述のように測定された温度は体の一局部の温度であつて体全体がその温度になつているとは限らないが，一応測定された温度を虫全体の温度と考えてみる。凍結部の冷却する速さは，氷の生成即ち潜熱放出がないばあいには，過冷却部のそれと近似的に等しいと考えてもよい。この比較は勿論同一温度範囲で行うのであるが，過冷却部と凍結部の冷却する速さの比が 1 に近い程，凍結部に於ける氷の生成，したがつて潜

* Luyet 及び Gilchrist (1935) によれば鳥類，哺乳類の赤血球の比熱は約 0.8，血漿のそれは約 0.9 である。昆虫と脊椎動物の比熱は同じであるとは云えないが，イラガ前蛹及び血液の含水量は上記の値であることを考慮に入れれば，虫の比熱も此れ等の値に近いであろう。それ故虫全体の比熱を 0.8，血液のそれを 0.9 と假定してみた。

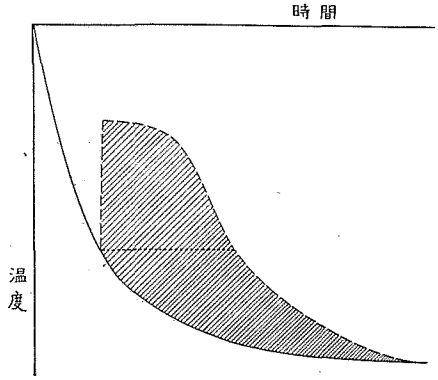
熱の放出は少く又1より小さくなる程未だ体内に氷の生成が行われているものと考えることができる。この比の値は −10°～−20°C に於て対照が 0.78，血抜きが 0.81 で大差はないが，この差は有意であり，幾分対照の方が凍結部でも氷の生ずる割合が多いものと思われる。恐らくここでは細胞から引き出された水の凍結に差のあることが 0.78 と 0.81 と異なつた値を示した一つの原因であろう（第2表）。

第 2 表

實驗處理		過冷却部と凍結部の冷却する速さの比	凍結曲線により圍まれた面積	含水量
血液を抜たい前蛹	對照	0.78±0.11 (+)	100	100
	實驗	0.81±0.10 (41)	72.6±7.3 (23)	54.8±5.7 (23)
NaCl で血液を置換した前蛹	對照	0.70±0.06 (−)	100	100
	實驗	0.68±0.07 (19)	133±7.3 (6)	112±2.0 (6)
glycerin を注射した前蛹	對照	0.71±0.11 (+)		
	實驗	0.53±0.07 (17)		
glycerin を加えた血液	對照	0.75±0.09 (+)		
	實驗	0.44±0.06 (13)		

(註) (+)：差は有意である。
(−)：差は有意でない。

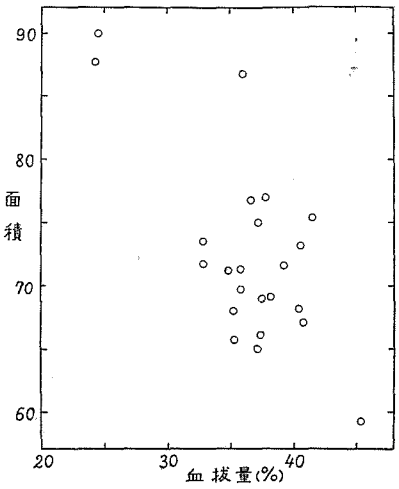
第6図の実線は，或る溶液が過冷却状態のままで，外囲の温度にまで冷却されたばあいの冷却曲線であり，破線は同一溶液の凍結曲線で，これ等両者に囲まれた斜線部の面積は近似的にできた氷の量に比例すると考えられる (Maximow, 1914；Walter 及 Weismann, 1935)。次に同一濃度ではあるが，容積の異つた2つの溶液を同一温度で凍結させると，できた氷の量の全含水量に対する割合は同一であるが，できた氷の量は液量の大きい方が多く，上述の面積も大きくなる。さて虫のばあい，対照と血抜きとでは血液濃度は同一であるが，その量は前者の方が大きい，したがつて前者の方が生ずる氷の量も多いことになる。凍結曲線を分析して，これを確めるには，虫の冷却曲線を求めることが必要であるが，実際上このことは困難なので，ここでは凍結曲線と過冷却点を通り横軸に平行に引かれた直線とで囲まれた面積を比較してみた（第6図の点線より上部）。この面積の大小とできた氷の量との間には大雑把に云つてある程度の平行関係が存在すると考えられる。実際問題として，この比較は主として対照と血抜きの凍結曲線で，大体過冷却点と rebound point の等しいもので行つた。この際 rebound point と過冷却



第6圖 冷却曲線と凍結曲線
(本文參照)

点の差 (rebound の度合) が実験と対照で少しく異るばあいには，この差の小さい方の過冷却点を，差が等しくなるように下方え平行移動させて補正した。面積は planimeter で測定した。23 測定の平均として，対照の面積を 100 としたとき，血抜きでは 72.6 なる値が得られ，後者の方ができた氷の量が少いものと認められる。この 23 測定の含水量は対照を 100 としたとき，血抜きで 54.8 であつた (第 2 表)。

第 7 図は横軸に抜いた血液量 (全体重に対する %)，縦軸に上述の面積の比をとつて plot したもので，点の散らばりは大きいが，傾向としては抜いた血の量の大きい程面積は小さく，出来た氷の量も少いと云えるであろう。* 体内に生じた氷の量の直接測定は目下進行中である。



第 7 圖　抜かれた血液量と凍結曲線の圍む面積の關係。
抜かれた血液量は全体重に對する百分率を現わし，面積は對照のばあいを 100 としたときの實驗の面積を現わす。此の量は体内に生じた氷の量と平行關係があると考えられる (本文參照)。

2)　血液よりも含水量の大きい 0.6 M NaCl 溶液を抜いた血の量にほぼ等しい量だけ注射すると，血抜きのばあいとは逆に対照の方が含水量が小さくなり，また凍結曲線に生ずる変化が全く逆になつている。この実験に用いた虫の目方は平均 341 mg，抜いた血液の量は 125 mg，注射した NaCl 溶液の量は 128 mg であつたから，虫の全含水量は 208 mg であつたものが，注射後には 238 mg に増加している。** 前述の虫及び血液の比熱を用い，NaCl の比熱を 1 とすると，虫の熱容量は 0.27，注射後には 0.29 になる。このことから，過冷却部の冷却する速さの大小関係が血抜きのばあいとは丁度逆につていることが説明出来る。

rebound の度合は対照と NaCl 注射の間で推計学的にみて有意の差の存在しないことは前述の通りであるが (第 1 表)，NaCl 溶液中を氷晶が延びる方が血液中を延びるよりも速い (篠崎，1954) から，過冷却が破れた際 NaCl 溶液を注射したばあいの方が一時に多量の氷を生ずるため熱容量が大きいにも拘わらず rebound の度合に差が現われなかつたのであろう。

NaCl 溶液注射のばあいに，水平部が長く続くのは，含水量が多くそれだけできる氷の量も多く，且つ熱容量が大きいため冷え難いことも一つの原因となつているものであろう。

凍結部の冷却する速さは対照の方が大きい。これも血抜きのばあいとは全く逆の関係であり熱容量の大小から理解できる。

過冷却部と凍結部の冷却する速さの比は，対照が 0.70，NaCl 注射が 0.68 で差なく，凍結

---

*　相關係數 $r=-0.67$ で，5% 以下の危險率で有意である。
**　虫 (60.9%)，血液 (75.2%) 及び NaCl 溶液 (96.5%) の含水量から計算できる。

部での氷の生成程度は両者で大体同じくらいである（第2表）。

凍結曲線と過冷却点を通る直線とで囲まれた面積は，対照を100とすると，NaCl溶液注射のばあいには6測定の平均として133となる。* したがつて，NaCl溶液注射の方ができた氷の量も多いことは明かであり，血抜きのばあいとは逆である。このばあいの含水量は対照の100に対して，注射のばあいには112であつた。注射量と面積の間の関係は例数が少いため明かには認められなかつた。

血液の大部分を0.6 M NaClで置換したばあいの凍結曲線の変化は，含水量の増加（熱容量の増加）と，NaCl溶液中の方が氷のできる速さが大きいことから説明できる。

3) glycerin溶液中では氷晶が進行する速さは，純水中よりも非常に遅くなる。即ちglycerinは氷晶の生長を抑制する（Brann, 1918）。虫にglycerinを注射すると，虫の熱容量，血液濃度は大きくなり，その上glycerinの上述の性質が加わつてくるために，凍結曲線に色々な影響が現われてくることが予想される。またglycerin注射によつて血液の濃度が増大すると，始めは細胞から血液中えの脱水が行われ，次いでglycerinが細胞内に入るにつれて水も再び細胞内え透入すると云う変化が起るはずである。注射後30～40分放置してから測定したのであるから，体内に於ける水とglycerinの移動は，だいたい平衡に近い状態であるとみてよいであろう。

この実験に使つた虫の目方は平均368 mgで，その熱容量は0.29である。これに比熱0.58のglycerinが25 mg注射されたのであるから熱容量は0.31になる。

reboundの度合は，対照では8.0°C，注射されたものでは7.5 °Cで，この差は推計学的に有意とは云えない。glycerinは氷の伸びる速さを遅くするので，注射したばあいの方がreboundの度合が小さくなることが期待されるが実際には両者間に殆んど差が存在しない。これは虫の過冷却の破れる温度が−20°C附近で極めて低いため，両者に於て凍結が始まつた際の氷の生成される速さに大差がなかつたためと想像される。

凍結曲線の水平部はglycerin注射のばあいには，殆んど認められなくなり，最高温度に到達した後直ちに温度が下り始める。この水平部に続く凍結部の温度降下の速さは，glycerin注射のばあいの方が小さく，しかもこの小さい速さで−30°C位まで直線的に降下する（第4図）。対照のばあいに凍結部の冷却する速さが大きいのは，水平部の終り頃には生ずる氷も少くなるからであろう。これに反しglycerin注射のばあいは，虫の温度がreboundによつて上昇するのと，氷の生成によるglycerinの濃縮が起り，それ等のために氷晶の進行がより遅くなる結果，氷によつて放出される潜熱が少くなるので，水平部が殆んど現われないと解釈される。glycerin注射では，前述の通りglycerinによつて氷の生成が抑えられるので凍結部に於いても，なお氷の生成が徐々ではあるが，長い間続くためこの部の冷却する速さが小さく，しかもそれが長く続くと考えられる。

---

* 血抜きの場合と同様比較し得るdataでの測定であつて，同様の補正が行つてある。

過冷却部と凍結部の冷却する速さの比は，対照が0.71，glycerin注射が0.53で有意の差があり，この値からもglycerinを注射すると，凍結部に於ても，尚相当量の氷が生成されていることが判る（第2表）。

以上凍結曲線に生じた変化は，上述の如く体内に注射されたglycerinの影響によつて一応説明される。

4) 体外に取り出した血液にglycerinを加えたばあいにも，その凍結曲線に生ずる変化は，虫にglycerinを注射したばあいのそれと同様であることは前に述べた。実験で使用した血液量は平均111 mg，加えたglycerin量は17 mgで，熱容量は前者では0.10，後者では0.11となる。

reboundの度合（第1表）は，実験されたdata総てについて考えると対照で6.1°C，glycerin添加のばあいが5.1°Cで有意の差があるとは判定できなかつた。然しreboundの度合は，過冷却点が低ければ低い程大きくなる。* それ故血液のみのばあいと，glycerinを加えたばあいとの過冷却点の余り違わぬ例で比較すると，それ等の値は夫々6.7°C，3.2°Cになり，この差は有意となる。この実験では，虫に注射したばあいよりも，glycerin濃度が高い上に，過冷却の破れた温度も高いので，glycerinの氷晶の生長を遅延させる作用が強く，過冷却点が同じ位ならば対照のばあいより，過冷却が破れた際に生ずる氷の量が少く，したがつてreboundの度合も小さくなつたものと考えられる。更に過冷却が破れてから，rebound pointに達するのに要する時間は，対照のばあいは非常に短いが，glycerinを加えたばあには，少くとも15秒位はかかり，氷の生成を遅くする影響が顕著に認められる。

glycerinを加えたばあいには，水平部の認められないこと，更に凍結部の冷却する速さも血液のばあいよりも小さく，その小さい速さで割合低い温度まで冷却されることは，glycerinを虫に注射したばあいに見られる変化と全く同じで，同様な説明が，このばあいにも当て嵌まる（第5図，第1表）。

過冷却部と凍結部の冷却する速さの比は，対照が0.75，glycerin添加が0.44で，この差は推計学的に有意で，後者では凍結部でもなお相当量の氷の生成が引続き行われていることを示す（第2表）。

5) 無処理の前蛹の初凍結と再凍結に於ける過冷却点の平均に大差の存在しないことは，前述の通りであり，この初凍結と再凍結における過冷却点の間の相関係数（γ）は0.78で，この値は有意である。血抜きのばあいも対照と血抜きの間の過冷却点に大きな差はなく，したがつて血液量の多少は余り過冷却すると云うことには関係しない様である。相関係数は0.57で有意である。血液の大部分をNaCl溶液で置換したばあいも同様に過冷却点の間に大差なく，相関係数は0.47である。glycerin注射のばあいも過冷却点間に大きな差は認められなかつた。**

---

* 氷点との差が大きく，過冷却が破れた際に一時に生ずる氷の量が多くなるからである。

** glycerin注射による氷点降下を考慮に入れても過冷却点間に有意な差は存在しない。

相関係数は0.59で有意である（第1表）。以上のことから，初凍結と再凍結の過冷却点の間に，正の相関関係の存在することから，イラガ前蛹では全く処理を施さぬばあいも，或いは血液量を減じたり，血液の大部分をNaCl溶液で置換したり，或いはglycerinを注射したりして，体内の血液の状態，組成を変えたばあいにも，初凍結（対照）において低い温度まで過冷却した個体は，再凍結においても低い過冷却点を示す。しかも上述の総ての測定で得られた過冷却点の値は互いに大体等しい。更に体外に出した血液は−10°C位で過冷却が破れるのに虫は−20°C位まで過冷却する。これ等の事実から考えると，体表，体壁或いは体壁内面の構造乃至はその性質が，虫の体内にある血液或いは加えられた液の過冷却点を決定するのに，かなりの程度に関与していると思われる。

体外に取り出した血液の過冷却点も初凍結，再凍結において差は認められない。相関係数は0.35である（第1表）。血液にglycerinを加えたばあいは，血液の過冷却点より，低い温度まで過冷却されるが，glycerinを加えたことによる氷点降下を差引くと，平均として過冷却点の間に有意の差は見出せない（第1表）。然しglycerinが加えられたばあい，非常に低い温度まで過冷却することもある。したがつて液の組成も過冷却を左右する一つの要因となり得ると云うべきであろう。

V.

以上述べたように，血液の状態，組成を人為的に変化せしめたばあい凍結曲線に現われる変化は，血液の凍結過程の変化から定性的にではあるが説明できる。即ち血液の凍結過程の変化は虫体の凍結曲線上にはつきりと反映してくる。云い換えれば血液の凍結が虫体の凍結のばあい主体をなしていると云うことができる。過冷却が破れた後の体温上昇は非常に大きく，しかも極めて短時間内に最高点に達する。即ち急激な氷生成の持続時間は極めて短いと云う事実は短時間内に相当大量の氷が生ずることを示すに他ならない。このためには過冷却の破れた後連続的且つ急速に凍結が進行する必要がある。イラガ前蛹においても細胞内部は凍り難く，過冷却度が余程大きくなければ，いわゆる細胞内凍結は起らない。本実験条件の下では細胞外凍結のみの起るばあいが多いことは，一度凍結した個体もほとんど正常に蛹化，変態する個体の多いことからみても明かである（朝比奈・青木・篠崎，1953, 1954）。この細胞外凍結が起るには細胞が密接に氷に接触することが必要で，この接触した氷によつて細胞内から水が奪われ細胞表面で氷が生長するのである。したがつて細胞外凍結のばあい，氷が生ずるためには，細胞の抵抗に打勝つて細胞内部より水が奪われねばならぬので，氷の生成速度は連続している液相のばあいに比べて小さくなる。それ故過冷却の破れた後の急激な氷生成に細胞の凍結が主役を演じているとは考えられない。この点から考えても，また量的にみても全体重の42%余りを占め且つ含水量が多く，全体腔を満している血液の凍結が主体をなしていると考えるのが自然であろう。

本研究の御指導に対し，青木教授に厚く感謝する。

摘　要

イラガ前蛹を材料として，1) 虫体より血液の一部を除去したばあい，2) 血液の一部を等張の NaCl 溶液と置換したばあい，3) 血液の約15% になるように glycerin を体腔に注射したばあい，虫体の凍結曲線が如何に変化するかを調べた。このように血液の量又は組成が変つたために凍結曲線の上に現われた変化は，その時の血液の凍結過程及び体の比熱の変化から定性的には充分説明できる。また体より取出した血液に glycerin を加えたばあいに，その凍結曲線に現われる変化は虫体に glycerin を注入したばあいの変化と本質的には全く等しい。

これらの事実からイラガ前蛹の凍結は，少くとも凍結の前半は血液の凍結が主体をなしていると云うことができる。

文　献

青木　薗・篠崎壽太郎 1953　イラガ前蛹の過冷却について．低温科學，**10**, 103.

朝比奈英三 1950　生物の凍結過程の分析 II. 植物柔組織の凍結過程の顯微鏡的觀察．低温科學，**3**, 229.

———— 1953　生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞（ウニ）の凍結過程．低温科學，**10**, 81.

朝比奈英三・青木　薗・篠崎壽太郎 1953　越冬イラガ幼虫の耐凍性機構．昆虫，**20**, 11.

Asahina, E., K. Aoki and J. Shinozaki 1954 The freezing process of frost-hardy caterpillars. Bull. Ent. Res., **45**, 329.

Brann, A. 1918 The effect of dissolved substances on the velocity of crystallization of water. III. Further evidence that the existence of hydrates in solution explains the retarding effect of the solute on the velocity of crystallization of water. J. Amer. Chem. Soc., **40**, 1168.

Luyet, B. J. and E. F. Gilchrist 1935 On the specific heat of nucleated and non-nucleated erythrocytes. Biodyn. 8, 1.

Maximow, N. A. 1914 Experimentelle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot., **53**, 327.

篠崎壽太郎 1954　イラガ前蛹の血液中の氷晶進行速度．低温科學，生物篇，**11**, 1.

Walter, H. und O. Weismann 1935 Ueber die Gefrierpunkt und osmotischen Werte lebender und toter pflanzen Gewebe. Jahrb. f. wiss. Bot., **82**, 273.

Résumé

In the prepupa of slug moth, *Monema flavescens*, freezing of the body, at a temperature not much below about −20°C, is not always fatal, and after thawing the prepupa is capable of pupating and further emerging under suitable conditions (Asahina, Aoki and Shinozaki, 1954). When organs or tissue pieces are dissected out of the body, such as the heart, fat body and so on, and are moderately cooled with a small amount of the blood, freezing occurs only in the blood and not in the interior of the tissue cells, on the outer surface of which water drawn from the cell interior freezes (extracellular freezing) and ice crystals grow. Further the cells intracellularly frozen are damaged without exception in our experience (Asahina, 1950 and 1953). From these observations it is supposed that freezing of the prepupa occurs only in the blood and not in the tissue cells themselves.

To confirm this supposition, therefore, changes appearing in the shape of the freezing curve were carefully examined, after the following treatments which brought about changes in the amount or constitution of the blood. 1) A part of the blood was drawn from the body, 2) a part of the blood was exchanged for an equal amount of isotonic NaCl solution (0.6 M) and, 3) glycerin was injected so as to equal about 15% of the blood contained in the prepupa. Further the freezing process of squeezed blood containing 15% glycerin was also examined for comparison. The experimental results show that the changes found in the freezing curve can be, at least qualitatively, elucidated by the changes of the heat capacity of the body and of the freezing pattern which have been caused by modifying the blood properties, and that the shape of the freezing curve of animal in which glycerin has been injected and that of squeezed blood containing glycerin are essentially identical. From these facts it may be safely said that all of the ice is formed in the blood, in other words, blood freezing plays the most important part in the process of the freezing of the prepupa of slug moth.