



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	耐凍性昆虫を超低温で凍結生存させる一つの方法
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo; 青木, 廉 他
Citation	低温科学. 生物篇, 16, 55-63
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17608
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p55-63.pdf



耐凍性昆虫を超低温で凍結生存させる一つの方法*

朝比奈英三・青木 廉**

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

I

動物を超低温まで冷却する際におこる凍害の主因を、媒液の凍結でできる濃縮塩溶液の作用に帰するかぎり^{11),19)}, のろい冷却は塩溶液の作用がはげしい温度域に細胞を長期間さらすという意味において甚だ動物に有害である。従つて一個体の動物を生かしたまま超低温に冷却することは、それがごく少形のものでない限りなかなか困難なはずであり、実際にもこのような低温で凍結生存に成功したものは、きわめて微少な線虫等よりほかにはほとんど知られていない¹⁰⁾。しかしわれわれの予想では細胞外凍結の状態を保つたまま冷却することができれば、少なくとも或程度以上の耐凍性をもっている動物は相当の低温に耐えられるようになるはずであつた¹⁾。又実際にもイラガ *Cnidocampa flavescens* の前蛹はほとんど固形炭酸の温度近くまで冷却されても生きている個体があつたし(青木・篠崎 1953 未発表), あるタマバエ *Eurosta solidaginis* の幼虫は -55°C に 18 日間さらした後にも変態を完了出来たという¹⁵⁾。そこでイラガ前蛹をそれぞれ細胞外又は細胞内の凍結をおこしやすいような条件において超低温まで冷却し, 上記の予想をたしかめようと試みた。

まず 1957 年春に或程度の予察的実験を行つて成功したので, 翌春さらにこれをすすめて液体酸素中で 1 日の凍結後ほぼ完全に近い状態で生存させることができた。本文はこれらの実験の報告である。尚イラガ前蛹の凍りかたについてはすでにしばしば述べているので, この動物の気候的低温における凍結過程については前報^{6),7),17)}を参照して下されば幸である。

II

イラガの越冬前蛹はその内臓がかなり蛹のそれに近づいた状態の幼虫形であつて, 体重は大体 250~450 mg である。この虫は水や空気を通しにくい堅いまゆ¹⁶⁾をつくつて越冬し, その中に入つたまま翌夏に変態を終つて羽化するのである。まゆの中の前蛹は冬期にはきわめて高い耐凍性をもつていて, たとえば約 -40°C の温度では 1 日凍結しておいても少なくとも一

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 460 号

** 現在の所属 東北大学理学部生物学教室

部の虫は羽化することができる。そこで -100°C まで冷却できる特殊な低温箱*を使つてまず予察的な冷却実験を行つた。このときの材料は前年晩秋に野外で採集したものを戸外温度に保存し冬期以後は 0°C の室内においたものである。これをまゆに入つたまま各30個づつペトリ皿に入れて、まず -20°C で予かじめ虫体を1日凍らせたものと**, 0°C においてあつたものとを冷却してみた。これら二つのペトリ皿を同時に低温箱に入れ、 0°C から約1時間半かけて箱内の気温を -83°C まで下げた。それからペトリ皿をとり出し室温で虫体を融解させた。その結果は -20°C で予備凍結した虫達は全滅していたが、 0°C から冷却したものは少なくとも数頭が生存していた。この方法だと低温箱に入れる際、 -20°C で凍らせてある虫体も一時いくらか暖められるが、その後の冷却速度が最初のうちは大きいので***, 恐らく虫体は融けることなく冷却される。ところが 0°C から低温箱に入れたものは冷却の途中で虫体の凍結が -20°C 附近において始めておこるはずで²⁾, 体内にきわめて多量にある血液がまづ凍り、ごく短時間に大量の氷ができる¹⁷⁾。従つてこのようなときには、予備凍結をさせた前記の場合に比べると、少なくとも -20°C 附近では虫体の冷却速度は凍結潜熱の放出のためになりに落ちることになるであろう。このことが冷却される虫の生存を可能にしたかも知れないので、次に予備凍結をしない材料で実験をくりかえしてみた。即ちA. B. 二つのペトリ皿にそれぞれ30のまゆを入れ、Aは -5°C に、Bは 0°C にそれぞれ1日おいてから前と同様に低温箱内に入れて冷却した。このときの冷却速度は -5°C から -90°C まで1時間半かかった。この温度に更に45分おいて

第1表 -90°C に冷却してから120日後の虫の状態

	A	B
冷却前の温度	-5°C	0°C
虫の数	30	30
生きている虫	9	6
変態が進んでから死んだ虫	4	4
変態が進まずに死んだ虫	17	20

からペトリ皿を箱から出して室温で虫体を融解させた。このときは直ちにまゆを開いて虫の生死をしらべず、このまま室温に放置して羽化を待つたが常態の前蛹が羽化するのに要する日数****をはるかに過ぎてても1頭も生れてこないで、約4ヵ月後にまゆを割つて中の虫をしらべた。結果は第1表に示すようにA. B. 共

大差はなく、使つた前蛹の少なくとも1/3位の数のものが、 -90°C までの冷却に耐えたことが明らかとなつた。

III

以上の予察実験によつて、この程度の冷却速度では虫体を超低温で凍結生存させることが可能であること、又おそらく -20°C より高温で予備凍結してあるものを超低温に急冷することは、虫の生存のために有害らしいことがわかつた。しかしこれでは予備凍結すること自体が

* 堀健夫教授の御好意により使用させて頂いた。尚本装置については堀(1956⁹⁾を参照されたい。

** この虫は非常に過冷却しやすいが、 -20°C にさらすと、40分以内にはほとんどの個体も凍結してしまう⁷⁾。

*** 低温箱内の冷却曲線をとると、最初の30分間は大体 $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のはやきで気温が下る。

**** 20°C では45~50日間かかる。

其後の過程に影響したのか、それとも予備凍結の温度が不適當であつたのかは不明である。そこで次の春に今度は -10°C 乃至 -30°C のいろいろな温度で過冷却状態又は凍結状態にある虫体を、急速に液体酸素 (約 -183°C) につけて冷却してみた。この方法は、もし無処理の虫に適用した場合には必ず細胞内凍結をおこす条件であるとおもわれるから⁷⁾、これによつて超低温に冷される際の凍害の機構の一つが明らかになるかも知れないと考えたのである。

材料はイラガ越冬前蛹を二カ月間 -5°C にさらして充分耐凍性の高い (Hardy) 状態にしておいたものである。まづまゆに入つたままの前蛹を 10 個ずつ多数の小孔をあけたビニール布でつつみ、4 個の包、A・B・C・D を作つた。A・B は 2 日間、C・D は 1 日だけ $-30\sim-35^{\circ}\text{C}$ にさらして予備凍結を行つた。これらの包みを -35°C の室内で急に液体酸素中に直接沈めた。このときおこる液体酸素の沸とうは一つの包みごとに約 3.5 分続いたから、このような冷却条件では、小組織片の場合⁸⁾ より少なくともその到達温度附近ではかなり冷却速度がおちることはたしかである。いずれの包みも液体酸素中にまる 1 日おいてから -30°C の室に出して約 3 時間おき次に 0°C の箱に移して融解させた。更に 1 日後にすべて 20°C の恒温箱に移したが、B・D は 3 日後にまゆを割つて虫の生死をその背管 (心臓) のうごきからしらべた。A・C は 70 日後にまゆを割つて前蛹の変態の進行程度をしらべた。これらの結果は第 2 表に示す。

第 2 表 液体酸素中で 1 日冷却後の結果

	A	B	C	D
使用個体数	10	10	10	10
-30°C 予備凍結日数	2	2	1	1
結果	70 日後： 3 前蛹* 生, 7 前蛹死	3 日後： 6 生存, 4 不明	70 日後： (3 蛹**+4 前蛹) 生, 3 前蛹死	3 日後： 7 生存, 3 不明

* 3 個のうち 2 個は或程度の変態進行をみとめた。

** 3 個のうち 1 個は完全に成虫化していたが脱皮出来なかつた。

この結果から、イラガ前蛹では -30°C 付近の予備凍結は超低温への急冷却に対して甚だ有効な凍害防止法であり、且つ予備凍結の時間も 1 日あれば充分であることがわかつた。そこで次に、予備凍結したものとししないものの比較を更に条件を細分して試みた。即ち 0°C に保存したものを、 -10°C で 1 日過冷却状態にあるもの、及び -10°C *, -20°C , -30°C の各温度で 1 日予備凍結させてあるものをそれぞれの温度の低温室内で直ちに液体酸素で冷却してみた。このときは同一処理に対して、まゆに入つたままの虫とまゆから出した裸の虫とをそれぞれ 10 個ずつ使用した。冷却及び加温の方法は前記の場合と全く同様で、ただ加温のとき -30°C におく時間を 2 時間にした。結果をまとめて第 3 表に示す。

第 3 表の (5) の実験では、まゆに入つたままの前蛹は、 20°C に保存して 70 日後に開いて

* この温度のままでは虫体は凍りださないから一旦 -20°C に冷して過冷却をやぶり以後 -10°C におく。

第3表 各温度での前処理の影響*

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
使用個体数	裸 10+繭 10	裸 10+繭 10	裸 10+繭 10	裸 10+繭 10	裸 10+繭 10
前処理	0°C	-10°C過冷却	-10°C予凍	-20°C予凍	-30°C予凍
結果	全死	全死	全死	全死	裸: 9生 繭: 10生***

* 前処理→-183°C, 1日→-30°C, 2時間→0°C, 1日→20°Cに保存。裸前蛹は1日後, 繭に入ったままの虫は70日後に生死をしらべた。

*** 変態の進行状態は本文参照。

みるとすべて生存しており, 90日現在の状態は, このうち5個は蛹(このうち2個は不完全)であり, 2個はかなり変態の進行した前蛹で, 残りの3個は休眠状態にあるいわゆる永久幼虫⁹⁾の形であつた。又対照としてまゆに入つたまま10個の虫を-30°Cで1日予備凍結後, 液体酸素に入れることのみ除いて本実験と全く同様に処理したところ, 20°Cで55日後において, 2個は成虫となり, 4個は蛹であり, 3個は永久幼虫の形で生存し, 1個のみが前蛹のまま死んでいた。

又第3表の(1)から(4)までの実験個体はすべて凍死したのであるが, これらの虫体を融解直後に切開してみると内部器管の著しい破壊が認められた。たとえば脂肪細胞の大部分はひどく形態がこわれて脂肪組織全体としてもバラバラに分離し易くなり, ときには体壁からほとんど遊離して血液中に分散していた。又血液の表面には脂肪細胞から流出した油滴が一面に浮んでいた。このような内臓組織の破壊は実験(1)(2)(3)において特にはなはだしかつた。一方虫が生存している(5)の場合は, 虫体を切開してもほとんど異常は認められず, ただ脂肪細胞のなかにはその内部のほぼ一定の大きさのこまかい多数の油滴が, 合体していくつかの大形の油滴に変形しているものがあつた。

IV

イラガ越冬前蛹を-20°C以下の気温にさらすとその体組織には細胞外凍結がおこり虫体はきわめて固く凍結するが⁷⁾, 凍つた虫体を約-40°Cで1日保存してもその組織細胞には何等の変化もみとめられない(朝比奈未発表)。一方この虫の組織に, 急速冷却等の人工的方法を用いて細胞内凍結をおこさせると, 細胞内部の構造は明瞭にこわされるが, 特に脂肪細胞の場合には甚しく崩壊する⁹⁾。これらのことから考えると, 恐らく前述の実験(1~4)の場合にはすべての昆虫に細胞内凍結がおこつたものであろう。これに反し実験(5)の場合は, 虫体の組織細胞がほとんど細胞外凍結のままで超低温に耐えていたものと考えられる。但しこの場合少なくとも融解後90日以内にはまだ羽化を完了した個体がないことからみて凍結が全く無害であつたとは云えないかも知れない。Salt (1957) は小麦のクキバチでは, 融解後数日乃至1カ月後に致命的となるような凍害がみとめられると述べている¹⁵⁾。前記イラガ前蛹の場合は大多数のものが3カ月以上生存しており, しかもその相当数のものに変態の進行がみとめられるから, 二

次的な凍害(たとえば変態や脱皮等を阻害するもの)はあるにしても、直接致命的となるような害は受けなかつたと考えてよいであろう。

さて上述のように -20°C より高温においたものはその後の急速冷却によつて、すべて細胞内凍結をおこして死んだと考えると、 -20°C での予備凍結の際、細胞外の氷の生長のため細胞はかなり強く脱水されるであろうが、まだ細胞内部には充分凍結をおこすに足りるだけの水が残っていたものと思われる。従つて -10°C での予備凍結が無効であつたことはきわめて当然である。又 -10°C 及びより高温におかれた不凍結個体に細胞内凍結がおこつたことは、前述の低温箱を用いた実験の場合よりはるかに速やく冷却されたため、凍結開始に伴う虫体からの潜熱の放出も到底組織細胞の冷却速度を充分におとすことができず、従つて細胞は脱水される余裕がなく遂に細胞内凍結をおこしたものであろう。これらに対して -30°C で予備凍結した虫体が、急速に超低温まで冷却されてもほとんどすべて生存できることは次の様に解釈される。この温度で1日*の予備凍結をすると、虫体内の細胞外凍結は充分に進行し、組織細胞は脱水されて凍り易い状態にある水をほとんど失つてしまう。従つてこうなつてからは甚だ急速に冷却されてもはや細胞内が凍りだすおそれはないものと思われる。

このように細胞内凍結がもはやおこり難いほど充分に脱水された細胞には、まだどの位の水分が残っているのであろうか、篠崎(1958)によれば、3月下旬乃5至月上旬のイラガ越冬前蛹は、 -2°C で凍らせておくと体内の全水分の約50%が氷にかわる。この量は大体このときの血液中の含水量に等しいので、これより体温が下ると、細胞中から引き出された水分によつて体内の氷を生長させることになる**。 -30°C では、虫体内の水の約90%が凍つてしまうからほぼ10%の水が残存していることになる¹⁸⁾。Lockett 及び Luyet (1951)は乾燥した小麦の種子を水に浸してその含水量をいろいろに変え、これを液体窒素で急に冷却した後の生死をしらべているが、それによると未吸水の種子は急冷却しても全く害をうけず、このときの種子の含水量はやはり10%内外である。しかし小麦の種子ではこれ以上の含水量のときもそれぞれ多少の被害を伴うとはいへ生存しており、含水量がそれ以上ならば種子に凍害がおこるといふ限界値は、恐らくゼラチンゲルの不凍条件¹²⁾である35%附近にあるといわれている⁹⁾。

同じ含水量をもつた細胞の凍結に対する抵抗性が植物と動物で果して異なるかどうかという問題にふれるには現在の資料はあまりに不十分であるが、完全個体の生物の耐凍性について考えれば次の様なことが指摘される。即ち Luyet 等の用いた小麦の種子では、その細部において含水量に差を生ずる可能性が大きいこと***、種子の一部分が凍死しても融解後の生長のときに他の部分の細胞が分化してこれを代償する能力が高いこと、等である。ところがイラガの場合は、体内の組織細胞が血液を介して含水量についてはほとんど相等しい状態を保っている

* おそらくさらに短時間で充分であろう。

** 実際には細胞内の水はその外面をうるほしている血液と常に平衡を保つように移動している管であるから血液中の水分が凍るに従つて細胞内の水は連続的に血液中に出てくる。従つて -30°C においても血液中の水分は失われない。

*** この胚子内で将来根となる部分は最も速く吸水する⁹⁾。

と考えられるので、部分的の凍害は種子等の場合よりむしろおこりにくく、もしおこるとしても超低温に及ぶ冷却条件では、それは或同一の性質をもつた組織全体が害される結果になるのであろう。前蛹の時期にはすでにこの虫の個体発生は充分進行しているために、一度生存に必要な体組織のうちのある一つが凍死してしまえばもはや他の細胞によつてこれを再生することはほとんど不可能と思われる。つまり凍結するときのその生物の分化の程度がその耐凍性の上に大きな影響をもつのであろう。

何れにしても耐凍性の甚だ高い生物は、その体の残存含水量を10%程度に減少させるような前処理によつて、その後の超低温への急冷却に際しておこる凍害をほとんど避けることができ、この理由は細胞内の凍り易い状態にある水が除かれたからだと解釈してよいであらう。酒井が最近耐凍性の高い植物の組織と皮層細胞で行つた実験の結果も同じ考え方によつて説明できるものである^{13),14)}。

V

イラガ前蛹の場合に、 -30°C 1日の予備凍結が以後の急冷却に対して細胞内凍結を防ぐのに有効だとすれば、このことは他の動物にあてはまつてもよいはずである。しかし -30°C で1日の凍結に耐える程耐凍性の高い動物は、少なくともわれわれの実験した範囲内ではきわめて稀であつた。樹上の越冬巢中に発見される鱗翅類幼虫はこのようなもの一つであつて、今回はエゾシロチョウの越冬幼虫をえらんだ*。この幼虫は長さ約2mm、体重平均1.7mg位で、厳冬期でも 10°C ~ 15°C の室内に持運ばれると、かなり活発に歩行することができる。この虫を -20°C より低い温度にさらすと、12時間以内にほとんどすべての幼虫が固く凍つてしまうが、少なくとも -30°C で2日間以内の凍結では殺されるものは一つもない。

実験に當つて、 0°C で保存してあつた越冬巢を分解し、その一部についたままそれぞれ約50頭づつの幼虫を3個の小さい全網かごに入れて冷却した。このかごを一つずつそれぞれ 0°C 、 -20°C 及び -30°C に1日さらし、それからかごのまま液体酸素中に3個とも沈めた。このときの液体酸素の沸とうは約20秒で終つた。1日後に液体酸素中よりかごをとり出し、 -30°C の低温室内に30分おきそれから 15°C の空気中に出して虫体を融解させた。室温で1日たつてからしらべると、 -30°C で予備凍結したのものでは、少なくとも60%以上の幼虫が生存していたが**、 0°C 及び -20°C で前処理した幼虫は一つ残らず死んでいた。

上記の超低温で凍結生存できた幼虫は常温の室内で飼養されたが、食草(リンゴの葉)をよく摂つて生長し、二回の脱皮を経たが遂に蛹化するに至らなかつた。この原因は凍結による二次的の害によるものか、或いは飼養法の失敗であるか明らかでないが、幼虫は融解後少なくとも2カ月間は生存し且つ生長したのであるから、細胞内凍結のような即時に致命的となる凍害をうけていながつたことは確かである。従つてエゾシロチョウ幼虫の場合にも、 -30°C での

* 今回使用した材料は釧路産のもので、飯島一雄氏からいただいた。ここに厚く御礼申し上げる。

** 越冬巢から幼虫を分離するときに、傷つけるおそれが多いので、 -30°C で予備凍結したグループのすべての幼虫の生死をしらべることはしなかつた。

予備凍結はその後の超低温への急冷却に際して細胞内凍結を防ぐことに役立つわけである。

摘 要

越冬イラガ前蛹を予かじめ 0°C 以下の色々な温度においてから超低温に冷却融解後の状態をしらべた。

まゆに入つたままの虫体を、初期の冷却速度が $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 程度の空気中において1時間半後に約 -90°C まで冷却した場合は、虫体を予じめ凍らせてから冷すと全滅するが、予備凍結をしないで冷却された虫には生きているものが多い。この後者の場合には虫体の凍結開始の際に放出される多量の潜熱が虫体の冷却速度をおとしたために、致命的な細胞内凍結をおこさずすんだものと解釈できる。

そこで細胞外凍結が充分進んで細胞が脱水されてしまえば、本来ならば必ず細胞内凍結を起させうる程の急速冷却を行つても、細胞は内部が凍ることなく超低温まで生きたまま冷却できるであろうとの予想のもとに、多数の前蛹をまゆのまま又は裸出して、 0°C 、 -10°C 、 -20°C 及び -30°C の各温度で予備処理をしてから液体酸素中に直接急に沈めてみた。1日後にこれらの虫を出して融解した結果をみると、まゆのあるなしに関係なく、 -30°C での予備凍結のみがその後の急冷却に際して昆虫を生存させるのに役立つ、その他の処理をしたものには1個体の生存者も発見できなかつた。こうして超低温で1日の凍結に耐えた昆虫の多くは融解後更に90日以上生存し、その半数以上に変態の進行を認めたが、蛹殻内でほとんど完全に成虫化した場合でさえこれらの虫は遂に羽化脱皮することができなかつた。超低温で凍結させたこれらの前蛹を融解直後に切開して組織細胞をしらべた結果では、 -30°C の予備凍結をしたもののみは殆んど異常がなかつたのに、その他の前処理をした虫の組織にはすべて細胞内凍結をおこしたと推定される崩壊がみとめられた。従つて -30°C 1日の凍結という前処理は、虫体内の細胞外凍結を充分に進行させ、体内の細胞はこのために脱水されて凍り易い状態の水をほとんど失つてしまつたと考えられる。それ故この後に急速に超低温まで冷却されてもはや細胞の内部が凍結するおそれはないものと思われる。

イラガ以外の動物であつても、もし -30°C で1日以上以上の凍結に耐えられる程耐凍性の高いものならば、同じ方法によつて超低温まで生きたまま冷却することができるであろうとの予想のもとにエゾシロチョウの越冬幼虫を使つて前と同様な実験を行つた。その結果は、 -30°C で予備凍結したものは大多数が生存し、凍らせずに 0°C においたもの及び -20°C で予備凍結したものは、超低温への急冷却によつてすべて殺された。

文 献

- 1) 青木 藤・朝比奈英三 1953 非常に低い温度における生物細胞の耐凍性の一機構. 科学, **23**, 147.
- 2) 青木 藤・篠崎寿太郎 1953 a イラガ前蛹の過冷却について. 低温科学, **10**, 103.
- 3) ————— 1953 b イラガ前蛹の過冷却に及ぼす冷却速度の影響. 低温科学, **10**, 109.
- 4) 朝比奈英三 1955 可動状態の動物の凍結及び過冷却による長期使存 (予報). 動物学雑誌, **64**, 280.

- 5) 朝比奈英三 1958 超低温で生存する動物細胞の凍りかたについて. 低温科学, 生物篇, **16**, 65.
- 6) 朝比奈英三・青木 廉・篠崎寿太郎 1953 越冬イラガ幼虫の耐凍性機構. 昆虫, **20**, 11.
- 7) Asahina, E., K. Aoki and J. Shinozaki 1954 The freezing process of frost-hardy caterpillars. Bull. Ent. Res., **45**, 329.
- 8) 堀 健夫 1956 水の薄膜の過冷却と蒸発 I. 低温科学, 物理篇, **15**, 33.
- 9) Lockett, M. C. and B. J. Luyet 1951 Survival of frozen seeds of various water contents. Biodynamica, **7**, 67.
- 10) Luyet, B. J. and M. C. Hartung 1941 Survival of *Anguillula aceti* after solidification in liquid air. Biodynamica, **3**, 353 (Smith, 1954 の引用による).
- 11) Meryman, H. T. 1956 Mechanics of freezing in living cells and tissues.
- 12) Moran, T. 1926 The freezing of gelatin gel. Proc. Roy. Soc., A. **112**, 30.
- 13) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存 I. 低温科学, 生物篇, **14**, 17.
- 14) ———— 1958 超低温における植物組織の生存 II. 低温科学, 生物篇, **16**, 41.
- 15) Salt R. W. 1957 Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. Canad. Entomologist, **89**, 491.
- 16) 篠崎寿太郎 1953 イラガの繭について. 低温科学, **10**, 127.
- 17) ———— 1954 イラガ前蛹の凍結. 低温科学, 生物篇, **12**, 71.
- 18) ———— 1958 凍結したイラガ前蛹の体内の水の量. 動雑, **67**, 38.
- 19) Smith, A. U. 1954 Effect of low temperatures on living cells and tissues, in Biological Applications of Freezing and Drying. Edited by R. J. C. Harris. Academic Press, N. Y., 1.

Résumé

Various organisms can be cooled in very cold liquid gases without any injury, provided that they have previously been desiccated to some extent. Since the extracellular freezing is considered to be a mode of dehydration from living cells, some organisms, at least frost-resistant ones, may withstand body freezing of this type even at an extremely low temperature.

A "slug caterpillar", *Cnidocampa flavescens* (Walk.) in overwintering prepupal stage was employed as material. In this stage the prepupal larva is very resistant against body freezing at a temperature as low as -40°C . Of the two groups of larvae preliminarily used, one was composed of insects which had previously been subjected to freezing at -20°C and the other was only held at 0°C . They were cooled in a special refrigerator, in which the air temperature was lowered to -90°C within 1.5 hours. These insects thus cooled were then rewarmed in the air at room temperature. After thawing, all of the insects previously frozen and then cooled were found to be killed, while in the other group about one-third of the insects revived. In the latter case the larvae were cooled in the air with their intact cocoons. It seems, therefore, very probable that in the early process of the cooling the freezing of a large amount of blood which filled the body cavity may lessen the cooling rate of the larva by the latent heat of fusion of ice, so that its tissue cells may scarcely freeze intracellularly. The larvae must have been resisting the severe extracellular freezing in their body.

From the results mentioned above, it was expected that, after some degree of de-

hydration by the extracellular freezing, the insect will survive freezing even if it is cooled rapidly to a super-low temperature. One hundred insects were divided into five groups, each of which was composed of ten larvae in the intact cocoon and the same number of naked ones. Previous to the rapid cooling in liquid gas, they were treated as follows: The first was stored at 0°C. The second was held for one day at -10°C, the temperature at which the insect never freezes spontaneously over a long period of time. The third was also held at -10°C for one day after the larvae had been subjected to freezing at -20°C. The fourth and the fifth were held for one day at -20°C and -30°C respectively, under which temperatures the larva usually freezes within two-thirds of an hour. All of these five groups of insects were then immersed directly in liquid oxygen. After being maintained there for a full day, they were held in the air at -30°C for two hours and were then transferred into the ordinary room air. Among five groups, the last was the only one successful case for the revival of the insect after thawing. Of ten naked larvae nine recovered the active movement of their hearts which was easily visible through the dorsum. None of them, however, appeared on the wing even after having been incubated at 20°C for more than three months. Some of them were able to continue their development even up to the formation of the imago, but could not cast away their pupal skins. This was also the case of the larvae in intact cocoons, at least within three months of incubation. The control insects which were stored at 0°C and then incubated at 20°C, usually emerged within about fifty days.

A preliminary experiment has shown that the tissue cells of this larva have never been affected by freezing at about -40°C, at least for several days, provided that it is extracellular. In the larvae of the fifth group in the present experiment, most of the tissue cells appeared to be quite normal just after thawing except for the fat cells in which small fat granules of uniform size sometimes fused into larger homogeneous masses. In the larvae of all the other groups, as a rule, a remarkable destruction of the fat body took place, and when the insect body was dissected numerous small oil droplets which had flowed out from the fat cells were observed on the surface of the blood without exception. In this latter case, the tissue cells, at least most of them, probably froze intracellularly, whilst in the former case, on the other hand, most of the cells must certainly have frozen extracellularly. It is therefore reasonable to suppose that in the cells of these insects, if they were previously frozen extracellularly at -30°C, any water hardly crystallizes in the tissue cell even at an extremely low temperature.

Similar results were also obtained from experiment on the overwintering larva of a butterfly, *Aporia crataegi adherbal* Fruhstorfer.