. Éizo ASAHINA 1959 Frost-Resistance in a Nematode *Aphelenchoides ritzema-bosi*. *Low Temperature Science, Ser. B, 17.* (With English résumé p. 61)

キクハガレセンチュウの耐凍性*

朝比奈英三
(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和34年7月受理)

I.

線虫類が非常に低い温度にさらされても生存できる能力があることは古くからしられている[7]。Luyet 等は食酢の中にすむ線虫 Vinegar Eel をつかつて，1941年はじめて1個体としての動物の「ガラス化」を報告したが[8]，この微小な長さ1～2 mm 直径 0.03 mm 内外の線虫は最近われわれが昆虫をつかつて成功するまでは[4]，超低温に耐えた最大の動物体であつた。又線虫は乾燥することなしに超低温に耐えることのできる動物の一つに数えられており[7]，De Coninck はその1種をつかつて，充分ぬれたままの状態でゆつくり液体空気中に入れても，そのうちのごく一部のものは生存することを明らかにしている[5]。このように線虫は生物の耐凍性に関する研究対象としてきわめて興味深いもので，われわれも研究材料として適当な線虫類を求めていた。たまたま北海道農業試験場の山田英一氏は，農作物害虫としての線虫を研究中そのうちの一種が乾燥状態で非常に低い温度に耐えるばかりでなく水と共に凍らせても少なくとも −20°C までの温度では相当多数のものが生き残ることを報告した[13]。そこでこの線虫をつかつて線虫類の耐凍性に関するいくつかの実験を行つた結果がこの報告である。

本実験の目的は

1. 線虫の体の凍結融解の過程を顕微鏡下に観察すること。
2. 線虫を −70°C までのいろいろな温度で凍らせると何のような凍害があらわれるか，又凍害がごく短時間の凍結中にも決定的に進行するような或特定の温度域があるか何うかを知ること。
3. われわれの予備凍結法[3]を適用してこの動物を超低温で生存させること。
4. Luyet のいわゆる「ガラス化法」の追試。

等によつて線虫の耐凍性の機構に関する何等かの手がかりを得ることにあつた。

尚ここで得がたい材料を教えていただき，その上充分に分けていただいた山田英一氏に厚くお礼を申し上げる。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第524号

II.

使つた材料はキクハガレセンチュウ *Aphelenchoides ritzema-bosi* Schwartz の成虫及び幼虫である。成虫の大きさは長さ 0.8 mm 内外，直径 0.02 mm 位に達する（図版 I–1）。本種は菊の葉の内部に入つたまま越冬するが，これが寄生している枯れ葉を水に浸しておくと，常温で数時間後にはきわめて多数の線虫が水中に泳ぎ出る。このような自由游泳状態の線虫はこのまま水中におくと 20 日以上も生存でき，交尾もするが，少なくとも 15°～20°C の水温で 25 日以内には産卵することはなかつた（山田未発表）。

水と共に凍らせた線虫を融解させてみると，融けてから 2～3 時間以内にうごきだす個体の数は次第にふえる。しかし融解直後にうごいていたものでもその後になつて死ぬことがあるので，生存個体数としてはすべて融解より 3 時間後に活動しているものをかぞえた。こうして得た生存個体数は融解後 1 日たつてもほとんど変らなかつた。

従来線虫類はかなりの乾燥にも耐えられることが知られているので，本種の耐乾性の大略を予察する意味で気温 20°C 相対湿度 75% 内外の室内で，時計皿に入れた線虫をふくむ水滴を空気中で乾し数時間後に再び水を加えて生きている個体の数をしらべ，さらにこの操作をくり返してみた。この結果は 1 回の乾燥注水ごとに使つた線虫の半数内外のものが死亡し，それぞれ 100 個体内外の材料を用いた数回の実験では何れの場合もこの操作を 5～6 回くり返すと全滅した。

III.

数個の線虫を含む小水滴をカバーグラスにとり，水をできるだけへらしてその上をシリコン油でおおつて懸滴とし，これを低温室内の顕微鏡下で観察した*。

この線虫は過冷却状態の水滴中にあつてもしばらくの間は体をうごかしており，—6°C では 10 分内外の後にはじめて運動を停止する。しかし後述するようにこの程度の温度での過冷却は 1 日つづいても全く線虫に無害であつた。

— 5°～—10°C に過冷却している水滴を植氷して凍らせるとその中にいた線虫の周囲には直ちに氷がはりつめるが，体が氷に接しただけで直ぐに虫体の凍結がはじまることはほとんどなく，虫体は前と全く同じ形状で氷にはさまれている（図版 I–2）。この状態の線虫の体内は明らかに過冷却状態にあり，—5°～—10°C の温度ではほとんど例外なく数分以内に各個体ごとに過冷却がやぶれて凍結する。虫体の凍り方はちょうど 1 個の植物細胞のフラッシング[1]のように或 1 個体の線虫が瞬間的に全体としてパッと暗化するのである（図版 I–3）。この際どの部分から虫体の凍結がはじまるか，即ち虫体内に向つてどのような開口部から氷が侵入するかということは遂に観察できず，一つの線虫全体がほとんど同時に全く暗黒に変るのがみられた。このような虫体の暗化は無数の微小な氷の結晶が体中にできたためであることはいうまでもな

* 懸滴の温度は小熱電対を懸滴中にさし入れて測定した。尚方法の詳細は前報[1]を参照されたい。

い。凍つた虫体をそのままの温度に保つていても，その体内の微氷晶は次第に融合して大形となるので，暗黒であつた体内は徐々に明るくなつてゆく（図版 II–4)。これと同様な過程は凍つている虫体を温める場合にもみられる。即ち体内は次第に透明になつてゆき融合して大形となつた氷晶は一つ一つの形がはつきりとみとめられる（図版 II–5)。

線虫体内のこれらの氷は温められるにつれて融解してゆき，体外にある氷の融けるのに先立つて全く消失する（図版 II–6)。全く融解した線虫を室温の水中におくと，早いものは数内以内にすでに体の一部をうごかし，やがて完全に虫体の運動能力を恢復するものがきわめて多い。こうして凍結に耐えた線虫の多くは少なくとも数日間は生存していた。

さてこのように線虫が凍結した場合に，氷が虫体を作つている細胞の内部にもできているのか，又は細胞の外部即ち体腔や消化管の内部等のみにできているのかということは，細胞内凍結がすべての生物にとつて致命的であると考えられる以上きわめて重大な問題であるが，虫体が凍つているときの観察から判断することは非常に難しい*。しかし次の様な事実から考えると，恐らく細胞内凍結はほとんどおこつていないとみてよいであろう。

1. 体内が凍結するとき多くの生物では細胞ごとにべつべつにおこるはずの突然の暗化（フラッシング）が線虫では全くみられず同時に全体が暗化する。
2. 凍結状態のままおかれた場合及び融解の過程において虫体内の氷晶が次第に大形化していつても，その一つ一つの結晶は全く透明で何等の挟雑物がみとめられない。
3. もし細胞内に氷があれば 0°C に近い温度でのろく融かした場合には氷晶の巨大化のために当然細胞はひどく害を受けると思われるが，融解後の線虫の体の内外の形態は少なくとも顕微鏡的には全く異常がない。

IV.

次に 0°C 以下 −70°C までのいろいろな温度段階でこの線虫の耐凍性をしらべた。方法はそれぞれ 40 内外の線虫を約 0.1 cc の水と共にプラスチック製の小さじにとり，低温室内においてごくわずか過冷却したときにさじ内の水に植氷して凍らせ，これより定めた時間だけそれぞれの温度の恒温箱中においた。但し −40°C 以下の温度での凍結には，−35°C の低温室内でドライアイスを入れた細長い魔法びん内の空気がよく成層することを利用して実験を行つた。実験は同一凍結温度ごとに各 3 回ずつ新しい材料で行つたが，0°C の場合及び −5°C の過冷却の場合は線虫約 100 を用い各 1 回のみ行つた

尚本実験に先立つて凍結及び融解の速度の影響をみるために次の様な予察を行つた。まづ線虫をその媒液である水に植氷してから −10°C，−20°C，−30°C，−40°C，−50°C，−60°C の各温度でそれぞれ 10 分間ずつ順次に冷却して最後に −70°C の温度にさらしここで 1 時間おい

---

* 凍結した生物体の中の氷の位置をきめるのに偏光顕微鏡が役立つ場合もあるが，今回は虫体が外から氷で包まれていること，体内の氷晶が長径数ミクロン又はそれ以下の小形のものであり，しかもその間に濃縮された体液が挟みこまれていること等のために，偏光を利用してもほとんど効果がなかつた。

たものと，植氷後いきなり −70℃ の空気中に入れて 2 時間おいたものとを双方とも急速に融かしてから比較してみたが，その線虫の生存率にはほとんど差がなかつた。又 −20℃，−35℃，−70℃ の各温度で 1 時間凍結させておいたそれぞれの線虫を 15℃ の多量の水中で数秒以内に融かした場合と，15℃ の空気中で 15 分内外かけてゆつくり融かした場合を比較したが，−20℃ からと，−35℃ から融かした場合は線虫の生存率の差はきわめて僅かであり，−70℃ からの場合は急速融解の方がやや生存率が高かつた。そこで本実験のときは凍結後の線虫の融解はすべて 15℃ の水中で急速に行つた。

結果は各 3 回の実験で得た平均生存率を第 1 表に示した。これからわかるように 0℃ 及び −5℃ での冷却のみでは 20 時間たつても全く線虫に害がない。そして一旦線虫が凍れば必ず相当の被害があり，1 時間の凍結による死亡率は −30℃ でも −5℃ でも大差なく大体 30% 位である。更に凍結温度が低くなると線虫の死亡率も徐々にふえ，−60℃ 以低では半数以上のものが死ぬ。しかし他の生物材料の場合にしられているような[2] ごく短時間のうちに決定的な凍害をあたえるような凍結温度は，少なくとも −70℃ までの温度範囲では発見できなかつた。

これらの温度で線虫のうける凍害はその凍結時間を 20 時間に延長してもそれ程増加せず，−10℃ 乃至 −35℃ の凍結温度範囲では線虫の生存率は何れも 45% 位であつた。凍結時間が長びいたためにおこる凍害の増加は −60℃ 以下ではこれより高温の場合よりもはるかに少なく，−70℃ ではまる 2 日間の凍結後にも 1 時間の凍結の場合より平均凍死率はわずか 8% 増加したにすぎなかつた。これらの結果からみると，線虫の凍死はその過半数のものが凍結の最初の 1 時間以内におこつてしまうものらしい。尚今回とつた方法では線虫を含む水滴が凍結を終了してその温度がまわりの気温とほぼ等しくなるのに要する時間は，−10

第 1 表 −70℃ までの各温度で凍らせた線虫の生存率

凍結温度 (℃)	凍結時間 (時間)	融解後 3 時間における平均生存率 (%)	備考
0*	20*	100	約 100 の個体を使つた 1 回の実験結果
− 5*	20*	100	
− 5	1	73	それぞれ 40 内外の個体を使つた 3 回の実験結果の平均値
− 5	20	72	
−10	1	72	
−10	20	47	
−20	1	72	
−20	20	44	
−25	1	64	
−30	1	66	
−30	20	46	
−35	1	64	
−35	20	43	
−40	1	58	
−50	1	53	
−60	1	46	
−60	20	37	
−70	1	43	
−70	48	35	

* この二つの場合のみ凍結せず。

℃では植氷後約15分，−20℃では約20分以内であつたから,* 上記の植氷後1時間という凍結期間は恐らく凍つた虫体がそのさらされた温度に達するのに充分な長さであろう。−5℃で凍らせた場合のみは凍結時間が1時間でも20時間でも全く凍死率が等しいという興味ある結果となつた。少なくとも数種の昆虫でしらべられた限りでは，この−5℃という温度では凍つている動物体内にまだ相当多量の凍りうる水が残されているはずである[10,11,12]。尚時計皿にやや多量 (0.3～0.5 cc) の水と共に線虫を入れて −5℃の空気中で凍らせ，30分以内に融解すると，その中の線虫の生存率は常に80%より高かつた。

又一旦凍結させた線虫を再度凍結させると，2回目の凍結融解後における生存率は最初の融解後のそれに比べて劣るのが常であつた。

V.

次にいままでわれわれが種々の生物を使つて成功している予備凍結による超低温での生存法[3]がこの動物でも可能かどうかをしらべてみた。即ち前章に述べたと同じ方法によつて −5

第2表　冬温度で予備凍結した場合の超低温冷却後の線虫の生存率

前処理 温度 (℃)	前処理 時間 (時間)	融解3時間後の生存率 ** (%)			平均値
15	1	5	3	0	3
0	1	3	4	0	2
− 5	2*	0	4	2	2
−10	2*	23	17	7	16
−15	2*	18	—	—	18
−20	1*	20	23	27	23
−25	1*	30	25	13	23
−30	1*	57	59	51	56
−40	1*	41	45	22	36
−50	1*	34	14	16	21
−60	1*	24	23	15	21
−70	1*	35	33	15	28

*　凍結時間

**　供試個体数は三回ともそれぞれ別個に40内外。

℃より −70℃までの各段階の温度で1～2時間凍結させておいた線虫を容器ごと急速に直接液体酸素中に投入した。この場合液体酸素の沸とうはいつも数秒以内であつたから線虫はきわめて急速にこの沸点の温度 (約−183℃) に冷されたわけである。線虫を30分液体酸素中においてから容器ごととり出し，15℃の水中で急速に融かした。こうして融解させた線虫をしらべると死亡している個体のうちの半数以上のものがひどく破壊され，内部構造のみならず外形も

*　試料の水滴中に微小なサーミスターをさし入れて測定した。

分断されたりしていることが多かつた。これに対して前章までの実験の場合には凍死している個体もそのほとんどが外見は完全な形態を保つていた。第2表にいずれも40内外の線虫を使つて各凍結温度ごとにそれぞれ別個に三回ずつ行つた実験の結果を示す。

−30℃又はそれより低温で予め凍らせておくと更に超低温まで急速に冷却しても生存できるものが多い事実はいろいろな生物でしられるようになつたが[3,9]，この線虫の場合も同じような傾向があらわれている。しかもこの線虫では−30℃より高い温度即ち−10℃～−25℃での予備凍結も相当に効果があり，20%内外のものは超低温への冷却に耐えられるようになる。更に面白いのは0℃又は室温から液体酸素に直接線虫を含む水滴を投入した際も，その融解後にしばしば生存個体を発見することである。この場合の生存率はこの程度の実験回数では確定しにくいが，−5℃で凍結させてあるものを超低温にさらした場合とほぼ同じ程度の値で常に5%以下である。このような事実はVinegar eel其他の線虫でも知られていて，その生存率もほぼ似た値（数パーセント以下）であることはきわめて興味深い[5,6]。

このような場合に生存していた線虫はいわゆる「ガラス化」していたのではないかと想像されるかもしれないが，今回の実験条件では，線虫を−5℃で予備凍結している場合は勿論，0℃及び15℃から超低温に急冷却した場合も試料の冷却速度を「ガラス化」するのに充分なほど高めることは全く不可能であり，実際に液体酸素中より引上げたときのさじの中の水滴は例外なく凍結していた。又われわれの方法では線虫の入つている氷塊の融解には少なくとも1，2秒以上はかかつているので，Luyet等が「ガラス化」した線虫を蘇生させるために必要と考えている1000℃/sec.の加温速度[8]よりははるかにのろい。−5℃で予備凍結後液体酸素に浸けた1例では，加温の際20℃の空気中で数分かかつて氷を融かした場合でも約5%の線虫が生存していた。

VI.

前述のようにLuyet等はVinegar eelを使つて生物の「ガラス化」，即ち生物を液体空気中で超急冷却したのち超急加温による蘇生に成功しているが，その場合は30%のエチレングリコールで前処理しなければ生存率はきわめて低いという。そこでキクハガレセンチュウにもこのいわゆる「ガラス化法」を試みてみた。

気温15℃の室内に魔法びんに充した液体酸素をおき，細いステンレススチールの針の先に1頭の線虫をとり濾紙で水をできるだけ除いてから素早く液体酸素中に突き入れた。このときの液体酸素の沸とうは1秒以内であつた。針についたままの線虫を30秒液体酸素中においた後今度は急速にとり出してすぐ20℃の水中で針をふつて融かした。こうして行つた32回の実験で生存していた線虫は融解より3時間後において4頭であつた。即ち無処理の材料としては，今迄試みられた他の線虫の場合[5,6]の生存率はいづれも1～2%以下であるから，それよりは更に良い成績を納めたことになる。

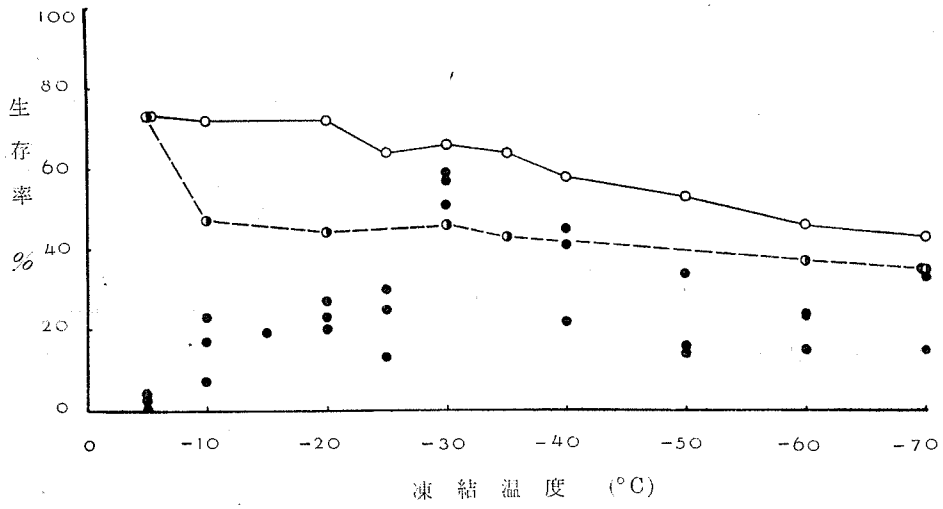
次に多数の線虫を薄い鉄板でできた小さじ上に約0.25 ccの水と共にとり，これを約10秒

かかつてゆつくりと液体酸素中にさし入れた。勿論さじ内の水滴は見たところ完全に凍つてから液体酸素中に浸される。30秒後にこのさじをとり出し20°Cの水中でふつて融かしたところ数回の実験において何れも40%内外の生存個体を得た。この結果はDe Coninckがカバーグラス上の線虫*が凍つてから1～2秒かかつて液体空気中に入れた実験の場合[5]に比べるとけたちがいに高い生存率である。

このようにキクハガレセンチュウが超低温への冷却に対してきわめて強い理由の一つは，この僅々10秒という短い凍結時間中に恐らく細胞外凍結によつてその体細胞からの脱水が非常に速やかにすすみ，これを更に超低温にさらしてもはや致命的な細胞内凍結をおこすおそれが甚だ少なくなることによるものであろう。このような考え方は先にのべた−5°Cの凍結状態又はそれより以高の温度から水と共に数秒以内に液体酸素温度まで冷却した際に得られるごく小量の生存者への説明としてもあてはまるものではなかろうか。

VII.

IV, V章にのべた結果を対照してこれらの実験の場合の凍害のあらわれ方を比較するために第1表及び第2表から第1図を作つた。これからわかるように超低温で線虫を生存させるための前処理としての予備凍結は−5°Cではほとんど効果がないが，−10°Cでは明らかに有効となり−30°Cに及んで最高の効果をあらわす。−40°C以低の予備凍結の場合は超低温冷却後の生存率のふれが甚しくなるため正確な効果がわかりにくいが，少なくとも−30°Cの場合よりはよくない。



第1図　線虫の耐凍性

○—○，各温度で1時間凍結後の平均生存率；◑－－◑，各温度で20時間凍結後の平均生存率；●，各温度で1時間予備凍結後，液体酸素中で急冷却したものの生存率。

* 自由生活をする線虫 *Anguillula silusiae*

これらの予備凍結の際は虫体に比べてかなりの量の水が凍るため潜熱の放出により虫体の冷却速度は一時はなはだのろくなりこの状態で虫体の凍結がはじまると考えられる。従つて先に述べた顕微鏡観察の結果からも想像されるように，虫体は細胞外凍結の状態で次第に冷却されてゆくにちがいない。もしそうだとすればこの線虫は細胞外凍結の状態では −70°C までの冷却に強い抵抗力を示すといえよう。このように考えると上記の −30°C 以高の温度範囲での予備凍結の効力の差は恐らく超低温まで冷却されるときおこる細胞内凍結による害に帰せられるのではなかろうか。少なくとも数種の昆虫でしらべられた限りでは[10,11,12]，−5°C という凍結温度ではまだ動物体内に凍るべき相当多量の水が残存し，−10°C ではこの量がかなり少なくなり，−30°C に至つて凍りうる水はほとんどすべて凍つてしまう。それ故−10°C より低い温度で予備凍結すれば線虫の細胞内の凍りやすい水はその多くが細胞外凍結にもとづく脱水によつて失われ，その結果更に超低温まで急速に冷却しても虫体は細胞内凍結によつて殺される危険が少なくなり，殊に−30°C での予備凍結によつてこのおそれはほとんど除くことができると説明されよう。今迄われわれがしらべた動物では −30°C より高温での予備凍結がこの線虫ほどに有効であつた例は一つもないが，酒井は耐凍性の高い植物材料で −20°C 又はそれ以高の温度での予備凍結も相当に有効なことを報じている[9]。

しかし以上の考え方のみでは −40°C より低温で予備凍結した場合にも，その後に超低温まで冷却すれば相当数の線虫が凍死する事実を説明することはできない。血球やカキのえらの細胞ではそれぞれ −35°C[2] 又は −40°C 附近[3] におくときわめて急速に凍害が進行することがしられているが，線虫では少なくとも −70°C までの温度範囲ではそのような特別に有害な凍結温度らしいものは見当らない。

このような場合に凍死した生物の形態は，その凍害の解明に一つの手がかかりをあたえるものであるが，この線虫の場合は，先に述べたように虫体の内臓の明瞭な崩壊や外形の破壊が少なからず発見された。このような線虫の死にかたは −70°C までの予備凍結だけの場合にはほとんどみられないが，液体酸素中で急冷却すると予備凍結温度の如何にかかわらずあらわれるもので，恐らく De Coninck が burst「破裂」と称している[5] 線虫の死にかたはこれであろう。彼はこの「破裂」は材料を液体空気中に入れるときにおこる沸とうのため機械的に虫体がこわされた結果であると考え，それを避けるために線虫をのせたカバーグラスを数秒かかつて徐々に液体空気中に入れる方法をとつている[5]。それにもかかわらず彼の実験では超低温から温めた際の線虫の生存率はきわめて低く通常 1% 以下であり，−30°C で予備凍結した場合でさえ 3.8～6.9% にすぎない。いづれにしても液体空気の沸とう説では予備凍結温度として−40°C より低温の方が比較的効果が少ない理由を説明できない。

Gehenio と Luyet は Vinegar eel を相対湿度 90～98% の空気中で乾燥させてからドライアイスを入れた石油エーテル (−77°C) 中で急冷却し，それを急融解した後の生死をしらべて

いる*。それによると湿度95%での乾燥がきわめて効果的で，16時間の乾燥によつて平均90%の線虫は−77°Cでの急凍結に耐える。しかし湿度90%での乾燥の場合は乾燥のみでも害が大きく，又凍害防止効果は全くみとめられない。このような興味深い結果に対して彼等は，線虫の耐凍性を高めるためにその体からの脱水は有効であるが，このときには脱水に伴なう何等かの生理的過程が進行することが必要で，このためには時間をかけて脱水せねばならないのであると説いている[6]。線虫を予備凍結をすることは同時に細胞からの脱水を意味するとわれわれも考えるのであるが，予備凍結のみによる害は前述のように比較的小さく，又VI章でのべた約10秒の凍結後すぐ超低温に冷却しても相当生存率が高い事実は脱水時間を重要視する説明とは全く矛盾する。

今回の実験で明らかにされた興味ある事実の一つは，このように耐凍性の高い線虫でさえ一旦凍結すれば必ず相当数のものが凍死することである。即ちわずか−5°Cで1時間凍らせた場合でさえほとんど30%のものが殺され，この凍死率は−20°Cでも全く変らず，凍結による体内の失水がほとんど最高に達すると思われる−30°～−35°Cでさえきわめて近い値を示している（第1図）。このようにほぼ一定の割合の個体が凍りさえすれば殺されるということは，実験材料である線虫の或一部のものが特に凍結に対して弱いのではないかという想像をおこさせる。元来これらの線虫は孵化後脱皮を重ね4期の幼虫期をえて成虫になることがしられており，実際にDe Coninckの行つた実験では，1齢の幼虫が最も弱く，2齢及び成虫がこれにつぎ，3及び4齢の幼虫が最も耐凍性が高いという結果が出されている[5]。しかし枯葉から水中に脱出してくるキクハガレセンチュウは，2齢以上のものばかりであり，少なくとも今回の実験については凍結融解後に特に生存者の多い，又はそれの少ない齢期というものは認められなかつた。又凍結融解をくり返して行つてみても，再凍結後の方が初凍結後よりも生存率が高くなる場合は1度もなく，むしろはるかに低下することの方が多かつた。このような比較的高温部での凍害はその大部分が，虫体の凍結状態がその時の温度でほぼ平衡状態に達すると思われる最初の1時間以内にもつとも急速にすすみ，それ以後におけるその凍死率の増加はごくゆるやかであり，特に−5°C凍結の場合は全く増加しない（第1表）。これらの場合の凍害の機構については更に実験を進めてから触れる予定であるが，材料に植氷後ごく短時間で媒液の凍結終了前に冷却をやめて融かすと，つねに80%以上の線虫の生存率を得ることや，細い試験管内で凍らせると同じ凍結温度においても時計皿やガラス板上で凍らせた場合よりも常に凍死率が高い事実からみると，恐らく氷の形成に伴なう何等かの機械的な傷害がその一因をなしているのかも知れない。

又最初に述べた空気中での乾燥による線虫の死亡の率が，−10°C乃至−70°Cの温度における20時間後の凍死率に近いことは興味深い事実である。しかもこの凍死率がこのような広い温度範囲においてほとんど変つていない事実は，現在高等哺乳動物の血球の研究者達によつ

* 少くともこの報告の上では，彼等はこのような処理後生存していた線虫は「ガラス化」していたものと考えている。

て唱えられている凍害は即ち凍結によつて生物内に生ずる濃縮塩溶液の害であるという考え方[2]では恐らく説明することが不可能であろう。

摘　　要

水中に自由游泳状態にさせたキクハガレセンチュウを使つて，液体酸素温度（約−183°C）までに及ぶ各温度段階でその耐凍性をしらべた。

1. 顕微鏡下にこの線虫の凍結融解の過程を観察した結果，虫体の凍結は媒液の凍結後数分おくれておこる急速な暗化として認められるが，少なくとも −10°C までの温度で凍結が始まつた場合は虫体は細胞外凍結をおこすと考えられる。

2. この線虫を水と共に凍らせると僅か1時間の凍結中に必ずその相当数（約30%）のものが死ぬ。このような凍死率は凍結温度が −5° 乃至 −35°C ではほとんどかわらないが，それより低温では僅かずつ増加する。

3. しかし凍結時間の影響はむしろ少なく，20時間以内に凍死する個体の半数以上のものは最初の1時間以内に死ぬ。−60°C 及び −70°C の凍結温度では凍結1時間後より後に死ぬ線虫の数はごく少ない。凍結20時間後の生存率は −5°C では凍結最初の1時間後と全く変らず，−10°C 乃至 −35°C ではほとんど一定で45% 前後をしめす。それ故この線虫は凍結に伴なう体細胞からの脱水，体液の濃縮等の害に対してそれ程敏感でないことがわかる。

4. その温度での凍害がごく短時間で線虫にとつて全く決定的になるような有害凍結温度は少なくとも −70°C までの温度範囲では発見されなかつた。従つてこの線虫は細胞外凍結に対してきわめて高い抵抗性をもつものと思われる。

5. 使用した材料は発育期の異なる4ステーヂの線虫を含んでいたが，特に耐凍性の高い，又は特にそれの低い，齢期というものは認められなかつた。

6. 従来われわれが各種の材料で成功している予備凍結によつて生物を超低温下に生存させる方法はこの線虫の場合にも成功した。この場合の予備凍結温度は −10°C 以低ですでに有効となり，−30°C がもつとも効果がある。このことは予備凍結によつて細胞外凍結が充分に進行し，これにもとづく脱水のため細胞内の凍り易い水が減少し，従つて致命的な細胞内凍結が超低温まで急冷却する際にもおこりにくくなつたことによると考えられる。

7. Luyet 等のいわゆる「ガラス化法」として知られた超急冷却及び超急加温法によつても，この線虫を超低温で生存させることができるが，その場合の生存率は上記の予備凍結法を用いたときよりもはるかに低い。

8. それ程の急冷却でなく，線虫を含む水滴が明瞭に凍結してからすぐ液体空気中に入れた場合でも少なからぬ線虫が生存している。これはおそらく短時間の凍結によつてもはなはだすみやかに線虫の細胞外凍結がすすみ，このため細胞が充分脱水されたからであろう。

文　　献

1) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. Contrib. Inst. Low Temp. Sci., ***10***, 83.
2) 朝比奈英三 1958 生細胞の凍結 (綜説). 細胞化学シンポジウム, ***8***, 1.
3) 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.
4) Asahina, E. and K. Aoki 1958 Survival of intact insects immersed in liquid oxygen without any antifreeze agent. Nature, ***182***, 327.
5) De Coninck, L. 1951 On the resistance of the free-living nematode *Anguillula silusiae* to low temperatures. Biodynamica, ***7***, 77.
6) Gehenio P. M. and B. J. Luyet 1951 Effect of a preliminary slight dehydration on the survival of "Vinegar eels" frozen at −77°C. Biodynamica, ***7***, 41,
7) Luyet B. J. and P. M. Gehenio 1940 Life and Death at Low Temperatures. Normandy, Miss.
8) Luyet B. J. and M. C. Hartung 1941 Factors in the revival of *Anguillula aceti* after its solidification in liquid air. Am. J. Physiol., ***133***, 368.
9) 酒井　昭 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.
10) Salt, R. W. 1955 Extent of ice formation in frozen tissues, and a new method for its measurement. Can. J. Zool., ***33***, 391.
11) Scholander, P. F., W. Flagg, R. J. Hock and L. Irving 1953 Studies on the physiology of frozen plants and animals in arctic. J. Cell. Comp. Physiol., ***42***, Suppl. ***1***, 1.
12) 篠崎寿太郎 1958 凍結したイラガ前蛹の体内の氷の量. 動雑, ***67***. 38.
13) 山田英一 1959 ハガレセンチュウに関する二・三の実験. 北海道農業試験場虫害第二研究室 昭和33年度試験成績, 27.

Résumé

To examine its frost-resistance, a plant-parasitic nematode *Aphelenchoides ritzema-bosi* was subjected under free-swimming condition to graded temperatures from 0°C to −70°C and to a super-low temperature of −183°C.

1. At −5°C to −10°C, the freezing process in the nematode was observed under microscope as an instantaneous darkening of the body caused by the very rapid formation of a number of minute ice crystals throughout the animal body. Judging from the development of ice crystals in frozen worms the nematode seems to be very apt to freeze extracellularly.

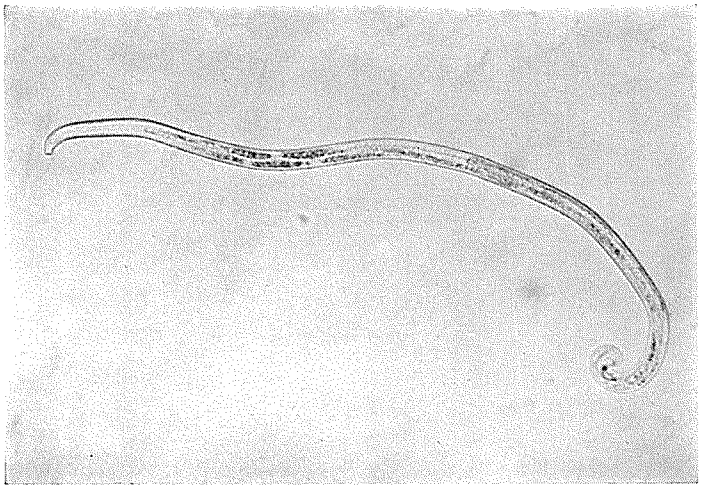
2. Within only one hour about three-tenths of total number of worms frozen were killed even at −5°C; the percentage of survivors was, however, almost constant (about 70%) between −5°C and −35°C; it dropped to 53% at −50°C, to 43% at −70°C. Freezing for longer periods of time gradually decreased the number of survivors except the case at −5°C in which the killed worms never increased in number even after freezing for 20 hours. By the freezing for 20 hours, the proportion of survivors was caused to drop to about 45% at temperatures between −10°C and −35°C, however, at lower temperatures that proportion was not definitely affected by the duration of freezing. Within an hour of freezing in this animal, there is found no critical temperature range in which a fatal injury promptly occurs.

3. Our prefreezing method to enable organisms survive at super-low temperatures

was successfully applied on this nematode. As was determined in various living matters, −30°C was found also in this nematode as the most effective prefreezing temperature. More than half of the total number of worms immersed in liquid oxygen revived, provided that they were previously frozen at −30°C for one hour. In this animal, however, the prefreezing treatments at temperatures lower than −10°C were also very effective. Besides, when they were transferred into liquid oxygen even from a temperature near 0°C, a small percentage of the worms was always found to be alive after thawing. These facts may perhaps be explained by their suitable body structure for dehydrating their cells very rapidly when extracellular freezing once occurs in themselves.

4. Luyet's method of extremely rapid cooling and thawing to enable survival from freezing at super-low temperature was also successfully applied on this species, although the effectiveness of the method seemed to be lower than the prefreezing method described before.

5. Of the four developmental stages recognized in the nematodes examined, none was found to be more frost-resistant than any other stage.

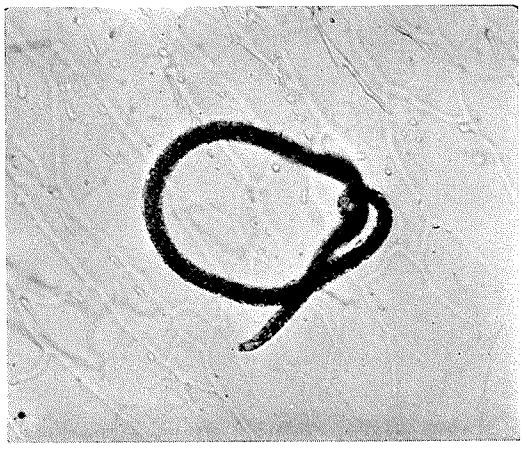


第 1 図　過冷却状態のキクハガレセンチュウ

−6℃　×140

第 2 図　線虫のまわりの水が凍つたところ

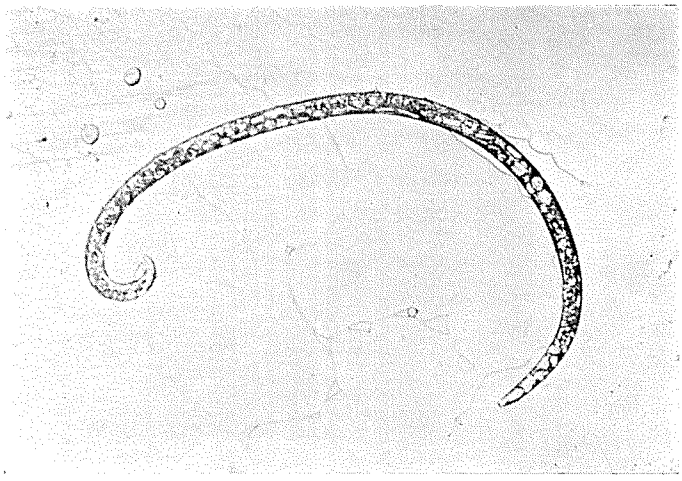
−2.6℃　×140



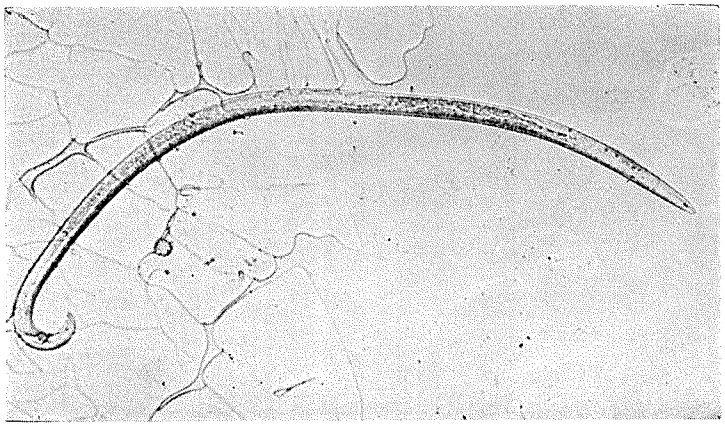
第 3 図　上図と同一物，4分後線虫の体内も凍つたところ

−4.4℃　×140

第 4 図　凍結している線虫の頭部，凍つてから 23 分後
−7℃　×440



第 5 図　融解しつつある線虫
×140



第 6 図　体内の氷が全く融解した線虫
×140