HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	昆虫の耐凍性とグリセリン
Author(s)	竹原, 一郎; 朝比奈, 英三
Citation	低温科學. 生物篇, 18, 57-65
Issue Date	1960-11-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17639
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p57-65.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Ichiro TAKEHARA and Éizo ASAHINA 1960 Frost-Resistance and Glycerol Content in Overwintering Insects. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 18***. (With English résumé p. 64)

昆虫の耐凍性とグリセリン*

竹原一郎　朝比奈英三
(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和 35 年 7 月受理)

I.

われわれは前報[1]において数種の鱗翅類の越冬昆虫にはグリセリンが検出されることを述べたが，同時にグリセリンを体内に含まない昆虫にも −10°C 程度の温度での凍結には相当長時間耐えられるものがあることを明らかにした。

既によく知られているように各種の生物において凍害防止剤としてのグリセリンの効果は明らかであるが，前報で指摘したように，昆虫がその体の凍結に耐えるためにこの物質が直接欠くことのできないものであるか何うかについては未だきわめて不充分な資料しかえられていない。われわれはイラガの体内におけるグリセリン代謝とその耐凍性との関係を研究中各種の越冬昆虫のもつグリセリンを定量し同時にその虫の耐凍性をしらべた。以下この結果について述べるが，これによると越冬昆虫のグリセリン含量とその耐凍性との関係は昆虫の種類によりかなりちがいがあり，現在のところ画一的な解釈を下すことはむづかしい。

本文に入る前に貴重な研究材料をわけて下さつた松本蕃氏，小野泱氏，飯島一雄氏，熊倉正昭氏，中島暉躬氏，高倉忠宏氏の方々に厚く御礼を申し上げたい。

II.

使つた材料は主として鱗翅類の越冬幼虫又は蛹であつて種名と採集時期，産地等は次の通りである。

			産地	時期
1. アワノメイガ	*Pyrausta nubilalis*	幼虫	札幌	10月24日
2. シンジュサン	*Philosamia cynthia pryeri*	蛹	札幌	(飼育)
3. アゲハ	*Papilio xuthus*	蛹	東京	1月下旬
4. キアゲハ	*Papilio machaon hippocrates*	蛹	十勝帯広	(飼育)
5. オオムラサキ	*Sasakia charonda*	幼虫	東京付近	12月上旬
6. ゴマダラチョウ	*Hestina japonica*	幼虫	東京付近	12月上旬
7. ムネアカオオアリ	*Camponotus obscuripes obscuripes*	成虫	釧路標茶	1月下旬

このうちシンジュサンとキアゲハは戸外にて卵より飼育して越冬期の材料をえた。これら

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 568 号

の昆虫はいづれも戸外の温度に保存したが，東京産のアゲハ及びオオムラサキ・ゴマダラチョウは凍結の危険をさけるために0°C内外の恒温においた。

虫体内のグリセリンの定量法は前報[1]と同様で，ペーパークロマトグラフィーで分離したグリセリンを溶出して比色定量した。尚第1表にあげたグリセリ含量は数頭の昆虫での平均値である場合が多いので，変動期である秋期における値は個体によるふれが相当にある。

耐凍性をしらべるには通常10ケ内外の昆虫をペトリ皿に入れて −5°C乃至 −35°Cのそれぞれ適当な恒温において凍らせた。虫体の過冷却が安定している，つまり凍り出しにくい虫は，予じめ水でぬらして植氷して凍らせた。凍結時間は正確にその虫体が凍結してからの時間をはかつた。凍らせた虫は適当な凍結時間の後に室温の空気中で融解させた。融解直後には生きていても正常に恢復できない昆虫がしばしばあるので，その後の虫の変態が進行したもの又は虫の活動が外見常態に恢復して1カ月以上生存したもののみを生存とした。

休眠期の判定はその昆虫を20°Cの恒温において100日以内に変態の進行が外見では全く認められなかつたものを休眠中とした。但し四齢で越冬しているオオムラサキとゴマダラチョウは一応休眠中として取扱つた。又ムネアカオオアリは0°C位の温度でも触れれば体をうごかすが，室温（15°～20°C）に1時間おくとかなり活撥に歩きはじめる。

III.

実験の結果は第1表にまとめてあげた。すでによく知られているようにアワノメイガ越冬幼虫（終齢）の耐凍性はきわめて高いが[2]この体内には相当のグリセリンが含まれていた。本種の休眠期は12月中には未だ終つていないので，この時期に20°Cの恒温におくと凍らせない対照の個体でも変態せず結局死んでしまう。凍結融解後生存していた幼虫は20°Cの恒温で少なくとも2カ月は異常なく生活し，一部の幼虫は6カ月以上も生きのびたがやはり変態はみとめられなかつた。

シンジュサンは最低気温が −20°Cにおよぶ札幌の真冬でも，一部の蛹は積雪上に出た樹枝について越冬しているが，これらは全く虫体の過冷却のみに頼つているので凍りさえすれば必ず死んでしまう。5月末休眠終了後の蛹を −5°Cで3時間凍らせたとき融解後生きているものが1頭発見されたが，これは20°Cにおいても羽化できず3カ月後に死んだ。この時期の蛹は凍らせなければ20°Cで30～50日間にすべて羽化する。

アゲハの越冬蛹は少量のグリセリンを含んでいるがその耐凍性はきわめて低く，虫体が一度凍ればもはや常態に恢復することはできなかつた。−5°C，5時間の凍結で融解後生存していたものも20°Cの恒温におくと蛹体の前半のみに変態が行なわれ，20～30日後には脱皮することなく死んでしまつた。このような凍害のための「半成虫化」はキアゲハの蛹を超低温で凍結させた場合に始めて発見され[3]，その後 −20°～−30°Cでの凍結によつても或程度はおこされることがわかつたが（朝比奈未発表），アゲハでは −5°Cでの凍結でもおこる事実は甚だ興味深い。

第1表　昆虫のグリセリン含量と耐凍性

種名	時期 (月，日)	グリセリン量 (mg/生体重g)	過冷却点* (°C)	凍結 温度°C	凍結 時間	生存率 (%)
アワノメイガ	X，27 (休眠中)	10.2	約 −20	−10	1	100
				−20	2	50
アワノメイガ	XI，20 (休眠中)	30.7	—	−20	24	100
				−35	1	100
アワノメイガ	XII，22 (休眠中)	38.7	−20～−25	−30	2	100
シンジュサン	I，20 (休眠中)	0	−20～−23	−10	1	0
シンジュサン	V，27 (休眠了)	0	−15～−18	− 5	3	10**
アゲハ	II，18 (休眠了)	4.5	−20～−25	− 5	5	40**
				−10	2	0
				−15	1	0
キアゲハ	X，26 (休眠了)	7.8	−20～−23	−20	1	50
キアゲハ	XI，20 (休眠了)	10.8	−20～−23	−20	24	100
				−35	1	100
キアゲハ	XII，23 (休眠了)	18.8	−20～−23	−35	24	100
オオムラサキ	I，19 (休眠中)	0	−18～−23	−10	24	70
				−15	24	20
				−20	6	0
ゴマダラチョウ	I，19 (休眠中)	0	−18～−23	−10	24	100
				−15	24	90
				−20	6	0
ムネアカオオアリ	II，25	32.6	−20～−25	−10	2	0
	III，7	26.2	−20～−25	−20	2	0

*　恒温に1日虫体をおいたときその過冷却がやぶれる温度。
**　説明本文参照。

キアゲハ越冬蛹は蝶の蛹としては恐らく最高の耐凍性をもち，真冬には −35°C 2日間の凍結にも耐え，−30°C で予備凍結すれば液体空気中に長時間浸しても生存できる[3]。そのグリセリン含量は真冬には体重の2% 内外に達する。使用した蛹は 20°C の恒温におくとそのほとんどが50日以内に羽化するので，いづれの時期のものも休眠終了と表示したが，実際には時期のおそいものほど羽化までの日数が短くなる傾向があり，12月に入つてからは20日以内に羽化するものが多い。従つて完全に休眠期の終るのは12月以降と考えるべきであろう。

近縁の蝶でその習性や分布もよく似ているオオムラサキとゴマダラチョウの越冬幼虫には共にグリセリンが検出されないが，双方とも中程度の耐凍性をもつている。

ムネアカオオアリは釧路標茶地方のような最低気温 −30°C に及ぶ酷寒の地で朽木等の内部で越冬しており（飯島，私信による），その耐凍性が期待されたが，相当多量のグリセリンを含んでいるにもかかわらず虫体にとつて凍結は常に致命的であつた。−10°C での凍結融解後に

体の一部をうごかすものが少なくなかつたが，いづれも完全に常態に恢復することなく数日中にすべて死んだ。

尚現在までのところこれらの昆虫にグリセリン以外の多価アルコールは検出されていないが，少なくとも量的には僅少であろう。

IV.

Salt (1955) は昆虫をその耐凍性について耐凍型と非耐凍型の二つの群に分け[4]，耐凍型のものはそのほとんどがグリセリン又はこれと近似の物質をもつていると考えている（私信による)。しかし上記の実験結果によれば昆虫体のグリセリン含量とその耐凍性との間に未だ一定の傾向らしいものをつかむことはむづかしい。この場合各昆虫ごとに生体重1g当りのグリセリン含量を比較することにも一つの問題があるが，これらの虫の越冬期における含水量は大体近く*，55～60% 位のものが大部分であるから一応このグリセリン量を問題にしてみよう。

ムネアカオオアリ成虫のグリセリン含量はイラガにまさるものがあるが，この成虫は明らかに非耐凍型であり，われわれの調べた限りではまだ成虫期に耐凍型をしめす昆虫は発見されていない。最近 Dubach 等 (1959) はやはり同属のアリ *C. pennsilvanicus* が冬期には多量(体量の約10%)のグリセリンをもつことを報告したが[5]，この虫の耐凍性については記述がない。アゲハの越冬蛹は非耐凍型とみなされるが，その体内には 0.5% 内外のグリセリンがある。いつぽうキアゲハの越冬蛹では春になつてその体内のグリセリンが 0.5% 程度に減少したときでも未だ耐凍型であつて，−20°C 2 日間の凍結に耐えることができる[1]。

アワノメイガ幼虫のグリセリン含量はイラガ前蛹のそれ**よりもはるかに増大してゆくが真冬のイラガ前蛹が予備凍結法を用いれば液体酸素中*** に長時間直接入れてもほとんど例外

第2表 アワノメイガ幼虫の予備凍結法による超低温（液体窒素）冷却* 1959, XII, 22.

	1	2	3	対照
使用固体数	10	10	10	10
予備凍結 温度	−25°C	−30°C	−35°C	−35°C
予備凍結 時間	2 時間	2 時間	2 時間	2 時間
液体窒素中にあつた時間	1 時間	1 時間	1 時間	0
融解後の状態	生 1** 15日以内に死	生 6** 70日以内に全て死	生 4** 30日以内に全て死	生 10 全て恢復

* 予備凍結後直ちに液体窒素中に直接しづめる。融解は 20°C の空気中で行なつた。
** 体の一部を動かすのみで歩行は全くできない。

* たとえばアリ 55%[5]，イラガ前蛹約 61%[6]，アワノメイガ 56～57%[7]。
** 生体重 1 g 当り 20～30 mg。
*** 沸点は約 −183°C。

なく生存でき変態も進行するのに[8]，同時期のアワノメイガ幼虫は同じ方法で超低温まで冷却した後常態に恢復できたものはほとんどなかつた（第2表）。

前報[1]において −5°〜−10°C位の温度での凍結に耐えるヒトリやヨトウの幼虫にはグリセリンが検出されない場合がしばしばあることを述べたが，−15°Cで1日の凍結に耐えるゴマダラチョウやオオムラサキにもやはりグリセリンがないことは甚だ面白い。いつぽう −20°Cより低温での凍結に耐える程耐凍性の高い昆虫は現在まで知られた限りでは例外なくグリセリンを含んでいるようである。第1表に示したアワノメイガやキアゲハの例ではそのグリセリン含量の増加につれて耐凍性も高まるかのようにみえる。しかしイラガ前蛹の例でみると，グリセリ含量の増加は12月に入つて始めて最高に達するが[9]，その耐凍性は例年11月初めまでに極値に達しているものが少なくない（朝比奈未発表）。

V.

越冬昆虫の体内にあるグリセリンが凍害を防ぐために有接有効であるか何うかをしらべる一手段として，グリセリンを注射した虫体の凍結実験を行なつた。材料は常態で冬期にはグリセリンをもつ例としてイラガ前蛹，グリセリンをもたぬ例としてシンジュサン蛹を選んだ。使つたイラガ前蛹は10月中旬より100日間以上20°Cの恒温においていわゆる永久前蛹[1]の形になつたもので，その体内のグリセリンは全く消失している。シンジュサンの蛹は10月下旬より6カ月間0°C内外の温度において完全に休眠を終らせたものと，同じ6カ月間を20°Cの恒温においてまだ休眠期にあるものの双方を使つた。グリセリンは98.5%溶液（和光，特級）を用い，各個体ごとにそれぞれ生体重の約3%に当るグリセリン量を，イラガ前蛹では肛門からシンジュサン蛹では腹部第5節の右気門から体腔内に注射し，その後2日間10°Cにおいてから実験を行なつた。

実験の結果は第3表に示した。イラガの永久前蛹は −20°C 1時間の凍結によつてほとんど

第3表　グリセリンを注射した昆虫の凍結

材料	使用固体数	前処理	冷却温度	時間	結果
イラガ前蛹	5	グリセリン注射	−20°C凍結	4	20日以内に全死
〃	3	無処理*	−20°C凍結	4	
シンジュサン休眠蛹	5	グリセリン注射	−10°C凍結	2.5	全死
〃	1	グリセリン注射	−10°C過冷却	2.5	羽化
〃	1	無処理*	−10°C凍結	2.5	死
シンジュサン休眠終了蛹	7	グリセリン注射	−10°C凍結	2.5	全死
〃	1	グリセリン注射	−10°C過冷却	2.5	羽化
〃	1	無処理*	−10°C凍結	2.5	死

* 対照となる無処理の例数が僅少であるが，これらの昆虫の耐凍性は既にしらべられている[1],[10]。

すべてのものが凍死するのが常であるが[10]，今回は −20°C 4時間の凍結によつて実験個体も対照個体も共に融解後20日以内に明瞭に死亡した。このときグリセリンを注射した個体には融解直後に背管(心臓)の僅かに脈動するものが3頭みとめられたが，対照個体の方では背管の脈動を体表面からみとめることはできなかつた。シンジュサンでは休眠蛹も休眠終了蛹もすべてグリセリン注射の如何を問わず凍結融解直後にすでに死んでいた。同時にグリセリン注射を行ない過冷却のみで凍結させなかつた個体は全く傷害を受けず休眠蛹も休眠終了蛹も共に20°Cで羽化させることができた。但しこのとき休眠蛹の方は20°Cに保温する前に5°Cに40日間おいて休眠を終了させた。

これらの結果からみると，このような方法で体内にグリセリンを与えた場合には，虫体に対する凍害を軽減する効果はほとんどないとみてよいであろう。本来グリセリンの凍害防止作用はその束一的性質 (Colligative property) により凍結の際の体液の濃縮，細胞よりの脱水等を軽減するためであると考えられているのであるが[11]，自然状態で高度の耐凍性を示す昆虫がもつているグリセリン含量と同程度のグリセリンを人工的に体内に加えた場合にはほとんど効果がないという事実ははなはだ興味がある。Salt はビートノメイガ幼虫が2.4～4.3% のグリセリンを含みながら非耐凍型である理由の一つはグリセリンが血液中に局在しているからかもしれないと想像した[12]。しかし彼の資料によつても血液以外の組織の含むグリセリンは生体重の1.5～2.0% に達しているので，もしも単なるグリセリンの存在だけで凍害防止効果があるとすれば，イラガ前蛹の例[9]からみてもビートノメイガには相当の耐凍性が期待できるはづである。われわれの知る限りでは同程度のグリセリン含量をもつ昆虫間の耐凍性に大差のある例は決して少なくない。このような場合耐凍性の高い方の昆虫の体内にはグリセリン以外の中性溶質が高濃度に溶けているかも知れないという考え方[12]は，これらの耐凍性昆虫の血液の氷点がそれ程低くない事実からみて[6),13)]，むしろ受け入れ難い。又越冬期のイラガ前蛹では，その体内から切り出された組織を食塩溶液で洗つてから凍らせたときでも相当の低温に耐えることができる[6]。従つて越冬昆虫の耐凍性の増大は恐らくその組織細胞の原形質の性状の変化 (たとえば植物細胞の hardening の際にみられるような脱水に対する抵抗力の増大[14]) によつて少なくとも或程度まではおこされるもので，このような変化を既におこしている細胞にとつてはグリセリンの様な比較的害の少ない水和に富む物質の存在はその耐凍性をさらに高めるのに役立つとみてよいであろう。

尚キアゲハ，アゲハ，アワノメイガ等におけるグリセリン含量の変化の様式はイラガの場合[9]とよく似ていて，休眠中に増加し，低温度におかれることがグリセリ量の増大に有効らしく，休眠が終了しても少なくとも前二者では，低温に保存されている限り容易に減量しない。Salt (1959) によれば20～30% に及ぶグリセリンをもつクキバチヤドリバチの越冬幼虫もこの様式のものらしい[15]。Dubach 等によれば越冬中のアリ *Camponotus pennsilvanicus pensilvanicus* では高低の温度処理をくり返すことによつて体内のグリセリン量をその都度減増させ

ることができたという[5]。

今回使用したすべての昆虫が，真冬にはグリセリンの有無や虫体の大小*にかかわらず−20°C内外又はそれ以低の過冷却点をもつていることは生態学的には重要な意味がある。即ちこれらの昆虫は特に植氷され易いような条件にさらされない限り過冷却状態のまま凍結することなく越冬してしまう場合がきわめて多いと考えられ，このようなときにはその昆虫の耐凍性の高低はその耐寒性とはほとんど無関係になるであろう[10]。

摘　要

鱗翅類の幼虫3種，蛹3種，アリ成虫1種を使つて，越冬期にその体内にできるグリセリン含量とその耐凍性との関係をしらべた。

1. ゴマダラチョウ幼虫とオオムラサキ幼虫にはグリセリンが検出されないが，−15°Cで1日の凍結に耐える。

2. アゲハ蛹とムネアカオオアリは共に非耐凍型であるが，前者は生体重の0.5%，後者は2〜3%位のグリセリンを含む。

3. 冬期には−30°C以低の凍結にも耐えるほど耐凍性の高まるアワノメイガ幼虫及びキアゲハ蛹のグリセリン含量は真冬にはそれぞれ約4%及び2%位に達する。

4. グリセリンをもたぬシンジュサン蛹は全く耐凍性がないが，その体の大形(2.8 gに及ぶ)なのにもかかわらず−20°C以低に過冷却される。他の6種の昆虫の過冷却点も真冬には−20°C付近かこれよりやや低い程度である。

5. これらの昆虫にグリセリン以外の多価アルコールは検出できなかつた。

6. アゲハ蛹は−5°C，5時間の凍結後生存することがあるが，このような蛹からは体の前半のみが変態した「半成虫」を生じた。

7. イラガの永久前蛹とシンジュサンの休眠蛹及び休眠終了蛹を使つてグリセリンを注射した昆虫の凍結実験を行なつたが，いづれの虫にも耐凍性の増大はみられなかつた。

8. 恐らく昆虫の耐凍性はその組織細胞の原形質のある状態変化によつてもたらされるもので，このように変化した細胞に対してのみグリセリンは凍害軽減剤として有効に働くものであろう。

9. これらの昆虫の体内におけるグリセリンの量的変化の様式はイラガ前蛹のそれに似て休眠が終了しても虫体を低温に保存するかぎりグリセリン量は急速には減少しない。

文　献

1) 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.
2) 朝比奈英三 1959　越冬昆虫の耐寒性．実験形態学新説，養賢堂，東京，92.
3) Asahina, E. 1959　Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely

* シンジュサンの蛹は体重2.8 gに及ぶ。

low temperature. Nature, ***184***, 1003.
4) Salt, R. W. 1955 Extent of ice formation in forzen tissues, and a new method for its measurement. Can. J. Zool., ***33***, 391.
5) Dubach, P., Smith, F., Pratt, D & Stewart, C. M. 1959 Possible role of glycerol in the win.ter-hardiness of insects. Nature, ***184***, 288.
6) Ashina, E., Aoki, K. & Shinozaki, J. 1954 The freezing process of frost-hardy caterpillars. Bull. Ent. Res., ***45***, 329.
7) Ditman, L. P., Vogt, G. B. & Smith, D. R. 1943 Undercooling and freezing of insects. J. Econ. Ent., ***36***, 304.
8) 朝比奈英三 1958 耐凍性昆虫を超低温で凍結生存させる一つの方法. 低温科学, 生物篇, ***16***, 55.
9) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 イラガ越冬前蛹のグリセリン. 低温科学, 生物篇, ***18***, 51.
10) Asahina, E. 1959 Diapause and frost-resistance in a slug caterpillar. Kontyû, ***27***, 47.
11) Lovelock, J. E. 1954 The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. Biochem. J., ***56***, 265.
12) Salt, R. W. 1957 Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing Can. Entomologist, ***89***, 491.
13) Salt, R. W. 1956 Freezing and melting points of insect tissues. Can. J. Zool., ***34***, 1.
14) Scarth, G. W. 1941 Dehydration injury and resistance. Plant. Physiol., ***16***, 171.
15) Salt, R. W. 1959 Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan). Can. J. Zool., ***37***, 59.

Résumé

In order to clarify the relation between their glycerol contents and frost-resistance, examination was made of several overwintering insects, including an adult ant and six species of lepidopterous larvae and pupae.

In non-frost-resistant pupa of a giant silk worm, *Philosamia cynthia pryeri*, no glycerol was detected. Bodies of remarkably frost-resistant insects, the larva of the European corn-borer and the pupa of the swallow tail, have been known to contain glycerol. In mid-winter their glycerol contents reached about 4% for the former and about 2% for the latter based on their fresh body weight. Pupae of *Papilio xuthus*, a butterfly allied to the swallow tail, were shown to have about 0.5% of glycerol, however, their frost-resistance was very low. Of ten pupae frozen at −5°C for 5 hours four survived and resumed their development, but the imaginal tissue was formed only in the anterior half of their pupal bodies. In spite of the relatively large glycerol content, evaluated as about 2 to 3%, a carpenter ant *Camponotus obscuripes obscuripes* was found to be a "freezing-susceptible" insect. After a body freezing at −10°C for 2 hours most of the ants were killed. A few of them revived with a feeble moving of their legs, but they could not walk and all died within a few days. On the other hand, two species of butterfly larvae, namely *Sasakia charonda* and *Hestina japonica*, were found to survive freezing at −15°C for a full day without any glycerol in their body. In all insects examined no appreciable amount of polyhydric alcohol other than glycerol was detected.

Using the dehardened prepupae of a slug caterpillar, *Cnidocampa flavescens*, and the pupae of *Philosamia* both in and after diapause, the direct effect of glycerol upon

the frost-resistance of the insects was examined. In each of the insects glycerol of about three per cent of body weight was injected into the body cavity, and then they were subjected to freezing. As a result of this experiment no enhancement in their ability to resist freezing was found.

It seems, therefore, that some insects in which a certain protoplasmic change has probably occurred in their cells can survive freezing, and that only in such insects the glycerol contained in their body may be effective in increasing their frost-resistance.