



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ムネアカオオアリの耐凍性 I : 耐凍性とグリセリンの関係
Author(s)	丹野, 皓三; TANNO, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 25-34
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17659
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p25-34.pdf



ムネアカオオアリの耐凍性 I*

耐凍性とグリセリンの関係

丹野 皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和37年7月受理)

I. 緒言

凍害防止剤としてのグリセリンの効果は各種の生物について明らかにされている。越冬昆虫の虫体内にしばしば検出されるグリセリンについても耐凍性と関連して論じられて来た。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のちがいがあり、グリセリン含量が多くても、必ずしも耐凍性が高いとは限らない¹⁾。又越冬昆虫のグリセリン含量とその耐凍性に関する多くの報告は幼虫及び蛹の時期におけるもので、成虫の時期の報告は少ない。

black carpenter ant *Camponotus pensilvanicus pensilvanicus* var. の成虫を冷温 (0~5°C) で飼育すると、グリセリンが体内に増加し、これを室温 (20~25°C) に移して飼育すると、全くグリセリンが虫体内に検出されなくなる事が Dubach 等により報告された²⁾。この蟻と同属のムネアカオオアリ *Camponotus obscuripes obscuripes* において、竹原、朝比奈により越冬期に 32.6 mg/生体重 g のグリセリンが検出されたが、-10°C 2時間の凍結にたえられない事が報告された¹⁾。今回の報告は、ムネアカオオアリを実験材料として、昆虫の1個体としての耐凍性とそのグリセリン含量との間の相関の有無をしらべたものである。

II. 実験材料及び方法

材料：1961 年末釧路標茶にて野外の朽木中で採集されたムネアカオオアリ *Camponotus obscuripes obscuripes* の成虫 (雄蟻と働蟻) を札幌に運んで実験材料として使用した。

方法：直径 10 cm のペトリ皿に水を含ませた濾紙をしき、この中にそれぞれ 10 匹の蟻を入れ、これを -5.0±0.1°C 及び -10±0.1°C の二つの恒温箱内でそれぞれ冷却した。一時間後まだ凍結していない虫があればぬらした紙片をその虫体の表面にはりつけて植氷した^{**}。凍結した状態で同じ温度に 24 時間置いてから室温で融解させた。その後は食餌として 10% 蔗糖液

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 618 号

** この方法でぬれた紙片は直ちに凍るが引き続き例外なく虫体の凍結がおこる。

を含ませた濾紙をペトリ皿内に入れ、これを時々取りかえて室温で飼育した。

凍結の判定：凍結すると蟻の腹部は非常に硬くなる。ここをピンセットの先端で軽くおして凍結を判定した。

凍結融解後における生死の判定：ピンセットで軽く虫体を押さえても全く動かない場合死んだものとし、かすかでも動ける虫は生きているものとした。

グリセリン及びグリコーゲンの定量：一度に3~5個体の虫体を磨碎してそれよりグリセリンとグリコーゲンを別々に抽出した。定量法は竹原、朝比奈の前報³⁾と同じである。

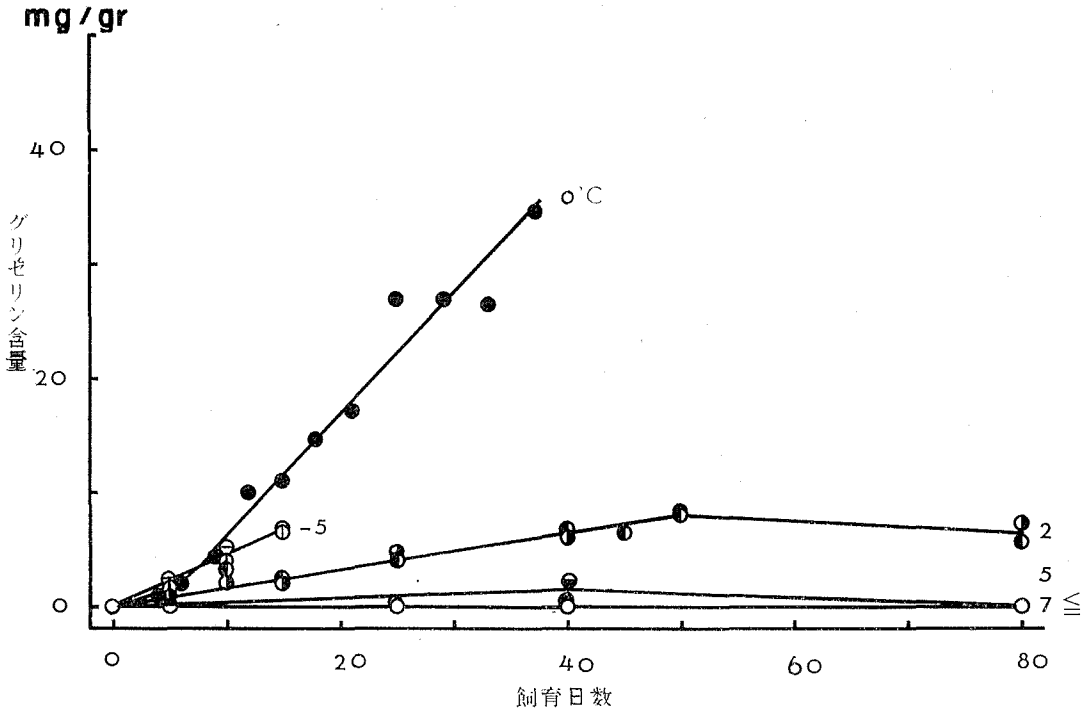
III. 実験結果と考察

1. グリセリンの増減と飼育温度

ムネアカオオアリを0°Cで飼育すると、その組織内にグリセリンが増加し、これを室温(20~25°C)で飼育すると、グリセリンが急速に減少し、7日後には、グリセリンは全く検出されなくなる。再びこの虫体を0°Cに移すと、グリセリンが再び増加する。この事実は1960年秋に採集したムネアカオオアリで観察された(未発表)。今回はさらにグリセリンと飼育温度の関係を明らかにする目的で、-5°Cから25°Cまでのいくつかの温度で蟻を飼育し、グリセリンの増加過程を観察した。ムネアカオオアリを働蟻と雄蟻に分けて、直径15 cmのペトリ皿に約80匹ずつ入れた。この中には食餌として10%蔗糖液を浸した濾紙をしき25°Cで10日間蟻を飼育した。最初採集地からとどいた時、蟻のグリセリン含量は雄蟻生体重1 g当り22.9 mg 働蟻では20.4 mgであった。25°C10日間の飼育で、グリセリンは雄蟻、働蟻とも全く検出されなくなった。次にこのグリセリンが全く検出されなくなった蟻を、10%蔗糖液を浸した濾紙をしいた径15 cmペトリ皿に約80匹ずつ入れ、-5°、0°、2°、5°、7°、10°、25°Cの各温度で暗黒状態で飼育した。-5°Cで飼育したものでは、飼育期間中蟻が植氷される恐れがあるので、蔗糖液を浸した濾紙は与えなかった。これらの温度で飼育している期間中のグリセリン増加過程を第1図に示した。

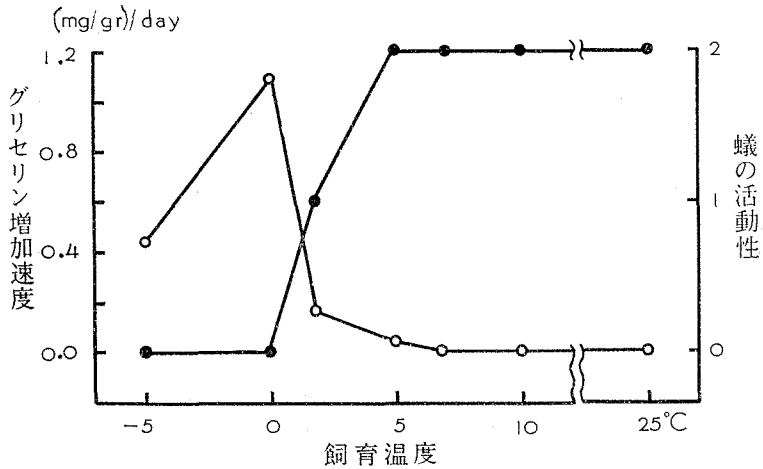
-5°Cから5°Cまでの飼育温度では、蟻の組織中にグリセリンが増加して来るが、7°C以上では、グリセリンは80日間の飼育期間中全く検出されなかった。グリセリンが増加する場合直線的に増加し、極大量に達すると、その後グリセリン量はほとんど増減する事なく一定量を保つが、2°C及び5°Cで飼育した場合は、極大量に達した後、ほんのわずかグリセリン含量が減少して行く傾向があった。

グリセリンの増加速度は飼育温度に影響され、増加速度が大であるほどグリセリンの極大値は高くなる。0°Cで37日間飼育した虫体のグリセリン含量は34.5 mg/grで、その時のグリコーゲン含量はグルコースに換算して22.3 mg/grであった。最初グリセリンが全く検出されない虫体のグリコーゲン含量はグリコースに換算して61.0 mg/grであった。グリセリンがグリコーゲンから生成される⁴⁾ものと考えれば、ムネアカオオアリのグリセリン含量は最大でも生体重の6%位であろう。



第1図 飼育温度とグリセリンの増加過程との関係

働 蟻： ⊖ -5°C, ● 0°C, ⊕ 2°C, ⊙ 5°C
 雄 蟻： ⊕ -5°C, ⊙ 2°C, ⊙ 5°C
 雄蟻及び働蟻： ○ 7°, 10°, 25°C



第2図 各飼育温度におけるグリセリンの増加速度と蟻の活動性

○ グリセリン増加速度 ● 蟻の活動性
 0: 虫は全く動かない。 1: 虫は正しく歩行出来ないが体の一部分を動かしている。 2: 虫は正常に活動する。

なぜグリセリンの増加速度が飼育温度に影響されるのか。グリセリンの増加速度と蟻の活動性との関係を示した第2図からこの問題を考察してみた。

0°C以下の飼育温度において、蟻は全く動かないが、飼育温度が0°Cより高くなると蟻は体の一部分を動かし始め、5°Cでは、動きは緩慢であるが正常に動き、7°C以上では活潑に活動する。一方グリセリンの増加速度は0°Cで飼育した場合最大となり、0°C以下では遅くなり0°Cより高温では急激に低下し、7°C以上の飼育温度では、グリセリンは全く生成されない。このように飼育温度が0°C以上の場合、グリセリンの増加速度の急激な低下と逆相関を示して虫の動きが活潑になる。グリセリンになる直前の基質又はその近くの基質がグリセリンになる系に関係する酵素の活性はおそらく0°Cより高い温度に最適点を持っているのであろうが、0°C以上の温度では蟻が動き出す事から判断して、0°C以上では虫体内の代謝に関係している全ての酵素が活性化され、その結果グリセリンが生成されて来る系に関係した基質が消費されるためグリセリンの増加速度が急激に低下するのであろう。0°Cより低い飼育温度でグリセリン増加速度が低下するのは、グリセリンが生成する系に関係している酵素の低温における活性低下が原因であろう。ところで-5°Cから0°Cまでのグリセリン増加速度の Q_{10} を求めるとその値は4.96である。この値は低温度による酵素活性の低下だけでは大きすぎて説明し難い。第3図に示したように-5°Cで飼育した場合過冷却状態で20日間しか生存出来ない事から考えて、-5°Cにおける飼育では、グリセリンが生成する系に関係した酵素の活性低下ばかりでなく他にもグリセリン増加速度を低下させる条件が存在しているものと思われる。

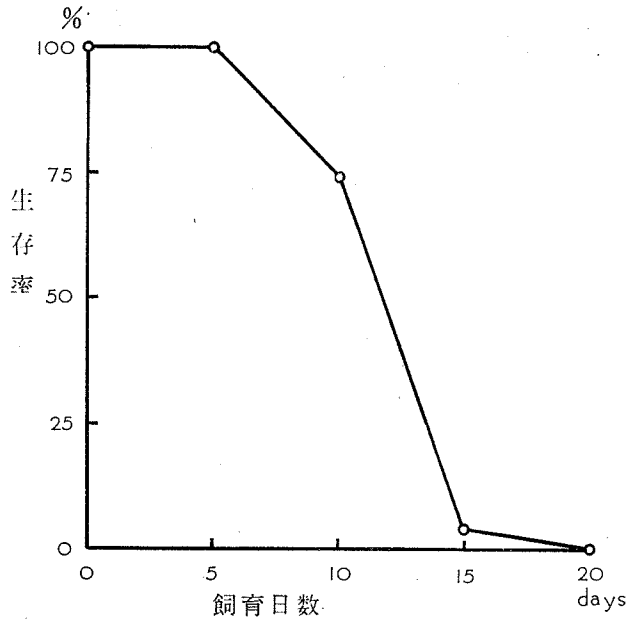
2. 耐凍性の獲得と飼育温度の関係

種々の飼育温度におけるムネアカオオアリのグリセリン増加過程と同時に耐凍性の変化を観察した。凍結条件、融解条件、融解後の条件、生死の判定はIIで述べた。耐凍性の高さは凍結融解後の生存日数(10匹の平均)で表現した。生存日数の平均値からの偏差は最大で±5日(5°Cの場合)、最少で±1日(-5°C及び10°C以上の場合)であった。

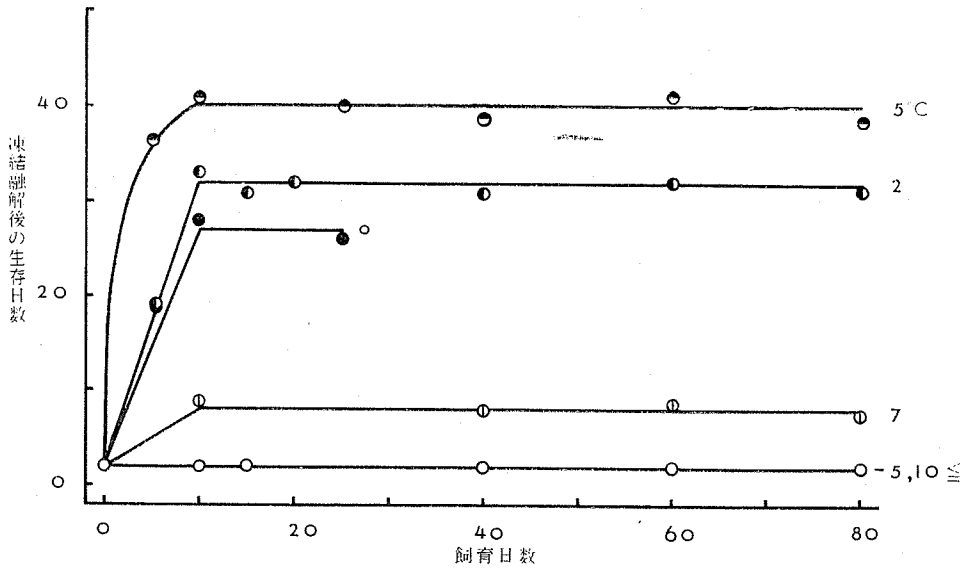
採集地からとどいたばかりの時、植氷しても-5°Cでは凍結しなかったが、25°Cで10日間飼育した結果、凍結するようになった。-5°Cで24時間凍結させると融解後2日間しか生存出来なかった。次に蟻をグリセリンの増加過程を調べた場合と同じ条件で飼育し、耐凍性の変化を観察した。結果を第4図(働蟻)及び第5図(雄蟻)に示す。

-5°Cに飼育すると過冷却状態におかれることになるが、この温度では第3図に示したように20日間しか生存出来ない。従って耐凍性のデータは、グリセリンの場合と同様に15日間まで生存した虫体を使用した。0°C以上で飼育した場合は、3カ月の間に死んだ虫は全くなく、室温にもどすと、すべて活潑に活動しその後死亡するものはなかった。この事から0°C以上で飼育すれば、この蟻は致命的な害は受けないと云える。

第4図に示したように、働蟻における5°C24時間凍結に対する耐凍性の獲得は飼育温度により異なり、-5°Cで飼育すると耐凍性は全く高まる事がなく、飼育温度がそれより高くなるにつれ耐凍性も増し、5°Cで最高になる。飼育温度が5°Cより高くなると、急激に耐凍性の獲



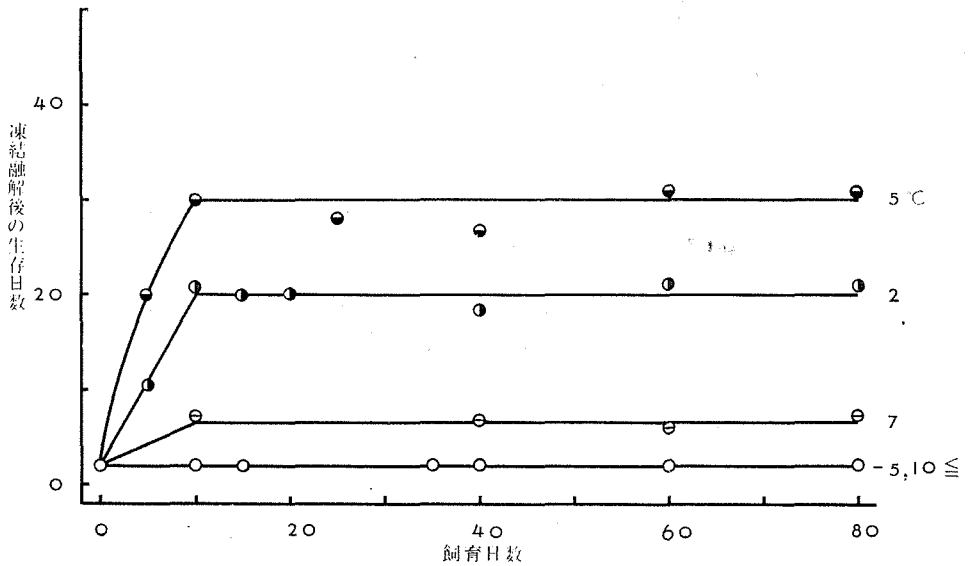
第3図 -5°Cで飼育した場合の働蟻の生存率



第4図 働蟻の耐凍性獲得過程と飼育温度

縦 軸: -5°C 24時間凍結融解後の生存日数
(10個体の平均値)

飼育温度: ● 5°C, ◐ 2°C, ● 0°C, ◑ 7°C,
○ -5°, 10° 及び 25°C



第5図 雄蟻の耐凍性獲得過程と飼育温度

縦 軸： -5°C 24 時間凍結融解後の生存日数
(10 個体の平均値)
飼育温度：● 5°C ，◐ 2°C ，◑ 7°C ，○ -5° ， 10° 及び 25°C

得が少なくなり、 10°C 以上では全く耐凍性は増加しない。

5° 、 2° 、 0°C で 10 日間以上飼育した虫体は、 -5°C 24 時間凍結後室温で融解すると、数時間後はほぼ正常に動き始め、その後の生存期間中蔗糖液を浸した濾紙をかみ切って運ぶ等全く正常な蟻と変らぬ行動をする。外見的に正常に思われるこのような行動は、死亡する 1~2 日前まで続き、その後急激に虫体が弱り死亡する。このように突然虫が死亡する事から考えて、凍結前に 5° 、 2° 、 0°C で 10 日間以上飼育した虫が -5°C 24 時間の凍結で受けた傷害は直接に虫体の運動機能に関係した器官、例えば筋肉組織、神経系、循環器等におけるものではないと考えられる。

5° 、 2° 、 0°C で 5 日間飼育した虫及び 7°C で 10 日間以上飼育した虫においては、凍結融解後の生存期間中歩行困難等傷害が見られた。脚及び触角は単独に動かせるが、統一した運動が出来ない事から考えて、筋肉は傷害を受けていないが、神経系が傷害を受けているものと思われる。 -5°C 及び 10°C 以上で飼育した虫では、凍結融解後の生存期間中みずから動くことはなく、ピンセットで軽くおさえるとわずかに体の一部を動かす程度であった。これは神経系の受けた傷害が 7°C で 10 日間飼育した虫体のそれより大きいためと思われる。

全ての飼育温度において、耐凍性の増加は 10 日間の飼育で最大に達し、以後 70 日間飼育しても変化しなかった。

0°C で飼育した場合、40 日以上飼育した虫体は、植氷しても -5°C では凍結する事はなか

った。

雄蟻についても同様に、 -5°C 24 時間凍結に対する耐凍性の獲得と飼育温度の関係を第 5 図に示した。雄蟻における耐凍性は同じ条件で飼育した働蟻と比較して低いが、耐凍性の獲得における飼育温度の影響や耐凍性が最大になる飼育温度及び飼育日数、凍結融解後の虫の動きから考えられる傷害の程度等は全く働蟻の場合と同じである。

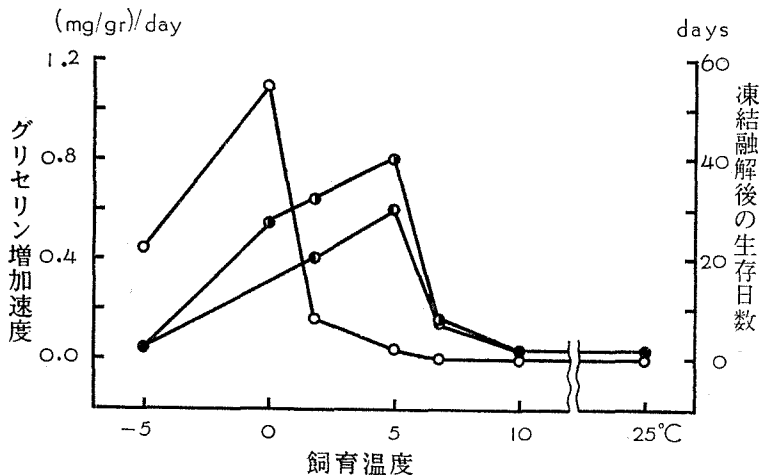
次に -10°C 24 時間凍結に対する耐凍性を見た。 -5°C での凍結に対する耐凍性を観察した場合と同じ飼育条件の虫体を用いて実験したが、飼育温度、飼育日数、雄蟻と働蟻の別に関係なく -10°C 凍結融解後の生存日数は 1~3 日で、生存期間中ピンセットで軽くおさえるとわずかに虫体の一部を動かす程度であった。

どの温度で何日間飼育した虫でも -10°C で虫体の表面にぬらした紙片をはりつけて植氷すると凍結した。植氷しなければ、 0°C で 40 日以上飼育した虫体のみは -10°C で少なくとも 3 日間過冷却状態を保っていた。 -10°C で 3 日間過冷却状態にあった虫を室温にもどすと、正常に活動し何ら傷害を受けたものはなかった。

3. 耐凍性の獲得とグリセリンの関係

耐凍性の獲得とグリセリン含量の関係を明らかにするために、飼育温度に対するグリセリン増加速度(第 1 図及び第 2 図)と獲得した耐凍性の高さ(第 4 図及び第 5 図)との関係を併せて第 6 図に示した。

種々の飼育温度におけるグリセリンの増加速度は働蟻、雄蟻とも全く同じであるが、耐凍性は常に働蟻の方が雄蟻よりも高かった。 -5°C で飼育した場合グリセリンはかなり増加する



第 6 図 耐凍性とグリセリン生成速度との関係

- グリセリンの増加速度
- 各温度で 10 日間飼育した働蟻の -5°C 24 時間凍結後の生存日数
- 各温度で 10 日間飼育した雄蟻の -5°C 24 時間凍結後の生存日数

が、耐凍性は全く増加しない。一方5°Cで飼育した場合グリセリンはほとんど増加しないが、耐凍性は他のどの温度で飼育した場合よりも高い。5°Cで40日間飼育した虫体は0.6 mg/grのグリセリンを含んでいた。同じ温度で80日間飼育した虫は全くグリセリンを含まないが(第1図)、耐凍性は40日目の虫と同様に高かった。7°Cで飼育した場合グリセリンは全く検出されなかったが、同じようにグリセリンが全く検出されない10°C以上で飼育した虫及びかなりグリセリンが検出される-5°Cで飼育した虫と比較してやや高い耐凍性を示した。0°C及び2°Cの飼育温度において、最初の10日間にグリセリンの増加に伴い耐凍性が高くなるが、それ以後の飼育でグリセリンはあいかわらず等速で増加して行くのに対して耐凍性はもはやそれ以上高まらない。

このような結果からみてムネアカオオアリを冷温で飼育した場合体内に増加して来るグリセリンは1個体としての耐凍性には全く無関係であり、0°C及び2°Cの温度で飼育した場合に見られるグリセリン増加に伴う耐凍性の増大は単なる平行関係であると考えられる。

しかし次の事実からみて、ムネアカオオアリの体内に生成されるグリセリンは虫体の凍害を防ぐために有効であろう。すなわち0°C以外のどの温度で飼育しても体内のグリセリン最大量は0°Cで40日間飼育した虫のグリセリン量(39 mg/gr)より少なく、-5°Cで植氷すると必ず凍結し、-10°Cにさらすと植氷しなくても12時間内に凍結する。ところがグリセリンの増加速度が最大である0°Cで40日間以上飼育した虫は、働蟻、雄蟻とも-5°Cで植氷しても凍結を起す事はなく、植氷しなければ-10°Cで少なくとも3日間凍結を起さずに過冷却状態で生存出来る。この事から虫体に含まれるグリセリンがかなりの量に達した場合耐凍性には無関係であるが虫体の過冷却能力を高めるのに役立つと思われる⁵⁾。

野外においてムネアカオオアリは朽木中で越冬するので冬期にはかなり低温にさらされる機会があるであろう。前述のように虫体が凍結する事は-10°C程度においてもほとんど致命的であるから、越冬期において虫体内に含まれるグリセリンは虫体の過冷却能力を高め、凍結を防ぐ意味において生態的に甚だ役立つものと思われる。

ところで第3図に示したように、-5°Cで20日間飼育すると蟻は凍結しなくても全て死亡する。この事実と冬期にはおそらく-5°Cよりも低い温度にかなり長い期間さらされても野外で生存している事とは矛盾しているように思われる。しかし本実験の場合は-5°Cで飼育する前に25°Cで10日間飼育したために耐寒性を失った⁶⁾結果-5°C20日間の飼育にたえられなかったのであろう。

IV. 摘 要

越冬期のムネアカオオアリを25°Cで10日間飼育した後-5°Cより25°Cに及ぶ種々の温度で80日間飼育した場合、その虫体内のグリセリン含量がどのように変化するか、又それに伴って耐凍性変るかどうかを調べた。

その結果虫体のグリセリン含量及び耐凍性(-5°C24時間凍結し融解した後の生存日数)は

飼育温度の影響を著しくうけることが判った。又虫体のグリセリン含量と耐凍性との間に何ら関係がない事が明らかになった。

虫体のグリセリン生成量が最大になる飼育温度は 0°C であるのに対して、耐凍性(-5°C 24時間凍結し融解した後の生存日数)が最高を示す飼育温度はグリセリンがほとんど生成されない 5°C であった。又 -5°C で飼育した虫体において、グリセリンはかなり速い速度で生成されるが、耐凍性の獲得は全く見られなかった。

実験したすべての飼育条件において、蟻は -10°C 24時間の凍結に耐えられず、融解後1~3日間しか生存出来なかった。

グリセリンの含量が最大である 0°C で40日以上飼育した虫体は、 -5°C で植氷しても凍結を起す事はなく、植氷しなければ -10°C でも3日間凍結を起さずに過冷却状態で生存出来る。この事から虫体に含まれるグリセリンがかなりの量に達した場合耐凍性には無関係であるが虫体の防凍性(過冷却能力)を高めるのに役立つと思われる。

終りに、実験の指導並びに御校閲下さった朝比奈英三教授に感謝する。又実験材料を採集して送って下さった飯島一雄氏に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Dubach, P., Smith, F., Pratt, D. and Stewart, C. M. 1959 Possible role of glycerol in the winter-hardiness of insects. Nature, **184**, 288-289.
- 3) 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**, 159-163.
- 4) Chino, H. 1958 Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*. II Conversion of glycogen into solbitol and glycerol during diapause. J. Ins. Physiol., **2**, 1-12.
- 5) 篠崎寿太郎 1954 イラガ前蛹の凍結. 低温科学, 生物篇, **12**, 71-86.
- 6) Colhoun, E. H. 1960 Acclimatization to cold in insects. Ent. Exp. Appl. **3**, 27-37.

Résumé

In order to clarify the relation between their glycerol contents and frost-resistance, examination was made of an adult carpenter ant *Camponotus obscuripes obscuripes* reared at various temperatures.

The overwintering carpenter ants, workers and males, collected in Shibeच्या, Hokkaido had contained about 2 per cent of glycerol based on their fresh body weight. When the ants were released from their state of dormancy by keeping them at 25°C , they became active and took sugar solution as food, and after 10 days, no glycerol was detected in their tissue. Groups of these ants were then kept at -5° , 0° , 2° , 5° , 7° , 10° , 20° and 25°C respectively. During the days kept at these temperatures, their glycerol contents and frost-

resistance were examined.

The glycerol contents in the carpenter ants kept at 0°C were larger than in those kept at any other temperatures. Under the same experimental conditions, the glycerol contents of worker ants were the same as those of male ones. Just after the body freezing at -5°C for 24 hours all ants were found to be alive with some or without any apparent injury. They died, however, within 2 months after the freezing. The life span in the ants frozen and thawed in this way is clearly affected by the temperature at which they have been reared previous to the freezing (see Fig. 4). In spite of their very small glycerol contents, the ants reared at 5°C before the freezing lived the longest, while the ants reared at -5°C before the freezing lived the shortest time although they had a relatively large glycerol content. In worker and male ants kept in the same environment, the former lived longer than the latter after the freezing. It must be noted that the ants reared at temperatures between 0°C and 5°C are, as a rule, frost-resistant whether they have glycerol or not. Moreover, within the first 10 days of rearing at every applied temperature, frost-resistance in the ants reaches the maximum and then remains at a constant level even if the glycerol content remarkably increases. After a thawing from a body freezing at -10°C for 24 hours, no ants could survive longer than 3 days. Judging from the results herein presented, it may well be said that in carpenter ants there is no relation between the glycerol contents and their frost-resistance.

When its glycerol content exceeded about 4 per cent of its fresh weight, the ant was never frozen at -5°C, even by an artificial ice seeding, and without ice seeding it could be kept under supercooled condition at -10°C at least for 3 days. It seems that the large glycerol content is ecologically useful for the overwintering carpenter ant by enhancing super-cooling ability and therefore protecting it from a body freezing by which all ants are invariably killed even at a temperature of -10°C.