



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アゲハ越冬蛹の耐凍性
Author(s)	丹野, 皓三; TANNO, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 21, 41-53
Issue Date	1963-12-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17672
Type	departmental bulletin paper
File Information	21_p41-53.pdf



アゲハ越冬蛹の耐凍性

丹野 皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和38年7月受理)

I. 緒言

越冬昆虫の体内に生ずるグリセリンとその耐凍性との関連についてはすでにしばしば論ぜられ、グリセリンの存在が耐凍性をもたらす原因であるとする見解も少なくない^{1)~3)}。しかしすでに前報においてのべたように各種の昆虫においてその耐凍性に対するグリセリンの役割を疑わせるような事実も又決して少なくない⁴⁾⁵⁾。本文では日本全土にごく普通に見出されるアゲハ *Papilio xuthus* の越冬蛹を用いて、この蛹体が凍る場合 1. どのような凍結の過程において凍害が初めて起るか 2. そのような凍害に対してこの蛹が自然状態で持っているグリセリン或は人工的に蛹体内に注射されたグリセリンが何等かの防禦効果をあらわすかどうか、という問題を明らかにするいくつかの事実を報告する。又動かない蛹のような外部から生死の判定の困難な材料を使った場合に生死を識別する便法として体重の減量速度を利用する方法について述べる。

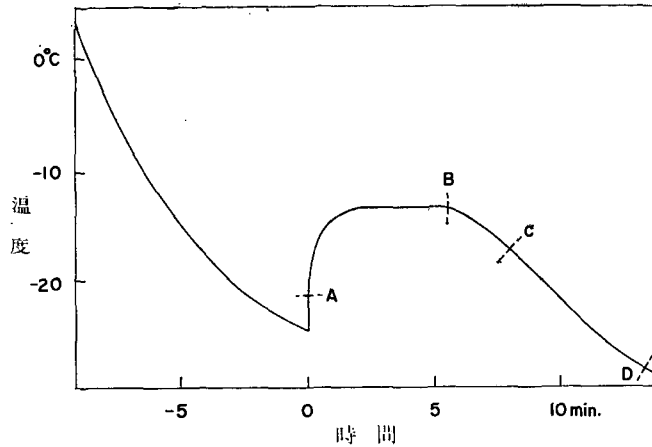
II. 材料と方法

材料として1962年秋に蛹化した仙台と東京のアゲハ越冬蛹を札幌に運んで使用した。仙台の越冬蛹は1962年9月中旬に卵又は初齢の時期に仙台と塩釜で採集され、同年11月中旬に蛹化するまでカラタチの葉で飼育された。この蛹を12月6日札幌に運んで2°Cに保存し数日中に実験に使用した。又東京において飼育された幼虫から得た蛹を3月9日札幌に運んで仙台の蛹と同様に2°Cに保存し数日中に実験に使用した。蛹が含有しているグリセリンの定量方法は前報⁴⁾⁵⁾と同じで、1個体ずつ別々に抽出し定量した。蛹の凍結処理として次の二つの場合を試みた。

i) 凍結曲線を記録しながら蛹を凍結させて或点まで凍結を進行させた場合

木綿糸でしばって背部を熱電対の先端に接触させた蛹を、二重にしたガラス管の中に宙吊りにし、これを $-34 \pm 1^\circ\text{C}$ に冷却したブラインの中に入れて凍結させ、凍結曲線を電子管式自動記録計で記録した。得た凍結曲線の代表的一例を第1図に示した。このようにして凍らせた蛹は、第1図に示したAからDまでの求める点まで凍結を進行させてから20°Cの温水中で急激に融解させた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第645号



第1図 アゲハ蛹の凍結曲線

- ii) 凍結した状態で -5°C に5時間又は24時間おいた場合及び凍結した状態で -10°C に5時間おいた場合

凍結の方法としてぬらした紙片を蛹の表面にはりつけて $-5.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 及び $-10.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の二つの恒温箱内でそれぞれ植水した。この状態でそれぞれの温度に5時間又は24時間おいた後室温で融解させた。この方法で凍結を起こさなかった場合は蛹をi)に示した方法で凍結曲線を測定し、凍結が始まったとたん(第1図A点)にすぐに $-5.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 又は $-10.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温に移し5時間又は24時間おいた。この場合一度凍結を起こした蛹は -5°C 又は -10°C の恒温箱内に移す過程及びその後の恒温箱内で融解するものはなく蛹は例外なく凍結したままの状態であった。この場合死亡した蛹には腐敗のための変色がほぼ5日間位でおこった。

凍結融解後蛹を相対湿度87% 温度 20°C の恒温恒湿度に保ったデシケーター内に移した。87%の相対湿度を保つためにKCl飽和溶液を満した径15cm 深さ6cmのガラス容器をデシケーターの中に入れた。このデシケーターを恒温箱に入れて $20.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保った。凍結融解後このような条件のもとで蛹の凍害の程度及び体重減量の様子を対照と比較して観察し測定した。

又微量注射器で蛹の体重あたり純グリセリン量が $3.0 \pm 0.2\%$ 又は $1.0 \pm 0.2\%$ になるように95%グリセリンを蛹の第二腹節に注射し 10°C で1日おいてからこの蛹を凍結させ、グリセリンを注射しないで凍結した蛹と比較して融解後の凍害の様子を観察した。

III. 結 果

1. 越冬蛹のグリセリン含量

仙台から送られた翌口の2月7日に蛹を1個体ずつ磨砕し、それぞれグリセリンを定量した。結果を第1表に示した。又東京より送られた蛹のグリセリン含量を札幌に送られ

第1表 仙台のアゲハ越冬蛹のグリセリン含量

実験番号	蛹の重量 (mg)	グリセリン含量 (mg/g)
1	502.1	11.9
2	323.0	15.1
3	419.5	41.4
	平均値	22.8 ± 13.2

た。当日の3月9日に定量した。結果を第2表に示した。

個体によりグリセリン含量にかなりのブレがあったが、すべての個体にグリセリンが検出された。

2. 凍結過程の進行と凍害の関係

蛹の凍結曲線の代表的一例を第1図に示した。この凍結曲線上のA, B, C及びDのそれぞれの点まで蛹の凍結を進行させてから20°Cの温水中で融解させた。融解後相対湿度87% 20°Cの恒温恒湿に保ったデシケーターの中に蛹を移し生死と変態の様子を観察した。結果を第3表に示した。

第2表 東京のアゲハ越冬蛹のグリセリン含量

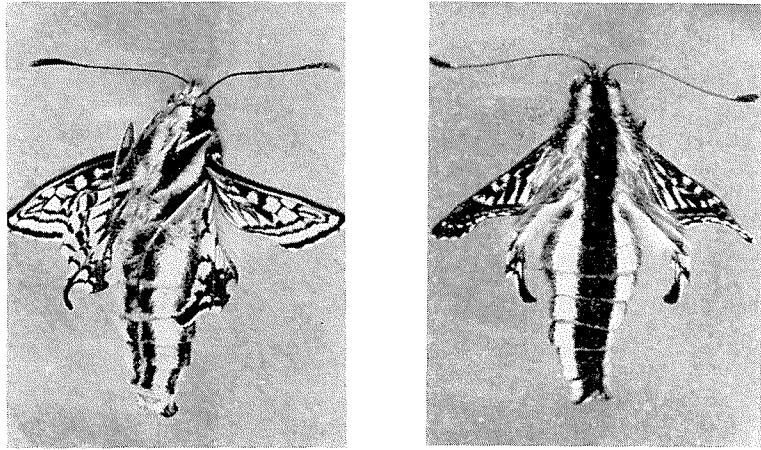
実験番号	蛹の重量 (mg)	グリセリン含量 (mg/g)
1	597.3	0.8
2	420.5	1.4
3	452.6	1.6
4	571.1	2.8
5	577.0	5.8
6	607.3	10.9
7	360.1	16.9
8	579.7	18.7
9	551.0	19.2
10	589.7	27.3
	平均値	10.5±8.9

第3表 凍結過程の進行と凍害の関係

凍結処理*	使用虫数	死亡数	生存数			生存率 (%)
			一部変態	脱皮不能	羽化	
仙 台 の ア ゲ ハ 蛹						
対照 (不凍)	5	0	0	0	5	100
A	3	0	0	3	0	100
B	1	0	0	1	0	—
C	1	1	0	0	0	—
D	4	4	0	0	0	0
東 京 の ア ゲ ハ 蛹						
C	9	4	5	0	0	56
D	3	3	0	0	0	0

* A, B, C, Dは第1図に示した凍結曲線上の各点まで凍結を進行させたことを示す。

凍結を起こしたとたん(A)に融解させた蛹はその後脱皮するまで変態したが自力で脱皮出来なかった。人為的に蛹皮をむいてやったものを第2図に示した。頭部の脊面腹面及び側面に見られる黒色帯状の紋は正常な成虫のそれと同じであったが、各腹節は正常な成虫の腹節よりも異常に肥大し、腹部を切開してみると蛹の時期のものと同様に非常に多量の脂肪体がみとめられた。脱皮した後の成虫の活動力は対照にくらべて非常に弱く、自力で自重に抗して他の物体にぶらさがることができなかった。B点まで凍結し融解させた蛹は前記のA点まで凍結させた蛹に見られた凍害と同じであった。ただし脱皮後の成虫の活動力はA点まで凍結させたものよりもさらに弱かった。C点まで凍結し融解させた蛹の半数はぜんぜん変態が進まずに数日以内に腐敗した。残りの半数は脚及び前後翅等頭胸部の大部分は変態したが第三腹節以下全腹



第2図 凍害を受けた蛹から羽化した成虫

部の変態がぜんぜん進まずに死亡した。D点まで凍結し融解させた蛹はぜんぜん変態することなくすべて死亡した。このように凍結が起こりさえすれば蛹はかならず何等かの凍害を受ける事実と凍結過程の進行に伴い生存率が減少するばかりでなく1個体の受けた凍害の程度も又増大する事実とが明らかになった。

3. 恒温での蛹体の凍結

蛹を凍結した状態で恒温に一定時間おいてから融解させその後の凍害の程度を観察した。蛹の凍結を起こさせる方法はIIで述べたように水にぬらした紙片を蛹の表面にはりつけて -5°C 又は -10°C においた。この方法で植氷されなかったものは凍結曲線をとりながらA点(第1

第4表 恒温での凍結と凍害の関係

凍結処理	凍結方法*	使用虫数	死亡数	生存数			
				一部変態	脱皮不能	羽化	
仙 台 の ア ゲ ハ 蛹							
対 照 (不凍)	—	5	0	0	0	5	
-5°C	5時間	植 氷	5	2	1	2	0
		自 発 凍 結	4	2	1	1	0
	24時間	自 発 凍 結	2	1	0	1	0
-10°C	5時間	植 氷	2	2	0	0	0
		自 発 凍 結	3	2	1	0	0
東 京 の ア ゲ ハ 蛹							
-10°C	5時間	植 氷	1	1	0	0	0
		自 発 凍 結	8	3	5	0	0

* 植氷；ぬれた紙片を蛹の表面にはりつけて -5°C 又は -10°C のそれぞれの温度に冷却する。自発凍結；植氷しても凍結を起こさなかった蛹を二重にした試験管に入れ -35°C の冷媒中で冷却し凍結曲線上で過冷却がやぶれるのを確かめてからそれぞれの恒温に移して凍結を続行させる。

図)まで凍結させた。凍結した状態で蛹を $-5.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 又は $-10.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温箱内にそれぞれ5時間又は24時間おいてから室温で融解させた。融解後相対湿度87% 20°C の恒温恒湿に保ったデシケーターの中に蛹を移し生死と変態の様子を観察した。結果を第4表に示した。

第4表から明らかなように、同一の凍結温度で処理された蛹のあいだで凍結方法は凍害に関係なく又凍結時間もこの温度では凍害に無関係であった。それでこの第4表から凍結の方法及び凍結時間の区別を取り去って第5表にまとめた。

第5表 恒温での凍結と凍害の関係(第4表をまとめたもの)

凍結処理	使用虫数	死亡数	生存数			生存率 (%)
			一部変態	脱皮不能	羽化	
仙 台 の ア ゲ ハ						
対 照 (不凍)	5	0	0	0	5	100
- 5°C 5時間	11	5	2	4	0	55
- 10°C 5時間	5	4	1	0	0	20
東 京 の ア ゲ ハ						
- 10°C 5時間	9	4	5	0	0	56

凍結した状態で -5°C に5時間又は24時間おいてから融解させた場合、その後約半数の蛹はぜんぜん変態することなく死亡した。残りの半数は正常ではないが変態が進んだ。変態した蛹(6個体)のうち4個体は腹部の変態が不完全で、1にのべたA点まで凍結させた蛹の凍害と同じ様子を示した。2個体は不完全ながら頭胸部の変態のみ進み腹部は変態しなかった。 -10°C で5時間凍結させた場合約半数の蛹はぜんぜん変態することなく死亡し残りの半数は頭胸部の一部分だけ変態して腹部の変態はぜんぜん起こらなかった。

4. グリセリン注射蛹の凍結

人工的に注射されたグリセリンが1個体としての凍害に対して何等かの防禦効果をあらわすかどうかを知る目的でグリセリン注射蛹の凍結を行なった。凍結処理として凍結曲線上のC点まで凍結を進行させてから 20°C の温水中で融解させる場合と凍結した状態で -10°C に5時間おいてから室温で融解させる場合とを試みた。これらの凍結処理は第3表と第5表の結果から明らかなように生存する個体がいくつか存在しうる凍結処理の中で最も苛酷な方法である。もし人工的に注射されたグリセリンが1個体としての凍害の程度及び生存率に対して何等かの影響を与えるならばその影響はこれらの凍結処理に対して最も顕著にあらわれるであろうと考えられる。材料として東京の蛹を用いた。最初蛹重量あたり3%のグリセリンを注射したが、グリセリン注射の害が大きくて注射されただけで死亡する個体があった。それで次にグリセリンの注射量を少なくして1%の注射を試みた。注射量の誤差がそれぞれ $3.0 \pm 0.2\%$ 、 $1.0 \pm 0.2\%$ であることを注射前と直後に蛹体重を測定してたしかめた。注射したグリセリンを蛹の体内に広く分布させる目的で注射してから 10°C の恒温箱内に24時間おいた。 10°C の温度に24時間

おいているあいだに注射されたグリセリンが代謝されて消費されるおそれがあるので3%グリセリンを注射され10°Cの温度に24時間おかれた蛹を磨碎してそのグリセリンを定量してみた。結果を第6表に示した。

第6表 人工的に注射されたグリセリンの保有

実験番号	蛹重量 (mg)	グリセリン注射量 (mg/g)	注射後10°Cに24時間おいた後のグリセリン量 (mg/g)	本来自然状態で持っていたと思われるグリセリン量 (mg/g)
1	552.0	30.1	37.5	7.4
2	406.6	29.6	69.2	39.6

この結果からみると、10°Cの温度に24時間おかれたあいだに注射されたグリセリンはほとんど代謝されて消費されるおそれがないように思われる。そこでこのように注射された1%グリセリンが蛹体内に広く分布した状態の蛹に前記の凍結処理を行なった。結果を第7表に示した。

第7表 注射されたグリセリンと凍害の関係

凍結処理	グリセリン注射の有無	使用虫数	死亡数	生存数			生存率 (実験値) (%)	生存率* (計算値)
				一部変態	脱皮不能	羽化		
対照(不凍)	有	5	2	1	1	1	60	—
-10°C 5時間	無	10	5	5	0	0	50	—
	有	10	8	2	0	0	20	30
凍結曲線上 のC点まで 凍結	無	9	4	5	0	0	56	—
	有	8	6	2	0	0	25	34

* 注射されたグリセリンの害と凍結の害がそれぞれ独立に起こると仮定した時の生存率。

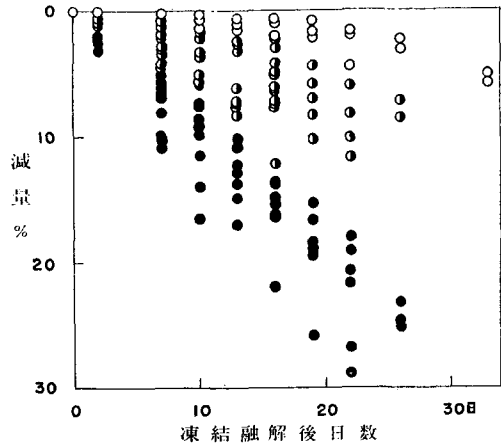
1%グリセリン注射のみ行なって凍結処理をほどこさなかった場合、蛹の生存率は60%であったからグリセリン注射の害が3%グリセリン注射の場合ほどではないが有ったと思われる。従って第7表でグリセリン注射蛹の凍結融解後の生存率と注射しないもののそれとを直接比較してその大小から人工的に注射されたグリセリンの凍害に対する防禦効果の有無を論ずるわけにはいかない。もしグリセリン注射の害と凍害とがそれぞれ無関係に独立に起こるならば、グリセリン注射をされて凍結させられた蛹の生存率はグリセリン注射のみされた蛹の生存率とグリセリン注射せずに凍結させられた蛹の生存率との積になる。もし注射されたグリセリンが1個体としての凍害に対して何等かの防禦効果を持つならば、グリセリンを注射されて凍結させられた蛹の生存率の実験値が前記の仮定に基く計算値より大きくならなければならない。実際には第7表から明らかのように凍結曲線上のC点まで凍結を進行させた場合及び凍結した状態で-10°Cに5時間おいた場合の両方とも実験値の方が計算値より小さい。このことから注射されたグリセリンは蛹1個体としての凍害に対して何等の防禦効果を持たないこと

が明らかになった。又注射されたグリセリンが蛹1個体の凍害の程度を軽くする事実もみとめられなかった。

5. 凍害と体重減量との関係

今までのべた凍害の観察と平行して凍結融解後の体重減量を観察した。凍結融解後相対湿度87% 20°Cのデシケーター中に蛹を入れておき、3~5日おき蛹の重量を測定した。測定した蛹の体重減量を蛹の重量%に換算してその時間に対する変化を第3図に示した。

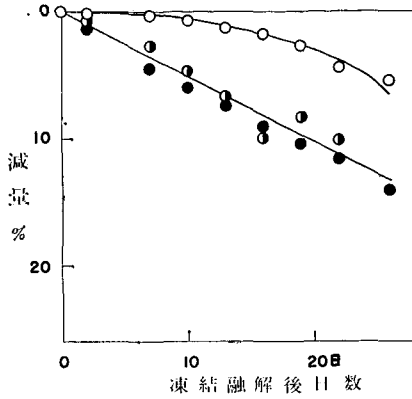
この図では種々の凍結処理を区別せずにいっしょに示した。凍結させると蛹の体重減量が早くなる。又凍結融解後死亡した蛹の減量速度は凍結融解後生存していた蛹の減量速度より早かった。次に凍結処理の違いにより減量速度に差があるかどうかをみた。まず-5°Cで凍結させた場合と-10°Cで凍結させた場合とを比較した。結果を第8表第4図及び第5図に示した。



第3図 凍結融解後の体重減量と生死の関係
○ 未凍結
◐ 凍結融解後生存していた蛹
● 凍結融解後死亡した蛹

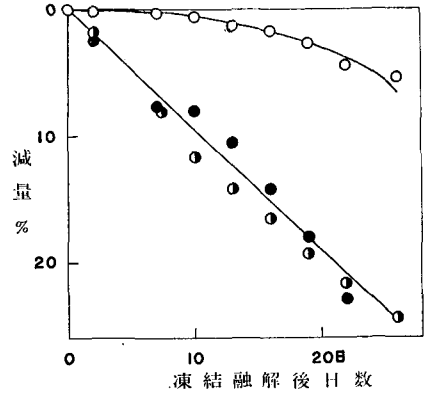
第8表 恒温での凍結による蛹の生死と体重減量の関係

凍結処理	生死	凍結方法	虫数	減量速度 (%/day)
仙台のアゲハ				
対照(不凍)	生	—	5	0.09±0.05
-5°C	生	植氷	3	0.51±0.05
		自発凍結	2	0.48±0.08
	死	植氷	2	1.40±0.25
		自発凍結	1	1.20
24時間	生	自発凍結	1	0.58
	死	自発凍結	1	1.06
-10°C	生	自発凍結	1	0.57
	死	自発凍結	2	1.05±0.03
東京のアゲハ				
-10°C	生	自発凍結	5	0.65±0.09
		植氷	1	0.90
	死	自発凍結	4	1.01±0.11



第4図 恒温で凍結した後生存していた蛹の体重減量

- 未凍結
- (●) -5°C 5時間凍結
- -10°C 5時間凍結



第5図 恒温で凍結した後死亡した蛹の体重減量

- 未凍結
- (●) -5°C 5時間凍結
- -10°C 5時間凍結

これらの図表から凍結融解後の蛹の減量速度は蛹の生死だけに関係し凍結温度凍結時間及び凍結方法に無関係なことが明らかになった。そこで恒温での凍結による蛹の生死と減量速度との関係のみを第8表からとりだして第9表にまとめた。

第9表 恒温での凍結による蛹の生死と体重減量との関係(第8表をまとめたもの)

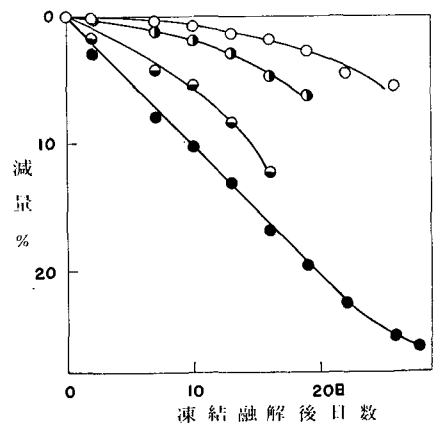
凍結処理	生死	減量速度 (%/day)
対照(不凍)	生	0.09±0.05
-5°C, -10°C	生	0.52±0.07
	死	1.06±0.25

第3図で明らかになったように、凍結が

第10表 凍結過程の進行と体重減量との関係

凍結処理*	生死	虫数	減量速度 (%/day)
仙台のアゲハ蛹			
対照(不凍)	生	5	0.09±0.05
A	生	3	0.27±0.02
B	生	1	0.64
C	死	1	0.31
D	死	3	0.91±0.09
東京のアゲハ蛹			
C	生	5	0.67±0.07
	死	4	1.05±0.08
D	死	3	1.01±0.10

* A, B, C, Dは第1図に示した凍結曲線上の各点まで凍結を進行させたことを示す。



第6図 凍結過程の進行と体重減量との関係

- 未凍結
- (●) 凍結曲線上のA点まで凍結(生存)
- (●) 凍結曲線上のB又はC点まで凍結(生存)
- (●) 凍結曲線上のC又はD点まで凍結(死亡)

起こりさえすればその後の減量速度は早くなり、凍結融解後生存していた蛹の減量速度は未凍結の蛹の約6倍、死亡した蛹では約11倍になった。次に凍結曲線上のそれぞれの点まで凍結を進行させた場合の凍結融解後の減量速度を第10表と第6図に示した。

凍結が始まってすぐ(凍結曲線上のA点)に融解させた蛹はすべて生存したが、その減量速度は凍結曲線上のB点以上凍結を進行させた場合に生存していた蛹の減量速度よりおそく約半分であった。凍結曲線上のB点以上蛹の凍結が進行すると、生存しえたものは恒温での凍結で生存しえた蛹の減量速度とほとんど同じであり、死亡したものは恒温での凍結で死亡した蛹の減量速度とほとんど一致した。これらの観察から凍結による蛹の生死と減量速度との間には密接な関係が存在する事実が明らかになった。

IV. 考 察

本文の実験に用いたアゲハ越冬蛹の体内にグリセリンが検出された。個体によりそのグリセリン含量にかなりのフレがあった。グリセリン含量の多い個体は生体重の4%強のグリセリンを含有していた。この量は耐凍性のある越冬昆虫としてすでに知られているイラガ前蛹のグリセリン含量と同等である⁶⁾。しかしアゲハ越冬蛹では蛹の凍結が起こったとたんに融解させた場合でも蛹体内の凍結が起こりさえすれば融解後正常な成虫まで変態する蛹は一個体もなかった。この実験事実から、アゲハ越冬蛹の体内に生ずるグリセリンはその凍害に対して何等防禦効果を持たないものと考えられる。すでに前報^{4),5)}においてしばしばのべたように各種越冬昆虫の体内に生ずるグリセリンはかならずしもその耐凍性に対して関係が有るとは限らない。云い換えれば越冬昆虫の体内に生ずるグリセリンの存在はその昆虫が耐凍性を有するための必要且十分な条件ではない。今回のアゲハ越冬蛹における実験の結果はこの我々の見解をさらに支持するものである。

すでに種々の生物材料において、人工的に加えられたグリセリンの凍害に対する防禦効果が明らかにされている^{3),7),8)}。しかしそれらの多くは細胞又は組織に関するものであり、個体としての多細胞生物に関するものは非常に少なく、わずかにイラガ前蛹とシンジュサンの休眠蛹及び休眠終了蛹等において、注射されたグリセリンがそれらの昆虫の受ける凍害に対して何等の防禦効果を示さない事実が報告されているにすぎない⁹⁾。今回の実験でも生体重あたり1%のグリセリンをアゲハ越冬蛹に注射して凍結させたが、注射されたグリセリンはアゲハ蛹の1個体としての凍害に対して何等防禦効果を示さなかった。いっぽう1個体の昆虫から切りはなされた組織例えばイラガの心臓等において人工的に加えられたグリセリンは凍害に対して防禦効果を示している(朝比奈未発表)。しかし我々はこの事実とアゲハ蛹でみられる今回の実験結果とが矛盾するとは考えない。1個体としての凍害に見られる現象は多様な要素を含んでおり、その生物体の組織細胞の中には凍結に対する抵抗性に相当の差があるものが存在することが考えられる。従って当然のことながら、1個体の単位での凍害現象がかならずしも個体から切りはなされた或一部の組織で見られなくても良いわけである。

凍結過程の進行に伴い凍害が増大することが明らかになった。蛹を凍結曲線上のB点ま

で凍結させた場合にすべての蛹は本文にのべた何等かの凍害を受けたが、死亡する個体は一つもなかった。一方 B 点を越えて凍結が進行すると、一個体の受ける凍害の程度は例外なく大きくなり、死亡する個体もあった。C 点を越えて -25°C まで凍結が進行した場合には、蛹は例外なく死亡した。これらの実験事実から凍結過程の進行に伴うアゲハ越冬蛹の凍害はまだ凍りやすい水が体内に充分存在している期間に融解された場合とほとんど凍りやすい水が体内から失われてから融解された場合との二段階に区分される。恒温での蛹体の凍結を試みたが、 -5°C での凍結による凍害は凍結曲線上の B 点まで凍結を進行させた場合のそれとほとんど一致した。又 -10°C で凍結させた場合の凍害は凍結曲線上の C 点まで凍結を進行させた場合のそれとほとんど一致した。すでに方法のところ述べてように蛹の凍結曲線を測定する場合、熱電対を蛹の体表に糸でしばって触らせるようにしたから測定された温度は外からの影響を受けて実際の蛹の温度より大分低く測定されたものと思われる。従って -5°C が凍結曲線上の B 点近くに、又 -10°C が C 点近くに対応する事は十分考えられる。もしそうであるとすれば、アゲハ越冬蛹の凍害は凍結過程の進行の程度に大きく関係しており、 -10°C までの凍結温度では 24 時間ないし数十分のかかなり広い時間範囲で凍結時間には関係しないと云える。

本文で述べたように最も特異な凍害のあらわれは第三腹節以下の腹部の変態が不完全で蛹の腹部に近い状態で変態が止まった事である。これについて三つの場合が考えられる。

i) 変態ホルモンを分泌する前胸腺が凍害を受けて変態ホルモンの分泌が不充分であった場合 ii) 前胸腺は凍害を受けなかったが腹部の未分化の組織が変態能力を失った場合 iii) 前胸腺及び腹部が双方共凍害を受けた場合 これらのうちどれが要因であるかを推論するデータを現在のところ持ちあわせていないが、近い将来並体結合等の方法で確める考えである。

凍結融解後蛹の体重減量速度が非常に早くなる。この事実をクロイラガ *Scopelodes contracta*, オオミズアオ *Actia artemis*, ジャコウアゲハ *Papilio alcinous* 等の蛹においても観察している(丹野・未発表)。しかもこの体重減量速度は凍結融解後の蛹の生死に対して非常に密接な関係を持っており、凍結処理のいかんにかかわらず死亡した蛹の減量速度は生存した蛹のその約 2 倍であった。この事実は蛹のように外見から即時に生死の判定をつけがたい材料にとってその生死を判定する有効な手段となりうるであろう。それではなぜ凍結させと融解後の減量速度が増すのであろうか。減量は蛹体から水分が取られる結果であると考えて¹⁰⁾、水分が蛹体から取られる時に関係すると思われる条件; i) 蛹体がおかれる相対湿度及び温度 ii) 蛹体表皮の水蒸気に対する透過性 iii) 蛹体内部の水に対する保持力について考察した。本文の実験で凍結融解後の蛹はすべて相対湿度 87% 20°C の恒温恒湿度の第件におかれたから i) の条件は考慮しなくて良い。今かりに ii) に示した蛹体表皮の水蒸気に対する透過性が凍結によって変化し、その変化した事だけが凍結融解後の体重減量に関係していると仮定する。もしそうならば蛹体表皮が水蒸気を自由に透過しないかぎり虫の減量速度は蛹体の含水量に対する蛹体表面積の割合に影響される。従って凍結融解後小さい個体ほど減量速度が早くならなければならない。しかし実験事実として、蛹の減量速度はその生死だけに關係して虫体の大小には關係せず一定の値を持つ事が明らかにされた。従って ii) の条件の変化だけで凍結融解後の減量を

説明する事はできない。これらの事から iii) の条件の変化が凍結融解後の減量に関係していなければならないと推論される。蛹体内部の水に対する保持力として生きた細胞の存在が大きく関係しているであろう。凍結融解後のクロイラガ *Scopelodes contracta* において、各組織の細胞が復元せずに収縮している事実が報告された¹¹⁾。もしこのような事がアゲハ蛹で起きているならば、蛹体内部の水に対する保持力が凍結によって変化する事が充分考えられる。

摘 要

アゲハ越冬蛹を凍結させて次のことがらを調べた。1. 凍結過程の進行と凍害の関係 2. この蛹が自然状態で持っているグリセリン或は人工的に蛹の体内に注射されたグリセリンがそのような凍害に対して何等かの防禦効果をあらわすかどうか 3. 凍害のひとつの表われとしての蛹の体重減量。

その結果次の事実が明らかになった。いったん蛹体が凍結を開始すれば蛹は例外なく凍害を受け、凍結過程の進行に伴い生存率が減少するばかりでなく一個体の受けた凍害の程度も又増大した。凍害の最も特異な表われとして蛹体腹部の不完全な変態が観察された。凍結融解後生存した蛹の腹部は例外なく異常を示し、頭胸部が変態しても腹部は蛹のそれに近い形態を示した。これら凍結過程の進行に伴う凍害はまだ凍りやすい水が体内に充分存在している期間に融解された場合とほとんど凍り易い水が体内になくなった状態で起きる場合との二段階に区分される。前者の場合蛹は凍死する事はなかったが正常に発生が進まなかった。後者の場合死亡する個体が急に増加した。蛹を凍結させた状態で -5°C 及び -100°C の恒温に一定時間おいてから融解させその後の凍害を観察した結果 24 時間以内では蛹の受けた凍害は凍結温度だけに関係し、凍結時間には関係しない事が明らかになった。凍結した状態で -5°C に 5 時間又は 24 時間おいた場合蛹の受けた凍害は前記の B 点まで凍結させた場合とほぼ一致した。又凍結した状態で -10°C に 5 時間おいた場合蛹の受けた凍害は凍り易い水が体液内にほとんどなくなる凍結過程での凍害とほぼ一致した。これらの凍害に対して自然状態で蛹体が含有しているグリセリン及び人工的に注射されたグリセリンは何等防禦効果を示さなかった。更に凍害の顕著な表示として凍結融解後蛹体重の減量が観察された。凍結させると蛹の体重減量速度が早くなる。又凍結融解後死亡した蛹の減量速度は凍結融解後生存していた蛹のその約 2 倍の速さであった。このように凍結による蛹の生死と減量との間には密接な関係が存在する事実が明らかになった。この事実は蛹のように外見から生死の判定をつけがたい材料にとってその生死を判定する有効な手段となり得るであろう。

終りに、実験材料を採集して送って下さった東北大学農学部中田礼嘉氏並びに東北大学理学研究科遠藤勝也氏に厚く御礼申し上げる。実験の指導並びに御校閲下さった朝比奈教授に感謝する。

文 献

- 1) Salt, R. W. 1957 Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. *Canad. Ent.*, **89**, 491-494.
- 2) Salt, R. W. 1959 Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan). *Can. J. Zool.*, **37**, 59-69.
- 3) Smith, A. U. 1961 *Biological Effects of Freezing and Supercooling*. Edward Arnold LTD. London.
- 4) 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.
- 5) 丹野皓三 1962 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. *低温科学, 生物篇*, **20**, 25-34.
- 6) 竹原一郎・朝比奈英三 1961 イラガ越冬前蛹のグリセリン I. グリセリン生成, 休眠, 耐凍性に及ぼす環境温度の影響. *低温科学, 生物篇*, **19**, 29-36.
- 7) Lovelock, J. E. and Polge, C. 1954 The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochim. J.*, **58**, 618-622.
- 8) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against hemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28-36.
- 9) 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.
- 10) Edney, E. B. 1957 *The water relations of terrestrial arthropods*. Cambridge University Press.
- 11) Usuki, H. and Aoki, K. 1963 Histological studies of the effect of freezing and thawing on the nerve tissues in the prepupae of slug moths. *Sci. Rep. Tohoku Univ.* vol. **29**, 印刷中

Summary

Observations were made on the frost-resistance of overwintering pupae of a butterfly, *Papilio xuthus*.

A typical process of freezing in this pupa is shown as a freezing curve in Fig. 1 in which a plateau is clearly noted. Actual ice formation within the pupal bodies resulted in some injuries to the insects without exception. However, if they were rapidly thawed in a certain stage of their freezing process being still on the plateau of the freezing curve above mentioned, none of them suffered fatal injury at least soon after thawing. They could even resume metamorphosis, but they always failed to appear on the wing; none of them could cast off their pupal skins. In these insects the formation of imaginal tissue was frequently restricted to the anterior half of the pupal bodies; the abdominal part remained in the pupal state. A body-freezing down to a stage beyond the plateau of the freezing curve, on the other hand, was usually followed by a fatal injury without any subsequent sign of metamorphosis. A cooling of the frozen insects down to a temperature below -20°C invariably resulted in frost-killing.

The pupae were found to have glycerol usually of about 1 per cent and sometimes even more than 4 per cent based on their fresh body weight. Such a large glycerol content was entirely ineffective to protect the insect against freezing injury. Besides, the pupae which were previously injected with glycerol (1 per cent of fresh body weight) never survived freezing.

In unfrozen control pupae, the loss of water content, as determined by a decrease in body weight, was always slower than in frozen and thawed pupae under the same temperature and humidity conditions. The rate of water loss in frost-killed pupae were about twice that in survived ones after a freezing and thawing. The determination of frost-killing within several days after thawing in a non-mobile animal, at least in some kinds of insects, can therefore be done by measuring the rate of body weight decrease.