HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ポプラハバチの耐凍性　I
Author(s)	丹野, 皓三; TANNO, Kouzou; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科學. 生物篇, 22, 59-70
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17681
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p59-70.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Kouzou TANNO and Éizo ASAHINA 1964 Frost-Resistance in the Poplar Sawfly, *Trichiocamps populi* Okamoto. *Low Temperature Science, Ser. B, 22.* (With English Summary p. 70)

ポプラハバチの耐凍性 I*

丹野皓三・朝比奈英三
(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和39年7月受理)

I. 緒　　言

昆虫の耐凍性の機構を研究するために，今までわれわれは主として鱗翅類の幼虫や蛹を材料としてもちい，ことに耐凍性の高い昆虫の代表的なものとして，専らイラガ *Monema flavescens* の越冬前蛹を使用して来た[1]。しかし越冬期に耐凍性をもつ昆虫は鱗翅類以外にも膜翅類・双翅類・鞘翅類のような完全変態をする昆虫類にそれぞれ見出されている[2]。いっぽうカナダにおいて Salt は主として膜翅類の越冬幼虫を使って昆虫の過冷却及び凍結に関する数多くの研究を発表しており，その見解はイラガ前蛹から得た実験の結果を主な根拠とするわれわれの考え方と必ずしも一致していない[3]。このような実験材料のちがいが耐凍性機構の解釈に差異を生ずる原因の一つだとすれば，われわれも亦耐凍性の高い膜翅類を使って，今まで鱗翅類の昆虫で得た知見を更に検討する必要があるように思われる。

著者の一人丹野は1963年秋予定された研究材料であった *Ceratina* 属の蜂の越冬成虫を採集中，たまたまポプラハバチの前蛹が *Ceratina* と似た環境で多数越冬していることを発見し，試みにこれを使ってみたところ最高度の耐凍性をもつ昆虫の一つであることがわかった。

本文ではこの昆虫の顕著な耐凍性と，越冬中にトレハロースを主とするきわめて多量の糖類が体内にふくまれている事実について報告する。

II. 材料と方法

材　料:　1963年10月中旬から11月中旬までに札幌で採集したポプラハバチ *Trichiocamps populi* Okamoto** の前蛹を使用した。この前蛹は外見は幼虫とほとんどちがわないが内蔵の状態は蛹のそれに近く，又さわると活潑に体をうごかすが全く歩くことはできない。この前蛹は食草であるポプラの樹下にはえているニワトコ，オオハンゴンソウ，タラノキ，アシ等の枯れた茎や枝の髄の中にうすい絹糸の繭を作って入っている。越冬中草の茎は虫の入ったまま倒れて積雪の下になるものが多かったが，ニワトコ等の枝は雪上にあらわれたままで，長期間充分低い温度にさらされる状態であった。採集した前蛹は湿度飽和にしたガラスのデシケーターに入れ，室温を外気温とほぼ同じにさせてある日光の当らない飼育室に保存した。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第681号

** この蜂を同定して頂いた兵庫農大の奥谷禎一博士に感謝する。

全糖の定量： 体重30～100 mg 前後の虫体を1個体づつ磨砕して10 ml の80% エタノールで抽出した。これを遠沈して得た上清液の0.05～0.5 ml に5 ml のアンスロン試薬[4]を加え100°C で10分間加熱した。これを急冷却させて，620 mμ の吸光度を分光光度計で測定した。標準糖液として100 μg/ml のグルコース液を用いた。

トレハロースの化学的定量： トレハロースが他の糖類にくらべて特に酸及びアルカリに対して安定であることを利用して Wyatt と Kalf は1957年トレハロースを化学的方法で定量した[5]。全糖量を調べた場合と同様にして得た上清液の0.05～0.5 ml を蒸発させ残渣をえた。この残渣を0.3 ml の1 N. H_2SO_4 で再溶解させ，100°C で10分間加熱後さらに0.2 ml の6 N. NaOH を加え100°C で10分間加熱した。冷却後全糖の場合と同様にアンスロン法で定量した。この方法でラムノース，リボース，キシロース，フラクトース，グルコース，シュークロース，マルトース，ガラクトース，ラクトース，及びラフィノースの0.1 mg/ml 標準溶液は完全に加水分解されてアンスロンで反応しなかったが，トレハロースは加水分解を受けずに100% 残っていることを予備実験で確めた。なおトレハロースのアンスロンによる発色率はグルコース100に対して95であるから[6]この点の補正を各実験値について行なった。

ペーパークロマトグラフィーによるトレハロース及び他の糖類，多価アルコールの定性定量： 生体527～1450 mg (10～20個体) をいっしょに磨砕し，10 ml の80% エタノールで3回抽出した。抽出液に活性炭を加えて遠沈し，その上清液をとって蒸発させた。これを0.6又は0.7 ml のピリジンで再溶解させ，その溶液の0.05 ml をワットマン No. 1 ろ紙につけ，n-ブタノール，氷酢酸，水 (4 : 1 : 2)[7]で室温で10回展開した。トレハロースの発色には permanganate periodate 試薬[8]を用い，他の糖類及び多価アルコールの発色にはアルカリ性硝酸銀[9]を用いた。発色させたクロマトグラムに合わせて発色させないクロマトグラムを切り取りそれぞれ10 ml 蒸溜水で抽出した。各抽出液中の糖は前記のアンスロン法で定量し，多価アルコールはクロモトロープ酸試薬[10]で発色させ定量した。

グリコーゲンの定量： 糖類を抽出した残りのアルコール不溶の残渣に0.5 ml の30% KOH を加え100°C で20分間加熱した[11]。冷却後4.5 ml の80% エタノールと活性炭を加えて遠沈し，この上清液についてアンスロン法で定量した。

含水量の測定： 前蛹を1個体づつ秤量してからそれぞれ小形のペトリ皿に入れ通常10ケの個体を同時に105°C の温度で風乾した。8時間後に2個体づつ秤量し，更に8時間後再度秤量したがもはや減量はなかった。最初の体重と8時間風乾後の体重との差を含水量とし百分率であらわした。

過冷却度の測定： 前蛹の柔いイモムシ状の体をU字形におりまげ，もどらぬように木綿糸でかるくむすび，この曲りめのうち側に細い熱電対の先端をはさみこんだ。この試料全体をガラスの二重管内に吊し，−10°C～−12°C の恒温ブライン槽中に浸して0.44°C/分 の冷却速度で冷し，熱電対のリード線をマイクロボルトメーターを経て電子管式記録計にむすんで凍結曲線をとった。

耐凍性の観察： 通常10ケの虫体をペトリ皿にとり，低温室内の恒温箱内において凍結さ

せた。後述するように過冷却点が高いので，−10°C 以低の気温では植氷しなくても約10分ほどで虫体は凍りだす。24時間凍らせておいた後室温の空気中で融解し，直後，2日後，5日後，30日後に体の外面から心臓のうごきを観察し，又運動の有無や変態の進行によって生死を判定した。耐凍度は凍結させた個体の80%以上が解融後30日以上生存できる最低の温度であらわした。但し超低温実験（後述）の場合を除き，−30°C 以低のテストは行なわなかった。

III. 耐凍性と過冷却度

1. 耐凍性

われわれがこの昆虫を使って実験をはじめたのは10月末であったが，このときはほとんどすべての前蛹が −30°C 1日の凍結に耐えられる程になっていた。このような高度の耐凍性は翌年6月初め気温が15°C に近ずいてもまだ続いていて，この頃まで −30°C で1日凍結させた前蛹はすべて正常に羽化できた。

第1表 ポプラハバチの耐凍性と体内成分の季節的変化
1963〜1964

月 日	耐凍度 (°C)	全糖量 mg/g 生体重	トレハロース 全糖中の%	グリコーゲン mg/g 生体重	変態期	気温（9時）前後5日平均
XI. 6	−30	53.7	—	—	前蛹	—
XII. 2	−30	68.2±12.1	—	—	前蛹	0.3
I. 8	−30	63.6	—	—	前蛹	−9.2
II. 5	−30	62.8± 5.1	—	—	前蛹	−5.6
III. 8	−30	62.4± 9.8	—	—	前蛹	−2.3
IV. 2	−30	64.0± 3.3	—	—	前蛹	4.4
IV. 13	−30	57.8± 8.0	78.5± 2.5	0.6± 0.1	前蛹	5.5
IV. 18	−30	60.9±12.9	73.2± 7.5	0.7± 0.1	前蛹	6.7
IV. 27	−30	41.7± 9.7	69.2± 4.8	0.3± 0.1	前蛹	7.5
V. 6	−30	47.4±12.1	79.2±14.3	2.0± 1.5	前蛹	10.4
V. 18	−30	44.5±12.9	77.0± 2.2	—	前蛹	13.0
VI. 1	−30	40.7± 5.6	85.0± 1.7	0.2± 0.1	前蛹	14.4
VI. 15	−30	36.2± 6.5	84.2± 5.3	0.2± 0.3	前蛹	16.1
VI. 15	<−10	25.3± 1.8	81.1± 9.9	0.3± 0.2	蛹化前*	16.1
VI. 15	<−10	12.8± 0.9	81.8± 2.3	0.3± 0.3	蛹	16.1
VI. 15	非耐凍性	17.0	66.0	0.0	成虫	16.1

* 第1図の B の状態

耐凍性の高い昆虫は，その耐凍度が −30°C 程度に向上したころには更にこれを超低温まで冷却しても生存できることがわかっている[12,13]。そこで予備凍結法[13]によってこのポプラハバチ前蛹の超低温での耐凍性をしらべてみた。前述のようにこの前蛹は非常に凍りやすいが，虫体を −20°C〜−30°C の恒温箱に入れてからこれが凍結，更にまわりの空気とほぼ同じ温度

まで冷却されるのに20分内外かかるので予備凍結の時間として90分を採用した。

金網のかごに入れた裸の前蛹の1群づつを −15°C, −20°C, −25°C, −30°C の各温度でそれぞれ予備凍結し，これをかごのまま液体窒素中に投入した。1日たってかごを引上げ気温10°C の空気中で融解させた。融解した前蛹を休眠（後述）を完全に終らせるため外気温とほぼ等しい室温の飼育室に1ケ月間おいてから20°C の恒温槽（相対湿度80%）に移し，引きつづき変態の進行を観察した。結果は第2表に示したが，予備凍結温度が −20°C 以低ならば使用した前蛹のほとんどすべてが液体窒素温度での凍結に耐えることができる。−15°C で予備凍結したものは超低温凍結より融解した直後に，すでに体の表面に水滴状に血液をふき出すものがあり，どの個体も少しも動かず，虫体を切開しても心臓は全く停止していた。ポプラハバチ前蛹はきわめて大形の（径200 μ 内外の球形に近い）脂肪体細胞 Fat-body cell をもっているが，−15°C の予備凍結後液体窒素に投入した前蛹では，この細胞の内部より流出したと思われる油滴が血液の表面に多量に浮んでいた。しかし脂肪体細胞の外形はほとんど変っていなかった。−20°C 以低の温度で予備凍結をしてから液体窒素に入れた前蛹では，その体を切開してもこのような油滴の流出はみられなかった。

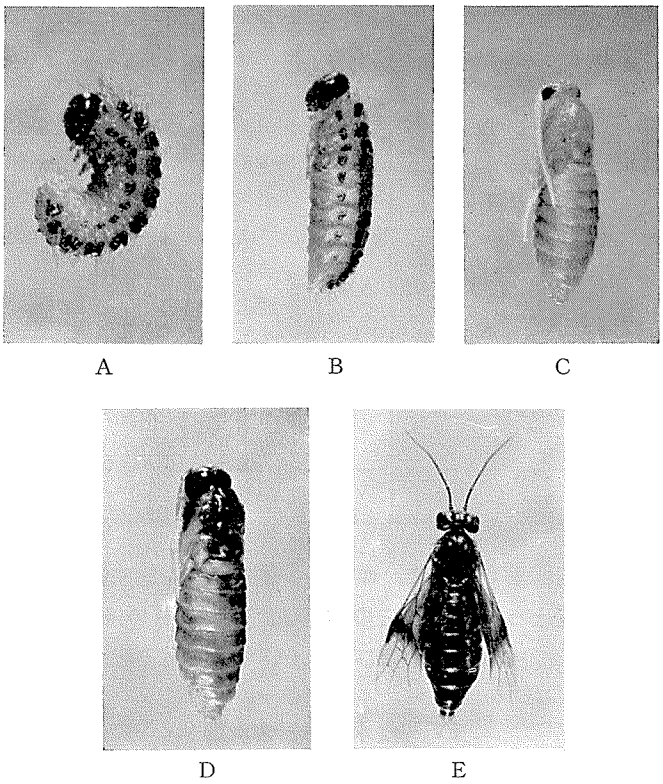
第2表 超低温における前蛹の耐凍性

XI. 13～XII. 25, 1963

	予備凍結	液体窒素中においた時間	使用個体数	生存個体数	蛹化個体数
1	−30°C, 1日	0	10	9	9
2	−15°C, 1.5時	1日	10	0	0
3	−20°C, 1.5時	1日	6	6	2
4	−25°C, 1.5時	1日	10	10	3
5	−25°C, 1.5時	15日	7	6	0
6	−30°C, 1.5時	1日	10	9	0

第2表に明らかなように一度超低温で凍らせた前蛹は，融解後長期間生存できてもその変態の進行が阻害されるのが多く，蛹化できるものはごく少数である。この原因の一つは脱皮の障害らしく −30°C で予備凍結させた第2表の6の例では前蛹のまま20°C で200日以上生存し，外観も越冬前蛹のまがった姿勢の幼虫形から蛹に近づいた棒状の形態（第1図）に変化するが，遂に幼虫の皮を脱ぐことができなかった。又第2表3及び4の例では蛹化できた個体もその蛹皮の下でほとんど完全な成虫に変態しながら，やはり1頭も脱皮羽化することができなかった。いっぽう対照（第2表の1）の個体は −30°C の凍結融解後生存した9個体はすべて蛹化し，このうち7個体が全く正常に羽化した。

前述のようにポプラハバチは越冬前蛹の形態である限り翌年6月になっても −30°C 1日の凍結に耐えるが，中旬になると融解後生存はしているが蛹化出来なくなる。蛹化数日前になってその変態がすすみ外観が棒状に変化すると（第1図の B）耐凍性は急に低下し −10°C の凍結にも耐えられないものがふえてくる。この時期には幼虫の外皮の下にすでに蛹の構造がほと



第1図　ポプラハバチ越冬後の変態
A　越冬前蛹　B　蛹化数日前の前蛹
C　蛹化後二・三日たった蛹
D　羽化二・三日前の蛹　E　成虫 ♀

んど完成されているらしく，これが脱皮して蛹になっても一部のものは −10°C 1日の凍結に耐えられ，融解後不完全ながら成虫まで変態をつづける。成虫になると耐凍性は全く失なわれ，−10°C でごく短時間の凍結後にも融かしてみると虫体は死後強直の特有の姿勢をとる[14]。

又4月上旬に越冬前蛹を外気温より 20°C の恒温にうつすと，蛹への変態は外気温においた場合(第1表)に比べてはるかに急速にすすみ同時に耐凍性も亦すみやかに低下する(第5表)。

2. 過冷却度

水棲のものを除けば従来知られていた越冬昆虫のほとんどは過冷却状態で冬の寒さにたえており[15]，又同一の昆虫においては耐凍性の最も高い時期にその過冷却度も亦甚だ大きい[1,2]。ポプラハバチの場合にもこれがあてはまるか否かをみるため，前蛹の耐凍性がまだ最高の状態にある3月下旬にその過冷却度を測定した。

結果は第3表に示すように，過冷却度は他の越冬昆虫に比べて意外なほど僅かであり，しかも過冷却点は非常に一定していて −8.6±0.4°C であった。又再反転点（凍結曲線上で過冷却点直後の温度上昇の後あらわれる頂部又は平担部の温度）は −3.2±0.7°C であった。次に一旦

第3表 前蛹の過冷却点 III. 12, 1964

	生体重 (mg)	過冷却点 (°C)	再反転点 (°C)
1	30	−8.5	−2.7
2	69	−9.8	−3.2
3	70	−8.5	−3.0
4	79	−8.3	−2.6
5	81	−8.8	−3.4
6	85	−8.5	−2.7
7	87	−8.3	−2.8
8	90	−8.5	−4.5
9	99	−8.5	−4.5
10	101	−8.4	−2.7
平均値		−8.6±0.4	−3.2±0.7

凍結曲線をとった個体* を融解5時間後，頭部から体内に熱電対先端部をつきさし傷口がぬれているままで再凍結曲線をとってみた。その結果は，第1回目の過冷却点 −8.5°C，再反転点 −2.7°C に対して，それぞれ −8.6°C，および −2.4°C でおどろく程一致していた。

IV. 炭水化物と含水量

越冬昆虫で耐凍性の高いものにはその体内の溶存成分として多価アルコールの検出される場合がきわめて多く，そのほとんどがグリセリンである[16]。ところがポプラハバチではグリセリンは全く検出されず11月初めより翌年6月中旬までを通じて常に多量の糖類が発見された

第4表 前蛹の糖成分 I. 8, 1964

	mg/g 生体重	%**
未知物質*	0.4	0.5
ラムノース	0.6	0.9
リボース	0.4	0.5
キシロース	0.0	0
フラクトース	0.0	0
グルコース	0.0	0
ガラクトース	0.4	0.5
トレハロース	61.5	97.0
ラフィノース***	0.3	0.5
計	63.6	99.9

* クロマトグラムの上で最上端に集まる未知の還元性物質
** 全糖量に対する各成分の重量百分率
*** クロマトグラムの上でラフィノースとそれより Rf の小さい物質をすべてふくむ

* 凍結時間15分，終末温度 −8°C。勿論前蛹は生存している。

(第1表)。この糖類の成分は第4表に示したようにそのほとんどがトレハロースであり，他の糖は問題にならぬ程少ない。多価アルコールとしてはペーパークロマトグラムの上で標準のグルコースの付近に一つのスポットが得られ，これはクロモトロープ酸で明瞭に発色しその量は1.5 mg/g であった。第4表にあげたトレハロースの全糖に対する割合はきわめて大きいが，ペーパークロマトグラフィーを使わず化学的検出法 (**II.** 参照) によって定量すると，第1表に示したようにいくぶん少ない値が得られる。このような差の原因として，検出定量の際の誤差の他にクロマトグラムの上でトレハロースと Rf の等しいマルトースやセロビオースの混入も考えられる。

4月中旬以後気温が5°Cを越える頃から虫体の糖の量は徐々に減り蛹化前の6月中旬には冬期にもっていた量の60%位になる。このように春になって生物体の糖が減少する場合は，高分子のものに変化する可能性も考えられるので，この時期に虫体のグリコーゲンをしらべてみた。しかし第1表に明らかなようにグリコーゲンは常にごく少量で，糖の減量に伴って増加する傾向は全くなかった。

4月上旬に前蛹を20°C の恒温に移すと糖量の減少はさらに急速で19日間にほとんど1/3位にまで急減し，同時に前蛹の変態もまた外気温においた場合(第1表)に比べて遙かにはやくすすむがグリコーゲンは常に微量であった (第5表)。これらの事実からみて糖の減少の主因は

第5表 越冬した前蛹の 20°C 恒温における耐凍性と体内成分の変化 (1964)

月 日	+20°C へ移してからの日数	耐凍度 (°C)	全糖量 mg/g 生体重	トレハロース 全糖中の%	グリコーゲン mg/g 生体重	変態期
IV. 13	5	<−25	38.6±6.6	70.6± 6.1	0.9±0.3	前蛹
IV. 18	10	<−15	29.3±4.1	71.4±11.0	2.1±2.4	前蛹
IV. 27	19	<−10	23.2±3.2	70.5± 6.8	0.3±0.2	蛹化前

第6表 前蛹の含水量 IV. 2, 1964

	生体重 (mg)	含水率 (%)
1	24	66.7
2	25	68.0
3	52	67.3
4	62	65.3
5	72	67.3
6	78	64.1
7	79	62.0
8	80	67.5
9	86	65.2
10	89	64.0
平均値		65.74±1.53

おそらく変態の進行すなわち新らしい体組織形成のための消費であろう。

いっぽう虫体の含水量をみると越冬前蛹では 65.7±1.5% できわめて一定しており (第6表), 蛹化直前には 61.3±2.5% に, 脱皮して蛹になると 65.6±2.4% となり, 羽化すると又わずか減少して 59.9±1.5% となった。

V. 休　　眠

越冬中の昆虫の物質代謝や耐凍性の変化が休眠の進行と関係している場合がしばしば報告されており, 本種の場合も少くとも越冬初期には前蛹は深い休眠状態にあるものと想像される。しかし入手できた材料が充分に多くなかったため今回の実験ではわづかに休眠終了期の予察を行なうに止めた。すなわち 12 月以後の適当な時期にそれぞれ 10 個体の前蛹を戸外温度より 20°C (相対湿度 100%) の恒温に移して 前蛹→蛹→成虫 への変態を観察した。この結果によると, 12 月中旬になると越冬前蛹の一部のものは成虫まで発生できるようになるが, その大多数は前蛹又は蛹のままで 2 カ月以内に死亡する。1 月以後には供試したすべての前蛹が完全に羽化できる。つまり 1 月になると越冬前蛹はすべて休眠を終ったものと考えられる。

VI. 論　　議

越冬昆虫の耐寒性は主としてその虫体の過冷却能力にもとづいており[15], 耐凍性の高い昆虫でも実際には凍らないままで冬を越してしまうものが多い[2]。ところが今回われわれが使用したポプラハバチ前蛹は −8.6±0.4°C という一定した高い過冷却点をもっている。今までに知られた耐凍性の高い陸棲昆虫でこのように凍り易いものは, Sømme が最近報告したカナダ産のタマバエ *Euura nodus* の越冬幼虫のみである[17]。この −8°C 乃至 −9°C という温度は札幌地方で冬期にこの昆虫が自然状態でさらされる温度より明らかに高い温度であり, 越冬中に虫体がしばしば凍結する可能性をしめしている。又実際に外気温とほぼ等しい室温をもった飼育室内ではこの前蛹は厳冬期には例外なく凍ることがわかった。これらの事実からみて, ポプラハバチ前蛹は, 越冬中に雪上に露立した枝や茎の中でしばしば凍結と融解をくりかえしているものと思われる。

従来耐凍性の高い生物中には, 生物細胞を凍結のときの原形質からの脱水や細胞の内外における水溶液の濃縮から保護する作用のある物質が比較的多量に存在すると考えられており, そのような物質として植物では糖類が, 動物では多価アルコールが重要視されて来た。昆虫では量の多少にかかわらず糖類をもつものはきわめて普通であるが, いままでに発見された耐凍性の高い昆虫に比較的多量のグリセリンのあるものが多かつたために, 昆虫の耐凍性に糖が関与する可能性は全く論じられたことがなかった[3,16]。従ってポプラハバチが最高の耐凍性を示す時期に多価アルコールはごく微量であり, そのかわりにきわめて多量の糖を含んでいることは注目されてよいであろう。すでに前節で述べたように, この多量の糖の大部分は非還元性の二糖類トレハロースである。この糖は最近各種の昆虫においてその血糖の主要成分であることが明らかにされた[18]。ポプラハバチ前蛹の全糖濃度は, *Ceratina* の越冬成虫の 1 例[14] を除け

ば，従来しられた昆虫のなかでは最高に位するものである。

しかし現在の資料ではこの多量の糖の存在がポプラハバチ前蛹の高い耐凍性の主要因であると判断することはなかなかむづかしい。第1表に示したように，越冬後4月中旬までほぼ一定の高い含量を維持して来た虫体内の糖は，4月末より徐々に減少し6月中旬には越冬期の糖量の60%位になるが，このときまで前蛹の耐凍性は引つづいて高く，−30°C 1日の凍結に耐えられる。同じ6月中旬においても変態のすすみ方がはやく，蛹化直前の形態変化がおこりはじめた前蛹では糖の量は急減し耐凍性も低下して −10°C の凍結に耐えられぬものがふえてくる。さらに脱皮して蛹になると糖は脱皮前の半量に減るが，一部の蛹は −10°C の凍結に耐えられ不完全ながら羽化することができる。このときの糖量は越冬期の 1/5 に過ぎないが，それでも生体重の 1.3% 程度を占め昆虫のもっ糖の量としてはむしろ多量である。成虫になるとその耐凍性は全く失われるが，これは何の昆虫にも共通の現象であり[16] 蛹以前の状態と同一には論じられない。このようにポプラハバチの耐凍性は変態の進行によって急激に低下するものであり，越冬中休眠が終了しても前蛹が蛹への変態をはじめない限りその耐凍性は低下しない。このとき越冬期に生体重の 6% 余りあった糖が約 4% に減少することはほとんど耐凍性に影響しない。第5表によれば4月上旬に 20°C に温められた前蛹は糖量が減少するにつれ耐凍性が低下してくるが，このときも変態の進行が急速に進んでおり，又多くの前蛹が −10°C 1日の凍結に耐えなくなった時期でも生体重の 2% をこえる糖が体内に残っている。他の耐凍性昆虫の例として，たとえばイラガでは，その前蛹のもっているグリセリンが環境温度によって甚だ敏感にグリコーゲンに変化することを利用して，グリセリン量と耐凍性との連関をかなり具体的につかむことができる[1]。しかしポプラハバチではその含んでいる糖の大部分がトレハロースであり，これは休眠期にも又休眠期後にも他の物質に変化せずこのまま使われる時期まで貯蔵されていると考えられるため，本種が前蛹の形態のままでその含糖量をごく少なくさせることは甚だ難かしいと思われる。

III 節に述べたようにこの前蛹は少なくとも厳冬期には液体窒素温度での凍結に耐えられる。従来このように耐凍性の高い動物を予備凍結法によって超低温まで冷却する場合有効な予備凍結温度は −30°C 付近にあることが知られていた[13]。ところがポプラハバチ前蛹では −20°C, −25°C, −30°C がいづれも同程度に予備凍結温度として有効で，供試した個体のほとんど全部が超低温に耐えている。いっぽう樹木では越冬中その耐凍性が最高になる時期には超低温冷却に対して有効な予備凍結温度範囲が −20°C 以高にまでひろがり[19]，しかもその時期にはこれらの植物の組織はきわめて大量の庶糖を含んでいることがわかっている[20]。今までわれわれが考えていたように，予備凍結の意義が冷却される生物組織にまづ細胞外凍結をおこすことによって，細胞内の凍り易い水を充分に少なくさせその結果超低温においても致命的な細胞内凍結を防ぐことにあるとすれば[12,13,21]，−20°C 付近で細胞外凍結をさせた場合，その細胞にこのような糖が多量にあると，その後に急冷却しても細胞内での氷核の生成，生長が非常におこりにくくなる可能性があるかも知れない。ポプラハバチ前蛹にきわめて大量に含まれているトレハロースが庶糖とその構造が甚だ類似した非還元性の二糖類であることもまたまことに

興味ぶかい事実である。

ポプラハバチ前蛹の耐凍性についてもう一つの興味ある問題は，休眠の終了した越冬後の前蛹が気温が15°C を越えた6月中旬まで −30°C という高い耐凍性を維持していることである。従来昆虫の耐凍性を発現させるために低温に保持することが必須の条件であるかの如く云われて来たが，これは必ずしも一般的条件ではなく，昆虫の種類によっては20°C 付近の恒温に保っておいてもその耐凍性が高まることが最近わかって来た[16]。しかし休眠終了後の昆虫は環境温度の上るにつれ体内のいわゆる凍害防禦物質を速やかに失い，同時に変体が進行するのが常であり，この際に耐凍性の低下もまたきわめて迅速である。ポプラハバチの場合は，前蛹から蛹への変態のはじまる時期が自然条件では非常におそく，又体内の糖の減りかたも甚だのろく，6月中旬においても36 mg/g という多量を維持していること等が特徴的である。しかしこの場合にも越冬前蛹の組織細胞のもつ原形質的条件と或量以上の凍害防禦物質の存在が結びついた場合には耐凍性が充分に高められるという考え方[16] ができるかもしれない。

要　　結

立ち枯れた草の茎の中や雪上に露出している木の枝の中で越冬しているポプラハバチ *Trichiocampus populi* Okamoto の前蛹を材料として，その耐凍性とこれと連関する諸性質をしらべた。

1） 越冬中の前蛹の過冷却点は他の越冬昆虫に比べると非常に高いが，また甚だ安定していて −8.6°C±0.4 であった。このことはこの前蛹が自然のままの状態で越冬中に容易に凍結・融解をくりかえすことをしめしている。

2） 前蛹は越冬中は勿論，春を過ぎても6月始めごろまで耐凍性が高く，−30°C 1日の凍結に耐え，融解後全く正常に変態して成虫となる。

3） 越冬中の前蛹は予備凍結法によって液体窒素温度に耐えることができる。この場合の予備凍結の温度は −20°C，−25°C，−30°C がいづれも同様に非常に有効である。しかしこのような超低温で凍結後の前蛹の変態は異常になり易く，蛹化できた個体も脱皮して成虫となることはできない。

4） 春に前蛹の変態がはじまり，形態が蛹に近づくと脱皮数日前にすでに耐凍性は甚だ低下する。これが脱皮して蛹になっても一部のものは −10°C 1日の凍結に耐えられる。

5） 越冬前蛹の体内には常に生体重の6% をこえる甚だ大量の糖を含み，その約80% はトレハロースである。春になると環境温度が上るにつれて前蛹の変態が進行し同時に体内の糖も減ってゆく。しかし蛹になっても体重の1% 以上の糖が残っている。前蛹のもつグリコーゲンは常に微量で春期に糖が減るときにも増加しない。

6） 4月初めまだ外気温の低い時期に前蛹を20°C の恒温におくと上記の変化が急速にすすみ耐凍性も急に下がるが，変化の様式は全く同様である。

7） 虫体の含水量は越冬期の前蛹が65%，蛹化直前61%，蛹65%，成虫60% ほどで越冬中から羽化までほとんど変らない。

8） 前蛹の休眠は12月にはすでにやぶれているものがあり，1月になるとすべての前蛹が休眠を終える。

9） 越冬期に組織細胞がもっている原形質の状態と，或量以上の糖が共存した場合に充分な耐凍性が期待できるという仮説は，ポプラハバチ前蛹の高い耐凍性に対する一つの可能な解釈であろう。

文　献

1) 朝比奈英三・竹原一郎 1964 イラガ越冬前蛹の耐凍性 補遺 I. 低温科学, 生物篇, **22**, 79-90.
2) 朝比奈英三 1959 越冬昆虫の耐寒性. (深谷・針塚・竹脇共編：実験形態学新説), 養賢堂, 東京, 92-113.
3) Salt, R. W. 1961 Principles of insect cold-hardiness. *Ann. Rev. Entomology*, **6**, 55-74.
4) Mokrasch, L. C. 1954 Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **208**, 55-59.
5) Wyatt, G. R. and Kalf, G. F. 1957 The chemistry of insect hemolymph II Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.*, **40**, 6, 833-847.
6) 堀越弘毅 1958 糖類(アンスロン法) 化学の領域. 増刊 **34**, 36-39.
7) Partridge, S. M. 1948 Filter-paper partition chromatography of sugars I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. *Biochem. J.*, **42**, 238-248.
8) Lemieux, R. U. and Bauer, H. F. 1954 Spray reagent for the detection of carbohydrate. *Anal. Chem.*, **26**, 5, 920-921.
9) Trevelyan, W. E., Procter, D. P. and Harrison, J. S. 1950 Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, **166**, 444.
10) Burton, R. M. 1957 The detection of glycerol and dihydroxyaceton, *In* Method in Enzymology, **3**, (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, *eds.*) Acad. Press Inc., Pub. N. Y. 246-248.
11) Balmain, J. H., Bigger, J. D. and Claringbold, P. J. 1956 Micromethod for the estimation of glycogen in the genital organs of the mouse. *Australian J. Biol. Sc.*, **9**, 139-158.
12) 朝比奈英三・青木廉 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**, 55-63.
13) Asahina, É. 1959 Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. *Nature*, **184**, 1003-1004.
14) 丹野浩三 1964 越冬期のツヤハナバチに含まれる多量の糖類. 低温科学, 生物篇, **22**, 51-58.
15) Wigglesworth, V. B. 1950 The Principles of Insect Physiology, 4th edn. Methuen, London, 544 pp.
16) Asahina, É. 1964 Freezing and frost-resistance in insect. *In* Cryobiology (H. T. Meryman, *ed.*) Academic Press, London, 印刷中.
17) Sømme, L. 1964 Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. *Can. J. Zool.*, **42**, 87-101.
18) Wyatt, G. R. 1961 The biochemistry of insect hemolymph. *Ann. Rev. Entomology*, **6**, 75-102.
19) 酒井昭 1963 超低温における植物の生存 III. 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係. 低温科学, 生物篇, **21**, 1-16.
20) 酒井昭 1960 木本類の耐凍性増大の過程 VII. 糖類の季節的変動 (2), 低温科学, 生物篇, **18**, 1-14.
21) 酒井昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.

Summary

The poplar sawfly, *Trichiocampus populi* Okamoto, was examined in the developmental stages from overwintering prepupa to adult with regard to its frost-resistance and related properties.

Since the supercooling point in the overwintering prepupae is −8.6±0.4°C and the thawing temperature is about −3°C, it is conceivable that they may freeze and thaw many times during the winter. The prepupae are highly frost-resistant as long as they remain in the same developmental stage. They can tolerate freezing at −30°C for at least a full day, even in the early summer, without any effect upon their future development. They can withstand liquid nitrogen temperature provided they have been previously frozen at temperatures lower than −20°C. Following rewarming from such a super-low temperature, the prepupae survive for periods as long as 100 days or longer. Some of them are able to resume development even up to the formation of imago, but cannot shed their pupal skins. When the metamorphosis to pupa has begun in the prepupae, their frost-resistance suddenly decreases. Even after moulting to pupae, however, some of them can survive freezing at −10°C for one day.

A remarkably large amount of sugar, estimated to be more than 6 per cent of fresh body weight, was found in the overwintering prepupae of this insect, but the amount of polyol was very slight. About 80 per cent of the total sugar content in the prepupa was a nonreducing disaccharide, trehalose. This high sugar level persists throughout the five month cold season. When the environmental temperature becomes warmer and the transformation to pupa begins to occur in the prepupa, the sugar content gradually decreases. On the other hand, the amount of glycogen in this insect is always very small.

All the prepupae are released from their diapause early in January. The water content in this insect is nearly the same (60–65 per cent) throughout the stages from overwintering prepupa to imago.

The remarkably high frost-resistance in this prepupae may possibly be related to the large amount of sugar under the protoplasmic condition of the insect in overwintering stage.