



Title	イラガ前蛹の耐凍性 補遺 I
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo; 竹原, 一郎 他
Citation	低温科学. 生物篇, 22, 79-90
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17683">https://hdl.handle.net/2115/17683</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p79-90.pdf



## イラガ前蛹の耐凍性補遺 I\*

朝比奈英三・竹原一郎

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和39年7月受理)

### I. 緒言・材料・方法

われわれがイラガ前蛹を材料として越冬昆虫の耐凍性機構の研究に着手して以来既に10年以上の歳月が流れ、その間に得た研究結果の主要なものはほとんど例年のように発表して来た。しかしこれらの研究結果のうち断片的なものや、未だ資料不十分なものはほとんど未発表のままのこされている。最近昆虫の耐凍性についての研究が発展するにつれ断片的な資料であっても今後の研究の手がかりとなるようなものが少なからずあることがわかって来た。そこで今後そのような資料を表記の題名のもとに少しずつまとめてゆくことにした。今回は昆虫の凍害及び耐凍性増大の機構に関係する資料のいくつかについて、特に最近改めて追試した結果を主として述べる。尚説明の便宜のためごく一部に前報<sup>1)</sup>の結果をそのまま記載したところがある。

実験材料のイラガ *Monema flavescens* Walker は札幌産の幼虫を採集飼育して得た越冬繭中の前蛹である。営繭期は年によって多少の差があるが、大体9月の月上旬が最盛期である。

グリセリンの定量方法は前報<sup>2)</sup>と同様で通常1測定値に対して1~3個体を用い、その値は生体重1g当りのmgで表わした。耐凍性の測りかたも前報<sup>1)</sup>と同様に通常10個の前蛹をペトリ皿に入れ、それぞれの低温に保った恒温箱内で凍結させた。この場合-20°Cより高温だと虫体の過冷却がやぶれにくいいため、前蛹を繭から出してその表面をぬらして植氷した。-20°Cより低温の場合は冷却40分内外で虫体の過冷却がやぶれるので、通常繭に入ったまま冷却した。これらの凍結させた前蛹はその温度に1日おいてから常温の室内にとりだし空気中において融解させた。この前蛹は融解直後に生きていても短時日のうちに死ぬものがあるので、生存個体数としては融解後15日たって明らかに生存しているものの数をとった。又同一群の80%以上の数の虫が生存できる最低の凍結温度をもってその群の耐凍度を表わした。

### II. 凍害について

#### 1. 有害温度域

哺乳動物の血球等を溶液中で凍らせる際には、その溶液の共融点より相当高い温度ですで

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第683号

に明らかな凍害が急速におこり、 $-40^{\circ}\text{C}\sim-50^{\circ}\text{C}$  以下の温度では凍害が急減することが知られている<sup>3)</sup>。しかし1個体の昆虫については今までそのような凍害の極点といったものは温度に対しては発見されず、耐凍性の低い昆虫ではさらされる温度が低い程凍害も著しいのが常である。ところが最近 Losina-Losinsky はアワノメイガ *Pyrausta nubilalis*\* の越冬幼虫では、 $-50^{\circ}\text{C}$  付近で凍らせると最も凍害が大きいことを報告した<sup>5)</sup>。いっぽうイラガ前蛹は予備凍結法によって液体空気温度でも凍結生存させることができるが<sup>6)</sup>、このような超低温から非常にゆっくり温めてやった場合でも大多数の個体が生存できることから、凍結にさいして特別な有害温度範囲があることは疑わしい。この問題を更に確かめるため充分耐凍性の高い12月中旬のイラガ前蛹を用い  $-20^{\circ}\text{C}$  より  $-70^{\circ}\text{C}$  までの段階的な温度で凍結実験を行なった。

$-40^{\circ}\text{C}$  以上の温度で前蛹を凍らせる際は低温室内の恒温箱を使った。 $-50^{\circ}\text{C}$  と  $-70^{\circ}\text{C}$  の場合は、低温室内においた魔法ピンの底に固形炭酸を入れるとピン内に安定した気温の成層がおこることを利用した。本実験で1日の凍結期間内の気温のフレは恒温箱を使った場合  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、魔法ピンを使った場合  $\pm 2.5^{\circ}\text{C}$  程度であった。これらの虫は何れも  $-20^{\circ}\text{C}$  の空气中でまず凍結させてから冷却したので、細胞内凍結のおこるおそれはほとんどない<sup>7)</sup>。凍結させた虫を加熱するときは何れの場合も直ちに  $10^{\circ}\text{C}$  内外の空气中で融解させ、1日後から  $20^{\circ}\text{C}$  の恒温に保った。この実験の結果は第1表に示すように  $-20^{\circ}\text{C}$  より  $-70^{\circ}\text{C}$  までの範囲ではいずれも凍

第1表 イラガ越冬前蛹の耐凍性 (1963年12月)

凍結条件	$-20^{\circ}\text{C}$ , 1日	$-30^{\circ}\text{C}$ , 1日	$-40^{\circ}\text{C}$ , 1日	$-30^{\circ}\text{C}$ に1時間 後 $-50^{\circ}\text{C}$ に1日	$-30^{\circ}\text{C}$ に2時間 後 $-70^{\circ}\text{C}$ に1日
使用個体数	10	10	10	10	10
生存個体数	9	10	10	8	8

害が少なく、1日の間に特に凍害が著しくすすむような温度域は発見されなかった。しかしこれらの前蛹の融解後の変態能力にはある程度の差があらわれ、凍結温度が  $-50^{\circ}\text{C}$  より低かった場合には  $-40^{\circ}\text{C}$  より高温で凍らせてあった前蛹に比べて蛹への変態が2カ月又はそれ以上もおくれておこるのが常であった。又  $-40^{\circ}\text{C}$  より低温で凍らせてあった前蛹のほとんどには後述するように脱皮傷害があらわれ羽化不能になった。

## 2. 長期凍結

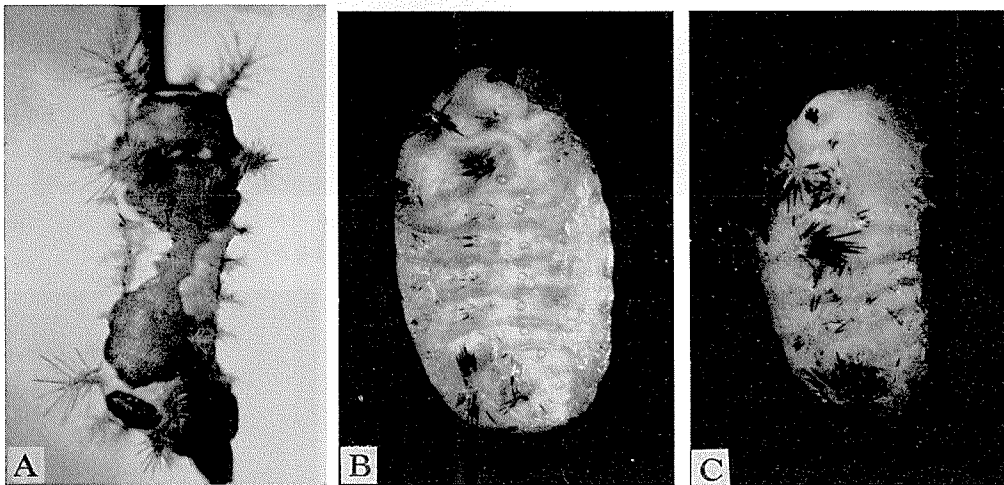
イラガ越冬前蛹は上記のように短時日の凍結に対してきわめて強いが、 $-10^{\circ}\text{C}$  又は  $-20^{\circ}\text{C}$  の温度で長期間(150日~300日)冷却しておくと、その体の凍結の如何にかかわらず、明らかに凍死個体が増えてくる<sup>8)</sup>。この事実は、この前蛹が生きてゆくための低温における代謝に関係しているものと思われる<sup>9)</sup>。もしそうだとすれば超低温においてはそのような原因による凍害の進行は非常におそくなると考えられるので、液体酸素を使って1959年1月にこの前蛹の長期間の凍結を試みた。しかし不幸にしてこのときは前蛹を超低温におくことわずが70日で実験を打ち切らざるをえなかったので、前蛹を  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存するよりも超低温におく方がよ

\* この幼虫の耐凍性は非常に高くイラガ前蛹のそれに近い<sup>4)</sup>。

いという想定を立証する資料は得られなかった。この実験は前蛹を繭に入ったまま  $-30^{\circ}\text{C}$  で1時間予備凍結してから液体酸素中に浸しておいたもので、融解させるときは直接室温の空気中に繭をとり出した。この結果は10個の使用前蛹のうち融解15日後には7個体が生存していたが、そのうち蛹化できたものは2個体、羽化したものは一つもなかった。

3. 凍害の症状

昆虫がその体を構成する組織細胞のきわめて多くのものに細胞内凍結がおこると考えられる程充分急速に冷却された場合や、たとえゆっくり凍った場合でもその虫の耐凍性をはるかに超える温度又は時間だけ冷却された場合には即時の凍死がおこる。しかしイラガ前蛹のように耐凍性の高い昆虫では、細胞内凍結にもとづく凍死の場合以外はその凍害の様式はむしろ別の形であらわれてくる。イラガ幼虫が繭に入って前蛹となってから日が浅くまだ充分にその耐凍性が高まってこない(次節参照)うちに凍結させると、融解直後にはその背管(心臓)が明らかに脈動しているにもかかわらずその数日後に死ぬ場合が少なくない。これが前蛹でなく摂食期の活動中の幼虫(第1図A)を凍らせた場合には、僅か  $-5^{\circ}\text{C}$  で1日の凍結後融解するとその血



第1図 イラガ幼虫と前蛹

- A: 活動期の幼虫, 背面 (×2)
- B: 越冬期の前蛹, 側面, 頭部は引込んでいる (×3.5)
- C: 蛹化数日前の前蛹, 側面, 頭部が突出している (×3.5)

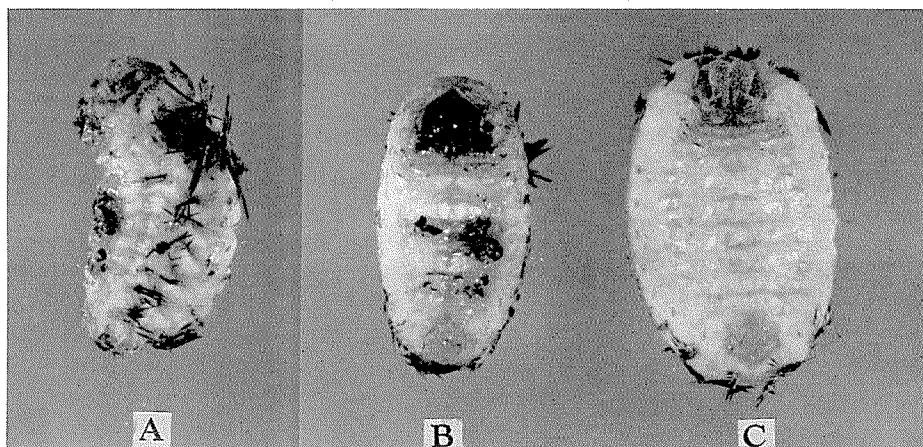
第2表 イラガ前蛹の長期冷蔵 (1956年12月5日開始)

冷蔵温度と期間	使用個体数	生存個体数*	永久前蛹**	蛹	化	羽	化
$0^{\circ}\text{C}$ 350日	10	9	1	5		3	
$-5^{\circ}\text{C}$ 過冷却 130日	10	10	1	9		8	
$-10^{\circ}\text{C}$ 凍結 130日	10	8	4	3		1	
$-20^{\circ}\text{C}$ 凍結 130日	10	7	1	6		4	

\* 冷蔵をやめて  $20^{\circ}\text{C}$  の恒温にうつし2週間後における生存個体数。

\*\*  $20^{\circ}\text{C}$  恒温に150日おいても外見上全く変態の進行がみられない前蛹の個体数。

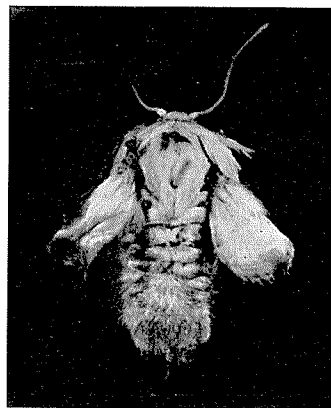
液は急に暗色化し、背管は初めは脈動しているが1~2日間に死亡する。更に耐凍性が高まった越冬中の前蛹でも、凍結時間が長いか又は凍結温度が非常に低いと、融解後における昆虫の変態発育の進行に欠陥があらわれやすい。越冬前蛹を $-30^{\circ}\text{C}$ より低い温度で、又は $-20^{\circ}\text{C}$ より高温でも長期間凍結しておくとしばしば永久前蛹<sup>9)</sup>となる(第2表)。これは休眠中の前蛹を $20^{\circ}\text{C}$ の恒温に保存したものと形態的には全く同様に(第2図)常温で100日以上生存でき、ごく徐々に体内の脂肪体を消耗し、長期間たっても蛹への変態はほとんど進行しない。これまでに得られたイラガ永久前蛹で最も長生きしたものは、 $-10^{\circ}\text{C}$ で150日凍結後常温で1205日



第2図 イラガ永久前蛹,  $20^{\circ}\text{C}$ で660日間保存 ( $\times 3.5$ )

A: 側面 B: 腹面 正常な越冬前蛹 Cよりもはるかに小さい

(3年3カ月)生存できた1例である。凍結融解後永久前蛹とはならなかったものでもその変態の進行が非常に遅延することは少なくない。又これらの虫に脱皮能力が低下することはきわめて普通におこる。即ち $-40^{\circ}\text{C}$ より低温で1日以上凍らせてあった前蛹では、幼虫の皮が脱げないため蛹化できないものが多く、又幸いに蛹化できたものでも更に脱皮して成虫になったものはほとんどない。しかしアゲハ類の蝶の越冬蛹のように凍結によって「半成虫」<sup>10), 11)</sup>をつくることはなく、超低温で凍らせてあった前蛹が蛹化した場合でも蛹の皮下には完全な成虫が形成され、もしも蛹皮をはがしてやれば翅こそびないがほぼ完全な成虫があらわれる(第3図)。これらの事実からみて耐凍性の高い昆虫でも、変態を進行させる機構に関係する組織細胞は最も凍害を受けやすいと考えられ、脱皮不能の現象もその一つのあらわれと解釈できる。



第3図 超低温で凍結後羽化したイラガ ( $\times 3.3$ )

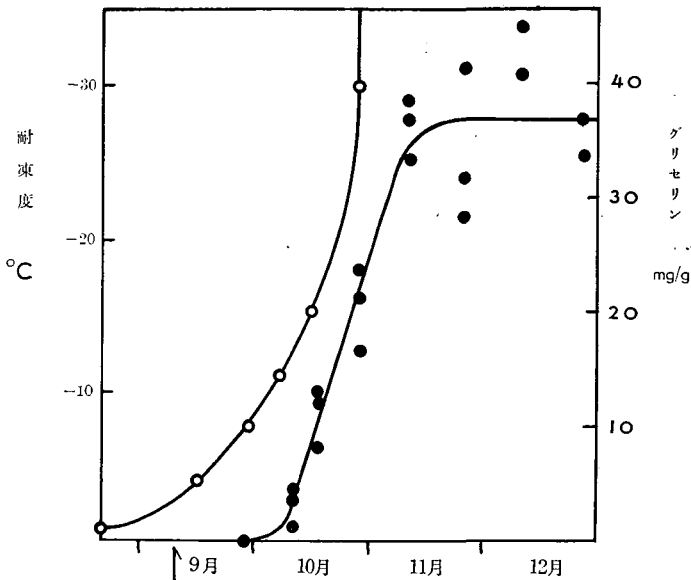
2月上旬の越冬前蛹を2ヶ月間 $-5^{\circ}\text{C}$ に保存しこれを $-30^{\circ}\text{C}$ で1日間予備凍結後液体酸素中に1日おいた。融解後は $20^{\circ}\text{C}$ の恒温においた。羽化のときは自力では脱皮できなかった。

### III. グリセリン含量と耐凍性

前報<sup>1)</sup>において越冬昆虫の耐凍性はその組織細胞の原形質の状態変化によって或る程度までは増加できるもので、このような状態になった昆虫ではその体内にグリセリンが増量することは耐凍性を更に増大するために有利であると述べたが、最近この予想の少なくとも後半を支持する資料がえられた。

#### 1. グリセリン増減の過程における耐凍性の変化

まず主として1960~1961年の資料<sup>1)</sup>によって、前蛹の体内にグリセリンが増量又は減量してゆく時期にその耐凍性がどのように変化するかを述べる。自然状態のイラガ前蛹では、秋になって気温が10°C付近に下がると急激にグリセリンが体内にできてくる<sup>1)</sup>。このときの前蛹の耐凍度の変化を第4図に示した。即ち営繭前の活動期の幼虫は前述のようにほとんど凍結に



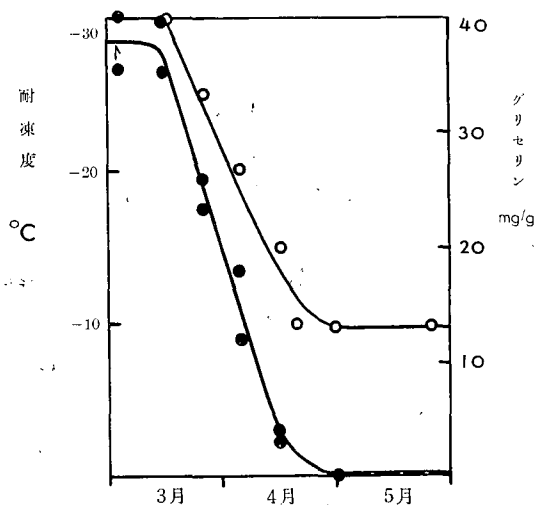
第4図 グリセリン増量期における耐凍性の変化 矢印は繭に入った時を示す  
○：耐凍度（1日間の凍結で使用個体の80%以上が生存できる最低温度）  
●：生体重1g当りのグリセリン量

耐えないが、繭に入って5日たつとようやく $-5^{\circ}\text{C}$ で1日の凍結に耐えるようになる。このころ幼虫は前蛹の形態にかわる。前蛹の耐凍性は引き続き増大し、グリセリンが明らかに増量する以前にすでに $-10^{\circ}\text{C}$ 1日の凍結に耐えられる。グリセリンが急増する10月中旬以後には耐凍性も急増し、グリセリン量が生体重の2%内外に達する10月下旬にはもはや $-30^{\circ}\text{C}$ の予備凍結によって液体空気温度にも耐えられる。札幌の気温では前蛹はこのような高い耐凍性を翌年の4月まで保っているが、気温が高くなるにつれその耐凍性は急速に低下する。この場合環境温度が $10^{\circ}\text{C}$ を越えると体内のグリセリンが急減する<sup>1)</sup>ばかりでなく前蛹から蛹への変態も

又急にすすむので、この時期の耐凍性の低下を直ちにグリセリンの減量に結びつけて考えるわけにはいかない。そこで戸外にあった前蛹を3月の初めに $10^{\circ}\text{C}$ の恒温に移し、その後の耐凍性とグリセリン量の変化をしらべた(第5図)。この温度ではグリセリンは急速に消失するが、前蛹の変態の進行はきわめておそく、5月末ごろまでは越冬前蛹と同じ外形のままである。第5図に明らかなようにグリセリンの減量に伴って前蛹の耐凍性は急速に低下するが、グリセリンが消失しても $-10^{\circ}\text{C}$ 1日の凍結に耐え、これ以後はもはや急速な耐凍性の低下はみられない。前蛹から蛹への変態が進み越冬中は体内に引き込まれていた頭部が突出するようになると(第1図C)もはや $-10^{\circ}\text{C}$ では1日以内に凍死するが、 $-5^{\circ}\text{C}$ では大部分の前蛹が凍結に耐え、融解後には蛹化できるが成虫への脱皮は不成功であった。

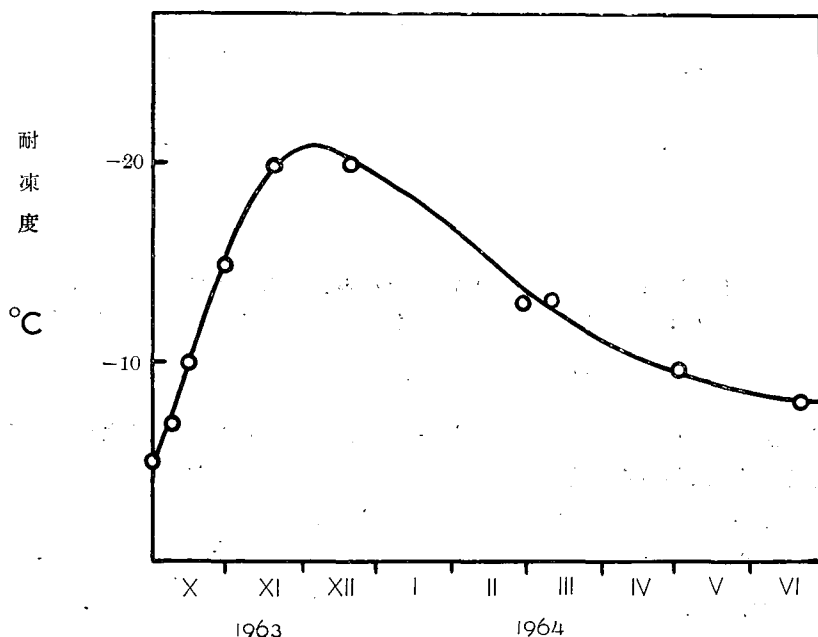
## 2. グリセリンが増量しない前蛹の耐凍性

以上の実験から越冬前蛹ではその体内にグリセリンができる\* 以前に $10^{\circ}\text{C}$ 1日の凍結に耐



第5図 グリセリン減量期における耐凍性の変化

○: 耐凍度 ●: グリセリン量  
矢印は前蛹を戸外より $10^{\circ}\text{C}$ の恒温に移した時期を示す



第6図  $20^{\circ}\text{C}$ の恒温におかれた前蛹の耐凍性の変化

\* 1 mg/g 以上

えられる程度にまで虫体の耐凍性が高まり、この耐凍度は春季グリセリンが消失した後も前蛹の変態が或る程度進行するまでは保たれているように見える。この問題を更に明らかにするには、秋に繭に入ってから冬を経て翌春までグリセリンが増加しない状態に前蛹をおいてその耐凍性をしらべることが望ましい。このために営繭後間もなく20°Cの恒温においた前蛹の耐凍性を季節を追ってしらべてみた(第6図)。この温度ではグリセリンは事実上増量せず、1960年の資料では9月末に20°Cにおかれてから少なくとも50日間はほとんど変わらず0.1 mg/g内外であった。1963~1964年の冬にはそれよりやや多かったが2月初めの定量ではグリセリン量が1 mg/gを超えた例はきわめて少なかった。いっぽうこの温度において前蛹の耐凍度は、10月中旬に-10°Cを越えてもさらに向上し、11月下旬より12月にかけて最高値をしめた。このころの前蛹は-20°C1日の凍結に耐えるが、-25°Cでは少数のものが生き残り、-30°C1日の凍結では全滅する。翌春3月には20°C恒温においても前蛹の耐凍性は明らかに低下しているが、休眠がやぶれて蛹への変態が進行しない限り6月になっても過半数の前蛹は-10°C1日の凍結にたえた。

### 3. 20°C 恒温で耐凍性の高まった前蛹に対するグリセリン注射

越冬休眠期に耐凍性のない昆虫はその体内にグリセリンが注射された場合、グリセリンそれ自身は無害であっても凍結に耐えるようにはならない<sup>4,11)</sup>。このことはイラガ前蛹でもしらべられているが<sup>9)</sup>、このとき使われた前蛹は10月中旬より100日以上20°Cにおかれており前述の耐凍性が最高である時期をややすぎていると思われる。又このとき使用した5個体の前蛹のうち3個体は融解直後には生存しており、20日以内に死んでいる。これらの事実からみて、20°C恒温でグリセリンの増量なしに耐凍性が高まった時期に、グリセリン注射が前蛹の耐凍性を高める効果があるかどうかを再検討する必要がある。このため1963年12月中旬にグリセリンを注射した前蛹の耐凍性をしらべてみた。

これまでにこの前蛹は78日間20°Cに保存されており、その耐凍度は-20°Cに達していた。グリセリン(和光特級, 98.5%)はうすめないものを、純グリセリン量が虫の生体重の約5%になるように微量注射筒とマイクロメーターを組み合わせた注射器(室町化学製)で前蛹の肛門より体腔内に注射した。虫体内に注射されたグリセリンは20°Cにおいても急速には減量しないことが予じめわかっていたので<sup>12)</sup>、これらの前蛹を注射後20°Cに4日間おいてから-30°C、-50°C、液体窒素温度でそれぞれ凍らせた。結果は第3表に示すように、グリセリン注射なしに凍らせた対照の前蛹に比べて明らかに耐凍性が増大していた。このとき凍結後生き残った

第3表 20°C 恒温におかれた前蛹へのグリセリン注射による耐凍性の増大 (12月)

グリセリン注射量*	0	5%	5%	5%
凍結条件	-30°C, 1日	-30°C, 1日	-50°C, 2日	-30°C, 2時間→液体窒素1日
使用個体数	10	10	10	10
生存個体数	0	10	4	6

\* 生体重に対する百分率

前蛹はいずれ1もカ月以上生存したが、 $-50^{\circ}\text{C}$  以下の温度で凍らせた場合には蛹化できなかった。

以上の三項目の観察の結果は、越冬昆虫の耐凍性に対するグリセリンの役割について重要な手がかりをあたえている。従来休眠中の越冬昆虫は耐寒性が高いといわれて来たが<sup>13)</sup>、休眠中の昆虫にしばしばおこるグリセリンの生成と他の性質とを分離した実験ができなかったこと等から、昆虫の耐凍性の主因は休眠状態であることよりも、この時期に虫体内にできるグリセリンであるという説が最近呈出されている<sup>14)</sup>。しかし今まで知られた耐凍性のある昆虫のほとんどすべてが休眠中又は休眠期後のものであり、またグリセリンをもため耐凍性昆虫もあるから<sup>4,15)</sup>、休眠した昆虫にはグリセリンの生成以外に何等かの耐凍性を高める要因があるように思われる。前報<sup>9)</sup>に述べたようにイラガ前蛹を $20^{\circ}\text{C}$  におくと最も長期間蛹への変態を進行させずにおくことができる。即ち休眠状態が長くつづくのである。今回の実験はこの休眠中に前蛹の耐凍性がグリセリンの増量なしに明らかに高まることを示し、しかもそのように耐凍性の高まった前蛹に対してはグリセリン注射が更に耐凍性を高めるために有効であることを明示している。現在のところこのような耐凍性増大の要因にふれることは未だ困難であるが、他の生物細胞での観察<sup>16)</sup>等からみて、恐らく休眠中には前蛹の組織細胞に原形質的变化がおこるのではないかと想像される。またイラガ前蛹の体内にグリセリンが生成し又消滅する場合に、その耐凍性の増減はきわめて急速であり、僅か $15\text{ mg/g}^*$  のグリセリンの増減は耐凍度を $10^{\circ}\text{C}$  以上も変化させる。従ってこのような場合におけるグリセリンの作用の機構は、哺乳動物の血液に凍害防止剤として加えられるグリセリンについて考案されたいわゆる塩害防止説<sup>17)</sup>とは明らかに異なるものと思われる。

#### IV. ハードニングの温度について

従来昆虫の耐寒性は秋から冬にかけて高まることが知られており、人工的に加温処理等によっていったん耐凍性を低下させた越冬昆虫も再び低い温度に長時間さらすと耐凍性が高まる事実がある<sup>18)</sup>。このことから越冬昆虫の耐凍性を高める……即ちハードニング hardening する

第4表 はじめ $20^{\circ}\text{C}$  のち $10^{\circ}\text{C}$  におかれた前蛹の耐凍性

実験 期 日	1963 年			1964 年
	11月19日	11月26日		2月3日
凍結前の温度条件	$20^{\circ}\text{C}$ (30日) $10^{\circ}\text{C}$ (14日)	$20^{\circ}\text{C}$ (30日) $10^{\circ}\text{C}$ (21日)		$20^{\circ}\text{C}$ (30日) $10^{\circ}\text{C}$ (90日)
平均グリセリン含量 mg/g 生体重	20.5	37.0		35.3
凍 結 条 件	$-25^{\circ}\text{C}$ , 1日	$-30^{\circ}\text{C}$ , 1日	$-30^{\circ}\text{C}$ , 2時間 →液体窒素, 1日	$-30^{\circ}\text{C}$ , 2時間 →液体窒素, 1日
使 用 個 体 数	10	10	10	5
生 存 個 体 数	10	10	6	3

\* イラガ越冬前蛹の含水量は約60%なので、このグリセリン量はほぼ0.27 Mにあたる。

……ためには 0°C に近い温度 (通常 5°C 以下の冷温) で比較的長期間おくことが必要であるように見られている。しかし米国産のヤママユ *Hyalophora cecropia* の休眠蛹は 25°C で保存しておいても少なくとも -15°C での凍結に耐えられるようになるし (Kanwisher 私信), 我国のキアゲハ越冬蛹は 20°C 恒温で 4 カ月おいた後に液体窒素中での凍結にも耐えるものがあった (朝比奈未発表)。そしてこれらの場合には何れも虫体内にグリセリンがつくられていた。この問題を更にしらべるために恒温条件においたイラガ前蛹を使って簡単な実験を行なった。既に述べたようにこの前蛹は 20°C 恒温では体内のグリセリンは増量せず, 又耐凍度も -20°C 程度までにしか向上しない。このような前蛹を 10°C に移すとやがて体内にグリセリンが増量し<sup>19)</sup> 同時に耐凍性も増大する。実験の結果は第 4 表に示したが, この時期に 20°C より 10°C に移すことによって虫体のグリセリン量は戸外温度におかれた自然状態の前蛹における値<sup>1</sup> と同じ程度に増加し, このときはその耐凍性も最高に達している。この実験で凍結に耐えて生存した前蛹の半数内外は変態できたが, 自然状態の前蛹と同様に (第 II 節参照), 超低温で凍らせたものは羽化できなかった。

このような事実からみて昆虫の種類によっては 10°~25°C の温度におかれても充分ハードニングが進むということが出来る。したがって越冬昆虫が高い耐凍性をもつためにはなるべく 0°C に近い冷温におかれることが必要であるという問題は次のように解釈されよう。夏より秋にかけてその組織細胞に或る原形質の変化がおこっている休眠昆虫のうちには, 気温の低下につれて体内の貯蔵栄養物質がグリセリンのようないわゆる保護物質に変化する場合がある。そしてこのような保護物質生産の最適温度がしばしば比較的低い冷温にある。またこの保護物質が充分な量だけでできてしまった後は凍害がおこらぬ範囲でなるべく低い温度におかれる程保護物質からもとの貯蔵物質へもどる反応はおさえられ<sup>19)</sup>, 同時に体細胞の原形質の状態も最も耐凍性の高いままに保たれるのであろう。

## 要 結

イラガ越冬前蛹をつかって, 昆虫の凍害及び耐凍性増大の機構を明らかにするためのいくつかの実験を行なった。

1. 耐凍性の充分に高まった前蛹では 1 日間の凍結によって即時の凍死がおこるような有害温度域は発見されない。

2. 前蛹を液体酸素中で 70 日間凍結させたが, 使用した 10 個体のうち 7 個体が生存し, そのうち 2 個体が蛹化したが羽化できなかった。

3. 越冬期の前蛹はこのような耐凍性が高いが, -40°C 以下に 1 日以上凍結しておく, 又はこれより高温でも長期にわたって冷却しておく, 融解後に変態機能がしばしばそなわれる。たとえば全く変態できずに永久前蛹になったり, 又体組織は変態しても脱皮できないために正常な蛹や成虫になれずに死ぬ。従って耐凍性の高い昆虫でも変態を進行させる機能に關係する組織の細胞が最も凍害に対して敏感であるらしい。

4. 前蛹をはじめから 20°C の恒温におくと長期に亘って休眠がやぶれずグリセリンも生産

されないが、その耐凍性は次第に高まり、12月ごろ最高となり $-20^{\circ}\text{C}$ で1日の凍結に耐えられる。この時前蛹にグリセリンを注射すると明らかに耐凍性が向上し、液体窒素中の凍結にも耐えたが融解後変態はできなかつた。 $20^{\circ}\text{C}$ 恒温における前蛹の耐凍性は春になると徐々に低下するが6月になつてもその体に変態がおこらぬ限り $-10^{\circ}\text{C}$ 1日の凍結に耐えられるものが多い。

5. 越冬昆虫の耐凍性の増大は休眠中におそらく何等かの原形質的变化がその組織細胞におこり、それに加えてしばしばグリセリンのような凍害防止物質が生産されることによるものであろう。そしてこのような凍害防止物質が虫体内につくられるためにはしばしば比較的 $0^{\circ}\text{C}$ に近い冷温が最適温度であるらしい。又ひとたび耐凍性が高まつてしまった昆虫にとっては、凍害をおこさぬ限りなるべく低温に保たれることは、これらの原形質的或いは凍害防止物質的条件を耐凍性の維持に一番よい状態にとどめておくために有利であるにちがいない。

## 文 献

- 1) 竹原一郎・朝比奈英三 1961 イラガ越冬前蛹のグリセリン I. 低温科学, 生物篇, **19**, 29-36.
- 2) 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.
- 3) Smith, A. U. 1961 Biological Effects of Freezing and Supercooling, Edward Arnold Ltd. London, 462 pp.
- 4) 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.
- 5) Losina-Losinsky L. K. (Лозина-Лозинский Л. К.), 1962 Survival of insect at super-low temperatures. (露文) *Doklady, Akademii Nauk*, **147**, 1247-1249.
- 6) 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.
- 7) Asahina, É., Aoki, K. and Shinozaki, J. 1954 The freezing process of frost-hardy caterpillars. *Bull. Ent. Res.*, **45**, 329-339.
- 8) 朝比奈英三 1955 可動状態の動物の凍結及び過冷却による長期保存 (予報). 動物学雑誌, **64**, 280-285.
- 9) Asahina, É. 1959 Diapause and frost-resistance in a slug caterpillar. *Kontyû*, **27**, 47-55.
- 10) Asahina, É. 1959 Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. *Nature*, **184**, 1003-1004.
- 11) 丹野皓三 1963 アゲハ越冬蛹の耐凍性. 低温科学, 生物篇, **21**, 41-53.
- 12) 竹原一郎 1963 イラガ越冬前蛹のグリセリン II. 低温科学, 生物篇, **21**, 55-60.
- 13) Ushatinskaya, R. S. (Ушатинская, Р. С.) 1957 Principles of Cold Resistance in Insects (露文), Academy of Sciences U.S.S.R. Press, Moscow, U.S.S.R., 314 pp.
- 14) Salt, R. W. 1961 Principles of insect cold-hardiness. *Ann. Rev. Entomology*, **6**, 55-74.
- 15) Sømme, L. 1964 Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. *Can. J. Zool.*, **42**, 87-101.
- 16) 朝比奈英三・丹野皓三 1963 生物細胞の耐凍性に関係する一つの原形質的要因. 低温科学, 生物篇, **21**, 61-69.
- 17) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 28-36.
- 18) Barnes, D. and Hodson, A. C. 1956 Low temperature tolerance of the European corn borer in relation to winter survival in Minnesota. *J. Econ. Ent.*, **49**, 19-24.
- 19) 竹原一郎 1964 イラガ越冬前蛹のグリセリン IV. 低温科学, 生物篇, **22**, 71-88.

### Summary

By the use of overwintering prepupa of a slug caterpillar, *Monema flavescens*, a few experiments were made on the frost-injury and resistance in insects.

Injury to living cells freezing in a salt solution has been known to increase most rapidly within a certain temperature range usually much higher than the eutectic point of the solution.<sup>3)</sup> In the slug caterpillar, however, freezing experiments at graded temperatures to 70°C did not disclose any such critical range where injuries rapidly develop.

Frost-injury in an insect does not always take place as killing immediately after thawing. Active heart beats are frequently observed after thawing although the insect may die in several days or more. The most common sublethal frost-injury is the failure to complete metamorphosis. Even in the most frost-resistant stage, if the freezing is too severe or prolonged, the prepupae frequently remain for a few years after rewarming in the same developmental stage as before. Some can transform into adult moths under their pupal cuticles, but are unable to shed them successfully. Clearly, frost-resistance in an whole insect is limited by the frost-resistance capacity of those tissue cells most susceptible to freezing. From the observations mentioned above, it seems likely that, at least in the prepupa of the slug caterpillar, the cells of those special tissues concerned with the developmental processes of metamorphosis are most susceptible to freezing.

Changes in the degree of frost-resistance during periods of both increase and decrease in glycerol content was observed in the prepupae. In autumn prior to glycerol formation, the prepupae can survive freezing at  $-10^{\circ}\text{C}$  for one day. As glycerol increases, their frost-resistance is rapidly enhanced. After the glycerol content has reached about two percent of the fresh body weight, further increase appears unnecessary for the insects to maintain their high frost-resistance, since at the point they have become sufficiently resistant to survive freezing even at liquid gas temperatures (Fig. 3). Since a slight increase in glycerol content is always followed by a remarkable increase in frost-resistance capacity, the mechanism of the protective action of glycerol against frost-injury in insects may well differ from the mechanism operating in the protection of mammalian erythrocytes by glycerol.<sup>16)</sup> As the glycerol disappears from the prepupae, there is also a good correlation between glycerol content and the degree of frost-resistance at a rearing temperature of  $10^{\circ}\text{C}$  (Fig. 4), where post-diapause development proceeds very slowly. Even after the prepupae have no more glycerol, they can survive freezing at  $-10^{\circ}\text{C}$  unless post-diapause development appreciably proceeds. An apparent increase in frost-resistance was found in the beginning of winter even in the prepupae reared at  $20^{\circ}\text{C}$ , where no glycerol was appreciably produced (Fig. 5). Only in these insects which have been hardened at  $20^{\circ}\text{C}$  is an injection of glycerol found to be very effective in increasing their frost-resistance.

It has been generally accepted that exposure to cold for relatively long periods of time, usually at a temperature slightly higher than  $0^{\circ}\text{C}$ , is necessary to produce frost-resistance in insects. However, the prepupae of *M. flavescens* in diapause stage may apparently be hardened, as mentioned above, by rearing them at  $20^{\circ}\text{C}$ . These prepupae, when transferred to  $10^{\circ}\text{C}$ , rapidly enhanced frost-resistance with the concomitant rise of glycerol content. They became as resistant to freezing as normal overwintering one in

severe cold atmosphere in midwinter. A reasonable interpretation of the effectiveness of mild chilling in producing good frost-hardening in insects may, therefore, be that the optimal temperature range which produces the rapid formation of protective substance, such as glycerol and sorbitol, in an insect frequently, though not always, involves temperatures just above zero. In addition, keeping insects at cold temperatures aids them in retaining the frost-resistance, by retarding both the post-diapause development and the conversion of protective substance into large molecular one.