



Title	ポブラハバチの耐凍性 II : 脂肪細胞における細胞外凍結と細胞内凍結
Author(s)	丹野, 皓三; TANNO, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 47-53
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17694
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p47-53.pdf



ポ プ ラ ハ バ チ の 耐 凍 性 II*

脂肪細胞における細胞外凍結と細胞内凍結

丹 野 皓 三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和40年7月受理)

I. 緒 言

昆虫の一個体としての耐凍性はもちろんその個体を構成している組織或いは細胞の耐凍性に深く関係しているから、一個体の耐凍性を研究するためには組織或は細胞単位での観察が必要である。従来そのひとつの方法として生体から摘出した組織或は細胞の凍結過程が観察されていた^{1,2)}。この方法のひとつの利点は凍結の時間経過を観察出来ることであり、耐凍性を研究するめに非常に重要である。しかし脂肪細胞のように大形でしかも不透明な細胞の場合にこの方法で細胞の内部を観察する事は困難である。

いっぽう一個体としての生物の凍結状態を知るにはどうしても切片にして観察する必要がある。従来多くの報告では凍らせた生物体を凍結乾燥してから、或いは凍結置換してから切片にして観察しており、組織切片に見られる空胞を氷のあつた場所と想定して氷の分布を推測していた^{3,4)}。脂肪細胞のように油滴等を含んでいる細胞では、この方法では氷のあとと油滴等の流出したあととを区別するのは困難である。

ところで昆虫の体腔の中で脂肪体が占めている部分は非常に大きい。又変態にともなう代謝において脂肪体が重要な役割をはたしている事実⁵⁾を考えると一個体の耐凍性を研究する場合にその脂肪細胞の凍結状態を観察する事は重要である。

著者はポプラハバチの前蛹を用いて虫をまるごと凍結切片にしてその脂肪細胞の凍結状態を観察した。その結果を報告する。

II. 材料と方法

材 料： 1964年秋に採集したポプラハバチの前蛹を外気とほぼ同じ温度条件にある飼育室に保存しておき、翌年1月から6月までの間に主に前蛹の時期のものを実験に用いた。

凍結条件・凍結切片： 虫を液体窒素の中に常温から急速につけて凍結させた場合とペトリ皿に虫を入れて -30°C の低温室内でゆっくり空冷させて凍結させた場合とを比較した。後者の場合に虫は体温 -9°C 近くで過冷却が破れて約20分後に -30°C に達する。これらの凍結

* 北海道大学低温科学研究所業績 第733号

温度に 24 時間おいた虫をごく少量のアニンで木のブロックに固着させ、 -15°C の低温室内で廻転式マイクロームを用いて厚さ 25μ の切片にした。高倍率にして観察する場合には 10μ の切片にした。この切片を -15°C の低温室で偏光顕微鏡を使って観察した。

凍結融解後の脂肪細胞の観察： 凍結融解後の虫から脂肪細胞を摘出して観察した。ポプラハバチの脂肪細胞は原形質膜の外側にもう一枚の比較的弾力のある外膜を持っている。普通の状態ではこの外膜は細胞に密着している。これをゆっくりと偏平にしていくと原形質が外膜から分離する⁶⁾。この事を利用して凍結融解後の脂肪細胞の原形質膜を観察した。

III. 結 果

ポプラハバチの脂肪細胞は尿酸の球晶を充した尿酸球晶胞を持った内臓層脂肪細胞とこれを持っていない体壁層脂肪細胞との 2 種類に区別される⁶⁾。それでこの 2 種類の脂肪細胞を比較しながら観察した。

1. 緩慢凍結

A. 細胞外凍結

普通の顕微鏡で観察すると黄色の内臓層脂肪細胞が細胞の外側に出来た透明な氷にとじこめられて不規則に収縮している (図版 I-1)。これを十字ニコルで観察すると、細胞表面に尿酸の球晶が輝やいて見える。この球晶は廻転載物机を廻転させても明るさは一定であり細胞の外側に出来た氷と容易に区別出来る。細胞の中は常に暗黒で氷が形成されていない (図版 I-2)。この切片を低温室内で観察していると数分後氷は昇華して収縮した細胞があとにのこる (図版 I-3, 鋭敏色板を用いている)。これを十字ニコルで観察すると尿酸の球晶だけが輝やいて見える (図版 I-4)。消化管の近くでも同様に細胞外凍結をしている (図版 II-7, 8)。一方体壁層の脂肪細胞でもこの凍結条件では細胞外凍結をしている (図版 II-5, 6)。この細胞外凍結をしている細胞を高倍率で観察すると、細胞の中で油滴が集まって大きな粒になっている (図版 III-9, 10, 11, 12)。

次に同様に凍結させた前蛹を室温で融解しすぐ脂肪細胞を摘出して観察した。脂肪細胞は体壁層内臓層とも球形にもどっており凍結前とかわりがない。ただ油滴が大きくなっている。これらの細胞を偏平にしてみると凍結前と同じく原形質が外膜から分離した。凍結融解後前蛹は正常に蛹化し、正常な成虫になった。

B. 細胞内凍結

前節で述べたように前蛹の脂肪細胞はのろい凍結条件ではほとんど細胞外凍結をするが個体によって内臓層脂肪細胞の一部 (全体の 1% 弱) の細胞が細胞内凍結をする場合がある (図版 IV-13, 14)。これを高倍率で観察すると大きな氷がたくさん細胞の中に出来ていて細胞はそれほど収縮していない。これが氷であることは消光位輝光位が廻転載物机を廻すとそれぞれ 90 度ごとにあらわれる事実と昇華して空胞となる事から明らかであり、油滴とは容易に区別出来る。

この凍結条件で細胞内凍結をする脂肪細胞は背隔膜と腹隔膜の近くにある内臓層脂肪細胞

だけであり、消化管の近くのもの及び体壁層脂肪細胞は細胞内凍結をするものはひとつも観察されなかった。

6月になって虫の外観が棒状になり蛹に近くなって来ると、細胞内凍結をする内臓層脂肪細胞が急に多くなり、全体の2/3ほどの細胞が細胞内凍結をする個体もあった。一方体壁層の脂肪細胞は蛹に近くなってこの凍結条件で細胞内凍結をするものは観察されなかった。

蛹に近い時期の前蛹から凍結融解後に内臓層脂肪細胞を摘出してみると、細胞は球形になっており一見前節で述べた細胞外凍結をした細胞の融解後の様子と同じであった。しかしこれを扁平にして観察すると、外膜の中で原形質膜が崩壊しており細胞の連絡部分に油滴が流出していた。一方体壁層の脂肪細胞では原形質膜の崩壊はおきていなかった。凍結融解後この蛹に近い時期の前蛹はそのほとんどが2, 3日間心臓を動かしていたが蛹化せずすべて死亡した。

2. 急速凍結

前蛹を常温から急に液体窒素につけて凍結させ、その温度に24時間おいてから -15°C で凍結切片にした。まず内臓層脂肪細胞を常光で観察すると、細胞の外側の氷は透明に見えるが細胞の中は小さな氷がたくさん出来ているらしく油滴の部分のをぞいて暗く見え、細胞は収縮していない(図版 V-17, VI-23)。これを十字ニコルで観察すると細胞の中は油滴の部分のをぞき一様に明るく見える。外側の氷は緩慢凍結をさせた場合よりも小さくてそのその界面だけが光って見える(図版 V-18, VI-24)。この切片を 0°C 以上にあたためたり或いは低温室内で氷を昇華させたりして見ると、常光では細胞の中が明るく見え、十字ニコルでは暗くなる(図版 V-19, 20, スダンブラックで染色している)。一方体壁層の脂肪細胞でもまったく同様なことが観察される(図版 VI-21, 22)。倍率をあげて観察すると、やはり氷の輪郭はわからないが油滴と細胞内にある微小顆粒の部分が十字ニコルで暗く見える(図版 VII-25, 26, 27, 28)。

液体窒素で急速に凍結した前蛹はその時に裂けめを生じ、極端な場合には2ケに割れてしまう。これを融解するととたんに裂けめから体液があふれてくる。心臓の動いているものはなくすべて死亡していた。この脂肪細胞を取り出して観察すると一見凍結前とかわりなくみえるが、原形質膜は完全に崩壊しており、細胞連絡の部分に油滴が流出していた。

IV. 考 察

今回の実験で凍結切片は常に -15°C で製作しているので液体窒素中での凍結状態等を直接見る事は出来ない。Stumpe等は -80°C で厚さ 1μ の凍結切片を得ており学ぶところが大きい⁷⁾。

脂肪細胞内の油滴が凍結により大きくなる事実について考察した。まず細胞外凍結の場合には細胞が脱水されるために乳濁系の外部相である水の油滴に対する体積比が小さくなり、従って安定度が低下し油滴がおたがいにのみあって大きくなるのであろう。これに対して細胞内凍結の場合には、やはり脱水による乳濁系の不安定化も考えられるが、この他に凍結過程で細胞内に出来た氷どおしが油滴を扁平にし、その結果油滴の界面張力が増大してぶつかり合った油滴のみあって大きくなる場合も考えられる。

朝比奈は種々の細胞について細胞内凍結は例外なく致命的である事実を観察している^{2,9)}。この点ポプラハバチの脂肪細胞も原形質膜の崩壊がおきる事実から考えて例外ではなかろう。しかし脂肪細胞の凍結による崩壊が一個体の昆虫の生死にすぐ現われてくるとはかぎらず、むしろ脂肪細胞の役割から考えてある時間を経過してから害が現われて来る可能性が多い。

Salt はタマ蜂の一種 *Eurosta solidaginis* (Fitch) とハバチの一種 *Cephus cinctus* Nort の幼虫を使って下記の実験をした。-10°C 以下の温度で虫の過冷却を破ってやると脂肪細胞は細胞内凍結をするが融解後なんら害を受けずに虫は変態した。又細胞内凍結をした脂肪細胞は成虫になるまで崩壊せずにあった。この事実から Salt は脂肪細胞は細胞内凍結をしても生存出来ると云う結論を下した^{8,10)}。しかし彼の報告では結論に達するのにいくつかの飛躍があり、細胞内凍結をした脂肪細胞それ自身が融解後生存していたと云う証明にはならない。実際ポプラハバチのように細胞内凍結により原形質が崩壊しても外側の比較的弾性に富む膜のために体腔に分散していくことはなく、一見正常に見える場合がある。又比較的少数の脂肪細胞だけが細胞内凍結をおこした場合は本実験で示したようにその昆虫自身は変態することが出来る。

内臓層の脂肪細胞の方が体壁層のそれより細胞内凍結をおこしやすい事実は細胞の大きさに関係しているように見える。体壁層の脂肪細胞の直径は内臓層のそれの約 2/3 であるから細胞の体積あたりの表面積の割合は 1.5 倍になる。従って凍結のさいより速く脱水され細胞内凍結をよりおこしにくいのであろう。一般にこのような理由で大きな細胞ほど細胞内凍結をおこしやすいと考えられているが¹¹⁾、脂肪細胞の場合は細胞の中に水以外の物質をたくさん持っているから細胞の持っている水量あたりの表面の割合はそれほど小さくはならず、従ってそれほど細胞内凍結をおこしやすくはならないと思われる。

実際にポプラハバチは越冬中しばしば自然状態で凍結融解をくりかえしているが¹²⁾、今回の実験結果から考えて、脂肪細胞は細胞外凍結の状態に凍結に耐えているにちがいない。

内臓層脂肪細胞の方が体壁層脂肪細胞より細胞内凍結をしやすい事実から考えて、おそらく細胞内凍結とはかぎらずに細胞外凍結による傷害に対しても前者の方が敏感であろうと思われる。もしそうならばこの事と前蛹が蛹化する期間に体壁層脂肪細胞が使われ蛹から成虫になる時間に内臓層脂肪細胞が使われはじめる事実⁶⁾とを合わせて考えると、前報で述べた -30°C で予備凍結した後液体窒素に投入した前蛹の融解後正常な蛹になるが成虫への脱皮のさい例外なく失敗する事実¹²⁾を説明することができるかも知れない。

V. 摘 要

ポプラハバチ *Trichiocampus popli* Okamoto の越冬前蛹をまるごと凍結切片にしてその脂肪細胞の凍結状態を観察した。

室温から急速に液体窒素の中に投入した場合と約 2°C/分の冷却速度で -30°C まで凍結させた場合とを比較した。これらの凍結温度に 24 時間おいてから -15°C の低温室内で凍結切片を製作した。

- 1) 緩慢凍結の場合にほとんどの脂肪細胞は細胞外凍結をする。ただ内臓層の 1% 弱にあ

たるものが細胞内凍結をする。細胞外凍結をしたものは融解後細胞内の油滴が大きくなっていることをのぞけば正常である。融解後前蛹は正常な成虫になった。

2) 6月になり蛹の形態に近くなった前蛹では緩慢凍結により細胞内凍結をする内臓層脂肪細胞が増加し、約2/3ほどの内臓層脂肪細胞が細胞内凍結をしていた個体もあった。凍結融解後は越冬期の前蛹を緩慢凍結したものと同様に一見正常に見えたが、脂肪細胞の原形質膜が崩壊していた。しかし脂肪細胞に密着して脂肪体全体を包んでいる弾力性にとむ外膜があるために油滴等が体腔に流出することはなく一見正常にみえた。一方体壁層脂肪細胞はすべて細胞外凍結をしていた。融解後前蛹は2,3日以内に例外なく死亡した。

3) 液体窒素で急速に凍結すると脂肪細胞は例外なく細胞内凍結をおこす。融解後の脂肪細胞は一見正常にみえるが、その原形質膜は完全に崩壊していた。しかしこれらを包んでいる外膜のために体腔の中に拡散するようなことはなかった。融解後生存していた前蛹はひとつもなかった。

終りにこの報告にあたり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) Asahina, E., Aoki, K. & Shinozaki, J. 1954 The freezing process of frost-hardy caterpillars. *Bull. Ent. Res.*, **45**, 329.
- 2) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. *Contrib. Inst. Low Temp. Sci.*, **10**, 83-150.
- 3) Meryman, H. T. 1955 The distribution and growth of ice crystals in frozen mammalian tissue. *Naval Medical Research Institute Report*, Project NM **000 018. 01. 08**, 1-30.
- 4) Kanwisher, J. 1959 Histology and metabolism of frozen intertidal animals. *Biol. Bull.*, **116**, 258-264.
- 5) Kilby, B. A. 1963 The biochemistry of the insect fat body. In *Advance in Insect Physiology I*. (Beament, J. W. L., Treherne, J. E. and Wigglesworth, V. B., eds.) Acad. Press Lond., 111-174.
- 6) 丹野皓三 1965 ポプラハバチの脂肪細胞。形態と尿酸の蓄積について。低温科学, 生物篇, **23**, 37-45.
- 7) Stumpe, W. E. and Roth, L. J. 1965 Frozen sectioning below -60°C with a refrigerated microtome. *Cryobiol.* **1**, 225-232.
- 8) Salt, R. W. 1959 Survival of frozen fat body cells in an insect. *Nature*, **184**, 1426-1427.
- 9) 朝比奈英三 1953 生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞(ウニ)の凍結過程。低温科学, **10**, 81-92.
- 10) Salt, R. W. 1961 A comparison of injury and survival of larvae of *Chephus cinctus* Nort after intracellular and extracellular freezing. *Can. J. Zool.* **39**, 349-357.
- 11) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* **47**, 347-369.
- 12) 丹野皓三・朝比奈英三 1964 ポプラハバチの耐凍性 I. 低温科学, 生物篇, **22**, 59-69.

Summary

In consideration of the frost-injury in the prepupa of the poplar sawfly, *Trichiocampus populi* Okamoto, the freezing states of fat-cells were observed.

The prepupa was frozen slowly or rapidly for one day. The cooling rate of slow freezing is about -2°C per minute and the final temperature is -30°C . The supercooling point in this insect is $-8.6\pm 0.4^{\circ}\text{C}$. Rapid freezing was obtained by directly immersing them into liquid nitrogen from room temperature. In a cold room at -15°C , freezing sections were made from the frozen insect body. Then they were observed under a polarizing microscope.

1) In slow freezing, extracellular freezing occurred in most fat-cells except a small number of those in the visceral fat-cell layer which froze intracellularly. The number of intracellularly frozen cells was estimated less than 1% of the total fat-cells in the visceral layer. The extracellularly frozen cells contracted irregularly, and the oil droplets within the cell coalesced into larger drops. After thawing, the cell recovered their normal size and shape, and their protoplasmic membranes appeared normal. Frozen and thawed prepupae could normally develop up to imago. Destruction of some fat-cells by freezing did not necessarily result in the death of individual prepupa.

2) In the insect at the end of the prepupal stage, intracellular freezing occurred even by slow freezing in many fat-cells of the visceral layer, sometimes over 70% of the total cells in that layer. Intracellularly frozen cells contracted very slightly, and there were many large ice crystals within them. The protoplasmic membrane was found to be destroyed after thawing. The thawed cells, however, appeared almost normal, because they are tightly covered with an outer thin membrane. On the other hand, extracellular freezing only occurred in all the fat-cells of the parietal layer. Those prepupae frozen in this way could survive only for a few days after thawing.

3) In rapid freezing, the intracellular freezing occurred in all the fat-cells. The cells did not contract, and there found many tiny ice crystals within them. The protoplasmic membrane was completely destroyed after thawing, although, the thawed cells appeared nearly normal for the reason mentioned before. The rapidly frozen prepupae were invariably found to be killed just after thawing.

図版説明

図版 I

1. 緩慢凍結による内蔵層脂肪細胞の細胞外凍結。細胞のまわりを氷粒がとりまいている。黒い粒子は尿酸の球晶の集まり。×92
2. 同上十字ニコルで観察。尿酸の球晶が光学的異方性を示し輝いている。×92
3. 同上氷を昇華させたところ。鋭敏色板を用いている。×92
4. 同上十字ニコルで観察。輝いているのは尿酸の球晶。×92

図版 II

5. 緩慢凍結による体壁層脂肪細胞の細胞外凍結。鋭敏色板を使っている。e: 体壁。×92
6. 同上十字ニコルで観察。細胞外の氷粒が輝いている。×92
7. 緩慢凍結による内蔵層脂肪細胞の細胞外凍結。消化管内 (g) 部の氷は体壁中の氷より小さい。×92
8. 同上十字ニコルで観察。×92

図版 III

9. 緩慢凍結による体壁層脂肪細胞の細胞外凍結。一個の細胞が画面いっぱいに見える。×370
10. 同上十字ニコルで観察。×370
11. 緩慢凍結による内蔵層脂肪細胞の細胞外凍結。×370
12. 同上十字ニコルで観察。×370

図版 IV

13. 緩慢凍結による内蔵層脂肪細胞の細胞内凍結 (矢印)。ほとんどの細胞は細胞外凍結をしている。×92
14. 同上十字ニコルで観察。×92
15. 細胞内凍結をおこしている細胞の常光での観察。細胞内に大きな氷晶が見られ細胞はそれほど収縮していない。一個の細胞が画面いっぱいに見える。×370
16. 同上十字ニコルで観察。×370

図版 V

17. 急速凍結による内蔵層脂肪細胞の細胞内凍結。×92
18. 同上十字ニコルで観察。×92
常光の場合の約 10 倍の露出時間で写真をとっている
19. 上と同じ条件で作った切片の氷を昇華させた後スタンブラックで染色。×92
20. 同上十字ニコルで観察。×92

図版 VI

21. 急速凍結による体壁層脂肪細胞の細胞内凍結。e: 体壁。×92
22. 同上十字ニコルで観察。×92
23. 急速凍結による内蔵層脂肪細胞の細胞内凍結。g: 消化管。×92
24. 同上十字ニコルで観察。×92

図版 VII

25. 急速凍結による内蔵層脂肪細胞の細胞内凍結。×370
26. 同上十字ニコルで観察。油滴と細胞内微小顆粒は暗く見える。×370
27. 急速凍結による体壁層脂肪細胞の細胞内凍結。×370
28. 同上十字ニコルで観察













