



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アワノメイガ幼虫の凍りかた : 凍結切片法による観察
Author(s)	朝比奈, 英三; ASAHINA, Eizo; 丹野, 皓三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 105-111
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17724">https://hdl.handle.net/2115/17724</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p105-111.pdf



## アワノメイガ幼虫の凍りかた\*

凍結切片法による観察

朝比奈英三・丹野 皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和42年9月受理)

### I. 緒 言

比較的小形の生物の凍結状態をしらべるときに、凍結した生物体をそのまま切片にして直接顕微鏡下に観察することは最も望ましい方法の一つである。特に越冬期の昆虫のように、1個体としての凍結が自然状態でおこりうるものにとっては、まるのまま凍らせた虫体の凍りかたをみないでその虫の凍結過程や凍害のおこりかたをしらべるとは甚だむずかしい。著者の一人丹野はすでにこの方法によってポプラハバチの脂肪体における細胞の凍りかたについて報告した<sup>1)</sup>。其後この方法の一部を改良して昆虫の凍結切片を作成することがさらに容易になった。今回はこの方法の紹介を兼ねて、この凍結切片法によって観察した越冬期のアワノメイガ幼虫の体内における氷のできかたについて報告する。方法の改良に助力された本研究所の大方由松・小笠原英治両技官に感謝する。又材料をわけて下さった北海道農業試験場虫害第一研究室長堀口治夫氏にお礼申し上げる。

### II. 材料と方法

**材 料:** アワノメイガ *Micractis nubilalis* Hübner の越冬幼虫(終令)を使用した。この幼虫は1967年3月初旬まだ積雪の多い野外\*\* から採集したもので、これを1カ月間  $-5^{\circ}\text{C}$  の低温箱に保存しておいた。

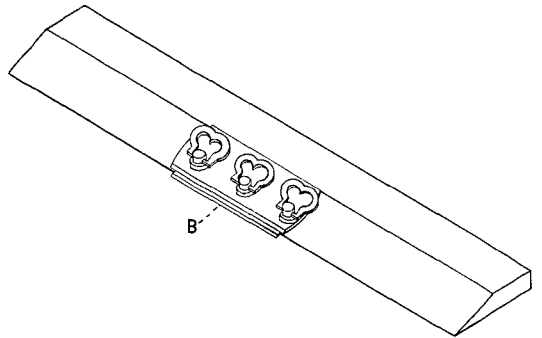
**耐凍性の判定:** 1967年4月5日に5頭の幼虫をペトリ皿にとり  $-25^{\circ}\text{C}$  の恒温箱に移した。これらの幼虫はすべて30分以内に自発凍結をおこした。24時間後に幼虫をおさめたペトリ皿を恒温箱からとり出し室温の空気中において虫体を融解させた。融解させた幼虫はペトリ皿に入れたまま相対湿度87%の恒湿びんの中におき室温に保って観察した。

**凍結切片の製作:** 上記のように  $-25^{\circ}\text{C}$  の温度で24時間凍らせておいた幼虫を  $-15^{\circ}\text{C}$  の低温室内に移し、回転式マイクロームを使って厚さ  $25\mu$  の凍結切片を作った。このとき少量のアニンで木製の支持台に虫体を固定した。マイクロームの刃として片刃の安全カミソリの

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第858号

\*\* 1967年の札幌における長期積雪の終日は3月29日。

刃を用いた。この刃を特別な形をした真鍮の支持板にのせ、それを旧式の時計に使われる大きなネジでとめた(第1図)。凍結した虫体の切片をつくると、マイクロームの刃は僅かの使用で切れなくなり、しばしば刃をとりかえる必要があるが、今回の方法では使用した刃を改めて研ぐ必要がなくごく短時間で容易に新しい刃と交換することができる。スライドグラス上に氷飽和にした液体パラフィン\*を1滴おとしておき、この上に虫体から切りとった切片をのせると、それまで巻いていた切片は直ちにきれいに水平にのびる。のびた切片の上も同じ液体パラフィンでおおい、 $-15^{\circ}\text{C}$ の低温室内で偏光顕微鏡下に観察した。

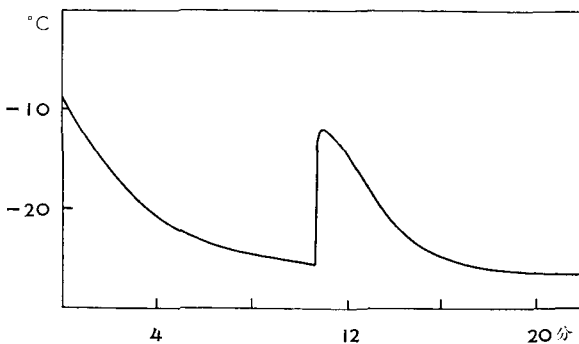


第1図 凍結切片用のマイクロームの刃。真鍮の支持板の上に安全カミソリの刃(B)をのせ、それをステンレス・スチールの板でおさえて大形の3個のネジでとめた。

**凍結曲線の測定：** 幼虫を二重試験管内に吊し、 $-30^{\circ}\text{C}$ の塩化カルシウムブライン中で冷却した。冷却開始より凍結終了までの虫体の温度変化を体表面に接した細い熱電対により自動平衡記録計で自記させた。尚この資料は1967年のものではないが、他の資料と参照するため特に記載した。使用したアワノメイガ幼虫は3月に野外より採集し、4月21日に使用されるまで $-5^{\circ}\text{C}$ に保存されたものである。

### III. 結 果

**凍結曲線：** 室温より冷却開始後15分以内にすべての幼虫が凍結をはじめた。その凍結曲線の代表的な1例を第2図に示す。これでわかるように過冷却点は $-25^{\circ}\text{C}$ 付近でかなり低く、しかもこの温度付近では冷却速度が非常に小さいので、虫体の過冷却が十分にすすんでから



第2図 アワノメイガ幼虫の凍結曲線  
縦軸：温度，横軸：時間

(体内の組織もほとんど同温度にまで冷却されてから)初めて虫体内で自発凍結がおこることがわかる。虫体が小形(体重110mg内外)であるため、この冷却速度に対しては単純なピークをあらわしたただで凍結曲線は間もなく終末温度に近づいてゆく。

第2図に示された凍結曲線をとった幼虫は $-30^{\circ}\text{C}$ まで冷却されて1時間後融解されたが完全に恢復し、順調

\* 液体パラフィンには微量の水をふくむことができる。このため使用温度で新しく氷がとけこむことがないように、予め少量の水片を加えて水を飽和させておく。

に変態して6月末に羽化した。

**耐凍性：**幼虫をペトリ皿に入れて気温  $-25^{\circ}\text{C}$  の恒温箱にうつすと、ペトリ皿内の温度が  $-20^{\circ}\text{C}$  付近に達したとき1頭が凍り、30分後、 $-25^{\circ}\text{C}$  ではのこりの4頭の幼虫が固く凍結していた。 $-25^{\circ}\text{C}$  で24時間の凍結の後融解させたところ使用した5頭のすべてが常態に回復して室温では活動をはじめた。これらの幼虫は恒湿びんの中で室温に保存したが、6月20日より7月12日までの間に4頭が羽化した。残る1頭は蛹化することなく7月末に死亡した。

**凍結切片の観察：**図版 I に第3体節の横断面の中央部を示す。まず消化管 (A) の内部には大形の氷塊があり、消化管組織 (この切片では前腸) の内部にも小形の氷がみえる。消化管をとりまく体腔内には血液 (haemolymph) の凍結によってできた大量の径数十  $\mu$  から 100  $\mu$  以上におよぶ大形の氷塊がある。同じ体腔の中にその外壁をなす隔膜にそって大きな内臓層脂肪体 (F) が暗色にみえ、これを十字ニコルでみると暗色の地に微粒状のものが無数に光ってみえる (図版 I-2)。凍った脂肪体を拡大してみると (図版 II-3) 脂肪細胞の間隙や表面にやや大形の氷粒 (黒い矢印) がみえ、又これらの氷粒にやや近い大きさの少数の油滴がみえる。偏光でみると (図版 II-4) 氷粒は顕微鏡ステージの回転に従って明暗に変わるが、油滴は常に暗い。細胞1個の大きさから考えて (図版 II-5 参照)、各々の細胞の境界と思われる辺りにかなり暗い場所が多いが (図版 II-4) これは消光位にある氷粒、油滴、細胞間隙に濃縮された血液等であろう。凍結させない脂肪体 (図版 II-5) を十字ニコルでみると (図版 II-6)、凍結した脂肪体 (図版 I-2) と同様に無数の微粒状のものが細胞内部に光ってみえる。凍っていない脂肪細胞を押しつぶしてみると細胞内にあった油滴はまわりの血液中に散逸するが、この微粒状のものはこわれた細胞の原形質膜の部分に残っていて (図版 II-7)、十字ニコルでみると明瞭に十字光をあらわす (図版 II-8)。従ってこの微粒状のものは球晶と考えられ直径が 2  $\mu$  位ある。これらの事実からみて図版 I-2 に示した凍結切片中の脂肪細胞の内部が一面にうす明るくみえるのはこの小球晶が無数にあるためであって、細胞内には氷ができていないように思われる。

次に胸部第1体節の断面をみると (図版 III-9) 体腔内に大きな氷塊があることは前述のとおりで、虫体を縦走している2本の腹走筋 (M) の組織内には氷がみえない。また胸部神経球 (G) の内部には多数の氷粒がみえ、これを拡大してみるとさしわたし十数  $\mu$  以上の比較的大きな氷粒であることがわかる (図版 III-10)。神経球を構成している神経細胞は長径 6  $\mu$  内外の偏球形のものであるから、神経球内部にみえる氷も恐らく細胞内ではなく組織の間隙に発達したものとされる。

後頭部の切片 (図版 IV-11) には多数の筋組織があり、縦断された筋組織の内部には断面長径が 20  $\mu$  内外ある氷粒が多数みとめられるが、この氷粒の大きさも筋細胞の断面よりはるかに大きい。筋組織が密になるとその中にある氷晶は小さくなり、臆になるとその内部には全く氷がみあたらない。背管は氷粒の間に挟まれて不規則な形に収縮しているが、組織内に氷があるかどうかは不明である。以上をみて一般的に言えることは、組織の部分にできる氷晶の大きさは、体腔にできるそれに比べてははっきり区別できる程小さい事実である。もちろん虫体の断面のみを観察しているのであるからここでみえる氷粒はこれよりさらに長い氷粒の断面であ

る場合もある (111 頁図版説明図参照)。

#### IV. 考 察

前述のように凍結切片内にみえる氷晶の大きさは、体腔内にできるものと組織内にできるものとの間に明らかなちがいがあり、氷粒の径が前者は後者の十倍以上も大きい。したがって 1 個体の昆虫が自発凍結する場合に、まず体腔内をみたしている血液の過冷却がやぶれるものと想像される。また消化管内にも大形の氷塊がみとめられるから (図版 I-1), Salt<sup>2)</sup> が指摘したように消化管内の液が最初に又は体腔内の血液とほとんど同時に凍ったと考えてもよい。

いっぽう虫体の凍結曲線を見ると過冷却がやぶれてすぐ非常に急速な大量の潜熱の放出がある。したがって凍結開始とともに体腔内の大部分の水分が急速に氷にかわり、この氷に植氷されて組織内にも氷が成長してゆき、細胞から水を奪って組織のまわりに、又は細胞の間隙に小形の氷粒を形づくるといふ説明は、これらの資料に対する可能な解釈の一つである。凍結切片を作った場合と同一の凍結条件で幼虫を凍結させると融解後正常に変態できるところから、体内におけるこのような氷の形成はこの虫に対してほとんど害をあたえなかったとみてよいであろう。

Salt はキリンソウのタマバエ *Eurosta solidaginis* (Fitch) の幼虫は耐凍性が高く、越冬中に度々凍結し、このとき脂肪細胞は細胞内凍結をおこすが死なないことを報告した<sup>3)</sup>。又彼は小麦のクキバチ越冬幼虫は、 $-10^{\circ}\text{C}$  以下の温度で過冷却をやぶってやるとすべて細胞内凍結をおこすと述べた<sup>4)</sup>。その後彼は凍結置換法によりこれらの幼虫の切片をしらべた結果、前説をやや改めて大形の細胞 (脂肪細胞と絹糸細胞) 内には氷ができるが、その他の小形の細胞中には氷がなかったと述べている<sup>5)</sup>。そして各種の昆虫からの資料によりこれらの昆虫における凍害は、虫体内で氷晶のできる場所が細胞内かまたは細胞外かという区別によってきまるのではなく、その昆虫が凍害を防ぐのに充分な量の防禦物質 (たとえばグリセリン) をもっているか否かによると考えた<sup>6)</sup>。

Salt の使用した小麦のクキバチ幼虫は非耐凍性であるため、彼の採用した細胞内凍結および細胞外凍結という凍りかたの差による凍害の比較は、融解後の幼虫の活動性の差や、幼虫が死ぬまでの日数の僅かの差に過ぎない<sup>4)</sup>。従ってこれらの幼虫が、さらされた温度に従ってそれぞれ程度の異なる細胞外凍結 (または一部の細胞内凍結) を受けたと考えると説明がつくように思われる。いっぽうキリンソウのタマバエの場合は、摂氏数度又はそれ以上の過冷却度で自発凍結をさせると、体内の脂肪細胞が細胞内凍結をおこすといわれている<sup>3)</sup>。しかし耐凍性の高い昆虫にはグリセリンのような物質を体内にもっているものが多く\*、その血液中では氷晶の生長速度は当然低められるからよほど冷却速度が大きくないと細胞内凍結はおこりにくいように思われる。

越冬期のアワノメイガの場合も体内に体重の 3~4% に及ぶグリセリンを含んでおり<sup>7)</sup>、春になっても  $0^{\circ}\text{C}$  以下の温度で保存されているとグリセリンはきわめて長期間消失しない。今回

\* キリンソウのタマバエのグリセリン含有量は生体重の 4.3%<sup>6)</sup>。

の実験で幼虫の大部分は  $-25^{\circ}\text{C}$  は付近で自発凍結をおこしたが、野外では冷却速度が低いからおそらく  $-20^{\circ}\text{C}$  付近で、また湿った場所にいれば植氷されてさらに高い温度で虫体が凍りだす可能性が高い。この幼虫の凍結曲線を見ると(第2図)、 $-25^{\circ}\text{C}$  で自発凍結させた場合に、潜熱の放出のため体温は一時  $-12^{\circ}\text{C}$  以上\* に昇る。はじめに記したように体内での氷晶の形成はまず体腔内ではじまり、凍りにくい組織の凍結は体腔内の血液の凍結による大量の潜熱の放出につづいておこると考えられる。従って虫体が  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で凍りだした場合でも、大部分の組織の凍結はおそらく  $-10^{\circ}\text{C}$  付近またはこれより高温でおこるものと思われる。耐凍性の高い越冬昆虫の細胞がかなりのグリセリンを含む血液にひたされた状態で凍りだす場合に、この程度の過冷却度で細胞内凍結をおこすとは想像しがたい。越冬期のイラガ幼虫の場合やはりアワノメイガと同程度のグリセリンを含んでいるが、脂肪体を取りだして少量の血液とともに凍らせると、 $10^{\circ}\text{C}$  程度の過冷却度で凍結をはじめた場合に細胞内凍結は無傷の細胞にはほとんどおこらない(朝比奈未発表)。またイラガ幼虫を液体酸素中で急冷却すると、幼虫は例外なく凍死し、融解後体内の脂肪細胞がすべて崩壊していることが観察される。しかし、この幼虫を  $-30^{\circ}\text{C}$  の空气中で自発凍結させたのちに液体酸素温度に冷却すればほとんど死ぬ個体はなく蛹化できる。又このように凍らせた幼虫の体内では融解後の脂肪細胞の形態は内部の油滴が大粒のものに融合する以外には破壊がみとめられない<sup>8)</sup>。

実際に今回の観察でも  $-25^{\circ}\text{C}$  付近で凍りだしたアワノメイガ幼虫の組織細胞中にはっきり氷晶のみとめられた例は一つもなかった。この幼虫の脂肪細胞が偏光下で明るくみえるのは氷ができてからではなく、多数の微球晶をふくむためである。各種の昆虫で尿酸の球晶を脂肪細胞内にもっているものが知られているので(丹野 1965 参照)<sup>9)</sup>、アワノメイガの場合もその微球晶は恐らく尿酸と考えてよいであろう。何れにしてもアワノメイガが野外で凍結する場合には、 $-20^{\circ}\text{C}$  以下の外気温で凍ったときでも、体組織の凍りかたはほとんどが細胞外凍結であろうと思われる。

## V. 摘 要

改良した凍結切片法により越冬期のアワノメイガ体内にできる氷を観察した。

凍結切片法の改良点はマイクロームの刃として簡単に着脱できる安全カミソリの刃を使うようにしたこと、及び切片を氷飽和の液体パラフィン上でのばしたことである。

アワノメイガを  $-25^{\circ}\text{C}$  の空气中で充分過冷却させてから自発凍結させて 24 時間おき、其後  $-15^{\circ}\text{C}$  の低温室内で凍結切片を作って観察した。虫体内にできる氷晶は消化管内と体腔内にできるものが最大で氷粒の径が  $100\mu$  以上に達するものがある。各組織のまわりや組織の内部にできる氷晶はこれよりはっきりと小形であり、細胞の内部に氷が確認できたものは一つもなかった。この幼虫の凍結曲線からみて、 $-25^{\circ}\text{C}$  付近で自発凍結が虫体におこった場合でも、まず体腔内の血液の凍結によって体温は  $-10^{\circ}\text{C}$  付近まで急上昇し、この状態で組織の凍結が

\* 図上では凍結曲線のピークは  $-12^{\circ}\text{C}$  までしか上がっていないが、熱電対の先端は体表面に接しているので、体内の温度はさらに高い。

すすむものと考えられる。凍結切片を作ったと同じ条件で同時に凍らせた幼虫は融解後異常なく恢復してそのほとんどが変態を完了した。これらの結果からみてこの時季のアワノメイガ幼虫には、野外で凍結する場合にも、細胞内凍結はきわめておこりにくいものと思われる。

## 文 献

- 1) 丹野皓三 1965 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. 低温科学, 生物篇, **23**, 47-53.
- 2) Salt, R. W. 1953 The influence of food on cold hardiness of insects. *Canad. Ent.*, **85**, 261-269.
- 3) Salt, R. W. 1959 Survival of frozen fat body cells in an insect. *Nature*, **184**, 1426.
- 4) Salt, R. W. 1961 A comparison of injury and survival of larvae of *Cephus cinctus* Nort. after intracellular and extracellular freezing. *Can. J. Zool.*, **39**, 349-357.
- 5) Salt, R. W. 1962 Intracellular freezing in insects. *Nature*, **193**, 1207-1208.
- 6) Salt, R. W. 1961 Principles of insect cold-hardiness. *Annu. Rev. Ent.*, **6**, 55-74.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

## Summary

Ice crystals formed in frozen larvae of the European corn-borer were observed under a polarizing microscope by the use of freeze-sectioning. An improved method of freeze-sectioning was described.

Larvae in overwintering stage were spontaneously frozen at  $-25^{\circ}\text{C}$ . After being kept at  $-25^{\circ}\text{C}$  for 24 hours, larvae were sectioned in a cold room at  $-15^{\circ}\text{C}$ . Ice crystals were mainly formed in body cavity where large ice grains were observed. Only smaller ice crystals were formed within various tissues. No apparent formation of intracellular ice crystals was observed in any tissue cells.

図版説明

図版 I 第3体節の横断面。図の右下が正背面にあたる。×108

1. 前腸 (A) の管内と、消化管をとりまくひろい体腔内に大形の氷晶がある。そのまわりに脂肪体 (F) が暗色に見えるが、これは径  $40\mu$  内外 (写真上で  $6\sim 3\text{mm}$ ) ある脂肪細胞の集まりである
2. 同上偏光写真。前腸の組織の間隙に氷ができている。脂肪体の細胞間隙に氷がみえる。脂肪細胞が一様にうす明るくみえるのは細胞内に含まれる球晶のためで氷ではない

図版 II 脂肪体の拡大図。×420

3. 脂肪細胞の間隙と思われるあたりに氷粒 (黒い矢印) がみえる
4. 同上偏光写真
5. 虫体からとりだした凍っていない脂肪体。径  $40\mu$  内外ある脂肪細胞の集まりであって、細胞内部には一様な大きさの油滴が密につまっている
6. 同上偏光写真
7. 常温でおしつぶされた脂肪体、油滴は散逸するが、崩壊した原形質の部分に微粒状のものが含まれている
8. 同上偏光写真。7にある微粒状のものは明瞭な十字光を示し球晶であることがわかる。又6の細胞内が光っているのはこの球晶のためである

図版 III 胸部第1体節の横断面。図の上方が背面にあたる

9. 胸部神経球 (G) の内部には氷晶がつまっている。腹走筋 (M) の組織内には氷がみあたらない。まわりの体腔内の氷粒は組織内のそれよりもはるかに大形である。×108
10. 同上 (G) の拡大図。×420

図版 IV II. 後頭部横断面。×72  
(右はその説明図)

- A. 背管
- B. 背走筋の腱
- C. 内転筋
- D. 内転筋の腱
- E. 食道

