HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ポプラハバチの耐凍性　IV ： 脂肪細胞の細胞内凍結と変態障害
Author(s)	丹野, 皓三
Citation	低温科學. 生物篇, 26, 71-78
Issue Date	1968-11-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17740
Type	departmental bulletin paper
File Information	26_p71-78.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Kouzou TANNO 1968 Frost-Resistance in the Poplar Sawfly, *Trichiocampus populi* Okamoto. IV. Intracellular Freezing in Fat-Cells and Injury Occurring upon Metamorphosis. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 26.*** (With English Summary p. 77)

ポプラハバチの耐凍性 IV*

脂肪細胞の細胞内凍結と変態障害

丹野皓三

(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和43年9月受理)

I. 緒　　言

種々の生物細胞において，細胞内に光学顕微鏡でみとめられる程度の大きさの氷晶が凍結により生じた場合に，細胞は致命的な傷害を受ける事が多くの研究者により知られている[1]。これに反して細胞内凍結をした細胞が生存できる事を報告した論文は非常に少なく，ほんの二三篇にとどまる。Salt はキリン草のタマバエ *Eurosta solidaginis* の幼虫を用いて，その脂肪細胞が細胞内凍結に耐えて生存できる事を報告した[2]。一方著者はポプラハバチの前蛹を用いた実験で，細胞内凍結をした脂肪細胞が生存するとは考えられない事を報告した[3]。

本報ではこの事をさらに確かめ，どの程度の量の脂肪細胞が細胞内凍結をした場合に融解後の変態に障害が現われるかを明らかにした。

II. 材料と方法

材料： 1967年の秋に採集したポプラハバチ *Trichiocampus populi* Okamoto の前蛹を外気とほぼ同じ温度条件の飼育室に保存しておき，翌年2月から3月にかけて実験に用いた。この時期の前蛹は細胞内凍結を起こさない様にゆっくりと凍結させれば，−196°C の温度にも耐えられる[4]。

凍結の方法： 第1表に示した冷却速度の異なる A から E までの凍結処理はそれぞれ次の様にして行なった。A. 20頭の前蛹を金網で作ったかごの中に入れて，室温から直接に液体窒素の中にひたした。1分間この中においてから −20°C の恒温箱に移し，この温度で2時間冷却させた。B. 金網の上に前蛹を並べて，液体窒素を満たした魔法びんの上 (−60～−70°C) に25秒間さらしてから −20°C に移し，この温度で2時間冷却させた。C. 金網の上に前蛹を並べて −30°C の低温室内で扇風機で風を強くあてながら5分間凍結させてから −20°C の恒温箱に移して2時間冷却させた。D. 金網の上に並べた前蛹を −20°C の低温室内で扇風機で通風しながら凍結させた。5分後 −20°C の恒温箱に移して2時間冷却させた。E. 直径9 cm のペトリ皿の中に20頭の前蛹を入れて蓋をしたものを −20°C の恒温箱に室温から入れて2時

* 北海道大学低温科学研究所業績　第921号

間凍結させた。

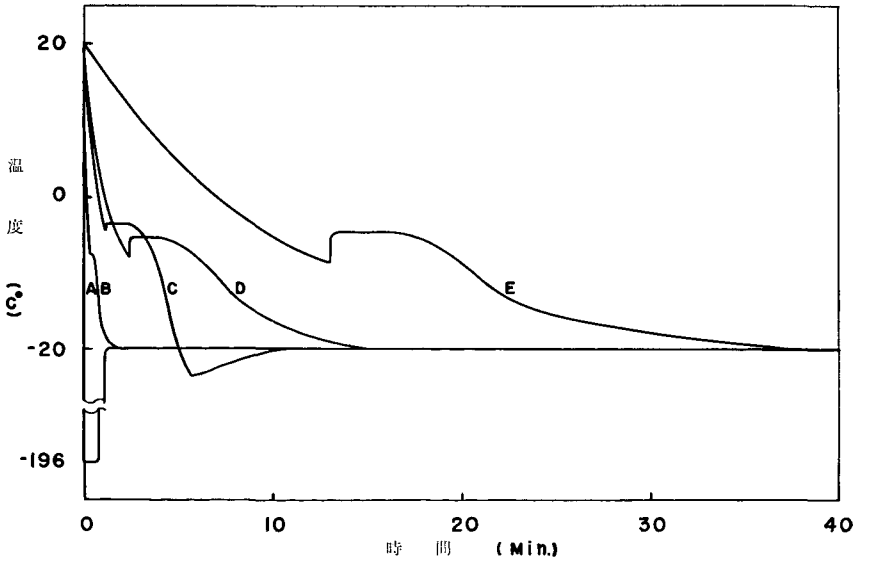
冷却速度の測定： 前蛹の柔いイモムシ状の体をU字形におり曲げ，もどらぬように木綿糸で軽くむすび，この曲りめの内側に熱電対の先端をはさみこみ，AからEまでの凍結曲線を自動平衡記録計で記録した。ひとつの凍結処理について5例の凍結曲線をとった。虫体の凍結が始まってから −20°C に至るまでの間の平均速度を凍結曲線から算出し，5例について平均したものを冷却速度とした。

凍結切片： −20°C の低温室内で回転式ミクロトームを用いて厚さ 20 μ の凍結切片を得た。−20°C の温度で氷飽和にした流動パラフィンをスライドグラスの上にとり，この上に凍結切片をのせ，カバーグラスをかけて −20°C の低温室内の顕微鏡下で観察した。凍結切片作制のこまかい点は前に報告している[5]。

融解後の観察： 凍結した前蛹を室温で融解した。融解後に前蛹をペトリ皿に入れ，過度の乾燥を防ぐためにこれをさらに腰の高いペトリ皿の中に入れてから +20°C の恒温箱に移し，その後の変態を観察した。

III. 結　　果

ポプラハバチの前蛹をいくつかの冷却速度で凍結した。その時の凍結曲線を第1図に示した。最も速い冷却はAの凍結曲線で，これは毎分 327°C の冷却速度であった。B, C, D 及び E の順に冷却速度は小さくなり，それぞれの値は毎分 15.4, 4.0, 0.8 及び 0.4°C であった。どの場合にも最終温度を −20°C にした。前蛹を凍結してから 2〜3 時間後に −20°C の低温室内で凍結切片にして観察した。



第1図　ポプラハバチの凍結曲線

凍結処理Aの場合にすべての脂肪細胞が細胞内凍結を起こした（図版I）。内臓層脂肪細胞及び体壁層脂肪細胞は凍結前の様にほぼ球形のままで細胞内凍結をしている。この事は凍結時にほとんど細胞の中から細胞外凍結によって水が引き出されないうちに細胞内凍結を起こした事を示している。内臓層脂肪細胞の内部には，体液中にできた氷よりもさらに微細な氷晶が無数にあるために透過光線は乱反射されて暗く見える（図版I-2）。体壁層脂肪細胞に於ても同様に，細胞内に無数の微小な氷晶がみとめられる（図版I-3）。他の組織の内部にも微小な氷晶が無数にできたために背走筋，腹走筋や腹髄等があたかも染色した様にはっきりとみとめられる（図版I-1）。しかし氷晶がこれ等の組織を構成している細胞の内部にもあるかどうかは，この方法では明らかにする事は出来なかった。

次に上記の凍結処理Aよりも比較的冷却速度の小さい凍結処理Bについて観察した。内臓層脂肪細胞はすべて細胞内凍結を起こしており，細胞内に微小な氷晶が無数にみとめられる（図版II-4,5）。しかし凍結処理Aの場合と異なり，細胞はいくぶん収縮してまるみを失っている。又細胞内の氷晶の量もAより少なくなっており，そのために細胞内の有形体である尿酸の球晶胞[6]がまわりの氷晶とはっきり区別がつく（図版II-5）。この事はある程度の水が細胞の外側に引き出されてから細胞内凍結をおこしたことを示している。一方体壁層脂肪細胞はその約半数のものが細胞外凍結を起こした。残りの半数の体壁層脂肪細胞は細胞内凍結を起こしているが，その内部にみとめられる氷の量は凍結処理Aに比べて，非常に小量であり，細胞は収縮して不定形の凹型を示している（図版II-6）。背走筋及び腹走筋の組織の中には氷晶はみとめられなく，それを構成している細胞は細胞外凍結を起こしていた。

凍結処理Cの場合にも，内臓層脂肪細胞はほとんど細胞内凍結を起こす（図版III-7）。しかし細胞内の氷の量は凍結処理Bのものよりさらに少なく，細胞はBよりも収縮している（図版III-8）。消化管の背面上にある少数の内臓層脂肪細胞は内臓層の中で最も大きい細胞であるが，この細胞内にはより多量の氷がみとめられる（図版III-7）。体壁層脂肪細胞の大部分のものは細胞外凍結であり，17パーセント内外のものが細胞内凍結を起こした（図版III-9）。

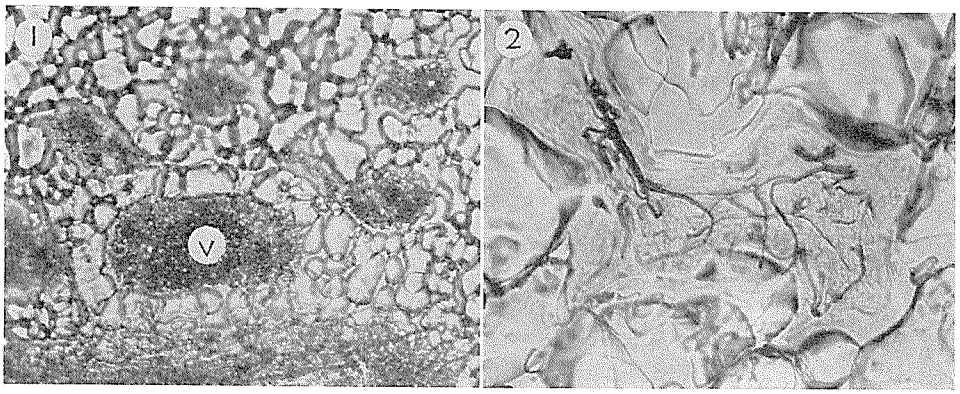
凍結処理Dにおいては冷却速度がさらに小さいために細胞内凍結を起こす脂肪細胞はより少ない。内臓層脂肪細胞の大部分のものは細胞外凍結を示し，17パーセント内外のものが細胞外凍結を起こした（図版IV-10）。細胞内凍結を起こしたものは比較的大きい細胞に多く，従って消化管の背面上にあるものに細胞内凍結が起きている場合が多かった。細胞内の氷は凍結処理Cよりもさらに少量であり，細胞の中心部に局在している（図版IV-11）。体壁層脂肪細胞はすべて細胞外凍結を起こし不規則に収縮していた（図版IV-12）。筋組織の中には氷晶はみとめられなく，組織は収縮して不規則に変形しており，凍結の過程で水が組織外に

第1表　虫体の冷却速度と細胞内凍結をおこした脂肪細胞の割合

凍結処理	冷却速度 (°C/min)	細胞内凍結の割合 (%)	
		体壁層脂肪細胞	内臓層脂肪細胞
A	327	100	100
B	15.4±3.1	48±8	100
C	4.0±0.3	17±3	98±2
D	0.8±0.1	0	17±6
E	0.4±0.0	0	0

引き出されて凍結したことを示している。

最も緩慢な速度で凍結したEの場合には，細胞内凍結を起こす脂肪細胞はひとつもなく(図版 V-13)，内臓層脂肪細胞 図版 V-14) 及び体壁層脂肪細胞 (図版 V-15) ともすべて細胞外凍結を起こしていた。もちろん筋組織の内部には氷晶はみとめられなかった。この様な冷却速度の変化に対する細胞内凍結をした細胞数の割合をまとめて第1表に示した。



第2図 腹髄の凍り方

1. 凍結処理 A，腹髄 (V) の中に微細な氷晶が無数にみとめられる。×250
2. 凍結処理 E，食道下神経節はその内部に氷晶がなく，内部の気管系がみえる。×250

腹髄は各体節に1個しかなく，その大きさも脂肪細胞にくらべて小さいものであるから，凍結切片の上にあらわれる機会は非常に少ない。第2図は冷却速度の異なる場合の腹髄の凍り方を比較したものである。最も速い冷却速度の凍結処理であるAの場合は，腹髄の中に微小な氷晶が無数にみとめられる (第2図-1)。一方最も緩慢な速度で凍結したEの場合には，腹髄よりも大きい食道下神経節でさえ，その内部に氷晶はみとめられなく，透明に見えるためにその内部の気管系がはっきりとわかる (第2図-2)。凍結処理Aの場合に腹髄はほとんど収縮することなく卵形をしているが，凍結処理Eでは不規則に収縮している。Eにみられた腹髄の凍り方がどの程度の冷却速度まで可能であるかはまだ明らかにしていない。

第2表 冷却速度と融解後の変態

凍結処理	融解後の生存率 (%)					
	1日目	23日目		31日目			48日目
	前蛹	前蛹	蛹	前蛹	蛹	成虫	成虫
A	0						0
B	100	80	0	50	0	0	0
C	100	85	0	80	0	0	0
D	100	85	5	25	10	35	65*
E	100	95	0	35	15	25	75

* このうちの半数のものは自力で脱皮することが出来ないために翅がのびなかった

次にこれまでに示した観察と平行して，それぞれの凍結処理により前蛹の受ける凍結傷害が融解後の変態にどの様にあらわれるかを調べた。結果を第2表に示した。凍結処理Aの前蛹はほとんどのものが融解直後に体表から体液を流出した。まもなく体液が褐色に変色しはじめてすべて死亡した。

凍結処理Bを受けたものは融解後1日たってからピンセットの先端でかるくさわるとすべてのものが虫体をかるく曲げて反応した。23日後においても80パーセントのものが生存していた。31日目には50パーセントのものが生存しており，外観が蛹に似てきて棒状になった。しかしその後蛹化したものは1個体もなく，すべて死亡した。Cの場合にも融解後の変態の様子はBの場合とほぼ同様であり，蛹化するものはなかった。凍結処理Dの場合には融後解に成虫まで変態したものが65パーセントあった。しかしそのうちの約半数のものは自力で脱皮する事ができなく，翅がのびなかった。Eの場合には75パーセントの前蛹が融解後に正常な成虫に変態した。

IV. 考　　察

大きい細胞ほど細胞内凍結を起こし易い事実は種々の生物細胞で知られており，すでに説明されている[7]。ポプラハバチの前蛹の脂肪細胞においても，平均230 μ の直径を持っている内臓層脂肪細胞の方が170 μ の体壁層脂肪細胞よりも細胞内凍結を起こし易い事を報告したが[3]，本報ではさらにこの事が明らかになった。特に凍結処理Cの場合にみられた様に，すべての内臓層脂肪細胞が細胞内凍結を起こしても，体壁層脂肪細胞は17パーセントしか細胞内凍結を起こさない事実は，明快な実証のひとつである。内臓層の中でも細胞の大きさに200 μ から250 μ までの変異がある[6]。この中で比較的大きいものは消化管の背面に分布している。この部分の脂肪細胞が特に細胞内凍結を起こし易い事実は，細胞内凍結の可能性に細胞の大きさがいかに大きく関係しているかを示している。

前蛹の他の組織を構成している細胞は脂肪細胞に比べて，はるかに小さいから，脂肪細胞の一部のものが細胞外凍結をしている場合には，他の組織の細胞はすべて細胞外凍結を起こしているであろう。従って本報の実験において処理A以外の凍結では，脂肪細胞以外の細胞はほとんど細胞外凍結であったと思われる。

Saltはタマバエの一種の幼虫を用いて凍結実験を行ない，細胞内凍結を起こした脂肪細胞が生存出来る事を報告した[2]。その根拠として，−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が変態する事と細胞内凍結をした脂肪細胞が成虫になるまで崩壊せずにあった事実とをあげている。しかしこの結果から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結論するには問題があると思われる。本報の実験結果から明らかなように，脂肪細胞の大部分に細胞内凍結を起こさせるためには冬期の自然界で虫体が凍りはじめる場合に起こり得る冷却速度よりもはるかに大きな冷却速度を必要とする。

ポプラハバチの前蛹を室温から液体窒素の中に急につけて凍結させると，その脂肪細胞は

すべて細胞内凍結を起こす。このような凍結細胞は融解後にその原形質膜は崩壊しているが，脂肪細胞の外側を包んでいる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[8]。脂肪細胞を包んでいるこの膜の存在は他の昆虫においても一般的に知られている[9]。

昆虫の脂肪細胞の電子顕微鏡的観察によれば，他の細胞にみられるミトコンドリア等の細胞内有形体はもちろんのこと，タンパク合成に関係するタンパク顆粒と云われている非常に複雑な構造の有形体も含まれている事が知られている[10]。又昆虫の変態に伴う物質代謝において脂肪細胞は単なる保存物質の置き場としてでなく積極的な物質代謝の場であることが知られている[11]。ポプラハバチの前蛹が成虫に変態する過程で，体壁層の大部分と内臓層の約3分の2の脂肪細胞が消費される[8]。脂肪細胞のこの様な複雑な構造と変態の時の重要な役割を考えれば，細胞内凍結により他の細胞と同様に脂肪細胞は致命的な害を受け，その結果ある程度以上の脂肪細胞が細胞内凍結をした場合には，融解後の昆虫の変態は障害を受けるであろう。

V. 摘　　要

ポプラハバチの越冬期の前蛹を種々の冷却速度で冷却し終末温度 −20°C で凍結させた。その結果次の事が明らかになった。

1. 冷却速度が大きいほど脂肪細胞は細胞内凍結を起こし易い。
2. 細胞内凍結をした細胞の中に含まれる水の量は冷却速度が大きいほど多い。
3. 大きい細胞ほど細胞内凍結を起こし易い。
4. 筋組織は毎分 15.4°C の冷却速度で凍結させても細胞内にはもちろん，組織内部にさえ氷晶はみとめられなかった。組織は全体として脱水され収縮していた。組織のこの様な凍結様式は毎分 0.4°C の冷却速度で凍結した前蛹の腹髄にもみられた。
5. 内臓層脂肪細胞の大部分が細胞内凍結をした前蛹は融解後1ヵ月あまり生存したが，蛹化するものはひとつもなかった。内臓層脂肪細胞の17パーセントのものが細胞内凍結を起こした前蛹は，成虫まで変態するものが多数あったが，その約半数は自力で脱皮することが出来ないために翅がのびなかった。
6. この様に融解後の昆虫にあらわれる変態障害の程度は細胞内凍結を起こした脂肪細胞が多いほど大きかった。この事実とポプラハバチの前蛹が成虫に変態する過程で脂肪細胞が重要な役割を演じてその大部分のものが消費される事実[8]とを合わせて考えると，他の細胞の場合で知られている様に細胞内凍結は脂肪細胞においても致命的であると思われる。

終りにこの報告にあたり御校閲下さった朝比奈教授に感謝する。

文　　献

1) 朝比奈英三 1958 生細胞の凍結. 細胞化学シンポジウム, **8**, 1-28.
2) Salt, R. W. 1959 Survival of frozen fat body cells in an insect. *Nature*, **184**, 1426.
3) 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.
4) 丹野皓三 1965 ポプラハバチの耐凍性 III. 耐凍性と糖含量. 低温科学, 生物篇, **23**, 55–63.
5) 朝比奈英三・丹野皓三 1967 アワノメイガ幼虫の凍りかた. 低温科学, 生物篇, **25**, 105–111.
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) Mazur, P. 1967 Physical-chemical basis of injury from intracellular freezing in yeast. *In* Cellular injury and resistance in freezing organisms (É. Asahina *ed.*), *Inst. Low Temp. Sci.*, Sapporo, 171–189.
8) Tanno, K. 1967 Freezing injury in fat-body cells of the poplar sawfly. *In* Cellular injury and resistance in freezing organisms (É. Asahina *ed.*), *Inst. Low Temp. Sci.*, Sapporo, 245–257.
9) Imms, A. D. 1934 A General Textbook of Entomology, Methuen & Co. LTD. London. 727 pp.
10) Locke, M. and Collins, J. V. 1965 The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *J. Cell Biol.*, **26**, 857–884.
11) 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.

Summary

Overwintering prepupae of the Japanese poplar sawfly were separately frozen at −20°C with various cooling rates from 327°C/min to 0.4°C/min. In a cold room at −20°C, frozen sections were made from these frozen insects. The frozen sections were observed under a microscope.

1. With the increase in rate of cooling of the insect, an increase the number of intracellularly frozen cells in fat-body of the insect was seen. The fat-cells of the visceral layer, especially in the dorsal part, underwent intracellular freezing more readily than that of the parietal ones. No ice was observed within the muscle tissue when the insect was frozen at −20°C with a cooling rate of less than 15.4°C/min. The individual muscle tissue as a whole was dehydrated and contracted as seen in an extracellularly frozen cell. A similar type of frozen tissue was also observed in the ventral nerve cord which was frozen at −20°C with a cooling rate of 0.4°C/min.
2. A very interesting relation was observed in the frozen-thawed insects between the number of intracellularly frozen fat-cells and the mode of injury occurring upon metamorphosis after thawing. When the prepupae were frozen with a cooling rate of 327°C/min, intracellular freezing invariably occurred in all fat-body cells. These frozen prepupae invariably succumbed immediately after thawing. The frozen prepupae in which almost of all the fat-cells in the visceral layer were frozen intracellularly but not in the parietal ones could survive for about one month after thawing, but could not pupate. When the prepupae were frozen with a cooling rate of 4.0°C/min, intracellular freezing occurred in about 17 percent of the fat-cells in the visceral layer, while all the fat-cells in the parietal layer froze extracellularly. After thawing, many of these prepupae were able to resume development to adults. Upon emergence, however, about half of the number could not shed their pupal skins and failed to appear on the wing. The prepupae which were frozen with a cooling rate of 0.4°C/min could resume metamorphosis normally after thawing. All fat-cells of these prepupae were observed to freeze extracellularly.

図版説明

図版 I 凍結処理 A 327°C/min

1. 腹部体節の横断面。消化管 (M) をとりまき脊走筋 (D) と腹走筋 (V) にかこまれて，内臓層脂肪細胞が細胞内凍結をしている。この筋組織の外側で体壁にそって分布している体壁層脂肪細胞もすべて細胞内凍結をしている。腹髄 (G) や筋組織はその内部に微細な氷が無数にあるために染色したように黒くみえる。×36
2. 内臓層脂肪細胞。細胞内に微小な氷が無数にあるために，尿酸の球晶胞 (U) ははっきりみえない。×250
3. 体層脂肪細胞。細胞内部に微小な氷が無数にみとめられる。×250

図版 II 凍結処理 B 15.4°C/min

4. 中央にある消化管をとりまいている内臓層脂肪細胞はある程度収縮してすべて細胞内凍結をしている。体壁層脂肪細胞の約半数のものが細胞内凍結を起こしているが，細胞内の氷の量が非常に少ないためにこの写真ではほとんど白く見える。×36
5. 内臓層脂肪細胞。細胞内の氷の量は A の場合よりいくぶん少ないので，尿酸の球晶胞 (U) がはっきり見える。×250
6. 体壁層脂肪細胞。内臓層と比べて細胞内の氷の量は非常に少ない。×250

図版 III 凍結処理 C 4.0°C/min

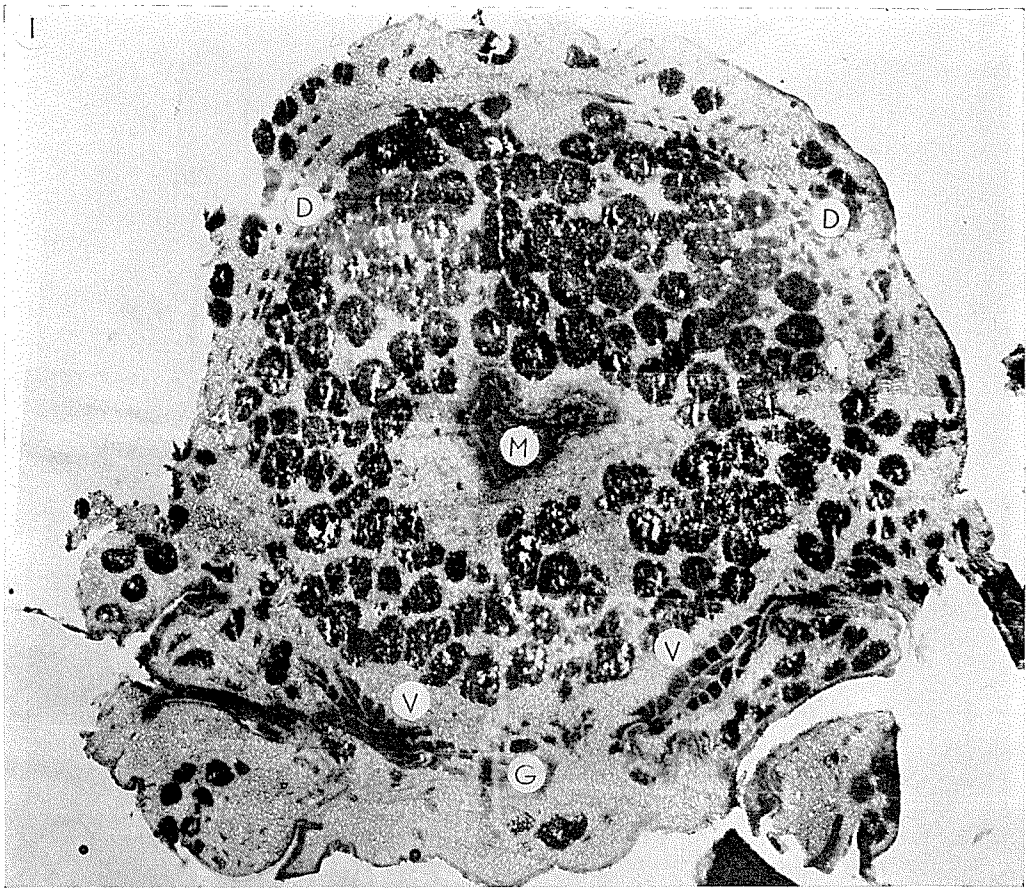
7. 中央に黒く見えるのが消化管で，内臓層脂肪細胞はほとんど細胞内凍結をしている。しかし細胞内の氷の量が凍結処理 C よりもさらに少ないために，かなり透明にみえる。そのために内臓層脂肪細胞の表層にある尿酸の球晶胞が黒点状になってたくさん見える。消化管の脊面にある内臓層脂肪細胞は特に大きい細胞であるが，これ等の細胞は，他のものより多量の氷が細胞内にあるために黒く見える。大分部の体壁層脂肪細胞は細胞外凍結である。×36
8. 内臓層脂肪細胞。細胞内の氷は細胞の中心部に局在している場合が多い。
(U) は尿酸の球晶胞である。×250
9. 体壁層脂肪細胞。大部分のものは細胞外凍結であるが，これは細胞内凍結をしたもので，細胞の中に少量の氷がみとめられる。×250

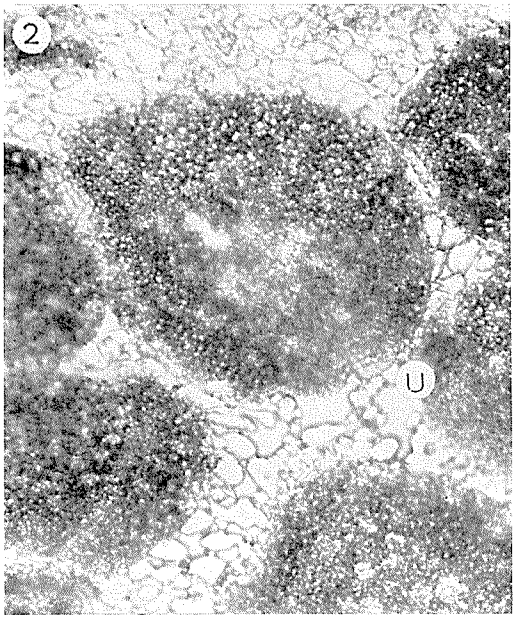
図版 IV 凍結処理 D 0.8°C/min

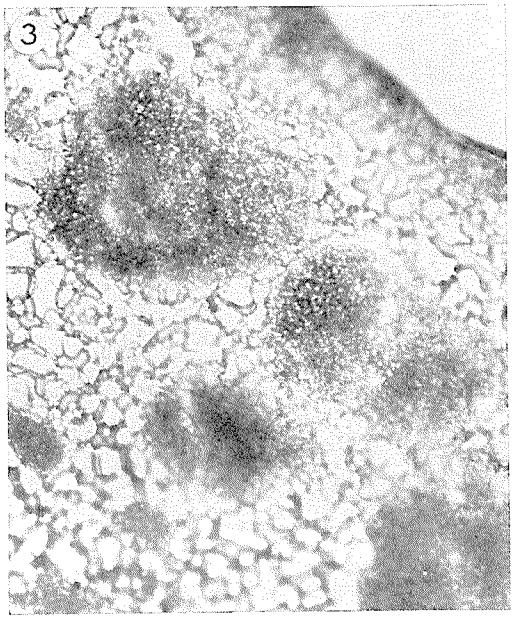
10. 中央の消化管の脊面に分布しているものと二三の大きいもの以外の大部分の内臓層脂肪細胞は細胞外凍結である。各内臓層脂肪細胞の表層に尿酸の球晶胞が黒点状に見える。体壁層脂肪細胞はすべて細胞外凍結である。×36
11. 内臓層脂肪細胞。細胞内の氷はほとんどの場合に細胞の中央部にみとめられる。
(U) は尿酸の球晶胞である。×250
12. 細胞外凍結をした体壁層脂肪細胞。×250

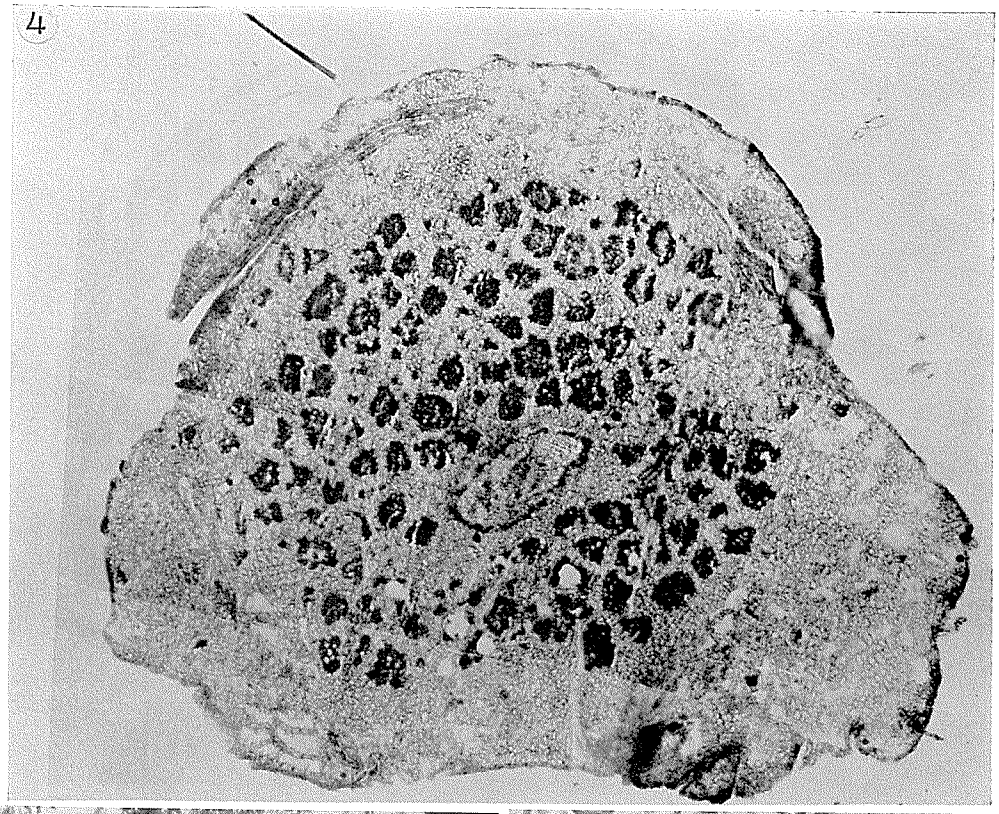
図版 V 凍結処理 E 0.4°C/min

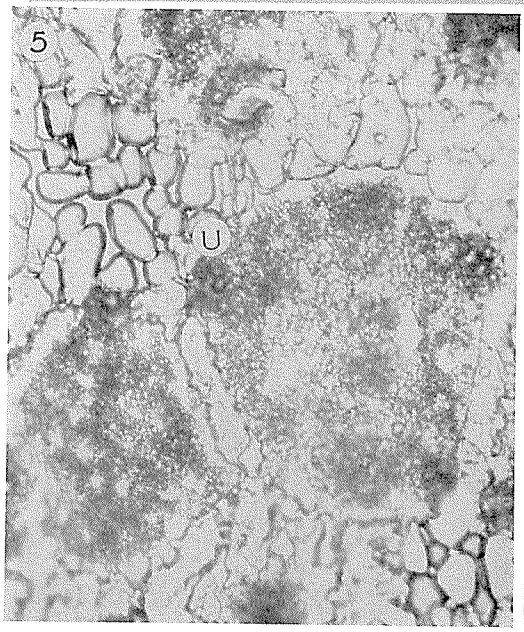
13. 腹部体節の横断面。脂脂細胞はすべて細胞外凍結である。×250
14. 内臓層脂肪細胞の細胞外凍結。
(U) は尿酸の球晶胞である。×250
15. 体壁層脂肪細胞の細胞外凍結。×250

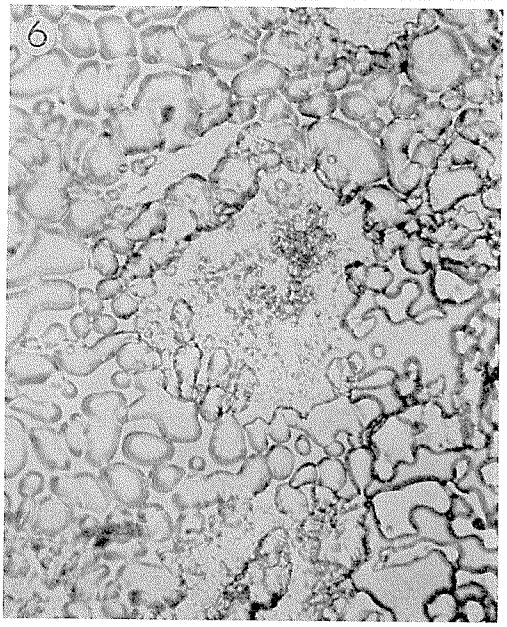

1
D
D
M
V
V
G

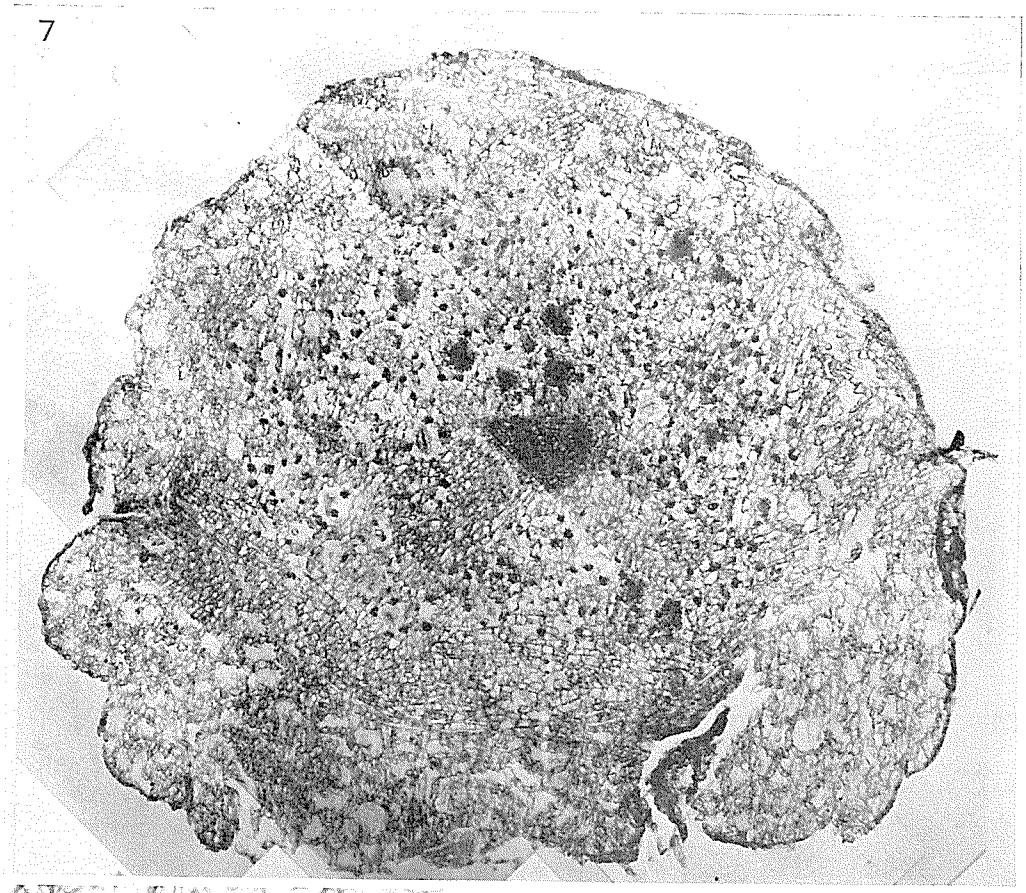

2
U

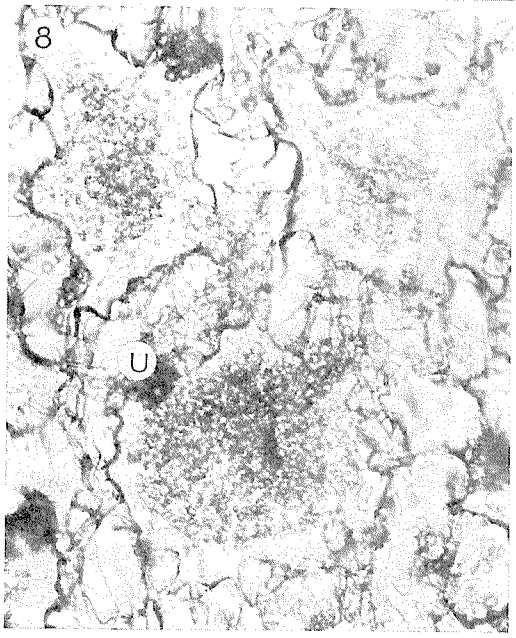

3

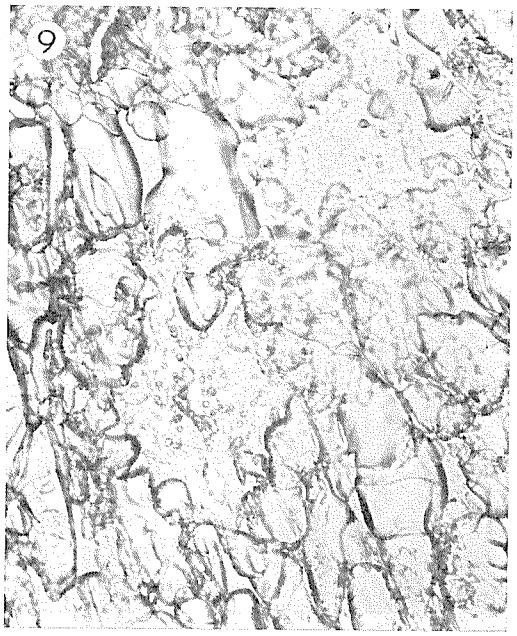

4

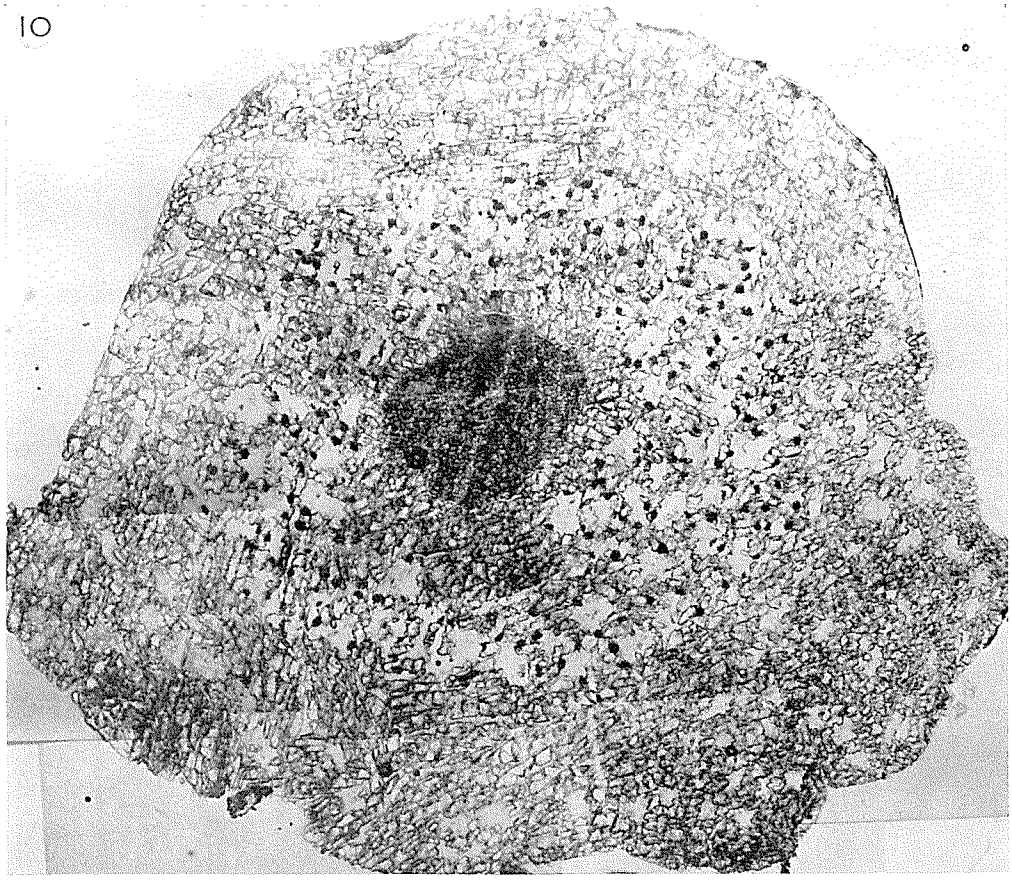

5
U

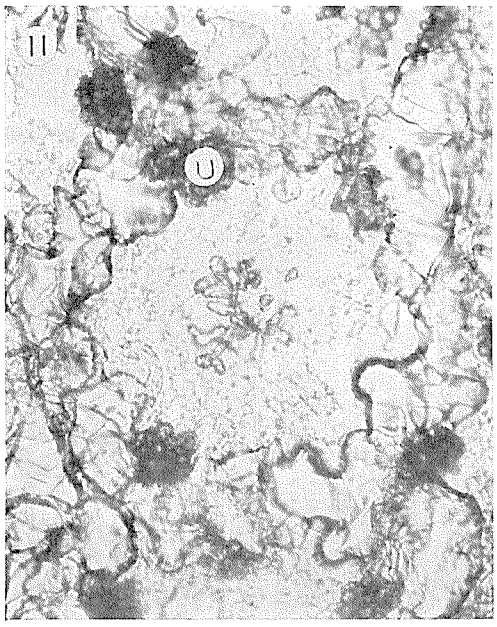

6

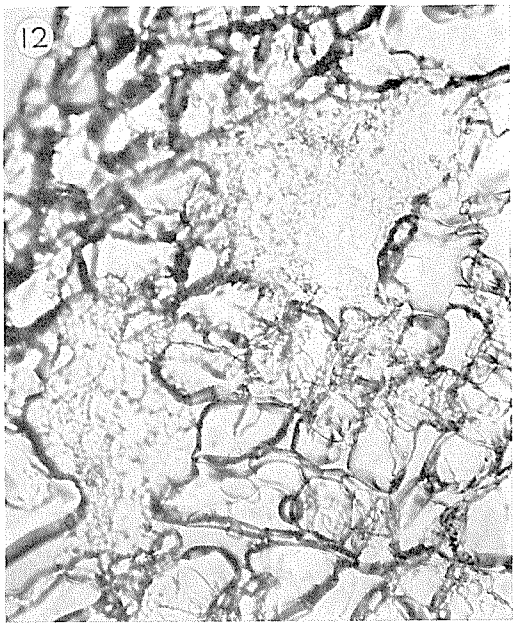

7


8
U

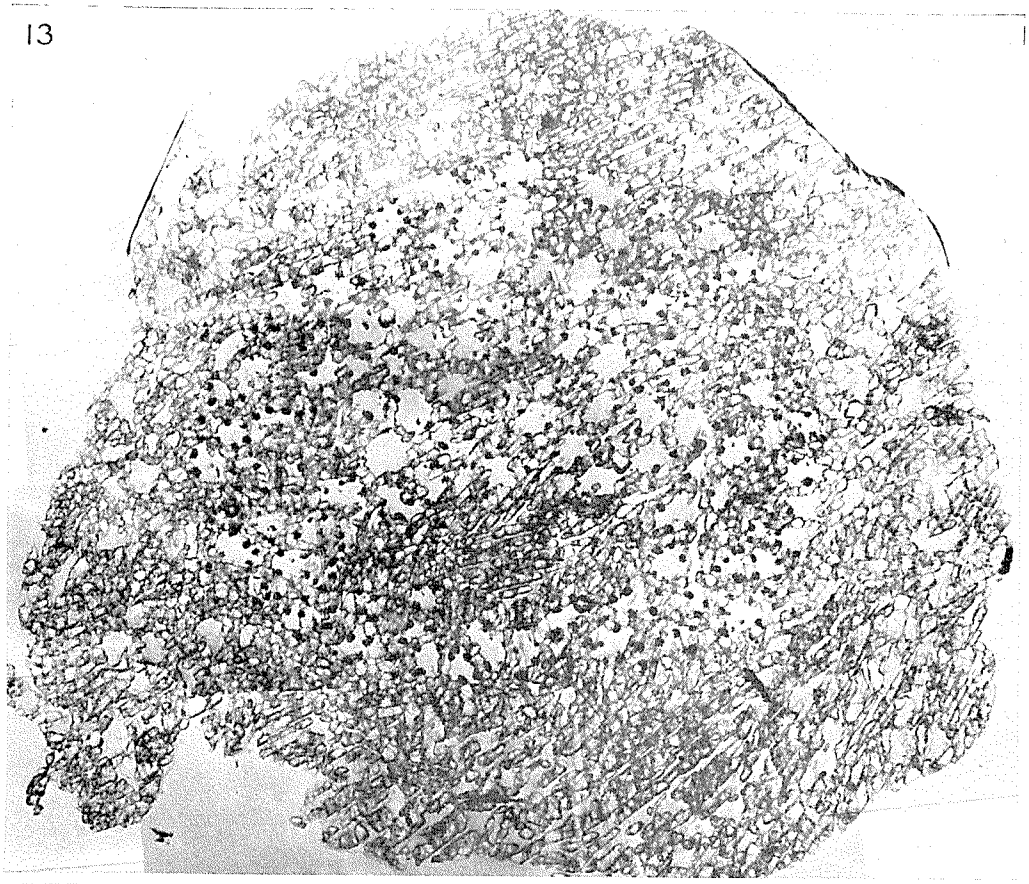

9


10

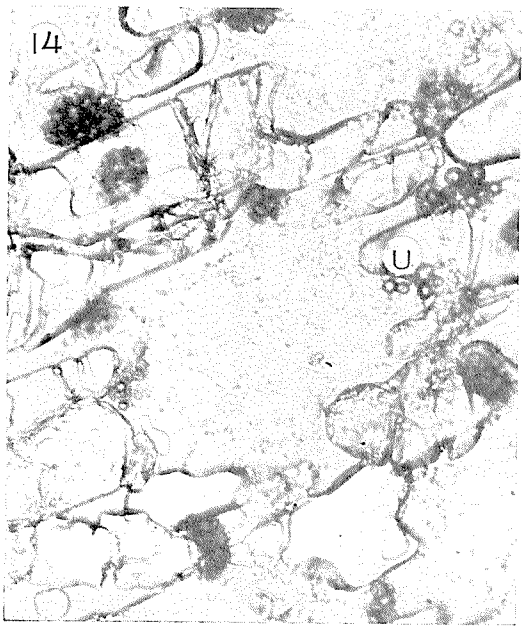

11
U


12

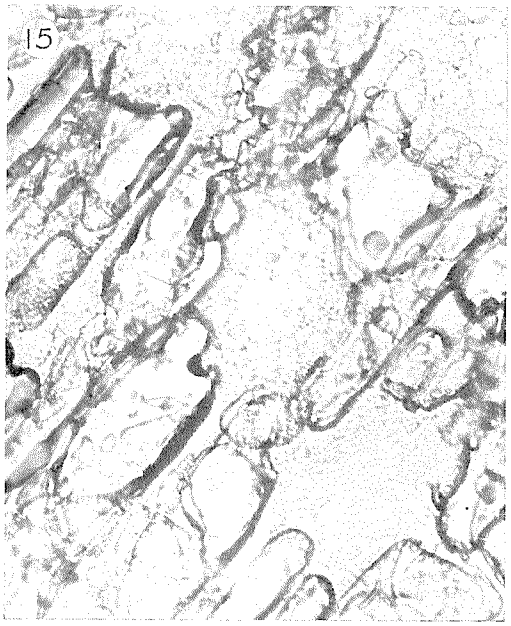
13



14



15



低温科学生物篇　第26輯　訂　正

頁	行	誤	正
英文目次	上から 5	*Aakira*	*Akira*
〃	上から 18	npon	upon
16	第3表の 7	血精	血清
17	下から 6	長瀬	永瀬
18	上から 8	血精	血清
18	上から 11	血精	血清
18	上から 12	血精	血清
27	上から 3, 4	真冬と春さきおよび……各凍結温度	真冬に 20°C で1週間 dehardening した前後および真冬と春さきに，各凍結温度……
65	上から 1	−20～−25°C	20～25°C
65	上から 3	(第2図 2)	(第1図 2)
65	下から 14	2～3°C/分	1°C/2～3分
67	上から 2	かかわらぬ	かわらぬ
67	上から 2	使っている	保っている
69	上から 18	行なわれもの	行なわれるもの
74	第2表脚註	翅	翅
78	上から 2	脊走筋	背走筋
78	下から 11	脊面	背面
78	下から 19	脊面	背面
85	下から 4	快復	回復
88	上から 8	神経感覚器管	神経感覚器官