



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ポプラハバチの耐凍性 V : -196℃での傷害
Author(s)	丹野, 皓三; TANN0, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 26, 79-84
Issue Date	1968-11-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17741
Type	departmental bulletin paper
File Information	26_p79-84.pdf



Kouzou TANNO 1968 Frost-Resistance in the Poplar Sawfly, *Trichiocampus populi* Okamoto. V. Freezing Injury at the Liquid Nitrogen Temperature. *Low Temperature Science*, Ser. B, 26. (With English Summary p. 83)

ポプラハバチの耐凍性 V*

-196°Cでの傷害

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

越冬昆虫のいくつかの種類は冬の外気温よりもはるかに低い温度である液体窒素(-196°C)の中で生存することができる¹⁾。しかしこのような低い温度で凍結した昆虫は融解後に成虫まで変態しても、羽化のさいに自力で脱皮できないために翅がのびない場合が多い^{2,3)}。

昆虫を室温から直接液体窒素中にひたすと、大部分の細胞が細胞内凍結を起こしてしまい、虫は生存できない。虫をこの低い温度で生存させるために予備凍結法⁴⁾が用いられる。これは虫体をあらかじめ-30°C程度の温度で凍結させて細胞内の水分の大部分のものを細胞外に氷結させてから液体窒素中に投入する方法である。

液体窒素の温度まで冷却したポプラハバチの前蛹にも融解後に脱皮障害がおこるが、予備凍結を非常に小さい冷却速度で行なってから液体窒素にひたした前蛹は、融解後に変態して正常な成虫になれる⁵⁾。予備凍結を非常に小さい冷却速度で行なうと、虫体内の個々の氷晶は、冷却速度が大きい場合に比べてはるかに大きくなる。

もしこの事が脱皮障害をふせぐための条件であるならば、予備凍結の段階で冷却速度によらないで別の方法で虫体内にできる氷晶を大きくさせても脱皮障害を防げるかもしれない。本実験はこの様な予測のもとに行なった。

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にある飼育室に保存しておき、1月から3月にかけて実験に用いた。

凍結の方法: 20頭の前蛹を直径9cmのペトリ皿に入れて毎分1.0°Cの冷却速度で凍結させ-20°Cまで冷却させた。冷却を始めてから2時間後に下記のA, B 2通りの予備凍結を行なった。A: -20°Cからさらに凍結温度を-30°Cまでさげて20時間凍結した。B: -20°Cから-5°Cに凍結温度を上げて、その温度に虫を18時間おいてからもう一度-30°Cまでさげて2時間凍結した。予備凍結を完了した前蛹を金網で作ったかごの中に入れて、液体窒素の中に

* 北海道大学低温科学研究所業績 第922号

ひたした。24時間たってから室温の空气中で融解した。

凍結切片： -20°C の低温室内で回転式マイクロームを用いて A 及び B の予備凍結をした前蛹から厚さ $20\ \mu$ の凍結切片を得た。 -20°C で氷飽和にした流動パラフィンをスライドガラスの上に少量とり、この上に凍結切片をのせて、カバーガラスをかけて -20°C の低温室内の顕微鏡下で観察した。又、カバーガラスをかけないで低温室内に切片を放置すると、切片の氷は昇華して、そのあとに組織がのこる。これを位相差顕微鏡を用いて観察した。凍結切片作成上のこまかい点は前に報告した⁶⁾。

融解後の観察： 凍結した前蛹を室温の空气中で融解した。融解後前蛹を直径 $9\ \text{cm}$ のペトリ皿に入れ、さらにこれを腰の高いペトリ皿の中に入れて $+20^{\circ}\text{C}$ の恒温箱に移し、その後の変態を観察した。

III. 結 果

前蛹の体内にできる氷の大きさを凍結の方法のところで述べた A, B 2つの予備凍結の場合について比較した (図版 I-1, 2)。まず B の予備凍結をした前蛹の腹部体節を観察した。前腸 (図版 I-2-F) をとりまいている多数の内臓層脂肪細胞は虫の体の中で最も大きい細胞であるが、これはすべて細胞外凍結をおこしており、又、体壁にそって分布している体壁層脂肪細胞も細胞外凍結をおこしていた。その他の細胞は脂肪細胞に比べて非常に小さい。小さい細胞ほど細胞内凍結を起こしにくいから、その他の細胞も細胞外凍結をしていたと思われる。実際に腹髄 (図版 I-2-G) の組織の内部に氷はみとめられず、従ってこの組織を構成している細胞は細胞外凍結をしていると考えられる。予備凍結 A においても脂肪細胞を含むすべての細胞は細胞外凍結をしていた (図版 I-1)。

細胞外の氷の大きさを比較すると、明らかに A より B の場合の方が大きい。又、氷の形を観察すると、A より B の場合の方がいくぶん丸みをおびておりなめらかである。B のものは、隣り合う氷の間にいくぶん隙間がみとめられるが、A のものには隙間はほとんどみとめられず氷が細胞のまわりにきっちりと詰まっている (図版 I-1, 2)。

頭部においても腹部で観察した事と同じ事が観察された (図版 II-3, 4)。頭部は放射状にのびた内転筋によってほとんど占められているが、この組織の中には氷晶がみとめられない。この事は、これと同じ切片の氷を昇華させたもの (図版 IV-7) と比較すると良くわかる。B の場合にも内転筋の内部には氷晶がみとめられず、透明に見える。内転筋の本来の形態である放射状の構造は B の場合の方がより大きな氷が組織の外側にできたために A の場合よりも乱されている (図版 IV-8)。

氷の形に方向性がもしあれば、一方向からの観察だけでは氷の大きさを推定するためには不十分なので、次に虫を縦断して観察した (図版 III-5, 6)。氷の配列に関しては、頭部に見られる様に組織にそった方向性がみとめられるが、1個の氷自身の形に関しては特に方向性はなく、その大きさは虫を横断した場合と変わりがなかった。

次に液体窒素の中に虫を投入した場合にこの A 及び B の予備凍結の違いが融解後の障害

にどのようにあらわれるかを調べた。結果を第1表に示した。A及びBの予備凍結のみで融解した前蛹は大部分のものが正常に変態した。少数のものは前蛹のまままで変態せずに約2ヵ月間生存した後に死亡した。予備凍結Aの後に液体窒素にひたした前蛹は融解後に大部分のものが成虫まで変態したが、そのうちの3分の1の個体は自力で脱皮することができないために翅がのびなかった。一方予備凍結Bの後に液体窒素に投入した前蛹はほとんどのものが正常に変態し、羽化のさい脱皮障害を起こすものはなかった。

第1表 予備凍結と液体窒素温度での障害

凍結処理	成虫まで変態したもの(%)	
	正常	脱皮不能
予備凍結 A	75	0
予備凍結 B	80	0
Aの後液体窒素	55	25
Bの後液体窒素	75	0

IV. 考 察

ポプラハバチ前蛹を2つの相異なる温度処理によって予備凍結してから液体窒素中で冷却する実験において、予備凍結の段階でつくられる虫体内の水をより大きくしたもののほうが、なぜひき続き液体窒素の温度で冷却した場合に融解後の羽化の時に脱皮障害を起こさないのか。この点について考察した。まず予備凍結の温度が高いほど次に液体窒素の温度で虫を冷却させる場合に細胞内凍結を起こし易いために、虫はより傷害を受けると考えられる。A及びBの予備凍結温度は同じ-30°Cであったから脱皮障害のあらわれ方の差をこの点に求めるわけにはいかない。又、予備凍結の段階ですぐ融解したものはA及びBともに害を受けたものはなかったから、予備凍結の段階での何らかの傷害を想定することも不合理である。

大部分の凍結しやすい水分を予備凍結の段階で凍結させたあと液体窒素の中に虫を入れると、急速かつ大きな温度降下による虫体の熱収縮のために虫体内部に大きな力が生ずるのであろう。実際に北米産のセクロピア蚕の蛹ぐらい大きい虫では、内部に生じたこの大きな力によるひずみに耐えられずにガラス製の器の様にこわれてしまう場合がある⁷⁾。凍結した虫の体内は、氷と細胞外凍結により収縮した細胞及びこれ等を取りまいて少量の濃縮した体液で満たされている。この様な状態のもとで熱収縮による力が虫に作用すると、物質の違いによる熱収縮率の違いや虫体の部位による収縮の時間的ずれ等のために、虫体内には大きなひずみが生ずるのであろう。このひずみがある限界を越えたために急速に解消される過程で、場所によってある組織はちょうど2枚のガラス板にはさまれてすり合わされる様な力をまわりの氷から受けるであろう。大部分の組織は多数の非常に小さな細胞の集まりであるから、組織としてこの様な力を受けても、それを構成する細胞どうしが互いにわずかずつ相対的位置を変えることにより、ひずみを解消してしまい、細胞はほとんど傷害を受けないであろう。これに反して脂肪細胞はまわりをとりかこんでいる氷粒よりも数倍も大きいから、まわりの氷粒の作用力からのがれる事はできず、その力をまともに受けるであろう。-30°C以下の温度では脂肪細胞は細胞外凍結をして大部分の水を失って、かたくなっていると思われるので、細胞に変形を与える力にもろく破壊されやすいであろう。

このような細胞を破壊する力はひずみが解消する時に生ずる力であるから、それはひずみの大きさに比例する。もし -196°C の終末温度に虫の体温が達する過程でひずみの大きさがある程度以上にならないうちに段階的に解消されれば、細胞は破壊されないであろう。ひずみの解消は虫体の変形、つまり虫体の大半を占める水の移動によってなされる。従って -30°C から -196°C に達する過程で、虫体内部の氷晶がよりなめらかに移動しやすいほどひずみは蓄積されにくく、細胞は傷害を受けにくいであろう。

氷晶の移動のしやすさは、その形、となり合う氷晶の数及びその相対距離等に関係する。これらの点でA及びBの予備凍結の状態を比較すると、Bの方がAよりも虫体内の氷晶は移動しやすいと思われる。氷晶の形はBの方がAの場合よりも丸みをおびているから移動する時に抵抗が少ないであろうし、となり合う氷晶の数もBの方が非常に少ないからまわりの氷晶から束縛をより受けないであろう。又、氷晶の間を満たしている濃縮した体液は水の移動のさいに潤滑油の様な性質と移動をゆるす場所を提供するから、その量も問題になる。A及びBの予備凍結の終末温度は同じであるから、濃縮した体液の量は変わりがないが、小さな氷晶が形成されるほど全体の氷晶の総表面積が大きくなり、濃縮した体液はこの表面全体により薄層状に分散されてしまう。実際に氷晶間に濃縮した体液と思われる隙間がBの場合に観察される。この点においてもBの方がAよりも水の移動が起きやすいことがわかる。

虫の体温が -30°C から -196°C に達する過程を非常にゆっくりと行なうと、虫体の部位の違いによる熱収縮の時間的なずれは充分小さくすることができから前蛹は傷害をより受けにくくなる。たしかに -30°C から直接液体窒素の中に前蛹を投入する場合よりも -30°C から一度 -70°C までさげて、この温度にある時間おいてから液体窒素にひたした場合の方が融解後の脱皮傷害を防ぐのにわずかであるが有効である⁵⁾。しかしその脱皮傷害を防ぐ効果は予備凍結Bの場合に比べて非常に小さい。この効果が小さい理由は次の様に考えられる。この方法が虫体の部位の違いによる熱収縮の時間的なずれを小さくすることはできても、虫体内部の物質の違いによる収縮率の差のために生ずる力を防ぐことはできない。

ポプラハバチの前蛹を比較的急速に凍結させることにより、17パーセントほどの内臓層脂肪細胞に細胞内凍結をさせて傷害を与えると、融解後の成虫化のさいに脱皮障害が起こる⁸⁾。この事実は本報でのべた脱皮障害も脂肪細胞の傷害により起こされた可能性を示している。

終りに御校閲くださった朝比奈教授に感謝する。

V. 摘 要

ポプラハバチの前蛹を毎分約 1°C の冷却速度で凍結し -30°C まで冷却したのち、液体窒素にひたすと、融解後前蛹は成虫まで変態するが自力で脱皮できないために翅がのびない。 -30°C の予備凍結の段階で虫を -5°C まで一度あげて数時間おいてからもう一度 -30°C までさげてやり、それから液体窒素にひたすと脱皮障害は起きなかった。

この脱皮障害の機構を虫体内の氷晶の大きさと関連させて考察した。

文 献

- 1) Asahina, É. 1966 Freezing and frost-resistance in insects. *In* Cryobiology (H. T. Meryman *ed.*), Academic Press, London, 451-484.
- 2) Asahina, É. 1959 Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. *Nature*, **184**, 1003-1004.
- 3) 朝比奈英三 1964 イラガ前蛹の耐凍性 補遺 I. 低温科学, 生物篇, **22**, 79-90.
- 4) 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.
- 5) Tanno, K. 1967 Freezing injury in fat-body cells of the poplar sawfly. *In* Cellular injury and resistance in freezing organisms (É. Asahina *ed.*) Press, Sapporo Japan, *Proc. International Conf. Low Temp. Sci.*, Vol. **2**, 245-257.
- 6) 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.
- 7) 朝比奈英三・丹野皓三 1965 セクロピア蚕休眠蛹の耐凍性 I. 低温科学, 生物篇, **23**, 71-76.
- 8) 丹野皓三 1968 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. 低温科学, 生物篇, **26**, 71-78.
- 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.

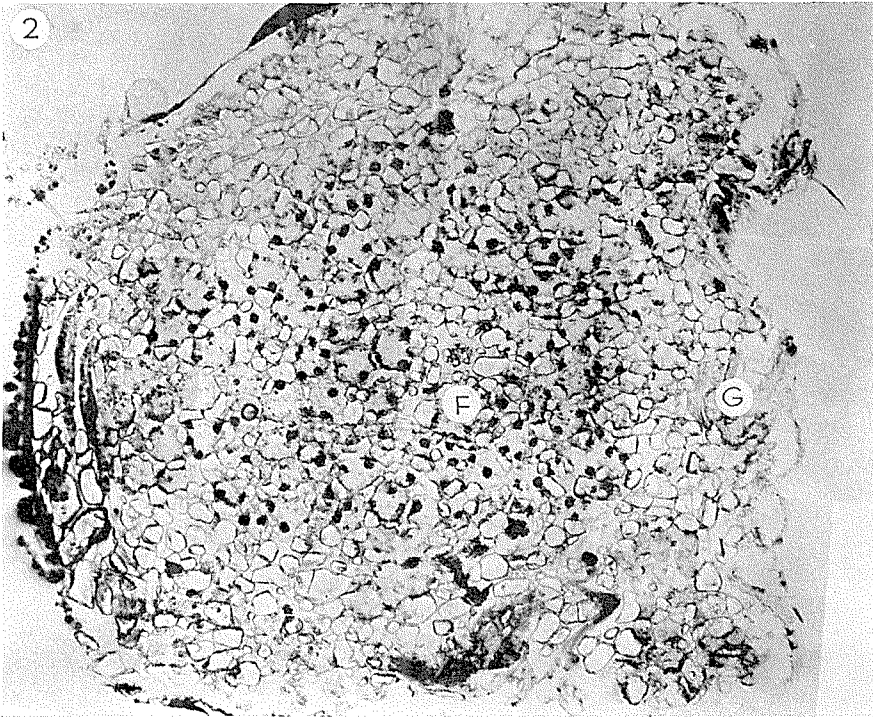
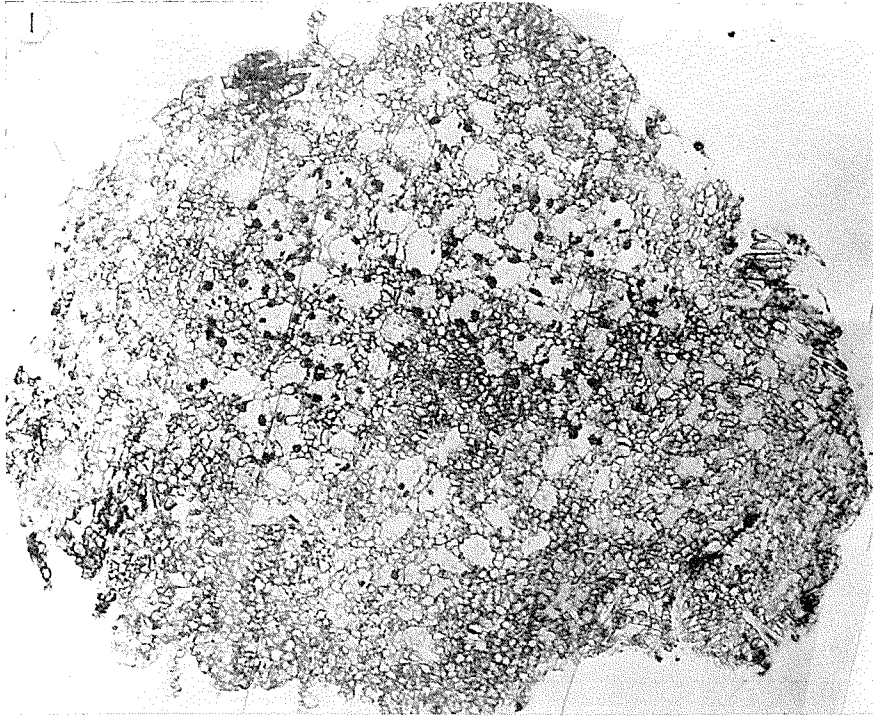
Summary

The prepupae of Japanese poplar sawfly can survive liquid nitrogen temperature after prefreezing at -30°C with a cooling rate of about 1°C per minute. After rewarming from the super-low temperature, they can resume development. Upon emergence, however, they cannot shed their pupal skins and fail to appear on the wing. Such freezing injury can be prevented by the following procedure. The prepupae, previously subjected to pre-treatment at -20°C with a cooling rate of about 1°C per minute, were warmed to -5°C and kept at the same temperature for several hours. These were then cooled down to -30°C with a cooling rate of 1°C per minute, and finally immersed in liquid nitrogen.

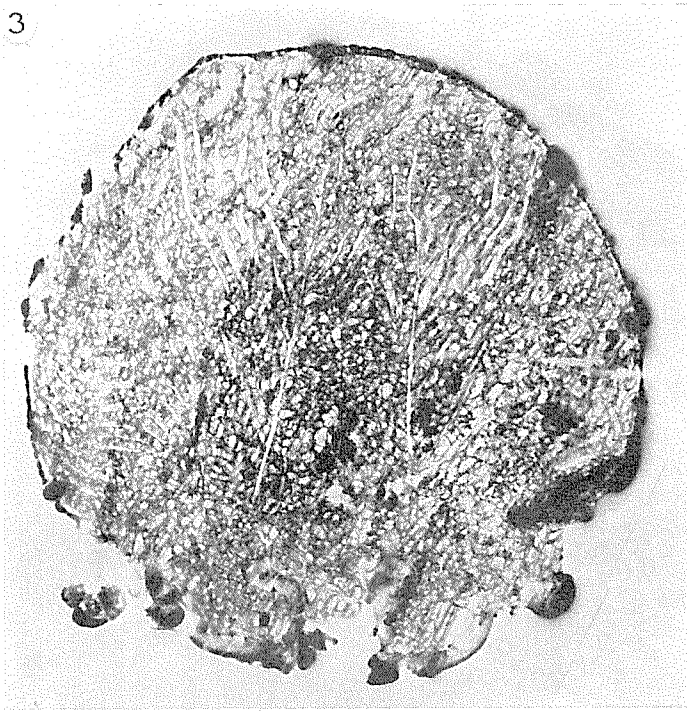
The mechanisms of such injury were discussed in relation to the size of ice crystals forming within the frozen prepupal body in the prefreezing process.

図 版 説 明

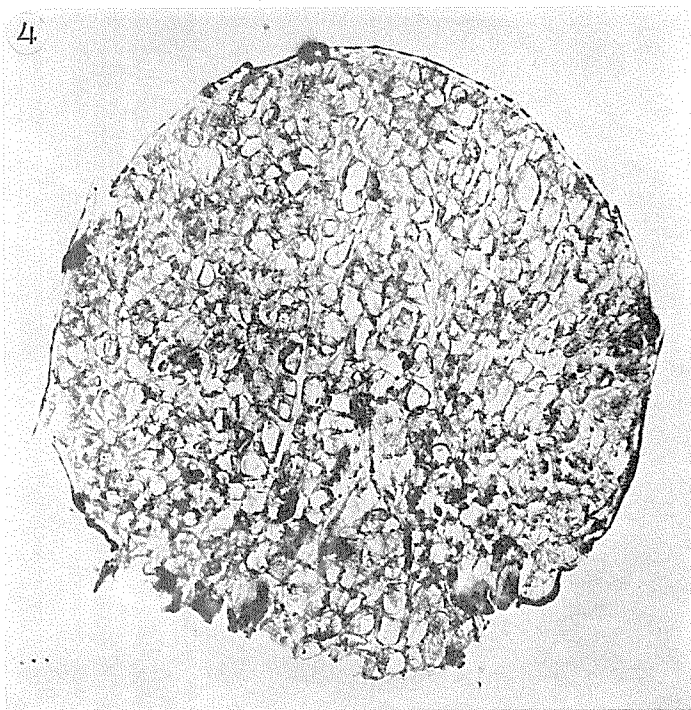
- 図版 I** 腹部体節の横断面 1: 予備凍結 A 2: 予備凍結 B
 虫体内部の氷粒は1より2の方が大きい。前腸(F)をとりかこんでいる内臓層脂肪細胞はすべて細胞外凍結をしており、その各々の細胞の表面に尿酸の球晶胞⁹⁾が黒点状に見える。体壁にそって分布している体壁層脂肪細胞はこの球晶胞を持っていないが、この脂肪細胞もすべて1及び2の場合とも細胞外凍結である。腹髄(G)の内部には氷晶はみとめられない。×36
- 図版 II** 頭部の横断面 3: 予備凍結 A 4: 予備凍結 B
 頭部においても氷粒は3より4の方が大きい。放射状に分布している内転筋の内部には氷晶はみとめられない。×36
- 図版 III** 頭胸部の縦断面 5: 予備凍結 A 6: 予備凍結 B
 虫体内部の氷粒はやはり5よりも6の方が大きい。内転筋にそった氷の配列がみとめられるが、氷粒自身の大きさ及び形には方向性はない。×36
- 図版 IV** 頭部の横断面と頭胸部の縦断面 7: 予備凍結 A 8: 予備凍結 B
 凍結切片の氷を昇華させたあとに残った組織を位相差顕微鏡で観察した。7は図版II-3と同じ切片であり、8は図版III-6と同じものである。P, 体壁層脂肪細胞; V, 内臓層脂肪細胞; M, 内転筋。×36

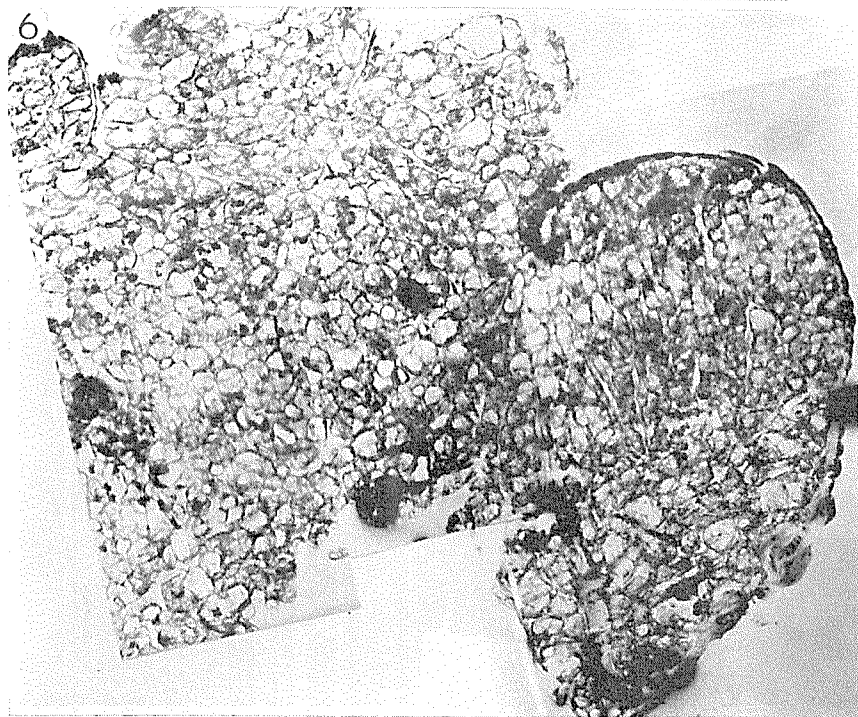
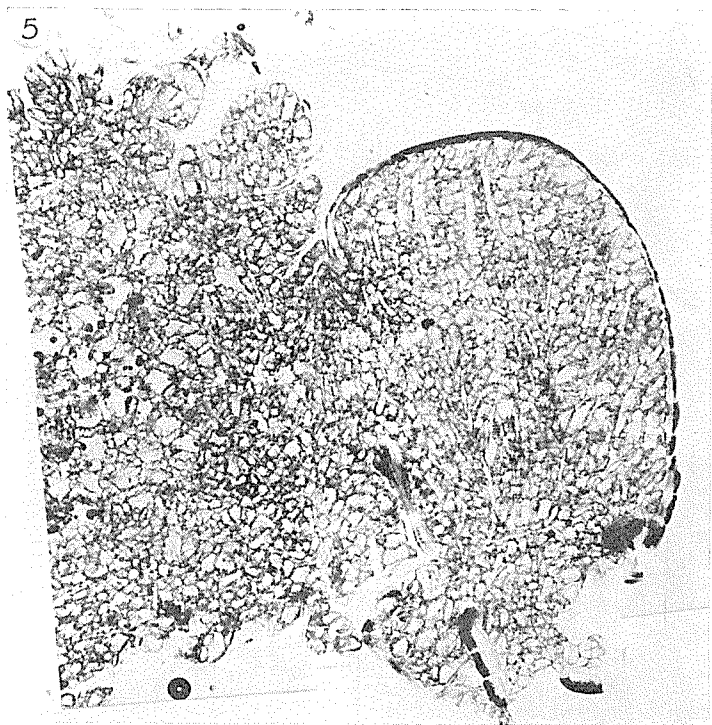


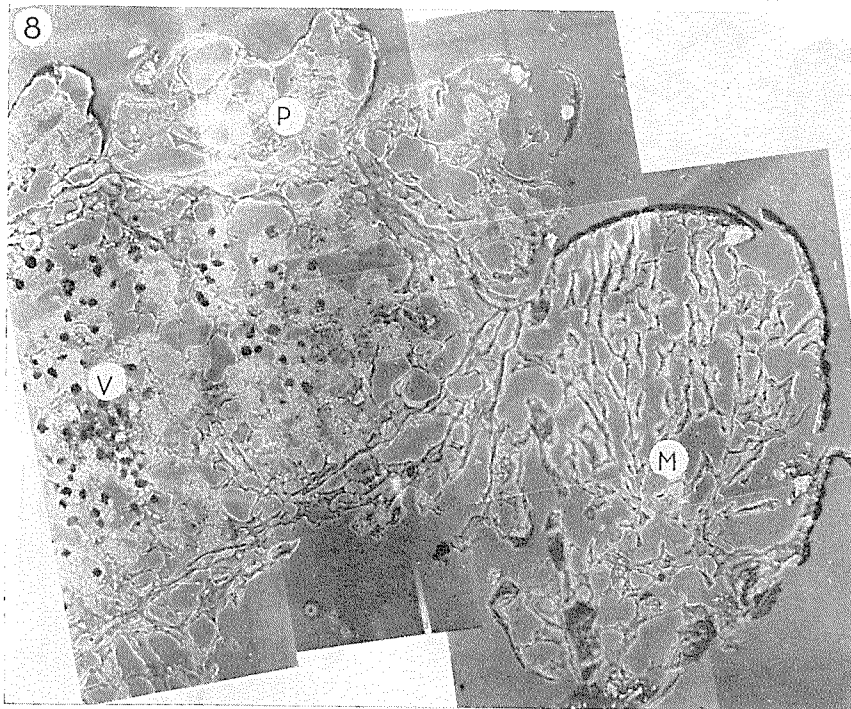
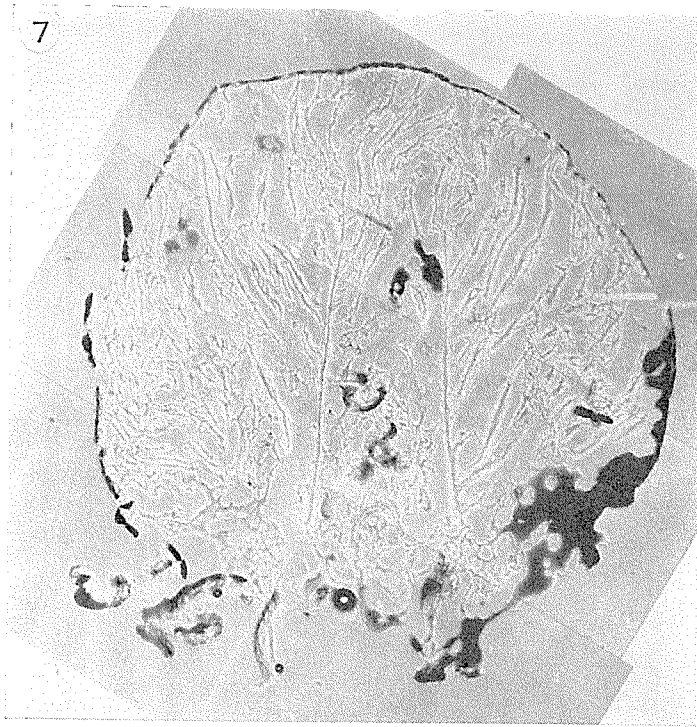
3



4







低温科学生物篇 第26輯 訂正

頁	行	誤	正
英文目次	上から 5	<i>Aakira</i>	<i>Akira</i>
"	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	神経感覺器管	神経感覺器官