



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エゾシロチョウの耐凍性 I
Author(s)	朝比奈, 英三; 大山, 佳邦; 高橋, 恒夫
Citation	低温科学. 生物篇, 30, 91-98
Issue Date	1972-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17800
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p91-98.pdf



エゾシロチョウの耐凍性 I*

朝比奈英三・大山佳邦

(低温科学研究所)

高橋恒夫

(北海道大学大学院理学研究科)

(昭和 47 年 8 月受理)

I. 緒 言

越冬昆虫の中で鱗翅類の幼虫や蛹には高い耐凍性をもつものが稀ではなく、予備凍結法¹⁾を利用して液体ガス温度までの冷却後生存が証明されたものもしばしばある²⁾。我国では北海道のみに分布するエゾシロチョウの越冬幼虫もその例の一つであって、すでに液体酸素中で凍結させても生存できることを報告した³⁾。しかし前回の実験では、恐らく凍結融解後の幼虫の飼養の不手際のため、幼虫の生長は五齢までに限られ、遂に蛹化させることができなかった。

これらの高度の耐凍性をもつ越冬昆虫でも、一旦液体ガス温度まで冷却されると、融解後完全な成虫にまで変態させることは甚だ難かしく、ポプラハバチを除いては未だ正常に羽化した例は知られていない^{2,4)}。丹野はポプラハバチの越冬前蛹を特別な四段凍結処理を行なうことにより、使用個体の大多数を液体窒素中で凍結後完全に羽化させることに成功した⁵⁾。また従来超低温での凍結生存が知られた越冬昆虫はすべて蛹か前蛹のステージのものであって、いわば成虫への変態直前のものばかりであった。われわれはまだ三齢幼虫にすぎない、つまり凍結融解後においてさらに器官形成のポテンシャルの高い三齢の越冬幼虫を材料として、超低温での耐凍性とくに凍結融解後の変態能力をしらべることは、上記の諸問題の解明に興味ある手がかりをあたえるであろうと考えこの実験を行なった。

II. 材料と方法

材料：エゾシロチョウは札幌市では毎年6月から7月にかけてボケ、リンゴ等に産卵する。孵化した幼虫は生長脱皮を重ね三齢に達して越冬する。このとき幼虫達は食草の葉を小枝のまわりに数枚つづり合わせた越冬巣を作り、その中に1匹づつ入る多数の小室を吐糸で作し、一つの越冬巣内に100~300もの個体が入っている。使用した材料は1971年秋に札幌市でボケの枝に作られた越冬巣より得たものである。越冬中の幼虫は体長ほぼ3mm、体重は2mg内外あり、常温では活発に体を動かすことができる(第1図)。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1203号

方法：1971年12月1日にボケの樹上のほぼ同じ場所に作られている3ヶの越冬巣を実験室に運び、これを翌年1月20日まで -5°C の恒温箱に保存した。毎回実験に当って越冬巣を開いて幼虫を一つずつ取出し、一部は秤量してグリセリン含量の定量を行ない、一部は凍結実験に使用した。

幼虫を大体10個体ずつガーゼに包んでまず -30°C の低温室内で冷却した。幼虫は -30°C の空气中で30分以内に凍結する。凍ったことを確かめた幼虫をガーゼに包んだまま低温室内で金網で作った長さ約50 mm、直径約17 mmの円筒形の容器に入れ、その容器ごとにそれぞれ後述する方法で予備凍結を行なった。予備凍結後液体窒素中に静かに容器ごと沈め、1時間後にとり出して -30°C の低温室に更に1時間おいてから常温の空气中で融解させた。幼虫の飼養にはすべて濾紙を敷いたペトリ皿を用い、食草としてボケの葉をあたえた。

過冷却点の測定は前報⁶⁾と同じ方法で1個体ごとに凍結曲線を取りこれから求めた。使用個体数は僅かであったが過冷却点は予想外に安定していた。グリセリン含量の測定には、幼虫10個体に80%エタノールを加えてすりつぶし、この抽出物をペーパークロマトグラフにかけてグリセリンを単離し、クロモトロピック酸試薬で発色、比色定量した⁷⁾。

III. 結 果

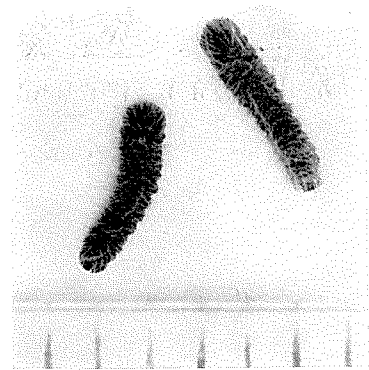
グリセリン含量と過冷却点

幼虫のグリセリン含量は12月下旬には1.5%にすぎないが、1カ月後には5.5%に達した。いっぽう12月下旬に幼虫の過冷却点は -12.6°C 付近にあり、1カ月後には -13.3°C 内外を示した(第I表)。この時季における札幌の日最低気温はこれらの冷却点よりしばしば下がるので、幼虫は越冬中に凍結融解をくりかえしているものと思われる。越冬幼虫の凍結曲線上には

第I表 越冬幼虫のグリセリン含量と過冷却点

年 月 日	グリセリン mg/g 生体重	過冷却点 $^{\circ}\text{C}$
1071, 12.23	15.4	
12.27		-12.6 ± 1.1
1972, 1.17	55.1	
1.22		-13.3 ± 1.0

温度での凍結を行なった(第II表)。予備凍結温度は前回の実験と同じ -30°C とし、対照は -30°C で3時間凍結させた。これは液体窒素凍結の実験群と総凍結時間を等しくさせたのである。



第1図 エゾシロチョウ3齢幼虫
食草をとり始めた時期で越冬中より
いくらか大きくなっている。
スケールは1 mm

只一つの過冷却点しか現われていないので、上記の過冷却点の差は幼虫の体内をみたす血液の濃度の差、おそらくはこの期間に変化したグリセリン濃度の差によるものであろう。

耐 凍 性

実験I. 幼虫の耐凍性が充分高まったと思われる1月の材料を用いて、まず液体窒素

第 II 表 越冬幼虫の耐凍性 I

1972, I. 20

実 験 群	対 照	L.N. 凍 結
使 用 個 体 数	10	10
凍 結 法*	-30°C (3 h)	-30°C (1 h) →L.N. (1 h)
加 温 法	→室 温	→-30°C (1 h)→室温
融解後生存個体数	10	10
蛹 化 個 体 数	3	5
羽 化 個 体 数	2	3

* L.N.: 液体窒素, (h): 凍結時間

凍結融解された幼虫は、いづれも生きていたが、この時季に食草の用意がなかったため、約4カ月間0°Cに保存し、5月9日より室温に戻して食草(ボケの葉)をあたえた。このためか幼虫の摂食が不十分で、生長及び脱皮が非常におくれ、蛹化できたものは30%に過ぎなかった。この事実は対照の個体群でも全く同様であったから、生長のおくれが超低温凍結に由来するものでないことは明らかである。しかし羽化できた蝶はほとんどが正常な個体であった。

実験 II. 実験 I の幼虫に食草をあたえ始めた時点で、幼虫の状態が正常な越冬幼虫に比べて劣っているようにみえたので、5月10日再度凍結実験を行なった。凍結法は実験 I と全く同じ方法(第 III 表の B)と、丹野の四段凍結法⁵⁾の変法(第 III 表の A)を試みた。材料は前回使用した残りの幼虫を越冬巣に入れたまま1月20日より5月10日まで-10°Cに保存しておいたものである。このとき実験 I の材料と幼虫の性質が全く同じであったか何うかは明らかでないが、1月20日頃は虫体の耐凍性もグリセリンの蓄積も最高に達し最も安定している時期と考えられるので、これを-10°Cで約4カ月保存してもその性質の変化はきわめて少ないであろう。

実験群 A はまず幼虫を-30°Cで5時間凍らせてから一旦-15°Cの室に移して15時間おき、再びこれを-30°Cに移して1時間後液体窒素中に沈めた。このときの対照群は、-30°C

第 III 表 越冬幼虫の耐凍性 II

1972, V. 11

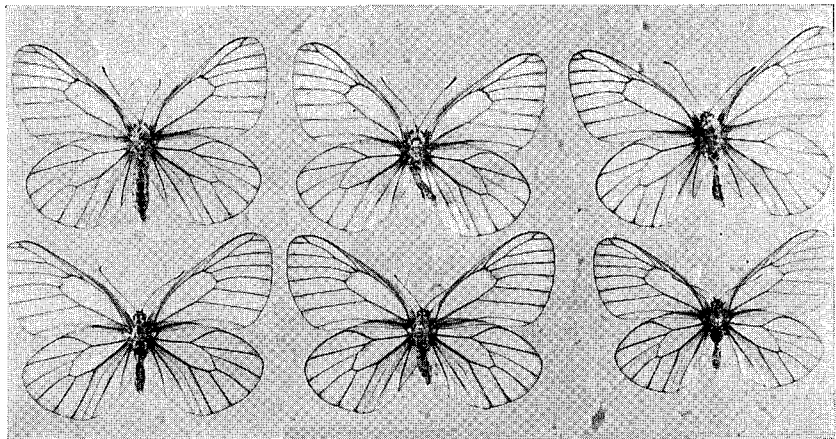
実 験 群	対 照	A	B
使 用 個 体 数 (a)	10	14	11
凍 結 法*	-30°C (23 h)	-30°C (5 h)→-15°C (15 h) →-30°C (1 h)→L.N. (1 h)	-30°C (1 h) →L.N. (1 h)
加 温 法	→室 温	→-30°C (1 h)→室温	→-30°C (1 h)→室温
融解後生存個体数	10	14	9
蛹 化 個 体 数 (b)	10	11	7
b/a×100	100	78	63
羽 化 個 体 数 (c)	10	9	6
c/a×100	100	64	54

* (h) は凍結時間, L.N. は液体窒素

の予備凍結温度において、実験群 A の全凍結時間と等しい 23 時間を経過させたものである。

第 III 表に示された結果からみると、実験群 A は B に比べて融解直後の生存率がいくらか良いようであるが、羽化率を比べると大差がない。A 群の幼虫の成長を観察するとすべて正常に 2 回脱皮したが、そのうちの 3 個体は 20 日乃至 30 日間五齢幼虫のまま過し、遂に蛹化せずに死んだ。蛹化した 11 個体のうち 2 個体は蛹殻内で成虫となったが、脱皮不能で羽化できなかった。いっぽう実験群 B では融解直後生きていた 9 個の三齢幼虫のうち 2 個体は脱皮することなく 2 週間後に死んだ。蛹化した 7 個体のうち 1 個体は脱皮できなかった。しかし A、B いずれの場合も脱皮できずに死んだ蛹は、蛹殻の内部では成虫体ができ上っており、アゲハ類の蛹を凍結させたときにしばしば生ずる半成虫^{1,8)}は観察されなかった。羽化した成虫は翅の伸長が不十分であつたごく少数を除いては、雌雄とも形態的に全く異常のないエゾシロチョウであつた(第 2 図)。

これらの結果からエゾシロチョウの越冬幼虫では、従来の 2 段凍結法によって液体窒素温度まで冷却されても正常な成虫に変態できるものが少くないことがわかった。



第 2 図 凍結融解された越冬幼虫より羽化したエゾシロチョウ (上 3 下 3)

- 左 列: -30°C (23 時間) 凍結 [対照]
 中央列: -30°C (1 時間) $\rightarrow$ 液体窒素 (1 時間) $\rightarrow -30^{\circ}\text{C}$ (1 時間)
 [実験 II の B]
 右 列: -30°C (5 時間) $\rightarrow -15^{\circ}\text{C}$ (15 時間) $\rightarrow -30^{\circ}\text{C}$ (1 時間) $\rightarrow$
 液体窒素 (1 時間) $\rightarrow -30^{\circ}\text{C}$ (1 時間) [実験 II の A]

実験 III. エゾシロチョウ 3 齢幼虫が越冬を終って春季に活動を開始し、新しく食草を食べはじめたとき、その耐凍性がどのように変化するかをしらべる目的で次のような二つの実験を行なった(第 IV 表)。材料はこれまでの実験と同じ群の幼虫で越冬巣ごと 1972 年 1 月 20 日より -10°C の冷凍庫中に保存しておいたものである。

多数の幼虫の入った越冬巣の一つを 5 月 15 日に冷凍庫より室温に移し、これにボケのわか葉としめた濾紙をあてえた。3 日間の飼養の後このうち 10 個体の幼虫を使って 5 月 18 日に凍結実験を行ない、同時に別の 10 個体をすりつぶしてグリセリン含量を測った(実験群 C)。実験時において幼虫はまだほとんど食草をたべていなかったが、少なくとも水分はとったらし

く越冬中2 mg 内外であった体重は4.3 mg (10 個体平均) に増量していた。このとき、グリセリン含量は生体重の0.2% 位に減っており、幼虫の大部分は -10°C の冷凍箱内で3時間以内に自発凍結した。しかしこれらの幼虫は -10°C での凍結には耐えることができ、融解後室温にて食草をとり、正常に脱皮蛹化し成虫まで変態を完了したものが多かった(第IV表)。

実験C群をとったと同じ幼虫群の中から、更に7日間の飼養の後に材料をとり前回と同様な実験を行なった

(実験群D)。幼虫は10日間の給餌中明らかにボケの葉を食べ、体重も越冬中の3倍以上に増加したが、まだ脱皮せず3齢幼虫のままであった。1個体当りのグリセリン量は体重の増加からみてほとんど変化していないように見える。しかしこの7日間の生長の間に幼虫の耐凍性は急速に失われ、 -10°C ではすべての幼虫が2時間以内に自発凍結をおこし、 -10°C 1日の凍結によって例外なく凍死した。

第IV表 越冬を終った幼虫の耐凍性

1972, V.

実験群	C	D
給餌日数	3	10
実験月日	V. 18	V. 26
使用個体数	10	10
平均体重* mg	4.3	6.8
グリセリン* mg/g	2.69	1.76
凍結法	-10°C (1日)	-10°C (1日)
融解後生存個体数	10	0
蛹化個体数	7	—
羽化個体数	7	—

* 10 個体平均

IV. 考 察

液体ガス中での -200°C 近い超低温凍結に耐える蝶蛾類の幼生は今まで知られただけでも、イラガ³⁾、アワノメイガ⁹⁾、キアゲハ¹⁾、セクロピア蚕¹⁰⁾等があるが、これらの何れの場合も完全な成虫としては羽化した例はない。その多くは成虫の構造および機能の不全による脱皮不能であり、キアゲハでは成虫への変態が前半身のみに限られた半成虫の形成が報告されている¹⁾。これらの昆虫は何れも -30°C 付近の温度の空气中で予備凍結されており、細胞外凍結状態で超低温まで冷却されたものと考えられる。この場合 -30°C 付近での予備凍結だけでは何等の障害も昆虫におこっていないので、虫体が細胞外凍結のまま超低温まで冷される過程で、または超低温より -30°C まで加温される過程で何等かの害作用が働くものと思われる。丹野はポプラハバチの前蛹にも同様な障害がおこるが、予備凍結のときの冷却速度をゆっくりさせると(約 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$)その後の超低温凍結による害を軽減できることを知り¹¹⁾、この様な害の主因を液体窒素中に虫が投入された時におこる、虫体の各部における、または構成物質の差による、熱収縮の差にもとづくものと考えた⁵⁾。そして予備凍結法として $-20^{\circ}\text{C} \rightarrow -5^{\circ}\text{C}$ (18時間) $\rightarrow -30^{\circ}\text{C}$ (2時間)の三段凍結を行なってから液体窒素中に移す方法により、使用したポプラハバチ前蛹の75%を正常に羽化させることに成功した⁵⁾。彼はポプラハバチ前蛹の脂肪体は二種類の脂肪細胞よりなり、その一つ体壁層脂肪細胞は前蛹期から蛹化までの間に除々に消費され、他の一つ内臓層脂肪細胞は、前蛹期にも使用されるが、特に蛹から成虫形成の期間に著しく消費されることを明らかにした¹¹⁾。これらの事実から彼は超低温凍結がポプラハバチにあ

たえる障害について、前蛹を作っている細胞のうち大形の細胞である脂肪細胞、特に最大の内臓層脂肪細胞（球形、直径 $200\sim 250\mu$ ）が、細胞外凍結のままそのまわりにできた氷晶とともに超低温まで急速に冷されるとき虫体の熱収縮にもとづく害をもっとも受けやすく、この結果として成虫形成が充分に行なわれないことが原因であろうと結論している¹²⁾。彼の用いた三段の予備凍結法、すなわち凍結中に一旦温度を高めることにより、最初細胞外凍結がおこった後虫体内にできた多数の細かい氷晶は、外面の平滑な球に近い少数の、大形の氷粒にかかわることが観察されている。これが急速な冷却時における虫体の熱収縮により細胞にあたえられる歪みを氷粒の位置の移動によって短時間に解消するのに役立つと丹野は考えている¹²⁾。

もしもエゾシロチョウの場合に、ポプラハバチの例が当てはまるとすれば、 -30°C のみの予備凍結後超低温冷却した個体群（実験 II の B）の羽化率と、予備凍結中に体内の氷晶を大形化させるため一旦 -15°C まで温度を高めた個体群（実験 II の A）の羽化率との差は相当に大きいことが期待される。しかし第 III 表に明らかなように、この両者の間には、融解直後の生存率には若干の差が認められるものの、完全に羽化した成虫の割合はごく近いものであった。このような結果に対する一つの可能な解釈として次のようなことが挙げられる。

ポプラハバチをはじめ、従来超低温生存に成功した昆虫類は、乾燥状態で冷却されたユスリカ幼虫の例¹³⁾を除けば、すべてが前蛹または蛹のステージのものであった。従って超低温凍結により致命的には至らない何等かの害を受けた場合には、融解後直ちに虫体内で行なわれる変態の際障害として形態の上にあらわれ易い。いっぽうエゾシロチョウのように三齢の幼虫期に超低温凍結された場合は、凍結により組織細胞のいづれかに害を受けたとしても、融解後栄養をとり、五齢まで脱皮を重ねて生長してゆく過程において、正常な器官形成を行なうに足るだけの充分な物質の供給と、崩壊した細胞の成分を他の細胞にとりこんで再構成するための時間的余裕がある。また虫体がごく小さい（体重 2 mg ）ため、凍結の過程で虫体内の場所による冷却速度の差が少なく、熱収縮の差が比較的小さくてすむことも考えられる。

越冬を終った幼虫は食草を食べて生長をはじめると急速に耐凍性を失うと言われている。エゾシロチョウの越冬幼虫の場合は給餌 3 日後体重が 2 倍に増加した時期に虫体のグリセリン含量は越冬中の量の約 5% (0.27% 生体重) まで減少するが、幼虫は少なくとも -10°C で 1 日の凍結に耐えられる。しかし給餌 10 日後体重が越冬時の 3 倍に増加した時には、1 個体当りのグリセリン含量には差がないが、 -10°C での耐凍性は全く失われていた。イラガ前蛹の場合にも越冬期が終り体内のグリセリンがほとんど消失した時期には、 -10°C 1 日の凍結に耐えるが、蛹への変態が明らかに進みはじめると、急に耐凍性がなくなることが知られている¹⁴⁾。エゾシロチョウの場合も、給餌 10 日後には体内の組織細胞の代謝型が越冬態より生長態へ移り変わり、細胞の耐凍性がほとんど失われたものと思われる。

摘 要

エゾシロチョウの三齢幼虫を使って予備凍結法により超低温での耐凍性をしらべた。越冬中の幼虫を使い、 $-30^{\circ}\text{C}\rightarrow$ 液体窒素温度の二段凍結、及び $-30^{\circ}\text{C}\rightarrow-15^{\circ}\text{C}\rightarrow-30^{\circ}\text{C}\rightarrow$ 液体窒素温度の四段凍結を行なったが、融解直後の生存率は前者の凍結法の場合に 80%，後者の場合

には100%であった。しかし幼虫群の羽化率はいずれの場合も60%内外ではほとんど差がなかった。エゾシロチョウの越冬幼虫がこのように超低温凍結されても害が少ない理由として、この幼虫はまだ三齢であるため、凍結によって組織細胞のいずれかに害を受けたとしても、融解後食草をとり五齢まで生長してゆく過程で、正常な器官形成を行なうにただけの物質の供給と、崩壊した細胞の成分を他の細胞にとりこんで再構成するための時間的余裕のあることが考えられる。また幼虫が非常に小さいため、凍結の過程で虫体内におこりうる温度勾配にもとづく体内各部の熱収縮の差が比較的小さくてすむので、超低温に急冷されるときおこりうる害をへらすと考えられる。

越冬後生長を再びはじめた幼虫の耐凍性の変化をみると、給餌3日のものではグリセリン含量は越冬中の約5%に減少するが、幼虫は少なくとも -10°C の凍結に耐えられる。しかし給餌10日後には -10°C に幼虫を冷却するとすべて凍死した。

文 献

- 1) Asahina, É. 1959 Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at an extremely low temperature. *Nature*, **184**, 1003-1004.
- 2) Asahina, É. 1969 Frost resistance in insects. In *Advances in Insect Physiology* (J. W. L. Beament, J. E. Treherne and V. B. Wigglesworth, eds.), Acad. Press, London, **6**, 1-49.
- 3) 朝比奈英三・青木 藤 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.
- 4) Asahina, E. 1965 Discussion on survival of insects. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. **15**, 212.
- 5) 丹野皓三 1968 ポプラハバチの耐凍性 V. -196°C での傷害. 低温科学, 生物篇, **26**, 79-84.
- 6) 朝比奈英三・大山佳邦 1969 越冬昆虫の耐寒性 I. 低温科学, 生物篇, **27**, 143-152.
- 7) Takehara, I. 1966 Natural occurrence of glycerol in the slug caterpillar, *Monema flavescens*. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 14**, 1-34.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 朝比奈英三・丹野皓三 1966 セクロビア蚕休眠蛹の耐凍性 II. 低温科学, 生物篇, **24**, 25-34.
- 11) Tanno, K. 1967 Freezing injury in fat-body cells of the poplar sawfly. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. Asahina ed.), *Inst. Low Temp. Sci.*, Sapporo, 245-257.
- 12) Tanno, K. 1970 Frost injury and resistance in the poplar sawfly, *Trichiocampus populi* Okamoto. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 16**, 1-14.
- 13) Hinton, H. E. 1960 Cryptobiosis in the larva of *Polypedilum vanderplanki* Hinton (Chironomidae). *J. Insect Physiol.*, **5**, 286-300.
- 14) 朝比奈英三・竹原一郎 1964 イラガ前蛹の耐凍性 補遺 I. 低温科学, 生物篇, **22**, 79-90.

Summary

The overwintering 3rd instar larvae of a pierid butterfly, *Aporia crataegi*, were examined for their frost resistance. The larvae could survive freezing at liquid nitrogen temperature if they were previously frozen at -30°C for at least one hour. After rewarming from the super low temperature many of them resumed development, and metamorphosed to adult butterflies without any post-thawing injury.

By feeding overwintered larvae at room temperatures, the larvae quickly lost their frost resistance. After ten days of feeding, none of them could survive freezing at -10°C .