モンシロチョウの休眠誘起時における脳—側心体系の微細構造

I. 脳 の 一 般 的 構 造

河 野 義 明

東京大学農学部

(1971 年 5 月 26 日受領)

Ultrastructure of the Brain—corpus Cardiacum System at the Time of the Humoral Determination of Diapause in *Pieris rapae crucivora* BOISDUVAL. I. General Structure of the Brain. Yoshiaki KONO (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 15: 228—239 (1971)

Anatomical changes of the brain and changes in the size of the motor neurones and neurosecretory III-cells were investigated in non-diapause and diapause individuals. The ultrastructure of the brain cells was also observed. The optic lobes developed in its size at the lateral sides of the brain hemispheres and the lateral ocelli of larva moved in and attached to the lateral surface of the optic lobes during the prepupal stage. One day after pupation, suboesophageal ganglion assumed a more anterior position, lying immediately ventral to the brain. These anatomical changes occurred in both non-diapause and diapause individuals. After the third day of pupation, neuropile of the optic lobes and motor neurones in the posterior and optic sides of the brain developed conspicuously in non-diapause pupa but not in diapause ones. Neurosecretory III-cell showed different changes in size from those of the motor neurones. Electron microscopic observation showed several types of glial cells, that is, perineurium cells with characteristic endoplasmic reticulum, two types of giant glial cells distinguished by their electron densities, and common glial cells filled with free ribosomes. Common neurones, motor neurones containing many mitochondria, and developing optic lobes were also described.

サクサン *Antheraea pernyi* (WILLIAMS and ADKISSON, 1964) とオオモンシロチョウ *Pieris brassicae* (CLARET, 1966) とで行なわれた脳移植実験の結果は脳に光周期受容器が存在することを示した。モンシロチョウ *Pieris rapae crucivora* 幼虫の光受容器である側単眼をエナメルで塗りつぶして光周反応を調べた結果も、平常個体との間に全く差異が現われず、やはり光周期受容器が一般の光受容器以外の場所にあることを示唆した (KONO, 1970)。

幼虫の脳で光周期刺激が感受されていると考えるならば、蛹休眠を支配する一連の内部機構、すなわち、光周期の受容、長日と短日との判別、それにもとづく脳ホルモンの分泌調節がすべて脳内で行なわれると結論できる。そして、脳の微細構造を知ることが、蛹休眠の直接的調節要因である脳ホルモンの分泌機構を解くためばかりでなく、休眠を調節する光周性の全機構を理解するた

めの重要な基礎となる。

モンシロチョウ幼虫を長日条件下で飼育した非休眠個体 (蛹化後ただちに成虫発育を開始する個体) では、前蛹期に除脳するとほとんどが成虫発育を行わない永続蛹となり、蛹化後に除脳すれば、その影響を受けずに成虫発育を行なう (未発表)。このことから、蛹化脱皮の時期にこの虫の休眠が内分泌的に決定されることが考えられる。そこで、蛹化前後の脳—側心体系を光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡で観察してその構造を明らかにし、今後の光周性の内部機構研究への手掛かりを得ようと試みた。

昆虫の脳の一般的微細構造はほとんど知られていないので、まず、脳を構成する種々の細胞を観察し、それらの存在位置、特徴などを確認した。同時に、蛹化前後に起こる脳の解剖学的変化などを観察し、休眠個体と非休眠個体とで比較した。

この研究を進めるに当たって終始暖かくご指導下さった

当害虫学研究室山崎輝男教授ならびに電子顕微鏡技術を細部にわたって懇切にご教示下さった当学部養蚕学研究室小林正彦氏に心から謝意を表する。

材料および方法

モンシロチョウ幼虫に半合成飼料を与え、20°C、10L-14D (10 時間明期-14 時間暗期の光周期) の休眠蛹をうる条件、または 20°C、14L-10D の非休眠蛹をうる条件で飼育し (KONO, 1968, 1970)、それぞれを休眠個体、非休眠個体とした。

光学顕微鏡観察のための標本は次の二つの方法に従って作製した。

1. 脳の形態観察と細胞の大きさの測定には、蛹化前2日から蛹化後5日までの個体の頭部を切り取り、直ちに Bouin 液で1昼夜固定し、常法に従って 5-6 μ のパラフィン切片を作り、paraldehyde thionin-neuclear fast red の二重染色を行なった。

2. 脳の神経分泌細胞と側心体の観察用には、昇汞ホルマリン固定液で24時間固定し (5°C)、パラフィン切片を paraldehyde fuchsin (PF と略す) (light green, orange G, chromotrope 2R) で染色した (CLARK, 1955)。

脳の前後長と細胞の大きさは組織切片をマイクロメーターで測定し、5-6 個体の平均値で示した。

電子顕微鏡観察用には、切り取った頭部を 5% glutaraldehyde を含む 0.2 M sodium cacodylate 緩衝液

(pH 7.6) で 5°C、2 時間、前固定し、洗浄用の 0.025 M sodium cacodylate-0.17M sucrose 溶液中で表皮を取り去り、1% 四酸化オスミウムを含む 0.2M sodium cacodylate 緩衝液で 1.5 時間固定した。エタノールで脱水後、Epon 812 に包埋した。LKB-Ultratome 4801-A で超薄切片作製後、3.5% 酢酸ウランの 50% エタノール液と佐藤 (1968) の鉛塩混合液とで二重染色して、JEM 7 型電子顕微鏡で観察した。

結 果

蛹化前後に見られる脳の解剖学的変化

幼虫の脳は蛹化前後に形態が大きく変わる。特に著しいのは脳の外側に脳の半球よりも大きい視葉が発達することであり、同時に他の変化も起こる。第1図に組織切片などの観察で明らかになった脳の解剖学的変化をまとめた。モンシロチョウの前蛹期を‘おぶり紐’掛け終了から蛹化までと定めたが、20°C で飼育した場合にはこの期間が約 24 時間である。蛹化前約 40 時間に非休眠個体の幼虫は摂食を終了するが、休眠個体では蛹化前約 64 時間に摂食終了するものが多い。

摂食終了時の幼虫の脳には、まだ視葉の突出は認められないが、脳球内部ではすでに発達を開始しており、脳側方部の前後長 (約 0.3 mm) に比べ視葉部分の前後長 (約 0.4 mm) のほうが大きくなっている。

視葉の突出は幼虫が蛹化場所に停止するところから始ま

第1図 蛹化前後に観察される脳の解剖学的変化。図下段の「—」は左の見出しに示した変化が起きる時期を表わす。

*印は非休眠個体でのみ見られる変化で、その他は休眠、非休眠個体共通の変化である。

り、蛹化時にはその部分の前後長は約 0.5 mm に達して一応大きさの増大は止まる。この視葉の突出と平行して幼虫の側単眼が視神経索にそって内部に移動する。蛹化時には第 2 図のような状態で発達した視葉の後側部に到達するが、その後、蛹期後半まで単眼を形成していたレンズ、視覚細胞、色素などはそのままの形で視葉に埋まっている。

第 2 図 視葉に埋没した幼虫の側単眼。Oc: 単眼, OpL: 視葉, T: 気管, (×450)。

蛹化後には食道下神経球が前方へ移動し、脳との神経縦連合が太く、短くなって食道を囲み脳と一体になるようになる。

以上の変化は休眠、非休眠の区別なく観察されたが、蛹化後 48 時間を過ぎると両者の脳の形態に差が現われてくる。すなわち、休眠個体の脳ではこれ以後ほとんど形が変わらないのに対して、非休眠蛹ではこの時期から羽化にかけて触角への神経および視葉内の髄質が発達する。蛹化後 4 日ですでに非休眠蛹の脳は側方部前後長 0.35 mm, 視葉部 0.6 mm と大きくなり、視葉では特に髄質部分の占める割合が高くなる。

蛹化前後の脳の構造

光学顕微鏡で観察したときの細胞の形態、染色状態によって特に目立つ神経分泌細胞、運動神経細胞の位置を第 3 図に示した。

脳前面中央に PF に染色される果粒を含んだ大型 (直径 15-19 μ) のⅢ型神経分泌細胞と名付ける細胞 (第 4 図 a) が各半球に 2 個存在し、脳間部背面にはやはり

第 3 図 脳に存在する神経分泌細胞と運動神経細胞の位置。
○: Ⅱ型神経分泌細胞, ⊙: Ⅲ型神経分泌細胞, ○: 視葉との境の運動神経細胞, ●: 後部中央の運動神経細胞, A: 前面, B: 背面, C: 後面, Oc: 視葉に埋没した幼虫の側単眼, OpL: 視葉, PIC: 脳間部。

PF 好染性の物質を含む約 10 個のⅡ型神経分泌細胞 (第 4 図, b) が存在する。また、特に大型の神経細胞 (長径 18-20 μ) が後部中央に数個 (第 4 図, c), 視葉との境に沿って 4 個 (第 4 図, d) 観察され、これらは運動神経細胞であろうと考えられる。

視葉には脳に存在する普通の神経細胞 (直径 10 μ 前後) よりさらに小さい神経細胞が密に見られ、後側辺には前述のように 6 個の単眼が埋没している。脳の皮質を構成している細胞には大別して神経細胞とグリア細胞とがあり、前者の特殊なものとして神経分泌細胞、運動神経細胞があげられる。後者も perineurium cell, 巨大グリア細胞, グリア細胞などに別けられる。これらの細胞の区別はその大きさ、存在位置などによって光学顕微鏡的にもある程度可能であるが、細胞内構造、細胞間の関連などを知るために電子顕微鏡観察を行なった。脳間部での種々の細胞の配列状態を観察結果に基づいて模式的に描いたのが第 5 図である。

脳の周囲は非細胞性の neural lamella で包まれている。neural lamella の中には約 15 m μ の規則的な縞をもつコラーゲン繊維が多数走っており、色素果粒と考えられるものも存在する (第 6 図, a)。この neural lamella を裏打ちするように perineurium cell (第 6 図, b) が 1 層または 2 層並ぶ。この細胞質内には特徴ある粗面小胞体の集合が認められ、第 6 図, d のように規則正しく凝縮した様相を示すこともある。細胞質内の遊離リボソームの密度は細胞によって異なる場合があり電子

第4図 脳の神経分泌細胞および運動神経細胞。a: III型神経分泌細胞 (矢印), b: II型神経分泌細胞 (矢印), c: 後部中央の運動神経細胞 (矢印), d: 視葉との境の運動神経細胞 (矢印), ML: 脳の中央を示す, OpL: 視葉。(×1,200)

第5図 脳間部微細構造の模式図。AX: 軸索, GC: 普通のグリア細胞, GGC-I: 電子密度の低い巨大グリア細胞, GGC-II: 電子密度の高い巨大グリア細胞, NC: 神経細胞, NL: neural lamella, NSC: 神経分泌細胞, PC: perineurium cell, er: 小胞体, g: ゴルジ体, ld: 封入体 (lamellar body), m: ミトコンドリア, n: 核, no: 仁, p: 色素果粒, sg: 分泌果粒, sv: シナプス小胞, v: 空胞, x: 凝縮した小胞体。

第6図 a: neural lamella の内部 ($\times 30,000$), b: perineurium cell ($\times 5,500$), c: 2種の電子密度の異なる perineurium cell ($\times 8,000$), d: perineurium cell 内の凝縮した小胞体 ($\times 27,000$)。GGC-I: 電子密度の低い巨大グリア細胞, NL: neural lamella, PC-I: 電子密度の低い perineurium cell, PC-II: 電子密度の高い perineurium cell, X: 凝縮した小胞体 cf: コラーゲン繊維, m: ミトコンドリア, n: 核, p: 色素果粒。

第7図 a: 電子密度の異なる2種の巨大グリア細胞 ($\times 2,800$), b: II型 (電子密度の高い) 巨大グリア細胞の内部 ($\times 26,000$), GGC-I: 電子密度の低い巨大グリア細胞, GGC-II: 電子密度の高い巨大グリア細胞, NC: 神経細胞, PC: perineurium cell, ch: クロマチン, er: 小胞体, g: ゴルジ体, m: ミトコンドリア, n: 核, p: 色素果粒。

第8図 a: 巨大グリア細胞 (II型) の細胞質 ($\times 120,000$), b: 巨大グリア細胞 (I型) 内の凝縮した小胞体 ($\times 22,000$), c: 巨大グリア細胞の神経分泌細胞間への貫入部分 ($\times 8,000$), d: 普通のグリア細胞 ($\times 5,500$)。NSC: 神経分泌細胞, X: 凝縮した小胞体, er: 小胞体, m: ミトコンドリア, n: 核, p: 色素果粒, sg: 分泌果粒。

第9図 a: 神経細胞 ($\times 16,000$), b: 神経細胞のミトコンドリア ($\times 40,000$), c: 運動神経細胞 ($\times 4,000$), d: 運動神経細胞質の拡大 ($\times 15,000$)。er: 小胞体, g: ゴルジ体, m: ミトコンドリア, n: 核, no: 仁。

第10図 a: 脳の髄質部 (×8,000), b: シナプス部分 (a の実線内) の拡大 (×26,000) 矢印は微小管を示す, c: 視葉部, 染色体 (chs) の見える分裂中の神経細胞と細胞間の空隙 (矢印) を示す。AX: 軸索, m: ミトコンドリア, s: シナプス, sv: シナプス小胞, v: 空胞, ch: クロマチン, n: 核。

密度の違った2種の細胞に区別される(第6図, c)。

さらに内側には巨大グリア細胞が位置する(第7図, a)。この細胞も電子密度の相異によって2種に区別され、電子密度の高いⅡ型の細胞には滑面、粗面両種の小胞体が電子密度の低いⅠ型の細胞より密に存在し、しかも、細胞基質そのものも電子密度が高い(第7図, b; 第8図, a)。Ⅰ型およびⅡ型の細胞ともに核は樹枝状を呈し、細胞質も樹枝状で長く伸び神経細胞の周囲を何層かにとり囲む。大型の神経細胞、神経分泌細胞では周囲を囲んでいる巨大グリア細胞の細胞質がそれらの細胞内にまで貫入している。巨大グリア細胞の細胞質には Perineurium cell とよく似たミトコンドリア、粗面小胞体の集まりが存在し、小胞体の凝縮像(第8図, b)、果粒(第8図, c)も見られる。小型のグリア細胞(第8図, d)は神経細胞の間や髄質にも存在し、細胞質を髄質内の軸索間へも延ばしている。多量のリボソームが細胞質中に含まれているために電子密度はきわめて高い。

脳の普通の神経細胞は直径約 10μ で、核の中央部に球形の大きい仁が見られ、細胞質にはミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ体が散在する(第9図, a)。この細胞のミトコンドリアはグリア細胞内の球形で中心部へ向かってクリステが発達しているものに比べ、細長く長軸方向にクリステが形成されている。ミトコンドリア内には小果粒が存在する(第9図, b)。

運動神経細胞の構造は普通の神経細胞に類似し、核内には球形の仁がある。ミトコンドリアは高密度に存在し、細長いものも多数見られる(第9図, c, d)。

脳の髄質(第10図, a)は軸索の束と軸索末端の集合とからなっている。軸索内には微小管(microtubules)が軸索に沿って走り、ミトコンドリアがところどころに存在する。軸索末端では第10図, bに示したようなシナプスが形成されている。このシナプス部位では終末部にシナプス小胞が多数集まり、後シナプス膜に沿って電子密度の高い物質が集積している。

視葉を構成している神経細胞には分裂中のものが多数観察される。蛹化前の個体の視葉(第10図, c)の神経細胞はクロマチンが核膜に接して存在し、発生初期の様相を示す。しかも、この視葉の細胞間、軸索間にはグリア細胞がいまだ貫入していない間隙が存在する。

神経細胞の大きさの変化

脳の形態の変化に伴う脳の神経細胞の大きさの変化を知るために、脳の後部および視葉との境の運動神経細胞、Ⅲ型神経分泌細胞の長径を发育段階を追って測定し

た。標本作製に当たっては毎日午前10時から正午までの間に頭部を切り取って固定し、細胞の大きさの日週変化による影響を除くように努めた。

第11図には運動神経細胞の大きさの変化を休眠個体と非休眠個体とで比較した結果を示した。どの運動神経細胞も蛹化前2日には同じ大きさを示し、その後は休眠個体の変化と非休眠個体の変化とは異なった経過を示す。休眠個体では蛹化直後までほとんど同じ大きさで、その後、蛹化後2日まで大きさを増してその状態で留まる。一方、非休眠個体では蛹化前1日に一時細胞が小さくなるが、その後は急激に大きくなり蛹化後5日まで続く。この結果、蛹化後5日の休眠、非休眠個体間には著しい差が現われる。また、視葉との境の細胞は後部の細胞より常に大きい、変化の様子は同じである。

第11図 蛹化前後における運動神経細胞の大きさの変化。
○: 非休眠個体, ●: 休眠個体, —: 視葉との境の運動神経細胞,: 後部中央の運動神経細胞。

第12図 蛹化前後におけるⅢ型神経分泌細胞の大きさの変化。○: 非休眠個体, ●: 休眠個体。

Ⅲ型神経分泌細胞の変化(第12図)は運動神経細胞で見られた変化とはやや異なる。蛹化前2日にはやはり休眠、非休眠の間に大きさの差異はない。非休眠個体では細胞は徐々に大きくなり、蛹化後2日以後は変化しない。休眠個体では蛹化直後に細胞は急激に小さくなるが蛹化後1日、2日には蛹化前2日と同じ大きさになり、その後再び小さくなる。このため、蛹化後5日では運動

神経細胞の場合と同様、非休眠個体の細胞は休眠個体のものよりはるかに大きい。

考 察

ここで述べたモンシロチョウの脳の微細構造は他の昆虫の脳の構造と大きな差異はないと考えられるが、詳しい比較ができる観察例がない。

オオサシガメ *Rhodnius prolixus* の胸部神経球には光学顕微鏡観察で4種のグリア細胞が存在する (WIGGLESWORTH, 1959)。モンシロチョウの脳にはオオサシガメで ii 型と呼ばれる運動神経の軸索の周囲を囲む myelin sheath を形成しているグリア細胞は観察されなかったが、その他の型、すなわち、Perinurium cell, 巨大グリア細胞, 小型のグリア細胞は存在する。これら3種のグリア細胞には、小胞体, リボソーム, 細胞基質の密度によってそれぞれ二種類に区別される細胞が見られ、発生の段階または、機能を異にするものが同時に存在することがうかがわれる。

モンシロチョウの蛹化前後に起こる細胞分裂や髄質の形成を伴った視葉の突出, 単眼の吸収, 食道下神経球の前方への移動などはオオモンシロチョウの蛹初期に胸部神経球の癒合とともに観察される neural lamella の更新, グリア細胞や神経細胞の分裂, 髄質の拡大など (HEYWOOD, 1965) と同様の変化であると考えられる。

これらの脳に現われた解剖学的変化のうち、蛹化前2日から蛹化後1日までに見られたものは、休眠個体, 非休眠個体の区別なく観察されたことから、明らかに蛹化に伴う変化であると結論できる。そして、蛹化後2日以後に見られる脳の変化は非休眠個体のみに現われ、成虫発育の一環である。

このように昆虫の後胚子発生を内分泌的に調節している脳自体の構造が変態に伴って変化するので、将来、脳を体外に取り出して研究する際になどにこれらの変化を発育状態の指標とすることができよう。

要 約

蛹化前後における脳の解剖学的変化と微細構造とを述べた。

前蛹期に脳の側方に視葉が発達し、幼虫の側単眼が内部へ移動して視葉の外側に埋没する。蛹化1日目には食道下神経球が前方へ移動し、脳の直下に密接する。これらの変化は休眠、非休眠両個体で観察された。

蛹化後3日以後には非休眠個体のみで視葉の髄質が発達し、運動神経細胞が大きくなる。電子顕微鏡観察では、特異的な小胞体の集合をもつ perinurium cell, 細胞内構造の異なる二種の巨大グリア細胞, 遊離リボソームに満ちたグリア細胞と運動神経細胞, 普通の神経細胞などを観察し、脳の一般的構造を明らかにした。

引 用 文 献

- CLARET, J. (1966) Mise en evidence du rôle photorecepteur du cerveau dans l'induction de la diapause, chez *Pieris brassicae*. Annales d'Endocrinologie 27 : 311~320.
- CLARK, R. B. (1955) The posterior lobes of the brain of *Nephtys* and the mucus-gland of the prostomium. Quart. J. Micr. Sci. 96 : 545~565.
- HEYWOOD, R. B. (1965) Changes occurring in the central nervous system of *Pieris brassicae* L. during metamorphosis. J. Insect Physiol. 11 : 413~430.
- KONO, Y. (1968) Rearing *Pieris rapae crucivora* BOISDUVAL on artificial diets. Appl. Ent. Zool. 3 : 96~98.
- KONO, Y. (1970) Photoperiodic induction of diapause in *Pieris rapae crucivora* BOISDUVAL. Appl. Ent. Zool. 5 : 213~224.
- 佐藤泰山 (1968) 超薄切片用鉛染色法の一改良法. J. Electron Microscopy 17 : 158~159.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1959) The histology of the nervous system of an insect *Rhodnius prolixus*. II. The central ganglia. Quart. J. Micr. Sci. 100 : 299~313.
- WILLIAMS, C. M. and P. L. ADKISSON (1964) Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm, *Antheraea pernyi*. Biol. Bull. 127 : 511~525.