短 報

***Bacillus thuringiensis* の毒素結晶体投与後の
カイコの中腸上皮にみられる微細構造の変化**

遠藤 泰久・宇尾 淳子
塩野義製薬研究所

Ultrastructural Changes in the Midgut Epithelium of *Bombyx mori* L. Induced by *Bacillus thuringiensis* Crystals. Yasuhisa ENDO and Junko NISHITSUTSUJI-UWO (Shionogi Research Laboratory, Fukushima-ku, Osaka, 553). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **23**: 183-185 (1979)

B. thuringiensis の結晶体毒素 (δ -endotoxin) を投与されたカイコやエリサンの幼虫は、毒素食下直後から体液中の K^+ 濃度が異常に増加し (RAMAKRISHNAN, 1968; PENDLETON, 1970), やがて麻痺症状があらわれて死に至る。われわれがさきに、この毒素を培養細胞に作用させた結果 (NISHITSUTSUJI-UWO *et al.*, in press) から考えても、この毒素は中腸上皮細胞のイオン調節機能に障害を与える働きをもつものと考えられる。一方、病理組織学的変化についての発表は数多く見られるが、中腸上皮細胞のうちでは、円筒細胞が膨潤し崩壊する (ANGUS, 1971) と報告されており、イオン調節機能の主役を担うと考えられている盃状細胞 (ANDERSON and HARVEY, 1966) に関しては、カイコはもとより、他の鱗翅目昆虫でも、ほとんど記載がなされていない。われわれは、この毒素の投与によって、麻痺症状を呈し始めた時期のカイコ幼虫の中腸組織を、電子顕微鏡下で観察した。その結果、円筒細胞と同様、盃状細胞にも病理的变化がみられ、しかも両細胞で非常に異なる構造変化を示すことが判明したので、その概要を報告する。

材 料 と 方 法

カイコ： 品種は 神鈴×秋宝 (神栄株式会社) で、桑生葉により 25°C で飼育した 3 令 2 日の幼虫を実験に供した。

***B. thuringiensis* の毒素結晶体：** *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 由来の無孢子変異株 (NISHITSUTSUJI-UWO *et al.*, 1975) を用い、ポリエチレングリコール 2 層分配法 (SACHS and ALDERTON, 1961) で結晶体を精製した。

投与方法： 精製した結晶体を 0.25% Tween-80 液中でまぜし、2.0mg/ml の濃度として、約 15mm 角に切った桑生葉に塗布し、幼虫に与えた。幼虫は摂食の開始をそそえるため、あ

らかじめ約 3 時間絶食させた。対照区には、0.25% Tween-80 液のみを塗布した桑生葉を与えた。

電子顕微鏡観察： 摂食開始後 30 分の幼虫の中腸をとり出し、二重固定した。0.1 M phosphate buffer pH 7.4 を用い、2.5 % グルタルアルデヒド・buffer 溶液中で 60 分間 4°C で固定後、同 buffer で組織を洗浄し、1% OsO_4 ・buffer 溶液により 4°C で 60 分間、後固定を行なった。固定終了後、エタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドを経て、エポン 812 に包埋した。LKB-8800 型ミクロームで切片を作成し、酢酸ウラニルと水酸化鉛で電子染色を行ない、JEM-100 CX 型電子顕微鏡で観察を行なった。

結 果 と 考 察

この実験に使用した毒素濃度では、カイコ幼虫は摂食開始後約 30 分で、初期の麻痺症状があらわれはじめて、動作がやや緩慢になった。60 分後には完全な麻痺症状を呈して、外部刺激に対してまったく反応を示さなくなった。光学顕微鏡下で観察すると、30 分後に中腸の中央部やや前方付近のごく少数の円筒細胞の先端が、管腔にむけて膨潤しはじめる。麻痺症状の進行に伴ってその変化はさらに広範囲にひろがり、円筒細胞の極度の膨潤や崩壊がみられるようになる。そこで、電子顕微鏡による観察も中腸の中央部に限定し、毒素投与後 15 分、30 分、60 分の 3 区で行なったが、ここでは一部の細胞で微細構造上の初期変化が、細胞小器官の全面に現われはじめる 30 分区の観察の概略のみを述べたい。

毒素を摂食して 30 分経過し、麻痺症状を呈しはじめた幼虫では、中腸上皮を構成する円筒細胞と盃状細胞とで非常に異なる構造変化が観察された (第 1 図)。

円筒細胞は、光学顕微鏡による観察で報告されているように (ANGUS, 1971)、一部の細胞は消化管内腔に向かって膨潤し、その細胞質の電子密度は対照区 (第 2 図) にくらべ著しく低下していた。核も膨潤し、小胞体は空胞状に拡張していた。これらの膨潤した細胞では、先端部の microvilli は一般に脱落して粗になっており、完全に消失している部分もみられた。対照区の円筒細胞基底部には、細胞膜が多数嚢状に陥入し、ミトコンドリアが密に存在する構造がみられるが、毒素処理区ではこの構造がほとんどの円筒細胞で消失していた。

もっとも特異的な微細構造の変化は、ミトコンドリアに認められた。一見正常にみえる細胞も含めて、多くの円筒細胞のミトコンドリアは、クリステが不規則に膨潤し、マトリックスの占める部分が減少してその電子密度が増加した。いわゆる“condensed form”に変形していた (第 3 図)。HACKENBROCK (1966) は、マウスの肝臓から分離したミトコンドリアが、異なるエネルギー状態で可逆的な構造変化をみせることを観察しており、低エネルギー状態下では condensed form に変化すると報

第1図 毒素処理区の中腸上皮基底部。円筒細胞(C)は電子密度が非常に低下し、細胞膜の陥入構造が消失している。一方、盞状細胞(G)は、逆に電子密度が増加しており、基底部の細胞膜の陥入が非常に増加している。M: 筋肉細胞。×6,000。

第2図 対照区の中腸上皮基底部。円筒細胞(C)の基部の細胞膜は、細胞内部に向かって複雑に陥入しており、その部分にはミトコンドリアが密に分布している。盞状細胞(G)では、細胞膜の陥入は円筒細胞(C)ほど顕著でない。また、盞胞部には内部にミトコンドリアを有する多数の細胞質突起がみられる。M: 筋肉細胞。×6,000。

告している。円筒細胞でみられたこれらの構造変化は δ -endo-toxin 処理後の培養細胞 (TN-368 cells) でみられた変化と非常によく類似していた (NISHITSUTSUJI-Uwo *et al.*, 1979)。

一方、盞状細胞は、円筒細胞とはまったく異質の構造変化を示した (第1図)。すなわち、細胞質の電子密度の増加が広く観察され、細胞基底部に陥入している細胞膜の間隙が大きくなっ

第3図 毒素処理区の円筒細胞(C)と盃状細胞(G)の一部。円筒細胞のミトコンドリアは condensed form に変形しているが、盃状細胞のそれには変化が認められない。
×20,000.

ていた。しかし、その他の構造には著しい変化は認められず、盃胞部にみられる多数の細胞質突起もよく保持されており、ミトコンドリアや小胞体にも円筒細胞でみられたような変化は認められなかった。

SUTTER and RAUN (1967) は、アワノメイガ *Ostrinia nubilalis* 幼虫に *B. thuringiensis* の胞子と結晶体とを投与し、その中腸上皮にあらわれる微細構造の変化について記載している。彼らの報告によると、感染した幼虫の中腸では、盃状細胞の細胞質突起(彼らはこれを 'microvilli' と呼んでいるが)が崩壊し、中腸上皮は全般的に空胞化していたが、円筒細胞の microvilli は損傷をうけていなかったという。一方、EBERSOLD *et al.* (1977) が、オオモンシロチョウ *Pieris brassicae* の5令幼虫に濃度の高い結晶体を強制投与したところ、投与直後から円筒・盃状両細胞の microvilli やミトコンドリアが膨潤しはじめ、遂には破裂するに至り、小胞体は大小さまざまな空胞と化した。核だけは変化しなかったと報告している。これら2つの報告や今回のわれわれの観察は相互にまったく異っているが、その理由については不明である。用いた昆虫の種による相違と観察時期の相違がその一因かも知れない。

円筒細胞と盃状細胞とが、どのような機能的分化を遂げているのかは、現在のところまだ明らかではない。今回観察されたように、*B. thuringiensis* の毒素処理後にみられる両細胞のま

ったく異質の構造変化は、中腸上皮細胞の機能的分業を示唆するものとして、興味深い問題を含んでいるように思われる。

引 理 文 献

- ANDERSON, E. and W. R. HARVEY (1966) *J. Cell Biol.* **31** : 107—134.
- ANGUS, T. A. (1971) *In Proc. 4th International Colloquium on Insect Pathology and Microbial Control*, College Park, Maryland (1970), pp. 183—189.
- EBERSOLD, H. R., P. LUETHY and M. MUELLER (1977) *Mitteil. Schweiz. Entomol. Gesel.* **50** : 269—276.
- HACKENBROCK, C. R. (1966) *J. Cell Biol.* **30** : 269—297.
- NISHITSUTSUJI-UWO, J., Y. WAKISAKA and M. EDA (1975) *J. Invert. Path.* **25** : 355—361.
- NISHITSUTSUJI-UWO, J., Y. ENDO and M. HIMENO (1979) *J. Invert. Path.* (In press)
- PENDLETON, I. R. (1970) *J. Invert. Path.* **16** : 313—314.
- RAMAKRISHNAN, N. (1968) *J. Invert. Path.* **10** : 449—450.
- SACHS, L. E. and G. ALDERTON (1961) *J. Bacteriol.*, **82** : 331—341.
- SUTTER, G. R. and E. S. RAUN (1967) *J. Invert. Path.* **9** : 90—103.