蚕体組織のウレアーゼ活性に及ぼす飼料の影響

山田政枝・中村晃三・井口民夫

農林水産省農業生物資源研究所

Effects of Diets on Urease Activities in Different Tissues of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Masae YAMADA, Kōzō NAKAMURA and Tamio INOKUCHI (National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Yatabe, Ibaraki 305, Japan). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 28 : 49—56 (1984)

Urease activities in the pupal hemolymph were compared in 15 silkworm varieties. In the pupae reared on mulberry leaves, urease activity ranged from 40 to 300mU/ml of hemolymph, while in those reared on an artificial diet no activity was detected in any varieties. Urease activities in the whole body of pupae reared on mulberry leaves ranged from 150 to 200 mU per pupa during the pupal period. On the other hand, no activity was detected in the pupae from larvae fed on an artificial diet. In pupae reared on mulberry leaves, urease activities were detected in the alimentary canal, body wall, silk gland and fat body of larvae, alimentary canal of mature larvae at high levels, and further in the malpighian tubes and ovaries in addition to the organs where the activity was recorded in the pupal period. In the eggs laid by adults from larvae reared on mulberry leaves, urease activity was very high, while in those from larvae reared on an artificial diet the activity was hardly detectable. Subsequently, changes of urease activities in the hemolymph during the course of development from the 4th instar larva to adult emergence were compared between both diet groups. In the individuals reared on mulberry leaves, urease remained at a low level during the larval stages, a small increase of activity being observed in the moulting period for the last larval ecdysis. However, at the beginning of spinning, urease activity increased sharply and this high level was maintained in the pupal period and also in the adult. On the other hand, in the hemolymph from the individuals reared on an artificial diet, urease activity was hardly detected throughout the whole stages examined. When the artificial diet coated with jack bean urease was administered orally to the last instar larvae for only 2 days before spinning, urease activity was detected in the pupal hemolymph. Also a high activity of urease was observed in the pupae from silkworms fed on the artificial diet coated with mulberry leaf powder for 2 days. These results suggest that mulberry urease is absorbed through the silkworm intestine. Therefore, the accumulation of urea in the silkworms reared on an artificial diet can be attributed to the lack of urease in the diet.

緒 言

先に報告したように、家蚕を桑葉で飼育した場合、化蛹 2 日後の血液にはウレアーゼ活性が認められ、一方、人工飼料で飼育した蛹の血液にはそれが検出されなかった (井口ら, 1984)。今回は全蛹期を通して蚕体ウレアーゼ活性の変動および諸組織のウレアーゼ活性の飼料による差異を検討した。また 4 齢から成虫に至るまでの血液のウレアーゼの変動について桑葉育と人工飼料育の間で比較した。さらに、ウレアーゼのような高分子物質の蚕体への取り込みについてナタ豆ウレアーゼを用いて実験した。これらの結果から蚕体におけるウレアーゼ活

性の獲得機構について考察した。以下その概要を報告する。

材料および方法

1. ウレアーゼ活性の測定

(1) 血 液

まずセベンス白繭ほか 14 品種の蚕児を桑葉と人工飼料でそれぞれ飼育し、得られた蛹について、化蛹 2 日後の血液ウレアーゼ活性を比較した。採血は 1 品種各飼料区ごとに 5~10 頭を用いて冷所で行い、ただちに少量のアスコルビン酸ナトリウムを加え、3,000 rpm の遠心分離によって血球を除去したのち、-50°C に保存した。

1983 年 9 月 27 日受領 (Received September 27, 1983)

また血液ウレアーゼの発育に伴う変動を知るために、蚕品種、紅白×同栄について、4齢後半から成虫に至るまで、12時間または24時間おきに採血し、ウレアーゼ活性の測定に供した。ウレアーゼ活性の測定は前報(井口ら, 1984)と同様に行い、活性の算出はナタ豆ウレアーゼとの比較によって行った。

(2) 蛹 体

蚕品種、紅白×同栄について桑葉育と人工飼料で飼育し、蛹期における全蛹体のウレアーゼ活性の変動を調査した。測定は化蛹直後から24時間おきに、各2頭ずつの雄を5mlの0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.4, 10mM EDTA, 10mM DTT, 2mM システインを含む)とともに磨砕し、遠心分離によって得られる上清を粗酵素液とした。活性は血液同様に算出し、1頭当りのウレアーゼ単位で表示した。

(3) 蚕 体 組 織

上記と同様に桑葉と人工飼料でそれぞれ飼育した蚕品種、支146号×日145号の雌について、5齢4日後、熟蚕期、前蛹期および化蛹2日後にそれぞれ解剖し、マルピーギ管、卵巣、脂肪組織、体壁、消化管および絹糸腺に分画し、秤量後上記0.2Mリン酸緩衝液とともに小型ガラスホモジナイザーまたは超高速ホモジナイザーによって冷却下で磨砕し、ただちに遠心分離し、その上清をウレアーゼ活性の測定に供した。

(4) 蚕 卵

桑葉育および人工飼料育で得られた同栄ほか6品種の成虫が産下した越冬卵を供試した。産下後10日の卵について、各品種0.5gを5mlのリン酸緩衝液とともに磨砕し、上記の諸組織の場合と同様に処理して、ウレアーゼ活性を測定した。

2. 蚕体へのウレアーゼの取り込み

桑葉育における蚕体のウレアーゼ活性の獲得機構を知るために、まずウレアーゼ活性を有する桑葉粉末(凍結乾燥によって調製した)、ナタ豆粉末(SIGMA製)、脱脂大豆粉末(味の素KK製)を人工飼料に塗布して、カイコに与え、繭層および蛹血液中の尿素量の変化を検討した。尿素の定量は既報(山田ら, 1983)に準じて行った。つぎに人工飼料で飼育した蚕品種、支146号×日145号の雌の幼虫にウレアーゼを一定時間与えて血液にウレアーゼ活性が現われるか否かを検討した。ナタ豆ウレアーゼを前述の0.2Mリン酸緩衝液に溶かし(1U/ml)、その溶液の一定量を経口的にカイコに与えた。給与はガラス製マイクロシリンジを用いて、強制的に40μl(1回に10μl)嚥下させる方法と飼料に100μl(1

Table 1. Comparison of urease activity in the hemolymph of 2-day-old pupae among several silkworm varieties

Diet	Mulberry leaves		Artificial diet	
Silkworm variety	Female	Male	Female	Male
Blanc des Cévennes	142.1	223.8	0	0
European 16	116.9	108.6	0	0
Giallo Marche	74.5	83.0	0	0
Kuni-Ichi	89.3	95.6	0	0
Awakuni-San	67.3	50.8	0	0
Koishimaru	105.2	126.2	0	0
Chyusu-otu	161.0	91.9	0	0
Renshin	42.1	66.4	0	0
Shinshōchō	125.4	96.8	0	0
Kōhaku	284.7	290.8	0	0
Dōei	154.6	303.4	0	0
C. 146	224.3	284.9	0	0
J. 145	252.1	191.5	0	0
Sericin-san	42.1	37.9	0	0
W. 81	217.6	266.6	0	0

Values are expressed as mU per milliliter of hemolymph.

回に50μl)吸着して食下させる方法で行った。ウレアーゼ給与48時間後の血液についてウレアーゼ活性を測定した。なお実験は5齢起蚕、5齢2日後および5齢4日後の3回にわたり行い、48時間の間にウレアーゼの給与は12時間おきに4回行った。またウレアーゼ溶液または結晶ウレアーゼおよび桑葉粉末を飼料に吸着または塗布して一定時間与えたのち、前蛹期、化蛹1日後、6日後の蛹血液のウレアーゼ活性を調査し、ウレアーゼが経口的に蚕体に取り込まれるか否かを検討した。なお、ウレアーゼ活性の表示は標品ウレアーゼによる反応によって発生する¹⁴CO₂の放射能から算出したmUを基に算出したが、実験の目的によっては発生する¹⁴CO₂のdpmを用いる方法も採用した。

結 果

化蛹2日後の血液ウレアーゼ活性は、Table 1に示したように、人工飼料育では各品種ともまったくその活性は認められなかった。一方、桑葉育では用いた15品種は40~300mU/mlの範囲でウレアーゼ活性を示した。しかしセリシンだけの糸を吐くセリシン蚕(Nd-s)では著しく低い値であり、品種によって活性に違いのあることが示された。雌雄間の比較では一定の傾向は見いだせなかった。

化蛹直後から成虫に至るまでの蛹体全体のウレアーゼ活性は、Fig. 1に示したように、桑葉育では1頭当り

Fig. 1. Changes of urease activity in the whole body of the male silkworm during pupal period. Silkworm variety : Kōhaku × Dōei.

Table 2. Differences of urease activities in the several tissues of the female silkworm reared on mulberry leaves and in those reared on an artificial diet^{a), b)}

Tissue	Diet ^{c)}	4-day-old last instar larva	Mature larva	Prepupa	3-day-old pupa
Malpighian tubes	M	0	0	9.2	17.5
	A	0	0	0	0
Ovary	M	0	0	0	18.3
	A	0	0	0	0
Fat body	M	2.4	34.5	40.9	46.8
	A	0	0	0	0
Body wall	M	10.8	17.0	8.9	7.6
	A	0	0	0	0
Alimentary canal	M	15.8	200.5	96.2	33.3
	A	0	0	0	0
Silk gland	M	4.5	4.7	4.3	7.2
	A	0	0	0	0

a) Values are expressed as mU per gram of wet weight.

b) Silkworm variety : C. 146 × J. 145.

c) M : mulberry leaves, A : artificial diet.

130~250 mU の範囲で変動し、蛹期の初期において高く、中期では低下し、後期および成虫になるとわずかに高くなる傾向が示された。全蛹体についても人工飼料育ではまったくウレアーゼ活性は認められなかった。

Table 2 には、5 齢中期、熟蚕、前蛹期および化蛹 2 日後のマルピーギ管ほか 5 組織のウレアーゼ活性を示した。人工飼料育のカイコの各組織ではいずれもウレアーゼ活性は認められなかった。一方、桑葉育では脂肪組織、体壁、消化管および絹糸腺については、測定した各発育時期とも活性が認められた。マルピーギ管および卵巣については前蛹期または化蛹 3 日後には活性が認めら

れるようになった。組織 1g 当りのウレアーゼ活性は脂肪組織では発育に伴って増加する傾向が認められ、蛹では他のいずれの組織よりも高い活性を示した。体壁および消化管では熟蚕において高い値を示し、前蛹期、蛹と次第に低下する傾向が認められた。絹糸腺もまたウレアーゼ活性を示し、5 齢期中にはほぼ一定の値であったが、蛹になると活性はわずかに上昇した。

桑葉育で得られた成虫が産下する卵にもウレアーゼ活性が認められた。Fig. 2 には、同栄ほか 6 品種の卵 1g 当りのウレアーゼ活性を示したが、桑葉育では 1.6~2.7 mU の範囲で活性が認められた。一方、人工飼料で飼い上げた成虫の産下卵では、同栄、紅白および中巢乙においてきわめて微量の活性が認められたが、その他の品種ではまったく検出されなかった。

先に蛹の血液では桑葉育の場合、ウレアーゼ活性が高いことを示したが、さらに 4 齢以降の発育に伴う変動についても調査した。Fig. 3 に雌の、Fig. 4 に雄の血液ウレアーゼ活性の変動を示した。人工飼料育においてはこの期間中、血液中にウレアーゼ活性はほとんど認められなかった。一方、桑葉育においては 4 眠中に明らかに活性が認められ、さらに熟蚕期から吐糸期にかけて急激に活性が高まった。吐糸完了時を頂点として再び低下するものの、蛹期中もかなり高いウレアーゼ活性を示し、成虫の血液では再び上昇した。桑葉育での発育に伴う血液ウレアーゼ活性の変動は雌雄間にわずかに違いがみられ、蛹期後半の雌では活性が漸減するのに対して雄においてはほぼ一定の値で推移した。以上のように、桑葉育における血液ウレアーゼ活性は、脱皮期において高

Fig. 2. Differences of urease activity in the eggs laid by several varieties of the silkworms reared on mulberry leaves and artificial diet. M : rearing on mulberry leaves, A : rearing on artificial diet.

Fig. 3. Changes of urease activity in the hemolymph of the female silkworm from the 4th instar to adult emergence. Silkworm variety : Kōhaku x Dōei.

まることが示された。

つぎにウレアーゼが経口的に体内に入ることを実証するために、まずナタ豆ウレアーゼおよびウレアーゼ活性を有する桑葉および桑葉粉末を蚕に与えて、繭層および血液中の尿素量の変動を検討した。Table 3 に示したように、全齢人工飼料育では繭層および血液ともに、尿素

含量が高いことが示され、一方、桑葉育では低い値であった。また5齢6日から熟蚕までの2日間だけを人工飼料から桑葉に切り換えて飼育した場合にも全齢桑葉育同様に尿素含量は低い値であった。ウレアーゼ活性の高いナタ豆粉末を人工飼料に塗布して与えた場合にも繭層尿素量は全齢人工飼料育の1/4程度に減少した。しかし、

Fig. 4. Changes of urease activity in the hemolymph of the male silkworm from the 4th instar to adult emergence. Silkworm variety: Kōhaku × Dōei.

Table 3. Effects of addition of jack bean meal, soybean meal, and jack bean urease to artificial diet, and of urease injection on the urea contents^{a)} in the cocoon shell and the pupal hemolymph

Dietary conditions and treatment	Urea content in the cocoon shell ($\mu\text{g/g}$)	Urea content in the hemolymph of 3-day-old pupae ($\mu\text{g/ml}$)
Feeding on mulberry leaves throughout the larval stages	59 ± 2	13 ± 2
Feeding on mulberry leaves for the last 2 days of the last instar after rearing on artificial diet	37 ± 0.3	31 ± 2
Feeding on artificial diet, and then on diet coated with jack bean meal for the last 2 days of the last instar	472 ± 30	Died
Feeding on artificial diet, and then on diet coated with soybean meal for the last 2 days of the last instar	$2,156 \pm 25$	$2,682 \pm 18$
Feeding on artificial diet coated with mulberry leaf powder ^{a)} for the last 2 days of the last instar	67 ± 15	62 ± 19
Feeding on artificial diet throughout the larval stages	$2,347 \pm 40$	$1,652 \pm 100$
Feeding on artificial diet coated with jack bean urease for the last 2 days of the last instar	41 ± 5	23 ± 4
Injection of urease solution ^{b)} into the mature larvae reared on artificial diet	51 ± 0.0	41 ± 7

a) Powder was prepared by freeze-drying of mulberry leaves.

b) 0.5 mU of jack bean urease per 10 μl of 0.2 M

その中に含まれるカナバニンの毒性のために、化蛹に至らず、蛹血液の尿素量は測定できなかった。脱脂大豆粉末を同様に2日間だけ人工飼料に塗布して与えた場合には繭層および血液ともに尿素量の低下は起こらなかった。しかし、ナタ豆ウレアーゼあるいは55°Cで風乾後粉碎した桑葉粉末を人工飼料に塗布して熟蚕前2日間与えると繭層および血液中に含まれる尿素量は低下した。またナタ豆ウレアーゼをリン酸緩衝液に溶かして熟蚕に注射した場合にも繭層および蛹血液の尿素含量は低下した。これらの実験において繭層尿素量が高い場合には蛹血液尿素量も高く、逆に繭層尿素量が少ない場合には蛹血液尿素量も少ないことが認められた。また飼料にウレアーゼが存在する場合には例外なく繭層および蛹血液中の尿素含量は低下した。

つぎに5齢初期、中期および熟蚕前2日の幼虫に48時間ウレアーゼを投与したのち、ただちに血液ウレアーゼを測定し、ウレアーゼが経口的に取り込まれるか否かを検討した。Table 4に示したように、ウレアーゼ溶液を経口投与すると血液中にウレアーゼ活性が現われ、明らかに体内にウレアーゼが取り込まれることが示された。またその取り込み量は5齢初期より、中、後期にな

phosphate buffer containing 10 mM EDTA, 10 mM DTT and 2 mM cysteine was injected to each larva.

c) Values are means with standard errors ($n=3$).

Table 4. Urease activity in the hemolymph of female larvae receiving jack bean urease^{a),b)}

Period of 5 th instar	Treatment	Urease activity of hemolymph (dpm/ml) ^{c)}	
		Oral administration	
		Through a syringe	With diet
Day 0-Day 2	Urease solution	3,838±1,005	6,845±180
	Water	0	0
Day 2-Day 4	Urease solution	12,913±667	32,440±62
	Water	0	0
Day 4-Day 6	Urease solution	27,383±2,020	60,513±1,237
	Water	0	0

^{a)} Silkworm variety : C. 146×J. 145.

^{b)} An aliquot of jack bean urease solution (1 U/ml) or the same amount of water was administered orally to each larva reared on artificial diet, four times every 12 hr, and the urease activity in the hemolymph was measured immediately after the last treatment.

^{c)} Values are means with standard ($n=5$).

るに従って多くなる傾向であった。

同様に人工飼料にウレアーゼ溶液を塗布して5齢幼虫に48時間だけ与え、上蔭後に前蛹、化蛹1日後および6日後の血液のウレアーゼ活性を測定した。Fig. 5に示したように、無投与の場合は前蛹期、化蛹1日後、6日後ともに血液にはウレアーゼ活性は認められなかった。起蚕時から2日間ウレアーゼ溶液を与えた場合には前蛹

期ではわずかに活性が認められたが、化蛹1日後、6日後の血液には検出されなかった。5齢2日から4日までウレアーゼを投与した場合にも、前蛹期でわずかに活性が認められたが、化蛹1日および6日後には検出されなかった。5齢4日から6日まで与えた場合には前蛹期の血液には高いウレアーゼ活性が認められ、化蛹1日後にも明らかに活性が示されたが、6日後には検出されなかった。しかし、5齢6日から8日(熟蚕)までウレアーゼを与えると同蛹期、化蛹1日後、6日後ともに明らかに血液にウレアーゼ活性が認められた。その傾向は5齢の全期間にウレアーゼを与えた場合とほぼ同じで、前蛹期に最も高く、化蛹1日後にはやや低下し、6日後にはまた高まる傾向であった。この活性の変動はウレアーゼ粉末を人工飼料に塗布して与えた場合も同様であった。桑葉の生葉は高いウレアーゼ活性を示す(未発表)。90℃で乾燥調整した桑葉粉末(ウレアーゼ活性は90%失活)と凍結乾燥した粉末(ウレアーゼ活性は持続される)をそれぞれ人工飼料に塗布して、5齢6日から熟蚕まで与えると、前者では前蛹期および化蛹1日後にわずかに活性が認められたが、化蛹6日後の血液では活性を示さなかった。一方、後者では前蛹期、化蛹1日後および6日後ともに高いウレアーゼ活性を示した。

以上のようにウレアーゼは経口的にカイコの血液に取り込まれること、5齢の前半に与えるより熟蚕直前に与

Fig. 5. Effects of oral administration of urease sources from jack bean and mulberry leaf on urease activity in the hemolymph of the female silkworm reared on artificial diet. Silkworm variety : C. 146×J. 145. Duration of feeding on artificial diet coated with urease sources is indicated in the figure on the left as a rectangular enclosure. Urease solution : jack bean urease solution (1 U/ml), urease powder : crystalline jack bean urease.

えるほうが化蛹後までその活性が維持されることを知った。

考 察

前にも述べたように従来昆虫におけるウレアーゼ活性は否定的であり、その存在を示す報告はきわめて少ない (GILMOUR, 1961; 長谷川, 1979; 石井, 1982)。しかし ROBINSON and BAKER (1939) はキンバエの一種 *Lucilia sericata* の幼虫組織にウレアーゼの存在を報告しており、またマメゾウムシの一種 *Caryedes brosciliensis* も高いウレアーゼ活性をもち、食下した豆に含まれるカナバニンをアルギニン→尿素→ $\text{CO}_2 + \text{NH}_3$ の代謝系のなかで速やかに転換することにより、カナバニンの殺虫作用を消失しているという興味ある結果が報告された (ROSENTHAL et al., 1977)。家蚕におけるウレアーゼについては従来報告がなく、今回の報告が最初であり、またそれが飼料によって大きく異なるという新しい事実が判明した。従来家蚕における尿素の生成はアルギニンをオルニチンと尿素に分解することによって生成されていることが知られていた (井口, 1969)。しかしその運命については追求されておらず、排泄物中にわずかに尿素が検出されること (福田, 1951) からおそらく尿素の形で体外に排泄されているものと考えられていた。本実験で、桑葉育蛹ではウレアーゼによって蚕体で生成される尿素がアンモニアと炭酸ガスに分解されることを知ったが、この事実は家蚕の窒素の異化代謝経路に新しい知識を導入したものといえよう。しかし、生成されるアンモニアはそのままでは毒性があり、おそらくグルタミン、アスパラギンの生成に利用されているものと考えられるが、この点は今後さらに明らかにする必要がある。

蛹のウレアーゼ活性が飼料によって左右されることから、人工飼料育では血液に飼料由来のウレアーゼ活性阻害物質があって、そのためにウレアーゼ活性を示さないのではないかという疑問がもたれたが、この点については前報 (井口ら, 1984) において否定された。すなわち人工飼料育蛹でウレアーゼ活性を示さないのは飼料にウレアーゼ活性がないためであり、換言すれば蚕体のウレアーゼは経口的に取り込まれているものと考えられた。今回この問題をナタ豆ウレアーゼの投与によって実証することができた。とくに5齢末期の投与では取り込み量が多くなり、全蛹期を通してウレアーゼ活性が保持されることが示された。しかし5齢初期および中期にウレアーゼを与えても、その後の投与を中止すると蛹血液のウレアーゼ活性は微弱であり、ついには消失すること

が判明した。この事実はおそらく蚕体に生成される尿素を分解することに消費されたものと思われる。胎児が胎生期に胎盤を通して母体から免疫体を獲得しない哺乳動物では、生後免疫体を獲得するために初乳中に含まれる γ -globulin などのタンパク質を腸管から吸収していることが知られている。すなわち小腸粘膜上皮による pinocytosis によって高分子物質を取り込むものと考えられている (奥田・藤井, 1971)。従来成熟動物では摂取タンパク質は胃および腸内のタンパク質分解酵素で分解され、もしタンパク質のまま吸収されると、その抗原性のために危険であるとみられていた。しかし最近、特殊な条件下では、ある種のタンパク質はそのまま吸収されるという実験報告があり、とくにタンパク質である酵素やホルモン (インスリンなど) についての成績が集中している (奥田・藤井, 1971)。家蚕においても分子量 480,000 にもおよぶ高分子であるウレアーゼが失活せずに経口的に血液中心に取り込まれることを今回の実験で示したが、それが腸管の pinocytosis によって取り込まれているのかまたは別の方法によるのかは今後の研究課題である。血液ウレアーゼが脱皮期に高く、また熟蚕期の消化管のウレアーゼ活性がきわめて高いことを考えると、新生組織の形成および旧組織の崩壊と深い関わりをもっているように思われる。

摘 要

1) 桑葉育と人工飼料育によって得られた 15 品種の蚕蛹について、血液のウレアーゼ活性を測定したところ、前者では 40~300 mU/ml の活性があり、人工飼料育では検出されなかった。

2) 化蛹直後から成虫に至るまでの全蛹体のウレアーゼ活性は、人工飼料育ではまったく認められなかったが、桑葉育では全般に高く、蛹期後半に低下して成虫で上昇する傾向を示した。

3) 蚕体組織のウレアーゼ活性の発育に伴う変化を検討した結果、人工飼料育では調査したどの組織でも活性が認められなかった。一方、桑葉育では、マルピーギ管、卵巣、脂肪組織、体壁、消化管および網糸腺では多くの場合活性が認められた。また熟蚕の消化管ではとくに高い活性が示された。

4) 桑葉育によって得られた卵についてもウレアーゼ活性が認められた。

5) 4 齢中期から成虫に至るまでの血液ウレアーゼ活性の変動を人工飼料育と桑葉育の間で比較したところ、人工飼料育ではまったく活性が認められなかったが、桑

葉育では4眠中、吐糸完了時（前蛹期）に高い活性を示した。

6) ナタ豆ウレアーゼが経口的に蚕体に取り込まれることを示す結果が得られたが、その活性が全蛹期まで維持されるには熟蚕前2日の投与で十分であることが認められた。また同じ時期に桑葉粉末を人工飼料に塗布して与えても蛹血液にはウレアーゼ活性が現われた。

引用文献

- 福田紀文(1951) 家蚕の蛹化と絹質物形成との関係に就て。蚕試報 13: 423—475.
- GILMOUR, D. (1961) [伊藤智夫 訳, 1963] 昆虫生化学. 東京: 岩波書店, pp. 176—178.
- 長谷川金作(1979) 昆虫変態の生化学. 東京: 南江堂, p. 131.
- 井口民夫(1969) 家蚕のアミノ酸栄養に関する研究. II. プロリン要求およびアルギニン要求に対する数種アミノ酸の影響. 蚕試報 23: 389—410.
- 井口民夫・山田政枝・中村晃三(1984) ^{14}C -尿素を用いた家蚕蛹血液のウレアーゼ活性の測定. 応動昆 28: 43—48.
- 石井象二郎(1982) 昆虫生理学. 東京: 培風館, p. 243.
- 奥田邦雄・藤井輝美(1971) 消化と吸収—その臨床. 東京: 中外医学社, pp. 48—52.
- ROBINSON, W. and F.C. BAKER (1939) The enzyme urease and the occurrence of ammonia in maggot-infected wounds. J. Parasitol. 25: 149—155.
- ROSENTHAL, G.A., D.H. JANZEN and D.L. DAHLMAN (1977) Degradation and detoxification of canavanine by a specialized seed predator. Science 196: 658—660.
- 山田政枝・中村晃三・井口民夫(1983) 家蚕の繭層中の遊離アミノ酸および尿素含量に及ぼす飼料の影響. 応動昆 27: 46—51.