カイコガ脳－側心体－アラタ体の培養と羽化ホルモン活性¹⁾

榊原弥佳・折笠千登世²⁾・普後 一

東京農工大学農学部

Cultivation of the Brain-Corpora Cardiac-Corpora Allata Complex of the Silkworm, *Bombyx mori* and Eclosion Hormone Activity of the Cultured Organs and Medium. Mika SAKAKIBARA, Chitose ORIKASA³⁾ and Hajime FUGO (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8, Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **34**: 63-70 (1990)

In order to clarify the regulation mechanism for eclosion hormone synthesis and secretion, fundamental culture conditions for brain-corpora cardiac-corpora allata complexes (Br-CC-CA complexes) of the silkworm, *Bombyx mori*, were established. When 10 brains were placed in 3 ml of CSM-2F medium, eclosion hormone activity was detected throughout the cultured periods. On the 6th day of the cultivation, the positive response for *Bombyx* eclosion hormone assay from the cultured brains was about 60%, and thereafter the activity decreased with the culture. Eclosion hormone activity was first detectable from the cultured medium 6 days after the cultivation. The highest eclosion hormone titer in the cultured medium was 22.5 units. It was concluded that culture conditions were not appropriate for the hormone synthesis since the hormone titer in brains and culture media was extremely low compared with those *in vivo*. Therefore, the culture conditions were modified for using Br-CC-CA complexes. It seemed suitable to culture 10 Br-CC-CA complexes together in 1 ml of CSM-2F medium with a gentle stream of air at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in 16 L-8 D. In these conditions, an increase of about 2-fold in eclosion hormone titer was observed in a brain during 12 day culture periods. Although the eclosion hormone activity was not detected in CC-CA and media at the initiation of culture, hormone activity in CC-CA could be detected 4 days after onset of the cultivation. Furthermore, the hormone titer in CC-CA became 2 units after 12 days cultivation. On the other hand, 55 units of hormone titer was detected in 1 ml of the medium 12 days after onset of cultivation, indicating that 5.5 units of hormone were released from 1 Br-CC-CA complex. Eclosion hormone titer detected from cultured Br-CC-CA complexes and media and expressed as the titer from a single Br-CC-CA complex coincided well with the hormone titer present in 1 intact animal. Morphological changes of brain and CA were scarcely observed during 16 days culture periods in the CSM-2F medium. These results indicate that the synthesis and secretion of eclosion hormone occurred during the culture periods.

緒 言

昆虫の羽化は1日のうち種特異的な時間帯に集中しておこなうことが知られている。たとえばカイコガ (*Bombyx mori*) では、蛹を成虫発育期間中16時間明-8時間暗(16L-8D)の光周条件下に保護しておく、成虫化完了後最初の明条件開始から1.5時間以内に羽化がおこなう(黄色・渡辺, 1978 a, b; 普後, 1982)。この羽化時刻の

猝付け (gating) は、成虫発育期間中に与えられた光周条件により変動し(黄色・渡辺, 1978a, b) その猝付け機構には脳が不可欠な存在であることが報告されている(普後, 1982, 1986)。

TRUMAN and RIDDIFORD (1970) は、羽化時間帯の異なる2種の鱗翅目昆虫(セクロピア蚕 *Hyalophora cecropia* およびサク蚕 *Antheraea pernyi*) 間の脳の交換移植実験や、脳磨砕物の注射実験などを行い、昆虫の羽化は脳に存在

1) 本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No. 63480046) の援助を受けて行った。

2) 現在 理化学研究所

3) Present address: Physical and Chemical Research Institute, 2-1, Hirosawa, Wako, Saitama 351-01, Japan.

1989年8月7日受領 (Received August 7, 1989)

1989年10月30日登載決定 (Accepted October 30, 1989)

すると考えられる生物時計の指令に従った、羽化ホルモン (eclosion hormone) の放出により誘導されることを証明した。羽化ホルモンはペプチドホルモンの一種であり、セクロピア蚕、サク蚕、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) などその存在が報告されている (TRUMAN, 1971, 1973; REYNOLDS and TRUMAN, 1980, 1984)。カイコガでも羽化ホルモンの存在が明らかにされ (普後・岩田, 1983a, b) 精製・単離が進められた結果、アミノ酸配列もほとんど解明された (NAGASAWA et al., 1983, 1985, 1987; KONO et al., 1987)。

羽化ホルモンは脳の神経分泌細胞群で産生された後、軸索を通して貯蔵・放出器官に移動し、そこから放出されると考えられている。タバコスズメガでは脳側方部にある5対の神経分泌細胞が羽化ホルモン産生細胞として同定され、貯蔵・放出器官は側心体-アラタ体とされた (COPENHAVER and TRUMAN, 1986)。また、カイコガでは羽化ホルモンの貯蔵・放出器官はアラタ体であるとされている (普後・岩田, 1983b)。

羽化ホルモンが脳で合成され、貯蔵・放出器官に移動し、生物時計の指令により体液中へ放出されることを直接証明するためには、これらの器官を培養し、ホルモンの合成や培養液中への放出について検討することが必要である。本稿では、羽化ホルモンの合成や放出を制御する機構を解明する手段として、まずカイコガ脳あるいは脳-側心体-アラタ体連合体の培養系について検討した結果を報告する。

本文に入るに先立ち、本稿をご校閲いただいた東京農工大学害虫学研究室三橋淳教授に厚く感謝の意を表する。

材 料 と 方 法

1. 供試蚕と飼育方法

実験にはカイコガの2品種 (日106号×大造, 日122号×支115号) を用いた。孵化後の幼虫は自然日長下, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の蚕室内で飼育した。給桑は1日2回行った。化蛹後の蛹は16L-8D光周条件下, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーターに保護した。この条件下で、日106号×大造種は化蛹から9~10日目、日122号×支115号種は11~12日目に羽化した。

2. 脳および脳-側心体-アラタ体の培養

脳単独の培養には、日106号×大造種を用いた。化蛹直後の個体を75%アルコールに30秒~1分間浸漬し、体表を消毒して滅菌濾紙上で乾かした。頭部にカミソリで傷を付け、ピンセットで脳を摘出した。摘出した脳は

滅菌した0.9% NaCl溶液で3回、さらに培養液で1回洗浄し、培養皿に移した。培養皿は市販の滅菌済ディスポーサブルペトリデッシュ (3.5×1.0 cm) を使用した。培養液は市販のGrace培地 (Gibco社製) またはCSM-2F液 (MITSUHASHI, 1968) を使用した。培養皿には10個の脳を入れ、1脳あたり $300 \mu\text{l}$ (3 ml /培養皿) の培養液量とした (Fig. 1A)。乾燥による培養液の損失を防ぐため、蒸留水を少量入れたひとまわり大きなシャーレの中に培養皿を置いた。培養皿は16L-8D光周条件下, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーター内に静置し、一定期間培養を行った。

脳-側心体-アラタ体連合体の培養実験には、日122号×支115号種の吐糸開始1日目の熟蚕幼虫を用いた。熟蚕幼虫の頭部を解剖用ハサミで切断した。頭殻の縫合線に沿ってハサミで切れ込みを入れ、滅菌した0.9% NaCl溶液を満たした解剖皿上に、頭殻内部が露出するように両端を開いてピンでとめた。解剖顕微鏡下でピンセットを使用し、脳-側心体-アラタ体間の軸索を切断しないように注意深く脳-側心体-アラタ体連合体を摘出した。なお、これらの器官に分布する気管はできるだけ付けたままとした。脳-側心体-アラタ体連合体の培養時には培養液交換を容易にするためと培養器官の支持台とを兼ねて、ナイロン製のメッシュ (オートクレーブ滅菌済) を培養皿に敷いておき、その上に連合体を載せた。1培養皿には10脳-側心体-アラタ体連合体を入れた。培養液はCSM-2F液を使用し、液量は1連合体あたり $300 \mu\text{l}$ または $100 \mu\text{l}$ (3 ml または 1 ml /培養皿) とした。また、脳-側心体-アラタ体連合体の培養は培養装置 (Fig. 1B) 内で行った。空気の入出口を備え付けた密閉容器 ($14 \times 20 \times 7$ cm) を用意し、脱脂綿・蒸留水を通すことにより滅菌した空気をエアープンプで容器内に送り込んだ。容器の一方から送られた空気は内部を通り抜け、もう一方の側に付けられた出口から穏やかに流出した。培養にあたってはこの装置全体をインキュベーター内に設置した。その他の培養条件はすべて脳単独の培養のときと同様にした。なお、培養装置を使用した場合には容器の中に蒸留水を通した湿った空気が送られるため、常に高湿度状態に保たれており培養液の乾燥は防がれている。

3. 培養器官および培養液の回収

培養脳、側心体-アラタ体および培養液の回収は、すべて点灯から2時間以内に行った。培養脳および側心体-アラタ体は0.9% NaCl溶液とともに磨砕した後、8,000 rpmで15分間遠心し、上清を羽化ホルモン抽出

Fig. 1. The culture dish ($\phi \times H$: 3.5×1.0 cm) (A) and culture apparatus ($W \times L \times H$: $14 \times 20 \times 7$ cm) (B).

Fig. 2. Change of eclosion hormone activity in a cultured brain. Ten brains were incubated in 3 ml of CSM-2F medium. At the indicated days, the brains were homogenized with $200 \mu\text{l}$ of 0.9% NaCl solution. After centrifugation, supernatant was assayed. Ten animals were used for each assay. Hormonal activity was determined by the *Bombyx* eclosion hormone assay (FUGO and IWATA, 1983a). Three to five determinations were shown.

液として生物検定 (後述) に供した。抽出量は 1 器官あたり $10 \mu\text{l}$ または $20 \mu\text{l}$ となるように調整した。

一方、培養液については次のように処理した。1 脳-側心体-アラタ体連合体につき $300 \mu\text{l}$ の培養液量とした場合には、回収後 1 晩蒸留水に対して透析し凍結乾燥した。凍結標品は蒸留水に溶解し、羽化ホルモン検定試料とした。また、1 連合体あたりの培養液を $100 \mu\text{l}$ と

した場合は、培養液をそのまま検定試料とし、生物検定に供した。

4. 羽化ホルモンの生物検定法

羽化ホルモン活性の検定は、普後・岩田 (1983a) の生物検定法により行った。検定には日 106 号×大造種の雄個体を用いた。羽化予定時刻 8 時間前の蛹である潜成虫を検定個体とし、1 検定個体あたりの注射液量は $20 \mu\text{l}$ と定めた。対照区として 0.9% NaCl 溶液、あるいは未使用の培養液をマイクロシリンジで同量注射した。検定試料注射後、2 時間以内に一連の羽化行動 (普後, 1982) を伴って羽化がおこった場合 (早期羽化誘導)、投与した試料中に羽化ホルモン活性が存在すると判定した。また、検定試料と羽化誘導との用量反応関係をそれぞれ求め、検定個体数の 50% の羽化を誘導する標品量を算出した。この時の値をカイコガ羽化ホルモン 1 単位 (unit) とし、それぞれの標品中に含まれる総羽化ホルモン単位 (力価) を求めた。

結 果

1. カイコガ脳の単独培養

カイコガ脳を単独で培養した。当初培養液には Grace の培地を用い培養を試みた (折笠, 1986) が、培養液から羽化ホルモン活性は検出されなかった。そこで次に、CSM-2F 培地 (MITSUHASHI, 1968) を用い、培養後の脳および培養液中の羽化ホルモン活性について検討した。このときの培養液量は培養脳 10 個に対し 3 ml とした。

培養開始後5日目から経日的に培養脳を回収して羽化ホルモンの抽出を行い、脳に存在する羽化ホルモン活性を生物検定法により測定した (Fig. 2)。培養5日目の脳からはカイコガ早期羽化誘導率にして60%前後の羽化ホルモン活性が検出された。しかしその後培養日数を増すごとに、ホルモン活性は減少する傾向にあり、培養11日目にはおよそ40%となった。

一方、培養液中の羽化ホルモン活性についても調査した。培養液を経日的に回収した後調整 [培養液をそのまま検定すると生理活性物質の量が非常に少なく、生物検定では活性が検出されないことが予想されたため、培養液は一度凍結乾燥して10倍に濃縮した (3 ml→300 μ l)] し、培養液中の羽化ホルモン活性を生物検定法により測定した (Table 1)。

羽化ホルモン活性は、培養開始後6日目までの培養液中には検出されなかった。しかし、脳を7日間培養した培養液あるいは8日間培養した培養液中のホルモン活性を調べたところ、早期羽化誘導率にして約20~30%程度のホルモン活性が検出された。脳を9日間培養した培養液には検定個体の約半数を羽化させる程度のホルモン活性が存在していた。そこで脳を8日間培養した後、培養液を新しいものと交換し、さらに24時間脳を培養した。この培養液についてホルモン活性を測定した。このときの検体調整も先と同様に行った。その結果、濃縮した培養液20 μ l 中には高いホルモン活性 (羽化誘導率56%) が認められた (Table 1)。また脳を9日間培養した後、培養液を交換してさらに4日間培養した。その培養液を回収してホルモン活性を調べたところ、その活性は20%前後に低下していた (Table 1)。

回収した培養液のうち、とくに羽化ホルモン活性の高かったものについて段階希釈を行い、この培養液中のホルモン力価を測定した (Fig. 3)。濃縮した培養液を1/10の希釈率にしたときの羽化誘導率は約10%前後であったが、3/10~9/10と希釈率が減少するに従い、羽化誘導率は高くなり、50%の検定個体を羽化させるのに必要な検体量は濃縮培養液の0.65倍希釈であった (Fig. 3)。したがって濃縮した培養液20 μ l 中には1.5単位の羽化ホルモン活性が存在することとなる。これらの結果より培養液全量中には22.5単位の羽化ホルモン活性が存在し、これは脳1個あたりにすると2.25単位と換算された。

2. カイコガ脳-側心体-アラタ体連合体の培養

(1) 培養条件の検討

カイコガ脳-側心体-アラタ体連合体の培養に適した

Table 1. Eclosion hormone activity in culture medium

Days after cultivation	Eclosion hormone activity (%) ^{a)}
6	0.0
7	28.6
8	20.0
9	50.5
10	25.0
8-9 ^{b)}	56.3
9-13 ^{c)}	20.0

a) Eclosion hormone activity was estimated by the *Bombyx* eclosion hormone assay (FUGO and IWATA, 1983a). The mean of 2 to 3 determinations was shown.

b) At the 8th day of cultivation, brains were transferred into a fresh CSM-2F medium. After further cultivation for 24 hr, medium was collected and assayed.

c) At the 9th day of cultivation, brains were transferred into a fresh CSM-2F medium and thereafter incubated for 4 days.

Fig. 3. Dose-response curve of eclosion hormone in the *Bombyx* assay (FUGO and IWATA, 1983a). Ten brains were incubated in 3 ml of CSM-2F medium. Collected medium was dialyzed against distilled water and then lyophilized. The lyophilized material was dissolved in 300 μ l of distilled water. This solution was diluted with distilled water as the indicated rates.

条件を検索するため、3通りの培養条件を設定した。すなわち Fig. 1 に示した培養装置を使い、以上の条件で培養を行った：[実験 I] 空気の供給を停止し、培養液量を一連合体あたり 300 μ l として18日間培養；[実験 II] 通気を行い、培養液量は一連合体あたり 300 μ l として12日間培養；[実験 III] 通気条件下、培養液量を100 μ l として17日間培養。

実験 I の条件で培養を行ったところ、培養脳中の羽化ホルモン活性は高いが、側心体-アラタ体からは活性が検出されなかった。また、培養液から検出されたホルモン活性も非常に低かった (Table 2)。次に実験 II の条件

で培養を行ったところ、脳はもちろん側心体-アラタ体からも羽化ホルモン活性が検出された。しかし側心体-アラタ体での羽化ホルモン活性は低く、培養液からも高いホルモン活性は検出されなかった (Table 2)。実験 III の条件では培養液を羽化ホルモン活性検定試料としてそのまま生物検定に供した。その理由は、培養液量が総量で 1 ml と少ないため、透析や凍結乾燥などをすることによって生ずる原液の損失を防ぐためである。結果に示

Table 2. Eclosion hormone activity in cultured-organs and medium

Experiment	Eclosion hormone activity ^{a)} (%)		
	Brains (0.5 Brain equivalent)	CC-CA (0.5 CC-CA equivalent)	Medium ^{b)} (Brain-CC-CA complex equivalent)
I ^{c)}	100	0	6 (0.6)
II ^{d)}	90	20	17 (0.6)
III ^{e)}	75	60	60 (0.2)

a) Eclosion hormone activity was estimated by the *Bombyx* eclosion hormone assay (Fugo and IWATA, 1983 a). The mean of 2 to 3 determinations was shown.

b) Culture medium was once lyophilized and then dissolved in distilled water, except in experiment III. Dosage of the concentrated material was the equivalent of the brain corpora cardiaca-corpora allata complex. In experiment III, medium was directly assayed.

c) Ten Br-CC-CA complexes were incubated in 3 ml of CSM-2F medium for 18 days without air supply to the culture apparatus (Fig. 1).

d) Ten Br-CC-CA complexes were incubated in 3 ml of CSM-2F medium for 12 days with air supply to the culture apparatus (Fig. 1).

e) Ten Br-CC-CA complexes were incubated in 1 ml of CSM-2F medium for 17 days with air supply to the culture apparatus (Fig. 1).

したごとく、脳中の羽化ホルモン活性は若干減少していたが、側心体-アラタ体からは早期羽化誘導率にして 60% の羽化ホルモン活性が検出された。また培養液についてみると実験 I, II よりもはるかに高いホルモン活性が検出された (Table 2)。以上の結果より、カイコガ脳-側心体-アラタ体連合体の培養には実験 III の条件が良いと判断された。したがって以後の培養実験はこの条件下で行った。なお今回の培養実験では、培養液の pH は培養前後でほとんど変化しなかった (pH 6.2)。

(2) 培養脳、側心体-アラタ体および培養液中の羽化ホルモン力価

培養開始時、および 4 日、12 日間培養を行ったときの連合体、培養液を回収し、脳、側心体-アラタ体および培養液それぞれに含まれる羽化ホルモン力価を測定した (Table 3)。培養 0 日目の脳には力価にしておよそ 2 単位の羽化ホルモンが存在したが、側心体-アラタ体からはまったくホルモン活性は検出されなかった。しかし 4 日間培養を行うと、側心体-アラタ体には脳を上回る羽化ホルモン活性が存在していた。さらに培養開始か

Table 3. Changes of eclosion hormone titers^{a)} in cultured organs and media

Hormone source	Eclosion hormone titer (units/organ or 0.1 ml medium)		
	0 ^{b)}	4	12
Brain	1.8±0.6	1.6±0.2	3.9±0.5
CC-CA complex	0	2.1±0.3	1.8±0.4
Medium	0	0	5.5±0.6

a) Eclosion hormone titers were estimated by *Bombyx* eclosion hormone assay (Fugo and IWATA, 1983 a). Each determination was the mean (±S.E.) of at least three assays.

b) Days after onset of cultivation.

(a) Right after incubation.

(b) 16 days after cultivation.

Fig. 4. Morphological change of brain-corpora cardiaca-corpora allata complex of the silkworm, *Bombyx mori*. Scale: 0.5 mm.

ら 12 日目についてみると、脳では 4 単位、側心体－アラタ体では 2 単位近いホルモン量が存在した。一方、培養液についてみると、培養 0 日目、4 日目に回収された培養液にはまったく羽化ホルモン活性が検出されなかった。しかし 12 日間培養を行った後に回収した培養液 0.1 ml 中には 5.5 単位前後の羽化ホルモン力価が存在していた。

3. 培養脳－側心体－アラタ体連合体の形態変化

培養開始前、および培養 16 日目の脳－側心体－アラタ体連合体の形態を Fig. 4 に示した。培養前の脳は表面が平滑で輪郭が明瞭であったが、培養後はいくぶん変形した。また、アラタ体はより丸く、大きくなった。したがって脳、アラタ体とも 16 日間培養することにより、若干の形態変化がおこることが観察された。

考 察

普後・岩田 (1983b) は、カイコガ脳の磨砕抽出物中には化蛹から羽化にかけて継続的に羽化ホルモン活性が検出されること、また羽化前後でアラタ体中の羽化ホルモン活性が急激に減少することを報告した。一方、黄色・渡辺 (1978b) は羽化するカイコガの脳間部神経分泌細胞群およびアラタ体へ向かう軸索中にはパラアルデハイドフクシン (PAF) に染色される神経分泌顆粒が存在し、この PAF 染色性物質が羽化ホルモンである可能性が高いことを示唆している。これらのことからカイコガ羽化ホルモンは脳で産生されアラタ体から放出されると推測されている (普後, 1986)。しかし、このことはまだ実証されてはいない。さらに、羽化ホルモンの放出時期は生物時計の指示によりコントロールされる (TRUMAN and RIDDIFORD, 1970, 1974; 普後, 1982, 1986; FUGO et al., 1984) と考えられているが、その機構については不明な点が多い。

本研究では羽化ホルモン合成および放出機構を解明するための一手段として、カイコガ脳あるいは脳－側心体－アラタ体連合体の培養系の確立について検討した。

第一にカイコガ脳単独の培養を試みたが、Grace 培地では良好な結果が得られなかった (折笠, 1986)。そこで、AGUI (1975) がヨトウガ (*Mamestra brassicae*) の脳の培養に使用した CSM-2F 培地 (MITSUHASHI, 1968) に変えて培養を行ったところ、脳および培養液から羽化ホルモン活性が検出された (Table 1)。CSM-2F 培地は Grace 培地に比べ、牛胎児血清などが入った複雑な組成をしているため、おそらく栄養条件などがより脳の培養に適していたものと考えられる。

培養脳の羽化ホルモン活性は、培養日数を追うごとに減少する傾向があった (Fig. 2)。これは *in vivo* で得られた結果 (普後・岩田, 1983b) と比較すると、顕著な経時的増減があるとはいいいくいの、培養脳で羽化ホルモンが合成されているか否かについてこの結果からは判定できない。一方、培養液についてみると、培養 7 日目から 10 日目にかけて回収された培養液からは羽化ホルモン活性が検出されている (Table 1)。この培養液中に存在する羽化ホルモンは、培養脳から放出された可能性が高い。とくに培養 8 日目から 9 日目にかけて回収された培養液からは早期羽化誘導率にして 60% 近いホルモン活性が得られた (Table 1)。このことは、この日に羽化ホルモンの放出がおこったことを強く示唆する。しかし、培養 8～9 日目以前に回収された培養液からもわずかながら羽化ホルモン活性が検出されている (Table 1)。これはおそらく培養を行ったのが脳単独であり、羽化ホルモンの貯蔵放出器官と考えられるアラタ体に連繋している軸索が切断されているため、軸索切断部位から培養液中に羽化ホルモンが滲出したためであろう。

最も高い培養液中の羽化ホルモン活性は、力価にして 1 培養脳あたりおよそ 2.25 単位と換算された (Fig. 3)。FUGO et al. (1984) は、羽化当日正常な個体で体液中に検出される羽化ホルモン力価は、1 個体あたり 6～8 単位であると報告しているので、これらの値の間にはかなりの差がある。

これら脳単独の培養実験をみると、生体内でみられる羽化ホルモンの変動 (普後・岩田, 1983b; FUGO et al., 1984) を再現しているとは思えない。したがって、生体内でみられる羽化ホルモンの変動を *in vitro* 条件下で再現させ、かつ本実験の目的である羽化ホルモンの合成や放出を制御する機構を解明するためには、培養条件の改良が必要である。そこで Fig. 1 に示した培養装置を作り、さらに脳－側心体－アラタ体連合体の培養を試みた。

脳－側心体－アラタ体連合体の培養に際し、培養連合体をいつの時期の個体から得るのが良いかを検討した。化蛹直後の個体からは脳は容易に摘出できるが、脳－側心体－アラタ体連合体を一緒にとることは非常に困難であり、かつ時間を要する。一方、5 齢幼虫から連合体を摘出するのは容易であるが、培養日数が非常に長期になる可能性が高い。そこで、吐糸 1 日後の熟蚕幼虫 (潜蛹) から連合体を摘出することにした。また供試カイコガ品種を日 122 号×支 115 号とした。これは脳単独の培養に

使用した日 106 号×大造よりも日 122 号×支 115 号のほうが大型であり、短時間に摘出器官を多数そろえる必要がある上で作業がしやすいためである。

この日 122 号×支 115 号熟蚕幼虫脳-側心体-アラタ体連合体を用いて、次に培養条件の改良を行った。Fig. 1 に示した装置に空気を送ったり、培養液量を変えて実験を行ったところ、培養装置に空気を送りかつ培養液量は 1 連合体あたり 100 μ l とした条件 (実験 III) のときに良い結果が得られた (Table 2)。培養条件 III (実験 III) の結果は生体での羽化ホルモンの値 (普後・岩田, 1983b; Fugo et al., 1984) にほぼ近いものである。とくに培養液中の羽化ホルモン活性が他条件に比べて頭部換算量が減少したにもかかわらず圧倒的に高い点から、この培養条件がより生体内での条件に近接していることが示唆された。このことは、Table 3 に示した結果からも支持される。培養開始時には脳の方に羽化ホルモン活性が認められ、側心体-アラタ体、培養液いずれからも羽化ホルモン活性が検出されなかった。ところが、4 日間培養すると、脳と側心体-アラタ体それぞれから羽化ホルモン活性が認められた。とくに側心体-アラタ体では 2.1 単位と脳を上回る羽化ホルモンが存在していた (Table 3)。アラタ体単独の培養では羽化ホルモン活性は認められない (榊原, 未発表) ので、側心体-アラタ体中の羽化ホルモン活性は脳由来のものと考えられる。12 日間連合体を培養したところ、脳 (3.9 単位)、側心体-アラタ体 (1.8 単位) そして培養液 0.1 ml 中には 5.5 単位の羽化ホルモン活性が認められた (Table 3)。CSM-2F 培地それ自体には羽化ホルモン活性はないので、培養液中の羽化ホルモン活性は、脳-側心体-アラタ体連合体に由来すると考えるのが妥当であろう。すなわち培養した脳-側心体-アラタ体から羽化ホルモンが培養液中に放出された可能性が非常に高い。さらに、この時得られた羽化ホルモン力価は 1 脳-側心体-アラタ体連合体あたり 5.5 単位前後と換算されている。この値は脳の方の培養で得られたホルモン力価 (Fig. 3) よりも 2~3 倍高く、また Fugo et al. (1984) により報告された体液中の羽化ホルモン力価により近い値となっている。脳、側心体-アラタ体とも培養期間中に羽化ホルモン力価が顕著に増加し、培養液からも高いホルモン力価が検出されたことから、カイコガ脳-側心体-アラタ体連合体は *in vitro* 条件下で羽化ホルモンを合成しそれを培養液へ放出しうることが強く示唆された。また、培養条件については培養液量を減らし、器官への空気の供給を行うことが少なくとも羽化ホルモンの合成に対して有効であると考えら

れた。

カイコガの脳は幼虫から成虫にかけて劇的な形態変化をとげるが、今回培養前後の脳-側心体-アラタ体連合体の形態を比較した (Fig. 4) 限りでは明らかな変化は観察されなかった。これは、培養条件が生体内の環境を忠実に再現していないためとも考えられるが、形態変化については培養条件の適否だけでなく、他のホルモン類の作用を考慮する必要もあると思われる。事実、培養液中にエクダイソンを入れることにより成虫脳の視葉に相当する部分の発達を観察されている (榊原, 1989)。

昆虫の脳を培養し、前胸腺刺激ホルモンの前胸腺への作用 (AGUI, 1975) を検討したり、タバコスズメガの休眠誘導に対する脳-側心体-アラタ体系の制御機構を検討 (BOWEN et al., 1984) したりした報告はある。しかし今回のように、脳-側心体-アラタ体連合体を培養し、実際に放出されたペプチドホルモンを確認した例は多くない。本研究では羽化ホルモンについてのみ検討したが、脳で作られる他のペプチドホルモン類 (前胸腺刺激ホルモンなど) も培養液中に存在する可能性がある。したがって、この培養系は脳内神経分泌細胞群由来のペプチドホルモン類の合成や放出機構の解明に有効な手段となりうるであろう。

摘 要

羽化ホルモンの合成および放出の制御機構を解明する手段としてカイコガ脳および脳-側心体-アラタ体連合体の培養実験を行い、以下の結果を得た。

1) CSM-2F 液を使用して脳単独の培養を行った。培養開始後 5 日目の脳からは早期羽化誘導率にして 60% 前後のホルモン活性が検出された。また培養開始後 6 日目以降に回収された培養液からも羽化ホルモン活性が検出された。培養 8 日目に培養液を交換し、さらに 1 日同じ脳を培養した後に回収した培養液からは 22.5 単位のホルモン活性が検出された。

2) 脳-側心体-アラタ体連合体の培養条件を検討したところ、培養装置で空気の流通を図り、1 連合体あたりの培養液量を 100 μ l とすることが羽化ホルモンの合成および放出に有効であることが判明した。

3) 培養開始時と 4, 12 日間培養を行った後の脳、側心体-アラタ体および培養液中に存在する羽化ホルモン力価を測定した。脳中の羽化ホルモン力価は培養開始時の 2 単位から 12 日目の 4 単位に増加した。また側心体-アラタ体では培養 4 日目にホルモン活性が検出され、12 日目にはおよそ 2 単位となった。培養液からは培養開始

後 12 日目に至って、1 連合体あたり 5.5 単位の羽化ホルモン力価が検出された。これらの結果から、培養条件下でも羽化ホルモンの合成および放出が行われることが確認された。

4) 培養開始時と培養開始後 16 日目の脳-側心体-アラタ体連合体の形態を観察した。培養中に脳およびアラタ体の形態は若干変化した、幼虫脳の基本的な形態は維持されていた。

引用文献

- AGUI, N. (1975) Activation of prothoracic gland by brain *in vitro*. J. Insect Physiol. 21: 903—913.
- BOWEN, M.F., D.S. SAUNDERS, W.E. BOLLENBACHER, and L.I. GILBERT (1984) *In vitro* reprogramming of the photo-periodic clock in an insect brain-retrocerebral complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5881—5884.
- COPENHAVER, P.F. and J.W. TRUMAN (1986) Identification of the cerebral neurosecretory cells that contain eclosion hormone in the moth, *Manduca sexta*. J. Neurosci. 6 (6): 1738—1747.
- 普後 一 (1982) カイコガの羽化行動とそのホルモン制御. 日蚕雑 51 (6): 523—527.
- 普後 一 (1986) 昆虫羽化ホルモンの作用機作. 植物防疫 40 (5): 230—233.
- 普後 一・岩田裕子 (1983a) 家蚕脳ホルモン粗抽出物中の羽化ホルモン活性と検定法. 日蚕雑 52 (1): 71—78.
- 普後 一・岩田裕子 (1983b) 家蚕の蛹-成虫発育期間における羽化ホルモン活性の変動. 日蚕雑 52 (1): 79—84.
- FUGO, H., Y. IWATA and M. NAKAJIMA (1984) Eclosion hormone activity in haemolymph of eclosing silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 30 (6): 471—475.
- KONO, T., H. NAGASAWA, A. ISOGAI, H. FUGO and A. SUZUKI (1987) Amino acid sequence of eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem. 51 (8): 2307—2308.
- MITSUHASHI, J. (1968) Tissue culture of the Rice stem borer, *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera: Pyralidae): III. Effects of temperatures and cold-strage on the multiplication of the cell line from larval hemocytes. Appl. Ent. Zool. 3 (1): 1—4.
- NAGASAWA, H., H. FUGO, S. TAKAHASHI, T. KAMITO, A. ISOGAI and A. SUZUKI (1983) Purification and properties of eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem. 47 (8): 1901—1906.
- NAGASAWA, H., T. KAMITO, S. TAKAHASHI, A. ISOGAI, H. FUGO and A. SUZUKI (1985) Eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: purification and determination of the N-terminal amino acid sequence. Insect Biochem. 15: 573—578.
- NAGASAWA, H., T. MIKOGAMI, T. KONO, H. FUGO and A. SUZUKI (1987) Molecular heterogeneity of eclosion hormone in adult heads of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem. 51 (6): 1741—1743.
- 折笠千登世 (1986) 培養脳における羽化ホルモンの合成と放出. 東京農工大学修士論文.
- 黄色俊一・渡辺四郎 (1978a) カイコの羽化行動に関する研究 (I) 蛹期の光条件と集団羽化リズム. 生物環境調節 16 (1): 27—30.
- 黄色俊一・渡辺四郎 (1978b) カイコの羽化行動に関する研究 (II) 羽化リズムの形成と脳の神経分泌. 生物環境調節 16 (2): 41—46.
- REYNOLDS, S.E. and J.W. TRUMAN (1980) Eclosion hormone. In: Neurohormonal Techniques in Insects. (T. A. MILLER ed.), New York: Springer-Verlag, pp. 196—215.
- REYNOLDS, S.E. and J.W. TRUMAN (1984) Eclosion hormone. In: Endocrinology of Insects. (R.G.H. DOWNER and H. LAUFER eds.), New York: Alan R. Liss., pp. 217—233.
- 榎原弥佳 (1989) カイコガ培養脳-アラタ体連合体による羽化ホルモンの合成・放出と明暗周期. 東京農工大学修士論文.
- TRUMAN, J.W. (1971) Physiology of insect ecdysis. I. The eclosion behaviour of Saturniid moth and its hormonal release. J. Exp. Biol. 54: 805—814.
- TRUMAN, J.W. (1973) Physiology of insect ecdysis. II. Relationship between the hormonal control of eclosion and tanning in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Exp. Biol. 58: 821—829.
- TRUMAN, J.W. and J.M. RIDDIFORD (1970) Neuroendocrine control of ecdysis in silkworm. Science 167: 1624—1626.
- TRUMAN, J.W. and L.M. RIDDIFORD (1974) Hormonal mechanisms underlying insect behaviour. In: Advances in Insect Physiology. Vol. 10. (J.E. TREHERENE, M.E. BERRIDGE and V.B. WIGGLESWORTH eds.), London/New York: Academic Press, pp. 297—352.