殺虫剤の作用機構研究の新技法

I. 昆虫の初代培養を利用した殺虫剤のアッセイ法

清水 利 昭*

筑波大学農林学系

(昭和 54 年 3 月 1 日受理)

Advanced Methods for Studying Mode of Action on Insecticides

I. Insect Primary Tissue Culture for Insecticides Assay

Toshiaki SHIMIZU

*Institute of Agriculture and Forestry, The Tsukuba University,
Ibaraki 300-31, Japan*

細胞培養, 組織培養のメリットとしては, 昆虫の体から生きたままの細胞, 組織をとり出し, ガラス器の中で培養し, 化学薬品, ホルモン, ウイルス等の直接的な作用を単純な系で調べることができるという点があげられる。最近, 組織培養は, 従来の知見をもとに毒性 (残留, 催奇性), 薬理, 代謝試験にまで応用されてきている。Murakami¹⁻⁵⁾ らはヒトの培養細胞を使って各種農薬や化学物質のとり込み, 残留, 代謝について調べている。

ここでは, 最初に培養組織の評価の指標を述べ, 次に, キチン合成とその阻害剤との関係や精巢の培養を紹介し, ホルモンや殺虫剤について解説したい。とくに精巢の培養は, 器官培養と生殖細胞の培養を兼ねているところに興味がある。

1. 組織の変化の何を指標とするか?

一般に農薬の検定を行なうためには, 培地に薬剤を添加し, 日を追って組織の変化を調べる方法がとられているが, 初代培養の欠点は, 定量的な取り扱いが困難なことがあげられる。これを補うためには次のような項目をメルクマールとして採用するとよいと思われる。

1) 形態の変化を経時的に位相差顕微鏡で観察する。
未分化または胚性組織の場合は生育 (growth) や分化

(differentiation) を, すでに成熟した組織の場合には, 成長よりも維持 (maintenance) を指標とする。

2) 固定, 脱水, 染色して組織学的・組織化学的研究に供する。超薄切片にして電子顕微鏡観察に供する。標識物質をとり込ませて, ミクロオートラジオグラフィーをとることもできる。

3) 細胞蛋白質 (一般的な定量法として Lowry 法⁶⁾ を組織培養研究用に改変した Oyama と Eagle⁷⁾ の方法がよく用いられている。), 核酸等の細胞内主要成分を生化学的に測定する。DNA, RNA, 蛋白質合成の前駆体である thymidine, uridine, あるいはアミノ酸などを標識し, その標識物質をとり込ませ, 核酸および蛋白質合成の抑制度を測定する。

4) 細胞培養の場合には, 細胞数や細胞核数を血球計算板や電気式細胞数測定器を用いて測定する。

5) 細胞, 組織の面積, 容積を測定する。

6) 酵素活性や呼吸量の測定, あるいは培地の化学的变化を測定する。

2. キチンとキチン合成阻害剤

Table 1 は Sowa と Marks (1975)⁸⁾ によるゴキブリ (*Leucophaea maderae*) の再生組織を β -エクダイソンを含む培地で培養し, キチン合成を促す条件下 (ゴキブリの再生組織では β -エクダイソンを含む培地でキチンへ

* 元理化学研究所研修員

Table 1 The *in vitro* assay systems for testing chitin biosynthesis inhibitors.

Species	Organs	Inhibitors	Labeled precursors	References
<i>Leucophaea maderae</i>	Leg regenerates ^{a)}	TH 6040 ^{e)} Polyoxin D ^{d)}	N-acetylglucosamine D-glucosamine	Sowa and Marks (1975)
<i>Plodia interpunctella</i>	Wing imaginal disks ^{b)}	TH 6040 Polyoxin D Cytochalasin B ^{e)}	D-glucose	Oberlander and Leach (1974)

^{a)} These from late instar nymphs were cultured in M20S medium containing β -ecdysone.

^{b)} These from last instar larvae were cultured in modified Grace's medium containing β -ecdysone.

^{c)} TH 6040 [N-(4-chlorophenyl)-N'-(2,6-difluorobenzoyl) urea] is an inhibitor of chitin synthesis, but the site of action has yet to be determined.

^{d)} Polyoxin D is an inhibitor of the chitin synthetase.

^{e)} Cytochalasin B is an inhibitor of sugar transport.

の ^{14}C -acetyl glucosamine (AGA) の取り込みが ^{14}C -glucosamine (GA) よりも 10 倍ほど高くなる。) でキチン合成阻害剤である TH 6040, polyoxin D を培地に加え、キチン合成を調べた時の条件、および Oberlander と Leach (1974)⁹⁾ による *Plodia interpunctella* (ノシメコクガ) の wing disks (翅の原基) を用いて同様の実験を行なった条件をまとめたものである。すなわち、阻害剤の作用を知るために標識した glucosamine や acetyl-glucosamine を培地に加え、それらの取り込みからその作用を検討したものである。Sowa と Marks (1975)⁸⁾, Marks と Sowa (1974, 1976)^{10,11)} は TH 6040 あるいは polyoxin D の存在下で ^{14}C -GA や ^{14}C -AGA をとり込ませると ^{14}C -UDP-AGA のみが、どちらの場合にもできることから、TH 6040 と polyoxin D は組織に同じように作用すると考えた。しかし、 ^{14}C -UDP-AGA の生成、蓄積については、まだ、はっきりとした結論を導くに足るデータが得られていないので、そのためにも培養系は有力な手段となりうるであろう。一方、Oberlander と Leach (1974)⁹⁾ は、ノシメコクガの翅の原基を使い cytochalasin B と polyoxin D を培地に加え、キチン合成阻害について調べたところ、これらの薬剤はクチクルの沈積を阻害したと報告しているが、この培養系では、クチクルの沈積をメルクマールにしておき、キチンそのものが生成されたか否かについては、明記していない。培養系ではないが、polyoxin D と chitin synthetase の関係については、Hori ら (1974)¹²⁾ の仕事がある。また、TH 6040 と chitin synthesis との関係については、Post ら (1974)¹³⁾ の仕事があるので参考にしたい。

Marks と Sowa (1976)¹¹⁾ は *in vitro* でゴキブリの再生組織を使って captan, kitazin-p, parathion, quintazene

とキチン合成について興味深い結果を得ている。

3. 精巢の培養と不妊剤

1915 年 Goldschmidt がセクロピアガの spermatocyst の精子形成を *in vitro* で観察して以来、多くの研究者によって生殖巣の培養が行なわれてきている^{14,15)}。以下に八木らが行なっている精巢の培養の例を示す。

1) 培地

培地の調整は α -エクダイソンをエタノールに溶かし、溶媒とともに Grace's の培地 (GIBCO 製) に加えた。溶媒の濃度は培地の 1/100 以下になるようにした。metepa と hempa の濃度は $0.5\ \mu\text{g}$ と $1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにそれぞれ α -エクダイソン ($0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む Grace's の培地で調整された。

2) 培養容器

Mitsuhashi と Maramorosch (1964)¹⁶⁾ が考案した培養容器と同じ型のものを大小 2 種類用いた。すなわち、直径 25 mm, 高さ 10 mm. あるいは直径 15 mm 高さ 4 mm のガラス製リングである。このリングの下端をカバーガラスで封じ、この容器の底に大リングでは $0.15\sim 0.30\ \text{ml}$, 小リングの場合には $0.04\ \text{ml}$ の培地を加え、組織を移した後、上端をカバーガラスで封じ (いわゆる sitting drop culture) 25°C に保存した。

3) 培養操作

Fig. 1 に虫の殺菌から組織の摘出、培地に移すまでの行程を示した。虫は無菌的に人工飼育されたものが良い。

このようにしてヨトウが休眠蛹 3 日目の精巢を α -エクダイソン ($5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む培地で 7 日間培養し、精巢を破き spermatocysts の発達を観察すると、精子形成 (spermatocytes が伸長した spermatids になること) が

Insect
↓
Immerse it in 0.05% mercuric chloride for 2 min
↓
Immerse it in 70% ethanol for 5 min
↓
Rinse twice with sterile distilled water
↓
Take out the organ from the sterilized insect under the dissecting microscope
↓
Place the organ in a small petri dish or Maximov slide filled with insect Ringer's solution or Ringer-Tyrode's salt solution¹⁶⁾
↓
Place the organ in a culture well filled with culture medium
↓
Incubate at 25°C

Fig. 1 The technical methods for the tissue culture.

著しく促進され、伸長した spermatocysts がみられた¹⁷⁾. この系を使って、metepa と hempa を作用させて精細胞の発達を調べた¹⁸⁾. 結果は Table 2 に示したように、metepa は hempa よりも spermiogenesis (精子変態、精子成熟) を抑制した。しかし、metepa や hempa の作用は精巣鞘に作用した結果なのか、直接 spermatocysts に作用した結果なのか、まだ明らかではない。

4. Spermatocyst と JH

カイコが幼虫の spermatocysts を培養して Juvenile

Hormone (JH) が spermatogenesis とくに, spermiogenesis におよぼす影響を検討するとともに, JH の生物検定が可能かについて調べた¹⁹⁾.

1) Spermatocyst

日 122×支 122 の F₁ で 4 齢 3~4 日目の個体を用い、精巣を摘出し、培地中で精巣を微針で破いて中の spermatocysts を培地中に放出させた。

2) 培地

Grace's の培地に必要に応じて熱処理したカイコガ蛹 (1 日目)、ヨトウガ蛹 (3 日目) の血液を加えた。その方法は、蛹から採血した血液を 60°C で、10 分間熱処理をし、3000 rpm で 10 分間遠心分離してその上澄みを 0.45 μ のミリポアフィルターでろ過してこれを一定量 (1/4 または 1/2) になるように Grace's の培地に加えた。JH は JH-I を用い、アセトン: エタノール=1:1 の溶媒に溶かしたものを培地に加え、くんだくさせて用いた。濃度は 0.5, 5, 50 μg/ml にし、溶媒は培地の 1/200 以下になるように調整し、5 日間培養した。

結果は Table 3 に示すように Grace's の培地のみで培養した場合、spermatocysts はすべて pyriform spermatocysts (一部の spermatocyte が伸長し始めた状態) の形状で発育は止まってしまい、その後の発達は、まったく見られなかった。血液を培地に加えた場合には、spermiogenesis (spermatids が伸長する) が急激に促進され、長く伸びた spermatocysts に発達した。この培地に JH を加えると、JH の濃度が高まるにつれてより強く spermatocysts の伸長が抑制されることがわかった。

Table 2 Inhibition of spermiogenesis in *M. brassicae* by chemosterilants *in vitro*.¹⁸⁾

Treatment ^{a)}	No. of exp.	Spermiogenesis					Degeneration of spherical spermatocysts ^{b)}				
		—	±	+	++	+++	—	±	+	++	+++
α-ecdysone (control)	5	0	0	0	0	5	4	0	1	0	0
α-ecdysone + metepa	5	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4
α-ecdysone + hempa	5	0	0	0	1	4	0	0	4	1	0

^{a)} Grace's medium containing 5 μg/ml of α-ecdysone was used as a basic culture medium and 0.5 μg/ml of metepa or 1.0 μg/ml of hempa was added to the medium.

^{b)} Seven days after cultivation, each testis was dissected to examine development or degeneration of spermatocysts.

Spermiogenesis:

—: spherical spermatocysts only; ±: mixture spherical spermatocysts and pyriform spermatocysts; +: elongated spermatocysts are less than 10%; ++: elongated spermatocysts are more than 10% but less than 50%; +++: elongated spermatocysts are more than 50%.

Degeneration of spherical spermatocysts:

—: no degeneration; ±: degeneration <1%; +: 1%-10%; ++: 10%-50%; +++: >50%.

Table 3 Effects of JH-I on spermiogenesis of *Bombyx mori* in vitro.¹⁹⁾

Concentr. of JH in the medium ^{a)} (μ g/ml)	No. of experiments	Spermiogenesis in the medium ^{b)}				
		—	±	+	++	+++
0 (control)	11	0	0	0	2	9
0.5	6	0	0	0	2	4
5	8	0	0	1	5	2
50	4	4	0	0	0	0
G-M only	10	8	2	0	0	0

^{a)} Composition of the medium: Grace's medium (G-M) 75% + heat treated blood of *B. mori* pupae 25%.

^{b)} Spermatocysts were cultivated for 5 days.

—: spherical spermatocysts; ±: spherical spermatocysts and pyriform spermatocysts; +: elongated spermatocysts <10%; ++: ≤10% elongated spermatocysts <50%; +++: elongated spermatocysts ≥50%.

5. 生殖細胞と DDT

生殖細胞に対する DDT の直接的な作用を調べるために、ヨトウガの生殖細胞を用い、DDT のとり入みと、とり入り部位を調べた²⁰⁾.

1) 培地

¹⁴C-DDT はエタノールに溶かし、Grace's の培地に加え 4×10^{-6} M にした.

2) 生殖細胞

ヨトウガ非休眠蛹 (1 日目) の精巢 (10 個) の生殖細胞を用いた. 培養容器中で精巢を破き、生殖細胞を放出させた後、¹⁴C-DDT を含む Grace's の培地 (0.2 ml) を加え 3 時間、25°C でインキュベートした.

3) 生殖細胞のとり扱い方

培養後、培地をとり除き、細胞は遠心 (2000 rpm) しながらか 3 回洗浄した. とり込まれた細胞中の ¹⁴C-標識物質は 0.1 N NaOH で溶かし、一部を液体シンチレーション・カウンターでカウントし、同時に細胞蛋白質を Lowry 法²¹⁾を用いて測定した. 細胞表面に付着した標識物質の除去には低濃度の Triton X-100 を用いた. また、おのおのの濃度の Triton X-100 洗液は 10 分間 30°C で振盪しながらインキュベートし、2000 rpm で遠沈し、上清を回収したものである. このディタージェントを使う方法は Berkowitz 等²¹⁾により紹介されているが、簡単で手とり早く、細胞核を分離でき、酵素実験にも利用できるもので便利である.

Table 4 に示すように、順次、Triton X-100 の濃度を上げると細胞表面に結合していると思われる標識物質が次々と回収された. 最後に細胞に残ったと思われる標識物質は、全標識物質の 50.4% であった²⁰⁾. Triton X-

Table 4 Liberation of ¹⁴C-DDT from cell surface after treatment with various concentrations of Triton X-100 (0.0001-0.01%)

Concentration of Triton X-100 (%)	Radioactivity liberated	
	(cpm)	(%)
(Medium)	1108	9.9
(0.9% NaCl)	40	0.4
0.0001	412	3.6
0.0005	228	2.0
0.001	348	3.1
0.005	784	6.9
0.01*	2686	23.8
Radioactivity remained in the cells**	5694	50.4

* This dose of Triton X-100 caused no visible disruption to the cells.

** Protein content digested with 5 ml of 0.1 N NaOH at room temperature was 375 μ g/culture well.

100 を使った Petrovic 等の実験では、0.05% の Triton でマウスの L-細胞の外側の膜が消失し、まれには、核が細胞から離れてしまう現象を報告し、0.3% に濃度を上げて、核はよく保持されていたと報告している²²⁾.

今後は DDT のとり込みや残留性ばかりでなく、精細胞の分化に及ぼす DDT の影響を調べてみたい. ことに、最近、エクダイソンを培地に加えなくとも化学的に組成のわかっている Grace's の培地だけでヨトウガ休眠蛹の spermiogenesis を導く系を見いだしたので²³⁾、より直接的に spermiogenesis における薬物の作用を検討して

Fig. 2 The chemical analytical methods for the tissue culture.

(動物組織培養法²⁴⁾より作成)

いくことができると思われる。

6. 薬理作用を調べるための手法

in vitro でおこる現象は、培地に含まれる化学物質の溶解度、細胞への物質の透過性、有効部位に達するまでの代謝等が複雑に関係しあって、細胞増殖あるいは細胞毒性として現われてくるので、さらに詳細な検討が必要となってくる。その機構を解明するためには、Fig. 2 に示したような手法が有効であると思われるので参考にさせていただきたい²⁴⁾。

引用文献

- 1) M. Murakami & J. Fukami: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **11**, 184 (1974)
- 2) M. Murakami & J. Fukami: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **15**, 425 (1976)
- 3) M. Murakami & J. Fukami: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 423 (1978)
- 4) M. Murakami & J. Fukami: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **21**, 印刷中
- 5) 村上 誠: 農業科学 **2**, 1 (1974)
- 6) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- 7) V. I. Oyama & H. Eagle: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**, 305 (1956)
- 8) B. A. Sowa & E. P. Marks: *Insect Biochem.* **5**, 855 (1975)
- 9) H. Oberlander & C. E. Leach: *Proc. 1st Int. Congr. Stored Products Entomol. in Georgia, USA, October 7*, p. 651, 1974
- 10) E. P. Marks & B. A. Sowa: "Mechanism of Pesticide Action, ACS Sym. Series No. 2." Am. Chem. Soc. Publishers, Washington, DC, p. 145, (1974)
- 11) E. P. Marks & B. A. Sowa: "The Insect Integument." ed. by H. R. Hepburn, Elsevier Scientific Publishing Company, p. 339, 1976
- 12) M. Hori, J. Eguchi & K. Kakiki: *J. Antibiot.* **27**, 260 (1974)
- 13) L. Post, B. deJong & W. Vincent: *Pest. Biochem. Physiol.* **4**, 473 (1974)
- 14) J. Demal and A. M. Leloup: "Invertebrate Tissue Culture. Vol. 2." Academic Press, New York and London, p. 3, 1972
- 15) E. P. Marks: *Gen. Comp. Endocrinol.* **15**, 289 (1970)
- 16) J. Mitsuhashi & K. Maramorosch: *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **22**, 435 (1964)
- 17) T. Fukushima & S. Yagi: *Appl. Entomol. Zool.* **10**, 220 (1975)
- 18) I. Nakayama, S. Yagi & N. Agui: *Appl. Entomol. Zool.* **11**, 141 (1975)
- 19) S. Yagi & T. Fukushima: *Appl. Entomol. Zool.*

-
- 10, 77 (1975)
- 20) T. Shimizu, M. Murakami & J. Fukami: *J. Pesticide Sci.* **4**, 67 (1979)
- 21) D. M. Berkowitz, T. Kakefuda & M. B. Sporn: *J. Cell Biol.* **42**, 851 (1969)
- 22) S. Petrovic, O. Djordjevic & L. Kostic: *Exp. Cell Res.* **52**, 419 (1968)
- 23) T. Shimizu and S. Yagi: *Appl. Entomol. Zool.* **13**, 278 (1978)
- 24) 黒田行昭: 動物組織培養法 共立出版, p. 269, (1974)