

家蚕幼虫斑紋の着色変化を利用した幼若ホルモン活性の簡易検定法

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	木口, 憲爾
巻/号	43巻4号
掲載ページ	p. 340-343
発行年月	1974年8月

家蚕幼虫斑紋の着色変化を利用した 幼若ホルモン活性の簡易検定法

木 口 憲 爾

東京都杉並区・蚕糸試験場
(1973年10月4日受理)

著者(1972, 1973)は、家蚕の幼虫斑紋の着色は眠期における幼虫体内の幼若ホルモン(JH)量と密接に関連し、アラタ体の摘出あるいはJHの注射による体内のJH濃度の変化が幼虫斑紋の著しい着色変化を誘起することを報告した。今回、この斑紋の着色変化とJH量との関係から、JH活性の簡易な生物検定ができないかと考え、C18-Cecropia-JHおよびJH関連物質12種を使用してその可能性を検討した。その結果、生物検定に利用可能と思われる結果を得たのでその概要を報告する。

本文に先立ち、御校閲を仰いだ生理部長・伊藤智夫博士、御指導を賜った小林勝利博士、赤井弘博士、ならびに合成幼若ホルモンを御恵与下された東京大学農学部・森謙治博士、中央蚕研株式会社・小沢洋一博士に深く感謝する。

材 料 と 方 法

1) 検定供試物質：JH活性の生物検定に供試し

た物質はMORI *et al.* (1971) および OZAWA *et al.* (1974) によって合成されたC18-Cecropia-JHおよびPhenyl-Geranyl-Ethers 12種(いずれも各種立体異性体の混合物)である(Fig. 1)。これらの化合物のJH活性は家蚕のアラタ体除去幼虫(4齢)に対する幼虫脱皮誘導活性に基づいて検定し、すでに報告している(KIGUCHI *et al.*, 1974)。それぞれの化合物は市販の落花生油で一定濃度(10 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$)に希釈し、この原液を必要に応じて段階希釈し検定に供試した。

2) 検定方法：材料蚕には褐円斑蚕の一種「茶斑」(L/L)を供試した。催青は温度25°C、湿度80%、常明下で行ない、飼育は全実験期間を通して25°Cの恒温室で行なった。4齢催眠期に、幼虫斑紋の着色度の均一なものを選定して検定動物とし、これらの幼虫に上述の落花生油で希釈したそれぞれの化合物を、腹部第5環節の皮下に注射した。注射はエチルエーテルで麻酔後マイクロメーターに接続した100

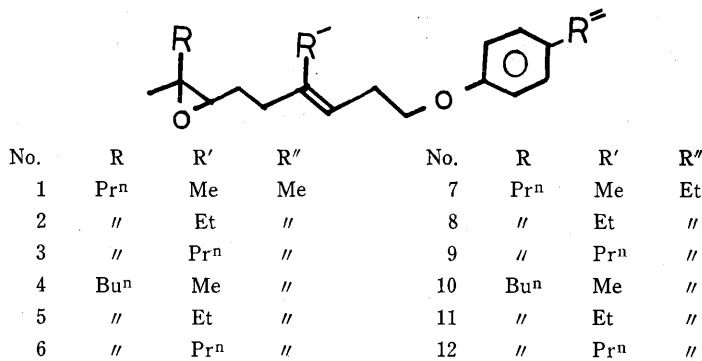


Fig. 1 Chemical structure of synthetic compounds tested.

μl の微量注射器で行なった。その後処理蚕を 25°C の恒温室に移して就眠させ、結果の判定は 5 齢起蚕で行なった。すなわち供試蚕の褐円斑は斑紋の周辺部が黒色でその内側は褐色であるが、注射した化合物の JH 活性に応じて斑紋の黒色部が完全あるいは部分的に橙褐色に変化した。そこでそれぞれの個体について、着色変化のまったく認められなかったもの(-), 黒色素が部分的に橙褐色に変化したもの(+), およびほぼ完全に橙褐色に変化したもの(++) の 3 段階に分類して JH 活性を判断する基準とした。

結 果

実験結果を Table 1 に示した。まず対照となる C18-Cecropia-JH についてみると、 $10\ \mu\text{g}$ の注射ではほとんどの個体ではほぼ完全な着色変化(++)が、また $1\ \mu\text{g}$ では供試頭数 10 頭中 4 頭に部分的な着色変化(+)が誘起された。

これに対して JH 関連物質の Phenyl-Geranyl-Ethers は全般に高い活性を示し、供試 12 物質中の 6 種の化合物において C18-Cecropia-JH より高い JH 活性を示すことが判明した。

化学構造と JH 活性との関連をみると、1) 末端側鎖 R はブチル基よりもプロピル基の方が活性が高い、2) 分子中央部の側鎖 R' はメチル基のものが最も活性が高く、エチル基、プロピル基の順に活性が低下する、3) フェニル基の para 位の側鎖 R'' についてはあまり明白な影響がみられない、しかし 4) 高活性を示した物質 No. 1, No. 4 および No. 7 の横配列の原子数はいずれも 17 もしくは 18 で、それ以上長いものでは著しい活性低下がみられる、などの諸点が明らかになった。

これらの斑紋の着色変化法による括性比較の結果は、4 齢のアラタ体除去幼虫を用いる幼虫脱皮誘導法によって得た結果 (KIGUCHI *et al.*, 1974) および終齢幼虫への投与実験による結果 (OZAWA *et al.*, 1974) と良く一致した。しかしながら、着色変化法は幼虫脱皮誘導法より JH に対する感度が低く、とくに幼虫脱皮誘導法で高活性を示す物質に対する感度が低い傾向がみられた。

考 察

JH およびその関連化合物を家蚕の発育制御に利用しようとする試みがなされつつある (AKAI *et*

Table 1 JH activity of synthetic compounds shown by color change method*

No. of compound	Effect	Dose ($\mu\text{g}/\text{larva}$)				
		10	1	0.1	0.01	0.001
1	++	10	10	5	0	0
	+	0	0	5	4	0
	-	0	0	0	6	10
2	++	10	4	0	0	
	+	0	6	2	0	
	-	0	0	8	10	
3	++	0	0			
	+	2	0			
	-	8	10			
4	++	10	8	0	0	
	+	0	2	7	0	
	-	0	0	3	10	
5	++	4	0			
	+	6	0			
	-	0	10			
6	++	0	0			
	+	8	0			
	-	2	10			
7	++	10	10	6	0	0
	+	0	0	4	3	0
	-	0	0	0	7	10
8	++	8	0	0		
	+	2	10	0		
	-	0	0	10		
9	++	0	0			
	+	9	0			
	-	1	10			
10	++	10	0	0		
	+	0	10	0		
	-	0	0	10		
11	++	0	0			
	+	6	0			
	-	4	10			
12	++	0				
	+	0				
	-	10				
C18-Cecropia JH	++	9	0	0		
	+	1	4	0		
	-	0	6	10		

* Silkworm larvae with multi-lunar marking were used as a test animal. Just before entering the 4th moulting period, the larvae were injected with different doses of each compound dissolved in $0.5\ \mu\text{l}$ of peanut oil. Effect was evaluated after ecdysis based on the color change of the marking. These effects were classified into three grades, ++ (perfect changed from black to brown), + (partially changed), and - (not changed).

al., 1971, CHANG *et al.*, 1972, MURAKOSHI *et al.*, 1972, NIHMURA *et al.*, 1972, 1974)。しかしながら、JH 関連化合物の作用には種特異性があり、JH₁としての作用があるかどうかは昆虫の種によって異なる場合のあることが報告されている(ZAORAL and SLAMA 1970, REDFERN *et al.*, 1971, MITSUI *et al.*, 1973)。したがって、これらの化合物の家蚕に対する JH 活性の検定には家蚕を用いる必要がある。

JH の検定法についてはすでに多数の報告があり(WIGGLESWORTH 1958, 1973, GILBERT and SCHNEIDERMAN 1960, MITSUI *et al.* 1973, RIDDIFORD *et al.* 1973)、家蚕についても、1) 4 齢のアラタ体摘出蚕に対する幼虫脱皮誘導活性に基づく方法、2) 終齢幼虫への JH 投与後の幼虫経過の遅延およびそれに伴う繭重・繭層重の増加割合をみる方法、が報告されている。前者は FUKUDA (1962) により、最初アラタ体の JH 分泌能の検定に用いられ、その後 OHTAKI *et al.* (1971, 1972), MOROHOSHI *et al.* (1972), 青森(1973) および著者等(1974) によって JH 関連物質の活性検定に使用されているもので、感度が極めて高く、アラタ体に対する JH の分泌促進作用などの JH 本来の作用以外のはたらきを除外できる優れた検定法と考えられている(OHTAKI *et al.*, 1972)。しかしアラタ体の摘出に若干の習熟を要するので簡便な方法とは言えない。また後者は AKAI and KOBAYASHI (1970) の見出した家蚕に対する JH の変態抑制作用に基づき CHANG and TAMURA (1971), OZAWA *et al.* (1973), NIHMURA *et al.* (1974) が生物検定に応用しているもので、処理は簡単であるが処理後の飼育に長時間を要し、飼育条件も厳密に規定することが困難であるなどの難点があると思われる。

その他に応用可能と思われるものとして、3) 卵(胚子)に対する致死作用、4) 過剰幼虫脱皮の誘導、5) その他の何らかの JH の生理作用に基づくもの、が考えられる。今回用いた着色変化のみによる JH の検定法は(5)に属するもので、家蚕においては初めての方法であり、昆虫全般をみても、最近 Tabacco hornworm, *Manduca sexta* のクチクラの着色変化を利用した検定法(Truman *et al.*, 1973) およびハスモンヨトウ、セスジスズメガの体色変化による方法(根岸, 私信)など数例が知られている

にすぎない。

斑紋の着色変化による本法は、他の諸法に比べて極めて簡便であり、しかも短期間で検定できる利点がある。また結果の項で述べたように、活性比較の面からみればアラタ体除去幼虫を用いた幼虫脱皮誘導法による結果(KIGUCHI, *et al.* 1974) および終齢幼虫への投与実験による結果(OZAWA *et al.* 1974) とよく一致し、再現性も高い。しかしながらこの検定法に関しては、感度がやや低く、また体色変化を誘導する物質がすべてこれまでに知られている幼虫脱皮の誘導などの JH 本来の生理作用を示すかどうか不明である点が欠点としてあげられる。したがって、本法を新しい JH 活性物質の探索に用いる場合には若干の問題が残るが、既知の活性物質の活性検定あるいは濃度の不明な JH の濃度検定などには十分利用できるものと思われる。

感度に関しては、今回は 4 眠期を利用して JH 活性検定を行なったが、3 眠期での JH の注射によっても同様な着色変化が誘起されることから、体重の軽い 3 眠期の幼虫を用いて検定を行なえばある程度の感度の増加が期待できる。また、JH による斑紋の着色変化は縞斑蚕にとどまらず多星紋、ひので斑などにも認められ、体色の黄化とも平行して起るので、縞斑蚕以外の系統を用いて斑紋および体色双方の着色変化を指標として検定することも可能と思われる。

なお、JH の生物検定法一般に関して、現在まで得られている検定結果の多くは JH の本来の生理作用の反映ではなく、むしろ JH の分解と関連した Synergistic action の反映でなかろうかとの疑問が提起されている(SLADE and WILKINSON, 1973)。この点に関しては家蚕の JH の化学構造が明らかにされた時点で検討したい。

摘 要

家蚕の幼虫斑紋の着色は、眠期の体内の JH 量によって強く支配され、橙褐色あるいは黒色に変化する(木口, 1972, 1973)。この現象を利用し、JH 活性を簡便かつ短期間で検定できる生物検定法を考案した。

文 献

AKAI, H., K. KIGUCHI and K. MORI (1971):

- Appl. Ent. Zool., **6**, 218-220.
- AKAI, H., and M. KOBAYASHI (1971) : Appl. Ent. Zool., **6**, 138-139.
- 青森棕二(1973) : 日蚕関東支部講要 (24), 40.
- CHANG, C.-F. and S. TAMURA (1971) : Appl. Ent. Zool., **6**, 143-145.
- CHANG, C.-F., S. MURAKOSHI and S. TAMURA (1972) : Agr. Biol. Chem., **36**, 692-694.
- FUKUDA, S. (1962) : Annot. Zool. Jap., **35**, 199-212.
- GILBERT L. I. and H. A. SCHNEIDERMAN (1960) : Trans. Amer. micr. Soc., **79**, 38-67.
- 木口憲爾(1972) : 日蚕雜, **41**, 407-412.
- 木口憲爾(1973) : 日蚕雜, **42**, 293-299.
- KIGUCHI, K., T. OHTAKI, H. AKAI and K. MORI (1974) : Appl. Ent. Zool., **9**, 29-33.
- MITSUI, T., C. NOBUSAWA, J. FUKAMI, K. MORI and K. FUKUNAGA (1973) : Appl. Ent. Zool., **8**, 27-35.
- MORI, K., T. MITSUI, J. FUKAMI and T. OHTAKI (1971) : Agr. Biol. Chem., **35**, 1116-1127.
- MOROHOSHI, S., S. ISHIDA and J. SHIMADA (1972) : Proc. Japan Acad., **48**, 730-735.
- MURAKOSHI, S., C.-F. CHANG and S. TAMURA (1972) : Agr. Biol. Chem., **36**, 695-696.
- NIHMURA, M., S. AOMORI, K. MORI and M. MATSUI (1972) : Agr. Biol. Chem., **38**, 889-892.
- NIHMURA, M., S. AOMORI, Y. OZAWA, K. MORI and M. MATSUI (1974) : Appl. Ent. Zool., **9**, 34-40.
- OHTAKI, T., S. TAKEUCHI and K. MORI (1971) : Jap. J. Med. Sci. Biol., **24**, 251-255.
- OHTAKI, T., K. KIGUCHI, H. AKAI and K. MORI (1972) : Appl. Ent. Zool., **7**, 161-167.
- OZAWA, Y., K. MORI and M. MATSUI (1973) : Agr. Biol. Chem., **37**, 2373-2378.
- OZAWA, Y., K. MORI and M. MATSUI (1974) : Agr. Biol. Chem., (in press)
- REDFERN, R. E., T. P. MCGOVERN, R. SARMI-ENTO and M. BEROZA (1971) : J. Econ. Ent., **64**, 374-376.
- RIDDIFORD, L. M. and A. M. AJAMI (1973) : J. Insect Physiol., **19**, 749-762.
- SLADE, M. and C. F. WILKINSON (1973) : Science, **181**, 672-674.
- TRUMAN J. W., L. M. RIDDIFORD and L. SAFRANEK (1973) : J. Insect Physiol., **19**, 195-203.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1958) : J. Insect Physiol., **2**, 73-84.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1973) : J. Insect Physiol., **19**, 205-211.
- ZAORAL, M. and K. SLAMA (1970) : Science, **170**, 92-93.

Summary

A simple method to evaluate the juvenile hormone activity based on the color change of the larval marking in the silkworm, *Bombyx mori*

By

Kenji KIGUCHI

In the silkworm the pigmentation of larval markings is greatly influenced by the concentration of juvenile hormone during the moulting period (KIGUCHI, 1972, 1973).

Using this phenomenon, a simple method to evaluate the juvenile hormone activity was developed. This method was proved to be useful and speedy for the evaluation.

(Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo)