

カイコの発育におよぼす疑似微小重力の影響

中山 伸・宮本 健助*
上田 純一*・藤井 修平
山本 良一

序

地上 1 G の下で進化発達してきた生物の形態形成や行動反応等は重力の支配下にあり、宇宙環境の特徴である微小重力環境は、生物の生活環の諸過程に多大な影響を与えられらる。近年の宇宙開発のめざましい進歩に伴い、宇宙微小重力環境の生物に対する影響を明らかにすることが緊急の課題となつてきており、スペースシャトルやミールを利用した宇宙軌道上において、宇宙における人体の医学・生理学の分野に関連した研究のみならず(関口ら 1998)、イモリなどの両生類やメダカなどの魚類を用いた交尾行動、胚発生そして個体の発育(山下ら 1994, Ijiri 1994, 1995, 1996, 1997)、カイコの成長・発育(Shi *et al.* 1996)、姿勢制御機構(森ら 1993, 高林ら 1994)、神経細胞の発生(山崎ら 1998, 勝田ら 1998)、あるいは、植物における形態形成や生活環に対する微小重力の影響など(Halstead and Dutcher 1987, Krikorian and Levine 1991, Musgrave *et al.* 1997)が調べられてきている。しかしながら、実際の宇宙実験においてはさまざまな制約があり、生物に対する微小重力の影響を明らかにするためには、地上において微小重力を模擬した実験による基礎的資料の蓄積が必要とされる。固着生活をしている植物においては、緩やかな回転により重力方向を消去するというクリノスタットが広く微小重力模擬実験に利用されてきているのに対し(Hoson *et al.* 1997)、行動性の高い動物ではヘッドダウンティルトやパラボリックフライトによって作り出される比較的短時間の微小重力環境の行動反応や生理的反応に対する影響を調べる実験が多数を占めており、クリノスタットを適用した比較的長時間にわたる疑似微小重力実験はカイコの発生を対象とした古澤ら(1998)の実験の他、ほとんどなされていない。

これまでの宇宙飛行から無重力空間に達すると宇宙飛行士の体において、下半身から上半身の体液シフトがおこることが示されてきている。この体液シフトは宇宙酔いのみならず、循環している血液量の急激な変化による重大なショック状態を引き起こす可能性もある。この重力の変化による体液シフトに対して、ホルモン制御による順化の機構が働くことが推察されており、体液移動やホルモンの動態に対する微小重力の影響を明らかにすることも重要な課題の一つである。

*本学非常勤講師，大阪府立大学総合科学部

本研究においては、実験動物に、比較的移動性が低く、行動の緩やかなカイコを適用し、クリノスタットを利用した長時間の微小重力の影響を調べる実験系の開発を行うとともに、カイコの成長、ならび吐糸行動に対する疑似微小重力の影響を調べた。カイコは、開放血管系を有する昆虫であるとともに、変態に対するホルモン制御の機構が比較的よく明らかにされており、今後、宇宙微小重力のホルモンの動態や体液移動の影響などを理解する上で、多くの利点があると考えられる。

実験材料と方法

材料：

カイコ (*Bombyx mori*) は市販されている交雑種 (錦秋×鐘和, または芙蓉×東海) を購入し、使用した (上田蚕種協業組合)。幼虫は人工飼料 (シルクメイト 2S, 日本農産工業) を用いて飼育した。

疑似微小重力の設定：

微小重力の設定には一軸の水平回転装置 (EYELA, MBS-1, 東京理化工械) を用いた。ターンテーブルの中心から 8 cm の位置に、カイコの卵あるいは幼虫を入れた試験管 (直径 2.5 cm, 長さ 20 cm) をとりつけ回転 (2 rpm) させた (写真 1)。プラスチック容器 (12.0×20.5×5.0 cm) はターンテーブルに直接取り付け (2 rpm) で回転させた。また、カイコを入れた培養容器を垂直あるいは水平に静置し地上対照とした。

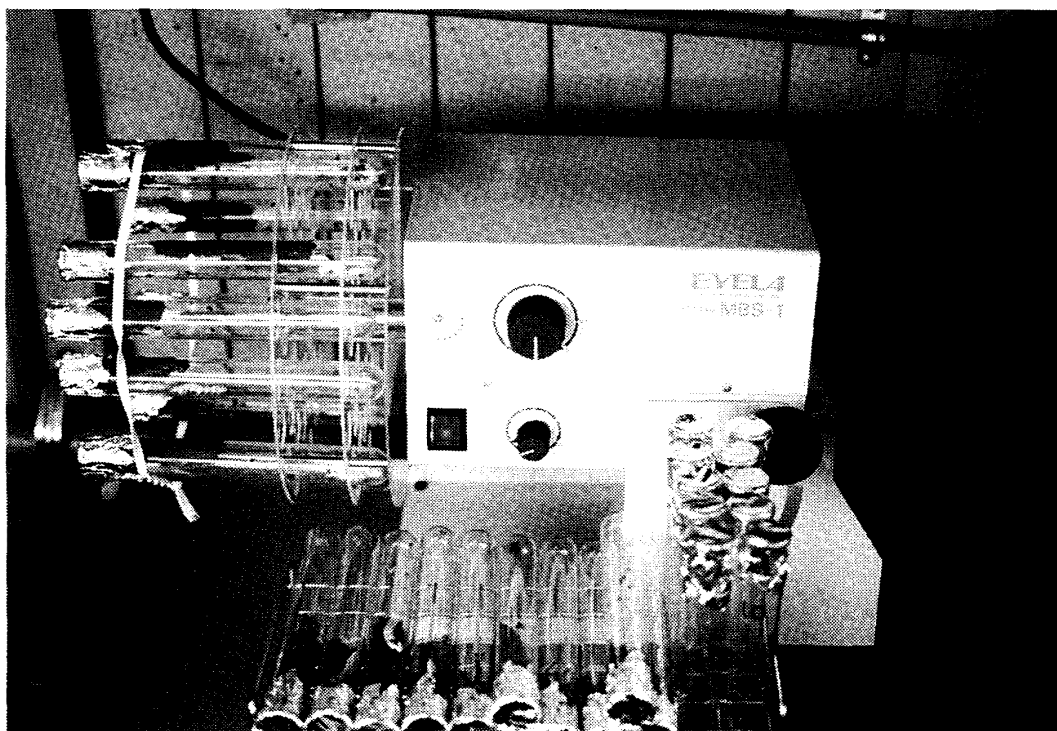


写真 1

カイコの孵化率に対する疑似微小重力の影響：

購入したカイコ卵を濾紙（Toyo No. 2，アドバンテック）に糊で張り付けて、内径 1.4 cm 長さ 10 cm の試験管の中に入れ、動かないように固定した。カイコ卵は、地上 1 G あるいはクリノスタット上、23.5℃、12 L 12 D 光条件で飼育し、一定時間ごとに孵化を測定し、孵化率を算出した。各処理区 10 本の試験管を使用し、計 100 個体について孵化を観察した。

結果と考察

地球上の生物進化の歴史における多様性に示されるように、動物の中で特に昆虫は著しく高い環境適応能を有していると考えられ、地球圏外での生物圏の建設を想定する場合、昆虫を有用な生物資源として活用できるものと期待される。本研究においては、宇宙微小重力環境の生物影響を調べるためのクリノスタットを用いた地上模擬実験系として、カイコの発育に対する疑似微小重力の影響を検討した。

開放血管系を有するカイコは、孵化から羽化し成虫になる過程における変態パターンが明瞭であり（図 1）、そのホルモン制御が比較的詳しく調べられているという研究上の利点を有している。また、古くから養蚕の目的で飼育されてきており、移動性が低く、その幼虫期は餌となる飼料上をあまり移動することなく生活し、繭を形成して蛹になる。従って、クリノスタット回転を与えた場合でもカイコ幼虫は体軸を大きく移動させることなく、重力の方向を感受できない、すなわち、疑似微小重力環境におくことが可能であると考えられる。実際、予備的にプラスチック容器や試験管内に平面的に張ったビニールネット上で飼育実験を行った結果、カイコの幼虫は飼料上で体軸を大きく動かすことなく、採餌行動をとり、成長したことから、クリノスタットの適用が可能であると判断された。また、これまでカイコにおいて、発育におよぼす過重力の影響が調べられた結果、カイコ卵は過重力に強いこと、また幼虫と蛹の短時間の過重力刺激に対する耐性を有しており（中山と沼田、1996、1997）、重力研究に適した昆虫であると推察される。

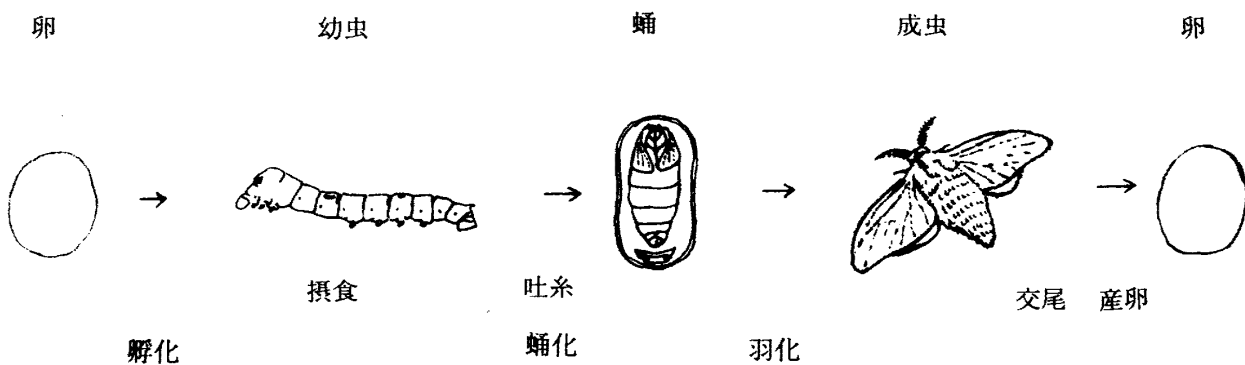


図 1

クリノスタット実験手法の確立

卵，幼虫あるいは蛹の各発育段階のカイコに一軸のクリノスタットを用い疑似微小重力処理をほどこした。なお，飼育は試験管中に平面にビニールネットをはりその上に餌を張り付け採餌できるようにするとともに，排泄物はビニールネットの網目を通して処理できるように工夫した。この条件下では，カイコは平面を移動することが出来るものの，垂直面については移動することは出来ないような状態になっており，一軸クリノスタット回転により重力の垂直方向ベクトルが消去された状態にあると考えられた。また，予備実験において，少なくとも地上1 G 条件で，この成育条件でのカイコ幼虫の長期間の飼育が可能であった。

カイコの胚発生におよぼす疑似微小重力の影響

購入した卵を，ろ紙にはりつけ，試験管中に固定した。経時的に孵化してくる個体数を測定した。カイコの孵化は通常，未明に開始し午前9時にはその日の孵化を終えることが知られており，孵化の測定は，一日一回午前11時に実施した。実験開始4日後に，クリノスタット処理区，そして地上対照区とも孵化が開始した。地上対照区では，その後の3日間で孵化率が65%に達し，9日後に測定した最終孵化率は73%であった。一方，クリノスタット処理区では孵化開始がやや遅れる傾向があったものの，培養9日目に観察した最終の孵化率は75%であり，地上対照区と差は認められなかった。

異なった胚発生時期にあるカイコ卵，すなわち孵化2あるいは8日前の卵に過重力処理(1,000 G, 30 分間)を与えても，卵の孵化はほとんど影響されず，孵化において過重力に対する耐性を示すことが報告されている(中山と沼田, 1996, 1997)。また，IML-2 宇宙実験で明らかにされたように，宇宙環境においても，メダカの受精卵の発生はほぼ正常に進行する(Ijiri 1994, 1995, 1996)。さらに，カイコ卵の孵化は宇宙軌道上においても進行することがロシアのミールを用いた宇宙実験においても示されている(Shi *et al.* 1996)。本実験結果とあわせ，カイコの卵の孵化に至る過程，および最終孵化率は，過重力あるいは微小重力という重力変化の影響をほとんど受けず，魚類の卵の発生と同様，昆虫の卵の発生は重力変化の影響をほとんど受けないことが示唆される。

幼虫発育におよぼす疑似微小重力の影響

孵化後の幼虫の成育に対する疑似微小重力の影響を検討した。横たえた試験管内に平面的にビニールネットを敷き，排泄物がネットの隙間から処理できるようにし，その上に，餌となるシルクメイトを脱落しないように付着させた。5 齢幼虫を入れ，1 G あるいはクリノスタット上で成育させた。試験管中で飼育させたために静止区は試験管を垂直においた垂直静止区と水平静止区の二つを作った。

飼育5 日後，体重を測定した結果，地上で試験管を水平あるいは垂直に静置したものでは，体重の増加に差は認められなかった。しかしながら，クリノスタット上で飼育した場合，体重の増加が抑制される傾向にあり，幼虫の成長が疑似微小重力によって阻害されることが示

唆された。

繭作りに至る過程におよぼす疑似微小重力の影響

カイコは5齢（終齢）幼虫期には、絹糸腺が急激に肥大発達し、その後、吐糸、繭形成を開始する。一般には営繭初期には、カイコの成熟幼虫は背地性を示しながら営繭場所を探し、適当な立体空間があれば8の字状に頭部を振り営繭場所を決め、その後羽毛と呼ばれる糸を吐き繭形成のための足場を作る。その後、3-4日間吐糸を続け繭を形成するが、人為的に平らな場所に成熟幼虫をおくと平面上に吐糸し、平面繭とよばれる布を形成することが知られている。この事実は、繭形成が重力の影響を強く受けることを示唆している。

繭形成過程に対する疑似微小重力の影響を明らかにする目的で、幼虫の成育に対する疑似微小重力の影響を調べた実験を継続し、吐糸行動に先立つ行動であるガットパーズを開始するまでに至る日数を調べた。垂直静止区では培養開始9日目で、5匹中1匹がガットパーズをし、10日目に2匹、11日目に2匹がガットパーズを行った。4匹はほぼ完全な形態の繭を形成した。繭を開いて、蛹の様子を観察した結果、4匹中の1匹は、繭の中で死亡していた。

また、水平静置区では10日目に5匹中1匹、11日目、12日目にそれぞれ1匹、そして最後に13日目に2匹がガットパーズを行った。1匹がほぼ完全な繭を作ったが4匹は繭を作ることなく死亡した。

一方、クリノスタット区においては、培養開始12日目に5匹中1匹、13日目に1匹、14日目に1匹ガットパーズを行った。後の2匹は13日目までに死亡した。ガットパーズを行った3匹の内、2匹が繭を作ることなく死んだものの、残りの1匹が繭を形成した。この個体について、繭を開いて観察して結果、繭形成後に死亡していた。

古澤ら（1998）によって、成熟カイコ幼虫を静置、垂直あるいは水平回転下で成育させ、繭形成およびトレハラーゼ活性とスクラーゼ活性に対する影響が調べられ、繭の形態や両酵素の活性が影響されることが示されてきている。本実験結果とあわせ、強い背地性を示すガットパーズを経て繭形成に至る過程は、微小重力環境下でも進行するものの、幼虫の成育にとって疑似微小重力環境はかなり阻害的影響をおよぼすことが示唆された。微小重力刺激は幼虫の成育に対して阻害的影響をおよぼすことから、繭形成後の個体死はその影響を強く受けていたことに起因する可能性がある。

吐糸から羽化に至る過程に対する疑似微小重力の影響

繭形成を経て羽化に至る過程におよぼす疑似微小重力の影響を検討した。5齢の終期になり摂食を終え、ガットパーズを終えた幼虫と、さらに、ワンダリング期を経て、糸を吐き出し始めた直後の成熟幼虫をクリノスタット上のプラスチックケースに移して成育させ、カイコが繭づくり行動を経て正常に羽化できるかを調べた。通常、カイコの羽化は未明から午前9時の間に起こることから、羽化の観察は、1日1回午前11時頃に行った。

吐糸開始直後に、クリノスタット上での疑似微小重力環境に移したものと、地上対照群との

間で、羽化した個体の割合は、前者が10個体中8個体、後者が10個体中9個体であり、ほとんど差は認められなかった。地上およびクリノスタット上で形成された繭の重量は、ほぼ同程度であった。

一方、ワンダリング期の吐糸開始前から飼育を行った場合、地上に静置した対照群で、14個体中すべてが繭を形成し、かつすべてが羽化した。また、クリノスタット上で繭形成をさせた場合でも、すべての個体が繭を形成し、且つ羽化し、両者の間で繭形成率、羽化率に差は認められなかった。しかしながら、形成された繭の重量は、地上静置したものでは、 0.46 ± 0.01 g、クリノスタット処理では、 0.41 ± 0.01 gで、やや疑似微小重力環境下では繭の発達が悪いことがわかった。また、吐糸開始後後羽化に至る蛹の期間は、地上対照群が、平均18.3日であったのに対し、クリノスタット処理群では19.6日と吐糸開始後、羽化に至る期間がわずかに長くなることがわかった。この結果は、繭形成や羽化過程は疑似微小重力環境下でもほぼ正常に進行することを示唆している。吐糸開始前からクリノスタット上で成育させたものでは、形成された繭の重量の減少や羽化の遅延が認められたが、吐糸開始後にクリノスタット処理を行った場合には形成された繭の重力にほとんど差がないことから、これらは幼虫の成長それ自身が疑似微小重力の影響を強く受けたことに起因することが推察される。

以上の結果から、試験個体数が少ないという条件であるが、クリノスタットによって作出される疑似微小重力環境下において、カイコの孵化率は影響されないことが明らかとなった。この結果はミールにおいて12日間のカイコのさまざまな発育段階における発育を観察した実験結果 (Shi *et al.* 1996) を支持した。しかし、地上対照と同様に繭形成や羽化の過程は進行しうるものの、幼虫の成長、吐糸開始後羽化に至る過程において疑似微小重力環境は、阻害的影響をおよぼすことが示唆された。今後は、飼育法に改良を加え、孵化から羽化まで生活環全体を通した疑似微小重力の影響を検討する必要がある。

カイコの成長変態過程は、ホルモンによって明確に制御されている。また、この発育変態過程の制御に体液浸透濃度の変化が密接に関わっていることが示唆されている (Nakayama 1991)。宇宙微小重力環境下では、体液の移動に大きな影響が認められることから、疑似微小重力環境下におけるカイコの発育阻害や羽化の遅延などは、体液組成の質的量的変化を介したホルモン動態の変化による可能性がある。今後、ホルモンの動態や体液の組成変化を含め、疑似微小重力の影響を検討していく必要がある。

最近、カイコを用いた宇宙放射線環境の生物影響実験系の提案がなされてきており、カイコ卵への放射線照射の影響が調べられている (木口ら 1999)。地上で産卵3日目までの初期発生過程でカイコ卵に数グレイ程度の重イオン線を照射した場合孵化率が著しく低下するが、その以降の過程で照射した場合には孵化率にほとんど影響が見られない (木口ら 1999)。さらに500グレイの重イオンビームを受精前の卵の前極側に照射した場合発生が完全に抑制されるものの、後極側に照射したものでは正常に孵化し形態異常も観察されないことが示され、重イオンが直接に核に損傷を与えなければ、すなわち核非存在部分への照射は可視的な生物影響をおよぼさないことが示されている。カイコの生活環の諸過程が疑似微小重力環境下でも進行しうる

ことを示唆した本実験結果とあわせ、カイコは宇宙微小重力や宇宙照射線環境下での実験動物として十分に利用できるものと推察される。

謝 辞

本研究は一部平成 11 年度帝塚山学園特別研究費で行われた。

文 献

- 古澤壽治, 一田昌利, 小谷英治, 塚本幸子, 宮崎順司, 西田幸代, 杉村順夫, 渡邊隆夫 (1998) 模擬微小重力下でのカイコの吐糸行動と繭糸トレハラーゼおよびシユクラーゼ活性。 *宇宙生物科学* **12**: 246-247
- Halstead, T. W. and Dutcher, F. R. (1987) Plants in space. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**: 317-345.
- Hoson, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M. and Buchen, B. (1997) Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta* **203**: S 187-S 197.
- Ijiri, K. (1994) A preliminary report on IML-2 medaka experiment: Mating behavior of the fish medaka and development of their eggs in space. *Biol. Sci. in Space* **8**: 231-233.
- Ijiri, K. (1995) Fish mating experiment in space—What it aimed at and how it was prepared. *Biol. Sci. in Space* **9**: 3-16.
- Ijiri, K. (1996) Fish mating behavior and development of their eggs in space. In “*Plants in Space Biology*” (H. Suge ed.) Institute of Genetic Ecology, Tohoku Univ. pp. 1-11.
- Ijiri, K. (1997) Explanations for a video version of the first vertebrate mating in space—a fish story. *Biol. Sci. in Space* **11**: 153-167.
- 勝田新一郎, 清水 強, 山崎将生, 和気秀文, 片平清昭, 永山忠徳, 大石浩隆, 宮本裕加子, 和合治幸, 大河内利康, 三宅将生, 長谷川正光, 松本茂二, 金子みち代, 向井千秋, 長岡俊治, 泉 友則, 柳川孝二, 植村 勝 (1998) 微小重力環境で飼育した幼弱ラットの大動脈壁レオロジー特性 (ニューロラボ実験速報) *Biol. Sci. in Space* **12**: 214-215.
- 木口憲爾, 三浦幹彦, 小林泰彦, 渡辺 宏 (1999) カイコを用いた宇宙環境の生物影響実験系の提案。 *Space Utilization Research* (第 15 回宇宙利用シンポジウムプロシーディング) **15**: 137-140.
- Krikorian, A. D. and Levine H. G. (1991) Development and growth in space. In “*Plant Physiology: A treatise, vol. 10*” (Bidwell R. G. S. ed.), Academic Press, New York, pp. 491-555.
- 森 滋夫, 高木貞治, 高林 彰, 御手洗玄洋, 白井支朗, 中村哲郎, 榊原 学, 長友信人, フォンバウムガルテン R. J. (1993) FMPT/IML-2 実験: 無重力下での鯉の行動観察。 *Space Utilization Research* (第 10 回宇宙利用シンポジウムプロシーディング) **10**: 13-16.
- Musgrave M. E., Kuang A., Matthews S. W. (1997) Plant reproduction during spaceflight: importance of the gaseous environment. *Planta* **203**: S 177-S 184
- Nakayama S. (1991) Osmotic pressure of hemolymph in the silkworm, *Bombyx mori*: Changes in amino acid and cation concentrations during development. *Appl. Ent. Zool.* **26**, 99-105
- 中山 伸, 沼田英治 (1996) カイコ卵の過重力に対する耐性。 *宇宙生物科学* **10**: 166-167
- 中山 伸, 沼田英治 (1997) カイコの発育に伴う過重力に対する耐性の変化。 *宇宙生物科学* **11**: 190-191.
- 関口千春, 矢代清高, 石井正則, 村井 正, 吉岡利忠, 重松 隆, 加藤恒生, 秋山真一郎, 立崎英雄, 阿部貴弘, 久米 稔, 泉龍太郎, 山口隆夫, 若田光一, 下田隆信 (1998) 宇宙開発事業団編集「*宇宙医学・生理学*」, 社会保険出版社

Shi Z., Zhuang D. and Eugene a. Ilyin (1996) 31 st COSPAR Meeting abstract pp. 313, Birmingham, UK

高林 彰, 小林 健, 渡辺 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉, Baumgarten, von R. (1994) IML-2 における金魚の行動観察。 *Space Utilization Research* (第 11 回宇宙利用シンポジウム プロシーディング) **11**: 8-11.

山崎将生, 清水 強, 三宅将生, 宮本裕加子, 和気秀文, 勝田新一郎, 大石浩隆, 永山忠徳, 片平清昭, 和合治幸, 大河内利康, 金子みち代, 松本茂二, 向井千秋, 長岡俊治, 泉 友則, 柳川孝二, 植村 勝 (1998) 宇宙で育ったラットの大動脈神経の組織化学的検索: 髄鞘形成 (ニューロラボ計画速報), *Biol. Sci. in Space* **12**: 212-213.

山下雅道, 黒谷明美, 今溝真理, 最上善広, 奥野 誠, 小池 元, 浅島 誠 (1994) IML-2 におけるイモリの実験運用。 *Space Utilization Research* (第 11 回宇宙利用シンポジウム プロシーディング) **11**: 13-16.