

家蚕幼虫消化器官の局所的機能差に関する研究

I. 消化管皮膜組織及び消化液の酵素作用について

山口 定次郎*

Sadajiro YAMAGUCHI : Studies on the Functional Localization of Digestive System in the Silkworm Larva, *Bombyx mori* L.

I. Activities of Certain Enzymes in Gut Epithelium and Gastric Juice.

(1955年12月10日受理)

家蚕幼虫の消化管皮膜組織及び消化液の酵素については酵素とpH、温度、蚕品種及び蚕の経過等との関係を研究されたものが多い。⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾然し消化管の各部位の機能差に関する研究は比較的少く、松村・岡¹¹⁾及び松村¹²⁾の消化管皮膜組織のAmylase及びInvertaseの局所差の研究、山口のX線透視による形態及び運動の研究、⁹⁾¹⁰⁾消化吸収の生理¹¹⁾及び結紮蚕児の生理¹²⁾、須貝¹³⁾及び堀江¹⁴⁾のAlkali phosphatase、伊藤・堀江及田中¹⁵⁾の消生化理の研究等を数えることができる。昆虫ではWIGGLESWORTH¹⁶⁾¹⁷⁾、HOBSON¹⁸⁾等の局所機能差の存在についての興味ある研究が見られるが之等は昆虫の一般消化生理の探究に止まらず、消化器官病理学の基礎的研究としても重要であると考えられるので、本報告では先づ標題の如く酵素の局所分布に重点をおいて消化管皮膜組織と、消化液に含まれるProtease、Amylase及びSuccharaseを中腸の前部、中部及び後部並びに後腸の4部分に分けて測定した結果の概要を記すことにする。

本研究を行うに当つて浦生博士・八木博士(信大)及び有賀博士(東大)からは常に懇篤な御指導を、西沢博士(信大)からは酵素実験上終始多大の御便宜並びに指導を賜わつた。又松村博士(農林蚕試)からは懇切な御指導と報文校閲の労を賜わつた。実験は主として清水猛・市川智子両氏の助力に負う所が甚大であつた。茲に併せて深甚な感謝の意を表する次第である。

実験材料及び方法

A. 供試材料：酵素の活性度は、供試蚕の品種、経過、pH等により異なり、之等については既に松村⁹⁾¹²⁾藤井・加藤¹¹⁾及び黒田¹⁰⁾等の報告があるが、酵素の局所分布については稍多量の酵素を必要とするので、この場合は

特に5齢4日～6日目を中心に材料をとつた。蚕品種は欧19、日115、太平、富岳、支113、銀嶺、アモイ(暗色)、100A(+^{be}、be型)、分白3(ae. be型)、ヒノデ(ae. +^{be}型)、秋花×銀嶺(絶食及び食桑中)、長光×信和等を採用した。

B. 消化管皮膜組織及び消化液の採集：消化管組織は蚕を生体で解剖し、気管、筋肉及びマルピギー管その他の組織を出来るだけ除去し消化管を縦に切開し、食片は胃腔膜と共に除き、水洗し濾紙上で水の余滴を除き、所定の4区分に切離す。即ち前腸と中腸前部を含む部分をA、中腸中部をB、中腸後部の細胞が肥厚し縮皺の多い部分をC、後腸をDとした。(以後多くの場合夫々A B C Dをもつて記すことにする)。材料はつとめて新鮮のものを速かに酵素抽出を行つて供試した。組織の長期保存には生組織を無水のAcetonで処理し乾燥末とし使用の場合にはさらに微細な粉末とし後抽出して用いた。次に消化液は予め消化管の形態と環節との関係を調べ外部から結紮を行い3～4時間の後、各部の体表皮を缺で傷つけここから体圧により膨出してくる腸管を水洗して血液の混入を防ぎ速かに缺で小孔をあけ、流出する内容物(消化液と食片とを含む)を下側においた試験管に受ける。更に遠心分離して上澄を消化液と見做した。貯蔵の場合は時間の長短にかかわらず上層に少量のToluolを加えておく。因に5令4日目(銀嶺)の腸皮膜組織の生の重量は大体次の通りであつた。(30頭測定1頭当りに換算。

A...54mg B...53mg C...68mg D...26mg 計201mg.

C. 酵素液の調製

(1) 消化管組織：新鮮組織各部1gについて、抽出液グリセリン・アンモン10ml(15% glycerin 2ml+0.05 N Ammonia液 8 ml)を加え、乳鉢でよく磨碎し、之に

* 信州大学繊維学部 蚕種学研究室

Toluol を加え混合, 瓶におさめ攪拌振盪, 密栓を施し 27°C で24時間抽出する。此液を遠心沈澱し, 上澄をとり酵素液とし同じく上層に Toluol を加え 0°C に保存し供試する。

(2) 消化液: 採液遠心分離後上澄をとり Toluol を加え攪拌振盪, 0°C 暗所に貯蔵する。後腸内容物は水分が少なく 70%位であつて上澄がとれないのでその一定量をとり, 同重量の水を加えて遠心分離し上澄をとり, その酵素力を測定し, 又一方水分率を測つておいて自然のままの消化液の酵素力を換算した。

D. 酵素作用の測定

1). Protease: 家蚕消化液の Protease は主に Trypsin 系酵素とされているので, ここではその積りで酵素作用の測定を行つた。基質には Casein を用いた。すなわち Casein 6g に水 100ml 及び 1 N. NH_4OH . 6ml を加え pH を 9.4 とし煮沸溶解させ, 濾過して使用に供した。反応液として, Casein 液 2.5ml pH 9.4 の緩衝液 ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$) 5ml, 之に酵素液 (組織抽出液の場合 2ml, 消化液の場合 0.5ml) を混じ, Toluol を加えたものを作り之を 27°C で48時間作用させ分解したアミノ態Nを, VAN SLYKE のアミノ態N定量法により測定した。1回の試料は組織抽出液を用いたときには, 反応液の 3ml, 消化液の場合はその 1ml を用いた。実験結果は, 組織 0.1g 当り, 又消化管は 0.2ml 当りにより分解生成されたアミノ態Nをもつて示した。

2) Amylase: Amylase 作用は分解生成糖の還元力を BERTRAND 法で測定し, その銅量をもつて示した。基質には可溶性澱粉 1% を煮沸濾過して用いた。反応液としては澱粉液 2ml, 緩衝液 (pH 9.4) 5ml に酵素液は (組織抽出液の場合 2.0ml, 消化液の場合 0.5ml) を混じたものを用い, これに Toluol を加え 27°C で48時間作用させた。

2. Saccharase: 基質には再結晶の Saccharose を用いた。反応液としては Saccharose (1%) を 2ml に緩衝液 (pH 7.8) 5ml を加え, これに酵素液 (組織抽出液の場合 2.0ml, 消化液の場合 0.5ml) を加えたものを用い, 之を 27°C. 48時間作用させた後, Amylase の場合と同様に BERTRAND 法により還元糖を測定した。緩衝液のpHについては, 先に松村¹²⁾は詳細な実験を行い 6.6~7.0が最適とされているが, 著者は組織の又は消化液の pHとの関係を考慮に入れ 7.8 を用いて測定した。

以上何れの酵素も材料の新旧により活性が多少とも異なり, 新鮮の場合に最も強いことを知つたので, 3種の

酵素とも, なるべく, 同一品種, 同様な時期の新鮮材料を使用した場合の結果を採用することにした。然し作用時間の長短又は緩衝液の pH の問題については一層の研究を必要とする様に思われる。実験結果は数字及び図をもつて示した。問題の性質上吟味はその品種毎各部位の示す凸型曲線について行ふべきであるが, 大勢を知るためにそれらの曲線の平均値をもつて記した。(Table 1 及 Fig. 1 Av.)

実験結果

Table 1

Division of gut Enzyme activity	Foregut + anterior midgut	Middle midgut	Posterior midgut	Hindgut
Protease (Amino N mg)				
Gut epithelium	0.52	0.51	1.24	0
Gastric juice	0.34	0.37	0.68	0.21
Amylase (Cu mg)				
Gut epithelium	3.26	1.86	5.46	2.38
Gastric juice	1.31	1.29	2.10	2.06
Saccharase (Cu mg)				
Gut epithelium	7.66	9.03	11.88	8.85
Gastric juice	2.86	3.12	9.15	9.04

Note—Figures showing the average value of enzyme activities of 0.1g fresh tissue-extracts and 0.2ml gastric juice, for 48 hours, in several silkworm varieties. 7 varieties for protease, 7~10 var. for amylase and 8 var. for saccharase were used.

実験の結果品種その他により値においては種々に現われ, 殊に Amylase+^{ae} 型等は ae 型に比しはるかに強いこと又欧19は何れの酵素も比較的強い作用を示し又多糸量系種は組織内酵素が多い等のことも見られたが, 之は経過の不同もあるのでここではあまり問題にせず主に部位的関係を観察した。又中腸は後腸に比して種々の点で作用も異なるであろうから一応特別に取扱つて記載した。

1. Protease

蚕の Protease は主に Trypsin とされているが著者は黒田¹⁸⁾の Amylase における如く Paper chromatography で調べたが, 腸皮膜組織の抽出液を Aceton:水 (4:10) で展開, Gelatin 0.5%液を吹きかけ40°30分間多湿で作用させ後, Amino 酸の呈色反応を行い検出すると Rf 0.30内外に細長く大きく 1ヶ所, 0.82に小さいもの, 0.95

に中位の大きさの呈色が見られた。おそらく Rf 0.30 のものが Trypsin で他のものはこの酵素以外のものではないかと思う。

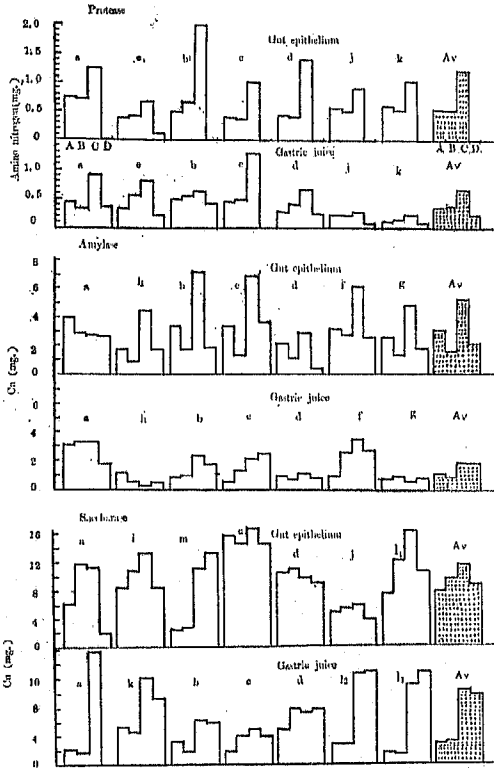


Fig. 1. Local difference of enzyme activity in gut epithelium and gastric juice. A B C D showing the division of gut, a b c... showing the races of silkworm respectively.

A. Foregut and anterior midgut, B. Middle midgut, C. Posterior midgut, D. Hindgut.
 a. E. 19 b. Taihei, c. C. 113, d. Ginrei, e. N. 115, f. 100A (+¹⁰⁰), g. Bunkaku 3 (ae)
 h. Hinode (ae), i. Amoi, j. Shūka × Ginrei (starved), k. Shūka × Ginrei (feeding), l. Chōkō × Shinwa, m. Fugaku, Av. Average.

本実験の結果 Protease 作用は皮膜組織では何れの品種も例外なく、 $A \leq B < C$ 、 $A > D = 0$ で、中腸後部に著しく強く、之に次いで中腸中部及前部は同程度である。消化液でも $A \leq B < C$ 、 $A \geq D$ で、皮膜組織の場合と平行関係にあり、中腸後部が活性度高く中部と前部は之に次いで弱い。次に後腸部では最も弱いか又は中腸前部に近い値を示す。

2. Amylase

Amylase 作用は皮膜組織では $B < A < C$ 、 $A > D > B$ の順で、中腸後部に可也強く前部之に次ぎ、中部が何れも低下していた。尚後腸では中腸中部より強い場合が見られた。次に消化液では、中腸は Protease の場合と同様に $A \leq B < C$ で中腸後部が最高である。又 $C > D > B$ で後腸は中腸後部に次いで強い。又 Amylase が品種的に著しく活性度に変異があることは松村¹⁰⁾により詳かにされたが、この場合も同氏より分与された+¹⁰⁰型の100Aがae型の分白3やヒノデよりも可也強いことが認められ、その差は中部及び後部に於て甚だしい。

3. Saccharase

Saccharase 作用は中腸皮膜組織では酵素分布が品種的に一定しないものもあるが、一般的にいえば $A < B < C$ で中腸後部最高で中部及前部が之に次ぐ。又後腸を含めて見ると $A < D < B < C$ 大体に於て松村¹⁰⁾の曲線と一致しているが、後腸に於て値が稍高い感がある。之は作用時間が長いために差が少くなったのであろう。尚後腸は中腸後部より例外なく低く、又大多数が中部より低い、前部に比しては高い場合が多い。消化液には従来 Saccharase は認められないといわれているが、この場合は次のように見られた。すなわち $A \leq B < C$ 、 $C > D > B$ で中腸後部に最高で後腸部之に次ぎ、中腸中部及び前部は同程度で、最も弱い。

以上消化管各部の皮膜組織と消化液の3酵素を測定した結果は品種其の他の条件により異なる点もあるが、酵素の局所差に重点をおいて観ると、皮膜組織については、中腸のみでは全体として中腸後部に最高を示すことが最も顕著な事実である。之に次ぐは中部及び前部であつて強いていえば一般に前部が稍弱い感がある。然し本実験の範囲では Amylase は中部が後部及び前部よりも弱いことが注目される。次に消化液の酵素については、皮膜組織の夫れと大体平行しており、後腸内の消化液の Amylase 及び Saccharase は稍強い。

考 察

消化管組織の酵素作用：松村・岡⁹⁾及び松村¹⁰⁾は消化管組織の Amylase と Invertase の部位的差異につき研究した。著者は之に加うるに Protease の部位による差異を同様に調査した所、値に多少の差はあるが大畧、松村等の場合と同様に $C > B > A > D$ の關係にあることを見出した。即ち消化酵素は中腸後部に活性が最も強いことが顕著な事実である。そしてこの部分が3種の酵

素を多量に消化管腔内に分泌するものであることは、消化液の活性度が殆ど同様にこの部に強いことでもわかる。一方細胞内に於て之等酵素が如何に作用しているかについては、此の研究のみでは明かでないが、著者は別の実験に於て、中腸後部が中腸前部に比して、種々の物質を多く摂取し、蓄積するものの如くであること¹⁴⁾、又消化管から体液への物質例えば蛋白質又は Amino 酸の移行は前部及び中部の方において速やかで、後部は遅い等の事実¹⁷⁾或は組織化学的研究で中腸後部は多糖類が特に多い等の観察(山口未発表)から考えて、組織細胞内物質自身の自己消化にも関係があるものと思う。即ち前、中部の如く単なる消化吸収に止まらず WIGGLESWORTH¹⁸⁾が *Aedes* (シマカ)の幼虫について観察している如く、中間代謝に与る場所となつてゐるものではないかと考えられる。

消化液の酵素作用：消化管内に分泌された消化液については、自然状態では前部及び後部の消化液が相互に混合し区分的の活性度を見ることは難しいので、著者は予め胴部結紮を行つておき3~4時間後、夫々採液、調査した。もとより完全ではないが、之によつて大体組織内酵素の分布と一致することを見出した。ただ消化液では後腸部酵素が中腸部に次いで相当に強い場合があつたが之は結紮前に中腸後部から消化液が移送されて来たためとみるのが妥当であろう。このことは Amylase と Saccharase の場合に見られることで Protease は後腸において余り高くないが之は酵素の再吸収の為ではあるまいかと思われる。いずれにせよ今後消化液の酵素測定にあつては、部位的差異の存在を無視することは出来ないとする。

水素イオン濃度と酵素作用：中腸皮膜組織の pH 値は著者¹⁴⁾によれば A, B, C, D 夫々 8.4, 8.2, 7.4, 6.7 内外を示し中腸前部高く後部程低い。又消化液では一般に 9.0 以上といわれるが、食物の影響をうけて 7.8 位迄低下することがあるが、絶食 6 時間内外で再び 9.0 以上に上る。又中腸前中部は高く、後部は矢張り稍低い。之に対し pH の高い部位に酵素作用は必ずしも強からず、pH の低い部に必ずしも弱からずという現象を示しており、之から観るとアルカリ液を分泌する分部と、酵素を分泌する部分とは各々所を異にしているのではないかと思われる。之に関して昆虫では HOBSON¹⁹⁾は *Lucilia* (キンバエ)の幼虫の長い腸の前及び後部は酵素を、短小の中部は強酸性液を分泌するといひ、又 WIGGLESWORTH²⁰⁾は *Glossia* (ツエツエバエ)の成虫について中腸前半部に

は酵素がなく中部に酵素が分泌され消化が起り、後部で吸収されると報告している。又蚕では腸組織の Phosphatase について須貝²¹⁾及び堀江²²⁾は $B > C > A > D$ の関係があり中腸中部が活性度が高いという。又伊藤・堀江・田中²³⁾は p^{H2} を食下させて一定時間後に腸組織内の p^{H2} を追跡した所 $C > A > B > D$ で之は著者や松村¹⁹⁾等の酵素作用とも畧一致して甚だ意義があるように思われる。尚山口・清水²⁴⁾は益菌を指示菌として各部消化液の殺菌力を *in vitro* で調べた所、中腸前部中部は殺菌力強く中腸後部稍弱く pH の値の消長とも畧平行していることを見出したが、之は生体消化管内の細菌叢等とも関連し、又軟化病や中腸型多角体病の発病部位²⁵⁾等とも関連し重要にして興味ある研究問題であると思う。

要 結

家蚕の消化管組織と消化液における Protease, Amylase 及び Saccharase の作用につき中腸の前、中、後部及び後腸の4部に区分し測定し考察した。材料蚕は10種内外につき主に5齢4~6日目のものを用い、夫々酵素液を作つた。消化液は特に幼虫を3~4時間結紮してから消化管を傷つけ採液し遠心上澄を供用した。Protease 作用は Casein を基質とし VAN SLYKE のアミノ態N定量法により、Amylase は澱粉を基質とし、又 Saccharase には蔗糖を基質とし生じた還元糖量を BERTRAND 法により夫々定量した。

前腸と中腸前、中、後部及び後腸を夫々 A, B, C 及び D とし組織及び消化液の酵素の消長を部位的順位をもつて示せば次の通りである。

消化管組織 消化液

Protease $A \leq B < C, A > D \approx 零$ $A \leq B < C, A \geq D$
 Amylase $B < A < C, A > D > B$ $A \leq B < C, C > D > B$
 Saccharase $A < B < C, B \geq D$ $A \leq B < C, C < D < B$

すなわち中腸後部は何れの酵素も常に作用が最強で中腸中部が之に次ぐといえる。然し組織では Amylase は中部において弱く現われた。消化液では3酵素共中腸後部に最大、前部と中部は畧同じで後部より弱い。後腸部は Amylase と Saccharase は中腸後部に次いで可也強く現われた。

而して従來の研究において中腸組織の前部及び中部に pH が高く後部程低いこと、又中腸後部に栄養物質の吸着が多いこと、組織化学的見地から中腸後部に多糖類の多いこと(山口未発表)又先人の研究結果等から考察して、Alkali 液分泌と酵素の分泌とは局部的機能分化が

あるものと考えられる。又中腸の前、中部は易分解性の物質が消化され速かに吸収されるに対し中腸後部は稍難分解性の物質の消化と、吸収及び蓄積が行われ、又特に中間代謝の場所として意義があるもののように考えられる。

文 献

- 1) 川瀬惣次郎・須田圭二・斎藤格二：蚕糸界報，348 (1921)
- 2) WIGGLESWORTH, V. B. : Parasitology, 21, 288~321 (1929)
- 3) 藤井音松・加藤潮時：熊本蚕試報，3 (1), 35~70 (1930)
- 4) HOBSON, R. P. : J. Exp. Biol., 8, 109~123 (1931)
- 5) 山口定次郎：応動，4 (5), 258~263 (1932)
- 6) 浦生俊興・山口定次郎・永井覚：蚕糸学雑誌，5 (3), 1~3 (1933)
- 7) 山藤 一雄：日農化，9 (2), (1933)
- 8) 松村 季美：長野蚕試報，(28) 1~119 (1934)
- 9) 松村季美・岡卓郎：長野蚕試報，(31), 1~32 (1935)
- 10) 山口定次郎：日蚕誌，6 (1), 66~68 (1935)
- 11) SHINODA, O. : J. Biochem, 11, 100~123 (1936)
- 12) 松村 季美：日蚕誌，13(4), 168~174 (1942)
- 13) WIGGLESWORTH, V. B. : J. Exp. Biol., 19, 56~77 (1942)
- 14) 山口定次郎：蚕糸学雑誌，14 (2), (1942)
- 15) 松村 季美：蚕糸試報，13 (10), 505~533 (1951)
- 16) 伊藤 智夫：遺伝，23 (1), (1953)
- 17) 山口定次郎：信大織報，(4), (1954)
- 18) 黒田 行昭：遺伝，29 (1), 8~12 (1954)
- 19) 須貝 悦治：日蚕誌，23, 192 (1954)
- 20) 石森 直人：日蚕関東講演集 第6回(1954)
- 21) 堀江 保宏：応動，20 (1, 2), (1955)
- 22) 山崎 寿：長野蚕試報，10 (4), 269~335 (1955)
- 23) 伊藤智夫・堀江保広・田中元三：日蚕関東講演集，16, (1955)
- 24) 山口定次郎・清水 猛・市川智子：日蚕中部講演集，10, 3 (1955)
- 25) 山口定次郎・清水猛：日蚕中部講演集，10, 3(1955)
- 26) WIGGLESWORTH, V. B. : The principles of Insect physiology, (1953)
- 27) ROEDER, K. D. : Insect physiology, (1953)
- 28) 皆川 豊作：酵素化学，(1951)

Summary

The present writer wishes to give in this paper the results obtained in the experiment for ascertaining whether there is functional localization or not in the digestive system of silkworm larva, *Bombyx mori* L. In this case, activities of protease, amylase and saccharase present in the different region of gut epithelium and gastric juice of alimentary canal were measured.

1. Materials and technique : The 4th to 6th day larvae of the fifth instar of various races were used. The gut tissues of worms were cut into the following four divisions A, B, C and D, such as oesophagus and anterior midgut (A), middle midgut (B), posterior midgut (C), and hindgut (D). The cut tissues were grouped into the four divisions. The tissues of the same group were gathered and homogenized and then extracted by a dilute solution of glycerine ammonium. The extracts were used as enzyme preparation of the gut tissue. After 3 to 4 hours ligation of the silkworm body in four divisions, the gastric juice was gathered by pressing out together with gut contents, which are the mixture of mulberry leaves and gastric juice, by slitting the integument and gut epithelium. The gastric juice thus obtained, was grouped into four divisions as above mentioned in the case of gut epithelium, and was centrifuged. The supernatant is used for the enzyme measurements. For the test of protease activity, VAN SLYKE'S amino-nitrogen analysis method was used. In this case a dilute solution of casein was used as substrate. The amylase activities were measured by means of BERTRAND'S method for a starch solution as substrate. For the measurement of saccharase activities, The same method as in the case of amylase was applied by using purified cane sugar as substrate.

2. The results obtained : The enzyme activities of protease, amylase and saccharase in the four divisions in both gut epithelium and gastric juice are shown in the following table.

From the result, it may obviously be said that all these enzyme activities both in the gut epithelium and

Table

Enzyme	Gut epithelium	Gastric juice
Protease	$A \leq B < C, A > D \overset{\text{zero}}{=}$	$A \leq B < C, A \geq D$
Amylase	$B < A < C, A > D > B$	$A \leq B < C, C > D > B$
Sacchalase	$A < B < C, B \geq D$	$A \leq B < C, C > D > B$

gastric juice were always remarkably high especially in the posterior midgut, which has many thick folds and cryptlike construction. These results agree well with those of MATSUMURA (1935, 1942), who studied the local difference of amylase and saccharase in the gut epithelium of silkworm larva, *Bombyx mori* L. The enzyme activity of gastric juice in hindgut, however, was a little higher than that of middle midgut. This may be due to the movement of the gastric juice from the posterior midgut to the hindgut before ligation. From the contradictory facts that the enzyme

activity was very high in the posterior midgut and low in the anterior and middle midgut, while the pH value was high in the anterior and middle midgut epithelium and low in the posterior midgut, as previously observed by the author (1942), it may be thought that, there is some different local differentiation between the secretion of alkaline digestive fluid and that of digestive enzymes. Furthermore, from the fact that considerably large amount of polysaccharide is observed histochemically in the posterior midgut epithelium (YAMAGUCHI unpublished) this part seems to play an important role in some intermediary metabolism, as well as of digestion and absorption of nutrients. This supposition fit well with the WIGGLESWORTH's opinion in *Aedes* larva (1942).

(The Faculty of Textile, Shinshu University, Ueda Japan.)