

応用生命科学科 生物学実験（昆虫の形態と機能）

担当教員：浅野、TA：高、小林、半谷、岡島、高橋、武内、谷口（応用分子昆虫学分野）

実験の予定と進め方について、カイコの系統（卵色・幼虫形質の遺伝）

鞘翅目・双翅目昆虫の外部形態観察と鱗翅目昆虫との比較

カイコの外部形態の観察

カイコの内部形態の観察（解剖）

昆虫細胞の構造と機能：血球細胞の観察

昆虫細胞の構造と機能：絹糸腺細胞の観察

昆虫細胞の構造と機能：生殖細胞の染色体観察

カイコの外部形態の観察

1. カイコの生活環

カイコ (*Bombyx mori* L) は、絹をとるために古くから育種改良された昆虫で、完全変態 (卵→幼虫→蛹→成虫と4期を過ごす) する昆虫である。幼虫期には4回脱皮を行い5齢期が終齢である。終齢幼虫は6～9日桑を食べ続けてから絹糸を吐き、繭を作る。2～3日で繭を完成させたカイコは、脱皮・変態して蛹になる。蛹の期間は約10日間で脱皮変態と同時に繭を破り成虫 (蛾) となりでてくる。蛾は餌を食べることなく交尾産卵して次代を残し一生を終える。このような生活環が1回のを1化性、2世代のものを2化性、それ以上のものを多化性と呼ぶ。

2. カイコ幼虫の外部構造観察・・・実体顕微鏡により観察

カイコなどの昆虫の皮膚は硬いクチクラに覆われ、これが外骨格を形成して外形を保持し、水分調節、外敵および病原菌などから体の保護を行い、同時に運動に必要な筋肉の付着点ともなっている。昆虫の体は頭部、胸部、腹部からなりカイコは胸肢、腹肢、尾肢といった3種類の肢をもつ。呼吸は気門で行うが、気門のある体節と無い体節とが認められる。カイコ幼虫の背面には3種類の班紋が存在し、その形態的な特徴から眼状紋 (目に似る)、半月紋 (三日月状)、星状紋 (星状の点) と名付けられている。このような班紋を持つ個体を形蚕と呼び、班紋を持たない個体を姫蚕と呼ぶ。

幼虫のスケッチを行い下記の名称を付けよ。また、設問に答えよ。

頭部、胸部、腹部、胸肢、腹肢、尾肢、尾角、気門、眼状紋、半月紋、星状紋

Q. 体節数はいくつかな?

Q. 気門は第何体節にいくつあるかな?

Q. 胸肢と腹肢には異なる爪がついている。これらを観察してスケッチする。

頭部を実体顕微鏡観察し詳細にスケッチしなさい。

石渡ノヘホルド腺を観察して雌雄を判定すること。一雌雄をメモする。

カイコは明日、解剖します。ビーカー等にいれて桑を与えてください。

カイコの内部形態の観察

カイコ幼虫の内部構造の観察・・・解剖し実体顕微鏡により観察

昆虫の内部器官は循環器（開放血管系）、呼吸器、消化器、排泄器、生殖器、神経系、腺組織、脂肪体、筋肉組織からなる。それぞれの形態を実体顕微鏡を用いて観察し、その機能による特徴的な構造を認識する。

実験手順

1. 解剖皿（シャーレにパラフィンを流し込み作成したもの）にカイコの生理食塩水（0.8%NaCl）をいれる。
2. 水道水を入れたビーカー中でカイコ（5齢幼虫）を麻酔する。一ぐったりするまで水中に入れておくと動かなくて解剖しやすい。
3. 背中側を下にして頭部付近（第1節）と腹部末端部付近（第13節）を虫ピンでとめる（パラフィンに突き刺す）。
4. 腹部の後端に解剖用ばさみで切れ目をいれる。（切れ目は皮膚だけが切れるように慎重にいれること。内部器官まで切ってしまうと観察が困難である。）
5. 切れ目から解剖ばさみをいれ皮膚だけが切れるよう（内部器官と一緒にきらないよう）に頭部方向へ真っ直ぐにきる。
6. 胸肢と第4腹肢の内側を虫ピンで引っかけて皮膚を開きパラフィンに突き刺してとめる。第1腹肢の内側でさらに止めると観察しやすい。
6. ピンセットを上手に使い、器官や組織を大きく破損することなく解剖しながら内部構造を実体顕微鏡下で観察する。

カイコ5齢幼虫の解剖を行い、下記1から4の器官・組織を観察してそれぞれを統括した解剖図をスケッチせよ。

1. 消化管

前腸、中腸、後腸の3部分からできている。前腸は、口腔、咽喉、食道から、後腸は小腸、結腸、直腸からなり第2体節から第9体節までは中腸が占める。

2. 排泄器（マルピーギ管）

直腸の壁面を迂回し、壁外にでる。ついで中腸の壁を左右3対の淡黄色の糸状細管として上行しさらに下降して小腸と結腸の間に開口している。

3. 気管

焦げ茶色の細い管で体内に張りめぐっている。9対の気門の内側に数本の気管が叢生しており、縦に走るもの（縦走気管）と横に走るもの（横走気管）とがある。

4. 循環器（背脈管）

背面中心線の皮膚の真下にあり、透けて見える管。膨張・収縮により血液を後方から前方へと送っている。

昆虫血球細胞の観察

本実験では昆虫（カイコ）の血球細胞の構造を観察する。また、ヒトのような抗原-抗体反応による免疫機構を持たない昆虫の異物や微生物の排除機構（生体防御機能）の一部担っている。

カイコの血液には赤血球・白血球の分化が無く、おおむね白血球に近い血球である。造血器官は翅芽をとりまく細胞群で、原白血球とプラズマ細胞が生産される。昆虫の血球細胞は通常2〜数種類存在し、カイコでは1) 原白血球、2) プラズマ細胞、3) 顆粒細胞、4) 小球細胞、5) エノシトイドの5種類に分類される。これらの血球細胞の中で原白血球細胞以外は異物侵入に対する生体防御の一翼を担っていることが解明されている。カイコ以外の昆虫ではシストサイト、アディポヘモサイト、ポドサイトと呼ばれる血球種を持つ種も観察されている。

1) 原白血球：最も原始的な血球で分裂可能あり、プラズマ細胞、顆粒細胞、小球細胞へ分化する直径6〜12 μm の球形または卵形の血球。細胞の中心に比較的大きな核があり、各内には1〜3個の仁とクロマチン粒（染色時）が観察される。

2) プラズマ細胞：採血直後には紡錘形であるがスライドガラス上で変形し（スライドと異物として認識する結果）、フィロポディアと呼ばれる突起を四方八方に出して扁平形を呈する。この構造形成には分裂装置として有名である骨格形成成分のアクチンが関与している。付着した突起を異物表面に伸展できる事が、貪食作用などの生体防御反応を円滑に行わせる上で重要であると考えられている。核は比較的大きく原白血球同様に1〜3個の仁とクロマチン粒が観察される。血球のサイズは紡錘形時に直径16〜30 μm 。

3) 顆粒細胞：球形または卵形の直径8〜16 μm の細胞で比較的小さな核を持ち、小球細胞へ分化が可能である。細胞質内には中性赤で生体染色される1〜3 μm の顆粒が含まれる。脱顆粒作用によって細胞室内顆粒を細胞外に放出する性質を持ち、これにより貪食作用を示す。また、大型異物を包囲して生体内隔離する包囲化作用（インキャプシレーション）や細菌感染時に細菌を貪食した顆粒細胞同士が集合して小節（ノジュール）を形成する作用がある。この際にはプラズマ細胞との関係プレーも観察されている。また、異物への付着と貪食を効率的に行うためレクチンと総称される糖蛋白質の橋渡しを受けて付着の効率を高める。顆粒細胞は変態に伴い、不要細胞の基底膜結合部位に結合する結果、これを認識してキモトリプシン様プロテナーを放出することで不要細胞を分解する。つまり、脱皮、変態に関連した組織の再編成にもきわめて重要な役割を果たしていると考えられる。

4) 小球細胞：直径8〜20 μm の細胞で細胞質に1.5〜6 μm の小球（中性赤で染色される）が1細胞に1〜20個含まれている。この細胞はカビや細菌の細胞壁成分の一つであるペプチドグリカンや β -1,3 グリカンと認識するタンパク質を合成している。

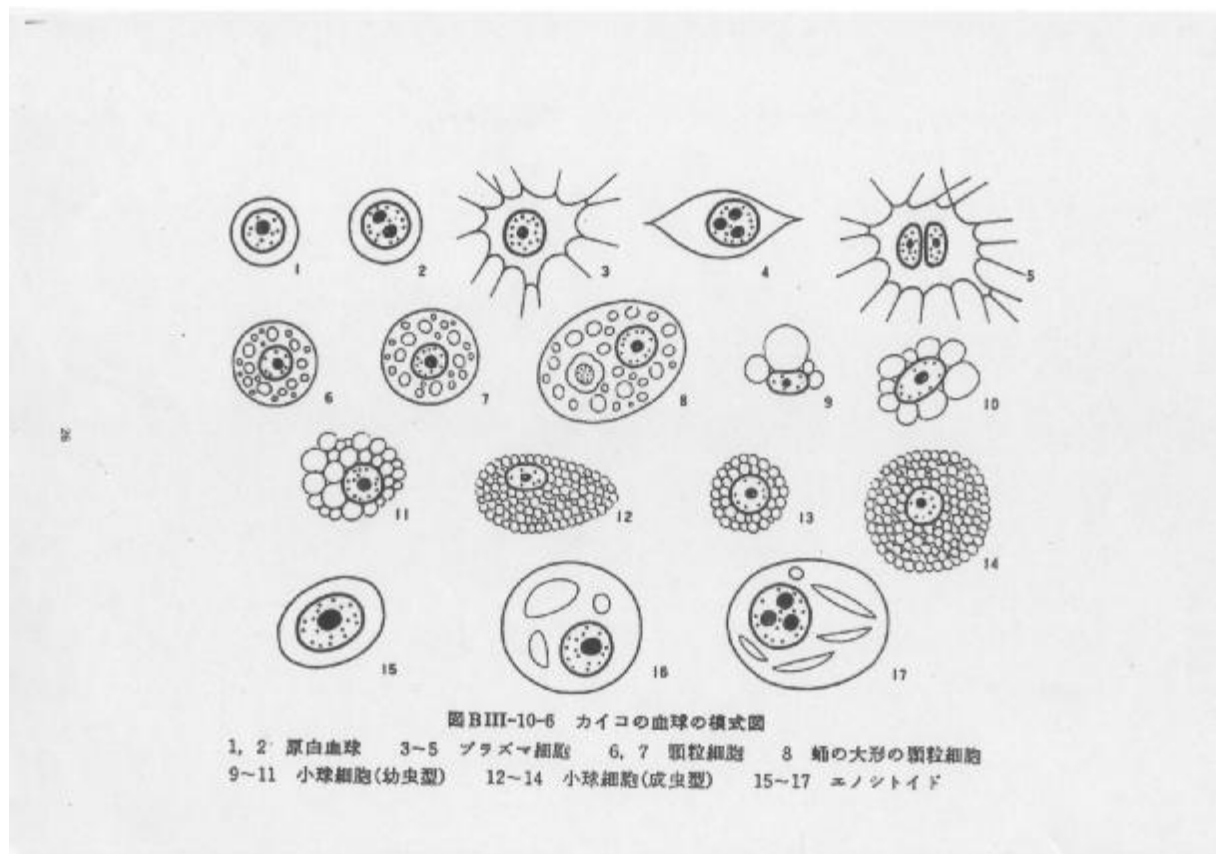
5) エノシトイド：直径12〜25 μm の血球で、6〜10 μm の大きな核を有する。細胞質中にはしばしば紡錘形や半月形のタンパク質性の大型含有物が存在する他、グリコーゲン顆粒や多糖類なども含まれる。この細胞はメラニゼーション（黒色化）を引き起こす酵素のフェノール酸化酵素の前駆体を合成している。

実験手順

a. 生体染色による小球細胞の小球ならびに顆粒細胞の顆粒観察用のカイコは血液採集前に中性赤を注射（1%中性赤を数 μL /個体）し、2~3時間放置する。――注射済み。

1. 中性赤により生体染色されたカイコの血液をスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて染色された小球と顆粒を観察する（小球には6 μm にもおよぶ大形のものがあるが顆粒の大きさはほぼ1~3 μm である）とともにその他3種類の血球細胞（プラズマ細胞、エノシトイド、原白血球）を観察し5種類全ての血球をスケッチする。

Q1. 5種類存在する血球細胞を観察してスケッチせよ。染色されていない血球細胞は区別しにくい。各細胞の説明と図をもとにその大きさや形の違いによってできる限り判別すること。



絹糸腺細胞の観察

絹糸腺は前部、中部および後部糸腺から成る。後部糸腺は絹糸の主成分であるフィブロインタンパクを合成している。中部糸腺は、フィブロインの外側を3層に覆うセリシンタンパクを合成している。また、フィブロインの濃度を約30 %まで濃縮し、フィブロインを内部に外層にセリシンが囲む形で前部糸腺へとおくりだす。1対の絹糸腺の双方から前方へと流動した絹タンパクは吐糸管で合一し、吐糸される間に分子摩擦と延伸により繊維となる。

絹糸腺細胞は分化してから、その数が変化することなく肥大成長のみを行う。このため絹糸腺細胞は他の体細胞に比べて非常に大きく巨大細胞と呼ばれる。絹糸腺細胞核は細胞分裂を伴うことなく分裂を繰り返す。この結果、核内のゲノム数（普通は2n）は非常に多くなり、核（染色体）の形態は球状ではなく棒状や樹枝状を呈している。

この実験では絹糸腺を取り出して腺組織における細胞の形態を観察する。

実験手順

1. カイコを麻酔・解剖して絹糸腺を取り出す。（解剖皿を用いて生理食塩水中で行う）
2. 出来るだけバラバラにしないように絹糸腺(前部糸腺から後部糸腺前部)を別のシャーレに移す。
3. 絹糸腺細胞の連結をほぐすための分離液（0.5 %酢酸：蒸留水：グリセリンを9：4：1の割合で混合した液）をシャーレに7分目（20 ml程度）とり絹糸腺を分浸し、細胞を破壊しないように注意して付着している気管・気管枝を取り除く。気管・気管枝を取り除きながら、30分以上（長い程良い）分離液中で処理する。

*（絹糸腺細胞は内部に生合成された蛋白質を取り囲んでいる1層の細胞で非常に壊れやすいので注意して取り扱うこと。）

4. しばらく浸漬してから実体顕微鏡下で観察を開始する。

Q 1. 前部糸腺と中部糸腺の境界付近、中部糸腺の前区、中区、後区ならびに中部糸腺と後部糸腺の境界を順次観察し、絹糸腺細胞は2列に縫合して管状になった1層の細胞であることを確認した後、細胞形態（特に大きさの違いに注意して）をスケッチせよ。

5. 分離液の中から細胞を上手に取り出し、スライドガラス上に重ならないように（前述の通り絹糸腺細胞は2列で1つの管状の形態をとるために丸まりやすいので上手に広げる）、染色液を組織が染まるように1〜2滴たらし、10分程度染色する（組織が染色液中にないとダメ）。

6. カバーガラスをかけてカバーガラスが平行になって観察できる程度でよいので優しく押さえる（強すぎると細胞が壊れるので注意する）。

Q 2. 細胞核を光学顕微鏡にて観察して、その形を前部糸腺（前部糸腺と中部糸腺の境界付近が観察しやすい）中部糸腺の前区、中区、後区細胞のいずれか一カ所もしくは全てスケッチせよ（核は細胞質よりも濃く染まる）。

昆虫の減数分裂と配偶子形成の観察

カイコの生殖細胞は発生初期の胚子において認められ、孵化時には第8体節の背面に生殖巣としての形が観察できる（外部形態の観察ですで見えた）。この生殖巣が成長し、配偶子を形成するための減数分裂にある時期を選び、分裂の様子と染色体（ $n = 28$ ）を観察する。

精巣は4個の精室に分かれ、各室の端に先端細胞という巨大な細胞が存在し、これを囲むようにして精原細胞が分裂増殖する。精原細胞は精原細胞嚢とという皮膜に包まれており、6回分裂して64個のシストを形成して精母細胞（第1精母細胞）に移行する。第1精母細胞は減数第1分裂（異形分裂）により染色体を半減した2個の精母細胞（ $n = 28$ ）となり、引き続き行われる減数第2分裂（同形分裂）を経て精子となる。減数分裂・精子変態によってもシストは崩壊しないのでカイコの精子は256個が1つの束（精子束）となる。カイコの精子には受精を行う、有核精子と受精は行わないが無核精子の受精を手助けする無核精子の2種類が存在する。

卵巣には4つの卵管が内在し、4齢の末期頃まで分裂を続けて卵原細胞数を増やすと同時に卵原細胞は3回続けて分裂し1個の第1卵母細胞と7個の栄養細胞とに分化する。第1卵母細胞は減数第1分裂の中期（ $n = 28$ ）で分裂を中断したまま肥大成長して完成卵となる。減数分裂は雄との交尾後精子が卵内に進入してから再開され、産卵後約90分頃減数第2分裂が終了する。

また、昆虫の卵管には3種類の構造が知られている。卵母細胞と栄養細胞の8個の細胞群は卵管内に1列に配置し、栄養細胞群が上に卵母細胞が下になるように位置関係をとるカイコのような栄養細胞群と卵母細胞が交互に配列する卵管を交互栄養室型卵管と呼ぶ。昆虫にはこのほかに栄養細胞を持たない無栄養細胞質型卵管と栄養細胞が先端部にある端栄養室型卵管が知られている。

実験手順

1. 雄を選び、生殖巣を2個摘出し、プラスチックチューブに入れた1 ml の75mMKCl 溶液（低張液）へ。
2. ピンセットを使い精巣を低張液の中に入れて、10 分間静止して低張処理する。
3. 遠心分離（3,000 rpm、1 分）で細胞を沈殿させる。
4. 細胞を残して上清を900 μ l 捨て、1 ml の固定液を加える。
5. タッピングで固定液中の細胞をゆっくりとバラバラにする。
6. 5~10 分間固定した後、遠心分離（3,000 rpm、1 分）で細胞を沈殿させる。
7. 上清 900 μ l 捨て、900 μ l の固定液を新たに加える。
8. タッピングで固定液中の細胞をゆっくりとバラバラにしてさらに5 分間固定する。
9. 遠心分離（3,000 rpm、1 分）で細胞を沈殿させる。
10. 上清 800 μ l を捨て、固定液300 μ l 加えてタッピングで固定液中の細胞をゆ

っくりとバラバラにする。

- 1 1. 細胞がバラバラになった精巢を取り出し、スライドガラスにのせピンセットの先端で精巢を押さえつけ内部の細胞液を露出させて細胞液をスライドに塗りつける。
- 1 2. 乾燥したら染色液を1~2 滴落とし、上から空気が入らないようにカバーガラスをかける。
- 1 3. 光学顕微鏡にて観察し、細胞と染色体の観察とスケッチを行う。

低張液 75mM KCl

固定液 MA 液 (Methanol 3: Acetic acid 1)

染色液 酢酸オルセイン

雄の精母細胞とパキテン期や中期染色体 (28本の2価染色体) を観察する。

精母細胞のシスト (64細胞群) や精子、その他の細胞を観察する。

