

An Insect Brain Hormone Activity from the Mammalian Tissues. Junko Nishiitsutsuji-Uwo (Department of Agricultural Chemicals, Shionogi & Co., Ltd., Doshomachi, Osaka) Received March 31, 1971. *Botyu-Kagaku* 36, 66, 1971 (with English Summary 76).

12. 脊椎動物の組織から抽出された昆虫の脳ホルモン作用類似物質 宇尾淳子 (塩野義製薬株式会社・植物薬品部) 46. 3. 31. 受理.

昆虫の除脳休眠蛹を羽化させる脳ホルモン作用類似物質が昆虫の脳以外に脊椎動物 (ほ乳類) の組織にも多量に存在する。とくに、ウシ・ブタ等の視床下部を含む間脳と胼に多い。これらの組織から抽出される物質は、原則として昆虫の脳そのものよりの抽出と同じ方法で抽出され、水溶性で熱に安定であり、一般に透析膜を通過せず、硫酸またはアセトンで沈殿する。脂質タンパクまたは核酸の可能性は少ない。

昆虫の三つの主要ホルモンのうち、前胸腺より分泌される脱皮ホルモン (ecdysone) は、まず Butenandt と Karlson により 1945年以來カイコで抽出が始められ、10年後に 500 kg のカイコサナギから 25 mg の結晶が得られ Ecdysone と名付けられた<sup>2)</sup>。更に10年かかってその構造式が決定された<sup>4)</sup>。ところが1966年、竹本<sup>10)</sup>はヒナタイノコズチから、中西<sup>14)</sup>はトガリハマキから、偶然に高収量で得られた未知のステロイドが ecdysone と類似構造をもち、かつ同じホルモ活性があることを発見した。以後、種々の植物体から類似物質が広く抽出され、大量かつ安易に脱皮ホルモンの供給が可能となって、ホルモン研究へ大きい貢献をなしている。一方、アラタ体から分泌される幼若ホルモン (JH) は、Williams<sup>20)</sup> のセクロピア蚕よりの粗抽出にはじまり、Röller<sup>15)</sup> の構造決定まで10余年の年月が流れたが、その間昆虫以外の無脊椎動物、脊椎動物の内分泌器官、ヒトの胎盤、また種々の植物やバクテリアにも JH の活性物質が含まれていることがわかり、現在では数多くの化学合成品がつくられるようになった。

三つのホルモンのうち、脳ホルモン (前胸腺刺激ホルモン) については、このホルモンが昆虫の脳間部にある神経分泌細胞によって生成されることは Wigglesworth (1940) の *Rhodnius* の実験以来、多くの昆虫で証明されているが、その化学的性質については、小林・桐村等<sup>9,10)</sup> のコレステロール説にはじまり、市川・石崎<sup>8,9)</sup> のタンパク系物質説、Williams の mucopolysaccharide 説<sup>21)</sup> 等、種々の報告がなされていて、いまだ物質の性質さえも判明していない。これは抽出材料となる昆虫の脳があまりにも小さい点と、bioassay の困難な点に起因している。

著者は①昆虫の脳ホルモンの分泌経路である脳間部

一側心体-アラタ体の系が脊椎動物の視床下部-下垂体の系と相同である。②視床下部の神経分泌細胞で生成されるホルモンは polypeptide である。③昆虫の脳ホルモンもまた polypeptide である可能性が高い (未発表データ、すなわち市川・石崎説と類似)。④他の二つのホルモン作用物質が広く動植物で発見されている。以上の4点から、脊椎動物の神経分泌系に昆虫の脳ホルモン類似物質が存在する可能性に着眼して種々の抽出を試みたところ、視床下部を含む間脳とその周辺に昆虫の脳ホルモン作用類似物質が存在することが判明した。一方、対照区として脊椎動物の多くの組織よりの抽出を行っていたところ、胼 (まれに脾等) からの抽出物は、応々にして間脳よりも強力な脳ホルモン作用を示すことがあるという事実を発見した。ここでは脊椎動物の種々の組織から抽出された昆虫の脳ホルモン作用類似物質についての予備的報告を行いたい。

#### 実験材料および方法

##### 〔抽出材料〕

ウシ・ブタ等屠殺直後に、各組織を多くの個体から各一部分ずつのみを集めて pool し、ドライアイスで冷凍して屠殺場より運搬し、ただちに、または -20°C に或期間貯蔵した後、抽出に用いた。脳の各部分に因しては、脳全体をドライアイスで一度冷凍したのち、融解して解剖し、ただちに抽出を行なった。

抽出対象となったウシ・ブタの組織は次のものである

脳：脳全体、前・側頭葉、小脳、中脳、中脳と間脳の移行部 (松果体を含む)、間脳 (視床下部を含む)、橋、延髄、下垂体

別にラット視床下部、大脳皮質、下垂体前葉  
脳以外の組織：血清、心筋、筋、黄骨髓、赤骨髓、

肺, 肝, 腎, 副腎, 膵, 脾, 十二指腸

各組織については, すくなくとも2度, 新しく購入して抽出を繰り返した。別に+の対照として, 羽化1日目のカイコ蛾頭部を集めて凍結貯蔵し, 必要に応じて抽出を行なった。

#### 〔抽出方法〕

原則として, カイコの脳を材料として脳ホルモン抽出を行なった石崎・市川<sup>8)</sup>の方法に従って, カイコ蛾頭部よりの新しい抽出法を試み, これと平行して脊椎動物の各組織の抽出を行なった。おもな抽出物の記号とその抽出方法は次のようである。

AP—20倍量以上の $-10^{\circ}\text{C}$ アセトンを用いて組織をホモジネートしてアセトン粉末を作る。

CE—組織そのものより, またはAPより, 主として2% NaCl または 0.2 M pyridine-HCl pH 5.7, 時に種々の buffer でもって凍結, 融解, 攪拌, 遠心をくり返して抽出する。

HF—CE を  $90^{\circ}\text{C}$  3分熱処理して変性物を落とし, 上清をとる。

EW—或抽出段階で等量のエーテルを加え, はげしく攪拌し, 遠心してエーテル層と寒天層を除き水層をとる。何度もくり返す。

Ch・Me—抽出液1に対し, クロホルム・メタノール (2:1) 混合液を4の割合で加え, はげしく攪拌し上層をとる。2~3回くり返す。

AC75 (30~75, 90 etc)—アセトン final 75% (30~75%, 90%等) まで加え, その沈殿物をとって水または buffer に溶解する。

AS75 (30~75, 90, 100 etc)—抽出物に硫酸を加えて75%飽和区 (30~75%, 90%, 100%飽和区等) の沈殿をとり, 水または buffer にとかし, 同じ液で透析する。

Phenol 上, 下—抽出物に水飽和フェノールを等量加え, 上層と(中)下層に分け, フェノールはおのおのエーテルで除く。何度もくり返す。

DCa (—e)—抽出物を DEAE セルロースのカラムに NaCl 等の濃度を順次上げていって各 peak を集め濃縮する。

CMA (—e)—抽出物を CM セルロースのカラムに NaCl 等の濃度を順次上げていって各 peak を集め濃縮する。

~P—各抽出物を凍結乾燥 (時に減圧乾燥) する以上の段階を順次または適当にくみ合わせて抽出を行なった。

#### Enzyme digestion

RNase (SIGMA), thermolysin (大和化成), pronase (科研化学) を各抽出物の蛋白濃度に対し 1/100 の濃度の割合で2度加え,  $37^{\circ}\text{C}$  に6~12時間

おいて消化させた。

タンパク質・DNA・RNA・糖の検定

タンパクの検定は Lowry<sup>12)</sup> の方法, DNA は Barton 法<sup>11)</sup>, RNA はオルシノール塩酸法<sup>13)</sup>, 糖はアンスロン法<sup>17)</sup>に従った。

#### 〔脳ホルモン活性検定試験〕

Test animal は主としてエリサン *Samia cynthia ricini* の除脳蛹を用いた。エリサンの羽化のための脳ホルモン分泌臨界期は蛹化後  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  で30~42時間である<sup>7)</sup>。蛹化後12時間前後に冷蔵麻醉 ( $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 4~12時間), 時にエーテル麻醉をして除脳し, 除脳後1~数カ月間  $25^{\circ}\text{C}$  に放置して後使用した。

一方, 小林等<sup>11)</sup> の用いたカイコ *Bombyx mori* の “Dauer pupa” もまた時に応じて使用した。すなわち日122号×支115号系統を蛹化後10分以内に冷蔵麻醉して除脳し,  $25^{\circ}\text{C}$  に保存し, 除脳後4~5週間の間に使用した。

Test 法は test animal を麻醉 (主として冷蔵麻醉) し, 第4腹節背方より各0.02~0.08 ml ずつ注射して注射部位をパラフィンで封じ,  $25^{\circ}\text{C}$  に保存した。原則として3~4段階の希釈を行ない, 各段階は5~6例ずつとした。ただしカイコの除脳蛹は test animal として, エリサン除脳蛹より信頼度において劣っているため (論議の項参照), 各段階は少なくとも10例以上とし, 各抽出物について40~50例を用いた。対照区は常に抽出物を溶解した溶液を—の対照とし, 抽出物の希釈に用いた溶液で実験区と同様の希釈を行なった。別にカイコの頭部よりの抽出物を+の対照として同時に注射し, 羽化に要する日数や, test animal の良否の比較検討に供した。

各抽出物や希釈に用いた水や buffer には石崎等<sup>8)</sup> の方法にしたがって, フェニールチオウレアを (時にペニシリンも) 加えた。

#### 実験結果

##### 〔ウシ・ブタの脳よりの抽出〕

予備実験として間脳を含む脳全体 (ただし下垂体を含まず) をアセトン粉末として冷凍保存し, これを出発点として種々の方法で粗抽出を行なった結果

①アセトン粉末 AP を2% NaCl (20ml/gAP) で抽出した分画 CE

②CE をさらに  $90^{\circ}\text{C}$  3分熱処理して変性物を除いた分画 HF

③HF に冷エタノールを加え, 最終70%とした時の沈殿物を0.05 M のトリス—塩酸液 pH 7.2 にとかし, 同液に透析した場合の透析内液

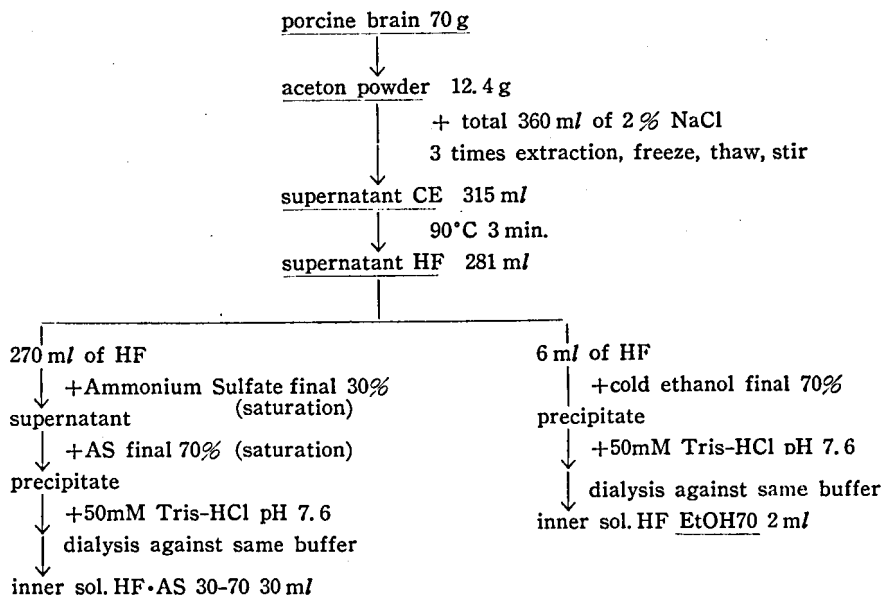
HF・EtOH 70

④CE または HF に硫酸を加え, 30~70%飽和区で

落る沈殿物を0.05 M トリス塩酸液 pH 7.2 に溶かして同液に透析した場合の透析内液 HF・AS 30~70, CE・AS 30~70  
以上の4つの分画は、エリサン除脳蛹に注射された

場合 host を羽化に導くことが判明した。すなわちウシ・ブタ等の脳の抽出物には、除脳休眠蛹の羽化を促すならんかの物質が含まれていることが推定される。第1表は抽出の1例を示した。

Table 1. An example of extraction from brain.



〔脳の各部位よりの抽出物の比較検討〕

ウシ・ブタ等の脳の抽出物をエリサンやカイコを除脳休眠蛹に注射すると、休眠蛹は羽化することがわかったため、次に脳のどの部分に有効物質が含まれているかを調べるために、ウシの脳4例分について、前頭

葉+側頭葉、小脳、中脳、中脳と間脳との移行部(松果体を含む)、視床下部を含む間脳の部分、橋、延髄の7部分に解剖し、それぞれをアセトン粉末とした。1g の AP に対して15倍量の2% NaCl で粗抽出を行ない、その上清 (CE) に対して 90°C 3分熱処理して

Table 2. Comparative hormonal activity among the parts of the brain.

Name of part	Mark of sample	*No. positive/No. Negative			Prot. mg/ml in sample	Judgment
		×1 0.05 ml	×3 0.05 ml	×10 0.05 ml		
frontal & temporal lobes	25② HF①	0/7	2/5	0/7	4.1	-
cerebellum	26② HF①	1/6	1/6	0/7	3.1	-
mesencephalon	27② HF①	2/5	1/6	0/7	3.8	--
transitional portion between mesencephalon & diencephalon	28② HF①	1/6	0/7	1/6	3.2	--
diencephalon	29② HF①	5/2	1/6	1/6	3.4	+
pons	30② HF①	2/5	2/5	0/7	3.2	±
medulla oblongata	31② HF①	1/6	0/7	0/7	4.2	-
Control	50 mM Tris-HCl pH7.7	0/9	0/9	0/9	0	-

\* For test animals were used brainless diapausing pupae

× means dilution.

変性物を除去した (HF) のち、各抽出物をエリサンに注射した。結果の 1 例を示すと第 2 表の通りである。希釈は原液 (×1)、その 3 倍 (×3)、その 10 倍 (×10) 希釈として、各段階 7 例ずつ計 21 例に注射した。

第 2 表の HF の他に各部分を CE についても比較検討したところ、次のような総合結果がえられた。

1. 視床下部を含む間脳の部分に活性が強い。
2. 中脳、橋、延髄にも応々活性がみられるが、間脳に比較すると弱い。

〔ウシ・ブタ・ラットの視床下部を含む間脳よりの抽出〕

上述の実験からウシ・ブタの脳特に間脳部には、多量の昆虫の脳ホルモン作用類似物質が含まれていることが判明した。そこでウシ・ブタの視床下部+下垂体、ウシの間脳、ウシの視床下部、ラットの視床下部について、それぞれ抽出を行なって bioassay したところ、全部有効な結果がえられた。

〔脳よりの抽出まとめ〕

今、脊椎動物の脳の各部よりの種々の抽出物がエリサン除脳蛹を羽化させる物質をどれほど含んでいるかを比較すると、第 3 表がえられる。

Table 3. Presumptive amount of materials present in the mammalian brain that may induce the emergence of the debrained *Samia*-pupae.

Mark of extract	Part of extraction	Method of extraction (see Method)	Minimum amount for emergence ** <i>Samia</i> -unit	
			per g AP	per one animal
29 HF ①	bovine hypothalamus	AP→CE→HF	200	100
29② HF ② AC90	"	AP→CE→HF→AC90	100	50
S 591	rat hypothalamus	CMP→CE	346	—
9 CE ①	bovine diencephalon + hypophysis	AP→CE	2680	8600
9 HF ②	"	AP→CE→HF	3000	9600
9 CE ② AS100	"	AP→CE→AS100	100	3200
2 HF EtOH70	porcine brain	AP→CE→HF→EtOH70	225	2800
2 CE ② AS100	"	AP→CE→AS100	411	5100
6 CE ①	bovine brain	AP→CE	2500	147500
6 HF ① AS100	"	AP→CE→HF→AS100	1240	73200

\* CMP is the defatted powder with chloroform and methanol.

\*\* See the Reference (8).

この表からみて、羽化に必要な物質を視床下部のみから抽出すると、ウシ・ブタ・ラットを問わず、その収量はきわめてわずかであり、視床下部を含む間脳部と下垂体ではもっとも抽出の効率がよいことがわかる。しかしながら、この物質が脳のどの部分に存在する(または生産される)かは、現在までの結果から結論づけることはむづかしい。脳よりの抽出物、とくに間脳、中脳、橋付近の抽出物は往々カイコやエリサンに対して強い毒性を示した。毒性は抽出段階が粗であるほど大きく、かつ濃度の高いほど大きい。また抽出段階が進むにつれて、今までに行なったような抽出方法では活性が失われて行くことが多く、後で述べる胼よりの抽出に比して抽出がむづかしい。今までに調べたところ、有効物質を含む分画は DNA を含まず、少量の RNA と糖とを含んでいる。イオン交換セルロースによる分画物は bioassay の結果についての再現性に乏しい。

〔脳以外の組織〕

脊椎動物の脳、とくに間脳-下垂体には、エリサン体眠蛹を羽化させるための有効な物質が含まれていることが明らかとなったが、他の組織には果たしてそれは含まれていないのであろうか。脳の対照実験として、種々の組織について、いろいろの方法で抽出を行ない、カイコとエリサンについてくり返し慎重に bioassay を行なった。その結果をまとめると第 4 表の通りである。抽出段階は主として AP→CE と AP→CE→AS 75 の 2 段階であった。

第 4 表から明らかなように、脊椎動物の脳以外の組織よりの抽出物は、ここで行なった抽出法の範囲では、一般にエリサンやカイコの除脳蛹を羽化させる物質を含んでいない。しかしながら、肝と脾の抽出物はまれに疑わしい結果を示すことがあった。例外的に良成績を示すのは胼よりの抽出物であり、何度くり返してもほぼ+の結果を得た。そこで胼のみについて、いろいろの抽出をくり返して bioassay を行なった。

〔ウシ・ブタの胼よりの抽出〕

Table 4. Comparative hormonal activity extracted from various mamalian tissues except brain.

Name of tissues	Origin of extraction	Material number	Statistical result*	
			<i>Samia</i>	<i>Bombyx</i>
Serum	porcine	20, 49, 51	—	—
	bovine	19, 50	—	—
Cardiac muscle	porcine	41	—	—
	bovine	42	— (seldom ±)	—
Muscle	porcine	14	—	
	bovine	16	—	
Yellow marrow	bovine	11, 40	±	
Red marrow	bovine	63	—	
Lung	porcine	12, 43	—	—
	bovine	18, 44	—	—
Kidney	bovine	23, 55	—	
Suprarenal glands	bovine	21, 56	—	—
Duodenum	bovine	61	—	
Liver	porcine	17, 45	— (seldom +)	sometimes ±
	bovine	13, 46, 57	—	sometimes ±
Spleen	porcine	47	— (seldom ±)	+ or ±
	bovine	15, 48, 58	—	— or ±
Pancreas	porcine	35, 37, 53	usually +	usually +
	bovine	22, 32, 34		
		36, 38, 39	usually +	usually +
		52, 59, 60		

\* Assayed by the brainless dipausing pupae of either *Samia* or *Bombyx*.

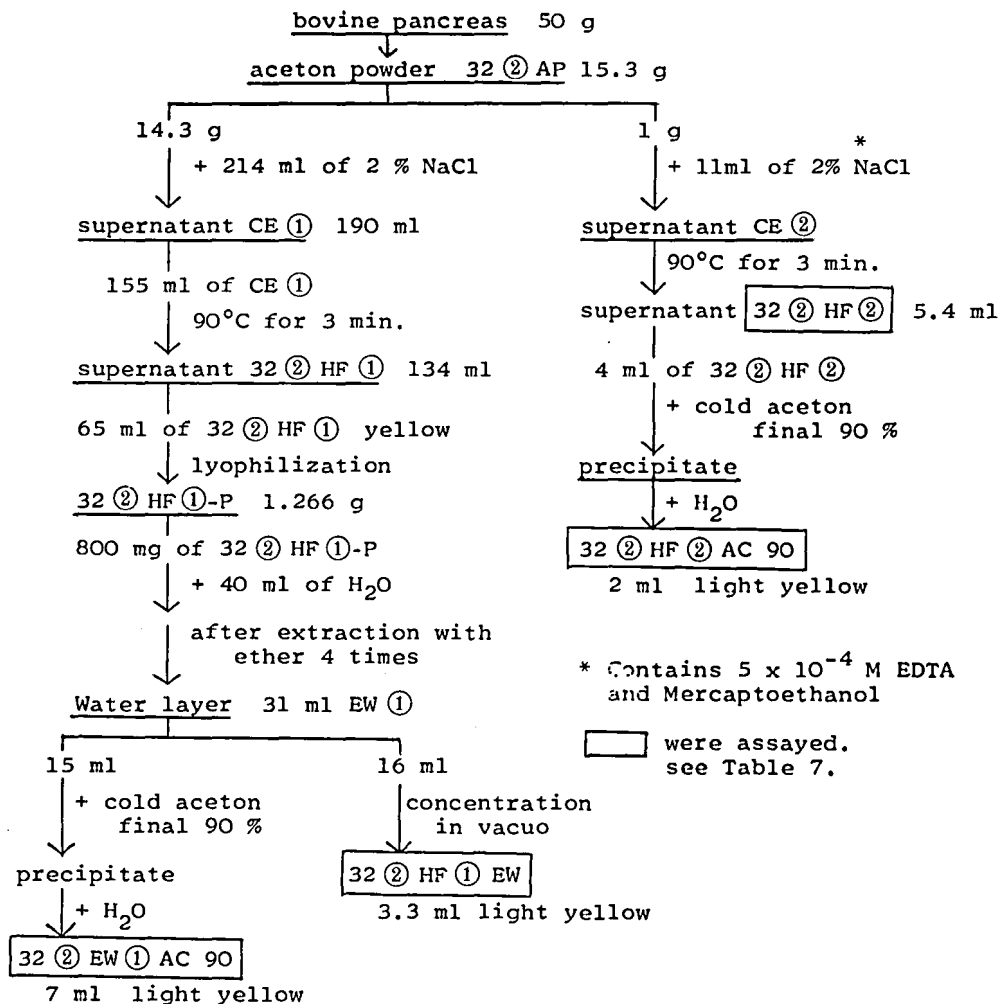
代表的な抽出例と、そのエリサン除脳蛹を用いての bioassay の結果をあげる (第5~7表)。カイコ蛾頭部よりの抽出を+の対照区とし、胫よりの抽出はカイコ蛾頭部と全く同じ方法で行なった。

第7表は第5, 6表で抽出された物質のうち□のものについての bioassay の結果が示されている。このうちとくに、32②HF①EW については、上列が当実験室で作った test animal で行なった bioassay の結果であり、下列の分は京都大学理学部動物学教室の石崎宏矩博士の特別提供の test animal でこれ

がもし注射により羽化すれば脳ホルモン作用があることは疑いないとの保証付のエリサン除脳蛹で行なった bioassay の結果を示してある。これが立合実験の代表例である。

I3のシリーズはカイコ蛾頭部よりの抽出物で、+の対照区となっている。I3 HF① AC90-P sup は 32③ HF① AC90-P sup に、I3 HF① AS75 は 32③ HF① AS75 に、また I3 HF② AC90-P sup は 32③ HF② AC90-P sup に各抽出法が対応する。29② HF② AC90 は上述したウシ・祝床下部よりの抽出物で

Table 5. An example of extraction from pancreas



ある (第3表参照)。

〔胼よりの抽出まとめ〕

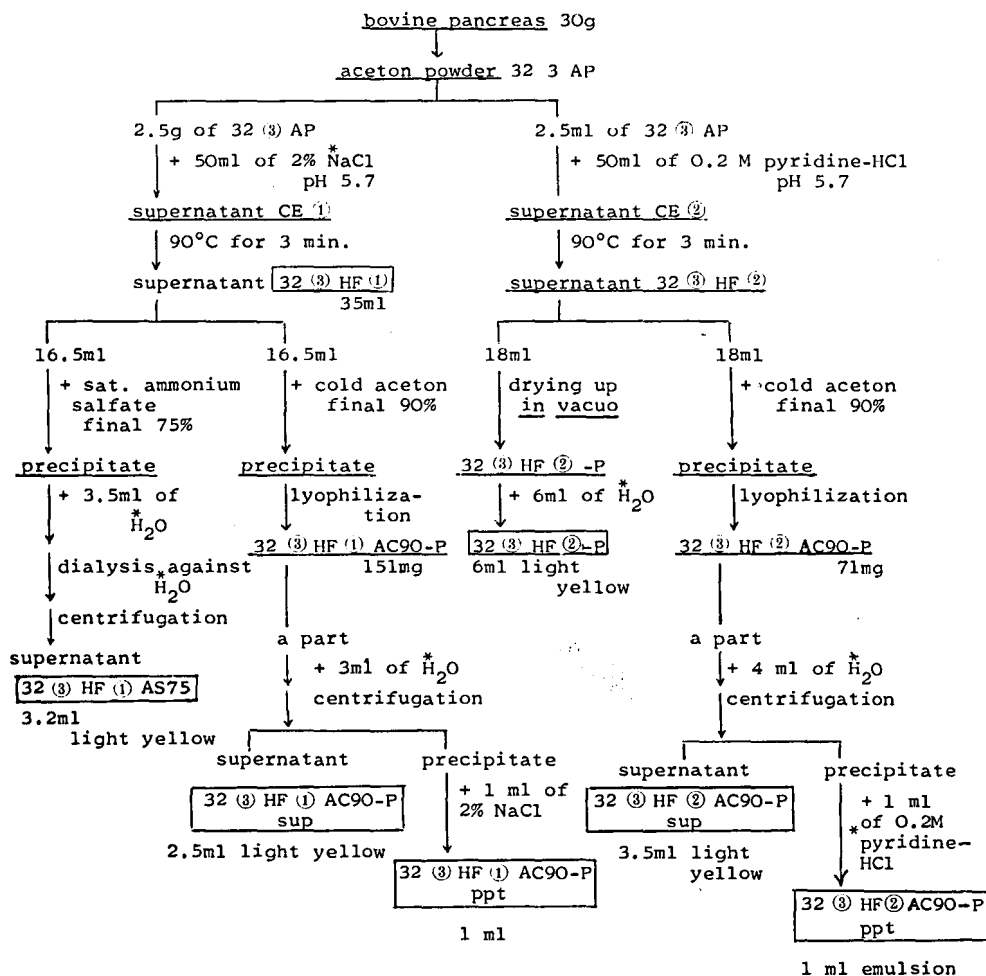
第5～7表にあげた代表例のほか数多くの抽出と bioassay をくり返して行なった結果、昆虫の脳ホルモンと類似作用をもつ物質について少なくとも次の諸点については再現性をもって結論づけることができる。

- ①ウシ・ブタの胼の直接またはアセトン粉末から塩でもって抽出できる。
- ②この物質はアセトンでは抽出されず、熱に安定である。
- ③アセトン30～75%、または硫酸75%で沈殿するが、後者の場合の方がホルモン作用効果が小さい。
- ④この物質は概して透析膜を通過しないらしいが長時間の透析により効果を減ずる。
- ⑤これらの抽出物は少なくともトリプシンによって

は失活しない。

- ⑥エーテル、クロロホルム・メタノール等で脱脂肪すると効果がます。
  - ⑦フェノール法によって核酸を除いても効果が残る。
  - ⑧カイコ蛾頭部よりの抽出物と比較して、注射により除脳休眠蛹の羽化に要する日数が、前者は約3週間であるが胼よりの抽出物では往々にして1～2週間長くなる場合がある。
  - ⑨脳の場合と同様、イオン交換樹脂をもちいての分画は、口下のところ再現性において劣っている。
- 〔脳、胼等で作られる既知のホルモン、酵素等の検定〕  
ウシ・ブタ等の脳や胼よりの抽出物が、注射によりエリサンやカイコの除脳休眠蛹を羽化させる作用をもつ物質を含んでいることが判明したので、脳や胼で作られる既知のホルモンや酵素について、また、アド

Table 6. Another example of extraction from pancreas.



□ were assayed. See Table 7.

\* Contains  $5 \times 10^{-4}$  EDTA and mercaptoethanol.

レナリン生合成に与する前駆物質 (tyrosine, *l*-dopa, dopamine), 無脊椎動物の neurohumor であり, かつ脊椎動物の間脳に多量に含まれる生体アミン (serotonin, dopamine) 等について bioassay を行なった (第8表). このうち視床下部起原の vasopressin, oxytocin, T. R. F. (thyrotropin releasing factor), また膵起原の insulin については bioassay は一であった. また膵由来の既知の酵素についても, まれに疑わしい結果の出る trypsin を除いては全く一であった. pancreatin が±の結果を示すのは, pancreatin そのものが膵の粗抽出物であるため, 問題の物質がわずかに含まれている可能性を示している.

ここで問題になるのは neurohumor の1種である

serotonin (5 HT) と dopamine であり, これらが時に bioassay で±の結果を示すことは, 昆虫の“羽化”という現象に一つの問題を投げかけているのかも知れない.

石崎(私信)によると, 脊椎動物のおもなる peptide 系のホルモンについてエリサンで試験したところ, 全部の結果を示したということである.

### 論 議

ホルモンの抽出, 精製には多くの段階があり, 各段階毎に数多くの bioassay を必要とすることは言をまたない. しかもこの bioassay は, 簡単に短期日に結果が判明し, かつ再現性に富む必要がある. Ecdyson や Juvenile hormone の検定に用いられた方法は,

Table 7. Extracts from bovine hypothalamus, pancreas and silkworm-head.  
An example of assay-result of brainless *Samia*-pupae.

** Mark of Sample	No. of Injections	No. of available cases	No. positive/No. negative			Protein mg/ml in sample	Judgment
			*3 × 10.08ml	×4 0.08ml	×16 0.08ml		
29② HF② AC90	15	8	0/0	2/1	0/5	6.9	+
*132② HF① EW	15	15	5/0	5/0	1/4	3.5	+++
*232② HF① EW	15	15	5/0	3/2	0/5	3.5	++
32② EW① AC90	15	6	0/0	1/0	4/1	6.0	+
32② HF②	15	15	5/0	5/0	1/4	6.0	+++
32② HF② AC90	15	11	1/1	3/1	1/4	—	+
32③ HF①	15	15	4/1	4/1	3/2	6.8	++
32③ HF① AC90·P sup	15	11	1/0	5/0	3/2	5.5	++
32③ HF① AC90·P ppt	15	8	0/0	0/5	2/1	1.8	±
32③ HF① AS75	15	15	5/0	4/1	4/1	5.1	++
32③ HF② ·P sup	15	15	2/3	5/0	4/1	6.7	++
32③ HF② AC90·P sup	15	15	3/2	4/1	3/2	3.5	+
32③ HF② AC90·P ppt	15	11	2/0	3/1	3/2	2.6	+
I3HF① AC90·P sup	15	12	2/0	5/0	3/2	15.0	++
I3HF② AC90·P sup	15	15	4/1	1/4	3/2	1.7	++
I3HF① AS75	15	15	5/0	1/4	2/3	3.1	+
0.2M Pyridine-HCl pH 5.7	15	15	0/5	0/5	0/5	0	—

\* 1, 2 32② HF① EW was assayed by two kinds of the brainless *Samia*-pupae one was prepared in my laboratory (upper line, \*1) and other was presented by Dr. Ishizaki (lower line, \*2). The sample was simultaneously injected into both kinds of assay-pupae.

\* 3 × means dilution.

\*\* No. 29—from bovine diencephalon  
No. 32—from bovine pancreas  
No. 13—from *Bombyx* adult-head } details of extraction, see Text.

よくこの条件を満足させていた。

しかるに、脳ホルモンの検定に現在用いられている方法、すなわち休眠蛹（除脳による、または自然、または飼育条件によって誘発された休眠蛹による）にホルモン液を注射して、host が羽化するかどうかで検定する方法には多くの難点がある。まず共通の欠点は、注射後判定までに少なくとも2～3週間必要な点である。

セクロピア蚕<sup>21)</sup>やサクサン（未発表データ）では、休眠蛹をそのまま何カ月にもわたって冷蔵し、冷蔵終了後直ちに除脳、注射をする方法を採用しているが、冷蔵期間に問題点が多く、かつ大型の昆虫であるために大量飼育上も不適當である。

小林等<sup>9,10,11,22)</sup>の用いているカイコ（日122号×支115号）は、大量飼育の点ですぐれているが、その他の点では難点が多い。まず、蛹化後10分以内に冷蔵麻醉し、除脳すると、♂は約60～70%が除脳後30～40日後でも未分化のまま残る。（♀は未分化の率が低く、かつ注射によって対照区でも羽化するものが非常に多いので使用不能である）。しかしながら、40日以後も絶えず羽化する個体が相当みられる。したがって、注射を除脳後30～40日で全部行なう必要があるが、注射によって何らかの液体—水や buffer のみでさえ—が注入されると羽化率は注射しないものに比して、高くなる場合が多い。

注射による羽化率は幼虫期の飼育条件によっても大



Table 8. Bioassay on the main and well-known Hormones, Enzymes etc.

Name of Samples	Result of Eri-silkworm	Remarks
vasopressin	—	pitressin tannate, Parke Davis
oxytocin	—	Atonin-O, Teikoku-Zoki
thyrotropin-releasing factor (TRF)	—	Synthetic, Shionogi
insulin	—	Novo
1-tyrosine	—	Kyowa-Hakko
1-dopa	—	N. B. C.
dopamine-HCl	sometimes ±	Sigma
serotonin (5HT)	sometimes ±	E. Merk
pancreatin	±	Fujisawa
trypsin	— (seldom ±)	E. Merk
chymotrypsinogen	—	Worthington Enzymes for Research
α-chymotrypsin	—	〃
carboxypeptidase	—	〃
thermolysin	—	Daiwa-Kasei
pronase	—	Kaken-Kagaku

きく左右される。また一般に、溶液中に Tris や Fe<sup>++</sup> が含まれている場合、ホルモン物質の有無にかかわらず羽化することが多い(未発表データ)。したがってカイコ除脳蛹は脳ホルモンの予備的検定にしか使用できなかった。

カイコに比して、石崎等<sup>8,9)</sup> や著者の用いているエリサン除脳蛹は信頼度において非常に高い。飼育は冬期は人工飼料で十分であり、蛹化後1日以内に除脳すればよく、かつ除脳後1~数カ月間はいつでも安心して bioassay に供しうる。

しかしながら、このエリサンでさえ、除脳後体のちぢむ個体は、放置しておくなら羽化しないが、注射をすれば、たとえ水や buffer のみでも変態のすすむ場合があって、除脳法や、試験個体の良否の見分けに、ある程度の熟練を必要とする。これは bioassay としての欠点の一つである。しかも注射後3週間の観察が必要な点は、カイコやセクロピア蚕でも同じとはいえ、脳ホルモン研究発展の上で一大障壁となっている。

著者は、カイコとエリサンの除脳蛹をそれぞれ1万例以上ずつ使用して、何回もの抽出と bioassay をくり返し、脊椎動物の脳、とくに視床下部を含む間脳部と膝に、除脳休眠蛹を羽化に導く作用物質が多量に含まれているという結論に達した。

これらの物質は、アセトンで抽出されず、塩で抽出され、熱に安定、アセトンまたは硫酸で沈殿し、一般

に透析膜を通過しない場合が多く、trypsin 消化によって失活しない。また、脂質類(脂質タンパクを含む)を除くと活性が高まる。この結果は、石崎・市川<sup>8)</sup>(著者の未発表データを含む)のカイコ脳より抽出された脳ホルモンと性質が一致している。しかしながら、一般に脊椎動物からの抽出物の場合には昆虫の脳よりのそれと比して羽化に要する日数が長く、高濃度を必要とする場合が多い。すなわち、有効数において劣っていると考えられる。

カイコの脳、ウシ・ブタの脳、ウシ・ブタの脾の全く異なる三つの材料からの抽出物が、同一の脳ホルモン作用物質を含んでいるかどうかは、どの物質も純化されていない現在、なんらの結論も出し得ない。共通点は、除脳休眠蛹に注射した場合、休眠を破って羽化させる作用をもつことである。

同じく、ウシ・ブタから得られた抽出物でも、脾からのそれと脳組織からのものとを比較すると、後者では粗抽出物ほど有効であり精製がすすむと失活(または無効化)する場合が多く、かつ毒性も強い。

小林・桐村等<sup>9,10)</sup>の昆虫脳ホルモン=コレステロール説にもかかわらず、組織化学的にみて無脊椎動物の神経分泌産物は脊椎動物と同様、タンパク様性質をもっていることは疑いのない事実と考えられる<sup>16)</sup>。石崎・市川<sup>8)</sup>の仕事は、よくこの線に沿っている。後には小林<sup>11,22)</sup>らもコレステロールの他に脳にはタンパク様

ホルモンが含まれていると報告している。ここに発表したデータは脊椎動物の脳、とくに視床下部に含まれるタンパク、または polypeptides 様の物質が昆虫の脳間部に含まれる前胸腺刺激ホルモンと同一、または類似的作用をもっていることを示唆している。しかしながら、胼の抽出物が脳のそれとなぜ同じ作用をもつのかは、説明できない。胼や脳でつくられる既知のホルモンと酵素が試験した限りでは全部無効であったことは、該物質が未知の物質である可能性を暗示するものと考えられる。

Serotonin は昆虫では脳間部の神経分泌細胞中の B-type neuron に含まれ、これが circadian rhythm を control しているといわれている (Hinks 1967)。Dopamine や serotonin のような “neurohumor” が注射によって除脳休眠蛹を羽化に導くことがあるのは興味深い。同じく “羽化” という現象の下には、脳ホルモン→前胸腺刺激→ecdysone→組織反応→羽化、という一般式で考えられる現象の他に種々の “by-pass” の反応や、ある過程での出発 (特に組織の反応の複雑な系での) も行なわれているのであろう。脊椎動物の脳や、とくに異質の胼抽出物が除脳休眠蛹を羽化に導く現象も、このような観点から考察しなおす必要があると思われる。

昆虫の脳の神経分泌細胞や側心体由来のホルモンには多くの効果が知られているが、これらの異なる効果が同一のホルモンのもつ多様性効果であるのか、または多くの異なるホルモンの存在によるのか、はわかっていない。脳ホルモンの作用機構の論議は昆虫由来の脳ホルモンが精製されてのちになされる問題と考えられる。

#### 謝 辞

この研究の遂行のためには多くの方々のご援助を賜った。特に京都大学理学部動物学教室の石崎宏矩博士にはエリサンの提供、bioassay の分担等の援助の他に有益な忠言をたびたび賜った。また、京都府立医科大学第一解剖学教室の佐野豊教授と大塚長康助教授 (現岡山大学医学部教授) にはウシ・ブタの脳の解剖の他に、その豊富なホルモン学の知識を惜しみなく賜った。ここに満腔の謝意を表したい。

蚕卵 (日 122 号×支 115 号) は常に東京蚕糸試験場の小林勝利博士とそのグループの方々のご厚意をかたじけなくし、その飼育には兵庫県蚕業試験場の兵藤嘉彦氏や、京都工芸繊維大学の大西盛夫氏等のお世話になった。心よりの感謝を述べたい。

最後に、終始変わらず抽出、飼育に御協力下さった納谷喜美子、大沢ユリ、西村将司氏等に深い謝辞を表す。

#### 摘 要

1. ウシ・ブタ・ラット等のホ乳類の脳、とくに視床下部を含む間脳、下垂体には多量の昆虫の脳ホルモン作用類似物質が含まれている。この物質はアセトンで抽出されず、塩で抽出でき、熱に安定、アセトンまたは硫酸で沈殿する。1例のウシの脳 (約 400 g) 中に、最低 15 万例のエリサン除脳蛹を羽化させる脳ホルモン作用類似物質が含まれている。
2. ウシ・ブタ等の胼 (まれに胼、肝等) にも強力な昆虫の脳ホルモン作用類似物質が含まれている。この物質はアセトンで抽出されず、塩で抽出でき、熱に安定、30~75%アセトンまたは75%硫酸で沈殿し、概して透析膜を通過しない。トリプシンによっては失活しない。除脂肪によってホルモン作用効果がます。また、フェノール法によって核酸類を除いても強い活性が残る。
3. 昆虫の脳より抽出された脳ホルモンと比較して、上記2者はエリサン除脳蛹に注射した場合、羽化に要する日数が長くなる傾向が往々みられる。一般に脊椎動物の脳からの抽出物の方が胼よりのそれと比して、精製に伴って失活しやすく、かつ毒性も強い。昆虫の脳、ウシ・ブタの脳、ウシ・ブタの胼の三つの異質の組織から抽出された物質が同じであるかどうかは全くわからないが、3者の共通点は、カイコやエリサン除脳蛹を注射によって羽化に導く点である。
4. 脊椎動物の胼や脳で産出する既知のホルモンや酵素は、一般に bioassay で一であるが、昆虫の neurohumor の1種では時に±の結果を示すことがある。

#### 引用文献

- 1) Barton, K. : *Biochem. J.* 62, 315 (1956).
- 2) Butenandt, A. and P. Karlson : *Z. Naturforsch.*, 96, 389 (1954).
- 3) Hinks, C. F. : *Nature* 214, 396 (1967).
- 4) Huber, R. and W. Hoppe : *Chem. Ber.*, 98, 2403 (1965).
- 5) Ichikawa, M. and H. Ishizaki : *Nature*, Lond., 191, 933 (1961).
- 6) Ichikawa, M. and H. Ishizaki : *Nature*, Lond., 198, 308 (1963).
- 7) Ichikawa, M. and J. Nishiitsutsuji : *Annot. Zool. Japon.*, 25, 143 (1952).
- 8) Ishizaki, H. and M. Ichikawa : *Biol. Bull.*, 133, 355 (1967).
- 9) Kirimura, J., M. Saito, and M. Kobayashi :

- Nature*, Lond., 195, 4842 (1962).
- 10) Kobayashi, M., J. Kirimura, and M. Saito : *Nature*, Lond., 195, 515 (1962).
  - 11) Kobayashi, M. and M. Yamazaki : *Appl. Ent. Zool.*, 1, 53 (1966).
  - 12) Lowry, O. H., N. J., Rosebrough, A. Farr, L., and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
  - 13) Mejsbaum, W.: *Z. physiol. Chem.*, 258, 117 (1939).
  - 14) Nakanishi, K., M., Koreeda, S., Sasaki, Ch-M. L. ang, and H. Y. Hsu : *Chem. Comm.*, 915 (1966).
  - 15) Röller, H., K. H., Dahm, C. C. Sweely, and B. M. Trost : *Angew. Chem* (Intern. Ed.) 6, 179 (1967).
  - 16) Scharrer, B. and M. Weitzman : *Aspects of Neuroendocrinology*. (Ed. W. Bargmann and B. Scharrer) p. 1~23, Springer-Verlag, Berlin (1970).
  - 17) Scott, T. A., and E. H. Jr. Melvin : *Anal. Chem.*, 25, 1656 (1953).
  - 18) 竹本常松, 小川俊太郎, 西本喜重 : *菜雑*, 87, 325 (1967).
  - 19) Wigglesworth, V. B. : *J. exp. Biol.*, 17, 201 (1940).
  - 20) Williams, C. M. : *Nature*, Lond., 178, 212 (1956).
  - 21) Williams, C. M. : *Insect and Physiology*. (Ed. J. W. L. Beament and J. E. Treherne) p. 133~139, Oliver & Boyd, Edinburgh and London (1967).
  - 22) Yamazaki, M., and M. Kobayashi : *J. Insect Physiol.*, 15, 1981 (1969).

### Summary

It is clearly established that the insect brain hormone (BH) is produced in the neurosecretory cells of the pars intercerebralis of the brain. But the chemical nature of the brain hormone is still uncertain. The author concentrated on the following point: that the neurosecretory system of the pars intercerebralis-cardiaca-allata in the insect is similar to that of the hypothalamo-hypophysis in vertebrates. Since the two other main hormones of insects, the ecdyson and the juvenile hormone, have been widely found in animals and plants, it was considered possible to

find brain hormone-analogues in the vertebrate hypothalamo-hypophyseal system.

Numerous extractions were performed on bovine and porcine tissues, not only the brain but also, other tissues, and the extracts were injected into debrained pupae of *Samia cynthia ricini*<sup>9)</sup> and *Bombyx mori*<sup>11)</sup> as the assay animals. Because confidence in the *Bombyx* is of a limited nature, it was used only to obtain information for the experiment (see Discussion). Brainless *Samia* pupae were always used when conclusions regarding the experiment were called for. After 20 thousand such injections the following results were obtained :

1. A substance (or substances) which induces the brainless diapausing pupae of lepidoptera to emerge is contained in large quantities in the mammalian, such porcine, bovine and rodent brain, especially in the diencephalon with the hypophysis. This substance(s) is not extracted with acetone but readily extracted with salt solution. It is heat-resistant, and precipitates with acetone or ammonium sulfate. The presumptive amount of this substance in one bovine brain is regarded as at least 150 thousand *Samia* unit.<sup>9)</sup>

2. A similar substance(s) having the same activity of the insect brain hormone is present in the bovine and porcine pancreas (rarely in the spleen, liver etc.). This is water-soluble, heat-stable and in general, non-dialyzable. The precipitate(s) of 30-75% acetone and of 75% saturated ammonium sulfate has a strong hormone-like activity and is resistant to trypsin. There is activity still remaining in the water layer after treatment with ether or phenol.

3. When substances derived from the mammalian brain and pancreas are injected into the assay animal, the host often needs a longer period for emergence than when the brain hormone extracted from the *Bombyx*-brain is used. In general, the substance from vertebrate-brain easily loses its activity and has more toxicity than the pancreas-substance. It is questionable whether or not the three kinds of extracts derived from such different tissues as insect brain, mammalian brain and mammalian pancreas are the identical substance. Identity activity is when each of these three substances is injected into

the brainless diapausing pupae, the moth emerges.  
4. Main and well-known hormones and enzymes produced in the brain and pancreas of ver-

tebrates give negative assay results. However, some neurohumors sometimes indicate a questionable ( $\pm$ ) result.

## 抄 録

ヒトリガ科の一種の性誘引物質—炭化水素—  
Hydrocarbon Sex Pheromone in Tiger Moths  
(Arctiidae) W. L. Roelofs and R. T. Cardé  
*Science* 171, 684 (1971).

ヒトリガ科の一種 *Homelina nigricans* のメス50頭の腹部末端を切り塩化メチレンで抽出した。粗抽出物を用いてケン化、アセチル化、臭素化を行なったが反応後も活性に変化はなかった。シリカゲルカラムクロマトグラフ法で分離精製し石油エーテル画分に活性があることから、化合物は nonpolar なものであると考えられた。マススペクトル分析は、分子イオン  $m/e=254$  を与え、これは  $C_{18}$  化合物にあたる。M-15, M-43 の 2-methyl alkane に特徴的な開裂の見られることから、2,5-dimethyl hexadecane か、2-methylheptadecane が考えられるが、ガスクロマトグラフ上の挙動から、このガの性誘引物質の化学構造は、2-methylheptadecane であると同定された。

*H. nigricans* は *H. aurantiaca* complex の中の9つの兄弟種の1つでそれらの少なくとも8種及び、余り近縁ではない種の *H. laeta*, *Pyrrharctia isabella* も 2-methylheptadecane に誘引され、それらのガの雌抽出物に、2-methylheptadecane が含まれることが、ガスクロマトグラフ法及びマススペクトルによって確認された。

このような近縁種で、しかも同一の性誘引物質を利用している場合には、それらの間の性的隔離に、住み場所のちがひ、地理的隔離、発生回数、交尾時間の日週期等の要素が働いているし、他の化合物が関与していることも考えられる。

2-methylpentadecane, 2-methylhexadecane, 2-methyloctadecane, 2-methylnonadecane, 4-methylheptadecane, *n*-octadecane は全く誘引性を示さ

なかった。2,15-dimethylhexadecane は *H. immaculata* の雄数匹を誘引したが、2-methylheptadecane の1/6程度の誘引性であった。(北村実彬)

Budworm Moth 類の性フェロモンの特異性と分類  
Sex Pheromone Specificity and Taxonomy of  
Budworm Moths (Choristoneura) C. J. SANDERS,  
*Science* 171, 911 (1971).

ハマキガ科 *Choristoneura* 属には北米における松柏科の重要な害虫が含まれる。その1つの *C. fumiferana* は、はじめ、ただ1つの種とされていたが、最近、それらの生理、生息分布、食性などの比較から、*C. fumiferana*, *C. pinus*, *C. occidentalis*, *C. biennis*, *C. orae*, *C. viridis* の6種に分類された。はじめの2種は北米東部、残りの4種は西部に分布する。しかし、これら6種の雄または雌の生殖器形態には差異がなく、実験室では試みれば交配もできよう。そこでこの6種の雄の性フェロモンに対する反応を実験室と野外で調べたところ、その結果の概要はつぎのとおりであった。*C. fumiferana*, *C. occidentalis*, *C. biennis* の3種の雌性フェロモンは同一か、または近似である。*C. orae* と *C. pinus* の性フェロモンは上記3種のものとは異なるが、たがいに同一か、近似である。*C. viridis* は形態的にも他の5種と差異があるし、その雄も他種の性フェロモンにあまり反応しない。強いて言えば、*C. pinus* の性フェロモンに僅かに誘引される。

東部と西部に生息する種の間で同一の性フェロモンがあることは並行進化の例と考えられる。また、生息分布が重なるものの中で同一の性フェロモンの存在する以上、その性的な隔離機構の検討が必要である。第二の物質がそれに関与しているとも考えられる。分布が重なっている地域での詳細な研究によって、さらに明かになるであろう。(桑原保正)