大日本蚕糸会

研　究　報　告

第 60 号　平成 24 年 12 月（2012）

目　　次

報　文

1. カイコの発育に及ぼす濃核病ウイルス２型の影響
蚕業技術研究所　野澤瑞佳……　1

2. 家蚕孵化幼虫の炭酸カルシウム摂食反応性に関する生理・遺伝学的研究
蚕業技術研究所　常山　泉……　11

3.「いろどり」繭層の蛍光色の雌雄差について
蚕糸科学研究所　栗岡　聡……　73

4. 静電容量センサーを用いた太繊度糸の繊度測定
蚕糸科学研究所　岡島正章……　77

5. 建染染料による深みのある黒染めの試み
蚕糸科学研究所　花之内智彦・塩崎英樹……　81

財団法人大日本蚕糸会
蚕糸科学研究所
蚕業技術研究所

Journal of
DAINIPPON SILK FOUNDATION

No. 60, December 2012

CONTENTS

Research Reports

1. NOZAWA, M.:
   Effect of parvo-like virus, DNV-2, on larval growth of the silkworm commercial races. 1

2. TSUNEYAMA, I.:
   Physiological and genetic studies on the feeding response to calcium carbonate in the newly hatched larvae of the silkworm, *Bombyx mori.* 11

3. KURIOKA, A.:
   Sex difference in the fluorescent color of the yellow green cocoon shell (Irodori) of *Bombyx mori.* 73

4. OKAJIMA, M.:
   The size measurement of thick silk yarn with capacitance sensor. 77

5. HANANOUCHI, T. and SHIOZAKI, H.:
   The trial of deep black dyeing on the vat dye. 81

Published by

THE DAINIPPON SILK FOUNDATION

カイコの発育に及ぼす濃核病ウイルス2型の影響

野澤瑞佳
蚕業技術研究所

MITSUYOSHI NOZAWA：Effect of parvo-like virus, DNV-2, on larval growth of the silkworm commercial races

緒　　言

カイコ濃核病ウイルス2型（DNV-2）は，エンベロープをもたない直径約24 nm の小型球形ウイルスで，2種類の単鎖 DNA と二分節のゲノム（VD 1および VD 2）をもつ[1)]。この2種ウイルスゲノムの末端は，パンハンドル構造をとり[2-4)]，VD 1には DNA ポリメラーゼ様配列が存在する[5)]。このように，カイコ濃核病ウイルス1型（DNV-1）とは異なる諸性状が明らかとなり，DNV-2は現在，デンソウイルス亜科から除外され，パルボ様ウイルスの一種に分類されている[6)]。

このウイルスは，カイコの中腸円筒細胞に特異的に感染し[7, 8)]，発病したカイコの幼虫は発育遅延のため繭を作らずに死亡する。このような症状を引き起こす DNV-2に対して，カイコの品種は感受性と抵抗性を示すものに明瞭に区別され[9-12)]，その発育に見られる特徴的な差異に基づいて抵抗性の遺伝様式が解析された。その結果，カイコの DNV-2抵抗性は，劣性の主働抵抗性遺伝子（*nsd-2*）に支配されており[13)]，その遺伝子は，カイコの第17連関群染色体上に座位することが判明した[14)]。その後のゲノム解析により*nsd-2*の本体は，アミノ酸トランスポーターをコードする塩基配列の欠損部位であると推定され，その部位がカイコの DNV-2抵抗性に関与すると考えられている[15, 16)]。一方，中垣ら[17)] は，DNV-2（中国株）に非感受性を示すカイコの品種「大草」を用いてウイルス DNA 量の変動を調べたところ，抵抗性カイコへのウイルス接種から約12時間後にウイルス DNA 量はピークに達し，その後カイコの眠期を経てウイルス DNA 量は大きく減少すると報告した。このように，カイコの DNV-2抵抗性に関する研究は，カイコの中腸円筒細胞膜上でウイルス感染が阻止されるために生じる抵抗性なのか，あるいはウイルス感染成立後に生じる感染細胞の排除による抵抗性なのか，一定の見解が得られておらず不明な点が多い。

このように DNV-2の諸性状やカイコの DNV-2抵抗性に関する研究は進展してきたが，このウイルスに抵抗性のある実用品種の開発は遅れていた。著者は，DNV-2抵抗性品種を開発するために，蚕業技術研究所の交雑品種を構成する原種から DNV-2に抵抗性のある系統を確立する研究を進めてきた。その研究過程で，DNV-2に強い感受性を示す品種から抵抗性のある品種まで，幼虫の発育程度に幅があることを観察した。これまで「感染」および「非感染」または「発病の有無」で分類されてきた，カイコの品種に及ぼす DNV-2の影響を定量化することで，カイコの品種にみられる DNV-2の感受性を詳細に序列化できると考えた。本研究ではその定量法に基づいて，蚕業技術研究所で育成された主要品種の DNV-2感受性を評価した。日本種7品種と中国種8品種の DNV-2感受性を調べた結果，品種の中に極めて強い感受性を示す品種が存在する一方で，抵抗性のある品種を3品種見出した。さらに本研究から，DNV-2に抵抗性を示す品種においても一時的なウイルス感染を示唆する現象を確認した。この知見とカイコの DNV-2抵抗性に関する既往の研究報告に基づいて，その抵抗性機構に関する一つの仮説を構築したので報告する。

本文に入るに先立ち，本稿の校閲を賜った蚕業技術研究所の井上　元博士に感謝の意を表する。

材料と方法

ウイルス液の調製

2003年に農業生物資源研究所の古田要二博士から分譲を受けた DNV-2（山梨株）を使用した。生物検定を始める前に，濃核病ウイルス1型（DNV-1）に抵抗性のある品種「中602号」[11] を用いて DNV-2を増殖した。まず，DNV-2 原液の10^{-2}希釈液を塗布した人工飼料（シルクメイト，原種壮蚕用，日本農産工業社製）を4齢初日のカイコに摂食させ，5齢で2型濃核病を発症した幼虫を採取して－20℃で凍結した。次に，解凍した幼虫の虫体重を秤量し，その重さの10倍量に相当する滅菌脱イオン水を加えてミキサーで磨砕後，得られた磨砕液を3,000 rpm で15分間遠心処理した。この処理で得た上清を滅菌ガーゼでろ過し，得られたろ液をさらに12,000 rpm で15分間遠心処理した。最後に，得られた上清をシリンジフィルター（0.45 μm）でろ過し，得られた DNV-2原液（10^{-1}濃度）を個別に分注後－20℃で凍結した。DNV-2原液の解凍は1回に限定し，試験に用いる度に新たな原液を解凍した。ウイルス原液の希釈には，滅菌脱イオン水を用いた。

カイコ

蚕業技術研究所で育成された主要品種のうち，日本種7品種と中国種8品種を用いた。これらの品種は，長年の育成により原種用の人工飼料で飼育が可能である。なお蚕業技術研究所の品種にはそれぞれ固有の品種記号が与えられているが，本研究ではこれらの記号の代わりに，日本種の品種は ISJ，中国種の品種は ISC と仮称して，これらの記号の後に番号を付け，品種を区別した。

生物検定と DNV-2の影響評価法

DNV-2の原液（10^{-1}）とその希釈液（10^{-5}）を用いて生物検定を行った。人工飼料（シルクメイト，原種1～3齢用，日本農産工業社製）10 g に各ウイルス液1 ml を混入し，滅菌ガラスシャーレ（直径9 cm）の底面にウイルス混入飼料を5 g 入れて滅菌した薬さじで4 cm 四方に広げた後に，その飼料上へカイコふ化幼虫20 mg を置いた。孵化幼虫にウイルス混入飼料を48時間摂食させたのち，飼料を摂食して発育した1齢幼虫を滅菌済みの竹串を用いて20頭採取し，清浄な人工飼料を入れたシャーレに移して飼育した。対照区のカイコには，同量の滅菌蒸留水を混入した人工飼料を与えた。飼育環境は25℃，16L-8D とした。給餌作業は，対照区のカイコの発育に合わせて，2齢初日，3齢初日および3齢3日目に，シャーレ内の全ての幼虫を新たな人工飼料を入れたシャーレに移し換えて行った。その際の給餌量は，原種用人工飼料を幅0.5 cm のサイズに輪切りにしたものを，2齢初日に1/2片，3齢初日と3日目に各1片ずつ与えるようにした。

カイコの幼虫発育に及ぼす DNV-2の影響を調べるために，対照区のカイコが3齢初日と4齢初日に達した時点で対照区とウイルス接種区の幼虫体重を個別に測定し，対照区の平均幼虫体重に基づいて，ウイルス接種区の平均幼虫体重を指数で表した。また，ウイルス接種区と対照区の間で幼虫体重の差を Steel の検定法（$\alpha=0.05$）で比較した。この統計処理によりカイコの幼虫体重に有意な差が認められ，さらに幼虫の発育程度を示す指数値が低いほど，カイコの発育に及ぼす DNV-2の影響は大きいと判断した。

Table 1. Effect of DNV-2 on larval growth of *B. mori* Japanese races observed on day 1 of third-instar control larvae

Race[a]	n[b]	DNV-2 dilution factors		Control
		10^{-1}	10^{-5}	
		LW[c] (n)[d]	LW (n)	LW (n)
ISJ-1	20	23.1 ± 1.14 * (20)	33.4 ± 1.72 * (20)	50.0 ± 2.09 (20)
ISJ-2	20	12.3 ± 0.46 * (20)	35.9 ± 2.22 * (20)	50.5 ± 1.77 (20)
ISJ-3	20	8.3 ± 1.05 * (18)	20.1 ± 4.95 * (20)	56.0 ± 1.86 (20)
ISJ-4	20	7.8 ± 0.61 * (12)	23.4 ± 2.69 * (20)	50.3 ± 2.44 (20)
ISJ-5	20	44.7 ± 1.19 * (20)	39.5 ± 1.68 * (20)	53.9 ± 2.04 (20)
ISJ-6	20	39.8 ± 2.69 * (20)	43.9 ± 2.65 (19)	50.3 ± 2.46 (20)
ISJ-7	20	22.5 ± 0.55 * (20)	23.9 ± 0.63 * (20)	59.5 ± 1.88 (20)

[a] ISJ shows the abbreviation of "Institute of Sericulture Japanese race".
[b] Number of larvae tested.
[c] Larval weight in mg (mean±SE); values with an astarisk differ significantly from that of control (Steel test, $p < 0.05$).
[d] Number of larvae survived.

Table 2. Effect of DNV-2 on larval growth of *B. mori* Japanese races observed on day 1 of fourth-instar control larvae

Race[a]	n[b]	DNV-2 dilution factors		Control
		10^{-1}	10^{-5}	
		LW[c] (n)[d]	LW (n)	LW (n)
ISJ-1	20	43.5 ± 4.65 * (20)	111.9 ± 8.44 * (20)	187.5 ± 6.41 (20)
ISJ-2	20	16.2 ± 2.58 * (20)	93.7 ± 5.57 * (19)	214.3 ± 7.71 (20)
ISJ-3	20	9.9 ± 0.50 * (14)	49.1 ± 5.44 * (20)	230.2 ± 10.4 (20)
ISJ-4	20	10.4 ± 1.30 * (11)	48.1 ± 5.22 * (20)	194.4 ± 7.88 (20)
ISJ-5	20	121.3 ± 2.23 * (20)	133.8 ± 4.89 * (19)	174.7 ± 5.38 (20)
ISJ-6	20	186.2 ± 3.92 * (18)	207.8 ± 7.79 (19)	203.4 ± 5.90 (20)
ISJ-7	20	57.0 ± 3.12 * (20)	60.9 ± 4.94 * (20)	200.5 ± 4.50 (20)

[a] ISJ shows the abbreviation of "Institute of Sericulture Japanese race".
[b] Number of larvae tested.
[c] Larval weight in mg (mean±SE); values with an astarisk differ significantly from that of control (Steel test, $p < 0.05$).
[d] Number of larvae survived.

結　　果

日本種の発育に及ぼす DNV-2の影響

日本種7品種の幼虫発育に及ぼす DNV-2の影響を調査した。対照区3齢初日に調べた結果を Table 1に，対照区4齢初日に調べた結果を Table 2に示した。DNV-2を10^{-1}濃度で接種した試験区では，全供試品種の幼虫体重は対照区の幼虫体重に比べて有意に減少した（Steel 検定，$p<0.05$）（Table 1，2）。一方，DNV-2を10^{-5}濃度で接種した試験区では，6品種について幼虫体重に有意な減少が認められたが（Steel 検定，$p<0.05$），ISJ-6の幼虫体重には対照区との間に有意な差が認められなかった（Table 1，2）。本調査で得られた幼虫体重の減少をカイコの品種間で比較するために，各品種の幼虫体重を指数化（ウイルス接種区の幼虫体重／対照区の幼虫体重×100）したところ，DNV-2を10^{-1}濃度で接種した試験区において，対照区3齢初日の時点で幼虫体重に影響が強く表れた品種の順序は，ISJ-3，ISJ-4，ISJ-2，ISJ-7，ISJ-1

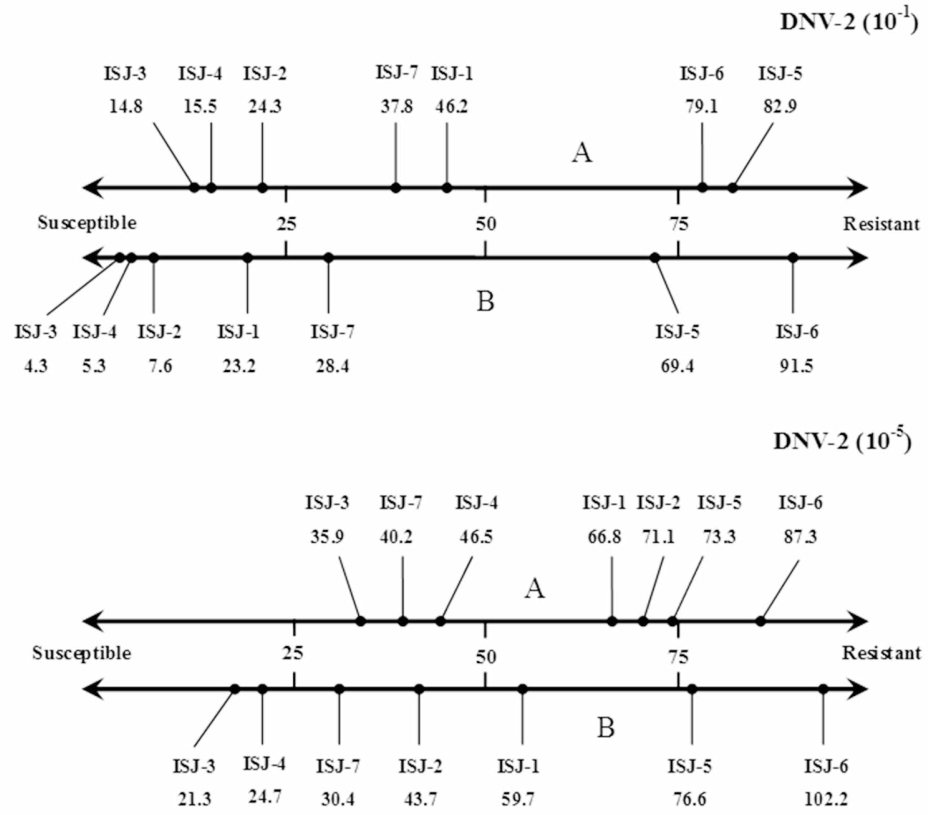


Fig. 1 Varietal differences in the growth index (GI) of *B. mori* Japanese races after oral inoculation of DNV-2 to the newly hatched larvae. Values under ISJ-1 to -7 are GIs calculated by a next formula, "larval weight (LW) of DNV-2 inoculated larvae/(LW of the control)×100". To calculate the GIs, the data of LWs from Table 1 and 2 were used in the above formula. A: GIs calculated at day 1 of third-instar control larvae. B: GIs calculated at day 1 of fourth-instar control larvae. Numerals in parentheses beside "DNV-2" mean dilution factors at the initial inoculation of the virus.

ISJ-6および ISJ-5の順となり，この順序は対照区4齢初日の調査では，ISJ-3，ISJ-4，ISJ-2，ISJ-1，ISJ-7，ISJ-5および ISJ-6の順となっていた（Fig. 1）。日本種7品種のうち ISJ-6は，対照区4齢初日に得られた指数値が対照区3齢初日に得られた値よりも高くなっており，ウイルス病に抵抗性を示す傾向が認められた。その他の品種は対照区4齢初日の調査で得られた指数値が3齢初日の値よりも低下しており，カイコの幼虫発育に及ぼす DNV-2の影響が明瞭に認められたが（Fig. 1），ISJ-5については指数値の低下が軽微であった（Fig. 1）。同様の評価をウイルス液10^{-5}濃度で行ったところ，対照区3齢初日の調査において，ウイルス接種の影響が幼虫体重に強く現れた品種の順序は，ISJ-3，ISJ-7，ISJ-4，ISJ-1，ISJ-2，ISJ-5および ISJ-6の順となり，この順序は対照区4齢初日の調査において ISJ-3，ISJ-4，ISJ-7，ISJ-2，ISJ-1，ISJ-5および ISJ-6の順となっていた（Fig. 1）。このウイルス濃度の試験において，ISJ-5および ISJ-6の指数値は，対照区4齢初日の値が対照区3齢初日の値よりも高くなっており，ウイルス病に抵抗性を示す傾向が認められた。一方，その他の品種の対照区4齢初日の指数値は，対照区3齢初日の値よりも低いため，ウイルス液10^{-5}濃度の接種においても10^{-1}濃度の接種時と同様に，カイコの幼虫発育に及ぼす DNV-2の影響が明瞭に表れた（Fig. 1）。

Table 3. Effect of DNV-2 on larval growth of *B. mori* Chiese races observed on day 1 of third-instar control larvae

Race[a]	n[b]	DNV-2 dilution factors		Control
		10^{-1}	10^{-5}	
		LW[c] (n)[d]	LW (n)	LW (n)
ISC-1	20	20.0 ± 0.87 * (20)	43.7 ± 2.53 (18)	51.7 ± 3.52 (20)
ISC-2	20	21.6 ± 1.30 * (18)	34.4 ± 2.67 * (18)	59.5 ± 2.43 (20)
ISC-3	20	12.6 ± 0.93 * (19)	27.3 ± 2.41 * (20)	43.4 ± 2.91 (20)
ISC-4	20	19.6 ± 0.92 * (19)	34.7 ± 1.57 * (20)	43.4 ± 1.84 (20)
ISC-5	20	16.5 ± 0.60 * (18)	39.4 ± 2.57 (20)	43.3 ± 2.25 (20)
ISC-6	20	16.6 ± 0.61 * (20)	29.5 ± 1.70 (18)	34.0 ± 2.39 (20)
ISC-7	20	15.5 ± 0.40 * (20)	54.7 ± 4.35 (18)	62.3 ± 3.37 (20)
ISC-8	20	40.6 ± 3.79 * (20)	33.6 ± 2.12 * (18)	64.8 ± 1.87 (20)

[a] ISC shows the abbreviation of "Institute of Sericulture Chinese race".
[b] Number of larvae tested.
[c] Larval weight in mg (mean±SE); values with an astarisk differ significantly from that of control (Steel test, $p < 0.05$).
[d] Number of larvae survived.

Table 4. Effect of DNV-2 on larval growth of *B. mori* Chinese races observed on day 1 of fourth-instar control larvae

Race[a]	n[b]	DNV-2 dilution factors		Control
		10^{-1}	10^{-5}	
		LW[c] (n)[d]	LW (n)	LW (n)
ISC-1	20	43.8 ± 2.29 * (20)	95.0 ± 5.52 * (18)	238.2 ± 24.57 (20)
ISC-2	20	52.0 ± 3.71 * (19)	82.9 ± 6.80 * (18)	225.5 ± 13.60 (20)
ISC-3	20	19.5 ± 1.73 * (19)	56.9 ± 6.58 * (20)	176.8 ± 15.51 (20)
ISC-4	20	39.4 ± 4.00 * (19)	119.2 ± 9.39 * (20)	191.9 ± 4.31 (20)
ISC-5	20	25.1 ± 2.49 * (18)	106.5 ± 6.59 * (20)	161.5 ± 6.08 (20)
ISC-6	20	29.8 ± 3.01 * (18)	60.1 ± 4.59 * (17)	152.8 ± 8.27 (20)
ISC-7	20	23.7 ± 2.60 * (19)	169.7 ± 20.42 * (18)	250.4 ± 24.32 (20)
ISC-8	20	121.6 ± 11.37 * (20)	143.6 ± 10.07 * (18)	182.4 ± 5.67 (20)

[a] ISC shows the abbreviation of "Institute of Sericulture Chinese race".
[b] Number of larvae tested.
[c] Larval weight in mg (mean±SE); values with an astarisk differ significantly from that of control (Steel test, $p < 0.05$).
[d] Number of larvae survived.

中国種の発育に及ぼす DNV-2の影響

中国種8品種の幼虫発育に及ぼす DNV-2の影響を調査した。対照区3齢初日に調べた結果を Table 3に，対照区4齢初日に調べた結果を Table 4に示した。DNV-2を10^{-1}濃度で接種した試験区では，全供試品種の幼虫体重は対照区に比べて有意に減少した（Steel 検定，$p<0.05$）（Table 3，4）。DNV-2を10^{-5}濃度で接種した試験区では，対照区3齢初日の調査で幼虫体重に有意な差が認められた品種は，ISC-2，ISC-3，ISC-4および ISC-8であり，その他の品種（ISC-1，ISC-5，ISC-6および ISC-7）では幼虫体重に有意な差が認められなかった。しかし，対照区4齢初日の調査では，全供試品種の幼虫体重に有意な差が認められ（Steel 検定，$p<0.05$）（Table 4），DNV-2の影響は遅れて現れた。また，日本種の場合と同様に，

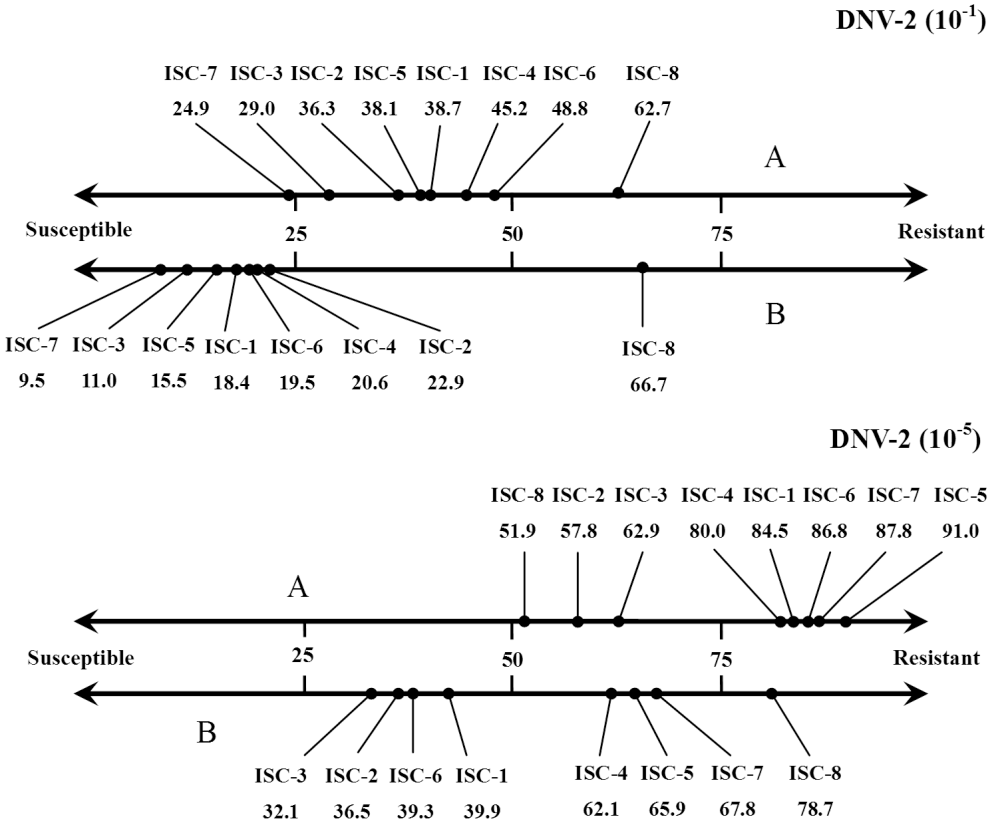


Fig. 2 Varietal differences in the growth index (GI) of *B. mori* Chinese races after oral inoculation of DNV-2 to the newly hatched larvae. Values under ISC-1 to -8 are GIs calculated using a previous formula shown in Fig. 1, based on the data from Table 3 and 4. The meanings of “A”, “B”, and numerals in parentheses beside “DNV-2” are also referred to Fig. 1.

幼虫体重に及ぼす DNV-2の影響を指数化し，ウイルス液10^{-1}濃度で接種した試験区において，対照区3齢初日の時点で幼虫体重に影響が強く表れた品種の順序を示すと，ISC-7，ISC-3，ISC-2，ISC-5，ISC-1，ISC-4，ISC-6および ISC-8の順となり，この順序は，対照区4齢初日の時点で，ISC-7，ISC-3，ISC-5，ISC-1，ISC-6，ISC-4，ISC-2および ISC-8の順となっていた（Fig. 2）。指数化によるこの比較の中で，対照区4齢初日における ISC-8の指数値（66.7）は，対照区3齢初日の値（62.7）よりもわずかに高い値を示したが，その他の7品種における対照区4齢初日の指数値は，いずれも対照区3齢初日の値よりも低下しており，中国種の発育に及ぼす DNV-2の影響が明瞭であった（Fig. 2）。同様の評価をウイルス液10^{-5}濃度でも行ったところ，対照区3齢初日の調査においてウイルス接種の影響が幼虫体重に強く現れた順序は，ISC-8，ISC-2，ISC-3，ISC-4，ISC-1，ISC-6，ISC-7および ISC-5の順であり，この順序は，対照区4齢初日の調査において，ISC-3，ISC-2，ISC-6，ISC-1，ISC-4，ISC-5，ISC-7および ISC-8の順となっていた。ウイルス液10^{-5}濃度の試験においても，ウイルス液10^{-1}濃度の試験結果と同様に，対照区4齢初日における ISC-8の指数値（78.7）は，対照区3齢初日の値（51.9）よりも高い値を示していたが，その他の7品種の対照区4齢初日の指数値は，いずれも対照区3齢初日の値よりも低下しており，これら品種の幼虫発育に及ぼす DNV-2の影響が明瞭であった（Fig. 2）。

考　　察

本研究では，蚕業技術研究所で育成されたカイコ実用品種（日本種7品種および中国種8品種）の発育に及ぼすDNV-2の影響を調査した。カイコの発育に及ぼすDNV-2の影響を定量的に調べるため，Kobayashi et al.[18]の手法を参考に，ウイルス接種から約8日目（3齢初日）と約12日目（4齢初日）にウイルス接種区と対照区の間で幼虫体重を測定した。得られた結果を統計処理し，幼虫体重に及ぼす DNV-2の影響を指数化して評価を行った。その結果，実用品種の多くが DNV-2に感受性を示したが（Table 1～4），日本種2品種（ISJ-5および ISJ-6）と中国種1品種（ISC-8）に幼虫体重の回復を伴う罹病抵抗性を示す現象が認められた（Fig.1，2）。また，本研究から DNV-2に対するカイコの感受性には品種間差異があり，ウイルスの影響が幼虫体重に強く現れる品種（例えばISJ-3等）も存在することが判明した。

カイコの交雑品種を構成する品種の多くが DNV-2に感受性を示すという本研究の結果は，過去に育成された交雑品種の多くがDNV-2に感受性であることを示した関[9, 10]および古田[11]の報告に裏付けを与える結果となった。カイコの DNV-2感受性は優性的に遺伝するため[13]，抵抗性品種と感受性品種の交配で得られる次世代の交雑品種は感受性を示すようになる。今回調べた実用品種の多くは DNV-2に感受性を示したが，幸い，本研究からDNV-2に抵抗性のある品種を3品種（ISJ-5，ISJ-6およびISC-8）見出すことができ，その後の研究で，これら3品種の交雑品種は DNV-2に抵抗性があり，化蛹することが判明している（野澤，未発表）。

本研究で認められた興味深い現象として，DNV-2に抵抗性のある ISJ-5，ISJ-6および ISC-8の幼虫体重が，DNV-2接種後に有意に減少したにも関わらず（Table 1～4），他の感受性品種とは異なって，幼虫のステージが進んでも体重が顕著に減少せず，3～4齢にかけて幼虫の体重が回復に向かうことである（Fig. 1，2）。この現象は，DNV-2抵抗性カイコでも一時的にウイルス感染が成立した可能性を示唆している。この可能性を支持する知見が，関[19]および中垣ら[17]の報告に見られる。すなわち，DNV-2山梨株の発見者である関[19]は，DNV-2抵抗性品種の「日124号」を冷蔵処理した後に DNV-2を接種したところ，中腸円筒細胞核の仁小体が肥大して，その後肥大が停止するという現象を観察した。また中垣ら[17]は，DNV-2（中国株）を用いて，抵抗性カイコの「大草」におけるウイルスDNA量の経時的変化を調べた結果，DNV-2接種から約12時間後にウイルス DNA 量がピークに到達し，その後カイコの眠期中にウイルス DNA 量が減少することを明らかにした。これらの報告から，本研究で確認された DNV-2抵抗性カイコ（ISJ-5，ISJ-6および ISC-8）におけるウイルス接種後の体重減少は，円筒細胞への一時的なウイルス感染による中腸円筒細胞の機能障害と，それに伴う栄養吸収の阻害に起因している可能性がある。

一方，Ito et al.[15]および伊藤・門野[16]は，カイコのゲノム情報を利用した研究から，抵抗性カイコにはタバコスズメガの一種で報告されたアミノ酸トランスポーターと相同性のある塩基配列上に大きな欠損領域があり，その配列の欠損により細胞膜上に分布するアミノ酸トランスポーターに構造的な奇形が生じ，DNV-2のレセプターサイトとして機能すると推察されるその部位が，カイコの DNV-2抵抗性に関与すると報告した。

この報告に基づいて，カイコの DNV-2抵抗性を中腸円筒細胞内にウイルスが侵入できないとする「非感染の抵抗性」と見なしてしまうと，本研究結果と関[19]および中垣ら[17]の知見と相反することになる。しかし，これらの知見を統合すると，カイコの DNV-2抵抗性機構に関する一つの仮説を見出すことができる。それは，DNV-2抵抗性カイコでは，DNV-2を構成する二つのウイルス粒子（VD1および VD2）の一方が，アミノ酸トランスポーターの障害により細胞内への侵入が阻止されるため，もう一方のウイルス粒子のみが細胞核に到達してDNA合成を開始する。その段階で核の仁小体はある程度まで肥大してウイルスDNA量は増加していくが，もう一方のウイルス粒子が不在のため，DNV-2のウイルス粒子が未形成の段階で，中腸被膜組織で生じる円筒細胞の更新によりウイルス感染細胞が排除される。そのため DNV-2抵抗性カイコでは，ウイルスの持続的な感染状態に陥ることなく治癒してしまうとする考え方である。この仮説について今後の検証が必要であろう。

摘　　要

蚕業技術研究所で育成された実用蚕品種のうち日本種7品種と中国種8品種を対象に，DNV-2に対する感受性調査を行った。ウイルス接種後の幼虫体重の変化を指標として，調査対象品種のウイルス感受性を調べた結果，12品種がDNV-2に感受性であり，3品種（ISJ-5，ISJ-6およびISC-8）が抵抗性を示した。これら抵抗性品種の幼虫体重は，DNV-2接種後に減少から回復に向かう傾向があり，抵抗性カイコにおいて一時的にウイルス感染が示唆される現象が認められた。この調査結果に基づいて，カイコの DNV-2抵抗性機構に関する新たな仮説を考察した。

Summary

Susceptibility to the parvo-like virus, DNV-2, was investigated in 15 commercial races of the silkworm maintained at Institute of Sericulture, Dainippon Silk Foundation, Japan. According to the growth index (GI) expressed by a next formula, “larval weight (LW) of DNV-2 inoculated larvae/(LW of the control) × 100”, the silkworm races of ISJ-5, ISJ-6 and ISC-8, were resistant to the DNV-2 and others were highly susceptible (Fig.1, 2). Based on the GI values of ISJ-5, ISJ-6 and ISC-8, initial infection of DNV-2 may be occurred in these resistant races. In previous reports by Nakagaki et al. (1999) and Seki (1987), they also suggested that initial infection of DNV-2 was occurred in the silkworm resistant races such as “Okusa” and “N 124”. Taking a new knowledge of Ito et al. (2008) into our results, a hypothetical system on the silkworm resistance to the DNV-2 may be explained as a new aspect.

引用文献

1) 小林迪弘・外城寿哉（1998）濃核病ウイルス．ウイルス，**48**，73-80.
2) Bando, H., Choi, H., Ito, Y., Nakagaki, M. and Kawase, S. (1992) Structural analysis on the single-stranded genomic DNAs of the virus newly isolated from silkworm: the DNA molecules share a common terminal sequence. Arch. Virol., **124**, 187-193.
3) Bando, H., Hayakawa, T., Asano, S., Sahara, K., Nakagaki, M. and Iizuka, T. (1995) Analysis of the genetic information of a DNA segment of a new virus from silkworm. Arch. Virol., **140**, 1147-1155.
4) Tijssen, P. and Bergoin, M. (1995) Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. Semin. Virol., **6**, 347-355.
5) Hayakawa, T., Kojima, K., Nonaka, K., Nakagaki, M., Sahara, K., Asano, S., Iizuka, T. and Bando, H. (2000) Analysis of proteins encoded in the bipartite genome of a new type of parvo-like virus isolated from silkworm — structural protein with DNA polymerase motif. Virus Res., **66**, 101-108.
6) Fauquet, C. M., Mayo, M. A. and Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. (2005) Virus taxonomy. VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses. pp. 1162, Academic Press, San Diego.
7) 関　宏夫・岩下嘉光（1983）山梨県の農家から分離した濃核病ウイルスの病理組織学的特徴と病原性．日蚕雑，**52**，400-405.
8) Watanabe, H. and Kurihara, Y. (1988) Comparative histopathology of two densonucleoses in

the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., **51**, 287-290.
9) 関　宏夫（1984）濃核病ウイルス（山梨株）の血清学的性状および感染性．日蚕雑，**53**，69-71.
10) 関　宏夫（1985）カイコ濃核病ウイルス（山梨株）に対する感染抵抗性の品種間差異．日蚕雑，**54**，445-448.
11) 古田要二（1994）核多角体病ウイルス及び濃核病ウイルスに対する指定蚕品種の感受性．蚕糸昆虫研究，**8**，29-36.
12) 古田要二（1985）濃核病ウイルス（古田株及び山梨株）に対する保存蚕品種の系統別感受性．蚕糸彙報，**125**，119-124.
13) 関　宏夫（1984）蚕の濃核病ウイルス（山梨株）に対する感染抵抗性の遺伝様式．日蚕雑，**53**，472-475.
14) Ogoyi, D. O., Kadono-Okuda, K., Eguchi, R., Furuta, Y., Hara, W., Nguu, E. K. and Nagayasu, K. (2003) Linkage and mapping analysis of a non-susceptibility gene to densovirus (*nsd-2*) in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol. Biol., **12**, 117-124.
15) Ito, K., Kidokoro, K., Sezutsu, H., Nohata, J., Yamamoto, K., Kobayashi, I., Uchino, K., Kalyebi, A., Eguchi, R., Hara, W., Tamura, T., Katsuma, S., Shimada, T., Mita, K. and Kadono-Okuda, K. (2008) Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx* parvo-like virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **105**, 7523-7527.
16) 伊藤克彦・門野敬子（2009）カイコ濃核病ウイルスの感染は宿主の抵抗性遺伝子によって決定される― 抵抗性遺伝子 *nsd-2*はアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子だった．比較内分泌学，**35**，30-38.
17) 中垣雅雄・守永知彦・周　垂欽・梶浦善太・武井隆三（1999）家蚕濃核病2型ウイルス（BmDNV-2）に感染したカイコの中腸被膜における2種類のウイルス DNA の量的変動．日蚕雑，**68**，173-180.
18) Kobayashi, M., Hashimoto, Y., Mori, H. and Nagamine, T. (1986) Changes in DNA, RNA, protein and glycogen in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), during the infection with a densonucleosis virus. Appl. Entomol. Zool., **21**, 486-489.
19) 関　宏夫（1987）カイコの濃核病ウイルス（山梨株）に関する病理学的研究，pp. 208，博士論文（乙第3137号），名古屋大学.

家蚕孵化幼虫の炭酸カルシウム摂食反応性に関する生理・遺伝学的研究

常山　泉
蚕業技術研究所

Physiological and genetic studies on the feeding response to calcium carbonate in the newly hatched larvae of the silkworm, *Bombyx mori*

Izumi TSUNEYAMA
Institute of Sericulture

目　次

緒　言 …… 12
第 1 章　摂食誘起物質の探索 …… 13
1.　糖の作用 …… 14
2.　糖以外の物質の作用 …… 16
3.　物質間の相互作用 …… 16
第 2 章　蟻蚕の摂食行動に及ぼす炭酸カルシウムの影響 …… 21
1.　炭酸カルシウムの摂食促進効果と引き留め効果 …… 22
2.　炭酸カルシウムと糖類の複合効果 …… 22
第 3 章　蟻蚕の摂食行動に及ぼすカルシウム塩の影響 …… 29
1.　カルシウム塩の効果とショ糖との複合効果 …… 29
2.　カルシウム塩の効果とその品種間差異 …… 32
第 4 章　広食性蚕の摂食誘起物質に対する摂食反応とその特異性 …… 34
1.　広食性蚕の摂食反応性 …… 35
2.　広食性蚕の摂食反応性の品種間差異 …… 38
第 5 章　集団育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝解析 …… 41
1.　炭酸カルシウムの摂食反応性の品種間差異 …… 42
2.　炭酸カルシウム摂食系統と不食系統の作出 …… 42
3.　集団育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝様式 …… 47
第 6 章　個体育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝解析 …… 50
1.　個体育における炭酸カルシウム摂食反応性とその遺伝様式 …… 53
2.　SLA 法による炭酸カルシウム摂食遺伝子 *cacp* の連関検索 …… 54
3.　BCMAP 法による *cacp* 遺伝子の座位決定 …… 57
総合考察 …… 61
総　　括 …… 63
引用文献 …… 65
Summary …… 70

緒　　言

過去半世紀にわたり，蚕の食性について多くの研究（鳥居・森井，1948；平尾,1969；村越,1974；浜野ら,1985，1986；平尾・荒井，1991；朝岡，1996）が行われてきたが，蚕の摂食の仕組みを化学的な要因によって立証した浜村ら（HAMAMURA,1959；HAMAMURA and NAITO,1961；HAMAMURA *et al.*,1962)の業績は,この分野の研究を大きく進展させた。

浜村らは，桑葉から，蚕の摂食行動に関与するいくつかの摂食誘起物質を分離，同定することに成功し，蚕の一連の摂食行動の発現が，誘引（Attractant)，噛付き（Biting)，呑込み（Swallowing）の３段階の独立した行動によって行われていることを明らかにした。誘引因子としてシトラール，噛付き因子としてβ－シトステロール及びモリン，呑込み因子としてセルロース，また，摂食を完全に行う補助因子としてショ糖などの物質が報告されている（HAMAMURA *et al.*,1962)。

一方,ITO（1960)，伊藤(1961)は，栄養学的な観点から各種の栄養素の添食試験を行い,糖やその他の物質に摂食促進効果を認めている。食性の研究は，その後も多くの研究者に引き継がれ，いくつかの摂食誘起物質が見つけられているが(平尾・石川，1964；内藤・林屋，1965；内藤 1968)，近年では,摂食誘起物質に関する新たな報告は見られない。また,これまでに報告された摂食誘起物質はいずれも植物界に広く見られる化合物であり，桑に由来する特殊な化合物は未だ発見されていない。そのため，蚕の摂食行動は，他の植物にも含まれるごくありふれた嗜好性物質（摂食誘起物質）によって促進され，蚕の寄主選択機構あるいは摂食機構を解明する上で重要な鍵となる「蚕はなぜ桑しか食べないのか？」という問題については，桑以外の植物に含まれる摂食阻害物質（deterrent）や忌避物質(repellent)の存在によるものと推測されている(福田，1962)。

1960 年代の初めに早くも提唱されていたこの浜村・福田説は，現在も広く受け入れられ，桑には蚕の摂食行動を促進する特殊な物質は存在しないものと考えられている。

蚕は，他の昆虫に先駆けて人工飼料による全令飼育が実用化され，この人工飼料の開発には，浜村の食性研究が大きく貢献してきたことは否めない事実である。また，人工飼料は,産業のみならず蚕の栄養要求に関する研究（伊藤，1983）の進展にも寄与してきた。

しかしながら，その後の食性の研究で，人工飼料に対する摂食反応性が蚕品種によって著しく異なる（伊藤ら，1966；長島，1968；高宮，1968；中村，1973；山本･清水，1982）ことが明らかにされ，一般に原種のそれは交雑種より劣り（福田，1987)，また，原種における地理的な特徴として，中国種の人工飼料摂食反応性が最も劣っていることが報告されている（清水･松野，1975)。さらには，人工飼料を嫌う品種（人工飼料摂食異常蚕）も存在する（山本，1983）ことが知られており，蚕の食性については，依然として不明な点が多く残されている。

一方，蚕の食性に関与する遺伝子については，上記の人工飼料摂食異常形質を支配する *nfad*（山本，1983)，フダンソウを食下する摂食異常形質を支配する *Np*（田島ら，1984)，家畜用の飼料を素材とするLP-1 人工飼料の摂食異常形質を支配する *pph*（神田ら，1988；神田,1992;飯塚，2006）及び桑を含まない準合成飼料（堀江・渡辺，1969；田島ら，1989）の摂食異常形質を支配する Ph^S と Ph^B（田島・大沼，1991，1992，1994a,b；大沼ら，2002)などのいくつかの突然変異が報告されているものの，いずれの食性形質の場合も摂食の可否の判定に用いられた食物には種々の物質（化合物）が含まれていたため，これらの形質を支配する遺伝子の詳しい生理機能については未だ明確な答えが得られていないのが現状である。

昆虫と植物は，植物の産する二次代謝産物（secondary compound）をめぐって共進化してきたと言われており，植食性昆虫の食性研究では，昆虫の寄主選択における摂食刺激因子として，植物に含まれる特殊な二次代謝産物が重要な役割を演じていることが明らかにされている(BAKER and NORRIS,1968；FRAENKEL,1969；CHAPMAN,2003)。したがって，蚕の摂食機構を遺伝学的な見地から解明するためには，桑

の二次代謝産物に由来する新たな摂食誘起物質を発見し，この物質に対する摂食反応性に関与する遺伝的な要因を明らかにすることが重要である。

本研究では,桑葉の巨細胞（idioblast）内に桑の二次代謝産物である炭酸カルシウムが蓄積されている(小林，1981；SUGIMURA *et al.*,1998;SUGIMURA *et al.*,1999;杉村,2007)ことに着目し，化学的に高純度の少数の物質を含む基本飼料に炭酸カルシウムのみを加えた飼料（以下，炭酸カルシウム飼料）を用いて，炭酸カルシウムが蟻蚕（蚕の孵化直後の幼虫）の摂食行動に及ぼす影響について検討した。その結果,炭酸カルシウムには，蟻蚕の摂食行動を誘起する作用があることを発見した。

また，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ系統（炭酸カルシウム摂食系統）と炭酸カルシウムに対して摂食反応性を持たない系統（炭酸カルシウム不食系統）を作出し，炭酸カルシウムに対する摂食反応性（以下，炭酸カルシウム摂食反応性）の遺伝様式を蟻蚕 50 頭供試して集団で調べたところ，この反応性を強力に支配する単一の不完全優性遺伝子（主働遺伝子）が,常染色体上に存在するものと判断される知見が得られた。

食性形質に対する遺伝解析を行う場合には，目的とする飼料を摂食した個体と摂食しない個体を分離する必要がある。一般に，この個体の分離には毛振るいが指標に用いられているが，糖やタンパク質などの主栄養源を含まない炭酸カルシウム飼料を摂食した蚕には毛振るいが見られない。このことから，新たに，炭酸カルシウム摂食系統と同不食系統の間で交雑種を作出し，それぞれの交雑種について個体別に摂食反応を調べてみた。

その結果，個体育（一頭育）では，蟻蚕 50 頭を供試した集団育の場合とは異なり，炭酸カルシウム摂食反応性が劣性的な形質とみなせることが判明した。さらに，この形質を支配する主働遺伝子を炭酸カルシウム摂食遺伝子（calcium carbonate preference ： 記号 *cacp*）と命名し，近年，原らが開発した EST 化した cDNA クローン RFLP （Restriction Fragment Length Polymorphism：制限酵素断片長多型）をマーカーに用いた完全連関による連関検索法（Scanning linkage analysis：SLA 法）と，3 点実験法を改良した同 RFLP マーカーによる座位決定法（Mapping for Back Cross：BCMAP 法）によって遺伝解析（原ら，2001；原ら,2002； Kadono-Okuda *et al.*,2002； Ogoi *et al.*，2003；Mase *et al.*，2007；原，2007）を行ったところ，*cacp* 遺伝子が分子遺伝子地図上（Nguu *et al.*，2005；原，2007）の第 9 連関群（cDNA クローンリンケージグループ 9：RFLG9)に所属することが明らかになった。また，その遺伝子座については RFLG9 において 0 の位置である cDNA クローン m162 から 21.4cM の距離にあることが推測される結果を得たので，以下にその概要を述べる。

本文に入るに先立ち，ご指導とご助言を頂いた東京農工大学名誉教授・黄色俊一博士，同大学大学院教授・蜷木 理博士，準教授・横山 岳博士，元農業生物資源研究所上級研究員・原和二郎博士，元京都工芸繊維大学大学院教授・杉村順夫博士，蚕業技術研究所副所長・田中幸夫氏，嘱託研究員・大沼昭夫博士，また，本稿の校閲を頂いた蚕業技術研究所所長・井上 元博士，インド繊維省中央蚕糸局・P.Jayarama Raju 氏ならびにご協力頂いた皆様に厚く御礼申し上げる。

第 1 章　摂食誘起物質の探索

緒言で述べたように，蚕の摂食誘起物質の探索は古くから行われており，これまでに多くの摂食物質が見出されてきた（WATANABE,1958；ITO,1960；HAMAMURA *et al.*,1962；内藤,1968)。

本研究（第 1 章）では,HAMAMURA *et al.*(1962),ITO(1960),伊藤(1961)によって既に摂食誘起作用を持つことが報告されている物質の他に，新たな摂食誘起物質を探索することを目的として炭酸カルシウムを加え,それぞれの物質について，蟻蚕の摂食行動に及ぼす影響を調査した。ここで,炭酸カルシウムに着目した理由は,桑葉の巨細胞内に含まれている炭酸カルシウム(SUGIMURA *et al.*，1998;SUGIMURA *et*

al., 1998)が,蚕の摂食行動に何らかの影響を及ぼしているものではないかと考えたためである。また,調査には,個々の物質の作用が明確に現われるように,セルロース, 寒天及び水から成る単純な組成の基本飼料を用いた。

中国種系原種「東」を用いた摂食試験の結果, 炭酸カルシウムに蟻蚕の摂食行動を誘起する作用が認められ, また, 同時にこの現象に伴ういくつかの知見を得たので, 以下に述べる。

材料及び方法

供試した蚕品種は,人工飼料に対する摂食反応性がやや劣る中国種系原種「東」(緑川ら,1992)である。調査には,越年処理または冷蔵浸酸処理した蚕種を使用し,同一母蛾から得た孵化直後の蟻蚕を各処理区に50頭ずつ当て,10蛾反復で試験を行った。

試験に用いた飼料は, 個々の物質の作用が明確に現われるように,セルロース10%あるいは15%(w/w), 寒天 3%(w/w)及び蒸留水に被験物質を加えた組成とし,ショ糖,果糖,ブドウ糖,ミオ・イノシトール,リン酸水素二カリウム,モリン,β-シトステロール,アスコルビン酸及び炭酸カルシウムを被験物質とした。

被験物質は全て試薬特級を使用し,セルロース粉末は飼料用 D(東洋濾紙)を,寒天は細菌培地用(和光純薬)をそれぞれ使用した。各成分をよく混合し,厚さが 3.5 mm程度となる容器に入れ,60 分間蒸煮した後,冷却し,直径24 mmの円盤状に打ち抜いて,内径60 mmのシャーレの中央に置いた。なお,β-シトステロールは水に不溶なので,セルロース粉末 1g に対し 20ml のジエチルエーテルに溶解して加え,よく混合した後,ドラフトチェンバー内で時々攪拌しながら,72時間乾燥させる方法で添加した。

試験は,蟻蚕を飼料の上に置き, 72 時間後の排出糞数 (以下, 糞数) 調べた。糞数と摂食量との間には高い正の相関(向山・伊藤, 1962) があるため, この糞数を摂食量の指標とした。また, 供試個体数に対する飼料上の個体数の割合を「引き留め率 (定着率)」として算出した。飼育条件は,温度25℃,湿度70%,全暗とし,作業はクリーンルーム内で行った。

調査結果について,糞数及び引き留め率の処理間差の検定は Wilcoxon の符号順位検定法 (以下, Wilcoxon-test) で,蛾区間差の検定については Kruskal-Wallis の検定法 (以下, Kruskal-Wallis-test) を用いて,危険率5%水準で行った(石居,1995 ; 石村,2000)。

結　　果

1. 糖の作用

セルロースを 15%含む基本飼料を用いて,ショ糖,果糖及びブドウ糖について,「東」の摂食行動に及ぼす影響について調査した(Table 1-1)。

糞数は,糖を加えた全ての区で対照区より有意に多く(Wilcoxon-test, $p<0.05$),いずれの糖にも蟻蚕の摂食行動を誘起する作用が認められた。ショ糖及びブドウ糖における糞数は 10%区が最も多く,次いで5%区の順に,果糖は5%区,次いで10%区の順に多くなったが,それぞれ両区間に有意差は認められなかった(Wilcoxon-test, $p>0.05$)。

一方,引き留め率を見ると,果糖あるいはブドウ糖を加えた場合,対照区との間に有意差は認められなかったが(Wilcoxon-test, $p>0.05$),ショ糖区では対照区より低くなる傾向があり,20%区の引き留め率が有意に低いことから(Wilcoxon-test, $p<0.05$),ショ糖は蟻蚕を遠ざける傾向を示すものと認められた。

なお,いずれの糖についても,糞数及び引き留め率に蛾区間で有意差が認められた (Kruskal-Wallis-test, $p<0.05$) 。

Table 1-1. Effect of sugars on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety "To"

Concentration [1] Substance %(w/w)	Water	No.of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d.[2]) (n=10) [4]	Significance among batches on no. of feces	Rate of larvae remained on diet food [3] % (Mean ± s.d.) (n=10)	Significance among batches on rate of larvae remained
Sucrose					
0	82	2.7 ± 3.3 [c 5)]		59.3 ± 17.1 [a 6)]	
0.5	81.5	15.8 ± 19.6 [b]		54.2 ± 23.6 [a]	
1	81	23.7 ± 15.9 [b]	S [7)]	52.4 ± 26.8 [a]	S [8)]
5	77	45.5 ± 17.8 [a]		52.9 ± 29.7 [a]	
10	72	48.7 ± 16.2 [a]		44.0 ± 25.0 [ab]	
20	62	21.1 ± 8.8 [b]		32.5 ± 21.1 [b]	
Fructose					
0	82	3.0 ± 3.2 [e]		53.3 ± 19.6 [a]	
0.5	81.5	14.8 ± 12.7 [d]		59.2 ± 22.2 [a]	
1	81	24.6 ± 10.2 [bc]	S	58.1 ± 29.3 [a]	S
5	77	42.7 ± 21.6 [a]		62.3 ± 23.3 [a]	
10	72	40.5 ± 28.3 [ab]		55.1 ± 24.6 [a]	
20	62	17.4 ± 15.2 [cd]		45.6 ± 18.9 [a]	
Glucose					
0	82	2.5 ± 3.3 [d]		51.8 ± 31.0 [a]	
0.5	81.5	8.2 ± 8.4 [c]		48.7 ± 18.8 [a]	
1	81	19.2 ± 13.1 [bc]	S	52.6 ± 21.3 [a]	S
5	77	44.7 ± 18.7 [a]		49.9 ± 13.4 [a]	
10	72	47.2 ± 19.0 [a]		50.0 ± 18.5 [a]	
20	62	17.7 ± 17.5 [bc]		49.8 ± 23.2 [a]	

[1] Basal diet contains 15% cellulose and 3% (w/w) agar.

[2] s.d.; Standard deviation

[3] No. of larvae remaining on each diet was counted after 72 h.

[4] Number of replicates

[5),6)] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxon signed-ranks test.

[7),8)] S in column is significant among batches at P=0.05 by Kurskal-Wallis test.

2. 糖以外の物質の作用

摂食主因子あるいは補助因子として報告されているミオ・イノシトール,リン酸水素二カリウム,モリン及びβ-シトステロール(HAMAMURA *et al.*,1962)，摂食誘起物質として報告されているアスコルビン酸(伊藤,1961)，さらに，炭酸カルシウムについて摂食行動に及ぼす影響を調査した(Table 1-2)。

摂食誘起作用は，アスコルビン酸を除くいずれの物質にも認められ，各物質の摂食に関する至適濃度は，ミオ・イノシトールで 0.5～2%の範囲に，リン酸水素二カリウムで 0.25～0.5%，モリンで 0.05～0.1%，β-シトステロールで0.05%付近，炭酸カルシウムについは5～10%の範囲であった。この場合，特に炭酸カルシウムの摂食誘起作用が強く，5%及び 10%区の 50 頭当たりの平均糞数は 100 個を超えた。

一方，アスコルビン酸は添加量に伴って糞数が減少し，0.1%以上の濃度区で対照区との間に有意差が認められることから(Wilcoxon-test，$p<0.05$)，アスコルビン酸を加えると蟻蚕の摂食は抑制されることを示しているが，この結果は伊藤(1961)の報告と相反した。

蟻蚕を飼料上に引き留める効果（定着効果）は，β-シトステロール，アスコルビン酸及び炭酸カルシウムに認められた。炭酸カルシウムは，全ての添加区で引き留め率が高く，対照区との間に有意差が認められ(Wilcoxon-test,$p<0.05$)，0.5～12.5%区では濃度に関わらずほぼ一定値となった。

なお，ミオ・イノシトールは糞数に，β-シトステロールは引き留め率に，リン酸水素二カリウム，モリン及び炭酸カルシウムは糞数と引き留め率に，蛾区間でそれぞれ有意差が認められた(Kruskal-Wallis-test，$p<0.05$)。

3. 物質間の相互作用

セルロースを 10%含む基本飼料を用いて，炭酸カルシウムと，ミオ・イノシトール及びショ糖，または，モリン及びリン酸水素二カリウムとを組み合わせ，蟻蚕の摂食行動に及ぼす物質間の相互作用を調査した(Table 1-3)。各物質の添加量は，実験 1 及び 2 で明らかになった摂食に関する至適濃度に従った。

炭酸カルシウム，ミオ・イノシトール及びショ糖をそれぞれ組み合わせた場合の糞数を見ると，ミオ・イノシトールとショ糖の組み合わせには相乗的な効果が認められず，糞数はそれぞれの物質を単独で添加した場合の糞数の総和にほぼ等しくなった。

一方，炭酸カルシウムとミオ・イノシトールあるいは炭酸カルシウムとショ糖を組み合わせると，蟻蚕の摂食反応性を高める相乗的な効果が現われ，50 頭当たりの平均糞数はそれぞれ 648.8 個と 679.0 個となり，これは炭酸カルシウム単独区の約 6.3 倍と約 6.6 倍，ミオ・イノシトール単独区の約 18.8 倍及びショ糖単独区の約 15.9 倍に相当していた。しかし，炭酸カルシウム，ミオ・イノシトール，ショ糖を全て添加しても，より強い摂食誘起作用は認められなかった。

引き留め率については，炭酸カルシウム区が最も高く，対照区との間に有意差が認められたが(Wilcoxon-test,$p<0.05$)，ミオ・イノシトールあるいはショ糖と組み合わせた場合に，炭酸カルシウムの引き留め効果が弱められる傾向が見られた。Fig.1-1 は，試験開始から 72 時間後の摂食状況を示したものであるが，これによると，炭酸カルシウムとショ糖を組み合わせた区(D)の糞数が特に多く,ショ糖区(C)では，飼料上の蟻蚕が対照区(A)や炭酸カルシウム区(B)より少ないことが明らかである。

Table 1-2. Effect of nonsugar substances on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety "To"

Concentration [1] Substance % (w/w)	Water	No. of feces per 50 larvae after 72 h (Mean ± s.d.[2]) (n=10) [4]	Significance among batches on no. of feces	Rate of larvae remained on diet food [3] % (Mean ± s.d.) (n=10)	Significance among batches on rate of larvae remained
Myo-inositol					
0	82	3.6 ± 2.7 [c 5)]		58.3 ± 17.4 [a 6)]	
0.1	81.9	18.9 ± 19.0 [b]		66.6 ± 17.6 [a]	
0.5	81.5	36.4 ± 32.4 [ab]	S [7)]	64.9 ± 20.8 [a]	NS [8)]
1	81	37.3 ± 20.2 [a]		65.5 ± 20.2 [a]	
2	80	38.4 ± 26.1 [a]		68.3 ± 10.6 [a]	
4	78	30.8 ± 24.2 [ab]		62.1 ± 26.0 [a]	
K_2HPO_4					
0	82	1.5 ± 1.6 [c]		52.9 ± 31.8 [a]	
0.1	81.9	6.6 ± 5.1 [ab]		56.4 ± 35.8 [a]	
0.25	81.75	10.8 ± 3.6 [a]	S	54.7 ± 34.2 [a]	S
0.5	81.5	11.1 ± 6.6 [a]		55.6 ± 31.8 [a]	
1	81	7.9 ± 5.6 [ab]		53.5 ± 28.1 [a]	
2	80	4.5 ± 2.9 [b]		53.0 ± 27.7 [a]	
Morin					
0	82	2.1 ± 2.4 [c]		56.9 ± 16.3 [a]	
0.01	81.99	6.2 ± 4.5 [ab]		59.9 ± 20.3 [a]	
0.05	81.95	6.6 ± 3.7 [a]	S	62.7 ± 11.1 [a]	S
0.1	81.9	7.2 ± 4.9 [a]		64.7 ± 10.5 [a]	
0.25	81.75	3.9 ± 3.3 [abc]		62.9 ± 16.5 [a]	
0.5	81.5	2.9 ± 2.8 [bc]		58.6 ± 19.4 [a]	
β-sitosterol※					
0	82	0.9 ± 1.2 [d]		55.1 ± 18.0 [b]	
0.01	81.99	8.0 ± 4.8 [ab]		84.0 ± 9.1 [a]	
0.05	81.95	13.8 ± 6.8 [a]	NS	87.0 ± 9.6 [a]	S
0.1	81.9	6.4 ± 3.3 [b]		73.2 ± 22.1 [ab]	
0.25	81.75	6.0 ± 4.7 [b]		73.6 ± 22.1 [ab]	
0.5	81.5	3.2 ± 2.8 [c]		64.9 ± 26.3 [ab]	
Ascorbic acid					
0	82	3.5 ± 5.0 [a]		52.9 ± 33.2 [b]	
0.05	81.95	2.2 ± 2.2 [a]		78.4 ± 25.5 [ab]	
0.1	81.9	0.6 ± 0.7 [b]	NS	86.7 ± 19.0 [a]	NS
0.15	81.85	0.4 ± 0.7 [b]		80.3 ± 17.2 [ab]	
0.2	81.8	0.1 ± 0.3 [b]		81.6 ± 11.8 [ab]	
0.25	81.75	0.1 ± 0.3 [b]		76.3 ± 22.8 [ab]	
$CaCO_3$					
0	82	0.4 ± 0.5 [d]		53.6 ± 23.9 [b]	
0.05	81.95	14.3 ± 12.1 [c]		76.8 ± 15.8 [ab]	
0.5	81.5	45.5 ± 43.7 [b]	S	86.1 ± 11.4 [a]	S
5	77	110.6 ± 62.5 [a]		85.6 ± 10.2 [a]	
10	72	115.3 ± 57.3 [a]		85.9 ± 10.3 [a]	
12.5	69.5	48.0 ± 32.2 [b]		85.1 ± 10.2 [a]	

[1)] Basal diet contains 15% cellulose and 3% (w/w) agar.
[2)] s.d.; Standard deviation
[3)] No. of larvae remaining on each diet was counted after 72 h.
[4)] Number of replicates
[5),6)] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxon signed-ranks test.
[7),8)] S in column is significant , whereas NS is not significant among batches at P=0.05 by Kurskal-Wallis test.
※ β-sitosterol was dissolved in ethyl ether and mixed with cellulose uniformly. Then the mixture was dried in draft-chamber for 72 h to remove ethyl ether.

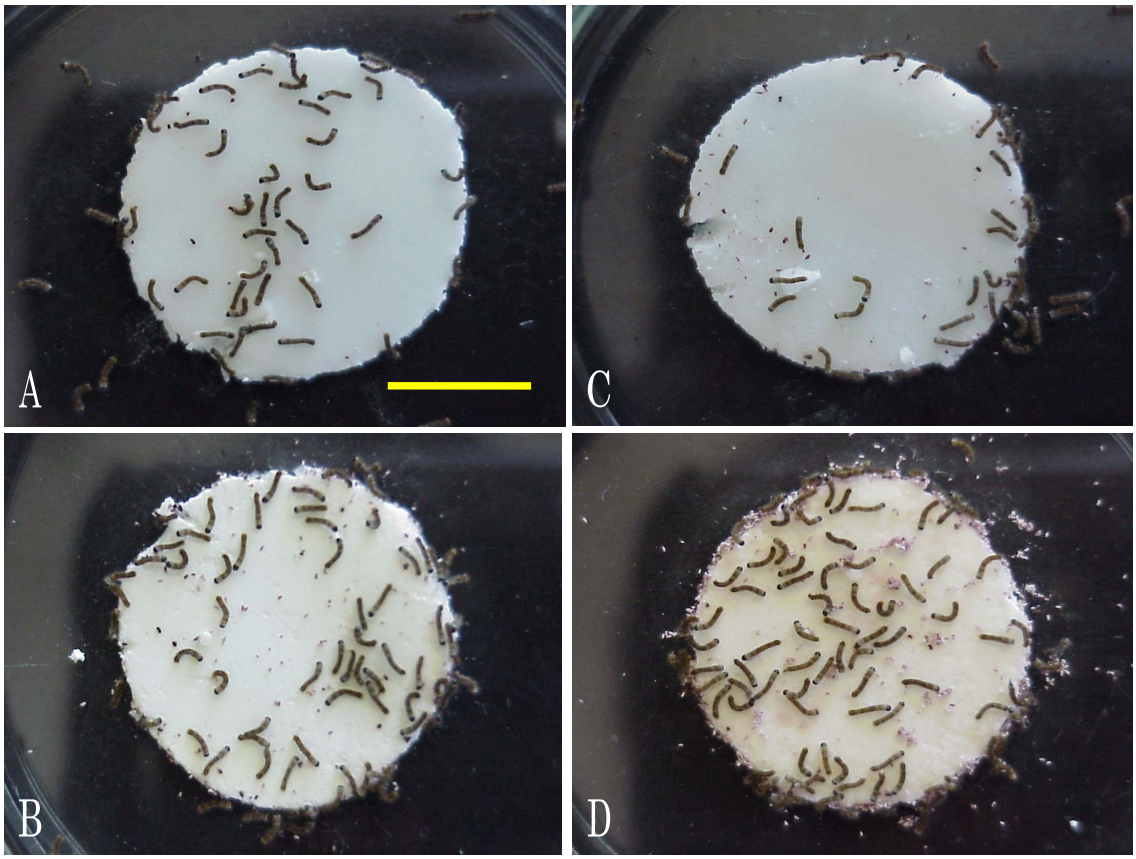


Fig. 1-1. Effect of $CaCO_3$ and sucrose on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety "To". One hundred larvae were tested on each diet. The photographs were taken at 72 h after feeding. The yellow bar in the photograph (A) shows 1 cm. A, Control; B, 10% $CaCO_3$; C, 10% sucrose; D, 10% $CaCO_3$ + 10% sucrose.

一方，炭酸カルシウム，モリン及びリン酸水素二カリウムをそれぞれ組み合わせた場合の糞数(Table 1-3)を見ると，炭酸カルシウムにモリンあるいはリン酸水素二カリウムを組み合わせると蟻蚕の摂食抑制が認められる。この場合，特に，リン酸水素二カリウムを添加すると糞数の減少は大きかった。しかし，炭酸カルシウム，モリン，リン酸水素二カリウムを全て添加した場合の糞数は，炭酸カルシウムとリン酸水素二カリウムの組み合わせ区と同じ程度であった。

また，引き留め率は，炭酸カルシウム区及び炭酸カルシウムとモリンの組み合わせ区が高く，対照区との間に有意差が認められたが(Wilcoxon-test, $p<0.05$)，いずれもリン酸水素二カリウムの添加によって，引き留め率が低くなる傾向が見られた。

Table 1-3. The interaction between substances on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety "To"

Concentration[1)] Substance % (w/w)				No.of feces per 50 larvae after 72 h (Mean ± s.d.[2)]) (n=10)[4)]	Rate of larvae remained on diet food[3)] % (Mean ± s.d.) (n=10)
$CaCO_3$	Myo-inositol	Sucrose	Water		
0	0	0	87	0.6 ± 0.8 [d 5)]	52.9 ± 30.2 [bc 6)]
0	2	0	85	34.4 ± 21.0 [c]	65.6 ± 28.0 [abc]
0	0	10	77	42.6 ± 18.2 [c]	44.2 ± 26.2 [c]
0	2	10	75	86.9 ± 37.5 [bc]	63.9 ± 21.5 [abc]
10	0	0	77	102.4 ± 48.7 [b]	87.7 ± 10.8 [a]
10	2	0	75	648.0 ± 70.5 [a]	76.5 ± 14.3 [ab]
10	0	10	67	679.0 ± 152.8 [a]	72.3 ± 22.6 [abc]
10	2	10	65	659.3 ± 66.5 [a]	67.3 ± 17.7 [abc]
$CaCO_3$	Morin	K_2HPO_4	Water		
0	0	0	87	0.2 ± 0.5 [e]	58.8 ± 14.3 [b]
0	0.1	0	86.9	5.2 ± 3.1 [d]	66.7 ± 14.1 [ab]
0	0	0.5	86.5	7.8 ± 5.9 [cd]	57.2 ± 24.0 [b]
0	0.1	0.5	86.4	5.5 ± 8.3 [d]	65.9 ± 17.0 [ab]
10	0	0	77	114.4 ± 64.4 [a]	86.0 ± 12.9 [a]
10	0.1	0	76.9	66.6 ± 72.1 [b]	85.1 ± 8.2 [a]
10	0	0.5	76.5	25.8 ± 31.6 [c]	68.8 ± 20.0 [ab]
10	0.1	0.5	76.4	25.7 ± 22.3 [c]	71.4 ± 13.6 [ab]

[1)] Basal diet contains 15% cellulose and 3% (w/w) agar.
[2)] s.d.; Standard deviation
[3)] No. of larvae remaining on each diet was counted after 72 h.
[4)] Number of replicates
[5),6)] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxon signed-ranks test.

考　　察

「東」を用いた今回の試験結果から,既に摂食誘起作用を持つことが確認されている物質については，アスコルビン酸を除くいずれの物質にも摂食促進効果があることが確かめられた。また，炭酸カルシウムには,摂食誘起作用（摂食促進効果）と蟻蚕を飼料上に引き留める効果（定着効果）が認められた。

糖の試験（Table 1-1）において，ITO(1960)が摂食誘起作用の弱い糖と報告しているブドウ糖を添加した区の糞数(絶対量)は，ショ糖区とほぼ等しくなった（10%区比較)。

著者は，Table 1-1 に示した結果から明らかとなった各糖の摂食に関する至適濃度（5 及び 10%）を用いて，3 種の糖について摂食誘起作用の強さを比較したところ，ブドウ糖の作用はショ糖のそれと同程度に強く，果糖の作用は両糖よりもやや弱いことを確認している(未発表)。この結果は，ITO(1960)の報告と一致しなかったが，供試品種の各糖に対する反応性の違いによるものと考える。

一方，HAMAMURA *et al.*(1962)は，無機塩の摂食誘起物質として，リン酸第二カリウムが呑込み因子(swallowing factor)の重要な物質の一つであることを報告しているが，Table1-3 に示した結果を見ると，リン酸第二カリウム区の糞数は炭酸カルシウムの 1/10 以下であり，リン酸第二カリウムの摂食誘起作用は弱いことを示している。また，摂食を完全に行うための必須物質(HAMAMURA *et al.*,1962)であるミオ・イノシトールとショ糖も，炭酸カルシウムのより強い摂食誘起作用には及ばなかった。

今回の試験では，多くの蟻蚕が炭酸カルシウムを添加した飼料を摂食し，全ての摂食要因(HAMAMURA *et al.*,1962)が揃わなくても，摂食が強く誘起される個体が現われた。また，糞数の標準偏差の値（Table 1-2）が示すように,蛾区間でも摂食量が大きく異なっていた。さらに，炭酸カルシウムは，ミオ・イノシトールあるいはショ糖と組み合わせた場合に相乗的な効果が現われ，蟻蚕の摂食行動を著しく促進した。摂食量は炭酸カルシウム区の 6 倍以上，ミオ・イノシトール区の約 18.8 倍及びショ糖区の約 15.9 倍となったことから，炭酸カルシウムはミオ・イノシトールとショ糖に対して互いに役割が異なる摂食刺激物質であると考えられた。

アスコルビン酸に摂食を抑制する作用が認められ，伊藤(1961)の報告と異なる結果となった。伊藤は，蚕の摂食行動が主に臭覚刺激と味覚刺激によって支配されていることを指摘し，アスコルビン酸の著しい摂食誘起作用は，臭覚刺激よりも，むしろ味覚刺激による効果が主であると報告しているが，Table 1-2 に示した結果はアスコルビン酸の臭いの効果(引き留め効果)のみが認められている。伊藤の試験では，アスコルビン酸を添加した基本飼料にいくつかの天然物が含まれていることから，アスコルビン酸本来の味覚よりも，アスコルビン酸が飼料の味覚の改善に寄与し，結果として蚕の摂食行動を著しく促進した可能性も考えられ，本試験のように単純な組成の飼料を用いた場合には，アスコルビン酸に対する反応が，異なることは十分に考えられることである。

一方，引き留め率（定着率）の調査から，摂食誘起作用を有するショ糖には蟻蚕を遠ざける傾向が認められることと（Table 1-1)，炭酸カルシウム区(0.5～12.5%)では摂食量(糞数)の変動に関わらず，引き留め率がほぼ一定値を示すという結果が得られた（Table 1-2)。これらのことから，蟻蚕を飼料上に引き留める効果と摂食誘起作用の間には，直接的な関係がないものと考えられる。つまり，蚕は炭酸カルシウムとショ糖に対して，それぞれの物質から少なくとも 2 つの刺激を感じ取り，それぞれの刺激に対して独立した行動を起こすものと推測される。

炭酸カルシウムは，桑科，カナビキボク科，ニレ属，フウ属，ミズキ属などに属する植物の葉の表皮細胞内に存在し(八杉ら,1996；小林,1981；SUGIMURA *et al.*,1999;杉村,2007)，これらの植物の中には，一時的ではあるが，蚕が摂食可能な植物(伊藤,1959；石川・平尾,1966；堀内・清水，1961；新倉,1967)が数種含まれている。また，カルシウムは，酸化物の形で桑葉灰分の 15～20%を占めていることが知られている(伊藤,1983)。これらは，炭酸カルシウムが蚕の摂食行動に関与する重要な物質であることを裏

づけるものと考えられるが，今回，得られたいくつかの知見について，他の品種でさらに検討を進めることが必要である。

摘　　要

セルロース粉末，寒天及び水に各種の物質を加えた飼料を，中国種系原種「東」の蟻蚕に与え，72 時間後の排出糞数と飼料上に留まっている蟻蚕の割合を調査した。

その結果，ショ糖，果糖，ブドウ糖，ミオ･イノシトール，リン酸水素二カリウム，モリン，β-シトステロール及び炭酸カルシウムに摂食誘起作用が認められ，これらの中では，炭酸カルシウムが最も強い作用を示した。また，アスコルビン酸には摂食抑制作用が認められた。

次に，摂食誘起作用の認められた物質を 2 種あるいは 3 種組み合わせた場合について調査したところ，炭酸カルシウムとショ糖あるいは炭酸カルシウムとミオ･イノシトールの組み合わせにおいて，蟻蚕の摂食反応性を高める相乗的な効果が現われ，摂食量（排出糞数）は，いずれも炭酸カルシウムを単独で加えた場合のそれの 6 倍を超えた。また，炭酸カルシウム，β-シトステロール及びアスコルビン酸には，蟻蚕を飼料上に留める効果（定着効果）が認められた。

第 2 章　蟻蚕の摂食行動に及ぼす炭酸カルシウムの影響

第 1 章に記載した研究では，桑葉の巨細胞内に炭酸カルシウムが含まれている（SUGIMURA *et al.*, 1998 ; SUGIMURA *at al.*, 1999）ことに着目し，化学的に高純度な少数の物質を含む基本飼料に炭酸カルシウムのみを添加した飼料を作製して，蟻蚕の摂食試験を行った。その結果，蟻蚕の摂食行動が誘起される現象が認められた。また，この飼料上には蟻蚕が引き留められていることも確認された。さらに，炭酸カルシウムと既知の摂食誘起物質であるショ糖やミオ・イノシトール（糖アルコール）を同時に添加すると相乗的な効果が現われ，蟻蚕の摂食量が著しく増加した。

しかし，これらの現象は，中国種系原種「東」の炭酸カルシウムに対する反応性を示すものであり（Table 1-2, 1-3），「東」に認められた炭酸カルシウムの効果が他の品種においても同様に認められるものか，この点については結論を得ていない。

そこで，本研究（第 2 章）では，炭酸カルシウムの効果を検証するために種々の品種を用いて，炭酸カルシウムの摂食行動に及ぼす影響と糖類との相互作用について調査した。10 品種を用いた試験の結果，炭酸カルシウムには，蟻蚕の摂食行動を誘起する作用（摂食促進効果）と蟻蚕を飼料上に引き留める効果（定着効果）があることが確認された。また，炭酸カルシウムと糖類の混在は，蟻蚕の摂食反応性を相乗的に高める効果（複合効果）があることが確かめられたので，以下に述べる。

材料及び方法

供試した蚕品種は，日本種系原種「日」，「かい（KAI）」，「りょう」，「蓉」，「朝」，中国種系原種「海（Kai）」，「ぼの」，「研白」，「つくば」，「支 131 号」の 10 品種である。

調査には，越年処理または冷蔵浸酸処理した蚕種を使用し，同一母蛾から得た孵化直後の蟻蚕を各処理区に 50 頭ずつ当て，10 蛾反復で試験を行った。

試験に用いた飼料は，セルロース 10%，寒天 3%（w/w）及び蒸留水から成る単純な組成の飼料（以下，基本飼料）とし，ショ糖，ラフィノース，果糖，ブドウ糖，ミオ・イノシトール（糖アルコール）及び炭酸カルシウムを被験物質とした。被験物質は，試薬特級または 1 級を使用し，セルロース粉末は飼料用 D

(東洋濾紙)を,また,寒天は細菌培地用（和光純薬）をそれぞれ使用した。

炭酸カルシウム，ショ糖及び他の糖の蚕の摂食に関する至適濃度は，いずれも約 10％である（Table 1-1）（常山ら，2001，2005）ことから，各被験物

質の添加濃度は 10％とし，ミオ・イノシトールについては，添加濃度を 2％とした（Table 1-1)。また，2 種の糖類を組み合わせて添加する場合，その添加総量が 10％となるように調製した。なお，対照区には，基本飼料を用いた。

飼料の作製は，基本飼料に所定濃度となる量の被験物質をそれぞれ添加し，各成分をよく混合した後，厚さ 3.5mm 程度となる容器に入れて 60 分間蒸煮した。冷えて固まった飼料を，直径 24mm の円盤状に打ち抜き，内径 60mm のシャーレの中央に置いた。蟻蚕を飼料上に置き，72 時間後の排出糞数（以下，糞数）を調べ，この糞数を摂食量の指標とした。また，供試個体数に対する飼料上の個体数の割合を「引き留め率（定着率)」として算出した。飼育条件は，温度 25℃，湿度 70%，全暗とし，作業はクリーンルーム内で行った。

調査結果について，糞数及び引き留め率の処理区間差の検定は，Wilcoxon の符号順位検定法(以下,Wilcoxon-test)を用いて，危険率 5%水準で行った。

結　　果

1. 炭酸カルシウムの摂食促進効果と引き留め効果

日本種系の原種「日」,「かい（KAI）」,「りょう」,「蓉」,「朝」と中国種系の原種「海（Kai)」,「ぼの」,「研白」,「つくば」,「支 131 号」について，炭酸カルシウムが摂食行動に及ぼす影響を調べた（Table 2-1)。

糞数は,「ぼの」を除く全ての品種において，炭酸カルシウム区が対照区より有意に多かった(Wilcoxon-test，$p<0.05$)。また,「ぼの」では炭酸カルシウム区と対照区の糞数の間に有意差が認められなかったものの(Wilcoxon-test,$p>0.05$)，炭酸カルシウム区において僅かな摂食反応が見てとれる。これらのことから，炭酸カルシウムは蟻蚕の摂食行動を誘起する作用（摂食促進効果）を有するものと考えられた。

一方，引き留め率を見ると，供試した全ての品種において，炭酸カルシウム区の引き留め率が対照区に比べて有意に高く(Wilcoxon-test，$p<0.05$)，炭酸カルシウムには，蟻蚕を飼料上に引き留める効果（定着効果）があることが確認された。

2. 炭酸カルシウムと糖類の複合効果

炭酸カルシウムとショ糖の相互作用について調査した（Table 2-1)。

炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区における 10 品種の平均排出糞数（糞数）は，品種間で大きな差異が認められたが，いずれの品種を用いた場合にも，蟻蚕の摂食反応性を高める相乗的な効果が現われ，各品種の糞数は，炭酸カルシウムあるいはショ糖を単独で添加した試験区に比べ，顕著に増加した。今回の実験条件では,「支 131 号」の糞数は 862.4 個となり，これは供試した品種の中で最も多く，次いで「かい（KAI)」の 651.0 個,「りょう」の 574.8 個,「朝」の 560.5 個,「蓉」の 454.2 個,「日」の 396.4 個,「つくば」の 369.7 個,「研白」の 306.0 個の順となった。

Table 2-1. Effect of $CaCO_3$ and sucroce on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm

Variety [1]	Concentration [2] Substance %(w/w)			No. of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d. [3]) (n=10) [5]	Rate of larvae remained diet food [4] % (Mean ± s.d.) (n=10)
	$CaCO_3$	Sucroce	Water		
"Hi"	0	0	87	0.0 ± 0.0 [c 6)]	18.6 ± 11.2 [b 7)]
	10	0	77	17.6 ± 23.2 [b]	50.9 ± 21.5 [a]
	0	10	77	38.7 ± 24.9 [b]	9.5 ± 3.8 [c]
	10	10	67	396.4 ± 78.0 [a]	43.3 ± 15.1 [a]
"KAI"	0	0	87	0.5 ± 0.5 [d]	25.3 ± 7.1 [b]
	10	0	77	27.0 ± 20.4 [c]	37.9 ± 8.0 [a]
	0	10	77	283.0 ± 49.4 [b]	17.8 ± 7.5 [c]
	10	10	67	651.0 ± 119.1 [a]	26.4 ± 15.1 [bc]
"Ryo"	0	0	87	0.1 ± 0.2 [d]	22.1 ± 13.5 [b]
	10	0	77	134.4 ± 73.5 [b]	49.8 ± 13.8 [a]
	0	10	77	31.1 ± 46.6 [c]	13.1 ± 10.0 [b]
	10	10	67	574.8 ± 78.1 [a]	43.9 ± 15.6 [a]
"Yo"	0	0	87	0.2 ± 0.4 [d]	51.5 ± 13.8 [b]
	10	0	77	16.0 ± 21.1 [c]	87.0 ± 17.1 [a]
	0	10	77	84.2 ± 26.1 [b]	28.0 ± 12.9 [c]
	10	10	67	454.2 ± 107.2 [a]	47.6 ± 14.6 [b]
"Asa"	0	0	87	0.3 ± 0.6 [c]	34.6 ± 11.1 [b]
	10	0	77	59.3 ± 37.2 [b]	61.9 ± 16.6 [a]
	0	10	77	86.9 ± 29.1 [b]	17.4 ± 10.7 [c]
	10	10	67	560.5 ± 192.5 [a]	43.8 ± 9.2 [b]
"Kai"*	0	0	87	0.0 ± 0.0 [c]	51.3 ± 27.0 [c]
	10	0	77	1.0 ± 1.3 [b]	86.6 ± 4.6 [a]
	0	10	77	1.8 ± 2.3 [b]	21.4 ± 17.1 [d]
	10	10	67	80.7 ± 38.3 [a]	71.5 ± 18.6 [b]
"Bono"*	0	0	87	0.0 ± 0.0 [c]	56.2 ± 27.0 [b]
	10	0	77	0.2 ± 0.4 [c]	73.0 ± 25.0 [a]
	0	10	77	2.0 ± 4.4 [b]	37.5 ± 20.8 [b]
	10	10	67	47.7 ± 45.1 [a]	73.1 ± 21.0 [a]
"Kenpaku"*	0	0	87	0.0 ± 0.0 [d]	26.8 ± 10.1 [b]
	10	0	77	25.6 ± 29.1 [b]	70.4 ± 12.2 [a]
	0	10	77	8.0 ± 13.7 [c]	16.9 ± 6.3 [c]
	10	10	67	306.0 ± 95.8 [a]	69.3 ± 15.6 [a]
"Tsukuba"*	0	0	87	0.5 ± 1.1 [d]	89.6 ± 13.1 [b]
	10	0	77	18.4 ± 25.7 [c]	99.8 ± 0.6 [a]
	0	10	77	152.2 ± 53.6 [b]	88.4 ± 17.1 [b]
	10	10	67	369.7 ± 77.5 [a]	97.3 ± 2.9 [b]
"Shi-131-go"*	0	0	87	2.0 ± 3.3 [c]	74.2 ± 14.8 [b]
	10	0	77	82.6 ± 76.8 [c]	95.5 ± 3.6 [a]
	0	10	77	302.4 ± 153.3 [b]	46.8 ± 19.3 [c]
	10	10	67	862.4 ± 244.8 [a]	66.4 ± 19.5 [b]

[1] Japanese and Chinese strains were tested, and all the marked varieties(*) belong to Chinese strain.

[2] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.

[3] No. of larvae remaining on each diet was counted after 72h.

[4] s.d.; Standard deviation

[5] Number of replicates.

[6),7)] Means in column , followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.

一方，「海」及び「ぼの」の糞数は，他の品種に比べて明らかに少なく，80.7 個と 47.7 個となった。各品種の糞数は，炭酸カルシウム単独区の約 4.3～80.7 倍及びショ糖単独区の約 2.3～44.8 倍にそれぞれ相当した。また，「海」と「ぼの」は，炭酸カルシウム単独区及びショ糖単独区においても糞数が少なく，特に「ぼの」では，炭酸カルシウム単独区と対照区の糞数の間に有意差が認められなかった(Wilcoxon-test，p>0.05)。

引き留め率は，いずれの品種においてもショ糖単独区の引き留め率が，対照区に比べて低くなることが読み取れることから，ショ糖には，蟻蚕を遠逃ける傾向が見られた。また，炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区の引き留め率は，「ぼの」を除き，炭酸カルシウム単独区とショ糖単独区の間に位置付けられていた。

次に，「海」と「ぼの」が，炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区においても，また，ショ糖に対しても摂食反応（以下，反応）が極めて弱いことが明らかになった（Table 2-1）ので，両品種が，ショ糖以外の糖類に対してどのような反応を示すのかを調査した（Table 2-2)。

Table 2-2. Effect of saccharides on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm varieties “Kai” and “Bono”

Variety	Concentration [1] Substance %(w/w)						No. of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d.[2]) (n=10) [3]
	Sucroce	Raffinose	Fructose	Glucose	Myo-inositol	Water	
“Kai”	0	0	0	0	0	87	0.0 ± 0.0 [a 4]
	10	0	0	0	0	77	1.2 ± 2.8 [a]
	0	10	0	0	0	77	0.1 ± 0.4 [a]
	0	0	10	0	0	77	0.0 ± 0.0 [a]
	0	0	0	10	0	77	1.5 ± 3.3 [a]
	0	0	0	0	2	85	0.1 ± 0.3 [a]
“Bono”	0	0	0	0	0	87	0.0 ± 0.0 [a]
	10	0	0	0	0	77	1.7 ± 2.4 [a]
	0	10	0	0	0	77	0.2 ± 0.6 [a]
	0	0	10	0	0	77	2.4 ± 3.9 [a]
	0	0	0	10	0	77	5.0 ± 14.8 [a]
	0	0	0	0	2	85	2.9 ± 8.5 [a]

[1] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.
[2] s.d.; Standard deviation
[3] Number of replicates
[4] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.

ラフィノース，果糖，ブドウ糖及びミオ・イノシトール（糖アルコール）を用いて摂食試験を行った結果，両品種はいずれの糖類を与えた場合にも反応が低く，各種の糖類を添加した試験区と対照区の糞数の間には，有意差が認められなかった(Wilcoxon-test，p>0.05)。

また，炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区を対照にして，炭酸カルシウムとブドウ糖及び炭酸カ

ルシウムとミオ・イノシトールを添加した混合飼料に対する「海」と「ぼの」の摂食反応を比較した（Table 2-3）ところ，「海」の糞数は，炭酸カルシウムとブドウ糖の組み合わせ区で 85.5 個，炭酸カルシウムとミオ・イノシトールの組み合わせ区では，38.7 個となった。両組み合わせ区(試験区)における糞数は，対照となる炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区の糞数（87.7 個）に比べて少なく，この条件では，「海」の摂食反応性を向上させることはできなかった。

一方，「ぼの」では，糞数が，炭酸カルシウムとミオ・イノシトールの組み合わせ区で 45.7 個，炭酸カルシウムとブドウ糖の組み合わせ区で 144.5 個，炭酸カルシウムとショ糖との組み合わせ区では 53.9 個となったことから，炭酸カルシウムとブドウ糖を混合した飼料を与えると，「ぼの」の摂食行動が明らかに促進することが確認された（Wilcoxon-test，$p<0.05$ ）。この場合，「ぼの」の糞数は，炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区（対照）の糞数の約 2.7 倍に相当した。

続いて，両品種の摂食反応性を，さらに向上させる条件を調査するために，ショ糖，ブドウ糖及びミオ・イノシトールの中から 2 種の糖類を組み合わせ，炭酸カルシウムと共に基本飼料に添加し，摂食試験を行なった（Table 2-4)。

Table 2-3. Effect of $CaCO_3$ and saccharide on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm varieties “Kai” and “Bono”

Variety	Concentration [1] Substance %(w/w)					No. of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d. [2]) (n=10) [3]
	$CaCO_3$	Sucroce	Glucose	Myo-inositol	Water	
“Kai”	0	0	0	0	87	0.0 ± 0.0 [c 4]
	10	10	0	0	67	87.7 ± 43.0 [a]
	10	0	10	0	67	85.5 ± 53.8 [a]
	10	0	0	2	75	38.7 ± 30.7 [b]
“Bono”	0	0	0	0	87	0.0 ± 0.0 [c]
	10	10	0	0	67	53.9 ± 71.6 [b]
	10	0	10	0	67	144.5 ± 108.8 [a]
	10	0	0	2	75	45.7 ± 68.0 [b]

[1] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.
[2] s.d.; Standard deviation
[3] Number of replicates.
[4] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.

Table 2-4. Effect of $CaCO_3$ and saccharides on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm varieties "Kai" and "Bono"

Variety	Concentration [1] Substance %(w/w)					No. of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d.[2]) (n=10) [3]
	$CaCO_3$	Sucroce	Glucose	Myo-inositol	Water	
"Kai"	0	0	0	0	87	0.1 ± 0.3 [d 4]
	10	10	0	0	67	91.7 ± 34.6 [c]
	10	5	5	0	67	139.8 ± 71.5 [bc]
	10	8	0	2	67	261.2 ± 45.5 [a]
	10	0	8	2	67	174.7 ± 61.1 [b]
"Bono"	0	0	0	0	87	0.0 ± 0.0 [f]
	10	10	0	0	67	53.1 ± 46.7 [e]
	10	0	10	0	67	154.7 ± 96.5 [d]
	10	5	5	0	67	360.4 ± 91.0 [c]
	10	8	0	2	67	417.0 ± 63.6 [b]
	10	0	8	2	67	650.6 ± 110.0 [a]

[1] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.
[2] s.d.; Standard deviation
[3] Number of replicates.
[4] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.

「海」は，炭酸カルシウム，ショ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区あるいは炭酸カルシウム，ブドウ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区で，一方，「ぼの」は，炭酸カルシウム，ショ糖及びブドウ糖の組み合わせ区，炭酸カルシウム，ショ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区あるいは炭酸カルシウム，ブドウ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区で，摂食行動が著しく促進した。

この場合，「海」の糞数は，炭酸カルシウムと，ショ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区で261.2 個，ブドウ糖及びミオ・イノシトールとの組み合わせ区では 174.7 個となり，対照となる炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区の糞数の約 2.8 倍と約 1.9 倍となった。

また，「ぼの」では，糞数が，炭酸カルシウムと，ショ糖及びブドウ糖の組み合わせ区で 360.4 個，ショ糖及びミオ・イノシトールとの組み合わせ区では 417.0 個，ブドウ糖及びミオ・イノシトールとの組み合わせ区で 650.6 個となり，これは炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区の糞数の約 6.8，約 7.9 倍及び約 12.3 倍にそれぞれ相当した。

考　　察

10 品種を用いて行った今回の摂食試験の結果から，炭酸カルシウムには蟻蚕の摂食行動を誘起する作用（摂食促進効果）があり，また，ショ糖と組み合わせると蟻蚕の摂食反応性を高める相乗的な効果(複合効果)が現われることが確認された。さらに，炭酸カルシウムは蟻蚕を飼料上に引き留め（引き留め効果)，ショ糖は蟻蚕を遠ざける傾向を示すことも同時に確かめられた。

以上の結果は，第１章の「東」(Table 1-3）に認められた炭酸カルシウムの効果を裏づけるものと言えるが，Table 2-1 で示したように,炭酸カルシウム区では,「ぼの」を除く全ての品種の摂食行動が誘起されている(Wilcoxon-test,$p<0.05$)。また,「ぼの」についても，僅かではあるが同区において摂食が認められた。これらのことから，炭酸カルシウムには，摂食促進効果があるものと判断した。

一方，炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区では，上述したように蚕の摂食量（平均糞数。以下，糞数）が，それぞれの物質を単独で添加した試験区の総和ではなく，相乗的に増加する。したがって，炭酸カルシウムとショ糖は，互いに役割の異なる摂食誘起物質であると考えられた。

また，各品種の引き留め率（Table 2-1）を見ると，炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区の引き留め率がいずれの品種においても，ショ糖区よりも高くなる傾向が認められることから，ショ糖区に炭酸カルシウムを添加することによって，ショ糖の有する蟻蚕を忌避させる作用が弱められていることがわかる。この結果から，組み合わせ区における摂食量増加の原因の一つとして，炭酸カルシウムの有する引き留め効果（定着効果）によって，蚕が飼料上に引き留められ，この飼料を摂食するチャンスが，より多く増えたことによるものと考えられた。

一方，中国種系の原種「海」と「ぼの」の同組み合わせ区に対する摂食反応性は，他の品種と比べて著しく低く，50 頭当たりの平均糞数は，それぞれ 80.7 個と 47.7 個となった(Table 2-1)。

そこで，両品種の摂食反応性を向上させる新たな条件を見出すために，炭酸カルシウムと，各種の糖類を 1 種あるいは 2 種混合した飼料を用いて摂食試験を行なったところ,「海」は，炭酸カルシウム，ショ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区で,「ぼの」は，炭酸カルシウム，ブドウ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区において，摂食量(糞数)が著しく増加した（Table 2-4)。この場合,「海」の 50 頭当たりの平均糞数は，261.2 個，また,「ぼの」では 650.6 個となり，これは，炭酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区の糞数の約 2.8 倍と約 12.3 倍にそれぞれ相当していた(Table 2-4)。

しかし，今回のこの条件においても，両品種の各組み合わせ区における摂食量（糞数）は，糞数の標準偏差の値(Table 2-4)から読み取れるように，蛾区間で大きく異なっており，また，Table 2-1 の 10 品種を用いた試験においても同様の傾向が認められことから，同一品種内においても摂食反応性に関与する遺伝子の構成は蛾区間あるいは個体間で異なっているものと推測された（Table 2-1)。

従来，ショ糖は，蚕の摂食誘起物質として，糖類の中で最も強い作用を持つと報告されてきた(ITO,1960；石川・平尾，1966）。また，果糖やラフィノースは，ショ糖に次ぐ強い摂食誘起作用を持つ糖であるとされ，その一方でブドウ糖は，蚕に対する栄養価は高いものの，摂食誘起用が弱いものと報告されている（伊藤・田中,1961)。しかし，本研究では,「海」と「ぼの」のショ糖に対する摂食反応（以下，反応）は明らかに弱かった（Table 2-1，2-2)。また,「ぼの」の場合，ショ糖，果糖及びラフィノースよりもブドウ糖に対してやや強い反応を示す傾向が見られた（Table 2-2)。

一方,「海」は，ショ糖以外の糖類に対しても反応が極めて弱く，特に，果糖に対しては全く反応を示さなかったが（Table 2-2)，上述したように，炭酸カルシウムと 2 種の糖類を組み合わせることによって,「海」のような各種の糖類に対してほとんど反応が見られない品種においても，摂食反応性が著しく向上した（Table 2-4)。

「海」は，今回供試した蚕の品種の中で，人工飼料適合性の低い品種であるが，この品種は，寄主で

ある桑を与えると，他の品種と遜色なく桑を摂食し，成長する。一般に，人工飼料適合性の低い品種はその飼料内に含まれる摂食阻害物質(ITO *et al.*，1975)によって摂食が抑制されるものと言われているが，今回の結果が示すように，摂食促進物質の欠乏や含有量のバランスも人工飼料適合性の良否に大きな影響を及ぼすものと考えられる。

本研究では，炭酸カルシウムを単独で与えると，「ぼの」を除く全ての品種において，明らかな摂食促進効果が確認された（Wilcoxon-test，$p<0.05$）（Table 2-1)。また，炭酸カルシウムと各種の糖類を組み合わせた場合には，いずれの品種にも相乗的な効果が現われ，蚕の摂食行動が著しく促進されることが確かめられた。これらのことから，炭酸カルシウムは，蚕の摂食誘起物質であると結論づけることは妥当であると考える。

蚕の電気生理学的な研究（石川・平尾，1963；朝岡，1996）によって，糖及びミオ・イノシトールをそれぞれ特異的に受容する味覚細胞（L_S 細胞及び L_I 細胞）が，小腮にある有柄感覚子上に存在することが確認されている。さらに，この L_S 細胞及び L_I 細胞については濃度応答に関する調査も進められている。しかし，現時点では，炭酸カルシウムを受容する味覚細胞の所在は明らかになっていない。また，摂食行動の決定が味覚細胞の機能のみならず脳を中心とする中枢神経系の情報処理機能が複雑に関与していることが知られている（朝岡，1996)。

したがって，今回，炭酸カルシウムの摂食促進機構ならびに糖類との複合促進機構について，以上の結果から明確に推測することは困難であった。

しかし，排泄された蚕の糞を観察すると，糖類を単独で添加した飼料を摂食した蚕の糞は不定形のものが多く見られるのに対して，炭酸カルシウムのみを摂食した蚕と炭酸カルシウムと糖類の混合飼料を摂食した蚕の糞はほぼ斉一で，桑や人工飼料を摂食した場合の糞と形状が類似した，いわゆる俵型の糞が排泄された。

これらのことから炭酸カルシウムと糖類の相乗効果について考察すると，この効果は，両物質の摂食刺激作用に加えて食下された炭酸カルシウムが腸のぜん動運動を刺激することで糞が恒常的に排泄され，連続食下の効率が高まることが一因であると推測された。また，この現象には，先に述べた炭酸カルシウムの有する引き留め効果も寄与するものと考える。

炭酸カルシウムの摂食促進機構，蟻蚕を引き留める機構（定着機構）及び糖類との複合促進機構について，更に類縁化合物を用いた調査を進め，どの無機イオンが重要な役割を担っているのか，他に強い摂食誘起作用を持つ類縁化合物が存在するのかなどについて検討する必要があると考える。

摘　　要

炭酸カルシウムが蟻蚕の摂食行動に及ぼす影響と糖類との相互作用について調査した。蚕品種は，日本種系の原種「日」，「かい」，「りょう」，「蓉」，「朝」と中国種系の原種「海」，「ぼの」，「研白」，「つくば」，「支 131 号」の 10 品種を供試した。

始めに，セルロース粉末，寒天，水から成る基本飼料に炭酸カルシウム添加した飼料を作製し，孵化直後の蟻蚕に 72 時間与えた。その結果，「ぼの」を除く全ての品種がこの飼料を摂食することが確かめられた。

次に，炭酸カルシウムとショ糖を同時に加えた飼料を蟻蚕に与えると，いずれの品種も，炭酸カルシウムとショ糖の相乗的な効果によって摂食反応性が高められたが，「海」と「ぼの」の摂食量は，他の品種に比べて顕著に少なかった。

続いて，炭酸カルシウムと 2 種の糖類を添加した飼料を両品種に与えたところ，「海」は，炭酸カルシウム，ショ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区で，「ぼの」は，炭酸カルシウム，ブドウ糖及びミオ・イノシトールの組み合わせ区において，摂食反応性が著しく向上することが確認された。

以上の結果から，炭酸カルシウムは，蟻蚕の摂食行動を誘起する化合物（摂食誘起物質）であることが明らかになった。また，炭酸カルシウムには，蟻蚕を飼料上に引き留める効果（定着効果）があった。

第 3 章 蟻蚕の摂食行動に及ぼすカルシウム塩の影響

第 2 章に記載した研究では，種々の蚕品種を用いて，炭酸カルシウムの摂食行動に及ぼす影響について検討し,炭酸カルシウムが，蟻蚕の摂食行動を誘起する作用（摂食促進効果）と蟻蚕を飼料上に引き留める効果（定着効果）を持つことを明らかにした。

炭酸カルシウムは，蚕の重要な栄養素の一つであるが(伊藤・新村,1966；伊藤,1983)，現時点では，炭酸カルシウムの摂食促進機構ならびに引き留め機構（定着機構）については解明されていない。

しかし，この炭酸カルシウムに認められた効果が，炭酸カルシウムのみに認められるのか，あるいは類縁化合物にも認められるものなのか，この点を明らかにすることは,炭酸カルシウムの摂食促進機構ならびに引き留め機構解明の糸口を見出すための一助になるものと考えられる。

そこで，本研究（第 3 章）では，各種のカルシウム塩及び炭酸塩について，蟻蚕の摂食行動に及ぼす影響を調査した。その結果，水に難溶な化学的性質を有する珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムに，炭酸カルシウムと同様の効果があることが明らかになったので，以下に述べる。

材料及び方法

供試した蚕品種は，中国種系原種「東」,「ね」及び日本種系原種「蓉」である。調査には，越年処理または冷蔵浸酸処理した蚕種を使用し，同一母蛾から得た孵化直後の蟻蚕を各処理に 50 頭ずつ当て，10 蛾反復で試験を行った。

試験に用いた飼料は，個々の物質の作用が明確に現われるように，セルロース 10%，寒天 3%(w/w)及び蒸留水に被験物質を加えた単純な組成とし，炭酸カルシウム，珪酸カルシウム，燐酸カルシウム，塩化カルシウム，酢酸カルシウム，炭酸水素ナトリウム，炭酸カリウム及びショ糖を被験物質とした。被験物質は，試薬特級または 1 級を使用し，セルロース粉末は飼料用 D（東洋濾紙）を，寒天は細菌培地用（和光純薬）をそれぞれ使用した。各成分をよく混合し，厚さが 3.5 ㎜程度となる容器に入れ，60 分間蒸煮した。冷えて固まった飼料を直径 24 ㎜の円盤状に打ち抜き，内径 60 ㎜のシャーレの中央に置いた。蟻蚕を飼料上に置き，72 時間後の排出糞数（以下，糞数）を調査べ，この糞数を摂食量の指標とした。また，供試蚕数に対する 72 時間後の飼料上の蚕数を「引き留め率（定着率)」とした。飼育条件は，温度 25℃，湿度 70%，全暗とし，全ての作業はクリーンルーム内で行った。

調査結果について，糞数及び引き留め率の処理間差の検定は，Wilcoxon の符号順位検定法（以下，Wilcoxon-test）を用いて，危険率 5%水準で行った。

結　　果

1. カルシウム塩の効果とショ糖との複合効果

「東」における炭酸カルシウムの摂食に関する至適濃度は，10%付近（Table 1-1）（常山・田中,2001）であったので，これに基づいて，カルシウム（Ca）または炭酸（CO_3）に関するモル数が等しくなるように，各カルシウム塩と炭酸塩の添加量を調整し，それぞれの物質について，摂食行動に及ぼす影響を調査した（Table 3-1)。

糞数を見ると，炭酸カルシウム区，珪酸カルシウム区及びリン酸カルシウム区が対照区より有意に多

く(Wilcoxon-test,p<0.05)，新たに珪酸カルシウムとリン酸カルシウムに蟻蚕の摂食行動を誘起する作用が認められたが,炭酸塩にはこの作用が認められなかった。これら 3 種のカルシウム塩の中で，炭酸カルシウム区の糞数が最も多く，次いで珪酸カルシウム区，リン酸カルシウム区の順となり，いずれの区間にも有意差が認められ(Wilcoxon-test,p<0.05)，最も摂食誘起作用が弱かったリン酸カルシウム区の糞数は,炭酸カルシウム区の 1/9 以下，珪酸カルシウム区の 1/3 程度となった。

一方，引き留め率は，カルシウム塩の添加区において，いずれも対照区より高くなる傾向が見られたが，炭酸カルシウムと同様に引き留め効果（蟻蚕を飼料上に引き留める定着効果）が確認されたものは，珪酸カルシウムとリン酸カルシウムだけであった(Wilcoxon-test,p<0.05)。この場合，珪酸カルシウム区の引き留め率が最も高く，炭酸カルシウム区とリン酸カルシウム区に対して有意差が認められたが(Wilcoxon-test, p<0.05)，炭酸カルシウム区とリン酸カルシウム区については，両区間に有意差は認められなかった(Wilcoxon-test,p>0.05)。なお，炭酸水素ナトリウム区と炭酸カリウム区には，蟻蚕を遠ざける傾向が見られた。

次に，珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムについて，添加濃度と摂食量(糞数)との関係を調査した（Table 3-2）ところ，糞数は，全ての添加区で対照区より有意に多かった(Wilcoxon-test,p<0.05)。両カルシウム塩の摂食に関する至適濃度は，共に 10%付近と見られたが，糞数は，珪酸カルシウムにおいて 5～10%区で,リン酸カルシウムでは，0.5～10%区で添加量間に有意差は認められなかった(Wilcoxon-test, p>0.05)。また，いずれの場合も 12.5%区の糞数は添加区の中で最少となり，10%区の 1/3 以下となった。

一方,引き留め率も,全ての添加区で対照区より有意に高く(Wilcoxon-test,p<0.05)，両カルシウム塩にも蟻蚕を飼料上に引き留める効果が認められた。この場合，いずれも 0.5～12.5%区において，添加量間に有意差は認められず(Wilcoxon-test,p>0.05)，引き留め率はほぼ一定値を示した。

Table 3-1. Effect of substances on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety "To"

Substance ※	Concentration [1] substance %(w/w)	Concentration [1] water %(w/w)	No. of feces per 50 larvae after 72 h (Mean ± s.d.[2]) (n=10) [4]	Rate of larvae remained on diet food [3] % (Mean ± s.d.) (n=10)
Control	0	87	1.1 ± 1.1 [d 5)]	53.1 ± 12.2 [c 6)]
$CaCO_3$	10	77	106.4 ± 66.5 [a]	85.5 ± 6.4 [b]
$CaSiO_3$	11.6	75.4	30.6 ± 17.2 [b]	95.2 ± 3.8 [a]
$Ca_3(PO_4)_2$	10.3	76.7	11.4 ± 6.7 [c]	85.1 ± 5.8 [b]
$CaCl_2$	11.1	75.9	1.0 ± 0.4 [d]	56.5 ± 13.7 [c]
$Ca(CH_3COO)_2$	15.8	71.2	0.9 ± 0.6 [d]	58.7 ± 9.5 [c]
$NaHCO_3$	8.4	78.6	0.8 ± 0.5 [d]	16.9 ± 8.5 [d]
K_2CO_3	13.8	73.2	1.1 ± 0.6 [d]	9.2 ± 5.9 [d]

[1] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.
[2] s.d.; Standard deviation.
[3] No. of larvae remaining on each diet food was counted after 72 h.
[4] Number of replicates
[5),6)] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxon signed-ranks test.
※ Each test substance includes either calcium (Ca) or carbonate (CO_3) at equal molar concentration.

ここで，珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムのショ糖との相互作用を検討するために，各物質の添加濃度を 10%に調整し,摂食試験を行った（Table 3-3)。

「東」を用いた試験では，珪酸カルシウムとショ糖あるいはリン酸カルシウムとショ糖を添加した区に相乗的な効果が現われ，50 頭当たりの平均糞数は，それぞれ 645.8 個と 160.6 個となった。これは，珪酸カルシウムとショ糖の組み合わせにおいて，珪酸カルシウム単独区の約 12.9 倍，ショ糖単独区の約 13.9 倍，リン酸カルシウムとの組み合わせでは，リン酸カルシウム単独区の約 16.2 倍，ショ糖単独区の約 3.5 倍にそれぞれ相当していた。

一方，引き留め効果は，珪酸カルシウム区とリン酸カルシウム区に認められ，ショ糖区には蟻蚕を遠ざける傾向が見られた。また，珪酸カルシウムとショ糖の組み合わせ区における引き留め率と，珪酸カルシウム区の引き留め率との間に有意差は認められなかったが(Wilcoxon-test，$p>0.05$)，リン酸カルシウムとショ糖を組み合わせると，ショ糖の添加によって，リン酸カルシウムの引き留め効果が弱められ，組み合わせ区の引き留め率は，ショ糖区と等しくなった。

Table 3-2.　Effect of calcium salts on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety “To”

Substance	Concentration[1)] substance %(w/w)	Concentration[1)] water %(w/w)	No.of feces per 50 larvae after 72 h (Mean ± s.d.[2)]) (n=10) [4)]	Rate of larvae remained on diet food [3)] % (Mean ± s.d.) (n=10)
$CaSiO_3$	0	87	1.3 ± 1.5 [d 5)]	51.7 ± 21.0 [c 6)]
	0.05	86.95	28.8 ± 17.1 [b]	79.9 ± 13.9 [b]
	0.5	86.5	31.4 ± 17.7 [b]	94.2 ± 4.3 [a]
	5	82	44.1 ± 22.0 [a]	93.9 ± 2.8 [a]
	10	77	50.7 ± 19.5 [a]	94.6 ± 5.4 [a]
	12.5	74.5	13.1± 11.6 [c]	95.4 ± 3.6 [a]
$Ca_3(PO_4)_2$	0	87	0.4 ± 0.6 [c]	51.6 ± 15.9 [c]
	0.05	86.95	3.8 ± 3.9 [b]	72.1 ± 11.4 [b]
	0.5	86.5	8.2 ± 8.0 [a]	84.3 ± 10.1 [a]
	5	82	9.5 ± 5.2 [a]	85.0 ± 8.0 [a]
	10	77	10.7 ± 6.7 [a]	84.1 ± 5.4 [a]
	12.5	74.5	2.9 ± 2.7 [b]	84.7 ± 8.4 [a]

[1)] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.

[2)] s.d.; Standard deviation.

[3)] No. of larvae remaining on each diet food was counted after 72 h.

[4)] Number of replicates

[5),6)] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxon signed-ranks test.

2. カルシウム塩の効果とその品種間差異

珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムの効果と両カルシウム塩のショ糖との相互作用を確認するために，「蓉」と「ね」について，「東」の場合と同様の調査を行った（Table 3-3）。

両品種の珪酸カルシウム区及びリン酸カルシウム区の糞数は対照区のそれよりも有意に多く(Wilcoxon-test, $p<0.05$)，珪酸カルシウムとリン酸カルシウムが，蟻蚕の摂食行動を誘起する作用を持つことが確かめられた。しかし，「蓉」及び「ね」の場合，珪酸カルシウムの効果はリン酸カルシウムよりも高かったものの，ショ糖区と比べると，珪酸カルシウム区の糞数は明らかに少なく，これは「東」の場合と異なっていた。また，両カルシウム塩は，ショ糖と組み合わせると摂食反応性を高める相乗的な効果が現われ，「蓉」の 50 頭当りの平均糞数は，珪酸カルシウムとショ糖の組み合わせで 867.6 個，リン酸カルシウムとの組み合わせで 212.9 個，「ね」では，順に 278.2 個と 109.1 個となり，これは，「蓉」における珪酸カルシウム単独区の約 19.3 倍，ショ糖単独区の約 7.5 倍及びリン酸カルシウム単独区の約 21.3 倍，ショ糖単独区の約 1.8 倍，「ね」では，珪酸カルシウム単独区の約 32.7 培，ショ糖単独区の約 7.7 倍及びリン酸カルシウム単独区約 30.3 培，ショ糖単独区の約 3.0 倍にそれぞれ相当していた。

一方，引き留め効果は，両品種とも「東」に見られた傾向と一致した。即ち，珪酸カルシウム区とリン酸カルシウム区に引き留め効果が認められ，ショ糖区には蟻蚕を遠ざける傾向が見られた。また，ショ糖と組み合わせると，ショ糖の添加によって珪酸カルシウムの引き留め効果が弱められることはなかったが，リン酸カルシウムの引き留め効果は弱められた。

Table 3-3. The interaction between calcium salt and sucrose on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety “To”, “Yo”,and “Ne”

Variety	Concentration [1] Substance % (w/w)				No.of feces per 50 larvae after 72 h (Mean ± s.d. [2]) (n=10) [4]	Rate of larvae remained on diet food [3] % (Mean ± s.d.) (n=10)
	$CaSiO_3$	$Ca_3(PO_4)_2$	Sucrose	Water		
“To”	0	0	0	87	0.3 ± 0.6 [e 4)]	53.7 ± 16.8 [c 5)]
	0	0	10	77	46.4 ± 19.4 [c]	43.0 ± 16.5 [d]
	10	0	0	77	49.8 ± 14.6 [c]	94.1 ± 2.7 [a]
	0	10	0	77	9.9 ± 6.3 [d]	83.9 ± 4.8 [b]
	10	0	10	67	645.8 ± 137.0 [a]	92.1 ± 11.7 [ab]
	0	10	10	67	160.6 ± 71.4 [b]	41.8 ± 17.6 [d]
“Yo”	0	0	0	87	0.6 ± 1.5 [f]	36.9 ± 13.7 [c]
	0	0	10	77	115.7 ± 54.0 [c]	10.0 ± 5.3 [d]
	10	0	0	77	44.9 ± 32.1 [d]	75.4 ± 8.6 [a]
	0	10	0	77	10.0 ± 12.0 [e]	52.8 ± 13.9 [b]
	10	0	10	67	867.6 ± 241.0 [a]	72.3 ± 8.2 [a]
	0	10	10	67	212.9 ± 64.1 [b]	9.5 ± 5.2 [d]
“Ne”	0	0	0	87	0.1 ± 0.3 [f]	76.3 ± 8.7 [c]
	0	0	10	77	36.1 ± 29.1 [c]	46.9 ± 14.2 [d]
	10	0	0	77	8.5 ± 7.4 [d]	98.2 ± 2.7 [a]
	0	10	0	77	3.6 ± 3.2 [e]	90.8 ± 9.8 [b]
	10	0	10	67	278.2 ± 68.5 [a]	96.8 ± 2.3 [a]
	0	10	10	67	109.1 ± 59.6 [b]	44.7 ± 7.0 [d]

[1] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.
[2] s.d.; Standard deviation.
[3] No. of larvae remaining on each diet food was counted after 72 h.
[4] Number of replicates
[5),6)] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxon signed-ranks test.

考　　察

3 品種を用いた試験結果から，珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムが，蟻蚕の摂食行動を誘起する作用を持つことは明らかである。しかし，摂食誘起物質として既に報告されているショ糖(ITO, 1960)と比較すると，珪酸カルシウムを添加した飼料を与えた場合の摂食量（糞数）は，ショ糖区の約 1/5～1.1 倍に，一方，リン酸カルシウムについては，いずれの品種においても摂食量が少なく，ショ糖区の約 1/10～1/5 となった。特に，「ね」を用いた試験では，両カルシウム塩の効果は明らかに低く，珪酸カルシウム区及びリン酸カルシウム区の 50 頭当りの平均糞数は，それぞれ 8.5 個と 3.6 個であった(Table 3-3)。

また，「東」及び「蓉」の摂食状況を観察すると，活発に摂食する個体が現われる一方で，蛾区によっては飼料を摂食しないものも多く見られた。これらのことから，両カルシウム塩を摂食誘起物質としてみなすには，論拠にやや曖昧さを感じることは否めなかったが，HAMAMURA *et al.* (1962)は桑葉から摂食因子を分離，決定する際に,呑込み因子（swallowing factor）については，基本飼料の組成に予めショ糖を加えたものを用いていたので，この点を考慮した上で Table 3-3 を見ると，摂食量(糞数)は，珪酸カルシウムとショ糖の組み合わせにおいてショ糖区の約 7～14 倍に，リン酸カルシウムとの組み合わせではショ糖区の約 2～3 倍となり，摂食反応性を高める相乗的な効果が現われることがわかる。この場合，糞数の標準偏差の値が示すように，蛾区間で摂食量に差は認められるものの，摂食状況を観察すると，いずれの品種においても，供試した大部分の蚕が飼料を摂食することが確認される。したがって，珪酸カルシウムとリン酸カルシウムは摂食誘起物質であると結論づけることができるものと考える。

なお，現在の育成品種は，人工飼料に対する適合性が高くなるように改良が進められているので，人工飼料をほとんど摂食しない品種を用いた場合にも，同様の結果が得られるものか否かについては，更に検討が必要である。

一方，引き留め率の調査結果から，珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムが，蟻蚕を飼料上に引き留める効果を持つことが明らかになり，炭酸水素ナトリウム及び炭酸カリウムには，蟻蚕を遠ざける傾向が認められた（Table 3-1)。また，珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムについて添加濃度と摂食行動との関係（Table 3-2）を見ると，0.5～12.5%区では，いずれの場合も，摂食量（糞数）の変動に関わらず，引き留め率がほぼ一定値となっていることがわかる。同じ傾向が炭酸カルシウム（Table 1-2)（常山・田中,2001）についても見られ，これは，飼料上に引き留める効果と摂食を誘起する作用との間には，直接的な関係がないことを示しているもの考えられる。

今回の試験で用いた珪酸カルシウム（S≒10 mg/100 g，25℃）及びリン酸カルシウム（S≒2.5 mg/100 g，25℃）は水に対する溶解度が小さく，添加濃度を 0.05～12.5%に調整（Table 3-2）してあるので，いずれの飼料も，飼料中のカルシウム塩の結晶（固体）と飼料の水分中の電離しているイオン（水和イオン）との間に平衡状態が保たれ，水分中に含まれているカルシウムイオンの濃度は，カルシウム塩の添加量（0.05～12.5%）に関わらず一定（飽和）となっているものと推測できる。

一方，これに対して摂食量(糞数)は，カルシウム塩の添加量によって大きく変動している（Table 3-2)。また，電気生理学的な研究から，塩類または有機酸類に感受性を持つ味覚細胞（N_2 及び N_2’受容細胞）が，カルシウムイオンに対してほとんど反応を示さない（石川・平尾，1963）ことが報告されており，これらは，カルシウム塩の結晶に摂食促進効果が認められることを示唆しているものと考えられる。

また，上述した理由によって，飼料の水分中に含まれているカルシウムイオンの濃度は，カルシウム塩の添加量に関わらず一定とみなせるが，引き留め率についても同様の傾向が認められている（Table 3-2）ことから，カルシウムイオンが引き留め効果に関与している可能性が考えられるものの，一方で，Table 3-1 で示した結果を見ると，強い電解質である塩化カルシウムと酢酸カルシウムには，引き留め効果が認められていない。また，Table 3-2 から，カルシウムイオンの濃度が一定であるにも関わらず，0.05%区の飼料の引き留め率が，他の飼料に比べて低いことが読み取れる。カルシウムイオンと蟻蚕を飼

料上に引き留める機構との間に関連性が認められるものか否かについては，さらに調査を進め，明らかにする必要がある。

前述したように，新たに珪酸カルシウム及びリン酸カルシウムが，摂食を誘起する作用と蟻蚕を飼料上に引き留める効果を持つことが明らかになったが，ここで注目すべきことは，両カルシウム塩と先に報告した炭酸カルシウムに対する蚕の摂食行動に，いくつかの共通点が見られるという興味深い結果が得られたことである。これは同時に，水に難溶な化学的性質を有するカルシウム化合物の中から，今後，蚕の摂食行動に関与する重要な物質が新たに発見される可能性を示唆しているものと考える。

蚕の味覚細胞は，口器の感覚子に存在し，刺激物質（化学物質）の質と量に関する情報を中枢神経へ直接的に伝達する神経細胞である(石川・平尾，1963；ISHIKAWA，1966；朝岡，1996)。また，近年，一部の味覚細胞（deterrent cell）に，複数の刺激物質を感知するサイト（受容サイト）が存在する(朝岡，1996)ことも検証され，その所在を明らかにすることは，刺激物質と摂食行動との関連性を解明する上で，重要な課題である。したがって，引きつづき，類縁化合物について摂食試験を行うと同時に，電気生理学的な手法を応用して，新たに摂食促進効果が確認された珪酸カルシウム，リン酸カルシウム及び炭酸カルシウムの刺激に対して，強い感受性を持つ味覚細胞あるいは受容サイトの所在を明らかにすることが必要であると考える。

摘　　要

カルシウム塩及び炭酸塩が，蟻蚕の摂食行動に及ぼす影響について調査した。

蚕品種は「東」,「蓉」及び「ね」を用いた。セルロース粉末，寒天及び水に被験物質を加えた飼料を孵化直後の蟻蚕に与え，72 時間後の排出糞数と飼料上に留まっている蟻蚕の割合を調査した。

その結果，全ての供試品種が珪酸カルシウムあるいは燐酸カルシウムを加えた飼料を摂食し，両カルシウム塩が摂食誘起作用と蟻蚕を飼料上に引き留める効果を持つことが明らかになった。また，両カルシウム塩は，いずれもショ糖と組み合わせると相乗的な効果を示し，蟻蚕の摂食行動を著しく促進した。この場合，いずれの品種においても，珪酸カルシウムとショ糖の組み合わせに高い効果が認められた。

第 4 章 広食性蚕の摂食誘起物質に対する摂食反応とその特異性

蚕は生態学上，桑を寄主植物とする単食性昆虫であるが，自然突然変異個体の中から，食性に関して選択範囲の広い，いわゆる“広食性蚕”と呼ばれる食性異常の蚕が見出されている。代表的な広食性系の蚕品種として，横山（1970，1975）がキャベツを食下した個体から選抜した「沢 J」，真野ら（1991）が，指定品種及び育成系統の中から， LP-1 飼料（堀江・渡辺，1983）に対する適合性によって選抜した「日 601 号」及び「中 601 号」，また，この日中の各品種から育成された「ひたち」及び「にしき」（田中・大井，1994）などが著名で，交雑種「日 601 号×中 601 号」(以下，“あさぎり”)，「ひたち×にしき」及び「日 603 号・ひたち×中 604 号・にしき」(“ひたちさんし”）は，家畜用飼料素材を主体とした低コスト人工飼料（柳川，1990；柳川ら，1991）に適した実用品種に指定されている（農林水産省農蚕園芸局，1990，1994，1996)。食性異常蚕（以下，広食性蚕）は，また，桑葉粉末入りの人工飼料に対する適合性にも優れている（横山，1970，1971；藤森ら，1982)。

著者は，広食性蚕に認められる各種人工飼料に対する高い適合性は，広食性蚕が食性正常蚕に比べて，特定の苦味物質の刺激に対する摂食阻害物質受容細胞（deterrent cell）の感受性が低い（ 朝岡，1996；ASAOKA，2000）ということだけに起因するものではなく，それと同時に，人工飼料に含まれる個々の摂食誘起物質の刺激に対する広食性蚕の摂食反応（摂食に関する反応）の強さを反映しているものと考

えている。

そこで，本研究（4 章）では，化学的に純度の高い少数の物質を含む基本飼料を用いて，蚕の味覚の認識において代表的な摂食誘起物質とされるショ糖とミオ・イノシトール（HAMAMURA *et al.*,1962 ;ITO,1960），また，第 1 章及び 2 章に記載した研究において，新たな摂食誘起物質として見出された炭酸カルシウムに対する広食性蚕（蟻蚕）の反応性について検討した。5 品種の広食性蚕を用いた摂食試験の結果，広食性蚕は食性正常蚕に比べ，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムに対して強い摂食反応を示すことが明らかになったので,以下に述べる。

材料及び方法

供試した蚕品種は，広食性系の原種「ひたち」,「にしき」,「日 603 号」,「中 604 号」,「沢 J」及び対照となる食性正常の交雑種「朝・日×東・海（日本種母体)」(農林水産省農蚕園芸局，1976）である。

調査には，越年処理または冷蔵浸酸処理した蚕種を使用し，同一母蛾から得た孵化直後の蟻蚕を各処理区に 50 頭ずつ当て，10 蛾反復で試験を行った。

試験に用いた飼料は，セルロース 10%（w/w)，寒天 3%（w/w）及び蒸留水に蚕の摂食誘起物質（ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウム）を単独あるいは 2 種組み合わせ加えた単純な組成とした。供試した摂食誘起物質は全て試薬特級を使用し，セルロース粉末は飼料用 D（東洋濾紙）を，寒天は細菌培地用（和光純薬）をそれぞれ用いた。飼料の作製は，各成分を良く混合し，厚さが 3.5 ㎜程度となる容器に入れ，60 分間蒸煮した。冷えて固まった飼料を直径 24 ㎜の円盤状に打ち抜き，内径 60 ㎜のシャーレの中央に置いた。試験は，所定数（50 頭）の蟻蚕を飼料の上に置き，72 時間後の排出糞数（以下，糞数）を調査し，この糞数を摂食量の指標にした。また，各試験区の糞数（観察値）から対照区の糞数（観察値）を引いた値を補正糞数とし，この補正糞数によって，飼料中の摂食誘起物質に対する各蚕品種の摂食に関する反応性（摂食反応性）を評価した。なお，飼育条件は，温度 25℃，湿度 70%，全暗とし，全ての作業はクリーンルーム内で行った。

調査結果について，糞数の処理間差の検定は Wilcoxon の符号順位検定法（以下，Wilcoxon-test）を，また，糞数の品種間差の検定については Mann-Whitney の U-検定法（以下，Mann-Whitney-test）を用いて，危険率 5%水準で行った。

結　　果

1. 広食性蚕の摂食反応性

広食性蚕「ひたち」と食性正常蚕「朝・日×東・海」について，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムの添加濃度と摂食量（排出糞数）との関係を調査した（Table 4-1)。

各物質の添加濃度と排出糞数（以下，糞数）の関係を見ると，両品種の糞数は，それぞれの物質の添加量の違いによって大きく変動するものの，いずれの物質を添加した場合にも，全ての添加区で対照区よりも有意に多く（Wilcoxon- test,$p<0.05$),「ひたち」と「朝・日×東・海」の摂食が各物質の作用によって誘起されることがわかる。また，同一の飼料を与えた場合の両品種の糞数を比べると，いずれの物質においても，添加量の多少にかかわらず,「ひたち」の糞数が,「朝・日×東・海」の糞数よりも明らかに多くなっており（Mann-Whitney-test,$p<0.05$)，この傾向は，同一飼料間で，両品種の補正糞数（対照区における摂食量の影響を補正するために，各蛾区における試験区の糞数の値から対照区の糞数の値を引いた値の平均値）を比較した場合についても認められる。このことから,「ひたち」が,「朝・日×東・海」よりも，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムに対して強い摂食反応(以下，反応)を示す蚕であることが確かめられた。

Table 4-1. Effect of concentrations of stimulant compounds on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm variety "Hitachi" and "Asa・Hi × To・Kai" [1)]

Stimulant (Substance)	Concentration [2)] Substance % (w/w)	Concentration [2)] Water % (w/w)	No. of feces per 50 larvae after 72 h (Mean ± s.d [3)]) (n=10) [4)] Variety "Hitachi"		Variety "Asa・Hi × To・Kai"		Significance between varieties on no. of feces
Sucrose	0	87	53.1 ± 29.0 [f 5)]	(-) [6)]	0.1 ± 0.3 [e]	(-)	S [7)]
	0.05	86.95	119.4 ± 56.4 [e]	(66.3)	1.7 ± 0.8 [d]	(1.6)	S
	0.5	86.5	682.2 ± 198.3 [ab]	(629.1)	34.4 ± 32.9 [b]	(34.3)	S
	5	82	858.9 ± 178.4 [a]	(805.8)	74.5 ± 51.6 [a]	(74.4)	S
	10	77	585.3 ± 127.7 [b]	(532.2)	90.7 ± 58.7 [a]	(90.6)	S
	15	72	361.1 ± 110.4 [c]	(308.0)	34.2 ± 31.4 [b]	(34.1)	S
	20	67	293.5 ± 102.9 [d]	(240.4)	19.6 ± 18.1 [c]	(19.5)	S
Myo-inositol	0	87	50.7 ± 41.8 [e]	(-)	0.2 ± 0.4 [e]	(-)	S
	0.05	86.95	186.9 ± 148.8 [bc]	(136.2)	2.2 ± 3.9 [d]	(2.0)	S
	0.5	86.5	348.6 ± 182.7 [a]	(297.9)	5.9 ± 5.6 [bc]	(5.7)	S
	1	86	263.7 ± 131.7 [ab]	(213.0)	13.3 ± 9.9 [a]	(13.1)	S
	2	85	117.6 ± 73.6 [c]	(66.9)	9.3 ± 8.5 [b]	(9.1)	S
	5	82	76.3 ± 51.6 [d]	(25.6)	4.8 ± 4.2 [cd]	(4.6)	S
	10	77	56.3 ± 44.9 [e]	(5.6)	2.1 ± 2.7 [d]	(1.9)	S
$CaCO_3$	0	87	51.8 ± 31.8 [e]	(-)	0.2 ± 0.4 [e]	(-)	S
	0.05	86.95	186.9 ± 148.8 [d]	(135.1)	1.4 ± 1.2 [d]	(1.2)	S
	0.5	86.5	226.6 ± 100.0 [c]	(174.8)	2.3 ± 1.7 [c]	(2.1)	S
	5	82	343.6 ± 99.8 [b]	(291.8)	15.7 ± 12.8 [ab]	(15.5)	S
	10	77	473.1 ± 128.6 [a]	(421.3)	19.3 ± 12.7 [a]	(19.1)	S
	15	72	452.9 ± 99.4 [a]	(401.1)	14.6 ± 11.0 [b]	(14.4)	S
	20	67	388.6 ± 83.1 [b]	(336.8)	10.8 ± 6.4 [b]	(10.6)	S

1) "Polyphagous" strain, "Hitachi", and normal strain, "Asa・Hi × To・Kai", were tested.
2) Basal diet contains 10% cellulose and 3% (w/w) agar.
3) s.d.;Standard deviation.
4) Number of replicates
5) Means, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.
6) Difference between the values of treatment and control in each laying.
7) Significance at P=0.05 by Man-Whitney U- test.

Table 4-2. The interaction between stimulant compounds on the feeding in the newly hatched larvae of the silkworm

Variety [1]	Concentration [2] Substance % (w/w)				No. of feces per 50 larvae after 72 h (Mean ± s.d. [3]) (n=10) [4]	
	Sucrose	Myo-inositol	$CaCO_3$	Water		
"Asa・Hi × To・Kai"	0	0	0	87	0.3 ± 0.4 [f 5)]	(-) [6)]
	10	0	0	77	91.6 ± 65.9 [c]	(91.3)
	0	1	0	86	12.6 ± 10.1 [e]	(12.3)
	0	0	10	77	18.5 ± 14.3 [de]	(18.2)
	10	0	10	67	461.9 ± 101.4 [a]	(461.6)
	0	1	10	76	188.5 ± 106.5 [b]	(188.2)
	10	1	0	76	42.7 ± 28.2 [d]	(42.4)
"Hitachi"	0	0	0	87	52.7 ± 26.7 [f]	(-)
	10	0	0	77	575.6 ± 104.9 [c]	(522.9)
	0	1	0	86	267.2 ± 153.4 [e]	(214.5)
	0	0	10	77	478.0 ± 191.6 [cd]	(425.3)
	10	0	10	67	1470.9 ± 145.7 [a]	(1418.2)
	0	1	10	76	1054.7 ± 139.7 [b]	(1002.0)
	10	1	0	76	455.3 ± 100.7 [d]	(402.6)
"Nishiki"	0	0	0	87	15.2 ± 10.6 [f]	(-)
	10	0	0	77	339.2 ± 145.7 [d]	(324.0)
	0	1	0	86	126.3 ± 50.0 [e]	(111.1)
	0	0	10	77	482.7 ± 158.3 [d]	(467.5)
	10	0	10	67	1157.5 ± 118.1 [a]	(1142.3)
	0	1	10	76	948.8 ± 123.0 [b]	(933.6)
	10	1	0	76	758.4 ± 147.2 [c]	(743.2)
"Nichi-603-go"	0	0	0	87	12.8 ± 9.8 [f]	(-)
	10	0	0	77	205.5 ± 121.4 [de]	(192.7)
	0	1	0	86	129.3 ± 67.7 [e]	(116.5)
	0	0	10	77	296.5 ± 90.4 [d]	(283.7)
	10	0	10	67	1105.3 ± 197.8 [a]	(1092.5)
	0	1	10	76	740.4 ± 101.4 [b]	(727.6)
	10	1	0	76	503.2 ± 154.0 [c]	(490.4)
"Chu-604-go"	0	0	0	87	37.8 ± 24.4 [e]	(-)
	10	0	0	77	309.3 ± 71.6 [c]	(271.5)
	0	1	0	86	162.2 ± 48.0 [d]	(124.4)
	0	0	10	77	337.6 ± 99.4 [c]	(299.8)
	10	0	10	67	1132.6 ± 208.4 [a]	(1094.8)
	0	1	10	76	838.2 ± 126.1 [b]	(800.4)
	10	1	0	76	263.0 ± 71.0 [c]	(225.2)
"Sawa-J"	0	0	0	87	15.5 ± 12.0 [f]	(-)
	10	0	0	77	465.1 ± 114.2 [b]	(449.6)
	0	1	0	86	93.1 ± 29.7 [e]	(77.6)
	0	0	10	77	154.2 ± 68.3 [d]	(138.7)
	10	0	10	67	1041.5 ± 162.9 [a]	(1026.0)
	0	1	10	76	352.8 ± 110.6 [c]	(337.3)
	10	1	0	76	403.5 ± 104.3 [bc]	(388.0)

[1] "Polyphagous" strains, "Hitachi", "Nishiki", "Nichi-603-go", "Chu-604-go", "Sawa-J", and a normal strain, "Asa・Hi × To・Kai", were tested.
[2] Basal diet contains 10% cellulose and 3% (w/w) agar.
[3] Standard deviation.
[4] Number of replicates
[5] Means, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.
[6] Difference between the means of treatment and control.

「ひたち」及び「朝・日×東・海」におけるショ糖の摂食に関する至適濃度は，それぞれ 5%と 10%，ミオ・イノシトールで 0.5%と１%，炭酸カルシウムでは共に 10%となった。この場合，「ひたち」のショ糖区における 50 頭当りの平均糞数は，858.9 個（補正糞数：805.8 個），「朝・日×東・海」は 90.7（90.6）個，ミオ・イノシトール区で順に 348.6（297.9）個と 13.3（13.1）個，炭酸カルシウム区では 473.1（421.3）個と 19.3（19.1）個となり，「ひたち」のショ糖区の最大糞数は，「朝・日×東・海」の最大糞数の約 9.5 倍（補正倍率：約 8.9 倍），ミオ・イノシトール区で約 26.2（22.7）倍，炭酸カルシウム区では，約 24.5（22.1）倍に相当していた。また，対照区では，「ひたち」が，セルロース，寒天及び水だけで構成される飼料に対しても，積極的な摂食行動を示す（平均糞数/50 頭：52.7 個）ことが確認され，一方で，「朝・日×東・海」の同区における摂食量（糞数）は少なく（平均糞数/50 頭：0.1 個），無視しうる程度の僅かなものであった。

次に，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムの添加濃度を「朝・日×東・海」の各物質の摂食に関する至適濃度（Table 4-1）に調整し，それぞれの物質を 2 種組み合わせ，「ひたち」と「朝・日×東・海」について摂食試験を行った（Table 4-2）。

ショ糖と炭酸カルシウムあるいはミオ・イノシトールと炭酸カルシウムを組み合わせると，第 1 章（Table 1-3）及び 2 章（Table 2-1，2-3）で既に明らかにしたように，蟻蚕の摂食反応性を高める相乗的な効果が現われ，両品種の摂食反応性は著しく向上した。

「ひたち」及び「朝・日×東・海」の 50 頭当たりの平均糞数は，ショ糖と炭酸カルシウムの組み合わせで 1470.9 個（補正糞数：1418.2 個）と 461.9（461.6）個，ミオ・イノシトールと炭酸カルシウムの組み合わせでは，順に 1054.7（1002.0）個と 188.5（188.2）個となり，「ひたち」の各飼料（組み合わせ区）における糞数は，「朝・日×東・海」の糞数のそれぞれ約 3.2 倍（補正倍率：3.1 倍）と約 5.6（5.3）倍を超えていた。

一方，ショ糖とミオ・イノシトールの組み合わせでは，両品種の糞数が，ショ糖単独区とミオ・イノシトール単独区の中間にあることから，ショ糖にミオ・イノシトールを添加すると，ショ糖の効果が弱められることを示している。これは，同組み合わせにおいて摂食に関する相加的な効果が現われることを確認している「東」（Table 1-3）や相乗的な効果が現われる「日 150 号×中 150 号」（未発表データ）の場合とは異なる結果となったが，「ひたち」の飼料に対する摂食反応性は「朝・日×東・海」よりも著しく高く，「ひたち」の糞数は，「朝・日×東・海」の糞数の約 10.7 倍，補正倍率で約 9.5 倍に相当していた。

2. 広食性蚕の摂食反応性の品種間差異

「ひたち」に認められたショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムに（摂食誘起物質）対する強い反応性が，他の広食性系の蚕品種についても認められるものか否かを明らかにするため，「にしき」，「日 603 号」，「中 604 号」及び「沢 J」を用いて，「ひたち」の場合と同様の試験を行なった（Table 4-2）。

各物質を添加した飼料に対する摂食反応性は，品種によって大きく異なることが読み取れるが，同一の飼料における全ての広食性蚕の摂食量（糞数）が，「朝・日×東・海」よりも著しく多くなっている（Mann-Whitney -test, $p<0.05$）。また，同様の傾向が，各広食性蚕と「朝・日×東・海」の同一飼料間の補正糞数を比べた場合にも認められることから，広食性蚕がこれらの摂食誘起物質に対して，鋭敏な反応を示すことが明らかとなった。

今回の実験条件では，「日 603 号」，「中 603 号」及び「にしき」が，炭酸カルシウムに，一方，「沢 J」については，ショ糖に強い反応を示す傾向が見られるが，後者の傾向は，「ひたち」と「朝・日×東・海」にも認められている。

各品種のショ糖区における 50 頭当たりの平均糞数は，「にしき」で 339.2 個（補正糞数：324.0 個），「日 603 号」では 205.5（192.7）個，「中 604 号」は，309.3（271.5）個，「沢 J」で 465.1（449.6）個，

また，ミオ・イノシトール区では，順に 126.3（111.1）個，129.3 個（116.5），162.2（124.4）個，93.1（77.6）個，炭酸カルシウム区で，それぞれ 482.7（467.5）個，296.5（283.7）個，337.6（299.8）個，154.2（138.7）個となり，広食性蚕の糞数は，ショ糖区において「朝・日×東・海」の糞数の約 2.2～5.1 倍（補正倍率：約 2.1～4.9 倍），ミオ・イノシトール区では約 7.4～12.9 倍（6.3～10.1 倍），炭酸カルシウム区で約 8.3～26.1 倍(7.6～25.7)にそれぞれ相当した。

対照区では，全ての広食性蚕に，「にしき」の場合と同様の反応が認められ，各品種の同区における 50 頭当たりの平均糞数は 12.8～37.8 個となった。

また，ショ糖と炭酸カルシウムあるいはミオ・イノシトールと炭酸カルシウムの組み合わせに相乗的な効果が現われ，「にしき」の 50 頭当たりの平均糞数は，ショ糖と炭酸カルシウムの組み合わせで 1157.5 個(補正糞数：1142.3 個)，「日 603 号」は 1105.3（1092.5）個，「中 604 号」では 1132.6(1094.8)個，「沢 J」で 1041.5(1026.0）個，また，ミオ・イノシトールと炭酸カルシウムの組み合わせでは，それぞれ順に 948.8(933.6）個，740.4(727.6）個，838.2(800.4）個，352.8(337.3）個となった。この場合，広食性蚕の糞数は，ショ糖と炭酸カルシウムの組み合わせにおいて，「朝・日×東・海」の糞数の約 2.3～2.5 倍，ミオ・イノシトールと炭酸カルシウムの組み合わせ区では約 1.9～5.0 倍となり，これは，補正倍率で見た場合にも約 2.2～2.5 倍と約 1.8～5.0 倍にそれぞれ相当することから，両組み合わせを構成する異種の摂食誘起物質の相互刺激に対する広食性蚕の反応は，「朝・日×東・海」よりも強いことが確かめられた。

一方，ショ糖とミオ・イノシトールの組み合わせの結果を見ると，「にしき」及び「日 603 号」には相乗的な効果が認められ，「中 604 号」及び「沢 J」については，いずれの糞数にもショ糖単独区の糞数との間に有意差は認められなかった（Wilcoxon-test,$p>0.05$）が，両品種の摂食は，ミオ・イノシトールの添加によって，やや抑制される傾向が見られた。しかし，各品種の飼料（組み合わせ区）に対する摂食反応性は「朝・日×東・海」よりも明らかに高く，広食性蚕の糞数は，「朝・日×東・海」の糞数の約 6.2～17.7 倍，補正倍率で約 5.3 倍～17.5 倍に相当していた。

考　　察

食性正常蚕「朝・日×東・海」と 5 品種の広食性蚕の蟻蚕を用いた今回の試験結果から，広食性蚕が，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムの刺激に対して，強い摂食反応を示すことは明らかである。

広食性蚕の味覚について，矢沢ら（1991）は，電気生理学的な手法を用いて，「あさぎり」及び「沢 J」のショ糖及びミオ・イノシトールに対する受容細胞（L_S 及び L_I 細胞）の受容閾値とサリシン（苦味物質）に対する受容細胞の受容閾値を調査し，両品種の L_S 及び L_I 細胞の機能には食性正常蚕との違いはなく，「あさぎり」と「沢 J」が，摂食阻害物質受容細胞（苦味物質受容細胞）の機能を失った苦味に対する“味盲蚕”であることを報告している。一方，これを追試した朝岡（1996）は，種々の味覚刺激物質（植物の二次代謝産物に由来する物質）に対する広食性蚕と食性正常蚕の摂食阻害物質受容細胞（以下，D 細胞）の受容閾値を比較し，広食性蚕が，D 細胞の機能を失った“味盲蚕”ではなく，サリシンを含む特定の苦味物質に対する D 細胞の感受性が，食性正常蚕よりも著しく低い（D 細胞の受容閾値が高い）味覚異常蚕であることを明らかにした。しかし，朝岡（1996）は，　広食性蚕のショ糖及びミオ・イノシトールに対する受容細胞（L_S 及び L_I 細胞）の機能についは，食性正常蚕との間に大きな違いを認めていない。

これは，矢沢ら（1991）の報告を支持するものであったが，本試験では，供試した全ての広食性蚕が，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムをそれぞれ単独で添加した飼料を良く摂食し，いずれの品種においても同一の飼料（各飼料）に対する摂食反応性は，食性正常蚕（朝・日×東・海）に比べ，著しく高くなった。

広食性蚕のショ糖区における 50 頭当りの平均糞数を補正糞数（各蛾区における試験区の糞数の値から対照区の糞数の値を引いた値の平均値）で見ると，192.7～522.9 個，ミオ・イノシトール区で 77.6～214.5 個，炭酸カルシウム区では 138.7～467.5 個となり，これは，食性正常蚕のショ糖区の補正糞数の約 2.1～5.7 倍，ミオ・イノシトール区で約 6.3～17.4 倍，炭酸カルシウム区では,約 7.6～25.7 倍に相当している（Table 4-2)。

また，2 種の摂食誘起物質を組み合わせ，摂食させると，ショ糖と炭酸カルシウムあるいはミオ・イノシトールと炭酸カルシウムの組み合わせには，蟻蚕の摂食反応性を高める相乗的な効果が認められた。一方，ショ糖とミオ・イノシトールを組み合わせた場合には，品種によって相反する反応（摂食の促進と抑制）が現われるため，一定の関係を見出すことは出来なかったが，Table 4-2 から明らかなように，広食性蚕の 3 組の飼料に対する摂食反応性は食性正常蚕に比べて高くなった。

この場合，広食性蚕の糞数（補正糞数）は，ショ糖と炭酸カルシウムの組み合わせにおいて，食性正常蚕の補正糞数の約 2.2～3.1 倍，ミオ・イノシトールと炭酸カルシウムの組み合わせで約 1.8～5.3 倍，ショ糖とミオ・イノシトールの組み合わせでは，約 5.3～17.5 倍にそれぞれ相当した。

尚，著者は，食性正常蚕「日 150 号×中 150 号」(“大鷲”. 農林水産省農蚕園芸局，1987）についても，同様の調査を行っているが，各飼料に対する 5 品種の広食性蚕の摂食反応性は,「日 150 号×中 150 号」に比べ非常に高く，今回の結果を支持するものとなった（未発表データ)。

以上のことから，広食性蚕が，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムに対して強い反応性を有する異常なカイコであることは明らかであるが，これは同時に，蚕の摂食行動の決定には，L_S 細胞や L_I 細胞などの味覚細胞の機能のみならず中枢神経系の情報処理機能が複雑に関与している（石川・平尾，1963；朝岡，1996）ことを立証することとなった。

昆虫の中枢神経系を構成する神経節は，その機能に上位性が認められている脳以外にもいくつか存在し，それぞれの神経節が，体の各部位の運動の調節に関わる中心的な役割を果たしていることが知られている（冨永，1995)。例えば，食道下神経節（suboesophagel ganglion）は，口器の運動の駆動と制御に関与するものと考えられている（冨永，1995；SHIMIZU,2000)。しかし，蚕が餌を選択し，摂食を始める時に，感覚受容細胞から伝達されたさまざまな情報（入力信号）は，脳内の神経回路でどのような統合や処理が施され，指令（出力信号）として下位の食道下神経節や前額神経節（frontal ganglion）に伝えられているのか，蚕の脳を中心とする中枢神経系の情報処理機構については，ほとんど解明されていない。

人工飼料の食性の研究から，広食性蚕（食性異常蚕）は，桑葉粉末入りの人工飼料に対しても適合性が優れている（横山，1970，1971；藤森ら，1982）ことが明らかにされ，また，著者は，広食性蚕と食性正常蚕（非広食性の原種及び交雑種）を桑葉粉末入りの人工飼料で飼育した場合に，広食性蚕は食性正常蚕に比べ，毛振るいと眠起の揃いが良く，各令期の発育経過が短くなることを認識している。これらの事例について，今回の結果を踏まえて推測すると，広食性蚕の有する個々の摂食誘起物質の刺激に対する摂食反応の強さが，各種の人工飼料に対する適合性の向上に少なからず寄与しているものと考えられる。

また，本研究では，広食性蚕が，主要な摂食誘起物質を含まない対照の飼料（セルロース，寒天及び水だけで構成される飼料）を摂食するという，実に興味深い現象が認められている。この場合，糞数の標準偏差の値から読み取れるように，各品種の摂食量（糞数）は，同一の品種内においても蛾区間で大きく異なり，これに加えて，50 頭当りの平均糞数も，12.8～52.7 個と僅かなものであったが,「朝・日×東・海」,「日 150 号×中 150 号」(未発表データ）及び先の研究で供試した種々の食性正常（非広食性）蚕（Table 2-1)（常山ら，2005）の同一の飼料（対照区）における糞数（平均糞数/50 頭：0～3.6 個）に比べ，広食性蚕の糞数は非常に多く，これは，強い食性選抜によって淘汰された広食性蚕に見られる特異的な現象とも考えられる。

この視点から広食性蚕の特徴を捉えると，確かに広食性蚕は，“味盲蚕”と言えるのかもしれないが，今回得られたいくつかの知見が，他の広食性蚕を用いた場合にも適用されるものか否かについては，さら

に調査が必要であるため，この件に関しては，今後の研究で明らかにして行きたい。また，HAMAMURA *et al.*（1962）,ITO（1960），伊藤（1961）によって，既に摂食誘起作用が確認されている他の物質についても，今回と同様の調査を進め，各物質に対する広食性蚕と食性正常蚕の反応を比較検討したい。

摘　　要

広食性蚕の蟻蚕における摂食誘起物質に対する摂食反応性について調査した。

蚕品種は，広食性系の「ひたち」,「にしき」,「日 603 号」,「中 604 号」,「沢 J」及び対照となる食性正常の「朝・日×東・海」を供試した。また，蚕の摂食誘起物質として，ショ糖，ミオ・イノシトール及び炭酸カルシウムを用いた。

試験は，セルロース粉末，寒天及び水に摂食誘起物質を単独あるいは 2 種組み合わせ加えた飼料を孵化直後の蟻蚕に与え，72 時間後の排出糞数を調査し，この糞数から対照区の糞数を引いた値（補正糞数）によって，飼料中の摂食誘起物質に対する各蚕品種の摂食に関する反応（摂食反応）を評価した。

その結果，いずれの飼料を与えた場合にも，同一の飼料における広食性蚕の摂食量（補正糞数）は，食性正常蚕に比べ顕著に多く，広食性蚕が，これらの摂食誘起物質に対して強い摂食反応を示すことが明らかになった。

第5章 集団育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝解析

第 2 章に記載した研究では，桑の二次代謝産物に由来する炭酸カルシウムが蚕の摂食誘起物質であることを証明した。

本研究（第 5 章）では，この炭酸カルシウムに対する蟻蚕の摂食反応性（摂食する性質）の遺伝様式を明らかにするために，種々の品種の中から,炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ系統と摂食反応性を持たない系統を作出し，両系統の間で F_1,F_2 及び BF_1 交配を行い，それぞれの交雑種について，炭酸カルシウムに対する摂食反応性について調べた。

その結果，蟻蚕 50 頭を供試した集団育では、炭酸カルシウムに摂食反応を示す性質は，摂食反応を示さない性質に対して不完全優性的に遺伝することが明らかになった。

また，炭酸カルシウムに対する摂食反応性に関与する遺伝的要因は，作用力の強い主働遺伝子と作用力の弱い複数の修飾遺伝子によって構成されていることが推測された。さらに，この主働遺伝子については，常染色体上に存在する単一の遺伝子であるものと判断される知見を得たので，以下に述べる。

材料及び方法

a）試験飼料

試験に用いた飼料は，セルロース 10%(w/w)，寒天 3%(w/w)及び蒸留水から成る基本飼料及び基本飼料に炭酸カルシウムを加えた炭酸カルシウム飼料とした。飼料に添加する炭酸カルシウムは試薬特級を使用し，濃度は，蚕の摂食に関する至適濃度である 10%(Table 1-1)（常山・田中,2001）とした。セルロース粉末は飼料用 D（東洋濾紙）を，寒天は細菌培地用（和光純薬）をそれぞれ用いた。飼料の調製にあたっては,各成分を良く混合し,厚さが 3.5 ㎜程度となる容器に入れ,60 分間蒸煮した。

b）摂食試験

供試した蚕品種は，日本種系及び中国種系の広食性の原種 4 品種と非広食性の原種 20 品種である。

調査には，越年処理または冷蔵浸酸処理した蚕種を使用し,同一蛾区（母蛾）から得た孵化直後の蟻蚕

を各処理区に 50 頭ずつ当て，10 蛾反復で試験を行った。調製した飼料を直径 24 ㎜の円盤状に打ち抜き，内径 60 ㎜のシャーレの中央に置いた。

試験は，50 頭の蟻蚕を飼料の上に置き，72 時間後の排出糞数（以下，糞数）を調査し,この糞数を摂食量の指標にした。また,炭酸カルシウム飼料区の糞数（観察値）から基本飼料区（対照区）の糞数（観察値）を引いた値を補正糞数とし，この補正糞数によって，飼料中の炭酸カルシウムに対する各蚕品種の摂食反応性を評価した。

c）摂食個体率

調査には，同一蛾区（母蛾）から得た孵化直後の蟻蚕 100 頭を用いた。蟻蚕の飼育は，12 穴マルチプレートの各ウェル（内径 21 ㎜）内で個別に行い，飼料は前項（b）と同様の方法で作製した円盤状の炭酸カルシウム飼料を八等分し，それぞれの蟻蚕に与えた。72 時間後に飼料を摂食した蚕数を数え，供試した蚕数に対する割合（摂食個体率）を算出した。試験は，10 蛾反復で行った。

d）蛾区選抜

選抜には,各世代につき 20 蛾区を用いた。同一蛾区（母蛾）から得た孵化直後の蟻蚕を炭酸カルシウム飼料と基本飼料に 50 頭ずつ当て，内径 60 ㎜のシャーレ内で飼育した。供試した全ての蛾区について，72 時間後の両飼料における排出糞数を調査し,その結果を基に目的とする蛾区一つを選抜した。なお，継代に用いた蚕は,孵化直後に 10℃で保存した選抜蛾区の蟻蚕を使用した。

各試験の飼育条件は,温度 25℃,湿度 70%,全暗とし,作業はクリーンルーム内で行った。

調査結果について,糞数の処理間差の検定は Wilcoxon の符号順位検定法（以下，Wilcoxon-test）を，また,補正糞数と摂食個体率の品種間差及び交雑種間差の検定については Mann-Whitney の U-検定法（以下，Mann-Whitney-test）を用いて，危険率 5%水準で行った。

結　　果

1. 炭酸カルシウム摂食反応性の品種間差異

広食性及び非広食性の原種 24 品種について，炭酸カルシウムに対する摂食反応性を調べた（Table 5-1）。

始めに，非広食性品種の補正糞数（各蛾区における炭酸カルシウム飼料区の糞数から基本飼料区の糞数を引いた値の平均値）を見ると，各品種の補正糞数は品種間で大きな差異が認められるものの，いずれの品種においても補正糞数が 0.1 個以上となっていることから，供試した全ての品種に炭酸カルシウムに対する摂食反応が認められた。しかし，中国種系の「ぼの」,「海 B（kai-B)」,「中 150 号」,「Tc90」及び「支 108 号」については，対照区の 50 頭当りの平均糞数（以下，平均糞数）と炭酸カルシウム区の平均糞数の間に有意差が認められなかった（Wilcoxon-test,$p>0.05$)。また，今回の調査では，日本種系品種の補正糞数は 5.4～141.6 個，中国系品種では 0.1～104.0 個となり，日本種系品種の炭酸カルシウムに対する摂食反応は，中国種系品種のそれよりもやや強い傾向が認められた。

一方，広食性品種は，非広食性品種に比べ炭酸カルシウムに対する摂食反応は強く，補正糞数は 277.9～464.7 個となった。この場合，特に「ひたち」と「にしき」の摂食反応が顕著であり，両品種の補正糞数（427.3 及び 464.7 個）は，非広食性品種の中で炭酸カルシウムに対して最も強く反応した「小石丸」の補正糞数（141.6 個）のそれぞれ約 3.0 倍と約 3.3 倍に相当した。

2. 炭酸カルシウム摂食系統と不食系統の作出(系統分離)

炭酸カルシウムに対して強い摂食反応を示した「ひたち」及び「にしき」について，1 蛾区当たり蟻蚕 100 頭を個別に飼育し,炭酸カルシウム飼料区における摂食個体の割合を調べた（Table 5-2)。

「ひたち」の炭酸カルシウム飼料区の 10 蛾区当たりの平均摂食個体率（以下，摂食個体率）は 73.4%,

「にしき」では 76.8%となり，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応が見られた両品種においても，飼料を摂食しない個体が多く含まれていることが確認された。また，各品種の摂食個体率の標準偏差の値から読み取れるように，炭酸カルシウム飼料を摂食する個体の割合は同品種内においても蛾区間で大きな差異が認められた。そこで，炭酸カルシウムに対して鋭敏な摂食反応を示す系統の作出を試みた。すなわち，炭酸カルシウム飼料における摂食個体率が高く，同時に対照となる基本飼料を摂食しない蚕を作出するために，「ひたち」と「にしき」を用いて，炭酸カルシウム飼料及び基本飼料における摂食量(糞数)を選抜の基準にして蛾区選抜を 14 世代実施した。

その結果，それぞれの品種から炭酸カルシウム飼料のみに高い摂食性を有する「HF6（ひたちの選抜系統)」と「NF2（にしきの選抜系統)」が得られた。選抜系統の「HF6」及び「NF2」は，いずれも対照の基本飼料区では摂食行動が見られないため，炭酸カルシウム飼料区における平均糞数は，補正糞数と等しくなり，その糞数は順に 769.4 個と 702.7 個となった。これは選抜前の「ひたち」及び「にしき」の平均糞数の約 1.8 倍と約 1.5 倍，補正糞数ではそれぞれ約 1.7 倍と約 1.3 倍に相当した。また，「HF6」及び「NF2」の炭酸カルシウム飼料区の摂食個体率を見ると，「NF2」の摂食個体率は 99.1%，「NF2」では 98.7%となり，両系統の摂食個体率が選抜前の「ひたち」と「にしき」の摂食個体率（73.4%と 76.8%）と比べ著しく向上していることがわかる（Mann-Whitney-test，$p<0.05$)。加えて，いずれの系統においても摂食個体率の蛾区間差が小さくなっていることから，「HF6」(Fig.5-1）及び「NF2」が，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つことが確かめられた。

一方，炭酸カルシウムに対して摂食反応性を持たない系統，すなわち，炭酸カルシウム飼料及び基本飼料を摂食しない蚕の作出には「海 B」と「支 108 号」を用いた。両品種について，上記の「ひたち」及び「にしき」の場合と同様の方法によって 6 世代の蛾区選抜を行った結果，炭酸カルシウム飼料と基本飼料を全く摂食しない「KNF45(海 B の選抜系統)」(Fig.5-1）及び「SNF08（支 108 号の選抜系統)」が選抜された。

Table 5-1. The feeding responses to $CaCO_3$ in the newly hatched larvae of the parent races

Variety [1]	Concentration [2] Substance %(W/W)		No.of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d.) [3] (n=10) [4]	Feces [5] (Mean ± s.d.) (n=10)	Variety	Concentration Substance %(W/W)		No.of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d.) (n=10)	Feces (Mean ± s.d.) (n=10)
	$CaCO_3$	Water				$CaCO_3$	Water		
Nonpolyphagous races					Nonpolyphagous races				
"Asa"	0	87	0.4 ± 0.6 [b 6)]	60.7 ± 30.9	"kai-B"*	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.2
	10	77	61.1 ± 30.7 [a]			10	77	0.1 ± 0.2 [a]	
"Hi"	0	87	0.4 ± 0.7 [b]	15.7 ± 19.0	"Chu-150-go"*	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.3
	10	77	16.2 ± 19.4 [a]			10	77	0.1 ± 0.3 [a]	
"KAI"	0	87	0.5 ± 0.0 [b]	26. 5 ± 20.4	"Ake"*	0	87	0.5 ± 0.6 [b]	2.6 ± 4.3
	10	77	27.0 ± 20.4 [a]			10	77	3.1 ± 4.1 [a]	
"Ryo"	0	87	0.1 ± 0.2 [b]	134.3 ± 73.6	"Tc90"*	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.2 ± 0.4
	10	77	134.4 ± 73.5 [a]			10	77	0.2 ± 0.4 [a]	
"Yo"	0	87	0.2 ± 0.4 [b]	15.8 ± 20.9	"Tsukuba"*	0	87	0.3 ± 0.5 [b]	17.8 ± 11.6
	10	77	16.0 ± 21.1 [a]			10	77	18.2 ± 11.5 [a]	
"So"	0	87	0.2 ± 0.4 [b]	5.4 ± 2.7	"Shi-108-go"*	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.3
	10	77	5.6 ± 2.6 [a]			10	77	0.1 ± 0.3 [a]	
"Nf"	0	87	0.7 ± 0.6 [b]	41.2 ± 21.4	"Raku"*	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	3.3 ± 3.2
	10	77	41.8 ± 21.2 [a]			10	77	3.3 ± 3.2 [a]	
"Nk"	0	87	0.7 ± 0.6 [b]	64.6 ± 30.2	Polyphagous races				
	10	77	65.3 ± 30.1 [a]						
"Koishimaru"	0	87	0.3 ± 0.5 [b]	141.6 ± 60.9	"Hitachi"	0	87	52.7 ± 26.7 [b]	427.3 ± 181.2
	10	77	141.8 ± 61.2 [a]			10	77	480.4 ± 181.9 [a]	
"To"*	0	87	0.8 ± 0.7 [b]	104.0 ± 54.2	"Nichi-603-go"	0	87	11.4 ± 8.7 [b]	277.9 ± 84.3
	10	77	104.8 ± 54.2 [a]			10	77	289.3 ± 85.5 [a]	
"Shi-131-go"*	0	87	1.6 ± 2.7 [b]	79.4 ± 68.1	"Nishiki"*	0	87	14.2 ± 8.6 [b]	464.7 ± 157.2
	10	77	81.1 ± 69.2 [a]			10	77	478.9 ± 153.2 [a]	
"Bono"*	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.2 ± 0.4	"Chu-604-go"*	0	87	36.5 ± 21.2 [b]	293.2 ± 110.5
	10	77	0.2 ± 0.4 [a]			10	77	329.6 ± 104.5 [a]	
"Kenpaku"*	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	25.6 ± 29.1					
	10	77	25.6 ± 29. 1 [a]						

[1] Japanese and Chinese strains were tested, and all the marked varieties(*) belong to Chinese strain.

[2] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.

[3] s.d.; Standard deviation.

[4] Number of replicates

[5] Difference between the values of treatment and control in each laying.

[6] Means in each variety, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.

Table 5-2. The effect of selection by the feeding responses to $CaCO_3$ in the newly hatched larvae of the parent races

Variety [1]	generation [2]	Concentration [3] Substance %(W/W)		No.of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d.) [4] (n=10) [5]	Feces [6] (Mean ± s.d.) (n=10)	Feeding ratio [7] % (Mean ± s.d.) (n=10)
		$CaCO_3$	Water			
"Hitachi"	0	0	87	54.0 ± 24.6 [b 8)]	435.8 ± 188.4 [b 9)]	-
		10	77	489.8 ± 180.3 [a]		73.4 ± 24.2 [b 10)]
(HF6)	14 th	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	769.4 ± 117.6 [a]	-
		10	77	769.4 ± 117.6 [a]		99. 1 ± 1.5 [a]
"Nishiki"	0	0	87	13.7 ± 6.0 [b]	457.5 ± 151.3 [b]	-
		10	77	471.2 ± 151.1[a]		76.8 ± 21.6 [b]
(NF2)	14 th	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	702.7 ± 105.1 [a]	-
		10	77	702.7 ± 105.1 [a]		98.7 ± 2.4 [a]
"kai-B"	0	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.2 ± 0.4 [a]	-
		10	77	0.2 ± 0.4 [a]		-
(KNF45)	6 th	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.0 [a]	-
		10	77	0.0 ± 0.0 [a]		-
"Shi-108-go"	0	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.3 [a]	-
		10	77	0.1 ± 0.3 [a]		-
(SNF08)	6 th	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.0 [a]	-
		10	77	0.0 ± 0.0 [a]		-

[1] The strains of HF6 and NF2 were bred to eat only the diet ($CaCO_3$ diet) consisting of basal diet, 77% water and 10% (w/w) $CaCO_3$, whereas those of KNF45 and SNF08 were bred not to do it.
[2] For selection, twenty layings were used in each generation.
[3] Basal diet contains 10% cellulose and 3% agar.
[4] s.d.; Standard deviation.
[5] Number of replicates
[6] Difference between the values of treatment and control in each laying.
[7] One hundred larvae per laying were reared individually on $CaCO_3$ diets for 72h. The percentage of larvae that excreted feaces was calculated.
[8] Means in each generation, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.
[9), 10)] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Man-Whitney U- test.

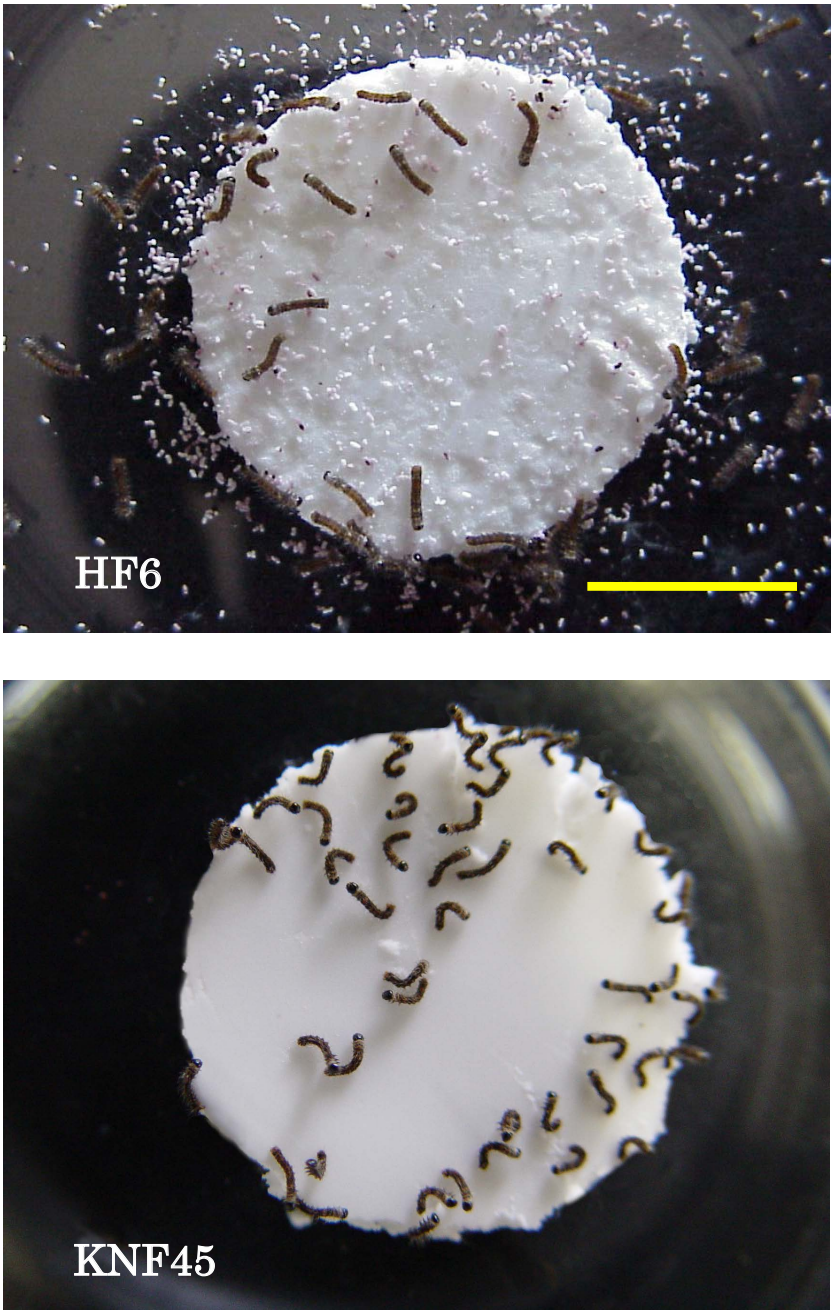


Fig. 5-1. Effect of the selection by the feeding responses to $CaCO_3$ in the newly hatched larvae. HF6 strain was bred to eat only the $CaCO_3$ diet consisting of basal diet and 10% (w/w) $CaCO_3$, whereas KNF45 strain was bred not to do it. Fifty larvae were tested on each $CaCO_3$ diet. The photographs were taken at 72 h after feeding. The yellow bar in the photograph (above) shows 1 cm.

3. 集団育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝様式

蟻蚕 50 頭を供試した集団育における炭酸カルシウムに対する摂食反応性の遺伝様式を明らかにするために，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ系統（以下，摂食系統）として「HF6」と「NF2」を，摂食反応性を持たない系統（以下，不食系統）として「KNF45」と「SNF08」を用いて，摂食系統「HF6」と不食系統「KNF45」ならびに摂食系統「NF2」と不食系統「SNF08」の間で F_1,F_2 及び BF_1 交配を行い，各交雑種について摂食反応を調べた（Table 5-3）。

始めに，摂食系統「HF6」と不食系統「KNF45」の F1 交雑種について補正糞数を見ると，「HF6×KNF45」及び「KNF45×HF6」の補正糞数がそれぞれ 245.1 個と 236.3 個となり，正逆交雑種の炭酸カルシウムに対する摂食反応に差異は認められなかった（Mann-Whitney-test, $p>0.05$）。しかし，両 F_1 交雑種の糞数が親となる摂食系統「HF6」の補正糞数の 1/3 程度となったことから，炭酸カルシウムに対して鋭敏な摂食反応を示す「HF6」と全く摂食反応を示さない「KNF45」を交配すると「HF6」の持つ摂食反応性が弱められることが確かめられた。

また，F_2 交雑種及び F_1 交雑種に摂食系統「HF6」を戻し交配した BF_1 交雑種の補正糞数はそれぞれ 302.3 個と 495.9 個となり，F_2 交雑種の摂食反応は F_1 交雑種（正逆交雑種）に対して，BF_1 交雑種の摂食反応は F_2 交雑種に対してそれぞれ有意に強かった（Mann-Whitney-test, $p<0.05$）。

しかし，F_1 交雑種に不食系統「KNF45」を戻し交配した BF_1 交雑種の摂食反応は他の交雑種と比べて明らかに弱く（Mann-Whitney-test, $p<0.05$），その補正糞数は F_1 交雑種の同糞数の 1/2 程度となった。

一方，摂食系統「NF2」と不食系統「SNF08」の F_1,F_2 及び BF_1 交雑種の炭酸カルシウムに対する摂食反応は，総じて，摂食系統「HF6」と不食系統「KNF45」の交雑種の場合と同様の結果となった。すなわち，F_1 交雑種においては，正逆いずれの場合も摂食系統「NF2」の有する摂食反応性が顕著に弱められた。

これに対して，F_2 交雑種の反応は F_1 交雑種（正逆交雑種）よりも強く現われるものの，その強さは F_1 交雑種に摂食系統「HF6」を戻し交配した BF_1 交雑種には及ばなかった（Mann-Whitney-test,$p<0.05$）。また，F_1 交雑種に不食系統「SNF08」を戻し交配した BF_1 交雑種の摂食反応は最も弱く（Mann-Whitney-test, $p<0.05$），その補正糞数は F_1 交雑種の同糞数の 1/2 程度であった。

考　　察

炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ摂食系統と,摂食反応性を持たない不食系統を用いた今回の交雑試験の結果から，蟻蚕 50 頭を供試した集団育では，炭酸カルシウムに摂食反応を示す性質（摂食する性質）が摂食反応を示さない性質（摂食しない性質）に対して不完全優性的に遺伝することが明らかとなった。

炭酸カルシウムは桑葉中に含まれる蚕の嗜好性物質の一つである（Table2-1）が，この炭酸カルシウムに対する摂食反応を，広食性系品種を含む 24 品種の原種について調べた結果，各品種の反応には品種間で大きな差異があることが確かめられた（Table 5-1）。また，同様の傾向が日本種及び中国種の各系統内の品種間の摂食反応を比べた場合にも認められる。このように，炭酸カルシウムに対する摂食反応性は，遺伝的変異が大きい形質であると見なされる。

Table 5- 3. The feeding responses to $CaCO_3$ in the newly hatched larvae of the hybrids

Crossing (♀×♂)	Concentration[1] Substance %(W/W)		No.of feces per 50 larvae after 72h (Mean ± s.d.) [2] (n=10) [3]	Feces [4] (Mean ± s.d.) (n=10)
	$CaCO_3$	Water		
HF6	0	87	0.0 ± 0.0 [b 5]	781.2 ± 119.6 [a 6]
	10	77	781. 2 ± 119.6 [a]	
KNF45	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.0 [f]
	10	77	0.0 ± 0.0 [a]	
HF6 × KNF45（F_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	245.1 ± 35.2 [d]
	10	77	245.1 ± 35.2 [a]	
KNF45 × HF6（F_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	236.3 ± 26.3 [d]
	10	77	236.3 ± 26.3 [a]	
HF6 × KNF45（F_2）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	302.3 ± 41.2 [c]
	10	77	302.3 ± 41.2 [a]	
(HF6 × KNF45) × HF6（BF_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	493.8 ± 70.6 [b]
	10	77	493.8 ± 70.6 [a]	
(HF6 × KNF45) × KNF45（BF_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	131.0 ± 25.4 [e]
	10	77	131.0 ± 25.4 [a]	
NF2	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	708.8 ± 100.6 [a]
	10	77	708.8 ± 100.6 [a]	
SNF08	0	87	0.0 ± 0.0 [a]	0.0 ± 0.0 [f]
	10	77	0.0 ± 0.0 [a]	
NF2 × SNF08（F_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	99.4 ± 25.9 [d]
	10	77	99.5 ± 24.9 [a]	
SNF08 × NF2（F_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	111.3 ± 37.1 [d]
	10	77	111.3 ± 37.1 [a]	
NF2 × SNF08（F_2）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	211.8 ± 30.4 [c]
	10	77	211.8 ± 30.4 [a]	
(NF2 × SNF08) ×NF2（BF_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	428.0 ± 76.0 [b]
	10	77	428.0 ± 76.0 [a]	
(NF2 × SNF08)× SNF08（BF_1）	0	87	0.0 ± 0.0 [b]	46.8 ± 9.4 [e]
	10	77	46.8 ± 9.4 [a]	

[1] Basal diet contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.
[2] Number of replicates.
[3] s.d.; Standard deviation.
[4] Difference between the values of treatment and control in each laying.
[5] Means in each crossing, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Wilcoxson signed-ranks test.
[6] Means in column, followed by the same letter, are not significantly different at P=0.05 by Man-Whitney U- test.

食性の遺伝学的な研究によって，桑入りの人工飼料摂食性は優性的（山本・清水，1982）に,一方，LP-1 人工飼料摂食性は劣性的（神田ら，1988）にそれぞれ遺伝することが明らかにされている。また，大沼・田島(1996),大沼（1997）は，桑とモリンを含まない準合成飼料を摂食する異常形質が不完全優性的に遺伝することを報告しているが，いずれの場合も摂食性に関与する遺伝的要因は，作用力の強い少数の主遺伝的要因と作用力の弱いポリジーン系の要因で構成されていると考えられている。

本研究の場合，Table 5-2 によって摂食系統「HF6」及び「NF2」の育成経過を見ると，いずれの系統においても炭酸カルシウム飼料による選抜効果が現われ，両系統の補正糞数が選抜前の「ひたち」と「にしき」のそれに比べて顕著に向上していることが確認できる（Mann-Whitney-test，$p<0.05$）。このことから，炭酸カルシウムに対する摂食反応性に関与する主働遺伝子の存在が考えられた。しかし，補正糞数の標準偏差の値から読み取れるように，強い選抜によって作出された「HF6」及び「NF2」においても，その摂食量を示す補正糞数は,同一系統内の蛾区間で大きく異なっていた。今回，著者は，炭酸カルシウムに対する摂食反応性が弱い「日」（Table 5-1）について,「ひたち」と「にしき」の場合と同様の選抜を行ったが，その選抜効果は，低いレベルであった（未発表）ことから，炭酸カルシウムに対する摂食反応性（以下，炭酸カルシウム摂食反応性）を支配する遺伝的要因には，主遺伝的要因以外にもこれを修飾するいくつかの遺伝的要因が関与しているものと推測された。

上述したように，本研究の結果では，炭酸カルシウム摂食反応性が不完全優性的に遺伝することを示すものであったが，摂食系統「HF6」と不食系統「KNF45」及び摂食系統「NF2」と不食系統「SNF08」の各組み合わせの F_1 交雑種における反応は，いずれの組み合わせの場合も正逆交雑種の間で差異が認められなかった(Table 5-3)。また，炭酸カルシウム摂食反応性に関与する主働遺伝子の数を一つ（仮名：*Cacf*）と想定して，摂食系統「HF6」と不食系統「KNF45」の組み合わせにおける F_2 及び BF_1 交雑種の糞数の期待値を Table 5-3 の原種の補正糞数（観察値）と F_1 交雑種の補正糞数（正逆交配の観察値の平均値）を用いて算出してみると，F_2 交雑種の理論上の分離比は *Cacf*/*Cacf*,*Cacf*/+,+/+の 3 つの遺伝子型が 1:2:1 の割合で出現することになることから，F_2 の期待値は，F_2 の *Cacf*/*Cacf* に「HF6」の補正糞数 781.2 個を，*Cacf*/+には「HF6×KNF45」の正逆の補正糞数の平均 240.7 個を,そして+/+には「KNF45」の補正糞数 0 個をあてはめて，(781.2＋2×240.7＋0）/4=315.7 個となる。一方，F_1 交雑種に摂食系統及び不食系統をそれぞれ戻し交配した BF_1 交配では,*Cacf*/*Cacf*, *Cacf*/+あるいは *Cacf*/+,+/+の 2 つ遺伝子型が 1:1 の割合で出現することから,「(HF6×KNF45）×HF6」の期待値は，(781.2＋240.7）/2=511.0 個に,また,「(HF6×KNF45）×KNF45」のそれは，(240.7＋0）/2=120.4 個となる。同様に，摂食系統「NF2」と不食系統「SNF08」の組み合わせでは，F_2 及び BF_1 の期待値がそれぞれ 229.9 個，407.1 個，52.7 個となり，いずれの組み合わせの場合も各期待値が観察値である補正糞数とほぼ一致する。

以上のことから，炭酸カルシウム摂食反応性に関与する主働遺伝子は，作用力の強い一個の遺伝子で構成され，その座位は常染色体上にあると考えられた。

今回の遺伝解析には，炭酸カルシウムの摂食系統として広食性の品種から選抜した系統を用いたが（Table 5-2)，非広食性品種「東」から選抜した系統を用いた場合にも，その形質が不完全優性の遺伝様式にしたがって遺伝することが確かめられている（未発表)。広食性蚕は非広食性蚕に比べ，各種の摂食誘起物質に対して強い摂食反応を示す特殊な蚕である(Table 4-1,2)。しかし，電気生理学的な研究では,広食性蚕の摂食誘起物質に対する味覚細胞（受容細胞）の機能に非広食性蚕との間に大きな差異は認められないことが示されている（朝岡,1996; ASAOKA,2000)。このことから，広食性蚕の摂食誘起物質に対する特異的な反応性は中枢神経系の情報処理機能の違いに起因するところが大であると考えられる。したがって，広食性蚕と非広食性蚕の炭酸カルシウム摂食反応性を支配する遺伝的要因は，同一性のあるものと推測される。

摘　　要

炭酸カルシウムに対する蟻蚕の摂食反応性の遺伝様式を明らかにするために，系統分離と遺伝解析を行った。

種々の品種の中から，摂食量（排出糞数）を指標とした蛾区選抜法による食性選抜と継代を繰り返すことにより，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ系統と摂食反応性を持たない系統を作出した。

試験は，両系統の間で F_1,F_2 及び BF_1 交配を行い，それぞれの交雑種の炭酸カルシウムに対する摂食反応性について調べた。

セルロース粉末，寒天及び水から成る基本飼料と基本飼料に 10％の炭酸カルシウムを加えた飼料を孵化直後の蟻蚕（50 頭）に与え，全暗 72 時間の排出糞数（以下，糞数）を調査し，飼料中の炭酸カルシウムに対する各交雑種の摂食反応性を評価した。

その結果，蟻蚕 50 頭を供試した集団育では、炭酸カルシウムに摂食反応を示す性質（炭酸カルシウムを摂食する性質）は，摂食反応を示さない性質（摂食しない性質）に対して不完全優性的に遺伝することが明らかになった。

また，炭酸カルシウムに対する摂食反応性（摂食する性質）に関与する遺伝的要因は，作用力の強い主働遺伝子と作用力の弱い複数の修飾遺伝子によって構成されていることが推測された。さらに，この主働遺伝子については，常染色体上に存在する単一の遺伝子であると考えられた。

第6章 個体育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝解析

第 5 章に記載した研究では、炭酸カルシウムに対する摂食反応性（以下，炭酸カルシウム摂食反応性）の遺伝様式を蟻蚕 50 頭供試して集団で調査し，この摂食反応性が不完全優性的に遺伝することを明らかにした。さらに、この形質を強力に支配する単一の主働遺伝子が常染色体上に存在すると判断できる知見が得られた。

蚕では遺伝解析法として，突然変異形質をマーカーに利用した方法が古くから確立されている（田島・町田，1958，1959；山本，1983；大沼・田島，1989，1990；蜷木ら，1996；大沼，1997；江口ら，2007）。また，近年には，原らによって EST 化されたｃDNA クローンの RFLP （Restriction Fragment Length Polymorphism：制限酵素断片長多型）をマーカーに用いた完全連関による連関検索法（Scanning linkage analysis：以下，SLA 法）と，3 点実験法を改良した同 RFLP マーカーによる座位決定法（Mapping for Back Cross：以下，BCMAP 法）が開発されている（原ら，2001；原ら，2002； Kadono-Okuda *et al.*,2002； Ogoi *et al.*，2003；Mase *et al.*，2007；原，2007）。この分子マーカーを利用した遺伝解析法によって，これまでに食性異常（Mase *et al.*，2007），ウイルス病抵抗性（Ogoi *et al.*，2003；Hara *et al.*，2007），蛾の寿命（李ら，2008），緑繭（原ら，2009）などの種々の形質を支配する主働遺伝子の座位が分子遺伝子地図上（Nguu *et al.*，2005；原，2008）に決定されている。

遺伝解析を行うためには，個体別にその発現形質を分離する必要があり，食性形質に対する遺伝解析の場合，目的とする飼料を摂食した個体と摂食しない個体の分離が毛振るいを指標にして行われている。しかし，糖やタンパク質などの主栄養源を含まない炭酸カルシウム飼料を摂食した蚕には毛振るいが見られないことから，炭酸カルシウム摂食反応性を支配する主働遺伝子の解析を行うためには，個体別に蚕を飼育し，排泄される糞によって摂食の判定を行う必要があると考える。さらには，この遺伝的要因に加えて，飼育密度などの環境的要因や生理的要因が蚕の摂食行動に影響を与える（蜷木ら，1997；山本，1983）ことも報告されている。

そこで，本研究（第 6 章）では，新たに，炭酸カルシウム摂食系統「HF6」と同不食系統「KNF45」 の間でF_1ならびにBF_1交配を行い，各交雑種について個体別に摂食反応を調べた。

その結果，個体育では，蟻蚕 50 頭供試した集団育の場合とは異なり，炭酸カルシウム摂食反応性が劣性的な形質とみなせることが判明した。さらに，この形質を支配する主働遺伝子を炭酸カルシウム摂食遺伝子（calcium carbonate preference ： 記号 *cacp*）と命名し，原らの開発した SLA 法及び BCMAP 法によって遺伝解析を行ったところ，*cacp* 遺伝子が分子遺伝子地図上の第 9 連関群（ｃDNA クローンリンケージグループ 9：RFLG9)に所属することが明らかになり，その遺伝子座は RFLG9 において 0 の位置であるｃDNA クローン m162 から 21.4cM の距離にあることが推測される結果を得たので，以下に述べる。

材料及び方法

a) 試験飼料

飼料の作製は，第 5 章の材料及び方法の a)に記載した試験飼料の作製法に準じて行った。

b) 摂食試験

蚕品種は，第 5 章に記載した炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ系統「HF6（限性蚕)」(以下，炭酸カルシウム摂食系統「HF6」）と摂食反応性を持たない系統「KNF45（姫蚕)」(炭酸カルシウム不食系統「KNF45」）ならびに両者の正逆 F_1 交雑種と BF_1 交雑種を用いた。調査には，越年処理または冷蔵浸酸処理した蚕種を使用し,同一母蛾から得た孵化直後の蟻蚕 100 頭を対照となる基本飼料区に，残りの蟻蚕の全て(試験区によっては一部)を炭酸カルシウム飼料区にそれぞれ割り当て試験を行った。蟻蚕の飼育は，飼料区別に分けた 12 穴マルチプレートの各ウェル（内径 21 ㎜）内で個別に行い，前項（a）の方法で調製した各飼料を直径 24mm の円盤状に打ち抜いた後，これを 8 等分し，ウェル内のそれぞれの蟻蚕に与えた。72 時間後の排出糞数（以下，糞数）を調査し,この糞数を摂食量の指標にした。また，供試した蚕数に対する飼料を摂食した蚕数の割合（摂食個体率）を飼料区ごとに算出し，基本飼料区（対照区）における摂食個体率が 0%となる試験区では，炭酸カルシウム飼料区の摂食個体率によって，各交雑種の炭酸カルシウムに対する摂食反応性を評価した。なお，飼育条件は,温度 25℃,湿度 70%,全暗とし,作業はクリーンルーム内で行った。

c) DNA の調製と Southern blot hybridization による RFLP の検出

試料となる蚕は－20℃で凍結保存した 4 齢起蚕を用いた。また，DNA の調製法及び Southern blot hybridization による RFLP の検出は，原らの手法（原ら，2002）に準じて行った。

1） DNA の調製

凍結保存した蚕は乳鉢に入れた液体窒素中で個別に粉砕し，試料の 10-15 倍量となる 200μg/ml の Protenase K を含む DNA 抽出 buffer（50mM EDTA，0.2%SDS ）に混ぜ，50℃で 60 分間インキュベートした。試料溶液に等量のフェノールを加え 30 分間ゆっくり撹拌した後，3,000rpm で 10 分間遠心し，2 層に分離した DNA を含む上層（水層）のみを別の容器に回収した。再度，フェノールを加え，撹拌することでタンパク質を丁寧に除いた後，2 回目の遠心を行い，回収した上層（水層）を 2-ブタノール処理により 2.5ml 程度の溶液に濃縮した。試料溶液中に含まれる 2-ブタノールをジエチルエーテルで除去し，さらに 60℃の湯煎でジエチルエーテルを完全に蒸発させた後，塩化セシウムを加え，溶液中の塩化セシウムの最終濃度が 1g/ml になるように調製した。次に試料溶液に 10mg/ml の EtBr を 35μl 加え，これを暗所にて 1 時間放置した後， 70,000rpm で 16 時間遠心した。分離した DNA 層を別の容器に移し，再度，100,000rpm で 3 時間遠心した後，回収した DNA 溶液（DNA 層）中に含まれる EtBr を 2-プロパノールで除去し，さらに，TE（10 mM Tris-HCl pH7.5，1mM EDTA）液中での透析により塩化セシウムを取り除いた。波長 260nm を用いた吸光度によって試料溶液中の DNA を定量し，TE で DNA の最終濃度（試料濃度）を

0.2μg/μl に調製した。

2) Southern blot hybridization による RFLP の検出

前項（c－1）で調製した個体別 DNA は制限酵素で消化した後，アガロースゲル電気泳動（1%，1×TPE ）法によって，1 レーン当たり 1μg の DNA を泳動した。泳動が終了したゲル中の DNA は 2 規定の塩酸中で切断処理し，さらに 0.5 M 水酸化ナトリウムで単鎖に変性させた後，バキュームブロッティング法により DNA をナイロンフィルターへ転写した。フィルター上の DNA の固定化は UV 照射によって行い，フィルターとの結合をより強固にするために，さらに 120℃で 30 分間インキュベートした。DNA の固定化（ブロッティング）が終了したフィルターは 42℃で振とうしながらハイブリダイゼーション buffer（50%フォルムアミド，5xSSC， 0.2%SDS，0.5%ブロッキング溶液）中で 4 時間プレハイブリダイゼーションした後，EST 化した c DNA クローンから作製した DIG 標識のリボプローブ(以下，プローブ)を加え，12 時間のハイブリダイゼーションを行った。RFLP の検出は，フィルター上の DNA にハイブリダイズした DIG 標識リボプローブとアルカリフォスファターゼを結合した DIG 抗体（Roche Diagnostics，Mannheim，Germany）を反応させ，次に，基質を含む溶液（Roche Diagnostics，Mannheim，Germany）中で，アルカリフォスファターゼと基質を反応させることによって発生する光をＸ線フィルムに感光させて行なった。なお，同フィルム上に検出された RFLP のシグナル(バンド)は，上記したように c DNA クローンから作製したリボプローブを用いて検出したものであるが，本報では，便宜上，c DNA クローンをプローブに用いて検出したシグナル(以下，バンド)と記した。

3) 連関検索と座位決定

炭酸カルシウム摂食遺伝子の連関検索には，前項（b）の摂食試験に供試した BF_1 交雑種「(HF6×KNF45)♀×HF6♂」における炭酸カルシウム飼料摂食個体の中から，試験開始から 72 時間後の排出糞数(以下，糞数)が 15 個以上の蚕を供試した。一方，同遺伝子の座位決定には連関検索の逆の交配形式となる BF_1 交雑種「HF6♀×（HF6×KNF45）♂」の炭酸カルシウム飼料区における同糞数が 8 個以上の蚕を用いた。蟻蚕の炭酸カルシウム飼料に対する摂食量（糞数）を基準に選抜したこれら BF_1 の蚕は，人工飼料で 3 令まで飼育し，その４齢起蚕を遺伝解析用の試料として－20℃で凍結保存した。

凍結保存した BF_1 ならびにその両親となる蛾の個体別 DNA の調製法と RFLP の検出法については前項(3)に記載した手順で行い，DNA の消化には *Eco*RⅠ，*Hin*dⅢ，*Bam* HⅠ，*Kpn*Ⅰ，*Sac*Ⅰの 5 種の制限酵素を用いた。連関検索は，原らの開発した EST 化した c DNA クローンの RFLP をマーカーに利用した Scanning linkage analysis 法（以下，SLA 法）によって行い，座位決定については 3 点実験法を改良した同 RFLP マーカーによる Mapping for Back Cross 法（以下，BCMAP 法）で行った（原ら，2001；原ら，2002；Kadono-Okuda *et al.*，2002； Ogoi *et al.*，2003；Mase *et al.*，2007；原，2007；李ら，2008；原ら，2009)。

また，遺伝解析に用いた c DNA クローンとその所属連関群（c DNA クローンリンケージグループ：以下，RFLG）を分子遺伝子地図（Nguu *et al.*，2005；原，2007）における RFLG の番号順に列記すると，m289（RFLG1)，m715（RFLG2)，e97（RFLG3)，m45（RFLG4)，ep32（RFLG5)，m122（RFLG6)，e53（RFLG7)，e12（RFLG8)，e42 及び m208 （RFLG9） ，m513（RFLG10)，e90（RFLG11)，e29（RFLG12） ，m23（RFLG13)，e95（RFLG14)，m581（RFLG15） ，e101（RFLG16)，m274（RFLG17)，m142（RFLG18)，m194（RFLG19)，e96（RFLG20)，m250（RFLG21） ，m69（RFLG22)，m114（RFLG23)，m111（RFLG24） ，m92（RFLG25)，m332（RFLG26)，m21（RFLG27），m449（RFLG28）である。

結　　果

1. 個体育における炭酸カルシウム摂食反応性とその遺伝様式

主栄養源を含まない炭酸カルシウム飼料を摂食した蚕には毛振いが見られない。そのため，集団育では各個体における摂食の可否の判定ができないことから，炭酸カルシウム摂食反応性を支配する主働遺伝子の解析を進めるにあたり，炭酸カルシウム摂食系統「HF6」（以下，摂食系統「HF6」）と炭酸カルシウム不食系統「KNF45」（以下，不食系統「KNF45」）の間で F_1 ならびに BF_1 交雑種を作出し，それぞれの交雑種について個体別に摂食反応を調べた（Table 6-1）。

Table 6-1. The feeding responses to $CaCO_3$ in the newly hatched larvae of the crossings

Crossing (♀×♂)	Hatching ability (%)	Concentration[1] Substance % (w/w) $CaCO_3$	Water	Total number of tested larvae[2] (%)	No. of feeding larvae (%)	No. of non-feeding larvae (%)	No. of feces in the feeding larvae	χ^2-test in BF_1 generation (1:1)[3]
HF6	95.2	0	87	100 (100)	0 (0)	100 (100)	-	-
		10	77	324 (100)	321 (99.1)	3 (0.9)	3 to 34	-
KNF45	94.8	0	87	100 (100)	0 (0)	100 (100)	-	
		10	77	319 (100)	0 (0)	0 (100)	-	
HF6×KNF45 (F_1)	93.2	0	87	100 (100)	0 (0)	100 (100)	-	-
		10	77	361 (100)	9 (2.5)	342 (97.5)	1 to 7	
KNF45×HF6 (F_1)	92.4	0	87	100 (100)	0 (0)	100 (100)	-	-
		10	77	352 (100)	6 (1.7)	346 (98.3)	1 to 6	
(HF6×KNF45)×HF6 (BF_1)	98.5	0	87	100 (100)	0 (0)	100 (100)	-	
		10	77	428 (100)	223 (52.1)	205 (47.9)	1 to 36	p=0.384>0.05
(HF6×KNF45)×KNF45 (BF_1)	94.7	0	87	100 (100)	0 (0)	100 (100)	-	
		10	77	451 (100)	6 (1.3)	445 (98.7)	1 to 4	-
HF6×(HF6×KNF45) (BF_1)	96.2	0	87	100 (100)	0 (0)	100 (100)	-	
		10	77	437 (100)	231 (52.9)	206 (47.1)	1 to 41	p=0.232>0.05

1) Basal diet (feed) contains 10% cellulose and 3%(w/w) agar.

2) The larvae, which derived from eggs of the same maternal moth, were assigned to treatment and control, and the each larva was reared in a plastic container of 21mm in diameter individually .

3) Observed significance level of χ^2- test in BF_1 generation (1:1 ; p= 0.05) .

初めに，摂食系統「HF6」と不食系統「KNF45」の F_1 交雑種について炭酸カルシウム飼料に対する摂食個体率をみると，「HF6×KNF45」が 2.5%，「KNF45×HF6」は 1.5%となり，個体育では，正逆いずれの交雑種においてもほとんどの蚕が炭酸カルシウムに対して摂食反応を示さないことがわかる。また，炭酸カルシウム飼料を摂食した蚕の排出糞数（以下，糞数）を調べると，「HF6×KNF45」で 6 及び 7 個の糞を，「KNF45×HF6」では 6 個の糞を排出した蚕がそれぞれ 1 頭ずつ観察されたものの，これらを除く摂食個体の糞数はいずれの交雑種においても 2 個以下となった。

一方，F_1 交雑種「HF6×KNF45」に摂食系統「HF6」を戻し交配した BF_1 交雑種「(HF6×KNF45) ×HF6」では，摂食個体の糞数に大きな差異が認められ，糞数は 1～34 個の間に広く分布したが（Fig. 6-1)，摂食個体と非摂食個体の割合はほぼ 1：1 となり（χ^2-test，$p>0.05$)，摂食個体率は 52.1%となった。また，F_1 交雑種に不食系統「KNF45」を戻し交配した BF_1 交雑種「(HF6×KNF45) ×KNF45」では炭酸カルシウム飼料を摂食した蚕は少なく，摂食個体率は 1.3%であった。これらの結果から個体育では，炭酸カルシウム摂食反応性が劣性的な形質とみなせるものと考えられるので，この形質を支配する主働遺伝子を炭酸カルシウム摂食遺伝子（calcium carbonate preference:記号 *cacp*）と命名した。

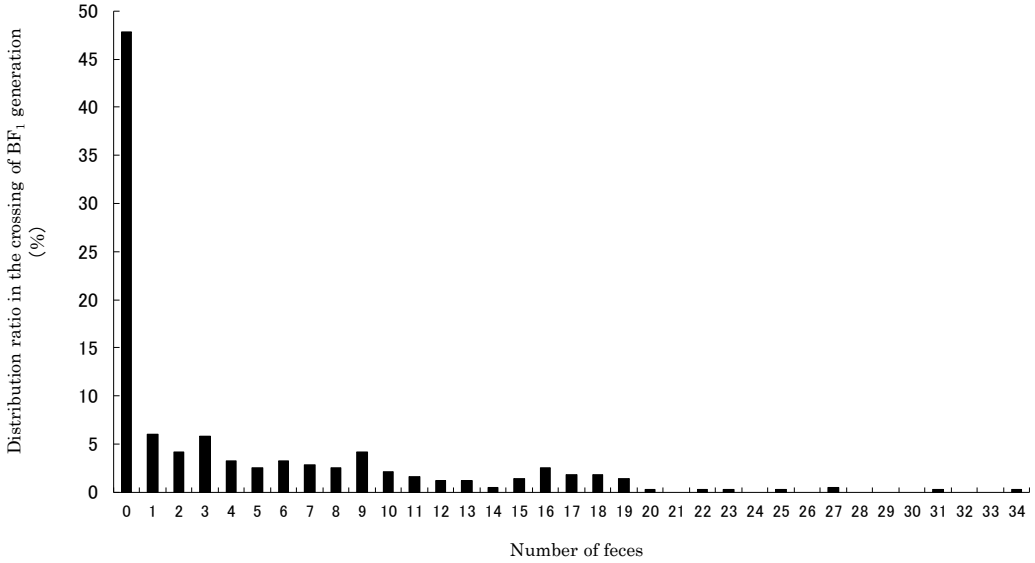


Fig. 6-1. Distribution ratio according to the individual consumption for the calcium carbonate diet (feed) in the newly hatched larvae of the crossing of BF_1 generation, (HF6×KNF45)×HF6.

The larvae were reared on the $CaCO_3$ diet (feed) at 25℃ in the dark for 72 hrs, and the consumption for the diet of each larva was estimated by the number of feces excreted since the start of feeding.

ここで，次の RFLP マーカーによる遺伝解析に移る前に，*cacp* 遺伝子と第１連関群（突然変異形質マーカーによって作製された連関地図の第１連関群：Z 染色体）との連関関係について検討してみた。仮に *cacp* 遺伝子が第１連関群に所属するとするならば，不食系統「KNF45」を雌とした F_1 交雑種では，炭酸カルシウムに対して摂食反応性を有する雌個体によって，その摂食個体率が，摂食系統「HF6」を雌とした F_1 交雑種のそれよりも顕著に高くなるはずであるが，Table 6-１に示した摂食試験の結果をみると，両者の摂食個体率に大きな差異は認められなかったことがわかる。また，F_1 交雑種「HF6×KNF45」に摂食系統「HF6」の雌と雄をそれぞれ交配した正逆の BF_1 交雑種を用いた摂食試験では，摂食個体の一部を飼育し，4 齢起蚕時に斑紋（限性蚕：♀形蚕，♂姫蚕）によって幼虫の雌雄を鑑別してみると，いずれの交雑種の場合にも，雌雄比に大きな偏りが見られなかった（未発表)。以上の結果から，*cacp* 遺伝子は第１連関群と独立の関係にあると判断された。

2. SLA 法による炭酸カルシウム摂食遺伝子 *cacp* の連関検索

炭酸カルシウム食遺伝子 *cacp*（以下，*cacp* 遺伝子）の分子遺伝子地図上（Nguu *et al.*,2005；原，2007）での所属連関群を明らかにするために，BF_1 交雑種「(HF6×KNF45) ♀×HF6♂」における炭酸カルシウム飼料摂食個体を供試して SLA 法による同遺伝子の連関検索を試みた（Table 6-1,6-2 ；Fig. 6-1, 6-2)。

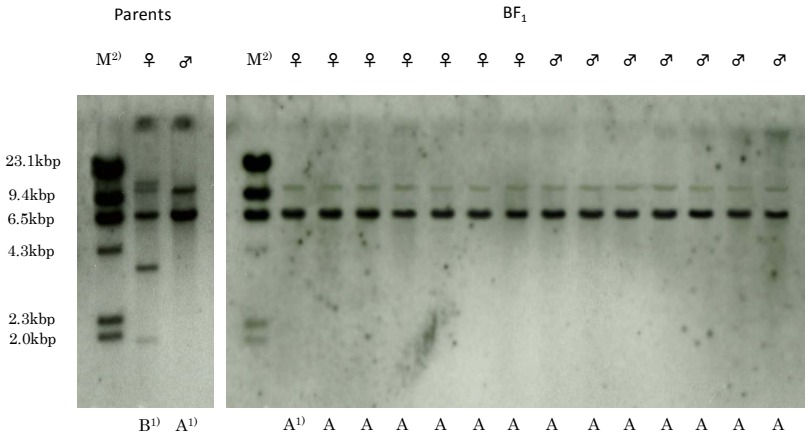


Fig.6-2 Southern blot analysis of parental moths,HF6×KNF45(♀) and HF6(♂), and their BF_1 generation, (HF6×KNF45)×HF6.

Genomic DNA was digested with *Hin*dⅢand probed with cDNA clone, e42 which belongs to RFLG 9 (the ninth cDNA clone linkage group).
1) The banding patterns were designated as homozygote (A) and heterozygote (B).
2) λ-*Hin*dⅢ molecular marker.

連関検索に際して，初めに，Table 6-1 に示した BF_1 交雑種の炭酸カルシウム飼料に対する摂食個体率をみると， 52.1%となり，この値から同 BF_1 交雑種の炭酸カルシウム飼料摂食個体（以下，摂食個体）の中には，*cacp* 遺伝子がヘテロ型(*cacp* /＋)のものとホモ型(*cacp* /*cacp*)のものが混在することが推測される。また，*cacp* 遺伝子がヘテロ型である F_1 交雑種「HF6×KNF45」において，個体数は 1 頭のみであったが最大 7 個の糞を排出する蚕が確認されている（Table 6-1)。これらのことから，*cacp* 遺伝子の連関検索には，これらヘテロ型の摂食個体の混入を防ぐため，同遺伝子が確実にホモ型と考えられる糞数 15 個以上の BF_1 摂食個体(Fig. 6-1)の 4 齢起蚕における DNA をランダムに選んだ 14 頭（雌雄各 7 頭）から個別に抽出し，これを供試した。抽出した各個体の DNA は，5 種の制限酵素で消化した後，分子遺伝子地図の 28 の連関群（RFLG１～28）にそれぞれ属する c DNA クローン（原，1997）をプローブに用いて個体別の RFLP を調べた(Table 6-2)。なお，*cacp* 遺伝子と独立の関係にあることが既に示されている連関地図・第１連関群（Z 染色体）に対応する RFLG1 においては，供試個体（限性蚕）の雌雄を RFLP のバンドパターンの差異によって判別できることを確認するために RFLP を調査した。

Southen blot hybridaizaition によって検出された BF_1 交雑種 14 個体（以下，$BF_1$14 個体）の RFLP のバンドパターン（以下，バンドパターン）をみると，第 9 連関群（RFLG9）を除く 27 の連関群ではホモ型とヘテロ型のバンドパターンが混在することがわかる。SLA 法では，BF_1 における RFLP の検出には，いずれの連関群においても，検体の雌親となる *cacp* 遺伝子がヘテロ型(*cacp* /＋)の F_1 雌「HF6×KNF45」では常にヘテロ型のバンドパターンを，*cacp* 遺伝子がホモ型(*cacp* /*cacp*)の雄親「HF6」では常にホモ型のバンドパターンが検出できる制限酵素と c DNA クローンの組合せが用いられている。一方，Z 染色体に対応する RFLG1 では，雌のバンドパターンはヘテロ型に，雄はホモ型に検出される制限酵素と c DNA クローンの組合せが使用されている。

Table 6-2. Scanning linkage analyses in the crossing of BF_1 generation, (HF6×KNF45)×HF6

RFLG [1)]	cDNA clone	Enzyme	Individual number ♀							♂							Remarks
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	m289	*Kpn* I	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	Differentiation of the sex
2	m715	*Kpn* I	A	B	A	B	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	Independent
3	e97	*Kpn* I	B	A	B	A	B	A	B	A	A	A	B	A	A	A	Independent
4	m45	*Sac* I	B	A	B	A	B	B	A	A	A	A	A	A	B	A	Independent
5	ep32	*Sac* I	B	A	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	Independent
6	m122	*Kpn* I	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	Independent
7	e53	*Hin*dIII	B	A	A	A	B	A	B	A	B	B	B	B	B	B	Independent
8	e12	*Sac* I	A	B	A	B	B	B	B	B	A	A	A	B	B	B	Independent
9	e42	*Hin*dIII	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Linked
10	m513	*Sac* I	B	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	Independent
11	e90	*Hin*dIII	B	A	B	B	A	B	A	A	B	B	B	B	A	A	Independent
12	e29	*Hin*dIII	A	B	A	B	B	B	B	B	A	A	A	A	B	B	Independent
13	m23	*Kpn* I	A	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	B	B	A	Independent
14	e95	*Kpn* I	A	B	A	A	B	A	A	A	A	B	A	A	B	B	Independent
15	m581	*Hin*dIII	B	A	B	B	A	B	B	A	B	A	B	B	A	B	Independent
16	e101	*Kpn* I	A	A	B	A	B	A	A	B	A	B	A	A	B	A	Independent
17	m274	*Sac* I	B	B	B	B	B	A	B	B	A	B	A	B	B	B	Independent
18	m142	*Kpn* I	B	B	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	A	A	Independent
19	m194	*Sac* I	A	A	A	B	B	A	A	B	A	A	B	A	A	B	Independent
20	e96	*Kpn* I	A	A	B	B	B	A	B	A	B	B	A	B	B	B	Independent
21	m250	*Kpn* I	A	A	B	A	A	B	A	A	A	A	A	A	B	A	Independent
22	m69	*Sac* I	B	A	B	A	B	B	A	A	A	A	A	A	B	A	Independent
23	m114	*Hin*dIII	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	Independent
24	m111	*Kpn* I	A	A	A	A	B	A	B	B	B	B	B	A	A	A	Independent
25	m92	*Sac* I	A	A	B	B	A	A	B	A	B	A	A	B	B	B	Independent
26	m332	*Hin*dIII	A	A	B	B	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	Independent
27	m21	*Sac* I	B	A	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	Independent
28	m449	*Hin*dIII	A	B	B	B	B	A	B	B	A	A	A	B	B	A	Independent

A and B indicate homozygote and heterozygote, respectively.

[1)] cDNA clone linkage group.

また，特殊な蚕（大沼，2003，2005）を除いて，蚕の雌では，染色体の交叉が起こらない（Sturtevant,1915）ことが明らかにされている。これらのことから，*cacp* 遺伝子と連関関係にある連関群に所属する c DNA クローンを用いて *cacp* 遺伝子をホモに持つ $BF_1$14 個体について RFLP を個別に検出すると，理論上は，全ての個体のバンドパターンが雄親「HF6」のそれと等しくホモ型となるはずである。それ故，ホモ型とヘテロ型のバンドパターンが混在するこれら 26 の連関群（RFLG2～8 及び 10～28；RFLG１のバンドパターンは，供試した BF_1 個体の雌雄を示す）と *cacp* 遺伝子は，独立の関係にあると判断できる。一方，第 9 連関群（RFLG9）に属する c DNA クローン e42（以下，クローン e42）を用いて同 BF_1 個体の RFLP を調べてみると，全ての個体に雄親「HF6」に由来する 10kbp と 6.5kbp 付近のバンドが検出され，ホモ型のバンドパターンを示した（Fig. 6-2）。また，供試した $BF_1$14 個体のバンドパターンが全てホモ型となる確率は 2^{-14} であるので，この事象は偶然によるものではなく，*cacp* 遺伝子が第 9 連関群（RFLG9）に所属することを示すものと考えられる。

3. BCMAP 法による *cacp* 遺伝子の座位決定

cacp 遺伝子の座位を明らかにするために，連関検索に用いたものとは逆の交配形式である BF_1 交雑種「HF6♀×（HF6×KNF45）♂」における炭酸カルシウム飼料摂食個体を供試して，BCMAP 法（RFLP を利用した 3 点実験法）による同遺伝子の座位決定を試みた（Table 6-1,6-3 ；Fig. 6-3）

前項(2)に記したように，*cacp* 遺伝子がヘテロ型(*cacp* /＋)である F_1 交雑において最大 7 個の糞を排出する蚕が確認されている(Table 6-1)ことから，*cacp* 遺伝子の座位決定には BF_1 交雑種の炭酸カルシウム飼料摂食個体（以下，摂食個体）の中から同遺伝子がヘテロ型の摂食個体の混入が疑われる糞数 7 個以下の個体を除いた糞数 8 個以上の摂食個体・全 69 頭の 4 齢起蚕における DNA を個別に抽出し，これを供試した。抽出した各個体の DNA は，5 種の制限酵素で消化した後，第 9 連関群（RFLG9）に所属する 2 つの c DNA クローン e42 と m208（原，1997；以下，クローン e42，クローン m208）をプローブに用いて個体別の RFLP を調べた（Table 6-3)。

SLA 法と同様に BCMAP 法による BF_1 の RFLP の検出には，検体の雌親となる「HF6」ではホモ型の RFLP バンドパターン(以下，バンドパターン)を，雄親の「HF6×KNF45」ではヘテロ型のバンドパターンをそれぞれ検出できることが予め確認されているクローンが用いられている。これを踏まえ，クローン e42 で検出した $BF_1$69 個体の RFLP のバンドパターンをみると，全ての個体で *cacp* 遺伝子をホモに持つ 69 個体に対して，66 個体のバンドパターンが雌親「HF6」と同じホモ型を，3 個体のそれは雄親「HF6×KNF45」と同じヘテロ型を示すことがわかる。一方，クローン m208 については，全 69 個体中，67 個のバンドパターンがホモ型に，2 個体がヘテロ型になった。

続いて，各個体における 2 つのクローンに対するバンドパターンをもとに，*cacp* 遺伝子と両クローンの配列を検討した。初めに，*cacp* 遺伝子がそれぞれのクローンの外側にある場合，即ち，配列が *cacp*‐e42‐m208，または e42‐m208- *cacp* の順となることを想定すると，前者の配列では，個体番号 12 と 51 のバンドパターンが単交叉を示すホモ型（*cacp* ）-ホモ型（e42）-ヘテロ型（m208）に，個体番号 34，52，55 ではバンドパターンが二重交叉を示すホモ型（*cacp* ）-ヘテロ型（e42）-ホモ型（m208）になる。一方，後者の配列では個体番号 34，52，55 で単交叉を示すバンドパターンのヘテロ型（e42）-ヘテロ型（m208）-ホモ型（*cacp*）に，個体番号 12 と 51 では，二重交叉を示すバンドパターンのホモ型（e42）-ヘテロ型（m208）-ホモ型（*cacp*）になることがわかる。今回のように供試総数が 100 に満たない BF_1 個体の中に，単交叉型よりも二重交叉型の個体が多く現れたり，二重交叉型の個体が 3 または 2 個体現れたりする事象は理論上あり得ないことである。それ故，*cacp* 遺伝子と両クローンの配列は，e42-*cacp*‐m208 の順であるとの判断は妥当であると考えられる。

Table 6-3. Mapping analysis of the *cacp* gene

Individual number																																		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	35	36	37
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Individual number																																		cDNA clone	Enzyme	n[3]	Σn[4]
38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	53	54	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	34	52	55	12	51				
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	A	A	e42[1]	*Eco*R I	0	0
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	*cacp*[2]	-	3	3
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	m208[1]	*Sac* I	2	5

Genotypes for the *cacp* gene and each cDNA clone of 69 individual larvae in the crossing of BF_1 generation, HF6×(HF6×KNF45), were shown.
A and B indicate homezygote and heterozygote, respectively.
[1] Each cDNA clone belongs to RFLG9 on the molecular gene map.
[2] Calcium carbonate preference gene.
[3] The recombinants between the *cacp* gene and each cDNA clone.
[4] The sum of the recombinants from the first cDNA clone,e42.

次に，*cacp* 遺伝子と両クローンの配列が明らかになったので，この配列をもとに *cacp* 遺伝子と各クローン間の組換価を算出した。Table 6-3 より，e42 と *cacp* の間では交叉型個体が 3 頭（個体番号 34, 52, 55），一方，*cacp* と m208 間には同個体が 2 頭（個体番号 12, 51）出現するということができる。各区間における交叉型個体の出現頻度によってそれぞれの組換価を算出すると，e42－*cacp* 間の組換価は 3/69×100=4.34 %，*cacp*－m208 間のそれは 2/69×100=2.90%となる。また，クローン e42 と m208 は，第 9 連関群（RFLG9）において 0 の位置であるクローン m162 から順に 4cM と 33 cM の距離にそれぞれ座位する（原，2007）ことが判明しているため，各区間の組換価の比と両クローンの座位により，*cacp* 遺伝子の第 9 連関群における遺伝子座を求めると，同遺伝子はクローン m162 から 21.4cM の距離に座位するものと推測された（Fig.6-3）。

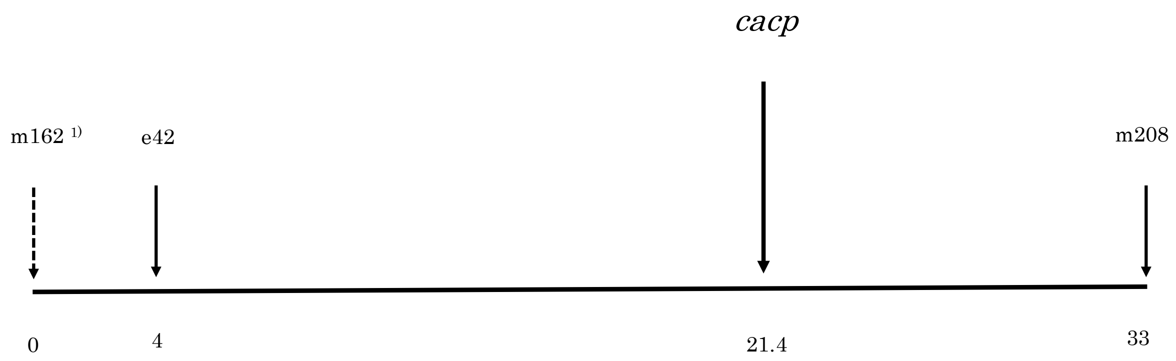


Fig.6-3. Linkage map on RFLG9 of the *cacp* gene in the silkworm strain 'HF6' using the cDNA clones,e42 and m208.

The locus of the *cacp* gene was settled by genetic distances (cM) of cDNA clones, e42 and m208, with the recombination-values which were calculated by data shown in Table 3.
[1] cDNA clone,m162 indicates position 0 in RFLG9.

考　　察

今回の個体育による摂食試験とｃDNAクローンのRFLPを利用した遺伝解析によって，炭酸カルシウムに対する摂食反応性が劣性的な形質として発現することならびにこの形質を支配する主働遺伝子（炭酸カルシウム摂食遺伝子:記号 *cacp*）が分子遺伝子地図上（Nguu *et al.*,2005；原，2007）の第9連関群（ｃDNAクローンリンケージグループ：RFLG9)に所属することが明らかになった（Table 6-1,6-2 ；Fig. 6-1,6-2)。

先の蟻蚕50頭を供試した集団育による摂食試験では，炭酸カルシウムに対する摂食反応性（以下，炭酸カルシウム摂食反応性）を排出糞数によって評価し（常山ら，2007)，一方，今回の個体育では，同反応性の評価に摂食個体率を用いている。このように両者の評価方法は異なるものの，集団育における炭酸カルシウム摂食反応性が不完全優性的な形質として発現するので（常山ら，2007)，当初，個体育においてもこの反応性が同様の遺伝様式を示すものと考えていたが，上述したように今回の摂食試験の結果，個体育では，炭酸カルシウム摂食反応性が劣性的な形質とみなせることが判明した。

そこで，著者は，この現象について炭酸カルシウム摂食系統「HF6」(以下，摂食系統「HF6」)の摂食行動に着目し，次の様に考察した。初めに，Table 6-1によって個体育した摂食系統「HF6」の摂食量（糞数）をみると，個体間の摂食量（糞数：3～34個）に大きなばらつきが認められることがわかる。このことから，個体選抜が行われていない摂食系統「HF6」には，*cacp*遺伝子（主働遺伝子）とこれを修飾する複数の遺伝子が全てホモ型になった個体の他に，*cacp*遺伝子といくつかの修飾遺伝子がホモ型になった個体や*cacp*遺伝子のみがホモ型になった個体が混在すると考えられる。さらに，摂食系統「HF6」の個体育における平均糞数（個／頭）が集団育のそれの6割程度に減少すること(未発表)，また，その一方で，高密度飼育環境が蚕の個体間に摂食に関する相利的競争を生じさせる（蜷木ら，1997）ことが報告されていることから，個体選抜が行われていない摂食系統「HF6」を集団育した場合にも，集団という環境要因によってその集団を構成する個々の摂食レベルが，各個体の遺伝子構成に関わらず相乗的に向上するものと考える。以上のことから，個体間に生じる相利的競争の有無が，摂食系統「HF6」のみならず次世代のF_1ならびにBF_1世代における個体育と集団育の摂食反応性の違いに現れ，結果として両者において異なる遺伝様式が示されると推測する。

今回の遺伝解析に供試した正逆BF_1交雑種の親となる炭酸カルシウム摂食系統は，蛾区選抜によって作出された摂食系統「HF6」を個体選抜することなく交配に用いたため，いずれのBF_1交雑種においても個体育における摂食個体の摂食量（糞数）に大きなばらつきが認められた（Table 6-1)。特に，BCMAP法による座位決定においては，通常，100以上の検体を供試することを理想とするが，BF_1交雑種「(HF6×KNF45) ♀×HF6♂」を個体育すると，糞数が1～41個の摂食個体が現れたため，この中から*cacp*遺伝子がヘテロ型の摂食個体の混入が疑われる糞数7個以下の個体を除くこととなり，最終的に供試できる個体数が69頭に制限された。その結果，座位決定には，摂食個体集団の一部の個体のRFLPを調査するようになったが，三点実験に用いたｃDNAクローンe42とm208によって検出された各個体のRFLPのバンドパターンの相互関係から導かれる二重交叉型個体の出現頻度から，*cacp*遺伝子がこの2つのクローンの間に位置すると結論づけることに理論上の矛盾がないと言える（Table 6-3)。また，今回，算出された両クローン間の組換価（7.94+2.94=7.24%）は，e42－*cacp*間および*cacp*－m208間における交叉型個体の出現頻度が少なかったため，原らの分子遺伝子地図（Nguu *et al.*，2005；原，2007）における両クローン間の組換価(29%)よりも小さくなったものの，*cacp*遺伝子と2つのクローンの相対的な位置関係については常に一定であると考えられる。これらのことから，e42－*cacp*間および*cacp*－m208間の組換価の比と両クローンの分子遺伝子地図上の座位によって*cacp*遺伝子の遺伝子座を求めると，同遺伝子がRFLG9において0の位置であるｃDNAクローンm162から21.4cMの距離に座位することが推測された（Fig.

6-3)。

前報（常山ら，2007）に記したように炭酸カルシウム摂食系統「HF6」は，広食性蚕「日 601 号」から育成された「ひたち」の中から，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を示す蛾区を選抜することによって作出した広食系統の蚕である。近年，Mase *et al.*（2007）は，ｃDNA クローンの RFLP を利用した遺伝解析によって，広食性蚕「沢 J」の有する LP-1 人工飼料（家畜用飼料を素材とする人工飼料；堀江・渡辺，1983）に対する摂食遺伝子 *fp* が，分子遺伝子地図の第 9 連関群（RFLG9）に所属し，その遺伝子座（20.2cM：原らの分子遺伝子地図では 23cM に補正）が，*cacp* 遺伝子の近傍にあることを明らかにしている。また，この *fp* 遺伝子については，同遺伝子の座上する RFLG9 が，突然変異形質マーカーによって作製された連関地図(以下，連関地図)の第 3 連関群に対応していることから，同連関群に座上する「沢 J」の有する LP-1 人工飼料摂食遺伝子 *pph*（神田，1992；Iizuka *al.*,2007）と同一の遺伝子である可能性が示唆されている。

一方，田島・大沼（1991，1992，1994a,b）は，「日 601 号」と「沢 J」の桑を含まない準合成飼料（堀江・渡辺，1969；田島ら，1989）に対する摂食反応性が連関地図の第 3 連関群に所属する不完全優性の広食性遺伝子 Ph^S（沢 J）と Ph^B（日 601 号)によって支配されていることを明らかにし，さらに，大沼ら（2002）は，両遺伝子の関係を，「完全な対立遺伝子と見なして良いかどうか未だ確かには言えないが，減数分裂に際し互いに異端に分離するので，ここは同類擬対立遺伝子と見なして扱い・・」としている。

食性形質の場合，その遺伝様式に違いが現れる主な原因として，交配相手の有する遺伝子構成の違いと上述した飼育環境の違いが考えられる。しかし，広食性蚕「日 601 号」の有する Ph^B遺伝子と同品種由来の炭酸カルシウム摂食系統「HF6」が有する *cacp* 遺伝子との関連性，あるいは，広食性蚕「沢 J」の有する食性遺伝子（*fp*，*pph* および Ph^S）と *cacp* 遺伝子との関連性については，現時点では言及できない。Ph^S と Ph^B 遺伝子の遺伝子座が明らかにされていないこと，また，神田（1992），Mase *et al.*（2007）が食性の遺伝解析に用いた LP-1 人工飼料と田島が用いた準合成飼料には魚粉や馬鈴薯澱粉，大豆脱脂粉末などの天然物の他，種々の化合物が添加されているため，これらの飼料に対するそれぞれの食性遺伝子（*fp*，*pph*，Ph^S および Ph^B）の生理機能が不明であることがその理由である。一方，今回座位決定した *cacp* 遺伝子は，炭酸カルシウム，セルロース，寒天，水のみを組成とする炭酸カルシウム飼料と，炭酸カルシウムに対して鋭敏に摂食反応を示す系統として作出した炭酸カルシウム摂食系統「HF6」（常山ら，2007）を用いて解析されたものであり，その生理機能が明らかにされた数少ない食性遺伝子であると考える。

摘　　要

炭酸カルシウムに対する摂食反応性（以下，炭酸カルシウム摂食反応性）を支配する主働遺伝子の解析を行うために，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ系統とこれを持たない系統の間で F_1 ならびに BF_1 交雑種を作出し，それぞれの交雑種について個体別に摂食反応を調べた。

セルロース粉末，寒天及び蒸留水から成る基本飼料と，この飼料に炭酸カルシウムを加えた飼料を孵化直後の蟻蚕に与え個体育した。72 時間後に，供試した蚕数に対する飼料を摂食した蚕数の割合（摂食個体率）を調査し，この摂食個体率によって各交雑種の炭酸カルシウムに対する摂食反応性を評価した。

その結果，個体育では，蟻蚕 50 頭による集団育の場合とは異なり，炭酸カルシウム摂食反応性が劣性的な形質として発現することが判明した。

次に，この形質を支配する主働遺伝子を炭酸カルシウム摂食遺伝子（calcium carbonate preference: 記号 *cacp*）と命名し，原らの開発したｃDNA クローンの RFLP を利用した SLA（Scanning linkage analysis）法及び BCMAP（Mapping for Back Cross）法によって遺伝解析を行った。

その結果，*cacp* 遺伝子が，分子遺伝子地図上の第 9 連関群（ｃDNA クローンリンケージグループ 9：

RFLG9)に所属することが明らかになった。また，その座位はRFLG9において0の位置であるcDNAクローンm162から21.4cMの距離にあることが推測された。

総合考察

桑葉の巨細胞（idioblast）内には,桑の二次代謝産物として非晶質（amorphous）の炭酸カルシウムが含まれていることが知られている(小林，1981；SUGIMURA *et al.*,1998; SUGIMURA *et al.*,1999;杉村,2007)。

本研究では，この点に着目し，セルロース，寒天及び水から成る単純な組成の基本飼料を用いて，炭酸カルシウムが蟻蚕の摂食行動に及ぼす影響について検討した（Table 2-1)。

その結果，炭酸カルシウムには,蟻蚕の摂食行動を誘起する作用があることを発見した。

炭酸カルシウムは，Wesson 無機塩混合物の主要成分の一つであるが，この無機塩混合物は，蚕の成長と発育に良い効果をもたらす(新村・伊藤,1963)ことで知られ，その高い栄養効果は，カルシウムなどの無機イオンにあることがすでに確かめられている(伊藤・新村,1966)。しかし，これらの報告は，Wesson 無機塩混合物の栄養的な効果を明らかにしたものであり，この無機塩混合物には摂食促進効果がないとされていた(新村・伊藤,1963)。また，この無機塩混合物を構成する個々の無機塩や無機イオンの摂食促進効果の確認は行われていなかった。

本研究では，Table 1-2, Table 2-1,Table 4-2 及び Table 5-1 の結果から明らかなように，中国種系の 5 品種を除く全ての品種(21 品種)の摂食行動が,炭酸カルシウムのみの摂食刺激作用によって誘起された（Wilcoxon signed-ranks test,$p<0.05$)。また，炭酸カルシウムは，既知の摂食誘起物質であるショ糖やミオ・イノシトールなどの糖類と組み合わせると相乗的な効果が現われ，蟻蚕の摂食行動を著しく促進した（Table 1-3, 2-1,2-4,4-2)。これらのとから，炭酸カルシウムは蚕の摂食誘起物質であると結論づけることは妥当であると考えられる。

昆虫の摂食行動は，感覚生理的な刺激に対する反応とされている（FRAENKEL, 1969; 浜村,1975)。そのため，味覚あるいは臭覚に作用する二次代謝産物の摂食刺激源あるいは摂食阻害源としての働きは大きく，特に単食性昆虫（monophagous insects）や狭食性昆虫（oligophagous insects）においては，寄主植物に含まれる特殊な二次代謝産物が，昆虫の寄主選択に関与している事例も少なくない（NAYAR and FRAENKEL,1963 ;HEWITT *et al.*, 1969；KIM *et al.*, 1975；BERNAYS and CHAPMAN,1994; TOL and VISSER, 2002； LOON *et al.*, 2002；CHAPMAN, 2003)。

浜村(1975)は，蚕が桑のみを食べる理由として，桑以外の植物には蚕が嫌う忌避物質（repellent）や摂食阻害物質（deterrent）が含まれているものと考え，蚕の摂食行動は植物界に広く分布するごくありふれた摂食誘起物質によって誘起され，桑には特殊な二次代謝産物が存在しないと結論づけた。

しかし，本研究の結果から，桑の二次代謝産物として桑葉の巨細胞内に蓄積される炭酸カルシウムが,蚕の摂食反応性の向上に関与しているということは想像に難くない。また，上記したように，炭酸カルシウムは蚕の成長に不可欠な無機塩である（新村・伊藤，1963；伊藤・新村，1966；伊藤，1983）ことが確認されている。

一方，平野（1971）は，栄養学的な観点から，昆虫とその寄主植物の関係に着目し，昆虫の摂食行動の最大の目的が栄養物の摂取にあることから，植物は，昆虫の栄養要求を満足させる栄養成分を含んでいなければ寄主とはなりえないと述べ，寄主植物と寄生昆虫の栄養的な関連性の重要さを指摘している。それ故，栄養源ならびに感覚生理的な摂食刺激源としての作用を有する炭酸カルシウムは，蚕の寄主選択において重要な役割を演じている物質であると考えられる。

また，炭酸カルシウムには，摂食促進効果に加え，蟻蚕を飼料上に引き留める効果(定着効果)が認められた（Table 1-2,2-1)。これは，炭酸カルシウムと同様に摂食誘起作用を有する珪酸カルシウムと燐酸

カルシウムにおいても確認され（Table 3-2），飼料中のカルシウムイオンの濃度と引き留め率との関係（Table 2-1，3-1）から，この効果にはカルシウムイオンが関与しているのではないかと考えられる結果が示された。今回は，このイオンと蟻蚕を引き留める機構の関連性を明らかにするまでには至らなかったが，この引き留め効果は，桑葉内に含まれる炭酸カルシウムが，シトラール（HAMAMURA *et al.*,1962）やヘキセノール（WATANABE,1958）などの誘引物質と共に，蚕を桑葉上に留める現象に寄与している可能性を示唆するものと考える。

上述した理由により，炭酸カルシウムは,蚕の寄主選択性に関わる重要な摂食刺激物質であると考えられるが,炭酸カルシウムを摂食する性質（摂食反応性）の遺伝とこの性質を支配する遺伝的要因を明らかにすることは，蚕の摂食機構ならびに寄主選択機構を遺伝学的な見地から解明するための糸口となると著者は確信する。

第 5 章に記載した遺伝学的解析によって，蟻蚕 50 頭を供試した集団育では、炭酸カルシウムを摂食する性質（形質）は，不完全優性的に遺伝することが明らかとなった（Table 5-3)。また，この性質を支配する主働遺伝子の数を一つと想定し，F_2 と BF_1 の各期待値を理論上の分離比から算出することを試みたところ，これらの値が，実測値とほぼ一致することがわかった。これらの結果より，炭酸カルシウムを摂食する性質（形質）の発現を強力に支配する単一の不完全優性遺伝子（主働遺伝子）が常染色体上に存在する可能性が示されたが，糖やタンパク質などの主栄養源を含まない炭酸カルシウム飼料を摂食した蚕には毛振いが見られないため，集団育では摂食した個体と摂食しない個体の分離は容易ではなく，これ以上の解析は進められなかった。

そこで，第 6 章に記載した遺伝学的解析では，個体育（一頭育）による摂食試験を行ったところ，個体育では，個体間に摂食に関する相利的競争が生じないため，炭酸カルシウムに対する摂食反応性が劣性形質として発現することが判明した（Table 6-1)。さらに，この形質を支配する主働遺伝子を炭酸カルシウム摂食遺伝子（calcium carbonate preference ： 記号 *cacp*）と命名し，原らの開発した cDNA クローンの RFLP をマーカーに用いた SLA 法及び BCMAP 法によって遺伝解析(原ら，2001；原ら，2002； Kadono-Okuda *et al.*,2002； Ogoi *et al.*，2003；Mase *et al.*，2007；原，2007）を行った結果，*cacp* 遺伝子が分子遺伝子地図上（Nguu *et al.*，2005；原,2007）の第 9 連関群（ｃDNA クローンリンケージグループ 9：RFLG9)に所属することが明らかになった（Table 6-2;Fig.6-2)。また，その遺伝座については RFLG9 において 0 の位置であるｃDNA クローン m162 から 21.4cM の距離にあることが推測された（Fig.6-3)。

蚕の食性に関する遺伝学的な研究では，これまでにフダンソウや各種の人工飼料に対する摂食反応性の遺伝について調べられてきたことは既に緒言で述べたが（田島ら,1984；山本,1983；神田ら,1988；神田,1992；大沼,1997)，本研究のような個々の物質（化合物）に対する摂食反応性の遺伝についての研究例は見られない。このため,これまでに発見された蚕の食性遺伝子の詳しい生理機能については，未だ明確な答えが得られていないのが現状である。

一つの例として，第 6 章で議論された家畜用の飼料を素材とする LP-1 人工飼料の摂食反応性に関与する LP-1 人工飼料摂食遺伝子 *pph*（主働遺伝子）を取り上げてみる。

pph は，食性異常蚕「沢 J」（横山,1975）の第 3 染色体上に座する自然突然変異遺伝子である（神田，1992；飯塚,2006)。神田（1992）は，この遺伝子の生理機能を明らかにするために各種の物質の添食試験を行った結果，この遺伝子の性格付けはできたものの，遺伝子の生理機能については明確な結論は得られなかったと述べている。この研究を引き継いだ飯塚（2006）は，近年，電気生理学的な手法と交配試験を併用して，この摂食反応性異常遺伝子 *pph* の生理機能が苦味物質サリシンの感受性に関与する遺伝子であることを明らかにした。しかし，LP-1 人工飼料にヤナギ科特有の物質とされるサリシン（化学大辞典編集委員会，1969）が含まれているか否かについては確認されていないため，飯塚の報告は，LP-1 人工飼料の摂食反応性に対する *pph* の機能を証明するまでには至っていない。

動物の遺伝子座は哺乳類で約 10 万と言われている（柏原ら，2000)。その一部の遺伝子の生理機能に

ついては，改変遺伝子を組み込んだノックアウトマウスなどの利用により明らかにされつつあるが，多くの遺伝子の生理機能については未だ解明されていない。したがって，遺伝子の生理機能の解明が，今後の遺伝学の重要な一つの課題であると言えよう。

以上のように，本研究では，桑の二次代謝産物に由来する炭酸カルシウムが蚕の摂食誘起物質であることを新たに発見し，また，この炭酸カルシウムを食べるという生理機能を有する蚕の劣性摂食遺伝子（*cacp* 遺伝子）が，分子遺伝子地図上の第 9 連関群（RFLG9)に座乗することを明らかにしたことに意義があるものと著者は考える。

一方，Table 5-2 から，炭酸カルシウムに対して強い摂食反応性を持つ（よく食べる）系統として「HF6」と「NF2」，摂食反応性を持たない（食べない）系統として「KNF45」と「SNF08」が作出されていることが見てとれるが，本研究では，炭酸カルシウムに対して同じ反応性を示す系統の食性形質が，同一座位の主働遺伝子よって支配されるのかあるいは異なる座位の主働遺伝子の支配によるのかについて究明するまでには至らなかった。しかし，これは，炭酸カルシウムに対する食性遺伝子（炭酸カルシウムを食べるあるいは食べない性質に関与する主働遺伝子）を特定する上で核心に迫る問題であると考えられる。

この件については，今後， SLA 法と BCMAP 法を用いて，各系統の食性形質を支配する主働遺伝子の座位を決定すると共に，得られたデータを蚕のゲノム情報によって解析し，結論を導きたいと考える。

総　　括

本研究の目的は，桑の二次代謝産物に由来する新たな蚕の摂食誘起物質を発見し，この物質に対する蚕の摂食機構を遺伝学的な観点から解析することにある。この目的を達成するために実施した試験，その結果ならびに得られた知見等の概要について，以下に示す。

1. 炭酸カルシウムの効果

桑葉の巨細胞内に炭酸カルシウムが蓄積されていることに着目し，セルロース，寒天及び水から成る単純な組成の基本飼料を用いて，炭酸カルシウムが蟻蚕（蚕の孵化直後の幼虫）の摂食行動に及ぼす影響について調べた。

その結果，炭酸カルシウムには，蟻蚕の摂食行動を誘起する作用（摂食促進効果）と蟻蚕を飼料上に引き留める効果（定着効果。以下,引き留め効果）があることが明らかになった。また，炭酸カルシウムは，既知の摂食誘起物質である種々の糖類と共に相乗的に強い摂食刺激作用（複合効果）を示すことも明らかになり,これらの事象から，炭酸カルシウムは蚕の摂食誘起物質であると結論づけた。

次に，炭酸カルシウムの類縁化合物である炭酸塩とカルシウム塩について摂食試験を行ったところ，珪酸カルシウムと燐酸カルシウムに摂食促進効果，引き留め効果及びショ糖との複合効果が認められた。

炭酸カルシウム，珪酸カルシウム及び燐酸カルシウムは，いずれも水に難溶な化学的性質を有するカルシウム塩である。これら 3 種のカルシウム塩に同様の効果があることが検証されたこと及び各カルシウム塩の添加濃度と，摂食量（排出糞数）ならびに引き留め率（蟻蚕が飼料上に定着する割合）との関係から，飼料中のカルシウム塩の結晶（固体）に摂食促進効果が，また，飼料の水分中に僅かに電離するカルシウムイオンには，蟻蚕を引き留める効果があるものと推測した。

2. 炭酸カルシウム摂食反応性の品種間差異

広食性品種を含む日本種系及び中国種系の原種 24 品種について，炭酸カルシウムに対する蟻蚕の摂食反応（以下，反応）を調べた。

その結果，広食性品種の炭酸カルシウムに対する反応は，いずれの品種も非広食性品種のそれに比べ

著しく強かった。また，広食性・非広食性ともに，各品種の反応は，品種間で大きな差異が認められた。同様の傾向は日本種及び中国種の各系統内の品種間の反応にも確認されることから，炭酸カルシウムに対する摂食反応性（炭酸カルシウムを摂食する性質：炭酸カルシウム摂食反応性）は,遺伝的変異が大きい形質であると考えられた。

3. 集団育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝解析

炭酸カルシウムに対する摂食反応性の遺伝様式を明らかにするために，系統分離と遺伝解析を行った。

a）系統分離（炭酸カルシウム摂食系統と不食系統の作出）

摂食試験（2）の結果に基づいて，種々の品種の中から，炭酸カルシウムに対して比較的強い摂食反応を示す品種とほとんど反応しない品種を選び出し，それらを用いて，炭酸カルシウムの摂食量（排出糞数）を指標とした蛾区選抜法による食性選抜と継代を繰り返した。

その結果，いずれの品種にも選抜効果が現われ，炭酸カルシウムに対して鋭敏に反応する系統(摂食系統)と，全く反応しない系統(不食系統)が作出された。しかし，この食性選抜では，高い選抜効果が得られたものの，一方で，蛾区間にその効果の差異が認められたことから，炭酸カルシウムに対する摂食反応性を支配する遺伝的要因には，作用力の強い主働遺伝子以外にも作用力の弱い複数の修飾遺伝子が関与しているものと推測した。

b）遺伝解析

作出に成功した炭酸カルシウム摂食系統と不食系統の間で，F_1,F_2及び BF_1交配を行い，それぞれの交雑種の炭酸カルシウムに対する摂食反応性について調べた。

その結果，蟻蚕 50 頭による集団育では，炭酸カルシウムに摂食反応を示す性質（摂食する性質）は，摂食反応を示さない性質（摂食しない性質）に対して，不完全優性的に遺伝することが明らかになった。

また，炭酸カルシウムに対する摂食反応性（摂食する性質）を支配する主働遺伝子の数を一つと想定し，F_2と BF_1の各期待値を理論上の分離比から算出することを試みたところ，これらの値が実測値とほぼ一致した。これらのことから，炭酸カルシウムに対する摂食反応性を強力に支配する単一の主働遺伝子が，常染色体上に存在するものと考えられた。

4. 個体育における炭酸カルシウム摂食反応性の遺伝解析

糖やタンパク質などの主栄養源を含まない炭酸カルシウム飼料を摂食した蚕には毛振いが見られない。そのため，集団育では摂食個体と摂食しない個体を分離することができないことから，炭酸カルシウムに対する摂食反応性を支配する主働遺伝子の遺伝解析を進めるにあたり，新たに，炭酸カルシウム摂食系統と不食系統の間で F_1ならびに BF_1交雑種を作出し，それぞれの交雑種について個体別に摂食反応を調べた。

その結果，個体育では集団育の場合とは異なり，炭酸カルシウムに対する摂食反応性が劣性的に遺伝することが明らかになった。

また，この形質を支配する主働遺伝子を炭酸カルシウム摂食遺伝子（calcium carbonate preference ： 記号 *cacp*）と命名し，原らの開発した cDNA クローンの RFLP をマーカーに用いた SLA 法及び BCMAP 法によって遺伝解析を行ったとろ，*cacp* 遺伝子が分子遺伝子地図上の第 9 連関群（c DNA クローンリンケージグループ 9：RFLG9)に所属することが明らかになり，その遺伝子座は RFLG9 において 0 の位置である c DNA クローン m162 から 21.4cM の距離にあることが推測された。

以上のように，本研究では，桑の二次代謝産物に由来する炭酸カルシウムが蚕の摂食誘起物質であることを新たに発見し，また，この炭酸カルシウムを食べるという生理機能を有する蚕の劣性摂食遺伝子（*cacp* 遺伝子）が，原らの分子遺伝子地図上の第 9 連関群（RFLG9)に座乗することを明らかにした。

引用文献

1. 朝岡　潔（1996）　カイコの食性異常のメカニズム．苦味物質の選択的味盲．遺伝，**50**，72-79.
2. ASAOKA. K.（2000）Deficiency of gustatory sensitivity to some deterrent compounds in “polyphagous” mutant strains of the silkworm, *Bombyx mori*. *J.Comp. Physiol. A*, **186**, 1011-1018.
3. BAKER, J.E. and D.M. NORRIS（1968）Further biological and chemical aspects of host selection by *Scolytus multistriatus*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **61**, 1248-1255.
4. BERNAYS, E.A. and R.F. CHAPMAN (1994) Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. pp.128-137, Chapman & Hall,New York.
5. CHAPMAN, R.F. (2003) Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.*, **48** 455-484.
6. FRAENKEL, G. (1969) Evaluation of our thoughts on secondary plant subustances. *Entomol.Exp.Appl.*, **12**, 473-486.
7. 江口良橘・永易健一・蜷木　理・原和二郎　(2007)　カイコ濃核病１型に対する優性非感受性の遺伝分析．蚕糸・昆虫バイオテック，**76**，159-163.
8. 藤森胡友・山本俊雄・田中教夫（1982）食性異常蚕「沢J」の人工飼料摂食反応性の遺伝様式．日蚕雑，**51**,235－236.
9. 福田紀文（1962）蚕の栄養と代謝（Ⅰ）．化学の領域，**16**，834-841.
10. 福田紀文（1987）家蚕および野蚕の人工飼料育,日本蚕糸新聞社，東京.
11. HAMAMURA, Y. (1959) Food selection by silkworm larvae, *Bombyx mori*. *Nature*, **183**, 1746-1747.
12. HAMAMURA, Y. and K. NAITO (1961) Food selection by silkworm larvae, *Bombyx mori*. *Nature*, **190**, 879-880.
13. HAMAMURA, Y., K. HAYASHIYA, K. NAITO, K. MATSUURA and J. NISHIDA (1962) Food selection by silkworm larvae. *Nature*, **194**, 754-755.
14. 浜村保次（1975）カイコの人工飼料育への道．pp. 1-68，みすず書房，東京.
15. 浜野国勝・宮沢 清・向山文雄（1986）カイコにおける食性の品種間差．日蚕雑，**55**，68-72
16. 浜野国勝・山本 亮・向山文雄（1985）カイコの人工飼料選好性と食性との関係．日蚕雑，**54**，495-499.
17. 原和二郎（2007）cDNA プローブと RFLP を用いたカイコ遺伝解析手法の確立と利用．蚕糸・昆虫バイオテック，**76**，207-209.
18. 原和二郎・小瀬川英一・間瀬啓介(2001) 連関検索に用いる DNA マーカーの開発と解析法の検討．蚕糸昆虫研資料,**30**,7-14
19. 原和二郎・小瀬川英一・間瀬啓介・門野敬子(2002) cDNA マーカーの RFLP を用いる連関検索法の改良．日蚕雑,**71**，95-100.
20. 原和二郎・小瀬川英一・間瀬啓介・長岡純治・岡野和弘・門野敬子（2001）蚕における EST 化した cDNA プローブの RFLP による連関検索法．日蚕雑，**70**，135-143.
21. Hara, W., Ann, Y., Eguchi, R., Kosegawa, E., Mase, K. Kadono-Okuda, K. and Nagayasu, K. (2008) Mapping of a Novel Virus Resistant Gene, *Nid-1*, in the silkworm, *Bombyx mori,* based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **77**, 59-66.

22. 原和二郎・永易健一・常山　泉・池嶋智美・鶴井裕治・飯田のり子・田中幸夫（2009）カイコの緑繭における二つの因子の遺伝解析．蚕糸・昆虫バイオテック，**78**，151-159.
23. HEWITT, P.H., V.B. WHITEHED and J.S. READ (1969) Quebrachitol:A phagostimulant for the larve of the moth, *Serrodes partita*. *J. Insect Physiol.*, **15**, 1929-1933.
24. 平野千里（1971）昆虫と寄主植物．pp.1-119，共立出版株式会社,東京.
25. 平尾常雄（1969）家蚕の食性に関する研究，（Ⅱ）においと食性．日蚕雑，**38**，147-156.
26. 平尾常雄・荒井成彦（1991）カイコの寄主植物選択における味覚認識の役割，応動昆，**35**，197-206.
27. 平尾常雄・石川誠男（1964）家蚕幼虫の臭覚に関する研究，（Ⅰ）Olfactometer による蟻蚕の走化性．**33**，277-285.
28. 堀江保宏・渡辺喜二郎　(1969)　人工飼料における家蚕の熱要求量について．日蚕雑，**38**，377-385.
29. 堀江保宏・渡辺喜二郎(1983) 線形計画法による家蚕人工飼料組成の設計とくに家畜飼料素材の導入について．蚕試報，**29**，259 - 283.
30. 堀内淋明・清水 滋（1961）ノニレによる蚕児の飼育について．日蚕雑，31，50-52.
31. 飯塚哲也(2006) カイコにおける摂食異常遺伝子の遺伝学的解析とその機能．pp.25-26，蚕糸・昆虫機能研究全国連絡会（資料）.
32. Iizuka, T., Mase. K., Okada, E. and Yamamoto. T. (2007) Determination of Polyphagous Gene (*pph*) Locus by Three-point Test with Visible Markers in the Silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **76** , 107-109.
33. 石居 進(1995) 生物統計学入門,培風館，pp.1-212，東京.
34. ISHIKAWA , S. (1966) Electrical response and function of bitter substance receptor associated with the maxillary sensilla of the larva of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Cell. Physiol.*, **67**, 1-11.
35. 石川誠男・平尾常男（1963）家蚕幼虫の味覚に関する電気生理学的研究．小顎の sensilla styloconica の感受性．蚕試報，**18**，297-335.
36. 石川誠男･平尾常男(1966) 家蚕の食性に関する研究．（Ⅰ）宿主植物選択性特に摂食抑制機構の分析．蚕試報,**20**,291-321.
37. 石村貞夫(2000) SPSS による分散分析と多重比較の手順．pp.30-77,東京図書，東京.
38. 伊藤智夫（1959）蚕児の食性について．日蚕雑,**28**,52-57.
39. ITO.T. (1960) Effect of sugars on feeding of larvae of the silkworm,*Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **5**, 95-107.
40. ITO, T., Y. HORIE and S. NAKASONE (1975) Deterrent effect of soybean meal on Feeding of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* , 21,995-1006.
41. 伊藤智夫（1961）家蚕の栄養に関する研究．Ⅳ．アスコルビン酸の効果について．蚕試報，**17**，119-136.
42. 伊藤智夫(1983) 栄養と人工飼料．pp.162-163，日本蚕糸新聞社，東京.
43. 伊藤智夫・新村正純(1966)　家蚕の栄養に関する研究．Ⅶ．無機物の栄養効果について．蚕試報，**20**,361-374.
44. 伊藤智夫・田中元三（1961）　家蚕幼虫に対する栄養物の経口的給与．Ⅱ．各種糖類給与およびその栄養価値について．蚕試報，**20**，361-374.
45. 伊藤智夫・堀江保宏・渡辺喜二郎・高瀬正三・長島政喜(1966) 人工飼料による原蚕飼育ならびに桑葉による次代蚕飼育について．日蚕雑,**35**,374-378.
46. Kadono-Okuda, K., Kosegawa, E., Mase, K. and Hara, W. (2002) Linkage analysis of maternal EST cDNA clones covering all twenty-eight chromosomes in the silkworm, *Bombyx mori*.

Insect Mol. Biol., **11**
47. 化学大辞典編集委員会（1969）化学大辞典３．pp.862，共立出版，東京.
48. 神田俊男(1992) カイコにおける線形計画人工飼料の摂食反応性に関する遺伝育種学的研究．蚕昆研研究報告,**5**,1-89.
49. 神田俊男・田村俊樹・井上元（1988）線形計画法による人工飼料 LP-1 に対する蚕の摂食反応性とその遺伝．日蚕雑,**57**,4894-494.
50. 柏原孝夫・河本 馨・舘 鄰（2000）動物遺伝学．pp.222-223，文英堂出版，東京.
51. KIM, M., H.S. KOU, T. ICHIKAWA, H. FUKAMI and S. ISHII（1975） Antifeedant in barnyard grass against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (STAL) (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **10**,116-122.
52. 小林弘(1981) 新生物Ｉ.pp.44，数研出版，東京.
53. 李　王順・原和二郎・横山　岳・蜷木　理（2008）カイコ成虫短命遺伝子 cDNA リンケージを利用した座位決定．蚕糸・昆虫バイオテック，**77**，47-52.
54. LOON, J.J.A.van, C.Z. WANG, J.K. NIELSEN, R. GOLS and Y.T. QIU（2002） Flavonoid from cabbage are feeding stimulants for diamondback moth larvae additional to glucosinolates : Chemoreception and behavior. *Entomol.Exp.Appl.* **104,** 27-34.
55. 真野保久・朝岡 潔・井原音重・中川 浩・平林　隆・村上正子・永易健一（1991）広食性多糸量蚕品種「あさぎり」の育成．蚕糸昆虫研報，**3**，31－56.
56. Mase, K., Iizuka, T., Yamamoto, T., Okada, E. and Hara, W. (2007) Genetic mapping of a food preference gene in the he silkworm, *Bombyx mori*, using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), Genes Genet. Syst., 82, 249-256.
57. 緑川栄一･阿相敏雄･代田丈志･清野力(1992) 春蚕用 朝・日×東・海の育成経過と性状．蚕研彙報，**40**,7-26.
58. 向山文雄・伊藤智夫（1962）人工飼料による蚕の消化試験（Ｉ）食下量消化量および消化率について．日蚕雑，**31**，317-322.
59. 村越重雄（1974）各種植物葉粉末のカイコの摂食と成育に及ぼす影響について．応動昆，**18**，29-31.
60. 長島政喜(1968) 人工飼料に対する蚕品種の適合性．蚕試彙報，**92**,91-117.
61. 内藤健一・林家慶三（1965）桑葉中の微量成分に関する研究．第 7 報,桑葉中よりルチンおよびクエルセチンの単離.日農化,**42**，423-425.
62. 内藤健一（1968）桑葉中の微量成分に関する研究．第 6 報,クロロゲン酸の単離．日農化，**39**，237-238.
63. 中村正雄（1973）人工飼料に適する蚕品種の適合性調査．蚕糸彙報,**96**,159-165.
64. NAYAR, J.K. and G. FRAENKEL (1963) The chemical basis of the host selection in the catalpa sphinx, *Ceratomia catalpae* (Lepidoptera, Shingidae C). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **56**,119-122.
65. Nguu,E.,Mase, K., Kosegawa, E. and Hara, W. (2005) Molecular linkage map for the silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphism of cDNA clones. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **74**, 5-13.
66. 新倉克己（1967）オオイタビによるによる蚕児飼育について．日蚕雑,**36**,413-416
67. 新村正純･伊藤智夫（1963）家蚕の人工飼料に添加した無機物の栄養について．日農化，**37**，757-760.
68. 蜷木　理・土井良　宏・吉武成美（1996）臭蚕の遺伝学的研究．日蚕雑，**65**，436-440.
69. 蜷木　理・三國辰雄・中村邦子・丸山　誠（1997）低コスト人工飼料による５齢蚕の高密度飼育が経過および生存率に及ぼす影響．日蚕雑，**66**，290-293.

70. 農林水産省農蚕園芸局（1976）蚕の新品種．技術資料,**86**，2－8.
71. 農林水産省農蚕園芸局（1987）蚕の新品種．技術資料,**113**，1－2.
72. 農林水産省農蚕園芸局（1990）蚕の新品種．技術資料,**120**，5－6.
73. 農林水産省農蚕園芸局（1994）蚕の新品種．技術資料,**128**，7－8.
74. 農林水産省農蚕園芸局（1996）蚕の新品種．技術資料,**131**，3-6.
75. Ogoi, D., Kadono-Okuda, K., Eguchi, R., Furuta,Y., Hara, W., Nguu,E. and Nagayasu,K. (2003) Linkage and mapping analysis of a non -susceptibility gene to densovirus (*nsd-2*) in the silkworm, *Bombyx mori. Insect Mol. Biol.*, **12**, 117-124.
76. 大沼昭夫（1997）世界一に見出された広食遺伝子（*Sek*）の連関検索．日蚕雑，**45**，1-6.
77. 大沼昭夫（2003）暗色遺伝子で標識されたＷとＺとの転座の作製．日蚕講要，**73**，65.
78. 大沼昭夫（2005）平衡致死法による実用的な雄蚕飼育技術の確立．日蚕雑，**74**，81-87.
79. 大沼昭夫・田島弥太郎（1989）蚕の食性に関する突然変異の研究（第２部）　第12報　諸桂由来の食性突然変異 *Nps* の連関検索．蚕研彙報，**37**，13-19.
80. 大沼昭夫・田島弥太郎（1990）蚕の食性に関する突然変異の研究（第２部）　第12報　食性変異遺伝子（*Nps*）の第３連関群における座位．蚕研彙報，**38**，15-22.
81. 大沼昭夫・田島弥太郎（1996）“世界一”に見出された新しい広食遺伝子 *Sek*．蚕研彙報,**44**,1-13.
82. 大沼昭夫・竹村洋子・田島弥太郎（2002）広蚕性遺伝子 Ph^B．Ph^S と *Sek* の遺伝子量効果．蚕糸会研報，**50**，79-87.
83. Sturtevant, A., H. (1915) No crossing over in the female of the silkworm moth. *Amer. Nat*,. XLIX, 42-44.
84. 清水久仁光・松野道雄(1975) 保存蚕品種の蟻蚕の人工飼料摂食反応性.蚕糸研究,**97**,9－24.
85. SHIMIZU, T. (2000) Explorative method to detect deterrent and stimulant in the food using *Bombyx mori* and *Mamestra Brassicae. Sericologia,* **40**, 297-302.
86. 杉村順夫（2007）クワ葉におけるカルシウム集積の場　―その構造と機能―．蚕糸・昆虫バイオテック，**76**，137-140.
87. SUGIMURA, Y., I. NITTA, Y. MORITA, S. ISHIKAWA, T. MORI, E. KOTANI and T. FURUSAWA (1998) Microscopic detection of calcium deposited in idioblasts of mulberry leaves. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **67**, 445-451.
88. SUGIMURA, Y., T. MORI, I. NITTA, E. KOTANI, T. FURUSAWA, M. TATSUMI, S. KUSAKARI, M. WADA and Y. MORITA (1999) Calcium deposition in idioblasts of mulberry leaves. *Ann. Bot.*, **83**, 543-550.
89. 高宮邦夫（1968）人工飼料に対する蚕品種の適応性．蚕糸研究，**69**,27－34.
90. 田中幸夫・大井秀夫（1994）夏秋蚕用広食性蚕品種「ひたち×にしき」の育成経過と性状．蚕研彙報，**42**,27－40.
91. 田島弥太郎・町田　勇（1958）蚕の食性に関する突然変異の研究Ⅷ　食性異常蚕出現率の淘汰ならびに正常系統との交雑実験．遺伝研年報，**8**，25-26.
92. 田島弥太郎・町田　勇（1959）蚕の食性に関する突然変異の研究Ⅸ　食性異常に関する主遺伝子の座位．日蚕東海支部講要，**7**，22.
93. 田島弥太郎・大沼昭夫（1991）蚕の食性に関する突然変異の研究（第２部）第13報　２種の広食蚕系統の遺伝学的解析．蚕研彙報，**39**，1-9.
94. 田島弥太郎・大沼昭夫（1992）蚕の食性に関する突然変異の研究（第２部）第14報　広食性遺伝子が蚕の第３染色体上に座位することを証明する実験．蚕研彙報，**40**，1-6.
95. 田島弥太郎・大沼昭夫（1994a）蚕の食性に関する突然変異の研究（第２部）第16報　２種の広食蚕

系統と C136 との交雑による蚕の食性遺伝解析．蚕研彙報，**42**，1-10.
96. 田島弥太郎・大沼昭夫（1994b）蚕の食性に関する突然変異の研究（第 2 部）第 17 報　ゼブラ遺伝子によって標識された広食性遺伝子を持つ蚕の一系統について．蚕研彙報，**42**，11-18.
97. 田島弥太郎・大沼昭夫・田中幸夫（1989）蚕の食性に関する突然変異の研究（第 2 部）第 8 報　蚕の各種食性突然変異系統の合成飼料に対する反応と特性．蚕研彙報，**37**，1-12.
98. 田島弥太郎・小林義彦・小沢民治・町田 勇（1984）蚕の食性突然変異(*Np*)の研究．蚕研彙報,**32**,7-30.
99. TOL, R.W.H.M.van and J. H. VISSER (2002) Olfactory antennal responses the vine weevil *Otiorhynchus sulcantus* to plant volatiles. *Entomol.Exp.Appl.* **102,** 49-64
100. 冨永佳也（1995）昆虫の脳を探る．pp.111-115，共立出版，東京.
101. 鳥居一男・森井謙介（1948）蚕児の食性に関する研究.蚕研彙報，**2**，3-12.
102. 常山 泉・田中幸夫（2001）蟻蚕の摂食反応性に及ぼす炭酸カルシウムの影響.日蚕雑，**70**,97-101.
103. 常山 泉・池嶋智美・飯田のり子・鶴井裕治・田中幸夫・蜷木 理・黄色俊一（2005）蟻蚕の摂食反応性に及ぼす炭酸カルシウムと糖の複合効果.日蚕雑，**74**,9-14.
104. 常山 泉・池嶋智美・飯田のり子・鶴井裕治・田中幸夫・原和二郎・蜷木 理（2007）蟻蚕の炭酸カルシウムに対する摂食反応性とその遺伝様式.蚕糸・昆虫バイオテック，**76**,55-61.
105. WATANABE, T. (1958) Substances in mulberry leaves which attract silkworm (*Bombyx mori*). *Nature*, **182,** 325-326.
106. 山本俊雄（1983）人工飼料摂食異常蚕の遺伝学的解析．日蚕雑，**52**,330-335.
107. 山本俊雄･清水久仁光(1982) 蟻蚕における人工飼料摂食反応性の遺伝学的解析．日蚕雑,**51**,332-336.
108. 柳川弘明（1990）カイコの人工飼料育技術．農業及び園芸,**65**，631 - 636.
109. 柳川弘明・渡辺喜二郎・鈴木 清（1991）低コスト人工飼料の開発．線形計画法による広食性蚕用人工飼料の開発．蚕糸昆虫研報,**3**，57－75.
110. 八杉龍一･小関治男･古谷雅樹･日高敏隆(1996) 生物学辞典．pp.397，岩波書店，東京.
111. 矢沢盈男・平尾常雄・荒井成彦・八木繁實（1991）“広食性蚕”（あさぎりおよび沢 J）の摂食反応と味覚応答．日蚕雑，**60**，363-371.
112. 横山忠雄（1970）食性異常蚕の品種別分布とその人工飼料に対する反応について．蚕研彙報,**18**，16 - 23.
113. 横山忠雄（1971）　食性異常蚕の人工飼料に対する反応について．Ⅱ．桑葉粉末を含まない人工飼料による飼育成績，蚕研彙報，**19**,12 - 16.
114. 横山忠雄（1975）蚕の食性に関する研究（XI）．食性異常蚕沢 J の由来と性質．蚕研彙報,24，27-30.

Summary

Physiological and genetic studies on the feeding response to calcium carbonate in the newly hatched larvae of the silkworm, *Bombyx mori*

By
Izumi TSUNEYAMA

Over the past fifty years, the search has been conducted for substances (stimulants) inducing feeding behavior of the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Many stimulants were isolated from mulberry leaves, all of which were chemical compounds commonly found among other green leaves. Consequently, it has been considered that feeding in the larvae of the silkworm is enhanced by quite common stimulants, which are also contained in other plants, and that, for the question of why the silkworm larvae eat only mulberry leaves, other plants contain deterrents and repellents that are feeding inhibitors to the larvae. However, studies on the feeding habits of the larvae of phytophagous insects revealed that typical secondary-substances contained in plants play an important role as feeding factors in host-plant selection of the phytophagous larvae. From this viewpoint, it is considered that some particular unidentified substances may also be contained in mulberry leaves.

In this study, focus has been given on calcium carbonate ($CaCO_3$) that accumulated in the idioblasts of mulberry leaves, and the effects of calcium carbonate on the feeding behavior in the newly hatched larvae of the silkworm were examined. Several Japanese and Chinese varieties of the silkworm were used for the experiments. Calcium carbonate was added to the basal diet consisting of cellulose, agar and distilled water. The diet (calcium carbonate feed), thus prepared, was given to the newly hatched larvae. As a result, it was found that calcium carbonate had the effects of inducing the feeding in the larvae and keeping them on the diet food. It was also found that calcium carbonate could produce a synergetic effect, which strongly stimulated larval appetite, in combination with various saccharides. Furthermore, calcium silicate ($CaSiO_3$) and calcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$), which had low solubility in water, were confirmed to have the same effects as calcium carbonate.

Next, the genetic aspects for the feeding response to calcium carbonate in the newly hatched larvae of the silkworm were investigated. The two strains, which have a contrast feeding response to calcium carbonate, were bred among numerous varieties by repeating interbatch-selections according to the amount of calcium carbonate consumed during feeding. Then, the crossings of F_1, F_2 and BF_1 generations between these two strains were carried out, and the feeding response to calcium carbonate of groups of 50 larvae in each generation was examined. The results indicated that, the strain showing a vigorous response to calcium carbonate was incompletely dominant against the strain not showing it. Moreover, it was inferred that the capability of responding to calcium carbonate was strongly controlled by a single major gene on the autosomal chromosome.

For genetic analysis concerning the eating habit, it is necessary to examine the feeding response according to the individual, and to separate trait that each possessed. However, in the group of 50 larvae rearing, the larvae which ate the calcium carbonate diets were not separated from the larvae

which did not eat them, because growth was not observed in the larvae of the silkworm which ate the calcium carbonate diet which did not include a main nourishment source such as sugar or the protein. This is why the further genetic analysis was not carried out by the group rearing.

In order to investigate the gene which controls the feeding response to calcium carbonate in the newly hatched larvae of the silkworm, further studies were conducted with the two strains mentioned above.

The crossings of F_1, and BF_1 generations between these two strains were carried out, and the individual feeding response to calcium carbonate in the larvae of each generation was examined. The ratio of the number of the larvae which ate the diets for the number of the tested larvae was calculated. The feeding response to calcium carbonate in each crossing was also evaluated by the ratio. Both the ratios in reciprocal F_1 hybrids were equivalent to the ratio in the parental strain not showing any feeding response to calcium carbonate. And the ratio of the larvae which ate the diets containing calcium carbonate was approximately 50% in the reciprocal crossings of BF_1 that crossbred the parental strain showing a vigorous response to calcium carbonate in the F_1 hybrid. These results lead us to the conclusion that, the strain showing a vigorous response to calcium carbonate was recessive against the strain not showing it when the larvae were reared individually and the trait was controlled by a single gene. This single recessive gene that controls the feeding response to calcium carbonate was named '*cacp* gene (calcium carbonate preference gene)'.

Further, in order to clarify the locus of the *cacp* gene, the genetic analysis was carried out through SLA (Scanning linkage analysis) and BCMAP (Mapping for Back Cross) using RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) of cDNA clones. It is found from the results that, the gene was linked to the ninth cDNA linkage group (RFLG 9) on the molecular gene map of the silkworm, and it was inferred that the locus of it was at distance of 21.4cM from cDNA clone, m162 which located position 0 on RFLG 9.

「いろどり」繭層の蛍光色の雌雄差について

栗岡　聡
蚕糸科学研究所

AKIRA KURIOKA：Sex difference in the fluorescent color of the yellow green cocoon shell (Irodori) of *Bombyx mori*.

緒　　言

笹繭「いろどり」の繭層色には，同一蚕期の飼育ロットであっても繭層の色相に個体差が認められる。特に，UV照射下で発光する蛍光色を比較すると，繭層蛍光色の個体差が顕著になり，繭層は強い蛍光を発する繭層(SF)と弱い蛍光を示す繭層(WF)の2群に大別された[1)]。「いろどり」繭層では，蛍光色の強弱に拘わらず，観測される波長は一定であることから，蛍光色の個体差は，蛍光波長成分の違いではなく，これらの波長の強度差に起因していることが示唆された。本報告では，このような蛍光強度の違いとカイコの雌雄差との関係について調べた。また，蛍光の強度差に依存して繭層のラジカル消去活性が異なるのか調べた結果も報告する。

材料と方法

UV照射による雌雄鑑別

平成22年度春蚕期の「いろどり」繭から無作為に250試料を抽出し，UV照射試験に供試した。紫外線照射キャビネット(Chromato-Vue C-75, UVP Ltd.)を用いて繭試料に365nmの紫外線を照射し，繭層から発光した蛍光色を目視で観察し，強い蛍光を発するSFと弱い蛍光を呈するWFの2群に分別した。分別した繭を切開して蛹を取り出し，蛹の雌雄鑑別を行い，繭層を雌雄別に分けた。

抗酸化活性の測定

抗酸化活性はDPPH分光測定法で行った。SF及びＷＦの各繭層試料50mgに2mlの70%エタノールを加え，室温で3時間抽出を行った。抽出液を70%エタノールで8倍に希釈した希釈液についてDPPH消去活性を測定し，雌雄別繭層の抗酸化活性を比較した。

3次元蛍光スペクトル測定

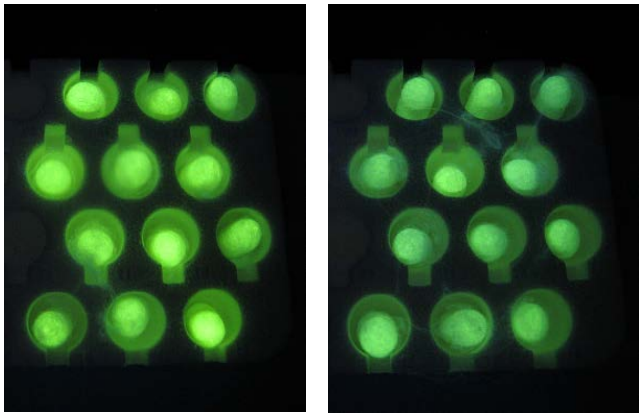
日立F-7000分光蛍光光度計を用いて励起波長240～500nm，蛍光波長250～620nm間の3次元蛍光スペクトルを測定した。

結果と考察

SF繭層とWF繭層の割合

前報の実験結果と同様に，本実験で用いた「いろどり」繭層も366nmの紫外線の照射によって，蛍光の強さに違いが認められた(図1)。そこで，繭層試料250粒について366nm照射下で分別した結果，強い蛍光を発光するSF繭層は163粒，弱い蛍光を発する繭層は87粒となり，供試した繭層試料の蛍光強度の割合は，SFが65.2%，WFが34.8%となった。

図 1. UV 照射による繭層の分別



SF　　WF
65.2 (%)　　34.8 (%)

雌雄差と蛍光強度

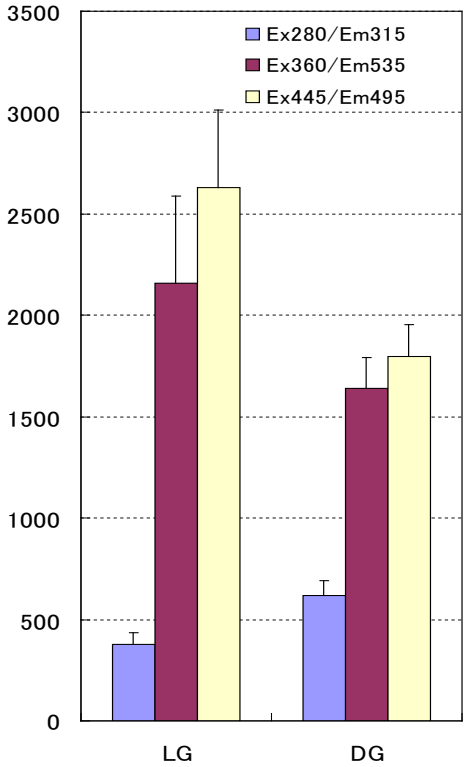
SF繭層とWF繭層の各群の繭層試料を切開し，蛹を取りだして雌雄を確認したところ，SFの繭層は雌に由来し，WFの繭層は雄に由来することがわかった（図2）。以上の結果から，「いろどり」繭層の蛍光色で確認されていた個体差は，雌雄間差によるものであり，「いろどり」は雌の方が雄よりも強い蛍光を発する繭をつくることが明らかとなった。

図 2. 雌雄により異なる蛍光色

雌　　雄　　SF　　WF

今回の実験に用いた「いろどり」繭層の蛍光波長を測定した結果，前報の平成20年度春蚕期の「いろどり」繭層の蛍光波長とほぼ同波長の315nm，495nm，535nmの蛍光波長が観測された。SF繭層ではWF繭層に比べて495nmと535nmの蛍光波長が強い傾向が認められた（図3）。

図 3．繭層表面の蛍光強度の比較



今回の平成22年度産と前回の平成20年度産の繭層試料の強度のパターンを比較すると，両者には違いが認められ，平成22年度産の繭層のほうが495nmの蛍光波長が強い傾向が認められた。このことは，「いろどり」繭層に含まれるフラボノイドが桑葉に由来することから，桑の生育状態によって繭層フラボノイドは変動をうけやすい可能性が示唆された。

雌雄差と抗酸化活性

SF繭層とWF繭層のエタノール抽出液のUVスペクトルを比較すると，SF繭層はWF繭層よりも364nmの吸収が約2倍強く，SF繭層はWF繭層に比較してフラボノイド量が多いことが示唆された(図4)。フラボノイド量が多いほど強いDPPHラジカル消去活性を示す可能性がある。そこで，雌雄別にDPPHラジカル消去活性を調べた結果，予想に反して雌雄差による活性差は認められなかった(図5)。

「いろどり」繭層に含まれる総フラボノール中には，抗酸化に関与しているフラボノイドと関与していないフラボノールが存在していると予想される。本実験の結果から，SF繭層はＷＦ繭層よりもフラボノイド含量が多いにもかかわらず，DPPH消去能において両者は同程度の活性を示したことから，抗酸化に関与しているフラボノイド含量には雌雄差がない可能性が示唆された。

図 4.「いろどり」エタノール抽出物の紫外線吸収スペクトル

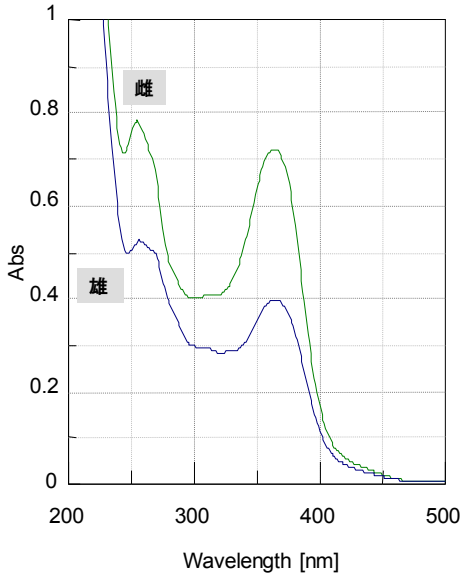
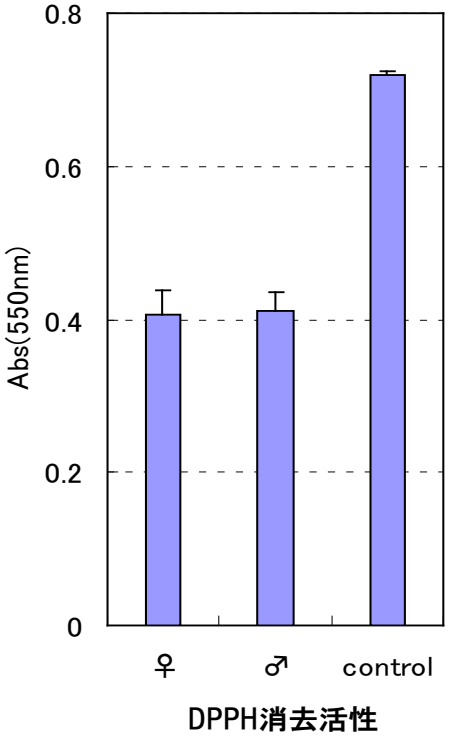


図 5.「いろどり」エタノール抽出物の抗酸化能



摘　　要

「いろどり」繭層の蛍光色の違いは，雌雄の違いによるもので，雌の方が雄に比べて強い蛍光を発する繭をつくることが明らかとなった。雌雄のフラボノール含量を比較すると，雌に由来する繭層の方が含量は多かった。しかし，抗酸化活性を雌雄別に比較した結果，両者の活性には顕著な違いが認められなかったことから，抗酸化活性に関わるフラボノイド含量には雌雄差がないことが示唆された。

引用文献

1）栗岡聡・山崎昌良（2010）　「いろどり」繭層の蛍光色の個体間差異．大日本蚕糸会研究報告，58，43-46

静電容量センサーを用いた太繊度糸の繊度測定

岡島正章
蚕糸科学研究所

MASAAKI OKAJIMA：The size measurement of thick silk yarn with capacitance sensor

緒　　言

本研究所で研究を進めてきた太繊度糸は，通常の生糸と異なり節や繊度ムラに特徴があるため，繊度感知器等の従来の接触型感知器では，節詰まりによる糸条故障が多くなること，目標とする繊度範囲内への繊度コントロールが難しいこと等のため，その実用化に問題があり，新たな感知システムの開発が必要とされていた。従来の繊度感知器に代わる繊度感知方式については，光電管方式[1)]，レーザーセンサー方式[2)]等多くの研究報告がある。しかし，光電管方式は，長時間の連続測定に難があること，レーザーセンサー方式は，精度は高いがセンサーが高価であることと，測定する糸の範囲により適合するセンサーを変える必要があること等の問題点があった。そこで，糸の形状に影響を受けにくい非接触型の静電容量センサーを生糸測定用に独自開発し繊度感知システムを構築した。本システムにおける基本性能について繊度測定試験を行ったので報告する。

材料と方法

1. 静電容量センサーによる繊度感知システム

静電容量センサーは，センサーに電圧をかけたときに，センサーの電極間に発生する電界を，非導体の生糸が走行する時の静電容量の変化を計測している。乾いている生糸よりも，濡れている生糸のほうが静電容量の変化が大きい特性を持つことから，水分率が大きい太繊度糸の計測に適している。そこで，繰糸の走行中の生糸測定用に，独自開発した静電容量センサー（翔栄システム製）（図1）を用いた非接触型繊度感知システムを開発した。表示ユニット（図2）には，繰製糸の太さの変化を表示するポジション，0点を合わせるオフセット，感度の調整をするためのゲイン，パソコンへの電圧出力端子が組み込まれている。

ポジションの表示位置と出力電圧の関係を調べた結果を図3に示す。ポジションの表示位置と出力電圧には比例関係があり，ポジションが1目盛変化すると出力電圧は約0.13Ｖ大きくなることがわかった。

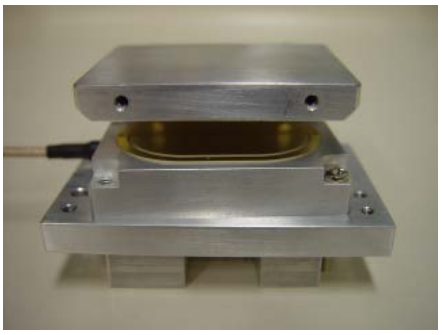


図 1．静電容量センサー

図 2．表示ユニット

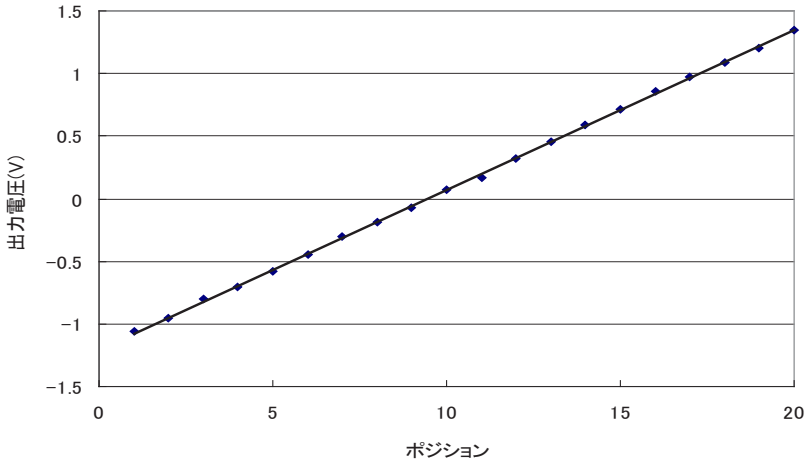


図 3. ポジション表示と出力電圧の関係

2. 測定方法

本繊度感知システムを用いて，出力される電圧（糸の入っていないときの電圧を0Ｖとする）を測定し，電圧と繊度の関係について調査を行った。測定用太繊度糸は，繭糸交絡撹拌繰糸機を用いて，繰糸速度5m/min，ローター回転200r.p.m.に固定し，粒数を変化させた35種類の糸を使用し，繰製した糸の糸長と糸量から平均繊度を求めた。

また，本測定システムにおける再現性について調査を行うため，繰糸後の糸を水で濡らし，再度測定を行うとともに，扁平状の生糸に対する測定性能を調べるため，ローラー間を通過させ扁平状に加工した糸についても計測を行った。

結果と考察

1. 電圧と繊度の関係

本測定システムを用い，約150～700デニールの各種太繊度糸についてそれぞれ1000回（1秒間に1回）出力電圧を測定し，平均繊度との関係を調べた結果を図4に示す。

データにややばらつきは見られるが，電圧と平均繊度には直線性があり，電圧が1Ｖ変化すると，繊度は200デニール程度変化することがわかった。本システムでは，オフセットを変更することにより，100～1000デニール程度の範囲の糸の測定が可能となっている。

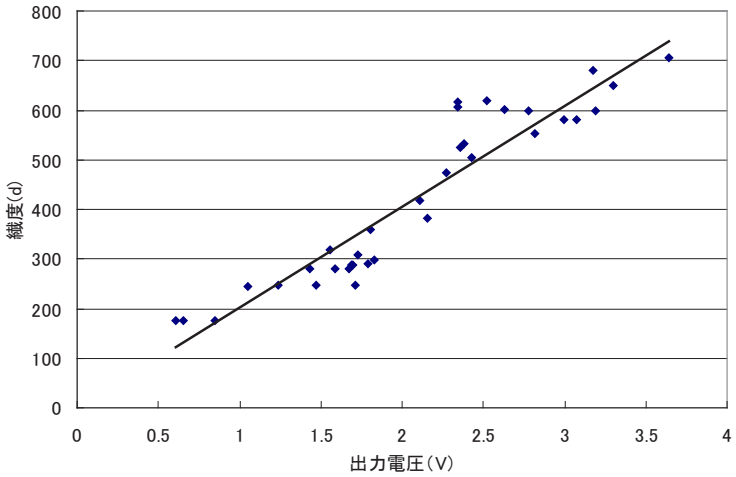


図 4. 出力電圧と平均繊度の関係

2. 測定データの再現性

測定データの再現性を調べるため，繰糸中に電圧を測定し巻き取った糸を用い，4回繰り返し電圧を測定した結果を図5に示す。

繰糸中の電圧は平均2.3Ｖであったが，4回繰り返し時の計測では平均1.2Ｖであった。これは，繰糸中の水分率は約450%，繰り返し時に濡らした糸の水分率は約250%と，糸の水分率に差があるためと考えられる。繰り返しを行った4回の測定のデータは再現性が高く，正確なデータが取得できることがわかった。

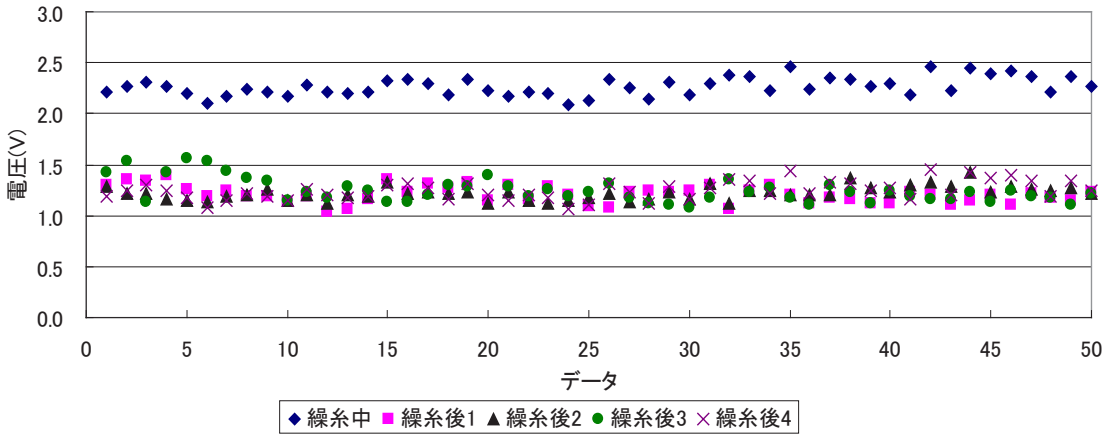


図 5. 測定データの再現性

3. 扁平に加工した生糸の測定

扁平に加工した糸について電圧を測定した結果を図6に示す。通常糸と扁平糸の測定値に大きな差はないことから，本測定システムでは，糸の断面形状に影響を受けることなく計測できることがわかった。

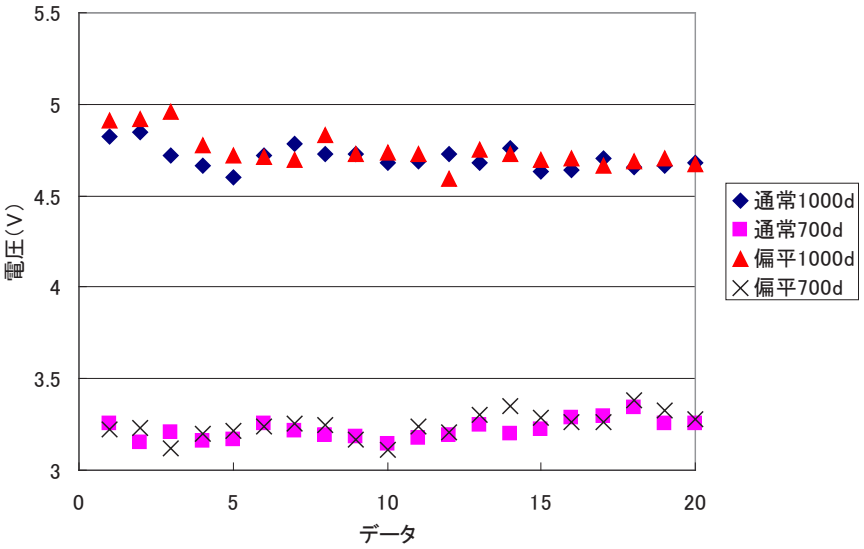


図 6. 扁平糸と通常糸の計測値比較

摘　　要

太繊度糸の繊度管理において，従来の生糸用の接触型感知器では繊度コントロールが難しいことから，非接触型の新たな繊度感知方式として，生糸測定用に独自開発した静電容量センサーを用いた測定システムを開発し，太繊度糸の繊度測定試験を行った。その結果，出力電圧と繊度には直線性があり，電圧が1Ｖ変化すると，繊度が約200デニール変化することがわかった。また，同じ条件下であれば再現性も高く，扁平等糸の形状にも影響を受けにくいため，太繊度糸の繊度コントロールに有用であることがわかった。

引用文献

1）柳原茂（1960）光線による生糸繊度の測定および感知に関する研究，蚕糸試験場報告, 16，113-127.
2）中島健一・三浦幹彦(2008)細繊度生糸繰製時における繊度管理システムの開発, 日シ学集録，56，9-13.

建染染料による深みのある黒染めの試み

花之内智彦・塩崎英樹
蚕糸科学研究所

TOMOHIKO HANANOUCHI and HIDEKI SHIOZAKI :The trial of deep black dyeing on the vat dye

緒　　言

絹繊維は染色性に優れるが，摩擦によりスレや毛羽が発生することや染色堅牢度，特に洗濯堅牢度に劣るなどの欠点がある。絹の耐洗濯性の向上が図れれば，今まで使用されなかった用途にも絹を利用できることが期待される。そこで，鮮明で染色堅牢度に優れた建染染料に着目し，絹先練り先染め衣料素材の開発を行っている。しかし，建染染料はアルカリ剤と還元剤とを使用して染色するため，アルカリに弱い絹には使用されていない。染浴のアルカリ剤や還元剤に対する絹の耐性を向上させるために，クエン酸精練による歩練り[1]やエポキシド加工[2]等を施した建染染色用加工絹糸の調製方法および染色条件を検討した[3),4)]。

本報では，建染染色技術の実用化のため，紋服や喪服等のフォーマルウェア用のログウッド黒染め糸[5),6)]の深みのある黒色を目指し，本染色法における黒系染料と基本色染料（赤・黄・青系染料）との配合染色黒染め糸について，分光測色計による分光反射率曲線のパターンから深みのある黒染めについて検討した。

材料と方法

試料

前報[2)]に従い，エポキシド加工した27中諸撚糸を建染染色用加工絹糸として，染色試験に供した。なお，対照区にはログウッドで染色された市販の絹縫合糸を用いた。

染色方法

染色実験は前報[4)]に準じ，黒系染料（Mikethren Black BBN s/f）と赤系（Mikethren Red FBB s/f），青系（Mikethren Blue BC s/f），黄系（Mikethren Yellow 3GL s/f）の各基本色染料とを配合して熱湯で練り，適量の冷水を加えた後，水酸化ナトリウム5g/L，炭酸ナトリウム20g/L，ハイドロサルファイトナトリウム12g/Lを添加して染液を調製し，浴比1：30，60℃，60分間の染色を行った。本染色実験で用いた黒系染料と基本色染料（赤・黄・青系染料）の染料濃度を表1に示す。

測色

C光源，2°視野の条件で分光測色計（CM-508i，ミノルタ製）を用いて染色糸の測色を行った。

表 1．黒系染料と赤･青･黄系染料の染料濃度

No.	染料濃度（%o.w.f）			
	黒	赤	青	黄
1	25	0	0	0
2	25	2	0	0
3	25	0	2	0
4	25	0	0	2
ログウッド	–	–	–	–

結果と考察

本染色法における黒系染料と基本色染料（赤・黄・青系染料）とを表1のように配合染色した糸の分光反射率を図1に示す。深みのある黒染めとされるログウッド黒染め糸の分光反射率曲線は，400nmから700nmの波長域でほぼ平坦な曲線を示す。それに対して，黒系染料のみで染色したNo.1の分光反射率曲線は500nm付近の反射が強く，青味掛かった黒色を呈する。黒系染料と青系染料や黄系染料とを配合染色したNo.2およびNo.3は500nm付近の反射が僅かに低下し，赤系染料を配合したNo.2では，500nm付近の反射が低下することがわかった。これは黒系染料と青系染料や黄系染料との配合染色では染料濃度が高くなり，400nmから700nmの波長域で光を吸収するため，500nm付近の反射が低下したものと考えられる。黒系染料と赤系染料との配合染色は，赤系染料の最大吸収波長が500nm付近にあるため，500nm付近の反射を低下させたものと思われる。

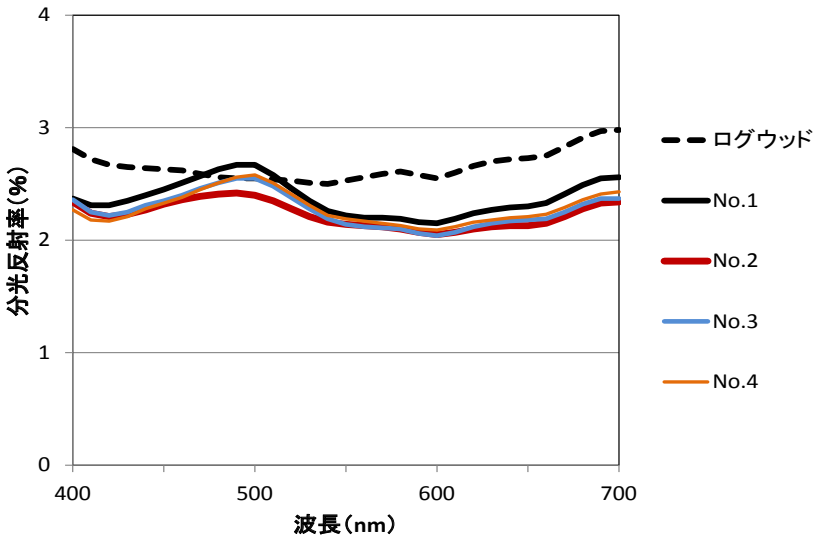


図 1．黒系染料と基本色染料との配合染色糸の分光反射率

摘　　要

フォーマルウェアに使える深みのある黒染めを目指し，黒系染料と基本色染料（赤・黄・青系染料）との配合染色を行った結果，黒系染料と赤系染料とを配合染色すると500nm付近の反射が低下することがわかった。さらに，深みのある黒色にするには，他の赤系染料との配合染色を試み，より500nm付近の反射を抑える必要がある。

引用文献

1) 花之内智彦，塩崎英樹（2006）酸精練法による歩練り絹糸の調製，繊維学会予稿集，**61**，251.
2) 花之内智彦，塩崎英樹（2006）クエン酸歩練り絹糸のエポキシドによる改質加工の試み，日本蚕糸学会関東支部学術講演会講演要旨集，**57**，5.
3) 花之内智彦，塩崎英樹（2012）絹への建染染色　- CI Vat Red 10を例として -，日シ学集録，**56**，84-85.
4) 花之内智彦，塩崎英樹（2012）建染染料による黒染め，日シ学集録，**59**，23.
5) 加藤弘（1987）絹繊維の加工技術とその応用，154-165，繊維研究社，東京.
6) 福澤佳計（1997）京黒染とログウッドによる黒引染，繊消誌，38，567-571.