

外部寄生蜂の毒液を使ったホルモンの働きを実感するための教材開発

中 松 豊

はじめに

チョウ目の幼虫を野外から採集しその後飼育してみると、かなりの確率で寄生蜂が寄生している。小学校理科でよく教材として使用されるモンシロチョウも、野外から採集してきた幼虫を教室内で飼育すると、やがてアオムシコマユバチ幼虫が脱出してくるという話を小学校の先生方から耳にする。モンシロチョウを飼育する目的で、寄生蜂が寄生していたら、観察を断念しなければならないという場合が多いが、野外で実際に起きている生物間の相互関係や環境を含む生態系の成り立ちを、児童や生徒に理解させる上では寄生蜂は欠かせない教材になる。またこれらの寄生蜂は教材として優れている面も多く、理科教育において利用価値が高い（河原と北野, 1983; 中松と田中, 2006; 中松ら, 2011）。

寄生蜂は寄主の体内に寄生する内部寄生蜂と寄主の体外に寄生する外部寄生蜂に分かれ、さらに寄生時に寄主を麻酔するかもしくは殺してから利用する殺傷寄生蜂（ideobiont parasitoid）と、寄主を生かしながら利用する飼い殺し寄生蜂（koinobiont parasitoid）に分かれる（Askew と Shaw, 1986）。寄生蜂が寄生成功するためには寄主の生理状態を制御し、寄生蜂の成長・発育を維持しなければならない（Thompson, 1982, Bentz とBarbosa, 1990; Thompson, 1993; Alleyne と Beckage, 1997）。とくに内部寄生蜂の場合は卵が寄主の体腔中に挿入されるので、寄主の生体防御系を制御しない限りは寄生成功することはない。そこで寄生蜂の雌蜂は産卵時に卵とともに寄主体腔中に注入する毒液やポリドナウイルスによって、寄主の生体防御系を制御し、卵や幼虫が寄主によっ

て排除されないよう調節している (Asgari ら, 1996; Schmidt ら, 2005). さらにこの毒液やポリドナウイルスは血漿中のタンパク質や脂質などの栄養分を増加させ, 寄生蜂幼虫に供給するなどしてその成長・発育を助けることも知られている (Nakamatsu ら, 2002; Nakamatsu と Tanaka, 2004).

アワヨトウスマユヒメコバチ *Euplectrus separatae* はアワヨトウ幼虫を寄主とし, その外部に複数の卵を産み付ける外部寄生蜂で, かつ寄主を生かしながら利用する飼い殺し寄生蜂である. この寄生蜂はアワヨトウ幼虫の皮膚に卵を産み付けるので, 寄生成功の鍵は, 寄主の変態を制御することにある. この寄生蜂は産卵前に寄主の体腔中に毒液を注入し, 内分泌環境を制御することによって, 寄主の変態 (幼虫脱皮) を止めてしまうことが知られている (Nakamatsu と Tanaka, 2003) (図1). この現象を発育停止という.



図1 アワヨトウ幼虫に毒液を注入するアワヨトウスマユヒメコバチの雌成虫
アワヨトウスマユヒメコバチの雌蜂は寄主アワヨトウ幼虫に毒液を注入後, 表皮上に産卵する.

チョウ目幼虫の変態は、アラタ体からの幼若ホルモンと前胸腺からのエクジステロイドという2種類のホルモンが関わっている(山下, 1986)。体内の生理的な環境が整った上でこの2つのホルモンが体内に同時に分泌されると、次齢への幼虫脱皮を行う。*Lacanobia oleracea*に寄生する外部多寄生蜂 *Eulophus pennicornis* の毒液は、これらのホルモンを制御することにより寄主の発育停止を促進していることが知られている(Edwardsら, 2006)。

ホルモンの実験は材料の調達や方法が複雑で、高等学校の生徒が扱える内容の簡易実験を構築するのは難しい。したがって、高等学校の教科書で扱っているホルモンの実験は、基礎生物においてメダカを使った心拍数の実験(東京書籍)しか掲載されていない。それ以外の教科書を使用している高等学校の生徒は動物の恒常性を保つ上で重要な役割を担っているホルモンの働きを、実験を通して実感することができない。アワヨトウスマユヒメコバチの毒液を使った簡易実験が開発されれば、教科書だけの知識的概念から実感を伴った理解に変化させることもできるし、また、高等学校の教科書で詳細に扱われない、動物の「寄生」の概念や、ひいては生物多様性の理解につながるものと考えられる。そこでアワヨトウスマユヒメコバチの毒液を使ったホルモンの簡易実験の開発を試みた。

材料と方法

1 供試虫

寄主アワヨトウ *Mythimna separata* は鹿児島県鹿屋市で採集した個体を、名古屋大学で継代飼育し、さらに皇學館大学にて、気温25℃、16時間明期8時間暗期の長日条件下で飼育した。餌は1齢～3齢幼虫まではシルクメイトL4M(日本農産工業(株))、4齢～6齢幼虫までは簡易人工飼料(表1)、成虫には10%ショ糖溶液を与え、ともにプラスチックの容器内で飼育した。

寄生蜂アワヨトウスマユヒメコバチ *Euplectrus separatae* も寄主アワヨトウ同様に鹿児島県鹿屋市で採集した個体を、名古屋大学で継代飼育し、コロニーを皇學館大学に移して気温25℃、16時間明期8時間暗期の長日条件下で飼育した。アワヨトウスマユヒメコバチは寄主アワヨトウの6齢0日目幼虫に

産卵させ、その後被寄生寄主は簡易人工飼料、羽化したアワヨトウウスマユヒメコバチ成虫は10%ショ糖溶液を与えて育てた。

表1 アワヨトウの簡易人工飼料成分

成分番号	材料	分量
1	草食動物用固形飼料 ^a	100g
2	ふすま ^b	100g
3	ビール酵母 ^c	20g
4	寒天 ^d	12g
5	大豆油 ^e	2ml
6	水	660ml
7	アスコルビン酸 ^f	5.32g
8	プロピオン酸 ^e	1.3ml
9	酢酸 ^g	20ml

^a オリエンタル酵母工業株式会社

^b 江別製粉株式会社

^c アサヒフードアンドヘルスケア株式会社

^d バイオセーフ株式会社

^e ナカライテクス株式会社

^f セラケム株式会社

^g トライアルカンパニー

2 アワヨトウウスマユヒメコバチ毒液のアワヨトウ幼虫への人工注入

アワヨトウウスマユヒメコバチの毒液を使った簡易実験を開発する前に、雌蜂から毒のうだけを摘出して内部の毒液をアワヨトウ幼虫に人工注入し、アワヨトウ幼虫の発育に対する毒液の効果を調べた。

まず、アワヨトウウスマユヒメコバチの毒液 (Venom) は以下の方法で供試した。羽化後6日目の雌成虫の腹部をリン酸緩衝液 (PBS 0.9% NaCl (w/v) in 0.067 M phosphate buffer, pH 7.4) を入れたペトリシャーレ内で解剖し、毒のうをピンセットでつまみ別の容器に移した。容器に入っている毒のうを2本のピンセットで破碎した後、12000gで10分間遠心分離を行い、その上澄みにPBS1 μ lあたり雌蜂の0.5, 0.1, 0.01匹分に相当する毒液量 (雌蜂等量) になるようPBSを加えて調節した。

6齢1日目のアワヨトウ幼虫への注入は、それぞれの雌蜂等量の毒液1 μ l

をマイクロキャピラリを使って腹脚の先端から注入した。注入した幼虫は個別にプラスチックペトリ皿に入れ、簡易人工飼料を与えて飼育し、蛹への変態の有無を記録した。

3 毒液の簡易抽出法

アワヨトウウスマユヒメコバチの毒液を使った簡易実験を構築するため、まずアワヨトウウスマユヒメコバチの雌蜂から毒液成分を抽出するための簡易方法を検討した。

生理食塩水 (0.9% NaCl (w/v) in distilled water) 10 μ l あたり 1.0, 0.5, 0.1, 0.01 雌蜂等量の毒液を作るため、羽化後 7 日目のアワヨトウウスマユヒメコバチの雌蜂を 2 匹, 10 匹, 20 匹それぞれ用意し、10 分程度冷凍庫の中に入れた。乳鉢の中に冷凍庫で冷やしたそれぞれの雌蜂と、同じく冷蔵庫で冷やした 200 μ l の生理食塩水を入れて乳棒で破碎し毒液成分を抽出した。また、0.01 雌蜂等量の毒液を作るため、冷やした 1 匹の雌蜂を冷やした 1000 μ l の生理食塩水で破碎し抽出した毒液成分も用意した。破碎後しばらく静置させ、その後上澄み液をエッペンチューブに回収し毒液として供試した。

4 アワヨトウへの毒液の簡易注入法

次に 3 で用意した毒液を、アワヨトウの 6 齢 1 日目の幼虫の体腔中に簡易注入する方法を検討した。

ピーカーの中に水を入れ、その中に 10 分間放置して麻酔したアワヨトウの 6 齢 1 日目の幼虫を用意し、腹部第 5 節の腹脚から 3 で用意した 10 μ l あたり 1.0, 0.5, 0.1, 0.01 雌蜂等量の毒液を 1ml のシリンジを用いて 10 μ l 注入後、ミシン糸で腹脚を結紮した。毒液を注入した幼虫は個別にプラスチックペトリ皿に入れ、簡易人工飼料を用いて 1 週間飼育し、蛹への変態の有無を記録した。

結果と考察

1 アワヨトウ 6 齢幼虫へのアワヨトウウスマユヒメコバチ毒液の人工注入。

外部寄生蜂が寄主に寄生すると、寄生蜂が産卵前に寄主に注入する毒液に

よって寄主が発育停止することが知られている (UematsuとSakanoshita, 1987; CoudronとBrandt, 1996; RichardsとEdwards, 1999). Edwardsら (2006) は外部多寄生蜂 *Eulophus pennicornis* の毒液が寄主 *Lacanobia oleracea* の5齢(終前齢)においてエクジソンの分泌を抑制し, 6齢(終齢)においては幼若ホルモン分解酵素を阻害して, 幼若ホルモン濃度を維持することによって寄主の発育停止を促していると報告している. アワヨトウウスマユヒメコバチに寄生されたアワヨトウ幼虫も, 寄生蜂の毒液によって発育停止が誘導されることが知られているが (Nakamatsu と Tanaka, 2003), 今回6齢1日目のアワヨトウ幼虫にアワヨトウウスマユヒメコバチの毒液を人工注入したところ, 毒液注入量が0.1雌蜂等量以上でアワヨトウ幼虫は発育停止を起こした(表2). しかし, 0.01雌蜂等量の毒液量では寄主の発育停止は見られなかったことから, 実際には0.1雌蜂等量以上の毒液を注入しているものと推測される. Nakamatsu と Tanaka (2003) は0.3雌蜂等量よりも少ない毒液注入量では, 幼虫形態が維持されず変態異常が多く見られたことから, 寄主が正常な発育停止を起こすためには0.3雌蜂等量以上の毒液量が必要であると報告している. しかし学校の教材においては, アワヨトウ幼虫の完全な幼虫脱皮や蛹化が起こらなければ, 正常なホルモンの分泌がおこなわれていない証拠になるし, 準備するアワヨトウウスマユヒメコバチの雌蜂の数も少なくて済むので, 簡易注入実験を開発する際には0.1雌蜂等量の毒液の人工注入を基準とした.

表2 人工注入するアワヨトウウスマユヒメコバチの毒液量の違いによる寄主アワヨトウの発育停止率

毒液量*	供試寄主虫数	発育停止した寄主虫数	発育停止率(%)
0.5	15	15	100.0
0.1	15	10	66.7
0.01	16	1	6.3
生理食塩水	15	1	6.7

*それぞれの数値はアワヨトウウスマユヒメコバチ雌蜂1匹が持っている全毒液量に対してアワヨトウ6齢1日目幼虫に注入した毒液量を示す。0.5は1/2匹分、0.1は1/10匹分に相当する。

2 アワヨトウウスマユヒメコバチ毒液の簡易注入実験

アワヨトウウスマユヒメコバチの雌蜂を解剖して毒のうだけを摘出して毒液を供試し、アワヨトウ幼虫にマイクロキャピラリを使って注入するのは容易でなく、ある程度の熟練が必要である。この実験を高等学校の授業でおこなうのは難しいと考えられるので、アワヨトウウスマユヒメコバチの雌蜂を乳鉢の中で一定量の生理食塩水とともに乳棒を用いて破碎し、毒液成分を抽出する簡易実験法を考案した。また毒液の注入も市販の1mlのシリンジを使って1.0, 0.5, 0.1, 0.01雌蜂等量をアワヨトウ幼虫の腹脚から注入することにより簡易化した。この方法で実際に実験をおこなってみたところ、0.1雌蜂等量の毒液注入実験区が75.0%、0.5雌蜂等量が76.7%となり、全体の7割以上のアワヨトウ幼虫が変態できずに発育停止を起こした(表3)。また、1.0雌蜂等量の毒液注入実験区は94.1%が発育停止を示したことにより、毒液の量が増えると発育停止率が上昇するという、毒のうだけを摘出して毒液を抽出した前述の結果と同様の傾向を示した。この結果より今回考案した実験方法は、高等学校の教材として十分利用できる可能性があることを示した。

表3 アワヨトウウスマユヒメコバチの虫体すべてを生理食塩水内で破碎し毒液を抽出した場合の、人工注入する毒液量の違いによる寄主アワヨトウの発育停止率

毒液量*	供試寄主虫数	発育停止した寄主虫数	発育停止率(%)
1.0	17	16	94.1
0.5	30	23	76.7
0.1	44	33	75.0
0.01	14	1	7.1
生理食塩水	48	3	6.3

*それぞれの数値は1匹のアワヨトウウスマユヒメコバチ雌蜂が持っている全毒液量に対する注入した毒液量を示す。1は1匹分、0.5は1/2匹分に相当する。

これらの昆虫を実験材料として扱うためには、いくつかの克服しなければならない課題がある。そのうち材料が小さいことは、特に今回のように観察実験ではなく、解剖や注入等を行う実験の場合は、最も考慮しなければならない問題と言える。

アワヨトウウスマユヒメコバチは体長3mmで、ほぼショウジョウバエと同じくらいの大きさなので非常に小さく扱いにくいですが、今回の実験から、冷凍庫の中に入れることにより短時間の麻酔が可能なので、その状態で乳鉢の中に投入し破碎すれば、誰でも簡易に寄生蜂から毒液を抽出できる。仮にアワヨトウウスマユヒメコバチが凍ってしまっても毒液の効果は持続することがわかっている(私信)。また、アワヨトウ幼虫への毒液の注入はある程度の技術を要するが、アワヨトウ幼虫は水を入れたビーカーの中に10分くらい浸漬すれば、15分くらいは麻酔されるので、比較的ゆっくり処置できる。また、万が一毒液の注入に時間がかかり、再び水の中に入れて麻酔しなければならない状況になっても、その後のアワヨトウの蘇生や経過観察に支障はないと考えられる。

3 実験時間とデータの取り方

実験時間については、毒液の抽出、毒液の注入および結紮、アワヨトウ幼虫の飼育・片付けに合計40分を要した(表4)。説明する時間(10分)を加味すると合計50分かかるため、高等学校の1単位時間(50分)で実験を完了するためには、アワヨトウウスマユヒメコバチとアワヨトウ幼虫の麻酔は、授業開始前の休憩時間に行った方がよいと考えられる(表4)。実際に実験に慣れていない高等学校の生徒がこの実験を行う場合、実験区(毒液注入個体)が2~3匹と対照区(生理食塩水注入個体)2~3匹くらいの供試虫数が妥当であると考えられる。しかし、毒液の注入は若干の技術を要するため、生徒によっては時間が足りなく

表4 アワヨトウウスマユヒメコバチの毒液を
注入する実験に要する時間

実験内容	所要時間(分)
アワヨトウウスマユヒメコバチの麻酔	10(冷凍庫)
アワヨトウ幼虫の麻酔	10(水麻酔)
毒液の抽出	5
毒液の注射	15
結紮	10
アワヨトウの幼虫飼育・片付け	10

なる恐れがある。その場合は2人一組で行うか、班で行うかを検討する必要があるだろう。

毒液を注入されたアワヨトウ幼虫は、個別に紙を敷いたペトリ皿などの容器に入れて、人工飼料（表1）もしくはトウモロコシなどのイネ科の作物や雑草をえさとして飼育する。アワヨトウの6齢幼虫は室温で約8日間で蛹になるので（巖, 1988）、実験区の発育停止を確認するためには10日前後の経過観察が必要になる。対照区のアワヨトウ幼虫がすべて蛹化した時に、実験区のアワヨトウ幼虫が幼虫形態を維持していれば、発育停止していると見なす。数班（供試虫数が10匹以上になるような班構成）ごとにデータを共有し、図や表にして分析し、その後レポートもしくはプレゼンテーションをさせれば、より深く昆虫の内分泌について理解が進むものと考えられる。

4 終わりに

昆虫は925000種存在し、動物種の80%を占めているなど多種であり、個体数も多い（Grimaldi と Engel, 2005）。また、我々の身のまわりに多数存在し、採集しやすい、小型で飼育に場所をとらない、ライフサイクルが短い等、生物教材としてすぐれた特徴を多く有している（犬飼, 1978）。今回使用したアワヨトウも、冬期を除いてはほぼ全国的に分布しているので、トウモロコシ、イネ、ムギ畑などを探索すれば容易に見つけることができる。今後アワヨトウスマユヒメコバチの毒液の効果を正確に定量しなければならないが、カイコをはじめとしたチョウ目昆虫やその他の昆虫でも発育停止を誘導することがすでにわかっているので、身の回りの昆虫を見つけてきて供試しても問題はないと考えている（私信）。しかし寄生蜂であるアワヨトウスマユコバチの入手は難しいため、しばらくは当研究室から供給することになるが、代替生物の発見や毒液成分の精製など、より簡易な形態での教材の提供を試みるつもりである。

これまで、高等学校の生物の実験において、ホルモンに関する簡易実験が少なく、授業において実際に実験することが難しかった。しかしアワヨトウスマユヒメコバチの毒液を使った今回の研究は、技術的にも時間的にも充分、高等学校の生徒が扱える教材として活用できる可能性があると考えられる。

謝 辞

本研究を進めるに当たり昆虫の飼育や実験を手伝ってくださった、皇学館大学教育学部の澤友美氏、藤本竜志氏、向冴子氏には心より御礼申し上げる。

参考文献

Alleyne, M., Beckage, N.E., 1997. Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology* 43, 407-424.

Asgari S, Hellers M, Schmidt O., 1996. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. *Journal of general virology* 77, (Pt 10):2653-62.

Askew, R. R., Shaw, M. R., 1986. Parasitoid communities: their size, structure and development. In: Waage, J. K. and Greathead, D. J. (Eds.), *Insect Parasitoids*, Academic Press, New York, pp. 225-264.

Bentz, J., Barbosa, P., 1990. Effects of dietary nicotine (0.1%) and parasitism by *Cotesia congregata* on the growth and food consumption and utilization of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 57, 1-8.

Coudron, T.A., Brandt, S.L., 1996. Characteristics of a developmental arrestant in the venom of the ectoparasitoid wasp *Euplectrus comstockii*. *Toxicon* 34, 1431-1441.

Edwards, J.P., Bell, H.A., Audsley, N., Marris, G.C., Kirkbride-Smith, A., Bryning, G., Frisco, C., Cusson, M. 2006. The ectoparasitic wasp *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) uses instar-specific endocrine disruption strategies to suppress the development of its host *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* 52,1153-62.

Grimaldi, D. and Engel, M.S., 2005. Evolution of the Insects. Cambridge University Press. pp.1-39

犬飼哲夫, 1978. クロコオロギを用いた実験の検討 新潟県立教育センター研究報告13, 85-90

河原久信, 北野日出男 1983. 動物の生得的行動の教材化 -アオムシコマユバチの配偶行動を例として. 教材生物ニュース (94), 95-101

巖俊一, 1988. 鱗翅目昆虫の相変異と関連現象「巖俊一生態学論集」 pp15-93

中松豊, 田中利治, 2006. 生得的行動の教材化-アワヨトウウスマユヒメコバチの産卵行動-. 生物教育46 (3),126-137

中松豊, 澤友美, 成川沙紀, 森下恵, 2011. アオムシコマユバチに寄生されたモンシロチョウ幼虫の教材としての活用法. 皇學館大学教育学部研究報告集, 61-76

Nakamatsu, Y., Fujii, S., Tanaka, T., 2002. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. Journal of Insect Physiology 48, 1041-1052.

Nakamatsu Y, Tanaka T., 2003. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. Journal of Insect Physiology 49 (2),149-59.

Nakamatsu, Y., Tanaka, T., 2004. Food resource usage of hyperparasitoid, *Trichomalopsis apanteloctena* (Pteromalidae: Hymenoptera) as a idiobiotic ectoparasitoid. Annals of the Entomological Society of America 97, 994-999

Richards, E. H., Edwards, J. P., 1999. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, Noctuidae) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*,

results in the appearance of a 27 kDA parasitism-specific protein in host plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 557-569.

Schmidt, O., Glatz, R.V., Asgari, S., Roberts, H.L., 2005. Are insect immune suppressors driving cellular uptake reactions- *Archives of insect biochemistry and physiology* 60 (4),153-8. Review.

Thompson, S. N., 1982. Effects of parasitization by the insect parasite *Hyposoter exiguiae* on the growth, development and physiology of its host *Trichoplusia ni*. *Parasitology* 84, 491-510.

Thompson, S.N., 1993. Redirection of host metabolism and effects on parasite nutrition. In: *Parasites*. Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A. (Eds.), *Parasites and Pathogens of Insects*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 125-144.

Uematsu, H., Sakanoshita, A., 1987. Effects of venom from an external parasitoid, *Euplectrus kuwanae* (Hymenoptera: Eulophidae) on larval ecdysis of *Argyrogramma albostrigata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology* 22, 139-144.

山下興亜, 1986. 内分泌生理とホルモンの化学 池庄司 敏明, 山下 興亜, 桜井 宏紀, 山元 大輔, 正野 俊夫 共著「昆虫生理・生化学」 pp.199-223 朝倉書店