



昆虫の共生微生物に関する研究

—— ヒメトビウシカの
細胞内酵母様共生微生物 ——

野田 博明

名古屋大学図書	
和	738749

報告番号 甲 第 1128 号

目次

	頁
I、緒論	----- 1
II、酵母様共生微生物の分布・形態・ 性質及び数の変動	
序論	----- 8
材料及び方法	----- 10
結果及び考察	
A、酵母様共生微生物と mycetocyte	----- 18
B、酵母様共生微生物の経卵伝搬	----- 26
C、酵母様共生微生物の組織化学 的観察	----- 30
D、Mycetocyteと脂肪体細胞の組織 化学的観察	----- 35
E、電子顕微鏡観察	----- 42
F、宿主の発育に伴う酵母様共生 微生物数の変動	----- 54
III、酵母様共生微生物及び宿主に及ぼ	

す高温の影響	
序論	----- 59
材料及び方法	----- 61
結果及び考察	
A. 高温下での発育	----- 66
B. 酵母様共生微生物数	----- 74
C. 高温飼育虫の組織観察	----- 77
D. 高温の産卵への影響	----- 85
E. 高温の甘露排泄への影響	----- 87
F. 高温飼育虫の脱皮と死亡	----- 88
G. エクジステロンの塗布と吸汁 処理の影響	----- 97
IV. ステロールに関連したヒメトビウ ンカと酵母様共生微生物の共生関係	
序論	----- 103
材料及び方法	----- 105
結果及び考察	
A. ヒメトビウンカ各ステージの ステロール組成と含量	----- 110

B、高温処理ヒメトビウンカのス テロール組成と含量	-----120
C、イネ・甘露中のステロール組成	-----122
D、トビイロウンカ・セジロウン カ・ツマグロヨコバイのステロ ール組成	-----136
E、ステロールを手えた高温処理 ヒメトビウンカの飼育	-----141

V. 総合考察

A、ヒメトビウンカとその酵母様共 生微生物との共生関係	-----150
B、昆虫の適応と共生微生物	-----155
C、今後の共生微生物に関する研究	-----161

謝辞	-----165
要約	-----166
引用文献	-----170

I. 緒論

昆虫の生活は菌類・細菌・原生動物など多くの微生物と深い係りを持っている。その中でも病原性の微生物は昆虫病理学の分野において研究が進められており、多くの知見が蓄積されている。しかしながら常に昆虫と接しているながら昆虫に病気を引き起こさせないばかりか、昆虫にとって益となる微生物については、若干の例を除いて研究が進んでいるとは言えない。ある種のアリでは菌類との間に複雑な共生関係がみられ (Martin, 1970)、ambrosia beetle においても菌類との共生が認められ、互いに好ましい影響を及ぼしている (Baker and Norris, 1968; Abrahamson and Norris, 1969)。また多くの昆虫の消化管内には微生物が棲息しており (Foglesong et al., 1975; Bignell, 1977)、少なからずその昆虫の消化作用を助けていることが示唆されている (Mauldin, 1977)。これらの例は微生物

が昆虫組織などに存在し、しかも後天的に共生関係が樹立される場合である。しかし、微生物が昆虫の体内、特に細胞内で生活し、雌の卵巣を通して卵内へ入り、昆虫の子孫に伝わる、いわゆる細胞内共生微生物がある。

微生物が昆虫の細胞内に存在することは、顕微鏡観察の技術の進んだ19世紀中期に、動物学者によって発見された。それ以来、多くの健全な昆虫体内に微生物が存在することが認められ、この問題に関する総説・著書がある (Steinhaus, 1949; Richards and Brooks, 1958; Koch, 1960; Brooks, 1963a; Buchner, 1965; Lanham, 1968)。

Richards and Brooks (1958) によれば、ある生物が他の生物の体内で生活している体内共生 (internal symbiosis) は、寄生 (parasitism)、(偏利)共生 (commensalism)、相利共生 (mutualism) に分けられるとしている。一般的には、共生 (symbiosis) という言葉は、広い意味では二種の生物が生活を共にし

ていることを示し、狭い意味では互いの利益のために共同生活をする相利共生を意味する。また、ある生物と相利共生関係にある微生物を共生微生物 (symbiote, symbiont) と呼ぶが、この言葉については、多くの研究者は広い意味で用いていることが多い。そこで本論文においても相利共生・偏利共生と思われる微生物について共生微生物と呼ぶこととする。これは現在までに明らかに相利共生であることが証明されている例は少なく、両者の区別がつきにくい場合が多いことや、多くの研究者によって相利共生関係の判明していないものに関するもの、その微生物が symbiote と呼ばれていることからである。

共生微生物を保有する生物を宿主 (host) と呼ぶ。共生微生物の内、宿主の細胞内に存在しているものを細胞内共生微生物 (intracellular symbiote) と言い、その細胞は、mycetocyte (菌細胞) と呼ばれる。アブラムシ類やヨコバイ類では、mycetocyte が集まっ

て、mycetome (菌細胞塊、菌細胞器官) と呼ばれる特殊な組織・器官を形成している。ゴキブリ類や本研究の対象であるイネのウンカ類では、そのような組織は形成されておらず、mycetocyte は脂肪体内に存在する。mycetocyte の昆虫体内における分布、形態、共生微生物の種類などは変化に富んでいるが、近縁種間もしくは同一目内ではかなりよく似た共生関係が樹立されている (Brooks, 1963b ; Buchner, 1965)。

細胞内共生微生物の中でも、雌成虫の卵巣を通し卵内に入り、宿主の次世代へ伝えられるものは、卵の胚子発育の研究と共に報告されている (Uichanko, 1924 ; 奈須・末永, 1958 ; Sander, 1968)。また、罹病虫を研究する際の健全虫における微生物層の把握とその関連性により、昆虫病理学の面から (Steinhaus, 1949)、さらに植物病理学的な観点から、植物寄生性病原菌やウイルスと共生微生物との関連についても興味をもたれている (Nasu,

1965)。前述のごとく共生微生物の研究の歴史は古いが、形態学的・組織学的な記載に関する研究に始まり、近年に至り、宿主と共生微生物の二種間の相互関係についてのより詳細な研究が可能になった。体内共生微生物の場合、宿主の組織内に生育している微生物を対象とするために、その相互関係を研究するためには、生理学的・生化学的手法等の発達を必要とした。

ジンサンシバンムシなどのある種の野穀害虫の共生微生物が、Stegobium paniceum 昆虫にとって重要な栄養素であるビタミンB群やコレステロールを作っていることがわかり (Fraenkel and Blewett, 1943; Pant and Fraenkel, 1954; Pant et al., 1960)、昆虫の栄養生理学的な面から共生微生物の重要性が強く認識されるようになった。上記昆虫の共生微生物は、宿主の卵表面に付着して次世代の孵化時に感染するという伝搬方法のため、微生物に感染していない昆虫を作ったり、微生物自身の培養も比較的容易で

あったと考えられる。共生微生物の研究においては、微生物を除去した昆虫 (aposymbiotic insect) を作る必要がある場合が多いが、卵内に取り込まれて次世代へ伝搬し、まったく宿主の体外に出ることのない微生物に関しては、aposymbiotic insect を作ることはおろかしく、かつ単独培養も困難であろうと言われている。残念ながら現在まで、実験系として確立された共生微生物の培養例はない。

体の害虫であるウンカ類 (ヒメトビウンカ Laodelphax striatellus、トビイロウンカ Nilaparvata lugens、セジロウンカ Sogatella furcifera) は、形態的に酵母に似た微生物を有していることが報告されている (奈須・末永, 1958; 奈須, 1963)。この微生物 (酵母様共生微生物) は雌の卵巣を通じて次世代へ伝わる。しかしながらウンカ類の共生微生物については知見が乏しい。ウンカ類の生理・生化学的研究を行う上でも共生微生物の存在を無視することはできず、またウンカ類が我が国及び東南アジアにとって重大な体害虫であることを考えあわせ

ると、その基礎的な知見の集積が急務とされる。

本研究はウシカ類、特にヒメトビウシカの酵母様共生微生物の形態・分布・伝搬様式等の基礎的な知見の蓄積を出发点とし、それらを基に、高温のヒメトビウシカとその共生微生物に及ぼす影響を調べ、さらに昆虫のステロール供給源の面から宿主と共生微生物の相互関係の一端を明らかにした。

II. 酵母様共生微生物の分布・形態・性質及び数の変動

序論

細胞内共生微生物を有する昆虫において、その微生物を特別な組織・器官に有しているものと、そうでないものがある。ヨコバイ類・アブラムシ類等は前者の例である。特別な組織 (mycetome) 内に存在している微生物は、普通その中にしか存在せず、また微生物の種類により生育場所が異なっている場合もみられる (Körner, 1972; Griffiths and Beck, 1973)。mycetome をもっていないウンカ類においても微生物が、一定した存在様式をしているであろうと想像される。ここでは、ヒメトビウンカの酵母様共生微生物の宿主内分布・存在形態・経卵伝搬の様式について調べ、組織化学反応を試み、微生物及び mycetocyte の性質・特徴について検討した。また近年、電子顕微鏡の発達により、共生微生物・mycetocyte

の微細構造などが報告されてきており (Bush and Chapman, 1961 ; Chang and Musgrave, 1969, 1973 ; Hinde, 1971b ; Griffiths and Beck, 1973)、ヒメトビウンカの共生微生物についても電子顕微鏡を用いて、宿主細胞との関係等について観察を行った。また、普通微生物は栄養等の条件が整っていれば急速に増殖する。しかしながら共生微生物に関しては、宿主内で増殖し過ぎることなく、宿主により種々の方法で調節されているように思われる (Brooks, 1975)。そこで、ヒメトビウンカの酵母様共生微生物はどのように宿主の中で増殖しているのかを、ヒメトビウンカの一世代を通して微生物数の変動としてとらえた。

昆虫の共生微生物はその多くが広義の細菌 (原核生物, procaryote) であり、研究の進んでいるアブラムシ類, ヨコバイ類, ゴキブリ類の共生微生物は原核生物である。一方、イネのウンカ類の酵母様共生微生物は、真核生物 (eucaryote) と考えられ、真核生物の共

生微生物については、宿主との相互関係を論じたものは少ない。ここでは他の昆虫の共生細菌とも比較しながら、ヒメトビウンカの酵母様共生微生物について調べた。

材料及び方法

a. 光学顕微鏡観察用試料

実験に用いたヒメトビウンカ、Laodelphax striatellus (Fallén) (Homoptera: Delphacidae) は、京都府北白川で採取され、香川県農業試験場で累代飼育された殺虫剤感受性系統であり、当教室において休芽虫（休品種：鈴風、日本晴）を用い、25℃、16時間照明で累代飼育したものである。

供試虫・卵を Bouin 液で一夜又は Bodian II 液で数時間から一夜固定した。Bouin 液固定試料は90%エタノールで、Bodian II 液固定試料は80%エタノールで洗った後、正ブタノー

ルで脱水し、パラフィンに包埋した。5~7 μm の切片を作成し、Mayerのヘマトキシリン・エオシン、トルイジン青、ゲンチアン紫で染色した。またクエン酸緩衝液でpH 5に調整したGiemsa液でも染色を行った。

b. 組織化学反応

パラフィン切片の固定・包埋操作などは、光学顕微鏡用試料作成方法と同様である。凍結切片の作成は、10%ホルマリン又は10%ホルマリン・カルシウムで固定し、豚の肝臓で包み、ドライアイス・アセトンで急速に凍結させた。凍結試料をコールドマイクロトーム (SLEE, type H) を用い、 -20°C で10 μm の切片を作成した。組織化学反応の詳細はLison (1960) 及び佐野 (1972) を参照した。

(i) 核酸に対する反応

固定液はBodian II液を使用した。

Feulgen 反応：切片を脱パラフィン・水洗後、室温で1N塩酸に1分間つけ、1N塩酸60 $^{\circ}\text{C}$

で10分処理し、再び室温で1分間1N塩酸につけた。Schiff試薬で60分染色後、亜硫酸溶液で3回洗い、一部の切片は0.5%ファーストグリーンで後染色した。対照標本は塩酸処理を省いた。

メチルグリーン・ピロニン染色：リン酸緩衝液でpH 5.5に調整した染色液（メチルグリーン0.15%、ピロニン0.25%）で15分間染色し、水洗後、第三ブタノールで脱水した。色素はあらかじめクロロホルムを用いて精製した。

トルイジン青による異調染色：pH 4.8に調整した0.1%トルイジン青で15分間染色した。

リボヌクレアーゼ消化試験：0.02%リボヌクレアーゼ（RNase, Type I-A Sigma Chemical Co.）溶液で65°C、2時間処理した後、メチルグリーン・ピロニン染色を行った。

核酸の抽出：10%過塩素酸溶液中に切片をつけ、冷蔵庫内に一夜放置後、上記の核酸染色を行った。

(ii) タンパク質に対する反応

固定には Bodian II 液、Bowin 液又は 10% ホルマリンを用いた。

Millon 反応：切片を脱パラフィン後、アセトンですすぎ、乾燥させた後、Millon 試薬で切片を覆い、水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレ内に入れ、60°C に 1 時間放置した。その後 2% 硝酸ですすぎ、エタノールで脱水した。

ニンヒドリン・Schiff 反応：脱パラフィン後無水エタノールで洗い、0.5% ニンヒドリン（無水エタノール溶液）に浸し、37°C で 15 時間酸化的脱アミノ反応を行った。水洗後 Schiff 試薬で 25 分間処理し、亜硫酸溶液で 3 回洗った。対照標本にはニンヒドリン処理を施していない。

フェリシアン化鉄法：10% ホルマリンで固定した試料を前述のごとく凍結切片とした。0.1% フェリシアン化カリウム水溶液・1% 硫酸第二鉄水溶液（1:3, 1/2）の混合液に 5 分づつ順次 3 回漬けた後、十分に水洗した。対照標本には、SH 基封鎖のため、あらかじめ昇汞飽

和水溶液に25℃で1時間浸漬したものを用了た。

ファーストグリーン染色：ファーストグリーンを用い、PH 1.2 (King, 1960) 及びPH 8.1 (Alfert and Geschwind, 1953) で染色した。

(iii) 炭水化物に対する反応

固定液は Bouin 液・Bodian II 液を用いた。
唾液消化試験の試料は Carnoy 液で固定した。

過沃素酸・Schiff 反応 (PAS 反応) : 0.5 % 過沃素酸水溶液で5分間処理し、水洗後、Schiff 試薬で15分間染色し、亜硫酸水溶液で3回洗い、エタノールで脱水した。

唾液消化試験：脱パラフィン・水洗した切片標本に唾液をかけ、乾燥しないように水を湿らせた濾紙を敷いたシャーレ内に入れ、37℃で1時間反応させた。水洗後、エーテルに溶かしたコロジオンに漬け、乾燥させてコロジオン膜をばった。コロジオン膜をばったのは、標本及び対照標本において、後のPAS反応の操作中にグリコーゲンが溶出しないよ

うにするためである。

アルシアン青染色：3%酢酸に2分間浸し、1%アルシアン青（3%酢酸水溶液）で1分間染色した。

(iv) 脂質に対する反応

試料はすべて10%ホルマリン・カルシウムで固定し、凍結切片とした。

ズダン黒B染色：凍結切片を水洗後、50%エタノールに30秒間浸し、60%エタノールに飽和させたズダン黒Bで15分間染色し、再び50%エタノールで洗い、一部の切片はアルム・カルミンで後染色した。切片はグリセリンで封入した。

ナイル青染色：1%ナイル青水溶液で15分間染色し、軽く水洗した後、1%酢酸で数分間分別した。

酢酸・硫酸によるコレステリン証明法：水洗後20%塩化第二鉄水溶液で5分間処理、または日光に5日間さらした後、無水酢酸・濃硫酸の等量混合液を滴下し、観察した。

c. 電子顕微鏡観察用試料

新鮮な供試虫の腹部を冷却した固定液中で切り取った。0.067 M コリジン緩衝液 (Bennett and Luft, 1959) に溶かした 2.6% オスミウム酸で 2 時間固定し、すぐに 6% グルタルアルデヒド (0.067 M コリジン緩衝液) で 1 時間後固定した。または、3% グルタルアルデヒドで前固定した後、1.33% オスミウム酸で後固定した (0.067 M コリジン緩衝液又は Millonig の緩衝液 (Millonig, 1961))。脱水は 70% エタノール、又は 35% エタノールから始め、ブチルグリシジルエーテルに浸潤後、エポン 812 に包埋した (Coulter, 1967)。超薄切片はガラスナイフを使い、Porter MT-1 ウルトラマイクロトームを用いて作成した。染色は、酢酸ウラニウム飽和水溶液 (Watson, 1958) 又は 95% エタノールに溶かした 30% 酢酸ウラニウムを用い、クエン酸鉛水溶液 (Reynolds, 1963) でさらに後染色した。観察には、日本電子 MET-7TS 型及び日立 HU

- 12型電子顕微鏡を使用した。

d. 酵母様共生微生物の計数法

ヒメトビウソカ体内の酵母様共生微生物は虫体を磨砕することにより容易に顕微鏡を用いて観察できる。以下のごとく、宿主の各ステージにおける酵母様共生微生物を計数した。5~50頭の供試虫あるいは供試卵を50~200 μl の0.8%食塩水で、ガラス製マイクロホモゲナイザーを用いて軽く磨砕し、十分攪拌した磨砕液をThomaの血球計算器(深さ、0.1mm)にのせ、一区画(0.25mm \times 0.25mm)当りの微生物数を数えた。虫一頭当り体内に保有する酵母様共生微生物数は次式により算定した(Noda, 1974)。

$$\text{一頭中の微生物数} = a(x + m) / n \cdot v$$

a : v 中に含まれる微生物数

m : 磨砕した供試虫の総体重(mg)

n : 磨砕した供試虫あるいは供試卵の数

v : 血球計算器内の微生物を数えた一区

画当りの容積 (0.00625 mm^3)

x : 磨碎に用いた食塩水の量 (μl)

卵及び1令幼虫においては、 $m \ll x$ であるので、 $m = 0$ として計算した。各サンプルについて5区画計数し、それぞれ3回反復した。ただし羽化後15日の雄成虫については2回反復した。

結果及び考察

A. 酵母様共生微生物と *mycetocyte*

ヒメトビウンカの体内には形態的に酵母に似た微生物(酵母様共生微生物)が観察された(図1)。酵母様共生微生物は腹部にのみ観察され、頭胸部には認められなかった。しかも、腹部脂肪体のある細胞(*mycetocyte*)内に存在し、一部雌成虫では卵巢内にも観察された。酵母様共生微生物の大きさは変化に富んでいるが、長さが平均約 $13 \mu\text{m}$ で米粒型あるいは長卵型をしており、出芽しているもの

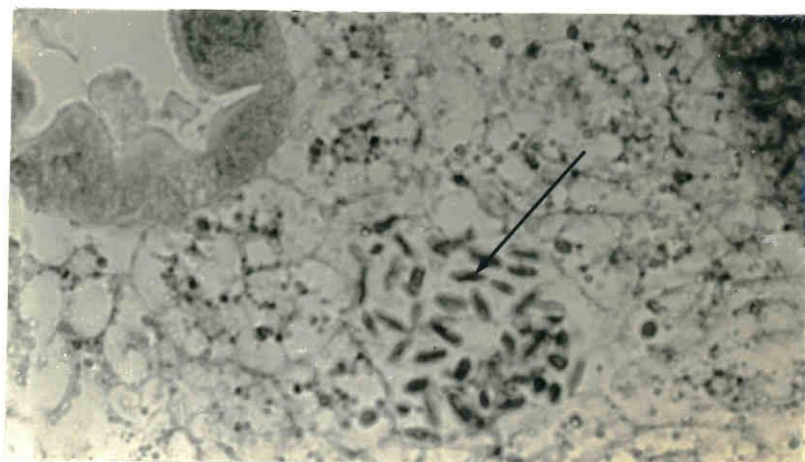


図 1. ヒメトビウナ幼虫脂肪体内の
酵母様共生微生物 (矢印)



図 2. ヒメトビウナ磨碎液中の
酵母様共生微生物

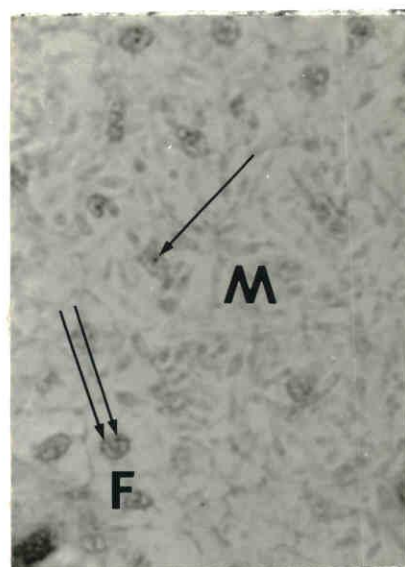


図 3. Mycetocyte と脂肪体細胞の核

矢印 : Mycetocyte の核
2 重矢印 : 脂肪体細胞の核
F : 脂肪体細胞
M : Mycetocyte

もしばしば観察された(図2)。出芽以外による微生物の増殖は認めることができず、出芽による栄養生殖によりヒメトビウソカの内体で増殖しているものと考えられる。酵母様共生微生物はエオシンに染まり、トルイジン青によっても濃く染まった。PH5でGiemsa染色をすると微生物は赤く染まり、容易に宿主の細胞や組織と区別できた。酵母様共生微生物の存在している細胞(mycetocyte)の核は、ほとんどの場合不定型であった(図3)。

脂肪体細胞とmycetocyteの区別は、本論文では、脂肪体の中で酵母様共生微生物が存在している細胞をmycetocyte, 存在していない細胞を脂肪体細胞と呼ぶ。

一般にmycetocyteは脂肪体内に局在的に存在している。2令幼虫では微生物は腹部脂肪体内に散在しており、あまり集団としては認められないが、3令幼虫になると微生物はどこどこにかたまって観察された。4・5令期になると微生物の数は多くなり、mycetocyteが腹

部脂肪体内のところどころに集まっているのが認められた。全般に *mycetocyte* は脂肪体の内部に多く、表皮に近いところや消化管に接するところには比較的少なかった。図4は5令雌幼虫、雄成虫および雌成虫の腹部の横断面である。5令幼虫では酵母様共生微生物は脂肪体内に局在的にみられ、脂肪体の中央部に多く認められる。雄成虫では羽化直後は多くの微生物が観察されるが、その後短翅型では4日目あたりになると、筋肉・精巢などの発達につれて、脂肪体は小さくなり、微生物の数も著しく減少する。図4は雄成虫の脂肪体がすでに幼虫に比べ非常に小さくなっており、微生物は生殖巣・消化管などの間と表皮の内側のあたりに散在するようになる。雌成虫では羽化後卵巣が発達し、筋肉が腹側に発達してくる。雌成虫腹部脂肪体は幼虫に比較して、腹部全体の割合からみると少なくなっているが、まだ腹部の多くの部分を占めている。脂肪体はその多くの部分が *mycetocyte* であり、

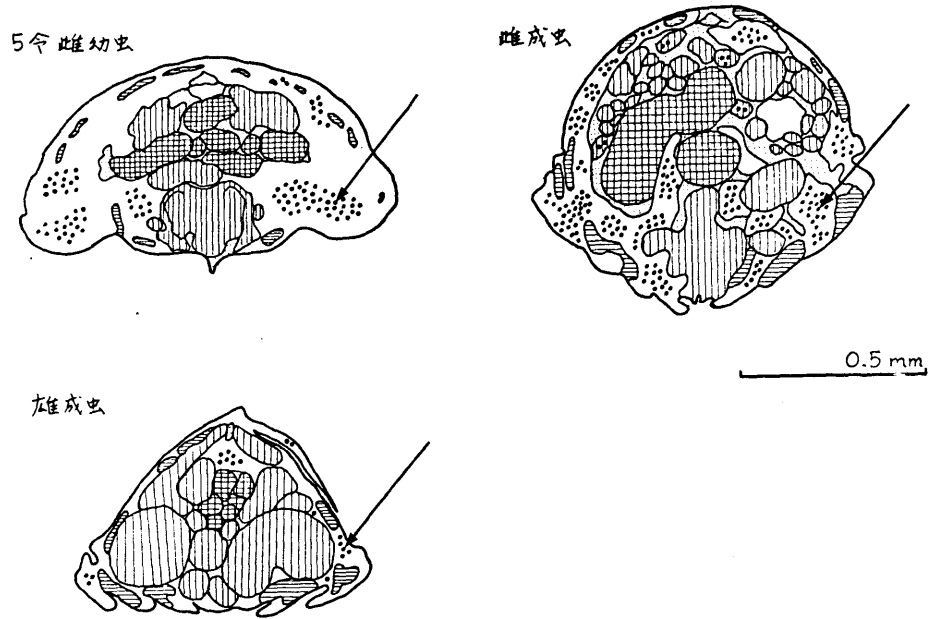








図4. 腹部横断面における酵母様共生微生物(矢印)の分布模式図

-  消化管・マルピギー氏管
-  生殖巣
-  筋肉・節間膜細胞
-  体腔
-  脂肪体
-  酵母様共生微生物

脂肪体細胞は表皮や各器官に接するところにみられ、mycetocyteを包み込んでいる。酵母様共生微生物の数は非常に多い。

mycetocyteと脂肪体細胞はともに脂肪体を形成しており、両者は幼虫期においては核の形態の遠い顆粒の存否(タンパク性顆粒と思われる)を除いては、光学顕微鏡で観察した限りにおいてよく似ている。しかし、成虫では両者の間に大きな差がみられるようになる。羽化直後の脂肪体細胞は、雄・雌ともに幼虫期のものと同じ組織像であるが(図5)、短翅型では3日目あたりで幼虫期の脂肪体細胞とは異なった組織像が認められる。細胞質が色素に濃く染まるようになり、雌成虫ではそれが著しい(図6)。また、細胞ごとの区切りが明瞭になり、脂肪滴が比較的小さくなり細胞質部分が増えている。これは鱗翅目昆虫などでよく調べられている変態と脂肪体細胞の変化の現象(Bishop, 1958; Ishizaki, 1965; 和久・住本, 1969; Larsen, 1976)と、似

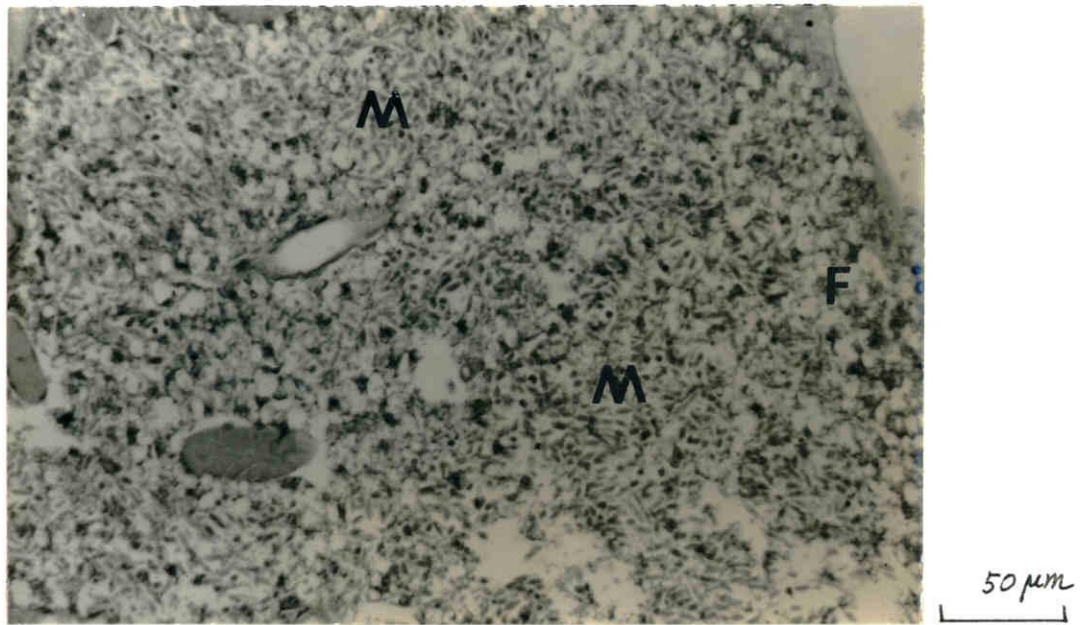


図5. 羽化直後の雌成虫の mycetocyte (M) と
脂肪体細胞 (F)

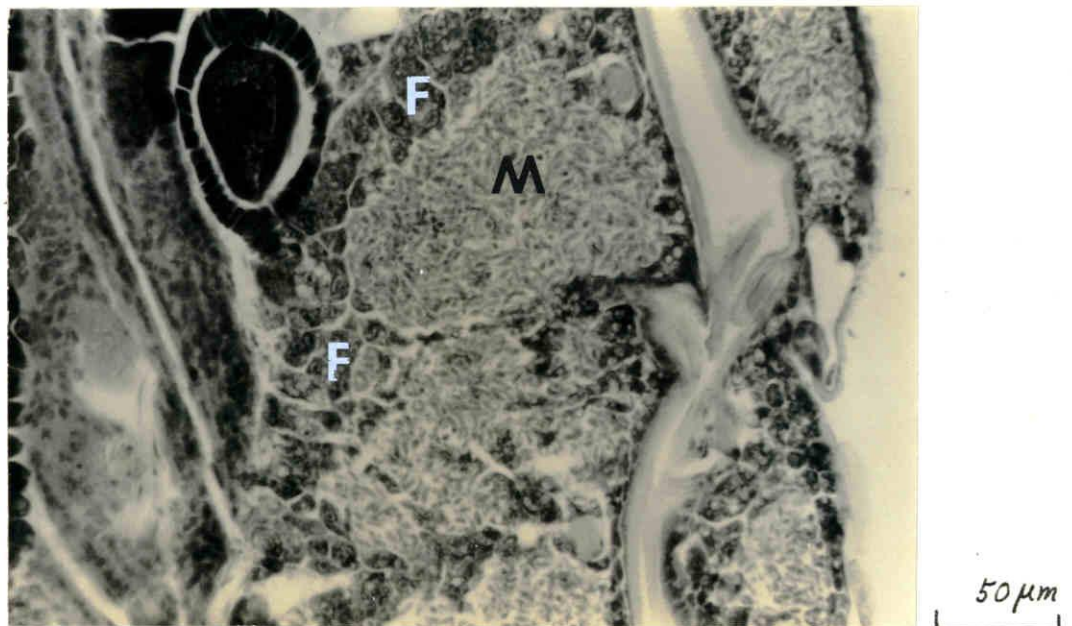


図6. 羽化後2日の雌成虫の mycetocyte (M) と
脂肪体細胞 (F)

ていると思われる。ヒメトビウシカにおいても成虫期には、幼虫期とは異なった代謝活動が行なわれるのであろう。しかし、mycetocyteではこのような成虫化に伴う変化は認められなかった。

脂肪体細胞内には、時々エオシンヤトルイジン青に染まる顆粒がみられた。若令期には顆粒は小さく少ないが、終令期には大きく又多くみられた。この顆粒はタンパク性顆粒であり(Ⅱ-D参照)、羽化前には非常に多くなり、短翅型では羽化後2・3日で消失した。この顆粒が消失したころには、前述のような脂肪体細胞の変化が起きており、^{これらは}昆虫の脱皮サイクルと関連をもっている可能性がある。一方、mycetocyteにはこの顆粒は幼虫・成虫を通じてまったく認められず、この顆粒の形成は脂肪体細胞特有のものであり、mycetocyteにはその機能はないか、あるいは発現されないものと考えられる。

B. 酵母様共生微生物の経卵伝搬

成熟した雌成虫の卵巢を観察し、卵巢小管と輸卵管に通ずる柄部 (pedicel) との接合部 (epithelial plug ; Bonhag, 1958) に酵母様共生微生物を認められた。それらの酵母様共生微生物は、脂肪体の mycetocyte 内に観察されたものと形態的差異は認められなかった。酵母様共生微生物は mycetocyte から epithelial plug へ移動するものと思われる (図7)。連続切片による観察からは、卵巢の他の部分から卵巢内に入るのはいずれも見えず、epithelial plug のみから入ると考えられる。epithelial plug に侵入した微生物は、epithelial plug に接している卵、すなわち卵巢小管内の一番下の卵 (terminal oocyte) が成熟を始める時期に、卵の後極から卵内へ膜に包まれて押し上がるようにして入る (図8)。この膜は卵黄膜と考えられる。その後成熟した卵内の後極付近には、卵黄に囲まれた symbiote ball が認められる (図9)。symbiote ball には膜様の構造が

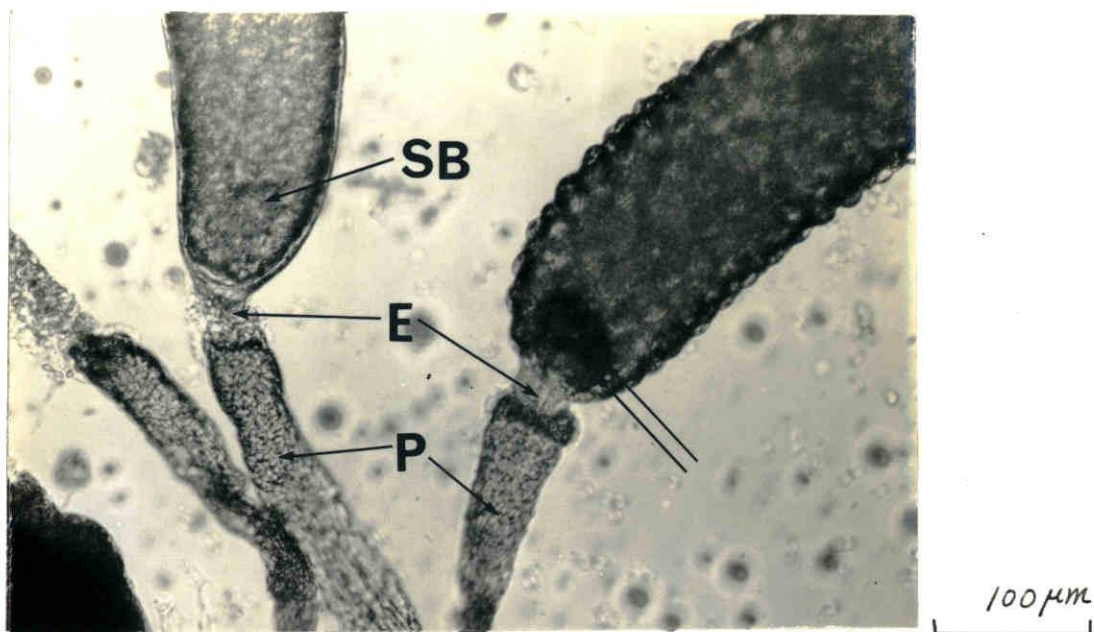


図7. 卵巢の epithelial plug (E).

P: pedicel, SB: symbiote ball

(右側の卵には出来かけの symbiote ball (2重矢印) が認められる。)

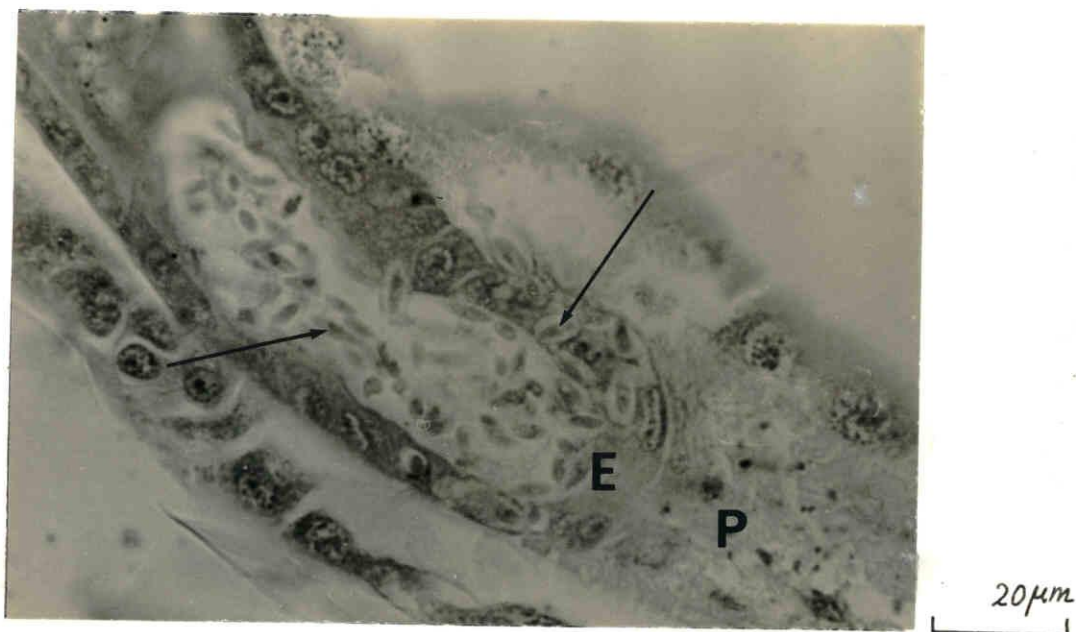


図8. 雌成虫における酵母様共生微生物(矢印)の卵への感染

E: epithelial plug, P: pedicel

(图中左上方向へ卵が伸びている。)

認められ、その中に酵母様共生微生物が存在した。

ヒメトビウソカの卵成熟は、卵巣小管内の一番下の卵から成熟を始め、他の卵はその卵が成熟して輸卵管へ送られるまで成熟しなかった。mycetocyteから移動してきた酵母様共生微生物は、epithelial plugを通り、最初の卵 (terminal oocyte) の後極から侵入する。そして、symbiote ballが形成され、卵が成熟を終え、卵殻も形成されると、共生微生物は完全に卵内に閉じ込められる。この卵が移動し、次の卵がepithelial plugに接すると、成熟を始めると同時に、同様に共生微生物の侵入を受ける。このように次から次へとすべての卵に共生微生物が感染して、次世代へ伝えられて行くと考えられる (Noda, 1977)。

産下された卵は後極付近にsymbiote ballを持っており、産下後2、3日頃には卵の前極付近に認められる。これは胚盤の陥入と共に前極へ押し上げられたためと考えられる。さ

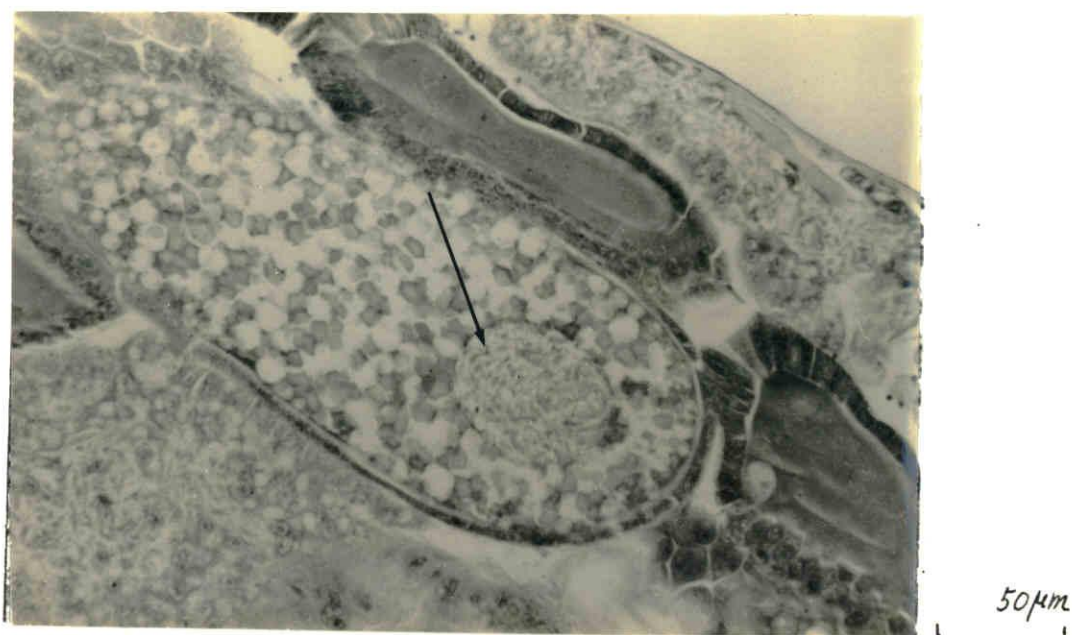


図 9. 此雌成虫内の卵内の symbiote ball (矢印)
(酵母様共生微生物が symbiote ball 内に存在する)

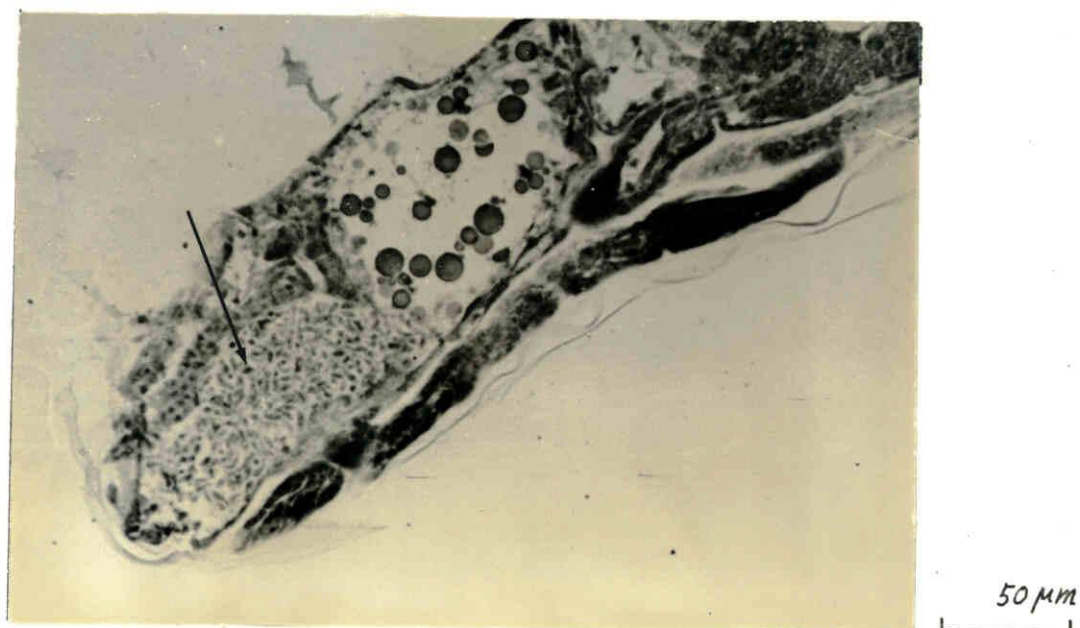


図 10. 産下卵内での胚子発育中における酵母様
共生微生物 (矢印) の胚子への感染

らに胚子の反転により再び卵の後極にもどる。これらの胚子発育の過程における symbiote ball の動向は、トビイロウンカ、セジロウンカ、ヒメトビウンカについて奈須・末永 (1958) により報告されている。胚子発育の後期になると脂肪体が形成され始め、その際 symbiote ball 内で生育していた酵母様共生微生物は脂肪体に感染した (図10)。脂肪体への感染は卵の後極付近から起こり、腹部脂肪体へののみ感染が認められた。このことは、ヒメトビウンカの全ステージを通じて、腹部へののみ酵母様共生微生物が存在していることの一つの理由でもあると思われる。こうして新しく孵化した1令幼虫は、すでに腹部脂肪体内に酵母様共生微生物を有している。

C. 酵母様共生微生物の組織化学的観察

核酸反応

DNA に対する反応である Feulgen 反応により、酵母様共生微生物内に Feulgen 反応陽

性の部分が認められた(図11)。塩酸による加水分解を行なわない場合は陰性であり、20分以上加水分解を行った場合にも反応が弱められた。この陽性部分は、メチルグリーン・ピロニン染色によっても紫又は青紫として認められ、酵母様真菌微生物の核であると考えられる。メチルグリーン・ピロニン染色で微生物の細胞質は赤く染まり(図12)、RNaseを処理したものは染まらず、RNAが染色されている。RNaseで1時間処理した切片においては、ある微生物はピロニンに染まったが、あるものは染まらなかった(図13)。RNase処理を2時間行なえばピロニンによって染まることはなく、核のみがメチルグリーンにより染まった。RNase処理に対して微生物間に差がみられ、微生物のステージによりRNAに差があるのか又は異なった微生物が存在しているのかもわからない。pH 4.8でトルイジン青染色をすると、微生物は赤紫に染まり、RNAによるものであろうと思われる。なお、通

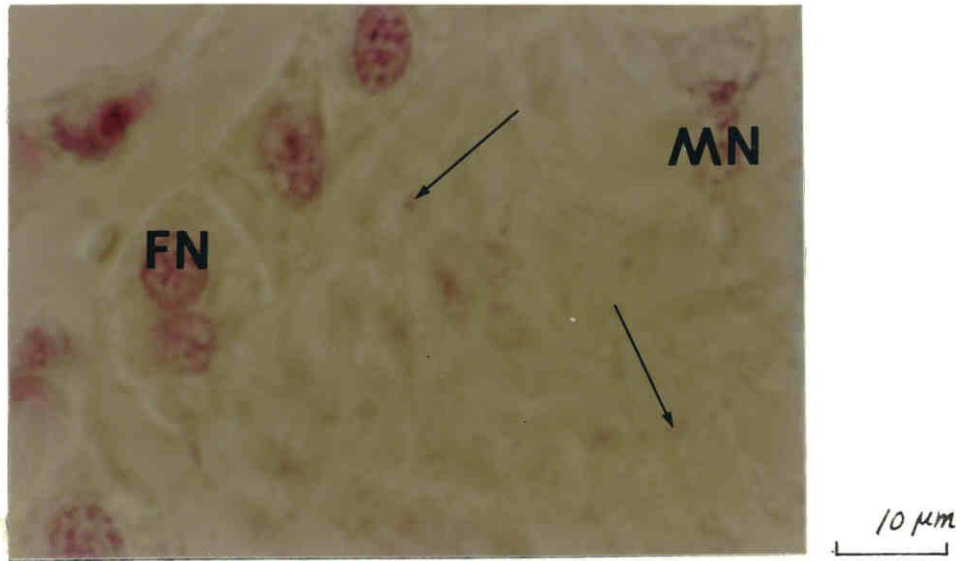


図 11. Feulgen 反応に染色された酵母様共生微生物の核 (矢印)
 FN : 脂肪体細胞の核, MN : Mycetocyte の核

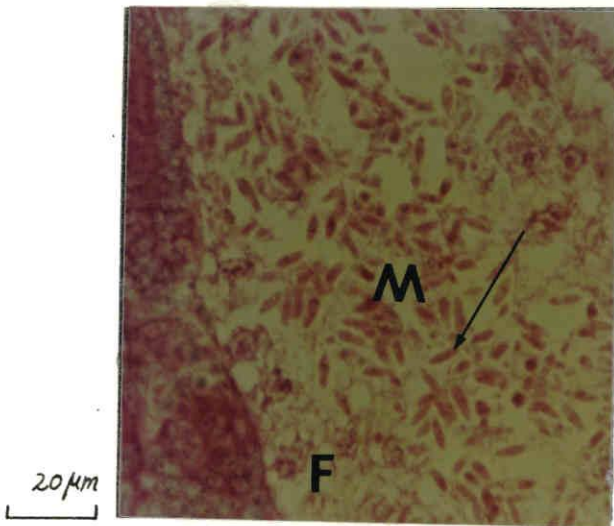


図 12. Mycetocyte (M) と脂肪体細胞 (F) のメチルグリーン・ピロニン染色
 矢印 : 酵母様共生微生物

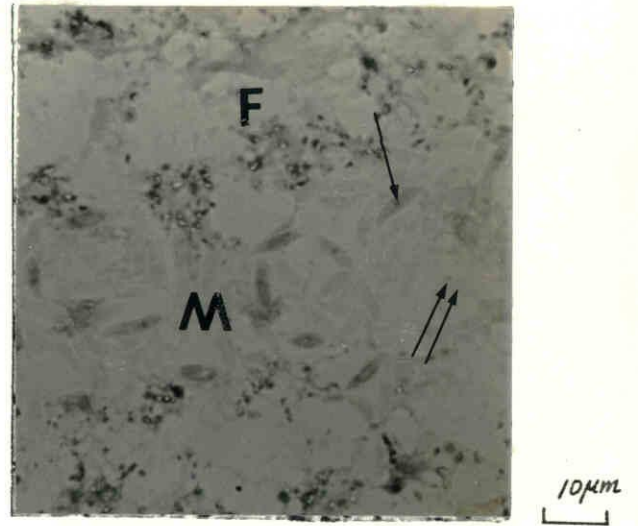


図 13. Mycetocyte (M) と脂肪体細胞 (F) のリボヌクレアーゼ消化試験後のメチルグリーン・ピロニン染色 (RNase 処理 1 時間)
 矢印 : ピロニンに染まる酵母様共生微生物
 2重矢印 : ピロニンに染まらない酵母様共生微生物

塩素酸で核酸の抽出を行った切片では、上記の染色法により微生物が染まることはなかった。

タンパク質反応

ニンヒドリン・Schiff 反応により酵母様共生微生物は淡く染まり(図14)、ニンヒドリンで酸化的脱アミノ反応を施さなかった切片では染色されず、アミノ基に対する反応がみられた。またMillon反応でもわずかに染まった。凍結切片にフェリシアン化鉄法を試みたところ青に染まり(図15)、対照標本として昇汞でSH基封鎖をしたものは染まらなかった。ファーストグリーンはpH1.2で強く微生物を染め、pH8.1では淡い緑色となった。これらのタンパク質に対する反応は陽性であるが、全般に反応は弱いように思われる。

炭水化物反応

PAS 反応により酵母様共生微生物は非常に濃い赤紫色に染まり、昆虫体内での分布がよく把握できた(図16)。唾液消化試験後の

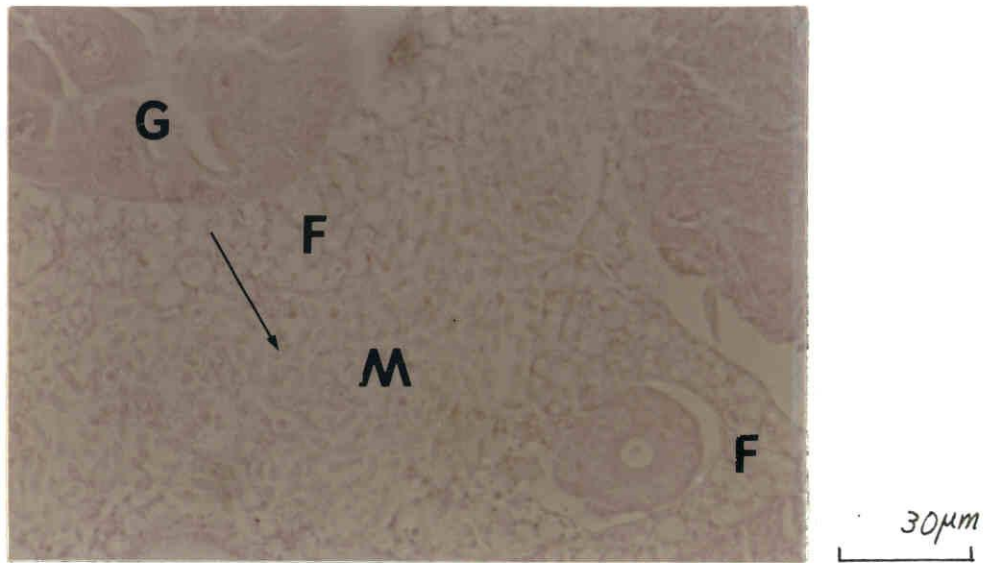


図14. 幼虫の mycetocyte(M) と脂肪体細胞(F) の
ニンヒドリン・Schiff 反応

矢印: 酵母様共生微生物, G: 消化管

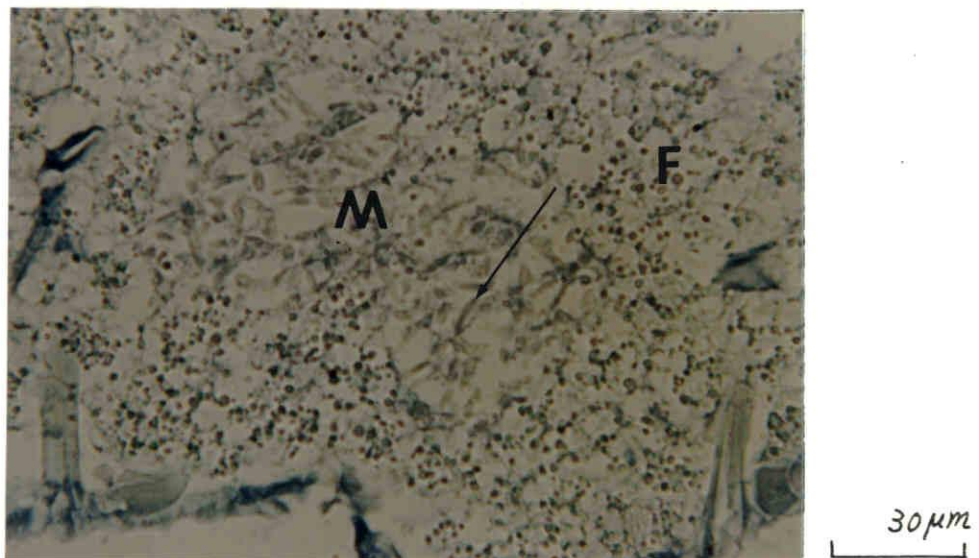


図15. 幼虫の mycetocyte(M) と脂肪体細胞(F) の
フェリシアン化鉄法による染色

矢印: 酵母様共生微生物

(脂肪体細胞内には染色された顆粒がみられる)

PAS 反応においても、その染色性は変わらなかつた(図19)。PAS 反応ではっきりと酵母様共生微生物の外郭を観察できるのは、微生物の細胞壁を構成している多糖類が強く染まっているためと思われる。アルシアン青では微生物は染まらなかつた。

脂質反応

凍結切片のズダン黒B染色では、細胞質内に小さく染まる部分をもった微生物が観察され、一部の微生物は脂肪滴様の構造をもっているのではないかと思われた。

D. Mycetocyte と脂肪体細胞の組織化学的観察

核酸反応

脂肪体細胞及び mycetocyte の核は Feulgen 反応(図11)、メチルグリーンにより染まり、細胞質はピロニンにより染められた(図12)。RNase 処理により細胞質はピロニンに染まらなくなり、RNA によるものである。

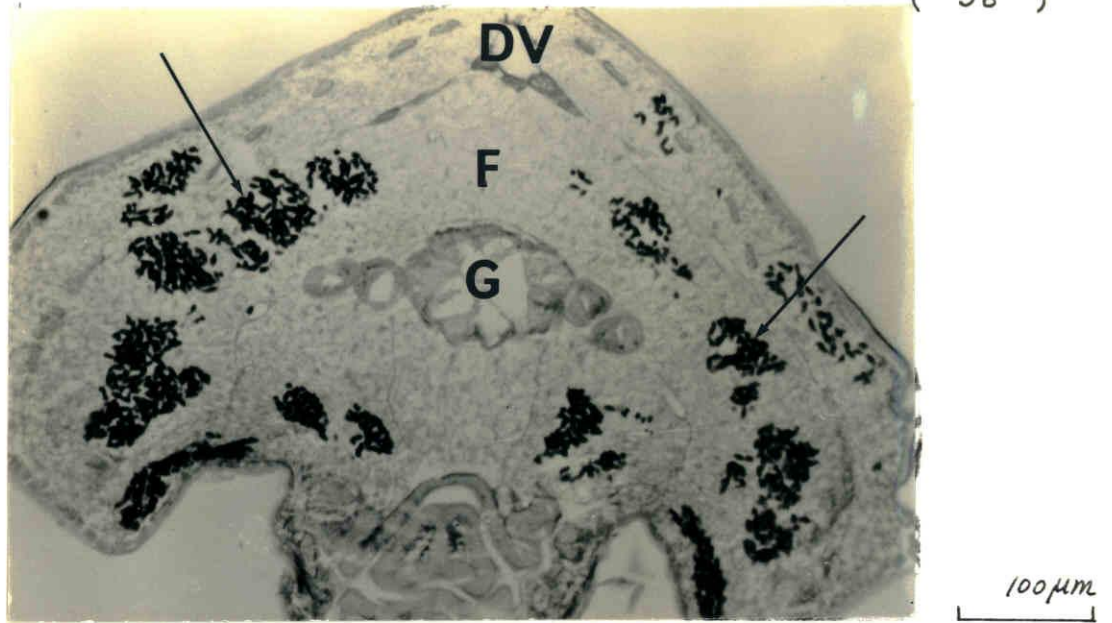


図16. 幼虫腹部横断面のPAS染色
 矢印: 酵母様共生微生物 G: 消化管
 DV: 背脈管 F: 脂肪体

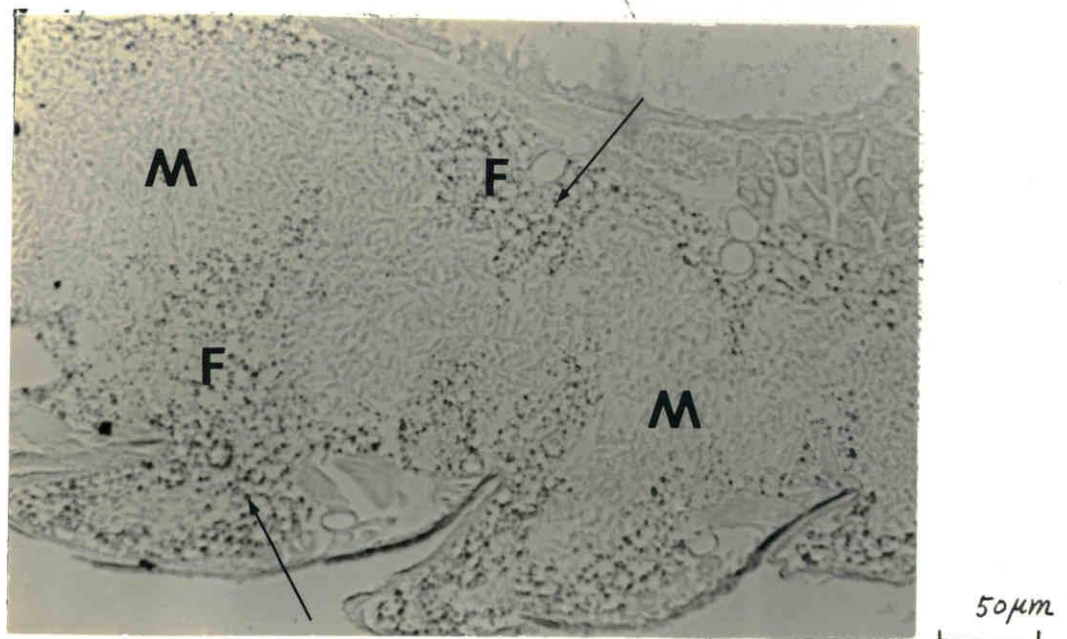


図17. Millon 反応で染色した脂肪体細胞内の顆粒 (矢印)
 (羽化直後の成虫)
 F: 脂肪体細胞, M: Mycetocyte
 (顆粒は脂肪体細胞内のみみられ, 酵母様共生微生物
 の存在する mycetocyte 内にはみられない)

タンパク質反応

脂肪体細胞及び *mycetocyte* の細胞質はタンパク質反応によりわずかに染まった。組織切片において脂肪体細胞にのみ観察された顆粒 (II-A 参照) は、Millon 反応 (図17)、フェリシアン化鉄法 (図15)、ファーストグリーン (PH12) により染められ、タンパク質の存在を示している。この顆粒はニンヒドリン・Schiff 反応ではほとんど染まらなかった。またこの顆粒はピロニンに染まり、タンパク質以外の物質が含まれている可能性もある。

炭水化物反応

コロジオン膜で被覆した切片にPAS染色を行うと脂肪体細胞内にPAS陽性物質がみられ (図18)、これらは唾液消化試験により消化されてしまう (図19) ので、グリコーゲンである。

脂質反応

スダン黒B染色により、脂肪体細胞内には多くの脂肪滴が観察された。これらの脂肪滴

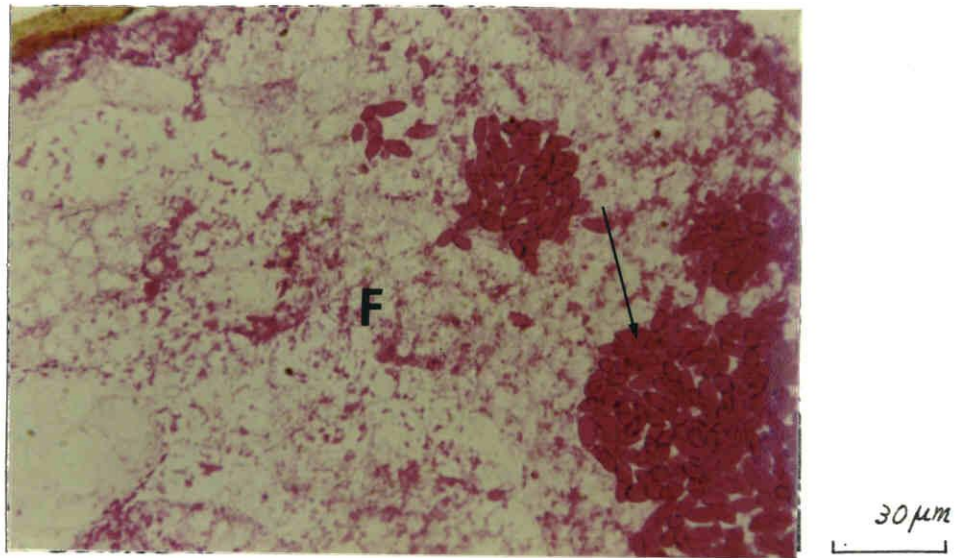


図18. 脂肪体細胞(F)内のPAS陽性物質と mycetocyte内の酵母様共生微生物(矢印)

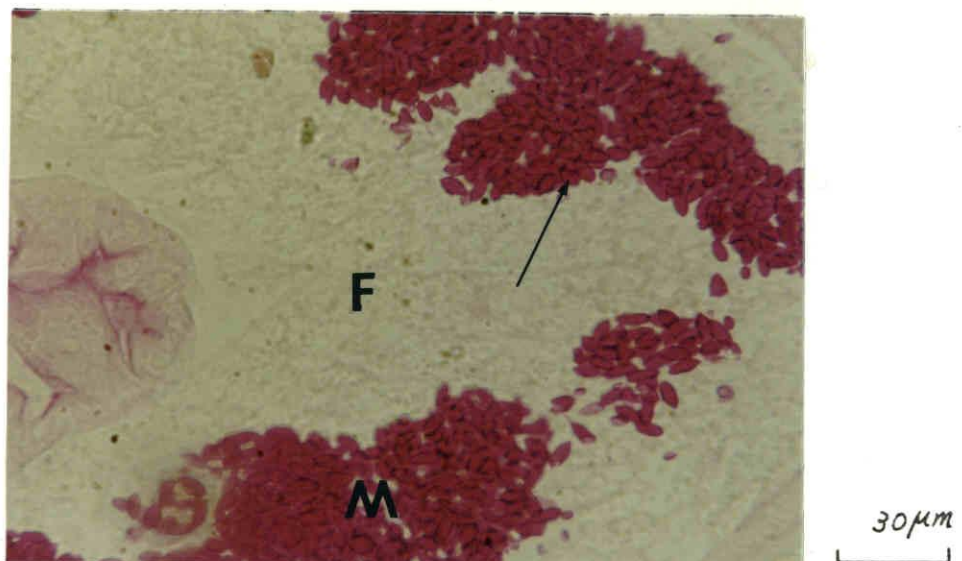


図19. 脂肪体細胞(F)と mycetocyte(M)の唾液消化試験後のPAS染色

(脂肪体細胞内のPAS陽性物質(グリコーゲン)が消失している。酵母様共生微生物(矢印)は唾液消化試験後もPAS染色される。)

はナイル青により赤く染まる(図20)ので、中性脂肪から成っている。一方、mycetocyteでは、一般に脂肪滴は小さく又その数も少なかった。図21のごとく、mycetocyteには脂肪滴は少ないが、それを取り囲んでいる脂肪体細胞には脂肪滴が多く、黒くみえる。酢酸・硫酸によるユレステリン証明法では、これらの脂肪滴は特異的な色調を示さなかったが、Lison(1960)はユレステロールの証明には少量のユレステロールが組織中に存在することが必要であろうとしており、かならずしもユレステロールの存在を否定するものではなく、量が少ないために反応がみられなかったのではないかと考えられる。

ここで、mycetocyteと脂肪体細胞とを比較すると次のような差異が認められた。

1. 脂肪体細胞の核は一般に球型であるが、mycetocyteの核は不定形である。
2. 脂肪体細胞はウニカの発育ステージにより組織像に変化がみられるが、mycetocyteで

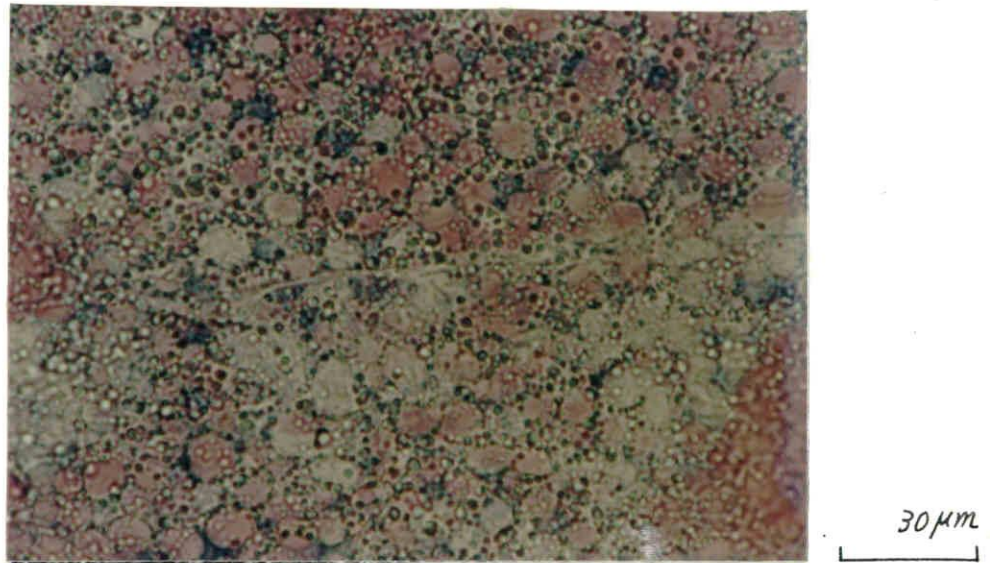


図 20. 幼虫脂肪体細胞のナイル青染色
(赤く染まっているのは中性脂肪であると示す)

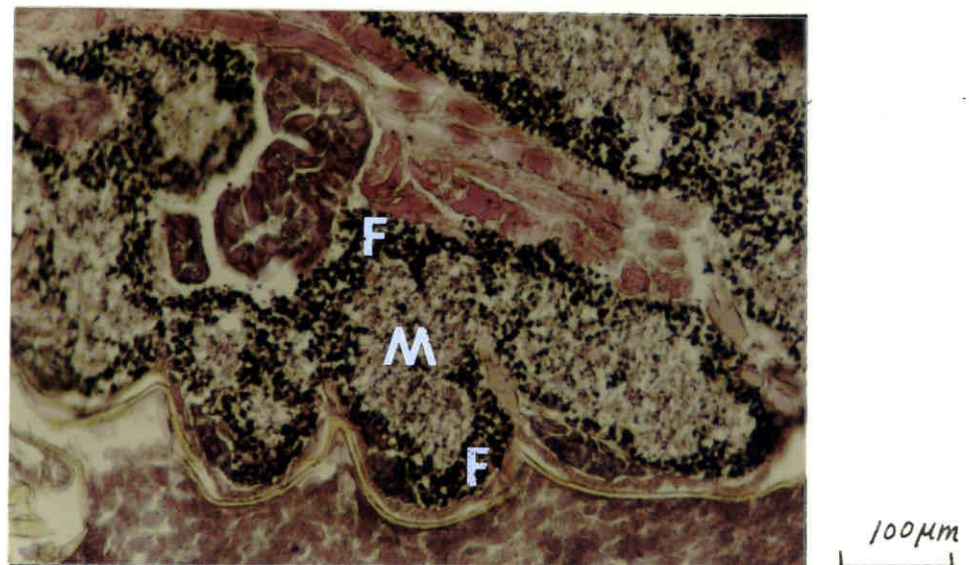


図 21. 凍結切片 雌成虫腹部縦断面のズダン黒 B
で染色された脂肪滴

F: 脂肪体細胞, M: Mycetocyte
(黒く染まっているのが脂肪滴)

はそのような変化は認められない。

3. 脂肪体細胞にはタンパク性顆粒が観察されるが、*mycetocyte*にはまったく顆粒は存在しない。

4. 脂肪体細胞には脂肪滴が多いが、*mycetocyte*では少ない。

これらのことから、脂肪体細胞はウシカの発育と関連をもっており、宿主の物質代謝を担っているものと考えられるが、*mycetocyte*は宿主の発育との関連性は脂肪体細胞に比べて低く、共生微生物にとってはより安定した生育環境であると言える。

両者間には上記のごとく差異が認められるが、*mycetocyte*は脂肪体細胞が変化したものであろうと思われる。共生微生物が感染することがこのような差異をもたらすのか、あるいは両者は胚子発育の段階からすでに異なった細胞として存在するのかは不明であるが、*mycetome*を有している昆虫では胚子発育の段階からすでに他の組織とは異なった器官とし

て mycetome が認められるし、Brooks (1963b) は、脂肪体に存在する mycetocyte も微生物の感染によりできるものではなく、胚子発育のときに特別な細胞としてみられるとしている。ヒメトビウシカにおいても発生の初期から脂肪体細胞とは異なった細胞群として mycetocyte が存在するものと予想されるが、さらに詳しい検討を要する。

E. 電子顕微鏡観察

Mycetocyte にはミトコンドリア・粗面小胞体などが観察され、ミトコンドリアはその数も多かった(図22)。細胞質はリボゾーム様顆粒によってみたされており、ミエリン様構造や種々の封入体などが観察された(図23、図24)。脂肪滴も観察されたが、グリコーゲン顆粒は少ないか又はほとんど観察されなかった。一方脂肪体細胞は大きな脂肪滴やグリコーゲン顆粒に富んでおり、粗面小胞体やミトコンドリアも多く観察された(図25)。脂

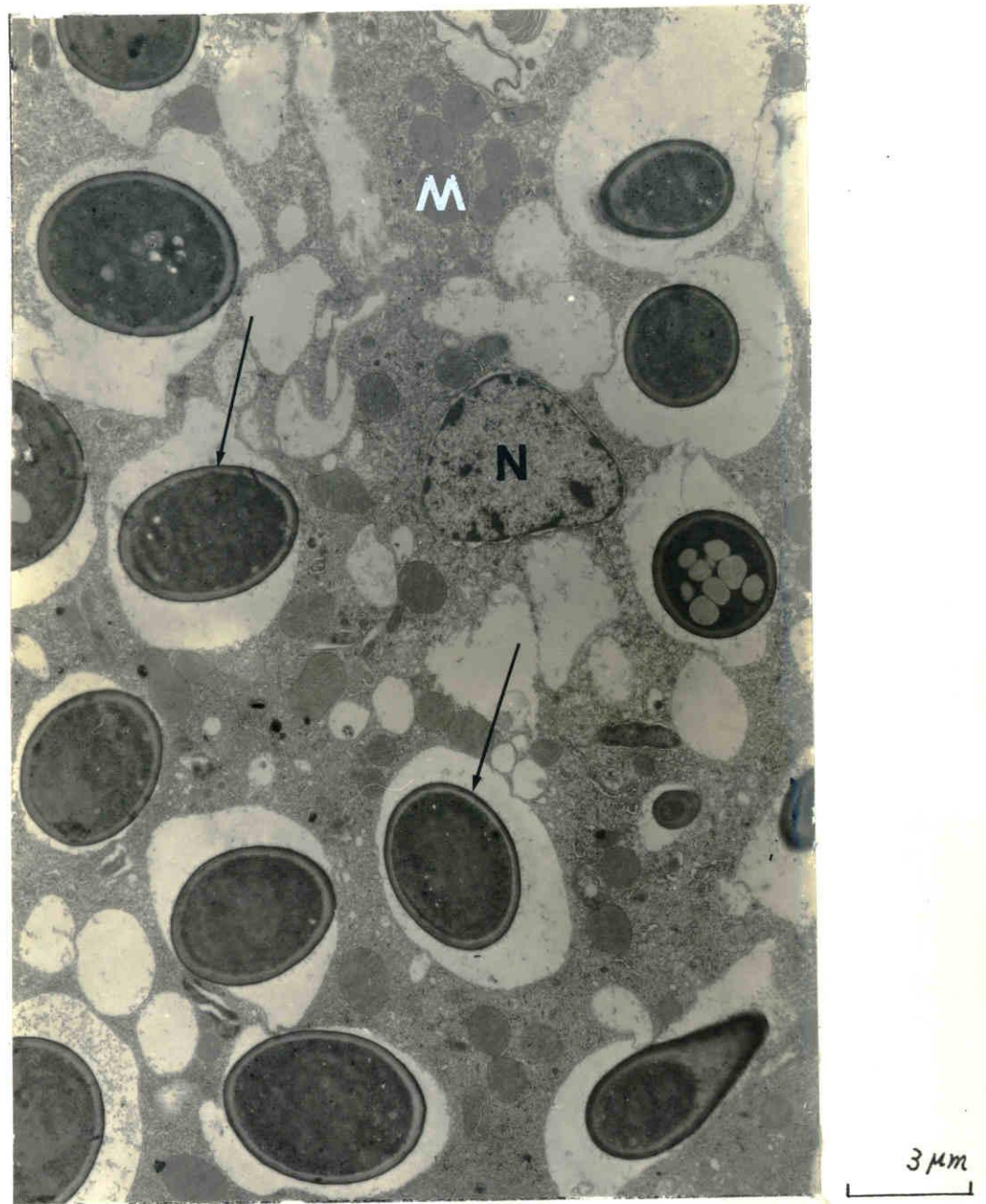


図 22. 幼虫の mycetocyte の電子顕微鏡像

矢印：酵母様共生微生物

M: ミトコンドリア, N: 核

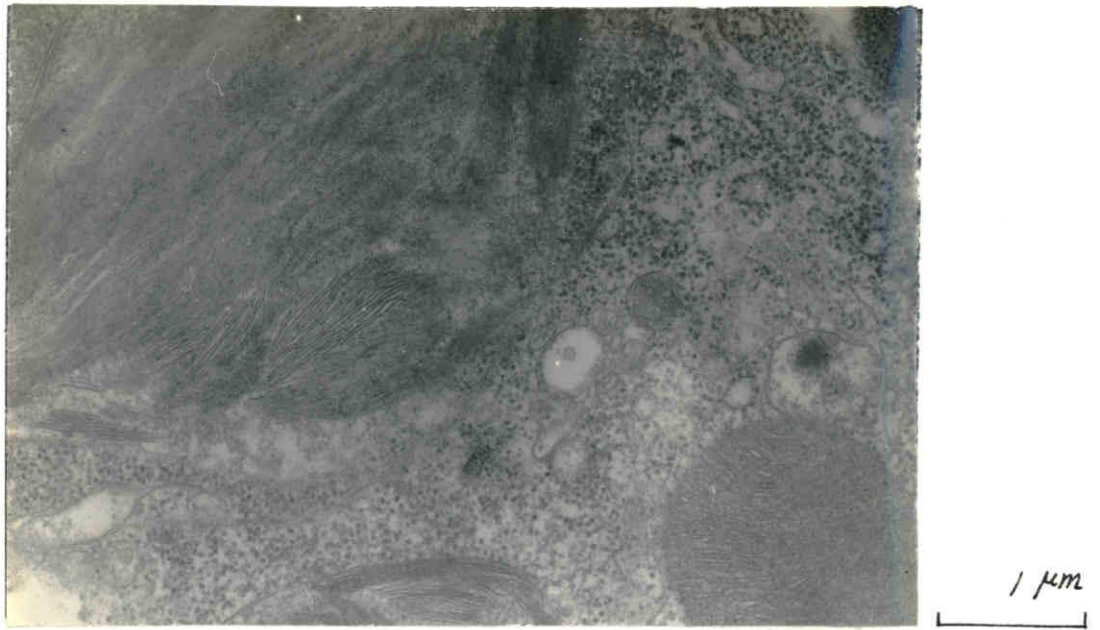


図 23 Mycetocyte 内にみられる ミエリン様構造

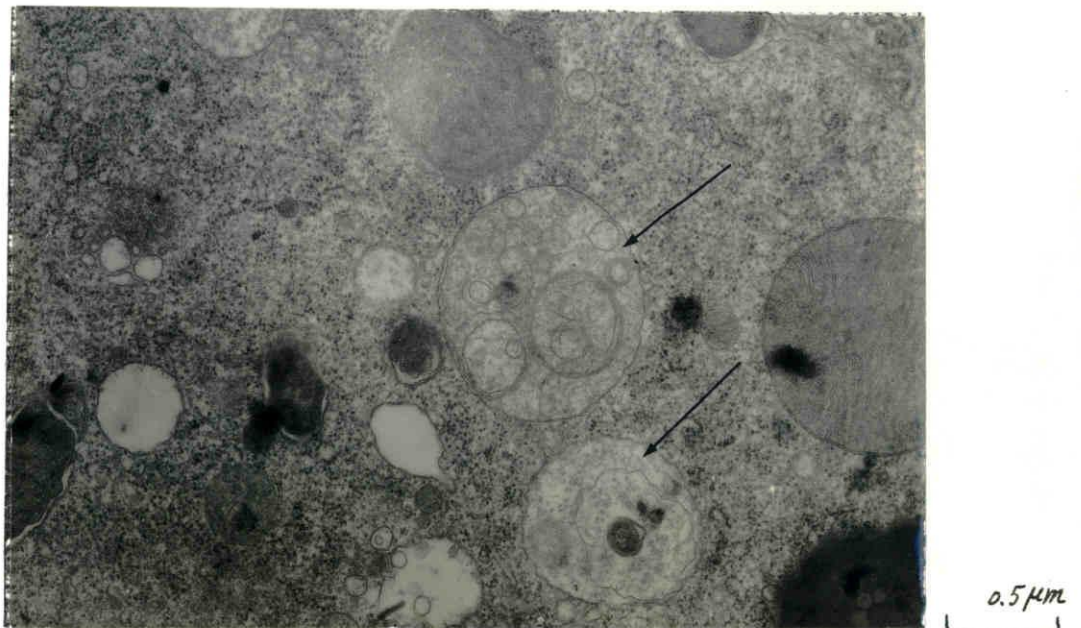


図 24 Mycetocyte 内にみられる 封入体 (矢印)

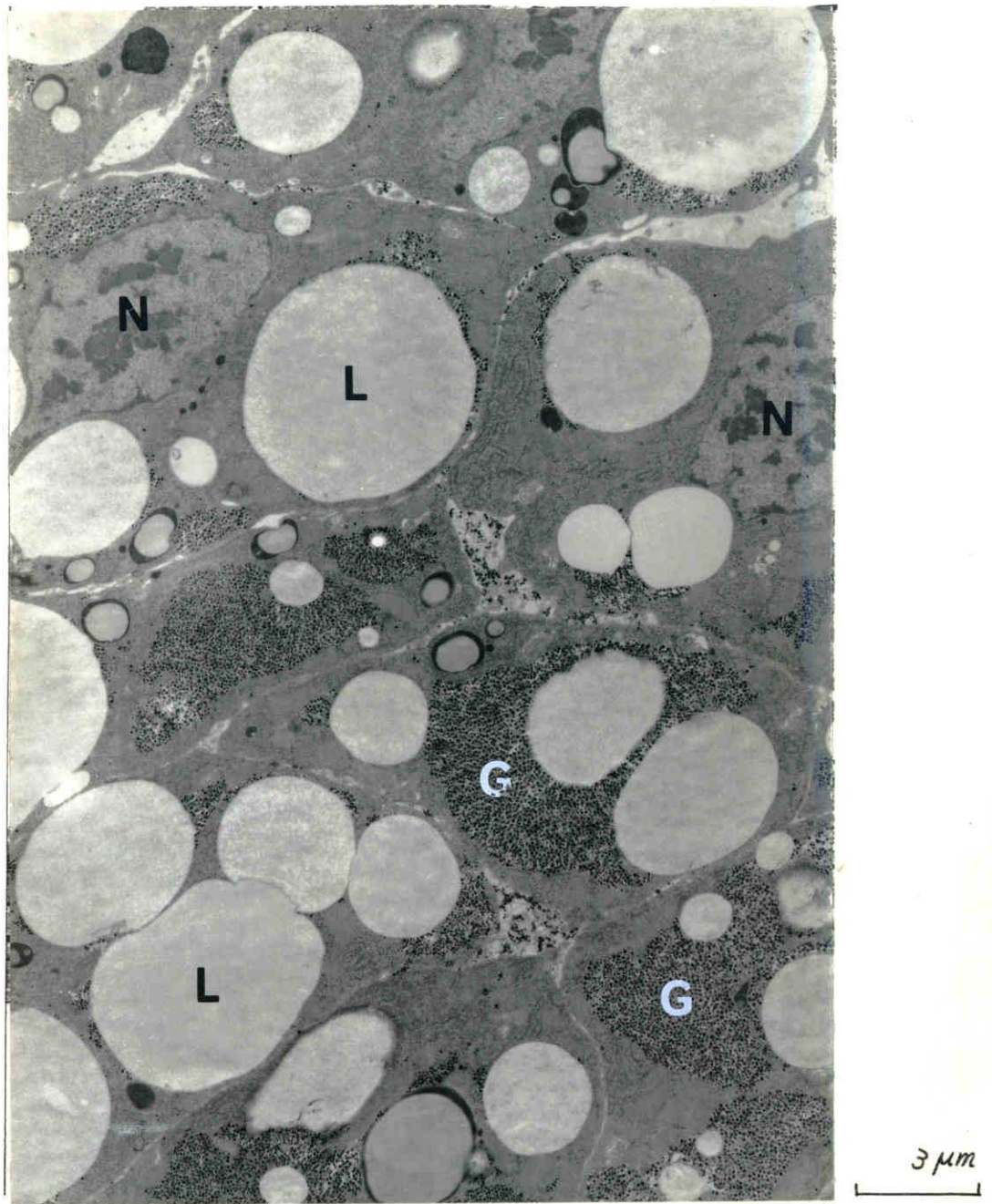


図 25. 脂肪体細胞の電子顕微鏡像

G: グリコーゲン, L: 脂肪滴, N: 核

筋体細胞ではミエリン様構造や封入体などはほとんどみられず、*mycetocyte* とは生理的にかなり異なっているものと予想される。

酵母様共生微生物は *mycetocyte* 内で一層の限界膜に囲まれて存在しており、微生物自身は厚い細胞壁を有し、その内側には細胞膜がみられる。内部構造ははっきりととらえることはできなかったが、ミトコンドリアと思われる構造が認められた (図 26)。普通酵母様共生微生物の細胞質の電子密度は大きい。中には細胞質内に膜構造、封入体、小胞などがみられ、電子密度の小さい微生物が観察された (図 26, 図 27, 図 28)。これらは崩壊過程にある微生物であると考えられ、細胞壁のこわれたものがみられるなど、酵素により消化されているのではないかと思われる。アブラムシの共生細菌について、Hinde (1971a) はライソゾームによって崩壊させられることを指摘しており、それは微生物の増加に対する制御機構の一つであろうと考えられている。

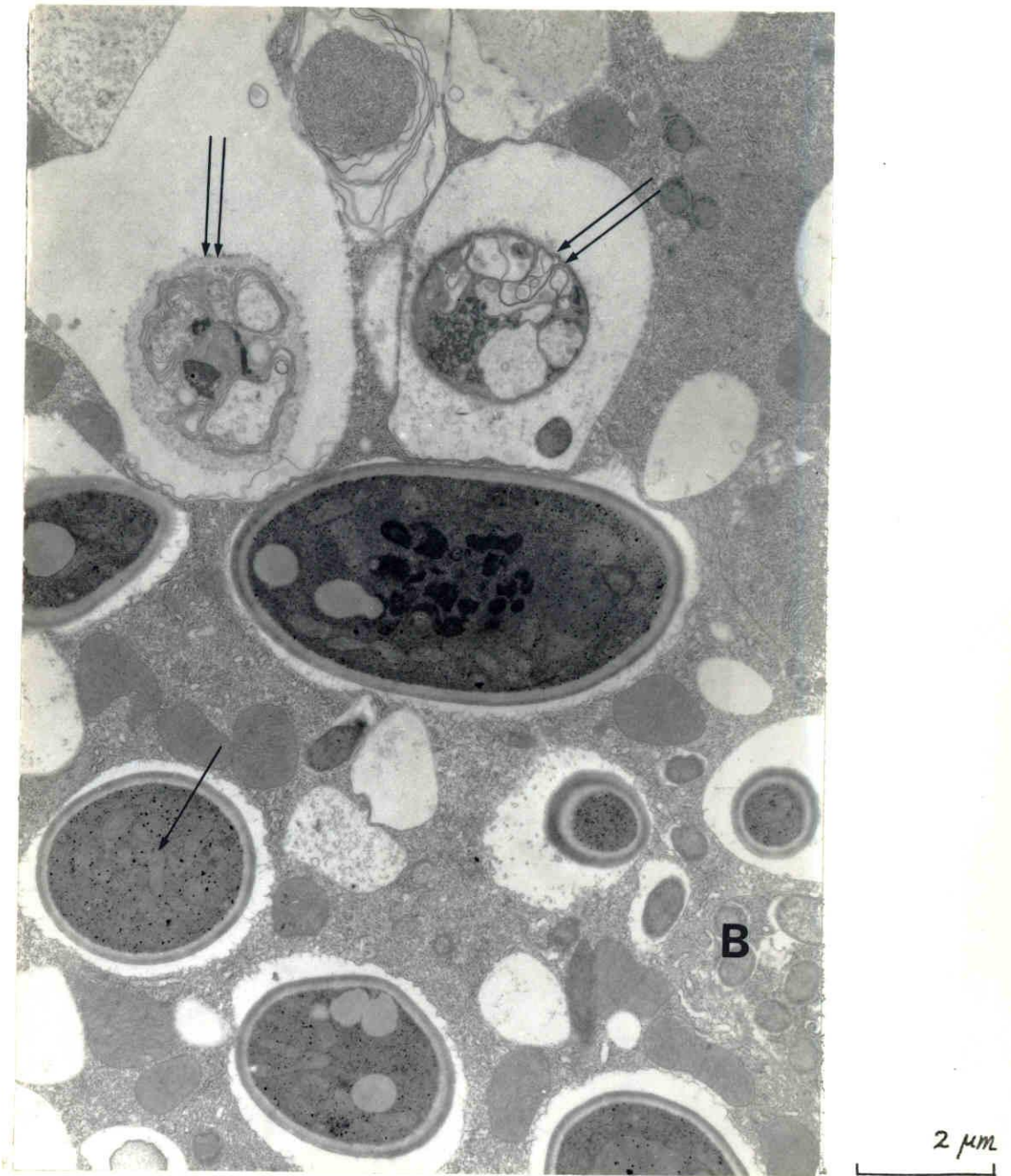


図 26. Mycetocyte 内の酵母様共生微生物の電子顕微鏡像

矢印：ミトコンドリア様構造
2重矢印：崩壊した酵母様共生微生物
B : 細菌

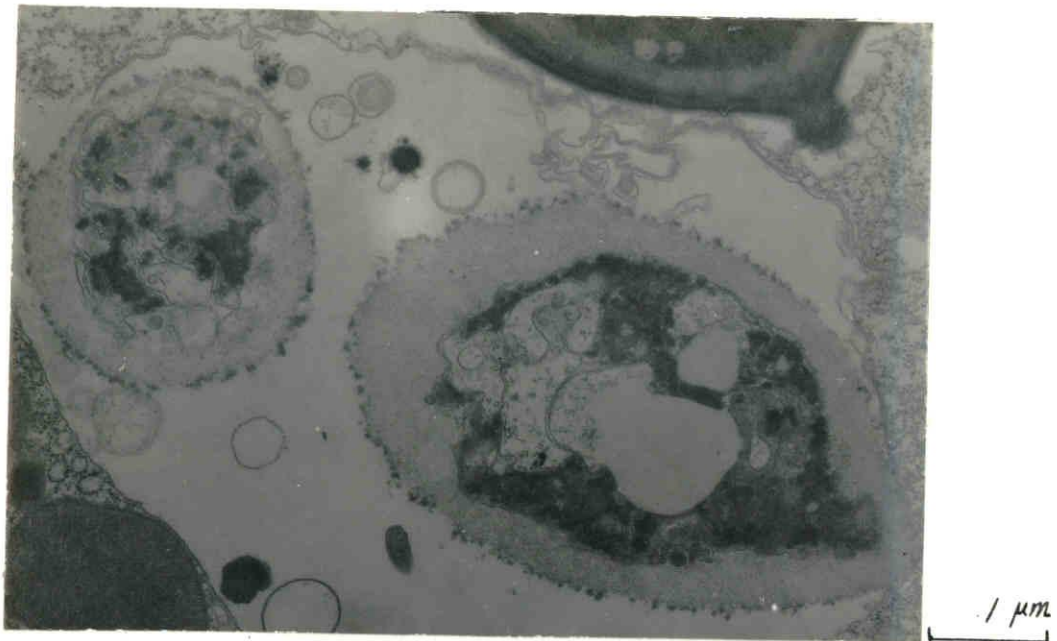


図27. Mycetocyte内にみられる崩壊過程の酵母様共生微生物



図28. Mycetocyte内にみられる崩壊過程の酵母様共生微生物

ヒメトビウシカの酵母様共生微生物については、ライソゾームとの関連は不明である。

酵母様共生微生物は限界膜によって囲まれているが、グルタールアルデヒド前固定・オスミウム酸後固定という一般的な固定法で試料を作成した場合、微生物と限界膜の間に空間が認められた。しかし、オスミウム酸前固定・グルタールアルデヒド後固定では限界膜との空間はほとんどみられなかった(図29)。微生物と限界膜との空間に関しては、空間がほとんどなく微生物を取り囲んでいるのが本来の姿ではないかと予想される。固定液の浸透圧などの関係で、グルタールアルデヒドで前固定した場合、人工的にこのような空間ができてしまったのではないと思われる。

微生物が限界膜によって囲まれているのは、他の多くの共生微生物の報告と同様であり、この膜は宿主の細胞膜に由来するものと考えられる。細胞内に侵入する際、細胞膜に取り囲まれて入るものと考えられ、宿主細胞の細

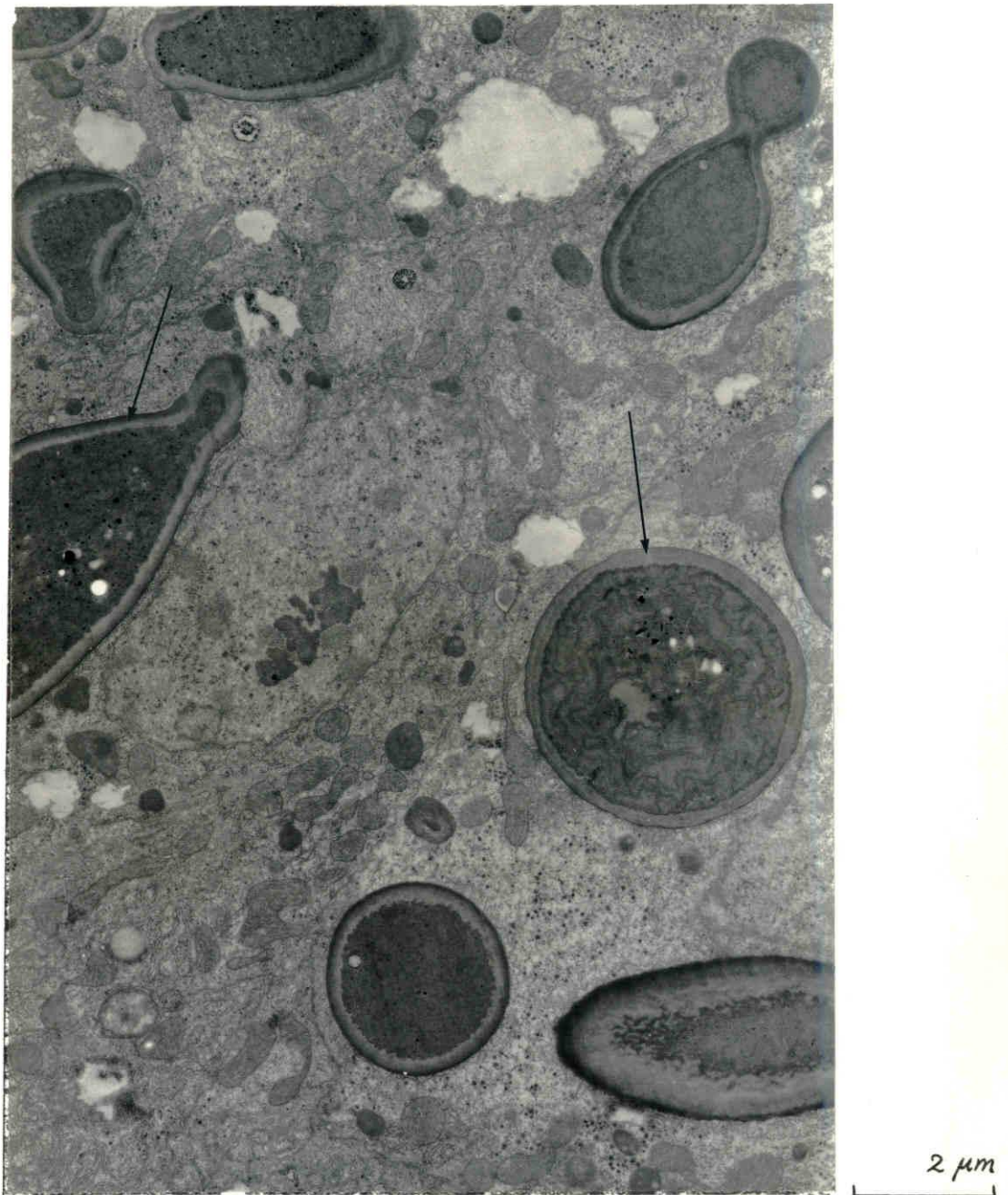


図 29. オスミウム酸前固定・グルタルアルデヒド後固定
による mycetocyte の電子顕微鏡像
矢印：酵母様共生微生物

胞質とは隔てられている。Griffiths and Beck (1975) はアブラムシの共生細菌の分泌した物質の一部はこの限界膜に包まれて宿主細胞の細胞質内へ送られると報告している。共生微生物はこの限界膜を通して宿主細胞と物質、情報交換を行っていると考えられ、この限界膜の存在は微生物と mycetocyte との共存にとって、大切な役割をしているものと思われる。

酵母様共生微生物の他に細菌が多く観察された。^{これは}細胞壁と細胞膜を有し、そのなかにリボゾーム様顆粒がたまっている。^{これが}細胞間隙に存在したり (図30)、細胞内に限界膜に包まれて存在した (図31)。細胞間隙に存在するものと細胞内に存在するものとは異なるのか、又何種類の細菌が存在するのかわからないが、少なくとも球菌と思われるものと桿菌と思われるものの2種が存在するようである。また、マイコプラズマ微生物に似た構造物が認められ (図32)、マイコプラズマ様微生物

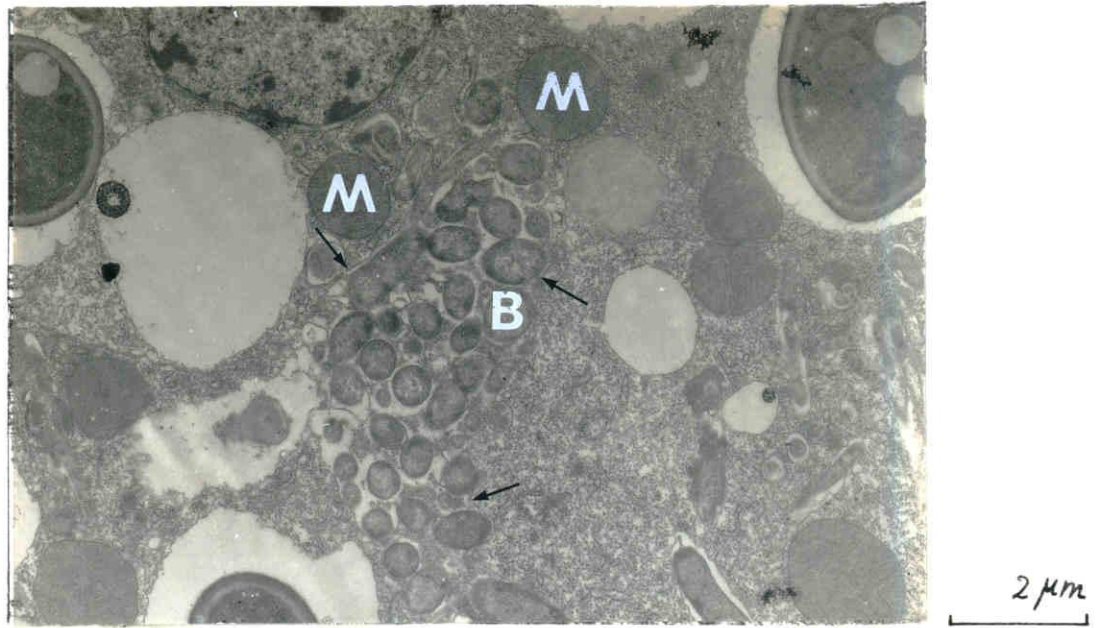


図 30. Mycetocyte の細胞間隙に存在する細菌 (B)
矢印 : 細胞膜, M : ミトコンドリア

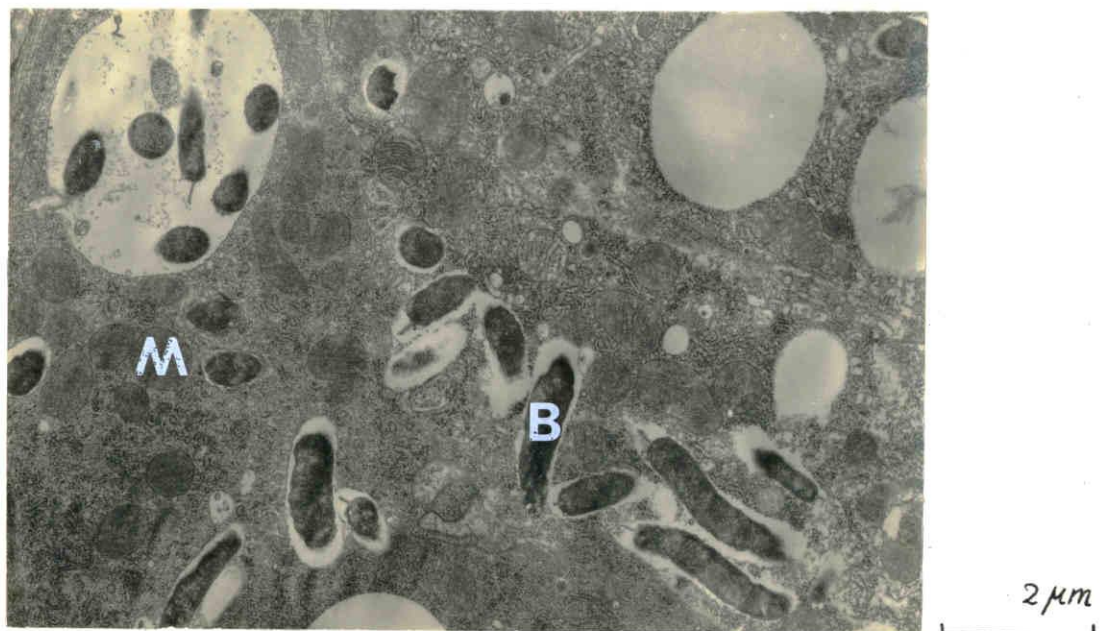


図 31. Mycetocyte 内に存在する細菌 (B)
M : ミトコンドリア

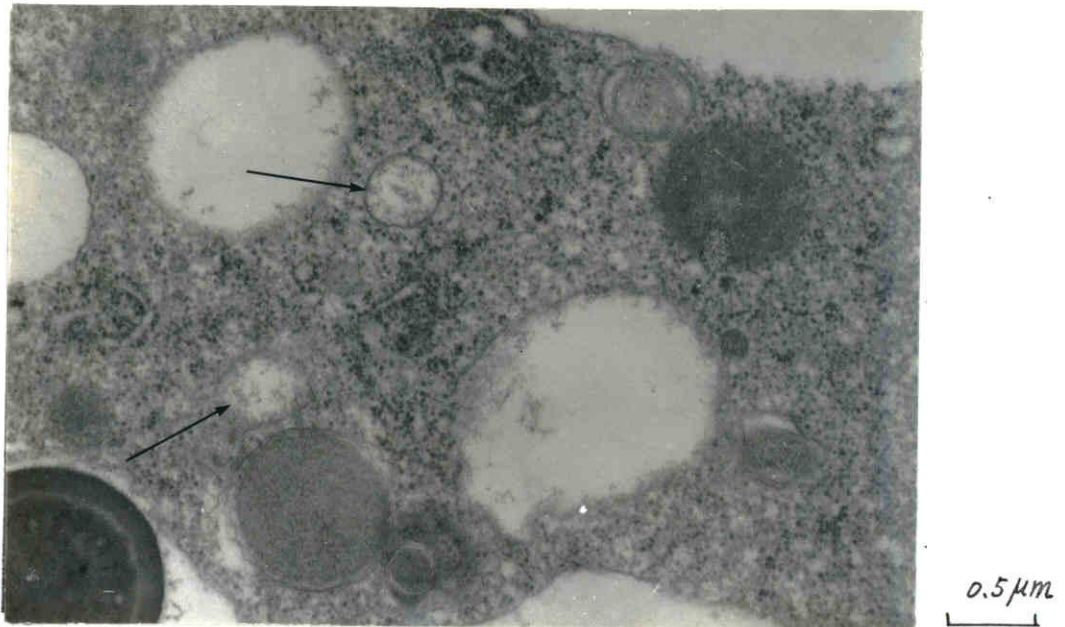


図 32. Mycetocyte 内に見られる マイコプラズマに似た構造体 (矢印)

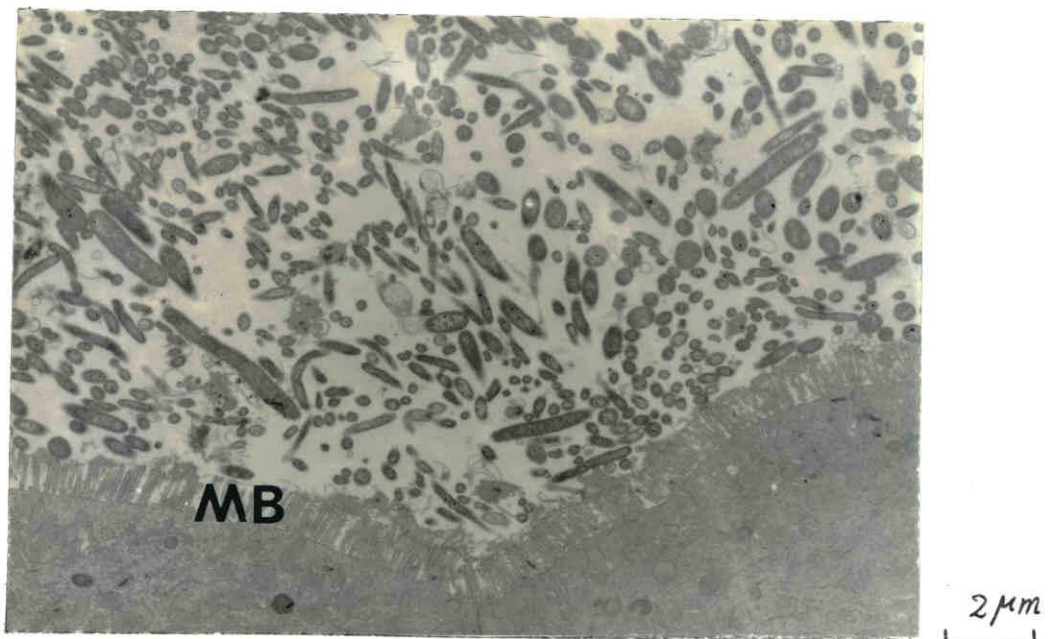


図 33. 消化管内の細菌
MB: 消化管壁の絨毛

が存在しているかもしれない。Mycetocyte には多くの微生物が混在している可能性が強く、複雑な環境となっているものと思われる。

脂肪体内以外にも、消化管内に非常に多くの微生物が観察された(図33)。これらは消化管内細菌であろうと考えられる。

以上のごとく、ヒメトビウソウカの体内には多くの微生物が存在しており、より詳細な観察が必要である。また、それらの経卵伝播についても検討が必要であろう。

F. 宿主の発育に伴う酵母様共生微生物数の変動

酵母様共生微生物の宿主内での分布を観察した際、微生物数は宿主の発育に伴い変化することが認められた。そこで、ウソウの一世代を通じて酵母様共生微生物の数がどのように変動するかを Thoma の血球計算器を用いて調べた(表1)。微生物数は産下後12~24時間内の卵では平均690、130~142時間内では平均

表 1. ヒメトビウンカ各ステージにおける1個体当りの酵母様共生微生物数

ステージ	I	II	III	平均値
卵 12-24時間	503 (46)	783 (43)	785 (35)	690 (41)
72-84時間	589 (43)	1172 (49)	767 (39)	843 (45)
130-142時間	1309 (41)	1621 (36)	1664 (48)	1531 (42)
幼虫 1令	3027 (27)	3072 (24)	2496 (12)	2865 (21)
2令	4715 (23)	4178 (31)	4342 (49)	4412 (34)
3令	18771 (21)	17310 (19)	12634 (29)	16238 (22)
4令	48028 (24)	46451 (37)	39439 (29)	44639 (30)
5令雄	87997 (45)	87174 (30)	106912 (46)	94028 (41)
5令雌	130762 (47)	157901 (47)	101978 (44)	130214 (46)
雄成虫短翅羽化当日	100022 (48)	73358 (49)	84787 (46)	86056 (48)
5日	12448 (50)	8611 (23)	13062 (65)	11374 (49)
10日	9958 (44)	5002 (33)	7034 (14)	7331 (32)
15日	9448 (24)	4401 (50)		6925 (32)
雄成虫長翅羽化当日	98351 (44)	72246 (45)	81475 (40)	84024 (43)
5日	7533 (9)	13248 (30)	6846 (36)	9209 (26)
10日	6848 (15)	4357 (43)	5557 (30)	5587 (27)
15日	2226 (46)	4934 (50)		3580 (49)
雌成虫短翅羽化当日	212954 (32)	172710 (53)	211661 (48)	199108 (44)
5日	251293 (41)	210438 (37)	230560 (43)	230764 (40)
10日	256550 (48)	258227 (47)	205779 (38)	240185 (45)
15日	216307 (49)	232237 (44)	181009 (51)	209851 (48)
雌成虫長翅羽化当日	129952 (54)	168243 (38)	147891 (39)	148695 (43)
5日	221645 (35)	174451 (54)	170195 (45)	188764 (44)
10日	174340 (34)	171635 (47)	163699 (51)	169891 (44)
15日	117136 (36)	170358 (40)	167672 (42)	151722 (40)

() : 出芽している個体数の割合 (%)

1531と増加している。これは卵内ですでに微生物が増殖していることを示している。1令幼虫では一頭当り微生物数は約2900であったが、幼虫期間を通して対数的に増加し、5令幼虫においては雌の方が雄よりも微生物数が多かった。これは雌の方が体が大きいことによるものと思われる。雄成虫では羽化後数日で、長翅型・短翅型ともに微生物数は急激に減少し、羽化後5日で羽化当日の数に比較しそれぞれ約 $\frac{1}{9}$ 、 $\frac{1}{8}$ に減少した。一方、雌成虫では羽化後も微生物数は増加し、短翅型雌成虫で約24万の微生物が計数された。短翅型雌成虫は長翅型雌成虫に比べ数が多かった。微生物の出芽率をみると、宿主のステージを通じて特に顕著な差はみられず、微生物の減少は宿主の側からの働きによるものではないかと考えられる。

幼虫期には体重増加に伴い酵母様共生微生物が増加しており、個体当りでは対数的に増加している。これは昆虫の発育に伴う増殖の

場の拡大により微生物が増えているように思われる。病原菌のように一方的に宿主を侵して増殖をするようなことではなく、宿主との間に平衡状態が存在するようにみえる。これは、微生物自身が自己の増殖を調節しているのではなく、宿主からの制御要因の支配下にあるのであろう。

雌成虫では羽化後も微生物は増加を続け、産卵期前期あたりに最高の数となった。この時期は微生物が卵内に入り次世代へ伝えられる時期であり、また雌成虫にとって産卵という重要な活動をする時期でもあり、宿主及び微生物にとってこのことは重要な意味をもつかもしれない。一方、雄成虫では羽化後急激な数の減少が起こる。雄成虫は精巣と筋肉の発達に伴い脂肪体の多くを消失したが、その時に微生物の多くも消化されてしまうのではないかと思われる。結局、雄の体内の酵母様共生微生物は次世代へ伝わることなく、雄の死と共に死ぬことになる。このように、共生

微生物は単に宿主内に生育しているだけでなく、宿主の発育と微生物の増殖の間には密接な関係があり、またそれが両者の共生を成立させているように思われる。

Ⅲ. 酵母様共生微生物及び宿主に及ぼす高温の影響

序論

共生微生物と宿主との関係や共生微生物の役割のより深い解明には、共生微生物と宿主との統合されたものとしての正常な昆虫を扱うばかりでなく、共生微生物を除去した昆虫 (aprosymbiotic insect) もしくは昆虫体内から切り離された微生物を比較対象として用いる必要性が感じられる。しかし、経卵伝播をするような細胞内共生微生物は、常に宿主の体内に存在し極度に適応しているため、外部に取り出して培養をすることは容易ではないと考えられている。ヒメトビウンカの酵母様共生微生物の培養の試みとしては、Mitsuhashi (1975) による symbiote ball の培養があるが、発展的に研究を進められる現状ではない。

一方、微生物を昆虫体内から取り除く場合にも、いかに昆虫に損傷を与えずに除去する

かが問題となる。共生微生物の宿主よりの除去に関しては多くの報告があるが、主として抗生物質や殺菌剤等の化学物質による方法 (Brooks and Richards, 1955; Malke, 1964; Ehrhardt, 1966; Ehrhardt und Schmutterer, 1966; Griffiths and Beck, 1974) と、X線照射 (Schwemmler, 1973) や高温等による物理的な方法とがある。高温により共生微生物を除去できることは古くから知られており、Glaser (1946)、Brooks and Richards (1955)、Huger (1956) らの研究により、高温が aposymbiotic insect を作る有効な手段であることが認識された。しかし、高温が宿主にも影響を与える可能性のあることや薬剤が共生細菌を殺すのに効果のあるところから、高温により共生微生物を除去することは、それ以後ほとんど試みられていないようである。

本研究では、高温がヒメトビウンカとその酵母様共生微生物にどのような影響を与えるか、高温により酵母様共生微生物をヒメトビ

ウンカから除去できるかどうか、もし共生微生物が崩壊した場合ヒメトビウンカにどのような影響が現われるかなどについて調べた。従来、微生物を除去する場合、共生微生物をまったく有しない昆虫を作ることが目標とされたが、もし宿主が極度に共生微生物の恩恵に浴している場合、共生微生物を完全に排除することは宿主の生存・発育に致命的となり、しかも完全に微生物を崩壊させるほどの操作を加えた場合、宿主に対する操作の直接的悪影響が出るのではないかなど問題が多い。そこで本実験では、完全には酵母様共生微生物が崩壊しなくとも、共生微生物の個体数が少ない昆虫を作ることを目標とした。

材料及び方法

a. 飼育方法

休芽出しを用い25℃16時間照明で累代飼育したヒメトビウシカを各温度条件下で飼育した。光条件はすべての実験において16時間照明である。試験管(直径1.0cm, 長さ10.4cm)内に休芽出しを1本ずつ入れ、底に水を数滴入れて、1頭ずつ飼育した。休芽出しは5日ごとに取り換えた。各温度条件は以下の四通りである。

A : 25℃下での飼育(正常温度)

B : 35℃下での飼育

C : 孵化当日の1令幼虫を3日間35℃下で飼育、その後25℃下で飼育

D : 孵化後約6日(3令幼虫)まで25℃で飼育し、3日間35℃下に置き、再び25℃にもどして飼育

上記飼育法においては試験管内に水が入っているため、湿度はかなり高いと予想される。なお本文中で高温飼育あるいは高温処理と述べる場合は35℃での飼育を意味し、B、C、Dのどれかの飼育条件を意味している。

死亡数・羽化数をのみ観察する場合は、次のような方法によっても飼育した(図34)。試験管(直径1.4cm, 長さ10.3cm)の底に水を入れ、温室で育てた体の葉鞘(葉身も一部ついている)をそれぞれ1本ずつ入れ、途中に綿を入れて虫が水につからないようにして、数頭ずつ飼育した。

b. 組織観察及び酵母様共生微生物の計数

組織観察用試料の作成はII-aに、電子顕微鏡観察はII-cの方法に従った。酵母様共生微生物の計数はII-dの方法による。

c. 産卵及び甘露排泄

産卵：飼育用のガラスビン(直径約9cm, 高さ約17cm)内で体芽出しを用いて高温条件(D)(3令期に3日間高温処理)で飼育した短翅型雌成虫の産卵数を、正常の短翅型雌成虫のそれと比較した。羽化した雌成虫はそれぞれ正常雄と共に5日間飼育した後、1頭ずつ

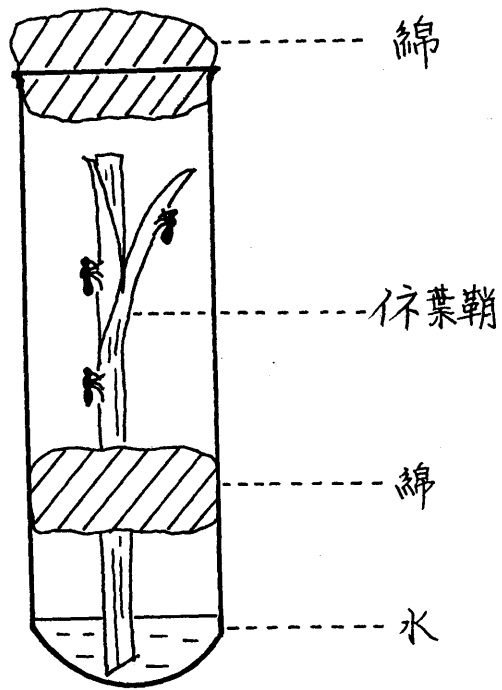


図 34. イネ葉鞘を用いた飼育法

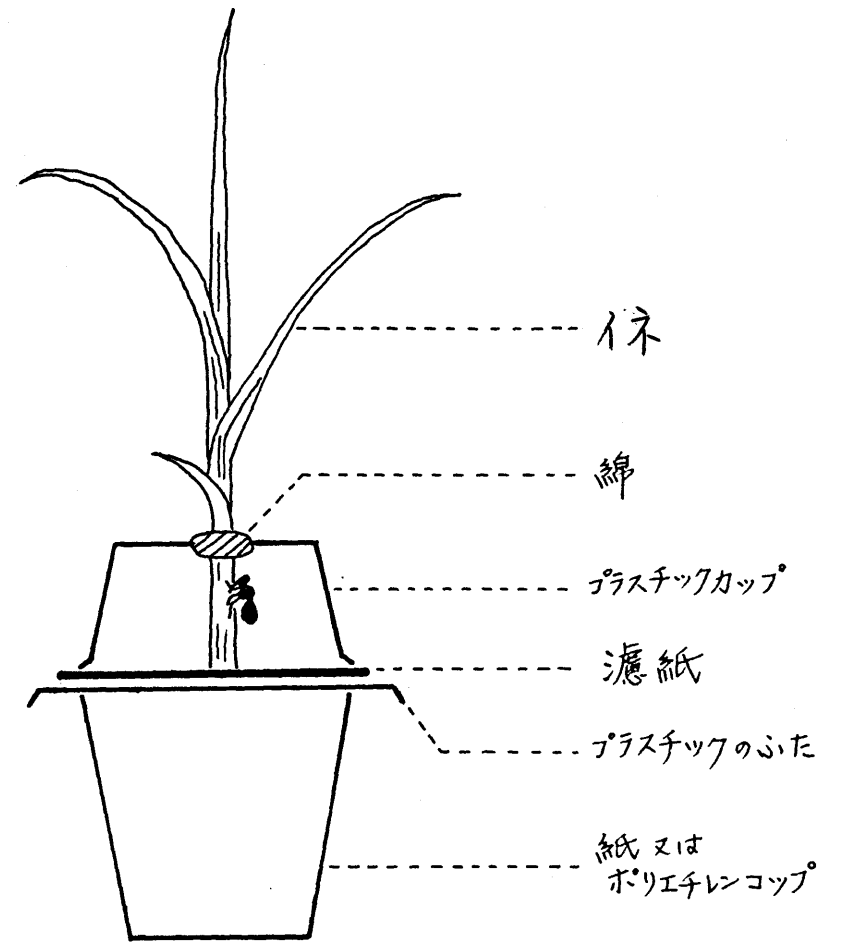


図 35. 甘露採取方法

試験管内のイネ葉鞘に25℃で24時間産卵させた。イネ葉鞘内に産下された卵数は、実体顕微鏡下で数えた。

甘露排泄：高温処理(c)5令幼虫(1令期に3日間高温処理)の吸汁量と正常5令幼虫の吸汁量とを、両者の甘露排泄量から比較した。カップ内に土を入れて育てた3~4葉の稲を吸汁させ、下に敷いた濾紙上に甘露を排泄させた(図35)。15頭づつ稲につけ、25℃で24時間吸汁させた後、濾紙を取り出し、アセトンに溶かしたニンヒドリンに浸し、乾燥・加熱した。稲汁液に由来すると考えられるアミノ酸が反応し、甘露滴が紫色に染まるため、甘露排泄の程度が比較できる(寒川、1970)。

d. エクジステロンの塗布及び吸汁

高温処理(c)5令幼虫(1令期に3日間高温処理)にエクジステロン(ecdysterone, $C_{27}H_{44}O_7$, ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD)を塗布し、その成虫脱皮に与える影響をみた。エクジステロン

はメタノールに溶かし、マイクロシリンジの針先から直接塗布するか又は針の先にガラスキャピラリーをつけて、高温処理5令幼虫の背側に0.125 μ l づつ塗布した。処理後の幼虫は数頭づつ試験管内で休葉鞘を吸汁させた。

高温処理(c)5令幼虫にエクジステロンを吸汁させる場合は図34の飼育法を用い、試験管の底の水にエクジステロンを0.01%又は0.001%に溶かし、休葉鞘を吸汁させた。試験管の底の水に色素を溶かしたところ、色素が休葉鞘の維管束内を上昇するのが確かめられた。

結果及び考察

A. 高温下での発育

予備実験として、25 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ Cの各温度でヒメトビウンカを2令から飼育した。25 $^{\circ}$ Cと30 $^{\circ}$ Cでは生育に顕著な差は見られず、酵母様共生微生物も認められた。40 $^{\circ}$ Cでは多くの個体が途中で死亡した。35 $^{\circ}$ Cでは発

育が遅れ、成虫において翅の奇型もしくは翅の伸びきっていない個体がみられた。35℃で飼育した個体を磨碎して顕微鏡下で観察したところ、酵母様共生微生物はほとんど見られず、35℃下での飼育が酵母様共生微生物の除去に効果のあることがわかった。そこで、35℃を高温とし、25℃を正常温度として以下の飼育を行った。

25℃でのヒメトビウンカの発育は図36Aに示した。図には、発育曲線と累積死亡率とを同時に示した。孵化後平均約13日で成虫となった。35℃下で飼育した場合、3令まではほぼ正常に発育したが、それ以降次の令へ進まない個体がみられた(図36B)。孵化後24日経過しても成虫が出現せず、すべてが幼虫であった。3令から4令への脱皮をみると、脱皮時期が正常の個体群より遅れ、脱皮期間が広い範囲にわたっている。35℃で飼育したヒメトビウンカは正常個体に比べて体が小さく、特に腹部の発達が悪かった。

各日における發育ステージの割合と累積死亡率

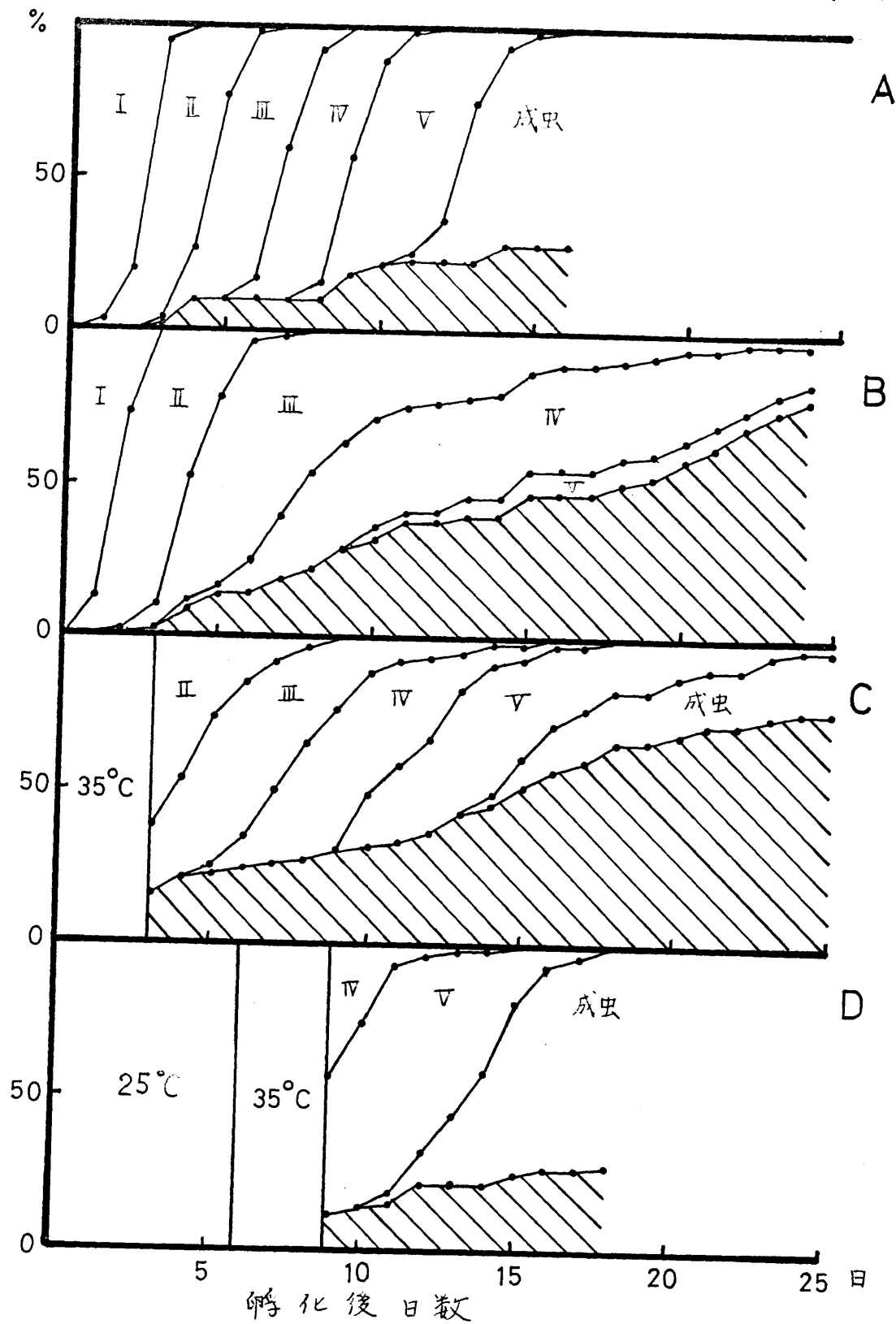


図36. 高温下でのヒメビウカの各令における脱皮發育曲線と死亡率曲線

(I, II, III, IV, V はそれぞれ幼虫の令を示す, 斜線部は死亡率を示す)
A, Bでは飼育開始1日目の死亡虫は除外してあり.

A: 25°C下での飼育

B: 35°C下での飼育

C: 孵化後3日間35°C, その後は25°Cで飼育

D: 孵化後6日から3日間35°C, その後は25°Cで飼育

体色は黄色または淡橙色をしており、多くは薄い色をしていた。正常虫のように黒や褐色の色素のみられる個体は観察されなかった。

1令より35℃で飼育した場合、酵母様共生微生物はほとんどみられなかった。しかし、35℃という高温下で飼育を続けることは宿主に大きな影響を与えている可能性があり、今後の実験にこの個体群を用いるのは困難であろうと考えられた。そこで次に、高温下での飼育期間を短くし、最初の3日間だけにし、あとは25℃で飼育した。

1令期に3日間高温処理すると、各令期間が長くなり、発育が遅延し、死亡個体も多かったが、25日までに20%が成虫となった(図36C)。しかし、孵化後25日経過してもまだ5令幼虫のままだった個体が認められた。羽化については、正常虫と同様に雄の方が雌より羽化が早い傾向にあった。各脱皮は全般に個体間の差が大きくなり、正常虫に比べ脱皮時期のずれが大きくなっている。体の大きさ

は全般に小さかったが、5令脱皮後成虫にならず5令幼虫のままだった個体では、むしろ正常5令幼虫よりも体の大きな個体が観察された。羽化した雌成虫は腹部が小さく、卵巣の発達に伴う腹部の肥大のみられた個体は少なかった。体色も淡く、活動性もすこし鈍いように思われた。^註正常虫に比べ背板の発達が悪いように思われた。これについては、長翅型・短翅型等の差もあり詳しく検討する必要があるが、5令脱皮後数日経過しても翅の形成の悪い個体が認められることや、羽化した個体でも翅の伸びきっていない個体のみられるところから、翅形成に影響が出ているように思われる。また5令幼虫において、翅の形成されている部分や腹部、あるいは頭胸部が黒褐色に着色している個体が見られた。これらは皮膚下における着色と思われた。また、脱皮途中で死亡している個体が見られ、特に成虫脱皮時に多く見られた。5令のクチクルから体を半分脱いだ状態で死んでいたり、後

脚や腹部末端は明らかに殻を脱いでいるのに、頭胸部背側に割れ目が入っておらず、脱皮しようとしたができない状態で死亡していた(図48)。

次に、35℃3日間高温飼育という操作を3令幼虫に与えた。羽化がわずかに遅れ、羽化曲線もすこしゆるやかになったが、すべて成虫になった(図36D)。体色はやほり淡く、羽化直後の雌は腹部腹側が少し扁平であった。

各飼育において、それぞれの令から次の令へ進んだ個体数を表2に示した。正常虫では各令の幼虫の85%以上が次令へ進んでいる。35℃下での飼育では3令幼虫の内67.9%が4令になっており、さらに4令のうち5令になったのは13.9%である。1令期に3日間高温処理した場合(C)、3令から4令、4令から5令への脱皮の割合は正常虫に近い値を示しているが、成虫になった5令幼虫は36.1%であり、5令で死亡もしくは羽化できない個体が多いことがわかる。連続して35℃下で飼育し

表 2. 温度の異なる飼育条件におけるヒメトビウカの発育率の比較¹⁾

飼育条件	飼育個体数	3令-4令	4令-5令	5令-成虫
A	60	53/54 (98.1)	46/53 (86.8)	43/46 (93.5)
B	63	36/53 (67.9) ²⁾	5/36 (13.9) ²⁾	0/5 (0.0) ²⁾
C	65	44/47 (93.6)	36/44 (81.8)	13/36 (36.1) ²⁾
D	76			54/62 (87.1)

1) 各令における個体の内 次の令へ脱皮した個体の割合

2) 次令へ進まなかった残りの個体は 死亡又は孵化後24日でその令にとどまっていた個体

() は % を示す, A, B の飼育個体数は 飼育後1日の生存虫数

A : 25°C 下での飼育
 B : 35°C 下での飼育
 C : 孵化後3日間35°C, その後は25°Cで飼育
 D : 孵化後6日から3日間35°C, その後は25°Cで飼育

た場合(B)、3令から4令への発育が僅かに影響をうけ、5令への発育が大きく影響をうけている。1令期の高温処理(C)は、5令から成虫への発育に影響を与え、羽化個体数を著しく減少させている。

高温処理をした場合、次の令へ進まずその令にとどまっている個体がみられたが、これに関連して、Wigglesworth (1952) は *Rhodnius*
Rhodnius prolixus において、高温下では脱皮が阻止され、36℃ではまったく脱皮がみられないことを報告しており、これは脳ホルモンの分泌が阻害されるためであるとしている。さらにこの現象は Okasha (1964, 1968a, 1968b, 1968c) により詳しく調べられ、脳ホルモンの減少、細胞分裂の阻害、細胞核分裂の損傷、中腸タンパク分解酵素活性の低下などを理由にあげている。しかし、この *Rhodnius* の高温による脱皮阻止は、高温にさらされている間は脱皮できないが、正常温度にもどし、吸血させれば脱皮するようになる。また、正常温度

にもどせば高温のストレスが弱められると報告されており、ヒメトビウンカのように、1令期の高温が5令期に影響を与えるような場合とは異なる。

高温飼育したヒメトビウンカは体色が薄かったが、*Rhodnius* でも高温下で脱皮した個体は体色が薄く (Wigglesworth, 1952)、またチヤバネゴキブリ (*Blattella germanica*) においても高温下飼育により体色が薄くなることが報告されている (Brooks and Richards, 1955)。

B. 酵母様共生微生物数

高温処理が酵母様共生微生物にどのような影響を及ぼしているかを、まず数について調べた。図37において正常虫の一個体当りの微生物数を○印でプロットし、1令期に3日間高温処理した個体の微生物数を×印でプロットした。微生物の増加は高温処理後、正常温度にもどされてもあまりみられなかった。5令幼虫においても5,000以下しか微生物を有し

一個体当りの酵母様共生微生物数

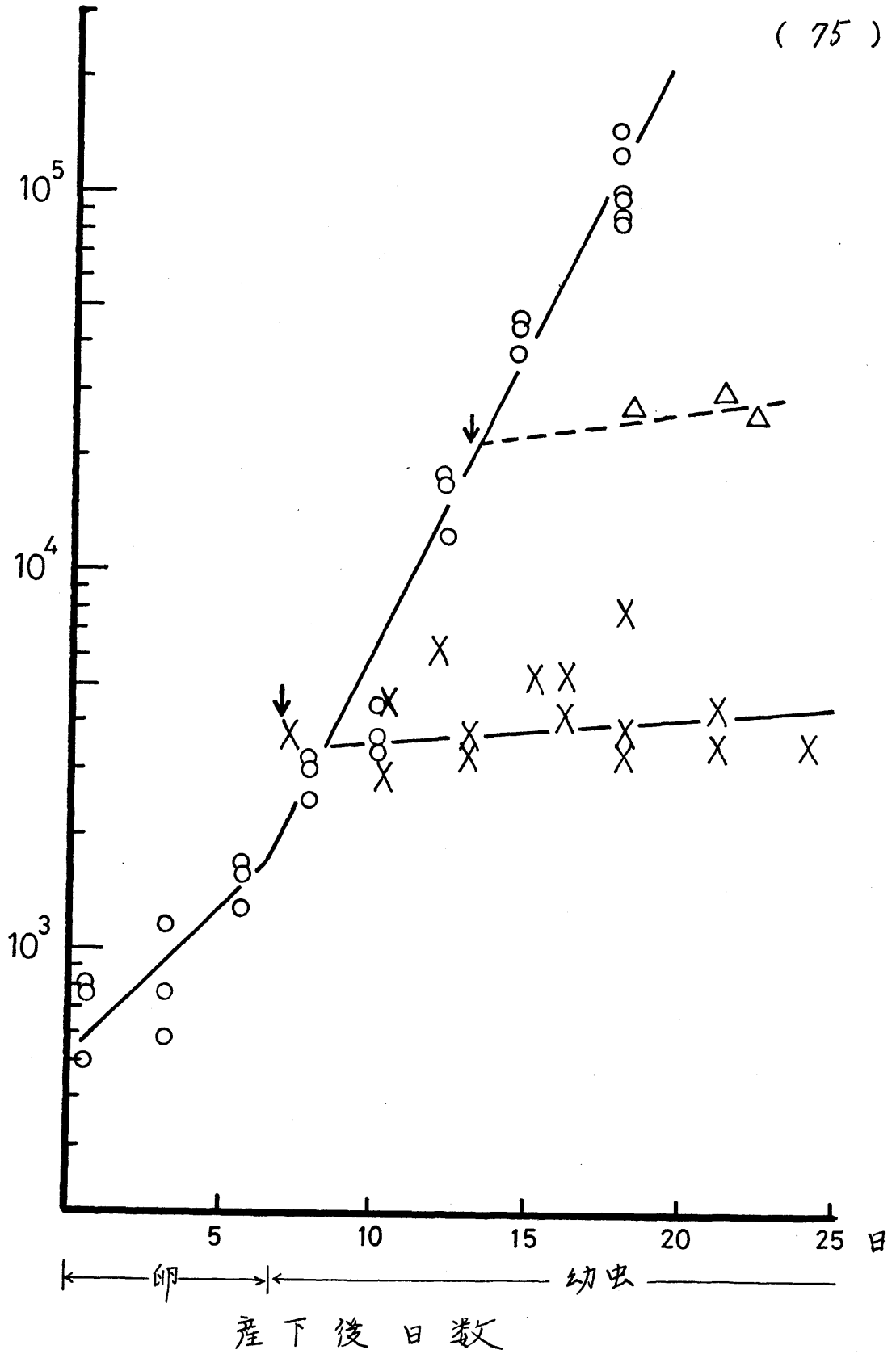


図 37. 高温処理後の酵母様共生微生物数

矢印のところで3日間35°Cに暴露し、その後は25°Cで飼育

×: 卵化当日35°Cに置いた

△: 卵化後6日に35°Cに置いた

○: 25°C下での飼育, 表1のデータよりプロットした

ておらず、正常虫が10万もの微生物を有しているのに比べて $1/20$ 以下であった。このように3日間35℃にさらすことにより微生物の増加はあまりみられなくなるが、出芽している微生物が観察されるところから、微生物が増殖しなくなったというより、微生物の崩壊が起っているために、結果的に数が増加しなかったのではないかと思われる。

次に、宿主にみられた発育遅延は、高温処理による直接的影響であるのか、微生物数の減少が宿主の発育に影響を及ぼしたのかが問題である。後者の場合、酵母様共生微生物が宿主のヒメトビウンカの生育に何らかの好適な要因となっているが、微生物数の減少がその要因の効果を減じさせることに起因して宿主の発育遅延等が起こることとを意味する。この点に関して、高温処理によりその共生微生物を除去した昆虫では生育の遅れが認められ (Glaser, 1946; Brooks and Richards, 1955; Huger, 1956)、薬剤を与えて共生菌を殺し

たアブラムシやゴキブリでも発育遅延・産卵産仔数の減少がみられ (Brooks and Richards, 1955 ; Ehrhardt, 1966 ; Ehrhardt und Schmutterer, 1966)、またアブラムシに抗生物質を吸汁させた場合も、発育・産仔に影響を与えることが報告されている (Mittler, 1971 ; Srivastava and Auclair, 1976) など、共生微生物の除去・減少は宿主の発育不良をもたらすと一般に考えられている。ヒメトビウソカにおいても酵母様共生微生物の減少が、宿主の発育遅延に影響している可能性が充分に考えられるので、以後主として1令期に高温処理した昆虫について検討を進めた。

C. 高温飼育虫の組織観察

1令期に3日間高温処理した昆虫の mycetocyte を、光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて観察した。正常5令幼虫と高温処理5令幼虫の酵母様共生微生物の分布を、PAS染色して比較すると (図38, 図39)、正常5令幼虫では

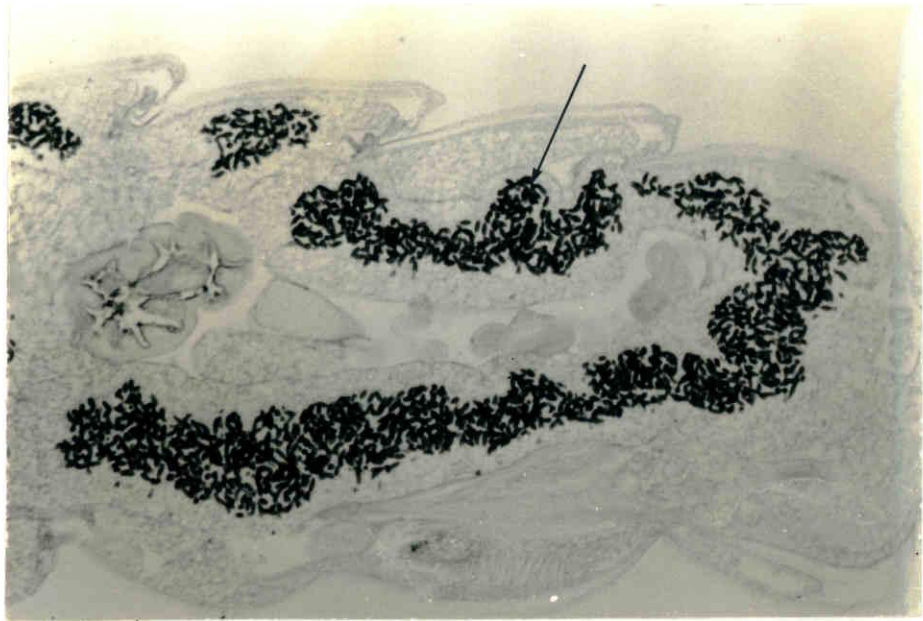


図38. 正常5令幼虫の腹部縦断面のPAS染色
矢印：酵母様共生微生物

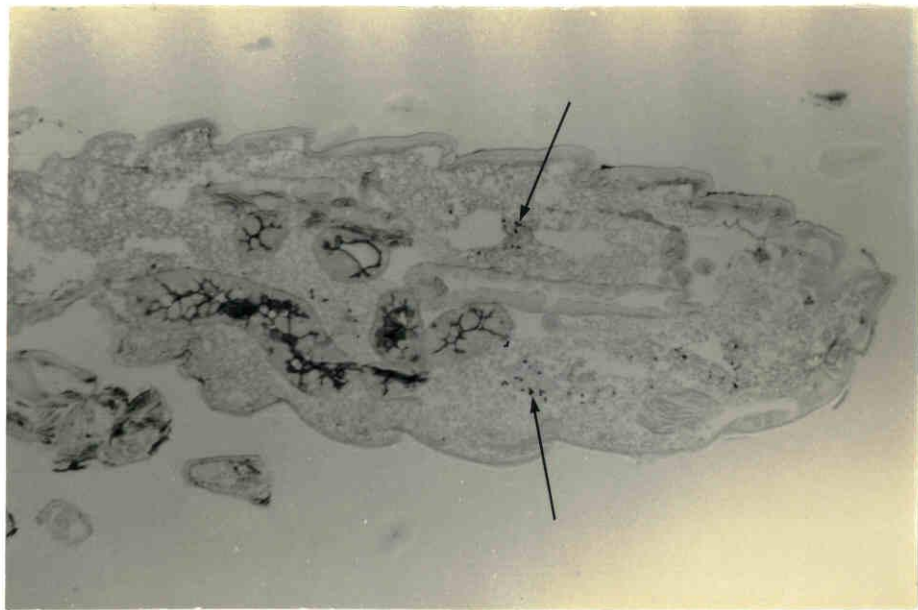


図39. 高温処理5令幼虫の腹部縦断面のPAS染色
(孵化後3日間高温処理)
矢印：酵母様共生微生物

腹部に多くの酵母様共生微生物がみられるが、高温処理5令幼虫では非常に少ない。電子顕微鏡による観察では、酵母様共生微生物の細胞質の電子密度が高く正常な微生物と思われるものはあまり見られず、細胞質内に多くの小胞などが観察されるものがみられた(図40)。しかし、このように細胞壁をもち酵母様共生微生物としての形態を具えているものは僅かで、崩壊した微生物が多くみられた(図41)。さらに完全に崩壊してしまった跡と思われるものがmycetocyte内に認められた(図42)。

たとえ酵母様共生微生物としての形態を整えているものでも崩壊の過程が認められるものが多く、Ⅲ-Bにおいて高温処理虫の微生物数を求めたが、実際に正常な酵母様共生微生物はずっと少ないのではないかと想像される。高温が酵母様共生微生物を崩壊させたという観察は本実験が最初と思われ、また1令期に3日間35℃にさらしただけで崩壊させたこ

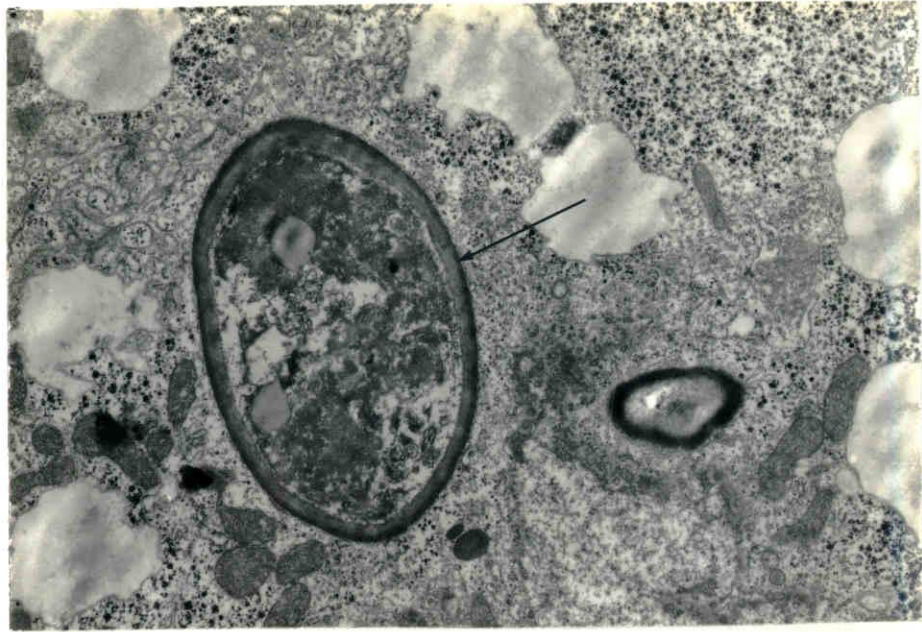


図40 高温処理 2令幼虫の mycetocyte の電子顕微鏡像

矢印：酵母様共生微生物



図41 高温処理 2令幼虫 mycetocyte 内の崩壊した酵母様共生微生物 (矢印)

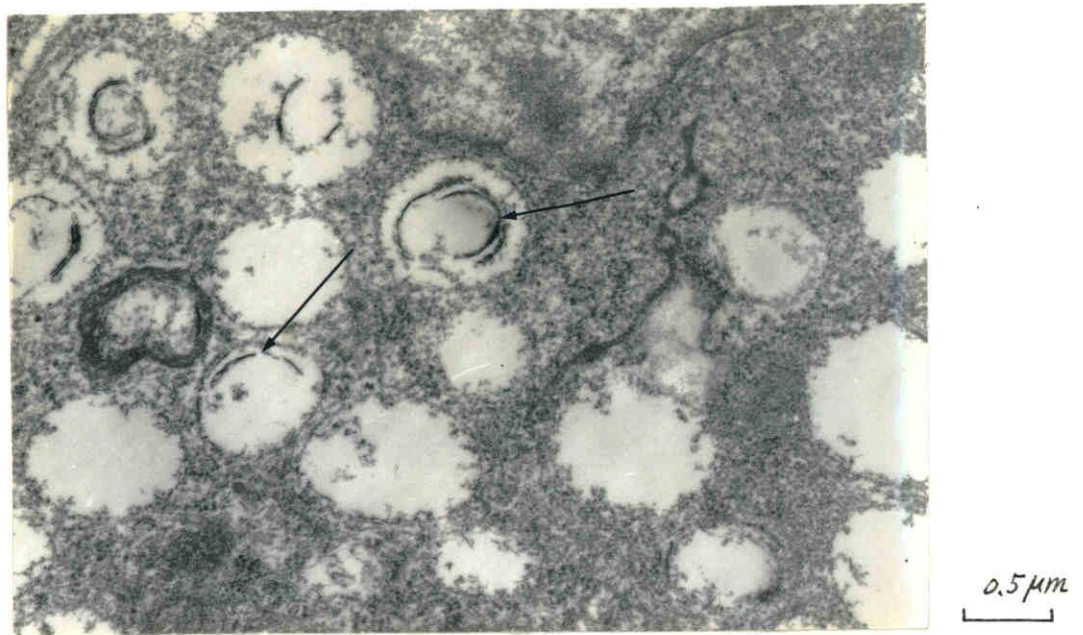


図 42. 高温処理により完全に崩壊した酵母様
共生微生物 (矢印)

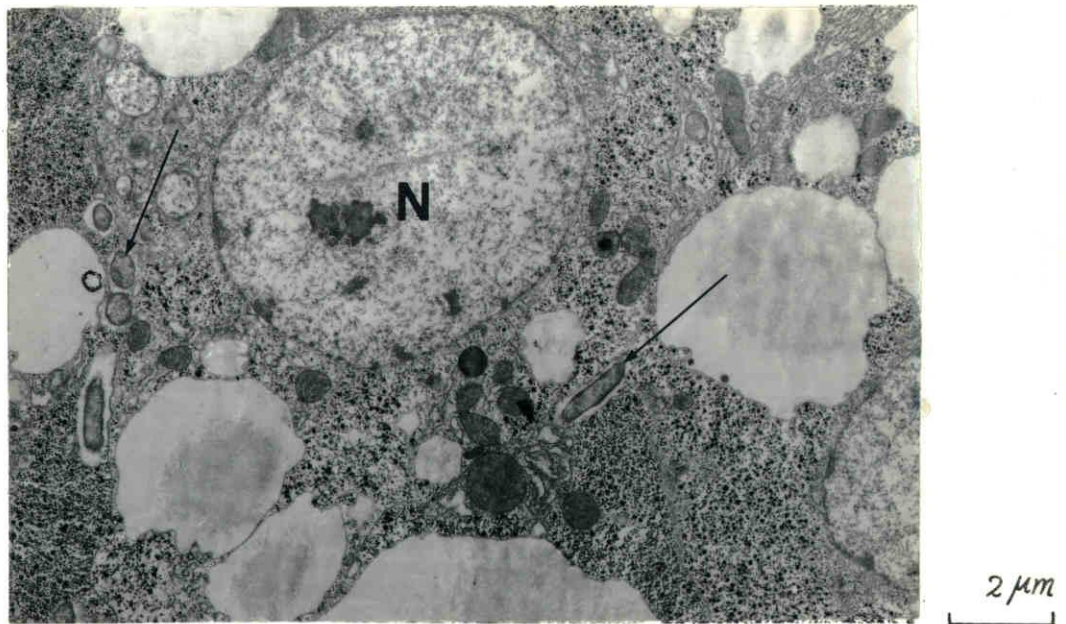


図 43. 高温処理幼虫の mycetocyte にみられる
細菌 (矢印)

N: 核

とは特筆すべきことと考える。Brooks (1963b) は、一般に高温による共生微生物の除去は、経卵伝搬時に起こすことができ、mycetocyte 内に存在する時は保護されていて、完全に除去することは困難であると述べている。この酵母様共生微生物の高温による崩壊の機構は不明で、ライソゾームの関与に関しても不明である。多くの崩壊物が mycetocyte 内に残っているところから、高温が宿主細胞内の消化酵素を活性化して崩壊させたのではなく、別の要因によるものかもしれない。

Mycetocyte の細菌は高温処理虫においても観察された。細菌のまわりに膜構造がみられたり、ミエリン様構造に取り囲まれたりしている細菌も観察され、高温の影響を受けている可能性もあるが、^{細菌は}明らかに存在していた(図43, 図44)。Chang (1974) は Cimex lectularius に ^{ナンキンムシ} において、36°C 下で2週間飼育したところほとんど共生細菌が見られなくなると報告している。ヒトビウソカにおいて3日間35°C 下

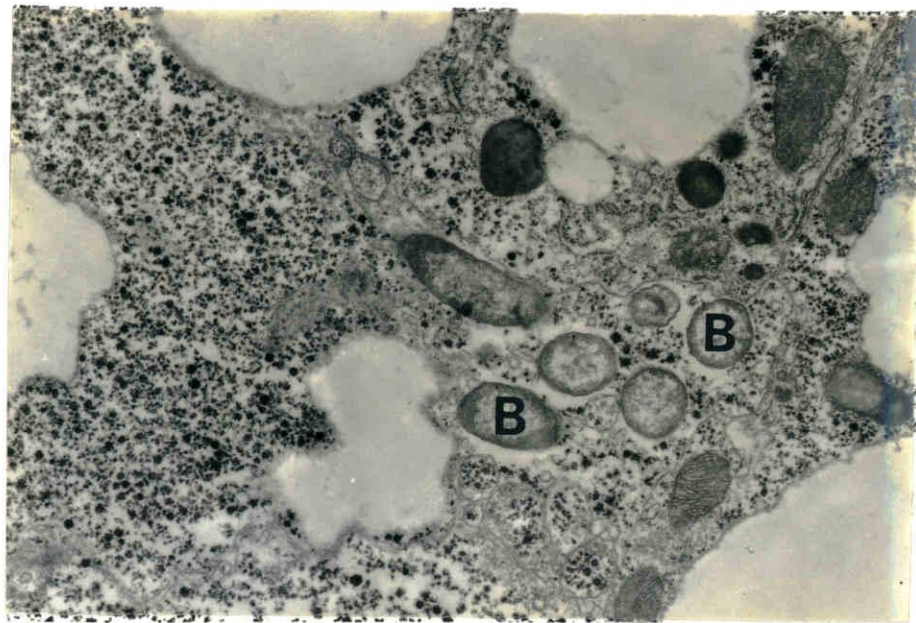


図 44. 高温処理幼虫 mycetocyte 内の細菌 (B)

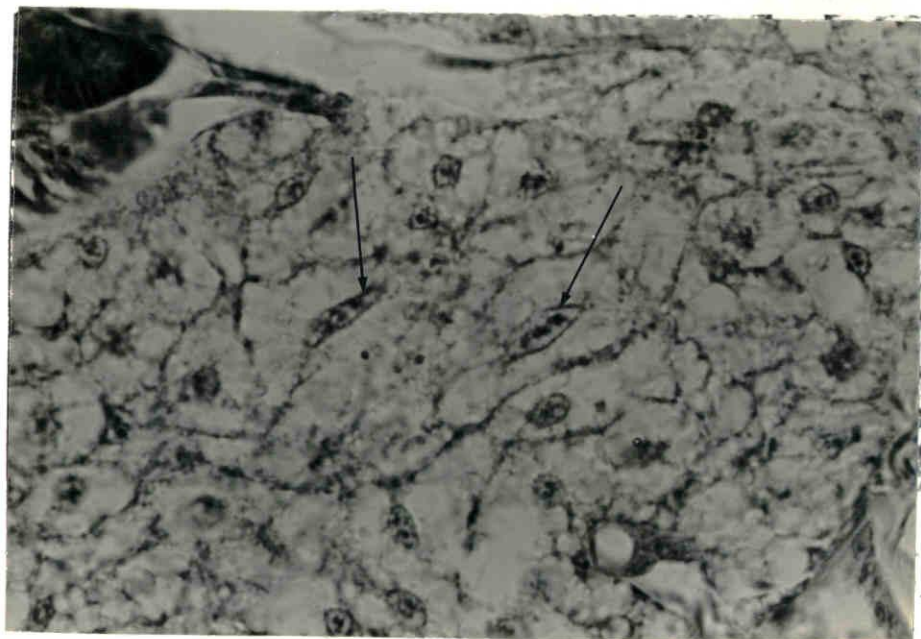


図 45. 高温処理 5 令幼虫の mycetocyte の異常核 (矢印)

で飼育したのば細菌に対しては酵母様共生微生物ほどの影響は与えていないと言える。

次に脂肪体を光学顕微鏡で観察したところ、mycetocyteと思われる細胞の核が異常なものがみられた(図45)。細長くなっていたり、肥大したりしていた。電子顕微鏡による観察では、クロマチンのほとんどみられない核も存在した。一般に細胞膜が鮮明度を欠き、正常虫ではmycetocyte内にはグリコーゲン顆粒がほとんどみられなかったが、高温処理虫ではグリコーゲン顆粒と思われる顆粒が認められた(図40、図44)。正常虫の脂肪体細胞にみられたものとは若干形態が異なるので、グリコーゲン顆粒かどうかについては断言できないが、正常細胞では観察されなかったものである。これらの異常は酵母様共生微生物の崩壊と共に起こる現象かもしれないが、高温による直接的な宿主に与える影響とも考えられ、今後研究を進める上で充分留意すべきである。

D. 高温の産卵への影響

3令の時に3日間35℃にさらした虫は、わずかながらの遅延を伴いながらもすべて成虫になった(図36D)。この雌成虫を用い、高温が産卵数に影響を及ぼしているかどうかを調べた。正常短翅型雌成虫と3令期高温処理短翅型雌成虫の24時間内の産卵数は図46のごとくである。それぞれ31、27頭供試し、横軸に産卵数、縦軸に供試虫全体に対する個体数の割合を示した。高温処理雌成虫の産卵数は平均4.5卵で、正常雌成虫の11.7卵に比べ少なくなっている。また1卵も産まなかった個体を除いて平均産卵数を求めても、それぞれ6.7卵、13.7卵とやはり産卵数の減少が認められる。

一般に、共生微生物を取り除くと顕著に産卵数、産仔数を減少させることが知られている(Brooks and Richards, 1955; Ehrhardt, 1966; Ehrhardt und Schmutterer, 1966)。共生微生物は産卵という昆虫にとって大切な活動に

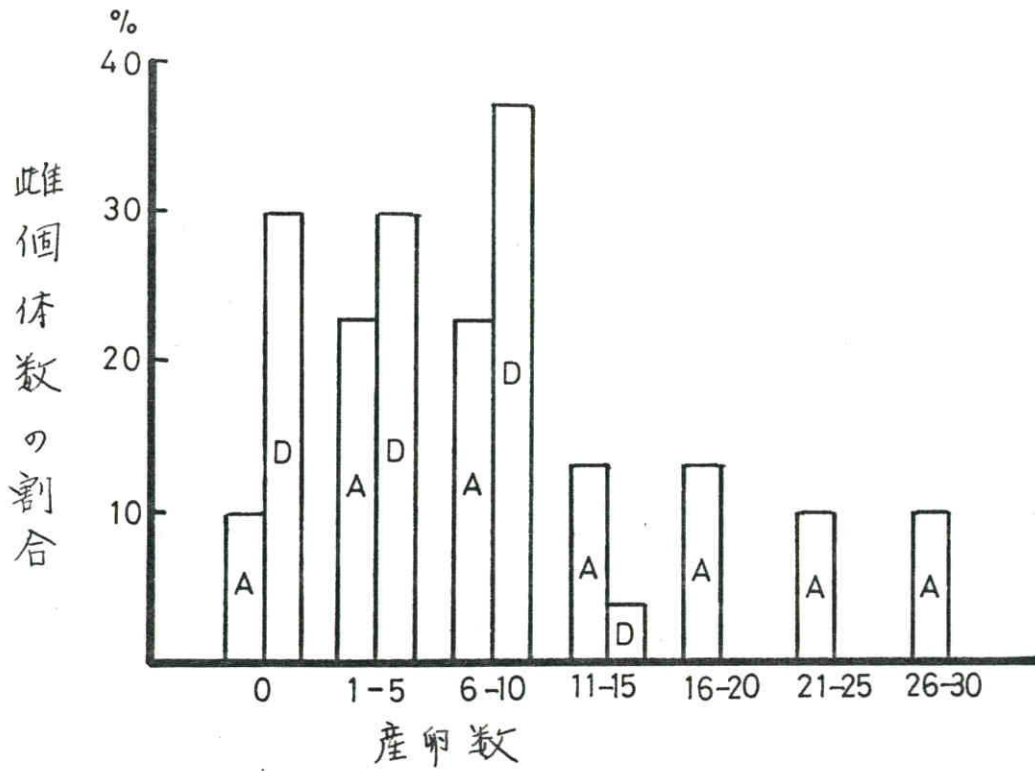


図 46. 正常雌(A)と高温処理雌(D)の産卵数
(高温処理雌は孵化後6日に35℃に置いた個体群より得られた)

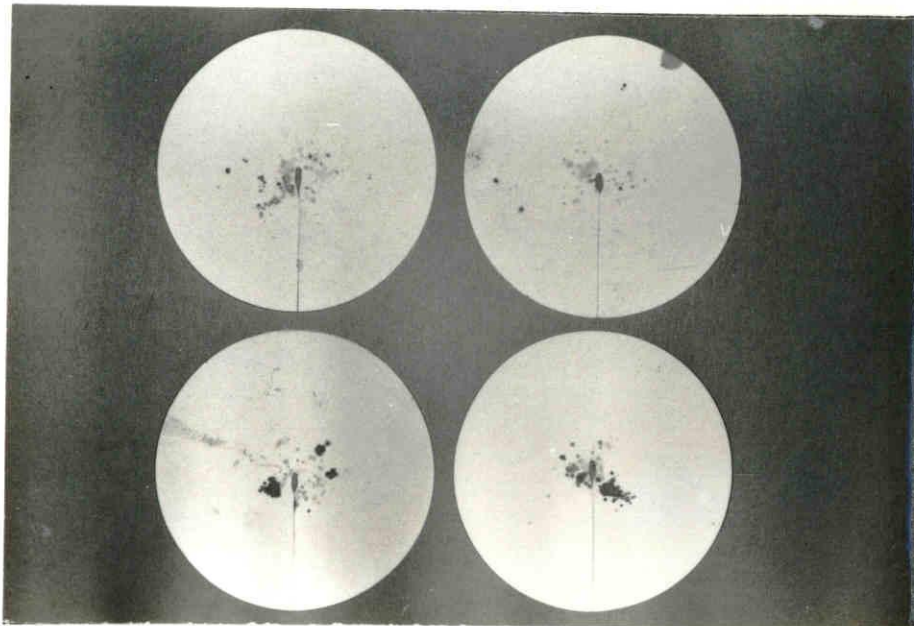


図 47. 正常5令幼虫(上)と高温処理5令幼虫(下)
の甘露排泄量
(高温処理は孵化後3日間)

貢献しているであろうと考えられている。ヒメトビウシカにおいても、高温が酵母様共生微生物に影響を及ぼし、産卵数の減少をもたらした可能性はあるが、現在のところ証明は困難であろうと思われる。

E. 高温の甘露排泄への影響

高温処理をしたことにより昆虫の吸汁量減少がもたらされたとすると、その結果として発育遅延、産卵数減少などが起こることも考えられる。

そこで、寒川(1970)の方法に基づき、甘露排泄量を比較することにより、吸汁量が減少しているかどうかを調べた。1令期に3日間高温処理した5令幼虫と正常5令幼虫それぞれ15頭の24時間内の甘露排泄量を図47に示した。両者の排泄量に大きな差はなく、むしろ高温処理虫の方が排泄量が多く、高温処理により吸汁量が減少しているのではないことがわかった。このことから、1令期の高温処理による発育遅延などは、ヒメトビウシカ体内

での何らかの変化によるものと考えられた。

F. 高温飼育虫の脱皮と死亡

高温処理をすると、脱皮せずその令にとどまっている個体や、脱皮途中で死亡している個体が観察されるなど(Ⅲ-A)、脱皮の異常が起っているように思われた。そこでⅢ-Aの1令期に3日間高温処理した虫の飼育データに基づき、脱皮と死亡との関係について検討した。1令期高温処理5令幼虫は成虫になる個体が少なく(表2)、羽化途中で死亡している個体が観察された(図48)ので、この5令幼虫における死亡及び羽化が何時起ったかをみた。まず成虫になった個体の5令期間を正常虫のそれと比較すると(図49)、正常虫では5令脱皮後平均 3.65 ± 0.08 日で羽化しており、3~5日の間にすべて成虫となっているが、高温処理5令幼虫では4~9日の間に羽化が起こり、平均 5.36 ± 0.34 日かかっている。羽化時期が遅れており、しかもばらついてい

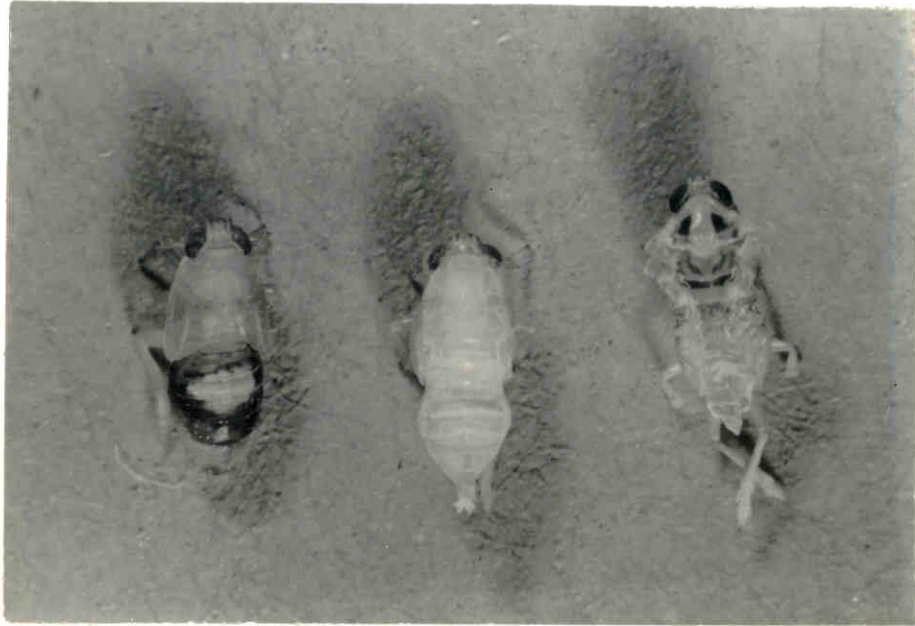


図48. 高温処理5令幼虫の脱皮異常
(孵化後3日間高温処理)

左： 腹部背側の幼虫皮膚下が着色している。

中： 後脚・腹端において幼虫クチクラが遊離・
脱皮しているが 頭胸部には割れ目ができて
いない。

右： 殻を脱ぎかけた状態で死亡している。

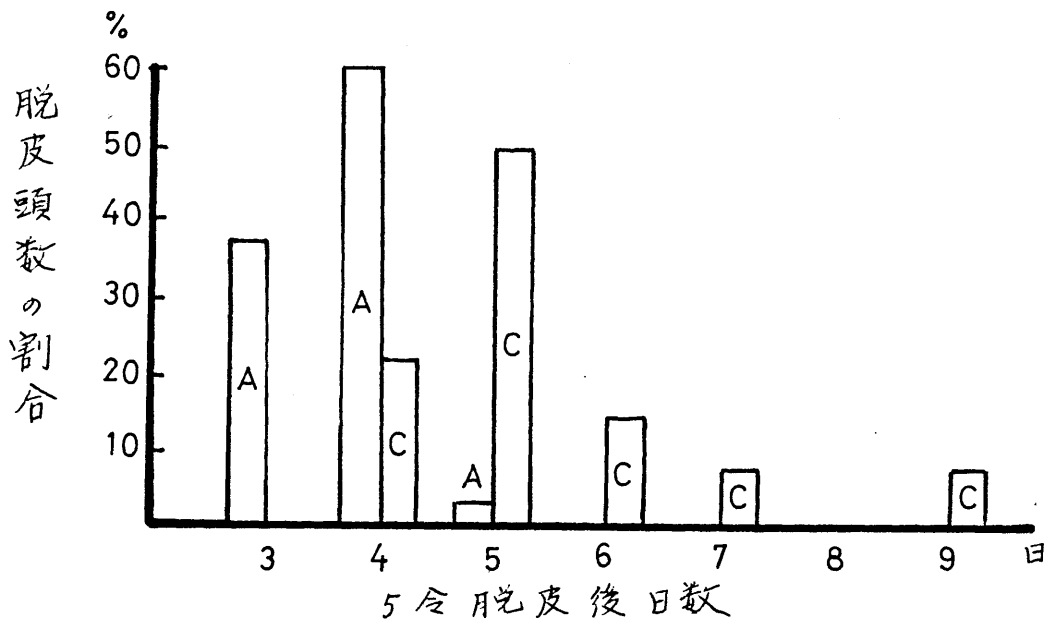


図49 高温処理個体で羽化した5令幼虫の5令期間
(図36の飼育データより, A:正常虫 C:孵化後3日間高温処理)
Cの9日に羽化した個体は孵化後27日に羽化した。

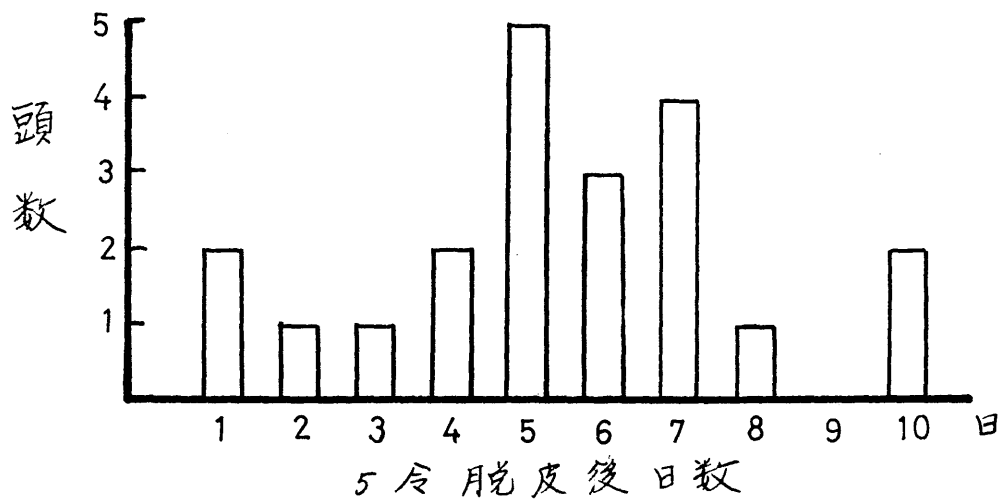


図50 高温処理個体で5令期に死亡した幼虫の5令生存日数
(図36の飼育データより, 孵化後3日間高温処理)
(死亡が確認された日までを生存日数としている)

る。次に5令期中に死亡した個体の内、5令脱皮後何日に死亡したかを脱皮後10日までみると(図50)、5~7日に多く死亡がみられ、羽化時期に死亡が多いように思われた。

そこで、成虫クチクラの形成はどのようなになっているのかをみるために、高温処理虫を5令脱皮後1, 3, 5, 7, 9日に固定し、組織切片を作成した。組織切片作成時に人工的に5令クチクラと真皮細胞との離脱が起こる恐れがあり、apolysisとの区別がつかない場合が考えられたので、成虫クチクラの分泌が始まっているか否かを基準にとり、供試虫のほぼ中央の縦断面を観察し、成虫クチクラが僅かでも体の一部に形成されていた場合を形成されたものとした(表3)。

5令脱皮後1日の個体ではapolysisの徴候はみられず、5令クチクラ自体も薄い(図51)。3日でもクチクラの形成はみられなかった。5日になると体の一部、特に脚に成虫クチクラの形成が認められる個体が発見し、7

表3. 高温処理 5令幼虫の成虫クチクラ形成個体数

	供試虫数	形成なし	形成あり*
5令脱皮後 1日	6	6	
3日	10	10	
5日	10	5	5
7日	10	4	6
9日	9	6	3
孵化後 35日以上	10	10	

* 体の一部分にでも成虫クチクラ分泌のされている個体を形成ありとした

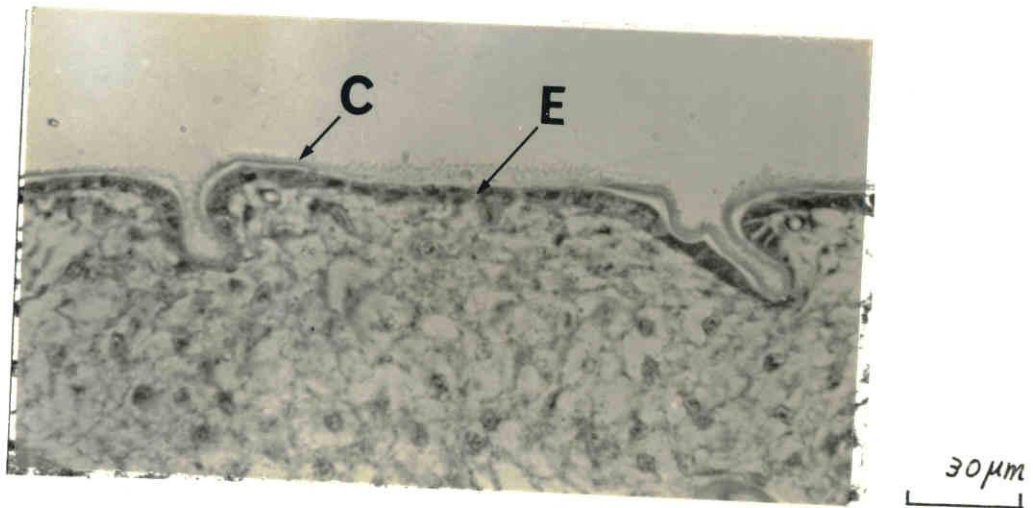
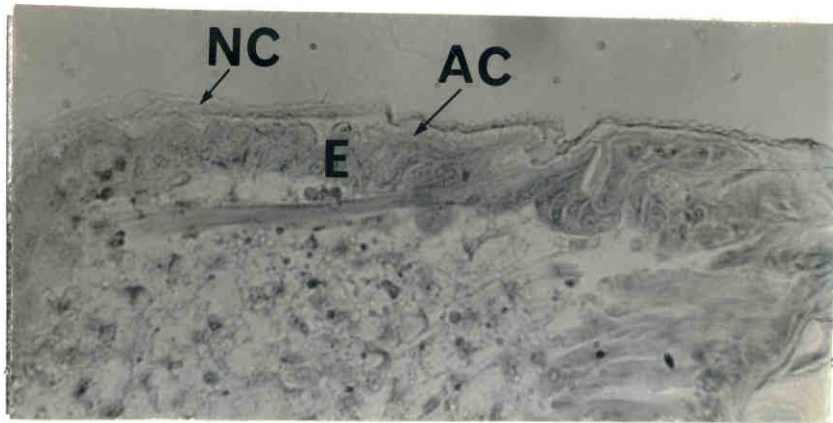


図51. 高温処理 5令幼虫 1日のクチクラ(C)と真皮細胞(E)

日に一番多かった(図52)。体全体にクチクラが分泌されている個体や、一部分にだけクチクラ形成の始まっている個体など種々の程度がみられたが、全般的に、脚での新クチクラ形成が観察される個体が多かった。9日にはクチクラを形成していた個体はすこし減ったが、これは成虫になったものや死亡したものがあつた。クチクラ形成をしていない個体の割合が増えたのであつたらう。このことは、孵化後35日以上経過した幼虫において、クチクラ形成がみられないことからわかる。しかし、孵化後35日以上経過した幼虫の切片を観察すると、真皮細胞が肥厚しているものが多く、脱皮への過程が始まっている状態ととどまっているように思われた(図54)。しかも、真皮細胞は5令脱皮後7日のもの(図53)と比較すると、細胞核がはっきりせず、なかには細胞が壊れているのではないかと思われるものもあつた。apolysis あるいは apolysis の始まるところまで進んで、それ以降何らかの理



(94)

図52. 高温処理 5令幼虫 7日のクチクラと真皮細胞
 NC: 幼虫クチクラ AC: 成虫クチクラ E: 真皮細胞
 (すでに 成虫クチクラの分泌がおこなっている)

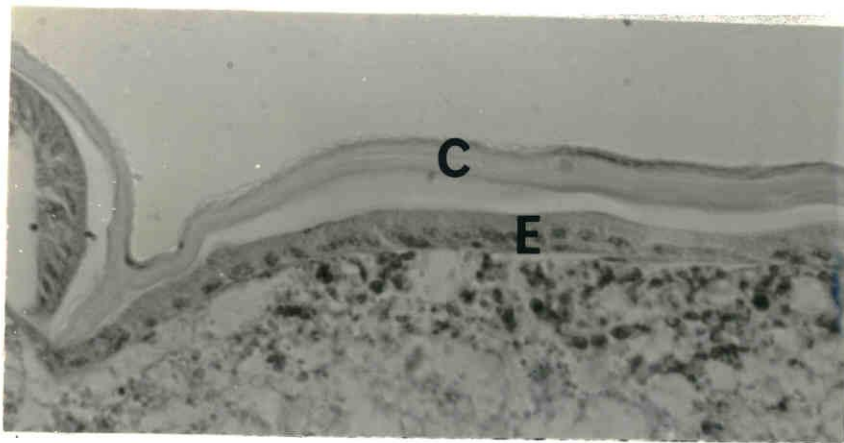


図53. 高温処理 5令幼虫 7日のクチクラ(C)と真皮細胞(E)
 (まだ 成虫クチクラの分泌がおこなっていない)

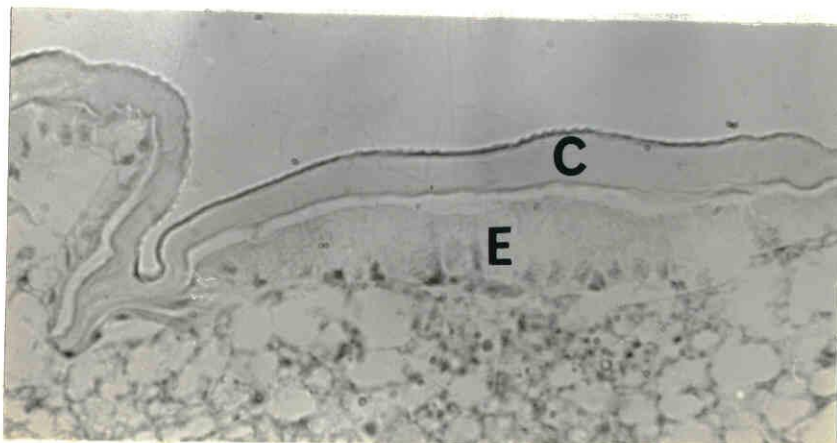


図54. 孵化後 35日以上経過した高温処理 5令幼虫
 のクチクラ(C)と真皮細胞(E)

由で成虫クチクラの形成が止まっていたのか
もしれない。

5令脱皮後9日の雄幼虫をみると、かなり
発達した精巣が観察されたり(図55)、孵化
後35日以上経過した幼虫で卵巣が発達して
おり、卵における卵黄形成の始まっていると思
われる個体もみられた(図56)。普通5令幼
虫では、これほど発達した精巣や卵巣はみら
れないので、羽化せずとも、生殖巣の発達は
ゆっくりと進んでいたものと思われる。

これらのクチクラの観察では5令脱皮後5~
9日に成虫クチクラの形成個体がみられ、死
亡が多かった時期と一致している。高温処理
虫ではapolysisから体全体にクチクラの分泌
がされているまで種々の過程が組織切片でみ
られ、apolysisから羽化までの過程は非常に
時間がかかっているものと推察される。この
脱皮過程が何らかの要因により遅らされてい
るか、阻害されていると考えられる。また、
多くの個体が死亡するのは、新クチクラの形

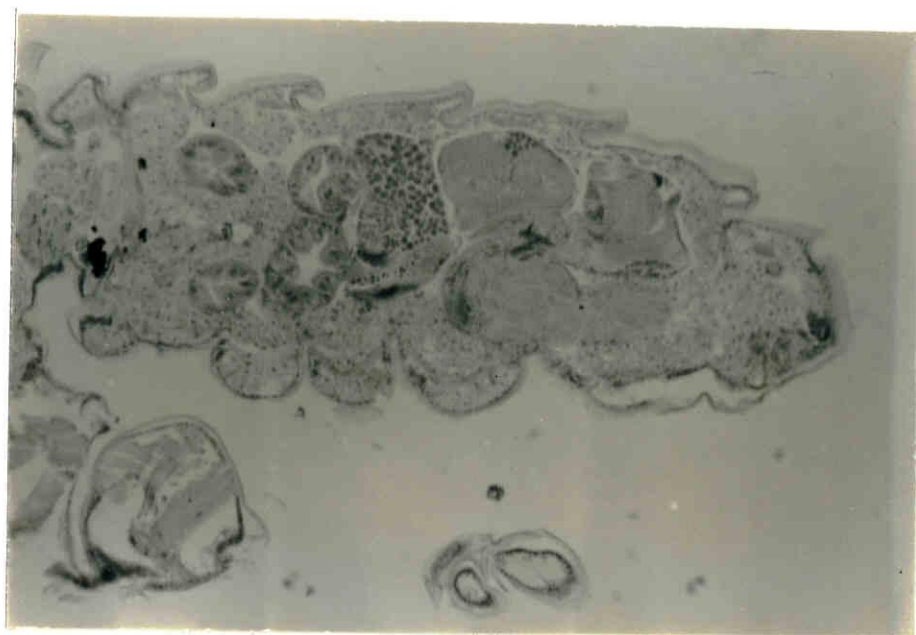


図55 高温処理 5令雄幼虫 9日の精巣
(普通幼虫期にはみられないほど精巣が発達している)

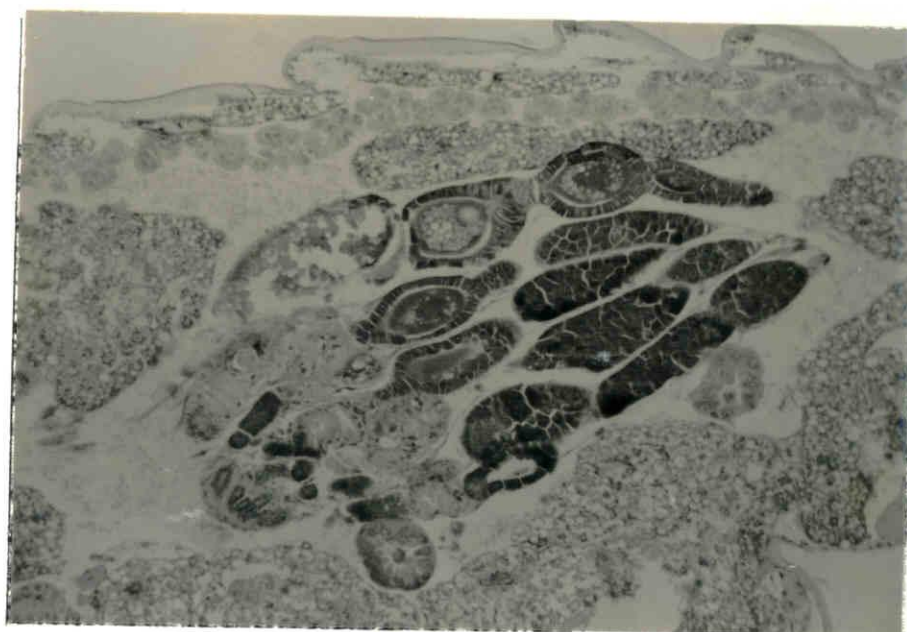


図56 孵化後35日以上経過した高温処理 5令
雌幼虫の卵巣
(普通幼虫期にはみられない卵巣の発達が認められる)

成が不充份であり、完全に羽化できなかつたり、一部分クチクラ形成がされているのに他の部分ではまだクチクラ形成が進んでいないなど、体全体がすばやく脱皮過程を完了できなかったためによるのではないかと思われる。羽化も死亡もせず長く5令幼虫のままいた個体は、成虫クチクラ形成の段階まで進んでおらず、生存できたのではないかと推定される。

G. エクジステロンの塗布と吸汁処理の影響
 1令期に3日間高温処理した5令幼虫が、脱皮異常を起こしたり羽化できないのは、成虫クチクラ形成が満足に行なわれなかったためであることがわかった。昆虫が脱皮をするのは脱皮ホルモン(エクダイソン)の働きであることが一般に認められている。また、高温処理虫では体色が薄く、背板の発達が悪いなど、内分泌系が関与していることも考えられたので、高温処理5令幼虫にエクジステロン(β -

エクダイソン)を処理した。処理後、生存幼虫、死亡虫、脱皮途中で死んでいる虫(殻を脱ぎかけているものや、腹端や後脚などの古いクチクラが完全に遊離しているなど明らかに脱皮途中と判断されるもの)、そして羽化して成虫になった虫の4つに分けて調べた。たとえ生きていても、立つことのできなかつた個体は死亡としてある。

表4はエクジステロンを5令幼虫の背側に塗布した場合の4日後までの各累積個体数である。脱皮途中で死亡したものと、成虫になったものについては、その個体数の内処理後2日までにみられたものは()内に示してある。I, II, IIIは孵化後19日の高温処理5令幼虫を、IVは孵化後26日の個体を用いた。0.01%において脱皮途中で死亡した個体、成虫になった個体が多く認められ、それより高い濃度では減少する傾向にあり、また低い濃度では対照区との差が認められない。1令期高温処理5令幼虫の成虫脱皮に関して、エクジ

表4. 高温処理5令幼虫へのエクジステロン塗布

処理濃度(%)	I					II					III					IV					
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	
1	34	10	10	5(2)	9(0)																
10 ⁻¹	36	14	14	3(0)	5(0)	30	18	8	4(2)	0											
10 ⁻²	36	2	10	11(1)	13(1)	30	4	5	6(1)	15(0)					10	5	4	0		1(0)	
10 ⁻³						30	5	6	8(3)	11(1)	25	3	12	6(1)	4(0)	10	6	2	1(0)		1(0)
10 ⁻⁴											25	6	16	2(1)	1(1)						
10 ⁻⁵											25	8	15	1(1)	1(1)						
対照区	36	12	19	5(3)	0	30	10	13	5(4)	2(2)	25	5	15	3(2)	2(2)	10	3	7	0		0
無処理区	36	20	15	1(0)	0	30	13	11	2(2)	4(4)	25	11	12	2(2)	0						

処理後4日までの累積個体数, ()内は処理後2日までの累積個体数

I, II, III, : 孵化後19日に処理, IV: 孵化後26日に処理(IIの個体群)

a: 供試虫数, b: 生存幼虫数, c: 死亡幼虫数, d: 脱皮途中死亡虫数, e: 羽化虫数

表5. 高温処理5令幼虫のエクジステロン吸汁

処理濃度	I					II				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
0.01%	30	6	12	6(4)	6(0)	40	17	15	4(2)	4(0)
0.001%	30	8	12	3(1)	7(5)					
対照区	30	7	18	4(4)	1(1)	40	24	16	0	0

処理後5日までの累積個体数, ()内は処理後2日までの累積個体数

I: 孵化後16日から吸汁, II: 孵化後19日から吸汁

a: 供試虫数, b: 生存幼虫数, c: 死亡幼虫数, d: 脱皮途中死亡虫数

e: 羽化虫数

ステロンの効果葉量が0.01と前後に存在すると考えられる。脱皮途中で死亡した個体、成虫になった個体について処理後2日までの数をみると、対照区、無処理区においては、そのほとんどが2日以内にみられる。しかし、エクジステロンの効果のあった0.1~0.001とにおいては、処理後3、4日に多く脱皮が起っており、これはエクジステロンの効果であろうと考えられる。このことは、2日以内に脱皮した個体の多くは、エクジステロン処理とは無関係に本来脱皮すべき個体かもしれない。IVでは、IIで用いた個体群を1週間後に処理したが、孵化後19日に処理した場合に比べてその効果が低いように思われる。対照区においては脱皮個体が10頭中1頭も認められず、これはその時期までに多くの個体が死亡又は成虫になってしまったため、残っていた個体は幼虫形態のまま生存していたもので、脱皮はおこらないのであろう。

次に、エクジステロンを吸汁させた結果を

表5に示した。吸汁開始後5日の各累積個体数を示してある。対照区に比べ、脱皮途中で死亡した個体、成虫になった個体が増えており、吸汁させた場合においても効果があった。

以上のように、エクジステロンを処理することにより、脱皮できる個体が増えた。このことは、高温処理5令幼虫が羽化できなかったのは、体内のエクダイソンの量が成虫脱皮に関して閾値に達し得なかったためであろうと思われる。脱皮ホルモン量の低い理由としては、一般には合成過程の異常、合成基質の不足、分解が早い、分泌がおこらないなど、種々の理由が考えられ、また、標的器官での取り込みや感受性なども関係するかもしれない。しかし、エクジステロンを処理しなくても成虫になる個体があり、また5令脱皮後5日頃には成虫クチクラが形成される個体が認められるなど、ある程度体内のホルモンは作用しており、ただ成虫脱皮に関して十分な量が体内にないと結論される。脱皮ホルモンの

量の少ないこと以外にも羽化を妨げている要因が存在するかどうかについては現在のところ不明である。

ヒメトビウソカにおいて、このエクダイソン量の少ないことによると考えられる脱皮異常・脱皮不能と、酵母液共圧微圧物の崩壊、減少とはどのようなかかわっているのかを、ステロールとの関連において次章で検討した。

IV. ステロールに関連したヒメトビウシカと 酵母様共生微生物の共生関係

序論

一般に昆虫は他の高等動物と同様、ある種のビタミン・アミノ酸などを必須の栄養素として餌から取り入れる必要がある(平野, 1971)。近年、アブラムシの栄養に関する研究が進み、共生微生物が合成した栄養素を宿主が利用しているという考え方が一般に認められてきている。多くのアブラムシで人工飼料が開発され、必須アミノ酸が少ないことや(Dadd and Krieger, 1968)、ステロールを必要としないことなどは、共生微生物によるものであると言われている(Dadd and Mittler, 1966; Srivastava and Auclair, 1971; Akey and Beck, 1972)。特にステロールに関しては、昆虫はステロール合成能を欠いていると考えられており(Clayton, 1964)、共生微生物によりステロールが供給されていることは、

生理・生化学的実験からも示唆されている。
Ehrhardt (1968), Houk et al. (1976) はア
ブラムシの共生細菌がコレステロールを作っ
ていると報告しており、Griffith and Beck
(1977a, 1977b) は電子顕微鏡オートラジ
オグラフィーなどの手法を用い、ステロール
の合成を示唆している。しかしながら、上記
の研究からこの問題が完全に解決したわけでは
なく、さらに追求を必要としている。

一方、アブラムシと同じ半翅目同翅亜目に
属するヒメトビウンカにおいても、三橋・小
山(1972)により人工飼料が開発されており、
やはり生育にステロールを必要としない。
このことから、ヒメトビウンカにおいても共
生微生物がステロールを宿主に供給している
可能性が強い。そこで、ヒメトビウンカのス
テロール組成・含量を調べ、吸汁植物である
糸、排泄物中のステロールとも比較検討し、
ヒメトビウンカのステロールの由来を究明し
た。また、Ⅲ-F, Gにおいて、高温処理虫での

脱皮異常・脱皮不能は、体内エクダイソン量の不足によるものであることが示された。コレステロールはエクダイソンの前駆物質であり (Robbins et al., 1971)、単に栄養成分として重要である以外に、昆虫にとって内分泌学的にも重要な意味をもつものと考えられる。そこで、高温処理虫のステロールも分析し、エクダイソン量の低いこととコレステロールとの関連、そして酵母様共生微生物のステロール供給への関与について検討した。

材料及び方法

a. 虫体ステロールの抽出・分析

供試したヒメトビウンカについては II-a に示したが、トビイロウンカ, *Nilaparvata lugens* (Stål), セジロウンカ, *Sogatella furcifera* (Horváth) は愛知県三河地方にて採取したものを、ツマグロヨコバイ, *Nephotettix cincticeps* (Uhler) は南国系をイネ芽出しを用いて、25℃16時間照明で累代飼育したものである。

新鮮な虫体又は -80°C に保存しておいた虫体を、クロロホルム・メタノール(2:1, v/v)で、氷冷下で磨砕抽出した(Folch et al., 1957)。磨砕液を濾過し、溶媒量の20%に相当する量の蒸留水を加え、クロロホルム層を抽出物Iとした(図57)。得られた油状物を、約10倍量の10% KOH(メタノール溶液)で75 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間ケン化し、エーテルで3回抽出した。この抽出物を薄層クロマトグラフィー(展開溶媒: クロロホルム・酢酸エチル, 20:1, v/v)で展開し、コレステロールに相当する部分のシリカゲルをかき取り、酢酸エチルで抽出した。上記抽出操作に用いた有機溶媒はすべて特級試薬を用いた。

ガスクロマトグラフィー(日本電子, JGC-20K)に用いた充填剤は、3%OV-1(ガスクロームQ, 100~120メッシュ)および1.5%OV-17(シマライト, 80~100メッシュ)で、1mのガラスカラムにつめた。分析条件は普通前者では、カラム温度240 $^{\circ}\text{C}$ 、窒素流

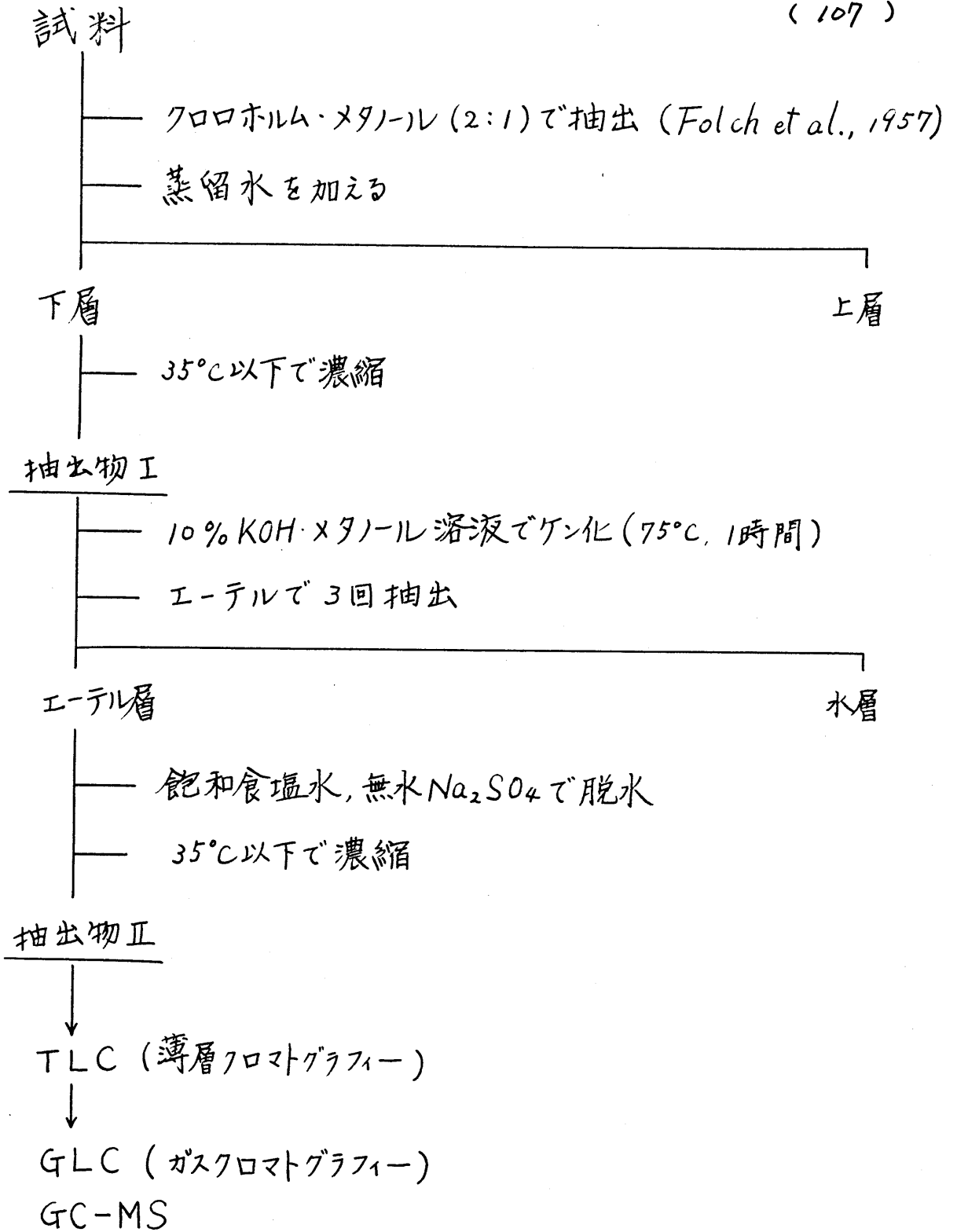


図 57. 虫体ステロールの抽出法

量 43 ml/分であり、後者では、カラム温度 260 °C, 窒素流量 39 ml/分である。検出器は FID である。ステロールの同定は、上記 2 つの異なった充填剤のそれぞれの保持時間から判定し、定量はコレステロール標品の標準曲線を分析のつど求め、ピーク面積から算定した。また、ステロールの同定には、GC-MS (日本電子, JMS-D100) も用いた。3%OV-1/1m カラムを用い、ヘリウムガスをキャリアーとして、カラム温度 260 °C で分析した。

b. イネ・甘露中のステロールの抽出・分析

イネは温室にて 2~3 葉ステージまで育て、葉鞘下部で切り取り、空気中で乾燥させた。イネ芽出しも同様に芽を切り取り、乾燥させた。よく乾燥したイネ又は芽出しを、メタノールで 70 °C, 90 分抽出した。溶媒を取り除いた後、エーテルと蒸留水を加え、エーテル層を抽出物 I とした。

甘露の採取は III-C の方法に従い (図 35)、

ヒメトビウシカの雌成虫にイネを吸汁させ、濾紙上に排泄された甘露からステロールを抽出した。使用した濾紙はあらかじめメタノールで洗った。甘露滴のついた濾紙を、メタノールで70℃90分抽出し、メタノールを取り除き、エーテルと蒸留水とに分配し、エーテル層を抽出物Iとした。

抽出物I以下の操作・分析法は、IV-aの虫体ステロールの抽出・分析法(図57)と同じである。

c. ステロールを与えた飼育実験

1 令期に3日間高温処理をしたヒメトビウシカにステロールを与えて発育を観察した。飼育方法は試験管内にイネ葉鞘を入れた方法を用いた(図34)。温室内で育てたイネを切り取り、切り口を試験管の底の液につけた。この液の中にステロールを入れておき、虫に体内の養分と共にステロールを吸汁させた。用いたステロールは、コレステロールと β -シトス

テロールである。それぞれの試薬はガスクロマトグラフィー, GC-MSで分析し、コレステロールには他のステロールや不純物は検出されなかったが、 β -シトステロールは、2種のステロール, β -シトステロールとカンペステロールの60.5:39.5の混合物であった。ステロールはほとんど水に溶けないため、そのまま懸濁させるか、又はTween85を用いて懸濁させた。Tween85は、 $100\text{mg}/100\text{ml}$ の濃度で用いた。ステロールは、 $100\text{mg}/100\text{ml}$ の割合で懸濁させた。孵化当日のヒメトビウンカ1令幼虫を試験管内に数頭づつ入れ、ステロールを吸才させると同時に、3日間 35°C 下に置いた。その後は 25°C で飼育し、イネは1ないし2日おきに取り換えた。

結果及び考察

A. ヒメトビウンカ各ステージのステロール組成と含量

ヒメトビウニカの1令幼虫, 5令幼虫(若干の4令を含む), 雄成虫(羽化後平均4日前後), 雌成虫(羽化後平均4日前後), 羽化後1週間以上経過した雄成虫の各ステージからステロールを抽出した。ガスクロマトグラフィーの分析から、ヒメトビウニカにおいてすべてのステージで2つの主要なピークと1つの小さなピークが認められた。大きな2つのピークは、コレステロールと24-メチレンコレステロールの標品の保持時間と一致し、小さなピークは、 β -シトステロールと同定された(図58, 図59, 図60)。またGC-MSを用いて分析した。ガスクロマトグラフィーでコレステロールと同定されたピークのマススペクトルは、分子イオンピーク m/e 386 であり、標品の開裂パターンと一致した(図61)。24-メチレンコレステロールのマススペクトルは、分子イオンピーク m/e 398, 基準ピーク m/e 314 であり、側鎖に2重結合をもつステロールに特徴的と考えられる m/e 253, m/e 271, m/e

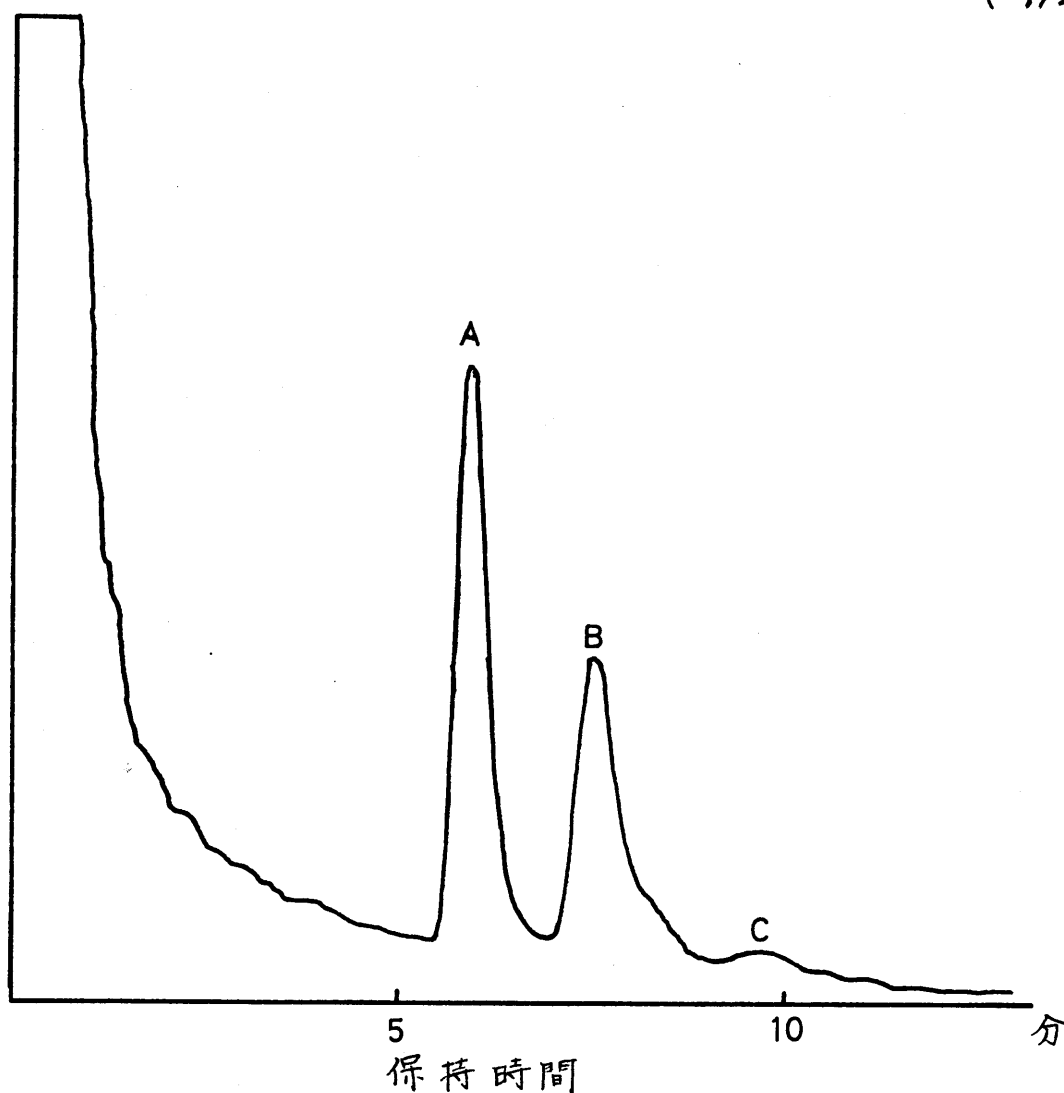
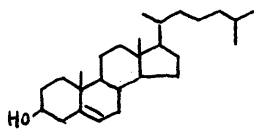
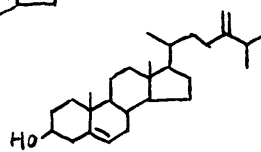


図 58. ヒメトビウンカ 1 令幼虫の体内ステロールの
ガスクロマトグラム

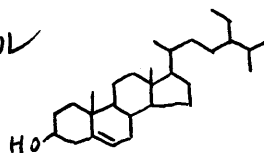
A: コレステロール



B: 24-メチレンコレステロール



C: β -シトステロール



分析条件

(OV-1 1mカラム, 窒素流量 43ml/分
カラム温度 240°C, 注入温度 265°C, 検出器温度 260°C)

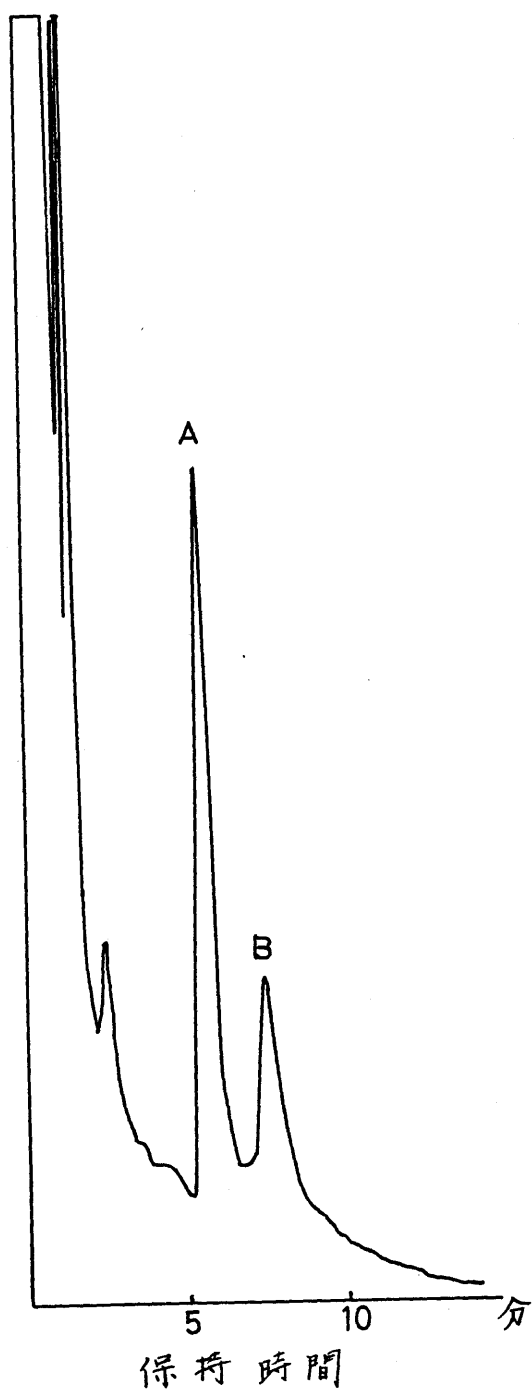


図59. ヒトビウカ雌成虫の体内ステロルの
のガスクロマトグラム (0V-17)

A : コレステロール
B : 24-メチレンコレステロール

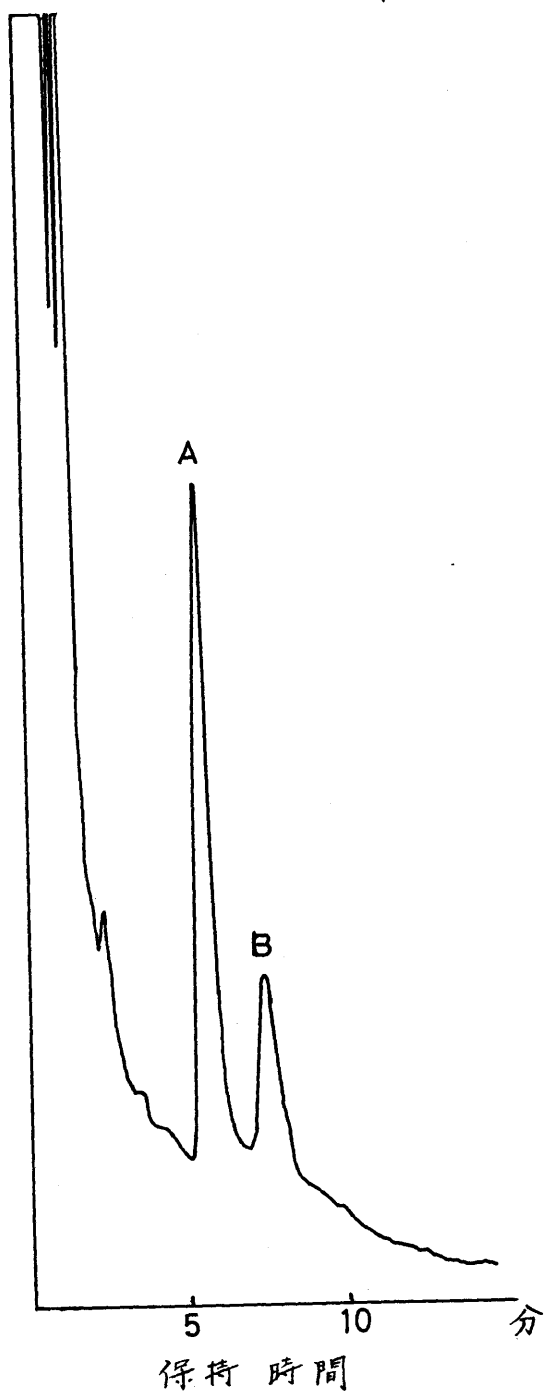


図60. ヒトビウカ雄成虫の体内ステロルの
のガスクロマトグラム (0V-17)

A : コレステロール
B : 24-メチレンコレステロール

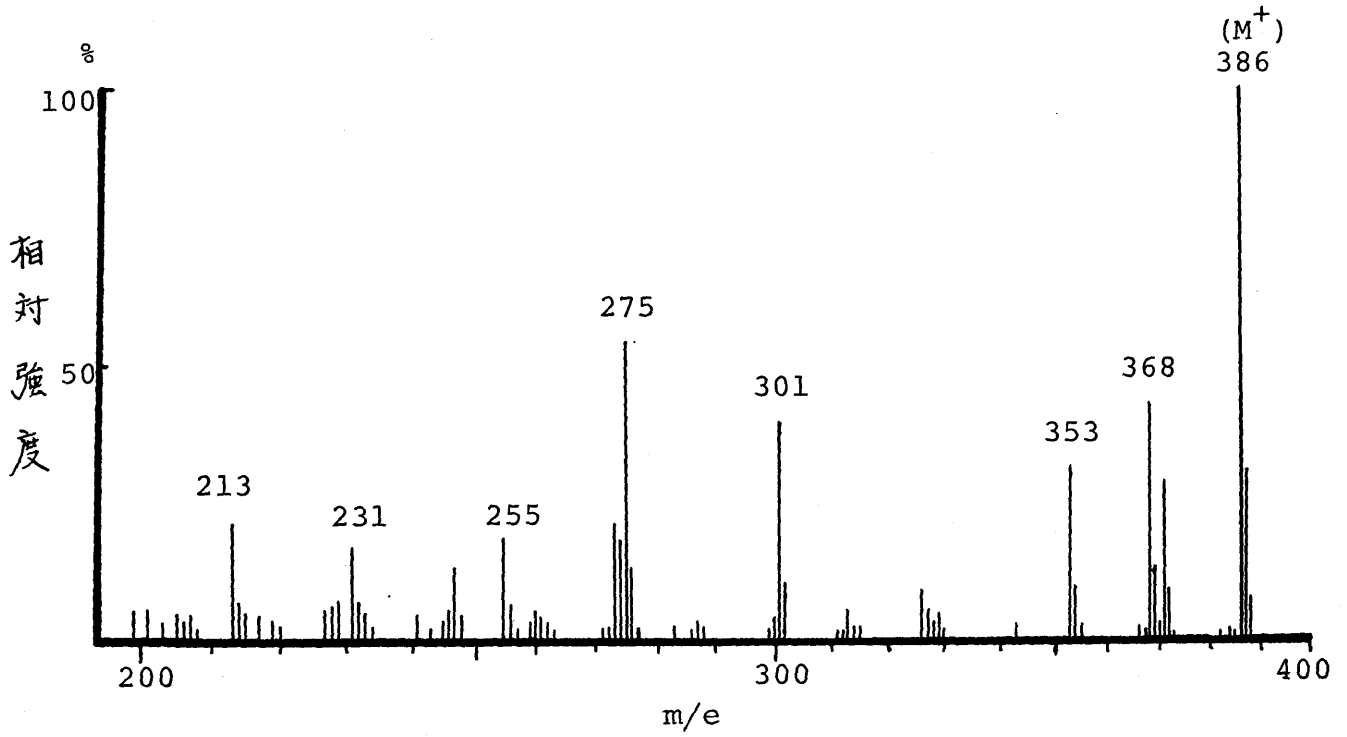
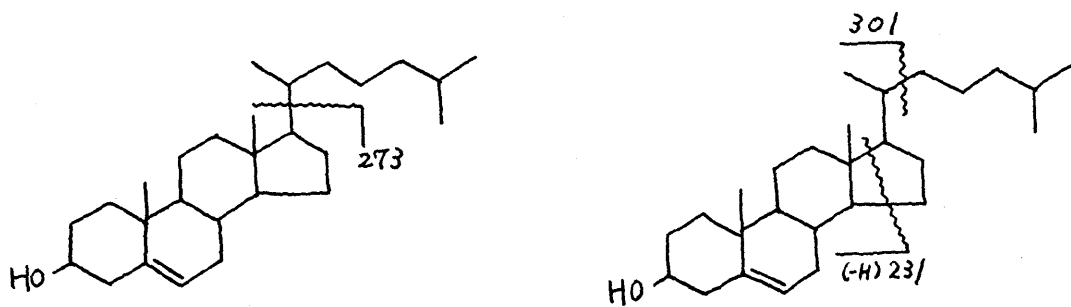


図 61. ヒメトビウカ 1 令幼虫体内のコレステロールのマススペクトル



(Wyllie and Djerassi, 1968 ; 津田, 1971 ; 参照)

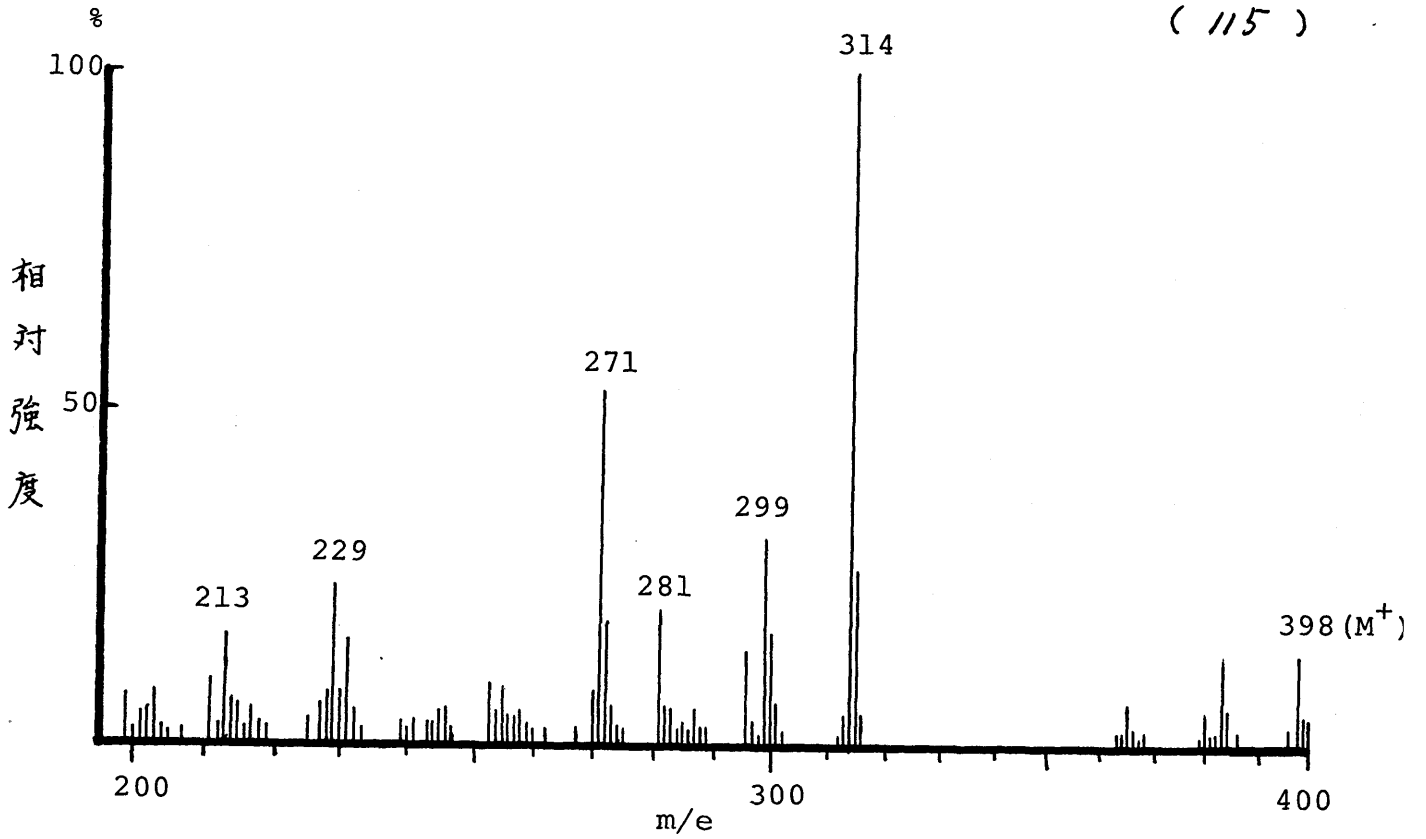
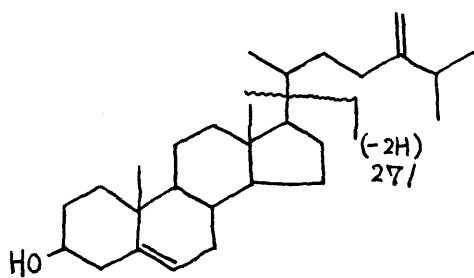
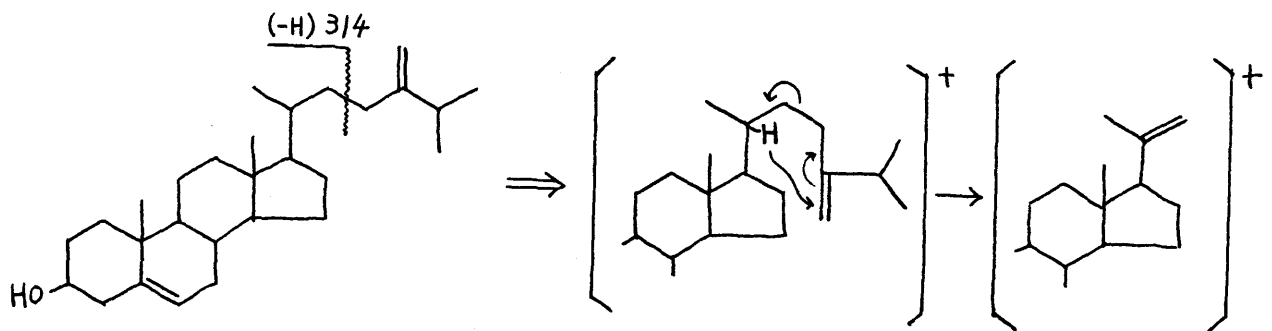


図 62. ヒメビウナカ / 令幼虫体内の 24-メチルコレステロールのマススペクトル



300 のピークがみられ、また $\Delta^{5,24(28)}$ -ステロール又は $\Delta^{5,24(25)}$ -ステロールに特徴的である m/e 314 のピークがみられた (図 62)。 β -シトステロールは、分子イオンピーク m/e 414 で、やはり標品の開裂パターンと一致した。

各ステージにおけるコレステロール及び 24-メチレンコレステロールの含量は表 6 に示した。1 令幼虫のコレステロール含量は生体重 1g 当り $9.8 \mu\text{g}$, 5 令幼虫で $13.7 \mu\text{g}$ となり増加している。成虫になるとさらに増加し、雄成虫では $32.6 \mu\text{g}$, 雌成虫では $50.7 \mu\text{g}$ であった。成育につれて、体重当りのコレステロール及び 24-メチレンコレステロール含量は増加しているが、24-メチレンコレステロールのコレステロールに対する比は $0.63 \sim 0.66$ とほとんど一定している。しかしながら、羽化後 1 週間以上経過した雄成虫では、この比が 0.46 と低下している。

一般に現在まで報告されている昆虫の体内ステロール含量は、イエバエで $0.056 \mu\text{mole/幼虫}$
Musca domestica

表6. ヒメトビウカ各ステージのステロール含量

ステージ	A	B	B/A
	コレステロール ($\mu\text{g/g}$)	24-メチレン コレステロール ($\mu\text{g/g}$)	
1令幼虫	9.8	6.2	0.64
5令幼虫	13.7	8.7	0.64
雄成虫	32.6	20.4	0.63
雌成虫	50.7	33.7	0.66
雄成虫 (羽化後1週間以上)	39.0	17.9	0.46

($\approx 1.6 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Pearincott, 1960), $0.027 \mu\text{mole}/$
幼虫 ($\approx 0.77 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Dwivedy, 1975)、ゴキ
ブリ *P. americana* の組織間で $0.15 \sim 1.06 \mu\text{g}/\text{mg}$ (Casida et al., 1957), *E. floridana* で $0.3 \sim 2.8$
 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Clayton and Edwards, 1961) と、ヒメト
ビウンカに比べて非常に高い値である。これは
実験方法の違いもあるが、上記の研究にお
いては、餌の中にコレステロールが入ってい
ると思われること、そして餌をそのまま体内
に取り込む昆虫であることによると思われる。
ヒメトビウンカは吸汁性昆虫であり、維管束
管内を転流している汁液を摂取しているた
め、体内に取り込むのは汁液に溶けている
栄養分のみである。ステロールのような水難
溶性の物質がそのまま多量に汁液中に溶けて
いるとは考えられない。ステロールエステル、
ステロール硫酸エステルや、タンパクに結合
した形で溶けている可能性もあるが、多量に
は汁液中に溶けていないであろうと想像され
る。Hou and Brooks (1977) は、維管束吸汁

種は他の摂食習性をもつ昆虫に比べてステロールをあまり必要としていないと述べている。ステロールをあまり取り込んでいないことが、体内ステロール量の低いことの一理由であると思われる。

普通、昆虫体内から検出されるステロールは、コレステロールと餌に由来するステロールであると考えられる。カイコ Bombyx mori では、コレステロールと桑葉に由来すると考えられるβ-シトステロール及びカンペステロールが検出される (Saito et al., 1963)。ヒメトビウムカでは、コレステロールとβ-シトステロールの他に24-メチレンコレステロールが主要なステロールとして検出されたが、昆虫において24-メチレンコレステロールが通常の状態に多量に存在する例は少なく、ミツバチ Apis mellifica において報告されているのみであろう (Barbier et al., 1959; Barbier und Schindler, 1959)。これはミツバチが吸蜜する花の花粉に由来するステロールであると言われている (Clayton,

1964)。24- χ チレンコレステロールは、一般に藻類によくみられるステロールであり(Patterson, 1971)、何故ヒメトビウヅンカ体内に多量に検出されたかをさらに検討した。

B. 高温処理ヒメトビウヅンカのステロール組成と含量

1令期に3日間高温処理した5令幼虫では脱皮異常がみられ、酵母様共生微生物が少なかったが、この5令幼虫(若干の4令幼虫を含む)のステロール組成、含量を分析した。

コレステロールと β -シトステロールが検出され、24- χ チレンコレステロールは非常に僅かであった(図63)。24- χ チレンコレステロールは微量のため定量できなかったが、コレステロール含量は2回の反復により、それぞれ $1.2 \mu\text{g/g}$ 、 $1.3 \mu\text{g/g}$ であった。これは正常5令幼虫の $13.7 \mu\text{g/g}$ と比べ(表6)、 $1/10$ 以下の量である。高温処理5令幼虫(図63)と正常5令幼虫(図64)のガスクロマトグラム

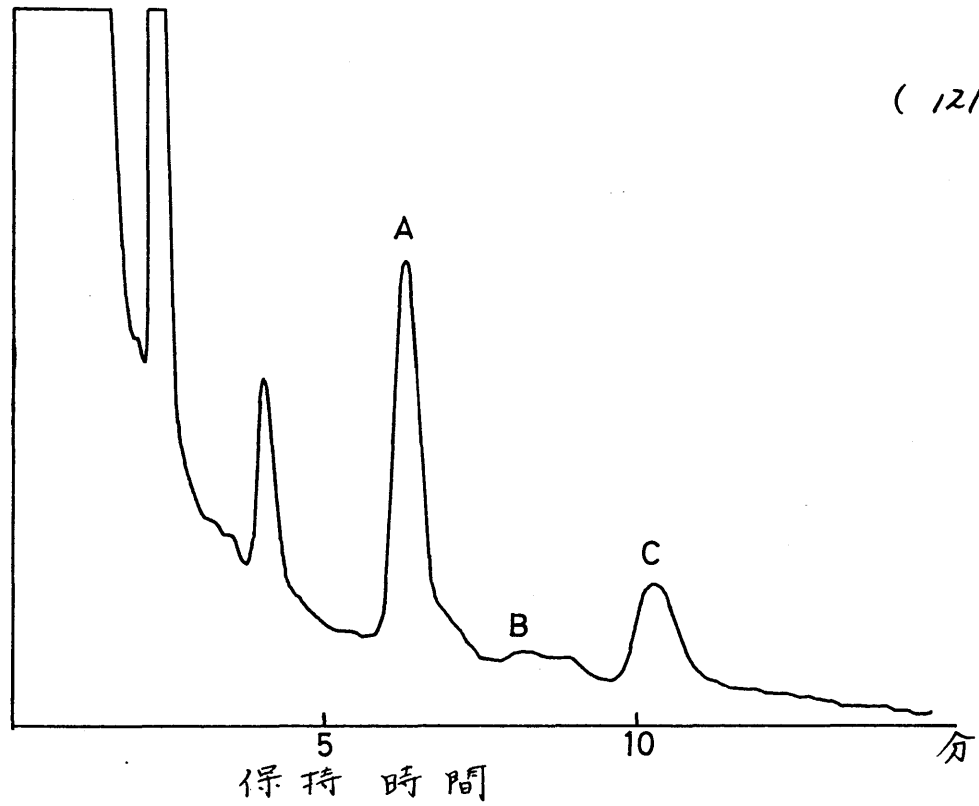


図63. 高温処理5令幼虫のステロールのガスクロマトグラム(0V-1)
A: コレステロール, B: 24-キチレンコレステロール, C: β -システロール

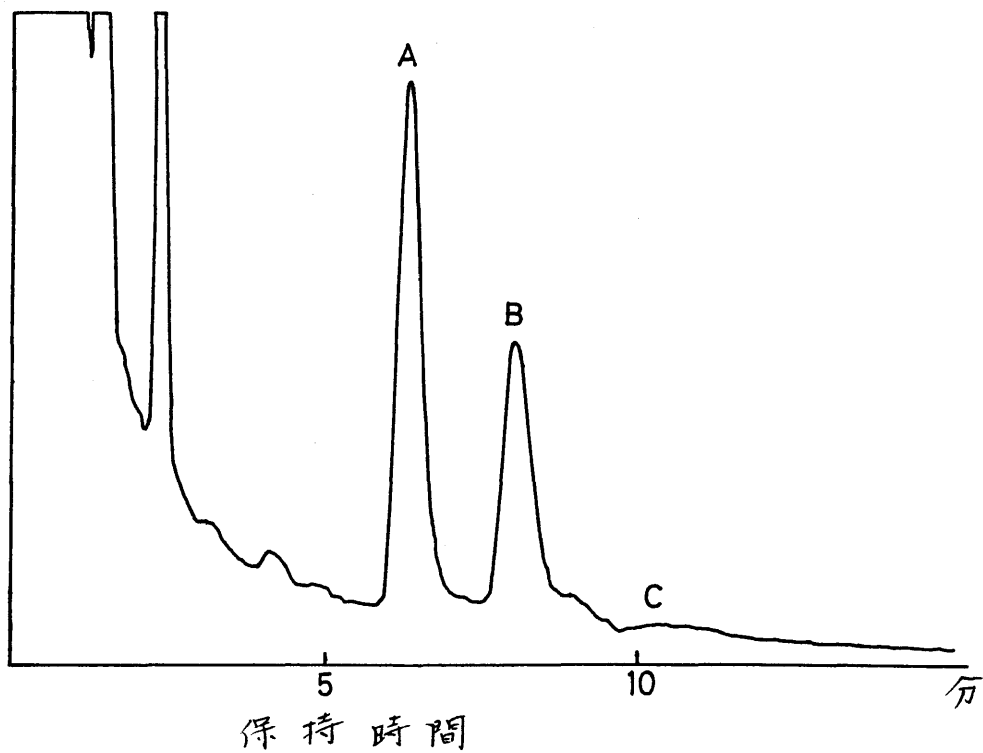


図64. 正常5令幼虫のステロールのガスクロマトグラム(0V-1)
A: コレステロール, B: 24-キチレンコレステロール, C: β -システロール

を比較すると、前者の方が β -シトステロールが多いが、これは分析にかけたサンプル量が前者において多いためと思われ、 β -シトステロールの絶対量はあまり差がないと考えられる。高温処理虫においては多量にサンプルを分析しているにもかかわらず、24- χ チレンコレステロールは非常に小さなピークが認められず、体内含量は異常に低い。

24- χ チレンコレステロールが昆虫体内に多量に検出されたという事実と、酵母様共生微生物の少ない高温処理虫では24- χ チレンコレステロールが非常に僅かしか検出されなかったという事実から、このステロールは酵母様共生微生物によって作られているのではないかと予想された。そこで、次に餌及び甘露中のステロールを分析した。

C. イネ・甘露中のステロール組成

イネは芽出しと2~3葉ステージのものを分析した。芽出しはイネが種子内の養分で生育し

ている時期であり、2~3葉のステージは土壌中の無機物から必要なものを作り出し、自ら生育している時期である。両ステージともに3種のステロールが検出された。カンペステロール、ステイグマステロール、そして β -シトステロールであり、ガスクロマトグラフィーにおける保持時間が標品のそれぞれとそれぞれ一致した(図65)。GC-MSによる分析からも、上記ステロールが同定された。カンペステロールは分子イオンピーク m/e 400(図66)、ステイグマステロールは分子イオンピーク m/e 412(図67)、 β -シトステロールは分子イオンピーク m/e 414であった(図68)。コレステロールは検出されず、24-メチレンコレステロールについても、ガスクロマトグラムではカンペステロールとピークがほとんど重なっているが、GC-MSによるマススペクトルから判断し、含まれていないと思われる。2~3葉ステージと芽出しを比較した場合、後者において相対的に若干ステイグマステロ

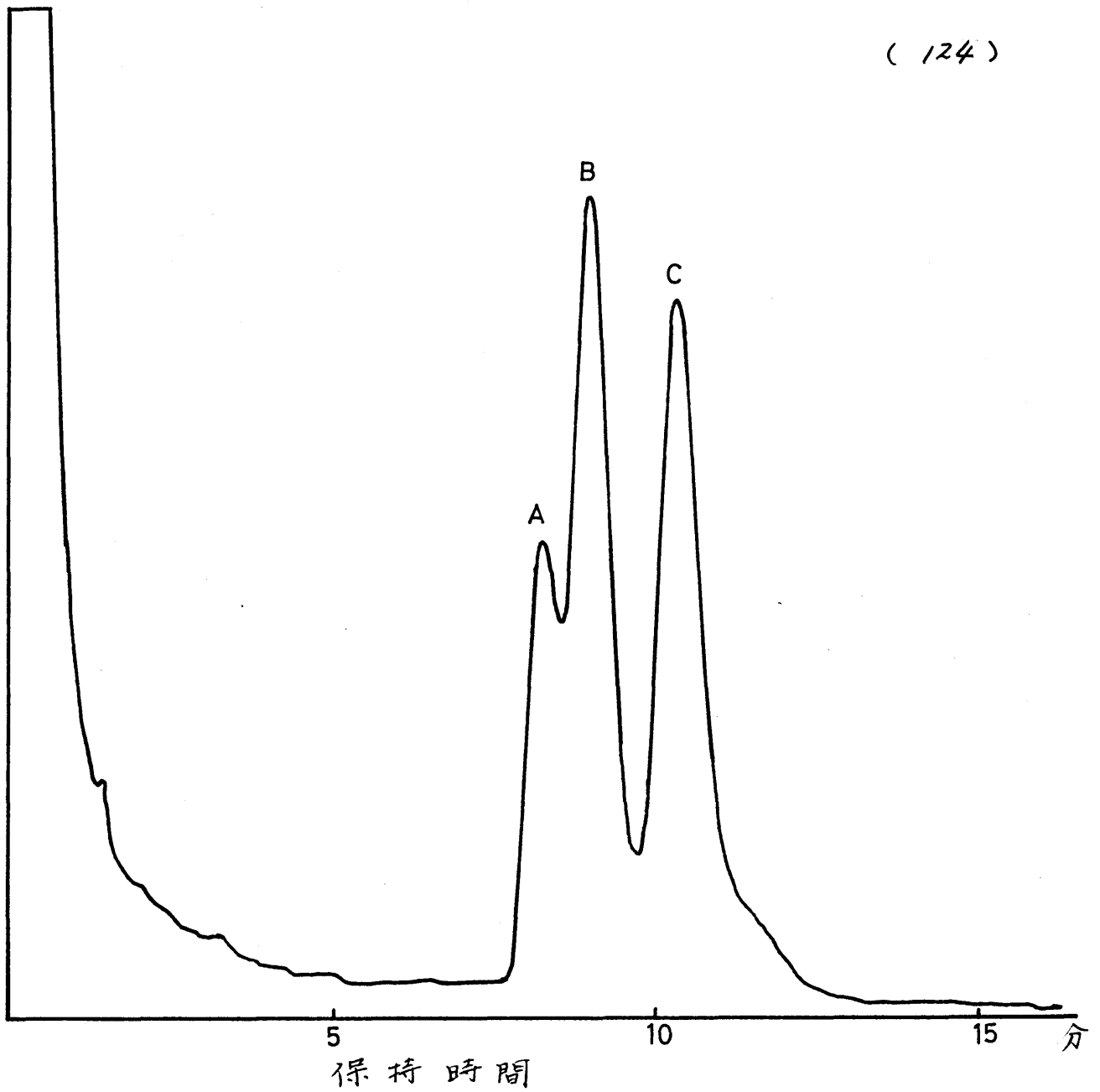
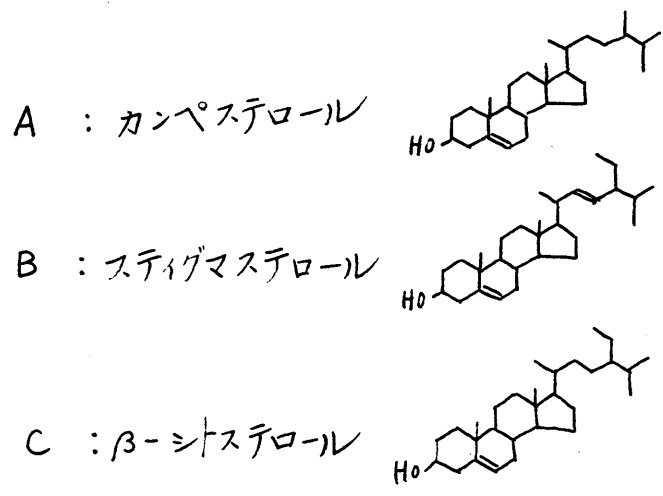


図 65. イネ芽出し中のステロールのガスクロマトグラム (00-1)



(125)

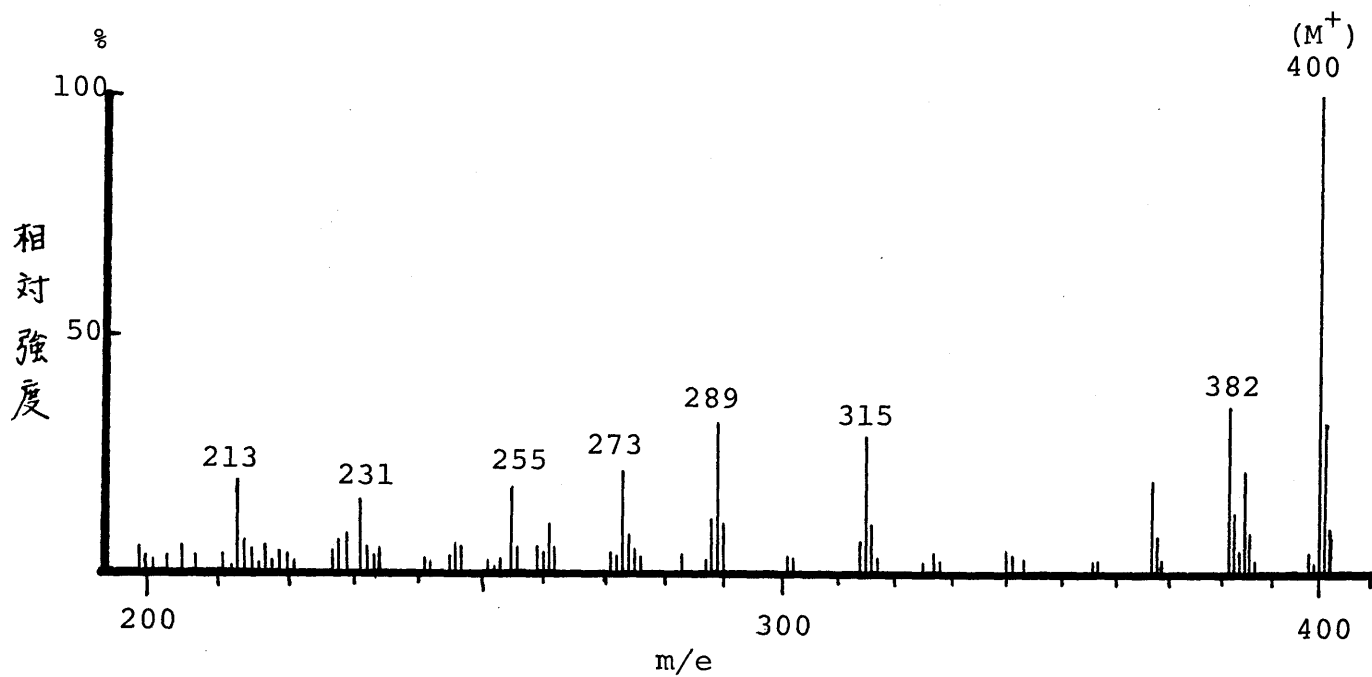
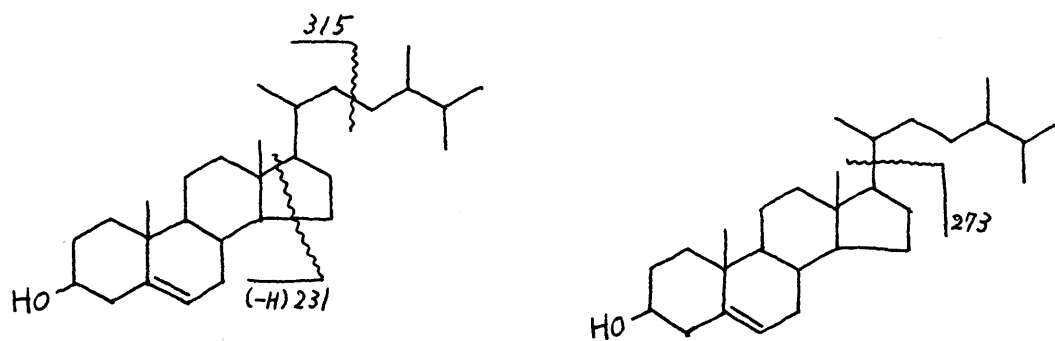


図 66. イネ芽出し中のカンペステロールのマススペクトル



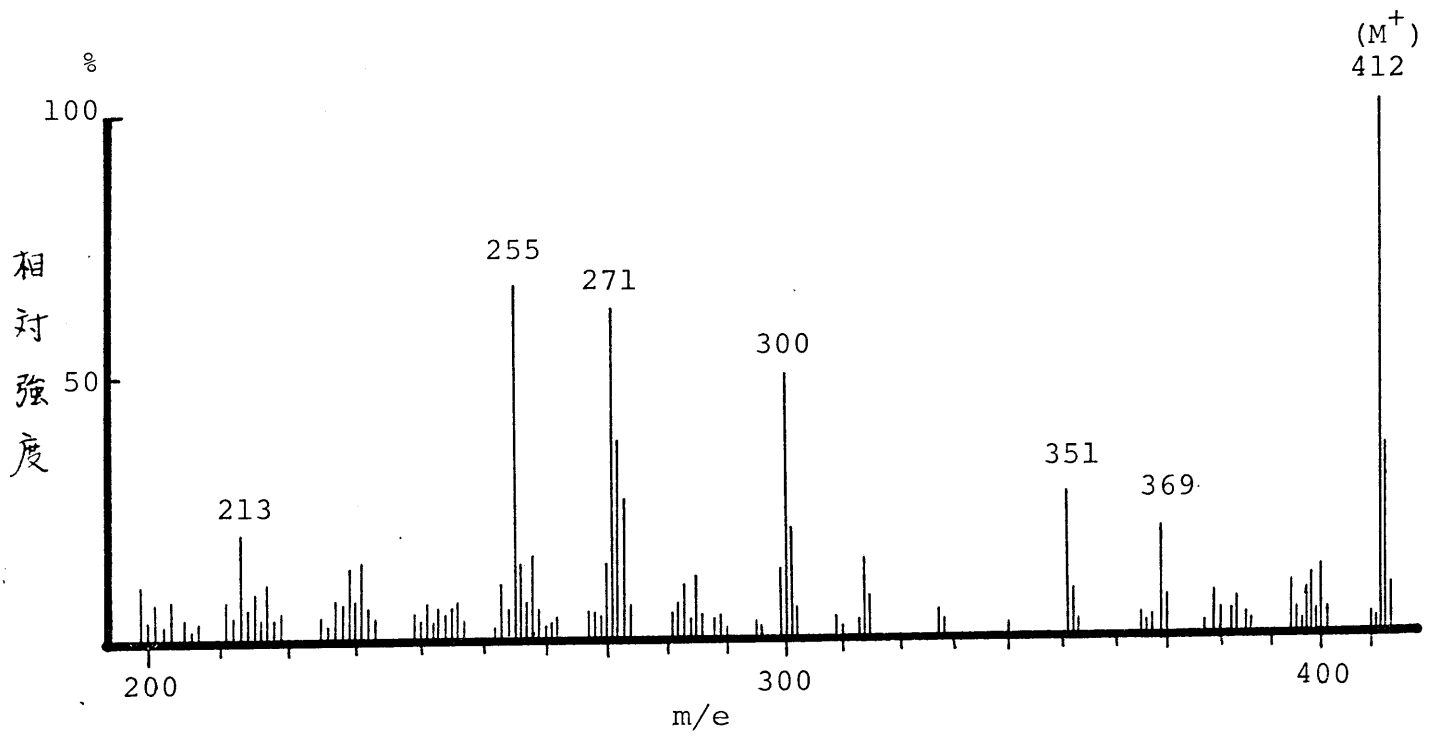
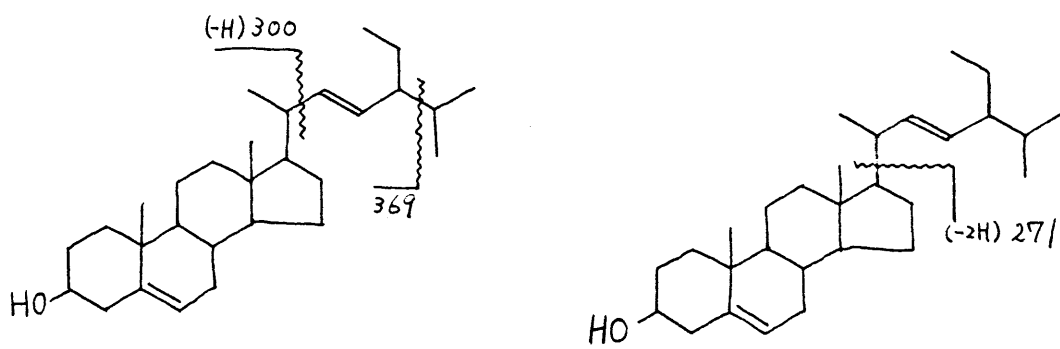


図 67. イネ芽出し中のスティグマステロールのマススペクトル



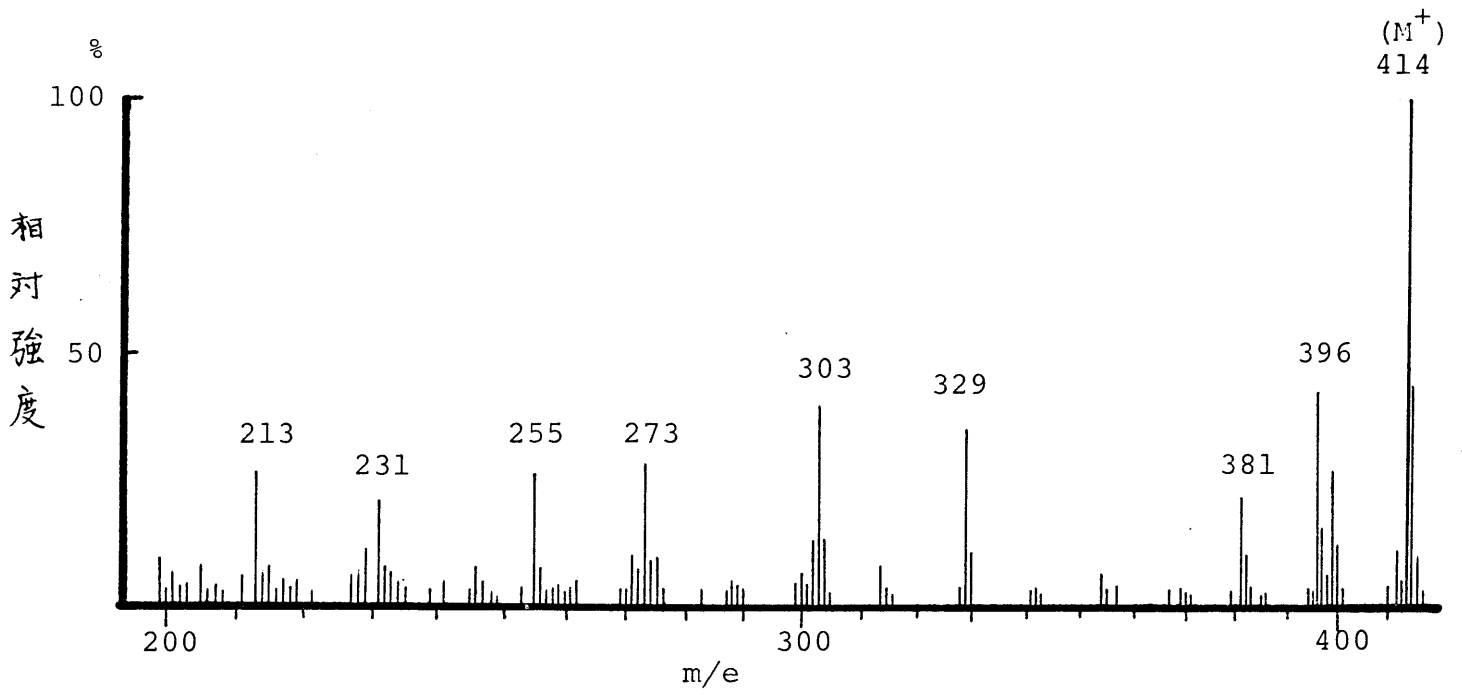
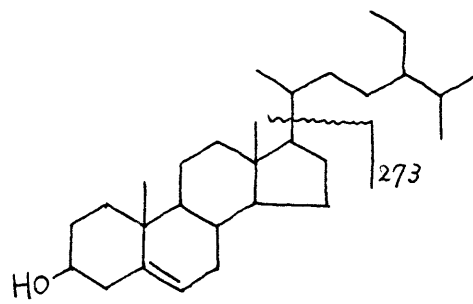
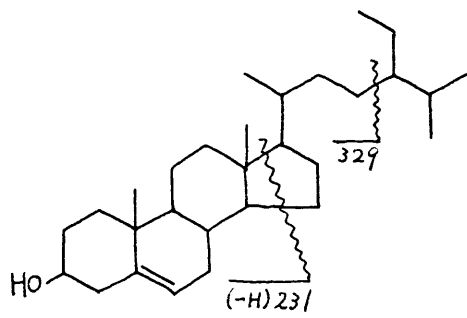


図 68. イネ芽出し中の β -システロールのマススペクトル



ールが多かったが、各ステロールの比率に大きな差はなかった。

甘露については、ヒメトビウシカ雌成虫が排泄したもののついて調べ、コレステロールと β -シトステロールが検出された。コレステロールが多く、 β -シトステロールは僅かであった(図69)。充填剤にOV-17を用いると、24-メチレンコレステロールとカンペステロールの保持時間が僅かに異なり区別できるので、OV-17を用いて甘露のサンプルを多量に分析したところ、コレステロールと β -シトステロールの間に小さなピークが認められ(図70)、これは保持時間からカンペステロールであると同定された。体中に検出されたステイグマステロール及びヒメトビウシカ体内にみられた24-メチレンコレステロールは検出されなかった。

ヒメトビウシカの排泄物中の物質は、一般に吸汁液の組成を反映しているので、甘露中に検出されたステロールは、ヒメトビウシカ

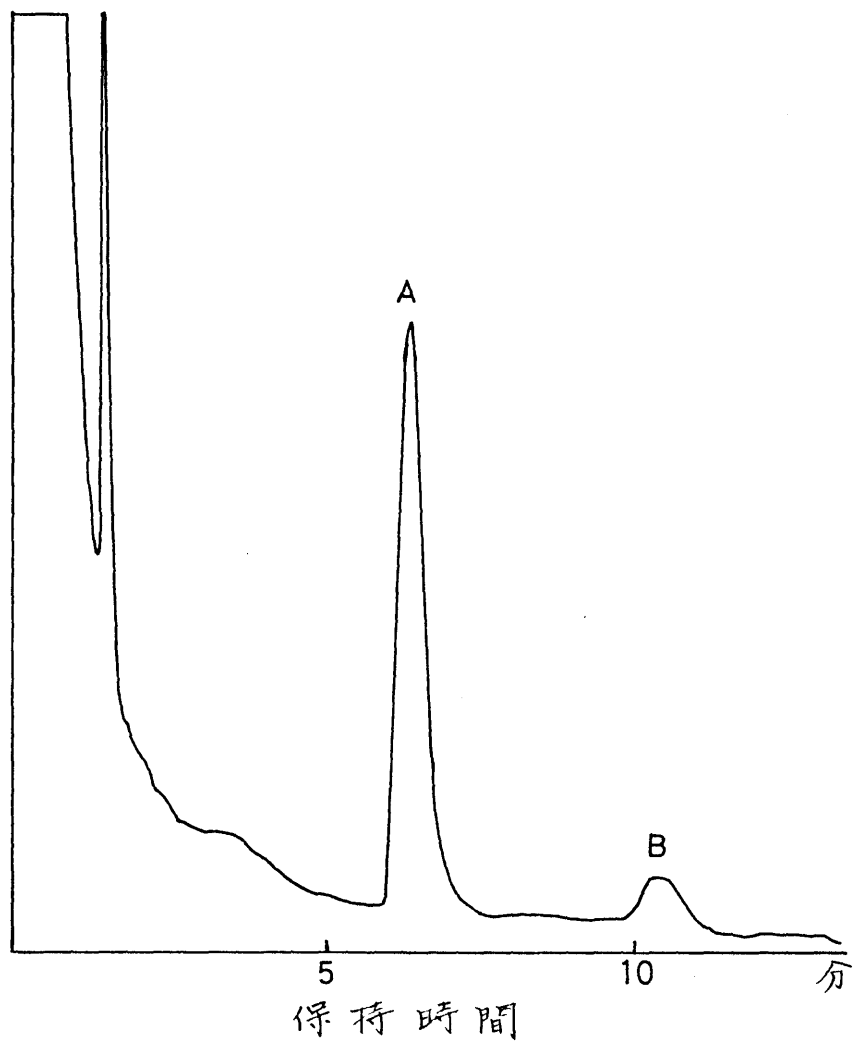


図69. 甘露中のステロールのガスクロマトグラム (0V-1)

A: コレステロール B: β -シトステロール

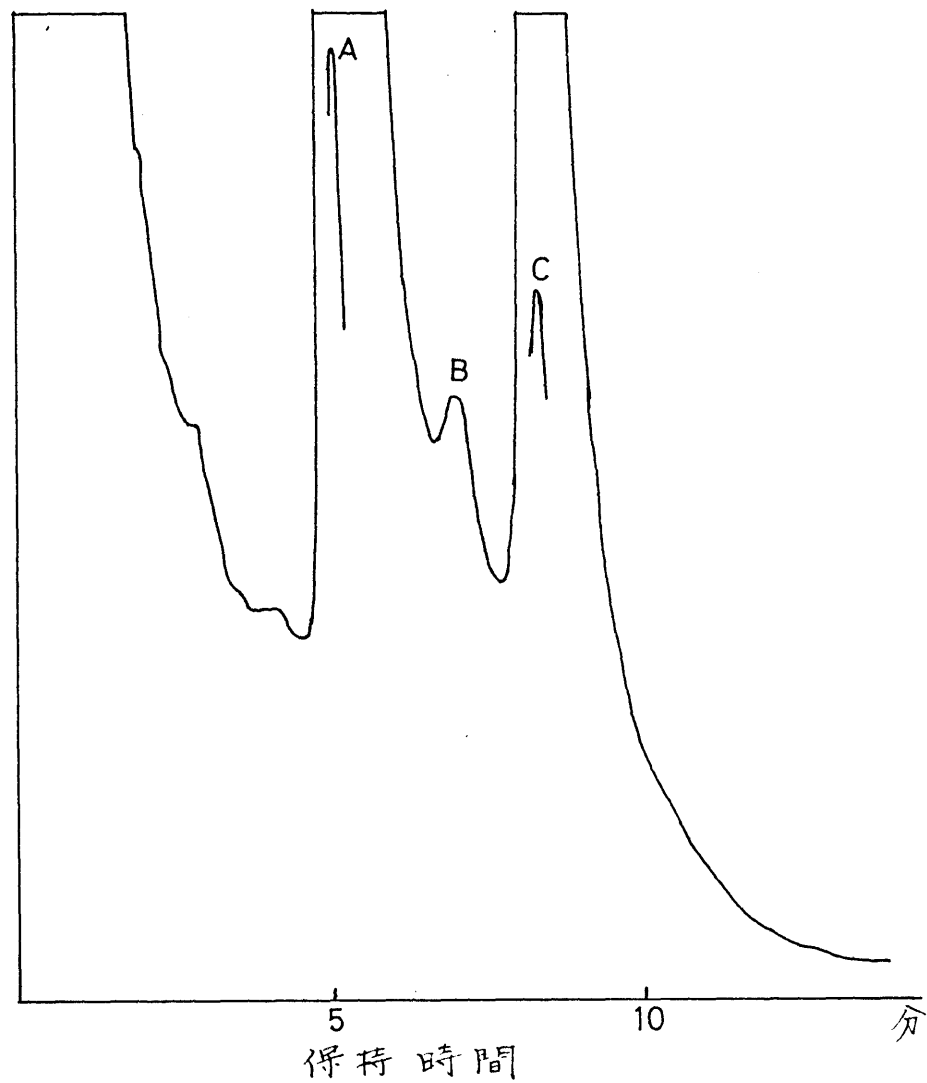


図70. 甘露中のステロールのガスクロマトグラム (0V-17)

A: コレステロール B: カンペステロール C: 3-シトステロール

の係における吸汁部位、すなわち維管束内のステロールと、ヒメトビウシカ体内から排泄されたステロールとである。コレステロールは虫体から排泄されたものであり、 β -シトステロールはカンペステロールと共に糸の維管束内の汁液に由来すると考えられる。このことから、係中にはカンペステロール、ステイグマステロール、 β -シトステロールが存在したが、実際にヒメトビウシカが吸汁しているのは、 β -シトステロールと非常に僅かのカンペステロールであると考えられる。また、糸体内のステロールの分布は一様ではなく、維管束内のステロールはそのほとんどが β -シトステロールであることを意味している。ヒメトビウシカ体内の β -シトステロールは、糸に由来するものであると考えられると同時に、虫体内に β -シトステロール以外の糸ステロールが検出されなかったことも、ヒメトビウシカがほとんど β -シトステロールしか糸から取り込んでいないことを示している。甘露中の

ステロールに関しては、Forrest and Knights (1972) がモモアカアブラムシで数種のステロールを検出しているが、やはり主要なステロールは、コレステロールと β -シトステロールである。

植物ステロールからコレステロールへの昆虫体内での転換は、カイコ、Manduca sexta、Tribolium confusum で転換経路が研究されており (Svoboda et al., 1975; 図71)、ヒメトビウソカにおいても、 β -シトステロールからコレステロールへの転換は、量的な点が問題ではあるが、可能であろうと予想される。図71にみられるように、24-メチレンコレステロールはカンペステロールからコレステロールへ転換される中間産物であり、ヒメトビウソカにおいても、24-メチレンコレステロールからコレステロールへ転換されている可能性が強い。

昆虫体内の24-メチレンコレステロールの由来については、IV-Bにおいて酵母様共生微生物

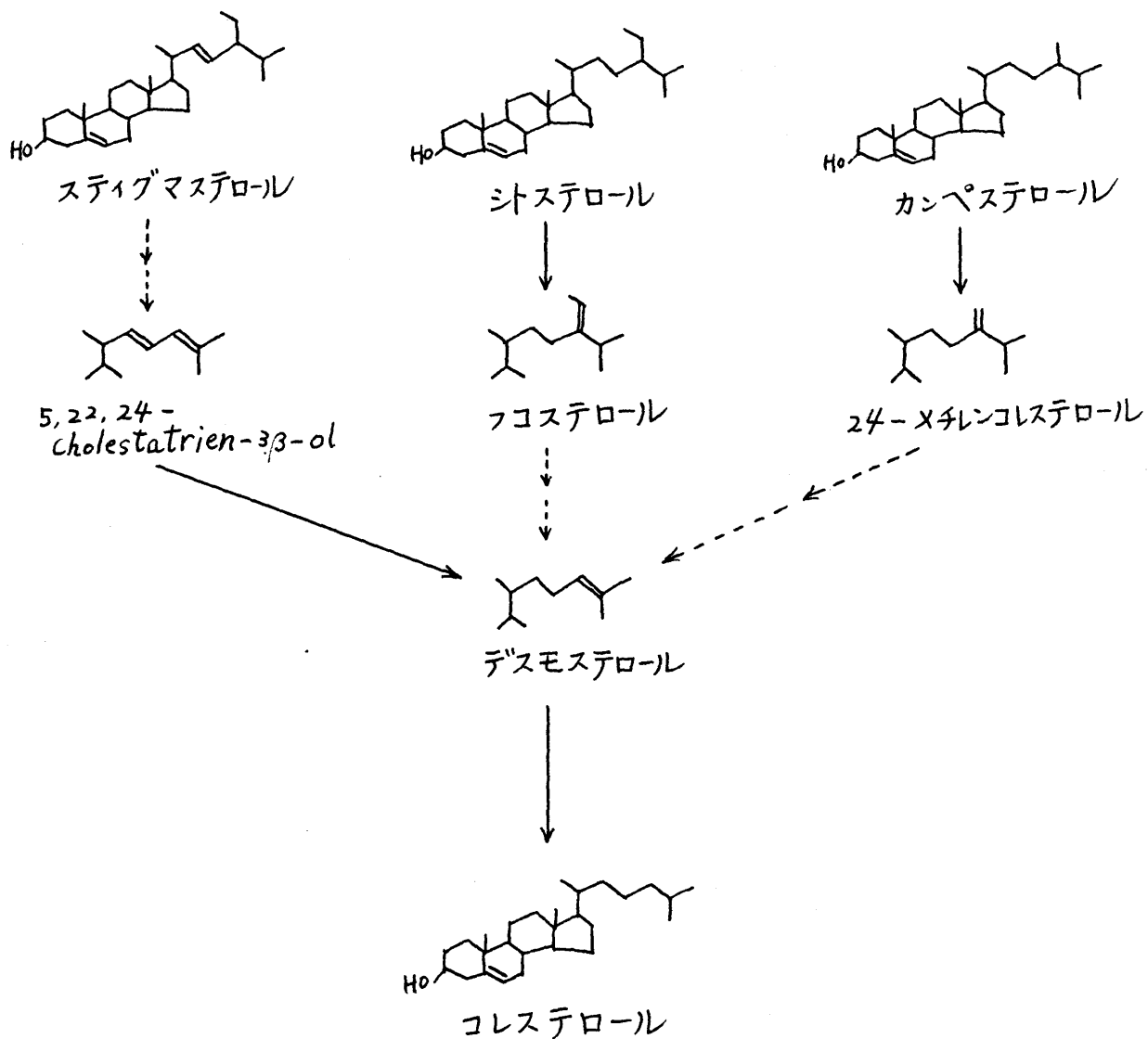


図 71. 植物ステロールからコレステロールへの転換経路 (Svoboda et al., 1975)

物によって作られているのではないかと考えられた。ここで、甘露中に僅かではあるが、カンペステロールが検出され、虫体内にもカンペステロールが僅かに取り込まれているものと予想される。しかしながら、虫体内の24-メチレンコレステロールが、このカンペステロールから代謝されたものであるという考え方は、以下の点から否定されると思われる。甘露中には非常に微量のカンペステロールしか検出されず、昆虫体内に入る量はきわめて僅かであるにもかかわらず、吸汁を開始したばかりの1令幼虫にも24-メチレンコレステロールが多量に存在する。24-メチレンコレステロールは排泄物中には認められず、また代謝の面からみても、カンペステロールからコレステロールへの転換の途中で、24-メチレンコレステロールで止まるといった例は知られていない。さらに、高温処理虫の吸汁活動は正常と考えられ(Ⅲ-E)、 β -シトステロールが虫体内に検出されるが、24-メチレンコ

レステロールは非常に僅かしか検出されず(図63)、体内のステロールに由来しているとは考えられない。

一方、以上の結果からは、酵母様共生微生物が24-メチレンコレステロールを合成し、それを昆虫がコレステロールに転換し、利用していると考えられる。まず、三橋・小山(1972)により、ヒメトビウニカはステロールの入っていない人工飼料において数世代飼育されており、ステロールを外部から取り入れなくても生育できることが示されていた。高温処理虫では酵母様共生微生物が崩壊しており(Ⅲ-C)、酵母様共生微生物数が少なかったが(Ⅲ-B)、高温処理5令幼虫では24-メチレンコレステロールは非常に僅かで、コレステロール含量も正常虫の $\frac{1}{10}$ 以下である(Ⅳ-B)。1令幼虫・5令幼虫・雄成虫・雌成虫において、コレステロールと24-メチレンコレステロールの比がほぼ一定であり、排泄物中には24-メチレンコレステロールが検出

されなかった。このことは、微生物が増加するにつれて、24-メチレンコレステロールの量も増加し、コレステロールへの転換も増えていることを示している。羽化後1週間以上経過した雄成虫では、コレステロールに対する24-メチレンコレステロールの比率が小さくなり、24-メチレンコレステロールの絶対量も減少して来ている(表6)。これは、羽化後1週間経過した雄成虫では、酵母様共生微生物の数が減少している(表1)ことを反映していると考えられる。

以上のことから、酵母様共生微生物により24-メチレンコレステロールが作られ、ヒメトビウニカはそれをステロール源として利用していると結論される。このことは、昆虫のステロール要求性ともからんで重要な点であるので、将来、酵母様共生微生物の分離、培養などが可能になれば、さらに詳しく追求する必要がある。

D. トビイロウンカ、セジロウンカ、ツマグロヨコバイのステロール組成

ヒメトビウンカと同じく体の害虫であり、よく似た吸汁習性をもった、トビイロウンカ、セジロウンカ、ツマグロヨコバイのステロールを分析した。ツマグロヨコバイの場合、ウンカ類に比べ導管からより多く吸汁することが示唆されているが (Noda et al., 1973)、やはり維管束を吸汁する。トビイロウンカとセジロウンカは、ヒメトビウンカの酵母様共生微生物に似た微生物をやはり脂肪体内に有している (図72, 図73)。ツマグロヨコバイは酵母様共生微生物を有しておらず、mycetome内に細菌が生息している (Nasu, 1965; Mitsuhashi and Kono, 1975)。それぞれ4、5令幼虫をヒメトビウンカの虫体ステロールと同じ方法で抽出し、ガスクロマトグラフィーで分析した。

トビイロウンカ、セジロウンカとともに、コレステロール、24-メチレンコレステロール、

(137)

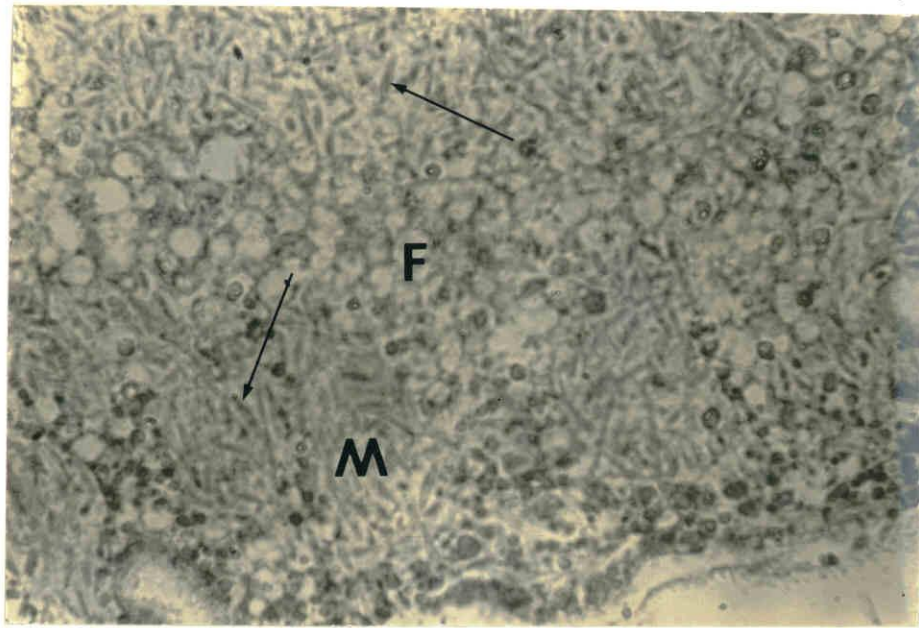


図72 トビイロウンカの酵母様共生微生物(矢印)

F: 脂肪体細胞, M: Mycetocyte

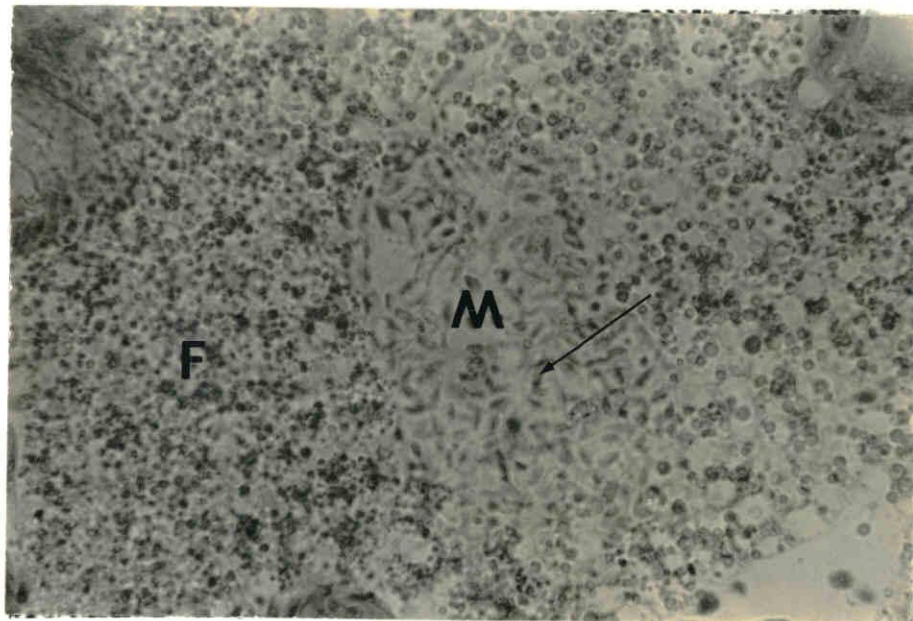


図73. セジロウンカの酵母様共生微生物(矢印)

F: 脂肪体細胞, M: Mycetocyte

β -シトステロールが検出された (図 74, 図 75)。トビイロウンカにおいては、ヒメトビウンカと比較した場合、コレステロールに比べ 24-メチレンコレステロールが少なく、 β -シトステロールが多かった。ツマグロヨコバイでは、コレステロールと β -シトステロールが主として検出され、若干量のカンペステロールがみられた (図 76)。これら 3 種においても、虫体内にみられる植物ステロールは主に β -シトステロールであった。

ウンカ類には共通して 24-メチレンコレステロールがみられるが、ツマグロヨコバイではみられず、このことは酵母様共生微生物による 24-メチレンコレステロールの合成をさらに支持すると共に、トビイロウンカ、セジロウンカにおいてもヒメトビウンカと同様、酵母様共生微生物がステロール供給源となっていることを示唆している。しかし、トビイロウンカについては、24-メチレンコレステロールが相対的に少なく、 β -シトステロール

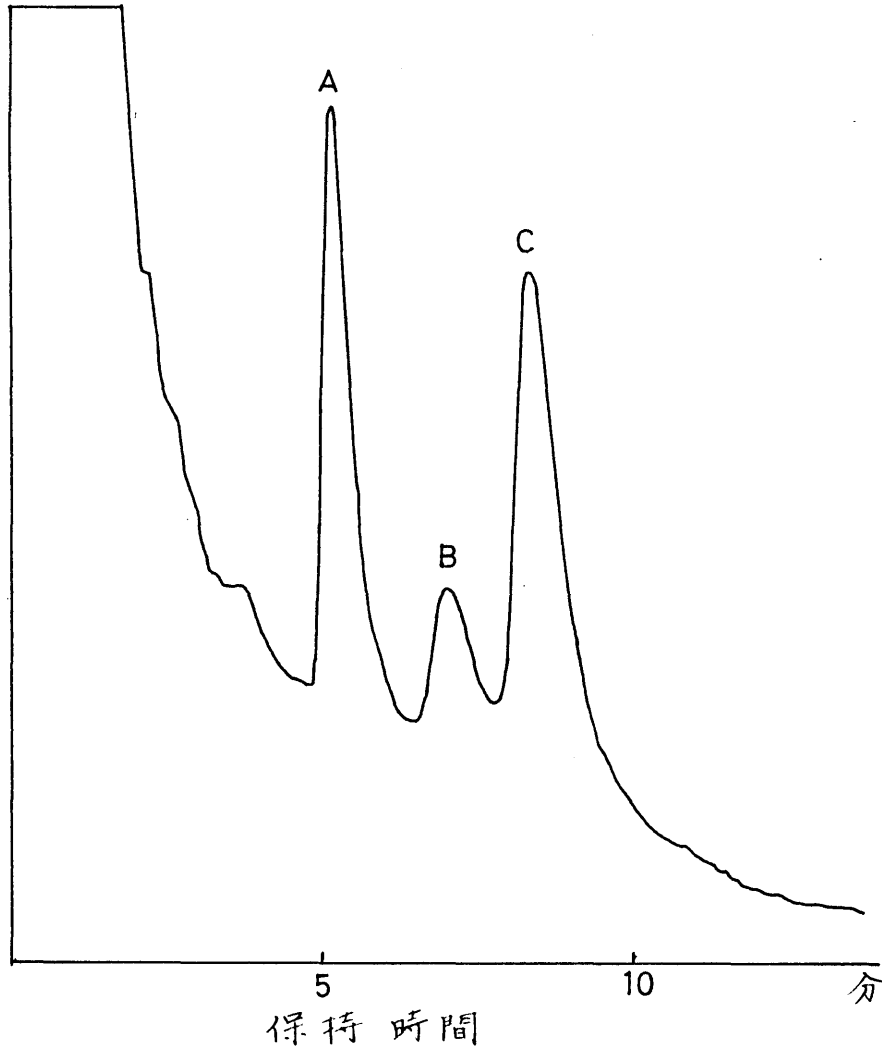


図74. トビイロウンカのステロールのガスクロマトグラム(00-17)

A: コレステロール B: 24-メチレンコレステロール
 C: β -シトステロール

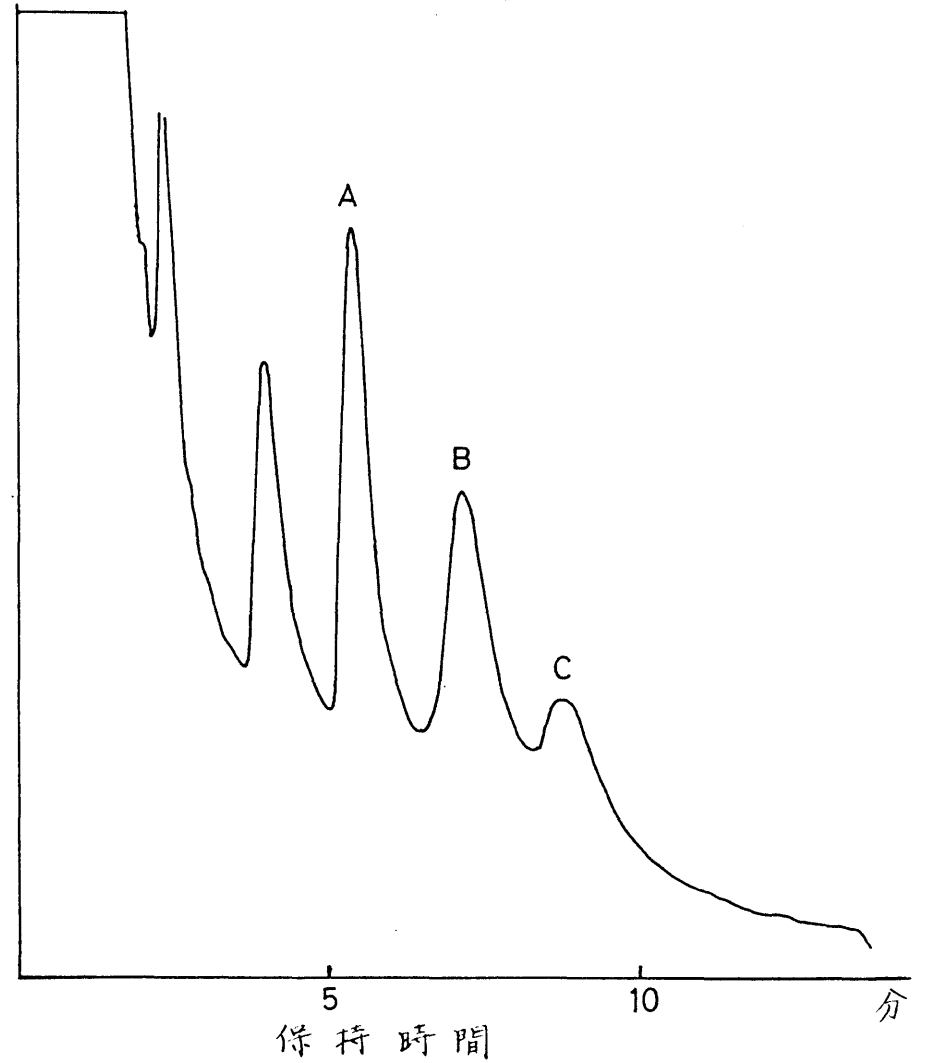


図75. セジロウンカのステロールのガスクロマトグラム(00-17)

A: コレステロール B: 24-メチレンコレステロール
 C: β -シトステロール

(140)

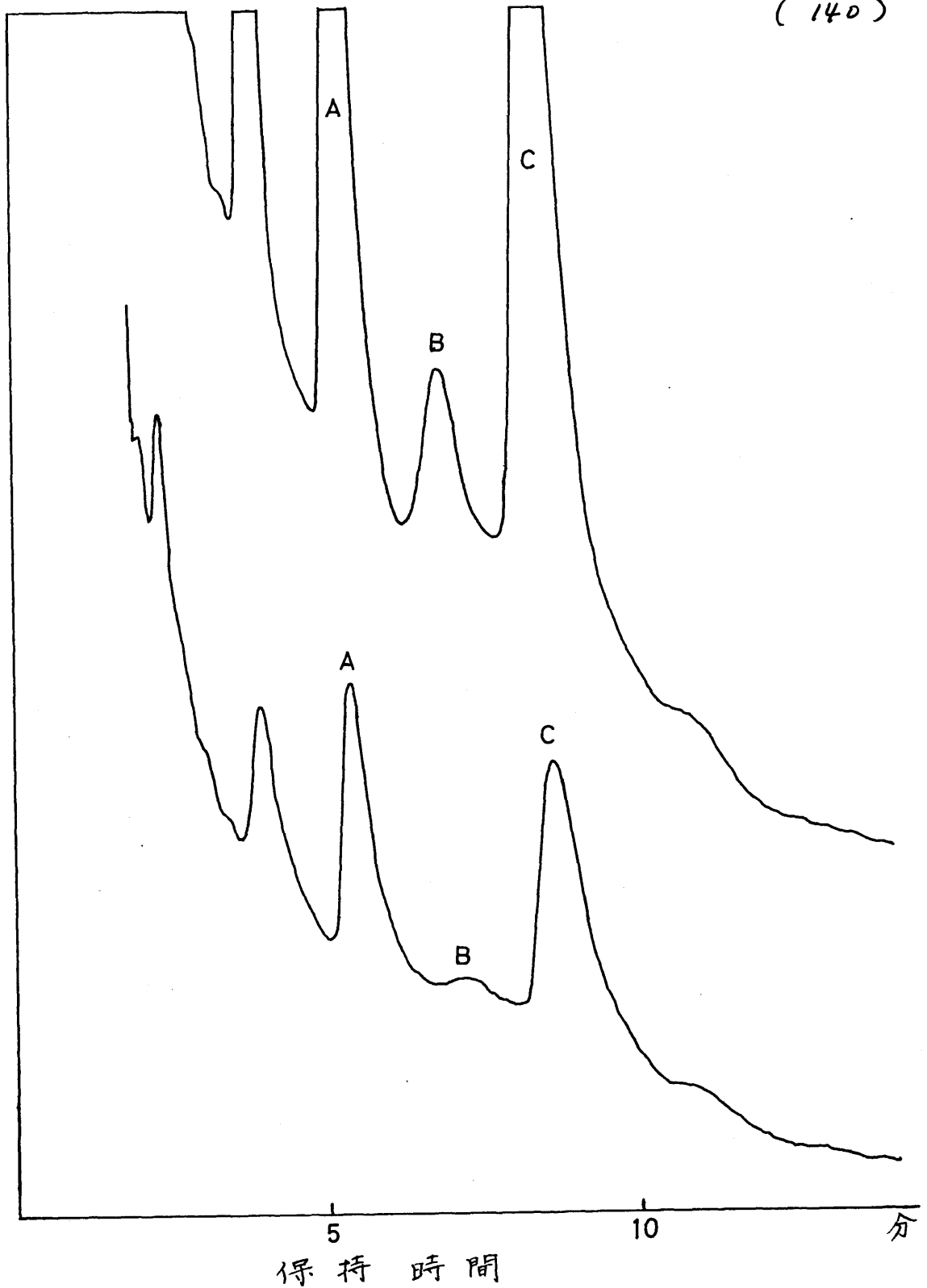


図76. ツマグロヨコバイのステロールのガスクロマトグラム(0T-17)

A: コレステロール B: カンペステロール c: β -システロール

が多く、コレステロールと β -シトステロールの比率はツマグロヨコバイの両ステロールの比率に類似している。図72のように、トビイロウンカの酵母様共生微生物がヒメトビウンカに比べて長細い形態をしており、トビイロウンカはヒメトビウンカ・セジロウンカの人エ飼料では飼育できないと言われていることなどから、トビイロウンカは他のイネのウンカと種とは生理的差異がかなりあるのではないかと考えられる。

E. ステロールを与えた高温処理ヒメトビウンカの飼育

高温処理5令幼虫は脱皮異常、脱皮不能を起こし、エクジステロンを処理してやれば羽化・脱皮する個体が増えた(Ⅲ-G)。また、高温処理5令幼虫では酵母様共生微生物が減っており、コレステロール含量も少なかった(Ⅳ-B)。そこで、高温処理5令幼虫の成虫

脱皮に関して、ステロール投与が効果があるかどうかをみた。酵母様共生微生物が、ステロール以外にも栄養分を宿主に供給していることも考えられるが、ここではステロールのみに着目し、成虫脱皮への影響を調べた。

孵化当日の1令幼虫を3日間35℃下に置くと共に、コレステロール、 β -シトステロール（カンペステロールを含む）をそれぞれ与えて飼育した。ステロールを与えないもの、高温処理をしない正常虫も同時に飼育し、死亡個体、羽化個体を観察した。高温処理後（孵化後3日）の個体数を100%として計算した。

Tween 85を用いてステロールを懸濁させた液に餌をつけて飼育した結果は図77に示した。正常虫は22日までにすべて羽化が完了し、47.0%が成虫になった。ステロールを入れなかった高温処理虫は、6.7%しか羽化できず、残りは38日までにすべて死亡した。コレステロールを与えると、正常虫に比べ羽化に要する日数は長いが、31日までに61.6%が羽化した。

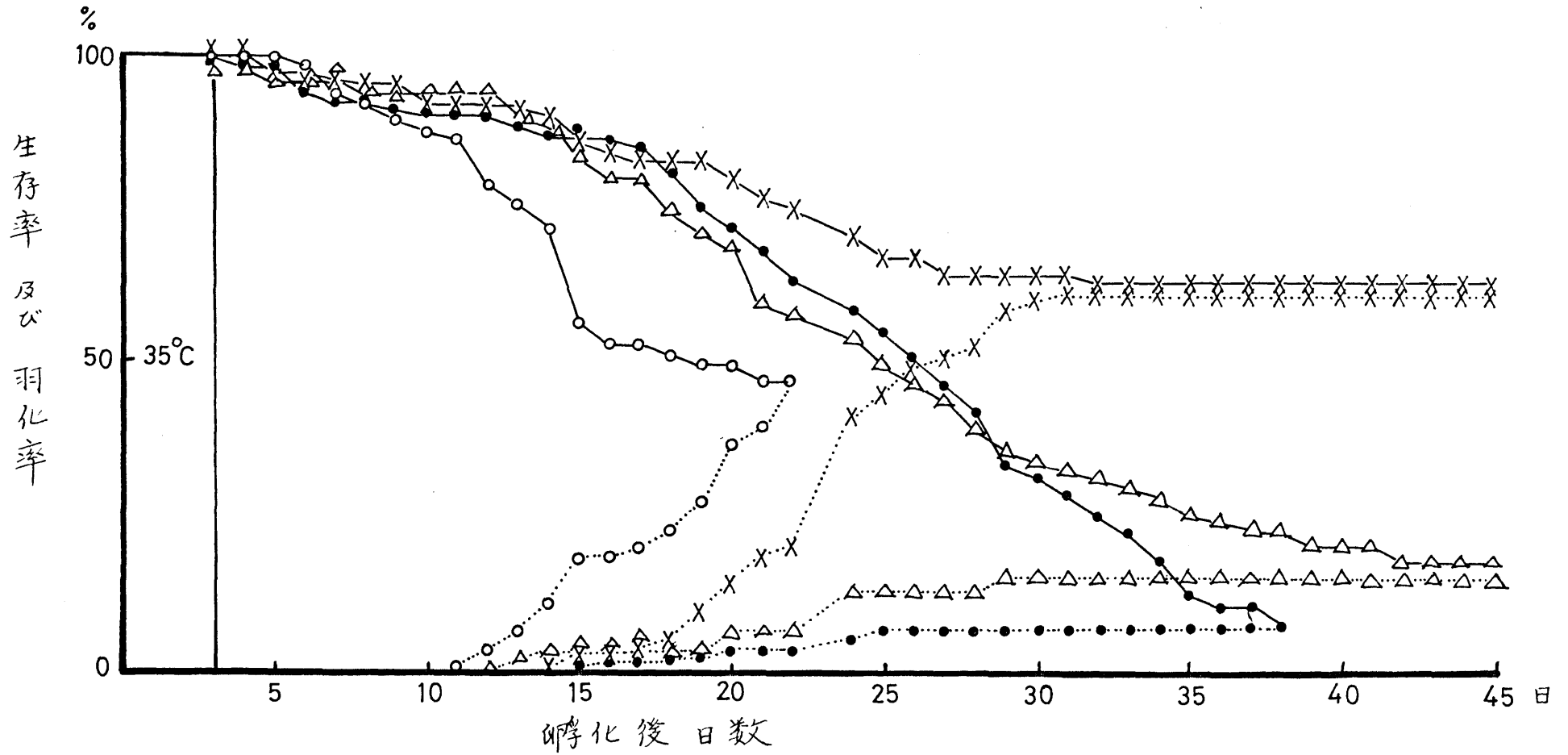


図77. ステロールを与えた高温処理虫の飼育 (Tween 85 を用いた飼育)

- 生存率
- ⋯ 羽化率
- 25°C下での飼育
- 孵化後3日間高温処理
- × 孵化後3日間高温処理, コレステロールを与えて飼育
- △ 孵化後3日間高温処理, β -システロール(カンペステロールを含む)を与えて飼育

β -シトステロールの場合、ステロールを与えない場合に比べ羽化率は15.2%とあがっていた。このように高温処理虫は、1令よりコレステロールを与えてやれば羽化できるようになった。

Tween 85 を入れずに、水にコレステロールを懸濁させただけでも同様の結果が得られた(図78)。コレステロールを与えると37.1%が羽化し、 β -シトステロールを与えた場合は10.7%が成虫になった。しかし、ステロールを与えなかった高温処理虫は1頭も羽化しなかった。また、コレステロールを吸汁させた高温処理5令幼虫の組織切片を観察すると、酵母様共生微生物は著しく減少しており、酵母様共生微生物は高温処理後増加していないことが確かめられた。

図78の飼育データにおいて、43日までの観察で羽化曲線を求めると図79のごとくである。正常虫は平均15~16日に羽化しているが、高温処理虫は平均22~24日付近に羽化がみられ、

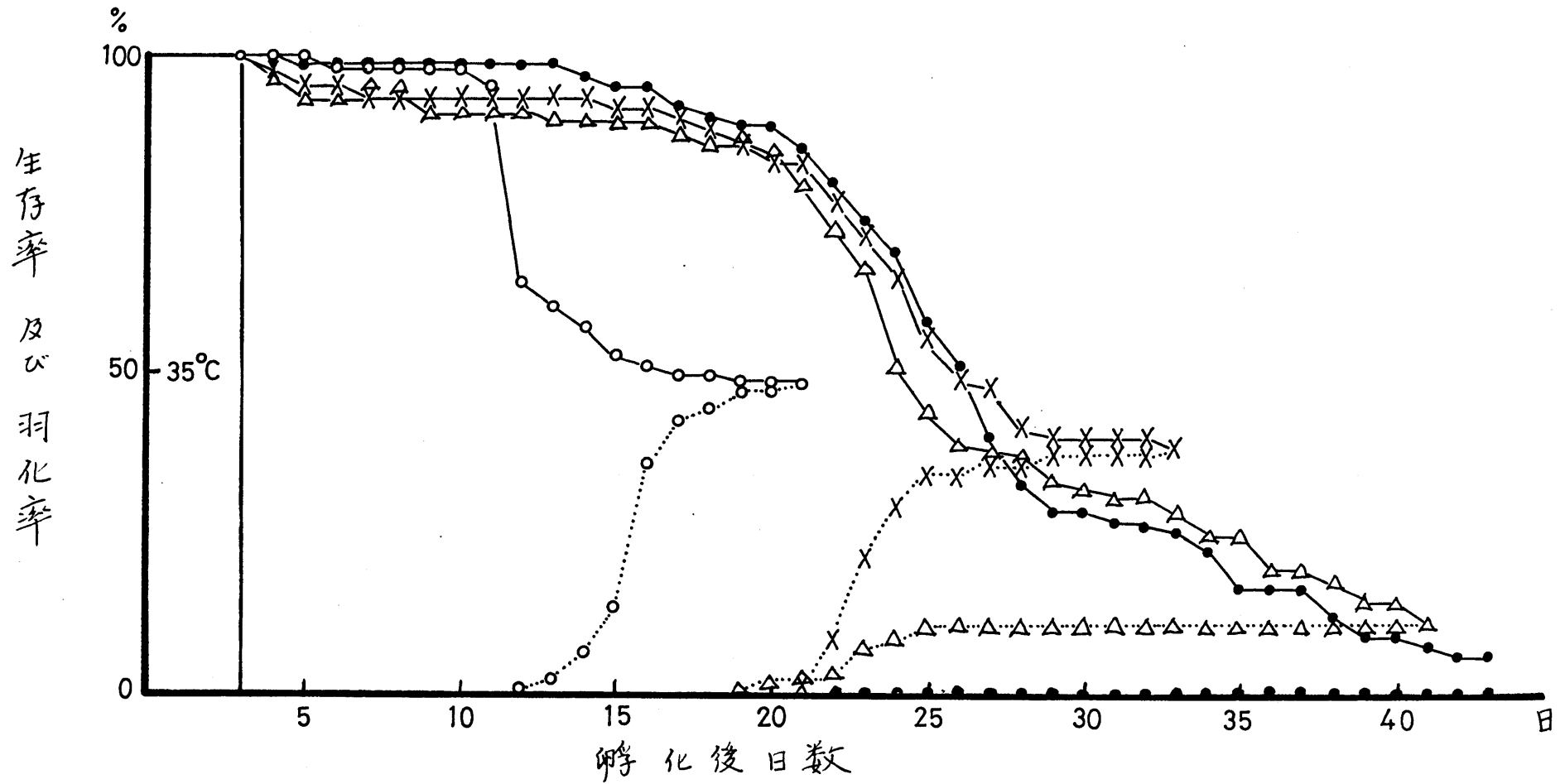


図78. ステロールを与えた高温処理虫の飼育

- 生存率
- ⋯ 羽化率
- 25°C下での飼育
- 孵化後3日間高温処理
- × 孵化後3日間高温処理, コレステロールを与えて飼育
- △ 孵化後3日間高温処理, β -システロール(カンペステロールを含む)を与えて飼育

ステロールを吸汁して羽化できるようになっても、羽化に要する日数は長い。ステロールを与えた高温処理虫の羽化曲線は正常虫のそれと同じ傾向を示し、羽化できた個体に関しては、各処理区とも羽化はほぼシンクロナイズしている。

次に、毎日の生存虫当りの累積羽化個体数の割合を求めてみると、図80のようになった。死亡個体を除外し、生存虫当りの羽化率を示したことになるが、これをみると、コレステロールを与えた場合、正常虫の曲線を平行移動したものとほぼ同じ曲線を示し、羽化までの日数は長くなっているが、実験個体群内の生存虫に対する羽化割合は同じであると言える。一方、 β -シトステロールを与えた場合、傾きが非常にゆるやかになっており、羽化傾向は正常虫とは異なっている。図中の矢印のところから右側の曲線の傾きは虫の死亡によるための上昇であり、羽化によるものではない。しかし、18~25日における曲線の上

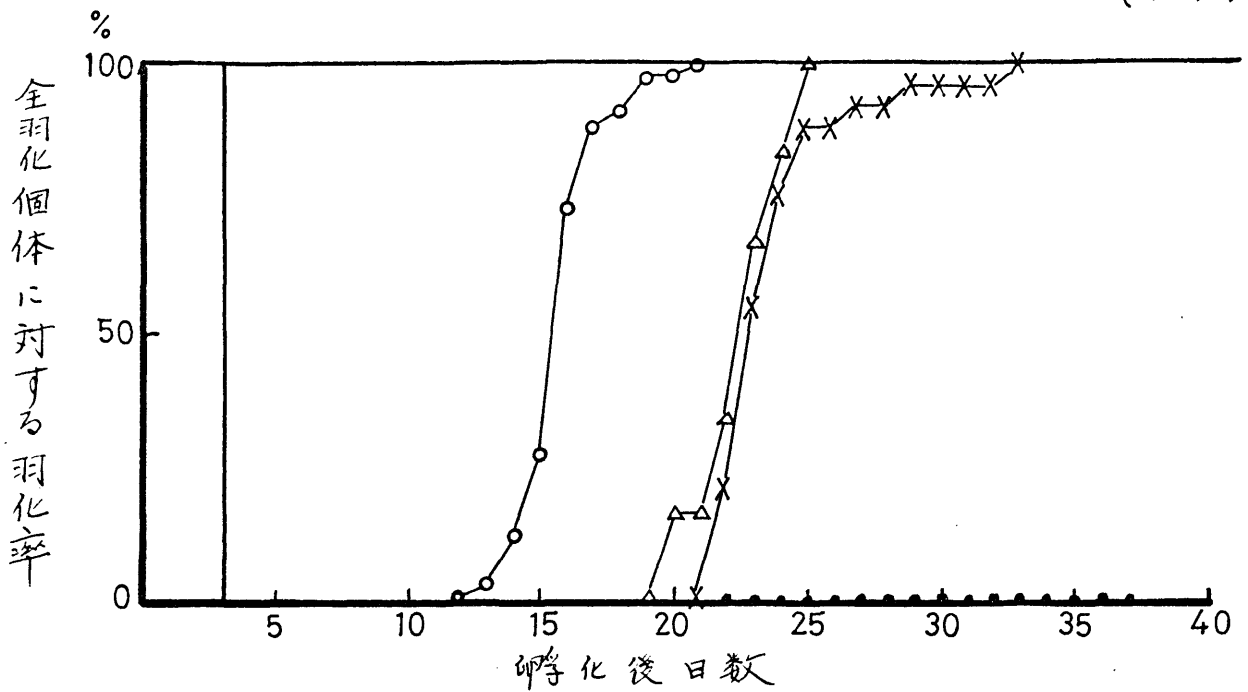


図79. ステロールを与えた高温処理虫の羽化曲線 (累積羽化数/全羽化数)

- 25°C 下での飼育
- 孵化後3日間高温処理
- × 孵化後3日間高温処理, コレステロールを与えて飼育
- △ 孵化後3日間高温処理, β-システロール(カンペステロール)を与えて飼育

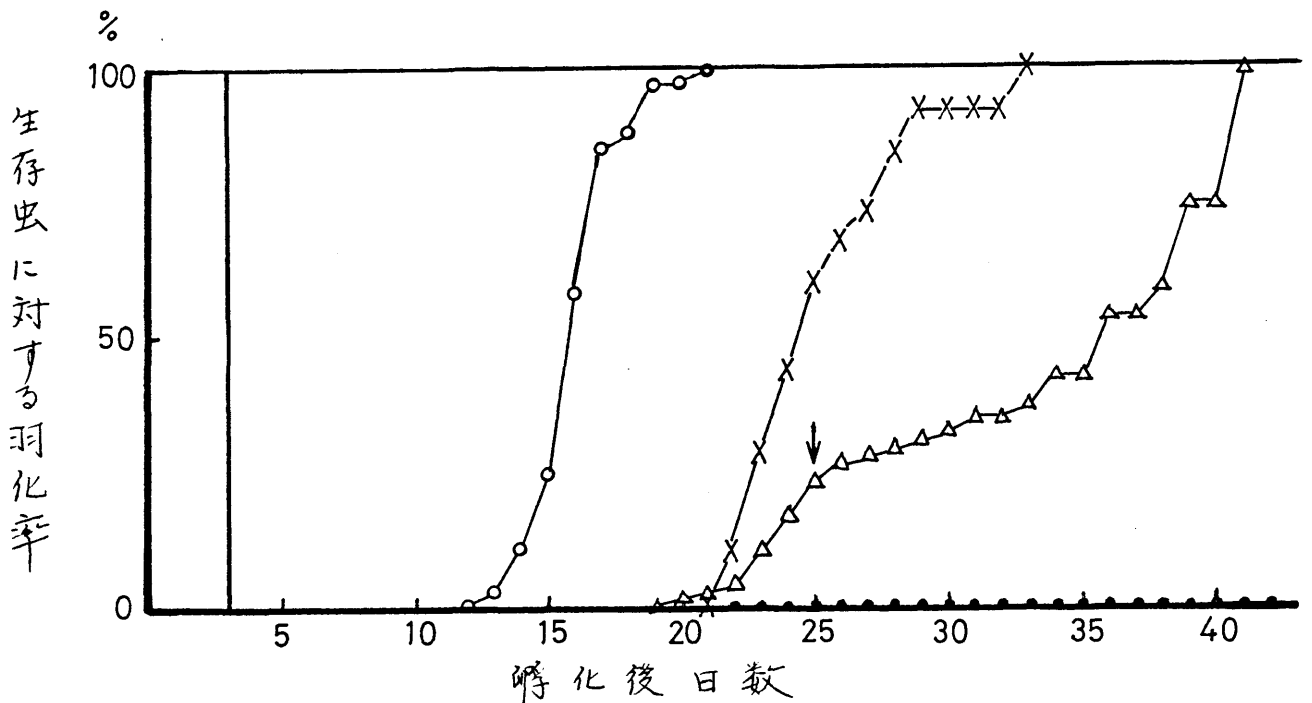


図80. ステロールを与えた高温処理虫の羽化曲線 (累積羽化数 / (累積羽化数 + 生存幼虫数))

- 25°C 下での飼育
- 孵化後3日間高温処理
- × 孵化後3日間高温処理, コレステロールを与えて飼育
- △ 孵化後3日間高温処理, β-システロール(カンペステロール)を与えて飼育

昇は、正常虫、コレステロールを与えた高温処理虫のものとは異なり、 β -シトステロールは、高温処理虫の成虫脱皮に関しては、コレステロールほどの効果はなく、正常虫のように羽化させることはできなかった。

以上のように、コレステロールを与えれば多くの個体が羽化したのは、高温処理虫においてコレステロールが不足していたためと思われる。このことは、高温処理5令幼虫のコレステロール含量が低かった(IV-B)ことと一致する。高温処理虫では酵母様共生微生物が少なく、24-Xチレンコレステロールの供給が少なくなり、コレステロールの不足をもたらしたものと考えられる。コレステロールを与えると、正常虫と同じ羽化の傾向を示したが、羽化までの日数が長いことから、他の要因も関与しているかもしれない。しかし、羽化に関しては、コレステロールの不足が成虫脱皮を妨げていた要因である。 β -シトステロールの場合、羽化が正常虫と同様にならないの

は、 β -シトステロール(又はカンペステロール)からコレステロールへ転換する必要があり、充分コレステロールに転換されなかったものと想像される。このことは、正常虫においても、吸汁された β -シトステロールが効率よくコレステロールへ転換されていない可能性もあり、実際に正常虫では、体維管束内のステロールがヒメトビウソカノステロール源としてどの程度寄与し得るのかを追求する必要もあろう。

高温処理した幼虫はエクジステロンを処理すると成虫脱皮を起こし(Ⅲ-G)、また、コレステロールを手えても羽化するところから、成虫脱皮に関して、エクジステロンもコレステロールも類似の効果を持つ。1令期3日間高温処理した虫は、コレステロール又はエクジステロンを処理すれば羽化するところから、成虫脱皮という面についてみれば、この高温による酵母様共生微生物の除去は、実験系として有効な手法であった。

V. 総合考察

A. ヒメトビウンカとその酵母様共生微生物との共生関係

昆虫の体内共生微生物は、宿主の体内に住み、宿主の栄養を利用して生活している。一方、共生微生物は昆虫のもっていない代謝・合成能力を備えており、合成あるいは代謝した物質を宿主に供給していると考えられている (Brooks and Kringen, 1972; Pant and Dang, 1972)。

ヒメトビウンカにおいては、酵母様共生微生物は脂肪体内の *mycetocyte* に生育しており、ウンカの体内の栄養を使い増殖していると考えられる。また、脂肪体内には気管細管なども見られ、ガス交換も宿主の組織が役目を果たしており、生育に好的な場を与えているであろう。しかし同時に、酵母様共生微生物は生育場所を *mycetocyte* 内に制限され、宿主体内で増え過ぎないように何らかの制約を受け

ている(表1)。このように、ヒメトビウンカとその酵母様共生微生物との間には、ある種の“妥協”もしくは“協調”が存在し、必要不可欠で安定な統一体を形成している。これは、本実験において明らかになったように、酵母様共生微生物が宿主の重要なステロール源となっていることから推察される。

ヒメトビウンカが体を吸汁する際のステロールの流れを図81に示した。体内にはカンペステロール、ステイグマステロール、 β -シトステロールが存在したが、この内 β -シトステロールと非常に僅かのカンペステロールが維管束内を転流しており、維管束吸汁種であるヒメトビウンカは、本来ならば、それらのみをステロール源としなければならない。維管束内の汁液は糖やアミノ酸は多く含んでいるが、脂質類、特にステロールは少ないと思われる。Griffiths and Beck (1977b) は、エンドウヒゲナガ *Acyrtosiphon pisum* を用いて、吸汁植物中の吸汁液のステロール濃度は非常に低い

イネ

ヒメトビウンカ

排泄物

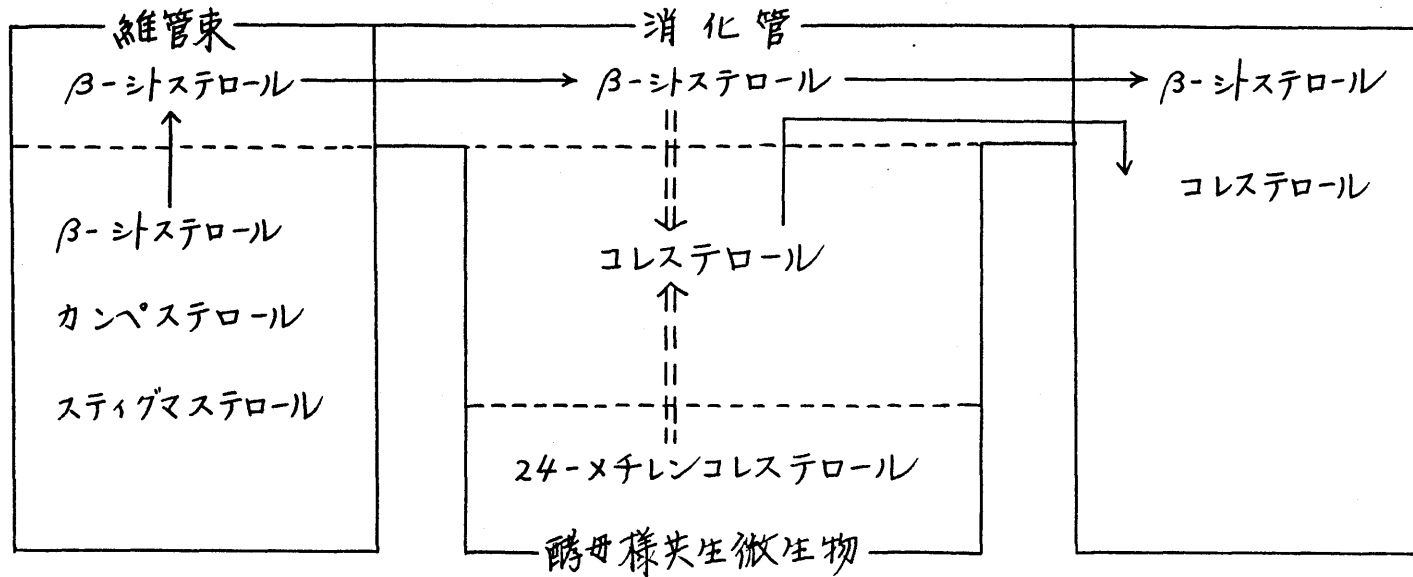


図81. ヒメトビウンカにおけるステロール利用に関する酵母様共生微生物の役割の模式図

もしれないと示唆している。しかしながら、ヒメトビウンカの酵母様共生微生物は、24-メチレンコレステロールを作っており、ウンカはそれを利用できるため、体の維管束内にはたとえステロールが少なくても発育に十分なコレステロールを得ることができると考えられる。

酵母様共生微生物が高温により数を著しく減少させられた場合、ヒメトビウンカは生育が遅れ、脱皮異常を起こした。これは、酵母様共生微生物によるステロール供給が不十分になったためであり、コレステロールを手当てすれば成虫まで発育した(図77, 図78)。また、この脱皮異常・脱皮不能が、エクジステロン処理により回復するところから(表3, 表5)、コレステロールとエクジステロン(β -エクダイソン)は、高温処理虫の成虫脱皮に対して同様の効果を示す。これは、コレステロールがエクダイソンの前駆物質であることを考えると、高温処理虫のコレステロールの不足がエクダイソンの十分な合成を阻害し、

結果として、脱皮異常、脱皮不能を起こしたと考えられる。高温処理5令幼虫のコレステロール含量は $1.3 \mu\text{g/g}$ であり、正常虫の $1/10$ 以下である。一般に、昆虫の組織において、エクダイソンは 10^{-7}M オーダーで作用すると言われている (Nijhout, 1976)。高温処理5令幼虫の $1.3 \mu\text{g/g}$ というコレステロール量は、約 $3.4 \times 10^{-6} \text{M}$ であり、エクダイソンが作用すると言われている値のわずが一桁上の値である。コレステロールは組織、特に膜の構成成分であり、そちらにも使われ、またコレステロールからエクダイソンまで変換される際の変換率も考え合わせると、 10^{-6}M オーダーのコレステロール量は、エクダイソン合成の基質量としては不十分ではないかと思われる。

酵母様共生微生物は種々の物質を宿主に供給していると思われる。今後、アミノ酸、ビタミン等についても説明する必要があるだろう。しかし、成虫脱皮に関してコレステロール量が重要となるのは、ヒメトビウンカが維管束吸

汁種であることと無関係ではないであろう。

本研究において、ヒメトビウニカとその酵母様共生微生物との相利共生関係を証明できた。また、共生微生物が宿主の内分泌系にまで影響を及ぼしているのは新しい例であろうと考える。

B. 昆虫の適応と共生微生物

昆虫の共生微生物は、細菌、酵母などが多く、存在様式は変化に富んでいる (Buchner, 1965)。しかし、近縁昆虫間では同じような微生物による、非常によく似た、あるいはまったく同じ存在様式がみられ、昆虫の近縁性と共生微生物との共生関係とは無関係ではあり得ない。

一般に、共生微生物は昆虫が過去において生活していた環境に存在していた微生物が、昆虫との係りを持つようになり、特殊化したものであろうと考えられる。その微生物は、

元来病原菌であったのか、自由生活菌であったのか、その起源については不明であるが、近縁昆虫には同じような共生関係がみられるということは、普通それらの近縁昆虫間の分化が起こる以前にすでに共生関係が樹立されていたと考えるのが妥当である。

昆虫の栄養摂取という面から共生微生物をながめると、あまり栄養的に充分であるとは言いがたい食物を摂取している昆虫において、共生微生物の存在が認められる。シロアリは木材を食べて生活しているが、消化管内の共生微生物がセルロースの消化を助けていると考えられ (Mauldin, 1977)、シロアリの生活にとって消化管内の微生物は大きな役割を果たしている。Ambrossia beetle においても同様である (Baker and Norris, 1968)。ゴキブリ類は共生細菌を有しているが、ゴキブリは一般に腐食性であり、必ずしも常に栄養的に十分な食物を得ているとは思われない。また、*Rhodnius* は哺乳動物の血液を吸血してお

り、十分に摂取できないビタミンB群を、消化管内の共生微生物が合成・供給している (Hill et al., 1976)。維管束吸汁種であるアブラムシ、ヨコバイ、イネのウンカ類などは、脂質・ビタミン等を充分に取り込めないと思われるが、それらを細胞内共生微生物が補っているものと考えられる。

一方、鱗翅目昆虫などではあまり共生微生物は報告されておらず、またたとえ報告されていても、それらが宿主の栄養生理と結びついている例は知られていないのではないかと思われる。これは、鱗翅目昆虫の幼虫は咀嚼性口器を持ち、栄養的により良い食物を摂食しているため、微生物による栄養分の補給という必要性が比較的少なかったため、その進化の過程で、微生物との共生関係をほとんど樹立しなかったのではないかと思われる。

前述のような、栄養的に充分ではないと思われる食物を摂食している昆虫においては、共生微生物を取り除くと多くの昆虫では正常

な発育ができない。長い共生関係の間に、昆虫のある種の代謝能が低下したことも考えられるが、一般に、昆虫間では必須栄養素はよく似ており(平野, 1971)、共生微生物を有している多くの昆虫では食物からの栄養だけでは不十分であり、発育が不良になるものと思われる。このことは、昆虫の進化の過程で、栄養的に不十分な食物を摂食して生活するようになった時点において、微生物との関係が生ずるようになったと思われる。すなわち、ある祖先種から現在のような食物を摂取するように適応するためには、共生微生物なしでは困難ではなかったかと考えられる。あるいは、共生関係の成立が、昆虫の食物に対する適応を促進したのかもしれない。これらのことは、昆虫の新しい餌への適応と共生関係の樹立が、比較的関連して起こったことを意味する。昆虫が現在のごとく非常に広い範囲にわたり生活をしており、種々のものを餌としているが、それらの分化適応の過程で共生微生物が

いくらか係りを持っていたものと推察される。

こうして、昆虫と微生物との間に共生関係が樹立されたが、微生物が代々昆虫の子孫に伝えられる必要があった。Rhodnius では、消化管内の細菌は糞とまざって体外へ排泄され、孵化幼虫はその糞を摂食することにより菌に感染する (Hill et al., 1976)。ジンサンシバンムシでは、卵表面に付着した細菌に孵化幼虫が感染する。より高度な伝搬方法は、卵内に微生物が入り、幼虫の孵化時にはすでに体内に微生物が存在するという経卵伝搬であり、アブラムシ、ヨコバイ、イネウンカ類等の細胞内共生微生物にみられる。また、Mitsunashi and Kono (1975) は、ヨコバイで精子を通じての次世代感染も示唆している。これらの経卵伝搬は、特に植物吸汁性昆虫にみられ (Buchner, 1965)、植物吸汁性昆虫ではその生活様式から考えると、糞などを通しての伝搬は樹立されにくく、経卵伝搬という確実な方法が生み出されてきたものと思われる。

ヨコバイ類などにおいては、mycetomeという、菌が生育するためにのみあると考えられるような器官が存在するなど、極度に適応していると考えられる。一度体内、特に細胞内に入り経卵伝搬で伝わるようになると、同種他昆虫個体内の微生物とも隔離されて、共生微生物はその個体の子孫の体内のみで生活することとなった。また、経卵伝搬が確立され、極度に相互依存的となってしまった場合、栄養的に必要であるだけでなく、昆虫にとって微生物あるいはmycetomeの存在そのものが必要となってしまったと思われる例がある。Schwemmler (1974) は、ヨコバイの胚子発育において、symbiote ballの存在が正常な胚子発育に必要であろうと述べている。このように、昆虫の進化適応の過程で共生微生物の果たしてきた役割は重要であろうと考えられるが、現在においても、ある種の共生微生物は昆虫の生育には欠くべからざるものである。

C. 今後の共生微生物に関する研究

共生微生物は昆虫と密接な関係にあり、昆虫の生理・生化学を研究する上で常に考慮に入れる必要があるだろう。共生微生物の研究法は大きく分けて、組織学的な研究法と生理・生化学的な研究法、そして微生物学的手法を用いたものに分けられるであろう。従来の共生微生物の研究は組織学的なものが主体であるが、これは研究の基礎になるもので、詳しく検討される必要があるであろう。近年、電子顕微鏡分野の進展が著しく、構造と機能との関連性から形態学的に共生微生物像というものをとらえることができると思われる。超微形態レベルでの種々の手法を組み合わせた研究は、宿主と共生微生物のより深い解明につながると考えられる。

一方、生理・生化学的に研究を進める上では、種々の手法の導入と共に、微生物の分離あるいは aposymbiotic insect を作り出すことが必要とされるであろう。この種の研究におい

ては、比較対象となるものを設定するか否かが研究の可否を決定するように思われる。また、微生物の培養も今後可能になってくると思われるが、昆虫の共生微生物はその住み場所を昆虫体内としているのであり、昆虫と共生微生物との2種間、もしくは他の共生微生物などが共存する場合は、多種間の相互関係を問題とするのであり、より広い視野が必要とされるであろう。

基礎的な研究の実際としては、昆虫の栄養生理との関連がまずあげられる。多くの共生微生物が宿主の栄養上重要な役割を演じていると思われ、その役割を調べる必要がある。また、代謝に関しては、微生物による殺虫剤の解毒分解なども、殺虫剤の作用機構研究する上で重要な課題となろう。

病理学との関連においては、共生菌と、病原菌・寄生菌との違い、すなわち共に昆虫体内で繁殖する微生物でありながら、昆虫側から見た場合の有利性・不利性とは何か、その

て、菌に対する認識機構が宿主の側に存在するのかなどの問題がある。リケッチアのような細胞内寄生菌と共生微生物との相違的・類似点の解明も重要な示唆を与えると思われる。

また、昆虫媒介植物病原体と共生微生物との関連も重要な課題である。Nasu(1965)は稲萎縮病ウイルスが、ツマグロヨコバイの共生微生物と共に経卵伝搬されて次世代感染することを報告しており、ウイルス病に対する防除面からも、この点に関する基礎的な研究がまたれる。

近年、細胞内器官であるミトコンドリアに対する理解が深まり、真核生物にとってのミトコンドリアの重要性が増々認識されると共に、ミトコンドリアは共生細菌が進化適応したものであるという考え方が広く認められるようになって来た。このミトコンドリアの共生進化説においても、細胞内共生微生物の研究は、ミトコンドリアと一般細菌との missing link をうめる可能性があり、その方面の研究

が始まることが期待される。

応用的に害虫防除の面からは、共生微生物を殺すことにより昆虫の発育を阻害し、作物の被害を軽減することが考えられる (Krieg, 1971)。人畜に低毒な薬剤や物理的的刺激などにより共生微生物を殺すことができれば、新しい害虫防除法の生まれる可能性がある。今後、広い視野に立った広汎な、そしてより詳細な研究が必要とされるであろう。

謝辞

本研究遂行にあたり多くの方々に御助言、御援助を賜わり、ここに感謝の意を表します。斎藤哲夫教授、宮田正助手、中筋房夫助手（害虫学教室）、和田弘次郎助手（農薬化学教室）、鬼頭純三助手（医学部解剖学教室）、川瀬茂実教授、山下興亜助教授、甲斐英則助手（養蚕学教室）、鶴高重三教授（培養工学教室）、巖俊一教授（京都大学農学部）、寒川一成博士（農林省熱帯農業研究センター）、奈須北北博士（農林省農業技術研究所）の方々には、特に有益な御助言、御援助をいただきました。

また、本多八郎技官、長谷川牧子嬢を始めとする害虫学諸兄の暖かい励ましと御援助には心から感謝いたします。

要約

ヒメトビウンカ, Laodelphax striatellus の酵母様共生微生物を組織学的、生理・生化学的に研究し、その役割の一端を解明すると共に、ヒメトビウンカとその酵母様共生微生物との相利共生関係をしらべた。

ヒメトビウンカの脂肪体内の細胞 (mycetocyte) 内には、膜によって囲まれた酵母様共生微生物が生育していた。酵母様共生微生物は DNA を有し、出芽により増殖していた。Mycetocyte は他の脂肪体細胞とは生理的に異なり、微生物の住み場所としての特性を備えていると考えられた。酵母様共生微生物は雌の卵巣の epithelial plug から卵内に入り、次世代へと伝わった。酵母様共生微生物の数は、昆虫の発育に伴い増加し、雌成虫の産卵期前期あたりで最高となったが、雄成虫では羽化後減少し、昆虫の生理と密接に結びついて増殖していると考えられた。

ヒメトビウンカを高温下(35℃)で飼育すると酵母様共生微生物が崩壊したので、1令幼虫を3日間35℃下に置き、その後25℃下にもどして飼育した個体を用い、酵母様共生微生物の役割を究明した。高温処理したヒメトビウンカでは酵母様共生微生物の増加はあまりみられず、正常虫と比べて5令期には $1/20$ 以下の数であった。この高温処理虫では、主として成虫脱皮時に脱皮異常や脱皮不能が認められ、多くが死した。これは成虫クチクラ形成が正常におこなわれなかったためであった。そこで、脱皮ホルモンであるエクジステロンを処理したところ有意に羽化できる個体が出現し、成虫脱皮に関して、体内のエクダイソンの不足が上記現象の要因であったと考えられた。

次に、高温処理虫におけるエクダイソンの不足と酵母様共生微生物数の少ないこととの関連を究明するために、エクダイソンの前駆物質であり、昆虫には合成能力がないとされ

ているステロールを分析した。ヒメトビウンカの吸汁植物であるイネからは、カンペステロール、ステイグマステロール、 β -シトステロールが検出されたが、ヒメトビウンカの排泄物中にはコレステロールの他に、上記3種のうち β -シトステロールが主に検出され、ヒメトビウンカは維管束内を転流している β -シトステロールを、イネからのステロール源としていると考えられた。一方、虫体を分析したところ、幼虫・成虫を問わずコレステロールと24-メチレンコレステロールが主要なステロールであり、イネに由来すると思われる β -シトステロールも検出された。高温処理した5令幼虫では、24-メチレンコレステロールが極めて僅かしか検出されず、他昆虫との比較からも、24-メチレンコレステロールは酵母様共生微生物に由来すると考えられた。

高温処理5令幼虫はコレステロール含量も低かったので、コレステロールを与えて高温処理虫を飼育したところ、多くが成虫となっ

た。以上のことから、高温処理虫の成虫脱皮の異常・不能に関しては、酵母様共生微生物の減少により24-メチレンコレステロールの供給が少なくなり、体内コレステロール量の減少がエクダイソンの合成にまで影響を及ぼしていたためと推定された。上記のごとく、酵母様共生微生物はヒメトビウソカノステロール源として、栄養生理上の重要な役割を担っていた。

引用文献

(170)

- Abrahamson, L.P. and D.M. Norris (1969) Symbiotic interrelationship between microbes and ambrosia beetles. IV. Ambrosial fungi associated with *Xyloterinus politus*. J. Invertebr. Pathol. 14 : 381-385.
- Akey, D.H. and S.D. Beck (1972) Nutrition of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* : Requirements for trace metals, sulphur, and cholesterol. J. Insect Physiol. 18 : 1901-1914.
- Alfert, M. and I.I. Geschwind (1953) A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. Nat. Aca. Sci. 39 : 991-999.
- Baker, J.M. and D.M. Norris (1968) A complex of fungi mutualistically involved in the nutrition of the ambrosia beetle *Xyleborus ferrugineus*. J. Invertebr. Pathol. 11 : 246-250.
- Barbier, M., T. Reichsten, O. Schindler and E. Lederer (1959) Isolation of 24-methylene-cholesterol from honey bees (*Apis mellifica* L). Nature 184 : 732-733.
- Barbier, M. und O. Schindler (1959) Isolierung von 24-Methylencholesterin aus Königinnen and Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). Helv. Chim. Acta. 42 : 1998-2005.
- Bennett, H.S. and J.H. Luft (1959) s-Collidine as a basis for buffering fixatives. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 6 : 113-114.
- Bignell, D.E. (1977) Some observations on the distribution of gut flora in the american cockroach, *Periplaneta americana*. J. Invertebr. Pathol. 29 : 338-343.
- Bishop, G.H. (1958) Nuclear and cytoplasmic changes in fat body cells of the queen bee during metamorphosis. J. exp. Zool. 137 : 501-525.

- Bonhag, P.F. (1958) Ovarian structure and vitellogenesis in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 3 : 137-160.
- Brooks, M.A. (1963a) The microorganisms of healthy insects. In "*Insect Pathology, an Advanced Treatise I*" (ed. E.A. Steinhaus) pp. 215-250. Academic Press, New York.
- Brooks, M.A. (1963b) Symbiosis and aposymbiosis in arthropods. In "*Symbiotic Associations*" *Symp. Soc. gen. Microbiol.* 8. pp. 200-231. University Press, Cambridge.
- Brooks, M.A. (1975) Symbiosis and attenuation. *Ann. New York Acad. Sci.* 266 : 166-172.
- Brooks, M.A. and W.B. Kringen (1972) Polypeptides and proteins as growth factors for aposymbiotic *Blattella germanica* (L.). In "*Insect and Mite Nutrition*" (ed. J.G. Rodriguez) pp. 353-364. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Brooks, M.A. and A.G. Richards (1955) Intracellular symbiosis in cockroaches. I. Production of aposymbiotic cockroaches. *Biol. Bull.* 109 : 22-39.
- Buchner, P. (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience, New York.
- Bush, G.L. and G.B. Chapman (1961) Electron microscopy of symbiotic bacteria in developing oocytes of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Bacteriol.* 81 : 267-276.
- Casida, J.E., S.D. Beck and M.J. Cole (1957) Sterol metabolism in the american cockroach. *J. Biol. Chem.* 224 : 365-371.
- Chang, K.P. (1974) Effects of elevated temperature on the mycetome and symbiotes of the bed bug *Cimex lectularius* (Heteroptera). *J. Invertebr. Pathol.* 23 : 333-340.
- Chang, K.P. and A.J. Musgrave (1969) Histochemistry and ultrastructure of the mycetome and its 'symbiotes' in the pear

- psylla, *Psylla pyricola* Foerster (Homoptera) Tissue & Cell 1 : 597-606.
- Chang, K.P. and A.J. Musgrave (1973) Morphology, histochemistry, and ultrastructure of mycetome and its rickettsial symbiotes in *Cimex lectularius* L. Can. J. Microbiol. 19 : 1075-1081.
- Clayton, R.B. (1964) The utilization of sterols by insects. J. Lipid Res. 5 : 3-19.
- Clayton, R.B. and A.M. Edwards (1961) The essential cholesterol requirement of the roach *Eurycotis floridana*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 6 : 281-284.
- Coulter, H.D. (1967) Rapid and improved methods for embedding biological tissues in Epon 812 and Araldite 502. J. Ultrastruct. Res. 20 : 346-355.
- Dadd, R.H. and D.L. Krieger (1968) Dietary amino acid requirements of the aphid, *Myzus persicae*. J. Insect Physiol. 14 : 741-764.
- Dadd, R.H. and T.E. Mittler (1966) Permanent culture of an aphid on a totally synthetic diet. Experientia 22 : 832-835.
- Dwivedy, A.K. (1975) Dietary cholesterol requirements of housefly, *Musca domestica*, larvae. J. Insect Physiol. 21 : 1685-1690.
- Ehrhardt, P. (1966) Die Wirkung von Lysozyminjektionen auf Aphiden und deren Symbionten. Z. vergl. Physiol. 53 : 130-141.
- Ehrhardt, P. (1968) Nachweis einer durch symbiontische Microorganismen bewirkten Sterinsynthese in künstlich ernährten Aphiden (Homoptera, Rhynchota, Insecta). Experientia

24 : 82-83.

- Ehrhardt, P. and H. Schmutterer (1966) Die Wirkung verschiedener Antibiotica auf Entwicklung und Symbionten künstlich ernährter Bohnenblattläuse (*Aphis fabae* Scop.) Z. Morph. Ökol. Tiere 56 : 1-20.
- Foglesong, M.A., D.H. Walker, Jr., J.S. Puffer and A.J. Markovetz (1975) Ultrastructural morphology of some prokaryotic microorganisms associated with the hindgut of cockroaches. J. Bacteriol. 123 : 336-345.
- Folch, J., M. Lees and G.H.S. Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226 : 497-509.
- Forrest, J.M.S. and B.A. Knights (1972) Presence of pytosterols in the food of the aphid, *Myzus persicae*. J. Insect Physiol. 18 : 723-728.
- Fraenkel, G. and M. Blewett (1943) Intracellular symbionts of insects as a source of vitamins. Nature 152 : 506-507.
- Glaser, R.W. (1946) The intracellular bacteria of the cockroach in relation to symbiosis. J. Parasitol. 32 : 483-489.
- Griffiths, G.W. and S.D. Beck (1973) Intracellular symbiotes of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. J. Insect Physiol. 19 : 75-84.
- Griffiths, G.W. and S.D. Beck (1974) Effects of antibiotics on intracellular symbiotes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Cell Tiss. Res. 148 : 287-300.
- Griffiths, G.W. and S.D. Beck (1975) Ultrastructure of pea aphid mycetocytes : Evidence for symbiote secretion. Cell Tiss. Res. 159 : 351-367.
- Griffiths, G.W. and S.D. Beck (1977a) In vivo sterol biosynthesis

by pea aphid symbiotes as determined by digitonin and electron microscopic autoradiography. *Cell Tiss. Res.* 176 : 179-190.

Griffiths, G.W. and S.D. Beck (1977b) Effect of dietary cholesterol on the pattern of osmium deposition in the symbiote-containing cells of the pea aphid. *Cell Tiss. Res.* 176 : 191-203.

Hill, P., J.A. Campbell and I.A. Petrie (1976) *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycetes : A microbiological, physiological and behavioural study. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 194 : 501-525.

Hinde, R. (1971a) The control of the mycetome symbiotes of the aphids *Brevicoryne brassicae*, *Myzus persicae*, and *Macrosiphum rosae*. *J. Insect Physiol.* 17 : 1791-1800.

Hinde, R. (1971b) The fine structure of the mycetome symbiotes of the aphids *Brevicoryne brassicae*, *Myzus persicae*, and *Macrosiphum rosae*. *J. Insect Physiol.* 17 : 2035-2050.

平野千里 (1971) 昆虫と寄主植物 pp.81-119, 共立出版東京

Hou, R.F. and M.A. Brooks (1977) Effects of cholesterol on growth and development of the aster leafhopper, *Macrostelus fascifrons* (Stål) (Hemiptera : Deltocephalidae). *Appl. Ent. Zool.* 12 : 248-254.

Houk, E.J., G.W. Griffiths and S.D. Beck (1976) Lipid metabolism in the symbiotes of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54 B : 427-431.

Huger, A. (1956) Experimentelle Untersuchungen über die künstliche Symbiontenelimination bei Vorratsschädlingen : *Rhizopertha dominica* F. (Bostrychidae) und *Oryzaephilus surinamensis* L. (Cucujidae). *Z. Morph. Ökol. Tiere* 44 :

626-701.

- Ishizaki, H. (1965) Electron microscopic study of changes in the subcellular organization during metamorphosis of the fat-body cell of *Philosamia cynthia ricini* (Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* 11 : 845-855.
- King, R.C. (1960) Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. IX. Studies on the cytochemistry and ultrastructure of developing oocytes. *Growth* 24 : 265-323.
- Koch, A. (1960) Intracellular symbiosis in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 14 : 121-140.
- Körner, H.K. (1972) Elektronenmikroskopische Untersuchungen am embryonalen Mycetom der Kleinzikade *Euscelis plebejus* Fall. (Homoptera, Cicadina). I. Die Feinstruktur der α -Symbionten. *Z. Parasitenk.* 40 : 203-226.
- Krieg, A. (1971) Aposymbiosis, a possible method for anti-microbial control of arthropods. In "*Microbial Control of Insects and Mites*" (ed. H.D. Burges and N.W. Hussey) pp. 673-677. Academic Press Inc., London.
- Lanham, U.N. (1968) The blochmannbodies : Hereditary intracellular symbionts of insects. *Biol. Rev.* 43 : 269-286.
- Larsen, W.J. (1976) Cell remodeling in the fat body of an insect. *Tissue & Cell* 8 : 73-92.
- Lison, L. (1960) *Histochimie et Cytochimie Animales, Principes et Methodes.* Gauthier-Villars & Co., Paris.
- 今泉正訳 組織化学及び細胞化学 — 理論と方法
白水社.
- Malke, H. (1964) Production of aposymbiotic cockroaches by means of lysozyme. *Nature* 204 : 1223-1224.

- Martin, M.M. (1970) The biochemical basis of the fungus-attine ant symbiosis. *Science* 169 : 16-20.
- Mauldin, J.K. (1977) Cellulose catabolism and lipid synthesis by normally and abnormally faunated termites, *Reticulitermes flavipes*. *Insect Biochem.* 7 : 27-31.
- Millonig, G. (1961) Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Physics.* 32 : 1637.
- Mitsubishi, J. (1975) Cultivation of intracellular yeast-like organisms in the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallén (Hemiptera, Delphacidae). *Appl. Ent. Zool.* 10 : 243-245.
- Mitsubishi, J. and Y. Kono (1975) Intracellular microorganisms in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Hemiptera : Deltocephalidae). *Appl. Ent. Zool.* 10 : 1-9.
- 三橋 淳・小山 健二 (1972) ヒメトビウカの人工飼育, 特に1令幼虫の飼育条件の検討. *応動昆* 16 : 8-17.
- Mittler, T.E. (1971) Dietary amino acid requirements of the aphid *Myzus persicae* affected by antibiotic uptake. *J. Nutr.* 101 : 1023-1028.
- 奈須 壮兆 (1963) 稲ウイルス病を媒介するウカ・ヨコバイ類に関する研究. *九州農業試験場報告* 8 : 153-349.
- Nasu, S. (1965) Electron microscopic studies on transovarial passage of rice dwarf virus. *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* 9 : 225-237.
- 奈須 壮兆・末 永一 (1958) ウカ類の胚子発育について *九州農業試験場報告* 5 : 71-84.

- Nijhout, H.F. (1976) The rôle of ecdysone in pupation of *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. 22 : 453-463.
- Noda, H. (1974) Preliminary histological observation and population dynamics of intracellular yeast-like symbiotes in the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera : Delphacidae). Appl. Ent. Zool. 9 : 275-277.
- Noda, H. (1977) Histological and histochemical observation of intracellular yeastlike symbiotes in the fat body of the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera : Delphacidae). Appl. Ent. Zool. 12 : 134-141.
- Noda, H., K. Sōgawa and T. Saito (1973) Amino acids in honeydews of the rice planthoppers and leafhoppers (Homoptera : Delphacidae, Deltocephalidae). Appl. Ent. Zool. 8 : 191-197.
- Okasha, A.Y.K. (1964) Effects of high temperature in *Rhodnius prolixus* (Stål). Nature 204 : 1221-1222.
- Okasha, A.Y.K. (1968a) Effects of sub-lethal high temperature on an insect, *Rhodnius prolixus* (Stål). I. Introduction of delayed moulting and defects. J. exp. Biol. 48 : 455-463.
- Okasha, A.Y.K. (1968b) Effects of sub-lethal high temperature on an insect, *Rhodnius prolixus* (Stål). II. Mechanisms of cessation and delay of moulting. J. exp. Biol. 48 : 465-473.
- Okasha, A.Y.K. (1968c) Effects of sub-lethal high temperature on an insect, *Rhodnius prolixus* (Stål). III. Metabolic changes and their bearing on the cessation and delay of moulting. J. exp. Biol. 48 : 475-486.
- Pant, N.C. and K. Dang (1972) Physiology and elimination of

- intracellular symbiotes in some stored product beetles.
In "*Insect and Mite Nutrition*" (ed. J.G. Rodriguez)
pp. 311-322. North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Pant, N.C. and G. Fraenkel (1954) Studies on the symbiotic yeasts of two insect species, *Lasioderma serricornis* F. and *Stegobium paniceum* L. Biol. Bull. 107 : 420-432.
- Pant, N.C., P. Gupta and J.K. Nayar (1960) Physiology of intracellular symbiotes of *Stegobium paniceum* L. with special reference to amino acid requirements of host. *Experientia* 16 : 311-312.
- Patterson, G.W. (1971) The distribution of sterols in algae. *Lipids* 6 : 120-127.
- Pearincott, J.V. (1960) Changes in the lipid content during growth and metamorphosis of the house fly, *Musca domestica* Linnaeus. *J. cell comp. Physiol.* 55 : 167-174.
- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 208-213.
- Richards, A.G. and M.A. Brooks (1958) Internal symbiosis in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 3 : 37-56.
- Robbins, W.E., J.N. Kaplanis, J.A. Svoboda and M.J. Thompson (1971) Steroid metabolism in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 16 : 53-72.
- Saito, M., M. Yamazaki, M. Shimizu and N. Ikekawa (1963) Studies on the sterol of *Bombyx mori* L. *Agr. Biol. Chem.* 27 : 572-575.
- Sander, K. (1968) Entwicklungsphysiologische Untersuchungen am embryonalen Mycetom von *Euscelis plebejus* F. (Homoptera, Cicadina). I. Ausschaltung und abnorme Kombination einzelner

Komponenten des symbiontischen Systems. Develop. Biol.
17 : 16-38.

佐野豊 (1972) 組織学研究法 南山堂, 東京.

Schwemmler, W. (1973) Sprengung der Endosymbiose von *Euscelis plebejus* F. und Ernährung aposymbiontischer Tiere mit synthetischer Diät (Hemiptera, Cicadidae). Z. Morph. Tiere 74 : 297-322.

Schwemmler, W. (1974) Endosymbionts : Factors of egg pattern formation. J. Insect Physiol. 20 : 1467-1474.

寒川一成 (1970) トビイロウンカの吸汁習性に関する研究
第2報 甘露排泄からみた吸汁習性. 応動昆
14 : 134-139.

Srivastava, P.N. and J.L. Auclair (1971) An improved chemically defined diet for the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Ann ent. Soc. Amer. 64 : 474-478.

Srivastava, P.N. and J.L. Auclair (1976) Effects of antibiotics on feeding and development of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera : Aphididae). Can. J. Zool. 54 : 1025-1029.

Steinhaus, E.A. (1949) *Principles of Insect Pathology*.
McGraw-Hill Book Company, New York.

Svoboda, J.A., J.N. Kaplanis, W.E. Robbins and M.J. Thompson (1975) Recent developments in insect steroid metabolism. Ann. Rev. Entomol. 20 : 205-220.

津田恭介 (1971) ステロイド 医学・生物学のための有機化学5
朝倉書店, 東京.

和久義夫・住本憲一(1969)カイコの脂肪体細胞の変態:

光学および電子顕微鏡による細胞学的研究.

京都工繊大繊維学部報告 5: 256-287.

Watson, M.L. (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 4: 475-485.

Wigglesworth, V.B. (1952) Hormone balance and the control of metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). J. exp. Biol. 29: 620-631.

Wyllie, S.G. and C. Djerassi (1968) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXLVI. Mass spectrometric fragmentations typical of sterols with unsaturated side chains. J. Org. Chem. 33: 305-313.

Uichanco, L.B. (1924) Studies on the embryogeny and postnatal development of the Aphididae, with special reference to the history of the "symbiotic organ", or "mycetom". Philipp. J. Sci. 24: 143-247.

報文目錄

1. Noda, H. (1974)

Preliminary histological observation and population dynamics of intracellular yeast-like symbiotes in the smaller brown planthopper, Laodelphax striatellus (Homoptera : Delphacidae); Appl. Ent. Zool. 9 : 275-277.

2. Noda, H. (1977)

Histological and histochemical observation of intracellular yeastlike symbiotes in the fat body of the smaller brown planthopper, Laodelphax striatellus (Homoptera : Delphacidae). Appl. Ent. Zool. 12 : 134-141.