雑草ヒエを寄主とするヒエホソメイガ *Enosima leucotaeniella* の生態学的研究

X. 越冬幼虫の血液のトレハロース濃度および血液量の季節変化

後藤 三千代

山形大学農学部

Ecology of Barnyard Grass Stem Borer *Enosima leucotaeniella* (RAGONOT) (Lepidoptera: Pyralidae) X. Seasonal Changes in Trehalose Concentration and Volume of Haemolymph in Overwintering Larva. Michiyo GOTO (Faculty of Agriculture, Yamagata University, 1-23, Wakaba-cho, Tsuruoka, Yamagata 997, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **39**: 264-266 (1995)

Abstract: Haemolymph and whole-body trehalose contents in overwintering larvae of *Enosima leucotaeniella* were measured by gas-liquid chromatography. The volume of haemolymph (V μ l) was determined by the following relationship: $V = (T_2/T_1) \times 1,000$, where, T_1 is the haemolymph trehalose concentration (mg/ml) and T_2 is the whole-body trehalose content (mg). This estimate was comparable in accuracy with the 14 C-inulin-dilution method. During October to March 1993 and 1994, the trehalose concentration in haemolymph was controlled by ambient temperature. However, the volume of haemolymph barely changed (55% to 65%) during October to February, but decreased markedly in March. Physiological changes such as decreased body glycogen and increased glucose content were also noticed in March. Therefore, the decreased haemolymph volume may be one phenomenon in a series of physiological changes of overwintering larvae in the late post-diapausing stage.

Key words: *Enosima leucotaeniella*, haemolymph volume, trehalose concentration, overwintering larvae, seasonal change

糖類(糖アルコールを含む)は耐寒性物質として越冬昆虫において重要な役割を果たしている(SOMME, 1982)。前報より、ヒエホソメイガ *Enosima leucotaeniella* 越冬幼虫の体内には8種類の糖類が検出されたが、血液には主にトレハロースだけが認められ、虫体、および血液ともその含量は気温の低下とともに増加し、12月~1月にかけて9月の約3倍蓄積した(GOTO et al., 1993 a)。しかし、2月は低温にも関わらずそれらの含量は低下し、温度条件だけではトレハロース含量の季節変動を十分説明できなかった(GOTO et al., 1993 a, b)。

血液によって運ばれる虫体内の糖類の全含量を知るうえで、血液の糖濃度とともに血液量が必要である(LEE, 1961)。しかしながら、越冬期における昆虫の糖類含量に関する報告の多くは虫体内の糖類含量(TAKEHARA and ASAHINA, 1961; STOREY and STOREY, 1986)か、もしくは血液の糖類濃度(TSUTSUI et al., 1988)で論じられており、糖類含量が血液の糖類濃度と血液量の両者の関係より論じられている報告は見当たらない。その背景の1

つとして、血液量が簡易に測定できないことが考えられる。血液量を推定する方法の中で、 14 C-イヌリン希釈法(LEVENBOOK, 1958)がいくつかの昆虫で利用されている(LOUGHTON and TOBE, 1969)が、この方法の測定には一定の条件を備えた施設を必要とする。一方、幼虫体内のトレハロースが血液に特異的に存在すると仮定して一定量の血液および虫体に含まれるトレハロース含量を測定し、次式(1)にあてはめて推定する方法(堀江ら, 1971; 以下、堀江らのトレハロース定量法)：

$$V = (T_2/T_1) \times 1,000 \quad (1)$$

V ：幼虫の血液量(μ l), T_1 ：血液1 ml中のトレハロース含量(mg), T_2 ：幼虫個体の全トレハロース含量(mg), は精度的に 14 C-イヌリン希釈法に近いとされ(堀江ら, 1971), しかも特別の施設を必要とせず広い利用が期待される。しかし、堀江ら(1971)の方法ではトレハロース含量をグルコースオキシダーゼ法(PAPADOPOULAS and HESS, 1960)で分析していることにより、血液量が個体別に得られないこと、およびトレハロースをそれ以外の糖類と切り離して求められないことなどが課題として残されている。そこで本研究ではこれらの問題点を改善するために個体別にヒエホソメイガ越冬幼虫の血液および虫体のトレハロース含量をガスクロマトグラフィーで分析し、(1)式より血液量を求め(以下、ガスクロによるトレハロース定量法)、 14 C-イヌリン希釈法で得た結果と比較した。また、ヒエホソメイガ越冬幼虫の血液のトレハロース濃度および血液量の季節変化について検討した。

本文に入るに先立ち、本稿を校閲していただいた大日本蚕糸会蚕品種研究所 堀江保宏博士、放射性同位元素の操作を教示していただいた東北大学農学部 金濱耕基博士および大川 亘教官に厚くお礼申し上げる。

材料および方法

1. 供試材料 ヒエホソメイガ：1993年10月~1994年3月の毎月(10/10, 11/15, 12/15, 1/15, 2/19, 3/15) 野外より越冬幼虫(各8個体)を採集し、調査に供した。カイコ：1993年8月6日、桑の葉で飼育された5齢幼虫を実験に供した。

2. 幼虫の炭水化物含量の測定 以下に記す以外の糖類およびグリコーゲン含量の分析法は前報(GOTO et al., 1993 a)に準じた。なお、虫体のトレハロース含量は採取血液のトレハロース含量を加えた総量として示した。サンプルのエタノール抽出液(内部標準物質として0.01%のサッカロースを含む)の一定量を乾固し、その中へシリル化剤としてTMSI-H, TMSI-Bを各々16 μ lずつ加え、60°Cに加熱した水の中で40分反応させた後、その0.6 μ lをガスクロマトグラフィー(HITACHI G-5000, 3 mのガラスのパックドカラム)による分析に供した。

Table 1. Volume of haemolymph in overwintering larva of barnyard grass stem borer *Enosima leucotaeniella* and 5th instar larva of silkworm *Bombyx mori*

Method	Sample No.	Body weight (mg)	Haemolymph volume (μl)	Haemolymph weight per body weight (%)
¹⁴ C-carboxyl-inulin ¹⁾	<i>E. leucotaeniella</i>			
	1	25.3	12.7	54.2
	2	37.1	22.7	65.9
	3	31.3	14.5	49.9
	4	33.2	14.9	48.3
	5	29.1	13.4	50.0
	Mean±SE			53.7±3.2
Trehalose content ²⁾	<i>E. leucotaeniella</i>			
	1	23.6	13.9	63.6
	2	35.7	20.6	62.2
	3	36.5	19.0	56.1
	4	28.6	14.9	56.0
	5	28.8	17.5	65.7
	Mean±SE			60.7±2.0
Trehalose content	<i>B. mori</i>			
	1	1211.1	289.2	24.6
	2	1378.3	270.3	20.3
	3	1800.4	333.7	19.1
	4	1788.9	288.3	16.6
	5	2024.2	506.9	25.8
	Mean±SE			21.3±1.7

1) Dilution method using ¹⁴C-carboxyl-inulin.

2) Method measuring both trehalose concentration in haemolymph and total content of trehalose in larva assuming trehalose of larva specifically distributed in haemolymph.

3. 血液の比重 ミクログラスピベットで採取した血液 (5 μl) の重量を測定 (Mettler AT-250) し、比重 (mg/μl) を求めた。

4. ¹⁴C-イヌリン希釈法による血液量の測定 放射性同位元素による血液量の測定は堀江ら (1971) に準じて行なった。すなわち、1994 年 11 月 8 日、野外より採集したヒエホソメイガ越冬幼虫の生体重を個体別に測定後、生理食塩水に溶解した ¹⁴C-carboxyl inulin を 3×10⁵ Bq/4μl/頭ずつ、頭部より体腔内に微量注射器で注射した。1 時間後に尾部より血液 4 μl をミクログラスピベットで採取し、10 ml のシンチレーター (トルエン 800 ml, 2-メトキシエタノール 200 ml, OMNIFLUOR 4 mg) に混合した後、液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-903 型) によって放射活性を測定し、LEVENBOOK (1958) の計算式により血液量を求めた。また、同一日に野外より採集した越冬幼虫の血液量をガスクロによるトレハロース定量法により求め、比較した。

結果および考察

1. ¹⁴C-イヌリン希釈法とトレハロース定量法による血液量の比較

¹⁴C-イヌリン希釈法とガスクロによるトレハロース定量法によりヒエホソメイガ越冬幼虫の血液量を個体別に求めたところ、

Fig. 1. Seasonal changes in carbohydrate content and haemolymph volume in overwintering larva of *Enosima leucotaeniella* from October to March 1993 and 1994. Each value is the mean (±SE) of 8 replicate samples. A: Carbohydrate content in body (mg/g); trehalose (●), glycogen (◇), polyols and sugars except trehalose (◆), and trehalose concentration in haemolymph (mg/ml) (○). B: Haemolymph volume (μl) (◆), and percentage (%) of haemolymph per body by weight (○).

ろ、それぞれ 12.7~22.7 μl, 13.9~20.6 μl の範囲にあった (Table 1)。また、血液 5 μl 当たりの血液重 (mg) を測定し、血液 1 μl 当たりの重量 (mg) を算出した結果、ヒエホソメイガの比重 (mg/μl) は 1.078±0.001 (平均値±S.E., N=20) で、これより虫体重に占める血液重の割合は、¹⁴C-イヌリン希釈法では 48.3~65.9%、ガスクロによるトレハロース定量法では 56.0~65.7% で、両者に有意差は認められなかった。また、堀江ら (1971) の結果と比較するためにガスクロによるトレハロース定量法により 5 齢期のカイコの血液量を求めたところ、270.3~506.9 μl の範囲にあった (Table 1)。また、5 μl 当たりの血液重 (mg) より血液 1 μl 当たりの重量 (mg) を求め比重 (mg/μl) を算出したところ、1.033±0.001 (平均値±S.E., N=10) で、これより虫体重に占める血液重の割合は 16~25% で、堀江ら (1971) が ¹⁴C-イヌリン法で得た 21~27%、並びにトレハロース定量法で得た 19~23% のほぼ範囲内といえる。このことから、ガスクロによるトレハロース定量法は個体別に血液量を求めることができること、また、従来の方では他の糖類を多く含んでいる場合に精度の低下が懸念されるが、本方法はトレハロースの値だ

けを取り出すことができる点で、改善されたといえる。

2. 炭水化物含量および血液量の時期別推移

ヒエホソメイガ越冬幼虫体内のトレハロース含量 (mg/g) は 10 月から 12 月にかけて上昇し、2 月までピーク値を維持したが、3 月には著しく減少した (Fig. 1-A)。一方、血液のトレハロース濃度 (mg/ml) は 10 月より 12 月にかけて有意 (1% 水準) に上昇したが、その後は 3 月まで有意差は認められず、ほぼ同水準を維持した。10 月～12 月にかけて野外の平均気温は 13.7°C から 4.5°C へと一途に低下したが、12 月～3 月においては 1.4～4.5°C の範囲にあった。従って、血液のトレハロース濃度は前報の温度反応 (Goto et al., 1993 b) と一致した傾向を示し、野外気温によってほぼ説明される。

一方、ガスクロによるトレハロース定量法により求めたヒエホソメイガ越冬幼虫の血液量 (V) の各月の平均値は、10 月～2 月にかけて 18.7～20.9 μ l の範囲にあったが、3 月には 9.6 μ l となり、他の月に比べて有意 (1% 水準) に低い値を示した (Fig. 1-B)。虫体重 (mg) に占める血液重 (mg) の割合は 10 月～2 月にかけて 55～65% と時期に関係なくほぼ一定値を示したが、3 月には 38% と著しく低下した (Fig. 1-B)。3 月にはまたそれ以前まで認められていたトレハロース含量とグリコーゲン含量の間での双変換の関係が消失し、トレハロース含量と共にグリコーゲン含量の著しい低下が認められた (Fig. 1-A)。さらに、2 月まで低く推移していたグルコース含量が 3 月において大幅に上昇 (Fig. 1-A) するなど、3 月において越冬幼虫は 2 月以前の時期とは異なる様々な生理的性質を示したが、血液量の著しい低下もこれら一連の生理的性質の変化の 1 つとして現われた特異的な

現象と考えられる。こうした越冬幼虫の生理的性質の変化は 1992 年～1993 年の場合、2 月に現われており (Goto et al., 1993 a), 時期および低下の程度など年により変動がみられるが、いずれも休眠覚醒以降 (後藤ら, 1991) の越冬幼虫で認められた。今後この時期における生理的諸性質の野外データの一層の蓄積とその変動機構の解明が重要である。

引用文献

- 後藤三千代・納谷伸一・木村秀一 (1991) 応動昆 **35**: 291-295.
GOTO, M., K. TAKAHASHI and C. SUZUKI (1993 a) *Appl. Entomol. Zool.* **28**: 417-421.
GOTO, M., K. TAKAHASHI and C. SUZUKI (1993 b) *Appl. Entomol. Zool.* **28**: 433-437.
堀江保宏・井口民夫・渡辺喜二郎・柳川弘明 (1971) 日蚕雑 **40**: 330-334.
LEE, R.M. (1961) *J. Ins. Physiol.* **6**: 36-51.
LEVENBOOK, L. (1958) *J. Cell. Comp. Physiol.* **52**: 329-339.
LOUGHTON, B.G. and S.S. TOBE (1969) *Can. J. Zool.* **47**: 1333-1336.
PAPADOPOULAS, N.M. and W.C. HESS (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **88**: 167-171.
SOMME, L. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* **73**: 519-543.
STOREY, J.M. and K.B. STOREY (1986) *J. Insect Physiol.* **32**: 549-556.
TAKEHARA, I. and E. ASAHINA (1961) *Low Temp. Sci. Ser. B.* **19**: 29-36.
TSUTSUI, H., Y. HIRAI, K. HONMA, K. TANNO, K. SHIMADA and S.F. SAKAGAMI (1988) *Appl. Entomol. Zool.* **23**: 52-57.