アカイエカ類の糖類摂食性試験の一手段¹⁾

渡辺 護 上村 清 久保田憲太郎

富山県衛生研究所 (富山市大手町 1-15)

(受領: 1972年11月22日)

A simplified method for the analysis of various sugars
fed the mosquito, *Culex pipiens* s.l.

Mamoru WATANABE, Kiyoshi KAMIMURA and Kentaro KUBOTA

Institute of Hygiene and Medical Microbiology,

1-15, Otemachi, Toyama 930

蚊は吸血だけでは寿命を維持することは困難で、ほとんどのものは花蜜などを摂食している (原田ら, 1971など)。しかし、これら吸血性昆虫の野外における吸血と吸蜜のサイクル、越冬時における栄養生殖分離と吸蜜の関係など不明な点が多い。このような生態を観察するためには、蚊1個体ずつの糖類分析が望ましく、しかも摂食の有無、摂取した糖種の判定が微量で短時間に多数個体処理できることが要求される。

そこで筆者らは多数個体を1個体ずつ、同時に分析するために、ペーパークロマトグラフィ法を用い、とくに従来のエタノール抽出法の簡易化のために蚊の直接附着法を試み、アカイエカ類における糖飛来選択性と実際の摂食との関係などを実験し、2, 3の知見を得たので報告する。

実験材料と方法

1) 供試昆虫

アカイエカ *Culex pipiens pallens*: 1970年秋に富山市水橋で採集し、累代飼育中のもの。

チカイエカ *Culex pipiens molestus* 川崎系: 大阪府立大学昆虫学教室より分与され、累代飼育中のもの。

2) 供試糖類

フルクトース, グルコース, シュクロース, マルトース, ラクトース, ラフィノース各市販特級試薬

3) 選択試験法

20 cm 角ケージに雌25個体, 雄25個体の蛹を入れ, 羽

化後2日間絶食の後、雌雄の選択飛来性を観察した。すなわち、水と糖、A糖とB糖というように2種類を対にして、脱脂綿の入った容器 (内径 27 mm, 深さ 17 mm) 6個に10 mlの水もしくは5%糖溶液を1つおきに入れ、ケージ中央に放置し1, 2, 3時間後の各容器への飛来数を観察した。飛来全数を100とし、2種類の飛来率をその選択性とした。

4) 摂食試験法

選択試験終了後ただちに全個体を吸虫管で回収し、低温麻醉もしくは凍結死させた。これらの個体を以下に示すペーパークロマトグラフィ法で糖類摂食の有無、種類を分析し、それぞれの摂食率を求めた。

5) ペーパークロマトグラフィ法

i) 試料の調製: 上記の麻醉摂食蚊を1個体ずつ直接クロマトグラフィ用濾紙上に並べ、柄付針で嚙嚢および中腸を2~3回突き刺し、腹内摂食物を濾紙に移し取り、展開を行なった (以下直接法と略記する)。一方、比較のために Lewis and Domoney (1966) などによって行なわれた吸蜜個体の嚙嚢や中腸をエタノールの入った乳鉢にとりだし、磨砕後遠心分離を行ない、上澄液を風乾濃縮後2~4 μ l 展開する (以下抽出法と略記する) 方法も行なった。

ii) 展開方法: 東洋濾紙 No. 51 A, 40×40 cm を使用。下端4 cmの位置に2 cmおきに20個体、一度に8枚160個体を処理した (実際には5%のスタンダード糖を2~4種各濾紙ごとに展開するので蚊は140個体ほどになる)。展開液は *n*-ブタノール: 氷酢酸: 水 = 4: 1: 2, または *n*-ブタノール: ピリジン: 水 = 6: 4: 3 を

¹⁾ 本報文の概要は第23回日本衛生動物学会大会 (1972年4月, 岡山市) で発表した。

用いた。展開槽 (33×50×50 cm) で室温下 (20~25°C) 14~16時間の展開を行なった。

iii) 発色法：発色にはベンチジン法を用いた。

なお、それぞれの糖は同時に展開したスタンダード糖の位置より同定した。

結果と考察

1. 展開試料作製方法のクロマトグラフィの比較検討 抽出法、直接法の各5%糖溶液を吸蜜させた時の検出

結果を表1に示す。両方ともに吸蜜量が多ければ、明瞭に摂食糖を分析判定できた。しかし、抽出法では蚊の吸蜜量が少なくなれば、資料の濃縮に最低2時間を要した。しかも、乳鉢またはホモジナイザーは蚊1個体に1個必要で、一度に多くの個体を観察するにはきわめて困難と考えられる。

一方直接法は蚊体内の吸蜜量が少量でも、濾紙に移し取ることができれば、スポットが小さく、発色反応が薄くなるが、定性分析は確実に行なうことができた。し

表1 アカイエカ吸蜜個体に対する抽出法と直接法のペーパークロマトグラフィの比較
判定規準は糖量として卅0.07 mg 以上, 卅0.05 mg, 卅0.02 mg, ±0.01 mg 以下。シュクロースはこれの約1.5倍量の発色状態を目安とする。1回に♂25個体, ♀25個体, 2~3時間給飼の4回のくりかえし実験。

糖の種類 (5%水溶液)	抽 出 法 ¹⁾				直 接 法			
	満腹摂食 ²⁾		半分摂食 ³⁾		満腹摂食 ²⁾		半分摂食 ³⁾	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
フルクトース	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅
グルコース	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅
シュクロース	+	卅	±	+	卅	卅	+	卅
マルトース	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅
ラクトース	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
ラフィノース	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅

¹⁾ Lewis and Domoney (1966) による。

²⁾ ♂は体重の約1倍, ♀は約1.3倍量摂食。

³⁾ 満腹摂食時の約半分。

表2 アカイエカ類の水と糖との選択率および摂食率
1回に♂25個体, ♀25個体, 2~3時間給飼の4~8回のくりかえし。

蚊の種類	試験組合せ	雌					雄				
		選 択 率 (%)		摂 食 率 (%)			選 択 率 (%)		摂 食 率 (%)		
		糖	水	糖	水 ¹⁾	未摂食 ²⁾	糖	水	糖	水 ¹⁾	未摂食 ²⁾
アカイエカ	水とフルクトース	90.1	9.9	55.0	0.0	45.0	83.7	16.3	47.4	0.0	52.6
	グルコース	94.8	5.2	35.9	0.0	64.1	84.0	16.0	86.4	0.0	13.6
	シュクロース	96.8	3.2	68.6	0.0	31.4	85.5	14.5	76.6	0.0	23.4
	マルトース	92.6	7.4	92.6	0.0	7.4	83.4	16.6	94.5	0.0	5.5
	ラクトース	68.8	31.2	23.6	0.0	76.4	90.5	9.5	28.2	0.0	71.8
	平 均	89.5	10.5	55.1	0.0	44.9	85.4	14.6	66.6	0.0	33.4
チカイエカ	水とフルクトース	76.5	23.5	83.2	0.0	16.8	47.7	52.3	78.8	0.0	21.2
	グルコース	68.9	31.1	72.9	1.0	26.1	36.0	64.0	63.0	0.0	37.0
	シュクロース	92.9	7.1	72.0	0.0	28.0	64.9	35.1	97.6	0.0	2.4
	マルトース	97.8	2.2	69.1	0.0	30.9	71.4	28.6	79.6	0.0	20.4
	ラクトース	65.3	34.7	52.9	0.0	47.1	50.0	50.0	47.9	2.1	50.0
	平 均	80.3	19.7	76.8	0.2	23.0	54.0	46.0	73.4	0.4	26.2

¹⁾ 水摂食は濾紙に摂食物を移し取ることができても糖反応がなかった個体を示す。

²⁾ 未摂食は濾紙になにも移し取ることができなかったものを示す。

表 3 アカイエカの各糖選択率および摂食率
1 回に♂25個体, ♀25個体, 2~3 時間給飼の 4~8 回くりかえし。

試 験 組 合 せ A 糖 対 B 糖	選 択 率 (%)		摂 食 率 (%)			
	A 糖	B 糖	A 糖	B 糖	A+B 糖	未 摂 食
フルクトースとグルコース	46.1	53.9	34.2	38.0	19.0	8.8
シュクロース	45.5	54.5	38.8	37.0	14.5	9.7
マルトース	62.1	37.9	36.5	35.4	20.1	8.0
平 均	51.2	48.8	36.5	36.8	17.9	8.8
グルコースとフルクトース	53.9	46.1	38.2	34.2	19.0	8.8
シュクロース	30.6	69.4	44.4	41.2	10.0	4.4
マルトース	38.4	61.6	39.6	40.5	9.7	10.2
平 均	41.0	59.0	40.7	38.6	12.9	7.8
シュクロースとフルクトース	54.5	45.5	37.0	38.8	14.5	9.7
グルコース	69.4	30.6	41.2	44.4	10.0	4.4
マルトース	54.3	45.7	40.0	29.3	23.0	7.7
平 均	59.4	40.6	39.4	37.5	15.8	7.3
マルトースとフルクトース	37.9	62.1	35.4	36.5	20.1	8.0
グルコース	61.6	38.4	40.5	39.6	9.7	10.2
シュクロース	45.7	54.3	29.3	40.0	23.0	7.7
平 均	48.3	51.7	35.1	38.7	17.6	8.6
ラク トースとフルクトース	19.1	80.9	5.0	51.4	30.7	12.9
グルコース	20.5	79.5	3.7	59.1	24.3	12.9
シュクロース	12.7	87.3	4.4	62.2	20.0	13.4
マルトース	15.2	84.8	4.0	64.0	18.0	14.0
平 均	16.9	83.1	4.3	59.2	23.3	13.2

たがって、直接法は抽出法よりも短時間に多数の個体を処理でき、分析成績が優れると考えられる。以上の結果より、摂食実験はすべて直接法で行なった。今後吸蜜行動実験や野外における吸蜜生態調査に応用できるものと考えられる。なお、糖分析には糖量として最低0.02 mg*あれば明確に分析判定できたが、アカイエカの吸蜜量は雄約1.00~1.70 mg, 雌 3.00~4.50 mg であった。したがって微量検出の難しいシュクロースの場合、とくに摂食量の少ない雄においては見落す可能性もあると思われる。

2. 飛来選択性と摂食性の関係

水と糖との選択飛来試験はアカイエカの平均糖選択率が雌89.5%, 雄85.4%に対し、チカイエカ雌80.3%, 雄54%で、チカイエカよりもアカイエカの選択率が高かった。また、雄よりも雌の選択率が高い(表2)。一方、そ

の時の実際の 腹内摂食率をみると、アカイエカ雌平均55.1%, 雄66.6%に対し、チカイエカ雌76.8%, 雄73.4%とむしろチカイエカに摂食率が高く、雌雄間の差はあまりない。なお、アカイエカに未摂食個体が多いのは食餌生理や習性によるものと思われるが、今後検討する必要がある。

2 糖間における各糖の平均選択率を表3, 表4に示す。アカイエカではフルクトース51%, グルコース41%, シュクロース59%, マルトース48%, ラクトース17%でラク トースが極端に嫌われ、他はシュクロースにわずかに高い程度で、平均的に飛来している。チカイエカにおいても同様な傾向を示し、フルクトース47%, グルコース48%, シュクロース52%, マルトース53%, ラクトース15%で、ラク トースを除いて平均的に選択されている。また、アカイエカ、チカイエカともに雌雄差は認められなかった。

摂食試験においても、ラク トースを除いて、各糖平均

* スタンダード糖の展開, および実験的に各濃度糖液を吸蜜させた蚊の観察による。

表 4 チカイエカの各糖選択率および摂食率
1 回に各 25 個体, ♀ 25 個体, 2 ~ 3 時間給飼の 4 ~ 8 回くりかえし.

試 験 組 合 せ A 糖 対 B 糖	選 択 率 (%)		摂 食 率 (%)			
	A 糖	B 糖	A 糖	B 糖	A+B 糖	未 摂 食
フルクトースとグルコース	46.2	53.8	23.7	36.5	27.4	12.4
シュクロース	48.6	51.4	27.7	36.8	26.8	8.7
マルトース	47.6	52.4	26.0	41.3	26.0	6.7
平 均	47.4	52.6	25.8	38.2	26.7	9.3
グルコースとフルクトース	53.8	46.2	36.5	23.7	27.4	12.4
シュクロース	40.1	59.9	32.4	35.6	27.4	4.6
マルトース	50.0	50.0	52.0	24.3	16.7	7.0
平 均	48.0	52.0	40.0	27.9	23.7	8.4
シュクロースとフルクトース	51.4	48.6	36.8	27.7	26.8	8.7
グルコース	59.9	40.1	35.6	32.4	27.4	4.6
マルトース	44.4	55.6	40.0	26.4	24.1	9.5
平 均	51.9	48.1	37.5	28.8	26.1	7.6
マルトースとフルクトース	52.4	47.6	41.3	26.0	26.0	6.7
グルコース	50.0	50.0	24.3	52.0	16.7	7.0
シュクロース	55.6	44.4	26.4	40.0	24.1	9.5
平 均	52.7	47.3	30.7	39.3	22.3	7.7
ラク ト ースとフルクトース	18.9	81.1	5.0	70.5	14.5	10.0
グルコース	17.5	82.5	6.3	65.0	14.7	14.2
シュクロース	4.6	95.4	5.8	60.4	24.7	9.1
マルトース	19.4	80.6	5.0	66.0	18.5	10.5
平 均	15.1	84.9	5.5	65.5	18.1	10.9

して摂食されており, 飛来選択性の影響を強く受けていると思われた. しかし, 供試した糖を 2 種類とも吸蜜している個体がアカイエカで最低 9.7%, 最高 30.7%, 平均 17.5%, チカイエカで最低 14.5%, 最高 27.4%, 平均 23.4% 観察された. これらの個体がどちらの糖を好んで摂食するかは問題で, その結果によって摂食性が異なってくる. たとえば, ラクトースと対の糖とでは, ラクトースだけを吸蜜している個体がきわめて少ない点などから考え, 両糖摂食個体は最初ラクトースを摂食したが, なんらかの理由でラクトースが忌避され, 対の糖に移行したように思われる. このような点などから両糖摂食個体もラクトースを好んで摂食したのではなく, むしろ対の糖を好んで摂食したものと判断される. ところが, 他の糖種間においては選択性の結果を考慮しても, 両糖とも摂食した個体が, ほんとうはどちらの糖を好んで摂食したか, またはどちらでもよかったのかは本法では判断できない. 今後は味覚受容器の閾値と飛来選択性, 摂食

性の関係などを観察する必要があると思われる.

3. 糖の分解と蚊の生存日数

蚊体内に摂食された糖は嚙嚢や中腸に貯えられるが, それらは吸蜜後 3 時間目から分解, 吸収が始まると思われる. すなわち, 吸蜜直後の蚊を用いた直接法糖分析の結果では, 単糖類のフルクトース, グルコースは吸蜜後 4 時間目から減少しはじめ, 8 時間目には検出が不能になった. 2 糖類のシュクロース, マルトースは 3 時間目から一部分解が始まる. 4 時間目には大部分の個体において分解がみられ, シュクロースはフルクトース, グルコース, シュクロースの位置に, マルトースはグルコースとマルトースの位置に発色が認められ, 摂食糖類の判定は困難になる. これらの結果から, 選択試験は糖投与後 3 時間目までが適当であり, ただちに低温麻酔を行ない, 摂食糖類の分析を行なった. なお, 選択飛来試験における経時的飛来数は羽化後 2 日間絶食させることにより, 糖投与後 2, 3 時間目にピークがみられ, 3 時間目

までに全体の70~80%の個体が吸蜜を終了した。

各種5%糖溶液を毎日与えたときのアカイエカ雌の50%生存日数は、水で7日、ラクトースで8日であった。他の4種類では25日を経過しても79~83%生存することが観察された。Galun and Fraenkel (1957) によればネッタイシマカ *Aedes aegypti* 雌の50%生存日数はフルクトース33日、グルコース27日、シュクロース32日、マルトース26日、ラクトース7.3日、グルコース還元糖のソルビトール15日、水5.5~8日で著者らの観察とはほぼ一致した。このように、各糖の蚊の生存日数に与える影響は、ラクトース*を除いてはあまり差がないように思われ、エネルギー源としてほぼ同等の働きをするものと考えられる。

ま と め

蚊体内の摂食糖類を検出する一方法として、供試虫体を直接ペーパークロマトグラフィー用濾紙上に並べ、柄付針で腹部を突き刺して腹内摂食糖類を濾紙へ移しとり、そのまま展開する簡便法（直接法）を試みた。その結果、Lewis and Domoney (1966), Lall (1970) などの抽出法、すなわち“磨砕—風乾濃縮—展開”の方法よりも、短時間に1個体ずつ、多数を一度に効率よく検出判定ができた。この方法は野外などでの吸蜜生態調査にも広く応用できると思われるが、吸蜜糖種を明確にする必要がなければ、Van Handel (1972) のフルクトースを検出する、呈色反応による吸蜜有無の判定方法も広く利用できると考えられる。

この直接法を用いて、アカイエカとチカイエカの糖類摂食性を観察したところ、水と各糖種間における選択飛来では、チカイエカよりもアカイエカのほうが高率（雌89.5, 雄85.4%）を示したが、そのときの実際の摂食状況をみるとチカイエカのほうがよく糖を摂食していた。各糖種間では、ラクトースだけが選択飛来率、摂食率、生存日数ともに極端に低率を示した。他のフルクトース、グルコース、シュクロース、マルトース間では共に有意差は認められなかった。また、糖類は摂食後3時間目から分解されはじめ、4時間目には、2糖類の分解が顕著にみとめられた。さらに8時間目には糖の検出が不能になり、体内消化吸收の可能性が考えられた。

本研究のご援助を計って下さった当研究所松田宗之次長、児玉博英博士、大浦敏氏などに深謝する。

文 献

- Galun, R. and G. Fraenkel (1957) : Physiological effects of carbohydrates in the nutrition of a mosquito, *Aedes aegypti* and two flies, *Sarcophaga bullata* and *Musca domestica*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **50** : 1-23.
- 原田文雄, 森谷清樹, 矢部辰雄 (1971) : 花蜜によるイエカ属成虫の飼育実験. 衛生動物, **22**(1) : 18-23.
- Lall, S. B. (1970) : Carbohydrate meals of haematophagous tabanids (Diptera). *J. Med. Ent.*, **7** (1) : 127-130.
- Lewis, D. J. and C. R. Domoney (1966) : Sugar meals in Phlebotominae and Sumuliidae (Diptera). *Proc. R. Ent. Soc. Lond.*, (A), **40**(10-12) : 175-179.
- Van Handel, E. (1972) : The detection of nectar in mosquitoes. *Mosquito News*, **32**(3) : 458.

Summary

A simplified technique was devised for the analysis of various sugars in adult mosquitoes. The sugar meal in the diverticulum of mosquitoes was applied directly on a filter (Toyo No. 51 A) and the ordinary one-dimensional paper-partition chromatography was carried out with standard sugar solutions. The results obtained by this simplified method were as accurate as that obtained by the previously reported and more complicated ones, by homogenizing the samples, concentrating it and developing on the filter paper. Moreover, the procedure is very simple and many samples can be tested within a short period of time, and thus it can probably be used to the field experiments.

Employing this procedure, sugar preference tests were carried out with *Culex pipiens pallens* and *C. p. molestus*. Lactose was least preferred among the sugars examined and there was no significant difference in preference among fructose, glucose, sucrose and maltose. It was also observed that the hydrolysis of sugars began 3 hours after the intake. Detection of disaccharide became almost impossible 4 hours after the intake and sugars disappeared after 8 hours indicating the complete digestion and absorption of these sugars.

* 選択, 摂食試験や Galun and Fraenkel (1957) の結果からラクトースはよく吸蜜されない恐れがある。また, 吸蜜されてもラクトースを分解する酵素をもっていない点も考慮する必要がある。