樹洞性オオモリハマダラカ *Anopheles omorii* の累代飼育法

荒 川 良 中 村 正 聡 上 村 清
富山医科薬科大学医学部寄生虫学教室 (〒930-01 富山市杉谷 2630)

(受領: 1988年1月20日)

Laboratory colonization of *Anopheles omorii* (Diptera :
Culicidae : Anophelinae)

Ryo ARAKAWA, Masatoshi NAKAMURA and Kiyoshi KAMIMURA

*Laboratory of Parasitology, Faculty of Medicine, Toyama Medical
and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan*

Key words: *Anopheles omorii*, tree hole *Anopheles*, laboratory colonization, larval development.

はじめに

日本で唯一の樹洞性ハマダラカであるオオモリハマダラカ *Anopheles omorii* Sakakibara は静岡県で初めて記録され (Sakakibara, 1959), 以後京都, 富山両県の限られた地域でしか生息が確認されていない (佐々ら, 1976). 北米に分布する本種に近縁の *An. barberi* Coquillett が三日熱マラリアの媒介能を有していると報告されている (Stratman-Thomas and Baker, 1936) ことから, 本種のマラリア媒介能の有無の確認を試みることにした. そのためには, まず, 本種を大量に増殖するための累代飼育法の確立が必要である. そこで, 富山県立山美女平のブナ *Fagus crenata* Blume 樹洞から, 1986年10月に本種幼虫を採集し, 室内で飼育羽化させた. この成虫をもとに累代飼育を試みた結果, 本種を容易に飼育する方法を確立できた. 本論文では, その飼育法と飼育の過程で明らかとなった本種のいくつかの生物学的特性について報告する.

材料と方法

1. 原 材 料

1986年10月14日, 富山県立山美女平 (標高 980 m) のブナの樹洞 (高さ 2.5 m, 幅 12×35 cm, 水深約 18 cm)

より採集した十数頭のオオモリハマダラカ 1~2 齢幼虫.

2. 第 1 代飼育法

上記幼虫を樹洞内の水, 落葉とともに持ち帰り, 幼虫用飼育室 (24±1 °C, 60 % RH, 14時間照明) で, 500 ml のポリプロピレン製ビーカーに入れ, 飼育を行った. 餌としては市販のベビーフード (雪印ベビーフード; レバー野菜フレーク, 40 g, 8袋入り) を与えた. 蛹化は11月初めから徐々に始まったので, 蛹を随時ペローペットで吸い上げ, 別の同様のビーカーに脱イオン水とともにいれ, 30 cm 立方のナイロン製布網ケージに入れた. このケージは成虫用飼育室 (24±1 °C, 70 % RH, 15時間照明—薄暮薄明の調光をそれぞれ1時間ずつ含む) に入れた. 成虫には餌として三角コルベン内に 3 % 砂糖水を入れ, それに脱脂綿を浸して与えた. 12月中旬から1週間に1回マウスを吸血のため入れた. 最初の産卵は翌1987年1月7日に認められた.

3. 発 育 実 験

オオモリハマダラカの卵, 幼虫, 蛹の発育期間を調べるため, 濾紙上に産下された第7代の卵を柄付き針で別の水に浸した濾紙に移した. 濾紙は 1, 5, 10 卵のものそれぞれ 6 枚, 50 卵のもの 2 枚で, それぞれ内径 9 cm, 高さ 6 cm の透明プラスチックカップの壁面に付着さ

せ、深さ2 cm ほど脱イオン水を入れた。さらに同数卵を入れた容器の半数については飼育水にかななくず（市販のマウス、ラット飼育用の乾熱滅菌したスギ材やモミ材からなる）を水の体積とほぼ等しくなる程度、すなわち、かななくずがちょうど水面下にくる位置までの量を入れた。蛹については幼虫飼育容器内のかなくずの有無にかかわらず、同一蛹化日ごとに500 ml のビーカーに脱イオン水とともに入れ、羽化まで布網ケージの中に置いた。以上の実験はすべて前述の幼虫飼育室で行った。観察は原則として1日に1回行い各齢の個体数を記録し、供試した幼虫すべてが蛹化するか死亡するまで続けた。

これとは別に、かななくずの有効性を比較するために、第12代の卵を用いて、四つの異なった飼育環境で実験を試みた。卵の産下された濾紙は1枚あたり50卵ずつになるように実体顕微鏡下で切断して4枚選びだし、それぞれを前述と同じプラスチック容器に入れた。そして一つの容器には脱イオン水のみ、一つには脱イオン水と、水量と同量のかなくずを入れた。さらに、かななくずからの滲出物および幼虫の休息場所を提供し、かななくずそのものとは接触できないようにするため、水量の半量ほどのかななくずをナイロンゴース（0.3 mm メッシュ）の袋に入れ、袋の口を熱シールして投入した容器を一つ用意した。最後の容器は、休息場所のみを与える目的で前述と同じナイロンゴースを2 cm 角に切って20枚投入した。そして水面が全容器とも同じ高さにくるように調整したうえで（脱イオン水の場合、水量ほぼ150 ml）、前述の粉末の餌を与えて飼育を行った。観察は先の実験と同様に1日に1回行い、1齢で明白な発育の停止を示した個体を除いて残りの全個体が蛹化するまで続けた。

4. 成虫の交尾に関する実験

羽化後、雌が交尾可能になるまでの期間を知るため、1988年5月27日に羽化した第10代成虫を、羽化後12時間以内に雌雄を分離して雌を30 cm 立方のケージに入れた。また、同年4月上旬から5月20日までに羽化した同世代の雄約100頭を、別の30 cm 立方のケージに入れた。そして雌を毎日5頭ずつ取り出して雄のケージに1昼夜入れ、その後、解剖して受精嚢内の精子の有無を確認した。

一方、羽化後、雄が交尾可能になるまでの期間についても同様に、まず同年5月28日に羽化し、分離した雌を30 cm 立方のケージに入れ、また、1週間後の6月4日に羽化した雄約50頭も別のケージに入れ、そして、毎日雌を5頭取り出し、雄のケージに1昼夜入れ、その後解剖し、受精嚢内の精子の有無を確認した。

また、成虫の交尾可能な空間の広さを知るため、30×20×20 cm、10×10×10 cm の布網ケージ、直径3 cm、高さ10 cm の円筒形プラスチックチューブ、直径1 cm、長さ15 cm の試験管を用いて、それぞれの中に、羽化後1週間以上経過した未交尾の雌雄を5日間入れて、交尾の有無を調べた。容器内に入れた個体数は、30×20×20 cm のケージが雄30頭、雌10頭、10×10×10 cm のケージおよびプラスチックチューブが雄10頭、雌3頭、試験管が、雌雄各1頭ずつと、雄3頭、雌1頭の2とおりで、30×20×20 cmのケージの実験は1回、他はそれぞれ2回繰り返した。なお、実験に用いたプラスチックチューブと試験管には内壁面に濾紙を全面に貼り付けた。また成虫の餌としてケージ内には前述と同様に砂糖水の入った三角コルベンを入れ、プラスチックチューブと試験管には砂糖水を浸らせた脱脂綿を入れて、ナイロンゴースで蓋をした。

結 果

1. 累代飼育法

以下の要領でオオモリハマダラカの累代飼育を行うことができた。

1) 吸血・採卵

蛹の羽化が始まってから約3週間経過すると、ケージ内の雌雄の個体数がともに100頭を越え、雌の交尾率も50%を越えたので、吸血源として金網で固定したマウスを入れた。マウスは午後1～4時の間に入れ、翌朝9時ごろ取り出すようにした。雌はマウスを入れるとただちに吸血に来る個体もみられたが、消灯前よりも翌朝の点灯後のほうが吸血個体が増しているの、夜間のみとか昼間のみに吸血するのではないことがわかった。また、ケージ内に入れたヒトの手からも好んで吸血することが観察された。吸血はその後1～2週間に1回の間隔で行われた。採卵には内径9 cm、高さ6 cm の透明プラスチックカップを用い、2 cm ほどの深さまで脱イオン水を入れ、内壁全域に濾紙を貼り付けた（Fig. 1）。この容器をケージ内に午後に入れて翌朝回収した。産卵はもっぱら夜間に行われ、消灯前に産卵した個体の観察では、雌は濾紙上に静止し、尾端を濾紙の水面との接点に置き、ほぼ横一列に産卵した。

2) 幼虫飼育法

卵が産下されると、カップをケージから取り出し、プラスチックの蓋をして幼虫飼育室に移した。卵の孵化が確認されると、餌として粉末ベビーフード（レバー野菜）と乾燥酵母をほぼ等量混合させ、乳鉢ですりつぶしたものを以後原則として1日に1回与えた。予備実験の結果幼虫の発育は容器内にかなくずを入れると好適で

Fig. 1 Egg deposition device for *An. omorii*.

Pieces of filter paper are attached on the inner wall of a plastic cup (9 cm inner diameter, 6 cm height) which was one-third filled with deionized water. Eggs are deposited on the filter paper just above the surface of water.

Fig. 2 The larvae of *An. omorii* in a plastic cup with shavings.

あることがわかったので、水の体積とほぼ等しくなるくらい、すなわち、かんなくずがちょうど水面下にくる位置までの量のかんなくずを入れた (Fig. 2). 幼虫の飼育は産卵日ごとに分けてこの容器で全個体が蛹になるまで続けた。

3) 蛹の羽化法

上記容器内に蛹が生じるとベローピペットで蛹を吸い上げ、深さ約 4 cm まで脱イオン水を入れた 500ml のビーカーに移して布網式のケージに入れ、成虫飼育室で次期世代として飼育を続けた。餌としては三角コルペン内の 3% 砂糖水に脱脂綿を浸して与えた。成虫が交尾する時間帯については詳細には調べていないが、照明が減光状態にはいる 1 時間前ごろや、点灯 2 時間後ごろに交尾を行っている個体が観察された。雄のスウォームのような行動はケージ内では認められず、雌がケージの壁から離れて飛翔すると付近で静止していたり飛翔していた数頭の雄が飛びかかっていく行動はたびたび観察された。

が、これからさらに交尾にいたるかどうかはまだ観察されていない。

継代は 1988 年 6 月現在 15 代に達した。

2. 発育実験

幼虫の各齢期の発育期間を求める実験ではかんなくずを入れた場合の 50 卵区、かんなくずを入れない場合の 10 卵区と 50 卵区では 1 齢幼虫のままで長期間それ以上の発育を行わない個体がみられた。全個体の 1 齢期を比較すると 10 日以下の個体での最大値は 6.5 日、10 日以上かかった場合の最小値は 16 日と 10 日以上の開きがあったので、この 16 日以上を要した個体については発育遅延個体として発育期間を求める集計からは除外することにした。かんなくずを入れない場合の 50 卵区では 1 齢に引き続き 2 齢でも長期間それ以上の発育を行わない個体もみられた。3・4 齢でのこのような発育の停止は観察されなかった。

各密度区での孵化幼虫数と発育の遅延がみられた幼虫の個体数を Table 1 に示した。実験では供試卵数より孵化個体数がかかなり少なくなったが、これは産卵された濾紙から別の濾紙へ移したことによる損傷や不受精卵の存在、肉眼では確認できない 1 齢初期の死亡などによると思われる。かんなくずを入れた場合の 50 卵区では 4 頭 (15.4%) の個体が発育を停止した。これらはいずれも 1 齢の期間が 127~131 日と長く、蛹化までは孵化後 136~143 日であったが、蛹はすべて 4 日間で羽化した。一方、かんなくずを入れない場合は、10 卵区から発育を停止する個体がみられ、10 卵区でのこれらの個体は最小 30.5 日、最大 72 日で蛹化した。かんなくずを入れない 50 卵区では 82.8% の個体が発育の停止を示し、うち 19 頭は 24~144 日の範囲で蛹化し、5 頭は 1 齢のまま 100 日以上経過した後死亡した。

次に発育の停止を示さなかった幼虫の発育期間を Table 2 に示した。卵期と蛹期についてはかんなくずの有無での比較を行わなかったため Table 2 には示さなかったが、それぞれ 3.0 ± 0.1 日と 3.1 ± 0.1 日 (平均値 $\pm 95\%$ C.L.) であった。幼虫については、複数個体飼育の場合、個体識別を行うことは不可能なので各齢の期間についてはその齢の個体の日ごとの累積数を個体数で除して求めた。全幼虫期間については幼虫の孵化時期が同一飼育容器内では同じだったので各個体ごとの期間を求めることが可能であった。その結果、かんなくずを入れた場合、各齢期ともかんなくずを入れない場合よりも発育期間が短く、全幼虫期間はかんなくずを入れた場合 12.55 ± 0.56 日、入れない場合 14.86 ± 0.69 日で両者の間には統計的に有意差があった (t 検定, $p < 0.05$)。

飼育水にかんなくずのみを入れて餌を与えなかった場

合の、幼虫の死亡したときの齢と孵化してから死亡するまでの期間を Table 3 に示した。幼虫 25 頭のうち、蛹まで発育したものはなかったが、いずれの個体も短期間

で死亡することではなく、半数以上の個体は 2 齢以上まで発育を続けた。しかし、餌を与えて正常に発育した個体の発育期間 (Table 2) と比較すると、各齢期間とも多く

Table 1 Enhancement of larval development in *An. omorii* reared in the culture medium containing shavings of trees.

No. of eggs	No. of larvae pupated	No. of larvae showing delayed development (%)
With shavings		
1	1	0 (0)
1	1	0 (0)
1	0	— —
5	3	0 (0)
5	5	0 (0)
5	3	0 (0)
10	7	0 (0)
10	6	0 (0)
10	0	— —
50	26	4 (15.4)
Without shavings		
1	1	0 (0)
1	1	0 (0)
1	0	— —
5	3	0 (0)
5	4	0 (0)
5	0	— —
10	6	3 (50)
10	5	2 (40)
10	7	2 (28.6)
50	29	24 (82.8)

Table 2 Developmental period (days) of larvae of *An. omorii* with and without shavings of trees in the plastic cup containing deionized water for rearing.

	Larval instar				Total (mean $\pm$ 95% C.L.)
	1st	2nd	3rd	4th	
With shavings	3.6	1.8	2.3	4.8	12.55 $\pm$ 0.56
Without shavings	4.1	2.6	2.5	5.2	14.86 $\pm$ 0.69

The period was calculated for the larvae which showed normal development.

Table 3 Survival of the larvae of *An. omorii* which were reared without food in the cup containing deionized water and shavings of trees.

	Instar of larvae died at			
	1st	2nd	3rd	4th
No. of individuals (%)	6 (24)	14 (56)	1 (4)	4 (16)
No. of days survived after hatch	53-82	30-66	102	25-57

Table 4 Developmental period of larvae and the rate of the larvae showing delayed development under different rearing condition.

Materials in the cup containing deionized water and food	No. of larvae pupated*	Developmental period in days*** (mean $\pm$ 95% C.L.)
None	27 (13**)	19.21 $\pm$ 1.38
Small pieces of nylon gauze	38 (10)	17.68 $\pm$ 0.70
Shavings enclosed in nylon gauze bag	35 (2)	16.90 $\pm$ 1.10
Bare shavings	43 (1)	15.95 $\pm$ 0.86

* Fifty larvae were used in each experiment.

** Number of larvae showed delayed development.

*** The period was calculated except for that of the larvae showing delayed development.

Table 5 Relationship between successful mating and age of adults in *An. omorii*.

Days after emergence of female	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rate of successful mating (%)*	0	0	0	0	0	0	20	0	20	40	30	40
Days after emergence of male	1	2	3	4	5							
Rate of successful mating (%)*	0	0	0	20	40							

Upper: Five females were released in a cage containing about 100 males of 7-30 days old.

Lower: Five females of more than 1 week old were released in a cage containing about 50 males which emerged on the same day.

* Mating was confirmed by dissecting spermathecae after 1 day of female release.

の日数がかかった。

このかんなくずの有効性を確かめるために行った実験の結果を Table 4 に示した。各カップとも卵は 50 卵入れたが最終的に蛹化した個体数は飼育水の場合 54 % と最も低く、かんなくずを入れた場合は 86 % と高かった。肉眼での幼虫の死亡は確認されず、濾紙に付着した卵を検鏡しても未孵化卵はほとんど観察されなかった。幼虫は肉眼での観察が困難な 1 齢初期に死亡したものである。幼虫が 1 齢のまま発育を停止した個体数の割合も、飼育水の場合 48.1 % と高く、ナイロンメッシュの場合で 26.3 %、袋入りかんなくずとかんなくずの場合それぞれ 5.7 % と 2.3 % で低い値であった。同様に幼虫の発育期間も飼育水のみとナイロンメッシュの場合はかんなくずを与えた場合よりも有意に長かった (t 検定, $p < 0.05$) が、袋入りかんなくずとかんなくずを与えた場合の間には有意差はなかった (t 検定, $p > 0.05$)。

3. 成虫の交尾

羽化後、雌雄が交尾可能になる期間を求めた実験結果を Table 5 に示した。雄の日齢を 7 日から 30 日にして、羽化直後から雌を毎日雄のケージに 1 昼夜いれると、羽化後 7 日目から雌の交尾済み個体が得られた。一方、逆に同一羽化日の雄の入ったケージに羽化後 1 週間以上経過した雌を入れると、雄の羽化後 3 日目から雌の

交尾済み個体が得られた。

ケージの大きさを変えて交尾の可能性を調べた実験では、20×20×30 cm のケージでは雌の全個体が交尾していたが、10 cm 立方のケージでは 2 回の繰返しで 1 個体のみ交尾、それ以外の容器では交尾済み個体は得られなかった。

考 察

オオモリハマダラカの累代飼育が成功した要因は、本種成虫が 30 cm 立方のケージ内で交尾が可能であったことと、幼虫の飼育水にかんなくずを入れることで容易に大量に幼虫の飼育ができたことにあると思われる。本種に近縁の *An. barberi* は 0.3 m³ のケージで自然交配が可能であったと報告されている (Copeland, 1987)。本種の場合 0.001 m³ の大きさでも交尾可能で、著者らが累代飼育に用いているケージの大きさは 0.027 m³ であり、*An. barberi* に比べて非常に小さい空間でも交尾が可能であった。また成虫の飼育室では薄暮薄明状態をつくり出す調光を行ったが、照明のコントロールをまったく行っていない通常の研究室内に成虫を入れたケージを置いても交尾が確認できたので、薄暮薄明条件は必ずしも交尾に必要なではない。一方、雌は羽化後 1 週間以上経過しないと交尾を受け入れないこともわかった。分布密度が低いと思われる本種が、このように長い雌の前交

尾期間を必要とすることは予想外であったが、実際、野外での本種成虫の生活の実態はまったくわかっておらず、雌雄の交尾がいつどのように行われるのか興味もたれる。

ハマダラカ類の飼育には水面上にわらなどの浮遊物において、幼虫尾端の接触場所を与えることが好適であるとしてよく行われている。本種の場合、当初はそういった物をいっさい使用せずに飼育を行ったが、幼虫の発育成績が好ましくないで、樹洞性ということもあって試しにかんなくずを入れたのが好結果をもたらした。しかも、かんなくずをナイロンゴースの袋に入れて飼育水に投入しても、かんなくずを直接入れた場合に比較して、発育期間は少し延びたが、統計的には有意でなく、発育遅延個体の出現も大差なかった (Table 4)。ナイロンゴースのみを入れた場合は発育が延長し、発育停止個体も多く現われたことから、かんなくずはたんに休息場所として有効であることにはならない。さらに餌を抜いてかんなくずのみを与えた飼育実験の結果からも、このかんなくずの植物質やなんらかの滲出成分が幼虫の発育に好影響を与えていることが示唆された。自然界でも本種幼虫が樹洞からしか採集されていない理由の一つとして、樹木の材からの滲出成分や落葉などの植物質が発育上有効に働くためと推察される。

これまで示してきたように、飼育条件が好ましくない場合、本種幼虫は1齢で発育を停止し、ときには2齢でも発育を停止する個体が現われた。これらの個体はそのまま死亡するようなことはなく、発育の早い個体が蛹化すると漸次発育を再開していった。長いものでは幼虫期が4カ月を越えた (この間、蒸発のための水量減少に対する脱イオン水の補充はときどき行ったが、水の入れ替え等はいっさい行わなかった)。野外における本種幼虫の採集数は1・2齢が圧倒的に多く (Sakakibara, 1960; 著者らの美女平での観察)、この理由は野外でも若齢幼虫期での発育停止が起こっている可能性が考えられ、この発育停止を引き起こす要因については今後さらに研究を続けていく所存である。

なお、この累代系統については今後オオモリハマダラカ富山86系 (TY-86 strain of *An. omorii*) と称することにしたい。

まとめ

1986年10月富山県立山美女平のブナ樹洞で日本特産で唯一の樹洞性ハマダラカであるオオモリハマダラカ *Anopheles omorii* 幼虫を採集し、これをもとに室内で飼育を続けた結果、継代に成功した。飼育は卵と幼虫は $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% RH, 14時間照明の飼育室で、蛹と成虫

は $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% RH, 15時間照明 (1時間の薄暮薄明調光を含む) の飼育室で行った。本種成虫は30 cm 立方の布網ケージ内で自然交配し、雌成虫には金網で固定したマウスを吸血源として用いた。卵は、内径9 cm, 高さ6 cm のプラスチックカップの壁面に濾紙を敷き詰め、深さ2 cm ほど水を入れたものをケージ内に入れると、吸血後4日目から濾紙と水面の境界部に産みつけられた。幼虫の飼育はこの採卵用の容器で引き続き行い、卵が孵化すると容器内の水量と同体積のかんなくずを入れた。餌としては粉末ベビーフードと乾燥酵母を同量乳鉢ですりつぶしたものを与えた。卵期は平均3.0日、幼虫期は平均12.55日、蛹期は平均3.1日であった。かんなくずを幼虫飼育水に入れない場合は、幼虫期は平均14.86日と有意に延長し、また1, 2齢で1カ月以上発育を停止する個体が多くみられるなどの悪影響が現われた。1988年6月現在継代は15代に達した。

本研究を進めるにあたってご指導、ご助言を賜った富山医科薬科大学前学長佐々学先生に厚くお礼もうしあげる。蚊の飼育には竹端恵子、松永知美、細江佐知子の3女史に多大な援助をいただいたので感謝の意を表する。

引用文献

- Copeland, R. S. (1987): Establishment of a free-mating colony of *Anopheles barberi* with notes on developmental rates. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 3: 502-503.
- Sakakibara, M. (1959): On *Anopheles (Anopheles) omorii* n. sp. *Endem. Dis. Bull. Nagasaki*, 1: 288-295.
- Sakakibara, M. (1960): On the seasonal distributions of the larvae of *Anopheles (A.) omorii* and nine other mosquito species found in a tree hole. *Endem. Dis. Bull. Nagasaki*, 2: 236-242.
- 佐々学, 栗原毅, 上村清 (1976): 蚊の科学, 312 pp., 図鑑の北隆館, 東京.
- Stratman-Thomas, W. K. and F. C. Baker (1936): *Anopheles barberi* Coquillett, as a vector of *Plasmodium vivax* Grassi and Feletti. *Am. J. Hyg.*, 24: 182-183.

Summary

A colony of *Anopheles omorii*, which is a tree-hole breeder and is distributed in limited areas in Japan, was newly established in the laboratory. Eggs and larvae were reared in an insectary at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and 60% RH. Pupae and adults were kept in another insectary at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and 70% RH with a day-length of 17:7 (L:D). The

first and the last 1 hr of the daytime were simulated to dawn and dusk controlling with automatic gradual increase and decrease of voltages. Adults were kept in a nylon mesh cage of 30 cm cube with a piece of cotton soaked with a 3 % sugar solution. They easily mated in this cage. A mouse, restrained in a wire net, was provided once every 1 or 2 weeks for a blood meal. Eggs were deposited on filter papers attached to the inner wall of a plastic cup (6 cm height, 9 cm diameter) containing deionized water

2 cm in depth. When the larvae hatched, shavings of cedar or fir were put into the cup to prepare good conditions for larval development in the same volume as the water in the cup. As food for the larvae, powdered food (liver and vegetables) and dried yeast were supplied once a day. The developmental period from egg to adult emergence was about 17 days under these conditions. Fifteen generations of the mosquito have been successfully maintained after 1 and half years in the laboratory.