

節足動物は危険な匂いを避けるか

～ ダンゴムシを用いた対照実験 ～

石井友樹 後藤拓磨 塩島健吾

要旨

節足動物の多くは感染症等を恐れてか仲間の死骸の匂いを忌避するという。この匂いを用い、環境に与える害の少ない虫除けや農薬を作ることが将来的にはできるかもしれない。そこで、ダンゴムシを用いて、条件を変えながら他個体の死骸の匂いに対してどのような反応を見せるか観察実験を行なった。ダンゴムシの死骸への反応は個体差がかなり大きかったもののダンゴムシが死骸に関心を示すことが示唆された。

1. はじめに

ゴキブリやアリ、イモムシ、シロアリ、ワラジムシ、ダンゴムシ等の生物は、ゴキブリの死骸を潰して得られる体液を忌避する傾向があり、昆虫に分類されないワラジムシ目もこの体液に含まれる成分を放出するようだ (Rollo, 2009)。しかし、これについては未だ十分な研究がなされておらず、日常生活への展用にもほど遠いと言える。本実験では、安定した捕集が容易であるという観点からオカダンゴムシ(以下ダンゴムシとする)を採用し、様々な条件下でダンゴムシの他個体の死骸への行動的反応を観察することにした。

2. 材料・研究方法

2-1. 研究試料

表 1 研究試料

実験	器具			誘引または忌避する試料			
	T 字路		飼育 ケース	死骸		スルメ	その他
	I	II		a	b		
1	○	○	×	○	×	×	○
2	×	×	○	○	×	○	×
3	×	×	○	×	○	×	×

上の表 1 に実験 1～3 の概要を示す。

死骸 a は生きたダンゴムシをすりつぶしたものを、死骸 b は乾燥させたダンゴムシとダンゴムシを水に沈めた後に一日土の上に放置したものをそれぞれ指す。また「その他」とはすりつぶしたトマトとローズマリーのことである。

実験 1 では 2 種類の T 字路 (I, II) を (図 1, 図 2)、実験 2, 3 ではともに縦 10×横 15×高さ 10 (cm) でプラスチック製の飼育ケースを使用した。T 字路 I (縦 11.5 cm×横 25 cm×幅 3 cm) の出発地点には円形のスペース(半径 2.5 cm)を作り、ダンゴムシがしばらくそこを動き回ったのち路に入っていくようにした(図 1)。T 字路 II は T 字路(縦 7.5cm 横 13.5 幅 1.5 cm)の二股の先が再び二股(左右ともに 13 cm)に分かれている(図 2)。また T 字路 II についても I と同様に出発地点に円形のスペース(同サイズ)を作った。T 字路 I, II ともに厚紙で作った壁の高さは 1.5cm とした。T 字路 I, II は乾燥後匂いを発さないみずのりで厚紙をはり合わせて作った。

実験 3 で使用するダンゴムシは空腹になるように前日から空の容器に入れておいた。

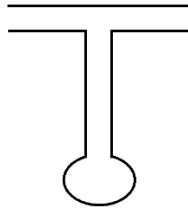


図 1 T 字路 I

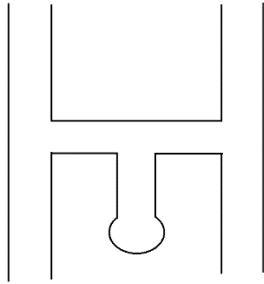


図 2 T 字路 II

2-2. 研究方法

飼育ケースや T 字路に試料の匂いがしみこまないように試料はアルミ箔の下に敷いた。

実験 1 ではトマト、ローズマリーについて各 10 回、死骸について 50 回の観察を行った。T 字路の出発地点にダンゴムシを入れて、ダンゴムシが T 字路の左右どちらに進んだか、また試料に対してどのような反応を示したかを観察した。

実験 2 と 3 では、下の表 2 のように試料の種類と設置場所を変えながら行動観察を行った。ダンゴムシは試料の設置と同時に入れた。

表 2 実験 2, 3 の条件

実験	試料	試料の位置	観察時間 [min]	観察回数
2	死骸	中央	8	1
	スルメ	中央	5	1
	なし	中央	5	1
3	腐敗	中央	3	2
	乾燥	中央	3	2
	乾燥*	中央	3	2

腐敗	端	3	1
乾燥	端	7	1
乾燥*	端	3	1

腐敗と示している試料は水死させた後、数日間土の上に置いて腐敗を進行させた試料である。このような試料を用意したのは、死骸が発する匂いが時間経過とともに強くなる、あるいは変化するため(田中, 2015)、このような変化がダンゴムシの行動に影響を与えるかもしれないと考えたからである。乾燥と示している試料は乾燥した飼育容器内で数日間放置して死んだ個体の死骸である。乾燥*は乾燥した死骸に水を含ませた試料である。

3. 結果

下の表 3 に実験 1 の観察結果を示す。

表3 試料へのダンゴムシの反応の観察結果

試料	死骸	トマト	ローズマリー
実験 1	△	×	×

△はダンゴムシが試料に近づいたり離れたりしたが一定の反応が認められなかったこと、×は試料がない実験と差が認められなかったことを表す。

実験 1 ではどの試料を使用した場合にも T 字路の右に行くダンゴムシと左に行くダンゴムシの数に差は見られなかった。また、トマトやローズマリーに寄って行ったり、遭遇した際に引き返したりするような反応を示した個体はいなかった。しかし、死骸への反応は個体によってかなりの差異が見られた。反応を示さない個体、死骸を避けるような動きを見せる個体、死骸にのぼりだす個体もいた。

実験 2 では、ダンゴムシは飼料の種類、有無に関わらず試料のある中央に寄って行くことがなく、観察時間中にケースの端に集まっているのがほとんどであった。

実験 3 で腐敗死骸を試料に用いた場合、試料を中央に置いた際には、ダンゴムシは試料への反応を示さず、ケースの端に沿って一方向に回り続

けた。試料を端に置いた際には、ダンゴムシはケースの端に沿って移動し、最初の遭遇では触覚で確かめるような行動を見せたが、すぐ離れ、その後は通り過ぎるだけで反応を示さなかった。

乾燥した死骸の場合、試料を中央に置いた際にも端に置いた際にも、試料に対する反応は観察できなかった。死骸に水を含ませた場合でも同様の結果が見られた。

4. 考察

実験 1 ではダンゴムシはトマトやローズマリーに対して反応を示さなかったが、死骸には個体ごとに差異はあったものの何らかの反応を示すものが多かったことから、死骸に対して何らかの関心を持っていると考えられる。

飼育ケースを用いた実験 2 で行った試料なしの観察から、ダンゴムシは飼育ケースの端に滞在することを好むことが示唆される。このことから、試料がある場合でもダンゴムシがケースの端に集まっていたのは、中央の試料を忌避したためではないと考えられる。

実験 1 と 2 では、個体の内的な状態(空腹状態等)を考慮せずに実験を行った。しかし、実験 1 で個体ごとに死骸への反応が大きく異なることや、実験 2 で、ダンゴムシの好物であるスルメを試料に用いた際にも、ダンゴムシが反応を示さなかったのは、これらの実験の結果に個体の状態が影響したためと考えられる。つまり、空腹な個体であれば、死骸に引き寄せられる可能性がある。

ところが、続いて行った実験 3 では空腹状態の個体のみを用いたが、死体を食べたり食べようとしていたりする個体は見られなかったので、少なくとも同種の死体に誘引効果はないと考えられる。

したがって、ダンゴムシは同種他個体の死骸を食べたり積極的に近づいたりすることはないが、反対に積極的に忌避するかどうかは、ダンゴムシが端を好むという性質のために、本実験では確かめることができなかった。

また、実験 3 において腐敗の進行の程度の違いによる反応の違いが確認できなかったことからダンゴムシは死骸に付随する微生物や、それらの分解作用が働く過程で発せられる臭いには、あまり影響を受けないと考えられる。

5. まとめと今後の課題

ダンゴムシが他個体の死骸になんらかの関心を持っていると考える。ただ得られた結果からはそれが誘惑によるものではないが、恐怖による忌避を示すものなのかははっきりしなかった。この点について今後の研究で明らかにする必要がある。さらに蚊や青虫等についても同様に実験を進めることにより、死の匂いを利用した虫除けや農薬が実現するかもしれない。また今回の実験では同種他個体の死骸に対する反応しか調べておらず、今後異種間ではどのような反応が見られるのか調べる必要がある。死の匂いは不飽和脂肪酸によるものであるという研究結果(Roll, 2009)もあるため、不飽和脂肪酸を用いて実験するのも有効かもしれない。

6. 参考文献

- David Roll 2009『Evolutionary Biology』
<https://wired.jp/2009/09/14/%e3%81%a9%e3%81%ae%e8%99%ab%e3%81%ab%e3%82%82%e5%bc%b7%e5%8a%9b%e3%81%aa%e5%8a%b9%e6%9e%9c%ef%bc%9a%e4%b8%87%e8%83%bd%e9%98%b2%e8%99%ab%e5%89%a4%e3%81%af%e3%80%8c%e6%ad%bb%e3%81%ae%e5%8c%82%e3%81%84/>, 2019.3.16
- 田中翔之助 2015, 8, 22 死体にウジ虫が湧くように見える理由と孤独死部屋の対処方法, [mhttps://last-cleaning.com/body-maggot-1681](https://last-cleaning.com/body-maggot-1681), 2019.3.16

納豆で水中ゴミを集めよう！

～ Let's collect the garbage in the water with NATTO!～

今西美結 栗田青依 小山七々子 山本果歩

要旨

本研究は、環境問題となっているゴミのポイ捨てに焦点をあてた。特に水中に漂うゴミを凝集したいと考えた。さらに環境になるべく負荷の少ない方法で行うために納豆菌がつくるポリグルタミン酸を用いて、効率の良い水質浄化方法を研究した。ゴミの種類によって効果は異なったが、我々の方法では、生物学的なゴミが凝集されやすいという結果が得られた。

1. はじめに

先行研究より納豆菌を利用した水質浄化システムがあることを知り、さらに調べると納豆菌がつくるポリグルタミン酸(以下 PGA)が水質浄化作用を持つことがわかった(株式会社エム・アール・オー, 2019)。

PGA は納豆の糸の成分で、凝集力に優れている。この PGA は γ -ポリグルタミン酸という直鎖状の高分子化合物で、多数のグルタミン酸がペプチド結合でつながっており、この構造が納豆の“ねばねば”を生み出している。このときふつう、一般のタンパク質では同じ不斉炭素原子についた アミノ基とカルボキシ基 (α 位)の間でペプチド結合しているのに対し、納豆の γ -ポリグルタミン酸では図 1 のようにアミノ基が γ -位のカルボキシ基とペプチド結合している。また、グルタミン酸として通常の L 型のみではなく、D 型のものも含んでいる点で、非常にユニークな物質である。

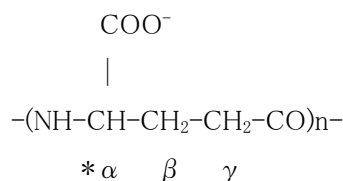


図 1. 納豆の γ -ポリグルタミン酸の構造式

*が不斉炭素 (α 位)

(柿井, 2016)

本研究では、以下の三種類の実験を行い、PGA 抽出方法と凝集力、および凝集するゴミの種類について検討した。

PGA を効率良く得る条件を調べるため、抽出方法を変えることで抽出できる PGA の量に違いが出るのかを調べるため実験 1 を行った。その結果、攪拌回数を増やす方法で最も多く PGA を抽出できた。

実験 2 では、以降の実験で使用する水質浄化に適した PGA の粉末を決定するため、実験 1 で得た 3 種 PGA の凝集力の違いを調べた。すりつぶすことで納豆の粘度が増し、藻をくっつけやすくなるのではないかと考えて実験を行ったところ、攪拌回数を増やした PGA の粉末が最も素早く藻を凝集し、沈殿した。この結果から、実験 3 では、この方法で抽出した PGA 粉末を使用した。

実験 3 では、様々なゴミと PGA の凝集の相性を調べた。PGA は生物学的な成分なので化学物質は凝集できないのではないかと考えて、実験を行ったが、PGA による凝集沈殿効果は確認できなかった。

2. 材料・研究方法

2-1. 研究材料

実験 1

納豆, 水, エタノール(99%), ビーカー100 mL,

ガラス棒、シャーレ、乳鉢、乳棒、ガーゼ

実験 2

藻、水、ビーカー、ガラス棒、実験 1 で精製した PGA 粉末

実験 3

ペットボトル、校庭の砂、家庭菜園用の培養土、紙、水、ビーカー、ガラス棒、実験 1(2)で精製した PGA 粉末

2-2. 研究方法

実験 1, 納豆からの PGA の抽出

下記の 3 つの方法で実験を行った。

- (1) 納豆 20 g をビーカーに入れ、ガラス棒で 50 回かき混ぜ、さらに水 30 mL を加えて、さらに 50 回混ぜた。混ぜたものをガーゼでこしながら絞った。絞ったものにエタノール 30 mL を加えて、白い塊が出なくなるまでエタノールを追加したのち、抽出した白い塊を自然乾燥させ、完全に乾いたものを乳鉢と乳棒で粉末状にした(府立大手前高校, 2014)。
- (2) (1)の最初の工程の納豆をビーカーに入れた後にかき混ぜる回数を 600 回に増やした。
- (3) (1)の最初の工程の納豆を乳棒ですり潰しながらかき混ぜ、ペースト状にした。

実験 2, 水質浄化に適した PGA の検討

本校の生物実験室の水槽から採取した藻 1.0 g と水 60 mL をビーカーに入れて混ぜたものを 3 セット用意し、実験 1 で精製した 3 種類の PGA 粉末をそれぞれ 0.25 g ずつ加えて観察した。

実験 3, 様々なゴミと PGA の相性の比較

- ① ペットボトルを 0.5 mm 角程度に切って、ゴミにみたてたもの
- ② ふるいにかけた校庭の砂
- ③ ふるいにかけた家庭菜園用の培養土

- ④ シュレッダーにかけられた紙をさらに細かく切ってゴミに見立てたもの

これらの 4 つのゴミをそれぞれ 1.0 g ずつと水 60 mL をビーカーに入れてかき混ぜた。その 4 種類のビーカーに、実験 2 の(2)で生成した粉 0.25 g 加えて観察した。

3. 結果

納豆からの PGA 抽出(実験 1)の結果の概要を下の表 1 に示す。

表 1 生成した粉の重さ

方法	得られた PGA 粉末
1. 50 回かき混ぜる	0.25 g/半パック
2. 600 回かき混ぜる	0.62 g/1 パック
3. 豆をすりつぶす	0.60 g/L パック (0.30 g/半パック)

※1 パックで 0.60 g だったため、1/2 パックだと 0.30 g だと考えた。

水質浄化に適した PGA 粉末の検討(実験 2)の結果の概要を下の表 2 に示す。

表 2 実験 2 の結果

方法	結果
1. 基本の方法	沈まなかった
2. 攪拌回数を増やす	沈んだ
3. 豆をすりつぶす	ゆっくりと沈んだ

様々なゴミと PGA の相性の比較(実験 3)の結果の概要を以下の①～④に示す。

- ① ペットボトルのゴミ
水と混ぜ合わせた時点でペットボトルのゴミが沈んだ。その後 PGA 粉末を入れても変化はなかった。
- ② 校庭の砂
①と同じく、PGA 粉末を入れる前に水と混ぜ合わせた時点で砂が沈んだ。PGA 粉末を入れても変化はなかった。
- ③ 家庭菜園用の培養土
②と同じ結果だった。

②と③の結果の違いが分かりづらかったので、PGA 粉末、実験試料、水が混ざった液体をろ過し、ろ液を観察した。PGA 粉末を加えていない実験試料と水だけの液体もろ過して比較したところ、PGA 粉末を加えたほうのろ液が黄ばんでいた。

④ 紙

PGA 粉末を入れる前に紙が水分を含み沈んだが PGA 粉末を入れると、底で紙と PGA 粉末が凝集している様子が確認できた。

4. 考察

実験 1 で、攪拌回数を増やすことで最も多くの PGA が抽出できた理由は、PGA が納豆のねばねば成分であることが関係していると考えられる。本研究以前に納豆は、攪拌回数が 50 回のものよりも、500 回のもののほうが粘度は増加することが分かっている (TANITA, 2012)。したがって、実験 1②の方法では、多くかき混ぜたことで納豆の豆についている PGA を取り出せたため、最も多くの PGA を抽出出来たと考えられる。また、①と③の方法で抽出された PGA の量に大きな違いがないことから、すりつぶしても PGA の取り出しやすさは変わらないと考えられる。以上より、PGA は攪拌回数を増やすことで取り出しやすくなる物質であると考えられる。この実験の目標である PGA が取り出しやすくなる条件を決めることができた。

実験 1 の三種類の PGA 粉末はそれぞれ異なる色をしていたため、大豆など PGA 以外の不純物が含まれていると考えた。実験 2 で、実験 1①の PGA 粉末が凝集沈殿効果を示さなかったのは、攪拌回数が少なく、PGA 粉末中の PGA 量が少なかったからであると考えた。実験 1②の PGA 粉末が最も凝集沈殿効果を示したのは、攪拌回数が多く、PGA 粉末中の PGA 量が多かったからであると考えた。実験 1③の PGA 粉末が大きな凝集沈殿効果を示さなかったのは、豆をすりつぶしたことにより①②の PGA 粉末に比べて、不純物の割合が多く、PGA の割合が少なかったからであ

ると考えた。以上より、PGA 粉末中の PGA 量が多く、三種類の PGA 粉末の中で最も凝集沈殿効果を示した実験 1②の PGA 粉末が、以降の実験に最も適していると考えた。

実験 3 で、①のペットボトルのゴミが、PGA 粉末を入れる前に沈んだのは、ペット素材の密度 (1.38 g/cm^3) が水より大きいからである。したがって、ペットボトルの破片をどれだけ小さくしても水に浮くことはなく、PGA の効果で沈んだのかが目視で確認できない。実験 3②、③の砂の場合も同様である。④の紙は、植物の繊維などから作られているため、PGA と凝集している様子が見られた。②、③のろ液の色から、PGA の成分が水に溶けだしていると考えた。以上より、PGA は生物的なごみを凝集する効果はあるが、化学物質を凝集する効果は弱いと考えた。

5. まとめと今後の課題

今回の実験より、水質浄化に使える PGA の抽出方法を明らかにできた。また PGA がどんなゴミを凝集できるかは、ゴミの種類によって異なることが分かった。PGA には、凝集できるものとできないものがあると考えられる。

PGA による凝集剤は、海や川を汚染する要因ともなるマイクロプラスチックを凝集し、それを回収することで、水質浄化に繋がると期待されている。しかし、私たちが作ったものでは、どんなゴミを凝集できるのか分からないため、実用化にはその課題を解決する必要がある。また、納豆から抽出したために発生する粘り気や臭いも課題となるため、より精製度をあげる方法を検討する必要がある。

6. 参考文献

柿井一男, 納豆菌の“ねばねば”パワーで排水処理, 2016.9.25, <http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/mizu/natto-index.html>, 2020.1.9.

株式会社エム・アール・オー, エコバイオ・ブロック (水質浄化), https://www.m-r-o.co.jp/index.php?page_id=98, 2019.10.17.

TANITA, 2012.7.10, タニタの健康コラム, <https://www.karadakarute.jp/tanita/column/columndetail.do?columnId=169>, 2020.1.16.

府立大手前高校「納豆のねばねばで水質浄化」, 2017.3.28, <https://otemae-hs.ed.jp/ssh/dat/2014S5.pdf>, 2019.10.17.



写真3 実験3(左からろ過後の②のPGAあり・なし, ③のあり・なし)

7. 添付資料



写真1 実験1の乾燥前の白い塊



写真2 実験2の結果(左から方法1, 2, 3)

ゼブラフィッシュの恐怖行動伝達

～ 彼らは視覚で恐怖を伝達しているのか ～

黒田 俊介 村上 逸紀 黒澤 幸誠

要旨

ゼブラフィッシュ *Danio rerio* が視覚による恐怖の伝達を行っているのか明らかにするため実験を行った。ゼブラフィッシュを 1 個体入れた水槽を準備し、そのゼブラフィッシュに平常時のゼブラフィッシュの映像と警報物質を投与し恐怖行動を示しているゼブラフィッシュの映像をそれぞれ 5 分ずつ見せ、その様子を観察して比較した。その結果、平常時のゼブラフィッシュの映像を見せた時潜行時間が減少し、ゼブラフィッシュは仲間の姿を視認した時に安心感を得ることがわかった。また、恐怖行動を示しているゼブラフィッシュの映像を見せた時、潜行時間が増加することが確認でき、視覚による恐怖の伝達を行っていることがわかった。

1. はじめに

恐怖は、身近の脅威(捕食者など)を知覚もしくは予期している状態で、一過性であり、恐怖の対象がなくなると速やかに消失する。実際の動物観察では、忌避すべき状況を直接予期させるような、具体的な手掛かりを与えた時に観察される生理・行動反応、また、忌避すべき状況との関連が明瞭ではない、漠然とした手がかりを与えた時に現れる反応が恐怖の行動である(吉田, 2011)。

ゼブラフィッシュとは脊椎動物のモデル実験動物として比較的最近登場した魚であり、体長約 5 cmの小型熱帯魚である。この魚は飼育が容易、多産、世代交代期が短いなど実験に適した特徴を持っている。

ゼブラフィッシュには警報物質の存在が確認されている。警報物質は多くの魚種(特にコイ目やカラシン目を含む骨鰐上目)の表皮中の club cell 中にある、捕食者による攻撃などでこの細胞が壊れることにより環境水中に放出されると考えられている。警報物質は捕食者の存在を間接的に示し、これを受容した同種もしくは近縁種は生得的な防衛行動を示す。警報物質は種特異的な反応を引

き起こすが、ゼブラフィッシュの場合吻を水底につけながら泳ぐ(本実験ではこれを潜行と呼称する)、フリーズする、密な群れを作るなどが含まれる(吉田, 2011)。

サイエンスⅡの先行研究で、ゼブラフィッシュを入れた 2 つの隣接した水槽を用意し、その片方に警報物質を投与して不安反応(恐怖行動)を誘発させ、他方の水槽内の個体の行動を観察し、投与前後の比較が行なわれた。その結果、不安反応(恐怖行動)である潜行やフリージングを示している時間の割合の増加が確認されている(生形ら, 2019)。

2. 材料・研究方法

2-1. 研究試料

本研究では、ゼブラフィッシュはもともと本校の生物実験室で飼育されていたものを使用した。オスとメスが混在しており、メスは性周期の関係から実験に影響を及ぼす可能性があるため、オスのみを使用した。エサはフレーク状のものを使用した。水槽は 14.5 cm×24.0 cm×14.5 cm のものを使用した。タブレットは Google nexus シリー

ズの 11.0 cm×19.5 cm のものを使用した。警報物質は生形ら(2019)の実験で使したものをういた。

2-2. 研究方法

①平常の状態および警報物質を投与されて恐怖行動を示している 8 個体の行動を撮影し、前半 5 分は平常、後半 5 分は恐怖行動の様子を収めた 10 分間の映像を作成した。

②1 個体のゼブラフィッシュが入った水槽を用意し、人の往来がない部屋で 30 分間静置した。

③ゼブラフィッシュを 5 分間観察した。

④ゼブラフィッシュにタブレットを用いて映像を見せ、その様子を観察した(図 1)。

この時、水槽の深さ 1/3 以深に 3 秒間以上とどまっている状態を「潜行」、1 秒間以上静止している状態を「フリージング」と定義した。

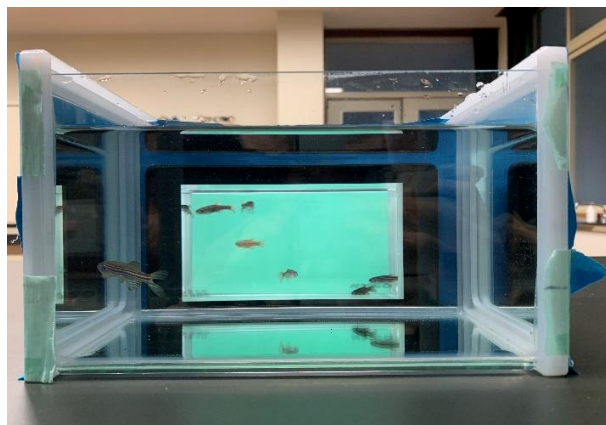


図 1

3. 結果

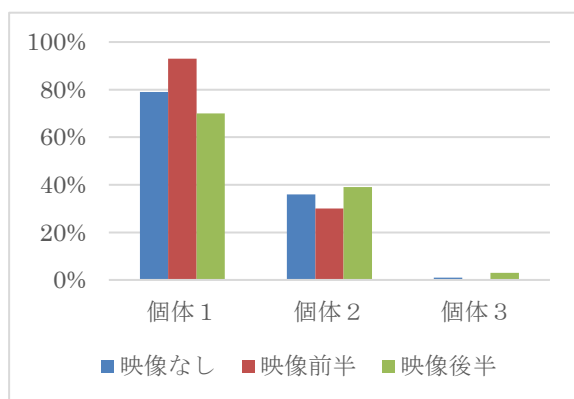


図 2-1

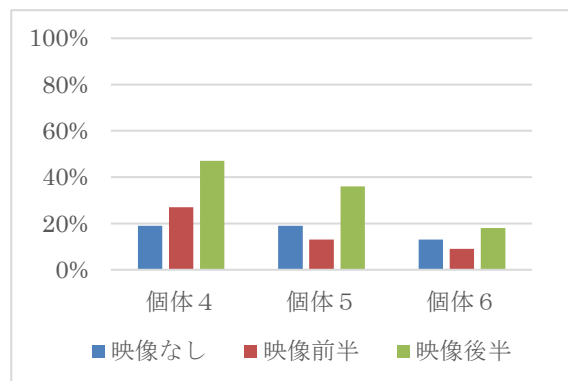


図 2-2

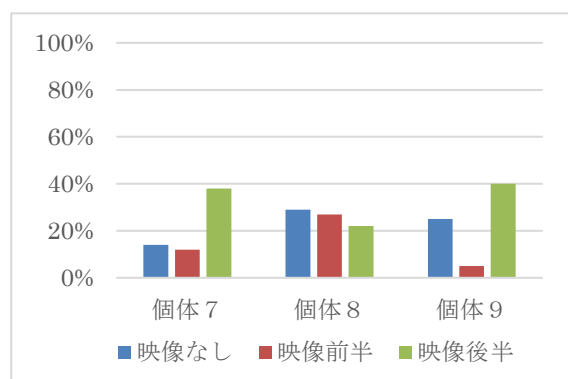


図 2-3

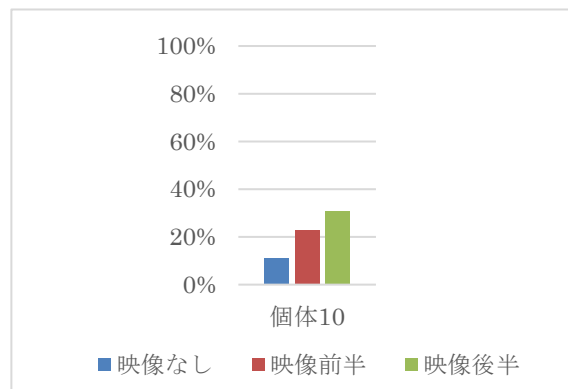


図 2-4

図 2 は、各個体について映像を見せる前の 5 分間、映像前半 5 分間、映像後半 5 分間における潜行時間の割合を示したものである。実験 1～10 はそれぞれ別の個体を用いて行った。

実験 10 回のうち 7 回(実験 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9)では映像を見ていない時より映像前半の 5 分間で潜行時間が短くなった。

また、実験 10 回のうち 8 回(実験 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10)では前半 5 分間よりも映像後半の 5 分間で潜行時間が長くなった。

4. 考察

計 6 回の実験において 1 個体だけで他個体を見ずに過ごしていた時より、平常状態の他個体の群れの映像を見せている前半 5 分間で潜行時間が短くなったことから、野生では群れで生活するゼブラフィッシュは、多数の仲間と行動している時に単独で行動している時よりも安心感を得たと考えられる。

また、計 8 回の実験において前半 5 分間より後半 5 分間で潜行時間が長くなったことから、ゼブラフィッシュは視覚を用いて仲間の姿を認識し、その様子から危険を察知していると考えられる。後半 5 分間はゼブラフィッシュが潜行している映像であることから、潜行という行動はゼブラフィッシュに恐怖を感じさせる視覚によるトリガーたり得ることが、先行研究(生形ら, 2019)に続いて確かめられたと言える。

5. まとめと今後の課題

本実験から、ゼブラフィッシュは単独で行動している時より仲間の姿が視界に入っている時の方が安心するようだということが示唆された。

また、ゼブラフィッシュは視覚で仲間を認識しており、仲間の潜行に恐怖を感じて、自らも潜行することが示唆された。

問題点としては、実験回数が 10 回と不十分であることと、実験方法の確立までに時間がかかったことである。

今後の展望としては、フリージングをしている映像などを見せて、恐怖を感じるトリガーをさらに突き詰めていきたい。

6. 謝辞

京都大学大学院情報学研究科前川真吾先生には、研究方法についての助言をいただきました。深く御礼申し上げます。

7. 参考文献

生形綾音 椋橋直陽 櫻井太翔 平田艶羽,

2019 恐怖は伝染するか? ~ゼブラフィッシュの警報物質を用いた研究~, <http://www.kyoto-be.ne.jp/rakuhoku-hs/BuildUpload/PDFFile05226505.pdf>
吉田将之, 2011, 魚類における恐怖・不安行動とその定量的観, https://www.jstage.jst.go.jp/article/hikakuseiriseika/28/4/28_4_317/_article/-char/ja/

eDNA を用いた琵琶湖疎水及びその下流域でのブルーギルの生息域調査

川本青汰 嶋村悠 田野入昭人

要旨

本研究は最新の生物調査手法の一つである eDNA 技術を用いて行った琵琶湖疎水及びその下流域におけるブルーギルの生息域調査である。eDNA 技術とは eDNA (environmental DNA, 環境 DNA) と呼ばれる環境水中の DNA を調べて生物相を把握する技術である。この技術を十分に活用することで、高校生の我々でもコストや時間を節約して生物種の生息域調査をすることが可能となる。しかしながら本研究において、我々は琵琶湖疎水及びその下流域でのブルーギルの生息域を特定することを目指したものの、ブルーギルの存在に関して信頼性のあるデータを得ることができなかった。

1. はじめに

ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) は、スズキ目サンフィッシュ科に属するアメリカ原産の外来魚で、日本各地に拡散し生態系の攪乱が問題となっている。駆除計画にはブルーギルの生息域を知ることが必要となるが、従来の方法は捕獲による生息確認のため、多くの時間やコストがかかることが欠点であった。eDNA 技術は、サンプル水中に含まれる生物の DNA を分析して生物調査を行うので、コストや時間が節減できることがメリットである。

そこで、我々はこの技術を活用して琵琶湖疎水及びその下流域におけるブルーギルの生息域調査を行うこととした。また、個体を捕獲する方法で行われた先行研究(石田, 2007)によると、ブルーギルの存在が確認されている琵琶湖の水が疎水を通して流れ込む高野川にはブルーギルが生息していない一方で、琵琶湖の水が直接は流れ込まない賀茂川には生息しているとされていたことから、疎水との合流地点より上流の高野川と賀茂川もサンプルをとって調べることにした。

予備実験としては、eDNA 解析技術を習得するため、高校生にも技術指導等を行っている神戸大学の源利文准教授の研究室を訪問し、基礎的

な実験技術を習得し、それらの技術を活用して、サンプル水の分析を行った。

2. 材料・研究方法

2-1. 研究試料

オスバン(塩化ベンザルコニウム(10%(W/V)水溶液)

Glass Fiber Filter GF/F 47mm(Whatman)
(0.7 µm まで保持できるもの)

DNeasy blood & tissue kit(Qiagen 社)

プライマーDNA(Maruyama, 2014 による)

ミトコンドリア DNA のシトクロム c 遺伝子中の
100 bp の領域を増幅する。

F:5'-GCCTAGCAACCCAGATTTTAACA-3'

R:5'-ACGTCCCGGCAGATGTGT-3'

Tris・Acetate-EDTA

アガロース(同仁化学研究所)

エチジウムブロマイド(GLP,フナコシ)

Taq-DNA ポリメラーゼ(New England Biolabs)

2-2. 研究方法

生息域を分析するために実験(1)と、ポジティブコントロールのための実験(2)、また、実験(2)でバンドが出なかったため、検証実験として実験

(3)を行った。

(1). 実験は、環境水を採取し、これをろ過し、ガラス繊維フィルターから DNA を抽出して *L. macrochirus* に特異的なプライマーで PCR を行い、アガロース電気泳動で増幅の有無を確認する方法で行った。環境水はビニール紐をバケツに括り付けて川に下ろして汲み上げるという方法で図 1, 図 2 に示す地点で採水した。汲み上げたサンプル水は事前に次亜塩素酸で洗浄したペットボトルに移し、採取する量は 2 L を超えるようにした。DNA の分解を抑えるためオスバン 1 mL を加えた。eDNA は、放出地点から、最大でも下流 1 km 以内で分解されることが知られている。本実験では各採水地点の距離を 2 km 以上に設定した。

採水番号		ポイント座標	
		E:	N:
琵琶湖疎水	1	135.861372	35.013931
	2	135.831172	34.996817
	3	135.815322	34.995336
	4	135.799267	34.999675
	5	135.791294	35.007044
	6	135.776153	35.015533
高野川	7	135.795122	35.022567
	8	135.787125	35.039058
	9	135.784986	35.048439
賀茂川	10	135.774444	35.034339
	11	135.742419	35.076417
	12	135.746889	35.064736
	13	135.758114	35.050356
鴨川*	14	135.769919	35.032211
	15	135.771817	35.017456
	16	135.770992	35.001869
	17	135.7628	34.970331
桂川 1**	18	135.740358	34.946375
	19	135.736667	34.945839
桂川 2	20	135.734458	34.929689
	21	135.734092	34.929919

図1 採水地点の座標

* 鴨川は高野川と合流後の賀茂川を指す

** 桂川 1 は鴨川と合流する前の桂川を指し、



図 2 採水地点の地図

桂川 2 は鴨川と合流後の桂川を指す

採取した環境水は、実験室に持ち帰ったのち、採取から 1 週間以内にすべてガラス繊維ガラス繊維フィルターを用いてろ過した。環境水の汚れの度合いに応じて 1 枚または 2 枚のガラス繊維フィルターを用いて 1 L をろ過した。

ガラス繊維フィルターからの DNA の抽出は DNeasy blood & tissue kit(QIAGEN)を用いて行った。サンプルごとろ過したガラス繊維フィルター 1 枚または 2 枚をザリベットのバスケット部に入れ、ガラス繊維フィルター 1 枚当たり 200 μ L の Buffer AL, 20 μ L の ProK を添加して 56°C の恒温槽で 30 分間放置したのち、2600 $\times g$ で 3 分間遠心分離した。さらに、ガラス繊維フィルター 1 枚あたり 220 μ L の TE を添加し、1 分間放置したのち 2600 $\times g$ で 1 分間遠心分離した。ザリベット下部にたまった液に、用いたガラス繊維フィルター 1 枚当たり 300 μ L のエタノールを添加し、この液の全

量を(複数回に分けて)Dneasy blood & tissue kit のカラムに移して 6000×g で 1 分間遠心し、液の全量をカラムに通して、DNA をカラムに吸着させた。このカラムを新しいチューブに寄せ換え、500 μL の Buffer AW1 を添加後、6000×g で 1 分間遠心、さらにカラムを新しいチューブに寄せ換えて 500 μL の Buffer AW2 を添加後、17000×g で 2 分間遠心した。最後にカラムを保存用のチューブに寄せ換えて 110 μL の Buffer AE を添加し、1 分間置いたのち 6000×g で 1 分間遠心分離して、得られた液を試料 DNA とした。

この DNA を以下の反応液、サイクルで PCR 増幅したのち、電気泳動を行い、エチジウムブロマ이드で着色して観察した。電気泳動の手順は実験 (1) (2) (3) で共通している。

反応液(単位は μL)

Buffer (10x)	5 μL
dNTPs (10mmol/L)	5 μL
Forward Primer	1 μL
Reverse Primer	1 μL
試料 DNA	2 μL
Taq polymerase	0.5 μL
水	35.5 μL

サイクル

94°C	2 min	} × 25cycle
94°C	30 sec	
52°C	30 sec	
72°C	1 min	
68°C	2 min	

(2). ポジティブコントロールとして、ブルーギルの切身をすりつぶし、そこから DNeasy blood & tissue kit を用いて実験 (1) と同様に DNA を抽出した。ただし、実験 (1) ではサンプル水をろ過したガラス繊維フィルターをザリベットに入れていたが、実験 (2) ではすりつぶした切身を直接ザリベ

ットに入れた。そして以下のサイクルで PCR 実験を行った。

反応液(単位は μL)

Buffer (10x)	2.5 μL
dNTPs (10mmol/l)	0.5 μL
Forward Primer	0.5 μL
Reverse Primer	0.5 μL
試料 DNA	2 μL
Taq polymerase	0.125 μL
水	18.875 μL

サイクル

95°C	2 min	} × 35cycle
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	
68°C	1 min	
68°C	2 min	

(3). 分析過程がうまく働いているか検証するため、実験 (2) で使用したブルーギルの DNA を用いて、反応液の諸条件を以下のように変えた PCR を行った。①から⑧までの試料を作製し、PCR のサイクルは実験 (2) と同様である。

反応液(単位は μL)

	①	②	③	④
10×Buffer	2.5	2.5	2.5	2.5
dNTPs *	1.0	0.5	1.0	0.5
Forward Primer	0.5	0.5	量は 0.5μL のまま	量は 0.5μL のまま
Reverse Primer	0.5	0.5	濃度を 10 倍と した	濃度を 10 倍と した
試料 DNA	2.0	2.0	2.0	2.0
Taq **	0.125	0.25	0.125	0.25
水	18.375	18.625	18.375	18.625

	⑤	⑥	⑦	⑧
10×Buffer	5.0	2.5	5.0	2.5
dNTPs *	0.5	0.5	1.0	0.5
Forward Primer	0.5	0.5	量は 0.5μL のまま	0.5
Reverse Primer	0.5	0.5	濃度を 10 倍と した	0.5
試料 DNA	2.0	4.0	4.0	2.0
Taq **	0.125	0.125	0.25	0.125
水	16.375	16.875	13.750	18.875

*dNTPs はそれぞれ 10mmol/L

**Taq DNA polymerase

3. 結果

実験(1)(2)においてブルーギルの DNA の存在を示すバンドが出ることはなかった。

実験(3)では、試料②・⑤・⑥・⑧で DNA の存在を示す約 100 bp のバンドが検出されたが、試料①・③・④・⑦ではバンドは検出されなかった。

4. 考察

実験(1)では、ブルーギルの生息が確認されている琵琶湖の環境水(ポイント 1)や、釣り人がブルーギルの遊泳を確認した地点の環境水(ポイント5)が含まれているにも関わらず、すべての地点の環境水についてブルーギルの DNA の存在を示すバンドが確認されなかった。また、ブルーギルの DNA が確実に含まれているであろう実験(2)の切り身からも確認されなかった。

よって、実験(1)(2)における過程の何らかの段階で、DNA の抽出に失敗した、DNA が損なわれた、DNA が増幅されなかった、DNA を染色できなかった、などの問題が発生したためバンドが検出されなかったと考えられる。

実験(3)で DNA の存在が確認された試料②・

⑤・⑥・⑧は、諸条件の変更点に共通性が見られず、実験(2)と同じ条件で行った試料⑧でも実験(2)と異なり DNA の存在を示す結果が得られたことから、実験技術が不足しているため安定した結果が得られなかったと考えられる。

5. まとめと今後の課題

本研究ではこの論文の執筆時点までにブルーギルの生息域を特定することはできなかった。

eDNA 技術を活用した生息域調査は、プロセス自体は比較的容易なものが多いものの、実行段階では PCR 実験技術の確立した環境や実験者で行わなければ、信頼性が担保できないと考えられる。

今後の課題については、今回の研究で予想した結果が得られなかった要因の一つに執筆者らの技量不足が考えられるため、執筆者らが十分な技術を身に付けた上で実験を行うことが、より良い結果を得るための第一歩であると考えられる。

また、他の要因として、DNA が抽出されなかった、PCR 実験においてエラーが起こった、といった原因が考えられるため、エタノール沈殿法によって目に見える形で DNA を抽出することを試みたり、京都府立大学の実験室および薬品類をお借りして院生のご指導を仰ぎながら、鋭意実験中である。

6. 謝辞

eDNA 技術を我々に惜しみなく教えてくださった神戸大学の源利文准教授や同研究室のみなさま、また京都府立大学の織田昌幸教授や同研究室院生の千賀明香音さんをはじめとする、本研究に携わってくださったみなさまに対する多大なる感謝の念をこの場を借りて申し上げます。

7. 参考文献

一般社団法人環境 DNA 学会, 2019. 4. 25, 環境 DNA 調査・実験マニュアル ver2. 1

石田裕子・中林真人・竹門康弘・池淵周一 (2007)
堰堤で区切られた都市河川の魚類相と
生息場の特性. 京都大学防災研究所年
報 50: 781-788.

Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H,
Kondoh M, Minamoto T (2014)
The Release Rate of Environmental
DNA from Juvenile and Adult Fish.
PLoS ONE 9 (12) : e114639 .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114639>

Sakai Y, Kusakabe A, Tsuchida K, et
al. Discovery of an unrecorded
population of Yamato salamander
(*Hynobius vandenburghi*)
by GIS and eDNA analysis.
Environmental DNA. 2019;1:281–
289. <https://doi.org/10.1002/edn3.31>

トビケラシルクの性質

～水中接着剤を作ろう！～

小島秀人 塩谷友梨 野村純 安井瑛大朗

要旨

本研究では、賀茂川に生息するヒゲナガカワトビケラが分泌する「トビケラシルク」の強度を調べ、既に販売されている水中接着剤で接着しない素材にも接着するのではないかと考え、その性質について考察した。またどのようにトビケラが巣を造るのかを知るためにトビケラが巣を作る過程を観察した。

1. はじめに

ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の幼虫は口器に絹糸腺があり、糸を吐き出す。幼虫はこの絹糸(トビケラシルク)を使って石と石の間に網を張り、かかった動植物破片をえさにするとともに筒状の巣を造る(丸山ら 2005)。

水中での接着ができる物質の開発はあまり進んでおらず、プラスチックやゴムなどに対して水中で接着可能な接着剤は存在しない。しかしトビケラシルクは水中での接着が可能であり、多少厭うもののゴムやプラスチックを接着する例も見られる。このような観点から水中接着剤や医療接着剤としての利用が期待されているが、研究がほとんど進んでいないのが現状である(新井ら 2017)。

昨年度のサイエンスⅡの研究(島田ら)では、トビケラシルクの熱・酸・塩基への耐性、ガラス・鉄・ゴム・石への接着性、巣を造る過程、接着面について研究した。

そこで本研究では、人工物・ラップの接着性、トビケラシルクの接着面の観察および元素分析等を行った。

2. 材料・研究方法

本研究で用いたトビケラは、2019年5月から11月に複数回、賀茂川北大路橋付近で採取した個体を用いた。また、単に水道水と言う場

合は、水道水からカルキ抜き剤でカルキを抜いたものを使用した。

2-1. 水道水と川水での行動の違い

2つの水槽A、Bを用意し、水槽Aにはカルキを抜いた水道水と観賞水槽用の微生物が存在しない石とテトラミン(観賞用熱帯魚用の餌)を付属スプーンの1/8ほどを入れた。

水槽Bには賀茂川の水と石をそのまま入れて別途餌を与えることはしなかった。また、それぞれに空気石から出るタイプの空気ポンプを設置し、採取したトビケラを2個体ずつ入れた。

2-2. 糸の観察

2-1の実験から2週間後に得たトビケラシルクを光学顕微鏡と実体顕微鏡で観察した。

2-3. 人工物への接着性

ゴムチューブを5cmほどに切り5本水槽に入れた。また同じ水槽にクリアファイルを5cm×5cmの正方形に切り、水槽の内側の面すべてにセロハンテープで張り付けた。さらにスライドガラスを同じ水槽に入れた。そこにトビケラを10個体入れ、水槽を25℃に設定された恒温器に入れた。

2-4. シルクの強度

賀茂川から石を採集してふるいにかけて、大きさ

の異なる4種(3 mm 未満, 3~5 mm, 5~7 mm, 7 mm 以上)に分けた。それぞれを水槽に入れ, 2匹ずつのトビケラを一週間飼育した。餌は与えなかった。トビケラによって造られた巣を観察し, その強度を手で直に触り調べた。

2-5. 巣を作る様子

ふるいで分けた4種の石のうち, 3mm 未満, 3~5mm, 5~7mm の石を, 水槽に一層敷きつめた中でトビケラを1匹飼育し, 巣を作る様子を, 水槽の底から, ビデオカメラで24時間撮影した(図1)。



図1. 実験の様子

2-6. ラップへの接着性

一つの水槽(A)には内側に食品用ラップ(サランラップ, 旭化成, ポリ塩化ビニリデン製, 以後ラップ)を貼って小石を敷き, もう一つの水槽(B)には小石とラップを巻いた手の拳2個分ほどの大きさの石を入れ, トビケラをそれぞれ1匹ずつ飼育した。そして, ラップに巣を造るのか調べた。

2-7. トビケラシルク詳細部の観察

電子顕微鏡(日立ハイテクノロジーズ TM3030Plus)を用いてトビケラシルクの繊維の分岐部分と石への接着部分を観察した。

2-8. トビケラシルクの元素の比較

電子顕微鏡に付属のSEM-EDS(エネルギー分散型X線分光装置)を用いて, 賀茂川で採取したトビケラシルク, 水道水中で造らしたトビケラシルク

それぞれについて, 構成元素を調べた。

3. 結果

3-1. 水道水と川水での行動の違い

水槽Aでは空気石の周り, 水槽の隅の部分に巣ができていた。トビケラは壁と壁の間に糸を張り, 自分自身を覆うように, 糸だけの, 石を使わないもやもやした巣を形成していた。

水槽Bではエアストーンの周り, 石と壁の間に巣ができていた。Aとは違い石と石, 石と壁の間を糸で接着していた。

3-2. 糸の観察

水槽Aでは底部分に小石が接着していた。手で触ってみたところ, 水面から上げても壊れないほど強固に接着していた。

水槽Bでは1匹は, 周りに巣を作っていたが巣の中にはおらずへばりつくようにいた。もう1匹は, 2週間前から同じ巣中住んでいて, 巣から出た形跡は見られなかった。

水槽Aから採取したトビケラシルクを光学顕微鏡ないし実体顕微鏡で観察したが, 実体顕微鏡では倍率が低く何も見られなかった。

光学顕微鏡で観察したところトビケラシルクの繊維の中に筋のようなものが見られた(図2)。

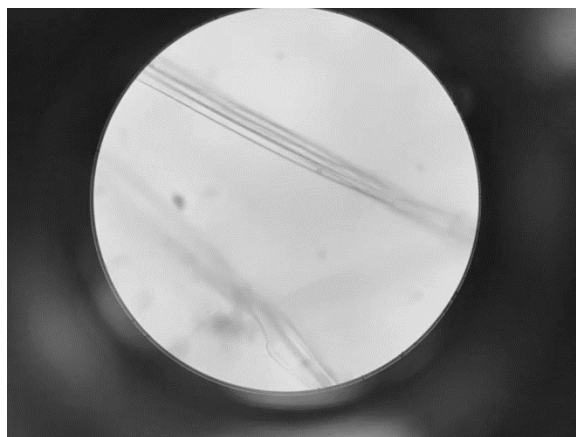


図2. 光学顕微鏡(×600)で見たトビケラシルク

3-3. 人工物への接着性

ゴムチューブ, スライドガラス, クリアファイル, それぞれすべて接着しなかった。ゴムチューブに糸

のようなものが着いていたがトビケラシルクとは違うもののように見えた。トビケラは死んでいてそのまわりにもややしたカビのような物質があった。

3-4. シルクの強度

3 mm 未満の石のみに強固な巣が見られた。7 mm 以上、5~7 mm の石では糸は張られていたが、巣は見られなかった。3~5 mm の石には糸が張られていなかった。7 mm 以上と 5~7 mm の石を持ち上げると、石が落ちそうなほど粘着力が弱かった。ただしここでいう「巣」とはトビケラが収まるほどの大きさの空間が存在するもののことを指す。

3-5. 巣を作る様子

ビデオの観察から大きな石の周りにある小石を、大きな石の下のくぼみにかき集める様子が見られた。小さすぎる石は使われていなかった(図 7)。

3-6. ラップへの接着性

水槽 A では、巣は造られたが、ラップを貼った側面には接着していなかった。水槽 B ではラップを巻いた大きな石に巣は接着していなかったが、石の下のくぼみに小さな石だけで造られた巣が見られた。その巣は、水槽の底と接着していた。

3-7. トビケラシルク詳細部の観察

電子顕微鏡で見たトビケラシルクの繊維は 1 本の繊維ではなく 2 本から 5 本ほどの繊維が束のようになっていることが分かった。また分岐点では繊維そのものから分岐しており、接着した跡のようなものは見られなかった。また、石との接着部分では接着面が大きくなっていた(図 3, 4, 5, 6)。

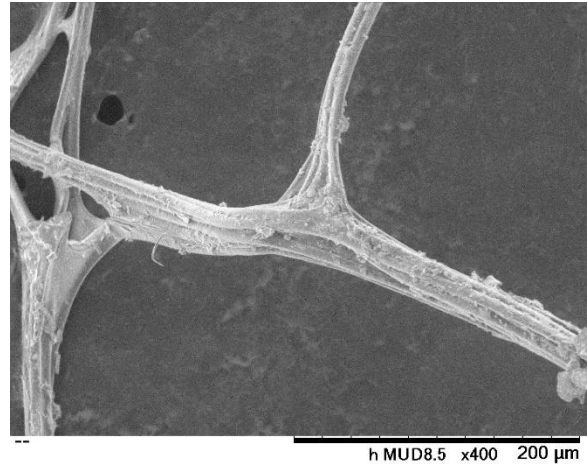


図 3. 電子顕微鏡(×400)で見たトビケラシルク (賀茂川で採取したトビケラシルク 分岐部分)

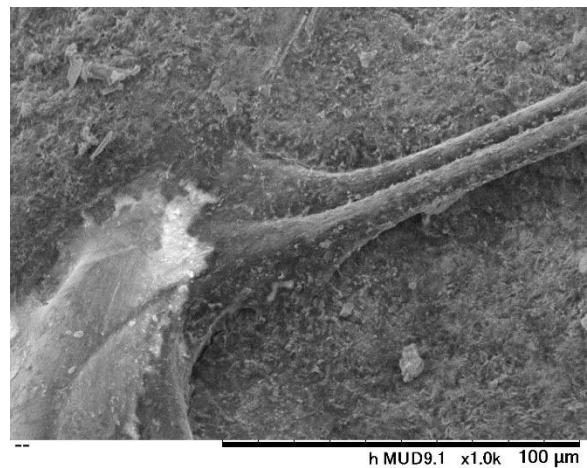


図 4. 電子顕微鏡(×1000)で見たトビケラシルク (賀茂川で採取したトビケラシルク 接着面)



図 5. 電子顕微鏡(×1000)で見たトビケラシルク (賀茂川で採取したトビケラシルク 分岐部分)



図 6. 電子顕微鏡(×1000)で見たトビケラシルク
(実験室で造らせたトビケラシルク)

3-8. トビケラシルクの元素の比較

EDS 分析において O, C, N のピークが強かった。次いで Ca, Al のピークもトビケラシルクに出ていた。しかし P, K, S のピークは見られなかった。また、水道水中で人工的に造らせたトビケラシルクは Si のピークが全くなかったが賀茂川で採取してきたトビケラシルクには Si の強いピークがあった(図 8, 9)。

4. 考察

4-1. 水道水と川水での行動の違い

この実験は今後トビケラを育てていくうえで水道水中かつ簡単に手に入る熱帯魚の餌のみで育成していけるかということを目的に行った。A の水槽でも 1 週間は生き続けることが分かったので今後はこれらの環境下で行っても大きな支障はないと判断した。A の水槽では大きな土台となるような石がなかったため、石を使わずに糸だけの巣ができたのではないかと考えられる。B の水槽の結果から川の水で水流がなくてもトビケラは巣を作ることが分かった。

4-2. 糸の観察

カイコのシルクは 2 本の束であるが、4 本の筋があったことから 4 本の繊維が束になって 1 つの繊維になっているのではないかと考えられる。そしてそれがトビケラシルクの粘着性、あるいは接着性を強めている可能性がある。

4-3. 人工物への接着性

石のようなざらざらした物には接着するが、つるつるとした人工物には巣を造れないのではないかと考えた。もやもやとした物質を身にまとっているトビケラが何匹かいたので、さなぎになる際に自分の身を守る粘膜のようなものかもしれない。またその物質が巣を造るのに役立っている可能性も考えられる。

4-4. シルクの強度

3 mm 未満の石の水槽で巣が造られ、5~7 mm, 7 mm 以上では造られなかったため、3 mm 未満の石は強固な巣を作る上で必要不可欠なのではないかと考えた。自然界では、3 mm 以上の石を用いられた巣も見受けられたため、3 mm 未満の石は石と石の隙間を埋める働きをしているのではないかと考えられる。3~5 mm の石の水槽のトビケラは、まだ小さい個体だったため、巣を造れなかった可能性がある。

4-5. 巣を作る様子

巣の近くにある石だけでなく離れたところからも集めていたことから、巣を造るのに適する石を選んでいてと考えられる。

4-6. ラップへの接着性

ポリ塩化ビニリデンには接着しない、もしくはラップのような柔らかいものには接着しないと考えられる。

4-7. トビケラシルク詳細部の観察

2 本から 5 本が束になって 1 つの繊維を形成していて、それ故に繊維がより強くなっていると考えられる。また石への接着については接着面を大きくすることによって面積あたりにかかる力を少なくすることによってより強く接着することに役立っているかもしれない。

4-8. トビケラシルクの元素の比較

先行研究より(新井ら 2017)トビケラシルクはタンパク質なので C, O, N については納得である. Ca や Al の反応については不明であるがタンパク質にこのような無機物が大切な働きをしている可能性はある. Si については賀茂川で採取したもののみ反応があったので川では巢にケイソウなどの二酸化ケイ素を含む生物が流れて絡み付いるものであり, またトビケラはそれらを食べ物としていると考えられる.

5. まとめと今後の課題

実験 1 から 6 までは主に水槽内でのトビケラの行動について, 実験 7 と 8 はトビケラシルクの性質について調べてきたが, まだまだトビケラには分からないことが多い. 過去の研究で今後の課題として挙げられていたシルクを海水につけたときの変化の原因や人工物に付かないわけ, 巣形成に使う石の嗜好, 飼う際の適した環境などといった初歩的なことも解明できていない. 今後は次々と出てきた問題一つ一つに向き合い, どのようにしてトビケラシルクを実用化するのかを考えようと思う.

6. 謝辞

京都府立大学の神代圭輔准教授および同研究室大学院生の皆さんには SEM, EDS の使用についてご指導いただきました.

7. 参考文献

- 丸山博紀・高井幹夫, 第 1 版 第 5 刷, 原色 川虫図鑑, 全国農村教育協会, 58~83p.
- 波多野友博, 2006, ヒゲナガカワトビケラの生成するシルクの構造とその接着様式
- 大日本蚕糸会, 2015. 12. 25, カイコの新シギ
http://www.silk.or.jp/kaiko/kaiko_fushigi.html

8. 添付資料



図 7. 巣を作る様子

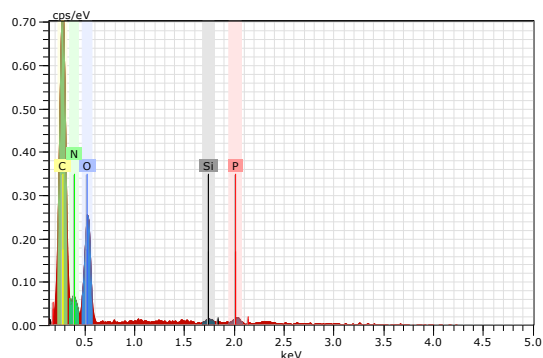


図 10. 元素スペクトル(実験室で造らせたトビケラシルク)

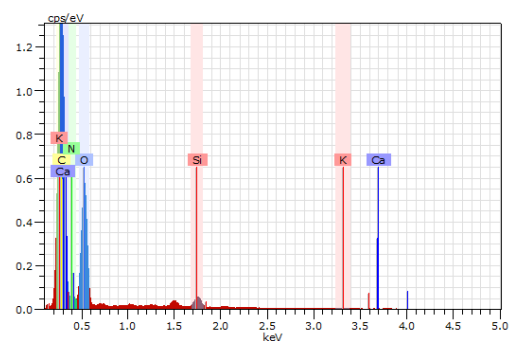


図 11. 元素スペクトル(賀茂川で採取したトビケラシルク)

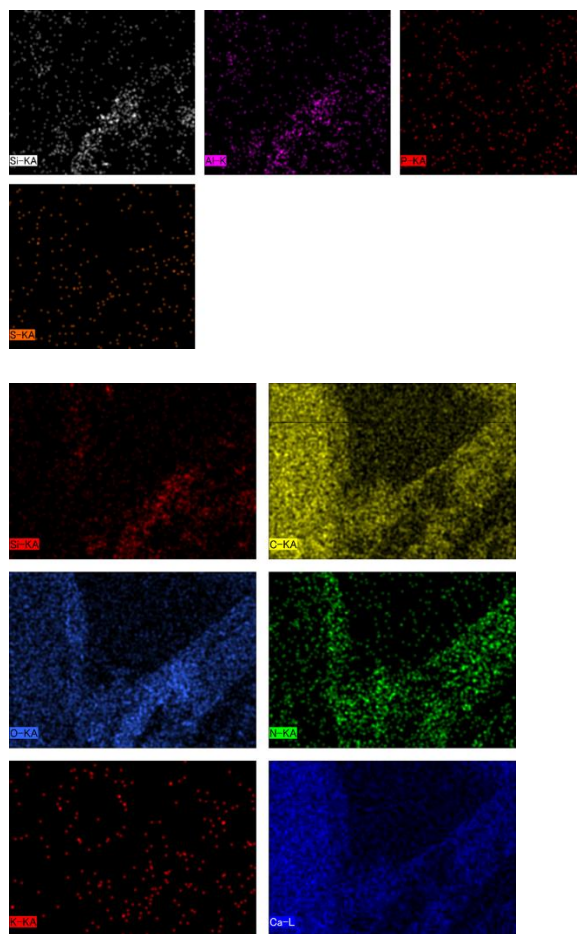


図 8. EDS の元素分析(賀茂川で採取したトビケラシルク)

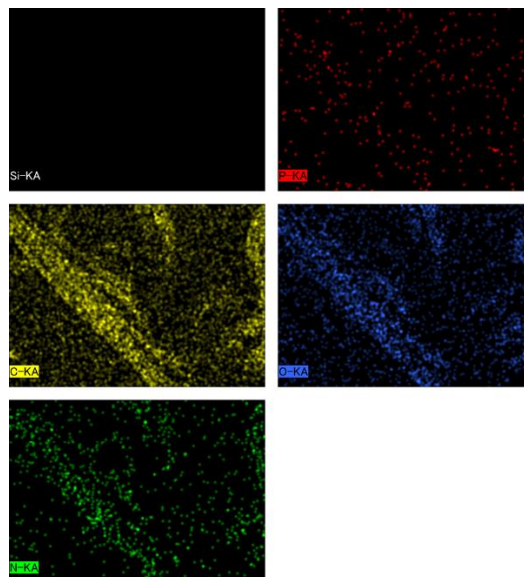


図 9. EDS の元素分析(実験室で造らせたトビケラシルク)

薬物投与によるシロカネグモの凶暴性の低下

梅原成哉 萱野創太 松原和志

要旨

クモは共食いをする性質があり、これはクモの集団飼育が不可能とされる第一の理由である。薬物投与により凶暴性を抑え共食いを防ぎ集団飼育を可能とし、クモの糸の量産への一助とするのが本研究の目的である。クモに薬物を投与し本来共食いをするはずの状況下で観察を行った結果、薬物投与を行ったクモでは共食いは観察されず薬物の作用により死亡した。よって薬物がクモの凶暴性にどのように作用したかは検証しきれなかった。

1. はじめに

本来警戒心が強く単独行動を好むタコに MDMA を投与するとタコ同士の積極的な接触が観察されるという先行研究 (Edsinger et al., 2018) がある。そこで我々は薬物の投与による生物の社会行動の変化について研究することにし、その対象としてシロカネグモ *Leucauge blanda* を実験に使用した。クモは共食いをする性質があり、これはクモの集団飼育が不可能とされる第一の理由である。薬物投与により凶暴性を抑え共食いを防ぎ集団飼育を可能とし、クモの糸の大量生産を可能にすることがこの研究の目的である。我々はクモを十分狭いケージ内で集団飼育すると共食いをするという情報を得ていたため、クモが共食いをするか否かという観点から定量的に社会行動の変化を観察できると考えた。同種同士で争う生物としては他にフタホシオロギ *Gryllus bimaculatus* があげられる。冬季の実験ではクモ類の採集が困難になったため安定した供給が見込めるフタホシオロギを使用した。

- ・アシナガグモ 6 個体
- ・フタホシオロギ (オス) 16 個体
- ・ニンジン 17.89 g
- ・カフェイン 0.71 g
- ・パブロンゴールド A 大正製薬 20 mg
- ・水道水 500 mL
- ・プラスチックコップ
- ・スプレーボトル (薬物投与に使用)

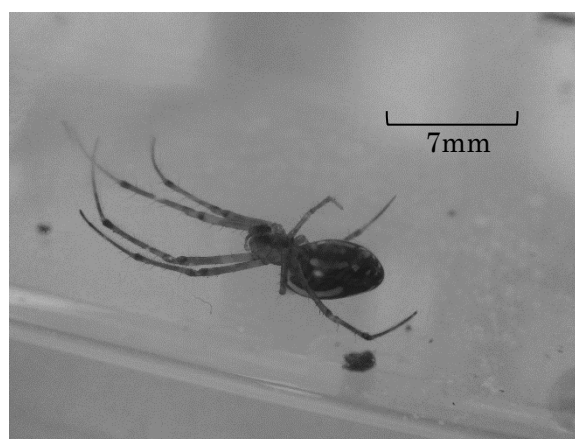


図 1 シロカネグモ *Leucauge blanda*
(上)と捕食されたシロカネグモの遺骸(下)

成体 オス

2. 材料・研究方法

2-1. 研究試料

使用した研究試料は以下のとおりである。

- ・虫かご (14×10×8 cm) 3 つ
- ・チュウガタシロカネグモ 9 個体

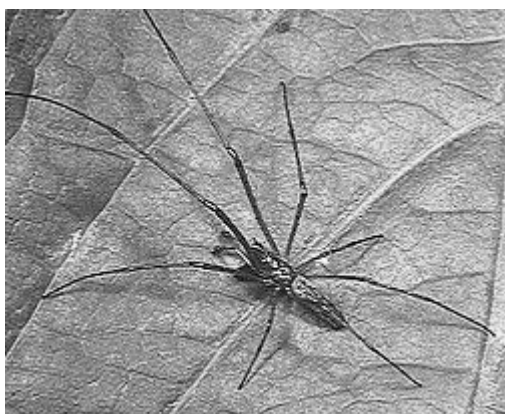


図 2 アシナガグモ *Tetragnatha Praedonia*
成体 オス(Wikipedia)より引用

2-2. 研究方法

実験 1 では、本校近隣で採集したチュウガタシロカネグモ 5 個体を虫かごに入れ、水分を供給するために濡らして丸めたティッシュペーパーを入れた後、5 日間にわたって経過を観察した。

実験 2 では、チュウガタシロカネグモ 4 個体と、同じく本校近隣で採集したアシナガグモ 6 個体を、虫かごを半分に仕切った場所(以下ケージと呼ぶ)にそれぞれ同種のクモを 2 個体ずつ入れ、設定した分量の風邪薬を水に溶かした水溶液(40 mg/L)を虫かご 1(ケージ 1, 2)に、4 mg/L を虫かご 2(ケージ 3, ケージ 4)を、スプレーを用いて吹きかけ、その後の様子を観察した。また、薬物投与を行わない状況下でアシナガグモが共食いを確認するため、別の虫かごにアシナガグモ 2 個体を入れ、実験 1 と同様にして対照実験を行った。

実験 3 では、実験前にフタホシコオロギ、学名 *Gryllus Bimaculatus* 16 個体をそれぞれ 1 個体ずつプラスチックコップに分け、9 個体にカフェインを 0.7 g 含ませたニンジンと餌として与え、残り 7 個体にはカフェインを含まないニンジンを与え 2 日間飼育した。なお、それぞれに濡らしたティッシュペーパーを入れ、ケージ内の温度は 20℃を保った。上記の虫かごに 2 個体ずつコオロギを入れカフェインを投与したものどうし、していないものどうしの 2 パ

ターンについて行ったコオロギ同士の喧嘩の様子を観察した。同時に、コオロギの戦闘意欲を煽動するためにメスのコオロギを虫かご内に入れ、その後 3 分間における鳴いた回数、はじめて鳴くまでにかかった時間、喧嘩の回数と開始時刻を調べた。

3. 結果

<実験 1>

- 5 月 16 日 クモを採取し虫かごに入れる。
- 5 月 17 日 互いに距離を取りながら各々が巣を張る。
- 5 月 20 日 クモの個体数が 5 個体から 2 個体に減った。
- 5 月 21 日 クモの数は 2 個体から 1 個体に減った。残ったクモが死んだクモを捕食しているところが観察された

5 月 20 日、21 日では、虫かご内で、体液を吸われ、黒色の塊となったクモの死骸と考えられるものが確認された(図 1)。

<実験 2>

結果は以下の表 1 に示す。

表内の数字は、薬物投与後 24 時間における死亡したクモの個体数である。表内の「No data」の部分は、実験を行っていない。

表 1 実験 2 の結果

	40 mg/L	4 mg/L	投与なし
シロカネグモ	1	1	No data
アシナガグモ	0	1	0

表内における「0」と記載されている項では、クモ

同士が交尾，産卵を行っていることが確認された。
また，この実験におけるクモの死骸の形状は実験
1 とは異なり，生前の体形をほとんどそのまま維持
していたことが確認された。

<実験 3>

結果は以下の表 2 と表 3 に示すとおりである。
コオロギを同時にケージに入れてからの経過時
間を時刻と呼ぶ。

表 2 カフェイン有りどうし

回数	初めて羽 を鳴らし た時刻	羽を鳴ら した合計 回数	初めて喧 嘩をした 時刻	喧嘩の回 数
1 回目	なし	0	No fight	0
2 回目	0:43	33	2:03	1
3 回目	0:31	246	No fight	0

表 3 カフェイン無しどうし

回数	初めて羽 を鳴らし た時刻	羽を鳴ら した合計 回数	初めて喧 嘩をした 時刻	喧嘩の回 数
1 回目	2:38	12	No fight	0
2 回目	0:47	159	0:39	1
3 回目	2:57	8	No fight	0

3 回目においてコオロギどうしが交尾しかけた。
カフェインを投与したコオロギはすべて翌日に死
んでいた。



図 3 コオロギのオス同士の争い



図 4 交尾しかけたコオロギ

4. 考察

実験 1 より，チュウガタシロカネグモは同時に複
数体が虫かごの中にいるとき，共食いをすることが
確認された．死んだクモの死骸の形状がクモに捕
食された死骸に特有の黒く縮んだものになっていた
ことがその証拠として考えられる。

実験 2 からは，チュウガタシロカネグモ及びアシ
ナガグモの双方において，クモの死骸が完全体
を維持していたこと，交尾及び産卵の発生により
一方が死ぬという現象が起こらなかったこと，の 2
点から今回の結果は凶暴性の低下に関する有効
なデータとは考えにくい．またこの実験において，
クモは共食い以外の何らかの原因，つまり投与し
た薬物に含まれるほかの物質の影響によって死
んでしまったと考えられる。

実験 3 からは，コオロギの鳴き方や求愛行動，
凶暴性に関するカフェイン投与による明確な差異
は観察できなかった．しかしカフェインを投与した
コオロギは翌日に死亡した．このことからコオロギ
に対してもカフェインは有毒性が高いと考えられる．
このことからシロカネグモの死因もカフェイン中毒
である可能性が高いと考えられる。

5. まとめと今後の課題

今回の研究からいえることは，チュウガタシロカ
ネグモは十分狭いケージの中では共食いすること，

また、カフェインはチュウガタシロカネグモやフタホシコオロギに対して有毒であることである。後の課題としては、適切な投与量で実験 2 の反証実験を行うこと、カフェインに選択毒性があるかを調査すること、他の昆虫に対するカフェインの毒性の調査などがあげられる。

6. 参考文献

- Eric, Edsinger. and Gül, Dölen., 2018,
A Conserved Role for Serotonergic
Neurotransmission in Mediating
Social Behavior in Octopus
Current Biology, Volume 28, Issue
19, 8 October 2018, Pages R1147-
R1149
- 2014.6.1, ウィキペディア「アシナガグモ科」,
<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%A2%E3%82%B7%E3%83%8A%E3%82%AC%E3%82%B0%E3%83%A2%E7%A7%91>, 2020.1.23