



シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害作用に関する行動学的および電気生理学的解析

小嶋, 健

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2023-03-06

(Date of Publication)

2025-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3427号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482224>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの
摂食阻害作用に関する行動学的および電気生理学的解析

令和 5 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

小嶋 健

目次

要旨	2
第 1 章 序論	6
第 2 章 選択型摂食試験によるクロキンバエに対するピレトリンの摂食阻害活性の評価	18
第 3 章 キャピラリー摂食試験によるピレトリンおよびピレトリン構成成分の摂食阻害活性の評価	35
第 4 章 ピレトリンに対する口吻の嫌悪応答の行動解析と摂食阻害に関わる味覚感覚器 の特定	50
第 5 章 ピレトリンに対する口吻の味覚神経応答の電気生理学的解析	67
第 6 章 総合考察	90
謝辞	95
本研究に関する原著論文	97
引用文献	98

要旨

植物は、植食性昆虫に対して防御物質として機能する多種多様な二次代謝物質を産生する。防御物質の主な機能は摂食阻害作用と有害性（致死性）であり、有害性物質の大半は昆虫の神経系を構成するイオンチャンネルに作用する神経毒である。これまでに、植物が産生する致死性の神経毒は数多く発見されてきたが、それらの防御物質としての機能は極めて不明瞭である。一般的に、神経毒は昆虫の行動や生理に影響を及ぼす亜致死作用を示す。亜致死濃度で摂食阻害作用を示す事例は多く知られているが、その中の一部は、潜在的に昆虫の味覚受容器を刺激する。従って、植物が産生する神経毒の一部は、致死性を有するものの、摂食を抑止する摂食阻害物質として機能している可能性がある。神経毒の潜在的な摂食阻害作用の機序を解明することは、植物がイオンチャンネルを標的とした神経毒の生合成能を獲得した進化的背景を探ることにつながる。

ピレトリンは、シロバナムシヨケギク *Tanacetum cinerariifolium*（除虫菊）が産生する殺虫性の化合物であり、その作用点は神経細胞に存在する電位依存性ナトリウムチャンネル（Nav）である。高濃度のピレトリンを含む除虫菊抽出物は天然殺虫剤として古くから産業利用され、日本では主に蚊取り線香として使用されてきた。ピレトリンから派生した合成ピレスロイド系殺虫剤は世界で広く使用されていることもあり、ピレトリンの殺虫作用の機序は、分子から神経細胞、神経系、行動レベルまで体系的に理解されている。これまでの研究から、ピレトリンや数種のピレスロイド系殺虫剤は、幅広い分類群の植食性昆虫に対して摂食忌避活性を示すことが明らかになっている。そこで私は、味覚や摂食行動に関する知見の蓄積があるクロキンバエ *Phormia regina* をモデルとして用いて、行動と電気生理学のアプローチからピレトリンの摂食阻害作用の機序を解明することにした。

第2章では、クロキンバエに対する摂食阻害活性を選択型摂食試験で調べた。ショ糖溶液に溶解したピレトリン抽出物（以下、ピレトリン）とその主成分であるピレトリン Ⅰ・Ⅱ は、ノックダウンが生じない濃度から喫食選好性を低下させた。すなわち、ピレトリンとピレトリン Ⅰ・Ⅱ はいずれも亜致死濃度でクロキンバエに対し

て摂食阻害作用を示した。ピレトリンやピレトリンⅠ・Ⅱが摂食阻害作用を示した下限濃度は 62.5 μ M であり、塩化ナトリウム（塩味物質）やクイニン（苦味物質）、酒石酸（酸味物質）が摂食阻害作用を示した濃度よりも 1/16 以上低かった。さらに、ピレトリンやピレトリンⅠ・Ⅱの摂食阻害作用には、口吻の激しいグルーミングや嘔吐を伴った。これらの量的・質的な差異は、ピレトリンはクロキンバエの口器にある味覚システムに作用するが、その機序は塩味や苦味、酸味物質とは本質的に異なることを支持した。

そこで、第 3 章では、拘束したハエの口吻にキャピラリー管で餌水を与えるキャピラリー摂食試験を行い、脚や胴体に化合物が接触する機会を排除した条件下でピレトリンと 6 つの殺虫性成分（ピレトリンⅠ・Ⅱ、シネリンⅠ・Ⅱ、ジャスモリンⅠ・Ⅱ）の正味の摂食阻害活性を評価した。ピレトリンとその構成成分は、塩味、苦味、酸味物質と同様に化合物濃度の増加に応じて摂取時間を短くさせ、摂取量を減少させた。その後、味覚物質を摂取したクロキンバエは直ぐにショ糖溶液を摂取したが、ピレトリンやその有効成分を摂取した場合は、摂取を中断してから摂取行動を再開するまでの時間は化合物濃度の増加に応じて長くなった。濃度応答性のロジスティック回帰により半数阻害濃度を得たところ、化合物の種類に依らず、摂取量と摂取時間の間で半数阻害濃度に差が認められなかったため、摂取量の減少は摂取時間の短縮に起因することが明確になった。

ノックダウンは、ピレトリンやピレスロイド系化合物に特有の即効的な麻痺作用であり、それらの化合物が昆虫の中樞神経系を即座に過興奮させることによって生じる。ノックダウンや殺虫作用はいずれも、神経細胞においてインパルスの生成に関わる Nav への薬理作用に起因する。そこで、クロキンバエの胸部腹面にピレトリンやピレトリンの有効成分を局所施用し、ノックダウン活性を評価した。キャピラリー摂食試験で得た摂食阻害活性はノックダウン活性と高度に相関したことから、摂食阻害作用を引き起こすピレトリンの標的分子はノックダウンや殺虫作用と同一であり、神経毒としての生理活性が摂食阻害を引き起こすことが示された。

第 4 章では、ピレトリンの摂食阻害作用を特徴づける口吻の嫌悪応答の行動解析を行い、摂食阻害の発現に関わるピレトリンの作用感覚器官を操作実験により特定した。拘束したクロキンバエの口吻運動のビデオ撮影により、摂食を阻害する味覚物質とは異なり、ピレトリンの摂取の中断は口吻や唇弁の震えを伴い、その後、口吻の部分的な伸展や引き戻しが断続的に繰り返されることが示された。また、時折、嘔吐く様

な胸部下方への口吻の伸展が引き起こされた。この嫌悪的な口吻伸展応答は最も目立つ行動応答であり、餌を探す時に繰り出す通常の口吻伸展応答とは明確に異なった。ワイヤ電極を用いた口吻の筋電図記録によって、これらの特徴的な口吻の運動応答は、口吻を構成する筋肉群の持続的な過興奮から描写することができた。このことから、摂取したピレトリンは、反復的な口吻の嫌悪応答を即座に引き起こすことで、摂食を中断させるだけでなく、摂取行動の再開を遅延させることがわかった。

消化管で速やかに吸収されたピレトリンが腹胸部の中樞神経系に作用することで、摂食行動が妨げられた可能性を否定するため、クロキンバエの咽頭を食道下神経節の手前で結紮する操作実験を行った。咽頭を結紮した条件でも、クロキンバエは咽頭が膨満するまでショ糖溶液を摂取した。ピレトリンを口吻に含ませると、口吻の持続的な過興奮が引き起こされたことから、ピレトリンの摂食阻害は、口吻や咽頭に存在する味覚器官への作用に基づいていることが明らかになった。ピレトリンの摂食阻害活性は、唇弁の周囲にある毛状味覚感覚子に触れない摂食条件でも再現されたことから、ピレトリンは、唇弁の内側に存在するペグ状味覚感覚子と咽頭の内側にある咽頭味覚器官のいずれか、または両方を標的とすることが示された。

第 5 章では、ピレトリンに対する口吻の味覚神経応答を電気生理学手法を用いて調べた。ペグ状味覚感覚子と咽頭味覚器官に由来する感覚ニューロンのピレトリンに対する応答を調べるため、それぞれに繋がる唇弁神経と咽頭神経に含まれる求心性神経の複合インパルスを吸引電極で記録しながら、クロキンバエにピレトリン入りのショ糖溶液を摂取させた。ピレトリンの摂取は、ペグ状味覚感覚子を構成する多数の感覚ニューロンを直ちに過興奮させ、過興奮の状態は口吻の筋活動の活性化と対応するように持続した。一方、咽頭味覚器官を構成する感覚ニューロン群は、1 分程度の潜時を経て漸進的に興奮した。これらの味覚感覚器の持続的な過興奮は、クイニンの摂取では生じなかった。これらの結果から、ピレトリンの摂食阻害作用をもたらす口吻の反復的な嫌悪応答は、唇弁のペグ状味覚感覚子の持続的な過興奮に起因することが明らかになった。

私は、昆虫に対して神経毒として作用するピレトリンが垂致死濃度で摂食阻害物質としてふるまうことをクロキンバエで明らかにした。この研究により、植物が産生する神経毒が摂食に関わる味覚感覚器を速やか

に刺激することで昆虫に対して摂食阻害作用を示すことを初めて実証した。得られた行動学的および電気生理学的知見を元に、摂取したピレトリンが味覚感覚器を構成する感覚ニューロンのインパルス生成部位にまで浸透し、Nav のゲーティングのキネティックを調節することで、味覚受容ニューロンや機械感覚性ニューロンを持続的に興奮させる、摂食阻害作用発現機序の新奇な仮説モデルを提案した。

昆虫は、食性の拡大とともに摂食形式や口器の形状を多様化させた一方で、味覚受容に関わる細胞構成を共有している。また、昆虫の神経細胞で機能する Nav は基本的に 1 種類であり、ピレトリンの感受性は中枢一末梢神経系を通して変わらない。普遍的な味覚受容の神経基盤は、幅広い昆虫種に対してピレトリンが実効的な摂食阻害作用を示すことを保証する。つまり、シロバナムシヨケギクの葉や子房に蓄積されたピレトリンは、摂食を試みるあらゆる昆虫に対して摂食阻害物質として機能することを意味する。コシヨウ科の植物が種皮に蓄えるピペロバチンやペリトリン、あるユリ科の植物が産生するベラトリジンは、ピレトリンとは異なる骨格の化学構造を有するが、いずれも Nav に結合し、昆虫の神経細胞に対してピレトリンと同様の薬理作用を示す。系統的に離れたこれらの植物における二次代謝の進化の背景には、強力な摂食阻害作用を有する神経毒を産生することによる適応度の向上があったと考えられる。

私は、シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害物質としての作用機序を明らかにした。昆虫の神経系が機能する上で必要不可欠な電位依存性ナトリウムチャネルは、植物が昆虫に対する防御形質を獲得するにあたり、これまで認識されていた以上に適応度に寄与する標的分子であることを示した。今後、ピレトリンをモデルとした研究が展開し、ピレトリンの味覚コーディング様式の細胞基盤や、摂食様式が異なる様々な植食性昆虫に対する摂食阻害作用の発現機序が明らかになることで、ピレトリンを筆頭とした一群の神経毒が摂食阻害物質として見直されることが期待される。

1 章 序論

1.1 植物が産生する神経毒の防御物質としての機能

植物は長い進化の歴史の中で、植食性昆虫に対抗するための多様な防御戦略を発達させてきた。植物自身による防衛手段は、昆虫に対して特異な生理活性を有する二次代謝物質による化学的手段と、刺やトリコーム（微毛）、硬い葉などで物理的に植食者からの加害を低減する物理的手段の二つに分けられる。化学的防御戦略は、植物の代表的な防御手段である。植物は、低分子化合物からペプチドやタンパクまで、多種多様な二次代謝物質を産生する(Harborne 1982)。植物由来の二次代謝物質としてこれまで同定された化合物の数は 20 万を超えている(Divekar et al. 2022)。二次代謝物質の中で植食者に対して特異な生理活性を有する化合物は一般的に防御物質と呼ばれ、植食者からの食害を回避、または低減することで適応度の向上に寄与する。防御物質として知られる主なケミカルクラスは、塩基性窒素を含むアルカロイド類、イソプレンを構成単位とする炭化水素系のテルペン類、フェノール類、糖がグリコシド結合した配糖体など多岐にわたる(Harborne 1982; Bennett and Wallsgrove 1994)。

二次代謝物質の生理作用は摂食阻害、有毒性、成長阻害の三つに大別される(Mithöfer and Boland 2012)。これまでに生理活性が特定された化合物の大多数は、摂食阻害物質か有毒物質のいずれかに当てはまる。一般的に、摂食阻害物質は昆虫の味覚感覚器で受容され、基本的に致死活性を示さない。これまでの研究により、摂食阻害物質の多くは、幅広い分類群の昆虫種において保存された特定の苦味受容体群で受容されることが明らかになっている(French et al. 2015a; Xu et al. 2016; Montell 2021)。苦味受容体が介在する摂食阻害物質の検出機構は、植食性昆虫の対抗適応による獲得形質であり、植物に潜在的に含まれる有害性物質の摂取を回避することに役立っていると考えられている(Mithöfer and Boland 2012)。

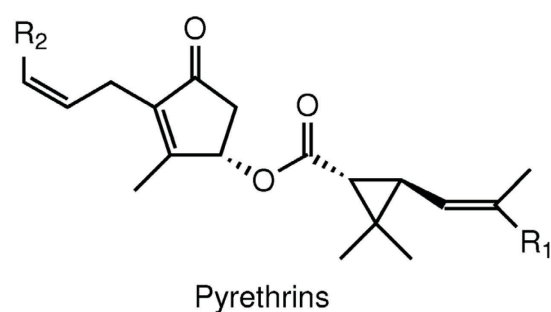
有毒性物質と呼ばれる二次代謝物質は、基本的に昆虫に対して致死活性を示す。昆虫にとって有毒な二次代謝物質の大半は昆虫の中樞神経系に作用する低分子の神経毒であり、その多くは昆虫の神経

系を構成するイオンチャネルや受容体を標的とする(Simpson and David 1974; Wang and Wang 2003; Gilbert et al. 2005; Wink 2018). これまでに特定された主な標的チャネル・受容体は、電位依存性ナトリウムチャネルや GABA 作動性塩素イオンチャネル、ニコチン性アセチルコリン受容体などであり、いずれも神経系の働きを維持する上で必要不可欠な膜タンパクである。生体内におけるイオンチャネルの機能は様々であるが、イオンチャネルを標的とする神経毒は基本的にそのゲーティング特性を調節し、リガンド作動性チャネルに対してはアゴニスト、もしくはアンタゴニスト活性を示す。このような生理活性を有する神経毒の摂取は、昆虫の中樞神経系の機能不全を引き起こすことで昆虫を致死させる。

個々の神経毒の致死活性を説明する固有の生理活性が明らかにされてきた一方で、植物における防御物質としての機能に関しては不明瞭な部分が多い。一般的に、致死性を有する神経毒は、昆虫の行動や生理に何かしらの負の影響を与える亜致死作用を示す(Desneux et al. 2007)。多くの場合、亜致死作用は致死量未満の量を摂取または暴露させた時に生じる。これまでの研究から、様々な植物産生神経毒について、亜致死量の摂取は昆虫の摂食行動に影響を与え、摂取量を減少させることが知られている(Matsumoto and Sei 1987; Mullin et al. 1992; Ainge et al. 2002; Sandoval-Mojica and Capinera 2011; Yang et al. 2012; Prota et al. 2014)。従って、植物体内に蓄積される神経毒は、より直接的に食害を抑止する摂食阻害物質として機能している可能性がある。摂取量を減少させるという広義の意味で摂食阻害作用を捉えた場合、神経毒の摂食阻害の機序として三つの可能性が考えられる。一つ目は、体内に吸収された化合物が中樞神経系の働きをかく乱することで、摂食行動が阻害される可能性である。これは、致死性神経毒の亜致死作用とみなすことができる。二つ目は、既知の摂食阻害物質と同様に、有毒化合物そのものが特定の味覚受容体を介して味覚受容器で受容される可能性である。三つ目は、化合物は、摂食に関わる味覚感覚器の味覚受容ニューロンを直接刺激することで摂食阻害を引き起こす可能性である。後者の二つの可能性は、これまでに実証されたことがない新奇の機序である。従って、神経毒が有する摂食阻害作用の機序を解明することは、植物がイオンチャネルを標的とした神経毒の生合成能を獲得した進化的背景を理解することにつながる。

1.2 モデルとしての神経毒ピレトリン

ピレトリン (pyrethrins) は、地中海のダルマチア地方を原産とするキク科のシロバナムシヨケギク *Tanacetum cinerariifolium* (旧学名: *Chrysanthemum cinerariaefolium*) が産生する殺虫性の化合物である。ピレトリンを多く含む花の乾燥粉末から蚊取り線香が作られた経緯から、この植物は日本では除虫菊と通称されている。ピレトリンは、ピレトリン I・II, シネリン I・II, ジャスモリン I・II の 6 種の殺虫性成分からなる (図 1-1)。I 型と II 型はそれぞれ、菊酸とピレトリン酸と呼ばれるカルボン酸のエステルであり、6 成分は互いに似通った構造を有している。ピレトリンは、昆虫からダニまで幅広い分類群の陸生節足動物に対して強い殺虫活性を示すが、ヒトや家畜を含む脊椎動物に対する毒性は低いことが知られている (Casida 1973)。また、ピレトリンは適度な光分解性を示すため、合成殺虫剤と比べて環境残留性が低い。これらの特長から、ピレトリンを高濃度に含むシロバナムシヨケギクの抽出物は、天然の殺虫剤として衛生害虫を駆除するために古くから産業利用され、現在では、農業分野や獣医学分野など、幅広い分野で活用されている (Macover 1995; Anadón et al. 2013)。抽出物に含まれるピレトリンの構成比は大きく変動するものの、主成分はピレトリン I・II であり、平均して全体の 70%以上を占める (Essig and Zhao 2001; Grdiša et al. 2013)。いずれの成分も殺虫活性を有するが、ピレトリン I/II の殺虫活性は、シネリン I/II とジャスモリン I/II よりも遥かに強いことが知られている (Sawicki and Thain 1962; Godin et al. 1965)。



	R ₁	R ₂
Pyrethrin I	Me	CH=CH ₂
Cinerin I	Me	Me
Jasmolin I	Me	Et
Pyrethrin II	CO ₂ Me	CH=CH ₂
Cinerin II	CO ₂ Me	Me
Jasmolin II	CO ₂ Me	Et

図 1-1 ピレトリンを構成する 6 つの有効成分。

ピレスロイド（pyrethroids）は、ピレトリン I から派生した合成物である。これまで半世紀以上にわたって、数多くのピレスロイド系殺虫剤が誕生し、家庭防疫分野や農業分野を中心に広く産業利用されてきた (Matsuo 2019; Ujihara 2019)。それぞれに固有の特徴を有するピレスロイド系殺虫剤の登場により、ピレトリンの作用機序の理解は大きく前進した。これまで半世紀以上にわたり実施された、昆虫神経細胞を用いたパッチクランプやアフリカツメガエルの卵母細胞発現系システムを用いた数多くの電気生理学的研究から、ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤は、いずれも昆虫の神経細胞膜に広く存在する電位依存性ナトリウムチャネルに選択的に作用し、そのゲーティングのキネティクスを調節することが明らかになっている (Casida 1973; Narahashi 1992; Soderlund 1995; Bloomquist 1996; Chen et al. 2018)。ピレスロイド系殺虫剤に対する抵抗性は様々な昆虫種で報告されており、いずれの抵抗性も、殺虫成分を分解する代謝酵素の過剰発現に加えて、電位依存性ナトリウムチャネルの遺伝子変異によって獲得される (Liu 2015; Scott 2017; Scott 2019)。従って、ピレスロイド系殺虫剤が電位依存性ナトリウムチャネルとは別のチャネルや受容体に作用する報告は幾つか知られているものの、致死作用を引き起こす標的タンパクは当該チャネルであることに疑いはない。

ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の薬理作用は、分子・神経レベルまでよく理解されている。これらの神経毒は、電位依存性ナトリウムチャネルを開口状態に保つことでナトリウム電流を持続させ、膜電位の脱分極を促進することでニューロンの反復放電を強制的に発生させる(Narahashi 2000)。この薬理作用は速やかに生じるため、ピレトリンやピレスロイド系化合物を昆虫の中枢神経組織に処理すると、組織中の多数のニューロンが一斉にバースト発火する(Soderlund 1995)。摘出した神経系を用いた実験では、神経系はしばしば、興奮が収束した後にインパルスが伝播しなくなる伝播遮断 (conduction block) の状態に陥る。ピレトリンの薬理作用を詳細に調べた研究事例は少ないが、チャバネゴキブリ *Blattella germanica* の電位依存性ナトリウムチャネルを開口状態に保つ効果は、6 つの活性成分の間で部分的に異なることが知られている(Chen et al. 2018)。

このような機序に基づいた中枢神経系の過興奮は、昆虫に様々な身体症状をもたらす。一般的に、多動 (hyperactivity) に始まり、体の震え (tremor) や痙攣 (convulsion) が生じ、麻痺状態 (paralysis) に行き着くことで、最終的に死に至る。埋込電極を用いた電気生理試験により、一連の中毒症状は、末梢・中枢神経系の興奮状態の推移と関連づけられることが示されている(Gammon 1978)。匍匐昆虫の多くは激しい痙攣を経て、ひっくり返った状態で麻痺に至ることから、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤によって引き起こされる特徴的な麻痺作用は、“ノックダウン (knock-down; KD)” と呼ばれる。この作用は極めて即効的であり、例えば、あるピレスロイド系殺虫剤をチャバネゴキブリの胸部に塗布すると、ゴキブリはわずか 10 秒程度でノックダウンする(Sugiura et al. 2008)。昆虫の中枢神経系に作用する天然物や合成殺虫剤は数多く存在するが (Ujváry 2010; Sparks et al. 2020)、麻痺に至る速さは抜きん出ていることから、ノックダウンは、ピレトリンやピレスロイド系化合物を特徴づける極めて重要な薬理効果である。

1.3 耐虫防御機能としてのピレトリンの潜在的な摂食阻害活性

ピレトリンは、シロパナムシヨケギク自身で生合成される。ピレトリンの活性成分を構成する酸とアルコール部位は、異なる 2 つの生合成経路によって生合成され、最終的にエステル化される。I 型と II 型のカルボン

酸である菊酸とピレトリン酸の生合成は非メバロン酸経路であり、アルコール部位の 3 種類のレスロロン（パイレスロロン、シネロロン、ジャスモロン）はオクタデカノイド経路で生合成される(Matsuda 2012; Lybrand et al. 2020). 遺伝子発現やトランスクリプトームの解析により、菊酸とピレトリン酸の生合成経路は近年明確になったが、レスロロン部位の生合成は現在でも十分には理解されていない(Lybrand et al. 2020). これまでに明らかになった生合成経路は、シロバナムシヨケギク以外ではまったく知られていないことから(Lybrand et al. 2020), シロバナムシヨケギクは、独自の進化を経て、この生合成能を獲得したといえる.

ピレトリンは植物体の地上部を通して蓄えられるが、花果に多く蓄積されることが古くから知られている(Casida 1973; Macover 1995). その含有量は、腺毛状突起 (glandular trichomes) の数と関連し、それらは筒状花の子房部分の表面に最も多く存在している(Brewer 1973; Zito et al. 1983). トランスクリプトーム解析により、ピレトリンの生合成に関わるあらゆる遺伝子は、開花前期に主に子房組織で発現することが明らかになった(Lybrand et al. 2020). 生殖器官である子房の発達に合わせて生合成が制御されることに加えて、葉などの栄養組織におけるピレトリンの蓄積は、生合成関連遺伝子の発現と共に、機械傷や、食害によって誘導される植物由来揮発成分、さらに防御応答のシグナル伝達物質であるジャスモン酸メチルの処理によって誘導されることが明らかになってきた(Lybrand et al. 2020). これまでに明らかになったピレトリン生合成の制御様式は一貫して、ピレトリンは被食回避のための防御物質として極めて重要な役割を担っていることを表している.

Yang ら (2012) は、シロバナムシヨケギクの花を加害するミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* が、実際に葉に含まれる濃度に相当する量のピレトリンを処理した近縁種の葉を加害しないことを実験的に示した. この時、摂食実験で得られた致死率は低かった. これらの発見は、シロバナムシヨケギクの組織に蓄積されるピレトリンは、殺虫作用が発現するよりも前に昆虫の摂食を阻害することで、植物体を過度な食害から守る仮説を導く. その後、ピレトリンに対する類似の摂食回避行動は、シルバーリーフコナジラミ *Bemisia tabaci* やモモアカアブラムシ *Myzus persicae* でも明らかになった(Prota et al. 2014).

これらの微小な吸汁性昆虫に対する摂食忌避作用は、いずれもリーフディスクを使った選択型摂食試験法によって示された. リーフディスク試験は、植食性昆虫の種類を問わない一般的な摂食試験法であるが、

葉面に化合物を処理した場合、葉を摂食する昆虫の胴体や脚が葉の表面を覆った化合物に絶えず曝される点に留意する必要がある。この状況では、摂食によって何かしらの影響が生じる前に、ピレトリンの跗節への接触に基づいた忌避作用である、接触イリテーション(Achee et al. 2009; Manda et al. 2013; Obermayr 2015)が起こりえる。そのため、リーフディスク試験で見出された摂食忌避の実体は、葉上で速やかに生じた接触イリテーションである可能性は否定できない。加えて、いずれの研究も、シロバナムシヨケギクの乾燥花果の粗抽出物であるピレトラムオイルが評価に用いられた。ピレトラムオイルの約 10%は、テルペン系化合物である(Casida 1973; Macover 1995)。植物由来テルペン類は蒸散性の忌避作用を示すことが多いことから(Maia and Moore 2011)、ピレトリン以外の構成成分が摂食の機会を減らした可能性も否定できない。

一方、ピレスロイド系殺虫剤の幾つかは、鱗翅目(Ruscoe 1977; Tan 1981; Kumar and Chapman 1984; Gist and Pless 1985)や甲虫目(Dobrin and Hammond 1985; Hajjar and Ford 1990; Baumler and Potter 2007)の幼虫に対して摂食阻害活性を示すことが 40 年以上も前から知られている。これらの種の幼虫の脚や腹脚には、接触化学受容器は存在しないため、それらの摂食阻害作用は化合物を経口摂取することで引き起こされたと考えられる。しかしながら、ピレスロイド系化合物の起源であるピレトリンを構成する 6 成分が、混合物として、または単独で昆虫の摂食を阻害する直接的な証拠は現時点でも存在しない。

1.4 ピレトリンの味覚感覚器に対する作用

摂食阻害物質は口器の味覚感覚器で知覚される。昆虫の口器や脚の先端に存在する味覚感覚器は、摂取に先立ち、餌の質や潜在的な有害性を判断するための検出器として機能している(Meyerhof 2013)。味覚感覚器を構成する味覚感覚子は、一般的に、甘味、塩味、苦味など異なる質の味覚物質の検出にそれぞれ特化した複数の味覚受容ニューロンから構成される(図 1-2)。クイニンやカフェイン、アリストロキア酸などの摂食阻害物質を選択的に検出する苦味受容ニューロンは、幅広い分類群の昆虫の味覚感覚器に存在する(L. M. Schoonhoven et al. 1992; Glendinning and Hills 1997; Glendinning et al. 1999;

Liscia and Solari 2000; Wada-Katsumata et al. 2013; Kim et al. 2015). キイロショウジョウバエや広食性のチョウ目の昆虫では、種間相同性が高い複数の味覚受容体（苦味受容体）が苦味受容ニューロンで機能的に発現していることが明らかになっている(Agnihotri et al. 2016; Xu et al. 2016). アブラナ科が産生するイソチオシアネート類や、シトロネラルなどのテルペン類は、摂食を抑制・阻害する有害性物質（noxious substrates）であるが、それらの検出は苦味受容体ではなく、温度感受性 TRP（transient receptor potential）チャネルの一種である TRPA1 や painless が関わっている(Kim et al. 2010; Kwon et al. 2010; French et al. 2015a; Mandel et al. 2018; Hull et al. 2020). キイロショウジョウバエの味覚感覚子では TRPA1 チャネルは苦味受容体と共発現していることから、苦味受容ニューロンは苦味物質と有害性物質の両方を検出することが示唆されている(French et al. 2015a). このように、植食性昆虫は、植物体に潜在的に含まれる有毒物質の摂取を回避するため、様々な分子種の化合物を検出できるような受容体のレパートリーを備えている。

ピレトリンの経口摂取によって摂食が阻害される場合、その機序は神経毒としての生理作用によって説明されるのだろうか。パーメスリンなど、ある種のピレスロイド系殺虫剤は、ヒツジキンバエ *Lucilia cuprina* の唇弁にある毛状味覚感覚子を構成する味覚受容ニューロンに対してわずかながら異常な反復興奮を引き起こす(Holan et al. 1978; Holan and Poppleton 1980). ピレトリンの構成成分に関しては、近年、ピレトリン I/II とシネリン I/II が、ヤブカ属の蚊の嗅覚感覚毛にある特定の嗅覚受容ニューロンを興奮させ、この嗅覚受容ニューロンの活性化には、電位依存性ナトリウムチャネルが部分的に介在していることが示された(Liu et al. 2021; Yan et al. 2021). ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤は幅広い昆虫種に殺虫活性を示すことに加え、大半の昆虫は、互いに相同性の高い 1 種類の遺伝子（*para*）しか保有していない(Dong et al. 2014). 従って、ピレトリンは、昆虫種に関わらず、特定の味覚受容体を介在することなく味覚受容ニューロンを直接的に興奮させることが本質的に可能であり、苦味受容ニューロンを刺激する既存の摂食阻害物質とは異なる機序によって摂食を阻害させる可能性がある。

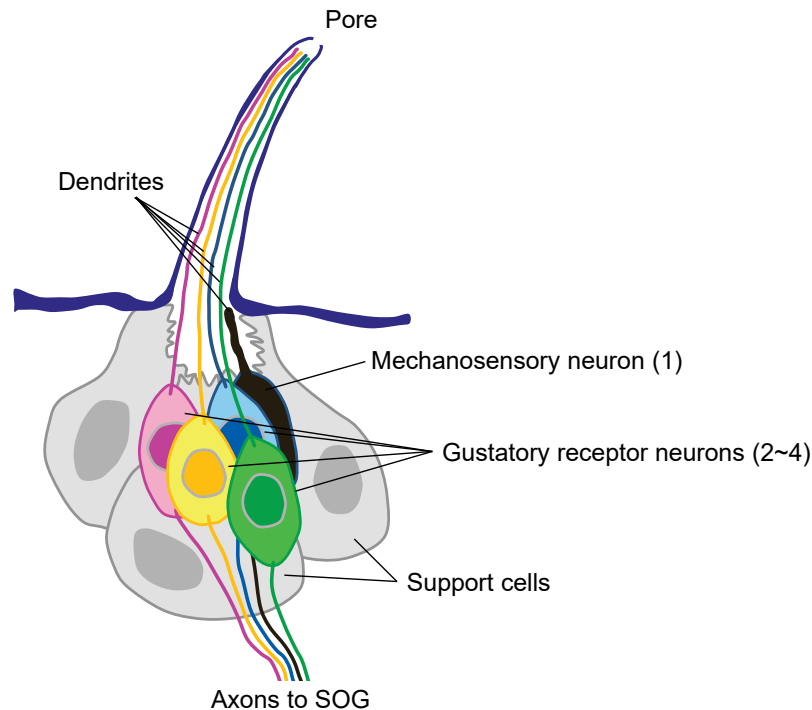


図 1-2 昆虫の味覚感覚子の一般的な構成。

化合物は感覚子の先端にある小さな孔（pore）から侵入する。感覚子は 2～4 本の味覚受容ニューロン（gustatory receptor neurons）を内包し、1 つの機械刺激受容ニューロン（mechanosensory neuron）を伴っていることが多い。味覚受容ニューロンの軸索は食道下神経節（SOG）に投射する。

1.5 実験モデルとしてのクロキンバエ

クロキンバエ *Phormia regina* (Meigen) は、クロバエ科に属する大型のハエである。クロキンバエは、摂食行動に関する生理学の研究に長く用いられており、摂食に関わる口吻の神経-筋肉構成や、唇弁の味覚感覚毛の細胞構成と応答スペクトルに関する知見は蓄積されている (Dethier 1976)。クロキンバエは、昆虫の味覚の基本要素である甘味、塩味、苦味、酸味物質を検出する味覚受容器を備えており (Dethier 1976; Liscia and Solari 2000; Ozaki et al. 2003)、テルペン類などの有害性物質に対しても特徴的な嫌悪応答を示すことが明らかになっている (Dethier 1976; Ozaki et al. 2003)。唇弁化学感覚毛に対するピレスロイドの作用を調べたヒツジキンバエ (Holan et al. 1978; Holan and Poppleton 1980) は、同じクロバエ科に属するクロキンバエの近縁種であり、クロキンバエにおいても同様の生理作用が想定される。従って、

一連の味覚物質や有害性物質をピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の対照として評価し、得られた結果を比較することで、ピレトリンの摂食阻害作用の機序を合理的に考察することが可能である。同じ双翅目に属するモデル生物であるキロショウジョウバエにおいて、近年急速に理解が深化している味覚受容の分子・細胞基盤(French et al. 2015a; Chen and Dahanukar 2017; Chen and Dahanukar 2020; Montell 2021)に関する知見を参照することも可能だろう。

クロキンバエは、摂食行動を研究する実験動物として様々な利点を備えている。クロキンバエやキロショウジョウバエなどの多くのハエ成虫は、ショ糖溶液からなる単純な人工餌を摂取することから、ショ糖溶液に混合した試験化合物の摂取行動への影響を評価することが可能である。大半の植食性昆虫では適用が難しい、クロキンバエを用いる最大の利点は、口吻伸展応答 (proboscis extension response; PER) アッセイや(Shiraiwa and Carlson 2007; Maeda et al. 2015)、キャピラリー摂食試験法など(Qi et al. 2015)、拘束した個体に餌液溶液を摂取させる実験パラダイムが利用できる点である。この方法を用いることで、経口摂取に基づいた厳密な意味での摂食阻害作用の評価が可能である。さらに、摂取行動の詳細な解析や *in vivo* 電気生理のアプローチも可能である。また、操作実験を施すことが可能な体サイズと種々の操作に耐えられる頑強さ(Dethier 1976)は、モデル生物のキロショウジョウバエにはない特長である。このように、ピレトリンの潜在的な摂食阻害作用の機序を調べる上で、クロキンバエはモデル種として相応しい。

1.6 研究の目的と本論の構成

そこで、クロキンバエを実験材料として選び、ピレトリンの摂食阻害作用の機序を明らかにすることを目的とした。博士論文の本論は、以下の構成からなる：第 2 章では、クロキンバエに対するピレトリンとその有効成分の摂食阻害活性を確かめるため、シロバナムシヨケギクの抽出精製物であるピレトリンとその主成分であるピレトリン I および II の摂食阻害活性を選択型摂食試験法で評価した。続いて、第 3 章では、キャピラリー摂食試験法を用いて、ピレトリンとピレトリン構成成分の摂食阻害活性を評価し、それらの化合物が摂取行動をどのように調節するのかを明らかにした。第 4 章では、ピレトリンの摂取によって引き起こされる特徴的

な口吻の嫌悪応答を行動学的に解析するとともに、嫌悪応答を指標として、ピレトリンが作用する標的器官を特定した。第 5 章では、標的となる味覚感覚子・味覚器官を構成する味覚神経の活動を電気生理学的に記録し、摂取したピレトリンに対する神経応答を明らかにした。第 6 章では、第 5 章までに得られた実験事実にもとづいて、ピレトリンの摂食阻害作用のモデル機序を提示し、今後の研究の展望について考察した。

用語の定義

ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤に関連する用語の定義をここ定める。

ピレトリン (pyrethrins) :

シロバナムシヨケギク (除虫菊) が産生する殺虫性の化合物。ピレトリンは、ピレトリン I・II, シネリン I・II, ジヤスモリン I・II の 6 種の殺虫性成分からなる (図 1-1)。ピレトリンは、これらの殺虫性化合物の混合物を指し示す一般名であり、用語の定義上は、抽出精製品か合成品かを問わない。また、ピレトリン I・II をまとめてピレトリンと呼ぶこともある。

天然ピレトリン (natural pyrethrins) :

シロバナムシヨケギクの花から抽出したピレトリンの精製物。本研究では、6 種類の有効成分を 95.7%の純度で含む試薬 (CAS RN®: 8003-34-7, 富士フィルム和光純薬, 大阪) を用いた。合成した有効成分と対比するための呼称。

ピレトリン I, II :

ピレトリンの主成分であるピレトリン I およびピレトリン II。本研究では合成品を使用したため、各章の材料と方法および結果に登場する本用語は、合成物を指す。

合成ピレトリン :

本研究で用いたピレトリン I および II の有機合成物を示す。天然ピレトリンと対比する際に用いた。

ピレスロイド系化合物 :

ピレトリンから派生した、ピレトリンと類似の化学構造をもつ合成化合物の総称。それらの多くは殺虫活性を有する。

ピレスロイド系殺虫剤 :

殺虫剤として市販されているピレスロイド系化合物。本研究ではピレトリンの作用と比較するため、2 種類のピレスロイド系殺虫剤 (アレスリン, デルタメスリン) を使用した。

第2章 選択型摂食試験によるクロキンバエに対するピレトリンの摂食阻害活性の評価

2.1 背景と目的

ピレトリンの摂食阻害活性とその作用機序を調べるにあたり、ハエ類のモデルシステムを用いる利点はいくつかある。摂食阻害作用を行動学的に調べる上での利点は、選択型摂食試験(Liscia and Solari 2000)や、口吻伸展応答（PER）試験(Shiraiwa and Carlson 2007; Maeda et al. 2015)、キャピラリー摂食試験法など(Ja et al. 2007; Qi et al. 2015; Diegelmann et al. 2017)、化合物の摂食選好性や嫌悪的な質を定量的に評価することができる一連の確立した摂食試験法が利用できることである。これまで、味覚物質や天然物、有害性物質など、様々な由来の化合物がこれらの生物試験法で評価されており(Dethier 1976; Liscia and Solari 2000; French et al. 2015a; Chen and Dahanukar 2020)、それらの摂食阻害活性の強さや嫌悪応答に関する行動学的な知見が蓄積されている。この利点を生かし、摂食阻害の成り立ちや味覚受容基盤がよく調べられている味覚物質と比較することで、ピレトリンの摂食阻害作用をより適切に解釈することができるだろう。

この章では、ハエが自由に摂食行動を行うことができる選択型摂食試験法で、ピレトリンの摂食阻害活性を評価した。基本的に、選択型摂食試験法では、摂食を試みる昆虫の体や脚が人工餌に触れざるを得ない。神経毒性のない味覚物質とは異なり、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤を混合した餌に脚の先端の跗節が接触することで、接触イリタンス(Obermayr 2015)が生じる可能性がある。接触イリタンスが生じると、摂食の機会が減ることで摂食量が低下するため、摂食阻害活性を過大評価することになる。そこで、人工餌に脚が触れる機会を最小限に留める工夫を施した選択型摂食試験を行った。摂食試験には、シロバナムシヨケギクの抽出精製物であるピレトリンに加えて、その主要成分であるピレトリンⅠとⅡを供試した。殺虫性化合物の比較対象として、ピレスロイド系殺虫剤であるアレスリンとデルタメスリンを評価した（図 2-1）。また、ハエに対して摂食阻害活性を示す数種の味覚物質（図 2-2）の摂食阻害活性を評価し、殺虫性化合物の活性と比較した。

2.2 材料と方法

2.2.1 ハエ

神戸大学理学研究科の尾崎まみこ名誉教授から贈与されたクロキンバエを住友化学株式会社健康・農業関連事業研究所で累代飼育した。ハエは 21 ± 1 °C , 70%RH, 明期 16 時間/暗期 8 時間の周期で飼育した。幼虫は豚レバーで飼育した。羽化したハエは、メッシュケージ（高さ 21 × 幅 21 × 奥行 28 cm）の中で 0.1M のショ糖溶液を与えて維持した。摂食実験には、羽化後 4 – 10 日齢の成虫を雌雄の区別なく用いた。

2.2.2 試験化合物

シロバナムシヨケギクに含まれるピレトリンそのものの活性を評価するため、6 種類の有効成分を 95.7%の純度で含むピレトリン抽出物（CAS RN[®]: 8003-34-7, 富士フィルム和光純薬, 大阪）を用いた。今後、このサンプルを天然ピレトリン（natural pyrethrins）と呼ぶことにする。天然ピレトリンに加えて、天然ピレトリンの主成分であるピレトリン I と II を評価した。これらの 3 つの成分は、住友化学株式会社の森達也博士によって化学合成され(Kawamoto et al. 2020), それぞれの純度は液体クロマトグラフィーで確かめられた（ピレトリン I : 99.4%, II : 96.9%）。これらの化合物には、酸化を防ぐため、ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）を 1%w/w の濃度で添加した。タイプ I 型のピレスロイド系殺虫剤であるアレスリン（95.9%, 2 つの異性体の混合物, シグマアルドリッチ, MO, USA）と、タイプ II 型ピレスロイド系殺虫剤であるデルタメスリン（99.5%, 関東化学, 東京）を合わせて評価した（図 2-1）。これらの天然および合成殺虫剤は、ジメチルスルホキシド（DMSO ; $\geq 99\%$, 富士フィルム和光純薬）に溶解し、それぞれ 100 mM のストックを作成した。味覚で受容される摂食阻害物質の陽性対照として、塩化ナトリウム（99.9%, ナカライテスク）, クイニン塩酸塩二水和物（クイニン ; 99.8%, 富士フィルム和光純薬）, L-(+)-酒石酸（酒石酸 ;

99.9%, シグマアルドリッチ) を用いた (図 2-2) . スクロース (富士フィルム和光純薬) を摂食刺激物質に用いた.

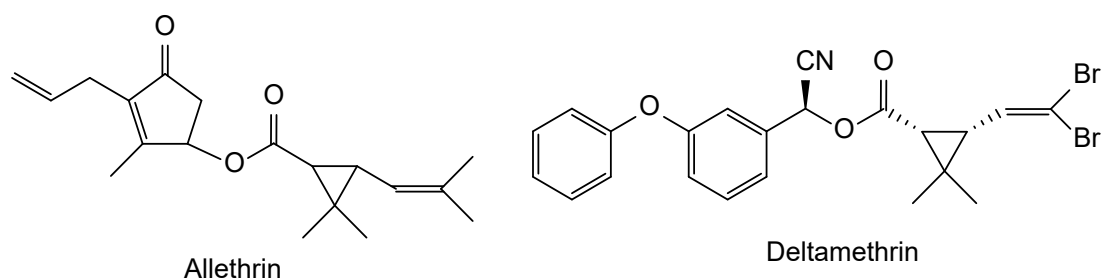


図 2-1 試験に用いたピレスロイド系殺虫剤であるアレスリン (タイプI型) とデルタメスリン (タイプII型) .

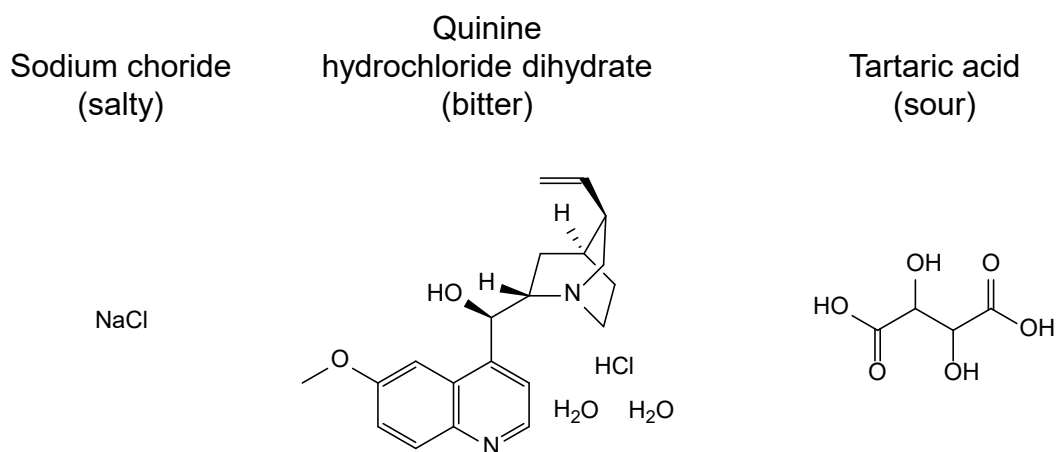


図 2-2 比較対照として用いた味覚物質.

それぞれ塩味, 苦味, 酸味として受容される塩化ナトリウム, クイニン塩酸塩, 酒石酸.

2.2.3 選択型摂食試験法による摂食選好性の評価

試験化合物の摂食阻害活性は, 片方に試験化合物を混合した2つのショ糖溶液の餌源をハエに選択させる, 選択型摂食試験法 (dual-choice feeding assay) で評価した. 殺虫性化合物の試験では, 100 mMのDMSOストックを0.1 Mのショ糖溶液で希釈した. 摂食行動に対するDMSOの影響を等しくするため, 同一濃度のDMSOを対照区のショ糖溶液に添加した. 殺虫性化合物の最高濃度は1 mMであり, そのショ

糖溶液にはDMSOが1%含まれていることになる。試験溶液は16倍または4倍に希釈して、濃度応答性を評価した。水溶性の味覚物質である塩化ナトリウム、クイニンおよび酒石酸はショ糖溶液で希釈し、DMSOを含まないショ糖溶液と比較した。

40～100頭のハエをメッシュケージ（高さ21 × 幅21 × 奥行28 cm）に投入し、 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ， $70 \pm 5\%$ RHに調節したインキュベーター（LPH-241PFD-SP, Nippon Medical & Chemical Instruments Co. Ltd., 大阪）の中で、20-24時間水のみを与えて絶食させた。アルミ皿（直径4.7 cm，深さ0.9 cm，重量： 0.457 ± 0.0018 SD g, $n = 12$ ）を2つ用意し、脱脂綿（5 × 6 × 厚さ0.4 cm，重量： 0.517 ± 0.0017 SD g, $n = 12$ ）を詰めた後に、片方に試験化合物を含むショ糖溶液を、もう片方には対照のショ糖溶液を10mlずつ滴下した。試験化合物を含んだショ糖溶液に脚の跗節が浸ることで、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤に特有の接触イリタンスが生じることを防ぐため、円形に切り出したポリエステルメッシュ（#1.5 mm）でアルミ皿を覆った。一对の餌皿はそれぞれの重量を測定した後に、約5 cmの間隔を空けてケージの中央に置き、5時間の摂食実験を開始した。試験終了後にハエを観察し、体を横向きにして、もしくはひっくり返って自身で起き上がることができない状態をノックダウンとみなして、その数を数えた。その後、餌皿を直ぐに取り出して重量を測定した。それぞれの化合物と濃度で試験を5回反復した。

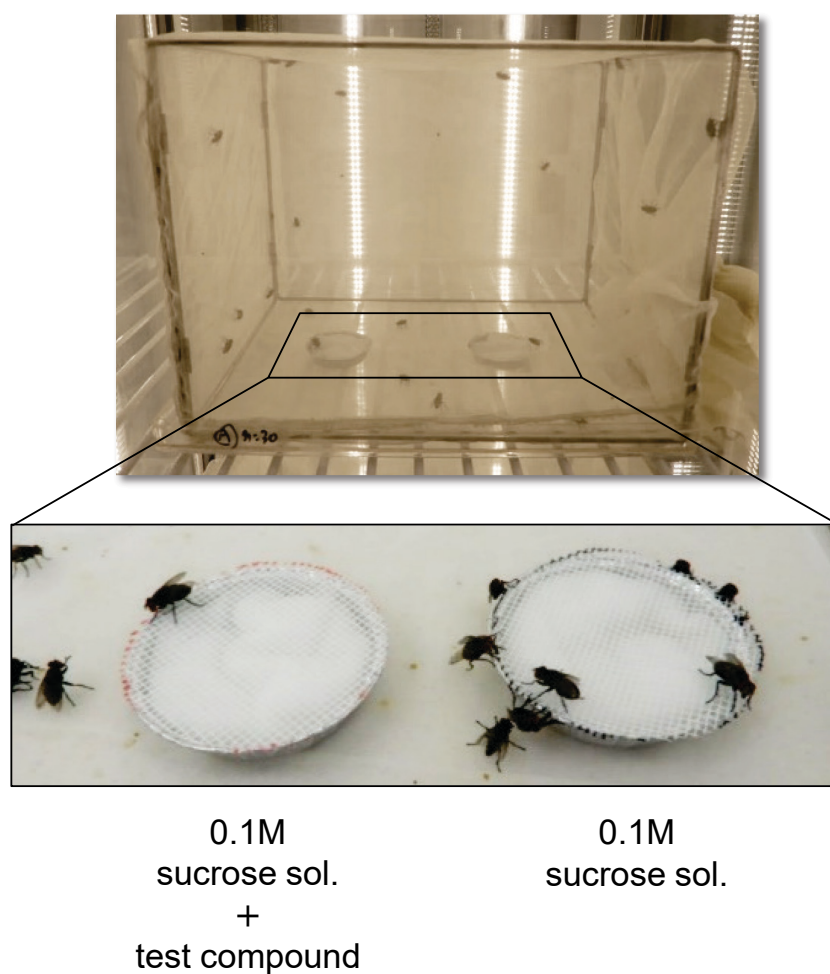


図 2-3 選択型摂食試験。

2つの餌皿を置いたメッシュケージに1日絶食させたハエを投入し、自由に餌を摂取させた。いずれの餌皿も0.1 Mのショ糖溶液が満たされているが、片方の餌皿（拡大図、左側）には所定濃度の化合物を含んでいる。餌皿の上にメッシュを置くことで、ハエの脚が試験溶液に浸り続けることがないようにした。

2.2.4 摂取量の算出

餌の摂取量は、摂食試験の前後で測定した餌皿の重量減少とした。蒸発による重量損失を考慮するため、摂食試験と同じ環境下で一對のショ糖溶液の餌皿の重量減少を測定した。5時間の試験時間で餌皿から蒸散する水の量は、DMSOの濃度に関わらず、0.69gだった(DMSO 1%含有: 0.69 ± 0.05 g, mean $\pm$ sd, $n = 8$; DMSOなし: 0.69 ± 0.08 g, $n = 8$)。各々の餌皿の摂取量は、餌皿の重量減少量から平均自然蒸散量 (0.69 g) を引くことで得た。ショ糖溶液の正味の摂取量は、1.06 g ($n = 44$ flies) から3.39

g (n = 98 flies) までばらついたが、概ね、ケージに投入したハエの数に比例した。測定精度が10 mgの電子天秤 (PM4000, METTLER TOLEDO, 東京) を用いることで、試験化合物の影響による摂取量の減少を十分な分解能で測定した。

2.2.5 摂食阻害活性とノックダウンの評価

これまでに行われた多くの選択型摂食試験では、試験化合物の摂食阻害活性は、試験化合物を混合した餌の摂食選好性の減少によって描写されてきた(Yang et al. 2012; Charlu et al. 2013; Prota et al. 2014; Rimal et al. 2019)。これらの先行事例に倣い、摂食阻害活性を表す指標として選好指数 (preference index: PI) を得た。PI の値は、試験化合物を含むショ糖溶液の摂取量 (I_t) と、対をなしたショ糖溶液の摂取量 (I_b) を求め、 $(I_t - I_b) / (I_t + I_b)$ の式にしたがって算出した。PI の値は-1 から 1 の範囲の値をとり、正の値は試験化合物の摂食選好性を、負の値は摂食阻害を表す。化合物の摂食阻害活性が強い場合、しばしば摂食量が負の値になった。このような場合は、摂取量を 0 とみなして PI 値を計算した。ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の殺虫作用を評価するため、試験終了時にケージの中でノックダウンしていたハエの数を投入個体数で割り、ノックダウン率 (以下、KD 率) を求めた。

2.2.6 選択型摂食試験のベースラインの検証

脂溶性の高い殺虫性化合物をショ糖溶液に溶解するために DMSO を補助溶媒として用いた。DMSO は、試験化合物のモル濃度に対して一定の割合で含まれている。DMSO は、昆虫を含む多くの生物にとって有害であるが、その致死性は、溶液に含まれる DMSO の濃度に加えて、試験した生物種や採用した試験方法など、様々な要因に大きく依存することが知られている(Pagán et al. 2006; Machova et al. 2009; Ravindran et al. 2011a; Ravindran et al. 2011b; Cvetković et al. 2015)。クロキンバエの摂食行動に与える DMSO の影響を調べるため、同一濃度の DMSO を含む一対のショ糖溶液を選択型摂食試験に供試

し、DMSO の濃度を 1 M から 10^{-5} M まで変えた。一対のショ糖溶液の合計摂取量とケージに投入したハエの数から一時間あたりの一個体摂取量を算出し、DMSO の濃度による変化を調べた。KD 率についても同様の解析を行った。さらに、クロキンバエに対する DMSO の潜在的な摂食阻害活性を調べるため、DMSO を含まないショ糖溶液に対する 1% の DMSO を含むショ糖溶液の摂食選好性を評価した。同様に、BHT の潜在的な摂食阻害活性を調べるため、20 μ M の BHT を含むショ糖溶液の摂食選好性を評価した。合成ピレトリンの溶液に含まれる BHT の最大濃度は、14.9 μ M である。

2.2.7 最小有効濃度と一個体摂取量の算出

各試験化合物について、摂食阻害もしくはノックダウンが生じた濃度を濃度応答データから調べた。摂食阻害作用は平均 PI 値が 0 よりも有意に下回った時に、ノックダウンは平均 KD 率が 0% から有意に上回った時に成立したと判断した。摂食阻害作用もしくはノックダウンが生じた最小有効濃度 (minimum effective concentrations ; MECs) をそれぞれの化合物で特定した。

化合物の殺虫活性の強さは、一定の殺虫作用をもたらした化合物の用量によって表されることが多い。ショ糖溶液の摂取量は、化合物の摂食阻害活性に依存して減少する。そのため、同じ MEC であっても、摂食阻害をもたらした化合物の摂取量は、ノックダウンを引き起こした化合物の摂取量よりも少なくなるはずである。そこで、摂食阻害またはノックダウンを引き起こした摂取量を試験化合物間で比較するため、すべてのハエが試験溶液を等しく摂取したとみなし、摂取したショ糖溶液の容量に含まれる化合物の重量をケージに投入したハエの数で割ることで、各化合物の MEC における一個体あたりの化合物の摂取量を推定した。

2.2.8 ピレトリンおよびピレスロイドの摂食阻害作用の特徴の解析

クロキンバエは 62.5 μ M の天然ピレトリンを含むショ糖溶液を摂取すると、直ぐに摂食を止め、口吻を前脚でしきりにグルーミングし始めることを見出した (図 2-6)。摂食によって引き起こされた口吻のグルーミン

グと、採餌行動および殺虫効果の間の関連性を調べるため、2つの餌を選択する状況におけるクロキンバエの摂食行動をデジタルカメラ（COOLPIX A900, ニコン, 東京）で記録した。個々の摂食履歴を得るため、一度の試験では、胸部背面に識別可能なマーキングを施した15匹のクロキンバエを使用した。試験は、各化合物についてそれぞれ3回繰り返した。5時間の試験期間の中で、最初の30分間の摂食行動を記録した。試験終了後に、ノックダウンしたハエの数を数えた。

撮影した動画は、マイクロソフト社のフォトアプリケーションで解析した。口吻を伸ばして餌を摂取した餌皿への訪問を特定し、個々のハエの餌探索の履歴を得た。試験化合物を最初に摂取したことの、その後の探索行動への影響を調べるため、処理区の餌を最初に訪問した個体の試験期間における訪問回数を数えた。また、処理区の餌皿に訪問している間に口吻のグルーミングが生じた頻度を算出した。

2.2.9 統計処理

得られたデータの統計解析は、R (ver. 4.1.2) を用いて行い、グラフの描画には Igor Pro 6.3.7.2 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, US) を用いた。各サンプルで得られた PI 値とノックダウン率は、一標本 t 検定を用いて、それぞれの基準値 (PI = 0, ノックダウン率 = 0%) と比較した。多重比較を行う場合は、得られた p 値をボンフェローニ法で補正した。MEC における推定一個体摂取量は、ボンフェローニで補正した一標本 t 検定を用いて、化合物間で比較した。ショ糖溶液の一個体摂取量の平均値と DMSO 濃度の関係は直線回帰し、DMSO 濃度の影響は一元配置分散分析で検出した。化合物間における餌源への訪問回数の平均値の多重比較は、テューキー法で行った。口吻のグルーミングの発生頻度および KD 率の化合物間における多重比較はフィッシャーの正確確率検定で行い、 p 値はホルム法で補正した。

2.3 結果

2.3.1 選択型摂食試験のベースラインの確認

様々な濃度の DMSO を含む一対のショ糖溶液をクロキンバエに摂食させた場合、ショ糖溶液の一個体摂取量の平均値は DMSO 濃度の増加に対して変化しなかった（図 2-4A）。また、DMSO 濃度の増加によって KD 率は増えなかった（図 2-4A）。殺虫性化合物を混合したショ糖溶液に含まれる最大濃度の 1% の DMSO は、PI 値を低下させなかった（図 2-4B）。合成ピレトリンの最高濃度（1 mM）に含まれる量に相当する、20 μ M の BHT もまた PI の平均値を変化させなかった（図 2-4C）。これらの結果から、ショ糖溶液中の DMSO は、クロキンバエの摂食選好性のベースラインに影響せず、また、合成ピレトリンに対して 1%w/w の割合で添加した BHT は摂食阻害活性を示さないことが確認された。

2.3.2 摂食阻害活性の評価

まず、塩味、苦味、酸味物質の摂食阻害活性を選択型摂食試験で評価した。ショ糖溶液中のこれらの味覚物質の濃度が増加するにつれて、PI の平均値は次第に減少し、 -1 へと近づいた（図 2-5A）。これらの味覚物質は、最終的にほぼ完全にハエの摂食を阻害した一方で、KD 率は増えなかった。それぞれの濃度で得られた PI の平均値と基準値（PI = 0）の比較から、摂食阻害をもたらした塩化ナトリウム、クイニン、酒石酸の MEC は、それぞれ、250、1、および 62.5 mM であることが示された。

天然ピレトリンや合成ピレトリンは、摂食阻害作用を示した 3 種の味覚物質と類似した PI 値の濃度応答性を示した（図 2-5B）。天然ピレトリンおよび合成ピレトリン I/II が摂食阻害作用を示した MEC は、いずれも 62.5 μ M だった。この濃度は、KD 率が有意に増加した最小濃度と比べると、天然ピレトリンとピレトリン I では 16 分の 1 であり、ピレトリン II では 1/16 未満だった。ピレトリン I と構造が類似しているアレスリンは、KD 活性を示す最小濃度の 1/16 の濃度で摂食阻害作用を示し、その MEC はピレトリン I と同じだった（図 2-5C）。デルタメスリンでは、3.9 μ M で KD 率が増加し、PI の平均値は 62.5 μ M の濃度まで有意に減少しなかった。したがって、デルタメスリンの効力発現パターンは、ノックダウンが生じる前にクロキンバエの摂食を阻害した天然・合成ピレトリンやアレスリンとは異なった。

それぞれの化合物の MEC における一個体摂取量を推定した（表 2-1）。PI の値が有意に低下した濃度でも、クロキンバエはかなりの量の味覚物質を摂取した。味覚物質の一個体摂取量は、摂食阻害作用の MEC に概ね相関した。統計的有意性は一部しか検出されなかったが、クイニンは、最小有効濃度だけでなく、一個体摂取量の点においても、最も強い摂食阻害活性を示した。摂食阻害もしくはノックダウンをもたらした MEC における、ピレトリンとピレスロイドの平均一個体摂取量は、いずれも 200 ng 未満だった。同一の MEC で摂食阻害活性を示した天然および合成ピレトリンでは、天然ピレトリンとピレトリン II の一個体摂取量は、ピレトリン I よりも少なかった。このことは、ピレトリン I の摂食阻害活性は、天然ピレトリンやピレトリン II よりも弱いことを示している。天然ピレトリンの MEC はデルタメスリンよりも高かったが、天然ピレトリンの一個体摂取量はデルタメスリンの摂取量よりも多くなかった。ピレトリン I の一個体摂取量は、アレスリンの摂取量と変わらなかった。

2.3.3 天然ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害作用と口吻のグルーミングの関連性

MEC のピレトリンの摂食阻害作用は、摂食を中断させた口吻の激しいグルーミングから特徴づけられた（図 2-6）。少数の個体を行動解析した結果、ピレトリン、またはアレスリンを含む餌皿を摂取したほぼ全ての機会に口吻のグルーミングが生じることが明らかになった（表 2-1）。一方、KD を引き起こした MEC のデルタメスリンでは、摂取によって生じる口吻のグルーミングの頻度は 8%に過ぎず、ショ糖溶液を摂取した時のベースライン（0%）と統計的に違いは見られなかった。3 種の味覚物質に関して、MEC の味覚物質を含むショ糖溶液を摂取している間に口吻のグルーミングは一切発生しなかった。これらの結果は、摂取によって引き起こされた口吻の激しいグルーミングは、ピレトリンやアレスリンの摂食阻害作用と密接に関わっていることを示している。

個々のハエの合計摂取量は、試験期間中に餌皿に訪問した総数に依存した。3 種の味覚物質についてそれぞれの MEC で試験した時、餌皿への訪問回数は、クロキンバエが最初に味覚物質を混ぜたショ糖溶液を摂取した時でも変わらなかった（表 2-1）。摂食阻害を引き起こした MEC の天然・合成ピレトリンおよ

びアレスリンを含むショ糖溶液を最初に摂取した個体は、餌皿への合計訪問回数を減少させる傾向を示したが、未処理溶液の値との差は、天然ピレトリンとピレトリン I でのみ観察された。高い割合で観察された口吻のグルーミングとは対照的に、試験終了時の KD 率は、ピレトリン II とアレスリンでは 0% だった。ピレトリンとピレトリン I の KD 率は 10% 未満であり、未処理溶液と 3 種の味覚物質の結果 (0%) との間に統計的有意性は認められなかった。KD を引き起こした MEC のデルタメスリンを含むショ糖溶液を最初に摂取した場合、試験後には約半数のハエが KD したが、試験中の餌皿への訪問回数は変化しなかった。ピレトリンやアレスリンを摂取した時のハエの行動を注意深く観察すると、ハエは口吻をグルーミングする合間にしばしば嘔吐し、唇弁の先端に内容物の液滴を抱える様子が見て取れた (図 2-7)。

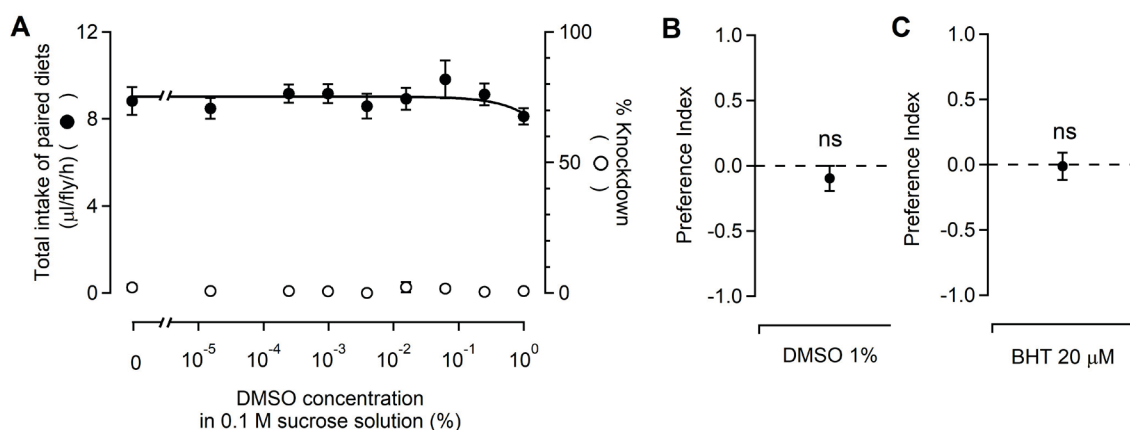


図 2-4 選択型摂食試験のベースラインの確認：DMSO および BHT のクロキンバエの摂食嗜好性に与える影響。

(A) 一对の対照溶液を摂取させた時の DMSO 濃度に対するショ糖溶液の一個体摂取量およびノックダウン (KD) 率の平均値の変化。DMSO 濃度の増加に対して、一個体摂取量の平均値は変わらず (一元配置分散分析, $df = 8$, $F = 0.636$, $p = 0.742$) , KD 率も増えなかった (一標本 t 検定, $p > 0.563$) 。 (B) ショ糖溶液に混合した 1% の DMSO は PI の平均値は 0 を下回らなかった (一標本 t 検定, $p = 0.424$) 。 (C) 1 mM の合成ピレトリンに含まれる量におおよそ相当する 20 μM の BHT は、PI の平均値を変化させなかった (一標本 t 検定, $p = 0.918$) 。エラーバーは標準誤差 (いずれも 5 反復) 。

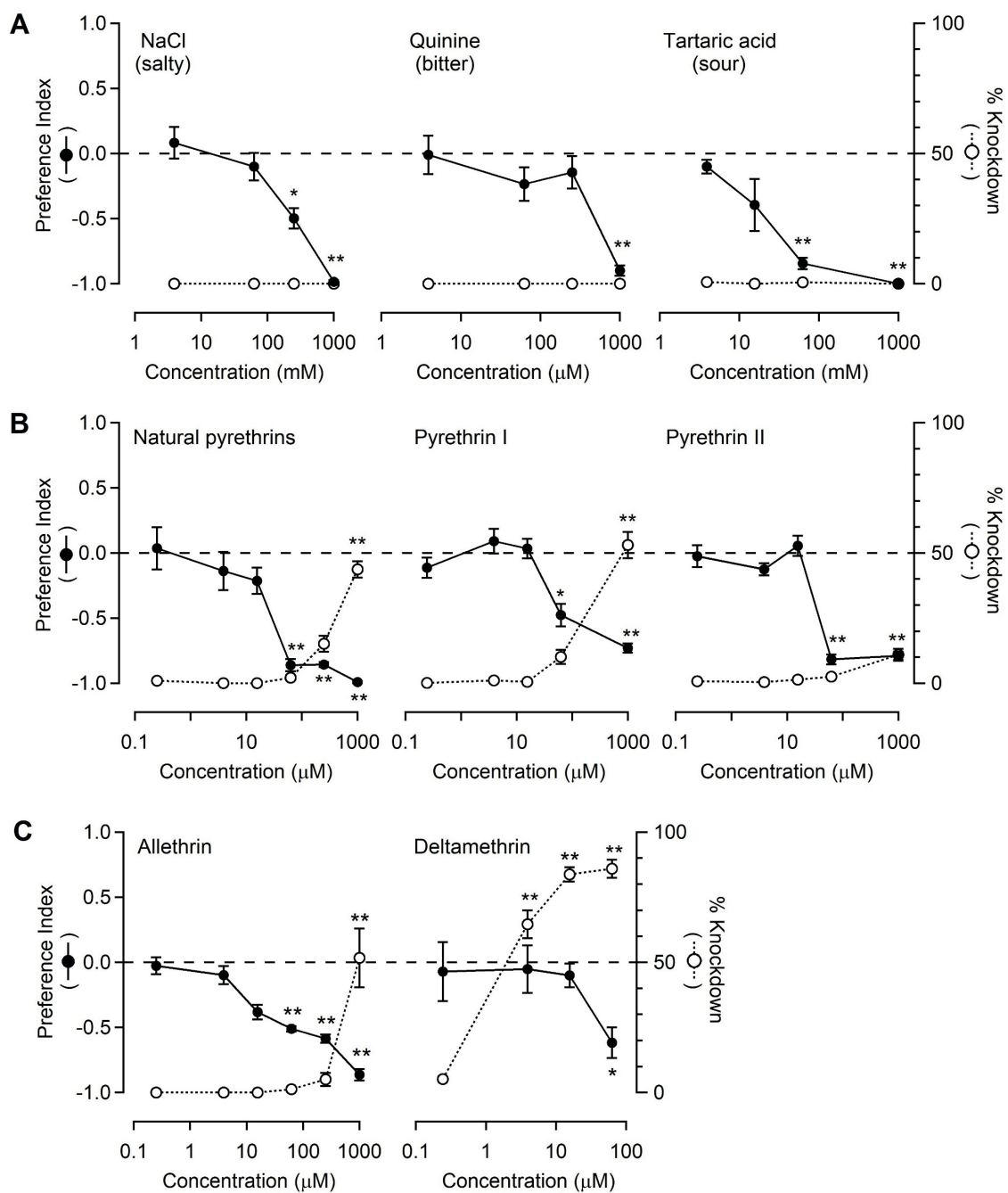


図 2-5 天然・合成ピレトリン、ピレスロイド系殺虫剤および既知の味覚物質のクロキンバエに対する摂食阻害活性。喫食選好指数 (preference indexes; PIs, 左軸) と、ノックダウンを含む瀕死個体の割合 (右軸) を試験化合物の濃度に対してプロットした。(A) 塩化ナトリウム, クイニン, 酒石酸の味覚物質; (B) 天然ピレトリンと, 合成したピレトリン I と II; (C) ピレスロイド系殺虫剤であるアレスリンとデルタメスリン。平均値 $\pm$ 標準誤差 (いずれも 5 反復)。アスタリスクは $PI = 0$ またはノックダウン率 0% に対して統計的有意性が得られた濃度を指す。ボンフェローニ補正した一標本 t 検定。
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

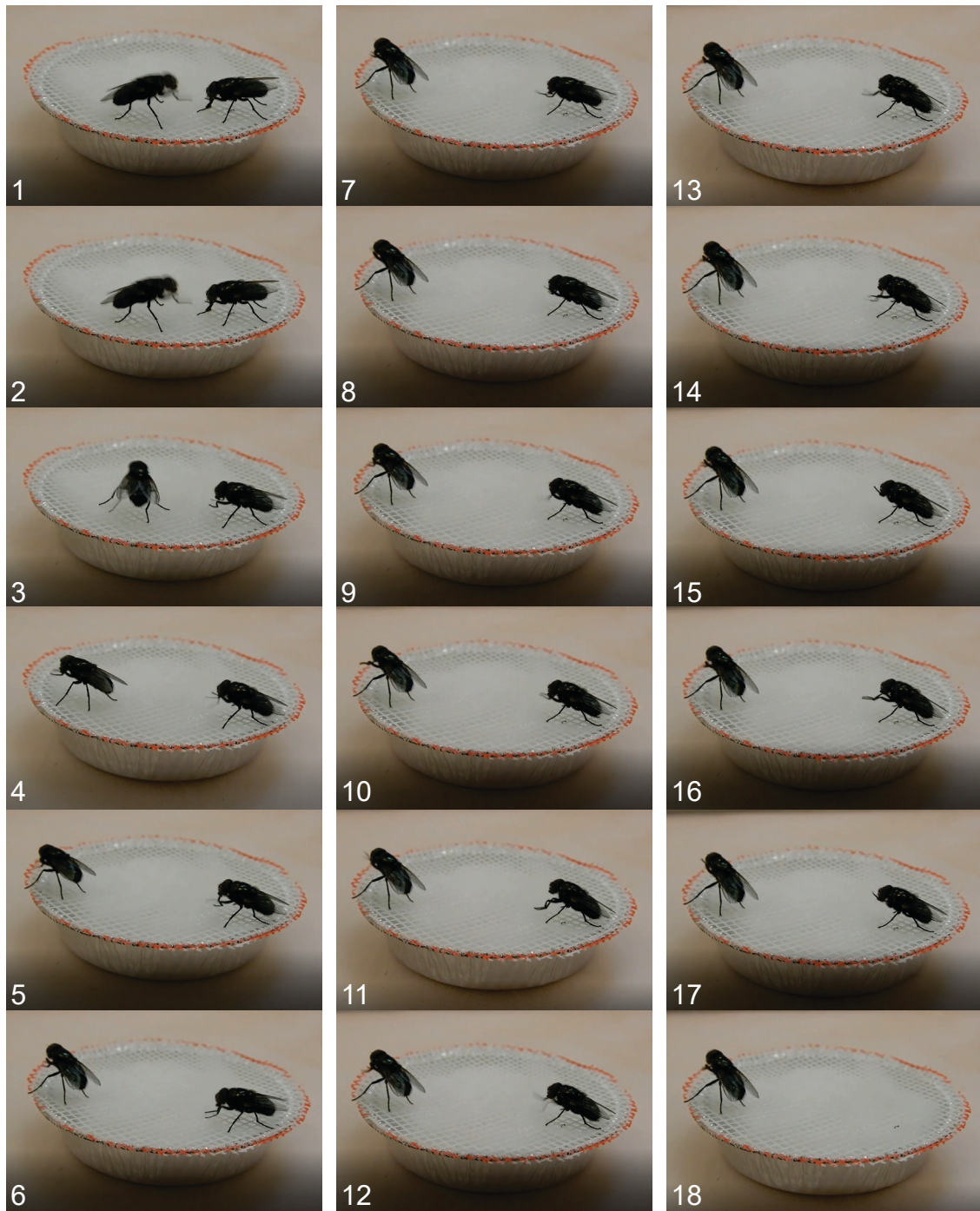


図 2-6 天然ピレトリンを経口摂取した時に生じる嫌悪応答.

右個体：クロキンバエは天然ピレトリン ($62.5 \mu\text{M}$) を含むショ糖溶液を飲むのを直ぐにやめると (2-3) , 口吻をふるわせながら, 前脚で頻りに口吻を擦り続ける (3-17) . 最終的に, ハエは餌場から飛び去る (18) . 30 フレーム/秒で記録した動画の 10 フレーム (0.33 秒) 毎のスナップショット.

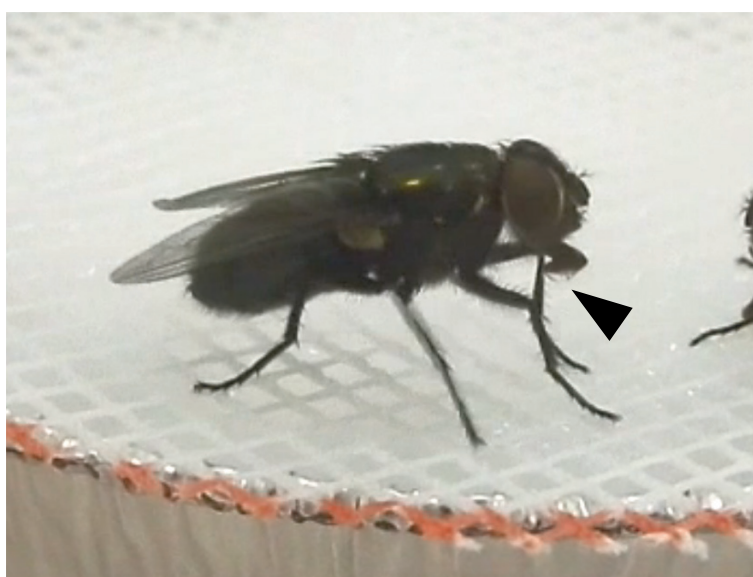


図 2-7 天然ピレトリン入りのショ糖溶液を摂取した後で口吻をグルーミングしながらしばしば生じる嘔吐。
口吻先端の唇弁に液滴を蓄えている（矢印）。

表 2-1 天然・合成ピレトリン，ピレスロイド系殺虫剤および摂食阻害活性を有する味覚物質の最小有効濃度（MEC）
におけるクロキンバエの摂取行動とノックダウン率。

Test compounds		MEC [§] (Effect)	Estimated individual intake (ng) [¶]	Behavior at the MEC [£]		
				Ave. number of visits	% of proboscis grooming	KD rate (%)
Tastants	NaCl	250 mM (FD)	137742 ± 28097 ^c	3.57 ± 0.39 ^a (n = 21)	0 ^a	0 ^a
	Quinine	1 mM (FD)	602 ± 169 ^d	3.70 ± 0.47 ^a (n = 23)	0 ^a	0 ^a
	Tartaric acid	62.5 mM (FD)	20947 ± 6658 ^d	3.73 ± 0.30 ^a (n = 22)	0 ^a	0 ^a
Insecticides	Natural pyrethrins	62.5 μM (FD)	39.2 ± 16.7 ^a	1.75 ± 0.21 ^{bc} (n = 24)	90.2 ^b	2.9 ^a
	Synthetic pyrethrin I	62.5 μM (FD)	199.9 ± 34.2 ^c	2.18 ± 0.21 ^c (n = 22)	95.5 ^b	10.0 ^a
	Synthetic pyrethrin II	62.5 μM (FD)	75.8 ± 16.7 ^{ab}	2.78 ± 0.25 ^{ab} (n = 27)	97.4 ^b	0 ^a
	Allethrin	62.5 μM (FD)	141.4 ± 17.6 ^{bc}	3.13 ± 0.27 ^{ab} (n = 32)	90.3 ^b	0 ^a
	Deltamethrin	3.9 μM (KD)	12.5 ± 2.6 ^a	3.36 ± 0.47 ^a (n = 22)	7.95 ^a	51.2 ^b
Control solution	Sucrose 0.1 M (incl. DMSO 1%)			4.08 ± 0.41 ^a (n = 24)	0 ^a	0 ^a

§ 摂食阻害（FD）およびノックダウン活性（KD）を示した最小有効濃度（MEC）は，それぞれ喫食選好指数の値が有意に減少した，または，KD率が増加した最小濃度である。

¶ 化合物の平均一頭体摂取量は，摂取したショ糖溶液中に含まれる試験化合物の重量をケージに投入したハエの数で割った値である。平均値 ± SE（5反復）。異なる上付きアルファベット（a-e）は，互いに有意に異なることを示す（ $p < 0.05$ ）。

£ 各化合物のMECの摂食試験の最初の 30分間のハエの摂食行動を記録した（それぞれ n = 45）。最初に化合物を含む餌皿に訪問した個体について，試験時間内で餌皿を訪問した数を数えた。訪問回数の平均値の多重比較にはチュ

キーの方法を用いた（平均値 ± SE）。化合物を含む餌皿に訪問した時の口吻のグルーミングの発生頻度（n = 44–103）と摂食試験の終了時にKDした個体の割合を得た。ホルム法で p 値を調整したフィッシャーの直接確率検定を用いて、グループ内の多重比較を行った。それぞれのカラムにおける異なる上付きアルファベットは、互いに有意に異なることを示す（ $p < 0.05$ ）。

2.4 考察

この章では、人工餌に混ぜた味覚物質の摂食阻害活性の評価に用いられてきた選択型摂食試験のパラダイムでピレトリンとピレスロイド系殺虫剤を評価した。得られたデータから、ショ糖溶液に混ぜたピレトリンとピレスロイドは、ショ糖溶液に対するクロキンバエの喫食選好性を濃度依存的に減少させ、そのパターンは、陽性対照として用いた 3 種類の味覚物質（塩化ナトリウム、クイニン、酒石酸）のものと類似することが示された。第一の発見は、天然ピレトリンとその主成分であるピレトリン I・II は、選択型摂食試験のパラダイムで、ノックダウンを引き起こす濃度よりも低い濃度で摂食阻害活性を示し、最小有効モル濃度の観点で見た活性強度は味覚物質の摂食阻害活性を上回ったことである。

ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害の成り立ちは、試験した塩味、苦味、酸味物質とは明確に異なり、摂食を中断させる口吻の熱狂的なグルーミングを引き起こした。ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤に特有の口吻のグルーミングは、クロキンバエの脚が麻痺することなく始まり、歩行および飛行能力を保ったまま継続した。ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の中では、摂取によって引き起こされた口吻のグルーミングの発生は、摂食阻害作用と結びついていた；口吻のグルーミングは天然・合成ピレトリンとアレスリンでは摂食阻害をもたらした MEC で発生したが、デルタメスリンでは KD を引き起こした MEC ではほとんど生じなかった。天然・合成ピレトリンとアレスリンはいずれも、KD 率が有意に増加することなく摂食を阻害し、特に、ピレトリン II とアレスリンは餌源への訪問回数を減らすことなく摂食阻害を達成した。これらの結果は、喫食選好性を有意に減少させた摂取量の減少は、ハエの活動を直ちに妨げ、最終的にハエを麻痺させるピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の本質的な殺虫作用によってもたされたのではないことを示している。

昆虫の末梢神経系に対するピレスロイド系殺虫剤の作用に関して、40 年ほど前に一連の電気生理学的研究がなされている。ピレスロイド系化合物や、結合サイトの一部をピレスロイド系化合物と共有している

DDT 類縁体は、ヒツジキンバエやイエバエの唇弁の味覚受容感覚毛を不規則に反復興奮させる(Holan et al. 1978; Holan and Poppleton 1980; Virgona et al. 1982; Holan et al. 1984). この反復興奮は、味覚物質に対して示す連続的で規則正しい発火パターンと明確に区別される。類似した神経興奮パターンは、ピレスロイド系殺虫剤を処理した蛾の触角の嗅覚受容ニューロンにおいても観察されている(Lucas and Renou 1992). このような末梢神経系で観察された神経の反復興奮は、この実験で摂食阻害作用を示すことが見出されたピレトリンやアレスリンを含む、タイプ I 型ピレスロイド系殺虫剤の神経興奮作用の主な特徴である(Narahashi 1992; Soderlund 1995; Bloomquist 1996). したがって、ピレトリンやアレスリンの摂取はクロキンバエの口器の味覚システムを直ちに刺激することで、摂食を中断させ、口吻のグルーミングを促すようなイリテーション(irritation)をもたらすと合理的に結論づけられる。このような、神経細胞上の電位依存性ナトリウムチャネルへの薬理作用が関わる摂食阻害の機序は、塩味受容体や苦味受容体など、特定の味覚受容体を選択的に結合する摂食阻害物質の機序とは根本的に異なる。ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害作用の元にあるイリテーションは、ピレスロイド系殺虫剤に脚の跗節が接触した時に忌避反応を引き起こす接触イリテーション(Achee et al. 2009; Manda et al. 2013; Obermayr 2015)に対して、摂食イリテーション(feeding irritation)と呼ぶことができよう。

KD 活性を基準とした摂食阻害活性の描写により、試験したピレトリンとピレスロイド系殺虫剤は、摂食阻害作用が先行した天然ピレトリン、合成ピレトリン I・II およびアレスリンと、KD 活性が先行したデルタメスリンの 2 つに分けられた。興味深いことに、これは、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の神経興奮性の作用に基づいた分類と一致する；前者の化合物はすべて、反復興奮を引き起こすタイプ I 型であり、後者のデルタメスリンは、タイプ I 型よりも殺虫活性が高く、 α シアノ 3 フェノキシベンジル基をもつタイプ II 型ピレスロイドである。タイプ II 型ピレスロイドは概して目立った反復興奮を引き起こさず、使用依存的なインパルス遮断を引き起こす(Lund and Narahashi 1983). とはいふものの、ゴキブリの中樞神経系の神経活動がデルタメスリンによって濃度および時間依存的にわずかに活性化される報告はある(Hendy and Djamgoz 1985). ノックダウンを引き起こす麻痺作用の強さと比べると限定的である神経興奮作用は、KD を引き起こした濃度でも口吻のグルーミングはほとんど生じなかった現象を合理的に説明する。したがって、亜致死濃度で生じる天然

および合成ピレトリンの摂食阻害作用は、タイプⅠ型ピレスロイドの薬理特性に基づいていると考えられる。

ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の KD 活性や致死活性は、本質的な薬理作用の強さや膜透過性、代謝耐性など、様々な性質に依存する(Casida 1973)。様々な要因が関わる中で、摂食を直ぐに中断させるだけのイリテーションには、化合物の薬理作用や膜透過性の強さが主に反映していると考えられる。各化合物の MEC における推定一個体摂取量に基づいた、ピレトリンの摂食阻害作用の強さは、ピレトリン>ピレトリンⅡ>ピレトリンⅠの順になった。ピレトリンとその構成成分の殺虫活性を比較した研究は数多くあるが、この相対強度の順序はあまり例がない；なぜなら、一部の例外を除いて(Sheppard and Swedlund 2000), KD 活性や致死活性はたいていピレトリンⅠもしくはピレトリンⅡの方が天然ピレトリンよりも強いからである(Sawicki 1962; Sawicki and Thain 1962; Tsuda et al. 1972; Farnham 1973)。現時点では、天然ピレトリンの摂食阻害活性の成り立ちをピレトリンⅠやピレトリンⅡの限られたデータから説明することは難しい。少なくとも、残りの4種類の成分（シネリンⅠ・Ⅱ、ジャスモリンⅠ・Ⅱ）の活性を調べて、それらと比較する必要がある。

この章の結論として、天然ピレトリンと合成ピレトリンⅠ・Ⅱが、クロキンバエに対して亜致死濃度で強力な摂食阻害物質として働くことを見出した。摂取した天然・合成ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤が口吻のイリテーションを直ちに引き起こすことで摂食行動を継続的に阻害したことから、これらの化合物はクロキンバエの口器にある味覚システムに作用するが、その機序は、塩味、苦味、酸味物質とは異なることが示唆された。

第 3 章 キャピラリー摂食試験によるピレトリンおよびピレトリン構成成分の摂食阻害活性の評価

3.1 背景と目的

第 2 章では、選択型摂食試験を行い、天然ピレトリンと合成ピレトリン I・II, およびピレスロイド系殺虫剤であるアレスリンは、クロキンバエに対してノックダウン (KD) が生じない垂致死濃度で摂食阻害活性を示すことを見出した。ピレトリンとアレスリンの摂取阻害作用は、塩味、苦味、酸味物質である塩化ナトリウム、クイニン、酒石酸とは異なり、ショ糖溶液の摂取を中断した直後から生じる口吻の激しいグルーミングを伴った。ピレトリンやアレスリンは、昆虫の神経系を反復興奮させるタイプ I 型ピレスロイドに該当する。タイプ I 型ピレスロイドに当てはまる幾つかの殺虫性化合物は、ハエの唇弁にある味覚感覚神経 (Holan et al. 1978; Holan and Poppleton 1980; Virgona et al. 1982; Holan et al. 1984) や蛾の触角にある嗅覚受容ニューロン (Lucas and Renou 1992) を過興奮させることが知られている。ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤が感覚器を刺激することに基づく、経口摂取したピレトリンやアレスリンは、口吻の激しいグルーミングを誘導するようなイリテーションをクロキンバエにもたらすことで、継続的な摂取を妨げたと考えられる。

一般的に、ハエが行う餌水の摂取は、短い休憩を挟みながら満腹になるまで繰り返される、一続きのひと飲み (feeding bouts) から構成される (Qi et al. 2015)。そのため、摂取速度やひと飲みの持続時間、ひと飲みの間隔など、摂取行動のシーケンスを規定する複数のパラメーターの数値から、ハエの摂取活動を描写することが可能である。ピレトリンの摂食阻害作用は、一連の味覚物質とは異なり、口吻の激しいグルーミングを伴ったことから、いずれも、帰結として摂取量を低下させるものの、ハエの摂取行動のシーケンスに与える影響は本質的に異なるはずである。私が知る限り、既知の摂食阻害物質が、ハエの摂取行動のシーケンスをどのようにかく乱するのかについての体系的な研究は存在しない。そのため、摂取行動のシーケンスをピレトリンと味覚物質で比較することで、ピレトリンの摂食阻害作用の機序を明らかにするための基本的な知見が得られるはずである。

個々の昆虫が摂取する餌の量を測定する最も簡便な方法は、拘束した昆虫の個体に給餌することである。ハエやミツバチなど、口吻を持つ昆虫には、口吻の先端にある味覚感覚毛に試験溶液を触れさせることで、摂食を誘起させる(Smith and Burden 2014; French et al. 2015b; Maeda et al. 2015; Qi et al. 2015)。キロショウジョウバエでは、校正されたキャピラリー管を用いて液体状の餌を拘束したハエに摂取させるキャピラリー摂食試験法が考案されている(Qi et al. 2015)。この方法を用いることで、他の行動要素の影響を完全に排除しながらも、ハエの摂取活動を正確に測定することができる。さらに、脚を切除、もしくは拘束させることで、脚を含めた口吻以外の体の部位が試験溶液に晒されることなく、化合物を経口摂取させることができる。このことにより、前脚の跗節への接触によって誘導される接触イリタンスや、経皮吸収を介した神経毒性作用など、ハエの摂取行動に直ちに影響を与えうるピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の垂致死作用の関与を排除することができる。従って、キャピラリー摂食試験法で得られた摂取量と化合物濃度の関係は、毒性のない味覚物質のみならず、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤についても、正味の摂食阻害活性を反映する。

そこで、本章では、キロショウジョウバエで用いられてきたキャピラリー摂食試験法をクロキンバエに適用し、クロキンバエの摂取行動のシーケンスが、ショ糖溶液に混合した試験化合物によってどのように変化するかを調べた。キャピラリー摂食試験では、天然ピレトリンや合成ピレトリン I, II, ピレスロイド系殺虫剤であるアレスリンとデルタメスリン、味覚物質（塩化ナトリウム、クイニン、酒石酸）に加えて、ピレトリンのマイナー成分であるシネリン I, II とジャスモリン I, II を評価した。得られた摂取量と化合物濃度の関係からそれぞれの化合物の摂食阻害活性を推定し、力価を化合物間で比較した。前章で行った選択型摂食試験から、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害には、殺虫作用の機序である電位依存性ナトリウムチャネルに対する作用が関わっている可能性が示されたことから、キャピラリー摂食試験で得られた正味の摂食阻害活性と、即効的な殺虫作用であるノックダウン (KD) 活性の相関関係を調べた。

3.2 材料と方法

3.2.1 ハエ

第2章2.2.1に記載の方法で飼育した。

3.2.2 試験化合物

前章と同様に、除虫菊から抽出精製した高純度のピレトリンを評価した。ピレトリンに加えて、ピレトリンを構成する6種の成分をすべて評価した（図 1-1）。ピレトリン I・II と同様に、シネリン I・II とジャスモリン I・II は、住友化学の健康農業関連事業研究所にて森達也博士によって化学合成された(Kawamoto et al. 2020)。各々の純度は、液体クロマトグラフィーで確かめた（シネリン I：95.7%，シネリン II：95.2%，ジャスモリン I：97.5%，II：96.6%）。天然・合成ピレトリンの比較対象として、ピレスロイド系殺虫剤であるアレスリンとデルタメスリンと（図 2-1），塩化ナトリウム，クイニンおよび酒石酸の味覚物質（図 2-2）を評価した。これらの試験化合物の由来は、第 2 章の 2.2.2 に記載した通りである。シネリン I/II とジャスモリン I/II は DMSO に溶解し、それぞれ 100 mM のストックを作成した。これら以外の試験化合物の溶液処方は、前章の 2.2.2 に記載した通りである。

3.2.3 キャピラリー摂食試験法

摂食実験の前に、クロキンバエは水を与えた状態で 24 時間絶食させた。ハエが暴れない様に翅をアルミピンチで挟んで固定し、前・中脚を解剖用のハサミで基部から切除した。摂食試験の直前に、マイクロピペット用チップ（容量：200 μ l）でハエに水を与えて、水の欲求を満たした。内径が等しい較正されたガラス毛细管マイクロピペット（容量：25 μ l；外径：1.2 mm；内径：0.65 mm；2-000-025; Drummond Scientific Co., PA, US）に、所定濃度の試験化合物を含む 0.1M のショ糖溶液を目盛りまで満たした。拘束したハエの口吻にマイクロピペットの先端を近づけて、餌水の液面を口吻の唇弁の外側にある味覚感覚毛

(labellar taste hairs) に触れさせると、ハエは口吻を直ぐに伸展させて餌水をすすり始める (feeding initiation, 図 3-1A) 。ひとたび摂取が始まったら、マイクロピペットの先端をハエから少し遠ざけて、ハエの口吻が完全に伸びるようにした。ハエが口吻を引き込んでマイクロピペットから口吻が離れたら、ひと飲みを終えたとみなした (feeding cessation, 図 3-1A) 。

前述した様に、ハエが行う餌水の摂取は、短い休憩を挟みながら満腹になるまで繰り返される、一続きのひと飲み (feeding bouts) から構成される (Qi et al. 2015) (図 3-1A) 。キイロショウジョウバエでは、最初のひと飲みの量が全体の 60%以上を占める (Qi et al. 2015) 。クロキンバエも同様の傾向を示したことから (data not shown) , 最初のひと飲みに対する影響を調べた (図 3-1B) 。ひと飲みの持続時間 (feeding duration ; 摂取時間) は、摂取開始から終了までの時間をストップウォッチで測定することで得た。ストップウォッチによる手動計測には 1 秒以内の計測誤差が見込まれたが、数秒からおおよそ 2 分にまでわたる摂取時間を秒単位で測定するには十分な精度であると判断した。マイクロピペットの下端から試験溶液の液面 (メニスカス) までの長さをデジタルノギス (GDCS-100; Niigata Seiki Co., 新潟) で測定し、摂取前後の差分の長さから、ひと飲みした量 (feeding intake ; 摂取量) を算出した。

前章にて、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤を摂取すると、クロキンバエは直ぐに口吻のグルーミングを行うことを見出した。口吻のグルーミングは継続的に観察されたため、摂取の再開に影響すると予想された。そこで、1 回目のひと飲みを終えてから 2 回目のひと飲みを始めるまでの間隔 (feeding interval ; 摂取間隔) を得た。摂取間隔は、最初のひと飲みを終えてから 30 秒の間隔で、ショ糖溶液を口吻に繰り返し接触させて、吻伸展を経てショ糖溶液を摂取した最初の時間とした。

前章で行った選択型摂食試験と同様に、殺虫性化合物の試験では、100 mMのDMSOストックを0.1 Mのショ糖溶液で希釈した。殺虫性化合物の最高濃度は1 mMであり、そのショ糖溶液にはDMSOが1%含まれていることになる。試験溶液は16倍または4倍に希釈して、濃度応答性を評価した。DMSOを1%含むショ糖溶液をブランク溶液として評価した。水溶性の味覚物質である塩化ナトリウム、クイニンおよび酒石酸は、ショ糖溶液そのもので希釈し、DMSOを含まないショ糖溶液をブランク溶液とした。

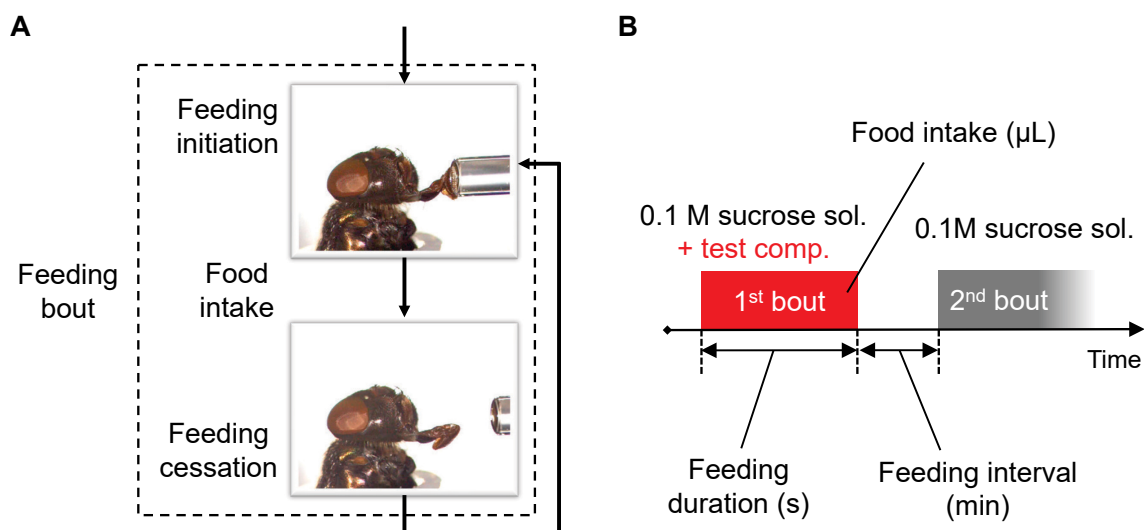


図3-1 キャピラリー摂食試験法.

A. ハエの摂食は、ひと飲み（feeding bout）の繰り返しからなる。キャピラリー摂食試験法では、ショ糖溶液を満たしたガラスキャピラリーをハエの口吻にあて、口吻伸展応答を誘導させてショ糖溶液を摂取させる。ひと飲みを終わると、ハエは口吻を引き込む。2回目のひと飲みも同様にキャピラリーを口吻にあてて誘導した。B. 摂取量が最も多い1回目のひと飲みに着目し、ショ糖溶液に加えた化合物の影響を3つの指標から評価した：化合物入りのショ糖溶液を摂取した量（feeding intake）、ひと飲みの持続時間（feeding duration）、1回目のひと飲みを終わってから2回目のひと飲みを開始するまでの間隔（feeding interval）。2回目のひと飲みは、30秒毎に口吻の先端にショ糖溶液を触れさせて誘導した。

3.2.4 ノックダウン活性の評価

ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の殺虫作用の特徴は、即効的なノックダウンである。摂食阻害作用とノックダウンの機序の関連性を探るため、試験化合物のノックダウン活性を摂食阻害活性と関連づけた。決まった量の化合物を体に処理することができる局所施用試験法で評価した。麻酔は用いず、ハエ成虫の翅をアルミクリップで留めて、動かない状態にした上で、胸部の中脚の間にマイクロピペット（P200, Gilson, Middleton, WI, US）で 1 μ L 処理した。ハエを蓋付のカップの中に放ち、ノックダウンするまでの時間をストップウォッチで計測した。試験化合物の希釈溶液はアセトンで調整した（重量/溶液体積）。

3.2.5 統計処理

それぞれの化合物において、摂取量および摂取時間の濃度応答データは、以下の関数を用いて、4パラメーターロジスティック回帰した。

$$f(x) = \text{base} + ((\text{max} - \text{base}) / (1 + \exp((x_{\text{half}} - x) / (\text{rate}))))$$

xは化合物濃度（μM）の対数値である。base（底値），max（最大値），xhalf（半数x値）とrate（傾き）からなる4つのパラメーターの推定値とその95%信頼区間を得た。平均摂取速度の濃度応答性は直線回帰した。KD率の濃度応答データ，および摂食阻害活性とKD活性の相関関係は，指数関数で回帰した。これらの回帰はIgorPro（ver. 6.3.7.2）を用いて行った。各濃度の摂取速度は無処理区と比較し，平均値の差の有意性はボンフェローニ補正を施したt検定で調べた。摂取間隔の値は，Wilcoxonの順位和検定を用いて比較した。これらの統計解析は，すべてR（ver. 3.6.1）で行った。

3.3 結果

3.3.1 ピレトリンの摂食阻害活性

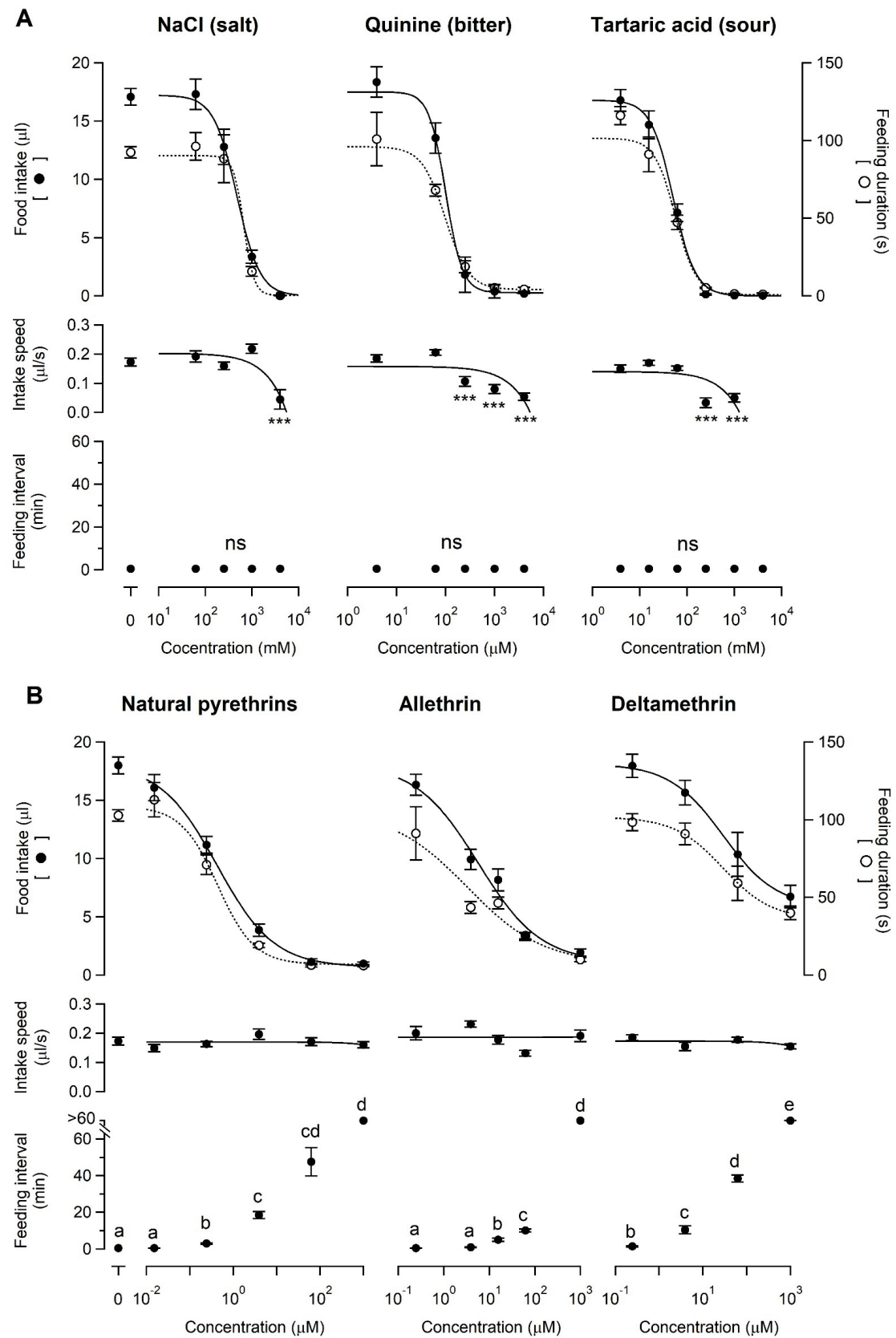
塩味，苦味，酸味物質である塩化ナトリウム，クイニン，酒石酸を含むショ糖溶液の摂取量は，基本的にそれらの化合物の濃度に応じて減少した（図 3-2A，上段）。いずれの化合物でも，摂取時間は，概ね摂取量の減少に沿うように短くなった。同様に，天然ピレトリンやアレスリン，デルタメスリンをショ糖溶液に混ぜた場合でも，摂取量と摂取時間は化合物の濃度の増加に応じて減少した（図 3-2B，上段）。味覚物質とピレトリン，ピレスロイド系殺虫剤に共通した濃度依存的な摂取量の減少は，ピレトリンを構成する6つの活性成分のいずれにおいても示された（図 3-2C，上段）。

そこで，摂取量と摂取時間の濃度応答性を4パラメーター対数ロジスティック関数で回帰し，それぞれの各化合物について，半数阻害濃度（IC₅₀）を得た（摂取量：表 3-1，摂取時間：表 3-2）。摂食量のIC₅₀値で表される摂食阻害活性は，天然ピレトリンで最も強く，統計的有意性は認められなかったものの，

その主成分であるピレトリンⅠとⅡが天然ピレトリンの後に続いた（図 3-3）。ピレトリンⅠとⅡの後は、シネリンⅠ、シネリンⅡ、ジャスモリンⅠ、ジャスモリンⅡの順に摂食阻害活性を示した。天然ピレトリンとピレトリンⅠおよびⅡの摂食阻害活性は、ピレスロイド系殺虫剤であるアレスリンやデルタメスリンよりも強く、クイニンよりも 100 倍程度、塩化ナトリウムや酒石酸よりも 100,000 倍以上強かった。このように、個々の摂食阻害活性は化合物間で大きく異なったものの、いずれの化合物でも、摂取時間と摂取量の IC_{50} 値の間に有意差は認められなかった（図 3-3）。このことは、化合物の由来や味覚モダリティに依らず、1 回目のひと飲みの方量の減少は、基本的に摂取時間が短くなることによってもたらされたことを示している。

摂取速度もまた摂取量に影響しうることから、各試行で得た摂取量と摂取時間から平均摂取速度を得た。味覚物質では、摂取量の極端な低下に合わせて平均摂取速度は減少したが（図 3-2A、中段）、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤では、摂取量や摂取時間と連動した体系的な変化は認められなかった（図 3-2BC、中段）。つまり、クロキンバエは、摂食を阻害する濃度のピレトリンやピレスロイド系殺虫剤がショ糖溶液に含まれていても、摂取速度を下げることなく、摂取し続けた。

ピレトリンを摂取したクロキンバエは直ちに摂取を中断し、口吻を震わせながら、下方に伸展させる行動を繰り返した。このような特徴的な口吻の活動は、ピレトリンの構成成分やアレスリン、デルタメスリンにおいても観察された。また、口吻が痙攣し、繰り返し伸展する中で、嘔吐も度々観察された。口吻が痙攣している最中にショ糖溶液を口吻の先端に与えても、クロキンバエは摂取を再開することはほとんどなかった。摂取を終えてから 30 秒毎にショ糖溶液を繰り返し与えて 2 回目の摂取を開始するまでの時間を測定したところ、天然ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤（図 3-2B）、ピレトリンの構成成分において（図 3-2C）、摂取を再開するまでに要した時間は化合物濃度の増加に従って長くなった。味覚物質では、ピレトリンやピレスロイドの摂取の際に見られたような口吻の活動や嘔吐は、摂取量が有意に低下した濃度でも一切観察されず、クロキンバエは、摂取終了から 30 秒後に与えたショ糖溶液に対して口吻を伸展させ摂取を行った（図 3-2A）。



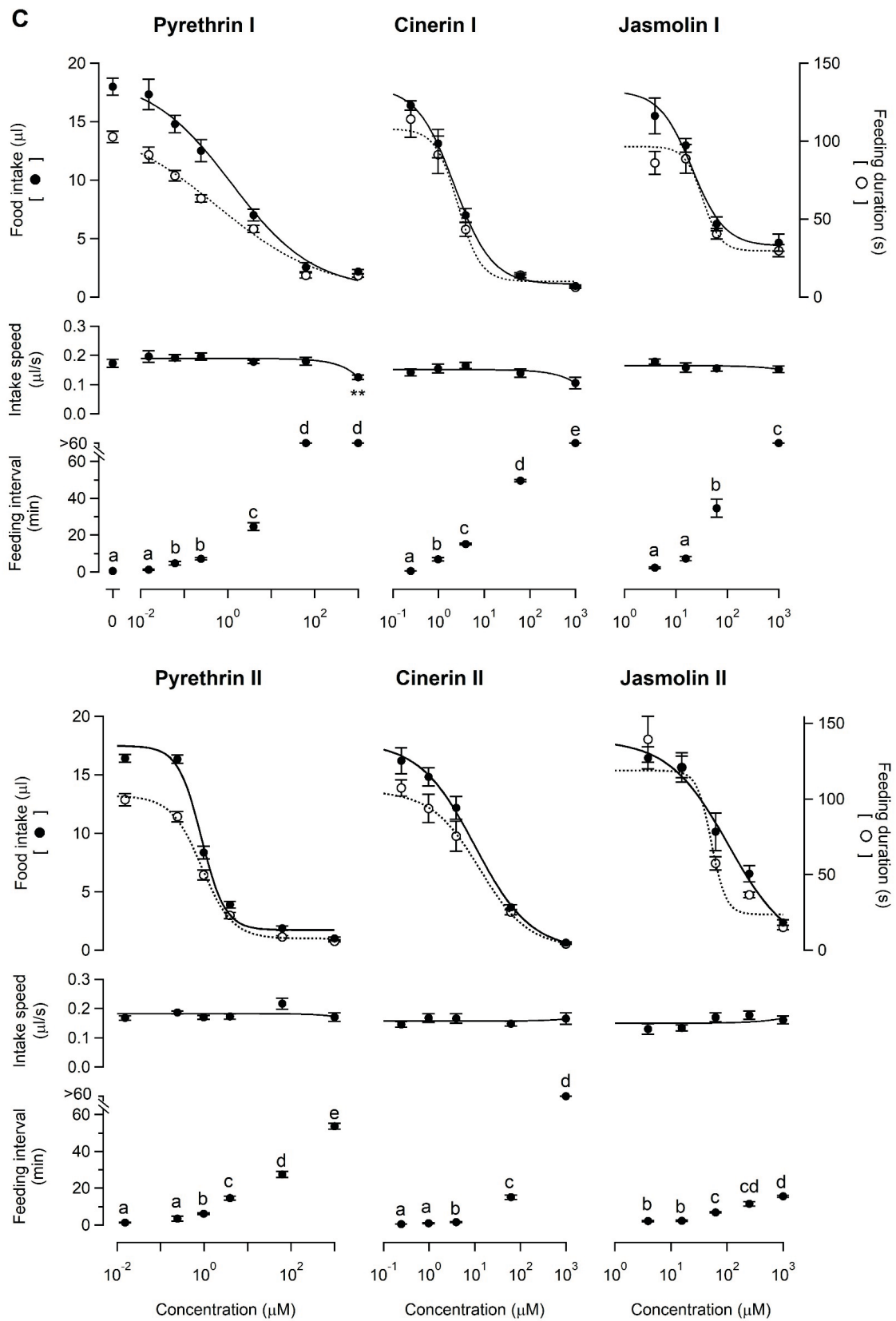


図 3-2 摂取行動に与えるピレトリンや味覚物質の影響.

味覚物質 (A), 天然ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤 (B), ピレトリンの構成成分 (C) を含むショ糖溶液をひと飲みした時の摂取量 (上段左軸), 摂取時間 (上段右軸), 摂取速度 (中断) および, 次のひと飲みを始めるまでの間隔 (下段). 摂取速度において, 無処理区と比べて有意差が認められた濃度にアスタリスクを示す (ボンフェローニ補正を施した t 検定, **: $p < 0.01$, $n = 7-20$). 摂取間隔の数値の上に記載したアルファベットは, それぞれの化合物において, 無処理区と比べて有意差があることを示す (Wilcoxon の順位和検定, $p < 0.05$, $n = 7-20$). エラーバーは標準誤差を示す.

表 3-1 摂取量の 4 パラメーター対数ロジスティック回帰.

Test compounds		Food intake					
		Top (μL) ^a	Bottom (μL) ^a	Slope ^a	Log IC ₅₀ (μM) ^a	χ ²	n
Pyrethrins	Natural pyrethrins	18.1 ± 1.78	0.68 ± 1.52	-0.66 ± 0.291	-0.37 ± 0.296	420.7	64
	Pyrethrin I	18.8 ± 2.33	0.61 ± 2.53	-0.95 ± 0.428	0.084 ± 0.404	552.0	80
	Pyrethrin II	17.5 ± 0.843	1.72 ± 0.854	-0.27 ± 0.0898	-0.061 ± 0.0951	271.7	72
	Cinerin I	18.0 ± 0.653	1.09 ± 0.606	-0.41 ± 0.0771	0.35 ± 0.0806	316.1	60
	Cinerin II	17.8 ± 1.44	0.00 ± 2.47	-0.61 ± 0.251	1.01 ± 0.342	356.7	56
	Jasmolin I	17.6 ± 0.865	4.36 ± 1.06	-0.32 ± 0.101	1.31 ± 0.123	445.9	48
	Jasmolin II	17.9 ± 0.868	0.030 ± 3.31	-0.53 ± 0.185	2.02 ± 0.269	488.5	53
Pyrethroids	Allethrin	18.1 ± 1.68	1.09 ± 2.53	-0.69 ± 0.329	0.76 ± 0.333	464.1	62
	Deltamethrin	18.1 ± 2.15	5.83 ± 5.38	-0.61 ± 0.690	1.46 ± 0.856	794.2	50
Tastants	NaCl	17.2 ± 1.65	0.00 ± 3.39	-0.25 ± 0.149	5.68 ± 0.221	630.4	52
	Quinine	17.5 ± 1.17	0.270 ± 1.41	-0.17 ± 0.0814	2.00 ± 0.127	478.3	62
	Tartaric acid	16.8 ± 1.15	0.00 ± 1.19	-0.235 ± 0.112	4.71 ± 0.111	488.0	72

^a values are indicated with 95% fiducial limit.

表 3-2 摂取時間の 4 パラメーター対数ロジスティック回帰.

Test compounds		Feeding duration					n
		Top (sec) ^a	Bottom (sec) ^a	Slope ^a	Log IC ₅₀ (μM) ^a	χ ²	
Pyrethrins	Natural pyrethrins	108.7 ± 5.74	6.87 ± 5.67	-0.42 ± 0.157	-0.36 ± 0.16	34229.0	64
	Pyrethrin I	113.2 ± 25	3.60 ± 20.5	-1.22 ± 0.753	-0.25 ± 0.631	20192.3	80
	Pyrethrin II	102.1 ± 7.08	7.63 ± 7.33	-0.35 ± 0.141	-0.054 ± 0.158	17853.5	72
	Cinerin I	108.0 ± 12.6	9.99 ± 12.1	-0.25 ± 0.197	0.42 ± 0.215	39427.0	60
	Cinerin II	105.5 ± 11.7	1.73 ± 19.7	-0.53 ± 0.315	1.11 ± 0.457	27601.7	56
	Jasmolin I	96.6 ± 5.6	29.6 ± 7.72	-0.17 ± 0.0803	1.52 ± 0.152	26035.8	48
	Jasmolin II	118.7 ± 6.68	23.6 ± 7.53	-0.13 ± 0.223	1.72 ± 0.143	43983.2	53
Pyrethroids	Allethrin	105.8 ± 19.9	7.11 ± 29.1	-0.83 ± 0.746	0.52 ± 0.755	48199.8	62
	Deltamethrin	101.7 ± 6.78	36.1 ± 15.3	-0.56 ± 0.365	1.46 ± 0.49	34211.5	50
Tastants	NaCl	90.3 ± 12.2	0.278 ± 23.3	-0.11 ± 0.254	5.82 ± 0.435	44153.3	52
	Quinine	96.1 ± 5.99	4.03 ± 7.78	-0.24 ± 0.1	2.00 ± 0.124	12202.0	62
	Tartaric acid	101.5 ± 7.89	0.635 ± 8.59	-0.22 ± 0.142	4.76 ± 0.121	24549.0	72

^a values are indicated with 95% fiducial limit.

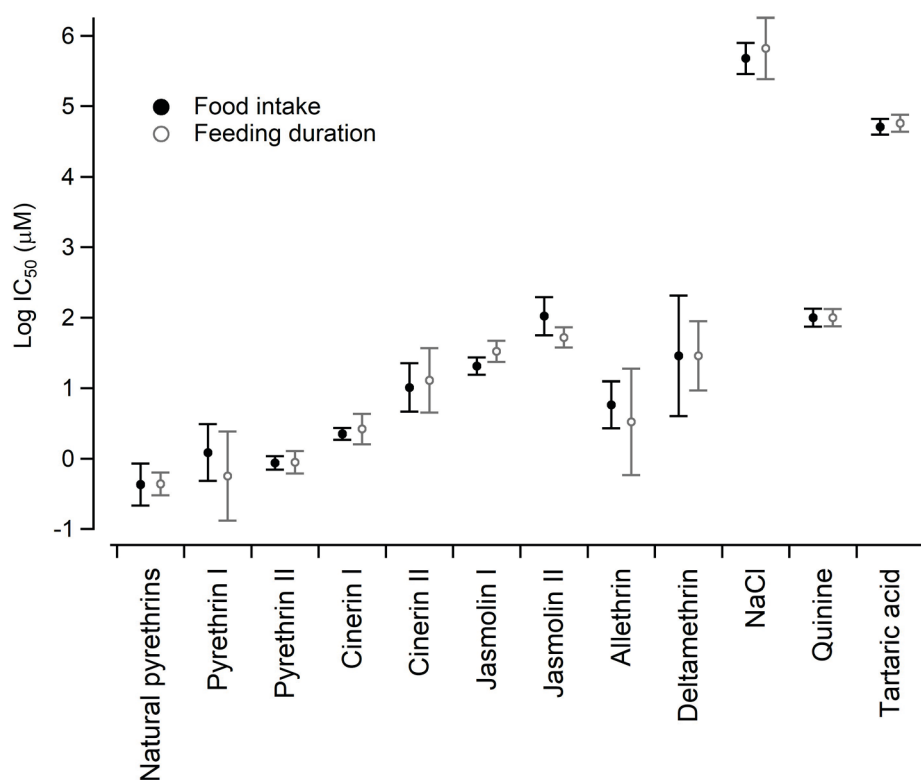


図 3-3 摂取量と摂取時間の半数阻害濃度 (IC₅₀ 値) .

表 3-1 および表 3-2 の数値を記載した。縦軸は IC₅₀ 値の対数値。エラーバーは 95%信頼区間であり、バーが重ならない化合物間では有意水準 5%で有意差が認められる。

3.3.2 ノックダウン活性との相関関係

摂食阻害活性と殺虫活性の関連を調べるため、試験したピレトリンとピレスロイド系殺虫剤のノックダウン活性を局所施用試験法で評価した。得られた平均ノックダウン時間を虫体に処理した化合物量（モルベース）に対してプロットした（図 3-4A）。得られたノックダウン時間の濃度応答性は、べき乗関数でうまく回帰された。ピレトリンの構成成分では、ノックダウン活性は基本的にピレトリン>シネリン>ジャスモリンの順で強くなった。得られた回帰曲線の多くは互いに交差し、濃度に対して効力順位が変化した。そこで、100 ng の化合物を局所施用した条件で得たノックダウン時間（図 3-4A、水色の点線で囲まれたデータ）を、1 mM の化合物を含むシヨ糖溶液の摂食量と関連付けた（図 3-4B）。プロットは、ピレトリンの構成成分とピレスロイド系殺虫剤で分離することなく、一つの帯を形成した。摂取量とノックダウン時間の関係は、べき乗関数にうまく当てはめられたことから、ノックダウン時間が短い化合物ほど摂食量が少ない、すなわち摂食阻害活性が強いことが示された。

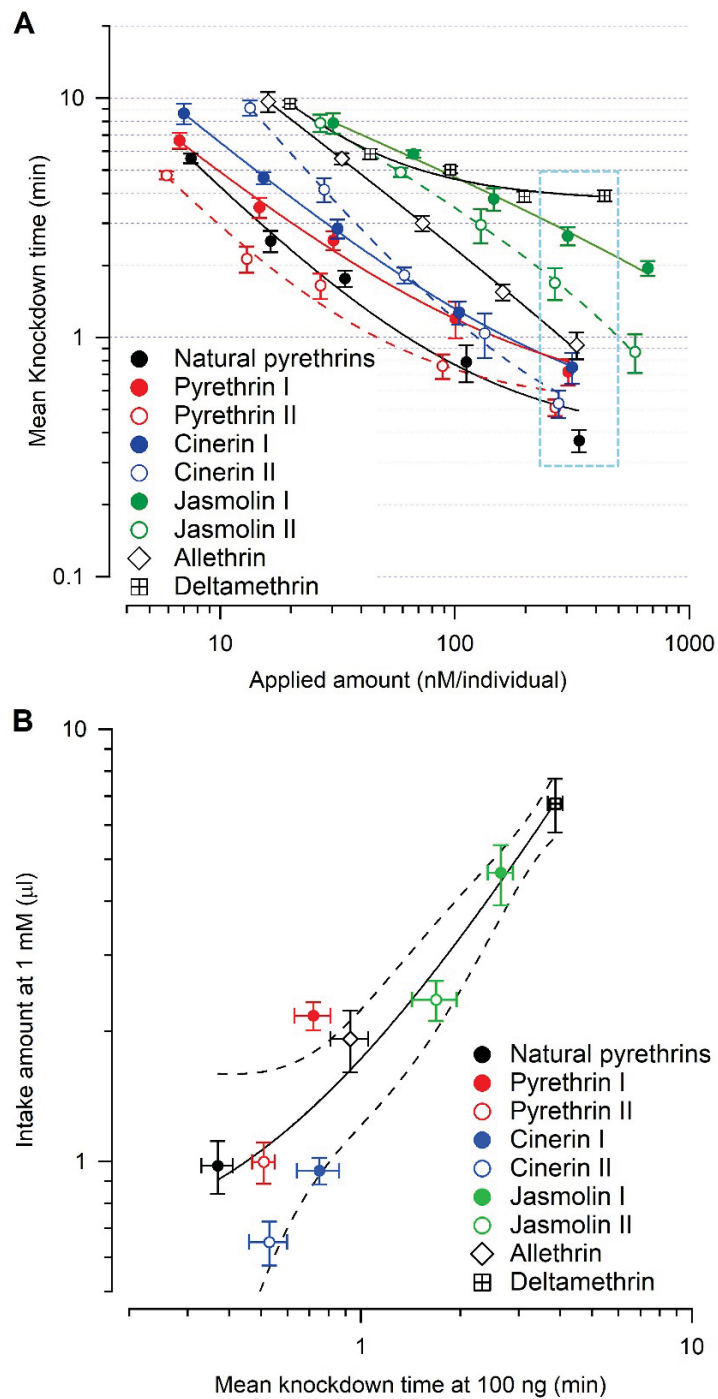


図 3-4 天然・合成ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤のノックダウン活性と摂食阻害活性との相関関係。

A. 局所施用法で得た平均ノックダウン時間 (±標準誤差, それぞれ $n = 10$) を化合物のモル濃度に対してプロットし、べき乗関数で回帰した。B. 処理量 100 ng (A, 水色の点線の囲い) のノックダウン時間に対して化合物 1 mM を含むショ糖溶液の摂取量を関連付けた。この活性-活性相関はべき乗関数で回帰することができた ($X^2 = 1.40$, $p < 0.01$, $n = 9$; 点線: 95%信頼区間)。エラーバーは標準誤差を示す。

3.4 考察

拘束したハエの口吻に餌を直接与えるキャピラリー摂食試験は、経口摂取に基づいた化合物の本質的な摂食阻害活性を正確に評価することが可能である。摂食阻害物質の陽性対照として用いた塩化ナトリウム（塩味物質）、クイニン（苦味物質）、酒石酸（酸味物質）は、ショ糖溶液中の濃度の増加に従って、クロキンバエのひと飲みの摂取量を減少させた。この結果は、同じ化合物セットを評価したキロショウジョウバエのキャピラリー摂食試験においても一貫して示されている(Chen et al. 2019)。摂取量の減少は、主に摂取時間を短くすることによってもたらされ、高濃度域では、摂取速度の減少をも加わることを見出した。摂食を阻害する味覚物質の味覚受容の分子・細胞基盤の詳細は、モデル生物であるキロショウジョウバエで明らかになってきた(Charlu et al. 2013; French et al. 2015a; French et al. 2015b; Kim et al. 2015; Chen et al. 2019; Rimal et al. 2019; Chen and Dahanukar 2020)。しかしながら、意外にも摂食阻害物質がハエの摂食をどのように阻害するのかについての行動学的な知見は見当たらない。得られた結果は、ハエの摂食行動において、ひと飲みの持続時間は味覚モダリティに依らない最も重要なパラメーターであることを示している。

天然ピレトリンとピレトリンを構成する6つの成分は、濃度の増加に応じて摂取量を減少させ、その濃度応答パターンは味覚物質と類似した。アレスリンやデルタメスリンもまた、ピレトリンと同様の摂取量の濃度応答パターンを示した。いずれの化合物を摂取した時も、味覚物質の場合と同様に、摂取量は摂取時間が短くなることで減少した。味覚物質の摂食阻害作用との決定的な違いは、摂取を中断させた後に摂取の再開を遅延させた点である。摂取を再開するまでの時間は、甘味刺激を繰り返し与えているにも関わらず、化合物の濃度の増加に応じて長くなった。ほとんどの化合物では、摂取をほぼ完全に阻害する濃度（ $\geq 62.5 \mu\text{M}$ ）では、摂取の再開に30分以上を要した。すなわち、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤は、味覚物質と同じくらい即効的に最初のひと飲みを中断させるだけでなく、その後の摂取行動を継続的に妨げた。ひと飲みを繰り返す実際の状況では、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の摂取によって引き起こされる持続的な摂食阻害は、摂取効率を大幅に低下させる。摂食行動を持続的に阻害するピレトリンの摂食阻害作用は、

味覚モダリティに依らず、摂取を中断させるだけの味覚物質のものと対照的である。

ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤はハエの摂取行動を速やかに中断させたことから、摂食に関わる口器の味覚感覚器への作用が想定される。ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤をショ糖溶液に混合した時の摂取量は、クロキンバエの胸部腹面に局所施用した時のノックダウン（KD）時間が短い化合物ほど、減少した。摂取量は摂取時間に依存したことから、この結果は、クロキンバエを速やかに KD させる化合物は、より短い時間で摂取を中断させたことを表している。KD は、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤に特有の即効的な中毒症状である。KD の発現は、殺虫作用の機序である神経細胞上の電位依存性ナトリウムチャネルの機能を調節する薬理作用に起因することから(Soderlund 2012)、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害作用もまた、KD や殺虫作用と同一の標的分子への作用に基づいていると結論付けられた。化合物の由来（天然/合成）に依らない摂食阻害活性と KD 活性の相関は、ピレトリンを構成する 6 つの殺虫性成分間の摂食阻害活性の違いは、KD 活性に関わる薬理的な作用の特徴の差異に基づいていることを示唆する。

この章の結論として、天然ピレトリンとその構成成分は、味覚物質と遜色ない速さでクロキンバエの摂取行動を中断させ、さらにその後の摂取行動の再開を継続的に妨げることを見出した。ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤は、神経細胞上の電位依存性ナトリウムチャネルに対する薬理作用を発揮することで、KD や殺虫作用だけでなく、摂食阻害作用をも示すことが明らかになった。これらの結果は、ピレトリンは、クロキンバエの口器に存在する味覚感覚器に作用するが、その機序は、塩味、苦味、酸味物質とは根本的に異なることを示唆した。

第4章 ピレトリンに対する口吻の嫌悪応答の行動解析と摂食阻害に関わる味覚器官の特定

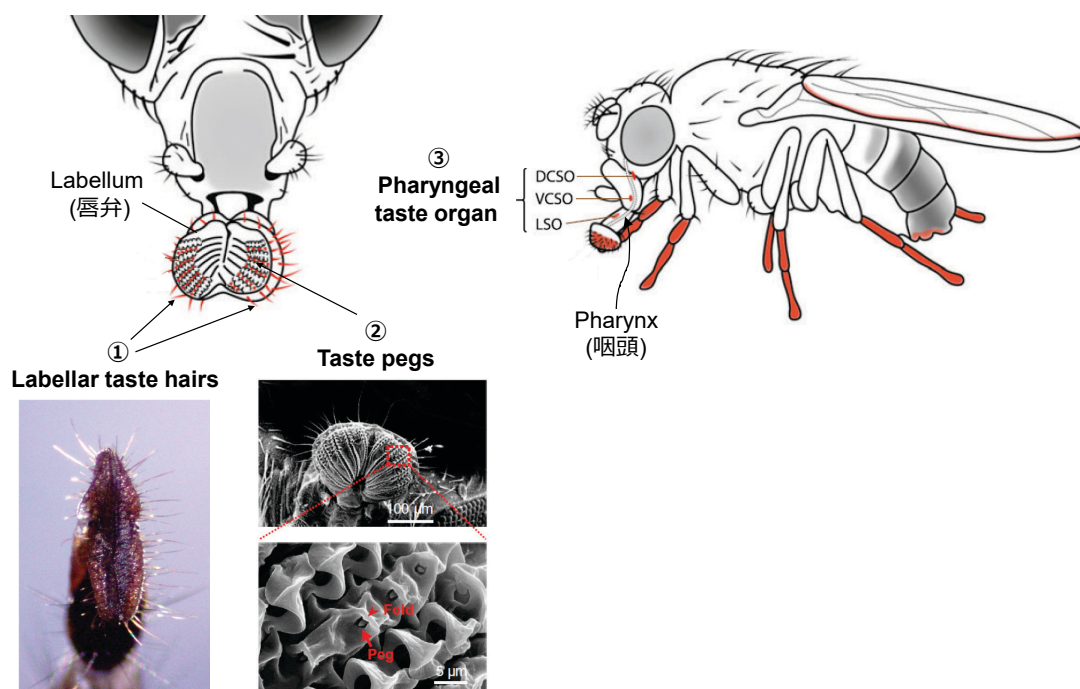
4.1 背景と目的

第3章では、キャピラリー摂食実験を行い、ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤がクロキンバエの摂取行動に与える影響を解析した。天然ピレトリンと6つの殺虫性成分はいずれも、味覚物質（塩化ナトリウム、クイニン、酒石酸）と同様に最初のひと飲みを中断させるだけでなく、その後の摂取行動を継続的に妨げた。天然ピレトリンを摂取したクロキンバエは、口吻を震わせながら下方に繰り返し伸展させる嫌悪的な行動応答を示した。味覚物質とは異なる、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤に特有の摂食阻害作用の発現様式を明らかにするには、この口吻の活動パターンを定量化し、摂取行動との関連性を明らかにする必要がある。

一方、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害活性はノックダウン（KD）活性と関連したことから、摂食阻害作用の標的分子は、KD活性や殺虫活性の作用点である神経細胞上の電位依存性ナトリウムチャンネルであり、神経系の働きをかく乱する薬理作用が摂食阻害の元にあることが明らかになった。高濃度ではピレトリンやピレスロイド系殺虫剤はハエの摂取を速やかに阻害したことから、摂取した化合物は摂食に関わる口吻の味覚感覚器を刺激した可能性が高い。ハエの口吻にある味覚感覚器は、キイロショウジョウバエで詳細に調べられている(Chen and Dahanukar 2017; Mahishi and Huetteroth 2019; Chen and Dahanukar 2020)。ハエ成虫の口吻には口吻の内外に複数の味覚感覚器が局在しており、それらは局在部位から大きく3つに分類することができる；口吻先端の唇弁の周囲に存在する毛状味覚感覚子（図4-1, ①）、唇弁の内側の疑気管（pseudotrachea）の間に点在するペグ状味覚感覚子（②）、そして咽頭の内側に点在する咽頭味覚器官である（③）である。これらの味覚感覚器は、ハエが餌を摂取する時に一時的、または継続的に餌の内容物に晒される。先行研究の通り(Holan et al. 1978; Holan and Poppleton 1980)、神経上の電位依存性ナトリウムチャンネルに作用するピレトリンやピレスロイド系殺虫剤は、口吻から摂取される際に味覚感覚器を構成する末梢神経を刺激することが可能である。しかしながら、得ら

れた電気生理学的なエビデンスは、その感覚器への作用が摂食の中断に関与したことを必ずしも意味しない。摂食阻害作用に関わる味覚器官を明確にするには、候補味覚器官の一部を切除したり、マスキングするなどの処置を行った上で摂食行動を調べる操作実験が有効だろう。

そこで、第4章では、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の摂取によって引き起こされる口吻の活動を動画撮影し、その特徴を把握した。口吻の活動を定量化し、その活動パターンを摂取行動と対応づけるため、拘束したクロキンバエの口吻の筋電図を記録しながらキャピラリー摂食試験を行った。続いて、口吻や咽頭に局在する味覚感覚器への作用が摂食阻害を引き起こす確証を得るため、口吻から摂取したショ糖溶液が消化管に吸収されないように咽頭を結紮した上で、口吻の筋活動を記録する操作実験（咽頭結紮実験）を行った。唇弁の毛状味覚感覚子（図4-1, ①）は潜在的な餌のプロベイングに用いられ、餌の摂取の開始・中断の判断には関わっていないことから(Mahishi and Huetteroth 2019)、最後に、唇弁の周囲に生える味覚感覚毛が試験溶液に晒されない細さのガラスキャピラリーを用いて摂食実験を行い、天然ピレトリンの摂食阻害活性と摂取後の口吻の活動を調べた。



External taste organ (外部味覚器官)	Labellar taste hairs (毛状味覚感覚子) — ①
	Taste pegs (ペグ状味覚感覚子) — ②
Internal taste organ (内部味覚器官)	Pharyngeal taste organ (咽頭味覚器官) — ③

図 4-1 ハエ類の味覚感覚器。

ハエの口器にある味覚感覚器は大きく3つに分けることができる；①毛状味覚感覚子，②ペグ状味覚感覚子，③咽頭味覚器官。キロショウジョウバエの咽頭味覚器官は，上唇感覚器（labral sense organ; LSO），腹側口腔感覚器（ventral cibarial sense organ; VCSO），背側口腔感覚器（dorsal cibarial sense organ; DCSO）3つの味覚器官から構成される。ハエの図はMeyerhof (2013)から引用し，一部改変した。ペグ状味覚感覚子の写真はZhouら (2019)から引用。

4.2 材料と方法

4.2.1 ハエ

第2章2.2.1に記載の方法で飼育した。

4.2.2 試験化合物

第2および第3章と同様に、除虫菊から抽出精製した高純度のピレトリン（天然ピレトリン）を用いた。塩化ナトリウム、クイニンおよび酒石酸の味覚物質（図 2-2）を評価した。これらの試験化合物の由来は、第2章の2.2.2に記載した通りである。天然ピレトリンはDMSOに溶解し、それぞれ100 mMのストックを作成した。これら以外の試験化合物の溶液処方は、前章の2.2.2に記載した通りである。

第2および第3章で行った試験と同様に、殺虫性化合物の試験では、100 mMのDMSOストックを0.1 Mのショ糖溶液で希釈した。殺虫性化合物の最高濃度は1 mMであり、そのショ糖溶液にはDMSOが1%含まれていることになる。試験溶液は16倍または4倍で希釈し、濃度応答性を評価した。DMSOを1%含むショ糖溶液をブランク溶液として評価した。水溶性の味覚物質である塩化ナトリウム、クイニンおよび酒石酸は、ショ糖溶液そのもので希釈した。

4.2.3 口吻の嫌悪応答の記録

天然ピレトリンの摂取によって引き起こされる口吻の嫌悪応答を描写するため、拘束したクロキンバエの摂取行動をデジタルカメラで記録した。先端を切り落とした1000 μ lチップの基部からハエを挿入し、頭部が先端から突き出した状態で固定した。拘束したハエを実体顕微鏡（SZ61; Olympus, 東京）下に固定し、第3章で行ったキャピラリー摂食試験で用いたガラス毛细管マイクロピペット（容量：25 μ l；2-000-025; Drummond Scientific Co.）で試験溶液を与えた時の口吻の動きを実体顕微鏡に接続したデジタルカメラ（DP22; Olympus）で撮影した。摂取行動をほぼ完全に阻害する62.5 μ Mの天然ピレトリンを試験した。対照試験として、DMSOを1%含むショ糖溶液を試験した。比較対象として、摂取行動を62.5 μ Mの天然ピレトリンと同程度抑制する濃度の味覚物質を評価した；塩化ナトリウム（1 M）、クイニン（250 μ M）、酒石酸（250 mM）。

4.2.4 口吻の筋活動の記録

天然ピレトリンの摂取は、口吻全体や唇弁の継続的な痙攣に加えて、通常のショ糖溶液の摂取では見られない下方への口吻伸展や急な口吻の引き戻し、嘔吐を断続的に引き起こした。ピレトリンに対する口吻の運動応答のレパートリーは幅広いことから、口吻を構成する様々な筋肉が同時多発的に収縮していると予想された。そこで、摂食行動の最中および摂食を止めた後の口吻の筋活動を定量化するため、ワイヤ電極を用いて、口吻を構成する筋肉の活動を筋電図法で記録した。ビデオ撮影の時と同様に、ハエを 1000 μ l チップで拘束し、ワックスプレート上で口吻をピンで固定した。唇弁を開口させる叉状後引筋（図 4-2A, Retractor Furca; Rt Fur）から、口吻の基幹である Rostrum を折り曲げて引き戻すための後引筋（図 4-2B, Retractor of Rostrum; Rt Rst）まで、口吻の運動に関わる幅広い筋肉の活動を検出するため、ポリウレタンで被覆された銅線（直径 10 μ m, FX-91; Kaisi Precision Tools, China）からなる記録電極を口吻の吻管（haustellum）の側方前方部に（図 4-2A）、不関電極の銅線は同側の複眼に刺入した（図 4-2B）。記録電極の先端は、吻管側方の特定の筋肉に刺入することなく、吻管の体腔内に留めた。その後、ファラデーケージの中に置いた実体顕微鏡の下にハエを固定し、二本のワイヤは差動増幅器（model DP-311; Warner Instruments, CT, US）のヘッドステージに接続した。筋電図のアナログ信号を差動増幅器で増幅し（gain: $\times 1000$, 10-Hz high-pass and 10k-Hz low-pass filter）、Axon Digidata1550B（Molecular Devices, California, US）でデジタル信号に変換した。筋電図は、64 ビットのウィンドウズ PC 上の pCLAMP（version 10.6, Molecular Devices）で表示、記録した。口吻の筋活動と口吻の実際の動きの関連を調べるため、いくつかの試行では、筋電図記録と動画撮影を組み合わせた。筋電図記録では、摂食行動を殆ど抑制する 4 および 62.5 μ M のピレトリンを評価した。対照試験として、DMSO を 1% 含むショ糖溶液を試験した。比較対象として、一連の味覚物質（塩化ナトリウム, 1 M；クイニン, 250 μ M；酒石酸, 250 mM）を評価した。Igor6.3.7.2 のアドオンソフトである NeuroMatic（ver.3.0c）（Rothman and Silver 2018）を用いて、筋活動の平均頻度を求めた。

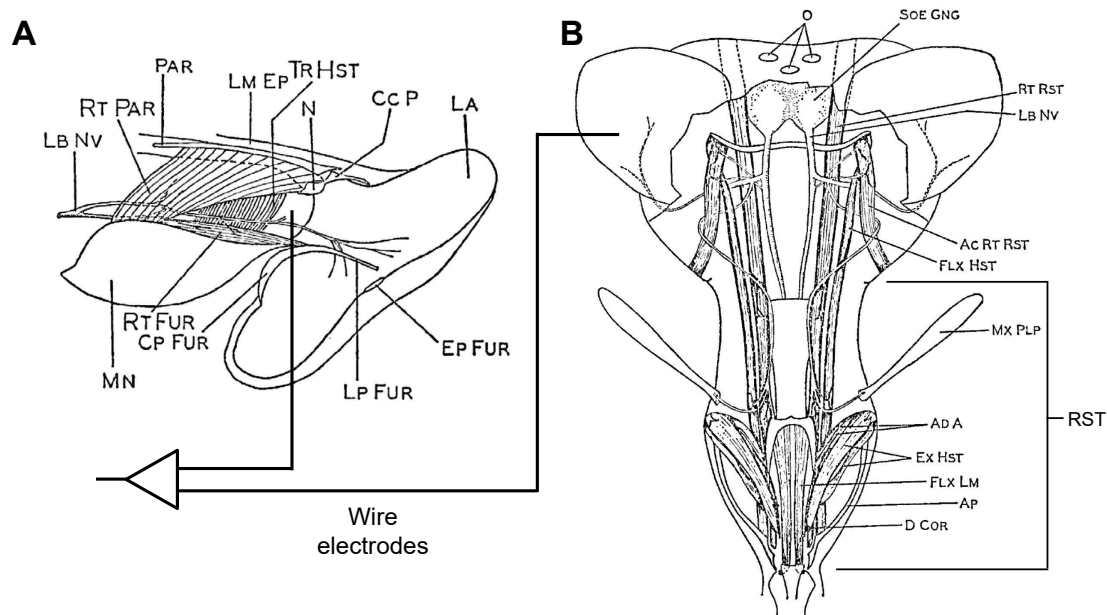


図 4-2 口吻を構成する筋肉と筋電図の記録部位。

A. 吻管（haustellum）の側方にある主な筋肉。B. Rostrum（RST）および頭部前面にある口吻の運動に関わる筋肉。いずれの図も Deithier (1959) から引用し、一部改変した。

4.2.5 咽頭結紮実験

口吻や咽頭に局在する味覚感覚器への作用が摂食阻害を引き起こす確証を得るため、口吻から摂取したショ糖溶液がそ嚢や中腸へと移行しないように、咽頭を結紮した上で口吻の筋活動を記録し、嫌悪的な口吻の活動を反映した口吻の持続的な筋活動が引き起こされるかどうかを調べた。ハエの体を仰向けにしてパラフィンベッドに固定し、頭部の裏側を露わにした状態で、口吻を伸ばして動かないように唇弁の基部をピンで固定した。口吻の基部（上唇，labrum）と頸部の間の頭蓋を解剖用ハサミで切除し、頸部から口吻へと伸びる咽頭を露出した（図 4-3）。表層にある気管を可能な限り傷つけないように注意しながら、細いピンセットで咽頭を丁寧に引っ張り出し、絹糸をほぐして得た絹繊維で咽頭を縛った。その後、ワイヤ電極を口吻に取り付け、餌溶液を摂取させた時の口吻の筋電図を記録した（手順は 4.2.3 の通り）。この状況下でも、1 日絶食させたクロキンバエは食紅を適量加えたショ糖溶液を摂取し、咽頭にふくませる（図 4-3）。

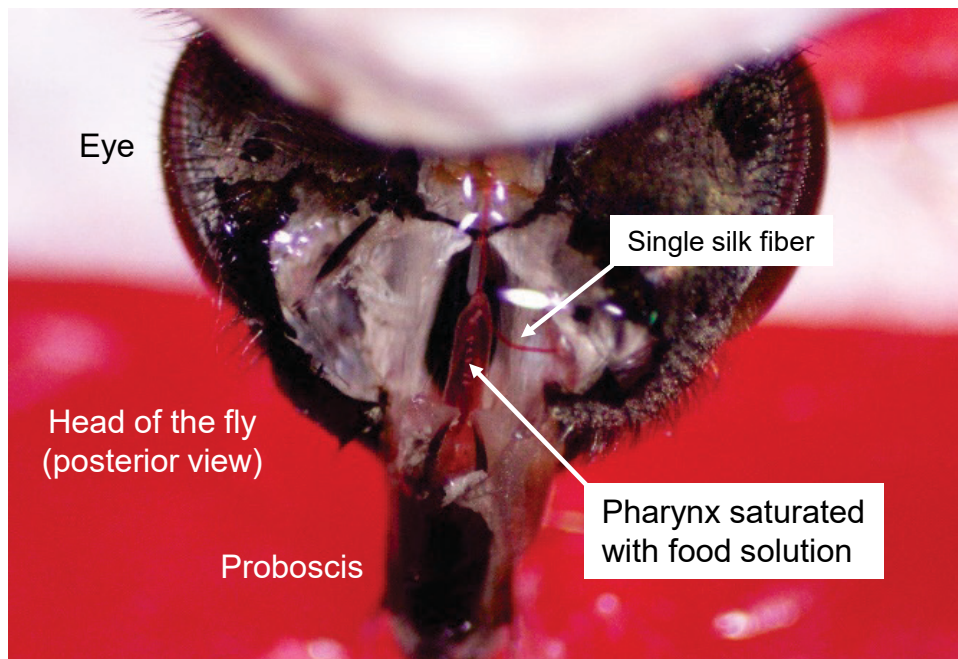


図 4-3 咽頭結紮実験.

クロキンバエの頭部の裏側のクチクラを切除し、絹糸を用いて、露わにした咽頭を食道下神経節の手前で結紮した。食紅で色づけたショ糖溶液を口吻に与えると、咽頭が膨満するまで溶液を摂取するのが見える。

4.2.6 キャピラリー摂食試験

唇弁の毛状味覚感覚毛の摂食阻害作用への関与を調べるため、唇弁の味覚感覚毛がピレトリンに晒されないように工夫したキャピラリー摂食試験を行った。キャピラリーガラス管（直径：1.5 mm，G-1.5，成茂，東京）をマイクロピペットプラー（P-1000，Sutter instrument，CA，US）で細く引き、その先端の外径（内径）を約 180（120） μm に調整した。このガラスキャピラリーの先端を唇弁の合わせ目にわずかに挿入することで、クロキンバエの唇弁の周囲にある感覚毛が試験溶液に晒されることなく、ハエは餌溶液を摂取することができる（図 4-4）。この方法でショ糖溶液を与えても、口吻伸展応答を行わないことから、外部味覚感覚子が試験溶液に晒されてないことが確認された。キャピラリー摂食試験では、0.1 M のショ糖溶液単独、およびピレトリン 62.5 μM 、塩化ナトリウム 1 mM またはクイニン 250 μM を加えたショ糖溶液を摂取させた時の最初のひと飲みの摂取量と摂取時間を計測した。摂取終了のタイミングは、キャピラリーを咥えなが

らも唇弁を動かさなくなる，もしくは口吻が痙攣し始めてキャピラリーから離れた時点とした．摂取量と摂取時間は，第 3 章 3.2.3 に記載した方法で計測した．

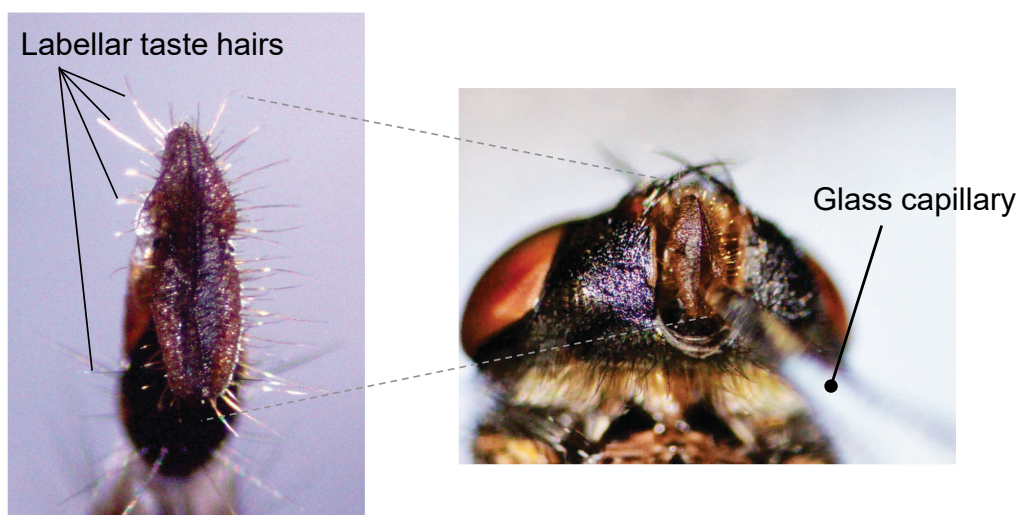


図 4-4 キャピラリー摂食試験．

先端の直径を調整したガラスキャピラリーで唇弁の合わせ目からショ糖溶液を摂取させた．摂取の最中においても，ガラスキャピラリーは唇弁の周囲に生える毛状味覚感覚子に触れることなく，漏れ出た溶液に感覚子が浸ることもない．

4. 2. 7 統計処理

キャピラリー摂食試験で得た摂取量の濃度応答データは，IgorPro（ver. 6.3.7.2）を用いて 4 パラメーターロジスティック回帰した．手順は，3.2.5 に記載した通りである．口吻の筋活動の平均頻度の化合物間における比較には，ボンフェローニ補正を施した t 検定を用いた．

4.3 結果

4.3.1 摂取したピレトリンおよび味覚物質に対する口吻の嫌悪応答

摂取行動をビデオ撮影することで，味覚物質と天然ピレトリンの決定的な違いが明確になった．摂取量

を十分低下させた濃度（62.5 μM ）の天然ピレトリンとピレトリン I・II に対して、ハエは摂取を直ぐに止めると、唇弁や口吻を小刻みに震わせた（図 4-5A, proboscis trembling）。動画の観察から、ハエは、口吻を震わせながら、伸展と引き戻し（retraction）を不規則に繰り返すことが示された。ハエは時折、えずく様に、胸がある下方へと口吻を完全に伸展させた（図 4-5B, aversive PER）。また、口吻の伸展や引き戻しの合間にハエは嘔吐し、唇弁に液滴を蓄えた（図 4-5C, vomiting）。これらの特徴的な口吻の活動は持続的であったが、多くの場合、一定時間後には収まり、ハエはその後摂取行動を正常に行うことができた。対照的に、塩化ナトリウムやクイニン、酒石酸を含むショ糖溶液の摂取を止めた後は、たとえ摂取をほぼ完全に阻害する濃度であっても、ハエは、ピレトリンの摂取で観察されたような口吻の活動を一切示さず、口吻を元の場所に直ぐに引き戻した（data not shown）。

A
Proboscis trembling



B
Aversive PER



C
Vomiting



図 4-5 摂取した天然ピレトリンおよびピレトリン I・II に対してクロキンバエが示す嫌悪応答。

ピレトリン（62.5 μM ）を摂取すると、口吻の先端にある唇弁（labellum）や吻管（haustellum）を震わせながら（A），時折、口吻全体をえずくように伸ばしたり（aversive PER; 嫌悪的口吻伸展応答，B），嘔吐したりする

(C) . この様な嫌悪的な口吻の活動は、摂食阻害活性を示す濃度であっても、塩化ナトリウム (1 M) やクイニン (250 μ M) , 酒石酸 (250 mM) では観察されない。

ピレトリンやピレトリン・II の摂取によって引き起こされた口吻の嫌悪的な活動を定量化するため、拘束したハエの口吻の筋活動をワイヤ電極で記録した。ショ糖溶液を与えた場合、口吻の筋活動は、摂取時間の長さに関わらず、キャピラリー管を唇弁に当てている間だけ活性化した (図 4-6A) 。摂取行動と対応した口吻の持続的な筋活動は、摂食を阻害する濃度の塩化ナトリウム、クイニンまたは酒石酸を含むショ糖溶液を摂取した時においても観察された (図 4-6C) 。天然ピレトリンを含むショ糖溶液を摂取した時は、摂取の最中だけでなく、摂取を止めた後も口吻は激しく活動し続けた (図 4-6B) 。

そこで、摂取時間が異なるそれぞれの試行で得られた筋活動頻度の時系列データを、摂取を終えたタイミングを基準として並び直して平均化した (図 4-7A) 。対照区のショ糖溶液を摂取した時は、口吻の筋活動は摂取を止めた直後に収まり、その後、低い活動レベルを維持した (図 4-7A) 。味覚物質を摂取した場合も同様に、口吻の筋活動のレベルは摂取中断直後に大きく低下し (図 4-7A) 、その後の活動レベルは対照区と変わらなかった (図 4-7B) 。一方、嫌悪的濃度の天然ピレトリンを摂取した場合、口吻の筋活動は摂取を中断した時点でさらに活性化し、その後、その活動レベルを維持した (図 4-7A) 。摂取の中断から生じた口吻の過興奮のレベルは、その後、緩やかに減少しながらも、摂取終了から少なくとも 4 分間は、味覚物質を摂取した時よりも高いレベルを維持した (図 4-7B) 。以上の結果から、経口摂取した天然ピレトリンは、口吻を構成する筋肉群の反復的で不規則な活動からなる嫌悪応答を引き起こすことで摂取を速やかに中断させることが明らかになった。

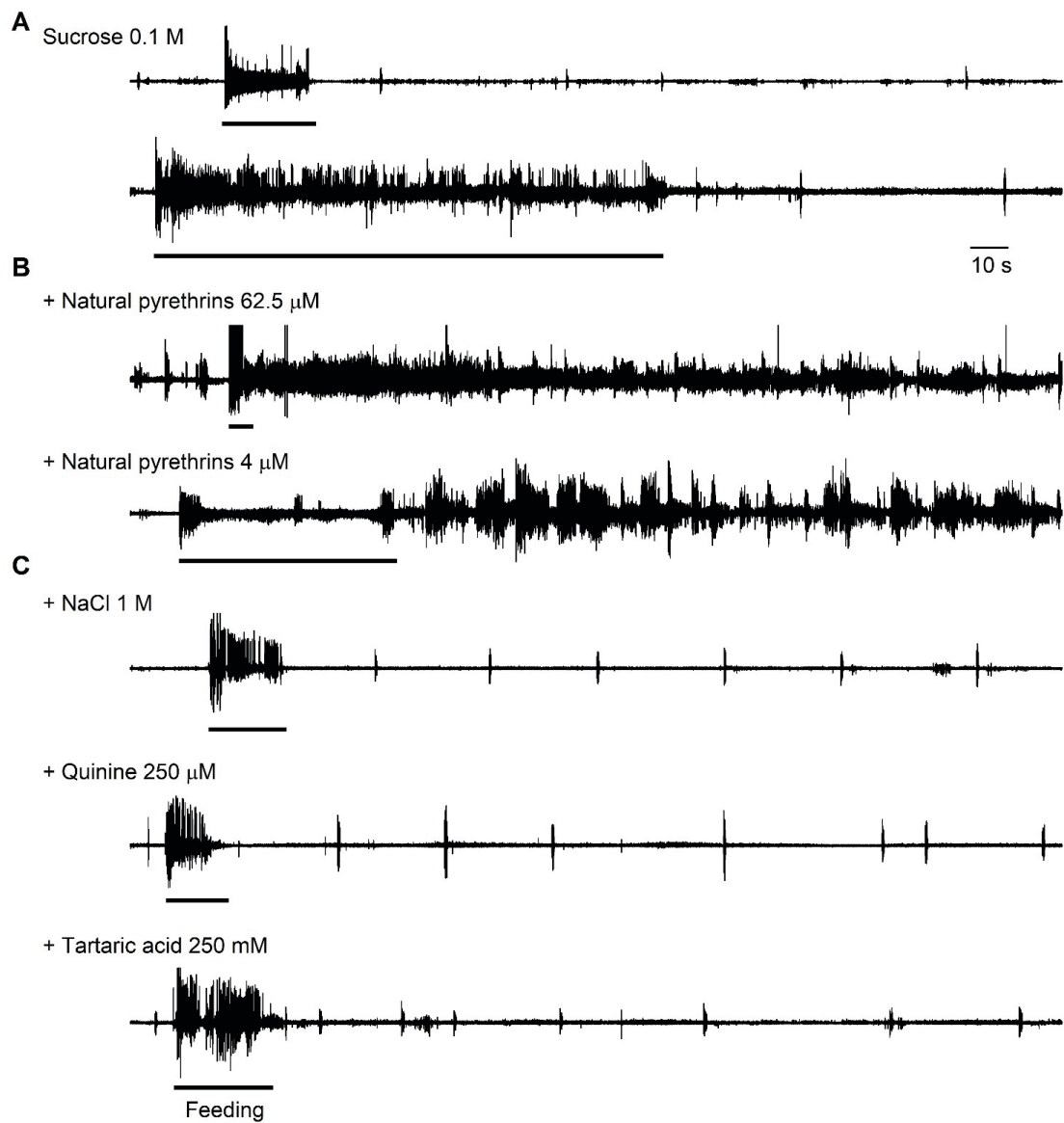


図 4-6 天然ピレトリンや摂食を阻害する味覚物質を摂取させた時の口吻の筋活動。

ワイヤ電極を用いて餌を摂取している時の口吻の筋活動を筋電図法で記録した。口吻は基本的に餌を摂取している時のみ活動的になる (A)。嫌悪的な濃度の天然ピレトリン (B)、または嫌悪的な味覚物質 (C) を含むショ糖溶液を摂取した時の口吻の筋電図。天然ピレトリンは摂取後に持続的な口吻の過興奮を引き起こした。図中の横線は、ハエがキャピラリーから餌を摂取している期間を示す。

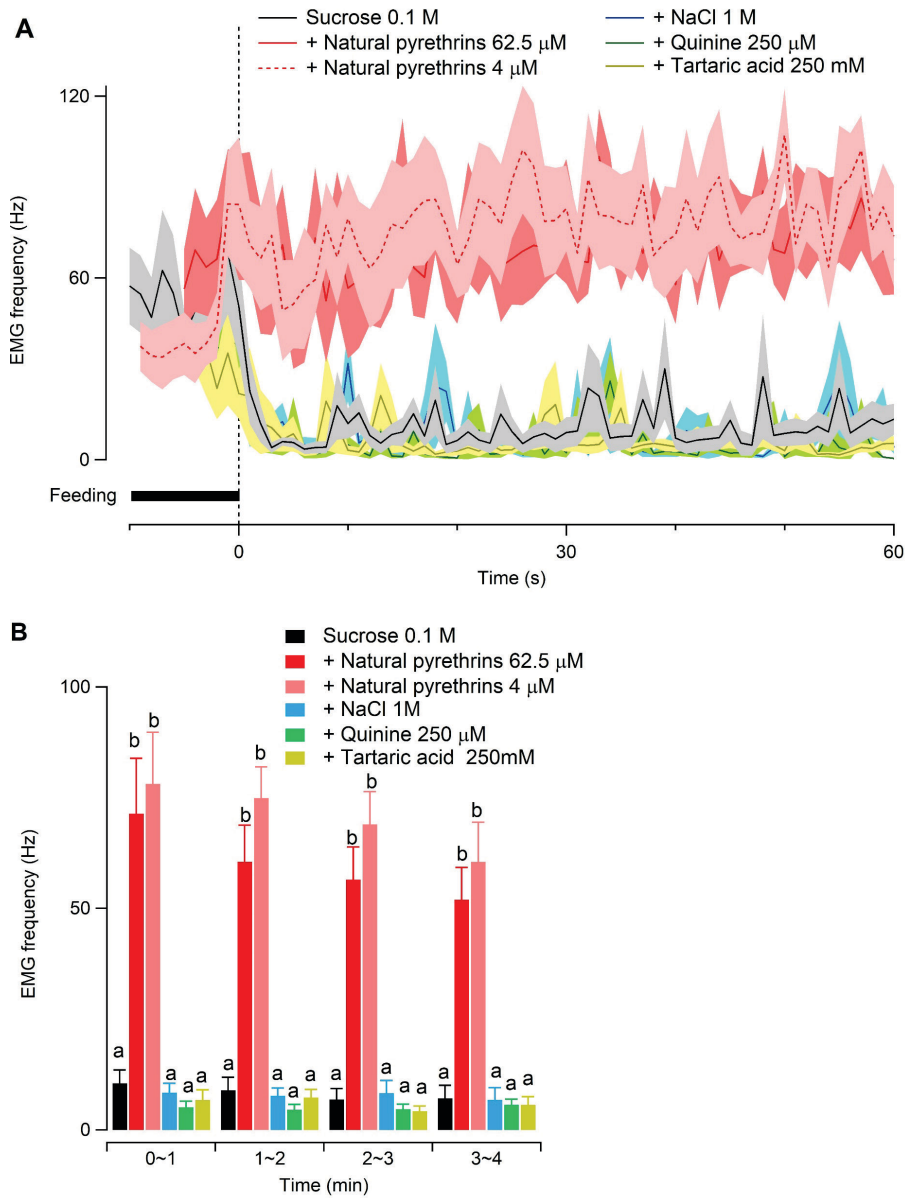


図 4-7 天然ピレトリンや嫌悪的な味覚物質を摂取したクロキンバエの口吻の筋活動。

A. 異なる個体から取得した口吻の筋活動の平均頻度の推移。 B. 摂取後 4 分間の口吻の筋活動の平均頻度。 各時間帯で、異なるアルファベット間には有意差があることを示す（ボンフェローニ補正を施した t 検定, $p < 0.001$, $n = 6 \sim 10$ ）。 エンベロープ (A) およびエラーバー (B) は標準誤差を示す。

4. 3. 2 咽頭結紮試験

咽頭を食道下神経節の手前で結紮したハエに天然ピレトリン (62.5 μ M) を摂取させると、唇弁が小

刻みに痙攣する嫌悪的な動きが引き起こされた。口吻の筋活動を記録したところ、天然ピレトリンを摂取した時のみ、口吻の筋活動は摂取後も継続することが示された（図 4-8A）。異なる個体から得られた筋活動頻度の時系列データを、摂取を終えたタイミングに合わせて並び直して平均化した。苦味物質のクイニンを摂取した後の口吻の筋活動は、摂取を中断した数秒後には対照区のショ糖溶液を摂取した時の筋活動のレベル（ベースライン）にまで収まった。一方、天然ピレトリンの摂取は、口吻の筋活動を摂取中断以降も持続させ（図 4-8B）、対照区を上回る活動レベルを少なくとも 4 分間維持した（図 4-8C）。咽頭を結紮しない通常のハエの行動が操作実験で再現されたことから、天然ピレトリンの摂取によって引き起こされた口吻の持続的な過興奮は、中腸や胃に移行した化合物の神経作用に由来するのではなく、餌を摂取している時にその内容物に晒される口吻や咽頭に存在する味覚感覚器への作用に基づいていることが明らかになった。

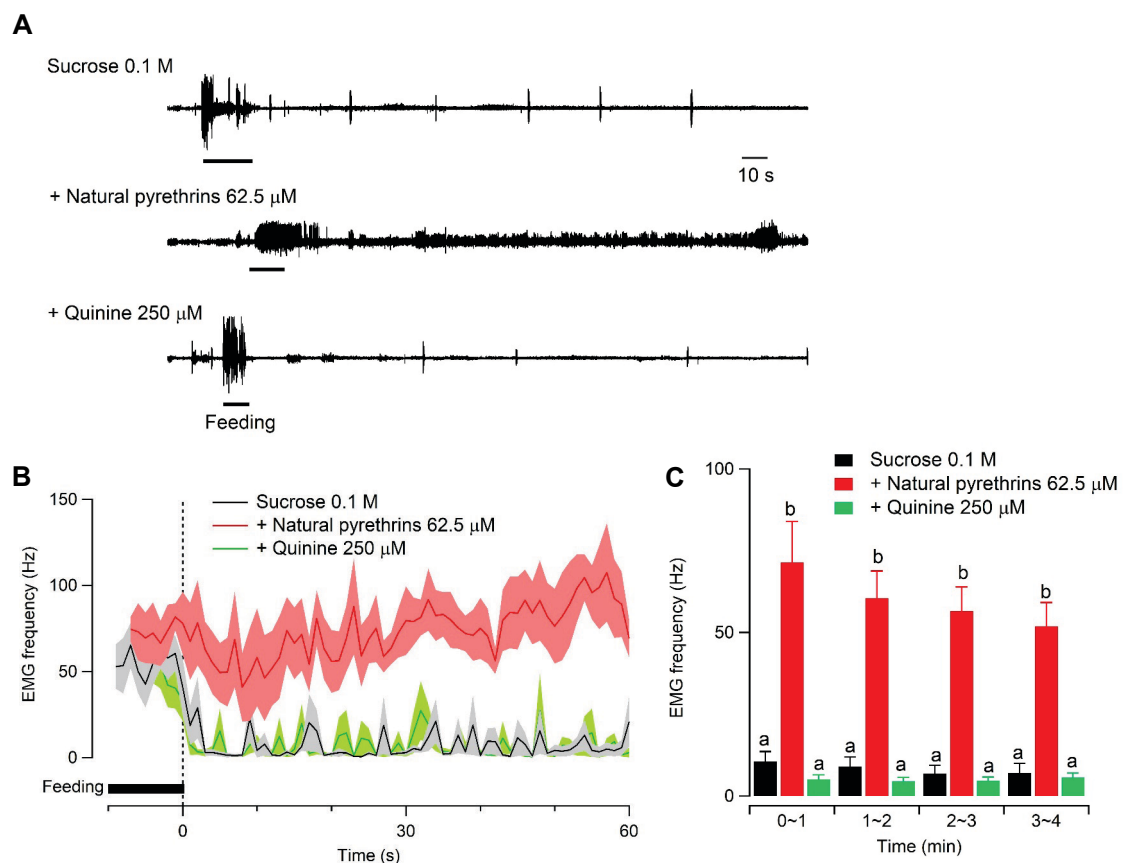


図 4-8 咽頭を結紮したクロキンバエに天然ピレトリンまたはクイニンを摂取させた時の口吻の筋活動。

A. ある個体から取得した口吻の筋電図。B. 異なる個体から得た口吻の筋活動の平均頻度の推移。C. 口吻の筋活動の平均頻度。それぞれの時間帯で、異なるアルファベット間には有意差があることを示す（ボンフェローニ補正を施した t 検定, $p < 0.001$, $n = 6 \sim 10$ ）。平均値を囲むエンベロープ (B) とエラーバー (C) は標準誤差を示す。

4. 3. 3 キャピラリー摂食試験

これまでに行った実験から、クロキンバエは、摂取したピレトリンに対して持続的な口吻の過興奮を伴った嫌悪応答を速やかに行うことで、摂取を中断することが明らかになった。ピレトリンとピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害作用には、それらが本質的に有する神経細胞を興奮させる薬理作用が関わっていることから（第3章）、ピレトリンは口吻や咽頭に存在する、一部またはすべての味覚感受器を速やかに刺激した可能性が高い。唇弁の毛状味覚感受子（図 4-1, ①）は潜在的な餌のプロベイングに用いられ、以降の餌の摂取の開始・中断の判断には関わっていない(Mahishi and Huetteroth 2019)。そこで、唇弁の味覚感受毛が試験溶液に晒されないように先端の直径を小さくしたキャピラリーガラス管を用いて摂食試験を行い、天然ピレトリンや味覚物質の摂食阻害活性を評価した。

クロキンバエは、唇弁の合わせ目からショ糖溶液を吸ることができ（図 4-3）、得られた摂取量（図 4-9A, 左端）と摂取時間（図 4-9B, 左端）には再現性があった。天然ピレトリンを試験すると、摂取を止めた直後から口吻の唇弁を痙攣させる嫌悪的な動きが観察された。得られた摂取量（図 4-9A）と摂取時間（図 4-9B）は天然ピレトリンの濃度の増加にしたがって次第に減少し、62.5 μM の濃度の摂取量は、十分な摂食阻害作用をもたらす塩化ナトリウム（1 M）やクイニン（250 μM ）と同程度だった。摂取量と摂取時間の濃度応答性を4パラメーター対数ロジステック関数で回帰し、それぞれの半数阻害濃度（ IC_{50} ）を得た（図 4-9AB, 挿入）。摂食量と摂取時間の IC_{50} 値は、いずれも 1 μM 未満であり、唇弁全体でキャピラリーから餌水を吸る通常のキャピラリー摂食試験法で得られた IC_{50} 値（図 3-3）と同程度だった。これらの結果から、天然ピレトリンの摂食阻害作用の発現には、唇弁の毛状味覚感受毛は関わっていないことが明らかになった。

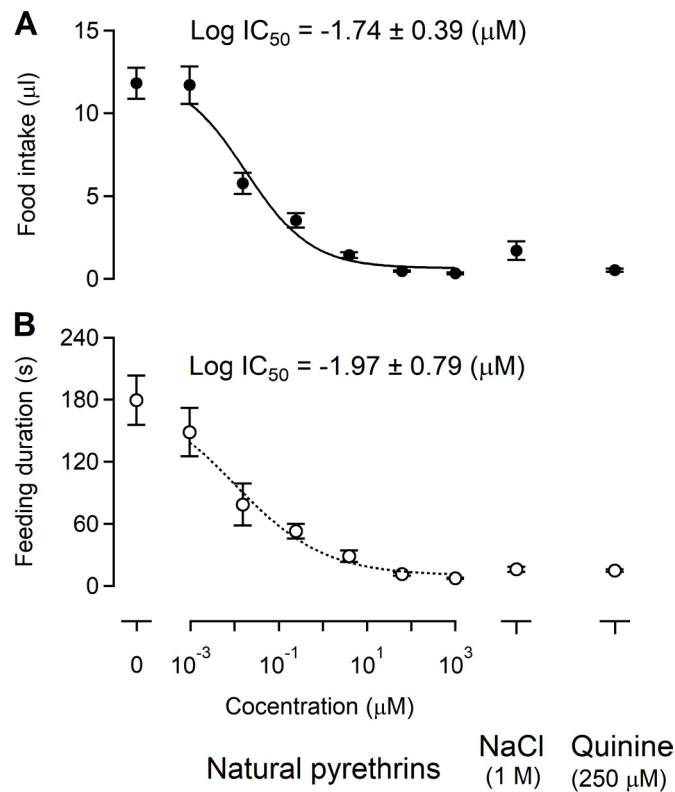


図 4-9 外部味覚感覚毛を刺激させない様にキャピラリー摂食させた時の天然ピレトリンおよび味覚物質の摂食阻害活性。ひと飲みした量 (A) と摂取時間 (B) をショ糖溶液に溶解させた天然ピレトリンの濃度に対してプロットした。塩化ナトリウム (1 M) , クイニン (250 μM) の結果を併記した。N = 10。平均値 $\pm$ 標準誤差。

4.4 考察

ビデオ撮影と口吻の筋電図記録により、天然ピレトリンの摂取は、クロキンバエの口吻を構成する筋肉を持続的に過興奮させることが明らかになった。筋電図によって示した口吻を構成する筋肉群の不規則で持続的な過興奮は、口吻の継続的な震えや、断続的に繰り返された口吻の伸展や引き戻しを反映した。時折引き起こされた、胸部がある下方への口吻の完全な伸展 (図 4-5B) は最も目立つ行動応答であり、餌を探す時に繰り返す通常の口吻伸展応答とは明確に異なった。類似する口吻の伸展運動は、キャラウェイ (セリ科) の精油 (Evans 1961) や、シトロネラルやリモネンなどのテルペン類 (Dethier 1972; Ozaki et al. 2003), ギ酸 (Saxena, 1958) など、有毒性の高い天然成分を摂取したクロキンバエで観察されている。Dethier (1976) は、このような口吻伸展運動を “Hesitant extension of the proboscis” と表現し、有毒

性の天然物の摂取に対する特徴的な嫌悪応答の一つとして取り上げた。その他に挙げられた嫌悪応答は、嘔吐と口吻のグルーミングであり、いずれも、選択型摂食試験（第 2 章）やキャピラリー摂食試験で観察されている。従って、天然ピレトリンによって引き起こされた一連の特徴的な口吻の振る舞いは、有害性の物質の摂取に対してクロキンバエが普遍的に示す嫌悪応答であると結論づけた。以上の考察を踏まえて、天然ピレトリンの摂取によって引き起こされた特徴的な口吻伸展は、嫌悪的口吻伸展応答(Ozaki et al. 2003)と呼称し（図 4-5B）、摂取活動の際に通常引き起こされる口吻伸展応答と明確に区別した。

このように、クロキンバエでは有害性物質に対する嫌悪行動は半世紀前から記載されてきた。意外なことに、摂食阻害物質の味覚受容の分子・細胞基盤が最も深く調べられているキロショウジョウバエでは、有害性物質に対する嫌悪行動は報告されていない。そのため、有害性物質の摂食阻害作用と嫌悪行動の因果関係は明らかにされてこなかった。今回、キャピラリー摂食で引き起こした嫌悪応答の筋電図解析により、ピレトリンの摂取が口吻の痙攣を直ちに引き起こすことで摂食を中断させ、この口吻の異常興奮が継続することで摂食再開を遅延させることを明らかにした。口吻の痙攣が続く中で時折生じた嘔吐は、一般的に、生存応答とみなされる。ひとしきりの摂取の後に続いた嘔吐は、そ嚢や中腸に蓄えられるピレトリンの量をできる限り少なくしたはずである。摂取した天然ピレトリンに対するクロキンバエの一連の嫌悪応答は、餌のさらなる摂取を継続的に抑えると同時に、すでに摂取した化合物の吸収を可能な限り回避することに役立つ。このことは、クロキンバエはピレトリンを有害な化合物として感受していることを意味する。このような、ピレトリンの摂食阻害作用の成り立ちは、嫌悪応答を引き起こすことなく、摂取行動を中断させるだけの塩味、苦味および酸味物質とは根本的に異なった。

咽頭結紮試験により、口吻の持続的な筋活動から描写される嫌悪応答は、餌溶液に晒される口吻や咽頭に存在する感覚器への作用に基づいていることが明らかになった。また、ハエの口器に存在する 3 種類の味覚感覚器の中で、潜在的な餌の評価に用いられ、蒸散物を検知することも可能である(Hopkins 1964; Dethier 1972; Dethier 1976)、唇弁の毛状味覚感覚子は、ピレトリンの摂食阻害作用の発現には関与しないことが示された。すなわち、残りの 2 つの味覚器官である、唇弁の内側に存在するペグ状味覚感覚子(Wilczek 1967; Chen and Dahanukar 2020)と、咽頭の内側にある咽頭味覚器官(Dethier 1976;

Chen and Dahanukar 2017; Chen and Dahanukar 2020)のいずれか、または両方に天然ピレトリンが作用し、嫌悪応答を引き起こすことが明らかになった。

この章の結論として、天然ピレトリンの摂取は口吻の嫌悪応答を継続的に引き起こすことで、餌のさらなる摂取を抑制し、クロキンバエは嫌悪応答の合間に嘔吐することで、摂取した化合物の吸収を可能な限り避けることを明らかにした。嫌悪応答の発現には唇弁の内側に存在するペグ状味覚感覚子や、咽頭の内側にある咽頭味覚器官のいずれか、または両方が関わることが示された。

第 5 章 ピレトリンに対する口吻の味覚神経応答の電気生理学的解析

5.1 背景と目的

第 4 章では、ピレトリンの摂取は、クロキンバエに特徴的な嫌悪応答を引き起こすことを明らかにした。嫌悪応答は、口吻の継続的な震えと、時折生じる嫌悪的口吻伸展応答や口吻の引き戻し、嘔吐から構成され、それらは口吻を構成する筋肉群の持続的で不規則な痙攣から描写された。一連の嫌悪応答は、ピレトリンの摂取によって速やかに引き起こされることで、餌のさらなる摂取を継続的に抑えると同時に、すでに摂取した化合物の吸収を可能な限り避けることを可能にすると結論付けられた。嫌悪応答の発現には唇弁の周囲にある毛状味覚感覚子は関与しなかったことから、ピレトリンは、唇弁の内側に存在するペグ状味覚感覚子や、咽頭の内側にある咽頭味覚器官のいずれか、または両方に作用することがわかった。

ピレトリンの摂取によって引き起こされた嫌悪応答は少なくとも 5 分間は持続し、濃度の増加に応じて、摂取ができる状態になるまでの時間を引き延ばした。この間、クロキンバエは口吻を震わせながら、嫌悪的口吻伸展応答や口吻の引き戻しを繰り返した。嫌悪的な行動が繰り返されることから、ピレトリンに対する味覚感覚応答は摂取後も持続する可能性が高い。このような感覚応答特性を電気生理学的にとらえるには、味覚器官が化合物溶液に晒されるタイミングを把握、もしくは制御することが可能なセットアップを組む必要がある。最も直接的な方法の一つは、餌水を摂取する神経運動機能を保った *in vivo* 条件で、クロキンバエの唇弁にあるペグ状味覚感覚子や、咽頭の内部に存在する咽頭味覚器官の神経活動を記録することである。得られた味覚神経の応答パターンを、嫌悪応答を表す口吻の筋活動と経時的に関連付けることで、嫌悪応答の解発に関わる味覚神経応答を特定することができるはずである。

ハエの唇弁にあるペグ状味覚感覚子や毛状感覚子を構成する味覚受容ニューロンは、唇弁神経 (labial nerve) に束ねられる。左右一対の唇弁神経は、口吻の側方を通して食道下神経節に接続する (Dethier 1976)。キイロショウジョウバエでは、咽頭味覚器官を構成する味覚受容ニューロンは咽頭神経 (pharyngeal nerve) に束ねられ、唇弁神経と同様、食道下神経節に接続する。クロキンバエでは、咽

頭味覚器官は形態学的にも生理学的にも同定はされていないが、その存在は指摘されており(Dethier 1976), キイロショウジョウバエの咽頭神経に相同する上唇額神経 (labrofrontal nerve) が存在する (Dethier 1959; Dethier 1976). そこで、片側の神経筋機能を保った in vivo 条件下でクロキンバエに天然ピレトリンを含むショ糖溶液を摂取させ、口吻の筋電図を記録しながら、反対側の唇弁神経または上唇額神経に含まれる感覚ニューロンの複合インパルス (compound action potentials) を細胞外記録法で記録した.

5.2 材料と方法

5.2.1 ハエ

第2章2.2.1に記載の方法で飼育した.

5.2.2 試験化合物

第4章と同様に、除虫菊から抽出精製した高純度のピレトリン (天然ピレトリン) を用いた. 比較対象として、キイロショウジョウバエの咽頭味覚器官で受容されることが明らかになっている(Chen et al. 2019), 苦味物質クイニン (図 2-2) を評価した. 天然ピレトリンとクイニンの溶液処方は、第2章の 2.2.2 に記載した通りである. 電気生理試験には、それぞれ、摂食を阻害する濃度である 62.5 μ M および 250 μ M の天然ピレトリンとクイニンを含む 0.1 M ショ糖溶液を使用した. 天然ピレトリンの溶液には 0.0625% の DMSO を含んでいる. 試験化合物以外の条件をそろえるため、すべての試験溶液に同一濃度の DMSO を加えた.

5.2.3 電気生理実験

摂取した天然ピレトリンに対するペグ状味覚感覚子や咽頭感覚器の神経応答を調べるため、それぞれの感覚器を構成する感覚ニューロンの神経活動を細胞外記録法で記録した。24 時間絶食させたクロキンバエの体を仰向けにパラフィンベッドに固定し、頭部の裏側があらわになるように口吻を伸ばした状態で動かないようにピンで固定した。口吻の基部（上唇, labrum）と頸部の間の頭蓋を解剖用ハサミで切除し、咽頭の腹側を露にした。唇弁神経（labial nerve, 図 5-1Ai）と咽頭神経（pharyngeal nerve, 図 5-1Aii）はそれぞれ左右一対あり、いずれも食道下神経節（subesophageal ganglion; SOG）を起点とする。唇弁の毛状味覚感覚子やペグ状味覚感覚子を構成する感覚ニューロンの軸索は、一対の唇弁神経を経由して食道下神経節の特定の部位に投射する(Steck et al. 2018)。右側の唇弁神経の付け根を食道下神経節から切り離し、切断した神経をガラスキャピラリーからなる吸引電極で吸引して、唇弁神経に含まれる求心性ニューロンの複合インパルスを記録した（図 5-1Bi）。キロショウジョウバエの咽頭味覚器官由来の味覚ニューロンの軸索を束ねる結合咽頭神経（combined pharyngeal nerve）(Miyazaki and Ito 2010)は、クロキンバエの上唇額神経（labrofrontal nerve）(Dethier 1959)に相当する。右側の上唇額神経を食道下神経節から切り離し、2 本の上唇神経（labral nerve）に分岐する基部をガラスキャピラリーで吸引した（図 5-1Bii）。いずれの記録でも、反対側の神経繊維はそのままの状態ですべて摂食機能を維持させ、ワイヤ電極を用いて口吻の筋活動を同時に記録した。口吻は、ある程度伸びた状態でとどまるように緩やかにピンで固定した。試験化合物はガラスキャピラリーに含ませて、唇弁の周囲の毛状感覚子を刺激しない様に唇弁の合わせ目から摂取させた。摂取時間は 10 秒～20 秒間の範囲とし、5 分間の観察時間をおいた。一頭で、一連の化合物セットを順々に評価した。天然ピレトリンは不可逆的な作用を示しうるため、味覚物質を試験した後で評価した。電気シグナルは 10kHz でサンプリングし、10-10kHz のバンドパスフィルターを通した後で、データ取得システム（Axon Digidata 1440B, Molecular Device, CA, US）に保存した。

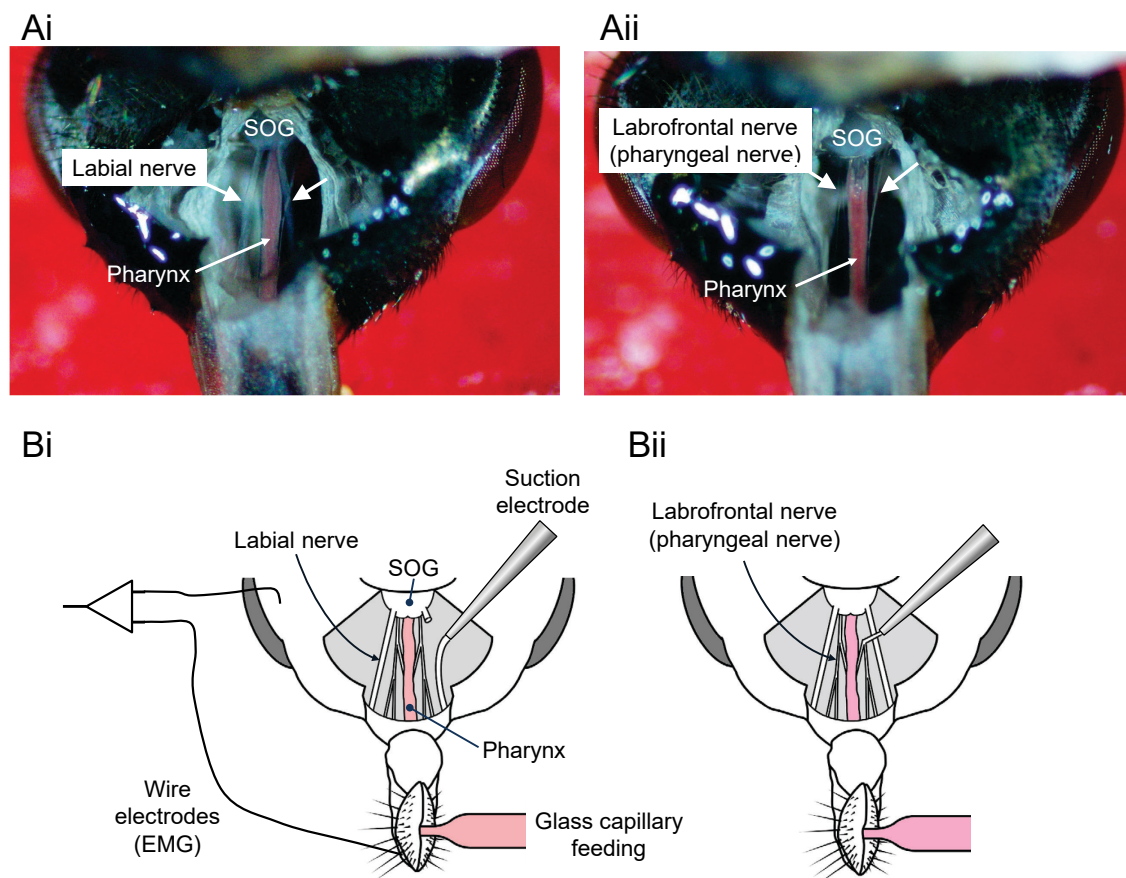


図 5-1 唇弁神経および咽頭神経に含まれる感覚ニューロンの神経応答の細胞外記録。

A. クロキンバエの唇弁神経 (labial nerve) と、キロショウジョウバエの咽頭神経に相当する上唇額神経 (labrofrontal nerve) . ハエの頭部の裏側のクチクラをはがすと、咽頭を挟んで一対の唇弁神経が手前に見える (Ai) . 唇弁神経を切除すると上唇額神経を視認できる (Aii) . B. 唇弁神経 (Bi) および咽頭神経 (Bii) の感覚ニューロンの神経活動を細胞外記録するための吸引電極の配置。口吻の筋電図を同時記録するため、口吻の吻管 (haustellum) の反対側方部の先端にワイヤ電極を刺入した。

5.2.4 解析

インパルスは Clampfit (ver. 10.6, Molecular Devices) を用いて抽出した。グラフの描画には Igor Pro 6.3.7.2 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, US) を使い、統計処理は R (ver. 3.6.1) で行った。各サンプルで得られたインパルスの発火頻度は一標本 t 検定を用いて比較し、多重比較を行う場合は、得られた p 値をボンフェローニ法で補正した。

5.3 結果

5.3.1 ペグ状味覚感覚子由来感覚ニューロンの天然ピレトリンに対する神経応答

摂取した天然ピレトリンに対するペグ状味覚感覚子由来の感覚ニューロンの神経応答を調べるため、唇弁神経に含まれる感覚ニューロンの複合インパルスを吸引電極で記録しながら、唇弁の毛状味覚感覚子を刺激しない様に試験溶液を唇弁の合わせ目から摂取させた。ワイヤ電極で同時記録した口吻の筋活動と食紅で色づけた餌溶液が咽頭を通過する様子から、ハエはショ糖溶液やクイニン（250 μ M）または天然ピレトリン（62.5 μ M）を混合したショ糖溶液をいくらか摂取することを確認した（図 5-2Ai-iii, 下段）。ショ糖溶液を摂取させるとインパルスの発火頻度は一過的に高い状態を保ち（図 5-2Ai-iii, 上中段）、インパルスの振幅の分布から、摂取前（図 5-2B, ベースライン）よりも大きいインパルスが多数発生することがわかった（図 5-2B, 上段）。キャピラリー摂取による唇弁神経の活性化は、空のガラスキャピラリーでも再現されたことから（図 5-2Aiv, B）、ショ糖溶液の摂取によって発生したインパルスの大半は、キャピラリー管の唇弁への接触に対するペグ状味覚感覚子の機械刺激受容ニューロンの興奮応答に由来することが示された。摂食を阻害する濃度のクイニンや天然ピレトリンをショ糖溶液に加えても、摂取中に発生したインパルスの構成は、機械刺激応答が優先するショ糖溶液に対する応答のものと変わらなかった（図 5-2B, 上段）。記録した複合インパルスの振幅値の幅や、自発発火インパルスの分布の形状は個体（プレパレーション）によって変化した（図 5-3, 上段）。いずれの個体においても、得られた複合インパルスの振幅値は単峰性の連続的な分布をとり、機械刺激または味覚刺激特異的なインパルスを分離・同定することはできなかった。そこで、個体毎に得られた複合インパルスは、神経活動のベースラインである自発的に発生した小さなインパルス（Small spike; S spike）と、ペグ状味覚感覚子の機械刺激によって付加されたより大きなインパルス（Medium spike; M spike）、そして、機械刺激でも活性化されない最も大きいインパルス（Large spike; L spike）の3種類に分けて解析した（図 5-2B）。

片方の唇弁神経が食道下神経節から切り離された条件下で、天然ピレトリンを摂取させたクロキンバエ

は口吻を継続的に痙攣させることを確認した（図 5-2Aiii, 下段）。天然ピレトリンの摂取に対して、ペグ状味覚感覚子を構成する感覚ニューロンの発火頻度は、ショ糖単独を摂取している時と同様に即時的に増加した（図 5-2Aiii, 中段）。これらの感覚ニューロンは、天然ピレトリンを摂取した直後からさらに活性化し、この活性化は、摂取している時には殆ど観察されなかった、自発発火インパルスよりも大きいインパルス（M, L スパイク）の発火頻度の増加に由来した（図 5-2Aiii, 中段；図 5-2B, 下段）。その後、唇弁神経の感覚ニューロンの過興奮は、口吻の筋活動と対応するように持続した。対照的に、唇弁神経の持続的な活性化は、摂食を阻害する濃度のクイニンを含むショ糖溶液を摂取した時には生じなかった（図 5-2Aii, 中段；図 5-2B, 下段）。

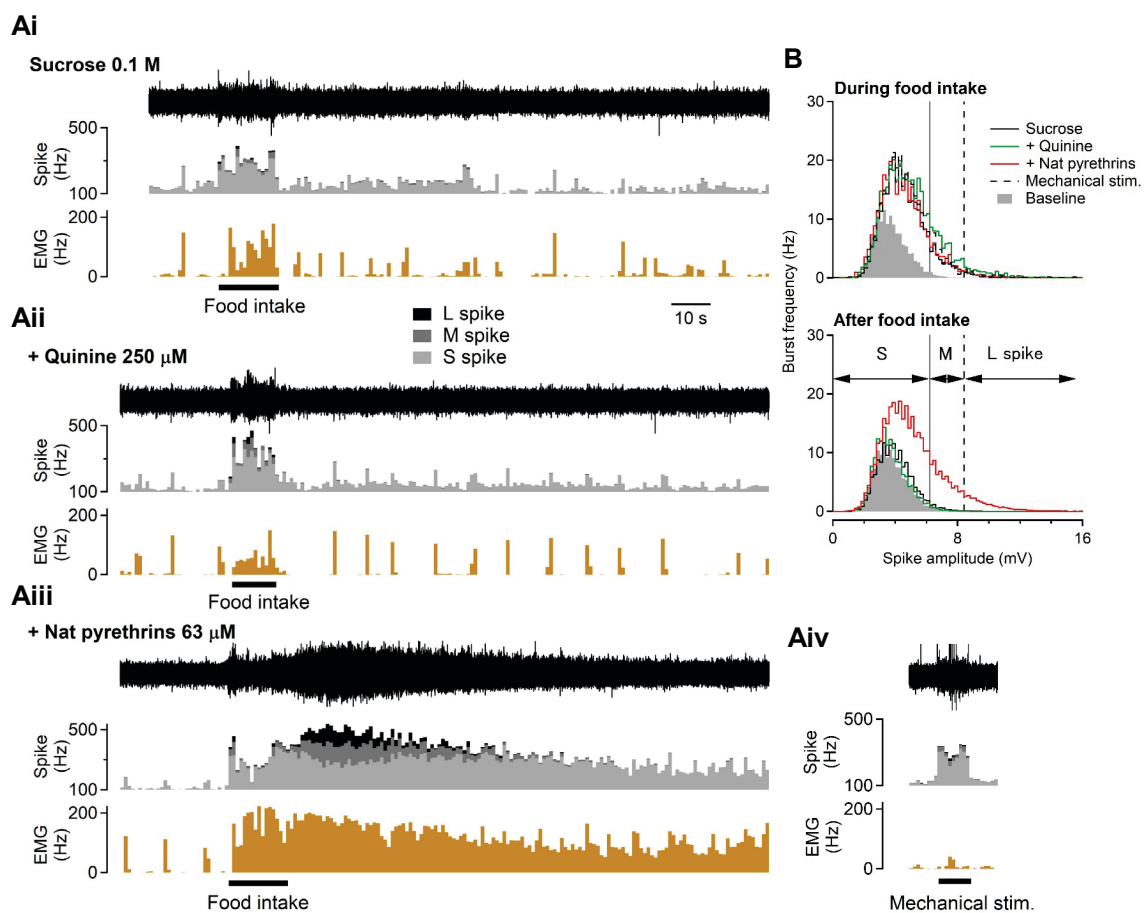


図 5-2 クイニンおよび天然ピレトリンを摂取した時のある個体の唇弁感覚ニューロンの応答。

A. ショ糖溶液（Ai），もしくはクイニン（Aii）や天然ピレトリン（Aiii）を含むショ糖溶液を摂取させた時のある個体（個体 A）の唇弁神経の神経活動と口吻の筋活動の推移。空のガラスキャピラリーで唇弁を機械的に刺激させた時の

神経活動（Aiv）． B. 摂取中および摂取後 2 分間のインパルスの振幅値の分布． 得られたインパルスは基本的に単峰性の分布をとり， 味覚物質や天然ピレトリンの摂取によって， より大きいインパルスを含む形状に変化した． 得られたインパルスは， 振幅の大きさから， 自発的に発生する小さなインパルス（Small spike; S spike, 灰色）， 唇弁への機械刺激によって新たに発生したより大きなインパルス（Medium spike; M spike）， 機械刺激でも活性化されない最も大きいインパルス（Large spike; L spike）の 3 つに分け（B）， 発火頻度の推移における内訳を対応する色で表した（A, 中段）． 同時に記録した口吻の反対側の筋肉の筋活動を A の下段に記載した．

天然ピレトリンの摂取によって引き起こされた唇弁神経の興奮応答は個体間で変動した（図 5-4）． 摂取を中断したタイミングを起点とした興奮応答の平均パターンを得るため， 各々の個体で得られた全ての大きさのインパルスの発火頻度を平均し， 同時に記録した口吻の筋活動の平均パターンと対応付けた（図 5-5）． その結果， ペグ状味覚感覚子を構成する感覚ニューロン群は， 天然ピレトリンの摂取を中断した直後からさらに活性化し， 口吻の筋活動の持続的な活性化と対応するように， その後， 興奮の状態を少なくとも 5 分間維持することが明らかになった． 天然ピレトリンの摂取によって即座に生じた感覚ニューロン群の興奮は， 自発発火インパルスよりも振幅が大きいインパルス（M, L スパイク）の発生頻度の増加から特徴づけられたが（図 5-2B；図 5-3, 下段）， それらの発生パターンは個体間で異なった（図 5-4）． そこで， 摂取中および摂取後 5 分間で得られたそれぞれの大きさのインパルスの発生頻度を平均化し， 化合物間で比較した（図 5-6）． 摂食を阻害する濃度のクイニンを含むショ糖溶液を摂取している時のインパルスの発火頻度は， 振幅の大きさに関わらず， ショ糖溶液の摂取の時よりも増える傾向があったが， 平均値の多重比較では統計的有意性は認められなかった． 天然ピレトリンを摂取している時のインパルスの発火頻度もまた， ショ糖溶液の摂取の時と変わらなかった． 摂取した後の感覚ニューロンの神経活動では， 天然ピレトリンを摂取した時に， 自発発火インパルスよりも大きい M および L インパルスの発火頻度が有意に増加した． 中でも， 天然ピレトリンを摂取した後の L インパルスの発火頻度は， ショ糖単独および天然ピレトリンを含むショ糖溶液を摂取している時の発火頻度よりも有意に高かった． これらの結果から， ショ糖溶液に含まれる天然ピレトリンは， クロキンバエがショ糖溶液を摂取している間に唇弁の内側にある多数のペグ状味覚感覚子に直ちに作用し， それらの感覚子を構成する多数の感覚ニューロンに対して， 味覚物質や摂食に伴う機械刺激では引き起こすことができない異常な過興奮を継続的に引き起こすことが明らかになった．

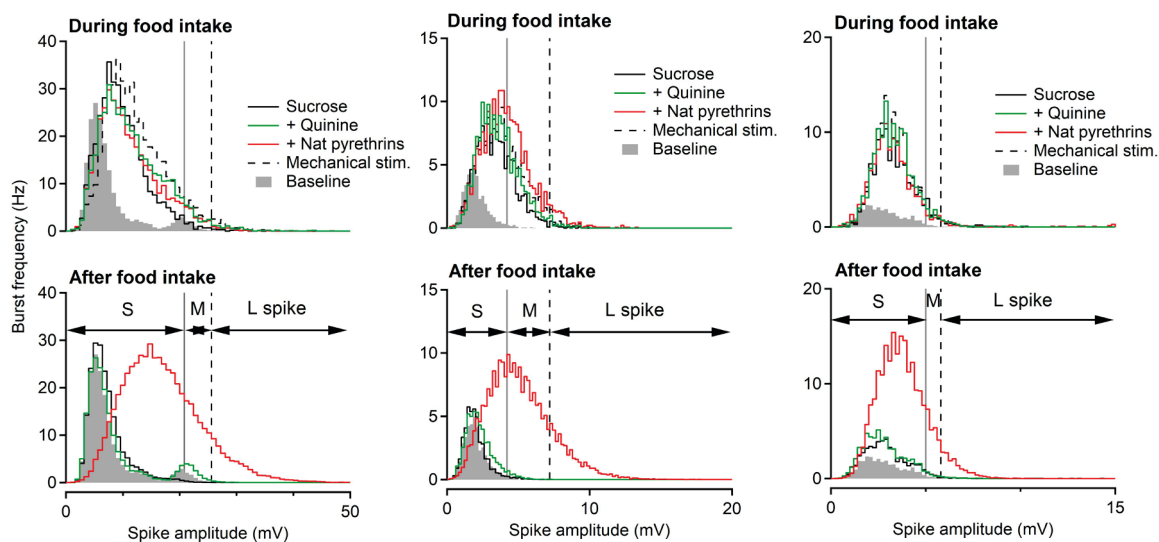


図 5-3 別の 3 個体から得られた摂取中および摂取後 2 分間の唇弁感覚ニューロンのインパルスの振幅値の分布。

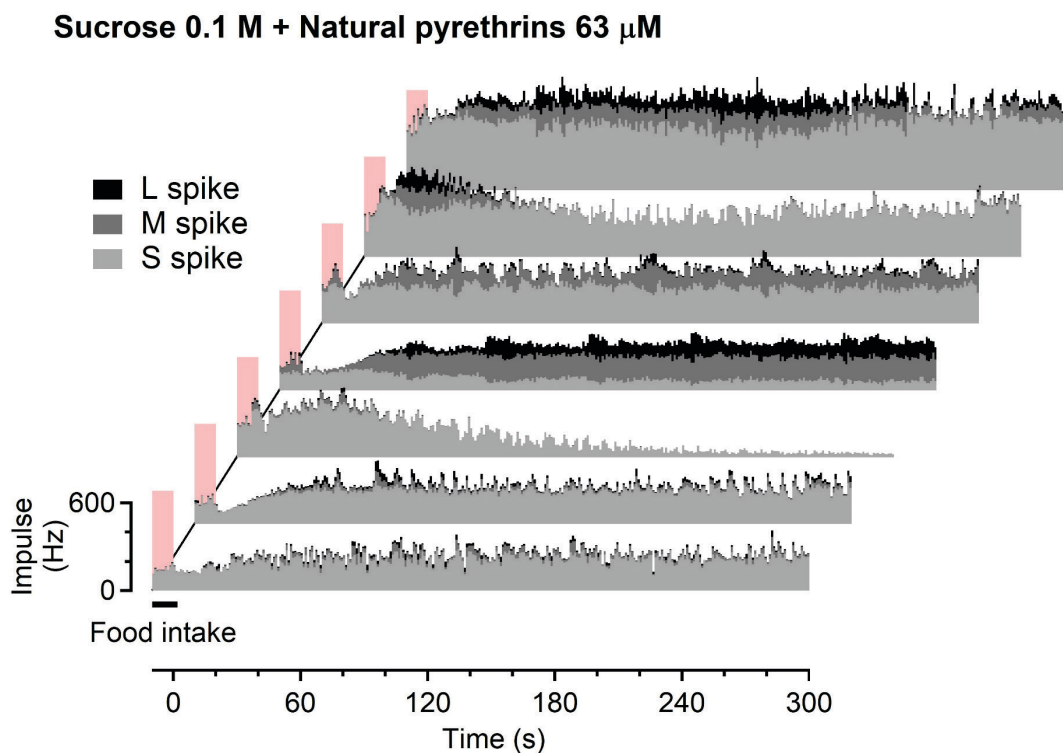


図 5-4 天然ピレトリンを摂取した時の唇弁神経由来感覚ニューロンの応答パターン。

異なる 7 個体から得られた唇弁神経に含まれる感覚ニューロンのインパルス頻度の推移。摂取を中断したタイミングを起点とし、インパルスの発火頻度は摂取を中断する 10 秒前から記載した。

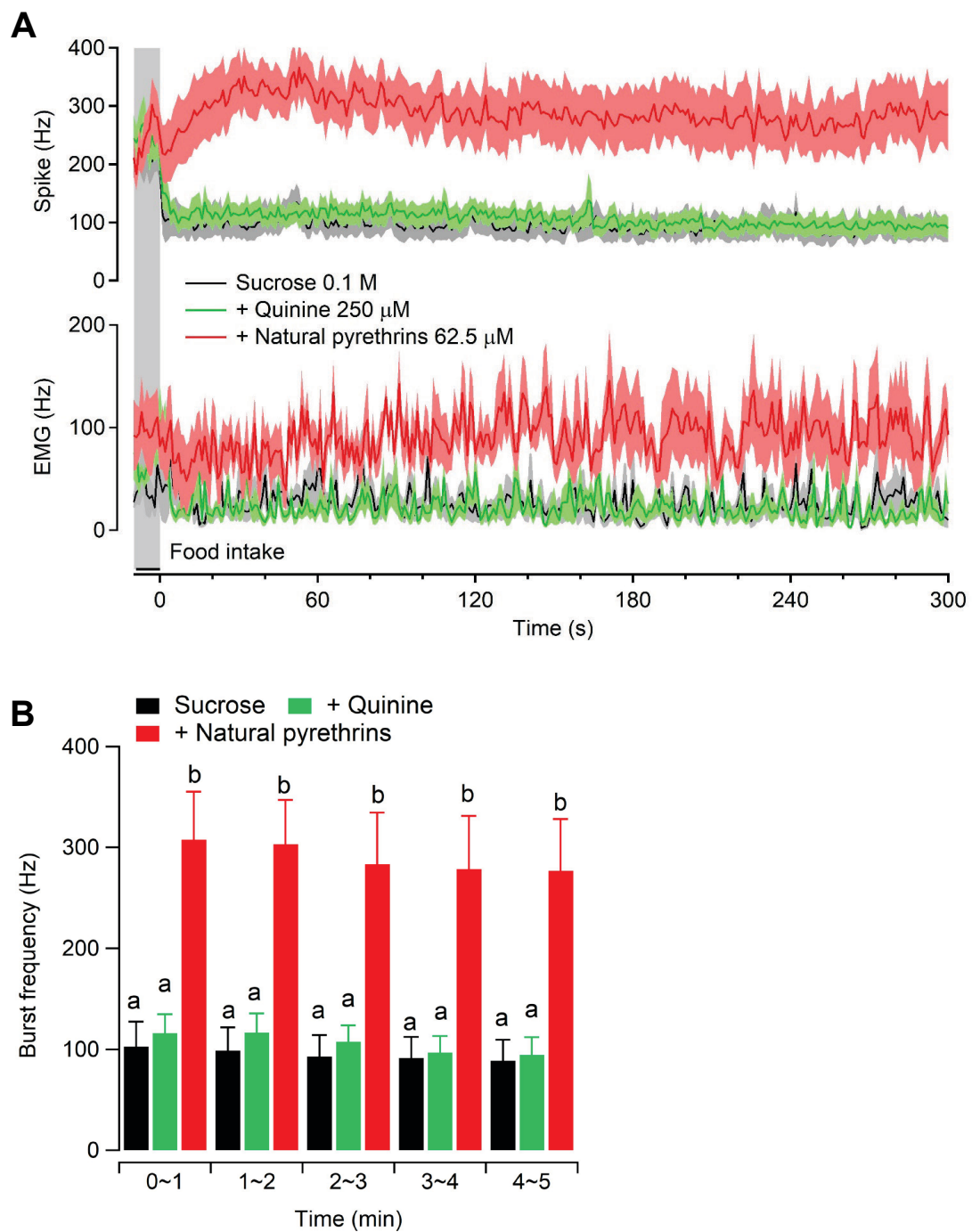


図 5-5 味覚物質および天然ピレトリンに対する唇弁神経由来感覚ニューロンの応答パターン。

A. 唇弁神経由来感覚ニューロンの平均発火頻度と口吻の筋活動の平均頻度の推移。B. 摂取後 5 分間の唇弁感覚ニューロンの平均発火頻度。各時間帯で、異なるアルファベット間には有意差があることを示す（ボンフェローニ補正を施した t 検定, $p < 0.001$ ）。エンベロープ (A) およびエラーバー (B) は標準誤差を示す。n = 7。

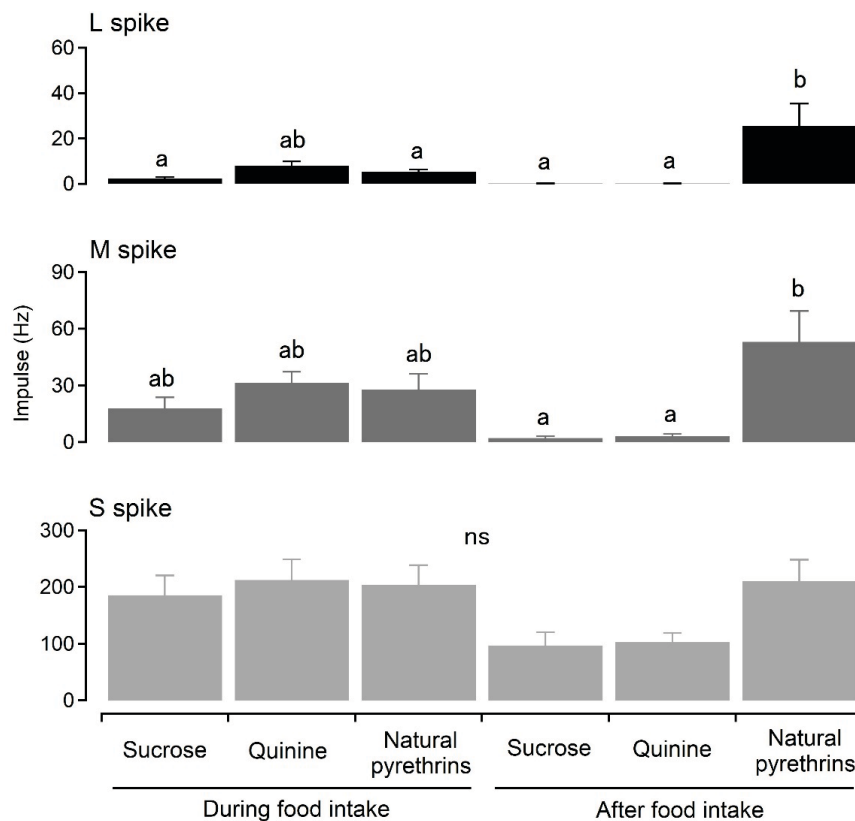


図 5-6 咽頭神経由来感覚ニューロンの興奮応答におけるインパルス構成.

それぞれの個体について、摂取中および摂取後 5 分間の複合インパルスをインパルスの振幅値にもとづいて S, M, L の 3 つに分類し、それぞれの条件における平均発火頻度を得た ($\pm$ 標準誤差, $n = 7$). 各インパルス幅において、棒グラフの上に示された異なるアルファベットは平均値の間に有意差があることを示す (ボンフェローニ補正を施した t 検定, $p < 0.05$).

5.3.2 咽頭味覚器官由来感覚ニューロンの天然ピレトリンに対する神経応答

天然ピレトリンに対する咽頭味覚感覚器の神経応答を調べるため、クロキンバエの咽頭神経 (上唇額神経) に含まれる感覚ニューロンの複合インパルスを吸引電極で記録しながら、毛状味覚感覚子を試験溶液に晒さないように唇弁の合わせ目から摂取させた。咽頭神経に含まれる感覚ニューロンは、待機状態で自発的に発火し続ける性質を示したが、発火頻度は 50Hz から 300Hz と幅があった (図 5-7)。発生したインパルスの振幅値の散布図を得たところ、自発神経活動は、振幅が明確に異なる 2 から 4 種類のインパルスのバンドから成り、ほとんどの場合、最も大きいインパルスの発火頻度が高かった。蒸留水を含んだガラスキャピラリーを口吻に当てると、最も大きいインパルスの発火頻度が直ちに減少すると同時に、しばしば比較的

小さいインパルスの発火頻度が継続的に増加した（図 5-7）。ショ糖溶液を摂取させた場合、溶液の摂取は、赤色に色づけた試験溶液が咽頭を通過する様子と、しばしば見られた飲み込み運動と連動した口吻の筋活動から確認することができた。試験化合物を含むショ糖溶液を唇弁に含ませた場合、神経活動のパターンが変化するタイミングは溶液を飲み込む行動の発生に依存し、数回の飲み込み動作の後に引き起こされた神経応答は、基本的に減衰することなく持続した。摂取後に継続する神経応答は、咽頭内に残存する餌溶液に咽頭感覚器が絶えず曝されることに由来すると予想された。そこで、一つ前の試験化合物が次の化合物に対する神経応答に影響する可能性を排除するため、蒸留水を摂取させて 1 分程度おいた後に、次の試験化合物を摂取させた。筋電図シグナルと飲み込み運動の観察から、摂取した個体についてのみ神経活動を解析した。

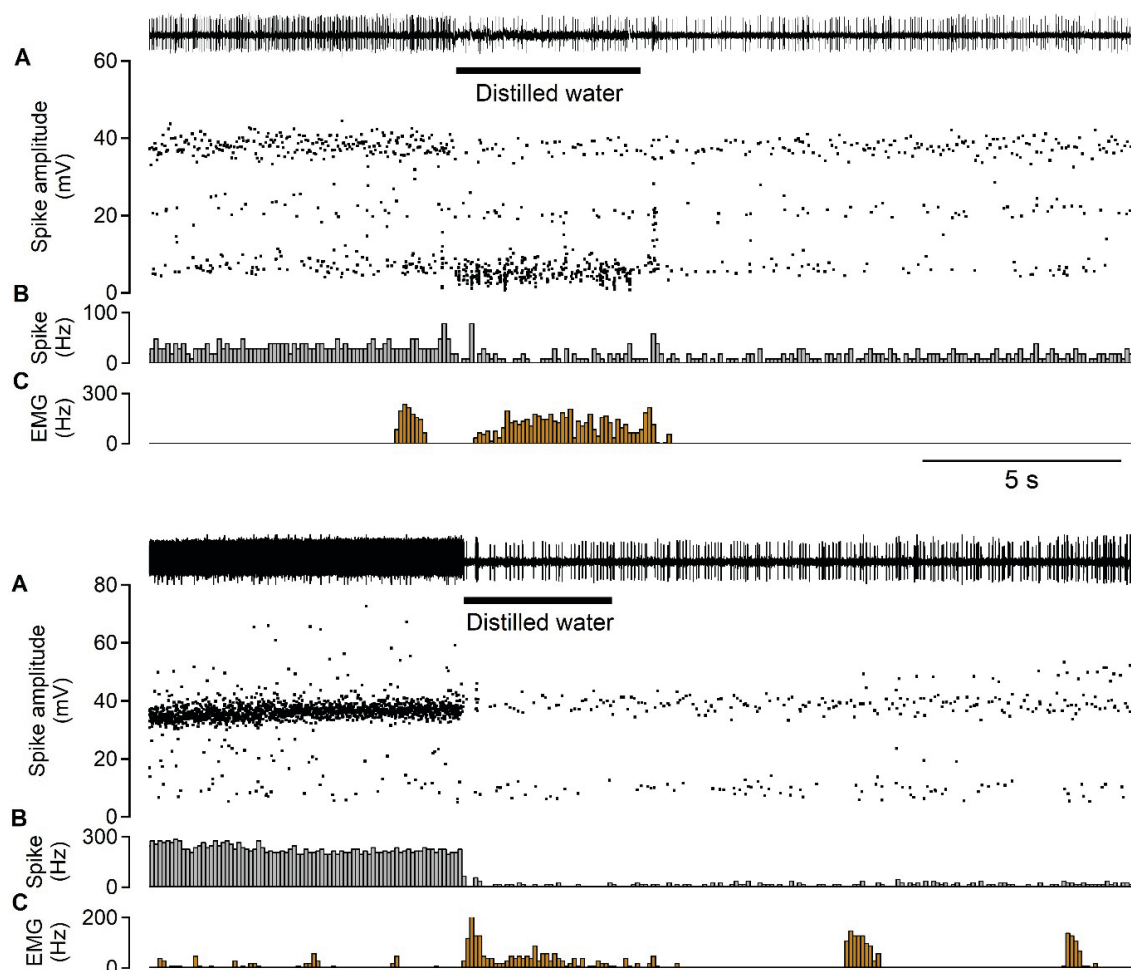


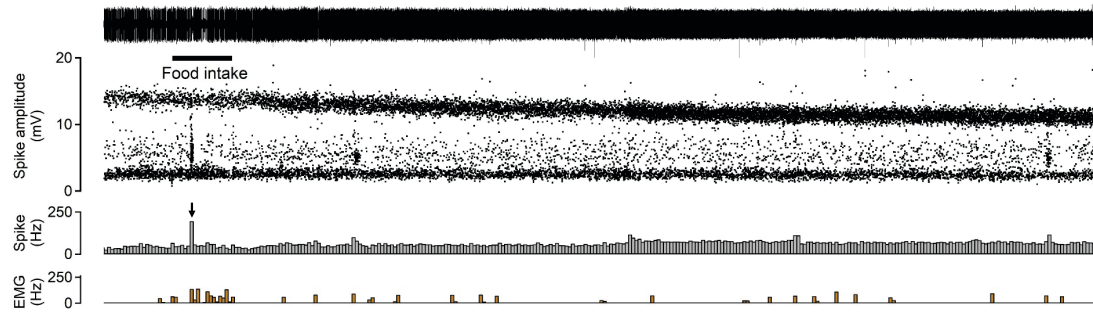
図 5-7 蒸留水を摂取させた時の異なる 2 個体の咽頭感覚ニューロンの活動と口吻の筋活動の推移。

A. インパルスの振幅値の散布図。上部に得られた電気シグナルを挿入した。B. インパルスの発火頻度。C. 筋電図で記録した口吻の筋肉の頻度。

クイニンまたは天然ピレトリンを含むショ糖溶液を摂取させた時の異なる 3 個体の咽頭神経の応答と同時に記録した口吻の筋活動を図 5-8 に示す。口吻の筋活動の頻度は、どのショ糖溶液を摂取させた時でも一時的または反復的に増加したことから、クロキンバエはいくらかの摂取運動を行ったことが確認された。摂取の最中に、飲み込み運動と連動した咽頭神経の発火頻度の瞬間的な増加がしばしば観察された（図 5-8AC, 矢印）。この一過的な興奮応答は、餌溶液が咽頭を通過することによって、咽頭味覚感覚器に存在する幾つかの機械受容器(Chen and Dahanukar 2017)が刺激されたことに由来すると考えられた。天然ピレトリンを摂取した時は、キャピラリー摂食試験や唇弁神経の細胞外記録の時と同様に、口吻の筋活動は直ちに活性化し、過興奮の状態は 5 分以上続いた（図 5-8Aiii, Biii, Ciii）。すなわち、天然ピレトリンの摂取に対する口吻の嫌悪応答は、咽頭神経の細胞外記録試験においても再現された。

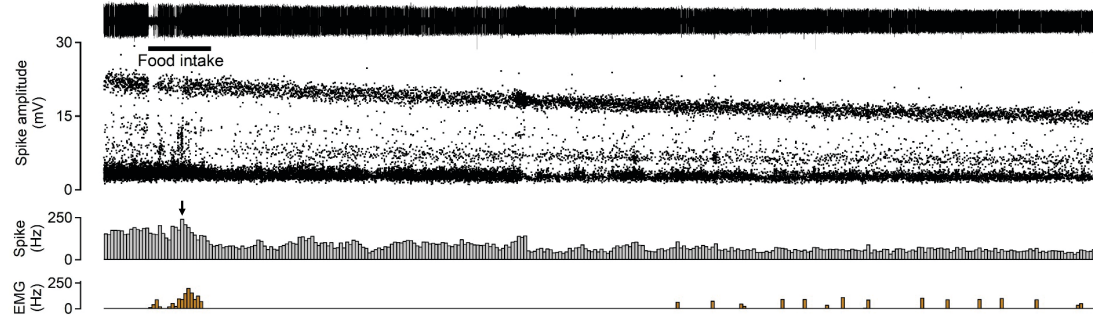
Ai

Sucrose 0.1 M



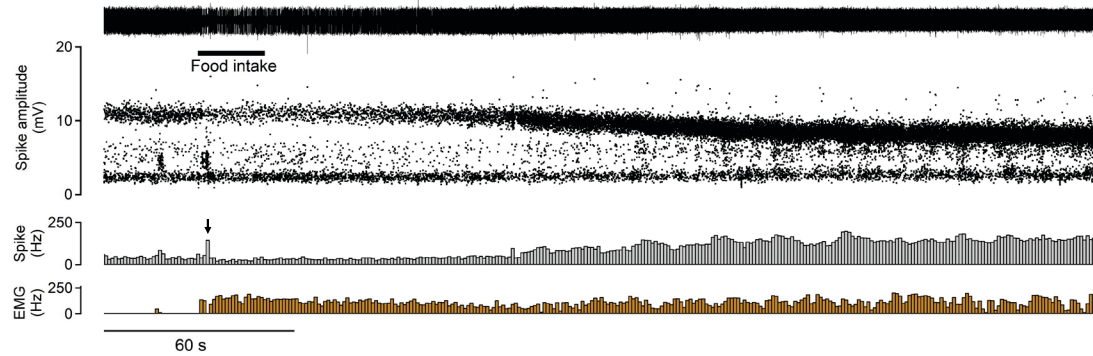
Aii

+ Quinine 250 μ M



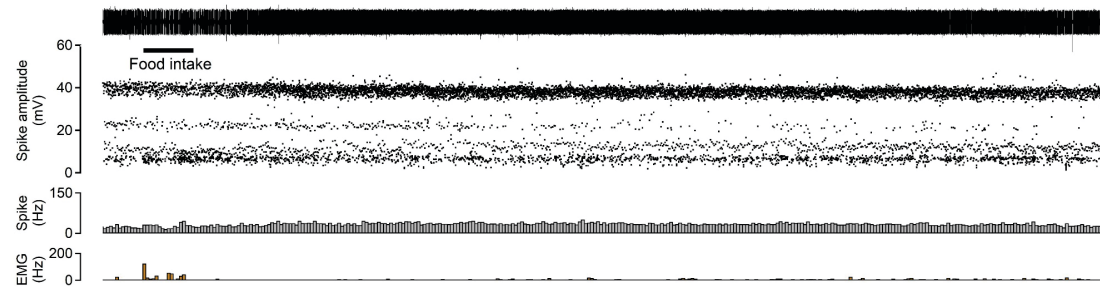
Aiii

+ Nat pyrethrins 63 μ M



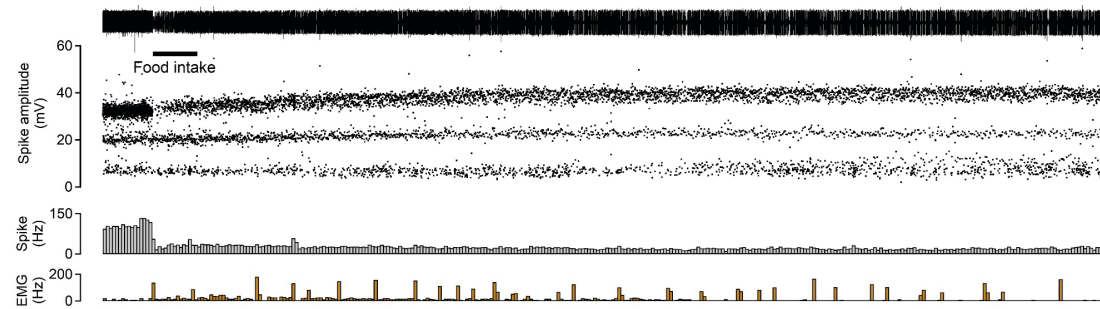
Bi

Sucrose 0.1 M



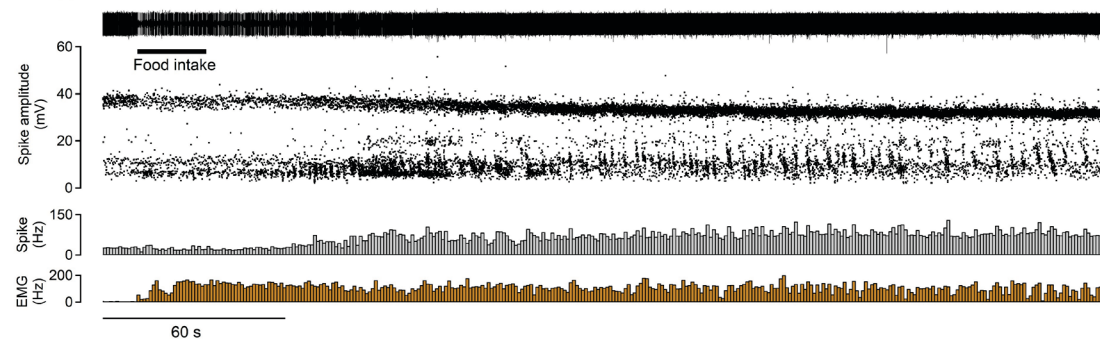
Bii

+ Quinine 250 μ M



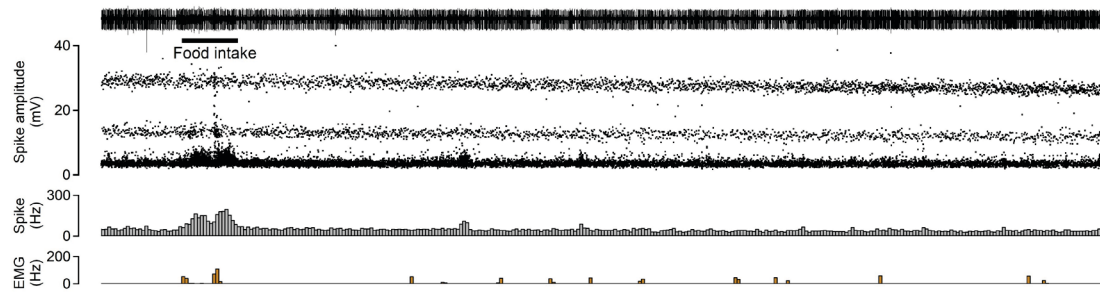
Biii

+ Nat pyrethrins 63 μ M



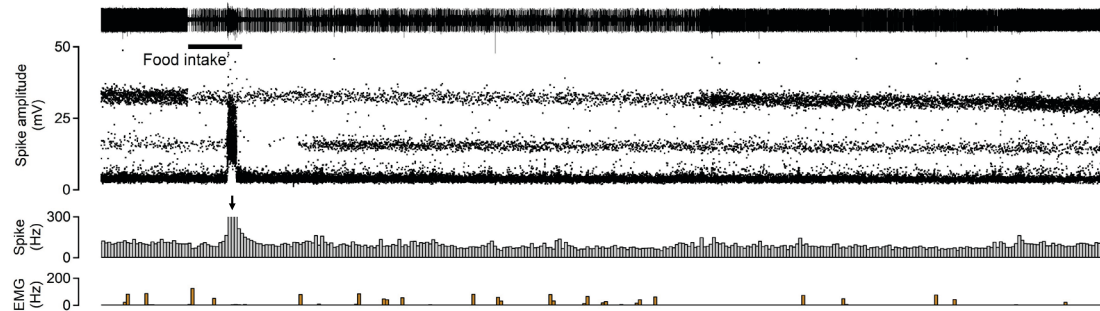
Ci

Sucrose 0.1 M



Cii

+ Quinine 250 μ M



Ciii

+ Nat pyrethrins 63 μ M

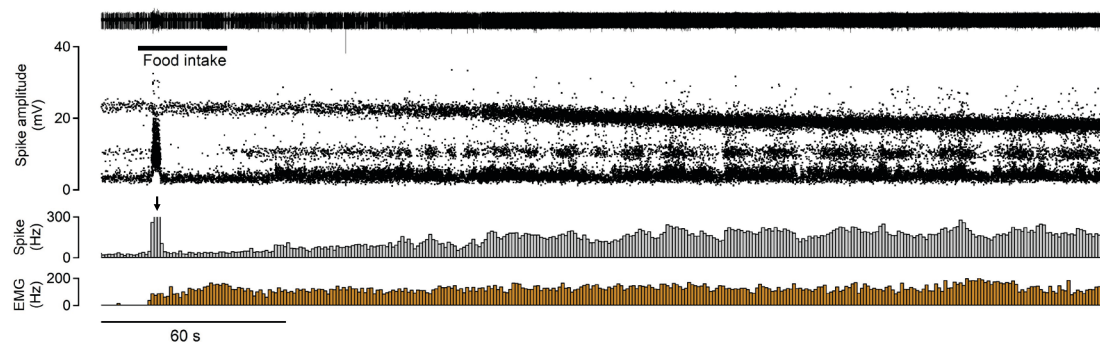


図 5-8 摂取したクイニンおよび天然ピレトリンに対する咽頭神経由来感覚ニューロンの応答。

異なる3個体(A, B, C)から得られた, ショ糖溶液(i), クイニン(ii), 天然ピレトリンを含むショ糖溶液(iii)を摂取させた時の咽頭味覚器官を構成する感覚ニューロンの神経活動と, 同時に記録した口吻の筋活動の推移. グラフは上段から電気シグナル, 抽出したインパルスの振幅値の散布図と, 1秒毎に得たインパルスの発火頻度, 筋電図で記録した口吻の反対側の筋肉の筋活動. Ai-iiiとCii, iiiに示した矢印は, 呑み込み運動と同期した, おそらく機械感覚性ニューロンに由来するインパルスの発火頻度の瞬間的増加を示す.

最も大きいインパルスを生成し, キャピラリー摂取した蒸留水に対して抑制応答を示した感覚ニューロンの発火頻度は, ショ糖溶液の摂取に対して明確な変化を示さなかった(図5-8Ai, Bi, Ci; 図5-9). 摂食を阻害する濃度のクイニンを摂取させると, このニューロンの発火頻度は摂取直後に一時的に減少した(図5-8Aii, Bii, Cii; 図5-9). 一方, 十分な摂取阻害活性を示す濃度の天然ピレトリンに対しては, 自発的な

神経活動のパターンを変化させなかった（図 5-8Aiii, Biii, Ciii; 図 5-9）。この結果は、最も大きなインパルスのバンドを生成する感覚ニューロンはおそらく味覚受容ニューロンであり、その自発発火は苦味物質によって抑制されることを示している。

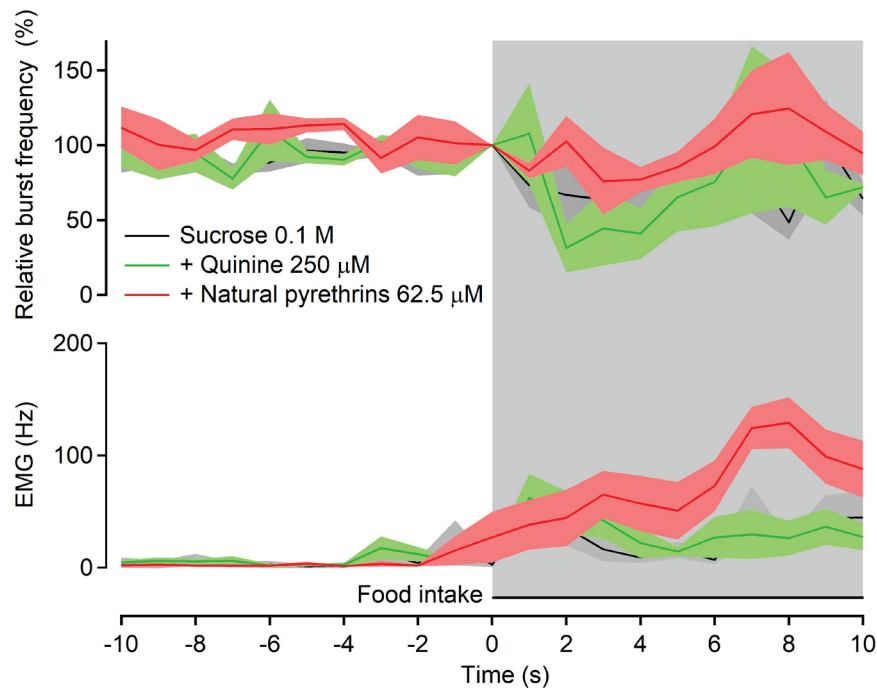


図 5-9 クイニンおよび天然ピレトリンの摂取に対する咽頭神経由来感覚ニューロンの神経応答

餌溶液に対して感受性を示し、最も大きいインパルスのバンドを生成する感覚ニューロンの発火頻度を摂取開始時の発火率を基準として相対化し、その平均値の推移を記載した。下段は、同時に記録した口吻の筋活動の推移。エンベロープは標準誤差。n = 6。

咽頭神経の感覚ニューロンは、天然ピレトリンの摂取に対して、ペグ状味覚感覚子の様に口吻の痙攣の開始と連動して発火頻度を増加させることはなかった。代わりに、数十秒のタイムラグの後に、それぞれのインパルスのバンドを生成する感覚ニューロンが、漸進的または断続的に活性化した。その結果、すべての大きさのインパルスを合計した複合インパルスの発火頻度は、摂取を終えた 30 秒から 1 分後にかけて増加し始めた（図 5-8Aiii, Biii, Ciii）。すべての個体から得た複合インパルスの平均発火頻度を求めたところ、1 分程度の潜時を経て、発火頻度は数分に渡って漸進的に増加することが示された（図 5-10A, 上段）。摂取後の平均発火頻度を比較することで、複合インパルスの平均発火頻度は、摂取 1 分後でショ糖溶液やクイ

ニン入りのショ糖溶液の発火頻度を上回ることが示された（図 5-10B）。口吻の筋活動は摂取後も高い活動レベルを維持したことから（図 5-10A, 下段），咽頭味覚器は口吻の嫌悪応答が始まった後に過興奮を始めたことが明確になった。咽頭神経は，複数の感覚ニューロンが持続的に過興奮する中で，時折，通常の味覚応答では見られない反復興奮パターンを示した（図 5-11）。以上の結果から，ペグ状味覚感覚子と咽頭味覚器官はどちらも，天然ピレトリンの摂取に対して興奮応答を示し，感覚ニューロンの応答と口吻の筋活動の経時的な対応関係から，ペグ状味覚感覚子の過興奮の開始が，摂取を中断させる口吻の嫌悪応答を引き起こすと結論付けられた。

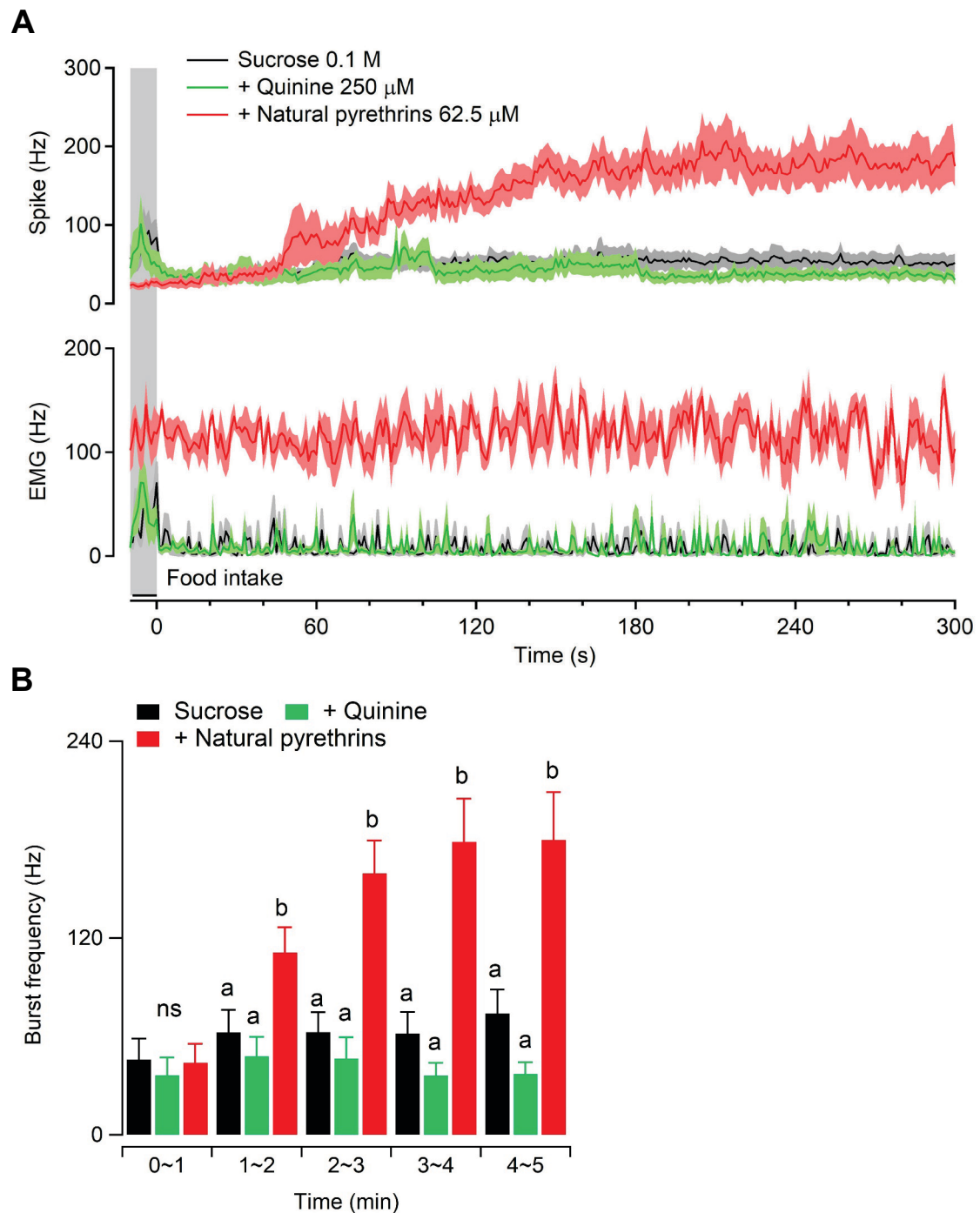


図 5-10 クイニンおよび天然ピレトリンを摂取した後の咽頭神経由来感覚ニューロンの神経活動。

A. 異なる 6 個体から取得した咽頭神経由来感覚ニューロンと同時に記録した口吻の筋活動の平均頻度の推移。B. 摂取後 5 分間の咽頭神経の複合インパルスの平均発火頻度の推移。各時間帯で、異なるアルファベット間には有意差があることを示す（ボンフェローニ補正を施した t 検定, $p < 0.001$, $n = 6$ ）。エンベロープ (A) およびエラーバー (B) は標準誤差を示す。



図 5-11 天然ピレトリンに対する咽頭神経の持続的な過興奮を特徴づける感覚ニューロンの反復興奮パターン。

反復興奮は、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の中枢神経系に対する薬理作用の主な特徴である、反復興奮パターンは過興奮が持続する中で度々観察された。

5.4 考察

第 5 章では、クロキンバエ成虫の唇弁および咽頭神経の複合インパルスの細胞外記録を行い、それぞれの神経に含まれる感覚ニューロンの神経活動が餌溶液のキャピラリー摂取によってどのように変化するのかを調べた。咽頭神経に含まれる求心性ニューロン群は、呑み込み運動と連動して反復的に興奮し、苦味物質であるクイニンの摂取に対して蒸留水やショ糖溶液とは明確に異なる応答を示した。この結果は、クロキンバエにおいても、キロショウジョウバエに存在する咽頭味覚器に相当する味覚器官が咽頭に存在し、その咽頭味覚器を構成する味覚受容ニューロンと機械感覚性ニューロンの両方の神経活動が記録されたことを表している。

サポニンなど、界面活性様作用を有する一部の摂食阻害物質は、細胞膜の損傷効果によって神経細胞を不規則にバーストさせることが知られている(Mitchell and Harrison 1985; L. M. Schoonhoven et al. 1992)。ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤は脂溶性が高く、界面活性様の性質を有しないことから、細胞膜の損傷による非特異的な作用機序は想定できない。第 3 章で行ったキャピラリー摂食試験により、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の摂食阻害活性は KD 活性と明確に相関することが明らかになった。この事実と矛

盾することなく、唇弁神経と咽頭神経の両方で感覚ニューロン群は過興奮を示し、咽頭神経の過興奮の中で反復興奮パターンが時折観察された（図 5-11）。神経の過興奮や反復興奮は、ピレトリンやタイプⅠ型のピレスロイド系殺虫剤の中樞神経系に対する薬理作用の特徴であり、それらは電位依存性ナトリウムチャネルの調節様式に基づいている (Narahashi 1992; Soderlund 1995; Bloomquist 1996)。これらの事実から、ピレトリンの摂取によって引き起こされた味覚感覚器の興奮応答は、それらを構成する感覚ニューロン上の電位依存性ナトリウムチャネルへの作用に起因したと結論付けられた。タイプⅠ型に属するピレスロイド系化合物に対する味覚受容ニューロンの応答を調べた先行研究では、化合物を処理した 5 分後以降に数個のスパイクの連なりからなる不規則なバーストを 0.05Hz 程の頻度で認めたに過ぎなかった (Virgona et al. 1982; Holan et al. 1984)。クロキンバエで見出された天然ピレトリンに対する味覚感覚器の過興奮は、味覚物質としてのコーディングと特定の行動応答を可能にする明確な感覚応答としてみなすことができる。

キロショウジョウバエでは、唇弁のペグ状味覚感覚子と咽頭味覚感覚器を構成する感覚子の多くは、感覚子あたり、数本の味覚受容ニューロンだけでなく、1 本の機械感覚性ニューロンを包含する (Chen and Dahanukar 2017; Zhou et al. 2019; Chen and Dahanukar 2020)。唇弁の内側表面への機械刺激によるバーストの誘導は、クロキンバエのペグ状味覚感覚子における機械感覚性ニューロンの存在を示している。神経細胞上の電位依存性ナトリウムチャネルは、インパルスの生成に関わる主要因子であり、昆虫において、このチャネルをコードする遺伝子は基本的に 1 種類である (Dong et al. 2014)。従って、感覚ニューロンの種類による電位依存性ナトリウムチャネルの調節様式や感受性の違いは本質的には存在しない。加えて、高い脂溶性を有するピレトリンやピレスロイド系殺虫剤は、水溶性の味覚物質とは異なり、生体膜を透過して組織の深部へと浸透する細胞膜透過性を有する (Seddon et al. 2009)。そのため、味覚感覚子の先端孔から侵入したピレトリンは、感覚子の体腔にある感覚ニューロンの樹状突起や感覚子の基部を占める支持細胞の内部へと浸透、拡散し、インパルスの生成部位である感覚ニューロンの細胞体や軸索基部にまで到達することが可能である。このように、味覚器官を構成する感覚ニューロン上の標的分子の均一性と化合物の細胞膜透過性の性質により、ピレトリンは潜在的に、機械感覚性ニューロンをも含めた味覚感覚子を構成するすべてのニューロンを興奮させることが可能である。

唇弁のペグ状味覚感覚子は、天然ピレトリンの摂取の中断に対して直ちに過興奮し、口吻の反復的な痙攣と対応する様にその状態を維持した。一方、咽頭味覚器官は、天然ピレトリンの摂取を中断してから1分程度の潜時を経て、漸進的に興奮が進行した。二つの味覚器官に由来する感覚ニューロン群の興奮応答と口吻の筋活動の経時的な対応関係から、ペグ状味覚感覚子の過興奮が、摂取を中断させる口吻の嫌悪応答を引き起こすことが明確になった。すなわち、天然ピレトリンがハエ類に対して摂食阻害作用を発現するための主要な標的感覚器は、摂食の初期段階で餌の内容物の質を評価する、唇弁のペグ状味覚感覚子であると結論付けられた。

クロキンバエの唇弁の片側には、疑気管の間に約100個のペグ状感覚子が存在する(Wilczek 1967)。組織学的な研究から、ペグ状味覚感覚子は、基本的に4本の化学感覚性ニューロンと1本の機械感覚性ニューロンから構成されることが明らかになっている(Peters and Richter 1963; Zhou et al. 2019)。近年、光遺伝学的手法を用いたキロショウジョウバエの研究により、唇弁にあるペグ状味覚感覚子の機械感覚性ニューロンが同時に活性化することで口吻の引き戻し運動が引き起こされ、この機械刺激応答は苦味物質によって促進することが明らかになった(Zhou et al. 2019)。口吻の引き戻し運動は唇弁を餌から引き離すため、摂取を中断させる。クロキンバエにおいて、この機械感覚性の摂食拒否機構を想定した場合、天然ピレトリンに対するペグ状味覚感覚子の応答的な過興奮には、キャピラリー摂食に伴う機械刺激では刺激されない多数の機械感覚性ニューロンや、摂食阻害濃度の苦味物質によって活性化される苦味受容ニューロンのバーストが含まれると考えられた。

ペグ状味覚感覚子とは異なり、咽頭味覚器官の過興奮は、天然ピレトリンを摂取してから1分程度の潜時を持って漸進的に進行した。クイニンが咽頭味覚器官を構成する一部の味覚ニューロンを直ちに抑制したことを踏まえると、過興奮が始まるまでの潜時は、天然ピレトリンが咽頭味覚器官の感覚子に内包された感覚ニューロンのインパルス生成部位に浸透するまでの時間を含むと考えられる。咽頭味覚器官の過興奮のパターンは、無刺激下で自発的に発火した数種の感覚ニューロンの漸進的な活性化によって形作られたが、それぞれの感覚ニューロンの味覚応答性を特定するには至らなかった。嫌悪的な口吻伸展応答や口吻全体の震え、嘔吐は、天然ピレトリンの摂取直後に引き起こされることはほとんどなく、口吻や唇弁が継続的に

震える中で断続的に引き起こされた（data not shown）。従って、一連の嫌悪応答は、摂取の中断をもたらしたペグ状味覚感覚子の過興奮ではなく、咽頭味覚器官を構成する複数の味覚受容ニューロンや機械感覚性ニューロンの不規則なバーストによって引き起こされたと考えられた。

最後に、これまでの考察を踏まえて、ピレトリンの摂食阻害作用発現機序の仮説モデルを提案する（図 5-12）；（1）摂取したピレリンは、味覚感覚子内の感覚ニューロンのインパルス生成部位にまで浸透し、そこに局在する電位依存性ナトリウムチャネルを開口させることで味覚・機械感覚性ニューロンを興奮させる。（2）この機序によって、唇弁の表面に配列した多数のペグ状味覚感覚子は直ちに過興奮し、口吻の引き戻しや唇弁の震えを引き起こすことで摂取を中断させる。（3）咽頭の内側に存在する咽頭味覚器は、摂取中断から一定の潜時を持って漸進的に過興奮が進行し、口吻全体の震えや嫌悪的口吻伸展応答を引き起こし、嘔吐を促す。（4）その結果、摂取の再開を遅らせる。

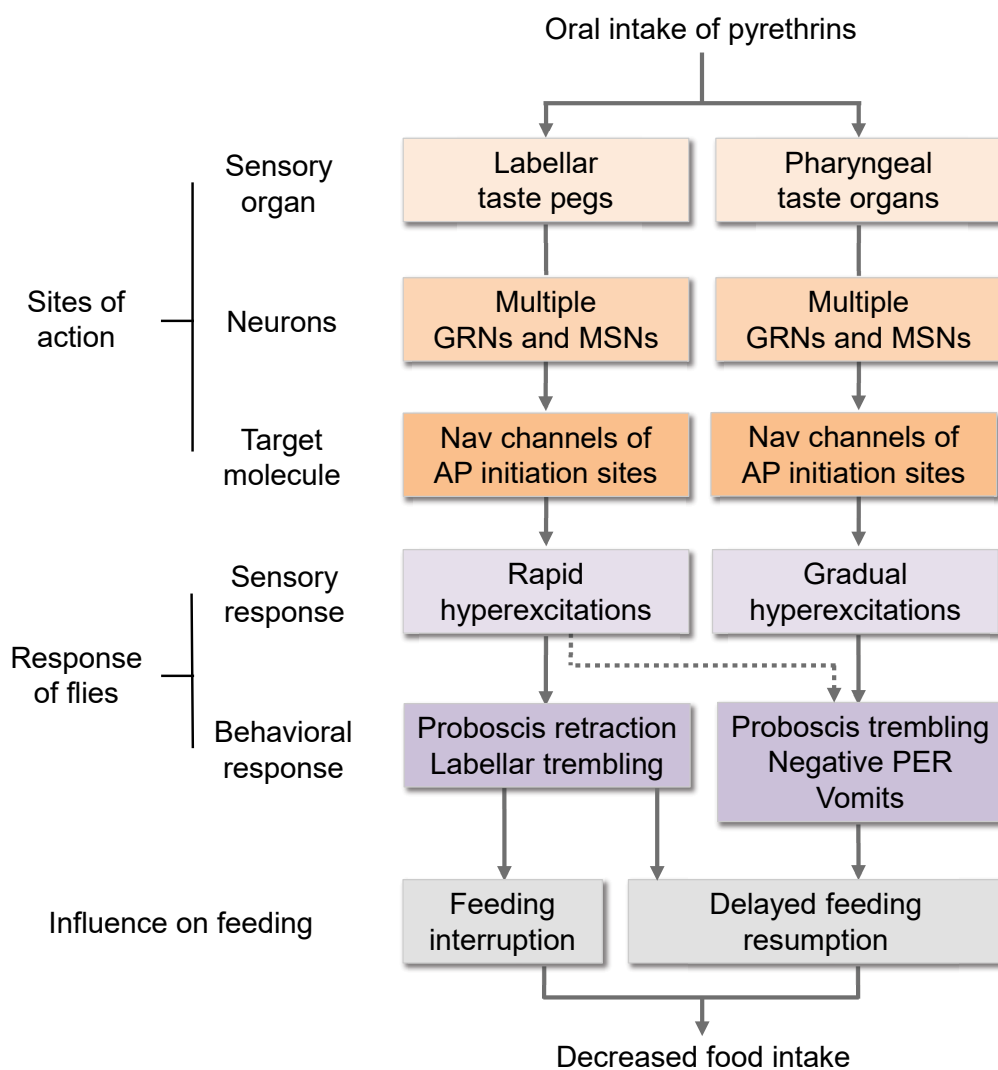


図 5-12 ピレトリンの摂食阻害作用発現機序の仮説モデル。

GRNs; gustatory receptor neurons, MSNs; mechanosensory neurons, Nav channels; voltage-gated sodium channels; AP; action potential, PER; proboscis extension response. 因果関係が不明瞭な箇所は点線で示した。

第 6 章 総合考察

私は、シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンに着目し、その摂食阻害作用の機序を行動学および電気生理学的な手法を用いて調べた。種々の摂食試験法が確立されているハエ類の中で、大型のクロキンバエを実験モデルとして用いることで、摂取したピレトリンはハエの口器の味覚感覚器に作用することで摂食行動を直ちに阻害することを明らかにした。得られた行動学および電気生理学的知見を元に、ピレトリンの摂食阻害作用の発現機序の仮説モデルを提案した（第 5 章，図 5-12）。摂食阻害作用の仮説モデルは、味覚感覚器を構成する感覚ニューロンのインパルス生成部位に存在する電位依存性ナトリウムチャンネルを標的とし、それらのチャンネルを開口させることで多数の感覚ニューロンを同時多発的に過興奮させることに基づいている。動物において、電位依存性ナトリウムチャンネルは神経細胞がインパルスを生成する上で中心的な役割を担っており、神経毒の代表的な標的分子の一つとしてみなされてきた(Bloomquist 1996; Narahashi 2000; Zlotkin 2001; Wang and Wang 2003)。ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤の様に、このイオンチャンネルの機能を調節することで神経細胞を興奮させる化合物は、昆虫に対して強力な摂食阻害作用を潜在的に示すことを明らかにした。ピレトリンの摂食阻害作用は亜致死濃度で発現したことから、経口的に摂取する状況において、ピレトリンは摂食阻害物質として振る舞うことを初めて示した。

これまでに、主に鱗翅目や甲虫目の昆虫について得られた摂食阻害物質に対する味覚受容ニューロンの応答パターンから、5 種類の味覚コーディング様式が提案されている(Schoonhoven 1982; L. M. Schoonhoven et al. 1992)。

- I. 苦味物質など、多くの摂食阻害物質に特異的にチューニングされたニューロンを刺激する（現在では苦味受容ニューロンと呼ばれることが多い）
- II. 多くの二次代謝物質を含む幅広い受容スペクトラムを持った受容体（受容部位）を刺激する
- III. 甘味物質などの摂食刺激物質によって活性化される（甘味細胞の）神経応答を抑制する
- IV. 幾つかのニューロンを活性化させると同時に他のニューロンの活動を抑制することで、中枢におけるコ

ーディング（アクロスファイバーパターン）を変化させる

V. 不規則で、しばしば高頻度な発火パターンを引き起こす

これらの法則には互いに重複する部分があり、摂食阻害物質の味覚応答は基本的に2つ以上の法則に当てはまる(L. M. Schoonhoven et al. 1992). 2000年以降、モデル生物であるキロショウジョウバエにおいて、味覚受容の分子細胞基盤の理解が飛躍的に進んだ。キロショウジョウバエの唇弁や前脚跗節にある毛状味覚感覚子と咽頭味覚器官では、摂食を阻害する苦味物質や酸味物質、塩味物質は嫌悪的な化合物を検出する特定の味覚受容ニューロンを活性化させると同時に、甘味物質による甘味受容ニューロンの活性化を抑制することが明確になっている(French et al. 2015b; Chen et al. 2019). この嫌悪的な味覚物質の受容機序は、主に植食性昆虫のエビデンスに基づいて提案された上記の味覚コーディングの様式 I, III, IV に当てはまる。コーディング様式 V は、ナス科植物が産生するソラニンを含むステロイドグリコアルカロイドなど、細胞膜を損傷させる界面活性様作用を有する摂食阻害物質に対する味覚応答パターンに由来しており、これらの化合物は少しの潜時の後に複数の、または感覚子内のすべての味覚受容ニューロンを散発的に興奮させる(Bentley et al. 1984; Mitchell and Harrison 1985; L. M. Schoonhoven et al. 1992). ピレトリンもまた味覚感覚器を構成するすべての感覚ニューロンを刺激することが本質的に可能であり、クロキンバエで得られた味覚受容ニューロンのたびたび不規則な過興奮パターンはこのコーディング様式の特徴と合致する。

前脚による口吻の執拗なグルーミングは、クロキンバエの摂食実験で見出されたピレトリンの摂食阻害作用の特徴である。一般的に、昆虫のグルーミング行動は、触覚などの感覚器に異物が付着した時に生じる。高粘性のワックス(Böröczky et al. 2013)や炭酸カルシウムの結晶(風間 et al. 2022)といった、嗅覚では受容し難い固体状の物質がマトリックス状に触角に付着した場合でもグルーミングは生じることから、空間的に配置された多数の機械感覚子を同時に活性化させるような機械刺激がグルーミングのトリガーになっていると考えられる。従って、口吻のグルーミングを誘導したペグ状味覚感覚子の過興奮には、相当な程度の機械感覚性ニューロンのバーストが含まれていたと考えられる。ペグ状感覚子を構成する感覚ニューロンを非選択的に活性化させるピレトリンは、苦味物質によって調節される機械感覚性の摂食拒否機構(Zhou et al. 2019)を駆

動することで、摂取を直ちに中断させると考えられた。

この研究では、ピレトリンの薬理作用特性と、口吻の嫌悪応答と対応づけられた味覚感覚器の応答パターンに基づいて、ピレトリンが味覚感覚子を構成する味覚受容ニューロンや機械感覚性ニューロンを活性化させることで摂食を中断させる機序モデルを提示した。この機序モデルは、ピレトリンやピレスロイド系殺虫剤、そして、これらの化合物と同様の薬理作用を示す化合物が昆虫の接触化学感覚器を刺激する基本的な機序である。今後、唇弁や咽頭味覚器内の個々の感覚子を構成するすべての感覚ニューロンの活動をカルシウムイメージングなどの手法を用いて同時記録することで、機序モデルの妥当性が検証されるとともに、味覚感覚器における機械感覚をも含めたピレトリンのマルチモーダルなコーディング様式の詳細が明らかになることが期待される。

シロバナムシヨケギクは、長い進化の過程の中でピレトリンを生合成する形質を獲得した。これまでの研究から、シロバナムシヨケギクの植物体におけるピレトリンの分布が明らかになっている。ピレトリンは植物体の花や葉に含まれるが、乾燥重量当たりのピレトリンの量は花の方が多い(Casida 1973)。花の中では、筒状花の子房に大半のピレトリンが存在する(Head 1966; Brewer 1973; Casida 1973)。ピレトリンは葉の表皮細胞に多く含まれ、内部の葉肉細胞には少ない(Zito et al. 1983)。シロバナムシヨケギクを加害するミカンキイロアザミウマは、植物体の表皮細胞の内容物を吸汁する(Yasumi et al. 1994)。アブラムシは葉肉細胞層の維管束にまで届く長い口針を持つが、プロービングの際にしばしば表皮細胞を貫通させることが知られている(宗林 1960)。従って、シロバナムシヨケギクの摂食を試みる吸汁性昆虫は、口針を表皮細胞に挿入した際に、口針の先端に存在する味覚感覚子をピレトリンに晒すことになる。鱗翅目や甲虫目昆虫の幼虫もまた、葉や子房の表層組織をかじり取った際に口器にある味覚感覚器がピレトリンに晒される。摂食の初期過程でピレトリンに暴露されることで、植物体を加害する昆虫が致死量のピレトリンを摂取するよりも前に、味覚感覚器が刺激されるはずである。今後、シロバナムシヨケギクの植物体における吸汁性昆虫の摂食行動を EPG (electrical penetration graph) 法などを用いて明らかにした上で、実際の含有濃度を踏まえてピレトリンの摂食阻害活性を人工膜摂食法で明らかにすることで、シロバナムシヨケギクを加害する吸汁性昆虫に対す

る摂食阻害物質としてのピレトリンの有効性が明確になるだろう。

ピレトリンを生合成する植物は、これまでにシロバナムシヨケギクしか知られていない。一方、電位依存性ナトリウムチャンネルに特異的に結合し、ピレトリンと同様に神経細胞に対して興奮性の作用を示す植物産生神経毒は幾つか存在する。よく知られた例は、コショウ科のコショウ *Piper nigrum* L.が産生するN-アルキルアミド系化合物のピペロバチンやペリトリン(Miyakado 1985; Ottea et al. 1990; Suzuki and Yamato 2018), ユリ科ベラトラム属および Schoenocaulon 属の植物が産生するステロイド誘導体アルカロイドのベラトリジンやセバジン(Sutro 1986; Ulbricht 1998; Norris and Bloomquist 2022)である。N-アルキルアミド系化合物はコショウの種皮に、ベラトリジンやセバジンは植物体の根に蓄積することが明らかになっている。ピレトリンと共通する薬理作用から予想される通り、ピペロバチンやペリトリン、ベラトリジンは摂食阻害作用を示し(Sandoval-Mojica and Capinera 2011), クロキンバエに対していずれもピレトリンと同様の嫌悪応答を引き起こす (data not shown)。従って、電位依存性ナトリウムチャンネルに結合し神経系を興奮させる神経毒は、普遍的に、昆虫に対して摂食阻害作用を示すといえる。これらの二次代謝物質は、植物体が生存し、繁殖する上で重要な部位である種 (N-アルキルアミド系化合物) や根 (ベラトリジン, セバジン) に蓄積されることが知られている。以上の点から、これらの神経毒もまた、ピレトリンと同様に、植食性昆虫に対する摂食阻害物質として機能していると考えられる。同じ防御機能を有する一方で、それぞれの植物が作るこれらの神経毒の化学構造の骨格は互いに異なることから、それぞれの生合成経路は独立に獲得されたことに間違いはない。系統的に離れたこれらの植物種における二次代謝の進化の背景には、単一の薬理機序によって、致死作用と摂食阻害作用の両方を発揮する神経毒を生合成することによる適応度の向上があったと考えられる。

私は、シロバナムシヨケギクが産生する神経毒ピレトリンの摂食阻害物質としての作用機序を明らかにした。昆虫の神経系が機能する上で必要不可欠な電位依存性ナトリウムチャンネルは、植物が昆虫に対する防御形質を獲得するにあたり、これまで認識されていた以上に適応度に寄与する標的分子であることを示した。今後、ピレトリンをモデルとした研究が展開し、ピレトリンの味覚コーディング様式の細胞基盤や、摂食様式

が異なる様々な植食性昆虫に対する摂食阻害作用の発現機序が明らかになることで、ピレトリンを含む一部の神経毒が摂食阻害物質として見直されることが期待される。

謝辞

本論文は、神戸大学大学院理学研究科生物学専攻生物制御科学講座に在籍し、博士課程後期課程で行った研究成果をまとめたものである。生物制御科学講座は住友化学株式会社の連携講座であり、健康・農業関連事業研究所の河村伸一先生と大和誠司先生によって平成 27 年に組織されました。健康・農業関連事業研究所所長の上川徹博士（住友化学株式会社理事兼健康・農業関連事業研究所所長）には、二期生として博士研究を行うにあたり、ご理解とご支援を頂きました。心より感謝の意を表します。職場の上司である河村先生と大和先生には、大学院の入試から博士論文の提出に至るすべての過程で、数多くのご指導と激励の言葉を賜りました。特に、河村先生には、投稿論文公開後の社内対応で多くのご尽力をいただきました。指導教官でもある大和先生には、多忙なマネジメント業務の傍ら、研究の進捗の確認から投稿論文や博士論文の添削まで、多大な時間を費やしてくださいました。両先生のご支援がなければ、通常の研究業務と並行して博士論文を仕上げることは不可能でした。ここに、深謝の意を表します。副査を務めていただいた青沼仁志先生（神戸大学大学院理学研究科生物学専攻・教授）と佐倉緑先生（神戸大学大学院理学研究科生物学専攻・准教授）には、本論文の作成にあたり、専門家として、適切な指摘を数多く賜りました。心より感謝申し上げます。深城英弘先生（神戸大学大学院理学研究科生物学専攻・教授）には、連携講座の担当として、様々な面でご支援頂くとともに、二度の研究進捗発表会では貴重なご助言を賜りました。ここに感謝の意を表します。また、岩橋福松博士（住友化学株式会社健康・農業関連事業研究所）には、論文投稿に先立つ社内手続きの際に適切なサポートを頂きました。

本研究を始めるにあたり、尾崎まみこ先生（神戸大学大学院理学研究科生物学専攻・名誉教授）と尾崎研究室のメンバーからは、多くのご支援とご鞭撻を頂きました。ハエの味覚感覚の専門家である尾崎先生には、研究テーマについて相談に乗って頂きました。さらに、70 年以上にわたって累代飼育されている由緒あるクロキンバエの系統を贈与して頂きました。チップレコーディング法を習得するにあたり、先田智也氏には細部に渡って丁寧に指導して頂きました。前田徹博士（現 Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University）からは PER アッセイをご教授頂きました。健康・農業関連事業研究所でクロキン

バエを飼育するにあたり、上尾達也博士（現奈良女子大学共生科学研究センター）には飼育方法を詳細にご教授頂きました。また、森達哉博士（住友化学株式会社健康・農業関連事業研究所フェロー）には、ピレトリンを構成する6種の活性成分を有機合成して頂きました。ここに挙げた方々のご支援とご協力がなければ、着想した研究テーマを実行することは不可能でした。心より感謝の意を表します。

最後に、家事全般を担ってくれている妻の亜希と、心の安らぎを与えてくれる娘の澪と榎に心より感謝します。

本研究に関する原著論文

第 2 章

Kojima T, Yamato S, Kawamura S (2022) Natural and synthetic pyrethrins act as feeding deterrents against the black blowfly, *Phormia regina* (Meigen). *Insects* 13:678

第 3-6 章

Kojima, T, Yamato S, Kawamura S Pyrethrins function as feeding deterrents by neuronal sodium channels-mediated hyper-excitation of the insect oral taste organs. *In preparation*.

引用文献

- Achee NL, Sardelis MR, Dusfour I, Chauhan KR, Grieco JP (2009) Characterization of spatial repellent, contact irritant, and toxicant chemical actions of standard vector control compounds. *J Am Mosq Control Assoc* 25:156-167.
- Agnihotri A, Roy A, Joshi R (2016) Gustatory receptors in Lepidoptera: chemosensation and beyond. *Insect Mol Biol* 25 10.1111/imb.12246
- Ainge G, Lorimer S, Gerard P, Ruf L (2002) Insecticidal Activity of Huperzine A from the New Zealand Clubmoss, *Lycopodium varium*. *J Agric Food Chem* 50:491-494. 10.1021/jf0106087
- Anadón A, Arés I, Martínez MA, Martínez-Larrañaga MR (2013) Pyrethrins and synthetic pyrethroids: use in veterinary medicine. In: Ramawat KG, Mérillon J-M (eds) *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin/Heidelberg, pp 4061-4086. 10.1007/978-3-642-22144-6_131
- Baumler RE, Potter DA (2007) Knockdown, residual, and antifeedant activity of pyrethroids and home landscape bioinsecticides against Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) on linden foliage. *J Econ Entomol* 100:451-458. 10.1603/0022-0493(2007)100[451:kraaao]2.0.co;2
- Bennett RN, Wallsgrove RM (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127:617-633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bentley MD, Leonard DE, Bushway RJ (1984) Solanum Alkaloids as Larval Feeding Deterrents for Spruce Budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera:

- Tortricidae). *Ann Entomol Soc Am* 77:401-403. 10.1093/aesa/77.4.401
- Bloomquist JR (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* 41:163-190. 10.1146/annurev.en.41.010196.001115
- Böröczky K, Wada-Katsumata A, Batchelor D, Zhukovskaya M, Schal C (2013) Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:3615-3620. 10.1073/pnas.1212466110
- Brewer J (1973) Microhistological examination of the secretory tissue in pyrethrum florets. *12 (11)* 17-22.
- Casida JE (1973) *Pyrethrum: the natural insecticide*. Academic Press, Massachusetts
- Charlu S, Wisotsky Z, Medina A, Dahanukar A (2013) Acid sensing by sweet and bitter taste neurons in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications* 4:2042. 10.1038/ncomms3042
- Chen M, Du Y, Zhu G et al. (2018) Action of six pyrethrins purified from the botanical insecticide pyrethrum on cockroach sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pestic Biochem Physiol* 151:82-89. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.05.002>
- Chen Y-CD, Dahanukar A (2017) Molecular and cellular organization of taste neurons in adult *Drosophila* pharynx. *Cell Rep* 21:2978-2991. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.041>
- Chen Y-CD, Dahanukar A (2020) Recent advances in the genetic basis of taste detection in *Drosophila*. *Cell Mol Life Sci* 77:1087-1101. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03320-0>
- Chen Y-CD, Park SJ, Joseph RM, Ja WW, Dahanukar AA (2019) Combinatorial pharyngeal taste coding for feeding avoidance in adult *Drosophila*. *Cell Rep*

29:961-973.e964. 10.1016/j.celrep.2019.09.036

Cvetković V, Lj T, Mitrović T et al. (2015) Toxicity of dimethyl sulfoxide against *Drosophila melanogaster*. *Biologica Nyssana* 6:37-41.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M (2007) The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81-106.
10.1146/annurev.ento.52.110405.091440

Dethier VG (1959) The nerves and muscles of the proboscis of the blowfly *Phormia regina* Meigen in relation to feeding responses. *Smithsonian Inst. Misc. Collections* 137:157-174.

Dethier VG (1972) Sensitivity of the contact chemoreceptors of the blowfly to vapors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2189-2192.

Dethier VG (1976) The hungry fly: a physiological study of the behavior associated with feeding. Harvard University Press, Massachusetts

Diegelmann S, Jansen A, Jois S, Kastenholz K, Velo Escarcena L, Strudthoff N, Scholz H (2017) The CAPillary FEeder assay measures food intake in *Drosophila melanogaster*. *JoVE* 121:e55024. doi:10.3791/55024

Divekar PA, Narayana S, Divekar BA et al. (2022) Plant Secondary Metabolites as Defense Tools against Herbivores for Sustainable Crop Protection. *Int J Mol Sci* 23 10.3390/ijms23052690

Dobrin GC, Hammond RB (1985) The antifeeding activity of selected pyrethroids towards the mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *J Kans Entomol Soc* 58:422-427.

Dong K, Du Y, Rinkevich F et al. (2014) Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 50:1-17.

10.1016/j.ibmb.2014.03.012

Essig K, Zhao Z (2001) Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for pyrethrum extract. *J Chromatogr Sci* 39:473-480. 10.1093/chromsci/39.11.473

Evans DR (1961) The effect of odours on ingestion by the blowfly. *J Insect Physiol* 7:299-304. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(61\)90080-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(61)90080-4)

Farnham AW (1973) Genetics of resistance of pyrethroid-selected houseflies, *Musca domestica* L. *Pesticide Science* 4:513-520. <https://doi.org/10.1002/ps.2780040410>

French A, Ali Agha M, Mitra A, Yanagawa A, Sellier M-J, Marion-Poll F (2015a) *Drosophila* bitter taste(s). *Front Integr Neurosci* 9:58. 10.3389/fnint.2015.00058

French AS, Sellier M-J, Ali Agha M et al. (2015b) Dual mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 35:3990-4004. 10.1523/jneurosci.1312-14.2015

Gammon DW (1978) Neural effects of allethrin on the free walking cockroach *Periplaneta Americana*: an investigation using defined doses at 15 and 32°C. *Pesticide Science* 9:79-91. <https://doi.org/10.1002/ps.2780090115>

Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (2005) *Comprehensive Molecular Insect Science: Pharmacology*. Elsevier,

Gist GL, Pless CD (1985) Feeding deterrent effects of synthetic pyrethroids on the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *The Florida Entomologist* 68:456-461. 10.2307/3495133

Glendinning JJ, Hills TT (1997) Electrophysiological evidence for two transduction

- pathways within a bitter-sensitive taste receptor. *J Neurophysiol* 78:734-745.
10.1152/jn.1997.78.2.734
- Glendinning JI, Tarre M, Asaoka K (1999) Contribution of different bitter-sensitive taste cells to feeding inhibition in a caterpillar (*Manduca sexta*). *Behav Neurosci* 113:840-854.
- Godin PJ, Stevenson JH, Sawicki RM (1965) The insecticidal activity of jasmolin II and its isolation from pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). *J Econ Entomol* 58:548-551. 10.1093/jee/58.3.548
- Graham-Smith GS (1930) Further Observations on the Anatomy and Function of the Proboscis of the Blow-fly, *Calliphora erythrocephala* L. *Parasitology* 22:47-115.
10.1017/S0031182000010957
- Grdiša M, Babić S, Periša M et al. (2013) Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip.) in Croatia. *Chemistry and Biodiversity* 10:460-472.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201200015>
- Hajjar MJ, Ford JB (1990) The effect of cypermethrin on the feeding of mustard beetles *Phaedon cochleariae* (F.). *Ann Appl Biol* 116:279-286. 10.1111/j.1744-7348.1990.tb06608.x
- Harborne JB (1982) Introduction to ecological biochemistry. 2nd ed edn. Academic Press,
- Head SW (1966) A study of the insecticidal constituents in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. (1) their development in the flower head. (2) their distribution in the plant. *Pyrethrum Post* 8:32-37.
- Hendy CH, Djamgoz MBA (1985) Effects of deltamethrin on ventral nerve cord activity

- in the cockroach. *Pesticide Science* 16:520-529.
<https://doi.org/10.1002/ps.2780160511>
- Holan G, Johnson WMP, Rihs K, Virgona CT (1984) A neurophysiological study of DDT-pyrethroid isosteres on the labellar hair receptor of *Lucilia cuprina*. *Pestic Sci* 15:637-641. 10.1002/ps.2780150617
- Holan G, O'Keefe DF, Virgona C, Walser R (1978) Structural and biological link between pyrethroids and DDT in new insecticides. *Nature* 272:734. 10.1038/272734a0
- Holan G, Poppleton TH Insect sensory nerve potentials: effects of insecticides. In: *Insect neurobiology and pesticide action (Neurotox 79)*, York, England, 1980. pp 73-78
- Hopkins BA (1964) The probing response of *Stomoxys calcitrans* (L.) (the stable fly) to vapours. *Anim Behav* 12:513-524. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90073-9](https://doi.org/10.1016/0003-3472(64)90073-9)
- Hull JJ, Yang Y-W, Miyasaki K, Brent CS (2020) TRPA1 modulates noxious odor responses in *Lygus hesperus*. *J Insect Physiol* 122:104038. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104038>
- Ja WW, Carvalho GB, Mak EM et al. (2007) Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:8253-8256. 10.1073/pnas.0702726104
- Kawamoto M, Moriyama M, Ashida Y, Matsuo N, Tanabe Y (2020) Total syntheses of all six chiral natural pyrethrins: accurate determination of the physical properties, their insecticidal activities, and evaluation of synthetic methods. *The Journal of Organic Chemistry* 10.1021/acs.joc.9b02767

- Kim H, Choi MS, Kang K, Kwon JY (2015) Behavioral analysis of bitter taste perception in *Drosophila* Larvae. *Chem Senses* 41:85-94. 10.1093/chemse/bjv061
- Kim SH, Lee Y, Akitake B, Woodward OM, Guggino WB, Montell C (2010) *Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8440-8445. 10.1073/pnas.1001425107
- Kumar K, Chapman RB (1984) Sublethal effects of insecticides on the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). *Pestic Sci* 15:344-352. 10.1002/ps.2780150404
- Kwon Y, Kim SH, Ronderos DS et al. (2010) *Drosophila* TRPA1 channel is required to avoid the naturally occurring insect repellent citronellal. *Curr Biol* 20:1672-1678.
- L. M. Schoonhoven LM, W. M. Blaney WM, Simmonds MSJ (1992) Sensory coding of feeding deterrents in phytophagous insects. In: Bernays EA (ed) *Insect-Plant Interactions*, vol IV, 1st edn. CRC Press, Boca Raton, USA, pp 59-79.
- Liscia A, Solari P (2000) Bitter taste recognition in the blowfly: electrophysiological and behavioral evidence. *Physiol Behav* 70:61-65. 10.1016/S0031-9384(00)00249-3
- Liu F, Wang Q, Xu P et al. (2021) A dual-target molecular mechanism of pyrethrum repellency against mosquitoes. *Nature Communications* 12:2553. 10.1038/s41467-021-22847-0
- Liu N (2015) Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol* 60:537-559. 10.1146/annurev-ento-010814-020828
- Lucas P, Renou M (1992) Electrophysiological study of the effects of deltamethrin, bioresmethrin, and DDT on the activity of pheromone receptor neurones in two

moth species. Pestic Biochem Physiol 43:103-115.

[https://doi.org/10.1016/0048-3575\(92\)90024-T](https://doi.org/10.1016/0048-3575(92)90024-T)

Lund AE, Narahashi T (1983) Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroids and DDT analogs.

Pestic Biochem Physiol 20:203-216. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(83\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(83)90025-1)

Lybrand DB, Xu H, Last RL, Pichersky E (2020) How plants synthesize pyrethrins: safe and biodegradable insecticides. Trends in Plant Science 25:1240-1251. 10.1016/j.tplants.2020.06.012

Machova J, Prokeš M, Kocour Kroupova H, Svobodová Z, Mácová S, Dolezelova P, Velisek J (2009) Early ontogeny, growth and mortality of common carp (*Cyprinus carpio*) at low concentrations of dimethyl sulfoxide. Acta Veterinaria Brno 78:505-512. 10.2754/avb200978030505

Macover DR (1995) Constituents of pyrethrum extract. In: Casida JE, Quistad GB (eds) Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses. Oxford University Press, Oxford, pp 109-122.

Maeda T, Tamotsu M, Yamaoka R, Ozaki M (2015) Effects of floral scents and their dietary experiences on the feeding preference in the blowfly, *Phormia regina*. Front Integr Neurosci 9 10.3389/fnint.2015.00059

Mahishi D, Huetteroth W (2019) The prandial process in flies. Current Opinion in Insect Science 36:157-166. 10.1016/j.cois.2019.09.004

Maia MF, Moore S (2011) Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. J Malaria Journal 10:S11. 10.1186/1475-2875-10-s1-s11

- Manda H, Shah P, Polsomboon S et al. (2013) Contact irritant responses of *Aedes aegypti* using sublethal concentration and focal application of pyrethroid chemicals. PLoS Negl Trop Dis 7:e2074. 10.1371/journal.pntd.0002074
- Mandel SJ, Shoaf ML, Braco JT, Silver WL, Johnson EC (2018) Behavioral aversion to AITC requires both painless and dTRPA1 in *Drosophila*. Frontiers in Neural Circuits 12 10.3389/fncir.2018.00045
- Matsuda K (2012) Pyrethrin biosynthesis and Its regulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. In: Matsuo N, Mori T (eds) Pyrethroids: From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 73-81. 10.1007/128_2011_271
- Matsumoto T, Sei T (1987) Antifeedant activities of *Ginkgo biloba* L. components against the larva of *Pieris rapae crucivora*. Agric Biol Chem 51:249-250. 10.1271/bbb1961.51.249
- Matsuo N (2019) Discovery and development of pyrethroid insecticides. Proceedings of the Japan Academy, Series B 95:378-400. 10.2183/pjab.95.027
- Meyerhof W (2013) Taste. In: Galizia CG, Lledo P-M (eds) Neurosciences - From Molecule to Behavior: a university textbook. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 285-302. 10.1007/978-3-642-10769-6_14
- Mitchell BK, Harrison GD (1985) Effects of Solanum glycoalkaloids on chemosensilla in the Colorado potato beetle : A mechanism of feeding deterrence? J Chem Ecol 11:73-83. 10.1007/bf00987607
- Mithöfer A, Boland W (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annu Rev Plant Biol 63:431-450. 10.1146/annurev-arplant-042110-103854
- Miyakado M (1985) Chemistry and Insecticidal activities of Piperaceae amides and

- their synthetic analogues. *Journal of Pesticide Science*
- Miyazaki T, Ito K (2010) Neural architecture of the primary gustatory center of *Drosophila melanogaster* visualized with GAL4 and LexA enhancer-trap systems. *J Comp Neurol* 518:4147-4181. 10.1002/cne.22433
- Montell C (2021) *Drosophila* sensory receptors—a set of molecular Swiss Army Knives. *Genetics* 217:1-34. 10.1093/genetics/iyaa011
- Mullin CA, Mason CH, Chou J-C, Linderman JR (1992) Phytochemical antagonism of γ -aminobutyric acid based resistances in *Diabrotica*. In: *Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance*, vol 505 ACS Symposium Series, vol 505. American Chemical Society, pp 288-308. 10.1021/bk-1992-0505.ch023
- Narahashi T (1992) Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol Sci* 13:236-241. 10.1016/0165-6147(92)90075-h
- Narahashi T (2000) Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther* 294:1-26.
- Norris EJ, Bloomquist JR (2022) Sodium channel-directed alkaloids synergize the mosquitocidal and neurophysiological effects of natural pyrethrins. *Pestic Biochem Physiol* 186:105171. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105171>
- Obermayr U (2015) Excitorepellency. In: Mustapha D, Frances SP, Strickman DA (eds) *Insect repellents handbook*. CRC Press, Florida, pp 91-115. 10.1201/b17407-8
- Ottea JA, Payne GT, Soderlund DM (1990) Action of insecticidal N-alkylamides at site 2 of the voltage-sensitive sodium channel. *J Agric Food Chem* 38:1724-1728.
- Ozaki M, Takahara T, Kawahara Y et al. (2003) Perception of noxious compounds by contact chemoreceptors of the blowfly, *Phormia regina*: putative role of an odorant-binding protein. *Chem Senses* 28:349-359. 10.1093/chemse/28.4.349

- Pagán OR, Rowlands AL, Urban KR (2006) Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria. *Neurosci Lett* 407:274-278.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.073>
- Peters W, Richter S Morphological investigations on the sense organs of the labella of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* Mg. In: XVI Int. Congr. Zool., Washington, 1963. vol 3. pp 89-92
- Prota N, Bouwmeester HJ, Jongsma MA (2014) Comparative antifeedant activities of polygodial and pyrethrins against whiteflies (*Bemisia tabaci*) and aphids (*Myzus persicae*). *Pest Manag Sci* 70:682-688. 10.1002/ps.3610
- Qi W, Yang Z, Lin Z, Park J-Y, Suh GSB, Wang L (2015) A quantitative feeding assay in adult *Drosophila* reveals rapid modulation of food ingestion by its nutritional value. *Mol Brain* 8:87. 10.1186/s13041-015-0179-x
- Ravindran R, Juliet S, Ajith Kumar KG et al. (2011a) Effects of solvents and surfactants against *Haemaphysalis bispinosa*. *Trop Biomed* 28:482-486.
- Ravindran R, Juliet S, Gopalan AKK et al. (2011b) Toxicity of DMSO, Triton X 100 and Tween 20 against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology* 35:237-239. 10.1007/s12639-011-0054-3
- Rimal S, Sang J, Poudel S, Thakur D, Montell C, Lee Y (2019) Mechanism of acetic acid gustatory repulsion in *Drosophila*. *Cell Rep* 26:1432-1442.e1434. 10.1016/j.celrep.2019.01.042
- Rothman JS, Silver RA (2018) NeuroMatic: an integrated open-source software toolkit for acquisition, analysis and simulation of electrophysiological data. 12 10.3389/fninf.2018.00014

- Ruscoe CNE (1977) The new nrdc pyrethroids as agricultural insecticides. *Pestic Sci* 8:236-242. 10.1002/ps.2780080310
- Sandoval-Mojica AF, Capinera JL (2011) Antifeedant effect of commercial chemicals and plant extracts against *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) and *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science* 67:860-868. <https://doi.org/10.1002/ps.2125>
- Sawicki RM (1962) Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. III.—knock-down and recovery of flies treated with pyrethrum extract with and without piperonyl butoxide. *J Sci Food Agric* 13:283-292. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740130503>
- Sawicki RM, Thain EM (1962) Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. IV.—knock-down activities of the four constituents. *J Sci Food Agric* 13:292-297. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740130504>
- Schoonhoven LM (1982) Biological aspects of antifeedants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 31:57-69. doi:10.1111/j.1570-7458.1982.tb03119.x
- Scott JG (2017) Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Pest Manag Sci* 73:716-722. 10.1002/ps.4328
- Scott JG (2019) Life and death at the voltage-sensitive sodium channel: evolution in response to insecticide use. *Annu Rev Entomol* 64:243-257. 10.1146/annurev-ento-011118-112420
- Seddon AM, Casey D, Law RV, Gee A, Templer RH, Ces O (2009) Drug interactions with lipid membranes. *Chem Soc Rev* 38:2509-2519. 10.1039/b813853m

- Sheppard DC, Swedlund B (2000) Toxicity of Individual Pyrethrin Esters to House Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Entomological Science* 35:279-282. 10.18474/0749-8004-35.3.279
- Shiraiwa T, Carlson J (2007) Proboscis extension response (PER) assay in *Drosophila*. *J Vis Exp* 193:193. 10.3791/193
- Simpson LL, David RC (1974) Poisons of Plant Origin. vol XIII. Springer New York, NY <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2943-5>
- Smith BH, Burden CM (2014) A proboscis extension response protocol for investigating behavioral plasticity in insects: application to basic, biomedical, and agricultural research. *J Vis Exp*:e51057. 10.3791/51057
- Soderlund D (1995) Mode of action of pyrethrins and pyrethroids. In: Casida JE, Quistad GB (eds) *Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses*. Oxford University Press, Oxford, pp 217-233.
- Soderlund DM (2012) Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch Toxicol* 86:165-181. 10.1007/s00204-011-0726-x
- Sparks TC, Crossthwaite AJ, Nauen R et al. (2020) Insecticides, biologics and nematicides: updates to IRAC's mode of action classification - a tool for resistance management. *Pestic Biochem Physiol* 167:104587. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104587>
- Steck K, Walker SJ, Itskov PM, Baltazar C, Moreira J-M, Ribeiro C (2018) Internal amino acid state modulates yeast taste neurons to support protein homeostasis in *Drosophila*. *eLife* 7:e31625. 10.7554/eLife.31625
- Sugiura M, Horibe Y, Kawada H, Takagi M (2008) Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 91:135-140.

- Sutro JB (1986) Kinetics of veratridine action on Na channels of skeletal muscle. The Journal of General Physiology 87:1-24. 10.1085/jgp.87.1.1
- Suzuki T, Yamato S (2018) Mode of action of piperovatine, an insecticidal piperamide isolated from *Piper piscatorium* (Piperaceae), against voltage-gated sodium channels. Neurotoxicology 69:288-295.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.07.021>
- Tan K-H (1981) Antifeeding effect of cypermethrin and permethrin at sub-lethal levels against *Pieris brassicae* larvae. Pestic Sci 12:619-626. 10.1002/ps.2780120606
- Team RC (2019) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Tsuda K, Abe Y, Fujita Y (1972) Studies on pyrethroidal compounds part II : comparative activity of pyrethrins I, pyrethrins II and other synthetic pyrethroidal compounds. Botyu Kagaku 37:48 - 56.
- Ujihara K (2019) The history of extensive structural modifications of pyrethroids. Journal of Pesticide Science 44:215-224. 10.1584/jpestics.D19-102
- Ujváry I (2010) Chapter 3 - pest control agents from natural products. In: Krieger R (ed) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition). Academic Press, New York, pp 119-229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00003-3>
- Ulbricht W (1998) Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. Rev Physiol Biochem Pharmacol 133:1-54.
- Virgona C, Holan G, Shipp E, Spurling TH, Quint G (1982) Neurophysiological effects of insecticides on the labellar taste receptors of *Lucilia cuprina* Wied. Pestic Biochem Physiol 18:169-173. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(82\)90102-X](https://doi.org/10.1016/0048-3575(82)90102-X)

- Wada-Katsumata A, Silverman J, Schal C (2013) Changes in taste neurons support the emergence of an adaptive behavior in cockroaches. *Science* 340:972-975. 10.1126/science.1234854
- Wang S-Y, Wang GK (2003) Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell Signal* 15:151-159. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00085-2)
- Wilczek M (1967) The distribution and neuroanatomy of the labellar sense organs of the blowfly *Phormia regina* Meigen. *J Morphol* 122:175-201. 10.1002/jmor.1051220303
- Wink M (2018) Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? *Front Physiol* 9 10.3389/fphys.2018.00364
- Xu W, Papanicolaou A, Zhang H-J, Anderson A (2016) Expansion of a bitter taste receptor family in a polyphagous insect herbivore. *Sci Rep* 6:23666. 10.1038/srep23666
- Yan R, Zhou Q, Xu Z et al. (2021) Pyrethrins elicit olfactory response and spatial repellency in *Aedes albopictus*. *Pest Management Science* 77:3706-3712. <https://doi.org/10.1002/ps.6390>
- Yang T, Stoop G, Wieggers G, Mao J, Wang C, Dicke M, Jongsma MA (2012) Pyrethrins protect pyrethrum leaves against attack by western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *J Chem Ecol* 38:370-377. 10.1007/s10886-012-0097-7
- Yasumi K, Ohba K, Hirano C (1994) Scanning Electron Microscopic Observations of the Mouthparts and Feeding Marks of *Thrips palmi* KARNY (Thysanoptera:Thripidae). *Japanese journal of applied entomology and zoology*

38:23-28. 10.1303/jjaez.38.23

Zhou Y, Cao L-H, Sui X-W, Guo X-Q, Luo D-G (2019) Mechanosensory circuits coordinate two opposing motor actions in *Drosophila* feeding. Science Advances 5:eaaw5141. 10.1126/sciadv.aaw5141

Zito SW, Zieg RG, Staba EJ (1983) Distribution of pyrethrins in oil glands and leaf tissue of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Planta Med 47:205-207. 10.1055/s-2007-969986

Zlotkin E (2001) Insecticides Affecting Voltage-Gated Ion Channels. In: Ishaaya I (ed) Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 43-76. 10.1007/978-3-642-59549-3_3

宗林 正 (1960) アブラムシの口針そう入と植物組織. 日本応用動物昆虫学会誌 4:38-44_32. 10.1303/jjaez.4.38

風間 春, 石栗 陽, 吉永 直 (2022) 炭酸カルシウム水和剤によるモモシクイガ産卵抑制メカニズム. 日本農薬学会誌 47:88-91. 10.1584/jpestics.W22-20