

アリモドキゾウムシへのタンパク質マーキングの試み

舞木 紀玲・小濱 継雄・松山 隆志・河野 伸二
(沖縄県農業研究センター)

A protein marking for the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Brentidae). Noriaki Moug, Tsuguo Kohama, Takashi Matsuyama and Shinji Kawano (Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan)

アリモドキゾウムシ *Cylas formicarius* (Fabricius) 成虫に rabbit IgG を付着させ、ELISA 法で検出するタンパク質マーキングについて検討した。浸漬処理では、1.0, 2.5, 5.0mg/ml IgG 溶液処理個体から24時間後にIgGを検出できた。また、5.0mg/ml IgG 溶液処理個体から、室内飼育条件 (26℃, 13L11D) で、28日間 IgG を検出できたが、処理個体から無処理個体へ IgG の汚染が高率で発生した。アルカリ性緩衝液 (炭酸ナトリウム緩衝液, pH9.6) を希釈液に使用することで、汚染率は低減されたが、0%ではなかった。さらに、医療用ネブライザーを用いた噴霧処理で付着する IgG 量を調整した結果、アルカリ性緩衝液で1.5mg/ml に希釈した IgG 溶液100 μ l/10頭を処理することで、汚染率を1.0%に低減できた。しかし、全ての処理個体から IgG を検出できる期間は処理7日未満であった。以上の結果から、IgG の浸漬および噴霧処理は、アリモドキゾウムシ成虫に対するタンパク質マーキング法として使用できないと判断された。

Key words : ELISA, rabbit IgG

緒 言

アリモドキゾウムシ *Cylas formicarius* (Fabricius) はサツマイモ *Ipomoea batatas* L. の重要な害虫であり、沖縄県全域に分布している (安田・小濱, 1990)。本種の寄主であるサツマイモ等は植物防疫法によって発生地域から未発生地域への持ち出しが規制されているため、本種の存在は沖縄県におけるサツマイモ生産振興の大きな障害となっている。そこで、沖縄県では久米島において不妊虫放飼法による本種の根絶事業を行っている (久場ら, 2000)。

不妊虫放飼の防除効果は、トラップに誘引された不妊虫と野生虫の比で評価する (Iwahashi, 1977)。野生虫と識別するため、不妊虫はマーキングする必要がある。現在アリモドキゾウムシ不妊虫のマーカースとして用いられている蛍光色素は、脱落率が高く、フェロモントラップ内で野生虫への汚染が発生する (久場ら, 2000)。本種に対して蛍光色素に代わるマーカースがないため、暫定的に用いられているが、根絶確認など正確な評価が必要な場合には利用できない。そのため、防除効果は、不妊虫の放飼を一時中断して野生虫の捕獲数で評価している。放飼を中断する期間は、放飼される不妊虫の生存期間より長いことが必要であり、残存する野生虫がこの中断期

間に増殖し、根絶が遅れるおそれがある。したがって、アリモドキゾウムシの根絶事業において、マーカースの脱落がなく、野生虫への汚染のない新たなマーキング法の開発は急務である。

タンパク質マーキング法は、簡便で安全、安価、そして大量マーキングが可能な手法である (Hagler and Jackson, 2001)。これは、免疫グロブリン (例えば IgG) を目的の昆虫に付着させ、ELISA 法で検出するという手法であり、サカハチテントウ *Hippodamia convergens* (Hagler, 1997) やカスミカメムシの一種 *Lygus hesperus* の卵寄生蜂 *Anaphes iole* (Hagler and Jackson, 1998) などでマーキング法と保持力の試験が行われている。サカハチテントウの野外試験で使用された rabbit IgG (以下 IgG) によるタンパク質マーキング法は、検出力が高い。そこで、アリモドキゾウムシに対する IgG を用いたタンパク質マーキング法の適性を評価するため、保持力および汚染発生の有無について検討した。

本試験に協力して頂いた沖縄県農業研究センターの赤嶺正和氏、玉城学氏、外間一樹氏、松元孝太氏に感謝する。

材料および方法

1. 供試虫

沖縄県糸満市で採取したサツマイモ塊根から採集したアリモドキゾウムシを累代飼育し、2～5世代目の成虫を供試虫とした。飼育は生のサツマイモ塊根を餌とし、26℃、13L11Dの条件で行った。

2. マーカーの検出法

IgGの検出には、Hagler and Miller (2002)の方法にしたがいDAS-ELISA法（以下ELISA法）を用いた。原則として、ELISA法による検出は実験の処理が終了した翌日に行い、サンプルは検出するまで、-28℃で冷凍保存した。サンプルは乳鉢と乳棒または1.5mlマイクロチューブとホモジナイザー（S-203 池田理化製）を用いて10倍希釈した10x Tris-Buffered Saline (Bio-Rad 製) 溶液500 μ lと共に粉砕した。Coating液としてanti-rabbit goat γ IgG (Calbiochem 製)、Conjugate液としてHRP labeled anti-rabbit goat γ IgG (Southern Biotech 製)を用いた。また、1.5% ABTS {2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt (Organon Teknika Corporation 製)}を0.1M Citrate buffer (pH6.0)で100倍希釈し、H₂O₂を最終濃度が0.1%となるように加えSubstrate液とした。吸光度(405nm)はSubstrate液を分注して15分後に、マイクロプレートリーダー(Benchmark Bio-Rad 製)を用いて測定した。

なお本試験では、マイクロプレート(Nunc 製)に無処理個体のサンプル液を対照として必ず分注し、対照の2倍以上の吸光度(以下基準値)をIgG検出個体、それ未満をIgG非検出個体と判定した。

3. 浸漬処理個体からのIgGの検出

アリモドキゾウムシ成虫を5頭ずつ、蒸留水で1.0、2.5、および5.0mg/mlの濃度に希釈したIgG (Cappel Reserch Reagents 製)溶液に15分間浸漬し、24時間の乾燥後に個体別にELISA検定を行った。

試験は26℃、13L11Dの実験室条件下で行った。マーキング処理した供試虫(以下マーク虫)はペーパータオルを敷いたタッパー(29.5×37.0×13.5cm)に収容し、実験室内で24時間乾燥させた(乾燥が終わった時点でマーキングが終了したとする)。なお、以下の試験および乾燥処理は上記の条件で行った。

4. 浸漬処理におけるIgG検出可能期間

浸漬処理個体のIgG保持期間を調査するため、蒸留水で2.5および5.0mg/mlの濃度に希釈したIgG溶液に、成虫を各50頭1分間浸漬した。24時間の乾燥後、マーク

虫は餌としてサツマイモ400gを入れたタッパー(29.5×37.0×13.5cm)に移し集団飼育した。マーキング1, 2, 3, 7, 14および28日後にタッパーから成虫を5頭ずつ無作為に選り、個体別にELISA検定を行った。

5. 浸漬処理におけるIgG汚染発生調査

マーク虫から無マーク虫へのIgGの汚染については、以下の方法で調査した。IgGを処理し、24時間の乾燥が終了した雄成虫、すなわちマーク虫10頭と未処理の雌成虫、すなわち無マーク虫10頭をプラスチックカップ(直径12.5cm、高さ9.5cm)に収容した。18時間後にマーク虫と無マーク虫を取り出し、個体別にELISA検定を行った。

なお、浸漬処理による汚染発生調査では、蒸留水で2.5および5.0mg/mlに希釈したIgG溶液を準備し、各濃度に雄成虫10頭を浸漬してマーク虫とした。

6. アルカリ性緩衝液の汚染低減効果

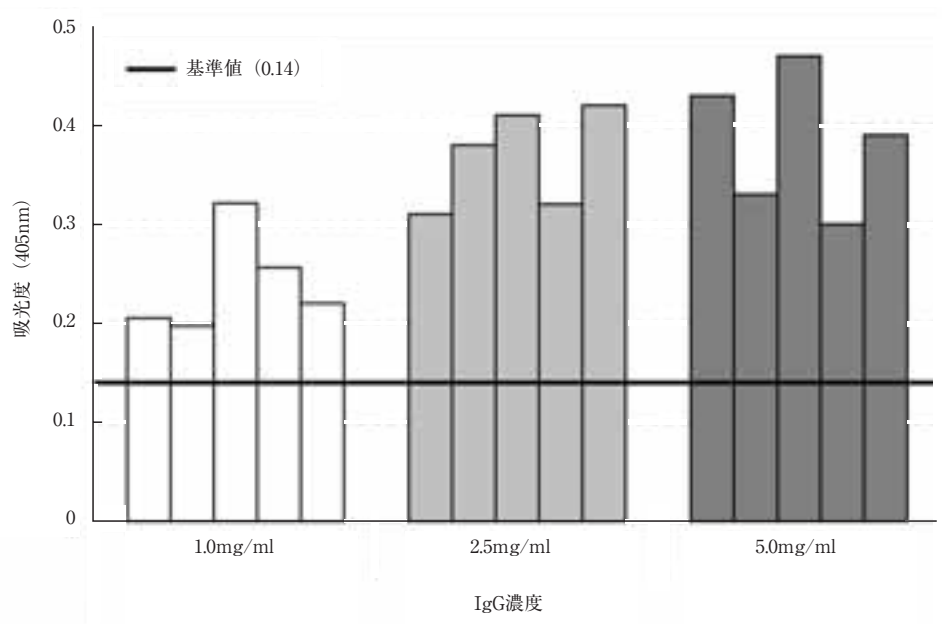
マーク虫から無マーク虫への汚染が認められたため、タンパク質の変性を促すアルカリ性緩衝液(0.05M炭酸ナトリウム緩衝液, pH9.6)の汚染軽減効果について検討した。雄成虫を10頭ずつ、アルカリ性緩衝液で2.5および5.0mg/mlの濃度に希釈したIgG溶液に10秒間浸漬した。対照区として蒸留水で希釈した同一濃度のIgG溶液を用い、汚染発生調査を行った。

7. IgG噴霧処理の汚染低減効果

噴霧処理は、浸漬処理と異なりIgGの処理量を調整することが可能であり、汚染低減効果が期待できる。そこで、噴霧処理のIgG濃度、処理量が汚染発生に与える影響について検討した。アルカリ緩衝液および蒸留水で希釈した1.0、1.5、2.0、2.5および5.0mg/mlのIgG溶液を準備し、医療用ネブライザー(NE-U22, オムロン製)で噴霧処理した。各濃度とも10頭を供試し、10頭あたり50 μ lと100 μ lの2段階で噴霧し、24時間の乾燥後、汚染発生調査を行った。さらに、上記条件で汚染が認められなかった組み合わせ、すなわちアルカリ性緩衝液で1.5mg/mlに希釈したIgG溶液の100および50 μ l噴霧処理については、1区10頭10反復で汚染発生調査を追加実施した。汚染の程度は、マーク虫のうち検出個体と判定された個体の割合(以下マーク個体率)と無マーク虫のうち検出個体と判定された個体の割合(以下汚染個体率)で評価した。

8. 噴霧処理におけるIgG検出可能期間

雄成虫を合計150頭供試し、アルカリ性緩衝液および蒸留水で1.5および2.0mg/mlの濃度に希釈したIgG溶液を準備し、10頭あたり100 μ lを噴霧処理した。24時間の乾燥後、直径9.5cm、高さ5.0cmのプラスチックカッ



第1図 アリモドキゾウムシにおけるIgG浸漬処理濃度と処理24時間後の吸光度. 基準値は無処理個体の吸光度 (405nm) の2倍の値.

プにおよそ1cmの土を敷き、餌としてサツマイモの蔓を与え、1頭ずつ個体飼育した。マーキング1, 7, 14, 21および28日後に、10頭ずつ無作為に選び、個体別にELISA 検定を行った。

結 果

1. 浸漬処理個体からのIgGの検出

供試した1.0, 2.5, 5.0mg/mlのいずれの濃度でも、全ての処理個体からIgGが検出された（第1図）。すなわち、1.0mg/ml以上の濃度のIgG溶液に浸漬した個体は、24時間後にマーク虫として判定できることが明らかとなった。なお、1.0mg/ml IgG溶液に浸漬した個体の吸光度は、2.5および5.0mg/ml IgG溶液に比べて低かった（第1図）。このため、以降の試験では吸光度が高い2.5および5.0mg/ml IgG溶液について検討した。

2. 浸漬処理におけるIgG検出可能期間

5.0mg/ml IgG溶液に浸漬した場合は、処理28日後まで全ての処理個体からIgGが検出された。一方、2.5mg/ml IgG溶液に浸漬した場合は、処理14日後まで全ての個体からIgGが検出されたが、28日後に非検出個体が1個体認められた（第1表）。

3. 浸漬処理におけるIgG汚染発生調査

2.5および5.0mg/ml IgG溶液で浸漬処理した場合、いずれの濃度でも、プラスチックカップ内でマーク虫と18時間同居させた全ての無マーク虫からIgGが検出され

た。しかし、無マーク虫の吸光度は同居させたマーク虫に比べ低い傾向にあった（第2図）。

4. アルカリ性緩衝液の汚染低減効果

アルカリ性緩衝液希釈した2.5および5.0mg/ml IgG溶液に浸漬したマーク虫全てからIgGが検出された。また、IgG溶液で浸漬したマーク虫と18時間同居した無マーク虫10頭のうち、2.5mg/mlでは10頭のうち3頭から、5.0mg/mlでは10頭全てからIgGが検出された。一方、蒸留水で希釈したIgG溶液に浸漬した場合、2.5, 5.0mg/mlいずれの濃度でも、全てのマーク虫および無マーク虫からIgGが検出された。また、IgGの有無に関係なく、蒸留水に比べアルカリ緩衝液で希釈したIgG溶液で処理した個体の吸光度が低い傾向にあった（第3図）。

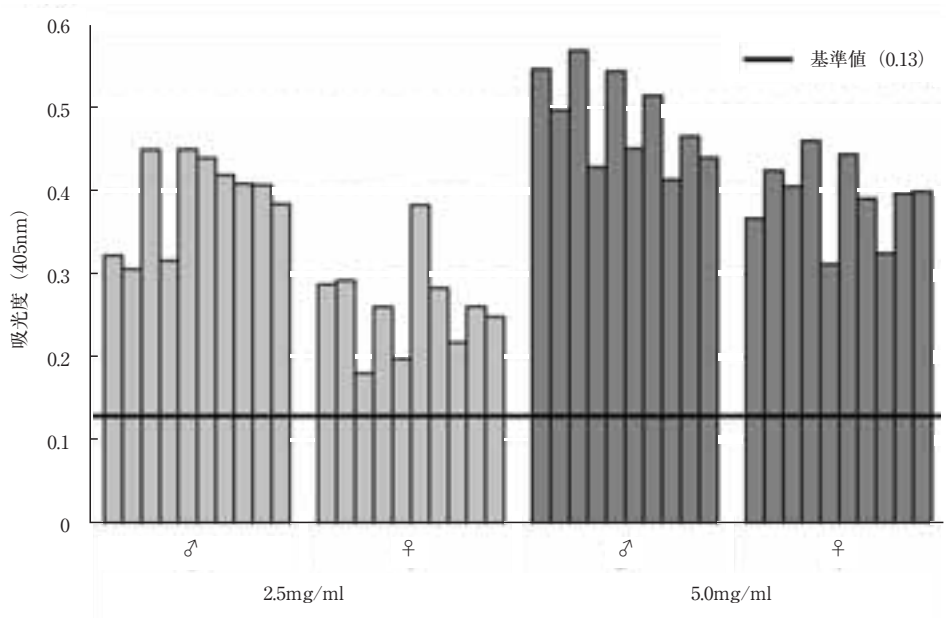
5. IgG噴霧処理の汚染低減効果

1.5mg/ml以上のIgG濃度で噴霧処理した場合、希釈液の種類、噴霧量の違いに関係なく全てのマーク虫から

第1表 浸漬処理28日後までのIgG検出個体数^{a)}

IgG濃度 (mg/ml)	処理後日数					
	1日	2日	3日	7日	14日	28日
2.5	5	5	5	5	5	4
5.0	5	5	5	5	5	5

a) 各濃度50頭ずつ処理し、各調査日に各濃度から5頭を無作為に選びIgGを検出した。



第2図 浸漬処理においてIgGの処理濃度が汚染発生に与える影響。処理24時間乾燥後、マーク虫（♂）と無マーク虫（♀）を同一容器に18時間収容した後、IgGの吸光度（405nm）を測定した。基準値は無処理個体の吸光度の2倍の値。

IgGが検出された。1.0mg/ml IgG溶液を噴霧処理した場合にIgGを検出できないマーク虫が認められたが、その数は50 μ lに比べて100 μ l噴霧処理で多い傾向が認められた。IgGが検出される無マーク虫（汚染個体）の数は、IgG濃度が高いほど、50 μ l噴霧より100 μ l噴霧で多い傾向が認められた。また、汚染個体が確認されないIgG濃

第2表 噴霧処理における希釈液、IgG濃度および噴霧量がマーク個体数と汚染個体数に与える影響

希釈液	IgG濃度 (mg/ml)	噴霧量 ^{a)}			
		50 μ l		100 μ l	
		マーク数	汚染数	マーク数	汚染数
蒸留水	1.0	9 ^{b)}	0	4	0
	1.5	10	1	10	6
	2.0	10	4	10	5
	2.5	10	2	10	5
	5.0	10	8	10	10
アルカリ性 緩衝液	1.0	6	0	0	0
	1.5	10	0	10	0
	2.0	10	1	10	3
	2.5	10	1	10	10
	5.0	10	8	10	10

a) ネブライザー（NE-U22，オムロン製）を用いた。 b) 供試虫10頭のうちIgGが検出された個体数。

度は、蒸留水が1.0mg/ml、アルカリ性緩衝液が1.5mg/ml以下と希釈液の種類で異なった（第2表）。全てのマーク虫からIgGが検出され、かつ汚染個体が発生しない条件は、アルカリ性緩衝液で希釈した1.5mg/ml IgG溶液を50または100 μ l噴霧した場合であった。同条件で追加試験を実施した結果、100 μ l噴霧処理ではマーク個体率が100%，汚染個体率が $1.0 \pm 3.2\%$ ，50 μ l噴霧処理ではマーク個体率が $72.0 \pm 20.4\%$ ，汚染個体率が0%となった（第3表）。

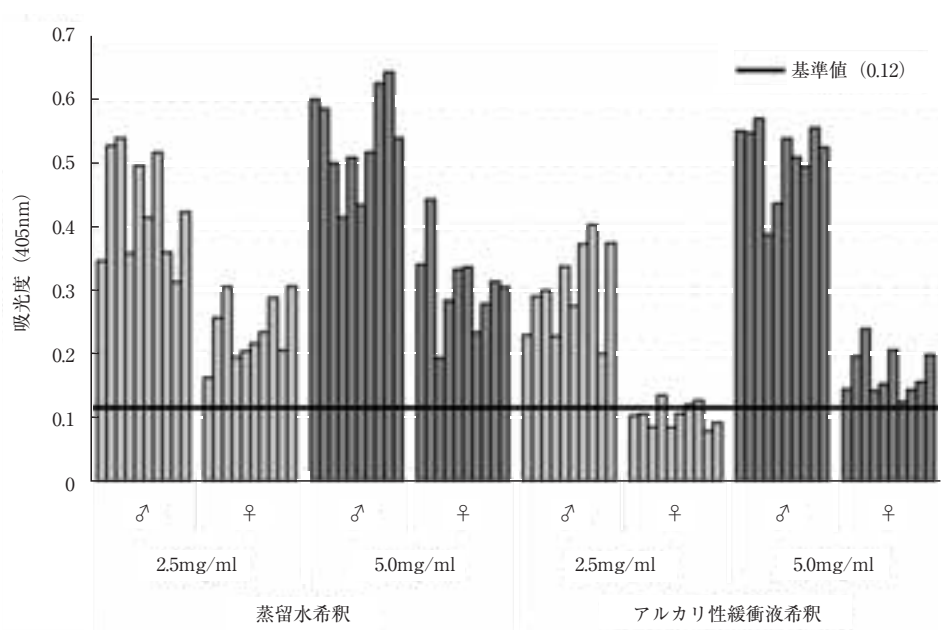
6. 噴霧処理におけるIgG検出可能期間

IgG処理1日後は、希釈液の種類、濃度および噴霧量に関係なく全てのマーク虫からIgGが検出されたが、処理7日後から非検出個体が確認された。非検出個体数は、日数の経過にしたがい増加し、処理14日後以降処理個体の半数以上になった（第4表）。

第3表 アルカリ緩衝液で希釈した1.5mg/ml IgG溶液で噴霧処理した場合のマーク個体率と汚染個体率

噴霧量 ^{a)}	マーク個体率 $\pm$ SD (%)	汚染個体率 $\pm$ SD (%)
50 μ l	72.0 ± 20.4	0
100 μ l	100	1.0 ± 3.2

a) ネブライザー（NE-U22，オムロン製）を用いた。



第3図 浸漬処理において希釈液の種類が汚染発生に与える影響。処理24時間乾燥後、マーク虫（♂）と無マーク虫（♀）を同一容器に18時間収容した後、IgGの吸光度（405nm）を測定した。基準値は無処理個体の吸光度の2倍の値。

考 察

マーキング法に必要な条件は、無マーク虫への汚染が発生しないこと、生存期間を通してマーカ―が検出可能であることである。アリモドキゾウムシでは、防除効果の判定にファンネル型のフェロモントラップが使用される。このトラップは、捕獲された個体が18時間程度生存し、トラップ内の生存虫や死亡虫と接触するため、マーカ―が脱落する頻度が低い場合でも、汚染が高率で発生する可能性がある。また、200Gyの放射線量で不妊化したアリモドキゾウムシ成虫は、照射28日後までにほとんどの個体が死亡する（Kohama and Hammond, 未発表）。

第4表 噴霧処理^{a)}における希釈液の種類およびIgG濃度がIgGの検出可能期間に与える影響

希釈液	IgG濃度 (mg/ml)	処理後日数と検出個体数				
		1日	7日	14日	21日	28日
蒸留水	1.5	10 ^{b)}	4	4	0	3
	2.0	10	7	5	4	3
アルカリ性緩衝液	1.5	10	8	3	2	2
	2.0	10	6	4	4	4

a) ネブライザー（NE-U22, オムロン製）を用い10頭あたり100μlを噴霧した。 b) 各濃度90頭ずつ処理し、調査日毎に無作為に10頭選びIgGを検出した。

したがって、アリモドキゾウムシでは、マーカ―の汚染がなく、28日間検出可能なマーキング法の開発が重要となる。

IgG浸漬処理24時間後に、1.0mg/ml以上の濃度で全てのマーク虫からIgGは検出された（第1図）。また、処理濃度が高いほど吸光度も高い傾向があり、IgGの付着量が多いと考えられた（第1図）。室内条件下で28日後までのIgGの検出を試みたところ、5.0mg/mlの濃度でマーキングした場合、28日後まで全てのマーク虫からIgGが検出されたが、2.5mg/mlでは1頭検出されなかった（第1表）。したがって、本種のマーキングに必要とされる保持期間（28日）を満たすためには5.0mg/ml以上の濃度が必要である。

しかし、2.5または5.0mg/ml IgG溶液に浸漬処理したマーク虫と無マーク虫を同居させた場合、全ての無マーク虫からIgGが検出された（第2図）。不妊虫放飼による本種の根絶防除において、モニタリングに使用するフェロモントラップ内は本試験で用いたプラスチックカップよりも捕獲虫が高密度となることが予想される。したがって、IgGをマーカ―として利用するためには、汚染を防止する方法が必要である。

IgGの希釈液にアルカリ性緩衝液を用い、汚染の低減を試みたところ、2.5mg/mlの濃度では無マーク虫10頭

のうち3頭から、5.0mg/mlの濃度では全ての無マーク虫からIgGが検出された。また、蒸留水に比べアルカリ性緩衝液で希釈した場合、無マーク虫の吸光度は低い傾向にあった(第3図)。したがって、IgGをアルカリ性緩衝液で希釈することで汚染を低減できるが、その効果は不十分と考えられる。

アルカリ性緩衝液で1.5mg/mlに希釈したIgG溶液100 μ lをネブライザーを使用して噴霧処理することで、全てのマーク虫を検出個体として識別可能で無マーク虫を検出個体として誤識別する率を $1.0 \pm 3.16\%$ に抑えることが可能だった(第3表)。しかし、全てのマーク虫を検出個体と判別できる期間は7日未満であり、5.0mg/ml浸漬処理の28日間に比べて短い(第4表)。使用したネブライザーは粒径5 μ mの細かい霧でIgG溶液を体表面に付着させるため、浸漬処理に比べて少量のIgGが均一に付着し、汚染する頻度は低くなると推測される。この結果、汚染低減効果は認められるものの、付着量が少ないため検出が可能な期間が短くなったと推測される。なお、1.0mg/mlの濃度で100 μ l噴霧処理に比べ50 μ lの方が、マーク個体数が高かった理由は不明である。

以上の結果は、アリモドキゾウムシのマーカーにIgGを使用した場合、必要な保持期間を確保するためには汚染が発生する付着量が必要であり、汚染を防止できる付着量では必要な保持期間が確保できないことを示している。したがって、IgGを体表面に付着させるマーキング法を本種に利用することは困難であると判断される。

IgGの利用方法として、体内に取り込ませて検出する方法や蛍光抗体法を用いてIgGの付着状態を蛍光顕微鏡

で観察し、マーク個体と汚染個体を識別する方法が考えられる。これらの方法については、今後の検討課題である。

引用文献

- Hagler, J. R. (1997) Field retention of a novel mark-release-recapture method. *Environ. Entomol.* 26 : 1079-1086.
- Hagler, J. R. and C. G. Jackson (1998) An immunomarking technique for labeling minute parasitoids. *Environ. Entomol.* 27 : 1010-1016.
- Hagler, J. R. and C. G. Jackson (2001) Methods for marking insects : Current techniques and future prospects. *Ann. Rev. Entomol.* 46 : 511-543.
- Hagler, J. R. and E. Miller (2002) An alternative to conventional insect marking procedures : Detection of a protein mark on pink bollworm by ELISA. *Entomol. Exp. et Appl.* 103 : 1-9.
- Iwahashi, O. (1977) Eradication of the melon fly, *Dacus cucurbitae*, from Kume Is., Okinawa with the sterile insect release method. *Res. Popul. Ecol.* 19 : 87-98.
- 久場洋之・照屋 匡・榊原充隆 (2000) 不妊虫放飼法によるゾウムシ類の根絶(9) 久米島における根絶実証事業. 植物防疫54 : 483-486.
- 安田慶次・小濱継雄 (1990) 沖縄県におけるイモゾウムシとアリモドキゾウムシの分布. 九病虫研会報36 : 123-125.

(2007年5月7日受領; 9月18日受理)