九病虫研会報 53：56-58（2007）
Kyushu Pl. Prot. Res. 53：56-58（2007）

食塩水に沈む卵の除去によるイモゾウムシ人工飼料の細菌汚染の低減

大野　　豪・小濱　継雄
（沖縄県農業研究センター）

Decreased bacterial contamination of artificial diet of the West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus*（Coleoptera: Curculionidae）, by eliminating eggs sinking into the saltwater before egg inoculation. Suguru Ohno and Tsuguo Kohama
（Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan）

Our recent study revealed that the majority of *Euscepes postfasciatus* eggs that sink into 14% saltwater were dead. We examined the effect of eliminating the eggs sinking into the saltwater before egg inoculation on the bacterial contamination of the artificial diet of the species. The mean rate of contamination when the sunken eggs were eliminated（51%）was significantly lower than that when sunken eggs were not eliminated（60%）. The contamination rate of the diet was 2% when the eggs were not inoculated, which is much lower than that when the eggs were inoculated in the absence of sunken eggs. Although eliminating the sunken eggs alone could not sufficiently suppress the contamination, we considered that this method could be used as one of the useful techniques for integrated management of bacterial contamination in the artificial rearing of *E. postfasciatus*.

Key words : brine floatation technique, *Ipomoea batatas*, Okinawa, quarantine pest, sterile insect release

緒　　言

沖縄県久米島からサツマイモの重要害虫イモゾウムシ *Euscepes postfasciatus*（Fairmaire）を不妊虫放飼法によって根絶するために，人工飼料を用いた本種の大量増殖法の確立が試みられているが（大野ら，2006a），人工飼料の細菌汚染が高頻度で起こることが障壁のひとつとなっている（大野ら，2005a）。大野ら（2005b）は，14%食塩水に沈むイモゾウムシ卵（以下，沈下卵）のほとんどが死亡卵であることを明らかにした。死亡卵は，生存卵より飼料の汚染源を多く含むと予想されるため，沈下卵を飼料に接種しないようにすれば，飼料の汚染率を下げられる可能性がある。そこで本研究では，人工飼料への卵接種前の沈下卵除去が，細菌汚染を低減する効果を示すか否かを調べた。

本文に先立ち，実験作業にご協力いただいた沖縄県ミバエ対策事業所の澤岻美奈子氏・澤岻安奈氏，および本稿に対して有益なご意見を下さった沖縄県病害虫防除技術センターの原口大氏・我那覇智子氏にお礼申し上げる。

材料および方法

1．供試虫および人工飼料

実験には，1994年に沖縄県読谷村で採集された後，沖縄県ミバエ対策事業所（那覇市）において，25±1℃，明期14時間：暗期10時間に設定した業務用コンテナ内で，サツマイモ塊根を餌として累代飼育されたイモゾウムシを用いた。採卵は，2005年2月～6月に，大野ら（2004）の方法に準じて行った。回収した卵は，蒸留水で十分に湿らせたろ紙を敷いたプラスチックシャーレに入れ，実験に供するまで，25±1℃，明期14時間：暗期10時間に設定した恒温器内に保管した。試験には主に6日齢（孵化直前）の卵を用いたが，卵数が不足した場合は，5日齢および4日齢の卵も6日齢卵に混合して用いた。人工飼料には，Shimoji and Yamagishi（2004）の人工飼料を大量増殖用に改良したもの（原料のサツマイモ粉末とビタミン・無機塩混合物を市販の調整済みのものに置換し，混合・加熱法を簡易化；浦崎貴美子ら，未発表）を用いた。人工飼料および殺菌処理後の卵を扱うための容器や器具はすべて，高圧蒸気滅菌（121℃，40分）あるいは70%エタノール噴霧により殺菌してから用

いた。

2．沈下卵除去および飼料への卵接種

蒸留水中に沈めた3～4万個の卵を，ピペットを用いて水とともに吸いとり，2本の5mlメスシリンダーに等分した。次に，これらを別々のビーカー（100または200ml）に移し，14%食塩水約100mlを注いでよく撹拌し，外見上ビーカー内の水の流れが止まるまで静置した。一方のビーカーだけから，ビーカーの底にたまった沈下卵をピペットを用いて取り除いた後，再度撹拌してから卵をナイロンゴースで濾しとり，蒸留水でよくすすぎ，蒸留水とともにビーカーに移した（除去区）。他方のビーカーの卵は，沈下卵を除去せずに同様の操作を行った（非除去区）。除去区・非除去区ともに，大野ら（2006b）の卵数推定法を用いて，4,000～8,000個の卵を分取し，50mlの70%エタノール中に40分間浸漬して卵表面の殺菌を行った後，滅菌水で2度洗浄し，高圧蒸気滅菌した0.6%ファーセレラン水溶液（ファーセレラン粉末［伊那食品工業］3g/蒸留水500ml）に1mlあたり100卵を含むように混合した。この混合液1mlを，卵が詰まらないように先端から約2mmの位置で切り落としたチップを装着したマイクロピペットを用いて，約5.5gの人工飼料を入れたプラスチックシャーレ（直径3.5cm，高さ1cm）内に滴下した。このように調整したシャーレを各区につき20個ずつ用意した。対照区として，卵を混合しないファーセレラン水溶液1mlを同様に滴下したシャーレを20個用意した。すべてのシャーレは，前記の卵保管時と同じ条件に設定した恒温器内に保管し，4週間にわたって少なくとも週3回，細菌コロニー形成の有無を肉眼で調べた。観察終了後，各区の細菌汚染率（汚染シャーレ数/20）を算出した。以上の作業を，異なる日に28回繰り返した。

3．データ解析

細菌汚染率の処理区間での比較に先立ち，日齢が若い卵を混合して用いることの汚染率への影響を見るため，汚染率のデータを6日齢の卵だけを用いた反復群と異なる齢の卵を混合した反復群に分けて，各区内の群間でWilcoxon検定（両側検定）により比較した。次に，沈下卵の除去が汚染率を低下させるか否かを確認するために，除去区および非除去区の平均汚染率を算出し，Wilcoxonの符号付順位検定（片側検定）により比較した。全反復を通じた両区間の汚染率の相関も調べた。また，細菌コロニーの形成開始時期に両区間で差があるかどうかを検定するために，汚染観察日のデータを接種後1週から4週までの4段階に分け，Mann-WhitneyのU検定（両側検定）により比較した。

結果および考察

人工飼料の細菌汚染率のデータを，除去区と非除去区のそれぞれについて，6日齢の卵だけを用いた場合（17反復），5～6日齢の卵を混合した場合（4反復）および4～6日齢の卵を混合した場合（7反復）に分けて比較したところ，三者の間に有意差は認められなかった（いずれも$P>0.1$）。このため，日齢の若い卵の混合は汚染率に影響しないとみなし，計28反復の平均汚染率を算出したところ，非除去区で59.6%，除去区で51.1%となり，沈下卵除去による汚染率の低下は統計的に有意だった（$P=0.03$，Table 1）。両区の汚染率の間には有意な正の相関が認められた（Spearmanの順位相関係数$r_s=0.70$，$P<0.001$，$n=28$）。卵を接種していない対照区の平均汚染率は2.0%であった（Table 1）。

卵接種後に汚染が観察されるまでの期間（週数）に関しては，除去区と非除去区ともに汚染率ゼロの反復が含まれたため，反復ごとの代表値を算出できなかった。そのため，汚染されたすべてのシャーレのデータを，反復の違いにかかわらずひとまとめにして比較したところ，除去区（$n=285$）と非除去区（$n=334$）の間に，汚染観察までの週数に有意差は認められなかった（$P=0.12$）。両区の汚染シャーレのデータをひとまとめにした場合（$n=619$），接種後1週目に汚染が観察されたシャーレの比率は全体の66.6%にのぼり，接種後2週目，3週目，4週目の比率は，それぞれ24.9%，6.5%，2.1%であった。

本研究により，沈下卵を卵接種前に除去することにより，人工飼料の細菌汚染率を有意に下げられることが確かめられ，死亡卵が汚染源のひとつとなっていることが明らかになった。今回，試験に用いた卵全体に対する沈下卵の割合は調べられていないが，本研究に先立って行った予備試験では，沈下卵除去前後での卵量の減少は，5 mlメスシリンダーでは検出できないほど小さかった。

Table 1. Bacterial contamination of artificial diet of *Euscepes postfasciatus* when eggs sinking into 14% saltwater were eliminated before inoculating eggs on the diet

Treatment	Contamination rate (%)[a]
Sunken eggs eliminated	51.1±35.3［0-100］[b]
Sunken eggs not eliminated	59.6±38.5［0-100］
Control (no eggs)	2.0± 2.8［0-10］

a) Mean ± SD［range］of 28 replications. **b)** The mean is significantly lower than that when the sunken eggs were not eliminated (one-tailed Wilcoxon signed-rank test, P=0.03).

わずかな割合しか占めなかったであろう沈下卵を除去するだけで，細菌汚染率が有意に低下したことは，死亡卵の混入は，たとえ少量であっても飼料の汚染率上昇を引き起こすことを示唆する。今後は，沈下卵の割合がどの程度まで高まると汚染源として問題となるのかを明らかにする必要がある。

しかしながら，本研究で示された沈下卵除去による飼料の汚染抑制効果は顕著なものではなく，沈下卵を除去した後の汚染率は50%以上にのぼった。この値は，卵を接種しなかった対照区の汚染率（２%）と比べると著しく高い。また，汚染の発生を遅延させる効果も認められなかった。このため，沈下卵の除去だけでは，飼料の細菌汚染防止法としては不十分である。しかし，我々がイモゾウムシの大量増殖法確立のため開発を進めている，卵の殺菌法や飼料の改良等を含む複数の手段を組み合わせた総合的な細菌汚染管理法の中に組み込めば，沈下卵除去は有効な汚染制御手段のひとつとなると思われる。

除去区と非除去区の汚染率には，非常に大きなばらつきが認められた。両区とも，汚染率の範囲は０%から100%にわたり，変動係数（標準偏差と平均値の比）は60%以上であった。両区の汚染率の間に相関が認められたことは，汚染率のばらつきが共通の原因で生じていることを示唆する。ひとつの原因として，処理前の卵表面に存在していた細菌の何らかの性質（たとえば，個体数や種構成）が異なっていた可能性がある。汚染率のばらつきの原因を明らかにすることは，より効果的な細菌汚染制御法を探索する上で重要である。

摘　　要

イモゾウムシの人工飼料への卵接種前における，14%食塩水に沈む卵（沈下卵）の除去が飼料の細菌汚染に及ぼす影響を調べた。沈下卵を除去した場合の平均汚染率（51%）は，除去しない場合の値（60%）より有意に低かった。飼料に卵を接種しない場合の汚染率は２%であり，これは沈下卵を含まない卵を接種した場合の値よりもはるかに低かった。沈下卵除去は，それ単独では汚染を十分に抑制できなかったが，イモゾウムシ人工飼育における細菌汚染の総合管理に関して，有効な手段の一つとして用いることができる。

引　用　文　献

大野　豪・佐々木智基・浦崎貴美子・小濱継雄（2004）エタノールによる卵表面処理がイモゾウムシの孵化後の生存・発育に及ぼす影響．九病虫研会報50：40-43.

大野　豪・佐々木智基・小濱継雄（2005a）イモゾウムシ卵のエタノール浸漬による人工飼料のバクテリア汚染抑制：卵をファーセレラン水溶液とともに飼料に接種した場合．九病虫研会報51：41-44.

大野　豪・佐々木智基・小濱継雄（2005b）食塩水浮遊法によるイモゾウムシの死亡卵の除去．応動昆49：255-258.

大野　豪・原口　大・浦崎貴美子・小濱継雄（2006a）サツマイモの大害虫イモゾウムシ―久米島における発生生態と防除の現状．昆虫と自然41（14）：25-30.

大野　豪・佐々木智基・中村隆文・原口　大・浦崎貴美子・小濱継雄（2006b）メスピペットとメスシリンダーを用いたイモゾウムシ卵の簡易計数法．応動昆50：51-56.

Shimoji, Y. and M. Yamagishi（2004）Reducing rearing cost and increasing survival rate of West Indian sweetpotato weevil, *Euscepes postfasciatus*（Fairmaire）（Coleoptera: Curculionidae）on artificial larval diet. Appl. Entomol. Zool. 39：41-47.

（2007年５月１日受領；８月９日受理）