

ATP アッセイを利用したフラーパーゾウムシ *Pantomorus cervinus* (BOHEMAN) 卵の生死判定

海老名崇生・金田昌士*・大村克己*

横浜植物防疫所調査研究部

ATP assay for determining egg viability of the Fuller rose beetle, *Pantomorus cervinus* (BOHEMAN) (Coleoptera: Curculionidae). Takao EBINA, Masashi KANEDA and Katsumi OHMURA (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-yamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 40: 69-73 (2004).

Abstract: The method of bioluminescent adenosine triphosphate (ATP) assay for determining egg viability of a quarantine insect pest: the Fuller rose beetle (*Pantomorus cervinus* (BOHEMAN)), was investigated. Eggs of this insect pest are found on fruit in the import inspection, but such eggs provide poor information for determining viability. Test insects were imported from New Zealand and were reared and maintained under laboratory conditions, by permit from authorities. The ATP concentration of newly laid eggs of the beetle was $1,398.60 \pm 199.46$ pmol (mean \pm SD), and it was found that the ATP concentration decreased over time until hatching. Test insects were frozen at -35°C for 24 hours, for complete killing. The ATP concentration of live eggs (5 to 9 days old) was 377.15 ± 128.30 pmol, and at 2 hours after freezing treatment, the ATP concentration dropped to 2.88 ± 1.89 pmol, indicating a logarithmic decrease in ATP concentration. And at 24 hours after freezing treatment, the ATP concentration of eggs was 0.03% of that of live eggs. Thus, it was shown that the ATP concentration reflected the viability of Fuller rose beetle eggs, and that the bioluminescent ATP assay has potential for application to plant quarantine inspection.

Key words: *Pantomorus cervinus*, ATP assay, determining viability, Fuller rose beetle

緒 言

フラーパーゾウムシ *Pantomorus cervinus* (BOHEMAN) は北米、ヨーロッパ、オセアニア、アフリカ等の温帯域を中心に分布し (CAB International, 1966)、成虫が広葉樹及び草本性生植物等の茎葉等の地上部を、幼虫が根や塊茎等の地下部を食害する広食性のゾウムシであり (CHITTENDEN, 1901; DICKSON, 1950; MORSE *et al.*, 1987)、我が国では従来未発生 (一部の限られた地域に侵入: 神奈川県病害虫防除所, 1997) の重要害虫である (真崎, 1982)。本種卵は、輸入検査現場ではかんきつ類 (*Citrus* spp.) やキウイフルーツ (*Actinidia chinensis*) 等の生果実に卵塊で発見されることが多いが、この外観のみによる生死判定は判断材料に乏しい場合がある。

そこで、MILLER *et al.* (1978), YU *et al.* (1984),

FORNEY *et al.* (1991) で報告されているアデノシン三リン酸 (ATP) の性質を利用した生物の生死判定方法の適用を試みた。ATP は生命維持のための代謝活動において化学エネルギーを伝達する役目を持ち (ATKINSON, 1965)、生きた細胞内では ATP が常に生産され維持されるが、細胞が死滅した場合には分解酵素の作用で ATP は急速に分解されて減少し、最終的には消滅することが知られており (LOCKSHIN *et al.*, 1977; PRADET & RAYMOND, 1983)、本試験で調査する検疫害虫の生死判定方法はこの現象を応用したものである。

FORNEY *et al.* (1991) は、凍結又は温湯浸漬又は臭化メチルくん蒸等殺虫処理の後、フラーパーゾウムシの卵塊の ATP 量が減少することを報告したが、本試験では輸入植物検疫への適用を考慮し、1 卵ごとの ATP 量を計測した。

本試験にあたり、ATP 量の計測方法に適切な助言を賜った東亜ディーケーケー株式会社の羽毛田 靖

* 現在: 農林水産省消費・安全局植物防疫課

氏、及び、試験全般に指導いただいた横浜植物防疫所調査研究部害虫担当の諸氏に厚くお礼申し上げます。

材料及び方法

本試験には、農林水産大臣の許可（農林水産省指令60横植第807号）を得て導入し、累代飼育したニュージーランド産フラーパーラゾウムシの卵及び1齢幼虫を供試した。本種は、真崎・高橋（1999）で報告された飼育方法を用いて、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度60～80%、16L:8Dの条件下で飼育した。

本種卵は、ペーパータオル及びパラフィルム（それぞれ25×75 mm大）を数枚交互に重ね合わせてステイプラーで止め、適度に水分を含ませたものを成虫の飼育容器に入れ、24時間後に取出し、このペーパータオルとパラフィルムとの間に産卵された卵塊を水で洗いながら1卵ごとにばらして採取した。卵は水を含ませたペーパータオルとともにガラスシャーレ（90 mm径、15 mm高）内に設置し、試験に供試するまで 24°C で保管した。生死判定の調査には産卵後5～9日経過後の卵（5～9日齢）を供試した。また、本種の1齢幼虫は、卵塊を115×128×83 mmのプラスチック製容器に入れ、水分を含ませたペーパータオルで湿度を与え、孵化したものを使用した。

ATP量の計測には、東亜ディーケーケー製のルミノメーター「ATPテスト：AF-70」[®]を使用した。ATP量を計測するための試薬として同社製「発光試薬」[®]（ルシフェラーゼ、ルシフェリン、硫酸マグネシウム、牛抽出アルブミン及びトリス緩衝液等含有）及び同社製「抽出試薬」[®]（塩化ベンザルコニウム及びHEPES緩衝液等含有）を使用した（当ルミノメーター及び専用試薬は器物に付着する細菌数を計測して微生物による汚染度を計ることを本来の目的とする）。ATPアッセイに使用した器具類は、高压滅菌（ 120°C 、60分）又は乾熱滅菌（ 120°C 、3時間）したもの、あるいは市販時にすでに滅菌されたものを使用した。

ATPの計測は、試験当日に1回、市販のATP100 nmol（ATP標準試薬）を基準にして校正を実施して行った。供試虫を1個体ずつ、5%トリクロロ酢酸水溶液1 mlを注入したプラスチック製チューブ内ですり潰し、10分間静置してATPを抽出した。その後、ATPを抽出した溶液から100 μl をトリス酢酸緩衝液（pH 7.8に調整；エチレンジアミン四酢酸を含む）で10倍に希釈して1 mlの溶液とした。この溶液から100 μl を計測用のディスプレイチューブに分注し、「発光試薬」100 μl 及び「抽出試薬」100 μl を加え、300 μl の溶液とした。この溶液を注入したチューブを

ルミノメーターに設置し、ATP量を計測した。各区の計測に際し供試虫を除き試薬のみでブランク値（背景発光）を3回計測し、供試虫のATP量の計測結果からブランク値を差し引き、試薬等の影響を補正した。

本種の卵期間は 24°C で約18～20日であり（真崎、1987）、採卵当日及び採卵日から1, 3, 5, 7, 9, 12日及び16日経過後の1卵ごとのATP量を計測した。ただし、採卵は24時間行ったので、日齢は1日間の幅がある。各区につき10卵を供試した。

供試虫は凍結処理（ $-35 \pm 1^\circ\text{C}$ で24時間）により殺虫し、その後室温に設置し、2, 15, 30, 45分後、1, 2, 4, 8, 24時間後に、1個体ごとのATP量を計測した。各区につき幼虫は5頭、卵は10卵を供試した。

1個体ごとにばらした卵におけるフラーパーラゾウムシの孵化率は約85～95%であり、凍結処理後では孵化は見られなかった。また、フラーパーラゾウムシの幼虫は凍結処理後すべて死滅したことが確認された。

結果及び考察

1. 生存時のフラーパーラゾウムシ卵のATP量

フラーパーラゾウムシ卵のATP量を産卵直後から孵化まで経過日数に従い計測した結果をFig. 1に示した。卵のATP量は、産卵直後（0～1日齢）では $1,398.60 \pm 199.46$ pmol（平均値 \pm SD）であるが、経過日数に従い減少してゆき、孵化直前（16～17日齢）には 189.99 ± 35.42 pmolとなり、産卵直後の14%にまで減少した。ATPアッセイを検疫害虫の生死判定に応用するためには、卵のATP量が経過時間に従い変化することに留意する必要がある。産卵直後の卵にATP量が多く含まれていた原因は不明であるが、胚子発生の初期段階では体組織や代謝機能の発育が途上であるため、栄養素があったとしても卵内の養分を消費してATPを合成する能力が低いことから、卵初期には多量のATPを要するものと推測される。このことは他の検疫害虫においても、同様の傾向を示すのではないかと推測される。

2. 殺虫処理後のフラーパーラゾウムシ卵及び幼虫のATP量

卵及び幼虫の生存時及び凍結による殺虫処理後のATP量計測結果をFig. 2に示した。卵及び幼虫のATP量はいずれも殺虫処理後1時間以内に対数的に減少した。殺虫処理後2, 15, 30分経過後のATP量計測結果から回帰を求めATPの半減期を算出した結果、卵では13.0分（ $R^2=0.917$ ）、幼虫では6.5分（ $R^2=0.919$ ）となった。FORNEY *et al.* (1991)の報告によれ

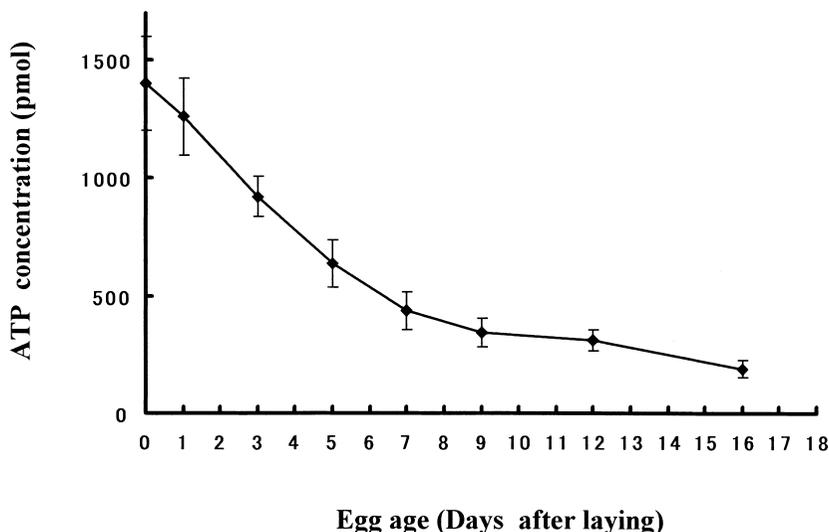


Fig. 1. Relationship between the ATP concentration and age of Fuller rose beetle eggs. Bars indicate SD.

ば液体窒素で30秒処理した卵塊（6～7日齢）のATP量を処理後数分～30分経過後計測したデータから同様に回帰を求めたところ、半減期を12.9分 ($R^2=0.934$)と報告していることから、実験条件が多少異なるものの卵死亡後のATP量の半減期は約10分前後であるものと考えられる。このATP量の対数的な減少はATP分解酵素の作用によるものであり (LOCKSHIN *et al.*, 1977; FORNEY *et al.*, 1991)、短時間で生存時と死亡後のATP量の差をもたらすことから、生死判定に応用するための重要な要素と考えられる。

フラーパーラゾウムシのATP量は、生存時では卵が 377.15 ± 128.30 (平均値 \pm SD) pmol、幼虫が 145.92 ± 46.04 pmol であるが、殺虫処理後2時間経過後では卵が 2.88 ± 1.89 pmol (生存時の0.76%)、幼虫が 1.34 ± 0.10 pmol (同0.92%) となり、いずれも処理後2時間で1%以下にまで急激に減少した。処理後8時間後からはATP量の変化が見られず、少なくともこの時点ではすでにATP量は分解し終えたものと考えられる。処理後24時間経過後、卵のATP量は生存時の0.03%となり、生存時と死亡後とのATP量の差は顕著となり、ATP量は供試虫の生死の状態を明確に反映した。

卵及び幼虫の個体のATP量の各データを散布図で Fig. 2 に示した。卵のATP量の偏差の幅は幼虫と比較して大きかった。これは、生存卵のATP量が産卵後経過時間とともに顕著に減少しており (Fig. 1)、供試卵の日齢が5～9日齢と幅があったため、生存時の各供試卵のATP量に大きな偏差があり、殺虫処理

後のATP量の偏差も振幅が大きいものと考えられる。加えて、Fig. 1では、産卵直後の卵のATP量の偏差が大きく、経過日数（齢）にともない偏差が小さくなることが示される。これは、卵初期では体組織、代謝機能の成長が途上であり、卵内のATPは生産と消費が平衡ではないことが原因であると推測される。そして、孵化後、供試虫のATP量は、状態及び体重が同じ場合、代謝機能に要する一定の量が維持されるものと考察される。

3. まとめ

フラーパーラゾウムシの卵及び1齢幼虫のATP量は供試虫の死亡後2時間で生存時の1%近くまで急激に減少した。このことから、本種卵のATP量は偏差が大きいものの死亡後の対数的なATP量の減少により、本種の生死を明確に反映し、輸入植物検査における害虫の生死判定に応用できる可能性が示唆された。さらに、ATPに関する代謝は、他の生物にも共通する基礎的な現象であり、HACCP等で採用されている微生物汚染の検査にすでにATPアッセイが利用されていることから (坂下ら, 2002; 食品と開発編集部, 2002)、植物検査の検査現場に応用できる可能性があるものと考えられる。輸入植物検査では多様な害虫が様々な状態で発見されており、今後はそれらの害虫への適用も含めた検討が必要となる。

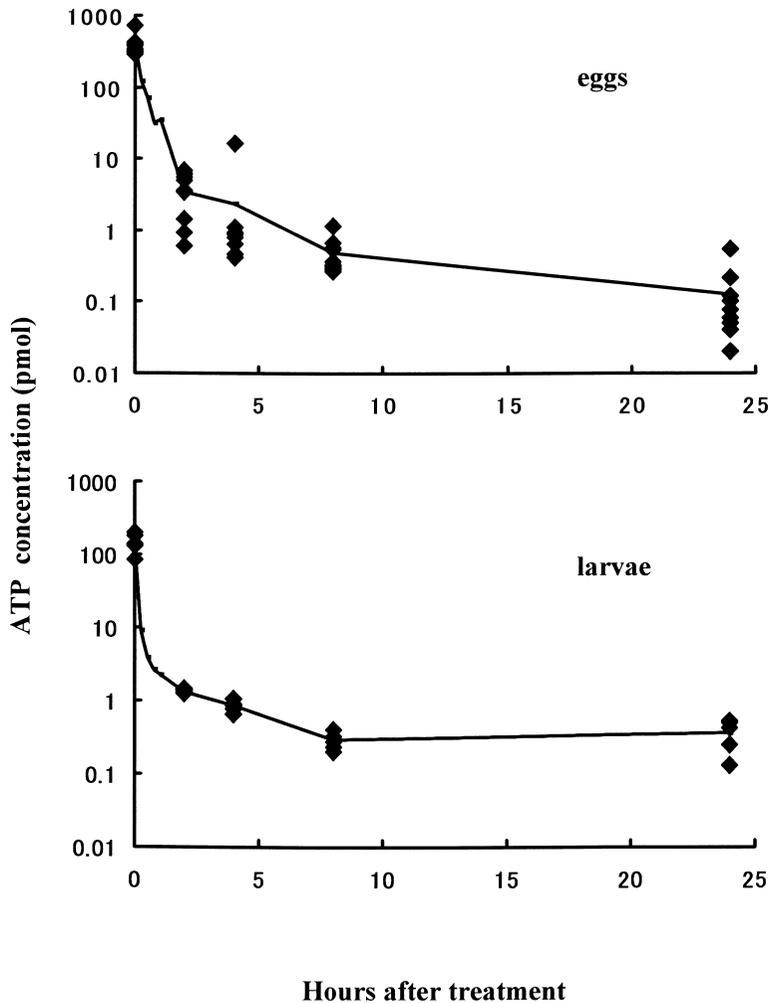


Fig. 2. Reduction of the ATP concentration of Fuller rose beetle eggs or larvae after freezing treatment (lethal treatment) at -35°C for 24 h. Data in the time value of “zero hours” of the graph indicate the ATP concentration of live eggs or larvae. The line represents the mean of ATP concentration, and each point represents data on an individual.

引用文献

- ATKINSON, D. E. (1965) Biological feedback control at the molecular level. *Science* **150**: 851-857.
- CAB International (1966) Distribution Maps of Pests. Series A: No.214. Commonwealth Institute of Entomology, London.
- CHITTENDEN, F. H. (1901) Some insects injurious to the violet, rose, and other ornamental plants. *U.S. Dept. Agric. Bur. Ent. Bull.* **27**: 88-96.
- DICKSON, R. C. (1950) The Fuller rose beetle: A pest of citrus. *California Agriculture Experiment Station Bulletin* No. 718, Berkeley.
- FORNEY, C. F., L. H. AUNG, D. G. BRANDL, E. L. SODER-

STROM and J. I. MOSS (1991) Reduction of adenosine triphosphate in eggs of Fuller rose beetle (Coleoptera: Curculionidae) induced by lethal temperature and methyl bromide. *J. Econ. Entomol.* **84**(1): 198-201.

神奈川県病害虫防除所 (1997) 平成8年度病害虫発生予察特殊報 (第2号).

LOCKSHIN, R. A., R. SCHLICHTIG and J. BEAULATON (1977) Loss of enzymes in dying cells. *J. Insect Physiol.* **23**: 1117-1120.

真崎 誠 (1982) 侵入が警戒される重要甲虫類—ゾウムシ類を中心として—. *植物防疫* **36**: 299-304.

真崎 誠 (1987) 輸入検疫で捕捉したフラーバラゾウムシ, *Pantomorus cervinus* (BOHEMAN) の産卵数およ

- び卵期間について. 植防研報 23: 75-77.
- 真崎 誠・高橋 学 (1999) フラーパーラゾウムシ *Pantomorus cervinus* (BOHEMAN) の幼虫の飼育. 植防研報 35: 65-68.
- MILLER, L. F., M. S. MABEE, H. S. GREES and N. O. JANGAARD (1978) An ATP bioluminescence method for the quantification of viable yeast for fermenter pitching. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 36: 59-62.
- MORSE, J. G. and P. A. PHILLIPS (1987) Monitoring Fuller rose beetle populations in citrus groves and egg mass levels on fruit. *The pest control circular*. No. 547. Sunkist Growers Inc., Ontario, Calif.
- 坂下聖加子・岩沢篤郎・中村良子 (2002) ATP 拭き取り検査を用いた病院環境の清浄度評価. 機能水医療研究 3(2): 97-101.
- 食品と開発編集部 (2002) ATP ふきとり検査法の最新動向. 食品と開発. 37(1): 25-28.
- STREHLER, B. L. and J. R. TOTTER (1952) Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 40: 28-31.
- PRADET, A. and P. RAYMOND (1983) Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 199-224.
- YU, S. Q., E. J. TRIONE and T. M. CHING (1984) Biochemical determination of the viability of fungal spores and hyphae. *Mycologia* 76(4): 608-613.