

環動昆

報 文

- 宇賀昭二・シバKライ・胡 立志・マフーズ・ユースPダッ
ハラン：インドネシア国スンバワ島における土壌
媒介性線虫の再感染 ―アルペンダゾール投与後
6-7ヶ月後の調査― (英文) 225
- 駒形 修・本山直樹：各種市販および自家製木酢液・竹酢液
の変異原性..... 231
- Salah Uddin Siddiquee・中村寛志：除去法を用いた地表徘徊
性ゴミムシ類成虫の個体数推定 (英文) 239
- アーディーン・ガッサ・福井昌夫・佐久間正幸・西岡孝明・
高橋正三：対植食者防御の主要因としてヤムビー
ンに含まれるロテノイド類 (英文) 251
- Yuliati Indrayani・吉村 剛・藤井義久・築瀬佳之・岡久陽
子・今村祐嗣：関西地域および北陸地域における
アメリカカンザイシロアリの被害調査 (英文) 261

短 報

- 山崎一夫・杉浦真治：オオブタクサ茎の髓も摂食するワタミ
ヒゲナガゾウムシ*Araecerus fasciculatus* (DeGeer)
(Coleoptera: Anthribidae) の幼虫 (英文) 269

資 料

- 青柳正人：大阪府北部の住宅団地におけるチョウ類相..... 273
- 14回セミナー参加聴講記 285
- 書 評 287
- 会 報 288
- 投稿規定 297

Vol. 15

4

日本環境動物昆虫学会

2004

Reinfection by soil-transmitted helminths in Sumbawa Island, Indonesia six or seven months after albendazole therapy

Shoji Uga¹⁾, Shiba Kumar Rai²⁾, Hu Lizhi¹⁾, Machfudz³⁾ and Yoes Prijatna Dachlan³⁾

- 1) Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kobe University
School of Medicine, Kobe, Japan
- 2) Department of Microbiology, Nepal Medical College, Kathmandu, Nepal
- 3) Tropical Disease Center, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

(Received : February 27, 2004 ; Accepted : August 6, 2004)

インドネシア国スンバワ島における土壌媒介性線虫の再感染 — アルベンダゾール投与後6-7ヶ月後の調査 — 宇賀昭二¹⁾, シバ K ライ²⁾, 胡 立志¹⁾, マフーズ³⁾, ユース P ダッハラン³⁾ (¹⁾ 神戸大学医学部保健学科病態解析学講座, ²⁾ ネパール医科大学細菌学講座 (ネパール), ³⁾ アイルランガ大学熱帯病センター (インドネシア)

インドネシア国スンバワ島の3個所の村で、集団駆虫後の消化管寄生蠕虫類の再感染調査を実施した。この村は調査に先立つ6-7ヶ月前にアルベンダゾールによる集団駆虫が実施された村である。全部で199人から採便し、寄生虫検査を行った結果、31% (62人) から何らかの寄生虫が検出された。得られた寄生率に性差および年齢差は認められなかった。陽性率の最も高かったのは Utan 村の42%であり、次いで Labanka (39%), Penyaring の (16%) 順であった。検出された寄生虫は鞭虫 (*Trichuris trichiura*) が最優占種であり、次いで鉤虫 (hookworm) であった。

A post-treatment survey of intestinal helminth infection was conducted in three villages on Sumbawa Island, Indonesia in August 1997. A total of 199 subjects, who were given a dose of albendazole in December 1996 and/or January 1997, took part in this study by submitting fecal samples. The overall prevalence of infection was 31%, with no significant differences between males (32%) and females (30%), or between children (30%) and adults (over 15 years) (32%). The highest prevalence was seen in Utan village (42%) followed by Labanka village (39%) and Penyaring village (16%). *Trichuris trichiura* was the most common parasite detected, followed by hookworm, *Ascaris lumbricoides* and others. The mixed infection rate was very low (5%), as was the infection intensity.

Key Words: Reinfection, Survey, Intestinal parasite, Soil-transmitted helminth, Indonesia

Introduction

Intestinal parasitic infection is one of the major health problems in developing countries. It has been estimated to affect some 3.5 billion people globally, and 450 million are thought to be ill as a result of such infections, the majority being children (WHO, 2000). Infection rates in some areas in developing countries are close to one hundred percent (Imai *et al.*, 1985; Rai and Gurung, 1986) and have been attributed to poor hygiene and sanitary conditions, a lack of education, and poverty. Polyparasitic infections are also common in some areas (Widjana and Sutisna, 2000; Rai *et al.*, 2001). Of these, soil-transmitted helminths are predominant (Auer, 1990; Widjana and Sutisna, 2000).

Indonesia is a vast country in Southeast Asia comprised of numerous islands. As it is a developing country located in a tropical region, many tropical and infectious diseases are ranked in the "top ten" diseases of this country (Rai *et al.*, 1998). The reported prevalence of intestinal parasitosis varies considerably from one study to another (Stafford *et al.*, 1980; Bang *et al.*, 1996; Uga *et al.*, 2002). Soil contamination is common, even in and around big cities like Surabaya on Java Island (Uga *et al.*, 1995).

Sumbawa is a small rugged island with volcanic ridges and fertile green valleys. The present study was conducted in three villages on Sumbawa Island in August 1997 to evaluate the re-infection with helminth parasites of subjects who were given a dose of albendazole either in December 1996 or January 1997.

Materials and Methods

This follow-up study was conducted in August 1997 in three villages, Penyaring, Utan, and Labanka on Sumbawa Island, east of Bali. A total of

199 individuals took part in this study by submitting their fecal samples in clean, dry screw-capped plastic containers distributed earlier. Informed consent was obtained from all subjects. The age, sex, and area (village name) of each individual were noted. Fecal samples were labeled, fixed in 10 % formal-saline and transported to the laboratory of parasitology in the Tropical Disease Center (TDC) in Airlangga University, Surabaya (East Java). Parasite eggs were detected using the formalin-ether sedimentation technique, and fecal concentrates were examined microscopically. The findings were grouped according to age, sex, and location. Statistical analysis was conducted using the chi-square test.

Results

Of the 199 subjects in this study, 62 (31 %) had helminth parasites (**Table 1**). No differences were found between males (32 %) and females (30 %) ($P > 0.05$) or between children (30 %) and adults (over 15 years old) (32 %) ($P > 0.05$). The highest prevalence was seen in Utan village (42 %) followed by Labanka (39 %) and Penyaring (16 %). The prevalence rates between Utan and Penyaring, and between Labanka and Penyaring, were statistically different ($p > 0.05$), but those between Utan and Labanka were not ($p > 0.05$) (**Table 2**). *Trichuris trichiura* was the most common parasite detected, followed by hookworm, *Ascaris lumbricoides*, and others (**Table 3**). Only 5 % of the study population showed mixed infections. The infection intensity was found to be low (one to five parasite eggs/wet mount; 18×18 mm).

Discussion

Recently, we reported a low rate of intestinal parasitic infection (10 % by Kato-Katz, 31 % by AMS & 22 % by Sucrose floatation methods) in the

Table 1 Prevalence of intestinal parasitosis on Sumbawa Island, Indonesia

Category	No. of		Percent positive (%)	P value
	specimen	positive		
Sex	Male	103	33	> 0.05
	Female	96	29	
Age-group	Children	86	26	> 0.05
	Adults*	113	36	
Total		199	62	31

* Over 15 years of age.

Table 2 Prevalence of intestinal parasitosis in three different villages on Sumbawa Island, Indonesia

Village	No. of		Percent positive (%)
	sample	positive	
Penyaring	76	12	16*
Utan	62	26	42**
Labanka	61	24	39***
Total	199	62	31

*, **: P<0.005, *, ***, P<0.005, **, *** : P>0.05.

Table 3 Parasite species detected on Sumbawa Island, Indonesia

Parasite	No. of		Percent positive (%)
	samples	positive	
<i>Trichuris trichiura</i>	199	62	31
Hookworm	199	22	11
<i>Ascaris lumbricoides</i>	199	20	10
<i>Vampirolepis nana</i>	199	2	1
<i>Enterobius vermicularis</i>	199	2	1
Mixed infection*	199	9	5

* Two or more than two parasites.

capital city of Indonesia (Uga *et al.*, 2002). However, in a rural area on Bali that is close to the present study site, the infection rate was reported as being one hundred percent, with a mixed infection rate of over 90% (Widjana and Sutisna, 2000; Stafford *et al.*, 1980). A similar report was made on another area in Indonesia (Bang *et al.*, 1996), where

over 85% of the subjects were reported to be positive for parasites. In the present study, however, the helminth egg positive rate was low, as was the intensity. This appeared to be due to the health study program jointly conducted by TDC, Airlangga University and investigators from counterpart Japanese Universities and the consumption

of anti-parasitic drugs by locals (drugs were made available from local health posts called *Puskemas*). The infection rates in the villages varied from 16 % (Penyaring) to 42 % (Utan), but we were not able to clarify the reason for this. During the first survey conducted in December 1996 and/or January 1997, villagers were given a single dose of albendazole. A precise survey of helminth prevalence after the treatment was not conducted in the three villages. However, about 10 % of the people in Utan village were positive in the survey performed in February 1997 by the local government staff (personal communication). A single dose of albendazole, a drug belonging to the benzimidazole group, cannot eradicate *T. trichiura* infections completely. In some studies, a single dose of albendazole (400 mg) provided a cure rate of only 44 % (Hanjeet and Mathias, 1991). The need for repeat doses of albendazole, especially with moderate and severe *T. trichiura* infections, has also been reported (Hanjeet and Mathias, 1991). In any case, the present study suggested that about 6 to 32 % of the people were re-infected during the preceding six to seven months.

The most common parasite detected in this study was *T. trichiura*, followed by hookworm and others. This appeared to be due to the consumption of anti-helminthic drugs. These re-infections might also have occurred after consumption of the drug six to seven months earlier, as indicated by the presence of *A. lumbricoides* eggs. Recurrences in the incidence of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* infections, nearly reaching pre-treatment levels nine to ten months after mass treatment, have also been reported in Indonesia (Imai *et al.*, 1985) and India (Paul and Gnanamani, 1998). Many epidemiological studies on intestinal parasites in Indonesia that found both species of hookworm have been reported. However, the number of the studies that differentiated one

from the other is limited. Higgins *et al.* (1993) and Nurdia *et al.* (2001) carried out surveys in the Flores and Java Islands, respectively, and found only *Necator americanus*; *Ancylostoma duodenale* was not found. Sumbawa Island, where this survey was conducted, is located between these two islands, therefore, the hookworm we found in this survey might be *N. americanus*.

In neighboring Bali, two-thirds of the study population has reportedly been infected with mixed helminth species (Widjana and Sutisna, 2000; Stafford *et al.*, 1980). The low (5 %) rate of mixed infections seen in this study indicates the effectiveness of the anti-parasitic drug taken six to seven months earlier. In addition to the significantly reduced positive rate, the low intensity of the helminth infection in the present study was an important finding.

Geohelminths are known to cause various kinds of morbidity including physical and mental retardation (Rai *et al.*, 2000, 2001; Sakti *et al.*, 1999) as well as death (WHO, 2000). Although the present study showed a reduced incidence and low intensity of infection, indicating the positive effect of chemotherapy, an integrated control program targeted through schools (Bundy *et al.*, 1990) appears to be essential in controlling enteric parasitic infections on this island.

Acknowledgments

This work was supported by the JSPS (Japan Society for the Promotion of Sciences) large-scale cooperative study program.

References

- Auer, C. (1990) Health status of children living in a squatter area of Manila, Philippines, with particular emphasis on intestinal parasitosis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 21

- : 289-300.
- Bang, M. J., Purnomo, E. M. Andersen, and R. L. Anthony (1996) Intestinal parasites of humans in a highland of Irian Jaya, Indonesia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90 : 49-53.
- Bundy, D. A., M. S. Wong, L. L. Lewis, and J. Horton (1990) Control of geohelminths by delivery of targeted chemotherapy through school. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84 : 115-120.
- Hanjeet, K. and R. G. Mathias (1991) The efficacy of treatment with albendazole. *Acta Trop.* 50 : 111-114.
- Higgins, D. A., D. J. Jenkins, L. Kurniawan, Purnomo, S. Harun, and S. S. Juwono (1984) Human intestinal parasitism in three areas of Indonesia : a survey. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 : 637-648.
- Imai, J., O. Sakamoto, F. E. Munthe, and S. Sinulingga (1985) Survey for soil-transmitted helminths in Asahan Regency, North Sumatra, Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 16 : 441-446.
- Nurdia, D. S., Sumarni, S. Suyoko, M. Hakim, and A. Winkvist (2001) Impact of intestinal helminth infection on anemia and iron status during pregnancy : a community based study in Indonesia. *Southeast Asian J. trop. Med. Public Health* 32 : 14-22.
- Paul, I. and G. Gnanamani (1998) Re-infection estimation of soil-transmitted helminths among slum school children in Visakhapatnam, Andhra Pradesh. *J. Commun. Dis.* 30 : 245-249.
- Rai, S. K. and C. K. Gurung (1986) Intestinal parasitic infection in high school children of Birgunj city. *J. Inst. Med. (Nepal)* 8 : 33-38.
- Rai, S. K., T. Matsumura, K. Ono, Y. Oda, S. Uga, N. Rai, and H. G. Shrestha (2001) Intestinal parasitoses in an "unknown disease outbreak" hit rural hilly area in western Nepal. *Nepal Med. College J.* 2 : 61-64.
- Rai, S. K., M. Nakanishi, M. P. Upadhyay, K. Hirai, Y. Ohno, K. Ono, S. Uga, H. G. Shrestha, and T. Matsumura (2000) Effect of intestinal helminth infection on nutritional and beta-carotene status among rural Nepalese. *Nutr. Res.* 20 : 15-23.
- Rai, S. K., S. Uga, I. Tantular, Y. P. Dachlan, and R. Tjanderahasan (1998) Current situation of health problems in east Java, Indonesia. *J. Env. Control Tech.* 16 : 43-49.
- Sakti, H., C. Nokes, W. S. Hertanto, S. Hendratno, A. Hall, D. A. Bundy, and Satoto (1999) Evidence for an association between hookworm infection and cognitive function in Indonesian school children. *Trop. Med. Int. Health* 4 : 322-334.
- Stafford, E. E., M. Sudomo, S. Masri, and R. J. Brown (1980) Human Parasitosis in Bali, Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 11 : 319-323.
- Uga, S., D. Kimura, K. Kimura, and S. S. Margono (2002) Intestinal parasitic infection in Bekasi district, west Java, Indonesia and comparison of infection rates detected by different methods. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 33 : 462-467.
- Uga, S., K. Ono, N. Kataoka, S. Anni, T. Indah, P. D. Yoes, and I. G. Ranuh (1995) Contamination of soil with parasite eggs in Surabaya, Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26 : 730-734.
- WHO. World Health Report 2000 (2000) Conquering Suffering Enriching Humanity, Geneva.
- Widjana, D. P. and P. Sutisna (2000) Prevalence of soil-transmitted helminth infections in the rural population of Bali, Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31 : 454-459.

各種市販および自家製木酢液・竹酢液の変異原性

駒形 修¹⁾・本山 直樹

千葉大学園芸学部生態制御化学研究室

1) 現在国立感染症研究所)

(受領 : 2004年 5月 6日 ; 受理 : 2004年 9月 14日)

Mutagenicity of various commercial and home-made Pyrolygneous Acid products
Osamu Komagata¹⁾ and Naoki Motoyama (Laboratory of Pesticide Toxicology,
Faculty of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo-shi, Chiba 271-8510,
¹⁾Present Address: Department of Medical Entomology, National Institute of
Infectious Diseases, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan). *Jpn. J. Environ.
Entomol. Zool.* **15** : 231-238 (2004)

Attempts to evaluate the mutagenicity of twelve commercial and seven home-made pyrolygneous acid (PA) products employing the *umu* test were unsuccessful because of the presence of anti-bacterial components in the products, which inhibited the growth of *S. typhimurium*, the bacteria used for the test. When the assay was conducted with diluted solutions of three selected products in the range 1~10⁶ ppm, positive reactions were obtained in the presence of metabolic activator S-9 Mix, although the A₆₃₀ values obtained were too low to confirm their mutagenicity. However, when several PA products were subjected to the *umu* test after removal of the anti-bacterial components on Sep-pak tC18 column, they all showed a positive reaction for mutagenicity. The simple clean-up method employed in the present study appears useful for evaluations of mutagenicity of samples such as PA products that consist of multiple components.

Key words : Mutagenicity, Pyrolygneous acid, *umu* test, *S. typhimurium*, S-9 Mix

市販木酢液12種と自家製木酢液7種の各々の原液について *umu* 試験により変異原性を検定したが、木酢液の検定菌に対する抗菌活性のために評価ができなかった。そこで木酢液3種を選んで、検定菌に対する影響を軽減するために1~10⁶ ppmに希釈し同様に変異原性を検定した。検定菌への影響は減少し、S-9 Mix 処理条件下

で陽性反応を示したが、得られた吸光度は陽性対照と比較して低いレベルであり、変異原性は確認できなかった。一方、数種木酢液をSep-pak tC18カラムを用いて部分的に抗菌物質を除去した後で同様の検定を行った場合は、供試した木酢液全てがS-9 Mix 処理によって明確な変異原性陽性反応を示した。本研究で用いた部分精製方法は、木酢液のような混合成分からなる資材の変異原性を簡便に検定する方法として有用であると考えられる。

はじめに

木酢液・竹酢液（以下木酢液と称する）は木・竹炭生産時の副産物であり、病虫害防除目的で農薬代替資材として宣伝され販売されている（岸本, 1996; 農文協, 2004）。木酢液にはイエバエ（竹井・林, 1968）やヤマビル（千葉県衛生研究所, 1997）に対して忌避効果があるという報告や、数種カメムシ類（谷田貝, 2001）に対して殺虫活性があるという報告がある。

また木酢液は、有機農業ブームに伴ってすでに広く普及していることから、平成15年の農薬取締法改正に伴って新設された農薬登録を要しない特定農薬（特定防除資材）の候補としても注目を集めている（日本農業新聞, 2004）。

一方著者らは木酢液の薬効について、著しい害虫防除活性を示した資材には合成ピレスロイドのシベルメトリンが混入されていたことから（本山・Rahman, 2004; Rahman and Motoyama, 1998）、害虫防除効果があるという農家の体験談には、合成化学農薬が混入されていたいわゆる漢方農薬の場合と同様に（駒形・本山, 1998; 1999）、疑義が存在することを暗示した。さらに、実際に各種市販品および自家製木酢液を供試して、通常推奨されている数100倍希釈液ではなく、10倍希釈液という濃厚液を処理しても植物体上の数種植物病原菌に対して防除効果が認められず、数種害虫に対しても10倍希釈液～原液を処理しても防除効果が認められないこと（駒形・本山, 2004a; 2004b）を確認した。従って、木酢液の農薬代替資材としての実用効果には疑問がある。

また、木酢液を農薬代替資材として使用する場合の安全性については、科学的な知見がほとんど見当たらない。

木酢液、木タールには200を超える成分が含まれているとされており、それらの成分は、有機酸、フェノール類、カルボニル、アルコール、その他中性成分、塩基等に分類できる（木材工業ハンドブック編集委員会, 1982年）。

梅津（2003）はこれらの成分中に、多数の変異原性、刺激性、生殖毒性、発ガン性をもつものがあることを指摘している。

著者らは上述した研究（駒形・本山, 2004a）において、各種木・竹酢液市販品および炭焼き窯から直接採取した木酢原液について主要成分の分析を行った結果、梅津（2003）が指摘した有害物質も含まれていることを確認した。ただし、市販の木酢液の品質にはばらつきがあり、成分によっては10倍以上の差が見られた。

各成分の単体での毒性については既に多くの情報があり、例えば発ガン性に関していえばIARC（International Agency for Research on Cancer）のような国際機関で発ガン性の評価がなされている。しかし、木酢液については混合物であるということの他に品質のばらつきもあり、また世界的に見て主要な資材とはいえないため、従来マウスに対する急性毒性（池田ら, 1964）以外、毒性評価の対象にはされてこなかった。

本論文では、前報（駒形・本山, 2004a; 2004b）で用いたのと同じ木酢液市販品、および炭焼き窯から直接採取した木酢原液について、毒性評価の一つとして変異原性試験である *umu* 試験を行っ

た結果を報告する。

材料と方法

1. 供試木酢液

供試した木酢液を表1に示した。これらの木酢液・竹酢液の主要成分と抗菌活性ならびに殺虫活性と水生生物に対する影響については前報(駒形・本山, 2004a; 2004b)に記載した通りである。

2. 試薬類

umu 試験は株式会社日本抗体研究所の試験キット、ウムラック[®]を用いた。検定菌 (*S. typhimurium*)、培養液、S-9 Mix、陽性対照物質 (Furylfuramide と 2-Aminoanthracene)、発色基質、停止液はキットに付属のものを使用した。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

3. 木酢液の部分精製

一部の木酢液 (C, F, G, H, M7) について固相抽出を行った。供試木酢液の pH は 2.6~4.7 の範

囲だったので (駒形・本山, 2004a)、固相カラムは Waters 社の Sep-pak tC18 (1g) を用いた。固相カラムはアセトン 10ml を通液した後、蒸留水 10ml を通液しコンディショニングを行った。その後、検体である木酢液の原液若しくは対照である蒸留水を 100ml 通液した。その後、蒸留水 50ml を通液してカラムを洗浄した後、約 10 分間空気を吸引して乾燥させ、アセトン 10ml で吸着物を溶出した。抽出液は 40℃ 以下の湯浴で保温しながら窒素気流下でアセトンを乾固させて 1ml のジメチルスルホキシド (DMSO) を加えて濃縮物を溶解させた後に、蒸留水を加えて 10ml とした。本液 (原液の 10 倍濃縮相当濃度) および更に蒸留水を用いて 10 倍 (原液相当濃度)、100 倍希釈した液 (原液の 10 倍希釈相当濃度) を精製検体とした。なお、通液速度は各液とも約 1 ml/min であった。

4. 変異原性試験 (*umu* 試験)

木酢液の変異原性を *umu* 試験で検定した。検

表1 供試木酢液

Group	Product Code	Trade Name	Manufacturer, Dealer, or Temperature at which product was collected
Commercial Product	A	Joryu-Mokusakueki	Keiyu Co. Ltd. (Made in Malaysia)
	B	Joryu Seisei Binchotan-Mokusakueki	Apurotto Co. Ltd.
	C	Joryu Chikusaku Geneki	Kamimura Seitohjo Co, Ltd. (Made in China)
	D	Tokusan Chikusakueki	Apurotto Co. Ltd.
	E	Mokusaku Geneki	Yoki Sangyo Co. Ltd.
	F	Shikoku Konpirasama Fumotosan Chikusakueki	Shikoku Tekuno Inc.
	G	Junsei Mokusakueki	Wako Mokuzai Co. Ltd.
	H	Mokuchikusakueki	Made in Otaki, Chiba Prefecture
Commercial Diluted Product	I	Yomogi Sakueki	Airisu Oyama Co. Ltd.
	J	300-fold Diluted Mokusakueki	Takuto Co. Ltd.
	K	Shokubutsu Mokusaku Ikiiki-spray	Shimada Shoji Co. Ltd.
	L	Shokubutsu Chikusaku Ikiiki-spray	Shimada Shoji Co. Ltd.
Home-made Product	M1		(Temperature) 84 °C
	M2		82 °C
	M3		86 °C
	M4		97 °C
	M5		122 °C
	M6		186 °C
	M7		200 °C

定はキットに添付されているマニュアルに従って以下の手順で行った。冷凍されている検定菌 (*S. typhimurium*) 用培養液を室温に戻し、1 mlを菌凍結乾燥品に入れ、静かに攪拌し、室温で10分間静置した後、37°Cで3時間静置培養した。代謝活性化試験用のS-9 Mixは、凍結乾燥品に蒸留水1 mlを入れ、よく攪拌した。検体である木酢液は、実験1では原液を、実験2では公比10の蒸留水希釈液 ($1 \sim 10^5$ ppm) を、実験3では前述した方法で部分精製した木酢液を試料として96穴マイクロタイタープレートの各ウェルにそれぞれ10 μ lずつ分注した。またS-9 Mixによる代謝活性化を必要としない陽性対照物質として、キットに同包のFurylfuramideを、代謝活性化を必要とする陽性対照物質として同じくキットに同包されている2-Aminoanthraceneを各々DMSOに溶解させた後、蒸留水で希釈し、木酢液と同様に10 μ lずつ分注した。調製した菌液を代謝活性化を必要としないウェルに100 μ lずつ分注した。残りの菌液には、その10%に相当する量のS-9 Mixを加え、代謝活性化を必要とするウェルに100 μ lずつ分注し、プレートを37°C、遮光の条件下で2時間培養した。37°Cに予熱しておいた発色基質を全ウェルに100 μ lずつ分注し、37°Cで1時間インキュベーションした後、反応停止液を全ウェルに100 μ lずつ分注した。3分後、色調が安定した後、マイクロプレートリーダー (Elx808, Bio-Tek Inst.) を用いて、発色度合いを波長630nmの吸光度 (A_{630}) で測定した。吸光度は各々に該当する対照ウェルの吸光度を引くことにより補正した。なお、Sep-pak tC18カラムで部分精製した木酢液の対照ウェルには、蒸留水100 mlをカラムに通液して同様に処理したサンプルを用いた。

結果と考察

陽性対照の濃度-発色 (A_{630}) 曲線は図1に示した。

実験1：原液に対する試験

各種木酢液の原液を用いたumu試験の結果は

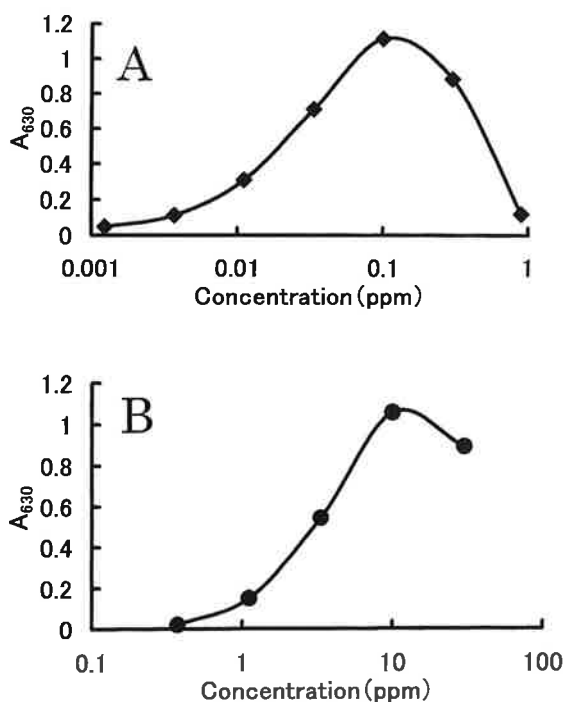


図1 変異原性試験における陽性対照の濃度-発色程度 (A_{630}) 曲線。A: Furylfuramide (S-9 Mix 非処理), B: 2-Aminoanthracene (S-9 Mix 処理)

表2に示した、希釈品 (I~L) とS-9 Mix非処理下での木酢液Cを除いた市販木酢液、自家製木酢液はともに吸光度が負の値となった。これはumu試験で用いた検定菌*S. typhimurium*の生育が阻害されたことを示している。なお、ここで供試した木酢液の多くは、前報(駒形・本山, 2004a)で述べたごとく、原液に近い濃度ではPS培地上の灰色かび病に対して抗菌活性を示したということ、また木酢液からは酢酸やホルムアルデヒドなどが検出されていることから、検定菌に対する生育阻害は当然予想されることである。希釈品 (I~L) の場合は酢酸をはじめとする成分濃度が著しく低いために生育阻害が起らなかったであろう。しかし、これらについても吸光度は低く、陽性対照の最小検出濃度程度もしくはそれ以下(図1)であった。なお、S-9 Mix存在下での木

表2 *umu* 試験で検定した各種木酢液の S-9 Mix 処理および非処理下における変異原性

Product Code	Concentration Tested	Mutagenicity (A ₆₃₀)					
		without S-9 Mix			With S-9 Mix		
		Rep. 1	2	X	Rep. 1	2	X
A	Original Solution	-0.376	-0.364	-0.370	-0.392	-0.410	-0.401
B	ibid.	-0.372	0.326	-0.023	-0.471	-0.503	-0.487
C	ibid.	N.D.	N.D.	N.D.	-0.442	-0.493	-0.468
D	ibid.	-0.381	-0.381	-0.381	-0.441	-0.453	-0.447
E	ibid.	-0.358	-0.373	-0.366	-0.436	-0.478	-0.457
F	ibid.	-0.353	-0.364	-0.359	-0.502	-0.506	-0.504
G	ibid.	-0.385	-0.385	-0.385	-0.476	-0.486	-0.481
H	ibid.	-0.369	-0.379	-0.374	-0.474	-0.499	-0.487
I	ibid.	0.039	0.045	0.042	0.110	0.096	0.103
J	ibid.	0.080	0.085	0.083	0.221	0.098	0.160
K	ibid.	0.030	0.073	0.052	-0.433	-0.478	-0.456
L	ibid.	0.016	0.077	0.047	-0.452	-0.471	-0.462
M1	ibid.	-0.377	-0.372	-0.375	-0.512	-0.514	-0.513
M2	ibid.	-0.437	-0.437	-0.437	-0.493	-0.493	-0.493
M3	ibid.	-0.390	-0.386	-0.388	-0.522	-0.517	-0.520
M4	ibid.	-0.375	-0.379	-0.377	-0.480	-0.485	-0.483
M5	ibid.	-0.387	-0.379	-0.383	-0.496	-0.488	-0.492
M6	ibid.	-0.378	-0.384	-0.381	-0.471	-0.492	-0.482
M7	ibid.	-0.391	-0.395	-0.393	-0.517	-0.512	-0.515

N. D.: No data due to experimental error

酢液Cについては操作上のミスにより信頼できるデータが得られなかったが、後述する実験（実験2, 図2）において木酢液CはS-9 Mix非処理下では菌の生育阻害を示すことが確認されている。

実験2：希釈液に対する試験

総合的に成分濃度が濃いと思われる（駒形・本山, 2004a）木酢液3種類すなわちC, G, Hについて、検定菌に対する抗菌作用の影響を減ずるために希釈液を作成しS-9 Mix処理および非処理下で検定を行った。S-9 Mix非処理下では、いずれの木酢液でも最高濃度である10⁵ppm（すなわち原液の10倍希釈液）では、検定菌に対する生育阻害が見られた（図2）。しかし、S-9 Mix処理下では生育阻害が見られないことから、生育阻害にはS-9 Mixに含まれる酵素系によって分解される基質が関与するものと推察される。しかし、得ら

れた発色程度（A₆₃₀値）は陽性対象の検量線の値と比較して著しく低く、変異原性陽性であると判断するのは困難であった。

実験3：部分精製した木酢液に対する試験

前報（駒形・本山, 2004a）で報告したごとく、今回供試した木酢液から検出された成分の中には、明らかに変異原性を示すと思われる成分が含まれている。しかし、実験1, 実験2において結果が陰性となった理由は2つ推察される。一つは変異原性を示す物質の濃度が低いため、もう一つは木酢液に抗菌活性があるためである。

*umu*試験では、変異原性の検定菌に*S. typhimurium*を用いるために、抗菌作用の高い化学物質では陰性になりやすい。通常、変異原性の試験では、水溶解度等の物理化学的条件が許す限り、最高濃度で試験を行うことになっている。しかし、濃度

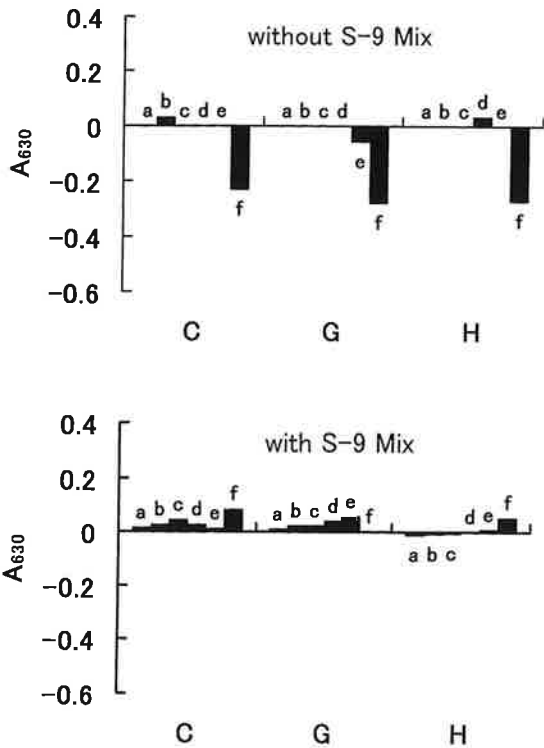


図2 S-9 Mix 処理および非処理下における木酢液 C, G, H 希釈液の変異原性 (供試濃度) a: 1 ppm, b: 10 ppm, c: 10² ppm, d: 10³ ppm, e: 10⁴ ppm, f: 10⁵ ppm.

が高くなれば生育阻害の起こる確率も高くなる。特に木酢液の場合はすでに言及したごとく多くの成分が含まれているため(木材工業ハンドブック編集委員会, 1982), 変異原性のある物質が含まれていても, 抗菌活性のある物質が共存していれば見かけ上陰性反応を示す可能性もある。

そこで木酢液 5 種, すなわち C, F, G, H, M7 について固相カラムを用いてカラムに吸着されない抗菌活性物質をある程度除去した試料について同様に変異原性試験を行ったところ, S-9 Mix 処理下で全ての供試木酢液は正の吸光度を示し, 陽性反応が得られた (図3)。

今回の部分精製では, 固相カラムを通すことによって木酢液に含まれていた酢酸, アルコール類等の試験系を妨害する抗菌物質は除かれているこ

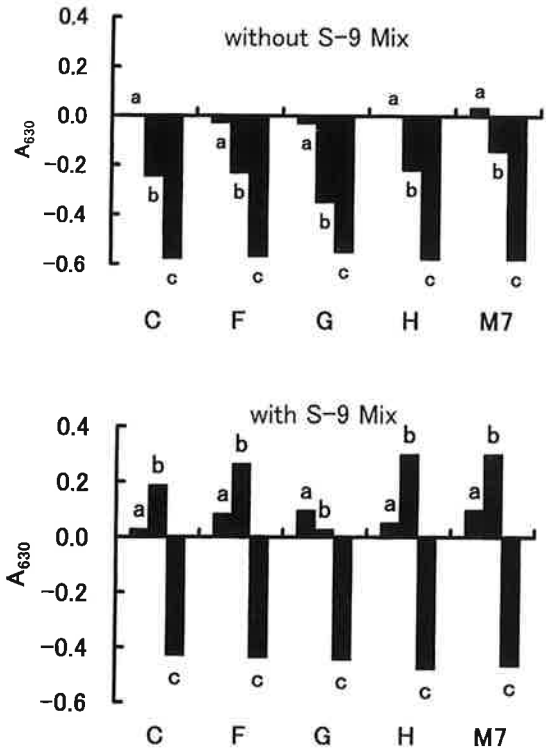


図3 部分精製した木酢液 C, F, G, H, M7 の S-9 Mix 処理および非処理下における変異原性 (供試濃度) a: 10 倍希釈液相当, b: 原液相当, c: 10 倍濃縮液相当

とが推察されるが, 木酢液に含まれる成分は多いため個々の成分の回収率については未検討である。さらに本研究では逆相系のカラムを用いているため, 木酢液に含まれているアルコール類等の濃度によっては他の成分の回収率が変化することも推察される。このように本研究では必ずしも変異原性物質を精製する為の条件が最適化されているわけではないにも関わらず, 部分精製した木酢液は全て S-9 Mix 処理によって吸光度が正となり, 検量線と比較して, 変異原性を有することを強く示唆した。

一方, 木酢液の種類によって陽性反応を示した濃度が異なることは興味深い。例えば, 木酢液 C, F, H, M7 は原液相当濃度で最も高い陽性反応を示したが, 木酢液 G は原液の 10 倍希釈液相当濃度

でもっとも高い陽性反応を示した。しかし、いずれの木酢液も原液の10倍濃縮液相当濃度では、明確に検定菌に対して生育阻害を示した。従って陽性反応を示した場合も、検定菌に対する生育阻害とのバランスの値に過ぎず、実際の変異原性はもっと強い可能性も考えられる。

試験方法について

一般に、植物抽出液と呼ばれる資材は、構造不明の多くの成分を含む。そのような資材に対しては、農薬等の単成分から成る化学物質の変異原性の試験方法をそのまま適用することは、必ずしも適切ではない。含有成分ごとの変異原性を検定することが望ましいが、木酢液の場合は成分そのものが不明なことに加えて、含まれる成分の種類が著しく多いために、それらの全てについて検定するのはコスト的に困難を伴う。本研究で採用した固相カラムを用いた部分精製の方法は、抗菌物質を含む混合成分から成る資材の変異原性を検定する上で、簡便かつ有用なひとつの方法と考えられる。

また、本研究で供試した5つの木酢液全てから変異原性陽性の反応が検出されたということは、木酢液を特定農薬の候補資材として考えるにあたっては、長期的摂取に伴う安全性に関して慎重な検討が必要なことを示唆するものである。

木酢液の濃度を変えた至適検定条件下における変異原性の評価、ならびに変異原性物質の単離・同定は今後の検討課題である。なお、木酢液の変異原性については、最近中島ら(2003)がAmes試験を用いて一部の木酢液から変異原性陽性の結果が得られたことを報告している。

引用文献

- 千葉県衛生研究所(1997)「ヤマビル of 生態と防除に関する調査報告書」, pp. 31-41.
- 現代農業(2004)「減農薬の宝物ー木酢・竹酢・モミ酢ーとことん活用読本」, 2004年4月号(別冊), 農文協.
- 池田良雄, 大森 仁, 加藤隆一, 高仲 正(1964) 昭和39年度特別研究推進調整費「木酢液利用に関する特別研究報告書」(昭和41年3月), pp. 65-80, 科学技術庁研究調整局.
- 岸本定吉(監修)(2004)「木酢・炭で減農薬ー使い方とつくり方」, 農文協.
- 駒形 修, 本山直樹(1998)有機農業用資材「ニュームシギエ」の殺虫活性と有効成分. 千葉大園学報 52:13-16.
- 駒形 修, 本山直樹(1999)有機農業用資材「健康源・地」の除草活性と有効成分. 千葉大園学報 53:15-18.
- 駒形 修, 本山直樹(2004a)各種市販および自家製木酢液・竹酢液の主要成分と抗菌活性. 環動昆 15(2):83-94.
- 駒形 修, 本山直樹(2004b)各種市販および自家製木酢液・竹酢液の殺虫活性と水生生物に対する影響. 環動昆 15(2):95-105.
- 木材工業ハンドブック編集委員会(1982)「木材工業ハンドブック」. pp. 904-908, 丸善株式会社.
- 本山直樹, G. K. M. Mustfizur Rahman(2004)日本農薬学会第26回大会(神戸)講演要旨集, p. 90.
- 中島大介, 影山志保, 後藤純雄, 柴野一則, 吉澤秀治(2003)木炭抽出物及び木酢液の変異原性について. 日本環境変異原学会第32回大会プログラム/要旨集, p. 109.
- 日本農業新聞(2004)特定農薬を拡大, 2004年2月7日.
- Rahman, G. K. M. M. and N. Motoyama(1998) A synthetic pyrethroid found as the active ingredient of "Nurse Green", a so-called natural-plant extract-formulation used for organic agriculture. *Tech. Bull. Hort. Chiba Univ.* 52: 7-12.
- 竹井 誠・林 晃史(1968)ハエ並びにナメクジに対する木酢液の効果について. 衛生動物 19(4):252-257.

梅津憲治 (2003) 「農薬と食」, pp. 99-116, ソフトサイエンス社, 東京.

谷田貝光克 (2001) 木酢液規格作成と木酢液によ

る農業害虫等の防除. *New Food Industry* 43 (6):4-8.

Estimating the adult population size of ground beetles (Carabidae) using the removal method

Salah Uddin Siddiquee and Hiroshi Nakamura

Faculty of Agriculture, Shinshu University, Minamiminowa 8304, Nagano 399-4598, Japan

(Received : May 26, 2004 ; Accepted : August 5, 2004)

除去法を用いた地表徘徊性ゴミムシ類成虫の個体数推定 Salah Uddin Siddiquee・
中村寛志 (信州大学農学部)

長野県にある信州大学農学部構内の森林内とその近くの野菜畑において、除去法を用いた地表徘徊性ゴミムシ類成虫の個体数推定を行った。プラスチック製の境界で区切られた40m²の区画に、乳酸飲料を入れた15個のプラスチック・トラップをセットし、10日間毎日ゴミムシを回収した。調査は森林では2002年の9月末、野菜畑では2003年の10月初めに行われた。森林での優占3種は*Synuchus cycloderus*, *Pterostichus subovatus*, *Synuchus nitidus*で、野菜畑では*Harpalus griseus*, *Harpalus sinicus*, *Amara simplicidens*であった。全ゴミムシ類と優占3種の個体数およびm²当たりの密度は、いくつかある除去法の中で回帰法と最尤法を用いて行われた。森林内では合計250個体のゴミムシ類が捕獲され、回帰法による推定値は254個体であった。また野菜畑では176個体の採集で、推定値は180個体であった。最尤法による推定値は回帰法とほぼ同じ値で、10回の実際の採集個体数と推定値がほぼ等しかった。またある時点の捕獲個体数とその時点までの累積捕獲個体数の相関係数は-0.9以下であり、推定精度も0.12以下の値であった。ゴミムシ類の個体数推定に応用する上での除去法の前記条件や捕獲回数と推定精度の関係が議論された。

Adult population sizes of ground beetles (Carabidae) in a forest and vegetable field in Nagano Prefecture, Japan were estimated using the removal method. Removal collections using 15 pitfall traps with a lactic acid beverage were conducted at 40-m² survey sites enclosed by a thick plastic sheet for 10 days in September 2002 in the forest site and October 2003 in the field site. Dominant species were *Synuchus cycloderus*, *Pterostichus subovatus* and *S. nitidus* in the forest, and *Harpalus griseus*, *H. sinicus* and *Amara simplicidens* in the field. Population sizes within the 40-m² sites and the density (/m²) of total carabid beetles and dominant species were estimated by the regression

and maximum likelihood methods. A total of 250 and 176 carabid beetles were caught in the forest and field sites, and estimates by the regression method were 254 and 180 individuals, respectively. Estimates of dominant species and total carabid beetles by the maximum likelihood method were almost equal to those obtained by the regression method. The observed numbers caught from 10 trappings were almost the same as the estimated values. The correlation coefficients between the number of individuals captured during the *i*th trapping and the total number captured prior to the *i*th trapping were less than -0.9 , and the precision level of the estimations was less than 0.12 . The prerequisite for the removal method and appropriate number of trappings required for estimating carabid population size were discussed in relation to the precision level of the estimations.

Key words: Ground beetle (Carabidae), population estimation, removal method, regression method, maximum likelihood method, pitfall trap

Introduction

Because of their diversity, ground beetles (Carabidae) have been studied from taxonomical, biogeological and evolutionary viewpoints, and recently, their role as potential predators in agroecosystems has been explored. The species composition, seasonal activity and spatial distribution of ground beetles have been studied globally (Yano *et al.*, 1995), and in Japan, important work in paddy fields (Habu and Sadanaga, 1970; Yahiro *et al.*, 1992), and a series of ground beetle studies have been conducted in various agroecosystems (Ishitani and Yano, 1994; Ishitani *et al.*, 1994). It has been established that ground beetles could be used as a biological control in pest management (Holland, 2002), and furthermore, with regards to environmental evaluation, some researches hope to develop ground beetles into a bio-indicator (Ishii *et al.*, 1996; Ishitani, 1996; Villa-Castillo and Wagner, 2002).

To study the ecology of ground beetles and establish them as a predator or bio-indicator, much attention needs to be paid to population estimations in different habitats and seasons. However, population

numbers per unit area have yet to be clearly reported, though the spatial distributions and seasonal activity of ground beetles represented by the number of insects collected per trap in various habitats have been previously analyzed (Ishitani *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2002).

Many methods for estimating the population sizes of animals and insects have been presented. Mark and recapture methods have been mainly used to estimate the population sizes of insects because birth, death and migration occur during their short life spans. The removal method, another population estimation method, has been applied to estimates of the stable population size of rats (Leslie and Davis, 1939) and fish (DeLury, 1951), and involves a series of trapping or collecting without replacement. Inoda and Tsuzuki (2000) tried to estimate population sizes of two *Cybister* species using the removal method.

There are three different approaches to analyzing removal trapping data. In this study we tried to estimate the population density ($/m^2$) of adult ground beetles at two different habitats in Nagano Prefecture, Japan, using the removal method, and

then compared the estimates of three approaches.

Materials and Methods

1. Study sites

Two sites in Minamiminowa Village, Nagano Prefecture were selected to estimate the population size of carabid beetles using the removal method. One site was a small area of experimental forest in the Faculty of Agriculture Campus, Shinshu University (Site 1) dominated by Japanese larch, *Larix leptolepis* Gord., Japanese cypress, *Chamaecyparis obtuse* Endl., and some broadleaf trees. A playing field is located in the northern part of Site 1. The other site (Site 2) was located in a vegetable field on the eastern side of the campus (Fig. 1). Tomatoes, eggplants, beans and potatoes were the main crops of this plot.

Field surveys using pitfall traps were conducted in Sites 1 and 2 from September 20 to 29, 2002 and September 30 to October 9, 2003, respectively. Fifteen trap stations spaced 2 m apart lengthwise

and 1 m apart widthwise were set in 40-m² areas (10 × 4 m) in both sites (Fig. 2). The survey areas were enclosed by thick plastic sheets 30 cm high above the ground and buried to a depth of 10 cm to protect against invasion of carabid beetles from the outside as well as escape from within.

The prerequisite for this method is that the population must remain stable during the trapping period, that is, there must be no significant natality, mortality or migration (Southwood, 1978). In this study, the adult carabid beetles could not enter or leave the site as a result of the plastic sheet boundary, because these beetles are almost unable to fly. As the surveys were conducted for only 10 days in autumn, the prerequisite mentioned above could be satisfied, even if new emergence and death occurred slightly.

Transparent plastic cups 13.5 cm deep and with an upper and lower diameter of 9 and 6 cm, respectively, were used as traps. Plastic covers were placed 10 cm above the traps to protect them from rainfall

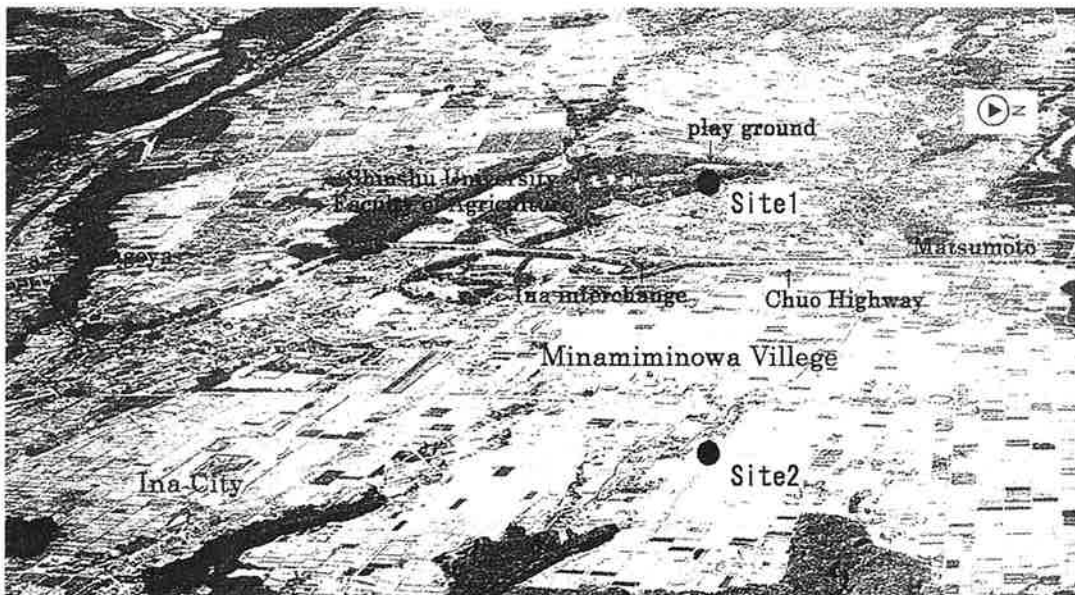


Fig. 1 Map of 2 survey sites in Minamiminowa Village.

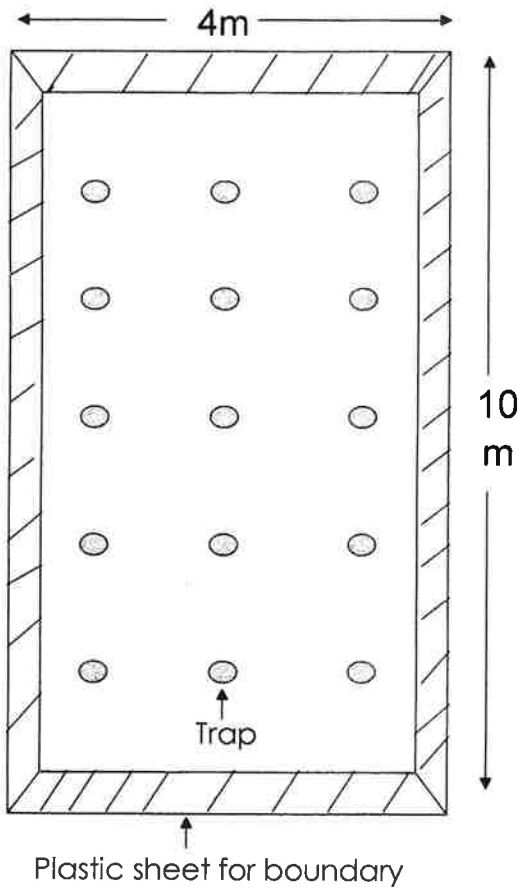


Fig. 2 Arrangement of traps in Site 1 and Site 2

and falling leaves. Inside the traps, lactic acid beverage (Culpis™, Culpis Co., Ltd., Tokyo) was used as bait. Beetle collections were made once a day for ten days incessantly at both sites.

2. Estimation methods using the removal collection data

There are several different approaches for analyzing removal trapping data. In this study we used the regression method (Leslie and Davis, 1939; DeLury, 1947, 1951) and maximum likelihood method (Moran, 1951; Zippin, 1956) to estimate the numbers of the three dominant carabid species and total number of carabid beetles within the 40-m² sites in the two distinguishable habitats. The density per one

m² and variance were also estimated.

Regression method: The following liner relation is expected under random trapping:

$$C_i = b (N - T_i)$$

where C_i , T_i and N are the number of insects captured during the i th trapping, the total number captured prior to the i th trapping, and the population size, respectively, and b is a constant. As N is equal to T_i at $C_i = 0$, the population size is then estimated as:

$$\hat{N} = \bar{T} + \frac{\bar{C}}{b} \quad b = - \frac{\sum_i T_i C_i - s \bar{T} \bar{C}}{\sum_i T_i^2 - s \bar{T}^2}$$

where \bar{T} and \bar{C} are the mean values of C_i and T_i , respectively, and s is the number of trappings. The variance of this estimate (\hat{N}) is calculated as:

$$v(\hat{N}) = \frac{\hat{\sigma}^2}{b^2} \left\{ \frac{1}{s} + \frac{(\hat{N} - \bar{T})^2}{\sum_i T_i^2 - s \bar{T}^2} \right\} \dots (1)$$

Maximum likelihood method: With random trapping, the probability of capturing C_i insects during the i th trapping, given that T_i insects were previously captured is:

$$P(C_i / T_i) = \binom{N - T_i}{C_i} p^{C_i} q^{N - T_i - C_i}$$

where $p = 1 - q$ is the probability of capturing during a single trapping. Based on the maximum likelihood of the joint probability of the catch samples in s trappings, Zippin (1956) showed that population size (N) and variance can be estimated as follows:

$$\hat{N} = \frac{\bar{T}}{(1 - \hat{q}^s)}$$

$$v(\hat{N}) = \frac{\hat{N}(1 - \hat{q}^s) \hat{q}^s}{(1 - \hat{q}^s)^2 - (\hat{p}s)^2 \hat{q}^{s-1}}$$

The estimates of $1 - q^s$ and p are given in Zippin (1956).

As the area of the survey sites in this study is 40 m², the estimates of density (m) per m² and