

環動昆

原 著

孫立倉・田代 亨・本山直樹：土壤活性剤とラベル表示された
ニームオイル製剤の殺虫活性と有効成分 1

孫立倉・田代 亨・本山直樹：有機資材カメガード®のラットと
マウスに対する忌避活性 9

木村悟朗・井上栄壮・平林公男：信濃川中流域における河道
掘削後のトビケラ類個体密度と種組成の変化（英文） 17

短 報

大庭伸也・ベレズグッドウィン パブロ：越冬前に卵塊を
保護するオオコオイムシ *Appasus major Esaki*
（カメムシ目：コオイムシ科）のオスの新成虫（英文） 27

松良俊明：ダンゴムシの摂食活動が植物生産に与える正の効果 31

森田哲夫・進村美穂・土屋公幸・湊 秋作：飼育下のニホンヤマネ
Glirulus japonicus で見られる脱毛現象（英文） 35

会 報 39

会 則 40

投稿規定 42

Vol. 20

1

2009

日本環境動物昆虫学会



JSEEZ

日本環境動物昆虫学会

土壌活性剤とラベル表示されたニームオイル製剤の殺虫活性と有効成分

孫立倉・田代 亨・本山直樹¹⁾

千葉大学大学院園芸学研究科

1) 現在 東京農業大学総合研究所

(受領 2008年10月26日；受理 2009年1月21日)

Insecticidal activity and the active components of formulations of neem oil labeled as soil activator. Lincang Sun, T. Tashiro and Naoki Motoyama¹⁾, Chiba University, Graduate School of Horticulture, 648 Matsudo, Matsudo-shi, Chiba-ken 271-8510, Japan. ¹⁾Present Address: Tokyo University of Agriculture, Nodai, Research Institute, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan.

Abstract

Insecticidal activity and fish toxicity of 8 neem (*Azadirachta indica*) oil formulations labeled as soil activator were examined and their active components identified. Radish seedlings pre-dipped in a diluted solution of neem oil exhibited extremely high insecticidal activity against diamond back moth larvae, LC50 being 6,665-fold dilution. Neem oil was also highly toxic to Medaka fish, LC50 after 24hr exposure being 72,890-fold dilution. Azadirachtin concentration in the formulation was estimated by HPLC analysis as 494-1,720ppm (average 864). Piperonylbutoxide (PBO), an insecticide synergist, was detected by GCMS in the range of 6,500-8,800ppm (average 8,075). HPLC analysis detected abamectin in the range of 900-2,200ppm (average 1,700). These results suggest that the high insecticidal activity of neem oil formulations was the result of adding abamectin. It was conjectured that PBO is added as a synergist for the insecticide.

土壌活性剤とラベル表示されたニームオイル製剤8本の殺虫活性と魚毒性、ならびに有効成分の検討を行った。カイワレ大根の芽出しをニームオイル希釈液に浸漬してコナガ幼虫に与えたところ、著しく高い殺虫活性を示し、LC50は6,665倍希釈液であった。メダカに対しても著しく高い魚毒性を示し、24hr曝露のLC50は72,890倍希釈液であった。これらの資材に含まれるアザジラクチン濃度は、HPLC分析により494-1,720ppm(平均864ppm)と推定された。GCMS分析では殺虫協力剤のピペロニルブトキシド(PBO)が6,500-8,800ppm(平均8,075ppm)検出された。HPLC分析ではアバメクチンが900-2,200ppm(平均1,700ppm)検出された。本資材の高い殺虫活性は混入されているアバメクチンによると推察された。PBOは殺虫協力剤として添加された可能性がある。

はじめに

日本では2007年に有機農業推進法が制定されたのに伴い、農薬代替資材として植物起源や微生物起源などのいわゆる自然農薬への依存度が増大している。ニーム油はインドセンダン *Azadirachta indica* という樹木の種子より抽出された精油成分で、その中に主成分としてアザジラクチンを含み、伝統的に昆虫に対する忌避、摂食阻害、発育阻害、殺虫活性などが認められている(例えばPrakash and Rao, 1997; Nazir *et al.*, 2007)。一般にニーム油は高等動物には無害であると考えられ、残留性も低

いことから次世代農薬の有力候補として注目されている(中川ら, 2006)。しかし、ニーム油には有益性だけでなく、哺乳動物の雄の精子数を減少させるという危険性も知られている(Parveen *et al.*, 1993; Aldakatti *et al.*, 2001; Boeke *et al.*, 2004)。

ニームを原料にした各種資材は、有機・減農薬栽培において農薬代替資材として使われているが、2008年1月には鹿児島県東串良町、鹿屋市、肝付町の施設園芸農家で作る東串良町園芸振興会で出荷したカラーピーマンとキュウリから農薬登録のない殺虫協力剤ピペロニルブトキシドが検出されるという事件があり、出荷停止・回

収という事態になった。調査の結果、複数の生産者が土壌改良剤として販売されていた同じニームオイル製剤（製造元は佐賀県のA社）を購入・使用していたことが判明し、ニームオイルにピペロニルブトキシドが混入されていたのではないかと疑われた（南日本新聞、2008）。当研究室には、当該ニームオイル製剤はアザミウマ類に対して即効的な殺虫効果を示したという情報と、当該生産者が実際に使用していた使い残しのニームオイル製剤8本が持ち込まれた。そこで本研究では、これらの資材の殺虫活性の検定と魚毒性の検定ならびに有効成分の分析を行った。

材料および方法

1. 供試ニームオイル製剤

佐賀県のA社が製造元で、ラベルに土壌活性剤ニームオイルと表示されている1ℓ容器に入ったものを8本入手して使用した。これらはいずれも鹿児島県東串良町園芸振興会が生産農家から回収したものである。

2. コナガ幼虫に対する殺虫活性の検定

日産株式会社生物科学研究所から入手した薬剤感受性系統のコナガ *Plutella xylostella* L. を 25℃の恒温室内で自然採光下でカイワレダイコンの芽出しを餌として飼育した。検定には3齢の幼虫を用いた。8本（NO.1～NO.8）のニームオイル試料を井戸水で2,000倍、4,000倍、8,000倍希釈し、カイワレ大根の芽出し8本を束ねて10sec間浸漬した。カイワレ大根は乾燥を防ぐために根部を水を含んだキムワイプで包み、その上からさらにアルミホイルで包んだ。アイスクリームカップ（底直径9cm x 高さ6cm）の底にろ紙を敷き、薬液に浸漬処理したカイワレ大根の芽出しを置き、コナガ幼虫8頭 x 3反復を接種した。恒温室内で25℃、14L:10Dの条件下で24hr保持後、生死虫数を観察記録し、Abbot (1925) の

方法で補正死亡率を求めた。LC50値を求める試験では、ニームオイル製剤 NO.1 についてだけ1,000倍、2,000倍、4,000倍、8,000倍、16,000倍、32,000倍希釈液を調製し、カイワレ大根の芽出しを10本ずつ束ねて浸漬処理し、コナガ幼虫を10頭 x 3反復ずつ接種して同様に処理した。LC50値はBliss (1934) のプロビットに従って算出した。

3. ヒメダカに対する毒性検定

埼玉県朝霞市の養魚場から入手したヒメダカ *Oryzias latipes latipes*（平均体長3.5cm）を供試して、ニームオイル製剤 NO.1 の魚毒性を検定した。ニームオイル製剤はあらかじめ24hrエアレーションした井戸水を用いて、10,000倍、30,000倍、60,000倍、90,000倍、120,000倍希釈液を調製し、ガラス瓶に0.8ℓずつ入れた。水温は定温循環水槽（アズワン株式会社製、CH-202型）を用いて20℃に保った。入手後3日間試験条件下で馴化したヒメダカを各濃度5頭 x 3反復投入し、1, 3, 12, 24, 48, 72hr間後に生死個体数を観察記録した。コントロール区には井戸水を用いた。

4. アザジラクチンの分析

ニームオイル製剤に含まれるアザジラクチンの濃度は一松ら (2000) の述べた方法に従ってHPLCで分析した。アザジラクチン標準品はSigma社から購入した。

5. ピペロニルブトキシド (PBO) の分析

ニームオイル製剤中のピペロニルブトキシド (PBO) はガスクロマトグラフィー質量分析計 (SHIMADZU社製、GCMS-QP5050A) を用いて分析した。分析条件は表1に示した。PBO標準品は和光純薬工業株式会社から入手した残留分析用原体（純度98%）を用いた。定性分析にはニームオイル製剤をアセトンで1,000倍希釈し、保持時間 (R.T.) ならびに選択イオンのパターンを

表1 GCMS分析条件

GCMS unit	Shimadzu GCMS-QP5050A
Column	Rtx-5Ms (Restek, 30m×0.25mmI.D. df=1.0μm)
Column temp.	50℃ (5min) → 20℃/min → 250℃ (5min)
Injection temp.	250℃
Injection mode	Splitless (Sampling time: 2min)
Carrier gas	He (Flow rate: 1.2ml/min)
Injection amount	1μl
—MS—	
Interface temp.	230℃
Ionization mode	EI
Analytical mode	Full Scan/SIM (m/z 149,176,177)

PBO 標準品と比較した。定量分析用の検量線は、PBO 標準品をアセトンで希釈して 0.001, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 ppm 溶液を調製し、GCMS に 1 μ l 注入して作成した。検出は SIM モードで選択イオンとして m/z149, 176, 177 を用いた。ニームオイル製剤 (NO.1~NO.8) はアセトンで 20,000 倍希釈液を調製し、1 μ l 注入した。

6. アバメクチンの分析

ニームオイル製剤中のアバメクチンは HPLC で分析した。ポンプは島津 SCL-10A, カラムは SIEDO CAPCELPARK C18 を用いた。移動相はアセトニトリル:水 = 8:2 で、流速 1 ml/min, オープン温度は 40℃であった。検出器は SPD-10A を用いた。アバメクチン標準品は和光純薬工業株式会社から入手したものを 20 ng および 200 ng 注入した。ニームオイル試料は、シクロヘキサンで 10 倍希釈したものをさらにアセトニトリルで 10 倍希釈して注入した。アバメクチンの検出限界は 20 ng, 回収率は 104%であった。

結果と考察

1. 殺虫活性

コナガ幼虫に対する殺虫活性を検定した結果は表 2 に示した。いずれの試料とも高い殺虫活性を示し、特に NO.1 と NO.4 は 8,000 倍希釈液でも補正死亡率が 50% かそれ以上を示した。試料 NO.1 についてだけは LC50 を算出するためにさらに濃度範囲を広げて検定した結果は表 3 に示した。これから計算した LC50 は、6,665 倍希釈液 (95%信頼限界 5,618—8,017 倍希釈液) となり、PBO 自体にもニーム油の主成分アザジラクチンにもこのような高い殺虫活性はないことから、それ以外に殺虫成分が含まれていることを暗示した。

2. 魚毒性

ニームオイル製剤 NO.1 を選んでヒメダカに対する魚毒性を検定した結果は表 4 に示した。本資材は著しく高

表 2 ニームオイル製剤 NO. 1~NO. 8 のコナガ幼虫に対する殺虫活性

供試濃度 (希釈倍数)	24hr後補正死亡率(%)±S.D.							
	NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	NO.7	NO.8
2,000	100 ± 0.0	93.1 ± 12.3	95.7 ± 6.1	100 ± 0.0	95.7 ± 6.1	87.0 ± 10.6	87.0 ± 10.6	95.7 ± 6.1
4,000	95.7 ± 6.1	69.6 ± 22.2	87.0 ± 10.6	91.3 ± 6.1	87.0 ± 10.6	87.0 ± 10.6	69.6 ± 16.3	87.0 ± 10.6
8,000	60.9 ± 10.6	51.5 ± 16.3	48.7 ± 10.6	73.9 ± 21.3	39.1 ± 12.3	43.5 ± 6.1	39.1 ± 6.1	56.5 ± 6.1

表 3 ニームオイル製剤 NO. 1 のコナガ幼虫に対する殺虫活性

供試濃度 (希釈倍数)	24hr後補正死亡率(%)±S.D.			
	反復 1	2	3	平均 ± S.D.
1,000	100	100	100	100 ± 0.0
2,000	100	100	100	100 ± 0.0
4,000	69.1	58.8	89.7	72.5 ± 12.9
8,000	38.1	58.8	27.8	41.6 ± 12.9
16,000	7.2	0.0	7.2	4.8 ± 3.4

表 4 ニームオイル製剤 NO. 1 のヒメダカに対する毒性

供試濃度 (希釈倍数)	補正死亡率(%)±S.D.					
	1hr	6hr	12hr	24hr	48hr	72hr
10,000	100 ± 0.0					
30,000	6.7 ± 9.4	26.7 ± 9.4	66.7 ± 34.0	80.0 ± 28.3	93.3 ± 9.4	100.0 ± 0.0
60,000	0	20.0 ± 16.3	33.3 ± 24.9	46.7 ± 9.4	53.3 ± 9.4	60.0 ± 16.3
90,000	0	0	13.3 ± 9.4	13.3 ± 9.4	13.3 ± 9.4	33.3 ± 18.9
120,000	0	0	0	6.7 ± 9.4	6.7 ± 9.4	6.7 ± 9.4

い魚毒性を示し、10,000 倍希釈液では曝露 1 hr 後に死亡率 100%に達した。曝露 24 hr 後のデータから計算した LC50 は、72,890 倍希釈液 (95%信頼限界 62,260-82,321 倍希釈液) となった。PBO にもアザジラクチンにもこのような高い魚毒性はないことから、本資材に含まれる高い殺虫活性を有する成分は高い魚毒性を有することを暗示した。

3. 有効成分

アザジラクチンを HPLC で分析して得られたクロマトグラムは図 1 に示した。ニームオイル製剤から検出された R.T. 5.669 min のピークは、アザジラクチン標準品から検出された R.T. 5.664 min のピークと一致した。ニームオイル製剤 8 サンプルに含まれるアザジラクチン濃度は表 5 に示す通り、494~1,393 ppm (平均 864 ppm) と推定された。

本資材に含まれる PBO を GCMS で分析して得られたトータルイオンクロマトグラムは図 2 に示した。多くのピークが検出されたが、R.T. 17.92 min に検出されたピークは PBO 標準品から得られた R.T. 17.89 min のピークと一致した。このピークのマススペクトルは図 3 に示したが、ニームオイル製剤からのピーク b と PBO 標準品のピーク a とも m/z176, 177, 149 のフラグメントイオンを示し一致した。検量線から算出した各試料の PBO 濃度は表 6 に示した通り、6,500-8,800 ppm の範囲であった。これは%に直すと、0.65-0.88%に相当し、鹿児島県の生産現場で使われたようにこの程度の濃度の殺虫協力剤 PBO を 1,000 倍希釈して散布しても殺虫活性は全く期待できない。従って、当然他の有効成分の混入が疑われるが、本研究で明らかになったようにコナガ幼虫に対して即効的な高い殺虫活性を有するということがヒメダカに対して高い魚毒性を有するということから

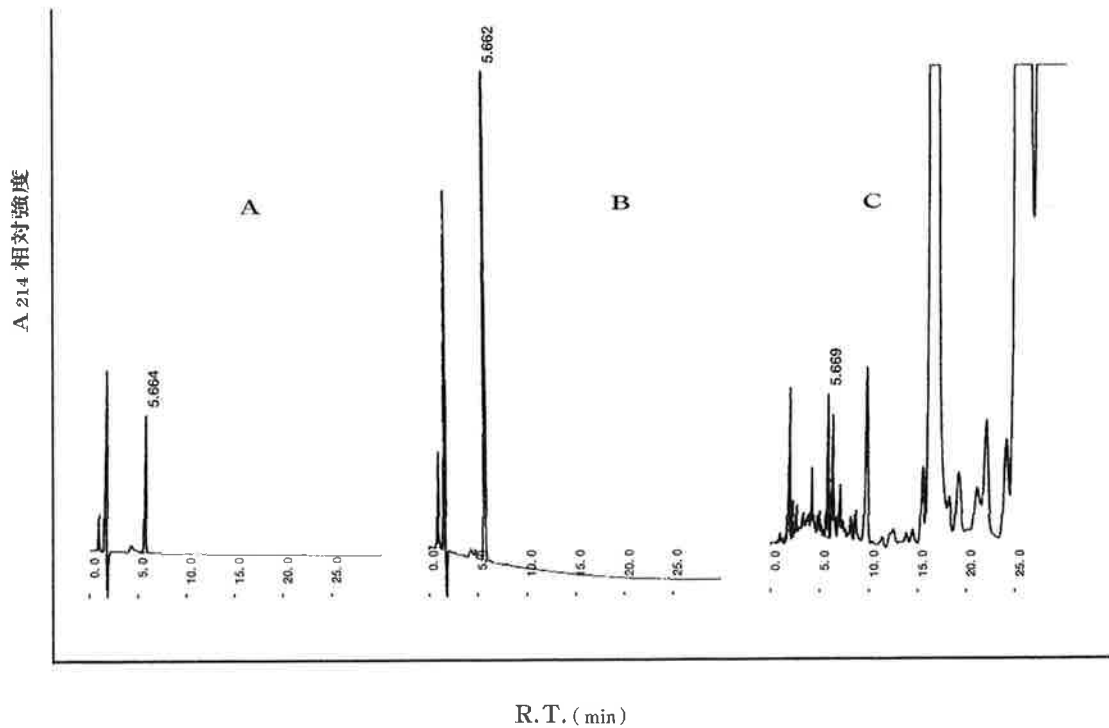


図 1 アザジラクチン標準品とニームオイル製剤 NO.1 の HPLC 分析
A: 標準品 10 ng B: 標準品 50 ng C: ニームオイル製剤 NO.1

表 5 ニームオイル製剤 NO. 1~NO. 8 から検出されたアザジラクチンの濃度

アザジラクチン濃度 (ppm)								
NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	NO.7	NO.8	平均
536	923	767	1,720	494	518	557	1,393	864

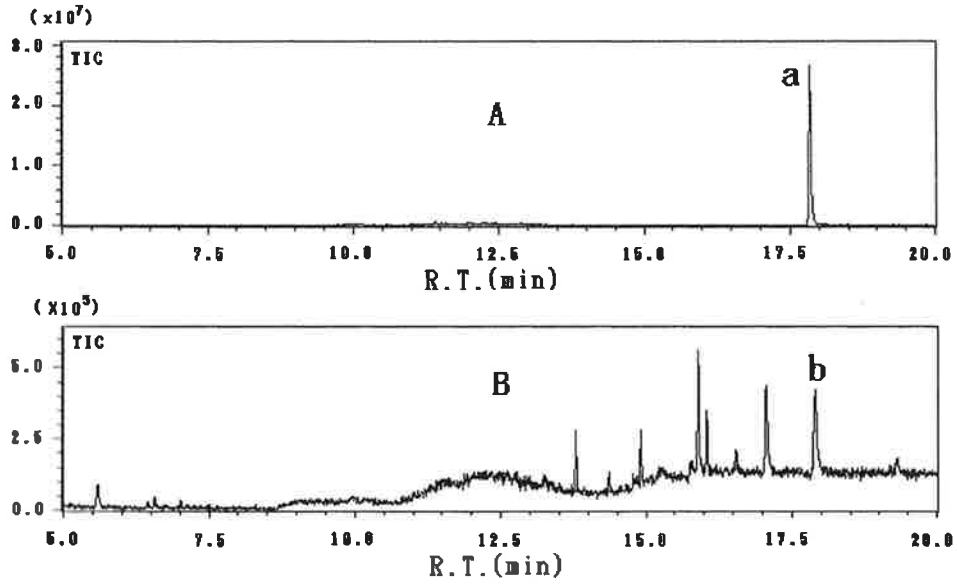


図2 GCMS分析におけるPBO標準品とニームオイル製剤NO.1の総イオンクロマトグラム
 A: PBO標準品 B: ニームオイル製剤NO.1
 ピークaのR.T.=17.92 min ピークbのR.T.=17.89 min

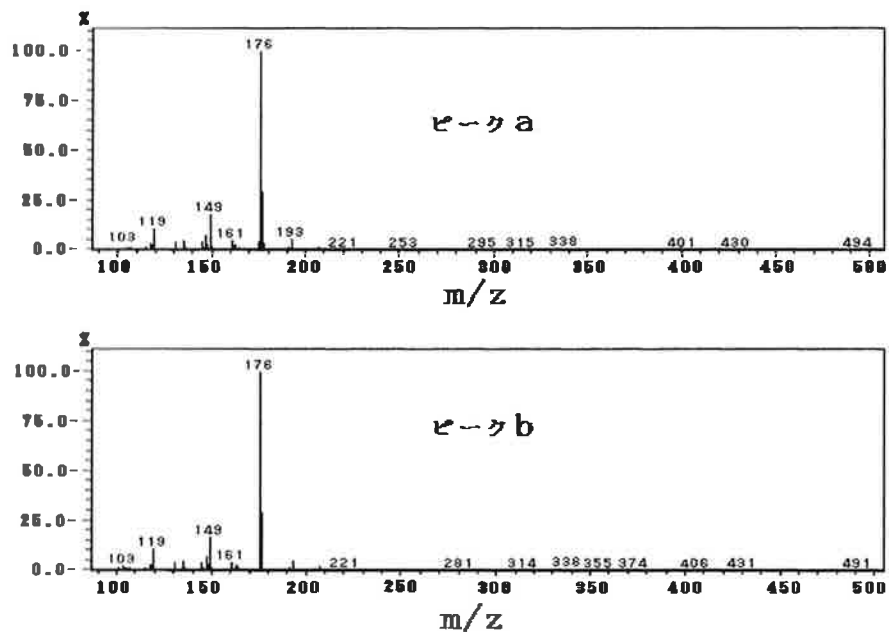


図3 ピークaとピークb(図2)のマススペクトル

表8 ニームオイル製剤NO.1~NO.8から検出されたピペロニルブトキシド(PBO)の濃度

PBO濃度(ppm)±S.D.								
NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	NO.7	NO.8	平均
8,537 ± 502	7,928 ± 274	6,451 ± 112	8,358 ± 911	8,698 ± 239	8,384 ± 231	8,789 ± 663	7,388 ± 561	8,067

アバメクチンの混入を予測した。

アバメクチンを HPLC で分析した結果は図 4 に示した。クロマトグラム A は標準品アバメクチン 20 ng を注入した時に得られた R.T. 10.348 min のピーク, B は標準品アバメクチン 100 ng を注入した時に得られたピークを示す。クロマトグラム C は, ニームオイル製剤 NO.1 から得られた R.T. 10.142 min のピークを示し, クロマトグラム D はニームオイル製剤 NO.1 の試料に標準品アバメクチンを 20 ng 添加して得られた R.T. 10.156 min のピークを示す。ニームオイル製剤のピークと標準品アバメクチンのピークは完全に重なったことから, 両者は一致すると判断した。ニームオイル製剤 NO.1 - 8 のアバメクチン濃度は表 7 に示した。アバメクチン濃度は 900 ppm (NO.7) から 2,200 ppm (NO.4) の範囲であり, 平均は 1,700 ppm であった。

4. 考 察

最近, 植物抽出液と称して有機・減農薬栽培で使用されていたアグリクール®という資材にはアバメクチンが約 1,600 ppm 混入されていることが報告された(橋爪ら, 2007)。本研究で分析したニームオイル製剤は土壌活性剤とラベル表示され, 減農薬栽培のカラーピーマンやキュウリの害虫防除に使用されていたが, 有効成分の本体はアバメクチンであると思われる。本来ニーム抽出液に含まれる主要殺虫活性成分はアザジラクチンであるが, アザジラクチンには今回コナガ幼虫に対して見られたような即効的な殺虫効果は知られていない(Prakash and Rao, 1997)。本研究で供試したニームオイル製剤からは 536~1,720 ppm (平均 864 ppm) のアザジラクチンが検出されたが, コナガに対する高い殺虫活性(表 2 と 3) や魚毒性(表 4) を説明できない。一方, ニームオイル製剤から検出されたアバメクチン濃度と 8,000 倍

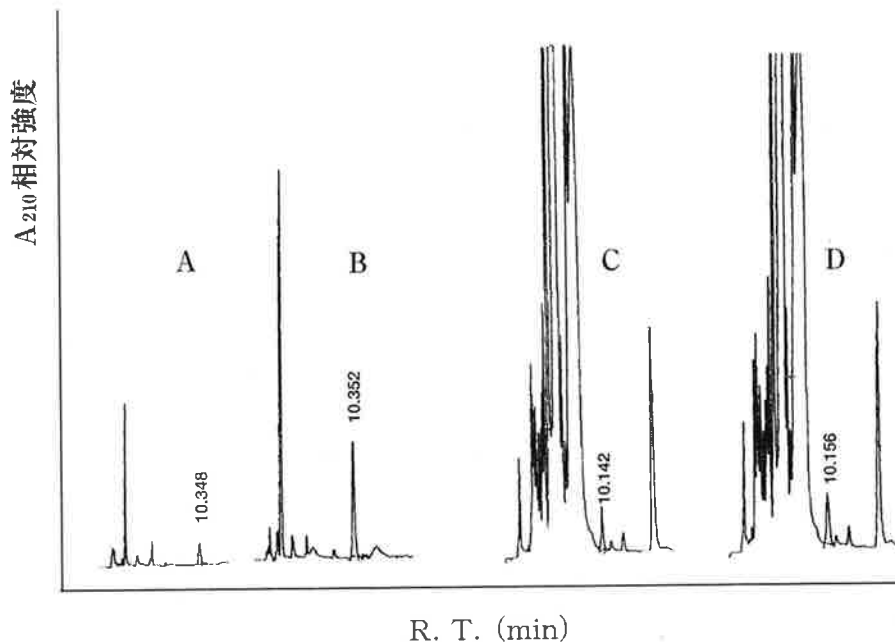


図 4 アバメクチン標準品とニームオイル製剤 NO.1 の HPLC 分析
 A : 標準品 20 ng B : 標準品 100 ng
 C : ニームオイル製剤 NO.1 D : ニームオイル製剤 NO.1 + 標準品 20 ng

表 7 ニームオイル製剤 NO.1 ~ NO.8 から検出されたアバメクチンの濃度

アバメクチン濃度 (ppm)								
NO.1	NO.2	NO.3	NO.4	NO.5	NO.6	NO.7	NO.8	平均
1,880	1,880	1,780	2,160	1,310	1,380	984	1,860	1,654

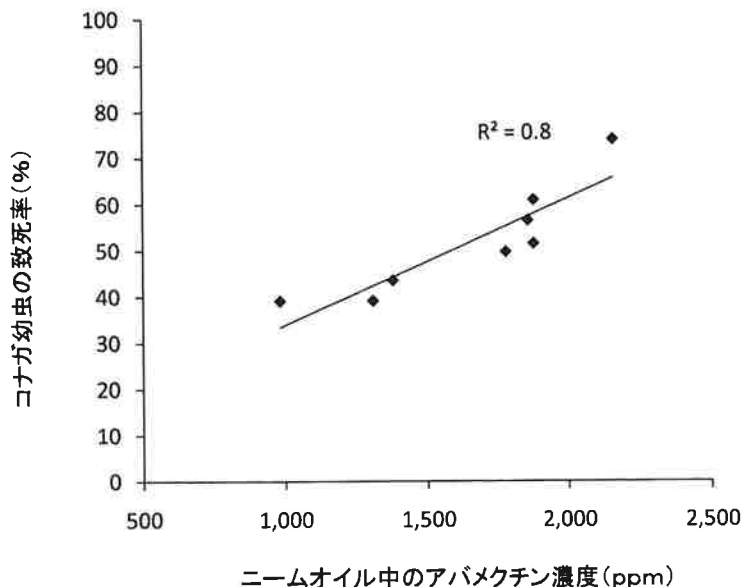


図5 ニームオイル製剤 NO.1～8 から検出されたアバメクチン濃度とコナガ幼虫に対する殺虫活性の関係

希釈液で得られたコナガ幼虫に対する殺虫活性の関係をプロットした結果は図5に示す通り、 $R^2=0.8$ という高い相関関係が得られた。この結果は、供試したニームオイル製剤の主要殺虫活性成分はアザジラクチンではなく、アバメクチンであることを示している。PBO はアバメクチンのチトクロム P450 モノオキシゲナーゼ系による解毒を阻害する殺虫協力剤目的で混入されていたと推察される。アバメクチンも PBO も試料によって濃度に若干の振れが認められたのは、分析に供したニームオイル製剤は生産農家から回収された使い残りのものであったことから、保管方法の違いによって生じた分解程度の違いを反映しているものと思われる。

本研究では農薬代替資材として販売・使用されていたニームオイル製剤には農薬登録のない殺虫剤と殺虫協力剤が混入されていることを明らかにしたが、このような事例は過去にも多数報告がある（例えば、本山ら、1996；Oh and Motoyama, 1996；駒形・本山, 1998 と 1999；橋爪ら, 2007）。このような資材に依存している有機・減農薬栽培は食の安全・安心を求める国民の要求を裏切る詐欺行為であり、しかもそのような状態が10数年前前から続いているということは、農薬管理行政に根本的な問題が存在することを提起している。

引用文献

Abbot, W. S. (1925) The method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol.

18: 265-267.

Aladakatti, R. H., R. N. Ahamed, M. Ahmed and M. G. Ghosesawar (2001) Sperm parameters changes induced by *Azadirachta indica* in albino rats. J. Basic and Clinical Physiology and Pharmacology 12: 69-76.

Bliss, C. I. (1934) The method of probits. Science 79: 38-39.

Boeke, S. J., M. G. Boersma, G. M. Alink, J. J. A. van Loon, A. van Huis, M. Dickle and I. M. C. M. Rietjens (2004) Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. Journal of Ethnopharmacology 94: 25-41.

橋爪直樹・木村真理子・本山直樹 (2007) 農植物保護液「アグリクール」の殺虫活性と有効成分の検討. 第32回日本農薬学会第大会講演要旨集 p. 124.

一松時生・斉藤浩之・水城英一・中村寿雄・野田 潔 (2000) ニーム由来成分を用いた害虫防除剤の開発: ニーム抽出物のハスモンヨトウに対する摂食阻害活性. 平成 12 年度福岡県工業技術センター研究報告 p. 113-115.

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. 千葉大学園芸学部学術報告 52: 13-16.

駒形 修・本山直樹 (1999) 有機農業用資材「健草源・地」の除草活性と有効成分. 千葉大学園芸学部学術報告 53: 15-18.

- 南日本新聞 (2008) 「ピーマンに無登録農薬／東串良町園芸振興会」鹿児島県内ニュース (経済・産業欄), 2008年1月20日.
- 本山直樹・呉 鴻圭・駒形 修・T. Mahmood (1996) 有機農業用資材として用いられるいわゆる天然・植物抽出液「夢草」に含まれる殺虫活性成分. 日本農薬学会誌 21 : 73-79.
- 中川大輔・逢阪修平・谷野圭持・宮下正昭 (2006) アザジラクチンの全合成研究. 天然有機化合物討論会講演要旨集 48 : 595-599.
- Oh, H.-K. and N. Motoyama (1996) Further evidence for the presence of a synthetic insecticide in so-called natural-plant extract-formulations. J. Pesticide Science 2 : 434-437.
- Parveen, D.S., B. Manivannan, K.M. Pathan, M. Kasturi and R.N. Ahamed (1993) Antispermatic activity of *Azadirachta indica* leaves in albino rats. Current Science 64 : 688-689.
- Prakash, A. and J. Rao (1997) Botanical pesticides against insects- 111. *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae). pp. 35-102, in "Botanical Pesticides in Agriculture", CRC Lewis Publishers, Boca Raton/New York/London/Tokyo.
- Zaved N., S.R. Gowen, M. Inam-ul-Haq, K. Abdullah and F. Shahina (2007) Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. Crop Protection 26 : 911-916.

有機資材カメガード®のラットとマウスに対する忌避活性

孫立倉・田代 亨・本山直樹¹⁾

千葉大学大学院園芸学研究科

1) 現在 東京農業大学総合研究所

(受領 2008年10月30日 ; 受理 2009年 1月 9日)

Repellent activity of the organic material, Kame-Guard®, against rats and mice. Licang Sun, T. Tashiro and Naoki Motoyama¹⁾. Chiba University, Graduate School of Horticulture, 648 Matsudo, Matsudo-shi, Chiba-ken 271-8510, Japan.
¹⁾ Present Address: Tokyo University of Agriculture, Nodai Research Institute, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan.

Abstract

The repellent effects of the organic material, Kame-Guard®, against rats and mice were examined in the laboratory. Rats fed with a solid diet pre-soaked in un-diluted Kame-Guard® solution consumed less compared to controls. When the material was added to drinking water at 2.5% and rats were allowed to drink *ad libitum*, water intake was significantly less than for controls. This effect was observed with up to 40-fold diluted solution. Similar results were demonstrated with mice. The activity was present in the supernatant after centrifugation of the material at 10,000xg. The elution profile on Sephadex G25 gel filtration chromatography suggested the active component was a low molecular weight, water-soluble substance(s). Further analysis of the active fraction by HPLC resolved one dominant and three minor components. Mice subjected to an odor selection test paid little regard to the mal odor of Kame-Guard®. These results imply that protection of the stock bark of apple trees from rodent attacks may be taste aversion rather than odor avoidance effect.

Key words : Kame-Guard®, Taste aversion, Odor avoidance, Rat, Mouse

有機資材カメガード®のラットとマウスに対する忌避効果を実験室内で検証した。カメガード®原液に浸漬処理した固型飼料をラットに与えたところ、摂食量は無処理区に比較して少なかった。飲水に本資材が 2.5% の割合になるように添加してラットに自由摂取させたところ、無処理区に比較して飲水量が減少した。飲水阻害活性は、本資材の 40 倍希釈液まで認められた。同様の結果はマウスにおいても確認された。飲水阻害活性は、10,000 xg で遠心分離した上澄み画分に存在し、セファデックス G25 ゲルろ過クロマトグラフィにおける溶出挙動から水溶性の低分子物質であると推察された。活性画分の HPLC 分析では、主要成分 1 つと少量成分 3 つが検出された。マウスに対する臭い選択試験では、悪臭に対する忌避行動は認められなかった。したがって、野外のリンゴ園で観察されている本資材による矮性台木の樹皮の野ネズミによる齧り被害の防止効果は、臭覚忌避ではなく、味覚忌避効果によることを示唆した。

はじめに

ネズミは人に対して衛生的、経済的、精神的被害を与えるが、特に人畜共通感染症として、サルモネラ症、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、エルシニア、リステリア、ウイルスによる腎症候出血熱、クリプトスポリジウム症、カンピロバクターなどに関与することが知られている

(谷川, 1999a)。また、ネズミによる火災、ガス爆発、停電などの重大被害も時々報道される。農業では倉庫や圃場での食糧の略奪も大きな問題である。最近では、リンゴ園でのネズミの齧りによる矮性台木の樹幹皮の食害も問題となっている(松中, 2006)。ネズミ防除には環境整備による発生源対策や、ねずみ返しのように物理的に侵入阻止をしたり、各種捕そ器や粘着トラップで捕獲

する方法に加えて殺そ剤や忌避剤を用いる化学的防除がある(谷川, 1999b)。殺そ剤にはワルファリンのような抗凝血剤と硫酸タリウム剤のような急性中毒殺そ剤があり, 草野(1999a)の詳細な解説がある。忌避剤としてはシクロヘキシミド, カブサイシン, メントールなどが知られており, ネズミの忌避行動は臭覚刺激に対する臭覚忌避, 味覚刺激に対する味覚忌避に基づくと考えられている(草野, 1999b)。味覚忌避については外国でも多くの研究報告がある(例えば Gill *et al.*, 2000; Bárdos, 2001; Massei and Cowan, 2002; Gentle *et al.*, 2006)。

カメガード®はロイヤルインダストリーズ株式会社によって製造・販売されている有機資材で, 植物生長調節剂的な効果の他に各種害虫や鳥獣に対して忌避効果があるとされている(カメガード液事例集, 2005)。しかしこれらの効果を対照区を設置して科学的に検証した論文はない。唯一あるのは, 青森県のリンゴ園で本資材をリンゴの矮性台木の樹幹に塗布あるいは散布施用すると, 対照区に比較して積雪期の野ネズミによる樹皮の食害が顕著に減少するという現場の調査結果だけである(松中, 2006)。そこで本研究では, 実験室内においてカメガード®のラットとマウスに対する忌避活性の検証とその有効成分について検討を行った。

材料および方法

1. カメガード®

カメガード®は, ラベルに「嫌気性菌入りアミノ液肥, 5ℓ入り, 2006年製造」と記載されているものを製造メーカーのロイヤルインダストリーズ株式会社(東京都狛江市和泉本町1-15-9)から入手した。同社によると(私信), 本資材は大豆と小麦等の穀類を一次醗酵させたものをさらに二次醗酵させ, それをろ過したものであることであった。

2. ラットの固型飼料摂食量に及ぼす影響測定

実験には日本クレア株式会社から購入後, 恒温室(25℃, 14L:10D)でラット・マウス用固型飼料 CE-2®(日本クレア株式会社)を与えて飼育した10~12週令のWister系ラット(*Rattus norvegicus* Berkenhout)の雄を用いた。固型飼料約70gをカメガード®の原液に5min間浸漬・風乾した。コントロール区用には, 固型飼料を同様に井戸水に浸漬処理した。ポリカーボネイト製飼育ケージ(30 x 24 x 15 cm)にラットを1頭ずつ入れ, 蓋の餌箱を真中で仕切り板で2分割し, 片方にカメガード®処理飼料をもう片方に水処理飼料を与え24hr自由に摂食させた。実験開始時と24hr後に各餌箱の固型飼料の重さを測定し, 摂食量を算出した。水は井戸水を入れた給水ビンの飲水口を蓋の真中から差し込んで自由に摂取させた。実験は各区とも3頭を1グループとし,

10反復行った。なお, 実験には毎回無処理区対無処理区, 無処理区対処理区を設置して比較した。

3. ラットの飲水量に及ぼす影響測定

餌箱の仕切りは除去した上記と同じ大きさの飼育ケージにラットを1頭ずつ入れた。片方の給水ビンには井戸水195mlとカメガード®5mlを入れ, もう片方の給水ビンには井戸水だけを200ml入れ, 飲水口を飼育ケージの蓋から各々15cm間隔で差し込み24hr自由に選択飲水させた。餌箱には固型飼料を与えた。実験開始時と24hr後に給水ビン+水の重さを測定し, 飲水量を算出した。実験は各区とも3頭を1グループとし, 3反復行った。なお, 実験には毎回無処理区対無処理区, 無処理区対処理区を設置して比較した。

カメガード®の濃度がラットの飲水量に及ぼす影響を調べる実験では, 原液の代わりにカメガード®を井戸水で10倍, 20倍, 40倍, 80倍希釈液した液を用いて同様に実験した。ただし, 無処理区対無処理区は設置せずに, 無処理区対処理区だけを設置して飲水量を比較した。実験は各区とも3頭を1グループとし, 10倍希釈液区と20倍希釈液区は3反復, 40倍希釈液区と80倍希釈液区は5反復行った。

4. 活性成分の分画

カメガード®原液を高速冷却遠心機(日立製作所製, 20PR-52型)を用いて10,000 x gで10min間遠心分離し, 得られた沈殿物を上澄み液と等量になるように井戸水で希釈して沈殿物懸濁液とした。沈殿物懸濁液と上澄み液を各々井戸水で40倍希釈し, 上記と同様の方法でラットの飲水量に及ぼす影響を実験した。実験は各区とも3頭を1グループとし, 5反復行った。なお, 本実験には日本クレア株式会社から購入し同様に飼育したJcl:ICR系マウス(*Mus musculus* Linnaeus)の雌も供試した。マウスの場合にもラットの場合と同様にサンプル5mlを195mlの井戸水に加えて与え, 24hr後の飲水量を測定した。

カメガード®原液の上澄み液をセファデックス G25ゲルろ過クロマトグラフィによって以下の条件で活性画分の分離を行った。セファデックス G25はファルマシアジャパンから購入した。セファデックス G25ゲルカラム(2.6 x 70 cm)を蒸留水で調製し, カメガード®原液の上澄み液を5ml添加し, 蒸留水で6.1 ml/minの流速で溶出した。カラムに添加した上澄み液は多量のタンパク質を含むと思われたので, 溶出した各フラクションは分光光度計(Shimadzu UV-16A, Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer)を用いて波長280nmで吸光度を測定した。あらかじめBlue Dextran 2000(Pharmacia Fine Chemicals社製)を添加・溶出して測定したボイドボリューム140mlを捨てた後, フラクシ

フクロクター (Gilson 社製, Micro Fractionator) を用いて 300 滴 (7 ml) のフラクションを 50 本集めた。フラクション 2~6 を F 1 (35 ml), フラクション 8~13 を F 2 (42 ml), フラクション 16~21 を F 3 (42 ml), フラクション 22~27 を F 4 (42 ml), フラクション 41~47 を F 5 (49 ml) として合わせ、各々から 20 ml ずつ取って上記と同様の方法でマウスに与え飲水量に及ぼす影響を測定した。

ゲルろ過クロマトグラフィにおいて活性のあった画分を凍結乾燥し、HPLC 分析を行った。HPLC は Shimadzu 社製の LC10A を用い、カラムは VP-ODS (6 x 150 mm) を用いた。凍結乾燥サンプルを移動相 1 ml に溶解してメンブレンフィルター (Millipore 社製, 0.2 µm GSWP) でろ過後 1 µl 注入した。メタノール: 水 = 7 : 3 (v/v) を移動相として 1 µl/min の流速で抽出した。なお、F 5 の吸収スペクトルを測定 (Shimadzu UV-16A, Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer) したところ、波長 250~260 nm の範囲に吸収が見られたので、溶出画分の検出は波長 254 nm で行った。

5. 臭覚忌避実験

臭覚忌避実験には 8 週令の Jcl: ICR 系マウスの雌を供試し、**図 1** に示すような自家製の簡易装置を作成して使用した。3つの半透明のプラスチック製箱 (タッパウェア) を 2本の水道管用塩ビパイプ (直径 6 cm x 長さ 30 cm) で接続した。両サイドの箱 (20 x 14 cm x 高さ 15 cm) の蓋は、10 x 8 cm の大きさに切り取って、ステンレス製のマウス飼育ケージ用餌箱 (網目 0.7 x 0.7 mm) をはめ込んだ。両方の箱に餌としてラット・マウス飼育用固型飼料 CE-2[®]を適量 (約 14 g) ずつ与え、水は井戸水を給水ピンの飲水口を両方の箱の餌箱の金網

から差し込んで自由に与えた。片方の箱の中には、カメガード®原液 20 ml をしみ込ませた脱脂綿を金網 (網目 1.3 x 1.3 mm) で包んでガラスシャーレの中に置いた。もう片方の箱の中には、対照区として井戸水をしみ込ませた脱脂綿を同様に置いた。真中の箱 (14 x 8 cm x 高さ 10 cm) はマウス導入口として用い、塩ビパイプと直角の壁に小孔を開けてゴム管で小型ポンプ (株式会社テクノ高槻社製, HIBLOW AIR PUMP SSP-3 EBS 型) と接続した。小型ポンプと真中の箱の間には流量計とカメガード®の臭気除去用に粒状活性炭のビンを経由して接続した。なお、接続部分は空気漏れを防ぐために接着剤を固化させてシールした。各々の箱には日本クレア株式会社から購入した床敷 (クリーンチップ) を適量敷いた。実験はマウス 1 個体ずつ行い、別々の個体を用いて 3 回反復した。マウスを真中の箱に導入して 2 hr 放置して環境馴化後、1 l/min の流速で両側の箱からの空気を吸引して真中の箱を通過させた。デジタルビデオカメラ (日本ビクター株式会社製, VictorGZ-MG77-S) を用いてマウスの行動を撮影記録し、パソコン上に再現してデジタルストップウォッチ (セイコーエスヤード株式会社製, SAVE103 型) 2 個を用いてマウスが両側の箱を訪問・滞在した時間を計測した。第 1 回目の実験では 10 hr, 第 2 回目は 6 hr, 第 3 回目は 6 hr 連続的に観察し、結果は 1 hr 当りの平均滞在時間 (min) で表した。なお、実験は 25°C の恒温室で行ったが、ビデオ撮影の採光のために、18W の蛍光灯を箱の反対側の離れた位置に下向きに設置して間接光を照射した。

結果と考察

1. 摂食忌避

カメガード®原液を浸漬処理した固型飼料と無処理の固型飼料のラットによる摂食量を比較した結果は**表 1** に示した。無処理区対無処理区のコントロール実験のラット 1 頭当たり 24 hr 当りの摂食量は 14.0~21.7 g の範囲であった。平均摂食量は 16.3 g と 15.1 g で有意差はなかった。したがって、個々の実験では無処理区対無処理区の比較でも摂食量に若干の振れ (偏り) が認められる場合もあったが、10 回反復の平均値でみると有意差はなく、この方法で忌避/誘引活性の検定が可能であることを示唆した。一方、カメガード®処理区対無処理区の比較実験では顕著な有意差が認められ、処理区の摂食量は 3.8~14.8 g の範囲で平均 9.6 g であったのに対し、無処理区では 17.3~24.5 g の範囲で平均 21.9 g であった。

検定方法を簡便化するために、ラットの飲水にカメガード®原液を添加して飲水量への影響を調べた結果を**表 2** に示した。固型飼料の摂食試験と同様に、無処理区対無処理区の比較では 1 頭当りの 24 hr 平均飲水量はそれぞれ 19.1 ml と 18.3 ml で有意差はなかったのに対し

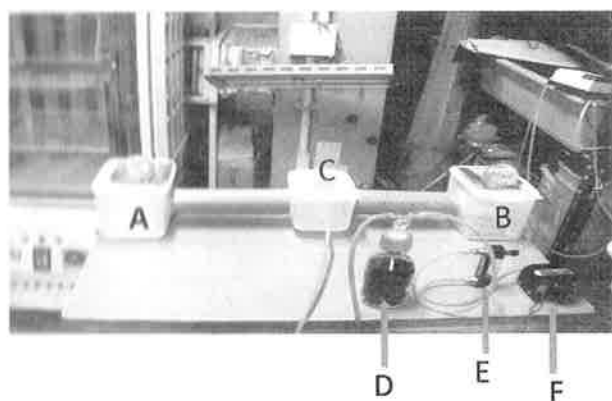


図 1 臭覚忌避実験に用いた装置
 A: カメガード®処理餌箱 B: 井戸水処理餌箱
 C: マウス導入箱 D: 粒状活性炭
 E: 流量計 F: 小型ポンプ

表1 カメガード®浸漬処理がラットの固形飼料 CE-2® (日本クレア) 摂食量に及ぼす影響

実験	供試ラット 体重 (g)	平均摂食量 (g) / 頭 / 24hr ± S.D.			
		コントロール区		試験区	
		無処理	無処理	カメガード®処理	無処理
1	243~297	15.1 ± 3.8	11.6 ± 4.2	14.8 ± 4.3	18.8 ± 4.6
2	248~301	17.9 ± 5.5	18.1 ± 6.9	9.0 ± 5.4	24.4 ± 5.5
3	249~304	20.2 ± 8.5	11.7 ± 6.4	11.6 ± 1.4	24.5 ± 2.7
4	256~312	16.5 ± 0.9	11.8 ± 1.6	3.8 ± 1.7	23.7 ± 3.9
5	266~322	14.0 ± 2.8	21.7 ± 1.5	7.2 ± 2.8	24.2 ± 4.8
6	273~336	15.3 ± 0.5	16.7 ± 2.8	11.5 ± 5.3	17.3 ± 4.8
7	277~339	14.2 ± 3.5	14.0 ± 2.3	8.6 ± 3.5	21.1 ± 2.7
8	284~346	16.3 ± 4.2	17.4 ± 4.7	7.7 ± 2.0	23.8 ± 4.0
9	288~350	18.4 ± 1.5	13.4 ± 2.8	12.2 ± 5.8	19.7 ± 7.2
10	294~355	14.7 ± 5.8	14.8 ± 6.4	9.2 ± 3.5	21.6 ± 3.7
平均 ± S.D. ¹⁾	297 ± 18	16.3 ± 2.0a	15.1 ± 3.3a	9.6 ± 3.1b	21.9 ± 2.6a

1) 各試験区における同一行内の異なるアルファベットは t-検定で有意差あり (P<0.05)

表2 ラットの飲水量に及ぼすカメガード®添加の影響

実験	供試ラット 体重 (g)	平均飲水量 (ml) / 頭 / 24hr ± S.D.			
		コントロール区		試験区	
		無処理	無処理	カメガード®処理	無処理
1	312~393	20.5 ± 7.6	17.7 ± 2.7	6.9 ± 3.9	31.5 ± 4.0
2	315~397	20.6 ± 6.0	11.4 ± 6.9	3.6 ± 2.0	22.6 ± 4.4
3	316~400	16.2 ± 8.7	23.8 ± 8.3	1.1 ± 0.6	27.0 ± 5.4
平均 ± S.D. ¹⁾	—	19.1 ± 2.5a	17.6 ± 7.2a	3.9 ± 2.9b	27.0 ± 4.5a

1) 各試験区における同一行内の異なるアルファベットは t-検定で有意差あり (P<0.05)

表3 ラットの飲水量に及ぼすカメガード®濃度の影響

濃度 (希釈倍数)	供試ラット 体重 (g)	反復	飲水量 (g) / 頭 / 24hr ± S.D. ¹⁾	
			カメガード®処理	無処理 (水)
10	316~402	3	3.7 ± 2.0a	31.2 ± 4.1b
20	319~408	3	1.9 ± 1.4a	36.8 ± 15.5b
40	321~409	5	8.3 ± 4.2a	26.5 ± 5.3b
80	323~411	5	16.1 ± 10.3a	18.4 ± 9.0a

1) 同一行内の異なるアルファベットは t-検定で有意差あり (P<0.05)

で、処理区対無処理区の比較実験では処理区は 3.9 ml に対して無処理区は 27.0 ml であり、明確な差が認められた。

上記の実験では飲水 200 ml 中にカメガード®原液を 5 ml 添加したので、カメガード®の濃度としては 2.5% 相当である。飲水阻害活性はどの濃度まで認められるかを調べるために、カメガード®の 10~80 倍希釈液を添加して飲水量に及ぼす影響を調べた結果を表 3 に示した。10~40 倍希釈液添加区における飲水量は各々の無処理区と比較して顕著に少なかったが、80 倍希釈液添加になると無処理区と有意差がなくなったことから、カメガード®の飲水阻害活性は 40 倍希釈液まで認められることが明らかである。

2. 活性物質

カメガード®は、製造メーカーからの情報（私信）で

は大豆と小麦等の穀類を 2 回発酵させる過したものとのものであったが、製品は悪臭を発する黒色の液体で、若干の浮遊物も混在していた。活性物質を分画するために、遠心分離によって沈殿物と上澄み液に分けてラットに対する飲水阻害活性の分布を調べた結果は図 2 に示した。沈殿物懸濁液区と無処理区の間には飲水量に有意差がなかったのに対して、上澄み液添加区では無処理区に比較して明らかに飲水量が少なかった。従って、カメガード®の飲水阻害物質は可溶性画分に分布していることがわかった。同様の実験をマウスに対して行った結果は図 3 に示した。ラットの場合と同様に、上澄み液はマウスに対しても飲水阻害活性を示した。上澄み液の活性物質をセファデックス G25 ゲルろ過クロマトグラフィを行って分離した結果を図 4 に示した。F1~F5 の 5 つのピーク（画分）が検出された。そこで得られた 5 画分についてマウスに対する活性を検定した結果は表 4 に示す

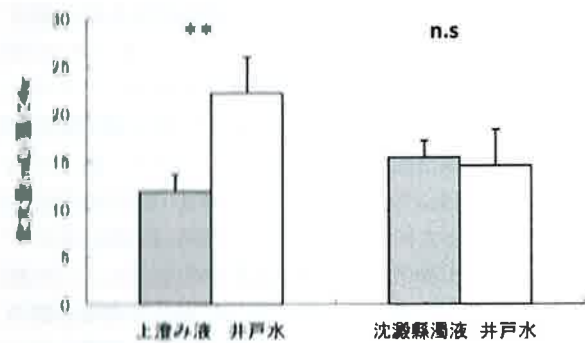


図 2 カメガード®上澄み液と沈澱懸濁液がラットの飲水量に及ぼす影響

**有意差あり (P<0.01) ns 有意差なし (P<0.05)

図 3 カメガード®上澄み液と沈澱懸濁液がマウスの飲水量に及ぼす影響

**有意差あり (P<0.01) ns 有意差なし (P<0.05)

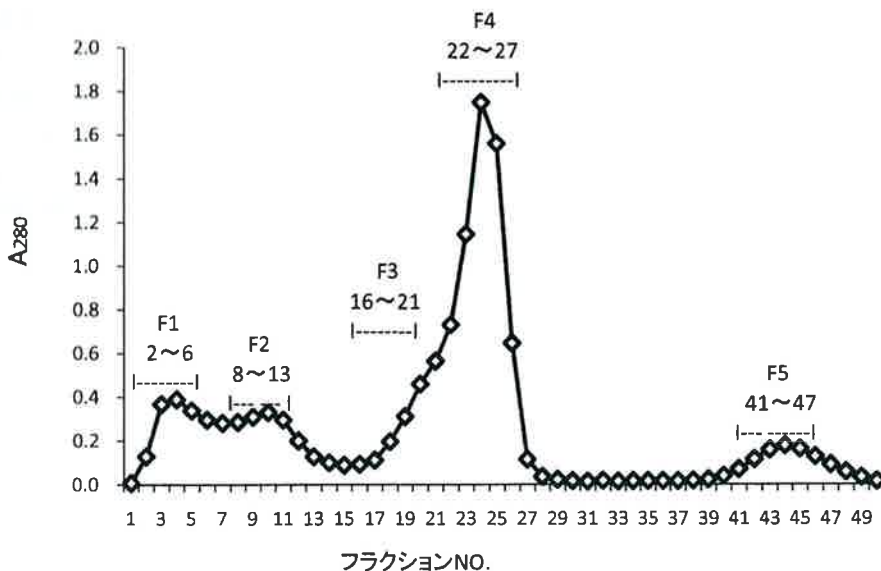


図 4 カメガード®上澄み液のセファデックスG25ゲルろ過クロマトグラフィにおける溶出パターン
 F1 (NO. 2-6, 36ml) F2 (NO. 8-13, 42ml) F3 (NO. 16-21, 42ml)
 F4 (NO. 22-27, 42ml) F5 (NO. 41-47, 49ml)