

低エネルギー電子線を利用した貯蔵食品害虫の防除法の開発
Development of control method of stored-product insects using
low-energy electron beams

2017年1月

今村 太郎

(千葉大学審査学位論文)

低エネルギー電子線を利用した貯蔵食品害虫の防除法の開発
Development of control method of stored-product insects using
low-energy electron beams

2017年1月

今村 太郎

目次

第1章 緒言	1
第2章 低エネルギー電子線（ソフトエレクトロン）の貯蔵食品害虫に対する殺虫効果	
第1節 3種の貯蔵食品害虫に対する低エネルギー電子線の効果	9
第2節 実用型ソフトエレクトロン処理装置の貯蔵食品害虫防除への応用	19
第3章 アズキ内部および玄米内部の害虫に対するソフトエレクトロン照射の効果	
第1節 アズキゾウムシに対するソフトエレクトロン処理の影響	25
第2節 異なる齢期のコクゾウムシに対するソフトエレクトロン処理の効果	37
第4章 低エネルギー電子線の殺虫メカニズム	
第1節 コメットアッセイを用いたDNA損傷の評価法	43
第2節 昆虫と穀物のDNA損傷と品質の評価	51
第5章 植物検疫を目指したソフトエレクトロンの応用	60
第6章 総合考察	65
引用文献	69
英文摘要	80
謝辞	84
学位論文の基礎となる、公表された学術論文	85
その他の公表された学術論文	87

第1章 緒言

現在、食品は複雑な貯蔵、加工、流通過程を経て消費者の元に届けられるが、これら全ての過程で昆虫の害を受ける可能性がある。三井（1984）は収穫後の過程で食品に害を与える害虫をその加害の様式によって、定住害虫、来訪害虫、迷入害虫の3種類に分けた。定住害虫は食品を餌として食品中で世代を繰り返す昆虫、訪問害虫はハエ類やゴキブリ類のように他の場所から食品を加害しにやってくる昆虫、迷入害虫は前の2つ以外の全ての昆虫で偶発的に食品に混入する昆虫である。このうち定住害虫は食品中で世代を繰り返すために被害が甚大になる恐れがあり、重要視されてきた。定住害虫の主な加害対象は貯蔵期間の長い穀物や穀物加工品であり、これらを食害する害虫は貯蔵害虫と呼ばれてきたが、動物質食品を食害する害虫も含めて貯蔵食品害虫とも呼ばれるようになった（三井，1968）。貯蔵食品害虫は主に小型のコウチュウ類やガ類であり（吉田ら，1989）、貯蔵穀物の害虫コクゾウムシ（*Sitophilus zeamais* Motschulsky）、小麦粉製品の害虫で精米所でもよく見られるコクヌストモドキ（*Tribolium castaneum* (Herbst)）、貯蔵アズキの害虫アズキゾウムシ（*Callosobruchus chinensis* (L.)）、玄米や乾燥食品の害虫であるノシメマダラメイガ（*Plodia interpunctella* (Hübner)）などがよく知られている（Fig. 1）。

貯蔵食品害虫の防除には三つの重要な側面がある。一つは量的損耗の防止である。貯蔵食品害虫は穀物などの中で世代を繰り返しながら食害し、重量損失をもたらす（吉田ら，1989）。我が国においても食糧難の時代は大きな問題であったが、現在でも発展途上国では10–30%の損失があると推定され、食糧確保の観点から地球規模で重要な課題になっている（中北・池長，1994）。



Fig. 1. Photos of stored-product insects. (a) *Sitophilus zeamais* Motschulsky, (b) *Tribolium castaneum* (Herbst), (c) *Callosobruchus chinensis* (L.), (d) *Plodia interpunctella* (Hübner).

次に検疫処理である。貯蔵食品害虫は人の移動や貿易を通じて世界各地に分布を拡大し、既に多くがコスモポリタン種になっている（中北・池長，1995）。しかし、分布がまだ局所的である重要な貯蔵食品害虫もあり、こういった害虫の本邦への侵入防止、全世界的な蔓延防止のため、農産物、食品の輸出入の際に殺虫処理が必要になる。

そして、近年、大きな問題であるのが質的損耗の防止である。先進国においては清潔志向の高まりから、加工食品へ害虫が混入することによる質的損耗の影響が大きくなっている（三井，1984）。食品に昆虫が混入した場合、消費者に対しては食品からの虫体発見という不快感や衛生的な被害を与え、食品を提供する側にとっては、商品価値の低下、さらには企業イメージの低下につながり、大損害を与える可能性がある（佐藤ら，2003; Murata et al., 2007）。

貯蔵食品害虫の防除は安価で安定した効果が得られる化学農薬、特に臭化メチルによるくん蒸に大部分を依存してきた（Ahmed, 2001; Gao et al., 2004）。しかしながら大部分の化学農薬は毒性の問題で使用できなくなり、また臭化メチルにはオゾン層を破壊する恐れのあることが指摘され、国際連合環境計画（UNEP）モントリオール議定書により、先進国では2005年までに、開発途上国では2015年までに検疫用途、緊急用途、不可欠用途を除き原則的に禁止された（Anonymous, 2000）。さらに植物防疫法のポジティブリスト化により、検疫の際に生きた害虫が発見されても、それが非検疫対象害虫であれば臭化メチルによるくん蒸の必要がなくなった。そのため、非検疫対象害虫に汚染された輸入品は、輸入業者が臭化メチルくん蒸以外の方法で自主的に殺虫処理を行う必要が生じた。このような状況から、臭化メチルに代わる殺虫技術の開発が早急に必要とされている。代替殺虫法としては、臭化メチル代替くん蒸剤の利用、天敵類を用いる生物的防除法、低温処理や高温処理、放射線の利用などの物理的防除法が考えられる（中北，2003）。臭化メチル代替くん蒸剤としてはホスフィン（リン化水素）が農薬登録されているが、処理期間の長さや金属への腐食性といった重大な欠点があるだ

けでなく、抵抗性害虫の出現が既に報告されており (Badmin, 1990; Benhalima et al., 2004)、化学農薬を使用しない手段が望ましい。天敵昆虫の利用は候補の一つであるが、これによって害虫を完全に殺虫することは難しい。また、混入によって経済的な害が発生するという貯蔵食品の特性から被害許容水準はゼロと考えられており (吉田ら, 1989)、天敵は使用場面の設定が困難である。温度条件の利用は、例えば穀物であれば 15°C以下の低温貯蔵が普及しており、害を減らすことに貢献しているが (中北, 1996)、この温度での低温貯蔵は常温に戻した際に再び害虫が活動を始める可能性がある。また 60°C以上の高温条件で殺虫は可能であるが、穀物の品質劣化を引き起こす (中北, 1996)。

放射線の利用は有力な代替手段である。貯蔵食品害虫の防除にはコバルト 60 およびセシウム 137 のガンマ線 (実際にはコバルト 60 の方を用いる)、加速電圧が 1,000 万ボルト以下の電子線、加速電圧が 500 万ボルト以下のエックス線が利用可能である。これらが利用可能な理由は、非放射性の物質に放射線を照射することにより照射された物質が放射能を帯びることがあるが、上記3種類の放射線では放射能が誘導されることはないためである (林, 1995)。

ガンマ線とエックス線は、電磁波放射線であり、透過力が大きい。そのため、食品にはほぼ均一に処理できるという利点があるが (Fig. 2)、その反面、施設や装置に分厚い遮蔽が必要である。ガンマ線は食品に対する照射で現在もっとも多く用いられている方法である (Anonymous, 2006) が、ガンマ線処理施設は線源となるコバルト 60 を必要とし、その減衰もあるため施設の維持が困難である。また、食品に対する照射を考えた場合、処理施設は空港など交通の便のよいところに建設される可能性がある。これは事故などを想定すればあまり好ましくはない。それに対してエックス線、電子線は線源に放射性物質を必要とせず加速器によって機械的に発生させるため、放射性物質による周辺への汚染の心配がなく、注目されるようになってきている。ただし、エックス線は

電子線からの変換時に発熱量が大きく、転換効率が低いという問題がある（林, 1995）。

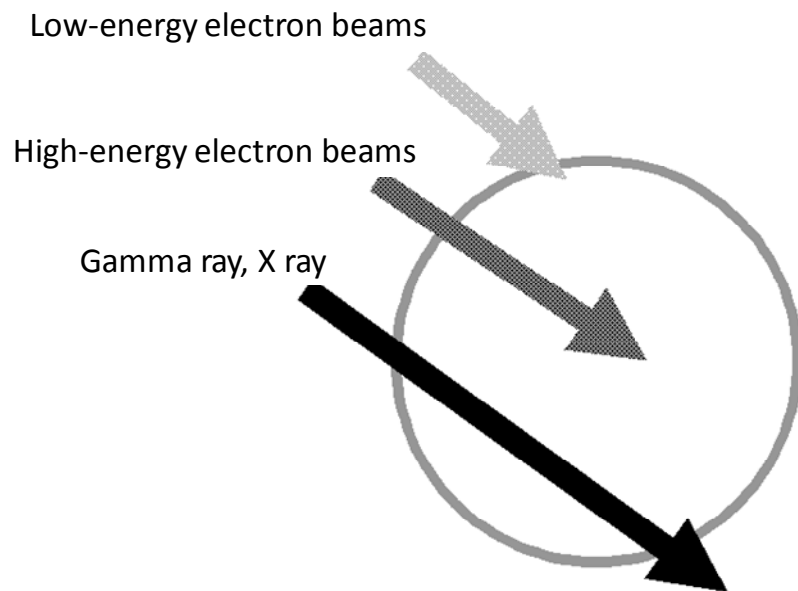


Fig. 2. Image of gamma ray, X ray, high-energy electron beams and low-energy electron beams.

電子線は電子加速装置により発生させられた高速の電子であり、粒子線である。そのため透過力は小さく、その透過力はエネルギーに依存する (Fig. 2, 3)。Fig. 3 は低エネルギー電子線の実際の透過力を示した図であり、吸収線量に応じて着色するフィルム (RCF 線量計) を積層し、加速電圧の異なる電子線を照射し、1枚ごとの吸収線量をプロットしたものである (Hayashi et al., 1998a)。電子線の透過する深さは照射したものの密度に依存し、低密度のものほど深く透過するので、横軸は透過する深さと密度の積である面密度で表されている。170 kV の電子線は、わずかに 2 枚目まで透過しているので、密度が 1 g/cm^3 の物質に対して透過する深さは $60 \text{ }\mu\text{m}$ 程度であると分かる (等々力, 2004)。透過力が小さいことは、メリットとしては大きな遮蔽を必要としないという点だけでなく、エネルギーの小さいものを穀物粒に照射した場合、穀物粒の内部まで透過せず (Fig. 2, 3)、内部の性質を変えないという利点がある (Hayashi, 1998)。加速電圧 300 kV 以下の低エネルギーの電子線をソフト電子線と定義し、これは穀物の表面殺菌を目的に研究が進められてきたが (Hayashi et al., 1997, 1998ab; Hayashi, 1998; Todoriki and Hayashi, 2000)、殺虫効果は明らかでなかった。本論文では、このソフト電子線の新規な物理的防除法としての利用可能性を明らかにし、さらに、これを用いた新たな貯蔵食品害虫防除法の提案を行うこと、およびまた、放射線を照射された昆虫の評価方法を開発し、殺虫機構を解明することを目的とする。

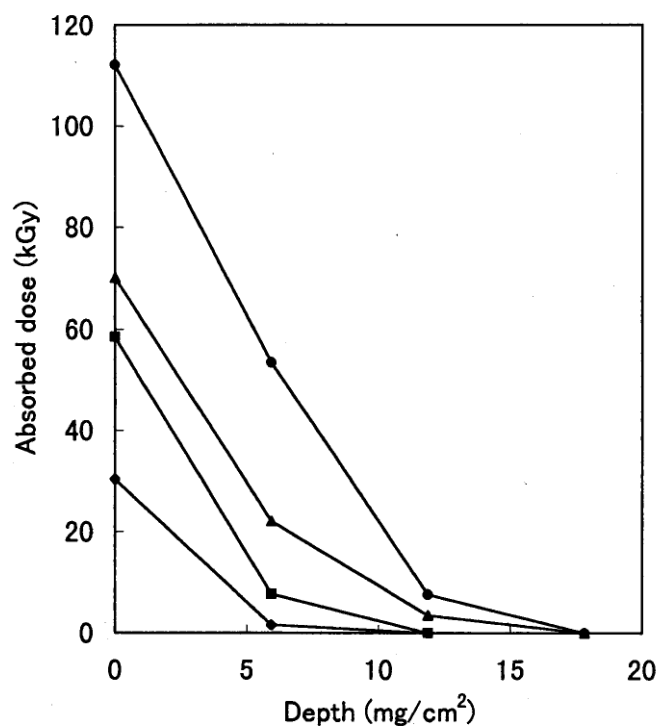


Fig. 3. Depth-dose curve for electron beams (Hayashi et al., 1998a).

◆ 170 kV, 4 μA; ■ 180 kV, 8 μA; ▲ 190 kV, 10 μA; ● 200 kV, 14 μA.

第2章 低エネルギー電子線（ソフトエレクトロン）の貯蔵食品害虫に対する殺虫効果

第1節 3種の貯蔵食品害虫に対する低エネルギー電子線の効果

1-1. はじめに

貯蔵食品害虫に被害された穀物は、臭化メチルくん蒸によって殺虫されてきた。臭化メチルは、残留性は低いものの、人間の健康への影響の観点から好ましくない。さらに、モントリオール議定書により臭化メチルはオゾン層を破壊する恐れのあることが指摘され、先進国では2005年までに原則的に使用禁止になった。そこで代替手法の開発が求められており、放射線照射は有力な代替手法の一つである。殺虫に利用可能な放射線にはガンマ線、エックス線、電子線があり、その中でも電子線はガンマ線のように線源に放射性物質を必要とせず、転換効率の面でエックス線より有利である（林, 1995）。

低エネルギーの電子線、特に「加速電圧が300 kV以下の電子線」と定義されているソフトエレクトロンは、これまで主に穀物の表面殺菌の目的で研究が進められてきた（Hayashi et al., 1997, 1998ab; Hayashi, 1998; Todoriki and Hayashi, 2000）。ソフトエレクトロンは透過力が小さいため、分厚い遮蔽を必要とせず、工場のラインへの組み込みが可能である。また、ソフトエレクトロンはほとんど品質を劣化させることなく貯蔵食品害虫を殺虫できる可能性がある。そこで、代表的な貯蔵食品害虫であるコクヌストモドキ、ノシメマダラメイガ、アズキゾウムシの3種にソフトエレクトロンを照射し、その殺虫効果を解明した。本研究はソフトエレクトロンを貯蔵商品害虫の殺虫に応用した最初の報告である。また、DNA コメットアッセイをDNAの損傷の観察に適用可能かを予備的に検討した。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 供試虫

実験に用いた昆虫は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門にて経代飼育されている系統である。コクヌストモドキは小麦全粒粉、ノシメマダラメイガは玄米と米糠を質量比3 : 1で混合したものを餌として、30℃、70%RHの恒温恒湿室内で飼育されているもの、アズキゾウムシはアズキを餌として25℃、70%RHの恒温恒湿室内で飼育されているものを用いた。

1-2-2. コクヌストモドキとノシメマダラメイガに対するソフトエレクトロン処理

コクヌストモドキとノシメマダラメイガの卵、幼虫、蛹、成虫をシャーレ（直径5.8 cm、深さ1.8 cm）に入れて、ナイロンメッシュで被い、ソフトエレクトロンを照射した。加速電圧は170 kV、電流は4 μ Aである。この条件下で15 cmはなれた穀物表面におけるエネルギーは60 keVであり（ICRU, 1984）、線量率はRCF線量計による測定で0.48 Gy/minであった（Far West Co. Ltd.）（McLaughlin et al., 1977）。

コクヌストモドキの場合、1処理区の個体数は、卵では20、幼虫では20、蛹では15、成虫では20とした。照射時間は卵では0（無処理）、2、5、10、15分、幼虫、蛹、成虫では0（無処理）、1、2、5、10、15分とした。処理後、30℃、70%RHの恒温恒湿室に戻した。幼虫と成虫には餌として小麦全粒粉を与えた。卵は7日後に孵化幼虫数、幼虫と蛹はそれぞれ17日後と7日後に成虫になった個体数、成虫は7日後に生存個体数を数えた。

ノシメマダラメイガの場合、1処理区の個体数は、卵では20、幼虫では20、蛹では10、成虫では10とした。照射時間は卵、幼虫、蛹では0（無処理）、2、5、10、15分、成虫では0（無処理）、1、2、5、10、15分と設定した。処理後、30℃、70%RHの恒温恒湿室に戻した。幼虫には餌として玄米を与えた。卵は6日後に孵化幼虫数、幼虫と蛹はそれぞれ20日後と8日後に成虫になった個体数、成虫は3日後に生存個体数を数

えた。

昆虫種×発育ステージ×照射時間の組み合わせはそれぞれ3反復とした。

1-2-3. アズキゾウムシに対するソフト電子線照射処理

表面に1個の卵が産み付けられているアズキ15個を卵の面を上にしてシャーレ（直径5.8 cm、深さ1.8 cm）に粘着テープで固定し、ソフト電子線を照射した。照射の条件は、上記と同じである。照射時間は、0（無処理）、1、2、5、10分とした。処理後、25℃、70%RHの恒温恒湿室に戻し、7日後に孵化幼虫数を数えた。

アズキゾウムシの幼虫はアズキ粒の中で発育するため、直接電子線を照射することはできない。そのため、1頭のアズキゾウムシ幼虫がアズキ粒の中に入っているアズキを20個用意した。それをシャーレに入れ、ナイロンメッシュで被い、アズキ粒の表面全体にソフト電子線が当たるように穀粒回転装置でアズキ粒を回転させながら、ソフト電子線を照射した。照射時間は、0（無処理）、1、2、5、10、15分とした。アズキ粒を回転させた影響を見るために、ソフト電子線を照射せずにアズキ粒を回転させるだけの処理も行った。処理後、25℃、70%RHの恒温恒湿室に戻し、4週間後に出現した成虫数を数えた。

20頭のアズキゾウムシ成虫をシャーレに入れ、ナイロンメッシュで被い、ソフト電子線を照射した。照射時間を、0（無処理）、1、2、5、10、15分とし、5日後に生存しているアズキゾウムシ成虫数を数えた。

それぞれの処理は3反復とした。

1-2-4. 殺虫の機構の予備的検討

ソフト電子線照射した昆虫の個々の細胞内で切断されたDNA鎖をDNAコメットアッセイ（単細胞ゲル電気泳動法）で調べた。ノシメマダラメイガの幼虫に加速

電圧 170 kV の電子線を 10 秒間照射し、照射後すぐに液体窒素で凍結した。それを丁寧にすりつぶし、粉末にして、冷却した PDS バッファーにけん濁し、125 μm のナイロンメッシュで濾した。このようにして得た細胞のけん濁液を Singh et al. (1988) の方法により、アルカリコメットアッセイにかけ、DNA の断片化を観察した。

1-3. 結果

1-3-1. コクヌストモドキに対する効果

Table 1 にソフトエレクトロンの殺虫効果の結果を示す。卵では、未処理区では 20 個中平均 14.3 個が孵化したのに対し、処理区では 2 分以上の処理で孵化幼虫は見られなかった。幼虫、蛹でも同様に、未処理区では幼虫 20 頭中平均 19.0 頭、蛹 15 頭中平均 13.5 頭が成虫まで発育できたのに対し、処理区ではどちらのステージでも 1 分以上の処理で成虫まで発育した個体は見られなかった。成虫では 20 頭中、未処理区では平均 19.3 頭が生存し、5 分間の処理までは生存率が高かったが、10 分以上の処理で全ての成虫が死亡した。

1-3-2. ノシメマダラメイガに対する効果

未処理区では、卵では 20 個中平均 16.0 個が孵化、幼虫では 20 頭中平均 4.7 頭が成虫まで発育、蛹では 10 頭中 9.3 頭が羽化したのに対し、処理区では 2 分以上の処理ですべての個体が死亡した。成虫ではすべての成虫が死亡するのに 15 分間の処理が必要であった。

Table 1. Survival responses of eggs, larvae, pupae and adults of three stored-product insect pests after exposure to soft electrons.

Species	Stage	No. of individuals	Day after exposure	Number of survivors (mean \pm SE)						
				Exposure time (min)	0 (control)	1	2	5	10	15
				Dosage (kGy)	0 (control)	0.48	0.96	2.4	4.8	7.2
<i>Tribolium castaneum</i>	Egg	20	5		14.7 \pm 1.7a	-	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
	Larva	20	17		19.0 \pm 0.6a	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
	Pupa	15	7		13.3 \pm 0.3a	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
	Adult	20	7		19.3 \pm 0.3a	19.3 \pm 0.3a	19.0 \pm 0.0a	16.0 \pm 1.2b	0.0 \pm 0.0c	0.0 \pm 0.0c
<i>Plodia interpunctella</i>	Egg	20	6		16.0 \pm 0.6a	-	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
	Larva	20	20		4.7 \pm 0.9a	-	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
	Pupa	10	8		9.3 \pm 0.3a	-	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b
	Adult	10	3		9.3 \pm 0.3a	8.7 \pm 1.3ab	7.0 \pm 2.1ac	3.3 \pm 0.7cd	3.7 \pm 0.3bcd	0.0 \pm 0.0d
<i>Callisobruchus chinensis</i>	Egg	15	7		11.7 \pm 1.5a	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	0.0 \pm 0.0b	-
	Larva	20	35		19.0 \pm 0.6a	3.0 \pm 0.6b	4.3 \pm 0.7b	3.3 \pm 0.3b	4.7 \pm 0.9b	3.3 \pm 0.3b
		20*	35		19.0 \pm 0.6a	18.0 \pm 0.6a	18.7 \pm 0.7a	19.0 \pm 0.6a	18.7 \pm 0.9a	18.0 \pm 0.0a
	Adult	10	5		10.0 \pm 0.0a	10.0 \pm 0.0a	10.0 \pm 0.0a	8.7 \pm 1.3a	2.3 \pm 1.9b	3.0 \pm 0.6b
				10.0 \pm 0.0a**	9.7 \pm 0.3a**	6.7 \pm 0.9b**	0.0 \pm 0.0c**	0.0 \pm 0.0c**	0.0 \pm 0.0c**	

Means followed by different letters are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

* These individuals had rotation treatment without electron exposure.

** Number of active adults.

1-3-3. アズキゾウムシに対する効果

卵では、未処理区では 15 個中平均 11.7 個が孵化したのに対し、処理区では 1 分以上の処理で孵化幼虫は見られなかった。幼虫では、ソフトエレクトロンを照射せずにアズキ粒を回転させただけでは死亡率の上昇は見られなかった。ソフトエレクトロン処理区では照射時間にかかわらず平均 3.0-4.7 頭が成虫まで発育した。成虫では、少しでも脚を動かすことができれば生存していると判定した場合、15 分間の処理でも生存しているものが見られたが、歩行能力のあるもののみを「活性のある成虫」と判定した場合、5 分以上の処理で「活性のある成虫」は見られなくなった。

1-3-4. 殺虫の機構の予備的検討

Fig. 4 に加速電圧 170 kV、10 分のソフトエレクトロン処理後 17 日経ったコクヌストモドキ幼虫を示す。照射直後は外見に変化はないものの、照射処理を行った幼虫の動きは緩慢であった。また、照射処理を行った幼虫は餌を摂食せず、照射の 17 日後、後部から後腸が出現した。照射処理を行った幼虫にこのように摂食せず、後腸が出現するものが複数見られた。



Fig. 4. Larva of *T. castaneum* 17 days after treatment with electrons at acceleration voltage of 170 kV electrons for 10 min.

ノシメマダラメイガ幼虫の DNA に対するソフトエレクトロンの効果を DNA コメットアッセイで調べた。幼虫の全身から得た細胞核を電気泳動にかけた。このアッセイでは、個々の細胞の DNA 鎖の切断が彗星の尾のような形で観察される。Fig. 5a は未処理の幼虫から得た泳動図で、ほとんど全ての細胞から得た泳動図が丸い形をしており、彗星の尾は短い。これは DNA の損傷がほとんど起こっていないことを示している。Fig. 5c は 100 Gy のガンマ線照射をした幼虫から得た泳動図で、彗星の尾は大きく、細胞間の差は小さい。これは全身で均等に DNA の損傷が起きたことを示している。Fig. 5b はソフトエレクトロン処理した幼虫から得た泳動図で、彗星の尾が大きいものが多いが、いくつか尾の短いもの、中間のものが見られる。これは全身で均等に DNA が損傷しなかったことを示している。しかし、彗星の尾が短いものは少なく、これは、幼虫の内部まで電子線が到達していることを示している。

これらの結果は、加速電圧 170 kV のソフトエレクトロンの効果は幼虫の表面だけに限らないことを示している。

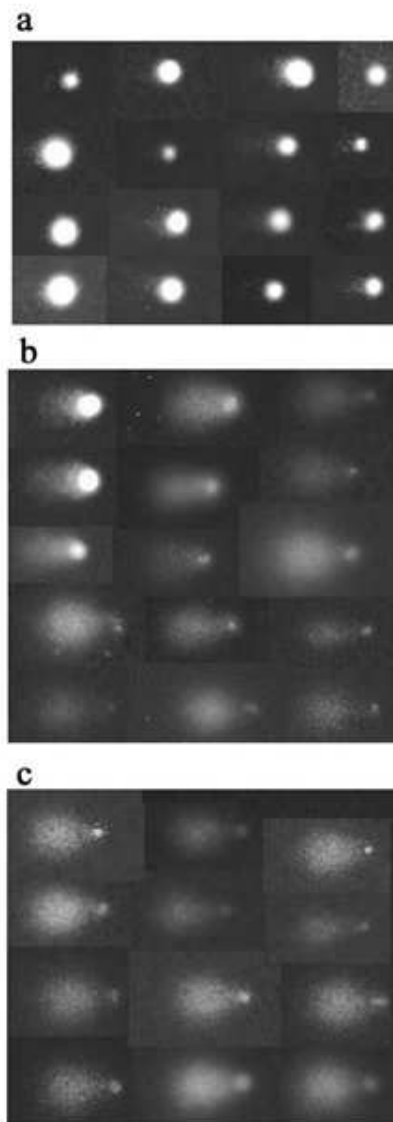


Fig. 5. DNA comet assay for the cells of *P. interpunctella* larvae:

- a. Comet images of individual cells from untreated larvae;
- b. Comet images of individual cells from the larvae treated with electrons at acceleration voltage of 170 kV for 10 sec;
- c. Comet images of individual cells from the larvae treated with gamma rays at 100 Gy.

1-4. 考察

以上の結果は、加速電圧 170 kV のソフトエレクトロン照射がコクヌストモドキとノシメマダラメイガの卵、幼虫、蛹を極めて短時間で殺虫できることを示している。コクヌストモドキとノシメマダラメイガの成虫は殺虫にやや長い時間を要したが、それぞれ 10 分と 15 分で殺虫できた。また、加速電圧 170 kV のソフトエレクトロンは穀物を外側から食べる害虫を 15 分 (7.2 kGy) 以上の処理で殺虫できることが示唆された。

加速電圧 170 kV のソフトエレクトロンは、アズキゾウムシの卵も極めて短時間で殺虫できたが、成虫と幼虫は 15 分間の照射後も生存する個体があった。成虫は 5 分間の照射で歩行能力を失ったので、5 分間の処理で不活性化することができる。アズキゾウムシの幼虫の生存率は照射時間に依存しなかった。アズキゾウムシの幼虫は豆の中で成育するので、ソフトエレクトロンが豆の中心まで到達しないことが示唆される。アズキゾウムシの幼虫を殺虫するのに必要な加速電圧を推定するための更なる研究が必要である。

ガンマ線の照射は不妊化を引き起こすことが報告されている (Cogburn et al., 1966; Brower, 1974; Hussain and Imura, 1989)。ソフトエレクトロン処理をした幼虫から得た細胞でも DNA の損傷が見られたので、ソフトエレクトロンも不妊化を引き起こす可能性がある。ソフトエレクトロン照射された昆虫における繁殖能力の研究が必要である。また、今回用いた DNA コメットアッセイによりソフトエレクトロン処理された昆虫の DNA に対する影響を評価できる可能性があることが明らかになった。

先行研究 (Hayashi et al., 1997, 1998a) により、殺菌目的の加速電圧 170 kV のソフトエレクトロン照射は、穀物の物理化学的性質や脂質に対して影響を与えないことが報告されている。殺虫に必要な線量は殺菌に必要な線量より小さいと思われる。例えば、今回得られた殺虫に必要な線量 (7.2 kGy; 170 kV, 4 μ A, 15 分) は、米の殺菌に必要な線量 (21.6 kGy; 170 kV, 4 μ A, 45 分) の 3 分の 1 である。したがって、ソフトエ

クトロンの穀物の害虫への使用は、穀物の品質への影響の面で、ガンマ線や高エネルギー電子線より有利であると思われる。

ソフトエレクトロン処理装置のプロトタイプが日本の企業によって開発されており、この装置では、線量 28 kGy、電流 4 μ A で、500 kg/時の速度で穀物の殺菌が可能である (Kaneko et al., 2001)。殺虫目的に必要な線量は殺菌目的の3分の1であるため、殺虫目的では3倍の 1.5 t/時の速度で処理が可能であると考えられる。装置の大きさは、奥行き 1.6 m×幅 2.7 m×高さ 2.1 m であり、電子線走査の幅は 45 cm である。ソフトエレクトロン照射装置の処理能力は装置の大きさ、特に、電子線走査と電流の大きさに依存する。大量の穀物の処理システムを構築するためには更なる研究が必要であるが、本節の結果は、ソフトエレクトロン処理が穀物の品質をほとんど劣化させずに貯蔵食品害虫を殺虫する方法としての可能性を持つことを示した。

第2節 実用型ソフトエレクトロン処理装置の貯蔵食品害虫防除への応用

2-1. はじめに

低エネルギー電子線 (ソフトエレクトロン) は透過力が小さく、装置に分厚い遮蔽を必要としないため、精米施設、食品工場のラインに組み込むタイプの処理装置の設計が可能である。実際、穀物処理用の実用型のプロトタイプ処理装置が開発されている (ソフトエレクトロンプロセッサ, NHV コーポレーション) (Hayashi et al. 2002; Kaneko et al., 2001)。

前節で、ソフトエレクトロン処理によって、貯蔵食品害虫のうちノシメマダラメイガやコクヌストモドキのように穀粒の外部に生息するものは完全に殺虫が可能であり、アズキゾウムシのように幼虫が穀粒の内部で発育するものは一部が生存することが明らかになった。

そこで、本節では貯穀害虫が加害している穀物・豆を実用型ソフトエレクトロン処理装置によって処理した場合に、どの程度の殺虫効果を示すかを調べた。

2-2. 材料と方法

2-2-1. コクゾウムシが加害している玄米の調製

卵から成虫までの発育段階のコクゾウムシが加害している玄米のサンプルを用意するために、次のような調製を行った。600 g の玄米が入った容器（直径 14.9 cm、高さ 9.1 cm）に 100 頭の成虫を入れ、25℃、70%の条件下で 22 日飼育し、成虫を取り除いた。これを 2.4 kg の未加害の玄米と混ぜ、更に 25℃、70%の条件下で 2 日間置いた。それに出現後 1 週間以内の成虫を混ぜ、ソフトエレクトロン処理を行った。

2-2-2. ノシメマダラメイガが加害している玄米の調製

卵から終齢幼虫までの発育段階のノシメマダラメイガが加害している玄米のサンプルを用意するために、次のような調製を行った。ソフトエレクトロン処理の 24、17、10、3 日前に、3 mg のノシメマダラメイガの卵（およそ 160 卵）をそれぞれ 300 g の玄米に混ぜ、25℃、70%の条件下で飼育した。卵は 25℃、70%で雌成虫に 3 日間産卵させた玄米を用いた。卵と混ぜてからの経過期間が異なる 4 種類の玄米（300 g）を 1.8 kg の未加害玄米と混ぜ、ソフトエレクトロン処理を行った。

2-2-3. アズキゾウムシが加害しているアズキの調製

卵から蛹までの発育段階のアズキゾウムシが加害しているアズキを用意するために、次のような調製を行った。ソフトエレクトロン処理の 17、12、7 日前にそれぞれ 200 g の小豆が入った容器（直径 14.9 cm、高さ 9.1 cm）に 10 対のアズキゾウムシ成虫を入れ、30℃、70%RH の条件下で飼育した。また、ソフトエレクトロン処理の 3 日前に

200 g のアズキに 10 対のアズキゾウムシ成虫を入れ、25°C、70%RH の条件下で飼育した。成虫はソフトエレクトロン処理の前に取り除いた。飼育期間が異なる 4 種類のアズキ 200 g を 2.2 kg の未加害アズキと混ぜ、ソフトエレクトロン処理を行った。

2-2-4. ソフトエレクトロン処理

上記の方法であらかじめ貯穀害虫に加害させておいた 3 kg の玄米およびアズキをソフトエレクトロンプロセッサ（NHV コーポレーション, 京都市, 日本）で処理した。加速電圧は 150 kV、電流は玄米の場合は 4.4 mA、アズキの場合は 6.4 mA とした。線量は RCF 線量計（Far West Co. Ltd.）による測定で 3.0 kGy と推定された（McLaughlin et al., 1977）。加速器のウィンドウから 5 cm 離れた玄米およびアズキ表面でのエネルギーは 80 keV と推測された。それぞれの貯穀害虫について反復は 3 回とし、未処理区も設けた。

2-2-5. ソフトエレクトロンの効果判定

照射後、25°C、70%RH の条件下に置き、出現する成虫を毎週カウントした。カウントした際に、成虫は取り除いた。

2-3. 結果と考察

ノシメマダラメイガはソフトエレクトロン処理によって全て殺虫され、処理後に成虫になった個体は観察されなかった（Table 2）。これは穀物を外側から食べる害虫の場合、実用型ソフトエレクトロン処理装置によって完全に殺虫できることを示している。

コクゾウムシとアズキゾウムシの大部分はソフトエレクトロン処理によって殺虫できたが、一部は生き残った。どちらもソフトエレクトロン処理から 4 週間後までに出現した成虫の割合は未処理区と比較して 10% 以下であった。このことは穀物・豆の内部

にいた個体の大部分がソフトエレクトロン処理によって殺虫できたことを示している。
コクゾウムシでは処理の直前に生きた成虫を混ぜたが、これらは処理の 24 時間後には
全て死亡した。いっぽう未処理区では全て生存していた。

Table 2. Number of adults emerged from brown rice or adzuki bean during storage after soft-electron treatment

	Storage period (weeks)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. zeamais</i>									
Untreated	0 ± 0 (0 ± 0) ^b	359 ± 31 (359 ± 31)	1643 ± 81 (2002 ± 111)	1353 ± 84 (3355 ± 194)	253 ± 37 (3608 ± 180)	22 ± 2 (3630 ± 179)	11 ± 4 (3641 ± 179)	1023 ± 126 (4664 ± 157)	530 ± 48 (5193 ± 186)
Treated	0 ± 0 (0 ± 0)	2 ± 1 (2 ± 1)	96 ± 7 (98 ± 7)	344 ± 15 (441 ± 29)	17 ± 3 (458 ± 31)	1 ± 0 (459 ± 31)	1 ± 1 (460 ± 32)	3 ± 3 (463 ± 33)	35 ± 3 (498 ± 30)
<i>P. interpunctella</i>									
Untreated	0 ± 0 (0 ± 0)	27 ± 6 (27 ± 6)	92 ± 4 (120 ± 2)	37 ± 2 (157 ± 4)	45 ± 7 (202 ± 8)	1 ± 1 (203 ± 9)	— ^a	—	—
Treated	0 ± 0 (0 ± 0)	0 ± 0 (0 ± 0)	0 ± 0 (0 ± 0)	0 ± 0 (0 ± 0)	0 ± 0 (0 ± 0)	0 ± 0 (0 ± 0)	—	—	—
<i>C. chinensis</i>									
Untreated	242 ± 13 (242 ± 13)	468 ± 25 (710 ± 37)	343 ± 7 (1053 ± 38)	53 ± 6 (1106 ± 35)	21 ± 6 (1127 ± 41)	240 ± 103 (1367 ± 133)	587 ± 117 (1954 ± 250)	301 ± 25 (2255 ± 236)	46 ± 12 (2300 ± 224)
Treated	22 ± 11 (22 ± 11)	17 ± 2 (39 ± 10)	42 ± 8 (81 ± 3)	3 ± 1 (85 ± 3)	1 ± 1 (86 ± 3)	53 ± 7 (139 ± 10)	129 ± 36 (267 ± 27)	65 ± 25 (333 ± 52)	3 ± 1 (336 ± 52)

Mean ± SE.

^a No datum.

^b Cumulative.

本実験において、生殖能力がある場合、出現した成虫は取り除かれるまでのあいだに交尾、産卵し、それが次世代の成虫として出現する。出現する成虫の数はコクゾウムシでは 7-8 週間後、アズキゾウムシでは 5-6 週間後に一時減少し、そこから再び増加している。このことはソフトエレクトロンによって処理された第 1 世代の出現が終わり、その子の第 2 世代が出現し始めたことを示している。第 2 世代が出現することから、ソフトエレクトロン処理によって不妊化されなかったことが分かる。ソフトエレクトロンが穀物・豆の内部の幼虫まで到達していなかったと推測され、これはアズキゾウムシによる先行研究の結果とも一致している (Imamura et al., 2004a)。

結論として、実用型ソフトエレクトロン処理装置は穀物・豆の害虫の殺虫が可能で、特に穀物・豆の外側に生息する害虫は完全に殺虫が可能であると言える。穀物・豆の粒の内部に生息する害虫は完全には殺虫できず、これらを完全に殺虫するためには他の防除技術との組み合わせが必要である。

第3章 アズキ内部および玄米内部の害虫に対するソフトエレクトロン照射の効果

第1節 アズキゾウムシに対するソフトエレクトロン処理の影響

1-1. はじめに

東アジア原産と考えられるアズキは、日本で最も人気のある豆類の一つである。この豆は餡子や赤飯などに利用されている。貯蔵の際に、しばしばアズキゾウムシの加害を受ける。このアズキゾウムシはアズキ以外にササゲ、ひよこ豆、リョクトウなどを加害することで知られている。成虫は豆の表面に卵を産みつけ、孵化した幼虫は豆の中に侵入し、豆の内部を食べて成長する。豆の内部で蛹化し、成虫は 30℃では産卵のおよそ 21 日後に出現する (Arora and Singh, 1970; Ahmed et al., 2003)。酷い加害があった場合、豆には成虫が出現する際に空けた穴が目立つようになり、食用に適さなくなり、また、豆の発芽能力も失われてしまう。Aslam (2004) はアズキゾウムシによって引き起こされるひよこ豆の収率損失を見積もり、アズキゾウムシを貯蔵豆の主要な害虫であることを明らかにしている。

緒言で述べたように、アズキゾウムシを含む貯蔵食品害虫の防除法としてくん蒸による殺虫の代替手段の開発が急務となっている。化学農薬を使わず、残留性の少ない手段が理想的であり、放射線照射はその候補の一つである。放射線を用いた殺虫の概念は国際的に理解されており (IAEA, 1989)、今までに、37 カ国で豆を含んだ貯蔵乾燥食品に対する放射線殺虫処理が認可されている (Anonymous, 2006)。食糧・農業における核技術 FAO / IAEA 共同事業部 (Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture) は WTO 全加盟国の認可によって放射線照射の使用を植物検疫措置とするように尽力している (Anonymous, 2004)。ガンマ線の照射は穀物に対する殺虫処理として長年支持されている (Cornwell, 1966; Hussain and Imura, 1989)。しかしながら、ガンマ線照射は照射した食品の品質に悪影響を与える

ことが報告されている (Hayashi, 1991; Hayashi et al., 1997; Amjad and Anjum, 2003)。その一方、電子線照射はより安全で費用対効果が高く、環境への影響も少ない (Furuta, 1987)。電子線はガンマ線よりも透過力が小さく、更に電子線発生装置からの電子線の利用効率 (最大で 80%) はガンマ線の効率 (1-25%) と比べて非常に高い (Best, 1989)。検疫処理としての電子線照射の有効性はナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch.、マメハモグリバエ *Liriomyza trifolii* (Burgess)、ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* (Fab.)、モモアカアブラムシ *Myzus persicae* (Sulzer) などの切り花害虫で報告されている (Dohino and Tanabe, 1994; Kumagai and Dohino, 1995; Dohino et al., 1996, 1998)。Tanabe and Dohino (1995) は 17 種類の切り花に対する電子線照射の影響を研究し、12 種類に対しては 5 MeV のエネルギーでも悪影響がないことを明らかにし、電子線照射はこれらの切り花種にとって効果的な検疫処理であることを示した。

比較的小さい透過力を持つソフトエレクトロン (加速電圧 300 kV 以下の電子線) は、熱処理やガンマ線照射に比べて品質をほとんど低下させることなく、穀物、豆、香辛料、発芽野菜 (スプラウト) を効果的に殺菌できることが報告されている (Hayashi, 1998)。ソフトエレクトロンは透過力が小さいので、分厚い遮蔽を必要とせず、そのため、食品処理工場のラインへの組み込みが容易である (Todoriki and Hayashi, 2000)。Imamura et al. (2004b) は実用型ソフトエレクトロン処理装置を貯蔵食品害虫の殺虫に利用する試験を行い、殺虫効果のあることを示した。また、加速電圧 170 kV のソフトエレクトロンはコクヌストモドキとノシメマダラメイガの卵、幼虫、蛹を効果的に殺虫できる (Imamura et al., 2004a)。これらの結果を踏まえ、ソフトエレクトロンのアズキゾウムシ防除への有効性を評価するために、ソフトエレクトロンのアズキへの照射による粒内のアズキゾウムシへの効果を明らかにする。まず発育ステージの違いによる感受性の差を調査するために、アズキ粒内のアズキゾウムシの様々な発育ス

テージに 170 kV のソフトエレクトロンを照射し、アズキゾウムシへの効果を調べた。その後、もっとも効果的な線量を見つけるために、上記の試験でもっとも死亡率が低かった発育ステージを耐性ステージとし、これにより高い線量の電子線を照射した。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 実験 1. アズキゾウムシの異なる発育ステージの放射線感受性

アズキの準備

アズキ（品種「大納言」）を実験に用いた。アズキゾウムシは $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、70%RH の恒温恒湿室で累代されているものを用いた。出現後間もないアズキゾウムシ成虫 25 ペアを 100 g のアズキの入った容器内に放し、翌日取り除いた。アズキは丁寧によく混ぜ、25 g ずつの 4 つのサンプルに分けた。これらは直径 8.3 cm のプラスチック容器に入れ、 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、70%RH の恒温恒湿室で目的とする齢まで飼育した。同様にして様々な齢のアズキゾウムシを得た。アズキゾウムシ成虫を取り除いた日を 0 日とした場合、実験に用いた齢は 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 日であり、 30°C での飼育により（Hussain and Imura, 1989）0 から 18 日齢は産卵されて間もない卵から豆の中に留まっている成虫までを含むと推定できる。

ソフトエレクトロン処理

前記の方法で用意した様々な齢のアズキゾウムシが生息するアズキ（25 g）にヴァンデグラフ電子加速器（NHV コーポレーション、京都、日本）で発生させた加速電圧 170 kV のソフトエレクトロン（電流 $2\ \mu\text{A}$ ）を照射した。アズキは照射窓から 15 cm の距離にある穀粒回動装置のトレーに入れた。回動装置は 1 秒間に 1 回の往復運動と 10 回の振動を行うように設定した。トレー表面における線量率は、RCF 線量計により、170 kV の条件で $0.5\ \text{kGy/min}$ と推定された（Hayashi et al., 1998a）。よって、10

kGy の処理を行うために、20 分間の照射を行った。電子線照射を行わない対照区も設定した。

1-2-2. 実験2. 耐性ステージである18日齢に対する処理

1-2-2で記述したアズキゾウムシの異なる発育ステージの放射線感受性の試験で、もっとも死亡率が低かった耐性ステージは18日齢であることが分かった (Fig. 6)。この耐性ステージに対する効果的なエネルギーと線量を決定するために、前記の方法で準備した18日齢のアズキゾウムシが生息しているアズキを、10 kGy (170 kV)、20 kGy (170 kV)、10 kGy (200 kV)、20 kGy (200 kV) の4条件で処理した。200 kVの場合、電流は7 μ Aであり、トレー表面での線量率は1.78 kGy/minと推定された。よって、照射時間はそれぞれの処理区で20、40、6、12分であった。電子線照射を行わない対照区も設定した。

1-2-3. 殺虫効果の判定

それぞれの処理区、対照区から出現した成虫数を記録した。二酸化炭素で麻酔し、目開き3.3 mmのふるいでふるうことにより、成虫をアズキから分離した。また、性別は触角の形状で識別した (Halstead, 1986)。観察は産卵の21日後から開始し、2日連続で新しい成虫が出現しなくなるまで続けた。成虫の出現数の減少率を対照区との比較で計算した。性比は出現個体数に対する出現した雌の個体数によって求めた。出現した成虫の寿命、産卵数、次の世代まで成長した子の数を調べるために、処理区及び対照区から得た成虫を雌雄1対ずつ25 gのアズキの入った容器に放し、毎日、観察した。

データの解析には一元配置分散分析及びTukey-Kramer HSD testを用いた。対照区と試験区の比較にはt-testを用いた (SAS Institute, 2002)。

1-3. 結果

1-3-1. アズキゾウムシの発育ステージと放射線感受性の関係

成虫の出現に対するソフトエレクトロン処理 (10 kGy, 170 kV) の効果を対照区に対する処理区の出現成虫数の減少率で示した (Fig. 6)。全ての処理区で出現成虫数は対照区よりも有意に低く、その数は0、2及び4日齢の0頭から18日齢の平均32.21頭の間であった。出現成虫数の減少率は齢が増すごとにゆっくりと減少した。その値は0、2及び4日齢で100%、16日齢で80.76%、18日齢で50.68%であった。全ての処理区でソフトエレクトロン処理の有意な影響があったが、最も感受性の高いステージは0から4日齢であった。

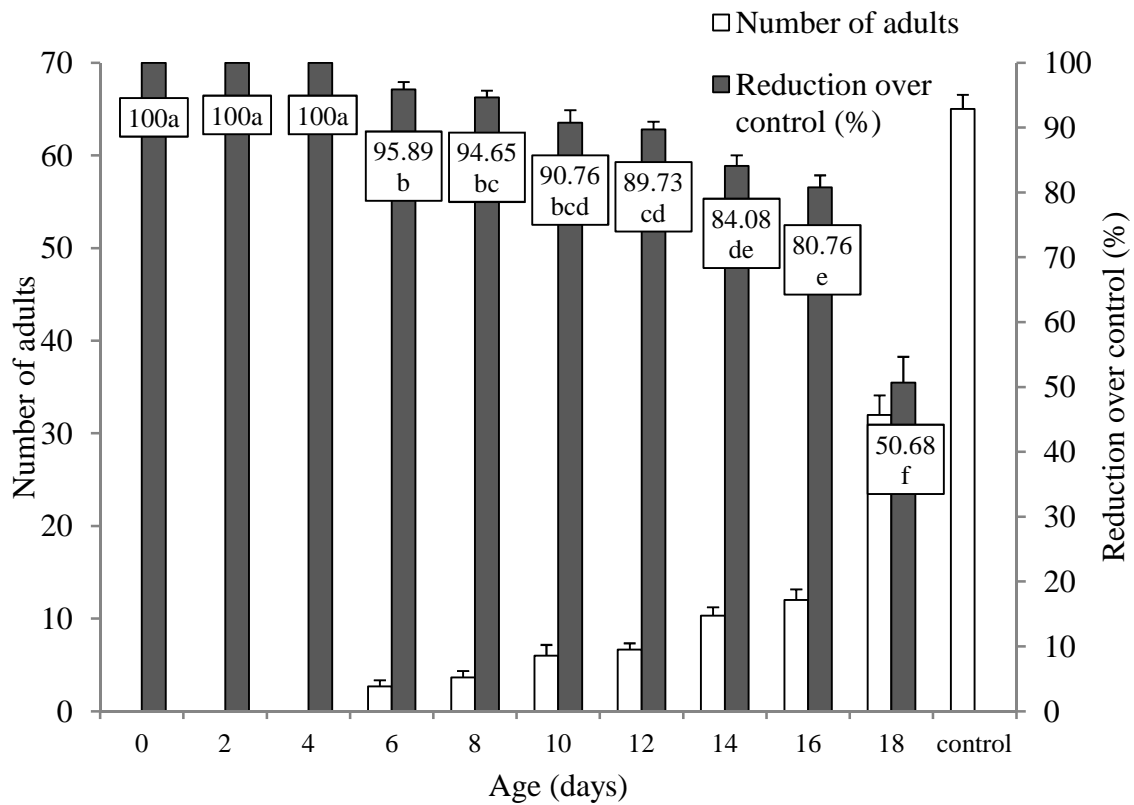


Fig. 6. Effect of soft electron treatment (170 kV–10 kGy) on *C. chinensis* of different ages in terms of reduction in adult emergence. Mean (\pm SE) values followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Tukey–Kramer HSD test).

1-3-2. 成虫の出現率、寿命、産卵数に対する影響

最も効果的な線量を求めるため、18日齢のアズキゾウムシが生息しているアズキに4種類の処理を行った。全ての処理区で成虫の出現率は対照区より有意に低かった (Table 3)。出現成虫数の平均は、対照区の107.0個体に対し、処理区では最少で20 kGy (200 kV) 処理区の24.7個体、最多で10 kGy (170 kV) 処理区の50.6個体であった。10 kGy (170 kV) 処理区を除き、他の全ての処理区で出現成虫数に統計的差はなかった。対照区に対する出現成虫数の減少率は10 kGy (170 kV) 処理区の52.6%に対し、20 kGy (170 kV) 処理区、10 kGy (200 kV) 処理区、20 kGy (200 kV) 処理区でそれぞれ76.3%、74.6%、76.9%であった。成虫出現後の観察により、出現した成虫の寿命、産卵数、成虫まで発育した子の数に対して、ソフトエレクトロンが影響を与えることが分かった。すなわち、すべての処理区で成虫寿命は対照区よりも短かく、処理区で2.1から2.6日であるのに対し、対照区では7.6日であった。同様に、産卵数は対照区の59.3個に対し、20 kGy (200 kV) 処理区、10 kGy (200 kV) 処理区、20 kGy (170 kV) 処理区、10 kGy (170 kV) 処理区でそれぞれ2.3、2.7、4.9、12.8個であった。また、出現した成虫が産んだ卵は、対照区で42.6頭が成虫まで発育したのに対し、全ての処理区で成虫まで発育する個体は見られなかった。

1-3-3. 出現した成虫の性比に対する影響

ソフトエレクトロン処理は出現した成虫の性比に有意な影響を与えなかった (Table 4)。雌性比は0.31から0.42で、日齢間の比較、及び対照区との比較で有意差はなかった。

Table 3. Effect of different soft electron treatments on 18-day-old *C. chinensis* in terms of adult emergence, longevity and fecundity.

Treatment	Number of adults emerged	Percentage reduction over control	Adult longevity (days) ¹	Number of eggs per female ²	Mean number of adults emerged (second generation)
10 kGy (170 kV)	50.6 ± 1.3b	52.6	2.6 ± 0.2b	12.8 ± 0.6b	0.0
20 kGy (170 kV)	25.3 ± 3.5c	76.3	2.2 ± 0.2bc	4.9 ± 0.3c	0.0
10 kGy (200 kV)	27.3 ± 3.4c	74.6	2.1 ± 0.2c	2.7 ± 0.3d	0.0
20 kGy (200 kV)	24.7 ± 0.9c	76.9	2.2 ± 0.1c	2.3 ± 0.2d	0.0
Control	107 ± 2.6a	—	7.6 ± 0.2a	59.3 ± 2.1a	42.6

Mean ± SE followed by different letters are significantly different (P < 0.05) by Tukey-Kramer HSD test using SQRT(x ± 0.5)

transformed data.

¹ n = 60; ² n = 30.

Table 4. Effect of soft electron treatment on the sex ratio of treatment surviving adults of *C. chinensis*.

Treatment	Female sex ratio ¹									
	Treatment age of insect (days)									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
10 kGy (170 kV)	x	x	x	0.31	0.34	0.42	0.39	0.32	0.37	0.31
Control	0.35	0.38	0.39	0.35	0.38	0.39	0.35	0.38	0.39	0.35
t-test				NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

¹ Ratio of number of female insects to total population.

x, no adult emergence; NS, non-significant.

1-4. 考察

1-4-1. アズキゾウムシの異なるステージの放射線感受性

ソフトエレクトロンは、食品照射に用いられる電離放射線の中で、ガンマ線、エックス線、高エネルギー電子線よりも安全である (Hayashi et al., 1998b)。今回の結果より、ソフトエレクトロンは、アズキゾウムシの防除に効果のあることが分かった。全ての成虫以前のステージにおける照射は幼虫から成虫への発育を妨げたが (80-100%)、O'Brien and Wolfe (1964) と同様に齢によって感受性の差が見られた。すなわち、アズキゾウムシの放射線感受性は、齢とともに有意に低下した (Fig. 6)。齢と感受性の関係より、死亡率が 90-100% である感受性の高いグループ (0-10 日齢)、死亡率が 80-90% である感受性のあるグループ (12-16 日齢)、死亡率が 50% 程度である耐性のあるグループ (18 日齢) に分けることができる。これらの 3 グループは、30°C での発育サイクルにより (Hussain and Imura, 1989)、それぞれ卵から幼虫の初期、幼虫の後期から蛹、豆の中で出現に備えている成虫に対応している。本研究においても、それぞれの日齢の 50 個の豆を分解することによってもこのことを確認した。今回の結果でアズキゾウムシは発育が進むに従ってソフトエレクトロン照射による死亡率が低下したが、ガンマ線照射によっても蛹と成虫を殺虫するためには卵、幼虫を殺虫する場合よりも高い線量を要することが報告されている (Yoshida et al., 1972)。発育の進んだステージで放射線耐性が見られることは、ハスモンヨトウ (Seth and Sehgal, 1987)、ナミハダニ (Dohino and Tanabe, 1994) など他種でも報告がある。

昆虫に対する放射線の影響は照射した昆虫を構成している細胞の放射線感受性と密接に関わっている。細胞分裂と組織の分化は卵の胚発生時に起こる。昆虫の分裂細胞は放射線に極めて敏感であるため、卵は最も放射線感受性が高い。一方、成虫は分裂細胞が少なく安定であり、最も耐性がある (Ahmed, 2001)。今回の結果からも、卵が最も放射線感受性の高いことを確認できた。また、電子線照射のエネルギーは照射する食品

の表面から奥に行くほど減少する (Hayashi et al., 1998)。卵は豆の表面に固着されるために電子線が直接当たるが、他のステージでは、豆の中で発育するために放射線の効果が減少あるいは阻害されていると考えられる。同様に、初期の幼虫は後期の幼虫や蛹よりも感受性が高く、これは豆内部の幼虫の生息している場所が影響している可能性がある。Ahmed et al. (2003) はアズキゾウムシの初期の幼虫は豆の表面直下に留まっているが、4 齢幼虫は豆の奥深くにすることがあり、この違いが植物精油のアズキゾウムシへの殺虫効果に影響していることを明らかにした。これは、豆内で豆の表面近くにいるかどうか感受性に直接的に関わってくることを意味している。豆内部での位置の他に、成虫の外表皮の堅さが昆虫内部へ電子線が透過するのを妨げる可能性がある。これは昆虫の最も発育の進んだステージで最も放射線に耐性があるという観察 (Hallman, 2000) と一致する。コクヌストモドキとノシメマダラメイガにおいても、成虫以前の発育段階に対してソフトエレクトロンが効果的であるという同様の結果が報告されている (Imamura et al., 2004a)。

1-4-2. 耐性ステージに対する効果的な線量

電子線照射に対してもっとも耐性がある 18 日齢のステージに対し、3 種の高線量条件を試した。エネルギーレベルの高い処理 (200 kV) では 10 kGy (170 kV) 処理よりも成虫の出現率は有意に減少した (Table 3)。このことは透過力に直接影響する電子線のエネルギー (Hayashi et al. 1991) が線量よりも殺虫率に対して決定的な役割を持つことを示している。3 種類の高線量条件では、10 kGy (200 kV) 処理は処理時間が短いため、最も効果的な処理である。

1-4-3. 成虫寿命、産卵数、性比に対する影響

死亡率の他に、放射線照射は寿命の短縮、産卵数の減少、孵化率の低下、発育の遅

延、摂食の阻害などの影響を及ぼす (Ahmed et al., 1981)。本研究においても、成虫寿命、産卵数、子世代の発育に対し、電子線照射が有意な影響を与えることが明らかになった。処理区から出現した成虫の寿命と産卵数は、対照区よりも有意に低下した。これは電子線照射後でも成虫が生殖能力を完全には失わないことを反映しているものの、成虫寿命の短縮と細胞器官の損傷 (Ahmed et al., 2001) によって、有意な産卵数の減少が起こったと考えられる。アズキゾウムシの生殖能力に対する放射線の影響は、Yang and Yang (1993) によって、ガンマ線照射したアズキゾウムシ成虫で産卵数が 97.4% 減少したと報告されている。Seth and Sehgal (1986) もハスモンヨトウの産卵数と生殖能力に対してガンマ線が悪影響を与えることを報告している。

不妊化によって商品から害虫を完全に防除することができる (Ahmed et al., 1976)。本研究によって分かったことの一つは、ソフトエレクトロン処理したアズキから出現した成虫が産んだ卵から次の世代の成虫まで発育するものがなかったことである。これは、結果的にソフトエレクトロン処理によって害虫の完全な管理が達成できることを意味している。DNA のような巨大分子は特に電離放射線に弱く、小さな分子へと破壊される。この DNA の損傷が細胞分裂を妨げ、不妊化や殺虫効果を引き起こす (Kunstadt, 1999)。アズキゾウムシを含む数多くの貯蔵食品害虫で、ガンマ線が不妊化を引き起こす効果を持つことが報告されているが (Begum et al., 1980; Kamel and Ahmed, 1980; Hussain and Imura, 1989)、電子線による不妊化の研究はあまり行われてこなかった。Dohino et al. (1997) はクワコナカイガラムシ *Pseudococcus comstocki* (Kuwana) に対して電子線が不妊化を引き起こすことを報告し、Imamura et al. (2004a) はソフトエレクトロン照射によってノシメマダラメイガの細胞で DNA の損傷が起こり、これが不妊化を引き起こす可能性があることを報告している。

雌性比は個体群の増殖に直接的な影響を与えるので、完全殺虫が達成できない場合、殺虫効果を評価する上で重要な要因である。性によって放射線感受性が異なるという研

究がいくつかあり、ハダニのような例外を除き、ミバエ、ガなどの多くの場合で雌の方が感受性が高い (Dohino and Tanabe, 1994; Hallman, 2000)。この違いは、雄の方が染色体の損傷が雌よりも多くても生存できることによる (Tothova and Marec, 2001)。しかしながら、本研究の結果では同様の傾向は見られず、ソフトエレクトロン処理区と対照区の間で性比に有意差は見られなかった (Table 4)。ソフトエレクトロン処理はアズキゾウムシの発育段階に対して、雌雄ともに同等の殺虫効果を持つことが明らかになった。しかし、性別間の電子線照射感受性の差を確かめるためには成虫においても同様の試験を行う必要がある。

本研究により、加速電圧 200 kV のソフトエレクトロンは 6 分程度の照射時間でアズキ内部で発育しているアズキゾウムシの全ステージを効果的に防除できることが明らかになった。電子線はガンマ線に比べて指向性があり透過力が小さいためにガンマ線より人体に対する害が少なく、電子加速装置は修理のために電源を切ることが可能で、火事や爆発、その他の大災害の際にも放射性物質が漏出することはない (Urbain, 1989)。これらのことを考慮すれば、ソフトエレクトロン処理は穀物における殺虫に大きな可能性を持つと思われる。

第2節 異なる齢期のコクゾウムシに対するソフトエレクトロン処理の効果

2-1. はじめに

ソフトエレクトロン処理によってコクヌストモドキ、およびノシメマダラメイガの卵から成虫まで、アズキゾウムシの卵と成虫は完全に不活性化できるものの、豆粒の中で発育するアズキゾウムシの幼虫は完全には殺虫できないことが報告されている (Imamura et al., 2004a)。また、実用型ソフトエレクトロン処理装置による処理で、穀物の外側を加害するノシメマダラメイガは完全に殺虫できるが、穀物・豆の粒内で発

育するコクゾウムシ、アズキゾウムシの一部は生存することが報告されている (Imamura et al., 2004b)。

本節では、ソフトエレクトロン処理に対するコクゾウムシの耐性ステージを明らかにするために、玄米の中で発育する異なる齢期のコクゾウムシに 170 kV の電子線を照射し、感受性を比較した。また、microMRI によって電子線に耐性を持つ発育ステージの粒内での位置を観察した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 異なる齢期のコクゾウムシのソフトエレクトロン処理に対する感受性

試料の準備

成虫出現後 30 日以内のコクゾウムシ成虫 100 頭を 300 g の玄米に入れて産卵させ、2 日後に取り除いた。玄米は 8 g ずつに分け、プラスチック容器に入れて処理を行う齢期に達するまで 25°C、70%RH の条件下に置いた。処理を行った齢期はコクゾウムシ成虫の産卵開始を起点として 2-17 日後のそれぞれと、19、21、23、25、27、29、31 日後であり、産卵直後の卵から蛹までが含まれている。

ソフトエレクトロン処理

あらかじめ目的とする齢期のコクゾウムシが内部にいるように調製した 8 g の玄米にソフトエレクトロンを照射した。加速電圧は 170 kV、電流は 4 μ A であった。穀粒の表面に均一に照射できるように、穀粒回動装置で穀粒を回転させながら、ソフトエレクトロンを照射した。加速器の照射窓からの距離は 15 cm とした。穀粒の表面が均一に照射されていることはメチルイエローで染色された玄米を用いて確認した (Hayashi and Todoriki, 2001)。線量率は穀粒回動装置を作動させない状態で、RCF 線量計 (Far West Co. Ltd.) による測定で 1.0 kGy/min と推定された (McLaughlin et al.,

1977)。穀粒回動装置上の玄米表面での吸収線量はこの測定値の半分であると推定される (Hayashi et al., 1998)。照射時間は 30 分とした。処理後、25°C、70%RH の条件下に置き、出現する成虫を数えた。コントロールとして、照射をせずに穀粒回動装置による処理のみを行ったものを用意した。反復数は3とした。

2-2-2. MRI

13日齢のコクゾウムシを内部に含む玄米を microMRI によって観察した。NMR スペクトロメーター (DRX300WB, Bruker, Karlsruhe, Germany) を使用し、プロトン microMRI を行った。室温 (≒23°C) でプロトン NMR シグナルを得、ParaVision (ver. 2, Bruker) で画像化し、幼虫が内部にいる米のスクリーニングを行った。100 個の玄米を調査した。

内部に幼虫がいる玄米を高空間分解能 MRI で観察した。米粒の縦方向および横方向からの画像を取得した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. 異なる齢期のコクゾウムシのソフトエレクトロン処理に対する感受性

無処理区に対する処理区における出現成虫数の減少率を殺虫率とし、Fig. 7 に示した。全ての齢期にわたって 60%以上の殺虫率が得られ、産卵開始から 3、4、17、19、21、23、25、27 日後のものは完全に殺虫できた。産卵開始から 5-16 日後の試料には孵化直前の卵から 3 齢幼虫が含まれる (Howe, 1952)。29 日後、31 日後の試料から生きた成虫が出現したが、この時期の試料には既に羽化して成虫になっているものの、玄米の中に留まっていた個体が含まれる (Howe, 1952) ためであると思われる。

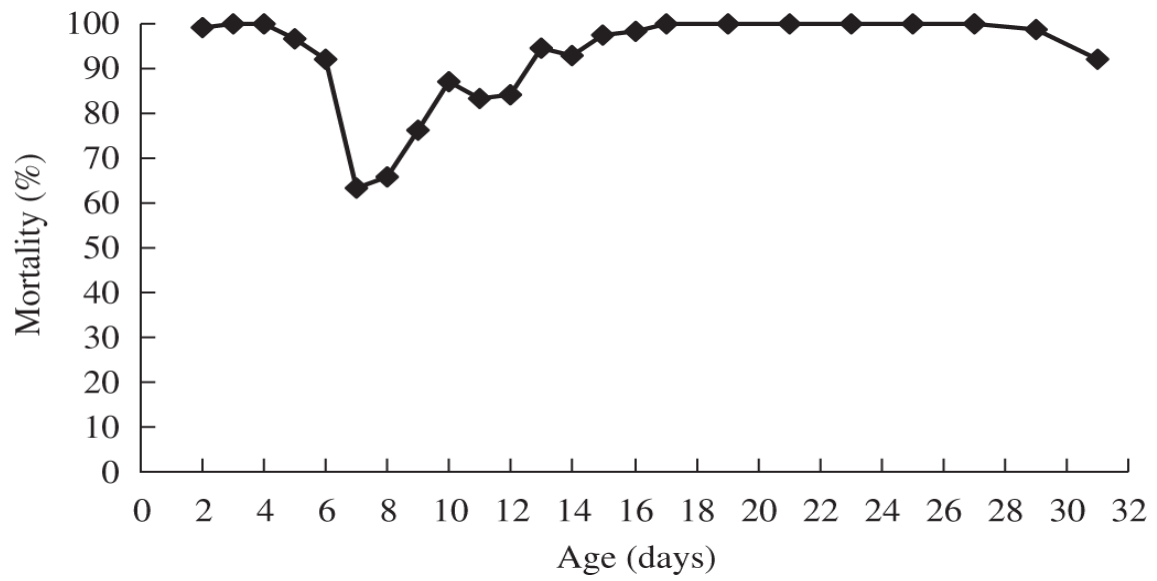


Fig. 7. Effect of soft-electron treatment (170 kV–15 kGy) on *S. zeamais* of different ages in terms of reduction in adult emergence (averages of three replications).

2-3-2. microMRI

産卵開始日から 13 日後の幼虫が内部に存在する玄米を microMRI で観察したところ、42 個中 38 個の玄米では玄米の表面に近い部分に幼虫がいたが、42 個中 4 個の玄米では玄米の中心部分に幼虫がいた (Fig. 8)。

コクゾウムシの雌成虫は口吻で玄米に穴を開け、中に卵を産む。孵化した幼虫は玄米の内部を食べ、一部の幼虫は玄米の中心部へと到達する。ソフトエレクトロンは透過力が小さく、玄米の中心部までは到達しないので、照射時にすでに中心部まで到達していた幼虫は生存したと考えられる。

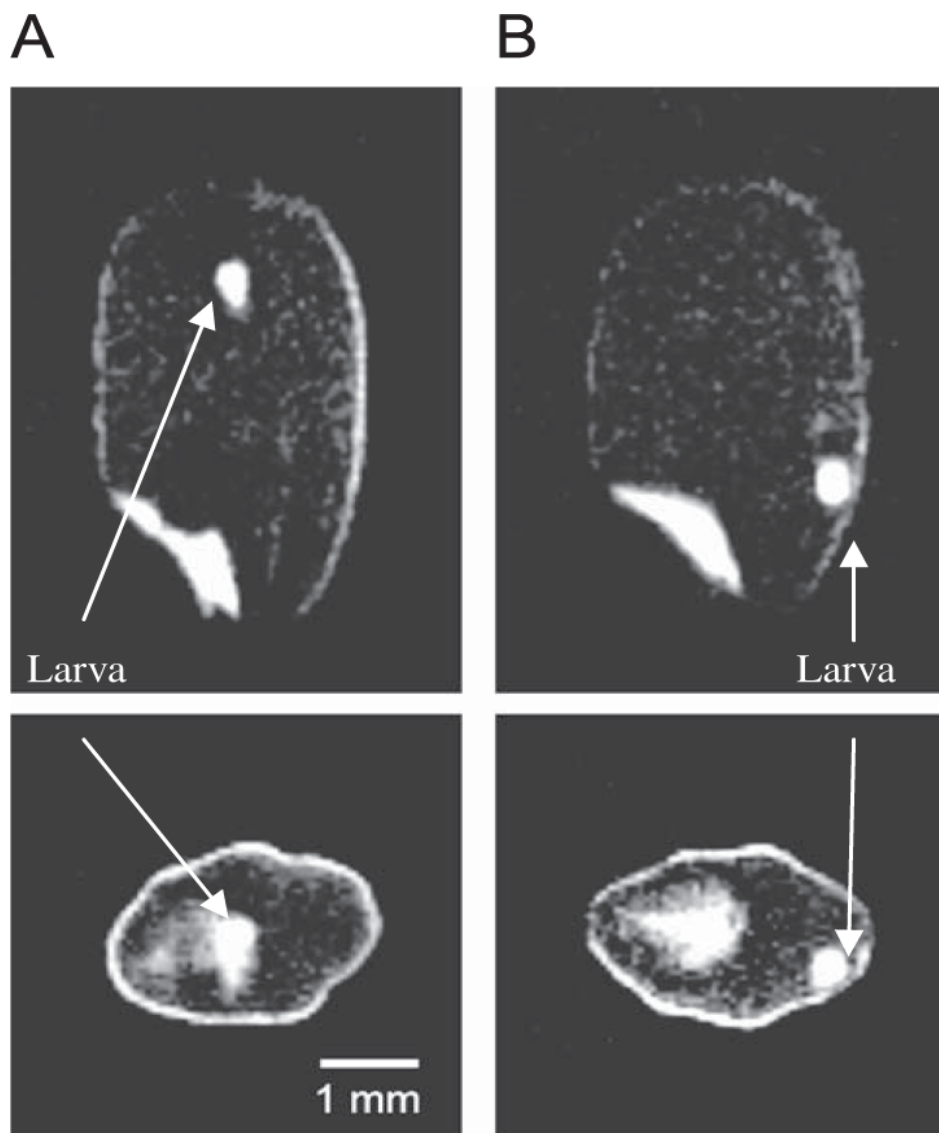


Fig. 8. The longitudinal and transverse images of grains containing larvae of *S. zeamais*. A larva resided at the center of a grain (A) and a larva resided at the periphery of a grain (B).

第4章 低エネルギー電子線の殺虫メカニズム

第1節 コメットアッセイを用いたDNA損傷の評価法

1-1. はじめに

クリシギゾウムシ *Curculio sikkimensis* (Heller)は東アジアでは重要なクリの害虫である (Tanaka et al., 1981; Kwon et al., 2001, 2004)。その殺虫にはくん蒸 (二硫化炭素、ホスフィン、臭化メチル)、低温貯蔵、CA (Controlled Atmosphere; 貯蔵環境の空気組成を調整すること) 貯蔵、放射線照射、冷水浸漬といった方法が実践されている (Kwon et al., 2004)。前述のように、臭化メチルは先進国では2005年、開発途上国では2015年までに段階的に廃止された (Anonymous, 2000)。国際連合環境計画 (UNEP) は、臭化メチル技術選択枝委員会 (MBTOC) を設立し、殺虫目的での食品への放射線照射が選択枝の一つであることを確認した (Ahmed, 2001; Fields and White, 2002)。放射線殺虫の概念は国際的に既に認められている (IAEA 1989; Hasan and Khan, 1998; Molins, 2001)。この技術は、食品の衛生的品質を増大し、食品の損耗を減らし、貯蔵寿命を延長するために利用される (WHO, 1988)。更に、国際食品規格委員会 (Codex Alimentary Commission) は全ての食品、農産物の殺虫に対し、1 kGy の線量を推奨している (CAC, 1984)。また、線量 10 kGy までは放射線照射によって食品中で有毒物質が生成されたり、栄養的、微生物的な問題が発生したりすることはない (WHO, 1988; CAC, 1984)。

貯蔵食品における殺虫の一手段として、電子線による処理が考えられる。60 keV のソフトエレクトロンは、コクヌストモドキ、およびノシメマダラメイガの卵、幼虫、蛹、成虫とアズキゾウムシの卵、成虫を殺虫することができる (Imamura et al., 2004ab)。Kwon et al. (2004) はクリの検疫用途、種苗管理目的の臭化メチルくん蒸代替手段の一つとして、0.5 kGy の放射線照射を推奨している。Cleghorn et al. (2002) は 225–700 kV でコクゾウムシ *Sitophilus oryzae* (L.) の加害する小麦に対する電子線の透過

力の試験を行い、400 kV で 200 Gy の処理で効果的に殺虫できることを示した。

放射線によって引き起こされる DNA の変化は、放射線処理の検知に利用される可能性がある (Delinceé, 1996; Imamura et al., 2004a)。DNA の断片化を検出する技術は DNA コメットアッセイと呼ばれる (Rojas et al., 1999; Imamura et al., 2004a)。これは細胞から核の DNA を取り出し、それぞれの核ごとに電気泳動することにより、DNA の断片化を観察する手法である。DNA の断片化を高感度に検出できるため、照射食品の簡便なスクリーニング法としてさまざまな食品に応用されている (等々力・林, 2002)。

細胞内の DNA は放射線に弱く (Hutchinson, 1966)、DNA が放射線によって直接的に損傷を受けたり、また生体内の水に放射線が作用して活性酸素やラジカルが生成し、これらを介して間接的に DNA が損傷を受けたりすることが放射線による殺虫機構と考えられている (林, 1995; 中原, 2008)。

しかしながら、特に DNA の断片化に対する電子線の効果に関する情報は少なく、また、昆虫における DNA の断片化を DNA コメットアッセイによって評価する手法は確立されていない。そのため、本節ではクリシギゾウムシ幼虫を用いて電子線照射による DNA 損傷を、DNA コメットアッセイにより評価した。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 供試虫

実験に用いたクリシギゾウムシの老齢幼虫は、茨城県で収穫されたクリ (品種「筑波」) から脱出してきたものを用いた。幼虫は 30°C、75%RH で維持した。

1-2-2. クリシギゾウムシ幼虫への電子線処理

クリシギゾウムシの老齢幼虫に電子線を直接的に照射した。ヴァンデクラフ型加速

器を用い、加速電圧は、0（対照区）、300、750、1000、1500 kV で、電流は 4 μ A とした。線量は有効性が確認されているところを基準とし、0（対照区）、1、4 kGy とした(CAC, 1984; Hayashi et al., 1997; Halverson and Nablo, 2000; Ahmed, 2001; Imamura et al., 2004ab)。加速器の照射窓から 15 cm の距離にプラスチック容器を置き、そこにクリシギゾウムシ幼虫を入れ、容器にフタをせずに電子線を照射した。RCF 線量計により線量率は 1.22 kGy/min と推定された (McLaughlin et al., 1977)。

1-2-3. DNA 損傷の評価

様々な加速電圧で線量 1 ないし 4 kGy の処理を行ったクリシギゾウムシ幼虫の個別の細胞における DNA 鎖の損傷の程度を、DNA コメットアッセイにより評価した。電子線照射した幼虫を液体窒素で素早く凍結し、静かに粉末にし、冷却した PBS バッファーにけん濁し、125 μ m のナイロンメッシュで濾した。このようにして得た細胞懸濁液を Singh et al. (1988) の方法により、中性コメットアッセイにかけた。スライドグラスを TBE バッファー (2 mM EDTA、90 mM Tris-boric acid、pH8.0) 中に 4°C で 30 分間置いてから、26 V で 10 分間、電気泳動を行った。

コメットアッセイするために、昆虫の細胞を顕微鏡スライド上のアガロースに設置し、細胞タンパク質を洗い流した。DNA をアルカリ条件で変性させ、電気泳動した。電気泳動によって、ほどけたり破壊されたりした DNA 断片は損傷していなかったり超らせん構造だったりした DNA よりも遠くまで移動する。染色すると、DNA によって彗星のような形ができる。彗星の頭部は蛍光で明るく染色され、彗星の尾部の長さや輝度は細胞内の DNA 鎖の損傷の程度を反映している。後述のテールモーメントを DNA 損傷の指標として用いた。彗星の頭部の中心と尾部の分布は Olive et al. (1993) の方法に従って決定した。Fig. 9 は典型的な彗星の基本的な特性を示している。

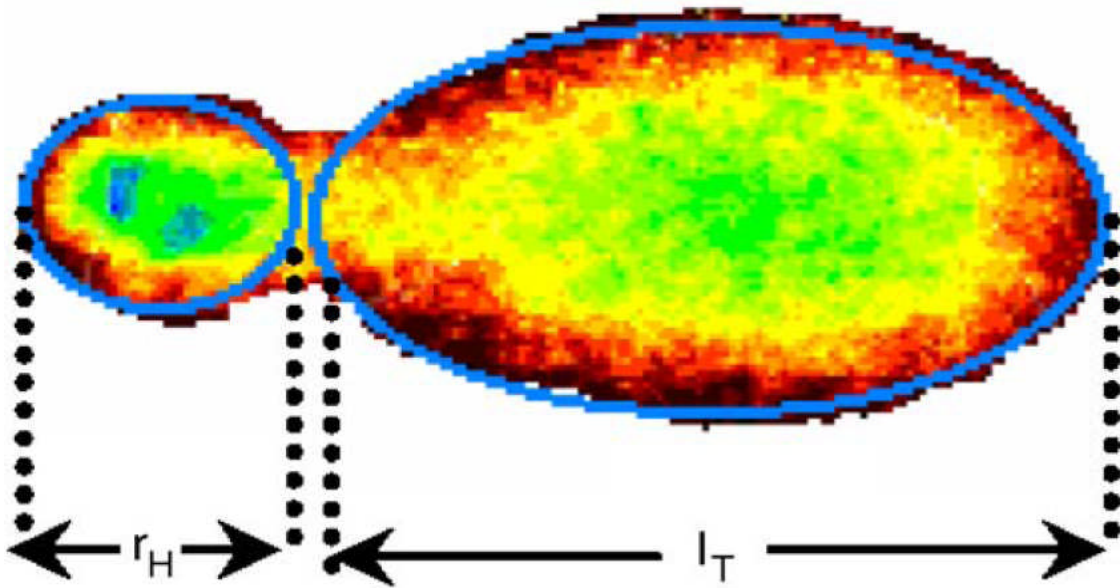


Fig. 9. Basic properties of a typical comet which could be used in determining DNA damage as $\% \text{ DNA damage} = (l_T / (l_T + r_H)) \times 100$; where, l_T is the tail area of comet image, r_H is the head area of comet image.

DNA 損傷は CASP ソフトウェア (v2.2.2) を用いて決定した。尾部に含まれる DNA の割合、尾部長、テールモーメント (尾部長と尾部に含まれる DNA の割合の積)、オリーブテールモーメント (尾部と頭部の重心間の距離と尾部に含まれる DNA の割合の積)、DNA 損傷率といった様々な目的の指標を求めた。ソフトウェアのプロトコールに従い、DNA 損傷の視覚的及びコンピュータ処理された画像解析を行った。スライドを励起波長 460 nm、20 倍で倒立蛍光顕微鏡 (Leica, ドイツ) によって観察した。評価と画像収集は Leica IM50 Image Manager v1.20 を用いて行った。重複のないランダムに選んだ 50 個の細胞を尾部長の泳動と尾部に含まれる DNA の割合に基づいて割り当てた。それぞれのスライドでの損傷スコアの合計は、それぞれのグレードに割り当てられた細胞の数とそれぞれのグレードの値の積の和によって求めた。

1-3. 結果と考察

750 kV から 1000 kV の加速電圧の電子線によって、1 kGy と 4 kGy でそれぞれ処理後 28 日以内、14 日以内にクリシギゾウムシ幼虫は 100% 死亡した。全ての幼虫は 1500 kV、4 kGy の処理で 1 日以内に死亡したが、1 kGy では 21 日を要した。

DNA 損傷率 (%) は照射区と非照射区で有意な差があった ($F = 30.36$; $P < 0.001$; Fig. 10)。損傷率は 1 kGy と 4 kGy の両方で加速電圧が大きくなるほど大きくなったが、高線量になるほど増加の割合は減った。これは幼虫の放射線感受性が線量に依存であり、上限のあることを示している (Fig. 10)。死亡率も線量依存性があり、この現象を支持している。両方の線量で 750 kV から 1500 kV の加速電圧における DNA 損傷の傾向は似通っていた。しかしながら、300 kV では 1 kGy と 4 kGy で大きな差があった (Fig. 10)。

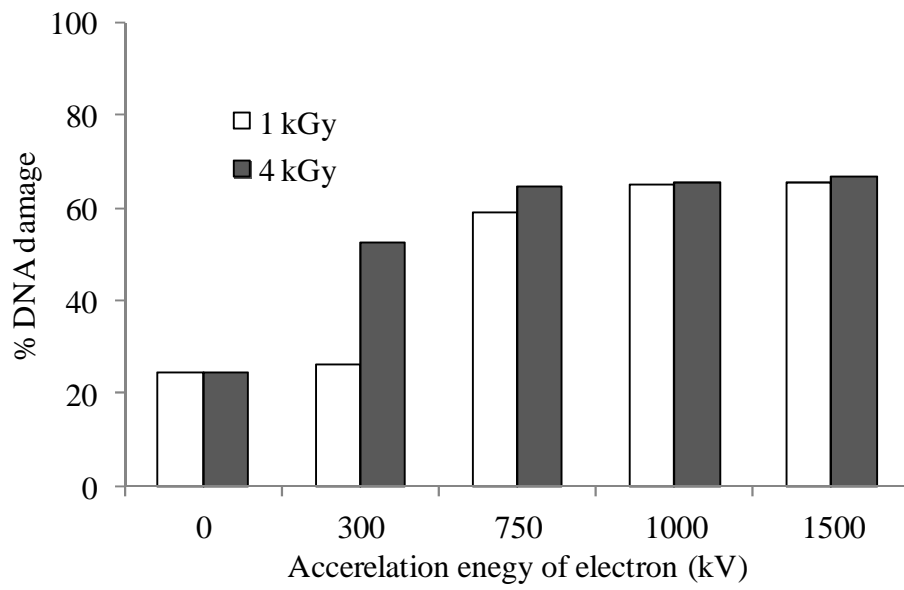


Fig. 10. Electron beam-induced percent DNA damage in the larvae of chestnut weevil irradiated at 1 and 4 kGy.

これらの結果は、170 kV のソフトエレクトロンがコクヌストモドキ、ノシメマダラメイガ、アズキゾウムシを効果的に殺虫できることを示した Imamura et al. (2004a) の結果とも対応している。Imamura et al. (2004b) は、コクゾウムシ、アズキゾウムシの穀物の内部を食べるステージは少数生き残るものの、150 kV のソフトエレクトロンは穀物を加害したコクゾウムシ、ノシメマダラメイガ、アズキゾウムシを効果的に殺虫できることも示している。その結果、実用レベルのソフトエレクトロン処理機は穀物の外部を食べる害虫を対象として用いることを推奨している。彗星状の異なった DNA 泳動パターンがクリシギゾウムシの放射線照射区と非照射区で観察された。照射区では彗星は首の部分で薄く、いくらか長い形をしていた。また、照射区では典型的な無傷の細胞は見られなかった (Fig. 11)。尾部長、テールモーメント、オリーブテールモーメント、尾部に含まれる DNA の割合といった他のパラメーターも DNA 損傷率と同様の傾向を示した。

電離放射線はオキシラジカルを生成するが、これらは通常的好氣的代謝で生成されるものと同じである。電離放射線と他の酸化ストレスによる細胞内巨大分子の構造変化は、これらの生体高分子が正常に機能する能力を変化させるかもしれない。細胞内巨大分子の構造の損傷は修復される可能性があるが (Harman, 1991)、放射線照射は DNA 塩基の修飾を引き起こす可能性もある (McBride et al., 1991)。

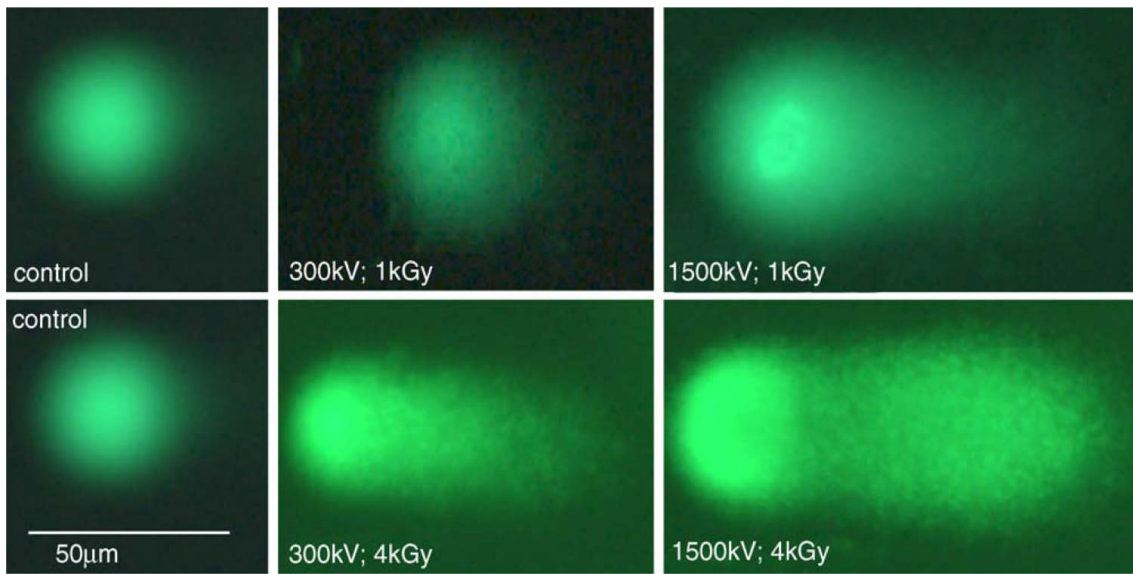


Fig. 11. Typical DNA comets from the larvae of chestnut weevil treated with different acceleration voltages of electron beam at doses of 1 and 4 kGy.

本研究におけるコメットアッセイの結果は、低い加速電圧の電子線処理では DNA 損傷が比較的少ないことを示している。また、スパイス、穀物、豆の殺菌だけでなく、特に穀物を外部から食べる害虫の殺虫に低エネルギー電子線処理を利用できることを示している。また、低エネルギー電子線処理は穀物の内部を食べる害虫を完全には殺虫できないが、他の技術と組み合わせることによって穀物と豆を加害する害虫の殺虫に有用となる可能性がある。更に、コメットアッセイは、サンプルごとの細胞数の必要量が少ないこと、低レベルの DNA 損傷を検知できること、潜在的な処理量が多いこと、適用が容易であること、異なった細胞に適用可能であること、低コストであることといった利点から、昆虫の細胞の DNA 損傷の検出に有用なツールである可能性がある。

第2節 昆虫と穀物の DNA 損傷と品質の評価

2-1. はじめに

放射線照射は臭化メチルによるくん蒸の代替手段の候補の一つである。ガンマ線の照射はその効果が確認されているが (Cornwell, 1966; Hussain and Imura, 1989)、照射した食品の品質に悪影響を与えることも報告されている (Hayashi, 1991; Hayashi et al., 1997; Amjad and Anjum, 2003)。一方、電子線照射は、より安全で費用対効果が高く、環境への影響も少ない (Furuta, 1987)。比較的小さい透過力を持つソフトエレクトロン (加速電圧 300 kV 以下の電子線) は、熱処理やガンマ線照射に比べて品質をほとんど低下させることなく、穀物、豆、香辛料、発芽野菜 (スプラウト) を効果的に殺菌できることが報告されている (Hayashi, 1998)。ソフトエレクトロンの貯蔵食品害虫への殺虫効果についていくつかの報告があり (Imamura et al., 2004ab)、穀物の外部を食べるものに関しては完全に殺虫できることが示されている。アズキ粒中のアズキゾウムシに関しては、電圧を上げることによって次世代の成虫の出現が見られなくな

り、効果的な防除が可能であることが示されている（前章）。

クリシギゾウムシの幼虫では、放射線照射によって引き起こされる DNA の損傷を comet assay によって検知する方法が開発されている (Todoriki et al., 2006) 。本節では、この方法をもちいて、ソフトエレクトロン処理したアズキゾウムシ幼虫の死滅効果が DNA 損傷によるか否かを明らかにするため、ソフトエレクトロン処理したアズキゾウムシ幼虫の DNA comet assay を行い DNA の損傷を調べた。同様に、アズキゾウムシの宿主となるアズキの細胞 DNA の損傷やアズキの発芽率から、ソフトエレクトロン照射のアズキへの影響を評価した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. アズキの準備

アズキ（品種「大納言」）を実験に用いた。アズキゾウムシは $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、70%RH の恒温恒湿室で累代されているものを用いた。出現後間もないアズキゾウムシ成虫 25 ペアを 100 g のアズキを入れた容器内に放し、翌日取り除いた。アズキは丁寧によく混ぜ、25 g ずつの4つのサンプルに分けた。これらは直径 8.3 cm のプラスチック容器に入れ、 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、70%RH の恒温恒湿室で幼虫期まで飼育した。

2-2-2. アズキゾウムシとアズキのソフトエレクトロン処理

前記の方法で準備したアズキゾウムシを含むアズキ (25 g) にヴァンデグラフ電子加速器 (NHV コーポレーション, 京都, 日本) で発生させた加速電圧 170 kV のソフトエレクトロン (電流 2 μA) を照射した。アズキは照射窓から 15 cm の距離にある穀粒回動装置のトレーに入れた。回動装置は1秒間に1回の往復運動と10回の振動を行うように設定した。トレー表面での線量率は、RCF 線量計により、170 kV の条件で 0.5 kGy/min と推定された (Hayashi et al., 1998a) 。よって、10 kGy の処理を行うために、

20 分間の照射を行った。10 kGy (170 kV) の処理と同様にして、10 kGy (200 kV) の条件で処理した。200 kV の場合、電流は 7 μ A であり、トレー表面での線量率は 1.78 kGy/min と推定された。電子線照射を行わない対照区も設けた。

50 g の未加害アズキを同様に 10 kGy (200 kV) の条件で処理した。電子線照射を行わない対照区も設けた。

2-2-3. アズキゾウムシとアズキのコメットアッセイ

処理区、未処理区のアズキゾウムシ幼虫をピンセットで取り出し、液体窒素に浸して凍結した。凍結した幼虫はすりつぶして粉末にし、3 ml の PBS バッファーを加えて 5 分間攪拌し、125 μ m のナイロンメッシュで濾してチューブに入れた。チューブは 20 分間氷で冷やした。それから、50 μ l の細胞けん濁液をバイアルに入れ、アガロースゲルを加えて 500 μ l にした。このうち 100 μ l を取ってスライドガラス上に置いた。カバーガラスを被せてからスライドガラスを 10 分間氷で冷やした。カバーガラスを外し、スライドをあらかじめ冷やした TBE バッファー (2 mM EDTA、90 mM Tris-boric acid、pH8.0) 中に 4°C で 30 分間置いた。その後、TBE バッファーで 5 分間洗浄してから、スライドを 26 V で 10 分間、電気泳動を行った。泳動後、70%エタノールで洗浄し、空気乾燥した。翌日、スライドを P.I. stain で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。種皮を剥いだアズキも同様の方法でコメットアッセイを行った。DNA 損傷率、尾部長、テールモーメント (尾部長と尾部に含まれる DNA の割合の積) を前節と同様にして求めた。また、核の直径も測定した。

2-2-4. アズキの発芽に対するソフトエレクトロンの影響

50 g のアズキを前記と同様の方法で 10 kGy (170 kV)、20 kGy (170 kV)、10 kGy (200 kV)、20 kGy (200 kV) の 4 条件で処理した。それぞれの処理区で、ラン

ダムに選んだ 30 個のアズキを試験に用いた。Yano et al. (2000) によるロール紙法を一部改良し、発芽試験を行った。湿らせたキッチンペーパーを二つ折りにし、10 個のアズキに巻き付けた。そのロールをビニールの網に置き、洗濯ばさみでビーカーの中につるした。ビーカーは 25℃の暗黒条件に置いた。発芽数 (5 日後) と芽の長さ (9 日後) を記録した。対照区も含め、それぞれの処理で反復数は 3 反復 (1 反復は 10 個のアズキ) とした。

2-3. 結果と考察

2-3-1. アズキゾウムシとアズキのコメットアッセイ

コメットアッセイにより、ソフトエレクトロン処理したアズキゾウムシと処理していないアズキゾウムシを判別できた (Fig. 12)。DNA の損傷は、尾の長さとテールモーメントによって表されている。170 kV と 200 kV でも損傷の程度に差が見られた。

アズキにおいても同様に、ソフトエレクトロン処理したアズキと処理していないアズキをコメットアッセイにより判別できた (Fig. 13)。

10 kGy (200 kV) 処理したアズキゾウムシとアズキで DNA コメットアッセイのそれぞれのパラメーターを比較した (Fig. 14)。同じ処理でもアズキゾウムシとアズキでは DNA 損傷率が大きく異なる。アズキゾウムシは DNA の損傷が大きく、これはソフトエレクトロンがアズキゾウムシまで到達していることを示している。ソフトエレクトロンはアズキ粒中のアズキゾウムシ幼虫にも到達し、DNA に損傷を与えることによって殺虫効果を持つものと考えられる。ソフトエレクトロンは透過力が小さいため、アズキの粒の奥深くまでは到達せず、そのためアズキ全体に対する損傷を受けたアズキの細胞の割合は小さく、そのため DNA 損傷率は小さい。

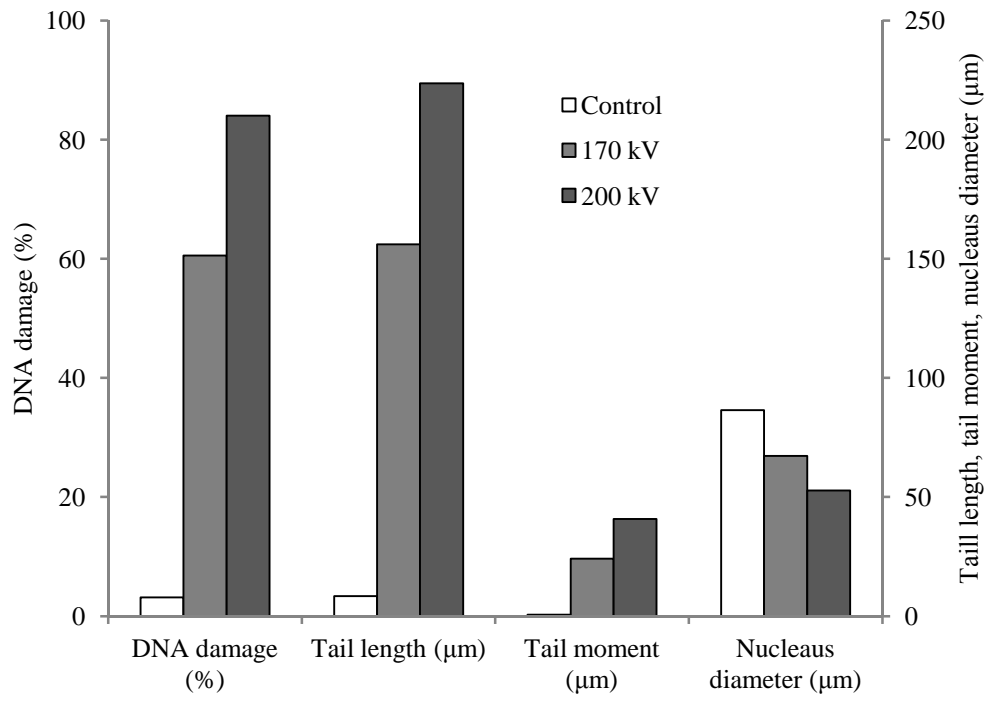


Fig. 12. Effect of soft-electron treatment on the DNA of larval cells of *C. chinensis*.

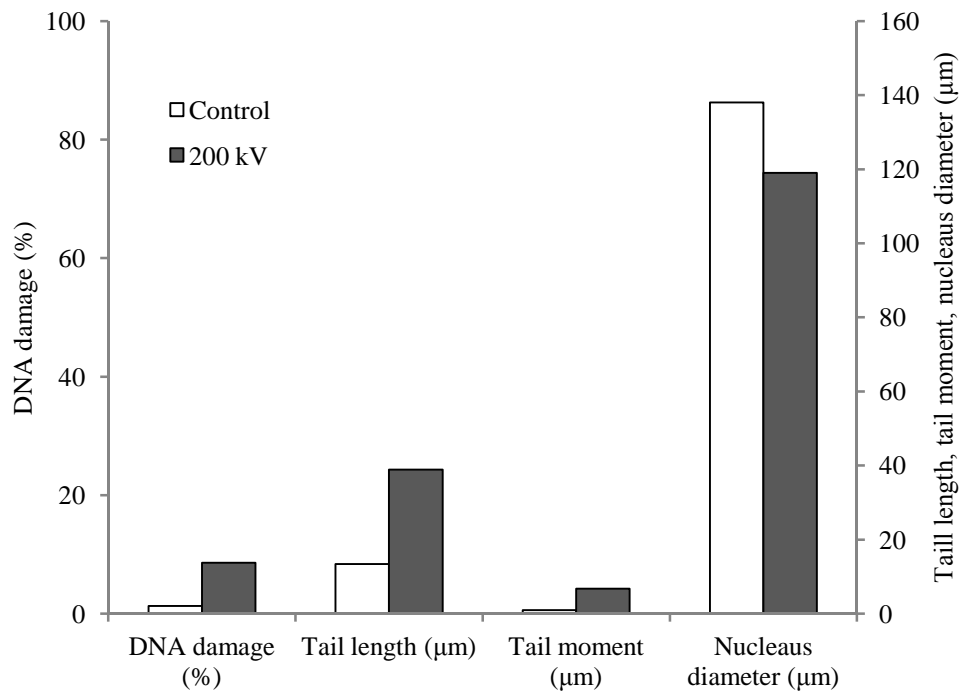


Fig. 13 Effect of soft-electron treatment on the DNA of azuki bean seed cells.

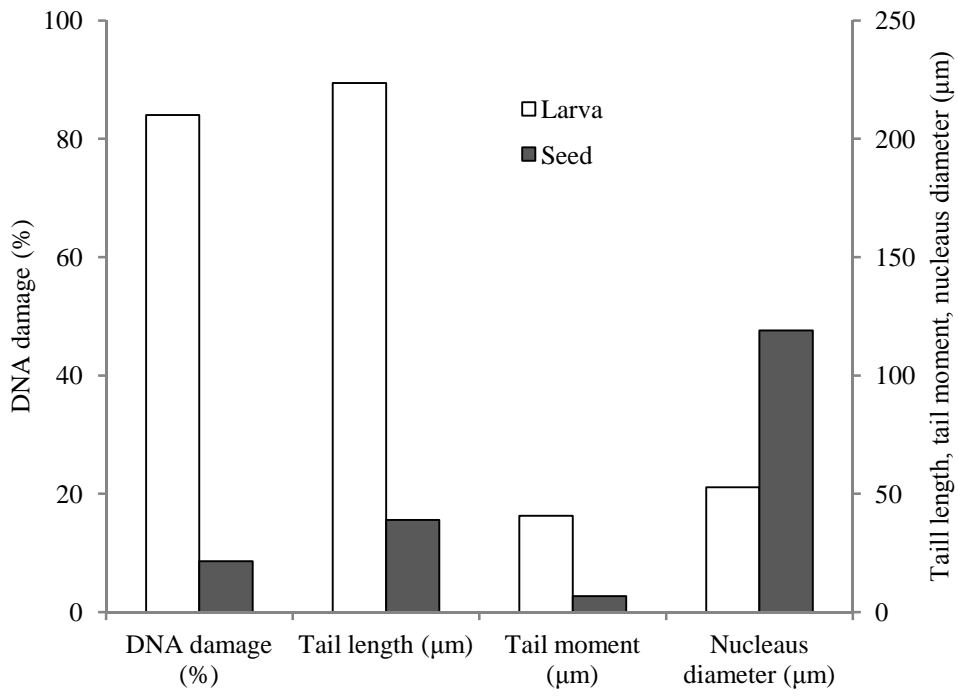


Fig. 14 Comparative effect of soft-electron treatment on seed and larval DNA.

2-3-2. アズキの発芽に対するソフトエレクトロンの影響

Table 5 はアズキの発芽にソフトエレクトロン照射がほとんど影響を与えないことを示している。発芽率は、4種の異なる処理条件で平均 90.0% から 93.2% であり、未処理区と有意な差はなかった。9 日後の芽の長さも処理区と未処理区で有意な差はなかった。

このことにより、本研究で用いた最も線量の高い 20 kGy (200 kV) 処理においてもアズキの発芽に影響を与えないことが明らかになった。これはソフトエレクトロン処理が発芽野菜 (スプラウト) の処理にも利用できる可能性を示している。ソフトエレクトロンは透過力が小さいため、種の胚まで到達せず、発芽に影響を与えなかったと考えられる。Kikuchi et al. (2003) は電子線処理が大豆種子の発芽を阻害せず、これは 20 kGy でも発芽の阻害が起こるガンマ線と比べて電子線の透過力の小さいことが原因であることを報告している。

前章によりアズキゾウムシは 20 kGy (200 kV) のソフトエレクトロン処理によって防除が可能であることが示されているが、この線量においてもアズキの発芽力にほとんど影響を与えないことが明らかになった。

Table 5. Effect of soft-electron treatment on germination of azuki bean seed.

Treatment	Germination (%) on the fifth day	Shoot length (cm) on the ninth day
10 kGy (170 kV)	93.2	5.52
20 kGy (170 kV)	90.0	5.25
10 kGy (200 kV)	90.0	5.24
20 kGy (200 kV)	90.0	5.41
Control	93.2	5.28
ANOVA (P = 0.05)	NS	NS

NS, non-significant.

第5章 植物検疫を目指したソフトエレクトロンの応用

1. はじめに

第2章の結果より、ソフトエレクトロン処理は穀物を外側から食べるタイプの貯蔵食品害虫に対しては非常に効果的であるが、内部を食べるタイプの貯蔵食品害虫は一部生存することが明らかになった。その解決策として、加速電圧を上げることが考えられ、これによってアズキゾウムシをアズキの発芽力を損なうことなく防除できることが明らかになった（第3章、第4章）。ところで、穀物表面における電圧 60 keV のソフトエレクトロンで処理した玄米を精米度 90%で精米すると、脂質の酸化、炊飯の物理特性が無処理のものと差がないものの、穀物表面における電圧 75 keV 以上では無処理のものと比べて有意に脂質の酸化が起こり、穀物表面における電圧 90 keV 以上では炊飯の物理特性にも影響が現れることが明らかになっている（Hayashi et al., 1998a）。したがって、玄米の場合、精米の品質の観点では照射するソフトエレクトロンの加速電圧は低いことが望ましい。そこで本章では、玄米を加害するコクゾウムシに対して別のアプローチ、すなわち他の防除法との組み合わせによる防除効果を明らかにする。

ソフトエレクトロン処理に対する玄米中で発育するコクゾウムシの主な耐性ステージは、若齢幼虫であることが明らかになった（第3章）。一方、ミトコンドリア電子伝達系を阻害することにより殺虫作用を持つと考えられているホスフィン（Chaudhry, 1997）が臭化メチル代替くん蒸剤として使用されている。しかし、一般にくん蒸剤抵抗性は卵や蛹のような呼吸量の少ないステージでみられ（Chaudhry, 1997）、ホスフィンにおいては、コクゾウムシの蛹の完全殺虫は困難である（森・川本 1966；森ら 1969）。そこで、ソフトエレクトロン処理とホスフィンくん蒸を組み合わせることによって両者の欠点を補い、発育ステージ全体にわたって殺虫率が向上する可能性を探るべく、ソフトエレクトロン処理と短時間、低濃度のホスフィンくん蒸との組み合わせに

よる殺虫効果を調べた。

2. 材料と方法

コクゾウムシの卵、幼虫、成虫を試験に用いた。150 g の玄米に 3,000 頭のコクゾウムシ成虫を入れ、25°C、70%RH の条件下で 2 日間産卵させた。成虫を除去後に再び 25°C、70%RH の条件下に戻した。卵の試料として産卵開始から 6 日後、幼虫の試料として 11 日後、蛹の試料として 29 日後の玄米を用いた。あらかじめ必要なステージのコクゾウムシがいるように調製した玄米を 15 g ずつに分け、ソフトエレクトロンを照射した。

ソフトエレクトロン処理の加速電圧は 170 kV、電流は 4 μ A であった。穀粒の表面に均一に照射できるように、穀粒回転装置で穀粒を回転させながら、ソフトエレクトロンを照射した。加速器の照射窓からの距離は 15 cm であり、穀物表面におけるエネルギーは 60 keV であった (ICRU, 1984)。穀粒の表面が均一に照射されていることはメチルイエローで染色された玄米を用いて確認した (Hayashi and Todoriki, 2001)。線量率は穀粒回転装置を作動させない状態で、RCF 線量計 (Far West Co. Ltd.) による測定で 1.0 kGy/min と推定された (McLaughlin et al., 1977)。穀粒回転装置上の玄米表面での吸収線量は、この測定値の半分であると推定される (Hayashi et al., 1998)。照射時間は 30 分とした。

くん蒸には内容積約 5.3 l のガラス製くん蒸ビンを使用した。ソフトエレクトロン処理の翌日、試料をステンレスメッシュ製の容器 (直径 3.0 cm×高さ 6.75 cm) に入れ、くん蒸ビン空間部に吊り下げて処理した。ホスフィンの濃度は 0.5 mg/l と 1.0 mg/l、くん蒸時間は 48 時間とした。

ソフトエレクトロン処理のみ、ホスフィンくん蒸のみ、ソフトエレクトロン処理とホスフィンくん蒸の両方、無処理 (コントロール) の 4 種類の処理条件を設けた。処理

後、25°C、70%RH の条件下に置き、出現する成虫を数えた。反復は3回とした。

3. 結果と考察

Table 6 に、コントロール、ソフトエレクトロン処理、ホスフィンくん蒸および両方の処理を行った玄米から出現したコクゾウムシ成虫の数を示す。卵と蛹の大部分はソフトエレクトロン処理で殺虫できたが、幼虫はソフトエレクトロン処理では 32% が生存した。これは第3章第2節で明らかになったように、コクゾウムシの幼虫は玄米の中心付近にいる場合があり、ソフトエレクトロンがこれらの幼虫まで到達しないことによる。一方、ホスフィンくん蒸では卵と幼虫を完全に殺虫できたが、蛹は 50% 以上が生存した。同属のコクゾウムシ、グラナリアコクゾウムシ *Sitophilus granarius* (L.) も含め、コクゾウムシ類の蛹は貯蔵食品害虫の中でヒメアカカツオブシムシ *Trogoderma granarium* Everts の休眠幼虫とともに特にホスフィンくん蒸に対する感受性が低いと報告されている (Hole et al., 1976 ; 相馬, 1995) 。両方の処理を組み合わせると、卵と幼虫は完全に殺虫でき、蛹はごく少数が生存した。

ソフトエレクトロン処理はコクゾウムシの卵と蛹を効果的に殺虫でき、ホスフィンくん蒸はコクゾウムシの卵と幼虫を効果的に殺虫できた。よって、これらを組み合わせることによって、卵から蛹までの全発育ステージで高い殺虫効果を達成できた。

Table 6. Number of adults (mean \pm SE) emerged from brown rice after treatments.

Stage	Control	Soft-electron treatment	Phosphine treatment		Soft-electron treatment and phosphine fumigation	
			0.5 mg/l ^a	1.0 mg/l	0.5 mg/l	1.0 mg/l
Egg	87.7 \pm 8.0	3.7 \pm 0.7 (96) ^b	0.0 \pm 0.0 (100)	0.0 \pm 0.0 (100)	0.0 \pm 0.0 (100)	0.0 \pm 0.0 (100)
Larva	318.3 \pm 54.3	100.7 \pm 15.0 (68)	0.0 \pm 0.0 (100)	0.0 \pm 0.0 (100)	0.0 \pm 0.0 (100)	0.0 \pm 0.0 (100)
Pupa	119.7 \pm 33.1	4.7 \pm 1.2 (96)	82.0 \pm 24.7 (31)	50.3 \pm 11.6 (58)	1.3 \pm 0.9 (99)	0.7 \pm 0.7 (99)

^a Concentration of phosphine.

^b Reduction over control (%).

日本では、輸入穀類等検疫要綱により、サイロにおけるホスフィンくん蒸では、15–20℃では、通常、濃度 2.0 mg/l で 4–6 日間の処理が行われる。また、コクゾウムシ等の貯蔵食品害虫を対象として農薬登録されているリン化アルミニウム剤は、15–20℃ではホスフィンが 0.5–3.0 mg/l の濃度になる使用量で 3–6 日間のくん蒸を行うように使用方法が定められている。15℃の温度条件下でのコクゾウムシ蛹に対する濃度 2.0 mg/l のホスフィンの LT95 は 19.0 日と報告されており（後藤ら, 1996）、これらの条件でのコクゾウムシ蛹の殺虫率は低いと考えられる。今回の実験では、ソフトエレクトロン処理と短時間、低濃度（0.5, 1.0 mg/l）のホスフィンくん蒸を連続して行うことにより高い殺虫効果を得ることができた。ホスフィンくん蒸の多用によって貯穀害虫にホスフィン抵抗性が発達することが報告されている（Benhalima et al., 2004）ので、ソフトエレクトロン処理と組み合わせることによってホスフィンへの依存を軽減できる可能性がある。

一度に処理できる量は、ホスフィンくん蒸では倉庫やサイロの大きさに依存するため、数百から数万 t を一度に処理することができる。しかしながら、ソフトエレクトロン処理とその翌日からのホスフィンくん蒸の併用では、処理速度はソフトエレクトロン処理の速度が制限要因となる。実用型ソフトエレクトロン処理装置の殺虫目的での処理速度は 1.5 t/時であり（第2章第1節）、これを 1 日 8 時間稼働させるとすれば、1 日当たり 12 t の処理が可能である。これを翌日から 2 日間ホスフィンくん蒸することになるので、3 日で 12 t の処理を行える。ソフトエレクトロン照射装置の処理能力は装置の大きさ、特に、電子線走査と電流の大きさに依存し、より電子線走査が大きく、電流が大きい装置が開発されることにより、処理速度は改善すると考えられる。

第6章 総合考察

貯蔵食品害虫の防除は臭化メチルくん蒸に依存してきた。代替のくん蒸剤であるホスフィンには抵抗性害虫の問題があり (Benhalima et al., 2004)、また、ヨウ化メチルなど新たなくん蒸剤も研究されているが (Faruki et al., 2005)、環境や人体に対する影響や抵抗性昆虫の問題が発生する可能性があることから、穀物に対して新規の農薬登録を行うのは困難である (Hallman, 2013)。臭化メチルくん蒸が使用できなくなった現在、有力な殺虫手段を持っていない状況にある。日本における穀物流通においては低温貯蔵の普及によってその被害が顕在化していないが、世界的には被害軽減のため放射線の利用も進んでいる (Hallman, 2013)。

日本における食品への放射線照射は、馬鈴薯の芽止め目的のガンマ線照射のみが認められている。しかし、許可には至らなかったものの 2000 年に全日本スパイス協会がスパイス類に対する殺菌目的での放射線照射の利用許可を厚生省に要請し、2006 年には原子力委員会の専門部会がその利用を認めるべきだとする報告書をまとめた。今後、放射線の利用が拡大する可能性がある。また、電子線は加速電圧が 1 MV 以上のものが規制の対象であるため、加速電圧が 300 kV 以下であるソフトエレクトロンは法律によって規制されない。また、表面のみの処理であり中心の可食部には電子線が到達しないという利点があるので、種子、穀物の殺菌、殺虫目的での普及をはかるべきであると考えられる。

海外においても、低エネルギーの電子線を貯蔵食品害虫の殺虫に用いる研究がなされている。アメリカの Nablo らのグループは electron beam fluidized bed process (EBFB) という方法を検討してきた (Nablo et al., 1998; Cleghorn et al., 2002)。これは電子線を照射する際の搬送システムに流動層装置を用い、ガスによって穀物を装置内で流動化し、電子線を穀物の表面全体に照射できるようにしたものである。この装置を用いてココクゾウムシが加害している小麦粒を処理した場合、700 kV の加速電圧で

800 Gy 処理することにより完全殺虫が可能であることを示している (Cleghorn et al., 2002)。この加速電圧の場合は穀物粒の表面から 1 mm ぐらいの深さまで電子線が到達するため (Cleghorn et al., 2002)、品質に多少の影響を及ぼす可能性がある。

本研究により、ソフトエレクトロン処理は穀物を外部から食べる害虫に対しては非常に効果の高いことが明らかになった。また、内部で発育する害虫に関しては、発育ステージによってはソフトエレクトロン処理を行っても生き残ってしまうことが明らかになったが、加速電圧を上げたり、ホスフィンくん蒸と組み合わせることによって、殺虫率を改善できることが明らかになった。また、コクゾウムシにおいては生き残るステージが若齢幼虫であり、その原因が玄米の内部奥深くまで侵入するものがあるためであることが明らかになった。ソフトエレクトロンによる殺虫を普及させるための課題としては、より効果的で穀物に対する負の影響のない加速電圧、線量や、他の手段との組み合わせの研究が必要であるとともに、実用型ソフトエレクトロン処理装置の処理量の改善が必要になると思われる。また、通常のかん蒸は極めて安価であり (中北, 1996)、装置導入の初期費用や装置のランニング、メンテナンスの費用が必要なソフトエレクトロン処理が価格の面でこれに対抗することは困難であると思われることから、処理装置の価格の改善とともにソフトエレクトロン処理の適用範囲の拡大などを考える必要があると思われる。そのためには、他の穀物やその他の食品と害虫の組み合わせの殺虫試験が必要である。殺菌効果がほとんどないホスフィンくん蒸に対し (Kwon et al., 2000)、ソフトエレクトロン処理は穀物の表面殺菌に効果があることが明らかにされていることから (Hayashi et al., 1997, 1998ab; Hayashi, 1998; Todoriki and Hayashi, 2000)、効果のある線量レベルは異なるものの、表面殺菌と同時に殺虫を行える点はこの方法のメリットであると考えられる。また、くん蒸は一度に大量の穀物を処理できるものの、倉庫などを密閉状態にして数日間の処理が必要である。それに対し、ソフトエレクトロン処理は大量の穀物を処理するのに時間を要するが、処理自体はごく短時間で終了し、倉

庫などを密閉状態にする必要がないという特性がある。この特性を生かせるような工場などへの導入法を考案できれば普及の可能性は広がると思われる。

本研究で、ソフトエレクトロン処理とホスフィンくん蒸を併用することにより高い殺虫効果を達成する方法を提案した。ホスフィンの主な殺虫機構としては、ミトコンドリア電子伝達系阻害作用が考えられているが (Chaudhry, 1997)、物理的殺虫法であるソフトエレクトロン処理と組み合わせることによりホスフィンくん蒸への依存を軽減できる可能性がある。一方、ホスフィン抵抗性コナナガシクイムシ (*Rhyzopertha dominica* (F.)) ではホスフィン感受性のものと比べて高い放射線抵抗性を持つことが報告されている (Hasan et al., 2006)。放射線は、直接的に放射線が DNA を損傷する直接作用と、生体内の水に放射線が作用して活性酸素やラジカルが生成し、これらを介して DNA を損傷する間接作用によって殺虫能力を持つ (林, 1995 ; 中原, 2008)。ホスフィンはカタラーゼなどの抗酸化酵素の働きを阻害することが報告されており (Chaudhry, 1997; Lall et al. 2000; Quistad et al. 2000; Hsu et al. 2002)、間接作用に対し、抗酸化酵素の働きによってホスフィン抵抗性系統は抵抗性を持つと考えられる (Hasan et al., 2006)。昆虫類ではネムリユスリカ (*Polypedium vanderplanki* Hinton) の乾眠幼虫は、48 時間以内の蘇生率で見た場合、ガンマ線での LD50 が 4400 Gy という高い放射線耐性を持つが、成虫まで発育できるかで見えた場合、LD50 は 160 Gy であり、他の昆虫とあまり変わらなかった (中原, 2008)。放射線耐性は他のストレス対策として発達した交差耐性であるため、昆虫が極めて高い放射線に対する耐性を獲得することは難しいと思われる (中原, 2008)。ホスフィン抵抗性系統など放射線に抵抗性を持つものの存在を考慮すると、ソフトエレクトロンを含む放射線による殺虫はより高い線量が要求されると考えられるが、害虫が難防除なほどの放射線抵抗性を獲得した例は報告がなく、抵抗性の観点からは放射線殺虫は将来に渡って使用できると思われる

る。

環太平洋戦略的経済連携協定（TPP）などを含む新たな自由貿易の拡大、地球温暖化や寒冷化のような地球規模の気候の変動、ヒートアイランド化のような局所的な気候の変化などによって、貯蔵食品・害虫を取り巻く環境は今後、更に変化する可能性がある。臭化メチルくん蒸の使用が制限された状況下でそのような変化に対応するためには、利用可能な複数の代替手段の確立が必要であり、今後も放射線による防除を含む貯蔵食品害虫防除法の技術開発および確立が必要である。

引用文献

- Ahmed M (2001) Disinfestation of stored grains, pulses, dried fruits and nuts and other dried foods. In: Food irradiation: principles and applications. Ed. by Molins RA, John Wiley & Sons, New York, 77–112.
- Ahmed, M., Begum, A., Khan, S.A. (1976) Radiation effects on mated females of Angoumois grain moth. *Bangladesh J. Zool.* 4: 55–56.
- Ahmed, M., Begum, A., Khan, A.T. (1981) Effect of gamma radiation on reproductive potential of *Dermestes maculatus* Degeer. *Nucl. Sci. Appl.* 11/12: 33–35.
- Ahmed, K.S., Itino, T, Ichikawa ,T. (2003) Duration of developmental stages of *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) on adzuki bean and the effects of neem and sesame oils at different stages of their development. *Pakistan J. Biol. Sci.* 6: 932–935.
- Amjad, M., Anjum, M.A. (2003) Effects of post-irradiation storage on the radiation-induced damage in onion seeds. *Asian J. Plant Sci.* 2: 702–707.
- Anonymous (2000) The Montreal Protocol on substrates that deplete the ozone layer (with amendments). United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya.
- Anonymous (2004) Irradiation as a phytosanitary treatment of food and agricultural commodities. IAEA-TECDOC1427, Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 1–8.
- Anonymous (2006) Database on approvals for irradiated foods. *Food Environ. Prot. Newslett.* 9: 27–59.
- Arora, G.L., Singh, T. (1970) The biology of *Callosobruchus chinensis* (L.) (Bruchidae: Coleoptera). *Punjab Univ. Res. Bull.* 21: 55–66.
- Aslam, M. (2004) Pest status of stored chickpea beetle, *Callosobruchus chinensis* Linnaeus on chickpea. *J. Entomol.* 1: 28–33.

- Badmin, J.S. (1990) IRAC survey of resistance of stored grain pests: Results and Progress. Proc. In: 5th Int. Working Conf. Stored Product Protection, Bordeaux, France, Sept. 9–14, 1990, pp. 973–982.
- Begum, A., Ahmed, M., Khan, A.T., Seal, D.R. (1980) Low dose gamma radiation effect on reproductive capacity of female *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae). *Bangladesh J. Biol. Sci.* 9: 1–4.
- Benhalima, H., Chaudhry, M.Q., Mills, K.A., Price, N.R. (2004) Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *J. Stored Prod. Res.* 40: 241–249.
- Best, D. (1989) Marketing irradiation. *Prepared Foods.* 158: 66–68.
- Brower, J.H. (1974) Radio-sensitivity of an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* 10: 129–131.
- CAC (1984) Codex general standard for irradiated foods, Codex Alimentarius Commission, CAC/Vol. XV, E-1, Codex Stan 106-1983, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome.
- Chaudhry, M.Q. (1997) A review of the mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. *Pestic. Sci.* 49: 213–228.
- Cleghorn, D.A., S.V. Nablo, D.N. Ferro, D.W. Hagstrum (2002) Electron beam treatment parameters for control of stored product insects. *Radiat. Phys. Chem.* 63: 575–579.
- Cogburn, R.R., Tilton, E., Burkholder, W.E. (1966) Gross effects of gamma radiation on the Indian-meal moth and the Angoumois grain moth. *J. Econ. Entomol.* 59: 682–685.

- Cornwell, P.B. (1966) Susceptibility of the grain and rice weevils *Sitophilus granarius* (L.) and *Sitophilus zeamais* Mots. to gamma radiation. In: The entomology of radiation disinfestation of grain. Ed. by Cornwell PB, Pergamon, Oxford, 1–18.
- Delinceé, H. (1996) Introduction to DNA methods for identification of irradiated foods. In: McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., Pearce, J. (Eds.), Detection Methods for Irradiated Foods—Current Status. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 345–348.
- Dohino, T., Tanabe, K. (1994) Electron beam irradiation of immature stages and adult males of two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 30: 27–34.
- Dohino, T., Masaki, S., Takano, T., Hayashi, T. (1996) Effect of electron beam irradiation on eggs and larvae of *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 32: 31–37.
- Dohino, T., Masaki, S., Takano, T., Hayashi, T. (1997) Effects of electron beam irradiation on sterility of Comstock mealybug, *Pseudococcus comstocki* (Kuwana). *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 33: 31–34.
- Dohino, T., Matsuoka, I., Takano, T., Hayashi, T. (1998) Effects of electron beam irradiation on *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 34:15–22.
- Faruki, S.I., Miyanoshita, A., Takahashi, K., Misumi, T., Imamura, T., Naito, H., Goto, M., Soma, Y. (2005) Susceptibility of various developmental stages of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Col., Curculionidae) to methyl iodide in brown rice. *J. Appl. Entomol.* 129, 12–16.
- Fields, P.G., White, N.G.D. (2002) Alternatives to methyl bromide treatments for stored

- product and quarantine insects. *Ann. Rev. Entomol.* 47: 331–359.
- Furuta, M., Katayama, T., Toratani, H., Takeda, A. (1987) Radiation sterilization by 10 MeV electron beams. *Food Irrad. Jpn.* 22: 1–3.
- Gao, M., Wang, C., Li, S., Zhang, S. (2004) Irradiation as a phytosanitary treatment for *Trogoderma granarium* Everts and *Callosobruchus chinensis* L. in food and agricultural products. In: Irradiation as a phytosanitary treatment of food and agricultural commodities. Ed. By IAEA. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 75–85.
- 後藤睦郎, 岸野秀昭, 今村守一, 廣瀬裕二, 相馬幸博 (1996) コクゾウムシ類蛹のリン化水素及びリン化水素・二酸化炭素感受性. *植防研報* 32: 63–67.
- Hallman, G.J. (2000) Expanding radiation treatment beyond fruit flies. *Agric. For. Entomol.* 2: 85–95.
- Hallman, G.J. (2013) Control of stored product pests by ionizing radiation. *J. Stored. Prod. Res.* 52:36–41.
- Halstead, D.G.H. (1986) Keys for the identification of beetles associated with stored products. I. Introduction and keys to families. *J. Stored Prod. Res.* 22: 163–203.
- Halverson, S.L., Nablo, S.V. (2000) Radiation. In: Subramanyam, B., Hagstrum, D.W. (Eds.), *Alternatives to Pesticides in Stored-Product IPM*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, pp. 381–400.
- Harman, D. (1991) The aging paces: major risk factor for disease and death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5360–5363.
- Hasan, M., Khan, A.R. (1998) Control of stored products pests by irradiation. *Integr. Pest Manag. Rev.* 3: 15–29.
- Hasan, M.M., Todoriki, S., Miyanoshita, A., Imamura, T., Hayashi, T. (2006) Soft-

electron beam and gamma-radiation sensitivity and DNA damage in phosphine-resistant and -susceptible strains of *Rhyzopertha dominica*. *J. Econ. Entomol.* 99: 1912–1919.

Hayashi, T. (1991) Comparative effectiveness of gamma rays and electron beams in food irradiation. In: Food irradiation. Ed. by Thorne S, Elsevier Science, London, UK, 167–216.

Hayashi, T. (1998) Decontamination of dry food ingredients and seeds with soft-electrons (low energy electrons). *Food Sci. Technol. Int. Tokyo.* 4, 114–120.

林徹 (1995) 「第5章 代替法開発の現状と今後の展望 第4節 電磁波を用いた殺虫技術」. 輸入農産物の防虫・くん蒸ハンドブック, サイエンスフォーラム, 東京. pp. 305–321.

Hayashi, T., Todoriki, S.S. (2001) Low-energy electron irradiation of food for microbial control. In: Loaharanu, P., Thomas, P. (Eds.), Irradiation for Food Safety and Quality. Technomic Publishing Co., Inc., UK, pp. 118–128.

Hayashi, T., Takahashi, Y., Todoriki, S. (1997) Low-energy electron effects on the sterility and viscosity of grains. *J. Food Sci.* 62: 858–860.

Hayashi, T., Okadome, H., Toyoshima, H., Todoriki, S., Ohtsubo, K., (1998a) Rheological properties and lipid oxidation of rice decontaminated with low energy electrons. *J. Food Prot.* 61: 73–77.

Hayashi, T., Takahashi, Y., Todoriki, S. (1998b) Sterilization of foods with low-energy electrons ‘‘Soft-electrons’’. *Radiat. Phys. Chem.* 52: 73–76.

Hayashi, T., Kato, K., Kashiwagi, M., Taniguchi, S., Nishikimi, T., Okazaki, T., Mizutani, A., Kaneko, H. (2002) Low energy electron beam surface sterilization of food material. *Nissin Electric Rev.* 47: 20–26.

- Hole, B.D., Bell, C.H., Mills, K.A., Goodship, G. (1976) The toxicity of phosphine to all developmental stages of thirteen species of stored product beetles. *J. Stored Prod. Res.* 12: 235–244.
- Howe, R.W. (1952) The biology of the rice weevil, *Calandra oryzae* (L.). *Ann. Appl. Biol.* 39: 168–180.
- Hsu, C.H., Chi, B.C., Liu, M.Y., Li, J.H., Chen, C.J., Chen, R.Y. (2002) Phosphine-induced oxidative damage in rats: role of glutathione. *Toxicology* 179: 1–8.
- Hussain, T., Imura, O. (1989) Effects of gamma radiation on survival and reproduction of *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Entomol. Zool.* 24: 273–280.
- Hutchinson, F. (1966) The molecular basis for radiation effects on cells. *Cancer Res.* 26: 2045–2052.
- IAEA (1989) Training manual on food irradiation technology and techniques. Technical Report Series 114, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. p. 53.
- ICRU (1984) Stopping powers for electrons and positrons. ICRU Report 37, International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, Maryland.
- Imamura, T., Todoriki, S., Sota, N., Nakakita, H., Ikenaga, H., Hayashi, T. (2004a) Effect of “Soft-electron” (low energy electron) treatment on three stored product insect pests. *J. Stored Prod. Res.* 40: 169–177.
- Imamura, T., Miyano-shita, A., Todoriki, S., Hayashi, T. (2004b) Usability of a soft-electron (low-energy electron) machine for disinfestation of grains contaminated with insect pests. *Radiat. Phys. Chem.* 71: 213–215.
- Kamel, A.H., Ahmed, S.E.S. (1980) Effects of gamma radiation on the developmental

- stages of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (L.). *FABIS Newsllett.* 2: 47.
- Kaneko, H., Mizutani, A., Kato, K., Nishikimi, T., Taniguchi, S. (2001) EB surface sterilization of food material. Proceedings of International Symposium on Utilization of Accelerators. Sao Paulo, Brazil, November, pp. 26–30.
- Kikuchi, O.K., Todoriki, S., Saito, M., Hayashi, T. (2003) Efficacy of soft electron (Low energy electron beam) for soybean decontamination in comparison with gamma rays. *J. Food. Sci.* 68: 649–652.
- Kumagai, M., Dohino, T. (1995) Electron beam irradiation of immature stages of leaf miner, *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 31: 83–88.
- Kunstadt, P. (1999) Radiation disinfestation and fumigant replacement, a technology whose time is now [WWW document]. URL <http://mbao.org/1999airc/67kunsta.pdf>.
- Kwon, J.H., Byun, M.W., Kim, K.S., Kang, I.J. (2000) Comparative effects of gamma irradiation and phosphine fumigation on the quality of white ginseng. *Radiat. Phys. Chem.* 57: 309–313.
- Kwon, J.H., Lee, J., Lee, S.B., Chung, H.S., Choi, J.U. (2001) Effects of water soaking and gamma irradiation on storage quality of chestnuts. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 89: 9–15.
- Kwon, J.H., Kwon, Y.J., Byun, M.W., Kim, K.S. (2004) Competitiveness of gamma irradiation with fumigation for chestnuts associated with quarantine and quality security. *Radiat. Phys. Chem.* 71, 43–46.
- Lall, S.B., Peshin, S.S., Mitra, S. (2000) Methemoglobinemia in aluminium phosphide poisoning in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 38: 95–97.
- McBride, T., Preston, B., Loeb, L. (1991) Mutagenic spectrum resulting from DNA

- damage by oxygen radicals. *Biochem.* 30: 207–213.
- McLaughlin, W.L., Miller, A., Fidan, S., Pejtersen, K., Pedersen, W.B. (1977) Radiochromic plastic films for accurate measurement of radiation absorbed dose and dose distribution. *Radiat. Phys. Chem.* 10: 119–127.
- 三井英三 (1968) 食品害虫の食性. *食糧*11: 85–110.
- 三井英三 (1984) 食品工場における害虫防除—主として物理的防除法—. *食糧*24: 49–70.
- Molins, R.A. (Ed.) (2001) *Food Irradiation: Principles and Applications*. Wiley, New York.
- 森武雄, 池上雍春, 楯谷昭夫 (1969) 燐化水素に対するコクゾウ蛹の感受性. *植防研報* 7: 67–70.
- 森武雄, 川本登 (1966) 燐化アルミニウム剤の性状と効果に関する研究. *植防研報* 3: 24–35.
- Murata, M., Imamura, T., Miyanoshita, A. (2007) Infestation and development of *Sitophilus* spp. in pouch-packaged spaghetti in Japan. *J. Econ. Entomol.* 1001: 1006–1010.
- Nablo, S.V., Wood, J.C., Desrosiers, M.F., Nagy, V.Y. (1998) A fluidized bed process for electron sterilization of powders. *Radiat. Phys. Chem.* 52: 479–485.
- 中原雄一 (2008) 「第 26 章 ネムリユスリカの放射線耐性と乾燥耐性」. 耐性の昆虫学, 東海大学出版会, 神奈川. pp. 302–312.
- 中北宏 (1996) 貯穀害虫に関する諸問題と防除の現状と今後の展望—II. 防除の現状と今後の展望—. *家屋害虫*18: 57–74.
- 中北宏 (2003) 貯穀害虫のイノベーション技術. *家屋害虫*25: 13–26.
- 中北宏, 池長裕史 (1994) II. 貯蔵食品害虫の特徴と防除. *食糧*32: 25–55.

- 中北宏, 池長裕史 (1995) 貯穀害虫に関する諸問題と防除の現状と今後の展望—I.貯穀害虫の持つ諸問題—. *家屋害虫* 17: 79–91.
- O'Brien, R.D., Wolfe, L.S. (1964) Radiation, radioactivity and insects. Academic Press Inc., New York, 211 pp.
- Olive, P.L., Frazer, G., Banath, J.P. (1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat. Res.* 136, 130–136.
- Quistad, G.B., Sparks, S.E., Casida, J.E. (2000) Chemical model for phosphine-induced lipid peroxidation. *Pest Manage. Sci.* 56: 779–783.
- Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 722, 225–254.
- SAS Institute (2002) JMP user's guide, Version 5. SAS Institute, Cary, NC.
- 佐藤洋, 白井保久, 田中定典, 今村太郎, 宮ノ下明大 (2003) チョコレート製品に侵入するノシメマダラメイガに対する外装フィルム密封度の効果. *応動昆* 47: 97–100.
- Seth, R.K., Sehgal, S.S. (1986) Effects of larval irradiation on fecundity and fertility of *Spodoptera litura* (Fab.). *J. Nucl. Agric. Biol.* 15: 156–161.
- Seth, R.K., Sehgal, S.S. (1987) Impact of gamma radiation on larvae of *Spodoptera litura* (Fab.) with reference to its effect on growth and development. *New Entomol.* 36: 1–11.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184–191.
- 相馬幸博 (1995) 「第2章 植物防疫法に基づく害虫侵入防止の実態 第3節 害虫の種類と消毒法」. 輸入農産物の防虫・くん蒸ハンドブック, サイエンスフォーラ

ム,東京. pp. 111–127.

Tanabe, K., Dohino, T. (1995) Response of 17 species of cut flowers to electron beam irradiation. *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 31: 89–94.

Tanaka, K., Kotobuki, K., Kakiuchi, N., 1981. Numerization of peeling easiness and role of phenolic compounds of the pellicle in the adhesion between the pellicle and embryo in comparison of Japanese (*Castanea crenata* Sief. et Zucc.) and Chinese embryo (*Castanea mollissima* Blume) chestnuts. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 50: 363–371.

等々力節子 (2004) ソフトエレクトロンによる殺菌技術. *食糧* 42: 85–95.

Todoriki, S., Hayashi, T. (2000) Disinfection of seeds and sprout inhibition of potatoes with low energy electrons. *Radiat. Phys. Chem.* 57: 253–255.

Todoriki, S., Kikuchi, O.K., Nakaoka, M., Miike, M., Hayashi, T. (2002) Soft electron (low energy electron) processing of foods for microbial control. *Radiat. Phys. Chem.* 63: 349–351.

Todoriki, S., Hasan, M., Miyanoshita, A., Imamura, T., Hayashi, T. (2006) Assessment of electron beam-induced DNA damage in larvae of chestnut weevil, *Curculio sikkimensis* (Heller) (Coleoptera: Curculionidae) using comet assay. *Radiat. Phys. Chem.* 75: 292–296.

等々力節子, 林徹 (2002) ガンマ線照射サクラランボ種子における DNA コメットアッセイとハーフエンブリオテストの比較. *食品照射*. 37: 6–11.

Tothova, A., Marec, F. (2001) Chromosomal principle of radiation-induced F₁ sterility in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Genome* 44: 172–184.

Urbain, W.M. (1989) Food irradiation: the past fifty years as prologue to tomorrow. *Food Technol.* 43: 76–92.

WHO (1988) Food Irradiation—A Technique for Preserving and Improving the Safety

of Food. World Health Organization, Geneva.

Yang, C.H., Yang, Z.H. (1993) Effects of ⁶⁰Co irradiation on genetics of adzuki bean weevil. *Acta Phytophyl. Sin.* 20: 331–335.

Yano, T., Koda, M., Shimizu, S., Suehara, K.I., Nakano, Y. (2000) Estimation of the final germination percentage of the soybean with a logistic curve and the germination percentage observed in the early stage of the germination test. In: Proceedings of the 3rd international soybean processing and utilization conference, October 15–20, 2000. Ed. by Saio K, Korin Publishing, Tsukuba, 123–124.

吉田忠晴, 深見順一, 福永一夫, 松山晃 (1972) キクイムシおよびアズキゾウムシの放射線による防除. *食品照射*. 7: 76–81.

吉田敏治, 渡辺直, 尊田望之 (1989) 図説 貯蔵食品の害虫 —実用的識別法から防除まで—. 全国農林教育協会, 東京. 628 pp.

Summary

Fumigation with methyl bromide has been the most widely applied management practice for controlling stored-product insects. However, the ozone depleting effect of methyl bromide has led to restrictions on its use, and the Montreal Protocol of the United Nations Environment Programme (UNEP) recommends the phasing out of methyl bromide by 2005 in developed countries and by 2015 in developing countries. There is therefore an urgent need to find an alternative strategy for controlling these pests. Low-energy electrons (soft electrons) with a low penetration capacity have been reported to effectively disinfect grains, pulses, spices, dehydrated vegetables, tea leaves and some sprout seeds with much smaller quality deterioration than other disinfection techniques such as heating and irradiation with gamma-rays. However, their effects to insects have not been reported. The aim of this research is to develop a control method of stored-product insects using soft-electron beams as alternative to methyl bromide fumigation.

1. Effects of soft-electron treatment on stored-products insect

Developmental stages of three stored-product insects viz. *Tribolium castaneum* (Herbst), *Plodia interpunctella* (Hübner) and *Callosobruchus chinensis* (L.) were exposed to soft electrons. Soft electrons at an acceleration voltage of 170 kV effectively inactivated eggs, larvae and pupae of *T. castaneum* and *P. interpunctella*. Soft electrons at 170 kV also inactivated the eggs of *C. chinensis* effectively. The adults of *C. chinensis* survived a 15 min exposure, but were inactivated having lost the ability to walk after a 5 min exposure. Soft electrons at 170 kV could not completely inactivate the larvae of *C. chinensis* inside beans. Efficacy of soft-electron treatment for

disinfestations of grains was also investigated by treating pre-infested brown rice and adzuki bean with a commercial-scale soft-electron machine (soft-electron processor). Soft-electrons at 150 kV efficiently disinfested brown rice grains pre-infested with *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *P. interpunctella* and adzuki beans with *C. chinensis*, although small numbers of the internal feeders such as *C. chinensis* in adzuki bean and *S. zeamais* in brown rice survived. The results indicate that the commercial-scale soft-electron machine can disinfest grains and beans, especially those contaminated with external feeders.

2. Effects of soft-electron treatments on insects developing inside beans and grains

Laboratory experiments were conducted to study the effect of soft-electron treatment on *C. chinensis*. Azuki bean seeds containing weevils of different ages were exposed to electrons at an acceleration voltage of 170 kV for 20 min (10 kGy). The radiation sensitivity of the insect decreased with increasing age. The egg stage was highly susceptible to electron radiation whereas the 18-day-old stage (fully developed adults ready for emergence) was the most tolerant, and treatment at a higher energy (200 kV equal to 10 kGy) was necessary to achieve an 80% mortality of this stage. However, the longevity, fecundity and fertility of the surviving adult insects were adversely affected by the electron treatment and they failed to complete their life cycle. Brown rice grains infested with different ages *S. zeamais* were also exposed to soft electrons. Soft electrons at an acceleration voltage of 170 kV effectively inactivated eggs, old larvae and pupae of *S. zeamais*, but could not completely inactivate young larvae. The locations of young larvae in rice grains were specified by magnetic resonance microimaging. Most of the larvae resided at the periphery of the grains while only a few

at the center, which were assumed to get out of inactivation. This indicated that soft electrons with low penetration capacity could reach the most of weevil larvae in grains.

3. Observation of DNA damages in insects and bean seeds using DNA comet assay

To develop method of evaluation of DNA damage in insects, effect of electron beam treatment on DNA damage in mature larvae of *Curculio sikkimensis* (Heller) was assessed using DNA comet assay. Electron beam treated chestnut larvae showed typical DNA fragmentation, compared with cells from non-treated ones which showed a more intact DNA. Investigations using the comet assay showed that the parameters including tail length, tail moment, olive tail moment as well as the quota of DNA damage at both the doses were significantly larger than the control batch larvae. DNA damages in soft electron treated *C. chinensis* larvae and azuki bean seeds were observed using this technique. DNA comet assay was successful to identify the electron treated larvae from that of untreated ones, and the electron treated seeds from that of untreated ones, respectively. The higher damage of DNA was observed in electron treated larvae compared to electron treated seeds. Germination capacity of azuki bean seeds was also tested and electron treatment did not affect it.

4. Combination of soft-electron treatment and phosphine fumigation

It is difficult to completely kill larvae of *S. zeamais* by soft electrons, combination of soft-electron treatment and short time–low–dose phosphine fumigation was tested. Most of the eggs and pupae were killed by soft-electron treatment alone, but 32% of larvae were survived. On the other hand, phosphine treatment was quite effective to eggs and larvae of *S. zeamais*, but over 50% of pupae survived the phosphine fumigation alone.

When both treatments were used, eggs and larvae were perfectly killed and very few pupae survived the treatment. It was concluded that combination of soft-electron treatment and short time–low–dose phosphine fumigation was quite effective to *S. zeamais*.

謝辞

本研究のとりまとめに当たり、千葉大学大学院園芸学研究科 化学生態学研究グループ 中牟田潔教授、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品安全研究領域長 等々力節子博士、同領域 食品害虫ユニット長 宮ノ下明大博士、元農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所長 林徹博士には、終始懇切なご指導とご助言並びにご校閲を賜った。国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 高橋敬一氏、中北宏氏、池長裕史氏、宗田奈保子氏、P.V.R. Reddy 氏、M. Hasan 氏には、研究の遂行に当たり懇切なご助言とご助力を賜った。同部門 吉田充氏、堀金明美氏には NMR による解析に当たり、多大な尽力を賜った。同部門 楡木真弓氏、小水いく代氏には実験用昆虫の飼育と試料の準備に当たり、ご助力を賜った。横浜植物防疫所 三角隆氏、谷川展暁氏、北村寿氏には、試料のくん蒸処理に当たり、多大な尽力を賜った。これらの方々のご厚意なくしては本研究の遂行は困難であった。ここに深く感謝の意を表する。

本研究の一部は原子力委員会の評価に基づき、文部科学省原子力試験研究費により実施されたものである。

学位論文の基礎となる、公表された学術論文

第2章第1節

Imamura, T., Todoriki, S., Sota, N., Nakakita, H., Ikenaga, H., Hayashi, T. (2004) Effect of “soft-electron” (low-energy electron) treatment on three stored-product insect pests. *J. Stored Prod. Res.* 40: 169–177.

第2章第2節

Imamura, T., Miyanoshita, A., Todoriki, S., Hayashi, T. (2004) Usability of a soft-electron (low-energy electron) machine for disinfestation of grains contaminated with insect pests. *Rad. Phys. Chem.* 71: 211–213.

第3章第1節および第4章第2節

Reddy, P.V.R., Todoriki, S., Miyanoshita, A., Imamura, T., Hayashi, T. (2006) Effect of soft electron treatment on adzuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Col., Bruchidae). *J. Appl. Entomol.* 130: 393–399.

第3章第2節および第5章

Imamura, T., Todoriki, S., Miyanoshita, A., Horigane, A.K., Yoshida, M., Hayashi, T. (2009) Efficacy of soft-electron (low-energy electron) treatment for disinfestation of brown rice containing different ages of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Rad. Phys. Chem.* 78: 627–630.

第4章第1節

Todoriki, S., Hasan, M., Miyanoshita, A., Imamura, T., Hayashi, T. (2006) Assessment

of electron beam-induced DNA damage in larvae of chestnut weevil, *Curculio sikkimensis* (Heller) (Coleoptera: Curculionidae) using comet assay. *Rad. Phys. Chem.* 75: 292–296.

その他の公表された学術論文

Faruki, S.I., Miyanoshita, A., Takahashi, K., Misumi, T., Imamura, T., Naito, H., Goto, M., Soma, Y. (2005) Susceptibility of various developmental stages of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Col., Curculionidae) to methyl iodide in brown rice. *J. Appl. Entomol.* 129, 12–16.

Murata, M., Imamura, T., Miyanoshita, A. (2008) Infestation and development of *Sitophilus* spp. in pouch-packaged spaghetti in Japan. *J. Econ. Entomol.* 1001: 1006–1010.

佐藤洋, 白井保久, 田中定典, 今村太郎, 宮ノ下明大 (2003) チョコレート製品に侵入するノシメマダラメイガに対する外装フィルム密封度の効果. *応動昆* 47: 97–100.