

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名：
Name 今出雄太

学位論文題目：
Title of Dissertation ワクモの総合防除を目指した基礎研究

学位論文要約： Dissertation Summary

ワクモの吸血はニワトリにストレスを与え、産卵率の低下や卵質の低下、汚卵の増加を引き起こし、ワクモの被害が酷い時には死亡する場合もある。また、ワクモに重度寄生されたニワトリでは、血中 $\beta \cdot \gamma$ グロブリンが減少し、免疫力が低下することが報告されている (Kowalski 2009)。さらに、ワクモは鶏痘やニューカッスル病ウイルス、セントルイス脳炎ウイルスなどの家畜伝染病を媒介するとの報告もある。ワクモによる経済被害は、飼料摂取量の増加やニワトリの死亡率の増加、卵質の低下、薬剤費などにより、ニワトリ 1 羽あたり 0.29 ドルと推定されており、オランダでは、国内の採卵鶏農場(約 3,000 万羽飼養)での年間損害額が約 1,100 万ユーロであると試算されている。最近では、ワクモの発育所要日数が約 7 日間と非常に短いことから薬剤耐性を持ちやすく、ワクモ駆除薬剤の効果が薄れ始めていることも問題となっている。さらに、ワクモは吸血後に鶏舎内の集卵ベルトやケージの繋ぎ目部分や狭い場所に集まり集塊を作り、そこで産卵し繁殖しているため、薬剤が浸透しにくいといった問題もある (Harrison 1963)。また、ワクモが鶏舎に侵入し、ある程度増殖すると簡単には防除できず、ワクモによる被害を回避することはほとんど不可能である。近年では、ワクモの薬剤に対する抵抗性が高まり、世界中の広範囲の地域に影響を及ぼしていることから、ワクモは世界の養鶏産業にとって、ますます大きな脅威をもたらすことが予想される (Sparagano et al. 2014)。そのため、本研究では薬剤や単一の駆除方法に頼らない、ワクモの総合防除を目指し、鶏舎内のワクモの基礎生態及び新たな駆除方法の考案を目的とし研究を行なった。

本研究では、まずワクモの生態調査に用いるためのワクモトラップの捕捉性能の検証を行ない、ワクモのモニタリング方法を確立した。さらに、確立したモニタリング用トラップと自動ワクモ観測装置を用い、ワクモの周年を通じたモニタリングと鶏への影響、および日周活動性に及ぼす環境要因の探索を行うことで、ワクモの防除方法を考案する上で重要な、鶏舎内でのワクモの行動特性を把握した。また、実験で得られたワクモの特性を *in vitro* 下で実証実験を行い、ワクモ駆除方法への利用可能性を探索した。最後に、生物捕食者としてのアリの可能性を調査するために鶏舎周辺にいる可能性が高いアリの種を用い、生きたワクモに対する反応を調べた。

ワクモトラップの捕捉性能を検討する際には、ダンボールトラップ、i-Trap、i-Trap II、自作のボードトラップを用いそれぞれの効果を調査した。それぞれのトラップは、4個のケージ上に7日間設置し、回収した後に目視でケージ上のワクモ数、それぞれのトラップに定着したワクモ数をカウントした。この作業は、2019年6月26日から7月3日、2019年7月12日から2019年7月19日の合計2回実施した(n=8)。各トラップが捕捉したワクモ個体数の割合は、ダンボールトラップ 10%、i-Trap15%、i-Trap2 15%、ボードトラップ 9%であり、各トラップ間で有意な差はなかった (n=8, one-way-ANOVA, $p=0.1575$)。一方、各トラップ(y)とケージに存在するワクモ数(x)との関係はそれぞれ、ダンボールトラップ ($y=0.065x+1570.4$, $R=0.63$, $p=0.32$)、i-Trap ($y=0.187x-1781$, $R=0.91$, $p<0.01$)、i-Trap2 ($y=0.115x+1110.2$, $R=0.86$, $p<0.01$)、ボードトラップ ($y=0.152x+2146.4$, $R=0.96$, $p<0.01$) であった。

この結果から、今回実験に利用したトラップは全て、従来のダンボールトラップと同様にワクモを捕捉できることが明らかとなった。さらに、従来のダンボールトラップよりもワクモのモニタリングに適していることも明らかとなった。また、今後i-Trapやボードトラップは、画像解析技術との併用により、ワクモの自動観測が可能となり、実際の鶏舎内でのワクモの行動特性を調べるこ

が可能となった。

確立したモニタリング用トラップと自動ワクモ観測装置を用い、ワクモの周年を通じたモニタリングと鶏への影響、および日周活動性に及ぼす環境要因の探索を行う際には、2014年4月23日から2015年3月1日までの間、香川県A養鶏場にて実験を実施した。期間中、縦2m横幅1m奥行1mの鉄製のラックを組み、ケージ上に1個のi-Trapを設置した。4台のカメラ(XG-200C レンズ CA-LA8) (株式会社キーエンス、大阪)を用いて、i-Trapの4側面を30分おきに撮影した。夜間の撮影時には、フラッシュを使い撮影を行った(図1)。ワクモ発生数の自動計測技術の確立のために、2014年5月～7月の期間中の各週7日目の24時間分の画像データを画像解析アプリケーション(Win ROOF ver7.4.5)で解析した。画像解析では、まず前処理として吸血後のワクモが赤色と暗褐色であることを利用し、2値化処理を行った。その後、円形に近い輪郭をパターンマッチングすることによってワクモをソフトウェアに自動認識させ、ワクモの画素値を自動で算出した。自動計測された画素値は24時間で48回分の数値が得られ、今回はその平均値を利用した。実際に捕捉されたワクモ数を調べるために、各週に回収したi-Trap内のワクモ数を目視でカウントし、実際のワクモ数と画素数からピアソンの相関係数を算出したところi-Trapの捕捉数(x')とケージ全体(y)との間に有意な相関関係にあることが明らかとなった($y = 5.1197x' + 16344$, $R^2 = 0.8833$, 無相関検定, $p < 0.01$)。

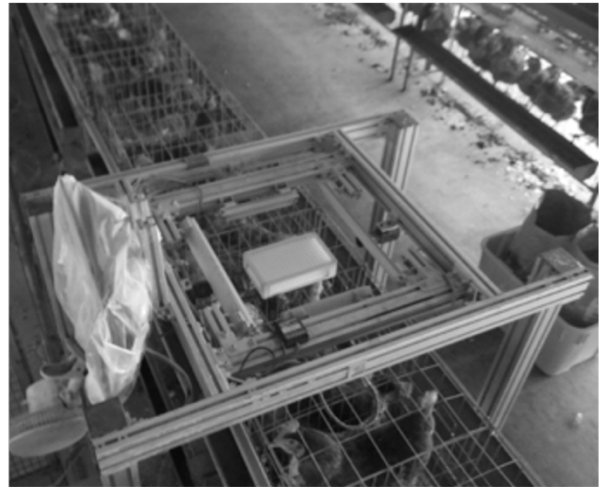


図1. ニワトリのケージ上に設置されたモニタリング装置. 装置の4側面に設置されたカメラと垂直関係になるようにi-Trapを設置した。

ワクモの周年を通じたモニタリングと鶏への影響、および日周活動性に及ぼす環境要因の探索を行う際には、28週齢のボリスブラウン32羽を、南側(ワクモ防除区)に16羽と北側(ワクモ被害区)に16羽に分けて飼育し、実験を行った。ワクモ防除区には、ワクモ駆除のために、ワクモ駆除用の薬剤(ネグホン(200倍希釈)(バイエル薬品株式会社、東京)、ボルホ・50%(200倍希釈)(バイエル薬品株式会社、東京))をワクモ被害区に薬剤がかからない様に散布した。被害区防除区両方のトラップは一週間毎に設置と回収を1年間繰り返した。また、ワクモ個体数は、実際のワクモ数と画素数との関係式に代入することで推定した。温度と相対湿度は、約30分間に1枚のタイムラプス撮影と同時に、おんどとりTM(ティーアンドディー株式会社、長野県)を用い、測定した。ニワトリへの影響を調査する際には、ワクモ発生前の2014年5月1週から、ワクモの収束が観測された2014年12月4週目まで毎日産卵数を計測し、産卵率(ヘンデイ:HD)を求めた。月に一度ワクモ被害区、防除区のハウユニット、卵重、卵黄色、卵殻強度、卵殻厚を測定した。また、ワクモが与える影響を調べるために、試験開始前に各区からそれぞれ10羽ずつ選出し、1ヶ月に1回獣医師の指導のもとに採血し、ヘマトクリットを測定した。また、ワクモの行動と環境要因の日周変化を調査する際には、温度、湿度に加え、日射強度を測定した。日射強度の測定は、香川県A養鶏場と同じ町内に位置する気象観測場で精密全天日射計MS-802(英弘精機株式会社、東京)を用い実施した。

ワクモ被害区でのワクモの発生は、温度と湿度の上昇に伴い、6月1週間目(Week)から観測され始め、翌年1月の1週目(Week33)でワクモの発生が収束した。7月4週目(Week12)に最も多くのワクモが観測され、8月1週目(Week13)から一時的に減少し、9月3週目(Week9)から再びワクモ数は増加した(図2-A, B)。ワクモ防除区では、全期間中ほとんどワクモは捕捉されていなかった。ヘマトクリット値は、ワクモが観測されていない時期では、ワクモ防除区とワクモ被害区との間に有意な差はなかった。一方、ワクモが最

(様式5) (Style5)

も多く観測された7月を境にワクモ被害区でのヘマトクリット値は低下し始め、8月、9月でワクモ被害区のヘマトクリット値は、ワクモ防除区に比べ有意に低かった($p < 0.01$) (図14)。その後、ワクモの発生が収束に向かい始める10月からヘマトクリット値は回復し始め、10月以降ワクモ防除区とワクモ被害区間では有意な差はなかった。産卵率はワクモが最も多く観測された7月4週目(Week12)にワクモ防除区に比べ、ワクモ被害区で有意に低かった($p < 0.05$)。翌週の8月1週目(Week13)のワクモ被害区での産卵率は、夏期の時期内で最も低く、ワクモ防除区に比べ有意に低かった($p < 0.01$) (図2-C)。その後、10月の2週目(Week22)から再び減少しはじめ、11月1週目、2週目(Week25, 26)でワクモ被害区はワクモ防除区と比較し、有意に低かった($p < 0.01$)。卵質は、表2にまとめて記載した。8月では卵黄色が有意に低下し、9月では卵重が有意に低下した($p < 0.05$)。ワクモの個体数とニワトリの産卵率の間には小さな負の相関傾向があった($y = -0.0871x + 103.18$, $R^2 = 0.69$, 無相関検定, $p = 0.06$)。

i-Trap内のワクモの個体数はトラップ設置後日を追うごとに増加し、日内で急激にワクモがトラップに集合する時間(午後8時)が設置後3日目から認められた。一方、急激に増加した時間後にはトラップ内のワクモ観測数が減少することが明らかとなった。

急激にワクモが集合する時間と、温度や相対湿度の変動の間に関係性は見られなかった(図15(a-1, 2) (b-1, 2))。鶏舎外の日射強度と急激にワクモが集合する時間との間では、8月、9月共に日射強度が0以下になる時間帯(8月23日:午後6時42分、9月25日:午後5時57分)との間に差が生じていた(図16(a-1) (a-2))。鶏舎内の消灯時間(午後8時)とワクモが集合する時間帯(午後8時)が8月、9月共にほぼ一致していた(図6(b-1) (b-2))。このことから、ワクモがトラップ内に集まる個体数と環境要因の日周変化の観察から、ワクモは鶏舎内の人工光に敏感に反応し、トラップ内に集まる行動を開始することが示唆された。

これらの結果から、カメラと画像解析技術を併用することでワクモ発生数の自動モニタリングが可能であり、ワクモの被害を速やかに把握する手法として有効であることが示された。また、日本国内でのワクモの発生パターンとニワトリへの影響に関する基礎データが得られた。今回の実験の結果から、継続的なワクモ被害は、ニワトリの産卵率や卵質を低下させる恐れがあることが示唆された。そのため、発生量によっては鶏卵生産中にワクモの駆除が必要である可能性がある。

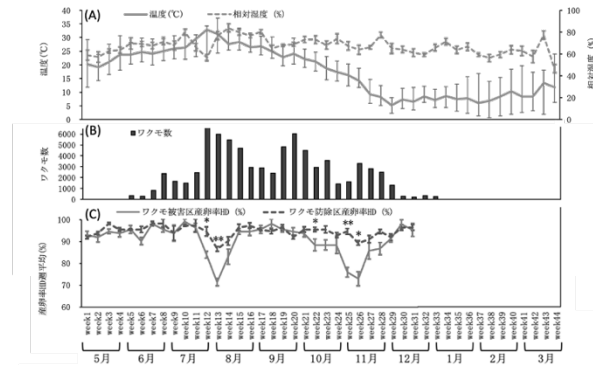


図2. (A) 鶏舎内の温湿度の年変化. (B) 年間のワクモ発生数の年変化. (C) ワクモ防除区と被防除区での産卵率の変化Welch t検定 *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ 垂直線は標準誤差を示す.

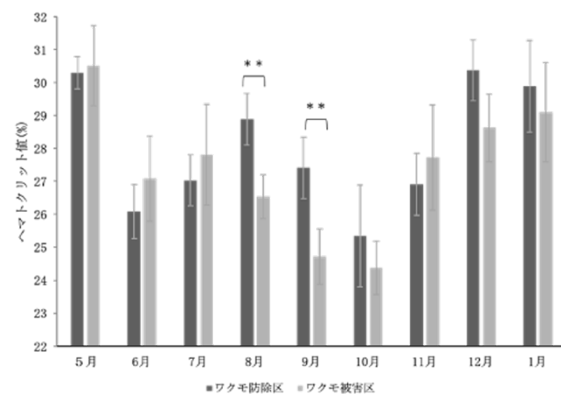


図3. ワクモ防除区と被防除区での月毎のヘマトクリットの変化. Welch t検定 *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$. 垂直線は標準誤差を示す.

(様式5) (Style5)

今回ワクモのトラップ内に集まる行動開始要因として光刺激が関与している可能性が示唆された。今後は、未だ明らかになっていないワクモと光刺激との関連を詳細に調査することによって新たなワクモ防除方法を立案できる可能性がある。

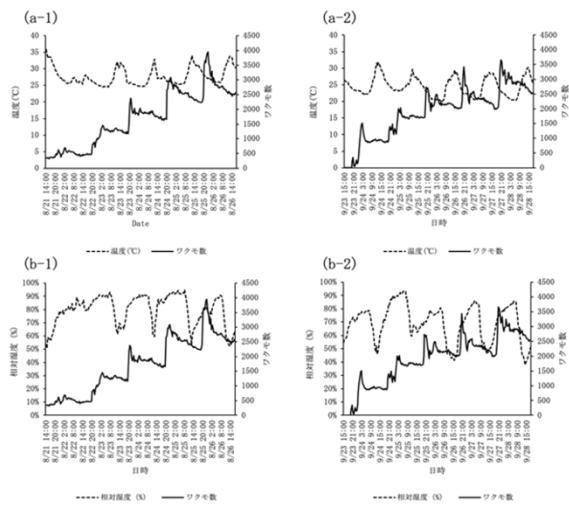


図4. 8月と9月のそれぞれ5日間におけるトラップ内ワクモ数と温度変化 (a-1, a-2) および湿度変化 (b-1, b-2) の関係。

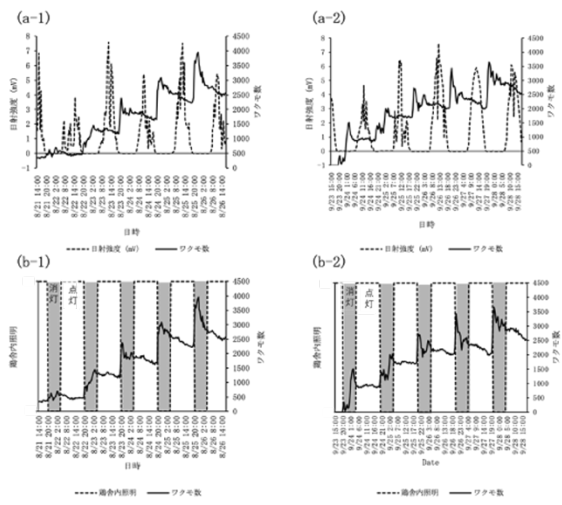


図5. 8月と9月のそれぞれ5日間におけるトラップ内ワクモ数と鶏舎外の日射強度の変化 (a-1, a-2) および鶏舎内照明の変化 (b-1, b-2) の関係。

光刺激がワクモの行動にどのような影響を与えるかを検討際には、*in vitro* 環境下で調査を行った。

ワクモの光に対する行動の変化を調査するために、プラスチック製の容器内に吸血後のワクモ 20 匹を入れ、暗視付き USB カメラ ELP-USBFHD05MT-KL36IR-J (Ailipu Technology, Shenzhen) を用いタイムラプス撮影を行なった。画像解析を容易にするために、プラスチック製の容器内に白いモルタルを敷き詰め背景が白になるように工夫した。ワクモを容器内に入れた後、温度 30℃、湿度 75%のインキュベータ内で飼育した。10 分暗期、10 分明期の計 20 分間、1 秒間隔でタイムラプス撮影を行った。異なるワクモを用いこの実験を 3 回繰り返した。ワクモの光による行動の変化を検討する際には、それぞれのワクモの移動距離を算出するためにトラッキングソフトの UMATracker を用いて解析した (Yamanaka and Takeuchi 2018)。トラッキング後の座標データから移動距離を算出し、明期と暗期の移動距離は Welch の t 検定を用いて比較した。また、ワクモの集合体の形成と光の関係を調査するため、温度 30℃、湿度 75%、3 時間明期 5 時間暗期の条件に設定されたインキュベータ内で観察実験を行なった。白いモルタルを敷き詰めたシャーレ内に吸血後のワクモを 10 匹入れ、動画を撮影しワクモの行動を記録した。ワクモの集合体の形成状況を分析するため、明期、暗期それぞれの期間中 30 秒毎の集合体を形成したワクモの数をカウントした。

トラッキングソフトを用いてワクモの移動距離を測定したところ、明期に比べ暗期でワクモの移動距離は有意に増加した ($p < 0.01$) (図 6)。明期開始時点では、10 個体中 3 個体が集合体を形成していた (図 7)。その後、明期の間で集合体を形成する個体や集合体から出ていく個体などが観察されたが、明期間中の集合体の平均個体数は 3.5 個体であった。暗期開始時点では、集合体を形成しているワクモの個体数は 10 個体中 4 個体であった。暗期の間で集合体を形成するワクモ数は平均 6.7 個体であり、明期と比較すると約 2 倍の個体数で集合体を形成した。

明期と比較して暗期にワクモの行動が活発になることが明らかとなった。また、暗期での移動距離が明期と比較して有意に長かった。このことから、ワクモは光に反応し行動を変化させることが明らかとなった。今回の実験では、暗期条件下で期間中ほとんどの時間で集合体を形成し続け、明期条件下では期間中ほとんどの時間で複数の個体が不規則に分散し続けた。このことから、ワクモの集合体の形成行動も光の影響を受けていることが明らかとなった。以上のことからワクモは、光の影響を受け行動を変化させ、暗

闇下で行動量が増加し、集合体を形成することが明らかとなった。集合体の形成と移動距離の増加が同じ暗期で生じていることは、一見矛盾するが、これは消灯直後の移動距離を測定したためである。

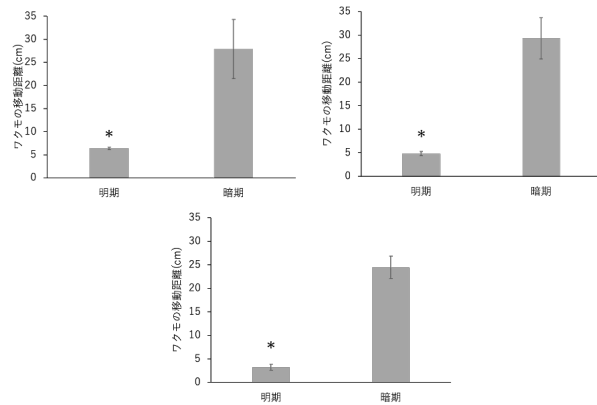


図6. 明期と暗期の10分間にワクモが移動した距離. 垂直線は標準誤差を表す. Welchのt検定 ($p < 0.05$) (3回の実験それぞれ $n = 10$).

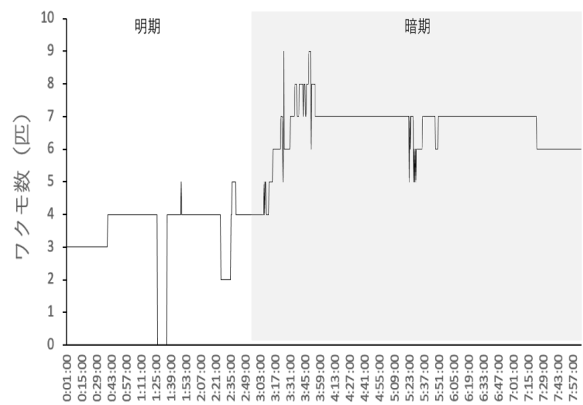


図7. 明期(3時間)と暗期(5時間)の集合体を形成したワクモ数の推移.

生物捕食者としてのアリの可能性を検討する際には、鶏舎周辺のアリ相を調査し、鶏舎周辺の優占種と人家や農地等に普通に生息する種のワクモに対する行動反応を実験室条件下で観察した。

鶏舎に侵入し得るアリの種類を同定するために2020年9月5日香川大学農学部(香川県三木町池戸)内にある鶏舎(40m×21m)周辺で目についた全てのアリのピンセットあるいは吸虫管を用いて採集した。鶏舎周辺の11地点に5m×5mの方形枠を設置し、各枠内で10分間ずつ行った。10分間になるべく多くの種類のアリの採集しようとした。採集したアリの70%アルコール液で浸漬標本とした後、実体顕微鏡下で日本産アリ類画像データベース(アリ類データベース作成グループ, 2008)および、日本産蟻類の検索と解説(I)、(II)、(III)(日本蟻類研究会, 1989)を用いて同定した。また、ワクモに対する捕食者としてのアリの役割を検討するために、実験1で採集された種の上位4種に加え、人家や農地周辺などでよく見られる6種のアリを用い、生きたワクモへの反応や捕食の有無などを調査した。

使用したアリの種類は表1にまとめて記載した。各種のアリのコロニーは、それぞれ香川大学農学部内で飼育されており、プラスチックケース内でコロニーが維持されているものを使用した。種ごとに飼育されたコロニーの採餌エリアにワクモを1匹ずつ投入し、そのワクモに対し接触した各種のアリ20匹がどのような行動を行うのかを調査した。調査項目は、接触後に攻撃するかどうか、攻撃後ワクモが致死に至るかどうか、ワクモ捕殺後巣に持ち運ぶかどうかを記録した。また、ワクモに接触しない時間が30分以上継続した場合、そのアリはワクモを認識していないと判断した。実験に用いたアリとワクモを70%アルコールで液浸標本とした後、実体顕微鏡で撮影し、Image J(Abramoff et al. 2004)を用いアリの頭幅、ワクモの体幅をそれぞれ10個体ずつ測定した。図8にワクモの体幅とアリの頭幅を示した。最も頭幅が大きなアリは、クロオオアリ(*Camponotus japonicus*)であり、続いてクロヤマアリ(*Formica japonica*)、トビイロシワアリ(*Tetramorium tsushimae*)であった(図8)。これら3種はワクモの体幅よりも大きく、それ以外の種はワクモの体幅と変わらない大きさであった。

鶏舎周辺でのみつけどりの結果、3亜科5種類のアリが採集された(表2)。その中で最も多かったのはトビイロシワアリ(*Tetramorium tsushimae*) (100%)で、すべての地点で発見された。ルリアリ(*Ochetellus glaber*) (55%)とクロヤマアリ(45%)がそれに続き、ハリナガムネボソアリ(*Temnothorax spinosior*) (27%)とムネボソアリ(*Tem. congruus*) (9%)もいくつかの地点から採集することができた。

(様式5) (Style5)

表1. 鶏舎周辺で見つけた発見されたアリの種類と発見頻度, 実験2で使用したアリのおおよそのコロニーサイズ.

属名	種名	鶏舎周辺で採取されたアリの出現率	コロニーサイズ
カタアリ亜科	ルリアリ	55%	1500
	アワテコヌカアリ	-	30
	クロオオアリ	-	200
ヤマアリ亜科	オオヤマアリ	45%	100
	ケブカアメイロアリ	-	800
	サクラアリ	-	2000
	インドオオズアリ	-	500
	ムネボソアリ	9%	-
フタフシアリ亜科	ハリナガムネボソ	27%	50
	イカリゲシワアリ	-	400
	トビイロシワアリ	100%	200

働きアリのワクモに対する反応は種によって異なっていた。クロオオアリやクロヤマアリの働きアリはワクモと接触しなかった。これらのアリが触角を使ってダニに接触するが、ワクモに興味を示すことはなかった。一方、イカリゲシワアリ (*Tetramorium lanuginosum*)、インドオオズアリ (*Pheidole indica*)、アワテコヌカアリ (*Tapinoma melanocephalum*)、トビイロシワアリでは、70%以上の働きアリがワクモを攻撃していた。これらの種は、ルリアリ、サクラアリ (*Paraparatrechina sakurae*)、ハリナガムネボソアリと比較し、有意に攻撃した割合が高かった。ケブカアメイロアリ (*Nylanderia amia*) は、イカリゲシワアリ、インドオオズアリ、アワテコヌカアリに比べて攻撃個体の割合が有意に低かった。

イカリゲシワアリ、インドオオズアリ、ケブカアメイロアリの捕殺成功率は、他の種に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、トビイロシワアリの捕殺成功率はルリアリやサクラアリと有意差はなかったが、ハリナガムネボソアリやアワテコヌカアリと比較して有意に高かった。また、ルリアリ、ハリナガムネボソ、サクラアリ、アワテコヌカアリの間で、捕殺成功率に有意な差は認められなかった。

トビイロシワアリ、イカリゲシワアリ、インドオオズアリ、アワテコヌカアリ、ケブカアメイロアリはワクモを捕殺後、捕殺した全てのワクモを巣室に持ち帰った (図8)。サクラアリとルリアリは、ワクモを捕殺したが、採餌場で廃棄し、巣室に持ち帰る行動は観察されなかった。また、トビイロシワ

アリの働きアリは、ワクモを巣室に運んだ後、直接幼虫にワクモを置き、幼虫はそれを摂食した。また、イカリゲシワアリ、インドオオズアリ、アワテコヌカアリ、ケブカアメイロアリは、幼虫にワクモを直接給餌しなかったが、一部の働きアリは巣室内でワクモを摂食していた。その後、幼虫の胎便の色が淡褐色から暗褐色に変化したことから、幼虫は働きアリからの吐き戻しによって間接的に消化されたワクモを摂食していたと考えられる。

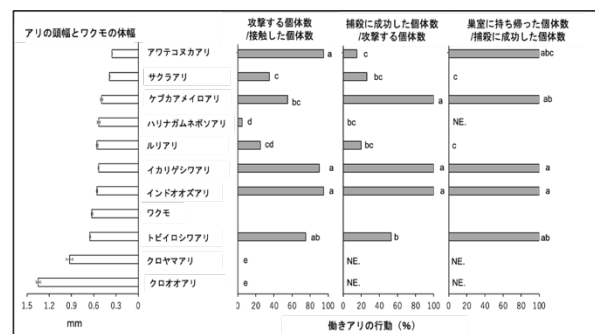


図8. アリの頭幅サイズとワクモの体幅サイズ, および各アリのワクモに対する行動反応. 異符号間は, Fisher Exact多重比較検定 ($P < 0.05$) による有意差を示す. NE: 未調査.

本実験の結果、10 種のアリのうち 5 種でワクモの捕食が認められた。実験で使した 10 種のアリの中では、クロオオアリやクロヤマアが最も頭幅が大きかった。過去の研究では、働きアリの頭幅が餌の選択に影響を与えることが報告されている (Kaspari 1996)。そのため、2 種の大型アリではワクモが獲物として小さすぎたため採餌しなかった可能性がある。一方、残りの 8 種のワクモに対する反応の違いは、頭幅

とは関係なく、他の特性がワクモに対する行動反応に影響を与えている可能性が示唆された。

体サイズ以外では、餌生物の選好性がワクモに対する行動反応に強く影響している可能性が考えられる。今回調査したアリに関し、餌選好性の詳細な調査は実施していないが、今回の実験で用いたアリは生きている節足動物やその死体、同翅目昆虫や花外蜜腺からの液状餌を利用していると考えられる。それぞれのアリのワクモに対する行動の違いの理由の一つとして、生きた節足動物に対する攻撃性が種によって異なることが考えられる。今回の結果では、10種類のアリの中で5種類のアリがワクモ捕食者として有力な候補となったが、中でもトビイロシワアリ、イカリゲシワアリ、インドオオズアリの3種類が生息地の選好性、社会構造、採餌とその後の行動から、ワクモの生物学的防除に利用できる可能性が高いことが示された。

以上の結果から、ワクモの総合防除に資する様々な知見を得ることができた。ワクモ自動計測方法を確立したことによって、ワクモの適切な駆除時期を把握することが可能となった。自動的に鶏舎内のワクモ個体数を計測することによって、ニワトリへ悪影響を与えるようなワクモの個体数になる前に駆除ができる。また、本実験によって、アリの中でもいくつかの種でワクモの捕食が確認された。そのため、捕食が確認できたアリを鶏舎に適宜導入することでワクモの駆除方法の一つとなる可能性がある。また、光の変化はワクモの集合体形成行動と関係があることが明らかになった。これにより、ワクモにとって繁殖する上で重要な役割をはたす集合体の形成を制御することができる可能性がある。光はニワトリの産卵周期と密接な関係があるため、更なる研究が必要であるが、本研究は養鶏産業における総合的害虫管理方法の確立へ貢献したと考えている。

(注) 要約の文量は、学位論文の文量の約10分の1として下さい。図表や写真を含めても構いません。

(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations