

第2章 ヒアリ等の監視技術・体制の確立

1. 有効なモニタリング手法の検討

1-1. 台湾に設置した SLAM トラップで採集されたアリ類

(1) はじめに

沖縄県におけるヒアリ対策では、SLAM トラップシステムを主に生殖虫の監視網として採用している。その一方で、ヒアリ未侵入地域の沖縄に展開する SLAM トラップシステムにはヒアリ採集の前例がなく、本トラップでヒアリが実際に採集されるのか、また働きアリ、女王アリ、雄アリがすべて採集可能なのかを確認する必要があった。そのため OIST と国立台湾大学との間に締結された MTA を含む共同研究計画に基づき、ヒアリ侵入地である桃園市に 2017 年より SLAM トラップを設置しその効果を調べた。また、継続的に試料を収集することで、台湾におけるヒアリ有翅虫（女王アリと雄アリ）の季節消長が明らかになれば、環境が類似する沖縄県における SLAM トラップ調査の最適時期が推定可能になり、調査の効率化にもつながることが期待できる。

(2) トラップ設置とサンプル回収

台湾国立ヒアリ防除センターと協力関係にある MONSTERS' agrotech 社の敷地内に、沖縄県内で使用している SLAM トラップと同じものを 1 台設置した（図 1-1_1）。設置場所としたのは、成熟したヒアリの巣が周辺にあり、地表を徘徊する働きアリが観察できる場所であり、できるだけ風を避けられる地点として、敷地建物と農耕地の間を選定した（図 1-1_2）。

2017 年 8 月 30 日から 2019 年 5 月 29 日までの間設置し続け、その間定期的に採集ボトルを交換した（設置日数は月ごとにばらつきがある：8～77 日）。採集ボトルの交換および回収試料の一時保管は、台湾大学と MONSTERS' agrotech により実施され、サンプルの確認は OIST により実施された。

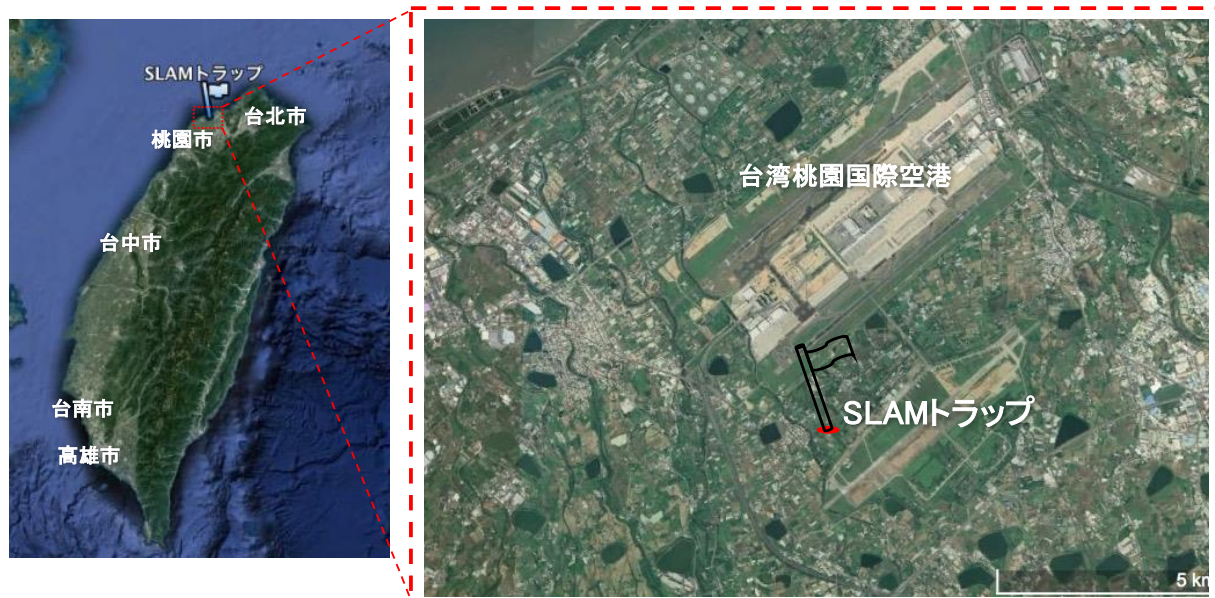


図 1-1_1 台湾における SLAM トラップ設置場所



図 1-1_2 SLAM トラップを設置した環境

左が設置開始時（2017年8月末）の環境で、右がそれから約2年後（2019年6月）の環境

(3) 結果

表 1-1_1 に、これまでに採集されたアリ類の一覧を示す（2017年8月30日から2019年5月29日まで）。設置期間全体で採集されたもののうち、同定できたものの中では6亜科、22属、形態種を含む61種のアリ類が確認された。ただし、形態種の中には働きアリと生殖虫との対応関係が不明なものがあるため、実際の種数はこれよりも少なくなると考えられる。ヒアリについては、働きアリと女王アリ（全て有翅）が捕獲されたが、雄アリは全設置期間を通して1度も捕獲されなかった。

表 1-1_1 台湾に設置した SLAM トラップ試料から同定されたアリ類一覧

亜科名	和名	働きアリ	女王アリ	オスアリ	
カタアリ亜科	アワテコヌカアリ	○	○	○	
	コヌカアリ	○		○	
	アシジロヒラフシアリ		○		
	ルリアリ	○			
	カタアリ亜科の一種A		○		
	カタアリ亜科の一種B		○		
	カタアリ亜科の一種C			○	
	カタアリ亜科の一種D			○	
サスライアリ亜科	ヒメサスライアリ属の一種			○	
	サスライアリ亜科の一種			○	
ヤマアリ亜科	アシナガキアリ	○			
	オオアリ属の一種A	○			
	オオアリ属の一種B	○			
	オオアリ属の一種C	○		○	
	オオアリ属の一種D			○	
	オオアリ属の一種		○		
	ケブカアメイロアリ	○			
	アメイロアリ属の一種A		○		
	アメイロアリ属の一種B		○		
	アメイロアリ属の一種C			○	
	アメイロアリ属の一種D			○	
	アメイロアリ属の一種E			○	
	アメイロアリ属の一種F	○			
	ヒゲナガアメイロアリ属の一種			○	
	クロトゲアリ	○		○	
	タイワントゲアリ	○	○		
	トゲアリ属の一種A		○		
	トゲアリ属の一種B		○		
	フタフシアリ亜科	ウスキイロハダカアリ	○	○	
		ハダカアリ属の一種A		○	
ハダカアリ属の一種B				○	
クボミシリアゲアリ		○			
シリアゲアリ属の一種A			○		
シリアゲアリ属の一種B		○			
シリアゲアリ属の一種C				○	
シリアゲアリ属の一種D				○	
シリアゲアリ属の一種E				○	
フタイロヒメアリ		○			
クロヒメアリ		○			
ヒメアリ属の一種				○	
オオズアリ属の一種A			○		
オオズアリ属の一種B				○	
ヒアリ		○	○		
オオシワアリ		○	○		
イカリゲシワアリ			○		
サザナミシワアリ			○		
シワアリ属の一種			○		
フタフシアリ亜科の一種A		○			
フタフシアリ亜科の一種B			○		
ハリアリ亜科	ケブカハリアリ属の一種		○		
	コガタハリアリ属の一種		○		
	ハリアリ属の一種A		○		
	ハリアリ属の一種B		○		
	ハリアリ属の一種C		○		
	オオハリアリ属の一種A	○			
	オオハリアリ属の一種B		○		
	オオハリアリ属の一種C			○	
	ニセハリアリ属の一種D			○	
	ハリアリ亜科の一種A			○	
	ハリアリ亜科の一種B			○	
カギバラアリ亜科	ハナナガアリ属の一種			○	

図1-1_3にSLAMトラップで捕獲されたヒアリの働きアリおよび有翅女王の個体数の月ごとの推移を示す。採集ボトル設置から交換までの期間には8~77日と大きなばらつきがあるため、このばらつきを30±8日を1期間として補正した。つまり、15日で交換したものは2回分の個体数を足して1期間のデータとして扱い、2ヶ月で交換したものは個体数を2等分して2期間のデータとして扱った。これによると、ヒアリの働きアリはSLAMトラップを設置してから数期間の間は、多い時で1期間に150個体を上回るほど捕獲されたが、その後冬季を挟んで捕獲数は激減し、夏以降はほとんど捕獲されなくなっていた。同様にヒアリの有翅女王も初年度の秋には1期間に40個体近くが捕獲されていたが、冬季以降ほとんど捕獲されなくなり、1個体が翌年5月と8月に採集されたのみであった(図1-1_3)。働きアリについては翌年の3月から5月にも小さな上昇が見られたが、それ以降前年のような個体数増加は見られなかった。

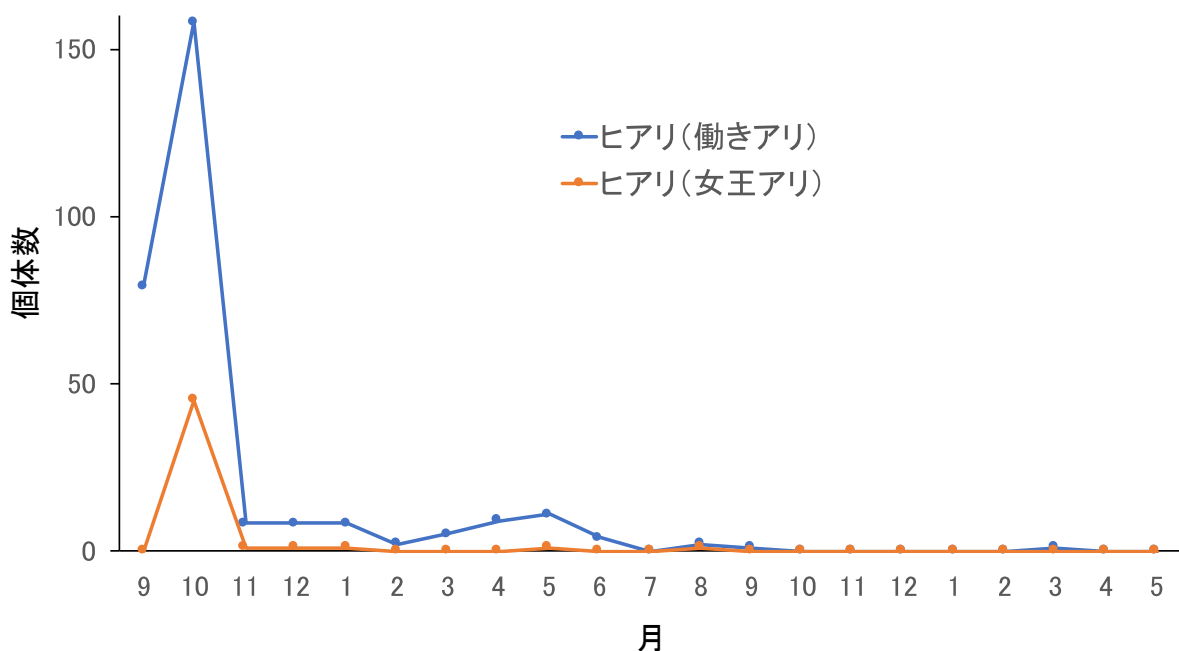


図1-1_3 ヒアリ捕獲数の推移(2017年9月~2019年5月まで)
 灰色の塗りつぶし部分はまとめて採集されたサンプルを約30日分に補正した値

(4) 考察

本調査の結果から、少なくともSLAMトラップシステムでヒアリの働きアリと有翅女王アリの採集が可能であることが判明した。これにより、ヒアリが沖縄県内に侵入した場合、現在港湾地域や本島全域に展開するSLAMトラップシステムがある一定の役割を果たす可能性があることを確認できた。

本SLAMトラップから同定された他種のアリ類の動向からは、ヒアリ生息地域でも同所的に生き残れるアリ類についての示唆が得られる(図1-1_4)。少なくとも働きアリおよび有翅女王双方で多くのヒアリ個体数が記録された2017年10月ごろに、ヒアリと同様に個体数を維持していたシリアゲアリの一種やオオシワアリは、ヒアリの影響を受けにくい種である可能性が高い。これは、これらの種の営巣環境がいずれも樹上であることが関係しているのかもしれない。また、ヒアリが高密度に生息する新北市の実験区でも目にすることがあるクロヒメアリやアメイロアリの一種

がここでも検出されている（ただし、双方のアメイロアリ属の一種が同種である確証はない）。地上活動性が強いとみられるこれらの種がヒアリの影響を回避できる仕組みについては興味深い。それに対して、ヒアリが検出されなくなった2018年9月以降に緩やかに増加を続けるアシナガキアリは、ヒアリの侵入による影響を受けやすいグループである可能性がある。

本調査では、10月付近にヒアリ働きアリの採集個体数に大きなピークが見られた。これは、新北市で実施した餌の嗜好性実験の際に得られたヒアリの季節活性データとも矛盾しない。また、この際有翅女王の増加もこれに連動しており、新北市でも同時期の巣の中に多くの有翅虫が存在することを確認している。しかし、今回桃園地域に設置したSLAMトラップは1基のみであり、設置場所の環境も期間中大きく変化しているため（図1-1_2）、正確な季節性やヒアリ採集個体の設置期間途中からの激減要因について推察するのは未だ容易ではない。周辺の巣の移動やトラップ周りの草丈など、局所的な変化やその巣独自の周期性が採集個体数に大きく影響する可能性が否定できないためである。2019年6月の現地訪問では、設置当時の2017年時点とは大きく周辺環境に変化が見られ、ヒアリの個体密度も明らかに低下していた。MONSTERS' agrotech 社への聞き取りによれば、地主が休耕地をすべて水田にしたことと、地元政府がヒアリに対して薬剤散布を行ったことが、ヒアリの個体密度低下に大きく影響しているのではないかということであった。ただし薬剤散布の時期や回数が住民に通知されることはないとのことであった。2019年夏より、同SLAMトラップを付近でヒアリ生息が確認できた地点に移動させて引き続き稼働させている。今後のデータ蓄積により、台湾におけるヒアリの活動季節性解明の一助となることが期待される。

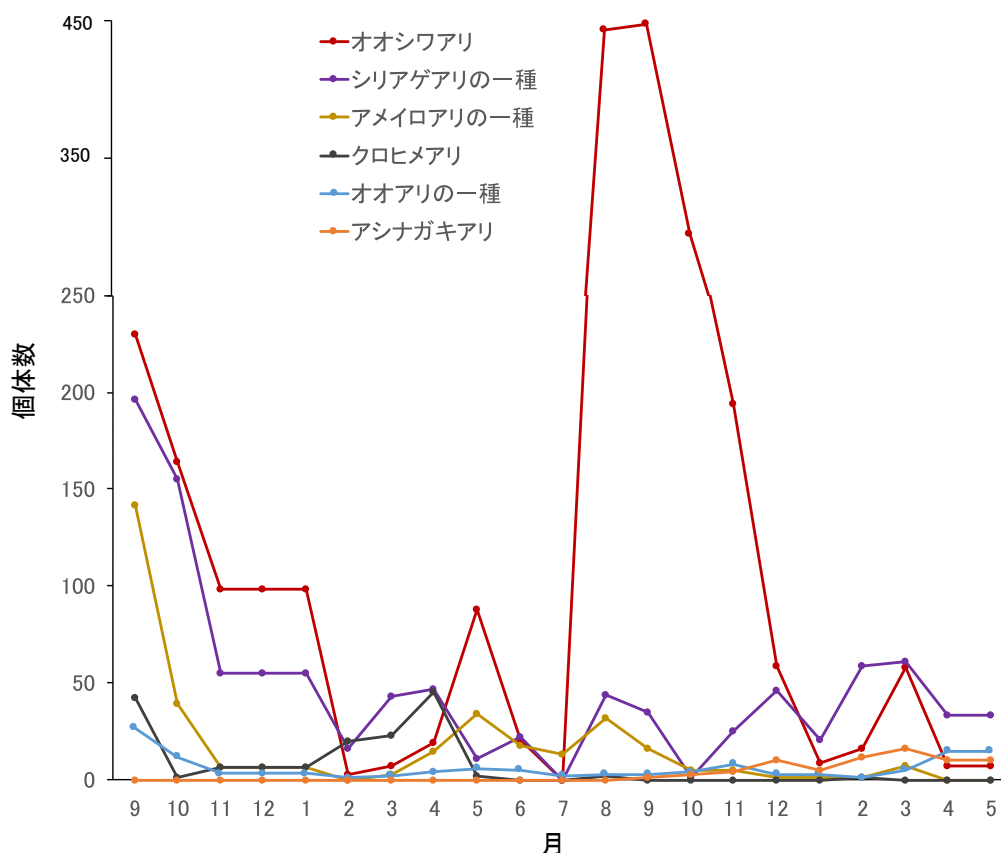


図1-1_4 ヒアリ以外のアリ（上位6種）の推移（2017年9月～2019年4月まで）
 灰色の塗りつぶし部分はまとめて採集されたサンプルを1ヶ月分に補正した値

1-2. ヒアリ長期モニタリング手法開発に向けたアリ塚調査

(1) はじめに

ヒアリの見分け方として沖縄県で現在採用している情報のひとつに、他のアリ類が作らないような大きなアリ塚を形成するという特徴がある。台湾においては、大きく発達したアリ塚はヒアリの存在を確認するひとつの目安になっており、ルーペなどを使用した形態形質に並んで有効な発見形質のひとつである。台湾と気候条件が酷似した沖縄においては、台湾同様にこのアリ塚の特徴が有効だと推測され、これを積極的に監視技術に組み込んでいくべきだと考える。しかしそれと同時に、これまで各季節に実験のため渡航している経験上、ヒアリのアリ塚の形状や見え方は季節によって変化しているような印象を受ける。さらに、2019年1月末に訪れた香港においては、冬季であるにもかかわらずアリ塚の発達が見られなかった（平成30年度報告書）。今後沖縄におけるより効果的な長期モニタリング方法を構築するにあたり、ヒアリ監視に有効な「顕著なアリ塚」という特徴について、客観的なデータに基づいた評価と、それに応じた監視システムへの適切かつ効果的な取り込みが必要である。

(2) 目的

実際に高密度でヒアリが生息し、沖縄に気候条件が酷似した台湾の試験地において、ヒアリが形成するアリ塚の季節変化を計測し、そのデータに基づいて侵入早期発見のための監視対象としての有効性や、適切な調査時期を検討する。

(3) 調査地および調査時期

台湾ヒアリ防除センターの好意により、台湾新北市内にある草地を、野外調査地として提供してもらい、各実験を実施した（N25.034515°，E121.468864°、図1-2_1～図1-2_2）。調査地にはヒアリのアリ塚が散見され、地表面では、餌探索のために徘徊するヒアリの働きアリが容易に目視で確認できた。ただし、暑さが厳しかったせいか、その活動性は高くなかったように見える。計測は2019年6月18日および19日で実施した。



図 1-2_1 新北市内調査区



図 1-2_2 調査風景

(4) 調査方法

【アリ塚のサイズ計測および活動性の記録】

調査区内のアリ塚の中から、石や植物体と一体化したようなものを避けて形状が計測できるものを選び、地表面からの高さをアリ塚の高さ、長軸の長さをアリ塚の幅とした。それぞれのアリ塚にメジャーを当てて写真を撮影し、実際の計測はその画像をもとに行った。寸法計測用撮影のあと、アリ塚を崩してそのアリ塚が使用中のものか、あるいは放棄後のものかを判定した（活性テスト）。さらに、使用中であった場合、その中から有翅虫が発見できたかを記録した。



図 1-1_3 アリ塚の計測



図 1-1_4 アリ塚の活性テスト

(5) 結果

今回の調査では 25 個のヒアリのアリ塚を計測した。それぞれの高さおよび幅の計測値は表の通り。25 のアリ塚のうち、19 (76%) は使用中であり、6 (24%) は放棄されたものであった。使用中のアリ塚のうち、有翅虫を確認できたのは 2 つ (10.5%) であった。計測したアリ塚全体では、その高さの平均は 171.4mm、幅の平均は 313.0mm となった。また、使用の有無における平均値の違いについては、高さでは使用中が 167.3mm だったのに対して放棄されたものでは 184.5mm、幅では使用中のものが 325mm だったのに対して放棄されたものでは 275mm であったが、いずれも有意な違いではなかった。

表 1-2_1 各アリ塚の計測値および活動性結果一覧

マウンドNo.	高さmm	長さmm	使用中？	有翅女王
Taipei001	108	200	Yes	No
Taipei002	137	200	No	No
Taipei003	160	440	Yes	No
Taipei004	120	200	Yes	No
Taipei005	150	180	Yes	No
Taipei006	150	530	Yes	No
Taipei007	110	280	No	No
Taipei008	185	430	Yes	No
Taipei009	220	230	No	No
Taipei010	170	350	Yes	No
Taipei011	160	330	Yes	No
Taipei012	170	185	Yes	Yes
Taipei013	150	230	Yes	No
Taipei014	110	170	Yes	No
Taipei015	175	340	Yes	No
Taipei016	180	330	No	No
Taipei017	130	290	Yes	No
Taipei018	230	470	Yes	No
Taipei019	165	310	Yes	No
Taipei020	230	330	No	No
Taipei021	230	280	No	No
Taipei022	240	410	Yes	No
Taipei023	215	400	Yes	No
Taipei024	190	470	Yes	No
Taipei025	200	240	Yes	Yes

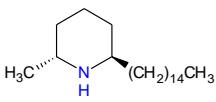
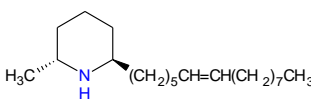
2. 同定技術の検討 (GC-MS によるヒアリ検出法)

2-1. GC-MS によるヒアリの毒性物質の検出

(1) 背景

ヒアリの特異的な毒性物質として、アルカロイド 2-methyl-6-alkylpiperidine (総称ソレノブシン、表 2-1_1) が単離されており¹⁾、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いた同定方法が報告されている (図 2-1_1、表 2-1_2)^{2,3,4)}。各種モニタリング調査によって生じる多量のサンプルからヒア리를迅速かつ確実に検出することを目的に、GC-MS を利用したヒアリ検出法を検討した。

表 2-1_1 ヒアリの毒性物質

name	structure
<i>trans</i> *-C ₁₅	 <ul style="list-style-type: none"> ・側鎖の炭素数が 15 個であるため、C₁₅ と呼ばれる。 ・炭素数が 11, 13, 15, 17 個のものがある。
<i>trans</i> *-C _{15:1}	 <ul style="list-style-type: none"> ・側鎖に二重結合が 1 つあるため、C_{15:1} と呼ばれる。 ・炭素数が 11, 13, 15, 17 個のものがある。

*cis 体の毒性物質もある。

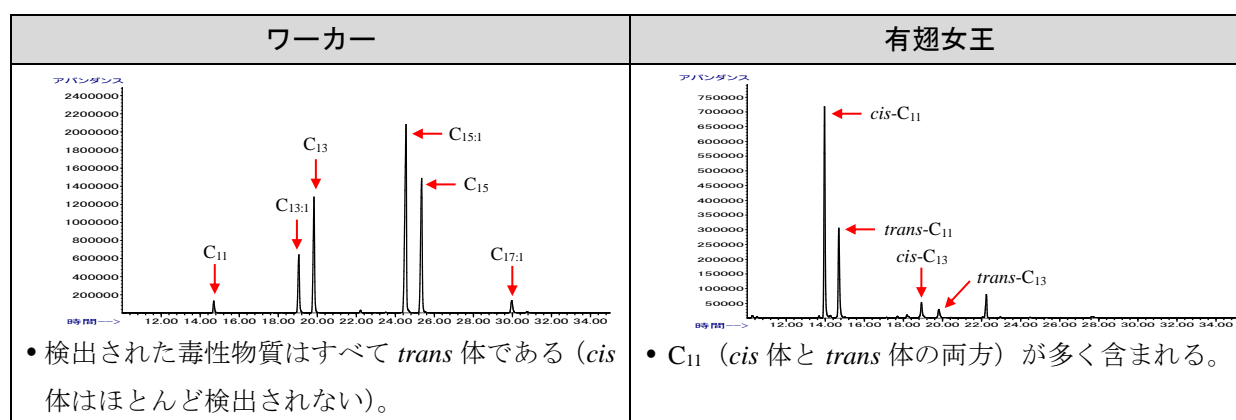


図 2-1_1 GC-MS によるヒアリの分析結果

表 2-1_2 GC-MS によるヒアリの毒性物質の測定条件

装置	: 6890N GC-5975MSD (Agilent Technologies)
カラム	: HP-5ms (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm film thickness)
カラム槽温度	: 90 °C (1 min)→10 °C/min→160 °C→3°C/min→250 °C (2 min)
注入口温度	: 230 °C
トランスファーライン温度	: 280 °C
MS イオン源温度	: 230 °C
注入方法	: Splitless
キャリアガス	: He
イオン化法	: EI
イオン化電圧	: 70eV
分析モード (モニターイオン)	: SIM (<i>m/z</i> 98, 126)

(2) 中国産ヒアリの分析

これまでに国内で確認されたヒアリの多くが中国由来のものであり、GC-MSによるヒアリ検出法を確立するためには、中国産のヒアリが持つ毒性物質の含有比等について確認する必要がある。そのため、2019年1月末に香港でヒアリの調査及び採集を行い、それらの個体をGC-MSにより分析した。

ヒアリ採集は香港ランタオ島の2箇所（調査地1：N22.315846，E114.048080 周辺、調査地2：N22.291440，E113.939054 周辺）で行った。1個のコロニーから採集したワーカーをランダムに10個体選定し、計100個体（10個体/コロニー×10コロニー）のワーカーをそれぞれ1個体ずつ分析した。その結果、これまでに台湾（新北市）産の個体で確認された結果（毒性物質C_{15:1}を最も多く持つ）とは異なり、毒性物質C_{13:1}を最も多く持つ個体が存在することが明らかになった（表2-1_3、図2-1_2）。また、それは調査地1の個体でのみ起こった。これらの結果から、毒性物質は個体や地域によってその含有量及び含有比が異なることが明らかになった。

表 2-1_3 香港産ヒアリワーカーの毒性物質

採集地	C _{15:1} を最も多く持つ個体数	C _{13:1} を最も多く持つ個体数
調査地1	54	16
調査地2	30	0

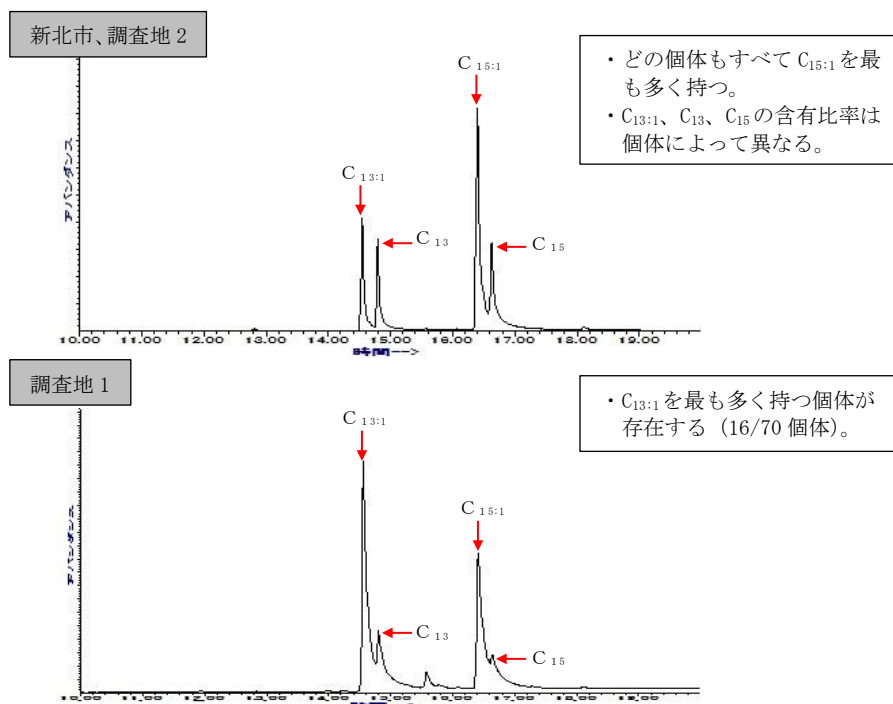


図 2-1_2 GC-MS による香港産ヒアリの分析結果

（測定条件は表 2-1_2 のカラム槽温度のみ変更：90 °C（1 min）→10 °C/min→270 °C（5 min））

(3) ヒアリワーカーの毒性物質

ヒアリワーカーが持つ毒性物質の含有比には個体差や地域差があることが明らかになった。さらに分析個体数を増やし検証したところ、C₁₅を最も多く持つ個体も存在することが明らかになった（表 2-1_4、図 2-1_3D）。しかしながら、これまでの分析結果と同様に、C_{15:1}を最も多く持つ個体（図 2-1_3AB）が約9割存在することが確認された。

表 2-1_4 台湾産及び香港産ヒアリワーカーの持つ毒性物質

採集地		C _{13:1} を最も多く持つ個体数	C _{15:1} を最も多く持つ個体数	C ₁₅ を最も多く持つ個体数	計
台湾	新北市	7	54	2	63
香港	調査地1	20	84	0	104
	調査地2	0	63	0	63
計		27 (12%)	201 (87%)	2 (1%)	230 (100%)

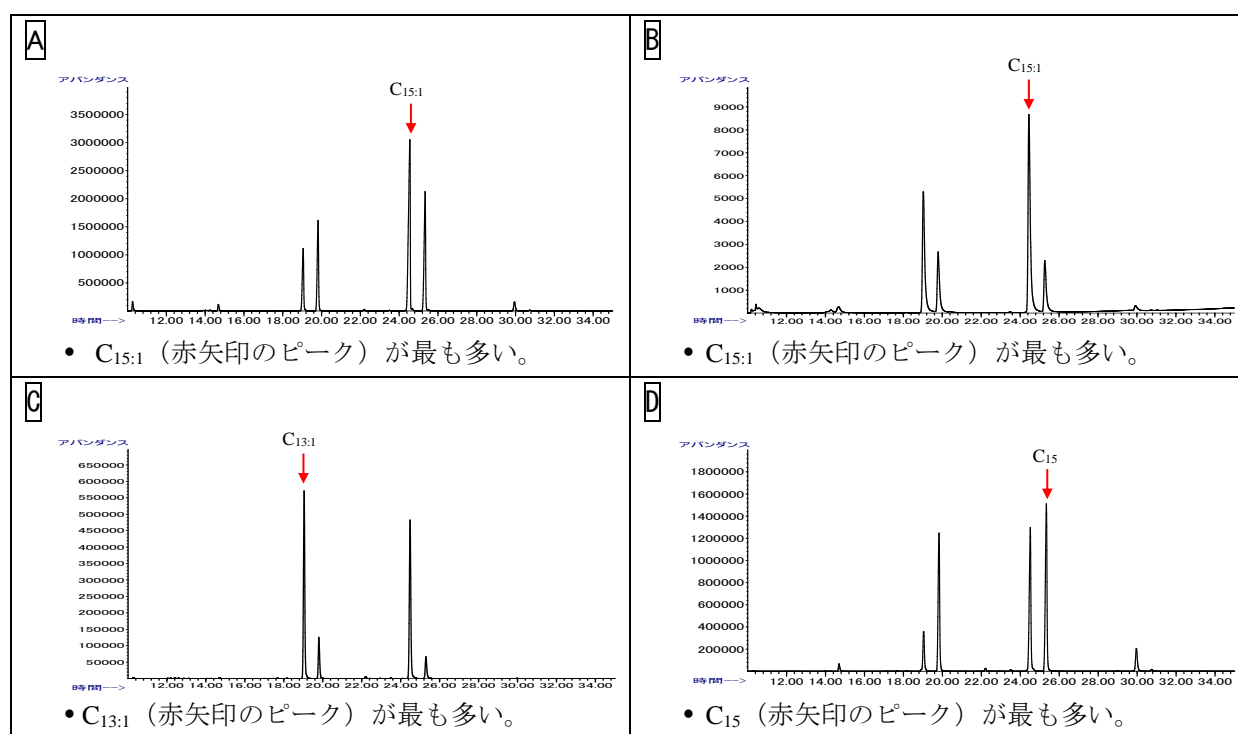


図 2-1_3 GC-MS によるヒアリワーカーの分析結果

- 1) MacConnell, J. G., Blum, M. S., Fales, H. M. *Science* **1970**, *168*, 840-841.
- 2) Chen, L., Fadamiro, H. Y. *Toxicon* **2009**, *53*, 469-478.
- 3) Chen, L., Fadamiro, H. Y. *Toxicon* **2009**, *53*, 479-486.
- 4) Yu, Y. T., Wei, H. Y., Fadamiro, H. Y., Chen, L. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5907-5915.

2-2. 誘引剤トラップ調査におけるヒアリ検出を目的とした GC-MS の利用

(1) 背景

沖縄県におけるヒアリの監視体制として、県内主要港湾周辺での誘引剤トラップによる調査を実施した。昨年度は約 5,000 個、今年度は約 10,000 個のトラップでアリ類を採集したが、すべてのサンプルについて顕微鏡下でヒアリの有無を確認するのは多くの時間と費用がかかる。作業時間及び費用の削減を目的に、GC-MS によるヒアリ検出を検討している。これまでの結果を踏まえ、前処理方法の改善及びその他検討を行った。

(2) 前処理方法の改善

これまでの前処理方法（図 2-2_1）では他のアリ類からの夾雑ピークが除けないために、良好なクロマトグラムが得られない可能性が考えられた。そこで、各種溶媒やカラムクロマトグラフィーに用いる吸着剤を検討し、図 2-2_2 に示す前処理方法を採用することとした。この前処理を行うことで良好なクロマトグラムが得られ、再現よく結果が得られるようになった。

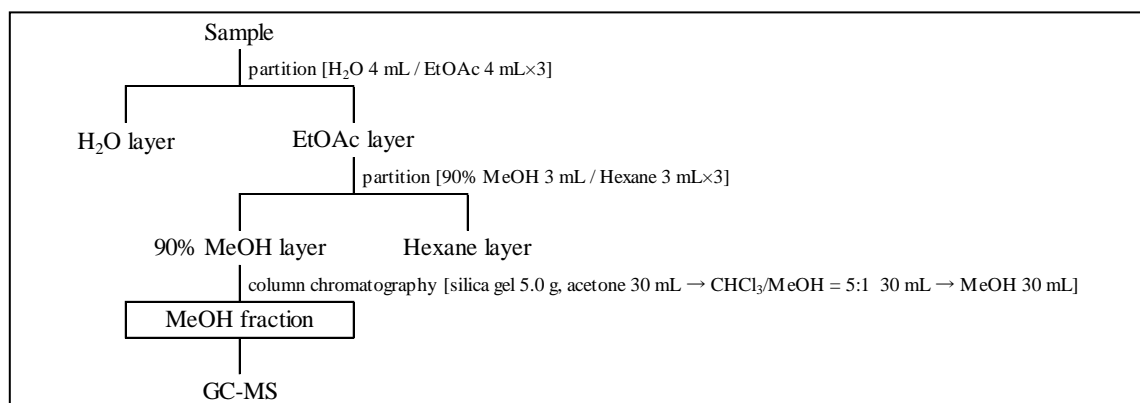


図 2-2_1 これまでの前処理方法

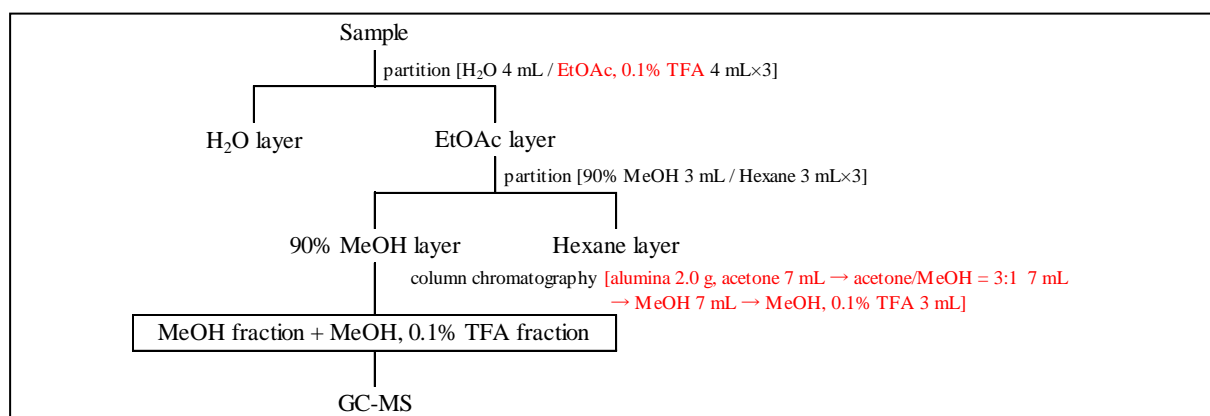


図 2-2_2 改善した前処理方法（赤字：改善した箇所）

(3) ヒアリワーカーの毒性物質の含有量

これまでのヒアリワーカーの分析結果から、毒性物質の含有比や含有量は個体差が非常に大きいことが分かった。誘引剤トラップ調査における検出下限の確認のため、ワーカー1 個体ごとの含有量を調査した (n=100)。含有割合の高い毒性物質 C_{15:1} について解析を行ったところ、図 2-2_3 に示すヒストグラムが得られた。含有量が最小と最大のものでは約 160 倍の差があること、正規分布にはならず低濃度側に偏る傾向があることが明らかになった。

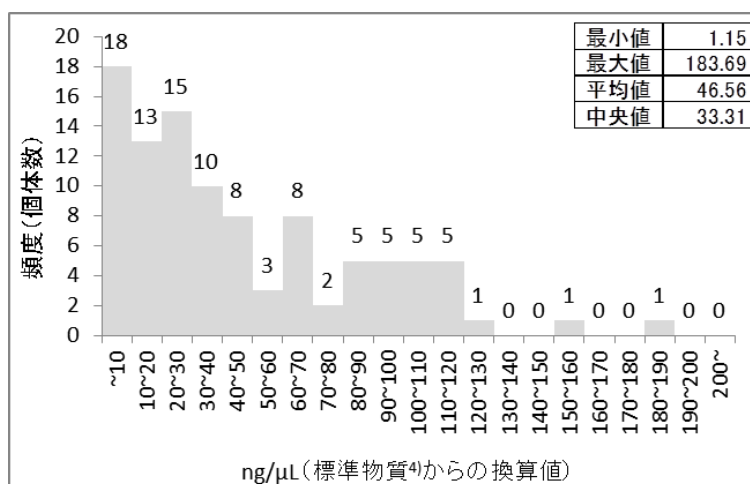


図 2-2_3 毒性物質 C_{15:1} 含有量のヒストグラム

(4) 誘引剤トラップ調査における検出下限

① 目的

誘引剤トラップ調査サンプルの分析では、トラップ（スナック）400～450 個で採集したアリ類を 1 つにまとめたものを 1 検体として分析を行う（図 2-2_4）。安全側の値としての検出下限値を決定するため、トラップ約 900 個分を 1 検体とした際の検出下限を確認する。

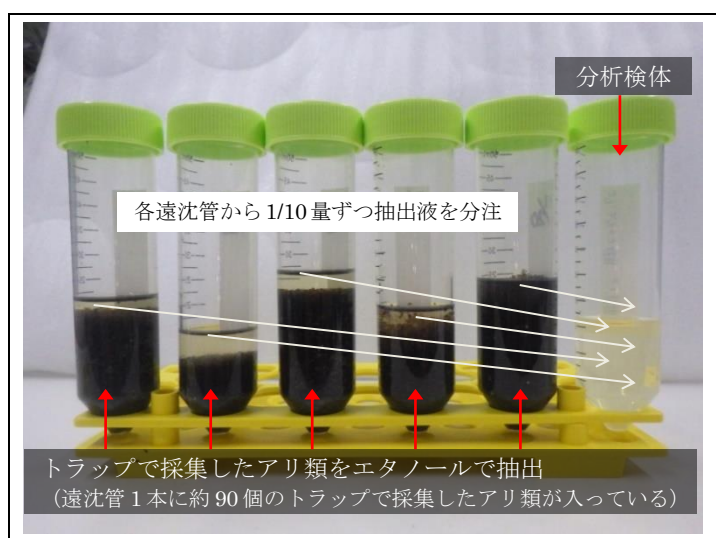


図 2-2_4 トラップで採集したアリ類とその分析検体

② 方法

以下に示す方法で試験を行った。なお、これまでの検討から、ワーカーの4つの主要（含有量が多い）ピークである $C_{13:1}$ 、 C_{13} 、 $C_{15:1}$ 、 C_{15} のうち、 $C_{13:1}$ 、 C_{13} のピークが出現する保持時間（リテンションタイム）には他のアリ由来の夾雑ピークが多量に出現する可能性が高いことが明らかになったため、 $C_{15:1}$ 、 C_{15} のうち含有割合の高い $C_{15:1}$ の検出について確認した。

- 分析検体には今年度の誘引剤トラップ調査サンプル（ヒアリは捕獲されていないと仮定）を用いた。
- 毒性物質 $C_{15:1}$ の濃度として 2.5 ng/ μ L 及び 25 ng/ μ L のヒアリ抽出液を検体に添加した（n=3）。
- 図 2-2_2 に示す前処理を行い、各検体を GC-MS で分析した（測定条件は表 2-1_2 の通り）。
- 目的ピークのリテンションタイムにおいて得られたピーク高さが S/N 比 \geq 10 であり、マススペクトルにおいてフラグメントイオン m/z 98, 292, 307 が観測された場合、毒性物質 $C_{15:1}$ が検出できたと判定した。

③ 結果

分析結果を表 2-2_1、図 2-2_5 に示す。添加濃度 25 ng/ μ L では 3 検体すべてで $C_{15:1}$ を検出できたが、添加濃度 2.5 ng/ μ L では 3 検体のうち 1 検体は検出できなかった。また、検出できた 2 検体（検体 B、C）のクロマトグラムを確認すると、 $C_{15:1}$ のピークは検出できているが、定性及び定量を妨害するピーク（妨害ピーク）が許容範囲（目的ピークの 1/3 未満：「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン⁵⁾」を参考に設定）を超えて存在するため、この濃度を検出下限値とするのは適切でないと考えられた。よって、トラップ約 900 個分を 1 検体とした際の検出下限は 25 ng/ μ L と確認した。ただし、図 2-2_5 に示したクロマトグラム及び S/N 比（添加濃度 25 ng/ μ L の 3 検体）から、約半分の濃度の 10 ng/ μ L においても良好なクロマトグラムが得られ、 $C_{15:1}$ のピークを検出できると考えられた。

以上の結果から、誘引剤トラップ調査サンプルにおいて実際に分析する検体（トラップ約 450 個）の検出下限を 10 ng/ μ L と推定し、次項に示すブラインドテストを行った。

表 2-2_1 分析結果

検体	トラップ個数	毒性物質 $C_{15:1}$ の添加濃度	
		2.5 ng/ μ L	25 ng/ μ L
A	885	×	○
B	852	○	○
C	905	○	○

$C_{15:1}$ を検出できたものは「○」、できなかったものは「×」で表した。

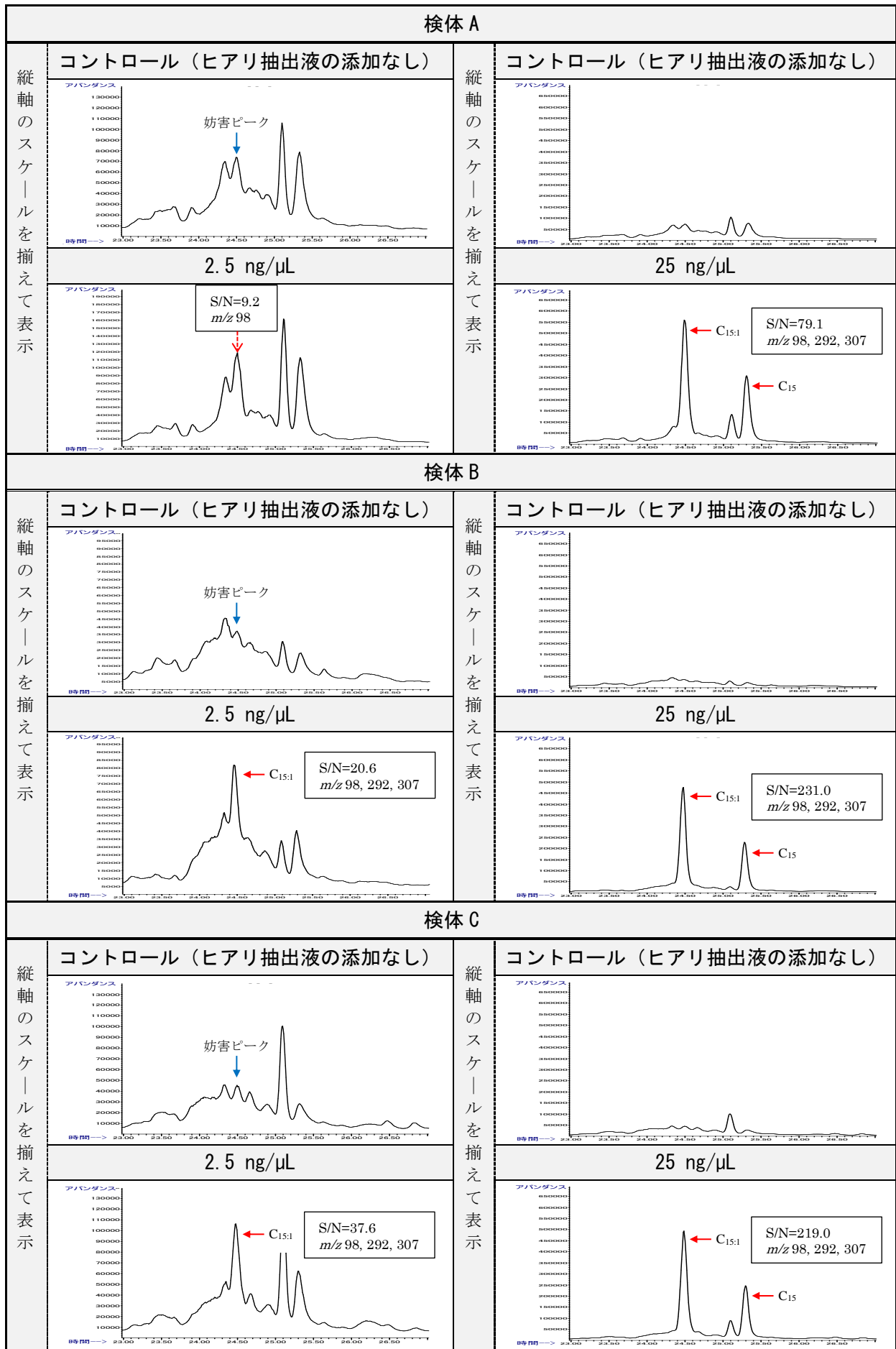


図 2-2_5 各分析検体のクロマトグラム

(5) ブラインドテスト

① 目的

誘引剤トラップ調査における GC-MS を用いたヒアリ検出技術の確立に向け、ブラインドテストによりその実用性を検証する。併せて、今年度の誘引剤トラップ調査でのヒアリの有無を確認する。

② 目的

以下に示す方法で試験を行った。

- 分析検体を表 2-2_2 に示す通り準備した。各検体を 2 つずつ準備し、そのうち 1 つずつに毒性物質 C_{15:1} の濃度として 10 ng/μL のヒアリ抽出液を添加した。
- 全 46 検体を分析実施者 2 名にランダムに振り分けた。
- 各実施者がそれぞれ 23 検体ずつを GC-MS で分析した（分析の前処理は図 2-2_2、測定条件は表 2-1_2 の通り）。
- 各検体に標準物質⁴⁾を添加して分析することで、分析装置の精度、リテンションタイムのずれを確認した。
- 目的ピークのリテンションタイムにおいて得られたピーク高さが S/N 比 ≥ 10 であり、マススペクトルにおいてフラグメントイオン m/z 98, 292, 307 が観測された場合、毒性物質 C_{15:1} が検出できたと判定した。

表 2-2_2 分析検体とそのトラップ個数

検体名	トラップ個数
那覇港A	344
那覇港B	401
那覇港C	393
那覇港D	394
那覇港E	357
那覇港F	443
那覇港G	378
那覇港H	356
那覇港I	376
那覇軍港	308
那覇空港	246
那覇保税地域	410
中城湾港A	351
中城湾港B	463
中城湾港C	356
金武湾港	414
ホワイトビーチ	<i>165</i>
本部港	231
平良港A	437
平良港B	438
石垣港A	401
石垣港B	356
石垣港C	402
平均	366

最大は太字・斜体、最小は斜体で表した。

③ 結果

試験結果を表 2-2_3、図 2-2_6（各クロマトグラムは測定時間全体図と目的ピークのリテンションタイム付近の拡大図を表示し、同じ行のクロマトグラムは縦軸のスケールを揃えて表示した）に示す。すべての検体において正答を示し、正答率 100%となった。なお、クロスチェック解析（実施者 A のクロマトグラムを実施者 B が、B のクロマトグラムを A がそれぞれ解析し、毒性物質の検出有無を確認した）においても双方で一致した解答となった。

以上の結果から、誘引剤トラップ調査における分析検体（トラップ 165～463 個）での検出下限を 10 ng/μL と確認した。今年度の誘引剤トラップ調査については、この濃度以上の毒性物質 C_{15,1} は検出されなかった。

表 2-2_3 ブラインドテストの結果

実施者	検体No.	検体名	C _{15,1} の検出* ¹	抽出液の添加* ²	正誤
A	1	ホワイトビーチ			正
	2	中城湾港A	○	○	正
	3	石垣港B	○	○	正
	4	石垣港A			正
	5	那覇港H			正
	6	那覇港B	○	○	正
	7	平良港A			正
	8	平良港B	○	○	正
	9	那覇港C			正
	10	本部港	○	○	正
	11	那覇港A	○	○	正
	12	那覇港A			正
	13	那覇空港	○	○	正
	14	那覇港F			正
	15	那覇空港			正
	16	那覇港E	○	○	正
	17	那覇港I			正
	18	本部港			正
	19	石垣港C	○	○	正
	20	那覇港H	○	○	正
	21	那覇港E			正
	22	那覇港F	○	○	正
	23	那覇港I	○	○	正
B	24	那覇港C	○	○	正
	25	中城湾港B			正
	26	中城湾港C			正
	27	石垣港B			正
	28	那覇港D	○	○	正
	29	那覇保税地域	○	○	正
	30	中城湾港C	○	○	正
	31	中城湾港A			正
	32	那覇港G			正
	33	那覇港D			正
	34	那覇軍港			正
	35	那覇保税地域			正
	36	石垣港C			正
	37	石垣港A	○	○	正
	38	那覇軍港	○	○	正
	39	金武湾港			正
	40	中城湾港B	○	○	正
	41	那覇港G	○	○	正
	42	金武湾港	○	○	正
	43	平良港B			正* ³
	44	平良港A	○	○	正
	45	ホワイトビーチ	○	○	正* ³
	46	那覇港B			正* ³

*¹ 検出できたものは「○」で表した。

*² ヒアリ抽出液を添加したものを「○」で表した。

*³ 前処理時の操作ミスにより誤答を示したが、再度分析を行い正答となった。

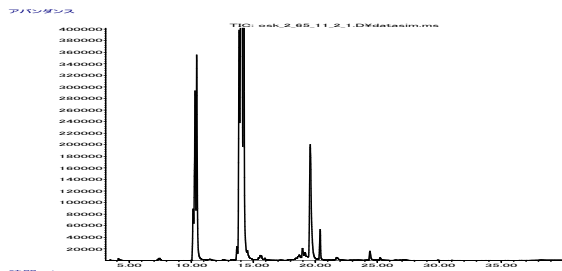
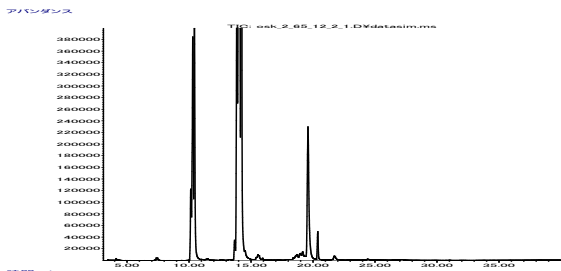
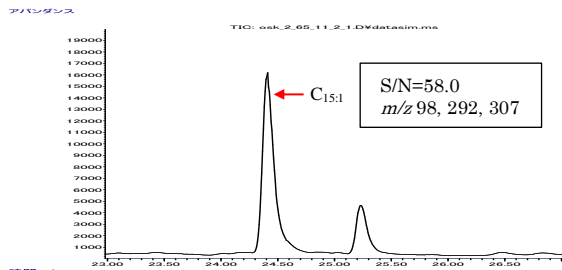
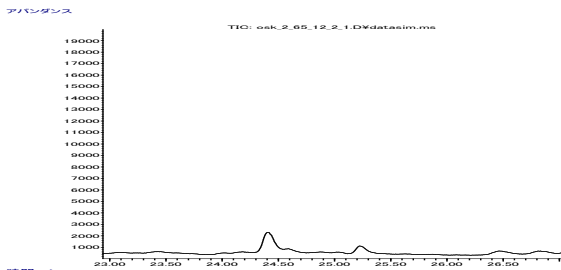
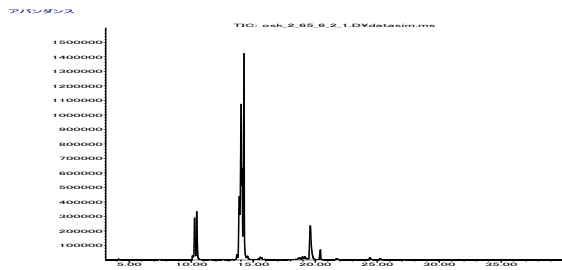
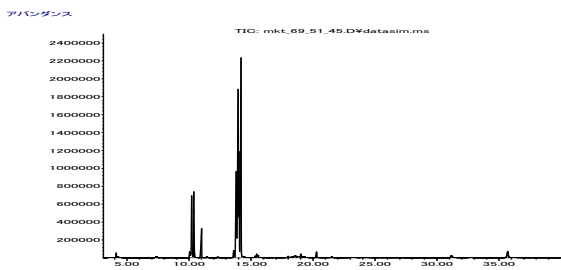
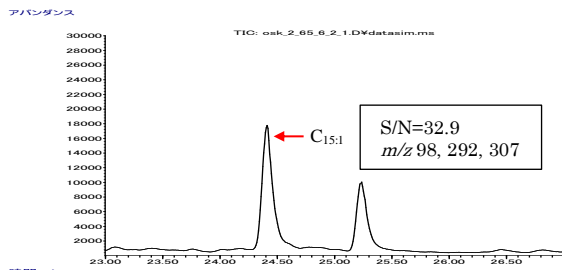
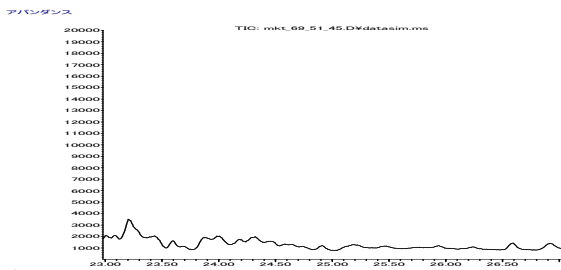
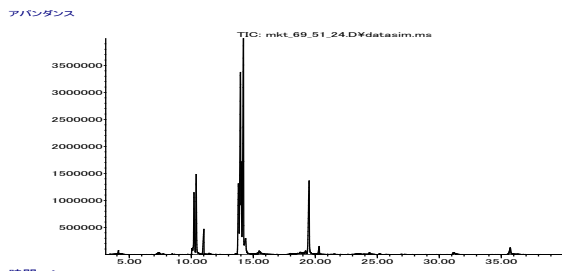
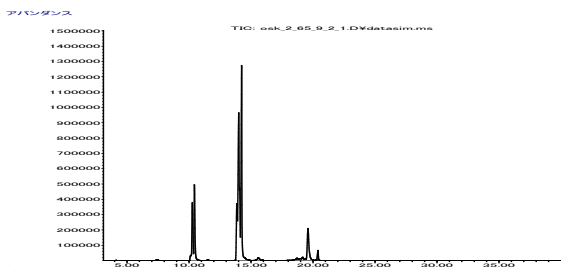
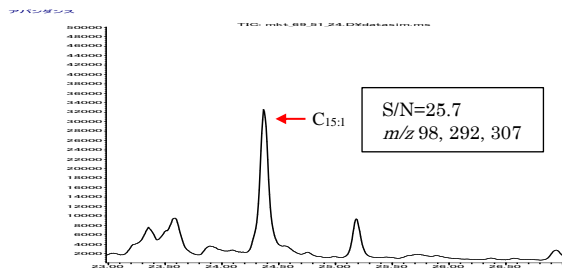
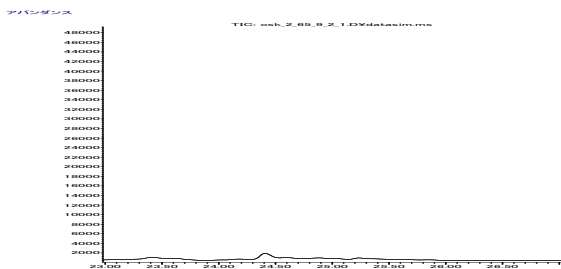
		検体 No、検体名、ヒアリ抽出液の添加有無、実施者	
		11、那覇港 A、添加あり、A	12、那覇港 A、添加なし、A
全体			
拡大			
		6、那覇港 B、添加あり、A	46、那覇港 B、添加なし、B
全体			
拡大			
		24、那覇港 C、添加あり、B	9、那覇港 C、添加なし、A
全体			
拡大			

図 2-2_6 各検体のクロマトグラム

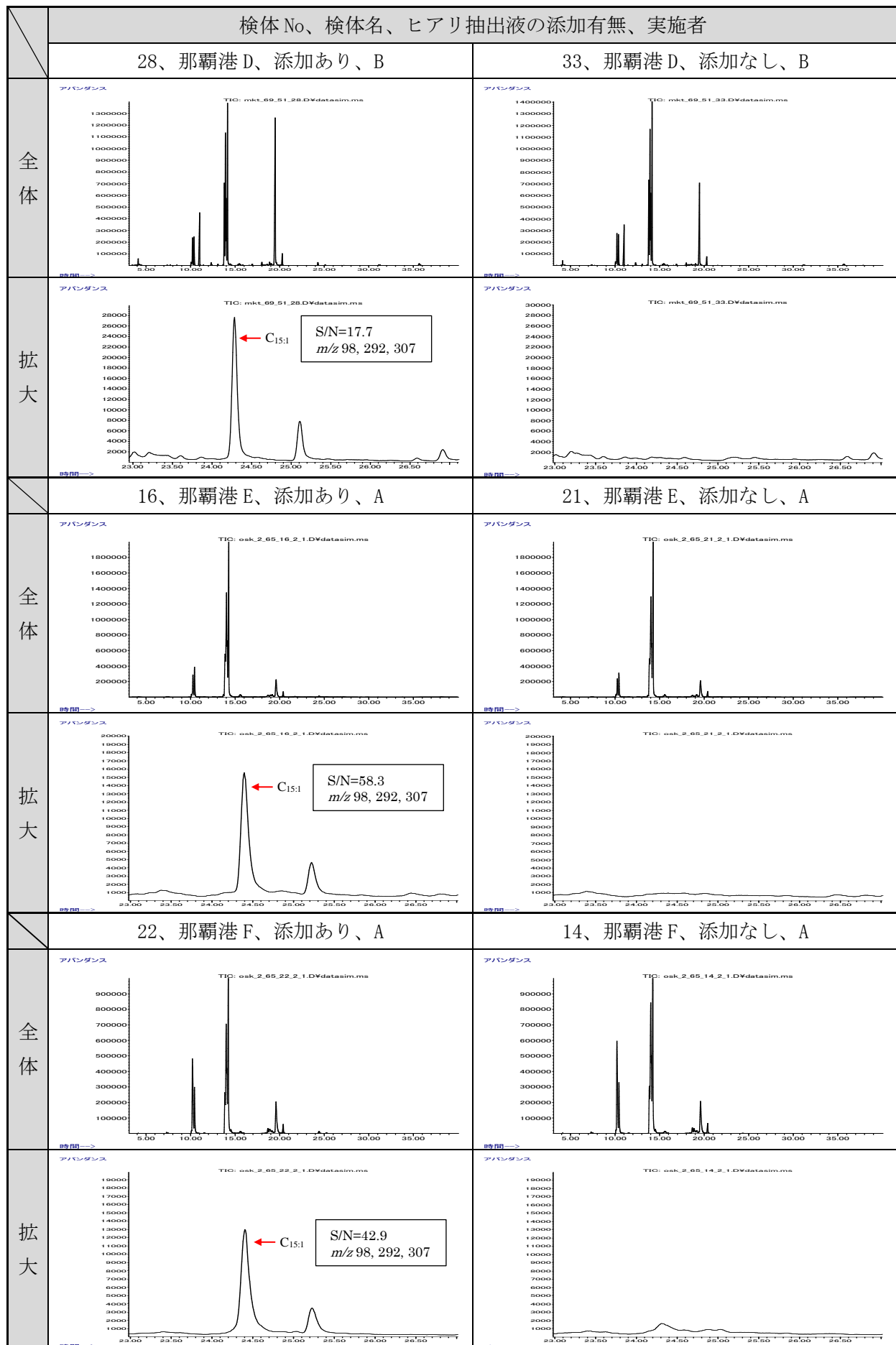


図 2-2_6 各検体のクロマトグラム (続き)

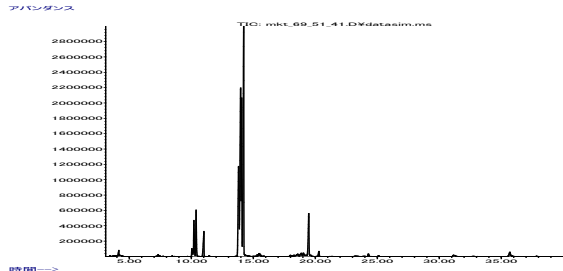
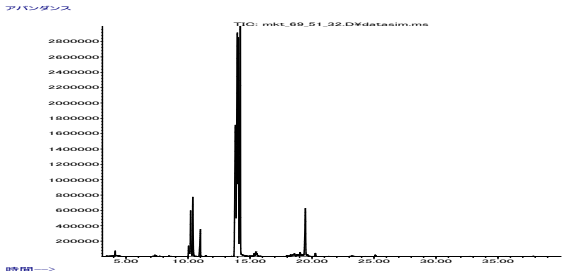
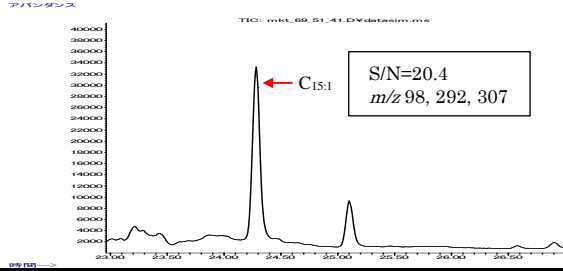
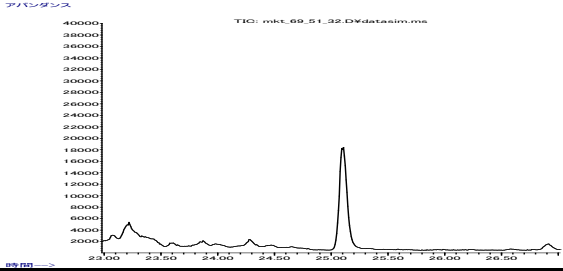
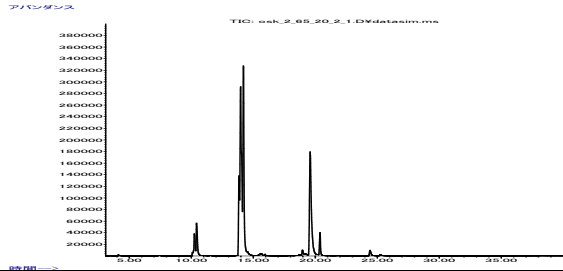
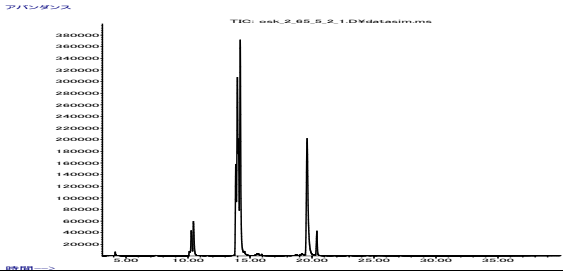
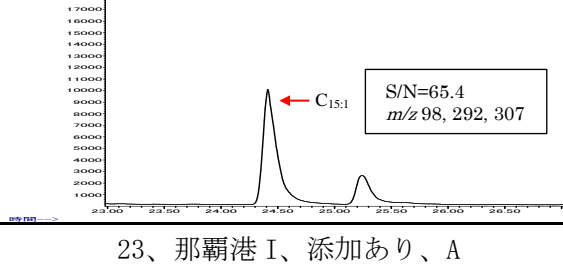
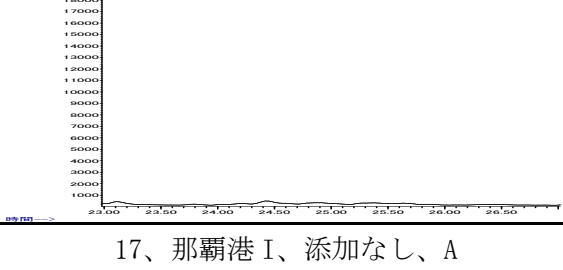
		検体 No、検体名、ヒアリ抽出液の添加有無、実施者	
		41、那覇港 G、添加あり、B	32、那覇港 G、添加なし、B
全体			
	拡大		
全体		20、那覇港 H、添加あり、A	5、那覇港 H、添加なし、A
	拡大		
全体		23、那覇港 I、添加あり、A	17、那覇港 I、添加なし、A
	拡大		

図 2-2_6 各検体のクロマトグラム (続き)

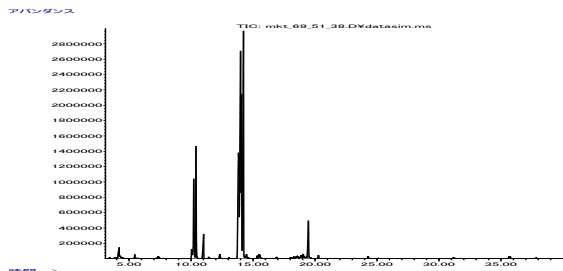
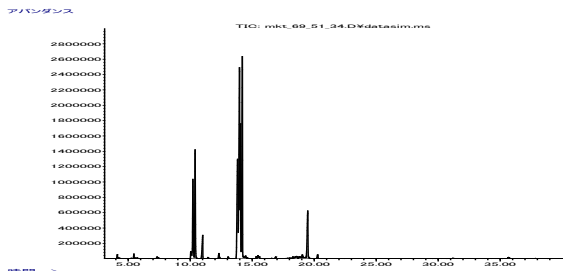
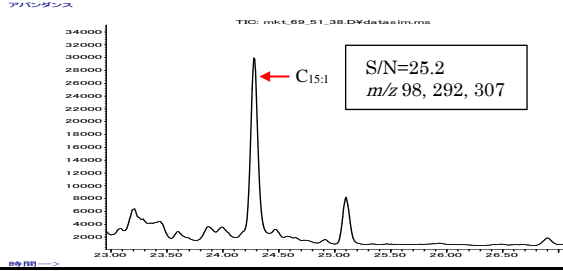
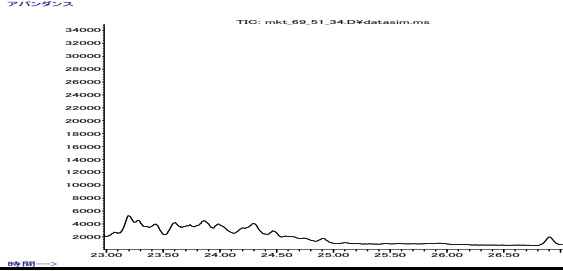
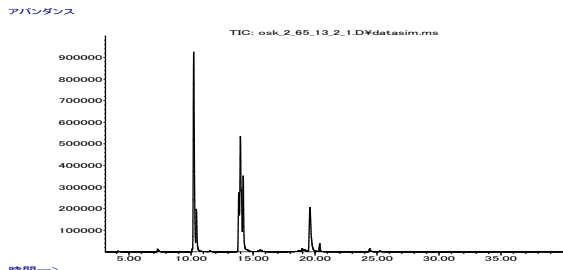
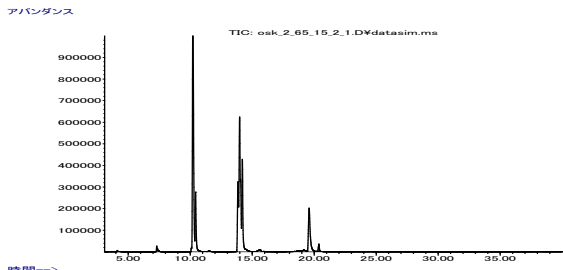
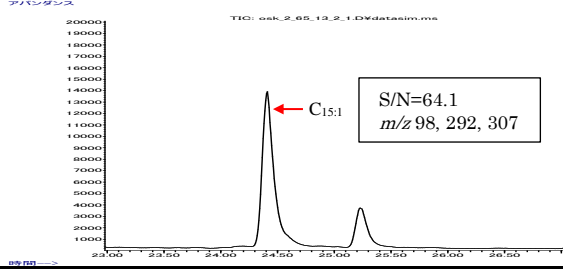
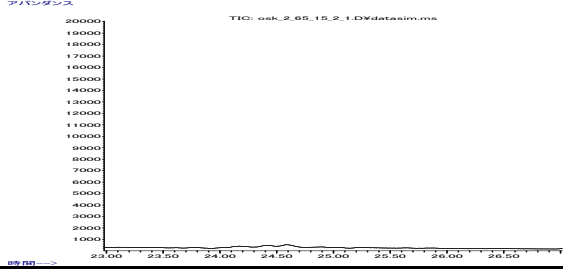
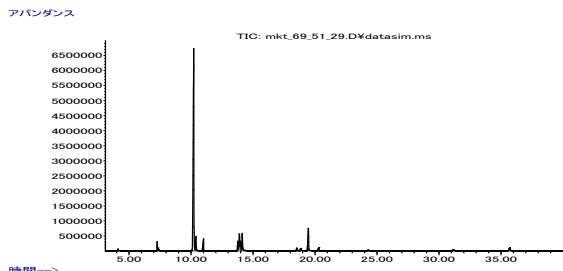
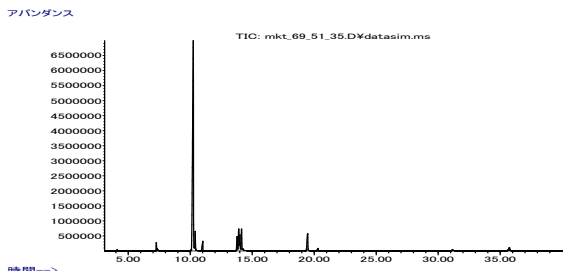
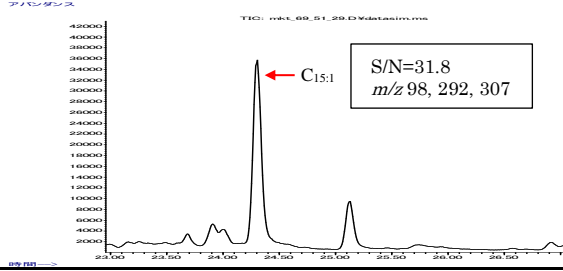
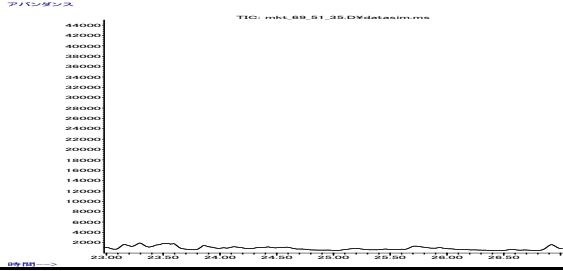
		検体No、検体名、ヒアリ抽出液の添加有無、実施者	
		38、那覇軍港、添加あり、B	34、那覇軍港、添加なし、B
全体			
拡大			
		13、那覇空港、添加あり、A	15、那覇空港、添加なし、A
全体			
拡大			
		29、那覇保税地域、添加あり、B	35、那覇保税地域、添加なし、B
全体			
拡大			

図 2-2_6 各検体のクロマトグラム (続き)

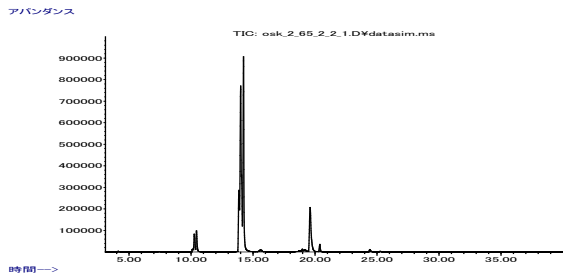
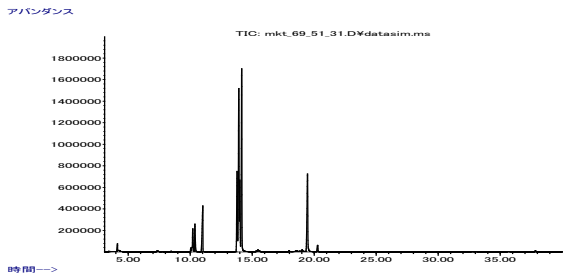
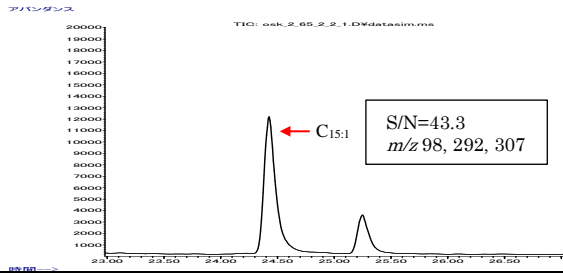
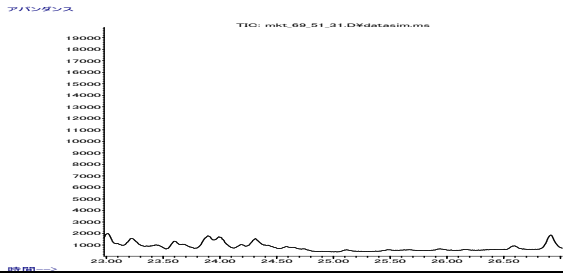
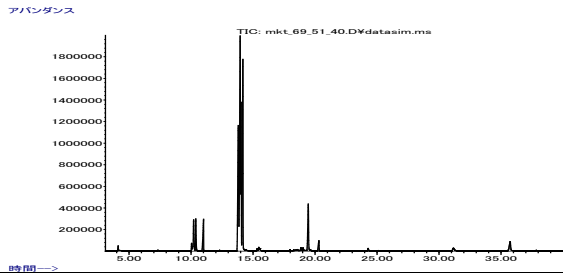
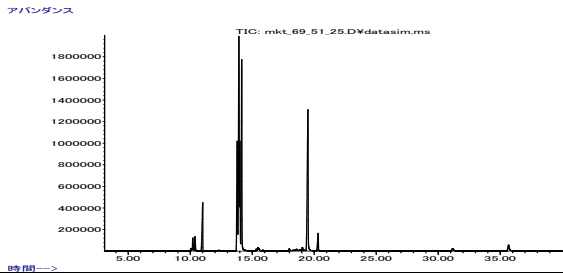
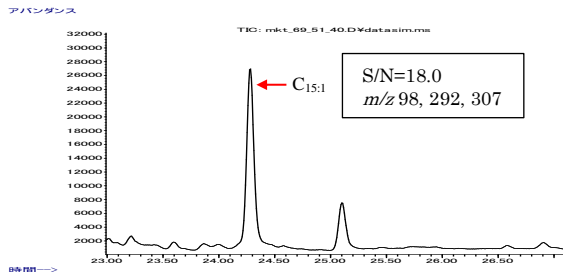
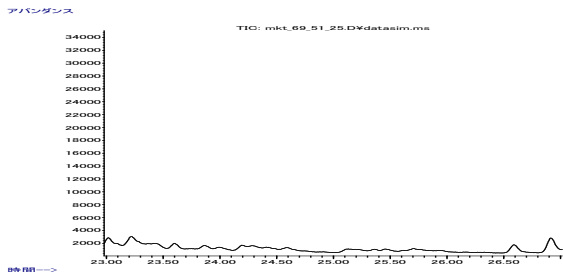
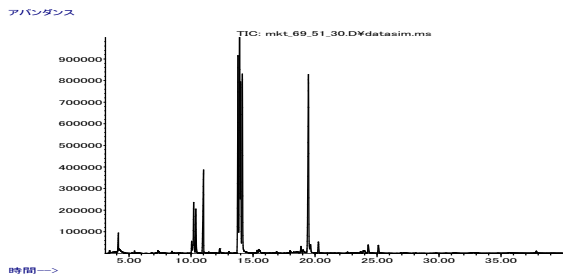
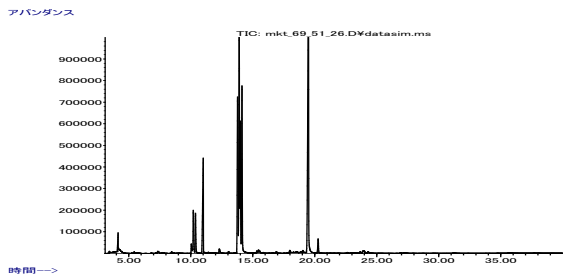
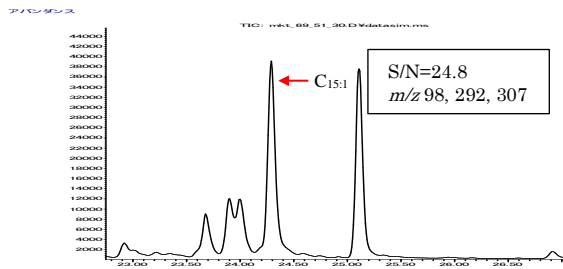
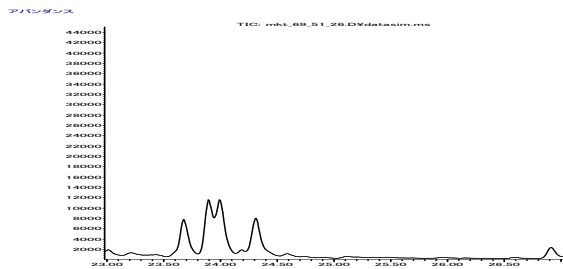
		検体No、検体名、ヒアリ抽出液の添加有無、実施者	
		2、中城湾港 A、添加あり、A	31、中城湾港 A、添加なし、B
全体	アバダンス		
	拡大		
		40、中城湾港 B、添加あり、B	25、中城湾港 B、添加なし、B
全体	アバダンス		
	拡大		
		30、中城湾港 C、添加あり、B	26、中城湾港 C、添加なし、B
全体	アバダンス		
	拡大		

図 2-2_6 各検体のクロマトグラム (続き)

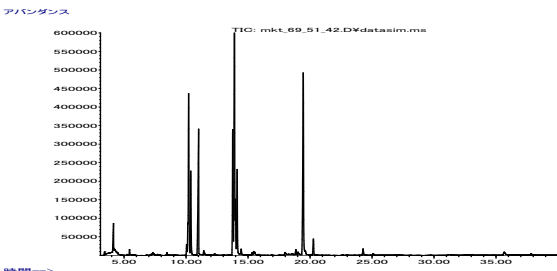
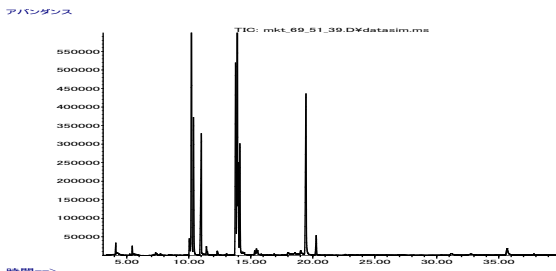
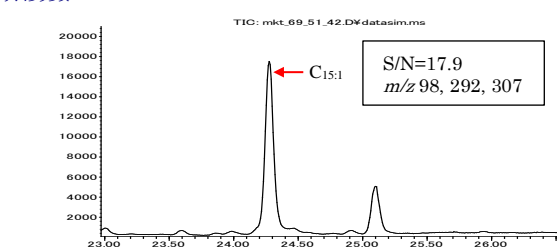
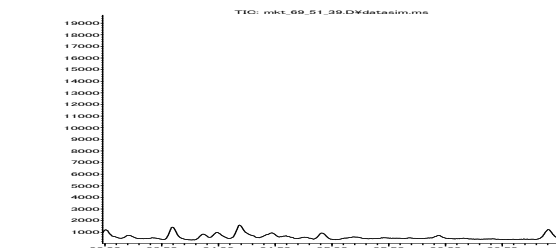
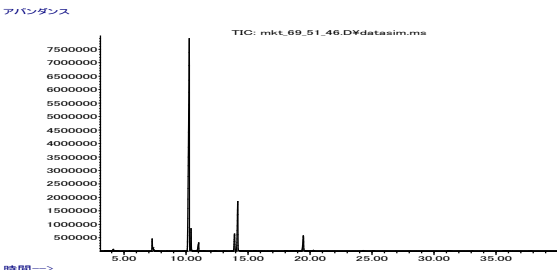
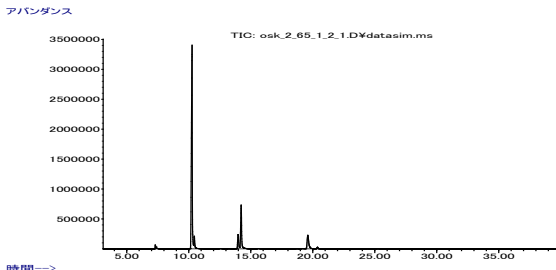
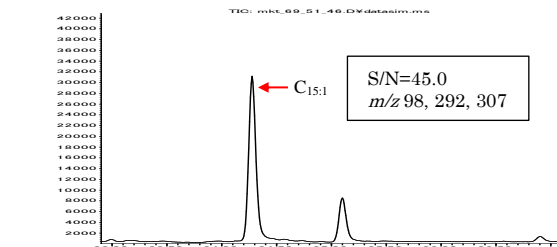
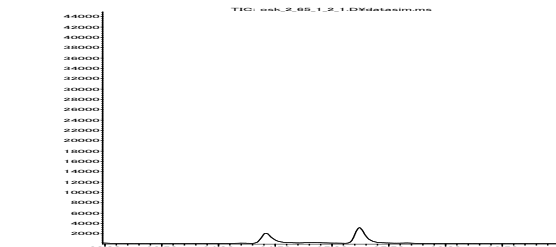
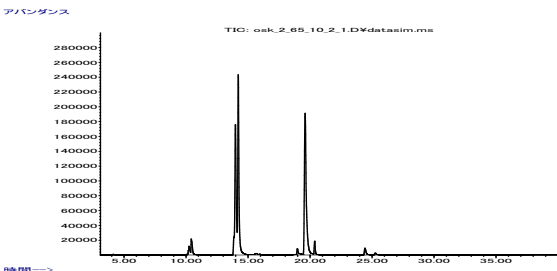
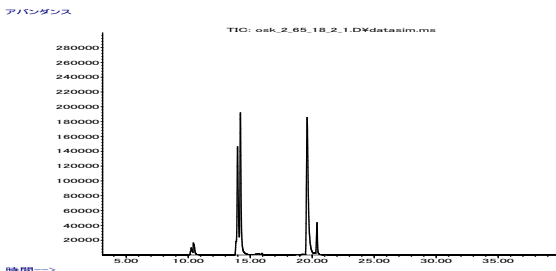
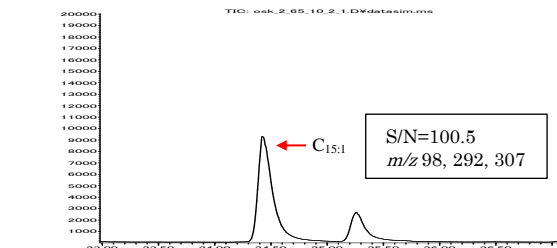
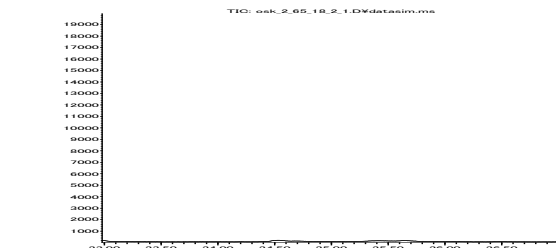
		検体No、検体名、ヒアリ抽出液の添加有無、実施者	
		42、金武湾港、添加あり、B	39、金武湾港、添加なし、B
全体			
拡大			
		45、ホワイトビーチ、添加あり、B	1、ホワイトビーチ、添加なし、A
全体			
拡大			
		10、本部港、添加あり、A	18、本部港、添加なし、A
全体			
拡大			

図 2-2_6 各検体のクロマトグラム (続き)

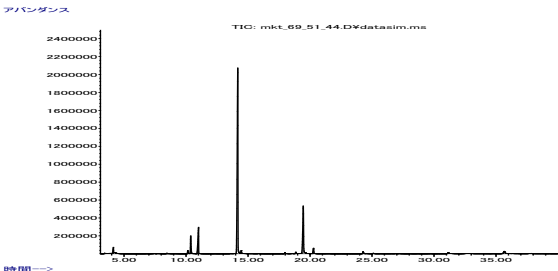
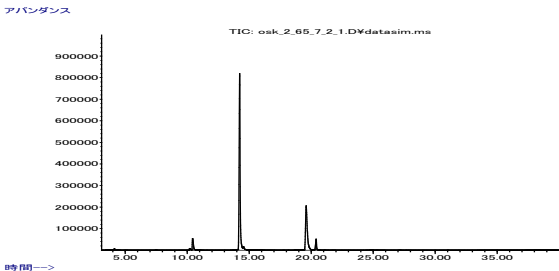
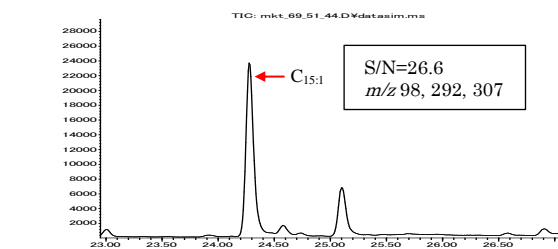
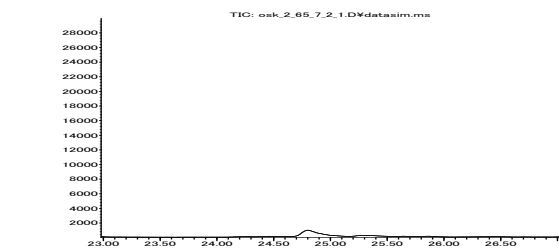
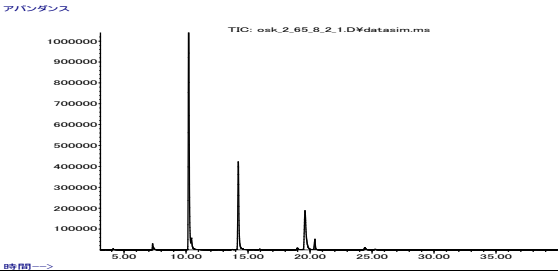
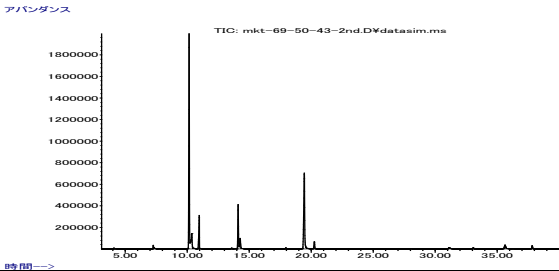
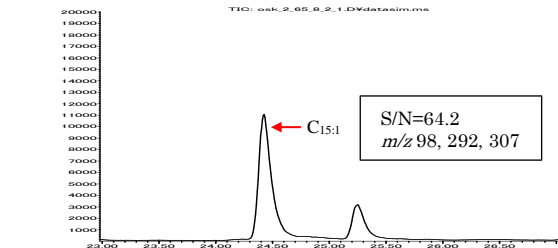
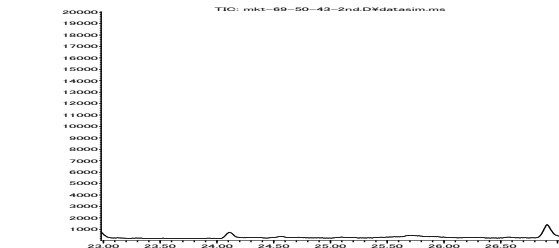
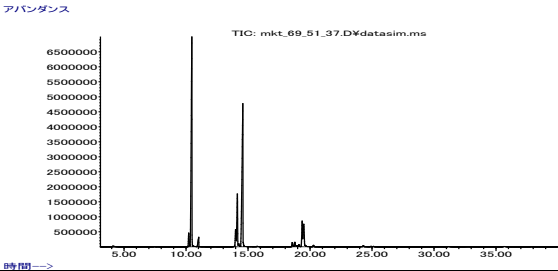
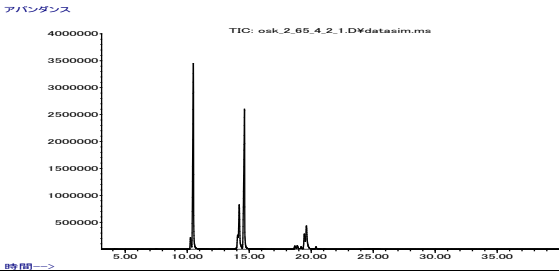
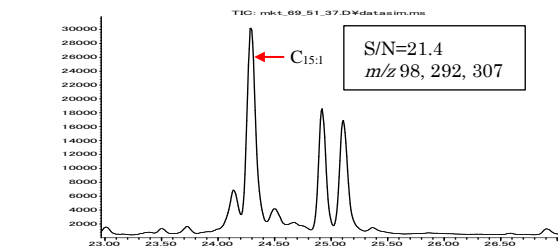
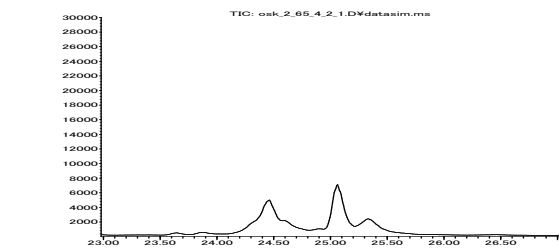
		検体No、検体名、ヒアリ抽出液の添加有無、実施者	
		44、平良港 A、添加あり、B	7、平良港 A、添加なし、A
全体	アバダンス		
	時間	5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00	5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00
拡大	アバダンス		
	時間	23.00 23.50 24.00 24.50 25.00 25.50 26.00 26.50	23.00 23.50 24.00 24.50 25.00 25.50 26.00 26.50
		8、平良港 B、添加あり、A	43、平良港 B、添加なし、B
全体	アバダンス		
	時間	5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00	5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00
拡大	アバダンス		
	時間	23.00 23.50 24.00 24.50 25.00 25.50 26.00 26.50	23.00 23.50 24.00 24.50 25.00 25.50 26.00 26.50
		37、石垣港 A、添加あり、B	4、石垣港 A、添加なし、A
全体	アバダンス		
	時間	5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00	5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00
拡大	アバダンス		
	時間	23.00 23.50 24.00 24.50 25.00 25.50 26.00 26.50	23.00 23.50 24.00 24.50 25.00 25.50 26.00 26.50

図 2-2_6 各検体のクロマトグラム (続き)

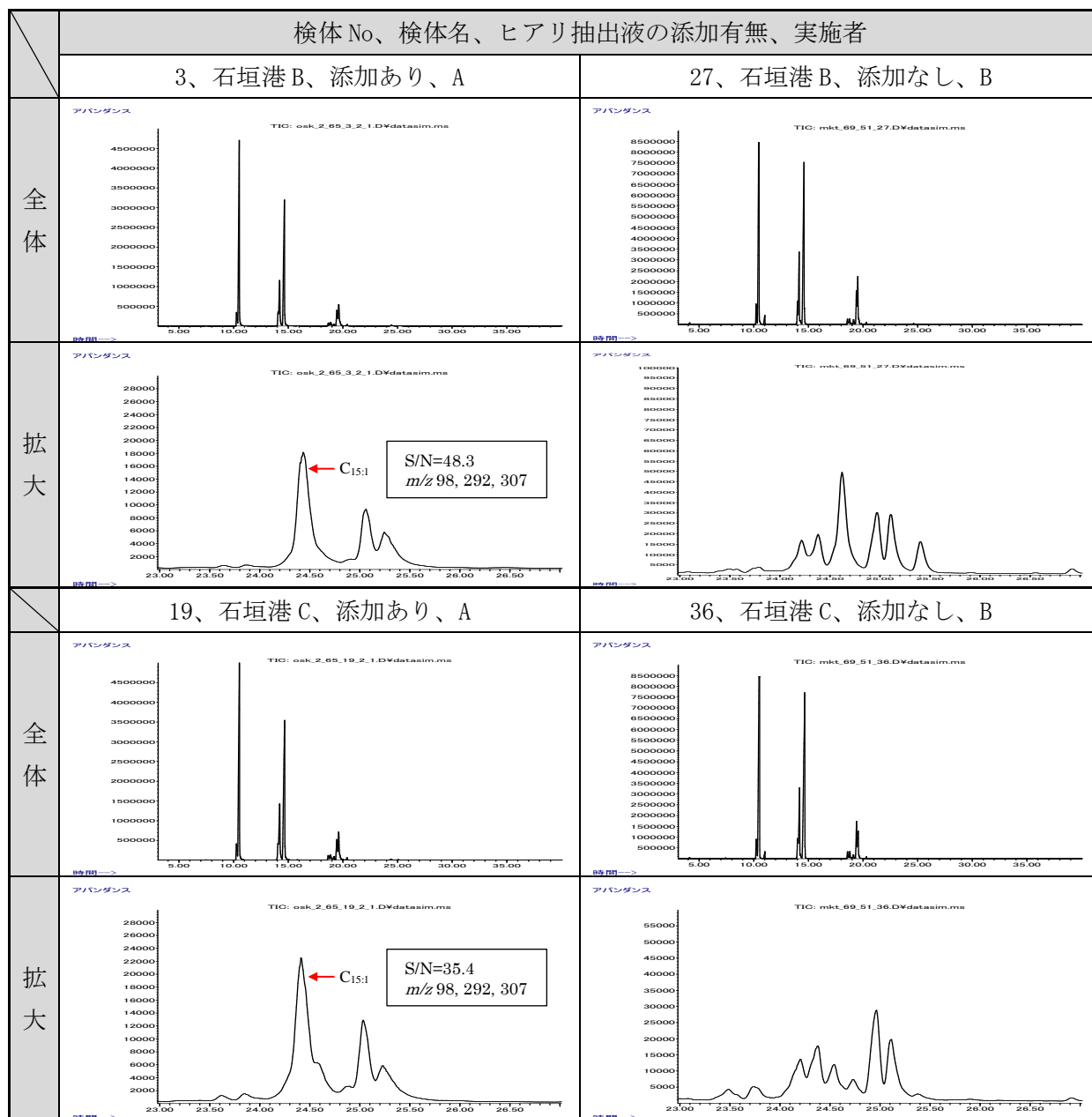


図 2-2_6 各検体のクロマトグラム (続き)

(6) 誘引剤トラップ調査サンプルの分析における考察

<ヒアリ有無の確認について>

実施したブラインドテストの結果から、誘引剤トラップ 165～463 個（平均 366 個）の分析検体での検出下限を 10 ng/μL と確認できた。また、今年度実施した誘引剤トラップ調査サンプルからは、この濃度以上の毒性物質は検出されなかったことを確認した。

検証した分析検体（トラップ 400 個前後）において、毒性物質 C_{15:1} の濃度 10 ng/μL を確実に検出できたことから、8 割以上（毒性物質の含有量 10 ng/μL 以上の個体が 82%存在する、図 2-2_3 参照）はヒアリワーカー1 個体を検出できることが示された。また、含有量が最小（1.15 ng/μL）の個体でも 10 個体存在すれば確実に検出可能である。なお、1 検体当たりのトラップ個数を 1/10（40～50 個）にすれば、含有量最小の個体が 1 個体のみ存在した場合でも毒性物質を検出できる可能性はある。その際は分析検体数が増えるため、作業時間や予算との兼ね合いになると考える。

<アリ類の重量と混入率について>

今年度実施した誘引剤トラップ調査で捕獲されたアリ類の重量を GC-MS で分析した検体ごとに示した（表 2-2_4）。分析検体の平均重量は 11.5 g、最大で 21.1 g となった。ヒアリ 1 個体の重量を 0.6 mg（数百個体をまとめて測定し個体数で割った値から算出、n=14）とすると、確認できた検出下限値（10 ng/μL=ワーカー10 個体とする）から、混入率 0.052%^{*1} 以上（最小で 0.028%^{*2} 以上）の場合、GC-MS によるヒアリ検出が可能であることを確認した。

このような大量サンプルの中からエタノール抽出液を分析（標本は非破壊）することでヒアリの検出が可能である点が、GC-MS の利点だと考える。

^{*1} 0.6 mg × 10 個体 / 11.5 g ≒ 0.052%

^{*2} 0.6 mg × 10 個体 / 21.1 g ≒ 0.028%

表 2-2_4 各検体のトラップ個数と捕獲されたアリ類の重量

検体名	トラップ個数	重量 (g)
那覇港A	344	7.64
那覇港B	401	12.1
那覇港C	393	14.4
那覇港D	394	13.8
那覇港E	357	7.71
那覇港F	443	12.2
那覇港G	378	8.61
那覇港H	356	12.3
那覇港I	376	18.0
那覇軍港	308	9.72
那覇空港	246	11.6
那覇保税地域	410	13.6
中城湾港A	351	7.39
中城湾港B	463	21.1
中城湾港C	356	10.5
金武湾港	414	14.2
ホワイトビーチ	165	8.59
本部港	231	<i>4.74</i>
平良港A	437	16.6
平良港B	438	13.1
石垣港A	401	11.5
石垣港B	356	7.47
石垣港C	402	7.94
平均	366	11.5

重量は湿重量で、最大を太字・斜体、最小を斜体で表した。

<作業時間について>

GC-MS 及び顕微鏡観察によるヒアリ有無の確認に必要な作業時間を表 2-2_5 に示した。GC-MS では 1 検体の前処理に要する時間はトラップの個数によらず一定である（図 2-2_2 に示した方法で 1 日（8 時間）に 8 検体処理できたため 1 検体あたり 1 時間とした）。一方、顕微鏡観察ではトラップの個数と作業時間は比例関係になるため、トラップ数が増えるにつれ GC-MS との差は顕著になる。

実際に、今年度実施した誘引剤トラップによる調査では、GC-MS を利用することで 8,420 個（23 検体）のトラップを 3 日間で処理した。同数を顕微鏡観察で処理しようとする、約 260 日必要な計算になる。このように、GC-MS によるヒアリ有無の確認では顕微鏡観察に比べて大幅に作業時間を削減でき、この点が GC-MS を利用するメリットであると考ええる。

表 2-2_5 ヒアリ有無の確認に必要な作業時間（1 日を 8 時間として計算）

ヒアリ有無の確認方法	トラップ50個で1検体		トラップ100個で1検体		トラップ400個で1検体	
	50個	400個	100個	800個	400個	3200個
GC-MS ^{*1}	1時間	8時間（1日）	1時間	8時間（1日）	1時間	8時間（1日）
顕微鏡観察 ^{*2}	12.5時間（1.5日）	100時間（12.5日）	25時間（3日）	200時間（25日）	100時間（12.5日）	800時間（100日）

^{*1}自動連続測定が可能であるため、前処理の時間のみで計算した。

^{*2}トラップ1個当たり15分で計算した（表3-2.8より）。

<今後の課題>

誘引剤トラップで採集したアリ類は図 2-2_4 に示すようにエタノールに浸漬し、GC-MS による分析に使用するまでこの状態（エタノール中）で保管した。その間に、アリ類の成分が抽出され、仮にヒアリが捕獲されていた場合はその毒性物質が抽出される。実施したブラインドテストでは試験開始直前にヒアリ抽出液を添加したため、ヒアリの毒性物質と他のアリ類の成分がエタノール中に同時に存在していた時間は短い。しかし、調査でヒアリが捕獲された場合は他のアリ類と同じタイミングでエタノール抽出されるため、それらの成分は分析に使用するまでは同時に存在する。この間に、ヒアリの毒性物質と他のアリ類由来の成分が何らかの化学反応を起こし、毒性物質に分解等が起きてしまう可能性は否定できない。それらが同時に存在する時間が長いほどそのリスクは高くなると考えられる。今回の試験では、アリ類の採集及びエタノール抽出から 3~4 か月経過後の分析であったため、この点について検証できていない。このような条件下で毒性物質が分解しないか、分解する場合は含有量がどのくらい減少するか、確認する必要がある。

(7) まとめ

誘引剤トラップ調査における GC-MS を利用したヒアリワーカーの検出について、得られた成果を以下に示す。

- トラップ 165~463 個（平均 366 個）を 1 検体とした際の検出下限を 10 ng/μL と確認した。
- 今年度実施した主要港湾周辺での誘引剤トラップによる調査において、すべての調査エリア（23 検体に分けて分析）で 10 ng/μL 以上の毒性物質は検出されなかった。
- GC-MS を利用することで、ヒアリ有無の確認に要する作業時間を大幅に削減できることを確認した。

5) 厚生労働省. 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン. 2010.

2-3. 毒性物質の物性（太陽光による変性）の把握

(1) 目的

SLAM トラップは野外に設置しているテント型トラップで、その中にエタノールが入った採集ボトルが仕掛けられている。SLAM トラップ調査において GC-MS を利用するために、ヒアリの毒性物質が太陽光によって壊れないか確認する。

なお、これまでに下記 2 点について確認を行った。

- 毒性物質はエタノール中で極めて安定である（図 2-3_1）。
- 毒性物質は 1 週間以上 40 °C 中にあると壊れていく（図 2-3_2）。

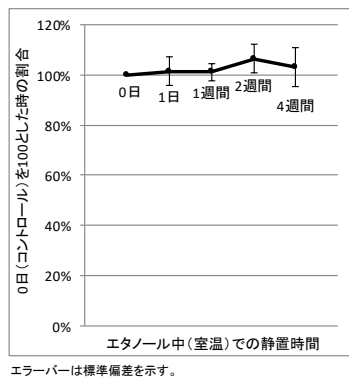


図 2-3_1 毒性物質のエタノール中での安定性

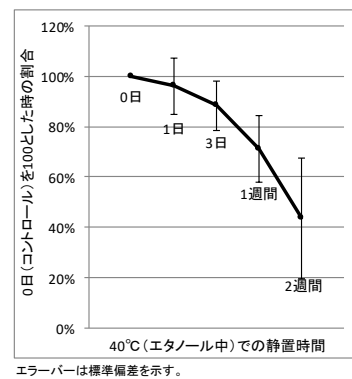


図 2-3_2 毒性物質の温度による影響

(2) 方法

以下に示す方法で確認を行った。

- ヒアリ抽出液を日中常に太陽光が当たる場所に設置した。
- 一定時間後（1 日後、3 日後、1 週間後、2 週間後、4 週間後）に抽出液を GC-MS で分析し、毒性物質 C_{15:1} の含有量の推移を確認した（n=6）。
- 高温下での確認を行うため、夏期（2019 年 7～8 月：期間中の日平均気温は 29.2°C）に実施した。

(3) 結果

分析結果を図 2-3_3、図 2-3_4 に示す。1 週間後までの毒性物質のピーク高さはコントロール（太陽光下での静置時間が 0 日）と変わらないが、2 週間後には約 70%に、4 週間後には約 50%になり、ヒアリ抽出液を 2 週間以上太陽光下に置いておくと、毒性物質は壊れていくことが明らかになった。他の毒性物質も同様の傾向を示した。SLAM トラップでは 2 週間ごと（石垣港周辺に設置の 1 基は 4 週間ごと）に採集ボトルを回収しているため、この結果に留意して分析を行う必要がある。

なお、今回は厳しい条件下での確認のため、図 2-3_5 に示すように太陽光が直射する環境を設定したが、実際の環境（トラップは木陰に設置されている）においては、太陽光による影響はある程度は緩和されると考えられる。

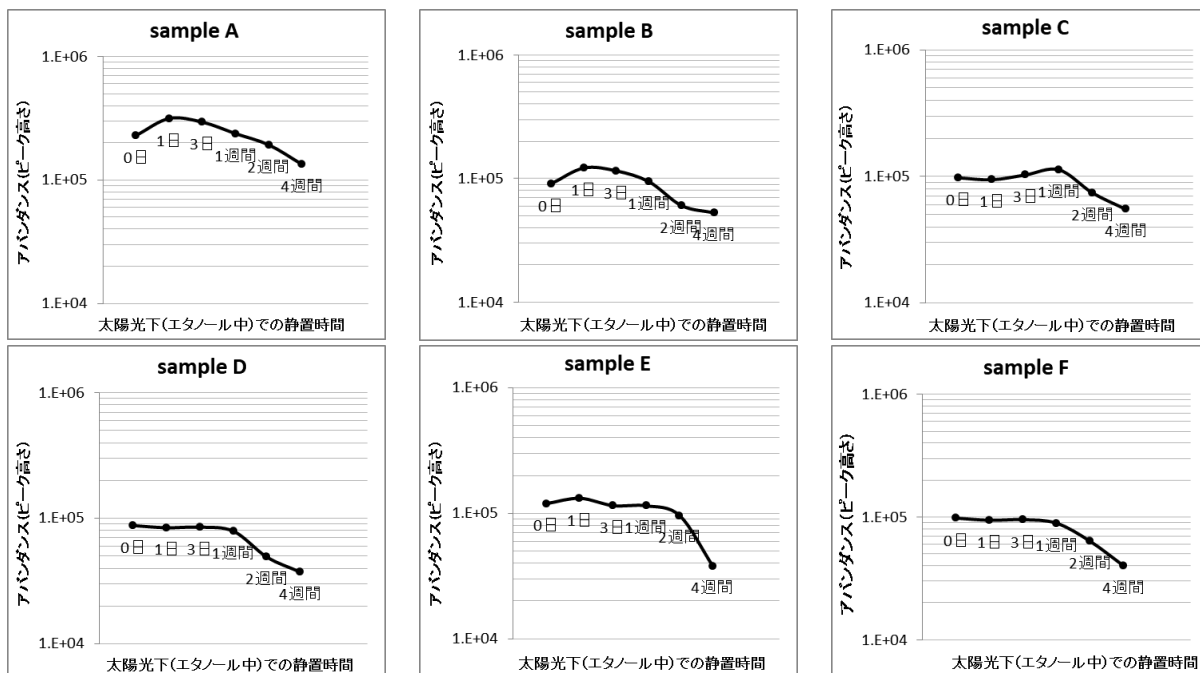
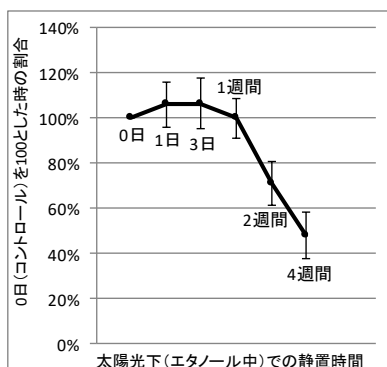


図 2-3_3 毒性物質の太陽光による影響



エラーバーは標準偏差を示す。

図 2-3_4 太陽光による毒性物質の減少率



図 2-3_5 太陽光による変性の確認方法