

### 3. GC-MS（ガスクロマトグラフ質量分析計）によるヒアリ検出

#### 3-1. GC-MSによるヒアリの毒性物質の検出

##### (1) 過年度の成果概要

- ・ 液-液分配及びカラムクロマトグラフィーを行うことで、ヒアリ以外の他のアリ類由来の夾雑ピークを大幅に除去し、再現良く結果が得られる前処理方法を確立した。
- ・ ヒアリの毒性物質が他のアリ類由来の化合物と反応を起こして分解しないこと、または、分解していてもGC-MSによる毒性物質の検出には影響を及ぼさない程度であることを確認した。
- ・ モニタリング調査で採集したアリ類のエタノール抽出液を前処理及びGC-MS分析に供し、ヒアリの毒性物質の有無を確認した。これまでに毒性物質は検出されていない。
- ・ 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。

##### (2) 過年度までの課題

- ・ 大量の他のアリ類の中に実際にヒアリ（標本）を入れたものを分析するなど、より現場に近く、過酷な状況下でも確実に検出し、再現性が確保できるか確認する必要がある。

#### 3-2. 作業の効率化や迅速化に向けた調査方法の検討

##### (1) 目的

沖縄県のヒアリモニタリングは誘引剤を用いた調査によるもので、昨年度は5,000地点で年2回（春と秋に1回ずつ）、今年度は10,000地点で年1回（秋に1回）実施した。今後、野生巣が発見された場合などには、調査範囲の拡大が必要になる可能性がある。調査地点数が多くなると、その分ヒアリ有無の確認作業にも時間が掛かってしまうため、作業の効率化が必要である。また、調査の結果を迅速に示す必要もあると考えられる。よって、作業の効率化や迅速性について検討した。

##### (2) 沖縄県におけるヒアリモニタリング

沖縄県では、誘引剤としてスナック菓子を使用しており、ヒアリの判別についてはGC-MSを用いたヒアリ特異的な毒性物質の検出により確認している。GC-MSを利用するためのモニタリング調査の流れは図3-2.1のとおりである。このうち、「アリ類の取り出し」方法及び「抽出」方法について検討した。

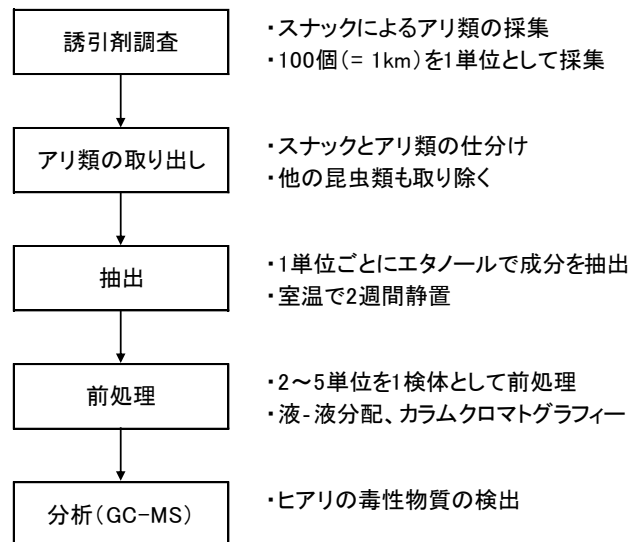


図 3-2.1 モニタリング調査の流れ

### (3) アリ類の取り出し方法の検討

沖縄県のモニタリング調査では、調査ルートに 10 m 間隔でスナックを設置し、100 個 (=1 km) を 1 単位としてアリ類を採集している。採集にはコマセバケツを使用しており、バケツの中にドライアイスを入れ、採集時点でアリ類を殺虫処理している。持ち帰ったアリ類は GC-MS による分析のため、エタノールを用いて成分の抽出作業を行うが、抽出前にはバケツからアリ類をすべて取り出している。取り出しにはピンセットや筆 (図 3-2.2) を利用しているが、1 単位 (バケツ 1 個 = スナック 100 個) の処理に平均 57 分 (平成 31 年度実績) 掛かる。GC-MS によるヒアリの毒性物質の検出には、分析前の前処理時のみでなく、この取り出し作業時にも余計な夾雑物をできるだけ取り除くことが望ましいと考え、細かいゴミやスナックのくず、他の昆虫類の除去作業を丁寧に行っていた。今後、調査地点数が大幅に増大した場合に備え、アリ類の取り出しに掛かる処理時間を短縮する方法について検討した。

検討結果を表 3-2.1 に示す。ゴミや他の昆虫類の除去作業を省略すること (改良法) で、処理時間を半減できる見込みとなった。このため、今年度のモニタリング調査でのアリ類の取り出し作業は改良法で行うこととした。

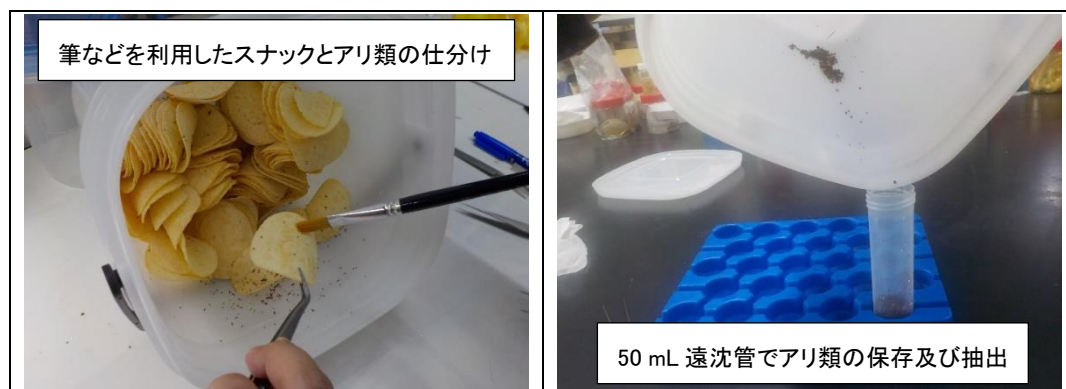


図 3-2.2 アリ類の取り出し作業

表 3-2.1 アリ類の取り出しに掛かる処理時間 1

方法	スナック 平均個数	平均処理 時間(分)
従来法 ・ピンセットや筆を用い、スナックとアリ類を仕分ける。 ・細かいゴミやスナックのくず、他の昆虫類はすべて取り除く。 ・仕分けたアリ類のみを抽出容器に移す。	90 <sup>*1</sup> (n = 94)	57 <sup>*1</sup> (n = 94)
改良法 ・ピンセットや筆を用い、スナックとアリ類を仕分ける。 ・細かいゴミやスナックのくず、他の昆虫類は取り除かない。 ・仕分けたアリ類(ゴミや他の昆虫類を含む)を抽出容器に移す。	190 <sup>*2</sup> (n = 4)	30 (n = 4)

<sup>\*1</sup> 平成31年度業務の実績値。

<sup>\*2</sup> モニタリング調査時の1単位のスナック個数は100であるが、今回は多めの個数で検証した。

【その他の方法（ふるい法）】

さらなる時間短縮を目指し、ふるいを使用する方法（図 3-2.3）を検討した。スナックをふるい、ふるいを通ったアリ類を仕分けるという簡易な作業であるため、従来法の 1/10 程度の処理時間（=5～6分）を見込んでいたが、バケツからふるいに移したり受け皿から容器に移すといった工程が増えたため、平均 27 分と改良法とほぼ同じ時間となった（表 3-2.2）。また、ふるいだけではスナックに張り付いたままのアリ類も多く、ロスが平均 26%（11～63%、n=8）となった。従来法及び改良法ではロスが0であるため、この方法は採用しないこととした。



図 3-2.3 ふるいによるアリ類の仕分け

表 3-2.2 アリ類の取り出しに掛かる処理時間 2

方法	スナック 平均個数	平均処理 時間(分)
ふるい法 ・ふるいを使用し、スナックとアリ類を仕分ける。 ・ふるいを通ったアリ類(スナックのくず等含む)を抽出容器に移す。	189 <sup>*</sup> (n = 16)	27 (n = 16)

<sup>\*</sup> モニタリング調査時の1単位のスナック個数は100であるが、今回は多めの個数で検証した。

#### (4) 抽出方法の検討

##### a) 超音波抽出法

これまでアリ類の成分の抽出は、アリ類をエタノールで浸漬し、室温で2週間静置していた。1週間でほぼ抽出されるものの平成30年度報告書に記載、年1~2回の頻度で行う誘引剤調査では、迅速性よりも、十分な抽出時間として2週間と設定していた。今後、調査結果を迅速に報告する状況も想定し、抽出時間を短縮する方法として超音波抽出法を検討した。

#### 【方法1】

- ・ ヒアリワーカー10個体をエタノール30 mLで浸漬し (n=3)、浸漬開始時に1分間超音波処理した (図3-2.4)。
  - ・ 超音波処理及び抽出は室温で行った。
  - ・ 一定時間 (1時間、1晩、2晩、1週間、2週間) 後に0.3 mL\*分注し、それらの抽出液をGC-MSにより分析した (測定条件は表3-2.3のとおり)。
  - ・ ワーカーが多く含有する毒性物質 *trans*-C<sub>15:1</sub> (Dehydrosolenopsin C、以下「C<sub>15:1</sub>」とする) の含有量 (ピーク高さ) を確認した。
  - ・ 従来法 (浸漬後は静置) でも同様に毒性物質の含有量を確認した。
- \*本GC-MS分析では、通常、抽出液の1/10量を前処理及び分析に供している。ここで、0.3 mLとは抽出液の1/100量であるため、本検討ではヒアリワーカー1個体の分析結果を示したことになる。

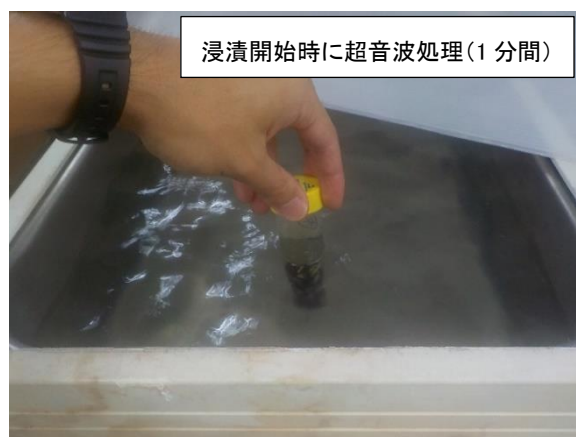


図3-2.4 超音波洗浄機による超音波処理

表3-2.3 GC-MSの測定条件

装置	: 7890B GC/5977B MSD (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 (m/z 98, 126)

## 【結果 1】

分析結果を図 3-2.5 及び図 3-2.6 に示す。超音波処理を行うことで、抽出時間が 1 時間でも全体（抽出時間が 2 週間のピーク高さを 100%とした）の 42%が抽出された。これは超音波処理を行わない従来法で 1 晩抽出した量にあたる。また、超音波処理し 1 晩抽出すると、全体の 72%が抽出され、ピーク高さも 10,000 を超えることから、検出に十分な量が抽出されると評価できた。よって、今年度のモニタリング調査では、超音波抽出法での 1 晩抽出によりアリ類の成分を抽出することを目指し、以降の検討を行った。

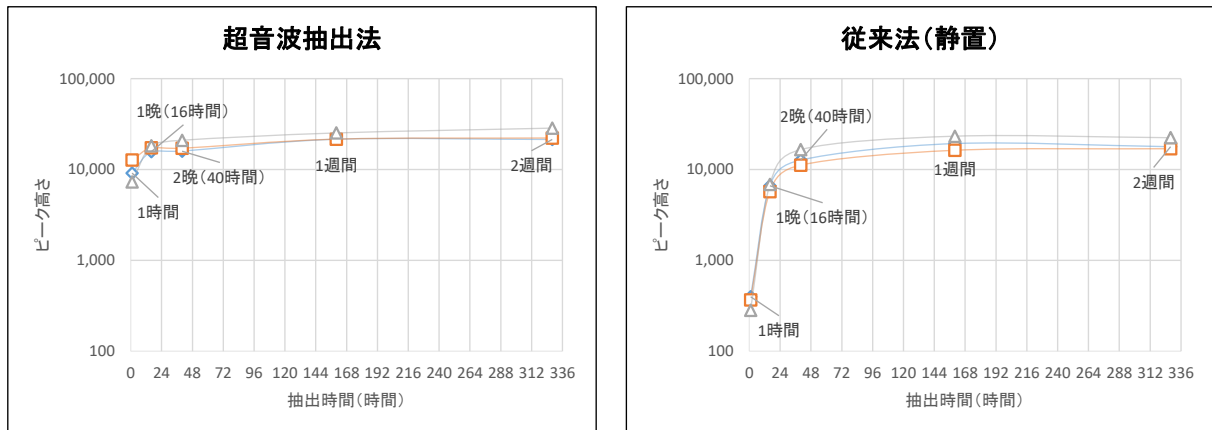


図 3-2.5 抽出時間によるピーク高さの推移

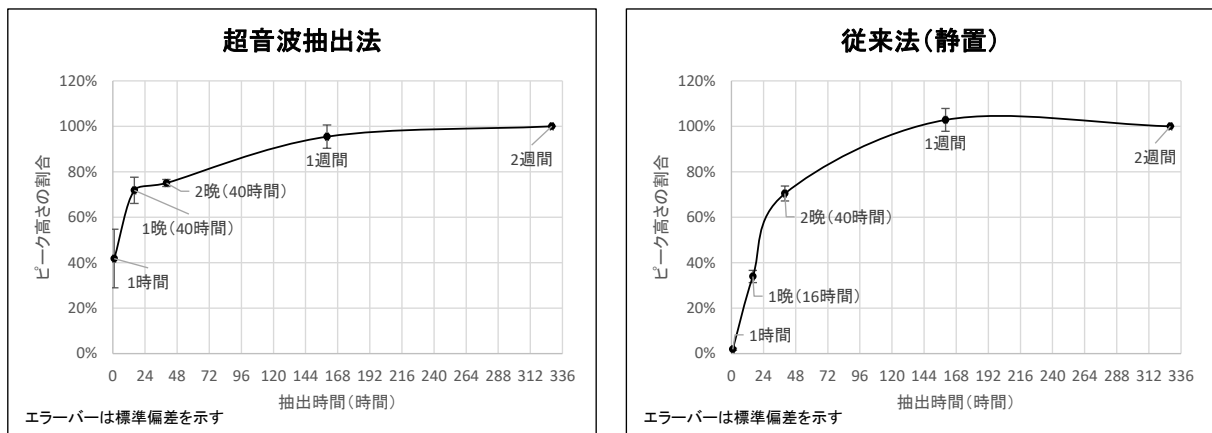


図 3-2.6 抽出時間 2 週間を 100%としたときの各抽出時間のピーク高さの割合

## b) 抽出溶媒量

### b-1) エタノール 30 mL

これまでヒアリモニタリング調査で採集したアリ類に対しては、エタノール 30 mL で成分を抽出してきた。調査で採集される 1 単位（スナック 100 個）のアリ類の重量は平均 2.81 g (0.383 ~7.81 g、平成 31 年度実績値)であった。アリ類を入れる容器は 50 mL 遠沈管を使用しており、抽出溶媒は 30 mL で十分であると判断していた。ただし、これまではヒアリ抽出液を添加した検体で毒性物質の検出を検証していたため、本検討では実際のヒアリ（台湾で採集し冷凍保存している個体）を採集したアリ類に混ぜ、それを抽出する方法で毒性物質の検出を試みた。

## 【方法 2】

- ・ 本検討用にアリ類を採集した。
- ・ 今年度のモニタリング調査では、アリ類の取り出しは改良法（表 3-2.1 参照）で行いゴミや他の昆虫類も含まれるため、本検討の 1 単位のアリ類（ゴミや他の昆虫類を含む）の重量は上記の平均 2.81 g より大きく設定した（サンプル 1～3、7.92～11.80 g、図 3-2.7）。
- ・ 各サンプルにヒアリワーカー10 個体を添加し、エタノール 30 mL で浸漬した。
- ・ 浸漬開始時に 1 分間超音波処理し、抽出時間は 1 晩（15 時間）とした。
- ・ 1 晩後、抽出液を濾過し、その 1/10 量を前処理及び分析に供した。前処理方法は図 3-2.8、GC-MS の測定条件は表 3-2.3 のとおりとした。

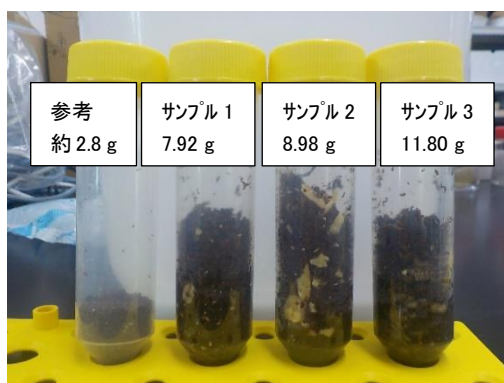


図 3-2.7 検討に用いたサンプル

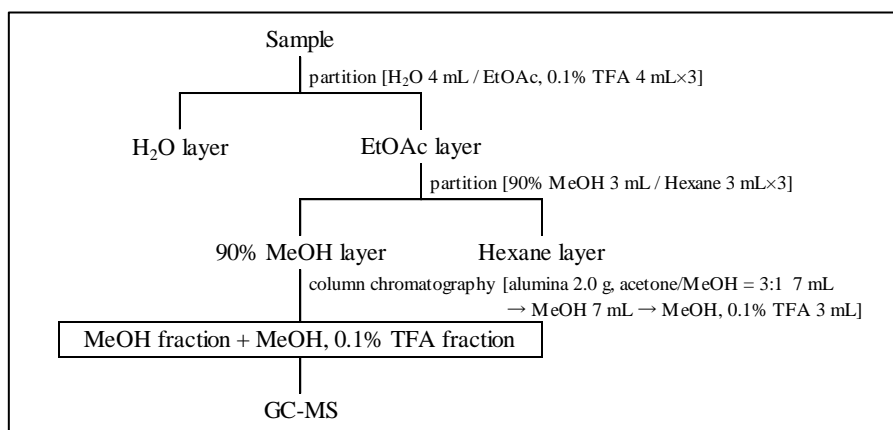


図 3-2.8 前処理方法

## 【結果 2】

分析結果を図 3-2.9 に示す。すべてのサンプルで毒性物質  $C_{15:1}$  のピークを検出できたが、それらのピーク高さは小さかった。ヒアリワーカー10 個体のみを抽出し分析すると、ピーク高さは平均 145,633 (133,756～155,678, n=3) となり、各サンプルのピーク高さはこの値の 1.2～3.6%にとどまり、毒性物質が十分に抽出されていないことが考えられた。その確認のため、これらのサンプルを再度エタノール 30 mL で抽出し（超音波処理なし）、2 週間静置後に前処理及び分析を行った。その結果、図 3-2.10 に示すとおり、毒性物質  $C_{15:1}$  は 1 回目の抽出時の 6.6～10.5 倍のピーク高さで検出され、それらはヒアリワーカー10 個体分平均値の 12.8～24.8%であった。よって、



毒性物質が十分に抽出されていないことが明らかとなり、その原因は抽出溶媒量の不足にあると考えられた。そこで、抽出に用いるエタノールを 100 mL とし、次の検討を行った。

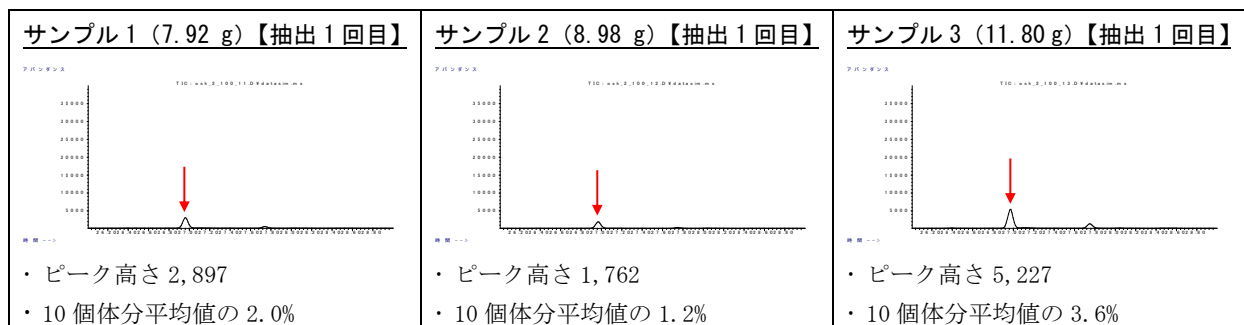


図 3-2.9 各サンプルのクロマトグラム ( $C_{15:1}$  (赤矢印) のリテンションタイム付近の拡大図)

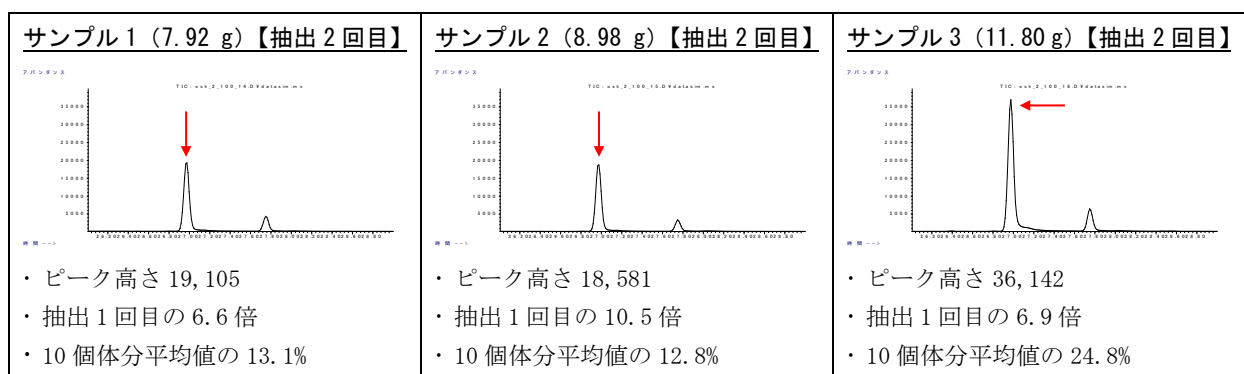


図 3-2.10 抽出 2 回目サンプルのクロマトグラム ( $C_{15:1}$  (赤矢印) のリテンションタイム付近の拡大図)

#### b-2) エタノール 100 mL

上記の結果を踏まえ、浸漬時のエタノール量を多くし、毒性物質の検出を試みた。

#### 【方法 3】

- ・ アリ類を入れる容器は底面積の大きいものに変更した (図 3-2.11)。
- ・ 各サンプルにヒアリワーカー 10 個体を添加し、エタノール 100 mL で浸漬した。
- ・ その他の操作は方法 2 と同様に行った。

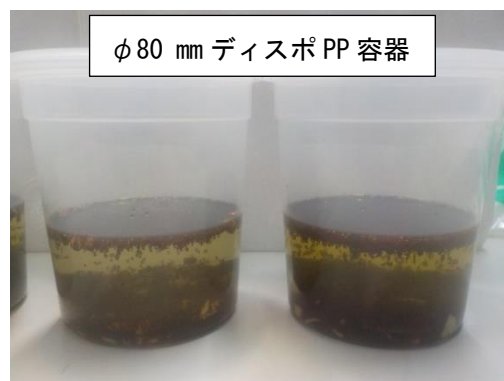


図 3-2.11 エタノール 100 mL による成分の抽出

### 【結果 3】

分析結果を図 3-2. 12 に示す。結果 2 (エタノール 30 mL で抽出) に比べると抽出効率は改善されたが、検出された毒性物質  $C_{15:1}$  のピーク高さはヒアリワーカー10 個体分平均値の 5.1~10.6% にとどまった。そこで、同サンプルを再度エタノール 100 mL で浸漬し、浸漬時に 1 分間超音波処理を施し、1 晩後に前処理及び分析を行った。その結果、図 3-2. 13 に示すとおり、 $C_{15:1}$  はヒアリワーカー10 個体分平均値の 13.5~20.5% のピーク高さで検出された。

今回は検証しなかったが、3 回目の抽出も行うとさらに毒性物質は抽出される可能性がある。また、抽出溶媒を変更する (メタノールやアセトン等) ことで抽出効率が改善する可能性も考えられた。しかし、迅速に結果を示すという観点と、1 回の抽出でも毒性物質の検出は可能 (ピーク高さが 5,000 程度あればマススペクトルにおいて物質同定に必要なイオンが観測される) であると考えられたため、次の検討は「エタノール 100 mL、1 分間超音波処理、1 晩抽出を 1 回」で行うこととした。

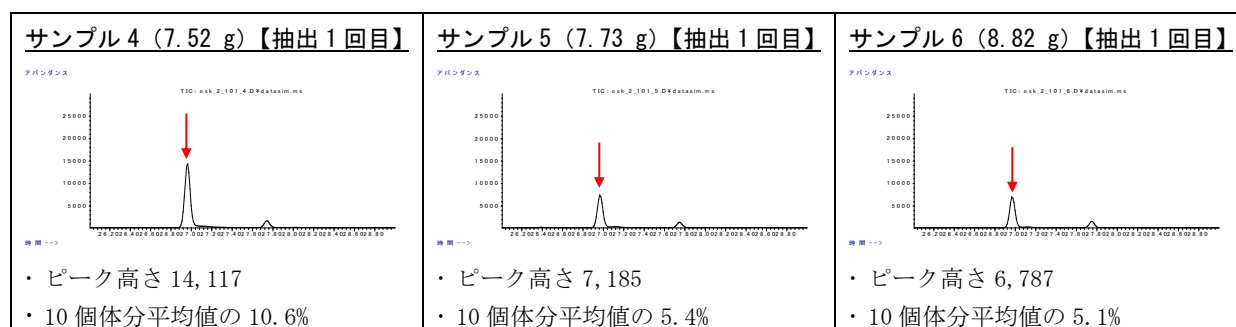


図 3-2. 12 各サンプルのクロマトグラム ( $C_{15:1}$  (赤矢印) のリテンション付近の拡大図)

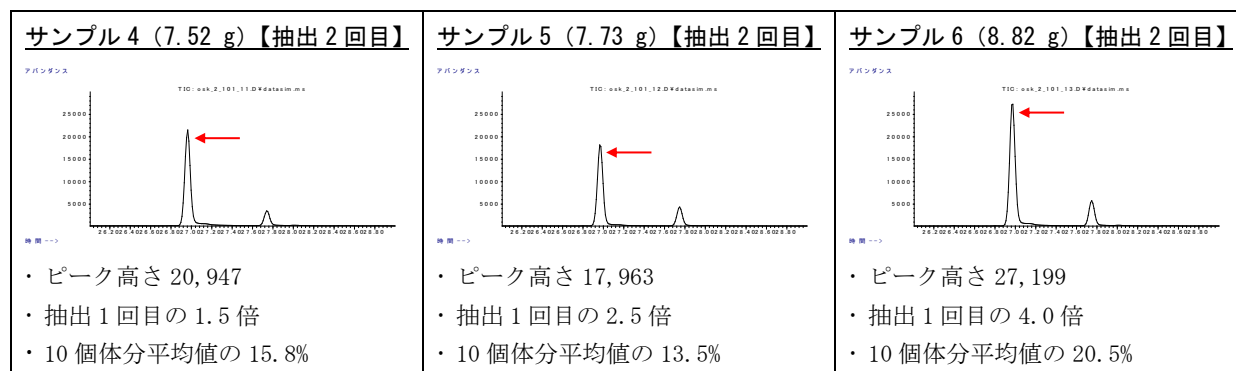


図 3-2. 13 抽出 2 回目サンプルのクロマトグラム ( $C_{15:1}$  (赤矢印) のリテンション付近の拡大図)

#### c) 1 検体 (5 単位) での毒性物質の検出

モニタリング調査では、2~5 単位 (スナック 200~500 個) を 1 検体として前処理及び分析を行う。上記 b) では 1 単位について検討した。よって、本検討では最大の 5 単位を 1 検体として毒性物質の検出を試みた。



#### 【方法 4】

- ・ 本検討用にアリ類を採集した。
- ・ 今年度のモニタリング調査では、アリ類の取り出しは改良法（表 3-2.1 参照）で行いゴミや他の昆虫類も含まれるため、本検討の 1 単位のアリ類（ゴミや他の昆虫類を含む）の重量は平成 31 年度の平均 2.81 g より大きく設定した（平均 10.13 g、範囲 8.24~12.02 g）。
- ・ 同様に、1 検体の重量も平成 31 年度の平均 11.50 g（範囲 4.74~21.12 g）より大きく設定した（平均 50.60 g、範囲 49.01~51.61 g）。
- ・ 検体は表 3-2.4 に示すとおり、9 検体準備した。
- ・ 1 単位ごとにエタノール 100 mL で浸漬し、浸漬開始時に 1 分間超音波処理を施し、抽出時間は 1 晩（15 時間）とした。
- ・ 1 晩後、1 単位ごとに抽出液を濾過し、それらの 1/10 量を各検体となるよう混ぜ合わせ、前処理及び分析に供した。前処理方法は図 3-2.8、GC-MS の測定条件は表 3-2.3 のとおりとした。
- ・ 昨年度までの判定基準と同じく、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分子イオン及び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 3-2.4 分析検体の情報

検体No.	重量 (g)	ヒアリの添加
検体1	49.66	ヒアリの添加はなし
検体2	51.36	5単位のうち1単位にヒアリワーカー10個体を添加
検体3	51.21	5単位のうち1単位にヒアリワーカー10個体を添加
検体4	49.80	5単位のうち1単位にヒアリワーカー10個体を添加
検体5	51.21	5単位のうち1単位にヒアリワーカー1個体を添加
検体6	51.35	5単位のうち1単位にヒアリワーカー1個体を添加
検体7	49.01	5単位のうち1単位にヒアリワーカー1個体を添加
検体8	51.61	5単位のうち1単位にヒアリワーカー1個体を添加
検体9	50.20	5単位のうち1単位にヒアリワーカー1個体を添加

#### 【結果 4】

分析結果を表 3-2.5 及び図 3-2.14 に示す。上記の判定基準では、ヒアリを 10 個体添加した 3 検体（検体 2~4）はすべて「検出」となったが、ヒアリを 1 個体添加した 5 検体（検体 5~9）はすべて「不検出」となった。しかし、このうち 3 検体（検体 5、検体 6、検体 8）は S/N 比 $\geq$ 10 を満たすものであった。また、マススペクトルにおけるイオンは目的ピークが大きいほど観測されやすいため、検体 5~9 について装置への試料注入量を 10 倍程度に増やし、再度測定した。その結果、表 3-2.6 及び図 3-2.15 に示すとおり、5 検体すべてでマススペクトルの対象イオンが観測され、そのうち S/N 比 $\geq$ 10 を満たす 2 検体（検体 5、検体 6）は「検出」となった。（試料注入量を増やすと、目的ピークだけでなく他の夾雑物ピークも高く検出されるため、理論的には S/N 比は変わらないはずだが、若干低下する傾向を示した。そのため、検体 8 は S/N 比 $<$ 10 となり、「不検出」となった。）

表 3-2.5 分析結果と毒性物質 C<sub>15:1</sub> 検出の判定

検体情報		C <sub>15:1</sub>			判定
検体No.	ヒアリ添加	ピーク高さ	S/N比*	マススペクトル*	
検体1	なし	-	-	-	不検出
検体2	10個体	11,446	190.1(○)	98, 292, 307(○)	検出
検体3	10個体	9,074	107.3(○)	98, 292, 307(○)	検出
検体4	10個体	11,262	248.4(○)	98, 292, 307(○)	検出
検体5	1個体	2,233	37.9(○)	98, 292(×)	不検出
検体6	1個体	782	14.4(○)	98, 292(×)	不検出
検体7	1個体	557	7.7(×)	98(×)	不検出
検体8	1個体	964	10.8(○)	98, 292(×)	不検出
検体9	1個体	588	8.3(×)	98(×)	不検出

\* 本判定基準を満たすものには(○)、満たさないものには(×)を示した。

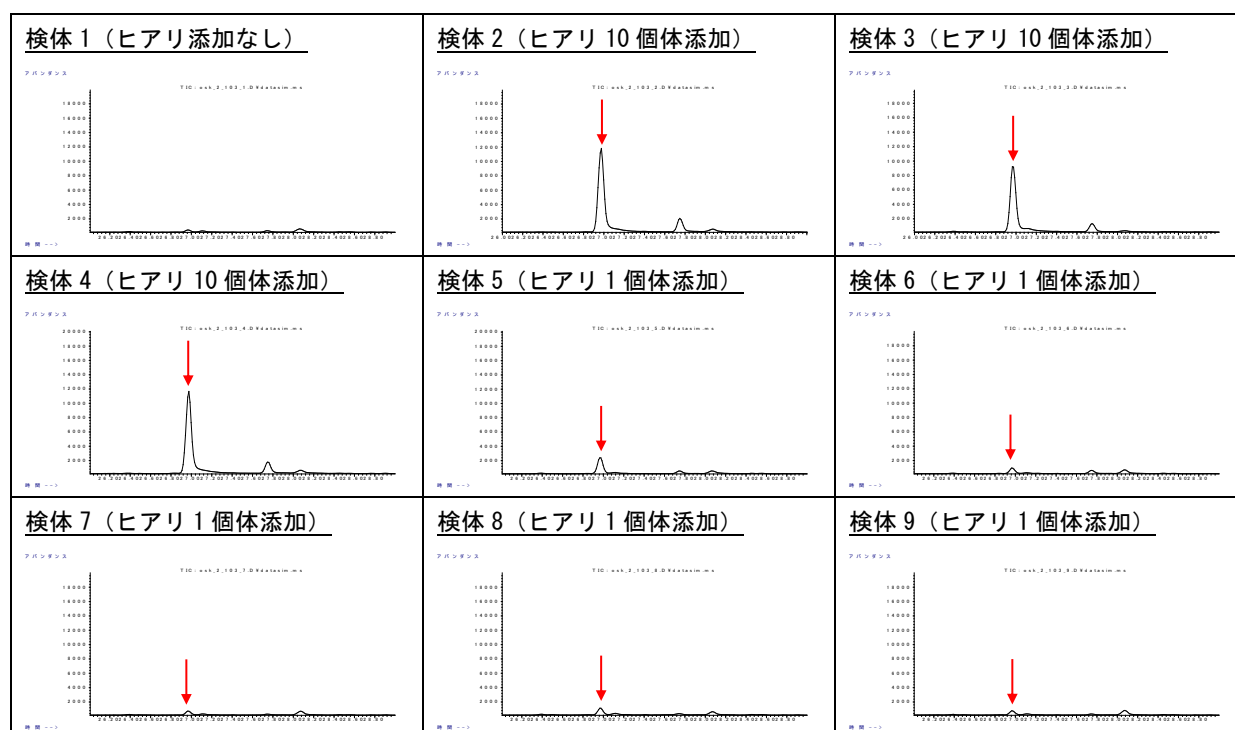


図 3-2.14 各検体のクロマトグラム (C<sub>15:1</sub> (赤矢印) のリテンションタイム付近の拡大図)

表 3-2.6 再分析の結果と毒性物質 C<sub>15:1</sub> 検出の判定

検体情報		C <sub>15:1</sub>			判定
検体No.	ヒアリ添加	ピーク高さ	S/N比*	マススペクトル*	
検体5	1個体	17,025	35.6(○)	98, 292, 307(○)	検出
検体6	1個体	10,845	12.9(○)	98, 292, 307(○)	検出
検体7	1個体	8,822	6.8(×)	98, 292, 307(○)	不検出
検体8	1個体	17,578	8.6(×)	98, 292, 307(○)	不検出
検体9	1個体	12,487	8.2(×)	98, 292, 307(○)	不検出

\* 本判定基準を満たすものには(○)、満たさないものには(×)を示した。

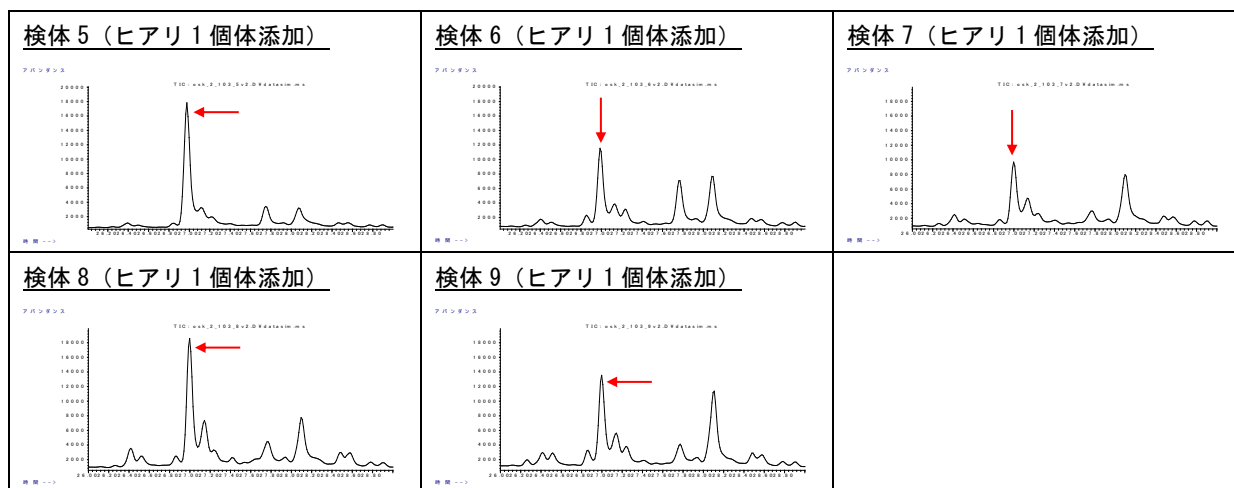


図 3-2.15 再分析検体のクロマトグラム (C<sub>15:1</sub> (赤矢印) のリテンションタイム付近の拡大図)

【考察】

毒性物質 C<sub>15:1</sub> の検出について

アリ類の成分の抽出に超音波抽出法を用いることにより、調査の結果を迅速に示すことが可能であることを確認した。抽出効率はあまり良くないものの、ヒアリが 10 個体入っていればほぼ確実に、1 個体でも 40%程度 (5 検体のうち 2 検体) は毒性物質を検出できる可能性を示した。また、結果 4 のように、目的ピークの S/N 比  $\geq 10$  は満たすがマススペクトルでのイオンが観測されないような場合は、試料注入量を増やすことで「検出」と判定できる可能性もある。あるいは、C<sub>15:1</sub> の可能性があるピークが検出された場合 (例えば表 3-2.5 の検体 7 や検体 9: 目的ピークのリテンションタイムに S/N 比  $\geq 10$  は満たさないがピークがあり、マススペクトルにおいて  $m/z$  98 は観測される) は、1 検体としてまとめる前の 1 単位ごとに分析することで「検出」と判定できる可能性が高くなると考えられる (図 3-2.16)。

上記のように 1 単位ごとに分けて分析しても本判定基準では「不検出」と判定される場合も起こり得ると考えられる。ただし、図 3-2.15 の検体 7~9 のようなクロマトグラム (当該リテンションタイムに明らかなピークが見られ、マススペクトルにおいて対象イオンが観測される) が得られた場合は、ヒアリがサンプル中に存在する可能性があると考え、サンプルの顕微鏡確認または詳細な再調査 (現場確認) を行うことで、見落としを防ぐことができると考えられる。

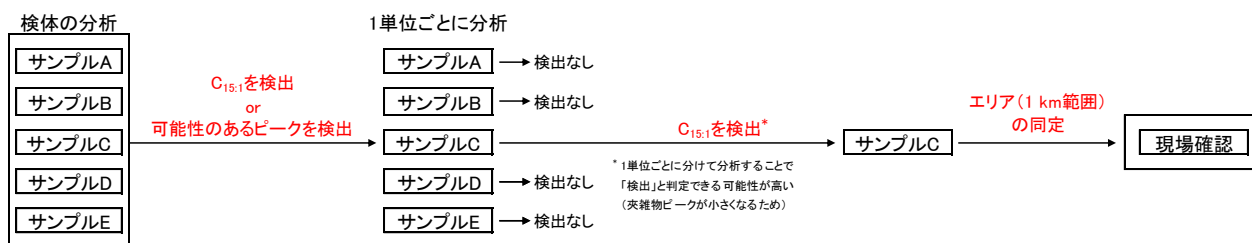


図 3-2.16 毒性物質を検出及び毒性物質の可能性のあるピークを検出した場合の流れ

## サンプル処理能力について

本検討で、サンプル重量が約 50 g の検体でヒアリの毒性物質を検出できることを確認した。50 g とは、1 単位の重量を 4 g（平成 31 年度の平均 2.81 g にスナックのくずや他の昆虫類が多少加わると想定）とすると、12～13 単位分に相当し、これまで 5 単位分を 1 検体として処理していたが、倍以上の処理能力を有することを示した（表 3-2.7）。また、平成 31 年度のモニタリング調査では、那覇港周辺（誘引剤 5,000 個）で採集されたアリ類は約 100 g で 9 検体に分けて処理していたが、2 検体として処理することが可能であり、大幅な労力削減が見込まれる。さらには、平成 31 年度の調査全体では約 260 g のアリ類を採集したが、調査エリアごとに処理（分析）することを行わなければ（平成 31 年度は 23 検体として処理した）、5～6 検体の処理で 10,000 個の誘引剤を処理できる可能性があり、さらなる労力削減が期待できる。

表 3-2.7 GC-MS によるサンプル処理能力

	1検体当たり		
	重量(g)	単位 <sup>*1</sup> 数	誘引剤個数
過年度	4.74 ~ 21.12 <sup>*2</sup>	2 ~ 5 <sup>*2</sup>	200 ~ 500 <sup>*2</sup>
本検討	49.01 ~ 51.61	12 ~ 13 <sup>*3</sup>	1200 ~ 1300

\*1 誘引剤100個(1 kmの調査範囲)を1単位として採集する。

\*2 平成31年度業務の実績値。

\*3 1単位の重量を4 gとしたときの値(平成31年度は平均2.81 g)。

### 3-3. 令和3年度ヒアリモニタリング調査サンプルの分析

#### (1) 目的

調査で得られる多量のサンプル処理に掛かる作業時間と費用を削減するため、顕微鏡観察の代わりにGC-MSを利用してヒアリの有無（毒性物質の有無）を確認した。

#### (2) 方法

##### a) サンプルの保管及び抽出方法

- ① 調査で採集したアリ類は現場で速やかにドライアイスにより殺虫し、次の処理を行うまでは冷蔵及び冷凍（冷蔵状態は調査日から最大で5日以内、その後エタノール抽出を開始するまでは冷凍状態）で保管した。
- ② 採集したアリ類を1単位ごと（誘引剤約100個）に99.5%エタノール100 mLで浸漬し、浸漬開始時に1分間超音波処理を施した。
- ③ 1晩後、1単位ごとに抽出液を濾過し、それらの1/10量ずつを分析検体として混ぜ合わせ、速やかに前処理及び分析に供した。

##### b) 分析検体

1単位ごとの各抽出液を調査エリアごとに1つにまとめたものを分析検体とし（表3-3.1）、検体ごとに前処理及び分析を行った。なお、1検体の重量を最大50 gとするため、那覇港エリアは3つに分け3検体とした。また、モニタリング調査とは別で採集したアリ類（4.0 g）の中にヒアリを1個体または10個体添加したサンプル（以下、「ヒアリ添加サンプル」とする）を準備し、それらの抽出液を添加した分析検体も準備し、分析を行った。なお、この分析は、昨年度まではヒアリ抽出液（他のアリ類の中に混ぜずヒアリだけを抽出した液）を添加した検体での分析であったため、実際にモニタリング調査でヒアリが採集された場合でも毒性物質を検出できるか確認するためのものである。

表 3-3.1 分析検体の情報

検体名	誘引剤 個数	単位数	重量(g)
那覇港A	1,223	15	49.0
那覇港B	1,471	16	49.7
那覇港C	1,333	14	42.2
那覇保税地域	517	6	20.2
那覇軍港	286	3	5.8
那覇空港	289	3	10.2
中城湾港	1,525	16	39.2
本部港	299	3	4.5
平良港	1,156	12	29.7
宮古空港	298	3	18.3
石垣港	1,740	17	42.3
石垣空港	279	3	5.4
計	10,416	111	316.5

### c) 前処理方法及び GC-MS の測定条件

昨年度と同様の方法で検体の前処理及び測定を行った（図 3-2.8、表 3-2.3）。

### d) 検出及び精度

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<sub>15:1</sub> が検出できたと判定した。

各検体に外部標準物質<sup>\*</sup>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。

<sup>\*</sup> Yu, Y. T., Wei, H. Y., Fadamiro, H. Y., Chen, L. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5907-5915.

## (3) 結果

分析結果を表 3-3.2 及び図 3-3.1 に示す。ヒアリ添加サンプルを加えていないすべての検体において、毒性物質は検出されなかった。

ヒアリ添加サンプルを加えた検体においては、10 個体のヒア리를添加した 3 検体すべてで毒性物質を検出した。一方、1 個体のヒア리를添加した 9 検体では、本判定基準に従うと、4 検体は「検出」となったが、5 検体は「不検出」となった。ただし、このうち 4 検体 (No. 4, 12, 14, 20) は目的ピークのリテンションタイムに明らかなピークが見られ、マススペクトルにおいても  $m/z$  98 が観測されており、装置への試料注入量を 10 倍程度に増やすことで本判定基準を満たすことができると考えられたため、再度測定した。再測定の結果、この 4 検体はすべて「検出」となった（表 3-3.3、図 3-3.2）。しかし、同様に再測定した検体 No. 16 はこの方法においても明らかなピークが観測されない結果であった。

この原因は、添加したヒアリの毒性物質含有量が非常に少ないためであると考えられた。そこで、検体にまとめる前の 1 単位ごとに分けて分析することでピークが観測されるか確認した。検体 No. 16 のヒアリ添加サンプル（以下、「サンプル A」とする）と、このサンプルを濾過後に再度 1 週間抽出したもの（以下、「サンプル B」とする）について、前処理及び分析を行った。その結果、サンプル A、B ともに、ピークは観測されたが、判定上は「不検出」であった（図 3-3.3）。ただし、抽出時間が長いサンプル B のほうがピーク高く観測された。そこで、サンプル B の試料注入量を 10 倍程度に増やして再測定したところ、「検出」となった。



表 3-3.2 分析結果と毒性物質 C<sub>15:1</sub> 検出の判定

検体情報				毒性物質C <sub>15:1</sub>			判定	備考
検体名	No.	重量(g)	ヒアリ添加	ピーク高さ	S/N比*	マススペクトル*		
那覇港A	1	49.0	なし	-	-	-	不検出	
	2	53.0	10個体	37,321	391.3(○)	98, 292, 307(○)	検出	
那覇港B	3	49.7	なし	-	-	-	不検出	
	4	53.7	1個体	1,400	10.2(○)	98, 292(×)	不検出	C <sub>15:1</sub> と思われるピークは観測された
那覇港C	5	42.2	なし	-	-	-	不検出	
	6	46.2	1個体	3,316	47.4(○)	98, 292, 307(○)	検出	
那覇保税地域	7	20.2	なし	-	-	-	不検出	
	8	24.2	1個体	1,583	26.4(○)	98, 292, 307(○)	検出	
那覇軍港	9	5.8	なし	-	-	-	不検出	
	10	9.8	1個体	2,487	24.5(○)	98, 292, 307(○)	検出	
那覇空港	11	10.2	なし	-	-	-	不検出	
	12	14.2	1個体	629	13.3(○)	98(×)	不検出	C <sub>15:1</sub> と思われるピークは観測された
本部港	13	4.5	なし	-	-	-	不検出	
	14	8.5	1個体	2,243	52.5(○)	98(×)	不検出	C <sub>15:1</sub> と思われるピークは観測された
中城湾港	15	39.2	なし	-	-	-	不検出	
	16	43.2	1個体	-	-	-	不検出	C <sub>15:1</sub> と思われるピークが観測されない
平良港	17	29.7	なし	-	-	-	不検出	
	18	33.7	10個体	30,253	99.2(○)	98, 292, 307(○)	検出	
宮古空港	19	18.3	なし	-	-	-	不検出	
	20	22.3	1個体	446	9.5(×)	98(×)	不検出	C <sub>15:1</sub> と思われるピークは観測された
石垣港	21	42.3	なし	-	-	-	不検出	
	22	46.3	10個体	22,873	33.8(○)	98, 292, 307(○)	検出	
石垣空港	23	5.4	なし	-	-	-	不検出	
	24	9.4	1個体	8,040	123.1(○)	98, 292, 307(○)	検出	

\* 本判定基準を満たすものには(○)、満たさないものには(×)を示した。

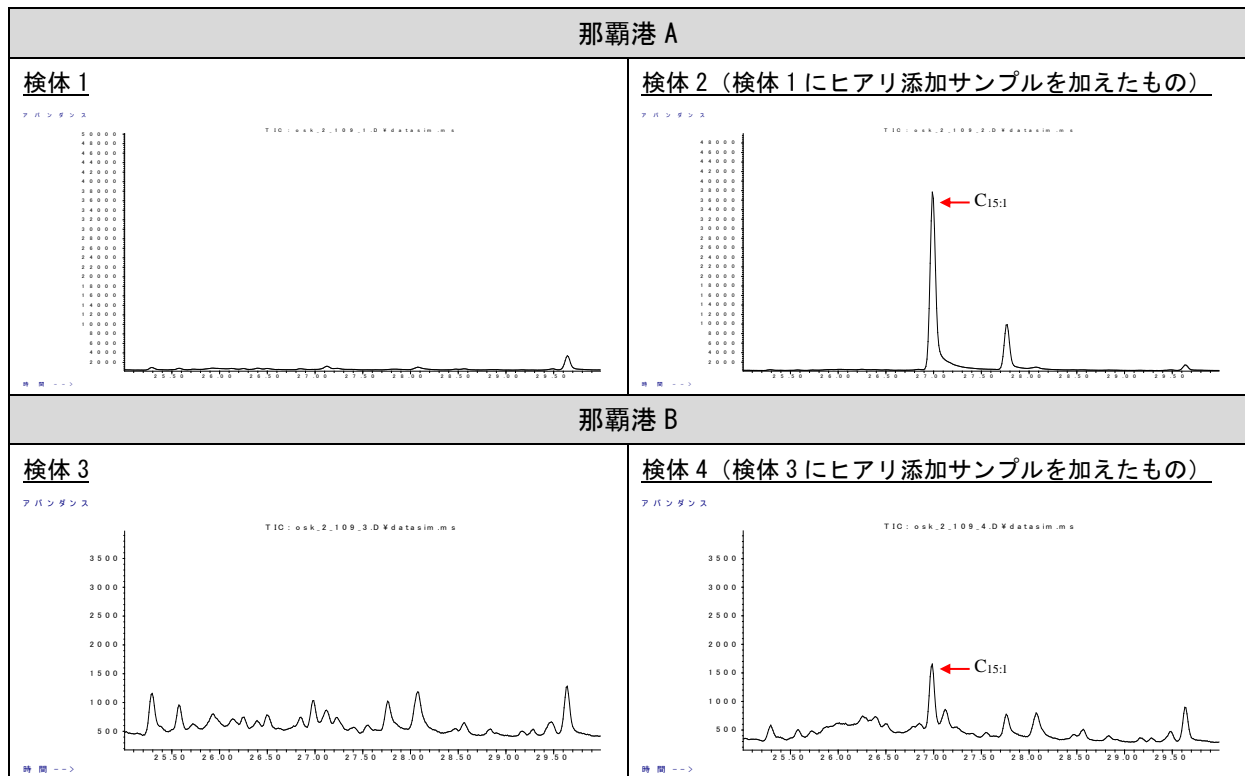


図 3-3.1 各検体のクロマトグラム (C<sub>15:1</sub> のリテンション値付近の拡大図、左右は同スケールで表示)

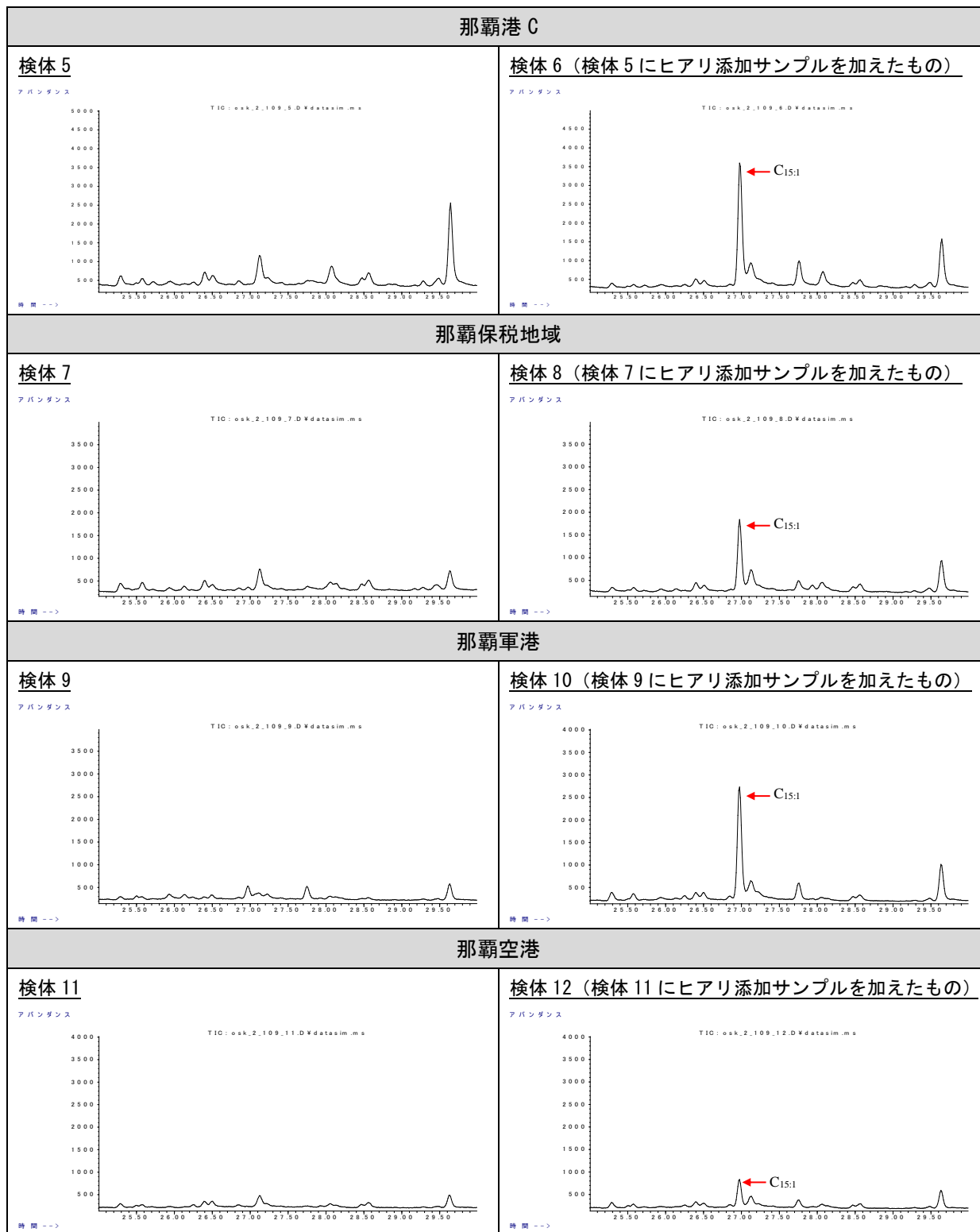


図 3-3.1 各検体のクロマトグラム (続き)

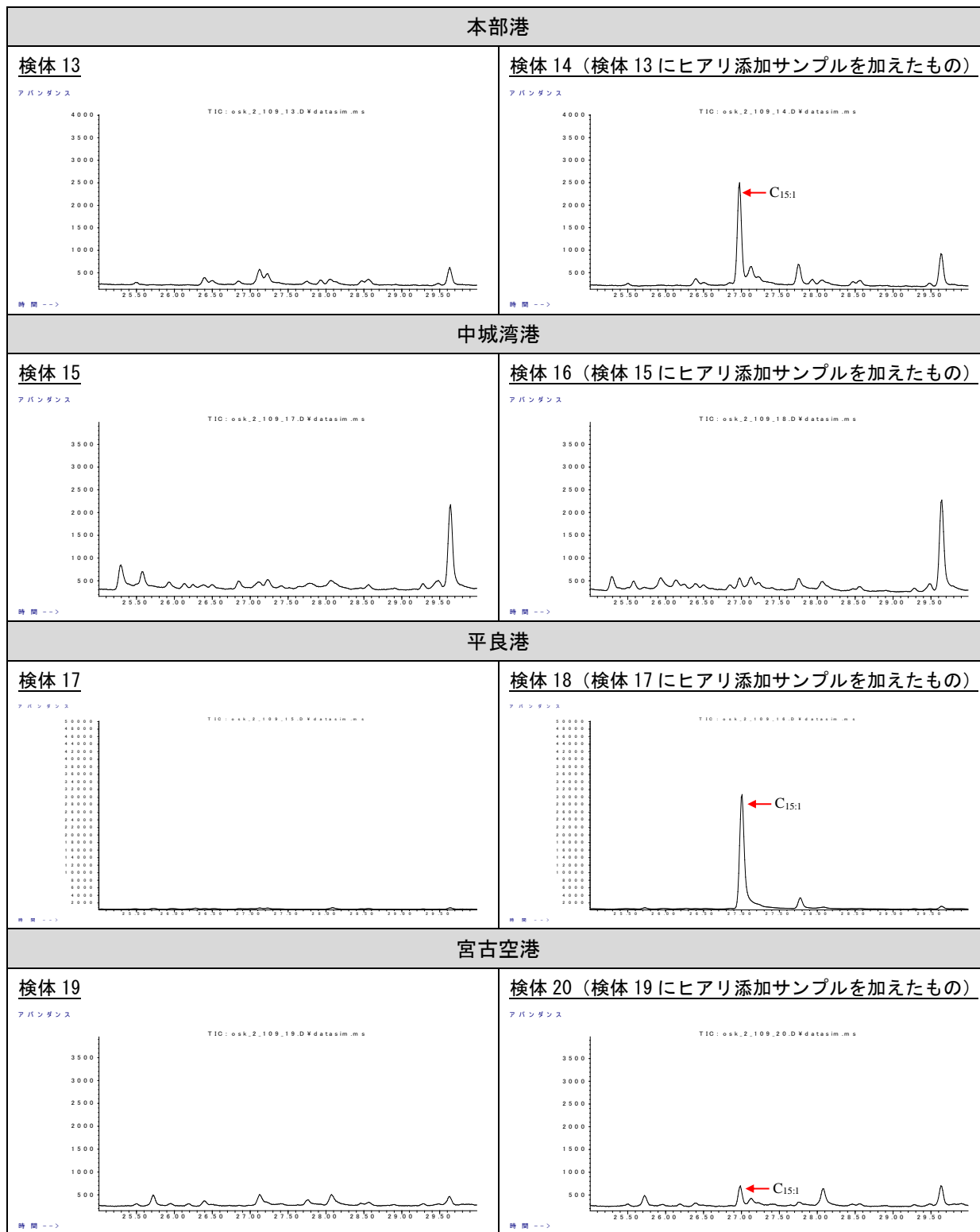


図 3-3.1 各検体のクロマトグラム (続き)

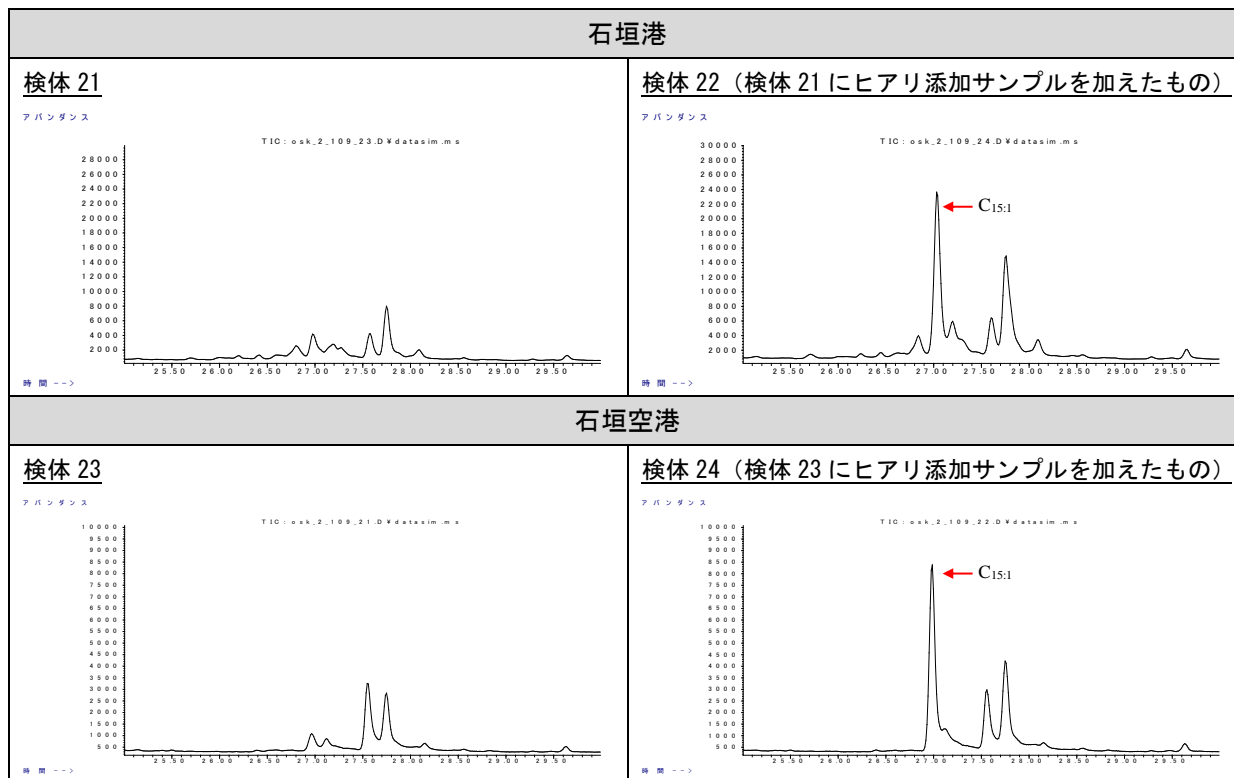


図 3-3.1 各検体のクロマトグラム (続き)

表 3-3.3 再分析の結果と毒性物質 C<sub>15:1</sub> 検出の判定

検体情報				毒性物質 C <sub>15:1</sub>			判定	備考
検体名	No.	重量 (g)	ヒアリ添加	ピーク高さ	S/N比*	マススペクトル*		
那覇港B	4	53.7	1個体	16,979	11.1 (○)	98, 292, 307 (○)	検出	
那覇空港	12	14.2	1個体	8,673	11.5 (○)	98, 292, 307 (○)	検出	
本部港	14	8.5	1個体	32,670	89.9 (○)	98, 292, 307 (○)	検出	
中城湾港	16	43.2	1個体	-	-	-	不検出	C <sub>15:1</sub> と思われるピークが観測されない
宮古空港	20	22.3	1個体	7,039	10.1 (○)	98, 292, 307 (○)	検出	

\* 本判定基準を満たすものには(○)、満たさないものには(×)を示した。

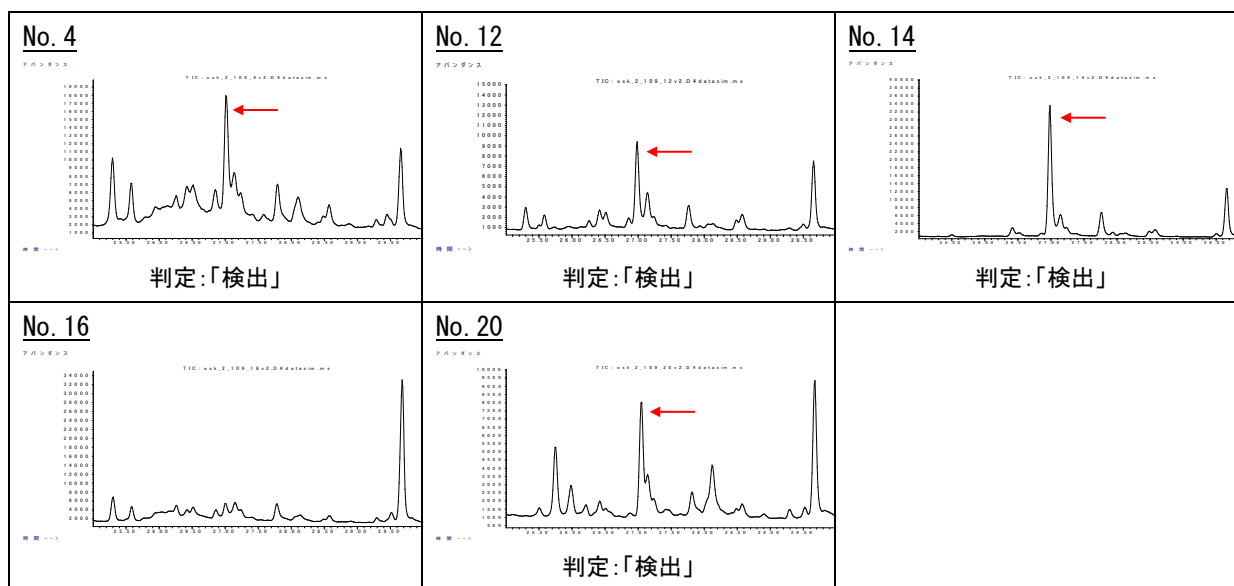


図 3-3.2 再分析検体のクロマトグラム (C<sub>15:1</sub> (赤矢印) のリテンションタイム付近の拡大図)

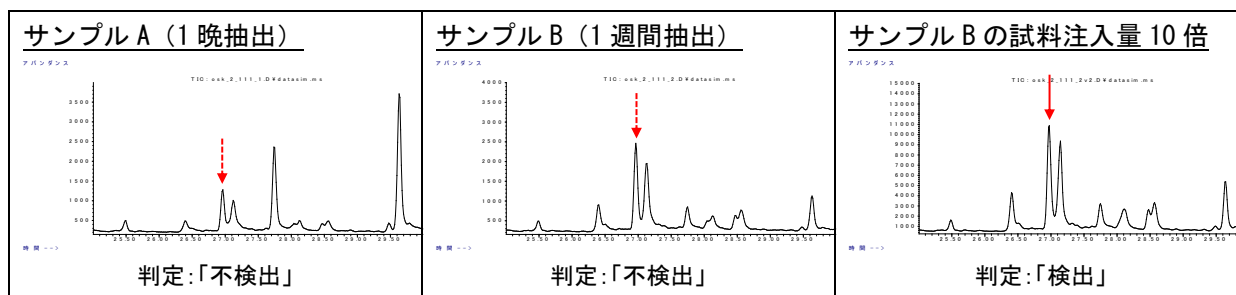


図 3-3.3 ヒアリ添加サンプルのクロマトグラム ( $C_{15:1}$  (赤矢印) のレンジオンタイム付近の拡大図)

#### (4) まとめ

ヒアリモニタリング調査(誘引剤調査)で採集したアリ類(サンプル)からは、ヒアリの毒性物質は検出されなかった。

サンプルにヒアリが 10 個体入っていれば、大量のアリサンプル中からも検出できることが明らかになった。また、サンプルに入っているヒアリが 1 個体の場合でも、はっきりしたピークが見られ、試料注入量を増やすことで検出できた。

毒性物質が少ない個体では検出不可となるため、必ず 1 個体入っていれば検出できるという方法ではないものの、最大 50 g という大量のアリの中にわずか 1~10 個体のヒアリがいれば検出できる方法であることを確認した。

#### (5) 今後のヒアリモニタリング調査における分析方法

##### 【抽出時間について】

昨年度まではアリ類の成分の抽出時間を 2 週間としていたが、超音波処理を行い抽出時間を 1 晩としても毒性物質を検出でき、調査の結果を迅速に示すことができた。ただし、抽出時間が長いほうが毒性物質もより抽出された。

このため、調査の規模や結果を迅速に示す必要性などにより、抽出時間を変更すると良いと考える。沖縄県において、今年度や過年度で実施してきたような調査(10,000 地点を年 1 回、5,000 地点を年 2 回)では、抽出時間を長くし(1 週間程度)、確実に検出できるようにすることが望ましいと考えられる。他方、例えば、ある地点でヒアリが発見された際のその周辺の緊急的なモニタリング調査などでは、調査後すぐにヒアリの有無を確認できたほうが良いため、超音波処理による 1 晩抽出後すぐに分析し、結果を示すことが必要だと考えられる。

現場での目視による確認には迅速性の面で及ばないが、GC-MS による検出では大量サンプルを迅速に処理できる点がメリットである。

##### 【サンプル処理について】

今年度はサンプル重量 50 g を 1 検体とし、約 10,000 個の誘引剤(サンプル総重量 316.5 g)を 12 検体分として処理した。ただし、検体は調査エリアごとに分けたため、この数になった。調査エリアを考慮せず 50 g を 1 検体とすると、サンプル重量が同じであれば 6~7 検体となるため、さらに省労力化できる方法となる。