

## (2) グリーンアノールの野外誘引試験

### a) 目的

これまで試作した各種ベイトが、野外で誘引効果を把握することを目的とした。

### b) 方法

#### b-1 野外試験時期

2019年3月20日から6月6日（計6回）

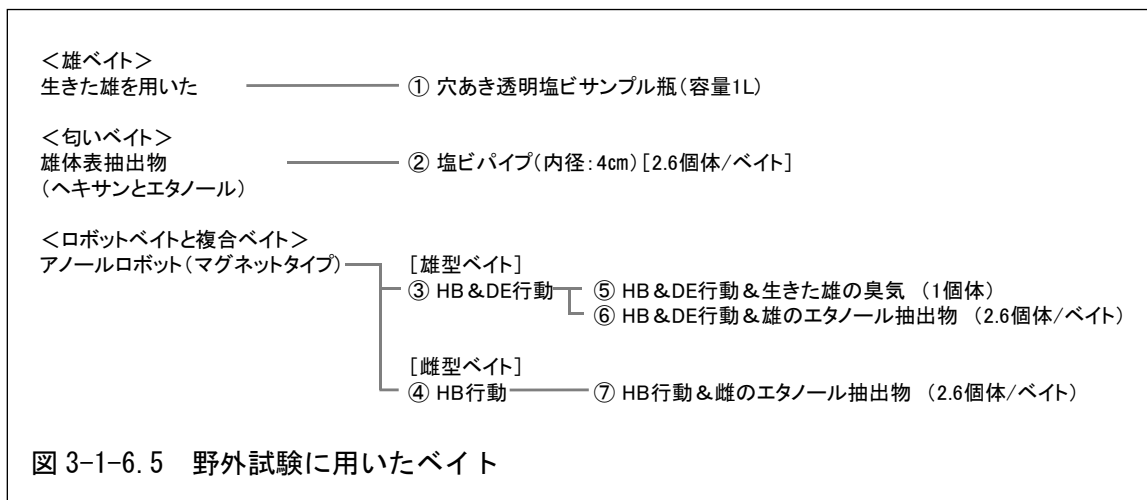
#### b-2 試験方法

野外試験は、赤嶺緑地内の図 3-1-6.4 に示す試験区（オレンジ点線内）で行った。



図 3-1-6.4 赤嶺緑地内の野外試験区（オレンジ点線内）

野外試験には大きく3つの種類(雄ベイト、匂いベイト、ロボットベイト)を用いた(図3-1-6.5参照)。また、複合ベイトとして匂いとロボットを組み合わせた。



雄ベイトの容器には、従来の穴あき透明塩ビサンプル瓶(以下、サンプル瓶)①を用いた。

匂いベイトでは、2種類(エタノールとヘキサン)の溶媒を用い雄の体表を抽出し、さらに脱脂綿に吸着させたものを用いた。それら2種類の脱脂綿吸着抽出物は、それぞれ内径40cmの塩ビパイプ②に装着し試験を行った。

ロボットベイトでは、今まで試作した中で一番ノイズの少ないマグネットタイプのものを用いた。今回は、HBのみ行うロボットも新しく試作し雌型ベイトとした④。また、HB&DE行動を行う前回報告のロボットを雄型ロボットとした③。これらロボットは、ロボット単体で誘引試験を行った。雄型ロボットには生きた雄個体を黒塗りのサンプル瓶に入れ、近傍に配置した複合ベイトの試験も行った⑤。さらに、これら雄・雌型ロボットにそれぞれ雄・雌体表抽出物も加え、複合型のベイトとして試験を行った⑥⑦。

ベイト①および②は、雄の逸脱防止のため、開口5mmのナイロンメッシュをベイト外側から被せ容器を2重構造とした。またアノールの捕獲には粘着テープ(5~6cm幅)を利用し、各ベイト近傍に装着した。

c) 結果

各ベイトの捕獲結果を表 3-1-6.2 に示す。

表 3-1-6.2 野外試験における各ベイトのグリーンアノール捕獲数

[アノール捕獲数/ベイト設置数]

試験 No.	試験日	設置時間(h)	雄ベイト		匂いベイト	ロボットベイトと複合ベイト				
			空ベイト	① 雄ベイト		オス型			メス型	
						② 塩ビパイプ式	③ ロボ (HB&DE)	⑤ ロボ (HB&DE)&雄臭気	⑥ ロボ (HB&DE)&雄抽出物	④ ロボ (HB)
1	3/20	5	1(♂)/5	0/5		0/1				
2	3/26	4	0/5	2(♂♂)/5		0/1				
3	4/2	3							0/1	
4	4/11	1.5		0/1(G)		0/1(G)			0/1(G)	
5	4/17	2.5			0/4			0/1		0/1
6	6/6	3.5					0/1			
合計			1(♂)/10	2(♂)/11	0/4	0/3	0/1	0/1	0/2	0/1

生きた雄をベイトとした場合、11 台のベイトで 2 個体のアノールを捕獲した（空ベイトの捕獲数：1 個体/10 台）。また、すべて雄の捕獲であった。試験 1 および 2 の①ベイト瓶の設置高さは、ギンネムの樹高半分より高い位置に設置した（図 3-1-6.6 左）。これは少しでも、雌に雄の発見を促そうと考えたものであった。しかし、雄がサンプル瓶に対して HB&DE 行動（威嚇）しているのが観察された。試験 4 では雄の比較的高い位置の行動圏を考慮してベイト瓶を地面に置く工夫をしたが、雌の捕獲はなかった（図 3-1-6.6 右）。この低い位置での雄ベイトの設置は、野外観察結果からも重要であると考えられる。また設置時間の増やすことも雌の捕獲に繋がると考えられるが、ベイト瓶の容量拡大、通気性向上などの改良が必要である。

昨年度の蚊帳試験における雄ベイトの雌誘引は、8 月～9 月の試験結果であり、今回の野外試験とは時期が異なる。



図 3-1-6.6 雄ベイトによる誘引試験

匂いベイトとして2つの溶媒（ヘキサンとエタノール）を用いた雄体表抽出物を、塩ビパイプに装填し試験を行ったが、アノールの捕獲は観察されなかった（図 3-1-6.7）。



また、ロボットベイトとして雄型と雌型を用い誘引試験を行ったが、アノールの捕獲はなかった（図 3-1-6.8）。試験 2 の雄型ロボット稼働中、ロボットに対して HB&DE 行動している雄が確認された（図 3-1-6.9）。これはロボットに対する威嚇であると考えているが、図 3-1-6.9 に示されている距離（約 1m）以上、この雄がロボットに接近することはなかった。現在のところ、これら原因は未だ僅かに残る可動部接触のノイズであると考えられる。



(ベイト③, 試験 4)



(ベイト④, 試験 3)

図 3-1-6.8 ロボットベイトによる誘引試験



図 3-1-6.9 雄型ロボットに対して HB&DE 行動する雄 (ベイト③, 試験 2)  
青矢印 : デュラップを開く雄

ロボット単体での試験に加え、複合ベイトとして雄型ロボットと生きた雄臭気や体表抽出物、雌型ロボットと雌体表抽出物をそれぞれ試験したが、いずれの試験においてもアノールの捕獲はなかった（図 3-1-6.10）。



### (3) グリーンアノールの蚊帳内誘引試験

昨年度の蚊帳内における雄ベイト（サンプル瓶）を用いた誘引試験では、雌の誘引活性（ベイトエリアまでの到達回数）があった。しかし、この試験方法は、試験開始時の雌雄間が近いことや、試験終了時の雌の蚊帳への局在など野外試験に適応した誘引試験方法とは言い難かった。そこで今回、試験区内に3本の樹木を植え、試験開始時の雌雄間を60cm以上とし、野外に近い環境下での誘引試験を行った。ここでいう野外環境とは、緑地や公園を想定したものではなく、民家の庭程度の環境である。

#### a) 目的

小規模環境下での、雄ベイトの雌に対する誘引力を評価することを目的とした。

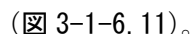
#### b) 方法

##### b-1 試験場所と期間


沖縄県環境科学センターの中庭に設置した蚊帳（縦×横×高さ＝2.0 m×3.0 m×1.8 m）内で2019年6月25日から2019年7月26日まで誘引試験をした。

##### b-2 試験方法

###### <試験区>

黄金椗（高さ：140～150cm）を3本植えた（樹間：120cm）蚊帳内を試験区とした（ 図 3-1-6.11）。

###### <ベイト>

ベイトには生きた雄を用い、ベイト容器は、サンプル瓶とステンレスメッシュ製（ST）ケージ（以下、STケージ）（ 図 3-1-6.11 赤矢印）をそれぞれ用いた。

#### <手順>

試験の手順を以下に示す。

- ① 雄ベイトをいずれかの樹木に設置し、残り 2 本の樹木に空ベイトを設置した。
- ② 雌を蓋つき透明容器に 1 個体ずつ入れ (1 回の試験に 3 個体もしくは 4 個体)、3 本の樹木の中央に置き 15 分間以上の馴化を行った。
- ③ 透明容器の蓋を雌に刺激を与えないように開け、試験開始(図 3-1-6.11 参照)とした。この時の雌と樹木までの距離は 60cm とする。
- ④ 試験中はビデオカメラで撮影し、試験終了時に樹木ごとの雌をカウントした (試験時間 : 0.5~7.5 時間)。



図 3-1-6.11 蚊帳内誘引試験区の様子

黄矢印 : ST ケージ (雄ベイト), 赤矢印 : 空ベイト  
青矢印 : 雌の入った透明容器 (雌の誘引試験開始位置)

#### <誘引活性評価>

ベイトなしの予備的試験によって、3 本の樹木中央に位置する透明容器の中から外へ移動し始める雌は、まず透明容器の淵で動きが止まり、辺りを見回す行動を行う。その後、3 本のいずれかの樹木に向かって足早に移動する (蚊帳には向かわない)。また一度樹木を選択したら、その樹木から容易に移動しないことが判った。そこで、雄ベイトに雌の誘引活性があれば、雌は雄ベイトの設置された樹木を選択すると考えた。また、強い誘引力が雄ベイトにあった場合、多くの雌が雄ベイト樹木を選択すると判断した。誘引力は誘引率として表した。

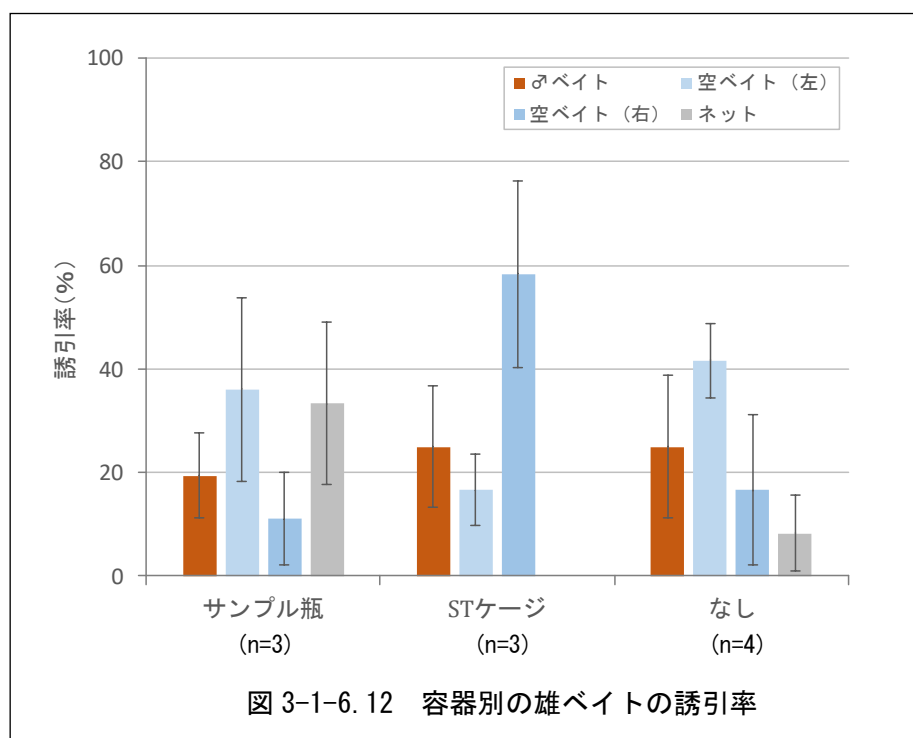
誘引率 (%) = 各樹木の試験終了時の雌個体数 / 試験に用いた雌個体数 × 100



### c) 結果

誘引試験結果を図 3-1-6.12 に示す。

雄ベイトの容器としてサンプル瓶と ST ケージを用いたが、いずれの容器を用いても雄ベイトが空ベイトより高い誘引率を示すことはなかった (図 3-1-6.12 左と中)。またベイト容器の影響を知るため、最初に雄 1 個体を直接試験区内に放ち、樹木を選択させその樹木をベイトとした場合でも、雌の誘引は観察されなかった (図 3-1-6.12 右)。よって、ベイトに用いた容器には関係なく、今回の試験時期 (6 月～7 月) と試験条件では、雄ベイトの雌に対する誘引活性はないことが判った。



#### (4) 室内 60 cm水槽誘引試験

##### a) 目的

雄由来の雌に対する誘引物質の探索を目的とした。

##### b) 方法

###### b-1 試験場所と期間

沖縄県環境科学センター中庭の小屋内に設置した 60 cm規格（幅 60 cm×奥行 30 cm×高さ 36cm）ガラス水槽内で 2019 年 8 月 19 日から 2019 年 12 月 25 日まで誘引試験を行った。

###### b-2 試験方法

###### <手順>

試験の手順を以下に示す。

- ① 60 cm水槽の両端に 1L 塩ビ製サンプル瓶を設置し、ベイト瓶とコントロール瓶とした。
- ② 4 個体の雌を 1L サンプル瓶にそれぞれ 1 個体ずつ入れ、ベイト瓶とコントロール瓶から一番離れた距離になるように設置した（図 3-1-6. 13 A 参照）。
- ③ 馴化時間：15 分
- ④ 雌の封入した瓶の蓋を静かに開けて試験開始とした。
- ⑤ 試験時間：約 2 時間
- ⑥ 試験はビデオ撮影し、終了後に解析した。
- ⑦ 雌がベイトおよびコントロール瓶に張付いた回数を試験時間で割った値を「ベイト到達回数（回数/分）」とした。また、ベイトおよびコントロール瓶に滞在した時間を試験時間で割った値を「ベイト滞在時間（分/分）」とした。試験の繰り返しは 3～6 回とし、ベイト瓶とコントロール瓶の「ベイト到達回数」や「ベイト滞在時間」の平均値を比較し、雌のベイトに対する誘引活性を評価した。なお、ベイトおよびコントロール瓶に張付かなくとも雌背中部分が瓶に接触している場合は、張付きと同様にカウントした。



図 3-1-6.13 室内 60 cm水槽誘引試験の様子

A. 試験 1A の全体図 (表 3-1-6.13 参照).  
 黄矢印: ベイト瓶 (雄), 赤矢印: 空ベイト (コントロール), 緑矢印: 雌の入った瓶, 馴化期間内は瓶に蓋をし試験開始で蓋を取る.

B. 雄の抽出物を投入したベイト瓶.  
 黄矢印: 雄のエタノール抽出物を添加したペーパーディスク. 赤矢印: ベイト瓶に到達した雌 (供試体).

### b-3 ベイトとベイト瓶

室内 60 cm水槽誘引試験に用いた各種ベイトとベイト瓶を表 3-1-6.3 に示す。

表 3-1-6.3 各種ベイトとベイト瓶

区分	No.	試験期間	瓶の種類	ベイト	添加量 ( $\mu$ L/10mL)	コントロール
試験1	A	8/19, 21, 10/4	穴あき瓶(穴:直径5mm)	雄	-	空
	B	8/27, 9/19	穴あき瓶			雌
	C	9/20, 24	密閉瓶			空
	D	9/27, 30	暗幕穴あき瓶			空
試験2	A	9/26, 10/1	穴あき瓶	エタノール粗抽出物	10	エタノール
	B	10/9, 11, 10/21, 23		ヘキサン層	20, 100	エタノール
	C	10/15, 16, 24, 25		10%含水メタノール層	20, 100	エタノール
	D	10/17, 18, 29, 30		水層	30, 100	水
試験3	A	11/1, 5	穴あき瓶	10%含水メタノール層とフィギュア	100	空
	B	11/7, 8		水層とフィギュア	100	空
試験4	A	11/22~12/6	穴あき瓶	水層をスチレン系樹脂で分画したもの(Fr. 1-2~1-5)	150	水:エタノール =1:1
	B	12/10~12/23		10%含水メタノール層をシリカゲルで分画したもの(Fr. 2-2~2-5)	150	エタノール

#### <試験 1>

試験 1 では、生きた雄をベイトとし、表 3-1-6.3 に示すベイト瓶を用い試験した。

#### <試験 2>

試験 2 では、雄のエタノール粗抽出物や液液分配物（表 3-1-6.3 参照）をベイトとして用いた（図 3-1-6.14 青枠）。抽出物や各分配物は、溶媒で一定容量とした後、直接ペーパーディスク（ADVANTEC、抗生物質検定用ペーパーディスク、直径 6 mm厚手）に添加した。ディスクの溶媒が蒸発後、穴あき瓶に投入しベイト瓶とした（図 3-1-6.13 B 参照）。また、溶媒のみをペーパーディスクに添加したものをコントロール瓶とした。

#### <試験 3>

試験 3 では、水層およびメタノール層分配物（100 $\mu$  L）を添加したペーパーディスクと雄サイズのアノールフィギュアを穴あき瓶に投入しベイト瓶とした。

#### <試験 4>

試験 4 では、試験 2 および 3 で用いた分配物を、さらにスチレン系樹脂（AmberChrom CG300M）とシリカゲルによって分離した分画をそれぞれベイトとして用いた（図 3-1-6.14 オレンジ枠）。ベイトの作製方法等は、試験 2 と同様にした。

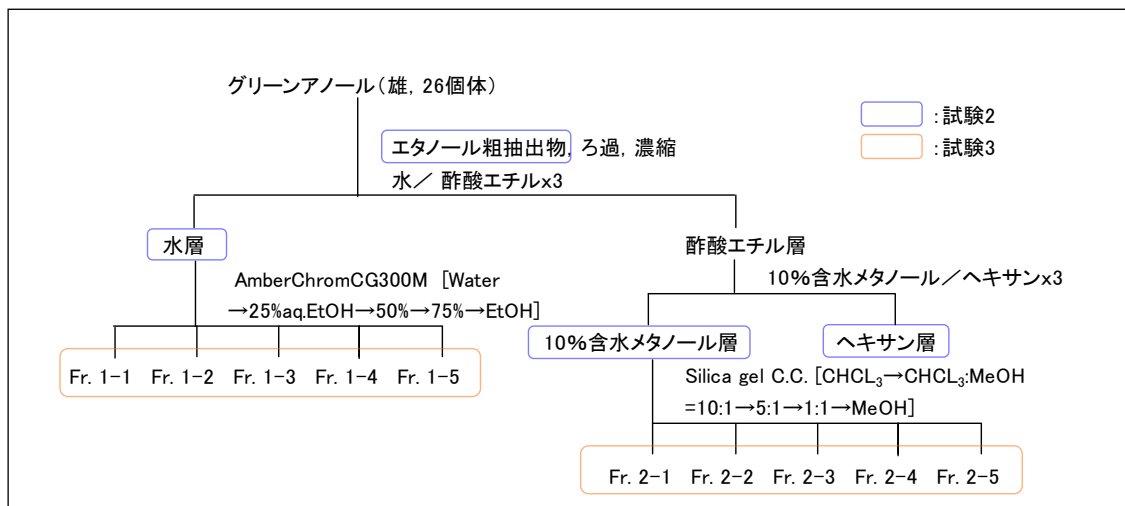


図 3-1-6. 14 雄アノール由来の誘引物質の分離スキーム

c) 結果

< 試験 1 >

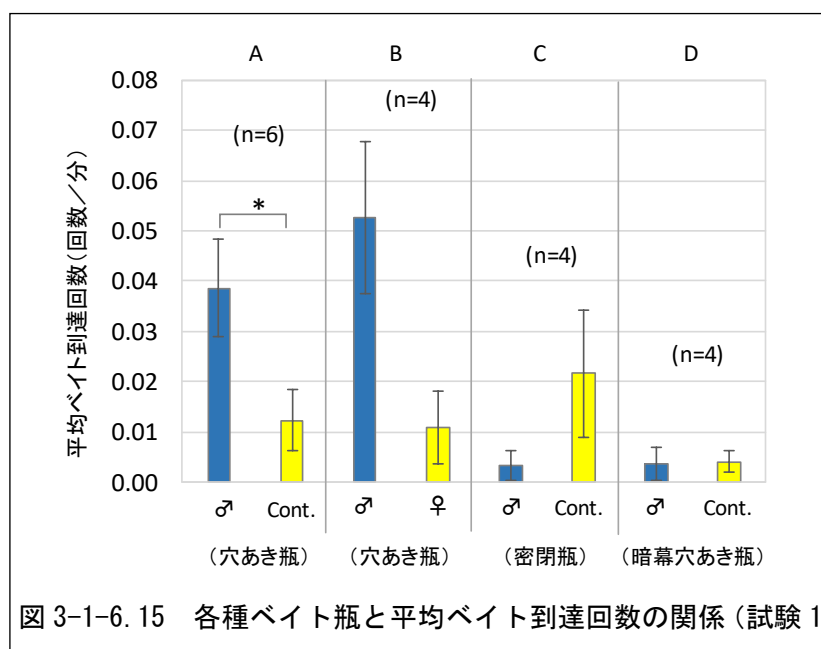
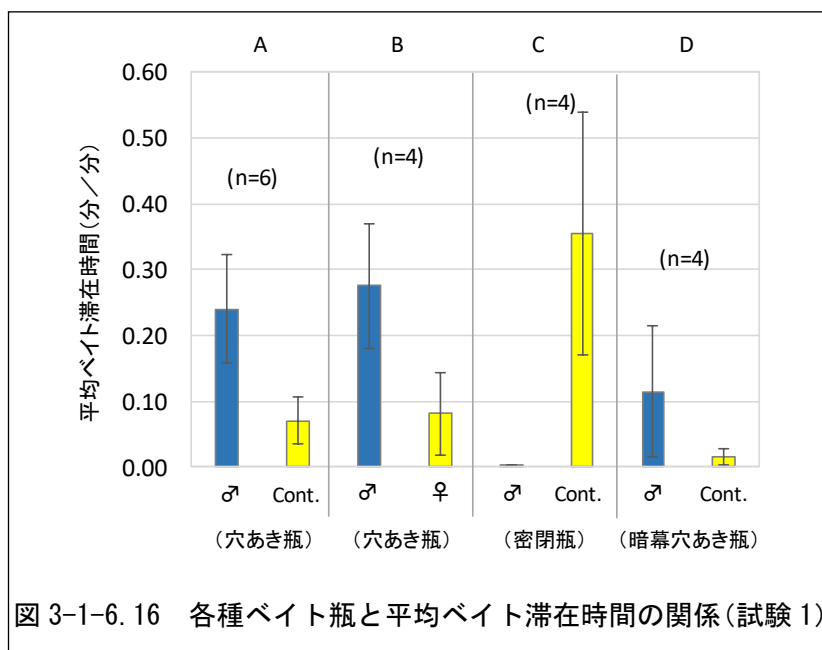


図 3-1-6. 15 各種ペイト瓶と平均ペイト到達回数(回数/分)の関係 (試験 1)

試験 1 では、ペイト瓶およびコントロール瓶として穴あき瓶 (表 3-1-6. 3 A, B)、密閉瓶 (C)、暗幕穴あき瓶 (D) の 3 種類を用いた。ペイト瓶には生きた雄、コントロール瓶は空として同試験区に設置し (試験 1B ではコントロール瓶として雌を投入した) 試験を行った。

その結果、穴あき瓶をベイト瓶とした平均ベイト到達回数が、コントロール瓶に比べ有意に高くなった（図 3-1-6. 15 A、ウィルコクソン符号順位検定、 $n=6$ 、 $\alpha=0.05$ ）。またコントロールベイトに雌を投入した試験 1B でも、試験 1A と同様にベイト瓶（雄）の方が、コントロール瓶（雌）に比べ、平均ベイト到達回数が高くなる傾向を観察した（図 3-1-6. 15 B）。これら結果より、雌は同性でなく異性に強く誘引されていることが判る。

密閉瓶をベイト瓶にした結果、平均ベイト到達回数がコントロール瓶に比べ大幅に減少した。また、暗幕穴あき瓶をベイト瓶にした平均ベイト到達回数は、コントロール瓶とほぼ同等の値を示した。これら結果は、雌の誘引に雄の匂いと姿が重要であることを示唆する結果と考えられる。また、これら誘引試験結果は、平均ベイト滞在時間を用いても同様な傾向が現れた（図 3-1-6. 16）。



#### <試験 2>

試験 2 では、雄の代わりに雄のエタノール抽出物や各種分配物をペーパーディスクに添加し、ベイトとして用いた。ペーパーディスクへの添加量を  $10\sim 30\mu\text{L}$  (雄 26 個体/10mL) とした平均ベイト到達回数および平均ベイト滞在時間の結果を図 3-1-6. 17 (A~D)、添加量  $100\mu\text{L}$  とした結果を図 3-1-6. 18 (B~D) に示す。添加量  $10\sim 30\mu\text{L}$  の場合、各種ベイトがコントロールの平均到達時間や平均滞在回数を大きく上回ることはなかった。一方、添加量を  $100\mu\text{L}$  とした場合、水層分配物の平均ベイト滞在時間においてコントロールに比べ有意な差が確認された（図 3-1-6. 18 右 D、ウィルコクソン順位和検定、 $n=4$ 、 $\alpha=0.05$ ）。また、この時の平均ベイト到達回数においても、コントロールの値に比べ高い傾向を示した（図 3-1-6. 18 左 D）。

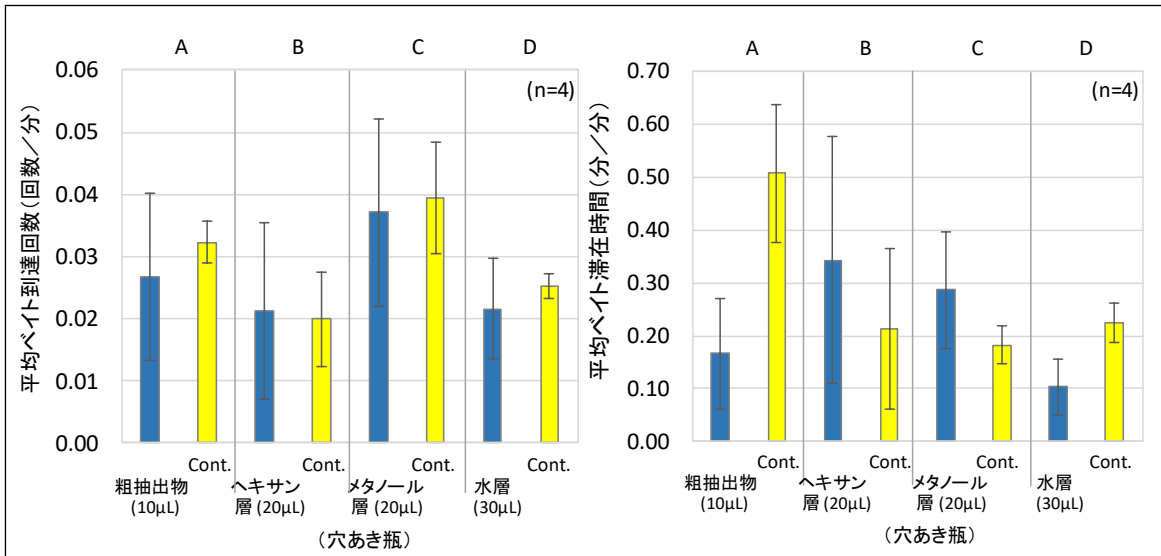


図 3-1-6.17 抽出物や各種分配物と平均ベイト到達回数（左）、および平均ベイト滞在時間（右）の関係（添加量 10~30 μL、試験 2）

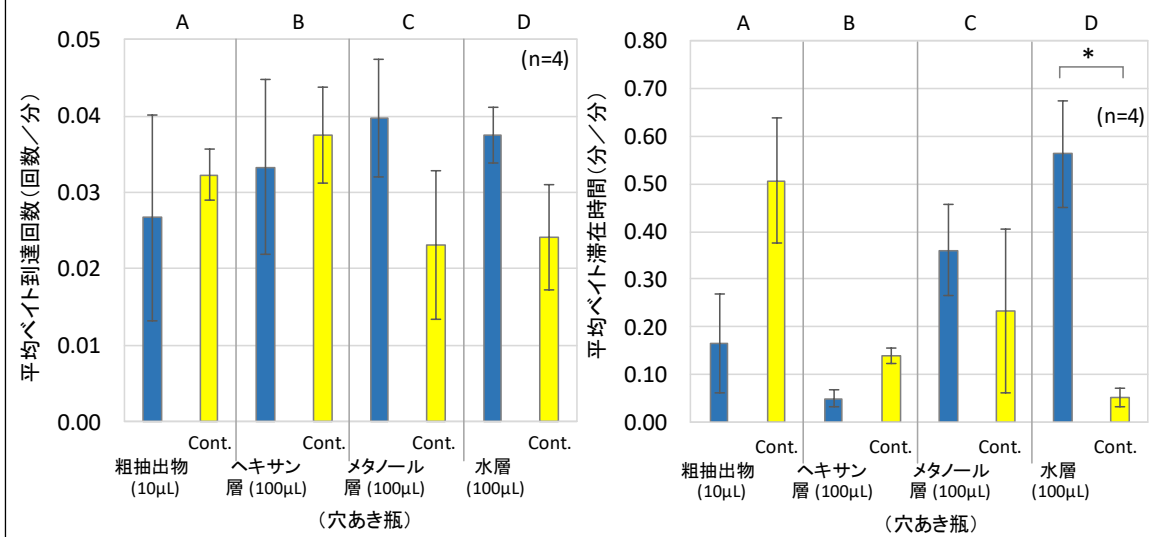
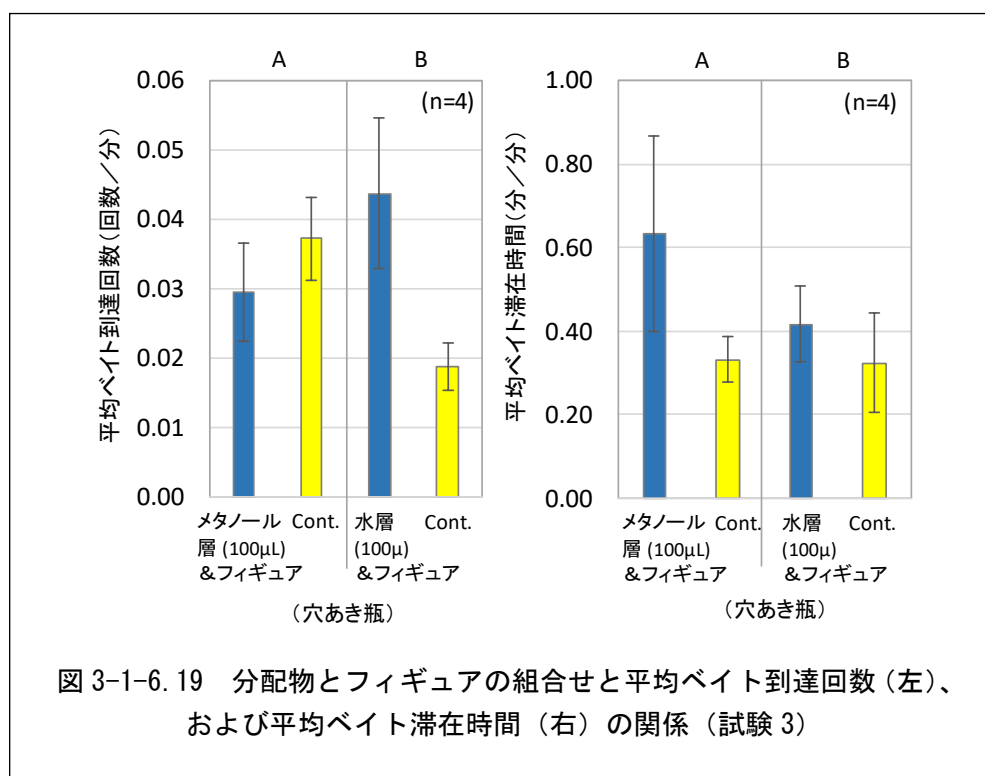


図 3-1-6.18 抽出物や各種分配物と平均ベイト到達回数（左）、および平均ベイト滞在時間（右）の関係（添加量 100 μL、試験 2）

<試験 3>

試験 3 では、試験 2 で良好な結果を得た水層分配物を 100  $\mu$ L 添加したペーパーディスクと雄フィギュアを穴あき瓶に投入しベイトとした (図 3-1-6. 19 左右 B)。また、メタノール層の分配物を使って同様にベイトを作成し (図 3-1-6. 19 左右 A) 試験を行った。その結果、水層分配物とフィギュアを投入したベイトへの平均到達回数が、コントロールに比べ大きく上昇したが、有意差は確認できなかった (図 3-1-6. 19 左 B、ウィルコクソン順位和検定、 $\alpha = 0.05$ )。



<試験 4>

試験 4 では、試験 2 で良好な結果を示した水層分配物と 3 つの分配物 (水層・メタノール層・ヘキサン層) の中で 1 番高いベイト到達回数を示したメタノール層分配物 (図 3-1-6. 18 左 C) の分離分画をそれぞれ試験した。その結果、Fr. 1-3 や Fr. 1-4 を添加したベイトの平均到達回数がコントロールに比べ高い傾向にあった (図 3-1-6. 20 左)。また、平均ベイト滞在時間では Fr. 1-1 や Fr. 2-5 を添加したベイトがコントロールに比べ高い傾向にあった (図 3-1-6. 20 右)。

生きた雄を穴あき瓶に投入したベイト瓶に対する雌の平均ベイト到達回数と平均ベイト滞在時間の関係は、連動した増加傾向を示した (図 3-1-6. 15 AB と図 3-1-6. 16 AB)。しかし、抽出物を液液分配、さらにスチレン系樹脂やシリカゲルによって分離した分画では、平均ベイト到達回数と平均ベイト滞在時間の値が連動しなくなった。よって、これら 2 つの誘引活性指標には、それぞれ別の化学物質が関与している可能性が示唆される。



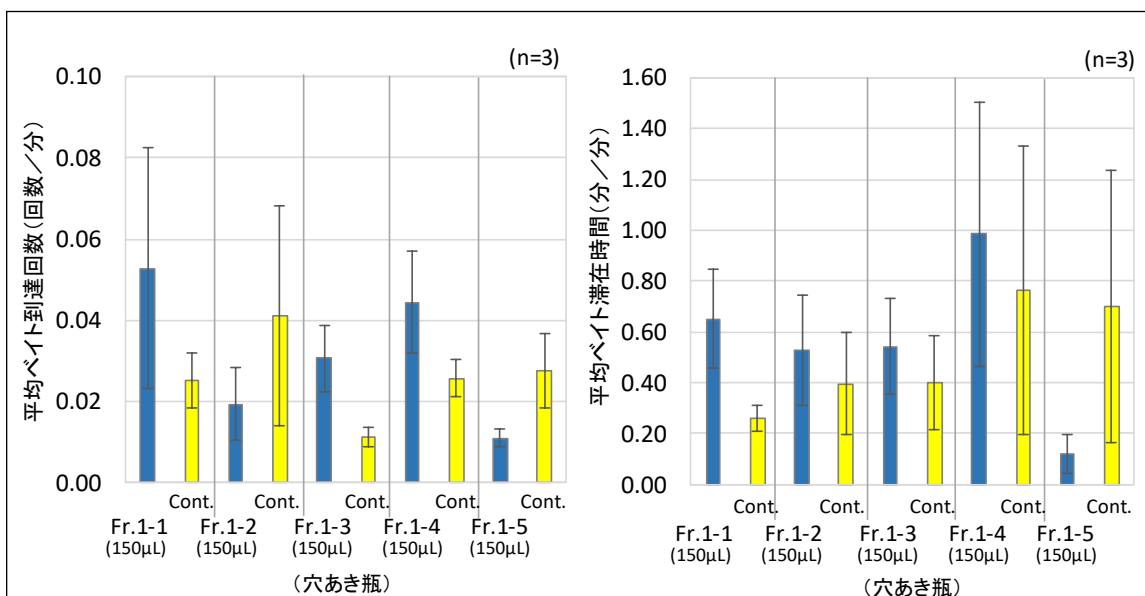


図 3-1-6.20 水層の分離分画と平均ベイト到達回数（左）、および平均ベイト滞在時間（右）の関係（試験 4）

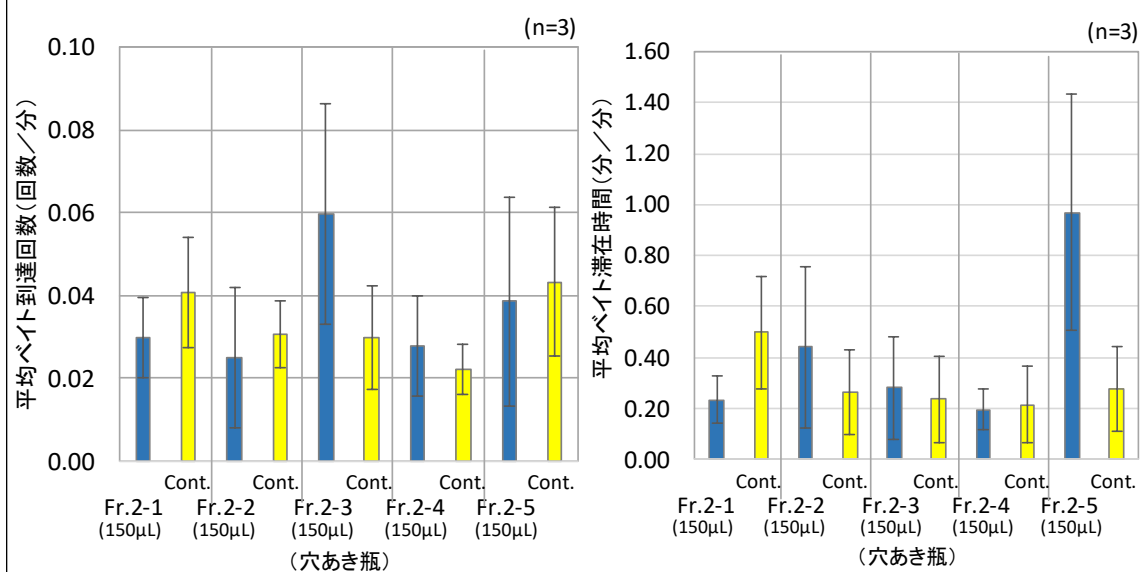


図 3-1-6.21 メタノール層の分離分画と平均ベイト到達回数（左）、および平均ベイト滞在時間（右）の関係（試験 4）

## (5) 野外誘引試験

### a) 目的

野外にて、雄由来の水層分配物がトラップ誘引剤として使えるかを検証した。

### b) 方法

#### b-1 試験場所と期間

野外誘引試験の試験場所は、赤嶺公園内（沖縄県那覇市）の3区間（A～C、図 3-1-6. 22）とし、試験期間を2019年11月13日から11月19日とした。



#### b-2 試験方法

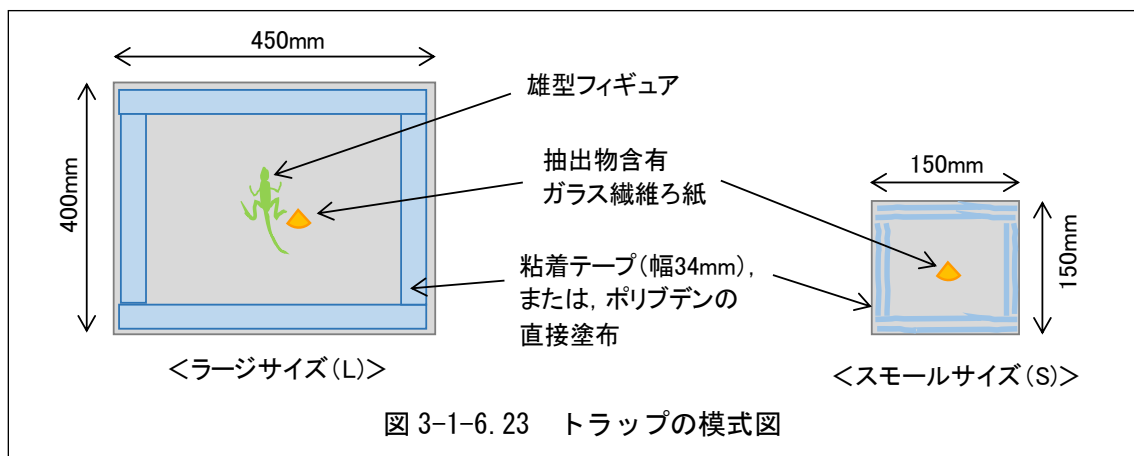
野外試験で用いたトラップを表 3-1-6. 4 に示す。

表 3-1-6. 4 野外試験に用いたトラップ

No.	名称	雄抽出物 (水層分配物)	サイズ (縦mm×横mm)	フィギュア
1	コントロール	なし	400×450	なし
2	匂い(S)	毎日100 $\mu$ Lずつろ紙に添加	150×150	なし
3	匂い(L)	毎日100 $\mu$ Lずつろ紙に添加	400×450	なし
4	フィギュア	なし	400×450	あり
5	匂いとフィギュア	毎日100 $\mu$ Lずつろ紙に添加	400×450	あり

トラップは、プラスチック段ボールを素材とし、ラージサイズ（L、縦 400 mm×横 450 mm、表 3-1-6.4 番号 1、3～5）とスモールサイズ（S、縦 150 mm×横 150 mm、表 3-1-6.4 番号 2）を作製した。それらトラップの 4 辺には、アノール捕獲用の粘着テープを装着した。また粘着テープの代わりにポリブデンを直接塗布したものも作製した（図 3-1-6.23 参照）。

トラップ番号 2、3、5 には、雄由来の水層分配物を野外試験期間中、毎日 100  $\mu$ L ずつ直接ろ紙に添加した。ろ紙は、ガラス繊維ろ紙（ADVANTEC、GS-25、直径 47mm）を 4 つ折りにしてトラップ中央部に固定した。またトラップ番号 4 および 5 では、中央部に雄サイズのアノール（デュラップなし）のフィギュアを設置した。



トラップ番号 1～5 を 1 セットとして、公園内の 3 区間にそれぞれ設置した。区間 A における設置方法は、遊歩道フェンス外側の擁壁の垂直面に設置した（図 3-1-6.24 A）。区間 B と C では、公園のフェンス外側に垂直に設置した。またトラップの地面までの高さは 5～10cm とした（図 3-1-6.24 B）。



図 3-1-6.24    トラップの設置の様子

A : 区間 A のトラップ設置. B : 区間 B と C のトラップ設置. 赤矢印 : トラップ

c) 結果および考察

野外誘引試験のアノール捕獲結果を表 3-1-6.5、表 3-1-6.6 に示す。

表 3-1-6.5 野外誘引試験で用いた各種ベイトによるアノール捕獲結果

区画	No.	ベイト	11/14 25°C, ☀	11/15 25°C, ☁	11/16 26°C, ☀	11/17 25°C, ☀☁	11/18 27°C, ☀☁	11/19 25°C, ☀☁
A	1	コントロール	ホオx1	幼x1 (36mm) 幼x1 (42mm)	—	—	ミナミx1	—
	2	匂い (S)	—	—	—	—	—	—
	3	匂い (L)	—	—	—	—	—	—
	4	フィギュア	ホオx1	—	—	—	—	—
	5	匂い&フィギュア	ホオ(幼)x1	—	ホオ(幼)x1	♂x1 (50mm)	—	—
B	1	コントロール	ミナミ(幼)x1	—	—	—	—	—
	2	匂い (S)	ホオx1	ミナミx2	—	—	—	—
	3	匂い (L)	—	—	—	—	幼x1 (29mm)	—
	4	フィギュア	—	ミナミx1	—	—	—	—
	5	匂い&フィギュア	—	ミナミx1	—	—	—	—
C	1	コントロール	ホオx1	—	—	—	—	—
	2	匂い (S)	—	—	—	—	—	ミナミ(幼)x1
	3	匂い (L)	幼x1 (36mm)	—	—	—	ミナミx1	—
	4	フィギュア	—	—	ホオx1	—	—	—
	5	匂い&フィギュア	♂x1 (47mm)	ミナミx1	ミナミ(幼)x1	ミナミ(幼)x1	—	ミナミx2

赤字: グリーンアノール, ホオ: ホオグロヤモリ, ミナミ: ミナミヤモリ

表 3-1-6.6 ベイト別の捕獲数

ベイト	グリーン アノール
コントロール	2
匂い (S)	0
匂い (L)	2
フィギュア	0
匂い&フィギュア	2