

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580235

研究課題名(和文) 外来種アメリカカンザイシロアリの繁殖様式解明と総合防除法の確立

研究課題名(英文) Investigation of breeding system and integrated control of *Incisitermes minor*

研究代表者

板倉 修司 (Itakura, Shuji)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60257988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：和歌山県東牟婁郡古座川町の被害材からアメリカカンザイシロアリの個体を採集し、マイクロサテライト解析を行った。集団全体での近交係数は0.5以上と高い値であり、近親交配の頻度が高いことが示された。また、遺伝子座あたりの対立遺伝子数が4よりも大きい部分集団もあり、近隣コロニーとの融合の可能性が示唆された。

ホウ酸化合物を経皮投与で10,000mg/kg投与しても全滅しない場合が観察され、グルーミングによる薬剤伝搬効果が低いものと推測された。また、経口投与した際には、死亡個体のホウ素含有量の約3倍のホウ素を摂取した個体が健全な状態で生息しており、ホウ素摂取量と殺虫活性に正の相関は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Pseudogates of the dry-wood termite *Incisitermes minor* (Hagen) were collected from infested timbers in Kozagawa, Wakayama Prefecture, Japan. Assessment of the individuals using microsatellite markers showed that the coefficient of inbreeding was higher than 0.5 and suggested that inbreeding within colonies could exist among some colonies. Mixing of individuals from different colonies could occur in *I. minor*, because number of alleles per locus was greater than four in some colonies.

Dermal administration of sodium salts of boric acid (10,000mg/kg) did not lead to the annihilation of *I. minor*. Diffusion of active ingredients could not be active because of low frequency of grooming activity among *I. minor* individuals. Dose of boron in sound individuals was about three times greater than that in dead individuals in the case of oral administration. Positive correlation between intake amount of boron and insecticidal activity of sodium salts of boric acid was not observed.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：シロアリ 外来種 ホウ素化合物

1. 研究開始当初の背景

アメリカカンザイシロアリは北米に広く生息する乾材シロアリであり、国内では1975年に東京都江戸川区で初めて発見された(森八郎、しろあり、27巻、45-47、1976)。その後、生息域が拡大し、2005年には20県90箇所アメリカカンザイシロアリの発見事例が報告された(乾材シロアリ対策特別委員会、しろあり、147巻、11-24、2007)。国内での発見事例の北限は宮城県仙台市と山形県上山市である(土居修一、しろあり、143巻、37-39、2006)。宮城県や沖縄県(安田いち子ら、Jpn. J. Entomol.、6巻、103-104、2003)ではコロニーの周辺地域へのアメリカカンザイシロアリ個体の拡散は確認されていないが、神奈川県(春成正和ら、家屋害虫、26巻、107-113、2004)、和歌山県(前田保永、家屋害虫、4巻、31-35、1982)や鹿児島県(乾材シロアリ対策特別委員会、しろあり、147巻、11-24、2007)のように同一地域内で多くの家屋が加害されている箇所も存在する。このように広範囲に生息域が広がった理由は、木材細胞壁中の結合水や木材を消化したときに生成する代謝水を利用して生きていくことができる(Pearce、Termite biology and behaviour、pp.40-64、CAB International、1997)というアメリカカンザイシロアリの特殊な生理的機能に由来する。つまり、アメリカカンザイシロアリは、外部から水分を供給されない家具や梱包材など乾いた木材中に潜入した状態で、長距離および長時間にわたる輸送あるいは保管にも耐えて生き延びることができるため、引越しや物流といった人間の経済活動によって容易に遠方へと運搬され得る。申請者の研究グループは、国内に存在するコロニー間の関連を調べるため、アメリカカンザイシロアリ向けマイクロサテライトマーカーを開発し(Indrayaniら、Mol. Ecol. Notes、6巻、1249-1251、2006)国内へは少なくとも2系統が侵入・定着していることを明らかにした。その後も国内での発見事例が相次いで報告されており、新たな地域で定着する恐れが高い。しかしながら、アメリカカンザイシロアリの生理生態に関する研究事例は少なく、その繁殖様式や生態などに関する知見が乏しい。本研究では、先ず、上述のマイクロサテライトマーカーを用いて、一本の被害材中に存在する複数コロニー間の関係、被害材は異なるが同一家屋内に存在するコロニー間の関係、さらに同一地域内の近隣被害家屋に存在するコロニー間の関係を推定し、地域内でのコロニーの広がり方を明らかにする。同時に、単一コロニー内に存在する生殖虫の数を推定し、一対の王と女王による単純ファミリーであるか、複数の補充生殖虫からなる拡張ファミリーであるかについても推定する。この結果に基づき、新たな総合防除法の確立を目指す。

2. 研究の目的

アメリカカンザイシロアリ被害木材から30個体ずつ擬職蟻を採集し、マイクロサテライトマーカーを用いて多系解析を行う。GDA(Genetic Data Analysis)ソフトウェアなどを用いて、同一被害木材内のコロニーに属する個体間の関係を推定する。解析結果に基づいて、同一被害木材に形成されたコロニーが、異なるコロニーが別々に侵入して設立されたものか、あるいは、1箇所へ侵入した個体群から派生したものなのかを明らかにする。

また、家屋内に存在する複数のコロニーに属する個体群を採集し、マイクロサテライトマーカーによる解析を行う。さらにコロニー間の関連性解析を行い、例えば屋根裏の垂木や棟木などの木材へ侵入したシロアリ個体が小コロニーをつくり、そこから床下などへ徐々に広がっていくのか、あるいは異なるコロニーに属する個体群が別々の機会に家屋へ侵入してきているのかを明らかにする。

これらの解析結果に基づいて、構造物や部材への集中的な殺蟻剤の散布、塗布あるいは注入処理、さらに有翅虫の飛翔による侵入を受けやすい部材の保護などを組合せた、アメリカカンザイシロアリの総合防除法を確立する。

3. 研究の方法

和歌山県南部古座川町でアメリカカンザイシロアリの擬職蟻を採集する。採集したシロアリ擬職蟻の頭部から、1匹ずつゲノムDNAを抽出し、冷凍保存する。下表に示した10種類のマイクロサテライト遺伝子座増幅用プライマー対の中で古座川町の個体の識別に適したプライマー対を選出し、抽出したゲノムDNAのPCR増幅を行い、冷凍保存する。

Locus	Sequence (5'-3')
07S-10	F: AAATCCAGCCAACAGGAATG R: GCTGCTTTCAACCAGACACA
07S-5	F: AACCAGGTGAACCAGTCCGAG R: GTCGCCTTGTATGGAGCAAT
07S-20	F: TGGGCTCCAGTTTCGTAATC R: CGATCCATGTTTCAGCTTCACT
07S-13	F: CGGCACGATCTTAATACACG R: CCACCGCTGTTTCATTAGTA
07S-7	F: TCGACGGTAGGGGAATACAG R: AGCCTACTTTAGGAAAGTGGATCTC
28S-10	F: GGACAGCATCAGCATGGTT R: TGTGAACCTCGGTAGTGACCT
28T-10	F: TGCCTTAAGGTCAAAATGGA R: AAAGATAGTTTGGCCCCATAGA
28T-12	F: GCATCATATCCGGGCATTAG R: ACATGGGTGACGGTTTCTGT
28T-18.1	F: ACGTCACACCTGAGACATGG R: TGTCTTCCGACTCAGCTTG
28T-18.2	F: TCCAAGCGACCATAAAATCAG R: AGCCGTCGTAATGTTGTATGC

PCR増幅産物を、アクリルアミド電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで可視化後、画像を撮影する。各遺伝子座におけるPCR増幅産物の本数とバンドサイズの読取り、記録

する。GDA (Genetic Data Analysis) ソフトウェアを用いて、各コロニー間の血縁連性を解析する。

得られた結果に基づき、侵入個所に設立された初期コロニーから他のコロニーが構築されていく経路を推定する。薬剤の蒸気圧や水溶性などを考慮しながら、侵入拡散経路を処理するのにふさわしい薬剤を選定する。アメリカカンザイシロアリの殺蟻に必要な十分な薬剤量を、推定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) によるマイクロサテライト遺伝子座解析

被害建築物の垂木 (2000 mm) を、250 mm 長の 8 部材へ切断した。同様に胴差し (2750 mm) を 250 mm 長の 11 部材へ切断した。24 頭以上の採集が可能であった 10 部材から採集した擬職蟻 (各 24 頭) の頭部を切断し、ゲノム DNA を 1 頭ずつ抽出した。ゲノム DNA を鋳型とし、アメリカカンザイシロアリ用マイクロサテライト遺伝子座増幅用のプライマー対 4 組 (07S-7、28S-10、28T-12、28T18-2) を用いて PCR 増幅を行った。合計 960 本の PCR 増幅産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、増幅された DNA バンドの大きさを読取り、Genetic Date Analysis ならびに Relatedness ソフトウェアを用いて解析した。胴差しではヘテロ接合体率の期待値と観察値がほぼ同じ値であったのに対し、垂木では観察値が低かった。この結果は、胴差しでは任意交配に近いが、垂木では近親交配が起こっていることを示唆している。有翅虫の侵入箇所となりやすい垂木では、同一コロニーから飛び立った有翅虫が垂木へ侵入し、その後近親交配が生じたと考えられる。一方、建物内部にある胴差しでは、異なるコロニーから別々に侵入した個体が移動してきた後に交配が起こったと推定される。分集団内での近交係数が正の値であったため、1 対以上の生殖虫による交配あるいは 2 つ以上のコロニーの融合が起きているものと推定される。一方、集団全体での近交係数は 0.5 以上と高い値であり、集団全体で近親交配の頻度が高いことが示唆された。血縁度は全体に高い値であったが、胴差しでは比較的 low、垂木では高い傾向が認められた。この血縁度データにより、侵入箇所となりやすい垂木では同一コロニーからの有翅虫による近親交配が、建物内部の胴差しでは異なるコロニーから来た個体による交配が起こっているとの推定が裏付けられた。

##### (2) キャピラリー電気泳動装置によるマイクロサテライト遺伝子座解析

上述した PAGE によるマイクロサテライト遺伝子座の塩基長の読み取り精度は数十塩基長である。新たに導入したキャピラリー電気泳動装置では一塩基長の差の識別が可能である。より詳細なコロニー構造を明らかに

するため、キャピラリー電気泳動による再解析を行った。

前述した擬職蟻から抽出し冷凍保管していたゲノム DNA を試料とした。これらのゲノム DNA を鋳型とし、蛍光 (FAM、VIC、NED、PET) 標識した 4 組のアメリカカンザイシロアリ用マイクロサテライト遺伝子座増幅用のプライマー対 (07S-7、28S-10、28T-12、28T18-2) を用いて PCR 増幅を行った。増幅産物の塩基長を ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer で読取り、Genetic Date Analysis を用いて解析した。

遺伝子座あたりの平均対立遺伝子数が、胴差しと垂木とともに 4 よりも大きな値となった。さらに、垂木の 1 部材では平均対立遺伝子数が 6.25 であった。2 倍体の王と 2 倍体の女王の子の集団であれば、遺伝子座あたりの対立遺伝子数は最大で 4 となるので、胴差しには 3 頭以上の生殖虫の存在が、垂木には 4 頭以上の生殖虫の存在が示唆される。しかし、実際に被害部材から採集された生殖虫の数は、胴差しでは 0 頭、垂木では 2 頭であった。擬職蟻を採集した被害部材に隣接する他の被害部材に生殖虫が生存していること、また 1 対以上の生殖虫ペアが存在しコロニーの融合が起こっている可能性があることが推測された。

##### (3) ホウ素化合物を用いたアメリカカンザイシロアリ防除法

アメリカカンザイシロアリの加害箇所は、小屋組や軸組に多くみられた。これらの部材は、土台 (コンクリート基礎と接触する木材) など地盤に近く常に湿気にさらされる部材と異なり、雨漏りなどがなければ水と接触することはない。この様にアメリカカンザイシロアリの主な加害対象が、通常では屋根や外壁板などによって風雨から遮断され、同時に地面に直接触れない建築用材であるため、水溶性の無機化合物を用いた防除あるいは駆除の可能性が考えられる。蒸気圧の低い無機化合物である八ホウ酸二ナトリウム四水和物 (DOT: disodium octaborate tetrahydrate) と四ホウ酸二ナトリウム十水和物 (硼砂、borax: disodium tetraborate decahydrate) の、経皮および経口投与によるアメリカカンザイシロアリに対する効果を検討した。また、経口投与の際、吸水性材料であるポリアクリル酸ナトリウムとこれらのホウ酸塩水溶液の混合物を用い、アメリカカンザイシロアリの誘引することができかどうかを合わせて検討した。

経皮投与した場合には、DOT を 10,000 mg/kg 塗布すると 9 週目に擬職蟻が全滅するケースが観察された。1,000 mg/kg 塗布では 20 週後も擬職蟻が全滅することはなかった。一方、硼砂を塗布した際には、10,000 mg/kg と 1,000 mg/kg 処理ともに 20 週間経過後も擬職蟻の全滅は観察されなかった。イエシロアリやヤマトシロアリなどミゾガシラ

シロアリ科のシロアリは、互いに他個体の表皮を舐めたりかじり取るグルーミング行動をとるため、個体の表面に薬剤を塗布すると他個体に取り込まれ効力が発揮されるが、アメリカカンザイシロアリでは、このグルーミング行動が弱く、個体表面に塗布した DOT や 硼砂 という薬剤の伝搬効果が不十分となった可能性が考えられる。

経口投与では、DOT 水溶液と硼砂水溶液をポリアクリル酸ナトリウムに添加し調製した混練物を擬職蟻の飼育容器に設置することで薬剤を摂取させた。DOT と硼砂を投与した際、一部は死亡したが、10 週間経過後にも全滅は観察されなかった。硼砂を経口投与し死亡した擬職蟻を回収し、体内に取り込まれたホウ素量を ICP-MS で定量した。なお、DOT 投与により死亡した擬職蟻は体の一部が他個体に共食いされ損傷したため、回収と分析を行わなかった。対照実験として、DOT あるいは硼砂を投与し 10 週間生存していた擬職蟻と無処理の擬職蟻についても同様の実験を行った。硼砂投与により死亡した個体のホウ素含有量は 13 mg/kg、生存していた個体のホウ素含有量は 36 mg/kg、DOT 投与により生存していた個体のホウ素含有量は 10 mg/kg であった。無処理の個体のホウ素含有量は 1 mg/kg であった。このように、硼砂を経口投与した場合、生存個体のホウ素含有量は死亡個体の約 3 倍であり、硼砂による殺蟻効果と摂取量との間に比例関係は認められなかった。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

板倉 修司、岡崎 昌也、山田 晋太郎、田中 裕美、国内で採集されたアメリカカンザイシロアリのコロニーの関係、第 64 回日本木材学会大会、2014 年 3 月 15 日、愛媛大学 ( 愛媛県 )

板倉 修司、山口 貴寛、福田 真人、アメリカカンザイシロアリに対するホウ酸化合物の効果、第 25 回日本環境動物昆虫学会年次大会、2013 年 11 月 16 日、神戸大学 ( 兵庫県 )

板倉 修司、岡崎 昌也、山田 晋太郎、田中 裕美、アメリカカンザイシロアリのコロニー構造について、日本木材保存協会第 29 回年次大会、2013 年 5 月 28 日、メルパルク東京 ( 東京都 )

板倉 修司、吉村 剛、森 拓郎、Emiria Chrysanti、築瀬 佳之、大村 和香子、アメリカカンザイシロアリのコロニーは簇出

( budding ) で広がるのか、日本木材保存協会第 27 回年次大会、2011 年 5 月 27 日、メルパルク東京 ( 東京都 )

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

板倉 修司 ( ITAKURA, Shuji )

近畿大学・農学部・教授

研究者番号： 6 0 2 5 7 9 8 8

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：