情報化学物質としての機能面に着目した昆虫体表炭化水素研究 —活性評価の重要性と抽出・分析手法における留意点—

秋野 順治*・山岡 亮平

京都工芸繊維大学大学院化学生態学研究室

Sample Preparation for Analyses of Cuticular Hydrocarbons as Semiochemicals. Toshiharu AKINO* and Ryohei YAMAOKA Chemical Ecology Laboratory, Kyoto Institute of Technology; Matsugasaki, Kyoto 606–8585, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 56: 141–149 (2012)

はじめに

昆虫の体を支える外骨格の表面: 体表面はワックス成分によって覆われている。このワックスは、クチクラワックス (体表ワックス) と呼ばれ、昆虫の体を乾燥から保護する機能を担う。また種によっては、種間・種内でのコミュニケーションツール: 情報化学物質としての機能も担う。例えば、ハエ目昆虫やコウチュウ目昆虫では、雌雄が出会ったときに互いを同種の異性であると確認するための同種識別・性識別シグナルとして作用する (Ferveur and Cobb, 2010)。また、社会生活を営むアリやハチ・シロアリのような真社会性昆虫では、血縁関係にある巣仲間個体を異種や同種でも非巣仲間個体から識別するためのシグナルとして機能する (van Zweden and d'Ettorre, 2010)。そればかりではなく、巣内に同居する各個体の発育段階や労働分業状況などの把握にも関与する (Liebig, 2010)。いずれの場合も、体表ワックスは触角などの受容器官によって直接接触することで受容・認識されており、それぞれの生理活性の発現に体表ワックス中の主要成分である長鎖炭化水素類の関与が疑われている。

体表ワックス中に含まれる長鎖炭化水素: 体表炭化水素 (Cuticular hydrocarbons: CHC) は、一般にその総炭素数が 23 以上の難揮発性成分から構成されており、昆虫の体表面をヘキサンなどの無極性有機溶媒で洗い流すことによって抽出することができる。その組成は、直鎖不飽和炭化水素 (アルケン, アルカジエンなど), 直鎖飽和炭化水素 (n -アルカン), 分枝飽和炭化水素 (モノメチル, ジメチル, トリメチルアルカンなど) に大別することができる。これらの各成分をどのような組み合わせで保持するのかは昆虫

の種毎に異なっており、そのため CHC には種特異性が認められる。CHC 組成上の種特異性を規定する要因は紛れもなく CHC 各成分の生合成に関わる酵素群であるが、それらの酵素群を規定しているのは遺伝情報である。従って、CHC の種特異性は遺伝的形質のひとつと考えることができる。このような観点に基づくのが化学分類 (Chemotaxonomy) であり、形態形質では顕著な差異が認められないような姉妹種や類縁種の判別時に、それらの CHC 組成を分類指標として活用しようとするものである。実際に、そのようなアプローチは有効な手段であり、形態分類や遺伝子配列に基づく分類の結果と齟齬をきたさないことが複数の昆虫種において確認されている (Bagnères and Wicker-Thomas, 2010)。

昆虫 CHC の組成の種特異性が広く認識されるようになり、さらに詳細な比較がなされるようになった結果、同一種内の個体間における CHC 組成多型の存在が明らかになってきた。その一つが、CHC 組成の性的二型である。これは雌雄間で CHC 組成に違いが見られるというもので、各性に特徴的な CHC 成分が種内における雌雄判別に寄与する可能性が示唆されている。つまり、両性に共通する成分が同種性の識別因子として、性特異的な成分が雌雄識別因子や配偶行動解発因子として、それぞれ機能するものと考えられている。このような事例の詳細な検証は、ショウジョウバエ (Ferveur and Cobb, 2010) やカミキリ類 (Yasui, 2009) に詳しい。しかし、CHC 組成の多型は性的二型にとどまらない。真社会性昆虫類においては、発育段階や性的成熟段階・労働階級間で CHC 組成に多型が認められており、それぞれ発育段階の識別、性的成熟段階の識別、労働階級の識別に寄与する情報を担うことが示唆されている

* E-mail: t-akino@kit.ac.jp

2012 年 4 月 23 日受領 (Received 23 April 2012)

2012 年 6 月 4 日登載決定 (Accepted 4 June 2012)

DOI: 10.1303/jjaez.2012.141

(Liebig, 2010).

CHC 研究のこのような広がりをうけて、近年は多種類の昆虫における種内交信での体表ワックス、とりわけ CHC の機能が改めて注目されている。それらの経緯や関連分野の研究成果は、“Insect lipids” (Stanley-Samuelson and Nelson, 1990) や “Insect Hydrocarbons” (Blomquist and Bagnères, 2010) に詳しくまとめられている。また、その種特異性の基盤となる酵素や遺伝的背景についての検証もはじまっている (Bagnères and Blomquist, 2010)。

同様の傾向は日本国内でも認められ、近年では、情報化学物質としての機能に着目した昆虫の CHC に関する研究はわずかながらに増加傾向にある。これに貢献する要因の一つとして、分析機器：ガスクロマトグラフ (GC) やガスクロマトグラフ直結質量分析装置 (GC-MS) の普及が挙げられる。各機器の取扱いの簡便化や、大型プロジェクトの推進によって、各研究グループ単位での装置導入が促進された影響は大きい。いずれにしても昆虫 CHC 研究の裾野が広がることには大きな利点があり、昆虫種内・種間での情報交信における CHC の役割について議論が深まるのは望ましいことである。しかしその一方で、誤った認識が広がりつつある恐れがある。それは、“CHC 分析では、対象昆虫をヘキサンに浸漬して得られた抽出物を分析すればよい”、“GC 分析にさえかければ、「容易」に「CHC」のガスクロマトグラムが得られる”、“特に、オートサンプラーを併用すれば自動的に大量の「CHC」に関するデータが得られる”、“CHC 成分の同定は GC-MS のデータベースを検索すれば「簡単」に「同定」できる”といったような“認識”である。確かに、簡易な抽出操作と安易な分析によっても「何らかの」クロマトグラムは得られるし、分析装置の自動化によって大量にガスクロマトグラムも得られる。さらには、それらのデータを解析すれば、「個体間差」や「種間差」に寄与していそうな成分の「推定」もできる。実際に、ガスクロマトグラムを比較することで、雌雄識別やカスト識別などの生物現象に対応するであろう個体間差や、それに寄与するであろう CHC 成分を検証しようとするような試みは少なくない。ところが、CHC に関する解析がクロマトグラム上での類似性あるいは相違性に関する議論のみに終始してしまうと、CHC が実際に情報化学物質として機能しているか否かについての検証がおろそかになる恐れがある。なによりも、各研究対象において分析・議論の対象にされている「CHC」が、真に“炭化水素”成分かどうかさえも疑わしい場合も少なくない。

本稿では、情報化学物質としての機能面に着目した昆虫 CHC の研究を進めるにあたって、CHC に関連した生物現象を理解しようとする場合に留意すべき問題点と、実際の抽出や分析の手法について留意すべき問題点の 2 つについて検証することを目的としている。研究対象として着目し

ている個体間相互作用が炭化水素成分によって解発されることを確認すること (生物検定) の必要性、CHC 成分の抽出と分画、分析と構造推定にかかわる留意点について順に議論したい。

どのようにして生物検定法を確立するか —活性評価の重要性—

CHC に限らず生理活性物質を研究するにあたっては、まず解決しなければならない最重要課題がある。それは、対象とする生理活性を的確に評価できるような生物検定法を確立することだ。その活性評価法が確立できなければ、対象とする現象が生理活性物質によって引き起こされていることを証明することができない。またさらに、各種クロマトグラフィーを駆使することによって生理活性成分を分離したとしても、活性成分を含む画分を特定することはできないし、その活性成分の化学性状を同定することもできない。すべては適正な生物検定法の確立にかかっているといっても過言ではない。

確立した生物検定法によって得られた結果に基づいて、(1) 対象とする生理活性は化学物質によって解発されること、(2) その化学物質が炭化水素であること、の 2 点を証明する必要がある。これらの点がクリアされなければ、CHC に生理活性があるとはいえない。仮に、研究対象とした生理活性が炭化水素以外の成分によって解発されているのだと考えれば、その生理活性に絡めて CHC の類似性や相違性について議論・考察を重ねることの無意味さは理解しやすい。そのような場合になされるべきことは、活性を持たない CHC の詳細な解析ではなく、本来の活性成分の探求であるはずだからだ。

それでは、情報化学物質としての活性評価を目的とする生物検定法を確立するには、どのような点に留意すればよいのだろうか。まず、その背景となる現象を的確に把握すること、そして対象とする指標行動を選抜することが必須である。そのためには研究対象とする生物現象をしっかりと観察する必要がある。そのようにして選抜した指標行動をもとに、それが化学物質によって解発されることを適切に評価できるような検定法を創案することになる。検定法は、過去の類例を参照して考案することも可能であるが、万能な方法というものとは存在しない。個々の事例に応じた工夫が求められる。たとえば、キボシカミキリの性フェロモンの同定を目指した研究では、(1) 配偶行動のシークエンスを詳細に調べた上 (Fukaya and Honda, 1992) で、(2) 一連の配偶行動の中から、性フェロモンに対して雄が反応したと判断できる決定的な行動 (この場合、雄による雌へのマウンティングと腹曲げ行動) を指標行動として抽出し、(3) 指標行動が化学刺激によって解発されることを証明するための生物検定法—カミキリ大程度のゼラチンカプ

セルをダミーとして用い、その表面に雌由来の化学物質などを処理して雄に提示したときに発現する指標行動を比較することで性フェロモン活性を評価する検定法—を開発したことによって、初めてその活性成分の同定 (Fukaya et al., 1996) が可能になった。近縁種のゴマダラカミキリの性フェロモン同定においても同様の方法が利用されているが、実際の研究にあたってはゴマダラカミキリの反応特性に応じて用いられたダミーが黒色の俵型ガラス球に変更されている (Yasui, 2009)。これらの研究では、いずれも、(4)CHC がフェロモンの活性本体であることの直接証明—活性成分として同定したCHC成分を化学的に合成し、その合成物がカミキリムシ由来のCHC同等に性フェロモン活性を示すことを確認する—も行われている。

真社会性昆虫の同巢識別フェロモンの研究においても、同様のアプローチがなされている。つまり、(1)同巢識別に関わる行動を詳細に観察し、(2)一連の行動の中から、同巢識別反応と判断できる決定的な行動 (大顎で噛み付き、腹部を曲げて相手に向けるなど) を指標行動として抽出し、(3)指標行動が化学物質によって解発されることを証明するための生物検定法を確立し、(4)その検定法に基づいてCHCに同巢識別活性があることを証明し、(5)CHCの組成や組成比の比較分析・解析を行う—という一連のステップが踏まれている。その行動評価にあたっては、どのような素材のものを検定用のダミーとして用いるかが重要な懸案事項だといえるだろう。まず、対照区では攻撃行動は認められないものを探す必要がある。その上で、検定試料であるCHCを処理した場合、同巢由来のCHCでは攻撃行動が解発されないが、異巢由来のCHCでは解発されるというような性質をもつ素材を選ぶ必要がある。これらの条件を満たすような検定系が確立できれば、生体由来のCHCに (厳密に言えば、体表ワックス抽出物の炭化水素画分に) 同巢認識活性があることを示すことが可能になる。多くの論文は、この段階までの証明をもってCHCが特定の生理活性を有すると論じている。しかし、確実にCHCが同巢識別フェロモンであることを証明するためには、その活性成分を人為的に調製した場合でも同等の活性が再現されることを確認する必要がある。ところが、一般にCHC組成が複雑であるため、その組成を再現するのは容易ではなく、最終的な確認作業を行うのは非常に困難である。アリ類では、CHCの構成要素が単純なクロヤマアリをモデル生物として用いることによって、この問題点が解決された (Akino et al., 2004)。それによって、体表ワックス中に含まれるCHCこそが同巢認識フェロモンとして機能することが証明されている。同様にCHCのフェロモン活性を直接に証明しようとする試みは他のヤマアリ *Formica execta* でも行われている (Martin et al., 2008) が、多くのアリではCHC組成の複雑さから合成炭化水素

による再構築ができない場合がほとんどである。

CHCの活性評価のみならず、検証対象の行動がフェロモンによって解発されることを証明しようとする場合には、共通して、無生物の検定用素材 (ダミー) を用いることが多い。これは、それによって、生物体に由来する視覚刺激や触覚刺激から切り離して、化学刺激の関与を強く示すことができるからである。また、生理活性を的確に評価できるような検定素材を見出すことができれば、そのサイズや形、色などの物理的刺激と、フェロモンのような化学刺激との協調作用についても検証することが可能になる。

CHC 試料の抽出と分画、そして保管 —操作における留意事項—

同巢識別やカスト識別、タスク識別の活性成分としてCHCに着目する場合、それらの活性が確かにCHCによって解発されることを確認する必要がある。そのためには適した生物検定系を確立するのがまず必須項目であることは先に述べたとおりである。そのような検定系が確立できたとして、次に留意すべき点は、研究対象とする活性成分が本当にCHCであるといえるだけの根拠を提示することだ。

少なからぬCHC研究が、対象昆虫の体をヘキサンに浸漬することで得られた抽出物をCHC成分とみなしている。その結果、粗抽出物の活性を検証することで“CHC”が活性本体であると判断し、その成分分析や組成比の比較・解析が進められている。ところが、その根本にある仮定: “[虫体のヘキサン浸漬抽出物] = [CHC]” という等式は疑ってかからなければならない。その理由は、至極当然で、第一に昆虫の体表ワックス成分には炭化水素以外の成分も含まれることが挙げられる。後述するガスクロマトグラフ分析で検出される成分に着目すると、多くの昆虫種の体表ワックス成分における量的な主成分は炭化水素類である。しかし、詳細に分析すると炭化水素以外の成分も少なからず含まれることがわかる。もとより、ヘキサンは炭化水素のみを選択的に抽出するわけではない。抽出に供した昆虫の状態によっては、ヘキサンに浸漬したときに、積極的に分泌物を放出することもあるだろうし、口や肛門などの開口部から様々な物質が抽出されてくる可能性もある。それらがいずれも極微量で、炭化水素量とは比べ物にならなかったとしても、こと生理活性を対象としているのであればその存在を無視することはできない。なぜならば、一般にフェロモン成分はpg (ピコグラム) やfg (フェムトグラム) のレベルで生理活性を示しうるからである。つまり、昆虫の体表ワックスの粗抽出液にフェロモン活性が認められたとしても、それがすなわち、量的な主要成分であるCHCが活性成分だと示唆するわけではない。

1. 抽出と分画について

CHCの抽出には、多くの先行研究にならって、炭化水

素系溶剤のヘキサン (nC_6H_{14}) やペンタン (nC_5H_{12}) を用いることが多い。極性を示す有機溶媒のジクロロメタンや酢酸エチル、アセトン、ジエチルエーテルでも、CHC を抽出することはできるが、それに加えて体内組織や体液に含まれる高極性の脂質成分なども併せて抽出してしまう可能性が高く、好んでは用いられていない。そのため、「CHC」をできるかぎり「選択的に」抽出しようとして、比較的抽出力が弱い炭化水素系の有機溶媒が用いられるのである。しかし、その浸漬時間によっては、アルデヒドやケトン、エステル類をはじめ、アルコールや脂肪酸であっても抽出される。そのため、抽出のための浸漬時間や炭化水素成分の分離・精製法については考えておく必要がある。

Yamaoka (1990) は、情報化学物質としての機能解明に先立って、クロヤマアリの体表炭化水素を効率よく抽出する条件を検証している。そのために、ワーカーをヘキサンに浸漬する時間を変化させ、ヘキサンに抽出される成分組成と、虫体のすりつぶし抽出によって得られる成分とを、それぞれ薄層クロマトグラフィーで比較した。それによれば、ワーカー虫体をヘキサンに5分浸漬抽出すれば体表炭化水素をもっとも効率よく抽出できるが、それ以上に長時間浸漬すると体内成分由来の極性脂質：トリグリセリドなども抽出されてきてしまう。この予備実験をもとに、クロヤマアリを5分間ヘキサンに浸漬したのち、その抽出液を分画して炭化水素成分を得る—というクロヤマアリのCHC分析のプロトコールが確立された。このプロトコールはクロヤマアリサイズのアリのCHCを精製するときの一指標になりうるが、汎用的なものではない。なぜならば、体表ワックス層の厚さや体内成分の易溶性は、研究対象となる昆虫種によって異なることが予期されるからだ。従って、本来ならば、CHCを効率よく抽出・精製するため、Yamaoka (1990) と同様の検証を各対象昆虫種において実施するほうがよいだろう。仮にそのような検証の過程を省くとしても、深慮なく不必要に抽出時間を延長することは避けるべきである。

このようにして得られた体表ワックス抽出液は、研究対象とする生理活性が炭化水素成分によることを確認するのが狙いであれば、炭化水素成分を分離・精製するためになんらかのクロマトグラフィー手段を講じる必要がある。一般には、シリカゲルやフロリジルを用いたカラムクロマトグラフィーがよく用いられる。例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいてヘキサン・エーテル（あるいはヘキサン・ジクロロメタンなど）の混合溶媒系を用いて、必要十分量のシリカゲルで分画すれば、炭化水素成分はヘキサンによってカラムから溶出されてくる。他方、炭化水素以外の極性を有する成分はヘキサンで溶出されことなく、エーテルやジクロロメタンなどの溶媒の比率を高めた場合にのみカラムから溶出されてくる。このようにし

て、体表ワックス粗抽出液から炭化水素成分と極性成分とを分画する。

2. 試料の取り扱いについて

いずれの場合においても、有機溶媒を用いるときには、プラスチック製のピペットやチップの使用は避け、ガラス製のピペットやキャピラリーを用いる必要がある。一般の生化学実験で使用する水系溶媒を扱う場合とは異なり、有機溶媒を吸い上げたピペットやキャピラリーは常時垂直に保持するように注意したい。これは、それらを大きく傾けると、吸い上げのために使用しているスポイトヘッドの内部に溶媒が入り込んでしまう恐れが高く、それによって試料溶液中への異物混入を引き起こすことがあるからだ。使用履歴が不明瞭な古いシリコン製・ゴム製のスポイトヘッドは用いないほうがよい。また、それぞれに用いる有機溶媒への不純物の混入にも注意をはらう必要がある。使用するガラス器具類についても、あらかじめ油汚れを入念に洗浄した上で、実験に用いる有機溶媒で共洗いしてから使用するのが望ましい。

有機溶媒についても、その操作過程で不純物が混入しないように注意したい。基本的には溶媒瓶にはピペットなどを直接入れることは避け、栓付三角フラスコなどに適宜必要量をわけとって使用するようにしたほうがよい。ジエチルエーテルのように酸化を防止する目的であらかじめ酸化防止剤 (*t*-ブチルヒドロキシトルエン: BHT) が添加されている場合もあるが、いずれにしても、必要に応じて溶媒への不純物混入について確認すればよいだろう。あらかじめ、分画操作などで用いるのと同程度の溶媒のみを濃縮してガスクロマトグラフ分析に供すれば、不純物混入の程度を知ることができる。有機溶媒の濃縮には窒素ガスや減圧式エバポレーターが利用されるが、特にエバポレーターを利用する場合にはその管内に処理している真空グリースの混入にも気を配る必要がある。正しいエバポレーターの取扱ひ方を確認しておくとういだろう。

上記の点をふまえた上で、微量試料を取り扱うにあたっては、先立って試料を添加せずに、その抽出から分画、濃縮までの一連の行程操作の全てを実施しておくとういだろう。それを対照実験とすれば、一連の操作のどの段階で不純物が混入する恐れが高いのかを知ることができる。これらの留意点については、学術誌に掲載される研究論文に記載されることはないが、初めてCHC分析に取り組もうとするときには知っておきたい事項である。

3. 試料の保管について

このようにして得られた抽出液もしくはCHC分画物は、GC分析に供するときまで冷凍庫などで保存・保管されることになる。ところが、その時点でもうっかりすると不純物混入を引き起こすことがある。そこで、保管時の留意点についても触れておきたい。CHCを抽出・分離するため

に有機溶媒を用いているので、プラスチック製品を避け、ガラス器具類を用いてきたにも関わらず、その保存・保管時に、例えばプラスチック製の容器やビペット、あるいはマイクロビペットを使用したり、パラフィルムを用いて封をすることが存外に多いようだ。これらの素材はいずれも有機溶剤に対する耐性が低く、不純物混入の原因になるので、その使用は避けるべきだ。スクリュースバイアルなどを用いる場合には、有機溶剤に耐性を示す PTFE などのテフロンが処理されたセプタムが、そのキャップ（蓋）の内側に正しく装着されていることを確認したい。また正しく装着されていても、キャップを必要以上に締めすぎないことも大切だ。

対象昆虫を生かしたままでの CHC の分析と留意点

昆虫個体の CHC を抽出する場合、前述したように、虫体を有機溶媒に浸漬する溶媒抽出法をとることが多い。しかし、その場合には通常抽出対象とした個体は死んでしまう。そのため、この抽出法は、継続的に同一個体の CHC 組成変化を検証するには不向きである。これに対して、1990 年代後半から CHC 抽出に用いられるようになった固相マイクロ抽出法 (SPME: Solid Phase MicroExtraction 法) は、抽出操作を行っても対象個体が死なないことから、継続的な CHC 組成変化の検証に有効な抽出手法である。SPME 法は、分配吸着剤を固定したガラスファイバーで対象個体の体表ワックスをこすり取る抽出法で、目的化合物の性状に応じて複数種類のファイバー（吸着剤）が用意されている。ただし、SPME 法は定性的な分析に威力を発揮するが、その定量性には難があると指摘されていることは留意しておく必要があるだろう。

SPME 法の利点は、特別な注入装置を導入しなくとも、ファイバー上に吸着した成分をガスクロマトグラフ分析にかけることができる点にもある。そのため、抽出から分析の過程を簡便に行うことができる。ただし、いずれの吸着剤ファイバーを用いたとしても、炭化水素成分のみを選択的に吸着するわけではない。したがって、その分析で得られたガスクロマトグラム上のピークの全てが炭化水素であるとは限らない。ファイバーに吸着された体表ワックス成分をあらかじめ有機溶剤で脱着して炭化水素成分を分離することもできない。そのため、別途溶媒抽出法などを併用することによって、あらかじめ検出されるピークのいずれが炭化水素成分であるのかを確認しておく必要がある。これらのメリット・デメリットを踏まえた上で活用すれば、SPME 法は CHC 分析の有力な手段となるだろう。

また近年になって、従来の方法とはまったく異なる体表ワックス抽出法が Roux et al. (2009) によって提唱された。それは、対象とする昆虫を人肌に温めた蒸留水中に漬

けて攪拌振とうすることでその体表ワックスを抽出する方法である。この方法であれば、抽出媒体が水であることから、実験対象の昆虫は必ずしも死に至ることはない。うまく活用できれば、CHC 組成の継続的な変化を知るための有効な手段となりうる。提唱者である Roux et al. (2009) は、複数個体のオオアリの一度の抽出対象として検証しているが、その体表ワックスが抽出されること、およびその一連の操作を経ても対象としたオオアリが死なないことを確認している。鈴木ら（私信）は、日本産トゲオオハリアリを用いてその追試と条件検証を行い、一定温度の水に入れて一定振動数で振騰すると、ワーカー 1 個体からでも CHC 成分を水で抽出できることを確認した。しかし、その CHC 組成比は、従来の有機溶媒抽出法で得られる CHC 組成比と若干異なっており、特定の成分の抽出効率が著しく低くなる傾向を認めている。抽出手法によって CHC 組成比に差異が生じる原因については解明できていないが、これについてはさらに検証を深める必要がありそうだ。また、この一連の操作によってトゲオオハリアリは死ななかったが、同様の操作をクロオオアリに対して行ったところその多くが死亡することも確認されている。そのため、水中で攪拌されることに対する耐性はアリの種によって異なっていることが予見される。その適用にあたっては、対象とする昆虫種の水抽出操作に対する耐性の確認と、従来の溶媒抽出法で得られる CHC 組成比との差異についてあらかじめ比較検証を行っておく必要はあるが、個体別に体表ワックス組成の経時的変化を解析したいような場合には水抽出法が有効な手法の一つになりそうだ。ただし、この場合においてもやはり抽出されてくる成分が炭化水素のみとは限らないため、特にその生理活性成分候補として CHC に的を絞って検証するならば、抽出物から炭化水素成分を精製する操作を挿入する必要がある。

CHC の分析と留意点

抽出・分離した CHC の組成や組成比を調べるには、得られた CHC 試料を GC 分析ならびに、ガスクロマトグラフ直結質量分析 (GC/MS 分析) に供する必要がある。いずれの場合でも、試料は GC 装置の注入口部分にある気化室内において高温条件下で気化されて、化学的に不活性なヘリウムガスをキャリアーとし、成分分離用の分析カラム：キャピラリーカラムに導入される。試料内の各成分は、カラム内壁に処理された固定相液体と移動相のヘリウムガスとの間で気液分配を重ねることによって、細かく分離される。このようにして得られたガスクロマトグラムを検証することによって、生物種間あるいは同種内個体間での CHC 組成や組成比の比較が可能になる。

FID 検出器は、その検出感度が高いために注入した試料量あたりナノグラム単位の含有量でも成分を検出すること

ができる反面、分離された成分は全て燃やされてしまうためにそれぞれの化学構造を知る手がかりは少ない。そのため、ガスクロマトグラムで検出されたピークをみるだけでは、それぞれが炭化水素であるのか否かを判定することはできない。前述したように、分析を行う以前に、試料に対して適切な前処理を施し、あらかじめ炭化水素成分を分離しておくことが必須となる。

GC/MS 分析では、FID 検出器のかわりに、質量分析計を検出器として利用する。そのため GC 部で分離された成分のそれぞれについて、構造情報を与える質量スペクトル（マススペクトル）を得ることができる。このとき得られるクロマトグラムは、検出範囲に指定した質量をもつイオンの総量変化として表記されることから、トータルイオンクロマトグラム (TIC) と呼ばれる。また、特定の質量（正確には電荷あたりの質量）をもつイオン量の変化のみを解析することも可能で、そのようにして描いたクロマトグラムをマスキロマトグラムという。汎用化されている四重極型 MS を含め、いわゆる走査型の質量分析機で検出した場合のクロマトデータは、経時的にみると断続的なデータである。そのため、連続的なデータが得られる FID-ガスクロマトグラムとは、多少分解能が異なることに留意する必要がある。

CHC を分析するにあたっては、GC 分析・GC/MS 分析のいずれにおいても、試料をカラムに導入する試料注入法に気を配る必要がある。通常、試料注入は Grob タイプのスプリット・スプリットレス注入法によることが多い。この注入法では、溶液試料を試料導入部に当たる気化室内で高温条件によって気化させ、気体状態になった試料成分を分離カラムに導入する。そのため、概して気化しにくい高沸点成分は、シリンジ内もしくは気化室に残ってしまい、分離カラムへの導入量が不十分になってしまうことが知られている。昆虫の CHC 成分を例に挙げると、多くの種で一般的にみられる主要成分は通常炭素鎖長が 23～33 程度である。このうち、炭素鎖長が 30 以上の炭化水素成分はそれよりも炭素鎖が短い炭化水素成分と比べると、カラムへの導入効率が低い。その導入効率は、試料注入口気化室の設定温度を高くすれば多少は改善されるものの、炭素鎖長が長くなるにつれて著しく低下する (Grob, 1987)。そのため、高沸点の長鎖炭化水素を含む試料の分析には、溶媒効果を使った一般的な Grob タイプのスプリット・スプリットレス注入法は適していない。この注入法で分析すると、高沸点成分の成分組成比が本来の成分組成比を反映しない恐れが強いからだ。

CHC 分析時における適切な試料注入法の重要性 —例をあげて—

クールオンカラム注入法は、先に挙げたような問題点の

解決法として提唱され、現在広く用いられている試料注入法である。この試料注入法だと、高沸点成分を含む試料は、溶液のまま直接低温に保たれた分離カラム内に注入される。試料は、その後急速に加熱されることで気化し、キャリアガスに移送されながら分離カラム内でのクロマトグラフィーが行われる。前述のスプリット・スプリットレス注入法による分析の場合とは異なり、高沸点成分であってもカラムへの導入効率が大きく損なわれることはない。そのため、高沸点成分を含むような試料でも元の成分組成比を大きく歪めることなく分析できる (Grob, 1987)。また、試料注入時の温度が低温であることから、熱によって分解や構造変化を起こしやすいような成分の分析にも効力を発揮する。ただし、使用する GC 装置がオンカラム注入専用の注入口を備えていなければならず、また試料が全量注入されるためにカラムへの負担も大きい。現時点では、スプリット・スプリットレス注入法ほど汎用的に用いられてはいないのが実情である。

しかし、対象種がもつ CHC の鎖長によって適切な試料注入法を選択しなければ CHC 組成比に大きな歪みを生じ、その解析上重篤な問題となることが報告されている。たとえば、ケズネアカヤマアリ *Formica truncorum* は、その CHC 組成が単純であること、同巢識別フェロモンとして CHC が機能するらしいことから、ヨーロッパを中心に同巢識別フェロモン成分の遺伝的制御要因の解明を目指す実験昆虫として用いられていた (Nielsen et al., 1999)。ところが、報告されていた CHC の分析条件は総炭素数 30 以上の高沸点成分を想定していないものであった。しかし、Akino (2006) は、他種のアカヤマアリ類の CHC を予備的に分析したところその主要成分が C30 以上の高沸点成分であったことから、ケズネアカヤマアリの CHC 組成についても再解析する必要があると考えた。そこで実際にその再解析を行ったところ、報告されている GC 条件で分析すると単純な CHC 組成を示すガスクロマトグラムが得られるのだが、クールオンカラム注入法で高沸点成分分析用カラムを用いて分析すると、直鎖飽和炭化水素ではなくメチル側鎖を複数有する長鎖分枝炭化水素（高沸点成分）がその量的な主成分であることが明らかになった。この Akino (2006) の報告以前には、CHC 組成の単純さを理由にケズネアカヤマアリをモデル生物としてアリにおける CHC の類似性やその遺伝制御に関する解析が幅広く進められ始めていたのだが、CHC 組成がそれ以前に報じられていたものと大きく異なっていたため、それらの研究の全てが根拠を失ってしまった。その影響は甚大で、2000 年以降、ケズネアカヤマアリの CHC 組成を基盤とした遺伝的検証に関する研究報告は激減した。このように議論の根幹である CHC 組成に疑いが生じると、その上に積み上げた議論は一夜にして瓦解する恐れがある。従って、対象とする生物

の行動反応に基づいて議論展開するのではなく、GC の分析結果に基づいて CHC の機能や類似性を議論するような場合、少なくともその分析にあたっては、(1) 解析対象として着目した成分は本当に CHC なのか、(2) 選抜した CHC 成分が適切な組合せであるか、(3) その分析条件は適切なものか、の 3 点について事前の確認が必要である。対象種の CHC 組成が明らかでない場合には、現時点で最も信頼性の高いクールオンカラム注入法による分析を実施するほうが望ましい。一方、対象種の CHC 組成が明らかで、クールオンカラム注入法を用いなくとも CHC 組成比に歪みを生じないのであれば、汎用的に利用可能で、注入試料量に求められる厳密さが比較的緩やかな試料注入法：スプリット・スプリットレス注入法を用いる利点は大きいといえる。

試料注入法の選択と併せて重要なことは、分析用カラムの選定である。一般に昆虫体表炭化水素の分析には無極性のメチルシリコン系キャピラリーカラム（例えば、カラム長 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25 μm のもの）を用いるが、その分析上限温度は 330°C ほどであることが多い。また、分析条件として 300°C ほどを上限として設定していることが多い。カラム長やキャリアガス圧にも依存するため一概にはいえないが、高沸点成分の存在（あるいは不在）を確認するにはさらに高温条件までを分析範囲とするほうが望ましい。そのため、一部メーカーによるような 400°C などの高温まで分析可能な高温用カラムや、溶出時間を短縮できる膜厚の薄い専用カラムなどを用いることも考慮する必要がある。

保持指標の導入による標準化

CHC 組成比の類似性を議論するにあたって、対象としている CHC 成分の化学構造にはあまり言及せず、それぞれの成分量だけに着目している報告も少なくない。しかし、類似性を吟味する以上は、その前提条件として、複数個体から選抜した CHC 成分のそれぞれが同一成分であることを検証しておく必要がある。このような検証はデータ解析の前段階で実施されることから、論文上に掲載されているデータ（表や図）から、的確な検証がなされているかどうかを評するのは難しい。しかし、そこで述べられているデータが保持時間（Retention time）でしかないような場合には、その適切性に関する検証が不十分である恐れがある。より標準化された保持指標値の導入や、マススペクトルの確認をあわせて検証すべきであろう。

近年では GC 装置にオートインジェクター（自動注入装置）が搭載されており、試料注入時に生じる人的なばらつき因子は著しく軽減されている。また装置の制御も精密さを増しており、試料をセットすれば正確な保持時間を示すガスクロマトグラムが得られるようになった。しかし、

GC 上での保持時間は、その性質上規格標準化された測定値ではないことを理解しておく必要はあるだろう。なぜならば、所違えば、GC 分析に用いられているカラムの特性（カラム長、内径、膜厚）とその劣化程度、保持時間に影響を及ぼしうる装置設置地点の気圧などが全て同一であることは稀だからだ。Kováts (1965) は、それらの分析条件を標準化した上で保持時間に替わりうる指標値として保持指標値（Retention Index）の概念を導入した。そこでは、保持時間情報を同条件下で溶出される直鎖飽和炭化水素の炭素数に換算することによって計測実測値の標準化が実現されている。炭素鎖長等量（Equivalent Chain Length of *n*-alkanes, ECL of *n*-alkanes）も、実質的には同様のアプローチによって保持時間の値を標準化する試みといえよう。これらの標準化された保持指標値を提示された場合には、特定している成分の同一性に関する推定における信憑性が高まる。成分推定、もしくは単に CHC の類似性を述べるにとどまるにしても、標準化されたデータに基づく議論が求められる。

ちなみに、Kováts の保持指標値は、物質の構造を推定するときの手がかりをも与える（上野, 1977）。ポリエチレングリコール系などの極性カラムで分析して得られる対象成分の保持指標値から、同成分をメチルシリコン系の無極性カラムで分析して得られる保持指標値を差し引いた値： ΔI は、官能基に特有の値をとり、複数の官能基による影響は加算的に現れる。体表炭化水素の解析であれば、例えば分枝アルカンのメチル側鎖の個数や位置の推定、不飽和炭化水素であれば不飽和結合の個数や位置の推定の際に有益な情報を与える。同手法は、例えばアルコールやケトン、アルデヒド、エステルなどを含む蛾類の性フェロモンの構造推定にあたっても有効活用されることが多い。

CHC 成分の“推定”および“同定”

CHC 成分を 1, 2, 3 あるいは A, B, C とするだけではなく、その特定をも試みる場合には、保持指標値（もしくは ECL 値）と対応するマススペクトルをもとに各構造を推定することになる。ここで、同定（Identification）と推定（Estification）の相違に関しては十分な理解をしておく必要がある。「同定」は、対象としている未知化合物が紛れもなくその物質であるということを証明できたときにのみ用いられるべき用語である。CHC 成分に関わる多くの研究でなされているのは「推定」であって、「同定」ではない。例えば、不飽和炭化水素を同定する場合、不飽和結合（多くは炭素・炭素の二重結合）の位置およびその幾何異性（シス体かトランス体か）を明確にする必要がある。不飽和炭化水素類は、硝酸銀処理を施したシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーによって、飽和炭化水素類から分離することができる。二重結合を一つ含むモノエン炭化

水素であれば、分離後にエポキシ誘導体あるいは二硫化ジメチル誘導体に変換してマスペクトルを測定することによって、特徴的に現れるフラグメントイオンから、元の二重結合位置を決定することができる。二重結合を複数含むポリエン炭化水素の場合には、部分還元反応を施し、対応する複数種のモノエン炭化水素を得た後に、同様の操作により二重結合位置の決定を行う (Yamaoka et al., 1987)。さらに、それぞれに対応する二重結合の幾何異性を、赤外分光器を検出器とする GC での分析や、対応する化合物の幾何異性体をそれぞれ有機合成して GC 上での挙動の合致性を調べることで決定する。それらの不飽和炭化水素成分を単離して測定に要する必要量を確保できるのであれば、核磁気共鳴 (NMR) 分析を行い、得られる ^{13}C -NMR スペクトルや ^1H -NMR スペクトルから二重結合の幾何異性を決定することもできる。これらの手続きを経て初めて不飽和炭化水素成分は「同定」される。分枝飽和炭化水素の場合には、メチル側鎖が結合する炭素が不斉を示すため鏡像異性体を生じる。つまり、モノメチルアルカンでは2種、ジメチルアルカンでは4種の異性体が存在する。しかし、これらの異性体は互いに分離することが難しく、また選択的に一方のみを合成することも容易ではない。そのため分枝飽和炭化水素の構造に言及しているほとんどのケースが、「同定」と示されているにもかかわらず、厳密には成分推定の段階にとどまっている。

近年は解析装置の発達により、測定したマスペクトルを付属のデータライブラリで検索すれば、与えるマスペクトルの開裂パターンと高い類似性をしめす化合物名が瞬時にリストアップされる。そのリストを参照しながら、対象成分の化学構造を「推定」することが多い。しかし、それは成分の「同定」ではない。この点を混同しないようにしたい。生理活性に着目してその活性成分同定を目指すのであれば、推定構造をもつ化合物 (純度の高い物) を市販で入手あるいは有機合成し、その成分量と生理活性との相関を、天然物と比較検証することが必要不可欠である。いずれにしても、ライブラリ検索だけを根拠としても、成分を「同定」できるという勘違いはしないように心がけたい。

CHC 解析における更なる問題点

これまでに述べてきたように、本稿では、情報化学物質としての機能に着目して昆虫 CHC の研究を進めるにあたって、留意しておくべき操作上の問題点を検証してきた。研究対象とした個体間相互作用あるいは生理活性の解発因子が真に炭化水素成分であることを確認する手法 (= 生物検定) の必要性、CHC 成分の抽出・精製・保管するための操作上の留意点、目的に応じて抽出方法を選択することの重要性、CHC 成分の分析と構造推定に関する留意点について述べてきた。これらの大半が学術論文内で直接に

述べられることのない事項であるが故に、おざなりにされてしまうことが懸念される。これらは、生理活性に着目した CHC 研究を進めるにあたっては非常に重要な事項である。操作法を含めて、不明瞭な点があれば、それらを明らかにした上で研究を進めていく必要があるだろう。

CHC 研究は、その生合成過程やそこに関わる遺伝的な制御機構の解明に向けて広がりつつある (Blomquist and Bagnères, 2010)。また、昆虫種間あるいは種内のコミュニケーションにおける役割ばかりではなく、植物の生存戦略と絡めて昆虫 CHC の生態的役割や機能に言及するような研究も盛んになってきている (Vereecken and McNeil, 2010)。昆虫・植物をとわず、体の表面を覆うワックスは、それに触れたときに最初に受容されうる化学刺激であることから、遭遇時における第1段階目の認識刺激として表皮ワックスが各種行動に及ぼす影響については改めて関心をもたれるようになってきたといえる。

本稿では触れなかったが、CHC 研究においては、解析結果の解釈においてその概念を整理する必要があるものも存在している。化学的類似と擬態、隠蔽の概念がそれにあたり、単なるデータ解析だけではなく、生態的機能もあわせて考える必要がある。また、それらの複雑な多次元データを取り扱うにあたって、留意すべき事項も少なくない。CHC についての検証を行う際には、本稿で紹介した事項に加えて、それらの点についても考慮して実験系を組み立てることが大切だろう。

引用文献

- Akino, T. (2006) Cuticular hydrocarbons of *Formica truncorum* (Hymenoptera: Formicidae): description of new very long chained hydrocarbons components. *Appl. Entomol. Zool.* 41: 667–677.
- Akino, T., K. Yamamura, S. Wakamura and R. Yamaoka (2004) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as nest-mate recognition cues in *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Appl. Entomol. Zool.* 39: 381–387.
- Bagnères, A.-G. and G. J. Blomquist (2010) Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (G. J. Blomquist and A.-G. Bagnères, eds.). Cambridge University of Press, Cambridge, UK, pp. 75–99.
- Bagnères, A.-G. and C. Wicker-Thomas (2010) Chemical taxonomy with hydrocarbons. In *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (G. J. Blomquist and A.-G. Bagnères, eds.). Cambridge University of Press, Cambridge, UK, pp. 121–162.
- Blomquist, G. J. and A.-G. Bagnères (2010) *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University of Press, Cambridge, UK. 492 pp.
- Ferveur, J. F. and M. Cobb (2010) Behavioral and evolutionary

- roles of cuticular hydrocarbons in Diptera. In *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (G. J. Blomquist and A.-G. Bagnères, eds.). Cambridge University of Press, Cambridge, UK, pp. 325–343.
- Fukaya, M. and H. Honda (1992) Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). I. Male mating behaviors and female sex pheromones. *Appl. Entomol. Zool.* 27: 89–97.
- Fukaya, M., T. Yasuda, S. Wakamura and H. Honda (1996) Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). III. Identification of the contact sex pheromone on female body. *J. Chem. Ecol.* 22: 259–270.
- Grob, K. (1987) *On-column Injection in Capillary Gas Chromatography. Basic Technique, Retention Gaps, Solvent Effects*. Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg Basel, New York. 591 pp.
- Kováts, E. (1965) Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In *Advances in Chromatography 1* (J. C. Giddings and R. A. Keller, eds.). Dekker, New York, pp. 229–247.
- Liebig, J. (2010) Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status. In *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (G. J. Blomquist and A.-G. Bagnères, eds.). Cambridge University of Press, Cambridge, UK, pp. 254–281.
- Martin, S. J., E. Vitikainen, H. Helanterä and P. Drijfhout (2008) Chemical basis of nest-mate discrimination in the ant *Formica exsecta*. *Proc. Royal Soc. London B* 275: 1271–1278.
- Nielsen, J., J. J. Boomsma, N. J. Oldham, H. C. Petersen and E. D. Morgan (1999) Colony-level and season-specific variation in cuticular hydrocarbon profiles of individual workers in the ant *Formica truncorum*. *Ins. Soc.* 46: 58–65.
- Roux, O., J. M. Matin, N. T. Ghomsi and A. Dejean (2009) A non-lethal water-based removal-reapplication technique for behavioral analysis of cuticular compounds of ants. *J. Chem. Ecol.* 35: 904–912.
- Stanley-Samuelson, D. W. and D. R. Nelson (1990) *Insect Lipids. Chemistry, Biochemistry & Biology*. Nebraska Press, USA. 487 pp.
- 上野民夫 (1977) GC-MS の使い方—有機化合物の構造決定への応用—. 化学 32: 862–871. [Ueno, T. (1977) How to use GC-MS—Application to the structural determination of organic compounds. *Chemistry* 32: 862–871.].
- Vereecken, N. J. and J. N. McNeil (2010) Cheaters and liars: chemical mimicry at its finest. *Can. J. Zool.* 88: 725–752.
- Yamaoka, R. (1990) Chemical approach to understanding interactions among organisms. *Physiol. Ecol. Jpn.* 27: 31–52.
- Yamaoka, R., M. Tokoro and K. Hayashiya (1987) Determination of geometric configuration in minute amount of highly unsaturated termite trail pheromone by capillary gas chromatography in combination with mass spectrometry and fourier transform infrared spectroscopy. *J. Chromatogr.* 399: 259–267.
- Yasui, H. (2009) Chemical communication in mate location and recognition in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 14: 183–194.
- van Zweden, J. S. and P. d’Ettorre (2010) Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (G. J. Blomquist and A.-G. Bagnères, eds.). Cambridge University of Press, Cambridge, UK, pp. 222–243.
-