針葉樹精油成分が引き起こすヤマトシロアリ兵蟻の 同一コロニーの擬職蟻に対する攻撃性について

澁谷 栄^{*1}, 山田 肇^{*1}, 谷田貝光克^{*2}

Aggressive behavior of soldiers of the termite *Reticulitermes speratus* against nest-mate pseudergates induced by the exposure to essential oils of conifers

Sakae SHIBUTANI^{*1}, Hajime YAMADA^{*1} and Mitsuyoshi YATAGAI^{*2}

In this study, we examined an aggressive behavior of soldiers of Japanese subterranean termite (*Reticulitermes speratus*) against pseudergates of the same colony, when the soldiers were exposed to the essential oils from coniferous trees. We tested six essential oils from conifers, and found the essential oils from *Chamaecyparis obtusa* bogwood, *Cryptomeria japonica* heartwood and *C. japonica* leaf and *Pinus thunbergii* leaf to cause the aggressive behaviors for soldier termites. From the *C. obtusa* bogwood essential oil, we obtained active fractions by the thin layer chromatography, and recognized calamenene as the main compound to cause the aggressive behaviors. Sixteen monoterpenes as contained in some coniferous leaf were also examined in the activities of promoting the aggressive behaviors, and terpinen-4-ol showed the frequency of the behavior among the compounds.

Keywords : *Reticulitermes speratus*, soldier, aggressive behavior, conifer, essential oil

針葉樹の心材、埋木、針葉から精油を採集して、ヤマトシロアリの兵蟻と擬職蟻に曝露したところ、ヒノキ埋木、スギ心材、スギ針葉、クロマツ針葉に由来する精油に曝露した場合、兵蟻の擬職蟻に対する攻撃行動が認められたため、寄与する物質について調べた。攻撃亢進活性が認められたヒノキ埋木の精油を薄層クロマトグラフィー上で展開し、得られた画分の活性について調べたところ、calameneneがヤマトシロアリ兵蟻の攻撃行動亢進に寄与している可能性が示唆された。また、針葉樹葉油に含まれる代表的なモノテルペン類の標品を用

* 1 秋田県立大学木材高度加工研究所
Institute of wood and technology, Akita Prefectural University

* 2 香りの図書館
Aroma Library

Corresponding author : Sakae Shibutani (ssakae@iwt.akita-pu.ac.jp)

いて同様に試験したところ、terpinen-4-ol を用いた場合に攻撃行動がよく観察され、モノテルペン系の物質であっても兵蟻の攻撃性を引き起こす活性に強弱がある可能性が考えられた。

キーワード：ヤマトシロアリ，兵蟻，攻撃行動，針葉樹，精油

1. 緒言

シロアリ類は木材を食害する害虫として知られている。階層社会を持つ昆虫であり、産卵などの役割を果たす生殖階級にあたる女王と王、主に木材を加害する擬職蟻、外敵からの防衛にあたる兵蟻など外観も異なるいくつかの階層を示す¹⁾。

一方、食害される木材には、生来的な化学的防御機構の一つとして抽出成分と呼ばれる低分子の化学成分を心材などに含んでいるものもある。一般的に抽出成分を多く含有している心材では、その効果としてシロアリに対して殺蟻、忌避、摂食阻害などの抗蟻性が示される。これまでも多くの木材あるいは樹木から抗蟻性の物質が同定されてきた。例えば、全国的に広く分布しているスギ (*Cryptomeria japonica*) では、いくつかの報告がある。オビスギからは殺蟻性を持つ物質として sandaracopimarinol, 16-phyllocladanol, β -eudesmol が報告されている²⁾。また、スギ黒心材からは cubebol 類などのセスキテルペンも殺蟻活性の主要因として報告されている³⁾。このほか、ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) に対する摂食阻害物質として心材に含まれるフェルギノール、あるいはノルリグナン類であるアガサレジノールなどが報告されている⁴⁾。

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) も国内で多く利用されている樹種の一つであるがスギと同様に抗蟻性に関して、いくつか報告されている。ヒノキでは心材に含まれる α -cadinol, *T*-muurolol が原因物質として同定されたこと⁵⁾のほか、 α -terpinyl acetate が寄与していることも知られている⁶⁾。このほか、カラマツなどが含有している taxifolin などのフラボノイド類もシロアリに対する摂食阻害物質としての報告がある⁷⁾。このような心材成分は針葉樹に限らず、広葉樹などでも知られており、モッコク⁸⁾、カゴノキ⁹⁾ など、いくつかの樹種でも報告がある。

ところで、植物の二次代謝産物のうち、主にモノテルペン、セスキテルペンなどによって構成されている揮発性の高い撥水性成分は精油とも呼ばれており、これまでに挙げた cubebol 類、 α -cadinol など精油を構成する成分にあたる。大村によれば、比較的高濃度の精油（トドマツ葉油）に曝露するとシロアリ同士が噛み付き合う、あるいは錯乱になることなどが記述されている¹⁰⁾。筆者らも精油類の抗蟻性を検討する過程で、曝露中に兵蟻の擬職蟻に対する攻撃行動を認めたことがある。しかしながら、このような精油類の曝露に伴う攻撃行動の亢進にどのような化合物が寄与しているかといった化学的な情報については、これまでのところあまり知られていない。

本研究ではいくつかの針葉樹由来の精油（材油および葉油）を用いて、ヤマトシロアリ兵蟻の同一コロニーの擬職蟻に対する攻撃行動の亢進性について検討を行ったので報告する。

2. 実験

2.1. シロアリ

本研究では2012年8月に秋田県立大学秋田構内（秋田市）のクロマツ (*Pinus thunbergii*) 林にて採集したヤマトシロアリを、木材高度加工研究所内にて飼養したものをを用いた。

2.2. 精油試料

供試した精油は、クロマツ葉油、スギ葉油、スギ材油（以上、秋田県産）、ヒノキ材油（産地不詳）、アカマツ (*Pinus densiflora*) 材油（産地不詳）、ヒノキ埋木精油（静岡県伊豆地方産）の6種類の精油である。いずれも水蒸気蒸留で採取した精油を用いた。

2.3. 精油曝露による攻撃行動亢進性の判定

兵蟻の攻撃性は以下のようにして判定を行った。

小型ガラスシャーレ（円形、直径3 cm、高さ1.5 cm）に濾紙（アドバンテック製、No.2）を円

形に切り抜いたものを敷いた。この濾紙に溶媒 (*n*-ヘキサン) で希釈した精油試料が濾紙1枚当たり2.5 μ Lとなるように溶液をしみ込ませた。溶媒を2分間程度、風乾させた後、予め別の容器に採集しておいたヤマトシロアリ兵蟻1頭と擬職蟻10頭をシャーレ上に投入してシャーレの蓋を閉めた。投入後、対象の拡大観察および記録のためマクロレンズ付き1眼レフカメラ (本体: EOS kiss digital X/CANON; レンズ: MACRO 100 F2.8 D/Tokina) を通して4分間観察を行い、この間に攻撃行動が1度以上見られた場合、活性有りと判断した。ここでは、兵蟻が擬職蟻に対して自身の大顎を用いて噛みつき行動を起こしたもの (実際に擬職蟻を挟めない場合も可) を攻撃行動とした。この観察を別個体のシロアリ (兵蟻および擬職蟻) をそれぞれ用いて繰返し3回行い、兵蟻の擬職蟻に対する攻撃活性の指標とした。

2.4. 精油成分の分画

精油成分の分画はシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) によって行った。精油100 μ L相当を TLC 上に線状に担持させ、溶媒 (ヘキサン-クロロホルム = 2 : 1) で展開を行った。展開後は UV を照射してスポットの確認を行い、スパーテルでシリカゲルの掻き取りを行って回収した。回収後のシリカゲルはクロロホルムを使用して分画した成分を溶離させ、得られた溶液をエバポレータによって濃縮して画分とした。このとき、それぞれの画分が同じ体積になるように調製して、一定量を濾紙に加えたとき、分画物の含浸量が元の精油の構成量と同程度になるようにして、前述の方法と同様に攻撃性の観察を行った。

2.5. 分析

精油成分の分析には、ガスクロマトグラフィーを用いた。分析条件は以下の通りで、機種: GC-14B (島津製作所), カラム: TC-5 (GLサイエンス), カラム初期温度: 60 $^{\circ}$ C, カラム初期時間: 5分, 昇温速度: 3 $^{\circ}$ C/分, カラム最終温度: 220 $^{\circ}$ C, カラム最終時間: 42分, キャリヤーガス: N₂, 試料導入口温度: 200 $^{\circ}$ C, 検出器温度: 230 $^{\circ}$ C, 検出器: FID とした。また、成分の同定には同様のカラムおよび温度条件に設定したガスクロマトグラフィー質量分析計 (GCMS-QP5000: 島津製作所) を用いて成分の帰属を行った。

2.6. モノテルペン標品

以下のモノテルペン標品を購入して実験で使した: α -pinene, β -pinene, limonene, α -terpineol (以上, 和光純薬); *p*-cymene, terpinen-4-ol, myrcene, 1,8-cineole, camphor, borneol, linalool, α -terpinene, γ -terpinene, α -phellandrene, terpinolene, (+)-3-carene (以上, 東京化成株式会社)。

3. 結果と考察

3.1. 精油による兵蟻の擬職蟻に対する攻撃性の亢進

針葉樹の心材から得られた材油, および針葉樹の葉油を使った攻撃性の亢進について, 図1のような大顎を使った攻撃行動を示したかどうかの結果を表1に示した。ヒノキの埋木の心材から得られた精油に曝露した時の攻撃行動の発生頻度は3反復中3回と高くなり, スギ心材も3反復中2回の攻撃が観察された。また, クロマツ, スギの葉油でも2回の攻撃行動が認められた。今回の試験では, アカマツ, ヒノキの材油では兵蟻の擬職蟻に対する攻撃は観察されなかった。また, 通常のヒノキ心材から得られた精油では攻撃行動の亢進は観察されず, 埋木由来の精油では観察された。これは, 埋木の構成成分の変化あるいは違いが主な理由であると考えられる。実際, 埋木では長期

図1 同じコロニーの擬職蟻を攻撃するヤマトシロアリの兵蟻 (クロマツの葉油に曝露したとき)

Fig. 1 An aggressive behavior of the soldier against the pseudergates in the same colony of the *R. speratus* when exposed to the leaf oil from the *P. thunbergii*

表1 針葉樹に由来する精油によるヤマトシロアリ兵蟻の攻撃行動亢進性
(+++ : 3回, ++ : 2回, + : 1回, - : 観察されず/いずれも3反復中)

Table 1 The activities of promoting the aggressive behavior of the soldier of the *R. speratus* in exposure to some coniferous essential oil
(+++ : 3 times, ++ : 2 times, + : 1 time, - : none of the aggressive behavior observed)

精油 Essential oil	原材料 Source	活性 Activity
材油	アカマツ <i>Pinus densiflora</i>	-
wood oil	スギ <i>Cryptomeria japonica</i>	++
	ヒノキ <i>Chamaecyparis obtusa</i>	-
	ヒノキ (埋木) <i>Chamaecyparis obtusa</i> (bog wood)	+++
葉油	クロマツ <i>Pinus thunbergii</i>	++
leaf oil	スギ <i>Cryptomeria japonica</i>	++

の時間経過などに伴う酸化などの影響により通常の材油成分とは異なる組成を示すことが知られている¹¹⁾。なお、精油を用いた試験に先立ち、コントロールとして同様の方法で無含浸の濾紙のみ、あるいは同様の方法で溶媒しみ込ませ、同様の時間で風乾させた濾紙を用いて兵蟻と擬職蟻をシャーレに投入して観察を行ったが、兵蟻の攻撃行動は認められなかった。

3.2. ヒノキ埋木に由来する成分の分画と原因物質の検索

攻撃性を比較的強く引き起こしたヒノキ埋木の精油について薄層シリカゲルクロマトグラフィーを用いて分離を行い、展開した距離によって3つの画分を作成した(画分1 : Rf値0.8 ; 画分2 : Rf値0.3 ; 画分3 : Rf値0.2)。得られた画分をもとの希釈度から算出して濾紙に含浸させて同様の試験を行ったところ、画分1の攻撃亢進性が最も多く観察された(画分1 : 2回 ; 画分2 : 0回 ; 画分3 : 1回/いずれも3反復)。ここでは、もとのヒノキ埋木由来の精油の活性が分散したことが考えられた。ガスクロマトグラフィーを用いて該当の画分1の内容物について分析を行ったところ、クロマトグラム上で純度88%程度のピークを与える成分が得られた。この成分について GC-

MS分析に付属のライブラリー検索を用いた分析の結果、主成分はセスキテルペンの1種 calamenene (図2)であることが判った。一方、今回用いたスギ材の精油についても同様の方法で分画し、得られた画分についても同様の試験を行ったものの、分画後には攻撃行動は観察されなかった。

これまでに、スギ黒心材の抽出物から殺蟻活性の高い成分の一つとして calamenene が報告されている³⁾。今回のスギ材油にも calamenene が含まれていたが、量的には少なく、このことが、ヒノキ埋木の場合と異なった結果となった原因である可能性が考えられたものの、詳細は不明である。

図2 calamenene の化学構造
Fig. 2 Chemical structure of calamenene

3.3. モノテルペン類による攻撃行動の亢進について

今回用いた2種類の葉油にも活性が認められたので、針葉樹葉油に含まれる代表的なモノテルペンについて、標品を用いて活性を調べた。結果は表2に示した。Terpinen-4-olの曝露では3回の反復で3回とも攻撃性が観察された。3回のうち

表2 モノテルペンによるヤマトシロアリ兵蟻の攻撃行動亢進性

(+++ : 3回, ++ : 2回, + : 1回, - : 観察されず/いずれも3反復中)

Table 2 The activities of promoting the aggressive behavior of the soldier of the *R. speratus* in exposure to some monoterpenes (+++ : 3 times, ++ : 2 times, + : 1 time, - : none of the aggressive behavior observed)

化合物名 chemical compound	活性 Activity
α -pinene	-
β -pinene	-
limonene	-
<i>p</i> -cymene	-
terpinen-4-ol	+++
myrcene	-
1,8-cineole	-
α -terpineol	++
camphor	-
borneol	-
linalool	-
γ -terpinene	-
α -terpinene	+
phellandrene	-
terpinolene	++
(+)-3-carene	+

2回攻撃性を示したのは α -terpineolとterpinoleneで1回は α -terpineneと(+)-3-careneであった。なお、それぞれの化学構造は図3に記した。そのほかの、例えば α -pineneなどは今回の実験条件では攻撃行動が認められなかったことから攻撃行動の亢進性は低いのかもしれない。これらのことから、モノテルペン系の物質であっても作用の強弱がある可能性が高い。しかしながら、攻撃行動の亢進性を示さなかったほとんどのモノテルペンに曝露した場合でも、兵蟻の大顎が開く頻度が通常に比べて多くなることが観察されることから、これらの化合物も例えば葉油のような混合状態では、攻撃行動の亢進性に寄与している可能性も考えられた。なお、今回使用した2つの葉油については既に分析結果¹²⁾が報告されており、terpinen-4-ol、あるいは α -terpineolを含んでいることが判明していることから、それらの化合物が攻撃行動の主要因として寄与しているのかもしれない。

また、今回の実験では、calameneneあるいはモノテルペンアルコールなどに活性が認められる傾向にあったが、これらの物質は、殺蟻性を示すことも知られている^{3, 12)}。攻撃行動の亢進性に関して、どのような作用機序があるか今のところ不明であるが、攻撃行動に関連して錯乱などについても言及されており¹⁰⁾、シロアリの神経系に作用していることも考えられ非常に興味深い。

まとめ

いくつかの針葉樹由来の精油類によるヤマトシ

図3 各モノテルペン類の化学構造

Fig. 3 The chemical structures of the monoterpenes :

(a) terpinen-4-ol, (b) α -terpineol, (c) terpinolene, (d) α -terpinene, (e) (+)-3-carene

ロアリ兵蟻の同一コロニーの擬職蟻に対する攻撃行動の亢進性について検討を行ったところ、精油あるいは構成成分の違いにより亢進性が異なる傾向が認められた。攻撃行動の亢進性は、これまでに比較的強い殺蟻性を示すことが報告されているモノテルペンあるいはセスキテルペンとの関連性が考えられた。

引用文献

- 1) 吉村剛：“木材保存学入門（改訂3版）”，公益社団法人日本木材保存協会編，2012，pp.66-79.
- 2) 曾我部昭好，金城一彦，阿部フミ子，山内辰郎，屋我嗣良：オビスギ心材の殺蟻成分，木材学会誌，**46** (2)，124-131 (2000).
- 3) 在原重信，梅山明美，坂東真也，小武家聖哉，伊元信治，小野未架子，吉川和子，網田克明，橋本茂：スギ黒心材の殺蟻成分，木材学会誌，**50** (6)，413-421 (2004).
- 4) 狩野仁美，澁谷栄，林和男，飯島泰男，土居修一：スギ心材の抗蟻性におよぼす高温乾燥の影響，木材学会誌，**50** (2)，91-98 (2004).
- 5) 金城一彦，堂福康海，屋我嗣良：ヒノキの殺蟻成分について，木材学会誌，**34** (5)，451-

455 (1988).

- 6) 大谷慶人，狭間稔，鯨島一彦：ヒノキ材殺蟻活性の化学的決定因子（第2報），木材学会誌，**42** (12)，1228-1233 (1996).
- 7) Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M. and Ohara, S.: Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki, *Journal of Wood Science*, **46**, 149-153 (2000).
- 8) 渡辺則利，佐伯沙子，住友昌之，近藤民雄，黒鳥四朗：モッコク材の殺蟻成分，木材学会誌，**12** (5)，236-238 (1966).
- 9) 姜夏泳，鯨島一彦，高村憲男：高知県産広葉樹材の耐蟻性試験（第4報），木材学会誌，**40** (1)，64-71 (1994).
- 10) 大村和香子：シロアリの行動を操る物質，木材工業，**55** (8)，346-351 (2000).
- 11) 谷田貝光克，佐藤敏弥，山口雄三，高橋利夫：*Streptococcus mutans* に活性なヒノキ埋れ木の成分，木材学会誌，**30** (3)，240-243, (1984).
- 12) 関根伸浩，澁谷栄，谷田貝光克：針葉樹葉油の水溶性とその植物種子発芽抑制活性および抗シロアリ活性，木材学会誌，**58** (1)，44-53, (2012).

(2013.4.8 受付)

(2013.6.21 受理)