[農化 第 39 卷, 第 12 号, p. 489~494, 1965]

カイガラムシの脂質に関する研究 (第2報)

ツノロウムシのグリセリドの脂肪酸組成と真正ロウ成分

橋本 皓, 向井克憲 (大阪府立大学農学部農芸化学教室)

昭和 40 年 7 月 9 日 受理

Studies on the Lipids of Coccids

Part II. Glycerides and True Waxes in the Lipids of *Ceroplastes pseudoceriferus* (GREEN)

By Akira HASHIMOTO and Katsunori MUKAI

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture

Fatty acid composition of glyceride and constituent of true wax in the lipids obtained from adult female insects have been analyzed by column, thin-layer and gas-liquid chromatographies. Eighty-three per cent triglyceride was the major component in the lipids from insect bodies. The fatty acid of the triglyceride had high contents of capric and lauric acid, 33.9, 38.5 % respectively. Glycerides were not detected in the lipids obtained from the "Wax shell" which was excreted by insect. Twenty-two per cent true waxes and seventy-eight per cent other lipid classes composed the lipids. Cerotic acid and ceryl alcohol were the major constituents in the true wax' in addition to the small amounts of fatty acids (C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{20} , C_{22} , C_{28}) and fatty alcohols (C_{18} , C_{20} , C_{24} , C_{28}).

(Received July 9, 1965)

緒 言

ツノロウムシ (*Ceroplastes ceriferus* ANDERSON) はカタカイガラムシ科に属し, 注目される農業害虫である。柿, 柑橘, 梨, 茶などこのムシによる被害植物の種類ははなはだ多い。世界共通種として分布するが, 近年日本産のは別種であることがわかり⁽¹⁾, その後日本産には *Ceroplastes pseudoceriferus* GREEN の学名が用いられている。

本ムシのリピドについては, 河野⁽²⁾による報告があり, melissic acid, psyllostearilic acid, ceryl alcohol, 樹脂酸, 環状アルコールが分離, 検出されている。しかし当時はまだクロマトグラフ分析の適用がなかった時代であり, このムシのリピドの研究は検討すべき余地がある。著者らは全リピドの構成成分を明らかにしようと思う。周知のように, このムシは多量のロウ状物質を分泌し, その分泌物生成機構には興味がある。著者らは雌成虫を採集し, 虫体内のリピドおよび虫体を被覆している物質の

リピドを調製した。そして両者のリピド成分を比較検討するために, まずカラムクロマトグラフィーにより分画した。本報ではグリセリドの脂肪酸組成および真正ロウ成分について検討したことを述べる。

実験材料と方法

1. 供試ツノロウムシ

1964 年 4 月中旬, 堺市百舌鳥八幡宮境内のハゼの木に寄生しているツノロウムシを採集し, 実験材料とした。それはすべて越冬雌成虫である。虫体は赤褐色でその虫体は, 淡紅色を帯びた軟調性のロウ状物質で, ドーム状に被覆されている。枝から剥離したムシの背面および腹面からの状態は, 第 1 図 a, b のようである。なお c は断面の模式図である。以下に被覆物というのは, 虫体から分泌されたロウ状物質によって, ドーム状に形成されたいわゆるロウ殻を意味する。上に採集したムシは, 著者の観察記録では, 包卵状態となる 3~4 週間前のもので, 虫体は十分に成育したものと判断された。

第1図 ツノロウムシ (雌成虫)
a: 背面, b: 腹面, c: 断面

2. 虫体と被覆物の分別

ビーカーにムシを入れ, それに2倍量のクロロホルムを加え, 約10分間ゆるやかにふりまぜた. 被覆物は容易にくずれ, 溶解した. ガーゼを用いて濾過し, 虫体を集めた. つづいて虫体は, 少量のクロロホルムで数回くりかえし洗い, 表面に附着したロウ状物質を除去した. 被覆物が除かれた虫体は, 光沢ある赤褐色の半球形として得られた. 清浄なガーゼ上にひろげ溶媒を揮発させた. 一方濾液は合一し, 分液ロートに入れ, しばらく静置すると, 二層に分離した. その上部は, honeydew を含む淡黄色の水層である^(3,4). 下層部のクロロホルム溶液をとり, 濾過した.

3. リピドの調製

虫体は乳鉢にて十分磨砕の後, クロロホルム:メタノール (2:1 v/v) 混液で抽出処理し⁽⁵⁾, リピドを得た. 以下これを虫体リピドという. 一方前記濾液のクロロホルム溶液は, 一度水洗後, 無水硫酸ナトリウムで脱水して, 溶媒を留去し黄褐色ロウ状物質を得た. 以下これを被覆物のリピドという. これら両リピドは窒素ガスを封入し, 使用時まで -20° に保存した. なお別にムシ1,000匹について上記2, 3の操作を定量的に実施し, リピド含量などを測定した.

4. 分析方法

リピドの性状測定など一般分析は, 日本油化学協会制定基準油脂分析法⁽¹⁹⁾によった. 融点の測定は, 柳本微量融点測定装置 MP-S 2 型により, 赤外線吸収スペクトルは日立製回折格子型赤外分光光度計により KBr 錠剤法で測定した. アルコールのアセテートは, Farquhar の

方法⁽⁶⁾で, 脂肪酸のメチルエステルは Stoffel ら⁽⁷⁾の方法に準じて調製した.

5. ペーパーおよび薄層クロマトグラフィー

脂肪酸のペーパークロマトグラフィー (PPC) は, 平山ら⁽⁸⁾の鉛塩-硫化アンモニウム法により実施した. アルコールの薄層クロマトグラフィー (TLC) は別報により⁽⁹⁾, ロウ, グリセリド, 脂肪酸のTLCは Mangold⁽¹⁰⁾, Blank ら⁽¹¹⁾の方法に準じてそれぞれ実施した. なお, 硝酸銀含浸シリカゲルプレートによる不飽和脂肪酸メチルエステルの TLC は, Privett⁽¹²⁾の方法により実施した.

6. カラムクロマトグラフィー

シリカゲル (クロマト用ワコーゲル Q-22) 80 g を *n*-ヘキサン中に懸垂させながら, カラム (内径 2.5 cm, 高さ 40 cm) を作成した. 小ビーカーに試料約 1 g を精秤し, *n*-ヘキサンを加え, さらにシリカゲル 1 g を添加, よくかきまぜ定量的にカラム内に加えた. 所定の溶媒で展開し, 順次流出する溶液を 50 ml ずつ分取, 溶媒を留去して溶出物を秤量した.

7. ガスクロマトグラフィー (GLC)

1) 柳本ガスクロマトグラフ GCG-2 型の装置 (熱伝導度型検出器) により次の条件で運転した. カラム: 長さ 3 m, 内径 5 mm, 充填剤: polydiethylene glycol succinate (日本クロマト工業製, 含浸率 10%), キャリヤーガス: ヘリウム, 流速毎分 60 ml, 入口圧: 1.5 kg/cm², ブリッジ電流: 150 mA, カラム温度: 200 $^{\circ}$, 記録紙速度: 毎分 5 mm.

2) 充填剤に SE-30 (1%) を使用した場合は次の条件であった. 装置: 柳本ガスクロマトグラフ GCG-3DH + GCF-100 (水素焰イオン化検出器), カラム: 長さ 2 m, 内径 5 mm, カラム温度: 230 $^{\circ}$, キャリヤーガス: 窒素, 流速は毎分 40 ml, 記録紙速度: 毎分 1 cm. なお, 各ピークの同定あるいは推定には, 標準脂肪酸メチルエステルおよびアルコールアセテートとの比較, および各ピークの保持時間 (t_R) の対数と炭素数との直線関係^(13,14)を用いた. 各ピーク面積は半値幅法により測定し, 面積比から組成百分率を算出した.

実験結果

1. リピドの収量と性状

直径が 5~9 mm のムシ 1,000 匹について, 虫体と被覆物の構成比およびリピド含量を求めた結果は, 第1表のとおりである. 全虫の約 80% が被覆物である. 被覆

第 1 表 虫体と被覆物の構成比およびリピド含量*

	重量 (g)	比 率 (%)
供 試 全 虫	135.1**	—
{ 虫 体	27.6**	20.4(全虫に対する)
{ 被 覆 物	107.4**	79.5(〃)
総 リ ピ ド	39.6	29.3(〃)
虫 体 リ ピ ド	5.6	20.3(虫体に対する)
被 覆 物 リ ピ ド	34.0	31.7(被覆物に対する)

* ツノロウムシ 1,000 匹について実験 ** 湿重量

物の約 30% がロウ状物質で, 残りの 70% は水分, honeydew, および混在する塵埃からなる。総リピドの含量は約 30% で, 平均 1 匹あたり 0.04 g となる。虫体のリピドは, 虫体の乾物に対して求めたところ, 59.2% の高い値を示した。また虫体 1 匹あたり平均 5.5 mg のリピドを含有する結果が得られた。第 2 表は虫体および被覆物リピドの性状である。被覆物リピドの酸価とヨウ素価が高い値を示すのは, 樹脂酸によるものと思われる。虫体リピドのケン化価の高いのは, 後述のカプリン酸, ラウリン酸含量の大なるためである。

第 2 表 虫体および被覆物リピドの性状

	虫体リピド	被覆物リピド
酸 価	15.71	50.30
ケ ン 化 価	272.16	168.28
ヨウ素価 (Wijs 法)	14.61	94.21
融 点	16~18°	49~50°
外 観	黄褐色油状(室温)	黄褐色固体

2. リピドの TLC

虫体リピド, 被覆物リピドの TLC 像は, 第 2 図に示すとおりである。すなわち虫体リピドには, 標品のトリパルミチンの R_F 値に一致するスポット, そして被覆物リピドには, 標品のマッコウロウエステル⁽¹⁵⁾の R_F 値に一致するスポットが認められた。これらクロマトグラムから, 両リピド構成分は明らかに相違のあることがわかる。

3. 虫体リピドからグリセリドの分画とその脂肪酸組成

1) カラムクロマトによる分画: 虫体リピドからグリセリドを分画し, その脂肪酸組成を求めるために, シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。その結果は第 3 図のようである。展開溶媒などクロマ

第 2 図 虫体および被覆物リピドの TLC

S: 標品, A: 虫体, B: 被覆物
1. ロウエステル 2. トリグリセリド 3. 脂肪酸
4. ジグリセリド 5. モノグリセリド
溶媒 n -ヘキサン: エーテル: 酢酸 (70:30:1 v/v)

ト条件は図に記載のとおりである。8 個以上のピークが溶出曲線上に得られた。ベンゼン: エーテル (70:30 v/v) で溶出するピーク 4 は, ヒドロオキサム酸反応陽性, 過ヨウ素酸化後ジッフの試薬による発色が認められた。先の第 2 図の条件で TLC を行なうと, トリパルミチンの R_F 値に一致する単一のスポットを与える。加水分解後の酸性分の TLC は, たとえば n -ヘキサン: エーテル (7:3 v/v) の溶媒で展開すれば, オレイン酸の R_F 値 (0.2) に一致するスポットを与えた。中性分の Liebermann-Buchard 反応は陰性であった。以上の結果

第 3 図 虫体リピドのカラムクロマトグラム

展開溶媒: A. n -ヘキサン, B. n -ヘキサン: ベンゼン (50:50), C. ベンゼン, D. ベンゼン: エーテル (90:10), E. ベンゼン: エーテル (70:30), F. ベンゼン: エーテル (50:50), G. エーテル, H. メタノール
試料: 1.0710 g, シリカゲル: 80 g (2.5 cmφ カラム)

第3表 脂肪酸およびそのメチルエステルの R_F 値

		脂 肪 酸 の PPC*						脂肪酸メチルエステルの TLC**			
	カプリル酸	カプリン酸	ラウリン酸	ミリスチン酸	パルミチン酸	ステアリン酸	アラキジン酸	オレイン酸	リノール酸	リノレン酸	ステアリン酸
標 品	0.79	0.74	0.66	0.57	0.47	0.35	0.24	0.57	0.38	0.14	0.67
試 料	0.79	0.76	0.66	0.56	0.48	0.35 ~0.37	0.24	0.57	0.38	—	0.67

* 溶媒：酢酸メチル：酢酸：水 (10:20:2 v/v)

固定相：ケロシン b. p. 185~215°

** 溶媒：石油エーテル：エーテル (80:20 v/v)

吸着剤：硝酸銀含浸シリカゲルプレート

からピーク4物質は、トリグリセリドと判定される。その収量は第3図に示すように虫体リピドの83%である。なお溶出曲線上の他のピークについて検したがジグリセリド、モノグリセリドの存在は微小でありここでは無視した。

2) 脂肪酸の PPC と TLC：第3表はトリグリセリドを構成する脂肪酸の炭素数範囲と二重結合数を知る目的で行なった PPC および TLC の結果である。炭素数は8~18の範囲であること、そして不飽和脂肪酸は mono-ethenoid, di-ethenoid であることが判断された。

3) トリグリセリドの脂肪酸組成：熱伝導度型検出器によるガスクロマトグラムを用いて算出した組成脂肪酸百分率は、第4表のとおりである。試料脂肪酸メチルエステルの一部について水素添加を行ない得たガスクロマトグラムおよび第3表の結果から、 $C_{16}:1$, $C_{18}:1$, $C_{18}:2$ の不飽和酸が確認された。飽和酸は、カプリン酸、ラウリン酸含量が大で、二者で72%を占めた。炭素数は8~18で PPC の結果によく一致した。なお C_{20} 以上は存在しなかった。

第4表 トリグリセリドの脂肪酸組成

炭素数	二重結合の数	組成(%)
8	0	2.8
10	0	33.9
12	0	38.5
14	0	12.4
16	0	1.9
16	1	trace
18	0	1.4
18	1	5.6
18	2	3.5

4. 虫体リピド中のロウエステル

第3図のクロマトグラムで、 n -ヘキサン：ベンゼンの混液で溶出するピーク2, 3の物質は、TLCの結果真正ロウであることが認められた。しかしこれは虫体内に

はじめてからロウエステルとして存在するものなのか、虫体と被覆物との分別の際に混入したものなのか、いずれかである。微量のため今回は精査しなかった。

5. 被覆物リピドのロウエステルの分析

1) カラムクロマトによる分画：第4図は被覆物リピドについて実施したカラムクロマトグラムである。その条件は図に記載のとおりである。12個以上のピークが溶出曲線上に得られた。各ピーク物質の収量、融点は第5表のとおりである。ピーク1~6の溶出物は、第2図の条件で TLC を行なうと、すべて標品のマッコウロウエステルの R_F 値に一致する単一のスポットが得られ、トリグリセリドに相当するスポットは認められなかった。1~6を合一し、ケン化後、酸成分および中性分の TLC 像は、たとえば n -ヘキサン：エーテル (7:3 v/v) で展開すれば、同時展開したオレイン酸、ステアリルアルコールの R_F 値 (0.2, 0.31) にそれぞれ一致するスポットが得られ、酸およびアルコール以外のスポットの出現はなかった。Liebermann-Buchard 反応は陰性

第4図 被覆物リピドのカラムクロマトグラム

展開溶媒：A. n -ヘキサン, B. n -ヘキサン：ベンゼン (50:50), C. ベンゼン
D. ベンゼン：エーテル (90:10), E. ベンゼン：エーテル (70:30),
F. ベンゼン：エーテル (50:50), G. エーテル, H. メタノール
試料：1.2453 g, シリカゲル；80 g (2.5 cmφ カラム)

第 5 表 分画物質の収率と融点

ピーク No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
収 率 (%)	15.4	1.7	0.7	1.7	1.5	0.9	39.5	7.7	11.8	4.6	5.9	8.6
融 点 (°C)	44.5	45	44	43.5	43.5	44	72	78	40.5	31.5	—	—
	46	48	48	46	45	46	73.5	80	42	33	—	—

真正ロウ 21.9%

であり, ステリンのエステルは存在しない。また Liebermann-Storch 反応も陰性であった。酸成分の赤外線吸収スペクトルの測定結果は 1700 cm^{-1} , 950 cm^{-1} 付近にカルボキシル基によると認められる吸収極大, 一方中性成分のそれは 1060 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} に第 1 級アルコールによると認められる吸収極大が得られた。なお両者には 718 cm^{-1} , 728 cm^{-1} に直鎖結合, $-(\text{CH}_2)_4-$ によると

第 5 図 脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム
カラム: 1% SE-30 (内径 5 mm, 長さ 2 m), カラム温度 230°

第 6 図 アルコールアセテートのガスクロマトグラム
カラム: 1% SE-30 (内径 5 mm, 長さ 2 m), カラム温度 230°

認められる吸収極大が得られた。以上のことから, ピーク 1~6 物質は真正ロウと確認された。収率は被覆ポリピドに対して約 22% であ

る。なお, ピーク 7~12 に至る溶出物中には, モノ, ジ, トリグリセリドは検出されなかった。

2) 高級脂肪酸: 混合脂肪酸は, 前記の鉛塩-硫化アンモニウム法により PPC を試みたが, C_{26} , C_{28} 酸と思われるスポットの検出は明確に得られなかった。第 5 図は, SE-30 を用いて得たガスクロマトグラフ分析の結果である。図中, ピーク 2, 3, 4 は標品の C_{18} , C_{20} , C_{22} の飽和酸メチルエステルの t_R に一致し, これらの酸が同定された。 t_R が 8.6 分を示す主成分のピーク 6 は, ミツロウから調製⁽¹⁶⁾した cerotic acid のメチルエステルの t_R に一致することから C_{26} 酸と判定した。以上のピーク 2, 3, 4, 6 について t_R の対数と炭素数との関係は, 第 7 図のようである。ピーク 7 はその直線上にのってくることから C_{28} の酸と推定される。なお別にカラム温度 200° で検したところ C_{14} , C_{16} 酸の存在が認められた。

3) 高級アルコール: アルコールアセテートのガスクロマトグラムは, 第 6 図のとおりで, 主成分はピーク 9 の C_{26} アルコールである。この t_R は 11.9 分に得られる。ミツロウおよび前報⁽¹⁷⁾のイセリヤカイガラムシから得た ceryl alcohol の t_R に一致した。ピーク 1, 2, 5 はそれぞれ C_{18} , C_{20} , C_{22} のアルコールとして同定された。ピーク 7, 10 は第 7 図の直線関係から, C_{24} , C_{28} アルコールと推定される。

第 7 図 保持時間の対数と炭素数との関係
図中の数字は第 5, 6 図のピーク No.

考 察

虫体リピドの主要成分の 1 つは 83% を占めるトリグリセリドで、その脂肪酸組成はカプリン酸、ラウリン酸の二者でもって 72% を占めた。このような傾向は同科のカメノコロウムシ (*Ceroplastes japonicus* GREEN) やルビーロウムシ (*Ceroplastes rubens* MASKELL) についても著者ら⁽¹⁸⁾は認めている。他の昆虫のグリセリドの脂肪酸組成について著者は詳らかでないが、いわゆる一般の動植物油脂のグリセリドにおいて、 C_{16} , C_{18} 酸含量が大であるのに対して、本ムシの低級飽和酸含量の大きなのは、特徴的であるように思う。

一方、被覆物リピド中にはグリセリドは存在せず、真正ロウおよび他のリピドクラスで存在することが認められた。著者らははじめ、被覆物リピドの主要成分は、おそらく真正ロウの形で存在するものと思っていた。しかし予期に反し、その主構成成分は第 4 図のピーク 7 物質で、被覆物リピドの 40% を占め、真正ロウは 22% を占めるにすぎなかった。この真正ロウは、第 5, 6 図から ceryl cerotate が主成分と思われる。なお河野が報告している melissic acid, psyllostearilic acid は検出されなかった。おそらく他のリピドクラスとして存在するのかもしれない。それについてはさらに検討したい。

本報で明らかにしたロウエステル成分、グリセリドの脂肪酸組成から、虫体と被覆物の両リピド構成には大きな相違のあることが認められた。このムシの生育過程において分泌された被覆物は、いわば代謝の終産物とも考えられ、虫体内リピド成分との相違があるのは当然のことと思われる。しかし全虫の 80% を占める被覆物は、このムシの生活機能上重要な役割を果たしているものと推察される。両リピド構成成分の比較検討は、被覆物の役割や、その生成機構を解明していく上に手がかりを与えるものと思う。

要 約

ツノロウ雌成虫のグリセリドの脂肪酸組成および真正ロウ成分を明らかにした。

(1) 虫体リピドの主成分はトリグリセリドで、83% を占めた。構成脂肪酸は、 $C_8 \sim C_{18}$ (偶数) で、カプリン酸とラウリン酸の二者で 72% を占めた。不飽和酸は、 $C_{16:1}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ が存在した。

(2) 被覆物のリピド中にはグリセリドは認められなかった。真正ロウは 22% を占め、その構成成分としての脂肪酸は cerotic acid が主成分で、他に C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{20} , C_{22} , C_{28} の飽和酸が検出された。アルコールは、ceryl alcohol が主成分で、他に C_{18} , C_{20} , C_{22} , C_{24} , C_{28} の飽和アルコールが検出された。

本研究に際し、ご高配を賜りました主任教授岩狭与三郎博士、ならびに有益な助言を賜りました京都府立大学教授野田万次郎博士に深く感謝いたします。またガスクロマト分析にご援助をいただいた柳本製作所西山正孝博士、SE-30 をご恵与くださった東北大学農学部鹿山光博士に深謝いたします。

- (1) 石原 保：系統農業昆虫学，養賢堂，p. 165 (1963).
- (3) 河野通男：本誌，9, 458 (1933).
- (2) R. H. Hackman：Arch. Biochem. Biophys., 33, 150 (1951).
- (4) 玉木佳男：応動昆，7, 355 (1963).
- (5) J. Folch, A. M. Lees, J. A. Meath, F. N. Le Baron：J. Biol. Chem., 191, 833 (1951).
- (6) J. W. Farquhar：J. Lipid Res., 3, 21 (1962).
- (7) W. Stoffel, F. Chu, E. H. Ahrens：Anal. Chem., 31, 307 (1959).
- (8) 平山 修，井上吉之：本誌，35, 138 (1961).
- (9) 橋本 皓，向井克憲：油化学，12, 613 (1963).
- (10) H. K. Mangold：J. Am. Oil Chemists' Soc., 38, 708 (1961).
- (11) M. L. Blank, J. A. Schmit, O. S. Privett：ibid., 41, 370 (1964).
- (12) O. S. Privett, M. L. Blank, O. Romanus：J. Lipid Res., 4, 260 (1963).
- (13) R. G. Ackman：J. Am. Oil Chemists' Soc., 40, 558 (1963).
- (14) 森 幹男，岩切泰子，小沢昭夫，柴田繁子：日水産，30, 161 (1964).
- (15) 藤井 久，松本博吉：日水産研究所報告，8, 19 (1957).
- (16) 喜多源逸：油脂化学及試験法，至文堂，p. 217 (1965).
- (17) 向井克憲，橋本 皓，辻本恵洋：本誌，39, 77 (1965).
- (18) 橋本 皓，広谷愛子，向井克憲：応動昆，投稿中。
- (19) 日本油化学協会編：油脂分析，試験法，理化学書院，p. 106 (1956).