

マツヘリカメムシが忌避する植物成分の探索

生物資源科学部 応用生物科学科

2年 原子 ひかり

2年 大塚 菜月

2年 木村 千聖

2年 鈴木 ちひろ

生物資源科学部 生物生産科学科

2年 鈴木 麻央

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

助教 福原 和哉

生物資源科学部 生物生産科学科

准教授 野下 浩二

【背景・目的】

秋田キャンパス周辺でよく観察される茶色い大きなカメムシは、北米原産のマツヘリカメムシという外来種であり、日本のみならずヨーロッパでも生息域を急速に拡大している。また、生息域の拡大により、マツヘリカメムシの主な寄主である、マツ属植物の生育に悪影響があるとの報告もある。

昨年度の自主研究において、見た目が不快だけでなく、生態系にも悪影響を与えかねないマツヘリカメムシの防除に利用可能な植物の探索をした。いくつかの野菜・山菜の有機溶媒抽出物で活性試験したところ、「サンショウの葉」および「湯沢ギクの葉」の抽出物について、カメムシの忌避反応が確認された。

そこで本研究では、各種分画法やクロマトグラフィーを用いて、カメムシが忌避する成分を「サンショウの葉」および「湯沢ギクの葉」から得るとともに、生物活性試験により得られた物質の忌避活性の強さを検証することを目的とした。

【実験方法】

1. 植物素材の収集

サンショウの葉は秋田キャンパスにおいて採集した。湯沢ギクの葉は大潟キャンパスで栽培される苗（アグリビジネス学科 神田啓臣准教授提供）より採取した。

2. カメムシの採集並びに飼育

秋田キャンパスにおいて、マツヘリカメムシを 30 匹ほど採取した。採集したカメムシは飼育容器(内径 149 mm×高さ 91 mm)にて 1 容器に 10 匹程度飼育し、餌として秋田キャンパス内のマツの枝を与えた。

3. 抽出物の調製と液-液抽出法による分画

① サンショウの葉 (5.13g)、および湯沢ギクの葉 (26.0 g) をそれぞれ粉碎し、メタノールで 2 回抽出した。

(溶媒量: サンショウの葉 100 mL、湯沢ぎくの葉 520 mL)

② 吸引ろ過により抽出液を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。

(得られた抽出物量: サンショウの葉 1.32 g、湯沢ぎくの葉 7.26 g)

③ 各抽出物を水 150 mL に溶かし、酢酸エチル 150 mL で 2 回抽出した。

④ 残った水層をさらにブタノール 150 mL で 2 回抽出した。

- ⑤ ブタノール層・水層をそれぞれロータリーエバポレーターで濃縮した。
- ⑥ 酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで濃縮したのち、90%メタノール 150 mL に溶かし、ヘキサン 150 mL で2回抽出した。
- ⑦ 90%メタノール層、ヘキサン層をそれぞれロータリーエバポレーターで濃縮した。
- 以上の操作により、サンショウの葉・湯沢ぎくの葉それぞれについて、4つの画分（ヘキサン層・90%メタノール層・ブタノール層・水層）を以下の収量得た（表1）。

表1. サンショウの葉および湯沢ぎくの各画分の収量

サンプル	ヘキサン層	90%メタノール層	ブタノール層	水層
サンショウの葉	174.3 mg	74.2 mg	629.1 mg	33.1 mg
湯沢ぎくの葉	1301.2 mg	2337.9 mg	2591.6 mg	882.3 mg

→ 各画分をメタノールに溶解し、活性試験に付した。

4. カラムクロマトグラフィーによる活性画分の分離

活性の見られたサンショウ葉 90%メタノール層を、シリカゲルカラムに乗せ、順次クロロホルム、クロロホルム-メタノール（以下C-M）(20:1)、C-M (10:1)、C-M (5:1)、C-M (3:1) それぞれ 500 mL で溶出した。各画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、クロロホルム溶出画分（7.00 mg）・C-M (20:1) 溶出画分（14.8 mg）・C-M (10:1) 溶出画分（24.2 mg）・C-M (5:1) 溶出画分（95.4 mg）・C-M (3:1) 溶出画分（11.8 mg）を得た。

C-M (5:1) 溶出画分をメタノールで 10 mg/mL、その他の溶出画分を 5 mg/mL に調製し、活性試験用のサンプルとした。

5. カメムシへの活性試験①：飼育容器内に置いた抽出物に対する反応の確認

飼育容器内にキムタオルを敷き、サンプル溶液を染み込ませたろ紙および溶媒のみを染み込ませたろ紙を飼育容器内の両端に配置した。この容器内にマツヘリカメムシを 8 匹入れ、試験開始直後（8 時半～9 時半）、昼休み（12 時）、および放課後（16 時）に飼育容器のどこにカメムシがいるのか、サンプル溶液を避けるような様子はあるかを確認した。

6. カメムシへの活性試験②：シャーレ内に置いた抽出物に対する反応の確認

直径 120 mm（高さ 20 mm）のシャーレに、半分に切った直径 90 mm のろ紙 2 枚を両端に置いた。それぞれのろ紙にサンプル溶媒および溶媒を 200 μ L ずつ染み込ませ、真空デシケーターで 1 時間程度乾燥した。乾燥後、シャーレ内にマツヘリカメムシを 5 匹もしくは 6 匹入れ、試験開始 2 時間後（10 時半）、昼休み（12 時）、および放課後（16 時～18 時）にカメムシの様子を観察した。

【結果と考察】

1. 抽出物の分画（液-液抽出法）と活性試験

昨年度活性の見られたサンショウの葉および湯沢ぎくの葉について、メタノールで抽出したのち、液-液分配によりそれぞれ 4 つの画分に分け、各画分の活性を確認した。

はじめに、飼育容器を用いた活性試験を行なったが、この方法では、カメムシがキムタオルの裏に隠れてしまい、活性を確認することが困難であった。そのため、シャーレを使用した活性試験に試験法を変更し、再度活性試験を行なった。

試験の結果、湯沢ぎくの各画分（ヘキサン層 100 mg/mL、90%メタノール層 100 mg/mL、ブタノール層 100 mg/mL、水層 100 mg/mL）には活性が見られなかった。一方、サンショウの葉については、90%メタノール層（10 mg/mL）にカメムシが忌避するような反応が見られ（図 1a）、ブタノール層（50 mg/mL）には活性が見られなかった（図 1b）。

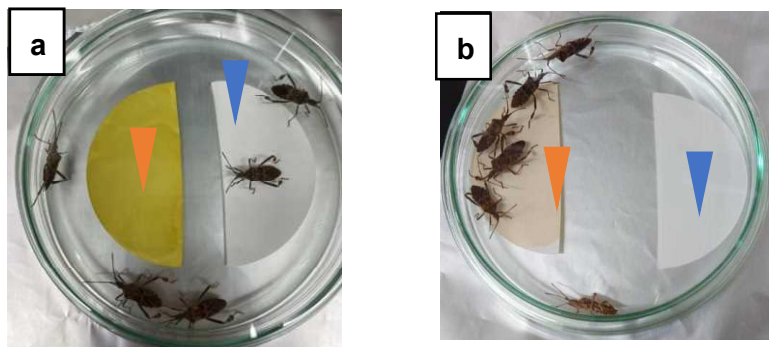


図 1：サンショウの葉の各画分に対するマツヘリカメムシの反応（橙矢印がサンプル、青矢印が溶媒のみ、それぞれ染み込ませたろ紙）：(a) 90%メタノール層；(b) ブタノール層。

2. カラムクロマトグラフィーと活性試験

以上のように、サンショウの葉の 90%メタノール層に忌避活性がみられたことから、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりさらなる分画を行ない、どの画分に活性が見られるか確認した。以上のことから、サンショウ葉 90%メタノール層の C-M (20:1) 溶出画分に忌避活性成分が濃縮されていることが示唆された。

次に、活性がみられた C-M (20:1) 溶出画分について、濃度依存性を確認するため、5 mg/mL 溶液を希釈し、1 mg/mL、0.2 mg/mL 溶液を調整し、それぞれの活性を確認した（図 3）。5 mg/mL 溶液に対しては、カメムシは上記に示したような忌避反応を示した。一方、1 mg/mL 溶液および 0.2 mg/mL 溶液については、前足を触覚を撫でつける様子も確認できたものの、はっきりとした忌避反応は見られなかった。



図 3：シャーレに配置した抽出物に対するマツヘリカメムシの反応（橙矢印がサンプル、青矢印が溶媒のみ、それぞれ染み込ませたろ紙）：左から 5 mg/mL、1 mg/mL、0.2 mg/mL。

以上の結果より、C-M (20:1) 溶出画分は、5 mg/mL の濃度では活性を示すものの、1 mg/mL 以下の濃度では活性を示さないことがわかった。

【まとめと今後の課題】

昨年の自主研究により、マツヘリカメムシが「サンショウの葉」および「湯沢ぎくの葉」を忌避する様子が観察された。本研究では、それぞれの植物の抽出物について、液-液抽出法およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行ない、カメムシが忌避する物質の濃縮を目指した。その結果、サンショウの葉に含まれる忌避物質の濃縮に成功した。今後はさらに高性能なクロマトグラフィーを行なうことで、活性画分に含まれる物質を分離し、活性物質の単離・同定を目指す。

本研究では、忌避活性を確認する方法として、カメムシの様子を数時間ごとに観察したが、この方法では、カメムシが避けているのか判定が難しく、再現性に課題が残った。今後活性物質を同定する過程において、動画撮影やタイムラプス撮影など、活性の確認・記録方法を工夫し、カメムシが忌避する様子をはっきりと記録する必要があると考えられる。

【謝辞】

湯沢ギクをご提供いただきました神田啓臣先生にこの場を借りて感謝申し上げます。