

ヒノキ枝心材の抽出物とその生物活性

2013.9

岩手大学大学院

連合農学研究科

生物資源科学専攻

(山形大学)

森川 卓哉

目 次

第1章 緒論

第1節	ヒノキ	1
第2節	ヒノキ科樹木抽出成分に関する研究	2
第3節	ヒノキの未利用木質資源	3
第4節	本研究の目的	4

第2章 ヒノキ枝心材の抽出成分

第1節	緒言	6
第2節	実験方法	7
2.1	ヒノキ枝心材の抽出	7
2.1.1	試料	7
2.1.2	抽出	7
2.2	ヒノキ枝心材抽出成分の単離と同定	7
2.2.1	カラムクトマトグラフィーによる単離	7
2.2.2	機器分析	8
2.2.2.1	GC-FID 分析	8
2.2.2.2	GC-MS 分析	8
2.2.2.3	NMR 分析	9
2.3.3	化合物の同定	9
2.3	ヒノキ枝心材抽出物の成分分析	10
2.3.1	GC-FID 分析	10
2.3.2	GC-MS 分析	10
第3節	結果と考察	12
3.1	ヒノキ枝・幹心材の抽出物量	12
3.2	ヒノキ枝心材抽出物の単離と同定	12
3.2.1	ヒノキ枝心材抽出物の単離	12
3.2.2	単離物の同定	12
3.3	ヒノキ枝心材抽出成分の構成	13
第4節	小括	15

第3章 ヒノキ枝心材の抗菌活性

第1節	緒言	43
-----	----	----

第 2 節 実験方法	44
2. 1 試料・試料調製	44
2. 1. 1 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物	44
2. 1. 2 ヒノキ枝心材単離化合物	44
2. 2 抗菌活性試験	44
2. 2. 1 供試生物	44
2. 2. 2 試験方法	45
2. 2. 3 統計処理	46
第 3 節 結果と考察	47
3. 1 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物の抗菌活性	47
3. 2 ヒノキ枝心材単離化合物の抗菌活性	47
第 4 節 小括	50

第 4 章 ヒノキ枝心材の抗蟻活性

第 1 節 緒言	55
第 2 節 実験方法	57
2. 1 供試生物	57
2. 2 木材ブロック食害試験	57
2. 2. 1 試料・試料調製	57
2. 2. 2 試験方法	57
2. 2. 3 統計処理	58
2. 3 PD 摂食試験	58
2. 3. 1 試料・試料調製	58
2. 3. 1. 1 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物	58
2. 3. 1. 2 ヒノキ枝心材単離化合物	58
2. 3. 2 試験方法	58
2. 3. 2. 1 PD 強制摂食試験	59
2. 3. 2. 2 PD 選択摂食試験	59
2. 3. 2. 3 PD 非接触試験	60
2. 3. 3 統計処理	60
2. 4 処理土壌試験	60
2. 4. 1 試料・試料調製	60
2. 4. 2 試験方法	60
2. 4. 2. 1 処理土壌強制接触試験	61
2. 4. 2. 2 処理土壌選択接触試験	61
2. 4. 3 統計処理	62

第 3 節 結果と考察	63
3. 1 ヒノキ枝・幹心材の耐シロアリ食害性	63
3. 2 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物の抗蟻活性	63
3. 3 ヒノキ枝心材単離化合物の抗蟻活性	63
第 4 節 小括	67

第 5 章 ヒノキ枝心材成分の木材腐朽菌・シロアリ以外の生物に対する活性

第 1 節 緒言	79
1. 1 ブラインシュリンプ	80
1. 2 水かび	80
1. 3 ハダニ	80
第 2 節 実験方法	82
2. 1 ブラインシュリンプ幼生致死活性試験	82
2. 1. 1 試料・試料調製	82
2. 1. 2 供試生物	82
2. 1. 3 試験方法	82
2. 2 抗水かび活性試験	82
2. 2. 1 試料・試料調製	82
2. 2. 2 供試生物	83
2. 2. 3 試験方法	83
2. 3 抗ハダニ活性試験	84
2. 3. 1 試料・試料調製	84
2. 3. 2 供試生物	84
2. 3. 3 試験方法	84
2. 4 統計処理	84
第 3 節 結果と考察	86
3. 1 ヒノキ枝心材成分のブラインシュリンプ幼生致死活性	86
3. 2 ヒノキ枝心材成分の抗水かび活性	86
3. 3 ヒノキ枝心材成分の抗ハダニ活性	87
第 4 節 小括	88

第 6 章 ヒノキ枝心材と生物活性

第7章 総括	98
引用文献	106
謝辞	112
Summary	113
本研究に関する報告一覧	119

第1章 緒言

第1節 ヒノキ

ヒノキ科 (*Cupressaceae*) は 21 属 125 種の針葉樹からなり，日本には 4 属 10 種が分布する (佐竹ら 1993). その一つであるヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) は日本を代表する針葉樹であり，天然では東北南部から本州，四国，九州の屋久島まで広く分布する. スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don.) と並ぶ植林樹種であり造林面積は 260 万 ha と日本の人工林総面積の 25% を占める (林野庁 2012). 古くから神社仏閣，神殿をはじめとする木造建築材として重用され，現在でも住宅の柱や梁，床，内装材など様々な場所で用いられるほか，建具，家具，工芸品など多岐に渡って利用され，日本の木の文化を支え形成してきた樹種といえる. このようにヒノキが重用されてきたのは材質が緻密で強度・加工性に優れるほか，雨水や湿気に強く耐朽性が高いためである. またその芳香性も優れた点の一つであり，精油としても好まれて用いられている. そのため，ヒノキの耐朽性に関する報告やその香りに関して多くの研究が成されてきた. とりわけヒノキの材として商業的価値を持つ部位は主に建築物等の構造材に用いられる幹材であることから，幹材の成分や生理活性に関して多くの先行研究がなされてきた.

第2節 ヒノキ科樹木抽出成分に関する研究

ヒノキの優れた特性は樹木中に含まれる抽出成分によるものであり、ヒノキに代表されるヒノキ科樹種に含まれる成分の生理活性に関して、これまでに多くの研究がなされてきた。特に、多様なテルペン類および β -thujaplicin (hinokitiol) に代表されるトロポロン類の多様な生理活性が報告されており、ヒノキアスナロ (*Thujopsis dolabrata* var. *hondae* Makino) やベイスギ (*Thujopsis plicata* Donn.) に含有される β -thujaplicin などのトロポロン類は非常に高い抗菌活性を有することで知られ (Debell et al. 1997; Debell et al. 1999; Morita et al. 2004), 菌以外にも抗シロアリ活性 (Nakashima et al. 1972), タバコシバンムシ (*Lasioderma serricorne*) に対する忌避活性 (Hori et al. 2004) などが報告されている。アスナロ (*Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc.) 心材中に含有される carvacrol, β -thujaplicin, thujopsene はマウスなどの齧歯類に対するかじり抑制効果 (Ahn et al. 1995) を有するほか, carvacrol, β -thujaplicin には殺ダニ活性 (Ahn et al. 1998) が報告されている。

ヒノキに含まれる成分についても多くの生物活性の報告がある。ヒノキ幹の耐朽性に関する研究としては、近藤らがヒノキ心材に含まれる cadinol 類を主体とする化合物のオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) およびカワラタケ (*Trametes versicolor*) に対する抗菌活性を報告している (近藤ら 1986) ほか、金城らによってヒノキ材中の α -cadinol, *t*-muurolol といった化合物がシイタケ (*Lentinula edodes*), ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) に対する抗菌物質として報告されている (金城ら 1986)。また、木材腐朽菌と並ぶ木材劣化生物であるシロアリに対しても高い活性を有することが知られている。金城らはヒノキの hexane 抽出物に含まれる *t*-muurolol, α -cadinol といったセスキテルペン類にシロアリに対する致死活性があることを報告した (金城ら 1988)。一方で大谷らはヒノキ幹に含まれるこれらのセスキテルペンには活性の持続性はあるが活性自体は弱く, α -terpineol や α -terpinyl acetate とした揮発性化合物が抗蟻活性の主体であると報告している (Otani et al. 1996)。また、松永らは異なる性質

を持つ複数の化合物が複合的に活性を発現していると報告している (松島ら 1990). 近年, ヒノキ幹の心材色の違いが抗蟻活性に寄与しているという報告が Kijidani et al. によって成されている (Kijidani et al. 2012). このようにヒノキ幹材の多様な生理活性成分に関する多くの報告が成されてきた.

幹材以外の部位では, Yang et al. によってヒノキ葉油成分の担子菌類, 微生物に対する活性が報告されている (Yang et al. 2007). また, 石井らはヒノキ樹皮に含まれる α -pinene, β -pinene, limonene といった揮発性の化合物のイネやカラタチに対する生長阻害を明らかにしている (石井ら 1993) ほか, 大原らは蒸煮処理したヒノキ樹皮のポリフェノール成分とそのタンパク質吸着能について報告している (大原ら 1995). また漏脂症ヒノキ樹脂の manool, torulosol, torulosal といったジテルペンが樹脂症病原菌に対する抗菌活性を有することが報告されている (山本ら 1997).

第3節 ヒノキの未利用木質資源

ヒノキ幹材が木材として重用されてきた一方、商業的価値のない枝や葉、樹皮といった部位や間伐材は伐採後そのまま林内に放置されるのがほとんどである。一般に立木から丸太 1 m³ が生産される際、人工林では 0.36 m³ の枝葉と 0.22 m³ の梢端部や曲がり部分が発生し (財団法人エネルギー総合工学研究所 2003), こういった未利用の林地残材の有効利用が求められている。樹皮の利用に関する研究として、島地らがヒノキ樹皮の燃料資源としての利用の可能性を検討している (島地ら 1984)。また、前述したように石井らはヒノキ樹皮に含まれる α -pinene, β -pinene, limonene といった揮発性の化合物がイネやカラタチの生長を阻害することを報告し (石井ら 1993), 大原らは蒸煮処理したヒノキ樹皮のポリフェノール成分とそのタンパク質吸着能について報告をおこなっている (大原ら 1995)。しかしながら、現状では日本の人工林の木質廃材の利用はほとんどなされておらず、実際の利用には至っていない。

ヒノキの枝材もまた未利用木質資源の一つである。枝はヒノキ樹体の重量の約 20-30% を占め (Mori et al. 1995), 伐採される際や、森林管理の一環として定期的におこなわれる枝打ちの際に切り落とされ、林内にそのまま放置されている。これらのヒノキの枝については、生枝材の衝撃に対する強度や枝打ちによる樹体への影響といった研究 (時光ら 2007; Onwona et al. 1994; 井上ら 1993) がなされているだけで、その化学的利用に向けた研究はほとんどなされていない。

第4節 本研究の目的

樹木は木材への加工過程において非常に多くの廃材が発生し、中でも枝葉部は利用法が確立されていないためそのほとんどが廃棄され、大半が林内に放置され大きな問題となっている。そのため現在枝葉部の新たな有効利用法が求められているが、幹材に比べ枝材は建材等には適しておらず、物理的な利用は限定される。そこでヒノキ枝材の化学的利用法に着目した。枝部についての化学的研究は前述したように幹材に比べてほとんどおこなわれていない。また近年、化学合成物質による環境汚染や人体への影響といった懸念から、化学合成物質から天然物質への指向が強くなるに伴い天然由来である樹木抽出成分に注目が集まっている。

そこで、本研究ではヒノキ枝材の有効な利用法を見出すため、枝心材抽出成分に着目し、その生物活性について検討した。

第2章 ヒノキ枝心材の抽出成分

第1節 緒言

樹木にとって枝は生命活動の維持のために不可欠な器官である。樹木の幹と枝は形成層で互いにつながっており、枝は幹の髄と材の内部まで接続しながら年輪を形成している。枝は成長するに従い、幹と同様に材の中心に心材が形成される。ヒノキの枝心材は幹心材に比べ非常に濃い赤褐色を呈しており、幹の心材色の違いはそこに含有される抽出成分に起因することから（大橋ら 1987）、枝と幹の間の成分構成も異なるものと考えられる。実際に Hirose et al. によってノルリグナンの hinokiresinol がヒノキ枝心材から単離されており（Hirose et al. 1965）、ヒノキ幹と枝の成分が異なるものと考えられる。

枝は樹木が自身の生命を維持するために欠くことのできない重要な器官であるが、我々が木材として利用しているのは幹であり、枝材の商業的価値は低く伐採される時に廃棄されている。また、枝の一部である節の存在は材の性質に悪影響を及ぼすため、良質木材を生産するためには定期的な枝打ちをおこなうことが求められている。このようなことからこれらの枝材のほとんどが有効に利用されることなく林内に放置されている。

そこで、本章では未利用の木質資源の一つであるヒノキ枝の有効利用法を見出すため、まずヒノキの幹心材と枝心材の成分の相違を詳細に明らかにすることとした。

第2節 実験方法

2.1 ヒノキ枝心材の抽出

2.1.1 試料

山形大学附属フィールド科学センター上名川演習林 (University Forest, Field Science Center, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Japan) にて, 93年生のヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.) を伐採し, 同一個体内より枝心材 (直径 5 cm × 幅 20 cm) および 幹心材 (直径 28 cm × 幅 35 cm) を採取した. 試料の写真を Fig. 2-1 に示す.

2.1.2 抽出

2.1.1 にて採取した枝・幹心材の試料をミキサーミル (Wonder Blender, Osaka chemical Co., Ltd., Japan) で粉砕し木粉とした. 木粉約 25 g を室温で hexane に 7 日間浸漬し, 得られた抽出液をろ過し, ロータリーエバポレーターにて濃縮し, 抽出物を得た. 次に ethyl acetate, methanol で同様の操作をおこない, hexane, ethyl acetate, methanol の逐次抽出物を得た.

2.2 ヒノキ枝心材抽出成分の単離と同定

2.2.1 カラムクロマトグラフィーによる単離

ヒノキ枝心材の hexane 抽出物 (4.01 g) をシリカゲル (60N, spherical 63–210 μm , neutral; Kanto Chemical Co., Inc., Japan) カラムクロマトグラフィーにて, 展開溶媒に hexane のみを用い 6 画分を得た (Fr. h-1~6). 続いて hexane / ethyl acetate (100:1 から ethyl acetate) の展開溶媒を用いて分画をおこない合計 34 の画分を得た (Fr. h-7~h40). 分画の詳細を Fig. 2-2 に示す. このうちの Fr. h-15, h-16 より germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol (321 mg), Fr. h-20 より α -cadinol (244 mg) の単離化合物を得た. Fr. h-18 (238 mg) を活性アルミナ (spherical 75 μm ; Wako pure Chemical Industries, Ltd., Japan) カラムクロマトグラフィーにて hexane を用いて精製し

t-cadinol (195 mg) を得た.

ヒノキ枝心材の ethyl acetate 抽出物 (2.46 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画した. 展開溶媒に hexane / ethyl acetate (100:1 から ethyl acetate) を用いて分画をおこない合計 27 の画分を得た (Fr. a-1~a-27). 続いて Fr. a-6~a-13 (1.09 g) を同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて, 展開溶媒に hexane / ethyl acetate (1:6 から ethyl acetate) を用いて分画し合計 25 画分を得た (fr. b-1~b-25). このうちの白色粉末状の fr. b-8 を hinokinin (38 mg) として単離した. 続いて fr. b-10~b-17 (0.61 g) を同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて展開溶媒に hexane / acetone (1:3 から acetone) を用いて分画し fr. c-1~c-28 を得, このうちの赤褐色粉末状の fr. c-23~c-25 を hinokiresinol (130 mg) として単離した. 分画の詳細を Fig. 2-3 に示す.

2. 2. 2 機器分析

2. 2. 2. 1 GC-FID 分析

Gas-liquid Chromatographic (GC) Flame Ionization Detector (FID) による分析には, HITACHI G-3000 (HITACHI Ltd., Japan) を用いた. 条件は以下の通りである.

DB-1 キャピラリーカラム (30 m × 0.32 mm i.d.; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA), カラム温度 100°C (1 min 保持) から 4°C/min にて 280°C まで上昇 (15 min 保持), 気化室温度 250°C, 検出器温度 250°C, キャリアーガスには helium を用いた.

2. 2. 2. 2 GC-MS 分析

GC-Mass Spectroscopy (MS) による分析は Shimadzu GCMS-QP-2010 Ultra (SHIMADZU Corp., Japan) を用いた. 条件は以下の通りである.

DB-1 キャピラリーカラム (30 m × 0.32 mm i.d.; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA), カラム温度 100°C (1 min 保持) から 4°C /min にて

280°Cまで上昇 (15 min 保持), 気化室温度 250°C, 検出器温度 250°C, キャリアーガスには helium (圧力: 50 kPa) を用いた.

検出ピークの同定は NIST 11, 11S Mass spectral library によるシミュラリティー検索をおこなった.

2. 2. 2. 3 NMR 分析

Nuclear magnetic resonance (NMR) による分析は JEOL JNM-EX400 (^1H 400 MHz/ ^{13}C 100 MHz) spectrometer (JEOL Ltd., Japan) を用いておこなった. 得られた値を解析するとともに既報の文献値 (Medarde et al. 1995; Labbe et al 1993; El-Shazly et al. 2004; Takaku et al. 2001, Borg-Karlson et al. 1981) と比較し同定した.

2. 3. 3 化合物の同定

単離化合物 (germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, hinokinin) は EI-MS, NMR により同定をおこなった. その詳細を以下に示す.

Germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol

EI-MS m/z : 222 (M^+ , 1%), 207 (4), 204 (3), 189 (1), 179 (1), 165 (1), 161 (1), 147 (2), 133 (2), 123 (16), 105 (13), 95 (11), 93 (11), 81 (100), 71 (13), 55 (16), 53 (8). $^1\text{H-NMR}$ δ : 0.79 (d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.83 (d, $J=6.7\text{Hz}$), 1.19 (s), 1.54 (s), 2.51 (dddd, $J=14.7, 11.9, 11.9, 3.5\text{Hz}$), 4.95 (bs), 5.17 (dd, $J=1.5, 9.2\text{Hz}$), 5.25 (d, $J=15.6\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 16.72, 18.96, 20.61, 23.68, 25.97, 30.71, 33.01, 39.63, 41.28, 52.83, 73.14, 125.73, 128.88, 132.59, 140.09.

t-Cadinol

EI-MS m/z : 222 (M^+ , 2%), 204 (64), 189 (15), 165 (100), 147 (4), 134 (17), 121 (33), 121 (33), 105 (41), 95 (45), 81 (36), 71 (13), 58 (9), 55 (13). $^1\text{H-NMR}$ δ : 0.74 (d, $J=1.7\text{Hz}$), 0.85 (d, $J=1.7\text{Hz}$), 1.16 (s), 1.61 (bs), 5.49 (bs). $^{13}\text{C-NMR}$

δ : 15.17, 19.78, 21.39, 22.57, 23.76, 29.26, 30.87, 37.71, 40.28, 46.63, 47.91, 70.66, 124.79, 134.35.

α -Cadinol

EI-MS m/z 222 (M^+ , 1%), 204 (29), 189 (5), 179 (2), 165 (3), 161 (32), 149 (6), 137 (13), 121 (69), 109 (32), 95 (100), 93 (28), 81 (37), 71 (35), 55 (26), 53 (12). $^1\text{H-NMR}$ δ : 0.71 (d, $J = 1.7\text{Hz}$), 0.86 (d, $J = 1.7\text{Hz}$), 1.05 (s), 1.54 (m), 1.61 (s), 1.93 (m), 2.12 (m), 5.44 (bs). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 15.09, 20.73, 21.50, 21.91, 22.64, 23.84, 25.95, 30.89, 39.82, 42.13, 46.65, 49.96, 72.49, 122.29, 134.97.

Hinokiresinol (TMS)

EI-MS m/z 369 (M^+ , 92%), 381 (25), 230 (58), 217 (21), 179 (20), 115 (7), 73 (100).

Hinokinin

EI-MS m/z 354 (M^+ , 30%), 218 (11), 192 (4), 173 (3), 162 (7), 135 (100), 105 (16), 77 (27). $^1\text{H-NMR}$ δ : 2.43-2.59 (4H, m), 2.85(1H, dd, $J = 3.5\text{Hz}$, $J = 1.5\text{Hz}$), 2.87 (1H, dd, $J = 3.5\text{Hz}$, $J = 1.4\text{Hz}$), 3.85 (1H, dd, $J = 2.0\text{Hz}$, $J = 2.3\text{Hz}$), 4.07(1H, dd, $J = 2.3\text{Hz}$, $J = 8.3\text{Hz}$), 5.88-5.89 (4H, m), 6.40-6.69 (6H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 34.82, 38.36, 41.27, 46.46, 71.13, 101.01, 108.28, 108.34, 108.79, 109.42, 121.58, 122.21, 131.31, 131.58, 146.34, 146.46, 147.85, 178.41.

2.3 ヒノキ枝心材抽出物の成分分析

ヒノキ枝・幹心材逐次抽出物 (hexane, ethyl acetate) に含まれる成分を同定し、構成割合を明らかにするため、GC-MS による同定と GC-FID による定量をおこなった。

2.3.1 GC-MS 分析

2.2.2.1 と同様 Shimadzu GCMS-QP-2010 Ultra (SHIMADZU Corp., Japan) を用い、同条件で分析をおこなった。

2.3.2 GC-FID 分析

2. 2. 2. 2 と同様 HITACHI G-3000 (HITACHI Ltd., Japan) を用い, 同条件で分析をおこなった. 定量についてはモノ・セスキテルペン類は標準物質の heneicosan 換算値を, hinokiresinol と hinokinin については標品から検量線を作成して求めた.

第3節 結果と考察

3.1 ヒノキ枝・幹心材の抽出物量

ヒノキ枝・幹心材の抽出物量を Table 2-1 に示す。枝心材の hexane 抽出率は 15.4% で、幹心材 3.1%のおよそ 5 倍であった。Ethyl acetate 抽出物も枝心材の抽出率が 11.0%、幹心材が 1.1%と、枝心材は幹心材の 10 倍含有していた。なお、methanol 抽出物は枝と幹の間に大きな差は見られなかった。枝心材の全抽出物量は 28.3%、幹心材が 5.6%であり大きな差が認められ、特に枝心材の低・中極性の抽出物が極めて高いものであった。

3.2 ヒノキ枝心材抽出成分の単離と同定

3.2.1 ヒノキ枝心材抽出成分の単離

ヒノキ枝心材の hexane 抽出物 (4.01 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画した。Hexane のみを用いて得られた画分は炭化水素化合物が混合しており、これらをカラムクロマトグラフィーでさらに分画することは困難であった為これらを炭化水素の画分 H-1 とした。続いて hexane / ethyl acetate の展開溶媒を用いて分画をおこない、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol (321 mg), *t*-cadinol (195 mg), α -cadinol (244 mg) を単離した。

ヒノキ枝心材の ethyl acetate 抽出物 (2.46 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて hexane / ethyl acetate の展開溶媒を用いて分画し hinokinin (38 mg) を得た。さらに展開溶媒 hexane / acetone にて分画をおこない hinokiresinol (130 mg) を得た。

3.2.2 単離物の同定

炭化水素化合物画分である H-1 は混合物であるため、GC-MS 分析をおこない β -elemene, copaene, α -muurolene, γ -cadinene, δ -cadinene を主成分として同定した。これら H-1 画分に含まれる主要化合物および単離化合物 germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol,

t-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, hinokinin のマススペクトルの図を Fig. 2-4~13 に示す。また, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokinin については NMR 分析 (Fig. 2-14~21) にて得られた値を文献値 (Medarde et al. 1995; Labbe et al. 1993; El-Shazly et al. 2004; Takaku et al. 2001, Borg-Karlson et al. 1981) と比較し同定をおこなった。Hinokiresinol については研究室保有の標品との比較によって同定した。

ヒノキ枝心材に含まれるこれらの化合物の化学構造式を Fig. 2-22 に示す。

3.3 ヒノキ枝心材抽出成分の構成

ヒノキ枝・幹心材の hexane, ethyl acetate 抽出物の GC-MS 分析によって得られた Total Ion Chromatogram (TIC) を Fig. 2-23, 24 に示す。Hexane 抽出物では, ヒノキの枝・幹心材に共通してモノテルペン炭化水素の β -elemene, セスキテルペン炭化水素の copaene, α -muurolene, γ -cadinene, δ -cadinene が確認され, セスキテルペンアルコールの *t*-cadinol, α -cadinol が枝・幹ともに検出された。またセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol が枝に特徴的に確認された。枝・幹の両方からリグナンの hinokinin が確認された。Ethyl acetate 抽出物の TMS 化物を分析した結果, 枝のみに特徴的な成分としてノルリグナンの hinokiresinol が確認された。またリグナンの hinokinin が枝・幹の両方に確認された。

GC-FID 分析によって得られた各化合物の Retention Time (RT) およびそれらの構成を Table 2-3 に示す。モノ・セスキテルペン炭化水素をみるとその構成割合はほぼ同様であり, 特に cadinene 型のセスキテルペン炭化水素である γ -cadinene と δ -cadinene が枝・幹ともに枝の抽出物構成割合の 30%を占めていた。Cadinol 型構造を持つセスキテルペンアルコールの *t*-cadinol, α -cadinol も枝・幹に共通する主要な化合物で, 枝抽出物の約 40%, 幹の約 50%と非常に大きな構成割合を占めていた。これら 4 つのセスキテルペンがヒノキの枝と幹に共通する主要な化合物といえる。枝のみに特徴的に含有

されたセスキテルペンアルコールの *germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol* の構成割合は 6.8% であった。枝のみに含有される成分であるノルリグナンの *hinokiresinol* は抽出物の 6.1%を構成していた。リグナンの *hinokinin* が枝・幹の両方に確認され、その構成割合は枝の 12.1%、幹の 10.5%と上記 4 つのセスキテルペン化合物に次ぐものであった。

第4節 小括

ヒノキ枝・幹の抽出物の相違を明らかにするために hexane, ethyl acetate, methanol にて逐次抽出をおこない、各抽出物量を求めるとともに、成分の単離と同定をおこない各成分の構成割合を明らかにした。

その結果、枝心材の抽出物量は幹心材に対し hexane 抽出物では 5 倍, ethyl acetate 抽出物では 10 倍ときわめて多く、特に低・中極性成分の多い構成であった。

ヒノキ枝心材の hexane 抽出物をカラムクロマトグラフィーで分画し H-1 画分 (β -elemene, copaene, α -muurolene, γ -cadinene, δ -cadinene) と、セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, α -cadinol を単離した。枝心材の ethyl acetate 抽出物からノルリグナンの hinokiresinol およびリグナンの hinokinin を単離した。

ヒノキ枝および幹心材の hexane, ethyl acetate 抽出物に含まれるモノテルペン炭化水素、セスキテルペン炭化水素、セスキテルペンアルコール、ノルリグナン、リグナンといった成分の構成を明らかにするため GC-MS, GC-FID 分析をおこなった。Hexane 抽出物では枝・幹ともモノテルペン炭化水素の β -elemene, セスキテルペン炭化水素の copaene, α -muurolene, γ -cadinene, δ -cadinene およびセスキテルペンアルコールの *t*cadinol, α -cadinol が検出された。枝と幹の大きな違いとして、枝のみにセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol が確認された。Ethyl acetate 抽出物の TMS 化物を分析した結果、枝のみにノルリグナンの hinokiresinol が確認され、リグナンの hinokinin が枝・幹の両方に確認された。

GC-FID 分析によって得られたこれらの化合物の構成比をみると、モノ・セスキテルペン炭化水素の構成割合は枝と幹でほぼ同様であり、cadinene 型のセスキテルペン炭化水素の γ -cadinene と δ -cadinene が大きな割合を占めていた。Cadinol 型構造を持つセスキテルペンアルコールの *t*cadinol, α -cadinol も枝・幹に共通して非常に大きな構成割合を占めており、これら 4 つのセスキテルペンがヒノキの枝と幹に共通する主要な

化合物といえる。枝のみに含有されるセスキテルペンアルコールである germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol の構成割合は他のセスキテルペンに比べその小さいものであったが、枝抽出物を構成する特徴的な化合物といえる。枝のみに含有される成分であるノルリグナンの hinokiresinol は抽出物の 6.1%を構成していた。リグナンの hinokinin が枝・幹の両方に確認され、上記 4 つの cadinene 型化合物に次ぐ構成割合であった。

このことから、ヒノキ枝心材は幹心材に比べ多量の低・中極性の抽出成分を含有し、その中に含まれる化合物の構成に枝と幹で相違がみられ、枝のみに germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol や hinokiresinol といった特有の成分が存在することが明らかになった。



Fig. 2-1 Samples of hinoki (left panel: branch, right panel: trunk log).

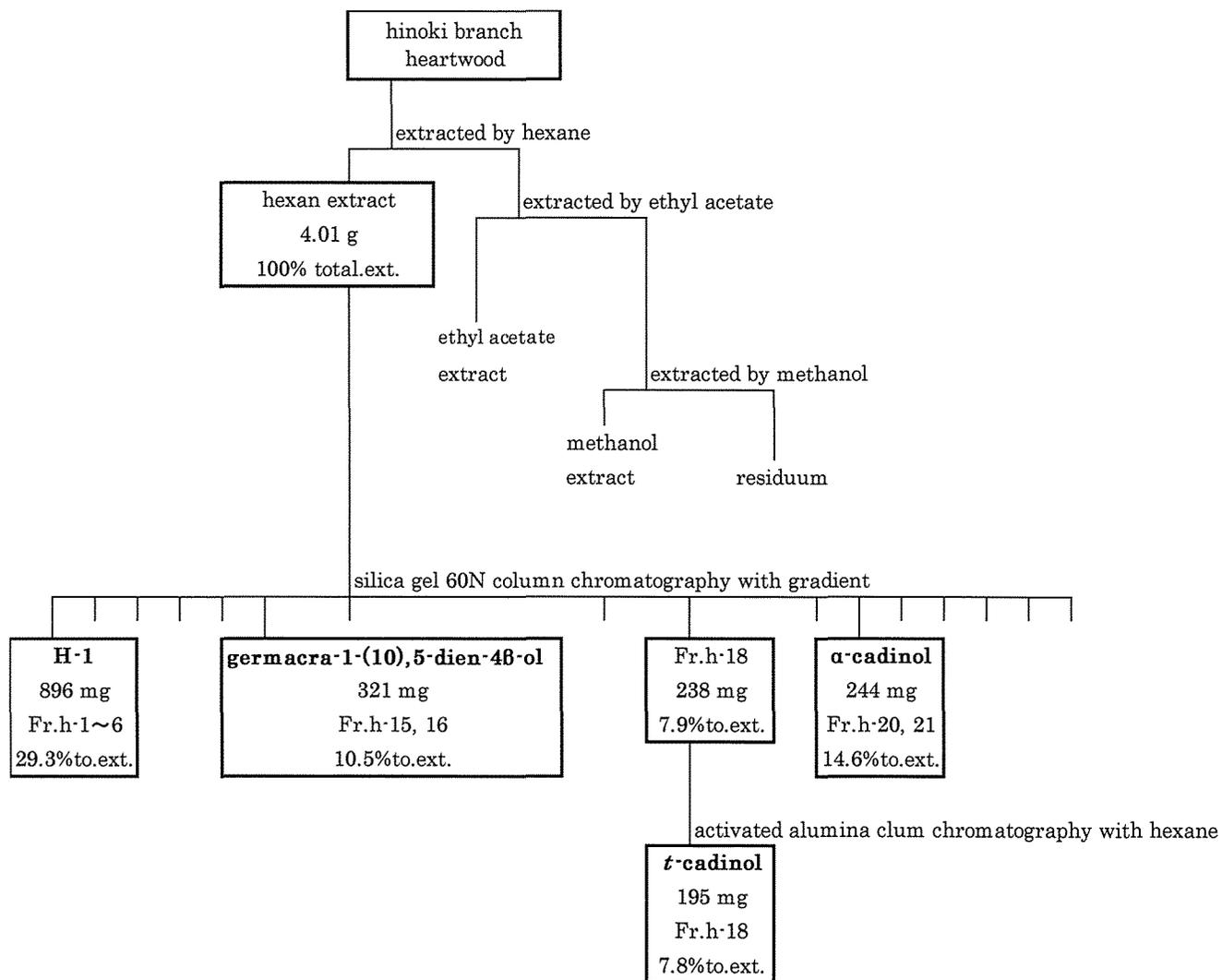


Fig. 2-2 Isolation scheme of hexane extract of hinoki branch.

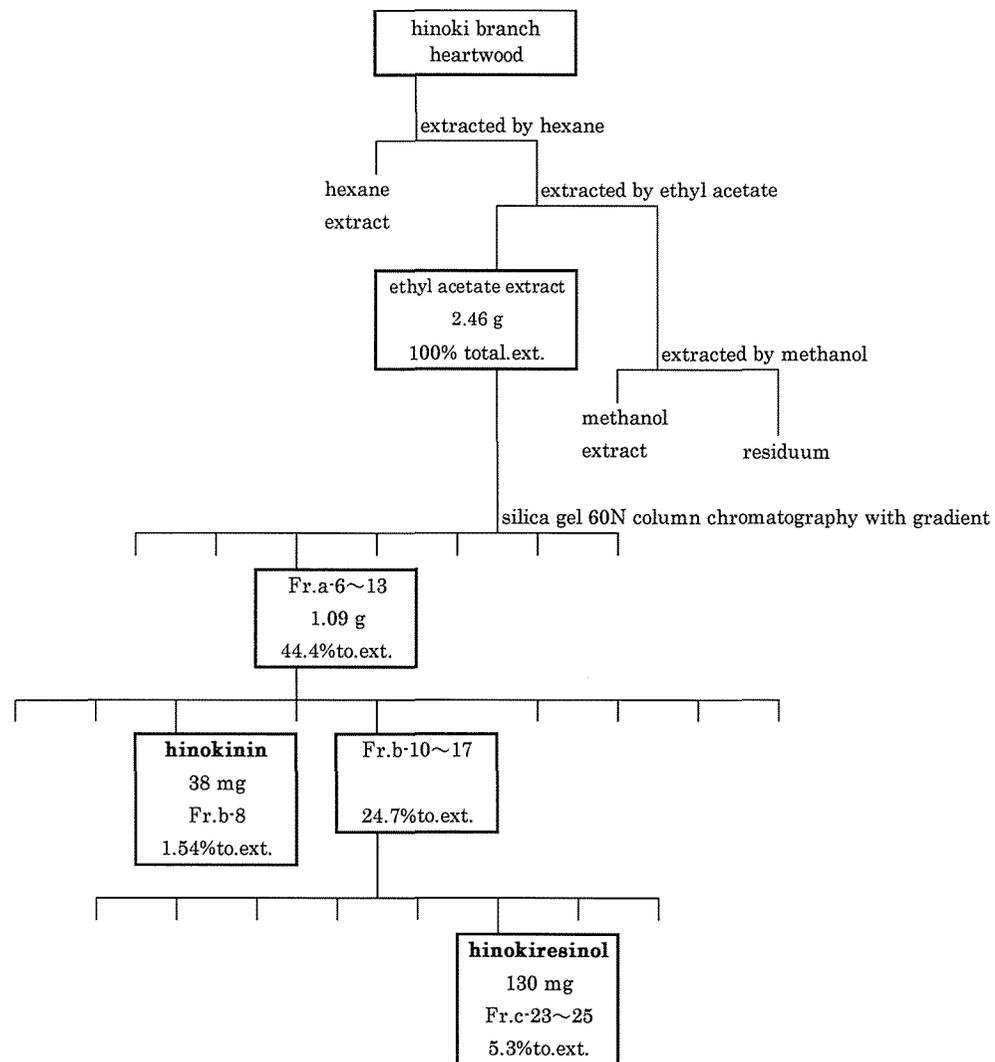


Fig. 2-3 Isolation scheme of ethyl acetate extract of hinoki branch.

Table 2-1 Yields of the successive extracts from hinoki heartwood.

	solvent	yield (%) [*]	
Branch heartwood extract	hexane	15.4	(54.2)
	ethyl acetate	11.0	(38.8)
	methanol	1.9	(6.9)
	Total	28.3	(100.0)
Trunk heartwood extract	hexane	3.1	(54.9)
	ethyl acetate	1.1	(19.0)
	methanol	1.4	(25.0)
	Total	5.6	(100.0)

^{*}Yields were calculated based on dry-weight of the heartwood.

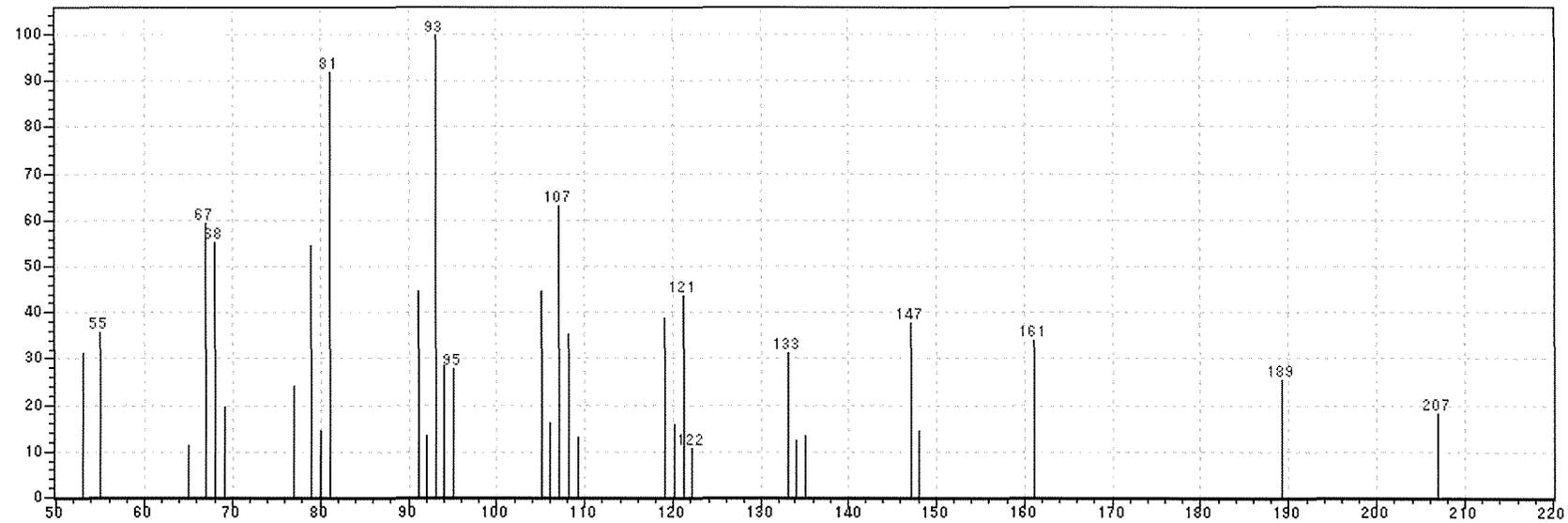


Fig. 2-4 Mass spectrum of β -elemene.

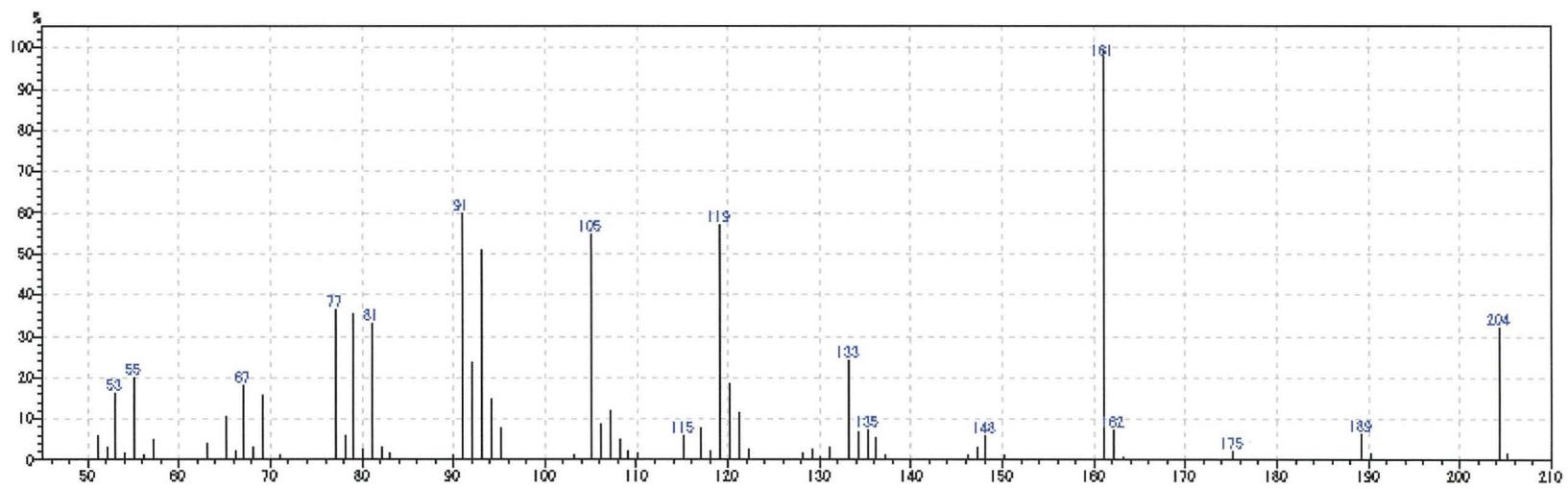


Fig. 2-5 Mass spectrum of copaene.

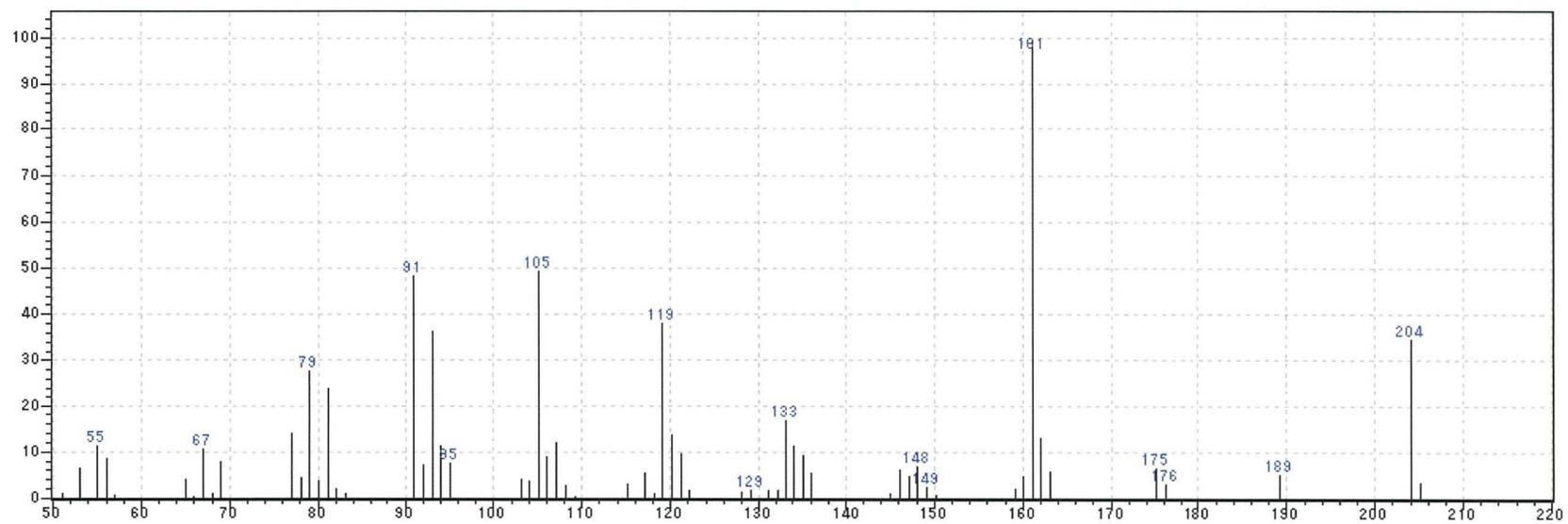


Fig. 2-6 Mass spectrum of α -murolene.

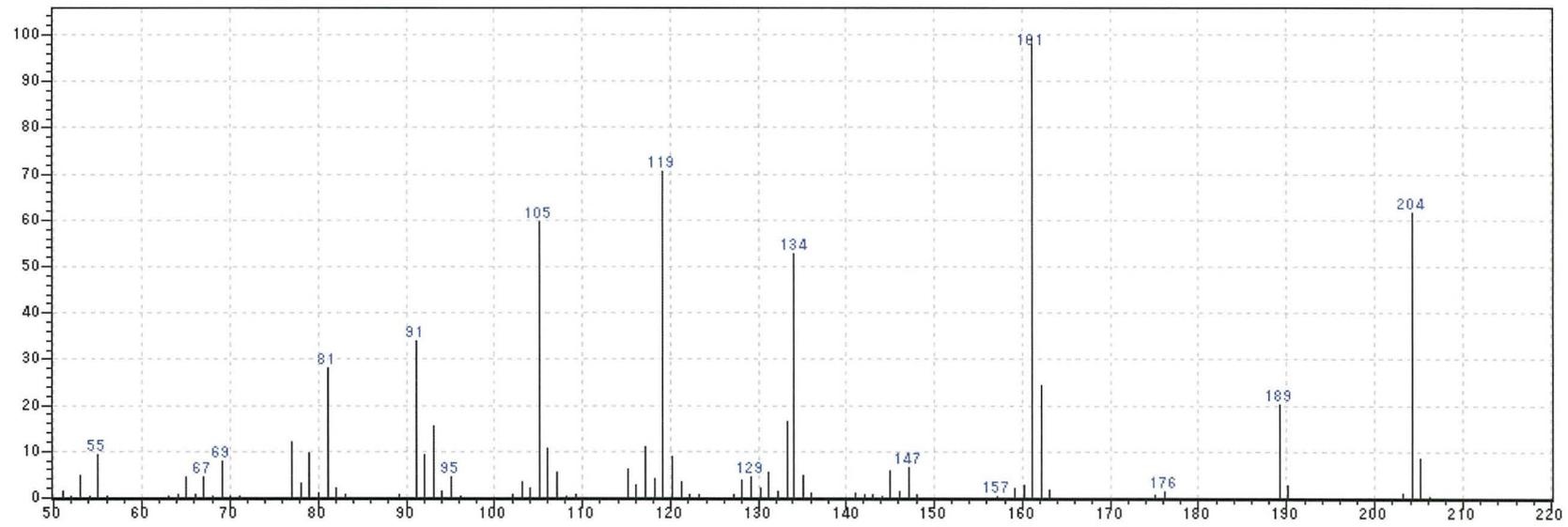


Fig. 2-7 Mass spectrum of γ -cadinene.

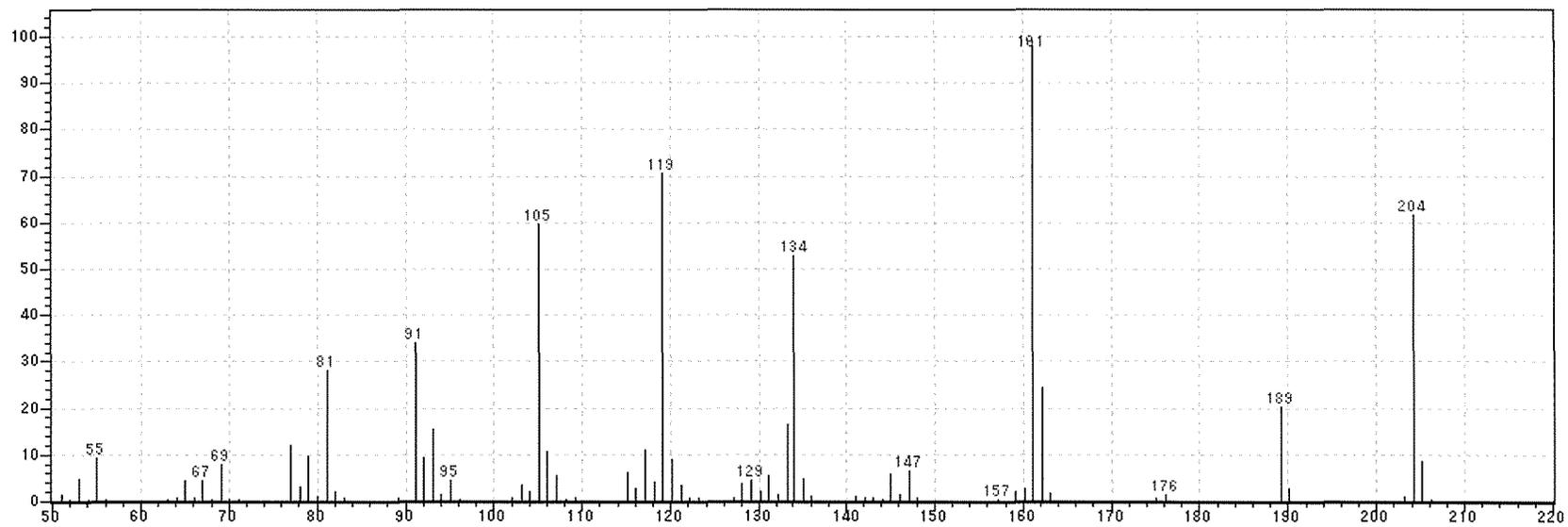


Fig. 2-8 Mass spectrum of δ -cadinene.

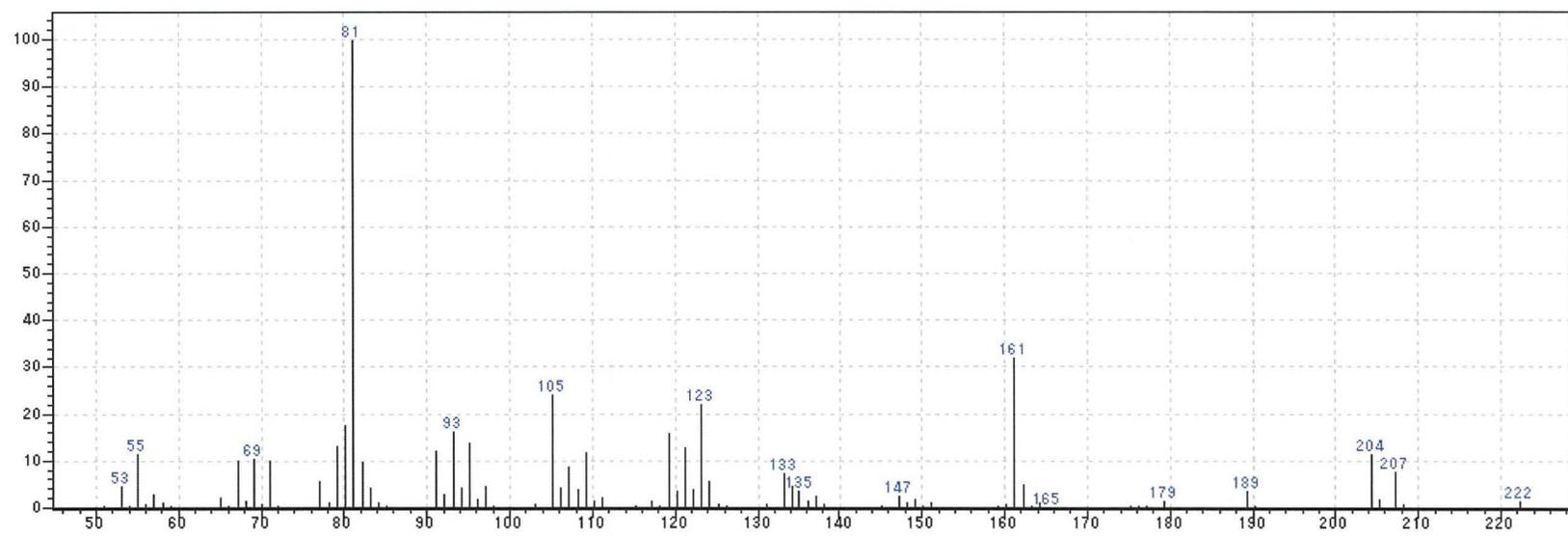


Fig. 2-9 Mass spectrum of germacra-1-(10) 5-dien-4 β -ol.

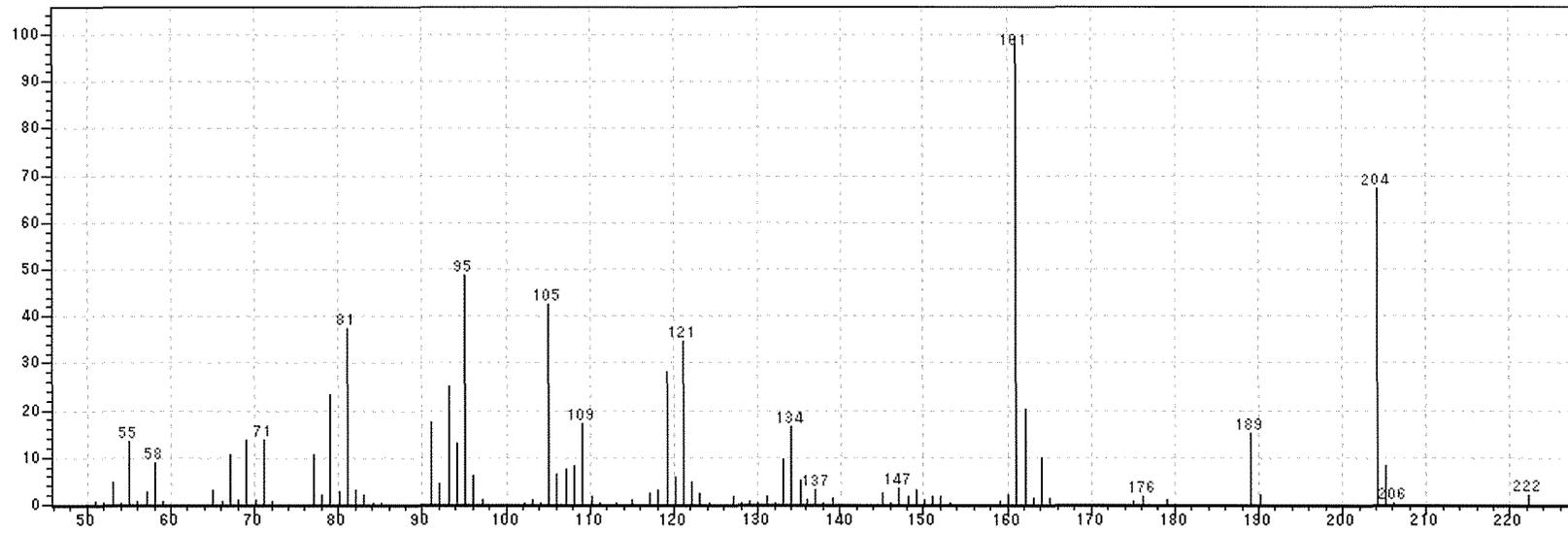


Fig. 2-10 Mass spectrum of *t*-cadinol.

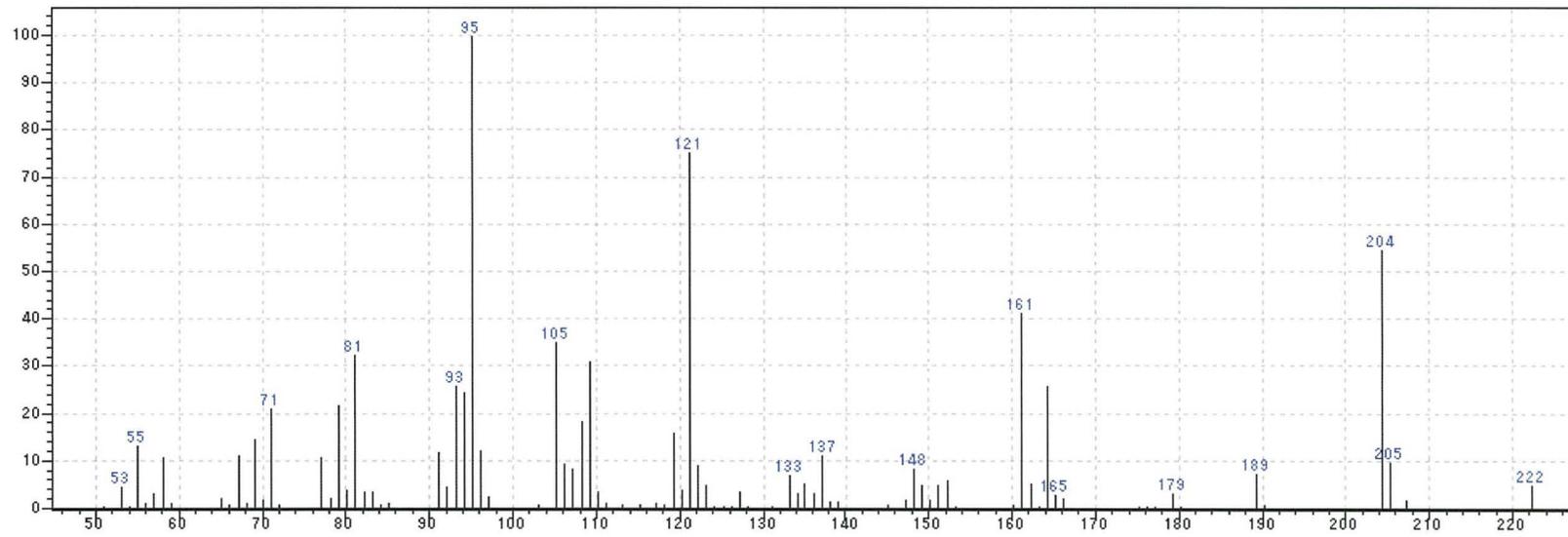


Fig. 2-11 Mass spectrum of α -cadinol.

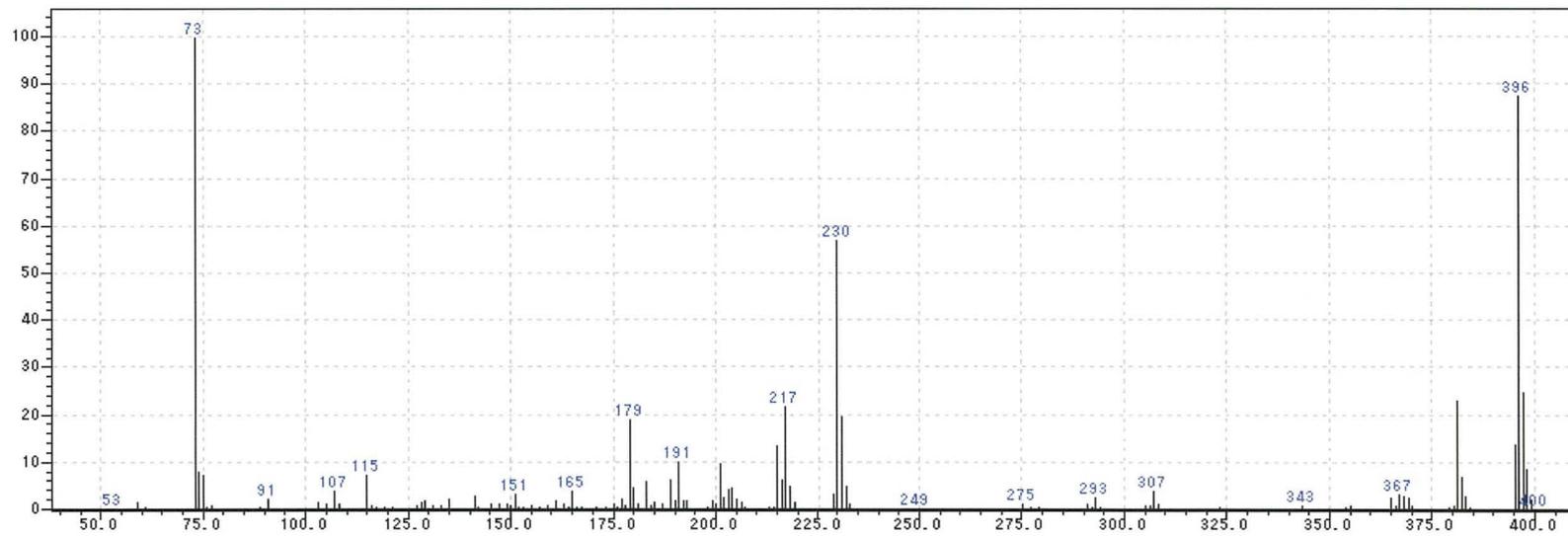


Fig. 2-12 Mass spectrum of hinokiresinol (TMS).

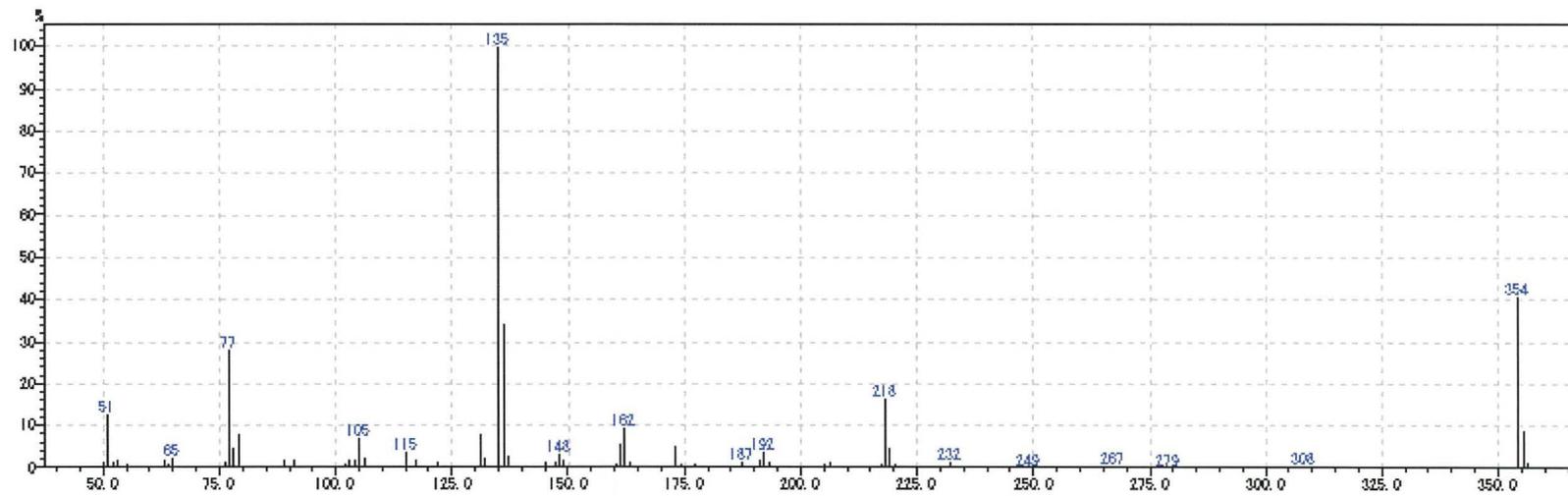


Fig. 2-13 Mass spectrum of hinokinin.

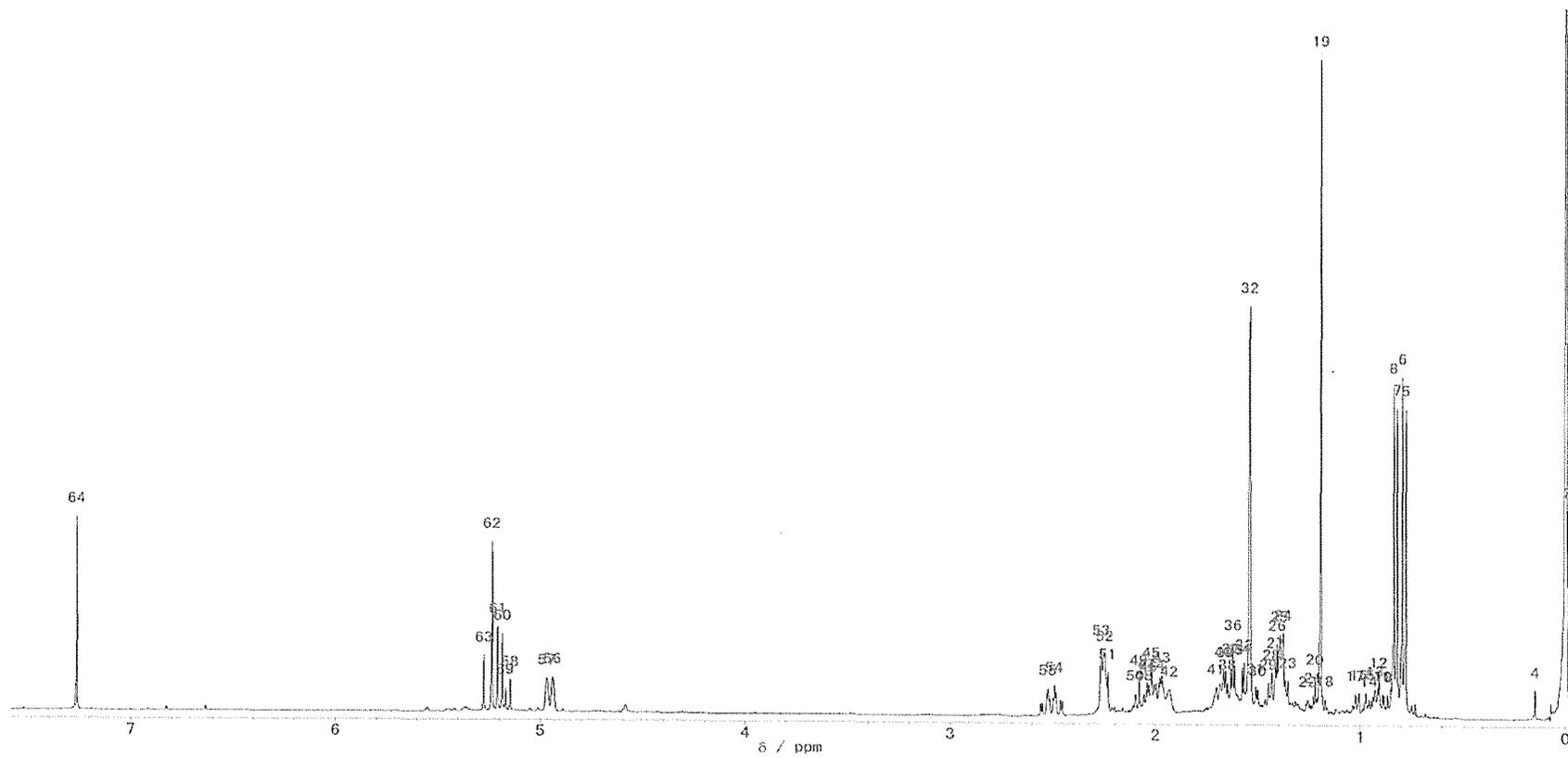


Fig. 2-14 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CDCl_3) of germacra-1-(10) 5-dien-4 β -ol.

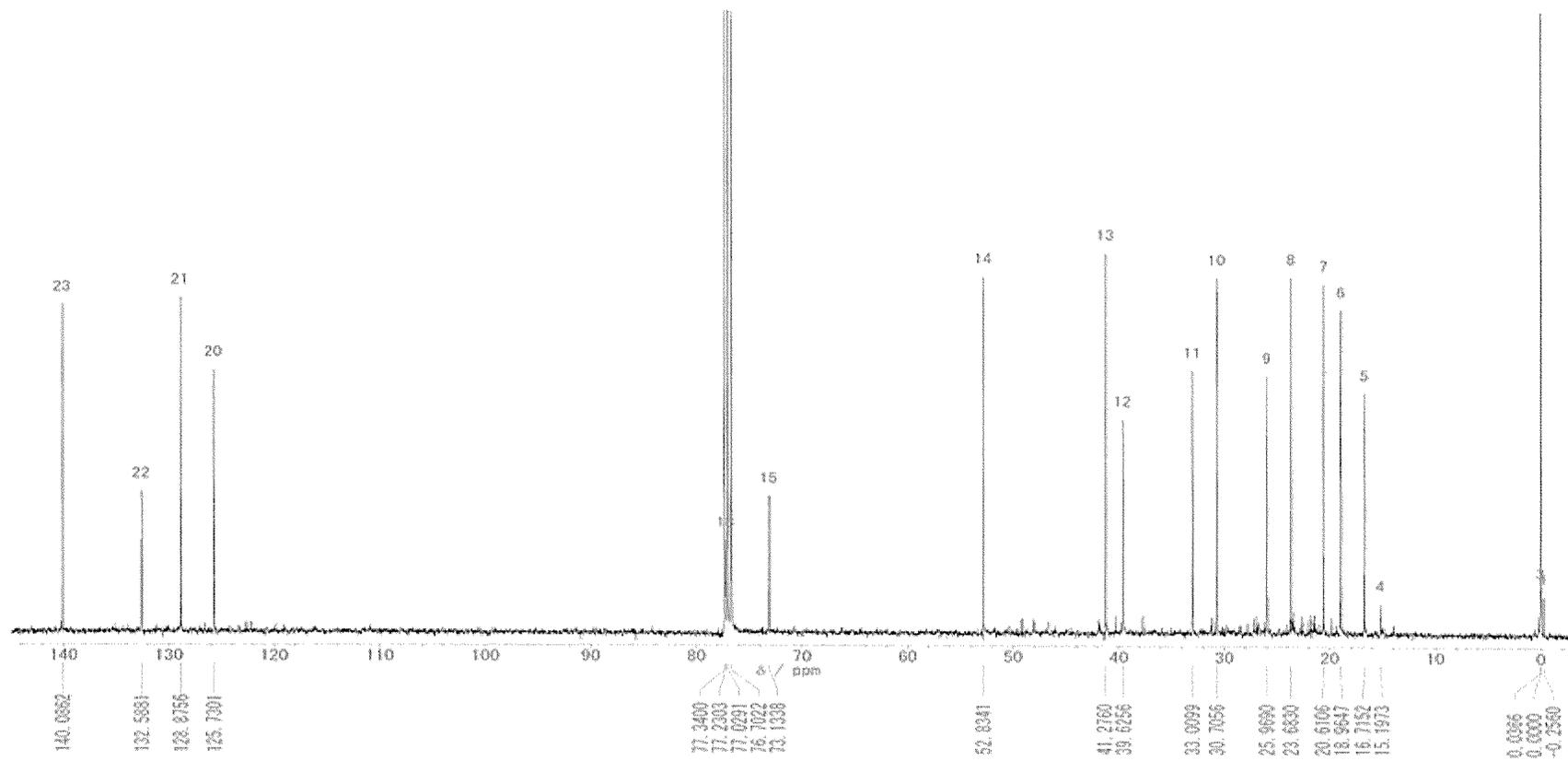


Fig. 2-15 ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of α -cadinol germacra-1-(10) 5-dien-4 β -ol.

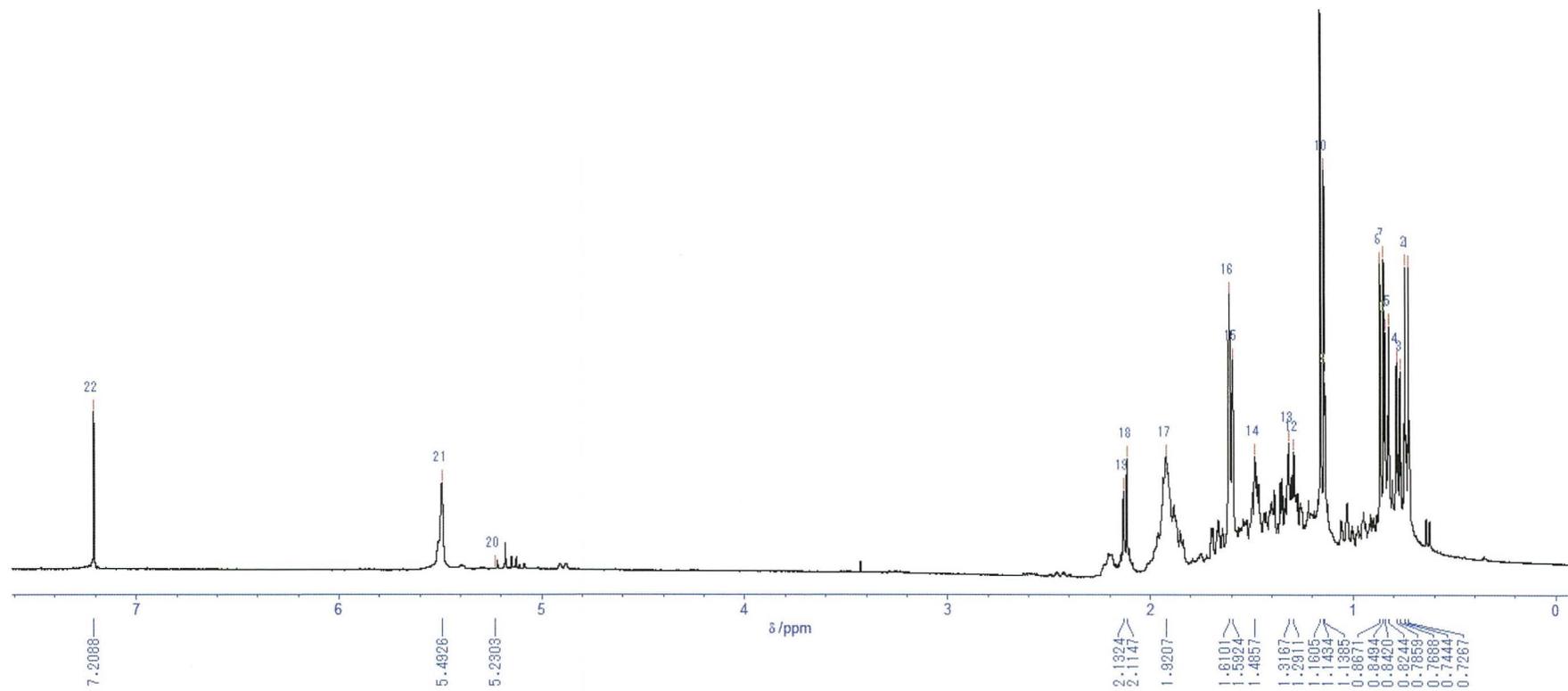


Fig. 2-16 ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of *t*-cadinol.

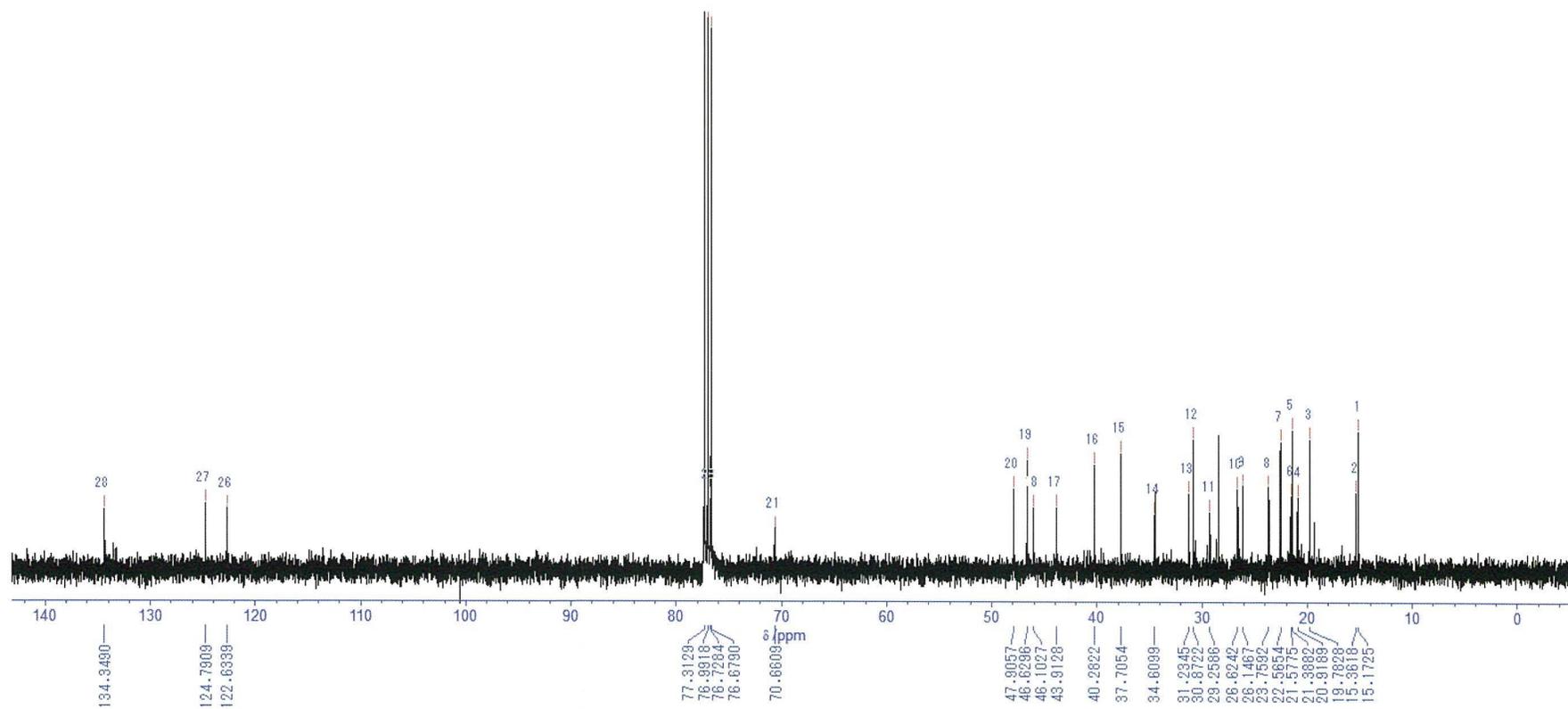


Fig. 2-17 ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of *t*-cadinol.

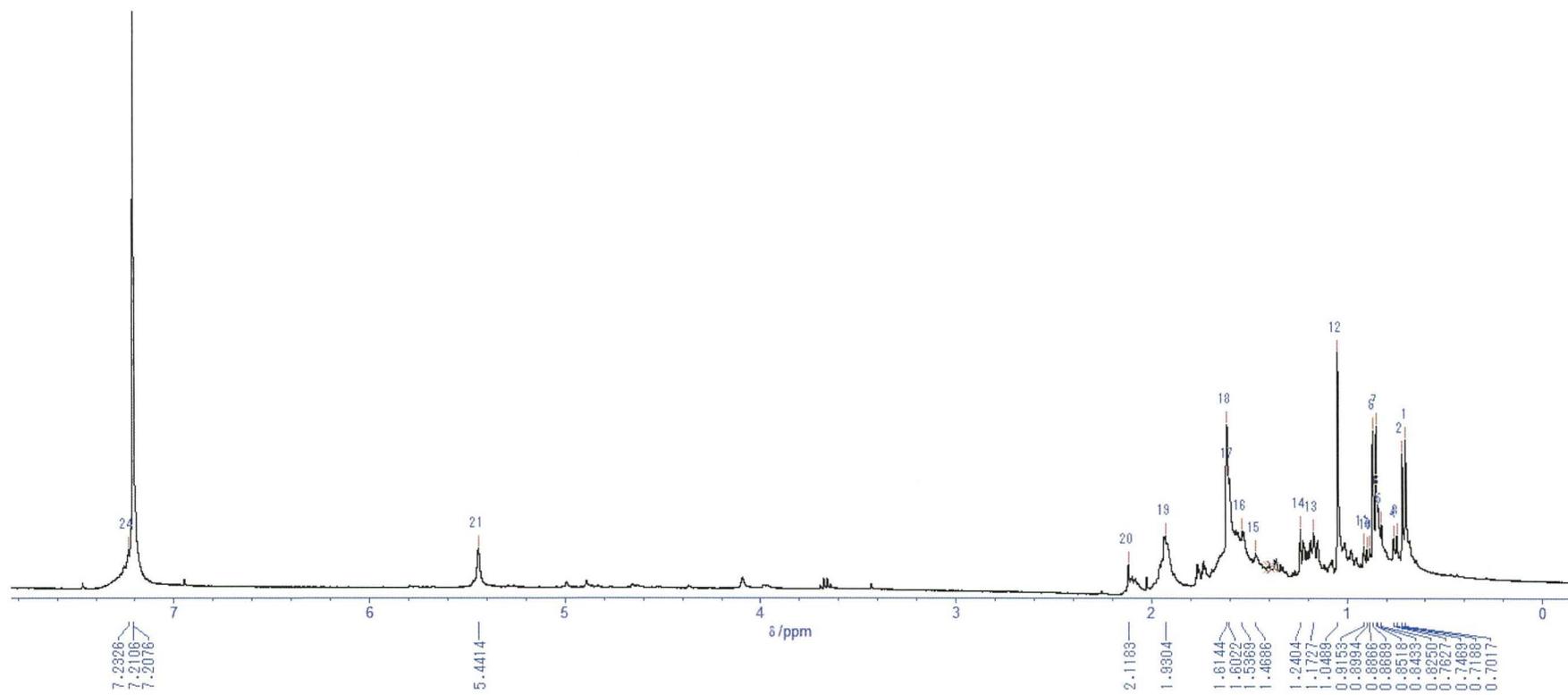


Fig. 2-18 ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of α -cadinol.

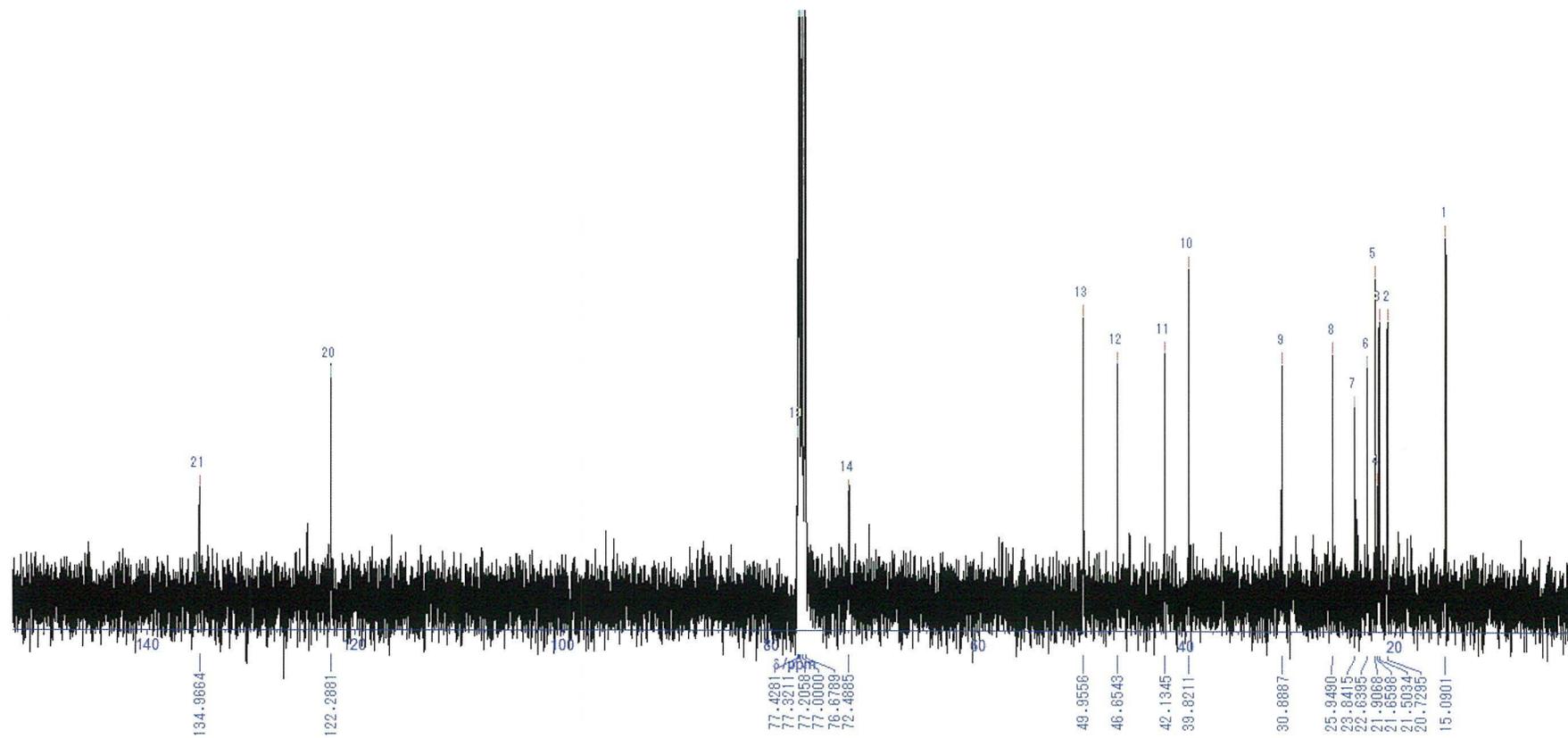


Fig. 2-19 ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of α -cadinol.

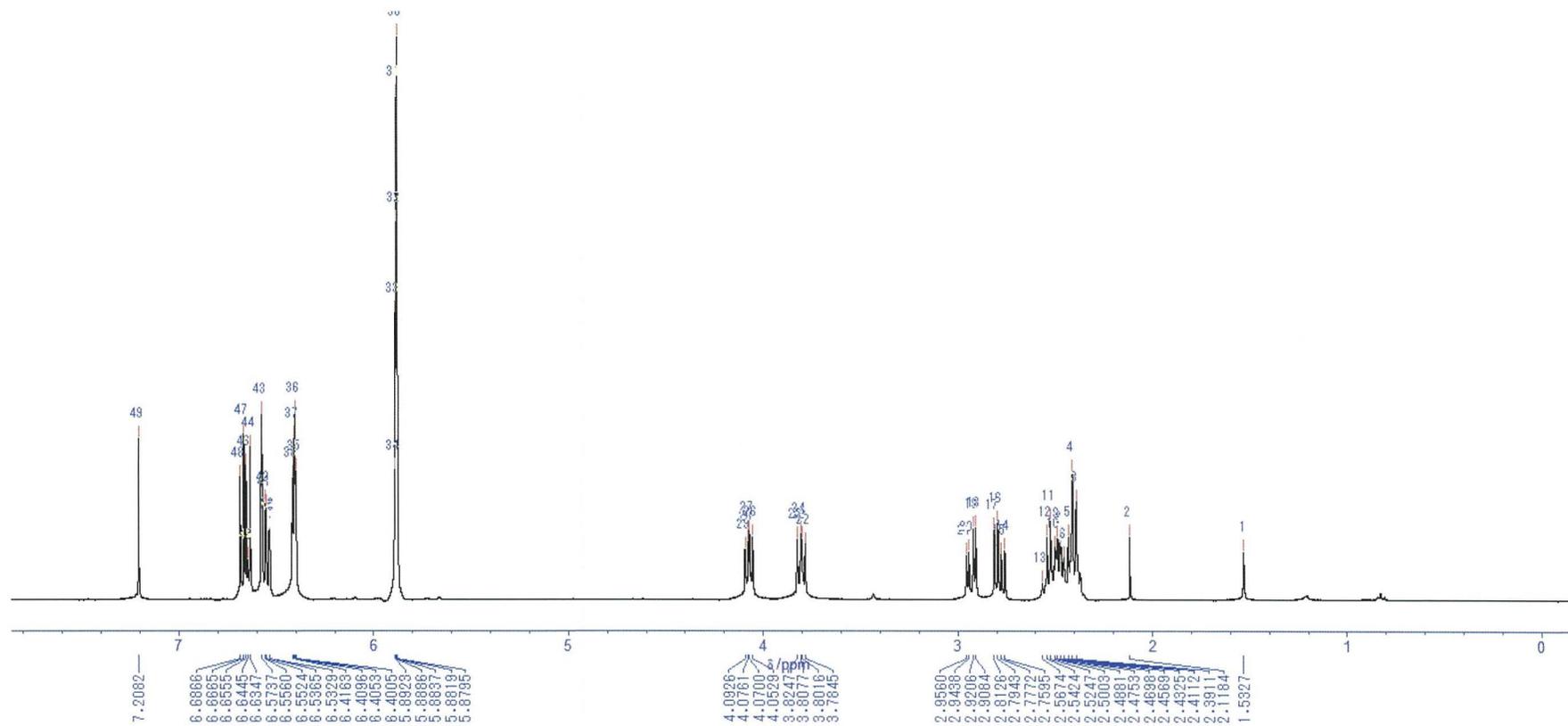


Fig. 2-20 ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of hinokinin.

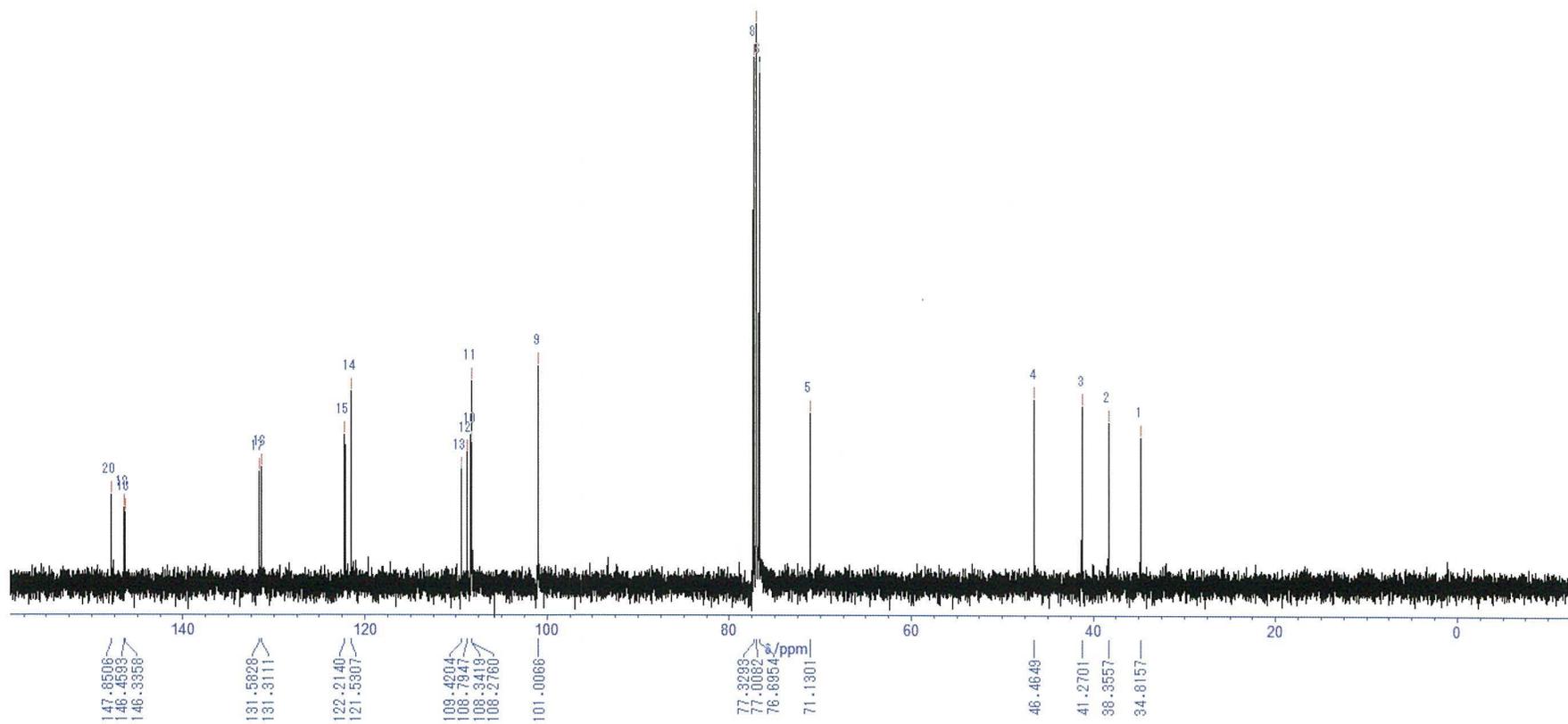


Fig. 2-21 ¹³C-NMR spectrum (CDCl₃) of hinokinin.

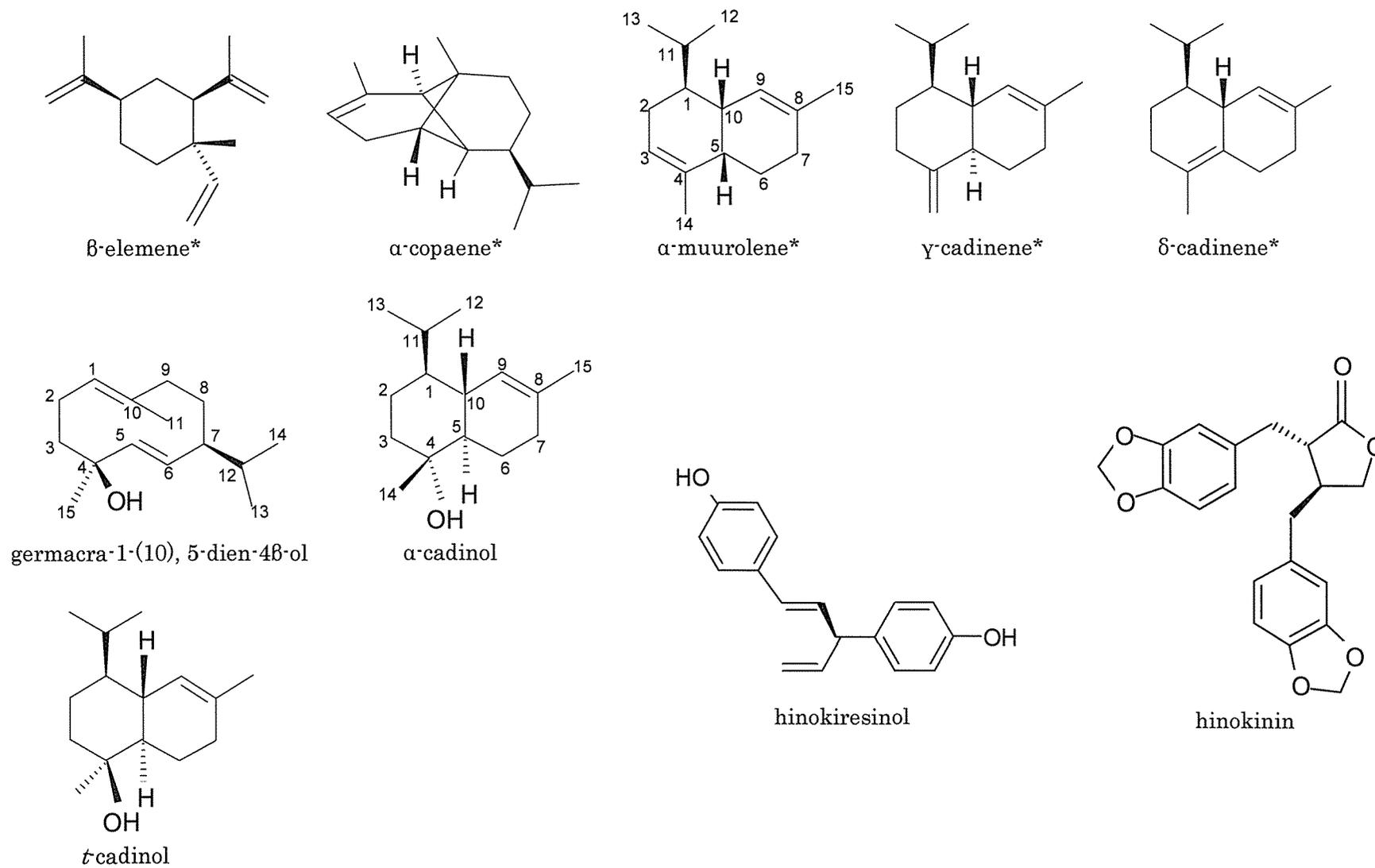


Fig. 2-22 Structures of compounds isolated from hinoki branch heartwood. *Means consisted compounds of the H-1 fraction.

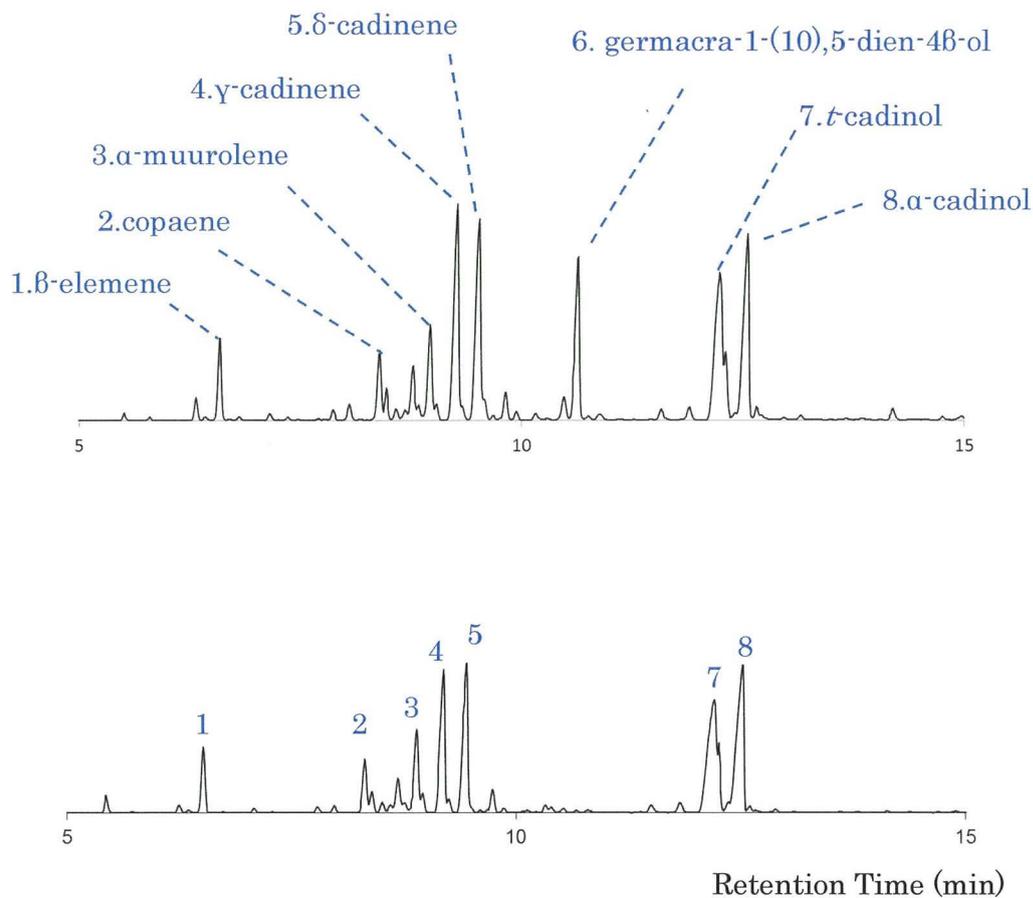


Fig. 2-23 Total ion chromatograms of hexane extract of branch heartwood (upper panel) and trunk heartwood (lower panel). Numbers 1–8 refer to compounds shown in Table 2-3.

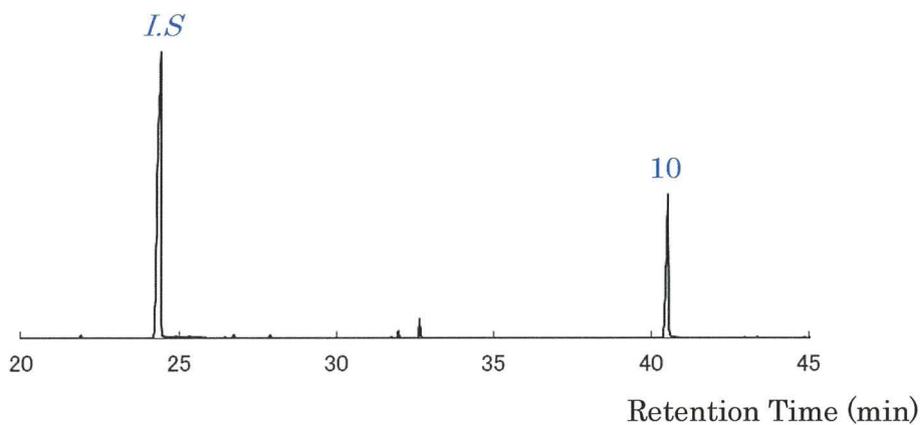
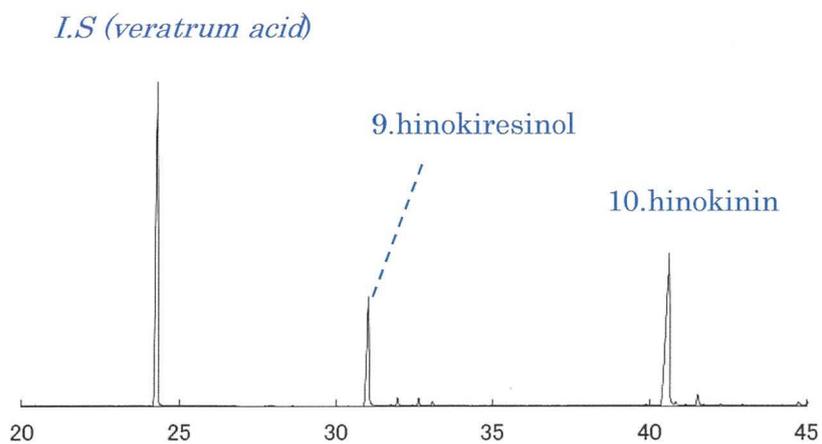


Fig. 2-24 Total ion chromatograms of ethyl acetate extract of branch heartwood (upper panel) and trunk heartwood (lower panel) which were trimethylsilylated

. Numbers 9-10 refer to compounds shown in Table 2-3. I.S: Internal standard (veratrum acid).

Table 2-3 Constituents of hexane and ethyl acetate extracts from hinoki branch heartwood (GC-FID).

	No.	Compound	Retention Time (min)	Content (mg/g dw) (%)			
				Branch (%)		Trunk (%)	
monoterpen hydrocarbon	1	β -elemene	9.3	2.6	(1.9)	0.5	(3.1)
sesquiterpen hydrocarbon	2	copaene	11.4	3.3	(2.4)	0.6	(3.6)
	3	α -muurolene	12.0	4.7	(3.5)	0.9	(5.2)
	4	γ -cadinene	12.4	21.5	(16.0)	2.3	(13.8)
	5	δ -cadinene	12.7	20.4	(15.1)	2.5	(14.9)
sesquiterpen alcohol	6	germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol	13.8	9.2	(6.8)	T*	
	7	<i>t</i> -cadinol	15.7	25.7	(19.1)	4.3	(25.7)
	8	α -cadinol	16.9	23.0	(17.1)	3.9	(23.5)
norlignan	9	hinokiresinol	34.8	8.2	(6.1)	T*	
lignan	10	hinokinin	44.7	16.3	(12.1)	1.7	(10.5)
Total				134.9	(100)	16.7	(100)

* Trace

* content of No.1-8, 10 (mg/g dw) = Yields of extracts \times (Each component peak area / I.S. peak area) (GC-FID)* content of No.9 (mg/g dw); $y = 0.5064x$ * content of No.10 (mg/g dw); $y = 1.5498x$

第3章 ヒノキ枝心材の抗菌活性

第1節 緒言

ヒノキの耐朽性は古くから知られ、木造建築材として重用されてきた。この特性は樹木中に含まれる樹木抽出成分に起因し、これに関する多くの研究が成されてきた。近藤ら (近藤ら 1986), および金城ら (金城ら 1986) によって、ヒノキ材の抗菌活性, 特に木材腐朽菌に対する活性は α -cadinol, *t*-muurolol といったセスキテルペンアルコールに起因することが報告されている。また, 大谷らの報告ではヒノキ精油中に含まれる α -terpineol をはじめとするモノテルペンアルコールにも高い抗菌活性があるとされている (大谷ら 2001)。しかしながら, ヒノキの抗菌活性に関する報告の多くは, 材として商業的価値を持つ幹材に関するものが大半である。ヒノキの幹以外の部位の抗菌活性については, Yang et al. によって葉油成分の担子菌類, 微生物に対する活性が報告されているが (Yang et al. 2007), 枝材に関する抗菌活性に関してはこれまでに報告がない。

そこで, 本章では未利用木質資源であるヒノキ枝の有効利用法の一つとして, その抗菌活性を明らかにするため, 幹心材と枝心材の抗菌活性試験をおこない, その差異を検討した。

第2節 実験方法

2.1 試料・試料調製

2.1.1 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物

試料は第2章2.1.1と同様のヒノキ枝・幹心材の hexane, ethyl acetate, methanol 逐次抽出物を用いた。これらの逐次抽出物を acetone にて濃度 1.0 mg/ml に調製し、検定試料に用いた。

2.1.2 ヒノキ枝心材単離化合物

試料は第2章2.3にてヒノキ枝心材の hexane, ethyl acetate 抽出物よりカラムクロマトグラフィーを用いて分離した H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinol を用いた。これらを acetone にて濃度 1.0 mg/ml に調製し、検定試料とした。また、対照試料となる positive control として、これまでに様々な菌に対する活性報告が成されている β -thujaplicin (hinokitiol) を用いた。

2.2 抗菌活性試験

2.2.1 供試生物

供試菌には JIS Z2119 “木材強制腐朽試験” および JIS K1571 “木材防腐剤の性能基準及び試験方法” で指定されている6種の木材腐朽菌（白色腐朽菌2種、褐色腐朽菌2種、軟腐朽菌2種）および JIS Z2911 “かび抵抗性試験方法” にて指定されている4種のかび菌を用いた。木材腐朽菌には、白色腐朽菌の *Trametes versicolor* (カワラタケ, NBRC: 30340) および *Lenzites betulinus* (カイガラタケ, MAFF: 420199, 褐色腐朽菌の *Fomitopsis palustris* (オオウズラタケ, NBRC: 30339) および *Gloeophyllum trabeum* (キチリメンタケ, MAFF: 420223), 軟腐朽菌の *Trichoderma virens* (NBRC: 6347) および *Chaetomium globosum* (MAFF: 645007) を用いた。かび菌には *Rhizopus oryzae* (NBRC: 31005A), *Aspergillus niger* (NBRC: 6342), *Penicillium*

citrinum (NBRC: 6352) および *Cladosporium cladosporioides* (NBRC: 6348)を用いた。

尚, ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物の抗菌試験には供試菌グループの代表的な菌種である *T. versicolor* (白色腐朽菌), *F. palustris* (褐色腐朽菌), *T. virens* (軟腐朽菌) および *R. oryzae* (かび菌) の 4 種を用い, ヒノキ枝心材単離物による試験には, より詳細に活性を検討するため上記 10 種の供試菌を用いた。供試菌の詳細を Table 3. 1 に示す。

T. versicolor, *F. palustris*, *A. niger*, *P. citrinum*, *R. oryzae*, *C. cladosporioides* は NITE (独立行政法人製品評価技術基盤機構) より, *L. betulinus*, *G. trabeum* および *T. virens* は NIAS (農業生物資源ジーンバンク) より購入した。試験前に菌株を Potato Dextrose Agar (PDA) 培地 (パールコア®ポテトデキストロース寒天培地 '栄研', Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) 上で $26 \pm 1^\circ\text{C}$ の暗条件下で前培養し, 試験に供した。

2. 2. 2 試験方法

抗菌活性試験は, 小藤田ら (小藤田ら 2001) および Kusumoto et al. (Kusumoto et al. 2010) の報告に基づいておこなった。試験培地には PDA 培地を内径 80 mm 滅菌シャーレ内に 15 ml 分注し, 固化後に常温になったものを用いた。クリーンベンチ内で調製した各抽出物 300 μl を PDA 培地表面に均一になるよう塗布し, 1 時間気乾し溶媒を十分に揮発させた。この際, 培地表面に 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 試料が塗布されたことになる。なお, 対照試験培地 (control) には, acetone のみを 300 μl 塗布し, 同様に気乾させた試験区を用いた。前培養した供試菌の菌叢外縁部から 5 mm コルクボーラーで菌叢をくり抜き, 調製した培地中央に置床後パラフィルムで密閉した。尚, 各試験は 3 反復おこなった。試験培地は恒温器内で $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 60%の暗条件下で静置培養し, control の菌叢外縁が内径 80 mm シャーレの淵に達した時点で試験を終了とした。

試験期間の目安は *T. versicolor* 約 6 日間, *L. betulinus* 約 10 日間, *F. palustris* 約 14 日間, *G. trabeum* 約 6 日間 *T. virens* 約 48 時間, *C. globosum* 約 6 日間, *A. niger* 約

14 日間, *R. oryzae* 約 32 時間, *P. citrinum* 約 5 日間, *C. cladosporioides* 約 32 日間である。最終日の菌叢 4 方向の直径を計測し, その平均値 ± 標準誤差 (SE) をもとめ, 以下の式より control に対する菌叢直径生長率 (%) を算出し, Antifungal index (%) として活性を評価した。

$$\text{Antifungal index (\%)} = 100 \times (1 - Da/Db)$$

Da: the total average of the mycelia diameter of each sample – 5 mm.

Db: the average diameter of the mycelia in the control – 5 mm.

試験の模式図を Fig. 3-1 に示す。

2. 2. 3 統計処理

算出した Antifungal index の値は Analysis of Variance (ANOVA) Tukey-Kramer test (Statcel 2 software, OMS, Tokyo, Japan) を用いて統計処理し, 活性を評価した ($p < 0.05$).

第3節 結果と考察

3.1 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物の抗菌活性

各菌に対する枝幹心材逐次抽出物の Antifungal index を Table 3-2 に示す。白色腐朽菌の *T. versicolor* に対してはいずれの抽出物も 30%以下の低い活性であり、枝と幹抽出物の間に顕著な差は認められなかった。褐色腐朽菌の *F. palustris* に対しては枝・幹ともに hexane, ethyl acetate 抽出物に活性が確認され、Antifungal index は枝心材 hexane 抽出物が $50.0 \pm 1.8\%$, ethyl acetate 抽出物は $49.0 \pm 6.4\%$ であり、これに対し幹心材 hexane 抽出物は $45.2 \pm 6.4\%$, ethyl acetate 抽出物は $44.6 \pm 4.8\%$ と、若干ではあるが枝心材抽出物は幹に比べ活性が高い傾向がみられた。軟腐朽菌の *T. virens* に対する枝 hexane 抽出物の Antifungal index は $42.0 \pm 4.2\%$ で幹 hexane 抽出物は $24.8 \pm 4.1\%$ と、顕著な活性の差がみられた。ethyl acetate 抽出物についても若干枝心材抽出物が高い傾向をみせた。かび菌の *R. oryzae* に対して枝 hexane 抽出物が $31.6 \pm 4.1\%$, 幹 hexane 抽出物 $22.0 \pm 4.8\%$ の活性を示した。なお、いずれの菌に対しても枝、幹ともに methanol 抽出物の活性は低いものであった。

以上の結果より、ヒノキの枝・幹の抗菌活性成分は hexane および ethyl acetate 抽出物を中心に存在しており、幹心材抽出物に比べ枝心材が高い活性を発揮する傾向がみられた。また枝心材は幹に比べ 5 倍の hexane 抽出物、10 倍の ethyl acetate 抽出物を含有していることから、ヒノキ枝心材は幹心材に比べ量的な面でも高い抗菌活性を有するといえる。

3.2 ヒノキ枝心材単離化合物の抗菌活性

各菌に対する枝心材単離物の Antifungal index を Table 3-3 に示す。白色腐朽菌の *T. versicolor*, *L. betulinus* に対し positive control である β -thujaplicin は 90%を超える高い活性を示した。それに対し単離化合物の活性は *T. versicolor* および *L. betulinus* に対し全体的に低いものであるが、 α -cadinol が *T. versicolor* に対し $52.5 \pm 4.1\%$ の活性を示し、hinokinin が $37.7 \pm 0.7\%$ の活性を示した。褐色腐朽菌の *F. palustris*, *G.*

trabeum に対しても β -thujaplicin は 90%超の高い活性を示した。 *F. palustris* に対しては顕著な活性をみせる化合物は確認できなかったが、 *G. trabeum* に対しセスキテルペンアルコールの α -cadinol が $87.4 \pm 1.1\%$, *t*-cadinol もそれに次ぐ $85.2 \pm 4.1\%$ の活性をみせた。 軟腐朽菌の *T. virens* に対しては β -thujaplicin の Antifungal index ($50.1 \pm 1.2\%$) を α -cadinol ($60.1 \pm 1.5\%$), hinokiresinol ($74.2 \pm 1.2\%$), hinokinin ($50.4 \pm 10.9\%$) が上回り、これまでと異なる活性傾向をみせた。 また、 *C. globosum* に対して α -cadinol が $87.4 \pm 1.1\%$ の非常に高い活性を示し、 hinokinin ($58.7 \pm 1.7\%$), *t*-cadinol ($58.5 \pm 1.7\%$) がそれに続いた。 かび菌に対する活性試験では、 *A. niger* に対しては β -thujaplicin の活性は $23.2 \pm 1.1\%$ と低く、単離化合物の活性もそれを下回るものであった。 *P. citrinum* に対しては β -thujaplicin が 100%の活性をみせ、化合物では α -cadinol ($77.0 \pm 3.2\%$), *t*-cadinol ($76.4 \pm 1.2\%$) のほか、 germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol ($42.9 \pm 3.8\%$), hinokinin ($60.1 \pm 4.5\%$) に活性が確認された。 *R. oryzae* に対しては β -thujaplicin が $57.1 \pm 0.9\%$ の活性を示し hinokiresinol がそれに続く $45.2 \pm 0.9\%$ の活性をみせた。 *C. cladosporioides* に対しては β -thujaplicin が $48.7 \pm 2.3\%$ の活性をみせたが、単離化合物の活性はいずれも低いものであった。

以上の結果より、セスキテルペンアルコールの α -cadinol が白色腐朽菌の *T. versicolor*, 褐色腐朽菌の *G. trabeum*, 軟腐朽菌の *T. virens*, *C. globosum* およびかび菌の *R. oryzae*, *P. citrinum* に対して高い活性をみせた。 α -Cadinol の立体異性体である *t*-cadinol も *G. trabeum*, *C. globosum*, *P. citrinum* に対し高い活性を示した。 これら cadinol 類の抗菌活性については、ヒノキ材やショウナンボク葉に含まれる α -cadinol の木材腐朽菌に対する活性 (近藤ら 1986; 金城ら 1986; Chang et al. 2008) や、スワルツィア属植物中の *t*-cadinol の抗菌抗微生物活性 (Rojas et al. 2006) など、多くの活性報告が成されている。 枝の特徴的なセスキテルペンアルコールである germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol の活性は上記の化合物に比べやや劣るが *P. citrinum* など

に活性がみられた。枝特有の化合物であるノルリグナンの hinokiresinol は positive control の β -thujaplicin や他の化合物が比較的低い活性であった *T. virens* や *R. oryzae* に対し高い活性を示した。また枝・幹両方に共通して含有される hinokinin は *T. versicolor*, *C. globosum*, *T. virens* といった菌に対し活性を示した。

ヒノキ枝心材成分の中でも菌によって化合物が示す活性は様々であり、このように異なる活性傾向をもつ複数の化合物を樹体内に持つことによって、多面的に樹体を防御していると考えられる。また前章においてヒノキ枝心材は幹心材に比べ多量の hexane, ethyl acetate 抽出物を有していることから、ヒノキ枝心材は量的な面でも高い活性を有するものと考えられる。

第4節 小括

未利用木質資源であるヒノキ枝心材の有効利用法の一つとして、その抗菌活性について幹心材と比較しながら検討した。

ヒノキ枝・幹心材部を hexane, ethyl acetate, methanol で逐次抽出し得られた抽出物を用い、白色腐朽菌の *T. versicolor*, 褐色腐朽菌の *F. palustris*, 軟腐朽菌の *T. virens* および他のかび菌の *R. oryzae* に対する活性試験をおこなった。その結果、枝・幹心材の hexane, ethyl acetate 抽出物に活性が確認された。

続いて枝心材の hexane, ethyl acetate 抽出物から得られた炭化水素の H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinin を用いて抗菌活性試験をおこなった。その結果、セスキテルペンアルコールの α -cadinol が白色腐朽菌の *T. versicolor*, 褐色腐朽菌の *G. trabeum*, 軟腐朽菌の *T. virens*, *C. globosum* およびかび菌の *P. citrinum* といった複数の菌に対して高活性を示した。また、 α -Cadinol の立体異性体である *t*-cadinol も *G. trabeum*, *C. globosum*, および *P. citrinum* に対し高い活性をみせた。枝の特徴的なセスキテルペンアルコールである germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol の活性は上記の化合物に比べやや劣るが *P. citrinum* などに活性を示した。枝特有の化合物であるノルリグナンの hinokiresinol は positive control の β -thujaplicin や他の化合物の活性が低かった *T. virens* や *R. oryzae* に対して高い活性を示した。また、枝・幹両方に共通して含有される hinokinin は *T. versicolor*, *C. globosum*, *T. virens* に対し活性を示した。

このように菌によって活性を示す化合物は様々であり、複数の化合物が多様な形で樹木の抗菌活性に寄与していることが考えられる。また、ヒノキ枝心材は幹心材よりも多量の抽出物を有し、化合物によって多面的に活性を発揮するほか、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol や hinokiresinol といった枝特有の化合物を含むことか、量的・質的な面で幹心材より高い抗菌活性を持つといえる。

Table 3-1 Details of the fungi which were used for an examination.

Wood-rot Fungi	White-rot fungi	<i>Trametes versicolor</i> (Linnaeus:Fries) Pilat **	NBRC 30340
	White-rot fungi	<i>Lenzites betulinus</i> (Berkeley et M.A. Curtis) Murrill	MAFF 420199
	Brown-rot fungi	<i>Fomitopsis palustris</i> (Linnaeus:Fries) Pilat **	NBRC 30339
	Brown-rot fungi	<i>Gloeophyllum trabeum</i> (Persoon:Fries) Murrill	MAFF 420223
	Soft-rot fungi · Fungus Group 4*	<i>Trichoderma virens</i> (J.H. Miller, Giddens et A.A. Foster) Arx **	MAFF 645007
	Soft-rot fungi · Fungus Group 5*	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze : Fries	NBRC 6347
Other Fungi*	Fungus Group 1*	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	NBRC 6342
	Fungus Group 2*	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	NBRC 6352
	Fungus Group 3*	<i>Rhizopus oryzae</i> Went et Prinsen-Geerligs **	NBRC 31005
	Fungus Group 4*	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresenius) G.A. de Vries	NBRC 6348

* JIS Z2911 かび抵抗性試験に用いられる菌株を Fungus Group 1-5 とした.

** 逐次抽出物の活性試験には**のついた菌株を用いた.

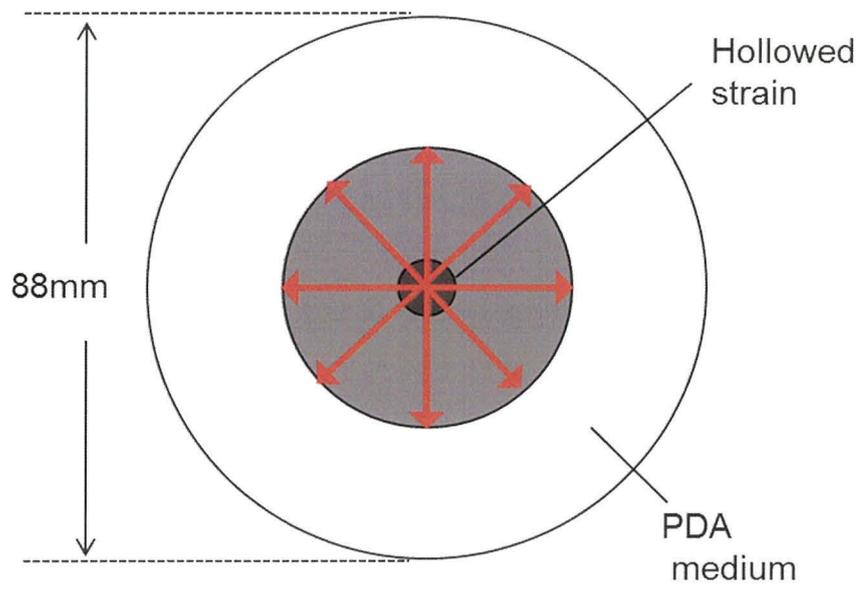


Fig. 3-1 Diagram of antifungal test method.

Table 3-2 Antifungal index of extracts from hinoki heartwood. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$.

Solvent	Antifungal index (\pm SE) (%)			
	White-rot fungi	Brown-rot fungi	Soft-rot fungi	Other fungi
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Fomitopsis palustris</i>	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
Branch				
Hexane	24.3 \pm 9.5 ab	50.0 \pm 1.8 a	42.0 \pm 4.2 a	31.6 \pm 4.1 a
Ethyl acetate	26.8 \pm 5.1 a	49.0 \pm 3.8 a	42.0 \pm 3.7 a	26.7 \pm 4.7 a
Methanol	10.3 \pm 3.2 b	23.4 \pm 8.5 c	17.9 \pm 14.0 b	13.1 \pm 12.2 a
Trunk				
Hexane	26.2 \pm 9.8 a	45.2 \pm 6.4 ab	24.8 \pm 4.1 ab	22.0 \pm 4.8 a
Ethyl acetate	20.6 \pm 8.3 ab	44.6 \pm 4.8 ab	36.9 \pm 4.9 a	25.3 \pm 9.7 a
Methanol	14.0 \pm 12.6 ab	32.4 \pm 4.0 bc	27.0 \pm 8.9 ab	16.8 \pm 9.6 a

Table 3-3 Antifungal index of isolated compounds from hinoki branch heartwood. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$.

Sample	Antifungal index (\pm SE) (%)					
	Wood rot fungi					
	White-rot fungi		Brown-rot fungi		Soft-rot fungi	
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Lenzites betulinus</i>	<i>Fomitopsis palustris</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Chaetomium globosum</i>
H-1	15.0 \pm 1.2 c	7.6 \pm 2.6 b	16.1 \pm 1.2 b	- 2.3 \pm 3.0 b	11.2 \pm 0.7 d	1.6 \pm 1.6 d
germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol	18.2 \pm 0.8 c	4.2 \pm 1.8 b	21.3 \pm 0.8 b	20.2 \pm 5.3 b	13.6 \pm 1.2 d	33.1 \pm 1.9 c
<i>t</i> -cadinol	20.4 \pm 0.7 c	12.3 \pm 2.0 b	20.5 \pm 1.3 b	85.2 \pm 4.1 a	29.6 \pm 0.8 c	58.5 \pm 4.8 b
α -cadinol	52.5 \pm 4.1 b	22.6 \pm 1.7 b	31.9 \pm 1.0 b	81.9 \pm 2.9 a	60.1 \pm 1.5 ab	87.4 \pm 1.1 a
hinokiresinol	18.4 \pm 1.6 c	24.9 \pm 1.6 b	36.5 \pm 0.8 b	21.7 \pm 3.7 b	74.2 \pm 1.2 a	31.5 \pm 2.3 c
hinokinin	37.7 \pm 0.7 c	19.4 \pm 2.5 b	32.4 \pm 8.1 b	3.1 \pm 2.6 b	21.4 \pm 10.9 cd	58.7 \pm 1.7 b
β -thujaplicin	93.4 \pm 2.9 a	95.1 \pm 2.2 a	92.7 \pm 3.3 a	100.0 \pm 0 a	50.1 \pm 1.2 b	100.0 \pm 0 a

Sample	other fungi			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
H-1	-2.9 \pm 0.9 c	13.1 \pm 6.8 cd	23.6 \pm 1.1 b	0.9 \pm 1.0 c
germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol	10.8 \pm 1.0 b	42.9 \pm 3.8 bc	15.5 \pm 2.0 b	2.5 \pm 0.5 bc
<i>t</i> -cadinol	8.9 \pm 1.5 b	76.4 \pm 1.2 ab	19.5 \pm 0.7 b	10.8 \pm 0.7 b
α -cadinol	6.7 \pm 1.3 bc	77.0 \pm 3.2 ab	24.8 \pm 1.3 b	7.9 \pm 0.6 bc
hinokiresinol	8.2 \pm 0.9 b	37.6 \pm 4.2 c	45.2 \pm 2.8 a	-0.1 \pm 0.7 c
hinokinin	7.6 \pm 1.1 bc	60.1 \pm 4.5 bc	29.8 \pm 1.2 b	2.9 \pm 0.6 bc
β -thujaplicin	23.2 \pm 1.1 a	100.0 \pm 0 a	57.1 \pm 0.9 a	48.7 \pm 2.3 a

第4章 ヒノキ枝心材の抗蟻活性

第1節 緒言

木材腐朽菌と並び、木材の生物劣化の原因としてあげられる生物がシロアリである。現在日本には東日本を中心にヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus* Kolbe), 西日本を中心にイエシロアリ (*Coptotermes formosanus* Shiraki) が分布し、古くから木材を食害劣化させる害虫として知られる。また、奄美大島以南に生息するダイコクシロアリ (*Cryptotermes domesticus* Haviland) や外来種のアメリカカンザイシロアリ (*Incisitermes minor* Hagen) による被害も拡大している (屋我ら 1997)。

建築材としてヒノキが重用される理由の一つとして、これらのシロアリに対する耐朽性の高さが挙げられる。この耐朽性はヒノキ中の様々な成分に起因し、多くの化合物が様々な抗蟻活性を発揮している。金城らの報告ではヒノキ幹の hexane 抽出物に含まれる *t*-muurolol, α -cadinol といったセスキテルペンアルコールが抗蟻活性成分の主体であるとされている (金城ら 1988)。一方で Otani et al. はヒノキ幹の alcohol-benzene 抽出物に含まれる *cadinol* 類には活性の持続性はあるが活性自体は弱く、 α -terpineol や α -terpinyl acetate といった揮発性の化合物が活性の主体であると報告している (Otani et al. 1996, 1997)。松永らは *cadinol* 類に加え、異なる性質を持つ複数の化合物が複合的に活性を発現していると報告している (松永ら 1990)。このようにヒノキ材に含まれる化合物の抗蟻活性、特に致死活性については様々な報告が成されている。これらヒノキの抗蟻活性に関する報告の多くは、抗菌活性に関する研究と同様、建材として商業的な価値を持つ幹材に関するものがほとんどである。

ヒノキの幹心材は一般的に淡黄色から薄赤色を示し、特に赤味の強い材が商品として好まれており (森ら 2010) 近年、Kijidani et al. によって心材色の赤味の強いヒノキ品種は、黄味の強い品種に比べシロアリによる食害を受けにくいことが報告されている (Kijidani et al. 2012)。一般にヒノキの枝心材は幹心材に比べ非常に濃い赤褐色を有す

る。このことからヒノキ枝心材が幹心材に比べ高い抗蟻活性を有する可能性は十分に考えられる。

そこで、本章では引き続き未利用木質資源であるヒノキ枝心材の有効利用法を探索するため、その抗蟻活性について検討した。試験には枝心材と幹心材の逐次抽出物、さらに枝心材の hexane, ethyl acetate 抽出物から単離された化合物を活性試験に用いた。なお、単離化合物ごとの活性の特徴を明らかにするため、複数の試験手法を用い、多面的に活性を評価した。

第2節 実験方法

2.1 供試生物

供試生物には東日本を中心に広く分布するヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus* Kolbe) を用いた。2010年に山形大学附属フィールド科学センター生物多様性保全研究園 (Field Science Center, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Japan) でアカマツ丸太に形成されたコロニーを採集し、恒温室内で $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度60%の暗所に保存した。試験にはヤマトシロアリ職蟻の成虫を用いた。

2.2 木材ブロック食害試験

2.2.1 試料・試料調製

試料は第2章2.1.1のヒノキ枝・幹心材を $5 \times 5 \times 20 \text{ mm}$ のブロック状に加工した。また、controlとしてアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) の辺材を用いた。加工した試験体ブロックを温度 $60 \pm 2^\circ\text{C}$ の循環式乾燥器で48時間乾燥させ、吸湿しないよう約30分間デシケータ中に放置した後、試験に供した。

2.2.2 試験方法

海砂 (particle size 0.1-0.3 mm; Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) 20.0 g を敷き詰めたアクリル樹脂製の円筒飼育容器 (直径 80 mm, 高さ 60 mm) の底に試験体ブロックを置き、飼育容器1個につき職蟻100頭を投入した。飼育容器は、温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ の暗所に21日間静置した。試験期間中に死亡したシロアリは容器から除去し、飼育容器内にかびが発生した場合も同様に除去した。容器内は定期的にスプレーで水を噴霧し常時湿潤を保った。模式図を Fig. 4-1 に示す。食害操作終了後、試験体を飼育容器から取り出し、試験体表面の付着物を十分に取り除き、24時間風乾した後、温度 $60 \pm 2^\circ\text{C}$ の循環式乾燥器で24時間乾燥し、30分間デシケータ中に放置した後秤量した。試験体ブロックの重量減少より、重量減少率 (Mass loss) と標準誤差 ($\pm \text{SE}$) を以下の式から算出し、摂食阻害活性を評価した。

$$\text{Mass loss (\%)} = 100 \times (W_1 - W_2) / W_2$$

W_1 : pre-treatment block weight, W_2 : post-treatment block weight

2.2.3 統計処理

各試料の重量減少率について Statcel 2 software (OMS, Tokyo, Japan) を用いて analysis of variance (ANOVA) の Tukey-Kramer による統計処理比較をおこなった ($p < 0.05$).

2.3 PD 摂食試験

2.3.1 試料・試料調製

2.3.1.1 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物

試料は第 2 章 2.1.1 と同様のヒノキ枝・幹心材の hexane, ethyl acetate, methanol 逐次抽出物を用いた。これらの逐次抽出物を acetone にて濃度 1.0 mg/ml に調製し、検定試料に用いた。

2.3.1.2 ヒノキ枝心材単離化合物

試料は第 2 章にてヒノキ枝心材の hexane, ethyl acetate 抽出物より単離した H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinol を用いた。これらを acetone にて濃度 1.0 mg/ml に調製し検定試料とした。また対照試料となる positive control として、これまでに抗蟻活性報告 (Nakashima et al. 1972) が成されている β -thujaplicin (hinokitiol) を用いた。

2.3.2 試験方法

逐次抽出物を用いた試験には、既報の Paper Disc (PD) (Advantec, 8 mm diameter, 1.5 mm thickness, ca. 30 mg weight) による試験法 (Kusumoto et al. 2009; Ganapaty et al. 2004) を参考に、餌となる PD に試料を含浸させシロアリに強制的に摂食させる PD 強制摂食試験をおこなった。続いて枝心材単離化合物による活性をより詳細に検討するため、PD 強制摂食試験に加え、PD 選択摂食試験および PD 非接触試験の 3 つの

手法で試験をおこなった。各試験の模式図を Fig. 4-2 に示す。いずれの試験も、内径 45 mm のガラスシャーレ内に 2.0 g の海砂を敷きスプレーで湿潤にした試験区にて、ヤマトシロアリ職蟻 10 匹を投入後パラフィルムで密閉し、 26 ± 1 °C、湿度 60%の暗所で静置した。試験地は適宜スプレーで湿潤に保ち、致死体はその都度取り除いた。各試験は 24 時間ごと 21 日間にわたり観察をおこない死虫数をカウントし、試験終了後に PD の汚れを取り除き吸引デシケーター内で 24 時間乾燥させ秤量した。尚、Acetone のみを 120 μ l 含浸させ気乾した PD を control 用の PD として用いた。いずれの試験も無給試験 (No feed test) を同時におこない、試験は各検体で 3 反復した。

致死活性については以下の式より 7 日目及び 21 日目の平均致死率 (Termite mortality) と標準誤差 (\pm SE) を算出し評価した。また、最終日における各試料の半数致死濃度 (LD_{50} μ g/mg) を算出した。

$$\text{Termite mortality (\%)} = 100 \times (N_2 / N_1)$$

N_1 : Number of initial termites, N_2 : Number of dead termites

同様に PD の重量減少より、平均重量減少率 (Mass loss) と標準誤差 (\pm SE) を以下の式から算出し、摂食阻害活性を評価した。

$$\text{Mass loss (\%)} = 100 \times (W_1 - W_2) / W_1$$

W_1 : pre-treatment paper disc weight, W_2 : post-treatment paper disc weight

各試験の詳細を以下に示す。

2.3.2.1 PD 強制摂食試験

本試験では、試料の摂食致死活性および摂食阻害活性について検討した。本試験法が PD を用いた一般的な抗蟻活性試験である。

Acetone にて調製した逐次抽出物試料を PD 重量当たり 0.5%, 1.0% and 2.0%, 単離化合物試料は 0.25%, 0.5% and 1.0% (sample weight/paper disc weight ratios) となるよう処理し、試験区中央に設置した。試験の模式図を Fig. 4-2-(a) に示す。

2.3.2.2 PD 選択摂食試験

本試験では、試料の摂食致死活性および摂食忌避活性について検討した。Acetone にて調製した逐次抽出物試料を PD 重量当たり 0.25%, 0.5% and 1.0% (sample weight/paper disc weight ratios) となるよう処理した。Acetone のみを 120 μ l 含浸させ気乾した control の PD を、試料を含浸させた PD と同じ試験区に設置し、シロアリに選択的に摂食させた。また、試験終了時の同一シャーレ内の処理 PD と control の PD の重量減少率についても比較した。試験の模式図を Fig. 4-2-(b) に示す。

2.3.2.3 PD 非接触試験

本試験では、試料に非接触の条件にてその揮発毒性について検討した。Acetone にて調製した試料を PD 重量当たり 0.5%, 1.0% and 2.0% (sample weight/paper disc weight ratios) となるよう処理した。調製した PD をシャーレ上蓋に両面テープで設置し、シロアリが直接接触できないようにした。また、餌となる無処理の PD を海砂上に設置した。試験の模式図を Fig. 4-2-(c) に示す。

2.3.3 統計処理

各試料の致死率、PD 重量減少率について Statcel 2 software (OMS, Tokyo, Japan) を用いて ANOVA の Tukey-Kramer による統計処理比較をおこなった ($p < 0.05$)。尚、(b) PD 選択摂食試験については同一シャーレ内の処理 PD と control の PD 間の重量減少率について t 検定試験をおこなった ($p < 0.05$)。

2.4 処理土壌試験

2.4.1 試料・試料調製

試料は 2.3.1.2 と同様、H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, hinokinin および positive control の β -thujaplicin を用いた。これらを acetone にて濃度 1.0 mg/ml に調製し検定試料とした。

2.4.2 試験方法

餌による影響を排除し、試料がシロアリの体表に直接接触することによる活性を検討

するため処理土壌強制接触試験, 処理土壌選択接触試験の2つの手法による試験をおこなった。各試験の模式図を Fig. 4-3 に示す。いずれの試験も, 2.3 PD 摂食試験と同様, 内径 45 mm のガラスシャーレ内に 2.0 g の海砂を敷きスプレーで湿潤にした試験区にて, ヤマトシロアリ職蟻 10 匹を投入後パラフィルムで密閉し, 26 ± 1 °C, 湿度 60% の暗所で静置し, 試験は各検体で 3 反復した。各試験の詳細を以下に示す。

2.4.2.1 処理土壌選択接触試験

本試験では, 餌による影響を排除し試料の接触致死活性について検討した。Acetone にて調製した試料を海砂重量 (2.0 g) に対し濃度 50, 100 and 500 ppm となるよう調製したのち, スプレーで湿潤にした。Acetone 溶媒のみを海砂に含浸させ揮発させたものを control とした。また, 餌となる PD は与えなかった。21 日間経過後に試験を終了し 7 日目及び 21 日目の平均致死率 (Termite mortality) と標準誤差 (\pm SE) を算出した。また, 最終日における各試料の半数致死濃度 (LD_{50} ppm) を算出した。試験の模式図を Fig. 4-2-(d) に示す。

$$\text{Termite mortality (\%)} = 100 \times (N_2 / N_1)$$

N_1 : Number of initial termites, N_2 : Number of dead termites

2.4.2.2 処理土壌選択接触試験

本試験では試料に対する接触忌避活性について検討した。試験区のガラスシャーレの半分を処理区とし, 処理土壌強制接触試験 (e) と同様の方法で処理をおこなった土壌海砂 (1.0 g) を敷いた (海砂重量に対し濃度 50, 100, 500 ppm)。反対側を無処理区とし, 無処理海砂 (1.0 g) を敷き, 2 区の間を 5 mm の空間を設けた。Control 試験として, 一方の区に溶媒を含浸・揮発させ, もう一方を無処理区間に設定した試験地を用いた。ヤマトシロアリの職蟻を 10 匹ずつ 2 区の間配置し, 26 ± 1 °C の暗所にて 1 時間毎に 12 時間シロアリの移動状況を観察した。以下の式から忌避率 (Repellent activity) を算出し活性を評価した。試験の模式図を Fig. 4-2-(e) に示す。

$$\text{Repellent activity (\%)} = 100 \times (N_1 - N_2) / N_1$$

N₁: Number of termites which are in control area, N₂: Number of termites which are in treatment area

2. 4. 3 統計処理

各試料の致死率について Statcel 2 software (OMS, Tokyo, Japan) を用いて ANOVA の Tukey-Kramer による統計処理比較をおこなった ($p < 0.05$).

第3節 結果と考察

3.1 ヒノキ枝・幹心材の耐シロアリ食害性

木材ブロック摂食試験の結果を Fig. 4-3 に示す. 21 日間の食害試験後の control の重量減少率 $20.1 \pm 1.0\%$ に対し, 枝心材の重量減少率は $2.2 \pm 1.1\%$, 幹心材部は $2.1 \pm 0.6\%$ であった. 材の間で重量減少に有意な差はみられなかったが, control に比べヒノキ枝・幹の心材は非常に高い摂食阻害性が確認された.

ヒノキ幹心材は一般に食害を受けにくいとされるとされるが, ヒノキ枝心材もそれと同等の耐シロアリ食害性があるといえる.

3.2 ヒノキ枝・幹心材の逐次抽出物の抗蟻活性

PD 強制摂食試験 (Fig. 4-2 (a)) をおこない枝・幹心材に含まれる抽出物の抗蟻活性について検討した結果を Fig. 4-4 に示す. 致死活性については枝心材の hexane 抽出物に高い活性を示し, 試験開始から 7 日目の時点で濃度 1.0% において $70 \pm 25.2\%$ の致死率であった. 摂食阻害活性については枝・幹のすべての抽出物において control と比較して PD の重量減少率が有意に低かったことから, いずれの抽出物にも摂食阻害活性があるといえる.

枝心材 hexane 抽出物は幹心材に比べ致死活性が高く質的相違があること, また枝心材は幹心材の約 5 倍の hexane 抽出物, 10 倍の ethyl acetate 抽出物を含有していることから, 枝心材は量的な面でも高い活性を持つといえる.

3.3 ヒノキ枝心材単離化合物の抗蟻活性

ヒノキ枝心材から分離された H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, hinokinin の抗蟻活性を検討するにあたり, 最も一般的な抗蟻活性試験方法である PD 強制摂食試験 (a) をおこない, 試料の致死活性および摂食阻害活性について検討した結果を Fig. 4-5 に示す. 高い致死活性がみられたのはセスキテ

ルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, および α -cadinol で, 7 日目の時点で濃度 0.5%, 1.0%においてすべてのシロアリが致死していた. その他の試料は最終日の 21 日目に濃度依存的に致死活性は増加したが, いずれも no feed よりも低い致死率であった. 7 日目の時点で control に致死がみられないことから, 7 日目迄に致死した個体は摂食阻害による餓死ではなく, 試料の致死活性によるものと考えられる. 摂食阻害活性については, すべての試料で摂食阻害を示し, 濃度 0.5%以上の総ての試料が control と比較して有意な摂食阻害活性を示した. 以上より, セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, および α -cadinol が非常に高い致死活性を発揮し, またその PD 重量の減少がみられなかったことから, これらセスキテルペンアルコールの致死活性は摂食によって発揮されるものではないと推察される. H-1 画分, hinokiresinol, hinokinin といった化合物は致死活性の低い一方で, 摂食阻害活性を有していることが明らかとなった. 特に hinokiresinol は濃度 0.5, 1.0%において試料を含浸した PD が海砂で覆われるなど, 明らかな忌避性がみられた.

PD 選択摂食試験 (Fig. 4-2-(b)) では PD 強制摂食試験 (a) のシャーレ内に試料を含浸させない control の PD を設置し, 摂食に選択の幅を持たせることにより各化合物の摂食忌避活性を検討した. その結果を Fig. 4-6 に示す. 致死活性については PD 強制摂食試験 (a) とほぼ同様の結果を示し, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, および α -cadinol が高い致死活性をみせ, PD はほとんど摂食されなかった. 一方, H-1 画分, hinokiresinol, hinokinin といった致死活性の低い化合物は, control の PD を選択的に摂食していた. このことから, H-1 画分, hinokiresinol, hinokinin といった化合物は, 致死活性は低いものの高い摂食忌避活性を持つことが明らかとなった.

試験 (a), (b) において, セスキテルペンアルコールの試料は非常に高い致死活性を示していたが, その PD はほとんど摂食されていなかった. このことから, 活性物質は摂食によってシロアリ体内に摂取されているのではないことが推察される. そこで PD 非接触試験 (Fig. 4-2-(c)) では揮発性物質の影響を検討するため, 非接触条件下での活

性試験をおこなった。その結果を Fig. 4-7 に示す。いずれの化合物においても致死活性、摂食阻害活性はほとんどみられず、唯一 positive control の β -thujaplicin に濃度 2.0% で有意な致死活性がみられた。このことから、シロアリに対し致死活性を示したこれらの化合物は餌、揮発性物質以外の形でシロアリに影響していると推察された。

PD 試験 (a), (b), (c) の結果を受け試料の活性をより詳細に検討するため、PD を排除しシロアリに直接試料が接触する処理土壌強制接触試験 (Fig. 4-2-(d)) をおこなった。結果を Fig. 4-8 に示す。7 日目の時点でセスキテルペンアルコールに試験 (a) とほぼ同様の致死活性が認められた。よってこれらの化合物はシロアリ個体に直接接触するか、もしくは水分等によって体内に取り込まれると考えられる。また、hinokiresinol, hinokinin といった化合物の致死率は濃度に依存せず control とほぼ同じ値であったことから、試験 (a) におけるこれらの化合物の致死原因は摂食阻害による餓死と推察される。

処理土壌選択接触試験 (Fig. 4-2-(e)) では試料による処理を施した土壌の接触忌避性を検討した。その結果を Fig. 4-9 に示す。Germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol といったセスキテルペンアルコールに加え、炭化水素画分 H-1 のすべての濃度において強い接触忌避活性がみられた。このことから、高い致死活性を持つセスキテルペンアルコール類は同時に高い接触忌避活性を持ち、また致死活性の低い炭化水素画分にも高い摂食忌避活性があることが示された。Hinokiresinol および hinokinin は摂食阻害、摂食忌避活性を有するが、短時間内での接触忌避活性は有していないと考えられる。尚、12 時間の試験期間中に致死した個体はなかった。

ヒノキ枝心材単離化合物の抗蟻活性試験結果一覧を Table 4-1 に示す。PD 強制摂食試験 (a) においてセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol (LD₅₀ 0.28 μ g/mg), *t*-cadinol (0.32 μ g/mg), α -cadinol (0.31 μ g/mg) に非常に高い致死活性が確認された。これらセスキテルペンアルコールは摂食阻害活性も有していた。しかしながら PD 非接触試験 (c) ではこれらの活性はみられず、続いておこなった処理土壌強

制接触試験 (d) において試験 (a) と同様の活性が発揮されたことから、これらの化合物はシロアリ個体に直接接触することで活性を発揮するものと考えられる。また *germacra-1-(10),5-dien-4β-ol*, *t*-cadinol, *α*-cadinol は処理土壌選択接触試験 (e) においても非常に高い摂食忌避活性を発揮したことから、ヒノキ枝の抗蟻活性の主体であるといえる。H-1 画分は致死活性は低いものの高い摂食阻害、摂食忌避、接触忌避活性を有していた。同様に致死活性の低い *hinokiresinol*, *hinokinin* といった化合物も摂食阻害、摂食忌避活性を示した。

以上の結果からヒノキ枝心材は、*germacra-1-(10),5-dien-4β-ol*, *α*-cadinol, *t*-cadinol といったセスキテルペンアルコールを主体として高い致死、摂食阻害、摂食忌避活性を発揮していることが示された。また、炭化水素画分 H-1 の摂食阻害・忌避、接触忌避活性、ノルリグナンの *hinokiresinol* およびリグナンの *hinokinin* の摂食阻害・忌避活性によって枝心材の抗蟻活性に寄与していると考えられる。ヒノキ枝心材は幹心材に比べ多量の抽出物を含有すること、さらに枝特有の成分を有することによってより多面的に抗蟻活性を発揮していることが明らかとなり、このことからヒノキ枝心材に含まれる抽出成分は抗蟻剤としての利用の可能性を持つことが示唆された。

第4節 小括

本章では引き続きヒノキ枝心材の有効利用法を検討するため、木材腐朽菌と並ぶ木材劣化生物であるシロアリに対する活性をおこなった。

まず木材の耐シロアリ食害性を検討するため、ブロック状に加工したヒノキ枝・幹心材をシロアリに食害させた。その結果、controlのアカマツの重量減少率 $20.1 \pm 1.0\%$ に対し、枝心材の重量減少率は $2.2 \pm 1.1\%$ 、幹心材部は $2.1 \pm 0.6\%$ であり、非常に高い耐食害性をみせた。ヒノキ幹心材は一般に食害を受けにくいとされるが、ヒノキ枝心材もそれと同等の耐シロアリ食害性があるといえる。

ヒノキ枝・幹抽出物の抗蟻活性を検討するため、逐次抽出物を用いた PD 強制摂食試験をおこなった。その結果、特に高い致死活性を示したのは枝 hexane 抽出物であった。また、すべての抽出物が摂食阻害活性を示した。

続いて枝心材抽出物から分画・単離された H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, hinokinin による PD 強制摂食活性試験をおこなうとともに、より詳細に抗蟻活性を検討するために複数の試験手法を用いて評価した。最も一般的な手法である PD 強制摂食試験 (a) にて致死活性が確認されたのはセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, および α -cadinol であった。また、摂食阻害活性についてはすべての試料に確認され、H-1 画分, hinokiresinol, hinokinin といった化合物は致死活性の低い一方で、高い摂食阻害活性を有していた。PD 選択摂食試験 (b) では試験 (a) とほぼ同様の致死活性を示し、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, α -cadinol が高い致死活性を示した。一方、H-1 画分, hinokiresinol, hinokinin といった致死活性の低い化合物は、control の PD を選択的に摂食しており、高い摂食忌避活性を持つことが明らかとなった。PD 非接触試験 (c) にて揮発性物質の影響を検討した結果、いずれの化合物においても致死活性、摂食阻害活性はほとんどみられなかった。このことから、シロアリに対し致死活性を示した化合物は餌や揮発性物質以外の形でシロアリに影響していると推察された。処理土壌強

制接触試験 (d) では PD を排除しシロアリに直接試料が接触する試験をおこなった。その結果、セスキテルペンアルコールに試験 (a) とほぼ同様の致死活性が認められた。よってこれらの化合物の活性はシロアリ個体に直接接触することによって発揮されることが考えられた。処理土壌選択接触試験 (e) では試料の接触忌避性を検討した。その結果、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol といったセスキテルペンアルコールに加え、炭化水素画分 H-1 に強い接触忌避活性がみられた。

以上のことからヒノキ枝心材は、幹心材に含まれる抗蟻活性物質（金城ら 1988; Otani et al. 1996, 1997; 松島ら 1990）として知られる α -cadinol, *t*-cadinol のほかに、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol を加えたセスキテルペンアルコールが抗蟻活性の主体であることが示された。また、炭化水素画分 H-1 は摂食阻害、摂食忌避、接触忌避活性を、ノルリグナンの hinokiresinol とリグナンの hinokinin は摂食阻害・忌避活性を有しており、これらも枝心材の抗蟻活性に寄与していると考えられる。枝心材は幹心材に比べ多量の抽出物を含有し、さらに枝特有の成分を有することによって幹に比べより多面的な抗蟻活性を発揮していることが明らかとなり、ヒノキ枝心材に含まれる抽出成分の抗蟻剤としての利用の可能性が示された。

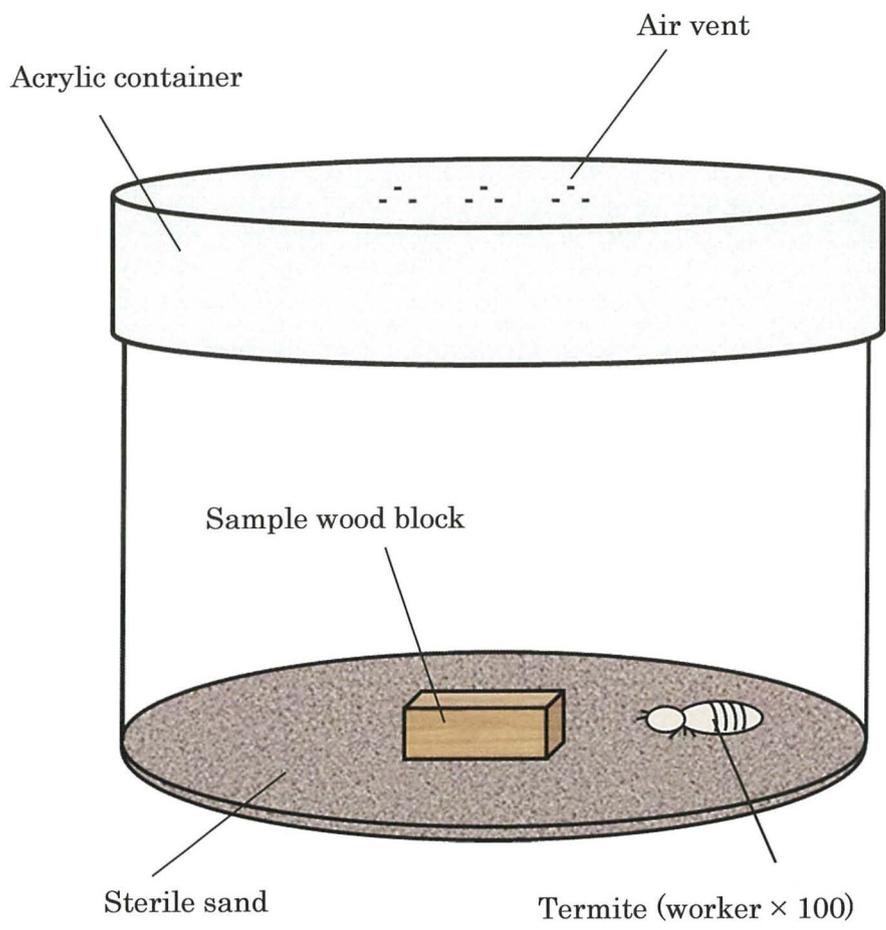
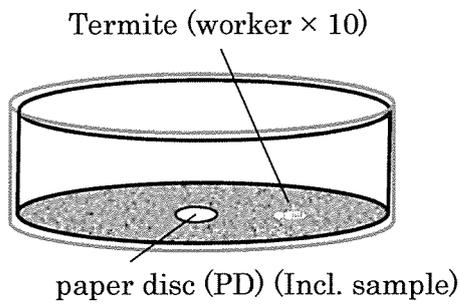
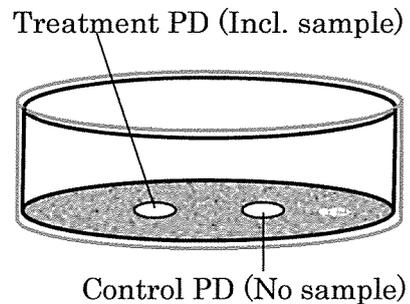


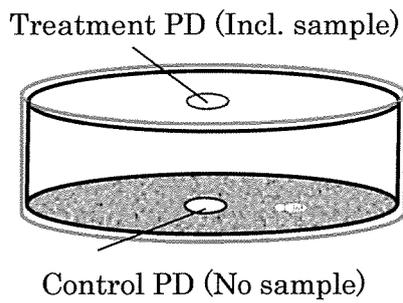
Fig. 4-1 Diagram of block feeding test methods.



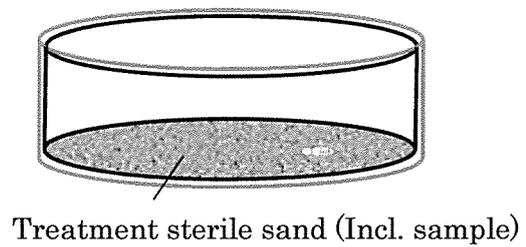
PD no-choice feeding test (a)



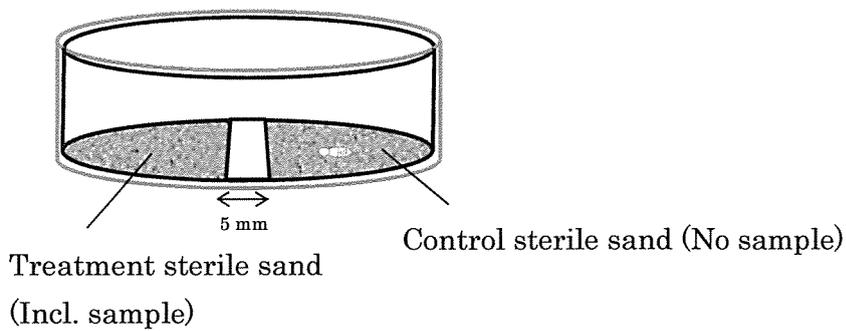
PD dual choice feeding test (b)



PD non-contact test (c)



No-choice contact test (d)



Dual choice contact test (e)

Fig. 4-2 Diagram of antitermitic test methods.

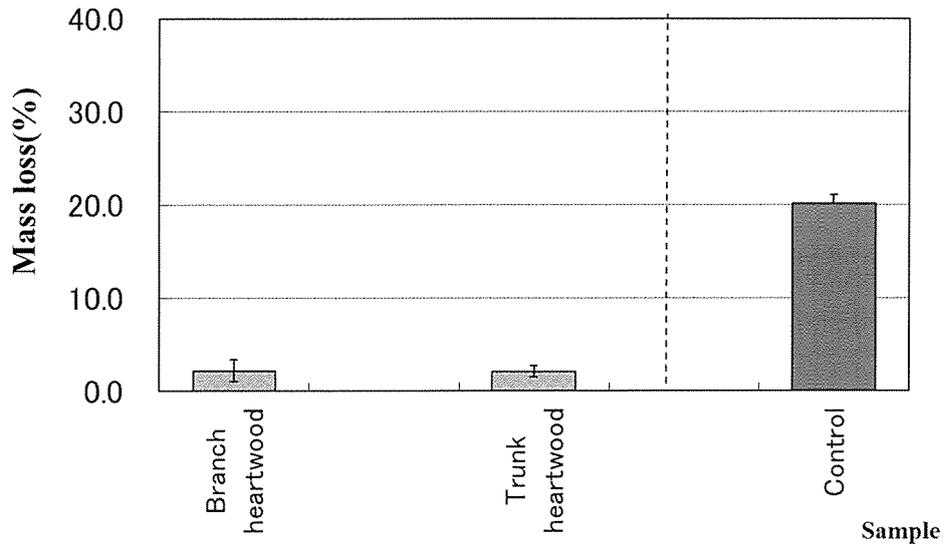


Fig. 4-3 Mass loss of branch and trunk heartwood of hinoki by wood block feeding test. Error bar: \pm SE.

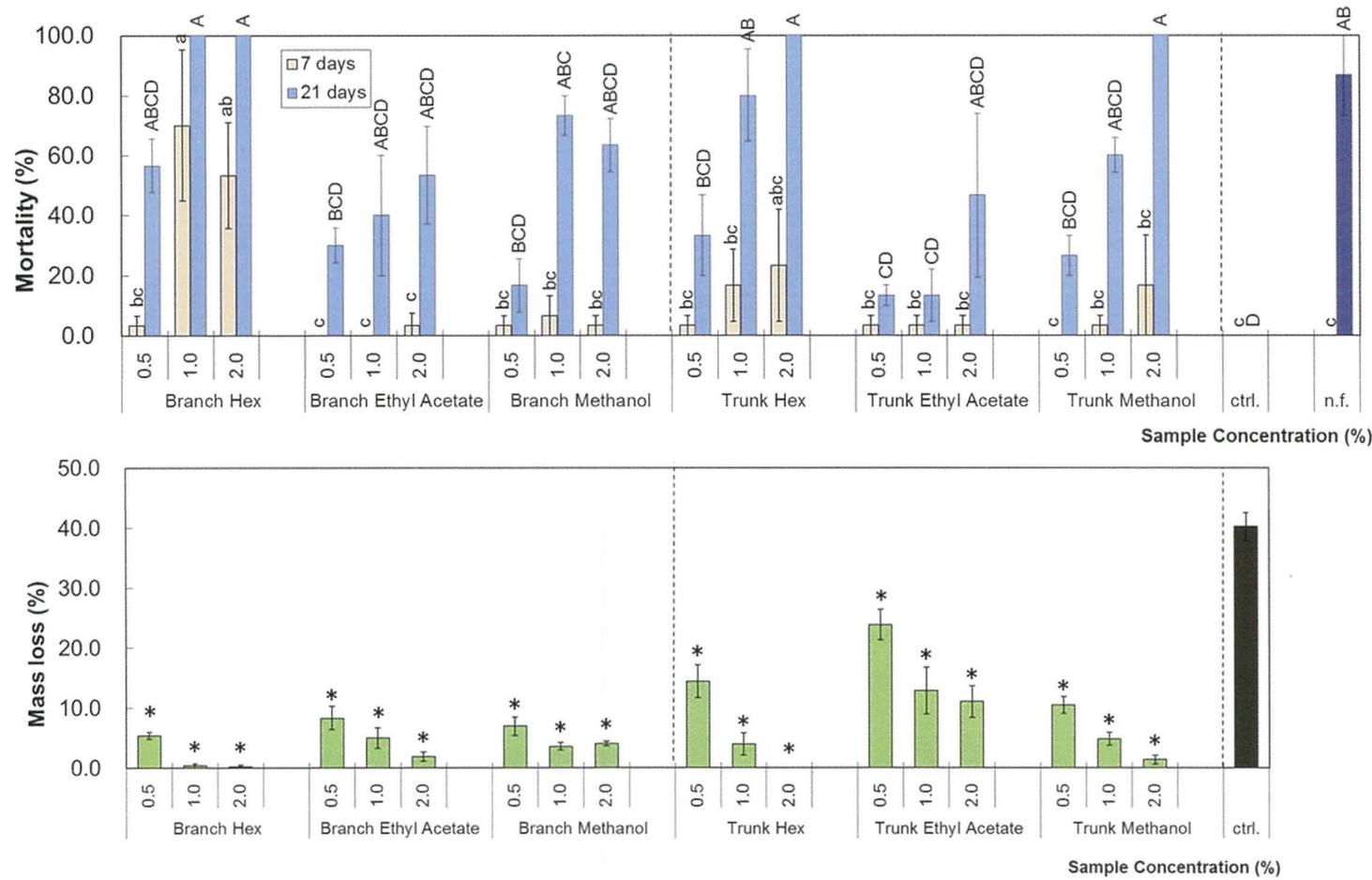


Fig. 4-4 Antitermitic activities of extracts from hinoki branch heartwood at No-choice feeding test. (upper panel: mortality, lower panel: Mass loss). Error bar: \pm SE. n.f: no feed test. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$, *Means significantly different from control.

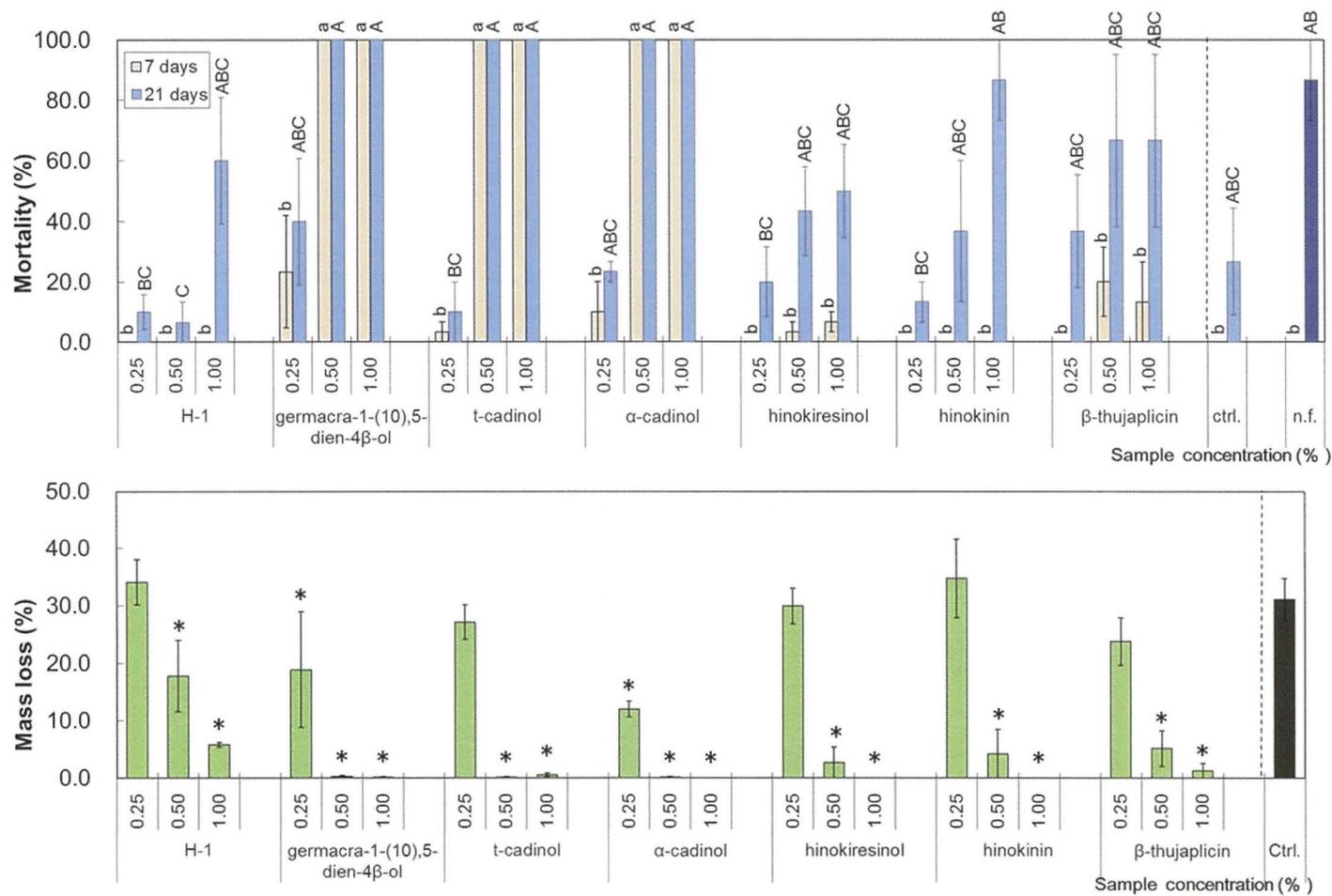


Fig. 4-5 Antitermite activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood at (a) No-choice feeding test. (upper panel: mortality, lower panel: Mass loss). Error bar: \pm SE. n.f: no feed test. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$, *Means significantly different from control.

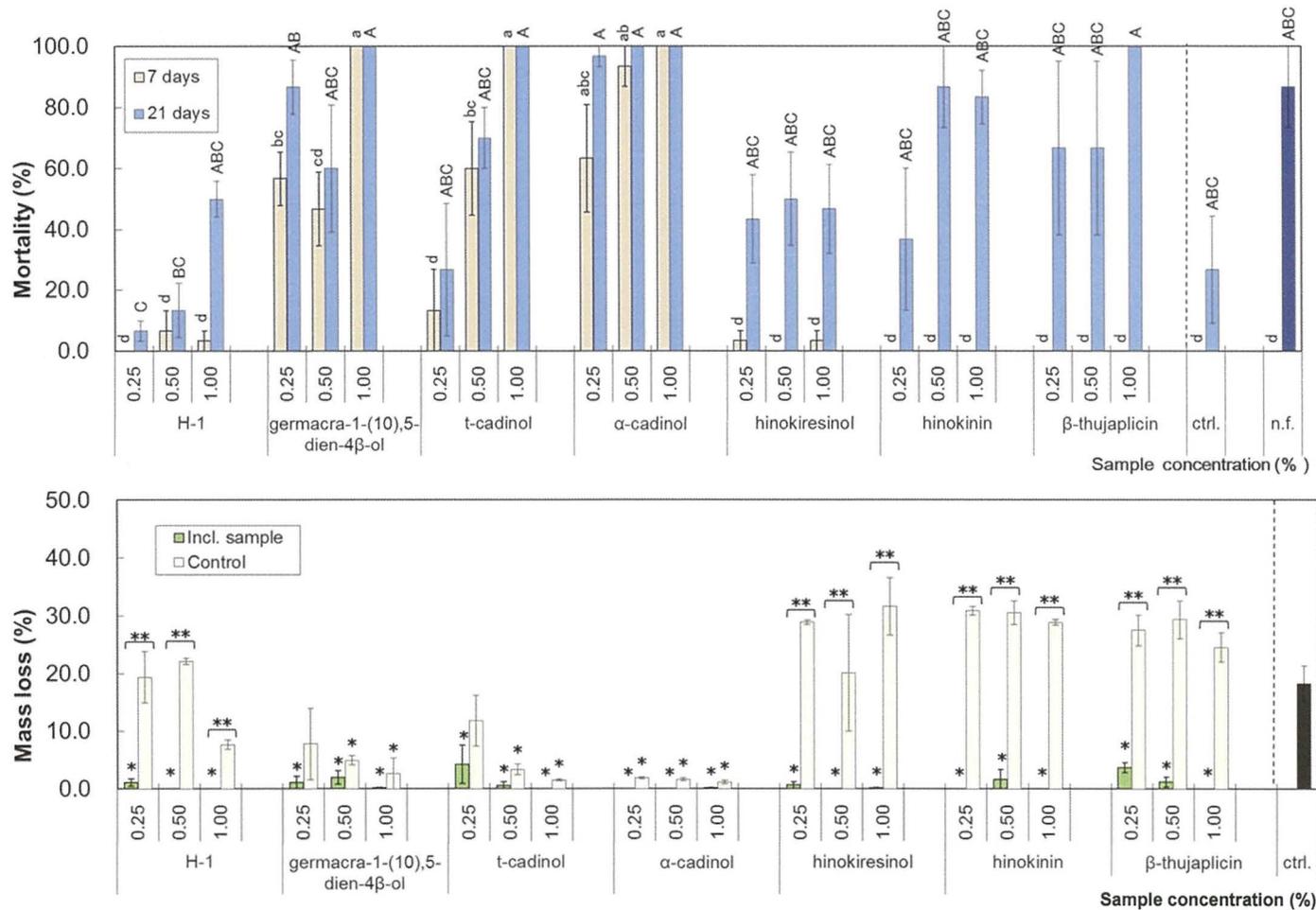


Fig. 4-6 Antitermite activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood at (b) Dual-choice test. (upper panel: mortality, lower panel: Mass loss). Error bar: \pm SE. n.f: no feed test. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$, *Means significantly different from control. **Means significantly different between sample and control of putting together.

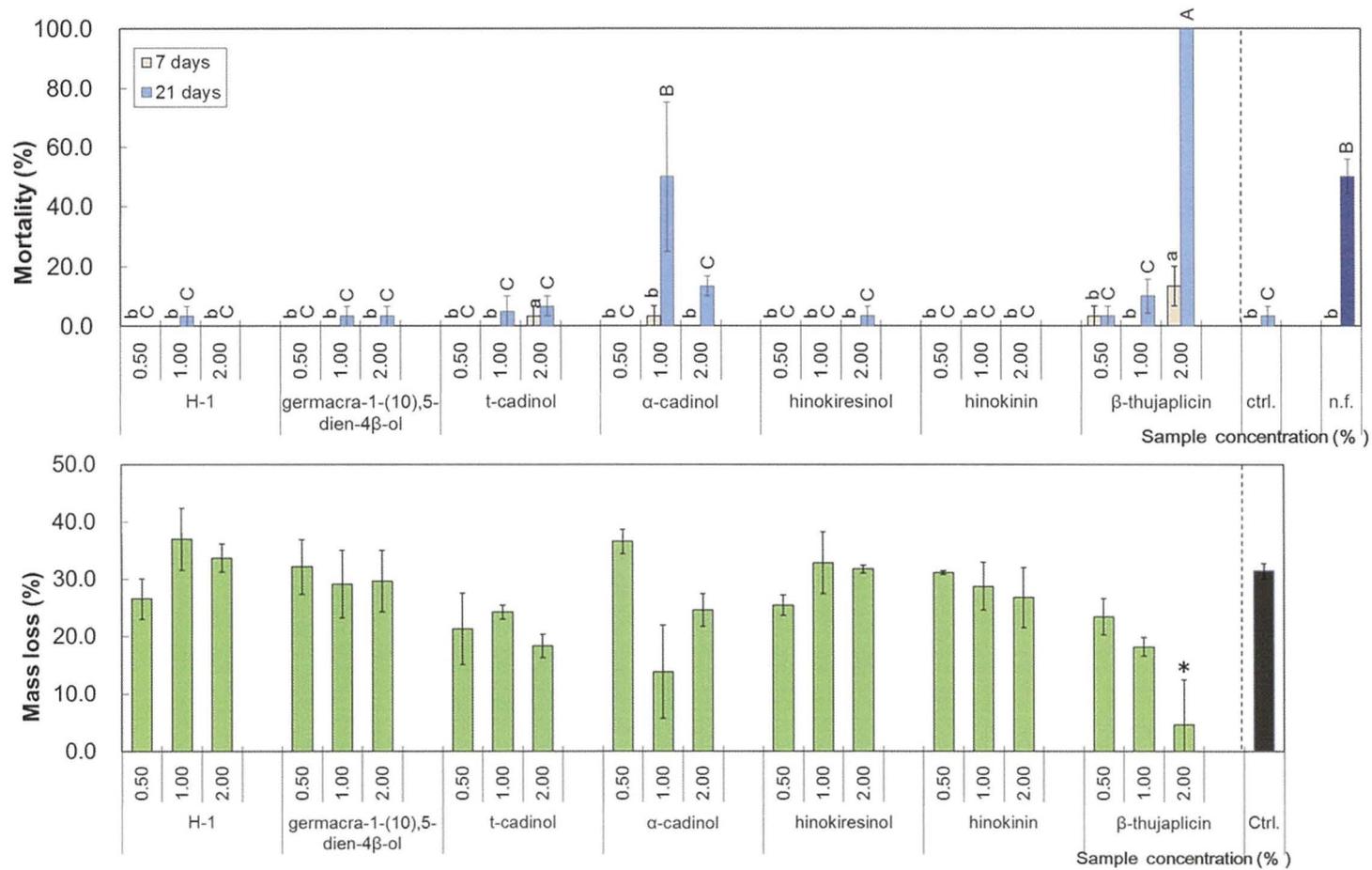


Fig. 4-7 Antitermite activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood at (c) Non-contact test. (upper panel: mortality, lower panel: Mass loss). Error bar: \pm SE. n.f: no feed test. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$, *Means significantly different from control.

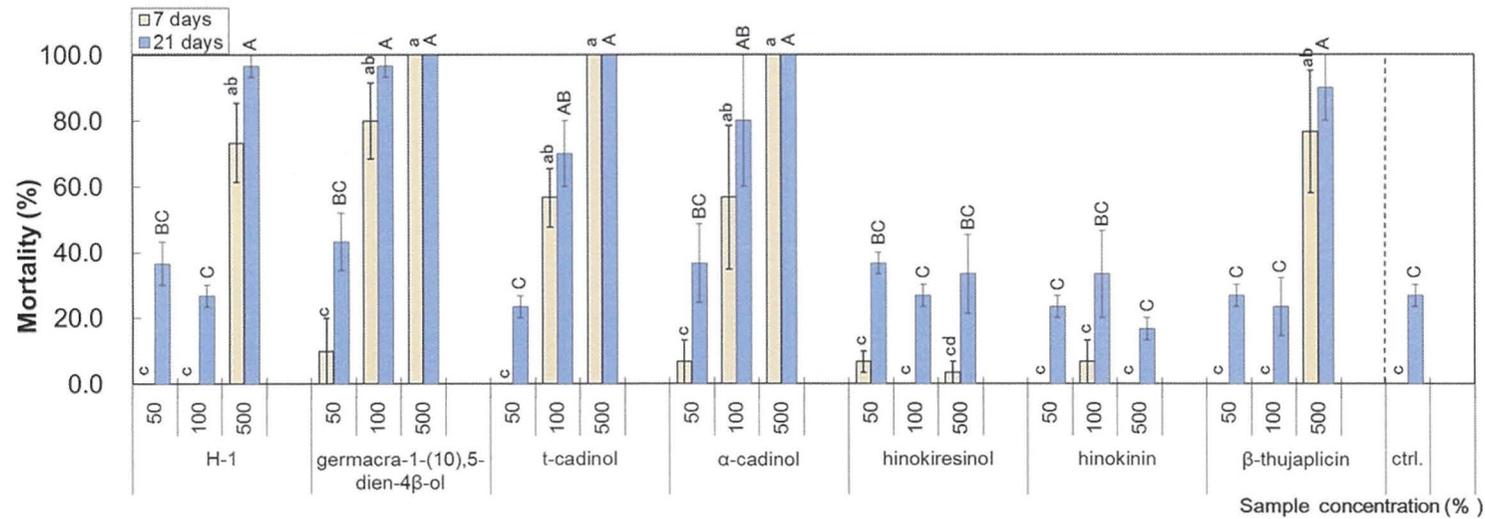


Fig. 4-8 Antitermite activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood at (d) No-choice contact test. Error bar: \pm SE. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$, *Means significantly different from control.

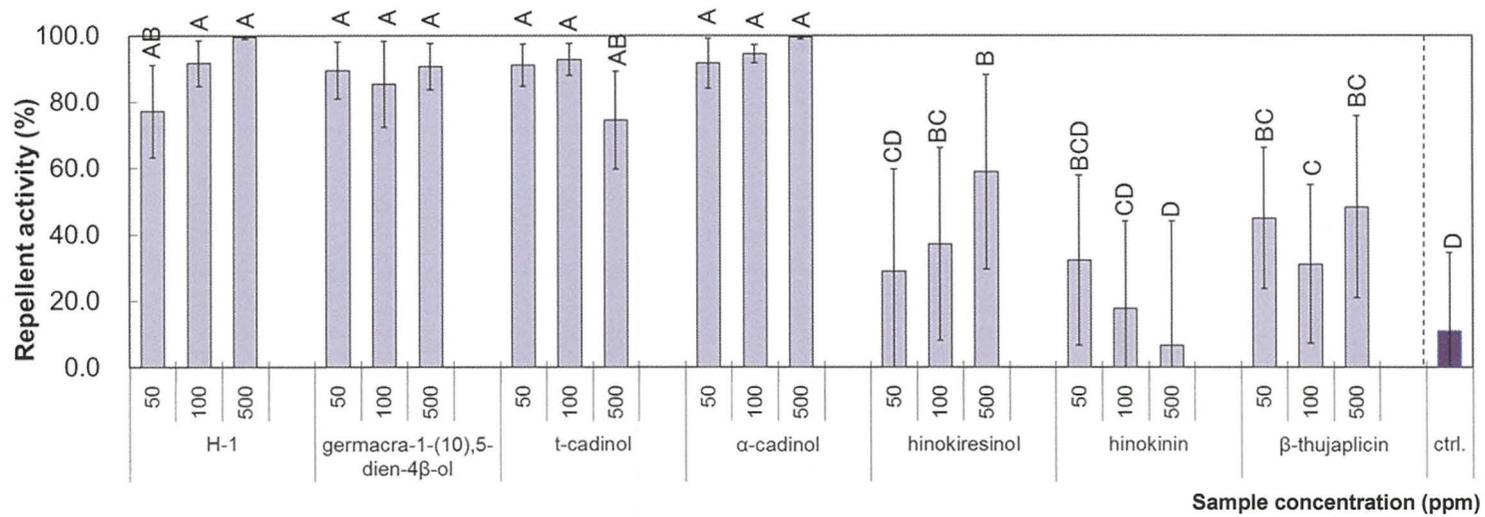


Fig. 4-9 Antitermite activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood at (e) Dual choice contact test. Common letters denote no significant difference. Error bar: \pm SE. Turkey-Kramer, $p < 0.05$, *Means significantly different from control.

Table 4-1 Antitermitic activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood.

Sample	Antitermitic activities							
	(a) PD no-choice feeding		(b) PD dual choice feeding		(c) PD non-contact		(d) No-choice contact	(e) Dual choice contact
	Trematocidal ^a LD ₅₀ (µg/mg)	Anti feedant ^b	Trematocidal ^a LD ₅₀ (µg/mg)	Repellent feedant ^c	Trematocidal ^a LD ₅₀ (µg/mg)	Anti feedant ^b	Trematocidal ^d LC ₅₀ (ppm)	Repellent contact ^e
H-1	ND*	+	ND*	+	ND*	-	390	+
germacra-1-(10),5-dien-4β-ol	0.28	+	0.29	-	ND*	-	76	+
<i>t</i> -cadinol	0.32	+	0.42	-	ND*	-	94	+
α-cadinol	0.31	+	0.20	-	ND*	-	93	+
hinokiresinol	13.71	+	ND*	+	ND*	-	ND*	-
hinokinin	ND*	+	ND*	+	ND*	-	ND*	-
β-thujaplicin	5.25	+	ND*	+	14.58	-	377	-

*ND means not determined.

a Trematocidal: Values of LD₅₀ µg/mg (PD dry weight)

b Antifeedant: + means significantly different from mass loss of control PD.

c Repellent feedant: + means significantly different between sample and control mass loss of putting together.

d Trematocidal: Values of LC₅₀ ppm

e Repellent contact: + means significantly different from contact times of control area.

第5章 ヒノキ枝心材成分の木材腐朽菌・シロアリ以外の生物に対する活性

第1節 緒言

ヒノキ科樹木に含有される樹木成分とその生理活性に関して、これまでに多くの研究がなされてきた。木材劣化の原因となる木材腐朽菌（近藤ら 1986; 金城ら 1986; Debell et al. 1997, 1999; 大谷ら 2001）やシロアリ（金城ら 1988; Otani et al. 1996, 2001; 松島ら 1990; Kijidani et al. 2012; Nakashima et al. 1972）に対する活性のほか、殺虫・殺ダニ（Ahn et al. 1995, 1998）、草本生長阻害（石井ら 1993）、抗酸化活性（Yamaguchi et al. 1999）など多岐に渡る。

このことから、第3章、第4章にて抗菌・抗蟻活性を示した枝心材成分にも多様な生物に対する活性があると考えられる。そこで本章では木材劣化の原因となる木材腐朽菌やシロアリ以外のいくつかの生物に対する活性試験をおこない、ヒノキ枝心材成分のさらなる利用法について検討した。

1.1 ブラインシュリンプ

ブラインシュリンプ (*Artemia salina* Leach) はホウネンエビモドキ科の小型の甲殻類で、熱帯魚の餌などとして広く流通している。また、ブラインシュリンプは生物毒性試験に用いられ、短時間の試験で微量の成分に対し反応がみられることから活性物質探索のためのスクリーニング試験に用いられ (Ohira et al. 1994; Tanaka et al. 1979; Ali et al. 2011), 日本では製品安全データシート (MSDS) や化学物質評価研究機構 (CERI) といった機関での評価データの基となっている。そこで、ヒノキ枝心材成分の菌類・シロアリ以外の生物に対する活性の一つとしてブラインシュリンプ幼生致死活性試験をおこなった。

1.2 水かび

水かびは卵菌類 (Oomycota) のミズカビ属 (*Saprolegnia*) の総称であり、これらの感染によって引き起こされる魚類の感染症は水かび病と総称される。感染するとエラや体表に白い綿状の菌糸体が形成され炎症を起し、場合によっては死に至る深刻な病気である。治療には殺菌剤のマラカイトグリーンが有効とされてきたが、2005年の薬事法の改正によって養殖魚への使用が禁止となった (Kashiwagi et al. 2006)。そこで、現在これに代わる新たな防除法が求められている。これまでに *Saprolegnia* 属の水かび病原菌に対し、樹木成分である β -thujaplicin や citral の抗菌活性が報告されており (Mori et al. 2002), ヒノキ枝に含まれる様々な樹木成分も水かびに対する活性を持つ可能性が考えられる。そこで、ヒノキ枝心材成分の水かび病原菌 (*Saprolegnia parasitica* Coker, *Saprolegnia diclina* Humphrey) に対する抗水かび活性試験をおこなった。

1.3 ハダニ

ハダニはハダニ科の節足動物の総称であり，その中には農作物に被害を与える害虫も含まれ，国内ではナミハダニ (*Tetranychus urticae* Koch) やカンザワハダニ (*Tetranychus kanzawai* Kishida) による園芸作物への被害が問題となっている．駆除には一般に農薬が用いられるが，ハダニはライフサイクルが非常に短く農薬に対して比較的早く抵抗性がでてしまう．このため，既存の農薬が効果を発揮しなくなることが指摘されている (細辻ら 1985)．また，近年の化学合成物質による環境や人体への影響の懸念から，天然物由来の樹木成分を用いた新たな農薬の開発が期待されている．そこで，ヒノキ枝心材成分を用いて代表的な農業害虫の一つであるカンザワハダニに対する活性試験をおこなった．

第2節 実験方法

2.1 ブラインシュリンプ幼生致死活性試験

2.1.1 試料・試料調製

試料は第2章2.3でヒノキ枝心材より得られたH-1画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinin を用いた。これらを dimethyl sulfoxide (DMSO) にて濃度 10 mg/ml に調製し検定試料とした。

2.1.2 供試生物

市販のブラインシュリンプ (*Artemia salina* Leach) (Japan pet drugs Co., Ltd., Jpan) を孵化させ, その幼生を用いた。

2.1.3 試験方法

試験方法は Ohira et al. の報告 (Ohira et al. 1994) に準拠した。市販のブラインシュリンプ卵を人工海水中に投入し, 恒温機内で 26°C の暗条件下で 24 時間かけ孵化させた。10 ml バイアル中の人工海水 5 ml に孵化したブラインシュリンプ幼生 10 匹と, 調製したサンプルを濃度 10, 50 and 100 ppm となるよう添加した。コントロールとしてジメチルスルホキシド (DMSO) を 50 μ l 添加した試験区を用いた。尚, 各検体は 3 反復試験した。26°C, 暗条件下の恒温機内に静置し 24 時間後の致死数をカウントし, 致死率を算出した。また, 試験終了時のブラインシュリンプ致死数から半数致死濃度 (LC₅₀ ppm) を算出し, 活性を評価した。

2.2 抗水かび活性試験

2.2.1 試料・試料調製

試料はヒノキ枝心材より得られたH-1画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinin を用いた。これらを acetone にて濃度 1.0

mg/ml に調製し検定試料とした。また、positive control にはこれまでと同様に β -thujaplicin を用いた。

2.2.2 供試生物

水かび病の主要原因菌である卵菌類の *Saprolegnia parasitica* Coker (ATCC: 90213) および *Saprolegnia diclina* Humphrey (ATCC: 90215) を用いた。両菌株は NITE (独立行政法人製品評価技術基盤機構) より購入した。供試菌は試験に用いる前に Glucose Yeast Agar (GYA) (1 % glucose, 0.01 % yeast extract, 2 % agar) 培地上での前培養をおこなった。

2.2.3 試験方法

試験培地には GYA 培地を用い、内径 80 mm シャーレに 15 ml ずつ分注し固化後に常温になったものを用いた。クリーンベンチ内で acetone 調製した各サンプルを GYA 培地表面に 1.0, 5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるよう調製し、塗布後に 1 時間気乾させ溶媒を十分に揮発させた。なお、対照試験培地となる control には acetone のみを 300 μl 塗布し、同様に気乾させた試験区を用いた。前培養した供試菌の菌叢外縁部から 5 mm コルクローラーを用いて菌叢をくり抜き、調製した培地中央に置床し、パラフィルムで密閉した。尚、各試験は 3 反復おこなった。試験培地は恒温器内で $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 60% の暗条件下で静置培養し、control の菌叢外縁が内径 80 mm シャーレの淵に達した時点で試験を終了とした。試験終了時の 4 方向の菌叢直径を計測し、その平均値と標準誤差 (\pm SE) を算出した。測定した菌叢直径から、以下の式より control に対する菌叢直径生長率 (%) を算出し、Antifungal index (%) として活性を評価した。

$$\text{Antifungal index (\%)} = 100 \times (1 - D_a/D_b)$$

D_a: the total average of the mycelia diameter of each sample – 5 mm

D_b: the average diameter of the mycelia in the control – 5 mm

2.3 抗ハダニ活性試験

2.3.1 試料・試料調製

試料はヒノキ枝心材より分画・単離された H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *trans*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinin を用いた。また, positive control にはこれまでと同様に β -thujaplicin を用いた。これらを acetone にて濃度 1.0 mg/ml に調製し, 展着剤となるクミテン[®]溶液 (Kumiai Chemical Industry Co., Ltd., Japan) (純水 3300 倍希釈) を用いて濃度 5000 ppm の検定試料を調製した。

2.3.2 供試生物

カンザワハダニ (*Tetranychus kanzawai* Kishida) はクミアイ化学工業 (株) より分譲された個体をインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 葉上で世代交代させたものを用いた。尚, 試験には雌成虫個体のみを用いた。

2.3.3 試験方法

試験は殺ダニ活性試験に広く用いられているリーフディスク法 (細辻ら 1985) に準拠した。各検定試料中の acetone 量が一定となるよう調製し, control には acetone と展着剤の水溶液を用いた。インゲンマメの葉を直径 20 mm の円状にカットしたリーフディスクを作成し, 2.3.1 にて調製した検定試料に浸漬させた。45 mm シャーレの底にろ紙を敷き純水で浸しリーフディスク (直径 20 mm) を表向きになるよう中央に設置し, 試験区とした。リーフディスク中央にナミハダニ雌成虫 10 匹を置床後シャーレに蓋をし, 26°C, 湿度 60%の恒温室内 (日照条件 d/h = 16/8) で 4 日間, 24 時間ごとに観察し致死数をカウントした。試験模式図を Fig. 5-1 に示す。致死個体は適宜取り除き, 試験終了時のナミハダニ致死数より致死率 (mortality) と標準誤差 (\pm SE) を算出した。尚, 各試験は 3 反復おこなった。

2.4 統計処理

各試験にて算出された Antifungal index, Mortality (%) の値は Analysis of Variance (ANOVA) Tukey-Kramer test (Statcel 2 software, OMS, Tokyo, Japan) を用いて統計処理し, 活性を評価した ($p < 0.05$).

第3節 結果と考察

3.1 ヒノキ枝心材成分のブラインシュリンプ幼生致死活性

各濃度の致死率を Fig. 5-2 に、算出した LC₅₀ 値を Table 5-1 に示す。セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4β-ol, *t*-cadinol, α-cadinol に非常に高い致死活性が確認され、LC₅₀ 値はそれぞれ 4, 7, 6 ppm であった。また、hinokiresinol も LC₅₀ 6 ppm の高活性を示した。枝に特徴的な化合物である germacra-1-(10),5-dien-4β-ol は、第3章において菌類に対して低活性であったが、第4章において高い抗蟻活性を示し、ブラインシュリンプ幼生に高い致死活性を示したことから、菌には活性を示さずシロアリやブラインシュリンプのような高等生物に対して活性を有していた。尚、H-1 画分、hinokinin および β-thujaplicin に活性は確認されなかった。このようにヒノキ枝心材抽出成分がブラインシュリンプ幼生に活性を発揮したことから、木材分解生物以外の生物に対しても活性を有する可能性が示唆された。

3.2 ヒノキ枝心材成分の抗水かび活性

試験結果を Fig. 5-3 に示す。*S. parasitica* に対して培地塗布濃度 5.0 μg/cm² において、germacra-1-(10),5-dien-4β-ol, *t*-cadinol, α-cadinol, hinokiresinol がいずれも 100%近い生長阻止率を示し、positive control である β-thujaplicin (100%) に次ぐ高い活性を示した。*S. diclina* に対する活性では、培地塗布濃度 5.0 μg/cm² において β-thujaplicin が生長阻止率 100%の活性を示し、単離化合物で高い活性を示したのは α-cadinol (95.6 ± 2.3%), hinokiresinol (91.1 ± 1.8%), *t*-cadinol (75.0 ± 1.8%), germacra-1-(10),5-dien-4β-ol (64.5 ± 6.6%) であった。

以上より、positive control の β-thujaplicin には劣るものの、両菌に対し germacra-1-(10),5-dien-4β-ol, *t*-cadinol, α-cadinol, および hinokiresinol に抗菌活性が確認され、特に *S. parasitica* に対して顕著に活性を示した。尚、H-1 画分および

hinokinin の活性はいずれの菌に対しても低いものであった。

3.3 ヒノキ枝心材成分の抗ハダニ活性

試験結果を Fig. 5-4 に示す。Positive control の β -thujaplicin の致死率は $76.7 \pm 25.0\%$ であり、セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol がこれを上回る致死活性を示した。最も高い活性を示したのが germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol (100%) で、次いで *t*-cadinol ($90.0 \pm 17.3\%$), α -cadinol ($86.7 \pm 11.5\%$) が高活性を示した。また炭化水素画分の H-1 にも $66.7\% \pm 20.3\%$ の致死活性が確認された。尚、hinokiresinol および hinokinin の活性は低いものであった。

高活性を示したのはセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol で、これらの化合物はシロアリ、ブラインシュリンプに対しても同様に高い致死活性を示したことから、節足動物に対し活性を有する化合物である可能性が考えられる。

第4節 小括

本章では、木材劣化の原因となる木材腐朽菌やシロアリ以外のいくつかの生物に対する活性試験をおこない、ヒノキ枝心材成分のさらなる利用法について検討した。

木材分解生物以外の生物に対する活性のスクリーニングをおこなうため、ブラインシュリンプ幼生致死活性試験をおこなった結果、セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol およびノルリグナンの hinokiresinol に非常に高い致死活性が確認された。H-1 画分および hinokinin には高い活性は確認されなかった。

水かび病原菌である *S. parasitica* に対する抗菌活性試験の結果、試験濃度 5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ において germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol および hinokiresinol がいずれも 100%近い生長阻止率を示し、positive control の β -thujaplicin に次ぐ活性を示した。*S. diclina* に対しても β -thujaplicin が生長阻止率 100%の活性を示し、次いで α -cadinol, hinokiresinol, *t*-cadinol, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol が高い活性を示した。

ナミハダニに対する抗ハダニ活性試験では、セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol が positive control の β -thujaplicin を上回る致死活性を示した。また炭化水素画分 H-1 の活性も β -thujaplicin に次ぐものであった。尚、hinokiresinol および hinokinin の活性は低いものであった。

以上の結果より、いずれの活性試験においてもセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol に高い活性がみられた。枝に特徴的な化合物であるノルリグナンの hinokiresinol はブラインシュリンプ幼生と水かび病原菌に対し高い活性を示したが、ハダニに対しては活性がみられないなど、他の化合物とやや異なる活性傾向をみせた。尚、ブラインシュリンプ、水かび、ハダニ試験にいずれにおいても hinokinin の活性は低いものであった。ヒノキ枝心材成分は木

材腐朽菌やシロアリ以外の生物に対しても生物活性を示し、またその活性は化合物によって多様な形で発揮されることが示された。このようにヒノキ枝心材抽出物は木材腐朽菌やシロアリといった木材分解生物以外の生物の対しても活性を示し、その利用法は木材保存に限らず漁業、水産業、農業等の分野へも利用できる可能性を持つと考えられる。

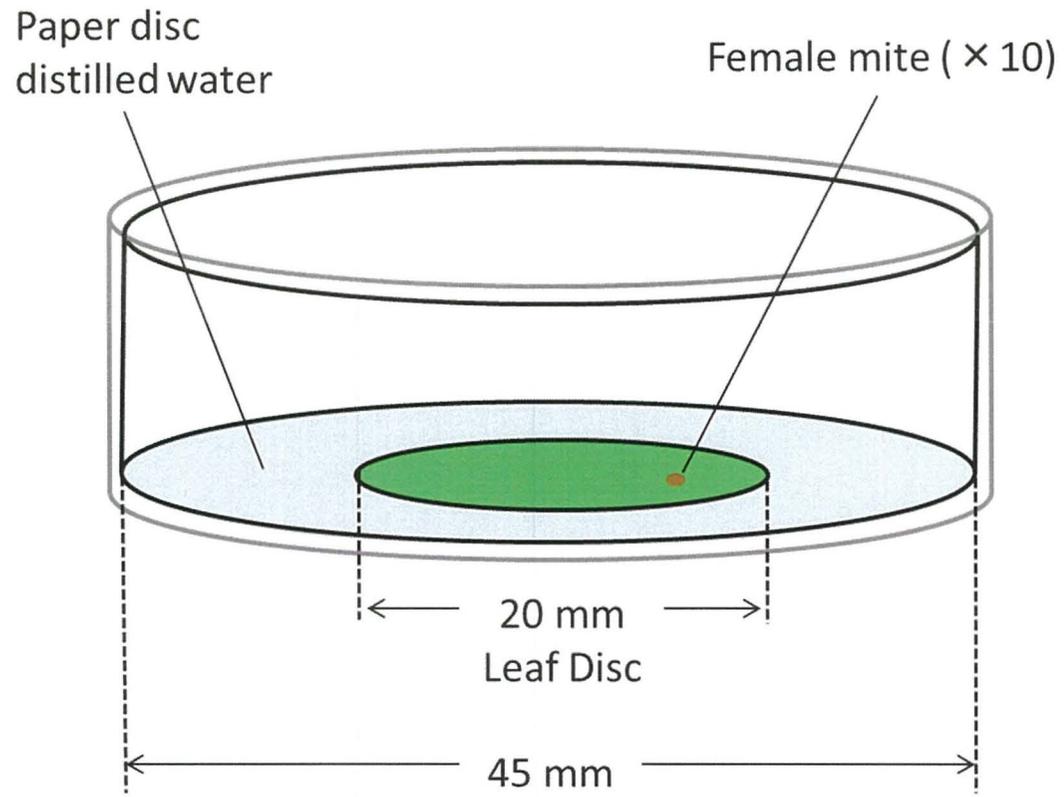


Fig. 5-1 Diagram of Leaf disc test method.

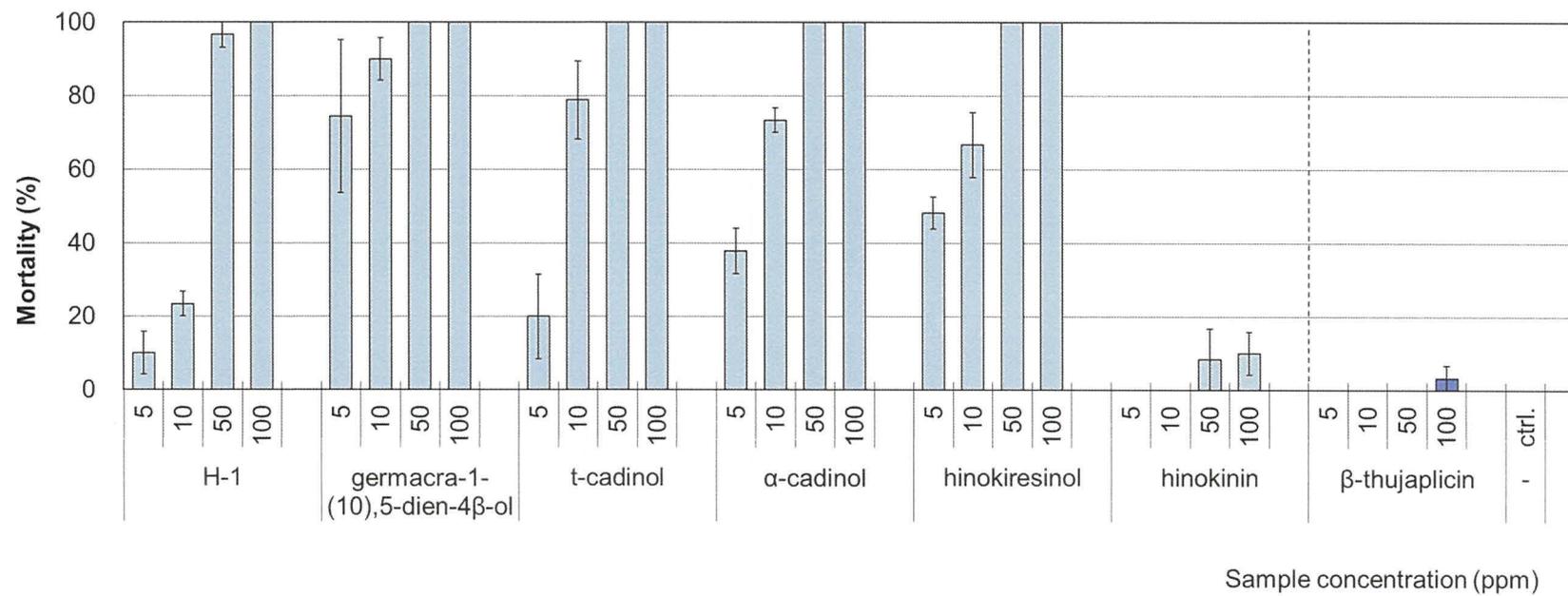


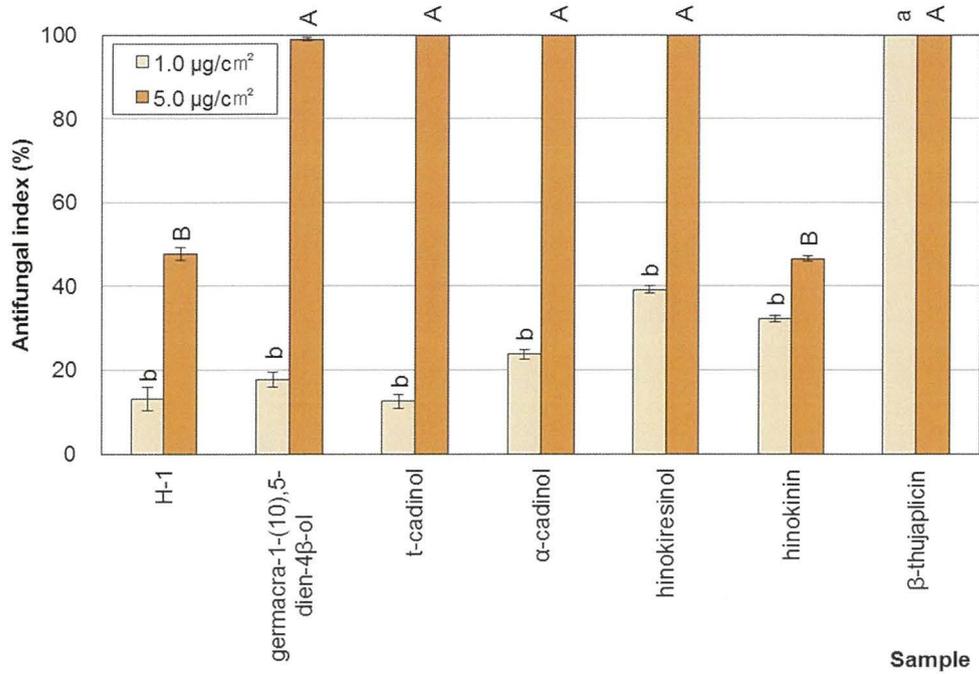
Fig. 5-2 Lethal activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood against brine shrimp larva. Error bar: \pm SE.

Table 5-1 LC₅₀ values of isolated compounds from hinoki branch heartwood against brine shrimp larva.

Sample	LC ₅₀ (ppm)
H-1	15
germacra-1-(10),5-dien-4β-ol	4
<i>t</i> -cadinol	7
α-cadinol	6
hinokiresinol	6
hinokinin	ND*
β-thujaplicin	ND*

**ND* not determined

Saprolegnia parasitica



Saprolegnia diclina

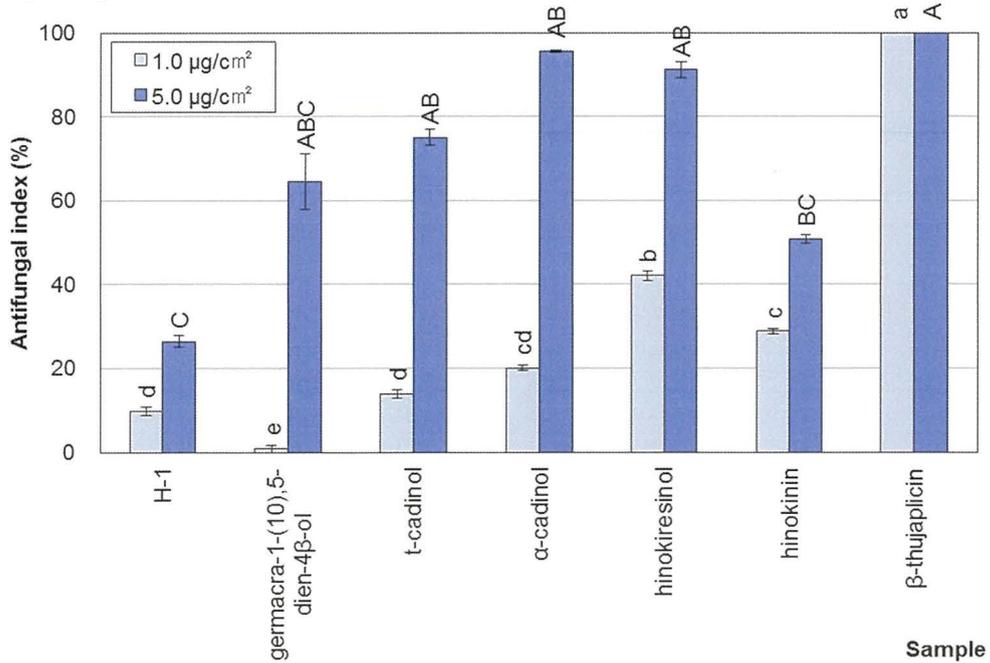


Fig. 5-3 Antifungal activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood. Error bar: \pm SE. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$.

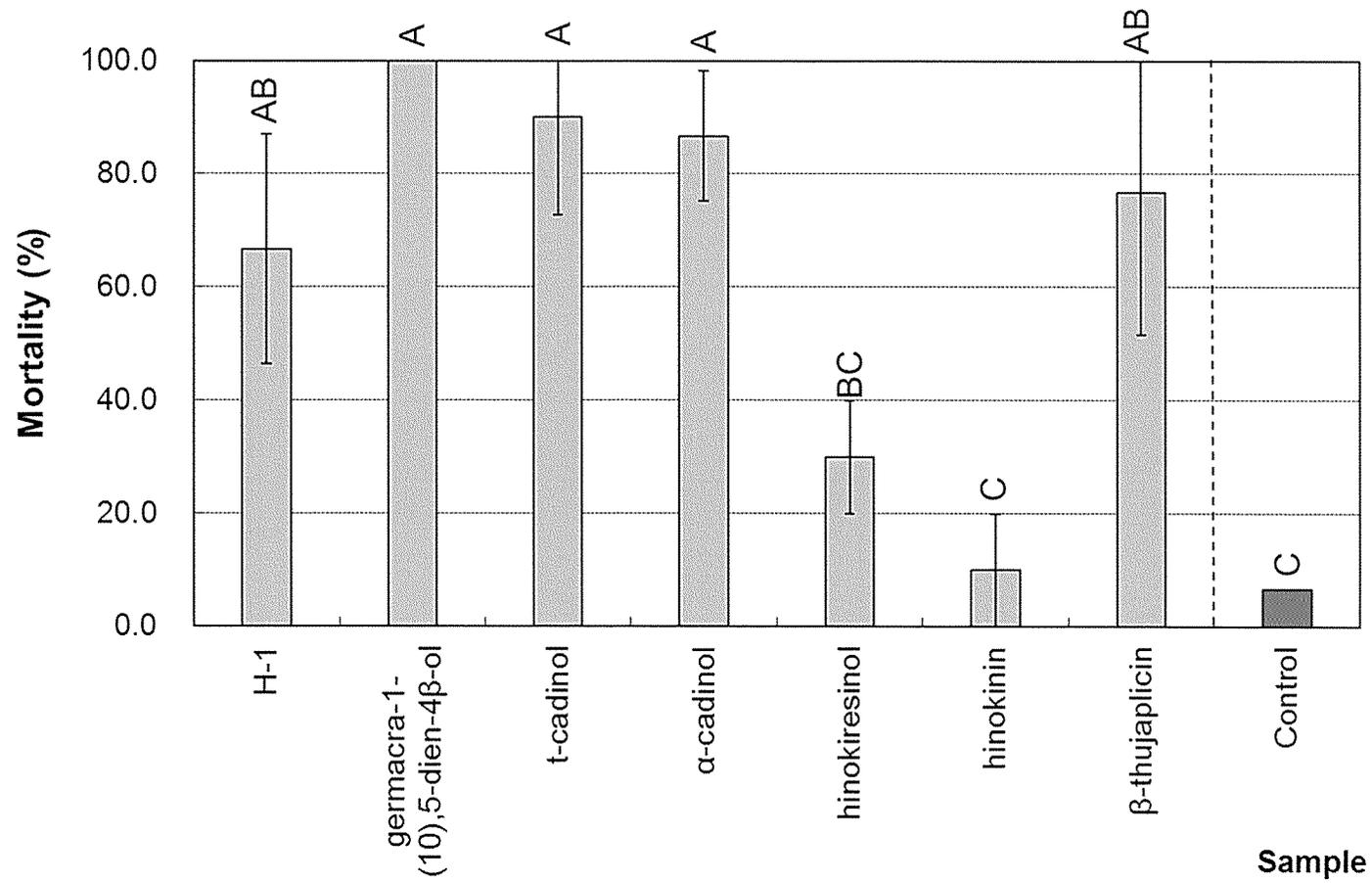


Fig. 5-4 Miticidal activities of isolated compounds from hinoki branch heartwood. Error bar: \pm SE. Common letters denote no significant difference. Turkey-Kramer, $p < 0.05$.

第6章 ヒノキ枝心材と生物活性

第2~5章にて、ヒノキ枝心材成分を用いて木材劣化の原因となる木材腐朽菌やシロアリのほか、ブラインシュリンプ、水かび、ハダニといった複数の生物に対する活性を検討した。本章ではこれらの活性を全体的に評価することとした。

活性試験の結果を Table 6 に示す。

炭化水素画分 H-1 の抗菌活性はいずれも低く、シロアリに対する致死活性もみられなかったが、シロアリへの摂食阻害、接触忌避活性を示した。また、ブラインシュリンプ、水かび、ハダニに対しては後述のセスキテルペンアルコール類には劣るが活性を示した。

セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol が多くの生物に対し活性を発揮し、特に α -cadinol が多岐に渡る生物活性を示した。

α -Cadinol は抗菌活性試験において白色腐朽菌の *T. versicolor*, 褐色腐朽菌の *G. trabeum*, 軟腐朽菌の *T. virens*, *C. globosum* およびかび菌の *R. oryzae*, *P. citrinum* といった複数の菌に対して高活性を示した。シロアリに対しては非常に高い致死活性のほか、摂食阻害、接触忌避活性が確認された。さらに、ブラインシュリンプ、水かび病菌、ハダニに対しても顕著な活性を示した。

t-Cadinol (α -cadinol の立体異性体) もそれに次ぐ多くの生物活性を有し、褐色腐朽菌の *G. trabeum* や *P. citrinum* に対し高い活性をみせた。シロアリに対しても致死活性、摂食阻害、接触忌避活性を示し、ブラインシュリンプ、水かび病菌、ハダニに対しても活性を示すなど、 α -cadinol と非常によく似た活性傾向をみせた。尚、 α -Cadinol, *t*-cadinol といったこれら cadinene 型セスキテルペン化合物の活性についてはこれまでに、ヒノキ幹心材の代表的な抗菌・抗蟻活性成分として報告されている。セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol は枝特有の化合物であり、その抗菌

活性に上記の *cadinol* 型化合物に劣るが、シロアリに対しては非常に高い致死、摂食阻害、接触忌避活性を示し、ブラインシュリンプ、ハダニに対しても高い致死活性を示した。これらの生物に対する致死活性は上記の *cadinol* 型化合物と同等かそれ以上のものであった。

ノルリグナンの *hinokiresinol* は抗菌活性については白色・褐色腐朽菌に対する活性はやや低いものであったが、*T. virens* や *R. oryzae* に対して β -*thujaplicin* や他の化合物の活性を上回る高い活性を示した。また、シロアリに対しては致死活性こそ低いが高い摂食阻害が確認され、試料を含浸させた PD を海砂で覆い隠すなどの忌避行動がみられた。ブラインシュリンプと水かび病原菌に対しても高い活性を示したが、ハダニに対しては活性を示さないなど、他の化合物とやや異なる活性傾向をみせた。

リグナンの *hinokinin* は他の化合物に比べ、いずれの試験においても顕著に高い活性は示さなかったが白色腐朽菌の *T. versicolor*, 褐色腐朽菌の *F. palustris* に対し抗菌活性、シロアリに対し摂食阻害、摂食忌避を示した。

以上より、ヒノキ枝心材は *t-cadinol*, α -*cadinol*, *germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol* といったセスキテルペンアルコールの化合物が多く、多くの生物に対する活性を示すと同時に、炭化水素化合物や *hinokiresinol*, *hinokinin* といった化合物がそれぞれ上記のセスキテルペンとは違った活性を発揮していることが明らかになった。また、ヒノキ枝心材は幹心材よりも多量の抽出物を有し、セスキテルペンアルコールの *germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol* やノルリグナンの *hinokiresinol* といった枝特有の化合物を有することによって幹心材に比べより多面的な生物活性を発揮し、樹体を化学的に防御していると推察される。枝が幹に比べ高い生物活性を持った理由として、枝が自然環境において幹より傷つきやすく、自己防御機構として二次代謝物による化学防御物質を生産する必要があるためと考えられる。

Table 6 Bioactivities of isolated compounds from hinoki branch heartwood.

Sample	Fungi										Termite			B. S.	Mite	Fungi (Oomycete)		
	Growth Inhibition ^a										Lethality ^b	Anti feedant ^c	Repellent contact ^d	Lethality ^e	Lethality ^f	Growth Inhibition ^a		
	White-rot fungi		Brown-rot fungi		Soft-rot fungi		Other fungi									<i>S. diclina</i>	<i>S. parasitica</i>	
	<i>T. versicolor</i>	<i>L. betulinus</i>	<i>F. palustris</i>	<i>G. trabeum</i>	<i>T. virens</i>	<i>C. globosum</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>C. cladosporioides</i>								
H-1												+	+	*	*	*		
germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol								*			**	+	+	**	**	**	*	
<i>t</i> -cadinol				**		*		**			**	+	+	**	**	**	**	
α -cadinol	*		*	**	*	**		**			**	+	+	**	**	**	**	
hinokiresinol			*		**	*		*	*			+		**	**	**	**	
hinokinin	*		*			*		*				+				**	*	
β -thujaplicin	**	**	**	**	*	**		**	*	*	*	+			*	**	**	

^a Growth inhibition: - \leq 30%, 30% < * < 70%, 70% \leq **

^b Lethality of fungi: Values of LD₅₀: - \leq 5 μ g/mg, 5 μ g/mg < * < 10 μ g/mg, 10 μ g/mg \leq **

^c Anti feedant: + means significantly different from mass loss of control PD.

^d Repellent contact: + means significantly different from contact times of control area.

^e Lethality of B.S.: Values of LC₅₀: - \leq 10 μ g/ml, 10 μ g/ml < * < 15 μ g/ml, 15 μ g/ml \leq **

^f Lethality of mite: - \leq 30%, 30% < * < 80%, 80% \leq **

第7章 総括

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) は日本を代表する常緑針葉樹であり、加工性や耐朽性にも優れることから古くから木材として利用されてきた。ヒノキの優れた特性は樹木中に含まれる抽出成分によるものであり、ヒノキに含まれる成分に関してこれまでに多くの研究がなされ、とりわけ材として商業的価値を持つ部位は建築材等に用いられる幹材であることから、幹材の成分や生理活性に関して多くの報告がなされてきた。

ヒノキ幹材が木材として重用されてきた一方で、商業的価値のない枝葉や樹皮といった部位や間伐材は伐採後そのまま林地内に放置されるのがほとんどである。これまでも有効な利用法について様々なアプローチがなされており、パーティクルボードや燃料資源などへの利用が検討されているがその利用率はわずかであり、ヒノキの未利用資源についても未だに有効な利用法がないのが現状である。特にヒノキ樹体の重量の約 20-30%を占める枝材の有効利用は重要であると考えられる。ヒノキ枝材は幹材に比べ建材等には適しておらず、物理的な利用は限定される。そこでヒノキ枝材の化学的利用法に着目した。前述したようにヒノキ幹心材の抽出成分に関してはこれまでに多くの報告が成されているのに対し、ヒノキ枝材の成分分析や化学的利用に関する研究は十分におこなわれていない。そこで本研究では、現在木質廃材として扱われているヒノキ枝心材中に木質資源としての有効な利用価値を見出すため、枝心材抽出成分に着目し、その生物活性物質について検討した。

第2章では未利用の木質資源の一つであるヒノキ枝の有効利用法を見出すため、まずヒノキの枝・幹心材の抽出成分の相違を明らかにした。

山形大学附属フィールド科学センター付属上名川演習林にて伐採したヒノキより採取した枝・幹心材を hexane, ethyl acetate, methanol で逐次抽出した。枝心材は幹

心材に比べ全乾重量当たり多量の抽出物を有し、幹の 5 倍の hexane 抽出物、10 倍の ethyl acetate 抽出物を含有する抽出率を示した、特に低・中極性成分の多い構成であった。

枝心材の hexane 抽出物をカラムクロマトグラフィーで分画し、炭化水素混合物画分 H-1 と、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol を、ethyl acetate 抽出物から、hinokiresinol および hinokinin を単離した。続いて枝・幹の hexane, ethyl acetate 抽出物を GC-MS, GC-FID にて分析し、その成分構成を検討した結果、枝と幹の hexane 抽出物から共通する主要なピークとしてモノテルペン炭化水素の β -elemene, copaene, セスキテルペン炭化水素の α -muurolene, γ -cadinene, δ -cadinene, セスキテルペンアルコールの *t*-cadinol, α -cadinol, リグナンの hinokinin が検出され、枝のみにセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol が確認された。Ethyl acetate 抽出物から枝・幹に共通してリグナンの hinokinin が確認され、ノルリグナンの hinokiresinol が枝心材のみに特徴的に確認された。これらの構成割合をみると、枝・幹ともに cadinene 型のセスキテルペン炭化水素の γ -cadinene と δ -cadinene および *cadinol* 型セスキテルペンアルコールの *t*-cadinol, α -cadinol が大きな構成割合を占めており、リグナンの hinokinin がこれに次ぐ構成割合であった。枝に特徴的にみられた germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, hinokiresinol はこれらの化合物に比べ構成割合は小さかった。

以上より、ヒノキ枝心材は幹心材に比べ多量の低・中極性の抽出成分を含有しており、その中に含まれる化合物の構成割合は類似しているが、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol や hinokiresinol といった成分が枝に特徴的に存在することが明らかになった。

第 3 章ではヒノキ枝心材成分の抗菌活性を明らかにするため、ヒノキ枝・幹心材の

抗菌活性試験をおこない、その活性の差異を比較した。

ヒノキ枝・幹心材部の hexane, ethyl acetate, methanol 逐次抽出物を用い、白色腐朽菌の *T. versicolor* (カワラタケ)、褐色腐朽菌の *F. palustris* (オオウズラタケ)、軟腐朽菌の *T. virens* およびかび菌の *R. oryzae* に対する抗菌活性試験をおこなった。その結果、枝・幹心材の hexane, ethyl acetate 抽出物に活性が確認された。

続いて枝心材の hexane, ethyl acetate 抽出物より分画・単離された H-1 画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinin を用いて活性試験をおこなった。試験には 6 種の木材腐朽菌 (白色腐朽菌の *T.versicolor*, *L. betulinus*, 褐色腐朽菌の *F. palustris*, *G. trabeum*, 軟腐朽菌の *T. virens*, *C. globosum*) と 4 種のかび菌 (*R. oryzae*, *A. niger*, *P. citrinum*, *C. cladosporioides*) を用いた。その結果、セスキテルペンアルコールの α -cadinol に非常に高い活性が確認され、*T. versicolor*, *G. trabeum*, *T. virens*, *C. globosum*, *R. oryzae*, *P. citrinum* に対し活性を有した。その立体異性体である *t*-cadinol がそれに次ぐ高活性を示し、*G. trabeum*, *C. globosum*, *P. citrinum* に対し高い活性をみせた。その一方で、枝の特徴的なセスキテルペンアルコールである germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol は上記の化合物に比べやや劣るが *P. citrinum* に活性を示した。枝特有の化合物であるノルリグナンの hinokiresinol は positive control の β -thujaplicin 等の活性が低かった *T. virens* や *R. oryzae* に対して高い活性を示した。また枝・幹両方に共通して含有される hinokinin は *T. versicolor*, *C. globosum*, *T. virens* に対し活性を示した。

以上より、菌によって活性を示す化合物は各々異なり、複数の化合物が多様な形で樹木の抗菌活性に寄与していると考えられる。また、ヒノキ枝心材は幹心材よりも多量の抽出物を有しており、その中に含有される化合物によって多面的に活性を発揮するほか、germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol や hinokiresinol といった枝特有の化合物を含

むことから、量的・質的な面で幹心材より高い抗菌活性を持つといえる。

第4章では木材腐朽菌と並ぶ木材劣化生物であるシロアリに対するヒノキ枝心材の活性を検討した。

ヒノキ木材の耐シロアリ食害性を検討するため、枝、幹心材をブロック状に加工し食害試験をおこなった結果、controlのアカマツと比べ枝・幹ともにほとんど食害を受けなかった。ヒノキ幹心材は一般に食害を受けにくい材として知られており、ヒノキ枝心材もそれと同等の耐シロアリ食害性があるといえる。

続いてヒノキ枝・幹抽出物の抗蟻活性を検討するため、逐次抽出物を用いたPD強制摂食試験をおこなったところ、枝心材のhexane抽出物に高い致死活性が確認された。また、すべての抽出物に摂食阻害活性が確認された。

続いて枝心材hexane, ethyl acetate抽出物から分画・単離されたH-1画分, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol および hinokinin を用いてPD強制摂食活性試験をおこなった。さらに、抗蟻活性をより詳細に検討するために複数の試験手法を用いて活性を評価した。最も一般的なPD強制摂食試験(a)の結果、致死活性が確認されたのはセスキテルペンアルコールのgermacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, および α -cadinolであった。摂食阻害活性についてはすべての試料に確認され、H-1画分, hinokiresinol, hinokininは致死活性の低い一方で、高い摂食阻害活性を有していた。PD選択摂食試験(b)では試験(a)とほぼ同様の致死活性を示した。一方、H-1画分, hinokiresinol, hinokininといった致死活性の低い化合物は、controlのPDを選択的に摂食しており、高い摂食忌避活性を示した。PD非接触試験(c)では揮発性物質の影響を検討した。その結果、いずれの化合物においても致死活性、摂食阻害活性はほとんど確認されなかった。よってシロアリに対し致死活性を示した化合物は餌と同時に摂取、または気体状で摂取される以外

の形でシロアリに影響していると推察された。処理土壌強制接触試験 (d) では PD を排除しシロアリの体表に直接試料を接触させる試験をおこなった。その結果、試験 (a) とほぼ同様の致死活性が *germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol*, *t*-cadinol, α -cadinol に認められた。よって、これらの化合物はシロアリ個体に直接接触することによって活性を発揮するものと考えられる。処理土壌選択接触試験 (e) では試料の接触忌避性を検討した。その結果、*germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol*, *t*-cadinol, α -cadinol といったセスキテルペンアルコールのほかに、炭化水素画分 H-1 に強い接触忌避活性が確認された。

以上のことからヒノキ枝心材は、幹心材に含まれる抗蟻活性物質 (金城ら 1988; Otani et al. 1996, 1997; 松島ら 1990) として知られる α -cadinol, *t*-cadinol のほかに、枝特有の成分である *germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol* といったセスキテルペンアルコールが致死、摂食阻害、接触忌避活性を有していた。また、また致死活性こそ低いものの、炭化水素画分 H-1 は摂食阻害、摂食忌避、接触忌避活性を、ノルリグナンの *hinokiresinol* とリグナンの *hinokinin* は摂食阻害・忌避活性を有しており、これらも枝心材の抗蟻活性に寄与していると考えられる。枝心材は幹心材に比べ多量の抽出物含有し、さらに枝特有の成分を有することによって幹に比べより多面的な抗蟻活性を発揮していることが明らかになった。

第 5 章では、枝心材成分の木材劣化の原因となる木材腐朽菌やシロアリ以外の生物に対する活性試験をおこない、ヒノキ枝心材成分のさらなる利用法について検討した。

生物活性のスクリーニング試験として広く用いられるブラインシュリンプ幼生致死活性試験をおこなった結果、セスキテルペンアルコールの *germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol*, *t*-cadinol, α -cadinol およびノルリグナンの *hinokiresinol* に非常に高い致死活性が確認された。

続いて水かび病原菌である *S. parasitica* に対する抗菌活性試験の結果、試験濃度

5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ において positive control に用いた β -thujaplicin が 100%の生長阻止率を示し, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, α -cadinol および hinokiresinol がそれと同等の高い抗菌活性を示した. *S. diclina* に対しては β -thujaplicin が生長阻止率 100%を示し, サンプルでは α -cadinol (95.6 \pm 2.3%), hinokiresinol (91.1 \pm 1.8%) が特に高い活性を示した.

農業害虫であるナミハダニを用いた殺ハダニ活性試験では, positive control の β -thujaplicin (76.7 \pm 25.0%)の致死活性をセスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, α -cadinol がを上回った. 最も高い活性を示したのが germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol (100%) で, 次いで α -cadinol (90.0 \pm 17.3%), *t*cadinol (86.7 \pm 11.5%) が高活性を示した.

このことから, ヒノキ枝心材成分は木材劣化に関する木材腐朽菌やシロアリ以外の生物に対しても生物活性を示し, またその活性は化合物によって多様な形で発揮されることが示された.

第6章では, 第2~5章にておこなった複数の生物に対する活性を全体的に評価した. 多くの生物に対し活性を発揮したのは, セスキテルペンアルコールの germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*cadinol, α -cadinol であり, 特に α -cadinol が菌, シロアリをはじめとする複数の生物に対し高い活性を示し, その立体異性体である *t*cadinol もそれに次ぐ多くの生物活性を有していた. これら cadinenol 型セスキテルペン化合物の活性についてはこれまでにヒノキ幹心材に含有される代表的な抗菌・抗蟻活性成分として報告されている. 枝特有の化合物である germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol は, 抗菌活性については上記の cadinol 型化合物に劣るが, シロアリやブラインシュリンプ, 水かび病菌, ハダニといった動物に対してこれらと同等かそれ以上の非常に高い活性を示した. 枝に特徴的な化合物であるノルリグ

ナンの hinokiresinol については, positive control の β -thujaplicin 等の活性が低かった *T. virens* や *R. oryzae* に対して高い活性を示し, シロアリに対しては致死活性こそ低いもの高い摂食阻害・忌避が確認された. また, ブラインシュリンプ幼生と水かび病原菌に対しても高い活性を示したが, ハダニに対しては活性がみられないなど, 他の化合物に比べその活性傾向がやや異なっていた. 炭化水素画分 H-1 および hinokinin は他の化合物に比べ, いずれの試験においても顕著な高い活性は示さなかったが, H-1 はシロアリへの摂食阻害, 摂食忌避, 接触忌避活性, ブラインシュリンプ, 水かび, ハダニに対する活性を示し, hinokinin は *T. versicolor*; *F. palustris* に対し抗菌活性, シロアリに対し摂食阻害, 摂食忌避を示した.

以上より, ヒノキ枝心材は幹心材に比べ多量の抽出物を含有し, *t*-cadinol, α -cadinol, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol といったセスキテルペンアルコール化合物や, 炭化水素化合物, ノルリグナンの hinokiresinol, リグナンの hinokinin といった多面的な活性を持つ化合物を有することが明らかになった. これらの化合物ごとの働きによってヒノキ枝心材は樹体を化学的に防御しているものと考えられる. 枝が幹に比べ高い生物活性を持った理由として, 枝が自然環境において幹より傷つきやすく, 自己防御機構として二次代謝物による化学防御物質を蓄積する必要があったためと考えられる.

本研究によってこれまで木質廃材として扱われてきたヒノキ枝材は, 幹以上の多量の抽出物を有し, また枝特有の活性成分を持つ有用な木質資源であることが見出された. 木材腐朽菌やシロアリに活性を発揮することから木材保存に関連する林業・土木建築分野への利用が考えられる. 例えば土壌に混入し抗蟻活性を発揮することから土壌処理剤等への利用が挙げられる. また, 木材腐朽菌やシロアリといった木材分解生物に限らず, ハダニや水かびにも活性を示したことから漁業, 水産業, 農業といった分野へも応用できる可能性がある. 今後これらの生理活性成分の特色を明らかにするため,

その効果の持続性，人体・農作物・環境への影響等を検証し，より付加価値の高い利用をおこなうことで林地廃材の問題解決の一端になり，木質資源としての新たな可能性が広がると考えられる。

引用文献

- Ahn YJ, Lee SB, Okubo T, Kim M. (1995) Antignawing factor of crude oil derived from *Thujopsis dolabrata* hondai sawdust, against mice. J. Chem. Ecol. 21: 263-271
- Ahn YJ, Lee SB, Okubo T, Kim M. (1998) Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and β -thujaplicin derived from *Thujopsis dolabrata hondai* sawdust. J. Chem. Ecol. 24: 81-90
- Ali N, Ahmed G, Shah SWA, Shah Ismail, Ghias M, Khan Imran. (2011) Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *Callistemon citrinus* Curtis. BMC Compl Alternative Med. 11: 99
- Borg-Karlson AK, Norin T. (1981) Configurations and conformations of torreyol (δ -cadinol), α -cadinol, T-muurolol and T-cadinol. Tetrahedron 37(2): 425-430
- Chang HT, Cheng YH, Wua CL, Chang ST, Chang TT, Su YC. (2008) Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. formosana Florin leaf against plant pathogenic fungi. Bioresource Technology 99: 6266-6270
- Debell JD, Morrell JJ, Gartner BL. (1997) Tropolone content of increment cores as an indicator of decay resistance in western red cedar. Wood Fiber Sci. 29: 364-369
- Debell JD, Morrell JJ, Gartner BL. (1999) Within-stem variation in tropolone content and decay resistance of secondgrowth western redcedar. For. Sci. 45: 101-107
- El-Shazly AM, Husseinb KT. (2004) Chemical analysis and biological activity of the essential oil of *Teucrium leucocladum* Boiss (Lamiaceae). Biochem. Syst. Ecol. 32(7): 665-674
- Ganapaty S, Thomas PS, Fotso S, Laatsch H. (2004) Antitermitic quinones from *Diospyros sylvatica*. Phytochemistry 65(9): 1265-1271

- Hirose Y, Oishi N, Nagaki H, Nakatsuka T. (1965) The structure of hinokiresinol. *Tetrahedron Letters* 6(41): 3665-3668
- Hori M. (2004) Repellency of hinokitiol against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). *Applied entomology and zoology* 39(3): 521-526
- 細辻豊二 編集. (1985) 最新農薬生物検定法. 全国農村教育協会: pp. 324-328
- 井上功盟. (1993) ヒノキ枝打ち林におけるヒノキカワモグリガ被害. 日本林学会関西支部 論文集(2): 191-192
- 石井孝昭, 門屋一臣. (1993) カラタチおよびイネの生長に及ぼすスギならびにヒノキ材中の生育阻害物質について. *園藝學會雜誌* 62(2): 285-294
- Kashiwagi, M, Yoshioka M. (2006) Fungicidal activities of horseradish extract on a fish-pathogen oomycetes, *Saprolegnia parasitica*. *Bull. Fac. Bio resources, Mie Univ.* 33: 1-7
- Kijidani Y, Sakai N, Kimura K, Fujisawa Y, Hiraoka Y, Matsumura J, Koga S. (2012) Termite resistance and color of heartwood of hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) trees in 5 half-sib families in a progeny test stand in Kyushu, Japan. *J. Wood. Sci.* 58(6): 471-478
- 金城和彦, 矢賀嗣良. (1986) 担子菌栽培培地に関する研究 (第4報) ヒノキの阻害活性. *木材学会誌* 32(8): 632-636
- 金城和彦, 堂福康海, 矢賀嗣良. (1988) ヒノキ (*Chamaecyparis obtuse* Endl.) の殺蟻成分について. *木材学会誌* 34(5): 451-455
- 近藤隆一郎, 今村博之. (1986) ヒノキ心材の耐朽成分. *木材学会誌* 32(3): 213-217
- 小藤田久義, 藤野陽治, 佐々木達也, 長谷部真, 太田路一, 鈴木幸一 (2001) スギ樹皮の抗菌活性とその関連成分. *木材学会誌* 47(6): 479-486
- Kusumoto N, Ashitani T, Hayasaka Y, Murayama T, Ogiyama K, Takahashi K. (2009)

- Antitermitic activity of abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum* Cones. J. Chem. Ecol. 35(12): 635-642
- Kusumoto N, Ashitani T, Murayama T, Ogiyama K, Takahashi K. (2010) Antifungal abietane-type diterpenes from the cones of *Taxodium distichum* Rich. J. Chem. Ecol. 36(12): 1381-1386
- Labbe C, Castillo M, Connolly JD. (1993) Mono and sesquiterpenoids from *Satureja gilliesii*. Phytochemistry 34(2): 441-444
- 松島七月, 姜夏泳, 鮫島一彦, 高村憲男. (1990) ヒノキ材殺蟻活性の複合性について. 木材学会誌 36(7): 559-564
- Medarde M, Gordaliza M, Lucas MJ. (1995) Structure elucidation of germacrane alcohols from *Juniperus communis* subsp. *Hemisphaerica*. J. Nat. Prod. 58(7): 1059-1064
- Mori S, Hagihara A. (1995) Branch Respiration in Hinoki [*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.] Trees, with Reference to Branch Positions within Tree Crowns. Bull Nagoya Univ. For. 14: 25-34
- Mori T, Hirose H, Hanjavanit C, Hatai K. (2002) Antifungal Activities of Plant Extracts against Some Aquatic Fungi. Biocontrol Science 7(3): 187-191
- 森康浩, 秋山真孝, 宮原文彦. (2010) 心材色に着目した精英樹第二世代からの京築ヒノキの選抜. 木材学会誌 56(5): 355-365
- Morita Y, Matsumura E, Okabe T, Fukui T, Shibata M, Sugiura M, Ohe T, Tsujibo H, Ishida N, Inamori Y. (2004) Biological activity of α -thujaplicin, the isomer of hinokitiol. Biol. Pharm Bull. 27(6): 899-902
- Nakashima Y, Shimizu K. (1972) Studies on an antitermitic activity of Hinokiasunaro (*Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. var. *Hondai Makino*). III. The components with a termiticidal activity. Miyazaki Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku 19: 251-259

- 大原誠資, 伊藤繁則. (1995) Steaming Treatment of Condensed Tannins II Polyphenols from steamed *Chamaecyparis obtusa* bark and their protein-adsorbing capacities. 木材学会誌 41(5): 498-504
- 大橋英雄, 林秀行, 山田美津子, 安江保民. (1987) ヒノキのフェノール性心材成分と心材色. 岐阜大学農学部研究報告 52: 131-139
- Ohira T, Yatagai M. (1994) Allelopathic compounds produced by forest plants II. The relationships between the inhibition effects on plant growth and killing activity of brine shrimp on phenolic compounds. Mokuzai Gakkaishi 40(5): 541-548
- Ohtani Y, Hazama M, Sameshima K. (1997) ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*) 材殺蟻活性の化学的決定因子(第3報)ヒノキ材の殺蟻活性に対する α -テルピニルアセテートの寄与. 木材学会誌 43(12): 1022-1029
- Onwona-Agyeman S, Morioka N, Kitagaka K, Kondo M. (1994) A Quicker and Non-Destructive Field Method for Estimating the Strength of Living Branches in a Plantation Forest. 日本林學會誌 76(4): 321-328
- Otani Y, Hazama M, Sameshima K. (1996) Crucial Chemical Factors for Termiticidal Activity of Hinoki Wood (*Chamaecyparis obtusa*) II. Variations in termiticidal activities among five individual samples of hinoki wood. 木材学会誌 42(12): 1228-1233
- 大谷慶人, 桐嶋充子, 鮫島一彦. (2001) 樹木精油成分の水和反応が抗蟻活性, 抗菌活性に及ぼす効果. 木材学会誌 47(3): 267-275
- 林野庁 編集. (2012) 森林・林業白書 平成23年度版. 一般財団法人 全国林業改良普及協会: pp. 55-56
- Rojas R, Bustamante B, Ventosilla P, Fernández I, Caviedes L, Gilman RH, Lock O, Hammond GB. (2006) Larvicidal, Antimycobacterial and Antifungal Compounds from the Bark of the Peruvian Plant *Swartzia polyphylla* DC. Chem. & pharm Bull.

54(2): 278-279

- 佐竹義輔. (1993) 日本の野生植物 木本 I . 平凡社: pp. 17-20
- Sheikh C, Hossain MS, Easmin MS, Islam MS, Rashid M. (2004) Evaluation of *in vitro* antimicrobial and *in vivo* cytotoxic properties of some novel titanium-based coordination complexes. Biol. Pharm Bull. 27(5): 710-713
- 島地岩根, 吉村貢, 阿部勲, 武田明正. (1984) ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* SIEB. et ZUCC.) 樹皮の燃料資源的基礎研究. 三重大學農學部演習林報告 13: 155-174
- Takaku N, Choi DH, Mikame K, Okunishi T, Suzuki S, Ohashi H, Umezawa T, Shimada M. (2001) Lignans of *Chamaecyparis obtuse*. J. Wood. Sci. 47(6): 476-482
- Tanaka K, Manabe M, Matsuura S. (1979) Biological test using brine shrimp (part2). Rept. Natl. Food Res. Inst. 34: 84-88
- Taylor AM, Gartner BL, Morrell JJ, Tsunoda K. (2006) Effects of heartwood extractive fractions of *Thuja plicata* and *Chamaecyparis nootkatensis* on wood degradation by termites or fungi. J. Wood Sci. 52(2): 147-153
- 時光博史. (2007) ヒノキ生枝の衝撃強さ. 日本林學會誌 89(2): 131-134
- 屋我嗣良, 河内進策, 今村祐嗣 編 (1997) 木材科学講座 12 保存・耐久性. 青海社 pp.96-98
- Yamaguchi T, Fujita K, Sakai K. (1999) Biological activity of extracts from *Cupressus lusitanica* cell culture. J. Wood. Sci. 45(2): 170-173
- 山本宏, 浅野直俊, 沢野千晶, 曾根つきみ, 我謝孟俊, 小野 義隆 (1997) 漏脂症ヒノキ樹脂から単離したジテルペン. 木材学会誌 43(7): 558-565
- Yang JK, Choi MS, Seo WT, Rinker DL, Han SW, Cheong GW. (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil. Fitoterapia 78(2): 149-152
- 財団法人エネルギー総合工学研究所 (編). (2003) 新エネルギーの展望 バイオマス発電. 財

団法人エネルギー総合工学研究所:p.8

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始ご指導，ご鞭撻を賜りました山形大学農学部森林科学コースの高橋孝悦教授，芦谷竜矢教授，岩手大学農学部共生環境課程の小藤田久義准教授に深謝の意を表します．

本研究に用いた試料の採取にあたり山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センターの皆様にご協力を賜りました．また，日本獣医生命科学大学応用生命科学部の畑井喜司雄教授には抗水かび活性試験の遂行に際しご助言頂きました．また抗ハダニクミアイ化学工業株式会社生物科学研究所害虫防除研究室の橋本尚也様にはハダニ活性試験において，ハダニの提供ならびにご助言を賜りました．独立行政法人産業技術総合研究所の関根伸弘研究員ならびに，秋田県立大学木材高度加工研究所の楠本倫久研究員には，各種試験の遂行にあたって多くのご助言を賜りました．記して，謝意を表します．

最後に，実験の遂行ならびに論文執筆に際しご協力，激励をくださった山形大学農学部森林資源利用学研究室の学生諸氏と，そして家族に心より感謝致します．

Summary

Chamaecyparis obtusa Endl. (hinoki) has long been an important plantation conifer in Japan. Hinoki timber is very durable and is the source of various bioactive compounds. Previous studies identified several of these chemicals and investigated the bioactivity of hinoki trunk heartwood.

Other parts of the tree, such as the branches, leaves, and bark, are considered woody waste and their disposal in forests has become a problem. Several studies have examined the utilization of these parts, such as for raw material for particleboard and as fuel, but they have not been widely implemented. Finding new uses for branch wood is important because branches comprise 20–30% of the weight of a tree. If bioactive compounds can be extracted from branches, the value of this resource will increase. To date, however, very few reports have investigated the bioactivity of hinoki branch heartwood. Therefore, this study examined new methods for utilizing hinoki branch heartwood. Extracts from hinoki branch heartwood were subjected to bioassays to reveal allelopathy and activity against harmful organisms.

Chapter two describes a hinoki that was felled at the Yamagata Field Science Center (Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka, Japan) and the separation of branch and trunk heartwood. Each heartwood sample was crushed and extracted with hexane, ethyl acetate, and methanol. The quantity of hexane extract components in branch heartwood was about five times that of trunk heartwood. The ethyl acetate extract of branch heartwood contained 10 times the quantity of trunk extracts. The hexane and ethyl acetate extracts of branches were

subjected to 60N silica gel column chromatography, which showed germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, and hinokinin. Gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) analysis demonstrated hydrocarbon mono- and sesquiterpenoids and sesquiterpene alcohols in both extracts, while germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol was present only in the branch extracts. The lignan hinokinin was present in both branch and trunk extracts. The norlignan hinokiresinol was a characteristic compound in the chromatogram of the branch heartwood extract. In the GC-MS analysis, the composition of the branch and trunk extracts was similar, except for germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol and hinokiresinol.

Chapter three presents tests of the antifungal activities of extracts from hinoki branch and trunk heartwood against four fungi: *Trametes versicolor*, *Fomitopsis palustris*, *Trichoderma virens*, and *Rhizopus oryzae*. The hexane and ethyl acetate extracts of branch and trunk heartwood displayed antifungal activity.

The compounds separated from the branch heartwood extracts (H-1, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, and hinokinin) were used in bioactivity tests against six wood rot fungi (*T. versicolor*, *Lenzites betulinus*, *F. palustris*, *Gloeophyllum trabeum*, *T. virens*, and *Chaetomium globosum*) and four mold fungi (*R. oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, and *Cladosporium cladosporioides*). α -Cadinol had strong antifungal activity against *T. versicolor*, *G. trabeum*, *T. virens*, *C. globosum*, *R. oryzae*, and *P. citrinum*. *t*-Cadinol, a stereoisomer of α -cadinol, showed similar antifungal activity. Germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, a characteristic compound of the branch heartwood,

showed weak antifungal activity against all of the fungi tested. The norlignan hinokiresinol showed strong activity against *T. virens*, and its activity was stronger than that of the positive control, β -thujaplicin. The lignan hinokinin, which was present in both branch and heartwood extracts, also had some activity against *T. versicolor*, *C. globosum*, and *T. virens*. Combinations of the different compounds showed wide-ranging antifungal activities. The yields of the branch extracts were greater than those of the trunk.

Chapter four describes investigations on the antitermitic activity of the branch heartwood of hinoki against Japanese termites (*Reticulitermes speratus*) and compared it with that of the trunk.

The branch and trunk heartwood depressed feeding activity compared with the control, showing strong anti-feeding activity. In the no-choice paper disc (PD) feeding test, branch and trunk heartwood hexane extracts had termiticidal activity and inhibited termite feeding. The effect of the branch extracts was strongest 7 days after the beginning of the test. All extracts inhibited feeding activity significantly compared with the control.

H-1, germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, α -cadinol, hinokiresinol, and hinokinin, which were separated from branch extracts, were tested using three PD test methods (no-choice PD feeding, dual-choice PD feeding, and noncontact PD test) and two soil test methods (no-choice contact and dual-choice contact tests). In the no-choice PD feeding test, the sesquiterpenes germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, and α -cadinol were strongly termiticidal. All compounds reduced feeding activity compared with the controls, and the sesquiterpenes inhibited feeding and

killed the termites. Hinokiresinol and hinokinin inhibited feeding, but did not kill termites. In the dual-choice test, the sesquiterpenes (germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, and α -cadinol) killed termites quicker than hinokiresinol, hinokinin, and β -thujaplicin, although feeding was inhibited at all concentrations. Therefore, hinokiresinol and hinokinin repel termites, but are not lethal. Termites covered the hinokiresinol-impregnated PDs with sterile sea sand in the no-choice and dual-choice PD feeding tests, implying that hinokiresinol was strongly repellent. In the noncontact PD test, no termiticidal or anti-feeding activities were observed. In addition, the sesquiterpenes showed strong termiticidal activity in the no-choice contact test. Therefore, these compounds had effects only with direct contact. In the dual-choice contact test, the sesquiterpenes and H-1 fraction showed strong repellent contact activity.

The sesquiterpenoids germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, and α -cadinol were strongly termiticidal, had anti-feeding activity, and repelled contact. H-1 prevented feeding and repelled contact. Hinokiresinol and hinokinin inhibited feeding, but did not kill termites. These compounds had effects only on direct contact. The sesquiterpenoids were strongly termiticidal and combinations of different compounds showed wide-ranging activity against termites.

Chapter five presents three bioassays carried out against a non-wood-eating organism, larval brine shrimp, which is a good bioassay method for monitoring bioactive compounds. The sesquiterpenoids germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, and α -cadinol were strongly lethal, and the norlignan hinokiresinol also had strong activity. The sesquiterpenoids and hinokiresinol were also lethal to mites and

germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol had the strongest lethality. In a bioassay against oomycete fungi, the sesquiterpenoids and hinokiresinol showed strong growth inhibition, especially α -cadinol and hinokiresinol.

Chapter six evaluates the results of the bioassays. The sesquiterpenoids germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol, *t*-cadinol, and α -cadinol had wide ranging bioactivity. α -Cadinol showed strong activity against fungi, termites, and other organisms. *t*-Cadinol, a stereoisomer of α -cadinol, showed similar activities. Germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol had weak activity against fungi, while it had a strong lethal effect on termites, brine shrimp larvae, and mites. These active sesquiterpenes are more abundant in branch heartwood than in trunk heartwood. The norlignan hinokiresinol also showed bioactivity against various organisms, but its activity differed from that of the sesquiterpenoids. The active compounds hinokiresinol and germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol are characteristic components of branch heartwood. H-1 and lignan hinokinin had weak lethality against various organisms, but displayed antifungal and strong anti-feeding activity.

Hinoki branch heartwood contains various, abundant active components in greater quantities than the extracts of trunk heartwood. Germacra-1-(10),5-dien-4 β -ol and hinokiresinol were characteristic compounds of branch heartwood. The combination of different compounds protects hinoki branches from attack by a wide range of harmful organisms. Some of these compounds might also be a source of antifungal and anti-insect chemicals for use to protect wooden structures.

At present, hinoki branch wood is wasted because it is considered valueless. However, extracts from hinoki branch heartwood could be a source of antifungal and anti-insect chemicals that might be used to protect wooden structures in forestry and engineering. In addition, these compounds were active against not only wood-damaging organisms, but also other organisms, and might be useful in other fields, such as agriculture and the marine products industry.

This study's findings suggest that the branch heartwood could be a valuable chemical resource, which may help to solve the problem of woody waste.

本研究に関する報告一覧

1. Morikawa T, Ashitani T, Sekine N, Kusumoto N, Takahashi K (2012)
Bioactivity of extracts from *Chamaecyparis obtusa* branch heartwood. Journal
of Wood Science 58(6):544–549