

日本産針葉樹樹皮抽出成分の抗菌活性について

澁谷 栄*・鮫島正浩*・佐分義正*

Antimicrobial Activities of Extractives from the Barks of Japanese Coniferous Trees

Sakae SHIBUTANI*, Masahiro SAMEJIMA* and Yoshimasa SABURI*

I. 緒 言

木材の生産時に副産される樹皮には多量の抽出成分が含まれている。樹木から木材あるいは木材チップを製造する工程においては樹皮をジェット水流により剥離することがしばしば行われるが、この際に樹皮の化学成分の一部が多量に抽出される。樹皮の抽出成分の中には様々な生理活性を示すものが多いので^{1,2)}、樹皮の剥離時に使用された水が環境中に廃液として放出された場合、それらが生態系に与える影響について近年指摘されるようになってきた³⁾。

抽出成分の様々な生理活性の中でも、その抗菌性は顕著なものの一つであろう。例えば、ウエスタンレッドシーダー (*Thuja plicata* D. Don) 材中に存在しているツヤプリシンなどのトロポロン類は強力な殺菌性を持ち、材の耐朽性原因物質として知られている⁴⁾。また、スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 材中に見出されるジテルペン化合物のフェルギノールはシイタケの成長阻害物質として同定されている⁵⁾。同じくジテルペン性の物質であるが、ナギ (*Podocarpus nagi* Thunb.) の根から得られたトータロールは 1.56 ppm で細菌 *Bacillus subtilis* の生育を阻害することが報告されている⁶⁾。また、樹皮に含まれるタンパク質を捕捉する能力を持つポリフェノールであるタンニン類は、菌類の働きを抑制しているものと考えられる^{2,7)}。以上のような例の他にも、微生物の生育を抑制する働きを持つ抽出成分は現在までに数多く報告されている⁹⁾。

樹幹の外側に存在する樹皮は、外部からの微生物の侵入を防ぐ役割の一端を担っているので、このような部位に位置する抽出成分には抗菌性を示す化合物が含まれることは当然予想される。

以上のような観点から、本研究では利用頻度の高い日本産針葉樹 6 種を選択し、その内樹皮抽出成分が、樹木や植物材料に棲息し、リグニン関連芳香族化合物の分解に関与する細菌および放線菌、またリグノセルロース分解に関与する糸状菌に対する抗菌性を調べた。さらに、抗菌性の原因となる物質を検索した。

II. 実 験

II-1. 樹皮試料

本実験で用いた樹皮は、以下の 6 樹種から得た。このうち、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.), スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don), アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) は 1995 年 5 月に東京大学千葉演習林内において、またトドマツ (*Abies sachalinensis* Fr.

* 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻

Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo.

Schm.), アカエゾマツ (*Picea glehnii* Fr. Schm.), カラマツ (*Larix leptolepis* Sieb. et Zucc.) は 1995 年 5 月に東京大学北海道演習林内において間伐材から剥離したものである。これらを風乾させたのち以下の実験に供した。

II-2. 試供菌株

本研究で用いた微生物は以下の通りである。細菌; *Pseudomonas paucimobilis* TMY 1009, *Pseudomonas putida* TN 1126, 放線菌; *Nocardia autotropica* DSM 4300, *Nocardia globerura* DSM 43273, *Nocardia corallina* DCM 2184, 糸状菌; *Trichoderma reesei* IAM 13106, *Phanerochaete chrysosporium* K-3.

II-3. 抽出物の調製

風乾後の樹皮から外樹皮を削除したのち, 残った内樹皮を小片化した。これをウィリーミルで粉碎し, 1 mm 篩いを通過させ樹皮粉としたものを試料に用いた。得られた試料の含水率は約 11~12% であった。

50 g の試料を 500 mL の *n*-ヘキサンを用いて室温で 24 時間静置浸漬抽出した。これをろ別し抽出液を得たのち, 残った内樹皮粉に新たに 500 mL の *n*-ヘキサンを加え, 室温下静置状態で 24 時間浸漬抽出した。以上の手順により得られた抽出液を合わせ, *n*-ヘキサン抽出液とした。

引き続き, *n*-ヘキサン抽出残さを乾燥させることなく同様の方法で酢酸エチルにより抽出し, 酢酸エチル抽出液を得た。さらに同様の方法で酢酸エチル抽出残さのエタノール抽出を行い, エタノール抽出液を得た。

なお, 各抽出液はエバポレータを用い, 湯浴温度 40°C 以下で溶媒を溜去し, 抽出物を濃縮乾固させたのち重量を測定し, これを各抽出物の収量とした。試料気乾重量当りの各抽出物量を表-1 に示す。

II-4. 細菌および放線菌に対する抗菌試験

表-2 に示す培地組成で寒天培地を作製し, これをオートクレーブで滅菌 (121°C, 20 分間) し

表-1 各針葉樹から得られた抽出物量 (%)^{a)}
Table 1. Yield of extracts from inner barks of coniferous trees^{a)}

	n-Hexane extracts	Ethyl acetate extracts	Ethanol extracts	Total
<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	8.0	4.6	15.9	28.5
<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	6.4	18.7	17.6	43.7
<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	2.3	5.1	17.3	24.7
<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	1.5	7.0	12.0	20.5
<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	3.9	1.9	10.4	16.2
<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	1.8	7.1	10.5	19.4

a) 気乾内樹皮に対する重量パーセント.

a) weight percent of air-dried inner bark.

表-2 抗菌試験に用いた培地組成
(1 Lあたり)Table 2. Composition of medium for
animicrobial tests
(for 1 L of cultures)

For <i>Pseudomonas</i> spp.	Pepton	10.0g
	Yeast extract	5.0g
	NaCl	5.0g
	Agar	30.0g
	pH	7.4
For <i>Nocardia</i> spp.	Malt extract	10.0g
	Yeast extract	5.0g
	Glucose	4.0g
	Agar	30.0g
	pH	6.8
For fungi	Malt extract	10.0g
	Yeast extract	2.0g
	Pepton	2.0g
	Asparagine	0.1g
	KH ₂ PO ₄	2.0g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g
	Agar	30.0g
	pH	5.0

た後、滅菌プラスチックシャーレ（直径 90 mm × 高さ 15 mm）に 20 mL ずつ分注した。各樹種から得た *n*-ヘキサン、酢酸エチル、及びエタノール抽出物の DMSO 溶液を寒天培地が固化する前に、添加後の濃度が培地に対して 0.1%、0.01%、0.001% となるように抽出物を加えて、均質になるように培地中によく分散させた。なお、抽出物を含まない DMSO のみを等量添加したものをコントロールとした。これらの試験培地上に栄養培地で前培養した細菌あるいは放線菌を接種し、27°C で培養し、その増殖を観察した。培養 3 日目の増殖状況を肉眼で観察し、抗菌性を $\#$: 全く増殖しないもの、 $+$: 若干の増殖は認められるが著しく生育抑制が観察されるもの、 \pm : 増殖が認められるがややコントロールと差異があるもの、 $-$: コントロールと同程度に増殖が認められるものとして、四段階で評価した。

II-5. アカエゾマツ内樹皮 *n*-ヘキサン抽出物の分画

細菌および放線菌に対して高い抗菌性を示したアカエゾマツの *n*-ヘキサン抽出物について活性を有する成分を単離するためシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。カラムクロマトグラフィーの条件は以下に示す通りである。ゲル：ワコーゲル C-200（和光純薬製）、カラムサイズ：直径 3.0 cm × 長さ 26 cm、溶出溶媒：*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 12/1 (v/v)。

カラムからの溶出液は 15 mL ごとにフラクションコレクターで集め、それぞれについてシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) (Merck 社製, No. 5554, 展開溶媒：*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 5/1 (v/v)) により構成成分を分析した。TLC 上で、同一の R_f 値を与える成分を含む画分をまとめ、画分 H-1 (R_f 値 0.9 以上)、画分 H-2 (R_f 値 0.7)、画分 H-3 (R_f 値 0.5)、画分 H-4 (R_f 値 0.4)、画分 H-5 (R_f 値 0.3)、画分 H-6 (R_f 値 0.2 以下) とした。なお、TLC の検出は展開溶媒を風乾した後に希硫酸を噴霧し、480°C の熱風で加熱して成分を炭化させスポットの位置を特定した。画分 H-1 から H-6 について II-4 の方法で抗菌試験を行った。

II-6. 糸状菌類に対する抗菌性

糸状菌に対する抗菌性は以下のようにして調べた。表-2 に示した培地組成で寒天培地を作製してオートクレーブで滅菌 (120°C, 20 分間) した。これを直径 90 mm の滅菌プラスチックシャーレに 20 mL ずつ分注し、培地が固化した後に各糸状菌の孢子液を培地表面に塗布した。この寒天培地上に、抽出物 5 mg を含む各抽出液を含浸させ風乾させたペーパーディスク (直径 9.0 mm, 厚さ 1.3 mm) を置いたのち、27°C で培養した。培養 5 日後に菌糸の生育状況を観察し、ペーパーディスクが接触した寒天培地上に形成される生育阻止円の大きさ、およびディスク上で

の菌糸の生育状況によってその抗菌性を, #: 形成された生育阻止円の直径が 2.0 cm 以上のもの, +: 2.0 cm 未満の阻止円形性があるもの, ±: 阻止円形成は認められないがペーパーディスク上に菌糸の生えていないもの, -: 阻止円形成の認められないだけでなく菌糸がペーパーディスク上に菌糸の生えたものとして, 四段階で評価した。

II-7. アカエゾマツ酢酸エチル抽出物の分画

抗菌試験で 2 種の糸状菌に対して強い抗菌性を示したアカエゾマツの酢酸エチル抽出物を以下に示す条件のカラムクロマトグラフィーにより精製した。ゲル: Sephadex LH-20 (ファルマシア-LKB 製), カラムサイズ: 直径 3.0 cm × 長さ 26 cm, 溶出溶媒: エタノール。

カラムからの溶出液は 15 mL ごとに集められ各画分を TLC (Merck 社製: No. 5554, 展開溶媒: ベンゼン/アセトン/酢酸=100/100/1 (v/v)) で構成成分を分析した。TLC 上で同一の Rf 値を与える成分を含む画分をまとめ, 画分 E-1 (Rf 値 0.6 以上), 画分 E-2 (Rf 値 0.5), 画分 E-3 (Rf 値 0.3), 画分 E-4 (Rf 値 0.2 以下) とした。得られた画分については II-6 の方法に従ってその抗菌試験を行った。

II-8. 機器分析

実験 II-5 で抗菌性の観察された画分 H-4 について溶媒をアセトンで置換した後に室温下でピストリメチルシリルアセトアミド (BSA) でトリメチルシリル (TMS) 化し, ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) を行った。GC-MS 分析は以下の通りである。GC-MS 機種; DX303 (日本電子製), GC 条件; キャピラリーカラム: CBP1-M-0.25 (カラム長さ: 25 m, 内径: 0.25 μ m, 島津製作所製), キャリアーガス (He): 45 kg/cm², 初期温度保持時間: 3.0 min, 昇温速度: 5°C/min, 温度範囲: 150-300°C, MS 条件; イオン化電圧: 70 eV, Current 電流: 100 μ A, イオン加速電圧: 3 kV。

また画分 H-5 に対して, 直接導入法により高分解能マススペクトル (MS) を以下の条件で測定した。なお, この高分解能マススペクトル分析では誘導体化を行っていない試料を用いた。機種; DX303 (日本電子製), 温度: 300°C, イオン加速電圧: 70 eV, Current 電流: 100 μ A, イオン加速電圧: 3 kV。

さらに画分 H-5 について ¹³C-NMR を用いて分析を行った。¹³C-NMR は, AC-300 (BRUKER 製) により測定した。試料溶媒としては CDCl₃ を用いた。化学シフトはトリメチルシランを基準にして求めた。

また, 糸状菌に対して抗菌性が見られたアカエゾマツの酢酸エチル抽出物の画分 E-3 の分析については HPLC を用いて以下の条件で行った。機種; LC-6A (島津製作所製), カラム名: COSMOSIL 5C-18-AR (NACALAI TESQUE INC. 製), 溶媒系: 水/アセトニトリル混合溶媒 (84/16 v/v), 流速: 1.0 mL/min, 検出: UV (280 nm)。

さらに, 逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて画分 E-3 の主成分を精製し, ¹³C-NMR を用いて構造分析を行った。逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーの分取条件は以下に示す通りである。ゲル: カラムクロマト用 C18 ゲル (ジューエルサイエンス株式会社製), カラムサイズ: 直径 2.5 cm × 長さ 15 cm, 溶出溶媒: 14% (v/v) アセトニトリル/水。

また, ¹³C-NMR 測定は試料を (CD₃)₂CO に溶解して行った。得られたスペクトルの化学シフト

は次のようであった。A ring, C-1: 141.4, C-2: 107.1, C-3: 160.4, C-4: 102.4, C-5: 159.5, C-6: 108.4, B ring, C-1': 130.9, C-2': 110.5, C-3': 147.7, C-4': 149.2, C-5': 116.3, C-6': 121.4, C- α : 126.9, C- β : 130.3, Glucoside C-1'': 104.2, C-2'': 74.9, C-3'': 78.0, C-4'': 71.5, C-5'': 78.2, C-6'': 62.6, -OCH₃: 56.4。

III. 結 果

III-1. 各抽出物の細菌、放線菌に対する抗菌性

各抽出物の添加濃度 0.1% で行った抗菌試験の結果を表-3 に示す。いずれの樹種についても酢酸エチル及びエタノール抽出物に比べて、*n*-ヘキサン抽出物は本研究で用いた *Pseudomonas putida* TN 1126 株以外のすべての細菌、および放線菌に対して強い抗菌性を示した。また、酢酸エチル抽出物では、トドマツ抽出物が *Nocardia* spp. に、アカエゾマツ抽出物が *Pseudomonas paucimobilis* に対してそれぞれ強い抗菌性を示した。なお、*Pseudomonas putida* に対しては、いずれの抽出物も抗菌性を示さなかった。

次に、抽出物を培地に対して 0.01% で添加した場合の抗菌試験の結果を表-4 に示す。

この濃度で明確な抗菌性を示したものは、アカエゾマツおよびヒノキの *n*-ヘキサン抽出物だけであった。スギの場合でも若干の抗菌性は認められたが、トドマツ、アカマツ、カラマツではほとんど抗菌性は認められなかった。また、いずれの樹種とも、この濃度では酢酸エチル抽出物、エタノール抽出物は全く抗菌性を示さなかった。

さらに、*n*-ヘキサン抽出物でも添加濃度 0.001% の場合は、アカエゾマツの抽出物が *P. paucimobilis* に対して、ヒノキの抽出物が *P. paucimobilis*, *N. autotropica* に対して、それぞれわずかな抗菌性を示すだけであった。

III-2. アカエゾマツ内樹皮*n*-ヘキサン抽出物中の抗菌活性成分

細菌および放線菌に対して強い抗菌活性を示し、また表-1 に示すように内樹皮に対する収量が多かったアカエゾマツの *n*-ヘキサン抽出物について、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて *n*-ヘキサン抽出物の分画を行い、抗菌性の原因となる物質について検索を行った。得られた各画分の抗菌試験の結果を表-5 に示した。ここでは画分 H-2, 画分 H-3, 画分 H-4, 画分 H-5 に *P. putida* を除く細菌、放線菌に対して抗菌性が観察された。この中でも強い抗菌活性をもつ画分は薄層クロマトグラフィーの展開において Rf 値 0.7, 0.4 にスポットを与える画分 H-2, 画分 H-4 であった。このうち、Rf 値 0.4 を与える画分 H-4 について、同一のカラムで再度精製した後、その画分を構成する主成分の構造について解析を行った。TMS 化した画分 H-4 の GC-MS 分析では、保持時間 19.4 分に画分 H-4 全体の約 65% を占める主要なピークが観測された。このピークのマススペクトルでは、その分子イオンピークは 372 (m/z) であった (図-1)。このマススペクトルにおいて 73 のフラグメントピークが観測されていることから、ガスクロマトグラム上で保持時間 19.4 分のピークを与えた化合物には TMS 基が少なくとも 1 個は入っているものと考えられた。TMS 基が 1 個入っている場合は、この化合物の元の分子量は 300 であると予想された。そこで直接導入法による高分解マススペクトルによる分析を行ったところ、分子量 300.226 を与えるピークが観測され、この結果に相当する分子式として C₂₀H₂₈O₂ (計算値: 300.209) が与えられた。このことから、該当する化合物はジテルペンではないかと予想された。

表-3 各抽出液を 0.1% 添加した培地上での生育試験結果 (培養 3 日後)

Table 3. Growth of microorganisms on agar-medium containing 0.1% of each extract (incubation for 3 days)

		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>
		<i>paucimobilis</i>	<i>putida</i>	<i>autotropica</i>	<i>globeterrae</i>	<i>corallina</i>
		TMY1009	TN1126	DSM4300	DSM43273	DCM2184
n-Hexane extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	++	±	++	++	±
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	++	-	++	++	++
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	++	-	++	++	++
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	++	±	++	++	++
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	++	-	++	++	++
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	++	-	±	+	-
Ethyl acetate extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	±	-	++	++	++
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	++	-	-	±	-
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	-	-	+	+	+
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	+	-	+	+	±
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	+	-	±	+	+
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	+	-	-	+	-
Ethanol extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	±	-	-	-	-
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	±	-	-	-	-
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	+	±	+	+	+
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	-	-	±	±	±
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	+	-	-	-	-
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	-	-	-	-	-

(注) 表の記号は、いずれも#: 全く成育しないもの (抗菌性大), +: 若干の成育は認められるが著しく成育抑制が観察されるもの, ±: 成育が認められるがややコントロールと差異があるもの, -: コントロールと同程度に成育が認められるもの (抗菌性なし) を示す。

(note) #: no growth, +: poor growth, ±: growth, but not so well as control, -: growth well as control.

表-4 各抽出液を 0.01% 添加した培地上での生育試験結果 (培養 3 日後)

Table 4. Growth of microorganisms on agar-medium containing 0.01% of each extract (incubation for 3 days)

		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>
		<i>paucimobilis</i>	<i>putida</i>	<i>autotropica</i>	<i>globeterrae</i>	<i>corallina</i>
		TMY1009	TN1126	DSM4300	DSM43273	DCM2184
n-Hexane extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	+	-	±	+	-
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	+	-	++	++	+
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	++	-	++	++	++
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	+	±	+	+	+
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	+	-	-	-	-
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	±	-	-	-	-
Ethyl acetate extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	-	-	-	-	-
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	-	-	-	-	-
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	-	-	-	-	-
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	-	-	-	-	-
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	-	-	-	-	-
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	-	-	-	-	-
Ethanol extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	-	-	-	-	-
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	-	-	-	-	-
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	-	-	-	-	-
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	-	-	-	-	-
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	-	-	-	-	-
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	-	-	-	-	-

(注) 表の記号は、いずれも#: 全く成育しないもの (抗菌性大), +: 若干の成育は認められるが著しく成育抑制が観察されるもの, ±: 成育が認められるがややコントロールと差異があるもの, -: コントロールと同程度に成育が認められるもの (抗菌性なし) を示す。

(note) #: no growth, +: poor growth, ±: growth, but not so well as control, -: growth well as control.

表-5 アカエゾマツ *n*-ヘキサン抽出物より精製した各画分の培地添加濃度 0.1% における分画後抗菌試験結果 (培養 3 日後)Table 5. Growth of microorganisms on agar-medium containing 0.1% of each fractions of *n*-hexane extracts of *P. glehnii* Fr. Schm. (incubation for 3 days)

Fraction No. (Rf value) ^{b)}	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Nocardia autotropica</i>	<i>Nocardia globerura</i>	<i>Nocardia corallina</i>
	TMY1009	TN1126	DSM4300	DSM43273	DCM2184
H-1 (0.9<)	-	-	-	-	-
H-2 (0.7)	++	-	++	++	++
H-3 (0.5)	+	-	±	±	+
H-4 (0.4)	++	-	++	++	++
H-5 (0.3)	++	-	+	+	++
H-6 (<0.2)	-	-	-	-	-

(注) 表の記号は, いずれも #: 全く成育しないもの (抗菌性大), +: 若干の成育は認められるが著しく成育抑制が観察されるもの, ±: 成育が認められるがややコントロールと差異があるもの, -: コントロールと同程度に成育が認められるもの (抗菌性なし) を示す.

b) TLC 分析での主要成分の Rf 値 (シリカゲル, 展開溶媒: *n*-ヘキサン/酢酸エチル=5/1 (v/v)) (note) #: no growth, +: poor growth, ±: growth, but not so well as control, -: growth well as control.

b) Rf value of major component on TLC analysis (silica-gel, developing solvent: *n*-hexane/ethyl acetate=5/1 (v/v)).

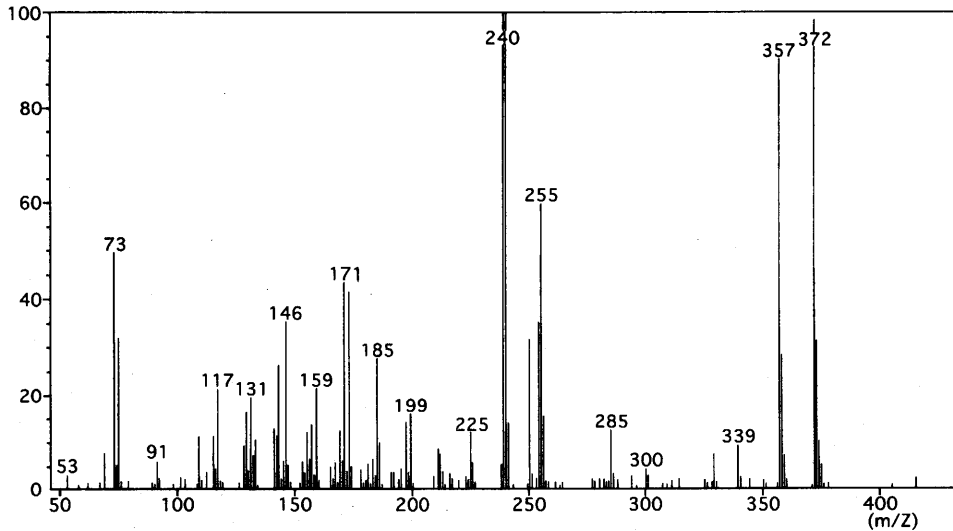


図-1 アカエゾマツ *n*-ヘキサン抽出物画分 H-4 の TMS 物の GC-MS 分析によるマススペクトル (保持時間: 19.4 分のピーク).

Fig. 1. Mass spectrum of the major component in fraction of *n*-hexane extracts of inner barks of *P. glehnii* Fr. Schm. (R. T. 19.4 min. on GC) in fraction H-4.

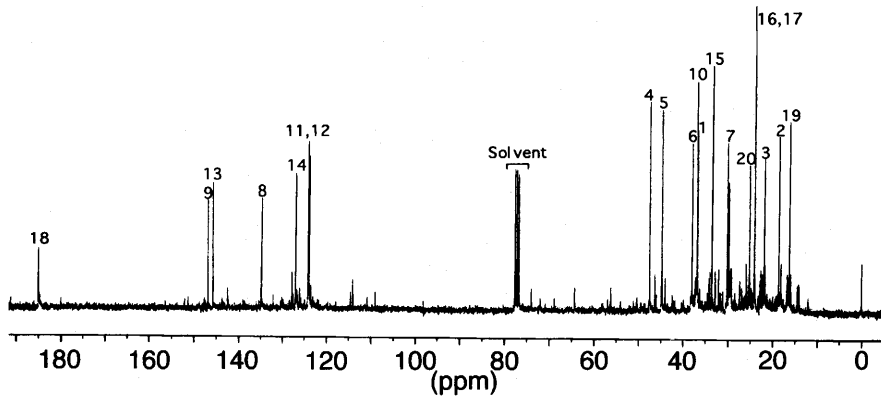


図-2 アカエゾマツ*n*-ヘキサン抽出物画分 H-4 の ^{13}C -NMR スペクトル.

Fig. 2. ^{13}C -NMR spectrum of fraction H-4 of *n*-hexane extracts of *P. glehnii* Fr. Schm.

また、画分 H-4 の ^{13}C -NMR スペクトル (図-2 および表-6) では、この化合物には 184.97 ppm にシグナルが観測されることから 1 つのカルボキシル基を含み、また 123.87~146.77 ppm に 6 本のシグナルが観測されることから 1 つのベンゼン環が含まれることが理解できた。そこで該当する化合物を検索したところ dehydroabietic acid に対する ^{13}C -NMR スペクトルの文献値¹⁰⁾と、すべてのシグナルがほぼ一致したことから画分 H-4 を構成する主要成分は dehydroabietic acid (8,11,13-abietatrien-18-oic acid) (I) であると同定した。

III-3. 各抽出物の糸状菌に対する抗菌性

表-7 に示した糸状菌に対する各抽出物の抗菌試験の結果から分かることは、細菌や放線菌などに強い抗菌性を示した *n*-ヘキサン抽出物は、糸状菌 *P. chrysosporium* および *T. reesei* に対しては全く抗菌性を示さないことである。これと対称的に細菌、放線菌に抗菌性の弱かった酢酸エチル抽出物およびエタノール抽出物は糸状菌に対して明確な抗菌性を示した。特にアカエゾマツの酢酸エチル抽出物の抗菌性は顕著で、*P. chrysosporium* および *T. reesei* に対してそれぞれ直径 2.5 cm, 2.3 cm の阻止円を形成させた。

III-4. アカエゾマツ内樹皮酢酸エチル抽出物中の抗菌活性成分

アカエゾマツ内樹皮の酢酸エチル抽出物をエタノールを溶出溶媒として用いた Sephadex LH-20 カラムによりさらに精製した。溶出順に TLC で構成成分を調べ、同一 Rf 値を与える成分を一つの画分としてまとめた。表-8 に示すように、得られた画分に対する抗菌試験の結果は、画分 E-3 にのみ著しい活性が存在することを示しており、他の画分の活性はこれと比べるとほとんど無視できる程度の活性であった。

画分 E-3 について HPLC による分析を行ったところ、図-3 に示すように、保持時間 14.5 分に主要成分によるピークを与えた。アカエゾマツの酢酸エチル抽出物については既に鮫島の報告⁸⁾があり、その結果に基づくと、画分 E-3 の主成分はスチルベン配糖体ではないかと考えられた。そこでスチルベン配糖体 isorhapontin 標品を用いスパイク法を行ったところクロマトグラム上でピークの一一致が確認できた。さらに画分 E-3 の主成分を逆相カラムクロマトグラフィーを用い

表-6 アカエゾマツ *n*-ヘキサン抽出物画分 H-4 の ^{13}C -NMR における各シグナルの化学シフトTable 6. Chemical shift of the major component in fraction H-4 of extracts from *n*-hexane of *P. glehnii* Fr. Schm.

Carbon-position	Major component in fraction H-4	Dehydroabietic acid ^{c)}
18	184.97	185.57
9	146.77	146.74
13	145.66	145.66
8	134.65	134.66
14	126.87	126.89
11	124.08	124.06
12	123.87	123.88
4	47.40	47.44
5	44.63	44.65
6	37.95	37.99
10	36.85	36.86
1	36.74	36.81
15	33.45	33.47
7	29.99	30.00
20	25.09	25.09
16	23.97	23.97
17	23.97	23.97
3	21.75	21.79
2	18.54	18.55
19	16.22	16.21

solvent: CDCl_3 , standard: TMS

(Carbon positions are numbered as Fig. 4.)

c) 文献 10 より転載

c) chemical shifts for dehydroabietic acid published in Ref. (10)

て精製を行い、これを HPLC 分析をして単一性を確認した後、 ^{13}C -NMR 分析を行った。その結果、スチルベン配糖体 isorhapontin 標品のスペクトルと一致した。以上のことから、このピークを与える化合物は標品とのスパイク法および、文献値との化学シフトの一致に従い、スチルベ

表-7 糸状菌に対する各抽出物の抗菌試験結果 (培養 5 日目)

Table 7. Antifungal activity of coniferous inner bark extracts (incubation for 5 days)

		<i>Phanerochaete chryso sporium</i> K-3	<i>Trichoderma reesei</i> IAM13106
n-Hexane extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	-	-
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	-	-
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	-	-
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	-	-
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	-	-
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	-	-
Ethyl acetate extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	-	-
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	++	++
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	+	±
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	+	±
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	+	-
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	±	±
Ethanol extracts	<i>Abies sachalinensis</i> Fr. Schm.	+	±
	<i>Picea glehnii</i> Fr. Schm.	+	±
	<i>Chamaecyparis obtusa</i> Sieb. et Zucc.	+	±
	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don	+	±
	<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	±	±
	<i>Larix leptolepis</i> Sieb. et Zucc.	+	±

(注) #: 形成された成長阻止円の直径が 2.0 cm 以上のもの (抗菌性大), +: 2.0 cm 未満の阻止円形成があるもの (抗菌性小), ±: 阻止円形成は認められないがペーパーディスク上に菌糸の生えていないもの, -: 阻止円形成の認められないだけでなく菌糸がペーパーディスク上に菌糸の生えたもの (抗菌性無し) を示す。

(note) #: strong inhibition (The diameter of clearing zone around a paper disk is more than 2.0 cm.), +: medium inhibition (The diameter of clearing zone around a paper disk is less than 2.0 cm.), ±: weak inhibition (No clearing zone, but no growth on a paper disk.), -: no inhibition.

表-8 アカエゾマツ内樹皮酢エチル抽出物の Sephadex LH-20 クロマトグラフィーにより得られた各画分による抗菌試験の結果 (培養 5 日目)

Table 8. Antifungal activity of components of ethyl acetate extracts fractionated by Sephadex LH-20 from *P. glehnii* Fr. Schm. inner barks (incubation for 5 days)

Fraction No. (Rf value) ^{d)}	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> K-3	<i>Trichoderma reesei</i> IAM13106
E-1 (0.6<)	-	-
E-2 (0.5)	±	-
E-3 (0.3)	++	++
E-4 (<0.2)	+	-

(注) #: 形成された成長阻止円の直径が 2.0 cm 以上のもの (抗菌性大), +: 2.0 cm 未満の阻止円形性があるもの (抗菌性小), ±: 阻止円形成は認められないがペーパーディスク上に菌糸の生えていないもの, -: 阻止円形成の認められないだけでなく菌糸がペーパーディスク上に菌糸の生えたもの (抗菌性無し) を示す。

(note) #: strong inhibition (The diameter of clearing zone around a paper disk is more than 2.0 cm.), +: medium inhibition (The diameter of clearing zone around a paper disk is less than 2.0 cm.), ±: weak inhibition (No clearing zone, but no growth is not observed on a paper disk.), -: no inhibition.

d) Rf value of major components on TLC analysis (silica-gel, developing solvent: benzene/acetone/acetic acid = 100/100/1 (v/v)).

ン配糖体の isorhapontin (3,4',5-hydroxy-3'-methoxy-stilbene-3-O-β-D-glucoside) (II) であると同定した。

IV. 考 察

本研究では、いずれの樹種とも、その細菌及び放線菌に対する抗菌活性は *n*-ヘキサン抽出物に集中している。添加濃度 0.01% では、いずれの樹種とも *n*-ヘキサン抽出物は抗菌活性を示したが、添加濃度 0.001% において抗菌性を示したのはアカエゾマツとヒノキだけであった。このうち、抽出量が他と比較して多いアカエゾマツ内樹皮 *n*-ヘキサン抽出物について、その構成成分の分画を行い抗菌性物質を検索した。その

結果、抗菌性物質の一つとして樹皮中の dehydroabietic acid (I) を同定した (図-4)。これに関連する化合物 abietic acid を用いて同様の抗菌試験を行ったが、abietic acid には抗菌性は認められなかった。このことから dehydroabietic acid (I) の示す抗菌性は、その発現に際してその構造

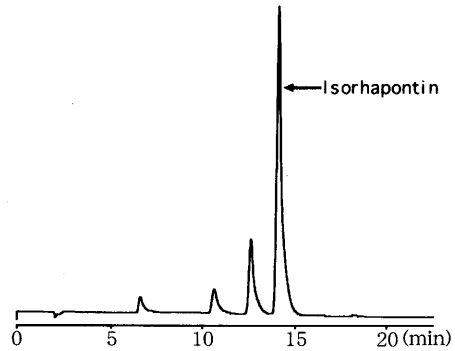


図-3 アカエゾマツ酢酸エチル抽出物の抗菌活性画分 E-3 の HPLC 分析によるクロマトグラム。

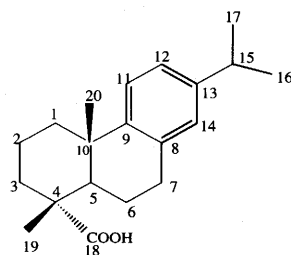
Fig. 3. HPLC of fraction E-3 from ethyl acetate extracts of *P. glehnii* Fr. Schm. inner barks.

中に存在する芳香環が重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。すでに, dehydroabietic acid (I) のグラム陽性菌に対する抗菌性については E. Hatmann らの報告があるが¹¹⁾, 本研究では dehydroabietic acid (I) が *P. paucimobilis* のようなグラム陰性菌に対しても抗菌性を示すことが確認された。なお, *P. putida* はいずれの樹種からの *n*-ヘキサン抽出物に対しても抗菌性を示していないが, これは *P. putida* が種々の炭化水素系化合物に対して強い分解性を持っていることに起因しているためと考えられた^{12, 13)}。また, アカエゾマツ内樹皮の *n*-ヘキサン抽出物には, dehydroabietic acid (I) 以外にも抗菌性を示す画分が認められたが, これらの画分の主要な構成成分も GC-MS 上で, ほぼジテルペンカルボン酸と思われる分子量域に分子イオンピークを与えていた。

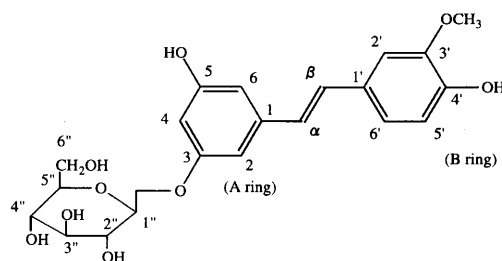
一方, 糸状菌 *P. chrysosporium* および *T. reesei* に対する抗菌試験では, アカエゾマツの内樹皮の酢酸エチル抽出物が非常に大きな生育阻止円を形成することが観察された。この結果はアカエゾマツ内樹皮の酢酸エチル抽出物にこれらの糸状菌に対して特異的な抗菌成分が存在することを示唆している。また, 多くの樹種で酢酸エチル抽出物やエタノール抽出物に生育阻止円が認められたが, これは針葉樹樹皮抽出成分に広く存在するフラバノール系ポリフェノール, いわゆる縮合型タンニンがこれらの溶媒で抽出されることから, これらの成分が抗菌活性を示したためではないかと考えられた。

ペーパーディスクによる試験では, ディスク中に含浸させた物質が寒天培地に拡散することで菌に取り込まれ抗菌作用を示し, 阻止円を形成するものと考えられる。この場合, 生育阻止円の大きさは含浸物の拡散性に強く影響を受けると言える。従って, アカエゾマツ内樹皮の酢酸エチル抽出物から得られた isorhapontin (II) は強い抗菌性を有するとともに, 高い親水性も有しているため大きな生育阻止円を形成したと考えられる。また, エタノール抽出物は酢酸エチル抽出物よりも親水性の高い物質が多いと考えられるが, ここで形成された阻止円の大きさは小さいことから, エタノール抽出物による抗菌性は isorhapontin (II) に比べると明らかに小さいとみなせる。一方, *n*-ヘキサン抽出物は阻止円をどの樹種も形成させていない。これは *n*-ヘキサン抽出物が疎水性で拡散性を持たないためとも考えられるが, ペーパーディスク上に菌糸が生えた点を考慮すると, 今回の試験で用いた糸状菌に対して, *n*-ヘキサン抽出物は抗菌性を持たないのではないかと考えられた。

isorhapontin (II) は *P. chrysosporium*, および *T. reesei* に対しても抗菌性を示したが, 細菌,



Dehydroabietic acid (I)



Isorhapontin (II)

図-4 アカエゾマツ内樹皮抽出物中の抗菌活性分.

Fig. 4. Antimicrobial compounds identified in extracts of inner bark of *P. glehnii* Fr. Schm.

放線菌に対しては強い抗菌性を示さなかったので、isorhapontin の抗菌作用は糸状菌に対して特異的なものであると考えられる。スチルベン配糖体の糸状菌に対する抗菌性についてもすでに報告はあるが¹⁴⁾、その活性の菌種特異性については述べられていない。

今回の結果では、細菌、放線菌に対する針葉樹内樹皮抽出物の抗菌活性原因の一つが dehydroabietic acid (I) のようなジテルペンカルボン酸の存在によることが確認され、一方アカエゾマツ内樹皮に特異的に存在する isorhapontin (II) のようなスチルベン配糖体は、針葉樹樹皮中に広く存在するフラバノール類 (縮合タンニン) などに比べて⁸⁾、糸状菌に対して著しく強い抗菌性を示すことが明らかとなった。さらに、針葉樹樹皮抽出成分の中でも、アカエゾマツの内樹皮は特に抽出物含有量も高く、また抗菌活性物質である dehydroabietic acid (I) や isorhapontin (II) なども多量に含むことから、これらの物質の抗菌活性を活用したアカエゾマツ樹皮の有効利用について検討していくことは価値あるものと考えられる。

一方、これまでの報告でも環境に放出された樹木抽出成分の危険性を指摘しているものもいくつか存在する。例えば樹脂酸類などは魚毒性を持つものとして指摘されている^{3, 15)}。本研究でも樹脂酸類の一種である dehydroabietic acid が細菌に対する抗菌性物質として同定された。このことから樹脂酸類の生物毒性について、さらに多くの生物に対して検討してみる必要がある。さらにトウヒ属針葉樹樹皮中に含まれるスチルベン配糖体の生物毒性についてはほとんど報告がないが本研究の結果から、これらの化合物が環境中に放出された場合の生物毒性についてさらに広く検討することが求められている。

謝 辞

本研究で用いた針葉樹樹皮を提供していただきました東京大学北海道演習林、ならびに千葉演習林の方々に深謝いたします。

要 旨

本研究では、6種の日本産有用針葉樹 (トドマツ: *Abies sachalinensis* Fr. Schm., アカエゾマツ: *Picea glehnii* Fr. Schm., アカマツ: *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc., カラマツ: *Larix leptolepis* Sieb. et Zucc., ヒノキ: *Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc., スギ: *Cryptomeria japonica* D. Don) の内樹皮より得た抽出物の細菌、放線菌および糸状菌に対する抗菌活性を調べ、さらに原因となる物質を検索した。

内樹皮粉を、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エタノールを用いて逐次抽出し、得られた抽出物について抗菌試験を行ったところ、細菌 (*Pseudomonas paucimobilis*)、放線菌 (*Nocardia autotropica*, *N. globerura*, *N. corallina*) に対しては、いずれの樹種の *n*-ヘキサン抽出物とも抗菌活性を示した。さらにこの中で、アカエゾマツ、およびヒノキの *n*-ヘキサン抽出物では特に強い抗菌性が認められた。これに対して、いずれの樹種の酢酸エチル抽出物、およびエタノール抽出物とも細菌、放線菌に対する抗菌活性は *n*-ヘキサン抽出物に比べて著しく低かった。さらに、アカエゾマツの *n*-ヘキサン抽出物について抗菌性の原因物質を調べたところ、これらの菌に対する抗菌物質の一つとしてジテルペンカルボン酸の dehydroabietic acid であることが明らかとなった。

一方、糸状菌 (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*) に対して内樹皮抽出物の抗菌性を調べた結果では、細菌、放線菌の場合とは対照的に *n*-ヘキサン抽出物には抗菌性が認めら

れず、逆に細菌、放線菌に対して抗菌性の弱かった酢酸エチル抽出物、エタノール抽出物に抗菌性が認められた。特に、アカエゾマツの酢酸エチル抽出物の抗菌性は非常に強いことから、特異的な抗菌物質の存在が示唆された。そこで、この抗菌物質について検索したところ、スチルベン配糖体の一種である isorhapontin が主な原因物質であることが明らかとなった。

キーワード： 樹皮、抽出成分、抗菌活性、樹脂酸、スチルベン

引用文献

- 1) 橋 燦郎: 木材学会誌, **41**, 967-977, 1995.
- 2) 木材の科学と利用技術 3: 日本木材学会編, 13-58, 1991.
- 3) D. B. EASTY, L. G. BORCHARDT and B. A. WABERS: *Tappi*, **61**, Oct., 57-60, 1987.
- 4) A. B. ANDERSON: *Tappi*, **45**(1), 40A-62A, 1962.
- 5) 中島 健他: 木材学会誌, **26**, 698-670, 1980.
- 6) I. KUBO, H. MUROI and M. HIMEJIMA: *J. Natur. Prod.*, **55**, 1436-1440, 1992.
- 7) T. OZAWA, T. H. LILLEY and E. HASLAM: *Phytochemistry*, **30**, 2937-2942, 1997.
- 8) 鮫島正浩: 針葉樹樹皮のフラバノール類およびその関連化合物に関する研究 (東京大学博士論文), 160-166, 1983.
- 9) 今村博之他: 木材利用の化学, 共立出版, 151-160, 1983.
- 10) J. P. KUTNEY and E. DIMTRIADIS: *Helv. Chim. Acta*, **65**, 1351-1358, 1982.
- 11) E. HATMANN, B. RENZ and J. A. JUNG: *Phytopathology Z.*, **101**, 31-42, 1981.
- 12) S. A. CHURCHILL, R. A. GRIFFIN, L. P. JONES and P. F. CHURCHILL: *J. Environ. Qual.*, **24**, 19-28, 1995.
- 13) R. VILLEMUR: *Can. J. Microbiol.*, **40**, 855-861, 1995.
- 14) S. WOODWARD and R. B. PEARCE: *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **33**, 127-149, 1988.
- 15) M. LEONA and O. AIM: *Comp. Biochem. Physiol.*, **88C**, 263-268, 1987.

(1997年10月31日受付)

(1998年3月16日受理)

Summary

Antimicrobial activities of extracts from the inner bark of six industrially important coniferous species in Japan were examined.

Air dried inner bark was ground to pass a 1 mm sieve, and extracted successively with *n*-hexane, ethyl acetate, and ethanol at room temperature. Extract with *n*-hexane from all species used in this study inhibited significantly growth of both *Pseudomonas paucimobilis* and three species of *Nocardia*, which were little inhibited by the extracts with ethyl acetate and ethanol. Growth of microorganisms was completely inhibited by the addition of 0.1% (w/w) *n*-hexane extracts from *Picea glehnii* and *Chamaecyparis obtusa* on an agar medium. A major component responsible for the inhibition of growth of *P. paucimobilis* and *Nocardia* spp. was purified and identified as dehydroabiatic acid (I).

In contrast to the results for *P. paucimobilis* and *Nocardia* spp., *n*-hexane extracts showed no inhibition on the growth of two fungal species (*Phanerochaete chrysosporium* and *Trichoderma reesei*). The growth of these fungi on an agar medium was however inhibited around a paper disk containing ethanol extracts. Ethyl acetate extracts from the inner bark of *P. glehnii* inhibited the growth of the two fungi. The extracts was purified and isorhapontin (II), a stilbene glucoside, was identified as the major component in the most active fraction.

Key words: Bark, Extractives, Antimicrobial activity, Resin acid, Stilbene

Antimicrobial Activities of Extractives from the Barks of Japanese Coniferous Trees

Sakae SHIBUTANI, Masahiro SAMEJIMA and Yoshimasa SABURI

Antimicrobial activities of extracts from inner bark of six industrially important coniferous species in Japan were examined. Extracts from *Picea glehnii* strongly inhibited growth of several bacteria and fungi. Dehydroabietic acid, which is a component of extracts from the *P. glehnii*, and isorhapontin were purified as a major antibacterial and antifungal compound, respectively.

Rainfall Characteristics in the Kiyosumi Range of Boso Peninsula (I) —Mean Annual Rainfall in Kiyosumi—

Koichiro KURAJI, Chieko YAMANAKA, Toshio NAGASHIMA,
Tsutomu KARUKOME and Mariko NORISADA

As the first step in research concerning rainfall characteristics in the Kiyosumi Range in the Boso Peninsula, the long-term mean annual rainfall at the Kiyosumi Meteorological Station were re-calculated using 94 years original daily rainfall records from 1904 until 1996. The mean annual rainfall in Kiyosumi Station was found to be 2,282 mm and no significant tendency to increase or decrease was detected.