

樹木含有セスキテルペンの自動酸化と

その生成物の生物活性

Autoxidation of sesquiterpene in tree and
bioactivities of the products

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〉

向井 堯徳

2018

目次

第 1 章 緒言.....	1
第 1 節 背景.....	1
第 2 節 本研究の目的.....	4
第 2 章 セスキテルペン炭化水素の自動酸化反応.....	5
第 1 節 序論.....	5
第 2 節 実験方法.....	7
2.1 試料の精製.....	7
2.2 自動酸化反応.....	7
2.2.1 室温での自動酸化反応.....	7
2.2.2 加熱による自動酸化反応.....	7
2.2.3 機器分析.....	7
2.2.4 過酸化物の定量.....	8
2.3 longifolene 酸化物の単離と同定.....	9
2.3.1 自動酸化生成物の単離.....	9
2.3.2 <i>m</i> -CPBA による酸化物の合成と単離.....	9
2.3.3 機器分析.....	9
2.3.4 化合物の同定.....	9
2.4 thujopsene 酸化物の単離と同定.....	12
2.4.1 自動酸化生成物の単離.....	12
2.4.2 <i>m</i> -CPBA による酸化物の合成と単離.....	13
2.4.3 機器分析.....	13
2.4.4 化合物の同定.....	13

第3節 結果と考察	15
3.1 Longifolene の自動酸化反応	15
3.1.1 longifolene の室温および加熱処理による自動酸化反応	15
3.1.2 longifolene 自動酸化の反応中間体の確認	16
3.1.3 自動酸化反応生成物の合成および立体配置の決定	17
3.1.3.1 <i>m</i> -CPBA による合成および単離	17
3.1.3.2 Longifolene-hydroxy ketone の立体配置の決定	17
3.2 thujopsene の自動酸化反応	19
3.2.1 thujopsene の室温および加熱処理による自動酸化反応	19
3.2.2 過酸化物の定量	19
3.3 自動酸化反応のまとめ	20
第4節 小括	38
第3章 自動酸化生成物の生物活性	39
第1節 序論	39
第2節 実験方法	40
2.1 抗蟻活性試験	40
2.1.1 供試生物	40
2.1.2 試料・試料調製	40
2.1.3 PD 強制摂食試験	40
2.1.4 PD 選択摂食試験	41
2.1.5 統計処理	42
2.2 抗菌活性試験	42
2.2.1 試料・試料調製	42

2.2.2	供試生物	42
2.2.3	試験方法	43
第 3 節	結果と考察	44
3.1	longifolene の生物活性.....	44
3.1.1	抗蟻活性試験	44
3.1.1.1	PD 強制摂食試験	44
3.1.1.2	PD 選択摂食試験	45
3.1.2	抗菌活性試験	45
3.2	thujopsene の生物活性.....	47
3.2.1	抗蟻活性試験	47
3.2.2.1	PD 強制摂食試験	47
3.2.2.2	PD 選択摂食試験	47
3.2.2	抗菌活性試験	48
3.3	自動酸化による構造の変化と活性	49
第 4 節	小括	71
第 4 章	総括.....	73
引用文献	77
謝辞	82
Summary	83

第 1 章 緒言

第 1 節 背景

日本では戦後の拡大造林政策のもと、スギ (*Cryptomeria japonica*) やヒノキ (*Chamaecyparis obtuse*) などの人工林が造成され、それらの資源が近年利用可能な状態になっている。その主要な樹種の人工林面積は、スギの 448 万 ha, ヒノキ 260 万 ha, カラマツ (*Larix kaempferi*) の 100 万 ha, トドマツ (*Abies sachalinensis*) の 88 万 ha, マツ類 (*Pinus*) の 86 万 ha などとなっている (林野庁 2016)。これらの樹種はこれまで木造建築材や家具, 工芸品など多岐にわたって利用されてきた。また最近, 新たな木材の利用として, 平成 24 年から再生可能エネルギーの固定価格買取制度が開始され, 木質バイオマス発電施設の稼働が本格化し, 間伐材などの小径木も利用可能となっている。さらに, 平成 32 年に開催される「2020 年東京オリンピック・パラリンピック競技大会」において関連施設の建築資材などに木材を多く取り入れることなどから木材の利用に対する関心が高まり, 今後の木材の利用の増大も予想される (林野庁 2015)。

樹木の利用は柱や板などのような物理加工の面だけでなく, 成分利用や成分変化を伴う化学加工の面によっても利用されてきた。伝統的な木材の利用技術として挙げられる炭焼きの際には副生成物として得られる木酢液は, 土壌改良材や農薬補助剤などに利用 (松井ら 2000) されてきた他, 植物 (Yatagai 1989) や菌類 (Ohta 1994) に対し生物活性を有すると報告されている。以上のように, 樹木は多様な樹種が存在するとともにその利用も物理的, 化学的な技術によって加工され, 多様な利用形態を持っている。我々にとって重要でかつ有用な資源であるため, 現在の技術を生かした利用も新たな利用や応用の技術の基礎的知見を得ることは重要な課題である。中でも樹木の樹種や生育環境によって違いの

ある抽出成分は、多様で付加価値の高い利用が期待できる。

樹木抽出成分の中で精油や天然樹脂として利用されている成分は主にテルペノイドである。テルペノイドは、工業的に利用されていた歴史があり、代表的なものにマツ類から得られるジテルペンのロジンがある。ロジンは、工業原料として世界で 146 万トン/年消費されており、製紙用サイズ剤、合成ゴム用乳化剤、接着剤、印刷用インク原料など幅広く使用されている（博多 2010; 辻本 2011）。針葉樹の針葉に多く存在しているモノテルペンである α -pinene は香料または camphor の製造原料などとして使用されている（大平ら 2016）。このほか、テルペノイドは各種医薬品原料としても利用されているが、自然界にあつては化学生態学的見地から樹木の防御物質や情報伝達物質としての役割があるとされている（Harborne 1981）。そのため、樹木（木材）害虫であるシロアリや害菌の木材腐朽菌などに対する忌避効果や殺虫/殺菌効果を有する成分が存在する（Martin and Bohlmann 2005; 谷田貝 2006）。特に有名なものでは、ヒノキアスナロ（ヒバ）や台湾ヒノキ材中に含有するヒノキチオール (β -thujoplicin) が知られており、その抗菌スペクトルの広さから活発な研究が行われている（Debell et al. 1997; Debell et al. 1999; Inamori et al. 2000; Baya et al. 2001）。

しかしながら、上記のテルペノイドの利用や役割の解明研究は比較的単離の容易なモノテルペンやジテルペンに集中しており、種類が多く樹種によっては大量に存在するセスキテルペンについての研究は比較的少ない。特に上に示したマツ類の材にはセスキテルペン炭化水素の longifolene が多く含まれており、ヒノキアスナロ（ヒバ）材中には thujopsene が多く含まれているが、モノテルペンとジテルペン類が利用されているにもかかわらず、これらの成分の機能解明は進んでいないのが現状である。従って、樹木成分利用を推進させるためにはこれら未利用セスキテルペン類の機能解明を研究する必要がある。

一方, longifolene や thujopsene, また caryophyllene, humulene などの環状セスキテルペンは橋頭結合や中員環構造を有しておりひずみが大きく, 空気中の酸素と反応して容易に酸化されること (自動酸化) が知られている (芦谷 2013). この反応はひずみの大きな構造を有するセスキテルペンに特異な反応であると考えられるが, caryophyllene や humulene の場合では自動酸化生成物に元の炭化水素にない抗害虫活性や抗菌活性が見られることが報告されている (Ashitani et al. 2013, 2015). 自然界では樹体が傷付き, 樹脂や心材が空気にさらされ成分が酸化される可能性が高く, 大量に生産する成分が多様な二次生成物に変化して新たな役割を果たすことが考えられるため, 自動酸化反応の解析は樹木中の成分の役割解明にも新たな知見を与えるであろう. 従って, 上記の longifolene や thujopsene も自動酸化反応で有用物質に転換させることができる可能性が考えられ, それら生成物の生物活性を検討することで未利用成分の新たな利用の開発と成分の化学生態学的機能解明が可能となると考えた.

第2節 本研究の目的

前節で longifolene や thujopsene といったセスキテルペン炭化水素は、比較的大量に樹体内に存在しているが、有効な利用法の開発はされていないことを述べた。本研究では樹木中に存在する未利用セスキテルペンの中で longifolene と thujopsene に着目した。なぜ、マツやヒバで longifolene や thujopsene が大量に生産されるのか。また、それらの生物活性などについて理解する必要がある。しかし、longifolene や thujopsene が森林生物である木材腐朽菌やシロアリに対して生物活性を示すという報告はほとんどなく、大量に生合成する理由も明らかではない。そこで前節で述べた自動酸化反応に着目し、これらの成分の自動酸化によってどのような酸化物が生成するか、その酸化物はどのような生物活性を示すのかを明らかにし、利用に関する基礎的知見の蓄積と自然界における longifolene や thujopsene の変化と酸化生成物の役割についての知見を得ることを目的とした。本研究では、マツの主要成分である longifolene やヒバの主要成分である thujopsene の自動酸化反応を検討し、その生成物の木材害虫/害菌に対する生物活性（抗蟻活性、抗菌活性）を評価した。

第2章 セスキテルペン炭化水素の自動酸化反応

第1節 序論

Ashitani et al. (1999; 2008) は、歪みの大きいセスキテルペン炭化水素である caryophellene や humulene は硫黄や酸素によって容易に自動酸化されることを示している。また、三環性で特徴的な構造を持つ thujopsene (Nagahama and Tazaki 1987) や longifolene (芦谷 2013) も空気中に曝されると自動酸化されることが報告されている。Longifolene や thujopsene の化学反応の研究については、その構造決定の研究のため古くから活発に行われてきた。Longifolene については、テトラアセチル化鉛 (草野ら 1978), オゾン (Dimitov et al. 2003), 過安息香酸 (Nayak and Dev 1963), 過マンガン酸カリウム (Nayak et al. 1989) などの酸化剤を用いた酸化反応の報告があり, longicamphenylone などが主要生成物として報告されている。Thujopsene に対しては、古くから空気中で保存しておいた場合、変質が認められることが知られていた (川村 1930)。また thujopsene は各種酸化剤に対しても通常の環状オレフィンと異なる異常反応が報告されている (伊藤 1974)。特に thujopsene については自動酸化反応機構について過酸化物 2 量体を中間体とする反応機構が提唱されている (Nagahama and Tazaki 1987)。

しかしながら, longifolene については自動酸化の反応機構は不明であり, thujopsene についても Nagahama の研究以降自動酸化の報告はなく, 反応の詳細について検討の余地が残されている。また, 室温での自動酸化は生成物を得ようとするとき長時間 (1-3 年) かかり, 成分利用という点では実用性に乏しい。そこで反応を制御する必要があるが, 自動酸化反応の利点として有害な溶媒や酸化剤を使用しないことがあげられ, 触媒等を用いず反応を加速させるため, 加

熱による促進を考えた.

そこで, 本章では未利用のテルペノイド longifolene と thujopsene の熱処理による自動酸化反応を室温での反応と比較検討し, 加熱処理の有効性や反応機構を明らかにすることを目的とした.

第 2 節 実験方法

2.1 試料の精製

崇城大学長浜静男名誉教授より譲渡された研究室所有の松根油をシリカゲル (60N, spherical 63-210 μm , neutral; Kanto Chemical Co., Inc., Japan) カラムクロマトグラフィーで 98% (GC) になるまで精製した longifolene を原料として用いた。また, 研究室保有のヒバ材精油をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 98% (GC) になるまで精製した thujopsene を原料として用いた。

2.2 自動酸化反応

2.2.1 室温での自動酸化反応

2 ml サンプル管に精製した原料 300 mg を入れ, 密閉せずにアルミニウム箔で覆い, 室温, 暗条件下で放置した。Longifolene は 3 年間, thujopsene は 1 年間放置した試料を用いた。

2.2.2 加熱による自動酸化反応

10 ml サンプル管に精製した原料と攪拌子を入れ, 空気に触れるように蓋をせずに用いた。加熱処理は, グリセリン浴中にて行い, ホットプレートスターラーで所定温度にて加熱攪拌した。所定時間ごとにキャピラリーを用いてサンプルを少量取り出した。取り出したサンプルは分析するまで冷凍庫で保存した。

2.2.3 機器分析

キャピラリーを用いて取り出したサンプルの 1 mg/ml アセトン溶液を調製した。室温での自動酸化反応物のアセトン溶液も同様に調製した。

反応物と 1:1 になるように内部標準のベラトルム酸 (Wako) を混合し, 溶媒

を揮発させた。カルボン酸生成物の同時分析のため、試料にベンゼン/メタノール混合溶液 (80 : 20) と市販の trimethylsilyl diazomethane (GL Science) をそれぞれ 20 μ l, 10 μ l 入れ, 30 分間放置し, メチル化をおこなった。なおジアゾメタンのメチル化前後で中性成分の変化がないことは予備試験で確認済みである。

定量分析は GC-FID を用い, 検量線法で収率を算出した。GC-FID 分析には GC-2014 SHIMADZU を用い以下の条件で分析した。カラム:DB-1 (J&W Scientific) キャピラリーカラム, キャリヤーガス:ヘリウム, 気化室温度:230°C, 検出温度:250°C, カラム温度:初期温度 100°C (1 分間保持), 昇温 5°C/min で 100°Cから 200°C, 昇温 10°C/min で 200°Cから 320°C, 最終温度保持時間 2 分間。分析時間は 37 分とした。

定性分析には, GCMS-QP2010 Ultra SHIMADZU を用い, 以下の条件で分析した。カラム:DB-1 (J&W Scientific) キャピラリーカラム, キャリヤーガス:ヘリウム, 気化室温度:250°C, インターフェース温度:250°C, カラム温度:初期温度 100°C (1 分間保持), 昇温 5°C/min で 100°Cから 200°C, 昇温 10°C/min で 200°Cから 320°C, 最終温度保持時間 2 分間。分析時間は 37 分とした。

2.2.4 過酸化物の定量

ヨウ素滴定法 (飯泉ら 1975) を用いて, 過酸化物価 (meq/kg) を算出した。フラスコに 50 mg の試料を入れ、クロロホルム 10 ml に溶解した。ヨウ化カリウム飽和水溶液 2 ml と 0.02% 塩化鉄 (III) を含む酢酸 5 ml を加え, 暗所で 10 分間, 室温放置した。精製水 50 ml で薄めてのち, 0.1N チオ硫酸ナトリウム水溶液で滴定した。滴定の際には, 指示薬としてデンプン溶液を加え, 色の変化を指標とした。なおデンプン溶液は, 試験ごとにデンプン (Wako) 1 g にかき混ぜ

ながら熱水 100 ml を加え、透明になるまでかき混ぜつつ加熱し、放冷したものをを用いた.

2.3 longifolene 酸化物の単離と同定

2.3.1 自動酸化生成物の単離

加熱処理した試料 332 mg を, 1%水酸化ナトリウム水溶液, 水, 飽和食塩水の順に用いて分液漏斗内で分液し中性部と酸性部に分離した. 中性部はロータリーエバポレーターによって濃縮した. また, 得られた酸性部は 6N 塩酸で酸性化した後, hexane で分液し, 有機層を回収し, 無水硫酸ナトリウムで脱水した. なお, 酸性の指標にはリトマス試験紙を用いた.

中性部は, シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し, 溶出溶媒に hexane と ethyl acetate (100% n-hexane から 100% ethyl acetate までグラジエント) を用いて, longicamphenylone, norlongilactone を単離した. 酸性部は, 溶出溶媒に hexane から hexane:diethyl ether (50;4) 混合溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し, longifolic acid (37 mg, 99%GC) と isolongifolic acid (53 mg, 96%GC) を単離した.

2.3.2 *m*-CPBA による酸化物の合成と単離

文献 (Bowman et al. 1966; 野村ら 1988) を準拠し, *m*-クロロ過安息香酸 (*m*-CPBA, Wako, 純度 69~75 %, 約 30 %水含む) を用いて longifolene の酸化を行った. あらかじめ *m*-CPBA を benzene へ溶解させ, 無水硫酸ナトリウムで 4 時間脱水させた. Longifolene 306 mg を溶剤に溶解させ, これに *m*-CPBA, 無水硫酸ナトリウムを加え, アルミホイルで蓋をして 1 日間室温で放置した. 反応終了後, 1%水酸化ナトリウム水溶液, 水, 飽和食塩水を順に用いて分

液漏斗内で分液し、有機層はロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。得られた合成物を GC-MS 分析に供した。また、溶媒を chloroform に代え、同様におこなった。

ベンゼン中での反応混合物 314 mg を、溶出溶媒に hexane, hexane:diethyl ether (99;1, 50;1, 20;1, 10;1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、petroleum ether を用いて再結晶を繰り返し、longifolene oxide (87 mg, 90%GC) を単離した。

クロロホルム中で反応混合物 298 mg を、溶出溶媒に 100% hexane から 100% ethyl acetate のグラジエント条件でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、methanol を用いて再結晶を繰り返し、longifolene-hydroxy ketone (30 mg, 90%GC) を得た。また、立体配置を確認するために、Longifolene-hydroxy ketone 10 mg と無水酢酸 0.5 ml, ピリジン 0.5 ml を混合し、12 時間反応させ、アセチル化をおこなった。

2.3.3 機器分析

単離した化合物の純度は GC-MS で確認した。分析条件は 2.2.3 と同様である。化合物の同定および構造を推定するために ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 分析をおこなった。また、longifolene-hydroxy ketone については、HMBC, HMQC 分析もおこなった。1D および 2D-NMR 分析には JEOL JNM-EX400 (^1H 400 MHz/ ^{13}C 100 MHz) spectrometer を用いた。溶媒には重水素クロロホルムを用いた。

2.3.4 化合物の同定

Longicamphenylone, norlongilactone, longicamphenylol については、GC-MS 分析をおこない研究室保有の標品とデータを比較して同定した。

Isolongifolic acid, longifolic acid, longifolene oxide については NMR 分析をおこなって得られた値を文献値 (Dimitrov et al. 2003) と比較しデータが一致したため同定した.

Isolongifolic acid

$^1\text{H-NMR}$ δ : 0.93 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.00 (3H, s), 1.25-1.41 (2H, m), 1.44 (1H, s), 1.51-1.72 (8H, m), 2.01 (1H, d, $J=3.5$ Hz), 2.34 (1H, dd, $J=4.4, 3.8$ Hz), 2.95 (1H, dd, $J=3.2, 2.1$ Hz)

Longifolic acid

$^1\text{H-NMR}$ δ : 0.95 (3H, s), 1.01 (3H, s), 1.03-1.12 (3H, m), 1.16 (3H, s), 1.26-1.44 (3H, m), 1.41 (1H, s), 1.45-1.70 (3H, m), 2.01 (1H, m), 2.11 (1H, s), 2.13-2.19 (1H, m), 2.55 (1H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 20.3, 24.9, 30.1, 31.8, 32.4, 32.4, 33.3, 36.9, 37.3, 39.8, 45.6, 46.9, 60.8, 64.0.

Longifolene oxide

$^1\text{H-NMR}$ δ : 0.78 (3H, s), 0.93 (3H, s), 1.00 (3H, s), 1.25-1.28 (1H, dd, $J=7.3, 14.4$ Hz), 1.35-1.50 (6H, m), 1.60-1.71 (3H, m), 1.76-1.82 (3H, m), 2.82 (1H, d, $J=4.6$ Hz), 2.99 (1H, d, $J=4.6$ Hz)

Longifolene-hydroxy ketone

$^1\text{H-NMR}$ δ : 1.09 (6H, s), 1.15 (3H, s), 1.30-1.40 (2H, m), 1.41-1.85 (8H, m), 2.23-2.30 (1H, m), 2.52-2.60 (1H, m), 3.68 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 4.58-4.65 (1H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 21.5, 21.9, 26.4, 27.5, 29.6, 33.7, 34.1, 41.4, 42.0, 43.3, 45.1, 50.7,

56.5, 73.9, 217.2.

Longifolene-hydroxy ketone acetate

$^1\text{H-NMR}$ δ : 1.07 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.48-1.81 (11H, m), 2.13 (3H, s), 2.25 (1H, bs), 2.48-2.50 (1H, m), 5.69 (1H, dd, $J=3.7, 1.3$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 20.9, 21.3, 23.0, 26.7, 27.5, 29.8, 33.4, 34.2, 41.1, 41.4, 41.7, 44.3, 51.7, 56.7, 75.9, 170.4, 210.8.

2.4 thujopsene 酸化物の単離と同定

2.4.1 自動酸化生成物の単離

Nagahama and Tazaki (1987) の方法を参考にし, 活性アルミナ (spherical 75 μm ; Wako pure Chemical Industries, Ltd., Japan) に精製水を重量比で約 10%含ませ, 1 日間放置し, 活性をを調製したアルミナカラムクロマトグラフィーにて, 室温での thujopsene の自動酸化物 300 mg の分画をおこなった. 溶出溶媒に hexane のみを用いた分画物を, さらに hexane を用いて再結晶を行い, 過酸化物二量体である bis(4⁹-thujopsen-8-yl) peroxide (35.4 mg) を単離した.

室温での thujopsene の自動酸化物 (1.06 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて, 溶出溶媒に 100% hexane から 100% ethyl acetate のグラジエント条件で分画をおこなった. Hexane のみの分画物では, thujopsadiene (6.8 mg) を単離した. Hexane/ethyl acetate を用いた分画物から epoxy thujopsanol (60.1 mg) と mayurone (30.4 mg) を単離した.

2.4.2 *m*-CPBA による酸化物の合成と単離

2.3.2 と同様に脱水ベンゼン中で *m*-CPBA (393 mg) を用いて thujopsene (306 mg) を酸化させた. 得られた酸化物を溶出溶媒に hexane/ethyl acetate を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し, thujopsanone (30.7 mg) を単離した.

2.4.3 機器分析

単離した化合物の純度は GC-FID で確認した. 分析条件は 2.2.3 と同様である. 化合物を同定するために ^1H -NMR, ^{13}C -NMR をおこない, 文献値と比較した. また, ^1D -NMR 分析には JEOL JNM-ECZ-600 (^1H 600 MHz/ ^{13}C 175 MHz) spectrometer を用いた. 溶媒には重水素クロロホルムを用いた.

2.4.4 化合物の同定

Mayurone は, GC-MS 分析をおこない研究室保有の標品の MS スペクトルと比較することによって同定をおこなった. Thujopsanone は GC-MS 分析をおこない MS スペクトルを文献 (Adams 2012) と比較することによって同定した. Thujopsadiene は GC-MS 分析をおこない MS スペクトルを文献 (Adams 2012) および NMR 分析によって得られた値を文献値 (Ito et al. 1969; Kim et al. 2013) を用いて同定した. Epoxy thujopsanol, bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide は NMR 分析によって得られた値を文献値 (Laurence and Keni 1995; Nagahama and Tazaki 1987) と比較して同定した.

Thujopsadiene

$^1\text{H-NMR}$ δ : 0.49 (1H, dd, $J=9.6, 4.8$ Hz), 0.64 (3H, s), 0.69 (1H, dd, $J=4.8, 4.2$ Hz), 1.06 (3H, s), 1.18 (3H, s), 1.91 (1H, dd, $J=4.8, 4.1$ Hz), 4.70 (1H, d, $J=1.3$ Hz), 4.87 (1H, bs), 5.10 (1H, d, $J=10.3$ Hz), 5.72 (1H, d; $J=10.3$ Hz).

Epoxy thujopsanol

$^1\text{H-NMR}$ δ : 0.17 (1H, dd, $J=9.6, 4.1$ Hz), 0.52 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.41 (3H, s), 2.04 (1H, bs), 2.76 (1H, d, $J=4.1$ Hz), 3.03 (1H, dd, $J=4.1, 2.1$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 9.1, 17.7, 24.5, 26.6, 27.2, 28.2, 30.0, 31.5, 33.5, 34.4, 36.5, 40.1, 60.3, 67.7.

Bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide

$^1\text{H-NMR}$ δ : 0.63 (6H, s), 0.99-1.73 (14H, m), 1.04 (6H, s), 1.14 (6H, s), 1.43 (3H, s), 5.03 (2H, d, $J=10.3$ Hz), 5.44 (2H, dd, $J=10.3, 2.0$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ δ : 10.1, 18.6, 27.1, 27.3, 27.8, 29.7, 31.0, 32.9, 36.8, 39.4, 40.7, 79.5, 124.1, 138.8.

第3節 結果と考察

3.1 Longifolene の自動酸化反応

3.1.1 longifolene の室温および加熱処理による自動酸化反応

Longifolene の室温による自動酸化反応の生成物のクロマトグラムを Fig. 2-1 に示し、主要な生成物の収率を Table 2-1 に示した。原料である longifolene は 3 年間で 45.9%まで減少した。主生成物として longicamphenylone が生成し、他に longicamphenylol, norlongilactone, longifolic acid, isolongifolic acid, longifolene-hydroxy ketone が確認された。それぞれの収率は、23.0%, 2.05%, 3.02%, 6.17%, 1.35%であった。Fig. 2-2 に生成物の構造を示す。

Longifolene の加熱処理の検討を行うにあたり、予備検討として 100°C, 120°C, 140°C の温度を検討した。140°C では短時間の反応で原料が固化し、攪拌子の回転が止まり反応が継続できなかった。GC で各温度条件での生成物を分析したところ 120°C での反応が、100°C に比べて生成物のピークが 24 時間の反応で明瞭に観察できたため、120°C の反応を選択し、反応機構の解析を行った。Longifolene の加熱処理 (120°C) による自動酸化反応での主要な生成物の経時変化を Table 2-2 に示した。反応初期の 1, 2 時間では、原料の longifolene はほとんど減少していなかった。原料は 4 時間後から減少が確認され、24 時間後では 22.1%まで減少した。加熱処理での主生成物は、室温の場合と同様に longicamphenylone であった。他に norlongilactone, longifolic acid, isolongifolic acid, longifolene-hydroxy ketone を確認した。24 時間でのそれぞれの収率は、longicamphenylone が 22.7%, norlongilactone が 4.25%, longifolic acid が 2.98%, isolongifolic acid が 1.25%, longifolene-hydroxy ketone が 2.18%であった。それぞれの生成物は反応時間が長くなるにつれて収率が増加したことから、加熱によって自動酸化が促進されたと考えられる。

室温と加熱処理の自動酸化反応による生成物はほとんど変わらなかったが、それぞれ異なる生成物が確認され、室温では longicamphenylol が確認されたが加熱処理では生成が確認されなかった。また、加熱処理では longifolene-hydroxy ketone が生成したが室温では確認されなかった。これは、加熱処理による自動酸化反応の方がより外部から与えられるエネルギーが大きいためであると考えられる。室温ではアルコール体の longicamphenylol を得られる反応が停止するが、加熱反応ではケトン体の longicamphenylone まで反応が進行したものと考えられた。また、longifolene-hydroxy ketone の生成には longifolene への酸素の付加と結合の切断と新たな結合の形成を含む環拡大結合が必要であり、室温条件では低い活性化エネルギーのため生成できず、加熱反応では外部から供給される熱エネルギーが活性化エネルギーとなって生成したものと考えられた。したがって、自動酸化反応では温度条件を変化することで得られる生成物がある程度制御できる可能性が示された。

3.1.2 longifolene 自動酸化の反応中間体の確認

Longifolene を 120°C で加熱処理 (0.5, 1 時間) した生成物の GC-MS 分析によって得られた TIC を Fig. 2-3 に示した。0.5, 1 時間加熱処理した生成物は、微量なピークが確認され、保持時間および MS スペクトルから保持時間 10.6 付近のピークが longicamphenylone、保持時間 11.8 付近のピークが longifolene oxide であると同定した。短時間の加熱処理では、自動酸化反応の主生成物であった longicamphenylone よりも先に longifolene oxide が生成することが示された。そのため、longifolene oxide が自動酸化反応の中間体として考えられた。

上記を確認するため longifolene oxide を合成し、単独で 120°C で加熱処理した。Longifolene oxide の 120°C での生成物の経時変化を Fig.2-4 に示した。

Longifolene oxide を加熱処理した結果, longicamphenylone, longifolic acid, isolongifolic acid, longifolene-hydroxy ketone が生成し, 反応時間とともにそれらの生成量が増加することが確認された.

以上のことから, longifolene oxide は longifolene の自動酸化反応の中間体の一つであることが示された.

3.1.3 自動酸化反応生成物の合成および立体配置の決定

3.1.3.1 *m*-CPBA による合成および単離

ベンゼンまたはクロロホルム中で longifolene と *m*-CPBA を反応させ, 得られた酸化生成物を GC-MS 分析した. 反応後の Total Ion Chromatogram (TIC) を Fig. 2-5 に示した. ベンゼン中の反応では, 原料である longifolene は消失し, 主生成物として longifolene oxide が 67.7%, 次に longicamphenylone が 16.1% 生成した. また, クロロホルム中の反応では, 主生成物として longifolene-hydroxy ketone が 58.4%, 次に longicamphenylone が 8.39% 生成した. クロロホルム中の反応では, longifolene oxide が生成せず, longifolene-hydroxy ketone が主生成物として確認されたのは, クロロホルム中に存在する微量の塩化水素により, 酸性条件下になったためと考えられた.

3.1.3.2 Longifolene-hydroxy ketone の立体配置の決定

Longifolene-hydroxy ketone については, 構造決定のため ^1H -NMR, ^{13}C -NMR に加え, DEPT, H-H COSY, HMQC 相関, HMBC 相関, NOESY スペクトルも分析した. Longifolene-hydroxy ketone の分子イオンピークは 236 (M^+) であった. TMS 化を行った GC-MS 分析は, トリメチルシリル基が一つ付いた MS スペクトルが観察されたことから, ヒドロキシ基を一つ有する化合物と推定

された. ^{13}C -NMR では 15 個の炭素が確認された. δ 217.2 にカルボニル基のシグナルが確認されたことから, カルボニルもしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された. 以上から, カルボキシ基とヒドロキシ基を有すると考えられた. ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 分析データと文献値 (Lhomme and Ourisson 1964; Joshi et al. 1976) を比べた結果, 類似していたため longifolene-hydroxyketone と推定されたが, 立体配置の決定には至らなかった. そのため, longifolene-hydroxy ketone をアセチル化し, NMR 分析を行った. HMBC 分析から Fig.2-6 に示す構造が導かれ longifolene-hydroxy ketone acetate の構造が同定された. NOESY 分析の結果からアセチル基の付け根の炭素に結合する水素と 13, 14 位のメチル基の水素との相関 (Fig.2-7) が得られたことから, 11 位の炭素の立体配置は *S* 体であることが示された.

3.2 thujopsene の自動酸化反応

3.2.1 thujopsene の室温および加熱処理による自動酸化反応

Thujopsene の室温による 1 年間の自動酸化反応での主要な生成物の収率を Table2-3 に示した. 原料である thujopsene は 0.226%まで減少し, ほとんどなくなっていた. 主生成物として mayurone が生成し, thujopsadiene, thujopsanone, epoxy thujopsanol が確認された. それぞれの収率は, 37.6%, 3.16%, 1.38%, 1.27%であった.

Thujopsene の加熱処理を longifolene と同様に 120℃で行った結果, 重合が生じたためか反応開始後すぐに固化が生じた. そこで 100℃で反応を行ったところ良好に生成物が分析できたことから, thujopsene の反応の解析を 100℃で行うこととした. Thujopsene の 100℃での自動酸化反応の生成物のクロマトグラムと構造を Fig. 2-8 に示し, Thujopsene の加熱処理 (100℃) による自動酸化反応での主要な生成物の経時変化を Table2-4 に示した. Longifolene とは異なり反応時間 1, 2 時間で原料である thujopsene は半分近くまで減少し, 20 時間後では 11.4%になった. 加熱処理での主生成物は, 室温の場合と同様に mayurone であった. 他に thujopsadiene, thujopsanone, epoxy thujopsanol も同様に確認された. 20 時間でのそれぞれの収率は, mayurone が 23.1%, thujopsadiene が 1.47%, thujopsanone が 5.51%, epoxy thujopsanol が 1.87%であった. それぞれの生成物は反応時間が長くなるにつれて収率が増加したことから, 加熱によって自動酸化が促進されたと考えられた.

3.2.2 過酸化物の定量

Thujopsene の加熱処理による自動酸化物のヨウ素滴定法による過酸化物の定量結果を Fig. 2-9 と Table 2-5 に示した. 自動酸化前の原料は過酸化物価が 0

meq/kg であり過酸化物がなかったが、加熱 1 時間で増加し、8 時間で最大値 (1414 meq/kg) を示した。その後減少していったことから過酸化物が分解し、酸化物が生成すると推定できる。室温での自動酸化物 (1 年間) では、過酸化物価が 1557 meq/kg と加熱処理よりも高い過酸化物価を示した。Nagahama (1987) によれば、室温での *thujopsene* の自動酸化物には過酸化二量体である *bis(4⁹-thujopsen-8-yl) peroxide* が生成することを示している。今回、ヨウ素滴定法によって自動酸化反応における過酸化物生成の経時変化を示したことによって、自動酸化の反応中間体として過酸化物が関与していることが裏付けられた。また加熱反応においても室温の反応と同様の反応機構であることが示された。

3.3 自動酸化反応のまとめ

Longifolene の自動酸化反応では、室温での場合は *longicamphenylone*, *longicamphenylol*, *norlongilactone*, *longifolic acid*, *isolongifolic acid*, *longifolene-hydroxy ketone* が確認され、加熱処理の場合では、*longicamphenylone*, *norlongilactone*, *longifolic acid*, *isolongifolic acid*, *longifolene-hydroxy ketone* を確認した。室温での自動酸化反応では確認できなかったが、加熱処理での自動酸化反応では *longifolene oxide* が反応中間体であると確認された。Dimitrov et al. (2003) は、*longifolene* のオゾン酸化の研究で *longifolene oxide* は *enol* を経て酸化され、*longifolic acid* を生成する報告をしている。また、Nayak (1963) は、クロロホルム中での *longifolene oxide* と過安息香酸との反応から *enol* は *hydroxyaldehyde* を経て *ketone* や *hydroxy ketone* が生成すると推定している。以上のことから考えた *longifolene* の自動酸化の反応機構を Fig. 2-10 に示した。

Thujopsene の自動酸化反応の生成物は、*mayurone*, *thujopsadiene*,

thujopsanone, epoxy thujopsanol が確認された. Thujospene の室温での自動酸化の反応機構は Nagahama (1987) によって示されており, 過酸化二量体を経る反応機構が提唱されている (Fig. 2-11). 本研究においても, 室温および加熱処理の自動酸化において過酸化物の存在は確認されたため反応機構はほぼ同様であると考えられる. 過酸化物化の経時変化から, thujopsene の加熱処理では, 過酸化物の分解が 8 時間後から生成を上回り, 生成量が減少に転じ, 室温での反応と比較して低い値となっていた. そのため過酸化物を得る目的ならば室温での反応が望ましく, 分解物を得る目的であれば加熱反応を行うことによって目的生成物を得ることが可能であると考えられる. しかしながら, 反応生成物は過酸化物の分解によって複雑となると考えられ, 単離物の収率が低いことから, 分解後の二次反応によって過酸化物以外の重合体の生成も予想される. Thujopsene は longifolene と比較して低い温度で短時間に速く減少したことから反応性が高く, 反応を制御することは比較的難しいことがわかった. 今後, 過酸化物の分解を制御する方法を見出せばより自動酸化反応の制御が可能となるものと思われる. また, longifolene においても longifolene oxide が反応中間体と確認したが, 過酸化物の関与も否定できないため確認の必要がある.

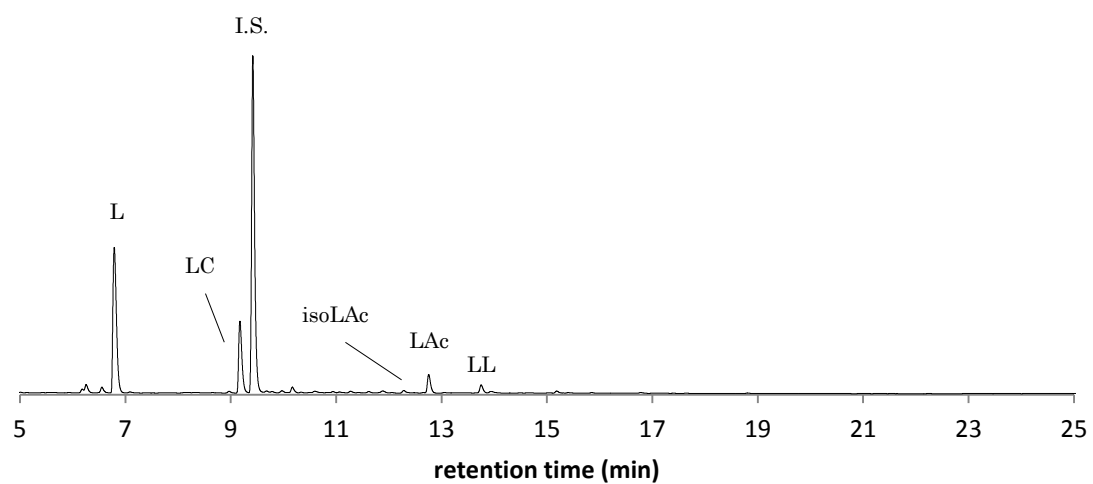


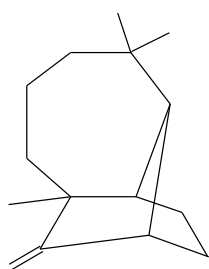
Fig. 2-1 Total ion chromatography of longifolene autoxidation products at room temperature

L:longifolene, LC:longicamphenylone, isoLAc:isolongifolic acid, LAc:longifolic acid, LL:norlongilactone

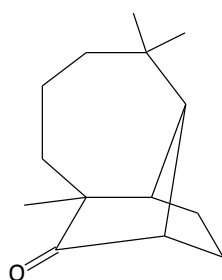
Table 2-1 Yield of autoxidation products and unreacted longifolene from reactions at room temperature

Conditions		Products (%)						Unreacted material (%)
Temperature	Time	LC	LA	LL	LAc	isoLAc	LHK	L
120 °C	24 h	22.7	-	4.25	2.98	1.25	2.18	22.1
Room temp.	3 years	23.0	2.05	3.02	6.17	1.35	-	45.9

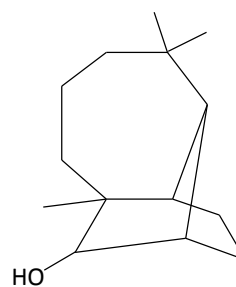
Note: L:longifolene, LC:longicamphenylone, LL:norlongilactone, LA:longicamphenilol, LAc:longifolic acid, isoLAc:isolongifolic acid, LHK:longifolene-hydroxyketone



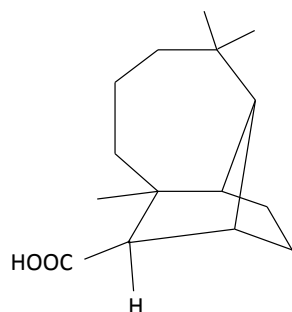
longifolene



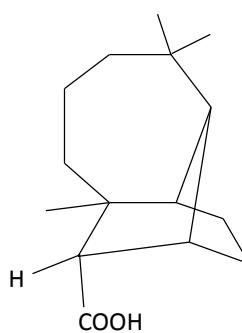
longicamphenylone



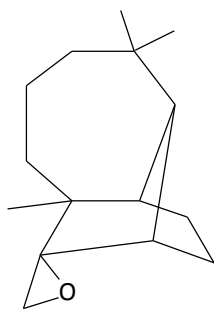
longicamphenylol



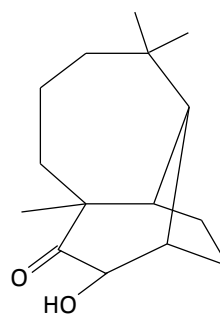
isolongifolic acid



longifolic acid



longifolene oxide



longifolene-hydroxy ketone

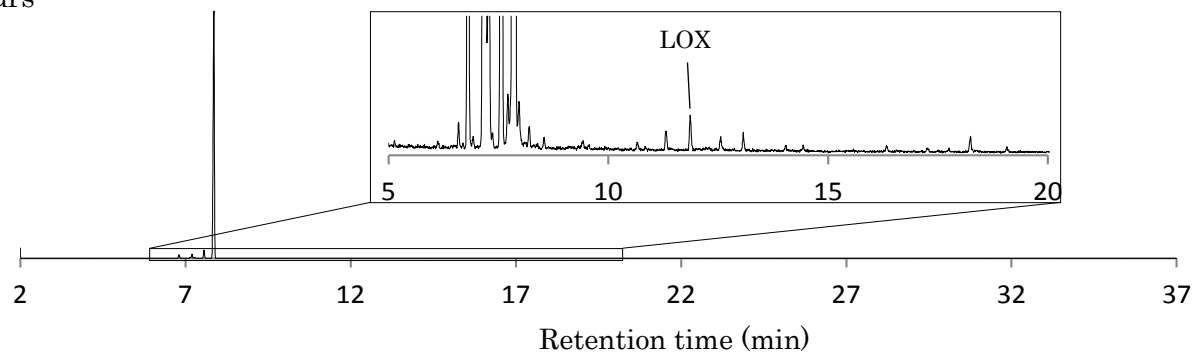
Fig. 2-2 Structures of compounds produced by longifolene autoxidation

Table 2-2 Yield of autoxidation products and unreacted longifolene from reactions at 120°C

Time (h)	Products (%)					Unreacted material (%)
	LC	LL	LAc	isoLAc	LHK	L
1	0.500	0.581	-	-	-	>99
2	0.926	0.526	-	-	-	>99
4	2.44	0.861	-	-	-	87.3
8	7.50	1.72	1.05	-	0.794	70.7
12	17.0	3.35	2.25	1.07	1.61	61.5
24	22.7	4.25	2.98	1.25	2.18	22.1

Note: L:longifolene, LC:longicamphenylone, LL:norlongilactone, LA:longicamphenilol, LAc:longifolic acid, isoLAc:isolongifolic acid, LHK:longifolene-hydroxyketone

0.5 hours



1 hour

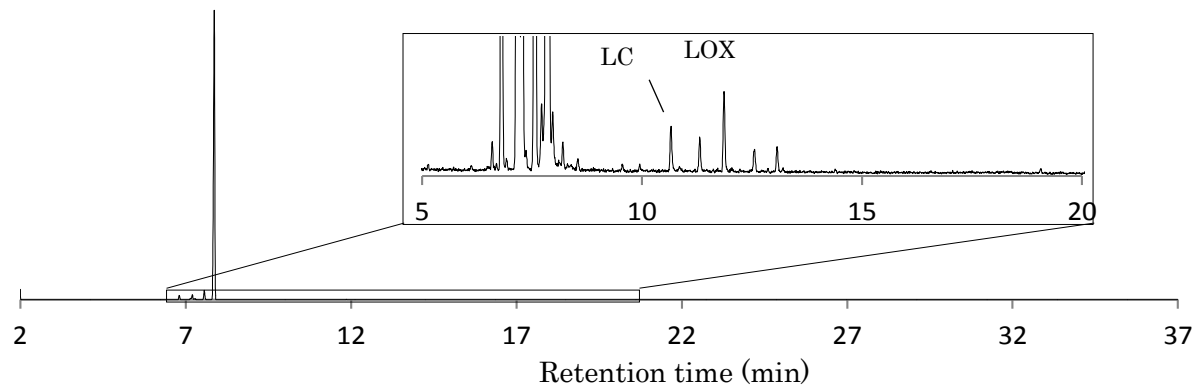


Fig. 2-3 Total ion chromatogram of longifolene autoxidation products at 120 °C for 0.5h and 1h.

LC: longicamphenylene, LOX: longifolene oxide

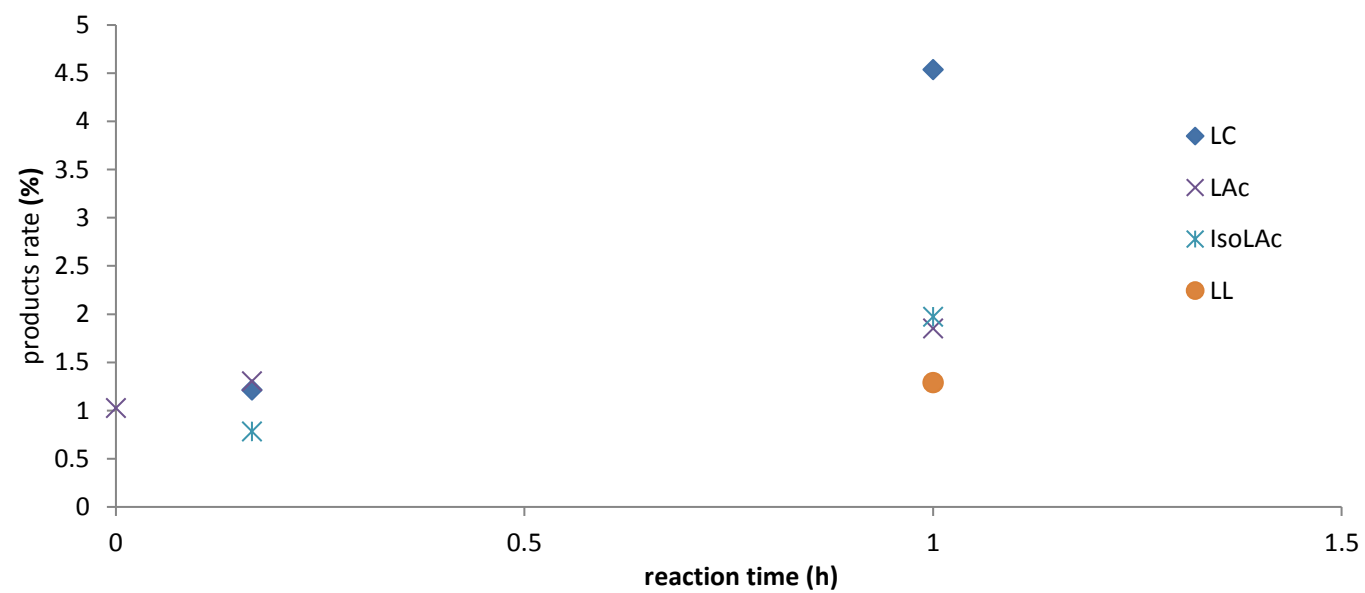


Fig. 2-4 Time course of the yield of products during longifolene oxide autoxidation at 120°C
LC:longicamphenylone, LL:norlongilactone, LAc:longifolic acid, isoLAc:isolongifolic acid

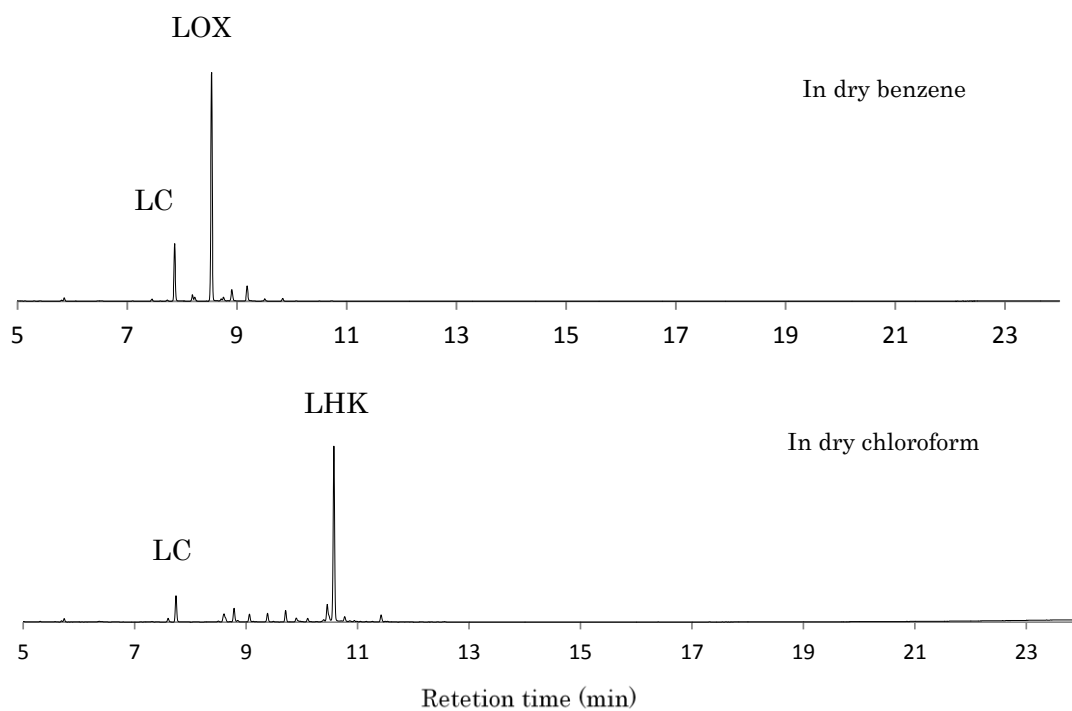


Fig. 2-5 Total ion chromatogram of reaction mixtures of longifolene with *m*-chloroperbenzoic acid in benzene (upper) or chloroform (under).

Note. LC; longicamphenylone, LOX; longifolene oxide, LHK; longifolene-hydroxy ketone

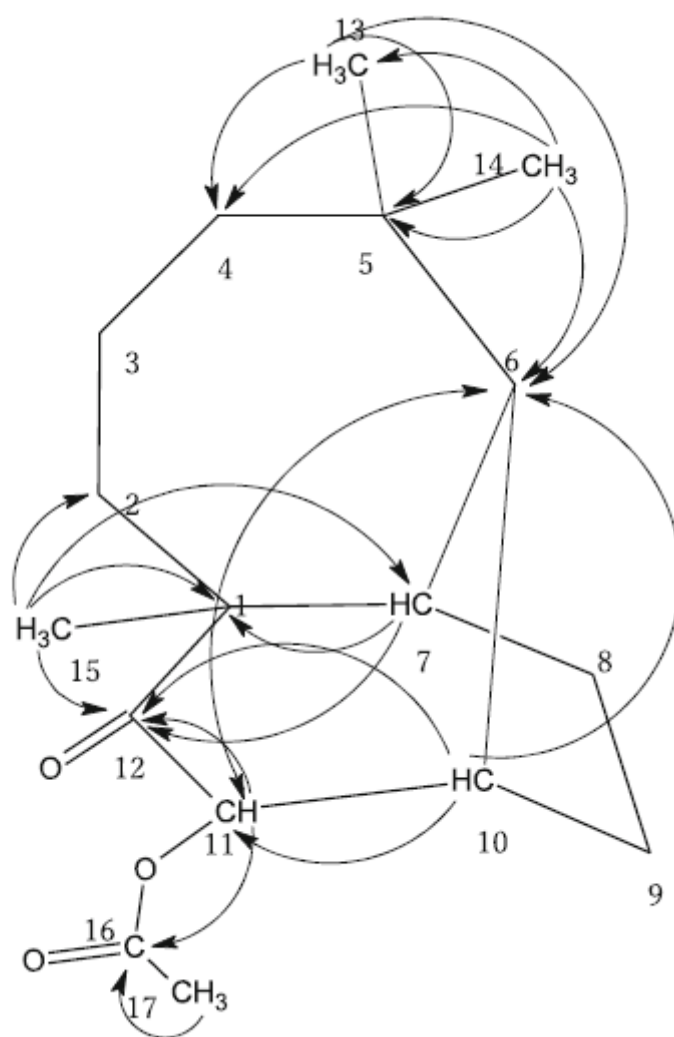


Fig. 2-6 HMBC correlations observed in the NMR analysis of longifolene-hydroxy ketone acetate

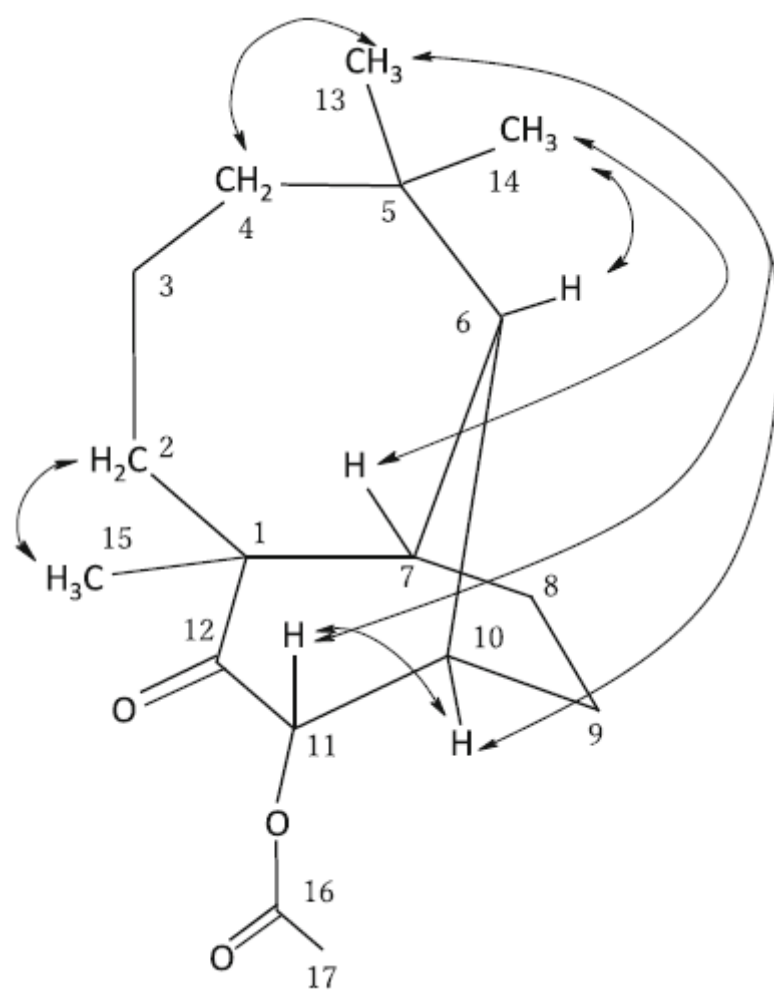


Fig. 2-7 NOESY correlations observed in the NMR analysis of longifolene-hydroxy ketone acetate

Table 2-3 Yield of autoxidation products and unreacted longifolene from reactions at room temperature and 100°C

Conditions		Products (%)				Unreacted material (%)
Temperature	Time	TD	TN	M	ET	T
100 °C	24 h	1.47	5.51	23.1	1.87	11.4
Room temp.	1 years	3.16	1.38	37.6	1.27	0.226

TD : thujopsadiene, TN : thujopsanone, M : mayurone, ET : epoxy thujopsanol, T : thujopsene

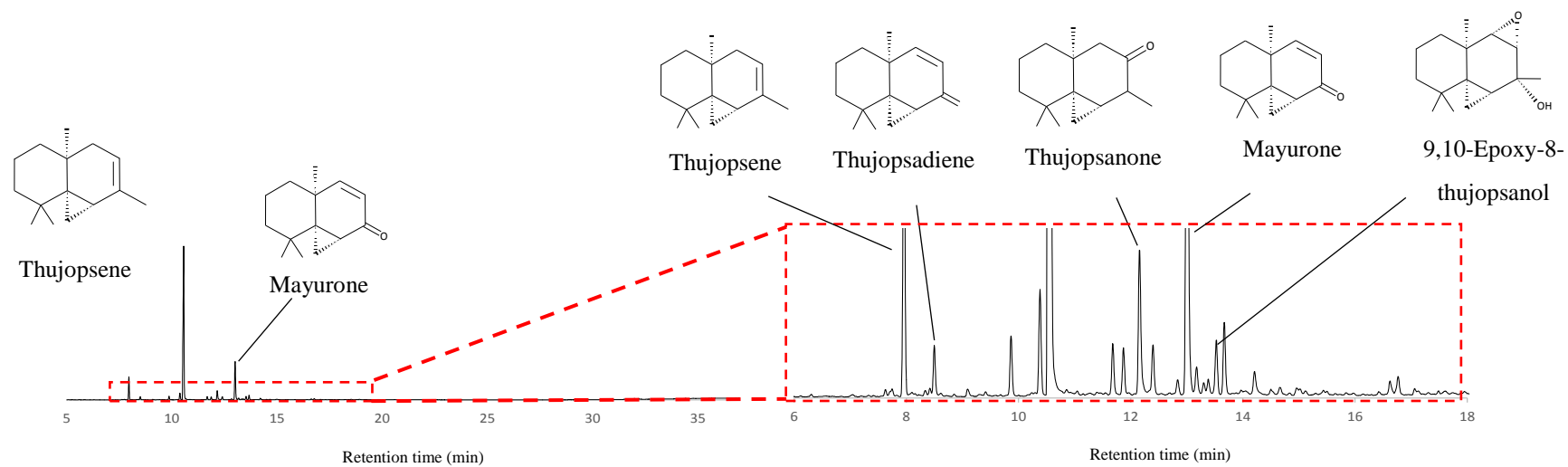


Fig. 2-8 Total ion chromatogram of longifolene autoxidation products at 100°C for 20h

Table 2-4 Yield of autoxidation products and unreacted thujopsene from reactions at 100°C

Time (h)	Product (%)				Unreacted material (%)
	TD	TN	M	ET	T
1	1.32	tr.	1.89		53.0
2	1.74	1.01	4.82	tr.	62.0
4	1.59	2.12	9.43	tr.	44.3
8	1.82	4.30	12.5	tr.	42.6
12	1.82	5.25	16.7	0.857	25.4
20	1.47	5.51	23.1	1.87	11.4

TD : thujopsadiene, TN : thujopsanone, M : mayurone, ET : epoxy thujopsanol, T : thujopsene, tr. : trace

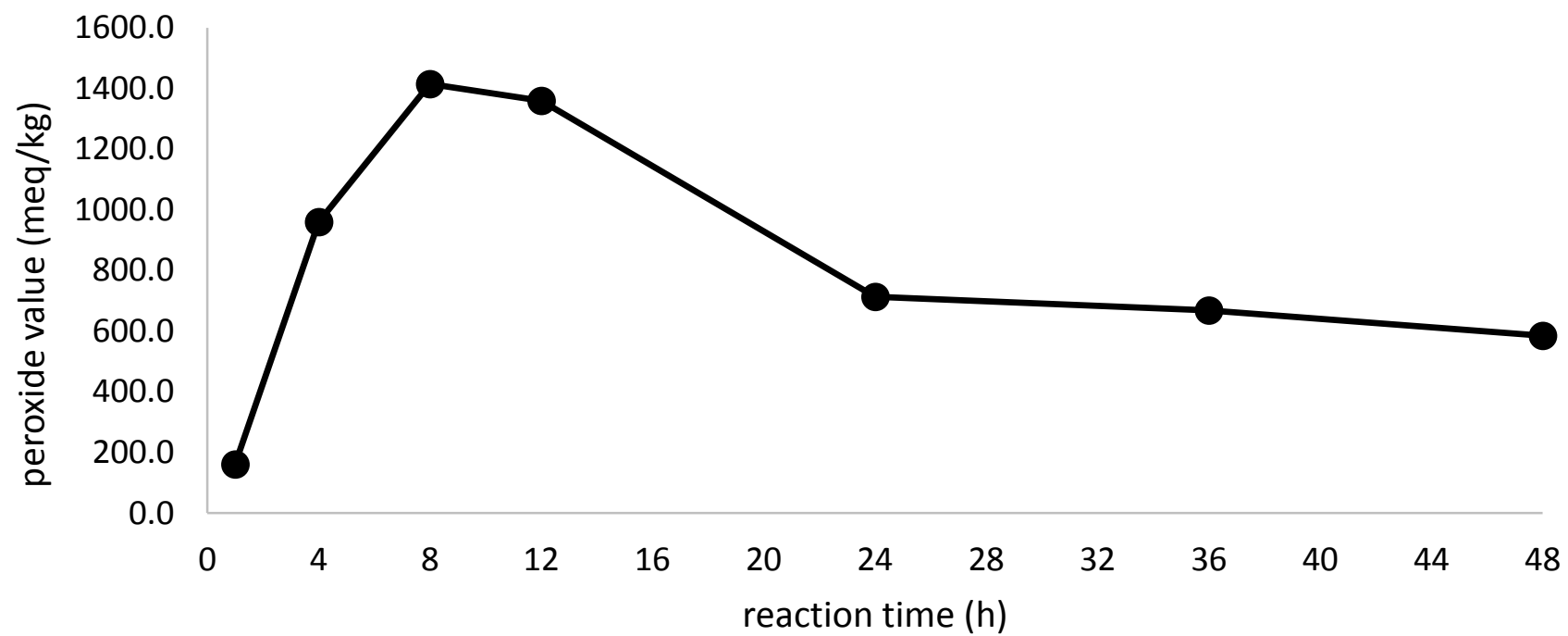


Fig. 2-9 Time course of peroxide value of thujopsene autoxidation at 100°C

Table 2-5 Peroxide value (meq/kg) of thujopsene autoxidation products at room temperature and 100°C

room temperature (1 year)	heating products at 100°C (h)						
	1	4	8	12	24	36	48
1557	160.6	960.0	1414	1359	712.9	668.0	584.8

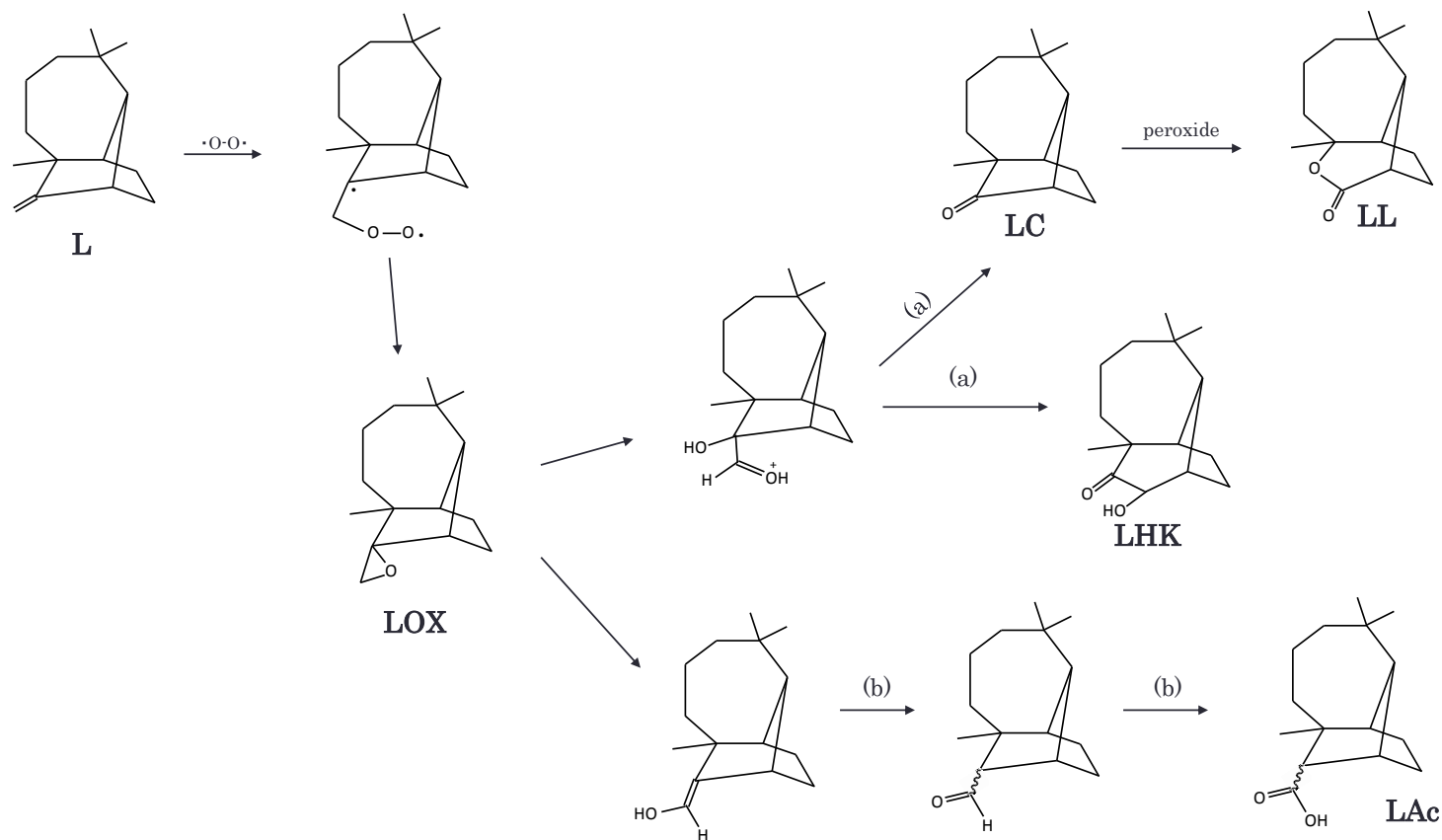


Figure 2-10 Reaction mechanism of longifolene autoxidation

Note: L:longifolene, LC:longicamphenylone, LL:norlongilactone, LA:longicamphenilol, LAc:longifolic acid, isoLAc:isolongifolic acid, LHK:longifolene-hydroxyketone

Reference:(a) U.R.Nayak, S. Dev (1963) *Tetrahedron*, 19 : 2269-2280, (b) V.Dimitrov et al. (2003) *Helvetica Chimica Acta*, 86 : 106-121

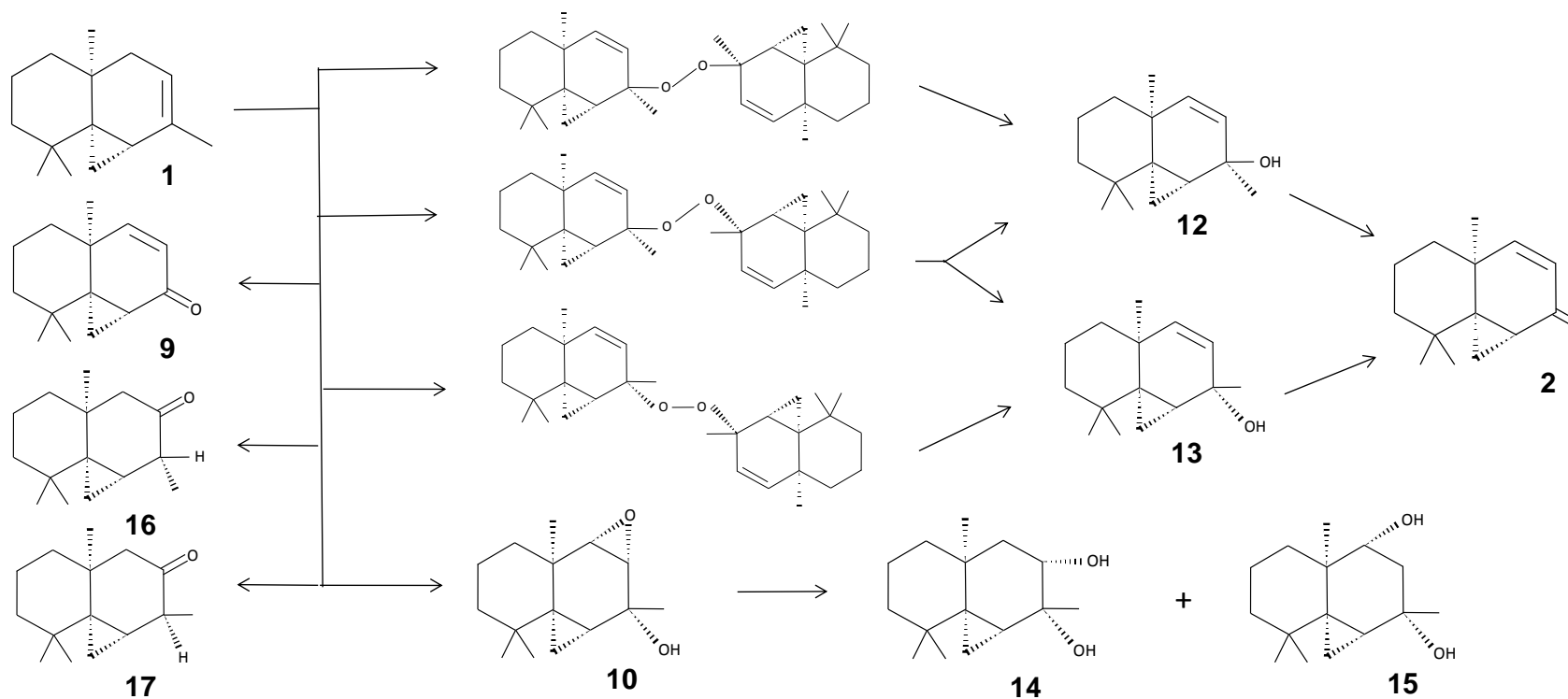


Fig. 2-11 Reaction mechanism of thujopsene autoxidation (Nagahama and Tazaki 1987)

1 ;thujopsene, 2 ;thujopsadiene, 9 ;mayurone, 10 ;epoxy thujopsanol, 12 ;thujopsen-8 β -ol, 13 ;thujopsen-8 α -ol, 14 ;thujopsene-8 α ,9 α -diol, 15 ;thujopsene-8 α ,10 α -diol, 16 ;thujopsan-9 α -one, 17 ;thujopsan-9 β -one

第 4 節 小括

本章では、未利用のテルペノイドの longifolene と thujopsene の有効利用法を見出すため、熱処理による自動酸化の有効性や反応機構を明らかにすることを目的として、室温および加熱処理による自動酸化をおこなった。

まず longifolene の室温による自動酸化では、longicamphenylone が主要生成物として検出され、他に norlongilactone, longicamphenylol, longifolic acid, isolongifolic acid が生成した。加熱処理による自動酸化でも同様に主要生成物は longicamphenylone であり、他に norlongilactone, longifolic acid, isolongifolic acid, longifolene-hydroxy ketone を確認した。それぞれの生成物は反応時間が長くなるにつれて収率が増加したことから、加熱によって自動酸化が促進されたと考えられた。

Thujopsene の室温による自動酸化では、mayurone が主要生成物として検出され、他に thujopsadiene, thujopsanone, epoxy thujopsanol が確認された。加熱処理による自動酸化でも同様に主要生成物は mayurone であり、他に thujopsadiene, thujopsanone, epoxy thujopsanol を同様に確認した。それぞれの生成物は反応時間が長くなるにつれて収率が増加したことから、thujopsene の自動酸化も加熱によって促進されたと考えられた。

また、longifolene の自動酸化反応は epoxide 中間体を経て進行することが合成 2 した longifolene oxide の反応結果から示された。Thujopsene の自動酸化反応は過酸化物の生成・分解を経て進行することが、生成する過酸化物の経時変化の追跡から確認された。

第3章 自動酸化生成物の生物活性

第1節 序論

第2章において、longifolene と thujopsene の室温と熱処理による自動酸化について検討し、様々な自動酸化物の生成を確認した。Longifolene や thujopsene は反応性に富むため、様々な酸化等の反応の検討が行われてきた。また、生物活性についても検討されており、原料である longifolene は、グラム陽性菌 (Himejima et al. 1992)、珪藻類 (Tsuruta et al. 2011)、枝角類および魚類である (Sweet and Meier 1997)、結核菌 (Gordien et al. 2009) に対して活性があることを報告されている。Thujopsene は、ネズミに対するかじり抑制活性 (Ahn et al. 1995)、植物の疫病菌 (Manter et al. 2007)、抗バクテリア活性 (Oh et al. 2011) があることが報告されている。しかし、longifolene や thujopsene が樹木害虫であるシロアリや害菌である木材腐朽菌に対して生物活性を示すという報告はほとんどない。

セスキテルペン炭化水素である caryophyllene や longifolene は抗蟻活性を示さなかったが、その自動酸化生成物である caryophyllene oxide や longicamphenylone, norlongilactone は殺蟻活性を持つことが報告されている (Ashitani et al. 2013; 芦谷 2013)。第2章で longifolene と thujopsene の自動酸化により得られた成分も有用な生物活性を示す可能性があることを示している。

そこで本章では、未利用抽出成分である longifolene や thujopsene の有効利用法の一つとして、自動酸化した生成物の生物活性を明らかにするため、木材害虫/害菌に対する生物活性（抗蟻活性、抗菌活性）を評価した。

第 2 節 実験方法

2.1 抗蟻活性試験

2.1.1 供試生物

供試生物にはヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) を用いた. 2010 年に山形県鶴岡市内で採取したコロニーを用いた. コロニーは $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に保持し, 定期的にスプレーで水を与えて常時湿潤に保ち, 恒温室内で飼育した. 試験にはヤマトシロアリ職蟻の成虫を用いた.

2.1.2 試料・試料調製

試料は第 2 章にて単離した longifolene, longicamphenylone, longicamphenylol, norlongilactone, longifolic acid, isolongifolic acid, longifolene oxide, longifolene-hydroxy ketone および thujopene, thujopsanone, mayurone, epoxy thujopsanol, bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide を用いた. 試料は, アセトンに溶かし, Paper Disc (PD: Advantec, 厚さ 1.5 mm, 直径 8 mm, 重さ 30 mg) 重に対してそれぞれ濃度 0.50%, 1.0%, 2.0% (w/w) になるように PD に含浸させ, 24 時間減圧デシケータ内で溶媒を揮発させて除いた. 24 時間後, それぞれの PD 重を測定した.

2.1.3 PD 強制摂食試験

ヤマトシロアリを用いた抗蟻活性試験には, 既報の PD による試験法 (Kusumoto et al. 2009; Ashitani et al. 2013; Morikawa et al. 2014) を用いて, PD 強制摂食試験をおこなった. 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. 内径 45 mm のガラスシャーレ内に海砂 (Wako, 300 ~ 600 μm) 2 g を敷き, PD を中央に置いた. スプレーで精製水を加え海砂を湿潤

にしたシャーレ内にヤマトシロアリの職蟻を 10 匹投入し、 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ の暗所に静置した。シャーレ内は適宜スプレーで湿潤に保ち、致死体は餌となるためその都度取り除いた。24 時間ごと 21 日間にわたって死蟻数をカウントし、試験期間終了後に、PD を減圧デシケータ内で 24 時間乾燥させ、PD の汚れを取り除き、摂食量を測定した。Acetone のみを PD に含浸させたものを control 用の PD として用いた。PD を与えないものを無給試験 (No feed test) を同時におこない、試験はそれぞれ 3 反復した。

致死活性については以下の式より 21 日目の平均致死率 (Termite mortality) と標準誤差 ($\pm\text{SE}$) を算出し評価した。

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

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

摂食阻害活性は、PD の重量減少より、平均重量減少率 (Mass loss) と標準誤差 ($\pm\text{SE}$) を以下の式から算出し、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

試験はそれぞれ 3 反復行った。摂食阻害活性は、コントロールの PD 減少量に対する相対値 (%) を算出し、評価した。

2.1.4 PD 選択摂食試験

ヤマトシロアリを用いた抗蟻活性試験には、既報の PD による試験法 (Ashitani et al. 2013; Morikawa et al. 2014) を用いて、PD 強制摂食試験をおこなった。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。2.1.3 とほとんど同様であるが、acetone のみを 120 μl 含浸させ気乾した control の PD を、試料を含浸させた PD と同じシャーレ内に設置し、シロアリに選択的に摂食

させた。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。

2.1.5 統計処理

各試料の致死率および PD 減少重量について 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 ($p < 0.05$)。

2.2 抗菌活性試験

2.2.1 試料・試料調製

試料は第 2 章にて単離した longifolene , longicamphenylone , longicamphenylol , norlongilactone , longifolic acid , isolongifolic acid , longifolene oxide, longifolene-hydroxy ketone および thujopene, thujopsanone, mayurone, epoxy thujopsanol, bis(4th-thujopsen-8-yl) peroxide を用いた。Thujopsadiene に関しては、単離物が少量であったことやアセトンに不溶であったことから試験に用いなかった。試料調製には acetone を用いて、0.50, 0.10, 0.020 mg/ml にして、試験に供した。

2.2.2 供試生物

用いた菌類は、*Trametes versicolor* (白色腐朽菌, NBRC 30340), *Lenzites betulinus* (白色腐朽菌, MAFF 420002), *Gloeophyllum trabeum* (褐色腐朽菌, MAFF 420223), *Trichoderma virens* (軟腐朽菌, MAFF 645007), *Rhizopus oryzae* (NBRC 31005) を用いた。試験前に菌株を Potato Dextrose Ager (PDA) 培地上で $26 \pm 1^\circ\text{C}$ の暗条件下で前培養し、試験に供した。

2.2.3 試験方法

抗菌活性試験は、既報 (Kusumoto et al. 2010) に基づいておこなった。試験培地には内径 85 mm 滅菌シャーレに PDA 培地を 15 ml 分注し、放冷後、固化したものをを用いた。PDA 培地表面に試料が 0.2, 1, 5 mg/cm² になるように調製した試料 600 μ l を PDA 培地表面に均一になるように塗布し、1 時間程度放置し、溶媒を完全に揮発させた。Control として acetone のみを 600 μ l 塗布し、同様に気乾させた培地を用いた。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ぬき、調製した培地中央に置き、その後パラフィルムで閉じた。試験培地は、高温器内で 26 \pm 1 $^{\circ}$ C の暗条件下で静置培養し、control または試験培地の菌叢外縁がシャーレの縁に達した時点で終了とした。各試験は 3 反復おこなった。

第3節 結果と考察

3.1 longifolene の生物活性

3.1.1 抗蟻活性試験

3.1.1.1 PD 強制摂食試験

Longifolene および longifolene 自動酸化生成物の PD 強制摂食試験による抗蟻活性を検討し、試料の致死活性および摂食阻害活性について検討した。Longifolene および longifolene 自動酸化生成物の致死活性の結果を Fig. 3-1 に示した。自動酸化の原料である longifolene は致死活性を示さなかった。最も強い致死活性を示したのは longifolene-hydroxy ketone ですべての濃度で $100\pm 0.0\%$ と強い活性を示した。Longicamphenylol も強い活性を示し、濃度 1.0%, 2.0% で $100\pm 0.0\%$ の致死活性を示したが、0.5% で急激に弱くなり、濃度依存的な傾向があると考えられる。Longifolene oxide は強い抗蟻活性を示し、濃度 0.50, 1.0, 2.0% でそれぞれ $23.3\pm 2.7\%$, $76.7\pm 2.7\%$, $93.3\pm 5.4\%$ と濃度依存的な傾向があった。Norlongilactone はすべての濃度で 70~80% の致死活性を示し、低濃度でも致死活性の差がなかった。Isolongifolic acid および longifolic acid は濃度 2.0% で中程度の致死活性を示し、濃度依存的な傾向があると考えられる。Longicamphenylone は中程度の活性を示したが、7 日目と 21 日目の致死活性があまり変わらず、試験期間初期にシロアリを殺したと考えられる。

Longifolene および longifolene 自動酸化生成物を用いたヤマトシロアリに対する摂食阻害活性の結果を Fig. 3-2 に示した。Longifolene は摂食阻害活性を示さなかった。Norlongilactone, longifolene oxide, longicamphenylol, longifolene-hydroxy ketone が強い摂食阻害活性を示した。Isolongifolic acid および longifolic acid は中程度の活性を示し、濃度依存的に阻害活性を示した。Longicamphenylone は活性がないか、非常に弱い活性を示した。

3.1.1.2 PD 選択摂食試験

PD 選択摂食試験では，致死活性および摂食忌避活性について検討した．Longifolene および longifolene 自動酸化生成物を用いたヤマトシロアリに対する致死活性の結果を Fig. 3-3 に示した．致死活性については，PD 強制摂食試験と同様の傾向を示した化合物は，longifolene, longicamphenylone, longicamphenylol, longifolene-hydroxy ketone であった．選択的に摂食できることから摂食による毒性よりも揮発した物質による影響であると推定した．Norlongilactone, longifolene oxide, isolongifolic acid, longifolic acid は PD 強制摂食試験と比較し，致死活性が低くなる傾向がある．これは，物質の忌避性が強く選択的に餌を得られることが影響していると考えられる．

Longifolene および longifolene 自動酸化生成物を用いたヤマトシロアリに対する摂食忌避活性の結果を Fig. 3-4 に示した．致死活性を示さなかった longifolene も，control の PD を選択的に摂食しており，摂食忌避活性を示した．Longifolene-hydroxy ketone は試験期間の初期にシロアリが死んでしまったことから摂食忌避活性がみられなかった．致死活性の低い化合物および濃度においても，高い摂食忌避活性を示すことがわかった．

3.1.2 抗菌活性試験

Longifolene および longifolene 自動酸化生成物の抗菌活性試験を検討し，結果を Fig. 3-5~9, Table 3-1 に示した．自動酸化の原料である longifolene は，*G. trabeum* (5 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) に対して 14%と弱い活性を示したが，他の菌にはほとんど抗菌活性を示さなかった．自動酸化反応で主生成物である Longicamphenylone は，抗菌活性が 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で 10%前後と弱い活性を示したが，*R. oryzae* に対しては活性を示さなかった．Norlongilactone は，木材腐朽菌に対して弱い活性を

示し、*R. oryzae* には若干強い 21 ± 3.2 ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) の抗菌活性を示した。Longicamphenylol は、すべての菌に対して中程度の活性を示し、菌の種類による活性の違いはほとんどなかった。Longifolic acid はすべての菌に対して最も高い抗菌活性を示した。特に *T. virens* に対しては濃度 $5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ で $92 \pm 0.25\%$ と非常に強い活性を示した。Isolongifolic acid は longifolic acid の次に高い抗菌活性を示した。Longifolene oxide は *T. versicolor*, *G. trabeum* を除く菌に対して中程度の活性を示した。Longifolene-hydroxy ketone も longicamphenylol と同様にすべての菌に対して中程度の活性を示し、菌の種類による活性の違いはほとんどなかった。

Longifolene および longifolene 自動酸化生成物では菌の種類間で活性の強さが異なる成分がほとんどなかった。

3.2 thujopsene の生物活性

3.2.1 抗蟻活性試験

3.2.2.1 PD 強制摂食試験

Thujopsene および thujopsene 自動酸化生成物の PD 強制摂食試験による抗蟻活性を検討し、試料の致死活性および摂食阻害活性について検討した。Thujopsene および thujopsene 自動酸化生成物の致死活性の結果を Fig. 3-10 に示した。自動酸化の原料である thujopsene は致死活性を示さなかった。最も強い致死活性を示したのは mayurone で 0.5, 1.0, 2.0% で試験期間初期に $100 \pm 0.0\%$ と強い活性を示した。bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide は 2.0 で $36.7 \pm 12\%$ と中程度の活性を示した。Epoxy thujopsanol は 0.5% で $100 \pm 0.0\%$ と非常に強い活性を示した。Thujopsanone は 2.0% で $100 \pm 0.0\%$ と強い活性を示し、1.0, 0.5% ではそれぞれ $63.3 \pm 14\%$, $12.5 \pm 8.2\%$ と濃度依存的に効いた。Thujopsadiene はほとんど致死活性を示さなかった。

Thujopsene および thujopsene 自動酸化生成物の摂食阻害活性の結果を Fig. 3-11 に示した。自動酸化の原料である thujopsene は摂食阻害活性を示さなかった。Mayurone は全く PD の減少が測定されず、強い摂食阻害活性と殺蟻活性を持っていると確認された。また、bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide, epoxy thujopsanol, thujopsanone, thujopsadiene は濃度依存的に摂食阻害活性が見られたことから、弱い摂食阻害活性があると示唆された。

3.2.2.2 PD 選択摂食試験

PD 選択摂食試験では、致死活性および摂食忌避活性について検討した。Thujopsene および thujopsene 自動酸化生成物を用いたヤマトシロアリに対する致死活性の結果を Fig. 3-12 に示した。致死活性については、PD 強制摂食試

験と同様に mayurone が最も高い致死活性を示し、試験期間中生きていた蟻はほとんど動かず、摂食している様子はなかった。他の化合物 bis(4th-thujopsen-8-yl) peroxide, epoxy thujopsanol, thujopsanone, thujopsadiene は殺蟻活性がないか弱い活性を示した。Epoxy thujopsanol, thujopsanone は選択的に摂食できることによって致死数が減ったことから、摂食毒性または摂食阻害による致死性が示唆された。

Thujopsene および thujopsene 自動酸化生成物を用いたヤマトシロアリに対する摂食忌避活性の結果を Fig. 3-13 に示した。強い致死活性を示した mayurone 以外の化合物は摂食忌避活性を示した。致死活性の低い化合物においても、高い摂食忌避活性を示すことがわかった。

3.2.2 抗菌活性試験

Thujopsene および thujopsene 自動酸化生成物の抗菌活性試験を検討し、結果を Fig. 3-14~18 に示した。自動酸化の原料である thujopsene は、*T. versicolor* に対して活性はなかった。*G. trabeum* に対して 0.2 µg/cm² で 20%程度と弱い活性を示したが、より高濃度では 10%程度と活性が弱くなり、濃度依存的には効いていない。*R. oryzae* に対してはすべての濃度で 10%程度と若干活性を示したが、濃度依存的には効いていなかった。したがってすべての菌類に対して顕著な抗菌活性は示さなかった。Thujopsanone は *T. virens*, *R. oryzae* に対しては活性を示さなかったが、*L. betulinus*, *T. virens* に対して濃度 5 µg/cm² において 20%程度と濃度依存的に活性を示していたため、弱い抗菌活性を示した。*G. trabeum* に対してはすべての濃度で 20%と同程度の活性を示していたため、低濃度でも活性を示していると判断した。Mayurone は、*T. versicolor* に対して濃度 5 µg/cm² において 50%程度と強い活性を示した。また、*L. betulinus* および *T.*

virens に対しては弱い活性があった。 *G. trabeum* に対しては $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で 20% 程度と弱い活性を示したが、より高濃度では 10% 程度と活性が弱くなったため、活性成分であるかはわからない。 *R. oryzae* に対してはほとんど活性はなかった。 Epoxy thujopsanol は *L. betulinus*, *T. virens*, *R. oryzae* に対しては弱い活性を示したが、 *T. versicolor* に対しては活性を示さなかった。 *G. trabeum* に対してはすべての濃度で 20% と同程度の活性を示していたため、低濃度でも活性を示していると判断した。 Bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide は *T. versicolor*, *L. betulinus*, *T. virens*, *R. oryzae* に対して活性を示さなかったが、 *G. trabeum* に対してはすべての濃度で 20% と同程度の活性を示していたため、低濃度でも活性を示していると判断した。

しかしながら、50% 程度の活性を示したのは *T. versicolor* に対する mayurone のみで、 longifolene の自動酸化物と比べて高い活性を示している化合物はほとんどなかった。

3.3 自動酸化による構造の変化と活性

自動酸化の原料である longifolene は抗蟻、抗菌活性をほとんど示さなかった。抗蟻活性試験において、 longifolene の酸化化合物で強い殺蟻活性を示したのは、 hydroxyl group を有する longicamphenylol と longifolene-hydroxy ketone であったことから、 hydroxyl group が強い殺蟻活性に関与していると考えられる。また、 norlongilactone および longifolene oxide は低濃度でも高い殺蟻活性および摂食阻害活性を示していたことから、 lactone および epoxide group も摂食阻害活性に関与していると考えられる。 Longicamphenylone, isolongifolic acid, longifolic acid は弱い活性を示していたことから、 carbonyl および carboxyl groups は弱い殺蟻活性に関与している。これらのことから、 longifolene の自動

酸化生成物では、hydroxyl group を有する構造が最も強い抗蟻活性を持つことが明らかになった。抗菌活性試験において、longifolene の酸化化合物で強い抗菌活性を示したのは、carboxyl group を有する isolongifolic acid と longifolic acid であったことから、carboxyl group が強い抗菌活性に関与していると考えられる。Hydroxyl group を有する longicamphenylol と longifolene-hydroxy ketone は中程度の活性を持っており、ほとんど同様の強さの活性を示していることから、hydroxyl group が抗菌活性に関与しており、longicamphenylone が抗菌活性を示していないことから、longifolene-hydroxy ketone の carbonyl group も抗菌活性に関与していないと考えられる。Lactone group はほとんど抗菌活性を示していないことから、抗菌活性には関与していないと考えられる。

自動酸化の原料である thujopsene は抗蟻活性を示さなかったが、抗菌活性に関しては *G. trabeum*, *R. oryzae* に対して弱い抗菌活性を示した。Thujopsene 自動酸化生成物の中で最も強い抗蟻活性を示したのは carbonyl group を有する mayurone であり、thujopsadiene が弱い摂食阻害活性しか示さなかったことから、この carbonyl group が活性に関与していると考えられる。また、thujopsanone も carbonyl group を有しているが、mayurone よりは活性が低かった。Epoxy thujopsanol も非常に強い殺蟻活性を有しており、longifolene では hydroxyl group が強い殺蟻活性に起因していたことから、hydroxyl group が活性に関与していると推定する。

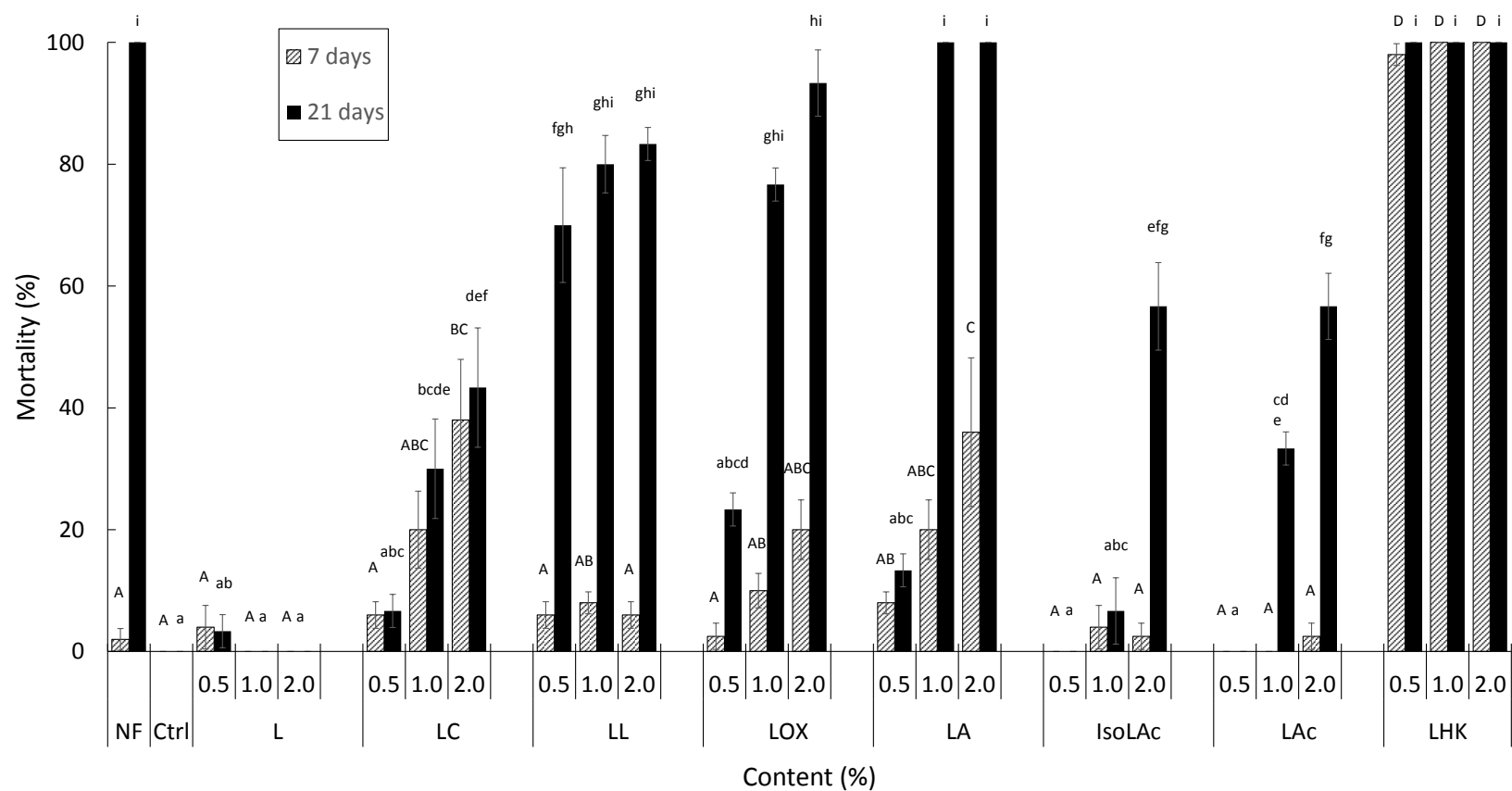


Fig. 3-1 Termiticidal activities after 7 and 21 days of longifolene autoxidation compounds in the no-choice test.

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

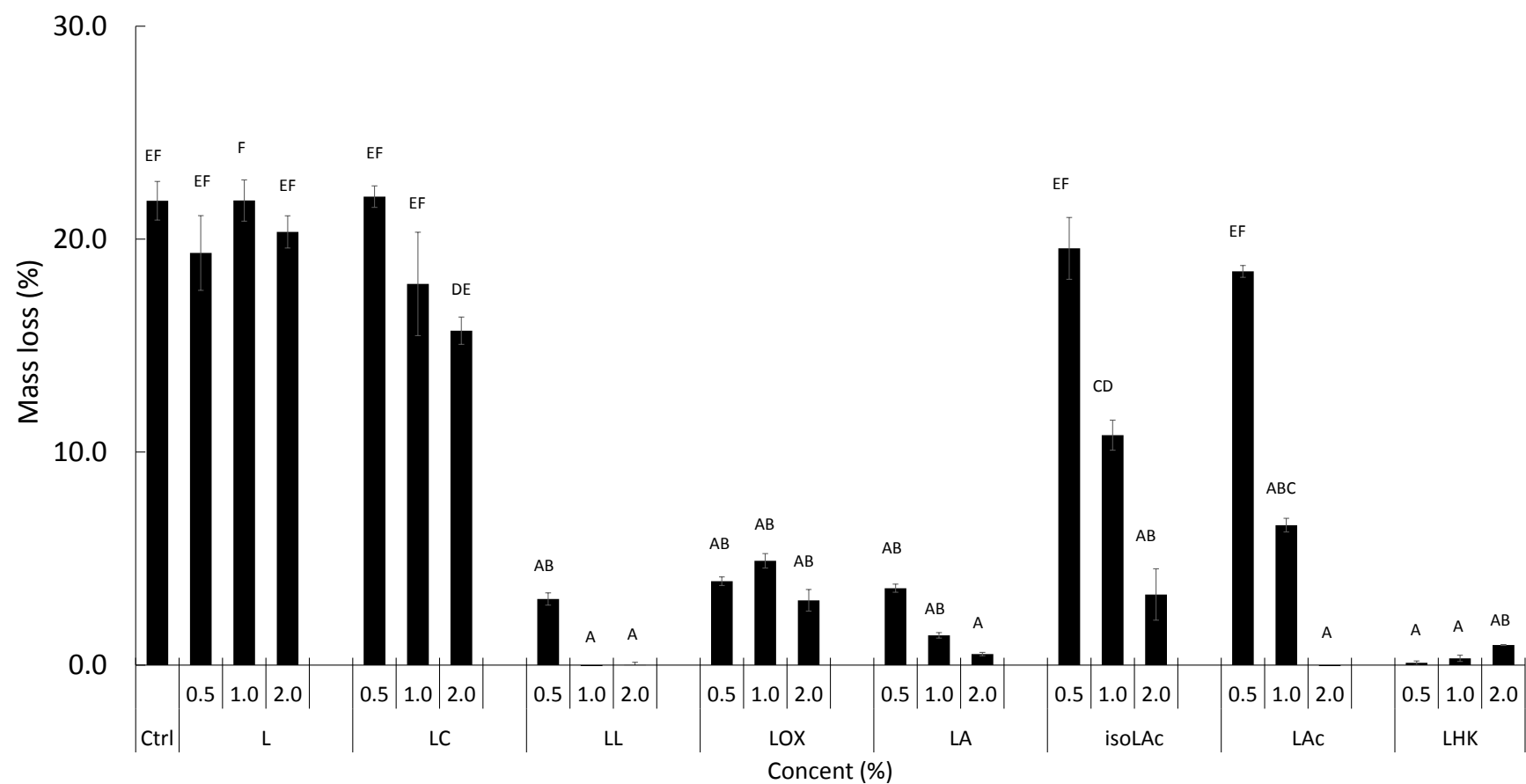


Fig. 3-2 Antifeedant activities after 21 days of longifolene autoxidation products in the no-choice test.

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicampenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

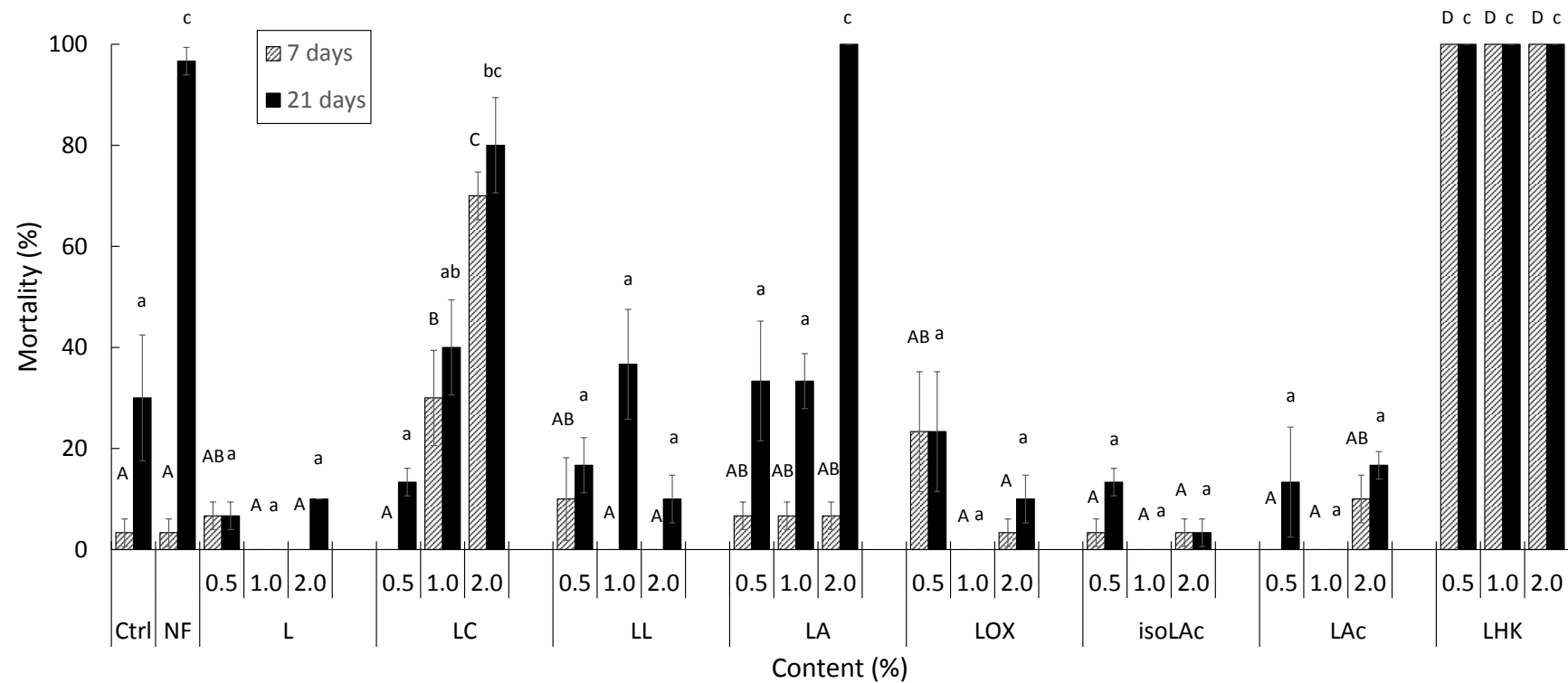


Fig. 3-3 Termiticidal activities after 21 days of longifolene autoxidation products in the dual-choice test.

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

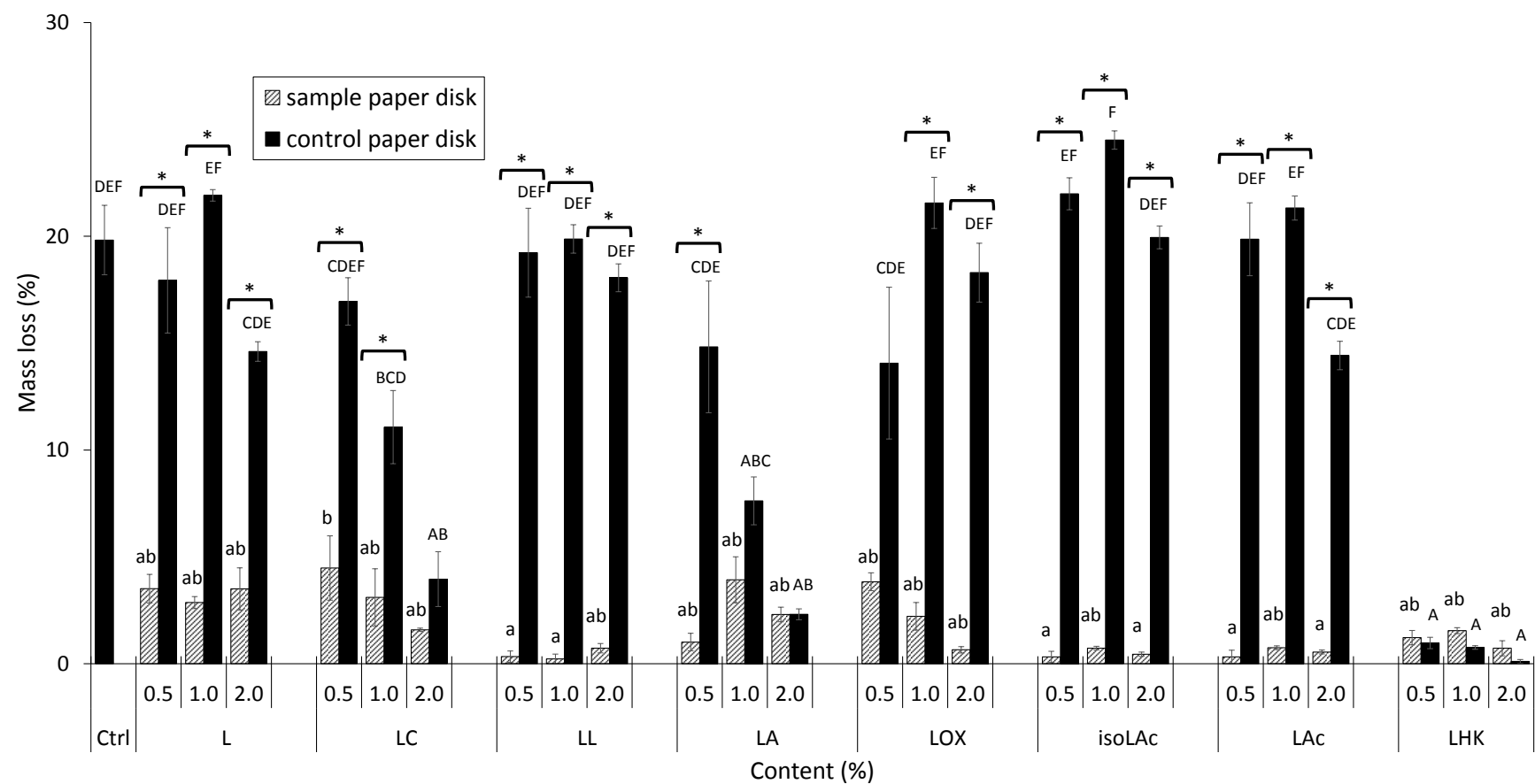


Fig. 3-4 Antifeedant activities after 21 days of longifolene autoxidation products in the dual-choice test.

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicampenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

Asterisks denote a significant difference between sample and control papers; Tukey–Kramer test, $p < 0.05$

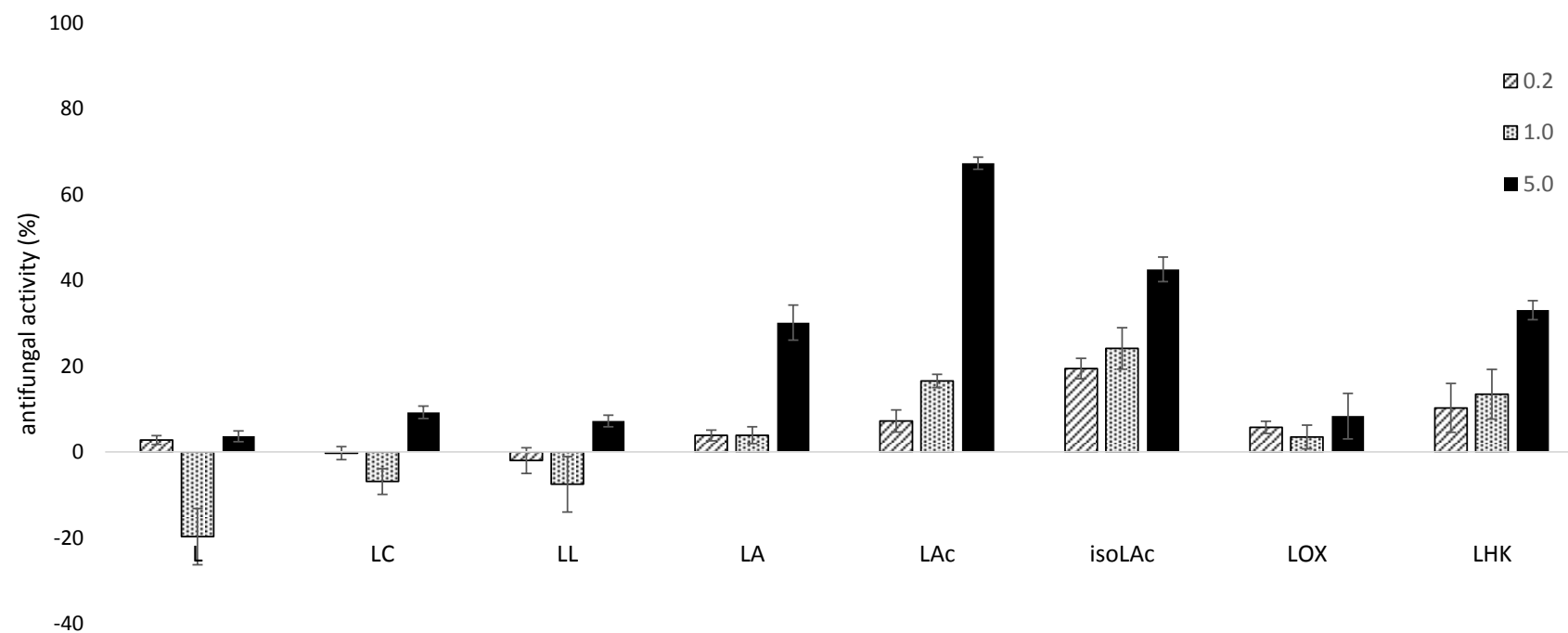


Fig. 3-5 Antifungal activities of longifolene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 µg/cm² against *Trametes versicolor*.

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

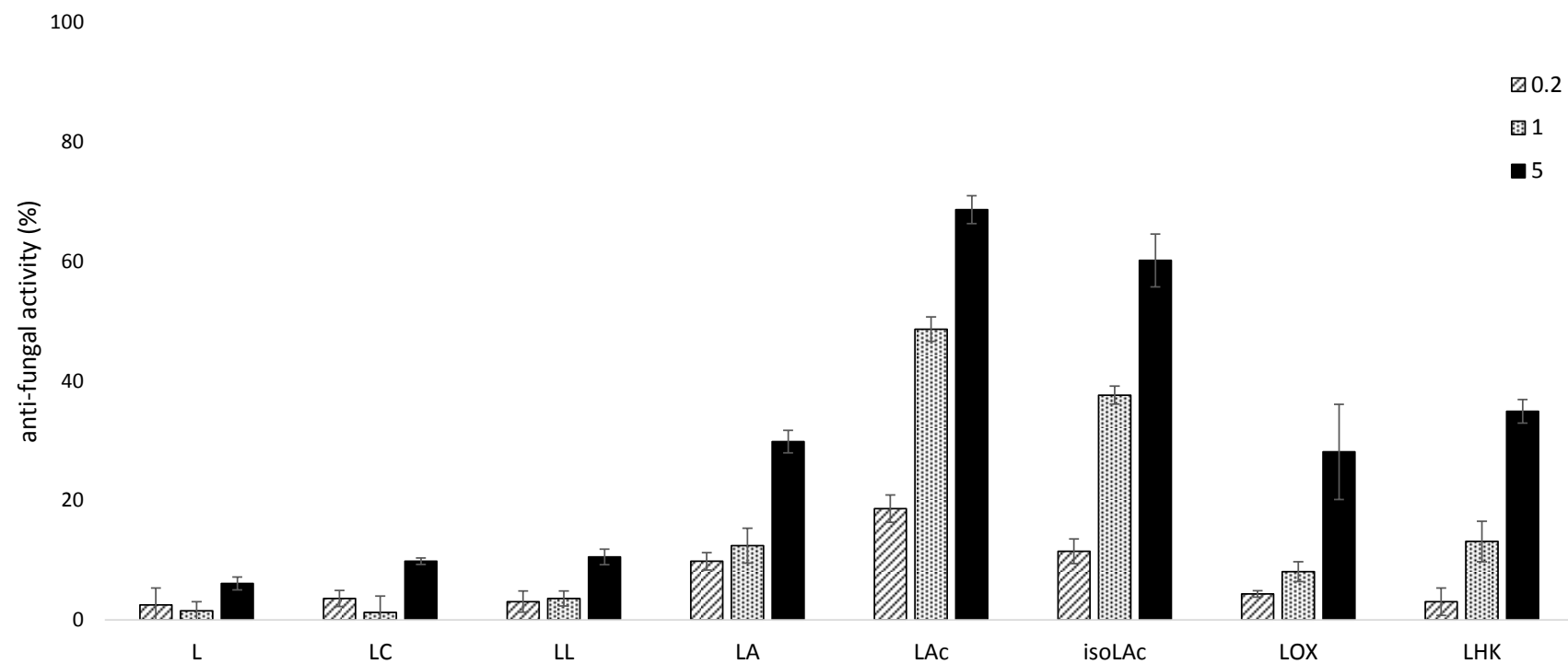


Fig. 3-6 Antifungal activities of longifolene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ against *Lenzites betulinus*.

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

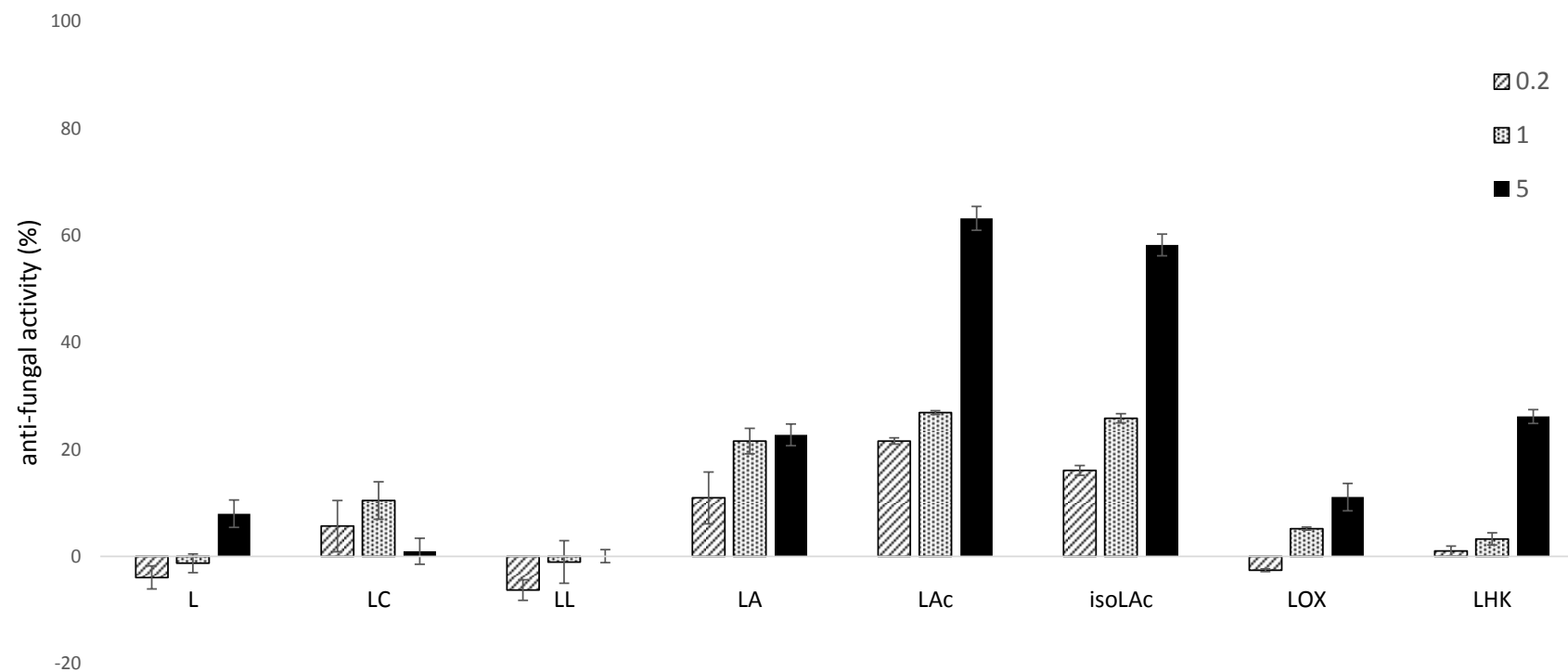


Fig. 3-7 Antifungal activities of longifolene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 µg/cm² against *Gloeophthllum trabeum*.

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

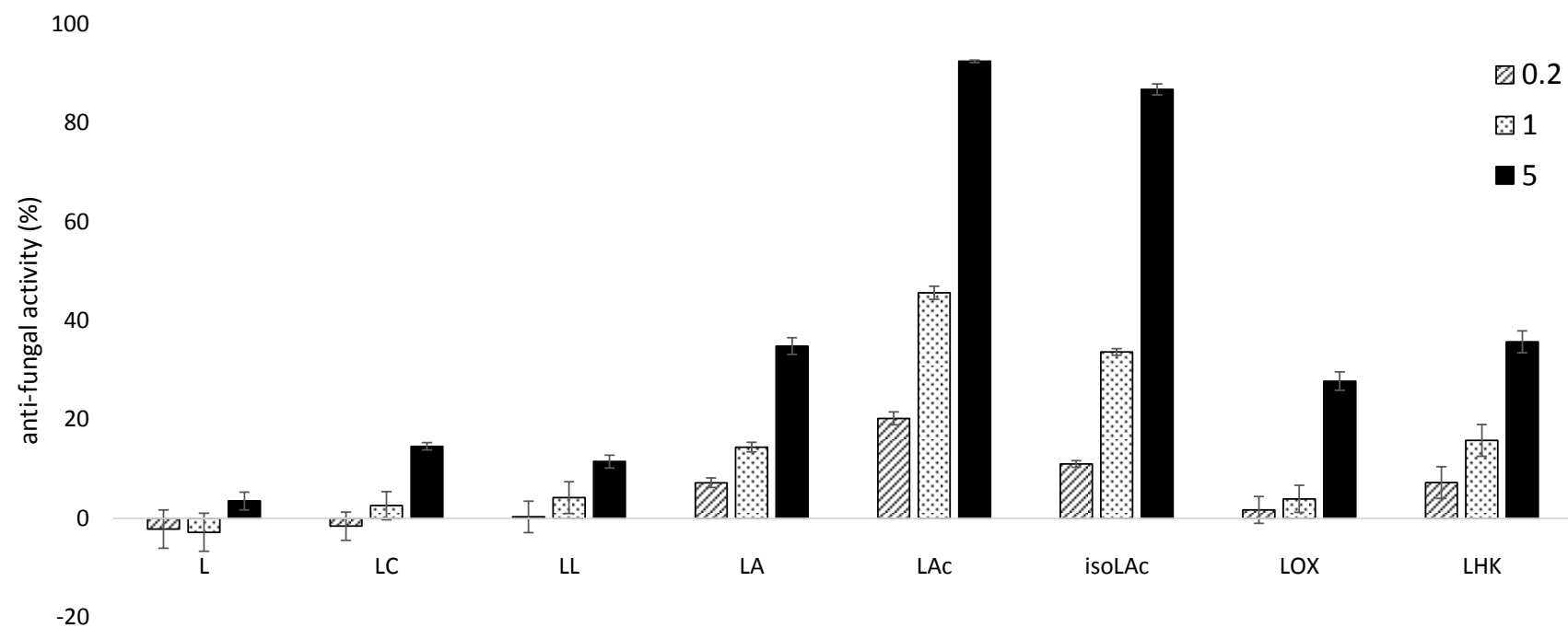


Fig. 3-8 Antifungal activities of longifolene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 µg/cm² against *Trichoderma virens*

L: longifolene, LC: longicampenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

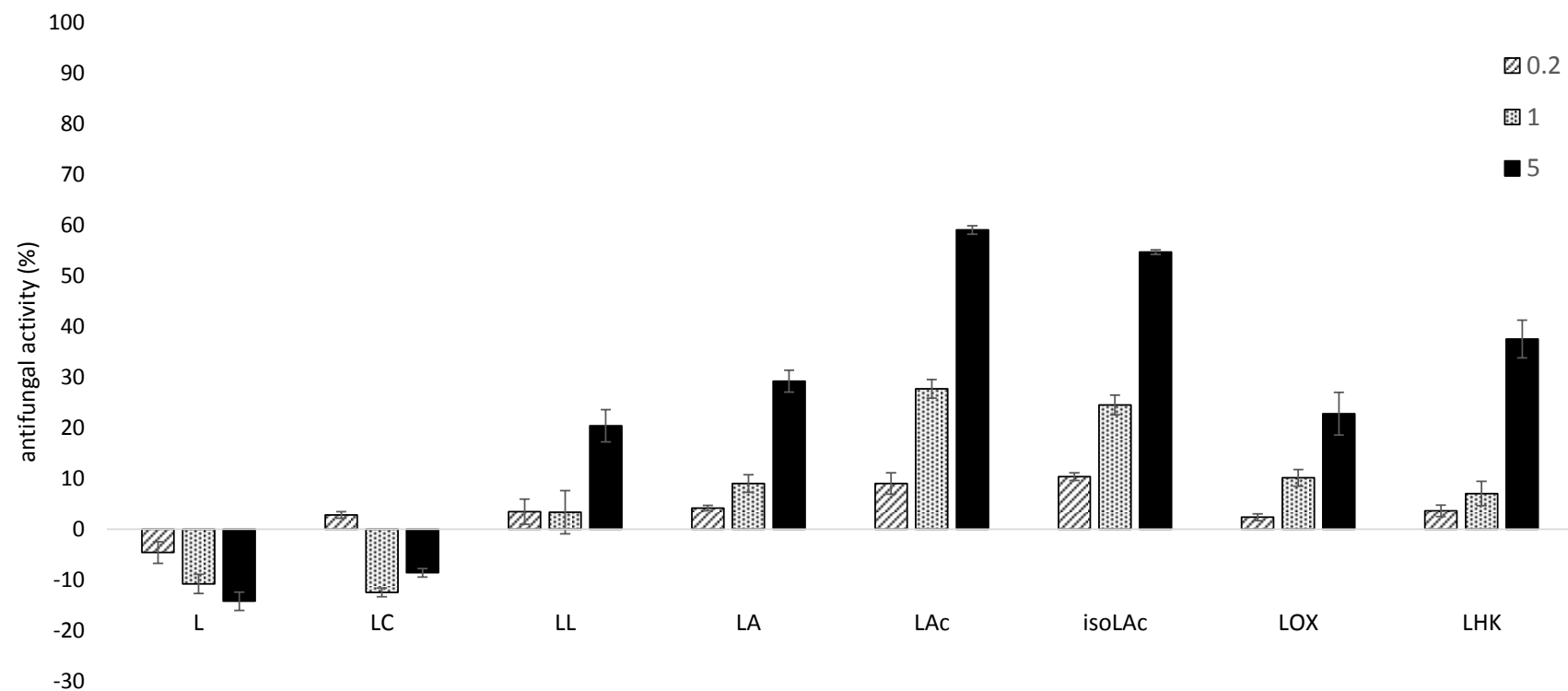


Fig. 3-9 Antifungal activities of longifolene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 µg/cm² against *Rhizopus oryzae*

L: longifolene, LC: longicamphenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

Table 3-1 Bioactivity of longifolene and its autoxidation products against select fungi

	L	LC	LL	LA	LAc	isoLAc	LOX	LHK
<i>Trametes versicolor</i>								
5 µl/cm ²	3.7±1.3	9.3±1.5	7.3±1.4	30±4.1	68±1.4	43±2.9	8.4±5.3	33±2.3
1 µl/cm ²	-20±6.5	-6.9±3.0	-7.5±6.5	3.9±2.0	17±1.6	24±4.8	3.5±2.8	13±5.8
0.2 µl/cm ²	2.8±1.0	-0.27±1.5	-2.0±3.0	3.8±1.2	7.2±2.6	19±2.4	5.7±1.4	10±5.7
<i>Lenzites betulinus</i>								
5 µl/cm ²	6.1±1.1	9.8±0.53	11±1.3	30±1.9	69±2.3	60±4.4	28±8.0	35±2.0
1 µl/cm ²	1.5±1.5	1.2±2.7	3.6±1.3	12±2.9	49±2.1	38±1.5	8.1±1.7	13±3.4
0.2 µl/cm ²	2.5±2.8	3.6±1.4	3.1±1.8	9.8±1.4	19±2.3	11±2.1	4.4±0.5	3.0±2.3
<i>Gloeophyllum trabeum</i>								
5 µl/cm ²	14±2.3	7.6±2.0	4.1±0.21	25±2.1	60±2.4	55±1.7	15±1.7	29±0.65
1 µl/cm ²	-1.3±1.8	10±3.5	-1.1±4.0	22±2.4	27±0.4	26±0.9	5.2±0.3	3.3±1.1
0.2 µl/cm ²	-4.0±2.2	5.6±4.8	-6.3±1.9	11±4.8	22±0.6	16±0.9	-2.6±0.3	1.0±0.9
<i>Trichoderma virens</i>								
5 µl/cm ²	3.5±1.8	15±0.75	12±1.3	35±1.7	92±0.25	87±1.1	28±1.9	56±2.2
1 µl/cm ²	-2.8±3.9	2.6±2.9	4.2±3.2	14±1.0	46±1.3	34±0.7	3.9±2.7	16±
0.2 µl/cm ²	-2.2±1.8	-1.6±1.2	0.30±3.6	7.2±3.1	20±2.3	11±1.6	1.7±3.3	7.2±1.7
<i>Rhizopus oryzae</i>								
5 µl/cm ²	-14±1.8	-8.6±0.9	21±3.2	29±2.2	59±0.83	55±0.46	23±4.2	38±3.8
1 µl/cm ²	-11±1.9	-12±0.9	3.3±4.3	9.0±1.7	28±1.8	25±2.0	10±1.6	7.0±
0.2 µl/cm ²	-4.6±2.1	2.8±0.6	3.4±2.5	4.2±0.6	9.0±2.1	10±0.8	2.3±0.7	3.6±1.1

L: longifolene, LC: longicamphenylone, LL: norlongilactone, LA: longicamphenylol, LAc: longifolic acid, isoLAc: isolongifolic acid, LOX: longifolene oxide, LHK: longifolene-hydroxy ketone

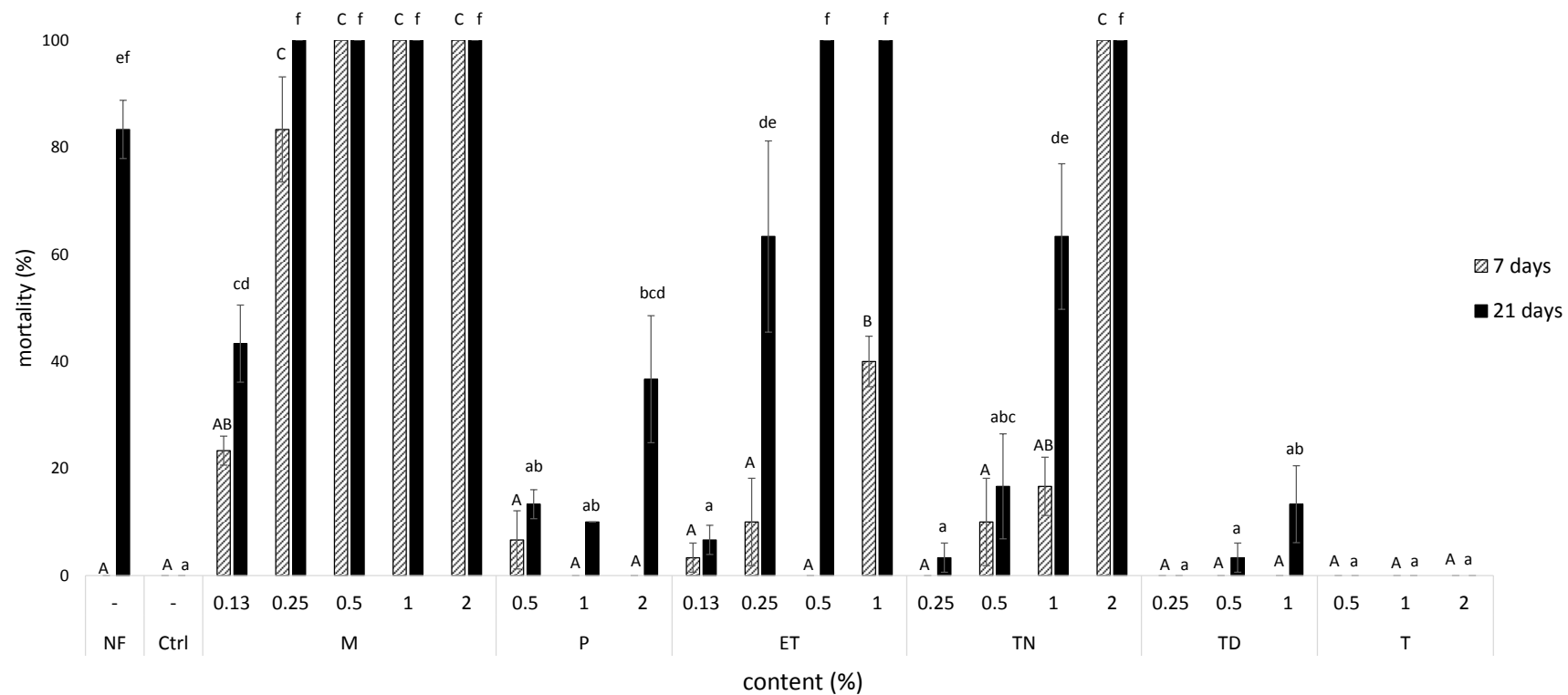


Fig. 3-10 Termiticidal activities after 7 and 21 days of thujopsene autoxidation compounds in the no-choice test.

M: mayurone, P: bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide, ET: epoxy thujopsanol, TN: thujopsanone, TD: thujopsadiene, T: thujopsene

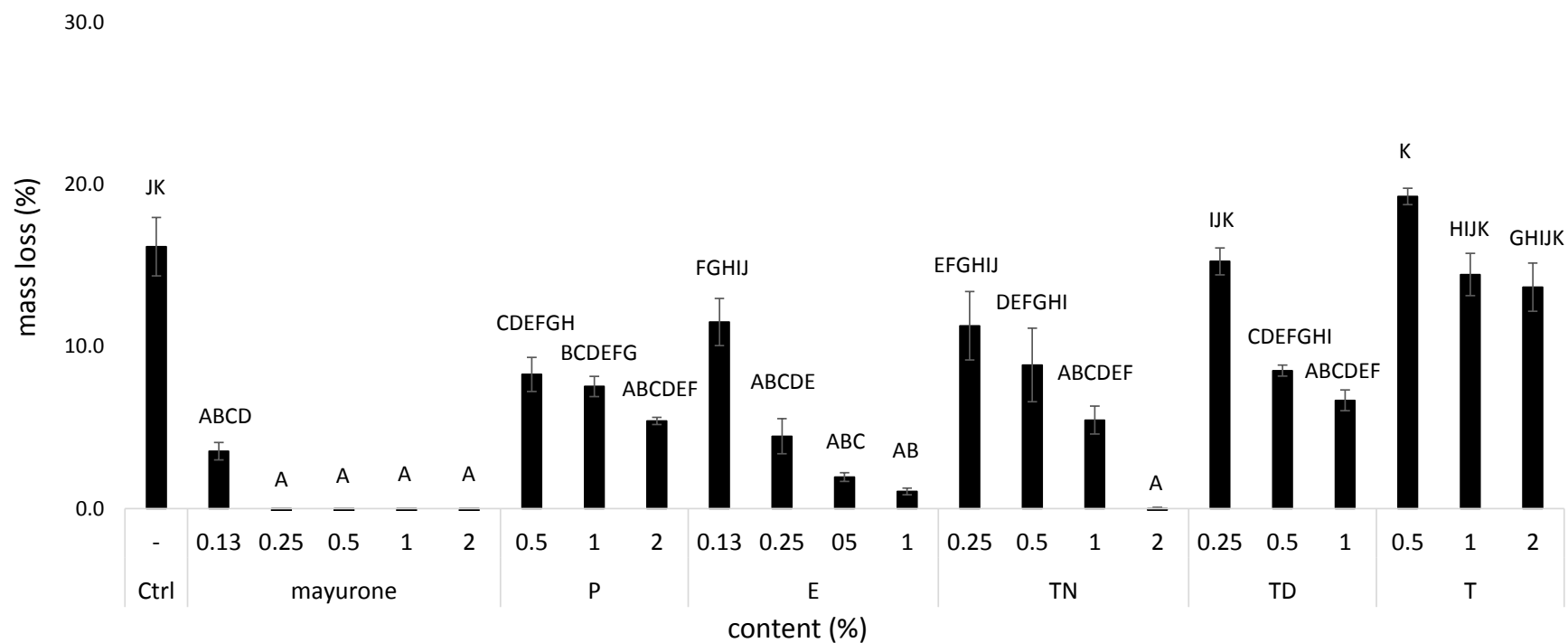


Fig. 3-11 antifeedant activities after 21 days of thujopsene autoxidation compounds in the no-choice test.

M: mayurone, P: bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide, ET: epoxy thujopsanol, TN: thujopsanone, TD: thujopsadiene, T: thujopsene

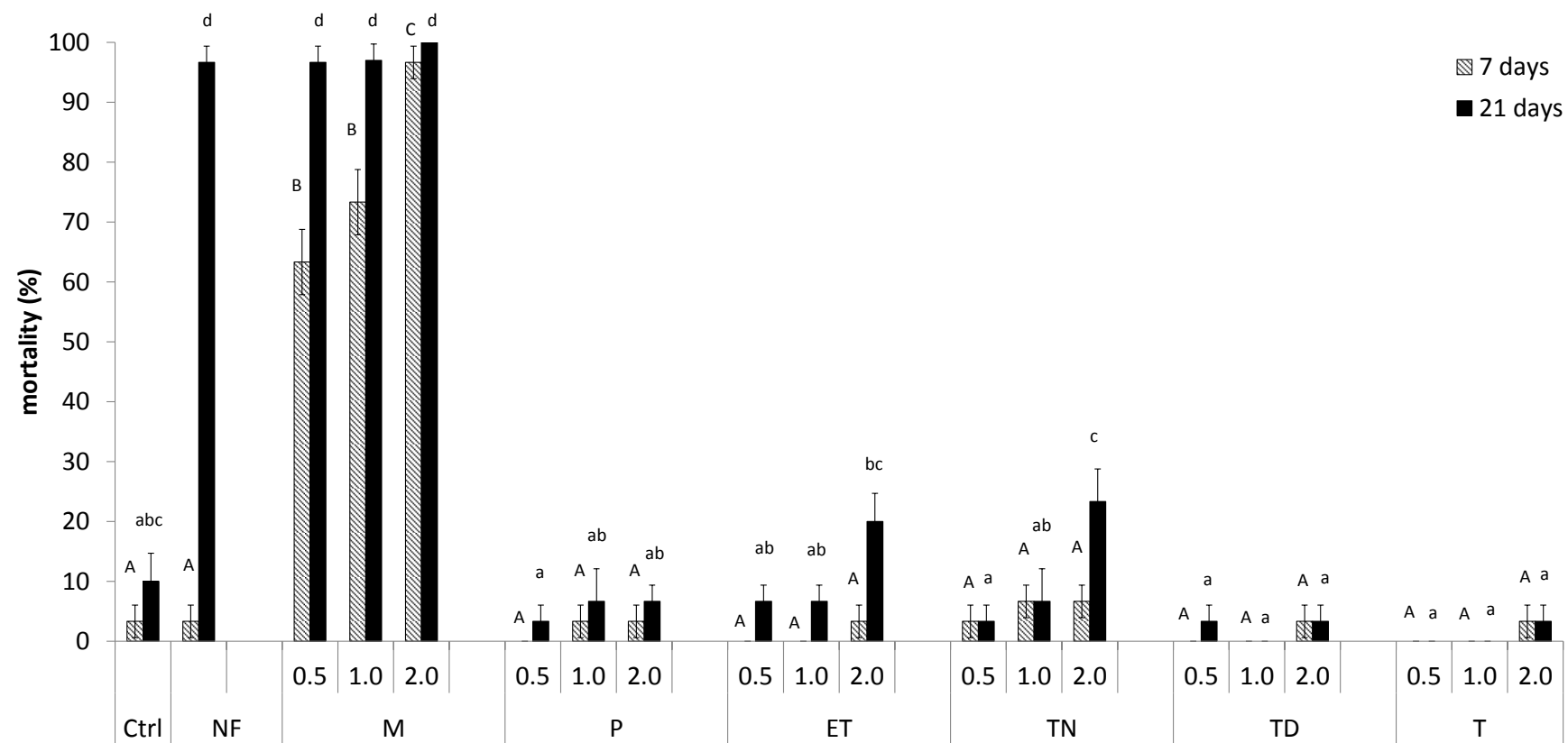


Fig. 3-12 Termiticidal activities after 7 and 21 days of thujopsene autoxidation compounds in the dual-choice test.

M: mayurone, P: bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide, ET: epoxy thujopsanol, TN: thujopsanone, TD: thujopsadiene, T: thujopsene

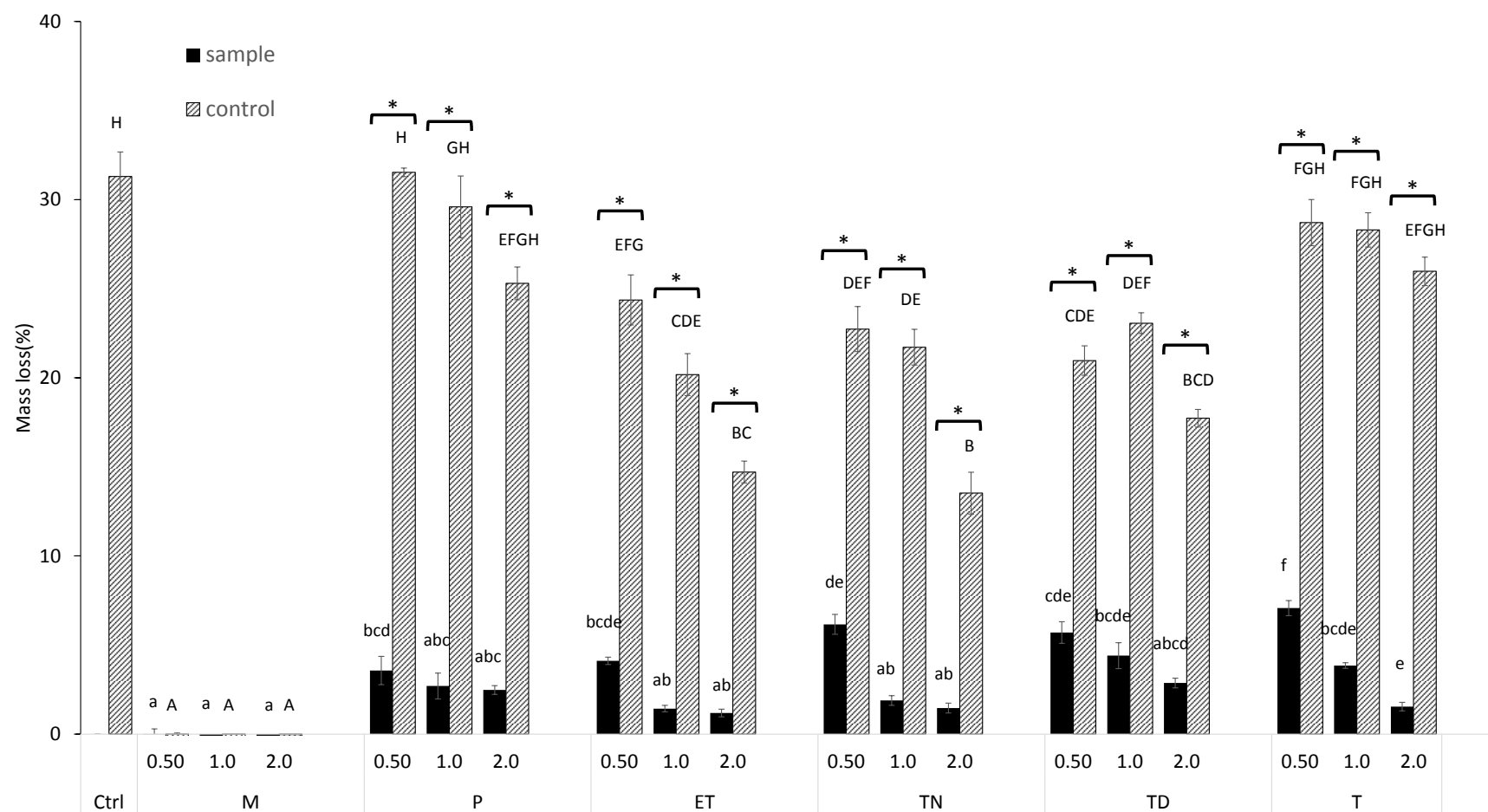


Fig. 3-13 Antifeedant activities after 21 days of thujopsene autoxidation compounds in the dual-choice test.

M: mayurone, P: bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide, ET: epoxy thujopsanol, TN: thujopsanone, TD: thujopsadiene, T: thujopsene

Asterisks denote a significant difference between sample and control papers; Tukey–Kramer test, $p < 0.05$

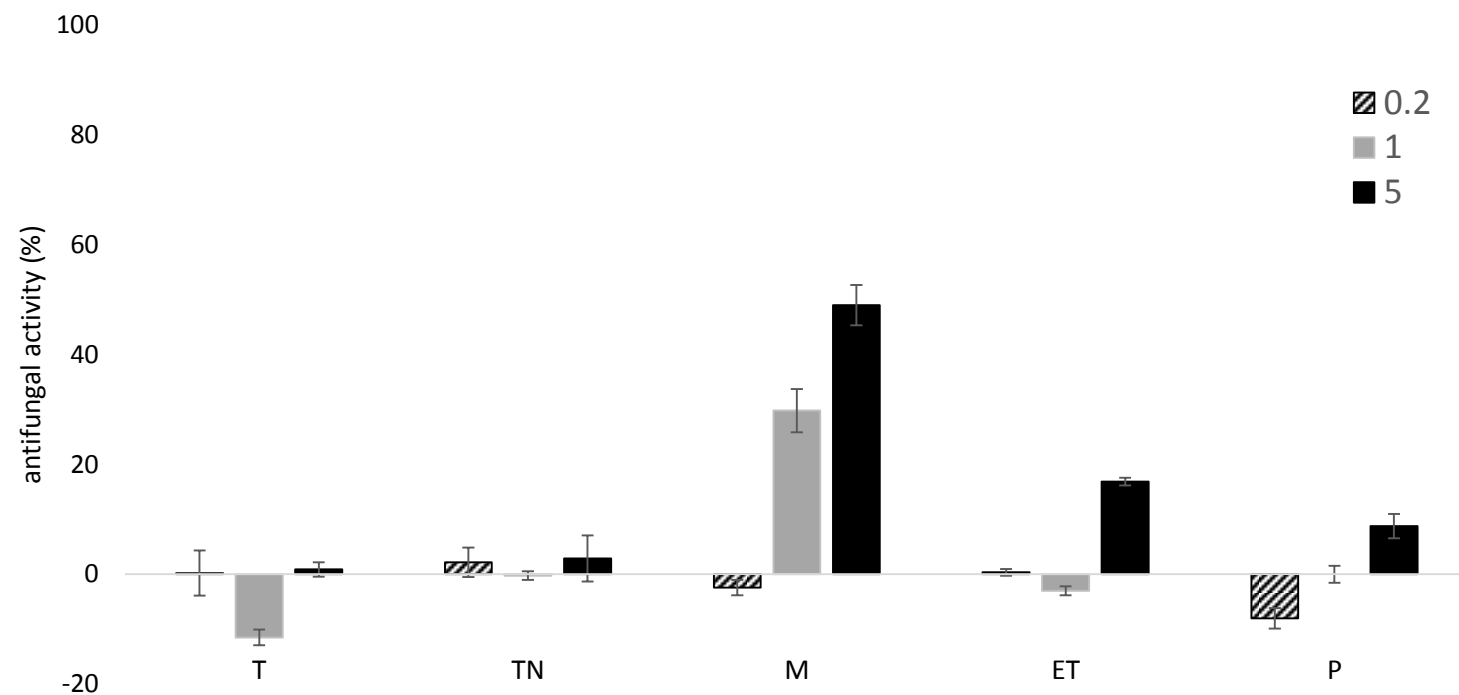


Fig. 3-14 Antifungal activities of thujopsene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ against *Trametes versicolor*

T: thujopsene, TN: thujopsanone, M: mayurone, ET: epoxy thujopsanol, P: bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide

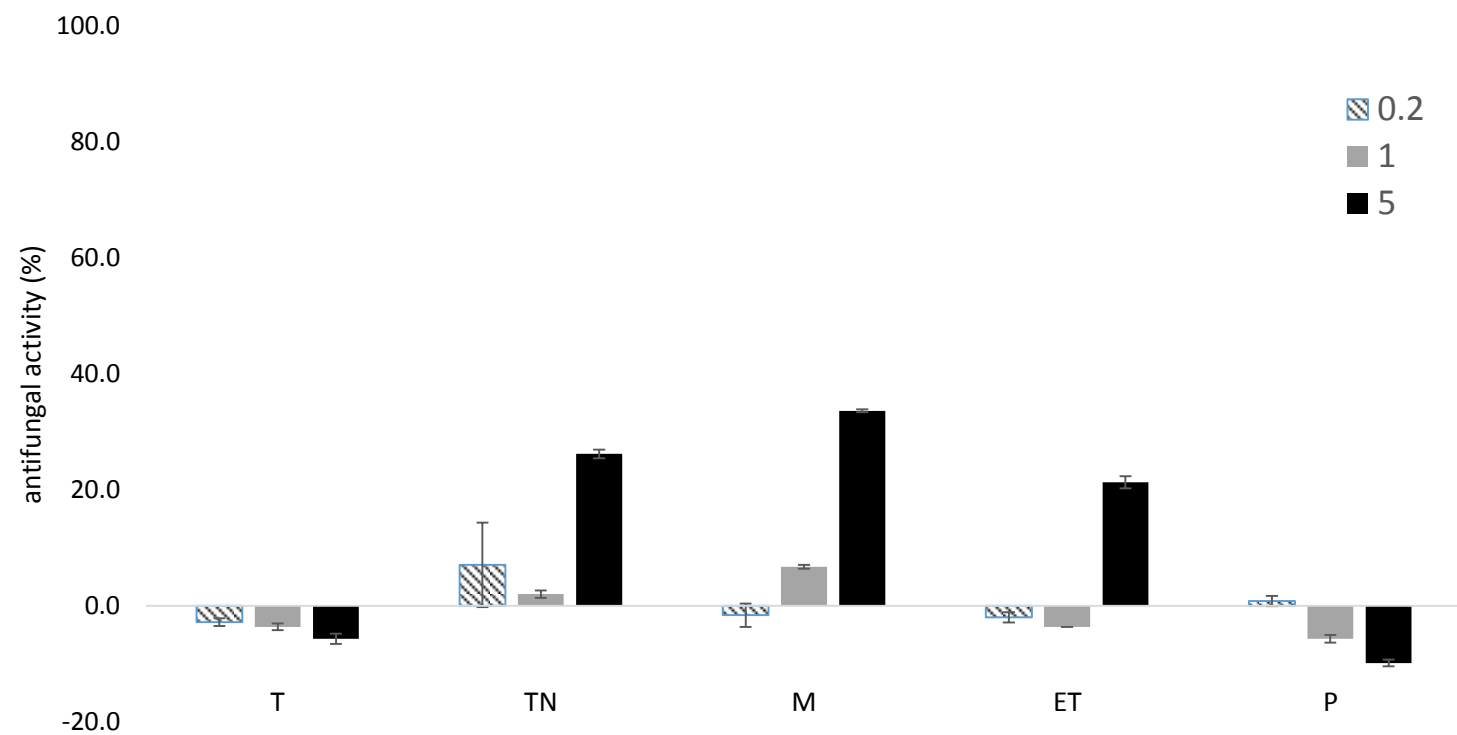


Fig. 3-15 Antifungal activities of thujopsene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 µg/cm² against *Lenzites betulinus*.

T: thujopsene, TN: thujopsanone, M: mayurone, ET: epoxy thujopsanol, P: bis(Δ9-thujopsen-8-yl) peroxide

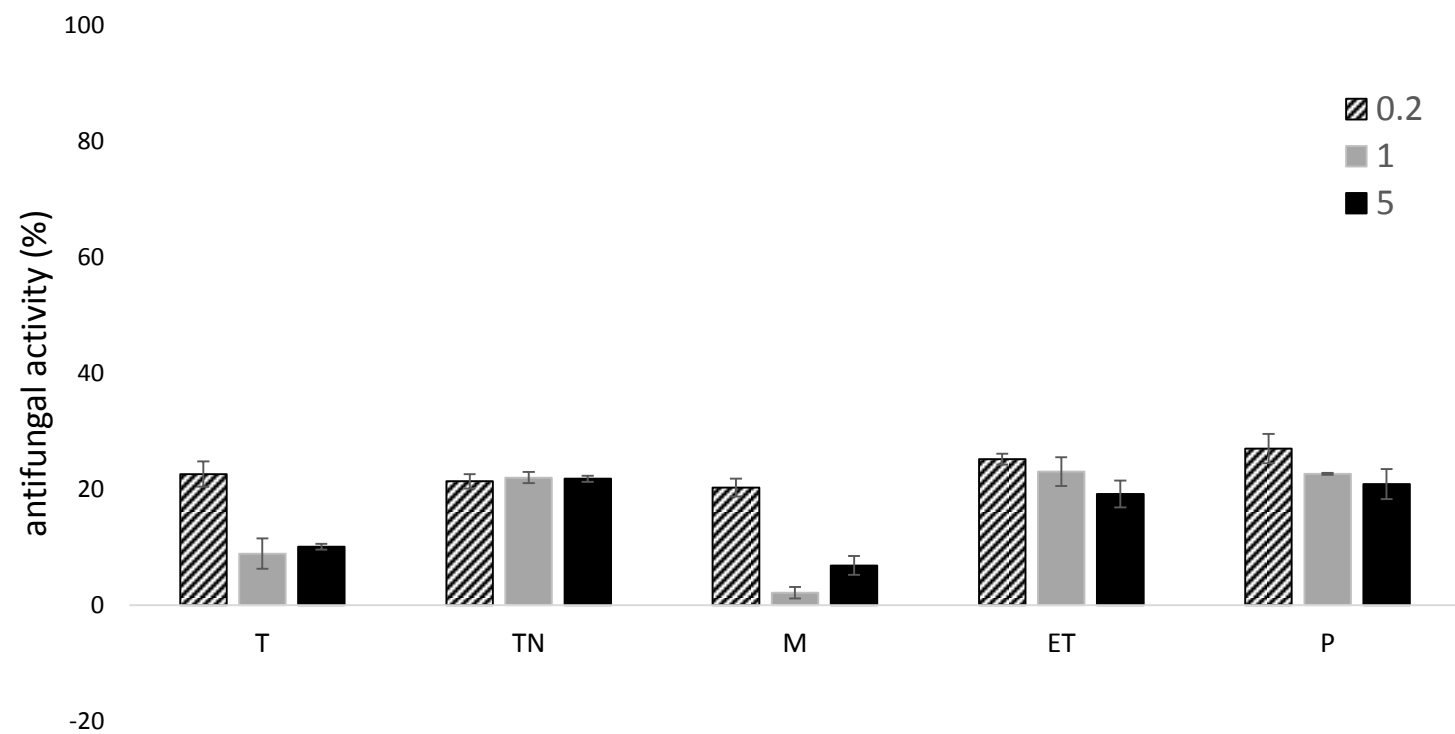


Fig. 3-16 Antifungal activities of thujopsene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 µg/cm² against *Gloeophyllum trabeum*

T: thujopsene, TN: thujopsanone, M: mayurone, ET: epoxy thujopsanol, P: bis(Δ⁹-thujopsen-8-yl) peroxide

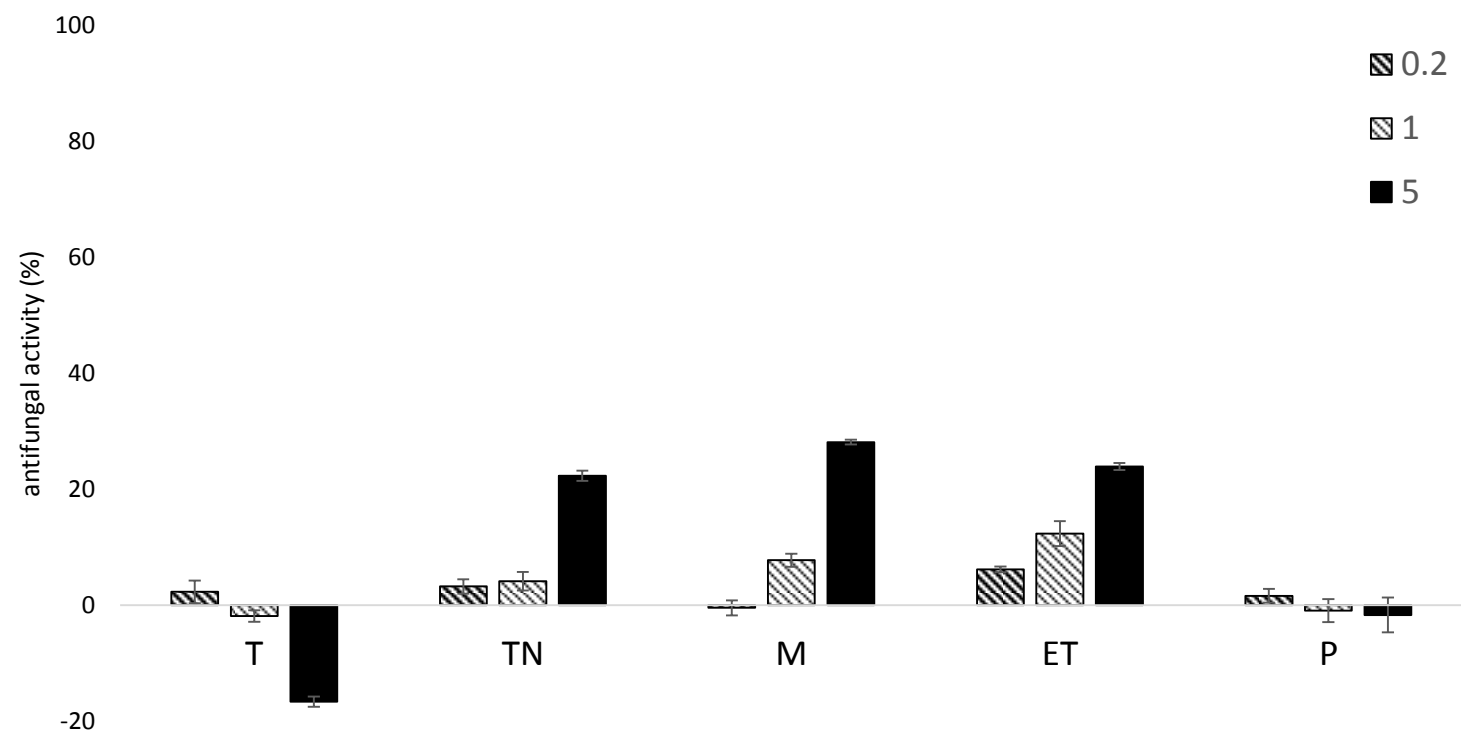


Fig. 3-17 Antifungal activities of thujopsene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ against *Trichoderma virens*

T: thujopsene, TN: thujopsanone, M: mayurone, ET: epoxy thujopsanol, P: bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide

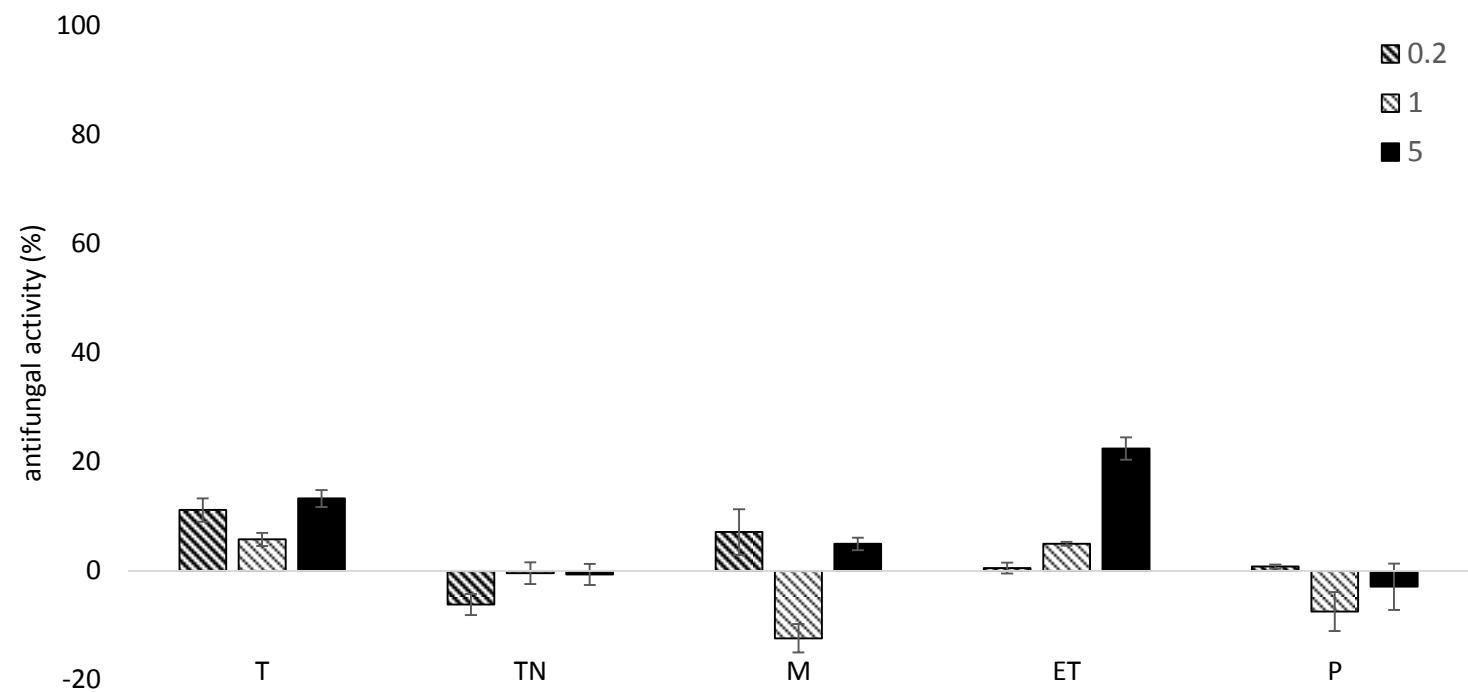


Fig. 3-18 Antifungal activities of thujopsene and its autoxidation products at concentrations of 5, 1, and 0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ against *Rhizopus oryzae* Went

T: thujopsene, TN: thujopsanone, M: mayurone, ET: epoxy thujopsanol, P: bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide

Table 3-2 Bioactivity of longifolene and its autoxidation products against select fungi

	T	T N	M	E T	P
<i>Trametes versicolor</i>					
5 µl/cm ²	0.86±1.3	2.9±4.2	49±3.7	17±0.7	8.8±2.2
1 µl/cm ²	-12±1.4	-0.30±0.81	30±3.9	-3.0±0.82	0.0±1.5
0.2 µl/cm ²	0.2±4.1	2.2±2.7	-2.4±1.4	0.33±0.59	-8.0±1.9
<i>Lenzites betulinus</i>					
5 µl/cm ²	-5.7±0.9	26.2±0.7	33.7±0.3	21.3±1.1	-9.9±0.6
1 µl/cm ²	-3.6±0.6	2.0±0.6	6.7±0.3	-3.6±0.0	-5.7±0.7
0.2 µl/cm ²	-2.8±0.7	7.1±7.3	-1.6±2.0	-2.0±0.9	0.8±0.9
<i>Gloeophyllum trabeum</i>					
5 µl/cm ²	14±2.3	7.6±2.0	4.1±0.21	25±2.1	60±2.4
1 µl/cm ²	-1.3±1.8	10±3.5	-1.1±4.0	22±2.4	27±0.4
0.2 µl/cm ²	-4.0±2.2	5.6±4.8	-6.3±1.9	11±4.8	22±0.6
<i>Trichoderma virens</i>					
5 µl/cm ²	3.5±1.8	15±0.75	12±1.3	35±1.7	92±0.25
1 µl/cm ²	-2.8±3.9	2.6±2.9	4.2±3.2	14±1.0	46±1.3
0.2 µl/cm ²	-2.2±1.8	-1.6±1.2	0.30±3.6	7.2±3.1	20±2.3
<i>Rhizopus oryzae</i>					
5 µl/cm ²	-14±1.8	-8.6±0.9	21±3.2	29±2.2	59±0.83
1 µl/cm ²	-11±1.9	-12±0.9	3.3±4.3	9.0±1.7	28±1.8
0.2 µl/cm ²	-4.6±2.1	2.8±0.6	3.4±2.5	4.2±0.6	9.0±2.1

Note: T: thujopsene, TN: thujopsanone, M: mayurone, ET: epoxy thujopsanol, P: bis(Δ⁹-thujopsen-8-yl) peroxide

第4節 小括

未利用抽出成分である longifolene や thujopsene の有効利用法の一つとして、自動酸化した生成物の生物活性を明らかにするため、抗蟻活性試験および抗菌活性試験を検討した。

Longifolene および longifolene 自動酸化生成物のヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) に対する PD 強制摂食試験および PD 選択摂食試験による抗蟻活性および木材腐朽菌などに対する抗菌活性を検討した。PD 強制摂食試験では殺蟻活性および摂食阻害活性を検討した。Longifolene の自動酸化の主要生成物である longicamphenylone は、中程度の殺蟻活性を示し、摂食阻害・摂食忌避活性を示した。しかしながら、抗菌活性はほとんど示さなかった。Norlongilactone は強い殺蟻活性および摂食阻害活性、摂食忌避活性を示した。木材腐朽菌に対して弱い活性を示し、*R. oryzae* には若干強い活性を示した。Longicamphenylol は強い殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示した。抗菌活性に関してはすべての菌に対して中程度の活性を示した。Longifolic acid は中程度の殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示した。抗菌活性では、longifolene 自動酸化生成物の中で最も強い活性を示した。Isolongifolic acid は中程度の殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示した。抗菌活性は longifolic acid の次に強い活性を示した。Longifolene oxide は中程度の殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示した。抗菌活性は *T. versicolor*, *G. trabeum* を除く菌に対して中程度の活性を示した。Longifolene-hydroxy ketone は longifolene 自動酸化生成物の中で最も強い殺蟻活性を示した。抗菌活性に関しては、すべての菌に対して中程度の活性を示した。

Longifolene 自動酸化生成物では、hydroxyl group を有する構造が強い抗蟻活性に関与していると推定した。また、carboxyl group が強い抗菌活性に寄与して

いると考えられる.

Thujopsene および thujopsene 自動酸化生成物のヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) に対する PD 強制摂食試験および PD 選択摂食試験による抗蟻活性並びに木材腐朽菌などに対する抗菌活性を検討した. 自動酸化の原料である thujopsene の活性は殺蟻活性・摂食阻害活性はなかったが, 摂食忌避活性は示し, 抗菌活性はほとんど示さなかった. Thujopsene の自動酸化の主要生成物である mayurone は, 最も強い殺蟻活性を示し, 抗菌活性については *T. versicolor* に対して中程度の抗菌活性を示し, *L. betulinus* および *T. virens* に対しては弱い活性を示した. bis(Δ^9 -thujopsen-8-yl) peroxide は弱い殺蟻活性および摂食阻害活性と摂食忌避活性を示し, 抗菌活性は *G. trabeum* に対して弱い活性を示したが, 顕著な活性は示さなかった. Epoxy thujopsanol は強い殺蟻活性および摂食阻害活性, 摂食忌避活性を示し, 抗菌活性はすべての菌類に弱い活性を示した. Thujopsanone は強い殺蟻活性および摂食阻害活性, 摂食忌避活性を示し, 抗菌活性は *G. trabeum* と *Trichoderma virens* に対しては弱い活性を示した. Thujopsene の自動酸化生成物は顕著な抗菌活性を示すものが少なかった.

Longifolene や thujopsene の自動酸化によって得られた化合物に抗蟻活性や抗菌活性等の生物活性を示すことが明らかになり, 自動酸化をすることによって生物活性が増加することが示された. また, 自動酸化による生成量は少ないが, 極めて強い生物活性を示すものも確認され, 抽出成分の利用の可能性が示された.

第4章 総括

近年、日本では戦後や高度経済成長期に植栽された人工林資源の効果的利用が強く求められている。樹木の樹種や生育環境によって違いのある抽出成分は、多様で付加価値の高い利用が期待できるため樹木資源の効果的な利用方法として期待されている。しかし、実際に利用されている成分は一部の化合物に限られている。特にセスキテルペン炭化水素である、マツ類心材成分の *longifolene* やヒノキアスナロ心材成分の *thujopsene* は多量に含有される成分であるが、化学特性や生物活性について未知な点が多く、他の成分が利用されているのに比べて効果的に利用されていない現状がある。さらに樹木がこれらの生物活性の低い成分をなぜ大量に合成するかといった化学生態学的見地からの役割解明の研究も進んでいない。一方、歪みの大きな構造を有するセスキテルペン類は酸素に曝されると特異な自動酸化挙動を示すことが知られており、*longifolene* や *thujopsene* も容易に自動酸化を受けることが知られている。しかしながらこれらの反応機構の詳細や生成物の生物活性の詳細は未知であった。そこで、本研究では、*longifolene* と *thujopsene* の自動酸化反応について検討するとともに、その自動酸化生成物の樹木害虫/害菌に対する活性（抗蟻活性、抗菌活性）を明らかにすることを目的とした。

第2章では、*longifolene* と *thujopsene* の熱処理による自動酸化の有効性と反応機構を明らかにすることを目的とし、*Longifolene* と *thujopsene* の室温および加熱処理による自動酸化をおこなった。*Longifolene* の室温による自動酸化では、*longicamphenylone* が主要生成物として検出され、この他にも *norlongilactone*, *longicamphenylol*, *longifolic acid*, *isolongifolic acid* が生成した。加熱処理による自動酸化では主要生成物は *longicamphenylone* であり、

この他にも norlongilactone, longifolic acid, isolongifolic acid, longifolene-hydroxy ketone の生成を確認した。室温と熱処理による自動酸化を比較すると室温では longicamphenylol が、熱処理では longifolene-hydroxy ketone の生成量が異なることが明らかになった。なお、熱処理では生成物は反応時間が長くなるにつれて収率が増加したことから、今回用いた温度範囲では加熱によって自動酸化が促進されたと考えられる。Thujopsene の室温による自動酸化では、mayurone が主要生成物として検出され、他に thujopsadiene, thujopsanone, epoxy thujopsanol の生成が確認された。加熱処理による自動酸化では主要生成物は mayurone であり、他に thujopsadiene, thujopsanone, epoxy thujopsanol の生成を確認した。このように室温と熱処理による自動酸化による生成物の相違は見られなかったことが確認された。なお熱処理ではそれぞれの生成物は反応時間が長くなるにつれて収率が増加したことから、今回用いた温度範囲では加熱によって自動酸化が促進されたと考えられる。室温と熱処理による自動酸化では両成分ともに生成物の構成に大きな違いはみられず、酸化による成分構成の多様化が進行する。両成分の自動酸化の主要生成物である longicamphenylone や mayurone を環境に配慮し、安価で短時間で得るには熱処理による自動酸化が有効的であると考えられる。

第 3 章では、longifolene と thujopsene の自動酸化生成物のヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) に対する抗蟻活性および木材腐朽菌に対する抗菌活性を検討した。自動酸化の原料である longifolene は殺蟻活性・摂食阻害活性は示さなかったが、忌避活性を示し、抗菌活性はほとんど示さなかった。Longifolene の自動酸化の主要生成物である longicamphenylone は、中程度の殺蟻活性を示し、摂食阻害・摂食忌避活性を示し、抗菌活性はほとんど示さなかった。Norlongilactone は強い殺蟻活性および摂食阻害活性、摂食忌避活性を示

し、木材腐朽菌に対して弱い抗菌活性、*R. oryzae* には若干強い抗菌活性を示した。Longicamphenylol は強い殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示し、菌に対して中程度の抗菌活性を示した。Longifolic acid は中程度の殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示し、longifolene 自動酸化生成物の中で最も強い抗菌活性を示した。Isolongifolic acid は中程度の殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示し、longifolic acid の次に強い抗菌活性を示した。Longifolene oxide は中程度の殺蟻活性、摂食阻害活性、摂食忌避活性を示し、*T. versicolor*, *G. trabeum* を除く菌に対して中程度の抗菌活性を示した。Longifolene-hydroxy ketone は longifolene 自動酸化生成物の中で最も強い殺蟻活性を示し、すべての菌に対して中程度の抗菌活性を示した。ヤマトシロアリと菌類に対して強い活性のある成分が異なっていたことから、自動酸化によって多種多様な生物活性を示す成分が生成されることが明らかになった。Longifolene が抗蟻および抗菌活性をほとんど示さないのに対して、そのすべての自動酸化生成物は抗蟻および抗菌活性の両方、あるいはどちらかの活性を示し、自動酸化によって生物活性は増加することが明らかになった。特に hydroxyl group を有する構造は強い抗蟻活性に関与していると推定した。また、carboxyl group が強い抗菌活性に寄与していると考えられる。Thujopsene 自動酸化生成物の活性試験では、原料である thujopsene は、longifolene と同様に、殺蟻活性・摂食阻害活性を示さなかったが、摂食忌避活性を示し、抗菌活性はほとんど示さなかった。Thujopsene の自動酸化の主要生成物である mayurone は、最も強い殺蟻活性を示し、抗菌活性については *T. versicolor* に対して中程度の抗菌活性を示し、*L. betulinus* および *T. virens* に対しては弱い活性を示した。bis(4th-thujopsen-8-yl) peroxide は弱い殺蟻活性および摂食阻害活性と摂食忌避活性を示し、抗菌活性は *G. trabeum* に対して弱い活性を示したが、顕著な活性は示さなかった。

Epoxy thujopsanol は強い殺蟻活性および摂食阻害活性，摂食忌避活性を示し，抗菌活性はすべての菌類に弱い活性を示した．Thujopsanone は強い殺蟻活性および摂食阻害活性，摂食忌避活性を示し，抗菌活性は *G. trabeum* と *Trichoderma virens* に対しては弱い活性を示した．Longifolene と比較して thujopsene の自動酸化生成物は顕著な抗菌活性を示すものが少なかったが，thujopsene においても自動酸化生成物の活性が原料よりも高く，自動酸化反応を経ることで樹木害虫や害菌に対する活性成分へ変化することが示された．

以上の研究結果から，longifolene や thujopsene は容易に自動酸化され，加熱処理によって自動酸化が促進されることが明らかになった．自動酸化によって得られた生成物は新たに抗蟻活性や抗菌活性を示し，極めて強い活性を表す成分も確認された．本研究によって，未利用セスキテルペン成分は自動酸化法を用いることによって有害な生物に対する防除剤に利用できる可能性が示された．また，樹木害虫や害菌に対する自動酸化生成物の活性評価の結果から，森林生態系の中における樹木の防御機構に成分の自動酸化反応が関与していることも示唆された．

引用文献

- Adams RP (2012) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry 4th edition. Alluredbooks
- Ahn YJ, Lee SB, Okubo T, Kim M (1995) Antignawing factor of crude oil derived from *Thujopsis dolabrata* S. et Z. var. *hondai* sawdust against mice. Journal of Chemical Ecology 21(3) :263-271
- Ashitani T, Nagahama S (1999) Direct episulfidation of caryophyllene and humulene. Nat Prod Lett 13:163–167
- Ashitani T, Borg-Karlson AK, Fujita K, Nagahama S (2008) Reaction mechanism of direct episulfidation of caryophyllene and humulene. Nat Prod Res 22:495–498
- Ashitani T, Kusumoto N, Borg-Karlson AK, Fujita K, Takahashi K (2013) Antitermite activity of b-caryophyllene epoxide and episulfide. Zeit Naturforsch 68C:302–306
- 芦谷 竜矢 (2013) 樹木抽出成分の生物活性-未利用セスキテルペン成分の自動酸化と抗蟻活性-グリーンスピリッツ, 8(2):3-7
- Ashitani T, Garbouï SS, Schubert F, Vongsombath C, Liblikas I, Palsson K, Borg-Karlson AK (2015) Activity studies of sesquiterpene oxides and sulfides from the plant *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) and its repellency on *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol 67:595–606
- Baya M, Soulounganga P, Gelhaye E, Gerardin P (2001) Fungicidal activity of beta-thujaplicin analogues. Pest Management Science 57(9):833-838
- Bowman MR, Chambers A, Jackson RW (1966) The Epoxidation of p-Menth-1-and-3-ene. Journal of the Chemical Society : 612-615

- Debell JD, Morrell JJ, Gartner BL. (1997) Tropolone content of increment cores as an indicator of decay resistance in western redcedar. *Wood Fiber Sci.* 29: 364-369
- Debell JD, Morrell JJ, Gartner BL. (1999) Within-stem variation in tropolone content and decay resistance of second growth western redcedar. *For. Sci.* 45: 101-107
- Dimitrov V, Rentsch HG, Linden A, Hesse M (2003) The Ozonolysis of Longifolene: A Tool for the Preparation of Useful Chiral Compounds. Configuration Determination of New Stereogenic Centers by NMR Spectroscopy and X-Ray Crystallography. *HELVETICA CHIMICA ACTA* 86:106-121
- Gordien AY, Gray AI, Franzblau SG, Seidel V (2009) Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 126 :500-505
- 博多宏一 (2010) ロジン変性フェノール樹脂. ネットワークポリマー 31(5):248-255
- Harborne, JB (1981) ハルボーン化学生態学. 文英堂 pp. 195-250
- Himejima M, Hobson KR, Otsuka T, Wood DL, Kibo I (1992) Antimicrobial terpene from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. *Journal of Chemical Ecology* 18 (10) :1809-1818
- Inamori Y, Sakagami Y, Morita Y, Shibata M, Sugiura M, Kumeda Y, Okabe T, Tsujibo H, Ishida N (2000) Antifungal activity of hinokitiol-related compounds on wood-rotting fungi and their insecticidal activities.

- Biological and Pharmaceutical Bulletin 23(8):995-997
- Ito S, Takeshita H, Muroi T (1969) Sensitized Photooxidation of Thujopsene; Synthesis of Thujopsadiene. Tetrahedron Letter 36:3091-3094
- Joshi AP, Nayak UR, Dev S (1976) Studies in sesquiterpenes-L 3-hydroxy-longifolaldehyde, the elusive intermediate in the abnormal perbenzoic acid oxidation of longifolene. Tetrahedron 32:1423-1425
- 川村實平 (1930) ひば材揮發油成分ノ化學的研究. 林業試験彙報 30:59-89
- Kim HK, Moon E, Kim YS, Choi US, Son WM, Choi ZS, Lee RK (2013) Bioactive Sesquiterpenes from the essential oil of *Thuja orientalis*. Planta Medica 79:1680-1684
- 飯泉新吾 (1975) 新実験化学講座 15, 丸善, 1975, p.685
- 笠野雅信, 松原義治 (1978) ロンギホレンの四酢酸鉛酸化. 油化学 27(5):309-311
- Kusumoto N, Ashitani T, Hayasaka Y, Murayama T, Ogiyama K, Takahashi K (2009) Antitermitic activities of abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum* cones. J Chem Ecol 35:635-642
- Laurence G. C, Keni J. (1995) Thujopsene- and cis-muurolane-related sesquiterpenoids from *Cupressus Bakeri*. Phytochemistry 40(1) :177-181
- Lhomme J, Ourisson G (1964) Longifolene (VIII) – mechanism of oxidation of longifolene by peracids (in French). Bulletin de la Societe Chimique de France 5 :1888-1889
- Manter DK, Kelsey RG, Karchesy JJ (2007) Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. Journal of Chemical Ecology 33 :2133-2147

- 松井隆尚, 松下洋一, 菅本和寛, 徳田陽之助, 小玉義和, 中田一則, 小田誠, 山内博利 (2000) スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 材の炭化生成物の調製と分析. 日本化学会誌 1:53-61
- Martin D, Bohlmann J (2005) Molecular biochemistry and genomics of terpenoid defenses in conifers. in Chemical Ecology and Phytochemistry of Forest Ecosystems, Elsevier :29-56
- Morikawa T, Ashitani T, Kofujita H, Takahashi K (2014) Antitermitic activity of extracts from *Chamaecyparis obtuse* branch heartwood. European Journal of Wood and Wood Products 72:651-657
- Nagahama S, Tazaki M (1987) Terpenoides X. natural autoxidation of thujopsene. Bull Chem Soc Jpn 60:4453-4454
- 長濱静男, 岩岡達矢, 芦谷竜矢 (2000) スギ材油のテルペノイド成分 (第 6 報). 木材学会誌 46(3):225-230
- Nayak UR, Dev S (1963) Studies in Sesquiterpenes – XIX. *Tetrahedron* 19:2269-2280
- 野村 正人, 藤原 義人 (1988) ロンギホレンオキシド, イソロンギホレンオキシド及び β -カリオフィレンオキシドの合成ゼオライト存在下でのギ酸による分解反応 テルペン類の合成ゼオライトを触媒とする反応(その 6). 油化学 37 : pp.97-101
- Oh I, Yang WY, Park J, Lee S, Mar W, Oh KB, Shin J (2011) In vitro Na⁺/K⁺-ATPase inhibitory activity and antimicrobial activity of sesquiterpenes isolated from *Thujopsis dolabrata*. Archives of Pharmacal Research 34(12) :2141-2147
- Ohta A, Zhang L (1994) Acceleration of mycelial growth and fruiting body

production of edible mushrooms by wood vinegar fractions. Mokuzai Gakkaishi 40:429-433

大平辰朗, 宮澤三雄 (2016) テルペン利用の新展開 シーエムシー出版

林野庁 編 (2016) 森林・林業統計要覧 2016 全国林業改良普及協会. pp.8-10

林野庁 編 (2016) 平成 28 年度森林林業白書 全国林業改良普及協会.

林野庁 編 (2017) 平成 29 年度森林林業白書 全国林業改良普及協会.

Sweet LI, Meier PG (1997) Lethal and sublethal effects of azulene and longifolene to Microtox®, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, and *Pimephales promelas*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 58 :268-274

辻本敬 (2011) 植物油脂を基盤とする軟質バイオベースポリマーの開発 日本接着学会誌 47(6):230-235

Tsuruta K, Yoshida Y, Kusumoto N, Sekine N, Ashitani T, Takahashi K (2011) Inhibition activity of essential oils obtained from Japanese trees against *Skeletonema costatum*. Journal of Wood Science 57 :520–525

Yatagai M, Unrinin G (1989) Germination and growth regulation effects of wood vinegar components and their homologs on plant seeds –Acids and neutrals-. Mokuzai Gakkaishi 35:564-571

谷田貝光克 (2006) 植物抽出成分の特性とその利用. 八十一出版 pp.32-54

謝辞

本研究を遂行するにあたって，御指導，御鞭撻を賜りました山形大学農学部食料生命環境学科の芦谷竜矢教授，高橋孝悦教授，岩手大学農学部共生環境課程小藤田久義教授，弘前大学農学生命科学部応用生命工学科の橋本勝教授に心より感謝し，御礼申し上げます．

また，崇城大学長浜静男名誉教授には，本研究に用いた試料を提供していただき，御礼申し上げます．

最後に，実験の遂行ならびに論文執筆に際しご協力してくださった山形大学農学部食料生命環境学科森林資源利用学研究室の学生の皆様，そして家族に心より感謝いたします．

Summary

Currently, development of new utilization methods is strongly required for forest materials in Japan. The use of chemical components contained in woody material is regarded as a promising method for non-construction forest material and woody wastes. Many components in wood extracts have various functions, including anti-fungal, anti-insect, and insect-attractant. However, studies on bioactivities for sesquiterpene hydrocarbons are limited. Sesquiterpene hydrocarbons with high steric hindrance are easily autoxidized. The oxidation which occurs under natural conditions is an easy synthesis method to convert the sesquiterpene into useful bioactive compounds. In addition, natural autoxidation is advantageous in that the reaction proceeds automatically without catalysis or special instruments, as compared with other methods such as hydroxylation or isomerization.

Longifolene is a main sesquiterpene component of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii*. Thujopsene is a component of sesquiterpene hydrocarbons in useful coniferous woods such as *Thujopsis dolabrata*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecypress obtusa*. Low-polarity extracts of pine and Hiba wood consist mainly of terpenoid components, which are useful products. Monoterpenes—such as α -pinene, β -pinene of Pinus wood, and hinokitiol (β -thujaplicin) of Hiba wood—in the extracts are used as flavor and/or medical materials, and the resin components of diterpenes are used as sizing reagents during pulping. However, longifolene and thujopsene, which account for most of the sesquiterpenes in the extracts, have not been regarded as a useful component compared with the mono- and di-terpenes. Thus, characterization of longifolene and thujopsene will not only lead to the elucidation of the terpenoid reaction, but it will also enhance the use of wood extracts. However, the mechanism for the natural autoxidation of longifolene, as well as the bioactivities of its products, has yet to be reported in detail. Specific autoxidation of thujopsene has been known about since the 1930s. In the 1960s, active studies were conducted concerning the structure decision and the chemical reaction of thujopsene. The reaction mechanism via the peroxide dimer of thujopsene is known for

thujopsene autoxidation but bio-activity of the autoxidation products has yet to be studied. Therefore, to obtain fundamental knowledge for longifolene and thujopsene autoxidation, I examined the reaction at high temperatures and the bioactivities of its products against termites and wood-rot fungi.

In the second chapter, reaction and products of autoxidation for longifolene and thujopsene were investigated. Autoxidation was examined by heating and non-heating (room temperature) methods. A longifolene sample was autoxidized at 120 °C or room temperature, and the products were analyzed by gas chromatography. Longicamphenylone, norlongilactone, isolongifolic acid, longifolic acid, and longifolene-hydroxy ketone were detected as the autoxidation products at 120 °C. During the reaction, longifolene was converted into the other autoxidation products via the formation of longifolene oxide as an intermediate. In the non-heating method, when longifolene was placed at room temperature for 3 years, longifolene, longicamphenylone, norlongilactone, longifolic acid, isolongifolic acid, and longicamphenylol were detected as the main products, with longicamphenylone having the highest yield. Longicamphenylol was not detected following autoxidation at 120 °C. It was considered that the longicamphenylol would be converted into longicamphenylone by further oxidation under high temperature conditions. In contrast, longifolene-hydroxy ketone was not detected following autoxidation at room temperature. Concerning longifolene-hydroxy ketone formation, rearrangement with ring expansion occurred in addition to oxidation. Therefore, high temperature conditions were needed to supply energy for longifolene-hydroxy ketone formation.

Oxidation products of thujopsene at 100 °C and room temperature were analyzed by gas chromatography. Thujopsene rapidly disappeared and reacted faster than longifolene. Mayurone, epoxy thujopsanol, thujopsanone, and thujopsadiene were detected as the autoxidation products by GC analysis. These compounds and bis(*Δ*⁹-thujopsen-8-yl) peroxide as an intermediate of the reaction were isolated from room temperature autoxidation products. Because autoxidation of longifolene and

thujopsene proceeded faster at higher temperature than at room temperature, the reaction was accelerated by heating and products could be controlled by setting the reaction temperature.

In the third chapter, bioactivities of the autoxidation products of longifolene and thujopsene were examined against termite and wood-rot fungi. Anti-termite activities of the longifolene and thujopsene autoxidation products were examined against a Japanese subterranean termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe) by paper disk methods in Petri dishes. Anti-fungal activities of the autoxidation products were investigated with white-rot fungi (*Trametes versicolor* and *Lenzites betulinus*), brown-rot fungi (*Gloeophyllum trabeum*), and soft-rot fungi (*Trichoderma virens* and *Rhizopus oryzae*).

Longifolene and the autoxidation products exhibited anti-termite activities, and all the autoxidation products had stronger termiticidal and antifeedant activities than did longifolene. All the autoxidation products had stronger lethal and/or antifeedant activities for termites than did longifolene, and longifolene-hydroxy ketone showed potent termiticidal activity. Longifolene showed very little to no anti-fungal activity against any of the fungi. Its autoxidation products, longicamphenylol, longifolic acid, longifolene oxide, and longifolene-hydroxyketone, did show anti-fungal activities. In particular, longifolic and isolongifolic acid demonstrated strong anti-fungal activity.

In anti-termite activities of the thujopsene and its autoxidation products, mayurone exhibited the highest termiticidal activities among the isolated compounds. The autoxidation product of thujopsene showed no strong activity other than mayurone against *T. versicolor* in an anti-fungal activity test. Mayurone, which is the main product of the autoxidation of thujopsene, showed the strongest anti-termite activity, and showed moderate antibacterial activity against *T. versicolor*. However, little activity was shown for other fungi.

From the above results, longifolene and thujopsene were easily autoxidized and it was revealed that

autoxidation was promoted by heat treatment. The product obtained by autoxidation was newly anti-termite and anti-fungal activity, thus indicating that longifolene and thujopsene can be converted easily into bioactive components by autoxidation. Application to the unused component of the autoxidation leads to the synthesis of novel useful compounds and is therefore very effective for the utilization of woody materials.