

スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 樹皮抽出成分
の化学的特性と生物活性

Chemical characterization and bioactivity of Sugi
(*Cryptomeria japonica* D. Don) bark extract

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)

西條 裕美

2015

目次

第1章 緒言	1
第1節 研究背景.....	1
第2節 研究目的	4
第2章 スギ樹皮抽出成分の赤潮藻類に対する活性	5
第1節 序論.....	5
第2節 実験方法.....	9
2.1 スギ樹皮の逐次抽出.....	9
2.2 赤潮藻類の培養	9
2.2.1 <i>Heterosigma akashiwo</i> の培養.....	9
2.2.2 赤潮藻類の保存・培養培地 (f/2 培地).....	9
2.3 赤潮藻類増殖抑制試験.....	10
2.3.1 試料調製	10
2.3.2 試験方法.....	10
2.4 成分分析.....	10
2.4.1 機器分析	10
2.4.2 内樹皮へキササン抽出物からの成分の単離.....	11
2.5 統計解析.....	11
第3節 結果と考察.....	14
3.1 スギ樹皮の逐次抽出.....	14
3.2 スギ樹皮逐次抽出物の増殖抑制試験	14
3.3 スギ樹皮逐次抽出物の成分分析.....	15
3.4 スギ樹皮成分の増殖抑制試験.....	16
第4節 小括	30

第3章 スギ樹皮抽出成分の抗酸化活性及び抗酸化機構	31
第1節 序論.....	31
第2節 実験方法.....	34
2.1 抗酸化試験	34
2.1.1 フリーラジカル捕捉能試験	34
2.1.2 β-カロテン退色法	35
2.1.3 リノール酸法.....	36
2.2 リノール酸メチル中の ferruginol 誘導体の定量分析.....	36
2.3 7β-hydroxyferruginol の合成	37
2.4 Ferruginol と DPPH の反応生成物の分析.....	37
第3節 結果と考察.....	38
3.1 抗酸化活性試験.....	38
3.2 リノール酸メチル中の ferruginol 誘導体の GC-MS による分析	39
3.3 各種溶媒における ferruginol と DPPH の反応	40
3.4 Ferruginol 抗酸化機構の推察	40
第4節 小括.....	50
第4章 スギ樹皮抽出成分の変異と変化	51
第1節 序論.....	51
第2節 実験方法.....	54
2.1 スギ樹皮及びスギ葉の抽出	54
2.1.1 試料採取	54
2.1.2 試料の抽出.....	54
2.1.3 成分分析.....	54
2.2 Ferruginol の自動酸化.....	55

第3節 結果と考察.....	56
3.1 スギ樹皮低極性抽出物のスギ葉のジテルペンタイプによる差異	56
3.2 Ferruginol の自動酸化	57
第4節 小括.....	69
第5章 総括	70
参考文献	74

謝辞

Sammary

第1章 緒言

第1節 研究背景

現在、日本の森林は、戦後植林されたスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don)・ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)を中心に利用可能な資源が充実しつつある。その齢級構成を、1966年と2012年で比較すると、10歳級以上の面積は47万haから235万haに増加しており(林野庁 2014, 2012)、供給ポテンシャルは高まっているといわれている。中でも、人工林ではスギの植林面積、蓄積量、及び林業における素材生産量が最も多いことが知られている(林野庁 2014)。

近年、バイオマス・ニッポン総合戦略に示されているように、木質バイオマスの有効利用が政策的に推進されており、その研究等が盛んに行われている(農林水産省 2011)。日本で排出される木質バイオマスは、未利用間伐材等800万トン、工場残材340万トン、建設発生材410万トンもの量が発生しており、そのうち工場残材、建設発生材は、燃料利用を主として9割以上使用され、年々その利用割合は増加しているが、未利用間伐材等は林内に放置されているのが現状である(林野庁 2014)。2008年の資料(農林水産省 2008)では、木材工業における残廃材のうち15%が樹皮排出量となっており、樹皮は他部位に比べ利用率が低く、13%(223千m³)が廃棄されていた。バイオマス利用が進んだ現在でも、これら樹皮は主に燃料利用などでしか利用されておらず、未利用間伐材に含まれる木材樹皮を考慮すると、樹皮の付加価値の高い利用を研究する必要があると考えられる。

スギ樹幹部の樹皮量は、林齢に関わらず、立木地上部の総現存量の6~7%(乾重量換算)存在することが推察されており(島地ら 1983)、上記のスギを主

とした日本の林業の状況を顧みるとその潜在的供給可能量は多量である。スギ樹皮の利用法の現状としては、エタノールの生産 (大原 2007)、木質チップ (関野ら 2011)、木質ペレット (武田ら 2011)、土壌改良材 (杉本ら 2002)、樹皮パネル (関野ら 2007)、高分子材料 (芦谷ら 2011) などが試みられている。

一方、樹木の成分は、様々な生物活性を有する成分が知られているが、スギ樹皮においても、樹皮成分の抗菌活性 (Kofujita et al. 2006, 2002, Yoshimoto et al. 1986)、抗細菌活性 (Li et al. 2008)、植物生長抑制 (青山ら 1983) が知られている。またスギ樹皮の特徴として、木部と比べて特に多量の副成分を含むことが知られている。従って付加価値の高い利用を考えるには、抽出成分の利用を拡大する必要がある。しかしながらスギ樹皮の抽出成分については、木部抽出成分と比較して、知見の蓄積が少ないのが現状である。スギ木部精油や葉の葉油などは、実際に製品として販売されているが、樹皮抽出成分はそのような利用の段階には至っていない。心材や葉成分については、品種での差異まで明らかになっている (長濱ら 2000, 安江ら 1976, 1978) のに対し、樹皮成分についてはそれらの違いも不明である。そのため、スギ樹皮成分の付加価値の高い利用を図るために、樹皮抽出成分をさらに調べる必要があると考えた。

また近年、資源利用法として、カスケード利用が提案されている (環境省 2012)。カスケード利用とは多段階利用のことで、木材を例として挙げると、建材等の資材として利用した後、ボードや紙等の利用を経て、最終段階で燃料として使用するような利用法である (林野庁 2014)。しかしながら、現在の木質資源のカスケード利用法は主に物理的な利用のみが提案されており、より効率的な資源利用を行うために、化学的、生物学的な利用法にも拡大されるべきである。

さらにスギ樹皮の利用に関する研究では、樹皮抽出成分が利用の障害になっ

ている研究も報告されている。例えば、樹皮に含まれる成分が植物生育に影響することから、スギ樹皮に硫酸鉄処理（久田ら 2009）や、界面活性剤添加、同様に硫酸鉄処理（稲本ら 2011）を行い樹皮堆肥として使用、またカラマツ（*Larix kaempferi*）、エゾマツ（*Picea jezoensis*）樹皮を使用した試験で野積にした樹皮を土壌改良材として使用する（田近 1991）研究が行われている。しかしながら、このような処理は、手間やコストがかかることが予想されることに加え、樹皮が持つ抽出物の能力を十分活用出来ていない。カスケード利用の概念を踏まえると、既知の活性に加え、スギ樹皮抽出成分の新たな活性を検討することにより、利用法に合わせスギ樹皮から有用成分を抽出し、抽出成分利用を行い、残渣を建材、高分子材料、堆肥や土壌改良材などの材料または燃料として使用することが望ましいと考えられる。

第 2 節 研究目的

前節の内容を踏まえ、本研究では、スギ樹皮抽出成分利用を図るため、スギ樹皮成分の新たな生物活性の探索と含有する成分の特性について検討することを目的とした。なお、樹皮では最も内側の周皮のコルク組織を境にして、それより内側の形成層からコルク皮層は内樹皮、また外側の死滅している組織は外樹皮と呼ばれている（吉永 2011, 重松 1960）。スギの内樹皮、外樹皮は成分構成が異なることが知られている（芦谷ら 2001）ことから、本研究では、樹皮を内樹皮、外樹皮に分けて扱うこととした。

第 2 章では、沿岸で問題になっている赤潮の防除剤へのスギ樹皮抽出物の新たな利用を検討するために、スギ樹皮抽出成分の赤潮藻類に対する活性試験を行った。第 3 章では、スギ樹皮抽出成分の主成分である **ferruginol** に焦点を当て、抗酸化剤としての利用の検討とその抗酸化機構について検討した。第 4 章では、スギ樹皮抽出成分の特性について、品種ごとの差異を調べるとともに、**ferruginol** の自動酸化過程を追跡し、成分の特徴と変質について検討した。

第2章 スギ樹皮抽出成分の赤潮藻類に対する活性

第1節 序論

赤潮は沿岸地域で植物プランクトンが大量に発生する現象であり、海洋の生物に悪影響をおよぼす重大な環境問題の一つとして、一般に認識されている。赤潮が発生するためには、(1) 水の停滞、(2) 過栄養、(3) 増殖刺激要因の三条件が必要であり、もっとも重要な条件は、過栄養であるとされている(川崎 1993)。このため赤潮は、産業や人々の日常生活が発展した現在、世界各地で発生する人為的な問題である。世界的には特に、北海、バルト海、地中海等の閉鎖性海域においての赤潮の発生が拡大している(環境白書 2005)。我が国では、戦後、局地的な赤潮は発生していたが、1960年代末から1970年代初めにかけて急激に増加し、現在年間30~10件前後発生(海上保安庁 2014)している(Figure 2-1)。また赤潮の広域化、外洋化、長期化、生物種の多様化が観察されており(川崎 1993)、高度経済成長時より河川の水質管理が整っている現在でも、さらなる赤潮への対策が求められている。

赤潮の増殖抑制の研究として、赤潮を直接回収(丸山ら 1998)する物理的防除法や、製鋼スラグ(鈴木ら 2006)や酸処理粘土(丸山ら 1987)を使って海水のpHへの影響を利用した化学的防除、藻類間のアレロパシー(松原ら 2008)や殺藻ウイルス(長崎ら 2005)を利用した生物学的防除など様々な研究が行われている。だが、生態系への影響、コスト、実地試験の不足等、まだ検討すべき点があり実用化にはいっていない。

赤潮を引き起こすプランクトンは、珪藻類と鞭毛藻類(主に渦鞭毛藻・ラフィド藻)に分けられ、異なった生理・生態学的特徴を有しており、それぞれが異な

った環境下で赤潮を形成すると考えられている (長崎ら 2005)。具体的には、珪藻類では *Skeletonema costatum* (Figure 2a) , 渦鞭毛藻では *Karenia mikimotoi*, *Heterocapsa circularisquama*, ラフィド藻では *Heterosigma akashiwo* (Figure 2b) などが挙げられ、それぞれに対応した防除法の確立が求められている。

Tsuruta *et al.* (2011) は、針葉樹各部位の精油の赤潮藻類 (*Skeletonema costatum*) に対する増殖抑制を検討したところ、クロマツ心材、スギ樹皮の精油に増殖抑制があることを見出している。また精油の含有成分 *ferruginol* と *longifolene* に増殖抑制が確認された。このことから、スギ樹皮の有効利用法として、赤潮藻類の防除剤としての利用法が考えられた。しかしながら、精油は、溶媒抽出と比較してジテルペン、フェノール性成分を大量に得ることは困難である。加えて、スギ樹皮の精油の抽出率は、木部や葉に比べ少ないという結果であった (Tsuruta *et al.* 2011) 。また、精油を得る熱水抽出の間に変化する成分も見られた。そこで本章では、新たな樹皮の有効利用法の検討として、スギ樹皮の溶媒による抽出物を用い赤潮藻類に対する増殖抑制効果を調べるとともに、増殖を抑制する成分を明らかにすることを目的とした。

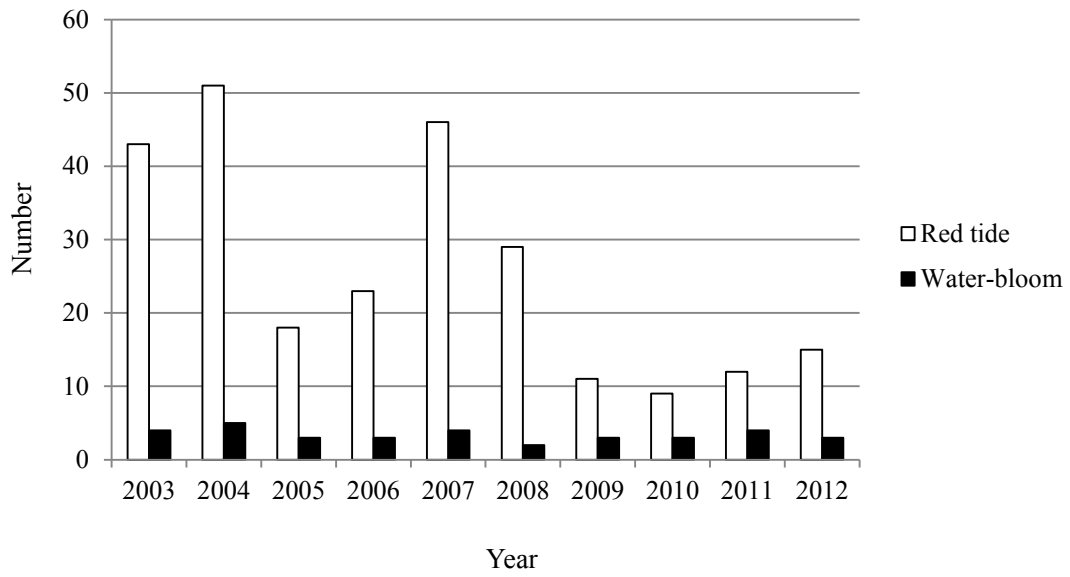
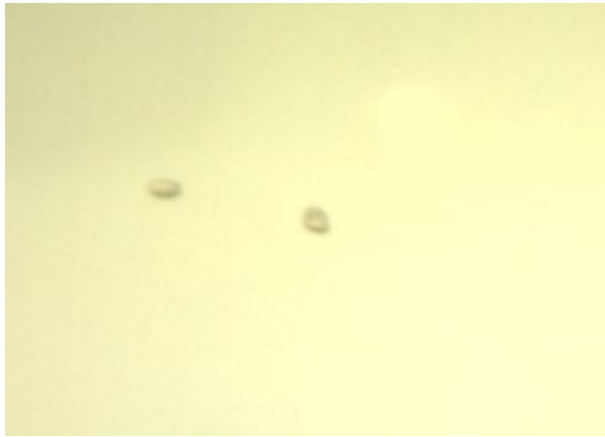


Figure 2-1. The number of marine pollution by algal in the coast of Japan for last 10 years (2003~2012). Note : This figure was prepared from reference data (Japan coast guard, 2014).



[a]



[b]

Figure 2-2. Photograph of *Skeletonema costatum* (NIES-16) [a] and *Heterosigma akashiwo* (NIES-293) [b]

第2節 実験方法

2.1 スギ樹皮の逐次抽出

山形大学農学部附属フィールド科学センター上名川演習林で採取した80年生スギの樹皮を内樹皮と外樹皮に分け使用した。内樹皮と外樹皮をはさみで約1 cm²の大きさに裁断し、内樹皮91 gと外樹皮137 gをそれぞれ三角フラスコ(1 L)に入れ、ヘキサンに浸漬させ、常温で2日間抽出した。得られた抽出液をろ過し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。これを減圧デシケーター内で乾燥させ、ヘキサン抽出物を得た。残渣木粉に同様の操作を、酢酸エチル、メタノールで行い、それぞれの抽出物を得た。

2.2 赤潮藻類の培養

2.2.1 *Heterosigma akashiwo* の培養

実験に使用した株は、独立行政法人国立環境研究所より購入したラフィド藻の *Heterosigma akashiwo* (NIES-293) を用いた。培養は、人工気象器 NKsystem BIOTRON (Nippon Medical & Chemical Instruments Co., LTD, Tokyo, Japan) 内で行った。培養条件は、温度 20~22°C、12 時間明暗周期、光量は明周期が約 2000 lux、暗周期時が約 2 lux で行った。

2.2.2 赤潮藻類の保存・培養培地 (f/2 培地)

精製水 1 L に、市販の人工海水剤 38 g を投入攪拌し、そのうち 999 mL に Table 2-1 に示す多量栄養素を加えた (f/2)。次に精製水 100 mL に、Table 2-2 に示す微量金属を加え、微量金属混液 (f/2 metal) を作製した。f/2 に f/2 metal を 1 mL 加え攪拌し f/2 培地を作製した。f/2 培地をオートクレープで滅菌し(121°C, 20 min),

これを赤潮藻類の培養に使用した。

2.3 赤潮藻類増殖抑制試験

2.3.1 試料調製

各抽出物及び単離成分を、1.0 mg/ mL の濃度となるよう調製した。このとき使用した溶媒は、内樹皮のヘキサン、酢酸エチル抽出物、外樹皮のヘキサン、酢酸エチル、メタノール抽出物、cubebol, phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, ferruginol, sugiol にはアセトン、内樹皮メタノール抽出物にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

2.3.2 試験方法

2.2.2 で作成した f/2 培地を目盛付スピッチグラスに 3~4 mL 加えた。*Heterosigma akashiwo* をスピッチグラスに接種し、定溶した試料を 5 μ L 入れ、5 mL にメスアップし、初期細胞個体数を計測した Thoma 血球計算盤 (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Germany) を使用し、個体数を数え、1.0 mL 当たりの個体数に換算した。

2.4 成分分析

2.4.1 機器分析

活性のみられた抽出物、単離成分を GC-MS を用いて分析を行った。各分析試料を 1 mg/ mL の濃度に調製し、GC-MS に 1 μ L インジェクションした。装置は、QP-5000 (SIMADZU, Kyoto, Japan) を用い、カラムには DB-1 (0.32 mm i.d. \times 30.0m; 0.25 μ m film thickness; J & W Scientific, Folsom, CA, USA) を用いた。直接注入のカラム槽の温度条件は、初期温度 50°C で 1 分保持後、5°C/min で昇温し

320°Cで5分保持した。気化室温度 250°C，検出器温度 250°Cとした。単離成分は NMR (日本電子 (JEOL) JNM-EX400) 分析に供した。サンプルを CDCl₃ 溶液として，¹H-NMR は 400MHz，¹³C-NMR は 100MHz で測定した。

2.4.2 内樹皮ヘキサン抽出物からの成分の単離

内樹皮のヘキサン抽出物をカラムクロマトグラフィーによる分画に供した。充鎮剤にはシリカゲル (60N, spherical 63-210 μm, neutral; Kanto Chemical Co., Inc., Japan) 使用した。展開溶媒には，ヘキサンと酢酸エチルを使用し，100 : 0 から 10 : 90 でグラジエントを行い溶出した。分画物は，TLC の R_f 値または GC-MS 分析結果を指標として，カラムクロマトグラフィーによる精製を繰り返し，成分 phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, ferruginol, sugiol を得た。Phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, ferruginol, sugiol は，芦谷ら (2001), Tsuruta et al. (2011) の研究で単離された成分を標準物質として GC の保持時間と MS スペクトルの比較により，成分を同定した。Cubebol は，既報の研究 (Matsushita et al. 2008) の NMR, MS データと比較し，同定した。

2.5 統計解析

各活性試験は，一元配置分散分析(ANOVA)により比較した。結果は，Tukey-Kramer honestly significant difference (HSD) comparisons ($p < 0.05$; JMP version 9.0.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)によって選択した。

Table 2-1. Multiplex nutrient of 1/2 medium.

Multiplex nutrient	Weight*
NaNO ₃	75 mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	6 mg
Vitamin B ₁₂	0.5 µg
Biotin	0.5 µg
Thiamine HCl	100 µg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10 mg

* per 1L sea water

Table 2-2. Trace metal of 1/2 medium.

Trace metal	Weight*
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	440 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	316 mg
CoSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.1 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.7 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.7 mg

* per 100 mL distilled water

第3節 結果と考察

3.1 スギ樹皮の逐次抽出

スギ樹皮の逐次抽出の結果を Table 2-3 に示す。内樹皮は、ヘキサン、メタノール、酢酸エチルの順に抽出物量が多かった。外樹皮は、酢酸エチル抽出物が最も多く、ヘキサン抽出物、メタノール抽出物は同程度であった。また全抽出量は内樹皮が 8.54%、外樹皮が 4.77%となり、内樹皮が外樹皮の 2 倍近い量を示した。スギ樹皮の精油の収率は、0.15%であった (Tsuruta et al. 2011)ため、スギ樹皮の抽出成分の利用には、熱水蒸留より溶媒抽出の方がより多量の抽出成分を得られ、適していると考えられる。

3.2 スギ樹皮逐次抽出物の増殖抑制試験

スギ樹皮抽出物の *H. akashiwo* に対する増殖抑制活性試験の結果を Figure 2-3 に示した。試験濃度は、1.0 µg/mL で行った。コントロールの *H. akashiwo* の増殖は、10 日まで直線的に増加し、その後緩やかになり安定となった。その時期のコントロールの個体数は約 20 万~25 万 / mL であった。コントロールとしてアセトンと DMSO のみを添加した培地の試験最終日 (試験 14 日目) の *H. akashiwo* の細胞数に、有意差は無かった ($p < 0.05$)。最終日のコントロールと比較すると、内樹皮ヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物、外樹皮のヘキサン抽出物で強い増殖抑制活性が確認され、これらの抽出物を添加した培地の細胞数濃度は、試験期間の早い段階 (試験 1~5 日目) で明らかに減少した。内樹皮のメタノール抽出物、外樹皮の酢酸エチル、メタノール抽出物にも増殖抑制活性が見られたが、コントロールの増殖と大きな差はなかった。Figure 2-4 にそれぞれの抽出物の試験最終日の増殖抑制率を示した。有意な増殖抑制活性が内樹

皮へキサン抽出物，酢酸エチル抽出物，外樹皮のへキサン抽出物で観察された。それらの抽出物は，100%近い抑制率を現した。個体数計測の際には，内樹皮へキサン抽出物を入れた培地は，試料添加直後に *H. akashiwo* の動きが無くなり球形になることが確認され，3日目までも同様の傾向であり，個体は確認されたが動きは止まり，球形となっていた。また内樹皮酢酸エチル抽出物を入れた培地でも，試料添加から1日後の計測時に，藻の動きが停止していた。内樹皮へキサン抽出物，酢酸エチル抽出物，外樹皮へキサン抽出物において抑制活性が確認されたことから，低極性の化合物が活性を有することが示唆された。以上の結果をふまえ活性成分の同定を行うため，さらに活性を有する抽出物の分析を行うこととした。

3.3 スギ樹皮逐次抽出物の成分分析

スギ樹皮抽出物のトータルイオンクロマトグラム (TIC)を，Figure 2-5 に示す。内樹皮へキサン抽出物には，4つの主要ピークが観察された。それぞれのピークのMSスペクトルから，Figure 2-5中の peak 1, 2, 3, 4の成分は，それぞれ，222, 290, 284, 286のシグナルを分子イオンピーク (M^+)と帰属した。各ピークの保持時間，MSスペクトルを研究室保有の標品と比較したところ，peak 2は phyllocladanol, peak 3は 6,7-dehydroferrugiol, peak 4は ferrugiolであることを確認した。しかしながら，peak 1は，研究室所有の標品とは一致せず，更なる分析が必要であった。

内樹皮の酢酸エチル抽出物には，内樹皮へキサン抽出物と同一の peak1-4の成分が確認されたが，peak1は，ピーク強度が小さく微量であると考えられる。他に m/z 300の分子イオンピークを示す peak5が内樹皮酢酸エチル抽出物に認められた。標品の保持時間，MSスペクトルと比べたところ peak5は sugiolであるこ

とが確認された。外樹皮ヘキサン抽出物には、ピークとして上記 peak 1-5 の成分が認められたが、peak 1, 5 は強度が小さく、peak 2 (phyllocladanol) が他の抽出物と比較して強い強度で検出された。

内樹皮のヘキサン抽出物の GC-MS 分析において、主成分と考えられた化合物の一つに Figure 2-6 中の peak 1 が検出された。Peak 1 の成分の構造を特定するため、内樹皮ヘキサン抽出物から分画した分画物を NMR 分析した。5.5 mg の peak 1 を ^1H NMR, ^{13}C NMR 測定に供した。得られたスペクトルデータを Table 2-4 に示し、得られた測定値と文献値 (Matsushita et al. 2008) と比較した結果を Table 2-4 にまとめた。Table 2-4 に示すように、NMR データを文献値 (Matsushita et al. 2008) と比較した結果、cubebol (Figure 2-7) と一致したため、peak 1 は cubebol であると同定した。

3.4 スギ樹皮成分の増殖抑制試験

スギ樹皮の低極性主要成分 cubebol, phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, ferruginol, sugiol による *H. akashiwo* 増殖抑制試験の結果を Figure 2-9 に示す。また測定最終日 14 日目の平均増殖率を Figure 2-10 に示した。Ferruginol を添加した培地に、試料添加から 1 日後に動きが停止している個体の存在を確認した。コントロールに対する最終日の増殖率は、ferruginol; 14%, phyllocladanol; 56.5%, 6,7-dehydroferruginol; 80.67%, cubebol; 31.67%, sugiol; 85% となり、どの化合物も増殖を抑制することが判明した。Phyllocladanol と 6,7-dehydroferruginol, sugiol を添加した場合、8 日目までは増殖率がほぼ等しかったが、それ以降は 6,7-dehydroferruginol, sugiol での増殖率が高くなった。Cubebol, phyllocladanol, ferruginol については、有意差 ($p < 0.05$) で抑制を確認した。活性成分と結論した cubebol, phyllocladanol は、スギ樹皮抽出物の特徴を表すセスキテルペン及び

ジテルペンである。Cubebol は, *Acusta despecta* (カタツムリ) に対する忌避活性 (Chen et al. 2000) , 幼生の *Aedes aegypti* (ネツタイシマカ) , *Aedes albopictus* (ヒトスジシマカ) に対する致死活性の報告 (Gu et al. 2009) があり, phyllocladanol については, 抗蟻活性の報告 (Arihara et al. 2004) がある。本研究で新たに cubebol, phyllocladanol が藻類に対し抑制効果を有することを見出した。活性成分の一つである ferruginol は, 赤潮藻類 *Skeletonema costatum* に対し強い抑制効果があったことが報告 (Tsuruta et al. 2011) されており, ferruginol は, 赤潮の防除に利用可能な成分であることが示唆された。

6,7-Dehydroferruginol は, *Skeletonema costatum* に対して弱い抑制活性が報告されている。さらに, 6,7-dehydroferruginol, sugiol の木材腐朽菌, 白蟻に対する活性は, ferruginol より弱いことが報告されている (Kusumoto et al. 2009, 2010)。赤潮の化学的防除法として検討されている防除法の一つに, 海水への過酸化水素の添加があり, それら過酸化水素から発生するラジカルにより藻類が影響を受ける (村田ら 1989) と考察されている。Ferruginol は, 抗酸化作用を持つ成分として報告 (Wang et al. 2002, Cheng & Chang 2014) されており, ferruginol の酸化還元作用が藻の細胞に影響している可能性も考えられる。

6,7-Dehydroferruginol は, ferruginol の酸化により生合成されていると考えることができる。即ち ferruginol は生物に対し高い毒性を示すが, 容易に酸化され, 活性の低い 6,7-dehydroferruginol に変化すると推定した。上記仮説は, 生物活性剤としてスギ樹皮成分を効果的に利用するためには, ferruginol の保持状態や, ferruginol の酸化条件を明らかにする必要があることを示している。

活性のあった抽出物の *H. akashiwo* に対する活性値は, 主要成分 cubebol, phyllocladanol, ferruginol の活性値よりも高かった。この結果は, 他に強い活性成分の存在, あるいは成分の相乗効果で活性が強くなった可能性を示唆してい

る。これらの可能性は、今後の課題と言える。

今回の試験では、スギ樹皮の低極性抽出物、低極性成分に活性が認められたが、これらは水に溶解しにくいという問題点が予想される。抽出物またはそれらの成分を実際に使用するためには、フィルター材料で使用方法も適すると考えられる。海洋では船舶を介した海藻類の移動が問題になっており (川井 2012, 松岡 1993) , バラスト水に混入する藻類や菌などの生物を処理するための技術の開発が行われている。例えば、フィルターで海水を通した後に、次亜塩素酸ナトリウムを混入し藻類、菌を処理するシステムが利用されており、新たに個体薬剤 DICD (水中でイソシアヌル酸, 殺生物性能を有する次亜塩素酸ナトリウムおよび次亜塩素酸に分解) を使用方法が開発 (藤原ら, 2013) されている。しかしながら、実際の利用のためにはスギ樹皮成分の魚類等に対する活性を知る必要がある。スギ樹皮抽出成分の魚や他の水生生物に対する活性は、渋谷ら (1999) が行ったバクテリア *Photobacteyium phosphoyeum* に対する発光阻害活性 (MICROTOX 試験) の報告のみで研究例が少ない。水域では、特に養殖場 (齋藤ら 2012, 近藤ら 2009) や、発電所の貯水池 (森本ら 1997), 取水口 (田村ら 2010) で、藻類発生の問題が発生しており、スギ樹皮抽出物はこれらの閉鎖水域の有害水生生物に対して魚などに直接接しないフィルター等で利用するのに適すると考えられる。

Table 2-3. Yeild of *Cryptomeria japonica* bark extracts

Solvent	Inner bark Yeild (%)*	Outer bark Yeild (%)*
<i>n</i> -Hexane	3.91	1.29
Ethyl acetate	1.24	2.17
Methanol	3.39	1.30
Total	8.54	4.77

*100 % is bark dry weghit

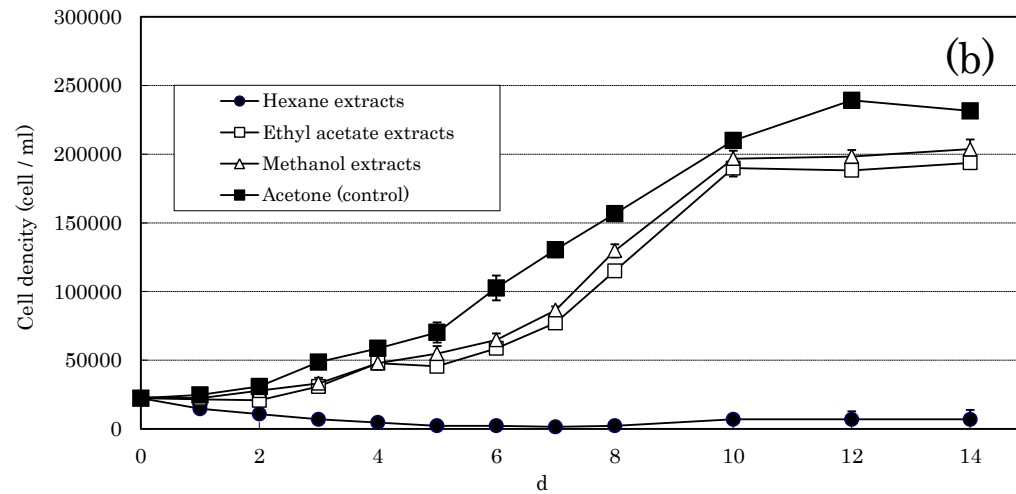
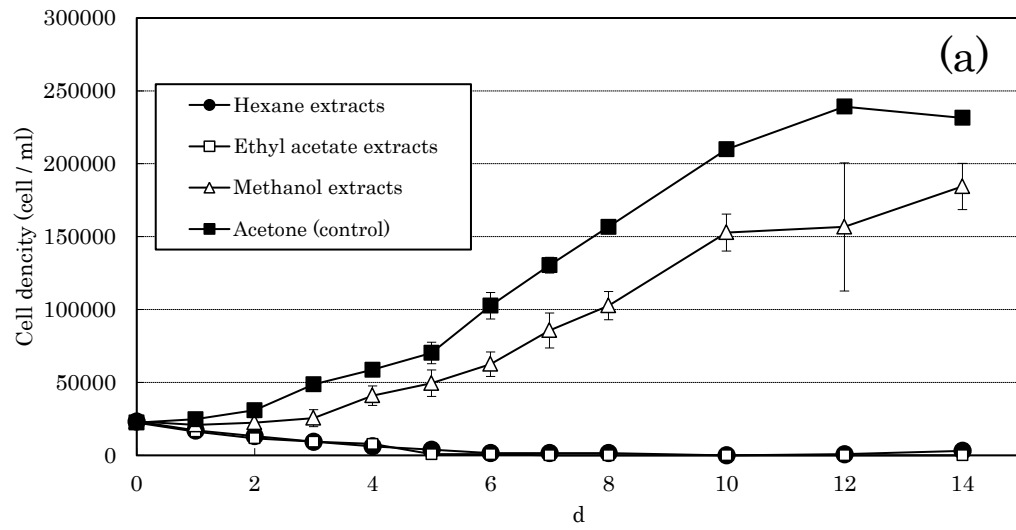


Figure 2-3. Aragal growth with *Cryptomeria japonica* bark extract of *Heterosigma akashiwo*. (a) Inner bark extract, (b) Outer bark extract.

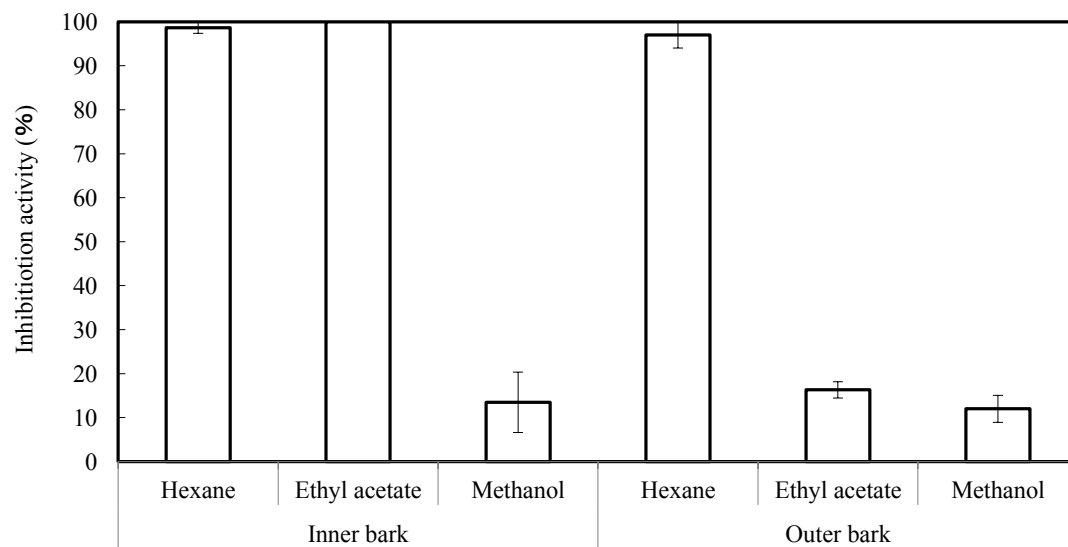


Figure 2-4. Growth inhibition activity of *Cryptomeria japonica* bark extract against *Heterosigma akashiwo* in the examination last day.

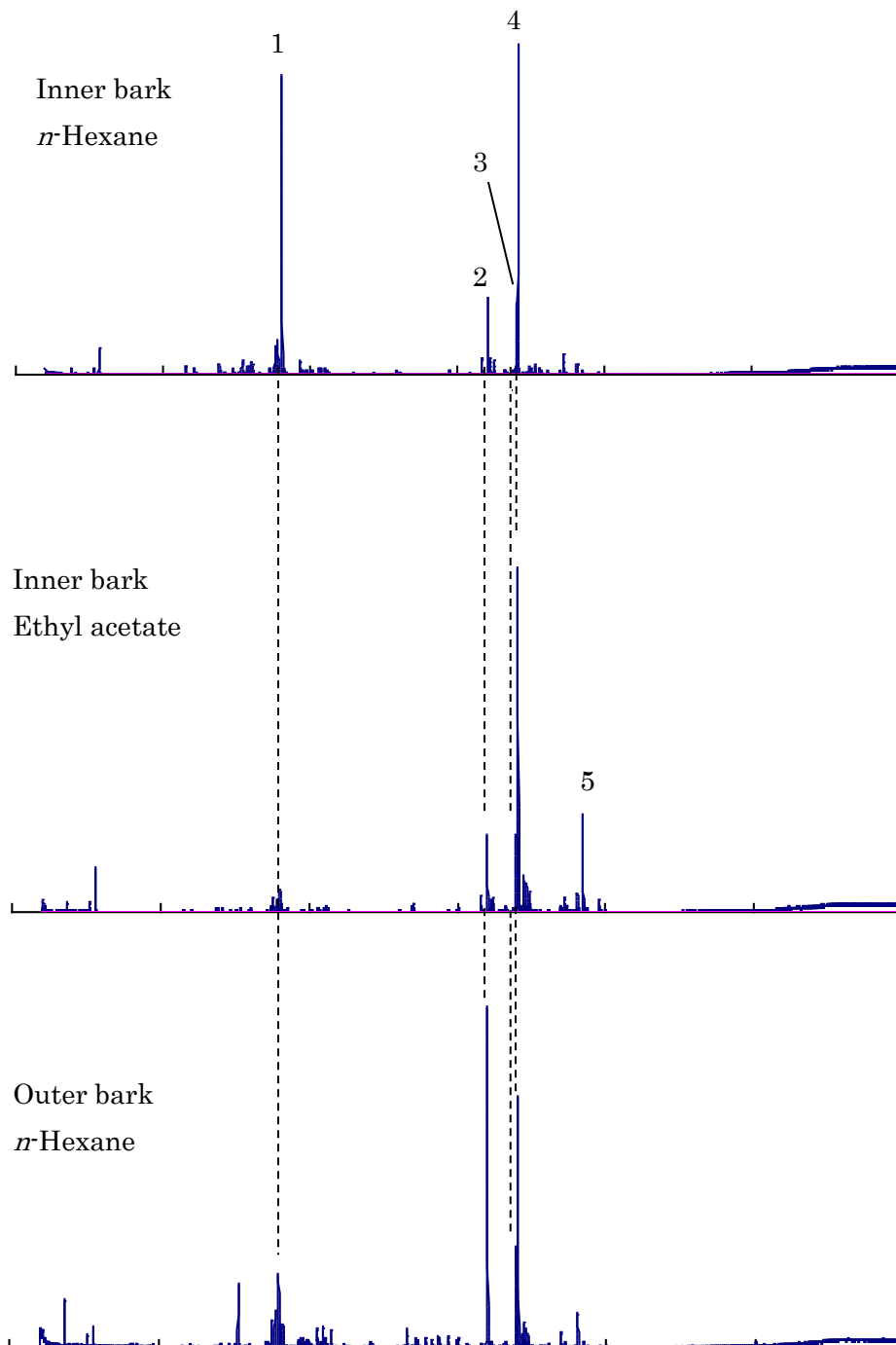


Figure 2-5. Total ion chromatogram of *Cryptomeria japonica* bark extracts exhibiting inhibitory against *Heterosigma akashiwo* by GC-MS.

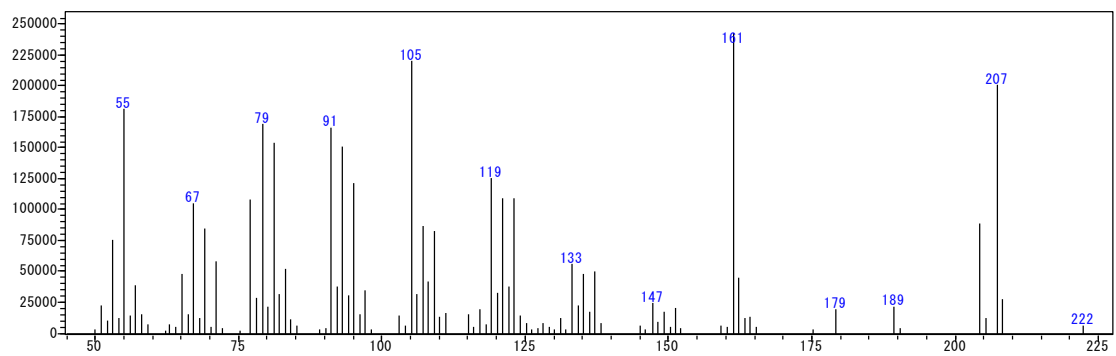


Figure 2-6. MS Spectrum of peak 1.

Table 2-4. NMR data for comparison of cubebol (CDCl₃).

¹³ C-NMR Data (δ)	CDCl ₃	CDCl ₃
Carbon No.	Cubebol*	Isolated compound
1	33.5 C	33.43
2	29.6 CH ₂	29.58
3	36.4 CH ₂	36.35
4	80.3 C	80.38
5	39.1 C	39.07
6	22.6 CH	22.64
7	44.2 C	44.14
8	26.5 CH ₂	26.51
9	31.7 CH ₂	31.69
10	30.9 CH	30.92
11	33.7 CH	33.67
12	18.8 CH ₃	18.76
13	19.7 CH ₃	19.67
14	20.1 CH ₃	20.09
15	28.0 CH ₃	27.90

* Matsushita et al. 2008.

Table 2-4. (Continuation)

H-NMR Data (δ)	CDCl ₃	CDCl ₃
Carbon No.	Cubebol*	Isolated compound
2	1.84 ddd (12.0,12.0,8.7)	1.86 ddd (10.27,10.69,3.12)
	1.45-1.72 m	1.46-1.71 m
3	1.45-1.72 m	1.46-1.71 m
	1.20-1.40 m	1.19-1.47 m
5	0.74-1.00 m	0.75-1.08 m
6	0.74-1.00 m	0.75-1.08 m
7	0.74-1.00 m	0.75-1.08 m
8	1.45-1.72 m	1.19-1.47 m
	0.74-1.00 m	0.75-1.08 m
9	1.20-1.40 m	1.19-1.47 m
	0.51	0.52
10	dddd(12.4,12.4,11.2,2.0)	dddd(12.20,12.20,12.49,1.96)
11	1.45-1.72 m	1.19-1.47 m
12	1.45-1.72 m	1.19-1.47 m
13	0.92 d (6.8)	0.92 d (6.89)
14	0.93 d (6.8)	0.93 d (0.94)
15	0.97 d (7.2)	0.97 d (6.71)
	1.28 s	1.28 s

* Matsushita et al. 2008.

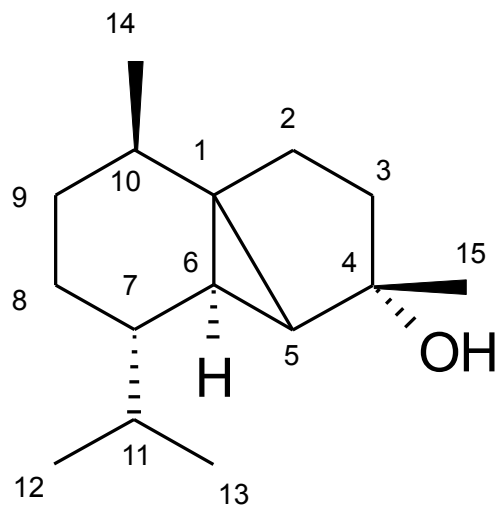


Figure 2-7. Structure of cubebol.

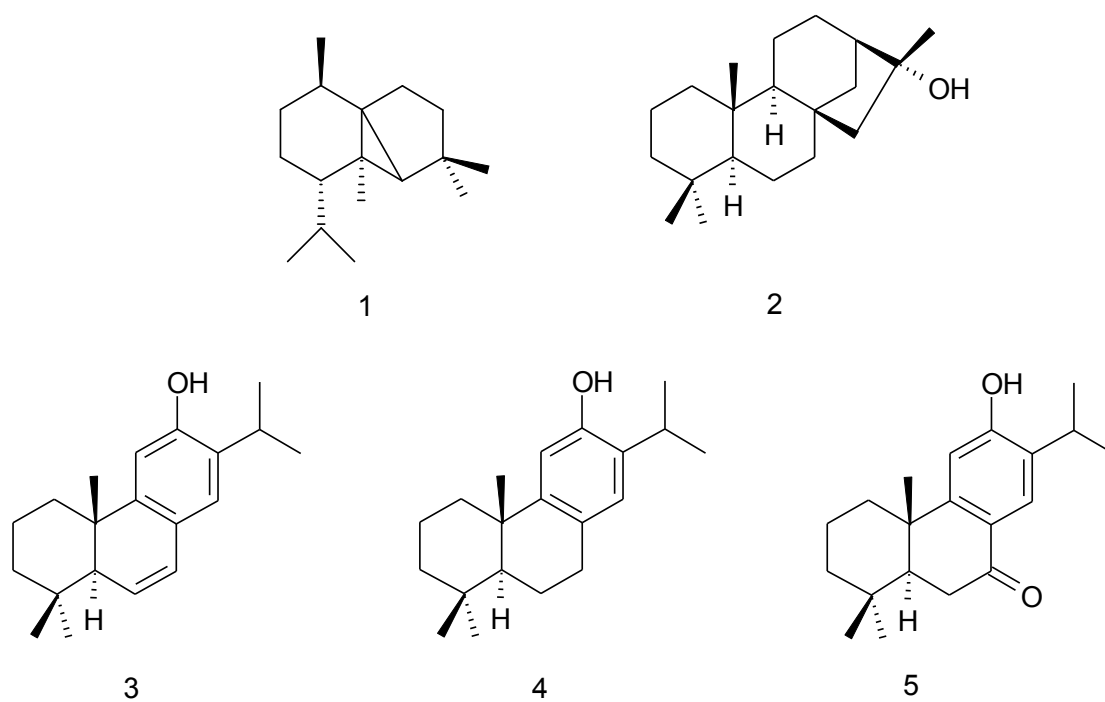


Figure 2-8. Main components of *Cryptomeria japonica* bark activity extracts.
 1 : Cubebol, 2 : Phyllocladanol, 3 : 6,7-Dehydroferruginol, 4 : Ferruginol, 5 : Sugiol.

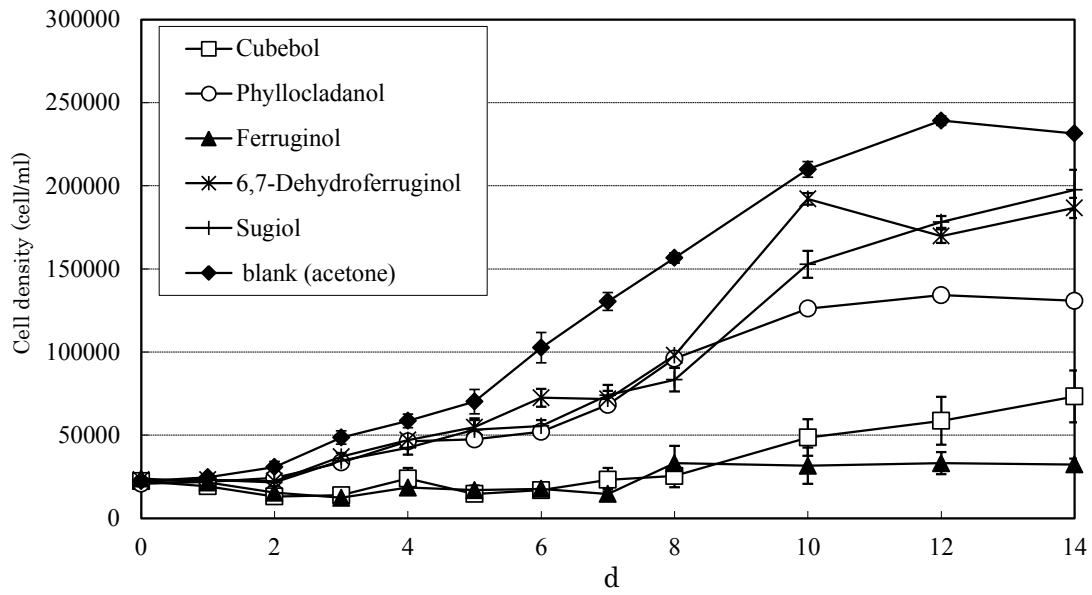


Figure 2-9. Aragal growth with *Cryptomeria japonica* bark component of *Heterosigma akashiwo*.

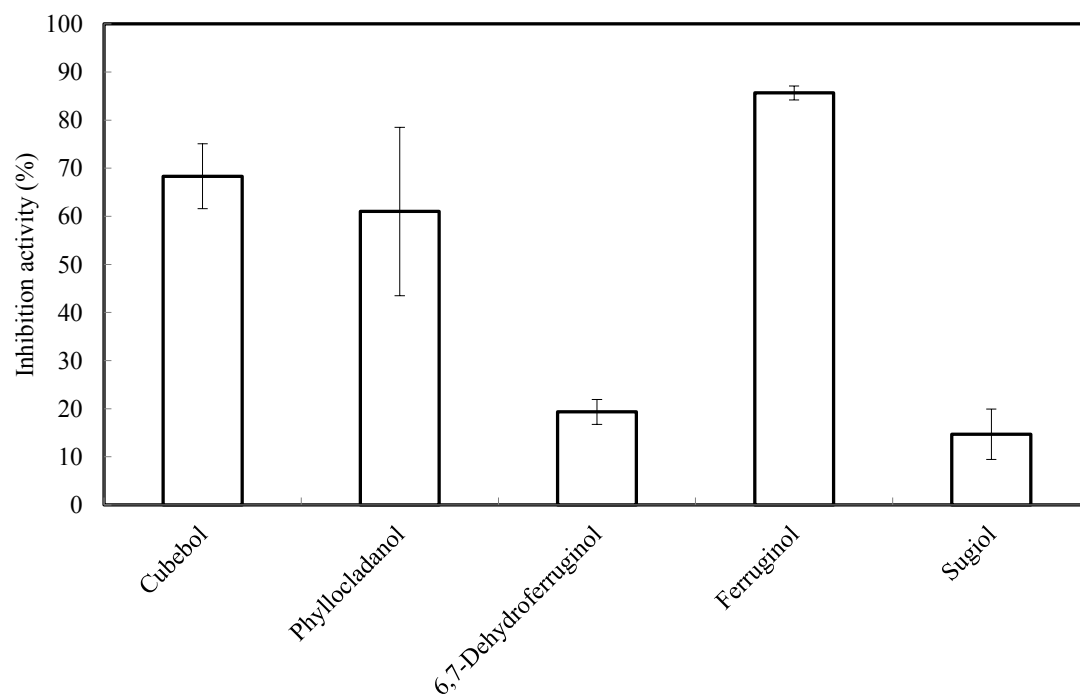


Figure 2-10. Growth inhibition activity of *Cryptomeria japonica* bark extract main component against *Heterosigma akashiwo* in the exsaminaion last day.

第4節 小括

本章では、樹皮の有効利用法の提案の一環として、スギ (*Cryptomeria japonica*) 樹皮抽出物の赤潮藻類に対する増殖抑制効果を検討した。また活性成分を明らかにすることを目的として、単離成分の赤潮藻類 *Heterosigma akashiwo* に対する増殖抑制試験を行った。スギ樹皮を内樹皮、外樹皮に分け、それぞれヘキサン、酢酸エチル、メタノールによる逐次抽出を行った。得られた逐次抽出物の中で、*H. akashiwo* に対し強い増殖抑制活性が確認されたのは、内樹皮のヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物、外樹皮のヘキサン抽出物であった。活性が確認された抽出物の GC-MS 分析を行ったところ、cubebol, phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, ferruginol, sugiol が主要成分として検出された。それらの成分の *H. akashiwo* 増殖抑制試験を行ったところ、cubebol と ferruginol に強い活性が確認され、phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, sugiol は、弱い活性であった。

以上より、スギ樹皮抽出物であるスギ内樹皮のヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物と外樹皮のヘキサン抽出物が赤潮藻類 *H. akashiwo* に対し増殖抑制に効果的であることが確認され、抽出物中の成分である ferruginol, cubebol に強い増殖抑制効果を見出した。

第3章 スギ樹皮抽出成分の抗酸化活性及び抗酸化機構

第1節 序論

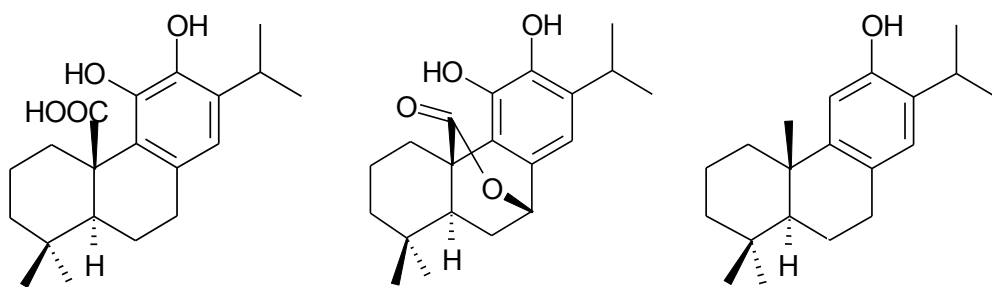
前章において、スギ樹皮抽出成分の赤潮藻類に対する活性を確認し、さらにスギ樹皮成分が有害藻類の防除剤として使用できる可能性を見出した。特に、活性成分の中で赤潮藻類に対する活性が強かったのは、アビエタン型ジテルペンの ferruginol であった。第2章で、ferruginol は、スギの樹皮抽出物の主成分であることを確認し、これは既報でも同様の結果が確認されている (芦谷ら 2001, Kofujita et al. 2006)。

Ferruginol について、抗酸化活性 (Wang et al. 2002, Cheng & Cheng 2014)、抗菌活性 (Kofujita et al. 2006)、抗蟻活性 (Chang et al. 2001)、抗腫瘍活性 (Rodriguez et al. 2006) の報告がある。また ferruginol は、スギの樹皮部以外にも、スギの心材部に多量に含まれ (長濱ら 2000)、他の植物では *Sequoia sempervirens* (Son et al. 2005)、*Chamaecyparis obtuse* (大橋ら 1987)、*Taxodium dubium* (Otto et al. 2003)、*Salvia barrelieri* (Kolak et al. 2009) にも含まれることが報告されている。これらのことから、ferruginol は重要な天然資源成分となる可能性考えられた。これらの中でスギ樹皮は廃棄物として多量に排出されており、スギ樹皮は有望な ferruginol のソースとして利用できる。そのため、スギ樹皮成分の利用法を考える上でも ferruginol の活性について詳細に調べる必要があると思われた。

植物の天然成分を抗酸化剤として利用する研究は多くなされており (Kahkonen et al. 1999, Brewer 2011)、実際に抗酸化剤として利用されているものもある。特にローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) や、セージ (*Salvia officinalis*) の抽出物は、実際に産業で使用されており (Tena et al. 1997)、含有する成分

carnosic acid やその誘導体成分 (Figure 3-1) の抗酸化機構は詳細に調べられている (Masuda et al. 2001, 2002) 。 Carnosic acid は、市販されており、またアビエタン型ジテルペンとして ferruginol にその構造はよく似ている。しかしながら、ferruginol の抗酸化メカニズムや、その生物活性の発現機構はまだ研究されていない。スギ樹皮の利用法を考える上でも、ferruginol の抗酸化活性の特徴を詳細に調べることが必要である。

本章では、スギ樹皮成分の抗酸化剤としての利用を検討することを目的とし、まず主成分である ferruginol の抗酸化能の評価と、その抗酸化機構について検討した。



Carnosic acid

Carnosol

Ferruginol

Figure 3-1. Structure of carnosic acid, carnosol, and ferruginol.

第2節 実験方法

2.1 抗酸化試験

Ferruginol の抗酸化能について評価するため、ferruginol は、市販抗酸化剤の carnosic acid, (±)- α -tocopherol, dibutylhydroxytoluene (BHT)と共に、抗酸化試験として多くの研究に使用されている DPPH ラジカル捕捉能試験, β -カロテン退色法試験に供した。Carnosic acid は、Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan), (±)- α -tocopherol, dibutylhydroxytoluene は、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)より購入した。Ferruginol は、研究室保有のものを使用した。

2.1.1 フリーラジカル捕捉能試験

DPPH ラジカル捕捉能試験は、Shimamura et al. (2007) の方法を参考にした。Ferruginol, carnosic acid, α -tocopherol, BHT を濃度が 0.05–5 mM になるように、エタノールにそれぞれ溶解させた。作製した試料 200 μ L に、800 μ L の 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) を入れ、次に 0.2 mM DPPH エタノール溶液 1 mL を加え、ボルティックスミキサーを使用し混合させた。その後 30 分間、暗条件室温 (20°C) 下に置き、UV-vis spectrophotometer (UVmini1240: Shimadzu, Kyoto, Japan) で 517 nm の吸光度を測定した。

阻害率は以下の式で算出し、その後算出した阻害率をもとに、50% 抑制濃度 (IC₅₀) をプロビット法で算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Ac: コントロールの吸光度

As: サンプルの吸光度

2.1.2. β -カロテン退色法

β -カロテン退色法は、Mikami et al. (2009) の方法を参考にした。リノール酸、 β -カロテン、Tween 40 を、それぞれ濃度 111 mg/ mL, 2.4 mg/ mL, 0.2 mg/ mL でクロロホルムに溶解させた。各試料のクロロホルム溶液を、リノール酸は 100 μ L, β -carotene は 250 μ L, Tween 40 は 500 μ L を取り、混合させ、クロロホルムを窒素気流で除去した。さらに精製水 45 mL, 0.2 M リン酸バッファー (pH 6.8) 5 mL を加え、リノール酸- β -カロテン溶液を作製した。Ferruginol と各市販抗酸化剤はそれぞれエタノールに溶解させ、そのエタノール溶液 60 μ L を、リノール酸- β -カロテン溶液 2.94 mL と混合させ、ボルティックスミキサーで混合させた。混合した試料は、すぐさま 470 nm での吸光度を測定し、その吸光度を試験開始前の吸光度とした。次に試料のリノール酸- β -カロテン溶液は、暗条件下で 50 度のウォーターバスに入れ、試験開始時から 15 分後の吸光度を測り、その後 30 分ごとに吸光度を測定し 195 分後に測定を終了した。またコントロールにはエタノールを使用し、リノール酸- β -カロテン溶液 2.94 mL と混合し同様に吸光度を測定した。

測定した各吸光度は、以下の式を使用して阻害率を算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = (B_{s0} - B_{s195}) / (B_{c0} - B_{c195}) \times 100$$

B_{c0} ; 試験開始前のコントロールの吸光度

B_{c195} ; 試験開始 195 分後の コントロールの吸光度

B_{s0} ; 試験開始前の試料の吸光度

B_{s195} ; 試験開始 195 分後の試料の吸光度

その後、算出した阻害率をもとに、50 % 抑制濃度 (IC₅₀) をプロビット法で算出した。

2.1.3 リノール酸法

リノール酸 14 μL と、リノール酸に対し 2 % mol 当量に当たる各試料をバイアル(直径 14 mm) 底面に塗布し、混合させた。リノール酸と各試料を塗布したバイアルは、アルミホイルで蓋をした後、85 $^{\circ}\text{C}$ のオーブンに入れた。24 時間後、バイアルをオーブンから出し冷却後、酢酸エチル 250 μL を加え、塗布してある試料を溶解させた。内部標準として *n*-heptadecane を加え、1 μL 注入しガスクロマトグラフィーによる分析を行った。使用機器は GC-1700 (Shimadzu), カラムには HP-5 キャピラリーカラムを使用し (0.25 mm i.d. \times 30 m; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA), カラム槽の温度条件は 180 $^{\circ}\text{C}$ スタート, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 280 $^{\circ}\text{C}$ まで上げた。気化室温度は 280 $^{\circ}\text{C}$, 検出器温度は 280 $^{\circ}\text{C}$ で行い, キャリアガスは窒素を使用した。反応後のリノール酸の残量を算出することにより, 抗酸化能について評価した。

2.2 リノール酸メチル中の ferruginol 誘導体の定量分析

Ferruginol 0.25 mg とリノール酸メチル 3.0 μL または 7.5 μL (それぞれ ferruginol に対し, 10 倍, 25 倍 mol 当量)をバイアル底面に塗布した。その後, 85 $^{\circ}\text{C}$ のオーブンで 2 時間から 40 時間加熱した。取り出した試料を冷却後, 酢酸エチル 250 μL を加え, GC-MS で分析を行った。使用機器は, GC-MS QP2010 (Shimadzu), カラムは, DB-1 キャピラリーカラム (0.32 mm i.d. \times 30 m; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific)を使用した。カラム温度は, 100 $^{\circ}\text{C}$ 開始で 3 分保持し, 昇温速度 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 最終温度 320 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分保持した。気化室温度は 250 $^{\circ}\text{C}$, 検出器温度は 320 $^{\circ}\text{C}$ で行った。キャリアガスには, ヘリウムを使用した。内部標準には, *n*-heneicosane を使用した。各成分の生成量は, ferruginol の検量線により算出し, 加熱前の ferruginol 量を 100%とし, 各加熱時間の ferruginol 量を表

した。

2.3 7 β -Hydroxyferruginol の合成

7 β -Hydroxyferruginol は、 Kuo et al. (2002)の方法を参考にした。Sugiol 5.8 mg をメタノール 5.8 mL に溶解させた。この溶液に、攪拌させながら水素化ホウ素ナトリウム 110 mg を少量ずつ加え、6 時間置いた。メタノールを留去した後、水を 30 mL 加え、酢酸エチルで抽出した。生成物は 2.2 の条件で GC-MS を用いて確認を行った。

2.4 Ferruginol と DPPH の反応生成物の分析

バイアル中で ferruginol 1.0 mg と DPPH 1.4 mg を各溶媒 (ヘキサン, 酢酸エチル, ベンゼン)1 mL で攪拌した。このとき使用した溶媒に DPPH のすべては溶解せず、沈殿が見られた。反応液は攪拌後すぐに GC-MS で分析, 及び高分解能質量分析装置 (HR-MS: JEOL JMS-SX102A) によって分析された。GC-MS は 2.2 の分析条件を用いた。HR-MS の分析条件は、カラムは HP-1 キャピラリーカラム(0.32 mm i.d. \times 30 m; 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific) を使用し, EI モード, イオン化電圧 70 eV, イオン加速電圧 10 kV, 質量分解能 3000 で行った。

第3節 結果と考察

3.1 抗酸化活性試験

Ferruginol と比較対照の化合物 carnosic acid, α -tocopherol, BHT を使用して、各抗酸化試験をおこなった。Table 3-1 は、DPPH ラジカル捕捉能試験と β -カロテン退色法試験における、それぞれの試料の IC₅₀ 値を表している。Ferruginol の IC₅₀ は、両試験で対照化合物と比べて最も弱い活性であった。両試験で対照化合物はどの濃度でもバッファーに溶解したが、ferruginol は、DPPH ラジカル捕捉能試験で高い濃度 (200 μ M 以上) ではエマルジョンを生成した。このことから両試験での ferruginol のバッファーへの溶解性は、他の3成分に比べ、低いことが考えられた。従って、この溶解性が対照化合物と比較して低い活性を示した原因の一つと考えられた。

Figure 3-2 は、リノール酸法での抗酸化活性を表している。この試験は、試料の不飽和脂肪酸の抗酸化能を直接評価するために、試料を、直接油脂に添加した。予備試験の結果から油脂酸化の抑制は、24 時間で終われるよう、85°C 条件下で行った。Figure 3-2 に示される通り、リノール酸のみバイアルに添加した試料で大部分のリノール酸が8時間後に消失した。Ferruginol の添加はリノール酸の酸化を抑え、24 時間後にもリノール酸は存在していた。Ferruginol の活性は、BHT より弱かったが、carnosic acid と α -tocopherol より強い結果となった。従って疎水性化合物 ferruginol は、非極性溶媒環境または無溶媒下では、リノール酸の酸化をより抑えることが出来ると考えられた。この結果から、ferruginol は、不飽和脂肪酸の抗酸化剤として、直接混合して使用する条件でより効果的に利用できることが示唆された。

3.2. リノール酸メチル中の ferruginol 誘導体の GC-MS による分析

Ferruginol の抗酸化機構を検討するため、ferruginol とリノール酸を混合し、反応物を GC-MS によって分析した。Figure 3-3 中の反応物の TIC 上に示す Peaks 1-5 の成分が、MS スペクトルより ferruginol の誘導体と考えられた (Figure 3-4)。他のピークは、MS スペクトルよりリノール酸メチルから派生した成分と推察された。Figure 3-5 は、GC-MS で検出した 5 つのピーク (peak No. 1-5) の生成量の時間経過を表している。Peak 2 は、この反応において反応初期から反応中期の 32 時間後まで増加したが、反応時間 40 時間後には消失していた (Figure 3-5a)。Peak 1, 3, 4 も反応初期から反応中期にかけて増加し、反応後期には、減少していた。しかしながら、peak 5 は、反応後期にかけて次第に増加していった。リノール酸メチルの割合が多い試料の反応は (Figure 3-5b), Figure 3-5a と同様の傾向であったが、より早く反応が進行した。

Peaks 1 と 5 は、標品の GC-MS データよりそれぞれ 6,7-dehydroferruginol, sugiol, と同定された。Peaks 3, 4 は、MS スペクトルより 7 β -hydroxyferruginol と予想された。Kuo et al. (2002) の方法より、7 β -hydroxyferruginol を合成し、GC-MS により分析したところ、保持時間、MS スペクトルが peak 4 と一致した。Peak 3 は、peak 4 にスペクトルパターンが類似していた (Figure 3-4b, c)。そのため Peak 3 は、peak 4 の立体異性体の 7 α -hydroxyferruginol であると推定された。Figure 3-5 の反応生成物の反応挙動から peak 2 は、この反応で最初に生成される ferruginol の誘導体と考えられた。このピークの GC-MS の分析結果 (Figure 3-4a) より peak 2 は、分子イオンピーク (M^+)284 を示しており、ferruginol から 2 つの水素が失われた誘導体と考えられた。

3.3. 各種溶媒における ferruginol と DPPH の反応

Peak 2 の成分を同定するため、ラジカル発生剤である DPPH と ferruginol の反応生成物の分析を行った。また peak 2 の成分の生成条件を検討するため、反応をヘキサン、ベンゼン、酢酸エチル中で行った。DPPH と ferruginol の反応の結果を figure 3-6 に示した。使用した溶媒すべてで、ferruginol 誘導体として 6,7-dehydroferruginol, peak 2 の生成が確認された。特にヘキサン中で行った反応が最も peak 2 の成分の発生量が多かった。この反応溶液から peak 2 の成分を単離することを試みた。しかしながら、この成分はとても不安定であり、単離することが出来なかった。この反応溶液を HR-MS により分析したところ、peak 2 の成分は、 $m/z = 284.2203 (M^+)$ (284.2140 calculated for $C_{20}H_{28}O$) を示し、ferruginol から水素を 2 つ失った構造が確認された。Peak 1, 3, 4, 5 のすべての成分で ferruginol の 7 位が酸化された構造をしているため、peak 2 をこれらの中間体と考えると、peak 2 の構造は ferruginol の *p*-キノンメチド体であると推察された。Peak 1 から 5 の成分と ferruginol の構造を Figure 3-7 に示す。大谷と住本 (1983) は、ferruginol と塩素との反応を研究し、塩素のラジカルにより ferruginol が酸化され、6,7-dehydroferruginol 等が生成することを確認しており、その反応の中間体としてキノンメチドの生成を推定している。これは、上記の酸素ラジカルと ferruginol の反応により、キノンメチド構造が生成し、反応が進行するという本研究の予測と一致している。

3.4. Ferruginol 抗酸化機構の考察

ここまでの結果から上記から予想される、抗酸化のメカニズムを Figure 3-8 に示した。初期反応で、ferruginol は、不飽和脂肪酸から生産されたラジカル種により 2 つの水素原子を引き抜かれ、キノンメチド体を生成する。

6,7-Dehydroferruginol は、キノンメチド体の異性化により形成される。6,7-Dehydroferruginol はキノンメチドよりも、より安定であり、6,7-dehydroferruginol の生成は、異性化としては優勢であると考えられる。また別経路で、ferruginol のキノンメチド体は、油脂酸化により生成された水により 7-hydroxyferruginol を生成する。大谷と住本 (1983) の報告を合わせて考えると、7-hydroxyferruginol は、6,7-dehydroferruginol の水の付加によっても生成されると考えられるが、7-hydroxyferruginol の脱水による 6,7-dehydroferruginol の生成と平衡反応となるであろう。最後に、最終生成物として、7-hydroxyferruginol から 2 つの水素が油脂から発生したラジカルにより奪われ、sugiol が生成すると考えられる。このメカニズムから、ferruginol は、ラジカルを捕捉しラジカル連鎖反応を止めることで油脂酸化を抑えることが示唆された。Caronosic acid の抗酸化機構は、11 位の水酸基が酸化されオルソキノンを経て反応が進む(Masuda et al. 2001, 2002)とされているが、11 位に水酸基の無い ferruginol は、carnosic acid と異なり、キノンメチドを経る抗酸化機構をとることが示唆された。

また、ferruginol の抗酸化機構の key step は、初期の段階でキノンメチド体の生成であることが示唆された。Sugiol は、ferruginol より弱い抗酸化能をもつことが分かっている (Wang et al. 2002)。付け加えて、ferruginol 誘導体の sugiol, 6,7-dehydroferruginol は、抗菌活性 (Kusumoto et al. 2010), 抗蟻活性 (Kusumoto et al. 2009), また前章における藻類の生長抑制活性試験において、ferruginol に比べ弱い活性であることが示されている。Ferruginol から生成されたキノンメチド体は、生物活性の発現機構においても重要な役割を担っているのではないかと考えられる。

Table 3-1. IC₅₀* values of ferruginol and reference compounds by the DPPH and β-carotene methods.

Samples	DPPH	β-Carotene
α-Tocopherol	18.2 ± 2.12	1.44 ± 0.608
Ferruginol	196 ± 14.7	700 ± 263
Carnosic acid	13.7 ± 0.37	7.23 ± 2.67
BHT	30.4 ± 5.40	19.7 ± 5.15

*IC₅₀ (μM) values correspond to the sample concentrations in the final volume of the testing solution.

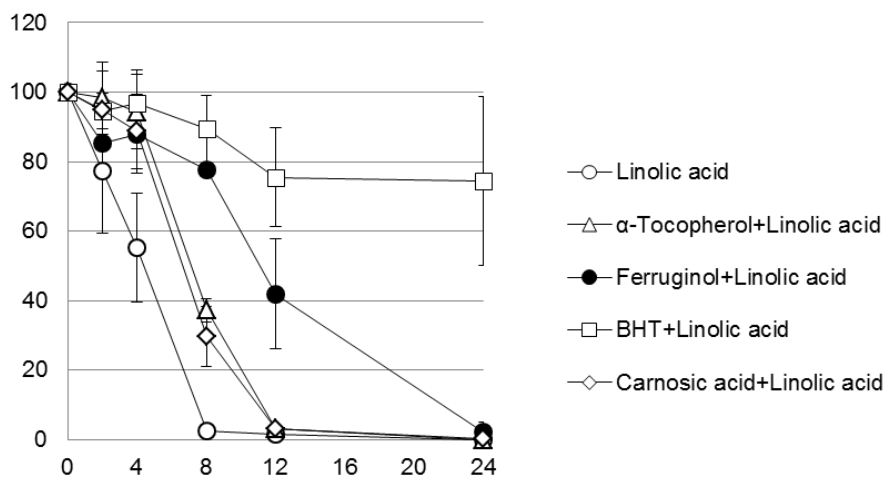


Figure 3-2. Antioxidant activities* of ferruginol and reference compounds by the linoleic acid method. * The antioxidant activity was evaluated based on the amount of residual linoleic acid.

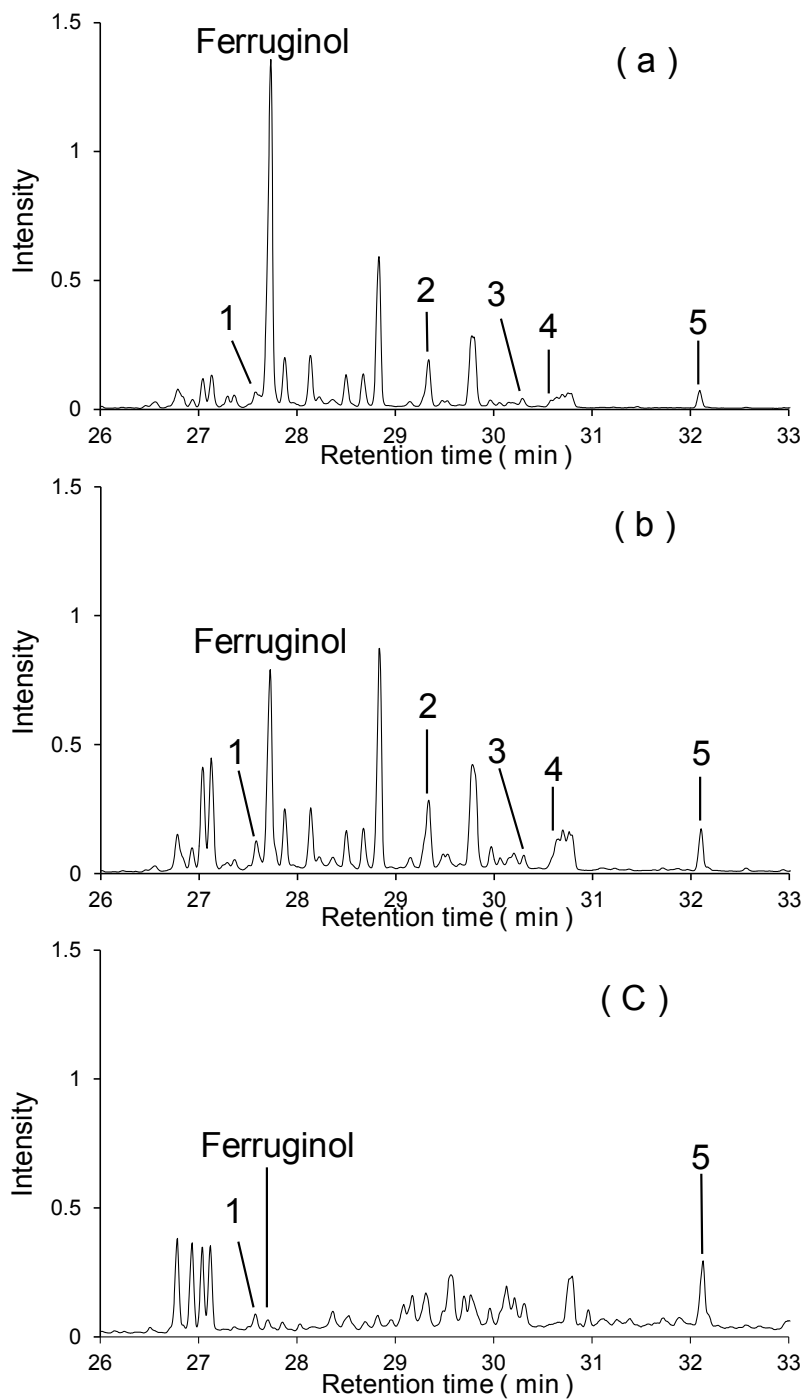


Figure 3-3. GC-MS total ion chromatograph of ferruginol and methyl linoleate (3.0 μ L) mixture heated for (a) 16 h, (b) 32 h, and (c) 40 h.

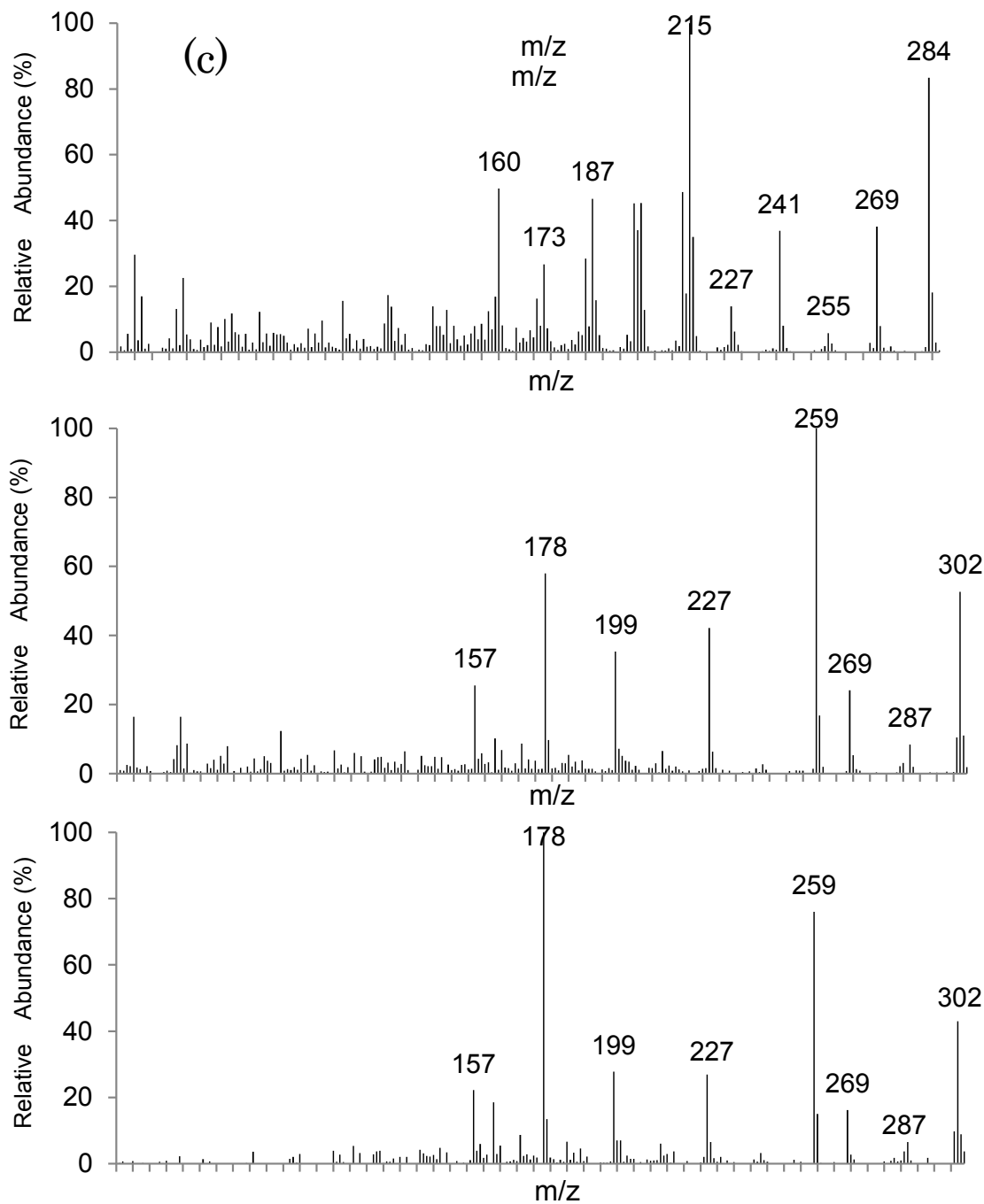


Figure 3-4. MS spectrum of product peaks 2 – 4: (a) peak 2, (b) peak 3, (c) peak 4.

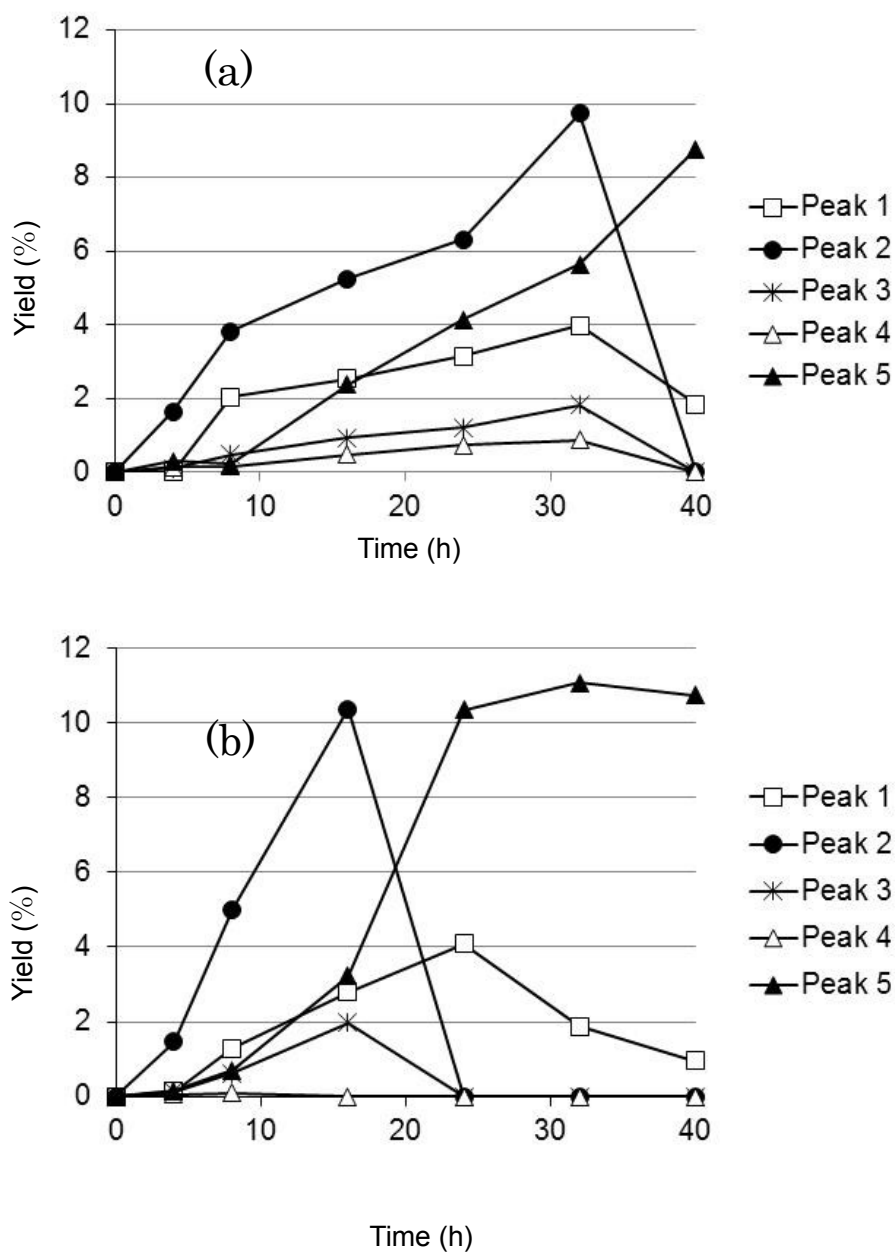


Figure 3-5. The time course of the quantity of ferruginol derivatives by GC-MS. (a) addition of 3.0 μL of methyl linoleate, (b) addition of 7.5 μL of methyl linoleate. *Yield of 100 % was calculated based on the amount of ferruginol before the reaction.

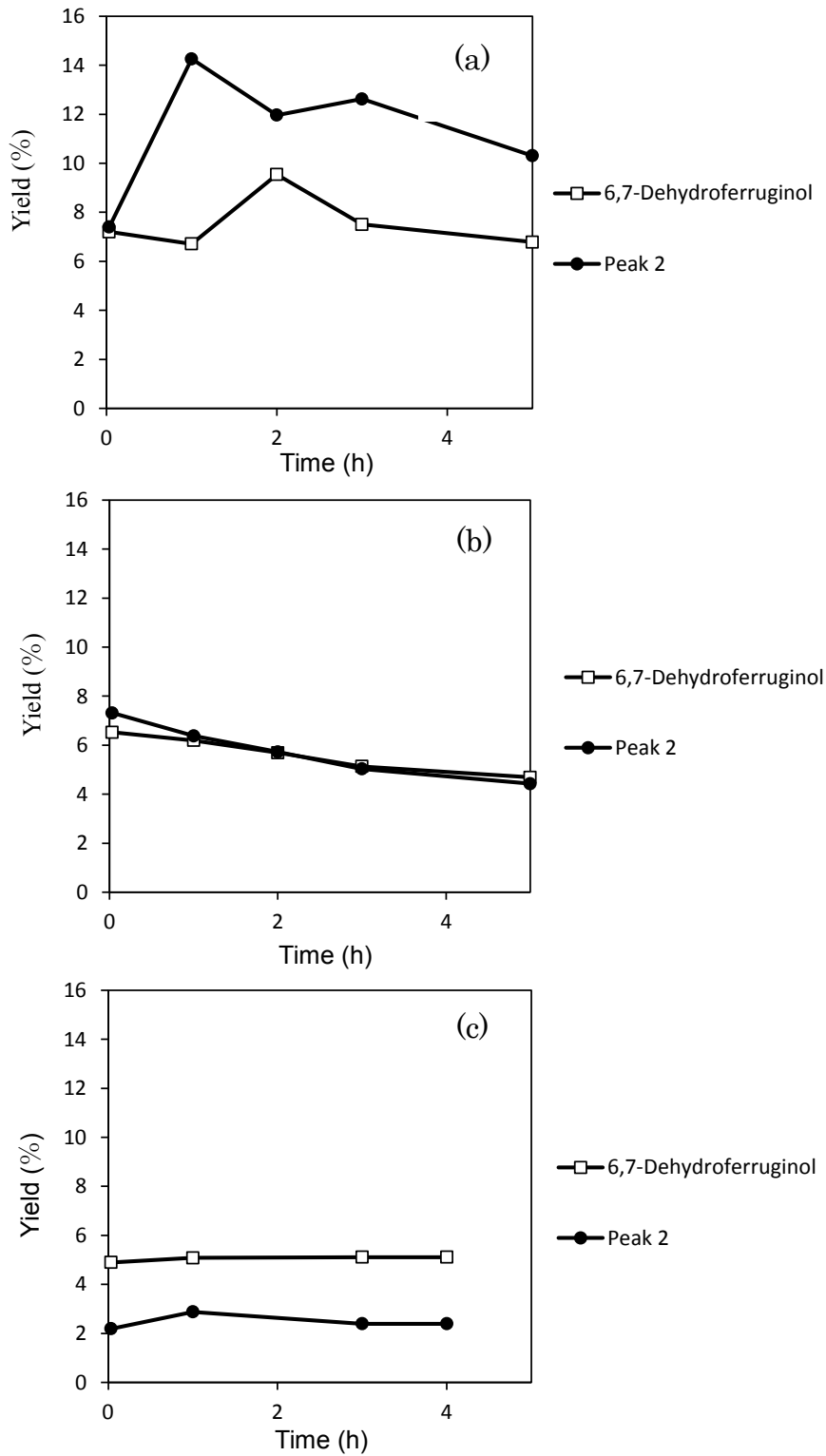


Figure 3-6. The time course of the quantity of ferruginol derivatives in (a) hexane, (b) benzene (c) ethyl acetate.

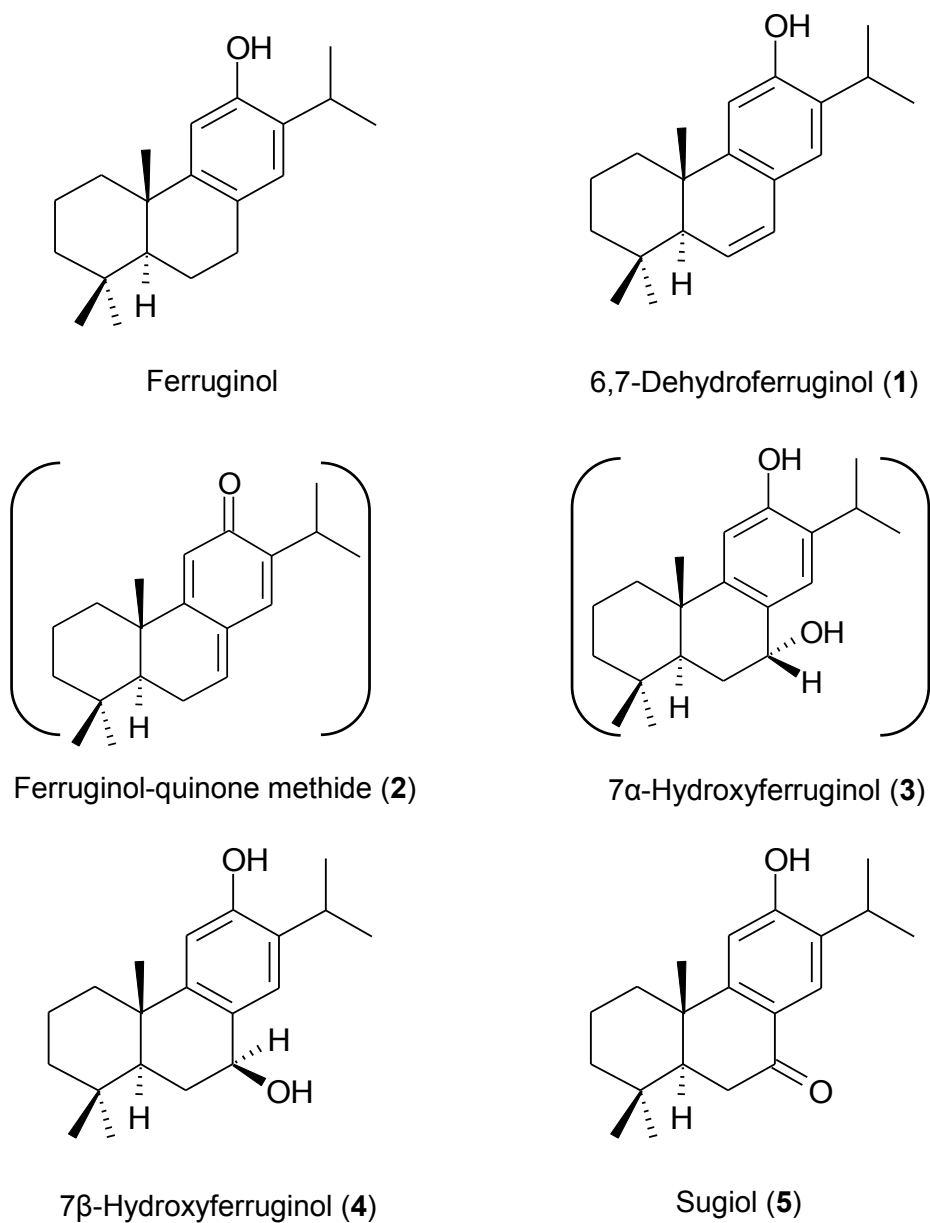


Figure 3-7. Chemical structures of ferruginol and the products produced from ferruginol with methyl linoleate in this study. Ferruginol, 6,7-dehydroferruginol (1), ferruginol-quinone methide (2), 7 α -hydroxyferruginol (3), 7 β -hydroxyferruginol (4), and sugiol (5). *[] is the postulated chemical structure.

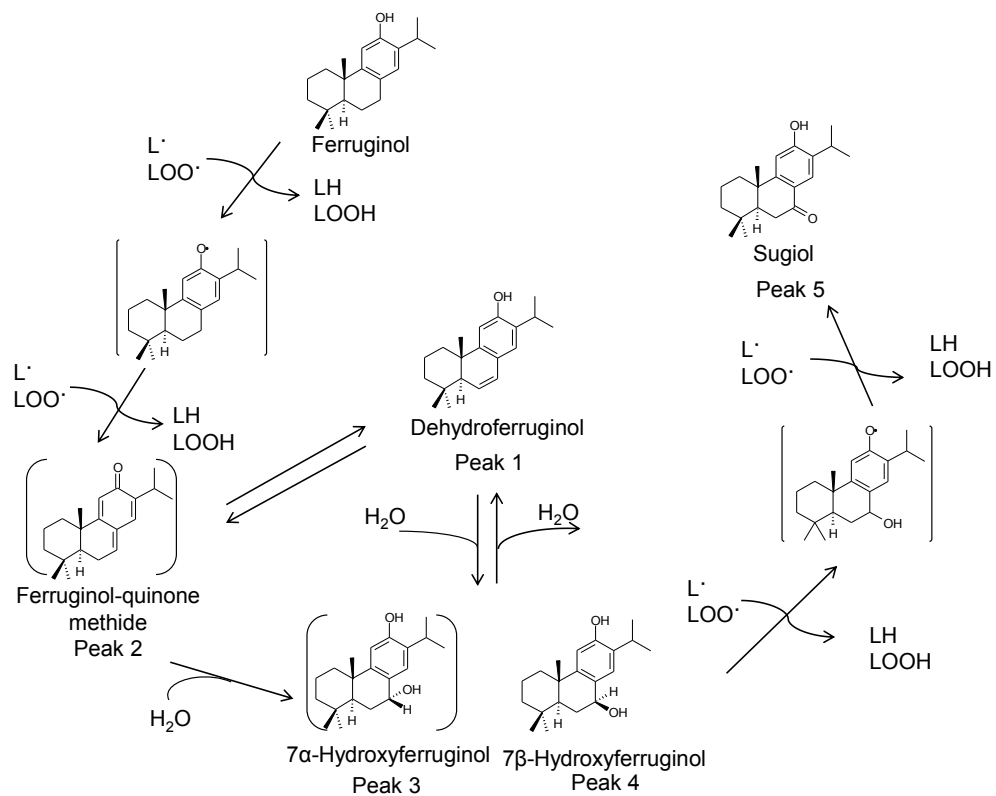


Figure 3-8. Proposed mechanism of ferruginol antioxidant activity against methyl linoleate oxidation.

第4節 小括

本章では、スギ樹皮成分の抗酸化剤としての利用を検討することを目的とし、まず主成分である ferruginol の抗酸化能の評価と、その抗酸化機構について検討した。

Ferruginol と市販抗酸化剤の carnosic acid, (\pm)- α -tocopherol, BHT と共に DPPH ラジカル捕捉能試験, β -カロテン退色法, 不飽和脂肪酸に対する抗酸化能を見るためリノール酸と直接混合し, 油脂酸化抑制能試験を行った。Ferruginol は, DPPH ラジカル捕捉能試験, β -カロテン退色法において carnosic acid, (\pm)- α -tocopherol より弱い活性であったが, 油脂酸化抑制能試験では BHT に次いで油脂の酸化を抑制した。次に ferruginol の抗酸化機構について調べるため, ferruginol とリノール酸を直接混合させて加熱した。試料の GC-MS 析を行い, ferruginol 誘導体の生成を追跡した。Ferruginol 誘導体として, 6,7-dehydroferruginol, 7 β -hydroxyferruginol, sugiol が同定され, 7 α -hydroxyferruginol, ferruginol-quinonemethide の生成を推定した。Ferruginol の誘導体と各成分の生成量より, ferruginol の *p*-キノンメチド体を中間体とする油脂の抗酸化機構を推定した。

第4章 スギ樹皮抽出成分の変異と変化

第1節 序論

第2, 3章において, スギ樹皮が含有する抽出成分の有効利用法について検討し, スギ樹皮抽出物の新たな利用を示した。これまでの樹木の抽出成分についての研究では, 産地や樹種ごとの違いがあることが知られている。この成分の違いについては化学分類学的視点から, スギの材, 葉の品種ごとの抽出成分について詳しく研究されている (長濱ら 1995, 2000, 安江ら 1976)。しかしながら, スギ樹皮の抽出成分については, 木部に比べ詳細に調べられておらず, 樹皮成分については, 知見の蓄積が少ないのが現状である。従って, 付加価値の高い利用法を考える上でも, スギ樹皮成分の品種ごとの基礎的知見の構築が必要であると考えた。

特に, スギの各クローン間では, スギ葉に含有されるジテルペン成分に顕著な差異があり, *ent-kaurene*, *phyllocladene*, *ent-sclarene* (Table 5-1) のいずれかの成分が主成分となるタイプ, もしくはそれらが複合して含有されているタイプの存在が示されている (Appleton et al. 1968, 1970, 安江ら 1976)。またこの葉のケモタイプと心材成分との関係も調べられている(長濱ら 2001, 2002)。しかし, スギ葉のジテルペンが, 樹皮の抽出成分の差異に影響があるか未知である。芦谷ら (2001) は, テルペンを中心としたスギ樹皮成分の特徴について, 1個体から採取した試料のみしか言及していない。また, スギ内樹皮が含有するフラバノール類に季節変化がある (鮫島ら 1986) とされているが, 樹皮の主要成分であり, 本研究で活性が確認されている低極性成分のテルペン類についてはこれまで不明である。樹皮成分を有効的に活用する上で, スギ樹皮成分の包括的な

理解を得ることが必要であるが、植物の成分の差異が起きる要因には、遺伝子、生育環境、生育年など様々な事柄が挙げられ、基礎的な知見が少ない樹皮成分の変化を調べるのは困難であることが予想された。そこで既知である上述したスギ葉のジテルペンタイプに焦点を当て、異なる葉のケモタイプのスギ樹皮成分を分析することにより、本研究で確認された低極性抽出成分の含有に差異があるかを検討した。また、3章の抗酸化活性試験で、**ferruginol** はリノール酸から発生したラジカルによって容易に酸化することが示された。そのため自動酸化反応でも変化が起こる可能性が考えられる。そこで本章では、**ferruginol** の自動酸化反応についても調べ、生成物と樹皮中の成分との比較も行った。

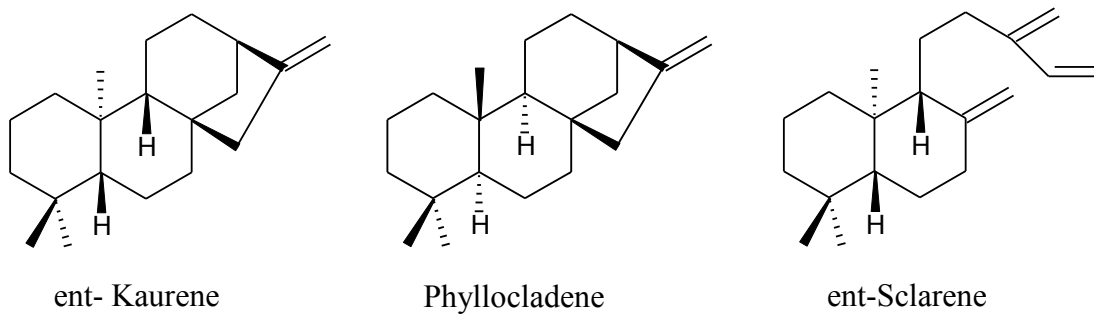


Figure 4-1. Structure of ent- kaurene, phyllocladene, and ent-sclarene.

第 2 節 実験方法

2.1 スギ樹皮及びスギ葉の抽出

2.1.1 試料採取

スギの樹皮及び葉は、山形県林業研究研修センター羽黒育種園で 1979 年に造成されたスギ 4 号採種園にて採取した。スギ立木から胸高位の樹皮 (2×5cm) を剥離し、同時に同一木の葉も採取した。

2.1.2 試料の抽出

採取した樹皮は、内樹皮、外樹皮に分け、内樹皮を 1 cm 四方に切った後、バイアル瓶に入れ、Shibutani et al. (2009) の実験を参考にヘキサンとベンゼンの混合溶媒 (ヘキサン:ベンゼン=1:1 (v/v)) の溶媒で抽出を行った。抽出期間は 3 日間で、2 回行った、得られた溶液は、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮を行った。また、葉はハサミで細かく裁断した後、バイアル瓶に入れ、ヘキサンによる抽出を行った。

2.1.3 成分分析

スギの内樹皮の抽出物は、内部標準の *n*-heneicosane と混合し (抽出物 : *n*-heneicosane = 10 : 1), GC-FID, GC-MS に 1 μ L インジェクションし、分析を行った。使用機器は、GC-MS QP2010 (Shimadzu), カラムは、DB-1 キャピラリーカラム (0.32 mm i.d. × 30 m; 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific)を使用した。キャリアガスはヘリウムを使用し、スプリット比は、1:20 で行った。カラム温度は、100 °C開始で 3 分保持し、昇温速度 5 °C/min, 最終温度 320 °Cで 5 分保持した。気化室温度は 250 °C, 検出器温度は 320 °Cで行った。GC-FID の使用

機器は、GC-FID (SHIMADZU GC-2014), 使用カラムは DB-5 キャピラリーカラム (30 m × 0.32 mm; 0.25 μm film thickness) を使用した。キャリアガスはヘリウムを使用し、スプリット比は、1:50 で行った。50 °C スタートの 1 分保持, 320 °C まで昇温温度 5°C / min, 5 分保持, 気化室温度 250 °C, 温度 300 °C, キャリアガスにはヘリウムを使用した。

スギ葉のジテルペンタイプを特定するため、葉のヘキサン抽出溶液は直接 GC-MS に注入し分析を行った。以前の研究 (Yamashita et al. 2014) で用いられた ent-kaurene, phyllocladene, ent-sclarene の研究室保有の標品を使用し、各スギの葉のジテルペンタイプを決定した。

2.2 Ferruginol の自動酸化

前章で用いた ferruginol 0.25 mg を、バイアル底面 (直径 14 mm) に塗布し、85 °C オープンで 2 時間から 40 時間加熱した。取り出した試料を冷却後、酢酸エチル 250 μL を加え、内部標準に *n*-heneicosane を使用し、GC-FID, GC-MS で分析を行った。GC-MS の使用機器は QP2010 (Shimadzu), カラムに、DB-1 キャピラリーカラム (0.32 mm i.d. × 30 m; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific) を使用した。カラム温度は、180°C 開始で 1 分保持し、280 °C まで昇温温度 2 °C/min, 320 °C まで昇温温度 10 °C / min, 最終温度 320 °C で 5 分保持した。気化室温度は 250 °C, 検出器温度は 320 °C で行った。キャリアガスはヘリウムを使用し、スプリット比は、1:20 で行った。GC-FID の使用機器は、GC-FID (SHIMADZU GC-2014), 使用カラムは DB-5 キャピラリーカラム (30 m × 0.32 mm; 0.25 μm film thickness) を使用した。カラム温度は、180 °C スタートの 1 分保持, 280 °C まで昇温温度 2 °C / min, 320 °C まで昇温温度 10 °C / min, 最終温度 320 °C で 5 分保持した。気化室温度 250 °C, 検

出器温度 300 °Cで行った。キャリアガスはヘリウムを使用し、スプリット比は、1:20で行った。生成物は、GC-FID 分析で ferruginol 換算値として定量した後、生成率を反応前の ferruginol を 100 %として算出した。

第 3 節 結果と考察

3.1 スギ樹皮低極性成分のスギ葉のジテルペンタイプによる差異

Figure 4-2 に葉の分析結果を、Table 4-1 に各試料の葉のジテルペンタイプを示す。今回、採取したスギの品種は酒田 3 号、西置賜 2 号、南魚沼 2 号であり、それぞれの葉のジテルペンタイプは、ent-kaurene, phyllocladene, ent-sclarene であった。Figure 4-3 に各試料の樹皮抽出物の GC-MS のクロマトグラフを示す。各試料で樹皮に含有される成分の同定、定量を行った結果、全ての試料の樹皮抽出物でモノテルペンの α -pinene, セスキテルペンの cubebol, ジテルペンの phyllocladanol を確認した (Figure 4-3)。また、ステロイドの sitosterol も共通して検出した。ジテルペンでは、ferruginol が最も多く含有され、その含有率はヘキサンベンゼン抽出物あたり 19.7%~45.7%であった。その他には、6,7-dehydroferruginol, 12-methoxy-8,11,13-abietatriene-7 β ,11-diol, sugiol などの成分を確認した。また ferruginol の誘導体として考えられる unknown のピークも確認した (Figure 4-4)。このピークの MS スペクトルと 12-methoxy-8,11,13-abietatriene-7 β ,11-diol の MS スペクトルは、類似していたため (Figure 4-4), この成分をその立体異性体である 12-methoxy-8,11,13-abietatriene -7 α ,11-diol と考えた。今回検出されたアビエタンタイプジテルペンの構造を Figure 4-5 に示す。樹皮抽出物中のジテルペンの定量結果を Table 4-2 に示す。Ferruginol は、全ての試料で最も多く含まれ

ることが確認され、*phyllocladanol* 以外の他のジテルペンの主成分として *ferruginol* から誘導した構造をとると考えられる成分がどのタイプのスギの樹皮でも含有されることが判った。しかしながら、どの試料でも成分の量の差異は確認されたがケモタイプごとに大きな定性的違いは見られなかった。今回用いた南魚沼 2 号の試料は、どちらも *ferruginol* 量が他品種の試料に比べ少なかった。これは、採取木が被圧木である南魚沼 2 号であることに起因することが考えられた。

本研究で分析した試料は、同一環境で生育した同じ樹齢の山形県（酒田 3 号、西置賜 2 号）、新潟県（南魚沼 2 号）産のスギ品種である。本研究により、葉のケモタイプが異なっても、同一環境で生育したスギ品種の樹皮低極性成分には、定性的に大きな違いが見られないことが示された。今後、心材成分との関係、同一品種で生育環境の異なる個体の分析、季節変動などの解析を行うことで、さらに樹皮成分に対する知見の蓄積の必要があるが、今回のデータはその前提となる基礎的知見である。

3.2 Ferruginol の自動酸化

次に、スギ樹皮含有成分の利用を考える上で、*ferruginol* は、含有量が多く様々な活性を有することから重要な成分と考えられる。そこで *ferruginol* の自動酸化を追跡した。

Ferruginol を 85°C で自動酸化させ GC 分析を行った。反応時間 2 h, 14h の試料の分析結果を、例として Figure 4-6 に示す。GC 分析から算出した各成分の生成率の変化を Figure 4-7 に示した。反応初期で最も生成量が多かったのは、前章で報告した *ferruginol* の *p*-キノンメチド体であった。次いで 6,7-dehydroferruginol, sugiol, 7-hydroxyferruginol の生成量が多くなる結果と

なった。この生成量の変動は、前章の油脂中の ferruginol の誘導体の変化に類似しており、すべての反応は、酸素ラジカルや過酸化ラジカル、水の付加、及び脱水によることが考えられ、前章と同様の自動酸化の反応機構が推察された (Figure 4-8)。また ferruginol の残量と GC で検出された ferruginol 酸化物の合算は、ferruginol の減少量に比べ少量であった。これは GC 分析条件では検出不可な ferruginol の過酸化物の生成、さらに ferruginol のキノンメチド体が生成されていることから ferruginol の重合体の生成によるものと考えた。

本結果より、樹皮中の成分として確認された 6,7-dehydroferruginol, sugiol が、ferruginol の自動酸化でも生成されることが示された。一方、12 位に酸素が付加し、11 位の水酸基がメチル化された構造を有する 12-methoxy-8,11,13-abietatriene-7 β ,11-diol, cryptojaponol が樹皮中で確認されている。モノテルペン β -thujaplicin のメチル化酵素の存在がカルス細胞を用いた研究で予想 (Yamada et al. 2002) されていることから、フェノール性水酸基のメチル化は植物内で酵素反応により生じると考えられる。12-methoxy-8,11,13-abietatriene-7 β ,11-diol, cryptojaponol は、このようなメチル化酵素によって ferruginol から生成したことが予想される。したがって、樹皮中では 6,7-dehydroferruginol 又は、sugiol からの更なる変化は、12 位の酸化と 11 位の水酸基のメチル化が制御された酵素反応によって進行しているものと考えられ、この点が単純な樹皮の自動酸化と異なることを考えた。本研究で予想された ferruginol の自動酸化過程は、3 章の抗酸化機構を支持する結果となり、樹皮中の ferruginol 誘導体の生成についてもある程度一致していた。

これまでの ferruginol 誘導体の生物活性の研究では、6,7-dehydroferruginol, sugiol は、ferruginol よりも弱い活性であることが示されている (Kusumoto et al. 2009, 2010)。本実験の自動酸化反応で ferruginol が、容易にこれらの成分

に変化することが示されたため、スギ樹皮抽出物を ferruginol の活性に依存した利用法で用いる場合は、この自動酸化反応による変質に特に注意する必要がある。

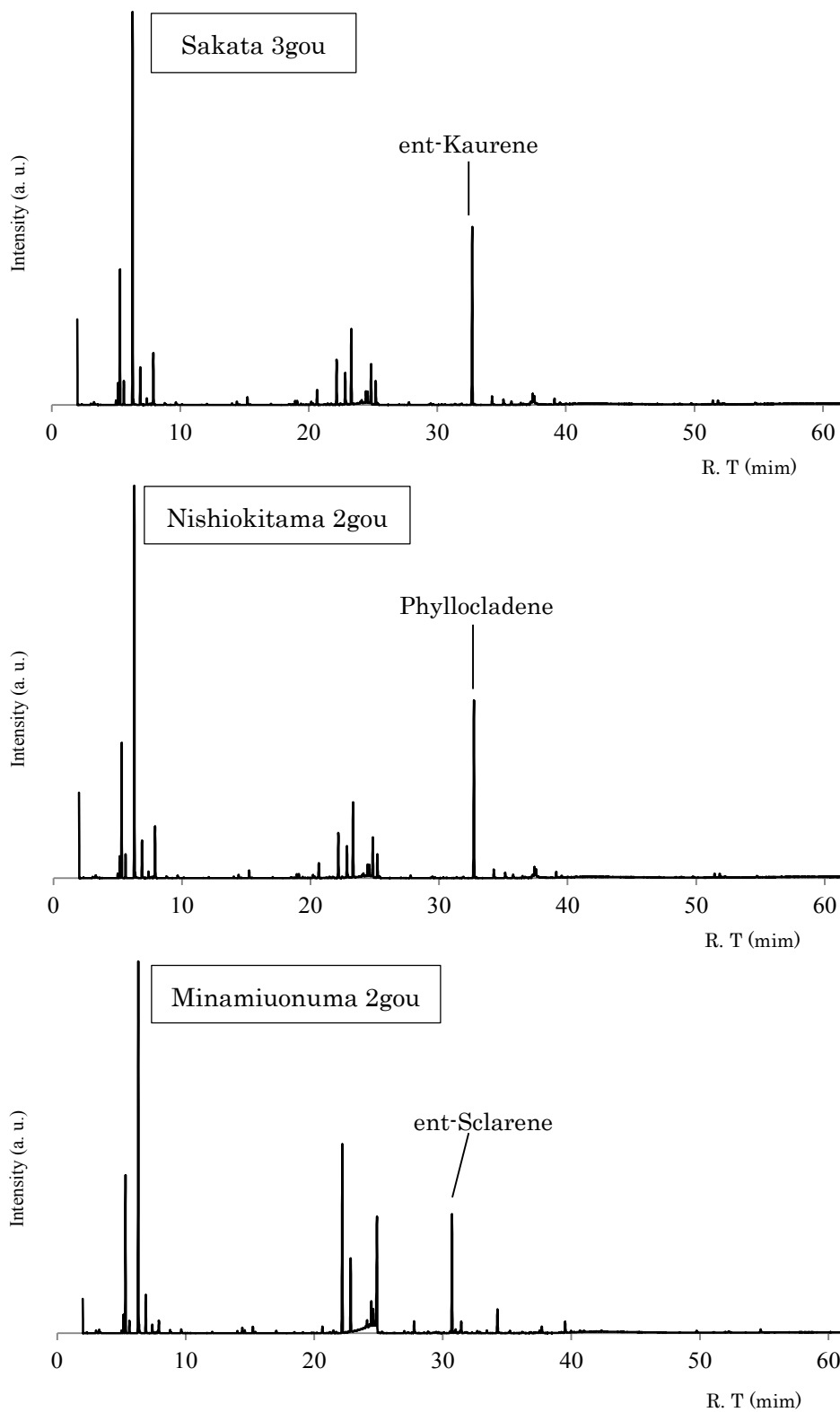


Figure 4-2. GC-MS chromatogram of *Cryptomeria japonica* leaf extracts.

Table 4-1 Variation of *Cryptomeria japonica* sample.

Variaty name	Leaf chemo-type
Sakata 3 gou	ent-Kaurene
Nishiokitama 2 gou	Phyllocladene
Minamiuonuma 2 gou	ent-Sclarene

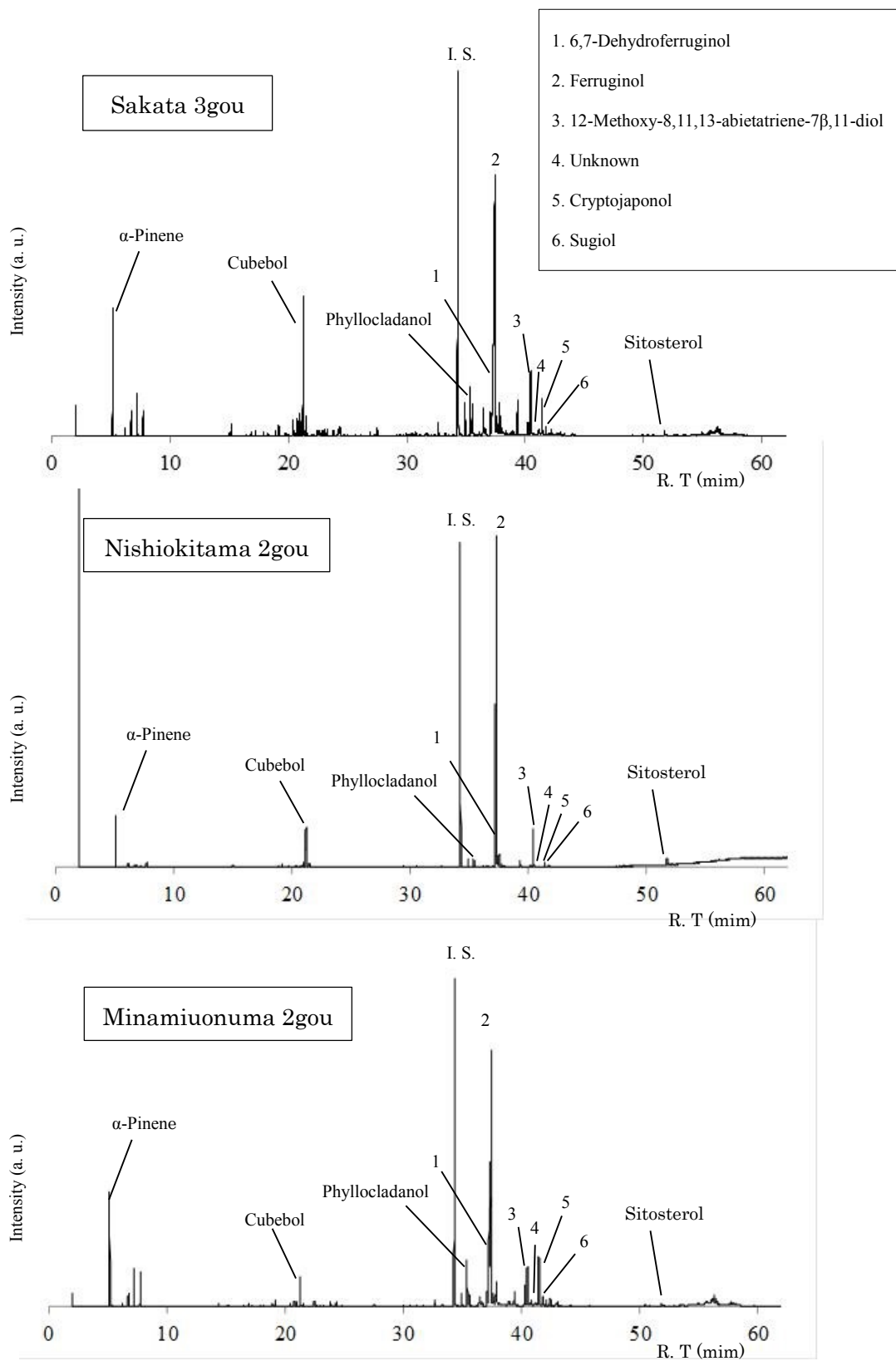


Figure 4-3. GC-MS chromatogram of *Cryptomeria japonica* bark extracts.

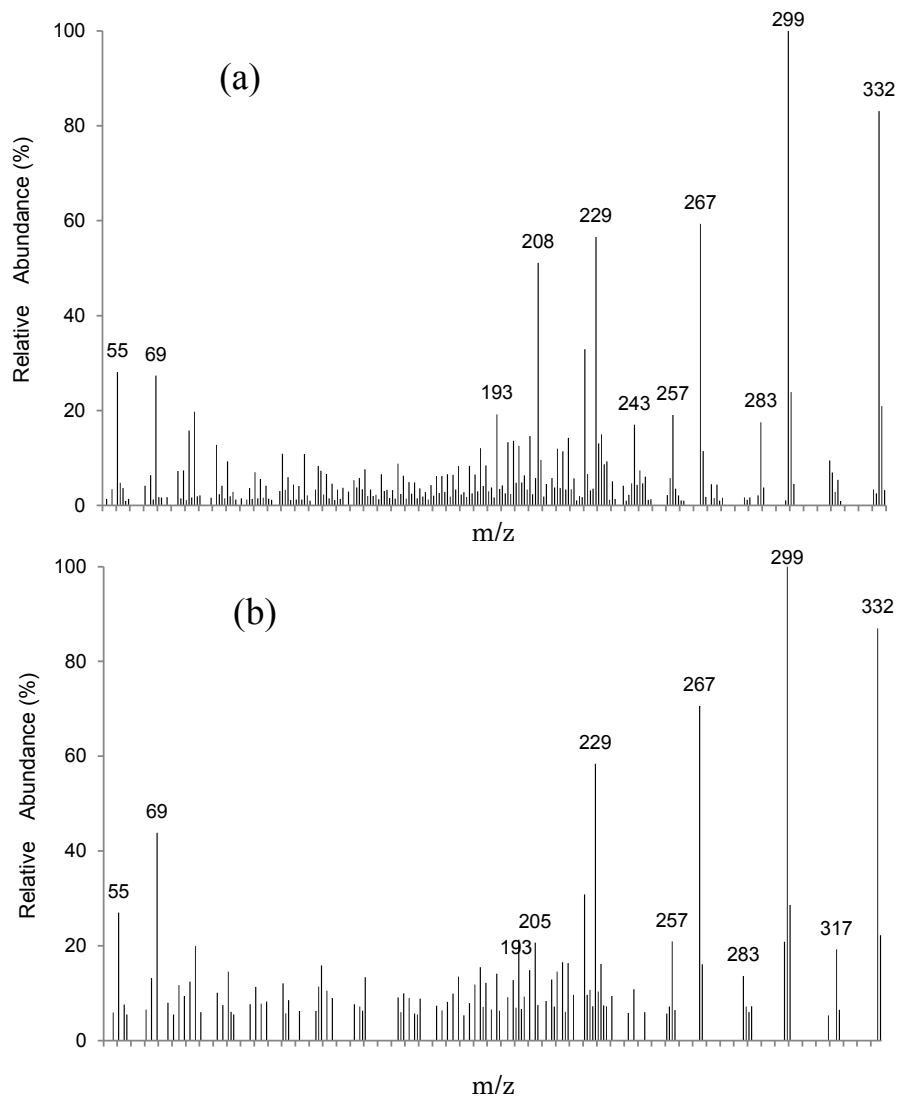
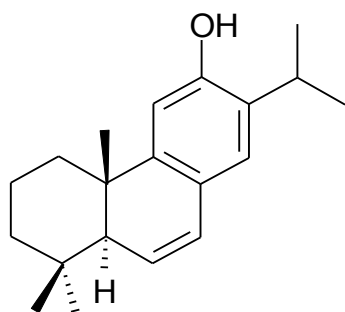
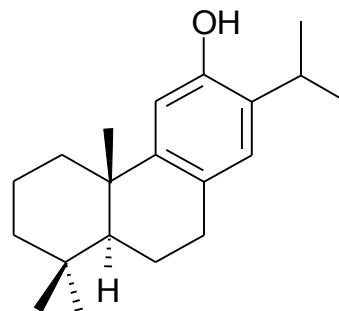


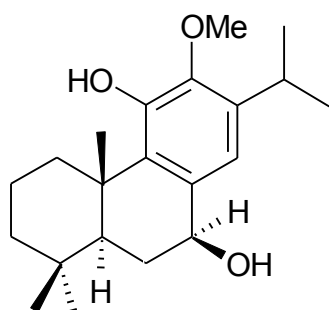
Figure 4-4. MS spectrum of 12-methoxy-8,11,13-abietatriene-7 β ,11-diol (a), unknown(b).



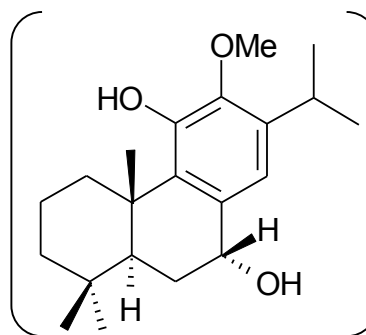
6,7-Dehydroferruginol



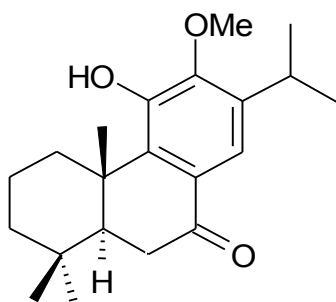
Ferruginol



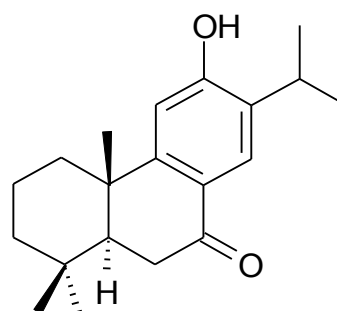
12-Methoxy-8,11,13-abietatriene-7 β ,11-diol



12-Methoxy-8,11,13-abietatriene-7 α ,11-diol*



Cryptojaponol



Sugiol

Figure 4-5. Structure of abietane type diterpene in *Cryptomeria japonica* bark.

*Estimated structure.

Table 4-2. Contents (%) of main diterpene component detected on chromatogram of Sugi bark extracts.

Peak No. *		Sakata 3 gou		Nishiokitama 2 gou		Minamiuonuma 2gou	
		350	365	477	312	455	448
1	6,7-Dehydroferruginol	4.57	7.61	11.6	6.35	8.78	6.49
2	Ferruginol	25.4	45.7	26.8	16.9	19.4	8.73
3	12-Methoxy-8,11,13-abietatriene-7 β ,11-diol	2.31	1.49	1.93	1.45	0.803	0.324
4	(12-Methoxy-8,11,13-abietatriene-7 α ,11-diol)**	1.66	1.38	0.764	0.962	0.807	0.0103
5	Cryptojaponol	0.181	2.46	3.38	1.98	1.69	0.876
6	Sugiol	0.308	1.54	0.786	0.142	0.28	0.137

* Refer to Figure 4-3.

** Estimated

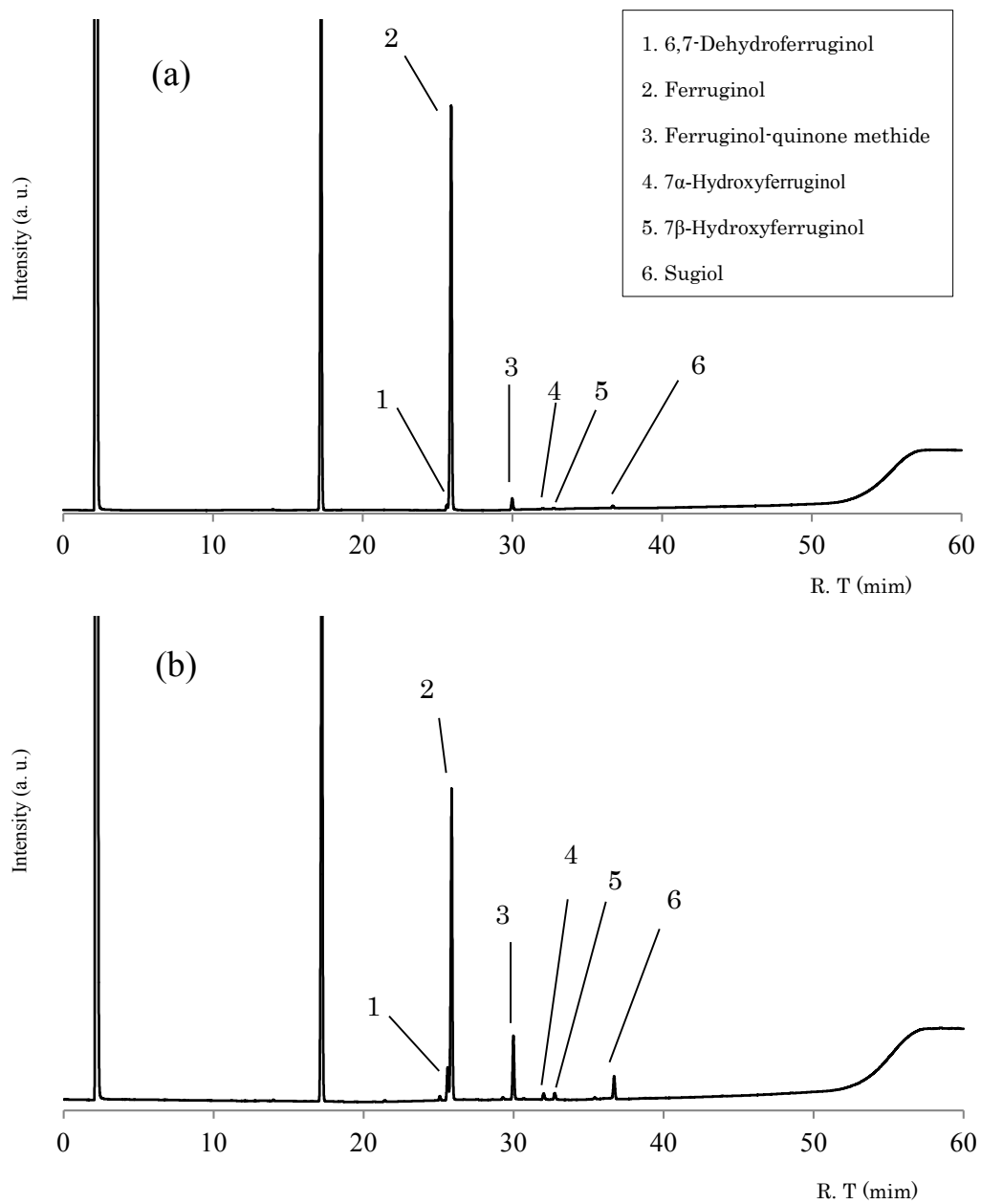


Figure 4-6. GC-FID chromatogram of ferruginol autoxidation samples.
 (a) reaction time for 2h, (b) reaction time for 14h.

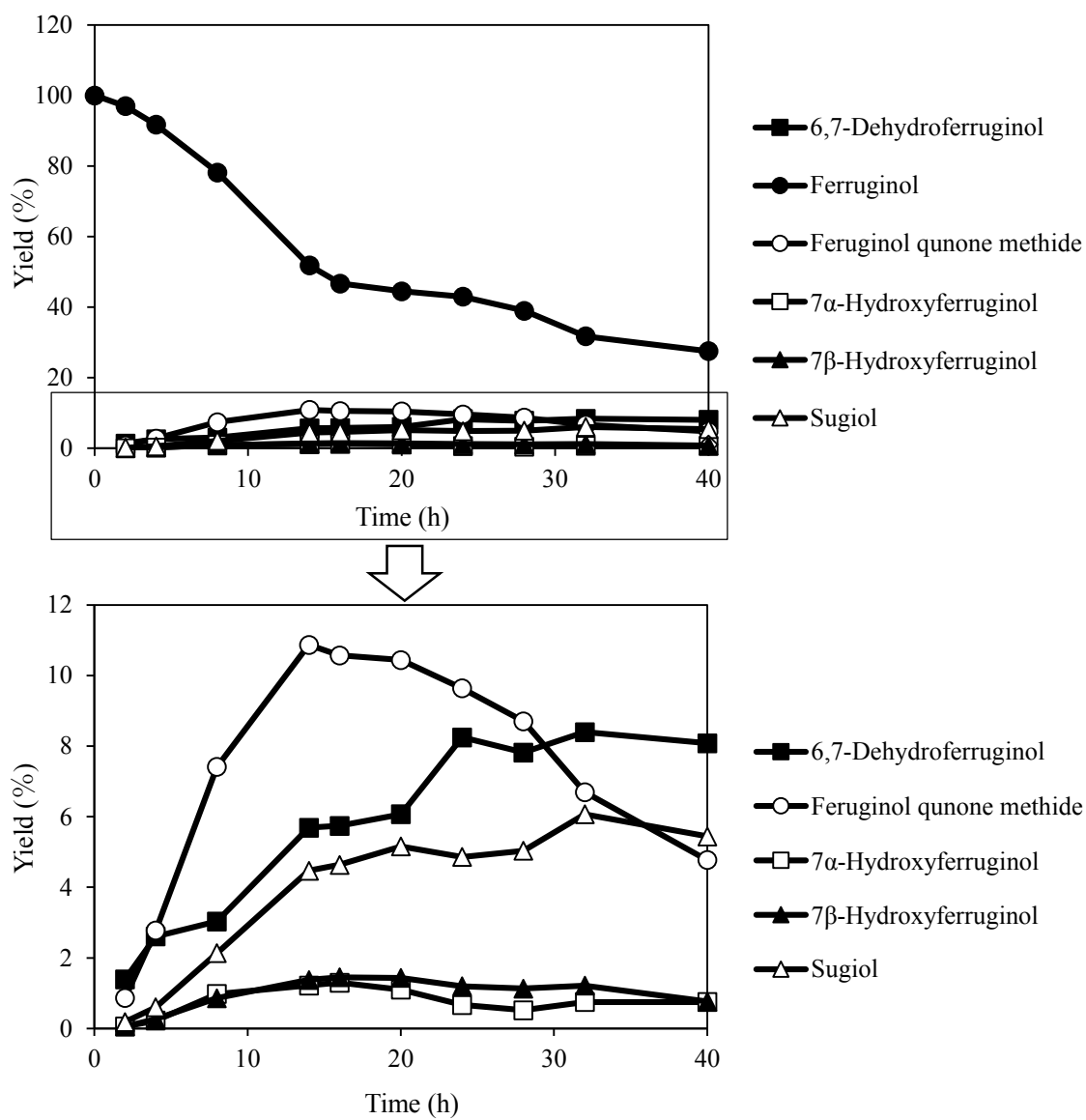


Figure 4-7. The time course of the quantity of ferruginol derivatives by GC-FID in ferruginol autoxidation.

*Yield of 100 % was calculated based on the amount of ferruginol before the reaction.

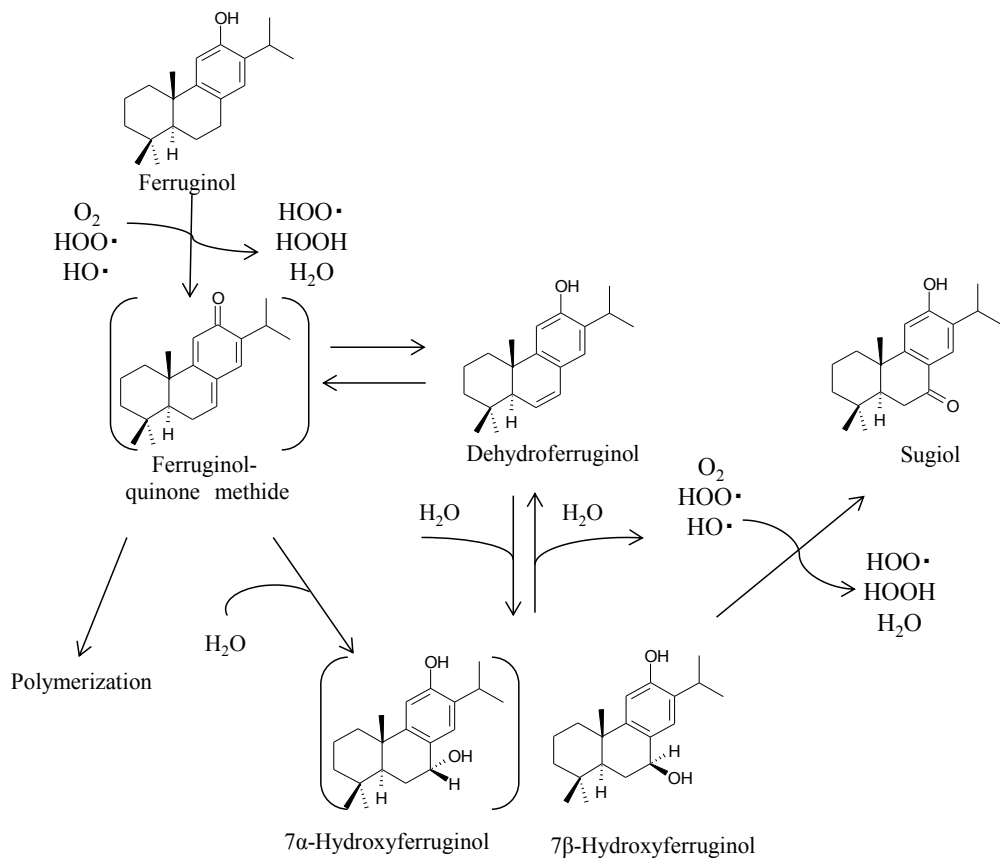


Figure 4-8. Autoxidation mechanism of ferruginol.

第 4 節 小括

本章では、化学分類学的視点からスギ葉のジテルペンタイプに焦点を当て、異なる葉のケモタイプのスギの樹皮成分を分析することにより、第 2 章で活性が確認された低極性抽出成分の含有量に差異があるかについて検討した。また、第 3 章の抗酸化活性試験で、ferruginol はリノール酸から発生したラジカルによって容易に酸化することが示されたため、ferruginol の自動酸化反応についても調べ、生成物と樹皮中の成分との比較を行った。

全ての試料の樹皮抽出物で、 α -pinene, cubebol, phyllocladanol, sitosterol と、ferruginol 及び ferruginol の誘導体を確認した。どの試料でも成分の量の差異は確認されたが定性的に大きな違いは見出すことが出来なかった。

次に、スギ樹皮含有成分の利用を考える上で、ferruginol は、含有量が多く様々な活性を有することから、重要な成分と考えられたため、ferruginol の自動酸化を追跡した。反応初期で最も生成量が多かったのは、前章で確認した ferruginol の *p* キノンメチド体であった。また 6,7-dehydroferruginol, sugiol, 7-hydroxyferruginol の生成が確認された。これらの生成過程は、前章の油脂中の ferruginol の誘導体の変化に類似しており、前章と同様に、自動酸化の反応機構が推察された。本研究で予想された ferruginol の自動酸化過程は、3 章の抗酸化機構を支持する結果である。前章で述べたように、ferruginol 誘導体の生物活性の研究から、6,7-dehydroferruginol, sugiol は、ferruginol よりも弱い活性であることが示されている。Ferruginol が自動酸化反応で、容易にこれらの成分に変化することを示されたため、スギ樹皮抽出物を ferruginol の活性に依存した利用法で用いる場合は、特に注意する必要があるが示された。

第5章 総括

現在、日本の森林は、戦後植林されたスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) を中心に利用可能な資源が充実しつつあり、中でもスギは、植林面積、蓄積量、及び林業における素材生産量が最も多い樹種である。林業において、樹木の樹皮は材部と同様には使用されておらず、その廃棄量は多く、特に生産量が多い樹種であるスギの樹皮の廃棄量は多い。木質資源の有効利用が求められているが、樹皮の利用法としては、主に燃料利用などでしか利用されていないのが現状である。資源利用の方法として、カスケード利用と呼ばれる多段階利用が望ましいとされている。よって、樹皮の成分を最大限に利用する付加価値の高い利用法を研究する必要があると考えられた。スギ樹皮は、木部と比べて特に多量の副成分を含むことから、付加価値の高い利用を考えるには、抽出成分の利用を拡大する必要がある。しかしながら、スギ樹皮の抽出成分については、知見の蓄積が少ないのが現状である。そこで、本研究では、スギ樹皮抽出成分の利用ため、スギ樹皮成分の新たな生物活性の探索と含有する成分の特性について検討することを目的とした。

第2章では、樹皮の新たな有効利用法の探索として、そのアレロパシー活性に注目してスギ樹皮抽出物を用いた赤潮藻類 (*Heterosigma akashiwo*) に対する増殖抑制効果を検討した。さらに増殖を抑制する成分を明らかにすることを目的として、単離成分の赤潮藻類 *H. akashiwo* に対する増殖抑制試験を行った。スギ樹皮を内樹皮、外樹皮に分け、それぞれヘキサン、酢酸エチル、メタノールによる逐次抽出を行った。得られた逐次抽出物の中で、*H. akashiwo* に対し強い増殖抑制活性が確認されたのは、内樹皮のヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物、外樹皮のヘキサン抽出物であった。活性が確認された抽出物のガスクロ

マトグラフ質量分析 (GC-MS) 分析を行ったところ, cubebol, phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, ferruginol, sugiol を主要成分として検出した。それらの成分の *H. akashiwo* 増殖抑制試験を行ったところ, cubebol と ferruginol に強い活性が確認され, phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, sugiol は, 弱い活性であった。

以上より, スギ樹皮抽出物であるスギ内樹皮のヘキサン抽出物, 酢酸エチル抽出物と外樹皮のヘキサン抽出物が赤潮藻類 *H. akashiwo* の増殖抑制に効果的であることを確認し, さらに抽出物中の成分である ferruginol, cubebol が強い増殖抑制効果を示すことを明らかにした。また, スギ樹皮の抽出成分は, 赤潮藻類の防除剤として使用の可能性を明らかにした。水に難溶の低極性抽出成分に強い活性を確認したことから, 特に閉鎖域の養殖や水槽, またはフィルターなどに藻類防除剤として利用する可能性が示された。

第 3 章では, スギ樹皮成分の抗酸化剤としての利用を検討することを目的とし, 主成分である ferruginol の抗酸化能の評価と, その抗酸化機構について追跡した。Ferruginol と市販抗酸化剤の carnosic acid, (±)- α -tocopherol, dibutylhydroxytoluene (BHT) を 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉能試験, β -カロテン退色法を用いて抗酸化試験を行った。さらに, 不飽和脂肪酸に対する抗酸化能を見るためリノール酸と直接混合する油脂酸化抑制能試験も行った。Ferruginol は, 極性溶媒中での試験である DPPH ラジカル捕捉能試験, β -カロテン退色法では, BHT, carnosic acid, (±)- α -tocopherol より弱い活性であった。しかし, 油脂酸化抑制能試験では BHT に次いで油脂の酸化を抑制する活性を示し, その活性は, carnosic acid, (±)- α -tocopherol より強かった。次に ferruginol の抗酸化機構について調べるため, ferruginol とリノール酸を混合させ加熱し, GC-MS 分析を行い, ferruginol 誘導体の生成を追跡した。

Ferruginol 誘導体として，生成物中に 6,7-dehydroferruginol，7 β -hydroxyferruginol, sugiol が同定され，7 α -hydroxyferruginol, ferruginol の *p*-キノンメチド体の生成が推定された。Ferruginol の誘導体と各成分の生成量より，ferruginol の抗酸化機構として，ferruginol キノンメチド体を中間体とする油脂の抗酸化機構を推定した。

第4章では，化学分類学的視点からスギ葉のジテルペンタイプに焦点を当て，異なる葉のケモタイプのスギの樹皮成分を分析することにより，第2章で活性を確認した低極性抽出成分の含有に葉のケモタイプの異なるスギ間で差異があるかを検討した。また，第3章の抗酸化活性試験で，ferruginol はリノール酸から発生したラジカルによって容易に酸化することが示されたため，ferruginol の自動酸化反応についても調べ，生成物と樹皮中の成分との比較を行った。

全ての試料の樹皮抽出物でモノテルペンの α -pinene，セスキテルペンの cubebol，ジテルペンの phyllocladanol, ferruginol，及び ferruginol 誘導体が確認された。ジテルペンでは，ferruginol が最も多く含有され，その含有率は抽出物あたり 19.7%~45.7 %であった。どの試料でも成分の含有量の差異は確認されたが葉のケモタイプに依存する定性的な違いは見つからなかった。Ferruginol は，全ての試料で最も多く含まれることを確認し，phyllocladanol 以外の他のジテルペンの主成分として ferruginol が酸化した構造をとると考えられる成分が多くの種類含有されることが分かった。

Ferruginol を自動酸化させ分析をおこなったところ，反応初期で最も生成量が多かったのは，第3章で確認された ferruginol の *p*-キノンメチド体であった。次いで生成量が多いのは 6,7-dehydroferruginol, sugiol, 7-hydroxyferruginol であった。この生成量の変動は，前章の油脂中の ferruginol の誘導体の変化に類似しており，同様の自動酸化の反応機構が推察された。

予想された ferruginol の自動酸化過程は、3 章の抗酸化機構を支持する結果となり、樹皮中の ferruginol 誘導体の生成についてもある程度一致する。これまでの ferruginol 誘導体の生物活性の研究では、6,7-dehydroferruginol, sugiol は、ferruginol よりも弱い活性であることが示されている。本実験の自動酸化反応で ferruginol が容易に、これらの成分に変化することを示したため、スギ樹皮抽出物を ferruginol の活性に依存した利用法で用いる場合は、特に注意する必要があると結論した。

上述した研究結果より、スギ樹皮は、燃料や材料としてだけの利用だけではなく、新たに有害な生物の防除剤、抗酸化剤として使用できる可能性が示された。しかしながら、その主体となる ferruginol は、自動酸化されやすく、抽出成分を利用するためには、樹皮又は抽出物の保存状態に注意する必要がある。

これまでのスギ樹皮の利用の研究では、主に燃料や材料利用が提示されている。本研究で示された抽出成分の利用は、それらのエネルギーやマテリアル利用に先立って得られる成分を利活用する方法であると考えられる。本研究は、将来的な資源利用の方法として、カスケード利用が望まれる中で、スギ樹皮の多段階利用のファーストステップとして、付加価値の高い抽出成分利用の可能性を示すものであり、その基礎的知見の提示を行ったものである。

参考文献

- 青山 政和, 窪田 実, 高橋 弘行 (1983) 樹皮抽出物の植物生育に及ぼす影響. 木材学会誌. 29(12):930-934.
- Appleton R. A., McCrindle P., Overton K. H. (1968) The alternative occurrence of (-)-kaurene, (+)-phyllocladene in the leaves of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Phytochemistry*. 7:135-137
- Appleton R. A., McCrindle P., Overton K. H. (1970) The diterpene type from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*. 9:581-583.
- Arihara Sigenobu, Umeyama Akemi, Bando Shinya, Kobuke Seiya, Imoto Shinji, Ono Mikako, Yoshikawa Kazuko, Amata Katsuaki, Hashimoto Shigeru (2004) Termiticidal constituents of the black-heart of *Cryptomeria japonica*. *Mokuzai Gakkaishi*. 50:413-421
- 芦谷 竜矢, 氏家 正嗣, 長濱 静男, 上野 智子, 坂井 克己 (2001) スギ樹皮抽出成分の特徴. 木材学会誌. 47(3):276-281
- 芦谷 竜矢, 藤田 弘毅, 楠本 倫久, 関根 伸浩, 高橋 孝悦, 栗本 康司 (2011) PEG・バイサルファイト法により液化したスギ樹皮を原料としたポリウレタンフィルム調製の調製. 木材工業. 66(5):205-209
- Brewer MS. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10:221-247.

- Chang Shang Tzen, Cheng Sen Sung, Wang Sheng Yang (2001) Antitermitic activity of essential oils and components from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides*). *Journal of Chemical Ecology*. 27:717-724.
- Chen Xiao Hui, Kim Chul-Sa, Kashiwagi Takehiro, Terabayashi Shin-ichi, Michio Horike (2000) Antifeedants against *Acusta despesta* from the Japanese Cender, *Cryptomeria japonica*. *Bioscience Biotechnol. Biochem.* 65(6):1434-1437.
- Cheng Sen Sung, Chang Shang Tzen (2014) Bioactivity and characterization of exudates from *Cryptomeria japonica* bark. *Wood Science Technology*. 48:831-840.
- 藤原 茂樹, 平山 敦, 長藤 雅則 (2013) 固体薬剤を用いたバラスト水処理システム. *JFE 技報* 32: 74-78.
- Gu Hui-Jing, Cheng Sen-Sung, Huang Chin-Gi, Chen Wei-June, Chang Shang-Tzen (2009) Mosquito larvicidal activities of extractives from black heartwood-type *Cryptomeria japonica*. *Parasitology Research*. 105:1455-1458
- 久田 紀夫, 森下 年起, 林 恭弘, 北原 伸浩, 橋本 真穂 (2009) スギ、ヒノキ樹皮粉碎繊維の植物生育阻害要因の除去とイチゴ高設栽培への利用. *近畿中国四国農業研究*. 14:64-67.
- 稲本 勝彦, 佐藤 弘, 高橋 龍三, 山崎 浩道, 長菅 香織, 矢野 孝喜, 山崎 博子, 山崎 篤 (2011) 界面活性剤および硫酸鉄処理によるスギ樹皮を培地としたシクラメン鉢物の生育改善. *園芸学研究*. 10(3):333-340
- 海上保安庁 海洋情報部 (2014) 海上保安レポート 2013.
- 環境省 (2012) 平成 24 年版 環境・循環型社会・生物多様性白書.
- 環境省 (2005) 平成 17 年版 環境白書.

- 川井 浩史 (2012) 船舶を介した海藻類の越境移動とその早期検出に向けて. 環境技術. 41: 427-432.
- 川崎 健 (1993) 海の環境学. 新日本出版社. pp.74-79.
- Kofujita Hisayoshi, Fujino Youji, Ota Michikazu, Takahashi Kouetsu (2006) Antifungal diterpenes from the bark of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Holzforschung*. 60(1):20-23.
- Kofujita Hisayoshi, Ota Michikazu, Takahashi Kouetsu, Kawai Yasushi, Hayashi Yoshiki (2002) A diterpene quinone from the bark of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*. 61(8):895-898.
- Kolak Ufuk, Kabouche Ahmed, Ozturk Mehmet, Kabouche Zahia, Topcu Gülaçtlı, Ulubelen Ayhan (2009) Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochemical Analysis*. 20:320-327.
- 近藤 伸一, 中尾 令子, 岩滝 光儀, 坂本 節子, 板倉 茂, 松山 幸彦, 長崎 慶三 (2009) 有害赤潮藻ヘテロカプサの分布域北上現象 : 佐渡島加茂湖での赤潮によるマガキの大量死. 日本水産学会誌, 78(4):719-725.
- Kuo Yuch-Hsiung, Chen Chia-Hsien, Wein Yung-Shung (2002) New dimeric monoterpenes and dimeric diterpenes from the heartwood of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. *Helvetica Chimica Acta*. 85:2657-2663.
- Kusumoto Norihisa, Ashitani Tatsuya, Hayasaka Yuichi, Murayama Tetsuya, Ogiyama Koichi, Takahashi Koetsu (2009) Antitermitic activities of abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum* cones. *Journal of Chemical Ecology*. 35:635-642

Kusumoto Norihisa, Ashitani Tatsuya, Murayama Tetsuya, Ogiyama Koichi, Takahashi Koetsu. (2010) Antifungal abietane-type diterpenes from the cones of *Taxodium distichum* Rich. *Journal of Chemical Ecology*. 36:1381-1386.

丸山 俊朗, 鈴木 祥広, 河添 智, 土手 裕, 増田 純雄 (1998) 凝集剤とタンパク質を併用した空気分散型-泡沫分離法による海産赤潮プランクトンの直接回収 水環境学会誌. 21(5):310-317

丸山 俊朗, 山田 僚一, 薄井 耕一, 鈴木 弘之, 吉田 多摩夫 (1987) 酸処理粘土による海産赤潮プランクトンの除去. 日本水産学会誌. 53(10):1811-1819.

Li Wen-Hsin, Chang Shang Tzen, Chang Shan Chwen, Chang Hui Ting (2008) Isolation of antibacterial diterpenoids from *Cryptomeria japonica* bark. *Natural Product Research*. 22 (12): 1085-1093.

Masuda Toshiya, Inaba Yuzuru, Takeda Yoshio (2001) Antioxidant mechanism of carnosic acid: Structure identification of two oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:5560-5565.

Masuda Toshiya, Inaba Yuzuru, Maekawa Tomomi, Takeda Yoshio, Tamura Hirotochi, Yamaguchi Hidemasa (2002) Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized Sage and Rosemary antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:5863-5869.

松岡 數充 (1993) バラスト水による有害海洋プランクトンの移動と生物海洋汚染の広域化 : オーストラリア・タスマニアの例. 沿岸海洋研究ノート 30: 224-233.

Matsushita Yoh-ichi, Sugamoto Kazuhiro, Miyakubo Kenji, Kurogi Chiaki, Matui Takanao, Oda Hisato, Fujimoto Hideo (2008) Chemical changes in terpenes of

sugi (*Cryptomeria japonica*) wood during steam drying in kiln at high temperature. *Journal of Wood Science*. 54:476-482

松原 賢, 長副 聡, 山崎 康裕, 紫加田 知幸, 島崎 洋平, 大嶋 雄治, 本城 凡夫 (2008)渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* に対する中心目珪藻類による増殖抑制作用.日本水産学会誌. 74(4):598-606

Mikami Ichiho, Yamaguchi Minako, Shinmoto Hiroshi, Tsushida Tojiro (2009) Development and validation of a microplate-based β -carotene bleaching assay and comparison of antioxidant activity (AOA) in several crops measured by β -carotene bleaching, DPPH and ORAC assays. *Food Science and Technology Research*. 15:171-178.

森本 浩, 大西 正記 (1997) 淡水赤潮の抑制手法に関する研究. 電力土木. 269:54-59.

村田 寿, 境 正, 延東 真, 黒木 暘, 木村 正雄, 九万田 一巳 (1988) *Chattonella marina* 赤潮除去剤の検討-特に過酸化水素と高度不飽和脂肪酸から発生するフリーラジカルの除去能. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55(6)1075-1082.

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) 精英樹県救磨3号, 県児湯3号, 県始良14号の成分. 木材学会誌. 46(3):225-230

長濱 静男, 塚本 智樹, 鳥居 信弘, 園田 太志, 山野邊 太郎 (2001) スギ材油のテルペノイド成分 (第7報) 精英樹水俣署4号外5クローンの成分. 木材学会誌. 47(6)487-492.

長崎 慶三, 高尾 祥丈, 白井 葉子, 水本 祐之, 外丸 裕司 (2005) プランクトンに感染するウイルスに関する分子生態. ウイルス. 55(1)127-132.

日本木材学会編集. (2011) 木質の構造. 文英堂. pp.249-251.

農林水産省 (2008) 平成 17 年木材需給報告書.

農林水産省 (2011) バイオマス・ニッポン 農林水産省ホームページ

<http://www.maff.go.jp/j/biomass/>

大原 誠資 (2007) 木質バイオマスからエタノールの生産技術の現状と展望. 森林科学. 51:56-59

大橋 英雄, 林 秀行, 山田 美津子, 安江 保民 (1987) ヒノキのフェノール性心材成分と心材色. 岐阜大学農学部研究報告. 52, 131-139.

Otani Yoshito, Sumimoto Masashi (1983) Extractive from the temperate wood species in pulping and paper making. III On brightness of Sugi BKP and chlorination of Ferruginol. *Japan TAPPI Journal*. 37:921-931.

Otto Angelika, White James D., Simoneit Bernd R. T. (2003) Natural Product

Terpenoids in Eocene and Miocene Conifer Fossils. *Science*. 297:1543-1545.

林野庁 編 (2014) 平成 25 年度森林林業白書 全国林業改良普及協会. pp.177-182

林野庁 編 (2014) 森林・林業統計要覧 2014 pp.8-11

林野庁 (2012) 森林資源の現況.

Rodriguez Jaime A., Theoduloz Cristina, Yanez Tania, Becerra Jose,

Schmeda-Hirschmann Guillermo (2006) Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: Assessment of its mechanism of action using in vitro models. *Life Sciences*. 78:2503-2509.

Saijo Hiromi, Tsuruta Kazuya, Kusumoto Norihisa, Ashitani Tatsuya, Takahashi Koetsu

(2013) Growth inhibition activities of Sugi bark components against *Heterosigma akashiwo*. *J. Wood Sci*. 59:238-242.

- 齋藤 孝, 滝川 清 (2014) 八代海における有害赤潮藻 *Chattonella antiqua* の HSI モデルによる発生予測手法の検討. 土木学会論文集 B3 (海洋開発). 70(2): 1146-1151
- 鮫島 正浩, 善本 知孝. (1986) スギ内樹皮中でのフラバノール類の季節変化. 東京大学農学部演習林報告. 75:307-314
- 関野 登, 小藤田 久義, 阿部 一成, 東野 正 (2011) 元素組成と化学成分から見た針葉樹樹皮チップ発熱量の特徴及びボイラー燃料としての発熱量変動範囲. 木材学会誌. 57:101-109
- 関野 登, 山内 剛 (2011) 残廃材を原料とした建築用バインダレス小片断熱パネル(第 5 報): スギ樹皮小片パネルの熱伝導率と耐落下衝撃性. 木材学会誌. 53(2)104-109.
- Shibutani Sakae, Takata Katsuhiko, Doi Suichi (2007) Quantitative comparisons of antitermite extractives in heartwood from the same clones of *Cryptomeria japonica* planted at two different sites. *Journal of Wood Science*. 53:285-290.
- 渋谷 栄, 鮫島 正浩, 佐分 義正, 鑑迫 典久 (1999) MICROTOXTM 試験における針葉樹樹皮抽出物による生物発光阻害. 東京大学農学部演習林報告. 102:133-142.
- 重松 頼生 (1960) 樹皮の構造に関する研究(第 5 報): スギ樹皮要素の配列について. 京都府立大学学術報告. 農學 12: 106-112.
- 島地 岩根, 吉村 貢, 安部 勲, 武田 明正 (1983) スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 樹皮の燃料資源学的基礎研究. 三重大学農学部演習林報告. 12:1-25.
- Shimamura Tomoko, Matsuura Ritaro, Tokuda Takashi, Sugimoto Naoki, Yamazaki Takeshi, Matsufuji H., Matsui Toshiro, Matsumoto Kiyoshi, Ukeda Hiroyuki

- (2007) Comparison of conventional antioxidants assays for evaluating potencies of natural antioxidants as food additives by collaborative study. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 54:482-487.
- Son KH, Oh HM, Choi SK, Han DC, Kwon BM (2005) Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*. 15(8):2019-2021.
- 杉本 香葉子, 三宅 忠夫, 森本 幸裕 (2002) スギ・ヒノキ樹皮を原材料とした土壌改良資材の性能について. 日本緑化工学会誌. 28(1):259-262.
- 鈴木 雅巳, 山本 民次 (2006) 製鋼スラッグの添加が海産珪藻 *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす影響に関する数値モデル解析:pHの影響の重要性. 鉄と鋼. 92(10): 635-642
- 田近 克司, 高野 了一, 水本 克夫, 茅原 正毅 (1991) 樹皮の土壌改良材としての利用 (第1報). 富山県林業技術センター研究報告. 5:20-28.
- 武田 宏 (2011) スギ樹皮を原料にした木質ペレット製造試験. 新潟県森林研究所研究報告. 52:49-52
- 田村 雅宣, 羽鳥 明満, 大宮 宏之 (2010) 火力・原子力発電所の取水口における海藻類流入の検討. 電力土木. 345:77-80.
- Tena MT., Valcarcel M., Hidalgo RJ., Uebera JL. (1997) Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: Comparison with liquid solvent sonication. *Analytical Chemistry*. 69:521-526.
- Tsuruta Kazuya, Yoshida Yayoi, Kusumoto Norihisa, Sekine Nobuhiro, Ashitani Tatsuya, Takahashi Koetsu (2011) Inhibition activity of essential oils obtained from Japanese trees against *Skeletonema costatum*. *Journal of Wood Science*. 57(6):520-525.

- Wang Sheng-Yang, Wu Jyh-Horng, Shyur Lie-Fen, Kuo Yueh-Hsiung, Chang Shang-Tzen (2002) Antioxidant activity of Abietane-type diterpenes from heart wood of *Taiwania cryptomerioides* Hyata. *Holzforschung*. 56:487-492.
- Yamada Junko, Fujita Koki, Sakai Kokki (2002) Feedback regulation of β -thujaplicin production and formation of its methyl ether in a suspension culture of *Cupressus lusitanica*. *Phytochemistry*. 60:447-450.
- Yamashita Yohei, Hashimoto Naoya, Kusumoto Norihisa, Saijo Hiromi, Goto Ikumi, Kobayashi Hikaru, Kurihara Yuka, Takahashi Koetsu, Ashitani Tatsuya (2014) Acaricidal activity of components of *Cryptomeria japonica* against spider mites. *Journal of Wood Science*. DOI:10.1007/s10086-014-1445-8
- 安江 保民, 荻山 絃一, 斎藤 正志 (1976) スギ葉のジテルペン炭化水素. 日本林學會誌. 58(8):285-290
- 安江 保民, 荻山 絃一, 及川 徹, 近藤 圭子, 仁科 健 (1977) スギ針葉のジテルペン炭化水素(II): 日本海側北部地域におけるその分布. 日本林學會誌. 59(6): 221-224.
- Yoshimoto Tomotaka, Samejima Masahiro, Macrae Robert. (1986) Some effects of *Cryptomeria japonica* inner bark extract on the growth of *Pleurotus ostreatus*, and *Trichoderma harzianum*. 東京大学農学部演習林報告. 74:1-8.

Summary

The bark of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don, commonly called Sugi) has been recognized as one of the most important wood-based waste materials produced by the Japanese wood industry. However, new methods for the use of Japanese cedar bark need to be developed to enable more effective use of Japanese forest resources. Several methods have been used for the preparation of synthetic plastic materials such as polyurethane and phenolic resin from wood-based wastes; these include liquefaction (solvolysis) of the Japanese cedar bark. Additionally, the Japanese cedar bark has been used as fuel for energy production.

The various bioactive components of the Japanese cedar bark have also been previously studied. For the effective utilization of natural resources, it is desirable that these functional bioactive components are used prior to the preparation of the plastic materials mentioned above. However, there is a lack of scientific knowledge regarding Japanese cedar bark extracts. The present study was performed to obtain the fundamental knowledge required for the applications of Japanese cedar bark extract.

The second chapter describes the ongoing efforts to develop novel applications for wood-based wastes by examining the growth inhibition properties of Japanese cedar

bark extracts against the red tide plankton *Heterosigma akashiwo*. Japanese cedar bark was separated into its outer and inner barks and then sequentially subjected to hexane, ethyl acetate, and methanol extraction. Strong inhibitory activities against *H. akashiwo* were observed in the tests involving the hexane extracts from the inner and outer barks and the ethyl acetate extracts from the inner bark. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis showed that cubebol, phyllocladanol, 6,7-dehydroferruginol, ferruginol, and sugiol were the main components of these active extracts. These components in isolation were then tested for their growth inhibitory effects against *H. akashiwo*. Cubebol, phyllocladanol, and ferruginol showed high inhibitory effects whereas 6,7-dehydroferruginol and sugiol only weakly inhibited growth. These results suggest that Japanese cedar bark extracts could be used as inhibitory agents against red tide plankton.

The third chapter discusses the antioxidant activity of the abietane-type diterpene ferruginol in comparison with that of carnosic acid, (\pm)- α -tocopherol, and dibutylhydroxytoluene by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, β -carotene bleaching, and linoleic acid assays. When a polar solvent buffer was used, ferruginol showed the lowest antioxidant activity using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and β -carotene

methods. However, under non-solvent conditions, ferruginol exhibited a stronger activity than carnosic acid and α -tocopherol during the linoleic acid oxidation assay. Five peaks corresponding to ferruginol derivatives were detected through GC-MS analysis of the reaction between ferruginol and methyl linoleate. Three reaction products were identified as 6,7-dehydroferruginol, 7 β -hydroxyferruginol, and sugiol, whereas the other two peaks were assumed to be 7 α -hydroxyferruginol and a quinone methide derivative of ferruginol. The duration of the reaction suggests that the quinone methide was produced at an early stage in the reaction and reacted further to produce 6,7-dehydroferruginol, 7-hydroxyferruginol, and sugiol. Thus, we inferred that quinone methide formation was a key step in the antioxidant reaction of ferruginol.

The fourth chapter describes the chemotaxonomical characterization of the low polar extract contained in Japanese cedar bark. First, each Japanese cedar tree was classified according to the diterpene components contained in their leaves. Then, each of the bark extracts collected from the different chemo-type Japanese cedar trees was analyzed by GC-MS. All bark samples presented monoterpene α -pinene, sesquiterpene cubebol, diterpene phyllocladanol, ferruginol, and ferruginol derivatives. The proportion of these components was different in all samples. Ferruginol was present in the highest

proportion in the low polar extract of Japanese cedar bark. However, no qualitative differences were observed depending on the leaf chemo-type. Japanese cedar bark extracts had many ferruginol-type diterpenes with the exception of phyllocladanol. After GC-MS, the autoxidation capacity of ferruginol was examined. In the early stage of the reaction, ferruginol quinone methide production was predominant. Other products included 6,7-dehydroferruginol, sugiol, and 7-hydroxyferruginol. The variation and duration of products is similar to the ferruginol antioxidant mechanism in unsaturated oil, as described in the third chapter. The ferruginol autoxidation mechanism was estimated with the ferruginol antioxidant mechanism. 6,7-Dehydroferruginol and sugiol have weaker biological activity than ferruginol. Thus, for future applications of the Japanese cedar bark in view of the potential effects of ferruginol, it is important to consider the oxidation of ferruginol, which results in the less biologically active compounds 6,7-dehydroferruginol and sugiol.

In conclusion, Japanese cedar bark has the potential to be used not only as a source for fuel and plastic production but also as a new alga inhibitor and antioxidant reagent. However, its main active component, ferruginol, is easily oxidized; therefore, care needs to be executed for the preservation of Japanese cedar bark extract compounds. In this

study, we provided the fundamental knowledge required for the effective use of Japanese cedar bark prior to its use as fuel and/or for plastic production.

謝辞

本研究を遂行するにあたって、御指導、御高配を受け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准教授に心より感謝し、御礼申し上げます。

また、日本獣医生命科学大学の畑井喜司雄名誉教授には、生物活性試験に関してご助言を受け賜わり、御礼申し上げます。山形県森林研究研修センター一部公一主任研究専門員には、試料を採取するにあたりご助言とお力添えを頂き御礼申し上げます。崇城大学工学部長濱静男名誉教授には、試料のご提供を頂き、深く感謝申し上げます。九州大学農学研究院環境農学部門の藤田弘毅先生には、研究を遂行するにあたりご助言を頂き、御礼申し上げます。秋田県立大学木材高度加工研究所の楠本倫久博士、岩手大学三陸復興推進機構三陸水産研究センター森川卓哉博士には、実験を行うにあたり多くのご助言を頂きました。御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行、論文執筆にあたり、多大なるご協力を頂きました、山形大学農学部食料生命環境学科森林科学コース森林資源利用学研究室の皆様、並びに岩手大学農学部共生環境課程森林科学コース森林資源化学研究室の皆様、に心より感謝申し上げます。