

間伐材精油の化学成分とその生理活性について

岡村 健司¹⁾, 村上 結城¹⁾, 岡田芳治²⁾, 野村正人²⁾

Chemical Components and Physiological Activities of Essential Oils from Thinned Wood

Kenji OKAMURA¹⁾, Yuki MURAKAMI¹⁾, Yoshiharu OKADA²⁾ and Masato NOMURA²⁾

Abstract

In this study, the authors investigated essential oils that were extracted from timber from thinning for antibacterial activity, bacterial elimination, and antioxidant activity aiming for effective use of the oils. The oils were found to be antibacterial against gram positive (*Staphylococcus aureus*) and gram negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. The antibacterial activities of the oils were re-examined by classifying the oils in Groups A to D ; and the chemical components of Group A, which showed antibacterial activity to all three bacteria, were analyzed. The main component was identified to be (+)- α -pinene (GC: 96.73%), which was shown to be involved in the expression of antibacterial activity. Bacterial elimination by the oils was tested by the hand washing method. The viable cell count was 88 in Group A compared to 668 in the control, showing strong bacterial elimination by the oils.

The authors then tested the availability of (-)-*Epicubenol*, which is a terpenoid contained in the oils, as a cosmetic ingredient. In a whitening effect test, which measured the inhibition of *L*-DOPA oxidation, (-)-*Epicubenol* showed an inhibition rate of 7.7%, which is higher than that of Arbutin (4.0%). The authors also disclosed that (-)-*Epicubenol* inhibits the enzymatic activity of tyrosinase between *L*-DOPA and DOPA quinine. The results suggest that essential oils from thinned wood contain useful components and are likely useful in many fields.

Key words : Thinned wood, Antibacterial activity, Bacterial elimination, Antioxidant activity, (-)-*Epicubenol*

¹⁾ 近畿大学大学院システム工学研究科

Graduate School of Systems Engineering, Kinki University.

²⁾ 近畿大学工学部化学生命工学科

Department of Biotechnology and Chemistry, Faculty of Engineering, Kinki University.

1. 緒 言

森林には8つの機能が備わっており、生物多様性保全機能、地球環境保全機能、土砂災害防止機能/土壌保全機能、水源涵養機能、快適環境形成機能、保健・レクリエーション機能、文化機能および物質生産機能がある。これらの機能を最大限に発揮するには適切な管理が必要である。一般的に森林の管理には、苗木づくり、植栽、地ごしらえ、下草刈り、つる切り(除伐)、枝打ち、間伐があり¹⁾、その中でも間伐は必要不可欠なのである。これを怠ると樹木が密集し、やせ細った樹木しか育たず、太陽光が林床に届かず下層植生が生育できなくなり、土砂災害などを引き起こす要因となっている。森林環境を守るためにも間伐は非常に重要な作業であり、その際、廃出される間伐材は、経済価値がないとの理由から、未利用のまま林内に放置されていた²⁾。しかし最近、地球温暖化防止の面から間伐材はカーボンニュートラルの考えの下、バイオマス燃料の素材として注目され、多くの事業が行われている³⁻⁵⁾。たとえば、バイオエタノール製造工程で、間伐材をチップ化し、水蒸気蒸留、糖化、発酵を経て製造される。今回、この工程の中でチップの水蒸気蒸留で得られる疎水性成分である精油についての利用を目的に本研究を行った。すなわち、著者らはすでに、多くの精油中に含まれているC₁₀のモノテルペノイドを含む化合物を化粧品、医薬品および食品添加物などへの利用を前提に利用可能な化合物に誘導・変換し、また、簡便な手法により殺虫剤、忌避剤、誘引剤、芳香剤、浴用剤などに適合できる化合物に変換しその効果発現についてはすでに報告⁶⁻⁹⁾した。本研究では、これらの関連研究の一環として間伐材の水蒸気蒸留により得られた精油中の含有成分を明らかにし、その中で興味ある化合物を単離した後、抗菌活性、除菌効果および抗酸化活性試験を行ったところ、新しい知見を得ることができたので報告する。

2. 実 験

2-1. 実験材料

広島県庄原市山間部で平成19年度に伐採(生育期間約20～30年)した杉および約5%程度のヒノキを含む混合間伐材をチップにした後、水蒸気蒸留により得られた精油を再度、減圧蒸留(bp.63～100℃/50mmHg, 比重 1.429)したものを

用いた。

2-2. 機器分析

単離した化合物の旋光度はP-1020型旋光計(日本分光株式会社製)を用いて測定した。分画油分中の成分分析は、GC-MS [Hewlett Packard HP 6890 GC, Hewlett Packard HP 5972 MSD, Column:TC-WAX(60m×0.25mm), Column Temp.: 70℃(5min hold)～240℃(3℃/min), Injection Temp.: 240℃]を使用した。分画した油分の成分については、同機種を使用しカラム[TC-1(30m×0.25mm)とカラム温度[50℃(5min hold)～240℃(3℃/min)], Injection Temp.: 240℃]に変更し、化合物の検索はNIST (National Institute of Standards and Technology)のWeb Bookにより行った。単離した化合物の構造確認は、¹H-および¹³C-NMR (JNM-EX400WB型FT, 日本電子株式会社製)により、テトラメチルシラン(TMS)を内部標準として、重クロロホルム溶媒中で測定した。

2-3. 生理活性試験

a) 抗菌活性試験¹⁰⁾

使用したグラム陽性菌は*Bacillus subtilis* (ATCC 6633) および*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)であり、グラム陰性菌は*Escherichia coli* (ATCC 8739)および*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)である。使用した培地は、*Bacillus subtilis*および*Pseudomonas aeruginosa*は標準寒天培地(日水製薬株式会社製)を、*Escherichia coli*はデゾキシコレート寒天培地(日水製薬株式会社製)を、*Staphylococcus aureus*はマノンニット食塩培地(日水製薬株式会社製)を用いた。試験方法としては、所定量の供試体をろ紙(8mm)に塗付し、35℃で24時間培養後、生育阻止円の半径(ディスクの内径を減じたもの)を測定した。

b) 除菌効果試験¹¹⁾

使用した培地は、new-パームチェック(PL)一般細菌(SCDLP)寒天培地(株式会社日研生物医学研究所製)のものをを用いた。試験方法は、試験液の濃度を0.1%に調整した後、界面活性剤であるTween 40を0.5%重量添加し、滅菌水を用いて100mLに調整した。試験液をスプレー容器に入れて、手に10回(0.88g)吹き付け30秒間放置後、水道水(流水中)で5秒間洗い、軽く水気を飛ばした。その後、手形培

地に手を押しつけ、37℃で24時間培養し生菌数の測定を行った。比較対照試験としては、水道水のみで手洗いをを行った以外、同様の操作を行い、生菌数を測定した。

c) 活性酸素抑制効果(SOD)試験¹²⁾

試料0.714mMを溶解したDMSO溶液0.1mLにキサンチン0.40mMとニトロブルーテトラゾニウム0.24mMを0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)144.7mLに溶解し調製した発色試液1.0mLを加え、さらに0.049mMのキサンチンオキシダーゼリン酸緩衝液0.2mLを加え、37℃の恒温水槽中で20min放置した。その後、反応停止液として69mMの硫酸ドデシル二ナトリウム2.0mLを加え、スーパーオキシドアニオンとニトロブルーテトラゾニウムの反応によって生成するジホルマザンを560nmに設定した分光光度計を用いて測定した。一方、コントロールとして試料の代わりにDMSO溶液0.1mLのみを用いる以外は同様の操作を行い、以下に示す次式に従って活性酸素の阻害率を計算した。吸光度は3回の測定結果からそれぞれ平均値を算出した。

活性酸素阻害率 (%) =

$$\frac{(\text{コントロールの吸光度}) - (\text{検体の吸光度})}{(\text{コントロールの吸光度})} \times 100$$

d) 脂質酸化抑制効果試験 (AAPH 添加ロダン鉄法)¹³⁾

1.3%リノール酸/エタノール溶液2.5mL, 0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.0)2.5mL, 蒸留水1.0mL, 各試料のエタノール溶液(0.2mM)を0.5mL, 92.8mM AAPH[2,2'-azobis-(2-amidinopropane)dihydrochloride]水溶液0.25mLを混合したものを反応液とし、50℃の恒温水槽中で遮光保存した。つぎに、この反応液0.1mLに75%エタノール溶液4.7mL, 30%チオシアン酸アンモニウム水溶液0.1mLおよび3.5%塩酸溶液に0.02Mの第一塩化鉄を溶解した混合液0.1mL添加し、3分経過後に500nmに設定した分光光度計(V-530型、日本分光株式会社製)で測定した。以後、同反応液を用いて、2時間間隔で8時間まで同様の操作を行った。なお、測定は3連で行い、数値は平均値で表す。

e) チロシナーゼ活性阻害試験¹⁴⁾

1) チロシンを基質とした場合

試料0.08mMをジメチルスルホキシド(DMSO)溶液

1.0mLに溶解した混合溶液をMcIlvaine緩衝溶液[L-Tyrosine 1.66mM, クエン酸(一水和物)4.7806gおよびリン酸水素二ナトリウム(無水物)21.9382gを水1,000mLに溶解しpH6.8に調整したもの]0.9mLに加え、予め37℃に設定した恒温水槽中で5分間予備加温を行った。ついで、マッシュルームから調製した市販チロシナーゼ1.67mgを蒸留水3.80mLに溶解した水溶液(1,500unit/mL)0.1mLを加えて、37℃の恒温水槽中で1分間放置した検体と11分間放置した検体を475nmに設定した分光光度計を用いて吸光度を測定し、1分間放置した検体の吸光度をc、11分間放置した検体の吸光度をbとした。一方、コントロールとして試料のかわりに蒸留水0.08mMを用いる以外、同一操作により検体の調製を行い、37℃の恒温水槽中で1分後と11分後の検体について、それぞれ吸光度を測定し、1分後の吸光度をa、11分後の吸光度をdとし、以下に示す方法でチロシナーゼ活性阻害率を計算した。阻害率は3回の測定結果からそれぞれ平均値を算出し、次式に従ってチロシナーゼ活性阻害率を求めた。

$$\text{チロシナーゼ活性阻害率 (\%)} = \frac{(d - a) - (b - c)}{(d - a)} \times 100$$

2) L-DOPAを基質とした場合

L-DOPA1.66mMを溶解した水溶液1.0mLにリン酸水素二ナトリウム0.4247gとリン酸二水素ナトリウム0.3600gを添加し、さらに、リン酸水素二ナトリウム(2.135g/L)とリン酸二水素ナトリウム(1.800g/L)から調製した30mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)1.8mLを加え、この混合溶液に試料0.08mMを溶解したDMSO溶液0.1mLを添加した後、攪拌した。その後、直ちにマッシュルームから調製したチロシナーゼ1.67mgを蒸留水3.80mLに溶解したチロシナーゼ水溶液(1,500unit/mL)0.1mLを加え、15秒間攪拌した後、25℃で培養し475nmに設定した分光光度計を用いて、3分後における吸光度の測定を行い、1分45秒から2分45秒間の傾きを求めた。一方、コントロールとして試料のかわりにDMSO溶液0.1mLを用いる以外は同様の操作を行った。チロシナーゼ活性阻害率の計算は、以下の次式に従って算出した。傾き

は3回の測定結果からそれぞれ平均値を算出し行った。

$$\text{チロシナーゼ活性阻害率 (\%)} = \frac{(\text{コントロールの傾き}) - (\text{検体の傾き})}{(\text{コントロールの傾き})} \times 100$$

3. 結果および考察

3-1. 間伐材精油の化学成分とその抗菌活性

入手した間伐材の精油成分について、GC-MS 分析を行った。その結果を Fig.1 に示す。また、MS ライブラリーデータ(NIST)から、精油中の主な化学成分として 57 成分を確認した(Table 1)。

つぎに、間伐材の精油に対する抗菌活性の予備試験をグラム陽性菌(*B. subtilis*, *S. aureus*)およびグラム陰性菌(*E. coli*, *P. aeruginosa*)を用いて、ペーパーディスク法により活性の有無を検討した。その結果、*B. subtilis*では10 μ L、*S. aureus*では5 μ L、*E. coli*では60 μ L、*P. aeruginosa*では40 μ Lの試料量で抗菌活性を発現することが確認できた(Table 2)。このことから間伐材の精油は、グラム陽性菌に比べてグラム陰性菌の方が抗菌活性を発現しにくいことが分かった。その理由としては、グラム陰性菌の細胞膜の外側には外膜があるため、油性である精油の透過性が抑えられ細胞膜まで精油が浸透できないことから、抗菌活性の発

現に大きな相違が現れたものと考察した¹⁵⁾。そこで、間伐材の精油中に含まれている化学成分中から、より高い抗菌活性を発現する化合物の特定を Fig.2 に示した分画方法(カラムクロマトグラフィー;Silica gel 60 (MERCK))を用いて行った。すなわち、精油(10g)をヘキサン抽出部(2.8g)と酢酸エチル抽出部(5.6g)に分画した。ヘキサン抽出部について、減圧蒸留を行い Group A (~75 $^{\circ}$ C/ 40mmHg, 0.91g)と Group B (75 $^{\circ}$ C/40mmHg~, 1.72g)に分留した。また、同様に酢酸エチル抽出部についても減圧蒸留を行い、Group C (~65 $^{\circ}$ C/ 0.5mmHg, 1.81g)と Group D (65 $^{\circ}$ C/ 0.5mmHg~, 3.02g)に分留(Fig. 2)した。これら分留した Group A~D の油分に対して、*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*および *P. aeruginosa* に対する抗菌活性の強弱を検討した結果を Table 3 に示す。分画部 Group A~D のいずれも、抗菌活性を発現することが確認でき、*S. aureus*に対する抗菌活性は Group A および B に強い活性があることを確認できた。*E. coli*に対する抗菌活性は、Group A に強い活性がある結果を得ることができた。一方、*P. aeruginosa* に対する抗菌活性は、Group A のみが抗菌活性を発現することが確認できた。これらの結果から、Group A が *B. S. aureus*, *E. coli* および *P. aeruginosa* の4つの菌に対して、いずれも高い抗菌活性が発現することを確認した。そこで、Group A に

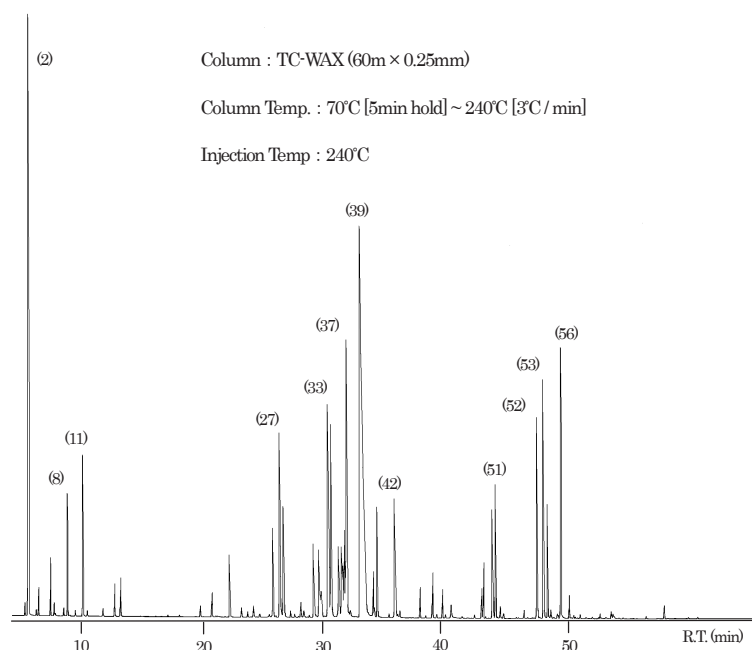


Fig. 1 Gas Chromatogram of Essential Oil of Thinned Wood.

Table 1 Element Composition in Essential Oil of Thinned Wood.

Peak No.	R.T. ^{a)}	Compounds	Peak Area (%)	Peak No.	R.T. ^{a)}	Compounds	Peak Area (%)
1	6.40	Tricyclene	0.125	30	28.15	β -Copaene	0.141
2	6.69	α -Pinene	15.942	31	28.57	Pinocarveol	0.031
3	7.28	α -Fenchene	0.056	32	29.34	α -Humulene	1.095
4	7.46	Camphene	0.232	33	30.10	α -Amorphene	4.990
5	8.38	β -Pinene	0.528	34	30.25	α -Terpineol/Terpinyol acetate	4.368
6	8.67	Sabinene	0.121	35	31.11	Germacone D	1.498
7	9.43	δ -3-Carene	0.078	36	31.27	β -Selinene	1.521
8	9.72	β -Myrcene	1.157	37	31.51	α -Murolene	8.290
9	9.90	α -Phellandrene	0.014	38	31.79	Bicyclgermacone	0.198
10	10.33	α -Terpinene	0.055	39	32.89	δ -Cadinene	21.863
11	10.96	Limonene	1.726	40	32.97	γ -Cadinene	3.853
12	11.29	β -Phellandrene	0.063	41	33.94	α -Cadinene	1.515
13	12.49	γ -Terpinene	0.082	42	35.35	Calamenene	2.177
14	13.41	<i>p</i> -Cymene	0.341	43	35.67	<i>p</i> -Cymene-8-ol	0.100
15	13.85	Terpinolene	0.397	44	37.24	cis-Murol-5-en-4- β -ol	0.348
16	17.52	α -Pinene oxide	0.021	45	37.70	α -Dehydro-ar-himachalene	0.031
17	18.42	Fenchone	0.026	46	38.22	α -Calacorene	0.582
18	20.04	Dehydro- <i>p</i> -cymene	0.134	47	39.00	cis-Murol-5-en-4- α -ol	0.342
19	20.94	α -Cubebene	0.324	48	39.66	β -Calacorene	0.235
20	21.26	Fenchyl acetate	0.014	49	42.19	Nerolidol	0.626
21	22.39	α -Copaene	0.922	50	42.91	1,10-Di- <i>epi</i> cubenol	1.821
22	23.52	Camphor	0.137	51	43.16	<i>Epi</i> cubenol	1.820
23	24.19	β -Cubebene	0.170	52	46.42	T-Cadinol	3.327
24	24.67	Linalyl acetate	0.063	53	46.93	T-Murolol	4.183
25	25.43	Longifolene	0.048	54	47.97	α -Eudesmol	0.065
26	25.74	Bornyl acetate	1.144	55	48.05	Cadalin	0.044
27	26.29	β -Elemene	3.332	56	48.30	α -Cadinol	5.285
28	26.59	Terpinen-4-ol	2.086	57	48.89	Intermedeol	0.295
29	27.73	Myrtanal	0.017	—	—	Total	100.0

a) Retention Time (min).

Table 2 Antibacterial Activity of Essential Oil of Thinned Wood.

Gram-Positive Organisms				Gram-Negative Organisms			
<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)
10	3	5	4	20	-	20	-
20	5	8	8	40	-	40	1
40	7	10	16	60	1	60	2

aureus,

ついて GC-MS 分析を行った結果、主成分は α -ピネン (GC : 96.73%)であり、その他、 β -ミルセン (GC : 1.69%), d-リモネン (GC : 1.58%)が含有していることを明らかにした。 α -ピネンについては単離後、比旋光度を測定したところ、 $[\alpha]_D^{25} = +35.1^\circ (c 1.00, \text{CHCl}_3)$ を示したことから、Fig.3 に示した(+)体の構造であることを確認した。そこで、(+)体および(-)体の α -ピネン(1),(2)の *B. subtilis*, *S. E. coli*

および *P. aeruginosa* に対する抗菌活性発現の相違を検討した結果を Table 4 に示す。(+)体では、*B. subtilis*, *S. aureus* および *E. coli* に対して抗菌活性が発現することを確認することができたが、(-)体では、*B. subtilis* に対してのみ、僅かに抗菌活性が発現しただけであった。このことから、(+)体と(-)体の光学活性の相違が抗菌活性の発現に大きく関与していることが明らかとなった。

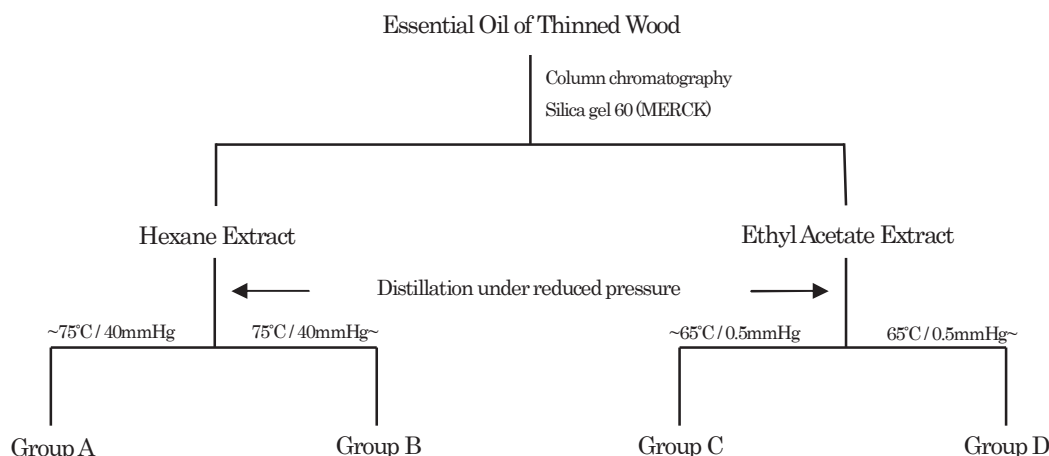


Fig. 2 Partition Scheme for Essential Oil of Thinned Wood.

Table 3 Antibacterial Activity of Group (A)~(D) for *B.subtilis*, *S.aureus*, *E.coli* and *Paeruginosa*.

Group	Conc. (μ L)	Gram-Positive Organisms		Gram-Negative Organisms	
		<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Paeruginosa</i>
(A)	5	3 ^{a)}	10	6	2
	10	5	15	10	3
	20	9	20	12	4
	40	12	24	16	6
(B)	5	5	20	2	0
	10	6	20	3	0
	20	7	20	4	0
	40	9	20	5	0
(C)	5	5	2	0	0
	10	8	2	0	0
	20	10	3	0	0
	40	15	5	0	0
(D)	5	5	5	0	0
	10	8	6	0	0
	20	10	8	0	0
	40	14	11	0	0

a) Inhibitory zone (mm).

つぎに、除菌効果について検討した。日常的な手洗いは通過菌(*Transient flora*)の除去を衛生的な手洗いで、常在菌(*Resident flora*)の除去を目的とする。そこで今回は、コントロールとして通常の水道水で手洗いをを行った後、寒天培地に接触させて 37°C/24 時間培養したところ、常在菌を形成している長桿菌(Long bacteria)と短桿菌(Short bacteria)の混合物としての生菌数 668 個を確認した。しかし、間伐材の精油を使用した場合には、生菌数 176 個となり、その生菌数は約 1/4 分に減少し、間伐材の精油に強い除菌効果があることを確認した。そこで、分画した Group A~D についての除菌効果を検討した結果を Fig.4 および 5 に示

す。Group A~D において、生菌数がいずれも減少する傾向が認められ、除菌効果があることを確認することができたが、その中でも、とくに Group A の生菌数は 88 個と最も少なく、高い除菌効果があることを確認することができた。Group A の主成分は(1)であることから、その存在が除菌効果に関与しているものと考え、(1)の除菌効果を検討した。その結果、(1)単体での除菌効果は、Group A の生菌数(88 個)と比べると約 2 倍量(176 個)の生菌数が確認され、(1)のみが除菌効果の発現に関与しているのではなく、Group A に微量成分として含有している β -ミルセン(GC:1.69%)および d-リモノン(GC:1.58%)などの C_{10} -モノテルペン炭化水素類にも除菌効果を持っていることから、これら化合物が相乗的に働き除菌効果の向上に関与しているものと考察した。

3-2. 抗酸化活性について

間伐材精油の抗酸化能活性評価として活性酸素阻害試験を行った結果、市販の抗酸化剤であるアスコルビン酸(SOD=7.2%)と比較したところ、ほぼ同程度の SOD 活性(7.6%)が発現することを確認した。そこで、抗酸化能活性発現の化学物質を特定する目的で、間伐材精油を分画した Group A~D 留分の活性酸素阻害試験を行った。その結果、とくに Group D は比較物質であるアスコルビン酸よりも高い阻害率(9.2%)を有していることが確認できた(Fig.6)。そこで、Group D(1.25g)留分をシリカゲルを充填したカラムクロマトグラフィー(展開液:CHCl₃)で Fr:1~4(Fr:1 = 119.2mg, Fr:2 = 372.8mg, Fr:3 = 682.5mg, Fr:4 =

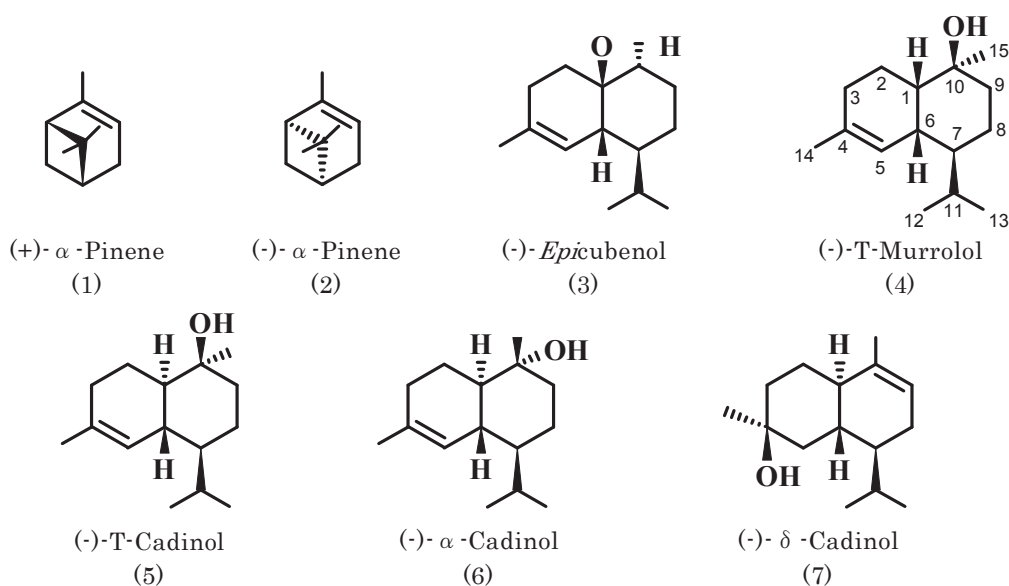


Fig. 3 Chemical Structure of Major Components.

Table 4 Antibacterial Activity of (+)- and (-)- α -Pinenes.

	Gram-Positive Organisms				Gram-Negative Organisms			
	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μ L)	Inhibitory Zone (mm)
(+) α -Pinene	5	12	5	12	5	16	5	-
	10	18	10	20	10	21	10	-
	20	26	20	28	20	30	20	-
(-) α -Pinene	5	-	5	-	5	-	5	-
	10	3	10	-	10	-	10	-
	20	6	20	-	20	-	20	-

61.7mg) で分画した後、それぞれの分画部に対する活性酸素阻害試験を行った。その結果、Fr-2 の油分は阻害値 11.6%を、Fr-3 は 8.5%の阻害値を示し、いずれもアスコルビン酸よりも高い阻害値を有することが確認できた。そこで、最も高い阻害値を示した Fr-2 の留分を再度、シリカゲル(MERCK 60)を充填したカラムクロマトグラフィー (Hexane:Ethyl acetate = 9:1)で再分画[Spot 1(R_f = 0.70,

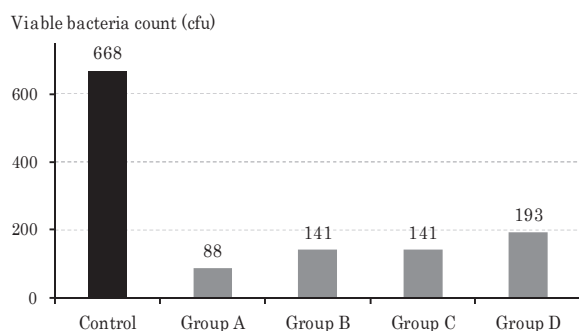


Fig. 4 Antimicrobial Activity of Group A~D.

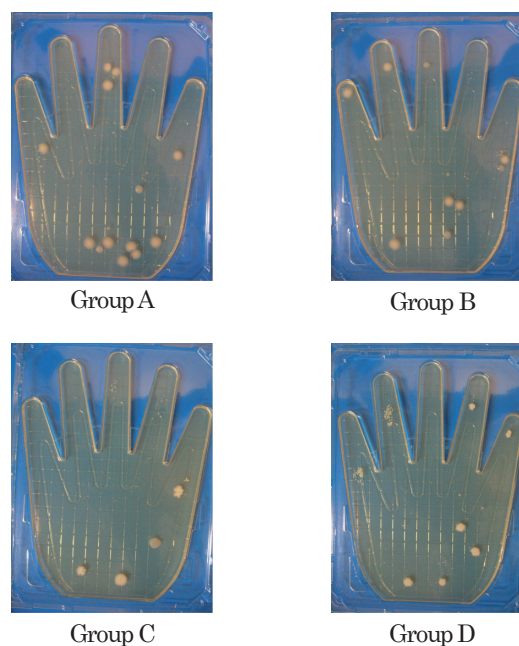


Fig. 5 Bacterial Colony Growth of Group A~D after Washing Hand.

31.5mg), 2(R_f = 0.62, 44.4mg), 3(R_f = 0.56, 37.8mg), 4(R_f = 0.52, 53.5mg), 5(R_f = 0.45, 41.6mg), 6(R_f = 0.44, 57.2mg)した。分画したSpot 1~6について、活性酸素阻害試験を行った。その結果、とくにSpot 4は12.5%の阻害値を示し比較物質であるアスコルビン酸よりも高い阻害値であることを確認することができた。そこで、Spot 4の油分に含まれる化学成分の $^1\text{H-NMR}$ [δ : 0.80(3H, d, J = 7.0Hz, $-\text{CH}_3(12\text{ or }13)$), 0.87(3H, d, J = 7.0Hz, $-\text{CH}_3(12\text{ or }13)$), 0.96(3H, d, J = 6.6Hz, $-\text{CH}_3(15)$), 1.70(3H, s, $-\text{CH}_3(14)$), 5.45(1H, m, =CH-)], およびMS [m/z (%) ; 222[M] $^+$, 204(27), 189(3), 179(14), 161(62), 119(100), 105(59), 95(30), 82(40), 69(29), 55(64), 41(89)]を測定し、MS ライブラリーデータ(NIST)および文献値^{1-4,16)}と比較したところ、既知化合物である(-)-エピクベノール(3)[$[\alpha]_D^{24}$ = -110.5° (c 0.639, CHCl_3)]であることを確認した。つぎに、(3)の抗菌活性(Table 5)について、グラム陽性菌(*B. subtilis*, *S. aureus*)およびグラム陰性菌(*E. coli*, *P. aeruginosa*)を用いて行ったところ、*E. coli*および*P. aeruginosa*に対しては抗菌活性を発現しなかったが、*B. subtilis*および*S. aureus*に対しては抗菌活性を発現することが確認できた。一方、活性酸素阻害効果について検討したところ、Spot 4は12.9%の阻害値を示したことから、その主成分である(3)の活性酸素阻害効果発現に関わりについて、濃度依存性を明らかにする目的で0.20mg/mL, 0.10mg/mL および0.05mg/mLに調整し活性酸素阻害試験を行ったところ、比較物質であるアスコルビン酸では低濃度(0.20mg/mL=16.3%→0.10mg/mL=8.7%→0.05mg/mL=4.2%)になるにつれて、その活性が低下していく傾向が認められる(Fig.7)のに対して、化合物(3)では低濃度(0.20mg/mL=14.5%→0.1mg/mL=12.9%→0.05mg/mL=12.4%)においても強い

活性が維持されていることを確認した。また、活性酸素阻害以外の抗酸化能評価として、脂質酸化抑制効果試験を行った結果をFig.8に示す。コントロール(試料無添加)では、時間の経過にともない吸光度が上昇するのに対し、アスコルビン酸では、吸光度の上昇を抑制していることが確認できた。一方、化合物(3)では、アスコルビン酸に近い脂質酸化抑制効果を発現することを確認した。一方、化粧品美白剤としての機能である美白効果を検討するためにマッシュルーム由来の酵素チロシナーゼを用いた活性阻害試験(Fig.9)を行った結果、*L*-チロシンを基質とした場合には、化合物(3)では6.7%の値を示し、比較物質として用いたアルブチンの阻害率(17.6%)よりも低い値であった。しかし、*L*-ドーパを基質とした場合には、化合物(3)は7.7%の値を示し、アルブチン(4.0%)よりも高い阻害率を有していることが分かった。本試験によるチロシナーゼ活性阻害では、*L*-チロシンおよび*L*-ドーパの段階でいずれも同等の活性阻害値を発現したことから、酵素チロシナーゼの活性を*L*-チロシンと*L*-ドーパ間および*L*-ドーパとドーパキノン間の二つの過程を同時に阻害することが分かった。このことから、酵素阻害に関与しているチロシナーゼのドーパオキシダーゼ活性を選択的に阻害しているものと考察した。

つぎに、化合物(3)以外の化学成分の単離とその生理活性について検討した。まず、分画したGroup Dの油分(0.679g)を用いて、シリカゲル(MERCK 60)を充填したカラムクロマトグラフィー(展開液:Hexane : Ethyl acetate = 8 : 2)により、二つの油分に再分画(Fr.3-1:0.20g およびFr.3-2:0.24g)した。順層系TLC(Kieselgel 60 F254, 20×20cm)により、これらの油分の R_f 値を求めたところ、Fr.3-1では0.63, Fr.3-2では0.52付近にスポットを確認することができた。単離したそれぞれのスポット成分に対する活性酸素阻害

Table 5 Antibacterial Activity of (-)-Epicubenol.

Gram-Positive Organisms				Gram-Negative Organisms			
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Conc. (μL)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μL)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μL)	Inhibitory Zone (mm)	Conc. (μL)	Inhibitory Zone (mm)
5	+	5	+	5	-	5	-
10	+	10	+	10	-	10	-
20	+	20	+	20	-	20	-

(SOD)試験を行った結果, Fr.3-1 では 12.6%, Fr.3-2 では 9.9%の阻害値を示し, 比較物質のアスコルビン酸よりも高い阻害値であることを確認した。そこで, 活性発現した分画油分Fr.3-1をTLCで精製した化学成分についてGC-MSを測定した。その結果, Fr.3-1には2成分が混在していることを確認することができ, $^1\text{H-NMR}$ 解析から, $(-)\text{-T}$ ムロロール (4) $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -75.1^\circ (c\ 0.138, \text{CHCl}_3)$, $^1\text{H-NMR}$ [δ :0.82, 0.86(6H, d, $J=7.2\text{Hz}$, $-\text{CH}_3(12\text{ or }13)$), 1.15(3H, s, $-\text{CH}_3(15)$), 1.64(3H, br.s, $-\text{CH}_3(14)$), 5.51(1H, d, $J=5.0\text{Hz}$, =CH-)], $^{13}\text{C-NMR}$ [δ :15.4(C_{13}), 19.3(C_8), 21.6(C_{15}), 20.9(C_2), 21.6(C_{12}), 23.6(C_{14}), 26.6(C_{12}), 29.2(C_{15}), 31.2(C_3), 34.5(C_6), 34.7(C_9), 46.1(C_{11}), 72.3(C_{10}), 124.6(C_5), 133.4(C_4)]およびMS [m/z (%) :222(M^+ , 12), 204(59), 189(8), 164(40), 161(72), 139(10), 121(69), 109(31), 105(29), 95(100), 94 (31), 71(29), 58(16), 43(66)] と $(-)\text{-T}$ カジノール (5) $^1\text{H-NMR}$ [δ :0.78, 0.89(6H, d, $J=7.2\text{Hz}$, $-\text{CH}_3(12\text{ or }13)$), 1.17(3H, s, $-\text{CH}_3(15)$), 1.62(3H, br.s, $-\text{CH}_3(14)$), 5.48(1H, d, $J=5.0\text{Hz}$, =CH-)], $^{13}\text{C-NMR}$ [δ :15.2(C_{13}), 19.2(C_8), 210.9 (C_2), 21.6(C_{12}), 23.4(C_{14}), 26.8(C_{11}), 29.4(C_{15}), 30.9(C_3), 34.8(C_6), 35.0(C_9), 44.1(C_7), 46.3(C_{11}), 72.1(C_{10}), 124.8(C_5), 133.8(C_4)]およびMS [m/z (%) :222(M^+ , 9), 204(52), 162 (12), 161(100), 134(9), 121(11), 119(12), 105(12), 95(10), 81 (11), 69(12), 58(2), 43(21)]であることを文献値¹⁷⁻¹⁹⁾との比較により確認した。また, 分画油分 Fr.3-2 に含まれている化学成分についても機器分析を行ったところ, 分画油分 Fr.3-1 と同様, 2成分が含まれていることを確認することができた。主成分として単離した化合物(6)の $^1\text{H-NMR}$ [δ :0.77(3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}_3(12\text{ or }13)$), 0.92(3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, $-\text{CH}_3(12\text{ or }13)$), 1.10(3H, s, $-\text{CH}_3(10)$), 1.70(3H, br.s, $-\text{CH}_3(4)$), 5.50(1H, br.s, =CH-)], $^{13}\text{C-NMR}$ [δ :15.1(C_{13}), 20.7(C_8), 21.5(C_2), 21.9(C_{12}), 22.6(C_{14}), 23.8(C_{15}), 25.9(C_3), 30.9(C_6), 39.8(C_9), 42.1(C_7), 46.6(C_{11}), 72.4(C_{10}), 122.2(C_5), 134.7(C_4)]およびMS [m/z (%) :204(M^+ , 19), 189(4), 179 (2), 161(26), 149(4), 137(10), 121(47), 105(26), 95(69), 81(30), 55(29), 43(100)]を測定し, 文献値²⁰⁻²³⁾と比較したところ, 既知化合物である α カジノールの値に近似している

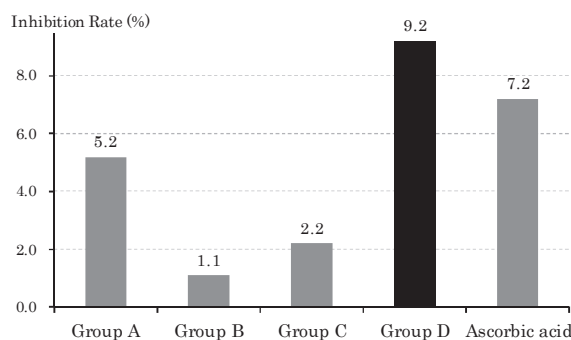


Fig. 6 SOD-like Activity of A~D Groups.

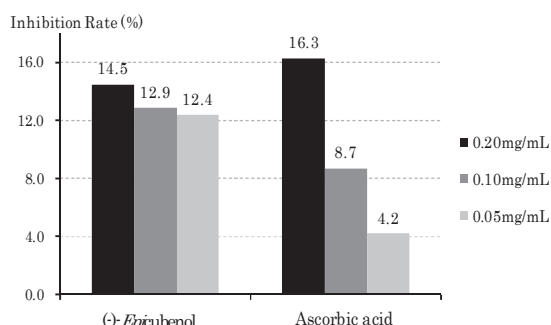


Fig. 7 SOD-like Activity of $(-)\text{-Epigallocatechin gallate}$ (EGCG).

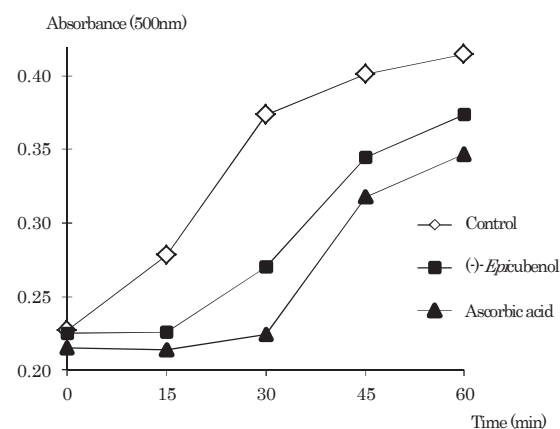


Fig. 8 Ferric Thiocyanate Assay of $(-)\text{-Epigallocatechin gallate}$ (EGCG).

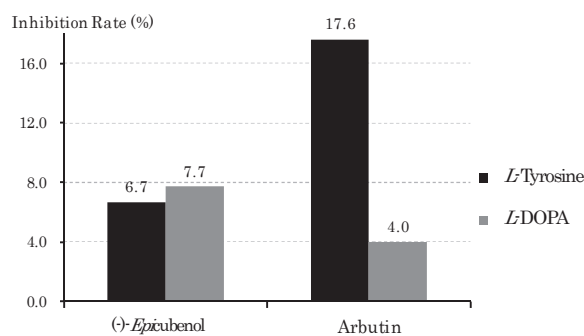


Fig. 9 Tyrosinase Inhibition Activity Assay of $(-)\text{-Epigallocatechin gallate}$ (EGCG).

ことから確認した。なお、単離した化合物の比旋光度を測定したところ、 $[\alpha]_D^{26} = -48.7^\circ (c0.118, \text{CHCl}_3)$ を示したことから(-)体であることも確認した。一方、化合物(6)に少量成分として含まれている化合物についても単離を試みたが構造決定を行えるだけの量を単離することはできなかった。しかし、化合物(6)を含む Fr.3-2 油分の $^1\text{H-NMR}$ を測定した結果から、 δ -カジノール(7)であることを推定^{24,25)}した。今回、分画した Fr.3-1 ((4)と(5)の混合物)と Fr.3-2 ((6)と(7)の混合物)は、比較物質であるアスコルビン酸よりも高い抗酸化能が発現することを確認することができた。

4. 結 言

今回容易に入手できた間伐材精油の有効利用を目的とした生理活性試験を実施し、下記の結果を明らかにすることができた。

- 1) 間伐材の精油に対する抗菌活性では、グラム陽性菌(*B. subtilis*, *S. aureus*)およびグラム陰性菌(*E. coli*, *P. aeruginosa*)を用いて行ったところ、いずれの菌に対しても抗菌活性を発現することが確認できた。その活性発現に最も関与している化学成分としてはモノテルペン炭化水素である(1)(*B. subtilis*, *S. aureus*および*E. coli*)であり、(-)体ではほとんど活性を発現しなかった。このことから、(+)体と(-)体の構造の違いが活性発現に大きく関わっていることが明らかとなった。
- 2) 単離したセスキテルペンアルコール(3)のグラム陽性菌(*B. subtilis*, *S. aureus*)およびグラム陰性菌(*E. coli*, *P. aeruginosa*)に対する抗菌活性は、*B. subtilis*および*S. aureus* に対して、強い抗菌活性が発現することを確認した。
- 3) 除菌効果については、手洗い試験により間伐材精油を用いた場合には、生菌数176個となり、約1/4に減少することが明らかになった。このことから、間伐材精油には除菌効果があることを確認した。
- 4) 抗酸化活性について活性酸素阻害試験により検討した結果、比較物質として用いた市販品のアスコルビン酸(8.7%)よりも、化合物(3)の方が高い阻害値(12.9%)を確認することができた。また、化合物(4)と(6)にも高い抗酸化能があることを明らかになった。

- 5) 化合物(3)の美白効果を検討したところ、L-ドーパ基質でアルブチン(4.0%)よりも高い活性阻害(7.7%)を発現することを確認した。

以上のことから、間伐材由来の精油ならびにその油分に含まれる化合物(3)は、抗菌活性、抗酸化能、脂質酸化抑制効果および美白効果を発現する機能を合わせ持つことが明らかとなり、抗菌剤、除菌剤および抗酸化剤などの用途開発資材として、十分可能であるものと考えられる。

5. 参考文献

- 1) B. A. Nagasampagi, L.Yankov, Sukh Dev, *Tetrahedron Letters*, 16, 1913-1918 (1968).
- 2) Y. Ohta, Y.Hirose,, *Tetrahedron Letters*, 22, 2073-2075 (1967).
- 3) M. Suzuki, N. Kowata, E. Kurosawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*,54(8), 2366-2368 (1981).
- 4) C. Solis, J. Becerra, C. Flores, J. Robledo, M. Silva, *J. Chem. Soc.*, 49, 157-161 (2004).
- 5) T. Fujimura, T. Kawai, T. Kajiwarara, Y. Ishida, *Plant Tissue Culture Letters*,11(1), 34-39 (1994).
- 6) M. Nomura, Y. Maegawa, Y. Fujihara, *J. Oleo Sci*, 54, 583-591 (2001).
- 7) K. Kasemura, A. Yamamoto, T. Gotou, Y. Fuiihara, M. Nomura, *Bokin Bobai*, 30, 137-144 (2002).
- 8) S. Tachibana, Y.Ohno, Y.Fujihara, Y. Okada, M. Sugiura, S. Takagi, M. Nomura, *J. Oleo Sci*, 55, 181-189 (2006).
- 9) S. Tachibana, T. Gotou, M. Nomura, *J. Oleo Sci*, 57, 107-113 (2008).
- 10) S. Ueda, H. Yamashita, M. Nakajima, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29, 111-116(1982).
- 11) T. Abe, S. Tanimoto, M. Hisama, Y. Mihara, M. Nomura, *Bokin Bobai*, 35,489-495 (2007).
- 12) S. Tanimoto, H.Tominaga, Y. Okada, M. Nomura, *YUKAGAKU ZASSHI*, 126, 173-177 (2006).
- 13) A. Maeda, S. Tanimoto, T. Abe, S. Kazama, H. Tanizawa, M. Nomura, *YAKUGAKU ZASSHI*, 128, 129-133 (2008).

- 14) Y. Kobayashi, Y. Ide, Y. Maegawa, Y. Fujihara, M. Nomura, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 77, 754-761 (2003).
- 15) 井上重治, 微生物と香り, pp.175-176, 188-206 フレグランスジャーナル社 (2002).
- 16) C. P. Cornwell, N. Reddy, D. N. Leach, *Flavour Fragr. J.*, 15, 352-361 (2000).
- 17) Y. S. Cheng, Y. H. Kuo, Y. T. Lin, *Chemical Communications*, 1967, 565-566 (1967).
- 18) B. A. Nagasampagi, L. Yankov, S. Dev, *Tetrahedron Letters*, 16, 1913-1918 (1968).
- 19) A. K. Brog-Karlso, T. Norin, *Tetrahedron*, 37, 425-430 (1981).
- 20) V. Herout, V. Sykora, *Tetrahedron*, 4, 246-255 (1958).
- 21) O. Motl, V. Sykora, V. Herout, F. Sorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 23, 1297-1306 (1958).
- 22) D. Caine, A. S. Frobese, *Tetrahedron Letters*, 36, 3107-3110 (1977).
- 23) A. T. Bottini, D. J. Garfagnoli, *J. Natural Products*, 50, 732-734 (1987).
- 24) W. G. Dauben, B. Weinstein, P. Lim, A. B. Anderson, *Tetrahedron*, 15, 217-222 (1961).
- 25) O. P. Vig, S. S. Bari, D. M. Dua, S. S. Rana, *Indian J. Chemistry*, 17B, 552-554 (1979).