

〈論文〉

木材抽出成分の抗菌性

奥田晴啓

Antifungal Activities of Wood Extractives

Haruhiro OKUDA

木材抽出成分が木材腐朽菌に対して、どの程度の抗菌性を有しているのか、ペーパーディスク法と寒天希釈法によって検討した。その結果、ヒバ油はACQに匹敵するか、あるいはそれ以上の抗菌性を有していた。また、ヒバ油に含まれる酸性油成分の一部であるヒノキチオールなどのトロポロン類が最も抗菌性に優れており、それに次いで、フェノール類の一種であるカルバクロールやモノテルペン酸類の一種であるシトロネル酸が効力を発揮することも判明した。さらに、ヒノキチオールの銅および亜鉛錯体には、ヒノキチオールと同等の抗菌性を有することが判明した。しかし、白色腐朽菌であるカワラタケは、トロポロン類が低濃度の場合に抵抗性を有することが明らかになった。

1. はじめに

屋外で使用する木材防腐剤として、抗菌性と定着性の良さからヒ素やクロムなどの毒性の高い成分を含むCCAが広く用いられてきた。しかし近年、環境に配慮する上で、動植物に悪影響を与えるような有毒物の使用を控え、安心して使用できる天然系物質を求める傾向が強い。現在のところ、木材防蟻剤にはヒバ中性油<sup>1)</sup>などの天然系物質が用いられているものの、木材防腐剤としては、ほとんど利用されていないのが現状である。

樹木は、カビや腐朽菌のほか昆虫などの外敵から身を守るための有効成分を有している。ヒノキアスナロ（別名 青森ヒバ *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. var. *hondai* Makino）は、特に腐りにくく害虫を寄せ付けないなど、昔から防腐・防虫効果が経験的に知られている。これは、材中に強い抗菌活性と広い抗菌スペクトルを有するヒノキチオール（hinokitiol 別名β-ツヤプリシン β-thujaplicin）などの物質が含まれるからである。ヒノキチオールは、強い抗菌性を有するとともに安全性<sup>2)</sup>も確認されており、食品添加物・化粧品・医薬品などに幅広く利用されている。また、利用面での障害になっていた昇華性と光分解性の問題は、塩および錯体とすることにより改善し、さらにカビ類や細菌類に対する抗菌力も維持できることが明らかになった<sup>3)</sup>。そこで、ヒノキアスナロ材（以下、ヒバ材と略す）の抽出物を木材防腐剤に利用することを目的として、その抽出物が木材腐朽菌に対して、どの程度の抗菌性（忌避性）を有するか検討した。また、ヒバ油以外でも抗菌性があると言われる

ヒノキ油、柿渋、木酢液などの天然系物質、および加圧注入用の木材防腐剤として、一般的に用いられているACQ（銅アルキルアンモニウム化合物）についても比較のために検討した。

2. 材料および方法

2.1 材料

2.1.1 ヒバ油類

ヒバ材から水蒸気蒸留法により抽出したヒバ油(HB)、それを分画して得られる酸性油(HA)と中性油(HN)、さらに酸性油から分画したトロポロン類(TPヒノキチオー

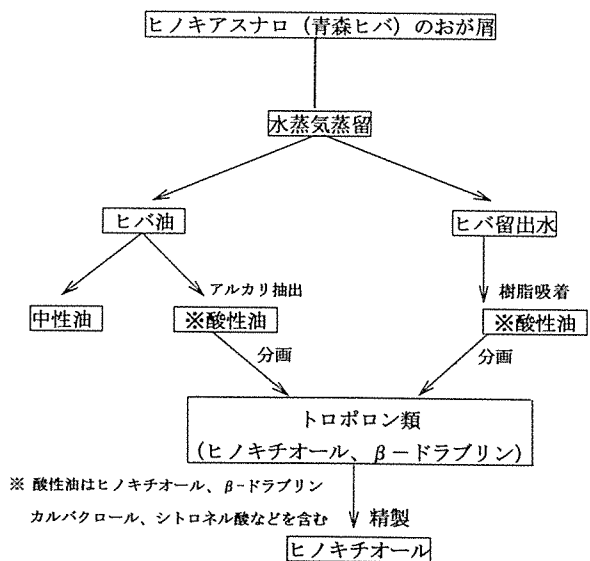


図1 ヒノキチオール精製過程

ルや $\beta$ -ドラブリンなどを含む)、およびトロポロン類から精製したヒノキチオール(HT)を供試した(図1)。また、酸性油に含まれるフェノール類の一種であるカルバクロール(CV)とモノテルペン酸類の一種であるシトロネル酸(CT)は、市販の材料を用いた。なお、ヒノキチオールについては、その銅および亜鉛錯体(以下、HT-Cu<sup>2+</sup>およびHT-Zn<sup>2+</sup>と略す)も供試した。

ヒバ油にはヒノキチオールなどのトロポロン類を3.12%含んでいた(LC分析)。また、ヒバ酸性油にはトロポロン類29.06%(ヒノキチオール19.1%、 $\alpha$ -ツヤブリシン1.4%、 $\beta$ -ドラブリン8.56%)、カルバクロール3.2%、シトロネル酸8.0%を含んでいた(GC/MS分析)。なお、これらヒバ油類の提供と、その分画精製、ならびに成分の分析は大阪有機化学工業(株)に依頼した。

### 2.1.2 その他の薬剤

柿渋、ヒノキ油、木酢液、およびACQを供試した。柿渋には天王柿の未熟柿の搾汁を2年間、発酵熟成した古渋(タンニンを5%含有 Folin-Denis法)を用いた。なお、柿渋の提供ならびに分析は岩本亀太郎商店に依頼した。ヒノキ油にはヒノキ材を減圧乾燥(熱板加熱)する際に採取されたものを用いた。木酢液には黒炭窯により広葉樹(モミジバフウなど)を炭化する際に採取(煙突温度80~150℃)されたものを用いた。また、ACQには有効成分として、銅化合物(CuOとして)が9.0%以上、N-アルキルベンジルメチルアンモニウムクロリド(BKC)が7.0%以上を含む市販の材料を用いた。

### 2.1.3 供試菌

供試菌は、木材の耐朽性を調べるための指標として用いられる、オオウズラタケ(*Fomitopsis palustris* (Berk. et Curt.) Gilbn. & Ryv. FFPRI 0507)とカワラタケ(*Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilat FFPRI 1030)を使用した。

## 2.2 方法

### 2.2.1 ペーパーディスク法による抗菌効力試験

木材腐朽菌に対するヒバ油、ヒノキチオール、HT-Cu<sup>2+</sup>、HT-Zn<sup>2+</sup>、ヒノキ油、柿渋、木酢液、ACQの抗菌性(忌避性)をペーパーディスク法により評価した。

オートクレーブで滅菌(120℃で15分間)した寒天溶液(グルコース2.0%・ペプトン0.5%・マルトース2.0%・寒天2.0%)をシャーレに分注し、培地とした。柿渋、木酢液、ACQに対しては滅菌済み蒸留水を、その他の薬剤については99.5%エタノールで濃度を調整した。それらを1cm平方角に切り取った濾紙(エチレンオキシドガスにより滅菌済み)に含浸させ、液垂れしない程度に軽く拭ったものと一白金耳かき取った供試菌を、

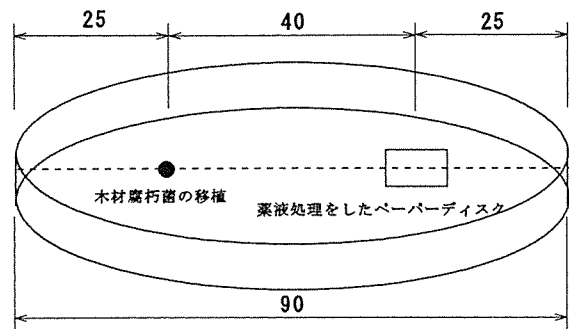


図2 ペーパーディスク法による抗菌効力試験

表1 各薬剤に対する忌避効果の判定基準

忌避値	観察状況
0	菌糸がペーパーディスクに達していない
1	菌糸がペーパーディスクに接触する
2	菌糸がペーパーディスクを1/2未満覆う
3	菌糸がペーパーディスクを1/2以上覆う
4	菌糸がシャーレ全体を覆う

図2のようにシャーレ寒天培地に移植し、培養温度27℃、湿度90%で保たれた恒温恒湿室内で28日間培養した。なお、柿渋、木酢液、ACQに対しては滅菌済み蒸留水を、その他については99.5%エタノールをコントロールとして用いた。

各薬剤に対する菌糸の生育状況を、表1に示す忌避効果の判定基準に従い、目視により1~2日ごとに観察した。なお、1菌種あたり2~3回の繰り返しを行い、その平均値を忌避値とした。また、表1の判定基準でコントロールの忌避値が4となった時の各薬剤の値を忌避値(A)として、次式から忌避率(D)を算出した。

忌避値(A)=コントロールの菌糸が、シャーレ全体を覆った時の各薬剤の忌避値

$$\text{忌避率(D)} = (4 - A) \div 4 \times 100(\%)$$

### 2.2.2 寒天希釈法による抗菌効力試験

ペーパーディスク法に供試した薬剤に加え、ヒバ酸性油、ヒバ中性油、トロポロン類、カルバクロール、シトロネル酸の抗菌性を寒天希釈法により評価した。なお、木酢液については、寒天培地の固化が困難であったため、ここでの使用は控えた。また、この試験は福田らの方法<sup>9)</sup>に準じて行った。

滅菌処理した寒天溶液に、所定の濃度に調整した薬剤を混入後、完全に溶解したことが確認できるまでスターラーで攪拌し、20mlずつシャーレに分注した。それらに、一白金耳かき取った供試菌を培地の中央部に移植し、上

記の恒温恒湿室内で培養した。なお、柿渋については、所定量を寒天溶液に直接混入した。一方、ACQについては滅菌済み蒸留水を、HT-Zn<sup>2+</sup>については99.5%メタノールを、その他の薬剤については99.5%エタノールを用いて所定の濃度に調整した後、寒天培地に対して、その体積比が5%となるように混入した。また、薬剤の無混入培地をコントロールとして用いた。

薬剤の無混入培地に移植した菌糸の生育コロニーが、シャーレ全体に広がったことを、目視により確認した時点で、その平均的な生育を示す部分の直径を測定するとともに、薬剤を混入した培地についても同様に直径を測定した。なお、1菌種あたり2~3回の繰り返しを行い、次式により生育阻止率を求めた。

$$\text{生育阻止率(\%)} = (D1 - D2) \div D1 \times 100$$

D1：薬剤無混入培地の生育コロニーの直径(mm)

D2：薬剤混入培地の生育コロニーの直径(mm)

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ペーパーディスク法による抗菌効力

ペーパーディスク法による抗菌効力試験の結果を図3~11に示す。図3は、ヒバ油を用いた場合のオオウズラタケの生育状況(試験開始より6日目)で、図4はその結果である。オオウズラタケとカワラタケのコントロールの忌避値は、8日あるいは9日で4に達し、シャーレ全体に菌糸が蔓延した。一方、オオウズラタケに対して20倍希釈液を用いた場合、忌避値が4に達するのに16日を要した。また、カワラタケに対して20~30倍希釈液を用いた場合には、28日間の培養でも忌避値が2で停止した。以上のことから、ヒバ油は両腐朽菌に対して明らかに抗



図3 ペーパーディスク法によるヒバ油の抗菌効力試験(オオウズラタケ)  
上段左より：コントロール、ヒバ油原液、2倍希釈液  
下段左より：10倍希釈液、20倍希釈液

菌性を有し、その効果はオオウズラタケよりもカワラタケに対して、有効であると考えられる。

図5は、ヒノキチオールを用いた結果である。オオウズラタケに対して2,000倍希釈液を用いた場合でも、菌糸の生育を明らかに阻害した。一方、カワラタケに対して1,000~2,000倍希釈液を用いた場合には、ほとんど忌避効果が認められなかったが、250~500倍希釈液では菌糸の生育の遅れが認められた。このことから、ヒノキチオールは両腐朽菌に対して強い抗菌性を有すると考えられる。

図6,7は、HT-Cu<sup>2+</sup>およびHT-Zn<sup>2+</sup>を用いた結果である。オオウズラタケに対して両錯体は、ヒノキチオール単体の場合と同様な効果を示した。一方、カワラタケに対して両錯体の1,000~2,000倍希釈液を用いた場合には、ほとんど忌避効果を示さなかった。しかし、500倍希釈液では菌糸の生育の遅れが認められた。このことから、HT-Cu<sup>2+</sup>およびHT-Zn<sup>2+</sup>は両腐朽菌に対して、ヒノキチオールとほぼ同等の抗菌性を有すると考えられる。

図8は、ヒノキ油を用いた結果である。オオウズラタケに対して4倍希釈液を用いた場合でも、菌糸の生育を阻害した。一方、カワラタケに対して原液および2倍希釈液を用いた場合には、忌避効果が認められたが、4倍希釈液ではほとんど効果が認められなかった。このことから、ヒノキ油の抗菌性はヒバ油やヒノキチオールと比較して、かなり微弱であると考えられる。

図9,10は、柿渋および木酢液を用いた結果である。両腐朽菌はこれらに対して、まったく忌避効果を示さなかったことから、木材腐朽菌に対する抗菌性は低いと考えられる。

図11は、ACQ6%水溶液を用いた結果である。カワラタケはACQに対して明らかに忌避効果を示したが、オオウズラタケは若干の生育の遅れしか示さなかった。これは、オオウズラタケが銅を体内に取り込んで、シュウ酸銅として無毒化する銅耐性菌<sup>5)</sup>の一種であるため、銅を主成分とするACQに対しては、カワラタケほどの忌避効果を示さなかったものと考えられる。

#### 3.2 寒天希釈法による抗菌効力

寒天希釈法による抗菌効力試験の結果を、図12~24に示す。図12は、ヒバ油を用いた場合のオオウズラタケの生育状況(試験終了後)で、図13はその結果である。ヒバ油は、1,250ppmまで両腐朽菌の生育を完全に阻止し、20ppmでも60%を超える高い生育阻止率を示した。この結果は、ペーパーディスク法の結果(抗菌効果はカワラタケに対する方が有効に作用する)とは、若干異なった。

図14,15は、ヒバ油から分画精製した酸性油と中性油

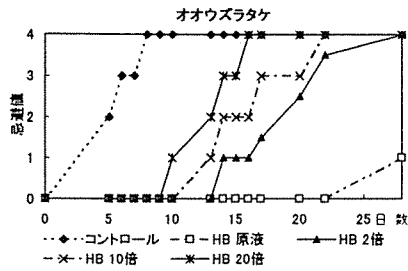


図4 ヒバ油(HB)の忌避性

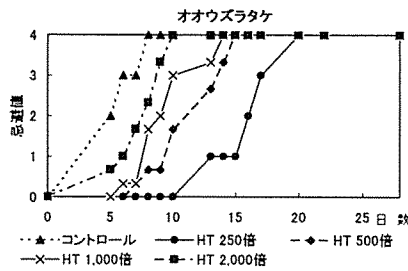


図5 ヒノキチオール(HT)の忌避性

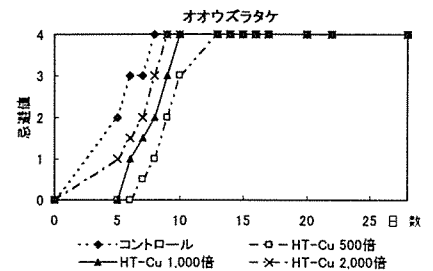


図6 ヒノキチオール銅錯体(HT-Cu<sup>2+</sup>)の忌避性

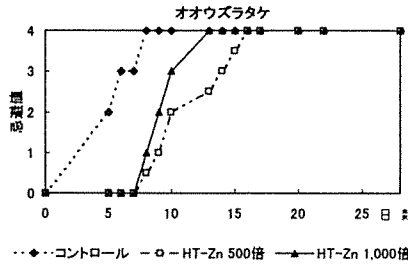


図7 ヒノキチオール亜鉛錯体(HT-Zn<sup>2+</sup>)の忌避性

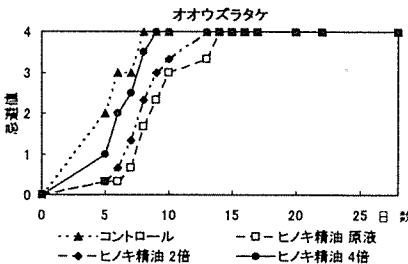


図8 ヒノキ油の忌避性

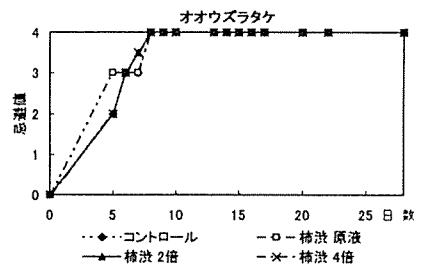


図9 樟脳の忌避性

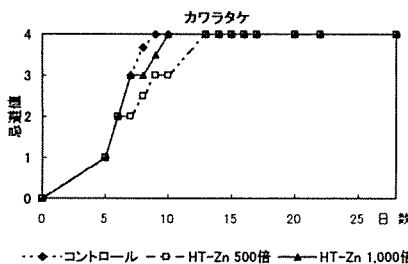


図10 木酢液の忌避性

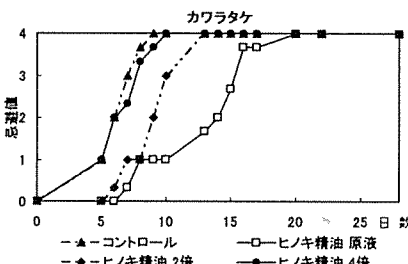


図11 ACQの忌避性

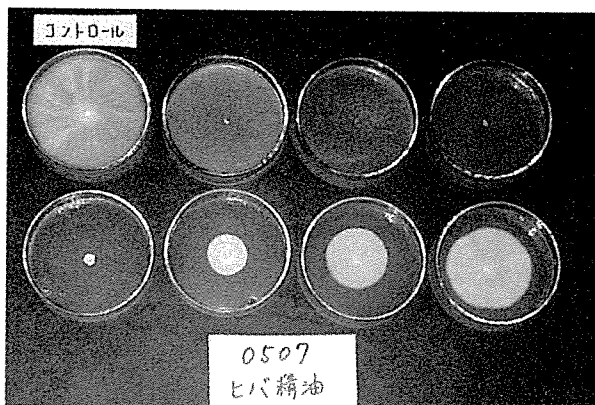


図12 寒天希釈法によるヒバ油の抗菌効力試験（オオズラタケ）  
上段左より：コントロール、5000ppm、2500ppm、  
1250ppm 下段左より：625ppm、313ppm、156ppm、  
78ppm

の結果である。酸性油は、50ppmまで両腐朽菌の生育を完全に阻止した。それに対して、中性油も20,000～78ppmの範囲で約80%を超える高い生育阻止率を示したが、生育を完全に阻止するには至らなかった。このことから、ヒバ油に含まれる酸性油成分が、木材腐朽菌の生育阻害に深く関与するとともに、中性油成分についても幾らかの抗菌性を有すると考えられる。

図16～19は、トロポロン類、ヒノキチオール、HT-Cu<sup>2+</sup>およびHT-Zn<sup>2+</sup>を用いた結果である。これらの薬剤は両腐朽菌に対して、50ppmまで菌糸の生育を完全に阻止した。この値は岡部ら<sup>6)</sup>が求めたヒノキチオールの最小発育阻止濃度(MIC: Minimum Inhibitory Concentration) 25ppmに、ほぼ近似する値であった。また、これらの薬剤を25ppm以下で用いた場合には、オオズラタケよりもカワラタケに対する方が、生育阻止効果は乏しかった。これらから、上述のペーパーディスク法の結果と同様、カワラタケは低濃度のヒノキチオール類に抵抗性を有することが示唆された。

図20,21は、酸性油の一成分であるカルバクロールとシトロネル酸を用いた結果である。前者は両腐朽菌に対して156ppmまで、後者は両腐朽菌に対して78ppmまで生育を完全に阻止した。このことから、ヒバ油成分の中では、ヒノキチオールに次ぐ抗菌性があると考えられる。また、カルバクロール78ppm以下では、オオズラタケよりもカワラタケに対する方が生育阻止率の低下は顕著であった。一方、シトロネル酸5ppmの場合には、カワラタケの生育阻止率が約80%であったのに対して、オオズラタケでは50%程度しか阻止することができず、オオズラタケに対する方が39ppm以下での生育阻止率の低下は明らかであった。

図22,23は、ヒノキ油と柿渋を用いた結果である。ヒノキ油25,000ppmを用いた場合、オオズラタケに対しては約80%、カワラタケに対しては約90%の生育を阻止したが、391ppmではそれぞれの菌に対して、10%あるいは0%まで生育阻止率が低下した。

柿渋はオオズラタケに対して5倍希釈液まで、カワラタケに対しては10倍希釈液まで生育を完全に阻止した。しかし、40倍希釈液ではカワラタケに対して約40%、オオズラタケに対しては数%しか生育を阻止することができなかった。ペーパーディスク法において、まったく認められなかった抗菌性が、寒天希釈法では認められた。この理由として、柿渋には木材抽出成分のような揮発性の有効成分を多く含まないこと、さらに木材腐朽菌に対して強い抗菌効力を持たないことなどから、忌避性試験でもあるペーパーディスク法では、効果がでなかった可能性が考えられる。また、福田ら<sup>7)</sup>が行った柿渋の同試験において、カワラタケはオオズラタケよりも、幾分生育阻止効果に乏しかった。しかし、今回の試験では、カワラタケに対する方がオオズラタケよりも効果は大きかった。この理由として、今回、我々が用いた木材腐朽菌と彼らが用いたものとの間に活性の差異があったことなどが考えられる。以上のことから、ヒノキ油と柿渋には、微弱ながら抗菌性を有することが確認できた。

図24は、ACQを用いた結果である。本実験で用いたACQは、両腐朽菌に対して1,250ppmまで生育を完全に阻止した。また、それを下回る濃度では、オオズラタケの生育阻止率の低下が顕著であった。これらから、上述のペーパーディスク法と同様に、オオズラタケは銅を主成分とするACQに対して抵抗性がある、いわゆる銅耐性菌であることが確認できた。

### 3.3 ヒバ油類の抗菌効力

図25に、ペーパーディスク法の結果から求めたトロポロン類含有量と忌避率の関係を示す。オオズラタケに対しては、ヒバ油に含まれるトロポロン類が0.16%、ヒノキチオール単体では0.4%で生育阻止率が100%になった。一方、カワラタケに対しては、ヒバ油に含まれるトロポロン類が0.1%で生育阻止率が75%に、1.55%で100%になった。また、ヒノキチオール単体では0.4%でも生育阻止率は50%であった。これらから、ヒバ油に含まれるトロポロン類は、ヒノキチオール関連化合物よりも低濃度で優れた抗菌性を有することが示唆された。

表2に、寒天希釈法の結果からもとめたMIC値と、それらに占めるトロポロン類含有量を示す。両腐朽菌に対するトロポロン類とヒノキチオール関連化合物のMIC値が50ppmであるのに対して、ヒバ油と酸性油のMIC値に

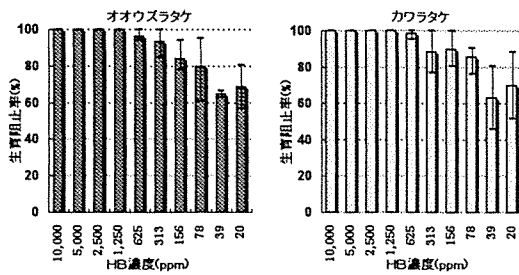


図13 ヒバ油(HB)の生育阻止率

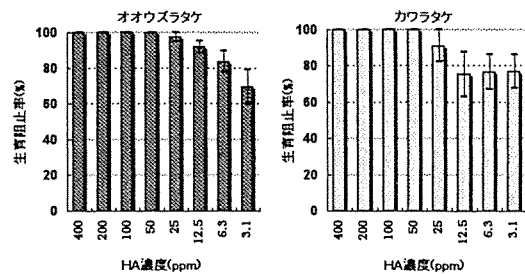


図14 ヒバ酸性油(HA)の生育阻止率

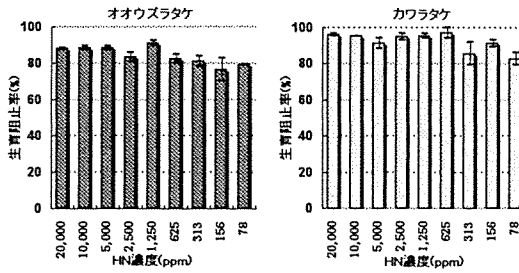


図15 ヒバ中性油(HN)の生育阻止率

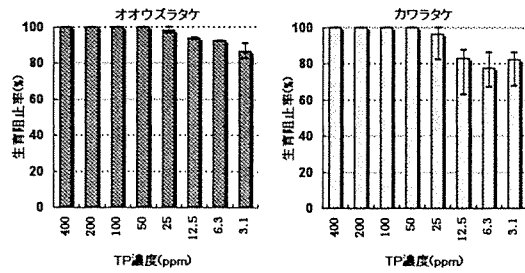


図16 トロポロン類(TP)の生育阻止率

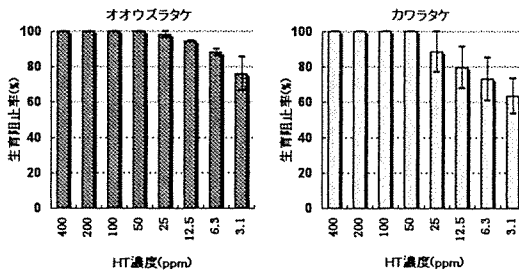


図17 ヒノキチオール(HT)の生育阻止率

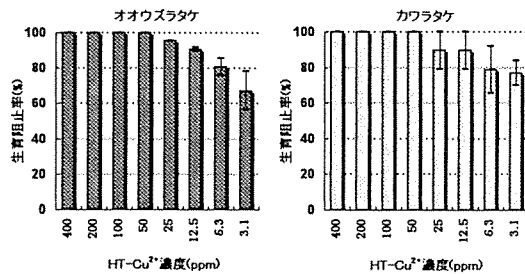


図18 ヒノキチオール銅錯体(HT-Cu<sup>2+</sup>)の生育阻止率

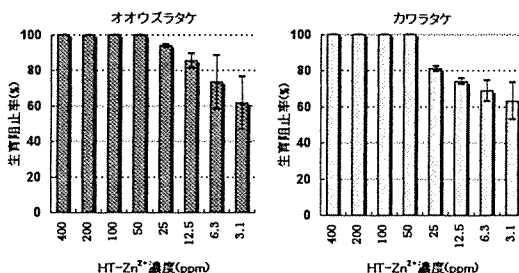


図19 ヒノキチオール亜鉛錯体(HT-Zn<sup>2+</sup>)の生育阻止率

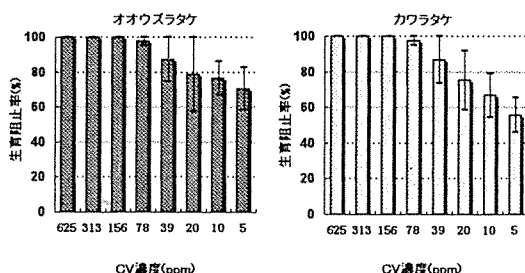


図20 カルバクローール(CV)の生育阻止率

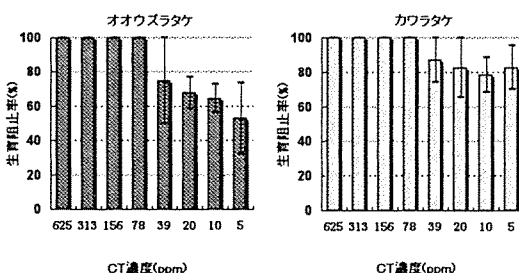


図21 シトロネール(CT)の生育阻止率

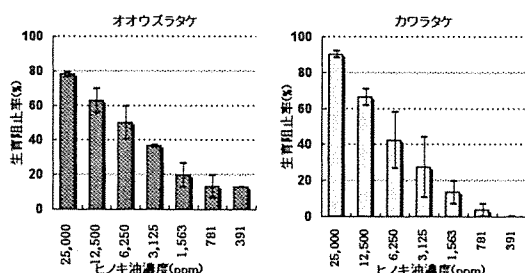


図22 ヒノキ油の生育阻止率

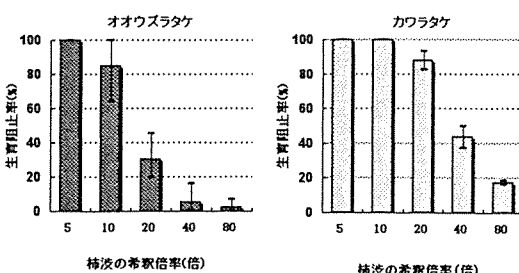


図23 希釈の生育阻止率

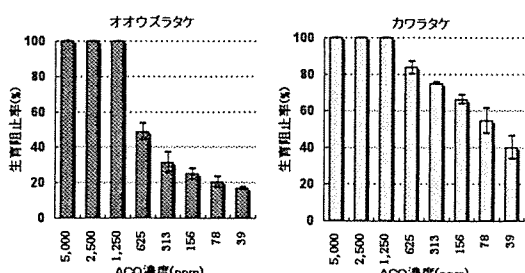


図24 ACQの生育阻止率

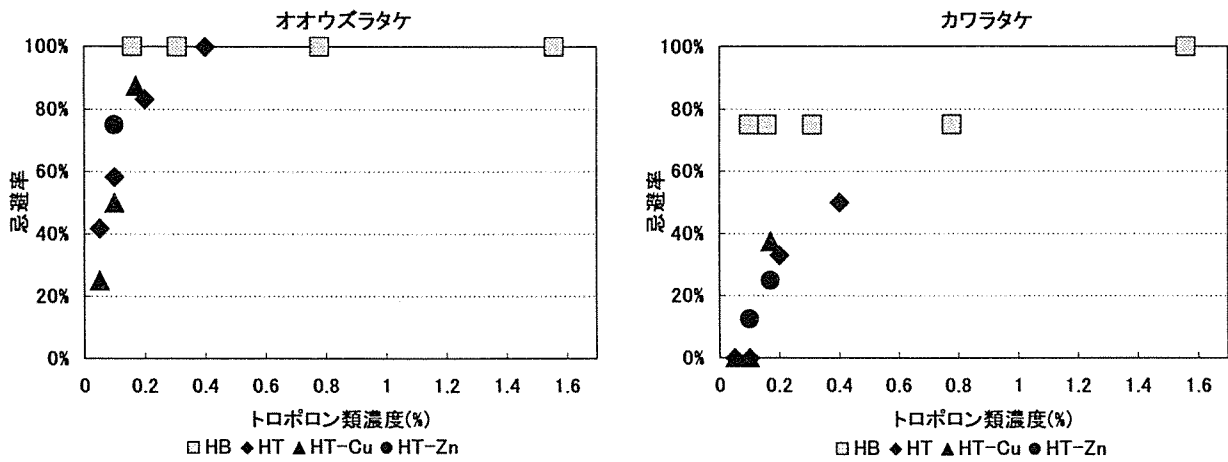


図 25 トロポロン類含有量と忌避率の関係

(HB:ヒバ油、HT:ヒノキチオール、HT-Cu<sup>2+</sup>:ヒノキチオール銅錯体、HT-Zn<sup>2+</sup>:ヒノキチオール亜鉛錯体)

表 2 木材抽出成分等のMIC値とそれに含むトロポロン類含有量

薬剤名	オオウズラタケ	カワラタケ
ヒバ油 (HB)	1,250 (39)	1,250 (39)
ヒバ酸性油 (HA)	50 (15)	50 (15)
ヒバ中性油 (HN)	—	—
トロポロン類 (TP)	50 (50)	50 (50)
ヒノキチオール (HT)	50 (50)	50 (50)
HT-Cu <sup>2+</sup>	50 (42)	50 (42)
HT-Zn <sup>2+</sup>	50 (42)	50 (42)
カルバクロール (CV)	156	156
シトロネル酸 (CT)	78	78
ヒノキ油	—	—
柿渋	200,000	100,000
ACQ	1,250	1,250

( ) 内はトロポロン類含有量 単位: ppm

占めるトロポロン類含有量は39ppmならびに15ppmであった。これは、ヒバ油に含まれるトロポロン類が木材腐朽菌に対して、最も有効な抗菌成分であることを示す一方で、それ以外の何らかの成分が、効力の向上に深く関与する可能性を示唆している。上述の結果から、この可能性として、酸性油成分であるカルバクロールとシトロネル酸が、この効果に大きく作用していると考えられる。

#### 4. まとめ

ヒバ油はオオウズラタケおよびカワラタケに対してACQに匹敵するか、あるいは、それ以上の抗菌効力を有することが明らかになった。ヒバ油の酸性油成分であるヒノキチオールを含むトロポロン類は、その中でも極めて強い抗菌効力を有していた。また、それに次いでカ

ルバクロールやシトロネル酸が効力を発揮することも判明した。しかし、トロポロン類が低濃度の場合、カワラタケに対する抗菌効力は、オオウズラタケよりも微弱であると考えられる。

ヒノキチオールの銅および亜鉛錯体は、トロポロン類と同等の抗菌効力を有した。また、銅化合物であるACQに対して、オオウズラタケは抵抗性を有したが、銅を含むヒノキチオール銅錯体の場合には有効に作用した。

ヒノキ油と柿渋は木材腐朽菌に対して、ヒバ油に及ばない微弱な抗菌効力を有した。

本研究では、木材抽出成分の抗菌効力に関する基礎的な知見を得ることができた。木材に薬剤を処理した場合、木材への定着性や木材成分との相互作用によって、防腐効果が異なることも考えられるので、今後、これらの知見を基にして、木材への防腐効力について検討したい。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ヒバ油類の提供、ならびに分画精製・分析を快諾いただきました大阪有機化学工業(株) 森田泰弘氏に、また、柿渋の提供と分析を快諾いただきました岩本亀太郎商店 岩本将稔氏に深く感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) 吉田慎治・森田泰弘・成田一憲・岡部敏弘: 青森ヒバ油由来中性油の防蟻性能. 第40回天然有機化合物討論会講演要旨集, 311-315 (1998)
- 2) 岡部敏弘・斉藤幸司: 木材抽出成分の薬理効果. 木

- 材保存. 19(2), 25-28 (1993)
- 3) 森田泰弘・奥田尚宏・岡部敏広：ヒノキチオール錯体の抗菌性及び光安定性. 第40回天然有機化合物討論会講演要旨集, 529-533 (1998)
  - 4) 福田清春・金子明裕・原口隆英：樹木精油の抗菌性. 木材保存. 17(3), 19 (1991)
  - 5) 島田幹夫：木材腐朽菌の代謝生理：銅耐性とシュウ酸、そして腐朽の生化学. 木材保存. 28(3), 86-96 (2002)
  - 6) 岡部敏弘・斉藤幸司・大友良光：青森ヒバ（ヒノキアスナロ）油に関する研究. 青森工業試験場業務報告書, 211-213 (1987)
  - 7) 福田清春・上村卓史：木材保存における柿渋の利用. 東京農工大学演研報. 33, 45-49 (1995)
- (2002年12月2日受理)