

木材乾燥における芳香蒸留水の有用成分利用（第2報） ヒノキ芳香蒸留水抽出物の抗かび活性

伊藤国億*

Effective Use of Aromatic Distilled Water by Drying Wood (II) Antifungal Activity of Hinoki-Aromatic Distilled Water Extracts

Ito Kuniyasu*

ヒノキ材乾燥時に回収した芳香蒸留水(FW)抽出物の抗かび活性を評価するため、抽出物の成分割合が異なる4種類のFW抽出物を用い、クロカビおよび白癬菌に対してMIC試験等を行った。これらのFW抽出物のMIC値は*C. sphaerospermum*に対して156~823 μ g/ml、*T. rubrum*、*T. mentagrophytes*に対して39~521 μ g/mlであり、抗かび活性が認められた。試験菌に対するFW抽出物成分の抗かび活性はモノテルペンアルコールよりもセスキテルペンアルコールが高いと考えられた。また、寒天拡散法ではモノテルペンアルコールよりも放散強度の小さいセスキテルペンアルコール等の揮発成分が抗かび活性に大きく寄与したと考えられた。

1. 緒言

スギ、ヒノキなどの住宅用材は材内の含水量を減らすため乾燥処理されて市場に供給されているが、その乾燥過程で材内の水分が排出蒸気となって多量に生じている。この排出蒸気には木材由来の精油等が含まれているが、排出蒸気を回収して精油を利用することはほとんどない。我々は、未利用資源かつ副産物である排出蒸気中の精油を回収するため、木材乾燥をラボスケールから実大スケールまで行い、その成分や収量を検証¹⁻³⁾した。こうしたなか、精油回収の際に精油よりも多く回収される芳香蒸留水（以降、FWとする。）に着目した。一般的にFWとは植物の枝葉から水蒸気蒸留により精油抽出と共に滞留して得られる水（ハーブウォーターとも言われる。）であり、抽出時に素材から水に溶け込んだ成分が含まれるため、その機能性を活用して古くから芳香剤や化粧水として利用されている⁴⁾。これと同じ原理で木材乾燥から得られるFWにも機能性成分が含まれていると考えられることから、ヒノキ材乾燥時に回収したFWの抽出成分を調査した⁵⁾。このFWには α -テルピネオールやテルペン-4-オールなどのモノテルペンアルコールや α -カジノールや ϵ -ムウロロールなどの

セスキテルペンアルコールが含まれていた。 α -カジノールや ϵ -ムウロロールは木材を腐朽させる担子菌に対する抗菌活性を有することが認められている⁶⁻⁷⁾。また、テルペン-4-オールはティートリーオイルの主成分であり、様々な抗菌活性が知られている⁸⁾。

そこで、ヒノキ材乾燥時に回収したFWから有用成分を抽出し、FWの機能性の一つとして抗かび活性を評価することにした。

2. 実験方法

2.1 FW抽出物の調製

FWは既報⁵⁾の実験方法と同様に、ヒノキ材の乾燥過程で排出される蒸気を冷却して回収した。FW中の精油成分間の比が大きく相違する乾燥温度max. 90℃前期分とmax. 75℃後期分及び高温セット乾燥のセット直後分を用いた。また、水蒸気蒸留において蒸留10時間経過後から回収したFWも用いた。各FWは固相抽出カートリッジ（GLサイエンス社製、Inert Sep RP-1）を用いてアセトン抽出し、エバポレーターで濃縮後、窒素雰囲気下でアセトンを除去して抽出物を調製した。以降、乾燥温度max. 90℃前期分のFW抽出物を「wd90_fw_ext.」、乾燥温度max. 75℃後期分のFW抽出物を「wd75_fw_ext.」、高温セット乾燥のセット直後分のFW抽出物を

* 試験研究部

「wdl20_fw_ext.」、水蒸気蒸留抽出物を「ws_fw_ext.」とする。これら抽出物はアセトンで1%濃度に希釈して既報⁵⁾と同様にGCMS分析に供し、成分分析を行った。

2.2 FW抽出物の抗かび活性試験

2.2.1 供試材料

2.2.1.1 試験液

2.1で得た各抽出物40mgを2ml容メスフラスコにそれぞれ加えて5% Tween 80水溶液で定容(2%(w/v)濃度)し、最小発育阻止濃度MIC(Minimum Inhibitory Concentration)試験に用いた。また、各抽出物50mgを1ml容メスフラスコにそれぞれ加えてアセトンで定容(5%(w/v)濃度)し、ペーパーディスク法による阻止円の測定に用いた。なお、対照材料として α -テルピネオール(>95.0% GC、東京化成工業社製)を用い、他の試験液と同様に調製した。

2.2.1.2 供試菌株

クロカビとして*Cladosporium sphaerospermum* (NBRC 6348)、白癬菌として*Trichophyton rubrum*(NBRC 5647)、*Trichophyton mentagrophytes* (NBRC 32409)を用いた。培地はMIC試験に*C. sphaerospermum*にはポテト・デキストロースブロス、*T. rubrum*、*T. mentagrophytes*にはサブラー・デキストロースブロス、ペーパーディスク法に*C. sphaerospermum*にはPDA培地を、*T. rubrum*、*T. mentagrophytes*にはSDA培地を用いた。各菌株は試験直前に各寒天培地を用いて28℃にて1週間の前培養を行った。前培養した菌株から孢子を約 10^6 個/mlとなるようにとり、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム水溶液に加え、単一孢子懸濁液を調製した。

2.2.2 MIC試験

予めオートクレーブ滅菌(121℃、15分)したブロス3.5mlの入った試験管に2.2.1.1で調整した各2%(w/v)試験液0.5mlを加えて攪拌した。攪拌後、2ml分取してブロス2mlの入った別の試験管に加えて攪拌し、この操作を繰り返して2倍希釈系列で試験液濃度0.002~0.25%(20~2,500 μ g/ml)とする培地を調製した。なお、予めオートクレーブ滅菌前のブロスにクロラムフェニコール濃度が0.005%になるように添加した。

各試験液濃度に調製した培地に各孢子懸濁液100 μ lをそれぞれ接種し、タッチミキサーにて攪拌した後、28℃にて1週間培養した。培養後、菌糸の発育の有無を目視にて評価し、菌糸の発育が認められない濃度を求めた。また、FW抽出物を含まない5% Tween 80水溶液で調製した培地も先述と同様に培養し、菌糸の発育を確認した。なお、この試験は3回繰り返し行い、MICの平均値を算出した。

2.2.3 ペーパーディスク法による阻止円の測定

ペーパーディスク法において、寒天拡散法および寒天気体防止法を用いて各抽出物の抗かび活性を評価した。

2.2.3.1 寒天拡散法

予め調製した寒天培地(ガラスシャーレの内径89mm、内寸高さ20mm、クロラムフェニコール0.005%含有)に2.2.1.2にて調製した各孢子懸濁液0.3mlをそれぞれ塗抹した。この寒天培地に2.2.1.1にて調製した5%(w/v)試験液30 μ lを添加した滅菌済み濾紙(ϕ 8mm、厚手、アドバンテック社製)を培地中央に置き、シャーレを粘着テープで密閉し、28℃にて3日間培養した。なお、試験液中のアセトンは濾紙に添加後、予め安全キャビネット内で5分間以上静置して除去した。

培養後、シャーレの裏に直行する線を引き、形成された菌糸の発育阻止円の直径2点をノギスで計測して平均値を算出した。また、アセトンを添加して5分以上静置した濾紙を置いた培地も先述と同様に培養し、菌糸の発育を確認した。なお、この試験は3回繰り返し行い、阻止円の平均値を算出した。

2.2.3.2 寒天気体防止法

2.2.3.1と同様に、接種した培地中央に試験液を添加した滅菌済み濾紙を置いた。これに濾紙を囲むようにシリコンリング(ϕ 20mm)を重ねて、その上にカバーガラス(24×25mm)を被せ、シャーレを粘着テープで密閉して培養した。この試験も3回繰り返し、阻止円を算出した。

2.2.3.3 気体寄与率の算出⁹⁾

各試験液の気体の寄与を評価するため、以下の式のとおり気体寄与率(δ)を算出した。

$$\delta = \{1 - (b - 20) / (a - 20)\} \times 100 \cdots \cdots (式)$$

a:寒天拡散法の阻止円

b:寒天气体防止法の阻止円

なお、阻止円直径が20mm以上の場合に限り算出

2.3 FW抽出物の放散成分分析

2.2.1.1にて調製した5% (w/v) 試験液30μlを抗かび活性試験に用いた濾紙に添加し、5分以上室内で静置してアセトンを除去了。これをサンプリングバッグ（テドラーバッグ、10L容）に入れて脱気し、次いで清浄空気を6.2L充填して28℃下で24時間静置した。なお、試験液量に対するサンプリングバッグ体積の比は2.2.3に用いたシャーレ（体積0.124L）の約50倍希釈とした。

静置後、Tenax TA吸着管を用いてサンプリングバッグの空気を0.5L捕集した。捕集した吸着管は加熱脱着-GCMS分析に供し、表1に示す分析条件で測定した。各FW抽出物の放散成分はn-アルカン（林純薬工業社製 C7-C33）を同様に測定してリテンションインデックス（RI）を作成し、精油のマススペクトル・データベースのGCリテンションインデックスおよびNISTライブラリより成分を定性した。また、内部標準試料自動添加装置によりトルエン d8を内部標準とし、トータルイオンクロマトグラム（TIC）の各ピーク面積と内部標準の面積の比を算出し、各FW抽出物の放散成分の強度を比較した。なお、この試験は3回繰り返し行い、各成分の平均強度を算出した。

表1 加熱脱着-GCMS分析条件

熱脱着装置	Perkinelmer Turbo Matrix 650
ページ	1 min
脱着流量	60 ml/min
温度及び時間	280 ℃、3 min
スプリット	入口 40 ml/min 出口 60 ml/min、注入率 1%
トラップ	Tenax TA/ Carboxen 1000
トラップ加熱	-20 ℃ - (40℃/s) - 280 ℃ (15min)
トランスファーライン	280 ℃
GC/MS	Shimadzu GCMS - QP2020NX
測定モード	SCAN
キャリアガス	He、1 ml/min
ス	
オープン	50 ℃ - (10 ℃/min) - 280 ℃
カラム	DB-5 (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm)
MS温度	230 ℃
検出器	0.7 kV

3. 結果と考察

3.1 FW抽出物の抗かび活性

各FW抽出物の各試験菌に対するMICを表2に示す。また、FW抽出物のTICを図1に示す。表2に示すようにFW抽出物のMIC値はクロカビ (*C. sphaerospermum*) に対して156～823μg/ml、白癬菌 (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*) に対して39～521μg/mlであり、クロカビよりも低かったことから、抗かび活性はクロカビよりも白癬菌に対して総体的に高かった。エッセンシャルオイルなどのテルペン類からなる精油の抗かび活性は白癬菌に

表2 各試験菌に対するMIC

[単位：μg/ml]

試験液	試験菌		
	<i>C. sphaerospermum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
wd120_fw_ext.	833	261	521
wd90_fw_ext.	625	313	521
wd75_fw_ext.	417	156	313
ws_fw_ext.	156	39	104
α-Terpineol	625	625	417

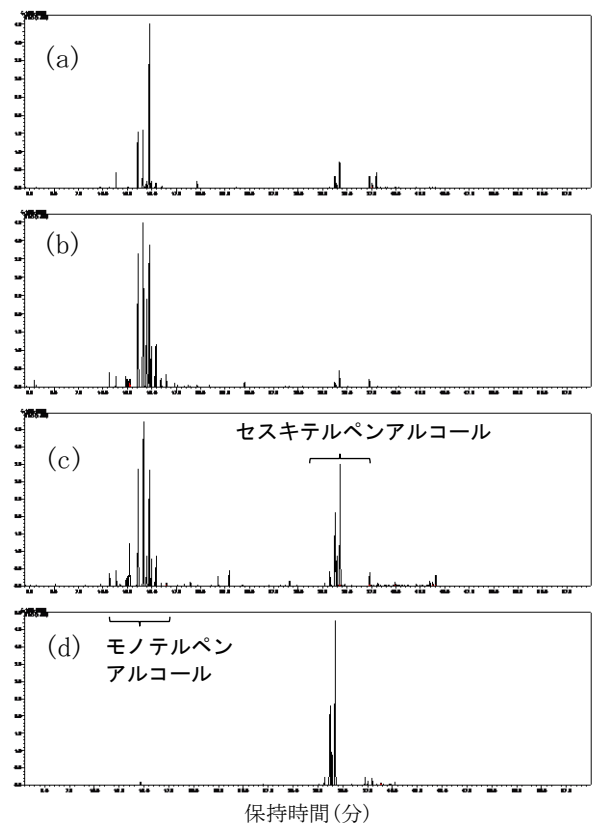


図1 FW抽出物のTIC

(a) wd120_fw_ext. (b) wd90_fw_ext.
(c) wd75_fw_ext. (d) ws_fw_ext.

より高いことが知られているが、本試験のモノテルペンアルコールやセスキテルペンアルコールから構成されるFW抽出物も精油と同様な活性傾向を示した。FW抽出物間においてMIC値はws_fw_ext.、wd75_fw_ext.、次いでwd90_fw_ext. またはwd120_fw_ext. の順に低かった。図1に示すようにTICチャートの保持時間14分前後のピークはボルネオールやテルペン-4-オール、 α -テルピネオールなどのモノテルペンアルコール、保持時間34分前後のピークは γ -ムウロロールや α -ムウロロール、 α -カジノールなどのセスキテルペンアルコールであり、各FW抽出物のセスキテルペンアルコールの成分割合はws_fw_ext.、wd75_fw_ext.、wd120_fw_ext.、wd90_fw_ext. の順に大きいことから、これら試験菌の抗かび活性はセスキテルペンアルコールの寄与が大きいと考えられる。また、wd120_fw_ext. に最も多く含まれる α -テルピネオール単体のMIC値はFW抽出物よりも総体的に高かったことから、FW抽出物の成分のうち α -テルピネオール以外の成分で、特にセスキテルペンアルコールが抗かび活性により寄与したと思われる。

寒天拡散法においてwd120_fw_ext.、wd75_fw_ext.、ws_fw_ext. を用いた各試験菌に対する阻止円を図2に示す。全てのFW抽出物に*C. sphaerospermum* よりも *T. rubrum* および *T. mentagrophytes* に大きい阻止円が形成され、MIC試験と同様な抗かび活性の傾向を示した。FW抽出物

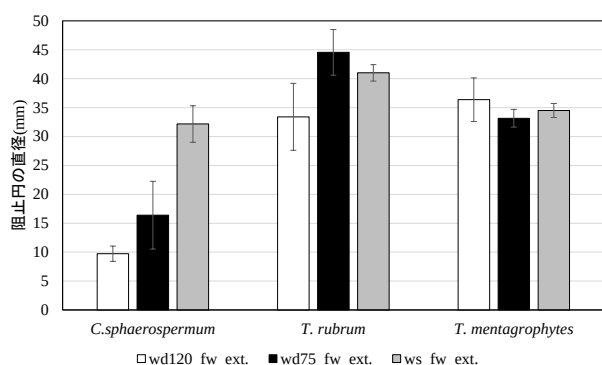


図2 寒天拡散法のFW抽出物による阻止円

表3 FW抽出物の気体寄与率

[単位：％]

試験液	試験菌		
	<i>C. sphaerospermum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
wd120_fw_ext.	-	57	47
wd75_fw_ext.	-	83	99
ws_fw_ext.	87	48	79

-：寒天拡散法において阻止円20mm以下

間では*C. sphaerospermum*に対してws_fw_ext.、wd75_fw_ext.、wd120_fw_ext. の順に阻止円が大きく、抗かび活性はMIC試験と同様な抽出物間の傾向を示した。一方、*T. rubrum*および*T. mentagrophytes*に対して抽出物間の阻止円の大きさは余り変わらず、MIC試験と異なる傾向を示した。

精油の抗菌性試験においてMIC試験と寒天拡散法では異なる活性傾向を示すことが報告されている⁹⁾。寒天拡散法では揮発する精油成分の活性が影響するため、本実験においてもシャーレ内で揮発した成分が影響した可能性が高い。そこで寒天気体防止法を用い、揮発成分を抑制したときの阻止円を測定し、気体寄与率を算出した(表3)。

*C. sphaerospermum*に対するFW抽出物の気体寄与率はwd120_fw_ext. およびwd75_fw_ext. において算出できなかった。これは寒天気体防止法のリング直径に満たない大きさの阻止円であり、抽出物濃度が足りなかった可能性があるため、濃度を上げた追試を行う必要がある。*C. sphaerospermum*に対するws_fw_ext. の気体寄与率は87%と高く、揮発成分の抗かび活性への寄与が大きかった。*T. rubrum*および*T. mentagrophytes*に対するFW抽出物の気体寄与率は各FW抽出物において50%弱～100%弱であったことから、揮発成分も抗かび活性に寄与したことを示唆した。FW抽出物間では*T. rubrum*および*T. mentagrophytes* に対してwd75_fw_ext.、ws_fw_ext.、wd120_fw_ext. の順に気体寄与率が高い傾向にあった。これはMIC試験におけるFW抽出物間の抗かび活性 (ws_fw_ext.、wd75_fw_ext.、wd120_fw_ext. の順に高い) と異なった。つまり、MIC試験で液体寒天に分散したFW抽出物の成分比と寒天拡散法における揮発成分比、揮発分量が異なることで抗かび活性が相違したと考えられる。

FW抽出物の放散成分のTICを図3に示す。各FW抽出物において図1に示す抽出成分比に比べ、図3に示す放散成分比は相違し、総体的にモノテルペンアルコールが増加、セスキテルペンアルコールが低下し、両者の成分比の差が大きくなった。特にws_fw_ext. においてモノテルペンアルコールの主要な成分であったボルネオールやテルペン-4-オール、 α -テルピネオールの放散成分割合は60%を占め、抽出物中に5%未満であった成分割合が10倍以上に増加した。また、抽出物中の割合が1%未満であった酢酸ボルニルや酢酸テルピニルは、放散成分では1～3%に割合が増加した。

内部標準物質のトルエン d8 に対する放散成分の相対強度 (全てのピーク / トルエン d8) はwd120_fw_ext. は380、wd75_fw_ext. は451、

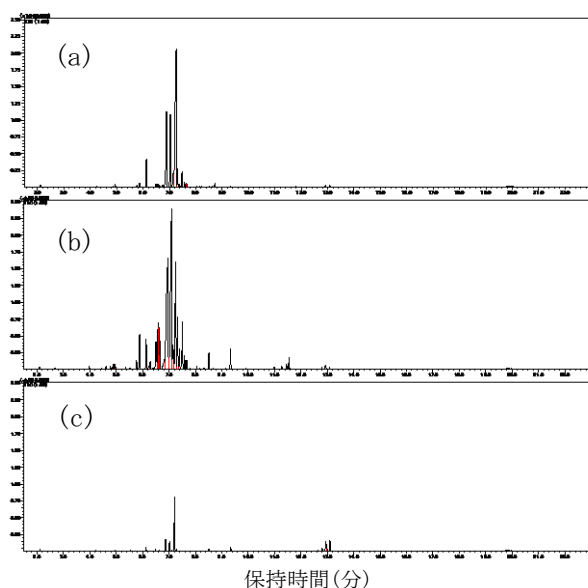


図3 FW抽出物の放散成分のTIC

(a)wd120_fw_ext. (b)wd75_fw_ext.
(c)ws_fw_ext.

ws_fw_ext. は 59 であった。wd120_fw_ext. と wd75_fw_ext. の放散量の差は10%程度と小さいにも関わらず、気体寄与率は相違し、wd120_fw_ext. よりもwd75_fw_ext. の方が高かった。つまり、全ての揮発成分の総量ではなく、各成分の抗かび活性に差があり、かつこれら成分量の差が気体寄与率に影響したと考えられる。

成分毎の放散強度のうち、FW抽出物の主要な成分と wd120_fw_ext. に対して wd75_fw_ext. および ws_fw_ext. の放散強度比が5倍以上となる成分を表4に示す。 α -テルピネオール放散強度は wd120_fw_ext. が最も大きかったが、気体寄与率が低く、抗かび活性への気体寄与は他成分に比べて低いと考えられる。また、ボルネオールおよびテルペン-4-オールの放散強度は気体寄与率が高い wd75_fw_ext. が最も大きかったが、ws_fw_ext. では放散強度が5、4と少なく、wd75_fw_ext. の20分の1以下であった。放散強度が小さいにも関わらず、寒天拡散法における ws_fw_ext. の阻止円は他のFW抽出物と余り変わらない大きさであった。ゆえに他の揮発成分か、或いは寒天拡散した成分が阻止円の形成に寄与したと推察されるが、ws_fw_ext. の気体寄与率が高い傾向にあったことから、他の揮発成分の寄与が大きいと考えられる。従って、ボルネオールおよびテルペン-4-オールの抗かび活性への気体寄与は他成分に比べて低いと考えられる。

表4 FW抽出物の放散成分強度

RT (min)	成分名	ピーク強度/Td8			放散強度比	
		wd120_fw_ext.	wd75_fw_ext.	ws_fw_ext.	(75/120)_fw_ext.	(ws/120)_fw_ext.
5.73	unknown	2	13	N.D.	5.1	
5.99	Fenchol<endo->	16	9	2	0.6	0.1
6.14	unknown	1	3	N.D.	5.4	
6.35	Pinocarveol<t->	2	13	1	6.0	0.4
6.42	Camphor/Verbenol<t->	3	21	N.D.	7.1	
6.48	Camphene hydrate	1	12	0	8.7	0.3
6.60	Isoborneol	1	6	N.D.	4.5	
6.77	Borneol	60	98	5	1.6	0.1
6.92	Terpinen-4-ol	51	113	4	2.2	0.1
7.16	Terpineol<α->	165	53	26	0.3	0.2
7.20	Myrtenol	8	17	1	2.1	0.1
7.36	Verbenone	8	17	N.D.	2.1	
8.36	Bornyl acetate	1	5	1	9.4	1.9
9.19	Terpinyl acetate< α ->	0	6	2	13.7	3.7
12.79	Murolol<epi-α->	1	3	7	2.7	6.2
12.84	Murolol<α->	N.D.	0	1		
12.94	Cadinol<α->	1	1	5	1.8	7.0

太字：FW抽出物の主要成分、N.D.：未検出

wd75_fw_ext. および ws_fw_ext. に共通して wd120_fw_ext. よりも放散強度比の高い成分は酢酸ボルニルと酢酸テルピニル、 α -カジノールなどのセスキテルペンアルコールであった。これら成分は放散強度がモノテルペンアルコールに比べて小さいものの、寒天拡散法において気体状態で抗かび活性の寄与が他成分に比べて大きかったと考えられる。

一方、*T. rubrum*に対する ws_fw_ext. の気体寄与率は48%であり、他の試験菌との差は不明であり、原因を究明したい。

4. まとめ

ヒノキ材乾燥時に回収した芳香蒸留水(FW)の抽出物の抗かび活性を評価するため、抽出成分の成分割合が異なる4種類のFW抽出物を用い、各試験菌(クロカビ:*C. sphaerospermum*、白癬菌:*T. rubrum*、*T. mentagrophytes*)に対してMIC試験およびペーパードISK法(寒天拡散法、寒天氣体防止法)による阻止円の測定を行った。

FW抽出物のMIC値は*C. sphaerospermum*に対して156~823 μ g/ml、*T. rubrum*、*T. mentagrophytes*に対して39~521 μ g/mlであり、抗かび活性が認められた。4種類のFW抽出物は成分割合が異なることから、成分の抗かび活性について考察した。FW抽出物のMIC値は標準試薬の α -テルピネオールよりも低く、セスキテルペンアルコールの成分割合が大きいほど低かった。従って、これら試験菌に対するFW抽出物成分の抗かび活性はモノテルペンアルコールよりもセスキテルペンアルコールが高かったと考えられる。

寒天拡散法および気体拡散防止法を用いた阻止円の測定から、FW抽出物の揮発成分による抗かび活性について評価した。MIC試験と寒天拡散法では異なる活性傾向を示した。各試験菌に対するFW抽出物の気体寄与率は50%弱～100%弱であり、寒天拡散法において揮発成分は抗かび活性に大きく寄与したと考えられる。

寒天拡散法における揮発成分を調べるため、サンプリングバッグ法により放散成分とその強度を測定した。 α -テルピネオールなどの主要なモノテルペンアルコールの放散強度と気体寄与率は相関せず、放散強度の小さいFW抽出物においても気体寄与率が高かったことから、各揮発成分の抗かび活性に差があると推察された。気体寄与率が高いFW抽出物は酢酸ボルニルや酢酸テルピニル、セスキテルペンアルコールの放散強度が大きかった。従ってモノテルペンアルコールに比べてこれらの成分は放散強度が小さいものの、気体状態でも抗かび活性の寄与が大きかったと考えられる。

謝辞

本研究にあたり芳香蒸留水サンプルをご提供いただきました交告製材(株)様に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 伊藤国億ほか：香りでやすらぐ木工製品の開発 木材乾燥における排出蒸気中の精油成分について、岐阜県生活技術研究所研究報告，18，pp. 5-9，2016.

- 2) 伊藤国億ほか：香りでやすらぐ木工製品の開発（第3報）木材乾燥における排出蒸気中の精油回収について，岐阜県生活技術研究所研究報告，20，pp. 6-9，2018.
- 3) 伊藤国億ほか：香りでやすらぐ木工製品の開発（第5報）木材乾燥による精油回収実証試験について，岐阜県生活技術研究所研究報告，22，pp. 1-4，2020.
- 4) 小木曾 加奈：信州産ハーブの芳香蒸留水-その特性と機能性-、長野県短期大学紀要，64，pp. 49-59，2009.
- 5) 伊藤国億ほか：木材乾燥における芳香蒸留水の有用成分利用（第1報）芳香蒸留水の精油量について，岐阜県生活技術研究所研究報告，23，pp. 18-22，2021.
- 6) 近藤隆一郎ら：ヒノキ心材の耐朽成分、木材学会誌，32(3)，pp. 213-217，1986.
- 7) 金城和彦ら：担子菌栽培培地に関する研究(第4報)ヒノキの阻害活性、木材学会誌，32(8)，pp. 632-636，1986.
- 8) 井上重治ら：精油の抗菌活性の詳細，抗菌アロマセラピーへの招待，井上重治ら，フレグランスジャーナル社，2011，pp. 42-106.
- 9) Inouye S., Uchida K., Maruyama N. et al.: A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay., Jap J Med Mycol, 47, pp. 91-98, 2006.