

日 本 木 材 学 会

北 海 道 支 部 講 演 集

第 4 2 号

平 成 2 2 年 1 1 月

日 本 木 材 学 会 北 海 道 支 部
札 幌

日本木材学会北海道支部講演集

第42号

目次

口頭発表(14:45～17:00)

- 0-1) カラマツ木部柔細胞の過冷却能に関与する冬季誘導性タンパク質(LKDRP1 及びLKDRP2)に関する研究
能美彩香, 森本和成, 藤川清三, 荒川圭太(北大院農) 1
- 0-2) ハイブリッドアスペンの凍結抵抗性に関する研究
○板羽貴史, 砂留光利(北大院農), 上出奈央(北大農), 藤川清三, 荒川圭太(北大院農) 5
- 0-3) 異なる凍結挙動を示すカツラおよびシラカンバ冬芽の組織細胞
遠藤圭太, 荒川圭太, 藤川清三(北大院農) 8
- 0-4) モウソウチク稈水解物のキシリトール発酵
松本晃幸, 三浦雅弘, 横野圭太郎, 霜鳥慈岳, 青山政和(北見工大), 中原正博(北海道三井化学株) 12
- 0-5) エレクトロスピニング法によるセルロースアセテート・ナノファイバーの調製とその利用
富樫文哉, 幸田圭一, 浦木康光(北大院農) 14
- 0-6) カラマツ材の鉄とニッケルの共触媒炭化の効果
小泉祐太, 鈴木京子, 鈴木 勉(北見工大) 17
- 0-7) 近赤外分光法による様々な含水率状態における木材試料の全乾密度の推定
藤本高明(北林産試), 土川 覚(名大院農) 19
- 0-8) 釘一面せん断単位接合部に対する複数本接合部のせん断性能の比較
重本洋介, 澤田 圭, 佐々木義久, 平井卓郎, 小泉章夫(北大院農) 23

展示発表(13:00～14:30)

- P-1) 食用担子菌の菌床栽培における木炭添加の効果
杉山諒司, 玉井 裕, 矢島 崇, 宮本敏澄(北大院農), 原田 陽(北林産試) 27
- P-2) 木酢液の木材防腐効果に関する組織学的研究
鄭 美和, 崔 貞恩, 洪 鎮英, 金 英熙, 趙 昶旭(国立文化財研究所保存科学室, 韓国) 31
- P-3) スギ材水蒸気乾燥凝縮液の防カビ性能
富樫 巖, 佐藤明日香, 後藤隆之(旭川高専), 藤本英人(宮崎木技セ) 35
- P-4) 土壌放線菌からの新規プロテインホスファターゼ阻害物質の探索
柳田進太郎, 三橋進也, 重富顕吾, 生方 信(北大院農) 39
- P-5) エゾマツ晩材部における褐色腐朽の進行に伴うせん断破壊状況の変化
石原 亘, 澤田 圭, 佐野雄三, 玉井 裕, 宮本敏澄, 平井卓郎, 小泉章夫, 佐々木義久(北大院農)
東 智則, 森 満範(北林産試) 43
- P-6) トドマツの辺材と心材は近赤外分光分析で判別できるのか?
宮内輝久, 藤本高明(北林産試) 45
- P-7) 土壌含水比の変化がカラマツ立木の根鉢剛性に与える影響
関矢 陽, 佃 猛司, 佐々木義久, 小泉章夫(北大院農) 47

0-1. カラマツ(*Larix kaempferi*)木部柔細胞の過冷却能に関与する冬季誘導性タンパク質(LkDRP1及びLkDRP2)に関する研究

北大院農 ○能美彩香、森本和成、藤川清三、荒川圭太

【緒言】

北方に生育する樹木は冬季に厳しい寒さに曝される。厳しい寒さの中で生き抜くために氷点下温度すなわち凍結に対する適応機能を発達させることは樹木にとって必要不可欠な生理応答である¹⁾。樹木の凍結適応機構は組織によって異なっており、師部、形成層では細胞外凍結、木部柔細胞では深過冷却、また一部の樹種の冬芽では器官外凍結という凍結適応機構を示すことが知られている。なかでも深過冷却は木部柔細胞に特徴的な凍結挙動で、細胞内の水分が脱水されずに準安定的かつ長期的に過冷却状態を維持するものである。これまでの研究では、細胞壁が細胞内部の水を隔離して細胞外氷晶の伝播や細胞内水分の脱水を防ぐことが過冷却能の主要因として挙げられていた。しかし、近年、本研究グループは、カツラ木部から抽出した4種類のフラボノール配糖体が過冷却促進活性(氷核形成阻害活性)をもつことを明らかにし、これらの細胞内成分が細胞内部の水の過冷却維持に貢献することを強く示唆した²⁾。一方で、低温順化過程を経ると細胞内部で様々な形態学的、生理的变化を生じ、なかでも可溶性糖や低温誘導性遺伝子、タンパク質の一部は、過冷却能の変化と高い相関性を示すことも指摘されている^{3,4)}。これまで本研究グループでは、木部柔細胞の深過冷却機構の解明のため、過冷却促進物質の単離、同定をはじめ、可溶性糖や可溶性タンパク質、低温応答性遺伝子群に関する研究をおこなってきたが^{3,4)}、木部柔細胞の凍結抵抗性機構の全体像を把握するにはまだ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、木部の凍結抵抗性機構における低温誘導性タンパク質の役割を調べるため、カラマツ木部の深過冷却能の変動と対応して発現する木部の可溶性タンパク質の同定や機能評価を目指して研究を開始した。これまでに、低温順化や脱順化による過冷却能の変動に対応して発現量が増減するタンパク質を16個見いだした。これらを過冷却関連タンパク質(*Larix kaempferi* Deep-supercooling Related Proteins : LkDRPs)候補とし、タンパク質の単離ならびに同定を進めた。これによってすべてのLkDRPsの部分アミノ酸配列が予測できたので、既知のタンパク質との相同性を調べたところ、15個のLkDRPsに対して相同性を示す遺伝子またはタンパク質が見つかった。このうちLkDRP1、2はカナダトウヒのlate embryogenesis abundant (LEA)タンパク質と高い相同性を示した。LEAタンパク質の中には、低温誘導性で不凍活性を示すものなど耐凍性に関わるようなものも報告されている⁵⁾。そこでLkDRP1、2の構造や機能を明らかにして過冷却能への関わりを調べるため、まずはこれらのタンパク質をコードする遺伝子の単離を試みた。

【実験方法】

遺伝子の単離と塩基配列の分析

既知の部分アミノ酸配列を元に以下のような **degenerate primer** を設計し、冬季のカラマツ木部柔細胞の cDNA ライブラリーをテンプレートに用い、PCR にて目的遺伝子断片の増幅をおこなった。

forward primer: 5'-GCNAARGARAAYACNAARAARATHCC-3'

reverse primer: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

forward primer は N 末端の部分アミノ酸配列をもとに、reverse primer は pBluescript ベクターの Xho I サイトの配列をもとに設計した。

PCR にて増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動した後、目的の長さの DNA 断片をゲルから抽出し、TA クローニング (**pGEM T-easy vector System, Promega**) によって目的の DNA 断片をサブクローニングした。TA クローニングで得られた目的のプラスミドを大腸菌 JM109 株 (**competent cell, TOYOBO**) に導入してプラスミドを増幅した。サブクローニングした遺伝子断片の塩基配列を調べるために **Big Dye Terminator Cycle sequencing kit Version3.1 (Applied Biosystems)** を用いてシーケンス解析をおこなった。得られた塩基配列の情報をもとに新たに以下のようなプライマーを設計し、上記と同様の方法で目的遺伝子の 5' 側の部分断片の塩基配列を調べた。

forward primer:5'-CTATGACCATGATTACGCCAA-3'

reverse primer:5'-AAGATTATCGTAGAATTGGCTGCC-3'

forward primer は pBluescript ベクターの EcoR I サイトの配列をもとに、reverse primer は先の実験で得られた塩基配列をもとに設計した。

【結果および考察】

LkDRP1 の等電点や分子量に加え、N 末のアミノ酸配列が LkDRP2 と非常に類似していることから(図 1)、両者の遺伝子を区別して増幅させるための **degenerate primer** の設計は難しいと判断し、N 末端のアミノ酸配列がより長く明らかになっている LkDRP2 の部分アミノ酸を利用して遺伝子を単離することにした。N 末端アミノ酸配列の分析結果(図 1)をもとに **degenerate primer** を用いて増幅した LkDRP2 の候補遺伝子断片の塩基配列を解析したところ、既知の部分アミノ酸配列と完全に一致する配列を含むものと、既知の部分アミノ酸配列と 1 残基のみ異なるものの 2 つが見いだされた。

LkDRP1	ATDTKFVSAQXNTKKIPXGSQFY-----
LkDRP2	ATDTKFVSAKENTKKIPRGSQFYDNL-----
PgLEA	MSMGSGFGALAVMVLAVLVAAGAAPTNLVSSACNGNKIPSGNPFNNL-----
	* * * * *

図 1. LkDRP1, 2 ならびにカナダトウヒの LEA タンパク質(PgLEA)の N 末端アミノ酸配列の相同性比較。LkDRP1, 2、PgLEA の N 末端のアミノ酸配列の相同性を比較した。X: 未同定アミノ酸、-: 未解析のアミノ酸。LkDRP1, 2 は以前におこなった N 末端アミノ酸分析の結果を示した。PgLEA (*Picea glauca* LEA)は相同性検索の結果、LkDRP1, 2 と高いホモロジーを示した遺伝子翻訳産物。*: 全ての配列に共通したアミノ酸。

今回明らかになったアミノ酸配列には終止コドンが含まれていたことから、LkDRP2 の N 末端の一部を残したほぼ全長が明らかになったと思われる。そこで、当該遺伝子の全長を調べるために、今回明らかになった塩基配列を元にして新たにプライマーを設計し、上記の方法に準じて再びシーケンス解析をおこなって 5'側の塩基配列を調べることにした。

新たなプライマーを用いて PCR で増幅した DNA 断片の塩基配列を調べたところ、既知の部分アミノ酸配列と非常に良く似たアミノ酸配列をコードする遺伝子断片が 8 個得られた。しかし既知の部分アミノ酸配列と完全に一致するアミノ酸配列を含む遺伝子は単離できなかった。

次に NCBI の BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によってこれら遺伝子翻訳産物の N 末端のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、8 個ともシトカトウヒ (*Picea sitchensis*) の機能未知タンパク質 (ADE75852) と高い相同性を示した。これらの 8 個のうち 3 個の部分アミノ酸は特に *P. sitchensis* と高い相同性を示した (図 2)。

LkDRP2	ATDTKFVSAKENTKKIPRGSQFYDNL----
LkDRP2-1	MSCSSVALLVALVIVMGGAAEATNTKFVSAACNSKKIPRGSQFYDNL----
LKDRP2-2	MSCSSVALLVALVIVMGGAAATNTKFVSAACNTKKIPQGSQFYDNL----
LkDRP2-3	MSCSSVALLVALVIVMGGAAEATNTKSVSSACNSKKIPRGSQFYDNL----
ADE75852	MSPSSVALLAAVIVMGGAAEAANTKFVSASCNTEKIARGSPFFNLL----
	* ** * ** * ** * ** *

図 2. *LkDRP2* 候補遺伝子から予測される N 末端アミノ酸配列の相同性比較。

LkDRP2 遺伝子を単離する過程で見つかった 8 種類の *LkDRP2* 候補遺伝子群から予測されたアミノ酸配列を用いて相同性検索をおこなった結果、PgLEA (図 1) よりもシトカトウヒ (*Picea sitchensis*) の機能未知タンパク質 (ADE75852) とより高い相同性を示した。ここでは特に *Picea sitchensis* と相同性を示した 3 つの遺伝子断片 (*LkDRP2-1*、*LkDRP2-2*、*LkDRP2-3*) に由来する N 末端のアミノ酸配列を示した。LkDRP2: 以前におこなった N 末端アミノ酸分析の結果を示す。ADE75852 (*Picea sitchensis*: unknown protein) を示す。*: 全ての配列に共通したアミノ酸を示す。

今回、LkDRP2 の遺伝子の同定を試みたが、既知の部分アミノ酸を含む遺伝子はまだ単離できていない。しかし、アミノ酸ならびに遺伝子レベルで非常に良く似た配列をもつものが複数見つかったことから、LkDRP2 には複数のアイソフォームが存在することが考えられた。実際、LkDRP1 と LkDRP2 は、分子量、等電点が類似していることから、両者はアイソフォームと考えられる。

これらの LkDRP1 や LkDRP2 のアイソフォームタンパク質群は シトカトウヒの機能未知なタンパク質と相同性が高いため、これらの機能を予想することは難しい。しかし、当初、LkDRP1 や LkDRP2 の N 末端のアミノ酸配列と相同性の高かったカナダトウヒの LEA タンパク質と一次構造が類似するタンパク質の中には抗菌活性を示すものがあるため⁶⁾、LkDRP1 や LkDRP2 についてもその機能解析は興味深い。もちろん、これらのタンパク質は過冷却能に関与する可能性が考えられるため、可能な限り LkDRP2 と同様に遺伝子全長を求め、過冷却活性や不凍活性の測定などを通じてその機能解析をおこないたい。

【参考文献】

- (1) 酒井昭 植物の耐寒戦略 (2003) 北海道大学図書刊行会
- (2) J. Kasuga, D. Kanmi, K. Arakawa, S. Fuzikawa (2008) *Cryobiology* 57 : 242-245
- (3) J. Kasuga, K. Arakawa, S. Fuzikawa, (2007) *New phytologist* 174 : 569-579
- (4) N. Takata, J. Kasuga, D. Takezawa, K. Arakawa, S. Fuzikawa (2007) *Journal of Experimental Botany* 58 : 3731-3742
- (5) M. Wisniewski, R. Webb, R. Balsamo, T. J. Close, X. Yu, M. Griffith (1999) *Physiologia Plantarum* 105 : 600-608
- (6) Y. Sawano, T. Miyakawa, H. Yamazaki, M. Tanokura, K. Hatano (2007) *Biol. Chem* 388 : 273-280

0-2. ハイブリッドアスペンの凍結抵抗性に関する研究

(北大院農) ○板羽貴史、砂留光利、(北大農) 上出奈央
(北大院農) 佐野雄三、藤川清三、荒川圭太

1. 緒言

北方に生育する樹木は、秋から冬にかけての日長の減少や、それに続く気温の低下に応答して凍結抵抗性を上昇させることが知られている。この低温順化の過程の中で、樹木内の構成成分に様々な生理的・構造的変化が生じ、その結果として、冬季の細胞は厳しい氷点下温度やそれにとまなう凍結、脱水などのストレスにも耐えられるようになる¹⁾。

ハイブリッドアスペンは形質転換のモデル樹種として用いられる木本植物のひとつである。ハイブリッドアスペンを用いて形質転換体を作成して低温誘導性遺伝子の機能評価を行うためには、実生そのものを使って凍結適応機構を明らかにする必要がある。そこで本研究は、モデル樹木の凍結適応機構を解明するため、ハイブリッドアスペン実生の低温順化処理による凍結抵抗性の変化とそれにとまなう組織構造変化を明らかにすることにした。

2. 材料と方法

【材料】

供試木には節間培養で増殖させたハイブリッドアスペン (*Populus tremula* × *P. alba*) を用いた。超純水に、1/2 濃度に減じたムラシゲ&スクーグ培地、20 mg/mL スクロース、0.2 mg/mL 2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES)、6 mg/mL アガーを添加し、1N 水酸化ナトリウムで pH 5.8 に調節した培地を 200 mL の培養びんに約 40 mL の割合で入れて固化させたものを生育用培地とした。継代は、培養個体を腋芽を含む節間ごとに葉を 1 枚付けたまま切り分けたものを生育用培地に移植するという節間培養にておこなった。移植した個体は 23°C、16 時間日長に設定した人工気象器 (LHP-300-RDCT、NK system) で無菌的に生育させた。びん内の個体が 10 cm 程度に成長したのちバーミキュライトを敷きつめた培養びんに植え替え、約 2 週間後、バーミキュライトを入れたプラスチックポットに移した。その後、23°C、16 時間日長の長日条件下で生育させた。短日処理は 23°C の 8 時間日長で、低温処理は 4°C (昼) / 2°C (夜) の 8 時間日長の条件で行った。

【凍結抵抗性の測定】

茎は縦半分にしたのち、3 mm 程度に分割し、試験管に 3 片ずつ入れた。これに 100 μL の超純水を加えた後、-1°C に設定した液相プログラムフリーザー (F26、Julabo) に試験管をセットしてから約 10 分後に植氷し、さらに -1°C で 1 時間平衡化させた。続いて 2.4°C/h の冷却速度で温度を低下させ、目的の温度に達した時点でサンプリングを行った。なお、液体窒素で急速凍結した試料と凍結せずに 4°C にて処理した新鮮試料を用意し、それぞれ生存率を算出するためのコントロール (生存率 0% と 100%) とし、以後凍結融解する試料と同様に処理した。平衡凍結した試料を 4°C の暗所にて一晩おいて緩速融解した後、超純水を 1 mL ずつ加えてから減圧脱気して組織に水を浸潤させた。試料は遮光して 2 時間振とうした後、導電率計 (Twin Cold B-173、HORIBA) を用いて水溶液の電気伝導度を計測した。計測に使用した溶液を元の試験管に戻してから、試料を沸騰水中で 20 分間加熱処理した。冷却後、さらに 2 時間振とうし、再び溶液の電気伝導度を計測した。計測した 2 つの電気伝導度の値から、以下の要領で各温度での細胞の生存率を算出した。

$$\text{生存率 (\%)} = \left(1 - \frac{S-R}{L-R}\right) \times 100$$

S = 熱処理前の測定試料の電気伝導度 / 熱処理後の測定試料の電気伝導度
L = 熱処理前の液体窒素凍結試料の電気伝導度 / 熱処理後の液体窒素凍結試料の電気伝導度
R = 熱処理前の新鮮試料の電気伝導度 / 熱処理後の新鮮試料の電気伝導度

【光学顕微鏡による観察】

実生苗の茎の培土から上方1~3 cmの切片を切り出した。カミソリを使って5 mm長に切り、茎切片をグルタルアルデヒド5%溶液・リン酸バッファー (pH 7.2) 中に浸漬し、固定液中の試料を真空ポンプに接続したデシケーター内で減圧脱気した後、4°Cで24時間固定した。その後、100 mMリン酸バッファーで4回洗浄し、1%四酸化オスmium中に2時間浸漬して固定した。これを蒸留水で4回洗浄した後、エタノールシリーズ (30%エタノール×1回、50%エタノール×1回、70%エタノール×1回、99.5%エタノール×4回) により脱水を行った。次に、プロピレンオキサイド：エタノール=1：1溶液に30分、プロピレンオキサイドに1時間×3回置換し、プロピレンオキサイド：樹脂 (EPON812：MHA：DMP-30=52.5：46.7：0.8) =1：1溶液で2時間、プロピレンオキサイド：樹脂=1：3溶液で2時間、樹脂のみの溶液で24時間処理して切片に樹脂を浸透させた。包埋板に試料と樹脂を入れ、35°Cで24時間、45°Cで24時間、60°Cで72時間静置して重合させた。この樹脂包埋試料からガラスナイフを取り付けたウルトラミクロトーム (ULTRACUT) を用いて1 μm厚の切片を作成した。得られた切片を1%ゲンチアナバイオレットで5分間染色し、超純水を用いて十分に染色液をすすいだ後、切片をスライドガラス上に移して、バイオリイトで封入し、カバーガラスで覆って永久プレパラートを作成した。その後、光学顕微鏡にセットしたデジタル撮影装置を用いて観察した。

3. 結果と考察

【凍結抵抗性の変化】

本研究では、凍結抵抗性の指標として、試料の生存率が50%となる温度であるLT₅₀を用いた (図1)。長日条件で8週間育成させた、すなわち短日処理直前のハイブリッドアスペン実生では、茎のLT₅₀は-3.2°Cであった。これに8週間の短日処理を行うと-4.8°CまでLT₅₀が低下した。短日処理6週間の後に2週間の短日・低温処理をすると、短日処理を継続するよりもLT₅₀は低下し、-6.6°Cになった。以上の結果より、人為的な長期の短日処理ならびに短日低温処理によってハイブリッドアスペン実生の凍結抵抗性は向上した。

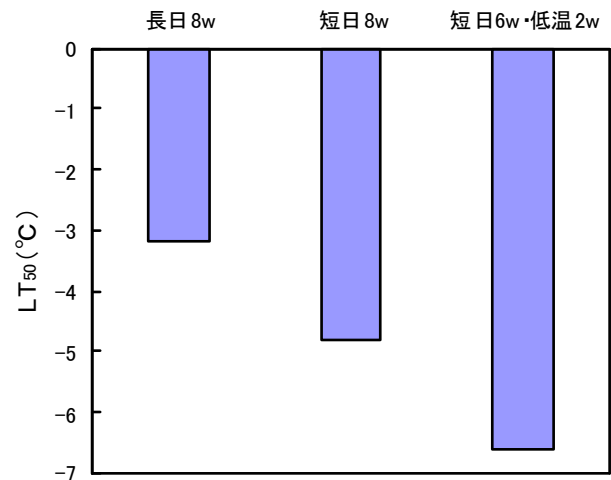


図1 短日・低温処理によるハイブリッドアスペン茎の凍結抵抗性の変化

【組織構造の変化】

バーミキュライトを入れたプラスチックポットに移した後、長日条件で10日間生育させたハイブリッドアスペン実生の茎を光学顕微鏡で観察すると、分化した師部、木部、髓や幅広い形成層帯があり、分化中の細胞も見られた (図2a)。

短日処理を4週間した実生では、まだ形成層帯は成熟中で分化が続いていたが、短日処理が6週間を過ぎたら形成層帯の幅は狭くなり、分裂や分化が止まっていた。短日処理が長くなるにつれて徐々に細胞の成熟が進み、短日処理が6週間のものでは形成層のすぐ隣の細胞まで細胞壁の肥厚が十分に進み、細胞内容物が豊富になっていた。短日処理を8週間したものでは形成層に隣接する細胞まで細胞壁の肥厚が進み、成熟が完了していた (図2b)。成熟が完了していた短日処理8週間のものを2週間低温処理すると、短日処理8週間のものと同様の構造が確認できた (図2c)。

今回、長日処理した実生の茎を光学顕微鏡で観察しても、木部放射柔細胞以外の細胞では細胞内容物はほとんど検出できなかったが、短日処理を行うことによって師部や髓の細胞で細胞内容物が多く見られるようになった。

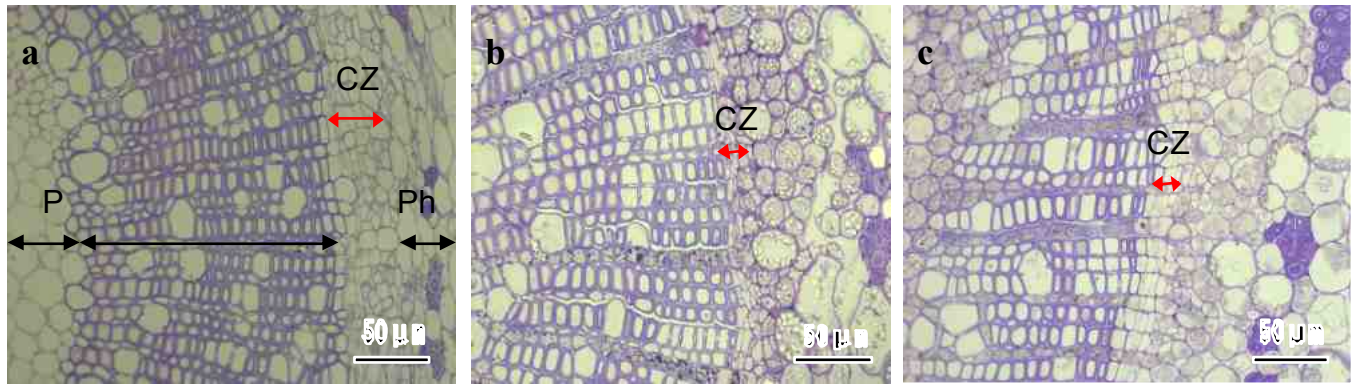


図 2 短日・低温処理による茎（木口面）の組織構造の変化. a: 処理前（長日 10 日間） b: 短日処理 8 週間 c: 短日処理 8 週間後、短日・低温処理 2 週間. P: 髄 Xy: 木部 CZ: 形成層帯 Ph: 師部

ゲンチアナバイオレット溶液 (GV) で染色した切片を光学顕微鏡で観察すると、短日処理 2 週間で髄の細胞内にプラスチドが確認できるようになった (データ示さず)。短日処理期間が長くなるにつれて検出できるプラスチドの数は増加し、短日処理 4 週間ではプラスチドの中心の色が少し抜けて見えるようになった。短日処理 8 週間ではプラスチド内部の大部分の色が白く抜けていた。このようにプラスチドの染色性が変化することは、細胞内にデンプンを蓄積することと関連性があると予想されたため、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した実生茎切片（柾目面）についてその反応性をみると、短日処理 8 週間では髄や木部柔細胞、師部柔細胞がヨウ素デンプン反応によって黒く染まっていた (データ示さず)。このことから、実生では長期の短日処理で細胞内にデンプンが蓄積されたものと考えられた。さらに短日処理 8 週間の後に続けて 2 週間の低温処理をおこなうと、GV 液にて再びプラスチドは染色されるようになったことから、短日低温処理によってデンプンが分解されたものと考えられた。これは、寒冷地の成木の季節的低温順化過程におけるデンプンの蓄積量や可溶性糖含量の変化と比較的よく対応したものであった^{2) 3) 4) 5)}。低温順化過程での可溶性糖の蓄積は凍結抵抗性の上昇に密接に関わることが知られているため、このモデル木本植物についても同様に凍結抵抗性（特に深過冷却）との関連は興味深い。

現在、形質転換ハイブリッドアスペンを用いた樹木の凍結適応機構解明の試みのひとつとして、野生の成木において冬季に含有量が増加する可溶性糖のひとつであるラフィノースを人為的に蓄積するハイブリッドアスペンを作出し、可溶性糖の蓄積と凍結抵抗性の関連性を調べているところである。今後もハイブリッドアスペン実生の凍結適応機構についてさらなる研究が必要である。

4. 参考文献

- 1) 酒井昭：植物の耐寒戦略（2003）北海道大学図書刊行会。
- 2) Sauter J.J.: Trees (1988) 2, 242-249.
- 3) Rinne P., Tuominen H., Junttila O.: Tree Physiology (1994) 14, 549-561.
- 4) Sauter J.J., Cleve B.: Trees (1994) 8, 297-304.
- 5) Sauter J.J., Wellenkamp S.: Holzforschung (1998) 52, 255-262.

0-3. 異なる凍結挙動を示すカツラおよびシラカンバ冬芽の組織細胞

(北大院農) ○遠藤圭太、荒川圭太、藤川清三

【緒言】

冬季に厳しい凍結ストレスに曝される寒冷地に生育する樹木の冬芽は、樹種によって異なる凍結適応機構を有する¹⁾。多くの樹種の冬芽では、器官外凍結という冬芽のみで見られる特殊な機構によって氷点下温度に適応することが知られており、器官外凍結する冬芽が氷点下温度に曝されると冬芽内の特定の場所のみ氷が析出する。一方、いくつかの樹種の冬芽では、師部や形成層と同様に草本植物を含む植物の一般的な凍結適応機構である細胞外凍結によって氷点下温度に適応していることも知られている¹⁾。

これまで冬芽の凍結適応機構のほとんどは、示差熱分析という組織の凍結に起因する発熱を検出する手法を用いて調べられてきた²⁾。この手法では実験システム上、冷却速度は自然界で起こりえないような速さの設定であり、しかも組織全体での凍結挙動によって適応様式が判断されるため、必ずしも個々の細胞レベルでの凍結挙動の違いを反映するものではない。そのため、示差熱分析の結果からでは、多様な組織からなる冬芽の組織細胞が氷点下温度に対してどのように適応しているかは必ずしも明らかにできたとはいえない。また、器官外凍結する冬芽と細胞外凍結する冬芽において、組織の構造や凍結挙動について細胞レベルで観察し比較した例はなく、なぜ異なる凍結挙動を示すのかは明らかにされていない。

そこで本研究では、自然界で起こるような温度低下を再現して十分に緩やかに冷却した試料を観察することのできる低温走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM) を用いて、器官外凍結するカツラ冬芽と細胞外凍結するシラカンバ冬芽の凍結挙動を細胞レベルで観察し、それらの構造の違いや凍結挙動を比較した。

【材料と方法】

供試木

2010年2月、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター札幌研究林に生育するカツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) および、シラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) 成木から1-3年生の枝を採取した。採取した枝は、乾燥を防ぐために雪と共にビニール袋に入れて-10°Cの冷凍庫で保存し、保存期間が6ヶ月以内の枝を実験に用いた。冷凍庫で保存した枝は、4°Cの冷蔵庫に移して1夜静置して融解してから実験に用いた。なお、実験には、枝の側方に形成される側芽を用いた。

緩速凍結処理

冬芽全体の凍結挙動を調べるため、カツラとシラカンバの枝を-30°Cまで緩速凍結 (冷却速度=5°C/day) によって凍結させて実体顕微鏡 (SMZ-2T, Nikon) にて観察した。冬芽のついた枝を-3°Cのフリーザー (MDF-192AT, SANYO) に移して1夜静置した後、-5°Cから-30°Cまで5°C/dayの冷却速度で緩速凍結した。-30°Cまで凍結した枝は、-30°Cのまま瞬時に液体窒素中に投入して急速凍結固定した。

冬芽の各組織の細胞の凍結挙動は、試料を-30°Cまで緩速凍結にて凍結させてからCryo-SEMで観察した。試料は、5mm程度の枝が付いた状態で切り出した冬芽 (冬芽の構成組織がすべて揃ったもの) と、実体顕微鏡の下で冬芽から摘出した花原基、リン片を用意した。冬芽全体の試料は、Cryo-SEM観察用の試料ホルダーに入れ、試料固定のために水でマウントした。また、冬芽から摘出した花原基やリン片は、試料と氷が直接接触した状態で凍結するように試料を水で覆った。ホルダーに入れた試料は-3°Cのフリーザーに移して温度平衡させた後、触氷して凍結させた。その後、-3°Cで1夜静置して-5°Cまで冷却した後、各温度まで5°C/dayにて緩速凍結した。各温度まで凍結した試料は、各温度から液体フロン (-164°C) にて急速凍結固定し、液体窒素中で保存した。緩速凍結処理を行

わかない室温のコントロール試料は、ホルダーに入った試料を室温から液体フロンで急速凍結固定することで調製し、使用するまで液体窒素中で保存した。

再結晶化処理による細胞内水分の有無の検証

-30℃まで凍結した冬芽の中の細胞内に凍りうる水が存在するか否かを確認するため、氷晶の再結晶化処理を行った後、Cryo-SEMにて細胞内の氷晶の状態を観察した。緩速凍結によって-30℃まで冷却した冬芽を液体窒素(-196℃)に浸漬させることで未凍結水を凍結させた後、-20℃のフリーザーに試料を移して1夜静置することで昇温して再結晶化を促した。その後、再度液体窒素に浸漬して急速凍結固定し保存した。

実体顕微鏡観察

緩速凍結処理にて-30℃まで凍結した試料は、氷点下温度を保つために-10℃の低温室で液体窒素中から取り出し、ナイフにて冬芽の断面を作成して実体顕微鏡で観察を行った。緩速凍結処理を行わないコントロール試料は、冷蔵庫で静置後、室温で断面を作成し観察を行った。

Cryo-SEM 観察

液体窒素中で保存した試料を-95℃のCryo-SEM (JSM-840A, JEOL) 試料作成室内のコールドステージに移した。およそ15分の温度平衡後、試料をコールドナイフで割断し直ちに白金-炭素にて試料割断面を蒸着した。蒸着した試料は、-164℃の観察用ステージに移し、加速電圧5kVで2次電子像を観察、写真撮影を行った。

【結果】

カツラ及び、シラカンバの冬芽の凍結挙動

緩速凍結 (冷却速度=5℃/day) によって-30℃まで凍結したカツラとシラカンバの冬芽の凍結挙動を、実体顕微鏡を用いて観察した。カツラの冬芽は、最外層に数層から成るリン片と、その内部の花原基と葉原基から構成されており、数層から成るリン片の間や、リン片と原基の間には空隙が観察された (データ示さず)。この冬芽を-30℃まで緩速凍結すると、細胞外の水が局所的に析出する典型的な器官外凍結の様相を呈した。カツラ冬芽の器官外凍結では、花原基を取り囲む数層からなるリン片の間のみ氷が析出し、リン片と原基の間やその他の場所では氷の析出は観察されなかった (Fig. 1)。

一方、シラカンバの冬芽は、最外層に数層から成るリン片とその内部の花原基と葉原基から構成されており、リン片間や花原基とリン片の間など、組織の間が粘性の高い物質で満たされている様子が観察された。この冬芽を-30℃まで緩速凍結すると、器官外凍結の典型となる局所的な氷の析出ではなく、冬芽の内部全体で細胞外氷晶が観察され、リン片の間や花原基に隣接して氷が存在していた。

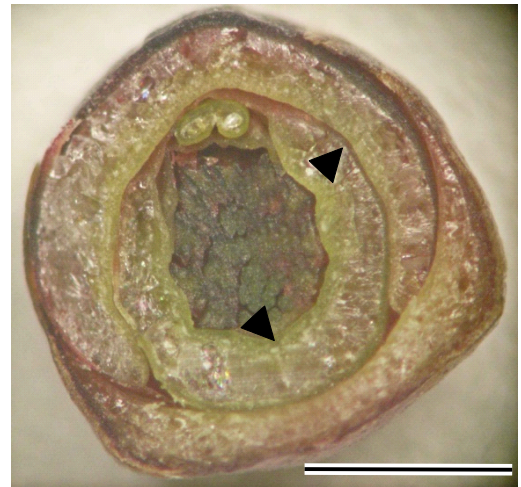


Fig. 1. カツラ冬芽の器官外凍結. -30℃までの凍結でリン片の間のみ氷が析出した. 矢頭: 氷. Bar=1 mm.

冬芽の組織細胞の凍結挙動

カツラ及びシラカンバ冬芽を緩速凍結処理によって-30℃まで凍結し、Cryo-SEMを用いて各組織の細胞の凍結挙動の観察を行った。凍結前のカツラ冬芽の花原基では、薄い細胞壁から成る細胞が組織内を密に占める様子が観察され (Fig. 2a)、リン片では、厚い細胞壁から成る細胞によって構成されている様子が観察された。また、カツラ冬芽の花原基及びリン片では組織内に細胞間隙は観察されず、細胞外で水は観察されなかった。コントロール試料のカツラ冬芽の花原基 (Fig. 2a) 及びリン片の細胞では、円形や楕円形の形をした細胞の割断面を観察すると、細胞

内には急速凍結固定によってできた微小な氷が見られたため、細胞内に水が多く含まれていたことが示された。

-30°Cまで緩速凍結したカツラ冬芽では、実体顕微鏡での観察同様にリン片の間のみで細胞外の氷の析出が観察され、花原基及びリン片の組織の中に氷は析出していなかった (Fig. 2b)。この器官外凍結したカツラ冬芽の組織細胞を細胞レベルで観察したところ、花原基の細胞は薄い細胞壁とともに収縮変形し、細胞内に氷晶が観察されないことから、凍結脱水していることが示唆された (Fig. 2b)。リン片の細胞でも、細胞内に氷晶は観察されず、凍結脱水して扁平上に収縮変形した様子が観察された。

シラカンバ冬芽は、花原基ではカツラ冬芽の花原基よりも若干厚い細胞壁が観察され (Fig. 3)、リン片では花原基よりも若干厚い細胞壁が観察された。また花原基の組織内では細胞間隙が見られ、円形の断面の細胞を観察すると、細胞内に水を多く含む様子が観察された (Fig. 3a)。またリン片でも、花原基同様に組織内では細胞間隙と円形の細胞の断面が観察され、細胞内に水を多く含む様子が観察された。

緩速凍結によって-30°Cまで凍結したシラカンバ冬芽では、花原基 (Fig. 3b) とリン片ともに組織の中で細胞外氷晶が析出していた。細胞外に氷が析出した花原基 (Fig. 3b) とリン片の細胞は、著しく収縮変形し細胞内氷晶は観察されないことから凍結脱水していることが示唆された。

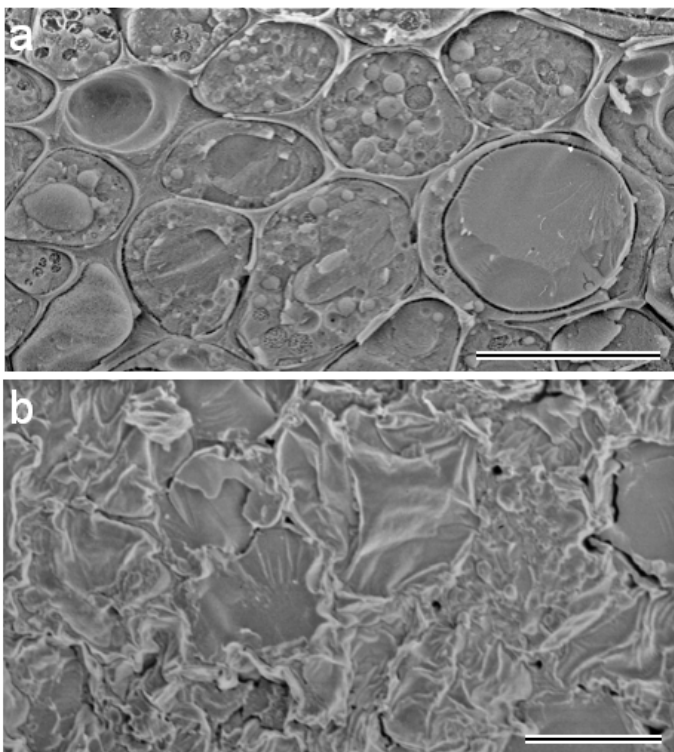


Fig. 2. カツラ冬芽の花原基の細胞の凍結挙動。
(a) コントロール試料の花原基の細胞。
(b) -30°Cまで凍結したカツラ冬芽の花原基の細胞。凍結脱水により収縮変形した様子が観察された。Bars=10 μ m.

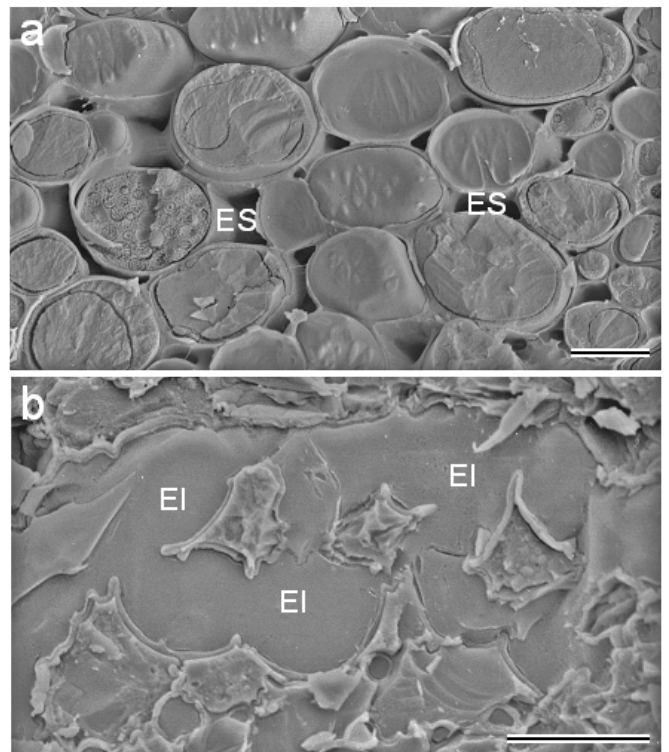


Fig. 3. シラカンバ冬芽の花原基の細胞の凍結挙動。
(a) コントロール試料の花原基の細胞. ES: 細胞間隙. (b) -30°Cまで凍結したシラカンバ冬芽の花原基の細胞。凍結脱水により著しく収縮変形した細胞と細胞外に氷が観察された. EI: 細胞外氷晶. Bars=10 μ m.

細胞内水分の有無の検証による凍結挙動の予測

緩速凍結によって-30°Cまで凍結したカツラ及びシラカンバの冬芽では、細胞内に水が存在して過冷却しているのか、細胞は完全に脱水して細胞外凍結しているのかを調べるために、凍結後に再結晶化処理を行った試料をCryo-SEMにて観察した。再結晶化実験では、液体窒素への浸漬で試料を完全に凍結させた。この時、細胞内に凍りうる水が存在する場合には、急速凍結固定によって微小な氷となる。この液体窒素で凍結させた試料を-20°Cまで昇温すると、細胞内の氷は再結晶化して大きな氷晶となる。一方、細胞内の水が凍結脱水によって完全に脱水して凍りうる水が存在しない場合には、液体窒素に浸漬後に昇温しても細胞内に氷ができていないため、再結晶化処理の前後で細胞内の構造に大きな変化はないはずである。

そこで、再結晶化処理を行ったカツラ冬芽を調べると、花原基の細胞は再結晶化処理によって細胞内に大きな氷晶が形成された様子が見られた。一方、リン片の細胞では再結晶化処理後も細胞内に氷は形成されず、再結晶化処

理前と変わらない様子であった。これらの結果により、器官外凍結したカツラ冬芽において、花原基の組織細胞では-30℃まで凍結しても細胞内に凍りうる水を保持していたことから過冷却していることが示唆された。一方、リン片の細胞は凍結脱水によって細胞内の水が完全に脱水され細胞外凍結したことが示唆された。

また、-30℃までの凍結で器官外凍結を示さなかったシラカンバ冬芽では、花原基、リン片ともに再結晶化処理後も細胞内に氷は観察されないことから、全ての細胞が細胞外凍結していることが示唆された。

冬芽から抽出した各組織の細胞の凍結挙動

カツラ及び、シラカンバの冬芽から花原基、リン片を抽出して氷と直接接触した状態で凍結させた際の抽出組織の細胞の凍結挙動を Cryo-SEM を用いて観察した。器官外凍結するカツラ冬芽では、冬芽全体を凍結させた場合、リン片間にのみ氷が析出するため花原基は直接氷と触れることがない。このカツラ冬芽から花原基を抽出して氷と直接接触させて凍結したところ、-10℃までの凍結処理で細胞内凍結を起こしていた (Fig. 4)。一方、リン片では-30℃までの凍結でも細胞内凍結は起こらず、細胞外凍結している様子が観察された。

シラカンバの冬芽では、各組織を抽出して直接氷と触れた状態で凍結させても、花原基、リン片ともに細胞内凍結は起こらず、-30℃までの緩速凍結によって全ての細胞が細胞外凍結している様子が観察された (Fig. 5)。

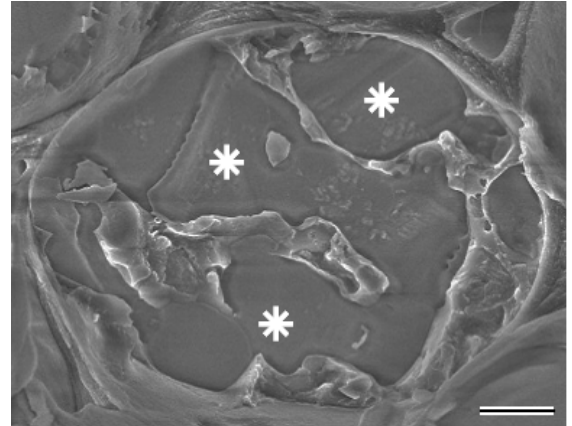


Fig. 4. カツラ冬芽から抽出して-10℃まで凍結した花原基の細胞。細胞内凍結した様子が観察された。*: 細胞内氷晶。Bar=1 μm.

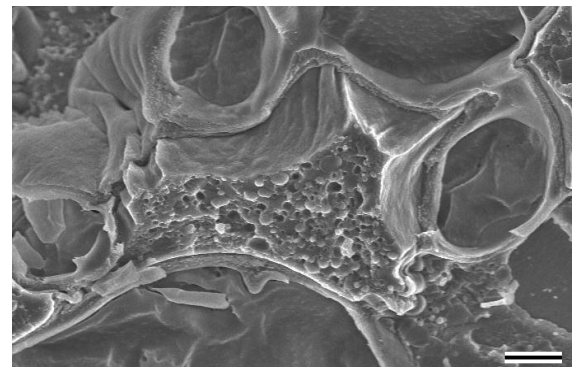


Fig. 5. シラカンバ冬芽から抽出して-30℃まで凍結した花原基の細胞。細胞外凍結した様子が観察された。Bar=1 μm.

【考察】

本実験では、器官外凍結するカツラ冬芽と細胞外凍結するシラカンバ冬芽を用い、氷点下温度における各組織細胞の凍結挙動を観察した。

器官外凍結するカツラ冬芽の組織では、同じく器官外凍結するカラマツ冬芽³⁾と同様に組織内に細胞間隙を持たないが、細胞外凍結するシラカンバ冬芽の組織では、細胞外凍結する師部や形成層と同様に組織内に細胞間隙を持っていた。この細胞間隙の存在は、細胞外凍結で氷を析出させる場所が細胞に隣接していることを示す。また、抽出した花原基を細胞外氷晶に隣接させて凍結すると、カツラ冬芽では細胞内凍結し、シラカンバ冬芽では細胞外凍結したことから、器官外凍結もしくは細胞外凍結という冬芽の凍結挙動の違いは、これらの組織細胞の細胞外氷晶に対する感受性、凍結脱水速度の違い、さらには細胞外氷晶を析出させるような細胞間隙の有無などが起因する可能性が考えられた。

【参考文献】

- (1) A. Sakai, W. Larcher; Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress, Springer-Verlag, Berlin, 1987, pp. 1-304.
- (2) H.A. Quamme; Deep supercooling in buds of woody plants, in: R.E. Lee, G.J. Warren, L.V. Gusta (Eds.), Biological Ice Nucleation and Its Applications, APS Press, St. Paul, MN, 1995, pp. 183-199.
- (3) K. Endoh, J. Kasuga, K. Arakawa, T. Ito, S. Fujikawa, Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behaviors of tissue cells in dormant buds of larch (*Larix kaempferi*), Cryobiology, 59, (2009), 214-222.

0-4. モウソウチク稈水解物のキシリトール発酵

北見工大 ○松本晃幸, 横野圭太郎, 三浦雅弘, 霜鳥慈岳, 青山政和
北海道三井化学㈱ 中原正博

[緒言]

タケは気候が温暖で湿潤な地域に広く分布し、わが国では函館以南に分布し、その資源蓄積は300~360万トンと推定されている。わが国で栽培されているタケ林(68,000 ha)の約6割がモウソウチク林(41,100 ha)と言われている。モウソウチク(*Phyllostachys heterocycla* (Carr.) Mifl.)は中国江南地方原産であるが、元文元年(1736年)、薩摩藩による琉球王国経由の移入によって本格的に植栽されるようになったと伝えられている。モウソウチクのヘミセルロースはアラビノグルクロノキシランから構成されており、¹キシロースの有望な給源の1つである。本報では、モウソウチク稈粉砕物の希硫酸水解を行い、キシロースを高収率で溶出させるための水解条件を検討した。一般に、リグノセルロースの水熱分解に際して、生成した単糖類の脱水反応によって、フルフラールやメチルフルフラールが、また、リグニンから低分子フェノールがそれぞれ副生する。これらはキシロースのキシリトールへの微生物変換において発酵阻害物質として働く。そこで発酵に先立ち炭末を用いて阻害物質を除去し、酵母によるキシリトールの生産性を検討した。

[実験]

予めモウソウチク稈粗砕物(42-80 mesh)をベンゼン・エタノール(2:1)混液および熱水で順次前抽出し原料とした。抽出済みの稈粗砕物(300 mg)に所定量の希硫酸(1~4%硫酸)を加え、121°C、60分間水解処理した。水解物をろ別し、ろ液中の中性糖をHPLC法(Aminex HPX 87P, Bio-Rad)で定量した。ろ液中の発酵阻害物質量は、水解液の280 nmでの吸光度を測定し、フルフラールとして推定した。また、原料に対する反応液の比を1:10~1:3(w/w)に上げ、水解液のキシロース濃度に及ぼす固液比の影響を調べた。さらに水解液中の発酵阻害物質を除去するために、水解液15 mLに所定量の炭末(白鷺M, 日本エンバイロケミカルズ)を加え、毎分160ストロークの往復運動式振とう器を用いて30°C、1時間接触攪拌した。炭末をろ別し、ろ液中の単糖および発酵阻害物質をそれぞれHPLC法と比色法で定量し、炭末の発酵阻害物質除去効果を評価した。菌株は、酵母 *Candida magnoliae* (FERM P-16522; AIST, Tsukuba) を用いた。キシリトール発酵は、1.5Lの培地を含む有効容量2L ジャーファメンターを用い、30°C, pH5.0, 微好気条件下で行った。グルコース及びキシロース等の発酵性の糖類及びキシリトールはHPLCを用いて測定した。

[結果・考察]

前抽出したモウソウチク稈の化学組成は、ヘキソザン 40.7%(グルカン 39.9%)、ペントザン 18.8%(キシラン 18.0%)、リグニン 27.9%、灰分 0.1%である。前抽出した稈粗砕物を希硫酸で水解すると、硫酸濃度が1~3%の範囲で濃度の上昇にともない水解液中のキシロース濃度は増加し、3%で最大値を与えた(Fig. 1)。さらに硫酸濃度を増加するとキシロース収量は僅かではあるが低下した。キシランは、2~4%硫酸での水解でほぼ定量的にキシロースとして回収されている(94~100%)。一方、水解液中のグルコース収量は原料中のグルカン当り0.1~0.2%にとどまっており、セルロースの加水分解が強く抑制されている。したがって、モウソウチク稈の希硫酸による121°C、60分間の条件での水解処理はキシランに選択的な水解条件と言える。上述した液比条件は、単糖類やリグニン定量条件に準拠したものであり、得られた水解液の糖濃度は極めて低い(3%硫酸処理でキシロース濃度は0.65 g L⁻¹)。そこで反応液に対する原料の比を増加した時、水解液の糖濃度におよぼす固液比の影響を調べた(Fig. 2)。固液比は最大で1:3まで上げることができ、キシロース濃度が61.1 g L⁻¹の糖液が得られたが、発酵阻害物質の指標であるA₂₈₀値²も上昇した。そこで、水解液を炭末処理した結果、炭末添加量の増加(0~15g L⁻¹)にともない吸光度値は大幅に減少したが、各単糖における収率、特にキシロースの収率にはほぼ変化が見られなかった(Fig. 3)。したがって、炭末処理によって発酵阻害物質が選択的に除去されることが明らかとなった。また、炭末接触時間による溶出糖の吸着量の相違が確認されなかったため、炭末への発酵阻害物質の収着は非常に早くしかも選択的に進行すると思われる。発酵前に滅菌処理を行うがその際、系内に硫酸イオンが存在するとキシロースが脱水しフルフラールが生成する。硫酸イオンの除去が必要であると考えられるので、硫酸イオンと反応し水不溶性の沈殿物を生成するCaCO₃で中和処理を行った。*C. magnoliae*によるキシリトール変換は12時間付近から開始され、約96時間で完了した。このときの初期キシロース濃度17.6g/Lに対し、最終キシリトール濃度が11.6g/Lであり、キシリトール収率70%となった。しかし転換時間が長いこと、今後、より短時間で高収率のキシリトールを得るための条件を検討していく。

Fig. 1. Effect of sulfuric acid concentration on hydrolysis of polysaccharides present in the culm of *Phyllostachys heterocyclus*¹

Sulfuric acid concentration (%)	Yield (%) ²			
	Glucose	Xylose	Arabinose	Mannose
4	0.9	19.7	1.0	0.1
3	0.7	20.5	0.9	0.1
2	0.5	19.3	0.9	ND ³
1	0.2	17.0	0.8	ND

¹Pre-extracted culm of *Phyllostachys heterocyclus* was hydrolyzed with dilute sulfuric acid with a solid to liquid ratio of 1:290 at 121°C for 1 h.

²Dry material basis. ³Not detected.

Fig. 2. Effect of solid to liquid ratio on the concentrations of solubilized sugars and fermentation inhibitors¹

Solid to liquid ratio	A_{280} ²	Concentration (g L ⁻¹)		
		Glucose	Xylose	Arabinose
1:10	119	0.7	18.9	0.8
1:5	188	1.4	40.0	2.0
1:3	262	2.2	61.1	2.6

¹Pre-extracted culm of *P. heterocyclus* was hydrolyzed with dilute sulfuric acid at 121°C for 1 h.

²Absorbance of the hydrolyzate at 280 nm.

Fig. 3. Effect of the dose of activated char on removal of fermentation inhibitors from the hydrolyzates¹

Dose of activated char (g L ⁻¹)	A_{280}	Concentration (g L ⁻¹)		
		Glucose	Xylose	Arabinose
0	119	0.7	18.9	0.8
5	52	0.7	18.9	0.9
10	16	0.7	18.9	0.9
15	6	0.7	18.8	0.9

¹Pre-extracted culm of *P. heterocyclus* was hydrolyzed with dilute sulfuric acid with a solid to liquid ratio of 0.1 at 121°C for 1 h.

²The hydrolyzates were treated with a commercial activated char (Shirasagi M, Japan EnviroChemicals Ltd.) at 30°C for 1 h.

[文献]

- 1) 松崎 啓, 守屋正夫, 石田 彰, 祖父江寛. 工化, **65**, 987-989 (1962).
- 2) Tada, K., Horiuchi, J., Kanno, T., Kobayashi, M. *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 228-230 (2004).

0-5. エレクトロスピンニング法による セルロースアセテート・ナノファイバーの調製とその利用

(北大院農) ○富樫文哉、幸田圭一、浦木康光

〈緒言〉

直径が nm オーダーの繊維はナノファイバーと呼ばれ、通常の繊維（繊維径が $1\ \mu\text{m}$ 以上）とは異なる次の特性を有している。まず、比表面積が 1000 倍も大きいという超比表面積効果が挙げられ、その他に、ファイバー内部の高分子が真っ直ぐ並ぶことにより生じる超分子配列効果やナノサイズ効果が知られている。これらの特性により、高性能フィルターや燃料電池など幅広い分野での利用が期待されている。ナノファイバーの作成方法として、近年、最も注目されているのはエレクトロスピンニング法である。エレクトロスピンニング法とは、ノズルに高電圧を印加し、コレクターとの間に電界を作ることにより、ポリマー溶液を噴出させコレクターで繊維を回収する方法である。溶媒は主として、飛行中に蒸発するので、この過程でナノサイズの繊維が形成される。この方法の長所は、常温紡糸が可能であることや、紡糸条件の選択により、ファイバー径や表面構造の制御が比較的容易であるということである。

本研究では、セルロースの代表的な誘導体であるセルロースアセテート（CA）からエレクトロスピンニング法によりナノファイバーを調製することを目的に、異なる置換度の CA を用いて最適紡糸条件を探索すると共に、この CA ナノファイバーの利用について検討した。

〈実験〉

紡糸試料となる CA は、シグマ・アルドリッチ社の置換度（DS）1.5 の誘導体と、ダイセル化学工業株式会社から供与された DS 2.4 の誘導体を使用した。

これらの CA を、エレクトロスピンニング装置（Fig. 1）を用いて、室温で作成した。DS 2.4 の CA は、ジメチルホルムアミド（DMF）やアセトン、さらにこれらの水溶液に溶解させて、紡糸用ドープを調製した。一方、DS 1.5 の CA は 90% 酢酸水溶液に溶解させて、ドープとした。

この紡糸用ドープを Fig. 1 に示すシリンジに入れ、以下の条件でエレクトロスピンニングを試みた。コレクターはステンレス製の円柱状のものを使用し、その表面にアルミ箔または高分子シートを巻いて 1350 rpm で回転させた。

印加電圧：+25 kV、ノズルとコレクターの距離：15 cm、CA 溶液の押出量：2 mL/h、ノズルの内径：0.4 mm。

アルミ箔などのコレクター上に堆積した CA ファイバーは、SEM（LV-SEM 日本電子 JSM-5310LV）を用いて、その形態を観察した。

〈結果と考察〉

Fig. 1 に示す装置を用いて、2 種の置換度をもつ CA のエレクトロスピンニングを試みた。なお、この装置では、コレクター側をアースすることにより、シリンジ側の電極との電位差を生じさせ、シリンジ側の荷電圧を 25 kV とした。

まず、DS 2.4 の CA を用いて、このアセトン溶液の紡糸を試みた。紡糸に最適な CA 濃度は 12 %wt であったが、Fig. 2 (a) に示すように、得られた繊維は繊維径も不均一であり、且つ CA の塊（ビーズ）も多数生成し、ナノファイバーが形成する不織布としては、不満足なものが得られた。そこで、より繊維径が均一で、ビーズが少ないファイバーを作成するために、アセトン水溶液を溶媒とする紡糸を検討した。Fig. 2 の(b), (c)及び (d)に、2 種の濃度のアセトン水溶液に対し、エレクトロスピンニングが可能であったときの CA 濃度とその繊維形態を示す。この結果、最も良好な紡糸が可能であったのは、(d) の

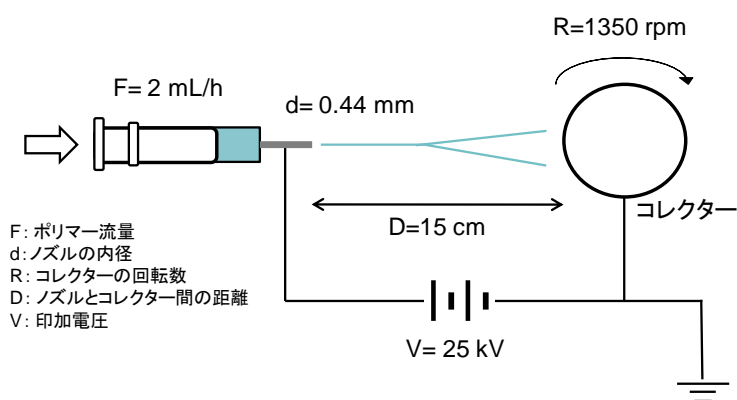


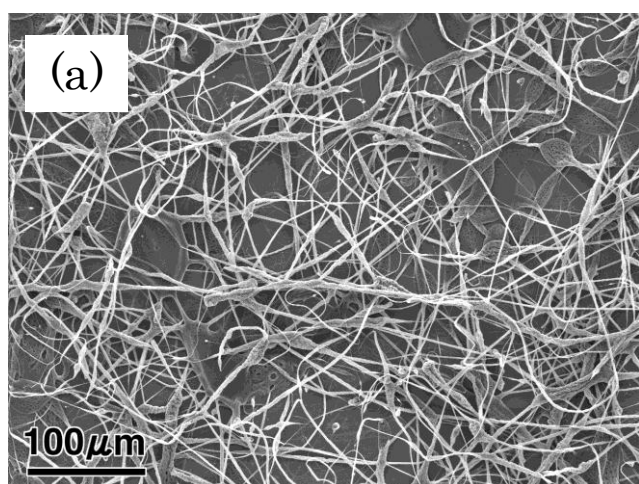
Fig.1 エレクトロスピンニング装置

条件であったが、得られた繊維径は平均 2.1 μm であり、ナノファイバーとは呼べない、大径繊維となってしまう。この原因は、アセトンの揮発性の良さにあると考え、より揮発しにくい溶媒での紡糸を検討した。

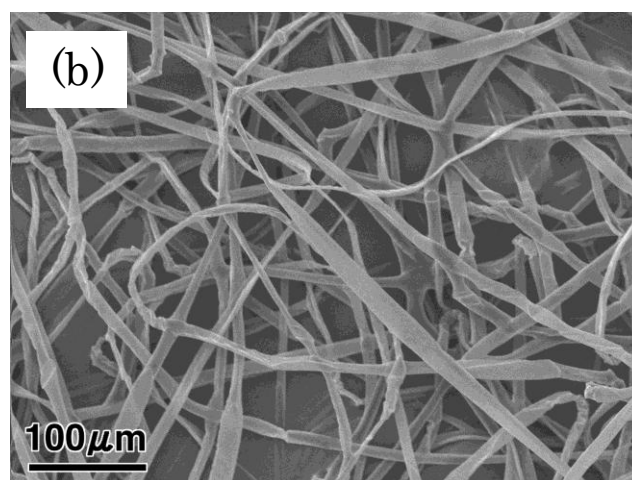
DS 1.5 の CA は酢酸水溶液に溶解するとの報告があったので、低揮発性有機溶媒として酢酸水溶液からの紡糸を試みた。80%(v/v) 酢酸水溶液を用いた場合、CA 濃度 15 %wt で、ビーズ状の塊が多数現れ紡糸に適さないドープと思われた。しかし、極少数であったが、繊維径がナノオーダーのファイバーも観測され[Fig. 2 (e)]、更なる条件検討で、目的とする繊維が得られるとの方向性が観出された。そこで、85%(v/v) 酢酸水溶液の 17 %wt CA 濃度のドープの紡糸を行った結果、ビーズの形成が少なく、平均繊維径は 265.6 nm で繊維径が均一なナノファイバーの作成に成功した[Fig. 3(g)]。

最後に他の溶媒についても紡糸条件を検討した。ここでも揮発しにくい溶媒として、DMF をアセトンに加えた混合溶媒での紡糸を検討した。種々の条件で検討した結果、DMF:アセトン=80:20、CA 濃度 20 %wt が最適条件となり、Fig. 3 (h)に示すファイバーが得られ、平均繊維径は 400 nm であった。以上の結果、エレクトロスピニングでは、溶媒の揮発性が、得られる繊維の繊維径に多大な影響を与えることが明らかとなった。

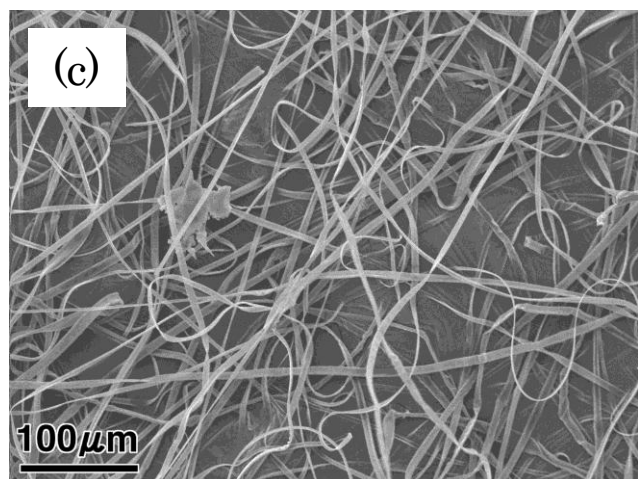
現在、ナノファイバーを多様な材料に対する表面改質材料として利用することを目的に、合成高分子表面への CA ファイバーのコーティングを検討しており、その結果も研究発表で報告する。



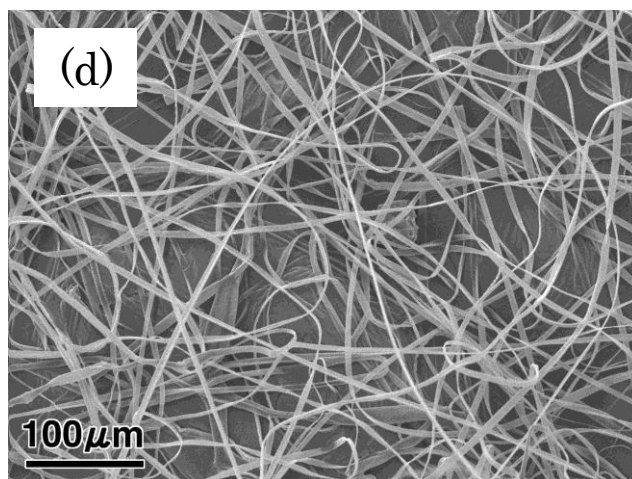
(a) only acetone CA:12 %wt



(b) acetone:water=9:1 CA:15 %wt

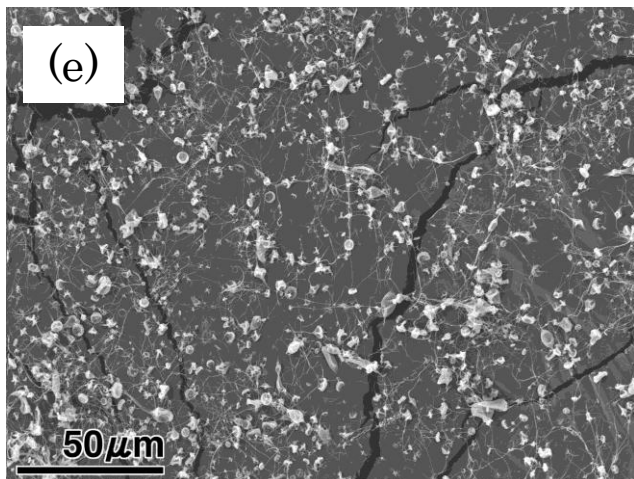


(c) acetone:water=6:1 CA:15 %wt

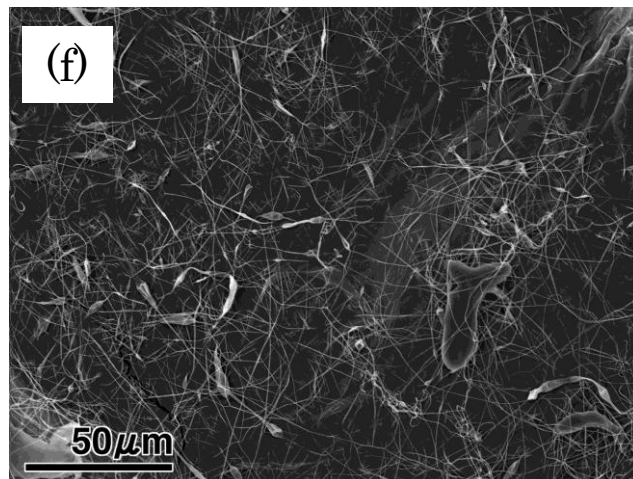


(d) acetone:water=6:1 CA:17 %wt

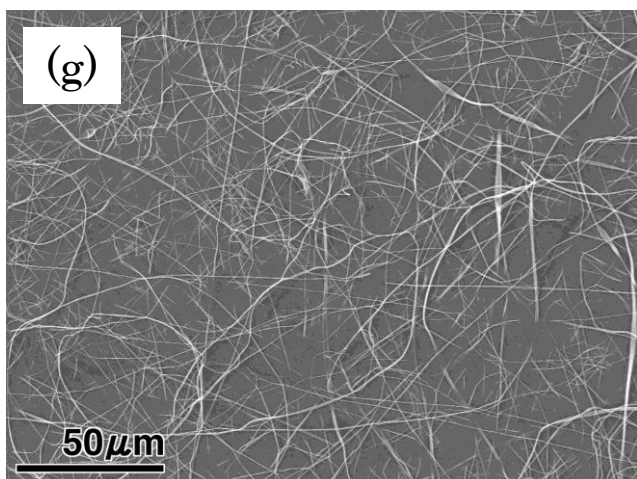
Fig.2 CAファイバーの形状 (アセトン-水系 CA:DS 2.4)



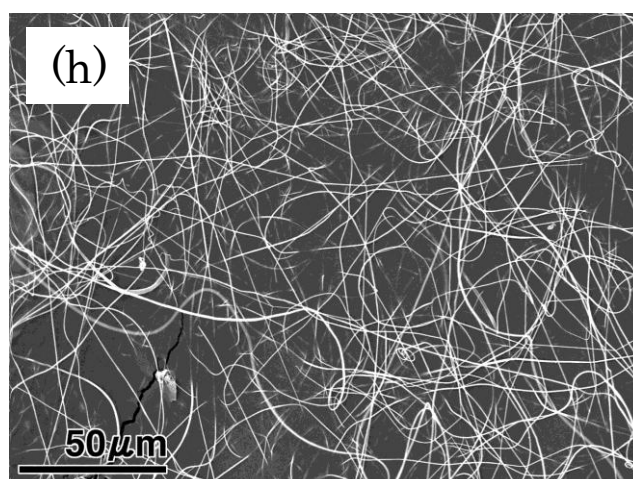
acetic acid:water=80:20
CA:15%wt (DS 1.5)



acetic acid:water=80:20
CA:17%wt (DS 1.5)



acetic acid:water=85:15
CA:17%wt (DS 1.5)



DMF:acetone=80:20
CA:20%wt (DS 2.4)

Fig.3 CAファイバーの形状(混合溶媒系)

0-6. カラマツ材の鉄とニッケルの共触媒炭化の効果

(北見工大) ○小泉祐太、鈴木京子、鈴木 勉

1. 緒言

近年石油資源の枯渇や地球温暖化が深刻化している中で、莫大な賦存量を誇る木質バイオマスの高度利活用が待望されている。このような事情を背景に、当研究室では木材の鉄 (Fe) またはニッケル (Ni) 触媒炭化を行い、結晶性でメソ孔に富んだ機能性木炭の製造に成功している。この機能性木炭は、グラファイト積層に覆われたナノサイズの中空体、グラファイトシェルで構成されており、シェルの大きさや連結形態が木炭性状に大きく影響している。例えば、Fe はメソ孔、Ni は結晶をより発達させる¹⁾。本研究ではカラマツ材に鉄とニッケルを様々な混合比で同時に添加し、その触媒効果を調べた。

2. 実験方法

①触媒炭の調製: カラマツ木粉(粒径 0.6~2.0mm)に、金属総添加量が重量で 5%となるように $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ と $\text{Ni}(\text{NO}_2)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の混合割合を変えて水溶液含浸で共添加した。その後、 N_2 気流中 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温し、 900°C で 1 時間保持して Ni 炭、Fe 炭を調製した。②酸洗浄炭の調製: 得られた Ni 炭、Fe 炭を室温で 1M HNO_3 に浸漬し、24h 攪拌後水洗した。③酸化処理炭の調製: 酸洗浄炭を 450°C のマッフル炉にて重量減少率がおおよそ 3 割になるように処理した。④各炭の性状測定: 結晶構造は $\text{Cu-K}\alpha$ 線照射による X 線回折、表面の性状は SEM-EDX により調べた。細孔構造は、 -196°C における N_2 の吸脱着等温線を測定し、BET 表面積、BJH 法によるメソ孔表面積、メソ孔体積等を求めた。導電性及び電磁波シールド性能は、バインダー(酢酸セルロース)と試料炭を重量比 1:1 の割合で混合し、 140°C -20MPa で熱圧成型して成型体とした後、四探針法で体積抵抗率を、同軸キャビティ管法で 40MHz~2GHz の周波数域における電磁波シールド性能を測定した。

3. 結果

3-1 SEM 観察

いずれの触媒炭も木材の細胞壁構造をそのまま維持していたが、酸化処理を行うと、Fe 炭や Ni 炭同様に、共添加炭でも細胞壁形状に沿って一面に生成しているグラファイトシェルが観測された(図 1)。Fe 炭と Ni 炭のグラファイトシェル平均直径は Ni>Fe で比較的均一であったが、共添加炭では図 1 にみられるように大小様々なサイズのシェルが不均一に生成していた。

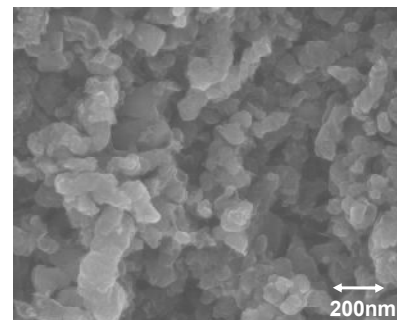


図 1 酸化処理炭 (Fe/Ni=3/2) の SEM 画像

3-2 結晶構造

共添加炭および Fe 炭、Ni 炭の XRD プロファイルを図 2 に示す。いずれも回折角 26° 付近に結晶炭素の回折ピークが現れた。ただし、共添加では Fe または Ni 単独由来の回折ピークは消失し、それぞれの混合比に対応した新しいピークが出現した。各炭の酸洗浄後の XRD プロファイルを図 3 に示す。Fe/Ni 混合比が 0/1>3/2>1/1>1/0>4/1>1/4 の順に結晶が発達したが、Fe/Ni=1/4 では炭素結晶ピークは著しく減少すると共に酸洗浄後の金属除去率が最も低かった。

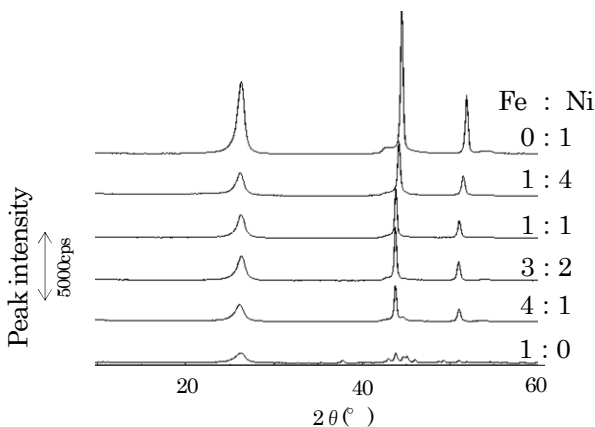


図 2 共添加炭の XRD プロファイル

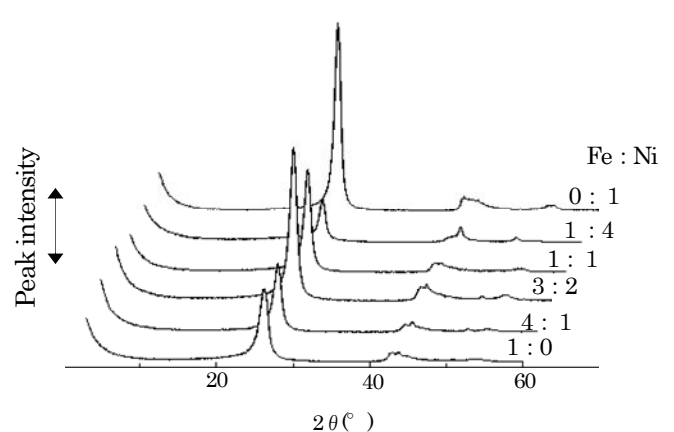


図 3 酸洗浄炭の XRD プロファイル

3-3 細孔構造

表1に共添加炭及び、Fe炭、Ni炭の細孔特性を示す。共添加炭の S_{BET} 、 S_{mes} 、 V_{mes} はいずれもFe炭とNi炭の値の中間的なものであった。また、Feの混合割合が増すごとに、 S_{BET} 、 S_{mes} 、 V_{mes} は増加していく傾向がみられた。しかしXRDプロファイルと同様に、混合比がFe/Ni=1/4のときでは、この傾向に従わず特異な値を示した。

表1 酸洗浄炭の細孔特性

試料炭	S_{BET} (m^2/g)	S_{mes} (m^2/g)	V_{mic} (m^3/g)	V_{mes} (m^3/g)	V_{mac} (m^3/g)	V_t (m^3/g)
Fe:Ni = 1 : 0	298	342	0	0.355	0.030	0.385
Fe:Ni = 4 : 1	204	268	0	0.294	0.042	0.336
Fe:Ni = 3 : 2	172	238	0	0.269	0.033	0.302
Fe:Ni = 1 : 1	131	232	0	0.250	0.030	0.280
Fe:Ni = 1 : 4	205	138	0	0.152	0.025	0.177
Fe:Ni = 0 : 1	88	172	0	0.245	0.023	0.268

S_{BET} : BET 表面積、 S_{mes} : メソ孔表面積、 V_{mic} : ミクロ孔体積、 V_{mes} : メソ孔体積、 V_{mac} : マクロ孔体積、 V_t : 全細孔体積 (=ミクロ孔体積+メソ孔体積+マクロ孔体積)

3-4 導電性および電磁波シールド性能

図4に共添加炭およびFe炭、Ni炭の体積抵抗率($\Omega \cdot cm$)を示す。Fe/Ni=1/1が最も高い導電性を示したが、Fe/Ni=1/0、4/1、1/1、0/1では、導電性に大きな差は見られなかった。一方、Fe/Ni=1/4の共添加炭の導電性は際立って低かった。

図5に共添加炭およびFe炭、Ni炭の電磁波シールド性能を示す。1.2GHz以上の高周波域では、Fe炭、Ni炭に比べ、共添加炭のシールド性能は低下した。また各共添加炭の電磁波シールド性能には大きな差が見られなかった。

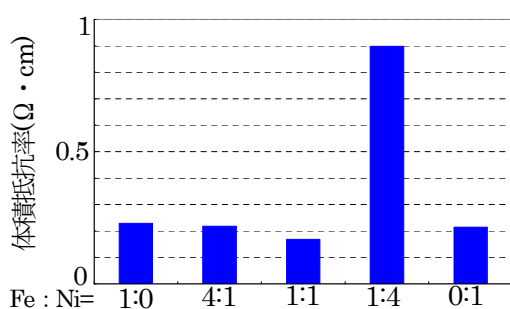


図4 共添加炭の体積抵抗率 ($\Omega \cdot cm$)

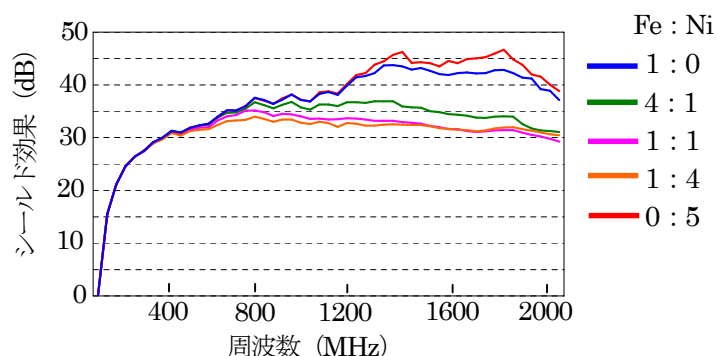


図5 共添加炭の電磁波シールド性能

4. 考察

Fe/Ni=1/4を除いて、結晶性はNi>共添加>Fe、メソ孔はFe>共添加>Niの順であった。この結果はこれまでの知見から予想されたもので、共触媒炭化は炭素性状の多様化に有効であった。ただし、共添加で生成したグラファイトシェルは、Fe、Ni触媒から別々に生成されたシェルの単純な混合物ではなく、いずれも各混合割合で新たに形成されたナノ合金から生成したシェルであると推測された。このことは、Fe/Ni=1/4の特異な挙動から裏付けられる。一般に、グラファイトシェルは非晶質炭素の触媒金属への溶解析出およびこの触媒金属のシェルからの流出によって形成されるといわれているが、この混合比に近い合金パーマロイを触媒に用いると、シェルからの流出が少なくシェル内に留まる傾向にあると報告されている²⁾。つまり、Fe/Ni=1/4ではパーマロイに近いナノ合金となったため、グラファイトシェル生成量が他の木炭に比べて少なく、結晶性、細孔の発達が劣り、酸洗浄しても金属が除去されにくくなったと考えられる。また、Fe/Ni=1/4と他の混合比の木炭の細孔特性から、BET表面積は未反応木炭の非晶質炭素由来ではなく、グラファイトシェル構造を反映した値であることもわかった。本研究の共触媒炭化においてナノ合金が生成するという発見は、炭化での触媒金属の作用や役割を明確にすると同時に、調製の難しいナノ合金製造に木材の触媒炭化を応用するという新しい可能性を提示するものである。

【参考文献】

- 1) 菊池充, 渡辺りつこ, 鈴木京子, 鈴木勉 (2009) セルロース学会第16回年次大会講演要旨集 (札幌), p.47
- 2) R.Anton (2009), Carbon 47, 856-865

0 - 7. 近赤外分光法による様々な含水率状態における木材試料の全乾密度の推定

(北林産試) 藤本 高明, (名大院生命農) 土川 寛

1. はじめに

全乾密度は、木材中に含まれる水分を取り除いた木材実質の量を表す情報に他ならない。木材実質量に関する情報は、材料の運搬・輸送に際してや森林におけるバイオマス量などを知るうえで重要である。全乾密度は、当然のことながら木材を全乾状態になるまで乾燥させ、その時の重量と体積から通常算出される。

伐採して間もない木材、すなわち生材は、一般に多量の水分を含んでいることが多い。しかし、通常的环境下で使用する段階の木材は、生材の状態から水分が取り除かれたいわゆる気乾状態にある。したがって、生材状態の段階の木材から、気乾ないしは全乾状態の性質を推定することが出来れば、製材や乾燥処理の際の事前情報として有用である。

近赤外分光法は、簡易な非破壊計測手法として幅広い分野で応用されている。また、同法によって木材の様々な性質を精度よく推定できることが多くの報告で確認されている¹。その中で、木材の密度についても、生材密度や気乾密度を精度よく推定可能なことが報告されている¹⁻³。しかし、生材の状態から得られたスペクトルを用いていけば間接的に気乾ないしは全乾状態の密度を推定する試みはほとんどない。

本研究では、全乾から飽水状態まで様々な含水率状態の木材から近赤外スペクトルを測定し、それらを多変量解析することによって気乾および全乾密度を推定できるか検討した。

2. 実験方法

供試材料として、カラマツ気乾材から寸法 20 (L) × 20 (R) × 20 (T) mm の試験体を 100 個準備した。各試験体に対し様々な含水率状態を付与するために、全試験体に水を減圧注入 (約 3 時間) し飽水状態にした後、順次含水率を低下させる方法を採用した (Table 1)。まず、注入前の気乾状態で、全ての試験体の密度と近赤外スペクトルを測定した (Step 1)。密度は、測長法により測定した。近赤外スペクトルの測定方法は後述する。ついで、注入処理後、再度、全試験体について密度とスペクトルを測定した (Step 2)。その後、室温放置、乾燥処理 (65 °C および 105 °C) をしながら、Table 1 の時間間隔で無作為に選んだ 10 サンプルについて密度とスペクトルを測定した (Step 3-21)。なお、含水率変化とスペクトル変化との対応を検討するために、10 サンプルのうちの 5 個は毎回測定を行った。最後に、105 °C、2 日間で全乾状態にした全試験体の密度とスペクトルを測定した (Step 22)。

近赤外スペクトル測定には、非接触拡散反射ヘッドを接続した Bruker Optics 社製の MATRIX-F を使用した。測定条件は、スペクトルレンジ 9000 – 4000 cm⁻¹、分解能 8 cm⁻¹、スキャン回数 32 回とした。スペクトルは、試験体

Table 1. Procedure of moisture contents conditioning.

Step	Conditioning of moisture content	Density and NIR measurements
1	Air-dry condition	All samples (100)
2	Water impregnated condition	All samples (100)
3	Leave at room for 1 hour	Ten samples *
4	Leave at room for 3 hours	Ten samples *
5	Leave at room for 5 hours	Ten samples *
6	Leave at room for 7 hours	Ten samples *
7	Leave at room for 9 hours	Ten samples *
8	Leave at room for 11 hours	Ten samples *
9	Leave at room for 23 hours	Ten samples *
10	Leave at room for 25 hours	Ten samples *
11	Leave at room for 27 hours	Ten samples *
12	Leave at room for 29 hours	Ten samples *
13	Leave at room for 31 hours	Ten samples *
14	65 °C for 15 minutes	Ten samples *
15	65 °C for 30 minutes	Ten samples *
16	65 °C for 45 minutes	Ten samples *
17	65 °C for 1 hour	Ten samples *
18	105 °C for 30 minutes	Ten samples *
19	105 °C for 1 hour	Ten samples *
20	105 °C for 2 hours	Ten samples *
21	105 °C for 3 hours	Ten samples *
22	Oven dry (105 °C for 2 days)	All samples (100)

* Five of them were randomly selected from all samples. The other five samples were measured spectra at all conditions.

の木口面から拡散反射により得た。得られたスペクトルを用いて、Partial least squares (PLS) 回帰分析によって、気乾密度 (DENar)、飽水状態 (生材) の密度 (DENwi) および全乾密度 (DENov) の予測モデルの構築を二通りの方法で行った。すなわち、各含水率状態の密度を、その状態において得られたスペクトルを用いて直接的に推定する (Direct) とともに、気乾および全乾密度を、様々な含水率状態で得られたスペクトルを用いて間接的に予測 (Indirect) できるか検討した。その際、解析には、 $9000-5500\text{ cm}^{-1}$ の領域の 2 次微分処理したデータを用いた。最適主成分数は Full cross validation 法によって算出した。ソフトウェアは、Unscrambler Ver. 9.6 (CAMO AS, Norway) を使用した。全試験体 100 個のうち、67 個を検量線作成用 (Calibration set) とし、残り 33 個 (Prediction set) を用いて得られた検量線の評価を行った。各含水率状態の密度と含水率の平均値と変位幅 (最小値-最大値) を Table 2 に示す。

Table 2. Wood density variation at each moisture content condition.

Density ^a (g/cm ³)	Calibration set (n = 67)				Prediction set (n = 33)			
	Mean	Range	SD	MC ^b	Mean	Range	SD	MC ^b
DENar	0.59	0.45–0.74	0.06	13.2–17.3	0.59	0.45–0.72	0.06	13.0–16.5
DENwi	0.92	0.70–1.15	0.14	59.5–147.3	0.93	0.74–1.15	0.14	59.1–160.8
DENov	0.54	0.41–0.68	0.06		0.54	0.41–0.68	0.06	

^a DENar: density at air dry condition; DENwi: density at water impregnated condition; DENov: density at oven dry condition.

^b MC: moisture content of each condition.

3. 結果

気乾状態、飽水状態および全乾状態における近赤外スペクトルを Figure 1 (a) に示す。気乾状態および全乾状態のスペクトルに顕著な差異は認められなかった。しかし、飽水状態のスペクトルは両者よりも高い吸光度を示し、特に 5200 cm^{-1} 付近の水の結合音領域では saturation していることが分かる。したがって、以下の検討には、 $9000-5500\text{ cm}^{-1}$ の領域のスペクトルのみを使用した。Figure 1 (b) に二次微分スペクトルを示した。図から明らかなように、各含水率状態のスペクトルは、特に $9000-8500\text{ cm}^{-1}$ および $7600-6800\text{ cm}^{-1}$ の領域で顕著な差異が認められた。

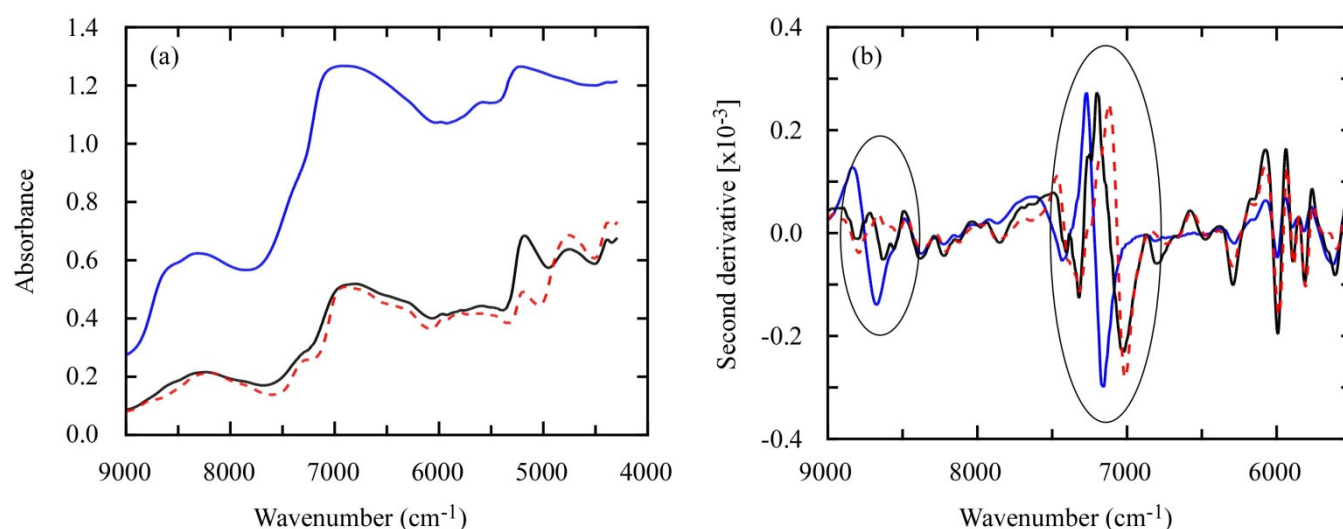


Figure 1. Original (a) and second derivative (b) spectra of air dry (black line), water impregnated (blue line) and oven dry (dashed red line) conditions.

含水率変化に伴う近赤外スペクトルの変化を、上述の $9000-8500\text{ cm}^{-1}$ および $7600-6800\text{ cm}^{-1}$ の領域で観察した。**Figure 2** に、全ての含水率状態でスペクトルを測定した 5 つのサンプル (**Table 1** 参照) のうちの 1 つサンプルの結果を一例に示した。繊維飽和点以上の高含水率状態では、 8680 cm^{-1} (CH str. second overtone due to CH_3)⁴ 付近の領域で吸収が認められたが、含水率低下に伴いその吸収は消失する傾向にあった。 $7600-6800\text{ cm}^{-1}$ の領域においては、 7320 cm^{-1} (2CH str. + CH def. due to cellulose)⁵ および 7000 cm^{-1} (OH str. first overtone due to H_2O and amorphous region in cellulose)⁶ 付近で繊維飽和点以下の低含水率状態のもので吸収が認められた。一方、 7160 cm^{-1} (OH str. first overtone due to H_2O)⁷ 付近の領域では、高含水率のものにおいてのみ吸収が認められた。以上のように、木材の含水率状態に対応して近赤外吸収ピークが変化することが確認された。

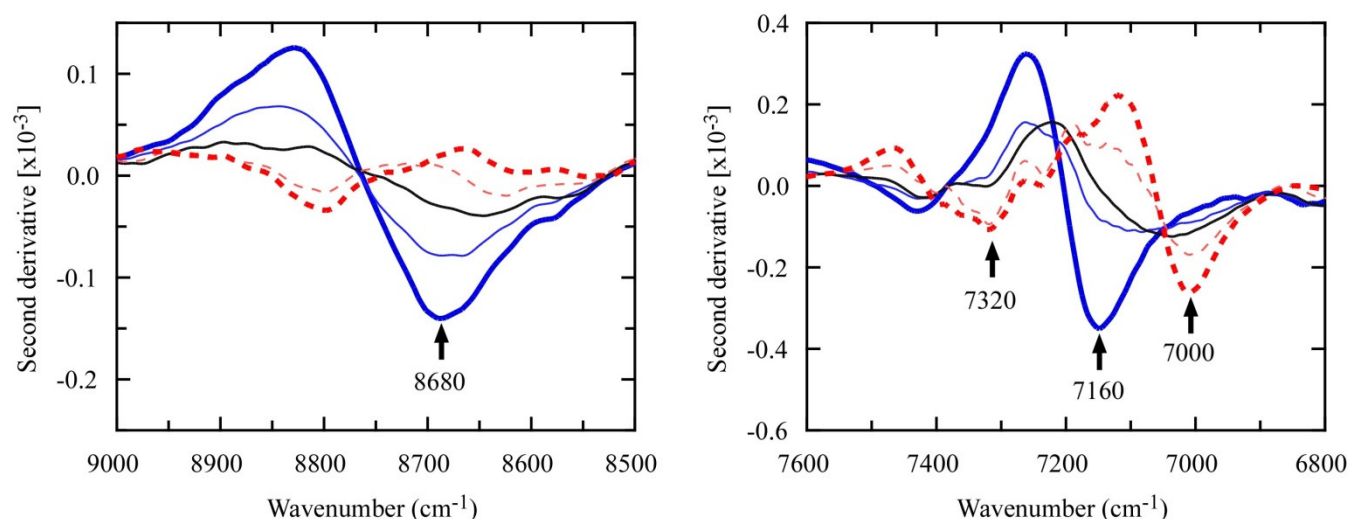


Figure 2. Spectral changes in accordance with moisture condition variation (thick blue line: 113.4%; thin blue line: 76.6%; solid black line: 38.6% (nearly fiber saturation point); thin dashed red line: 10.0%; thick dashed red line: 0.0%).

気乾密度 (DENar)、飽水状態の密度 (DENwi) および全乾密度 (DENov) を、それぞれの含水率で測定したスペクトルを用いて直接的 (Direct) に推定した結果を **Table 3** に示した。各密度とも比較的精度のよい検量モデルが得られ ($R^2 = 0.84-0.93$, $\text{SECV} = 0.021-0.038\text{ g/cm}^3$), これらに未知試料をあてはめても同様の精度が得られた ($R^2 = 0.79-0.90$, $\text{SEP} = 0.025-0.041\text{ g/cm}^3$)。なお、DENwi の予測モデルは、DENar および DENov のそれよりも少ない Factor で説明できることが分かった。

ついで、DENar および DENov を、様々な含水率状態で得られたスペクトルを用いて間接的に予測 (Indirect) できるか検討した結果、両密度とも比較的精度のよい検量モデルが得られた ($R^2 = 0.75-0.77$, $\text{SECV} = 0.030\text{ g/cm}^3$)。なお、両密度の間接推定には、9 つの Factor を必要とする結果となった。

以上のように、各含水率状態の密度を、その状態において得られたスペクトルを用いて直接的に推定できると同時に、乾燥時の密度 (気乾および全乾密度) を、水を多く含んだ生材の状態 で得られたスペクトルを用いて間接的に予測することも可能であることが示唆された。

本研究において各密度に対する良好な検量モデルが得られたが、どのようなスペクトル情報に基づいてそれを実現しているかを考察する必要がある。密度予測モデル構築の際に得られる Loadings 値などを検討し、水分や木材構成成分の寄与について考察した結果を当日報告する予定である。

Table 3. Results of PLS modeling of density at each moisture content condition. ^a

Density (g/cm ³)	Calibration set (n = 67)			Prediction set (n = 33)		
	Factor	R ²	SECV	R ²	SEP	RPD
<u>Direct</u> ^b						
DENar	7	0.87	0.021	0.79	0.026	2.22
DENwi	2	0.93	0.038	0.90	0.041	3.41
DENov	6	0.84	0.025	0.82	0.025	2.39
<u>Indirect</u>						
DENar	9	0.75	0.030	0.86	0.020	2.98
DENov	9	0.77	0.030	0.87	0.020	3.00

^a Factor: optimum number of PLS factors; R²: coefficient of determination; SECV: standard error of cross-validation; SEP: standard error of prediction; RPD: ratio of performance to standard deviation.

^b Direct prediction was made using spectra from corresponding moisture conditions. Indirect prediction was made using spectra from various moisture conditions.

参考文献

1. Tsuchikawa S (2007) A review of recent near infrared research for wood and paper. *Appl Spectrosc Rev* 42:43–71
2. Mora CR, Schimleck LR (2009) Determination of specific gravity of green *Pinus taeda* samples by near infrared spectroscopy: comparison of pre-processing methods using multivariate figures of merit. *Wood Sci Technol* 43: 441–456.
3. Fujimoto T, Kurata Y, Matsumoto K, Tsuchikawa S (2010) Feasibility of near infrared spectroscopy for on-line multi-traits assessment of sawn lumber. *J Wood Sci.* online first DOI: 10.1007/s10086-010-1122-5.
4. Osborne BG, Fearn T (1988) *Near infrared spectroscopy in food analysis.* Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK.
5. Ali M, Emsley AM, Herman H, Heywood RJ (2001) Spectroscopic studies of the ageing of cellulosic paper. *Polymer* 42, 2893–2900.
6. Tsuchikawa S, Siesler HW (2003) Near-infrared spectroscopic monitoring of the diffusion process of deuterium-labeled molecules in wood, Part.1: softwood. *Appl Spectrosc* 57:667–674
7. Curran PJ (1989) Remote sensing of foliar chemistry. *Remote Sens. Environ.* 30, 271–278.

謝辞

本研究の一部は、「平成22年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」(農林水産省, 2010~2012年度, 研究代表者: 土川覚) により行われた。

0-8. 釘一面せん断接合部の単位接合に対する複数本接合のせん断性能評価

(北大院農) ○重本洋介、澤田圭、佐々木義久、平井卓郎、小泉章夫

[緒言]

現在わが国で用いられている木造住宅の中で、在来軸組構法は最も一般的な構法のひとつである。在来軸組構法住宅では、自重などの鉛直加重に耐えるための軸組と地震や風などの水平力に耐えるための耐力壁の組み合わせによって成り立っている。耐力壁には、柱の間に筋違いを通す筋かい仕様や、受け材を用いて各種面材を軸組に取り付けた真壁仕様、面材を軸組に直接釘打ちした大壁仕様などがある。本研究は、その中の大壁仕様の耐力壁に着目した。

大壁仕様では、実際に水平力が掛かったときには軸組の木材と面材の間にせん断力が発生する。木材と面材を釘で接合した場合の一面せん断における許容耐力に関しては、木質構造設計規準に示されているが、そこに示されているのは端縁距離の条件を満たして、かつ釘1本の接合部に対する値である。

しかし実際の施工現場では、釘の本数が増えることで、割裂が起こりやすくなるなど破壊形態が異なることがあり、接合部全体の下限耐力が、釘1本あたりの下限耐力の合計と等しいか不明である。また端縁距離に関しても、施工条件によって木質構造設計規準で示している条件を満たしていない場合があることも考えられる。その場合、端縁距離が不足することに合わせて許容せん断耐力の低減が必要である。つまり、実際の施工時に複数本の釘が用いられる場合には、それらを考慮する必要があると考えられる。

そのような背景から、本研究では繊維直交加力を受ける釘接合の一面せん断実験より、釘の端縁距離や本数、あるいは打ち方によって、せん断性能にいかなる差が出るかを比較した。

[試験体および試験方法]

1. 試験体

試験体として、主材にスギ(*Cryptomeria japonica*)製材を、側材にカラマツ(*Larix kaempferi*)2級合板(12mm、24mm厚)を用いた。(建築基準法により、7.5mm以上の合板を使用した大壁仕様の耐力壁の壁倍率は、2.5倍と定められている。)

試験体の形は、合板表層の繊維平行方向に荷重が掛かるように合板を主材に52.5mmかぶせて1~6本の釘で打ちつけたものを基本形とした(Fig.1は、釘5本打ちの試験体)。試験体寸法はFig.1に記号で表記し、Table.1に試験体の一覧を載せた。欠き込みは、主材を土台に固定した際の拘束力がせん断破壊に影響を与えない為に入れることとし、欠き込みからの破壊を避ける為、角部分は円弧状にした(Photo.1はS505S)。

主材と側材の接合には、12mm厚合板にはCN50釘(釘径 $d=2.8\text{mm}$)、24mm厚合板にはCN75釘(釘径 $d'=3.7\text{mm}$)を使用して、釘間隔 S は釘6本の場合のみ80mm(28 d)とし、その他の場合は100mm(35 d)とした。釘を打つ位置の基

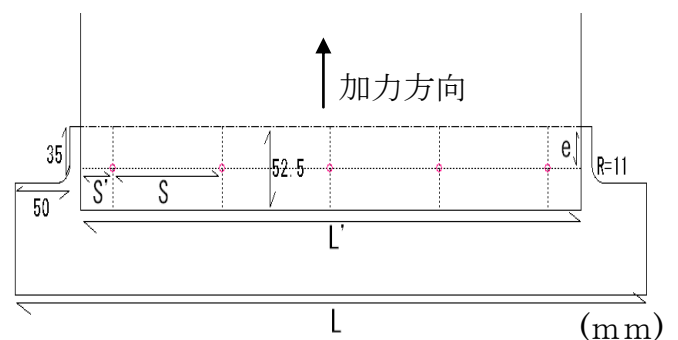


Fig.1 試験体図(5本打ち)

準線として、主材との縁距離 e が $13\text{mm}(4.6d, 3.5d')$ 、 $26\text{mm}(9.2d, 7d')$ を考えた。また釘の打ち方は、直線型、千鳥型、W 型の 3 種類とした。千鳥型は、縁距離 $e=13\text{mm}$ 、 26mm の位置から釘径 d あるいは d' だけずらして、W 型は縁距離が端から 13mm と 26mm の交互になるように釘を打ち付けた (Table.1)。各試験条件につき、6 体ずつ実験を行った。



Photo.1 試験体の写真(S505S)

Table.1 試験条件一覧

試験体	釘種	釘本数 n	$L(\text{mm})$	$L'(\text{mm})$	$S(\text{mm})$	$S'(\text{mm})$	$e(\text{mm})$	打ち方	
S501L	CN50	1	300	200		100	26	直線型	
S501S							13		
S503L		3	380	260			26		
S503S							13		
S505L		5	580	460	100	30	26		
S505W							26,13		W 型
S505S							13		直線型
S505SC							13		千鳥型
S506L		6			80		26		
S751L		CN75	1	300	200		100		26
S751S	13								
S753L	3		380	260			26		
S755L							26		
S755LC	5		580	460	100	30	26	千鳥型	
S755W							26,13	W 型	
S755S							13	直線型	
S755SC							13	千鳥型	

2. 試験方法

試験は、油圧式試験機を用いて、変位が 1mm から 4mm まで 1mm ずつ増加するように制御して主材の繊維直交方向に正除荷加力を行い、その後最大荷重の半分になるまで引張り方向に一方方向加力していった。

[結果と考察]

試験より、最大荷重(P_{\max})とエネルギー(E)を求めた。

1. CN50 を用いた試験体の試験結果

Fig.2 に CN50 を用いた試験体の釘 1 本あたりの P_{\max}/n と E/n を示す。初めに Fig.2 を全体的に眺めると、 P_{\max}/n 、 E/n とともにすべての試験体に対して有意水準 5% で有意差があること

が確認された。このことから、同じ CN50 釘を用いた場合でも、釘の端縁距離や本数あるいは打ち方によって P_{max}/n と E/n に明らかな違いが生まれることが確認された。

まず、本数ごとに、縁距離の異なる試験条件を比較した。全ての本数条件において破壊形態は、 $e=26mm$ で半数以上が引き抜け、 $e=13mm$ で全てが主材の割裂だった(Fig.3)が、釘の本数が増えるにつれて P_{max}/n 、 E/n に対する縁距離の影響が顕著になった。そして、5 本の場合には P_{max}/n 、 E/n とともに $e=26mm$ と $e=13mm$ の間で有意水準 5%の有意差があった。これは、縁距離が十分に確保されていない場合には、釘の本数が増えることで割裂が起こりやすくなるのが原因だと考えられる。しかし、釘 6 本で釘間隔 S を $80mm$ にした条件の結果を見ると、縁距離をある程度十分に確保しておけば釘の本数が増えることや、釘間隔が狭まることで影響を受けないことが確認された。

また E について $e=13mm$ で比較した場合、釘本数の間で E/n に有意水準 5%の有意差があったが、 $e=26mm$ で比較した場合には釘本数の間で有意差はなかった。その原因として、 $e=13mm$ の様に主材が割裂する場合、端からの割れと同時に主材の釘を打ちつけた部分からも割裂が進み、本数が増えることでその影響も大きくなることが考えられる。一方 $e=26mm$ の場合、破壊形態が引き抜けなので、割裂のように釘同士が影響を与え合うことがないと考えられる。

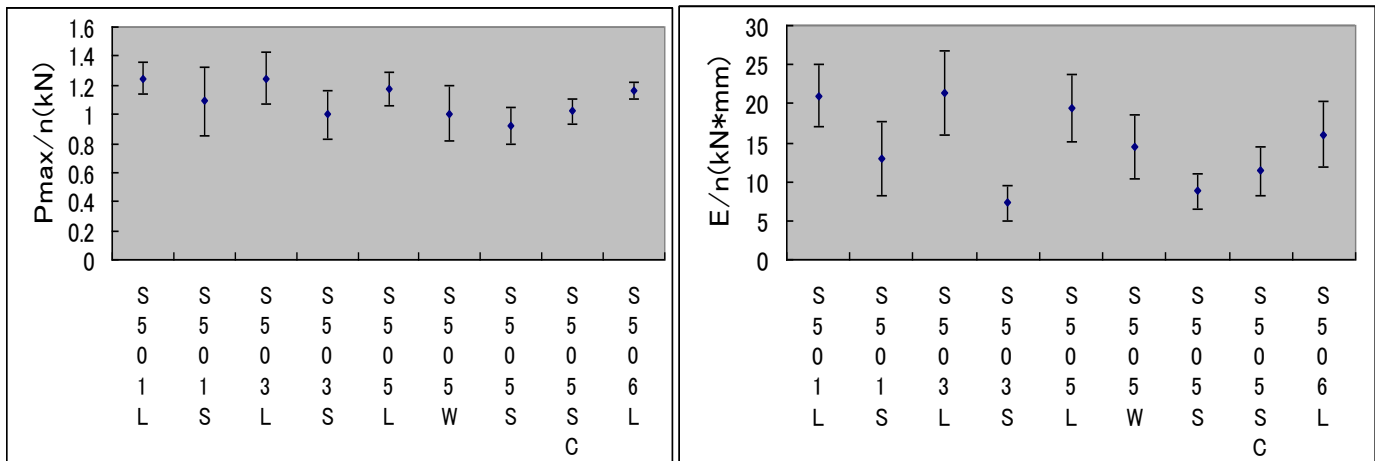


Fig.2 CN50 を用いた釘接合部の P_{max}/n 、 E/n

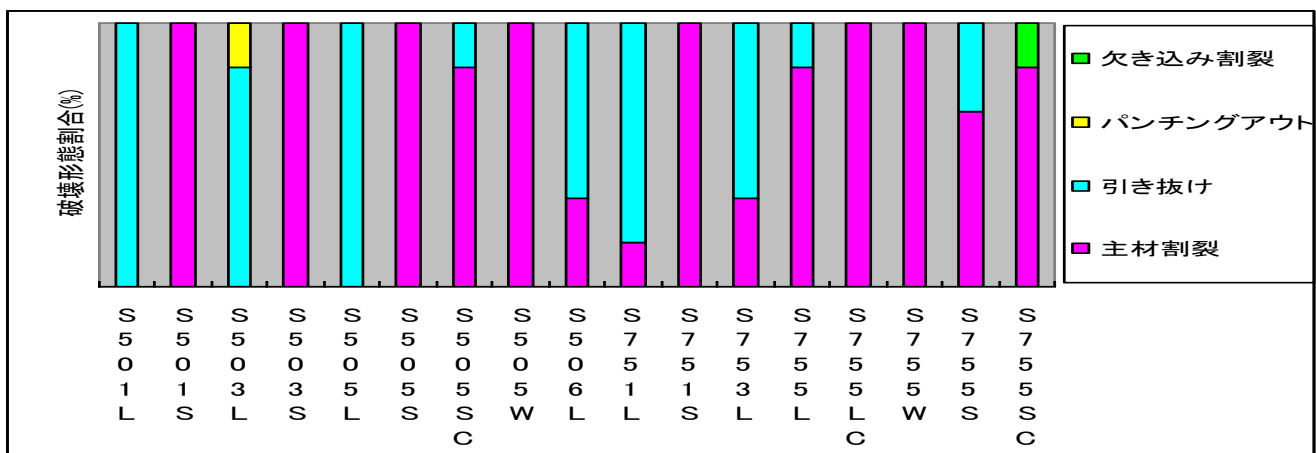


Fig.3 破壊形態の割合

2. CN75 を用いた試験体の試験結果

Fig.4にCN75を用いた試験体の釘1本あたりのPmax/nとE/nを示す。まず初めに、Fig.4を全体的に眺めると、Pmax/n、E/nともにすべての試験体に対して有意水準5%で有意差があることが確認された。このことから、同じCN75釘を用いた場合でも、釘の端縁距離や本数あるいは打ち方によってPmax/nとE/nに明らかな違いが生まれることが確認された。

e=26mmの1本打ちと5本打ちのE/nは有意水準5%で有意差が見られた。このことから、CN75で縁距離を十分に確保した場合、釘の本数がE/nに直接影響を与えられと考えられる。また、本数が1本から5本に増えることで、同じe=26mmの条件でも半数以上の破壊形態が引き抜けから主材の割裂に変化した(Fig.3)。それに対して、e=13mmの場合には、1本打ちと5本打ちともに主材の割裂によって破壊している。つまり、縁距離の違いによるPmax/nとE/nの差が1本打ちよりも5本打ちの方が顕著になったのは、破壊形態が変化したことが大きな原因だと考えられる。

次に同一本数の条件において、e=26mmとe=13mmの間でPmax/n、E/nともに有意水準5%で有意差があった。このことから、CN75の場合は縁距離を十分に確保することが重要なのではないかと考えられる。この考えに当てはめれば、e=13mmの5本打ちの条件で直線型に比べて千鳥型のPmax/n、E/nがともに小さくなったのも、千鳥にすることで5本のうち3本の縁距離がd'分だけ短くなったことが原因だと説明ができる。

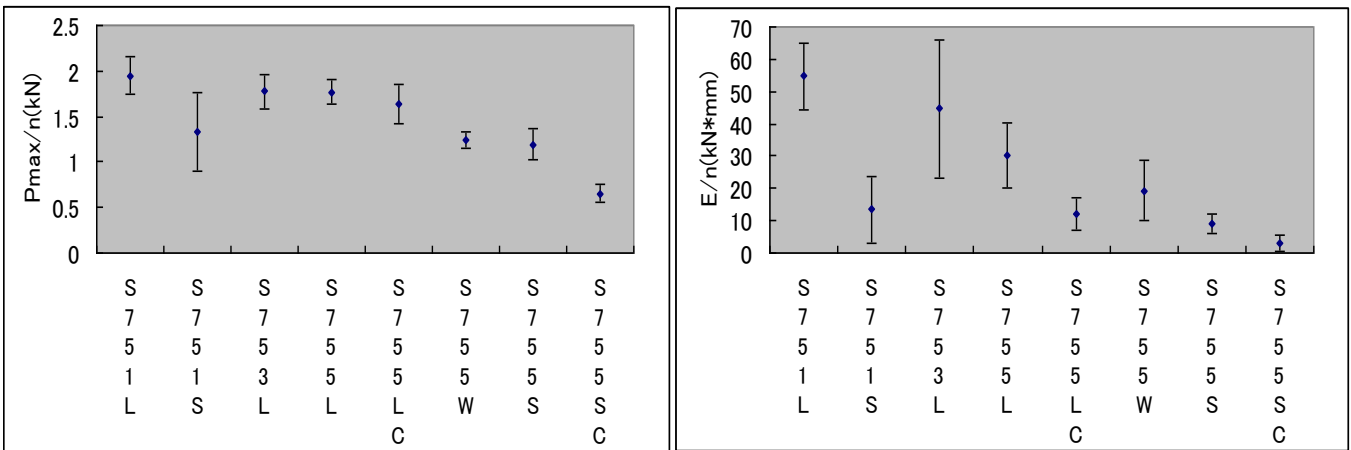


Fig.4 CN75を用いた釘接合部のPmax/n、E/n

[参考文献]

1. 日本建築学会：木質構造設計規準・同解説 一許容応力度・許容耐力設計法一(2006)
2. 平井卓郎，宮澤健二，小松幸平：木質構造[第3版](2009)
3. 平井卓郎：北海道大学農学部演習林研究報告 44，1307-1328(1987)
4. 平井卓郎，安藤康光，上田恒司：木材学会誌 37，1157-1166(1991)
5. 辻野哲司，平井卓郎：木材学会誌 39，1307-1316(1993)

P-1. 食用担子菌の菌糸成長における木炭添加の効果

(北大院農) ○杉山諒司, 玉井裕, 矢島崇, 宮本敏澄
(北海道立林産試験場) 原田陽

1. 緒言

木炭は燃料としての用途だけでなく多面的機能を持つ。その一つに土壌改良材としての機能があり、木炭施用によるカラマツ実生の発芽率と成長の向上¹⁾, アキニレの老樹の地下部の細根形成の促進²⁾といった植物の成長を補助する報告がある。植物だけでなく菌類に対しても木炭施用で菌根菌の成長促進が確認され、菌根形成も早まることから³⁾, 菌糸活性剂的な働きが期待できる。

そこで本研究ではさらなる木炭の用途開発のひとつとして、きのこ栽培における木炭の有効性を検討した。

2. 実験方法

2.1 菌糸伸長試験

カエデのおが粉(10メッシュパス)と米ぬか(20メッシュパス)を3:1もしくは3:2(絶乾重量比)で混合した基本培地に、砕いた市販のカラマツ木炭(下川木炭, 下川町森林組合)(10メッシュパス)10%(w/w)を添加、水道水を加えて含水率を65%に調整した。これをガラス製シャーレに充填し、高圧滅菌(121°C, 30分)した。自然冷却後、PDA培地で前培養した担子菌19種23菌株(Table 1)の菌叢を直径6mmのコルクボーラーで寒天ごと打ち抜き、菌叢面が培地と接するよう接種した。

23°Cに設定した暗所にて培養を行い、直径50-70mm程度まで菌叢が伸長した際に菌叢直径を4方向から測定し、その平均値を記録した。

2.2 栽培試験

供試菌株はヒラタケ(Po-1), ウスヒラタケ, トキイロヒラタケ, エノキタケ(Fv-4), ブナシメジの5種を用いた。2.1同様に培地を調製し、予備試験を元に木炭を適量(5-10%)添加した。ポリプロピレン製栽培ビン(450ccもしくは800cc)に培地(270gもしくは570g)を充填、高圧滅菌(121°C, 60分)を行い、自然冷却後に種菌を接種して、温度23°C, 暗所にて培養を行った。ブナシメジのみ菌糸蔓延後に追培養(熟成)を行った。培養後に芽出し操作を行

Table 1 Strain number of 23 species on mycelial growth test

<i>Agrocybe cylindracea</i>	ヤナギマツタケ	AC-1	W
<i>Auricularia auricula</i>	キクラゲ	AA-1	C
<i>Flammulina velutipes</i>	エノキタケ	FV-4	W
		FV-33	W
<i>Ganoderma lucidum</i>	マンネンタケ	GL-6	C
		GL-7	C
<i>Hericium erinaceum</i>	ヤマブシタケ	HE-1	C
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	ブナシメジ	HM-888	C
<i>Lepista nuda</i>	ムラサキシメジ	LN-5	W
<i>Naematoloma sublateritium</i>	クリタケ	NS-2	C
<i>Pholiota aurivella</i>	ヌメリシギタケモドキ	PA-1	W
		PA-4	W
<i>Pholiota nameko</i>	ナメコ	PN-6	C
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	タモギタケ	PC-1	C
<i>Pleurotus dryinus</i>	ツバヒラタケ	PD-1	W
<i>Pleurotus eryngii</i>	エリンギ	PE-1	C
<i>Pleurotus ostreatus</i>	ヒラタケ	PO-1	W
		PO-4	W
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ウスヒラタケ	PP-3	W
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	トキイロヒラタケ	PSa-1	W
<i>Sparassis crispa</i>	ハナヒラタケ	SC-1	W
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	サケツバタケ	SR-1	W
<i>Termitomyces eurrhizus</i>	オオシロアリタケ	TE-4	W

*C:Culture strain W:Wild strain

い農業用マルチシート（700AG，デュポン™ タイベック）で覆い，蛍光灯照明下（100 lux 以下）で子実体原基の柄が 10 mm 程度伸長するまで管理した。以降，照度約 500 lux で子実体の生育を行い，菌傘の 8 分開きを目安に子実体を収穫した。収穫の際は傘径 10 mm 以上の子実体を有効とし，生重量と有効茎数を測定して子実体収量とした。また栽培期間を 3 段階に分けて，接種から菌まわりが完了するまでを菌糸蔓延日数，芽出し操作から子実体原基が形成するまでを原基形成日数，原基形成から収穫するまでを生育日数として記録した。

3. 結果と考察

3.1 菌糸伸長試験

Table 2 に菌糸伸長試験における担子菌 19 種 22 菌株の菌叢直径を示した。17 菌株で菌糸伸長の促進が認められた。木炭による効果の大きい順に，ブナシメジ，ヤナギマツタケ，ムラサキシメジ，トキイロヒラタケ，クリタケ，ヒラタケ (Po-4)，マンネンタケ (Gl-6)，タモギタケ，キクラゲ，ヌメリスギタケモドキ (Pa-1)，エリンギ，ヌメリスギタケモドキ (Pa-4)，エノキタケ (Fv-4)，エノキタケ (Fv-33)，ツバヒラタケ，ヒラタケ (Po-1)，



Fig. 1 Mycelial growth of *Termitomyces eurhizus* for 35 days after inoculation

ウスヒラタケとなった。一方でハナビラタケは菌糸成長が 90% に抑制された。オオシロアリタケについては木炭添加でのみ菌糸伸長が観察できた (Fig. 1)。今回，木炭が担子菌菌糸の伸長を促進させる結果が多い傾向にあったが，逆に抑制効果の認められたハナビラタケや，菌株間で異なる効果を示したマンネンタケ，全く影響のないヤマブシタケ，菌糸伸長が木炭添加でのみ確認できたオオシロアリタケなど菌種，菌株により影響が異なった。

Table 2 Mycelial growth test of 22 speices on the medium applied charcoal

Species	Diameter of mycelial tuft (mm)		The inoculation period (day)	Effect of charcoal (%)
	Charcoal addition -	Charcoal addition +		
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	40.3 ± 1.2	54.9 ± 1.2	*	17
<i>Agrocybe cylindracea</i>	42.3 ± 1.1	55.9 ± 0.9	*	11
<i>Lepista nuda</i>	45.6 ± 3.6	58.4 ± 6.2	*	33
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	56.9 ± 4.5	72.6 ± 4.3	*	8
<i>Naematoloma sublateritium</i>	54.2 ± 1.5	67.0 ± 4.0	*	21
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Po-4)	53.8 ± 0.9	66.3 ± 0.8	*	7
<i>Ganoderma lucidum</i> (Gl-6)	61.1 ± 4.6	72.8 ± 4.6	*	11
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	56.6 ± 4.0	67.0 ± 5.7	*	17
<i>Auricularia auricula</i>	63.2 ± 3.6	74.0 ± 0.9	*	10
<i>Pholiota aurivella</i> (Pa-1)	63.2 ± 3.4	73.9 ± 3.6	*	17
<i>Pleurotus eryngii</i>	53.4 ± 1.1	61.4 ± 1.4	*	11
<i>Pholiota aurivella</i> (Pa-4)	52.9 ± 0.7	60.8 ± 0.7	*	16
<i>Flammulina velutipes</i> (Fv-4)	60.9 ± 1.6	69.1 ± 2.7	*	14
<i>Flammulina velutipes</i> (Fv-33)	62.9 ± 5.1	70.8 ± 3.5	*	13
<i>Pleurotus dryinus</i>	64.9 ± 3.3	72.4 ± 1.7	*	17
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Po-1)	67.9 ± 3.2	74.9 ± 3.0	*	8
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	62.0 ± 1.9	67.3 ± 1.9	*	8
<i>Sparassis crispa</i>	49.8 ± 3.1	45.0 ± 2.0	*	33
<i>Pholiota nameko</i>	66.8 ± 5.1	69.9 ± 6.0	*	15
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	57.5 ± 5.5	62.5 ± 6.4	*	15
<i>Ganoderma lucidum</i> (Gl-7)	61.5 ± 4.1	66.8 ± 2.5	*	12
<i>Hericium erinaceum</i>	74.9 ± 2.0	74.5 ± 2.0		10

Legend : Charcoal addition - : Medium without charcoal, Charcoal addition + : Medium with 10

* A significant difference at 0.05 levels, respectively.

Effect of charcoal (%) = Diameter of mycelial tuft (Charcoal addition +)

/ Diameter of mycelial tuft (Charcoal addition -) × 100

Notes: Mean±S.D. (n = 3-5)

3.3 栽培試験

ヒラタケ (Po-1) , ウスヒラタケ, トキイロヒラタケ, エノキタケ (Fv-4) , ブナシメジの5菌株を用いた栽培試験の結果を Table 3 に示した。

ヒラタケは菌糸蔓延日数と原基形成日数が短縮され, 生育日数は長期化した。収量については生重量, 有効茎数ともに減少した。ウスヒラタケは菌糸蔓延日数と原基形成日数が短縮され, 総栽培期間は 2.9 日短縮された。トキイロヒラタケは菌糸蔓延日数と原基形成日数が短縮され, 総栽培期間は 2.8 日短縮された。有効茎数に影響はなかったが生重量が減少し, 子実体サイズが小型化した。エノキタケは生育日数のみ短縮され, 総栽培期間は 1.8 日短縮した。ブナシメジは菌糸蔓延日数が短縮した。また熟成 0, 10, 30 日区において原基形成日数は短縮され, 特に熟成 0 日区で4日程度早く原基が形成された。一方で原基形成が短縮された試験区については生育日数が長期化した。総栽培期間は全ての熟成条件で7~10日の短縮となった。

きのこ栽培において木炭は、栽培期間中の菌糸蔓延と原基形成を促進させ、結果として総栽培期間は多くの菌種, 菌株で短縮された。過去のシイタケの菌床栽培において木炭が子実体の一斉発生を促した報告⁴⁾からも木炭には菌糸伸長促進効果と共に、原基形成を促進させる効果がある。

また、木炭添加区において米糠の量が相対的に少ない(70-85%程度)にも関わらず収量はほぼ同等であったことから、生物的効率は向上したといえる。

以上の結果より、食用担子菌におけるカラマツ木炭添加は栽培期間の短縮と生物的効率の向上が期待できる。比較的栽培期間の長い菌種において、木炭添加はさらに有効な手法となる可能性がある。

参考文献

- 1) 田中優子：北海道大学大学院農学院 修士論文. (2003)
- 2) 前島重雄, 卯之原昇, 藤井英二郎, 長尾英幸：ランドスケープ研究 64, 42-43 (2001)
- 3) 川端久仁子：北海道大学大学院農学院 修士論文(2008)
- 4) 石川洋一, 塩田敦史：栃木県林業センター年報 32, 33-39 (2001).

Table 3 Effect of charcoal addition to sawdust medium on mycelial growth, cultivation period, fruit body yield, and number of significant fruiting bodies

Species	Charcoal addition	Period (days)						Fruiting body yield (FW g/bottle)	Number of significant fruiting bodies
		Spawn Run	Aging	Primordia formation	Maturation	Total cultivation			
<i>Pleurotus ostreatus</i>	—	12	0	15.9 ± 4.7 *	6.5 ± 0.7 *	33.8 ± 4.0	26.4 ± 4.0 *	9.8 ± 1.8 *	
	+10	11	0	11.8 ± 3.9	7.7 ± 1.3	30.1 ± 4.0	22.6 ± 1.8	7.5 ± 2.0	
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	—	12	0	7.1 ± 1.0 *	6.2 ± 0.6	24.9 ± 1.9 *	28.2 ± 3.8	5.4 ± 3.2	
	+10	11	0	6.0 ± 1.1	5.6 ± 0.8	22.0 ± 1.3	26.9 ± 5.8	6.8 ± 1.8	
<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	—	16	0	6.3 ± 0.5 *	3.5 ± 0.8	23.9 ± 1.5 *	19.0 ± 3.5 *	18.8 ± 4.2	
	+10	14	0	4.8 ± 0.8	3.2 ± 0.4	21.1 ± 1.0	14.3 ± 4.4	15.9 ± 3.4	
<i>Flanmmulina velutipes</i>	—	21	0	10.9 ± 1.5	8.5 ± 0.8 *	40.4 ± 1.3 *	79.3 ± 9.8		
	+5	21	0	10.3 ± 1.1	7.3 ± 0.8	38.6 ± 1.1	78.0 ± 9.0		
	—	36	0	14.1 ± 2.8 *	17.1 ± 0.8 *	67.2 ± 2.5 *	88.9 ± 8.6	43.0 ± 4.9 *	
	+10	28	0	9.7 ± 1.0	21.7 ± 1.3	59.4 ± 1.7	79.4 ± 3.4	27.7 ± 5.1	
	—	36	10	11.4 ± 0.5 *	18.2 ± 0.9 *	75.6 ± 0.8 *	94.8 ± 4.8	44.4 ± 5.8	
	+10	28	10	10.4 ± 0.5	19.6 ± 0.5	68.0 ± 0.8	103.2 ± 7.1	40.0 ± 7.1	
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	—	36	20	10.5 ± 2.3	16.4 ± 1.7	82.9 ± 1.0 *	113.8 ± 12.0	61.9 ± 7.7	
	+10	28	20	10.0 ± 0.9	17.3 ± 1.0	75.3 ± 0.7	114.8 ± 9.6	54.1 ± 4.6	
	—	36	30	12.9 ± 1.6 *	14.4 ± 1.2 *	93.3 ± 2.3 *	110.5 ± 9.9	63.0 ± 12.4	
	+10	28	30	10.0 ± 0.0	15.8 ± 0.4	83.8 ± 0.4	111.5 ± 7.7	56.2 ± 7.9	

Legend : —: Medium without charcoal, +5 : Medium with 5 % charcoal, +10 : Medium with 10 % charcoal

* A significant difference at 0.05 levels, respectively.

Notes: Mean±S.D. (n=10)

P-2. 木酢液の木材防腐効果に関する組織学的研究

国立文化財研究所保存科学室〔韓国〕

○鄭 美和、崔 貞恩、洪 鎮英、金 英熙、趙 昶旭

研究発表要旨

有害生物防除のための殺生物質である木酢液の木材適用性に関する研究は重要である。本研究では、人工的な保存処理剤の代わりに、天然物由来である木酢液を用いた木材保存処理剤開発の可能性を木酢液処理後の木材防腐効果を通して検討した。

1. はじめに

有機質の材料で構成された文化財は、展示環境及び外部環境に晒されることによって、直接および間接的な被害が引き起される。これは文化財の美的・歴史的な価値を損失させるだけではなく、形態及び構造的変化をもたらす。特に、生物学的な劣化の原因である菌類による有機質文化財の損傷は、被害が深刻である。外部において被害が見られる時には、内部においては既にかかなりの被害が進行した状況であり、薬品を利用した消毒や薫蒸方法などを通じて一時的な救済策は講ずることができるものの、適切な条件が与えられることにより再発する危険性がある。今までの菌類の防除は、化学薬剤に依存されてきた。多くの化学薬品使用にもかかわらず、外部からの絶え間ない菌類の流入が起こることで、文化財に対する深刻な汚染及び損傷、さらには、人間の健康と安全にも深刻な問題を引き起こしている。したがって、新たな保存処理剤の原料として、従来の化学薬品に比べて環境負荷が少なく、人体への有害性も少ない天然物質から探索することが望ましい。

そこで、本研究では、天然物である木酢液からの抽出物と分画物の抗菌活性の測定および木材に木酢液を処理し、強制腐朽後の木材腐朽程度と木材組織観察し、木酢液の有機質文化財保存処理剤としての可能性を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と実験方法

2.1 木酢液

木酢液は（株）樹村林産で製作され、rotary vacuum condenser (EYELA, Japan) で濃縮し、Crude 状態で作った。この抽出物をdichloromethane (以下MC)、ethyl acetate (以下EA)、n-butanol (以下BuOH) の順で分画した。分画物も同じ方法を用いて濃縮を行った。この中で最も抗菌効果が優れていたMC分画物を本研究に使用した (Table 1)。

2.2 抗菌活性

表面汚染菌に対する抗菌活性は paper disc agar diffusion methodによって評価した。孢子数を 3×10^6 で合わせたPDA mediaの中央に、抽出物を50ul (0.1g/ml) ずつ吸収させたpaper disc (Advantec, 8mm) を乗せて28°Cで培養する。4 - 5日後 disc 周りに生成されるclear zone (mm) を測定した。

木材腐朽菌に対する抗菌活性は、0.1g/ml濃度で paper disc soaking method により評価した。培養期間中、抽出物を含んだ paper discの上で成長した菌糸の直径比較を通じて、菌糸生長抑制率 (Hyphal Growth Inhibition Ratio, HGIR) を次の式によって算出した。これらの実験は3回繰り返した。

$$\text{菌糸生長抑制率 (\%)} = (Dc - Dt) / Dc \times 100$$

Dc = diameter of grown hypha in control、Dt = diameter of grown hypha in treatment

抗菌活性の評価実験に用いた微生物種を以下に述べる。

表面汚染菌は*Cladosporium cladosporioides* H1 (以下H1)、*Aspergillus sydowii* H2 (以下H2)、*Penicillium citreonigrum* H3 (以下H3)、*Penicillium toxicarium* H4 (以下H4)、*Penicillium corylophilu* H5 (以下H5)、*Aspergillus versicolor* H6 (以下H6)、*Acremonium alternatum* H7 (以下H7) であり、これらは有機質文化財から分離した微生物である。木材腐朽菌は*Pleurotus ostreatus* (KACC 50356)、*Schizophyllum commune* (KACC 43 373)、*Ganoderma lucidum* (KACC 42231)、*Trametes versicolor*、*Tyromyces palustris*である。

2.3 木材試片

木材は韓国の木造文化財の建築物中で76%以上を占めるアカマツ (*Pinus densiflora*) の辺材を選択した。木酢液処理によるアカマツ辺材試片の抗菌効果を評価するため、10x10x10 (mm³) の大きさで切断して木材試片で作った。アカマツ試片を121°Cに30分間滅菌した後、様々な濃度 (0.001、0.005、0.01、0.03、0.05、0.08、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30g/ml) のMC分画物を100kPaで1時間含浸させた。以後、一週間室温にて乾燥させた後、強制腐朽させた。

2.4 強制腐朽試験の方法

ASTM (American Society for Testing Materials) により定められた方法によって、soil block testを行った。腐葉土と砂を3:1で混合した後、70%の含水率になるように蒸留水を添加した培養ビンに121°Cに30分間高圧滅菌した。培養ビンの中に供試菌を接種した白華feeder strip (110x15x10 mm³) を入れた後3週間28°C、70%RHで培養させる。供試した菌は*Trametes versicolor* (白色腐朽菌) および *Tyromyces Palustirs* (褐色腐朽菌) である。3週間後、準備したアカマツ辺材試片を白華feeder stripの上に置いて同様の条件で強制腐朽させた (Figure 1)。



Figure 1. ASTM method

2.5 重量減少率測定

3、6、9週の間、強制腐朽木片の重量減少率 (%) を測定するために採取した試料は、60°Cで72時間乾燥した後、次の式によって重量減少率 (%) を算出した。この実験は、3回繰り返した。

$$\text{重量減少率 (\%)} = (\text{健全材乾重量} - \text{腐朽材乾重量}) / \text{健全材乾重量} \times 100$$

2.6 SEM観察

3、6、9週の間、強制腐朽木片を10x7x7 (mm³) の小片にし、2% glutaraldehyde (以下GA) + 2% paraformaldehyde (以下PA) 固定液 (in 0.05M cacodylate buffer, pH 7.2) で4時間固定した後cacodylate bufferで30分間ずつ2回洗浄し、エチルアルコール (30、50、70、95、100%) で脱水した。100%エチルアルコール:キシレン=1:1の溶液で2時間、キシレン中に2時間浸漬した後、Paraffinで包埋した。この木片の観察する断面 (横断面、放射断面) をsliding microtomeで表面を滑らかに仕上げた後、キシレンでParaffinを取り除いた。木片を100%エチルアルコール:キシレン=1:1の溶液で2時間浸漬し、100%エチルアルコールで脱水した。gold coatingした後走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: Hitachi S-2400 SEM) を使って観察した。

3. 結果

3.1 木酢液の抗菌活性

木酢液の抽出物及び分画物の0.1g/mlの濃度における抗菌活性の結果をTable 1に示す。MCとEAに比べて、抽出物とBuOHでは抗菌活性が弱くなった。木材腐朽菌に対してはEAで菌の成長を99.9%抑制し、表面汚染菌では菌の種類によってMCとEAの抗菌活性が少し異なっていた。しかし、全体的にMC分画物で様々な微生物を抑制する効果が優れていると判断された。木酢液の抗菌活性の結果から、抽出物及び分画物の中で最も抗菌効果が優れていたMC分画物を本研究に使用した。

Table 1. Antifungal activities of wood vinegar against mold(A) and decay fungi(B)

A.	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Crude	10.0	-	-	-	-	-	-
MC	23.0	29.0	10.5	9.0	-	20.0	16.0
EA	20.0	15.0	11.0	10.0	-	11.0	14.0
BuOH	9.0	-	-	-	-	-	-

clear zone(mm), - : no activity

B.	<i>P. ostearatus</i>	<i>S. commune</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>T. palustris</i>
Crude	32.0	00.0	99.9	18.2	21.0
MC	99.9	57.7	99.9	99.9	16.0
EA	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
BuOH	99.9	34.1	99.9	70.0	20.0

菌糸抑制率 (%)

3.2 重量減少率 (%) 測定

強制腐朽期間中、対照群で利用した100%エチルアルコール（以下EtOH）とともにすべての濃度の分画物を処理した木材試片の重量減少率(%)は60℃に72時間乾燥させた後、腐朽前と後の重量を測定して算出した。その結果、白色腐朽菌である*T. versicolor*による強制腐朽をさせた時、抽出物の濃度が増加するにしたがって、重量減少率が減少したが、大きな差はみられなかった。しかしながら、強制腐朽期間が長くなるにしたがって、2倍以上の重量減少がみられた。褐色腐朽菌である*T. palustris*を強制腐朽させた時には、木材に処理した抽出物の濃度が増加するにしたがって、重量減少率が徐々に減少し、培養期間が長くなると、低い濃度では2倍以上の重量減少がみられたが、高濃度で処理した試片では3%程度の違いであった。処理濃度が増加するにしたがって、木材腐朽菌の成長は抑制された。対照群と比べた時、白色腐朽菌と褐色腐朽菌において、それぞれ最大30%、60%の重量減少を抑制させたことは、分画物の腐朽菌に対する抵抗性の高さを示している。

3.3 木材試片の外観形態観察

木材の腐朽は腐朽された木材に現われた色相および状態によって、褐色腐朽菌と白色腐朽菌、そして軟腐朽(soft-rot)に分類される。本実験ではアカマツに対する褐色腐朽及び白色腐朽を強制的に進行させて現われた外観的变化を観察した。正常材とは違い褐色腐朽されたアカマツは、その見かけが暗褐色またはさび色を現わした。したがって、アカマツ(針葉樹材)に被害を与えやすい褐色腐朽菌の被害を被った木造文化財の建築物は腐朽被害がなく、完全なことのように見える時が多い危険があったと思われた。9週目の褐色腐朽材は、白色腐朽材よりも脆くなっていた(Figure 2)。アカマツの白色腐朽は褐色腐朽とは違い、木材全体が白色の腐朽菌で覆われて、腐朽が進行していることを容易に把握することができた(Figure 3)。褐色腐朽材は腐朽初期段階では木材の色相の変化は目立たないが、白色腐朽材は初期段階から色相の変化が著しく現われた。

木酢液の処理による褐色腐朽菌と白色腐朽菌の成長に対する影響を調べた結果、処理濃度が高くなるにしたがって、外観的な腐朽が阻止されるということが明らかになった。



Figure 2. 木酢液処理9週目の褐色腐朽
(左: EtOH処理、右: MC 0.25g/mlの木酢液処理)



Figure 3. 木酢液処理9週目の白色腐朽
(左: EtOH処理、右: MC 0.25g/mlの木酢液処理)

3.4 木酢液処理に関するアカマツの腐朽状態

木材に侵入した菌糸は木材細胞壁を直ちに分解しなかった。3週目は木材試片の外部に腐朽がみられたが、内部には菌糸の侵入がみられなかった。腐朽菌は、栄養分が容易に得られる放射組織に侵入し、壁孔や細胞壁を分解した。横断面相において、樹脂道内および細胞壁内腔に菌糸が侵入する様子が観察され、放射断面では放射組織の分野壁孔を介した菌糸の侵入がみられた。また、菌糸が壁孔を通過する時には、菌糸のサイズが細長く変化することが観察された (Figure 4、5)。9週目は木材試片の内部まで菌糸が侵入し、外部には分解が進行した細胞壁が観察された。3週目においても観察されたような樹脂道、壁孔及び放射組織での菌糸の侵入と破壊が、より進行しているのが観察された。

細胞壁の分解様式は腐朽菌によって異なっていたが、腐朽期間が長くなるほど細胞壁の破壊が進行され、木酢液の処理濃度が高くなるにしたがって、木材腐朽が抑制されている様子が観察された。木酢液の処理は、菌糸の侵入を100%阻止することはできなかったが、木酢液が持つ腐朽の進行を阻害する効果を明らかにすることができた。

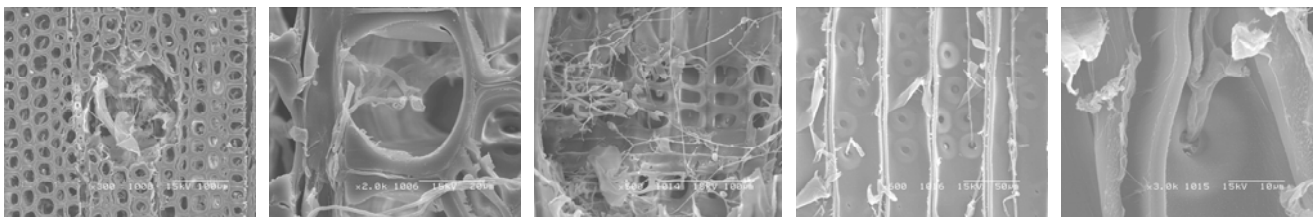


Figure 4. MC 0.05g/mlの木酢液処理後の菌糸侵入による腐朽状態 (3週目)

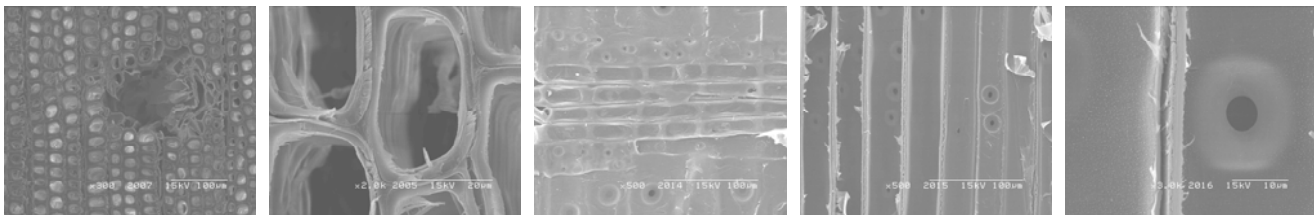


Figure 5. MC 0.25g/mlの木酢液処理による菌糸侵入の阻害された状態 (3週目)

4. 考察

本実験の結果は強制腐朽であるため、実際の木造文化財建築物における腐朽についてすべて説明できるとは言い切れないが、木酢液の抗菌活性、特にアカマツの木造文化財である建築物で発生する褐色腐朽菌と白色腐朽菌に対する抗菌効果があり、腐朽によるアカマツ組織の破壊の進行を抑制することを明らかにできた。

したがって、天然物である木酢液のMC分画物の成分は、アカマツで作られた木材建築物に損傷を起こす褐色腐朽菌と白色腐朽菌に対する抗菌活性を持つことから、木材文化財の保存処理剤として使用できる可能性があるといえる。

今後、木酢液分画物の成分分析および文化財材質及び環境、人間に対する安全性評価を行う予定である。さらに、有機質文化財の劣化源である様々な微生物に対する適用性評価も行うことで、保存処理剤としての開発を進める。

5. 謝辞

本研究は、文化財庁国立文化財研究所の支援により、保存修復技術開発研究(R&D) 事業である文化財保存のための天然殺生物の開発研究の一環として行われた。この場を借りて感謝致します。

P-3. オビスギ材水蒸気乾燥凝縮液の防カビ性能

(旭川高専) ○富樫 巖, 佐藤明日香, 後藤隆之, (宮崎木技セ) 故・藤本英人

1. 緒言

2000年4月1日に施行された「住宅の品質確保の促進等に関する法律」により、割れや狂いが少ない安定した品質の建築材が求められ出した。その対策として水蒸気加熱によって木材を乾燥する熱気乾燥が注目され、同処理材の需要が高まった。一方、同乾燥処理工程では木材の乾燥に伴って精油などを含む蒸気が排出されることになる。

宮崎県産のオビスギ材には多量の精油が含まれていることで、その排気蒸気凝縮液の有効利用の検討¹⁾、含有物質の分析が行なわれてきた^{2, 3)}。同凝縮液には α -ムーロレンなどのセスキテルペンが多く存在することが明らかにされたことを受け³⁾、本研究では同凝縮液から回収した精油などの防カビ性能⁴⁾を評価することで、新たな利用可能性を模索した。なお、防除対象は植物またはキノコの栽培作目に病害を起こすとされるカビ(糸状菌)とした。

2. 実験方法

2.1 供試材料

宮崎県産スギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)の心持ち柱材を熱気加熱式IF(インターナルファン)式乾燥機にて蒸気乾燥した際に排気ダクトから冷却回収した凝縮液、すなわち精油と水分の懸濁液(以下、材油エマルジョン)、さらに材油エマルジョンから分離したスギ精油を用いた(いずれも宮崎県木材利用技術センターで調製³⁾)。

2.2 供試菌株

糸状菌は、①灰色カビ(*Botrytis* spp.)として旭川高専保存株ANCT-06001とANCT-06022(旭川市および近郊の葉菜水耕栽培施設より分離)、②フザリウム属菌(*Fusarium* spp.)としてANCT-06033とANCT-06039(同栽培施設より分離)、③トリコデルマ属菌(*Trichoderma* spp.)としてANCT-05090(愛別町内の原木シイタケ栽培施設より分離)とNBRC 33016(帯広市内の菌床シイタケ栽培施設より分離、その後寄託したカルチャーコレクション菌株)の合計6菌株を供試した。

2.3 防カビ性能の評価方法

ポテトデキストロース寒天培地(以下、PDA培地)にスギ精油、材油エマルジョン、および必要に応じてエタノール(特級試薬99.5%)を添加した平板培地を調製した。PDA培地へのスギ精油の添加濃度は0.5~2.0 v/v%、材油エマルジョンの添加濃度は1.0~50 v/v%、エタノールの添加濃度は0.5~2.0 v/v%とした。それらに供試菌株を接種し、温度25℃で10日間培養して菌糸成長量(コロニー半径)を経時的に測定し、コントロール培地での挙動と比較した。繰り返し数は3とし、各供試菌株の接種源にはPDA平板培地で25℃・5日間の前培養を行った後、コルクボーラで寒天ごと打ち抜いた直径5 mmの円盤を使用した。

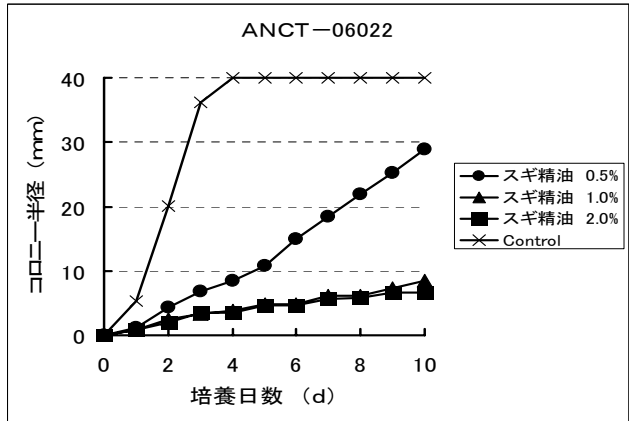
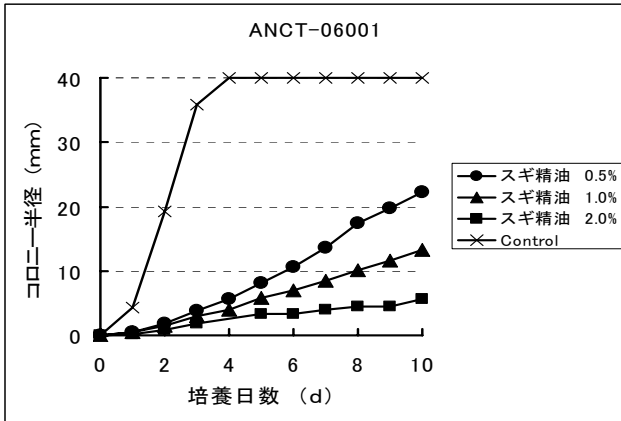
3. 結果と考察

3.1 スギ精油の防カビ性能

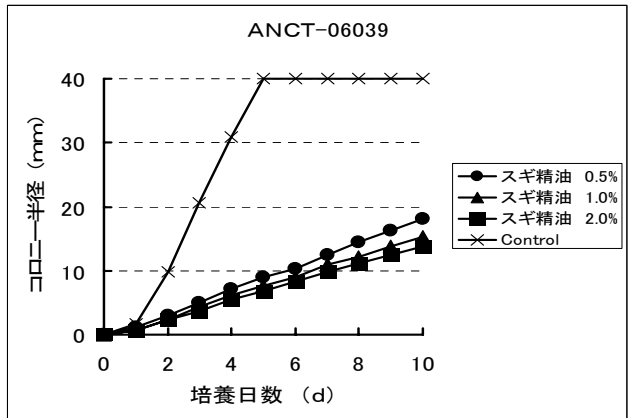
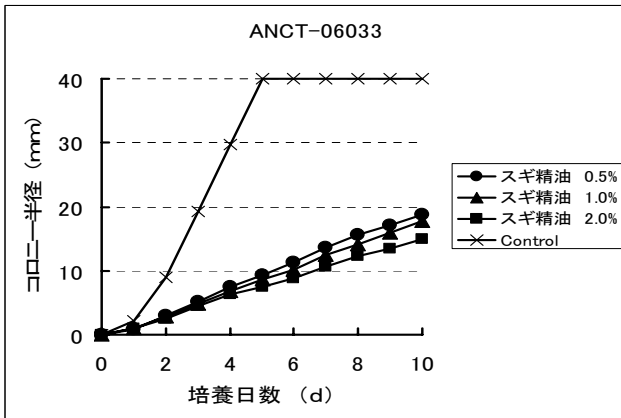
スギ精油に対するボトリチス属菌、フザリウム属菌およびトリコデルマ属菌の菌糸成長の経時変化を第1~3図に示した。この結果から、1.0%濃度以上のスギ精油によってボトリチス属菌が強く阻害され、以下にフザリウム属菌が続くものの、トリコデルマ属菌は影響を受け難いことが分かる。

3.2 材油エマルジョンの防カビ性能

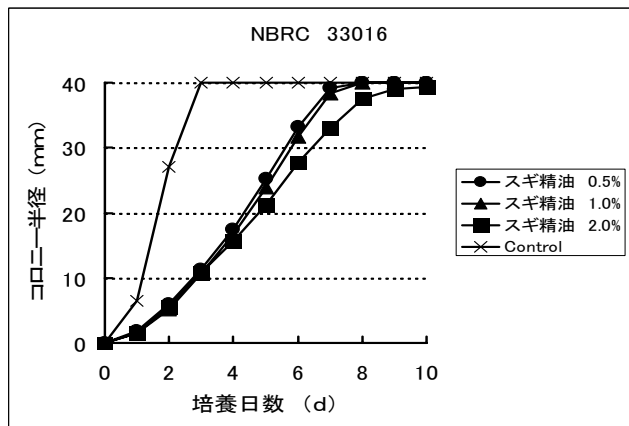
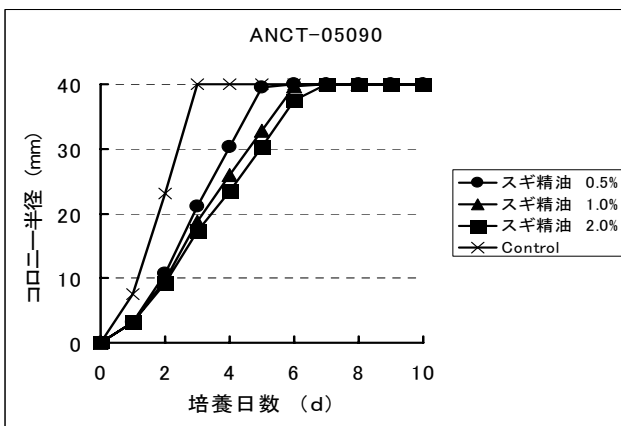
ボトリチス属菌に対するスギ精油の防カビ性能が高いことから、同様の方法を用いて材油エマルジョンに対する同属菌の挙動を観察し、得られた結果を第4図に示した。スギ材の乾燥に伴って大量に回収される材油エマルジョンをそのまま使用することができれば、非常に効率的であると期待した。しかし、その添加濃度50%で阻害効果がようやく観察される程度であった。



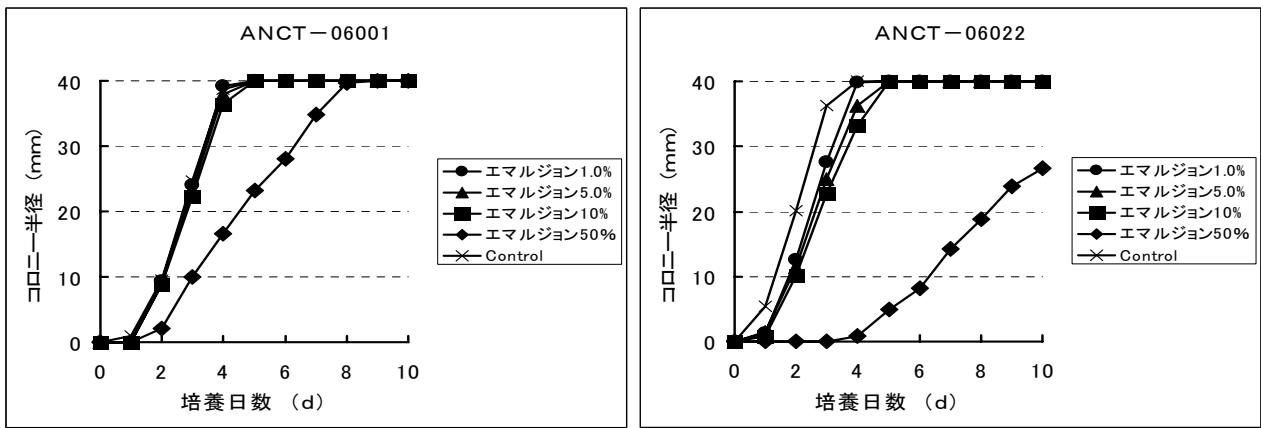
第1図 スギ精油を添加した PDA 平板培地におけるボトリチス属菌の菌叢成長量
 (左: ANCT-06001, 右: ANCT-06022)
 注) 培養温度 25°C, Control はコントロール培地を示す.



第2図 スギ精油を添加した PDA 平板培地におけるフザリウム属菌の菌叢成長量
 (左: ANCT-06033, 右: ANCT-06039)
 注) 第1図と同じ.



第3図 スギ精油を添加した PDA 平板培地におけるトリコデルマ属菌の菌叢成長量
 (左: ANCT-05090, 右: NBRC 33016)
 注) 第1図と同じ.

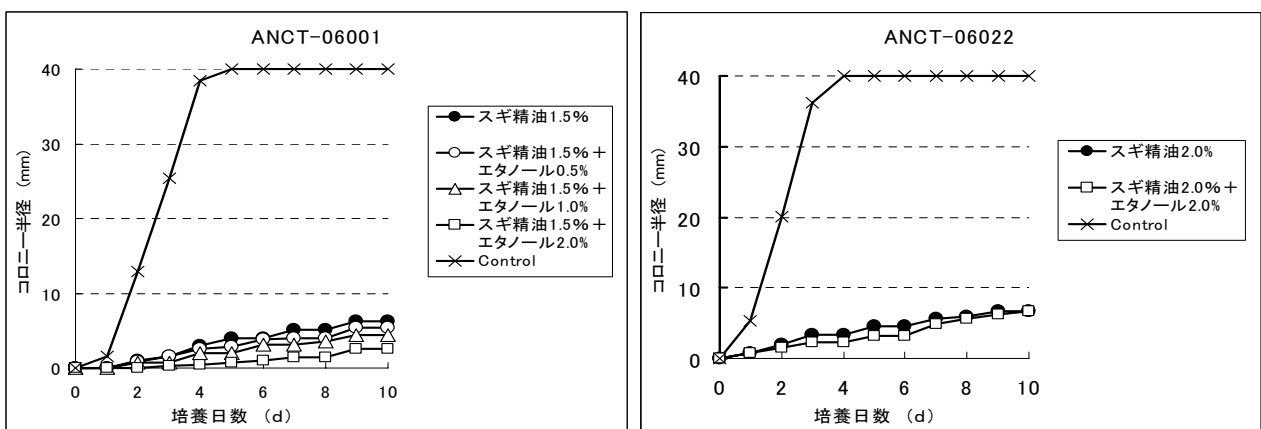


第4図 材油エマルジョンを添加したPDA平板培地におけるボトリチス属菌の菌叢成長量（左：ANCT-06001，右：ANCT-06022）
注）第1図と同じ。

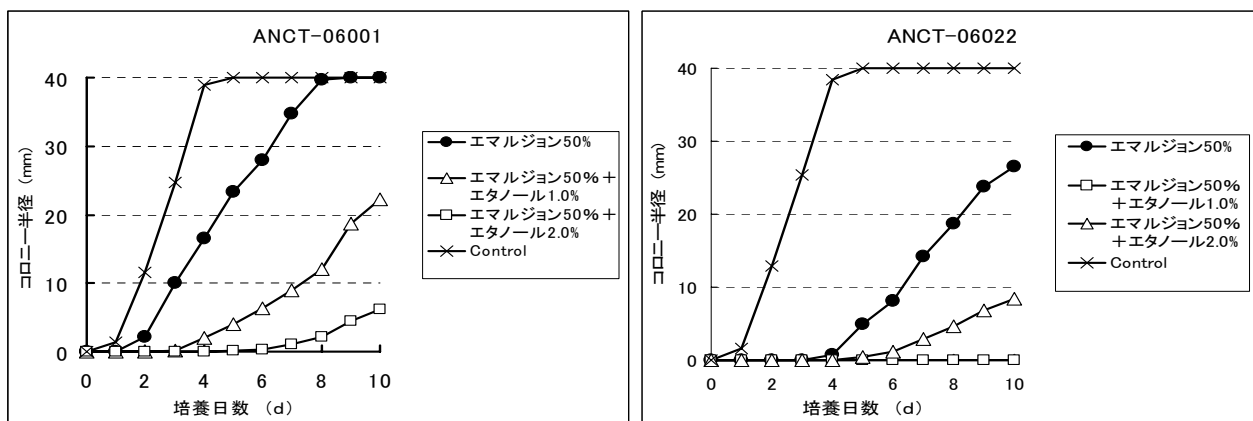
3.3 スギ精油および材油エマルジョンへのエタノールの添加効果

スギ精油または材油エマルジョン，そしてエタノールを添加したPDA平板培地を用いてボトリチス属菌の菌叢成長への影響を観察し，得られた結果を第5～6図に示した。各添加濃度は，スギ精油1.5または2.0%，材油エマルジョン50%，そしてエタノールは0.5～2.0%とした。スギ精油の場合と比較すると，材油エマルジョンにエタノールを1.0～2.0%添加した場合にボトリチス属菌の菌叢成長に与える阻害効果が増大する傾向がみられた。また，本要旨にはデータを示していないが，ボトリチス属菌に対する2.0%のエタノール単独添加はほとんど観察されなかった。従って，ボトリチス属菌への阻害効果はスギ精油や材油エマルジョンがベースであり，エタノールがその効果をサポートすることで同効果が増強されると考察される。

以上から，必要に応じてエタノールを添加することになるが，スギ精油と材油エマルジョンを用いたボトリチス属菌の防除の可能性に注目したい。ボトリチス属菌により引き起こされる灰色かび病は，種々の野菜や花きなどの施設栽培において発生しやすい。一方，スギ精油と材油エマルジョンは，各種セスキテルペン類を含有しており³⁾匂いが非常に強いことから，灰色かび病防除のために両者を栽培作物へ直接散布することは考え難い。今後における可能性としては栽培施設内の環境殺菌に用いることで，ボトリチス属菌の濃度を減少させる予防的利用が考えられる。



第5図 スギ精油とエタノールを添加したPDA平板培地におけるボトリチス属菌の菌叢成長量（左：ANCT-06001，右：ANCT-06022）
注）第1図と同じ。



第6図 材油エマルジョンとエタノールを添加した PDA 平板培地におけるボトリチス属菌の菌叢成長量 (左: ANCT-06001, 右: ANCT-06022) 注) 第1図と同じ。

日常におけるカビ被害としては、以上のような栽培作目の病害以外にも住宅などの風呂場を始めとする水回り箇所の壁・床・天井などの表面汚染がある。そうした場所での利用ではスギ精油や材油エマルジョンの匂いは問題にならない可能性もある。そこで現在、*Cladosporium* spp. など⁵⁾ に対するスギ精油の防カビ性能の評価・検討を進めているところである。

引用文献

- 1) 藤本英人：ゴキブリ忌避剤およびその製造方法，特開 2008-169190 (2008)。
- 2) 松井隆尚，松下洋一，菅本和寛，宮窪建児：蒸煮処理により生成するスギ材蒸煮水溶液の成分分析，宮崎大学工学部紀要，No. 33，75-79(2004)。
- 3) 松井隆尚，松下洋一，菅本和寛，宮窪建児，藤本英人，落合克紀：水蒸気乾燥により生成するスギ材水蒸気乾燥凝縮液の成分分析，宮崎大学工学部紀要，No. 34，23-26(2005)。
- 4) 岡村大悟，鮫島正浩，谷田貝光克：樹木の精油成分とその抗菌活性，木材保存，28(6)，224-235(2002)。
- 5) 濱田信夫：浴室の微生物汚染の現状と対策，防菌防黴，34(2)，81-86 (2006)。

P-4. 土壌放線菌からの新規プロテインホスファターゼ阻害物質の探索

(北大院農) ○柳田 進太郎、三橋 進也、重富 顕吾、生方 信

1. はじめに

放線菌は土壌分解菌として土壌物質の循環プロセスに関わっており、多種多様な代謝産物を産生することで知られている。その中で *Streptomyces* 属からは多くの生理活性物質が同定され、現在も新たな生理活性物質の検索が続けられている¹⁾。

トウトマイセチン (tautomycetin, 以下 TC) は 1989 年に理化学研究所において放線菌 *Streptomyces griseochromogenes* から単離・構造決定が報告されたポリケチド化合物である (Fig.1)²⁻³⁾。さらに当研究室および菊池らのグループ (北大遺制研) との共同研究によってプロテインホスファターゼ 1 型 (PP1) の特異的な阻害剤であることが報告されている⁴⁾。

生体内において、多数のタンパク質がプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの作用によって、それぞれリン酸化と脱リン酸化の作用を受ける。これらの酵素が基質タンパク質のリン酸化状態を調整することで、細胞増殖・分化・アポトーシスをはじめ多くの細胞機能の制御に関与している⁵⁾。

TC などのプロテインホスファターゼ阻害剤を用いた研究は、プロテインホスファターゼの作用機構や基質タンパク質における脱リン酸化の生理的意義の解明に大きく寄与すると考えられる⁴⁾。本研究では TC 産生菌である *Streptomyces griseochromogenes* に変異を誘導することで、より PP1 に対し選択的かつ安定な構造をもつ新規化合物の単離・構造決定を試みた。すなわち TC 生産株に変異を誘導し、PP1 阻害活性と HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来の細胞) の形態変化を指標に一次スクリーニングを行ない、HPLC 分析によって新規 PP1 阻害物質の探索を行なった。加えて、ポリケチド生合成に関与する前駆体を添加することにより新規活性物質の生産性の増強を試みた。

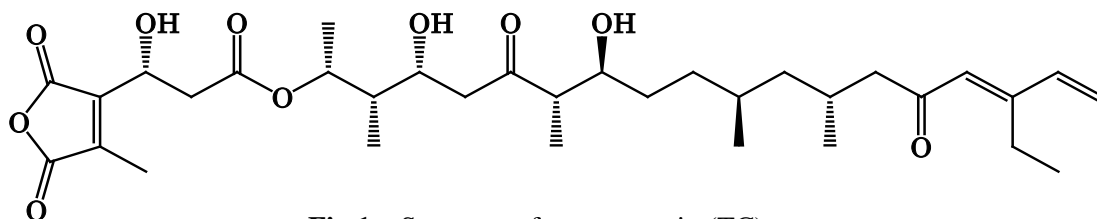


Fig.1 Structure of tautomycetin (TC).

2. 材料と方法

2.1 変異株の取得

本研究で用いた放線菌は、クリーンベンチの室内殺菌用の紫外線を変異原として変異させた。採取した変異株はそれぞれ、5 ml の生産培地 (soluble starch 1.9 %、D-(+)-glucose 3.81 %、yeast extract 1.14 %、soybean meal 1.14 %) で 28°C、170 rpm の条件で 6 日間振とう培養した。6 日後、培養液は遠心分離によって上清と沈殿に分けた。沈殿にはそれと同量の acetone を加え抽出を行なった。これを遠心分離に

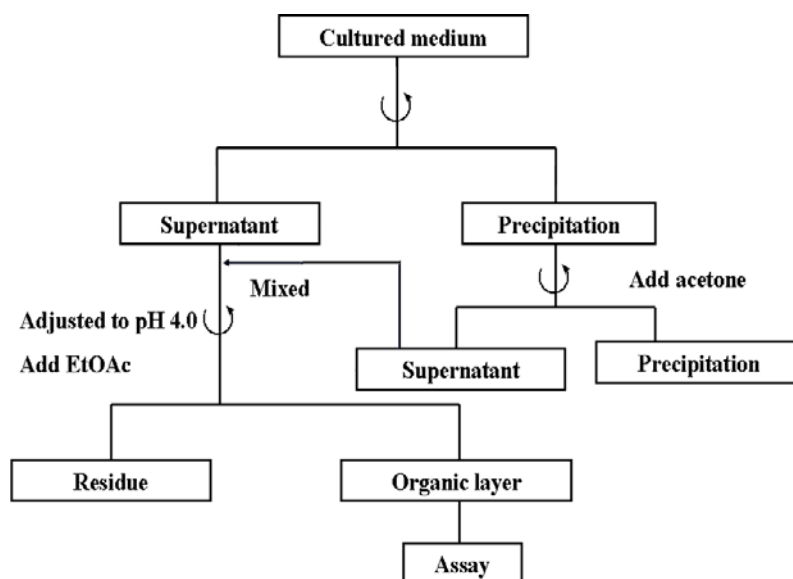


Fig.2 Extraction and measurement of activity in first screening.

よって上清と沈殿に分け、上清を acetone 抽出前に分離した上清と混ぜた。pH を 4.0 に調節したのちに EtOAc を全量の 3 分の 1 加えて抽出を行なった。これを遠心分離によって有機層と水層に分離し、有機層をスピードバックコンセントレーターによって揮発させ、抽出物を得た(Fig.2)。

2.2 一次スクリーニング

二つのスクリーニング手法を用いた。まず、採取した変異株 180 株のうち PP1 阻害活性の高い株を選定した。次にプロテインホスファターゼ阻害剤はヒト細胞の形態変化を誘導することが知られているため⁶⁾ PP1 阻害活性の高い株のうち HeLa 細胞の形態変化を誘導する株の選定を行なった。

スクリーニングソースは、上記の培養液から得られた抽出物を dimethyl sulfoxide (DMSO) 50 μ l に溶解することで調製した。

PP1 の阻害活性試験は文献 7 を参考に *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) を PP1 の人工基質として用いた。ホスファターゼ活性により *p*NPP から分離した *p*-nitrophenol (*p*NP) はアルカリ下で H^+ を失い、*p*-nitrophenolate が生成することで黄色を呈する。その吸収度を測定し PP1 阻害活性を評価した。20 mM *p*NPP を含む 40 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (pH 8.4) の溶液 388 μ l へ、スクリーニングソース 2 μ l または DMSO (コントロール) 2 μ l をエッペンチューブに加えて全量 390 μ l とした。攪拌後、室温で 120 μ g/ml PP1 を 10 μ l 加えて反応させた。25 分後に 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) を 100 μ l 加えて反応を停止し、450 nm で吸光度を測定した。

HeLa 細胞処理は、細胞培地に上記のスクリーニングソースを最終濃度 2 % になるように加え、5 時間後の細胞の形態変化を光学顕微鏡で観察した。

2.3 HPLC 分析

菌株は実験 2.1 と同様の条件で培養し、その抽出物を MeCN で溶解することで HPLC 測定溶液とした。検出器は HITACHI Photodiode Array (L-7455) を用い、移動相は以下のように A および B の二種類の溶離液を Fig.3 に示した MeCN の濃度勾配になるよう測定を行なった。

<HPLC 条件>

カラム : Waters Nova-Pak_{C18} (ϕ 3.9 mm \times 150 mm)

溶離液 : (A) 0.1% AcOH

(B) 95% MeCN / 0.1% AcOH

流速 : 1.0 ml / min

温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出波長 : 260 nm

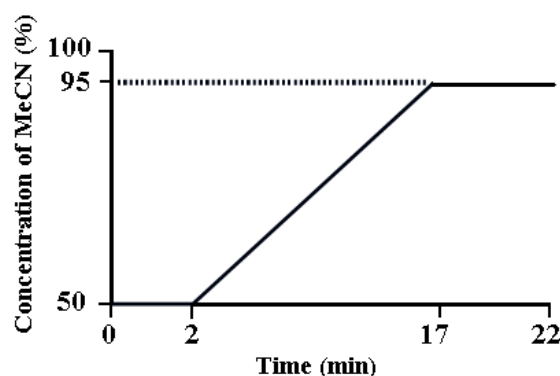


Fig.3 Eluent composition.

2.4 TC の前駆体による生産性の増強

Fig.4 に添加した前駆体の構造を示した。前駆体はそれぞれのナトリウム塩を、最終濃度 0.05 % になるように生産培地に溶解させた。抽出後は PP1 阻害活性試験によってそれぞれの活性を評価した。

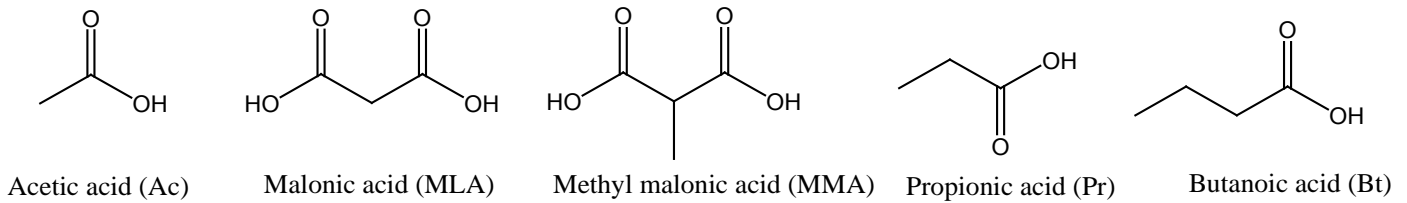


Fig.4 Additives in the culture medium.

3. 結果と考察

3.1 一次スクリーニング

採取した 180 株の変異株のうち、PP1 阻害活性が高く HeLa 細胞の形態変化を誘導する株を 7 株まで選定した。

3.2 HPLC 分析

一次スクリーニングから選定した株は、さらに HPLC 分析によって標品の TC とは異なる保持時間および吸収波長の化合物を生成する株の選定を目的に行なわれた。TC 標品を測定した結果、保持時間が約 9 分にピークが観測された。次に最も PP1 阻害活性の高い株 (53-1-25 株) の培養液から得た抽出物を測定した結果、約 12 分に活性物質のピークが観測された。さらに、これら二つを混合し 0°C で一時間インキュベートした後に測定したところ、Fig.5 に示すように別々のピークとして検出された。Fig.6 にそれぞれの UV スペクトルを示す。ピーク I では 268 nm に吸収極大が観測され、ピーク II では 252 nm に吸収極大が観測された。したがってピーク II の化合物が TC の標品と異なる保持時間と UV スペクトルを示すことから 53-1-25 株が産生する化合物は TC とは異なる構造の化合物であることが示唆された。また、ピーク II を分取し、PP1 阻害活性を行なったところ高い活性が見られたことから、これがピーク II の化合物の活性本体だと考えられる。

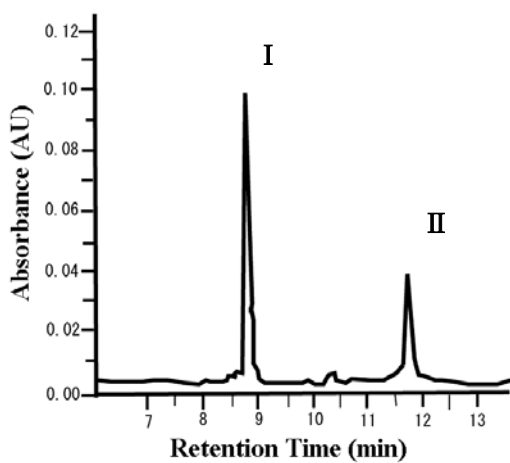


Fig.5 Profile of HPLC analysis

Peak I : TC.

Peak II : Active compound from strain 53-1-25.

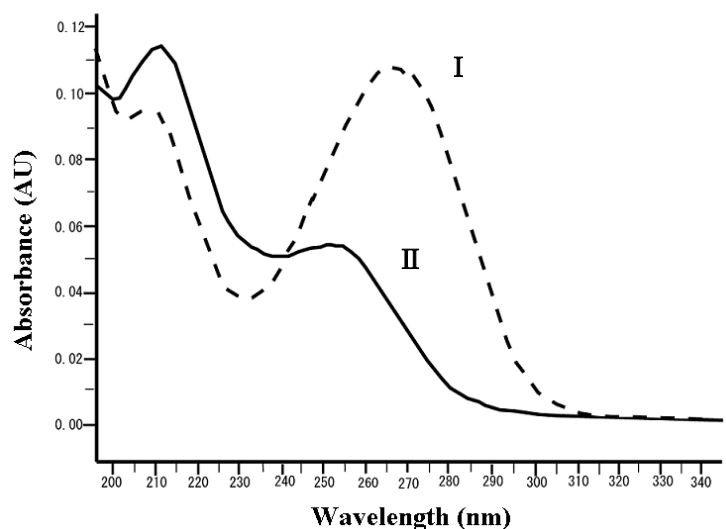


Fig.6 UV spectra of I and II .

Continuous line : Peak I .

Dashed line : Peak II .

3.3 マロン酸添加による PP1 阻害物質の生産性の増強

HPLC 分析で検出した化合物を同定するにあたって、大量培養を必要とした。そこで、効率良く目的物を得るために文献 8 を参考にして TC の前駆体を培養液に添加する実験を行なった。PP1 の阻害活性はマロン酸およびメチルマロン酸を添加したときに高い活性を示した。さらに、サンプルを 50 倍、100 倍と希釈したときの PP1 阻害活性はマロン酸を添加したときで最も高い活性を示した。(Fig.7) したがって、この PP1 阻害活性物質の生合成にはマロン酸が大きく寄与していることが考えられる。

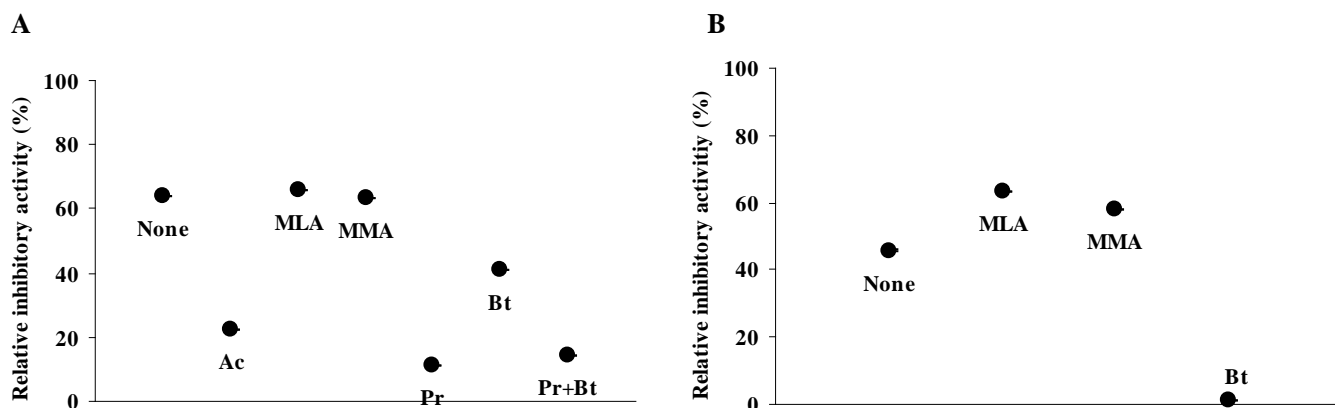


Fig.7 PP1 inhibitory activity of extracts. Extracts were dissolved in 50 μ l DMSO , and then they were diluted by 50-fold (A) and 100-fold (B) , representatively.

4. まとめ

HPLC 分析および PP1 阻害活性試験から本研究で用いた TC 生産株は、紫外線による変異処理によって TC 生産能を失う代わりに、新規 PP1 阻害活性物質の生産能を獲得したと考えられる。現在は、このピーク II に相当する化合物の構造決定に向け単離・精製を試みている。

5. 参考文献

- 1) 室伏きみ子, 関啓子 監訳, 『Brock 微生物学』(2002),オーム社
- 2) X.-C.Cheng., et al: *J.Antibiot.*,**42**,141-144 (1989)
- 3) X.-C.Cheng., Ubukata M., and Isono K: *J. Antibiot.*, **43**,890-896(1990)
- 4) Mitsuhashi S., and Ubukata M., et al: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,**287**,328-331(2001)
- 5) 秋山徹, 河府和義, 編集, 『阻害剤活用ハンドブック』(2006), 羊土社
- 6) Magae J., et al: *Proc. Jpn. Acad. B: Phys. Biol. Sci.*,**66**,209-212 (1990)
- 7) Kita A., Matsunaga S., et al: *Structure.*,**10**,715-724(2002)
- 8) Ubukata M., X.-C.Cheng., Uzawa J., and Isono J: *J.Chem.Soc.*,**19**,2399-2404(1995)

P-5.エゾマツ晩材部における褐色腐朽の進行に伴うせん断破壊状況の変化

(北大院農) ○石原亘、澤田圭、佐野雄三、玉井裕、宮本敏澄、
平井卓郎、小泉章夫、佐々木義久(北林産試) 東智則、森満範

【緒言】

木材を長期間使用する際、褐色腐朽菌によって引き起こされる褐色腐朽は木材の物理的性質を速やかに劣化させることは古くから知られているが^{1,2)}、その機構に関しては未だに不明な点が多い。本研究では、腐朽材に対して JIS せん断強度試験を行い、その破壊面をとりわけ晩材部に着目して観察することで、褐色腐朽菌の腐朽機構に対して一考察を与えることを目的とした。

【材料及び試験方法】

〔試験体の作製〕

材料には、トドマツと同様に主要な道産材の一つであるエゾマツ (*Picea jezoensis*) の正角材を用い、せん断試験体 28 体、及びエンドマッチさせた同数のコントロール試験体、質量減少測定用の試験体を作製した。せん断強度の測定は JIS Z 2101、質量減少率の測定は JIS Z 2101 (耐朽性試験) に則って行った。各試験体寸法は、せん断強度試験体が 20×20×30mm・切欠き部分 10×20×10mm の椅子型で、質量減少率測定用試験体が 20×20×20 mm とした。

〔腐朽処理〕

腐朽処理には褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) を使用した。図 1 に示すように、培地 (石英砂+培養液 (D-グルコース 4.0%、麦芽抽出物 1.5%、ペプトン 0.3%)) は直径約 50 mm の培養ビン内に作製し、腐朽菌を培養後に試験体を接地させた。また、せん断強度試験体を腐朽させるにあたっては、図 2 に示すように、

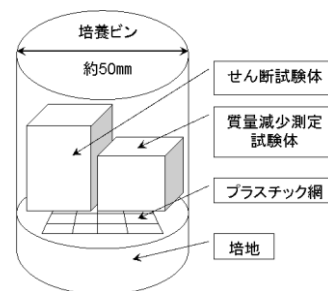


図 1 腐朽処理の方法

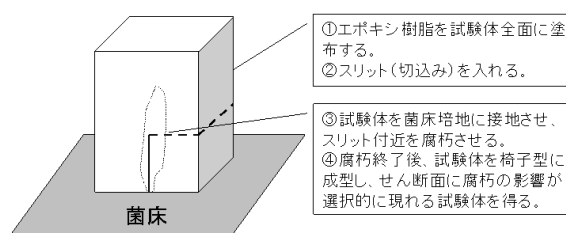


図 2 せん断試験体腐朽方法

エポキシ樹脂を試験体表面に塗布し、せん断面にのみ腐朽の影響が及ぶようにし、加圧面での腐朽による

変形が生じないようにした。腐朽は 24℃ の恒温室で行い、表 1 に示すように複数の培養期間を設定した。

表 1 試験体の腐朽

腐朽期間(週間)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	合計
試験体数	4	4	4	4	4	2	2	2	2	28

〔破壊面の観察〕

JIS せん断試験は、試験時においてせん断面内での応力分布が位置によって大きく異なることが知られており³⁾、破壊点付近にあたる「せん断面上端部」と、垂直応力の影響が最も少ない「せん断面中心部」を今回の観察の対象とした。図 3 に示すように試験体の 2 ヶ所から試験片 (約 6 mm×6 mm×1 mm) を採取し、SEM 試料台に接着後に白金 (Pt) を蒸着させ観察試料とした。破壊面の観察には高分解能走査型電子顕微鏡・JSM-6301F (日本電子) を用いた。

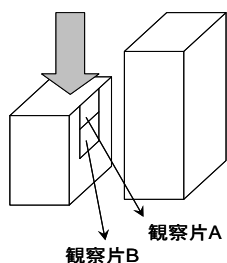


図 3 観察片の採取

【結果】

腐朽させた試験体の破壊面を観察し、健全材との比較を行った。図 4 に初期腐朽の状態にあると思われる試験体のせん断面上端部における観察例を示す。なお、今回の試験では、質量減少率が 20%未滿の試験体ばかりであったが、僅少な質量減少であっても、せん断強度が大きく低下している試験体が見つかった。

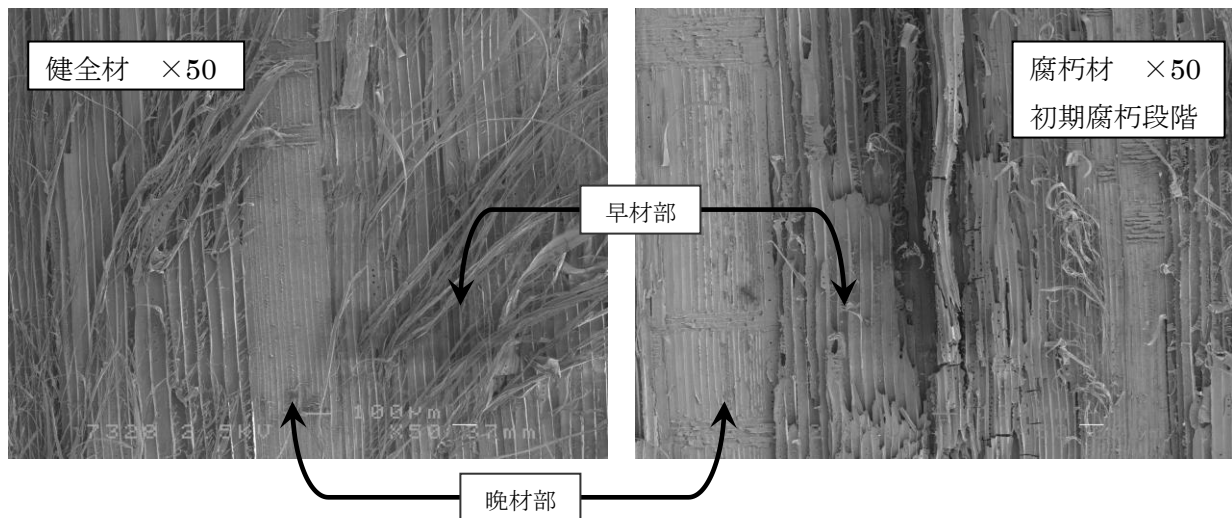


図4 健全材及び腐朽材のせん断試験体破壊面の概観

【考察】

針葉樹材を引張り破壊させた際に、晩材部の細胞壁境界付近では、繊維軸方向に沿った長い破壊（縦裂破壊）が、早材部では仮道管を横切る破壊が（直交破壊）観察されることは既に報告されている⁴⁾。せん断試験体の破壊面の観察でも同様の傾向が見られ、早材部では細胞壁を切断するような破壊を示しているのに対し、健全材の晩材部の破壊はほとんど細胞間層あるいは一次壁(P層)で破壊していた。また、早材部仮道管を構成するマイクロフィブリルの裂け破壊の痕跡があり、いわば破壊面に“毛羽立ち”があるように見えた。一方の腐朽材においては、早材部ではマイクロフィブリルの“毛羽立ち”が見られなくなり、また、腐朽の進行に伴い、セルロース鎖の切断に起因すると思われる微小なクラックが仮道管に多数見られるようになった。晩材部の場合は腐朽の進行に伴って早材部同様に細胞壁の切断破壊が見られるようになるもののその発現は遅く、初期腐朽においては健全材同様の破壊状況を呈していた。

観察結果より、晩材部の明白な劣化に先立って、二次壁におけるマイクロフィブリルの破壊様式の変化が腐朽初期における強度の低下に影響していることが示唆された。昨今、褐色腐朽による急速な強度低下とヘミセルロースの低分子化の関連を指摘する報告が多数なされている^{5,6)}。今後は、より高倍率下での詳細な破壊面の観察と、それに対応する化学組成の変化を把握し、多方面から腐朽機構の解析を試みていきたい。

【参考文献】

- 1) 高橋旨象, 木材の腐朽機構に関する研究(第1報)腐朽にともなうブナおよびスギ材の強度の変化, 木材研究:京都大学木材研究所報告, 41:75-89(1967)
- 2) Susumu Mizumoto, The Effect of Decay caused by *Gloeophyllum trabeum* on the Strength Properties of Japanese Red Pine Sap-wood, 日本林学会誌, 48:7-11(1966)
- 3) 大草克己, 木材のせん断に関する弾塑性論および破壊力学的研究(第3報)椅子型(JIS)せん断試験体の応力特異性とエネルギー解放率, 鹿児島大学農学部学術報告, 30:201-215(1980)
- 4) 古川郁夫, 木質系材料の安全に関する研究(I)フラクトグラフィ的手法による材質劣化度の評価, 鳥取大学演習林研究報告 17:151-169(1988)
- 5) Simon F. Curling, Carol A. Clausen, Jerrold E. Winandy, Relationships between mechanical properties, weight loss, and chemical composition of wood during incipient brown-rot decay, forest products journal 52:34-39(2002)
- 6) Jerrold E. Winandy, Modeling strength loss in wood by chemical composition. Part1. An individual component model for southern pine, Wood and fiber Science 33:239-254(2001)

【緒言】

屋外構造物や住宅の土台など高度な耐朽性および耐蟻性が要求される用途に木材を用いる場合、防腐防蟻処理（保存処理）木材の使用が求められる。保存処理木材に関する日本農林規格（JAS）¹⁾では、処理木材の中央部断面における薬剤の浸透面積に関する基準が設けられている。この基準は辺材と心材で異なっているため、処理木材の中央部断面における辺材と心材を区別する必要がある。

スギやカラマツなどは、目視可能な着色心材を形成するため辺心材の区別が容易である。しかし、着色心材を形成しないトドマツの場合、生材では含水率差に基づく外観の差により判別が可能であると考えられる。しかし、乾燥材では目視による判別は不可能である。

近赤外（NIR）分光分析と統計解析を組み合わせることで、非破壊かつ迅速に木材の様々な形質を評価できることが報告されている²⁻⁵⁾。また、Scots Pine⁶⁾や Norway Spruce⁷⁾について、NIRを用いた辺心材判別が可能であることが報告されている。そこで本研究ではトドマツの辺心材の NIR 分光分析による判別が可能かどうか予備的検討を実施したので、その結果について報告する。

【実験】生材時に目視による判別に基づき分別したトドマツ辺材および心材から 2 cm (T) × 2 cm (R) の断面をもつ杭を作成した。これらから 2 cm (T) × 2 cm (R) × 1 cm (L) のブロックを切り出し試験体とした。辺材、心材それぞれ 24 個のうち 18 個ずつをトレーニングセット、6 個ずつをテストセットとして用いた。非接触拡散反射ヘッドを接続した MATRIX-F (Bruker Optics K.K) を用い、各試験体の木口面を測定し、4000-9000cm⁻¹ の NIR スペクトルを得た。得られた NIR スペクトルおよび前処理として二次微分 (Savitzky-Golay: 19point) を行ったものを用い、PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) による判別分析を実施した (The Unscrambler 9.8、CAMO)。

【結果と考察】

トレーニングセットを測定して得られた NIR スペクトルは、試験体毎のベースラインシフトが大きく、またピークもブロードであり辺心材に特徴的な傾向は認められなかった。そこで、前処理として、二次微分を行い、PLS-DA を実施した。

PLS-DA ではクラスを分類するため目的変数 (Y) として各クラスにダミー変数を設定し、PLS モデルを作成する。本検討では“辺材”と“心材”クラスを分類するため、ダミー変数として辺材を 1、心材を 0 に設定し、波数域 4000-9000 cm⁻¹ の二次微分スペクトルを用いて PLS モデルを作成した。このモデルを用い PLS-DA を行うと、Y の予測値 (Y_{pred}) が得られるが、これが 0.5 よりも大きい場合は 1 (辺材) と、0.5 よりも小さい場合は 0 (心材) と予測される。また、トレーニングセットとの類似度表す指標としての偏差 (Deviation) が 0.5 を超えると、Y_{pred} の値が信頼できなくなる

表1 二次微分スペクトルを用いたPLS-DAの結果

Sample Name	Y _{pred}	Deviation
sapwood 1	0.994	0.245
sapwood 2	1.255	0.340
sapwood 3	1.223	0.425
sapwood 4	0.910	0.365
sapwood 5	1.221	0.330
sapwood 6	1.164	0.361
heartwood 1	0.429	0.373
heartwood 2	-0.059	0.338
heartwood 3	0.108	0.290
heartwood 4	0.009	0.307
heartwood 5	0.159	0.292
heartwood 6	0.000	0.446

* Y_{pred}>0.5かつDeviation<0.5は1 (辺材) と予測
Y_{pred}<0.5かつDeviation<0.5は0 (心材) と予測

テストセットについて PLS-DA を実施した結果、辺材の Y_{pred} はすべて 0.5 よりも大きく、心材の Y_{pred} は 0.5 よりも小さく、いずれの Deviation も 0.5 を超えていなかった（表 1）。このことから、PLS-DA によってテストセットの辺材と心材が正しく予測されることが確認された。

次に、前処理を行わない NIR スペクトルを用い、二次微分スペクトルの場合と同様の条件で PLS モデルを作成し、PLS-DA を実施した。表 2 に示すように、心材の一つ（heartwood3）が正しく予測されなかったが、その他については正しい予測を得ることができた。

以上の結果、NIR 分光分析と PLS-DA を用いることでトドマツの辺心材を判別できる可能性があることが示された。

【謝辞】本研究の一部は、「平成 22 年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」（課題名：北海道産人工林材を活用した低コストで高性能な単板集成材の開発と実用化）により実施された。

【引用文献】

- 1) 農林水産省告示第 1083 号 製材の日本農林規格（平成 19 年 8 月 29 日）
- 2) Tsuchikawa S.: Applied Spectroscopy Review, 2007, 42, 42-71
- 3) Fujimoto T; Kurata, Y; Matsumoto, Y; Tsuchikawa S.: Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2008, 16, 529-537
- 4) Fujimoto T; Kurata Y; Matsumoto K; Tsuchikawa, S: Applied Spectroscopy, 2010, 64
- 5) Fujimoto T; Tsuchikawa S: Journal of Near Infrared Spectroscopy, in press
- 6) Flaete PO; Haartveit EY: The International Research Group on Wood Preservation, 2003, IRG/WP 03-10459
- 7) Sandber K; Magdalena S: European Journal of Forest Research, 2009, 128, 475

表2 NIRスペクトルを用いたPLS-DAの結果

Sample Name	Y_{pred}	Deviation
sapwood 1	0.784	0.176
sapwood 2	1.386	0.172
sapwood 3	0.849	0.234
sapwood 4	0.569	0.250
sapwood 5	0.945	0.282
sapwood 6	1.538	0.216
heartwood 1	0.087	0.210
heartwood 2	-0.083	0.139
heartwood 3	0.534	0.158
heartwood 4	0.025	0.257
heartwood 5	0.158	0.262
heartwood 6	0.126	0.201

* $Y_{pred} > 0.5$ かつDeviation<0.5は1（辺材）と予測

$Y_{pred} < 0.5$ かつDeviation<0.5は0（心材）と予測

P-7. 土壌含水比の変化がカラマツ立木の根鉢回転剛性に与える影響

○ 関矢陽、佃猛司、佐々木義久、小泉章夫（北大院農）

1. はじめに

台風などによる強風は、森林経営に大きな被害をもたらすことがある。被害の多くは根返り、幹折れ、枝折れである。根返りに対する根鉢の抵抗力は森林の風倒害防除、街路樹の安全な管理を行う上で、重要な指標となるものと考えられる。そのため、樹木の引き倒し試験によって、根返りに対する根鉢の抵抗力が、求められてきた。しかし、引き倒し試験では、風荷重のように樹木が繰り返し荷重を受けることによる根鉢の抵抗力への影響は考慮されていない。また、降雨による土壌水分の影響も考慮されていない。

そこで、本研究は、複数の異なった土壌含水比の条件において、繰り返し曲げ剛性試験を行うことにより、土壌含水比が立木の根鉢の回転剛性に与える影響を考察することを目的とした。

2. 試験方法

2. 1 载荷除荷繰り返し曲げ剛性試験

北海道大学札幌研究林札幌試験地のカラマツ6本を試験木とした。これらの試験木に対し、载荷除荷5回繰り返しで曲げ剛性試験を行った。荷役用スリングに連結したワイヤーを手動ウィンチで巻き上げて荷重を掛けた。実験は8~9月の期間に供試木1本あたり6~11回行った。荷重レベルは、風速10m/sの風によって、それぞれの試験木の根鉢が受けるモーメントとした。荷重(P)はスリングとワイヤーに連結したロードセルを用いて検出し、樹幹の水平変位(δ)は地上0.05mと1.3mの高さで計測した。荷重と変位はデータロガーに0.5秒間隔で記録した。この試験の概略図を図1に、試験木の形状、加力点高さ、試験木からアンカーまでの距離を表1に示す。

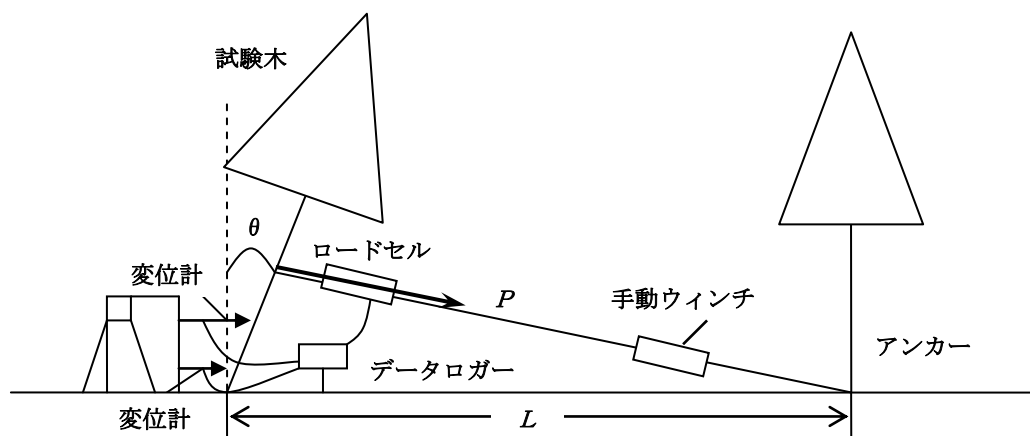


図1. 载荷除荷繰り返し曲げ剛性試験の概略図

表 1. 試験木の形状、加力点高さ、試験木からアンカーまでの距離

No.	D_B (cm)	H (m)	H_C (m)	B_C (m)	A (m^2)	H_P (m)	L (m)	P_W (kN)
1	16.7	13.6	3.0	4.8	25.4	2.4	11.1	762
2	20.3	10.8	2.4	3.7	15.5	2.5	12.0	465
3	12.7	10.4	2.2	2.5	10.3	2.5	12.1	309
4	23.2	18.9	8.4	2.9	15.2	2.5	11.9	456
5	33.9	19.5	14.3	8.5	22.1	2.5	10.2	669
6	25.0	22.2	7.4	3.3	24.4	2.5	10.2	732

D_B : 胸高直径 H : 樹高 H_C : 枝下高 B_C : 樹冠幅

A : 樹幹投影面積 H_P : 加力点高さ L : 試験木からアンカーまでの距離

P_W : 風速 10m/s の風によって樹幹が受ける風荷重計算値

樹冠の形状は三角形仮定、風圧力を受ける樹冠中心は樹冠高さの 3 分の 1 の位置として、風速 10m/s の風によって樹冠が受ける風圧力 (P_W) は (1) 式から求めた。

$$P_W = \frac{1}{2} \rho v^2 A \cdot C_D \quad (1)$$

ここで、 v は風速 (m/s)、抵抗係数 C_D は 0.5、空気密度 ρ は 1.20 kg/m³ とした。

2. 2 土壌含水比の測定

電極式土壌含水比計 (電極 : Delta-T Devices 社製 SM200 ロガー : Delta-T Devices 社製 HH2) を使用し地表面の土壌含水比 (%vol) をそれぞれの試験木の根本から 50cm 間隔で 3m まで計測した。この計測は曲げ剛性試験と同日に行った。

3. 結果と考察

それぞれの試験木の見かけの回転角 θ (rad) は (2) 式によって求めた。ここで回転中心は地表面にあり、樹幹の撓みは考慮しないこととした。

$$\theta = \arctan\left(\frac{\delta_{1.3} - \delta_{0.05}}{1300 - 50}\right) \quad (2)$$

$\delta_{1.3}$: 地上高 1.3m の樹幹水平変位 (mm)

$\delta_{0.05}$: 地上高 0.05m の樹幹水平変位 (mm)

荷重により根鉢に作用するモーメント M は (3) 式から求めた。このとき、荷重の水平成分のみを考慮し、樹幹が回転することによって生じる荷重の鉛直成分と樹冠重量による

付加モーメントは無視することとした。

$$M = P \cos \left(\arctan \left(\frac{H_p}{L} \right) \right) \cdot H_p \quad (3)$$

根鉢に作用するモーメントと見かけの回転角の一例を図2に示す。

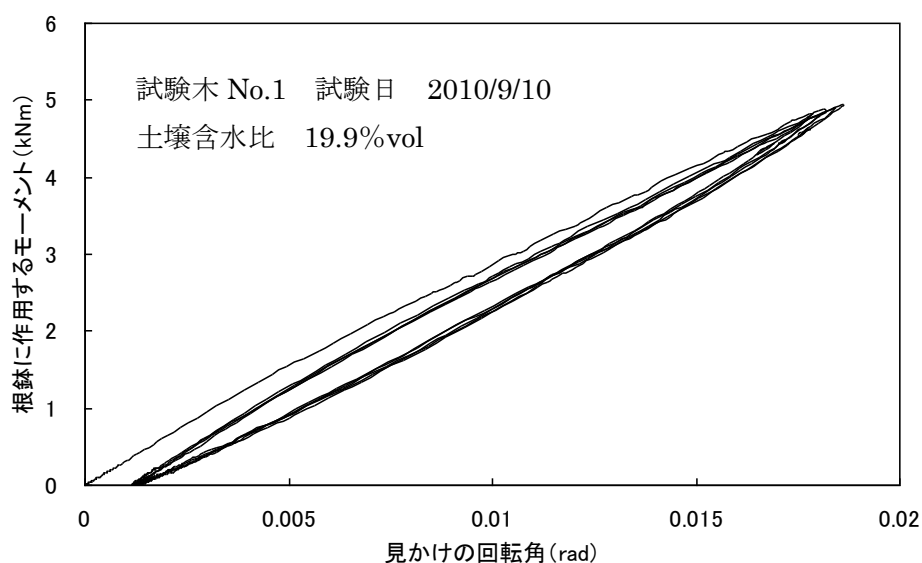


図2. 根鉢に作用するモーメントと見かけの回転角

1回目の荷重除荷では根鉢の回転が残留するが、2回目以降の荷重除荷ではほぼ同じ軌跡を描いている。1回目から2回目の見かけの回転角の残留が顕著なことに対し、荷重レベルでの見かけの回転角は1回目から5回目にかけてほとんど変化は見られない。それぞれのループの荷重開始時と除荷開始時の割線の傾きを根鉢の回転剛性と定義すると、上記の事柄からも回転剛性が2回目で顕著に増加したことがわかる。

この1回目の荷重除荷後の根鉢の回転の残留と回転剛性の増加は、土壌の塑性変形と、根系木部の遅延弾性の関与が考えられる。

試験木 No.1 の土壌含水比と一回目荷重除荷による根鉢の残留回転角の関係を図3に、土壌含水比測定日と土壌含水比を表2示すに示す。土壌含水比は樹木の根元での測定値を使用した。

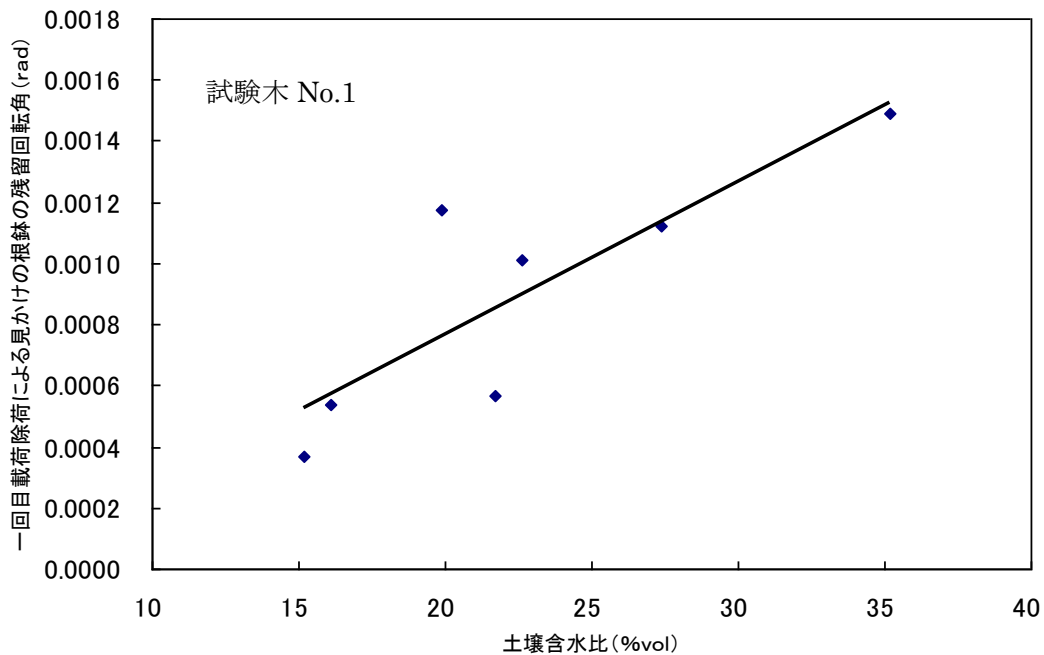


図 3. 土壌含水比と一回目載荷除荷後の見かけの根鉢の残留回転角の関係

表 2. 試験木 No. 1 の土壌含水比測定日と土壌含水比

測定日	8/9	8/21	8/22	8/24	8/31	9/7	9/10
土壌含水比 (%vol)	35.2	15.2	16.1	27.4	22.6	21.7	19.9

図 3 より、土壌含水比と根鉢の残留回転角には正の相関がみられ、土壌含水比が大きくなるにつれ、土壌が変形しやすく根鉢が回転しやすくなることがわかる。両者の関係の相関係数は 0.84 と大きかった。

これらの事柄が大雨と強風が同時に起こる場合の危険度にどれほどの影響を与えるのか今後の研究が必要である。

4. まとめ

- ・繰り返し曲げ剛性試験では 1 回目の載荷除荷後の見かけの根鉢の回転角の残留が顕著であった。
- ・繰り返し曲げ剛性試験では 2 回目以降の載荷除荷ではほぼ同じ軌跡を描くことがわかった。
- ・土壌含水比と 1 回目載荷除荷後の根鉢の見かけの残留回転角には正の相関があった。

日本木材学会 北海道支部講演集 第42号

平成22年11月9日 発行

編集人 小泉 章夫

発行人 青山 政和

発行所 日本木材学会 北海道支部

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

北海道大学農学部内
