

日本木材学会

北海道支部講演集

第 47 号

平成 27 年 11 月

日本木材学会北海道支部

旭 川

日本木材学会北海道支部講演集

第47号

目次

<口頭発表> 13:10-14:40

- 0-1) 暖温帯域にはなぜ環孔材型の通水様式をもつ種が少ないのか? ..... 1  
○梅林利弘 (北大院農), 福田健二 (東大院新領域)
- 0-2) 針葉樹分解性の白色腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea* のトランスクリプトーム解析 ..... 4  
○堀 千明 (北大院農), 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院農), Jill Gaskell,  
Dan Cullen (USDA-FPL)
- 0-3) ウダイカンバ枝条におけるコルク形成層活動の季節変化 ..... 5  
○渋井宏美, 佐野雄三 (北大院農)
- 0-4) マイタケ「大雪華の舞1号」の腸内環境改善効果 ..... 8  
○佐藤真由美, 東 智則, 米山彰造 (北林産試),  
韓圭鎬, 末岡さつき, 得字圭彦, 島田謙一郎, 木下幹朗, 福島道広 (帯畜大・食品科学)
- 0-5) カラマツ樹皮抽出液に含まれる糖類とフェノール類の疎水性イオン液体を用いた分離 ..... 11  
○檜山 亮, 折橋 健 (北林産試)
- 0-6) PEG リグニン由来の電気二重層キャパシタ用セパレータの開発 ..... 15  
○久保田惇, 磯崎友史 (北大院農), 山田竜彦 (森林総研), 幸田圭一, 浦木康光 (北大院農)

<展示発表> 14:40-15:40

- P-1) ミズナラ外樹皮由来のトキシプラズマ症治療薬シードの探索 ..... 17  
○遠藤麻理奈 (北大農), 重富顕吾, 三橋進也, 五十嵐 慎 (帯畜大・原虫研), 生方 信 (北大院農)
- P-2) 交雑ポプラの超低温保存に関する研究 ..... 20  
○川村浩平 (北大農), 嘉見大助 (北農業研セ), 鈴木伸吾, 桜井健至, 荒川圭太 (北大院農)
- P-3) 樹木における氷核活性の検出 ..... 23  
○鉄穴口晃 (北大農), 鈴木伸吾, 荒川圭太 (北大院農)

P-4) 北海道産材を用いた枠組壁工法耐力壁の面内せん断性能	27
○戸田正彦, 大橋義徳, 古田直之 (北林産試)	
P-5) 造林木ヤング率の非破壊測定法の検討 ー曲げ試験と応力波伝播速度試験	31
○日置絵里香, 小泉章夫 (北大院農), 鳥田宏行 (北林試)	
P-6) 土壁のせん断性能が伝統的建築物の耐震診断に与える影響	33
○山田南美 (北大農), 澤田圭 (北大院農), 山田大樹 (芽室町役場)	
P-7) 北海道に産するスギタケ属の系統解析	37
○相澤桃子, 玉井 裕, 宮本敏澄, 矢島 崇 (北大院農)	
P-8) クマイザサを用いた簡易なきのこ栽培法	41
○大石 哲, 玉井 裕, 宮本敏澄, 矢島 崇 (北大院農)	
P-9) タモギタケの生長に及ぼす光照射の影響	44
○横山貴史 (北大農), 玉井 裕, 宮本敏澄, 矢島 崇 (北大院農)	
P-10) ムラサキシメジの栽培	48
○吉田有希 (北大農), 玉井 裕, 宮本敏澄, 矢島 崇 (北大院農)	
P-11) シイタケ菌床栽培用の広葉樹おが粉の糖化性に関する予備的検討	51
○折橋 健, 檜山 亮, 原田 陽 (北林産試), 村山大雅 (旭川高専)	
P-12) (-)-Epogymnolactam の合成研究	53
○上田一貴 (北大農), 岡戸祐治, 重富顕吾, 生方 信 (北大院農)	
P-13) 水溶性酢酸セルロースの電界紡糸とコンポジット化	56
○鶴原正啓, 幸田圭一, 浦木康光 (北大院農)	

※口頭発表座長：O-1～3 山岸祐介 (北大院農) ; O-4～6 本間千晶 (北林産試)

**<特別講演> 15:55-16:25**

「溶液化木材をもとにした活性炭素繊維の調製 ー細孔構造と吸着特性ー」

趙広傑 教授 (北京林業大学)

○梅林利弘（北大院農），福田健二（東大院新領域）

### 【要約】

暖温帯域における広葉樹の環境適応戦略を水利用の面から説明する目的で，広葉樹 5 種における木部水分分布の季節変化を低温走査電子顕微鏡を用いて組織学的に検討した．その結果，環孔材樹種は，一度の凍結・融解サイクルによりほとんどの孔圏道管がその機能を失うため，樹液の凍結が起きる地域では通水性の著しい損失を落葉により回避する必要があると考えられた．一方，凍結・融解サイクル数が少ない暖温帯域では，散孔材樹種は冬季の通水性の損失はほとんどみられなかった．また，環孔材樹種は他の樹種よりも落葉時期が早かった．凍結・融解サイクル数の少ない暖温帯域において，環孔材型の通水様式をもつ種は光合成を行う期間が制限される傾向があるため，散孔材型の通水様式が有利になりやすいと考えられた．

### 【緒言】

陸上植物の水損失の大半は，葉からの蒸散によるものであり，その水は土壌の根から仮道管や道管により構成される木部通水経路を通じて補われる．日本において，北海道を含む寒冷地に分布する落葉広葉樹の通水様式は，管孔性の違いにより 2 つに大別される(Umebayashi et al. 2008)．年輪の前半部に大径の孔圏道管を形成する環孔材樹種では，主に当年の孔圏道管が通水に関与し（以下，環孔材型），年輪内にはほぼ均一に比較的小径の道管を形成する散孔材樹種では，数年の道管が関与する（以下，散孔材型）．

この 2 つの通水様式の違いは，冬季の樹液の凍結・融解サイクルに伴う道管内での通水阻害（キャビテーション）の発生とキャビテーションを起こした道管の機能回復（リフィル）により生じることが知られている(Utsumi et al. 1996, 1998)．大径の道管は高い水輸送効率をもたらすが，凍結ストレスに対し非常に脆弱である（Utsumi et al. 1996）．孔圏道管は，たった一度の凍結・融解サイクルによりキャビテーションを引き起こし（Utsumi et al. 1999），その機能が失われるが，小径の道管は複数回の凍結・融解サイクルに耐える．このことに関し，内海らは北海道に生育する環孔材樹種のヤチダモと散孔材樹種のシラカンバおよびオノエヤナギにおける木部水分分布の季節変化を調べており（Utsumi et al. 1996, 1998），夏季ではいずれの樹種もキャビテーションの発生による通水性の低下はほとんど認められなかったが，ヤチダモの孔圏道管は 11 月で，シラカンバおよびオノエヤナギの道管は 1 月から 3 月にかけてキャビテーションを引き起こした道管数が増加したことを報告している．さらに，散孔材樹種のみで 4 月にリフィルがおきたことも報告している．すなわち，凍結・融解サイクルが繰り返される寒冷地の場合，広葉樹は冬季のキャビテーションによる通水性の低下を落葉により回避していると考えられる．

これらの知見からすると，大径の道管は通水効率が高いため，暖温帯域では大径の道管を形成する樹種は通水面においてより有利になると考えられるが，温帯域の常緑広葉樹 34 種の通水様式を調査した報告では，環孔材型を持つ樹種はわずか 2 種であった（Umebayashi et al. 2010）．この事実から，水利用の観点から考えた場合，環孔材型の通水様式は暖温帯域において不利に働く原因があると予想される．そこで本研究では，暖温帯域における環孔材型および散孔材型の通水特性を明らかにすることを目的とし，広葉樹 5 種の木部水分分布の季節変化を低温走査電子顕微鏡（cryo-SEM）を用いて組織学的に検討した．

### 【実験方法】

#### 試料

東京大学千葉演習林札郷試験地の苗畑に植栽されている落葉環孔材 1 種（イヌエンジュ），落葉散孔材 2 種（イヌウメモドキ，ミツバツツジ）と常緑散孔材 2 種（シロダモ，バリバリノキ）を各種につき 12 本使用した．試験期間（2010 年 5 月から 2011 年 3 月まで）における最高気温は 8 月の 35.2°C であり，最低気温は 2011 年 1 月の -6.6°C であった．

## 方法

2010年5月から2011年3月までの期間において、2ヶ月毎に樹幹から凍結試料（各種につき2本ずつ）を夜明け前に採取した(Umebayashi et al. 2015). また、9月に各樹種の夜明け前の葉の水ポテンシャルをプレッシャーチェンバー（model 3000, Soilmoisture Equipment Corp., CA, USA）により測定した。

凍結試料を得るために、プラスチック製の漏斗を樹幹に設置し、漏斗内に液体窒素を注ぎ入れ、樹幹を5分間凍結させた。ノコギリを用いて凍結部位から長さ5cmの試料を採取し、直ちにデュワー瓶に入れ、実験室に持ち帰った。冷凍庫（-27℃）内で、凍結試料の中央からブロック片（約6×6×10 mm<sup>3</sup>）を切り出し、その横断面をスライディングマイクロームにより平滑にした後、直ちに液体窒素内に入れた。液体窒素内で試料ホルダーにブロック片を固定し、cryo-SEM (JSM-6390 LV, JEOL, Tokyo, Japan)を用いてその横断面の水分布を無蒸着のまま加速電圧3.0 kVで検鏡およびその画像を取得した。

## 【結果および考察】

### 環孔材型

5月において、当年の孔圏道管はすでに形成されており、大半の道管の内腔は水で満たされていた。9月においても孔圏外道管を含む大半の道管の内腔は水で満たされていた（図 1A）。9月の時点で夜明け前の水ポテンシャルが-0.30 MPa 以上であったことから、乾燥ストレスはほとんど受けていないと考えられた。11月になるとすでに落葉していたが、孔圏道管の多くは未だ水で満たされていた。1月になると孔圏道管の大半と多くの孔圏外道管の内腔では水が消失していた（図 1B）。

Utsumi ら(1996)は北海道におけるヤチダモの落葉は10月から11月の期間で起き、孔圏道管のキャビテーションは11月で起きたと報告している。暖温帯域における12月の最低気温は-2.8℃であり、12月までは凍結・融解サイクルによるキャビテーションの発生は起きず (Taneda & Tatenno 2005), 1月で発生したと考えられる。すなわち、北海道の樹種と比較すると約2ヶ月もの期間通水を行うことが可能であったと考えられるが、落葉によりその機能を十分に生かすことができなかつたと考えられる。また、高い通水効率は水の消費が激しい夏季には有用ではあるが、冬季に有用であるかどうかはわからない。したがって、たった一度の凍結を回避するための「早期の蒸散の停止」が環孔材型の通水様式の特徴の一つであると考えられた。

### 散孔材型

5月から9月までミツバツツジを除く3種では、当年に形成された木部において、大半の道管の内腔は水で満たされていた。また、9月の水ポテンシャル値はバリバリノキで最も低かったが、-0.35 MPa 以上であり、ほとんど水ストレスを受けていないと判断することができた。シロダモは11月、イヌウメドキは1月において、いくつかの道管の内腔では水が消失していたが、3月までその数はほとんど変わらなかった。バリバリノキは年間を通じて大半の道管の内腔が水で満たされていた（図 1C）。一方、ミツバツツジは5月の時点で形成層付近のいくつかの道管の内腔で既に水が消失しており、7月になると年輪中央付近における多くの道管の内腔で水が消失していた。11月になると中央から晩材にかけてほとんどの道管の内腔で水が消失したが、早材では多くの道管が水で満たされていた。いずれの樹種も、1月と3月の木部水分分布は11月と大きな違いは見られなかった。なお、11月ではいずれの樹種も落葉していなかったが、落葉樹2種では1月で落葉が確認された。

散孔材型はいずれの樹種も冬季に著しい通水性の低下を引き起こすことはなく、落葉樹もイヌエンジュと比較するとより長い期間葉を維持していた。Utsumi ら (1998) は北海道におけるシラカンバとオノエヤナギの落葉は11月では起きていたと報告している。暖温帯域において、落葉期のより遅くなる傾向は主に散孔材型で見られる特徴なのかもしれない。凍結・融解サイクル数の減少はおそらく散孔材型にメリットが多く、暖温帯域に常緑広葉樹が分布する理由として、冬季のキャビテーションによる通水性の低下を起こす危険性がほとんど無くなるためであろうと考えられる。ただ、ミツバツツジにおいて、晩材の多くの道管が夏季にキャビテーションを起こした理由については、今のところよくわからない。

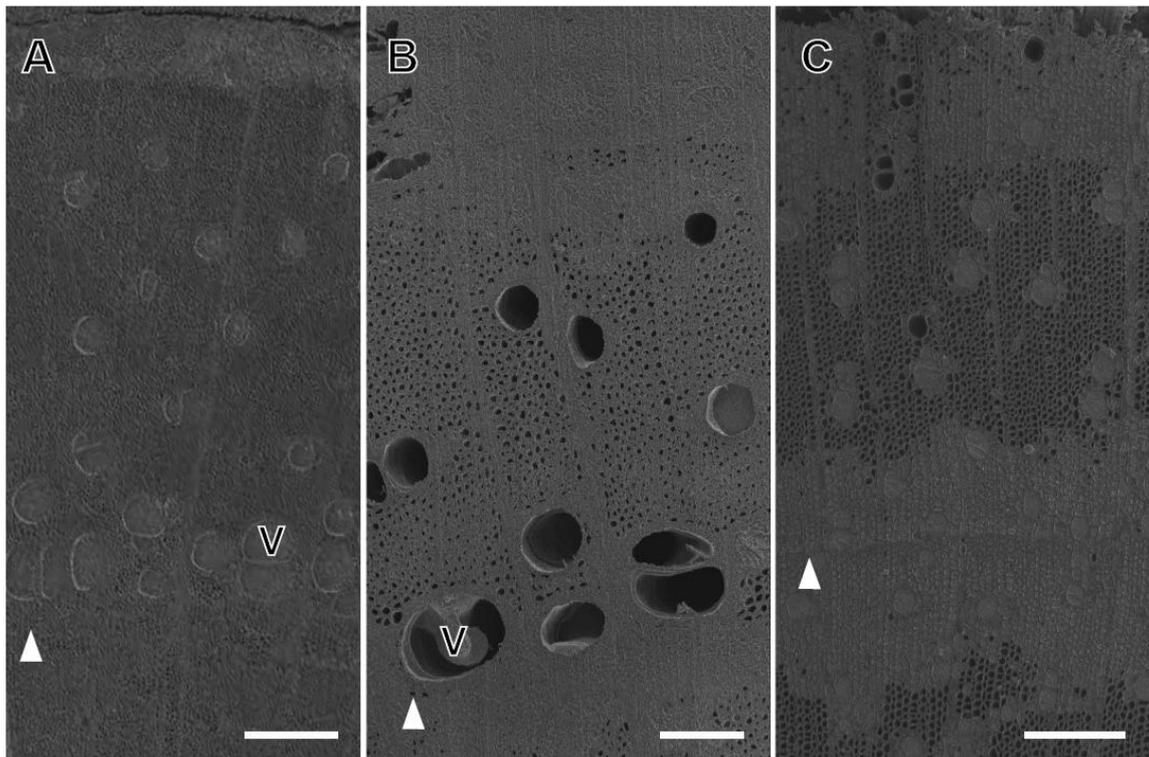


図 1. イヌエンジュ[9 月 (A)と 1 月(B)]およびバリバリノキ[1 月(C)]における当年に形成された木部水分分布. V は孔圏道管, 矢頭は年輪界を示す. スケールバー (A, C) = 200  $\mu\text{m}$ , (B) = 100  $\mu\text{m}$

【文献】

- Taneda, H. & Tateno, M. (2005) Hydraulic conductivity, photosynthesis and leaf water balance in six evergreen woody species from fall to winter. *Tree Physiol* 25, 299–306
- Umebayashi, T., Ogasa, M.Y., Miki, N.H., Utsumi, Y., Haishi, T. & Fukuda, K. (2015) Freezing xylem conduits with liquid nitrogen creates artifactual embolisms in water-stressed broadleaf trees. *Trees* doi: 10.1007/s00468-015-1302-4
- Umebayashi, T., Utsumi, Y., Koga, S., Inoue, S., Fujikawa, S., Arakawa, K., Matsumura, J. & Oda, K. (2008) “Conducting pathways in north temperate deciduous broadleaved trees.” *IAWA J* 29, 247–263
- Umebayashi, T., Utsumi, Y., Koga, S., Inoue, S., Matsumura, J., Oda K., Fujikawa, S., Arakawa, K. & Otsuki, K. (2010) Xylem water-conducting patterns of 34 broadleaved evergreen trees in southern Japan. *Trees* 24, 571–583
- Utsumi, Y., Sano, Y., Fujikawa, S., Funada, R. & Ohtani, J. (1998) Visualization of cavitated vessels in winter and refilled vessels in spring in diffuse-porous trees by cryo-scanning electron microscopy. *Plant Physiol* 117, 1463–1471
- Utsumi, Y., Sano, Y., Funada, R., Fujikawa, S. & Ohtani, J. (1999) The progression of cavitation in earlywood vessels of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* during freezing and thawing. *Plant Physiol* 121, 897–904
- Utsumi, Y., Sano, Y., Ohtani, J. & Fujikawa, S. (1996) Seasonal changes in the distribution of water in the outer growth rings of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*: a study by cryo-scanning electron microscopy. *IAWA J* 17, 113–124

## 針葉樹分解性の白色腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea* のトランスクリプトーム解析

○ 堀 千明 (北大院農), 石田卓也, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩 (東大院農),  
Jill Gaskel, Dan Cullen (USDA-FPL)

### 【緒言】

木材腐朽菌は自然界で最も効率良く木材成分を分解できる生物である。しかしながら、杉や松などに代表される針葉樹には、テルペンや脂質などの抗菌性を持つ抽出成分が多く含まれているため、針葉樹を分解できる腐朽菌は多くない。その中で、白色木材腐朽菌 *Phlebiopsis gigantea* は、伐採されたばかりで抽出成分を多く含む針葉樹を分解できる珍しい菌である。それにも関わらず、本菌がどのように針葉樹を分解しているのかに関しては、これまでほとんど研究がなされていなかった。そこで本研究では、取得した本菌の全ゲノム配列を基に、他の 20 種の木材腐朽菌のゲノム情報と比較解析した。さらに、テーダマツの木粉、または抽出成分を除いた木粉の分解過程で発現される全転写産物 (トランスクリプトーム) を網羅的に解析した。

### 【実験方法】

*P. gigantea* のゲノム上にコードされている遺伝子の中から、木材成分の分解に関わる可能性の高い糖質関連酵素(CAZy)または脂質の分解に関わる遺伝子群を抽出し、各々のグループについて主成分分析を行った。また、伐採したばかりで抽出成分を多く含むテーダマツ (*Pinus teada*) の木粉 (1mm メッシュ) を調整した。一部の木粉からアセトン抽出により抽出成分を除いた木粉も調整した。これら 2 種類の木粉を各 0.5% 唯一の炭素源とした 250mL の培養液を 1L フラスコに調整し、ポテトデキストロース寒天培地で育てた *P. gigantea* を植菌し、5 日間培養した。得られた菌糸から total RNA を抽出し、ライブラリーを構築し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2000) で塩基配列を決定した。その情報をゲノム上にマッピングし、各遺伝子の発現量を RPKM 値で表した。

### 【結果および考察】

本菌のゲノムサイズは約 3,000 万塩基対であり、遺伝子は 11,891 個あることが予測され、いずれの値も他の腐朽菌とほぼ同じ値であった。得られたゲノム情報を基に、本菌および他腐朽菌 20 種が保有する木材主要成分の分解酵素遺伝子数に関して主成分分析を行った。その結果、木材の主要成分の分解関連酵素においては、一般的な白色木材腐朽菌グループと同様のカテゴリーに本菌は分類された (図 1 A)。一方で、脂質代謝関連酵素については、本菌は針葉樹を分解することが知られている *Phanerochaete carnosae* や *Bjerkandera adusta* と同じカテゴリーに分類された (図 1 B)。即ち、針葉樹の分解には脂質代謝が重要である可能性が示された。

そこで *Pinus teada* (テーダマツ) のおがくず、または抽出成分を除いたおがくずの分解過程で分泌されるタンパク質を網羅的に同定した。その結果、抽出成分によって脂質の分解に必要なリパーゼが最も強く誘導されることが明らかになった。この培養系のトランスクリプトームを大規模シーケンサーで解析したところ、脂質代謝のβ酸化およびそれに続くグリオキサル酸経路、シュウ酸生成に関わる遺伝子の発現量が増加することを見出した。

以上の結果から、菌体内・外の脂質分解からシュウ酸蓄積までの代謝経路が活性化されることによって、本菌が針葉樹に素早くコロニーを形成する可能性が考えられた。

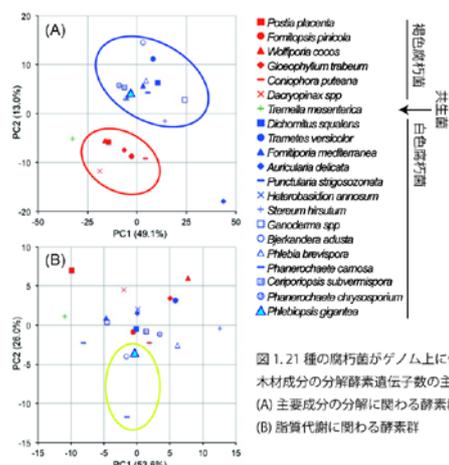


図 1. 21 種の腐朽菌がゲノム上に保有する木材成分の分解酵素遺伝子数の主成分分析 (A) 主要成分の分解に関わる酵素群 (B) 脂質代謝に関わる酵素群

○渋井宏美（北大院農）、佐野雄三（北大院農）

## 1. 緒言

カバノキ属の樹木は、しなやかで腐朽しにくい外樹皮を有する。古くからこれらの外樹皮はさまざまな工芸品、カヌー、屋根ふきなどの材料として用いられており、木材だけでなく、外樹皮も貴重な資源として有効利用することが可能である。

近年、北海道ではシラカンバやウダイカンバの外樹皮が工芸品に利用されている。しかし、工芸品として利用できるように外樹皮を上手く剥がすことのできる時期は限られている。外樹皮を剥ぐ際は、コルク形成層を境に剥ぐため、採取しやすい時期は、コルク形成層活動期に関係すると考えられる。外樹皮を利用し、採取時期を検討する上で、その活動が季節によりどのように変化するかを理解することが求められる。しかしながら、カバノキ属樹木のコルク形成層活動の季節変化について調べた例は筆者らの知る限りではない。

コルク形成層とは、師部または皮層の外層にて二次的に分化し、外樹皮の大部分を占めるコルク組織を外側に形成し、内側にコルク皮層を形成する分裂組織である。一般に、コルク組織の分裂頻度は圧倒的にコルク皮層より高い。カバノキ属樹木のコルク形成層は、連続して幹を一周し、鱗片状の外樹皮をもつ樹種とは異なり、最初に分化したコルク形成層が長年にわたり活動し続けるという特徴を持つ。構成細胞は接線方向に細長い形をし、細胞壁の薄い細胞から成る組織と、細胞壁の厚い細胞から成る組織が交互に重なり、多層構造を形成する<sup>1, 2, 3)</sup>。この多層構造はコルク形成層活動の季節的な変化によるものであるとされ、これまでの研究より、各組織は平滑な部分では一年に一对ずつ形成され、皮目と呼ばれる通気組織では1~3対で形成されること、および細胞壁の薄い細胞層が先に形成され、その後に厚壁の細胞層が形成されることがわかっている<sup>5, 6)</sup>。本研究では、さらに詳細にコルク形成層活動の季節的な変化について調べるために、2015年の成長期に1週間または2週間毎に採取したウダイカンバの枝条を用いて、光学顕微鏡による観察を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 試料

北海道大学札幌研究林実験苗畑に植栽されたウダイカンバ (*Betula maximowicziana* Regel.) 成木の小枝を用いた。コルク形成層の季節的な活動を調べるために、2015年4月中旬~8月初旬にかけて、1週間または2週間毎に枝を採取した。試料は、採取後すぐに乾燥しないよう切断部を湿らせた状態で実験室に持ち帰った。持ち帰った試料は外見の状態がわかるように写真撮影を行った。

### 2.2 実験方法

当年生と2年生の各節の基部近くを5×3×3mm程度にトリミングし、3%グルタルアルデヒド・リン酸バッファー (pH7.5) 溶液で固定した。蒸留水で水洗後、エタノールシリーズで脱水した。脱水後、nブチルグリシジルエーテルで置換した試料をエポキシ樹脂で包埋し、滑走式マイクロームを用いて、2.5~5 μm厚の横断面の切片を作製し、トルイジンブルーで染色した。永久プレパラートを作製し、光学顕微鏡及び偏光顕微鏡 (Zeiss, Axio Imager. A2) で細胞の形態や配列を観察し、写真撮影を行った。

## 3. 結果

**コルク形成層活動の開始**：当年生枝の伸長が確認されたのは5月13日の試料であり、このとき当年生枝基部では既に維管束形成層、コルク形成層ともに活動が開始していた (Fig. 1)。コルク形成層は、表皮細胞のすぐ内側の細胞から分化し、並層分裂する細胞が多く見られ、一部の細胞は垂層分裂しており、まだ分裂を開始していない細胞も見られた (Fig. 1)。2年生枝においては、コルク形成層の活動開始は5月19日の試料で初めて観察された。これは、5月4日の試料で開葉と同時に活動開始が観察された維管

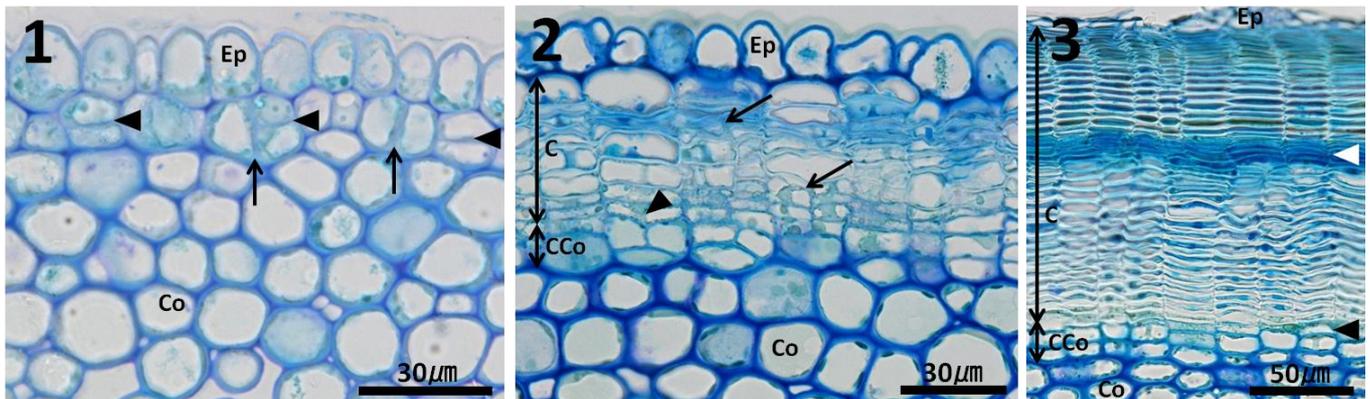
束形成層よりも約2週間遅れであった。維管束形成層に由来する二次組織に関しては、5月19日の試料で道管形成が開始しているのが確認され、5月26日の試料では最初に形成された道管が木化していた。5月19日の2年生枝で、コルク形成層の活動開始は、皮目と、平滑部の一部分でのみ確認された。

**形成層活動の活発な時期：**当年生枝でコルク形成層が一周完全に分裂しているのが確認されたのは5月26日の試料であり、放射径の違いから、コルク細胞とコルク皮層の区別がつくようになった。また、5月26日の試料から当年生枝において肉眼で皮目が明瞭に観察されるようになり、このとき皮目では薄壁の組織と厚壁の組織が1層ずつ観察された。

5月26日から6月16日にかけての試料は、当年生、2年生の枝ともに維管束形成層、コルク形成層の活動が活発であり、両者ともに主に並層分裂が行われ、比較的頻度は低い垂層分裂をしている細胞もよく見られた (Fig. 2)。2年生枝では、観察範囲内でコルク形成層の分裂活動が一周完全に連続していたのは、6月16日に採取した試料からであり、この頃にコルク細胞の細胞壁が肥厚し始め、薄壁の細胞と厚壁の細胞の区別が可能になった。

当年生枝の6月9日以降の試料では、初期に形成された薄壁のコルク細胞が内側から分裂した細胞により押されることで放射方向につぶれ、内腔が狭くなり、最終的には内腔がほとんどない状態になっていた。また当年生枝と2年生枝ともに、薄壁のコルク細胞は、放射壁が著しく屈曲して、ジグソーパズルのピースのように組み合わさって配列していた。

**形成層活動の終了：**6月16日以降の試料では、当年生枝、2年生枝ともに分裂して間もなく細胞壁が未発達のコルク細胞が2~5個存在していたが、その数は徐々に減り、8月4日の試料ではほぼ全てのコルク細胞の細胞壁が肥厚し、分裂活動が完了した様子が観察された (Fig. 3)。2年生枝における前年に形成されたコルク組織と比較して、当年生枝、2年生枝ともに、当年に形成されたコルク組織では接線壁が歪んでいるもの多く見られた (Fig. 3)。皮目では、当年生の枝で薄壁の組織と厚壁の組織がそれぞれ4層ずつ、2年生枝では薄壁の組織と厚壁の組織がそれぞれ3~4層と2~3層形成されていた。維管束形成層の活動に関しては、6月16日以降の試料で徐々に形成層帯が狭くなり、当年生枝と2年生枝でそれぞれ7月22日と7月7日の試料で初めて一部の木部に成長輪のターミナル部分が観察され、8月4日の試料では道管形成が終了し、分裂が継続している一部分を除いて、大半で成長輪のターミナル部が形成されており、活動が終わりかけている状態であった。



**Fig. 1** 当年生枝 (5月13日採取) 横断面. 表皮の内側の細胞よりコルク形成層が分化し、活動する. 矢印: 垂層分裂. 黒矢尻: 並層分裂. **Fig. 2** 当年生枝 (6月2日採取) 横断面. コルク形成層活動が活発になる. 矢印: 並層分裂とともに垂層分裂により生じた細胞壁. 黒矢尻: コルク形成層. **Fig. 3** 2年生枝 (8月4日採取) 横断面. コルク形成層活動が終了し、コルク形成層に隣接するコルク組織の細胞壁が肥厚している. 黒矢尻: コルク形成層. 白矢尻: 当年の初期に形成された薄壁のコルク細胞. Ep: 表皮. Co: 皮層. C: コルク組織. CCo: コルク皮層.

#### 4. 考察

当年生枝と2年生枝では、同一の小枝内であっても、コルク形成層と維管束形成層の活動開始時期は異なっていた。これは、形成層活動の開始は頂端部から始まって求基的に進むという一般論と矛盾しない。2年生枝における師部と木部の形成開始のずれに関しては、針葉樹のデータではあるが、師部が木部に約3週間先立って活動を開始する *Picea abies* の幹のデータ<sup>6)</sup>と類似していた。また木部形成時期については、同じカバノキ属の *Betula grossa* の枝において開葉の約2週間後に、最初に形成された道管の

木化が始まった<sup>7)</sup>という結果よりも約1週間早い結果であった。二次組織におけるコルク形成層と維管束形成層の開始のタイミングは樹種によって一致したりずれたりする<sup>3)</sup>が、ウダイカンバではコルク形成層の方が遅れて形成開始することが分かった。

維管束形成層、コルク形成層ともに、全周で一斉に分裂を開始するのではなく、部分的に開始することが分かった。特にコルク形成層は、場所ごとの開始のタイミングのずれが大きかった。コルク形成層の活動開始と木部形成の活動開始が同時期であったことは、道管形成により水分供給がより順調に行われるようになったことで、コルク形成層の活動が開始したことを示唆する。当年生枝におけるコルク形成層の分化は表皮のすぐ内側で起こる種が多く、他に表皮細胞から分化したり、さらに内側の細胞から分化したりする種もある<sup>3)</sup>が、ウダイカンバのコルク形成層分化は一般的なタイプであることが分かった。

コルク形成層と維管束形成層の活動終了時期に関しては、当年生枝、2年生枝ともに、開始時ほどではないが少しずれがあり、コルク形成層の方が少しだけ早かった。開始のタイミングのずれも考慮すると、コルク形成層の方が、維管束形成層よりも活動期間が短いと言える。

これまでの研究で、ウダイカンバでは、5年生の枝に当年生枝の時に形成されたコルク組織の一部が脱離せずに残っていた<sup>4)</sup>。初期に形成された薄壁のコルク細胞の放射壁が歪んで、互い違いに組み合わさって配列したり、当年に形成されたコルク細胞の接線壁が歪んでいたりしたのは、その後の年に幹が肥大成長して接線方向に引っ張られても、防御組織であるコルク組織が破けないように余裕を持たせる効果があると考えられる。

今後は、分裂活動の変化の様子をさらに詳細に調べるために、透過型電子顕微鏡を用いた調査を行う予定である。

## 引用文献

- 1) Chang Y. P. (1954) "Anatomy of Common North American Pulpwood Barks" Tappi Monograph Series 14, Technical Association of the Pulp and Paper Industry, N. Y., pp. 110-127.
- 2) Schönherr J., Ziegler H. (1980) Water permeability of *Betula* periderm. *Planta*, 147, 345-354.
- 3) Evert R. F. (2006) "Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their structure, Function, and Development. 3rd ed." John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. pp. 427-445.
- 4) 渋井 宏美, 佐野 雄三 (2013) カバノキ属樹木における外樹皮の構造と形成. 日本木材学会北海道支部 平成25年度研究発表会 要旨. [http://www.agr.hokudai.ac.jp/wrsh/files/2013\\_11\\_28/O-6.pdf](http://www.agr.hokudai.ac.jp/wrsh/files/2013_11_28/O-6.pdf).
- 5) 渋井 宏美, 佐野 雄三 (2014) シラカンバ樹皮組織に含まれる有機結晶. 日本木材学会北海道支部 平成26年度研究発表会 要旨. <http://www.agr.hokudai.ac.jp/wrsh/files/kouensyuu/Volume46.pdf>, p.1-4.
- 6) Jyske T. M., Suuronen J. P., Pranovich A. V., Laakso T., Watanabe U., Kuroda K., Abe H. (2015) Seasonal variation in formation, structure, and chemical properties of phloem in *Picea abies* as studied by novel microtechniques. *Planta*, 242, 613-629.
- 7) Takahashi S., Okada N., Nobuchi T. (2013) Relationship between the timing of vessel formation and leaf phenology in ten ring-porous and diffuse-porous deciduous tree species. *Ecological Research*, 28, 615-624.

○佐藤真由美, 東 智則, 米山彰造 (北林産試)  
韓圭鎬, 末岡さつき, 得字圭彦, 島田謙一郎, 木下幹朗, 福島道広 (帯畜大・食品科学)

## 1. 緒言

近年、腸内細菌叢が免疫機能や肥満など、ヒトの健康状態や様々な疾病に関与していることが明らかになってきた。腸内細菌叢を健康的なバランスに保つには、有用腸内細菌「プロバイオティクス」の摂取とともに、プロバイオティクスの栄養源となって、それらの増殖を促し、腸内細菌叢を健康的なバランスに改善する、「プレバイオティクス」の摂取も必要と考えられる。マイタケは食物繊維が豊富であり、腸内細菌叢の改善効果が期待できる食品である。また、その主要な食物繊維であるβ-グルカンには健康機能性も期待される。

一方、「大雪華の舞1号」は道総研 林産試験場で開発されたマイタケの品種で、北海道の主要な造林樹種であるカラマツを培地基材の一部として置換しても、収量が減少しないという特徴を有する<sup>1)</sup>(図1)。これまでに演者らは、正常食に「大雪華の舞1号」を添加した飼料を与えたラットについて、盲腸内の短鎖脂肪酸濃度が上昇し、腸内発酵が促進されていることを報告している<sup>2)</sup>。

本研究では、高脂肪食に「大雪華の舞1号」を添加した飼料をラットに与え、「大雪華の舞1号」の腸内環境改善効果を検討した。

なお、本発表の内容の一部は、第12回アジア栄養学会議(2015年5月, 横浜)で発表した<sup>3)</sup>。

## 2. 実験方法

### 2.1 栽培および試料調製

「大雪華の舞1号」をカンバ培地(VB)および30%カラマツ置換培地(VL)で栽培した<sup>1)</sup>。収穫後の子実体を加熱処理後に凍結乾燥粉末とした。

### 2.2 成分分析

マイタケに含まれる食物繊維はプロスキーマ変法で定量した。β-グルカンはMushroom and Yeast Glucan Assay Kit (Megazyme International Ireland Ltd, Bray Co, Wicklow, Ireland)を用いて定量した。キチンは倉沢ら<sup>4)</sup>の方法に従い定量した。

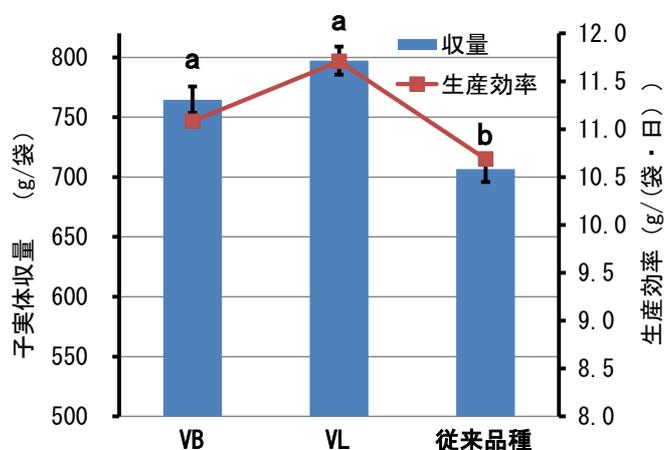


図1 マイタケの各試験区別子実体収量(2.5kg培地)

a, b: 異なる文字の間には有意差があることを示す。  
(Tukeyの検定:  $p < 0.01$ )

培地基材: VB, カンバ、VL, カラマツ30%置換。

表1 飼料組成

成分 (g/10 kg)	対照群	VB群	VL群
カゼイン	2000	1767.8	1778.3
L-シスチン	30	30	30
大豆油	700	636.6	630.1
ラード	1300	1300	1300
ミネラル(AIN-93G)	350	350	350
ビタミン(AIN-93G)	100	100	100
重酒石酸コリン	25	25	25
第3ダイブチルヒドロキノン	0.4	0.4	0.4
シュクロース	1000	1000	1000
セルロース	500	0	0
マイタケ(VB)	0	1075	0
マイタケ(VL)	0	0	1092
α-コーンスターチ	1320	1320	1320
コーンスターチ	2674.6	2395.2	2374.2
合計	10000	10000	10000

培地基材: VB, カンバ、VL, カラマツ30%置換。

## 2.2 動物実験

20%脂肪を添加した AIN-93G 基準食を調製し、対照群には食物繊維として 5%セルロースを添加した。一方、マイタケ添加群として、食物繊維の割合が 5%になるように、VB または VL の粉末を添加した飼料を調製した (表 1)。これらの食餌を 8 週齢の F344 系雄ラットに 4 週間自由摂取で与え、室温 23±1℃、湿度 60±5%、明暗周期 12 時間で飼育した。飼育期間中には摂取量、体重および糞便排泄量を測定し、動物実験終了時には脂肪組織重量、肝臓重量および盲腸重量を測定した。また、採取した盲腸の内容物重量および盲腸内容物の pH を測定するとともに、内容物中の短鎖脂肪酸 (SCFA) 濃度をガスクロマトグラフで定量した。腸内細菌数 (大腸菌群、乳酸菌、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*) は、選択培養法により測定した。糞便中に含まれるムチンと IgA は、ウエスタンブロット解析で定量した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 各マイタケの食物繊維含有量

加熱処理後の子実体の粉末に含まれる食物繊維量を従来品種と比較した (表 2)。不溶性食物繊維は従来品種よりも「大雪華の舞 1 号」に多く含まれていた。マイタケの主要な食物繊維である  $\beta$ -グルカンとキチンは、従来品種に比べて、「大雪華の舞 1 号」で有意に多く、この品種の特徴と考えられた。

表2 加熱処理後の子実体に含まれる食物繊維含有量の比較

成分 (g/100g D.W.)	従来品種	VB	VL
不溶性食物繊維	41.1	45.8	45.9
$\beta$ -glucan	32.6 <sup>b</sup>	34.8 <sup>a</sup>	35.1 <sup>a</sup>
キチン	11.0 <sup>b</sup>	12.5 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>
水溶性食物繊維	2.0	2.2	1.8

a, b: 異なる文字の間には有意差があることを示す。  
(Tukey-Kramer test, p<0.05)  
培地基材: VB, カンバ、VL, カラマツ30%置換。

### 3.2 マイタケを与えたラットの盲腸内細菌叢と短鎖脂肪酸

動物実験終了時におけるラットの体重および肝臓、脂肪組織、盲腸の重量は各群間で違いが認められなかった。ラットの盲腸内細菌叢を調べた結果 (図 2)、対照群に比べ VB 群では、盲腸内の大腸菌群が有意に少なく、*Lactobacillus* が有意に多いことが明らかとなった。同様の傾向は VL 群でも認められた。

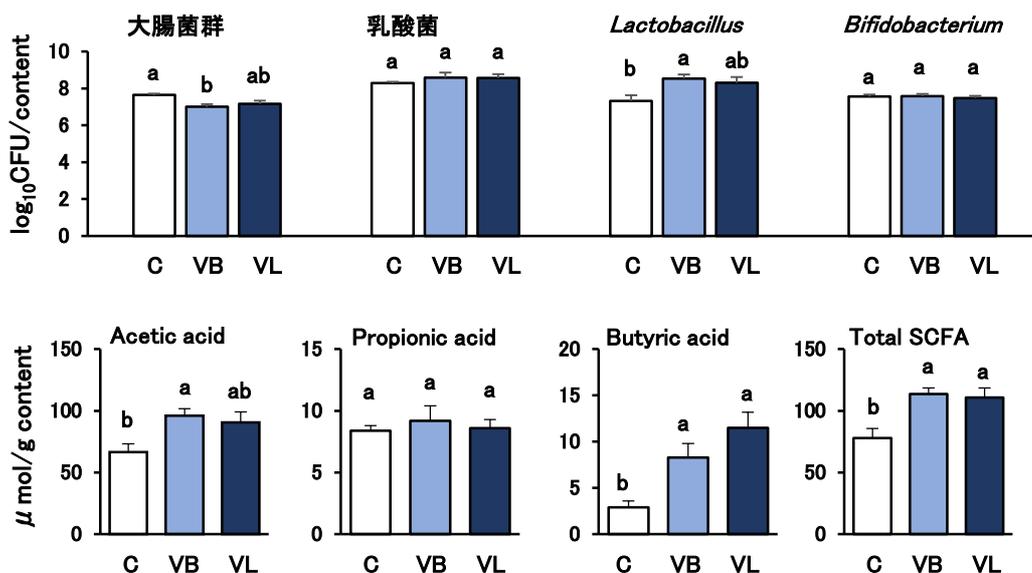


図2 マイタケを添加した高脂肪食を与えたラットの盲腸内細菌叢と短鎖脂肪酸 (SCFA) 濃度

C: 対照群, VB: VB群, VL: VL群 (各群: n=5)。培地基材: VB, カンバ、VL, カラマツ30%置換。  
a, b: 異なる文字の間には有意差があることを示す。(Tukeyの検定: p<0.05)

表3 マイタケを添加した高脂肪食を与えたラットの盲腸内容物量, pH, ムチンおよびIgA

	対照群	VB群	VL群
盲腸内容物 (g)	2.16±0.14	2.71±0.59	3.24±0.46
盲腸内 pH	8.08±0.08 <sup>a</sup>	7.22±0.15 <sup>b</sup>	7.11±0.20 <sup>b</sup>
ムチン (mg/g content)	2.57±0.13 <sup>b</sup>	2.95±0.13 <sup>ab</sup>	3.18±0.16 <sup>a</sup>
IgA (μg/g content)	198±25 <sup>a</sup>	152±28 <sup>a</sup>	154±10 <sup>a</sup>

平均値±標準偏差 (n=5).

a, b: 異なる文字の間には有意差があることを示す。(Tukeyの検定: p<0.05)

培地基材: VB, カンバ、VL, カラマツ30%置換.

盲腸内の短鎖脂肪酸 (acetic acid, propionic acid, butyric acid) を分析した結果、acetic acid と butyric acid の濃度は VB と VL 群で高く、短鎖脂肪酸の総量もこれらの 2 群では対照群に比べて有意に高かった (図 2)。盲腸内 pH は、対照群に比べ、VB と VL 群において有意に低かった (表 3)。これらの結果から、マイタケは腸内発酵を促進することにより、腸内 pH を下げ、大腸菌群の増殖を抑制すると推測された。

### 3.3 マイタケを与えたラット糞便中のムチンおよび IgA

消化管内では、腸内細菌やそれらが産生する毒素が生体内へ侵入することをムチンや IgA 等によって阻止している。そこで、このような腸管バリア機能を評価することを目的として、糞便中に含まれるムチンおよび IgA を定量した (表 3)。IgA 含有量は、各群で違いが認められなかったが、ムチンは VL 群において有意に増加していた。

高脂肪食の摂取により、腸内細菌叢のバランスが崩れることが知られているが、「大雪華の舞 1 号」の摂取は、腸内発酵を促進し、腸内 pH を低く抑えることにより、腸内細菌叢を改善することが明らかになった。また、IgA の増加は認められなかったものの、ムチンの増加による腸管バリア機能の増強効果が示唆された。本研究では、培地基材の樹種が異なる培地で栽培した「大雪華の舞 1 号」について腸内環境改善効果を比較したが、両培地間でこれらの効果に大きな違いはないと考えられた。

以上のことから、「大雪華の舞 1 号」は β-グルカン等の食物繊維含有量が高く、腸内環境改善効果を持つプレバイオティクスとして有用であると考えられた。

## 4. 引用文献

- 1) 米山彰造, 宜寿次盛生, 原田 陽, 森 三千雄: カラマツおが粉の利用に適したマイタケ新品種の選抜. 林産試験場報 20(3), 21-26 (2006).
- 2) 越田招雲, 韓圭鎬, 島田謙一郎, 木下幹朗, 佐藤真由美, 福島道広: 新品種マイタケ投与ラットの脂質代謝と腸内発酵に及ぼす影響. 第 44 回日本栄養・食糧学会北海道支部会講演要旨集, 札幌, 2014. p14.
- 3) Han, K. H., Sueoka, S., Tokuji, Y., Shimada, K., Kinoshita, M., Sato, M., Fukushima, M.: Effect of maitake fruit body on cecal fermentation in rats. Proceedings of the 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, 2015, p352.
- 4) 倉沢 新一, 菅原 龍幸, 林 淳三: 窒素含有多糖類 (キチン) を含むキノコ類中の酵素-重量法による食物繊維の定量-. 日本栄養・食糧学会誌 44, 293-303 (1991).

## 謝辞

本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の一部として実施した。

## 【緒言】

北海道では年間 170 万  $\text{m}^3$  程度のカラマツ類 (*Larix spp.*) が伐採され<sup>1)</sup>、その多くはカラマツ (*L. kaempferi*) と考えられる。絶乾重量で年間 7 万トン程度のカラマツ樹皮が製材工場等で発生していると推計され、現状では主に燃料等として利用されている<sup>2)</sup>。

カラマツ樹皮には抽出容易な糖類およびフェノール類が含まれており<sup>3)</sup>、その糖類は発酵などの処理によりバイオエタノールや他のバイオプロダクトの原料になると考えられる。また、カラマツ樹皮に含まれるフェノール類は工業原料等としての利用が期待される<sup>4)</sup>。しかし、これらの効率的な分離方法が確立されていないため、これら成分の高付加価値利用はほとんど行われていない<sup>4)</sup>。

そこで、演者らはカラマツ樹皮の高付加価値利用の可能性を高めることを目指し、疎水性イオン液体（以下、疎水 IL）を用いた新しい効率的な樹皮含有成分の分離手法の開発を試みた。

## 【実験方法】

## i) 糖類とフェノール類の混合水溶液の調製

2011 年 2~3 月に伐採した 3 個体のカラマツの樹皮を速やかに 40°C のオーブンに入れ、水分が 10% 以下になるまで風乾して粉碎した。絶乾重量で 1 g の樹皮粉に対し、30 ml の含水エタノール (50 : 50, v/v) を加えて 30°C で 1 時間抽出した<sup>5)</sup>。エバポレーターを用いて減圧下においてエタノールを除去し、脱イオン水を加えて液量を 22.5 ml とし再溶解し、不溶物を No. 5C のろ紙で除去した (LBE 液)。これとは別に、(+)-カテキン水和物および D(+)-グルコースを脱イオン水に溶解させ、カテキン/グルコース液 (以下、CG 液) を調製した。カテキン水和物の一部を 105°C オープンで一昼夜乾燥し、絶乾重量を測定した。

## ii) 液-液抽出と樹脂化

疎水 IL として 1-オクチル-3-メチルイミダゾリウムテトラフルオロボレート (以下、 $[\text{C}_8\text{mim}][\text{BF}_4]$ ) を用いた。

Figure 1 に示すような手順で液-液抽出および $[\text{C}_8\text{mim}][\text{BF}_4]$ 相に溶解したフェノール類の樹脂化を行った。試験管に  $[\text{C}_8\text{mim}][\text{BF}_4]$  を 1.5 ml 入れ、LBE 液、CG 液または脱イオン水を 2.5 ml 加えチューブミキサーで 5 秒程度攪拌した後、遠心分離した。液-液抽出前後の $[\text{C}_8\text{mim}][\text{BF}_4]$ の水分を Karl・Fischer 水分計により測定した。 $[\text{C}_8\text{mim}][\text{BF}_4]$ 相を回収し、パラホルムアルデヒドを加え、減圧下において 105°C で 6 時間攪拌しながら加熱した。加熱後、室温付近まで放冷し、貧溶媒 (アセトン:n-ヘキサン=3:1) を 10 ml 程度加え

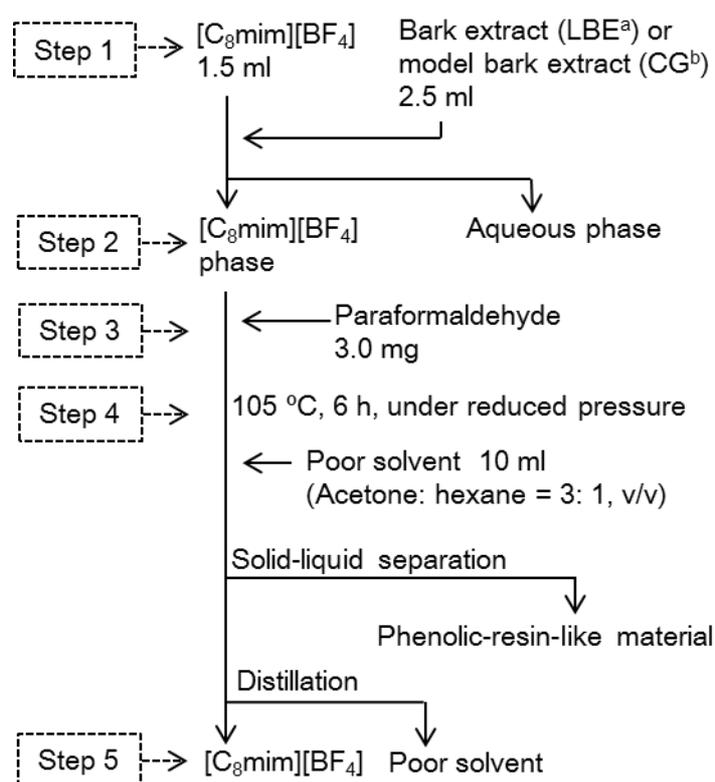


Fig. 1. Schematic for the separation process.

<sup>a</sup> Larch bark extract.<sup>b</sup> Catechin and glucose in deionized water.

て沈殿（以下、樹脂様物質）を生じさせ、1G P16のガラスフィルターでろ過して重量を測定した。

Folin-Ciocalteu 試薬を用いて水相中のフェノール類をカテキン当量で定量した。HPLC を用いて水相中のグルコースおよび残留した[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]を定量した。

**iii) [C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]の回収と[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]中のフェノール類の観察**

樹脂様物質除去後の[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]（Step 5）を回収し乾燥させ重量を測定した。[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]の粗回収率を次の式（1）により計算した。

$$R = A/B \times 100 \quad \text{式(1)}$$

ここで、R は粗回収率（%）、A は樹脂様物質回収後の[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]（Step 5）の絶乾重量（g）、B は液-液抽出後の[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]（Step 2）の絶乾重量（g）である。

Fig. 1 の各過程（Step 1-5）における[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相をメタノールで希釈し吸光度計を用いて210-500 nmの吸光度を観察した。

**【結果および考察】**

**i) 液-液抽出**

液-液抽出に使用する前の[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]（Step 1）の水分は検出限界以下であった。LBE 液、CG 液およびブランクとしての脱イオン水に対して、[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]を用いて液-液抽出を行った後の[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相（Step 2）に含まれる水分を Table 1 に示す。各[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相には 122.2-125.4 mg/gの水分が含まれていた。また、水相には 16.8-17.9 mg/g の[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]が含まれていた。[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]は水と相分離する疎水性イオン液体であるが、一定程度の親水性を持っていること確認され、[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相の水に留意すべきことがわかった。

Table 1. The mutual solubility of water and [C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>] after liquid-liquid extraction (Step 2).

Aqueous phase	Water in the [C <sub>8</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] phase <sup>a)</sup> (mg g <sup>-1</sup> )	[C <sub>8</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] in the aqueous phase <sup>a)</sup> (mg g <sup>-1</sup> )
LBE <sup>b)</sup>	125.4 ± 0.3	17.9 ± 0.0
CG <sup>b)</sup>	122.2 ± 0.4	16.9 ± 0.1
water	122.9 ± 0.9	16.8 ± 0.1

<sup>a)</sup> Values represent the mean ± standard deviation (SD) of 3 replicates.

<sup>b)</sup> See Fig. 1.

Table 2 に液-液抽出前の水相に含まれるフェノール類およびグルコースの定量結果と液-液抽出後の水相におけるフェノール類とグルコースの残留割合を示す。LBE 液の分析結果から、樹皮絶乾重量あたり抽出されたフェノール類およびグルコースはそれぞれ 68.7 mg/g および 12.0 mg/g と算出された。LBE 液および CG 液において、それぞれ液-液抽出前の含有量に対し 96%程度 of 分離率で効率よく分離できることが明らかとなった。

**ii) 樹脂化**

LBE 液から得られた、液-液抽出後の[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相にパラホルムアルデヒドを加え、（Step 3）、加熱し（Step 4）、貧溶媒で析出させたところ、10.0 ± 0.8 mgの固体の樹脂様物質が得られた。一方、パラホルムアルデヒドを加えずに加熱し

Table 2. The concentration of the phenolic compounds and glucose in aqueous solution before liquid-liquid extraction and the residual ratio in the aqueous phase after liquid-liquid extraction.

Original aqueous solution <sup>a)</sup>	Solute	Amount of solute in water before liquid-liquid extraction <sup>b)</sup> (mg mL <sup>-1</sup> )	Residual ratio in the aqueous phase after liquid-liquid extraction <sup>b)</sup> (%)
LBE	phenolic compounds	3.05 ± 0.14	4.1 ± 0.4
	glucose	0.53 ± 0.01	96.5 ± 1.2
CG	phenolic compounds	2.92 ± 0.03	3.6 ± 0.4
	glucose	1.26 ± 0.05	96.2 ± 0.5

<sup>a)</sup> See Table 1.

<sup>b)</sup> Values represent the mean ± SD of 3 replicates.

た場合は樹脂様物質が得られなかった。これらのことは、LBE 由来のフェノール類が加熱によりイオン液体中で自己重合することはないが、パラホルムアルデヒドと共重合して高分子化することを示している。一方、CG 液から得られた[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相からは同条件では樹脂様物質を得ることができなかった。

[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相に移行したカテキン当量のフェノール類 (7.3 mg) と加えたパラホルムアルデヒドの量 (3.0 mg) を基にした理論量に対する収率は 121.9 ± 8.9% となり、100% を超えた。Folin-Ciocalteu 法によるフェノール類の定量の精度の問題、あるいは樹脂様物質からの[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]の洗い出しが不十分だった可能性が考えられた。

液-液抽出で水相に溶け込んだ[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]を除いた[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]の粗回収率 R は 100.6 ± 2.5% であった。この粗回収率には、液-液抽出により[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相に混入した糖等の不純物の重量が含まれるが、その重量は数十 mg 程度と考えられ、[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]約 15 g に対して極めて小さいことから、イオン液体は概ね回収可能と考えられた。

### iii) イオン液体とフェノール類の観察

各過程 (Step 1-5) における、[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相の 190-500 nm の吸光度を観察した結果を Fig. 2 に示す。カラマツ樹皮に含まれるフェノール類は 99% が flavanol および proanthocyanidin であり<sup>6)</sup>、210-250 nm および 280 nm 前後に極大吸光波長をもつことが知られている。Step 1 ([C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]のみ) では 234 nm に大きな一つのピークが見られた。Step 2-4 では 280 nm 付近に大きなピークが現れ、Step 5 でそのピークが小さくなった。また、234 nm のピークトップが Step 2-4 で 244 nm 付近にシフトし、Step 5 で 234 nm に戻った。これらのことから[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相にフェノール類が溶け込み、Step 5 で大部分のフェノール類が[C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>]相から回収されたことを示していると推察される。

### 【まとめ】

疎水 IL を用いて液-液抽出することによりカラマツ樹皮から抽出された糖類とフェノール類を高い割合 (約 96%) で分離できることを明らかにした。疎水 IL に溶解したフェノール類は高分子化させて貧溶媒で析出させることで回収できることを示した。1 種類のイオン液体を続けて使用し、分離工程と回収工程を行うことができることから、簡易で効率的な分離方法に成り得ると考えられた。

### 【引用文献】

1) 北海道水産林務部 (2015) 平成 25 年度 北海道木材需給実績

(<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/rrm/grp/04/H25FYjyukyujisseki-2.pdf>) 2015 年 10 月 14 日アクセス

2) 関 一人 (2013) 北海道のカラマツ類の樹皮に含まれる樹脂成分の特性と有用性. 林産試だより

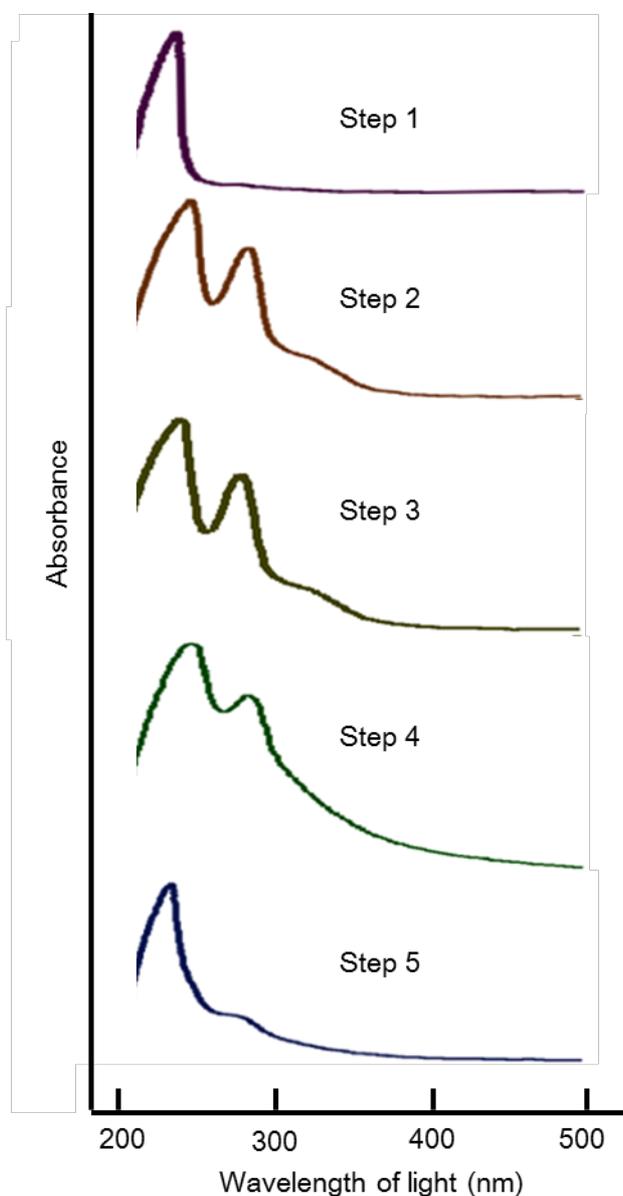


Fig. 2. Absorbance at  $\lambda = 210-500$  nm for [C<sub>8</sub>mim][BF<sub>4</sub>] and its contents for each step of the separation process.

2013年12月号 8-11

- 3) 折橋 健、檜山 亮、岸野 正典、関 一人 (2013) 北海道産樹皮の新たな用途の創出に向けて—カラマツおよびトドマツ樹皮の成分組成—. 第63回日本木材学会大会研究発表要旨集 Q28-P-PM11
- 4) 大原 誠資 (2009) 樹皮タンニンの化学特性と化学・酵素変換. 木材学会誌 55:59-68
- 5) 折橋 健、檜山 亮 (2015) トドマツおよびカラマツ樹皮成分の組成と段階的抽出. 林産試験場報 544 (印刷中)
- 6) 鮫島 正浩、善本 知孝 (1981) 針葉樹樹皮のフェノール性抽出成分の特徴について. 木材学会誌 27: 491-497

## PEG リグニン由来の 電気二重層キャパシタ用セパレータの開発

○久保田惇（北大院農）、磯崎友史（北大院農）、  
山田竜彦（森林総研）、幸田圭一（北大院農）、浦木康光（北大院農）

### 【緒言】

我々の研究グループでは単離リグニンの高付加価値利用を目指して、リグニン誘導体を部材とした電気二重層キャパシタ (EDLC) の開発に取り組んでいる。EDLC の電気化学的特性は部材に大きく影響を受ける。本研究では部材の内、特にセパレータの性能の改善を目的として、その調製条件を検討した。

### 【実験方法】

スギチップの加溶媒分解で得られる PEG リグニン (PEGL) [1]をハリマ化成(株)から供与いただき、これを樹脂原料として使用した。

#### 二成分系ポリエステルフィルムの調製

PEGL と無水マレイン酸 (MA) を混合し (混合比: [-COOH (MA)/-OH (PEGL)] = 1/9, 3/7, 5/5, 6.6/3.4, 8/2, 9/1)、棒型と共に熱圧プレスした (プレス条件: 200 °C, 5 MPa, 4 h)。

#### 二成分系多孔質フィルムの調製

混合比: [-COOH (MA) /-OH (PEGL)] = 6.6/3.4 の PEGL と MA に 10 % の NaCl 粉末を加え、上記と同様にフィルムを調製した後、NaCl を水洗除去した。

#### 三成分系ポリエステルフィルムの調製

混合比: [-COOH (MA) /-OH (PEGL)] = 6.6/3.4 の PEGL と MA に 10 % 及び 30 % の PEG ( $M = 20,000, 500,000, 2,000,000$ ) を加え、上記と同様にフィルムを調製した。

#### 三成分系多孔質フィルムの調製

混合比: [-COOH (MA) /-OH (PEGL)] = 6.6/3.4 の PEGL と MA に 30 % の PEG500,000 を加え、更に 5 % の NaCl を加えて上記と同様にフィルムを調製した。その後、NaCl を水洗除去した。

#### EDLC セルの組み立て、評価

セパレータは、アセトン洗浄した各 PEGL 由来のフィルムと、対照として市販のセルローズ系セパレータ (三菱製紙(株)) を用いた。電極は、[市販活性炭/カーボンブラック/Na-カルボキシメチルセルローズ = 85/5/10 (w/w/w)] の混合物を円盤状に打ち抜いて用いた。

電解液は、1 M のトリエチルメチルアンモニウムテトラフルオロボレート/プロピレンカーボネート溶液を使用した。セパレータと電極を電解液に浸漬した後、二対の電極でセパレータを挟んで封入し、EDLC セルを作製した。サイクリックボルタンメトリー (CV)、交流インピーダンス法により EDLC セルの電気化学特性を評価した[2]。

### 【結果および考察】

#### 二成分系ポリエステルフィルム

PEGL と MA の二成分の熱圧プレスにより、ポリエステルフィルムを得た。混合比: [-COOH (MA) /-OH (PEGL)] = 6.6/3.4 の時、引張強度と弾性率が最大値を示した (45.6 MPa、2.4 GPa)。そこで、この混合比のフィルムをセパレータとして EDLC に組みこんだ。二成分系フィルムをセパレータとした EDLC のボルタモグラムは、小さく潰れた線状の形となり (Fig 1)、ほぼ静電容量を持たないことが示唆された。実際、その値は市販のセルローズ系セパレータを用いた場合 (65.2 F/g) に比べ極めて低かった (4.3 F/g)。同様に、電荷移動抵抗と固有抵抗もセルローズの値 (2.4 Ω、1.2 Ω) に比べ、非常に高かった (486.6 Ω、117.9 Ω)。これらの理由は、フィルム表面に細孔が存在せず電解質イオンの移動が制限されたため、と考えた。そこでこのフィルム

を多孔質化し、EDLC に組み込んだ。その結果、静電容量値は 59.1 F/g、電荷移動抵抗と固有抵抗はそれぞれ 28.7  $\Omega$ 、26.5  $\Omega$ まで改善した。しかし、セルロース系セパレータの性能には及ばず、特に固有抵抗値が高かった。この理由として、フィルムの柔軟性の低さ故に電極とセパレータが十分に接着していないことが考えられた。固有抵抗は接着性にも依存し得るためである。

### 三成分系ポリエステルフィルム

そこで柔軟性の向上を目指し、新たに PEG を加えて三成分系フィルムを得た。特に 30 %の PEG500,000 を加えると、強度と弾性率は低下したものの、フィルムは最大歪み (94.1 %) を示した(Fig 2)。そこで、この柔軟なフィルムを EDLC セパレータとして組み込んだ。

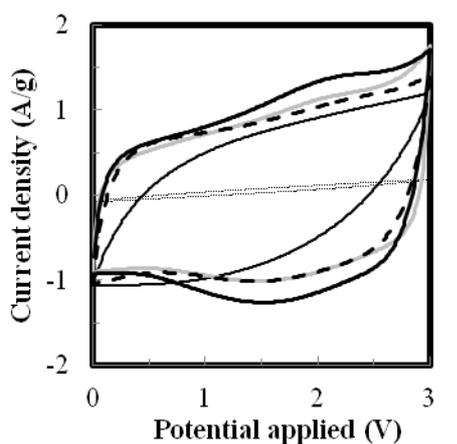
Fig 1 に示した通り、この三成分系フィルムを備えた EDLC は明瞭なボルタモグラムを呈し、高い静電容量値 (69.8 F/g) を示した。また電荷移動抵抗と固有抵抗も大幅に減少した (各々2.0  $\Omega$ 、4.9  $\Omega$ )。セパレータ部材としての利用に際し、フィルムの力学的弱さの影響が危惧されたが、セル中では電極に挟まれ外部応力から守られるため、影響はほぼ無いように思われた。最後にこの三成分系フィルムでも食塩の添加による多孔質化を行ったところ、静電容量値は更に改善され (84.2 F/g)、セルロース系セパレータの値をも超えた (Fig 1)。電荷移動抵抗値は減少した (1.6  $\Omega$ ) 一方で、固有抵抗値は増加した (8.8  $\Omega$ )。この固有抵抗値の増加は、電極とセパレータの積層における技術的熟練度の問題であり、今後は改善可能と考える。現在は電気化学特性のさらなる向上を目指し、食塩の添加比条件の最適化などを検討している。

### 【結論】

PEG リグニンと無水マレイン酸と PEG の 3 成分系からなる、リグニン由来の新規ポリエステルフィルムを調製した。このフィルムをセパレータとして用いた EDLC は、良好な電気化学的特性を示したことから、リグニン利用の新たな可能性を見出したといえよう。

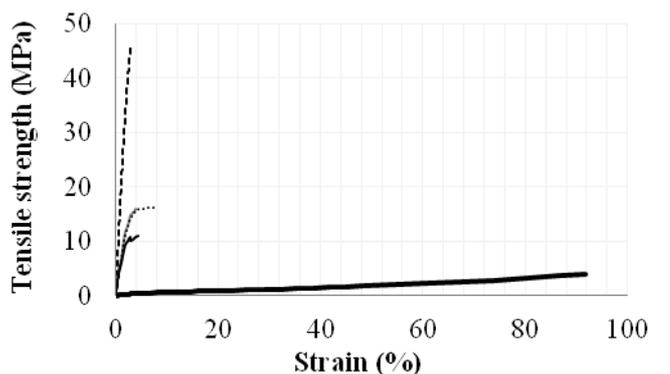
### 【参考文献】

- [1] Jian, L., Satoshi, K., Tatsuhiko, Y., Keiichi, K., Yasumitsu, U.. *Bioresources*, 2012, 7, 5634-5646.  
 [2] Qu, D., Shi, H.. *Journal of Power Sources*, 1998, 74, 99-107.



..... Binary film      — Porous binary film  
 --- Ternary film      — Porous ternary film  
 — Cellulosic paper (reference)

Fig 1. Cyclic voltammogram of the EDLC with PEG-lignin based polyester films at a scan rate of 0.05 V/s.



---- Binary polyester[-COOH(MA)/-OH(PEGL) = 6.6/3.4]  
 — 10% PEG 20,000      ..... 10% PEG 500,000  
 — 10% PEG 2,000,000      — 30% PEG 500,000

Fig 2. Stress-strain curves for PEG-lignin based ternary polyester films with different charged ratio and the type of PEG.

○遠藤麻理奈(北大農), 重富顕吾, 三橋進也(北大院農)  
五十嵐慎(帯畜大・原虫研), 生方信(北大院農)

## 1. 緒言

トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)はアピコンプレックス門に属する偏性細胞内寄生原虫であり、哺乳類や鳥類などの温血動物に寄生する。ヒトにはトキソプラズマに感染した豚肉やラム肉を生焼け状態で食べた場合や、トキソプラズマの生活環の一種であるオーシストが混入した水や食べ物を飲食した場合などに感染する。感染者の多くは感染後も無症状であるが、女性が妊娠中に感染した場合、胎児にも垂直感染し、先天性トキソプラズマ症による視力障害などを引き起こす場合がある。また、AIDS 患者などの免疫不全患者が感染した場合、もしくは過去に感染し体内にトキソプラズマが潜伏状態である場合は、トキソプラズマ脳炎を引き起こし死に至るケースも確認されている<sup>3)</sup>。

現在トキソプラズマ症の治療薬としては pyrimethamine や sulfadiazine<sup>3)</sup>、spiramycin acetate などが知られているが、日本国内では未認可もしくは保険適用外であるため、治療には高額のコストが必要とされる。また、米国においてもトキソプラズマ症は、主に経済的利益の問題から製薬企業等があまり注目しない neglected parasitic infection (顧みられない寄生虫感染症) に指定されており、より安価なリソースからの薬剤開発が必要とされている。

木材を加工する際に廃材として発生する樹皮は、現在家畜飼料や敷料、燃料として利用されているが、樹皮の特性を活用した、より高位な利用法の開発が求められている。樹皮材の特徴として、木部と比べ高い割合で抽出成分が含まれることが挙げられる。我々はこの利点に着目して行った先行実験において、ミズナラ(*Quercus crispula* Blume)の外樹皮に抗トキソプラズマ活性を持つ抽出成分が存在することを見出した。

本研究では先行研究で得られた結果に基づき、ミズナラの外樹皮に含まれる抗トキソプラズマ症治療薬シード化合物の単離・構造決定を行うことを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

先行研究で抗トキソプラズマ活性が確認された北海道大学苫小牧研究林のミズナラを 2015 年 5 月に伐採し、実験室に持ち帰ったのち当日中に外樹皮を剥がした後、風乾した。

### 2.2 メタノール抽出

風乾した試料をさらに凍結乾燥機で一昼夜かけて乾燥した後、ミキサーで粉体化した。得られた粉体 150 g にメタノール 900 g を加え、ホモジナイザーで 2.5 時間攪拌した。その後同じ操作を再度繰り返し、合わせた濾液を 150 mL に濃縮した。得られた濃縮物に Milli-Q 水を 50 mL 加えたのち水酸化ナトリウムと塩酸を用いて pH 7 に調整した。

### 2.3 酢酸エチル抽出

2.2 のサンプルに酢酸エチル 200 mL を加え、軽く攪拌した後、遠心分離した(2,000 rpm, 10 min)。分離後有機層のみをピペットで回収し、ナスフラスコに集めた。沈殿は回収した後、酢酸エチル、Milli-Q 水ともに 200 mL ずつを加え、攪拌した。得られた混合物を合わせて分液漏斗に流し込み、振盪した後、有機層を回収した。この抽出操作を 5 回繰り返した。回収した上清と有機層をロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、酢酸エチル抽出物とした。

## 2.4 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離

フラッシュ自動精製システム (Isolera, Biotage 社) を用いて分画した。カラムには Biotage 社の SNAP ノーマルシリカゲルカラム 25 g と 50 g を連結させて使用した。流速 100 mL/min に設定し、50 mL ずつ分画した。溶離液として EtOAc:hexane=15:85、35:65、MeOH:CHCl<sub>3</sub>=20:80 を順次用いた。

## 2.5 高速液体クロマトグラフィーによる分離

高速液体クロマトグラフィーを使用し、さらなる分画を行った。分取条件は、使用カラム: Mightysil RP-18 GP 250-20(5 μm)、流速: 15.0 mL/min、溶離液として MeOH:CHCl<sub>3</sub>=10:90 を用いた。

## 2.6 抗トキソプラズマ活性評価<sup>4)</sup>

改変イーグル培地を使用して 96 穴プレートに単一層の正常ヒト繊維芽細胞由来細胞株 HFF を培養し、そこにトキソプラズマ RH 株 1,000 個体を加え 2 時間、37°C でインキュベートした。その後活性評価対象のサンプルを任意の濃度で加え、3 日間培養を行った。培地上清のみを回収し、サンドイッチ ELISA 法でトキソプラズマが持つ MIC10 タンパク質を定量することにより活性評価を行った。

## 2.7 スペクトル解析

単離した物質の構造を特定するため各種スペクトル解析を行った。MS(FD<sup>+</sup>、EI<sup>+</sup>)、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、DEPT、COSY、HSQC、HMBC を測定することで構造を解析した。

## 3. 結果・考察

### 3.1 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画と抗トキソプラズマ活性

樹皮試料 150 g から調製したメタノール抽出物 6.06 g を液液抽出に供し、酢酸エチル抽出物 3.63 g を得た。得られた画分をシリカゲルクロマトグラフィーに供し TLC のパターンに従って 12 画分に分離した。活性評価を行ったところ、EtOAc:hexane=35:65 で溶出した画分 4 と MeOH:CHCl<sub>3</sub>=20:80 で溶出した画分 9 で活性がみられた。高濃度ではアフリカミドリザル腎細胞 Vero 細胞に対する細胞毒性を示したが、抗トキソプラズマ活性を示す濃度内では細胞毒性は見られなかった。このうち画分 4 について、さらに HPLC での分画を試みた。

Table 1 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる各画分の収量

画分	EtOAc:hexane=15:85			EtOAc:hexane=35:65						MeOH:CHCl <sub>3</sub> =20:80		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
収量 (mg)	251.9	83.5	163.7	146.5	83.5	261.7	103.9	69.1	769.5	301.6	382.1	207.9

### 3.2 HPLC による分画

シリカゲルクロマトグラフィーによって得られた画分 4 を逆相 HPLC により、溶離液を MeOH:H<sub>2</sub>O=90:10 として分画した。4-0 から 4-6 の 7 区分に分画し (Fig. 1)、これらのサンプルを用いて細胞毒性試験と抗トキソプラズマ活性評価を行った (Table 2)。その結果、各サンプル 100 μg/mL の濃度で、4-1 を除くすべてのサンプルで強い細胞毒性が認められた。しかしながら、HFF に対し 10 μg/mL の濃度ではほぼ細胞毒性を示さず、Vero 細胞に対しては画分 4-2、4-3、4-4 でわずかな細胞毒性が見られた (Table 2)。抗トキソプラズマ活性に関しては、100 μg/mL 注入の場合ほぼ全てのサンプルで活性が見られたが、10 μg/mL で活性を示した画分は画分 4-4 並びに画分 4-5 のみであった。このことから、今回 HPLC で分取された画分中、顕著な抗トキソプラズマ活性を示し且つ細胞毒性の弱い画分 4-5 が最も有用であると考えられた。画分 4-5 からは 26.5 mg の固形物が得られたため、

当該サンプルを用いてスペクトル解析を行った。

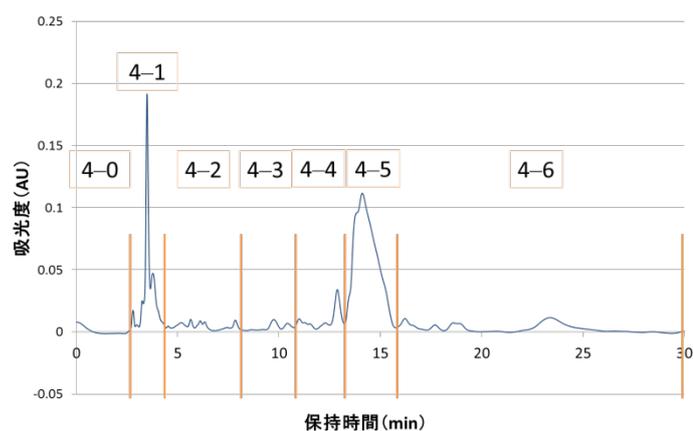


Fig. 1 画分4の逆相HPLCクロマトグラム

Table 2. 逆相HPLC画分の抗トキソプラズマ活性並びに細胞毒性

	細胞傷害性 <sup>a</sup>		<i>T. gondii</i> 抑制
	HFF	Vero	
4-0	+	+	-
4-1	+/-	+/-	-
4-2	+	+	-
4-3	+	+	-
4-4	+	+	++
4-5	+	+	++
4-6	+	+	-

<sup>a</sup> (-) > 100 $\mu$ g/ml; (+) 10–100  $\mu$ g/ml; (++) 1–10  $\mu$ g/ml

### 3.3 活性画分4-5に含まれる物質の同定

機器分析の結果、EIによるライブラリリサーチによって画分4-5には olean-12-en-28-oic acid 並びに構造異性体である olean-12-en-29-oic acid が含まれていることが示唆された(Fig. 2)。さらに、<sup>1</sup>H-NMRの結果より両異性体は約2:1の割合で含まれていることも示唆された。このどちらか、もしくは両方が抗トキソプラズマ活性物質であると考えられたため、今後この2種をHPLCで分離する条件を検討していくことが必要となる。2種ともにカルボキシル基を含むことから溶離液に0.1%酢酸を加えることも検討している。分取後には再び活性評価を行い、どちらの異性体が真の活性物質であるかを確定させる予定である。さらに、両異性体の絶対立体配置を新 Mosher 法及び NOE 解析などを駆使して決定する予定である。

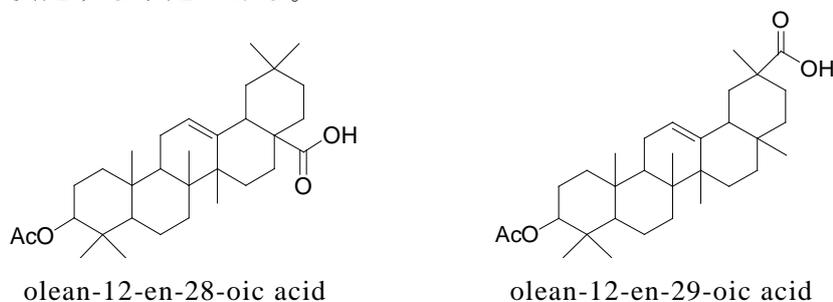


Fig. 2 活性画分4-5に含まれる物質の構造

#### 【参考文献】

- 1) 福島和彦、船田良、杉山淳司、高部圭司、梅澤俊明、山本浩之、2011、木質の形成 バイオマス科学への招待 第2版、海青社、403
- 2) Rowinsky, E. K. and Donehower, R. C., 1995. "DRUG-THERAPY - PACLITAXEL (TAXOL)." *N Engl J Med Overseas Ed* 332, 1004-1014.
- 3) Montoya, J. G. and Liesenfeld, O., 2004. "Toxoplasmosis." *Lancet* 363, 1965-1976.
- 4) Dautu, G., Ueno, A., Miranda, A., Mwanyumba, S., Munyaka, B., Carmen, G., Kariya, T., Omata, Y., Saito, A., Xuan, X., and Igarashi, M., 2008. "Toxoplasma gondii: Detection of MIC10 antigen in sera of experimentally infected mice." *Exp Parasitol* 118, 362-371.

○川村浩平（北大農）、嘉見大助（北農業研セ）、鈴木伸吾、桜井健至、荒川圭太（北大院農）

### 【緒言】

木本植物が種子を生産できるようになるまで成長するには長い年月を要し、個体サイズが大きくなる。近年、研究の増加にともなう増えつつある形質転換樹木の系統維持を考えると、野外で植栽するには制約が多いため、種子による系統保存が極めて困難である。そのため、作出された形質転換樹木は、継代培養によってクローン個体を増殖することで系統維持されている。しかし、継代培養による系統の維持には、多数の個体を植え継ぐ労力やそれらを維持するための相応のスペースが必要となること、それにともなうコンタミネーションの危険性が増すことなどが問題点として挙げられる。そこで、これらの問題点を克服するための方策の1つとして、超低温保存法の適用が有効なのではないかと考えた。

植物の超低温保存は、凍結にほとんど耐えられない植物であっても、それらの培養細胞、組織、体細胞不定胚などの試料に前処理を施すことで、約-150°C以下の温度で個体再生可能な状態を維持して保存する技術である（酒井 1996）。超低温保存を行うことで、継代培養にかかる労力やスペースを最小限に抑えると共に、試料を遺伝的に安定に維持することが求められる（Jokipii et al. 2004）。近年では絶滅の危機にある植物を増殖して超低温保存する試みもなされている（Touchell and Dixon 1995）。そのため、超低温保存技術は、進歩を続けるバイオテクノロジーに関連した重要な基礎技術の1つとして位置づけられる（Sakai 1995）。

植物材料の超低温保存を普及させるためには、簡便で効率の良い保存法の開発が要求される。このような保存法として、ガラス化法がある。ガラス化法は、脱水濃縮した組織を濃厚なガラス化溶液で処理してから液体窒素中で急冷するもので、細胞を懸濁液であるガラス化溶液と共にガラス化させることで細胞内凍結を回避して細胞を保存する方法である（酒井 1996）。他の保存方法の1つとして緩速凍結法があるが、この方法は-40°C程度まで試料を緩速冷却するため、耐凍性が低い試料に適用するのが難しい場合がある。それに比べてガラス化法は氷点下温度での凍結脱水処理を行わないため、耐凍性が低い試料にも適用することができ、加えて操作が簡単で特殊な設備を必要としないという利点がある。

そこで本研究では、遺伝子組み換え実験に用いられるモデル樹木の1つである交雑ポプラについて、野生株と形質転換株の茎頂を用いてガラス化法による超低温保存を試みた。

### 【実験材料および方法】

#### 1. 材料

実験には交雑ポプラ (*Populus tremula* × *P. alba*) の野生株と形質転換株を用いた。形質転換株における GFP の植物体への導入にはアグロバクテリウム法を用いた。小胞体 (ER) 局在性のシグナル配列を付した GFP の遺伝子を挿入したプラスミド (Mitsuhashi et al. 2000, Hayashi et al. 2001) を導入したアグロバクテリウムを用いて、Fenning and Gartland (1995) の方法を参考にして交雑ポプラの形質転換株を作製した。

#### 2. 培養方法

継代培養は 1/2 MS 液体培地 (1/2 濃度の MS、20 g/L スクロース、0.2 g/L MES、pH 5.8) に、6 g/L の寒天を添加した 1/2 MS 寒天培地を培養ビン (約 200 mL 容) に約 30 mL 用意し、継代用

の個体から腋芽を含む節間ごとに切り取り、培地に移植することで行った。個体は 23°C、16 時間日長に設定した人工気象器にて生育させた。実験には、3 週間以上生育させた個体を用いた。

### 3. 超低温保存

はじめに野生株を用いて Kami ら (2008) の方法を参考にガラス化法の条件検討を行った。継代後 3 週間以上経った個体を 3 週間 5°C の冷暗所に置き、低温馴化処理を行った。低温馴化処理を行った個体から実体顕微鏡を用いて長さ 3-4 mm、直径 2 mm の茎頂を切り出し、スクロース (0.4 M) を添加した 1/2 MS 寒天培地で 2 日間の前培養を行った (23°C、16 時間日長)。前培養終了後、茎頂を 1.8 mL 容のクライオチューブに移し、脱水耐性を付与するためにローディング液 (2.0 M グリセロール、0.4 M スクロース添加 1/2 MS 液体培地) に浸漬し、30 分間室温で処理を行った。その後、氷冷した PVS2 溶液 [30% (w/v) グリセロール、15% (w/v) エチレングリコール、15% (w/v) ジメチルスルホキシド、0.4 M スクロース添加 1/2 MS 液体培地] または PVS3 溶液 [50% (w/v) グリセロール、50% (w/v) スクロース添加 1/2 MS 液体培地] に浸漬して一定時間静置することで浸透脱水処理 (ガラス化溶液処理) を行った。なお、浸透脱水処理の途中で PVS2 溶液あるいは PVS3 溶液を一度新しいものと入れ替えた。ガラス化溶液処理後、試料の入ったクライオチューブを直ちに液体窒素中に投下して 1 時間の超低温保存を行った。超低温保存後、クライオチューブを 42°C に設定したウォーターバス中に 2 分間つけて急速昇温させた。その後、PVS2 溶液または PVS3 溶液を除去して洗浄液 (1.2 M スクロース添加 1/2 MS 液体培地) で洗浄した後、同溶液に浸して 30 分間室温で処理した。その後、茎頂を 1/2 MS 寒天培地に置床し、3 週間後にシュート再生した茎頂の数を数えて再成長率を算出した。

次に形質転換株を用いて PVS2 溶液による超低温保存実験を行った。ただし、形質転換株では低温馴化処理を行わずに実験を行うこととした。

いずれの条件でも、ガラス化溶液で処理した後に液体窒素中での超低温保存を行わずに洗浄を行い、個体再生させた試料を対照区とした。

#### 【結果および考察】

低温馴化処理を行った交雑ポプラの野生株の茎頂をガラス化溶液で処理しただけで再成長させた対照区では、PVS2 溶液での処理時間が 0-60 分間の場合、再成長率は 100%を保っており細胞障害は抑えられていたが、PVS2 溶液での処理時間が 90 分間に及ぶと再成長率が低下し始めた (図 1. a)。対照区で試料の超低温保存は行っていない条件なので、生存率の低下は PVS2 溶液の薬害によるものと考えられる。一方で超低温保存を行った実験区では PVS2 溶液での処理時間が長くなるに応じて茎頂の再成長率が上昇した。PVS2 溶液での処理時間が 90 分間のものでは超低温保存後の再成長率は約 80%だったが、これは対照区の生存率とほとんど差が無いほど高い再成長率だった。

次にガラス化溶液として PVS3 溶液を用いた場合、対照区ではいずれの処理時間においてもほぼ全ての茎頂が再成長を示したにもかかわらず、超低温保存を行った実験区では処理時間に応じて茎頂の再成長率は上昇したものの、最大でも約 50%の再成長率であった (図 1. b)。

結果として低温馴化を行った交雑ポプラの野生株の茎頂では、ガラス化溶液として PVS2 溶液を用いて処理時間が 90 分間の試料が超低温保存後の再成長率が最も高いことがわかった。

また、形質転換株の茎頂の超低温保存の結果については、現在再成長率を計測中である。

今後、低温馴化を行った形質転換株での実験を予定している。さらに、GFP を過剰発現する形質転換株を用いて超低温保存前後での GFP の発現様式やタンパク質組成を比較し、超低温保存による組織への影響の有無を調べてガラス化法による交雑ポプラの超低温保存の有効性を検証していきたい。加えて、超低温保存の期間を延長することによる茎頂の生存率への影響や緩速凍結法による超低温保存の有効性などについて調べていく予定である。

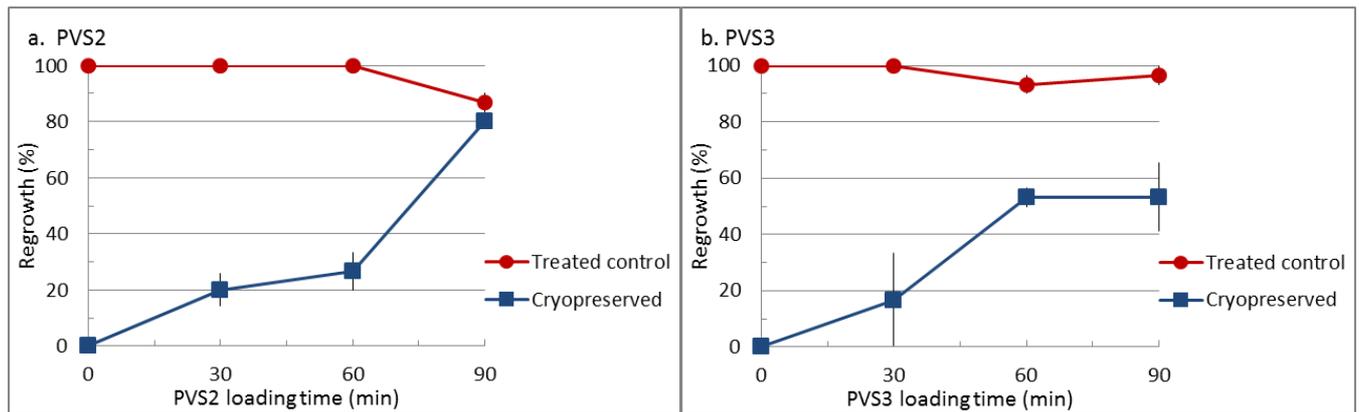


図 1. ガラス化溶液処理時間が交雑ポプラ野生株の茎頂の再成長率に与える影響。

ガラス化溶液として PVS2 溶液 (a) と PVS3 溶液 (b) を用いて超低温保存を行った時の茎頂の再成長率を比較した。Treated control: ガラス化溶液処理後, 液体窒素中で超低温保存を行わなかった試料 (対照区)。Cryopreserved: ガラス化溶液処理後, 超低温保存を行った試料 (実験区)。

#### 【参考文献】

- Fenning, T. M., Gartland, K. M. A.: Transformation Protocols for Broadleaved Trees, *Methods in Molecular Biology*, 44, Agrobacterium Protocols, 149-165 (1995).
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N.K., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.: A Proteinase-Storing Body that Prepares for Cell Death or Stresses in the Epidermal Cells of Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.*, 42, 894-899 (2001).
- Jokipii, S., Rynänen, L., Kallio, P. T., Aronen, T., Häggman, H.: A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx., *Plant Science*, 166, 799-806 (2004).
- Kami, D., Kasuga, J., Arakawa, K., Fujikawa, S.: Improved cryopreservation by diluted vitrification solution with supercooling-facilitating flavonol glycoside, *Cryobiology*, 57, 242-245 (2008).
- Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.: Characterization of Organelles in the Vacuolar-Sorting Pathway by Visualization with GFP in Tobacco BY-2 Cells, *Plant Cell Physiol.*, 41, 993-1001 (2000).
- Sakai, A: In "Cryopreservation of Plant Germplasm I, Biotechnology in Agriculture and Forestry 32," Y. P. S. Bajaji ed., Springer-Verlag, Berlin, p.53 (1995).
- 酒井 昭: ガラス化法 (vitrification) による植物培養細胞・組織の超低温保存, *低温生物工学会誌*, 42, 1, 61-68 (1996).
- Touchell, D. H. and K. W. Dixon: In "International Workshop on In Vitro Conservation of Plant Genetic Resources," Organized by Univ. Kebang-saan Malaysia and IBPGRI, Kuala Lumpur, p.33 (1995).

○鉄穴口晃（北大農）、鈴木伸吾、荒川圭太（北大院農）

### 【諸言】

植物細胞に限らず生きている細胞は、細胞内の水が凍結する(細胞内凍結)と死滅する。これは、細胞内で形成された氷晶が成長して原形質膜などの膜構造を破壊してしまうためである。多くの植物は越冬中でも 40% 以上の水を含んでいるため、急激に冷却されると、致命的である細胞内凍結が起こりやすいといわれている(酒井 2003)。細胞内凍結を避けるため、耐寒性の高い樹木は、氷点下温度に対して種や組織に特徴的な適応機構(細胞外凍結、器官外凍結、深過冷却)を示して細胞内凍結を防ぎ、冬の氷点下温度に適応している(Ishikawa and Sakai 1982; Sakai and Larcher 1987)。

樹木の氷点下温度への適応機構のうちの一つである細胞外凍結は、皮層や形成層組織で見られる。これらの組織では、氷点下温度になると細胞外の水が先に凍結する。このとき、細胞内の水は過冷却しているため細胞外の水と細胞内の水の間には蒸気圧の差が生じ、結果的に細胞内の水が細胞外へ脱水される(凍結脱水)。気温の低下にともなって凍結脱水は進んで細胞内の水の量が少なくなるので致命的な細胞内凍結が生じにくくなる(酒井 1982)。このような組織では、比較的高い氷点下温度で細胞外の水が凍結しやすいため、植物細胞の外側の領域で氷核形成を起こしやすい条件にあるといえる。このことは、細胞内部に比べて細胞外の方が氷核形成を促す(すなわち氷核活性を示す)何らかの物質が存在する可能性があるとも考えられる。植物組織での氷核活性の検出は、細胞外凍結が始まる時期や氷が集積する場所と密接に関連するため、氷核活性物質が樹木の氷点下温度への適応機構に大きな役割を持っていると考えられる。実際、氷核活性物質に由来する氷核活性が組織ごとの凍結様式の決定に重要であると指摘する報告がある(石川 2014)。そこで本研究では、皮層柔細胞のみならず冬芽でも細胞外凍結で氷点下温度に適応しているシラカンバ(*Betula platyphylla* var. *japonica*) (遠藤 2013) と、先に氷核活性を阻害するポリフェノール(Kasuga et al. 2008; Wang et al. 2012)が見出されているカツラ(*Cercidiphyllum japonicum*)を用いて氷核活性を検出することを試みるとともに、氷核活性の季節変化について調べることにした。

### 【材料及び方法】

#### 実験材料

氷核活性の季節変化を調べるために、北海道大学札幌研究林実験苗畑に生育しているシラカンバとカツラの芽や葉、枝を4月下旬～8月下旬の期間に2か月おきに採取した。採取後、組織ごとに細胞外の凍結に関与する凍結温度を測定するため、直ちにカミソリで芽もしくは葉を切りとり、残った枝は純水でよく洗った後にカッターナイフで樹皮と木部に分けた。組織は1.5 mL容のチューブに約0.5 gずつ取り分けて液体窒素で凍結し、実験に使用するまで-80°Cのフリーザーで保存した。

#### 粉碎・抽出・分離方法

各組織は試料の10%重量のポリビニルピロリドンを加え、乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で磨砕して粉末にした。全量を15 mL容のチューブに移し、そこに芽と葉の試料では試料重量の10倍量の、樹皮と木部では5倍量の抽出バッファー[50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0)、0.5 M ソルビトール、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、5 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]を加えてよく攪拌した後、9,000xgで10分間遠心分離し、上清を別のチューブに取り分けた。沈殿を洗浄するため、新たに1 mLの抽出バッファーを加えてしっかり攪拌した後、9,000xgで5分間遠心分離して上清を除いた。この操作をさらに二回繰り返した後、沈殿に試料の5倍量の抽出バッファーを添加してよく懸濁したものを不溶性画分(沈殿の画分)の試料とし、使用するまで液体窒素で凍結して-80°Cのフリーザーで保存した。一方、取り分けた上清はさらに15,000xgで10分間遠心分離した。得られた上清を新しいチ

チューブに移して可溶性画分（上清の画分）の試料とし、使用するまで液体窒素で凍結して $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーで保存した。

### 凍結温度の測定方法

各画分の凍結温度は熱分析法によって測定した。冷凍保存していた各試料をフリーザーから取り出して $4^{\circ}\text{C}$ で解凍し、よく攪拌したものを $0.2\text{ mL}$ 容のPCRチューブに $10\ \mu\text{L}$ ずつ分注した。これらのチューブ底付近の表面に熱電対をセロテープで貼り付け、 $4^{\circ}\text{C}$ で予冷したプログラムフリーザーにセットして $0.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で $4^{\circ}\text{C}$ から $-60^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、試料の凍結にともなう潜熱の放出を測定した。なお、1つの試料あたり5つのチューブに分注して凍結温度を測定し、その中央値を試料の凍結温度とみなした。この凍結温度の測定は各試料について3反復以上行い、その平均値 $\pm\text{SD}$ を求めた。また、試料を加えず抽出バッファーのみで同様に処理して得られた沈殿および上清の画分をそれぞれコントロールとして用いた。コントロール実験では、実験ごとの結果のばらつきを考慮し、全ての時期で得られた結果から平均凍結温度を算出して利用することにした。

### 試料の熱処理

氷核活性について熱処理の影響をみるために、試料を入れたチューブを $95^{\circ}\text{C}$ で10分間湯浴した後、前述の熱分析法によって凍結温度を測定した。

### 【結果および考察】

#### シラカンバ及びカツラの氷核活性の検出

熱分析によってシラカンバとカツラの各組織から氷核活性の検出を試みた。両樹種とも4月は芽と樹皮と木部、6月と8月は葉と樹皮と木部の各組織の沈殿および上清の画分の凍結温度を測定した。なお、コントロール（抽出バッファーのみ）の測定値が $3^{\circ}\text{C}$ 程度の範囲でばらつくため、各樹種各画分ごとに、各測定の最高値と最低値を除き、4月から8月までの全測定値の平均値 $\pm\text{SD}$ でコントロールの凍結温度を表した。

シラカンバでは、コントロールの凍結温度と比べると、4、6、8月に採取した芽と葉の沈殿および上清、8月の樹皮の沈殿および上清の画分で凍結温度が高く、氷核活性があることが示唆された。また、カツラでは、コントロールに比べて4、6、8月の芽と葉と樹皮の沈殿画分で凍結温度が高く、氷核活性があることが示唆された。

一方で、シラカンバとカツラ両樹種の木部では、沈殿、上清の両画分ともに凍結温度はコントロールとほとんど差がみられず、この時期には氷核活性がほとんどないことが示唆された。

#### シラカンバの氷核活性の季節変化

シラカンバの氷核活性がどのような季節変化をするのかを調べるために、4、6、8月の芽（または葉）と樹皮、木部の各組織から沈殿および上清の画分を調製し、それぞれ凍結温度を測定した。芽（または葉）では、沈殿の画分の凍結温度はほぼ一定の値を示しており、氷核活性の季節変化はみられなかったが、上清の画分では芽が葉に展開した4月と6月の間で凍結温度が高くなった。また、樹皮では、4月から8月にかけて沈殿（図1 a）、上清（図1 b）の両画分ともに凍結温度が徐々に高くなった。

#### カツラの氷核活性の季節変化

シラカンバと同様に、カツラでも氷核活性がどのような季節変化をするのかを調べるために、4月、6月、8月の芽（または葉）と樹皮、木部の沈殿および上清の画分の凍結温度を測定した。芽（または葉）では、沈殿、上清の両画分ともに凍結温度に季節的な変化はみられなかった。また、樹皮では、沈殿画分の凍結温度に大きな季節変化はみられなかった（図1 c, d）。

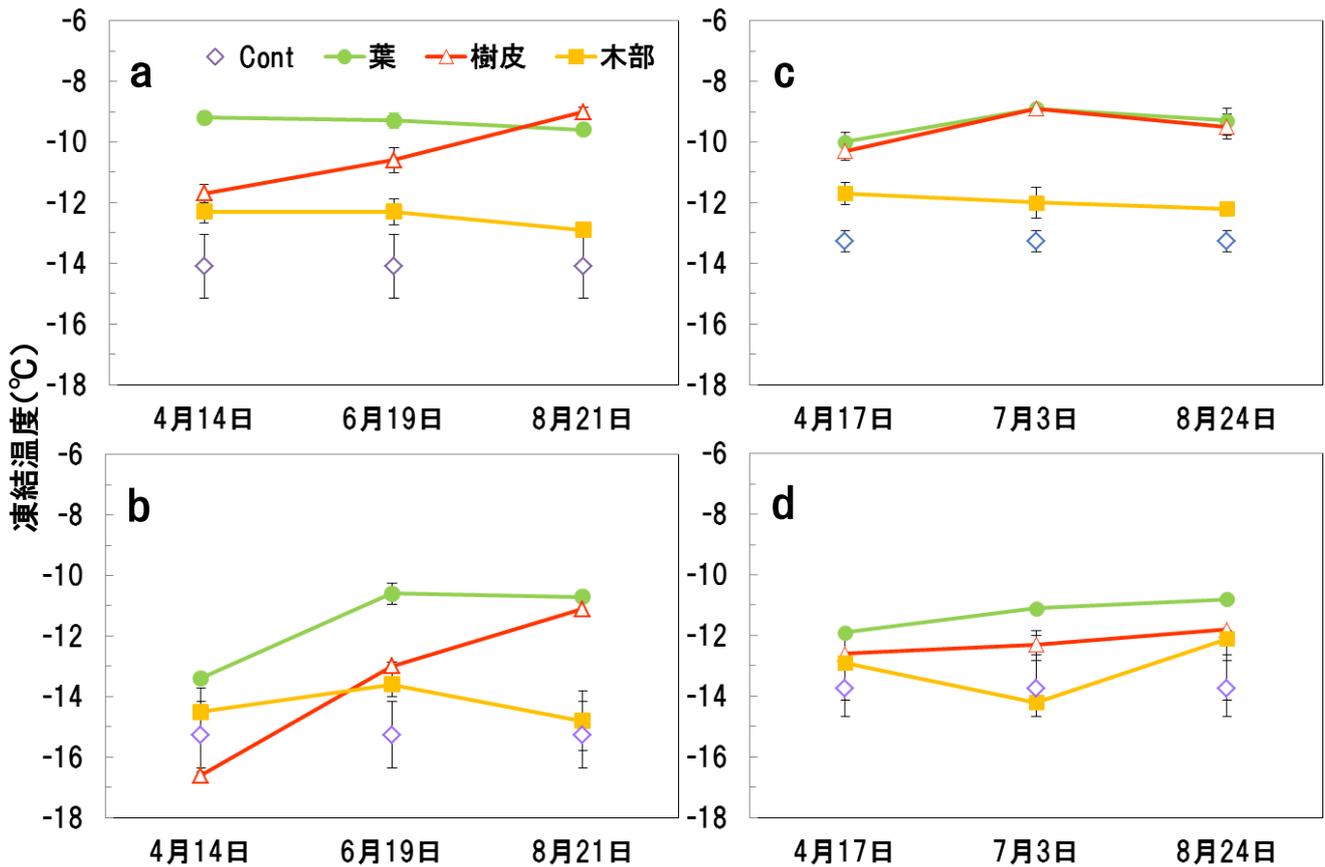


図. シラカンバ及びカツラ各組織の凍結温度の季節変化.

各時期に採集したシラカンバ (a, b) とカツラ (c, d) の各組織から調製した沈殿 (a, c) および上清 (b, d) の画分の凍結温度 (平均値±SD, n≥3) を熱分析法で測定した. (●), 芽と葉; (△), 樹皮; (■), 木部; (◇), コントロール (抽出バッファーのみ). なお、a-d のいずれのコントロールも全ての時期の測定値の平均値を用いた.

### シラカンバ及びカツラの氷核活性に対する熱処理の影響

シラカンバとカツラ両樹種で検出された氷核活性に対する熱処理の影響をみるために、組織の沈殿と上清の画分を 95°C で 10 分間処理した後で凍結温度を測定した。その結果、シラカンバの 4 月の芽と 4~8 月の樹皮、木部のすべてが上清、沈殿の両画分ともに熱処理後の凍結温度の低下は 1°C 未満と小さかったが、6 月と 8 月の葉の沈殿と上清の両画分では熱処理後に凍結温度は 3°C 程度低下した (データ示さず)。そのため、シラカンバにおける氷核活性は、組織や季節に応じて熱感受性の高い因子が関与する可能性が示唆された。

一方カツラでは、4 月から 8 月まで通して芽と葉の沈殿画分の凍結温度は、熱処理によって 2~4°C 程度低下した。また、樹皮の沈殿画分の凍結温度も熱処理によって 2~3°C 程度低下した。芽と葉と樹皮の上清画分と木部の沈殿、上清両画分は、いずれも熱処理によって凍結温度に変化はみられなかった。シラカンバと同様にカツラの氷核活性においても、組織や季節に応じて熱感受性の高い因子が関与する可能性が示唆された。

### 【まとめ】

本研究では、熱分析を用いてシラカンバとカツラから氷核活性の検出を試みたところ、両樹種の芽、葉、樹皮の組織から氷核活性が検出された。シラカンバでは、4 月と 6 月の間で芽や葉の上清画分の凍結温度が高くなり、樹皮では沈殿、上清の両画分ともに凍結温度が徐々に高くなった。一方カツラでは、凍結温度の季節的な変化はみられなかった。そのため、氷核活性の季節変化は樹種や組織によって異なることが示唆された。また、これらの氷核活性では、熱感受性の高い何らかの成分が部位や季節に応じて関与する可能性も示唆された。

### 【文献】

- 遠藤圭太: 樹木冬芽の越冬機構に関する研究, 北海道大学大学院農学院 平成 24 年度博士論文, (2013)
- Ishikawa M, Sakai A: Characteristics of freezing avoidance in comparison with freezing tolerance: a demonstration of extraorgan freezing, In: "Plant Cold Hardiness and Freezing Stress, Vol 2", Li PH, Sakai A, eds, Academic Press, New York, pp.325-340 (1982)
- 石川雅也: 植物組織の氷核活性の検索, 低温生物工学会誌, Vol. 60 (2), pp.79-88 (2014)
- Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshiba M, Fujikawa S: Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity, *Plant Cell Environ*, 31, 1335-1348 (2008)
- 酒井昭: 植物の耐凍性と寒冷地適応—冬の生理・生態学—, 学会出版センター, pp.21-26 (1982)
- Sakai A, Larchar W: Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress, *Ecological studies* 62, Springer-Verlag, Berlin (1987)
- 酒井昭: 植物の耐寒戦略—寒極の森林から熱帯雨林まで, 北海道大学図書刊行会, p.27 (2003)
- Wang D, Kasuga J, Kuwabara C, Endoh K, Fukushi Y, Fujikawa S, Arakawa K: Presence of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) hydrolyzable tannins in deep supercooling xylem parenchyma cells in *Cercidiphyllum japonicum*, *Planta* 235, 747-759 (2012)

○戸田正彦（北海道立総合研究機構 林産試験場）、大橋義徳、古田直之

### 【緒言】

平成 27 年に枠組壁工法用製材の JAS が改正され、国産材を対象とした新たな樹種区分が増設された。これにより、今後は道産材を含めた国産材を用いた枠組壁工法建築物が増加すると期待される。本研究では、道産カラマツ・トドマツの枠組壁工法用製材およびカラマツ合板を用いた耐力壁の面内せん断試験を実施して性能評価を行うとともに、釘接合性能からせん断変形挙動を推定し、実験値との比較を行った。

### 【試験体および試験方法】

試験に用いた枠組壁工法用製材は、北海道産のカラマツ（平均比重 0.52、変動係数 6.2%）およびトドマツ（同 0.39、9.6%）の寸法形式 204 材（厚さ 38mm×幅 89mm）であり、面材は厚さ 9mm のカラマツ構造用合板（同 0.56、6.0%）を用いた。使用した釘は太め鉄丸釘（CN50）であり、釘間隔は外周が 100mm—中通り 200mm、または外周 50mm—中通り 100mm とした。試験体寸法は幅 1820mm×高さ 2460mm とし、枠組材の緊結は平成 13 年国土交通省告示第 1540 号の第 5 第十五号の規定に準じた。面材を接合するくぎ等の縁端距離は、縦枠では見付け幅の 1/4 程度(10mm)、上枠および下枠では同 1/2 程度（19mm）とした。試験体の仕様を図 1 に示す。試験体数は各仕様 3 体である。

試験方法はタイロッド式とし、加力用木材はカラマツ集成材（幅 89mm×厚さ 150mm）を使用し、上枠材および頭つなぎ材とはボルト（M16、4 本）で固定した。また土台材はカラマツ製材（89mm 角）を用いた。変位の測定にはひずみゲージ式変位変換器を用いて、変位計 H1 で上枠部の水平変位を、H2 で下枠部の水平方向変位を、変位計 V3、V4 で左右の縦枠脚部の鉛直方向変位を測定した。加力方法は正負交番繰り返し加力とし、繰り返しのステップは真のせん断変形角が 1/600、1/450、1/300、1/200、1/150、

1/100、1/75、1/50rad の正負、同一変形段階で 3 回の繰り返し加力を行った。最大荷重に達した後、最大荷重の 80% の荷重に低下するまで加力するか、試験体の変形角が 1/15rad 以上に達するまで加力した。

面内せん断試験における真のせん断変形角（ $\gamma_0$ ）は次式により求めた。

真のせん断変形角  $\gamma_0$  (rad)

$$\gamma_0 = \gamma - \theta$$

ただし

見かけのせん断変形角  $\gamma$  (rad)

$$\gamma = (\delta 1 - \delta 2) / H$$

脚部の回転による変形角  $\theta$  (rad)

$$\theta = (\delta 3 - \delta 4) / V$$

$\delta 1$  : 上枠部の水平変位 (mm) (変位計 H1)

$\delta 2$  : 下枠部の水平変位 (mm) (変位計 H2)

H : 変位計 H1 と H2 の間の標点間距離 (mm)

$\delta 3$  : 右縦枠脚部の鉛直方向変位 (mm) (変位計 V3)

$\delta 4$  : 左縦枠脚部の鉛直方向変位 (mm) (変位計 V4)

V : 変位計 V3 と V4 の間の標点間距離 (mm)

いずれも浮き上がり方向を正とした。

試験実施の様子を図 2 に示す。

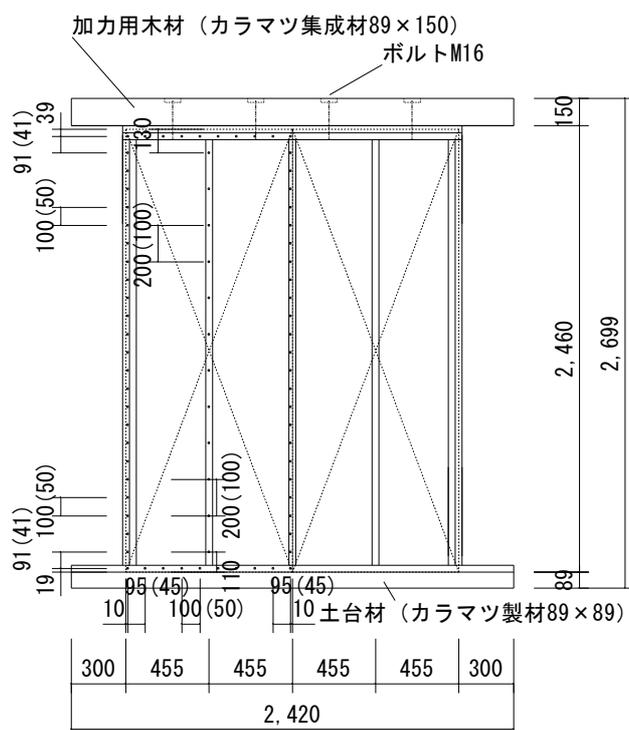


図 1 試験体の寸法（単位：mm）

【結果および考察】

荷重－変形角曲線を図3に示す。また試験終了後の代表的な破壊形態を図4に示す。カラマツ 204材での主な破壊形態は、釘間隔 100mm の場合は釘の引抜けやパンチングアウトであり、釘間隔 50mm の場合は、これらに加えて上枠材・下枠材の横引張破壊が多く見られた。また合板の座屈破壊やそれに伴う面外への離脱も確認された。トドマツ 204材の場合もカラマツと同様の傾向が認められたが、パンチングアウトの発現数はやや少なかった。また釘自体が破断した事例もカラマツ、トドマツで1体ずつ認められた。

荷重－せん断変形曲線の終局加力を行った側の包絡線から降伏耐力  $P_y$ 、終局耐力  $P_u$  等を求めた。短期基準せん断耐力  $P_0$  は、次の(a)から(d)までに掲げる耐力について、それぞれ算出した下限値のうち最も小さい値とする。

- (a) 降伏耐力  $P_y$
- (b) 終局耐力  $P_u$  に  $0.2\sqrt{2\mu - 1}$  を乗じる
- (c) 最大耐力  $P_{max}$  の  $2/3$
- (d) 特定変形時の耐力（タイロッド式の場合：真のせん断変形角  $1/150\text{rad}$  時）

壁倍率は次式により算定した。

$$\text{壁倍率} = P_0 \times (1/1.96) \times (1/L)$$

ここで、1.96：壁倍率=1を算定する数値（kN/m）、 $L$ ：壁の長さ（m）

各種評価値を表1に示す。

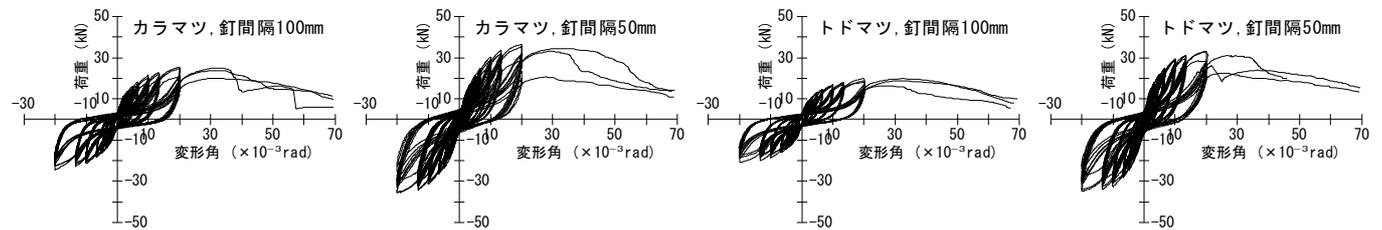


図3 荷重－変形角の関係曲線



図2 試験実施の様子

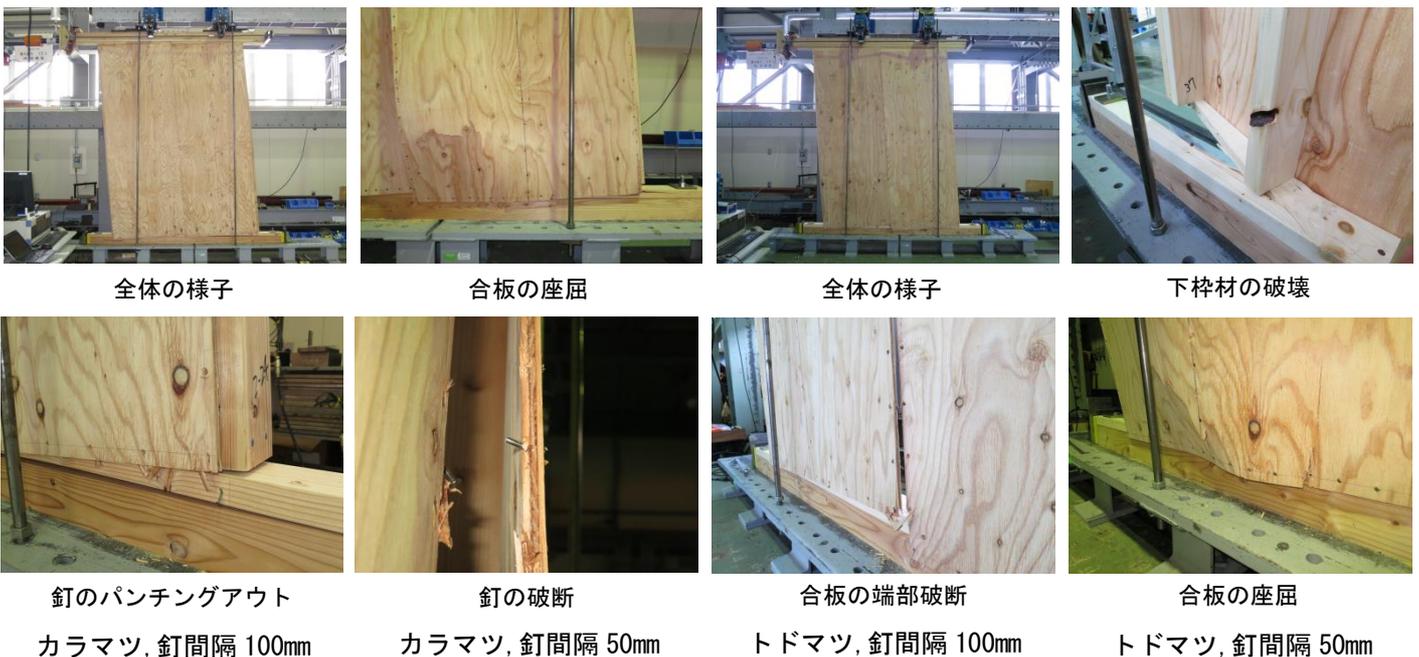


図4 代表的な破壊形態

表 1 試験結果に基づく評価値

	カラマツ		トドマツ	
	釘間隔100mm	釘間隔50mm	釘間隔100mm	釘間隔50mm
最大耐力 $P_{max}$ (kN)	23.68	33.41	19.05	31.93
最大耐力時変形角 $\gamma_{Pmax}$ ( $\times 10^{-3}$ rad)	24.08	19.81	24.40	17.56
降伏耐力 $P_y$ (kN) (a)	12.70	18.01	10.37	17.07
降伏変形角 $\gamma_y$ ( $\times 10^{-3}$ rad)	3.30	4.09	3.00	3.20
終局耐力 $P_u$ (kN)	21.72	30.15	17.62	28.94
終局変形角 $\gamma_u$ ( $\times 10^{-3}$ rad)	44.58	38.00	46.40	32.16
降伏点変形角 $\gamma_v$ ( $\times 10^{-3}$ rad)	5.65	6.85	5.11	5.42
剛性 $K$ (kN/rad)	3846	4417	3464	5405
塑性率 $\mu$	7.97	5.46	9.07	5.97
構造特性係数 $D_s$	0.263	0.320	0.244	0.304
$P_u \cdot (0.2\sqrt{2\mu - 1})$ (kN) (b)	16.55	19.04	14.56	19.17
$2/3P_{max}$ (kN) (c)	15.79	22.28	12.70	21.29
特定変形時 (1/150rad) 耐力 (kN) (d)	17.05	23.43	14.34	24.51
短期基準せん断耐力 $P_0$ (kN)	12.17	17.05	10.18	16.97
壁倍率 (試算値)	3.41	4.77	2.85	4.75

※ $P_0$ および壁倍率以外は3体の平均値

$P_0$ を算定した結果、全ての仕様で降伏耐力が決定因子となった。釘間隔を通常の100mmから50mmとし釘本数を増やすことで耐力の向上を期待したが、釘本数の増加に見合うほどの効果は得られなかった。特にカラマツ204材の場合は釘間隔100mmで壁倍率3.41、同50mmで4.77と1.4倍向上したのにとどまり、またトドマツ204材でも1.67倍までしか上昇しなかった。これは、柱脚・柱頭部分において、上枳材・下枳材に打たれた釘が繊維直交方向に加力を受けることによって、釘の引抜やパンチングアウトが発生する前に上下枳材の横引張破壊が発生し、耐力が上昇しなかったためと考えられる。また釘間隔50mmの場合は、合板が対角方向に大きな圧縮力を負担したことによって座屈が発生し、面外へ大きく離脱したことも理由として挙げられる。

【せん断変形挙動の推定】

一般に、合板などの木質面材料を釘打ちした面材張り耐力壁のせん断挙動は、それぞれ剛体と仮定した軸組(枳組)材がピン接合されたフレームと面材とからなる壁要素のせん断変形( $\gamma_f$ )と、面材自体のせん断変形( $\gamma_s$ )を直列に加算することによって表現される<sup>1)</sup>。

$\gamma_f$ を求めるには面材の回転方向を仮定したモデルよりも、力の釣り合いにより面材の回転方向を決める神谷のモデル<sup>2)</sup>を適用したほうが実験値との整合性が高い<sup>3)</sup>。しかし、枳組壁工法の縦枳材(断面38×89mm)は、例えば在来軸組工法の一般的な柱断面(105mm角)に比べると剛性が不足しており、面材に打たれた釘がせん断力を負担した場合に生じる曲げ変形の影響が少なくないと考えられる。杉山<sup>4)</sup>は、このような枳組壁工法の耐力壁では、面材釘のせん断力のうち、辺に直交する方向の成分は上記の曲げ変形によって減少することに注目して、釘のせん断抵抗は辺に沿った方向の成分のみを考慮し、かつ外周に打たれた釘のみを考慮する略算法を提案している。

ここでは、杉山の略算式を用いた解析と、軸材を剛体と仮定した神谷のモデルによる解析を行い、実験値との比較を行った。解析の元となる釘接合部の1面せん断変形挙動は、同じロットの204材およびカラマツ合板を用いて実施した釘接合1面せん断試験<sup>5)</sup>のデータを使用した。ただし計算には、これらを

完全弾塑性モデル化したのち、さらに特徴点を結んだトリリニア曲線（図中の破線）を用いた。また $\gamma_s$ の算定にあたり、合板の $G$ は $0.5 \text{ (kN/mm}^2\text{)}$ とした。なお神谷のモデルにおいても釘は合板の四周にのみ打たれていると設定し、間柱に打たれた釘は寄与していないと仮定して解析を行った。また本実験の壁が幅 $910\text{mm}$ の合板を2枚張りした仕様であるため、合板1枚張りモデルの解析で得られた荷重-変形角曲線を2倍することによって本試験に相当する荷重-変形角曲線を作成した。推定値と実験値（包絡処理線）とを図6に示す。

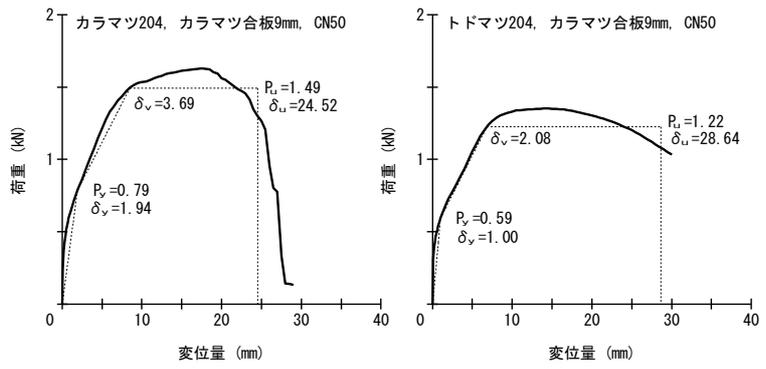


図5 推定に用いた釘接合部の1面せん断性能

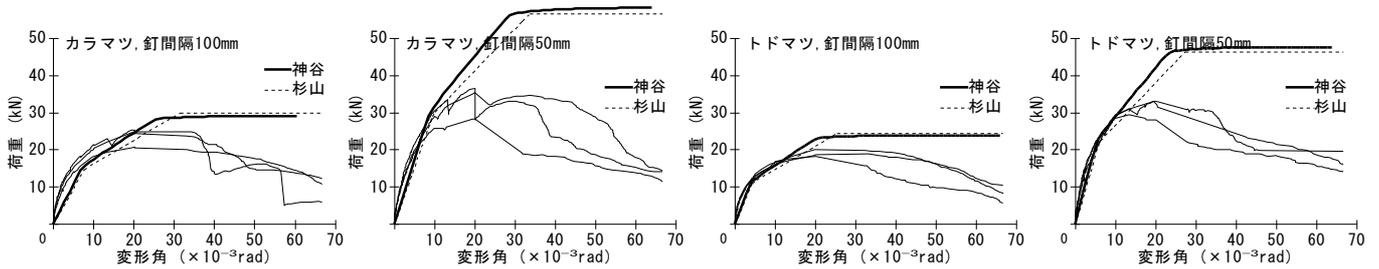


図6 推定値と実験値の比較

算定の結果、杉山式による値は神谷モデルよりも最大耐力に至るまでは低めに評価される傾向が確認された。またいずれも初期剛性は実験値に比べてやや低く、逆に最大耐力は実験値より高くなる傾向が認められた。特に釘間隔 $50\text{mm}$ の場合の最大耐力は実験値を大きく上回っていた。これは試験結果で示したように、釘接合性能が十分に発揮される前に上下枠材の横引張破壊や合板の座屈が発生し最大耐力に達したため、および部材同士がピン接合されているという仮定が成り立たなくなったためである。また初期剛性については、トリリニア化した釘接合部の初期剛性が低めに評価されていることが要因である。

【まとめ】

道産204材と道産カラマツ合板からなる枠組壁工法耐力壁の面内せん断試験を行った結果、カラマツ、トドマツともに釘間隔を $50\text{mm}$ としても壁倍率は最大4.7倍程度にとどまった。これは上下枠材の破壊や合板の座屈が発生したことによって最大耐力が決定されたためと考えられる。釘接合部1面せん断試験の荷重-すべり量の関係をもとに、合板釘打ち壁のせん断変形挙動を推定した結果、枠組材を剛とみなした計算および枠組材に対して直交方向の釘せん断性能を無視した略算式ともに、初期の挙動は安全側に推定することが可能であったが最大耐力は過大な評価となった。これは、実験では下枠材や外枠材の割裂破壊が先行して発生したために、釘せん断性能が十分に発揮されなかったことが大きな要因であると考えられる。

【文献】

- 1) 日本建築学会：“木質構造基礎理論”、日本建築学会編、丸善、pp.127-134 (2010)
- 2) 神谷文夫：面材を釘打ちした耐力壁のせん断剛性および強度に関する理論的研究、日本建築学会論文報告集309、pp.86-91 (1981)
- 3) 戸田正彦、藤原拓哉、野田康信、大橋義徳、平井卓郎：厚物パーティクルボードを張った床構面の面内せん断性能、木材学会誌、55(2)、pp.69-76 (2009)
- 4) 杉山英男、松本忠史：多数の開口を持つ合板釘打ち張り耐力壁のせん断耐力略算法（第1報） 無開口壁ユニットのせん断耐力評価、木材学会誌、39(1)、pp.75-59 (1993)
- 5) 戸田正彦、大橋義徳、古田直之：北海道産枠組壁工法用製材の釘接合性能、日本木材加工技術協会 第33回年次大会（札幌）講演要旨集、pp.103-104 (2015)

## P-5

### 造林木ヤング率の非破壊測定法の検討ー曲げ試験と応力波伝播速度試験

○日置絵里香，小泉章夫（北大院農），鳥田宏行（北林試）

#### 【諸言】

生立木を傷つけずに，ヤング率などを指標として樹幹の強度を評価する非破壊試験は，検定林の遺伝・環境要因が材質に及ぼす影響の調査や人工林の材質評価などに利用されている。非破壊試験には，曲げ試験，応力波伝播速度試験がある。曲げ試験のなかでも，最近は，荷重-たわみ関係から弾性変形をしていることを確認し，樹幹の曲げヤング率を決定する方法が行われており，その精度等の検討がまだ不十分である。本研究は，立木非破壊試験で得られた樹幹曲げヤング率と応力波伝播速度，そして，同供試木の丸太材、無欠点小試験体の動的ヤング率を比較することにより，立木の曲げ試験の精度を検討することを目的として行った。

#### 【材料】

供試木は，以下に示す一般民有林の造林木である。

表 1. 供試木の概要

樹種	本数	林齢	試験地	平均樹高[m]	平均胸高直径[cm]
トドマツ	10	41	砂川市	15.9	20
トドマツ	7	42	砂川市	16.8	18.1
カラマツ	10	29	新十津川町	14.7	19.1
カラマツ	7	30	新十津川町	14.8	19.2
グイマツ雑種F <sub>1</sub>	40	19	三笠市	12.8	16.5

#### 【実験方法】

立木状態で 2 種類の非破壊試験 ((1)曲げ試験 (2) 応力波伝播速度試験) を行った (図 1)。

##### (1) 曲げ試験：

樹木に取り付けた木製レバーを用いて，樹幹に人力で曲げモーメントを負荷した。このとき，荷重と樹幹の高さ 80-160cm の区間に設置した矢高ゲージで測定した曲げ変位を小型のデータロガー（共和電業製 EDX-10A）に 5-10Hz のサンプリング速度で記録し，荷重-たわみ関係の直線性をノートパソコンで確認し，樹幹ヤング率 ( $E_b$ ) を求めた。各供試木について直交 2 方向で試験を行った。

##### (2) 応力波伝播速度試験：

立木の樹幹の高さ 70-170cm に応力波伝播時間測定機器（ファコップ）のセンサーを打ち込み，ハンマーで打撃し，応力波伝播速度 ( $v^2$ ) を測定した。この時，START センサーの打ち込み深さは 15mm で固定した。また，打撃加速度は  $10-40m/s^2$  とした。

立木状態で非破壊試験を行ったあと，供試木の地上高 50-200cm から丸太を切り出し，縦振動試験を行い，丸太の動的ヤング率 ( $E_f$ ) を求めた。その後，丸太の元口から 50-90cm 部分を切りだし，辺材部から  $20 \times 20 \times 300mm^3$  の無欠点小試験体を採取した。縦振動試験を行い，無欠点小試験体の動的ヤング率 ( $E_d$ ) を求めた。縦振動試験には，FFT アナライザーを用いて解析した。



図 1. 上) 立木曲げ試験

下) 応力波伝播速度試験

【結果および考察】

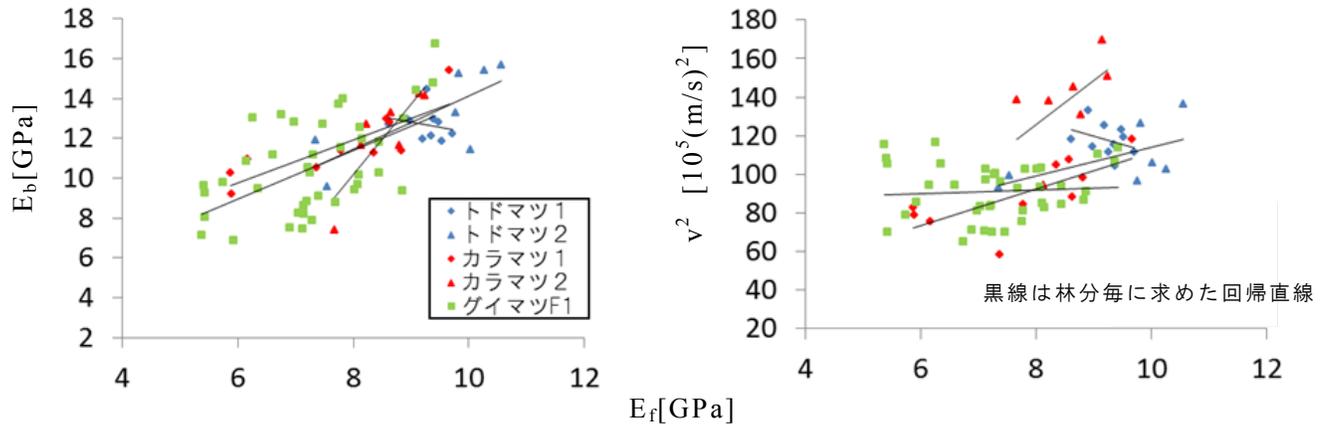


図2. 左) 樹幹曲げヤング率 ( $E_b$ ) と丸太の動的ヤング率 ( $E_f$ ) の比較  
右) 応力波伝播速度の2乗 ( $v^2$ ) と丸太の動的ヤング率 ( $E_f$ ) の比較

曲げ試験によって得られた  $E_b$  は、伐採後に測定した丸太の  $E_f$  と高い相関を示した。応力波伝播速度試験で得られた  $v^2$  との相関よりも高いものであり、立木に対する曲げ試験は、十分に実用的な精度を持っていることがわかった。また、 $E_b$  について求めた各林分の回帰直線は  $v^2$  について得られたそれらよりもバラつきが小さかった (図2)。5 林分を込みにしたときの  $E_f$  との相関係数は、 $E_b$  との場合は 0.69、 $v^2$  との場合は 0.15 だった。したがって、立木の曲げ試験によって、樹種や林分に関わらず、丸太のヤング率を推定することができると考えられた。

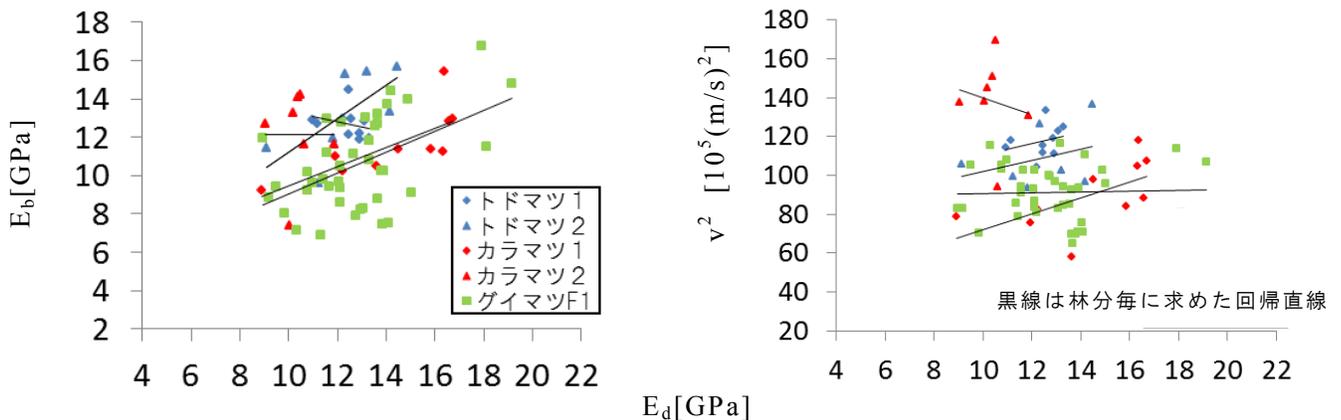


図3. 左) 樹幹曲げヤング率 ( $E_b$ ) と無欠点小試験体の動的ヤング率 ( $E_d$ ) の比較  
右) 応力波伝播速度の2乗 ( $v^2$ ) と無欠点小試験体の動的ヤング率 ( $E_d$ ) の比較

$E_b$  は、曲げ試験の応力分布を考えると、樹幹の辺材部の影響が大きいと予想される。また、応力波伝播速度試験で得られた  $v^2$  は、応力波の伝播経路となっている辺材部分の比ヤング率を反映した値である。したがって、 $E_b$ 、 $v^2$ 、いずれの値も、樹幹の辺材部から採取された無欠点小試験体の材質との相関が高いことが期待された。しかし、実際には、 $E_b$ 、 $v^2$  どちらについても、無欠点小試験体の  $E_d$  との相関は、丸太の  $E_f$  との相関よりも低かった。その原因として、 $E_b$  については、辺材部に欠点の多い供試木が多く、無欠点部分が少なかったためだと考えた。ただし、 $v^2$  については、試験時にセンサー間に節が入らないようにしたので、 $E_d$  との相関が  $E_f$  とのものよりも低かった理由は、明らかではない。

【謝辞】

ギイマツ F1 供試木の試験体採取に際してご協力いただいた、道総研林業試験場の脇田陽一研究主幹ほかの皆さまにお礼申し上げます。

○山田南美、澤田圭（北大農）、山田大樹（芽室町役場）

## 【緒言】

伝統的建築物は、大きな地震力が作用しても木造軸組と土壁が耐力を維持したまま大きくせん断変形することで倒壊を防ぐという特徴がある。そのため、壁量計算のように耐力壁の量で地震への抵抗の度合いを評価する耐震診断の方法では、伝統的建築物の耐震性能を適切に評価できないことがある。

そこで、伝統的な木造建築物の耐震診断の方法には、限界耐力計算が用いられることが多い。限界耐力計算では、桁行・張間の方向ごとに地震動による必要スペクトルと建築物全体の復元力特性との応答から地震時の建築物の変形量を求め、建築物の損傷、倒壊の2段階で耐震性能を評価する。この復元力特性を求めるためには構成要素の荷重-変形関係が必要であり、限界耐力計算を用いた耐震診断マニュアル<sup>1)</sup>にはさまざまな構成要素の荷重-変形関係のデータが掲載されている。

同マニュアルには土壁の荷重-変形関係のデータが掲載されているが、土壁は材料となる土の性質や仕様の違いなどの地域差が大きく、これまで多様な地域の土壁の性能に関するデータが報告されている。なかにはマニュアルの値とは大きく離れたものも見られる。また、実際に耐震診断がおこなわれるのは築数十年経過した建築物であり、土壁の性能が損傷などにより低下していることが考えられるが、性能低下後のデータの扱い方は確立されていない。そこで本研究では、北海道の木造古民家を例にとりてさまざまな土壁の荷重-変形関係のデータを用いて限界耐力計算に基づく耐震診断のシミュレーションをおこない、土壁の性能の違いが耐震診断結果に与える影響を調べた。

## 【対象建築物】

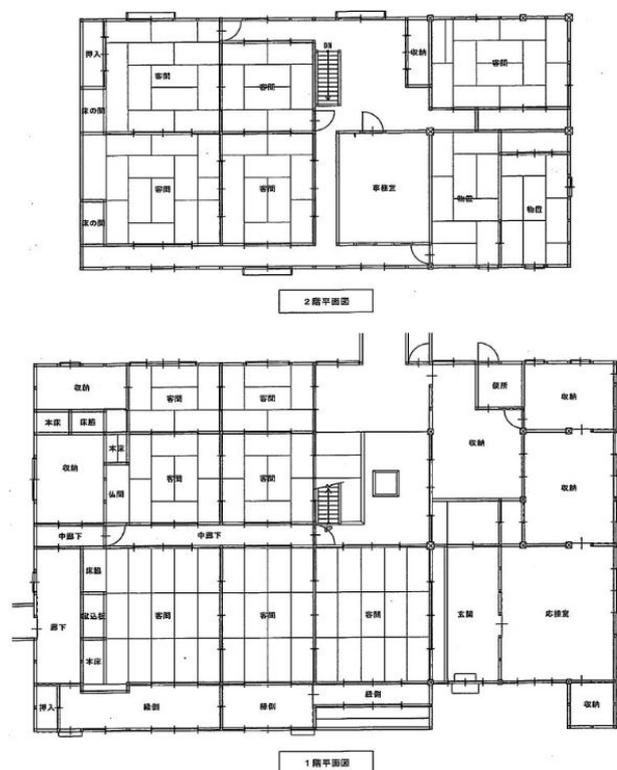


図1 松久園の平面図



図2 松久園の外観

今回、北海道河西郡芽室町にある『松久園』を対象とした。図1は、松久園の1階及び2階の平面図を、図2は外観を示す。大正7年に作られた岐阜様式の木造軸組構法の2階建ての古民家で、現在は冬季以外の期間、料亭として使われている。1階桁行方向は22.7m、張間方向は14.5mで、外壁は土壁、内壁は一部が土壁で多くは小壁つき独立柱である。主な柱の寸法は120mmの正角材で、大きな柱は200mm以上の正角材も見られる。鴨居の寸法はおおむね400~500mmである。柱と横架材には北海道北見産のエンジュ、ヤチダモが用いられており、土壁はところどころに剥離、ひび割れが見られる。

## 【シミュレーション方法】

土壁の荷重-変形関係は、文献<sup>2-11)</sup>より 8 地域 11 仕様のデータを得た。表 1 に土壁の産地・仕様・せん断性能を示す。土壁の荷重-変形関係は仕様が同じであっても壁長によって異なる。対象建物は半間の土壁が多かったため、本研究では、高さ 2730mm の半間の壁のデータを文献から得て、シミュレーションに用いた。

表 1 11 仕様の土壁のデータ

No.	産地	壁の横幅の寸法	材料や仕様の特徴など	壁倍率	壁基準耐力(kN)	終局荷重 Pu(kN)	降伏荷重 Py(kN)	塑性率 $\mu$
1	岐阜	910mm	塗厚55mm	1.00	3.00	6.52	4.00	14.72
2	福井鯖江	910mm	塗厚55mm	0.50	1.50	3.08	2.00	28.73
3	熊本	910mm	塗厚55mm、土の最大圧縮強度が規定の7倍	3.10	8.68	21.06	13.50	4.27
4	京町屋型	980mm	3段貫、中央の貫は通し貫	1.87	3.59	7.95	5.75	6.37
5	京町屋型	980mm	3段貫、中央の貫は差込貫	1.26	1.13	7.50	6.85	6.15
6	京壁	910mm	3段貫、貫厚さ15mm	1.54	2.74	5.50	4.20	6.04
7	京壁	910mm	3段貫、貫厚さ30mm	1.41	2.52	6.80	4.28	3.77
8	京壁	910mm	5段貫、貫厚さ15mm	1.89	3.37	7.73	6.30	4.96
9	滋賀	910mm	3段貫、中央の貫は楔打ちにより柱に固定	1.60	2.95	6.21	4.20	5.49
10	秋田	910mm	3段貫、貫厚さ29mm、壁厚さ90mm	1.80	2.40	5.40	3.17	12.12
11	北陸	910mm	4段貫	0.89	1.59	6.30	5.50	1.92

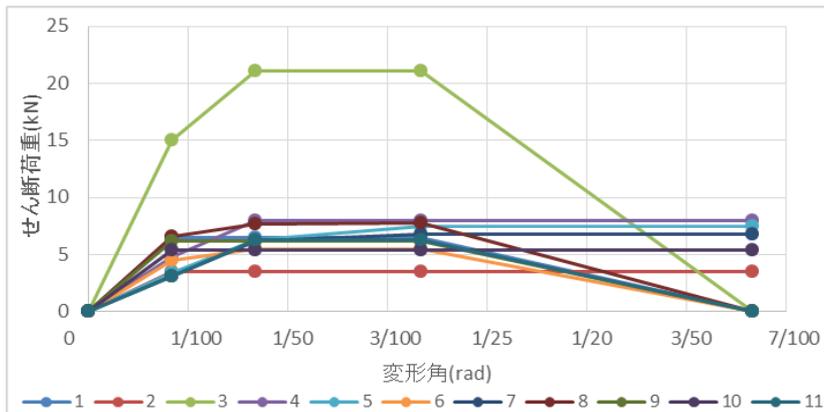


図 3 11 仕様の土壁の荷重-変形関係 (凡例の番号は表 1 参照)

土壁は  $R=1/60 \sim 1/30$ rad にかけてせん断亀裂が発生し、一度損傷した土壁は初期段階と同等の耐力は見込めない。そこで以下の 3 パターン (A、B、C) の荷重-変形関係を設定し、建築物の損傷時および倒壊時の応答変形を求めた。

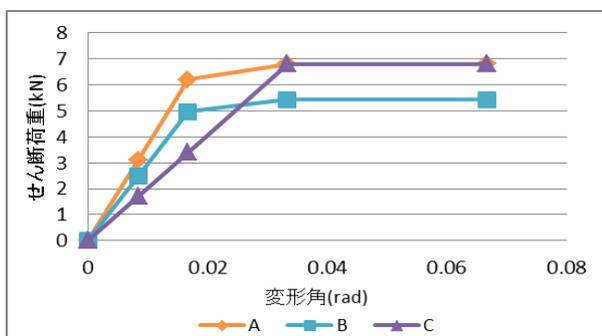


図 4 3 パターンの荷重-変形関係の一例

半間より大きい壁の荷重-変形関係については荷重を壁長に比例させて割増した値を用いた。荷重-変形関係を文献から読み取り、その荷重変形関係をバイリニア化し、変形角  $R=1/120, 1/60, 1/30, 1/15$ rad のときのせん断荷重の値を得た。図 3 に 11 仕様の土壁の荷重-変形関係を示す。

A: 未損傷を想定した荷重-変形関係

B: 土壁の繰返し試験では、1 回目の繰返し荷重ピークよりも 2、3 回目の繰返し荷重ピークのほうが近い値を示す。そこで大きな荷重低下を示さないような繰返し荷重を受けた場合を想定し、荷重を全体的に 80% 低減した荷重-変形関係

C: 土壁はせん断亀裂などによって大きく荷重が低下するが、 $1/30$ rad 以降は荷重の低下が見られず、横ばいとなっている<sup>12)</sup>。そこで土壁に大きな亀裂が生じた場合を想定し、 $1/30$ rad までは割線剛性で表し、それ以降は荷重が増加しない荷重-変形関係

また、土壁のせん断性能値として壁倍率、壁基準耐力、終局荷重、降伏荷重、塑性率の値を求め、土壁のどの性質が診断結果に大きく影響しているのか、相関関係を調べた。

診断方法の比較として、限界耐力計算以外にも、壁量計算、許容力度計算、エネルギー一定則の考え方を基にした精密診断法の 1 つである保有耐力診断法でも診断をおこなった。

限界耐力計算は、(社)日本建築構造技術者協会関西支部が発行している『木造建築物の限界耐力計算Ⅱ ver.2』を用いた。

【結果と考察】

(I) 診断方法による結果の違いについて

図5と図6に、11仕様のデータで壁量計算、許容応力度計算、保有耐力診断法をおこなった結果を示す。耐震性能の評価は、壁量計算では評点が1.0以上で「建物の損傷なし」、保有耐力診断法では評点が1.0以上で「一応倒壊しない」、1.5以上で「倒壊しない」となる。許容応力度計算では評点が1.0以下であることが要求されるが、壁量計算の結果および保有耐力診断法の結果と同一のグラフで比較するため、許容応力度のみ評点の逆数をとって図に示した。図7と図8には、限界耐力計算での診断結果を、損傷と倒壊の判定で分けて示した。

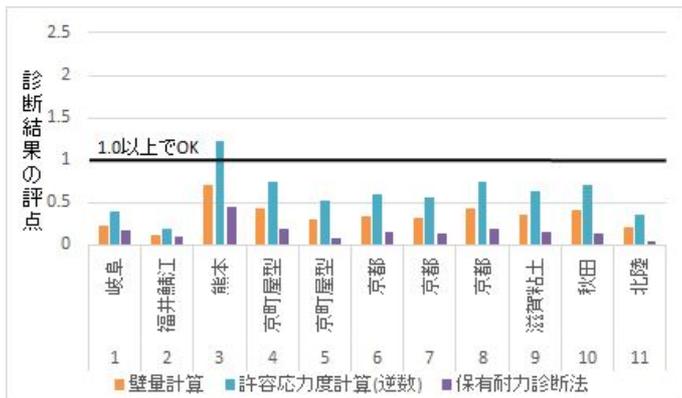


図5 桁行方向の診断結果

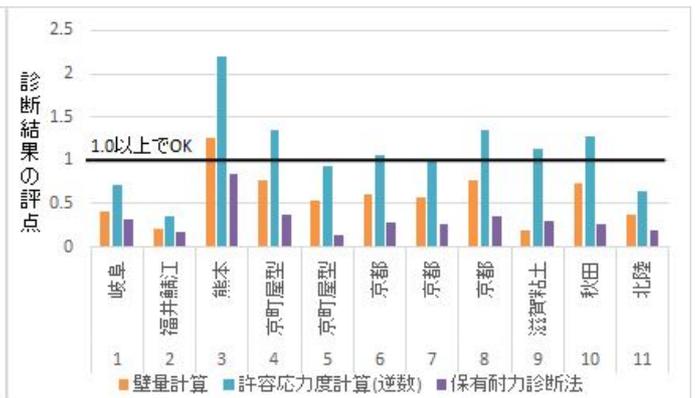


図6 張間方向の診断結果

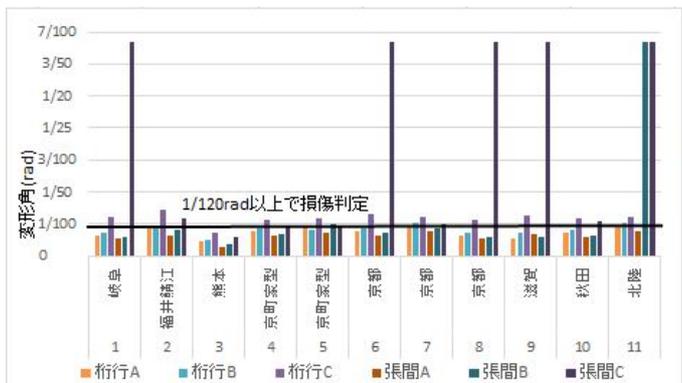


図7 限界耐力計算による損傷の判定

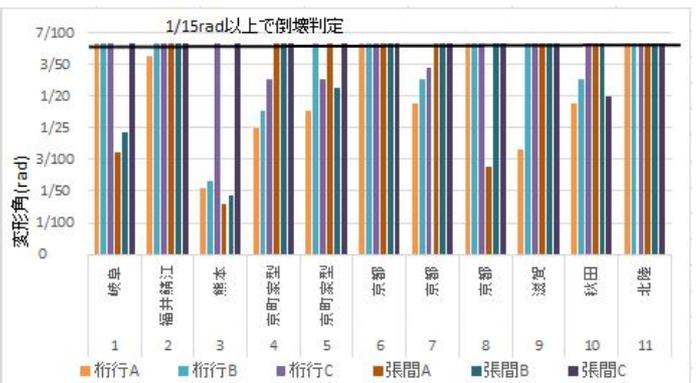


図8 限界耐力計算による倒壊の判定

限界耐力計算の損傷判定と壁量計算、許容応力度計算を比較すると、前者は多くの土壁仕様で安全性を満たしていたが、後者の2つは多くの仕様で評点を満たしていなかった。限界耐力計算の倒壊判定と保有耐力診断法を比較すると、前者は桁行方向のみ、または張間方向のみで判定を満たす場合が見られたが、後者はすべての仕様で評点を満たしていなかった。限界耐力計算以外の方法で耐震評価が低かった理由として、この建物は耐力壁の存在量が少なかったため厳しい結果になりやすかったことが考えられる。床面積に対して耐力壁の量が少ないのは伝統的な木造建築物ではよく見られることであり、そのような建物に対して限界耐力計算以外の方法で耐震性能を満たすことはかなり難しいことがわかった。

また、限界耐力計において、損傷レベルが異なる3パターンを比較してみると、3パターンすべてで耐震性能を満たしているものでも、土壁の損傷を加味したほうが変形角は大きくなる傾向が見られる。しかし、Aで倒壊判定でもBとCで安全側の判定になる場合(No.5、10)も見られた。このことは、ほかの構造計算・耐震診断では部材の劣化部分は耐力を低減するという考え方が用いられるが、限界耐力計算ではこの考え方は耐震性能を過大評価する可能性があることを示している。

## (II) 限界耐力計算に影響する土壁の性能について

表2に土壁のせん断性能値と限界耐力計算の判定結果との関係から求めた決定係数を示す。一例として桁行方向について、図9に壁基準耐力と限界耐力計算損傷判定との相関を、図10に終局耐力と限界耐力計算倒壊判定との相関を示す。11仕様の土壁のせん断性能値と限界耐力計算の変形角の相関をとったところ、終局耐力、壁基準耐力、降伏耐力、壁倍率の4つの項目において比較的高い負の相関が見られた。

表2 土壁のせん断性能値と限界耐力計算の判定結果との相関

決定係数	限界耐力計算損傷判定		限界耐力計算倒壊判定	
	桁行	張間	桁行	張間
壁基準耐力	<b>0.72</b>	<b>0.75</b>	0.39	<b>0.51</b>
終局耐力	0.51	0.56	<b>0.59</b>	<b>0.40</b>
降伏耐力	0.29	0.41	0.36	0.33
塑性率	0.01	0.00	0.09	0.03
壁倍率	0.59	0.51	0.50	0.31

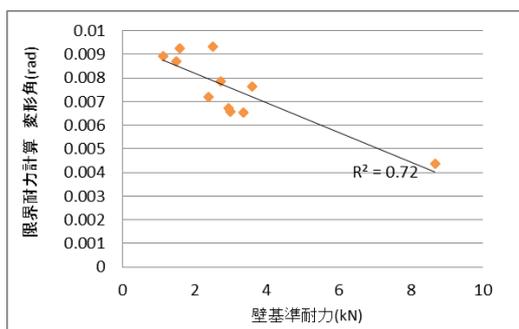


図9 壁基準耐力と限界耐力損傷判定との相関

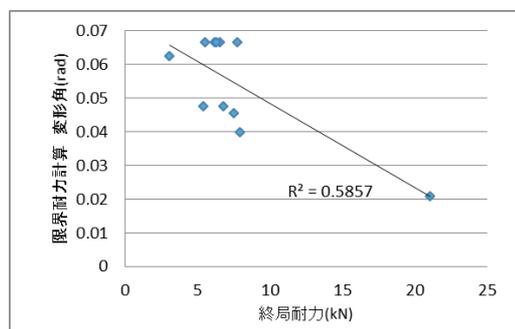


図10 終局耐力と限界耐力計算倒壊判定との相関

特徴として、損傷の判定において壁基準耐力の決定係数がほかに比べて大きいことと、倒壊の判定において終局耐力の決定係数が比較的大きいことが挙げられる。これらはそれぞれ、損傷の判定では土壁の荷重-変形関係の初期の応答のデータが、倒壊の判定では終盤のデータが重要になることから説明できると考えられる。土壁の仕様によって、限界耐力計算損傷判定には大きな影響を及ぼさないが、倒壊判定には大きな差が生じることを留意する必要がある。

## 【文献】

- 1)木造軸組構法建物の耐震設計マニュアル編集委員会：伝統構法を生かす木造耐震設計マニュアル 限界耐力計算による耐震設計・耐震補強設計法 学芸出版社
- 2)小林ほか：壁土の地域特性を考慮した土塗壁の耐震性能に関する研究 日本建築学会四国支部研究報告集 p.47-48(2013年5月)
- 3)小林ほか：壁土の地域特性を考慮した土塗壁の耐震性能評価 日本建築学会大会学術講演梗概集(北海道)p.467-468(2013年8月)
- 4)田淵ほか：京町家型土壁の水平せん断性能 日本建築学会構造系論文集第605号 p.143-150(2006年7月)
- 5)岡本ほか：耐荷機構に基づいた土壁の構造性能評価法とその検証その2京壁による要素試験法の検証 日本建築学会大会学術講演梗概集(北海道)p.407-408(2004年8月)
- 6)遠藤ほか：耐荷機構に基づいた土壁の構造性能評価法とその検証その3滋賀地方の土壁の破壊実験と要素試験法の検証 日本建築学会大会学術講演梗概集(北海道)p.409-410(2004年8月)
- 7)川鍋ほか：耐荷機構に基づく土壁の構造性能評価法とその検証その4秋田地方の土塗り耐力壁の水平加力実験と要素試験体による評価法の検証 日本建築学会大会学術講演梗概集(北海道)p.411-412(2004年8月)
- 8)中尾ほか：土塗り壁のせん断耐力の評価に関する実験的研究 日本建築学会構造工学論文集 Vol.49B(2003年3月)
- 9)三宅ほか：伝統的土壁の仕様と力学特性の関係性 日本建築学会北陸支部研究報告集第54号 p.43-46(2011年7月)
- 10)鈴木ほか：木造住宅土塗り壁の実大試験による耐震性能の再検討 日本建築学会構造系論文集第515号 p.115-122(1999年1月)
- 11)横内ほか：歴史的町並みの地震防災対策に関する研究 日本建築学会大会学術講演梗概集(北海道)p.461-466(2013年8月)
- 12)澤田ほか：耐荷機構に基づく有開口土壁の合成と体力の推定 日本建築学会構造系論文集第620号 p.93-100(2007年10月)

○相澤桃子, 玉井 裕, 宮本敏澄, 矢島 崇 (北大院農)

### 1. はじめに

スギタケ属は、ナメコを代表とする独特なぬめりを有する優秀な食用キノコとしてアジア諸国で親しまれている。北海道にも多くのスギタケ属食用菌が分布しているが、分類上不明確な点が多く存在する<sup>1)</sup>。そこで本研究では、北海道内で採集したスギタケ属7種について ITS シーケンスを基にした系統解析を行い<sup>2)</sup>、スギタケ属内における遺伝的関係性について検証することを目的とした。

### 2. 材料と方法

2012年～2013年に北海道内でスギタケ属子実体の採集を行い、形態観察による種の同定をした<sup>3)4)5)</sup>のち単離操作を行った。子実体組織及び単離菌株の菌糸より DNA を抽出し、5.8s rDNA の ITS 領域の塩基配列解析を行った。得られた採集系統のシーケンスに、保有菌株6系統と NCBI の GenBank からデータシーケンスを16系統加えて系統樹を作成した。系統樹は PAUP\*4.0 を用いて近隣結合法で推定し<sup>6)</sup>、作成した系統樹は TreeView で表示した。外群には、同じモエギタケ科のモエギタケを用いた。また、ブートストラップ解析においてブートストラップ値は1000で行った。

### 3. 結果及び考察

採集されたスギタケ属は45系統あり、形態観察による同定の結果、ナメコ4系統、ツチスギタケ5系統、ヌメリスギタケ1系統、ヌメリスギタケモドキ9系統、キナメツムタケ13系統、チャナメツムタケ4系統、シロナメツムタケ4系統、未同定5系統となった。このうち、シロナメツムタケを除く6種41系統が単離に成功した。保有菌株を含め、DNA の PCR 増幅が成功した39系統(**Table 1**)の ITS 領域の塩基配列解析の結果、読み取れた ITS 領域は447～718bp の範囲内であった。NCBI の GenBank からデータシーケンスを加え(**Table 2**)、作成した系統樹(**Fig**)で55系統のスギタケ属菌はA～Fの6つのクレードを作った。このうち A はキナメツムタケ、B はチャナメツムタケ、F はナメコのみから成っていた。一方で、C においてはヨーロッパ産のスギタケのデータとツチスギタケの採集系統のほとんどが同じクレードに入り、D ではヌメリスギタケとヌメリスギタケモドキが混在する結果となった。これらのことから、今までツチスギタケとして同定されてきた日本の系統は欧米の系統(*Pholiota terrestris*)とは異なりスギタケに近縁であり、北海道においてヌメリスギタケとヌメリスギタケモドキは非常に近縁であることが示唆された。



写真 左：ヌメリスギタケ 中央：ヌメリスギタケモドキ 右：ツチスギタケ

**Table 1.** The list of the wild strains used in this study

Species	Japanese name	Strain no.	Date	Geographic origin		
<i>Pholiota microspora</i> (Berk.) Sacc.	ナメコ	Pm12	2012	Hokkaido		
		Pm1310101	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
		Pm1310102	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
		Pm131026	2013.Oct	Otaru,Hokkaido		
<i>Pholiota squarrosa</i>	スギタケ	Psq12	2012	Hokkaido		
<i>Pholiota</i> sp.	ツチスギタケ	Pt12	2012	Hokkaido		
		Pt131006	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
		Pt131027	2013.Oct	Niseko,Hokkaido		
		Psp131113	2013.Nov	Sapporo,Hokkaido		
<i>Pholiota adiposa</i>	ヌメリスギタケ	Pad122	2012	Hokkaido		
		Psp131010	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
<i>Pholiota aurivella</i>	ヌメリスギタケモドキ	Pau131004	2013.Oct	Ebetsu,Hokkaido		
		Pau131006	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
		Pau131010	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
		Pau1310261	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
		Pau1310262	2013.Oct	Niseko,Hokkaido		
		Pau1311011	2013.Nov	Chitose,Hokkaido		
		Pau1311012	2013.Nov	Chitose,Hokkaido		
		<i>Pholiota spumosa</i>	キナメツムタケ	Ps1310101	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido
				Ps1310102	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido
				Ps1310261	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido
Ps1310263	2013.Oct			Sapporo,Hokkaido		
Ps131027	2013.Oct			Sapporo,Hokkaido		
Ps1311011	2013.Nov			Eniwa,Hokkaido		
Ps1311012	2013.Nov			Eniwa,Hokkaido		
Ps1311013	2013.Nov			Eniwa,Hokkaido		
Ps131106	2013.Nov			Ebetsu,Hokkaido		
Ps1311151	2013.Nov			Shiraoi,Hokkaido		
Ps1311152	2013.Nov	Shiraoi,Hokkaido				
Ps1311153	2013.Nov	Shiraoi,Hokkaido				
<i>Pholiota lubrica</i> (Pers.:Fr.) Sing.	チャナメツムタケ	Plu131010	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
		Plu1310191	2013.Oct	Kyougoku,Hokkaido		
		Plu131101	2013.Nov	Chitose,Hokkaido		
		Plu131106	2013.Nov	Ebetsu,Hokkaido		
<i>P.sp</i>	スギタケ属未同定種	Psp1310041	2013.Oct	Ebetsu,Hokkaido		
<i>P.sp</i>		Psp131006	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
<i>P.sp</i>		Psp1310261	2013.Oct	Sapporo,Hokkaido		
<i>P.sp</i>		Psp1310262	2013.Oct	Makkari,Hokkaido		
<i>Stropharia aeruginosa</i>	モエギタケ	Sa131004	2013.Oct	Ebetsu,Hokkaido		

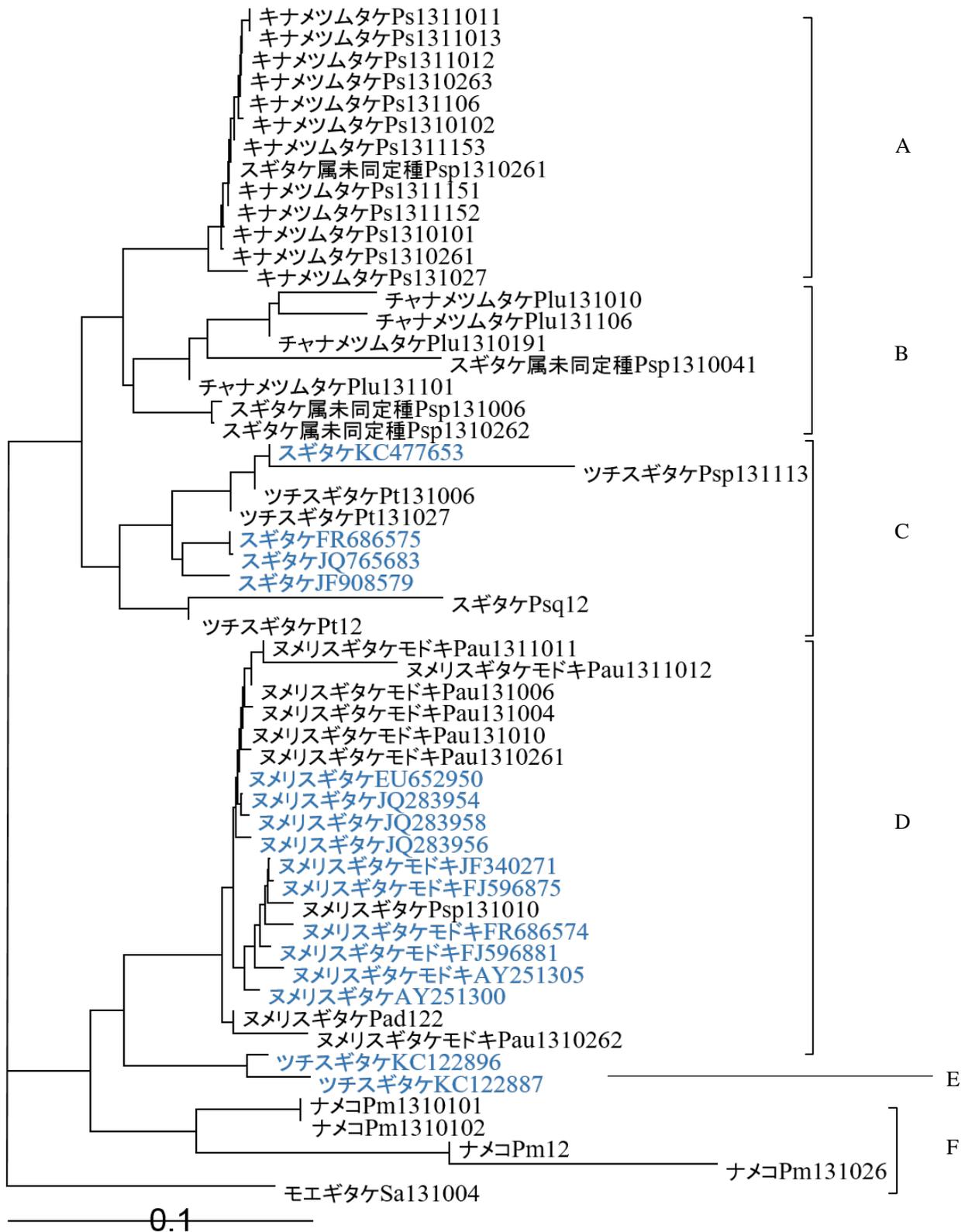


Fig. The phylogenetic tree based on ITS region sequences (Blue : NCBI GenBank strains)

**Table2.** The list of the NCBI GenBank strains used in this study

Species	Japanese name	Strain no.	Date of collect(resistared)	Geographic origin
<i>Pholiota adiposa</i>	ヌメリスギタケ	JQ283958	(2012)	Beijing,China
		JQ283956	(2012)	Beijing,China
		EU652950	(2008)	Heilongjiang,China
		JQ283954	(2012)	Beijing,China
		AY251300	(2003)	Korea
<i>Pholiota aurivella</i>	ヌメリスギタケモドキ	FR686574	2009	Germany
		JF340271	(2011)	Latvia
		AY251305	(2003)	Korea
		FJ596881	(2009)	USA
		FJ596875	(2009)	USA
<i>Pholiota squarrosa</i>	スギタケ	KC477653	2011	Japan
		JF908579	1998	Italy
		JQ765683	(2012)	Sweden
		FR686575	2009	Germany
<i>Pholiota terrestris</i>	ツチスギタケ	KC122896	2006	USA
		KC122887	2007	USA

## 【参考文献】

- 1) Teruyuki Matsumoto · Yasushi Obatake · Yukitaka Fukumasa-Nakai · Eiji Nagasawa. (2003) Phylogenetic position of *Pholiota nameko* in the genus *Pholiota* inferred from restriction analysis of ribosomal DNA
- 2) Yong-Hyun Cho · Won-Sik Kong · Gyu-Hyun Kim · Chang-Sung Jhune · Chang-Hyun You · Young-Bok Yoo · Kwang-Ho Kim (2003) Analysis of Cultural Characteristics and Phylogenic Relationships of *Pholiota* species
- 3) 今関六也・大谷吉雄・本郷次雄・青木孝之・内田正宏・前川二太郎・吉見昭一・横山和正・保坂健太郎・細矢剛・長澤栄史・伊沢正名・木原浩・菅原光二・水野仲彦 (2011) 増補改訂新版 日本のきのこ, 232-233
- 4) 今関六也・本郷次雄 編著 (1987) 原色日本新菌類図鑑 (I)、保育社、204.
- 5) 高橋郁雄 (2003) 新版北海道きのこ図鑑、亜璃西社、156,163.
- 6) 田辺昌史 (2008) 分子系統解析ハンドブック

○大石哲, 玉井裕, 宮本敏澄, 矢島崇 (北大院農)

### 【緒言】

北海道の森林において、クマイザサは森林の下層植生として広く分布しており、膨大な資源量を持っているが、輸送や搬出のコストの面からその利用は小規模なものに限られている。過去に食用きのこ菌床栽培への利用が検討され、タモギタケ、ウスヒラタケの栽培においてクマイザサのみを使用した培地でおが粉と米ぬかの混合培地と同等以上の収量を得られたことからクマイザサは補助的栄養源を必要としない有効な培地基材であることが示されている。一方、現行の菌床栽培では高圧滅菌などに多大な設備投資を必要とするが、地域における小規模なきのこ栽培では特殊な設備を利用しない簡易な手法が求められる。特殊な設備のない地域におけるきのこ栽培では、高圧滅菌に代わる培地の処理の方法として、培地を常圧の水蒸気により加熱する、発酵させる、煮沸する、石灰水に浸漬させるなどといった方法がとられている。本研究では、クマイザサを用いたきのこ栽培において高圧滅菌に代わる滅菌処理を検討した。

### 【種菌の接種方法及び菌株の選抜】

供試菌株はヒラタケおよびヒマラヤヒラタケの各 1 系統を用いた。破碎したクマイザサを 1% 石灰水に 24 時間浸漬後、含水率が 65%程度になるまで遠心脱水し、種菌をクマイザサ培地と混合、または種菌で培地を挟む形で 10% (w/w) 接種した。種菌の接種後、栽培袋に 500 g 充填し、温度 23℃、暗所で培養した。菌糸蔓延後に温度 17℃、湿度 90%の明所で発生操作を行った。種菌を接種してから菌糸が蔓延するまでの日数を菌糸蔓延日数、子実体が形成するまでの日数を栽培日数とした。子実体が収穫できた菌床から子実体形成率、得られた子実体収量から生物的効率 (BE) を算出した。ヒラタケでは種菌を培地に混合したものは、菌糸蔓延日数が 10 日と挟み込んだものよりも早かった。また、全ての菌床において子実体が発生した。ヒマラヤヒラタケでは半数以上が雑菌の混入により子実体が収穫できなかった (Table 1)。ヒラタケは菌糸蔓延が速く雑菌にも強いいため、以降の試験ではヒラタケを用いて、種菌を培地と混合することとした。

Table 1 Cultivation in lime water immersion medium

Spawn	Inoculation	Mycelium running time(days)	Total cultivation time(days)	BE(%)	Fruiting rate(%)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PL06)	mix	10.0±0.0	28.3±1.5	68.1±6.4	100
	sandwich	16.0±0.0	29.7±2.9	55.9±9.1	100
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (PLS)	mix	11.0±0.0	47.0±0.0	81.0±0.0	33
	sandwich	-	-	0	0

Mean±S.D. (n=3)

【石灰水浸漬培地における栽培試験】

2%、4%石灰水に浸漬した培地の pH と、細菌数および真菌数を測定した。細菌数及び真菌数の測定は希釈平板法を用いた。また、それぞれの培地において栽培試験を行った。4%石灰水に浸漬した培地において、2%石灰水に浸漬させたものよりも pH が上昇し、培地中の細菌数及び真菌数が減少した (Table 2)。しかし栽培試験において、培養中にヒトヨタケ属菌が発生したことによ (Fig. 1) 2%ではヒラタケ子実体が発生しなかった。4%ではヒトヨタケの発生後もヒラタケ菌糸が蔓延して一部の菌床で子実体を収穫することができたが菌糸蔓延日数が 32~42 日まで延び、収量も減少した (Table 3)。細菌数及び真菌数の減少から、培地の処理に十分な石灰水の濃度は 4%であると考えられる。しかしながら、好アルカリ性であるヒトヨタケ属菌を抑えて安定したきのこの栽培を行うためには更なる培地の処理が必要である。

Table 2 pH and CFU in lime water immersion medium

Ca(OH) <sub>2</sub> concentration	pH	Bacteria (CFU/g×10 <sup>6</sup> )	Fungi (CFU/g×10 <sup>6</sup> )
0%	5.6	117	5.03
2%	9	123.67	4.33
4%	12.2	0.43	0.035



Fig. 1 Contamination by *Coprinopsis* sp. in lime water immersion medium

Table 3 Effect of lime water concentration on cultivation

Treatment	Mycelium running time(days)	Total cultivation time(days)	BE(%)	Fruiting rate (%)
Control	13.9±0.7	25.3±1.1	34.1± 9.4	100
2% lime water	-	-	0	0
4% lime water	38.1±3.4*	51.0±7.0*	26.1±11.1	70

Mean±S.D. (n=10)

\* A significant difference at 0.05 levels.



Fig. 2 Fruit body of *Preurotus ostreatus*  
Right: sterile Left: 4% lime water

### 【石灰水で煮沸した培地における栽培試験】

更なる培地の処理として培地の煮沸を検討した。また、種菌のコストを抑えること、培養初期の菌糸蔓延を速くして雑菌の蔓延を抑えることを目的として種菌にヒラタケ廃菌床を用いた。破碎したクマイザサを水道水または 2%石灰水に浸漬し、90~100℃で一時間加熱した。放冷後、ヒラタケ廃菌床を 10% (w/w) 接種した。水道水で煮沸した培地では培養中にトリコデルマ属菌が発生したことにより半数以上の菌床で子実体を収穫することができなかった。石灰水で煮沸した培地は雑菌が発生することなく子実体を収穫することができた。石灰水によるアルカリ処理によってトリコデルマ属菌の発生を抑えられ、さらに煮沸処理によってヒトヨタケ属菌の発生を抑えることが可能になると考えられた。



Fig. 3 Fruit body of *Preurotus ostreatus* in lime water boiled medium

Table 4 Additional treatment in order to suppress contamination

Treatment	Mycelium running time(days)	Total cultivation time(days)	BE(%)	Fruiting rate (%)
Control	13.9±0.7 a	25.3±1.1 a	34.1± 9.4 b	100
4% lime water	38.1±3.4 d	51.0±7.0 d	26.1±11.1 bc	70
Boil	19.3±0.5 c	32.0±2.0 c	20.3±4.0 c	40
Lime water boil	15.3±2.0 b	28.9±3.1 b	52.0±13.8 a	90

Mean±S.D. (n=10)

\* A significant difference at 0.05 levels.

### 【総括】

クマイザサを用いた簡易なきのこ栽培において、石灰水の浸漬と煮沸を組み合わせた培地の処理が有効であった。石灰水での浸漬により培地の生菌数を減らすことは可能であるが、ヒトヨタケ属菌がクマイザサに残存しているため滅菌処理としては不十分である。また、煮沸のみを行った場合でも、トリコデルマ属菌が生残してしまう。高圧滅菌に代わる培地の処理としては、石灰水の浸漬に煮沸を加えることが有効であった。一般的な菌床栽培法と比較すると設備、容器、種菌等の面において、3割程度のコスト削減を期待できる。

○横山貴史 (北大農), 玉井 裕, 宮本敏澄, 矢島 崇 (北大院農)

## 1. 緒言

きのこの菌糸生長や子実体の形成は、温度や光、水分、酸素、二酸化炭素などの環境因子によって影響を受けている。このため、きのこの施設栽培ではこれらの環境を調節することによって品質や収量を向上させることが可能になる。光環境については、シイタケ<sup>1)</sup> やエノキタケ<sup>2)</sup>、ヒラタケ<sup>3)</sup> などについて詳細に調べられた報告があるが、タモギタケについてはまだそのような報告は少ない。そこで、本研究ではタモギタケの菌糸生長と子実体の生長に及ぼす光照射の影響について調べた。

## 2. 実験方法

### 2.1 光照射が菌糸生長に及ぼす影響

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)を体積比 3 : 1 で混合した培地に水道水を加えて含水率を 60% に調整した。これをガラス製シャーレに 30g 充填し、高圧滅菌(121℃, 30 分)した。自然冷却後、PDA 培地で前培養したタモギタケ Pc98-3 株の菌叢をコルクローラーで打ち抜き、菌叢面が培地と接するようにシャーレの中心に接種した。接種後、温度 21℃湿度 70% で、蛍光灯、赤色 LED、緑色 LED、青色 LED を光源とする光照射区 (光量子束密度  $2 \mu \text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) と暗黒下で 8 日間培養を行った。菌叢直径は直交する 2 方向から測定してその平均を記録し、菌叢密度は目視で観察した。

### 2.2 光照射時間が子実体生長に及ぼす影響

培地は 2.1 同様に調製し、800mL の PP 製栽培ビンに培地約 480g を充填し、高圧滅菌(121℃, 60 分)した。自然冷却後、種菌を接種し、温度 21℃湿度 70% の暗所で培養した。菌回りが完了し、原基形成を確認した栽培ビンを温度 19℃湿度 85% の部屋で、光を 1 日当たり 24 時間照射、12 時間照射、6 時間照射する試験区で生育した。光源はすべて蛍光灯(光量子束密度  $10 \mu \text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )を用いた。収穫した子実体は形態観察を行い、収量を測定した。

### 2.3 光源が子実体生長に及ぼす影響

培地調製から菌回りの完了までは 2.2 同様に行った。原基形成を確認した栽培ビンを温度 19℃湿度 85% の部屋で、蛍光灯、赤色 LED、緑色 LED、青色 LED を光源とする光照射区(光量子束密度  $10 \mu \text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )と暗黒下で生育を行った。このとき、光照射区での照射時間は、1 日当たり 12 時間とした。収穫した子実体は収量、柄の直径、傘の直径、子実体の長さ(傘の厚みを含めた柄の長さ)を測定した。収量以外の測定項目に関しては、1 つのビンにつき傘の直径が 10mm 以上の茎を 5 本無作為に選び各項目を測定し、その平均値を求めた。(図 1) 傘の直径と柄の直径は直交する 2 方向で測定し、その平均値を求めた。



図 1 子実体の測定箇所

### 2.4 暗黒下での芽出しと青色 LED での生育

2.3 の実験の結果を踏まえ、暗黒下で芽出しを行い、青色 LED でその後の生育を行うことにより、茎数が多く整った形の子実体を得ることを目的として栽培実験を行った。青色 LED の光量子束密度と照射時間は 2.3 と同様に設定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 光照射が菌糸生長に及ぼす影響

表 1 に、各光源下での菌糸伸長速度を示した。今回の結果では有意差は認められなかった。また、目視による菌叢密度の観察でも、各試験区において違いは見られなかった。タモギタケの菌糸生長には光照射は影響を及ぼさないと考えられる。

表 1 各光源下での菌糸伸長速度

	暗黒下	蛍光灯	青色 LED	赤色 LED	緑色 LED
菌糸伸長速度(mm/day)	7.2±0.6	6.9±1.0	6.3±0.8	6.1±1.7	7.6±0.7

#### 3.2 光の照射時間の違いによる子実体生長への影響

表 2 に、1 日当たり 6 時間照射、12 時間照射、24 時間照射の試験区で生育した子実体の収量と生育日数を示した。収量、生育日数ともに有意差は見られなかった。24 時間照射と 12 時間照射で傘の色は同等だったが 6 時間照射で顕著に薄くなった。また、24 時間照射では柄の短い子実体となったため、12 時間照射で最適な形状の子実体を得られた。(図 2)

表 2 各照射時間での収量と生育日数

照射時間(h/d)	収量(g)	生育日数(d)
6	43.3±3.9	7.0±1.6
12	40.0±6.7	6.7±1.0
24	44.9±5.6	6.7±1.0



図 2 各照射時間で栽培した子実体  
左から順に 24 時間、12 時間、6 時間

#### 3.3 光質の違いによる子実体生長への影響

暗黒下で生育した子実体と光照射区で生育した子実体ではどちらも傘を形成し生長したが、暗黒下では傘への着色が見られなかった。このことから、タモギタケ子実体の生長には、傘への着色にのみ光照射が必要であると考えられる。傘の色は、蛍光灯と青色 LED で同等、赤色 LED で薄くなり、緑色 LED は青色 LED と赤色 LED の中間程度だった。

表 3 に、各光源下で生育した子実体の柄の直径、傘の直径、子実体の長さ、収量を示した。柄の直径と傘の直径は、暗黒下、赤色 LED、緑色 LED に比べて蛍光灯、青色 LED で大きかった。子実体の長さは暗黒下とその他光源下に有意差は無かった。また、収量に有意差は無かった。全ての項目において蛍光灯と青色 LED は同等の値を示した。また、暗黒下、赤色 LED で生育した子実体は茎数が増加する傾向にあった。(図 3)

表 3 柄の直径、傘の直径、子実体の長さ、収量

	柄の直径(mm)	傘の直径(mm)	子実体の長さ(mm)	収量(g)
暗黒下	3.6±0.85a	20.4±3.95a	35.7±7.26abc	41.0±5.61
蛍光灯	5.4±1.1b	30.5±6.29c	38.5±7.49ab	44.8±4.78
青色 LED	5.6±1.4b	30.0±6.13c	39.6±6.05a	49.1±7.09
緑色 LED	4.3±1.3a	24.6±6.49b	34.2±7.36bc	48.9±5.47
赤色 LED	3.8±0.95a	21.5±4.63ab	33.9±7.29c	46.0±2.30



図 3 各光源下で生育した子実体

### 3.4 暗黒下での芽出しと青色 LED での生育

暗黒下で芽出しを行い、その後の生育を青色 LED で行った子実体は、青色 LED のみで生育した子実体に比べて茎数が多く、傘径が揃う傾向にあった。また、傘への着色は青色 LED のみで生育した子実体と同等であった。(図 4)



図 4 暗黒下で芽出しを行い、その後の生育を青色 LED で行った子実体

#### 【参考文献】

- 1) 五十嵐祥友：菌床シイタケ栽培における光の役割，きのこ研だより 37号 43-50(2014)
- 2) Yuichi Sakamoto · Yutaka Tamai · Takashi Yajima : Influence of light on the morphological changes that take place during the development of the *Flammulina velutipes* fruit body, *Mycoscience* 333-339(2004)
- 3) 稲富聡・難波謙二・小平律子・岡崎光雄：ヒラタケ栽培における子実体の発生と生長におよぼす光の影響，日本応用きのこ学会誌 Vol.8 No.4 183-189(2000)

○吉田有希（北大農），玉井 裕，宮本敏澄，矢島 崇（北大院農）

## 1. 緒言

ムラサキシメジは落葉分解菌の一種であり、その栽培は、露地栽培がほとんどである。露地栽培は気候条件などの外部環境の影響を直接受けることから、安定した収量を確保することが難しい。また、ムラサキシメジ栽培にはバーク堆肥が培地基材として用いられているが、バーク堆肥はオガコに比べてコストが高いことや、粘性が高く攪拌や詰め込みの作業効率が悪いといった問題点が挙げられる。本研究では、室内でムラサキシメジ子実体を発生させることを目的として、菌株の選抜および適切な培地組成の検討を行うとともに、バーク堆肥に代わる材料としてタモギタケ廃菌床の利用可能性についても検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 菌株の選抜

ムラサキシメジ7系統を用いて、菌株の選抜を目的とした菌糸伸長試験を行った。培地には、体積比でバーク堆肥：米ぬか=10：2、バーク堆肥：カエデオガコ：米ぬか=5：5：2、バーク堆肥：オオムギ=10：2にそれぞれ混合した3種類を用いた。オオムギは一晩浸水処理したものを使用した。各培地を含水率60%に調整し、90mm ガラスシャーレに30g ずつ充填し、高圧滅菌(121℃、30分)を行った。自然冷却後、PDA 培地で前培養したムラサキシメジの菌叢をコルクボーラーで打ち抜き、ガラスシャーレの培地上に接種した。23℃、暗所にて15日間培養を行い、菌叢直径を測定した。

### 2.2 フスマまたは粉碎オオムギ添加の影響

供試菌株はムラサキシメジ Ln13-1、Ln13-2、Ln13-3、Ln14-2 の4系統を用いた。培地として、バーク堆肥：フスマ=10：2、バーク堆肥：粉碎オオムギ=10：2の割合で混合したものを用いた。含水率、充填量、滅菌方法、接種方法、培養温度・日数は2.1と同様。

### 2.3 タモギタケ廃菌床における菌糸伸長

供試菌株は2.2同様。廃菌床は、カエデオガコとフスマを体積比3：1で混合した培地でタモギタケを収穫した直後の菌床を風乾させて使用した。廃菌床のみ、カエデオガコ：フスマ=10：2、廃菌床：フスマ=10：2の3種類の培地を用いた。含水率、充填量、滅菌方法、接種方法、培養温度・日数は2.1と同様。

### 2.4 バーク堆肥・タモギタケ廃菌床混合培地における菌糸伸長

供試菌株は2.2同様。廃菌床は2.3で用いたものと同様のものを使用した。培地には、体積比でバーク堆肥：廃菌床=5：5、バーク堆肥：廃菌床：フスマ=5：5：2、バーク堆肥：オガコ：フスマ=5：5：2の組成となる3種類を使用した。含水率、充填量、滅菌方法、接種方法、培養温度・日数は2.1と同様。

## 3. 結果および考察

### 3.1 菌株の選抜

3種類の培地上におけるムラサキシメジ7系統の培養試験結果を表1に示した。Ln13-1、Ln13-2、Ln13-3はバーク堆肥と米ぬかの混合培地およびバーク堆肥とオオムギの混合培地での伸長が良好であった。また、オガコを添加した培地組成では生長が抑制された系統が多く見られた。Ln14-2においては、培地添加物としてオオムギを使用した際に伸長が促進された。本実験より、3種類の培地組成でおおむね伸長が良好であったLn13-1、Ln13-2、Ln13-3、さらにオオムギを添加することによって特に伸長が促進された

Ln14-2 の 4 系統を選抜した。

表 1: ムラサキシメジ菌糸伸長量(mm)

系統	バーク+米ぬか	バーク+オガコ+米ぬか	バーク+オオムギ
LN3	50.6 ± 6.47	43.1 ± 3.73	31.4 ± 3.70
LN5	37.3 ± 6.19	40.4 ± 3.31	40.3 ± 3.13
Ln13-1	59.9 ± 4.05	45.7 ± 4.18	68.6 ± 7.38
Ln13-2	64.6 ± 14.6	50.1 ± 3.03	71.3 ± 5.18
Ln13-3	54.3 ± 6.89	47.1 ± 4.45	57.5 ± 4.43
Ln14-1	50.8 ± 11.4	28.2 ± 7.89	41.1 ± 4.83
Ln14-2	33.3 ± 1.82	37.2 ± 1.82	61.1 ± 15.5

### 3.2. フスマまたは粉碎オオムギ添加の影響

フスマまたは粉碎オオムギを添加した際の菌糸伸長量を図 1 に示した。フスマを添加した場合はオオムギを添加した場合と同等の伸長が見られた。一方、粉碎したオオムギを添加した培地では菌糸の生長が抑制される傾向が見られた。オオムギを粉碎処理したことによって培地の粘度が増し、通気性が低下したことが、菌糸伸長が抑制された要因の一つであると考えられた。

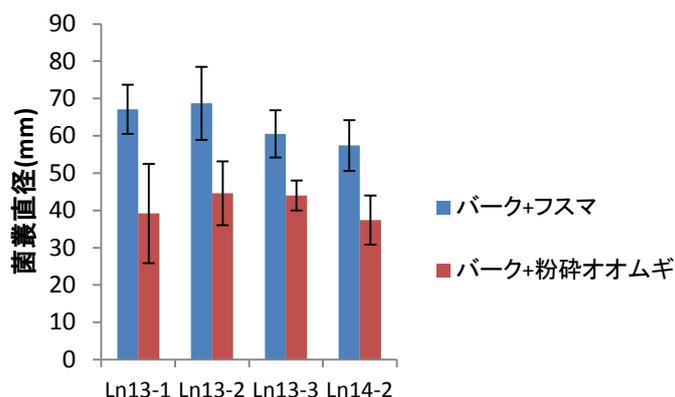


図 1 : フスマまたは粉碎オオムギ添加時の菌糸生長

### 3.3. タモギタケ廃菌床における菌糸伸長

タモギタケ廃菌床を用いた培地における菌糸伸長量を図 2 に示した。Ln13-1、Ln13-2、Ln13-3 においては廃菌床のみの培地においても菌糸の伸長は見られた。Ln14-2 は廃菌床を含む培地に比べて、オガコを培地基材に用いた場合の方が、伸長が良好であった。廃菌床とフスマを混合した培地では目視での判定だが、菌叢密度が濃くなった。これは 4 系統に共通して見られた傾向であり、栄養源となるフスマの割合が関係していると考えられた。しかしながら、培地組成にバーク堆肥を含む場合に比べると、いずれも菌叢直径が小さいため、培地基材がオガコまたは廃菌床のみでは栽培には不適であると考えられた。

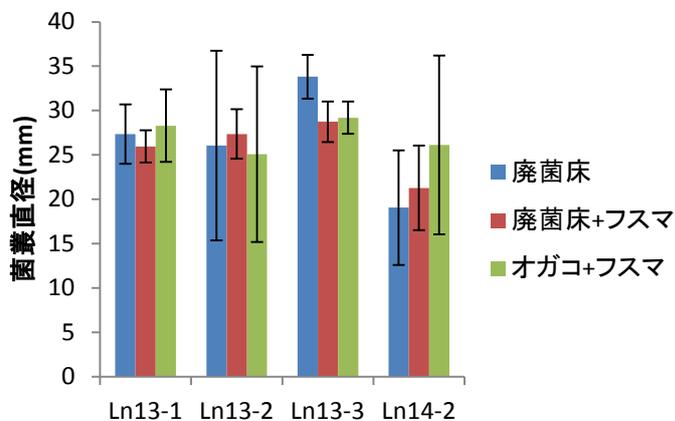


図 2 : タモギタケ廃菌床におけるムラサキシメジ菌糸生長



写真 : 廃菌床を用いた培地におけるムラサキシメジ菌糸の伸長 (Ln13-2)  
左から廃菌床のみ、廃菌床+フスマ、オガコ+フスマを培地としたもの

### 3.4 バーク堆肥・タモギタケ廃菌床混合培地における菌糸伸長

バーク堆肥・タモギタケ廃菌床における菌糸生長量を図3に示した。バーク堆肥と廃菌床を混合することによって、廃菌床のみを培地に用いた場合に比べて、菌糸の伸長が促進された。また、バーク堆肥と廃菌床を同体積混合することによって、新たにフスマを添加しなくても菌糸が伸長したため、廃菌床には菌糸生長に必要な栄養源が十分残っていると考えられた。

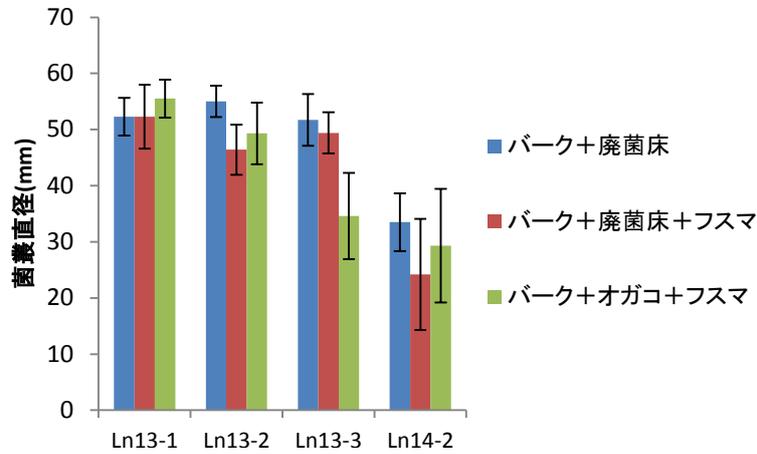


図3：バーク堆肥・廃菌床混合培地における菌糸生長

異なる培地組成におけるムラサキシメジの菌糸生長について検討してきたが、培地添加物にはフスマまたはオオムギが適していることがわかった。オガコや廃菌床は、それ自身のみでは菌糸の生長が遅く、栽培には不適であると考えられた。しかし、バーク堆肥と混合することによって伸長が良好となった。廃菌床を用いることによって新たにフスマを加える必要なく菌糸が成長したため、バーク堆肥・廃菌床混合培地については混合割合についてさらなる検討を行えば、コストの高いバーク堆肥と栄養源となるフスマのコストも削減することが可能であると示唆された。

#### 参考文献

- 1) 川島祐介(2003)：ムラサキシメジ及びウスヒラタケの生産技術の開発  
群馬県林業試験場研究報告第9号 55-66.
- 2) 相沢孝夫・玉田克志・更級彰史・佐藤資之・木村榮一(2007)：ニュータイプきのこ開発事業(第1報)ームラサキシメジ人工栽培技術の開発ー 宮城県林業試験場成果報告第16号 6-22.
- 3) 松本哲夫(2007)：関東・中部の中山間地域を活性化する特用林産物の生産技術の開発(3)  
群馬県林業試験場業務報告

○折橋 健, 檜山 亮, 原田 陽 (北林産試), 村山大雅 (旭川高専)

### 【緒言】

北海道における生シイタケの生産量は年間 8,150 t (H25) であり, そのうちの 97 % が菌床栽培である<sup>1)</sup>。この菌床栽培における培地基材には, 一般的にナラ類やカンバ類のおが粉が使用されているが, 供給不足や価格高騰の懸念があることから, 良質で安価な代替材料が求められている<sup>2)</sup>。

近年, エネルギー利用といったバイオマス利用の高まりとともに, 道内でも資源作物の導入, 利用に関する検討が行われている。その中でヤナギ類は, 北海道の環境に適応した植物であり, また超短伐期もしくは短伐期での大量生産が可能であることから注目されている。これまでの研究から, オノエヤナギ (*Salix sachalinensis*) とエゾノキヌヤナギ (*Salix pet-susu*) の有望性が見出されており, この 2 樹種を対象に実用に適した栽培収穫システムの開発<sup>3,4)</sup> や, 活用方法の検討<sup>4)</sup> が進んでいる。

以上のような背景から, 我々はヤナギ資源の将来性に着目し, シイタケ菌床栽培における培地基材としての可能性を調査してきた。その結果, オノエヤナギやエゾノキヌヤナギのおが粉を用いた場合, ミズナラ (*Quercus mongolica* var. *grosseserrata*) やシラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) のおが粉を用いる場合よりも, 子実体の発生重量が増加することや, 商品価値の高い大粒の子実体発生個数が増えることが明らかとなってきた<sup>2)</sup>。そこで現在, ヤナギおが粉を用いたシイタケ菌床栽培の実用化を目指して栽培試験を継続するとともに, ヤナギおが粉がシイタケ増収をもたらす要因について検討を行っている。

シイタケは白色腐朽菌であり, セルラーゼを産生しセルロースの糖化が可能である。このため, おが粉の糖化性がシイタケ収量に対して影響している可能性がある。そこで, 市販のセルラーゼ酵素を用いて, オノエヤナギやエゾノキヌヤナギおが粉の糖化性を調べ, ミズナラやシラカンバおが粉の糖化性と比較することを目的とし, 予備的な検討を行ったので報告する。

### 【試料と方法】

#### 〔試料〕

オノエヤナギ, エゾノキヌヤナギのおが粉は, 白糠町町有地に自生していた個体 (樹齢 10~20 年, 樹高 5~6 m) を伐採, 粉碎したものである。ミズナラ, シラカンバのおが粉は, シイタケ菌床栽培用に市販されているものを購入した。以上 4 種のおが粉は, カッター式のミルで粒径 500  $\mu$  m 未満に粉碎し, 試料とした。なお, 試料中のグルカン量 (%) は, 乾物ベースでオノエヤナギ 40.8 %, エゾノキヌヤナギ 38.5 %, ミズナラ 35.4 %, シラカンバ 35.3 % である。

#### 〔方法〕

シイタケ栽培試験において通常我々は, 菌床栽培用の培地基材として水 6 : おが粉 3 : 栄養剤 1 の割合 (重量ベース) で混合したものを使用し, これを 98°C で 135 分, 続いて 121°C で 30 分滅菌処理してから種菌を接種している。そこで, 糖化実験前にこの条件に近い形で試料の前処理を行った。すなわち, 乾物 3 g の試料を 10 mL 容遠沈管に入れ, 水を加えてよく混ぜた。最終的な水分量は 6 g を予定したが, 結果として, 試料と水をよく馴染ませるために 7 g を要した。加水後, 遠沈管はキャップを緩めにしてオートクレーブに入れ, 105°C で 135 分, 続いて 121°C で 30 分加熱処理を行い, 終了後急冷して常温に戻した。

糖化実験では, 緩衝液として 0.05 M クエン酸 / クエン酸 Na 緩衝液 (pH 4.8) を, 酵素としてメイセラーゼ粗原末 (明治製菓製) を使用した。酵素は緩衝液に溶かし, 4.5 FPU/mL の酵素液としてから用いた。100 mL 容三角フラスコに前処理した試料を洗い移し, 液量が 60 mL となるように酵

素液 20 mL と緩衝液を加えた。最終的に、酵素添加量は前処理した試料乾物 1 g あたり 30 FPU、基質濃度は 5 % (w/v) となった。これを 50℃ のインキュベーター内で 72 時間、130 rpm の速度で水平回転振とうしながら糖化した。糖化開始時と 24, 48, 72 時間後に糖化液 1 mL を秤取した。この液に内部標準液 (2 % *meso*-エリトリトール溶液) 100  $\mu$ L と緩衝液を加えて液量を 2 mL としてから、高速液体クロマトグラフを用いた Hiyama et al.<sup>5)</sup> の方法でグルコース量を定量した。糖化性の指標として、グルコース収率 [%、=糖化液中のグルコース量 (mg)  $\times$  10  $\times$  0.9 / 試料乾物量 (g) / 試料中のグルカン量 (%)] を求めた。以上の糖化実験は、試料につき 3 反復行った。

### 【結果および考察】

糖化実験において経時的に測定したグルコース量より求めたグルコース収率を表に示す。糖化開始時に 0.8~1.1 % の収率となっているが、この原因は不明である。前処理によりヘミセルロースもしくはセルロースの一部が分解し溶出した可能性の他、試料に含まれるヘミセルロース、セルロース以外の成分由来の可能性が考えられる。24 時間後のグルコース収率は、ミズナラ、シラカンバが同程度 (6.5 % 程度) であったが、それらに比べてエゾノキヌヤナギが 1.2 倍、オノエヤナギが 1.5 倍の収率であった。これは、ヤナギ 2 種の糖化性が、ミズナラやシラカンバよりも良好なことを示唆するものと考えられる。48 時間後のサンプル採取において、一部サンプルよりわずかな異臭を確認した。また、24 時間後のグルコース収率と比べて、48 時間後の収率はオノエヤナギを除いて低下し、72 時間後の収率はオノエヤナギも含めて明らかに低下した。これらの要因として、実験中に雑菌の繁殖が起こり、グルコースが消費された可能性が考えられる。

表 糖化実験におけるグルコース収率の経時変化 (%、n=3)

樹種	糖化開始時		24時間後		48時間後		72時間後	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
オノエヤナギ	0.8	0.0	9.8	0.6	10.2	0.7	4.4	1.1
エゾノキヌヤナギ	0.8	0.1	7.8	0.5	6.6	0.9	1.9	2.1
ミズナラ	1.1	0.3	6.4	0.2	5.3	0.3	2.9	2.9
シラカンバ	0.8	0.1	6.5	0.4	6.0	0.1	3.2	2.6

糖化開始から 24 時間後における試料乾物 1 g あたりのグルコースの生成量 (mg、=グルコース収率 (%)  $\times$  試料中のグルカン量 (%) / 10 / 0.9) は、オノエヤナギ 44 mg、エゾノキヌヤナギ 33 mg、ミズナラ 25 mg、シラカンバ 25 mg であり、ミズナラ、シラカンバに対してエゾノキヌヤナギが 1.3 倍、オノエヤナギが 1.8 倍の生成量であった。これは、(24 時間時点での) ヤナギ 2 種のグルコース収率が高いことに加え、試料のグルカン量が多いことによるものと考えられる。上記のように、本実験では実験後半 (48 時間後、72 時間後) の糖化状況を捉えることができなかったが、ヤナギ 2 種ではシイタケ菌が資化できる糖量が多く、子実体の増収との関連性が示唆される結果が得られた。今後の検討では、抗菌剤を加えるといった対策を取った上で、この仮説の検証を進めていく予定である。

### 【引用文献】

- 1) 北海道水産林務部林務局林業木材課：“北海道特用林産統計 (平成 25 年)”，札幌，2015.
- 2) 原田陽，折橋健，檜山亮，宜寿次盛生，棚野孝夫：日本きのこ学会誌 22(1), 24-29 (2014).
- 3) 森林総合研究所北海道支所：“北海道におけるエネルギー作物「ヤナギ」の生産の可能性”，札幌，2014.
- 4) 北海道開発局開発調査課：“北海道開発計画調査「北海道に適した新たなバイオマス資源の導入促進事業 (平成 20~22 年度) の概要」”，札幌，2011.
- 5) Hiyama, R., Gisusi, S., Harada, A. : J. Wood Sci. 57, 429-435 (2011).

○上田一貴（北大農）、岡戸祐治、重富顕吾、生方信（北大院農）

## 1. 緒言

オートファジーとは細胞内成分の自己分解機構のひとつであり、飢餓対応や細胞内環境維持のほか、ガンや神経疾患に関係している。しかし、その詳細な生理機構に関しては未だ明らかとなっていない。そのため、オートファジー誘導もしくは阻害活性を持つ物質は、オートファジーの関与する様々な生理機構の解明に有用であるばかりでなく、及び将来的に医療の現場での応用の可能性が期待されている。

当研究室において、北海道に自生するモリノカレバタケ属の一種 (*Gymnopus* sp.) からオートファジー誘導活性を持つ化合物(+)-epogymnolactam(**1**)が単離・構造決定された。さらに、その全合成も当研究室において達成されている。しかし、依然オートファジー誘導の作用機構については明らかになっていない。(+)Epogymnolactam(**1**)のオートファジー誘導機構の解明のためには、(+)-epogymnolactam(**1**)の各種誘導体を調製し、構造活性相関に関して検討を行うことが有効である。構造活性相関に用いる誘導体のひとつとして、(+)-epogymnolactam(**1**)のエナンチオマーである(-)-epogymnolactam(**2**)は、特異的な酵素との相互作用を検証するための、有力な分子プローブのひとつである。本研究では、将来的に構造活性相関評価を行うことを目標とし、非天然型の (-)-epogymnolactam(**2**)の合成について検討した。また本発表では、特にそのエナンチオマー過剰率向上の検討について報告する。

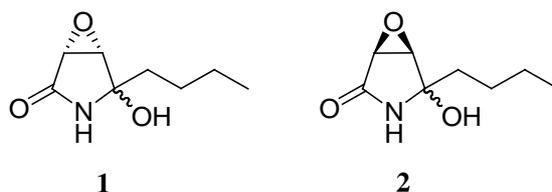


Fig.1 Structure of (+)-epogymnolactam(**1**) and (-)-epogymnolactam(**2**).

## 2. 実験方法

### 2.1. 合成計画

(+)-Epogymnolactam(**1**)の合成経路に基づいて、(-)-epogymnolactam(**2**)の合成計画を立てた(Fig. 2)。

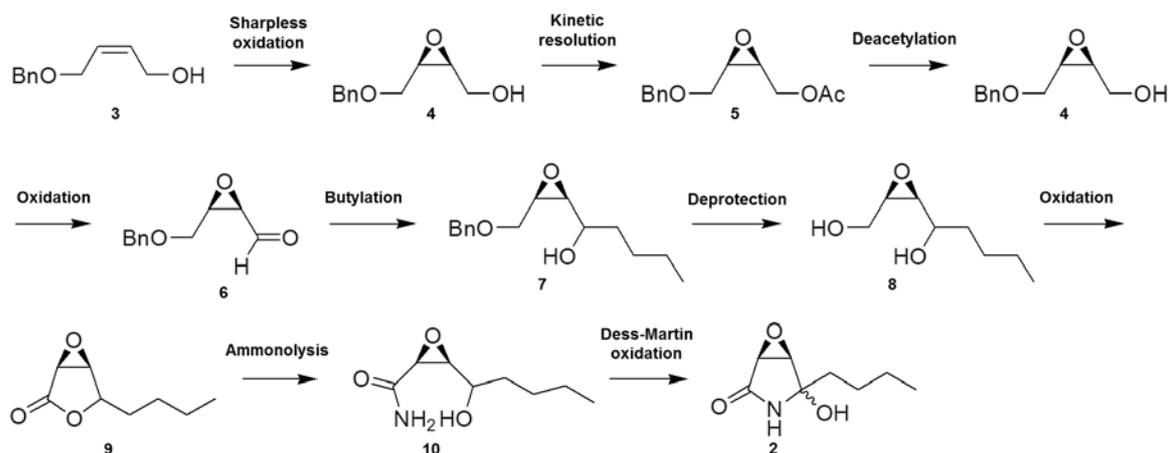


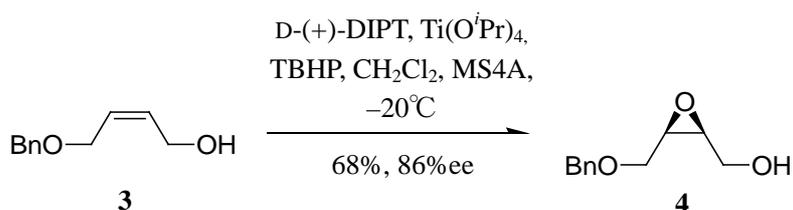
Fig.2 Synthetic strategy of (-)-epogymnolactam(**2**).

天然型の(+)-epogymnolactam(**1**)の全合成においては、アリルアルコール(**3**)からシャープレス不斉エポキシ化反応により(2*S*,3*R*)体エポキシアルコール(後述, *ent*-**4**)を調製した後、porcine pancreatic lipase(PPL)を用いた速

度論的分割により光学純度の向上を図った。PPLにより、不要な異性体である(2*R*,3*S*)体エポキシアルコール(**4**)は選択的にアセチル化され、取り除かれた。この処理により、光学純度の向上に成功した。非天然型である(-)-epogymnolactam(**2**)の合成においても、所望の(2*R*,3*S*)体エポキシアルコール(**4**)の調製はシャープレス不斉エポキシ化反応により、容易に達成できると考えられたが、続く速度論的分割においては、PPLの基質特異性の問題から同様の戦略を用いることは困難であると予想された。そこで、(-)-epogymnolactam(**2**)合成においては、必要な(2*R*,3*S*)体エポキシアルコール(**4**)を、PPLを用いてアセチル誘導体(**5**)にして回収した後、脱アセチル化することで、光学純度を高めることとした。

## 2.2. 実験部

(*Z*)-4-(Benzyloxy)but-2-en-1-ol(**3**)を出発物質として、シャープレス不斉エポキシ化反応を行い、85.7%eeのエポキシアルコール(**4**)を得た(Scheme 1)。



Scheme 1 Synthesis of epoxyalcohol(**4**).

その後、光学純度向上のためにPPLを用いた光学分割を行った。PPLにより必要なアセチル誘導体(**5**)を得るために、反応時間ごとにサンプルを採取しHPLCによるエナンチオマー過剰率の分析を行った。分析の結果、14時間が最も多くのアセチル誘導体(**5**)を得ることが出来る反応時間であった(Fig. 3)。これにより、必要な異性体のみをアセチル化し回収・精製することで、光学純度98%eeのアセチル誘導体(**5**)を得ることが出来た。

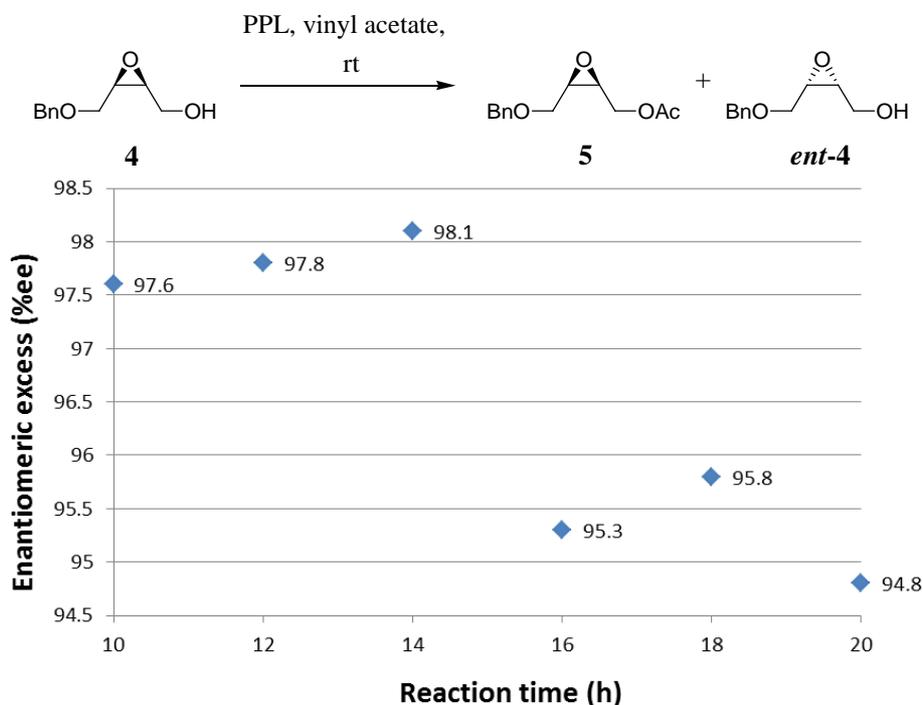
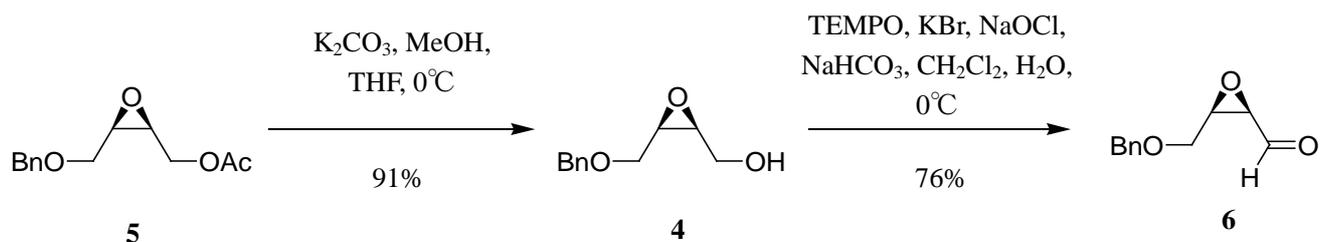


Fig. 3 Enantiomeric excess of each reaction time.

アセチル誘導体(**5**)を脱アセチル化することで、再びエポキシアルコール(**4**)を得た。得られた**4**をTEMPO酸化によりエポキシアルデヒド(**6**)を得た(Scheme 2)。



**Scheme 2** Synthesis of epoxyaldehyde(**6**).

### 3. 結果と考察

PPL を用いた分割における反応時間の最適化を検討し、98%ee でアセチル誘導体(**5**)を得ることに成功した。またそこから、エポキシアルデヒド(**6**)までの合成を達成した。今後さらに研究を進め、(-)-epogymnolactam(**2**)の全合成及び構造活性相関評価を行うことを目指している。

### 4. 参考文献

- 1) S. Mitsuhashi, C. Shindo, K. Shigetomi, T. Miyamoto, and M. Ubukata, *Phytochemistry*, **114**, 163-167(2015)
- 2) Y. Okado, K. Shigetomi, S. Mitsuhashi, and M. Ubukata, *J. Antibiotics*, doi: 10.1038/ja.2015.63(2015)

○鶴原正啓（北大院農）、幸田圭一（北大院農）、浦木康光（北大院農）

### 【緒言】

水溶性高分子は、グリーンケミストリーの観点から、21世紀に入り、注目を集めている。代表的なセルロース誘導体である酢酸セルロース（CA）は、通常、有機溶媒に可溶であるが、置換度（DS）1.0以下のCAは水溶性を示すことが古くから知られていたが、調製が難しかった。しかし、最近、水溶性CA（WSCA）の工業生産が可能となった。そこで、本研究では、このWSCAから環境に温和な条件でナノファイバーを調製する目的で、電界紡糸による細径繊維の調製を試みた。さらに、カーボンナノチューブ(CNT)を混合したWSCAの電界紡糸も検討した。

### 【実験方法】

ダイセル社より提供されたWSCA (DS=0.895)粉末を、0-60 wt%のエタノール水溶液に溶解して、種々の濃度の電界紡糸用ドープを調製した。また、WSCAの水溶液にCNT水分散液を加えて混合し、ドープを調製した。これらのドープに対して、15-30 kVの印加電圧および、ノズルとコレクタ間の距離15、24 cmに変え、種々の条件で電界紡糸を行った。得られた繊維の形態を、電子顕微鏡（SEM、TEM）を用いて観察した。

CNT混合繊維については、粉碎後、成形用樹脂粉末（酢酸セルロース）と混合して熱圧プレスにより薄片状のペレットに再成形した。この成形物の電導度測定および電磁波シールド能を評価した。

### 【結果および考察】

水溶性という特性を活かしてWSCA水溶液の電界紡糸を試みたが、ノズルからの液滴の噴出が起きるのみで、濃度、印加電圧など紡糸条件を変えても、繊維を得ることはできなかった。この原因は、水の低揮発性に由来すると考えられたので、揮発性が高く、環境にも温和なエタノール水溶液を溶媒としたドープを作製し、電界紡糸の条件を検討した。50 %エタノール水溶液を溶媒としたところ、繊維を得ることができ、最終的には、WSCA濃度9 %、印加電圧、25 kV、ノズル-コレクタ距離24 cmで最も良好な紡糸が行え、直径540 nmの電界紡糸繊維を得ることができた（Fig. 1）。

このナノファイバーは、依然として水溶性であるために、用途が限られる。そこで、この繊維を水不溶性に変換するために、アンモニア蒸気によるケン化を試みた。IR測定から、1週間のケン化処理でも脱アセチル化が不十分であることが示されたが、WSCAナノファイバーは目的の水不溶性となった。

WSCAナノファイバーの機能化、本研究では電導性繊維への変換を目指し、CNTとのコンポジット化を検討した。前述のエタノール水溶液系WSCAドープにCNTを混合して、電界紡糸を行った結果、4 %（対WSCA）まで添加しても、電界紡糸は可能であった。この中で、液滴部分の生成を抑えつつ、紡糸できた条件は、CNTが3 %が限界であった。

CNT配合ナノファイバーの電磁波シールド能を評価するために、繊維を粉碎して酢酸セルロースを加えペレットを作製した。結果として、電気導電性および電磁波シールド能は観測されなかった。TEM観察により、CNTの配合量が少なく、CNT同士の接触が少ないことが、その原因であることが分かった。今後は、高CNT混合ドープの紡糸条件を探察する必要がある。

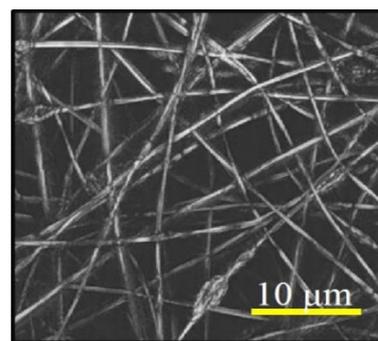


Fig.1 SEM image of electrospun WSCA-CNT nanofiber (WSCA : CNT = 100 : 1 )

【謝辞】電磁波シールド性能の測定にご協力頂いた、北見工大鈴木研究室に謝意を表します。

日本木材学会 北海道支部講演集 第47号

---

平成27年11月5日 発行

編集人 重富顕吾, 大崎久司, 古田直之

発行人 浦木康光

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

---