

山形県上倉山のクロベ (*Thuja standishii* Carr.) 葉の ヘキサン抽出成分について

高橋孝悦*・渡部大寛*・斉藤正一*・楠本倫久**・芦谷竜矢*

*山形大学農学部食料生命環境学科森林科学コース

**森林研究・整備機構森林総合研究所森林資源化学研究領域

(令和2年9月4日受付・令和2年11月19日受理)

n-Hexane extractives of Kurobe (*Thuja standishii* Carr.) leaves
in Mt. Kamikura in Yamagata prefecture

Koetsu TAKAHASHI*, Masahiro WATANABE*, Shoichi SAITOU*,
Nori-hisa Kusumoto** and Tatsuya ASHITANI*

*Section of Forest Science, Department of Food and Life and Environment, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka 997-8555, Japan

**Department of Forest Resource Chemistry, Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba 305-8687, Japan

(Received September 4, 2020 · Accepted November 19, 2020)

Summary

The leaf *n*-hexane extracts (neutral and acidic fractions) in Kurobe (*Thuja standishii*) collected from Mt. Kamikura in Yamagata prefecture were analyzed by GC and GC-MS comparing with four other conifer leaves.

The results showed that the main constituents in the neutral fraction were α -pinene, sabinene and bornyl acetate for monoterpenes, and hibaene, dolabradiene and nezukol for diterpenes. There was a variation in the contents of nezukol among individuals. The results also showed that the main constituents in acidic fraction were palmitic acid for fatty acid and *trans*-communic acid for diterpene carboxylic acid, and variation was also found in the content of *trans*-communic acid among individuals. These results suggested that Kurobe have chemotypes.

As the results of the other conifers, the main constituents in the neutral fraction of Sugi (*Cryptomeria japonica*) were α -pinene, sabinene and limonene for monoterpenes, elemol and hydroxygermacrene for sesquiterpenes, and kaurene for diterpene. Unknown diterpene carboxylic acids were also found as main constituents in the acidic fraction. The main constituents in the neutral fraction of Hiba (*Thujopsis dolabrata*) were sabinene for monoterpene, elemol for sesquiterpene, and hibaene and dolabradiene for diterpenes. The main constituent in the acidic fraction was *trans*-communic acid for diterpene carboxylic acid. The main constituents in the neutral fraction of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) were sabinene, β -myrcene, limonene, bornyl acetate and α -terpinyl acetate for monoterpenes, elemol for sesquiterpene, and hibaene for diterpene. Unknown lignans were also found as main constituents in the neutral fraction. Hinoki acid, sesquiterpene carboxylic acid, was also found as a main constituent in the acidic fraction. The main constituents in the neutral fraction of Kouyamaki (*Sciadopitys verticillata*) were α -pinene for monoterpene, and sclarene, kaurene and six unknown furano-type compounds for diterpenes. *trans*-Communic acid and unknown diterpene carboxylic acids were also found as main constituents in the acidic fraction.

The cluster analysis was carried out by using Ward's method on the 53 major constituents found in neutral and acidic fraction. The results suggested that Kurobe (*Thuja*) had a near relationship with Hiba (*Thujopsis*), and far relationships with Kouyamaki (*Sciadopitys*) and Hinoki (*Chamaecyparis*).

Key words : *Thuja standishii*, giant tree, *n*-hexane extractives, terpenoids, cluster analysis

I. はじめに

日本勤労者山岳会鶴岡支部 (Rousan 鶴岡) の山行 (2020. 6.13,14)¹⁾ に同行し、山形県朝日連峰の一つ上倉山 (1,144m) 山頂付近でクロベの巨樹 (写真1) に遭遇することができ、幸運にもこの巨樹の葉を持ち帰ることができた。このような機会がなければクロベの葉の分析は不可能であったことをまず述べておきたい。

さて、クロベ (別名ネズコ, *Thuja standishii* Carr.) は大変耐久性に優れた樹木で、その心材はトロポロン類を多く含むことが良く知られている。クロベ (黒檜) は、ネズコ (鼠子) とも呼ばれ、他にも様々な呼び名がついている²⁾。名前の由来³⁾は、富山県の黒部溪谷に特に多いことからとも、葉の裏側の色がアスナロやヒノキに比べて暗いことからという二つの説がある。その他に、葉裏が白い「シラビソ (白檜曾)、マツ科モミ属」を「白檜 (しらべ)」と呼ぶのに対応して葉裏が白くない檜、つまり「黒檜 (くろべ)」と名付けられたともいわれる。一方「ネズコ」は、心材がねずみ色を帯びることから付けられたとも言われている。名前の由来とされている葉は、ヒノキ科のヒノキ属 (ヒノキやサワラなど)、ビャクシン属 (イブキやカイヅカイブキなど)、アスナロ属の葉の形態とよく似た特徴を持っているが、ヒノキやアスナロのような裏側のワックス質の白い紋様が見られないのが特徴である⁴⁾。実際に上倉山で採取できた葉の裏側には白い紋様はなかった (写真2)。また、クロベは江戸時代に幕府によって厳重に保護された有用な樹木のひとつで、ヒノキ、サワラ、アスナロ、コウヤマキと共に木曾五木として有名である。同じネズコ属の樹木としてはアメリカから「米スギ」と呼ばれ、大量に輸入されたアメリカネズコ (ウエスタンレッドシダー) がある。米スギは、秋田の天然杉が枯渇する中、天井板材の代替品として一時期使用されており、ネズコと同じように耐久性に優れた木材として有名である⁵⁾。

クロベの全国的な分布をみれば、本州と四国に分布するとされている。林弥栄 (1969) が編集した「有用樹木図説」にはクロベの分布が点として示されており、島根県の隠岐島や新潟県の佐渡島などにも分布が確認されている⁶⁾が、最近行われた調査報告⁷⁾では、2019年時点でその3か所が消滅されたとしている。しかし、中部地方を中心に東北地方まで、全体としてはクロベの集団は安定して推移しているとしている。東北地方には北限のネ

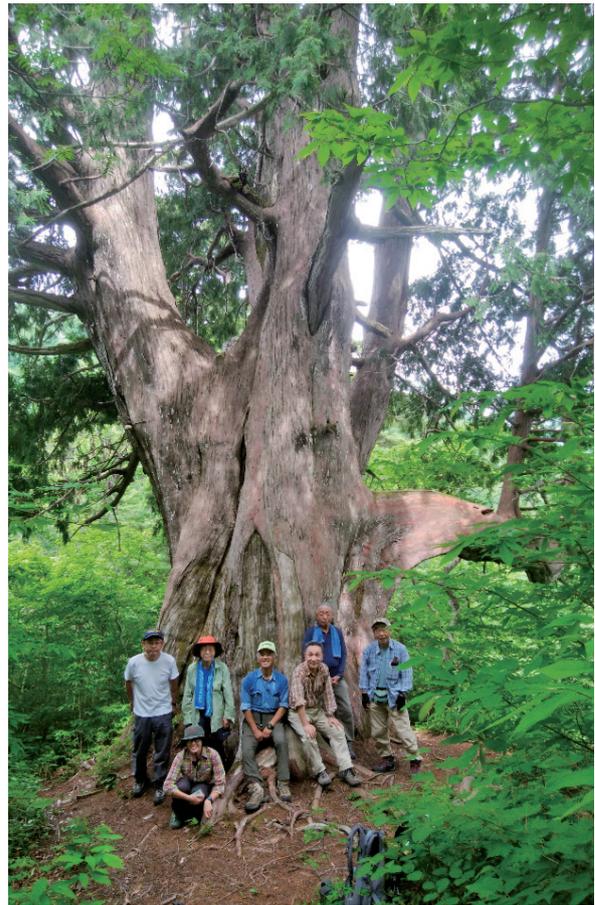


Photo 1 Giant tree of Kurobe in Mt. Kamikura

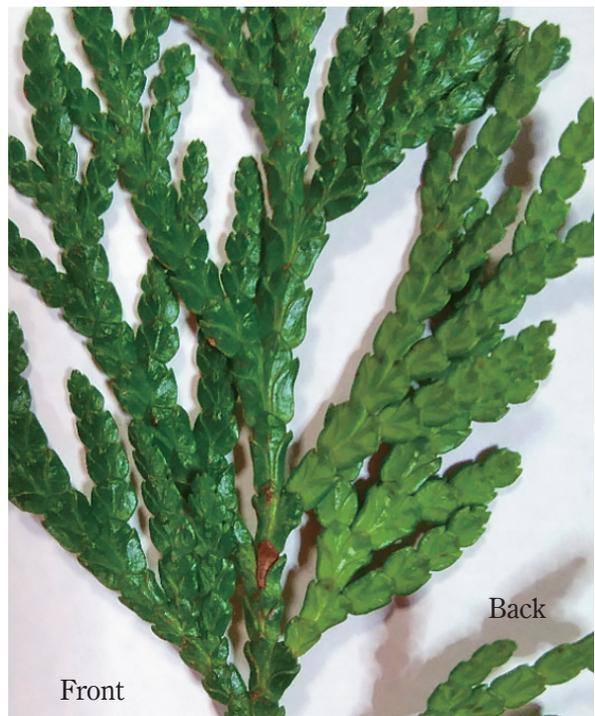


Photo 2 The leaf of Kurobe in Mt. Kamikura

ズコ林として青森県弘前市の国有林に「太鼓山ネズコ林木遺伝資源保存林」があり、岩手県紫波町の国有林には「山王海ネズコ林木遺伝資源保存林」が設置されている⁸⁾。山形県にはクロベの巨樹が最も多く存在し、上倉山のクロベ、岩神権現のクロベ、縄文のクロベがあり、秋田県と宮城県の県境付近にある軍沢の大ネズコ、千年のクロベを含めると五つの巨樹が存在することになる。このように、東北にはクロベは広く分布していることが伺える。この他にもクロベの巨樹は存在し、全国のクロベ巨樹が紹介されている⁹⁾。山形県庄内地方には県指定の天然記念物として、鶴岡市長沼字十文字24に江戸時代の寛永6年(1629年)、秋田県平鹿郡十文字町から来た開拓者が発見し、「十文字開発樹」と命名したクロベの巨樹が存在する¹⁰⁾。山形県内の中で上倉山のクロベの巨樹は特に有名で、特別天然記念物級の大きさがあり、日本一とも言われている。

クロベの心材の成分についてはよく研究されており、その精油成分として hinokitiol (β -thujaplicin) が含有されていることが知られている¹¹⁾。hinokitiol はヒノキ心材には殆ど含まれておらず、 α や β -thujaplicin はその名の通り、ネズコ属 (*Thuja*) に多く含まれており、この属を特徴づける成分となっている。nezukone を加えて、1960年代に7員環構造のトロポロン類として注目され、ネズコ属の心材の耐久性成分として紹介されている。さらに、一属一種のアスナロ属 (*Thujaopsis*) にもトロポロン類が心材に確認され、アスナロの変種で青森県に多く分布するヒバの耐久性成分としても存在している。

ところが、クロベの葉の成分分析の報告例は少なく、中塚らが1955年に報告した「ネズコ葉の精油成分について」が最初で¹²⁾、その後1970年に北谷が、nezukol など8種類のジテルペンの存在を報告し、特に nezukol の構造を詳しく調べ、Corbettらが報告した (-)-8 β -hydroxy sandaracopimar-15-ene をネズコ特有のジテルペンとして、「nezukol」と呼ぶことを提案している¹³⁾。

上述のようにクロベの葉の成分については不明な点が多いため、針葉樹で比較的近縁とされるスギ科、ヒノキ科、コウヤマキ科の樹木との比較分析を試みた。これらの葉のテルペン類の主な研究としては、スギでは安江、長濱、渡部らの研究^{14,15,16)}が、ヒバでは高橋、長濱らの研究^{17,18,19)}が、ヒノキでは長濱らの研究²⁰⁾が、コウヤマキでは住本らの研究²¹⁾がそれぞれ上げられる。今回、クロベ(3個体)と入手できたスギ(*Cryptomeria japonica*)、ヒバ

(*Thujaopsis dolabrata*)、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、コウヤマキ (*Sciadopitys verticillata*) の葉成分を分析し、それぞれを比較しながら、クロベ葉成分の特徴を明らかにしたい。

なお、今回の研究は東北森林管理局と山形大学農学部が締結している連携協定に基づき実施した。

II. 試料及び実験方法

1. 試料

クロベ (*Thuja standishii*) 3個体の試料は、上倉山山頂付近の樹下に落下していた緑葉 (約1g) を使用した。スギ (*Cryptomeria japonica*) は山形県羽黒町三橋に植栽されているスギ1個体 (T) を使用した。ヒバ (*Thujaopsis dolabrata*) は青森県産のヒバ1個体と金峰山山頂付近に自生するヒバ1個体 (K) の2個体を使用した。ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) は金峰山山頂付近のヒノキ1個体 (K) を使用した。コウヤマキ (*Sciadopitys verticillata*) は金峰山の中の宮に植栽されているコウヤマキ1個体 (K) を使用した。

2. 抽出

試料の抽出は渡部らの方法の基本を行った¹⁶⁾。10mlのバイアル瓶にハサミで細かく刻んだ試料 (生重) 1g を入れ、ヘキササン10mlを加え密栓し、室温で1週間程度抽出した。一週間以上経過したものはろ過することなくそのまま冷蔵庫に保存した。ヘキササン抽出液は、モノテルペンの減少と、セスキテルペンの変質を避けるため、濃縮することなくGCまたはGCMSに直接注入し分析を行った。また、中性部は一般にアルカリ処理後のヘキササン可溶部を指すが、アルカリ処理により中性部の成分が変質する恐れがあることから、ヘキササン抽出液そのものを中性部として扱った。

3. 酸性部の分画

1ml容マイクロ試験管にヘキササン抽出液300 μ lを取り、5%NaOH水溶液を等量加え、キャップをしてよく振とうした。水溶液層 (下層) を500 μ lのマイクロシリンジで別のマイクロ試験管に移しとり、ジエチルエーテルを等量加え、キャップをして振とうする操作を2回行った。このときジエチルエーテル層は別のマイクロ試験管に分けた。残った水溶液層に5N-HClを等量加えキャップをしてよく振とうし、酸性としたのち、300 μ lジエチルエーテルを加え、キャップをして振とうする操作を2回行った。酸性の水層を抽出したジエチルエーテル層をマイクロ試験

管に移し（計600 μ l）、2回水洗（300 μ l）した。このジエチルエーテル溶液60 μ lと0.1%ベラトルムメタノール溶液30 μ lをマイクロ試験管にとり乾固させメチル化用の試料とした。なお、GCMS分析ではマススペクトルが十分観察できるように5倍量のジエチルエーテル層300 μ lと0.1%ベラトルムメタノール溶液30 μ lをマイクロ試験管にとり乾固させて、メチル化用の試料とした。

4. メチル化

乾固させた試料が入ったマイクロ試験管に溶剤（ベンゼン・メタノール：8:2）を20 μ l加え試料をよく溶かす。さらに、トリメチルシリルジアゾメタン（10v/v% ヘキサン）を10 μ l加え栓をして、30分程度反応させてメチル化を行った。

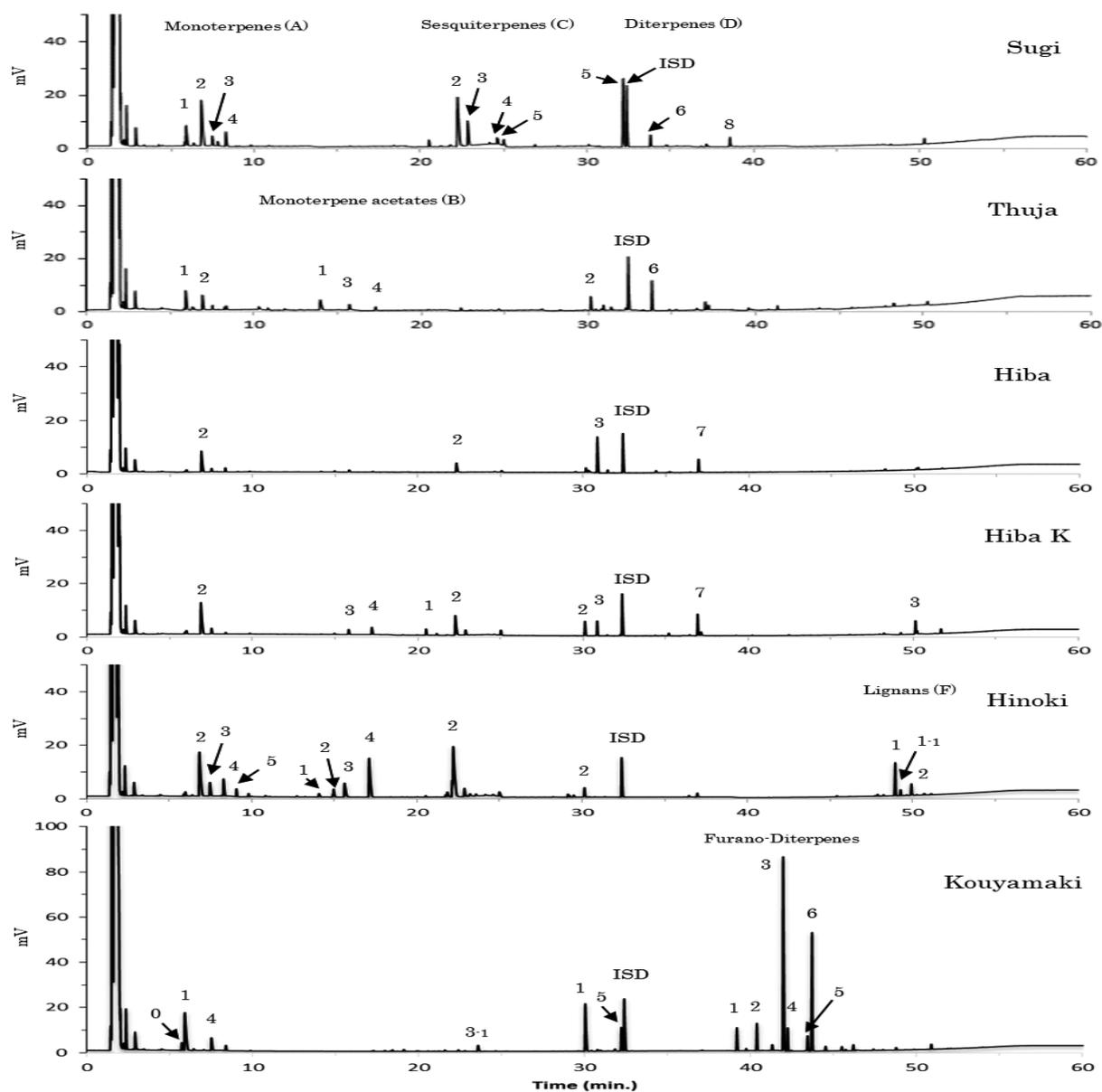


Fig.1 GC of *n*-hexane extracts (neutral fraction) in the leaves of Kurobe and four other conifers

Legend: (A) 0; Tricyclene, 1; α -Pinene, 2; Sabinene, 3; β -Myrcene, 4; limonene, 5; γ -Terpinene, (B) 1; Unknown, 2; Unknown, 3; Bornyl acetate, 4; α -Terpinyl acetate, (C) 1; Germacrene-D, 2; Elemol, 3; Hydroxygermacrene, 3-1; Unknown, 4; α or β -Eudesmol, 5; Hedycaryol, (D) 1; Sclarene, 2; Hibaene, 3; Dolabradiene, 5; Kaurene, 6; Neuzokol, 7; Sempervirol, 8; Unknown, (E) 1; Unknown, 2; Unknown, 3; Unknown, 4; Unknown, 5; Unknown, 6; Sciadin, (F) 1; Unknown, 1-1; Unknown, 2; Unknown, 3; Unknown.

5. GC分析

GC分析(FID)は主に定量分析を目的に行った。注入量は2 μ l(標準物質1 μ l+試料1 μ l)、HP5系(SH-Rtx-5MS)の30mキャピラリーカラム、内径0.25mm、膜厚0.25 μ m、注入温度250 $^{\circ}$ C、検出器温度320 $^{\circ}$ C、カラム温度50-320 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ Cを1分間保持後5 $^{\circ}$ C昇温、分析時間60分、カラム圧力120kpa、スプリット比1/10で、島津GC-2014(FID検出器)を使用して分析した。

6. GCMS分析

GCMS分析は主に定性分析及化合物の確認を目的に行った。注入量は2 μ l(標準物質1 μ l+試料1 μ l)、HP5系(SH-Rtx-5MS)の30mキャピラリーカラム、内径0.25mm、膜厚0.25 μ m、注入温度250 $^{\circ}$ C、インターフェース温度320 $^{\circ}$ C、カラム温度50-320 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ Cを1分間保持後5 $^{\circ}$ C昇温、分析時間60分、カラム圧力80kpa、スプリット比1/10、スキャン範囲50-800、イオン化電圧70eVで、島津GCMS-QP2010Ultraを使用して分析した。

7. 化合物の確認と標準物質

化合物の同定及び推定は、標品を用いて行うと共にMSライブラリーによるシミラリティー検索により行った。標品から確認できたものを同定とし、その他のものについては推定とした。

標準物質としてはヘネイコサン(0.1mg/ml酢酸エチル溶液)とベラトルム酸(0.1mg/mlメタノール溶液)を使用した。

8. クラスタ解析

成分の類似性に関する分析は、データ数が少ないため、得られたデータを正規化せず、平方距離を用いたウォード法により面積比をもちいて解析し樹系図に示した。

III. 結果及び考察

1. クロベと他の針葉樹葉ヘキサン抽出成分(中性部)の比較

5樹種6個体(スギ、クロベ、ヒバ、ヒバK、ヒノキ、コウヤマキ)のGC分析(図1)とGCMS分析(図8)を行うと、5-10分付近にモノテルペン7成分が、10-20分付近にモノテルペンアセテートなど5成分が、20-30分付近にセスキテルペン9成分が、30-40分付近にジテルペン9成分が、40-45分付近にフラン型ジテルペン6成分が、50分付近にリグナン類と考えられる4成分がそれぞれ分離良く確認できた。

クロベと4樹種を比較すると、クロベはセスキテルペンが少なく、モノテルペンアセテートが多いのが特徴的であった。4樹種については、スギはモノテルペンアセテートがほとんど見られず、ヒバもモノテルペンアセテートとセスキテルペンが少ない傾向を示した。これとは対照的にヒノキはモノテルペン、モノテルペンアセテート、セスキテルペンを多く含み、リグナンも確認できた。別格だったのがコウヤマキで、フラン型のジテルペンがかなり多く見られ、他の樹種とは大きく異なっていた。

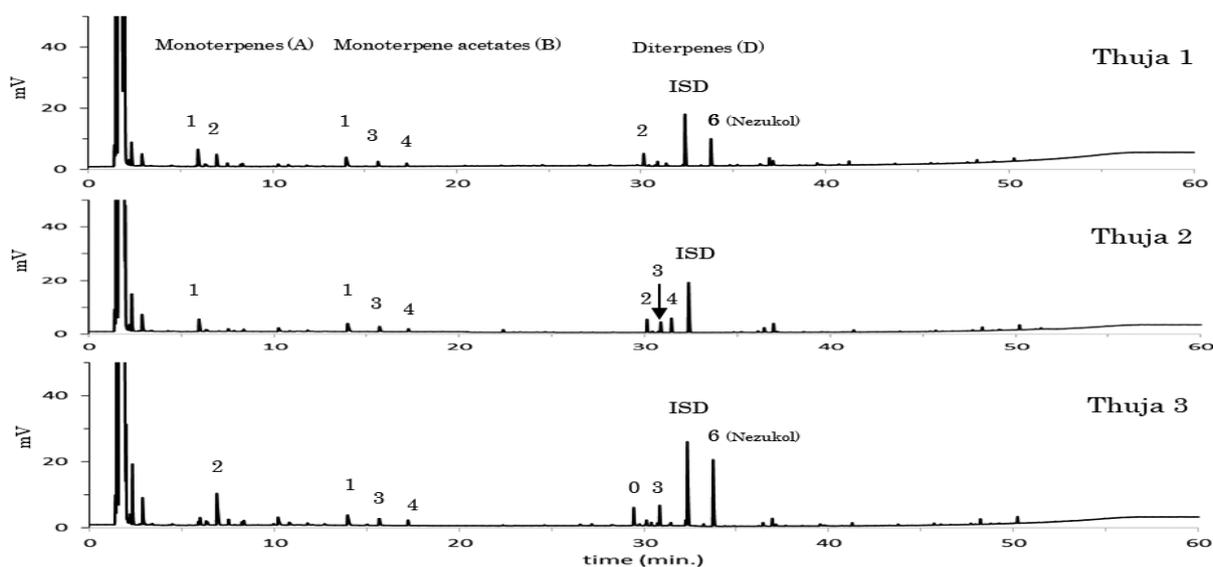


Fig.2 GC of n-hexane extracts (neutral fraction) in the leaves of three Kurobes
Legend: (A) 1; α -Pinene, 2; Sabinene, (B) 1; Unknown, 3; Bornyl acetate, 4; α -Terpinyl acetate, (D) 0; Rimonene, 2; Hibaene, 3; Dolabradiene, 4; Iso-kaurene, 6; Nezuol.

2. クロベ3個体の葉ヘキサン抽出成分（中性部）の比較

次に、クロベの3個体を比較した（図2）。モノテルペン、モノテルペンアセテートには大きな違いが見られないが、Thuja 2のジテルペンの構成が他の2つと異なっていた。特に、Thuja 2にはクロベの代表的なジテルペンである nezukol が全く見られなかった。このように、クロベには nezukol がいない個体が存在するなど、ジテルペンの種内変異があるものと推察された。

3. クロベと他の針葉樹葉ヘキサン抽出成分（中性部）の構成（標準物質比：ヘネイコサン比）

クロベと4樹種、合計8個体で確認できた成分の構成を求め、表1に示した。ただ、含有量の少ない成分も見られたため、標準物質比が0.1以上のものを示した。

モノテルペンは7成分の内、4成分を同定し、3成分を推定した。その構成は樹種ごとに異なっていた。モノテ

ルペンアセテートは5成分の内、2成分を推定した。その構成はクロベ3個体がともに bornyl acetate を含有し、ヒノキが種類も量も多かった。セスキテルペンは8成分の内、3成分を同定し、3成分を推定した。その構成はスギ、ヒバ、ヒノキで elemol と hydroxygermacrene が多く、クロベやコウヤマキはほとんど見られなかった。ジテルペンは8成分の内、6成分を同定し、2成分を推定した。その構成はクロベとヒバがよく似ており、hibaene と dolabradiene を多く含んでいた。kaurene はスギとコウヤマキに多く含まれ、nezukol はスギとクロベに多く含まれていた。このように、ジテルペンの構成は樹種の特徴をよく現していた。保持時間が37分以降にはコウヤマキの特徴的なジテルペンとされるフラン型のジテルペンやヒノキなどに見られるリグナン類が存在していたが、同定や推定には至らなかった。今後の課題である。

Table 1 Construction of *n*-hexane extractives (neutral fraction) in the leaves of Kurobe and four other conifers

	P.Name	R.Time	M+	Compound	I or E	SugiT	Thuja1	Thuja2	Thuja3	Hiba	HibaK	Hinoki	Kouyamaki
1	A0	5.696	136	Tricyclene	E								0.125
2	A1	5.954	136	α -Pinene	I	0.411	0.483	0.273				0.102	1.083
3	A2	6.901	136	Sabinene	I	1.242	0.331		0.490	0.733	1.166	1.850	
4	A3	7.505	136	β -Myrcene	I	0.162					0.116	0.385	0.246
5	A4	8.342	136	limonene	I	0.250						0.465	
6	A5	9.084	136	γ -Terpinene	I							0.156	
7	A6	10.425	152	Fenchone	E			0.100	0.133				
8	B1	14.023	196				0.326	0.254	0.183				
9	B1-1	14.079	154									0.106	
10	B2	14.965	154									0.259	
11	B3	15.752	196	Bornyl acetate	E		0.128	0.116	0.109		0.112	0.552	
12	B4	17.219	(181)	α -Terpinyl acetate	E						0.172	1.562	
13	C1	20.515	204	Germacrene-D	E						0.141		
14	C1-1	21.848	204									0.179	
15	C1-2	22.138	222	Cubebol	I							0.310	
16	C2	22.295	(204)	Elemol	I	1.413				0.293	0.672	2.372	
17	C3	22.867	222	Hydroxygermacrene	I	0.550					0.125	0.234	
18	C3-1	23.556	222										0.120
19	C4	24.699	222	α or β -Eudesmol	E	0.177						0.159	
20	C5	25.029	222	Hedycarvol	E	0.119					0.118		
21	D0	29.451	272	Rimuene	I				0.185				
22	D1	30.016	272	Sclarene	I								0.991
23	D2	30.135	272	Hibaene	I		0.236	0.232		0.104	0.331	0.213	
24	D3	30.871	272	Dolabradiene	I			0.178	0.207	1.010	0.309		
25	D4	31.439	272	Iso-kaurene	E			0.234					
26	D5	32.191	272	Kaurene	I	1.213							0.385
27	D6	33.797	290	Nezukol	I	0.156	0.520		0.770				
28	D7	36.945	286	Semperviol	E					0.300	0.459		
29	D7-1	36.963	374				0.132	0.149					
30	D8	38.578	(271)			0.139							
31	E1	39.153	374										0.352
32	E2	40.357	344										0.395
33	E3	41.941	388										3.429
34	E4	42.214	358										0.325
35	E5	43.416	342										0.215
36	E6	43.736	328	Sciadin	I								1.842
37	F1	48.945	354									0.695	
38	F1-1	49.268	400									0.125	
39	F2	49.925	352									0.249	
40	F3	50.150	398								0.285		

Legend: P.Name; peak name of GC, R.Time; retention time of GC, M+; molecular ion peak, I or E; identification or estimation.

Note: the data were calculated based on the ISD(heneicosane) area in each sample, and were showed over 0.100 value.

このように未確認の成分も含めて各成分の量的な把握ができたため、次にクラスター解析を行うこととした。目的は化学成分からクロベがどのように位置づけられるのか、また分類することが可能かを理解するためである。

4. 中性部のクラスター解析

クラスター解析の結果を図3に示した。コウヤマキ(*Sciadopitys verticillata*)はコウヤマキ科と言う独立した科に位置付けられることが多いが、明らかに他の樹種とは異なる位置を占めていた。スギ科のスギ(*Cryptomeria japonica*)とヒノキ科のヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)は次に異なる位置を占め、ヒバ(*Thujopsis dolabrata*)とクロベ(*Thuja standishii*)は近い位置関係にあった。特に、クロベのnezukolを欠く個体(Thuja 2)が他の個体と差が認められ、クラスター解析からも化学タイプの存在が示唆された。

津村らのDNAを用いた解析²²⁾では、クロベとヒバは近い位置関係にあり、ヒノキとスギはこれらより離れた位置関係にあるとしている。また、コウヤマキはマツ科と近い位置関係で、全く独立した位置にあるとしている。これらのことを総合すると、ヘキサン抽出物中のテルペン類など多様な成分を用いてクラスター解析することにより、分類の指標となりうることを示唆された。樹種と個体を増やすことにより、化学タイプも含めた分類の可能性を検討する必要がある。

5. クロベと他の針葉樹葉ヘキサン抽出成分(酸性部)の比較

5樹種6個体(スギ、クロベ、ヒバ、ヒバK、ヒノキ、コウヤマキ)の葉のヘキサン抽出物の酸性部をメチル化し、ガスクロ分析(図4)とガスマス分析(図9)を行った。ガスクロ分析を行うと、保持時間25分近から50分付近までに13の主要メチル化物が認められた。25分付近にはセスキテルペンカルボン酸のhinoki acidがヒノキで確認された。30分付近から35分付近にかけては脂肪酸のpalmitic acidなど3成分が確認された。35分付近から45分付近にかけてはジテルペンカルボン酸のtrans-communic acidなど7成分が確認された。さらに、リグナン類と考えられるメチル化物がヒバKで確認された。

クロベと4樹種を比較すると、クロベはセスキテルペンカルボン酸やジテルペンカルボン酸の種類は少なく、脂肪酸2種類とジテルペンカルボン酸のtrans-communic acidが存在するだけの単純な成分構成であった。4樹種については、ヒノキはセスキテルペンカルボ

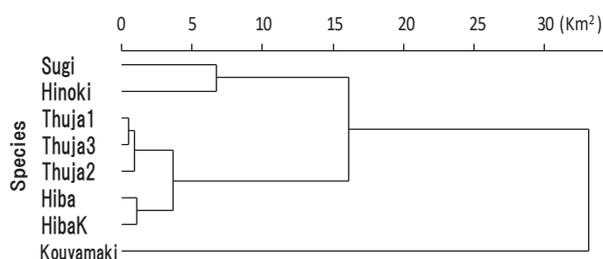


Fig.3 Cluster analysis of *n*-hexane extractives (neutral fraction) in the leaves of Kurobe and four other conifers

ン酸のhinoki acidが特徴的に存在し、スギはジテルペンカルボン酸の種類が多く、ヒバは脂肪酸とジテルペンカルボン酸とリグナン類が、コウヤマキはセスキテルペンカルボン酸、脂肪酸、ジテルペンカルボン酸がそれぞれ認められた。

6. クロベ3個体の葉ヘキサン抽出成分(酸性部)の比較

次に、クロベの3個体を比較した(図5)。Thuja 3のメチル化物の構成が異なり、trans-communic acid (M+316)が少なく、新たにメチル化物の4 (M+316)が確認され、ジテルペンカルボン酸の構成が他の2つと異なっていた。このように、クロベにはジテルペンカルボン酸の種内変異があると推察された。

7. クロベと他の針葉樹葉ヘキサン抽出成分(酸性部)の構成(標準物質比:ベラトルム酸比)

クロベと4樹種、合計8個体で確認できた成分の構成を求め、表2に示した。ただ、含有量の少ない成分も見られたため、標準物質比が0.025以上のものを示した。

セスキテルペンカルボン酸はhinoki acidのみが推定され、ヒノキとコウヤマキに存在していた。脂肪酸は3成分の内、palmitic acidのみが推定された。palmitic acidはどの樹種にも共通して存在していた。ジテルペンカルボン酸は8成分の内、trans-communic acidのみを同定した。trans-communic acidはスギとヒノキ以外で、主要成分として存在していた。リグナン類は構造を推定できなかったが、ヒバKで存在が確認できた。

ジテルペンカルボン酸についてはスギで長濱らがcis-communic acid, imbricataroic acid, isocupressic acidの双環性ジテルペンカルボン酸と、sandaracopimaric acid, isopimaric acidの三環性のジテルペンカルボン酸を報告している。しかし、これらの化合物を特定するに至らなかった。今後確認する必要がある。

このように未確認の成分も含めて各成分の量的な把握ができたため、次にクラスター解析を行うこととした。

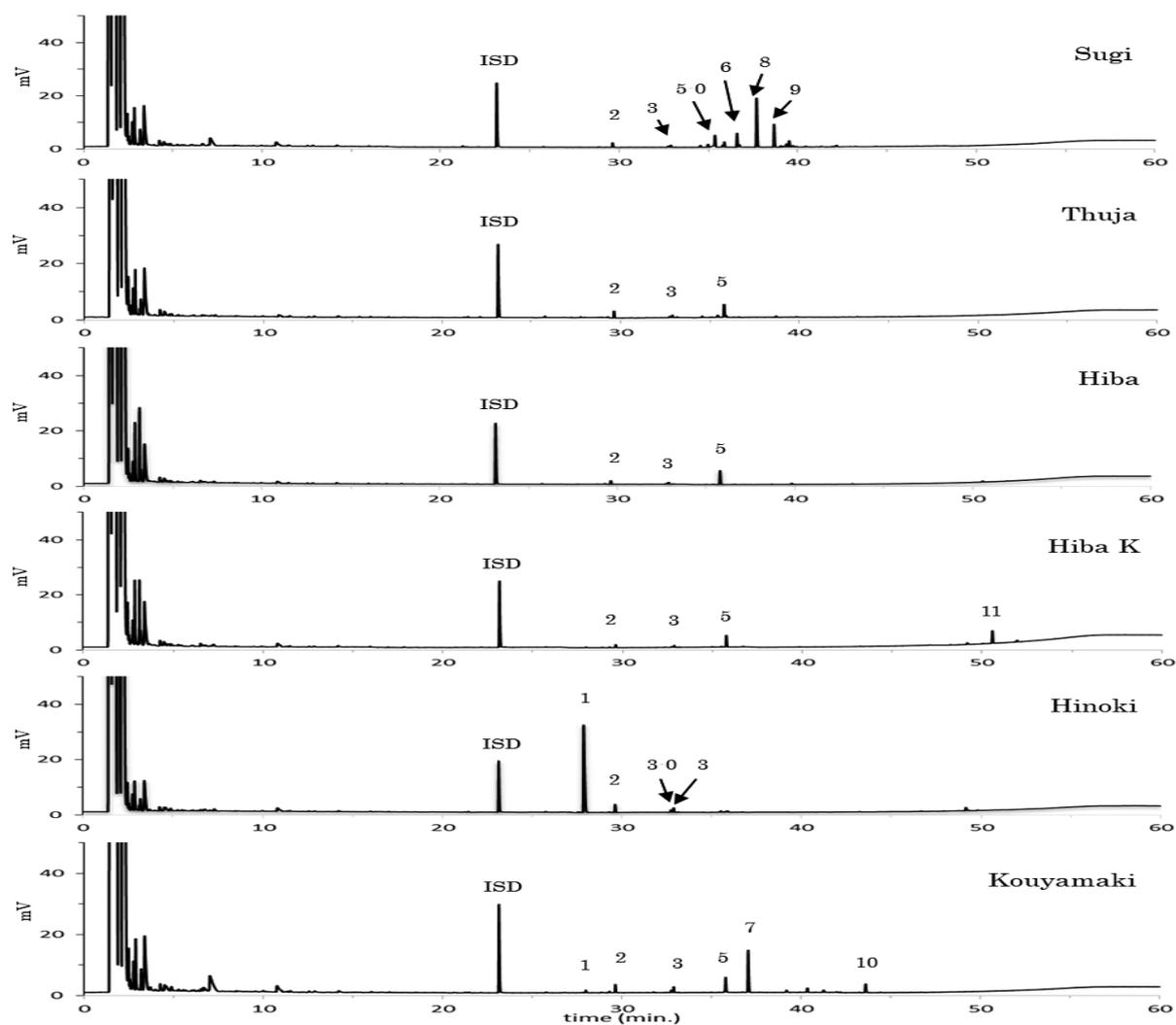


Fig.4 GC of *n*-hexane extracts (acidic faction) in the leaves of Kurobe and four other conifers
 Legend: 1; Hinoki acid, 2; Palmitic acid, 3-0; Unknown, 3; Unknown, 5-0; Unknown, 5; *trans*-Communic acid, 6; Unknown, 7; Unknown, 8; Unknown, 9; Unknown, 10; Unknown, 11; Unknown.

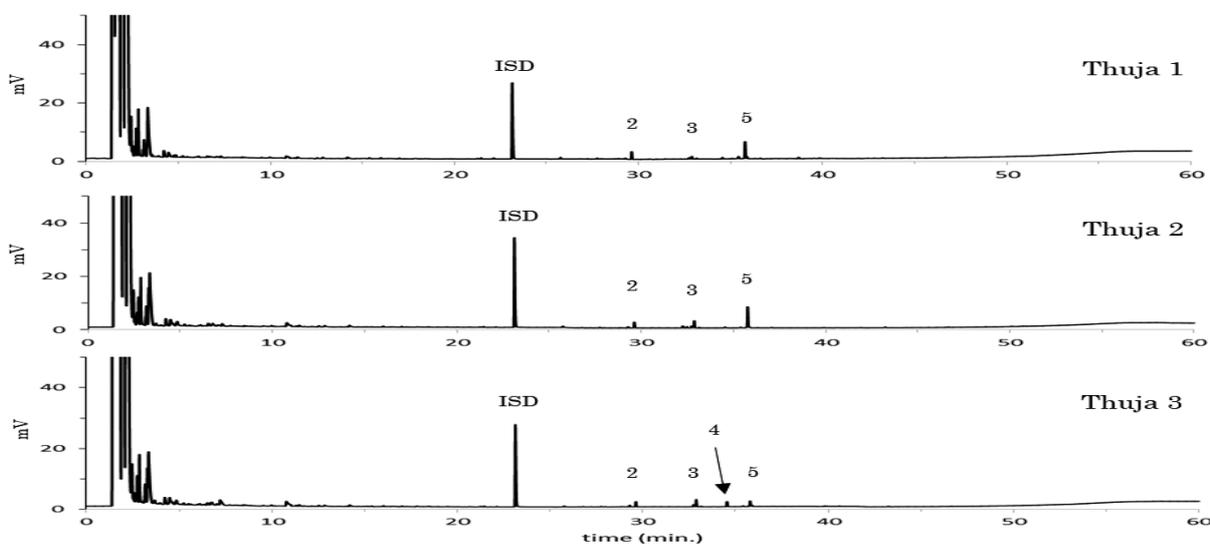


Fig.5 GC of *n*-hexane extracts (acidic faction) in the leaves of three Kurobes
 Legend: 2; Palmitic acid, 3; Unknown, 4; Unknown, 5; *trans*-Communic acid.

Table 2 Construction of *n*-hexane extractives (acidic faction) in the leaves of Kurobe and four other conifers

	P.Name	R.Time	M+	Compound (methyl ester)	I or E	SugiT	Thuja 1	Thuja 2	Thuja 3	Hiba	Hiba K	Hinoki	Kouyamaki
1	M1	27.929	248	Hinoki acid	E							2.631	0.027
2	M2	29.628	270	Palmitic acid	E	0.058	0.085	0.054	0.052	0.050	0.037	0.139	0.076
3	M3-0	32.741	294						0.028			0.064	0.032
4	M3	32.888	292			0.030	0.029	0.069	0.076	0.026	0.025	0.080	0.056
5	M4	34.552	316						0.058				
6	M5-0	35.396	316			0.250	0.035						
7	M5	35.785	316	<i>trans</i> -Communic acid	I		0.216	0.225	0.065	0.217	0.159		0.161
8	M6	36.600	316			0.203							
9	M7	37.042	330										0.501
10	M8	37.693	348			0.895							
11	M9	38.672	334			0.345							
12	M10	43.600	328										0.105
13	M11	50.584	398								0.183		

Legend: P.Name; peak name of GC, R.Time; retention time of GC, M+; molecular ion peak, I or E; identification or estimation
 Note: the data were calculated based on the ISD(veratric acid methyl ester) area in each sample, and were showed over 0.025 value.

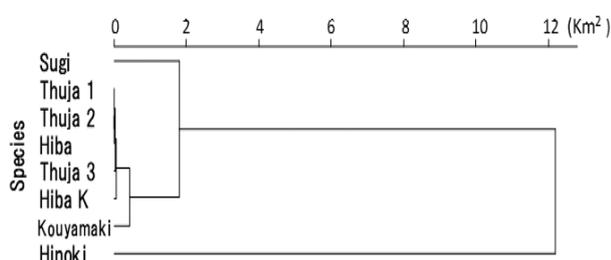


Fig.6 Cluster analysis of *n*-hexane extractives (acidic faction) in the leaves of Kurobe and four other conifers

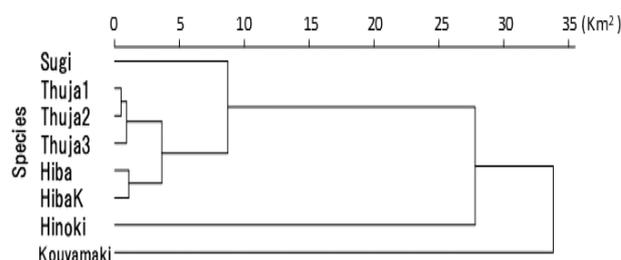


Fig.7 Cluster analysis of all *n*-hexane extractives in the leaves of Kurobe and four other conifers

8. 酸性部のクラスター解析

クラスター解析の結果を図6に示した。平方距離の値は酸性部と比較して小さい値であったが、酸性部は中性部と大きく異なる結果となった。中性部の解析と比べて、ヒノキとコウヤマキの位置関係が逆転し、ヒノキが独立した位置を占めていた。これはおそらく、ヒノキはセスキテルペンカルボン酸のヒノキ酸が量的にも多く、構成も特異であったためと考えられた。スギはジテルペンカルボン酸の種類が多く、クロベやヒバやコウヤマキと違う位置関係となったと考えられた。また、クロベとヒバは中性部の成分でも近い関係にあったが、酸性部の成分はさらに近い関係があることが分かった。

このように、前述した津村らのDNAを用いた解析と比べて、ヒノキとコウヤマキの関係は既存の分類にはない結果となったが、樹種の成分組成から、樹種や個体ごとの類似性と相違性を表現でき、針葉樹の分類や化学タイプの存在を現すためにはクラスター解析は有用であった。次に、中性部と酸性部を合わせて解析する。

9. 中性部と酸性部のクラスター解析

次に、5樹種8個体の中性部40成分と酸性部13成分、合計53成分を用いてクラスター解析を行った(図7)。コウヤマキ (*Sciadopitys verticillata*) が最も独立した位置

関係として表され、次にヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) が位置付けられ、スギ (*Cryptomeria japonica*) が続き、ヒバ (*Thujopsis dolabrata*) とクロベ (*Thuja standishii*) の順にデンドログラムを形成していた。さらに、ヒバとクロベの化学タイプも表現できていた。これは先に述べた津村らのDNAを用いた解析の結果とよく一致しており、中性部と酸性部の53成分を用いることにより、より遺伝的な相違を現すことができ、結果としてDNA解析に近いものとなったと考えられる。ただ、ミトコンドリアDNAの解析だけでは表現できないクロベやヒバの化学タイプを現すには化学成分のクラスター解析は有効であることが示された。

以上のように、クロベ (*Thuja*) の分類上の位置を考えた場合、ヒバ (*Thujopsis*) とかなり近縁の樹種であることが化学成分のクラスター解析からも明らかになった。

10. おわりに

クロベ葉ヘキサン抽出成分 (中性部と酸性部) の特徴を明らかにするために、クロベの他に4樹種 (スギ、ヒバ、ヒノキ、コウヤマキ) を同時にGC・GCMS分析し、比較・検討した。その結果を下記に示す。

(1)クロベを含む5樹種8個体を分析し、中性部では40成分、酸性部では13成分、合計53成分を確認するこ

とができた。

- (2) クロベの葉の成分の特徴は、中性部ではモノテルペンアセテートと考えられる成分を含有していることであった。また、nezukolが全く認められない個体が見られ、ジテルペンの変異によるケモタイプの存在が示唆された。酸性部では脂肪酸やジテルペンカルボン酸の*trans*-communic acidが確認され、この成分が少ない個体が見られ、中性部と同じようにケモタイプの存在が示唆された。
- (3) スギでは、中性部でモノテルペン、セスキテルペン、ジテルペンが確認されたが、モノテルペンアセテートが確認されなかった。酸性部では他の樹種と比べ、ジテルペンカルボン酸の量も種類も多いのが特徴であった。
- (4) ヒバでは、中性部でモノテルペン、モノテルペンアセテート、セスキテルペン、ジテルペンが確認され、酸性部では脂肪酸とジテルペンカルボン酸が確認された。それらの構成はクロベと最も類似していた。
- (5) ヒノキでは、中性部でモノテルペン、モノテルペンアセテート、セスキテルペン、ジテルペンに加えて、50分付近の高温で出現するリグナン類と考えられる成分が確認された。酸性部ではヒノキの特徴を示すhinoki acidが量的にも多く確認された。
- (6) コウヤマキでは、中性部でフラン環型ジテルペン類が特徴的にみられ、明らかに他樹種と構成を異にしていた。酸性部でも他の樹種では見られないジテルペンカルボン酸が存在していた。
- (7) クラスタ解析からは、中性部は独立した科と位置付けられるコウヤマキが他の樹種と大きく異なるなど、津村らのDNA解析の結果と類似していた。しかし、酸性部は中性部の結果と大きく異なり、ヒノキが独立した位置を占め、コウヤマキはクロベやヒバと近いものとして位置づけられた。また、中性部ではnezukolを欠く個体が、酸性部では*trans*-communic acidの少ない個体が化学タイプとして区別することが可能であった。
- (8) 渡部らが提案した針葉のヘキサン抽出液を濃縮せずに、GC・GCMS分析を行うことで、5樹種8個体のテルペノイド化合物等を良好に分析することができた。
- (9) GC・GCMS分析に用いる試料（生葉）と抽出溶剤（ヘキサン）の割合は、試料1gとヘキサン10mlで十分であり、室温で1週間ほど抽出すればGC分析が可

能であった。

次に課題を下記した。

- (10) クロベの分布域は広く、山形県以外にも東北各地、関東、中部、四国など、日本各地に分布する。nezukolや*trans*-communic acidを欠く化学タイプが明らかになったことから、クロベのテルペノイド成分の全体的変異を確認する必要がある。
- (11) スギでその存在が確認されているhedycaryolなどのセスキテルペン類は加熱などにより異性化することが知られている。今回もhedycaryolがGC分析では確認できるが、GCMS分析ではピークを確認できないなど、注入温度、カラム膜厚などを考慮して分析する必要がある。特にセスキテルペンを多く含むスギやヒノキでは再検討する必要がある。
- (12) 中性部では40成分の内24成分を確認したが、まだ、16成分が未確認である。特に、後半に出てくるフラン型ジテルペンやリグナン類を標品等で確認する必要がある。酸性部では13成分の内3成分しか確認できなかった。また、既にスギなどで報告されているジテルペンカルボン酸を確認する必要がある。
- (13) クラスタ解析を用いた化学成分による針葉樹の分類の精度を上げるためには、樹種や個体数を増やす必要がある。

Rousan 鶴岡の前川会長、長南事務局長の助言とお誘いがなければ、今回のクロベの葉の分析は不可能であった。朝日連峰の一角、標高1,000mを超える上倉山山頂付近で、まだ新鮮な緑色の落葉を採取することはかなわなかった。また、山行に同行した家内（高橋）と会員の皆様にも感謝したい。クロベの葉の分析では、まだ不慣れなGC分析やGCMS分析を指導して頂いた芦谷研究室の学生諸氏にお礼を述べたい。

さて、この研究を振り返るといろいろな勉強ができたのではないかと思う。例えば、恩師の一人である安江保民先生が既にnezukolをスギから単離していたことである。学生の頃（高橋）に 8β -hydroxysandaracopimar-15-eneとよく言われていたが²³⁾、これがnezukolであるとは頭の片隅にもなかった。今回、nezukolの確認には今年2月に亡くなられた長濱静男先生が単離したnezukolを使用した。先人のご苦労の上に我々の研究があることを再確認させられた。安江保民先生に感謝を申し上げると共に、長濱静男先生のご冥福をお祈りしたい。

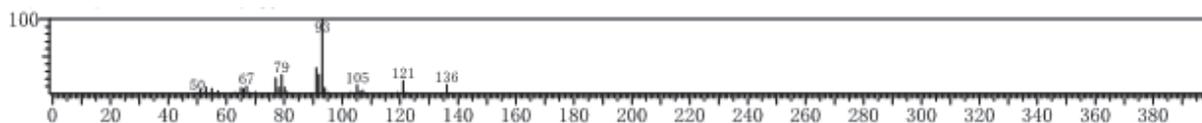
特に、今回の研究では長濱静男先生との共同研究の財

産が化合物の確認に大変役に立った。先生はスギを始め、ヒバ、ヒノキなど数多くの針葉樹の葉の成分をご研究になっておられた。ヒバではhibaene、dolabradiene、*trans*-communic acidなど多数のジテルペンを単離し、その地理的変異もご研究されている。また、ヒノキではヒノキ酸を含めて広範囲に研究をなされ、その変異についても考察されている。ネズミサシ属(*Juniperus*)についてのご研究もあるが、クロベについては分析をされていなかったようだ。それはクロベ(*Thuja*)が山岳地帯に分布すること、九州には分布していないことなどが原因していたと思う。今回のこの研究を最も喜んでくれたであろう長濱先生にご報告できないことが残念である。再度ご冥福を祈り、感謝の言葉としたい。

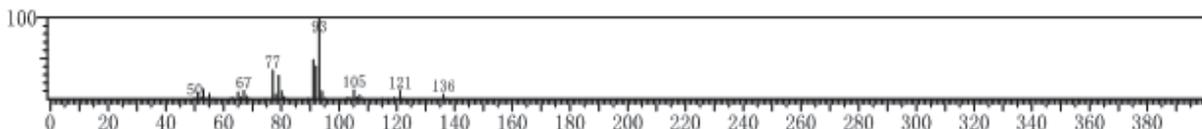
11. 文献

- (1) ROUSAN 鶴岡(2020)朝日連峰 上倉山(1,144m). 頭殿山(1,203m)朝日鉱泉一泊. 「ROUSAN 鶴岡」ニュース. No10号.
- (2) 庭木図鑑 植木ペディア クロベ
<https://www.uekipedia.jp/%E5%B8%B8%E7%B7%91%E9%87%9D%E8%91%89%E6%A8%B9/%E3%82%AF%E3%83%AD%E3%83%99/>
- (3) 植物写真館 クロベ
http://www.zoezoe.biz/2010_syokubutu/ka_5_ha/245_hinoki/thuja/kurobe.html
- (4) 馬場多久男(2001)葉でわかる樹木 625種の検索. 信州毎日新聞社. p118. 長野.
- (5) 高橋孝悦(1977)ベイスギ材の変色防止と浅色化. 山形大学農学部卒業論文.
- (6) 林弥栄(1969)有用樹木図説. 誠文堂. p125-8. 東京.
- (7) Worth J. R. P. (2019)Current distribution and climatic range of the Japanese endemic conifer *Thuja standishii*(Cupressaceae). Bulletin of FFPRI. 18(3): 275-288.
- (8) 東北森林管理局
<https://www.rinya.maff.go.jp/tohoku/sidou/jumoku/shubetu/kurobe.html>
- (9) 巨木学
http://kyobokugaku.hippy.jp/kyobokugaku/55_kurobe.pdf
- (10) 山形県鶴岡市長沼「十文字開発記念樹」
<https://www.pref.yamagata.jp/cgi-bin/yamagata-takara/?m=detail&id=1631>
- (11) 今村博之・岡本一・後藤輝男・安江保民・横田徳郎・善本知孝(1983)木材利用の化学. 共立出版. p378. 東京.
- (12) Nakatsuka T. and Hirose Y. (1955) Composition of the essential oil from leaves of “Nezuko”. J. Jpn. Forestry Soc. 37(11): 496-498.
- (13) 北谷正行(1970)ネズコ葉精油中のジテルペン類. 日本化学雑誌. 91(7): 80-84.
- (14) 安江保民・萩山絃一・須藤昭二・塚原初男(1979)スギ針葉のジテルペン炭化水素に関する育種学的研究. 文部省科学研究費研究報告.
- (15) 長濱静男(2002)シリーズ“川下から川上まで”針葉樹の化学分類をめざして(2). 木科学情報. 9(1): 6-9.
- (16) 渡部大寛(2018)スギ(*Cryptomeria japonica*)針葉のテルペノイド成分の変異. 山形大学大学院農学研究科修士論文.
- (17) 高橋孝悦・安江保民・萩山絃一・森本茂(1981)天然生ヒバに見られるジテルペンの変異. 日本林学会東北支部会誌. 33: 124-126.
- (18) Takahashi K., Nagahama S., Nakashima T. and Suenaga H. (2001)Chemotaxonomy on the leaf constituents of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. - Analysis of neutral extracts(diterpene hydrocarbon). Biochem. System. Ecol. 29: 839-848.
- (19) Takahashi K., Nagahama S., Nakashima T. and Suenaga H. (2003)Chemotaxonomy on the leaf constituents of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. - Analysis of acidic extracts. Biochem. System. Ecol. 31: 723-738.
- (20) 長濱静男(2002)シリーズ“川下から川上まで”針葉樹の化学分類をめざして(4). 木科学情報. 9(3): 36-37.
- (21) 住本昌之(1965)天然有機化合物(IV)こうやまきのテルペノイド. 化学. 20(3): 55-63.
- (22) Tsumura Y., Yoshimura K., Tamaru N. and Ohba K. (1995)Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. Theor. Appl. Genet.. 91: 1222-1236.
- (23) 川嶋健之・安江保民・萩山絃一(1978)スギ葉のジテルペン炭化水素(V)微量成分について. 日本林学会東北支部会誌. 30: 184-187.

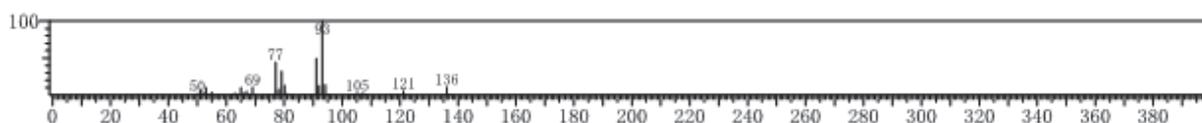
A0 peak : M+136 Tricyclene Kouyamaki #:1: 5.880



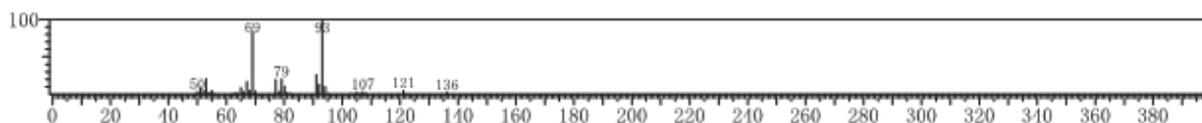
A1 peak : M+136 α -Pinene SugiT#:2: 6.165, Thuja #:2: 6.165, Hinoki #:2: 6.165, Kouyamaki #:2: 6.170



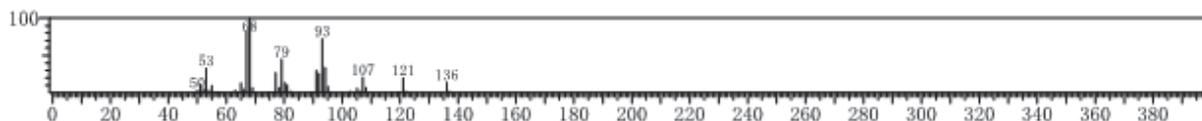
A2 peak : M+136 Sabinene SugiT #:4: 7.190, Thuja #:5: 7.180, Hiba#:3: 7.185, HibaK #:4: 7.200



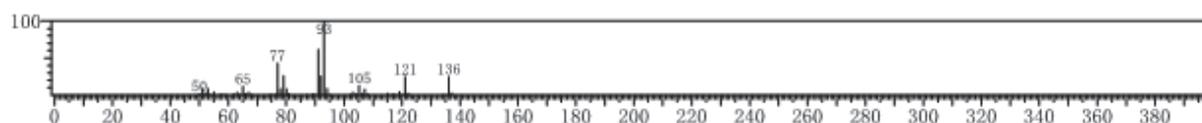
A3 peak : M+136 β -Myrcene SugiT #:6: 7.630, Kouyamaki #:4: 7.630, HibaK #:6: 7.630



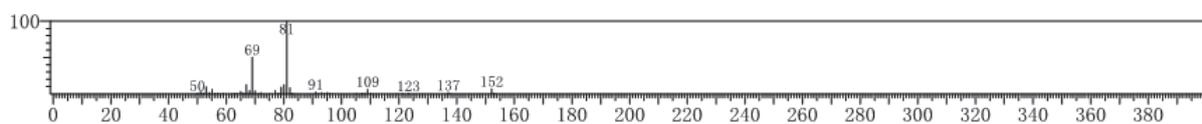
A4 peak : M+136 Limonene SugiT #:8: 8.690



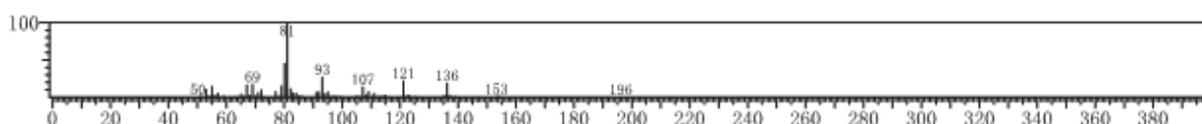
A5 peak : M+136 γ -Terpinene Hinoki #:9: 9.555



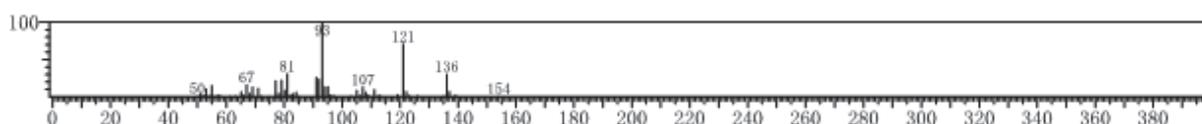
A6 peak : M+152 Fenchone Thuja3 #:11: 10.425



B1 peak : M+196 Thuja #:15: 14.305



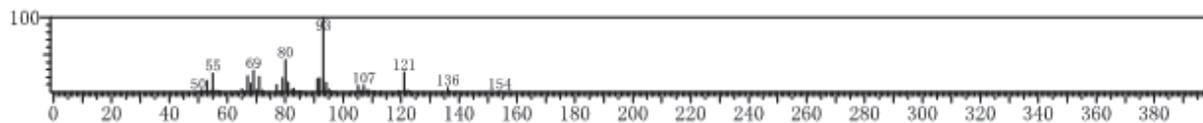
B1-1 peak : M+154 Hinoki #:14: 14.265



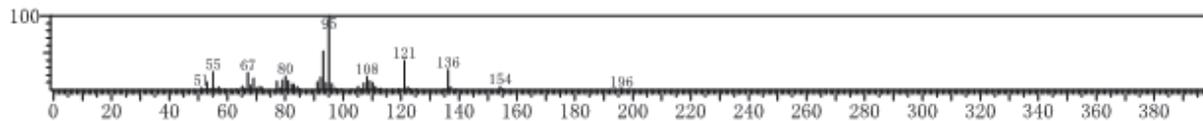
(continued on next page)

Fig.8 MS spectrum of main constituents in the leaf neutral fractions of Kurobe and four conifers.

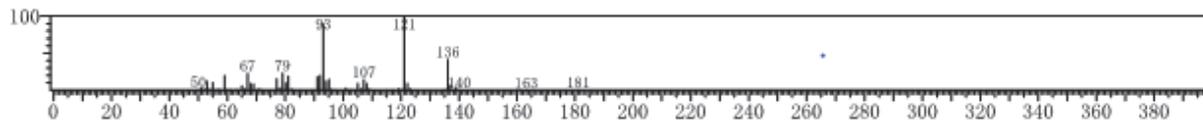
B2 peak : M+154 Hinoki #:15: 15.285



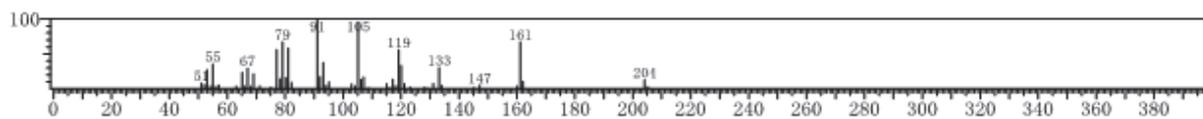
B3 peak : M+196 Bornyl acetate Thuja #:16: 16.205, HibaK #:16: 16.225, Hinoki #:16: 16.225



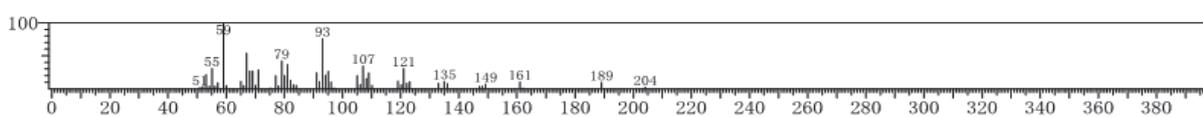
B4 peak : M+(181) α-Terpinyl acetate Thuja #:17: 17.955, HibaK #:17: 18.000, Hinoki #:17: 18.000



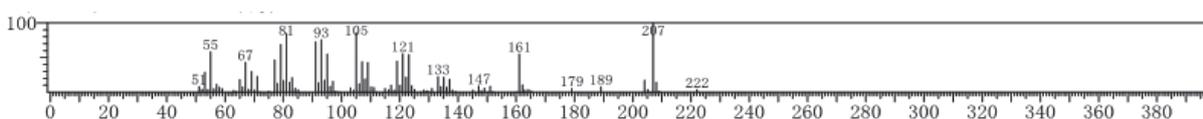
C1 peak : M+204 Germacrene-D SugiT #:9: 21.555, HibaK #:19: 21.555, Hinoki #:19: 21.555



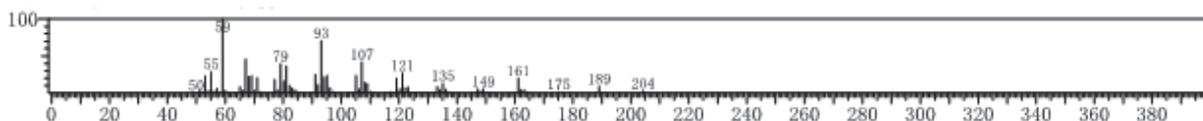
C1-1 peak : M+204 Hinok #:20: 22.550



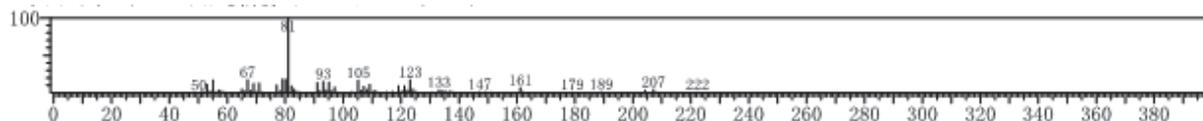
C1-2 peak : M+222 Cubebol Hinoki #:21: 22.805



C2 peak : M+(204) Elemol SugiT #:11: 23.275, Hiba #:9: 23.250, HibaK #:22: 23.305, Hinoki #:22: 23.305



C3 peak : M+222 Hydroxygermacrene SugiT #:12: 23.945, HibaK #:24: 23.950, Hinoki #:24: 23.950



C3-1 peak : M+222 Kouyamaki #:10: 24.66012

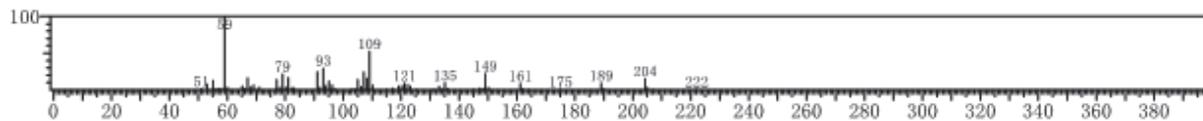
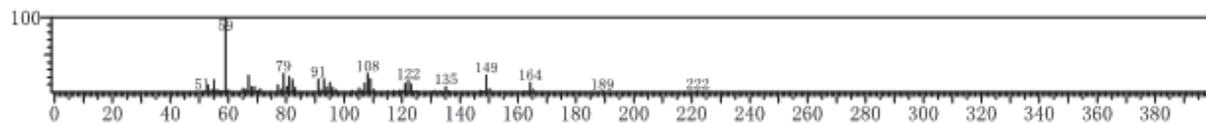
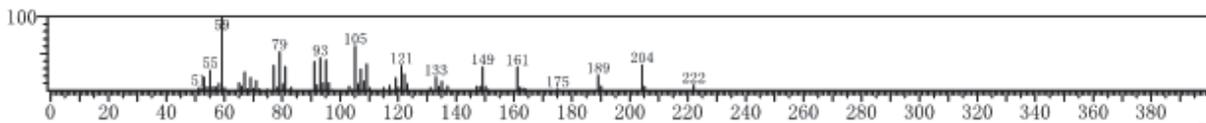


Fig.8 (continued)

C4 peak : M+222 β -Eudesmol SugiT #:14: 25.765, Hinoki #:28: 25.765

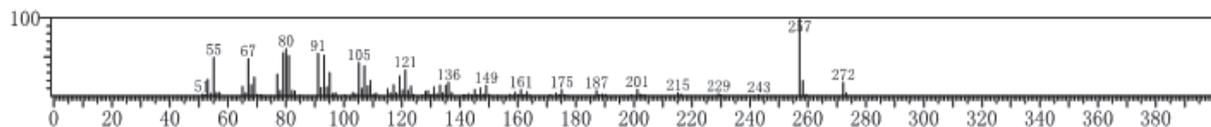


α -Eudesmol SugiT #:15: 25.825, Hinoki #:29: 25.830

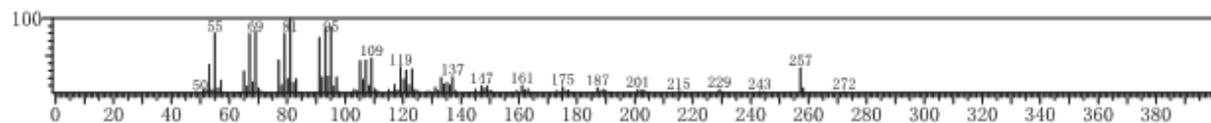


C5 peak : Hedycaryol Not detect

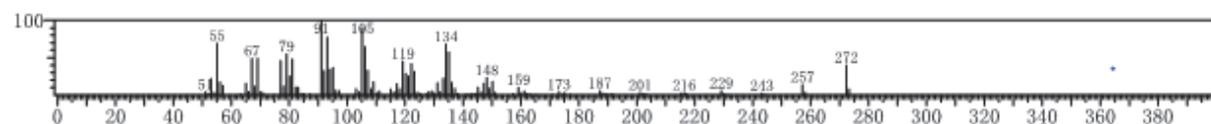
D0 peak : M+272 Rimuene Thuja3 #:21: 31.225



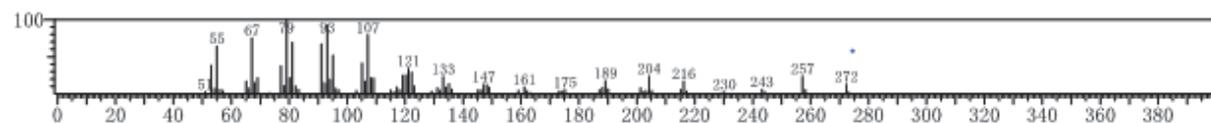
D1 peak : M+272 Sclarene Kouyamaki #:11: 31.925



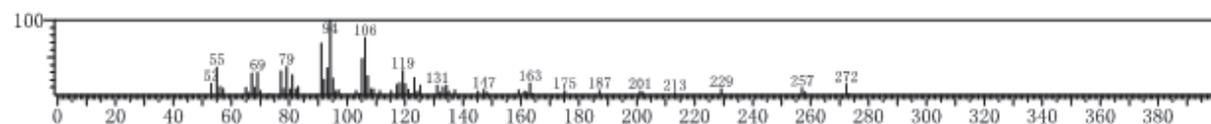
D2 peak : M+272 Hibaene Thuja #:19: 31.925, Hiba #:10: 31.935, HibaK #:17: 31.935, Hinoki #:35: 31.940



D3 peak : M+272 Dolabradiene Thuja #:21: 32.720, Hiba #:12: 32.755, HibaK #:18: 32.735



D4 peak : M+272 Iso-kaurene Thuja #:22: 33.245



D5 peak : M+272 Kaurene SugiT #:18: 34.220, Kouyamaki #:14: 34.200

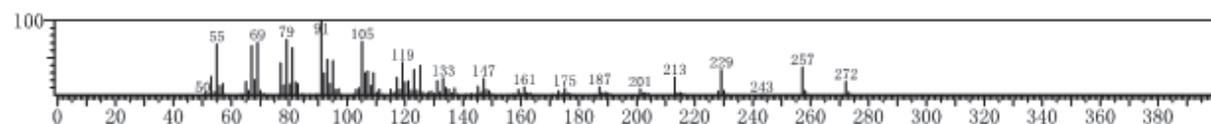
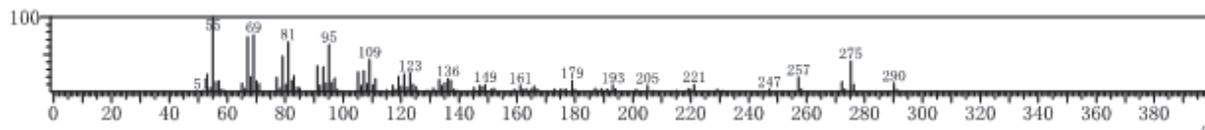
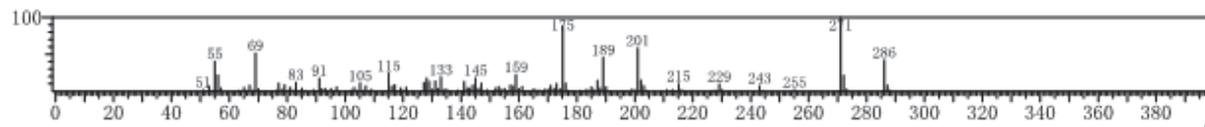


Fig.8 (continued)

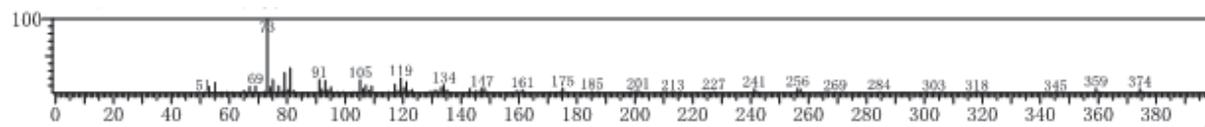
D6 peak : M+290 Nezukol SugiT #:20: 35.840



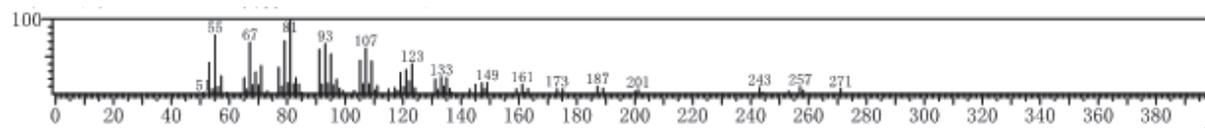
D7 peak : M+286 Sempervirol Hiba #:19: 39.090, HibaK #:26: 39.100



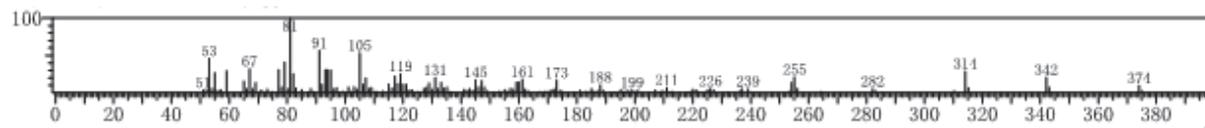
D7-1 peak : M+374 Thuja #:31: 39.295



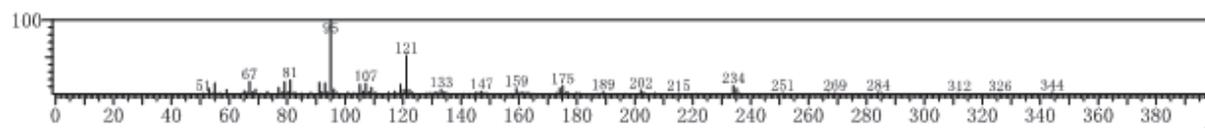
D8 peak : M+(271) SugiT #:28: 41.530



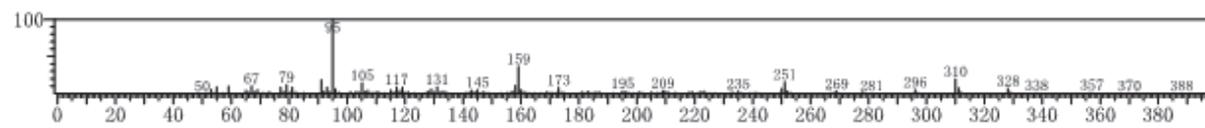
E1 peak : M+374 Kouyamaki #:20:41.550



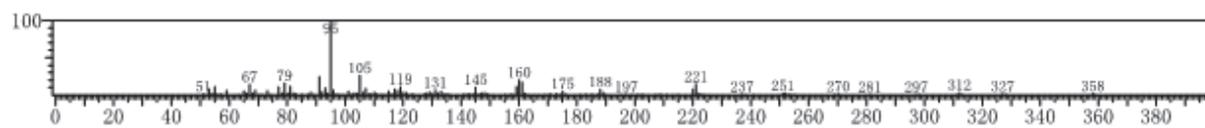
E2 peak : M+344 Kouyamaki #:21: 42.855



E3 peak : M+388 Kouyamaki #:23: 44.660



E4 peak : M+358 Kouyamaki #:24: 44.855



E5 peak : M+342 Kouyamaki #:25: 46.230

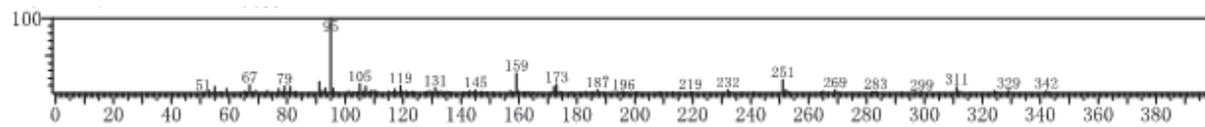
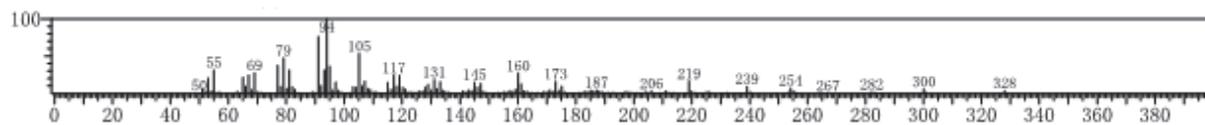
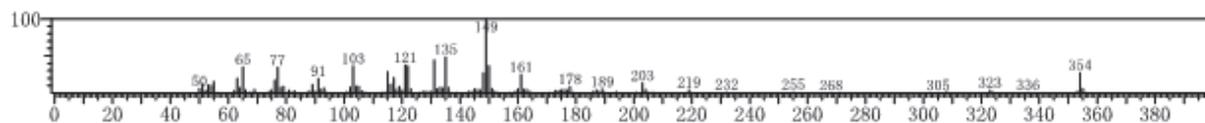


Fig.8 (continued)

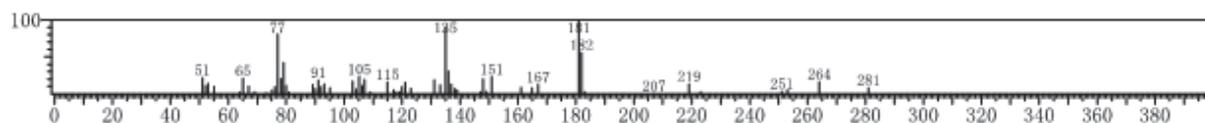
E6 peak : M+328 Sciadin Kouyamaki #:26: 46.360



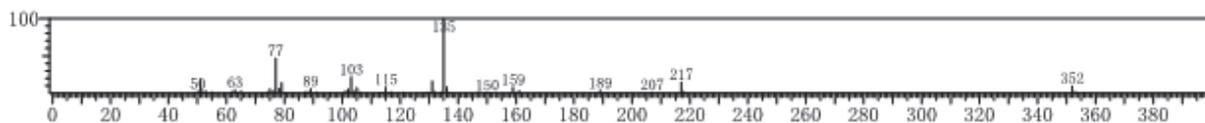
F1 peak : M+354 Hinoki #:40: 51.810



F1-1 peak : M+400 Hinoki #:41: 52.340



F2 peak : M+352 Hinoki #:42: 52.705



F3 peak : M+398 HibaK #:32: 53.110

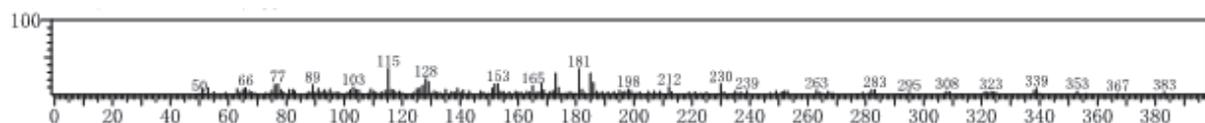
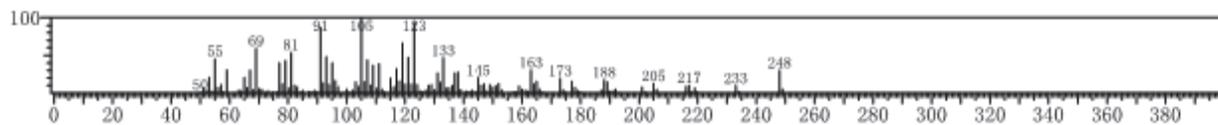
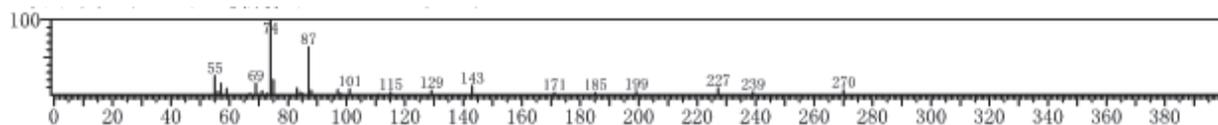


Fig.8 (continued)

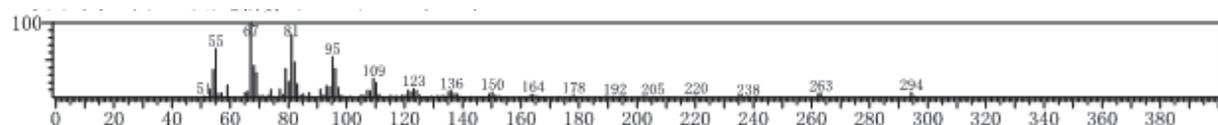
M1 peak : M+248 Hinoki acid methyl ester Hinoki #:29.925



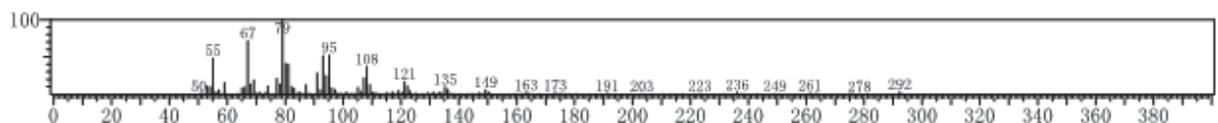
M2 peak : M+270 Palmitic acid methyl ester SugiT #:6:31.910, Thuja1 #:20:31.915, Thuja2 #:18:31.910, Thuja3 #:8:31.910, HibaK #:18:31.910, HinokiK #:31.920, KouyamakiK #:8:31.910



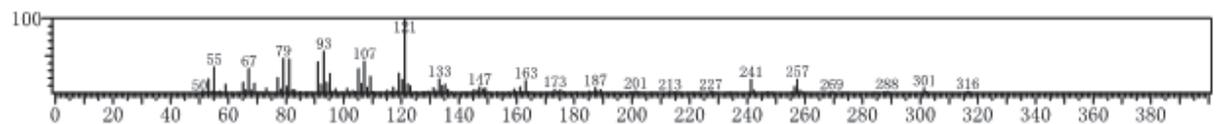
M3-0 peak : M+294 SugiT #:7:35.275, Thuja3#:35.270



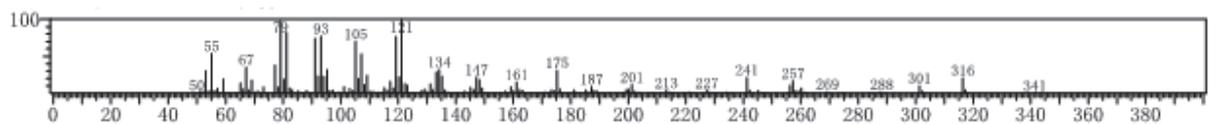
M3 peak : M+292 SugiT #:8:35.410, Thuja2 #:19:35.415, Thuja3#:35.415, HibaK #:20:35.410, HinokiK #:14:35.415, KouyamakiK #:9:35.405



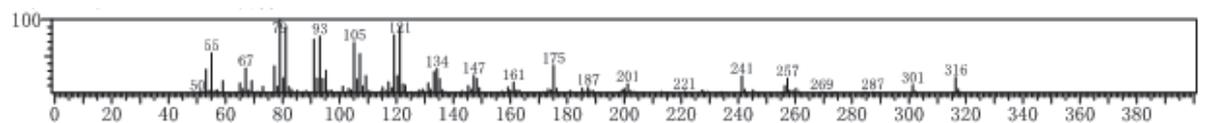
M4 peak : M+316 Thuja3 #:11:37.025



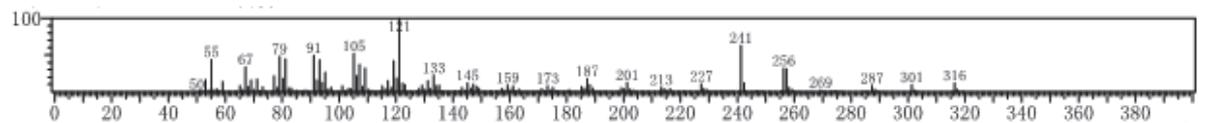
M5-0 peak : M+316 SugiT #:11:37.985



M5 peak : M+316 *trans*-Communic acid methyl ester Thuja1 #:2:38.465, Thuja2 #:20:38.465, Thuja3 #:12:38.455, HibaK #:23:38.465, HinokiK #:16:38.455, KouyamakiK #:10:38.450



M6 peak : M+316 SugiT #:14: 39.310, HinokiK #:18:39.310

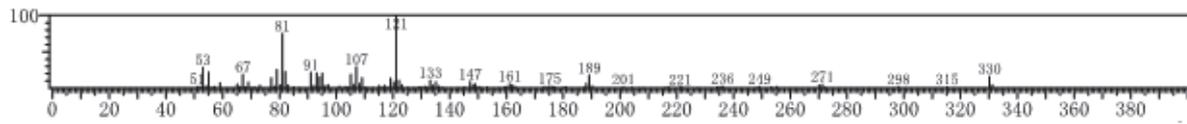


(continued on next page)

Fig.9 MS spectrum of main constituent methyl esters in the leaf acidic fraction of Kurobe and four conifers

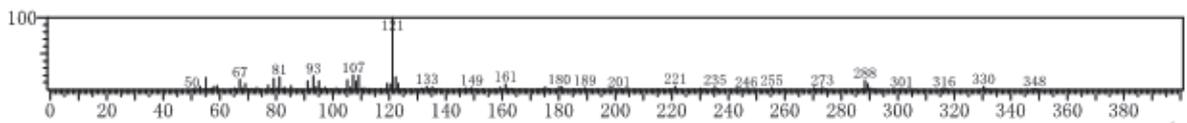
M7 peak : M+330

KouyamakiK #:11:39.755



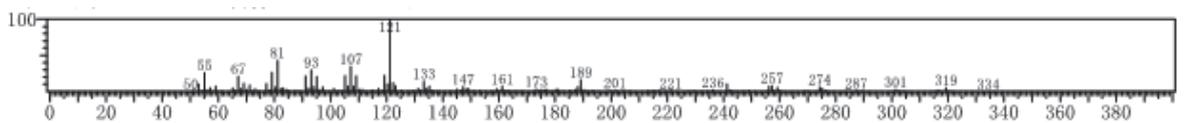
M8 peak : M+348

SugiT #:16:41.665



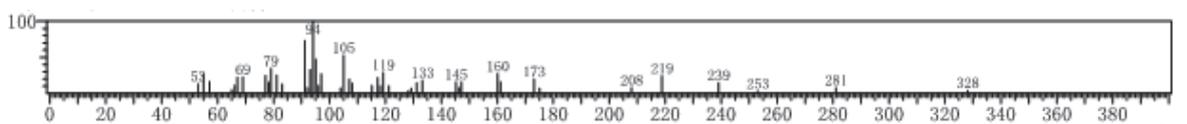
M9 peak : M+334

SugiT #:19:42.455



M10 peak : M+328

KouyamakiK #:12:46.740



M11 peak : M+398

HibaK #:28:54.195

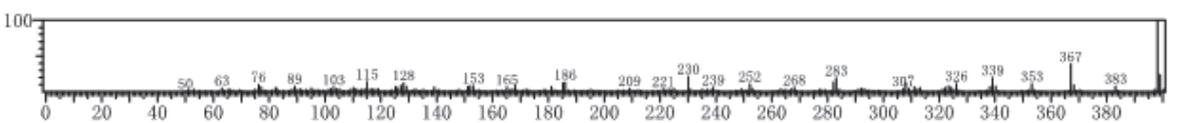


Fig.9 (continued)