

修士論文

# ニンニクの皮由来の抗菌性物質の探索研究

弘前大学大学院 教育学研究科

教科教育専攻 理科教育専修

08GP207 伊藤 厚

指導教員 北原 晴男

平成 21 年度

# 目次

第1章 序論	1
第1節 ニンニク	
第1項 ニンニクの歴史	2
第2項 青森県とニンニク	4
第3項 研究仮説と目的	7
第2節 ニンニクの生理活性物質	
第1項 ニンニク鱗片の生理活性物質	9
第2項 ニンニクの皮の生理活性物質	14
第3節 植物炭疽病菌 ( <i>Colletotrichum acutatum</i> ) について	
第1項 植物炭疽病	16
第2項 供試菌 <i>Colletotrichum acutatum</i> について	20
第3項 植物炭疽病の防除薬剤	22

第2章 本論	25
第1節 これまでの研究経緯	26
第2節 ニンニクの皮からの抗菌性物質の抽出と分離	
第1項 抗菌性物質の抽出と分離	29
第2項 抗菌性物質の分析	32
第3節 ニンニクの皮 AcOEt 抽出物の活性試験	
第1項 ペーパーディスク法による活性試験	33
第4節 抗菌活性物質の単離	
第1項 抗菌活性物質の純度の再検討	36
第2項 TLC の五重展開による分離	40
第3項 Fr. II Bc i ~ iv の活性試験	42
第4項 Fr. II Bc i ~ iv の NMR 分析	44
第5節 結論	49
実験の部	50
参考文献	79
謝 辞	85

# 第 1 章

## 序論

## 第1章 序論

### 第1節 ニンニク

#### 第1項 ニンニクの歴史

ニンニクは、その学名を *Allium sativum* L.と云い、ネギ科の多年生の植物である。学名は、植物学者のリンネがニンニクを意味するラテン語 *Allium* を属名に、栽培を意味する *sativum* を種名に命名したものである。

ニンニクの由来は中央アジア地域が原産といわれ、古くから栽培されている。その証拠として、紀元前 3750 年頃に造られたとされるエジプトの王家の墓からニンニクの粘土模型が発見され、紀元前 1300 年頃に造営されたツタンカーメン王の墓からは乾燥したニンニクの鱗茎が発見された。また、紀元前 600 年頃の新バビロニア王国の空中庭園 (Hanging Gardens) でニンニクの栽培が行われていたことを記述した粘土板が発掘されている。アジア地域への伝来は、紀元前 121 年頃、漢の外交使節である張騫によって中国へもたされたと言われている<sup>1)</sup>。

日本には、朝鮮半島、中国大陸を経て伝来したと考えられている。4 世紀から 5 世紀の伝承が記録されている「古事記」や「日本書紀」にもニンニクの記載がある。また既に 3 世紀には中国大陸、朝鮮半島との交通が行

われていることから、4 世紀にはニンニクが日本にも入ってきたと考えられる<sup>1)2)</sup>。

## 第2項 青森県とニンニク

青森県の特産物として、リンゴが知られているが、ニンニク・ながいも・ごぼうも全国出荷量第1位を誇る<sup>3)</sup>。

特にニンニクは全国シェアの約80%を占めており、田子町などで生産されている福地ホワイト六片種(Fig.1)は高品種として知られている<sup>4)</sup>。

	作付面積	収穫量	全国順位	シェア
ながいも	2,710ha	72,200t	1位	37%
ニンニク	1,290ha	14,400t	1位	75%
ごぼう	1,740ha	38,800t	1位	23%
だいこん	3,070ha	134,300t	3位	8%
にんじん	1,230ha	37,300t	4位	6%
かぶ	259ha	9,000t	3位	5%
ねぎ	549ha	15,200t	6位	3%
ピーマン	94ha	3,100t	10位	2%
メロン	872ha	15,000t	6位	6%

農林水産省 野菜生産出荷統計より

Table. 1 平成16年の青森県産野菜の収穫量及び全国における地位



Fig. 1 福地ホワイト六片種

このように青森県の主農産物であるニンニクだが、商品として出荷する際  
や加工品を製造する際、食用部分(鱗片)以外の部分は、利用方法がな



いため産業廃棄物として処理されている。

食品分析表によると、盤茎部・茎・皮などのニンニクの廃棄部は約8%とされており、Table. 1 の青森県のニンニク生産量を考えると、約 1000 tが廃棄物となる計算となる。また、青森県のニンニク生産の中心地の一つである田子町のニンニク加工センターでは、年間 180 tが加工用ニンニクとして使用され、その約 3.6%にあたる 6.5 tの皮などの廃棄部が未利用資源として排出されている。このように、ニンニクの生産・加工に伴い、膨大な量の皮などの廃棄部が未利用資源として捨てられている。

こうした未利用資源の有効化についての必要性は高く、その研究は様々な場所で行われている。青森県においても、リンゴの搾汁残渣やホタテの貝殻が大問題となり、有効利用の研究の対象として用いられている。しかし、ニンニクの皮などの廃棄部については、その方法が確立されていない。

### 第3項 研究目的と仮説

ニンニクの皮などの研究を行うにあたり、植物体における鱗片を守る皮の役割から一つの仮説を立て、ニンニクの皮からの生理活性物質の探索を行うこととした。

ニンニクは9～10月に鱗片を植え、翌年の6～7月に収穫される。

植えから収穫までの約8ヶ月間土中に存在しており、鱗片は絶えず雑菌などの脅威にさらされる。よって、最も外側にある皮が鱗片を物理的且つ生理的に保護していると考えられる。そこで『ニンニクの皮は物理的のみならず、生理的にも植物体を保護する機能があり、皮に何らかの抗菌性物質が含まれ、植物体が病害の被害を受けないように守っている。』という仮説をたてた。

仮説を証明する手段として、本学農学生命科学部植物病理学・田中和明研究室、佐野輝男研究室との共同研究のもと、植物潜在菌である植物炭疽病 *Colletotrichum acutatum* に対する抗菌性物質をニンニクの皮から探索し、廃棄物を有効利用できる植物由来の食に安全な抗菌性物質を見出すことを本研究の目的とした。



Fig. 2 *C. acutatum* の分生子(孢子)

## 第2節 ニンニクの生理活性物質

### 第1項 ニンニク鱗片の生理活性物質

ニンニクの栽培の歴史は長く、古くから食品だけでなく、民間伝承薬としても用いられてきた。世界最古の薬物治療書である「エルビスパピルス (The Papyrus Evers)」には、22 の病気の処方箋にニンニクが含まれている。疲労、衰弱、神経系疾患、婦人病、腫瘍など、慢性疾患病や老化の予防・治療などである<sup>5)</sup>。日本では、737年に九州で疱瘡が大流行し、多くの死者が出た。そこで朝廷は色々な対策の一つとして、天平9年の官符を諸国に下した。そこには天然痘の症候から治療方法までを記述している<sup>6)</sup>。また、天然痘以外にも、日本最古の医書である「大同類聚」と「医心方」に、悪寒・便秘症・切り傷・虫刺され・狂犬病など、消化、胃腸疾患や抗菌の治療などに使われていたことが書かれている<sup>7)8)</sup>。

このようにニンニクは色々な治療に使われてきた。実際にニンニクの成分研究がなされ、様々な効能が化学的に証明されている。

ニンニクの鱗片に含まれる成分は約 60%が水分である。その他に、糖質やタンパク質が含まれているが、特徴的な成分として有機イオウ化合物

が0.3%含有されている<sup>9)</sup>。有機イオウ化合物は、無機性イオウである硫酸イオウから Cysteine に固定される<sup>10)</sup>。こののち、ニンニクの酵素により、Cysteine から *S*-alk(en)yl-l-cysteine sulfoxides が、生合成されることが報告されている (Fig. 3)<sup>11)</sup>。

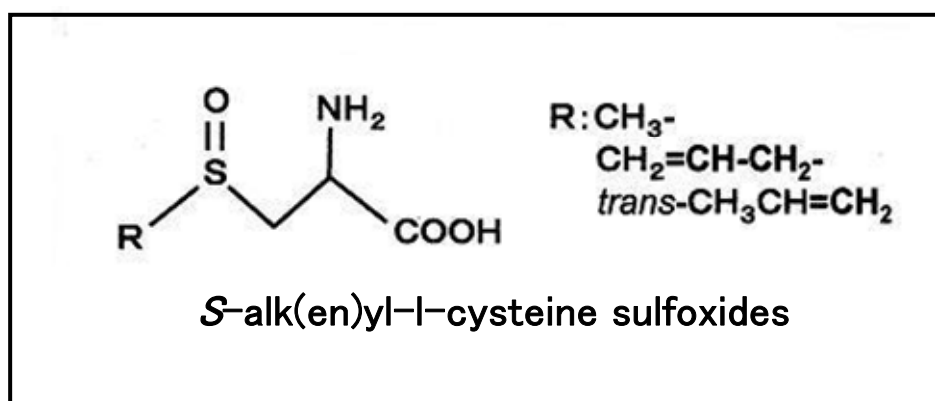


Fig. 3 *S*-alk(en)yl-l-cysteine sulfoxides の構造式

ニンニクには様々な酵素が含まれているがその中でもイオウ成分に大きな影響を与えるのは Alliinase である。Alliinase はニンニク鱗片の維管束鞘に存在し<sup>12)</sup>、ニンニクが粉碎されると無臭の Alliin と速やかに反応し、Allicin などの Thiosulfinate を生じる。Thiosulfinate、特に Allicin は不安定な物質で、Diallyl disulfide に変化する (Fig. 4)。

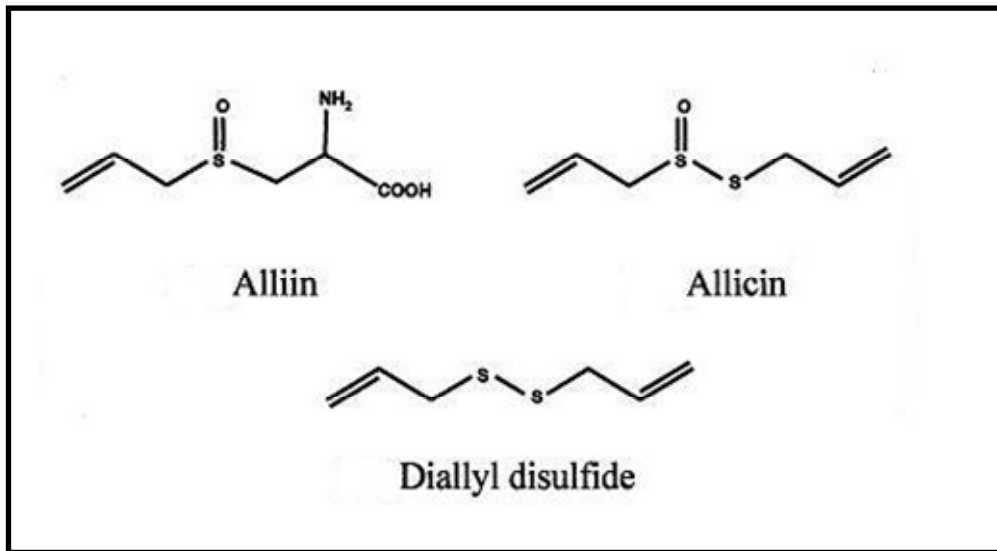
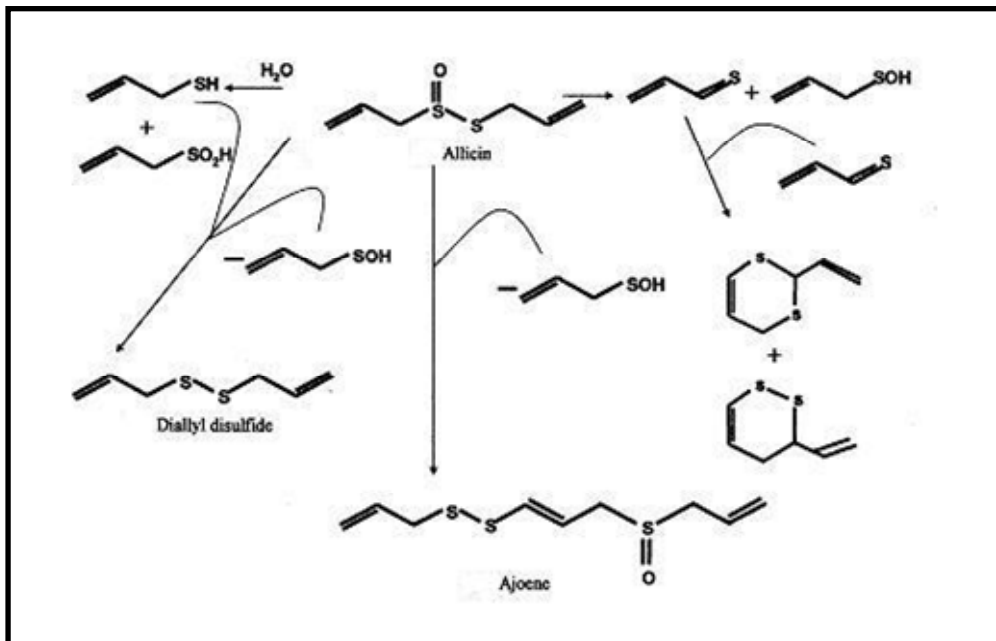


Fig. 4 ニンニクの鱗片に含まれるイオウ化合物

また、温度、溶媒などの諸条件により多様なイオウ化合物に変化する (Scheme. 1)<sup>13)</sup>。



Scheme. 1 ニンニクにおける各種イオウ化合物の生成

揮発性イオウ化合物には様々な生理活性がある。Allicin は抗菌性<sup>14)</sup>、また Ajoen は血小板凝集抑制作用を持ち<sup>15)16)</sup>、Diallyl sulfide には免疫抑制があることが報告されている<sup>17)</sup>。またニンニクの鱗片 Steroid saponines の Eruboside-B や Allxin などが単離、構造決定され、抗菌性物質や発癌抑制効果を持つことが報告されている (Fig. 5)<sup>18)19)20)</sup>。

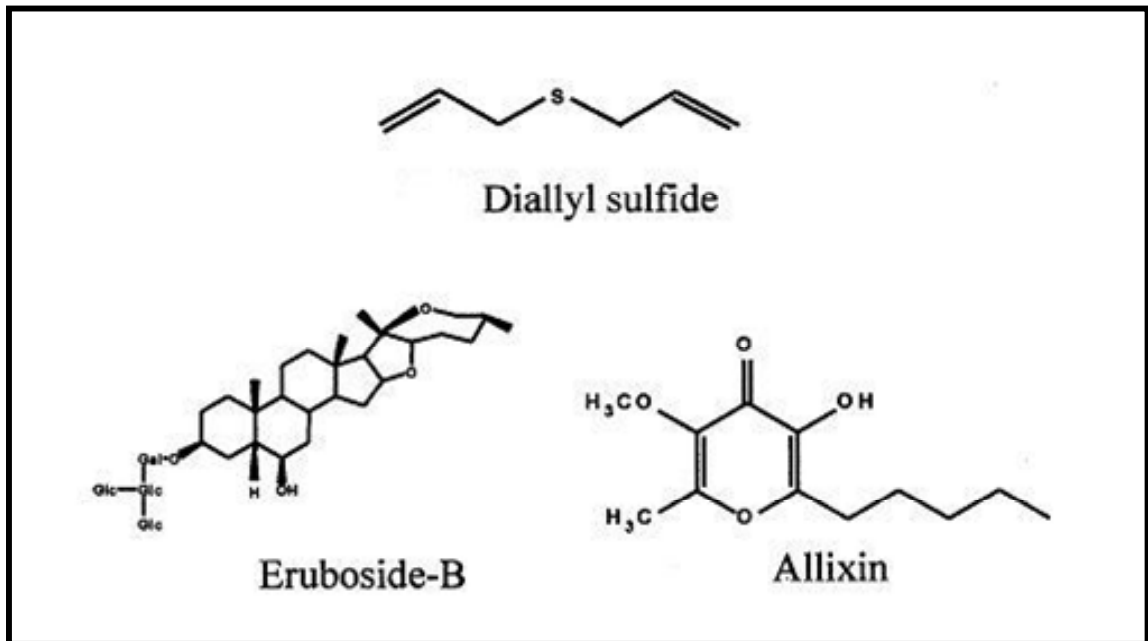


Fig. 5 ニンニクに含まれる生理活性物質



## 第2項 ニンニクの皮の生理活性物質

ニンニクの皮の生理活性物質についての研究は、化学組成について、ニンニクの皮の特有成分は Pectin であるという報告がいくつかある<sup>21)22)23)</sup>。また、Schmidtlein らはニンニクの皮抽出物に *p*-Coumaric acid、Ferulic acid、Sinapic acid が含まれているという報告をしている (Fig. 6)<sup>24)</sup>。

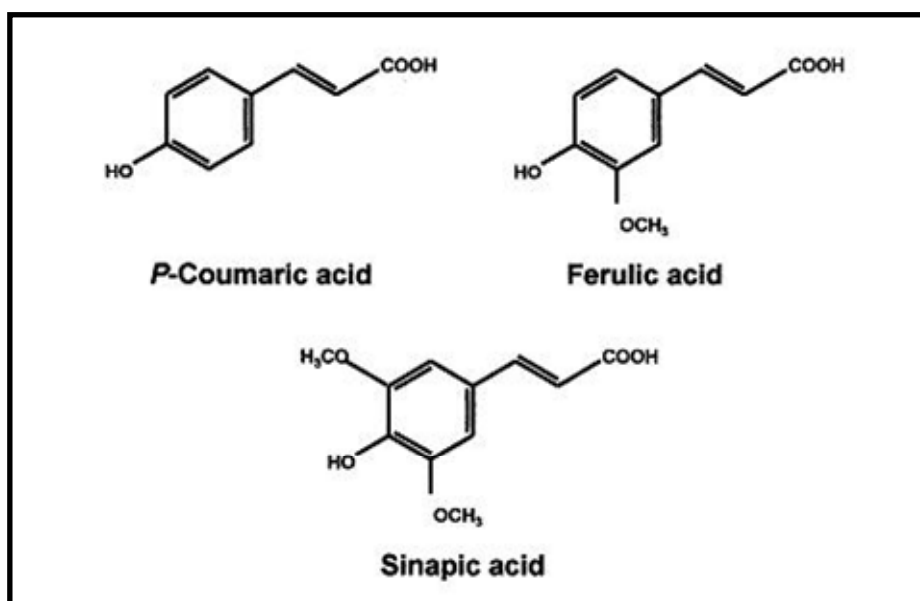


Fig. 6 ニンニクの皮に含まれる主な化合物

また、生理活性物質についての報告、Makoto Ichikawa, et al. の 2003 年報告された抗酸化活性物質のみで<sup>25)</sup>、食べる部分でないという理由からほとんど研究されていないのが現状である (Fig. 7)。

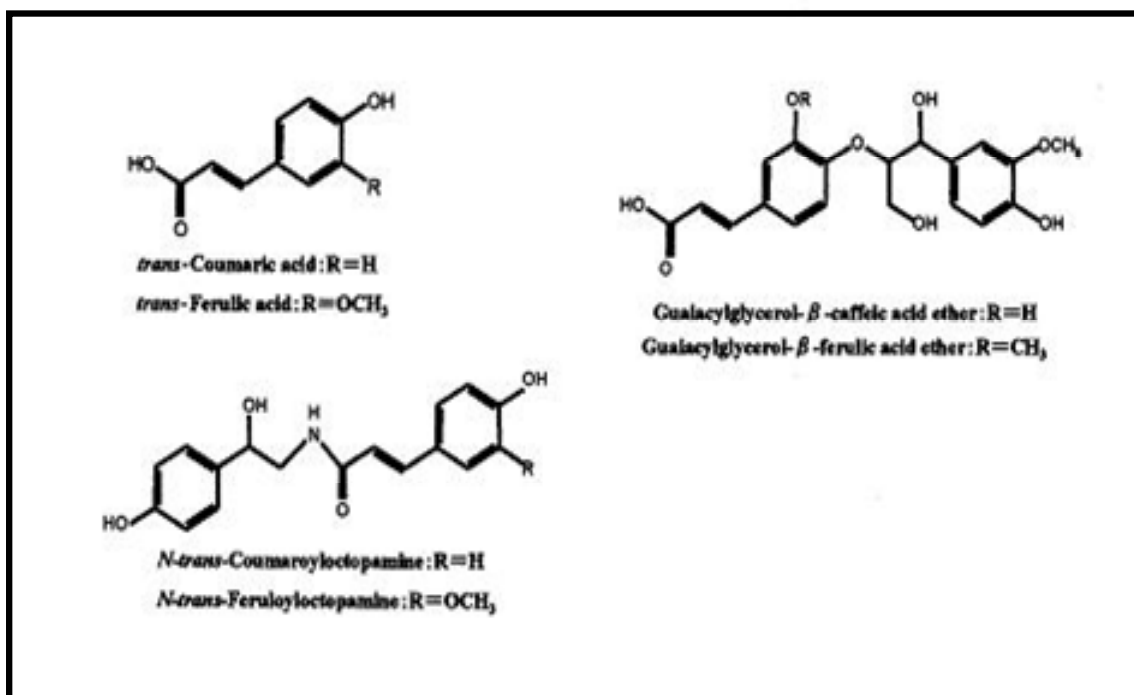


Fig. 7 ニンニクの皮から得られた抗酸化活性物質

### 第3節 植物炭疽病 (*Colletotrichum acutatum*) について

#### 第1項 植物炭疽病

「炭疽病」は、もともと動物においてバクテリアの一種の *Bacillus anthracis* が原因で皮膚に黒色の壊疽斑 (=炭疽 anthracnose) ができる病名として使われていた。「植物炭疽病」は、その後、植物においても同様な黒色の壊疽斑 (anthracnose) ができる病害が発生し、動物の病名に由来し、命名された植物の病気である<sup>26)</sup>。

植物炭疽病は、一般的に「カビ」と呼ばれている真菌類に分類される *Colletotrichum* 属菌によって引き起こされ、現在までに 38 種 1 変種 8 分化型の *Colletotrichum* 属菌が確認されている (Table. 2)<sup>27)</sup>。

1	* <i>C. acutatum</i>	18	<i>C. gloeosporioides</i> var. <i>minus</i>
	a. <i>C. acutatum</i> f. sp. <i>pineum</i>		(teleom: <i>G. cingurata</i> f. sp. <i>minor</i> )
	b. <i>C. acutatum</i> f. sp. <i>chromogenum</i>		
2	* <i>C. capsici</i>	19	<i>C. gnaohalii</i>
3	* <i>C. caricae</i>	20	* <i>C. graminicola</i>
4	<i>C. caudatum</i>	21	<i>C. helichrysi</i>
5	<i>C. circinans</i>	22	* <i>C. higginsianum</i>
6	* <i>C. coccodes</i>	23	<i>C. liliacearum</i> (* <i>C. lili</i> )
	異名: <i>C. atramentarium</i>	24	* <i>C. lindemuthianum</i>
7	* <i>C. coffeanum</i>	25	<i>C. linicola</i>
8	* <i>C. corchori</i>	26	* <i>C. malvalum</i>
9	* <i>C. crassipes</i>	27	* <i>C. musae</i>
10	<i>C. curvatum</i>	28	<i>C. nigrum</i>
11	* <i>C. dematium</i>	29	<i>C. nymphaeae</i>
12	* <i>C. destructivum</i>	30	<i>C. orbiculare</i>
13	* <i>C. falcatum</i>		異名: * <i>C. lagenalium</i>
14	* <i>C. fragariae</i>	31	<i>C. paludosum</i>
15	<i>C. fusarioides</i>	32	<i>C. phyllachoroides</i>
16	* <i>C. fuscum</i>	33	<i>C. psoraleae</i>
	* <i>C. gloeosporioides</i>	34	* <i>C. spinaciae</i>
	a. <i>G. cingulata</i> f. sp. <i>aeschynomenes</i>	35	<i>C. sublineolum</i>
	b. <i>G. cingulata</i> f. sp. <i>camelliae</i>	36	* <i>C. trichellum</i>
	c. <i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>clidemiae</i>	37	* <i>C. trifolii</i>
	d. <i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>cucurbitae</i>	38	* <i>C. truncatum</i>
	e. <i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>cuscutae</i>	39	<i>C. typhae</i>
	f. <i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>manihotis</i>	40	* <i>C. theae-sinensis</i>
(teleom: <i>G. cingurata</i> f. sp. <i>maniharis</i> )			
		(注: 番号は40以外SUTTON(1992)の種番号に一致)	

Table. 2 *Colletotrichum* 属の種名一覧 (\*は日本で報告のある種)

植物炭疽病を発病すると、宿主植物の葉・茎・果実などに様々な病斑を生じ、やがて組織の壊死、枝枯れ、果実の腐敗などをもたらす<sup>26)</sup>(Fig. 8)。

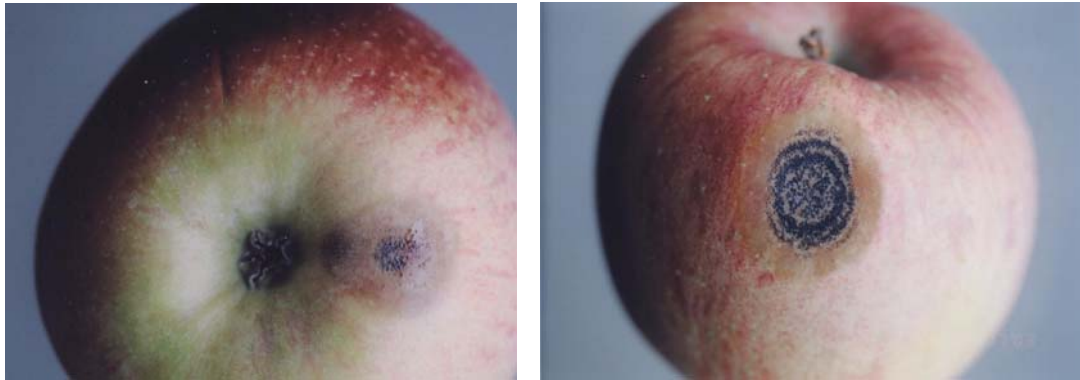


Fig. 8 リンゴ果実にできた壊疽斑

植物炭疽病菌は、植物体に保菌される形で存在し、このような菌を植物潜在菌と呼ぶ。宿主となる樹木には様々な種類があるとされるが、ニセアカシアやイタチハギに代表されるマメ科木本の保菌率が高いとされている。これらの木本類は、街路樹やのり面の緑化に広く用いられているほか、逸出した個体が広く全国の丘陵地斜面や道路のり面、河川敷等に分布を広げている<sup>26)</sup>。

植物炭疽病は、高温と多雨が伝染と発病を助長し、梅雨期(6月)頃から発病し始め、分生子(孢子)が飛散して二次感染を続けながら蔓延し、10月頃まで感染が続く。高温や多雨の条件を好むこと<sup>26)</sup>から、90年代以降の地球温暖化による異常気象が問題になっている現在では、被害の

拡大が懸念されている植物病害の一つである。

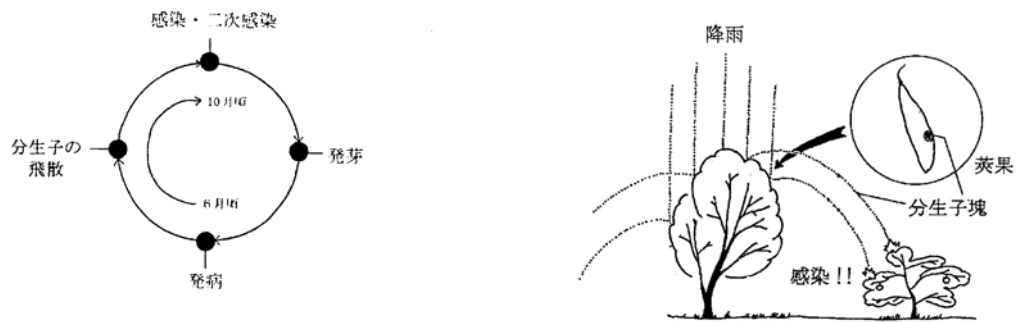


Fig. 9 植物炭疽病の発病と感染メカニズム

植物炭疽病は、感染源樹種から分生子や花卉が飛散して周辺の果樹に感染・発病し、その範囲のことを「影響範囲」と呼んでいる。「りんご炭そ病報告書」によると影響範囲は「感染源樹種から最大で50 m までである」としている。植物炭疽病は、一度感染するとねずみ算式に二次感染を引き起こしていき、収穫後の果実でも病害を引き起こすことから、病害の防除方法としては感染源樹種への農薬の散布が主な方法となっている。

## 第2項 供試菌 *Colletotrichum acutatum* について

抗菌活性試験には、*Colletotrichum acutatum* を供試菌として用いた。本菌は、共同研究者の弘前大学農学生命科学部植物病理学研究室により、リンゴから分離、同定されたものである。

*C. acutatum* は、1965年、Simmondsによりオーストラリアで命名・記載された植物炭疽病菌である<sup>28)</sup>。1996年時点で18か国から40種以上の作物に炭疽病を起こすことが報告されている。日本でも、北海道を除く16県で分布が知られており、1992年に石川<sup>29)</sup>や佐藤<sup>30)</sup>らにより *C. acutatum* がイチゴおよびトルコギキョウの炭疽病を起こすことが相次いで明らかにされて以来、これまで自然発生で8科22種、人工接取による発病(築尾ら, 1993)<sup>31)</sup>を含めると24科31種の植物に発病することが報告または確認されている(Table. 3)<sup>32)</sup>。

発表年 (分離年)	宿主(科)/部位	発生地 (県)	備考**	報告者 (分離者)
1992	* イチゴ(バラ科)/葉	栃木	+ T	石川ら
		長崎	+ T/G	築尾ら
	トルコギキョウ(リンドウ科)/茎, 葉	宮崎	+ T/G	佐藤ら
		千葉	+ T	佐藤ら
1993	コスモス(キク科)/花	神奈川	+ T	矢口ら
	* クワ(クワ科)/葉	茨城	+ T	吉田ら
	* カキ(カキノキ科)/果実	(九州)	?	築尾ら
	* アジサイ(ユキノシタ科)/葉	(九州)	?	築尾ら
	ソラマメ(マメ科)/さや	(九州)	?	築尾ら
	* クリ(ブナ科)/葉	(九州)	?	築尾ら
	* アーティチョーク(キク科)/総包	(九州)	?	築尾ら
	プロテア(ヤマモガシ科)/?	宮崎	?	?
1994	* ビワ(バラ科)/果実	千葉	+ T/G	佐藤ら
		鹿児島	T	佐藤ら
	* キウイ(マタタビ科)/葉	神奈川	+ T	牛山ら
	* リンゴ(バラ科)/果実	長野	T	飯島
1995	アネモネ(キンポウゲ科)/全地上部	静岡	+ G!	佐藤ら
		愛媛	+ G	佐藤ら
	プルーン(バラ科)/果実	長野	+ T/G!	佐藤ら
		岡山	+ T	佐藤ら
	ギシギシ(タデ科)/葉	大分	T	佐藤
モロヘイヤ(シナノキ科)/葉	神奈川	+ T	本多ら	
1996	* イチゴ(バラ科)/葉	福島	+ T	平子
(1991)	* バンレイシ(バンレイシ科)/葉	沖縄	T/G	(佐藤)
(1992)	ドクダミ(ドクダミ科)/?	茨城	T	(白田)
(1993)	* モモ(バラ科)/未熟果	福岡	G	(梶谷)
(1995)	ヒヤシンス(ユリ科)/花柄	香川	T	(佐藤)
	ギシギシ(タデ科)/葉	香川	T	(佐藤)
	* リンゴ(バラ科)/果実	千葉	T	(佐藤)
(1996)	キカラスウリ(ウリ科)/果実	香川	T	(佐藤)
合計	22 種(18 科)	16 県		

- \* : *C. gloeosporioides* による炭疽病の報告されている宿主  
\*\* : 備考 + : 接取試験による病原性の確認済み(空欄は未確認)  
T: 病原菌は典型的 *C. acutatum*  
G: 病原菌は *C. gloeosporioides* との中間型  
! : 病原菌が以前 *C. gloeosporioides* と誤同定されていたもの

Table. 3 日本における *Colletotrichum acutatum* の宿主および分布



### 第3項 植物炭疽病の防除薬剤

イチゴやウリ類の炭疽病の防除には、ベンゾイミダゾール系薬剤 (Benomyl) の効果が高く、常用されていた。しかし、イチゴ炭疽病菌 (*C. gloeosporioides* (teleom.: *Glomerella cingulata*)) では静岡県(手塚・牧野, 1989)<sup>33)</sup>、香川県(楠ら, 1991)<sup>34)</sup>、奈良県(岡山ら, 1991)<sup>35)</sup>、北九州地域(築尾・小林, 1991)<sup>36)</sup>でベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌の発生が確認されている。また、ウリ類の炭疽病菌 (*C. lagenarium*) においても、スイカ(高松ら, 1989)<sup>37)</sup>、キュウリ(三浦ら, 1993)<sup>38)</sup>でベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌の発生が確認されている。検定試験での耐性菌株率はイチゴ炭疽病で 81%、キュウリ炭疽病では 93%が Benomyl 耐性を有しており、本剤の防除効果の減衰が問題となっている<sup>39), 40)</sup>。

一方、ベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌に対して Diethofencarb 剤の効果が高いことが楠ら<sup>34)</sup>や三浦ら<sup>38)</sup>により報告されている。しかし、Diethofencarb 剤は、Benomyl 耐性菌に対して非常に高い防除効果を示したが、感性菌には全く効果を示さず、ベンゾイミダゾール系薬剤との間に負相関交差耐性を示すことが判明した。そこで、Benomyl、Diethofencarb 両薬剤を併用した防除が行われていた。しかし、93 年にな

り、石川ら<sup>29)</sup>や松尾<sup>41)</sup>により *C. gloeosporioides* とは病徴発現のしかたが異なった *C. acutatum* によるイチゴ炭疽病が報告された。本菌は、Benomyl、Diethofencarb の両剤に低感受性を示すことが中澤ら<sup>42)</sup>により報告されている。現在、ベンゾイミダゾール系薬剤の Thiophanate methyl と Diethofencarb の混合剤が感性菌にも耐性菌にも防除効果が示されていることから現地圃場で防除薬剤として有望とされている (Table. 4, Fig. 10)<sup>43)</sup>。

薬 剤	濃度	耐 性 菌					感 性 菌				
		2週 間後	3週 間後	4週 間後	5週 間後	6週 間後	2週 間後	3週 間後	4週 間後	5週 間後	6週 間後
Benomyl	500 倍	30	60	95	100	100	0	0	0	0	0
Diethofencarb	200	0	0	0	0	0	0	55	80	85	100
Diethofencarb・Thiophanate methyl	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
無 処 理	—	15	25	85	95	100	5	55	60	85	100
無 接 取	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table. 4 Benomyl 耐性及び感性のイチゴ炭疽病菌に対する各種薬剤浸漬の防除効果

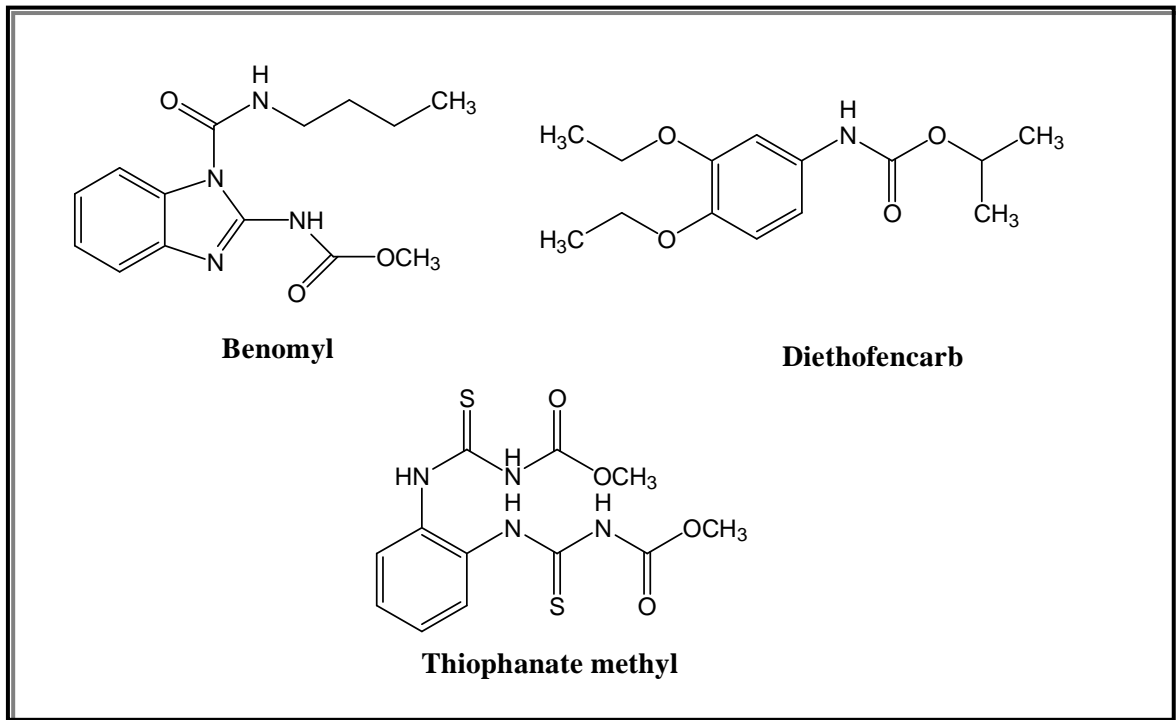


Fig. 10 一般的な植物炭疽病に対する合成農薬

以上のことから、Benomyl と Diethofencarb には、*C. acutatum* に対して耐性があり、現在、有効な農薬がほとんどない。また、Thiophanate methyl は、Diethofencarb との混合剤で用いると有望とされるが、これらの防除薬剤には動物毒性や環境ホルモンとしての働き<sup>44)</sup>があり、新規な食に安全な農薬の開発が求められている。

そこで、リンゴへの感染拡大が懸念され、さらに、防除農薬耐性を持ち、新規防除薬の開発が求められている点から注目されている *C. acutatum* に対する新規防除薬の開発を目的にニンニクの皮の抗菌性物質の探索を行なうことにした。

## 第 2 章

### 本論

## 第1節 これまでの研究経緯

植物炭疽病菌 (*C. acutatum*) に対する抗菌性物質の探索を行なうにあたり、本研究室の庄司哲也 (平成 19 年 3 月卒業) らはニンニクの皮の酢酸エチル (AcOEt) 抽出物に抗 *C. acutatum* 菌活性があることを確認した。また、抗 *C. acutatum* 菌活性物質の分離を行い、分離した成分の *C. acutatum* 菌に対する活性試験を行った (Table. 5)。

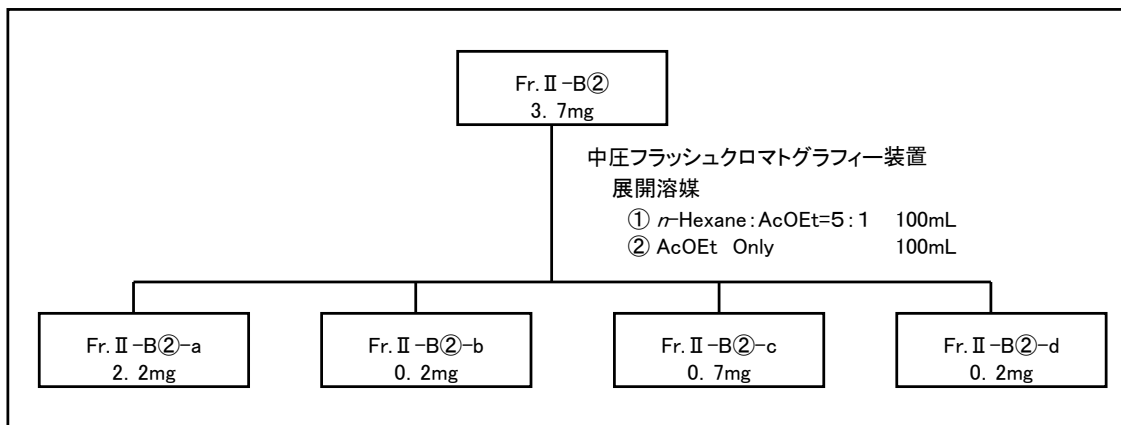
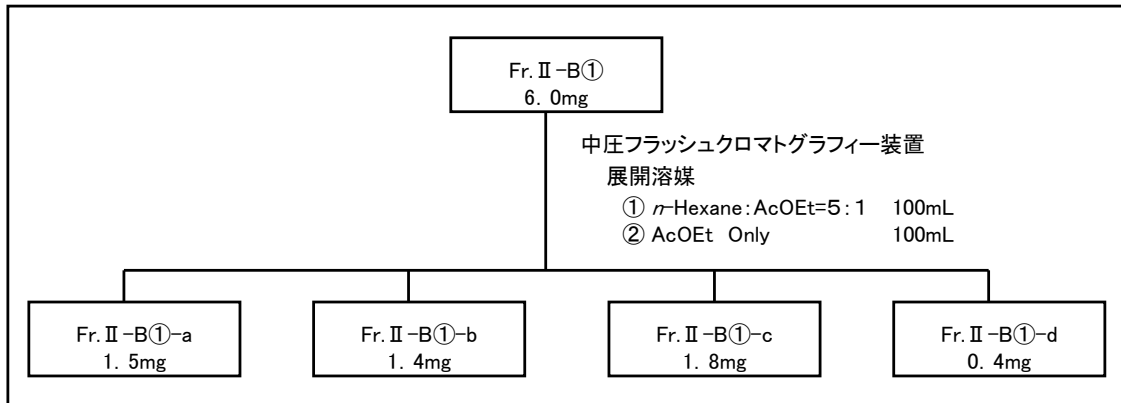
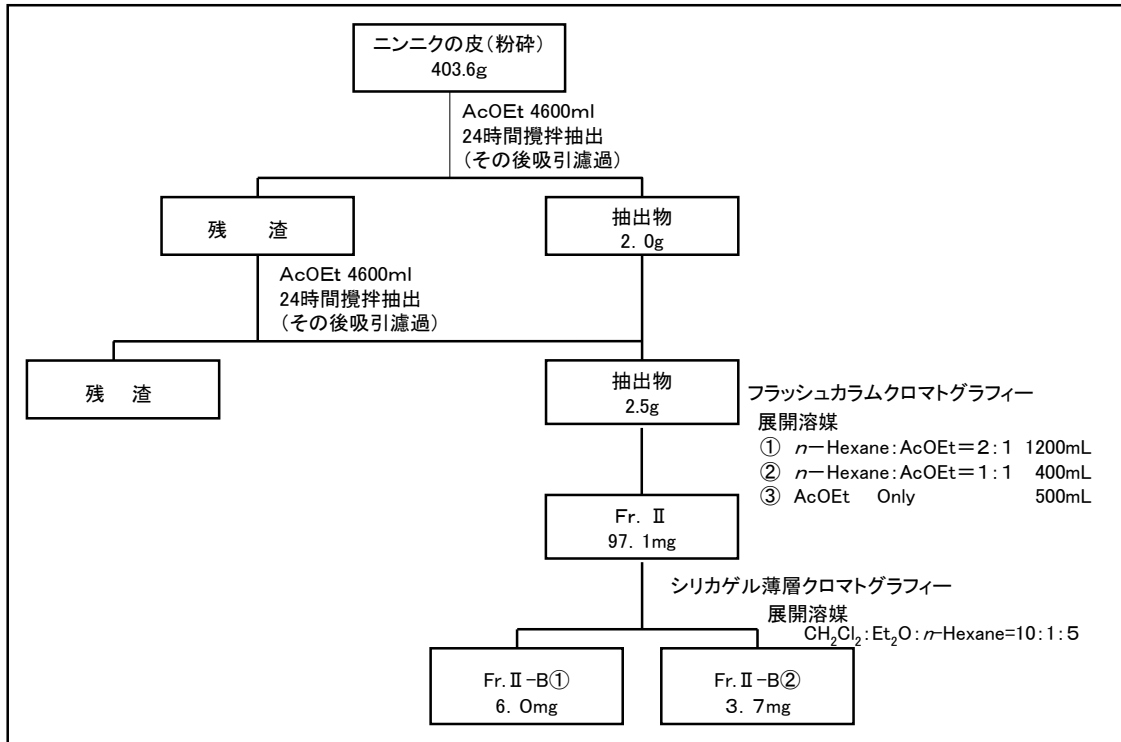


Table. 5 庄司氏の分離工程表

以上のことから本研究は庄司氏の知見のもと、ニンニクの皮の AcOEt 抽出物から抗 *C. acutatum* 菌活性を持つ物質の単離、化学構造の決定を目指し、また実用化に向けて抗菌スペクトル解析を行うことも合わせて目的とした。

## 第2節 ニンニクの皮からの抗菌性物質の抽出と分離

### 第1項 抗菌性物質の抽出と分離

ニンニクの皮をミキサーにかけて粉碎し、5 L のガラス瓶に AcOEt とともに加え、メカニカルスターラーで24時間攪拌抽出し、エバポレーターで溶媒を留去した。それを真空ポンプで乾燥し、AcOEt 抽出物を得た。残渣に AcOEt を加え、同様の操作を行い、最終的な AcOEt 抽出物を得た。

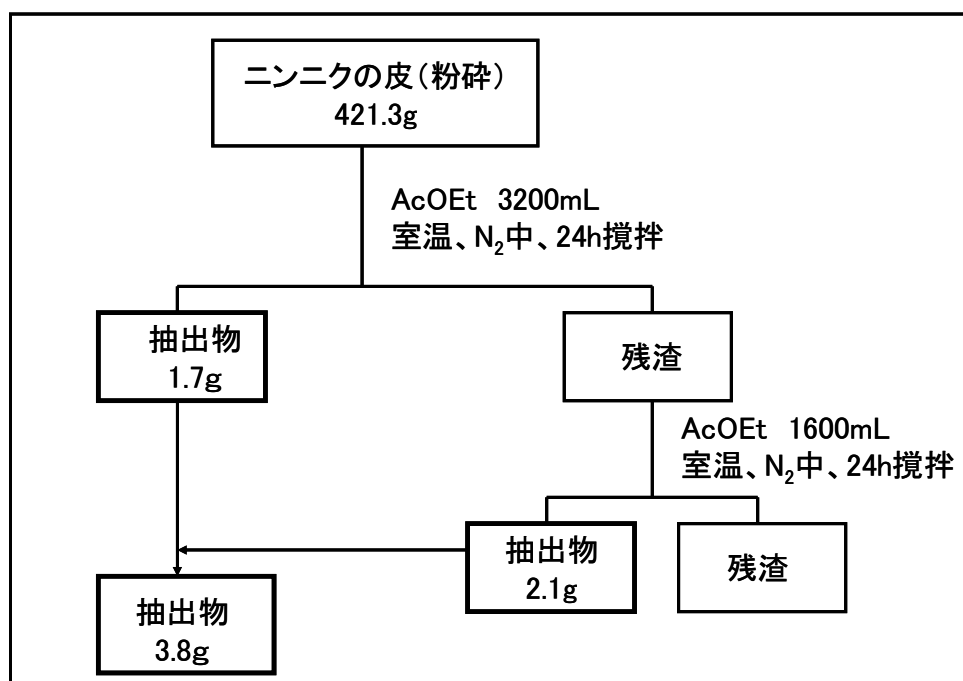


Table. 6 ニンニクの皮からの抗菌活性物質の抽出



AcOEt 抽出物の一部をフラッシュカラムクロマトグラフィー (シリカゲルは抽出物の 10 倍、カラム 45 cm×3.4 cm) で色相と TLC (25 TLC plates 5×2 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) を基準にしながら分離した。展開溶媒は① *n*-Hexane:AcOEt=2:1、② *n*-Hexane:AcOEt=1:1、③ *n*-Hexane:AcOEt=1:2、④ AcOEt only で順次展開した。色相をもとに Fr. I ~Fr. III とした。

得られた分画のうち Fr. II を TLC (25 TLC plates 20×20 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) で分離した。展開溶媒を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Et<sub>2</sub>O:*n*-Hexane=10:1:5 とし、UV 吸収をもとに Fr. II A~Fr. II C とした。

Fr. II B をカラムクロマトグラフィー (EYELA VSP-3500、カラム φ 10 mm×20 cm) により分離した。展開溶媒を *n*-Hexane:AcOEt=3:1 とし、紫外線検出器による分析をもとに Fr. II Ba~Fr. II Be の 5 種を得た。ここまでの工程を図に示した。

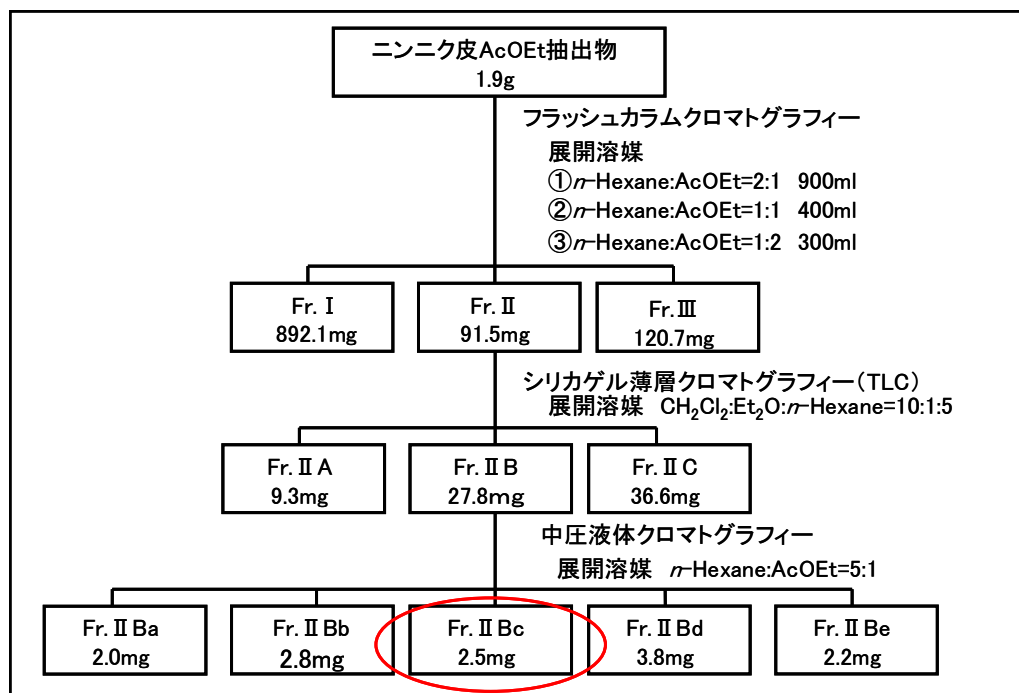


Table. 7 抗菌活性物質の分離

## 第2項 抗菌性物質の分析

分離した5つの画分のうちFr. II Bcを目的の成分として分取した。この成分の純度を調べるために液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析した(Fig. 11)。分析の結果、2つのピークが見られ、矢印のピークが目的の成分であると考えた。この成分は目的の活性部位であるのでこの分画を用いて活性試験をすることとした。

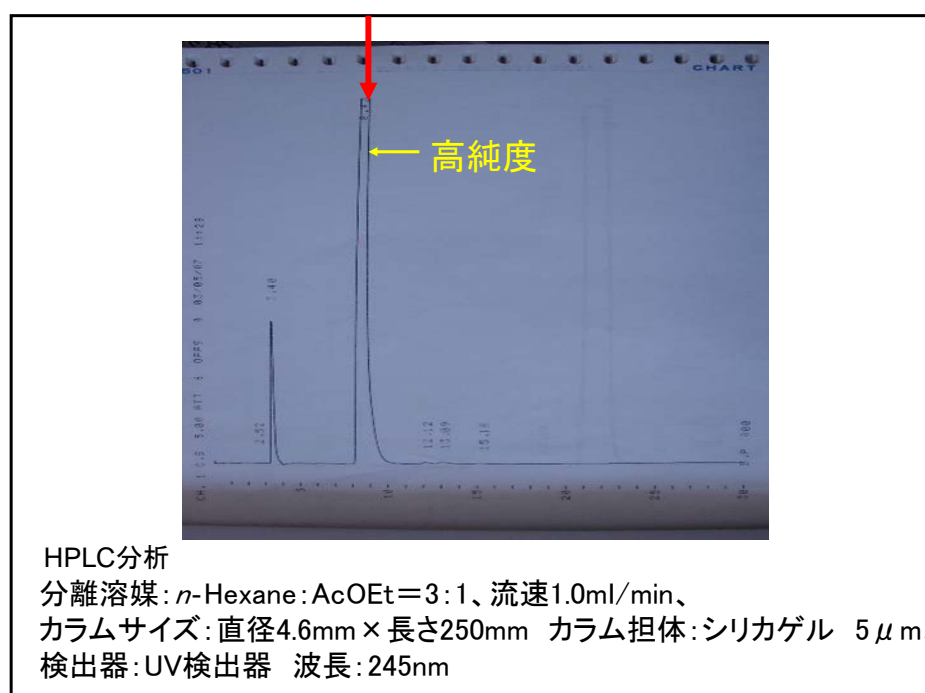


Fig. 11 抗菌性物質の HPLC による分析

### 第3節 ニンニクの皮 AcOEt 抽出物の活性試験

#### 第1項 ペーパーディスク法による活性試験

植物病原菌として、①植物炭疽病菌 (*Colletotrichum actatum*)、②斑点落葉病菌 (*Alternaria mali Roberts*)、③灰色カビ病 (*Botrytis cinerea*)、④根頭癌腫病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、⑤イチゴ炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) の 5 種を用いた。活性試験用試料として、Fr. II Bc を 5%ジメチルスルホキシド (DMSO) 水溶液に溶解し、濃度を調整し 100  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$  とした 3 つの試料を作成した。①、②、③、⑤に関しては PSA 培地を用い 20°C、④に関しては YP 培地を用い 25°C暗所で、いずれも 5 日間培養した。培地に菌を接種し、滅菌ペーパーディスクを 5 ヶ所にのせ、これに各濃度の抽出物およびコントロールとして滅菌水と DMSO を 40  $\mu\text{L}$  添加し、5 日間培養した後、阻止円検定を行った。

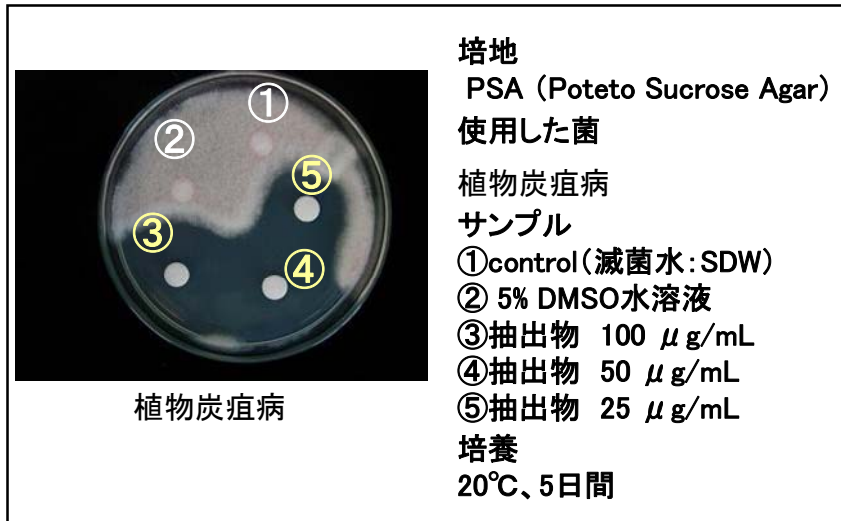


Fig. 12 植物炭疽病に対する活性試験

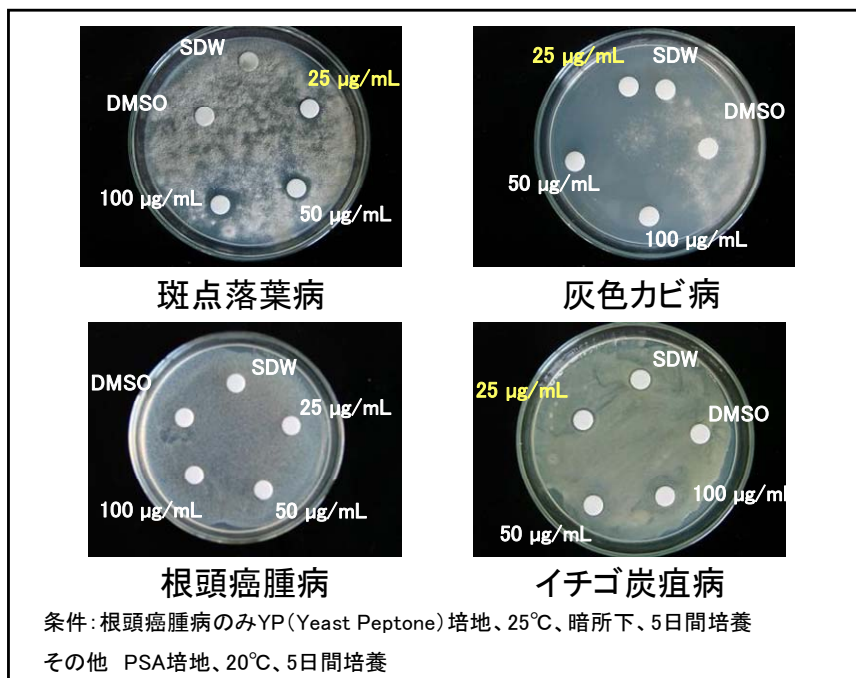


Fig. 13 植物病原菌に対する活性試験

活性試験の結果、滅菌水や5%DMSO 水溶液ではいずれも抗菌活性を示さなかったが、ニンニク抽出物は、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において①、②、③、⑤の4種の菌に対して抗菌活性を有した。また、①と②に対してニンニク抽出物は高濃度ほど活性が強く、濃度依存性を示した。

Table. 8 ペーパーディスク法による活性試験\*

	<i>C.actatum</i>	<i>A.mali</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>C.gloeosporioides</i>
滅菌水	—	—	—	—	—
5%DMSO 水溶液	—	—	—	—	—
試料 1 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	+++	++	+	—	+
試料 2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	+++	+	+	—	+
試料 3 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	++	+	+	—	+

\*+++ : 阻止円の直径が 2.5 cm 以上

+ : 阻止円の直径が 1.5 cm 未満

++ : 阻止円の直径が 1.5 cm 以上 2.5 cm 未満

— : 抑制せず

## 第4節 抗菌活性物質の単離

### 第1項 抗菌活性物質の純度の再検討

高活性な分画 Fr. II Bc は HPLC 分析により十分な純度があると考えていたが、TLC 分析により、濃いスポットの下にわずかなテーリングが見られた。そこで抗菌活性物質の純度の再検討を行うことにした。

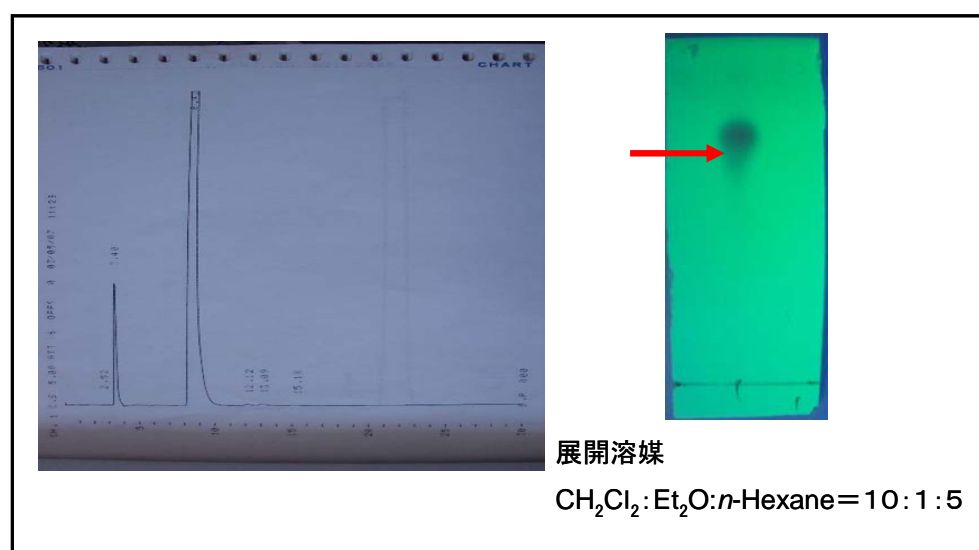


Fig. 14 TLC による純度の再検討

まず TLC (25 TLC plates 5×2 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) による分離を試みた。展開溶媒を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Et<sub>2</sub>O:*n*-Hexane 系、CHCl<sub>2</sub>:Et<sub>2</sub>O:C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> 系、*n*-Hexane:AcOEt 系を用意し、比率を変えて展開した。スポットは UV 吸収とリンモリブデン酸の呈色により分析した。

A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Et<sub>2</sub>O:*n*-Hexane 系

展開溶媒を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Et<sub>2</sub>O:*n*-Hexane = ① 10:20:10、② 10:20:15、③ 10:20:20 として順次展開した。いずれもスポットは 1 つで明確に分離しなかった。

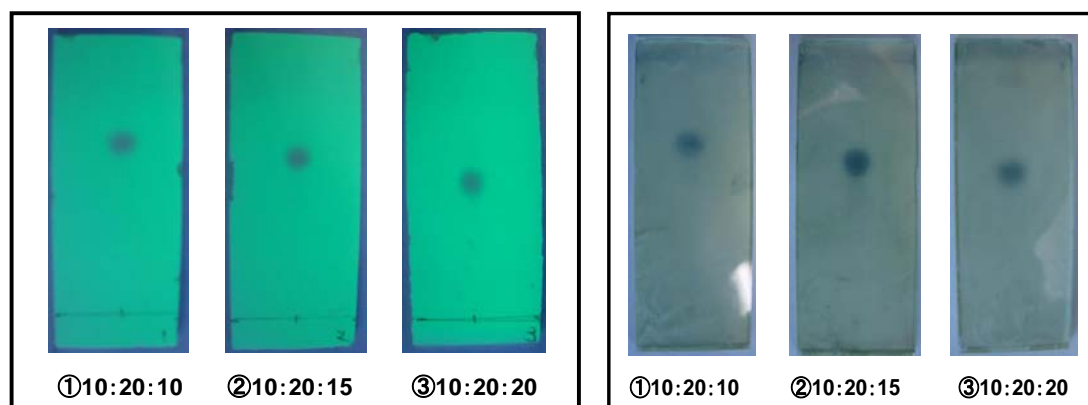


Fig. 15 展開溶媒 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Et<sub>2</sub>O:*n*-Hexane での TLC 分析



B:  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  系

展開溶媒を  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 =$  ①1:1:1、②1:1:5、③1:1:10、④1:2:1、⑤1:2:2、⑥1:2:5、⑦1:2:10、⑧10:1:1、⑨10:1:5、⑩10:1:10 の 10 種用意し順次展開した。いずれもスポットは1つであり、明確には分離しなかつた。

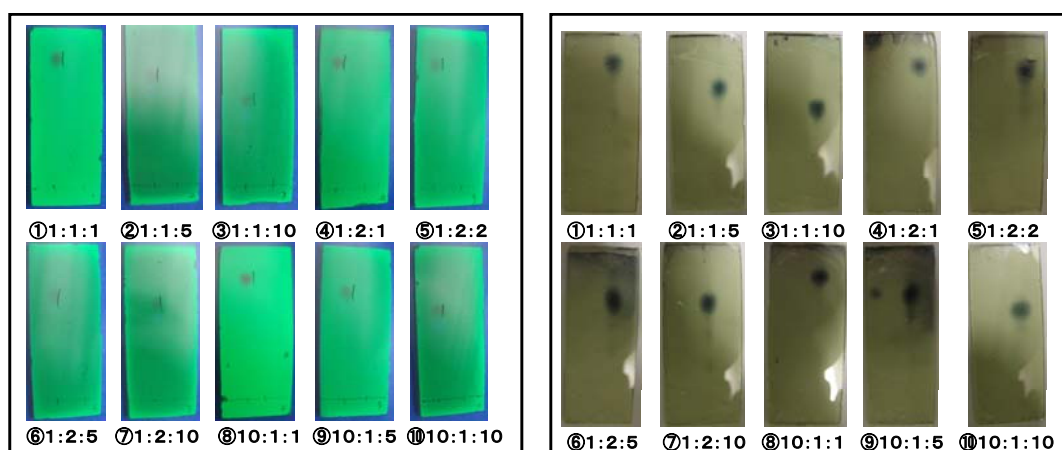


Fig. 16 展開溶媒  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  での TLC

C: *n*-Hexane:AcOEt 系

展開溶媒を *n*-Hexane:AcOEt = ①1:3、②1:1、③5:1、④10:1 とし順次展開した。*n*-Hexane:AcOEt = 5:1 においてスポットの分離が確認できた。そこで、この *n*-Hexane:AcOEt = 5:1 で TLC の多重展開を行い、さらに分離度を上げることとした。

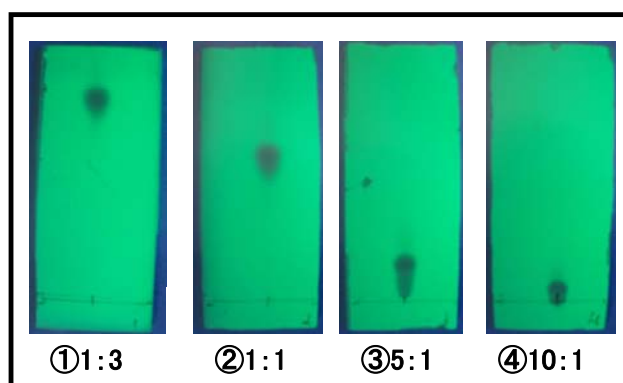


Fig. 17 展開溶媒 *n*-Hexane:AcOEt での TLC 分析

## 第2項 TLC の五重展開による分離

高活性な分画 Fr. II Bc を TLC (25 TLC plates 20×20 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) を用いて分画した。展開溶媒を *n*-Hexane:AcOEt=5:1 として五重展開した後、UV 吸収をもとに Fr. II Bc i ~Fr. II Bc iv の4つに分画した。

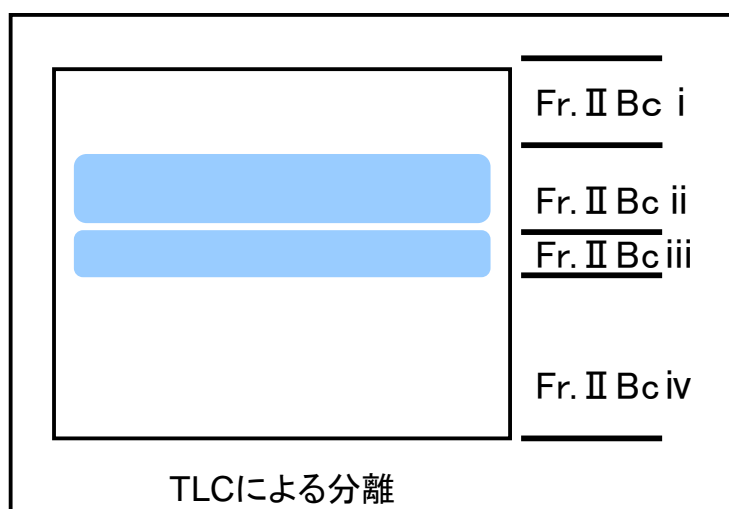


Fig. 18 *n*-Hexane:AcOEt=5:1 による TLC の五重展開

得られた4つの分画を TLC (25 TLC plates 5×2 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) で五重展開し、その後 *p*-anisaldehyde で呈色させた。その結果、図に示すようなスポットがいくつか現れた。

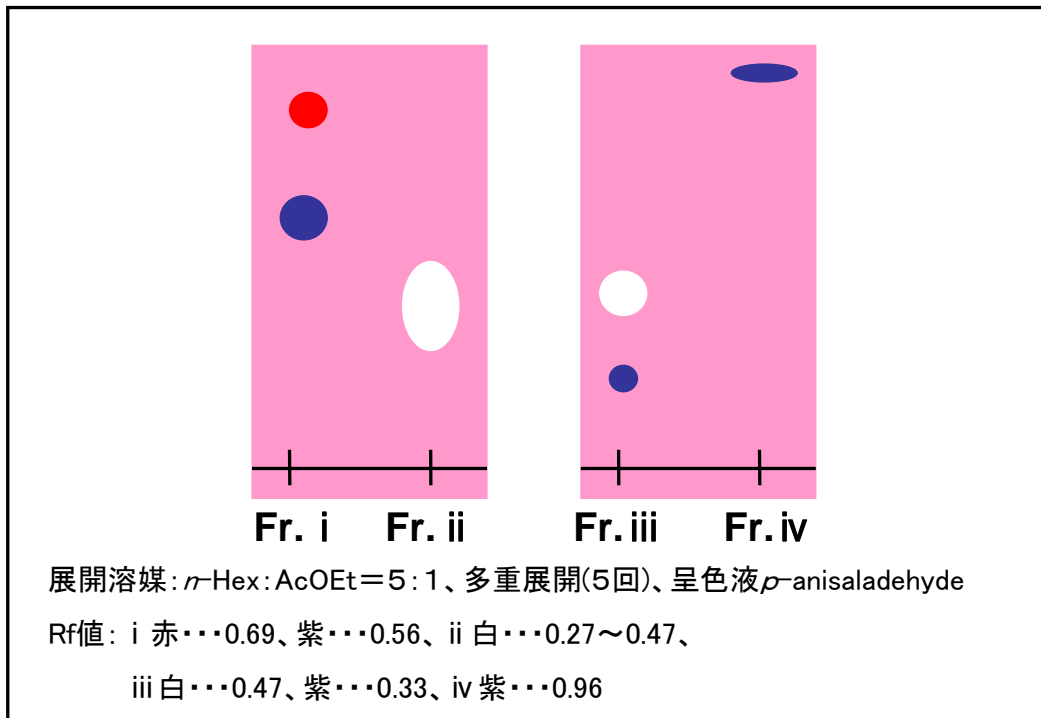


Fig. 19 TLC の *p*-anisaldehyde による呈色

### 第3項 Fr. II Bc i ~ ivの活性試験

目的の活性物質を特定するために、ペーパーディスク法による *C. actatum* 菌の抗菌活性試験を行った。分離した Fr. II Bc i ~ ivを5% DMSO 水溶液に溶解し、各濃度を 100  $\mu$ g/mL になるように設定した。前培養として菌を PSA 培地を用いた滅菌シャーレで 20°C、明所下のインキュベーターで 5 日間培養した。菌接種後、ペーパーディスクに抽出物およびコントロールとして滅菌水と 5%DMSO 水溶液を 40  $\mu$ L 添加し、20°C、明所下のインキュベーターで 5 日間培養した後、抗菌活性試験を行った。

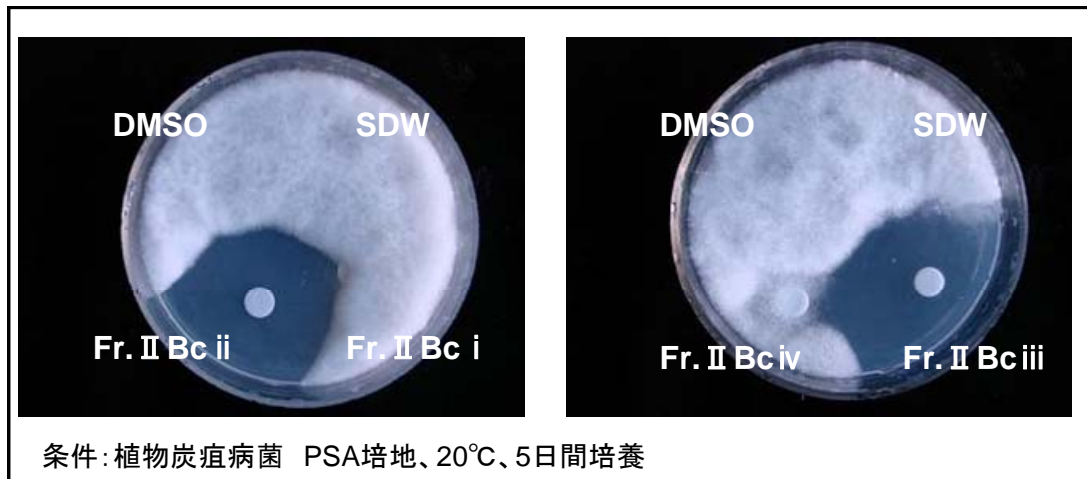


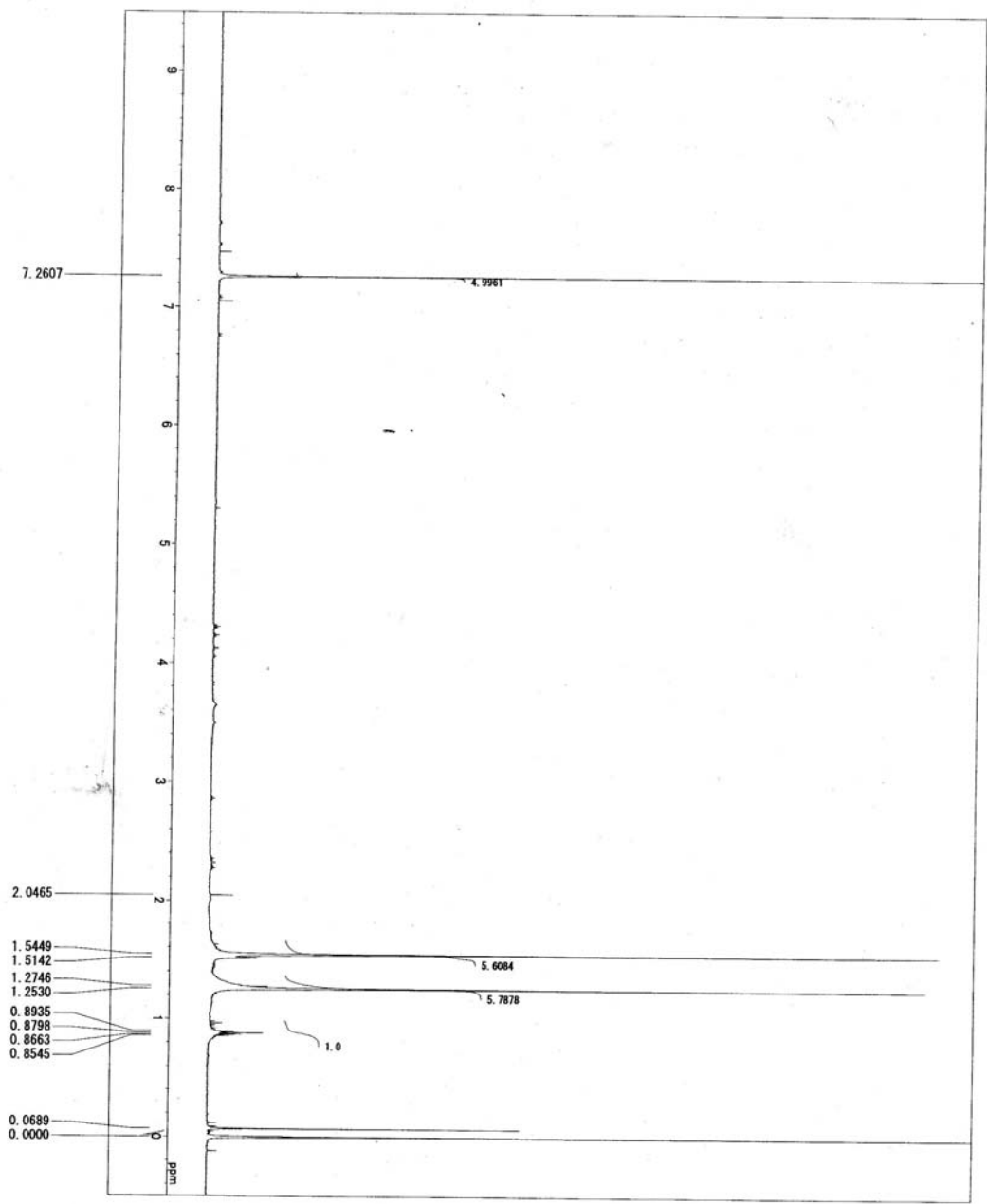
Fig. 20 Fr. II Bc i ~ ivの活性試験

活性試験の結果、Fr. II Bc i には活性がなかったが、Fr. II Bc ii、Fr. II Bc iii は強い活性を示した。Fr. II Bc iv にもやや活性が見られた。Fr. II Bc ii、Fr. II Bc iii は非常に純度の高い物質であると考えたので、NMR による分析を行った。

#### 第4項 Fr. II Bc i ~ iv の NMR 分析

目的の抗菌性物質の特定の為、Fr. II Bc i ~ iv に関して  $^1\text{H-NMR}$  による分析を試みた。TMS を基準物質、溶媒を  $\text{CDCl}_3$  としてサンプルを溶解させた。それぞれを図に示した。

NMR の結果から Fr. II Bc ii 、Fr. II Bc iii はともに混合物であることがわかった。

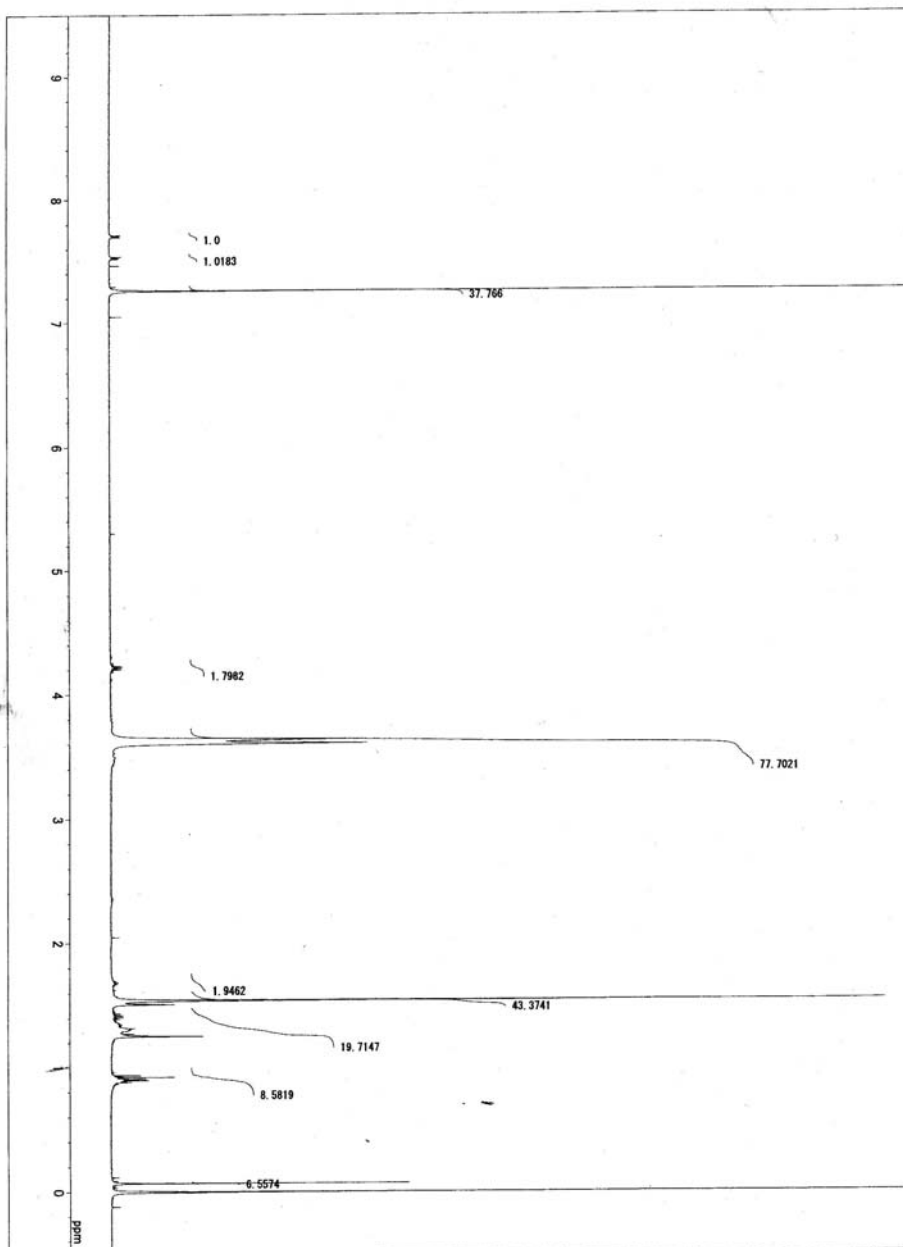


FILE D:\KAITOH091216001-1.JDF  
 ORIGINAL FILE D:\Kaitoh091216001-1.jdf  
 DATE 2009/Dec/16 15:35:56  
 COMMENT  
 No.1/aitech091216001  
 ECHO MODE single\_pulse\_ex2  
 ECHO COMMENT single\_pulse  
 OBS NUC 500.15991521 MHz  
 OBS FREQ 5.0 ppm  
 OBS OFFSET 3.4 dB  
 OBS ATN 9384.385 Hz  
 FREQ (Span) 15334  
 POINT 0.5728 Hz  
 RESOLUTION 64  
 SCAN 64  
 DUMP SCAN 1  
 ACQ TIME 1.7459 s  
 RELAXATION DELAY 5.0 s  
 REPEAT TIME 6.7459 s  
 PULSE WIDTH 8.8 μs  
 INSTRUMENT ECA 500  
 TEMPERATURE 22.9 °C  
 SPEED 15.0 Hz  
 SOLVENT CHLOROFORM-D  
 REFERENCE 0.0 ppm  
 RGAIN 50  
 BROAD FACTOR 0.25 Hz  
 WINDOW Exponential  
 T1 0.0 %  
 T2 0.0 %  
 T3 80.0 %  
 T4 100.0 %  
 OPERATOR  
 PRINT DATE 2009/Dec/17 10:01:39

\*基準物質 TMS 溶媒 CDCl<sub>3</sub>

Fig. 21 Fr. II Bc i の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

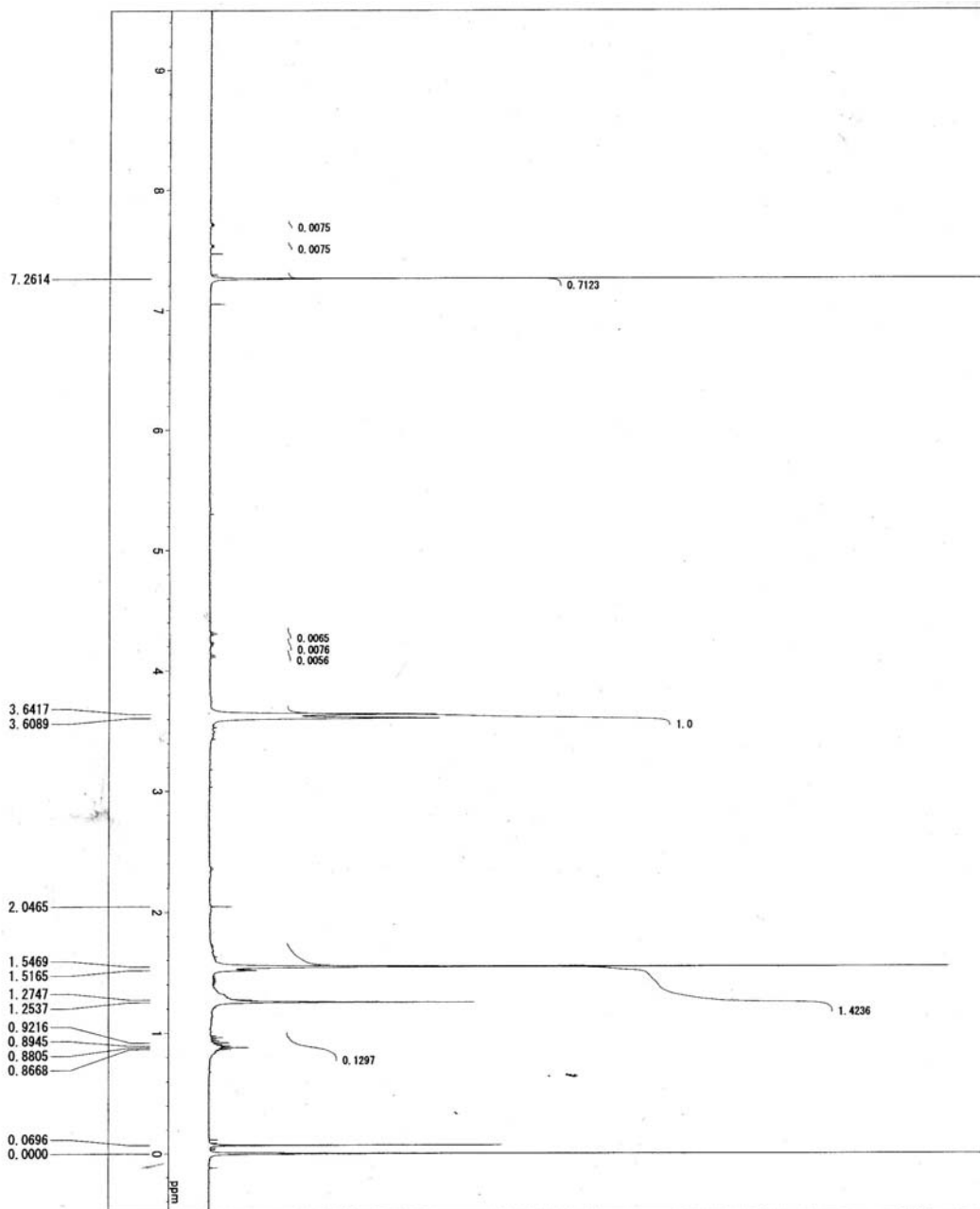




FILE D:\M1TOR091215001-1.D\F  
 0616 INFL FILE D:\M1TOR091215001-1.Jd  
 DATE 2009/Dec/15 13:21:31  
 COMMENT  
 atoh091215001  
 EXMODE single\_pulse ex2  
 OBS NUC 1H  
 OBS FREQ 500.15991521 MHz  
 OBS OFFSET 5.0 ppm  
 OBS AIN 2.4 dB  
 FREQ(Span) 9384.385 Hz  
 RESOLUTION 18380.5728 Hz  
 SCAN 64  
 DUMMY SCAN 1  
 ACO TIME 1.7459 s  
 RELAXATION DELAY 5.0 s  
 REPETITION TIME 6.7459 s  
 PULSE WIDTH 6.8  $\mu$ s  
 INSTRUMENT EGA 500  
 TEMPERATURE 23.7  $^{\circ}$ C  
 SPEED 23.0 Hz  
 SOLVENT CHLOROFORM-D  
 REFERENCE 0.0 ppm  
 BROAD FACTOR 50  
 WINDOW 0.25 Hz  
 T1 Exponential  
 T2 0.0 %  
 T3 80.0 %  
 T4 100.0 %  
 OPERATOR  
 PRINT DATE 2009/Dec/15 13:54:36

\*基準物質 TMS 溶媒  $\text{CDCl}_3$

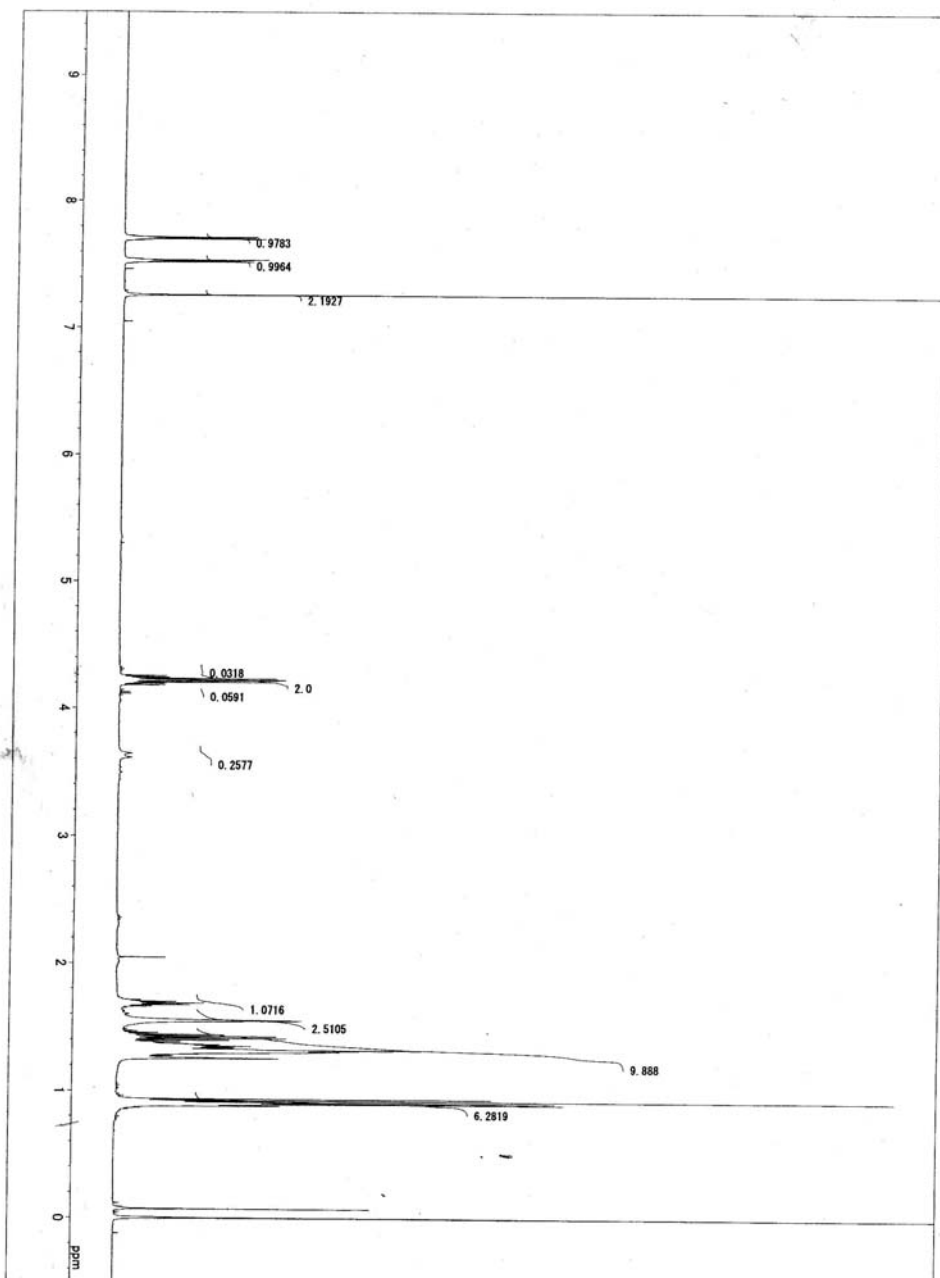
Fig. 22 Fr. II Bc ii の $^1\text{H}$ -NMR スペクトル



FILE D:\Y11091216002-1.JDF  
 ORIGINAL FILE D:\Y11091216002-1.JDF  
 DATE 2009/Dec/16 16:27:18  
 COMMENT  
 No.3/a1c091216002  
 EXPRNAME single\_pulse\_ex2  
 EXPRCOMMENT single\_pulse  
 OBS NUC <sup>1</sup>H  
 OBS FREQ 500.15991521 MHz  
 OBS OFFSET 5.0 ppm  
 OBS ATN 3.4 dB  
 FREQ(Span) 9384.385 Hz  
 POINT 16384  
 RESOLUTION 0.5728 Hz  
 SCAN 64  
 DUMMY SCAN  
 AQC TIME 1.7459 s  
 RELAXATION DELAY 5.0 s  
 REPETITION TIME 6.7459 s  
 PULSE WIDTH 6.8 μs  
 INSTRUMENT ECA 500  
 TEMPERATURE 22.9 °C  
 SPEED 4.0 Hz  
 SOLVENT CHLOROFORM-d  
 REFERENCE 0.0 ppm  
 RGAIN 50  
 BROAD FACTOR 0.25 Hz  
 WINDOW Exponential  
 T1 0.0 %  
 T2 0.0 %  
 T3 80.0 %  
 T4 100.0 %  
 OPERATOR  
 PRINT DATE 2009/Dec/17 09:59:44

\*基準物質 TMS 溶媒 CDCl<sub>3</sub>

Fig. 23 Fr. II Bc iii の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル



FILE D:\X17091216003-1.JDF  
 ORIGIN FILE D:\X17091216003-1.JDF  
 DATE 2009/Dec/16 17:06:04  
 COMMENT  
 No. 4/a17091216003  
 EXMODE single\_pulse\_ez2  
 EXCOMMENT single\_pulse  
 OBS\_NUC 1H  
 OBS\_FREQ 500.15991521 MHz  
 OBS\_OFFSET 5.0 ppm  
 OBS\_ATN 3.4 dB  
 FREQD(Span) 9384.385 Hz  
 POINT 16384  
 RESOLUTION 0.5728 Hz  
 SCAN 64  
 DUMP\_SCAN 1  
 ACQ\_TIME 1.7459 s  
 RELAXATION\_DELAY 3.0 s  
 REPEATON\_TIME 8.7459 s  
 PULSE\_WIDTH 8.8 μs  
 INSTRUMENT EGA 500  
 TEMPERATURE 22.9 °C  
 SPEED 17.0 Hz  
 SOLVENT CHLOROFORM-D  
 REFERENCE 0.0 ppm  
 RGAIN 48  
 BROAD\_FACTOR 0.25 Hz  
 WINDOW Exponential  
 T1 0.0 %  
 T2 0.0 %  
 T3 80.0 %  
 T4 100.0 %  
 OPERATOR  
 PRINT DATE 2009/Dec/17 09:52:34

\*基準物質 TMS 溶媒 CDCl<sub>3</sub>

Fig. 24 Fr. II Bc iv の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

## 第5節 結論

- 1) 当研究室で開発した方法を用い、ニンニクの皮から抗菌活性物質の抽出、分離を行い高活性成分を得た。
- 2) 高活性成分の、四種の菌に対する活性試験をペーパーディスク法により行うと共に、植物炭疽病に対する追試をした。  
その結果、新たに三種の菌に活性があることが判った。
- 3) 高活性成分の再分析を行い、さらに四成分に分離した。
- 4) 四成分の活性試験を行い、Fr. II Bc ii、Fr. II Bc iiiに高い活性があることがわかった。Fr. II Bc ivにもやや活性があることがわかった。
- 5) 四成分の  $^1\text{H-NMR}$  分析を行った結果、高活性な分画 Fr. II Bc ii、Fr. II Bc iiiは混合物であることがわかった。

以上の結果より、

ニンニク抽出物＝さまざまな植物病原菌に対する高活性な抗菌性物質

上記のことを証明した。

## 実験の部

## 器具類

### ○ 精製

#### (1) フラッシュカラムクロマトグラフィー装置

ポンプ: VSP-3050 (EYELA)

UV detector: RI-20UV (EYELA)

カラム管: フラッシュ液クロ用ガラスカラム

FCC-20N 型 (EYELA) (17 cm × 2 cm)

#### (2) フラッシュカラムクロマトグラフィー

カラム管: 45 cm × 3.4 cm 52 cm × 3.7 cm

### ○ 抽出・濃縮

ミキサー: National MX-X52

#### (1) 攪拌器具

LABORTECHNIK RW20DZM.n (IKA)

#### (2) 濃縮装置

エバポレーター: N-N SERIES (EYELA)

ウォーターバス:THB-7D (IWAKI)

SB-651 (EYELA)

冷却器:CA-110 (EYELA)

アスピレーター:ASP-13 (IWAKI)

真空ポンプ:SW-100 (SATO)

DAH-60C (ULVAC)

○ スペクトル機器

HPLC

ポンプ:HITACHI L-6000

Chromato-Integrator:HITACHI D-2500

レコーダー:Shodex RISE-60

○ 活性試験用機具類

蒸留水装置:Autostill WG200 (yamato)

オートクレーブ HA-240M II : (HIRAYAMA)

インキュベーター:MIR-253 (SANYO)

滅菌シャーレ:90×15 mm (IWAKI)

AUTOMATIC MIXER:S-100 タイテック株式会社

テーハー式乾熱滅菌機:平沢製作所 (HIRASAWA)

100–1000  $\mu$  L ピペットマン: Finnpiquette (Labsystems)

10–100  $\mu$  L ピペットマン: Nichipette (Nichiryō)

## 試薬類

### ○ カラムクロマトグラフィー用シリカゲル

#### (1) 分析用シリカゲル

Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck)

#### (2) フラッシュクロマトグラフィー用シリカゲル

Silica gel 60N 40–100  $\mu$  m (関東化学)

#### (3) フラッシュクロマトグラフィー装置用シリカゲル

Silica gel 60 0.040–0.063 mm (Merck)

#### (4) シリカゲル薄層クロマトグラフィー

25 TLC plates 20×20 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck)

### ○ 溶媒類

(1) *n*-Hexane (和光純薬, 第1級 20 L)

(2) Diethyl ether (純正化学, 第1級 20 L)

(3) Ethyl Acetate (和光純薬, 第1級 20 L)

(4) Dichloro methane (純正化学, 第1級 20 L)



(5) Methyl alcohol (ゴードー溶剤, 第1級 20 L)

(6) Dimethyl sulfoxide (和光純薬, 特級 500 mL)

(7) Ethyl alcohol (日本アルコール販売, 第1級)

(1)～(5)は単蒸留したのち、(6)、(7)はそのまま使用した。

## 材 料

○ ニンニクの皮

(1) 提供先

青森県畑作園芸試験場

田子町農業協同組合たつこにんにく課

(2) 処理・保存方法

室温で保存

○ 植物炭疽病菌 *Colletotrichum actatum*

(1) 提供先

弘前大学農学生命科学部植物病理学研究室

(2) 保存方法

4°C、暗黒、PDA スラント上で保存

○ 斑点落葉病 *Alternaria mali Roberts*

(1) 提供先

弘前大学農学生命科学部植物病理学研究室

(2)保存方法

4℃、暗黒、PDA スラント上で保存

○ 灰色カビ病 *Botrytis cinerea*

(1)提供先

弘前大学農学生命科学部植物病理学研究室

(2)保存方法

4℃、暗黒、PDA スラント上で保存

○ 根頭癌腫病菌 *Agrobacterium tumefaciens*

(1)提供先

弘前大学農学生命科学部植物病理学研究室

(2)保存方法

室温、暗黒下で保存

○ イチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*

(1)提供先

三重県科学技術振興センター

弘前大学農学生命科学部植物病理学研究室

(2)保存方法

4°C、暗黒、PDA スラント上で保存

## 実験方法

### I) 試料の作成

(第2章 第2節 第1項 Table. 6)

9月にニンニクの鱗片を植え、翌年の7月に収穫したニンニクを、収穫後 35°Cで乾燥し、止葉(盤珪部と保護用を除いた皮)のみ集め市販のミキサーで粉砕し試料を 421.3 g得た。

### II) 抗菌性物質の抽出

(第2章 第2節 第1項 Table. 6)

粉砕した止葉からの生理活性物質の抽出は図 1 に示すように行った。5Lの硝子容器に 421.3 g の試料と酢酸エチルを 3200 mL 加え窒素雰囲気下で 24 時間メカニカルスターラーを用いて攪拌した。次いで吸引濾過を 3 回繰り返し残渣を除去し、抽出液から酢酸エチルをエバポレーターで除去した後、真空ポンプで乾燥し抽出物 1.7 gを得た。先の残渣に酢酸エチル 1600 mLを加え同様の操作を行い、更に 2.1 g の抽出物を得、前の抽出物と合わせて 3.8 gとした。

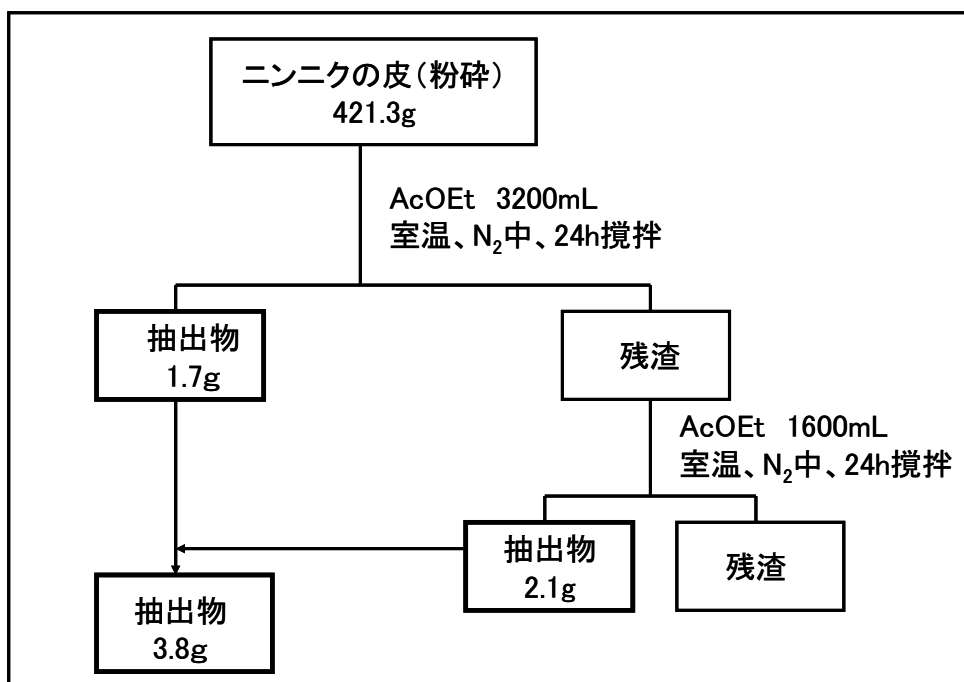


Table. 6 ニンニクの皮からの抗菌活性物質の抽出

### Ⅲ) 抗菌性物質の分離

(第2章 第2節 第1項 Table. 7【より詳細にするため Table. 9 Table. 10 Table. 11 Fig. 25 を新たに置く】)

ニンニクの皮の抽出物の分離は Table. 9 に示すように行った。抽出物 3.8 g のうち 1.9 g をフラッシュカラムクロマトグラフィー(シリカゲル 190.0 g、カラム 45 cm×3.4 cm)により分画した。図中に示した三種の展開溶媒を順次使い、展開溶媒①で分離した試料を Fr. I (892.1 mg)、②で分離した試料を Fr. II (91.5 mg)、③で分離した試料を Fr. III (120.7 mg)とした。

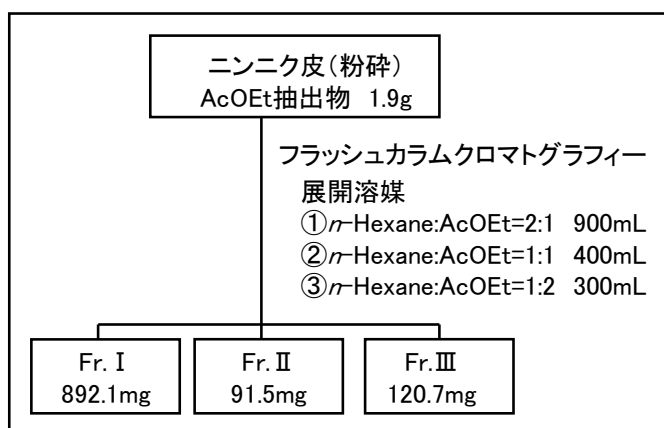


Table. 9 Fr. II の分離分画

Fr. II を更に Table. 10 に示すようにシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分離した展開後 UV 吸収を有する成分と、その前後の吸収を持たない成分とに 3 分画し Fr. II A (9.3 mg)、Fr. II B (27.8 mg)、Fr. II C (36.6 mg) を得た。(Fig. 25)

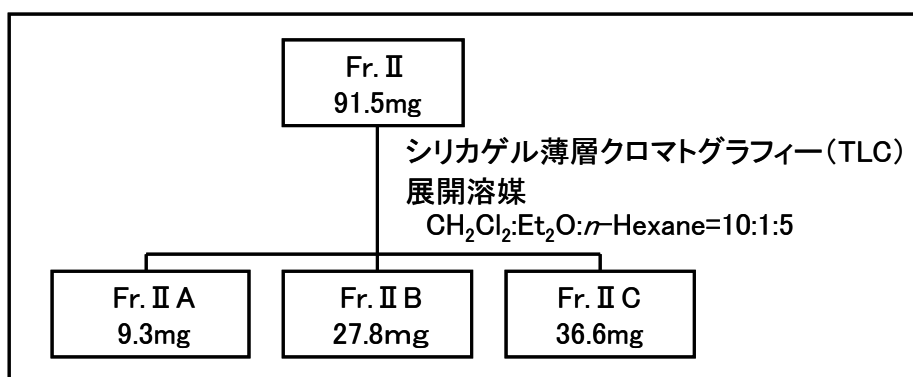


Table. 10 Fr. II の分離

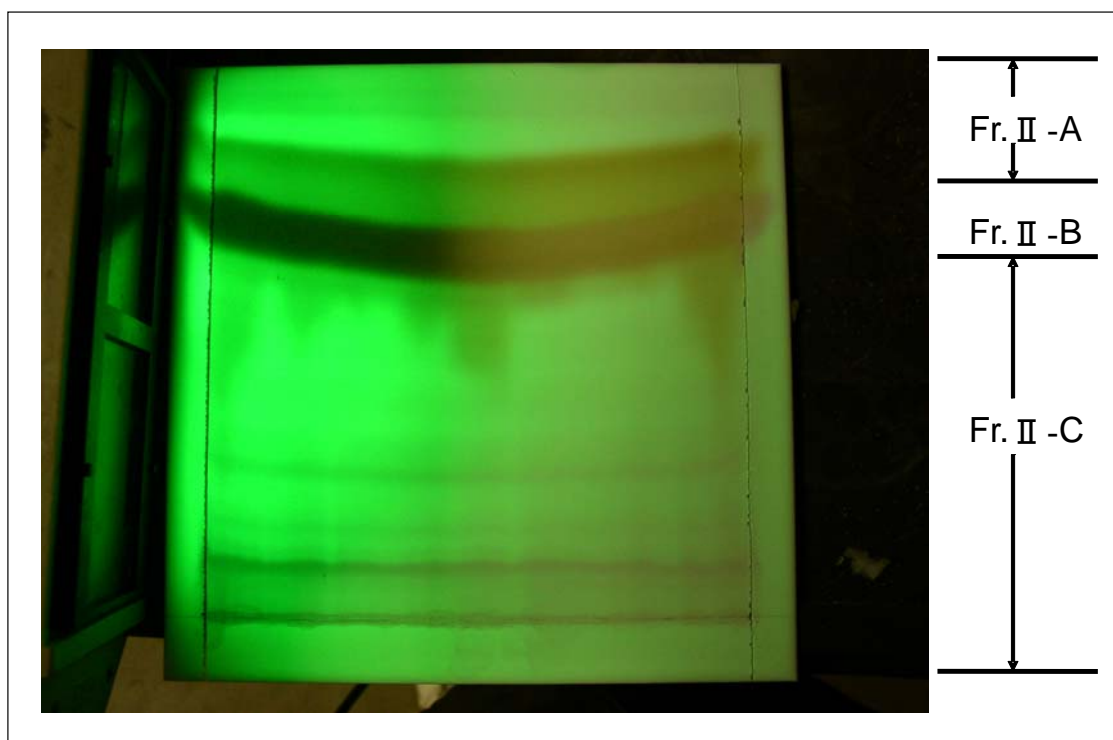


Fig. 25 シリカゲル薄層クロマトグラフィーの展開の様子

Fr. II B を Table. 11 に示すように中圧クロマトグラフィーにより更に分離した。Fr. II B (27.8 mg) を中圧フラッシュクロマトグラフィーにより約 2 mL ずつ試験管に分取し、fr.1～fr.27 を得た。紫外検出器による分析により、図4に示したようにフラクションを纏め、fr.1～fr.3 から Fr. II Ba (2.0 mg)、fr.4～fr.6 から Fr. II Bb (2.8 mg)、fr.7～fr.12 から Fr. II Bc (2.5 mg)、fr.13～fr.24 から Fr. II Bd (3.8 mg)、fr.25～fr.27 から Fr. II Be (2.2 mg) を得た。

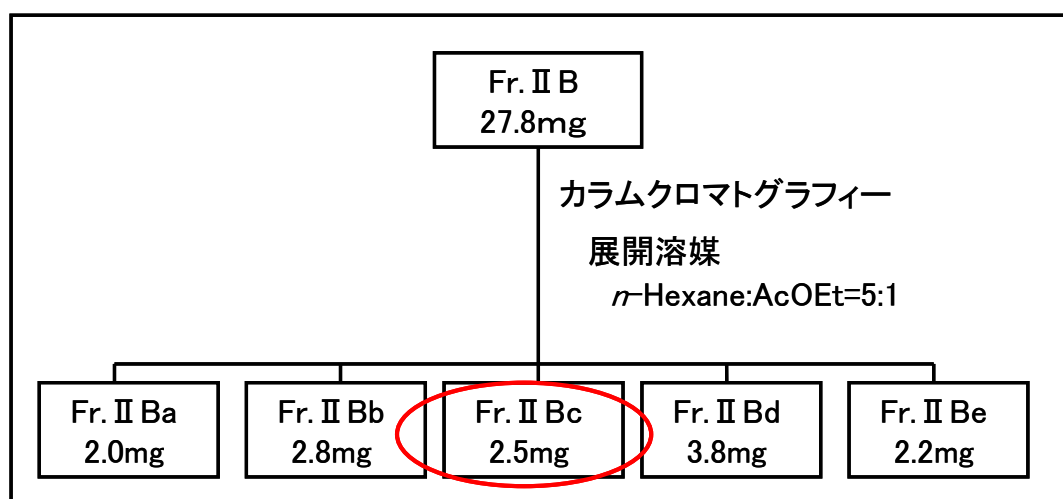


Table. 11 Fr. II B の分離



#### IV) 抗菌性物質の純度の分析

(第2章 第2節 第2項 Fig. 11)

Fr. II Bc を濃度が 10 mg/mL となるよう少量の AcOEt で溶かし、10  $\mu$  L のマイクロシリンジを用いて液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入し、分析した。分析は次のような条件で行った。

○展開溶媒 *n*-Hexane:AcOEt = 3:1

○流速 1.0 mL/min

○カラムサイズ直径 4.6 mm × 長さ 250 mm

○カラム担体 シリカゲル 5  $\mu$  m

○検出器 UV 検出器、波長 245 nm

ピークはリレーションタイム 3.4 と 8.8 に現れ、8.8 の方を目的の抗菌性物質とした。

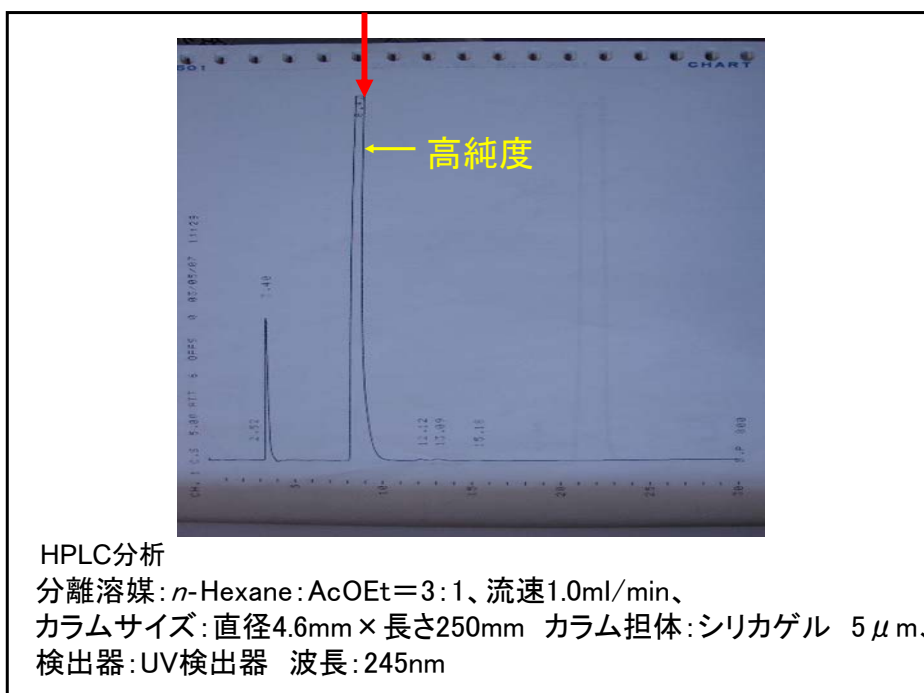


Fig. 11 抗菌性物質の HPLC による分析

## V) 抗菌性物質の活性試験

(第2章 第3節 第1項 Fig. 12 Fig. 13)

### 1) ペーパーディスク法による抗菌活性試験

#### 1) 抗菌活性用試験サンプルの調整

Fr. II Bc 2.5 mg を AcOEt 2.5 mL で溶解させ、2 mL ピペットを用いて 10 mL の容器に 1 mL 移した後、溶媒を留去した。この Fr. II Bc を DMSO 500  $\mu$ L で溶解し、これに滅菌水を加え、100  $\mu$ g/mL のサンプルを 10 ml 得た。このサンプルを分注し、さらに滅菌水を加え、①100  $\mu$ g/mL、②50  $\mu$ g/mL、③25  $\mu$ g/mL のサンプルを得た。

## 2) Poteto Sucrose Agar(以後 PSA)培地の調整

1 L の三角フラスコに蒸留水 1 L、さいの目に切ったじゃがいも 200 g を入れ、コッホ釜で、100°Cで 1 時間蒸した。別の1 L の三角フラスコに漏斗とガーゼを用いてろ過し、ろ液にスクロース 20 g、寒天 20 g を加え、攪拌した。その後、オートクレーブ(121°C、1 気圧、20 分間)で滅菌し、室温で保存した。培地は活性試験時に電子レンジで溶かし、滅菌シャーレ 1 枚あたり 20 mL 分注し、PSA 平板培地(Petridish  $\phi$  9 cm)を調整した。

## 3) Yeast Peptone(以後 YP)培地の調整

300 mL の三角フラスコに蒸留水 250 mL、YE 1.25 g、ペプトン 2.5 g、NaCl 1.25 g、寒天 3.75 g 加え、攪拌した。そして、オートクレーブ(121°C、1 気圧、20 分間)で滅菌し、室温で保存した。培地は、PSA 培地と同様に、滅菌シャーレ 1 枚あたり 20 mL ずつ分注し、YP 平板培地(Petridish  $\phi$  9 cm)を調整した。

#### 4) 植物病原菌の前培養

供試菌である5種の菌の分生子塊をPSA平板培地(Petridish  $\phi$  9 cm)およびYP平板培地に接種し、前培養を行った。菌は①植物炭疽病菌(*Colletotrichum actatum*)、②斑点落葉病菌(*Alternaria mali Roberts*)、③灰色カビ病(*Botrytis cinerea*)、④根頭癌腫病菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、⑤イチゴ炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)の5種であるが、①、②、③、⑤についてはPSA培地を用い、20°C、明所で5日間、④についてはYP培地で25°C、暗所で5日間培養した。活性試験時、形成した分生子塊を滅菌水に懸濁させ、孢子懸濁液( $3.3 \times 10^6$  / mL)にして用いた。なお、供試菌の保存は、4°C、暗黒下のインキュベーターで行った。

## 5) 抗菌活性試験

250 mL 三角フラスコに保存しておいた PSA 培地および YP 培地を電子レンジで溶かし、1 回の試験で平板培地 3 枚を用いた。この平板培地に孢子懸濁液を 300  $\mu$ L 滴下し、培地の表面に隙間なく流し込み、よく乾燥させた。滅菌ペーパーディスクを 5 箇所へのせ、これに、各濃度の抽出物および control (SDW)、DMSO を 40  $\mu$ L 添加し、①、②、③、⑤では 20°C、明所で 5 日間、④では 25°C の暗所で 5 日間それぞれ培養した。

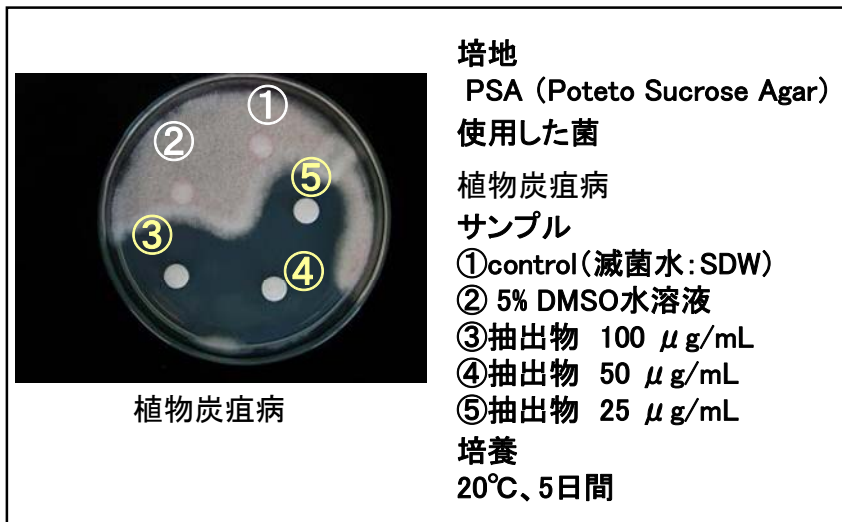


Fig. 12 植物炭疽病に対する活性試験

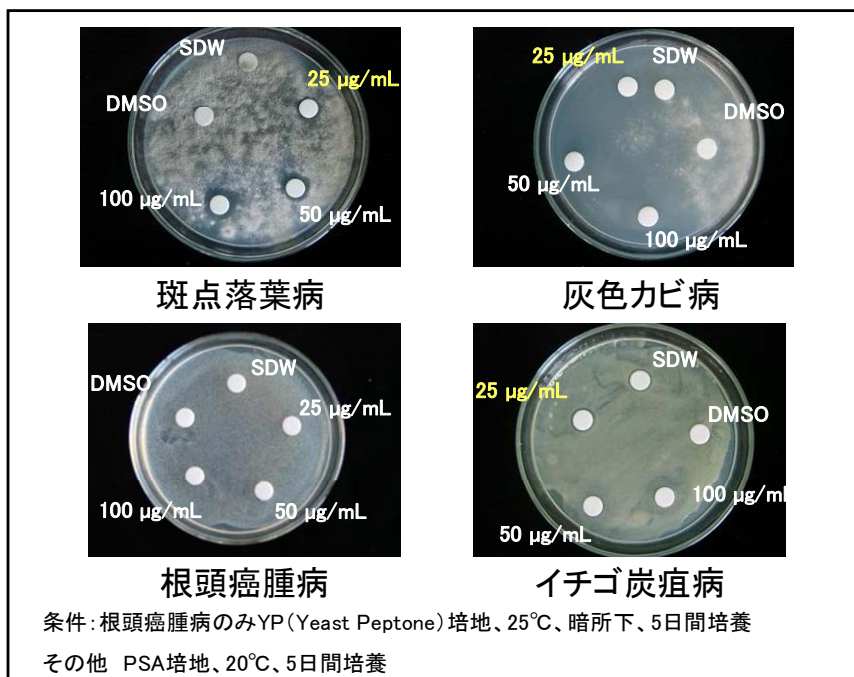


Fig. 13 植物病原菌に対する活性試験

Table. 8 ペーパーディスク法による活性試験\*

	<i>C.actatum</i>	<i>A.mali</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>C.gloeosporioides</i>
滅菌水	—	—	—	—	—
5%DMSO 水溶液	—	—	—	—	—
試料 1 (100 $\mu$ g/mL)	+++	++	+	—	+
試料 2 (50 $\mu$ g/mL)	+++	+	+	—	+
試料 3 (25 $\mu$ g/mL)	++	+	+	—	+

\*+++ : 阻止円の直径が 2.5 cm 以上

+ : 阻止円の直径が 1.5 cm 未満

++ : 阻止円の直径が 1.5 cm 以上 2.5 cm 未満

— : 抑制せず



## VI) 抗菌活性物質の TLC による分離

(第2章 第4節 第1項 A B C)

高活性な分画 Fr. II Bc を少量の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で溶かし、キャピラリーを用いて TLC (25 TLC plates  $5 \times 2$  cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) に滴下した。100 mL のバイアル瓶に展開溶媒を 2 mL 入れ、TLC を展開した。展開後、UV 吸収と鱗モリブデン酸の呈色によりスポットの確認を行った。用いた展開溶媒を下に示した。

A:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{Et}_2\text{O}$ :*n*-Hexane 系

①  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{Et}_2\text{O}$ :*n*-Hexane = 10:20:10

②  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{Et}_2\text{O}$ :*n*-Hexane = 10:20:15

③  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{Et}_2\text{O}$ :*n*-Hexane = 10:20:20

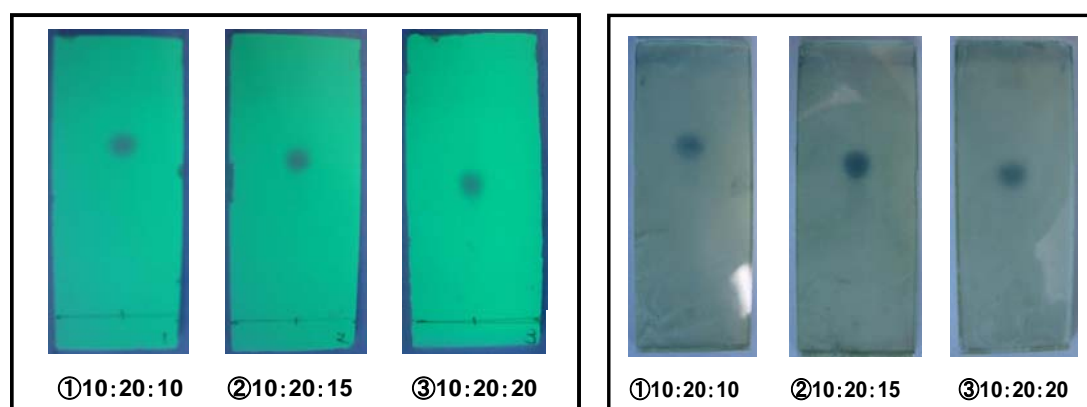


Fig. 15 展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{Et}_2\text{O}$ :*n*-Hexane での TLC 分析

B:  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  系

- ①  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 1:1:1$
- ②  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 1:1:5$
- ③  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 1:1:10$
- ④  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 1:2:1$
- ⑤  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 1:2:2$
- ⑥  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 1:2:5$
- ⑦  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 1:2:10$
- ⑧  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 10:1:1$
- ⑨  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 10:1:5$
- ⑩  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 = 10:1:10$

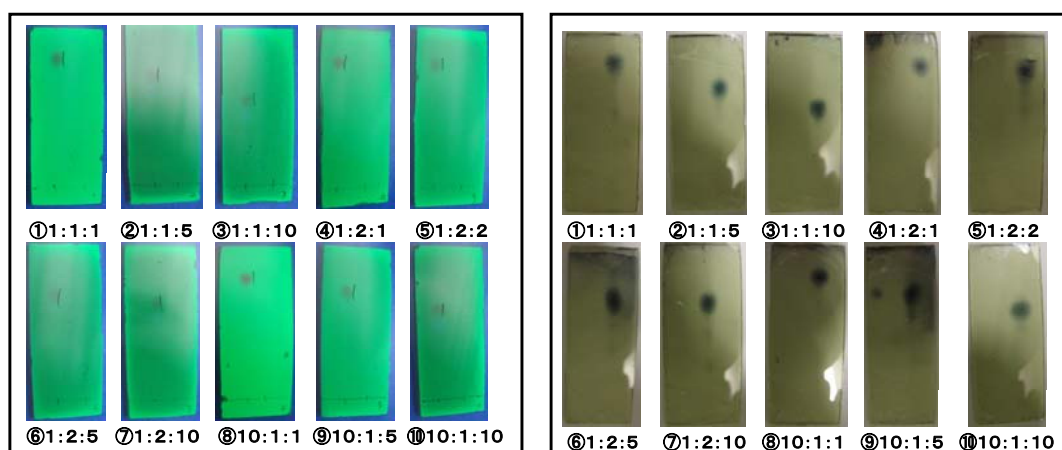


Fig. 16 展開溶媒  $\text{CHCl}_2:\text{Et}_2\text{O}:\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  での TLC

C: *n*-Hexane:AcOEt 系

① *n*-Hexane:AcOEt = 1:3

② *n*-Hexane:AcOEt = 1:1

③ *n*-Hexane:AcOEt = 5:1

④ *n*-Hexane:AcOEt = 10:1

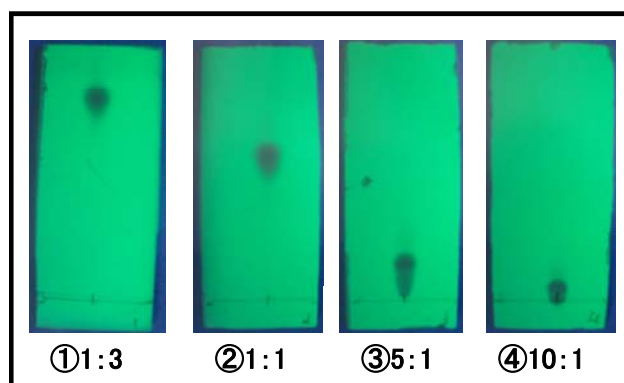


Fig. 17 展開溶媒 *n*-Hexane:AcOEt での TLC 分析

## VII) TLC の五重展開による分離

(第2章 第4節 第2項 Fig. 18 【分離工程を Table. 12 に示す】)

Table. 12 に示すように高活性な分画 Fr. II Bc を TLC (25 TLC plates 20×20 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) を用いて分離した。Fr. II Bc (3.0 mg) を展開溶媒 *n*-Hexane:AcOEt=5:1 によって展開した後、溶媒を乾燥させ、同様の溶媒で再び展開した。この操作を 5 回繰り返した後、溶媒を留去し、UV を基に Fr. II Bc i (0.2 mg)、Fr. II Bc ii (1.8 mg)、Fr. II Bc iii (0.2 mg)、Fr. II Bc iv (0.7 mg) を得た。

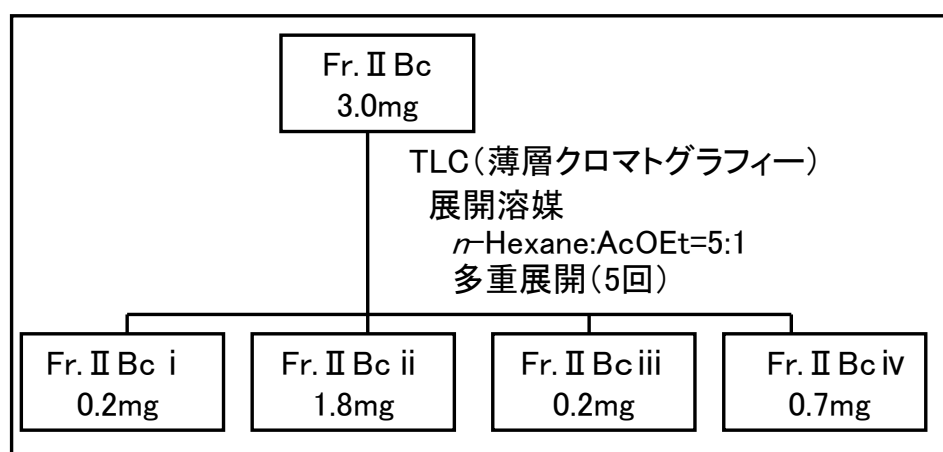


Table. 12 Fr. II Bc の分離

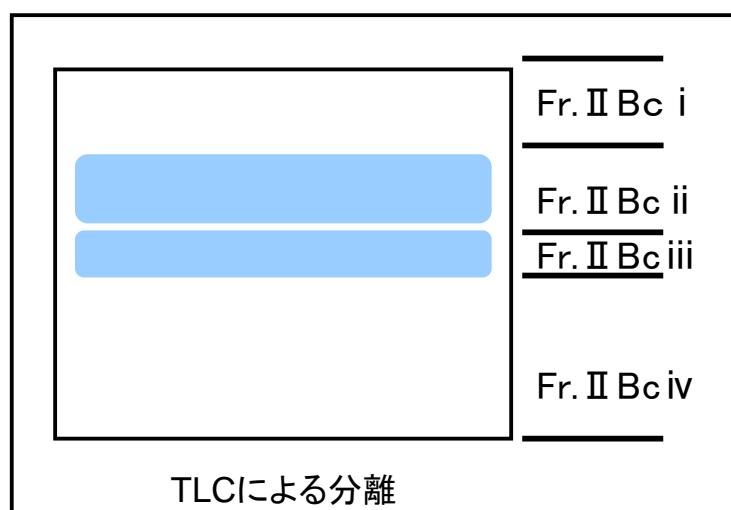


Fig. 18  $n$ -Hexane:AcOEt=5:1 による TLC の五重展開

VIII) Fr. II Bc i ~ iv の *p*-anisaldehyde による呈色

(第2章 第4節 第2項 Fig. 19)

1) 呈色液の調整

100 mL の試薬瓶に 99%EtOH 80 mL と *p*-anisaldehyde 10 mL を加え、さらに氷冷しながら濃 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 8 mL 加え、呈色液とした。

2) Fr. II Bc i ~ iv の五重展開および TLC の *p*-anisaldehyde による呈色

Fr. II Bc i ~ iv を TLC (25 TLC plates 5×2 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>) を用いて展開した。展開溶媒を *n*-Hexane:AcOEt=5:1 とし、五重展開した後、*p*-anisaldehyde の呈色液に浸し、600W のホットプレート上で約 1 分間加熱した。加熱後、浮かび上がったスポットを Fig.20 に示した。

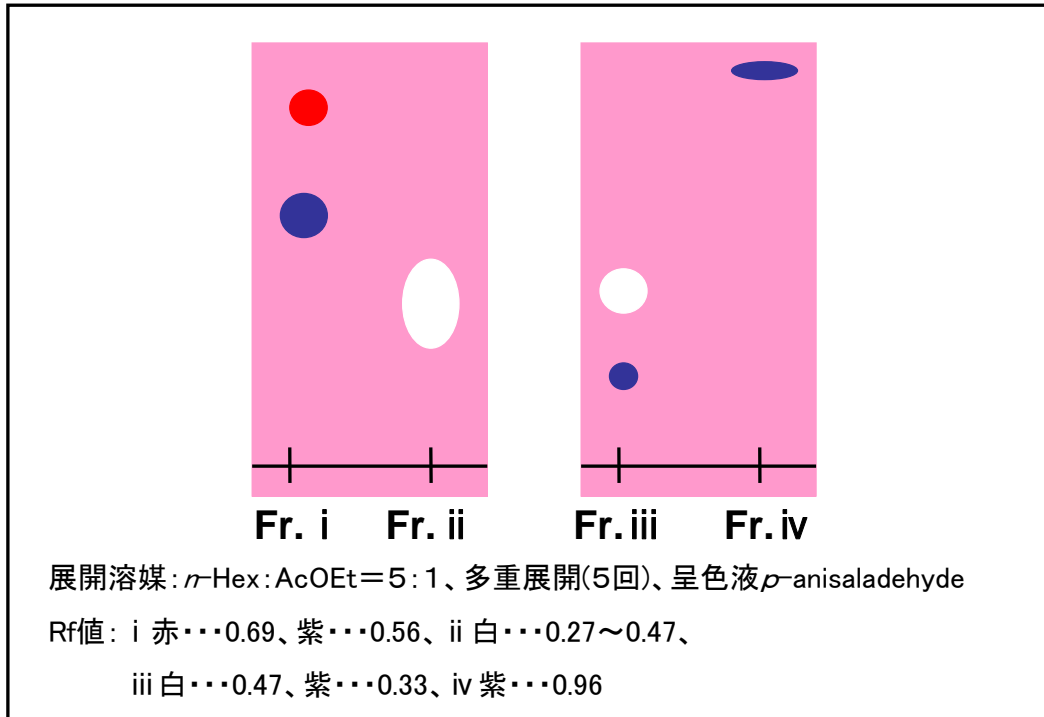


Fig. 19 TLC の *p*-anisaldehyde による呈色

## IX) Fr. II Bc i ~ iv の抗菌活性試験

(第2章 第4節 第3項)

### 1) 抗菌活性用試験サンプルの調整

Fr. II Bc i ~ iv をそれぞれ 5% DMSO 水溶液で溶かし、濃度を調整して 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるようにした。

### 2) 活性試験

抗菌活性試験は植物炭疽病菌 (*Colletotrichum actatum*) を用いた。前培養後、孢子懸濁液を作り、PSA 平板培地に孢子懸濁液を 300  $\mu\text{L}$  滴下し、培地の表面に隙間なく流し込み、よく乾燥させた。この平板培地を 6 枚用意し、3 枚ごとに 2 種類に分けた。滅菌ペーパーディスクを 4 箇所へのせ、1 種類には Fr. II Bc i、Fr. II Bc ii および control (SDW)、DMSO を 40  $\mu\text{L}$ 、もう 1 種には Fr. II Bc iii、Fr. II Bc iv および control (SDW)、DMSO を 40  $\mu\text{L}$  添加し、20°C、明所で 5 日間培養した。



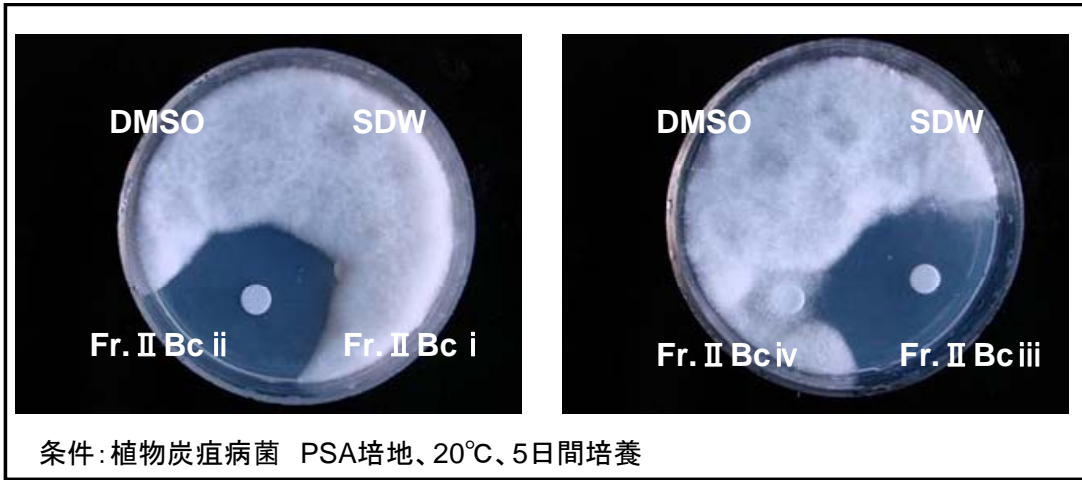


Fig. 20 Fr. II Bc i ~ ivの活性試験

## 参考文献

- 1) 齊藤洋監修, 2000, 『ニンニクの科学』, 朝倉書店, pp.2-12.
- 2) 湧永製薬株式会社, 『ニンニクを科学する』,  
<http://www.wakunaga.co.jp/garlic/side/what.html>
- 3) 青森県農林水産部, 1999, 「農林水産業の動向」, p.102.
- 4) 青森県田子町 HP, 「田子町」  
<http://www.net.pref.aomori.jp/takko/txt/c01main.htm>
- 5) Cyril B, 1930, ‘Ancient Egyptian Medicine’, “*The Papyrus – Translated from the German Version*”, Ares Publishers London.
- 6) 国史体形編集会編, 1980, 『続日本紀』, 卷 25, 吉川弘文館.
- 7) 大神神社史料編集委員会編, 1979, 『大同類聚法(安部真直撰)』,  
平凡社.
- 8) 朝倉屋藏版, 1979, 『医心方(丹波康頼選)』人民衛星出版社.
- 9) Pentz R., Guo Z., Kress G., Muller D., Muller B., and Sieger C.P.,  
1990, ‘Standarization of garlic powder preparations by estimation of  
free and hydrolysable SH groups’, ” *Planta Med.* ”, 56, p.691.
- 10) 齊藤和季, 野路征昭, 高橋秀樹, 1999, 「植物の硫酸同化系の分

子機構と制御」, 『化学と生物』, 37, pp.156-163.

- 11) Lancaster J.E., and Shaw M.L., 1989, ‘ $\gamma$ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(flavor precursors) in *Allium*’, “*Phytochemistry*”, 28, pp.455-466.
- 12) Ellmore G.S., and Feldberg R.S., 1994, ‘Allin lyase location in bundle sheaths of the garlic clove(*Allium Sativum*)’, “*American Journal of Botany*”, 81, pp.89-94.
- 13) Fenwick G.R, Hanley A.B., 1985, ‘The genus *Allium*.Part2. In Frita, T.E.(ed)’, “*Critical Review in Food Science and Nutrition*”, 22, CRC Press, Boca Raton, FL., pp273-377.
- 14) Cavlito C.J., and Bailey J.H., 1944, ‘Allicin, the antibacterial principle of *Allium sayivum*.I.Isolation, physical properties and antibacterial action’, “*Journal of the Americanchemical Sociery*”, 66, pp.1950-1951.
- 15) Block E., and Ahmad S., 1984, ‘(*E,Z*)-ajoene;A potent antihrombotic from garlic’, “*Journal of the Americanchemical Sociery*”, 106, pp.8295-8296.
- 16) Apitz - Castro R., Escalante J., Vargas R., Jain M.K., 1986,

‘Ajoene, the antiplatelet principle of garlic, synergistically potentiates the antiaggregatory action of prostacyclin, forskolin, Indomethacin and dipyridamole on human plates’, “*Thrombosis Research*”, 42, pp.303-311.

17) Jeong H.G., and Lee Y.W., 1998, ‘Protective effects of diallyl sulfide on N-nitrosodimethylamine—induced Immunosuppression in mice’, “*Cancer Letters*”, 134, pp.73-79.

18) Matsuura H., Ushiroguti T., Itakura Y., Hayashi N., and Fuwa T., 1998, ‘A furostanol glycoside from garlic, bulbs of *Allium sativum L*’, “*Chemical and Pharmaceutical Bulletin*”, 36, pp.3659-3663.

19) Koderu Y., Matsuura H., Yoshida S., Sumida T., Itakura Y., Fuwa T., and Nishio H., 1989, ‘Allixin, a stress compound from garlic’, “*Chemical and Pharmaceutical Bulletin*”, 37, pp.1656-1658.

20) Nishio H., Nishio A., Takayasu J., Iwashima A., Itakura Y., Koderu Y., Matsuura H., and Fuwa T., 1990, ‘Antitumor-promoting Activity of allixin, a stress compound produced by garlic’, “*Cancer Journal*”, 3, pp.20-21.

21) Abdel - Fattah A.F., 1970, Khaireldin, A.A. Pectin of garlic skins.

*U.A.R.J.Chem.*,13, 27-37.

- 22) Abdel-Fattah A.F., Edrees M.A., 1972, 'study on the Ccomposition of garlic skins and the structural features of the isolated pectic acid.', "Journal of the Science of Food and agriculture", 23, pp.871-877.
- 23) Alexander M.M., 1973, 'Sulebele, G.A.Pecyic substances in onion and garlic skins.', "Journal of the Science of Food and agriculture", 24, pp.611-615.
- 24) Schmidlein H., 'Herrmann, K.On the phenolic acids of vegetables. IV.Hydroxycinnamic acids and hydroxybenzonic acids of vegetables and potatoes', "Z.Lebesm.Unters.-Forsch", p.159, pp.255-263.
- 25) Ichikawa M., 2003, 'Identification of Six Phenylpropanoids from Garlic Skin as Major Antioxidants', "Jourenal of Agricultural and Food Chemistry", 51, pp.7313-7317.
- 26) 日本道路公団東北支社, 2003, 「果樹園に近接する道路植生管理の作業指針(案) 特にニセアカシア樹のリンゴ炭疽病保菌の危険防止対策」, pp.1-24.
- 27) Sutton, B. C., 1992, 'The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In BAILEY,' J. A. and M. J. JEGER ed.

“*Colletotrichum Biology, Pathology and Control*”. CAB International,  
Wallingford, pp.1-26.

- 28) Simmonds, J. H.,1965, *Qd. J. Agric. Anim. Sci* 22, pp.437-459.
- 29) 石川成寿ら, 1992, 『関東病虫研報』, 39, pp.129-133.
- 30) 佐藤豊三ら,1992, 『日植病報』, 58, p.554(講要).
- 31) 築尾嘉章ら, 1993, 『九病虫研会報』 39, pp.32-35.
- 32) 佐藤豊三, 1996, 「炭疽病菌の分類の問題点と同定法」, 『植物防疫』,50, p.278.
- 33) 手塚信夫, 牧野孝宏, 1989, 『関東病虫研報』, 36, pp.92-94.
- 34) 楠幹生ら, 1991, 『日植病報』 57, p.431.
- 35) 岡山健夫ら, 1991, 『関西病虫研報』, 33, pp.15-19.
- 36) 築尾嘉章, 小林紀彦, 1991, 『九病虫研会報』 37, pp.23-26.
- 37) 高松進ら, 1989, 『日植病報』, 55, p.524.
- 38) 三浦靖ら, 1993, 『日植病報』, 59 pp.77-78.
- 39) 楠幹生ら, 1992, 『香川農試研報』, 43, pp.29-35.
- 40) 三浦靖ら, 1994, 『香川農試研報』, 45, pp.59-62.
- 41) 松尾和彦, 1992, 『今月の農業』, 36(11), pp.42-45.
- 42) 中澤靖彦ら, 1993, 『日植病報』, 59, pp.102-103.

- 43) 日本植物病理学会 殺菌剤耐性菌研究会 編, 1998, 「植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル」, pp.41-42.
- 44) 製品安全データシート クミアイ化学工業株式会社 HP  
[http://www.kumiai-chem.co.jp/msds/ra-wa/laviright\\_s.pdf](http://www.kumiai-chem.co.jp/msds/ra-wa/laviright_s.pdf)
- 45) 佐々木成俊, 2005, 「ゼロ・エミッションを志向して ニンニクの皮からの抗菌性物質」 弘前大学教育学部修士学位論文.

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始多大なる御指導およびご助言を頂きました北原晴男教授に深く感謝致します。

植物病理学のご指導ならびに抗菌活性試験を行っていただきました弘前大学農学生命科学部植物病理学研究室 田中和明助教授、原田幸雄名誉教授、佐野輝男教授、共同実験者の田中研究室卒業生 三浦さんに深く感謝致します。

本研究においてニンニクの皮の提供をしていただきました青森県畑作園芸試験場 岩瀬利己氏、田子町農業協同組合たっこにんにく課の方々に深く感謝致します。

最後に、公私にわたり御協力、御助言を賜りました弘前大学教育学部有機化学研究室修了生の十川和広先生、熊澤健一先生、卒業生の庄司哲也さん、澤谷優さん、4年生の石田幸也さん、大宮亜由美さん、西尾誉花さん、村上真那さん、弘前大学教育学部有機化学研究室内の皆様に心より感謝いたします。

誠にありがとうございました。