

研究の動向



■ ショウガの抗菌活性

鳴門教育大学 西川 和孝

1. はじめに

ショウガ (*Zingiber officinale* Roscoe) は、ショウガ科に属する多年生草本で、食生活においては香辛料として使用されている。また、ショウガの根茎（以下、ショウガと略す）のコレク皮（外皮）を除いて、乾燥したものを生姜といい、薬用として古くから使用されている。その特徴としては、特異の香気と強い辛味があげられる¹⁾²⁾。ショウガの辛味成分は、gingerol 類、shogaol 類等であり、抗酸化活性、抗腫瘍活性、抗アレルギー活性、強心活性、抗菌活性等の数多くの生物活性を示すことが報告されている^{3)~7)}。

通常、ショウガは二倍体 ($2n=22$) であるが、Adaniya らがコレヒチン処理による育種学的手法を用いることによって、四倍体ショウガ ($2n=44$) の作出を可能にした^{8)~10)}。これによって、ショウガの大量増殖、花粉稔性向上等に大きく寄与した。また、四倍体ショウガは二倍体ショウガに比べ大型化することが報告されている^{8)~10)}、四倍体ショウガの辛味成分についての報告はほとんどない。そこで、四倍体ショウガに含まれる辛味成分の化学構造を解析し、二倍体および四倍体ショウガの辛味成分の比較を行った。さらに、ショウガの抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性を測定し、四倍体ショウガの食品素材としての有用性について紹介する^{11)~14)}、*1。

2. ショウガの材料

ショウガは高知県産の「黄金の里」を用いた。四倍体ショウガの作出は、Adaniya らの方法に従い、茎頂を 0.2% (w/v) コレヒチンを含む 2.0 mg/L BA (benzyladenine) および 0.05 mg/L NAA (naphthaleneacetic acid) を添加した MS (Murashige & Skoog) 培地にて 8 日間処理

後、MS 培地にて植物体を作成した^{8)~10)}。植物体は圃場に順化後、栽培して根茎を得た。二倍体ショウガは、処理をしない茎頂を同様に培養および順化後、根茎を得た。コレヒチン処理後に再生した植物体と処理後順化して約 1 年経過した植物体について染色体を観察した。染色体数の確認は Adaniya らの方法に従い、二倍体および四倍体ショウガを同定した^{8)~10)}。ショウガは収穫・貯蔵後、冷凍保存 (-50°C) し、分析に用いた。

3. 辛味成分の抽出と単離、同定

四倍体ショウガ (乾燥重量 37.47 g) をジクロロメタン (400 mL×4) およびメタノール (400 mL×4) で抽出した (全体で 16 時間、室温下)。得られた抽出エキスをエバポレーターにて濃縮した。濃縮エキスに水を混合し Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付した。さらに得られた画分を、Preparative C18 125 Å, Sephadex LH-20 等のカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 1 (196.5 mg) および 2 (32.2 mg) を単離した (図 1)。各化合物の ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルは、それぞれ 500 MHz および 125 MHz にて測定した。その結果、化合物 1 を [6]-gingerol (¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 0.90 (3 H, t, $J=7.1$ Hz, H-10), 1.30 (6 H, m, H-7,8,9), 1.40 (2 H, m, H-6), 2.49 (1 H, dd, $J=4.6, 15.9$ Hz, H-4b), 2.55 (1 H, dd, $J=8.0, 15.9$ Hz, H-4a), 2.78 (4 H, t, $J=10.0$ Hz, H-1,2), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.95 (1 H, m, H-5), 6.63 (1 H, dd, $J=2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 6.68 (1 H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.77 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 14.3 (C-10), 23.6 (C-9), 26.3 (C-7), 30.3 (C-1), 32.9 (C-8), 38.3 (C-6), 46.3 (C-2), 51.3 (C-4), 56.4 (-OCH₃), 68.9 (C-5), 113.2 (C-2'), 116.2 (C-5'), 121.7 (C-6'), 134.1 (C-1'), 145.8 (C-4'), 148.9 (C-3'), 212.1 (C-3)), 化合物 2 を [6]-dehydroparadol (¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 0.92 (3 H, t, $J=7.0$ Hz, H-10), 1.35 (8 H, m, H-6,7,8,9), 1.65 (2 H, t, $J=7.5$ Hz, H-5), 2.36 (2 H, t, $J=7.5$ Hz, H-4), 3.90 (3 H, s,

Kazutaka NISHIKAWA

鳴門教育大学学校教育学部 教授

〔著者紹介〕(略歴) 鹿児島大学大学院連合農学研究科博士後期課程修了。博士 (農学)。高知県庁入庁後、鳴門教育大学講師、准教授、2014 年より現職。2005 年より兵庫教育大学大学院連合学校教育学研究科兼任。

〔専門分野〕食物学 (食品学、栄養学、調理学)、栄養教育

四倍体シヨウガ根茎 (*Zingiber officinale* Roscoe)
(乾燥重量 37.47 g)

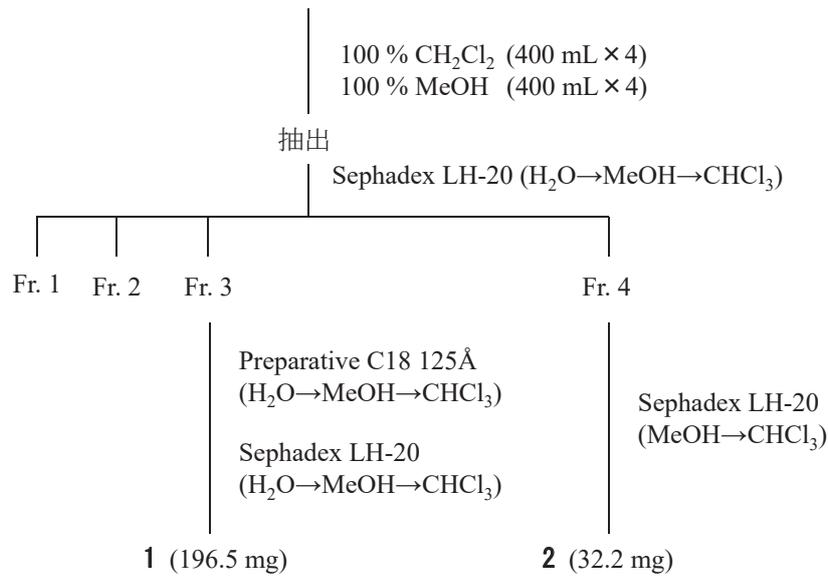
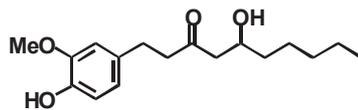
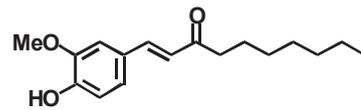


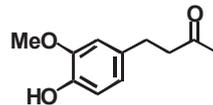
図1 四倍体シヨウガ根茎から化合物の単離・精製



[6]-gingerol (1)



[6]-dehydroparadol (2)



zingerone (3)

図2 実験で用いたシヨウガの辛味成分

-OCH₃), 6.48 (1 H, d, $J=15.9$ Hz, H-1), 6.83 (1 H, dd, $J=8.2, 10.4$ Hz, H-5'), 7.05 (1 H, dd, $J=1.7, 8.2$ Hz, H-6'), 7.16 (1 H, d, $J=1.5$ Hz, H-2'), 7.50 (1 H, d, $J=15.5$ Hz, H-2). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 14.2 (C-10), 23.4 (C-9), 26.4 (C-5), 30.3 (C-7), 32.4 (C-6), 33.0 (C-8), 40.9 (C-4), 56.5 (-OCH₃), 111.8 (C-2'), 116.6 (C-5'), 121.0 (C-1), 123.8 (C-6'), 128.6 (C-1'), 141.5 (C-2), 149.5 (C-4'), 150.3 (C-3'), 201.5 (C-3)) と同定した^{15)~17)} (図2). [6]-Gingerol (1) は, 二倍体シヨウガの主な辛味成分であることが知られているが, 四倍体シヨウガにも同様に含まれていた. また同時に単離した [6]-dehydroparadol (2)

は, Surh らによる報告はあるが¹⁶⁾¹⁷⁾, 四倍体シヨウガから単離した報告はなく, 新しい知見として注目される.

4. 二倍体および四倍体シヨウガの辛味成分の比較 (HPLC 分析)

二倍体および四倍体シヨウガの辛味成分の比較は, 高速液体クロマトグラフィー (日本分光 HSS-900 HPLC スーパーバイザシステム. 以下, HPLC と略す) により行った. 凍結乾燥したシヨウガ (約 20 mg) を 50% (v/v) 水性エタノールにて室温下16時間抽出した. 抽出液をミリポアフィルター (0.22 μ m, Millipore, USA) にて濾過し, 各抽出エキス (2 mL) を25°C 遠心エバポレーター

(UNIVAPO 100H, UNIJET II, UniEquip, Germany) にて濃縮後、滅菌蒸留水を加えて 2 mL に秤量した。得られた抽出エキスを HPLC 分析に供した¹⁸⁾。HPLC 分析の条件は、以下のとおりである。カラム：TSK-gel ODS 80Ts (4.6 mm i.d.×250 mm), 移動相溶媒：メタノール：水 (9:1 (v/v), 40 min), 流速：0.4 mL/min, カラム温度：40°C, 検出：280 nm, 保持時間 (min)：[6]-gingerol (1) (8.79), [6]-dehydroparadol (2) (9.46), zingerone (3) (7.55)。Zingerone (3) は市販品 (Sigma-Aldrich) を用いた。化合物の同定は、保持時間とフォトダイオードアレイ検出器による UV スペクトルの比較により行った。

これらの化合物 (1, 2) と関連化合物である zingerone (3) について、HPLC 分析を行った。その結果、二倍体および四倍体ショウガともに [6]-gingerol (1) が乾燥重量当たり 0.74% [237 µg/mL] (二倍体), 0.64% [206 µg/mL] (四倍体) 含まれていた (表 1)。また、[6]-dehydroparadol (2) は、[6]-gingerol (1) 程多くはないが乾燥重量当たり 0.07% [12 µg/mL] (二倍体), 0.09% [14 µg/mL] (四倍体) 含まれていた。[6]-Gingerol (1) および [6]-dehydroparadol (2) 含量は、ともに二倍体および四倍体ショウガ間で有意差はなかった。また、zingerone (3) はほとんど検出されなかった (表

表 1 二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスに含まれる辛味成分濃度 (% 乾燥重量, [] : µg/mL)

辛味成分	二倍体	四倍体
[6]-Gingerol	0.74 [237]	0.64 [206]
[6]-Dehydroparadol	0.07 [12]	0.09 [14]
Zingerone	tr [-]	tr [-]

値は平均値を示した (n = 5)。tr: trace

1)。実際に食してみても辛味成分の違いはほとんど感じられず、二倍体および四倍体ショウガの辛味成分の組成は、ほとんど変わらないことが明らかとなった。

5. ショウガの抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性

ショウガの抽出エキスおよび辛味成分について、グラム陰性菌の *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* PAO4290, *Salmonella typhimurium* LT2, *Salmonella enteritidis* 11654, *Vibrio parahaemolyticus* Na2, *Yersinia enterocolitica* SYT-11-72 およびグラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Listeria monocytogenes* 4A (AFISC2318), *Bacillus cereus* IFO3131 に対する抗菌テストを行った^{18)~20)}。各種培養条件は、表 2 に示した。各サンプルの最小発育阻止濃度 (以下、MIC と略す) は、微量液体希釈法により各種薬剤濃度に対する感受性を検査して算出した。また、対照薬剤として penicillin G および erythromycin を用いた。最初の接種菌量は、 2×10^5 cfu/mL に調製した¹⁸⁾。24時間培養後、各サンプルの抗菌活性をマイクロプレートリーダー (655 nm 検出, Model 450, Bio-Rad, USA) によって MIC 値を測定した。

(1) ショウガの抽出エキスの抗菌活性

二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスの抗菌スペクトルおよび MIC 値を表 3 に示す。各抽出エキスは供試したグラム陽性菌に対し、高い抗菌活性を示した。特に、二倍体および四倍体ショウガともに、*Staphylococcus aureus* および *Bacillus cereus* に対し、明らかな抗菌活性を示した (MIC 値 : 4 mg/mL)。また、*Listeria monocytogenes* に対する MIC 値も 8 mg/mL (二倍体) および 4 mg/mL (四倍体) と比較的高いことがわかった。一方、グラム陰性菌に対しては、低い抗菌活性であり、今回調査した菌種 (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*

表 2 供試菌と培養条件

供試菌	培地	培養温度 (°C)
グラム陰性菌		
<i>Escherichia coli</i>	Nutrient broth	35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nutrient broth	35
<i>Salmonella typhimurium</i>	Nutrient broth	35
<i>Salmonella enteritidis</i>	Nutrient broth	35
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Nutrient broth (1.0% NaCl 添加)	35
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Nutrient broth (0.5% NaCl 添加)	30
グラム陽性菌		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nutrient broth	35
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nutrient broth	35
<i>Bacillus cereus</i>	Nutrient broth (0.5% NaCl 添加)	35

および *Yersinia enterocolitica*) および濃度において抗菌活性を示さなかった. *Pseudomonas aeruginosa* および *Vibrio parahaemolyticus* に対しては, 二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスの MIC 値は 16 mg/mL とわずかな抗菌活性を示した. これは, 植物由来の抽出エキスがグラム陰性菌よりグラム陽性菌に対し感受性を示すというこれまでの報告と一致していた¹³⁾¹⁸⁾. 以上の結果から, 二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスに含まれている化合物が, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* および *Listeria monocytogenes* のグラム陽性菌に対し, 比較的高い抗菌活性を示すことが明らかとなった.

(2) ショウガに含まれる辛味成分の抗菌活性

次に, ショウガに含まれる辛味成分と抗菌活性の関連性について調査した. 辛味成分の抗菌スペクトルおよび MIC 値を表 4 に示す. その結果, [6]-dehydroparadol (2) および zingerone (3) は抗菌活性を示さないものも

表 3 二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスの抗菌活性 (MIC 値 mg/mL)

供試菌	二倍体	四倍体
グラム陰性菌		
<i>Escherichia coli</i>	>16	>16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	16
<i>Salmonella typhimurium</i>	>16	>16
<i>Salmonella enteritidis</i>	>16	>16
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16	16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>16	>16
グラム陽性菌		
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	8	4
<i>Bacillus cereus</i>	4	4

あり, グラム陰性菌よりもグラム陽性菌に対してわずかに抗菌活性を有する程度であった. 一方, [6]-gingerol (1) は, 今回調査したすべての細菌に対して抗菌活性を示し, グラム陰性菌よりもグラム陽性菌に対して抗菌活性を示す傾向があった. 特に, [6]-gingerol (1) の MIC 値は, *Staphylococcus aureus* に対し 250 µg/mL, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* および *Bacillus cereus* に対し 500 µg/mL であった. また, *Pseudomonas aeruginosa* および *Bacillus cereus* に対して, [6]-dehydroparadol (2) の抗菌活性は zingerone (3) より高い活性を示した. これは, gingerol 類の炭素鎖長の違いが抗菌活性と関連する Yamada らの報告と同様の傾向を示した¹²⁾.

四倍体ショウガに含まれる辛味成分の抗菌活性は penicillin G や erythromycin のような市販の抗生物質と比べ低い活性であった (表 4). しかし, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* および *Bacillus cereus* に対して, [6]-gingerol (1) の抗菌力は penicillin G の抗菌力の 1/2 から 1/4 程度であった. また, *Pseudomonas aeruginosa* に対して, [6]-gingerol (1) および [6]-dehydroparadol (2) の抗菌力は erythromycin の抗菌力の 1/4 から 1/8 程度であり, penicillin G よりも高い活性を示した. したがって, 抗菌活性を有する四倍体ショウガは, 今後有用な食品素材であると考えられる.

6. 終わりに

Dhawan らは, 倍数体を作成するとその二次代謝成分は増加する傾向があると報告している²¹⁾. しかし, 今回調査したショウガの場合, 辛味成分に変化は認められなかった. 四倍体ショウガは大型化されるが^{8)~10)}, 辛味成分は保持されており, その食品としての有効性は変わらないと考えられる. また, ショウガの抗菌活性の結果か

表 4 ショウガの辛味成分の抗菌活性 (MIC 値 µg/mL)

供試菌	[6]-Gingerol	[6]-Dehydroparadol	Zingerone	Penicillin G	Erythromycin
グラム陰性菌					
<i>Escherichia coli</i>	1,000	>1,000	>1,000	15	62.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	1,000	>1,000	>1,000	125
<i>Salmonella typhimurium</i>	1,000	>1,000	>1,000	0.25	125
<i>Salmonella enteritidis</i>	1,000	>1,000	>1,000	0.5	125
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	500	1,000	1,000	250	4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,000	>1,000	>1,000	250	64
グラム陽性菌					
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	1,000	1,000	0.03	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	500	1,000	1,000	4	62.5
<i>Bacillus cereus</i>	500	1,000	>1,000	125	0.25

ら、二倍体および四倍体ショウガの抽出エキスおよび [6]-gingerol (1) がグラム陽性菌に対し、比較的高い抗菌活性を示した。MIC 値の結果より、四倍体ショウガの抽出エキスおよび辛味成分の抗菌活性は penicillin G や erythromycin のような市販の抗生物質と比べ低い活性であった。しかしながら、近年の食生活のグローバル化や多様化、健康指向による低塩化は、香辛料の使用を増大させている。そのため今回の研究材料である四倍体ショウガは新たな香辛料の一つとして、合成保存料とは違った可能性があるのではないかと考えられる。

脚注

*1 本稿は、引用文献14) をもとに作成している。本研究の一部は、浦上食品・食文化振興財団の研究助成を受けたものである。

参考・引用文献

- Zarate, R.; Yeoman, M. M. Studies of the cellular localization of the phenolic pungent principle of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. *New Phytol.* 1994, Vol. 126, 295-300.
- Coe, F. G.; Anderson, G. J. Ethnobotany of the Garifuna of Eastern Nicaragua. *Econ. Bot.* 1996, Vol. 50, 71-107.
- Ficker, C.; Smith, M. L.; Akpagana, K.; Gbeassor, M.; Zhang, J.; Durst, T.; Assabgui R.; Arnason, J. T. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother. Res.* 2003, Vol. 17, 897-902.
- 山原條二, 畠山祥子, 谷口久美子, 河村芽理, 吉川雅之. 生姜の健胃作用成分 (第2報) 台湾産生姜 (*Zingiberis Rhizoma*) 脂溶性成分の辛味及び抗潰瘍作用. 新規ジアリルヘプタノイドの化学構造. 薬学雑誌. 1992, Vol. 112, 645-655.
- Kikuzaki, H.; Nakatani, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.* 1993, Vol. 58, 1407-1410.
- 黄啓榮, 松田久司, 酒井香代子, 山原條二, 玉井洋進. ショウキョウのセロトニンによって誘発された体温低下及び下痢に対する作用. 薬学雑誌. 1990, Vol. 110, 936-942.
- 山原條二, 松田久司, 山口祥子, 下田博司, 村上啓寿, 吉川雅之. 生姜修治の薬理的な解明. I. Gingerol 類及び Shogaol 類の抗アレルギー活性及び強心活性. *Natural Medicines*. 1995, Vol. 49, 76-83.
- Adaniya, S.; Shirai, D. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci. Hort.* 2001, Vol. 88, 277-287.
- Adaniya, S. Optimal pollination environment of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) evaluated by in vitro pollen germination and pollen tube growth in styles. *Sci. Hort.* 2001, Vol. 90, 219-226.
- 岡田昌久, 松本満夫. 組織培養による大ショウガ4倍体系統の育成. 高知農技七研報. 1993, Vol. 2, 37-40.
- Karuppiyah, P.; Rajaram, S. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012, Vol. 2, 597-601.
- Yamada, Y.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. Identification of antimicrobial gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Antibact. Antifung. Agents*. 1992, Vol. 20, 309-311.
- Alzoreky, N. S.; Nakahara, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, Vol. 80, 223-230.
- Nishikawa, K.; Patar, A.; Tanaka, N.; Ishimaru, K. Antibacterial activities of extracts and constituents in the rhizomes of diploid and tetraploid gingers (*Zingiber officinale* Roscoe). *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2013, Vol. 20, 215-220.
- Agarwal, M.; Walia, S.; Dhingra, S.; Khambay, B. P. Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. *Pest Manag. Sci.* 2001, Vol. 57, 289-300.
- Surh, Y. J.; Lee, S. S. Enzymatic reduction of xenobiotic α,β -unsaturated ketones: formation of allyl alcohol metabolites from shogaol and dehydroparadol. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1994, Vol. 84, 53-61.
- Locksley, H. D.; Rainey, D. K.; Rohan, T. A. Pungent compounds. Part I. An improved synthesis of the paradols (alkyl 4-hydroxy-3-methoxyphenethyl ketones) and an assessment of their pungency. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. 1972, 3001-3006.
- Patar, A.; Nishikawa, K.; Tanaka, N.; Ishimaru, K.; Maeda, H. Antibacterial activities of extracts and constituents in the complex of tea catechins and soybean protein. *Jpn. J. Food Chem.* 2003, Vol. 10, 161-164.
- Nakasone, N.; Iwanaga, M. The role of pili in colonization of the rabbit intestine by *Vibrio parahaemolyticus* Na2. *Microbiol. Immunol.* 1992, Vol. 36, 123-130.
- Matsuoka, K.; Kurebayashi, T.; Kimura, K. Regulation and properties of glutamine synthetase purified from *Bacillus cereus*. *J. Biochem.* 1985, Vol. 98, 1211-1219.
- Dhawan, O. P.; Lavania, U. C. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*. 1996, Vol. 87, 81-89.