

機能性飼料開発に向けたトウモロコシおよびソバにおけるポリフェノールに関する分析手法の確立と植物生理学的研究

江口研太郎¹⁾

(2011年1月11日 受理)

要 旨

江口研太郎 (2011) 機能性飼料開発に向けたトウモロコシおよびソバにおけるポリフェノールに関する分析手法の確立と植物生理学的研究。九州沖縄農研報告 56: 1-37.

植物に含まれる二次代謝産物、ポリフェノールは植物の生育に不可欠な物質ではないが、紫外線などの環境ストレスから植物組織を保護するために蓄積されると考えられている。本研究では、飼料用機能性トウモロコシの育種素材の確保のため、紫トウモロコシ在来種のアントシアニン含量、ポリフェノール含量ならびに DPPH ラジカル消去活性の変異を調査し、その結果、ペルー産の在来種が機能性に優れることを明らかにした。次に、ペルー産の在来種を由来とする機能性に優れる紫トウモロコシ品種の育成に有効な近赤外分光分析による迅速定量法を開発した。穂芯と茎葉ではアントシアニン含量と DPPH ラジカル消去活性を精度よく推定する検量線を作成することができた。紫トウモロコシを材料として、サイレージ調製を行った。その結果、サイレージ発酵してもアントシアニンが発酵品質を左右することはないことが明らかとなった。ソバを材料として、紫外線照射を環境要因としたアントシアニン含量の変動解析を行った。その結果、アントシアニンに結合する糖鎖は、外的環境に応じて変化することが明らかになった。また、ソバに含まれ、家畜の光線過敏症を誘発するファゴピリンについて、高速液体クロマトグラフィーを使った正確な定量法を開発し、ダットンソバよりも普通ソバの方がファゴピリン含量は少ないこと、および、ソバの穀実にファゴピリンはほとんど含まれていないことを明らかにした。

キーワード：アントシアニン、サイレージ、ソバ、トウモロコシ、ファゴピリン。

I. 緒 言

家畜飼料には品質保持や栄養補助を目的として多くの飼料添加物が使われている。しかし、日本国内では近年、植物が本来有する生体防御機能を活用し、抗生物質や抗菌剤の使用を極力抑えて、より安全な畜産物を生産しようとする動きが高まっている。このように飼料添加物に頼らずに、作物が本来有する二次代謝産物を由来とした機能性成分を、家畜の健康増進に役立てようとする農業体系は、広い意味で循環型農業と解釈することができる。二次代謝産物に着目した研究は、食品開発分野においていち早く行われてきた。食品には、栄養性、嗜好性に加え、「病気を予防する」という機能があり、この3番目の機能を指す食品として「機能性食品」という言葉が誕生した。機能性食品には植物由来の二次代謝産物に着目して作られた製品も多い。緑茶「べにふうき」

に含まれるメチル化カテキンの抗アレルギー作用 (山本 2006)、紫サツマイモ「アヤムラサキ」に含まれるアントシアニンの血圧降下作用 (小林ら 2005) などが有名である。最近では、飼料開発分野においても、植物由来の二次代謝産物に着目した機能性飼料に関する研究が増えている (堀之内ら 2007; 佐伯 2007)。

食品研究分野では、天然色素としてアントシアニンをういた製品が多く開発されている。アントシアニンは、フラボノイド系ポリフェノールの一種で、抗酸化作用 (Navindra et al. 2006; Francesco et al. 2007)、血圧降下作用 (小林ら 2005)、抗変異原性 (五十嵐ら 2004) など多くの機能を示すことが知られている。アントシアニンは、単胃動物のラットなどにおいて胃 (Severine et al. 2003)、腸 (Miyazawa et al. 1999; Talavéra et al. 2003) から吸収され血流を介して複数の臓器に運ばれることが

知られている (Mazza et al. 2002)。また、ヒトにおいては、経口摂取により上昇した血中のアントシアニン濃度と血中の抗酸化状態には正の相関関係があることが報告されている (Mazza et al. 2002)。

飼料研究分野では、アントシアニン含有の紫トウモロコシの飼料特性が明らかにされるとともに、乳牛への給与が健康等に及ぼす影響が検証されてきた (農林水産省 2009)。それによると、紫トウモロコシのサイレージを乳牛に給与すると、血液の抗酸化状態が上昇すると報告されている。また、乳牛の血液中の肝機能指標である GOT, GPT, γ -GTP を改善させたことから、その給与は肝機能の強化に効果があるとも報告されている。また、ウシ第一胃液に対するアントシアニンの安定性は高いことが報告されている (Hosoda et al. 2009)。乳牛は活性酸素などの酸化ストレスに常にさらされていると考えられており (Castillo et al. 2006)、酸化ストレスによって引き起こされる乳生産性の低下を軽減するために、家畜に対して抗酸化物質を供給することは有効な手段であると考えられる。高泌乳牛が示す泌乳初期に乳量が著しく増加する泌乳パターンは、大きな負のエネルギー出納を引き起こし、疾病の発生や繁殖成績低下の要因となっている。ストレス軽減方策のひとつとして、乳牛に抗酸化性のある飼料を給与することが考えられる。夏季暑熱環境下における泌乳牛の乳量・乳質低下の原因として、泌乳最盛期の極端な乳量増加や暑熱環境による飼料摂取量不足、すなわちエネルギー充足率の著しい低下とそれに付随する酸化ストレスの亢進が関与している可能性が高く (Bernabucci et al. 2005)、酸化ストレス対策が活性酸素種に起因する各種代謝疾病の予防に重要であると考えられていることによる。

これらの事情を踏まえて、日本国内では、アントシアニンを含む紫トウモロコシ品種の育成が進んでいる (澤井ら 2004)。育種法には戻し交配による成分育種が用いられている。成分育種とは、作物の含有成分を改良する育種のことを指し、例えば飼料用ビートでは砂糖を得ようとして長年選抜が続けられ、糖含量が大幅に向上し、かつ収量増も達成されている (蔵之内ら 1994)。また、ヒマワリやワタなどの工芸作物においても成分育種によって有効成分や品質が飛躍的に向上した例が多い (Palmer et al. 1997; 本田ら 2002)。特に最近、作物の需要拡大、

高付加価値化および差別化などの観点から多くの農産物で成分・品質を対象にした育種がいつそう重視されるようになってきている。

我が国において栽培されるトウモロコシの最も大きな用途は、酪農などにおける粗飼料としての利用である。輸入トウモロコシとは異なり子実だけでなく茎葉を含む地上部全体 (ホールクロップ) を利用する。トウモロコシは高栄養価な飼料として確固たる地位を築いているものの、ポリフェノールに着目した品種育成は日本国内ではまだ始まったばかりである。

本研究は、トウモロコシやソバを利用した機能性飼料の開発を目的として実施した。まず、ペルー、中国、韓国および日本の紫トウモロコシ在来種のアントシアニン含有量の変異を調査し、ペルー産の紫トウモロコシ在来種のアントシアニンは含量が非常に高いことを明らかにした。この知見がもとになり、現在、農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センターでは、ペルー産の紫トウモロコシ在来種を交配親とした紫トウモロコシの品種育成が進められている。

紫トウモロコシ育種現場では、アントシアニンの定量には分光光度計法による化学分析が行われているが、アントシアニンの抽出には酸・有機溶媒を用いるため人体への安全性やコスト面で課題が残されている。事業育種における近赤外分光分析法の導入は実績が多いことから、アントシアニンの定量分析への応用も実現性は高い。そこで、安全で低コストかつ迅速な推定法の確立を目指して、トウモロコシ育種現場で利用できるアントシアニン含量の推定および抗酸化作用 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性で評価) の推定法として近赤外分光分析法の導入を試みた。

本研究では、可視光と近赤外光が測定波長域である近赤外分光分析装置 (NIRS6500, Foss NIRSystems Co., Ltd., Laurel, USA) を用いて、アントシアニン含有の紫トウモロコシ茎葉を材料として、可視光域、近赤外光域および可視-近赤外光域のそれぞれについてスペクトルを取り、重回帰分析で推定式を作成した。各波長域で作成した推定式の精度の比較には、Ratio of the standard error of performance to the standard deviation of the reference data (RPD) 値 (Williams 2001) を用いた。また、近赤外光のみを

測定波長域とする近赤外分光分析装置 (InfraAlyzer500, Bran+Luebbe GmbH, Norderstedt, Germany) を用いて、紫トウモロコシの穂芯、子実および茎葉を材料として、重回帰分析、主成分回帰分析および Partial least square regression (PLS 回帰分析) により、アントシアニン含量と DPPH ラジカル消去活性に関する推定式を作成した。RPD 値と、化学分析値と近赤外推定値との相関係数 (R 値) から、トウモロコシ事業育種へ近赤外分光分析法が導入できるか検討した。

紫トウモロコシをサイレージに調製した場合、通常のトウモロコシサイレージと同等の高い発酵品質を示すか否かについて検討した報告はない。そこで、本研究では、紫トウモロコシサイレージと通常のトウモロコシサイレージを貯蔵し、その発酵品質を比較した。

最近、植物に含まれるアントシアニンの機能性がにわかに注目されるようになったが、植物がアントシアニンを蓄積する本来の目的は、食されることにより動物へ機能性をもたらすためではなく、植物自体を自己防衛するためと考えられている。作物における環境ストレスとポリフェノールによる抗酸化機能に関しては多くの報告がある。松井ら (2003) は、ランにおける光と温度ストレスについて報告している。Gabrielska et al. (1999) は、アントシアニンは活性酸素による酸化ダメージから植物組織を保護するという重要な役割を持つと報告している。植物体内でのアントシアニンの生体的役割については広く議論されてきており (Willson and Whelan 1990; Gould and Lister 2006)、植物の成長にさまざまな役割を果たすことが明らかとなってきた。例えば、蓄積したアントシアニンによりクロロフィルが覆われて、アントシアニンが犠牲になり間接的に葉細胞への酸化的ダメージを軽減することが報告されている (Field et al. 2001; Hoch et al. 2003; Lee et al. 2003)。

以上のように、アントシアニンが植物組織に対して果たしている役割については多くの研究がなされてきた。しかし、アントシアニンを含む植物体を機能性飼料として活用するために必要とされる知見は十分に得られていない。特に、植物体の収穫法について検討した報告は例を見ない。そこで、植物体全体にアントシアニンを含み、茎部が赤味を帯びてい

るソバを飼料として用いることを想定して、収穫法について検討した。収穫で重要な点は、アントシアニンが植物体のどの位置に多く含まれるか把握すること、ならびに、アントシアニンは種類ごとに機能性の高さが異なるゆえ、どの位置に機能性に優れた種類のアントシアニンが蓄積されるか把握することが必要である。

ソバの子実および茎葉にはフラボノイド系ポリフェノールが含まれており、特にルチンおよびアントシアニンについては数多くの研究がなされている (Kim et al. 2005; Lee et al. 2006; Matsui et al. 2008; Suzuki et al. 2009; Qin et al. 2010; Awatsuhara et al. 2010)。ソバの高い機能性に着目して、日本国内の一部ではソバをホールクロップ飼料作物として利用している地域も存在する。また、ソバ製粉過程で発生する残渣を乳牛の飼料として利用する試み (渡邊ら 2007)、ソバくずを豚に給与する試み (佐々木ら 2007) がなされている。

畜産の現場では、ソバは飼料としてはあまり使われていない。ソバおよびダツタンソバには家畜に対して光線過敏症を誘引する因子として知られるキノン系ポリフェノールであるファゴピリンが含まれるためである (Johnson 1983)。しかし、ソバおよびダツタンソバは多くの機能性成分を含むことから、今後、機能性飼料として利用される可能性も高い。ソバを機能性飼料として有効活用するには、ファゴピリンを全く含まない、あるいはほとんど含まない品種を選抜する必要がある。そこで、ファゴピリン含量を正確に定量する分析手法を開発した。従来法では、ファゴピリン含量は分光光度計法により算出する (Hinneburg and Neubert 2005; Özbolt et al. 2008)。しかし、得られた抽出液にはクロロフィルが多く含まれているため誤差が大きく、極わずかにしかファゴピリンを含まないソバや、ファゴピリンを全く含まないソバを検出できない欠点があった。これらを克服することを目的として、ファゴピリンを含まないソバを探索する分析法の開発を目指した。

本研究は2002年から2008年にかけて九州沖縄農業研究センターにおいて行った一連の研究 (江口ら 2004, 2008, 2009, Eguchi et al. 2008, 2009a, 2009b) を取りまとめたものである。

本研究を遂行するにあたり、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター山田敏彦教授には、多く

の貴重なご助言と温かいご支援を賜った。心より感謝申し上げる。また、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター荒木肇教授、上田宏教授、星野洋一郎助教ならびに、北海道大学農学研究院高橋公咲助教には論文作成に当たり多大なるご激励とご鞭撻を賜った。

本研究において、近赤外分光分析に関するご指導に関しては、九州沖縄農業研究センター分析・モニタリング室長の佐藤哲生博士、ポリフェノールに関する研究のご指導に関しては、九州沖縄農業研究センター機能性利用研究チーム主任研究員の西場洋一博士、同チーム主任研究員の沖智之博士に豊富な実績を生かしたご助言を終始賜った。サイレージの研究に関しては九州沖縄農業研究センターイネ発酵TMR研究チーム主任研究員の服部育男博士には共同研究者としてご尽力いただいた。さらに九州沖縄農業研究センターバイオマス・資源作物開発チーム主任研究員の松井勝弘博士には、農学研究の先輩として様々なご指導をいただいた。心より感謝の意を表する。

Ⅱ. アントシアニン高含有紫トウモロコシ 在来種の導入

近年、日本で育成された肉色が紫色のサツマイモなどアントシアニンを含む作物が高い抗酸化活性を持つ食用作物として注目されている。他方、南米には、子実が紫色で抗酸化活性の高いトウモロコシ在来種が存在することが知られている。そこで、本研究では、飼料用機能性トウモロコシの育成を目指して、ペルーを含めた各国の紫トウモロコシを供試して、ラジカル消去活性を機能性の指標として、子実の機能性が高い紫トウモロコシ品種を探索した。

1. 材料および方法

1) 供試材料と調査条件

紫トウモロコシ（日本産6品種：徳間1号、若宮黒糯在来、小林黒糯、黒糯とうもろこし、菅生ポップ、三股黒糯）、（中国産1品種：承德）、（韓国産1品種：COL/KYEONG）、（ペルー産4品種：IL-322, IL-323, IL-324, IL-325）を供試した。特性調査は日本・中国・韓国産を2002年に、ペルー産を2003年に行った。1品種あたり2畦26株、株間30cm、畦間75cmで栽培した。

2) 抽出液の調製

トウモロコシ子実を粉碎し抽出液を調製した。すなわち、トウモロコシ子実粉碎物(1.0g)に対し、1.0%トリフルオロ酢酸(TFA)を加え、16時間、暗所室温にて静置した後、遠心分離(1,870×g, 10分)により上清液を得た。残渣に再び1.0%TFAを加え、遠心分離し上清液を得た。両液をあわせて1.0%TFAにより全量10mLとし、以下の測定に用いた。

3) ラジカル消去活性の測定

沖ら(2002)の方法に従い、DPPH ラジカル消去活性は520nmにおける吸光度の減少量により評価し、トウモロコシ子実1.0gあたりのTrolox相当量として算出した。

4) アントシアニン含量の測定

トウモロコシ子実抽出液の520nmにおける吸光度を測定し、シアニン-3-グルコシドで作成した検量線からトウモロコシ子実1.0gに含まれるシアニン-3-グルコシド相当量として算出した。

5) ポリフェノール含量の測定

沖ら(2002)の方法に従い、Follin-ciocalteu法にて、トウモロコシ子実抽出液の750nmにおける吸光度を測定した。ポリフェノール含量は没食子酸で作成した検量線からトウモロコシ子実1.0gに含まれる没食子酸相当量として算出した。

6) アントシアニンのLC/MS分析

紫トウモロコシに含まれる主要なアントシアニンの同定は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(HP-1100; Agilent technologies, Inc.)とエレクトロスプレーイオン化質量分析計(ESI-MS)(Esquire 3000 plus ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ionization(ESI)source(Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA))で行った。分離は両分析法ともカラムとしてCadenza CD-C18 column(3μm, 150×2.0mm i.d.; Imtakt Corp., Kyoto, Japan)を用いて35℃で行った。溶離液Aは、10%アセトン/0.05%TFA、溶離液Bは、30%アセトン/0.05%TFAとした。流速は、0.2mL/分のAからBへのグラジエント分析とし、溶離液B(0%)から始めて、40分で溶離液B(100%)となるようにした。

2. 結果および考察

1) 特性調査

日本・中国・韓国産の紫トウモロコシは、どの品種も子実収量が低かった（第1表）。ペルー産の紫トウモロコシの生育特性は、6月播種では、雄穂は開花したが、雌穂は開花しなかった。8月播種では、雄穂雌穂ともに開花したが、不稔であった（第1表）。いずれの品種も倒伏と病害に弱かった。

2) ラジカル消去活性

紫トウモロコシ子実の DPPH ラジカル消去活性を測定した結果、第1図に示すように、日本・中国・

韓国産の8品種は0.5~3.1 $\mu\text{mol-Trolox}$ 相当量/gであった。一方、ペルー産の供試品種は高い活性（12.8~19.0 $\mu\text{mol-Trolox}$ 相当量/g）を示した。

3) アントシアニン含量・ポリフェノール含量

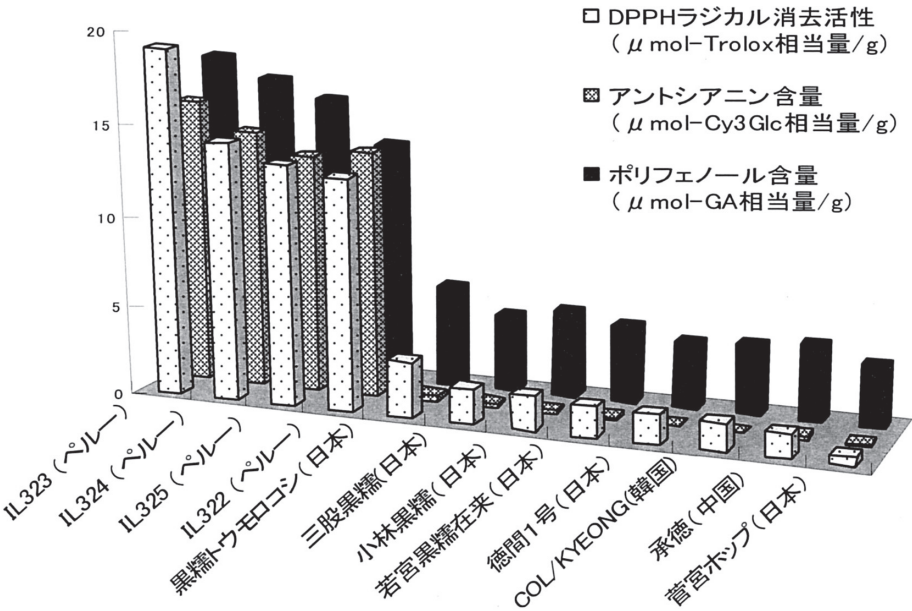
DPPH ラジカル消去活性の高いペルー産の紫トウモロコシは、アントシアニン含量とポリフェノール含量がともに高かった（第1図）。

4) アントシアニンの分析

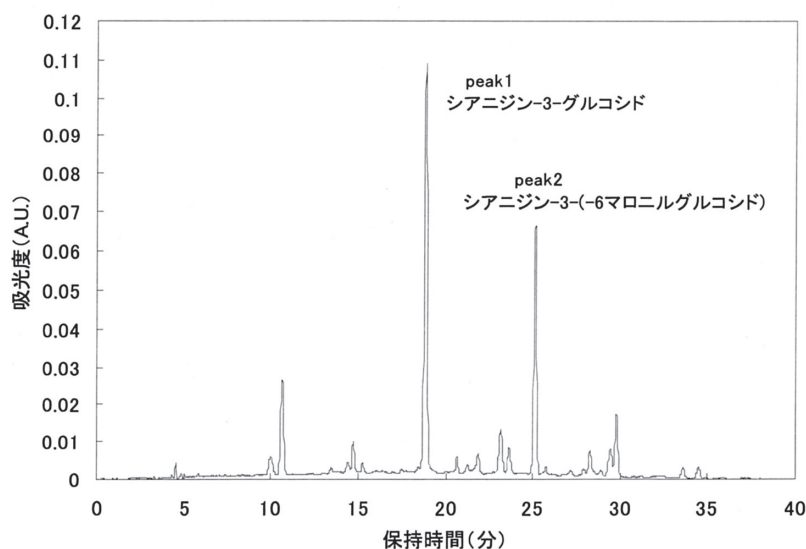
ペルー産の紫トウモロコシ（IL-323）に含まれるアントシアニンの組成を HPLC で分析した（第2図）。主要な2種のアントシアニン（Peak 1, 2）について

第1表 紫トウモロコシの生育特性

品種名	絹糸抽出期 月/日	稈長 cm	着雌穂高 cm	子実重 g/穂	播種日 年/月/日
IL-322（ペルー）	7/29	400	—	0.0	2003/6/26
〃	10/1	160	—	0.0	2003/8/4
IL-323（ペルー）	7/30	400	—	0.0	2003/6/26
〃	10/1	270	160	0.0	2003/8/4
IL-324（ペルー）	7/30	400	—	0.0	2003/6/26
〃	10/1	220	130	0.0	2003/8/4
IL-325（ペルー）	7/30	400	—	0.0	2003/6/26
〃	10/1	240	160	0.0	2003/8/4
COL/KYEONG（韓国）	6/27	85	23	33.6	2002/4/11
小林黒糯（日本）	7/22	201	133	46.3	2002/4/11
若宮黒糯在来（日本）	8/2	131	93	0.0	2002/4/11
徳間1号（日本）	7/16	175	87	35.2	2002/4/11



第1図 紫トウモロコシの DPPH ラジカル消去活性、アントシアニン含量、およびポリフェノール含量



第2図 紫トウモロコシにおけるアントシアニンのHPLCクロマトグラム

注) ペルー産「IL-323」の分析例を示す。

LC/MS 分析を行ったところ、 m/z 値と既報 (Aoki et al. 2002) から Peak1はシアニジン-3-グルコシド、Peak2はシアニジン-3-(6-マロニルグルコシド) であると推測された。

3. まとめ

供試したペルー産の紫トウモロコシは、九州で子実を収穫することは不可能であるが、ラジカル消去活性が高いことが明らかになった。一方、Tsuda et al. (1989) は、シアニジン-3-グルコシドは抗酸化活性が高いと報告している。このことから、アントシアニン合成に関する遺伝子を戻し交雑法を用いて優れた自殖系統へ導入することにより、九州の気候に適した抗酸化活性の高い F₁品種の育成は可能であると考えられた。

アントシアニン含量とラジカル消去活性は直線関係にあり、変異の幅も広いことから、高アントシアニン含量の選抜により、抗酸化活性の高い品種を育成することができる。しかし、アントシアニンを含まない通常系統の稈にもある程度の抗酸化作用を有することから、穂芯や稈にアントシアニンのほかに抗酸化作用をもつ物質が含まれると考えられる (農林水産省 2009)。Adom and Liu (2002) は、トウモロコシの子実には、フェルラ酸が結合状態で含まれていることを報告している。一方、Akin et al. (2006) は、トウモロコシの茎の髄には p -クマール酸やフェルラ酸がエステル形で多く含まれるこ

とを報告している。フェルラ酸の髄における含量は子実の含量の3倍以上であるため、これらの有機酸が茎の抗酸化作用に寄与していると考えられる。これらの有機酸単独またはアントシアニン等との化合物による抗酸化作用の変動も今後検討していく必要がある。

Ⅲ. 近赤外分光分析によるアントシアニンの迅速定量法の開発

我が国では、トウモロコシ (*Zea mays* L.) は高栄養価なホールクロップ飼料作物として利用されている。一般に知られているトウモロコシは子実が黄色であるが、南米のトウモロコシ遺伝資源には子実や穂芯および茎葉にアントシアニンを含むものが存在する (写真1, 2)。アントシアニンは、フラボノイド系ポリフェノールに属し、高い抗酸化作用を有することが知られており、アントシアニンを含んだ飼料を家畜に給与すると家畜体内において機能性を示す可能性がある。畜産現場からの需要の高まりを受けて、日本国内では、アントシアニンを含む紫トウモロコシ品種の育成が進んでいる (澤井ら 2007)。アントシアニンの定量法はシアニジン-3-グルコシドを標品とした分光光度計法が主流であるが、本研究では、より迅速な推定法の確立を目指して近赤外分光分析法の導入を試みた。

本研究では、まず、近赤外分光分析装置 (NIRS6500, Foss NIRSystems Co., Ltd., Laurel, USA) を用いて、



写真1 紫トウモロコシの雌穂



写真2 紫トウモロコシの茎葉

アントシアニン含有の紫トウモロコシの茎葉を材料として、可視光域（400～900nm）、近赤外光域（1100～2500nm）および可視-近赤外光域（400～2500nm）のそれぞれについてスペクトルを取り、重回帰分析によりアントシアニン含量の推定式を作成した。各波長域で作成した推定式の精度の比較にはRPD値を用いた。次に、近赤外分光分析装置（InfraAlyzer500, Bran+Luebbe GmbH,

Norderstedt, Germany）を用いて、アントシアニン含有の紫トウモロコシの穂芯、子実および茎葉を材料として、重回帰分析、主成分回帰分析およびPLS回帰分析によりアントシアニン含量とDPPHラジカル消去活性の推定式を作成した。推定式の精度をRPD値とR値から判断して、トウモロコシ育種へ近赤外分光分析法を導入できるか検討した。

1. 材料および実験方法

1) 紫トウモロコシの栽培環境

紫トウモロコシは、2007～2008年にかけて九州沖縄農業研究センター（宮崎県都城市）で栽培した。収穫期は黄熟期とし、サンプルは穂芯（135点）、子実（156点）および茎葉（84点）で、自然乾燥した後、2mmメッシュのミルで粉碎したサンプルを近赤外分光分析と化学分析に用いた。

2) 化学分析の条件

粉碎した穂芯0.5g、子実1.0g、茎葉0.5gに対し、4mLの1.0%TFAを加えて、暗所室温にて24時間静置した。その後、抽出液に6mLの水を加えメンブレンフィルター（0.45μm; Advantec Co., Ltd., Tokyo, Japan）を通して測定液とした。アントシアニンの定量は、分光光度計（CS-9300PC; SHIMADZU Co., Ltd., Kyoto, Japan）を用いて、シアニジン-3-グルコシドを標品として検量線を作成し、520nmにてトウモロコシ穂芯、子実および茎葉中のアントシアニンを定量した（第2表）。トウモロコシ穂芯、子実および茎葉中のDPPHラジカル消去活性の測定は、Oki et al.（2006）の手法を基本としたが、反応溶液の組成を改変して行った。すなわち、96穴マイクロプレートに、50μLのエタノールと50μLの200mM 2-morpholinoethanesulphonic

第2表 近赤外分光分析に供試した試料のDPPHラジカル消去活性とアントシアニン含量

		キャリブレーションセット						プレディクションセット					
		個数	最大値	最小値	平均値	標準偏差		個数	最大値	最小値	平均値	標準偏差	
穂芯	DPPHラジカル消去活性 ¹⁾	81	371.95	0.97	56.54	72.27		54	247.08	0.86	69.23	65.81	
	アントシアニン含量 ²⁾	81	68.17	0.04	9.26	14.30		54	53.71	0.04	11.63	13.76	
子実	DPPHラジカル消去活性	94	52.07	1.02	6.30	6.27		62	16.42	0.00	5.55	3.47	
	アントシアニン含量	94	5.33	0.01	1.04	1.14		62	4.37	0.03	0.94	0.88	
茎葉	DPPHラジカル消去活性	51	152.17	8.47	51.72	47.51		33	191.92	8.06	52.13	53.14	
	アントシアニン含量	51	34.13	0.09	9.34	11.50		33	33.25	0.09	9.07	11.49	

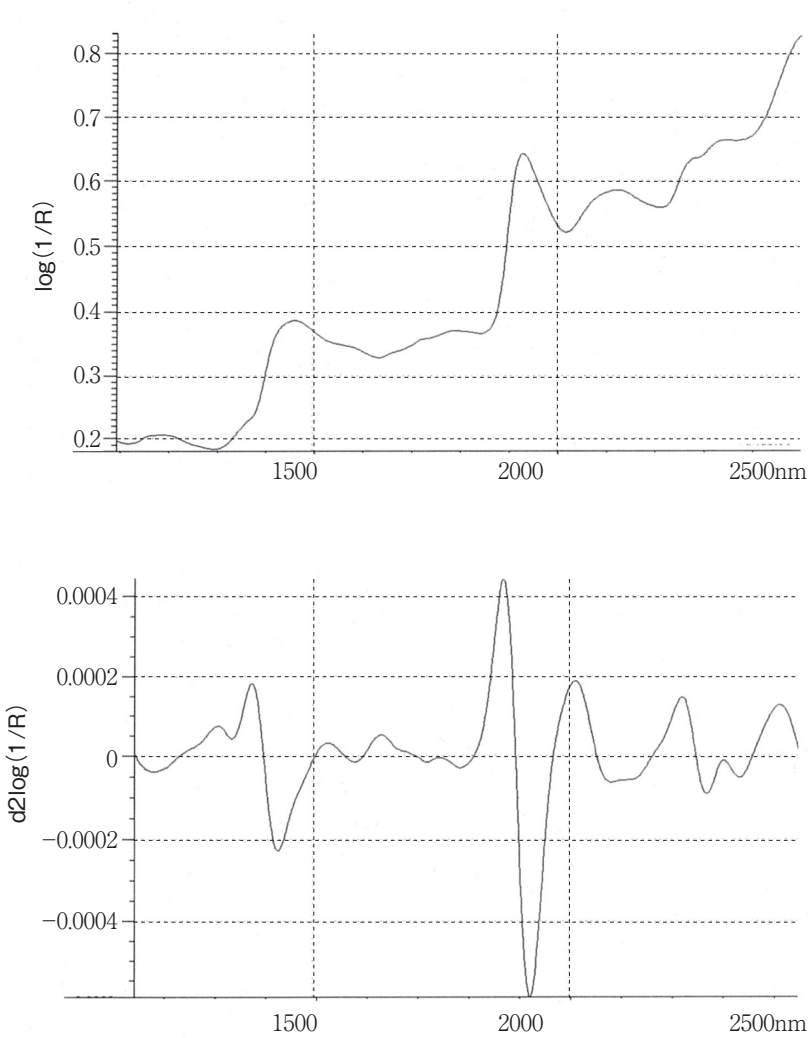
¹⁾ μmol-Trolox 相当量 /g 風乾物
²⁾ μmol-シアニジン-3-グルコシド相当量 /g 風乾物

acid (MES) (Wako Pure Chemicals Co., Ltd., Osaka, Japan) 緩衝液 (pH 6.0) ならびに50 μ L の 0.4%TFA に溶解した試料を注入し、それぞれの穴にエタノールに溶解した800 μ M の DPPH を50 μ L 加えて攪拌した。DPPH ラジカル消去活性は、分光光度計 (CS-9300PC; SHIMADZU Co., Ltd., Kyoto, Japan) を用いて、室温で20分間放置した溶液の 520nm における吸光度の減少量により評価し、材料1gあたりの Trolox (Aldrich Chemical Co., Ltd., Milwaukee, Wis, USA) 相当量として算出した (第2表)。

3) NIRS6500

近赤外光と可視光を測定波長域とする近赤外分光分析装置 (NIRS6500, Foss NIRSystems Co., Ltd., Laurel, USA) を用いてトウモロコシ茎葉のスペク

トル測定を行った。波長域は、可視光域 (400~900nm), 近赤外光域 (1100~2500nm) および可視-近赤外光域 (400~2500nm) とした。標準セルを利用し、測定は、拡散反射モード、2nm 間隔で行った。キャリブレーション式には58サンプル、プレディクション式には19サンプル使った。プレディクション式のサンプルにおける化学分析値 (アントシアニン含量) は、キャリブレーション式のサンプルよりも小さい値になるように設定した。近赤外分光分析のスペクトル値と化学分析値の重回帰分析は、VISION ソフトウェア (Nireco Co., Ltd., Japan) で実施した。測定したスペクトルは、ギャップ0nm, セグメント20nm の条件で2次微分変換した (第3図)。NIRS6500でのキャリブレーション式の作成では、VISION ソフトウェアにより、単相関の高い波



第3図 紫トウモロコシ穂芯の近赤外反射スペクトル
上段：原スペクトル，下段：2次微分スペクトル。

長を第1波長として自動選択した。第2波長以降は、変数増加法により相関の高い波長をマニュアル選択した。

4) InfraAlyzer500

近赤外光のみを測定波長域とする近赤外分光分析装置 (InfraAlyzer500, Bran+Luebbe GmbH, Norderstedt, Germany) を用いてトウモロコシ穂芯、子実および茎葉のスペクトル測定を行った(写真3)。波長域は1100~2500nm で標準セルを利用し、測定は、拡散反射モード、2nm 間隔で行った。穂芯では、キャリブレーション式には81サンプル、プレディクション式には54サンプル使った(第2表)。子実では、キャリブレーション式には94サンプル、プレディクション式には62サンプル使った(第2表)。茎葉では、キャリブレーション式には51サンプル、プレディクション式には33サンプル使った(第2表)。プレディクション式のサンプルにおける化学分析値(アントシアニン含量と DPPH ラジカル消去活性)は、キャリブレーション式のサンプルよりも小さい値になるように設定した。NIRS データと化学分析値の重回帰分析は、IDAS ソフトウェア (Bran+Luebbe GmbH, Norderstedt, Germany) で実施した。主成分回帰分析および PLS 回帰分析は、Unscrambler



写真3 近赤外分光分析用の標準セルに詰めたトウモロコシ子実粉砕物

ソフトウェア (Version 9.6; Camo Co., Norway) で実施した。本研究では、原スペクトルだけでなく、微分変換したスペクトルを用いた。すなわち、ギャップ11, セグメント10で1次微分変換したスペクトル(d1と表記), ギャップ10, セグメント11で2次微分変換したスペクトル(d2と表記), およびギャップ5, セグメント5で2次微分変換したスペクトル(d22と表記)を用いた。InfraAlyzer500でのキャリブレーション式の作成では、予測標準誤差(SEP)が最も小さくなるように波長を選択した。

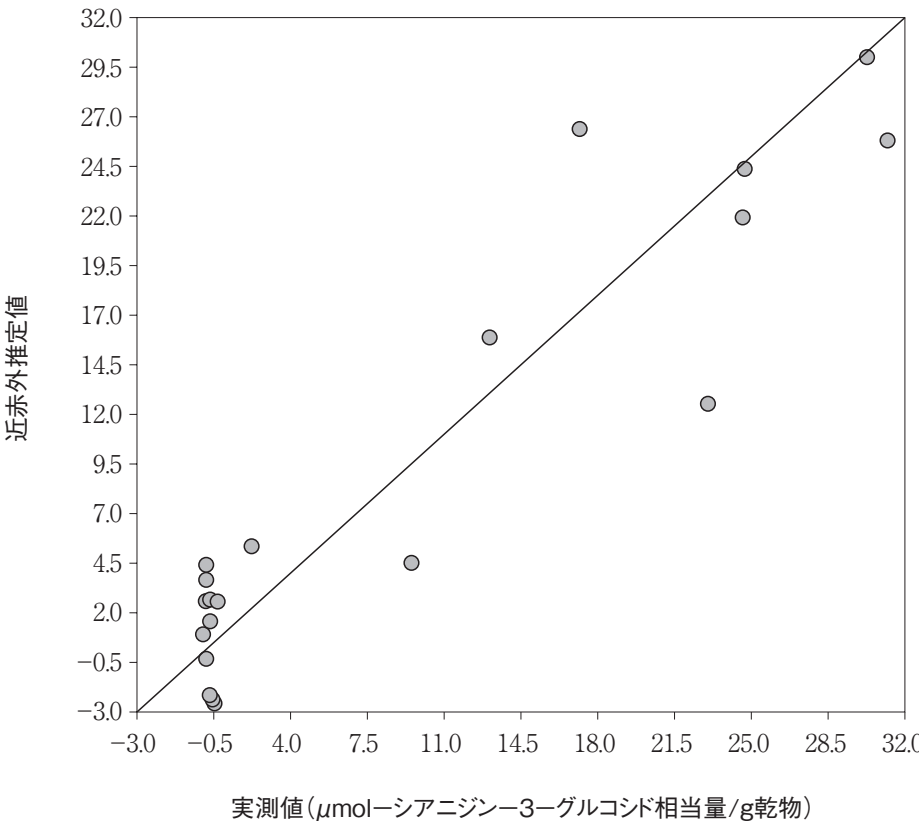
2. 結果および考察

1) 可視-近赤外光スペクトルによる重回帰分析

第3表の左側にはキャリブレーションで得られた結果, すなわち, 選択波長, R 値, 検量線作成群の標準誤差 (SEC) を記載した。一方, 表の右側にはプレディクションの結果, すなわち, 検量線評価群の SEP, 実測値と推定値との差 (Bias) および RPD 値を掲載した(第2表)。Williams (2001) は, RPD 値が2.4以上, 重相関係数が0.81以上であれば, 作成した検量線の精度は高く, 近赤外分光分析法をスクリーニング法として育種現場で活用できると報告している。アントシアニンは紫色色素のため, 可視光域 (400~900nm) で精度の良い推定式 (RPD=2.39) を作成できることは明らかであったが, 本研究により近赤外光域 (1100~2500nm) においても, 高精度とは言えないが (RPD=2.06) 推定式を作成できることが明らかとなった。可視-近赤外光域 (400~2500nm) では最も精度の高い (RPD=2.74) 推定式を作成することができた。実測値と推定値との相関図からも推定精度は高いと判断できる(第4図)。

2) 近赤外光スペクトルによる重回帰分析, 主成分回帰分析および PLS 回帰分析

第3表と同様に, 第4表の左側にはキャリブレーションで得られた結果, 選択波長, R 値および SEC 値を記載した。一方, 表の右側にはプレディクションの結果, SEP 値, Bias 値および RPD 値を記載した。穂芯の DPPH ラジカル消去活性に関する検量線では, RPD=2.63, R=0.93で精度が高いことが分かった。穂芯のアントシアニン含量に関する検量線では, RPD=2.44, R=0.91で精度が高いことが分かった。子実の DPPH ラジカル消去活性に関



第4図 紫トウモロコシ茎葉に含まれるアントシアニン含量の推定値（可視－近赤外光法）と実測値の相関図

第3表 紫トウモロコシ茎葉の可視－近赤外光スペクトルによる重回帰分析結果

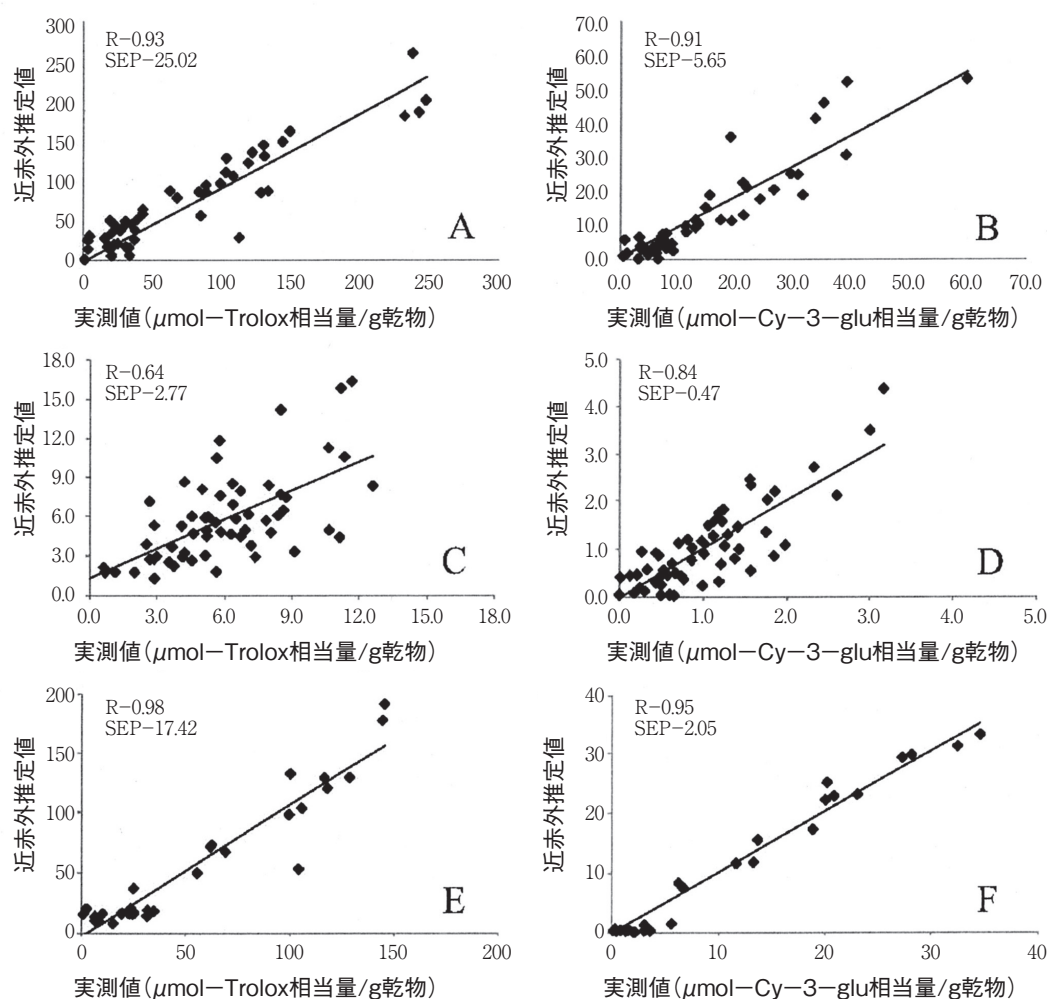
波長域	選択波長 (nm)					キャリブレーション		プレディクション			RPD
						R	SEC	SEP	R	Bias	
Vis (400-900nm)	480	592	—	—	—	0.90	4.81	4.81	0.90	−0.83	2.39
NIR (1100-2500nm)	2370	1350	1700	2438	2142	0.94	4.08	5.58	0.87	−1.65	2.06
Vis-NIR (400-2500nm)	630	1610	1352	1074	1788	0.92	4.72	4.19	0.93	−0.12	2.74

注) R：重相関係数，SEC：検量線作成時の標準誤差，SEP：検量線評価時の予測標準誤差，Bias：実測値と推定値（可視－近赤外光法による）の差，RPD：SD/SEPにより算出される。数値が大きいと検量線の精度は高い。

第4表 紫トウモロコシ穂芯，子実および茎葉の近赤外光スペクトルによる重回帰分析結果

	ス ペ ク トル 処 理	選 択 波 長 （nm）	キャリブレーション		プレディクション			RPD
			R	SEC	R	SEP	Bias	
穂芯								
DPPH ラジカル消去活性	d1	1647, 1651, 1775, 2363, 2395	0.91	30.54	0.93	25.02	−2.95	2.63
アントシアニン含量	d1	1647, 1659, 1667, 1775, 1963, 1971, 2131, 2231, 2363	0.94	5.04	0.91	5.65	0.56	2.44
子実								
DPPH ラジカル消去活性	d2	1514, 1610, 2190	0.47	5.63	0.64	2.77	0.20	1.25
アントシアニン含量	d2	1158, 1622, 1694, 1758, 1854, 2190, 2338	0.78	0.75	0.84	0.47	−0.01	1.87
茎葉								
DPPH ラジカル消去活性	d1	1394, 1494, 1610, 1650, 2302, 2438	0.97	11.33	0.98	17.42	−3.31	3.05
アントシアニン含量	d1	1203, 1655, 1659, 1687, 2207, 2319, 2443	0.98	2.39	0.95	2.05	−0.12	5.60

注) 表3を参照のこと。d1：1次微分，d2：2次微分。



第5図 紫トウモロコシの子実、穂芯および茎葉におけるアントシアニン含量とDPPHラジカル消去活性の推定値（近赤外分光法）と実測値の相関図

注1) DPPHラジカル消去活性 (μmol-Trolox相当量/g乾物): A) 穂芯, C) 子実, E) 茎葉。

注2) アントシアニン含量 (μmol-シアニジン-3-グルコシド (Cy-3-glu) 相当量/g乾物): B) 穂芯, D) 子実, F) 茎葉。

する検量線では, RPD=1.25, R=0.64で精度は低かった。子実のアントシアニン含量に関する検量線においても, RPD=1.87, R=0.84で精度は低かった。すなわち, 紫トウモロコシの子実に関しては, アントシアニン含量およびDPPHラジカル消去活性を近赤外分光分析法で推定することはできないと判断した。茎葉のDPPHラジカル消去活性に関する検量線では RPD=3.05, R=0.98で精度が高いことが分かった。茎葉のアントシアニン含量に関する検量線においても, RPD=5.60, R=0.95で精度は高いことが分かった。これらのことから紫トウモロコシの事業育種において, 近赤外分光分析法は穂芯および茎葉のDPPHラジカル消去活性とアントシアニン含量の推定に応用できると判断した。第5図に実測値

と推定値との相関図を記載した。

第5表に主成分回帰分析およびPLS回帰分析について表示した。表の左側にはキャリブレーション式作成時のスペクトル処理法とファクター数, およびR値とSEC値を記載した。表の右側には, プレディクションの結果, SEP値, Bias値およびRPD値を掲載した。穂芯のDPPHラジカル消去活性に関する検量線の精度は, RPD=2.41, R=0.91であった。穂芯のアントシアニン含量に関する検量線の精度は, RPD=2.30, R=0.90であった。子実のDPPHラジカル消去活性に関する検量線は, RPD=1.29, R=0.66で, 事業育種に導入できる精度ではないことが明らかとなった。また, 子実のアントシアニン含量に関する検量線においても, RPD=1.69, R=0.88で精度は低

第5表 主成分回帰分析（PCR）およびPLS 回帰分析（PLSR）の結果

	ス ペ ク ト ル 処 理	キャリブレーション			プレディクション			RPD
		Factors	R	SEC	R	SEP	Bias	
穂芯								
DPPH ラジカル消去活性	raw	PCR-7	0.85	38.10	0.91	27.30	−2.58	2.41
アントシアニン含量	d2	PLSR-11	0.92	5.62	0.90	5.98	0.75	2.30
子実								
DPPH ラジカル消去活性	d1	PLSR-4	0.52	5.37	0.66	2.70	0.10	1.29
アントシアニン含量	d2	PLSR-11	0.84	0.62	0.81	0.52	0.08	1.69
茎葉								
DPPH ラジカル消去活性	d22	PLSR-6	0.98	10.38	0.96	16.09	−2.10	3.30
アントシアニン含量	d22	PLSR-6	0.97	2.75	0.97	2.67	0.10	4.30

注）第3表を参照のこと。d22：2次微分。

かった。茎葉の DPPH ラジカル消去活性に関する検量線では、RPD=3.30、R=0.96で精度は高かった。茎葉のアントシアニン含量に関する検量線においても、RPD=4.30、R=0.97で精度は高かった。主成分回帰分析および PLS 回帰分析を用いた場合でも、子実の DPPH ラジカル消去活性とアントシアニン含量を近赤外分光分析法で推定することはできないものの、穂芯と茎葉の DPPH ラジカル消去活性とアントシアニン含量に関しては、近赤外分光分析法にて精度良く推定できることが明らかになった。

紫トウモロコシには子実が濃い紫色をした系統も存在するが、アントシアニンが含まれる部位は表面の種皮のみで、子実の大部分を占める胚乳にはアントシアニンは含まれていない（写真4）。そのため、濃い紫色をしたトウモロコシ子実には外観上アントシアニンが豊富に含まれるように思われるが、実際はあまり含まれていない。近赤外分光分析の検量線の精度の高さは、測定の対象となる成分の含有量に

よるところが大きく、紫トウモロコシ子実のアントシアニンに関しては含有量が少ないため精度の高い推定式を作成することができなかった。一方、紫トウモロコシの穂芯と茎葉に関してはアントシアニンの含有量が高いため、精度の高い推定式を作成することができたと考えられる。

3. まとめ

近赤外分光分析は同時多項目の分析が可能という優れた特徴を有している。藤原ら（1995）は、温州ミカンの果汁の全糖濃度、Brix 値および酸濃度の3成分が高い精度で同時測定可能であることを明らかにした。飼料用トウモロコシの事業育種では高栄養価な系統の選抜を目指した近赤外分光分析装置の利用が提案されている（井上ら1990）。本研究で開発したアントシアニン含有量と DPPH ラジカル消去活性の推定式と併せることで、近赤外分光分析法により高栄養価でしかも高い機能性を有する紫トウモロコシ系統の選抜が可能となる。

Ⅳ. 紫トウモロコシサイレージの発酵品質

日本国内で栽培される飼料用トウモロコシの大部分は、ホールクロップサイレージとして利用されており（戸澤 2005）、高栄養価の長大型飼料作物として、特に酪農家を中心に栽培されている。九州地域で飼養される乳牛においては、夏季暑熱環境のため泌乳ピークが低く抑制される傾向がある。そこで暑熱に伴う酸化ストレスの低減を目指して、薬物に頼らない安全な対策を取ることが近年重要な課題となっている。



写真4 紫トウモロコシの子実の断面

植物由来のポリフェノールの一種であるアントシアニンに関しては、抗酸化作用を示すことが *in vitro* (Tsuda et al. 1994, 1996; Janina et al. 1999) および *in vivo* (Navindra et al. 2006; Francesco et al. 2007) の系で多数報告されている。また、ラット試験で、紫トウモロコシに含まれるアントシアニンが大腸の発がん抑制に作用すること (青木 2002) および紫サツマイモに含まれるアントシアニンが肝機能改善に作用すること (須田ら 1997) など高い機能性について報告されている。これらのことから、アントシアニンを含む紫トウモロコシのサイレージを乳牛などの家畜に給餌することにより、安全に酸化ストレスや疾病を予防できる可能性がある。

II では、ペルー在来種の紫トウモロコシの子実におけるアントシアニン含量は、日本在来種の紫トウモロコシの子実よりも高く、抗酸化作用が非常に強いこと、およびアントシアニンの主成分はシアニン-3-グルコシドであることを明らかにした。しかし、紫トウモロコシをサイレージに調製した場合、一般に普及している通常のトウモロコシサイレージと同等の高い発酵品質を示すか否かについては明らかでない。

そこで、本研究では、茎葉にアントシアニンを含む材料として長野県中信農試が開発したトウモロコシ系統および雌穂にアントシアニンを含む材料としてペルーから輸入したトウモロコシ在来種を用いて、夏季環境条件で紫トウモロコシサイレージを貯蔵し、その発酵品質を通常のトウモロコシサイレージと比較検討した。

1. 材料および実験方法

1) トウモロコシサイレージの調製

アントシアニンを含むサイレージ原料として、長野県中信農試が開発したトウモロコシ系統長交 C922 の茎葉 (九州沖縄農業研究センター都城研究拠点にて、2005 年 4 月播種、同年 7 月黄熟期収穫)、およびペルーから輸入したトウモロコシの雌穂 (パープルコーン、リーデル社、千葉) を、それぞれ約 5 mm に細切混合したものを供試した (以降、紫トウモロコシ材料と表記する)。なお、茎葉と雌穂の混合割合は 2001~2004 年の九州沖縄農業研究センター都城研究拠点のトウモロコシ収量試験におけ

る生茎葉収量と生雌穂収量の結果に基づいて、3 対 1 とした。サイレージ調製時の乾物率は 16.4% であった。一方、アントシアニンを含まないサイレージ原料として市販 F₁ 品種「ゆめちから」 (伊東ら 2004) の茎葉および雌穂 (九州沖縄農業研究センター都城研究拠点にて、2005 年 4 月播種、同年 7 月黄熟期収穫) を、それぞれ約 5 mm に細切混合したものを供試した (以降、対照トウモロコシ材料と表記する)。茎葉と雌穂の割合は紫トウモロコシ材料と同じにした。サイレージ調製時の乾物率は 25.5% であった。

サイレージ調製は、田中と大桃 (1995) の小規模サイレージ発酵試験法を参考にして行った。すなわち、紫トウモロコシ材料と対照トウモロコシ材料を 20×30 cm のパウチ袋 (飛竜 KN-210, ハイテック社、東京) に 200 g ずつ入れ、市販の真空包装機で密封し、下記の試験 2) と 3) の条件で貯蔵した。以降、紫トウモロコシ材料由来のサイレージを紫トウモロコシサイレージ、対照トウモロコシ材料由来のサイレージを対照トウモロコシサイレージと表記する。

2) サイレージの貯蔵期間と発酵品質

貯蔵期間が紫トウモロコシサイレージの発酵品質に与える影響を調査した。サイレージの乳酸発酵は 2~3 ヶ月で安定する (増子 1999) ことから、貯蔵期間を 2 ヶ月、2.5 ヶ月および 3 ヶ月間とした。夏季環境条件でのサイレージ貯蔵を想定し、恒温器を 25℃ に設定して、紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージをそれぞれ 3 反復で、遮光静置して貯蔵した。

3) サイレージの貯蔵温度と発酵品質

貯蔵温度が紫トウモロコシサイレージの発酵品質に与える影響を調査した。過去 10 年間 (1995~2004 年) の 7 月、8 月、9 月における都城市の最高・最低気温 (気象庁 2005) を参考にして、夏季サイレージ貯蔵時の環境温度は、25~35℃ であると想定し、25℃、30℃ および 35℃ に設定した 3 室の恒温器に紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージをそれぞれ 3 反復で、2 ヶ月間、遮光静置して貯蔵した。貯蔵後、紫トウモロコシサイレージのアントシアニン含量を、設定温度ごとに、既報 (江口ら 2004) に準じて測定した。

4) サイレージの品質評価

サイレージ発酵品質は pH、VBN (揮発性塩基窒

素), 有機酸組成(乳酸, 酢酸, 酪酸等) および V2-SCORE (サイレージ発酵品質の簡易評価法) を調査した。有機酸組成は HPLC を用いたブロムチモールブルー (BTB) ポストラベル法, VBN は微量拡散法により, それぞれ測定した (自給飼料品質評価研究会 2001)。

統計処理は, サイレージの種類と貯蔵期間, ならびにサイレージの種類と貯蔵温度を要因とする二元配置の分散分析を行い, 有意差が認められた項目については Fisher の最小有意差法 (LSD) により多重検定を実施した (エクセル統計2002, 社会情報サービス社, 東京)。

2. 結果および考察

1) サイレージの貯蔵期間と発酵品質

第6表に, サイレージ貯蔵期間と発酵品質の関係を示した。2ヵ月, 2.5ヵ月, 3ヵ月の貯蔵期間ごとに, 発酵品質を調査したところ, 紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージの pH は, いずれの貯蔵期間においても3.8~4.1の間となり, 全て良好な範囲内であった。紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージの原物中の有機酸組成は, 乳酸0.79~2.14%, 酢酸+プロピオン酸0.09~0.23%, 酪酸+カプロン酸+吉草酸0.00~0.01% でサイレージと貯蔵期間の違いによる有意差はなかった。VBN も全貯蔵期間において紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージとの間に有意差は見られず, 28.5~49.3mg/ 原物100g であった。紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージの V2-SCORE はいずれの貯蔵期間においても, 91点以上を示し良質であった。これ

らのことから, 貯蔵期間が2~3ヵ月であれば, 紫トウモロコシに含まれるアントシアニンがサイレージ発酵に影響を与えることはなく, 対照トウモロコシサイレージと同等の優れた発酵品質に調製できると考えられた (第6表)。

2) サイレージの貯蔵温度と発酵品質

第7表に, サイレージ貯蔵温度と発酵品質の関係を示した。25℃, 30℃, 35℃の貯蔵温度ごとに発酵品質を調査したところ, 紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージの pH は, いずれの貯蔵温度においても3.9~4.3の間となり, 全て良好な範囲であった。紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージの有機酸組成は, 乳酸0.69~2.08%, 酢酸+プロピオン酸0.02~0.18%, 酪酸+カプロン酸+吉草酸0.00~0.10% の範囲内であった。VBN は全貯蔵温度において紫トウモロコシサイレージと対照トウモロコシサイレージとの間に有意差は見られず, 28.5~39.5mg/ 原物100g であった。紫トウモロコシサイレージおよび対照トウモロコシサイレージの V2-SCORE は, いずれの貯蔵温度においても, 89点以上を示した。これらのことから, 貯蔵温度が25~35℃であれば, 紫トウモロコシに含まれるアントシアニンがサイレージ発酵に影響を与えることはなく, 対照トウモロコシサイレージと同等の優れた発酵品質に調製できると考えられた。また, 貯蔵後の紫トウモロコシサイレージにおけるアントシアニンの残存量を調査した。その結果, 貯蔵温度が30℃以上になると, アントシアニン含量は減少したものの, 紫トウモロコシサイレージ内にアントシアニンが残存していることが明らかとなった (第7表)。

第6表 紫トウモロコシサイレージの貯蔵期間と発酵品質の関係

	対照サイレージ			紫サイレージ			分散分析 ²⁾		
	2.0ヵ月	2.5ヵ月	3.0ヵ月	2.0ヵ月	2.5ヵ月	3.0ヵ月	サイレージ	期間	交互作用
pH	4.1	4.0	3.8	3.9	4.0	3.9	N.S.	N.S.	N.S.
有機酸組成 (% , 原物中)									
乳酸	1.09	2.14	0.79	0.99	1.43	1.60	N.S.	N.S.	N.S.
酢酸 + プロピオン酸	0.14	0.22	0.09	0.23	0.15	0.17	N.S.	N.S.	N.S.
酪酸 + カプロン酸 + 吉草酸 ¹⁾	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	N.S.	N.S.	N.S.
VBN (mg/ 原物100g)	29.6	28.5	47.3	37.0	49.3	36.2	N.S.	N.S.	N.S.
V2-score	98	97	92	95	91	95	N.S.	N.S.	N.S.

¹⁾ 異性体を含む。
²⁾ N.S. は有意差がないことを示す。

第7表 紫トウモロコシサイレージの貯蔵温度と発酵品質の関係

	対照サイレージ			紫サイレージ			分散分析 ²⁾		
	25℃	30℃	35℃	25℃	30℃	35℃	サイレージ	温度	交互作用
pH	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	4.3	N.S.	N.S.	N.S.
有機酸組成（％，原物中）									
乳酸	2.08	1.09	1.17	0.69	1.03	1.59	N.S.	N.S.	N.S.
酢酸＋プロピオン酸	0.02	0.07	0.07	0.07	0.10	0.18	N.S.	N.S.	N.S.
酪酸＋カプロン酸＋吉草酸 ¹⁾	0.00 ^a	0.10 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a	0.10 ^b	0.00 ^a	N.S.	*	N.S.
VBN（mg/新鮮物100g）	28.5	29.6	38.4	31.8	33.4	39.5	N.S.	N.S.	N.S.
V2-score	99 ^a	90 ^c	96 ^b	97 ^a	89 ^c	95 ^b	N.S.	**	N.S.
アントシアニン（mg/原物1g） ³⁾	n.d.	n.d.	n.d.	5.3 ^a	4.3 ^b	4.1 ^b	**	**	**

¹⁾ 異性体を含む。

²⁾ *, **印はそれぞれ，5，1％水準で有意差あり。N.S.は有意差がないことを示す。

³⁾ n.d.：検出されず。

3. まとめ

本研究により，アントシアニンはサイレージ発酵に影響を与えないこと，また，紫トウモロコシサイレージにはアントシアニンが含まれ，機能性サイレージとして利用できる可能性があることが明らかとなった。

V. ソバのアントシアニンが紫外線ストレスによって受ける影響

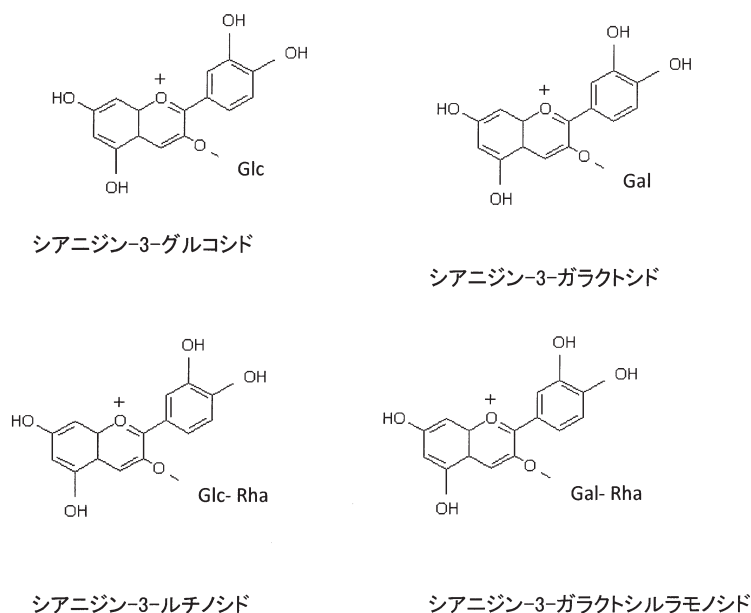
アントシアニンは赤色や紫色をした植物体に含まれるフラボノイド系ポリフェノールであり（Strack and Wray 1993），また活性酸素による酸化ダメージから植物組織を保護するという重要な役割をもつ（Gabrielska et al. 1999）。植物体内でのアントシアニンの生体的役割については広く議論されてきており（Willson and Whelan 1990; Gould and Lister 2006），植物の成長にさまざまな役割を果たすことが明らかとなってきた。例えば，アントシアニンの蓄積によりクロロフィルが覆われて，アントシアニンが間接的に葉細胞への酸化的ダメージを軽減する作用について報告されている（Field et al. 2001; Hoch et al. 2003; Lee et al. 2003）。

ダツタンソバ（*Fagopyrum tataricum* Garten）および普通ソバ（*Fagopyrum tataricum* Moench）は，タデ科に属する穀物である（Wijngaard and Arendt 2006）。ソバの子実および茎葉にはフラボノイド系ポリフェノールが多く含まれるため，機能性作物として広く認知されている。このため，日本国内の一部では，ソバを機能性飼料として利用する

地域も存在する。ソバのアントシアニンは生育期間全般を通じ，茎葉部に含まれている（写真5）。ソバに含まれるアントシアニンはシアニジン-3-グルコシドであることが報告されている（Troyer 1958, 1964）。Kim et al. (2007) は，ダツタンソバに含まれるアントシアニンは，シアニジン-3-グルコシドとシアニジン-3-ルチノシドであると報告しており（第6図），Watanabe (2007) は，普通ソバに含まれるアントシアニンの主体は，シアニジン-3-ルチノシドであると報告している。一方，Kim et al. (2007) は，普通ソバに含まれるアントシアニンは，シアニジン-3-ガラクトシド，シアニジン-3-グ



写真5 ソバの草姿



第6図 ソバに含まれるアントシアニンの構造

ルコシド, シアニジン-3-ルチノシドおよびシアニジン-3-ガラクトシルラモノシドの4種類であると報告している(第6図)。

環境ストレスの生物的要因として病原菌, 傷, 養分欠乏や過剰症などがあり, 非生物的要因として温度, 光, 紫外線 (Baumbush et al. 1998), 湛水 (Ushimaru et al. 1992), 乾燥, 除草剤 (Knörzer et al. 1996), オゾン (Baumbusch et al. 1998), SO_2 , 無機イオン, 高塩類などがある。また, 環境ストレス要因が重なるとより一層ストレスが強くなり, 活性酸素の発生やその消去活性の活性変動は著しくなることが知られている (Alscher et al. 1997)。本研究では, 環境ストレスのひとつである紫外線を取り上げ, 紫外線によって, ダツタンソバの茎に蓄積されるアントシアニンの種類と量がどのように変化するのか調査した。まず, 圃場で栽培したダツタンソバについて主茎の節位ごとにアントシアニンの種類と含量の調査をした。続いて, アントシアニンと紫外線の関係を調べるために, 人工気象器を使って, ダツタンソバの幼苗を育てて, アントシアニンの種類と含量を調査した。また, 圃場で栽培した普通ソバについては, 幼苗期, 開花期, 成熟期において節位ごとの茎および葉に含まれるアントシアニンの種類と含量を調査した。

1. 材料および実験方法

1) ダツタンソバの栽培環境

ダツタンソバ品種“ロツタダタム”の種子を, 2008年4月11日に九州沖縄農業研究センター圃場(熊本県合志市)にて4反復で播種した。試験区は 900cm^2 で, 播種密度は $125\text{個体}/\text{m}^2$ とした。本研究では, 各試験区から播種後22日目の幼苗(地際から4番目の節が出現した頃)を3個体採取した。主茎を3部位すなわち, 基部節(地際から1番目の節), 中間節(地際から2番目の節)そして頂部節(頂端から3番目の節)に分けた。

ダツタンソバ品種“ユーゴスラビア”, “ロツタダタム”および“ネパール”の種子を人工気象器内にて4反復で播種した。試験区は 36cm^2 で, 播種密度 $1\text{個体}/\text{cm}^2$ とした。人工気象器の環境は, 室温 15°C , 湿度70%, 光合成有効照射量 $74\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。紫外線照射量は(有: $30.0\text{mW}/\text{m}^2$)と(無: $0.0\text{mW}/\text{m}^2$)とし, 播種後8日目, 11日目, 17日目そして25日目に幼茎を収穫した。

2) 普通ソバの栽培環境

普通ソバ4品種“牡丹ソバ”, “階上早生”, “常陸秋そば”および“信濃夏ソバ”を2007年4月11日に九州沖縄農業研究センター圃場(熊本県合志市)にて4反復で播種した。播種密度 $150\text{個体}/\text{m}^2$ とした。生育期間中の平均気温は 19.5°C , 最高気温は 25.2°C ,

太陽光照射量は $19.8\text{MJ}/\text{m}^2/\text{日}$ であった。幼苗期、開花期（播種後42日目）および成熟期（播種後62日目）の各期において植物体を3個体ずつ採取した。主茎を3部位すなわち、基部節（地際から1番目の節）、中間節（頂端と地際の中間の節）そして頂部節（頂端から1番目の節）に分けた。

3) アントシアニンの抽出

新鮮物を液体窒素で凍らせた後、凍結乾燥機（model FDU-1200; EYELA, Japan）を使って真空凍結乾燥を行った。乾燥物はビーズ（Bead Smash 12; Waken, Japan）を使って微粉碎した。アントシアニンはメタノール塩酸（99/1, v/v）に粉碎物を浸し、24時間、4℃暗室のもとで抽出した。サンプルは $10,700\times g$ で10分間遠心分離した。上清液を回収後、再度メタノール塩酸（99/1, v/v）を加えて、上記と同じ条件で遠心分離した。両方の上清液を併せて、メンブレンフィルター（ $0.45\mu\text{m}$; Whatman plc., USA）を使って精製し、HPLC分析用とした。

4) ダッタンソバに含まれるアントシアニンの定性および定量分析

アントシアニンのHPLC分析はWatanabe and Ito (2002)の手法を基本としたが、検出波長、流速およびグラジェントの条件を改変して行った。すなわち、Cadenza CD-C18 column（ $3\mu\text{m}$, $250\times 4.6\text{mm}$ i.d.; Imtakt Corp., Kyoto, Japan）を装着したHPLC（LaChrom Elite; Hitachi Ltd., Japan）を用いて、カラム温度 35°C 、インジェクション $20\mu\text{L}$ で分析を行った。溶離液Aは、水/メタノール/酢酸（92.5/5.0/2.5, v/v/v）、溶離液Bは、水/メタノール/酢酸（2.5/95.0/2.5, v/v/v）とした。流速は、 $0.75\text{mL}/\text{分}$ のAからBへのグラジェント分析とし、溶離液B（5%）から初めて、60分で溶離液B（40%）となるようにした。HPLCクロマトグラムは 520nm で検出し、シアニジン-3-グルコシドとシアニジン-3-ルチノシド（Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan）を標品として検量線を作成し、アントシアニンを定量した。

5) 普通ソバに含まれるアントシアニンの定性および定量分析

アントシアニンのHPLC分析は、Watanabe and Ito (2003)の方法を基本としたが、検出波長、流速およびグラジェントの条件を改変して行った。すなわち、Cadenza CD-C18 column（ $3\mu\text{m}$, $250\times$

4.6mm i.d.; Imtakt Corp., Kyoto, Japan）を装着したHPLC（LaChrom Elite; Hitachi Ltd., Japan）を用いて、カラム温度 35°C 、インジェクション $10\mu\text{L}$ で分析を行った。溶離液Aは、水/メタノール/酢酸（92.5/5.0/2.5, v/v/v）、溶離液Bは、水/メタノール/酢酸（2.5/95.0/2.5, v/v/v）とした。流速は、 $0.75\text{mL}/\text{分}$ のAからBへのグラジェント分析とし、溶離液B（5%）から始めて、60分で溶離液B（40%）となるようにした。HPLCクロマトグラムは 520nm で検出し、シアニジン-3-ルチノシド（Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan）を標品として検量線を作成し、全ピークのアントシアニンをシアニジン-3-ルチノシド相当量として定量した。

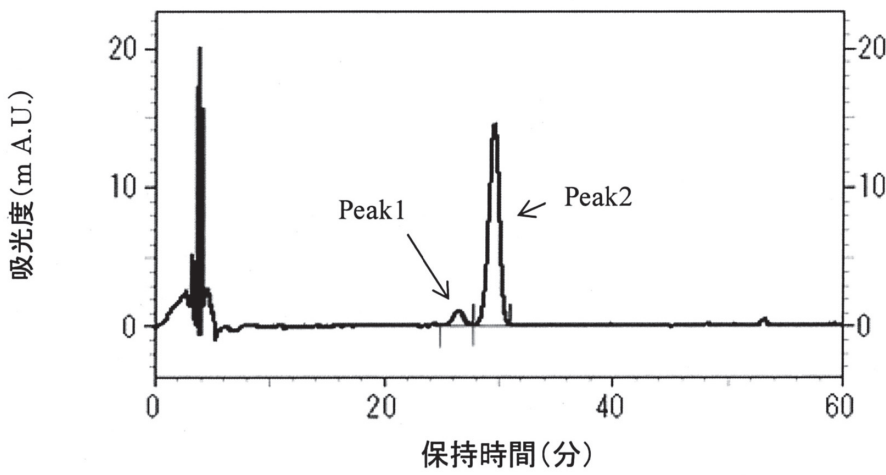
普通ソバの抽出液（ $20\mu\text{L}$ ）を、LC-ESI-MS/MSに注入した。分析は、HPLC（HP-1100; Agilent technologies, Inc.）とESI-MS（Esquire 3000 plus ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA)で行った。分離はCadenza CD-C18 column（ $3\mu\text{m}$, $250\times 4.6\text{mm}$ i.d.; Imtakt Corp., Kyoto, Japan）を用いて 35°C で行った。溶離液Aは、水/メタノール/酢酸（92.5/5.0/2.5, v/v/v）、溶離液Bは、水/メタノール/酢酸（2.5/95.0/2.5, v/v/v）とした。流速は、 $0.75\text{mL}/\text{分}$ のAからBへのグラジェント分析とし、溶離液B（5%）から初めて、60分で溶離液B（40%）となるようにした。

2. 結果および考察

1) ダッタンソバのアントシアニン

ダッタンソバ品種“ロツタンダタム”の幼茎からのメタノール塩酸抽出液のHPLCクロマトグラムにはアントシアニンのピークが2本確認できた。標品を使ったクロマトグラフとリテンションタイムの比較からピーク1はシアニジン-3-グルコシド、ピーク2はシアニジン-3-ルチノシドであることが分かった（第7図）。この結果は、Kim et al. (2007)の報告と一致した。

茎に含まれるアントシアニンの特性を調べるために、異なる節位ごとに総アントシアニンに対するそれぞれのアントシアニン含有率を求めた。基部節でのシアニジン-3-ルチノシド含量は頂部節や中間節よりも多かった（第8表）また、全部位でシアニジ



第7図 ダッタンソバの主茎部に含まれるアントシアニンの HPLC クロマトグラム

注) Peak 1：シアニジン-3-グルコシド，Peak 2：シアニジン-3-ルチノシド。

第8表 ダッタンソバの節位ごとのアントシアニン含量 (mg/100g 乾物)

部位	節位	シアニジン-3-グルコシド		シアニジン-3-ルチノシド		総アントシアニン	
頂部節	3	0.014 ± 0.003	c	0.362 ± 0.067	c	0.376 ± 0.070	c
中間節	2	0.032 ± 0.005	b	0.682 ± 0.121	b	0.715 ± 0.126	b
基部節	1	0.076 ± 0.005	a	1.054 ± 0.082	a	1.130 ± 0.084	a

注1) 平均値 ± 標準偏差で表示した。
注2) 同列中の異なる英小文字は LSD 法 (n= 4) により 5 % 水準で有意差あり。

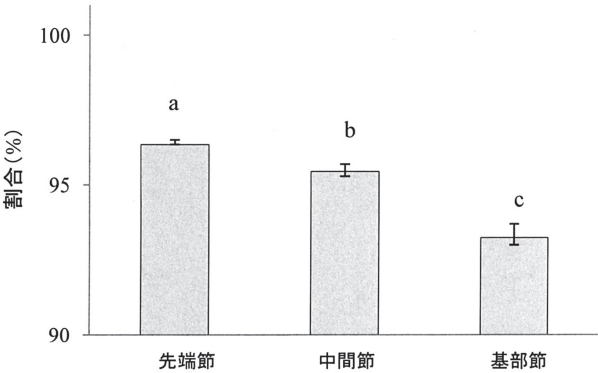
ン-3-グルコシドの含量はシアニジン-3-ルチノシドの含量よりも少なかった (第8表)。

全アントシアニン (シアニジン-3-グルコシドとシアニジン-3-ルチノシド) に対するシアニジン-3-ルチノシドの割合は基部節よりも頂部節において高かった (第8図)。

2) アントシアニンと紫外線照射との関係

アントシアニンと紫外線照射との関係を、ダッタンソバ幼茎を用いて人工気象器内で調査した。“ロッタングダム”，“ネパール” および “ユーゴスラビア” の平均値では，播種後25日目において，紫外線照射 (有) 区のシアニジン-3-ルチノシドの含量は紫外線照射 (無) 区のシアニジン-3-ルチノシドの含量よりも2.3倍高かった (第9図)。一方，シアニジン-3-グルコシドの含量は2.0倍高かった (第10図)。

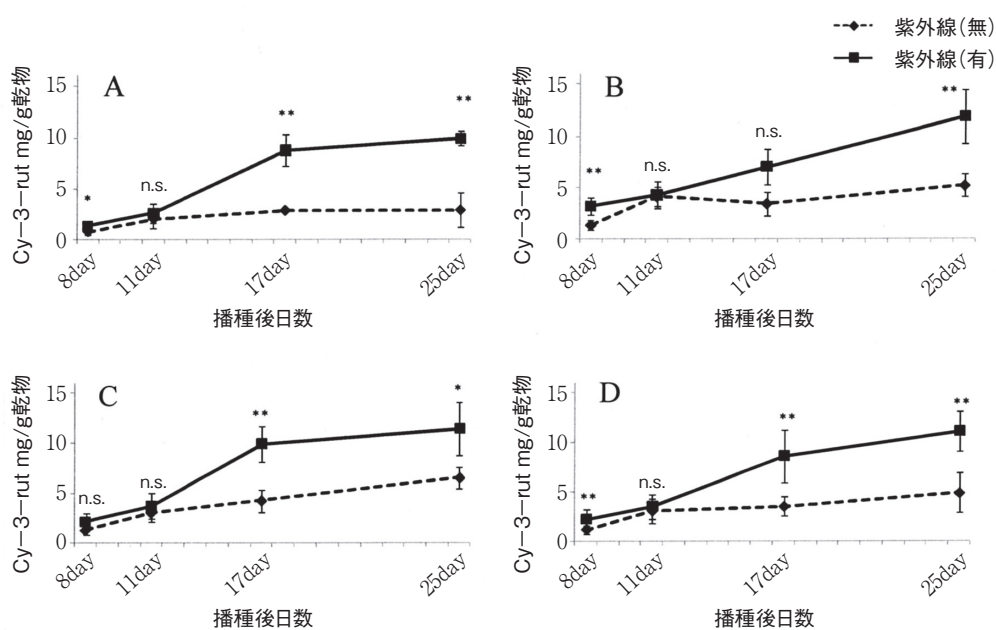
全アントシアニンに対するシアニジン-3-ルチノシドの割合は，紫外線照射 (有) 区では，播種後，8日目，11日目そして17日目にて紫外線照射 (無) 区よりも有意に高かった (第11図)。25日目は有意



第8図 ダッタンソバの節位ごとにおける全アントシアニンに対するシアニジン-3-ルチノシドの割合

注1) 異なる英小文字は LSD 法 (n=4) により5% 水準で有意差あり。
注2) 図中の棒線は標準偏差を指す。

ではないものの同様な傾向が見られた (第11図)。つまり，紫外線照射 (有) 区では，全アントシアニンに対するシアニジン-3-ルチノシドの割合は，紫外線照射 (無) 区よりも高くなることが明らかになった。Beckwith et al. (2004) は，ペンニセツム・セ

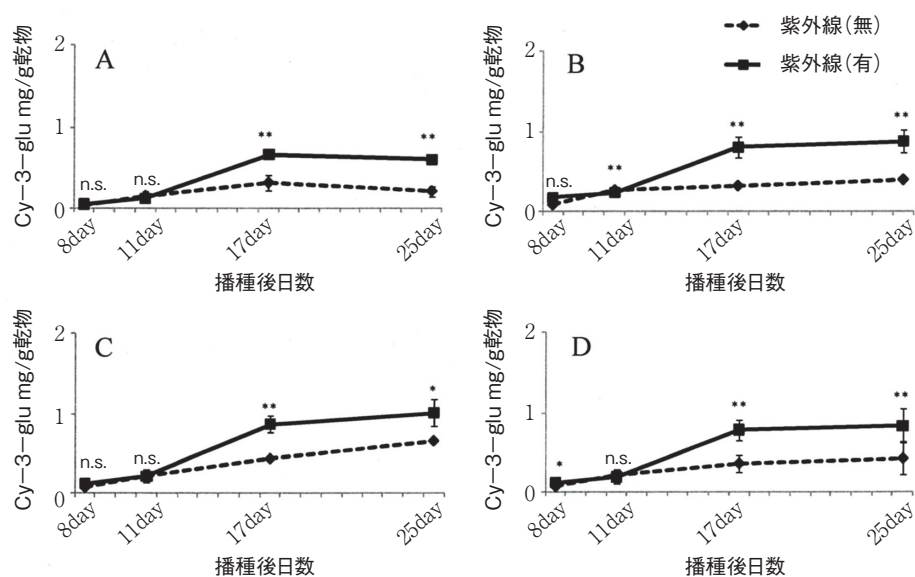


第9図 紫外線がシアニジン-3-ルチノシド含量に及ぼす影響

注1) A: ユーゴスラビア, B: ロッタンダタム, C: ネパール, D: A-C の平均値。

注2) 紫外線(有)および(無)下の平均値間において, **, *, n.s. はそれぞれ1%水準で有意, 5%水準で有意, 有意でないことを示す。

注3) Cy-3-rut はシアニジン-3-ルチノシドの略。

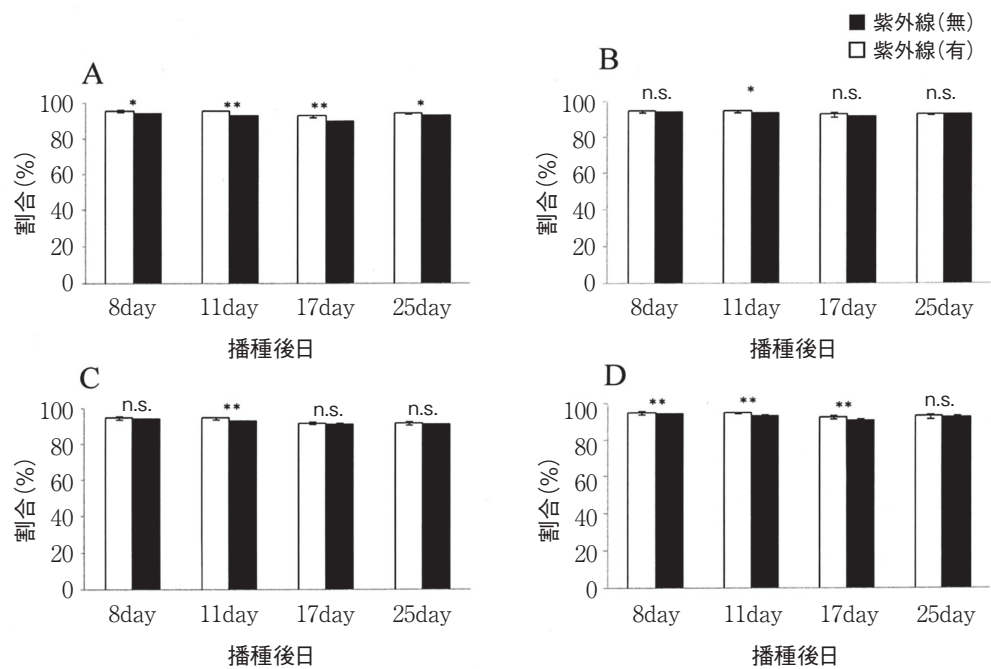


第10図 紫外線がシアニジン-3-グルコシド含量に及ぼす影響

注1) A: ユーゴスラビア, B: ロッタンダタム, C: ネパール, D: A-C の平均値。

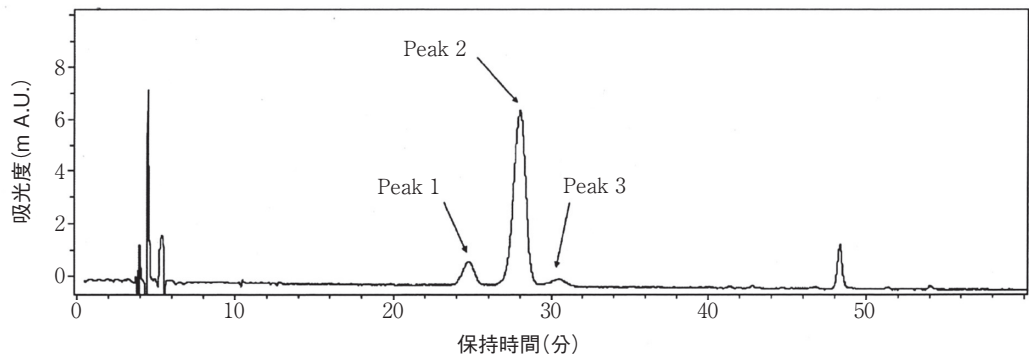
注2) 紫外線(有)および(無)下の平均値間において, **, *, n.s. は, それぞれ1%水準で有意, 5%水準で有意, 有意でないことを示す。

注3) Cy-3-glu はシアニジン-3-グルコシドの略。



第11図 紫外線（有）および（無）下における全アントシアニンに対するシアニジン-3-ルチノシドの割合

注1) A：ユーゴスラビア，B：ロタンダタム，C：ネパール，D：A-Cの平均値。
注2) 紫外線（有）および（無）下の平均値間において，**，*，n.s.はそれぞれ1％水準で有意，5％水準で有意，有意でないことを示す。



第12図 普通ソバ幼苗の茎葉に含まれるアントシアニンのHPLCクロマトグラム

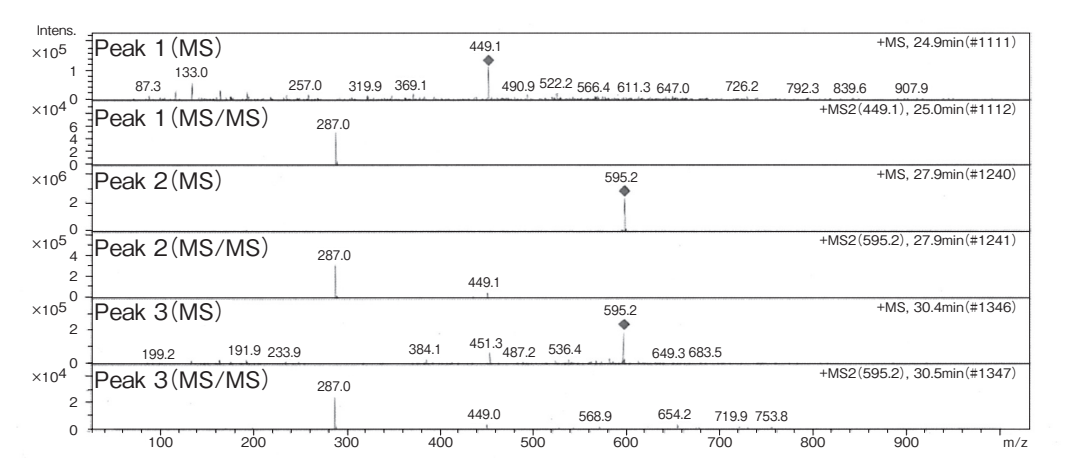
注) Peak 1：シアニジン-3-ガラクトシド，Peak 2：シアニジン-3-ガラクトシルラモノシド，Peak 3：シアニジン-3-ルチノシド。

タケウムを材料として紫外線照射試験を行っており、本研究で得られた結果と同様の報告をしている。

3) 普通ソバのアントシアニン

普通ソバ“常陸秋ソバ”のメタノール塩酸抽出液のHPLCクロマトグラム上では、3つのアントシアニンのピークが検出された（第12図）。MSおよびMS/MS解析では、ピーク1（ m/z 449 of $[M+H]^+$ ），ピーク2（ m/z 595; m/z 287, 449 of $[M+H]^+$ ），ピーク3（ m/z 595; m/z 287, 449 of $[M+H]^+$ ）の結果が得られた（第13図）。リテンションタイムと

MSおよびMS/MSスペクトルとの比較からピーク1はシアニジン-3-ガラクトシド，ピーク2はシアニジン-3-ガラクトシルラモノシド，ピーク3はシアニジン-3-ルチノシドであることが分かった。また、 m/z 値はKim et al. (2007)の報告と一致した。HPLCクロマトグラムにて検出された“常陸秋ソバ”のアントシアニンのリテンションタイムは“牡丹ソバ”，“階上早生”および“信濃夏ソバ”で検出されたアントシアニンのリテンションタイムと一致した。つまり、本研究に用いた普通ソバは全品種



第13図 普通ソバの茎葉に含まれる3種類のアントシアニンについてのLC-ESI-MS/MSスペクトル

第9表 普通ソバの茎部に含まれるアントシアニン含量

要因	シアニジン-3-ガラクトシド (mg/100g 乾物)		シアニジン-3-ガラクトシルラモノシド (mg/100g 乾物)		シアニジン-3-ルチノシド (mg/100g 乾物)		総アントシアニン (mg/100g 乾物)	
品種								
牡丹ソバ	17.9 ± 5.1	a	39.3 ± 10.2	a	3.9 ± 0.9	a	61.0 ± 13.1	a
階上早生	24.1 ± 7.0	a	35.1 ± 6.8	ab	3.1 ± 0.9	a	63.1 ± 13.5	a
信濃夏ソバ	17.3 ± 3.8	a	20.6 ± 4.3	b	3.5 ± 1.0	a	41.4 ± 7.4	a
採取時期および部位								
幼苗期 子茎	71.7 ± 18.5	a	117.9 ± 29.6	a	5.2 ± 1.1	b	194.8 ± 42.0	a
開花期 頂部節	1.0 ± 0.6	c	12.4 ± 3.7	c	8.9 ± 2.9	ab	22.3 ± 6.2	cd
中間節	12.0 ± 2.8	c	58.3 ± 9.9	b	10.2 ± 2.4	a	80.5 ± 12.1	bc
基部節	38.2 ± 9.7	b	25.3 ± 4.0	c	0.5 ± 0.3	c	66.1 ± 12.1	bc
成熟期 頂部節	0.8 ± 0.8	c	1.0 ± 0.6	c	n.d.	—	1.7 ± 1.3	d
中間節	7.0 ± 1.9	c	5.6 ± 1.3	c	n.d.	—	12.7 ± 2.5	d
基部節	7.5 ± 2.7	c	0.9 ± 0.7	c	n.d.	—	8.4 ± 2.8	d
分散分析表								
品種 (A)	N.S.		*		N.S.		N.S.	
採取時期および部位 (B)	**		**		**		**	
A × B	*		N.S.		N.S.		N.S.	

注1) Peak 1：シアニジン-3-ガラクトシド，Peak 2：シアニジン-3-ガラクトシルラモノシド，Peak 3：シアニジン-3-ルチノシド。
注2) 総アントシアニンは，シアニジン-3-ルチノシド相当量として算出した。
注3) 同列中の異なる英小文字はLSD法（n= 4）により5%水準で有意差あり。
注4) **，*，n.s.はそれぞれ1%水準で有意，5%水準で有意，有意でないことを示す。
注5) 平均値±標準偏差で表示した。
注6) 採取時期および部位では，牡丹ソバ，階上早生および信濃夏ソバを混合して求めた。

において同じ種類のアントシアニンを有することが明らかになった。
生育ステージの異なる茎および節位の異なる茎に関してアントシアニンの組成を調査した。どの生育ステージにおいても，3種類のアントシアニンを検出できた（第9表）。シアニジン-3-ガラクトシドは

節位が高くなるにつれて含量が低下する傾向が見られた（第9表）。シアニジン-3-ガラクトシルラモノシドの含量は中間節では，頂部節および基部節よりも高い傾向が見られた（第9表）。シアニジン-3-ルチノシドの含量は，基部節では頂部節よりも低い傾向が見られた（第9表）。シアニジン-3-ルチノシド

は全供試品種において成熟期ではどの部位においても検出されなかった（第9表）。

全アントシアニン（シアニジン-3-ガラクトシド、シアニジン-3-ガラクトシルラモノシドおよびシアニジン-3-ルチノシド）に対する各アントシアニンの割合は、部位別そして生育ステージ別に異なった。幼苗期では、主となるアントシアニンは、シアニジン-3-ガラクトシドとシアニジン-3-ガラクトシルラモノシドであった（第9表）。中間節では、シアニジン-3-ガラクトシルラモノシドの割合は、全アントシアニンの種類の中で最も高かった（第9表）。一方、シアニジン-3-ガラクトシドの割合は中間節では小さかったが、頂部節ではさらにその割合は下がった（第9表）。基部節では、シアニジン-3-ガラクトシドの割合が高く、続いてシアニジン-3-ガラクトシルラモノシドの割合が高い傾向が見られた（第9表）。シアニジン-3-ルチノシドの割合は3種類のアントシアニンの中で最も低かった（第9表）。成熟期では、シアニジン-3-ルチノシドは、どの部位においても検出されなかった（第9表）。シアニジン-3-ガラクトシドは節位が低くなるにつれて含量が増加する傾向にあった（第9表）。

普通ソバの葉のアントシアニンは茎と同じ種類の

ものが存在していた（第10表）。葉のアントシアニン含量は茎に比べると低かった（第10表）。シアニジン-3-ガラクトシドとシアニジン-3-ガラクトシルラモノシドは節位が低くなるにつれて含量が高まる傾向にあった（第10表）。しかし、この傾向はシアニジン-3-ルチノシドでは見られなかった（第10表）。シアニジン-3-ルチノシドは成熟期では、全品種の全節位において検出されなかった（第10表）。シアニジン-3-ガラクトシルラモノシドに対するシアニジン-3-ガラクトシドの割合は中間節で高く、基部節では低い傾向が見られた（第10表）。

4）アントシアニンと生育期間との関係

本研究では、普通ソバの茎葉に含まれる3種類のアントシアニン（シアニジン-3-ガラクトシド、シアニジン-3-ガラクトシルラモノシドおよびシアニジン-3-ルチノシド）について調査した。今まで、普通ソバに含有されるアントシアニンは4種類報告されている。すなわち、シアニジン-3-ガラクトシド、シアニジン-3-グルコシド、シアニジン-3-ガラクトシルラモノシドおよびシアニジン-3-ルチノシドである（Kim et al. 2007）。本研究で同定された3種類のアントシアニンは、（Kim et al. 2007）の報告とは矛盾しないが、シアニジン-3-グルコシドは

第10表 普通ソバの葉部に含まれるアントシアニン含量

要因		シアニジン-3-ガラクトシド (mg/100g 乾物)		シアニジン-3-ガラクトシルラモノシド (mg/100g 乾物)		シアニジン-3-ルチノシド (mg/100g 乾物)		総アントシアニン (mg/100g 乾物)	
品種									
牡丹ソバ		2.7 ± 1.0	a	11.5 ± 1.8	a	3.8 ± 0.9	a	18.0 ± 2.5	a
階上早生		1.1 ± 1.0	a	2.8 ± 1.2	c	1.2 ± 0.4	b	5.0 ± 2.3	b
信濃夏ソバ		1.7 ± 0.9	a	6.0 ± 1.9	b	1.8 ± 0.5	b	9.1 ± 2.7	b
採取時期および部位									
幼苗期	子葉	1.2 ± 1.3	b	6.8 ± 2.9	c	4.0 ± 1.3	a	11.3 ± 4.9	bc
	開花期								
	頂部節	0.0 ± 0.2	b	2.7 ± 1.2	cd	3.6 ± 0.5	a	6.3 ± 1.3	cd
	中間節	2.8 ± 1.4	b	14.2 ± 4.1	b	4.0 ± 1.2	a	21.0 ± 6.1	b
成熟期	基部節	7.1 ± 2.9	a	21.9 ± 2.4	a	4.1 ± 1.3	a	33.0 ± 3.7	a
	頂部節	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—	n.d.	—
	中間節	1.4 ± 0.8	b	0.5 ± 0.4	d	n.d.	—	2.0 ± 1.2	d
	基部節	0.3 ± 0.2	b	1.0 ± 0.4	d	n.d.	—	1.3 ± 0.3	d
分散分析表									
品種 (A)		N.S.	* *		* *		* *		
採取時期および部位 (B)		* *	* *		* *		* *		
A × B		N.S.	* *		*		* *		

注) 第9表と同じ。

HPLC 分析および LC/MS 分析で確認することはできなかった。Kim et al. (2007) は、シアニジン-3-グルコシドとシアニジン-3-ガラクトシルラモノシドのリテンションタイムは一致すると報告している。しかし、少なくとも“常陸秋そば”の幼苗で検出されたピーク 2 には、シアニジン-3-グルコシドの分子イオンピークは検出できなかった。本研究では、シアニジン-3-グルコシドは検出されなかったものの、Kim et al. (2007) の報告と同じく、ピーク 2 に僅かだけ含有されていた可能性がある。

3. まとめ

本研究では、ダッタンソバ幼苗に含有されるアントシアニン（シアニジン-3-グルコシドとシアニジン-3-ルチノシド）について調査した。アントシアニンの定性分析結果は、既報（Kim et al. 2007）と一致した。また、全アントシアニンに対するシアニジン-3-グルコシドの割合とシアニジン-3-ルチノシドの割合は節位ごとに異なることが明らかになった。

立山ら（2006）はナス果菜に含まれるアントシアニンは部位ごとに構成成分が異なると述べている。前川ら（2006）は、アブラナ科スプラウトの生産時に光強度を高めることでアントシアニン含量が増加することを報告している。これらのことから、アントシアニンを有する植物体は、環境ストレスを被ると、部位ごとにアントシアニン含量とアントシアニンの糖鎖組成を変化させて植物組織を保護している可能性があると考えられる。

ダッタンソバは紫外線などの環境ストレスから植物組織を保護するために、アントシアニンを蓄積している可能性がある。Beckwith et al. (2004) によれば、ペンニセツム・セタケウムは紫外線照射が強くなると、アントシアニンの種類や割合が変化すると報告している。ペンニセツム・セタケウムと同じように、ダッタンソバのアントシアニンも環境ストレスに応じてアントシアニンの種類や割合を変動させている可能性がある。本研究の結果では、ダッタンソバでは、全アントシアニンに対するシアニジン-3-ルチノシドの割合は基部に比べて頂部の節位のほうが高いことが明らかになった。

シアニジン-3-ルチノシドの抗酸化作用は、シアニジン-3-グルコシドよりもやや強い（Heo et al. 2007）あるいはほとんど同じ（Lichtenthaler et al.

2003）であると報告されている。本研究では、ダッタンソバは紫外線ストレスを多く被る頂部節では、全アントシアニンに占めるシアニジン-3-ルチノシドの割合を高めることによって、抗酸化作用を強めていると考えられた。Rubinskiene et al. (2005) は、カシスにはシアニジン-3-ルチノシドとシアニジン-3-グルコシドが含まれており、シアニジン-3-ルチノシドはシアニジン-3-グルコシドよりも熱安定性が高いと報告している。Reen et al. (2006) は、シアニジン-3-ルチノシドはシアニジン-3-グルコシドよりも、食道における扁平上皮細胞癌の阻害が強いと報告している。本研究の結果から、ダッタンソバは異なる節位にアントシアニンを異なった割合で蓄積させていることが明らかになった。すなわち、アントシアニンの糖鎖構成の違いが植物組織の保護機能に関係していると推測された。普通ソバにおいても、異なる節位にアントシアニンを異なった割合で蓄積し、生育ステージごとに蓄積されるアントシアニンの種類を変動させていることが明らかになった。これらのことから、アントシアニンの変動はダッタンソバおよび普通ソバ植物体の組織保護機能に作用をもたらすと推察された。

Watanabe and Ito (2003) は、ソバ幼苗に連続的な紫外線照射処理を行うとアントシアニン合成が促進され、伸長成長が抑制されると報告した。Miura et al. (1989) は、ベニタデ (*Polygonum hydropiper* L.) の幼苗は、低温ではアントシアニン含量が増加すると報告している。本研究では人工気象器（24/0 h 明/暗、15℃）でダッタンソバ幼苗のアントシアニン含量の評価をした。人工気象器では、ダッタンソバのアントシアニン含量は紫外線照射が強くなるにつれて増加することが分かった。本結果は、Watanabe and Ito (2003) の報告と一致した。筆者らは、紫外線照射が厳しい環境では、全アントシアニンに対するシアニジン-3-ルチノシドの割合は、紫外線照射がない環境よりも高いことを明らかにした。リンゴでは、アントシアニン生合成に関与する遺伝子は紫外線照射によって活性化することが明らかとなっている（Ubi et al. 2006）。紫外線照射は配糖体の糖転移酵素の活性化に関与する遺伝子発現を誘導する可能性がある。そのため、ソバ植物体の部位で、紫外線照射の特に厳しい頂部では、糖転移酵素の活性化に関与する遺伝子発現が誘導され、配糖

濾液を減圧乾燥したところ、約100mLの濃い粘液が得られた。その粘液を5mL取り、薄層クロマトグラフィー (TLC) (150A; Whatman, Japan) にリニアチャージし、Samel et al. (1996) の手法、すなわち、展開溶媒 (50 : 40 : 10 : 20 = トルエン : ギ酸エチル : ギ酸 : ピリジン) を用いて展開したところ、蛍光灯のもとで赤色バンドが確認できた。その後、TLC プレート上の赤色バンド ($R_f=0.65$) を掻き取りメタノールへ溶解した。同じ精製作業を残りの粘液全て (約95mL) について行った。得られた溶液は、4℃で10分間、 $10,700 \times g$ にて遠心分離した。そして、ファゴピリンの前駆体であるプロトファゴピリンをファゴピリンへ変換させるため4℃で24時間、蛍光灯のもとで静置した。このようにしてファゴピリンと想定される赤色色素を精製した。

3) ファゴピリンの定性分析

分光光度計 (V-560; Jasco, Japan) を使ってメタノールに溶解した赤色色素の UV-vis 吸収スペクトルをとった。また、赤色色素 (2 μ L) を TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck Ltd., Japan) 上にスポットし、Samel et al. (1996) の方法、すなわち展開溶媒 (50 : 40 : 10 : 20 = トルエン : ギ酸エチル : ギ酸 : ピリジン) を用いて展開した。そしてスポットに UV ライト (302nm) を当てて可視化した。赤色色素の分子量を決定するため、ESI-MS (LCQ Deca ion trap mass spectrometer; Thermo Finnigan, USA) を利用した。赤色色素は流量5 μ L/分でメタノールへの直接注入とした。キャピラリー温度は220℃とし、スプレー電位は5.0kVとした。Sheath ガスの流速は30 arbitrary units とした。

4) HPLC および TLC の条件

ダッタンソバおよび普通ソバの葉、茎、花、殻および子実の凍結乾燥物100mgをメタノール1.25mLに浸し25℃で2日間静置した。これらのサンプルを25℃で10分間、 $10,700 \times g$ にて遠心分離した。濃度は80mg/mLであった。抽出液のうち2 μ L を TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck Ltd., Japan) にチャージし、展開溶媒 (50 : 40 : 10 : 20 = トルエン : エチルギ酸 : ギ酸 : ピリジン) にて展開し、302nmの紫外線を照射してスポットを可視化した。HPLC 分析は、Inertsil ODS-SP column (5 μ m, 150 $\times$ 4.6mm id; GL Sciences Inc., Japan) を装着した HPLC system (LaChrom Elite; Hitachi, Japan) に、抽出液を20 μ

L 注入して行った。カラム温度25℃、流量1mL/分、溶離液 (3 : 40 : 1 : 1 = 水 / メタノール / トリフルオロ酢酸 / テトラヒドロフラン) とした。検出波長は590nmとした。

5) 分光光度計の条件

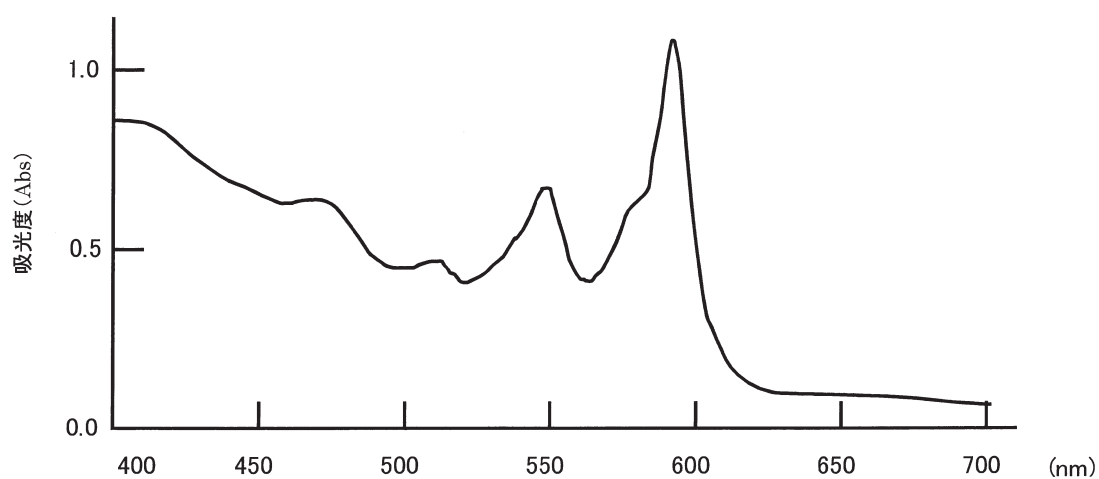
ファゴピリン含量は、Ozbolt et al. (2008) の方法に従って求めた。すなわち、ダッタンソバおよび普通ソバの葉、茎、花、殻および子実の凍結乾燥物60mgを3反復で採取し、80% テトラヒドロフラン4mLに浸し、65℃のウォーターバスで30分間湯煎した。サンプルは、25℃で10分間、 $2,000 \times g$ にて遠心分離した。そして上清液を試験管に移した。沈殿物については再抽出をして遠心分離した。遠心分離の後、得られた上清液を最初の上清液と併せて混合液とした。混合液 (0.5mL) を試験管へ移し、減圧乾燥させた。乾燥物にメタノール1mLを加えて超音波破碎をし、10分間、 $10,700 \times g$ にて遠心分離をした。得られた抽出液の濃度は3.75mg/mLであった。抽出液0.5mLを石英セルへ入れ、分光光度計 (V-560; Jasco, Japan) で590nmにおいて吸光度を測定した。ファゴピリン含量は、1.72 μ g/mL から27.5 μ g/mL のヒペリシン標品による直線的な検量線 ($r=0.999$) を用いて算出した。

2. 結果および考察

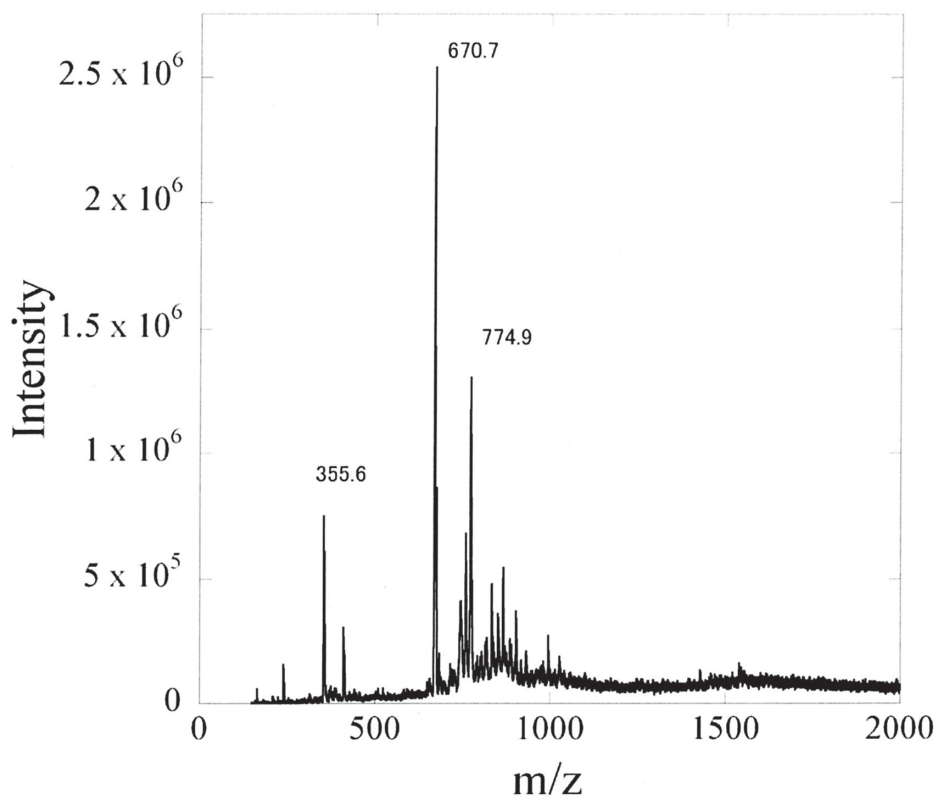
1) ファゴピリンの定性分析

ダッタンソバから精製した赤色色素についての TLC 分析において、 $R_f=0.43$ にメジャースポット、 $R_f=0.40$ にマイナースポットが観察された (データ未掲載)。Samel et al. (1996) は、ソバの花から精製したファゴピリンを TLC 分析したところ、3つのスポット ($R_f=0.38, 0.43, 0.46$) を検出したと報告している。本研究の結果は Samel et al. (1996) の報告とほぼ一致していた。

TLC プレートから赤色色素を掻き取りメタノールに溶解し、UV-vis 吸収スペクトルを測定したところ、最大吸収波長は、547nmと591nmであった (第15図)。Samel et al. (1996) は、ファゴピリンの吸収スペクトルの最大吸収波長は546nmと590nmであると報告しており、一方、Hinneburg and Neubert (2005) は、ファゴピリンの吸収スペクトルの最大吸収波長は546.6nmと590.4nmであると報告している。これらの報告は本研究の結果と一致している。



第15図 ダットンソバから精製した赤色色素の UV-vis 吸収スペクトル



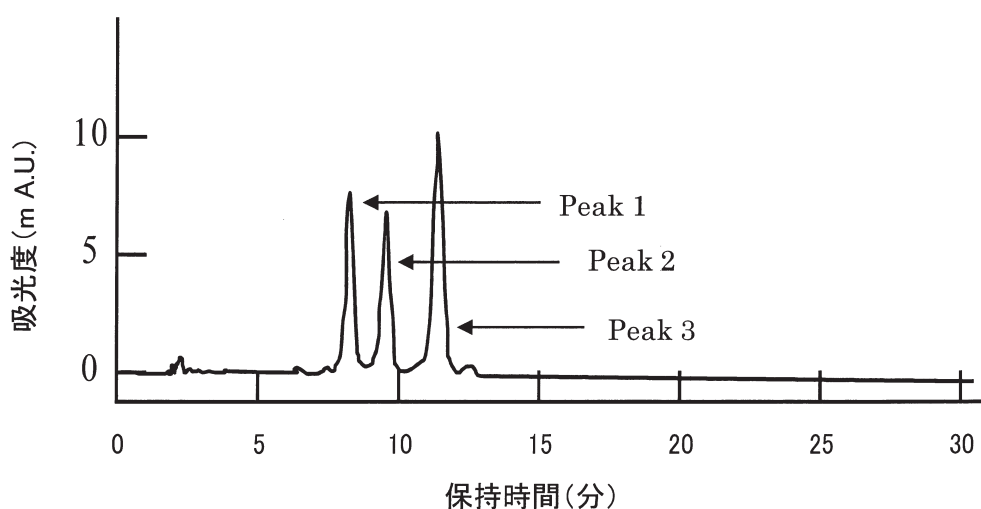
第16図 ダットンソバから精製した赤色色素の ESI-MS スペクトル

TLC プレートで精製した赤色色素の ESI-MS のデータは、 m/z 値670.7 $[M-H]^-$ で強いイオンピークを示し、その値は、ファゴピリンと一致した（第16図）。

2) ファゴピリンの定量分析

HPLC を使ったファゴピリンの定量法は未だ報告されていない。ファゴピリンはセントジョーンズ

ワートに含まれるヒペリシンの類縁体であり、本研究では、HPLC を使ったヒペリシンの定量法をもとにして、ファゴピリンの定量法を開発した。ダットンソバから精製したファゴピリンの HPLC クロマトグラムでは、3つのピークが検出された。リテンションタイムは、8.2分、9.5分および11.4分であった（第17図）。また、それぞれの UV-vis 吸収スペク



第17図 ダッタンソバの葉から精製したファゴピリンとファゴピリン類縁体の HPLC クロマトグラム

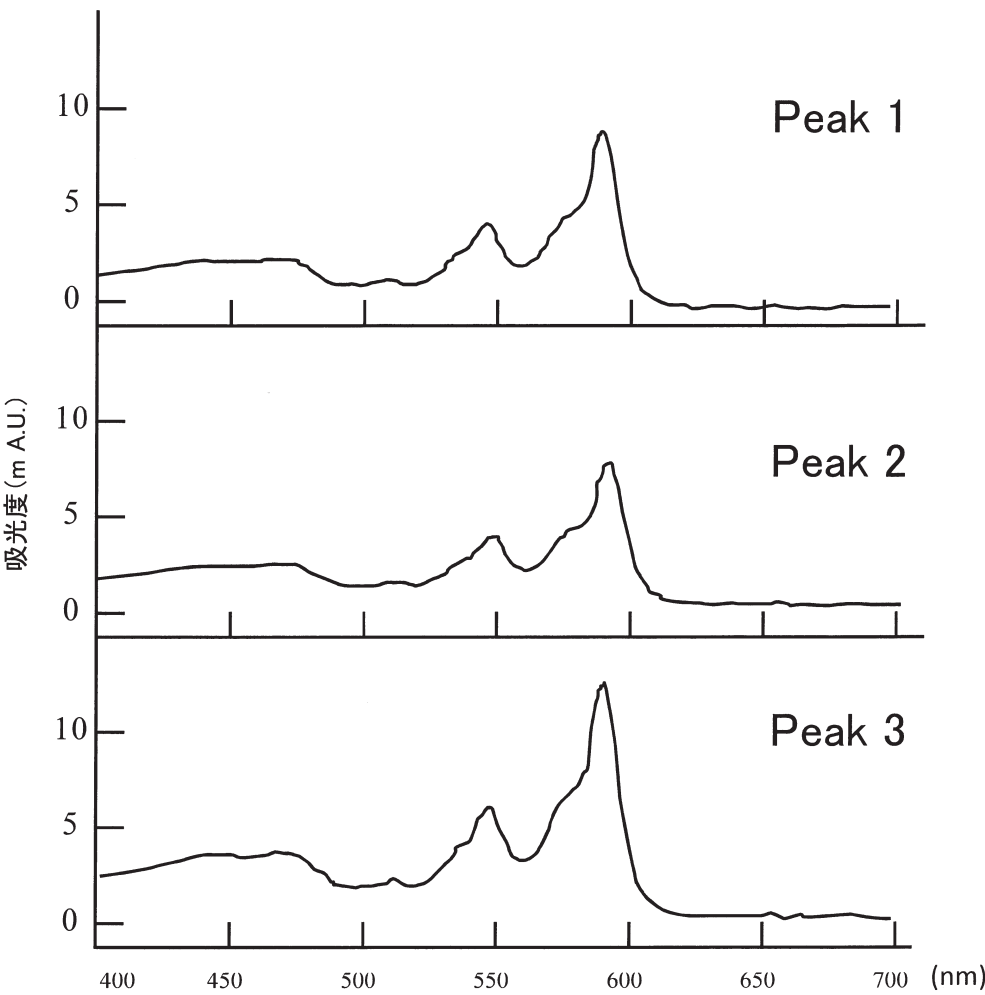
注) Peak1 : 8.2分, Peak2 : 9.5分, Peak3 : 11.4分。

トルでは、547nm と591nm が最大吸収波長であることから、これらの3つのピークは、ファゴピリンとファゴピリン類縁体であると考えられた(第18図)。プロトファゴピリンは光の照射によりファゴピリンへ変換される (Brockman 1957)。このことから、Alali et al. (2004) は、プロトヒペリシンをヒペリシンに転換させるため、ヒペリシンの入った HPLC バイアル瓶を分析直前に光にさらすことを提案している。そこで、本研究においても、プロトファゴピリンをファゴピリンに転換させるため、4℃、24時間にて HPLC バイアル瓶を蛍光灯にさらした。しかし、精製したファゴピリンの検出波長590nm における HPLC クロマトグラムでは、ピークは1本でなく、3本確認された。セントジョーンズワートでは、ヒペリシンの他に、プロトプセウドヒペリシン、プセウドヒペリシン、プロトヒペリシンが存在する (Xenophontos 2007)。同様にソバもファゴピリンとプロトファゴピリンの他に、未同定のファゴピリン類縁体を含んでいる可能性がある。本研究では、それぞれのピークの構造を明らかにすることは行わず、それぞれのピークを併せて総ファゴピリン (ファゴピリンおよびファゴピリン類縁体) 含量とした。Hinneburg and Neubert (2005) と Ozbolt et al. (2008) は、ファゴピリンと構造が類似しているヒペリシンを標品として、ファゴピリン含量を求めている。本研究においても、それぞれのピークをヒ

ペリシン相当量として求めて、総ファゴピリン含量を算出した。メタノールに溶解したヒペリシンのリテンションタイムは25分だった。検量線作成では、1.72 $\mu\text{g/mL}$ から27.5 $\mu\text{g/mL}$ までのヒペリシン標品の HPLC クロマトグラムをとり、それぞれ濃度のピーク面積から直線性の高い ($r=0.999$) 検量線を作成した。

3) ダッタンソバと普通ソバに含まれるファゴピリン

本研究で開発した HPLC 法および分光光度計法 (Ozbolt et al. 2008) を用いて、ダッタンソバおよび普通ソバの葉、茎、花、殻および子実に含まれるファゴピリン含量を求めた。HPLC 法で求めたファゴピリン含量と分光光度計法で求めたファゴピリン含量との相関係数は0.97 ($n=24$) で、高い相関があった。分光光度計法で算出したダッタンソバの葉と花のファゴピリン含量は、新しく開発した HPLC 法で算出した数値よりも、それぞれ1.8倍および2.6倍高かった (第11表)。一方、分光光度計法で算出した普通ソバの葉と花のファゴピリン含量は、新しく開発した HPLC 法で算出した数値よりも、それぞれ3.1倍および2.6倍高かった (第11表)。ダッタンソバ葉の抽出液の UV-vis 吸収スペクトルから、ファゴピリンの検出域 (590nm) にはファゴピリンのスペクトル以外にもクロロフィルやその他の二次代謝産物のスペクトルが含まれることが明らかとなった

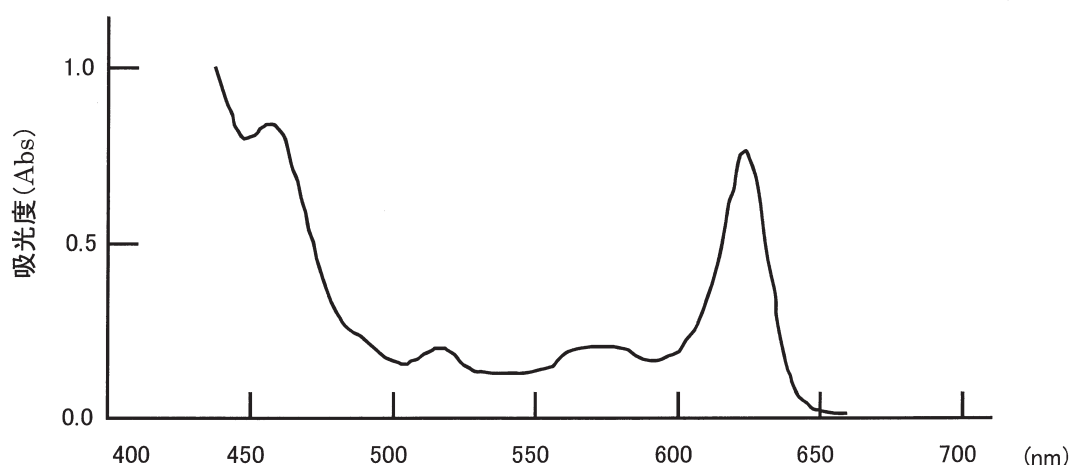


第18図 Peak1-3の UV-vis 吸収スペクトル

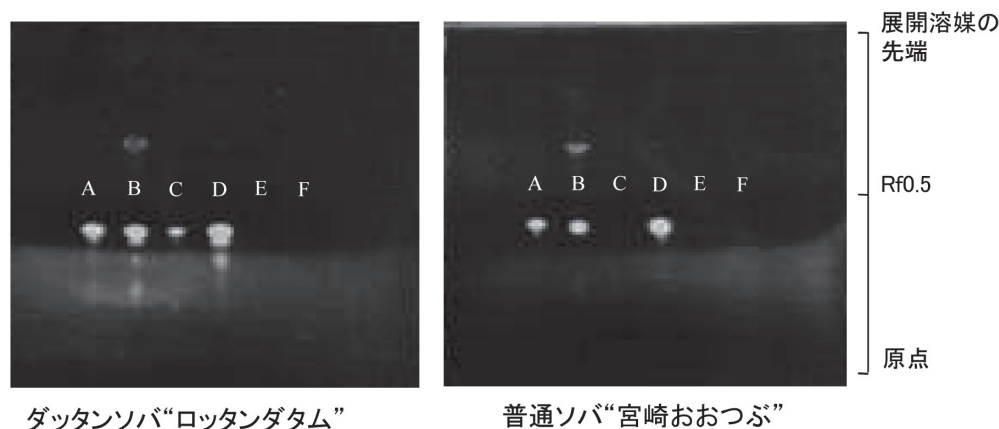
第11表 ダッタンソバおよび普通ソバの葉、茎、花、殻および子実に含まれるファゴピリン含量 (mg/g 乾物)

品種	部位	ファゴピリンとファゴピリン類縁体含量			総ファゴピリン含量	
		HPLC 法			HPLC 法	分光光度計法
		Peak1	Peak2	Peak3		
ダッタンソバ “ロッタンダタム”	葉	0.33±0.00	0.35±0.01	0.37±0.02	1.06±0.03	1.89±0.37
	茎	0.07±0.03	0.02±0.00	0.02±0.00	0.11±0.03	0.09±0.08
	花	0.88±0.01	0.68±0.02	0.28±0.00	1.87±0.03	4.73±0.33
	殻	0.00±0.00	0.00±0.00	0.03±0.05	0.04±0.05	0.08±0.08
	子実	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	N.D.
普通ソバ “宮崎おおつぶ”	葉	0.08±0.01	0.14±0.00	0.17±0.00	0.39±0.00	1.19±0.21
	茎	0.04±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0.04±0.03	N.D.
	花	0.31±0.03	0.15±0.01	0.18±0.01	0.64±0.06	1.67±0.19
	殻	0.00±0.00	0.02±0.03	0.00±0.00	0.02±0.03	N.D.
	子実	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	N.D.	N.D.

注) 各含量はヒペリシン相当量で算出した。平均値±標準偏差 (n= 4)。N.D.: 検出されず。



第19図 ダッタンソバの葉の抽出液の UV-vis 吸収スペクトル



第20図 ダッタンソバおよび普通ソバに検出されたファゴピリンの TLC 分析

注) (A) ファゴピリン精製液, (B) 葉, (C) 茎, (D) 花, (E) 殻, (F) 子実

(第19図)。すなわち、590nm を検出波長とした分光光度計による従来の測定法ではファゴピリン含量が過大評価されてしまうと考えられた。クロロフィル A および B (Wako Co., Ltd., Japan) をメタノールへ溶解し (0.4mg/mL), 本試験で開発した HPLC 法で分析したところ、クロロフィル A と B は検出されなかった (データ未掲載)。これらのことから新しく開発した HPLC 法は従来の分光光度計法と異なって、クロロフィル含有に左右されることなく、正確にファゴピリン含量を測定できることが明らかになった。

4) ソバにおけるファゴピリンの蓄積部位

TLC プレートに検出されるファゴピリンの赤色スポットの大きさと濃さは、ダッタンソバと普通ソ

バで異なる。ダッタンソバでは、葉と花の抽出液から大きな赤色スポットが、茎から小さな赤色スポットが検出されたが、殻と子実からは赤色スポットは検出されなかった。一方、普通ソバでは、葉と花の抽出液から大きな赤色スポットが検出されたが、茎、殻および子実からは赤色スポットは検出されなかった (第20図)。

HPLC 法でダッタンソバと普通ソバのファゴピリン含量を測定したところ、葉に多量 (1.06mg/g および 0.39mg/g), また、花にも多量 (1.84mg/g および 0.64mg/g) に含有されていることが明らかになった。一方、茎に少量 (0.11mg/g および 0.04mg/g), 殻に極少量 (0.04mg/g および 0.02mg/g), 子実に極少量 (0.01mg/g および 検出無し) 含有され

ていることが明らかになった (第11表)。

Brockmann (1957) は、ソバには極少量のファゴピリンが含まれるが、そのほとんどは花に蓄積されると報告している。Johnson (1983) は、穀実にはほとんどファゴピリンが含まれず、大部分が茎葉に蓄積されると報告した。Joshi and Padora (1991) は、ファゴピリンは花と殻に少量含まれているが、葉、茎および殻には含まれないと報告している。本研究で得られた結果はいずれの報告とも異なった。従来の分光光度計による定量では、品種や生育ステージの違いによってクロロフィル含量やその他の代謝産物含量に差が生じたため、ファゴピリンの蓄積部位については今まで特定できなかったと考えられる。本試験により、ダッタンソバおよび普通ソバともに、ファゴピリンは主に葉と花に含まれ、茎には葉や花よりも少ない量が含まれること、殻および子実にはほとんど存在しないことが明らかになった。また、ダッタンソバは普通ソバよりも多くのファゴピリンを含むことが明らかになった。

3. まとめ

近年、ポリフェノールだけでなく抗酸化性生理活性物質に関して、様々な生活習慣病の予防を目指した研究がなされている。その一方で、これまで実験動物を用いた害作用の報告も少なからずあった。例えば、一部のフェノール性抗酸化物質には、投与量や標的臓器によって発がん性あるいは発がん促進作用が認められるという実験事実が挙げられる。古くは、FDA による食品成分や食品添加物の毒性学的研究に端を発し、合成フェノール性抗酸化剤 butyl hydroxyanisole (BHA) や tert-butyl-hydroquinone (TBHQ) のラット前胃発がん作用や腎臓および膀胱発がんの促進作用など、数多くの研究報告がある (Ito et al. 1997)。これら一連の研究はその後、代謝による活性化学種の生成や標的臓器など極めて多くの重要な情報を与え、食品成分の毒性学的研究の進展に大きく貢献している。

一方、食品由来成分においても、コーヒー酸やセサモールに極めて高用量の投与ながら (0.4%)、前胃発がん作用が確認され (Ito et al. 1989)、フラボノイドのケルセチンでは、条件によっては大腸発がんを促進する可能性も指摘されている (Pereira 1996)。また、発がん性以外にもタンニン類、カル

コン類、茶カテキンを含む没食子酸類などによる急性毒性 (肝傷害作用) の報告がある (Galati and Obrein 2004)。さらに、大豆イソフラボンでは、大腸発がんの促進作用 (Rao et al. 1996)、骨粗しょう症マウスにおける胸腺の萎縮 (Yellari et al. 2002) など、ホルモン依存的な害作用も示唆されている。ソバを飼料として使うと、光増感作用体であるファゴピリンの影響により、家畜が光線過敏症を発症する可能性がある。光毒性は、太陽光照射と光増感作用体との間に起きる光化学反応で、皮膚細胞の炎症作用を誘引する。ファゴピリンが関与する光線過敏症はファゴピリズムとして知られており、従来、ソバは飼料として利用されてこなかった。特に、ソバの葉と花には高濃度のファゴピリンが含まれることから、ホールクロップ飼料としての利用はできなかった (Johnson 1983)。しかし、本研究により、ダッタンソバおよび普通ソバの穀実にはほとんどファゴピリンが含まれないため濃厚飼料として利用できる可能性があることが示唆された。ダッタンソバの茎葉には普通ソバの茎葉よりも多くのファゴピリンを蓄積しているため、ホールクロップ飼料として給餌する際は、普通ソバよりもダッタンソバのほうがファゴピリズムを発症する可能性があるので注意が必要である。

本研究では、ソバのファゴピリン含量を HPLC で測定する方法を開発した。この分析法は、ソバの品種群からファゴピリンをあまり含まない個体あるいは全く含まない個体を正確に選抜する手法として利用価値が高い。

VII. 総合考察

本研究で、ペルー産の紫トウモロコシ在来種には中国産、韓国産および日本産の紫トウモロコシ在来種よりもアントシアニンが多く含まれることが明らかになった。アントシアニンの組成を LC/MS 分析で同定したところ、シアニジン-3-グルコシドとシアニジン-3- (6-マロニルグルコシド) が主要な2種類であることが明らかになった。しかし、ペルー産の紫トウモロコシ在来種は日本の気候に適さず低収量であるため、アントシアニンを含む多収な有望品種を育成するには、アントシアニン合成に関する遺伝子を日本で開発した系統に導入する必要がある。

飼料添加物に頼らない循環型農業を確立するため

にも、紫トウモロコシ品種の育成に対する期待は大きい。井上ら（1990）は、トウモロコシ系統の栄養成分を近赤外分光分析法で定量する推定式を開発した。本研究で開発したアントシアニン含有量およびDPPHラジカル消去活性の推定式に加えて、栄養成分の推定式を用いて近赤外分光分析法による成分育種を行うことで、高栄養価でしかも高い機能性を有する紫トウモロコシ品種の育成が効率的に進むと考えられる。

機能性サイレージとしては、緑茶飲料残渣を用いた報告がある（除ら2004）。本研究では、紫トウモロコシと通常トウモロコシのサイレージ発酵品質は同等で、アントシアニンはサイレージ発酵に影響を与えないことが明らかとなった。

ダッタンソバに含まれるアントシアニン（シアニジン-3-グルコシドとシアニジン-3-ルチノシド）について調査したところ、全アントシアニンに対するシアニジン-3-グルコシドの割合とシアニジン-3-ルチノシドの割合は節位ごとに異なることが明らかになった。Beckwith et al. (2004) は、ペンニセツム・セタケウムに含まれるアントシアニンの種類や割合は、紫外線照射が強くなるに従って変化すると報告している。シアニジン-3-ルチノシドの抗酸化作用は、シアニジン-3-グルコシドよりもやや強いと報告されている（Heo et al. 2007）。本研究により、ダッタンソバは異なる節位にアントシアニンを異なった割合で蓄積していることが明らかになった。すなわち、ダッタンソバはペンニセツム・セタケウムと同様に紫外線照射の多い頂部節で、全アントシアニンに占めるシアニジン-3-ルチノシドの割合を高めることによって、抗酸化作用を強めて植物組織を保護している可能性があると考えられた。

ソバを飼料として使うと、ファゴピリンの影響により、家畜が光線過敏症を発症する可能性がある。特に、ソバの葉と花には高濃度のファゴピリンが含まれることから、ホールクロップ飼料としての利用はできなかった（Johnson 1983）。しかし、本研究により、ダッタンソバおよび普通ソバの穀実にはほとんどファゴピリンが含まれないことが明らかになった。すなわち、ソバ穀実はファゴピリズムを誘発する可能性の低い濃厚飼料としての利用が想定できる。ダッタンソバ茎葉は普通ソバ茎葉よりも多くのファゴピリンを蓄積しているため、ホールクロッ

プ飼料として利用する際は、ダッタンソバのほうが家畜に対しファゴピリズムを誘発しやすいと考えられる。本研究では、ソバのファゴピリン含量をHPLCで正確に測定する方法を開発した。この分析法は、ソバの品種群からファゴピリンをあまり含まない個体あるいは全く含まない個体を選抜する手法として特に利用価値が高い。すなわち、遺伝資源や突然変異処理した個体群から、ファゴピリンを欠失した個体を選抜することができれば、光線過敏症を誘引しないホールクロップ飼料ソバ品種を育成することが可能となる。

本研究で得られた成果が、二次代謝産物を由来とした機能性飼料作物の正しい認識へと結びつき、飼料添加物に依存しない健全な飼料生産へ発展していくことを期待してやまない。

VIII. 摘 要

本論文は、第I章の緒言から始まり、第VII章の総合考察で締めくくられている。第II章では、アントシアニン高含有紫トウモロコシ在来種の導入と題して、遺伝資源の評価を行った。第III章では、近赤外分光分析装置を使ったアントシアニンの迅速定量法の開発と題して、トウモロコシ育種現場へ近赤外分光分析法を導入して、迅速にアントシアニン高含有系統を選抜することが可能か検討した。第IV章では、紫トウモロコシサイレージの発酵品質と題して、アントシアニン高含有のトウモロコシをサイレージとしても通常のトウモロコシサイレージと同様の使い方ができるか検討した。第V章では、植物のアントシアニンが環境ストレスによって受ける影響と題し、ソバ植物体を飼料として利用することを想定して、機能性に優れるアントシアニンを茎葉のどの部位で最も効率的に確保できるか明らかにした。第VI章では、高速液体クロマトグラフィーを使った植物色素ファゴピリンの定量法の開発と題して、ソバに含まれるポリフェノールの一種、ファゴピリンの含有量を正確に定量できる分析手法を開発した。この新しい手法により、ソバ植物体のどの部位にファゴピリンが含まれているか明らかにした。

引 用 文 献

- 1) ADOM, K.K. and LIU, R.H. (2002) Antioxidant activity of grains. J. Agric. Food Chem. **50** : 6182-

- 6187.
- 2) AKIN, D.A., MORRISON, W.H., RIGSBY, L.L., BARTON, F.E., HIMMELSBACH, D.S. and HICKS, K.B. (2006) Corn stover fractions and bioenergy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **129-132** : 104-116.
 - 3) ALALI, F., TAWAHA, K. and AL-ELEIMAT, T. (2004) Determination of hypericin content in *hypericum triquetrifolium* Turra (Hypericaceae) growing wild in Jordan. *Nat. Prod. Res.* **18** : 147-151.
 - 4) ALSCHER, R.G., DONAHUE, J.L. and CRAMER, C.L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* **100** : 224-233.
 - 5) 青木宏光 (2002) 紫トウモロコシ色素の機能性と食品への応用. *Food Style* **21** : 58-62.
 - 6) AOKI, H., KUZE N. and KATO Y. (2002) Anthocyanin isolated from purple corn (*Zea mays* L.) . *FFI J. Jpn.* **199** : 41-45.
 - 7) AWATSUHARA, R., HARADA, K., MAEDA, T., NOMURA, T. and NAGAO, K. (2010) Antioxidative activity of the buckwheat polyphenol rutin in combination with ovalbumin. *Molecular Medicine Reports* **3** : 121-125.
 - 8) BAUMBUSCH, L.O., EIBLMEIER, M., SCHNITZLER, J., HELLER, W., SANDERMANN Jr, H. and POLLE, A. (1998) Interactive effects of ozone and Pow UV-B radiation on antioxidants in spruce (*Picea abies*) and pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiol. Plant.* **104** : 248-254.
 - 9) BECKWITH, A.G., ZHANG, Y.J., SEERAM, N.P., CAMERON, A. C. and NAIR, M.G. (2004) Relationship of light quantity and anthocyanin production in *Pennisetum setaceum* cvs. Rubrum and red riding hood. *J. Agric. Food Chem.* **52** : 456-461.
 - 10) BERNABUCCI, U., LACETERA, N., BASIRICO, L., RUECA, F., PIRAZZI, D., RONCHI, B., SEREN, E. and NARDONE, A. (2005) Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* **88** : 2017-2026.
 - 11) BROCKMANN, H. (1957) Photodynamically active plant pigments. *Proc. Chem. Soc. London.* 304-312.
 - 12) CASTILLO, C., HERNÁNDEZ, J., VALVERDE, I., PEREIRA, V., SOTILLO, J., LÓPEZ ALONSO, M. and BENEDITO, J.L. (2006) Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science.* **80** : 133-139.
 - 13) 江口研太郎・須田郁夫・小林美緒・沖智之・澤井晃・村木正則 (2004) ペルーから導入した紫トウモロコシ在来種の抗酸化活性. *九農研* **66** : 149.
 - 14) 江口研太郎・服部育男・澤井晃・村木正則・佐藤健次 (2008) 紫トウモロコシサイレージの発酵品質. *日草誌* **54** : 141-143.
 - 15) 江口研太郎・澤井晃・佐藤哲生 (2009) 近赤外分光分析法によるトウモロコシの DPPH ラジカル消去活性とアントシアニン含量の推定. *九農研* **72** : 93.
 - 16) EGUCHI K., MATSUI K., OKI T. and SATO T. (2008) Variation of anthocyanin types at different nodal positions and growth stages in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum* **25** : 9-14.
 - 17) EGUCHI K. and SATO T. (2009a) Differences in the ratios of cyanidin-3-O-glucoside and cyaniding-3-O-rutinoside to total anthocyanin under UV and Non-UV conditions in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Garten). *Plant Prod. Sci.* **12** : 150-155.
 - 18) EGUCHI K., ANASE T. and OSUGA H. (2009b) Development of High-Performance Liquid Chromatography Screening Method for the Determination of the Fagopyrin Content of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) and Common Buckwheat (*F. esculentum* Moench) . *Plant Prod. Sci.* **12** : 475-480.
 - 19) FIELD, T.S., LEE, D.W. and HOLBROOK, N.M. (2001) Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol.* **127** : 566-574.
 - 20) FRANCESCO, C., VINENZO, S., DOMENICO, T., ANTONELLA, S. and ANTONIO, T. (2007) Radical-scavenging capacity of several Italian red wines. *Food Chem.* **103** : 75-81.
 - 21) 藤原孝之・本庄達之助 (1995) 近赤外分光法によるウンシュウミカン果汁の糖および酸含量の推定. *食科工* **42** : 109-117.
 - 22) GALATI, G. and O'BREIN, P.J. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biol. Med.* **37** : 287-303.
 - 23) GABRIELSKA, J., OSZMIANSKI, J., KOMOROWSKA, M. and LANGNER, M. (1999) Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effect. *Z. Naturforsch.* **54C** : 319-324.
 - 24) GOULD, K.S. and LISTER, C. (2006) Flavonoid functions in plants. In: Andersen, Ø.M. and Markham, K.R. (Eds.) *Flavonoids Chemistry*,

- Biochemistry and Applications, pp397-441. Boca Raton, CRC Press, New York.
- 25) HEO, H.J., KIM, Y.J., CHUNG, D. and KIM, D.O. (2007) Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chem.* **104** : 87-92.
- 26) HINNEBURG, I. and NEUBERT, R.H.H. (2005) Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. *J. Agric. Food Chem.* **53** : 3-7.
- 27) HOCH, W.A., SINGSAAS, E.L. and MCCOWN, B.H. (2003) Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiol.* **133** : 1296-1305
- 28) 堀之内正次郎・三角久志・岩切正芳 (2007) 機能性食品の添加飼料が豚の産肉性と肉質に及ぼす影響の検討. 宮崎県畜試研報 **20** : 75-59.
- 29) 本田祐・木村正義・犬山茂 (2002) ヒマワリ品種「ノースクイーン」の育成とその特性. 北海道農研研報 **176** : 75-89.
- 30) HOSODA, K., ERUDEN, B., MATSUYAMA, H. and SHIOYA, S. (2009) Silage fermentative quality and characteristics of anthocyanin stability in anthocyanin-rich corn (*Zea mays* L.) *Asian-Australasian J. Ani. Sci.* **22** : 528-533.
- 31) 五十嵐善治 (2004) 食品素材によるアントシアニンの多様性と機能－アツミカブを中心として－. 日本食生活学会誌 **15** : 4-11.
- 32) ITO, N., HIROSE, M. and IMAIDA, K. (1997) Antioxidants-carcinogenic and chemopreventive properties. In: BERTINO, J.R. (Ed.) *Encyclopedia of cancer*. Vol. **1**, pp51-63. Academic Press
- 33) ITO, N. and HIROSE, M. (1989) Antioxidants-carcinogenic and chemopreventive properties. *Adv. Cancer Res.* **53** : 247-302.
- 34) 伊東栄作・池谷文夫・濃沼圭一・江口研太郎 (2004) サイレージ用トウモロコシの新品種「ゆめちから」の育成とその特性. 九州沖縄農研報告 **43** : 1-25.
- 35) 井上直人・阿部亮・袖山栄次・西牧清・中村茂文・滝沢康孝 (1990) 近赤外反射光分光法を利用したトウモロコシホールクロップサイレーズの可消化有機物含量の原料段階における推定. 日草誌 **36** : 20-31.
- 36) JANINA, G., JAN, O. and MALGOZATA, K. (1999) Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effect. *Z. Naturforsch.* **54c** : 319-324.
- 37) 自給飼料品質評価研究会 (編) (2001) 改訂 粗飼料の品質評価ガイドブック. 日本草地畜産種子協会, 東京, p1-196.
- 38) JOHNSON, A.E. (1983) Photosensitizing toxins from plants and their biologic effects. *Handbook of Natural Toxins*. In: R.F. KEELER and A.T. TU (Eds.) Vol. **1**, pp345-359. Plant and Fungal Toxins. Marcel Dekker, New York.
- 39) JOSHI, B.D. and PARODA, R.S. (1991) Buckwheat in India. *Physiology and Biochemistry*. In: B.D. JOSHI and R.S. PARODA (Eds.) pp30-36. National Bureau of Plant Genetic Resources, India.
- 40) 除春城・蔡義民・喜田環樹・松尾守展・河本英憲・村井勝 (2004) 緑茶飲料残さ TMR サイレージの調製, 発酵品質および栄養価. 日草誌 **50** : 40-46.
- 41) KIM, Y.S., KIM, J.G. and LEE, Y.S. (2005) Comparison of the chemical components of buckwheat seed and sprout. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition.* **34** : 81-86.
- 42) KIM, S.J., MAEDA, T., SARKER, M.Z.I., TAKIGAWA, S., MATSUURA-ENDO, C., YAMAUCHI, H., MUKASA, Y., SAITO, K., HASHIMOTO, N., NODA, T., SAITO, T. and SUZUKI, T. (2007) Identification of anthocyanins in the sprouts of buckwheat. *J. Agric. Food Chem.* **55** : 6314-6318.
- 43) 気象庁 (2005) 観測開始からの毎月の値. 気象庁, 東京, <http://www.data.kishou.go.jp/mdrr/smp/jp/index.html> [2007年2月20日参照]
- 44) KNÖRZER, O.C., DURNER, J., BOGER, P.A. (1996) Iterations in the antioxidative systems of suspension-cultured soybean cells (Glycine max) induced by oxidative stress. *Physiol. Plant.* **97** : 388-396.
- 45) KONO, Y. and FRIDOVICH, I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* **257** : 5751-5754.
- 46) 小林美緒・沖智之・増田真美・永井沙樹・福井敬一・松ヶ野一郷・須田郁夫 (2005) 紫サツマイモ「アヤマラサキ」から調製したアントシアニン含有物の高血圧自然発症ラットに対する血圧降下作用. 食科工 **52** : 41-44.
- 47) 蔵之内利和 (1994) テンサイ高品質系統の開発. 育種学最近の進歩 **35** : 30-35.
- 48) LEE, D.W., O'KEEFE, J., HOLBROOK, N.M. and FIELD, T.S. (2003) Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecol. Res.* **18** : 677-694.
- 49) LEE, H.S., PARK, C.H., PARK, B.J., KWON, S.M., CHANG,

- K.J. and KIM, S.L. (2006) Rutin, Catechin Derivatives, and Chemical Components of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) Sprouts. Korean J. Crop Sci. **51** : 277-282.
- 50) LICHTENTHALER, R., MARX, F. and KIND, O.M. (2003) Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. Eur. Food Res. Technol. **216** : 166-173.
- 51) 前川健二郎・前田智雄・大島千周・鈴木卓・大澤勝次 (2006) 数種アブラナ科スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化能に及ぼす照射光強度の影響. 園芸学研究 **5** : 315-320.
- 52) 増子義孝 (1999) サイレージの発酵. 「サイレージ科学の進歩」(内田仙二監修), デイリー・ジャパン社, pp86-87, 東京.
- 53) 松井鑄一郎・李進才 (2003) 作物の環境ストレスと抗酸化機構. 植物の生長調節 **38** : 118-124.
- 54) MATSUI, K., EGUCHI, K. and TETSUKA, T. (2008) A novel gene that diverts the anthocyanin biosynthetic pathway towards the production of proanthocyanidins in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). Breed. Sci. **58** : 143-148.
- 55) MAZZA, G., KAY, C.D., COTTRELL, T. and HOLUB, B.J. (2002) Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. J. Agric. Food Chem. **50** : 7731-7737.
- 56) MIYAZAWA, T., NAKAGAWA, K., KUDO, M., MURAISHI, K. and SOMEYA, K. (1999) Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanin, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3,5-diglucoside, into rats and humans. J. Agric Food Chem. **132** : 1865-1871.
- 57) 森本宏 (1969) 「飼料学」, 養賢堂, p1-711. 東京.
- 58) MORISHITA, T., YAMAGUCHI, H. and DEGI, K. (2007) The contribution of polyphenols to antioxidative activity in common buckwheat and Tartary buckwheat grain. Plant Prod. Sci. **10** : 99-104.
- 59) MIURA, H., SHIMIZU, M., TAZUKE, A. and IWATA, M. (1989) Effect of monochromatic light on anthocyanin content in seedling of benitade (*Polygonum hydropiper* L.). J. Jpn. Soc Hort. Sci. **58** : 123-129.
- 60) NAVINDRA P. SEERAM, RUPO LEE, H. SAMUEL SCHEULLER and DAVID HEBER (2006) Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. Food chem. **97** (1) : 1-11.
- 61) 農林水産省農林水産技術会議事務局 (2009) 研究成果470. 安全・安心な畜産物生産技術の開発－抗生物質に依存しない減投薬飼養管理システムの構築－. p1-206.
- 62) 沖智之・増田真美・納美由紀・小林美緒・吉田収・西場洋一・須田郁夫 (2002) サツマイモ「シモン1号」葉部熱水抽出液のラジカル消去活性. 食科工 **49** : 683-687.
- 63) OKI, T., KOBAYASHI, M., NAKAMURA, T., OKUYAMA, A., MASUDA, M., SHIRATSUCHI, H. and SUDA, I. (2006) Changes in Radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation. J. Food Sci. **71** : C18-C22.
- 64) OŽBOLT, L., KREFT, S., KREFT, I., GERM, M. and STIBILJ, V. (2008) Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. Food Chem. **110** : 691-696.
- 65) PALMER, J.C., COOPER, H.B.Jr., PELLOW, J.W. and ANDERSON, D.M. (1997) Breeding methodology in a quality cotton district. Proceeding of Beltwide Cotton Conferences : 1628-1630.
- 66) QIN, P.Y., WANG, Q., SHAN, F., HOU, Z.H. and REN, G.X. (2010) Nutritional composition and flavonoids content of flour from different buckwheat cultivars. International Journal of food science and technology **45** : 951-958.
- 67) RAO, C.V., WANG, C.X., SIMI, B., LUBET, R., KELLOFF, G., STEELE, V.E. and LUBET, R.A. (1996) Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary cancer in rats. Carcinogenesis **17** : 1305-1311.
- 68) REEN, R.K., NINES, R. and STONER, G.D. (2006) Modulation of N-nitrosomethylbenzylamine metabolism by black raspberries in the esophagus and liver of Fischer 344 rats. Nutrition Cancer Inter. J. **54** : 47-57.
- 69) RUBINSKIENE, M., VISKELIS, P., JASUTIENE, I., VISKELINE, R. and BOBINAS, C. (2005) Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. Food Res. Inter. **38** : 867-871.
- 70) 佐伯真魚 (2007) 副産物飼料の機能性とその活用. 栄養生理研究会報 **51** : 15-20.
- 71) SAMEL, D., DONNELLA-DEANA, A. and DE WITTE, P. (1996) The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways.

- Planta Med. **62** : 106-110.
- 72) 佐々木直・阿閉博明・小松繁樹 (2007) そばくず給与が豚の肉質に及ぼす影響. 岩手県農研セ研報 **7** : 55-60.
- 73) 澤井晃・池谷文夫・伊東栄作・濃沼圭一・江口研太郎 (2004) サイレージ用トウモロコシ新品種「ゆめつよし」の育成とその特性. 九州沖縄農研報告 **45** : 41-62.
- 74) SÉVERINE, T., CATHERINE, F., ODILE, T., CATHERINE, B., JEAN-LOUIS, L. and CHRISTIAN, R. (2003) Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthized rats. J. Nutr. **133** : 4178-4182.
- 75) STRACK, D. and WRAY, V. (1993) Anthocyanins, Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics. In: Harbone J.B. (Ed.) Vol. **1**, pp325-356. Academic Press, London.
- 76) 須田郁夫・古田収・西場洋一・杉田浩一・松ヶ野一郷 (1997) 紫甘しょジュース飲用ラットにおける肝障害軽減効果. 九農研 **59** : 25.
- 77) SUZUKI, T., WATANABE, M., IKI, M., AOYAGI, Y., KIM, S.J., MUKASA, Y., YOKOTA, S., TAKIGAWA, S., HASHIMOTO, N., NODA, T., YAMAUCHI, H. and MATSUURA-ENDO, C. (2009) Time-course study and effects of drying method on concentrations of gamma-aminobutyric acid, flavonoids, anthocyanin, and 2"-hydroxynicotianamine in leaves of buckwheats. J. Agric Food Chem. **57** : 259-264.
- 78) TALABÉRA, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, Jean-Louis L. and Rémésy, C. (2003) Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthized rats. J. Nutr. **133** : 4178-4182.
- 79) 田中治・大桃定洋 (1995) プラスチックフィルムを用いた小規模サイレージ発酵試験法 (パウチ法) の開発. 日草誌 **41** : 55-59.
- 80) 立山千草・五十嵐善治 (2006) ナス果菜の栽培品種・部位別のアントシアニン量, クロロゲン酸量およびラジカル消去活性. 食科工 **53** : 218-224.
- 81) 寺原典彦・太田英明・吉玉国二郎 (2000) アントシアニンの性質. 「アントシアニン-食品の色と健康-」 (大庭理一郎・五十嵐喜治・津久井重紀夫監修), p23, 建帛社, 東京.
- 82) 戸澤英男 (2005) 「トウモロコシ-歴史・文化, 特性・栽培, 加工・利用-」. p1-396. 農山漁村文化協会, 東京.
- 83) TROYER, J.R. (1958) Anthocyanin pigments of buckwheat hypocotyls. Ohio J. Sci. **58** : 187-188.
- 84) TROYER, J.R. (1964) Anthocyanin formation in excised segments of buckwheat-seedling hypocotyls. Plant Physiol. **39** : 907-912.
- 85) TSUDA, T., WATANABE, M., OHSHIMA, K., NORINOBU, S., CHOI, S.W., KAWAKISHI, S. and OSAWA, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin. J. Agric. Food Chem. **42** : 2407-2410.
- 86) TSUDA, T., SHIGA, K., OHSHIMA, K., KAWAKISHI, S. and OSAWA, T. (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from Phaseolus vulgaris L. Biochem Pharmacol **52** : 1033-1039.
- 87) UBI, B.E., HONDA, C., BESSHO, H., KONDO, S., WADA, M., KOBAYASHI, S. and MORIGUCHI T. (2006) Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. Plant Sci. **170** : 571-578.
- 88) USHIMARU, T., SHIBASAKA, M. and TSUJI, H. (1992) Development of the O₂ (–) –detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. Plant and Cell Physiology. **33** : 1065-1071.
- 89) 渡邊潤・佐藤寛子・植村鉄夫・加藤真姫子 (2007) 乳牛における低未利用飼料資源ソバ製粉過程残渣の利用. 日本畜産学会大会講演要旨 **107** : 42.
- 90) 渡辺満・伊藤美雪 (2002) ソバ地上部の生育ステージによる抗酸化能とフラボノイド組成の変動. 食科工 **49** : 119-125.
- 91) WATANABE, M. (2007) An anthocyanin compound in buckwheat sprouts and its contribution to antioxidant capacity. Biosci. Biotechnol. Biochem. **71** : 579-582.
- 92) WIJINGAARD, H.H. and Arendt, E.K. (2006) Buckwheat. Cereal Chem. **83** : 391-401.
- 93) WILLIAMS, P. C. (2001) Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries In: P.C. WILLIAMS and K.H. NORRIS (Eds.) 2nd Edition, pp145-169. AACC Press, St. Paul.
- 94) WILLSON, M.F. and WHELAN, C.J. (1990) The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. Am. Nat. **136** : 790-809.
- 95) XENOPHONTOS, M., STAVROPOULOS, E., AVRAMAKIS, E., NAVAPOUDIS, E., DÖRNEMANN, D. and KOTZABASIS, K. (2007) Influence of the developmental stage on the (proto)-hypericin and (proto) pseudohypericin levels of *Hypericum* plants from Crete. Planta Med. **73** : 1309-1315.
- 96) 山本真里 (2006) 抗アレルギー効果のある茶葉成分. 日本補完代替医療学会誌 **3** : 53-60.
- 97) YELLARI, S., NAAZ, A., SZEWZYKOWSKI, M.A., SATO, T.,

WOODS, J.A., CHANG, J., SEGRE, M., ALLRED, C.D.,
HELPERICH, W.G., and COOKE, P.S. (2002) The
phytoestrogen genistein induces thymic and

immune changes: a human health concern? Pro.
Natl. Acad. Sci. **99** : 7616-7621.

Studies on Establishing Analysis Methods and Plant Physiology for Polyphenols in Corn and Buckwheat for Developing Functional Forage

Kentaro Eguchi¹⁾

Summary

Polyphenols contained in plant tissue are secondary metabolites. Although these compounds are not directly involved in plant growth and development, they do play beneficial roles. For example, these compounds reduce photo-oxidative damage in the leaf cells. In this study, variations in anthocyanin content, polyphenol content, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity were investigated in local varieties of purple corn; the local varieties in Peru exhibited high functional activity. In this study, quantitative analytical methods using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) were developed to estimate DPPH radical-scavenging activity and anthocyanin content of the cob and leaf-stem of purple corn. The anthocyanin of purple corn silage is retained in the silage after storage. The stored purple corn silage is expected to be highly beneficial because of its free-radical-scavenging capacity and antioxidant activity. In this study, we examined the type and quantity of anthocyanin accumulated in the leaf and stem of buckwheat under different conditions of ultraviolet (UV) radiation. The results indicate that buckwheat may accumulate certain types of anthocyanin that protect plant tissue against severe environmental stress. In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to measure the fagopyrin content of buckwheat. Tartary buckwheat contained more fagopyrin than common buckwheat. In the buckwheat plant, fagopyrin was found to be mainly present in the leaves and flowers, and to a small extent, in the stems, hulls, and groats.

Key words: anthocyanin, silage, buckwheat, corn, fagopyrin.