

## コシアブラ抗酸化成分の促成栽培条件による変動

村山 徹<sup>1\*</sup>・箭田浩士<sup>2</sup>・宮沢佳恵<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東北農業研究センター 960-2156 福島市荒井字原宿南

<sup>2</sup> 食品総合研究所 305-8642 つくば市観音台

### Effect of Forcing Culture Conditions on Content of Antioxidative Component in *Eleutherococcus sciadophylloides* (Franch. & Savat.) H. Ohashi

Tohru Murayama<sup>1</sup>, Hiroshi Yada<sup>2</sup> and Kae Miyazawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Agricultural Research Center for Tohoku Region, Harajuku-minami, Arai, Fukushima 960-2156

<sup>2</sup>National Food Research Institute, Kannondai, Tsukuba 305-8642

#### Abstract

The antioxidative activity in *Eleutherococcus sciadophylloides* (Franch. & Savat.) H. Ohashi. was assessed by the  $\beta$ -carotene degradation method and DPPH radical scavenging activity. Its methanolic extract showed a high antioxidative activity and its component was chlorogenic acid. Effect of temperature, light and cutting length on the chlorogenic acid concentration in young shoots was tested in a growth chamber. Intense light and long cutting increased the concentration of chlorogenic acid. Based on these findings, culture conditions suitable for forcing were investigated in green house. Young shoots that contain a high concentration of chlorogenic acid could be harvested in forcing culture by planting 30~40 cm-long cuttings in 10~15 degree C water.

**Key Words** : antioxidative activity, Araliaceae, chlorogenic acid

**キーワード** : 抗酸化活性, クロロゲン酸, ウコギ科

#### 緒 言

コシアブラは、ウコギ科の落葉高木で、北海道から九州までの山地に自生している。材は光沢があって美しく、加工しやすいので、細工物や民芸品に用いられる。その若芽は、こくのあるまろやかな風味で、おいしい山菜として珍重されているが、全国的な知名度は必ずしも高くない。一部の地域で促成栽培が試み始められているが、その技術は手探りで栽培条件や内部品質の検討はなされていない。

また、コシアブラは他のウコギ科の植物同様、栄養価の高い薬用植物としても注目を集めている。安江ら (1968, 1969) はコシアブラの葉の成分を分析し、フラボノイド成分として kaempferitrin, quercetin 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, kaempferol 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside を同定した。北島ら (1989) もコシアブラの葉に上記以外に afzerin, 3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl kaempferol 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, quercetin 3,7-O-bis- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside が含まれていることを示した。しかし、それらの成分がどのような生理機能性を示すのか、その後の報告はない。また、これらの報

告で用いられた時期のコシアブラの葉は、食用としては用いられない。

そこで、筆者らは、山菜として食用にする時期のコシアブラ若芽の抗酸化活性を評価してその成分を同定し、その成分含量に影響する要因を検討した。さらに、その結果に基づいて、好適な促成栽培技術を確立するため、ガラス室内で栽培条件が収量と抗酸化成分含量に及ぼす影響を検討した。

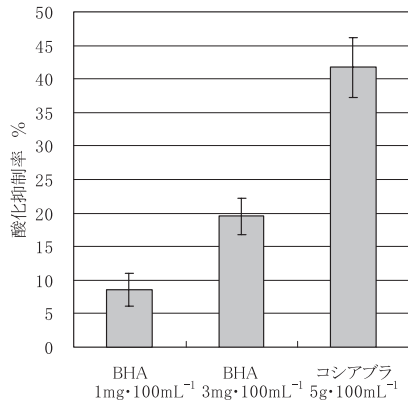
#### 材料および方法

##### 実験 1. 抗酸化活性、ラジカル消去活性の評価とその成分の同定

山形県真室川町の山林に自生するコシアブラの若芽を採取した。それらを 80%メタノールと共にポリトロンホモジナイザーで磨砕・抽出後、20 倍量に定容して試料溶液とした。抗酸化活性は、津志田らの方法 (1994) に基づいて、 $\beta$ -カロテン退色法により評価した。リノール酸の酸化に伴う 470 nm での吸光度の減少を 45 分後に測定し、{対照 (80%メタノール) での吸光度の減少 - 試料での吸光度の減少} / 対照での吸光度の減少 (%) を抗酸化活性 (酸化抑制率) として表した。DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性は、Hatano らの方法 (1988) に準じて評

2006年6月8日 受付. 2006年9月19日 受理.

\* Corresponding author. E-mail: murat@affrc.go.jp



第1図 コシアブラメタノール抽出物の抗酸化活性縦棒は標準誤差 (n=5)

価した。試料溶液を生体重 0.5, 1.0, 2.0 mg 相当量・mL<sup>-1</sup> 加えることによる DPPH の退色を、30 分後に 517 nm での吸光度として測定した。ラジカル消去活性は、(対照の吸光度 - 試料の吸光度) / 対照の吸光度 (%) として表した。

抗酸化成分は、活性の評価と同じ試料を用いて、分析用カラム (LiChrospher 100RP-18 (5 μm), Merck), フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 (島津 SCL-10A), 電気化学検出器 (Coulchem II, esa) を取り付けた液体クロマトグラフィー (島津 LC-10) で分析した。溶離液は 10 mM リン酸と 10 mM リン酸を含むメタノールを用い、メタノール濃度を 40 分間に 10% から 70% まで上昇させた。

### 実験 2. コシアブラの収量・品質に関わる要因の解明

山形県真室川町の山林で 2001 年 3 月に採取したコシアブラの穂木を、供試直前まで 4°C で保存した。

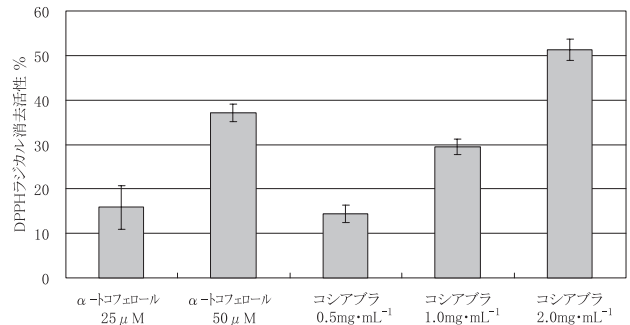
(試験 1) 気温と光強度の影響をみるために、長さ 10 cm に調製した穂木をパーミキュライトに挿し、気温 (昼/夜) 30/20, 25/15, 20/10°C と光量子束密度 540, 160, 30 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup> を組み合わせた 9 試験区を設け、12 時間日長 (白色蛍光灯)、湿度 80% のグロースチャンパー内で栽培した。

(試験 2) 穂木の長さの影響をみるために、穂木長を 20, 15, 10 cm とし、20/10°C, 12 時間日長 (200 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>)、湿度 80% で栽培した。

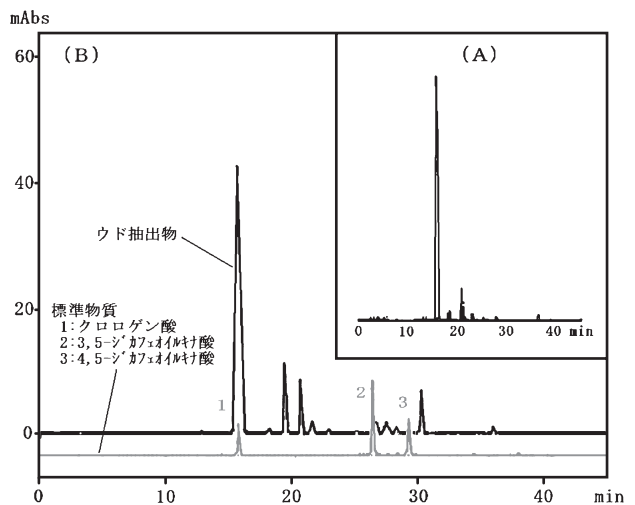
試験 1 では 1 区 12 本を、試験 2 では 1 区 5 本 3 反復を供試し、葉柄が十分に伸長して葉が開き始めた時点で収穫した。それらを 80% メタノールと共にポリトロンホモジナイザーで磨砕・抽出後、10 倍量に定容して DPPH ラジカル消去活性を評価し、クロロゲン酸を定量した。クロロゲン酸の定量は、成分分析と同様の装置を用い、溶離液を 10 mM リン酸を含む 50% メタノールとし、UV/VIS 検出器 (325 nm) で行った。

### 実験 3. 促成栽培技術の確立

福島県飯野町の山林で 2001 年 12 月に採取したコシアブラの穂木を、供試直前まで 4°C で保存した。実験には直径 1 cm 程度の穂木のみを用い、無加温ガラス室内で行った。



第2図 コシアブラメタノール抽出物の DPPH ラジカル消去活性 縦棒は標準誤差 (n=5)



第3図 コシアブラメタノール抽出物のクロマトグラム (A) 電気化学検出器 (400 mV), (B) UV/VIS 検出器 (325 nm)

長さ 40, 30, 25, 20 cm に調製した穂木を 20, 15, 10 °C に設定した恒温水槽に挿してビニールを被覆し、黒色遮光資材 (ダイオシート、遮光率 60 ~ 65%) で遮光した。1 区 10 本、3 反復とし、無加温ガラス室内で 2002 年 2 月 5 日から栽培した。収穫およびクロロゲン酸の定量は、実験 2 と同様に行った。

## 結 果

### 実験 1. 抗酸化活性、ラジカル消去活性の評価とその成分の同定

コシアブラ若芽のメタノール抽出物 5 g・100 mL<sup>-1</sup> の抗酸化活性は 40% 以上で、抗酸化物質である BHA と比較すると試料 5 g 当たりで BHA 3 mg 相当以上であった (第 1 図)。メタノール抽出物 1.0 mg・mL<sup>-1</sup> の DPPH ラジカル消去活性は 30% 程度で、試料 1 g 当たり天然抗酸化物質である α-トコフェロール 25 μmol 相当以上であった (第 2 図)。津志田ら (1994) によると試料 100 g 当たり BHA 25 mg 相当以上の野菜は非常に強い抗酸化活性を示すものと分類され、コ

第1表 コシアブラ若芽の成長および成分含量に及ぼす温度と光強度の影響

温度 (昼/夜) (°C)	光量子束密度 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ )	収穫芽数/挿し穂数 (%)	収穫までの平均所要日数	一芽重 (g/本)	ラジカル消去活性 (%)	クロロゲン酸 ( $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ )
30/20	540	0.0	—	—	—	—
	160	0.0	—	—	—	—
	30	0.0	—	—	—	—
25/15	540	41.7	24.4	0.73	38.8	104.4
	160	16.7	26.0	1.44	18.2	51.6
	30	16.7	26.0	0.89	9.3	41.8
20/10	540	58.3	26.0	0.83	25.9	106.5
	160	66.7	34.7	1.26	22.1	57.2
	30	100.0	37.6	1.15	14.5	41.7
要因効果 <sup>z</sup>	温度	*	ns	ns	ns	ns
	光	ns	ns	ns	ns	**
	交互作用	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>z</sup> 要因効果の \* は 5%, \*\* は 1%水準で有意差あり

第2表 コシアブラ若芽の成長および成分含量に及ぼす穂木長の影響

穂木長 (cm)	生育日数	若芽長 (cm)	一芽重 (g/本)	ラジカル消去活性 (%)	クロロゲン酸 ( $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ )
20	15	8.48a <sup>y</sup>	1.79a	22.3a	93.5a
15	21	7.50ab	1.55ab	18.5ab	61.3b
10	23	6.26b	0.98b	15.4b	63.7b
要因効果 <sup>z</sup>		*	*	*	*

<sup>z</sup> 要因効果の \* は 5%水準で有意差あり

<sup>y</sup> 異なる文字間に Tukey 法による有意差あり

シアブラもこのグループに属する。

この抽出物を液体クロマトグラフィーで分析した結果では、ピークの大きさがスーパーオキシド消去活性との間に高い相関のあることが知られている (Guo ら, 1997) Coulochem による電気化学的検出法では、ポテンシャル 100 mV の場合に、Retention time 15.6 min 付近にのみピークが観察された。400 mV に上げると、21.6 min 付近にもピークが現れたが、15.6 min と比較すると非常に小さかった。PDA検出器によるクロマトグラムでもこのピークが突出して大きく、UV/VIS スペクトルをみると  $\lambda_{\text{max}}$  が 325 nm で、Retention time はクロロゲン酸と一致した (第3図)。

### 実験2. コシアブラの収量・品質に関わる要因の解明

(試験1) 収穫できる大きさに成長する若芽の割合には、温度の影響が大きかった。30/20°C では、萌芽し始めた段階ですべての芽が枯死した。25/15°C では、芽が伸長し始めるのは早かったが、葉柄が十分に伸びる前に枯死するものが多かった。20/10°C では生育が遅く収穫までに時間はかかったが、光量子束密度が 160 と 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  では一芽重の大きい若芽が得られた。クロロゲン酸含量には光強度の影響が大きく要因として関与し、540  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  で多く、ラジカル消去活性も高かったが、強光下では生育が抑制され一芽重が小さかった (第1表)。

(試験2) 穂木の長さは若芽の成長、ラジカル消去成分含量に有意に関与していた。穂木が長いほど生育が良好で早く収穫することができ、若芽長、一芽重は穂木長 20 cm で

有意に大きかった。クロロゲン酸含量も穂木長 20 cm で有意に高く、ラジカル消去活性も高かった (第2表)。

### 実験3. 促成栽培技術の確立

コシアブラの促成栽培では、水温が最も重要で、穂木長も、収穫できる芽の割合と若芽長に有意に関与した。水温 20°C では萌芽し始めた段階でしおれ始める芽が多く、収穫できる芽の割合が有意に減少し、若芽長、一芽重も小さかった。15°C では芽の伸長は早かったが、穂木長 20, 25 cm では葉柄が十分に伸びる前にしおれるものが多く、収穫できる芽の割合が低下した。穂木長 40 cm では、若芽長、一芽重ともに大きく供試区の中では最も旺盛な生育を示した。10°C では生育が遅く収穫までに日数はかかったが、短い穂木でも損失は少なく、結果的に最も収量が多くなった。穂木長 20, 25 cm では、若芽長、一芽重が小さく、生育がやや劣った。

クロロゲン酸含量は 15, 10°C 区で有意に多く、15°C で最も多くなった。20, 15°C では穂木長による差はなかったが、10°C では穂木の長い方が含量が高い傾向であった。以上のことから、水温 10 ~ 15°C、穂木長 30 ~ 40 cm で外観、内部品質共に優れた若芽が収穫できた (第3表)。

## 考 察

クロロゲン酸は、多くの植物に含まれるポリフェノールで、多様な生理機能が報告されている。抗酸化活性、ラジカル消去活性の他にも抗変異原性 (Yamada・Tomita, 1996;

第3表 コシアブラ若芽の成長および成分含量に及ぼす水温と穂木の長さの影響

水温 (°C)	穂木長 (cm)	収穫芽数/挿し穂数 (%)	収穫までの平均所要日数	若芽長 (cm)	一芽重 (g)	クロロゲン酸 (mg・100 g <sup>-1</sup> )
20	40	33.3	22.5	7.41	1.54	38.3
	30	31.3	22.5	6.60	0.92	34.3
	25	12.5	22.5	6.45	0.79	31.2
	20	16.7	22.5	5.20	0.55	36.9
15	40	100.0	19.9	9.96	2.40	71.1
	30	100.0	19.6	7.57	1.64	86.3
	25	25.0	20.5	7.92	1.83	82.2
	20	33.4	19.0	7.94	1.95	65.9
10	40	100.0	23.8	9.59	2.04	68.7
	30	100.0	20.3	9.37	2.38	73.4
	25	100.0	24.0	8.25	1.67	57.8
	20	81.3	23.4	8.11	1.53	34.8
要因効果 <sup>2</sup>	水温	**	*	**	**	*
	穂木長	*	ns	*	ns	ns
	交互作用	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>2</sup> 要因効果の \* は5%水準, \*\* は1%水準で有意差あり

Yoshimoto ら, 2002), 染色体保護作用 (Abraham ら, 1993), 肝臓保護作用 (Basnet ら, 1996; Kapli ら, 1995), 抗ガン性 (Huang ら, 1988; Mori ら, 1986; Tanaka ら, 1993), メラニン形成阻害 (下園ら, 1996), 抗菌活性 (Zhu ら, 2004) 等の生理機能性を有し, 摂取することによって体内に吸収されることが確認されており (Olthof ら, 2001), コシアブラの若芽にもこれらの効果が期待できる。

コシアブラ若芽のクロロゲン酸含量には, 供試条件の範囲では光強度の影響が大きかった。植物のクロロゲン酸含量と環境要因の関係についての報告は少ない。Percival ら (2000) は, 貯蔵中のバレイショに蛍光灯やナトリウムランプの光を照射するとクロロゲン酸含量が増加し, それはUVや赤外部を含むためと推察している。光質の影響については, Tegelburg ら (2004) がアメリカシラカンバ (*Betula pendula* Roth) の実生を用いて, UV-B 照射でクロロゲン酸含量が顕著に高まり, FR の方が R よりも多くなる傾向にあることを示した。一方, リンゴでは, クロロゲン酸含量と光強度の間には関係のないことが報告されている (Awad ら, 2001)。また, サンザシ (*Crataegus*) では, 低温および乾燥ストレスによってクロロゲン酸含量が高まる (Kirakosyan ら, 2004)。これらのことから, グロースチャンパー試験での強光下でのクロロゲン酸含量の増加は, 光そのものの影響に加え, 蛍光灯の放射熱による乾燥ストレスも関与していると推察される。

コシアブラの若芽を収穫するためには, 弱光下での栽培が必須条件であった。また, 一定以上の穂木の長さが必要であった。コシアブラの穂木は, 同じウコギ科で広く促成栽培に利用されているタラノメと比較すると細く, 吸水力も弱いので, 強光下ではしおれを生じ, 一定以上の穂木の長さがないと十分生育できないものと推察される。また, 成分も充実したものとするためには, 低温で生育させることが重要で, Kirakosyan ら (2004) の報告と一致する。遮

光なしで収量を得るのは困難であるが, 本試験の結果強光下で成分は増加するため, 一時的な遮光の除去等の処理によってさらに高品質化を図れる可能性もある。

材料として用いたコシアブラは, 遮光下促成栽培したものや林間地に自生しているものを用いたため, クロロゲン酸以外の物質は非常に少なかった。しかし, 畑地で栽培して光を十分当てることにより, ケルセチンやケンフェロールが顕著に増加することが明らかになりつつある (未発表)。一般には, ポリフェノール成分は, 野生のものの方が栽培したものより多いというイメージが広まっているが, 必ずしもそうとは言えず, さらに解析を進める予定である。

今後は, 光を十分当てて生育させた場合のコシアブラのクロロゲン酸以外の機能性成分の分析, その変動要因の解析を通して, より高機能性を有するコシアブラの生産法と加工法を検討する。また, 促成栽培を実用化する上で最大の問題は, 効率的な増殖・養成法の確立である。実生, 分根, 挿し木 (三浦・小野瀬, 1993), 冬芽の組織培養 (引田・千葉, 1993), 不定胚 (Taniguchi ら, 1996) による増殖が検討されてきたが, 実用に耐えうる技術は得られていない。筆者らも上記に加え, 接ぎ木を試みたが実用化しうる効率的な増殖法は確立できていない。さらに検討を続ける予定である。

## 摘 要

コシアブラ若芽の抗酸化活性をβ-カロテン退色法とDPPHラジカル消去活性で評価したところ, 高い活性を示した。主たる抗酸化成分は, クロロゲン酸と同定された。グロースチャンパー試験で, その成分含量に影響する要因を検討したところ, 光が強く, 穂木が長いと含量が高まること示された。その結果に基づいて, 好適な促成栽培技術を確立するため, ガラス室内で栽培条件が収量と抗酸化成分含量に及ぼす影響を検討した。促成栽培では, 10 ~

15°C の水に 30 ~ 40 cm の穂木を挿すことによって、クロロゲン酸含量の多い若芽を収穫できた。

### 引用文献

- Abraham, S. K., L. Sarma and P. C. Kesavan. 1993. Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and  $\beta$ -carotene against  $\gamma$ -radiation-induced *in vitro* chromosomal damage. *Mutation Res.* 303: 109–112.
- Awad, M. A. P. S. Wagenmakers and Anton de Jager. 2001. Effect of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Sci. Hort.* 88: 289–298.
- Basnet, P., K. Matsushige, K. Hase, S. Kadota and T. Namba. 1996. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1479–1484.
- Guo, C., G. Gao, E. Sofic and R. L. Prior. 1997. High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: Relationship to oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1787–1796.
- Hatano, T., H. Kagawa, T. Yasuhara and T. Okuda. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 36: 2090–2097.
- 引田裕之・千葉 太. 1993. コシアブラの冬芽の組織培養による幼植物体の再生—各種糖類と冬芽の採取時期、および 1-ナフチルアセトアミドの影響—. *日林誌.* 75: 245–249.
- Huang, M-T., R. C. Smart, C-Q. Wong and A. H. Conney. 1988. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 48: 5941–5946.
- Kapli, A., I. B. Koul and O. P. Suri. 1995. Antihepatotoxic effects of chlorogenic acid from *Anthocephalus cadamba*. *Phytother. Res.* 9: 189–193.
- Kirakosyan, A., P. Kaufman, S. Warber, S. Zick, K. Aaronson, Steven Bolling and S. C. Chang. 2004. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiol. Plant.* 121: 182–186.
- 北島潤一・高森 靖・田中靖子. 1989. コシアブラの葉の成分に関する研究. *薬誌.* 109: 188–191.
- 三浦直美・小野瀬浩司. 1993. コシアブラの増殖方法. *日林東北支部誌.* 45: 221–222.
- Mori, H., T. Tanaka, H. Shima, T. Kuniyasu and M. Takahashi. 1986. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxy-methanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer Lett.* 30: 49–54.
- Olthof, M. A., P. C. H. Hollman and M. B. Katan. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131: 66–71.
- Percival, C. C. and L. Baird. 2000. Influence of storage upon light-induced chlorogenic acid accumulation in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 2476–2482.
- 下園英俊・小堀真珠子・新本洋士. 1996. サツマイモ抽出物によるマウスメラノーマ細胞のメラニン生成抑制. *日本食品科学工学会誌.* 43: 313–317.
- Tanaka, T., T. Kojima, T. Kawamori, A. Wang, M. Suzuki, K. Okamoto and H. Mori. 1993. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic, ferulic acids. *Carcinogenesis* 14: 1321–1325.
- Taniguchi, T., K. Tabuchi, K. Yamaguchi and Y. Fujisawa. 1996. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Acanthopanax sciadophylloides*. *J. For. Res.* 1: 51–55.
- Tegelburg, R., R. Julkunen-Tiitto and P. J. Aphalo. 2004. Red: far-red light ratio nad UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. *Plant, Cell and Environment* 27: 1005–1013.
- 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木証吉. 1994. 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定. *日本食品工業学会誌.* 41: 611–618.
- Yamada, J. and Y. Tomita. 1996. Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 328–329.
- 安江政一・加藤義成・林 玉美・榊原仁作. 1968. コシアブラ *Acanthopanax sciadophylloides Franch. et Sav.* の成分研究 (第 1 報) 葉の水溶性成分および Antoside の構造について. *薬誌.* 88: 738–741.
- 安江政一・加藤義成・林 玉美・榊原仁作. 1969. コシアブラ *Acanthopanax sciadophylloides Franch. et Sav.* の成分研究 (第 2 報) Flavonoid および Terpenoid 成分, ならびに Hirsutrin と Isoquercitrin の一致について. *薬誌.* 89: 872–876.
- Yoshimoto, M., S. Yahara, S. Okuno, M. S. Islam, K. Ishiguro and O. Yamakawa. 2002. Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2336–2341.
- Zhu, X., H. Zhang and R. Lo. 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7272–7278.