HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アスパラガス一代雑種の効率的採種法及び生理活性機能向上に関する基礎的研究
Author(s)	前田, 智雄
Citation	北海道大学大学院農学研究科邦文紀要, 27(2), 269-313
Issue Date	2005-12-27
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/8284
Type	bulletin (article)
File Information	27(2)_MAEDA.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農研邦文紀要 27(2)：269～313，2005

アスパラガス一代雑種の効率的採種法及び生理活性機能向上に関する基礎的研究*

前　田　智　雄
（北海道大学大学院農学研究科　園芸緑地学講座）

Fundamental studies on the efficient seed production method of all-male hybrids and improvement in antioxidative bioactivities of *Asparagus officinalis* L.

Tomoo MAEDA
(Laboratory of Horticultural Science, Division of Bioresources and Product Science, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, 060-8589, Japan)

目　　次

第Ⅰ章　緒　　言 ……269
第Ⅱ章　アスパラガス一代雑種の効率的採種法に関する基礎的研究
A．緒　　論 ……271
B．交配実験用隔離ハウスの設置及び苗の定植 ……272
C．アスパラガス花粉の効率的な保存法の検討 ……273
D．アスパラガスの交配能力の季節変動 ……275
E．種子の品質に及ぼす交配方法の影響 ……276
F．ポリネーターにセイヨウミツバチを利用した際のアスパラガスの採種量に及ぼす雌雄比の影響 ……278
第Ⅲ章　アスパラガスの生理活性機能に関する基礎的研究
A．緒　　論 ……280
B．抗酸化成分（ルチン，総ポリフェノール）含量の品種，系統間差及び季節変動 ……281
C．ルチン及び総ポリフェノール含量の作型及び収穫物の規格による差異 …288
D．アスパラガス粗抽出物の低比重リポタンパク（LDL）抗酸化活性 ……292
第Ⅳ章　総合考察 ……297
摘　　要 ……303
引用文献 ……305
Summary ……312

*本論文は，北海道大学博士論文（2004年）である。

第Ⅰ章　緒　　言

アスパラガス（*Asparagus officinalis* L.）は地中海沿岸を原産とするユリ科アスパラガス属の多年生園芸作物で，アメリカ，ヨーロッパ，日本をはじめ世界中で広く消費されている[1)]。冷涼で比較的乾燥した気候を好むが，高温・多湿にも適応できることから，現在ではタイなどの亜熱帯から，オランダ，北海道，カナダといった亜寒帯の地帯まで世界中で広く栽培されている。2001年には世界の61か国の，合計約25万haの面積で栽培されており，栽培面積は世界的に増加傾向であると報告されている[2)]。

日本におけるアスパラガスの栽培は，大正時代の1924年に北海道岩内町においてホワイトアスパラガスの本格的な栽培と缶詰加工が始まったのが起源とされている[3)]。それ以後，北海道をはじめとして東北地方や長野県などに栽培が拡大した。戦争で一時栽培面積が激減したものの，戦後は順調に普及し，1960年代にはホワイトアスパラガスの栽培面積は2,000haを超えた。このころから生食向きのグリーンアスパラガスの栽培が本格化し，1970年代には北海道でグリーン，ホワイトを合わせて5,000haを超える栽培面積を誇り，全国的に栽培が拡大した。

しかし，1980年代になると円高の進行による輸入価格の低下から，海外からの輸入量が急増したことや，主産地である北海道において，病害の蔓延による収量低下と，それに伴う生産者の作付意欲が減退したことなどにより栽培面積が減少した[4]。しかし1990年代には，広島・香川・佐賀・長崎などの西南暖地において，新しい栽培方法である立茎栽培が確立され[5]，これにより従来よりもはるかに高い収量を得ることが可能となったため，水田転作畑を中心にアスパラガス栽培が増加した。この栽培方法は現在では長野や福島，さらには北海道などの古くからの産地にも普及してきている。また北海道においては，病害に強く収量が多い品種が海外から導入されたこともあり，2000年代に入って生産面積は再び増加に転じている。

この間のアスパラガスの市場流通量を見ると，1980年前半には国産・輸入合わせて2万t弱だったものが，2000年には約4万tと，流通及び消費は増加傾向を示している。現在は国内の流通量の約半分が国産，半分が輸入品という状況で，国産品と輸入品がそのシェアを激しく競っている状況である[6]。このような状況から，国内におけるアスパラガスに対する生産意欲や，輸入品に対する対抗意識が高まっており，日本独特の栽培方法である立茎栽培に適した品種や，病害に強い品種，さらには輸入品に対抗するための高品質な品種の育成が望まれている。

アスパラガスの育種では，一般的に収量性や耐病性などが優れた株及び系統を用いた選抜育種が行われている。アスパラガスは雌雄異株の作物で，ほぼ完全に他殖性であるため，自殖系統を作るのは非常に困難である。このため交配・採種した場合，遺伝的に個体間変異が多く，収量や品質の安定性が低いことが知られている[7]。このため，近年では多収性や均一な品質を目指し，組織培養による増殖によって得た均一な形質の雄株と雌株を用いた一代雑種育種が盛んになってきている。この際，育種段階では多数の雄親と雌親を交配するため，雌雄の開花時期のずれを回避したり，労力を分散したりするために，保存花粉による交配技術の確立が重要である[8]。また長期にわたって交配を行う場合には，アスパラガスの交配能力の季節変化が採種量に影響を及ぼすことが考えられる。また，品種の育成が完了して大量に採種する際には，人工交配では労力がかかるため，隔離圃場もしくは隔離ハウスで，ポリネーターとして昆虫を利用した大量採種が必要となる。

アスパラガスの育種に関しては，園田ら(2003)[9,10]が育種年限の短縮方法に関する研究を行い，優良株の選抜・検定について効率的な手法を提唱している。また，パーティクルガンを利用して，特定の遺伝子を導入する育種方法なども研究されている[11,12]。しかし，効率的な採種方法については，人工交配時の花粉保存技術や，最適な交配時期，虫媒交配時の最適な雌雄比などに関する系統だった研究はほとんど行われていないのが現状である。

一方，近年野菜の持つヒトに対する生理活性，いわゆる機能性が注目されている。ヨーロッパや日本における大規模な疫学調査の結果，野菜や果物の摂取量の多い人は，少ない人よりも虚血性心疾患や動脈硬化，脳血管症のリスクが低いことが報告されている[13,14,15]。活性酸素やフリーラジカルが，老化やさまざまな生活習慣病の引き金となることが明らかになるにつれて，植物の機能性の中でも特に抗酸化活性が着目されてきており[16]，これをアピールポイントにしたさまざまな商品開発が進められてきている。特に，植物界に広く分布するカロテノイド類や，ポリフェノールの一種であるフラボノイド類，フェノールカルボン酸の中に強い抗酸化活性物質が多数見いだされており，これらの物質を含む植物と，その機能性に関する研究が盛んになってきている。また，生理活性を有することが明らかになった成分については，その含量を向上させるため，その成分を多く含む系統の選抜育種，いわゆる「機能性育種」が始まっている。最近では，さまざまな作物において機能性成分を多く含む新品種の育成が進められており，ニンジンのβ-カロテン[17]やトマトのリコピン[18]，さらにソバのルチン[19]などについては，実際にそれらの含量によって選抜された品種が育成され，市場に出回りはじめている。

アスパラガスは中世ヨーロッパでは薬草として用いられていたとされ[3]，また野菜の中では比較的抗酸化活性が高いとされており[20]，生理活性として血圧上昇抑制作用[21]，抗腫瘍作用なども報告されている[20]。また毛細血管を強くする作用[21]をはじめとしてさまざまな生理活性を持つことが知られているルチンを豊富に含むことが報告されており[23,24]，その機能性が注目を集めている。しかし，アスパラガスの機能性に関する研究はまだ始まったばかりの段階であり，前述した血圧上昇抑制作用や抗腫瘍作用なども，その詳細な作用機構や活性物質についてはいまだに明らかになっていない。生理活性物質であるルチンについても，その品種間差が存在することや抽出・定量方法に関する報告[23]はあるが，品種間差の詳細や季節変動，栽培方法との関係などについてはほとんど明らかになってない。近年消費者の健康志向は非常に高まっており，アスパラガスに関して学術的に裏付けられた機能性が明らかになれば，アスパラガスの消費量全体のさらなる底上げにつながるものと考えられる。また，機能性育種によって生理活性物質を豊富に含む新品種が育成されれば，国産アスパラガスの輸入品に対する競争力が向上するものと思われる。

本研究は，アスパラガスの生理活性機能の向上を目的とした育種を行う際に必要な技術である，一代雑種の効率的な大量採種方法の確立を図り，さらに生理活性物質のルチン及び総ポリフェノール含量について，品種間差，季節変動及び栽培法による含量の変動について検討した。また，アスパラガスの生理活性を評価するため，若茎粗抽出物の抗酸化活性評価試験を行った。

第二章では，機能性育種を行う際の前提条件となる，効率的な採種方法の確立のための知見を得ることを目的として，隔離ハウスを用いた一代雑種の採種方法に関する基礎的研究を行った。

第三章では，機能性育種を行う際の基礎的知見を得ることを目的として，すでにその生理活性が報告され，アスパラガスに比較的豊富に含まれているルチンとルチンを含む総ポリフェノール含量について，品種間差や季節変動，さらに栽培方法による含量の変動について検討した。さらにアスパラガスに含まれる抗酸化物質の生理活性を評価するため，粗抽出物の持つ抗酸化活性について種々の抗酸化活性評価試験を行った。

第四章では，第二章及び第三章の研究結果から，総合的な考察を加えた。

第II章　アスパラガス一代雑種の効率的採種法に関する基礎的研究

A．緒　　論

アスパラガスは雌雄異株で他殖性であり，自殖系統を作ることはほとんど不可能であるため，交配・採種を行う場合，通常の集団選抜では，後代は遺伝的に個体間変異が多く，結果的に収量や品質の安定性が低くなることが知られている[7]。したがって，近年では多収かつ品質が揃った品種の育成を目指して，組織培養による増殖によって得た，均一な形質の雄株及び雌株のクローン集団を両親として用いる，いわゆる一代雑種育種が盛んになっている。一方，アスパラガスの雄株は，雌株と比較して一般に，落下種子の実生の雑草化がない，種子をつけることによる株の消耗がない，手頃な太さの若茎を多数生産する，などの利点を有することが指摘されている[25,26]。このため，Sneep ら（1953）[27]が提唱した，性決定遺伝子が MM の超雄株（Super male）を花粉親として用いた全雄一代雑種の育成が盛んになっている[28,29,30]。これは超雄株（MM）と雌株（mm）との交配によって得られた種子の性の表現型がすべて雄（Mm）となることを利用した育種法である。現在市販され普及している品種のほとんどが海外で育成された一代雑種で，さらに全雄一代雑種もかなり普及してきている。このため，日本で品種育成を行う際にも，その品種は全雄一代雑種であることが求められることから，その育成手法及び採種法を確立する必要がある。

アスパラガスの場合，育種段階では多数の雄親と雌親を交配するため，開花時期のずれを回避したり，労力を分散したりするために，保存花粉による交配技術の確立が重要である。また

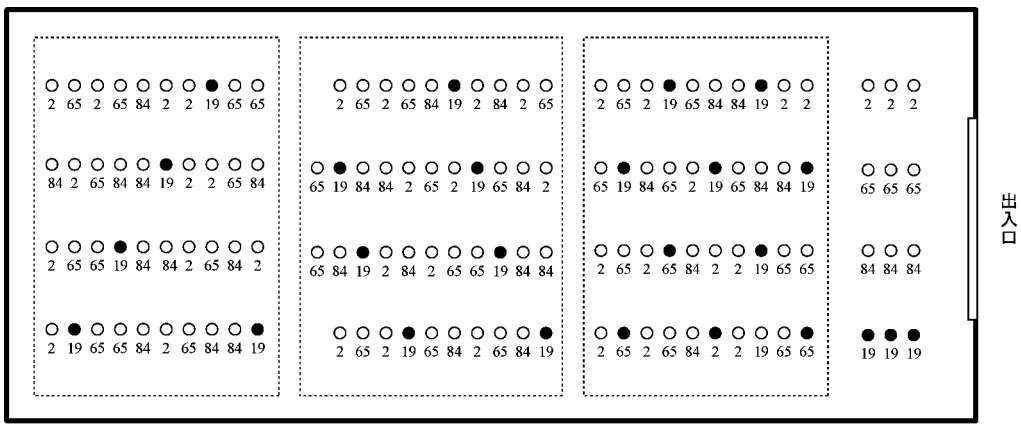
長期にわたって交配を行う際，交配能力の季節変動が採種量に影響を及ぼすことが考えられる。また，品種の育成が完了して大量に採種する際には，人工交配では労力がかかるため，隔離圃場もしくは隔離ハウスで，訪花昆虫などの花粉媒介者（ポリネーター）を利用した大量採種が必要であるが，その際，種子親と花粉親の比率（雌雄比）が採種量に大きな影響を及ぼすと思われる。これらの技術は個々には従来から用いられているが，人工交配時の花粉保存技術や，最適な交配時期，虫媒交配時の最適な雌雄比などについての系統だった研究はほとんどされていない。今後日本において，機能性，収量性及び耐病性を向上させた，国際的に競争力を有する品種の育成を行う際に，これらの知見はきわめて重要であると思われる。

そこで本章では，アスパラガスの機能性育種に欠かせない全雄一代雑種の効率的な採種法の確立を目的として，花粉の長期保存，交配時期及び虫媒交配における雌雄比について検討した。

B．交配実験用隔離ハウスの設置及び苗の定植

北海製罐株式会社石狩農場（北海道石狩市生振（おやふる））に隔離ハウス（間口6.3 m×長さ26 m，屋根にはビニールフィルムを張り，両サイドに寒冷紗を張ったもの）を1994年5月初旬に設置した（第1図）。5月26日にアスパラガスの苗を定植した。苗は北海道大学大学院農学研究科で育成され，北海製罐株式会社が組織培養によって増殖した超雄株‘ZM-19’[31,32]のクローン苗，及び北海道内の圃場から選抜された，3系統の雌株‘No.65’，‘No.84’及び‘瑞洋-2’のいずれも組織培養によって増殖した苗を，ハウス内の3区画にそれぞれ雌雄比（雌株：雄株）が3：1，5：1，7：1となるように定植した。この場合，超雄株は第2図に示した黒印の位置に，雌株は3系統を超雄株との距離になるべく系統による偏りが生じないように配置した。畦間は150 cm，株間は35 cmとした。肥培管理は通常のハウスアスパラガス栽培と同様とし，定植後は灌水チューブを用いて適宜灌水を行った。この隔離ハウスを用いて，定植翌年の1995年から全雄一代雑種の効率的な採種法の確立を目的と

第1図　北海製罐㈱石狩農場に設置した隔離ハウス



雌雄比　7:1　　雌雄比　5:1　　雌雄比　3:1

第2図　隔離ハウス内に設けた雌雄比が異なる3つの区画及び各区画における株の配置
●19：超雄株‘ZM-19’，○2：雌株‘瑞洋-2’，○65：雌株‘No.65’，○84：雌株‘No.84’

したさまざまな実験を行った。

C．アスパラガス花粉の効率的な保存法の検討

アスパラガスの育種においては，収量性・耐病性・外観品質及び機能性成分含量などにおいて優れた形質を有する雄株及び雌株を選抜し，試験的な交配を行って，親株の組合せ能力を検定する必要がある。この場合，多数の組合せについて交配を行うことになるが，そのたびに雄株から花粉を採取するのは非効率的である。そこで，ある時期に花粉を大量に採取して保存しておき，この保存花粉を交配に用いることができれば，組合せ能力検定の省力化につながる。アスパラガスの花粉保存法についてはSnopeら（1964）[33]，稲葉ら（1983）[34]，Marcellanら（1996）[8]の報告があるが，いずれも同一の条件下で花粉を保存しており，花粉の保存の適条件については詳しく検討されていない。また，アスパラガスは花が小さいため，採取した花から葯を取り出す作業に非常に手間がかかる。採取した花のまま保存し，簡単な操作で花粉を単離できれば，さらに効率の向上につながる。

そこで，本研究ではアスパラガスの組合せ能力検定の効率向上を目的として，花粉の1か月程度の保存に適する温度及び湿度条件並びに保存形態について検討を行った。

a．材料及び方法

1）アスパラガスの花の採種と花粉保存条件

北海道石狩市の北海製罐㈱石狩農場に栽植されたアスパラガス‘ガインリム’から，1995年7月25日に開花当日と思われる雄花を採取した（第3図）。採取後室内に数時間放置して若干乾燥させた後，花または葯を温度（5℃または30℃）と湿度（低湿と高湿）を組み合わせた条件下で保存した。

保存形態が花の場合は，数時間乾燥させ生乾きの状態の花をそのまま蓋付きのガラスバイアルに入れた。保存形態が葯の場合は，生乾きの花からピンセットで葯を採集し，ガラスバイアルに入れた。湿度条件は以下の通りである。低湿の場合はそれぞれのバイアルを，シリカゲルを入れた密閉容器に入れて保存した（相対湿度10%以下）。高湿の場合はバイアルを相対湿度50～70%の人工気象室内でそのまま保存した。

第3図　開花当日の‘ガインリム’雄花

保存温度は5℃及び30℃とした。試験区はこれらの条件を組み合わせた，花のまま・5℃・低湿（WF-5-LH），花のまま・5℃・高湿（WF-5-HH），花のまま・30℃・低湿（WF-30-LH），花のまま・30℃・高湿（WF-30-HH），葯・5℃・低湿（SA-5-LH），葯・5℃・高湿（SA-5-HH），葯・30℃・低湿（SA-30-LH），葯・30℃・高湿（SA-30-HH）の8区に設定した（略号のWFはWhole Flower，SAはSeparated Antherの略である）。保存中の花粉を保存開始時及び1，2，3，5，7，14，26日目にそれぞれのバイアルから材料を取り出し，花粉発芽率を調査した。花または葯を100 μmの金属メッシュ上で薬さじを用いてすりつぶして花粉をふるい落とし，回収した花粉を花粉発芽培地上に置床した。花粉発芽培地の組成は前田ら（1995）[35]にもとづき，スクロース30%，ホウ酸0.02%，寒天3%の寒天培地とした。室温で3時間インキュベートした後に，花粉管が花粉の直径の2倍以上に伸長したものを発芽花粉とみなし，花粉発芽率を調査した。

2）隔離ハウス内における人工交配

1）の各区の条件下で26日間保存した花粉を，1995年8月30日に隔離ハウス内に栽植されている雌株‘瑞洋-2’の，開花当日の花それぞれ30花に交配した。対照として，交配日の朝に開花した‘ガインリム’の雄花から採集した花粉を同様に交配した。11月上旬に，成熟した果実を採取し，それぞれの区における着果率，一果当たり種子数，種子重を調査した。また，交配当日に採取した花粉を用いて，花粉発芽率を調

査し，花粉発芽実験の対照とした。着果率は結実花数／交配花数×100(%)，一果当たり種子数は総採種種子数／結実果数とした。

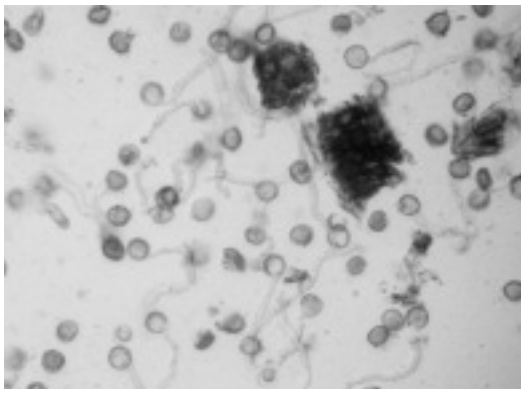
b．結果及び考察

1）花粉の保存条件が花粉発芽率に及ぼす影響

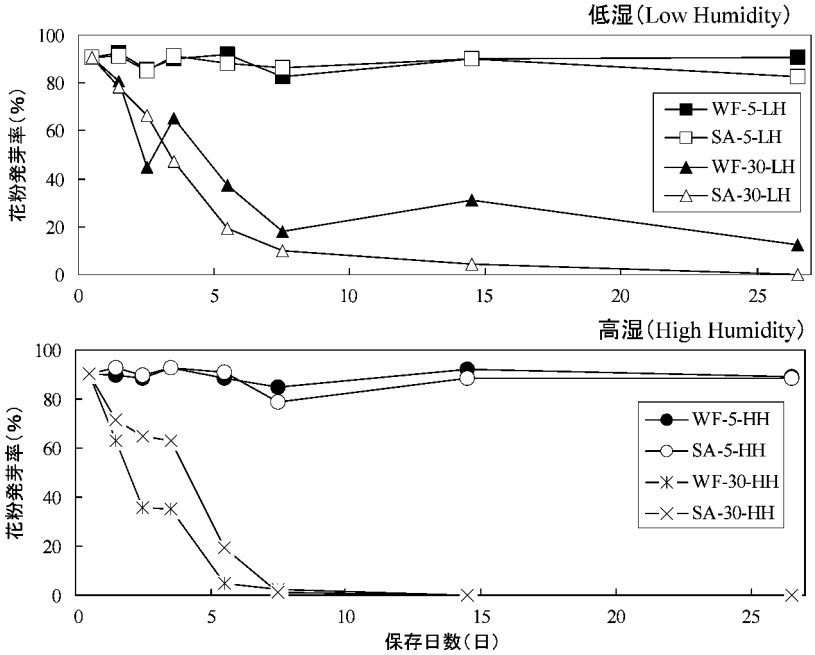
5℃・低湿で保存した花粉は，保存形態によらず，保存開始から26日目まで82.5～92.5%と高い発芽率を維持した。また5℃・高湿条件でも26日目まで78.5～92.5%と，保存形態にかかわらず高い発芽率を維持した。一方，30℃・低湿保存区の7日目における花粉発芽率は，花の状態で保存したもので18.0%，葯で保存したもので10.0%となり，保存形態にかかわらず保存日数が長くなるにしたがって発芽率は低下する傾向を示した。また，30℃・高湿保存区の7日目における花粉発芽率は，花の状態で保存したもので2.5%，葯で保存したものでは1.5%で，低湿条件と比較して花粉発芽率は著しく低下した。また，30℃・高湿条件下で保存した花粉の発芽率は，14日目以降はいずれも0%になった（第4図，第5図）。

2）花粉の保存条件が種子生産に及ぼす影響

5℃で26日間保存した花粉を用いて人工交配した場合の着果率は80.0～90.0%と高い値を示した。この場合，保存形態や湿度条件による着果率の差はほとんど認められなかったが，高湿区では，低湿区と比較して，一果当たり種



第5図　5℃・低湿条件で26日間保存したアスパラガス花粉の発芽（×200倍）（品種：ガインリム）



第4図　アスパラガスの花粉発芽率に及ぼす花及び葯の保存温度及び湿度の影響
試験区略号は保存形態－保存温度－湿度条件で示した。
保存形態；WF：花のまま，SA：葯，温度：5，30℃
湿度条件；LH：低湿（相対湿度10%以下），HH：高湿（相対湿度50～70%）

子数が少ない傾向が認められた。30℃で保存した場合，低湿区で着果が認められたが，一果当たり種子数はきわめて少なかった。また，30℃・高湿区で着果は認められなかった(第１表)。高湿または高温条件下で花粉を保存した花粉を交配に用いた場合，たとえ着果が認められても，種子が入っていなかったり，入っていても種子が不完全であったりする果実が多かった。これは高温及び高湿条件によって花粉の活性が下がり，受粉の刺激によって果実は形成されたものの，受精が正常に行われなかったためであると推測される。

以上のことから，花粉の保存には低温（5℃）・低湿条件が適しており，この条件で保存された花粉は，保存形態（花または葯）にかかわらず，26日保存後にも高い発芽率を維持し，さらに受精能力も高いことが確認された。したがって，多数の育成系統を作出するため，低温・低湿条件下で短期間保存した花粉を用いて人工交配を行う方法が可能であり，このことは育成系統作出の効率を向上させることの一助となるものと考えられる。

D．アスパラガスの交配能力の季節変動

野外で生育する植物の多くは開花期間が比較的短く，一斉に開花するため，採種のための交配時期は限定される場合が多い。しかし，アスパラガスは，春先から晩秋まで次々と若茎が萌芽し，それぞれが生長・開花・結実を続ける習性があり，その間に雄株や雌株の交配能力がどのように変化しているかについてはほとんど報告されていない。アスパラガスの交配能力の季節変動は，大量採種を効率的に行う際の重要な基礎的知見であると考えられる。交配能力の季節変動を評価するためには，雄株の生産する花粉の発芽能力と受精能力，雌株の受精能力及び種子を成熟させる能力のすべてが重要で，これらを分けて検討する必要がある。

そこで本節では，アスパラガスの雌雄それぞれにおける交配能力の季節変動を把握することを目的として，雄株から経時的に花粉を採取して雌株に交配することで雄株における交配能力の季節変動の評価を行うとともに，保存花粉を雌株に経時的に交配することで雌株における交配能力の季節変動の評価を行った。

a．材料及び方法

1995年6月1日に，‘ガインリム’の開花当日の雄花を採取し，花のままバイアルに入れ，5℃・低湿条件で保存した。保存花粉を用いて，1995年6月16日，7月1日，7月17日，8月2日，8月17日，9月1日に，隔離ハウス内の雌株（3系統）のうち，交配当日に開花していて，かつ生育が比較的揃っている個体に人工交配を行った。保存花粉は交配前日に100 μmの金属メッシュで花粉をふるい落としてガラスバイアルに入れて冷蔵庫で保存し，人工交配に用いた。

また，上記のそれぞれの日に，交配当日に採取した‘ガインリム’の花粉を用いて人工交配を

第１表　人工交配後の種子生産に及ぼす花粉の保存条件の影響

試　験　区	花粉発芽率（%）	着果率（%）	一果当種子数	平均種子重（mg）
WF-5-LH	90.5	90.0	4.6	14.8
WF-5-HH	89.1	86.7	2.8	14.5
WF-30-LH	14.1	73.3	0.7	12.5
WF-30-HH	0.0	0.0	－	－
SA-5-LH	82.5	80.0	3.3	14.3
SA-5-HH	88.2	88.9	2.6	14.5
SA-30-LH	0.0	6.7	0.1	15.0
SA-30-HH	0.0	0.0	－	－
採取直後花粉	74.2	76.7	4.2	14.6

試験区略号は保存形態－保存温度－湿度条件で示した。
保存形態；WF：花のまま，SA：葯，温度：5，30℃
湿度条件；LH：低湿（相対湿度10%以下），HH：高湿（相対湿度50～70%）

行った。交配当日に採取した花粉の発芽率の調査も行った。果実が成熟した11月上旬に，それぞれの株から果実を採取し，着果率，果実重，一果当たり種子数及び種子重を調査した。

b．結果及び考察

保存花粉の発芽率は，6月16日から9月1日まで概ね70～90%の高い値を維持した。前節では少なくとも1か月間，花粉の保存が可能であるとしていたが，この結果から約2か月半保存した花粉でも高い発芽率を維持することが明らかになった。これにより，開花の全期間を通じて保存花粉を利用した交配が可能であることがわかった。次に，着果から種子形成に至る各項目の季節変化を調べたところ，6月16日から7月17までの交配では，花粉の鮮度(新鮮または保存）にかかわらず着果率は61.0～95.6%，果実重は0.32～0.52 g，一果当たり種子数は3.4～5.1個，種子重は22.7～29.2 mgとなり，すべての項目で他の時期に比べて高い値を示した（第2表)。8月2日の交配では着果率が，保存花粉で9.1%，当日採取花粉では28.5%で，6月～7月と比較して著しく低くなった。また，一果当たり種子数及び種子重も6～7月に比べて低い値を示した。これは高温によって受粉後の花粉管伸長もしくは受精が阻害されたためと考えられる。

8月後半以降の交配では，着果率は花粉の鮮度によらず再び高くなったが，それでも6月～7月に比べると着果率はやや低く，一果当たり種子数は少なく，種子重は小さくなる傾向が認められた。本実験で交配に保存花粉と当日採取の花粉を用いた理由は，同一の保存花粉を用いることで雌親の交配能力の季節変化を，当日採取の花粉を用いることで雄株の交配能力を検定するためである。本実験の結果から雌株の交配能力は6月中旬から7月中旬にかけて高く，夏場の暑い時期に一時的に低下し，その後はやや回復するものと推測された。また，8月下旬以降に当日採取花粉を用いた区では保存花粉よりも一果当たり種子数が少ない傾向が認められることから，雄株の交配能力は，雌株同様に6月中旬から7月中旬にかけて最も高く，夏場の暑い時期に最も低くなり，その後の交配能力は若干回復するものの，その回復の程度は小さいものと考えられる。

E．種子の品質に及ぼす交配方法の影響

海外におけるアスパラガス一代雑種の商業的な採種にはミツバチが利用されているが[36]，日本において過去に行われた商業採種は解放された圃場において自然に交雑させていたため，主要な訪花昆虫が何かは不明である。また，商業的な採種は民間の種苗会社で行われるため，効率的な採種を行うための基礎的知見はなかなか公表されないという実情がある。日本で生産さ

第2表　人工交配による種子生産性の季節変化

交配日	使用花粉	花粉発芽率(%)	着果率(%)	果実重(g)	一果当種子数	種子重(mg)
Jun. 16	当日開花	76.7	95.6	0.32	3.4	28.9
Jul. 1	当日開花	90.0	85.8	0.52	5.0	25.9
Jul. 17	当日開花	90.8	71.1	0.36	4.4	26.1
Aug. 2	当日開花	82.3	28.5	0.28	0.3	21.9
Aug. 17	当日開花	97.0	58.7	0.31	0.3	21.9
Sept. 1	当日開花	86.2	46.2	0.19	0.2	15.1
Jun. 16	保存	27.2	83.3	0.36	5.1	29.2
Jul. 1	保存	86.2	61.0	0.44	4.7	27.5
Jul. 17	保存	72.1	75.6	0.36	4.4	22.7
Aug. 2	保存	75.0	9.1	0.33	4.0	21.2
Aug. 17	保存	69.6	70.6	0.25	1.8	21.8
Sept. 1	保存	91.5	49.0	0.25	3.1	10.1

当日開花：各交配日に開花当日の‘ガインリム’の花を採取して交配。
保存：6／1に採取し，花・5℃・低湿条件で保存した花粉を用いて交配

れるアスパラガスの国際競争力を高めるためには，日本の気候に適した多収な品種，茎枯病や株腐病のような日本で発生が多い病害に対する抵抗性品種，機能性成分含量の多い品種などを日本国内で育成していくことが重要である。このためにも，花粉媒介者（ポリネーター）を明らかにし,効率的な授粉法を確立するとともに，その知見を日本のアスパラガス研究者や種苗生産者で共有し，良質な系統が育成された際にはすみやかに大量採種を行うことが可能な環境を整える必要がある。

本節では，ポリネーターとしてミツバチを用いた際の果実及び種子の品質を調査し，人工交配によるそれと比較した。また，北海道におけるアスパラガスの主要なポリネーターを明らかにするため，訪花昆虫の調査を行った。

a．材料及び方法

1995年6月27日～8月9日に，隔離ハウス（第1図，第2図）内の，雌雄比（雌株：雄株）が5：1で栽植されている区画を寒冷紗で二重被覆し，北海道農業試験場から分譲されたセイヨウミツバチ一群の巣箱を設置した（1000～1300頭／箱）（第6図）。巣箱はそのまま放置して虫媒交配させ，この区をミツバチ交配区とした。対照として，6月17～7月17日にかけて隔離ハウス中に栽植された雌株‘No.84’の3株に，‘ZM-19’の開花当日の花粉を人工交配した（人工交配区）。成熟した果実を採取した後，両区から無作為にサンプリングした30果について，果実重，一果当たり種子数，種子重を調査した。ミツバチ交配区については系統間差を排除するため，3種類栽植されている雌株のうち‘No.84’に着果した果実からサンプリングを行った。

また，自然条件下でのポリネーターを明らかにするため，アスパラガス圃場における訪花昆虫の調査を8月14及び15日に行った。両日はいずれも晴天であった。調査は午前9～10時，午後1～2時，午後5～6時の3回行い，訪花している昆虫を捕虫網を用いて捕獲し，種を同定した。

第6図　各区画に設置した
セイヨウミツバチの巣箱

b．結果及び考察

1）アスパラガスの訪花昆虫

アスパラガスの主な訪花昆虫として，セイヨウミツバチ，ヒラタアブ及びタネバエが確認された。このうち，特にセイヨウミツバチが盛んに花粉を収集・媒介していることがわかった。ヒラタアブ及びタネバエについても訪花は確認できたが，訪花の様子や花粉の付着状態などを観察した結果，アスパラガスの主な花粉媒介者（ポリネーター）はセイヨウミツバチであると推測した。

2）セイヨウミツバチによる着果と種子形成

隔離ハウスにおける交配実験の結果，セイヨウミツバチを用いた交配によって正常に着果が認められ(第7図)，人工交配に比べ一果当たり種子数がやや少ないものの，種子重は人工交配のそれよりも重かった(第3表)。これらのこと

第7図　セイヨウミツバチ放飼による
果実形成の様子

第3表　人工交配及びミツバチ放飼によるアスパラガスの果実及び種子形成

試　験　区	果実重 (g)	一果当 種子数 (個／果)	種子重 (mg)
人工交配(対照区)	0.25	2.3	25.4
ミツバチ交配	0.21	1.8	29.6

それぞれの区において♀'No.84'×♂'ZM-19'の果実を調査（各区30果3反復）

から，セイヨウミツバチはアスパラガスのポリネーターとして有効であり，隔離ハウス内に巣箱を設置することで種子生産を効率的に行うことが可能であることが示された。

F．ポリネーターにセイヨウミツバチを利用した際のアスパラガスの採種量に及ぼす雌雄比の影響

アスパラガスは雌雄異株であるため，採種を行う際には花粉親としての雄株と，種子親である雌株を採種圃場に栽植することになる。効率的な採種を行う際上で，雌雄比は採種量を決めるきわめて重要な要因であると考えられる。すなわち，採種圃場において雄株の比率が高い場合受粉に必要な花粉の量は十分に確保される反面，雌株の株数は少なくなる。逆に，雌株の比率が高い場合は，受粉さえ行われれば採種量は相対的に多くなると予想されるが，雄株が少ないと，花粉量が少なくなり，授粉が不充分になる可能性がある。

そこで本節では，セイヨウミツバチをポリネーターに利用する効率的な大量採種法の確立のための基礎として，雌雄比を変化させて交配を行った際の採種量の変動について調査した。さらに，採種量と雌株の生育との関連についても併せて検討した。

a．材料及び方法

実験は1996年に，前述の隔離ハウス（第1図）に栽植した株（定植3年目）を用いて行った。雌雄すべての系統について，開花期を揃えることを目的として1996年の5月上旬から5月25日までの期間，萌芽し若茎すべてを通常どおり収穫した。5月25日に収穫を打ち切り，その後は放任して若茎を生育させた。6月7日に隔離ハウス内の雌雄比（雌株：雄株）が3：1，5：1及び7：1で栽植されたそれぞれの区画（第2図）を寒冷紗で二重被覆した。6月17日に各区画に北海道農業試験場から分譲されたセイヨウミツバチの巣箱（2000頭／箱）1箱を設置し，7月26日まで40日間虫媒交配を行った。巣箱を撤去した後は，他の訪花昆虫による交配（コンタミネーション）が生じないように寒冷紗で覆ったままで栽培管理を行った。

果実が成熟した11月上旬に，株ごとにすべての茎及び果実を収穫し，株ごとの着果数，果実重及び一果当たり種子数を調査した。また，それぞれの株についてすべての茎の茎長及び茎径を調査した。また株ごとに茎数も記録した。各株の生育状態を評価するため，アスパラガスの生育評価指数として一般的に用いられている生育指数（Growth Index：GI）を，

$$\text{生育指数（GI）} = \text{平均茎長} \times \text{平均茎径} \times \text{株当茎数}$$

の数式によって算出した。

b．結果及び考察

本研究における栽植密度（150 cm×35 cm）から10 a当たりの雌株の株数を概算すると，雌雄比3：1では1,429株，5：1では1,587株，7：1では1,667株となる。

10 a当りの採種量を雌系統ごとに雌雄比の間で比較すると，'No.65'及び'No.84'では5：1の場合にそれぞれ244.4 kg及び125.3 kg/10 aで最も多く，次いで3：1でそれぞれ171.3 kg及び97.7 kg/10 a，7：1でそれぞれ169.8 kg及び94.6 kg/10 aの順となった（第4表）。一方，'瑞洋-2'の場合では，3：1と5：1ではそれぞれ88.1 kg及び87.1 kg/10aで採種量の差はほとんどなく，7：1では71.7 kg/10 aと低くなった。また，雌系統の採種量を評価するために，各雌雄比の採種量を雌系統ごとに平均した値で比較すると，'No.65'の採種量が195.2 kg/10 aで最も多く，次いで'No.84'が105.9 kg/10 a，'瑞洋-2'は82.3 kg/10 aで，系統毎に採種量の明確な差が認められた。各系統の生育量（GI）を比較すると，採種量が最も多かった'No.65'は平均で3,373，'No.84'は1,755，'瑞洋-2'は2,390であった。このことか

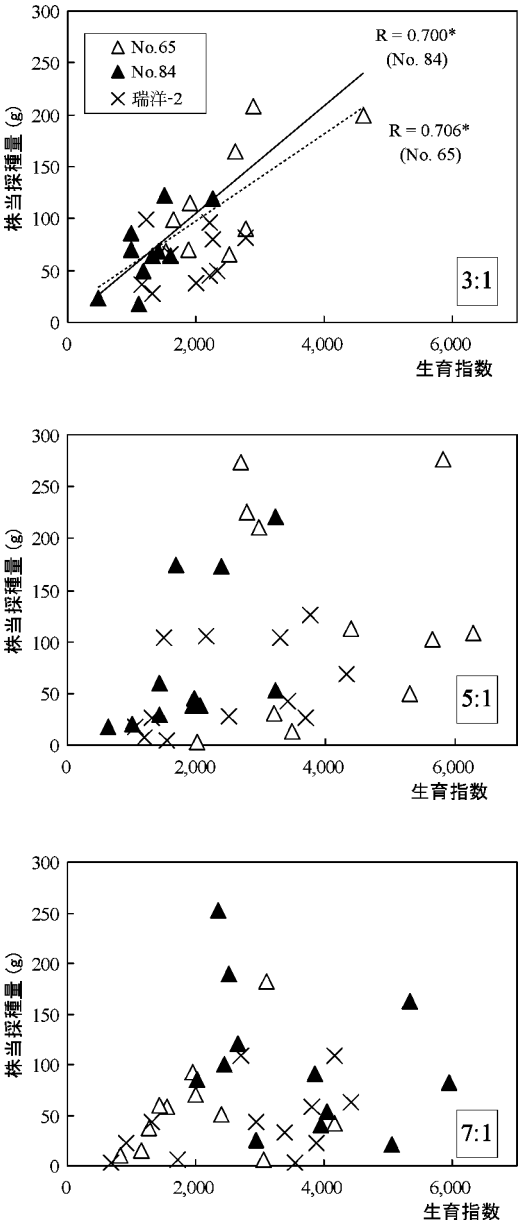
第４表　虫媒交配による種子生産に及ぼす雌雄比の影響及び系統間差異

		10ａ当雌株数	採種量 10ａ当 (kg)	採種量 株当 (g)	生育指数
No.65	３：１	1,429	171.3	119.9	2,484
	５：１	1,587	244.4	154.0	4,048
	７：１	1,667	169.8	101.9	3,588
	平均		195.2	125.3	3,373
No.84	３：１	1,429	97.7	68.4	1,282
	５：１	1,587	125.3	78.9	1,901
	７：１	1,667	94.6	56.7	2,082
	平均		105.9	68.0	1,755
瑞洋-2	３：１	1,429	88.1	61.6	1,909
	５：１	1,587	87.1	54.9	2,472
	７：１	1,667	71.7	43.0	2,789
	平均		82.3	53.2	2,390

ら，‘No.65’は生育量及び採種量ともに多いこと，‘No.84’は生育量が低いわりに採種量が比較的多いこと，逆に‘瑞洋-2’は生育量が高いわりに採種量が少ないことが示唆された。

次に株ごとの生育指数と株当採種量の関係をみると，雌雄比が３：１の場合では‘瑞洋-2’以外で生育指数と株当たり採種量に有意な相関関係が認められた。雌雄比が５：１，７：１になるにしたがい，有意な雌株の生育量と採種量の関係は不明瞭になり，有意な相関関係は認められなくなった(第８図)。このことは，雌雄比が低い場合，すなわち雄株が多く花粉量が充分に確保される場合には，採種量は雌株の生育量に依存するが，雌雄比が高い場合には，雄株が少ないことから花粉量が不足し，雌株の生育量が充分で花数が多くても花粉が行き渡らずに採種量が少なくなったと考えられる。Huyskes ら(1959)[37]は屋外の隔離された採種圃場で雄株の周囲どれくらいまでの距離にポリネーター昆虫によって花粉が運ばれるかを実験した。その結果，１株の雄を中心とした半径1.5ｍ以上離れた雌株にはほとんど花粉が運ばれないことを報告した。このことは，１本の畦で考えると５株程度に１株は雄株が配置されている必要があると言え，本研究の結果を裏付けている。

以上のことから，隔離ハウス内でミツバチをポリネーターとして採種を行う場合，雌雄比は５：１ないし３：１程度が，花粉が不足することがなく，かつ雌株数も確保できる条件を満たしているものと考えられる。石黒ら(1959)[38]はアスパラガスのオープン交配での採種圃場では，雌雄比を５～６：１にすると良いと述べている。本実験の結果もこれに矛盾しない結果であった。石黒らは５～６：１が良いとする根拠は示しておらず，おそらくは経験から導き出し



第８図　各雌雄比（雌株：雄株）における雌株の生育量と株当たり採種量の関係

たものと思われるが，本実験により最適な雌雄比が科学的に裏付けられたことは意義があると考えられる。

しかし，本実験では，花や生育量（GI）は雌系統間で差異が観察されたことから，採種に供する系統によっては最適な雌雄比は異なってくる可能性も考えられる。

また小面積におけるミツバチを利用した採種に関する問題点も明らかになった。本試験で用いた隔離ハウスの各区画はそれぞれの面積が小さく，ミツバチの巣箱からの距離が十分確保できていなかった。晴天の日には区画の南側にミツバチが多数とどまっている様子が確認できた。このため，ある程度区画の面積が広くないと，ミツバチが自由に飛び回れないことが考えられ，このことが採種量に影響した可能性は否定できない。こうしたことから，大規模な隔離圃場や隔離ハウスで採種を行う際の最適な雌雄比については，さらに大面積のハウスを用いた検討が必要であると考えられる。

第III章　アスパラガスの生理活性機能に関する基礎的研究

A．緒　　論

近年，フラボノイドをはじめとしたポリフェノール類を豊富に含む食品の抗酸化活性や生理機能に注目が集まっており，植物がその重要な供給源であることから，さまざまな植物が機能性食品素材として脚光を浴びるようになってきている。赤ワインに含まれるプロアントシアニン[39]や，チャに含まれるカテキン類[40]は強い抗酸化活性を示し，動脈硬化や心疾患を抑制することが報告されている。また，ケルセチンやその配糖体の一種であるルチンの生理機能に関しては，血管壁の強化[41]，血圧上昇抑制[42]，マウスの直腸粘膜ガンの増殖抑制[43,44]及びアポトーシスの誘導[45]などの報告がある。またフラボノイド類に限らず，カフェ酸などのフェノールカルボン酸の抗酸化活性と生理機能との関連についても多数の報告がある[46]。一方，近年植物由来の化学物質（Phytochemical：ファイトケミカル）と，動脈硬化の関係が着目されている。過去のさまざまな研究から，血清中に存在する低比重リポタンパク（LDL）が活性酸素やフリーラジカルなどによって酸化修飾を受けることが，アテローム型動脈硬化の原因になることが明らかになってきた[47]。生体内におけるLDLの主要な抗酸化物質はビタミンE（α-トコフェロール）とビタミンC（アスコルビン酸）であるが[16]，ネギ属野菜[48]及びブドウ種子[49]の植物の抽出物，あるいはクロロゲン酸やカフェ酸など[50]の植物に含まれるさまざまなファイトケミカルがLDLの酸化を抑制することが報告されており，機能性植物由来食品の摂取による動脈硬化の予防効果について関心が高まってきている。

アスパラガスが，これらの生理活性を持つファイトケミカルを豊富に含んでいることが最近明らかになってきた[4,20]。すなわち，ルチン・アントシアニンなどのフラボノイド類，他の植物やアスパラガス自身に生育抑制作用を示すアレロパシー物質（allelochemical：アレロケミカル）として報告されているカフェ酸やフェルラ酸などのフェノールカルボン酸，プロトディオシンなどのサポニン類などが含まれている[51,52,53]。しかし，アスパラガスについて，これらのファイトケミカル含量の品種間差や収穫時期による変動に関する体系的な研究はなく，また実際にヒトが摂食した際の生理活性については十分に解明されていないのが現状である。

近年さまざまな作物で，ファイトケミカルの持つ生理活性に着目した育種（機能性育種）が行われている。前述したニンジンのβ-カロテン，トマトのリコピン，ソバのルチンの他，タマネギのケルセチン[54]，カンキツのβ-クリプトキサンチン[55]，キャベツのビタミンU[56,57]などについて，それらを豊富に含む系統の選抜及び交雑育種が行われており，すでに品種登録が完了して市場に出回っているものもある。アスパラガスについても，生理活性に着目した育種がアメリカですでに始まっている[53]。したがって，アスパラガスのファイトケミカルと生理活性の関係や，それらの含量の品種間差や栽培条件による差を明らかにすることは，生理活性を強化した品種の育成や，生理活性を強く発現させる栽培法の確立を目指す際に，基礎的知見として大きな意義があると考えられる。

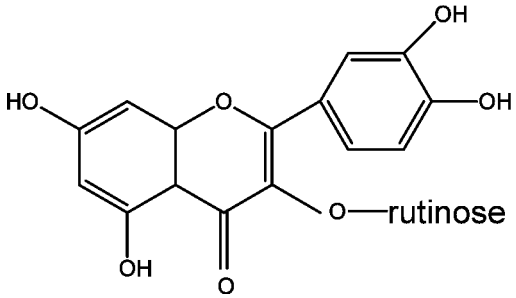
本章では，アスパラガスの育種プログラムに「機能性育種」を取り入れていくための基礎的知見を得ることを目的とし，アスパラガスの代表的なファイトケミカルであるルチンの他，抗酸化活性の指標となる総ポリフェノール含量について，その品種間差や季節変動，さらには栽培法や収穫物の規格による差異を明らかにするとともに，アスパラガスの機能性の基礎的な評価として，DPPH ラジカル捕捉活性及び LDL 抗酸化活性を測定し，ファイトケミカルの含量とこれらの抗酸化活性との関連について検討した。

B．抗酸化成分（ルチン，総ポリフェノール）含量の品種，系統間差及び季節変動

フラボノイドはポリフェノール化合物の一種であり，植物界に広く分布している。フラボノール，アントシアニジン，フラボン，フラバノン，カテキンなどのサブカテゴリーがあり，化合物の数は既知のものだけでも 4,500 種類以上に及ぶ[58]。ルチンやケルセチンの他，アントシアニジン類やケンフェロール，ミリセチンなど抗酸化活性に基づくと思われる生理活性が報告されているものが多く，植物の機能性成分として注目されている。

ルチン（Rutin：quercetin-3-rutinoside，第 9 図）はフラボノイドのひとつで，フラボノール化合物に分類されるケルセチンをアグリコンとして，C リングの 3 位に β 結合によってグルコース-ラムノース（ルチノースと呼ばれる）が結合した配糖体である。

アスパラガスに含まれるルチンについては，Chin ら（2002）[24] が高速液体クロマトグラフィーを用いて定量することが可能であること，さらに品種間差や部位間差が認められたことを報告している。しかし分析した品種数が少なく，また採種時期も一時期のみであり，詳細な品種間差やルチン含量の季節変動についてはほとんど報告がない。



第 9 図　ルチン（quercetin-3-rutinoside）の構造式

また植物に含まれるポリフェノール類では，フラボノイドの他にもカフェ酸やクロロゲン酸などのフェノールカルボン酸についても，多くの化合物が抗酸化活性を示し，さらに動物の生体細胞あるいは生体由来物質に対する生理活性物質として同定されている[46]。植物に含まれるフェノール化合物は物質の種類も多く，またその含量もさまざまで，ひとつひとつの物質をそれぞれ定量することはきわめて困難である。そこで，植物の機能性を評価する上での指標として，植物に含まれるフェノール化合物の総量を測定することが可能なフォーリン・チオカルト法やフォーリン・デニス法がよく用いられている[59]。

本章では，アスパラガスの機能性成分の中でも特に注目されるルチン及びや総ポリフェノール含量の品種・系統間差，及びその季節変動について検討した。さらに，これらのファイトケミカルと関連が深いと思われる抗酸化活性について，その基礎的な指標として広く用いられている DPPH ラジカル捕捉活性の測定も行い，ファイトケミカル含量と抗酸化活性の関連について検討を行った。DPPH（1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl）は安定ラジカルで，そのエタノール溶液は 517 nm 付近に極大吸収を持つ紫色の溶液である。ラジカル捕捉能を持つ抗酸化物質をこの溶液に加えると，DPPH ラジカルが捕捉され，517 nm の吸光度が抗酸化物質の増加にしたがって直線的に減少することが知られており，さまざまなファイトケミカルや植物抽出物の抗酸化活性の評価基準に用いられており，アスパラガスについても，甲村ら（2004）[60] がラジカル捕捉活性の品種間差について報告している。そこで本研究でもアスパラガスのファイトケミカル含量と抗酸化活性の関係を検討するために，抽出液の DPPH ラジカル捕捉活性の測定を行った。

a．材料及び方法

1）植物試料の収穫・保存・調整

長野県野菜花き試験及び場福島県農業試験場において，露地立茎栽培により収穫されたアスパラガス若茎のＬまたは２Ｌサイズ（一茎重約20 g 前後，基部の太さ 15〜25 mm 程度）を材料とした。品種間差の検討には，長野県野菜花き試験場内の国際品種比較試験圃場にて 2004 年４月30日に収穫された‘UC157’，‘Atlas’，‘Grande’，‘パープルパッション’（Purple Passion），‘Pacific Purple’，‘Pacific 2000’，‘NJ953’，‘NJ978’，‘NJ1064’，‘ガインリム’（Gijnlim），‘Jersey Giant’，‘Guelph Millennium’，‘ウエルカム’(Welcome)，‘0008G2’，‘Apollo’，‘JWC1’，‘Andreas’，‘NJ977’，‘KA1617’の 20 品種を供試した。また，系統間差，部位間差及び季節変動を検討するため，2003 年に福島県農業試験場で収穫された‘UC157’，‘ガインリム’，‘パープルパッション’，‘Pacific Purple’の４品種及び育成系統Ａ〜Ｅの５系統を供試した。育成系統はそれぞれＡ：‘MW500W’×‘ウエルカム’，Ｂ：‘ウエルカム’×(‘MW500W’×‘ガインリム’同系交配後代)，Ｃ：‘MW500W’×(‘MW500W’×‘ガインリム’同系交配後代)，Ｄ：‘信濃ヨーデル’×‘ガインリム’同系交配後代及びＥ：‘信濃ヨーデル’×‘ガインリム’同系交配後代である。これらの品種及び系統では，春先（４月下旬）から夏場（８月末）までの毎日の収穫物から，およそ１か月間隔で分析用試料をサンプリングした。サンプリングは４／22，５／21，７／７，７／23，８／26 に行った。この場合，５／21 までは通常の露地収穫を行い，その後立茎して，７／７からは再び立茎栽培で収穫を行った。サンプリングした若茎は長さ 24 cm に調製した後，ビニール袋に入れて−30℃のディープフリーザーへ入れ，抽出を行うまで凍結保存した。

2）ルチン及びポリフェノール類の抽出

凍結したままの若茎を，頂部から０〜８cm（頭部），８〜16 cm（中央部），16〜24 cm（基部）に切断し，材料とした（第 10 図）。品種間差や季節変動の検討には若茎頂部から８cm（頭部 1/3）の部位のみを供試し，部位間差の検討には中央部と基部の切片も供試した。切片は２〜４本分をまとめ，すばやく細断して５g を秤量した後ホモジナイザーのカップに入れ，適量の 80％メタノールを加えて氷冷下で２分間ホモジナイズし，全量をメスシリンダーに移し，80％メタノールを用いて 40 ml にメスアップした。これを 50 ml 容の遠沈管に移し，4 ℃，8,000 G で 15 分間遠心分離を行い，上清を 0.45 μm の PTFE シリンジフィルターで濾過してルチン含量の分析試料とした。また，これを純水で５倍希釈したものを総ポリフェノール含量測定の試料とした。抽出は３反復で行った。

第 10 図　ルチン及び総ポリフェノール含量の分析に供したアスパラガス若茎（凍結した状態）

3）ルチン及び総ポリフェノール含量の定量分析

ルチン含量は Chin ら（2002）[24] の方法にしたがい，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。HPLC システムは WATERS 2690 システム，検出器は WATERS 996 フォトダイオードアレイ検出器を用い，検出波長は UV 354 nm とした。分析カラムは WATERS Symmetry C18（4.6×250 mm），分析温度は 40℃とした。移動相は（A）アセトニトリル，（B）0.2％リン酸のリニアグラジェントとし，流速は 1.0 ml/min とした。グラジェント条件は試料１点につき，以下の通りである。０−５分，A：B＝16：84，５−30 分，A:B＝16：84 → A：B＝65：35，30−35 分，A：B＝65：35 → A：B＝16：84，以降 A：B＝16：84 保持とし，１サンプルの分析時間は 40 分間，サンプル毎の待機時間を５分間とした。分析用標準品は市販

のルチン(関東化学)を用い，12.5，25，50 ppm 溶液で検量線を作成し，外部標準法によって定量分析を行った。

総ポリフェノール含量はフォーリン・デニス法[59]により，ケルセチン（関東化学）をリファレンス試料として測定した。96 穴のマイクロプレートの各ウエルに試料液または 0，25，50，100 ppm ケルセチン溶液(80%メタノール溶液) 150 μl を分注し，フォーリン・デニス試薬(FURUKA) 756 μl，2.5% $CaCO_3$ 75 μl を加え，室温に 60 分間静置した。60 分経過後，ただちに BIO-RAD Model 550 マイクロプレートリーダーで 700 nm の吸光度を測定した。ケルセチン溶液の濃度と吸光度から検量線を作成し，各試料液中の総ポリフェノール含量をケルセチン当量で算出した。

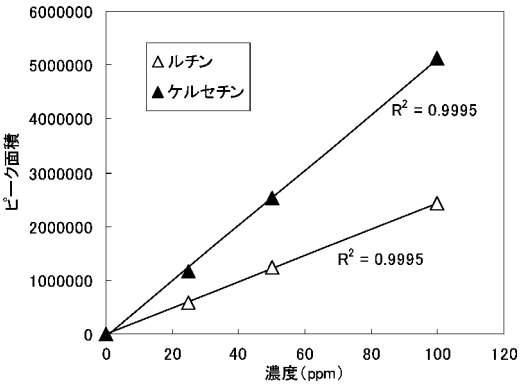
4）DPPH ラジカル捕捉活性の測定

DPPH ラジカル捕捉活性の測定は Yokoyama ら(1998)[61]の方法をもとに行った。1 cm ガラスセルに試料液（ルチン定量のため HPLC 分析に供したものと同じもの）200 μl，Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4) 800 μl，50%DPPH-エタノール溶液 1 ml を入れて混合し，室温（20～25°C），暗所で 25 分間反応させた。反応終了後，ただちに反応液の 517 nm の吸光度を分光光度計（日立U-1100）で測定した。リファレンス試料として 0，50，100，250 ppm α-トコフェロール（エタノール溶液）を用いた。α-トコフェロールの濃度と吸光度から検量線を作成し，試料のラジカル捕捉活性を α-トコフェロール当量（ppm）で算出した。

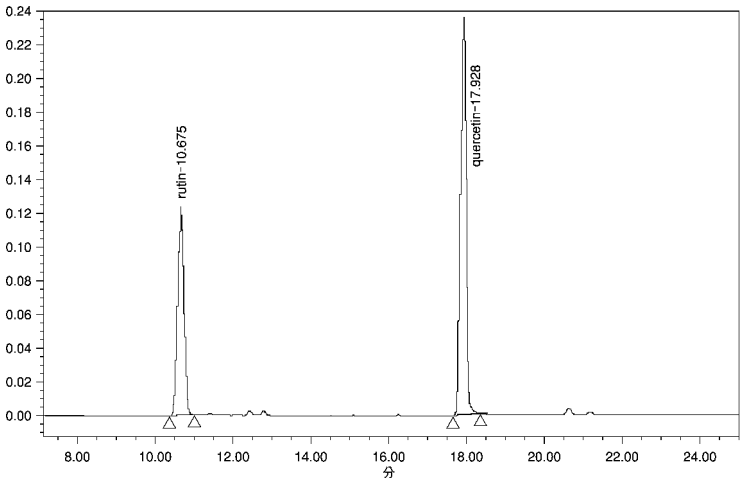
b．結果及び考察

1）HPLC，フォーリン・デニス法，DPPH ラジカル捕捉活性の分析精度

ルチンとそのアグリコンであるケルセチンの標準品 (50 ppm 80%メタノール溶液) の HPLC クロマトグラムを第 11 図に，25，50，100 ppm のクロマトグラムのピーク面積から得られた検量線を第 12 図に示した。ルチンは本実験の条件では溶出時間（RT）がおよそ 10.7 分，ケルセチンは RT がおよそ 17.9 分であった。また，ルチン及びケルセチンとも 25～100 ppm の濃度



第 12 図　ルチン及びケルセチン標準品の濃度と HPLC クロマトグラムピーク面積から得られた検量線



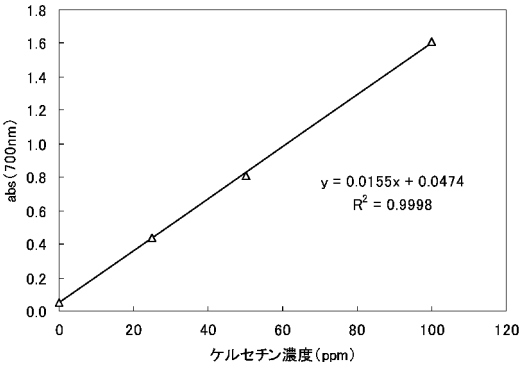
第 11 図　ルチン及びケルセチン標準品の HPLC クロマトグラム

ではピーク面積と濃度は決定係数が0.995と，きわめて良好な直線回帰を示した。

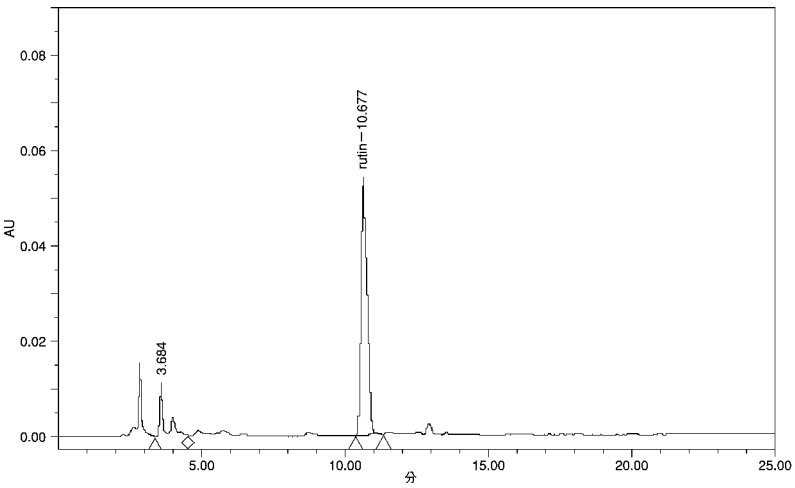
第13図にアスパラガスのメタノール粗抽出物のHPLCクロマトグラムを示した。クロマトグラムが示すように，アスパラガスにはルチンが含まれおり，ケルセチンはほとんど含まれていなかった。またルチンのピーク近辺に分析精度に影響するような夾雑ピークは見あたらなかった。これにより，アスパラガスに含まれるルチンは，HPLCによって精度良く分析できることが確認された。

フォーリン・デニス法によるポリフェノールの定量は，ガラスセルを用いて分光光度計で吸光度を測定する方法が一般的である。しかし，この方法では1サンプルずつ測定する必要があり，分析に非常に時間を要するという欠点がある。本研究では，定法のフォーリン・デニス法を若干改変し，700 nmのフィルターを用いて96穴のマイクロプレートリーダーを用いて測定する方法を試みた。マイクロプレートリーダーはわずか数分で最大96サンプルの吸光度測定が可能で，これを利用することで，多数のサンプルについて短時間で分析することが可能となる。

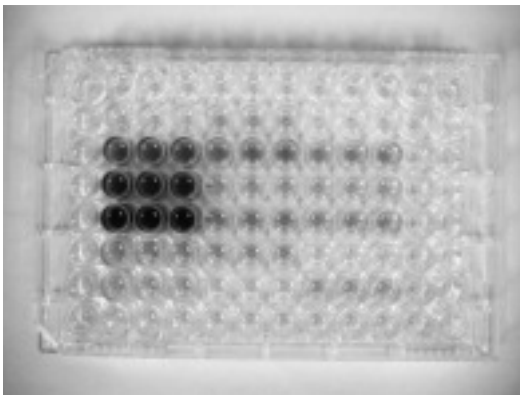
当初は桑原ら（1985）[62]の報告をもとに，フォーリン・デニス試薬は原液を用い，炭酸ナトリウム溶液は5％としたが，この濃度ではウエル内に沈殿を生じ，吸光度の測定が不正確になることがわかった。このためフォーリン・デニス試薬及び炭酸ナトリウム濃度を下げて最適な組合せを検討した結果，フォーリン・デニス試薬を純水で50％に希釈し，炭酸ナトリウム濃度を2.5％にすると沈殿を生じることなく，発色も正常に進むことがわかった（データ省略）。この条件でリファレンス試料のケルセチン溶液（0，25，50，100 ppm）の発色反応後の吸光度を測定し，濃度と吸光度で検量線を作成した。その結果，この濃度範囲における決定係数は0.9998となり，検量線は良好な直線となった（第14図，第15図）。このことから，96穴マイクロプレートリーダーを用いて，試料中のポリフェノール含量を迅速に測定できることが明らかとなったため，以下の実験における総ポリ



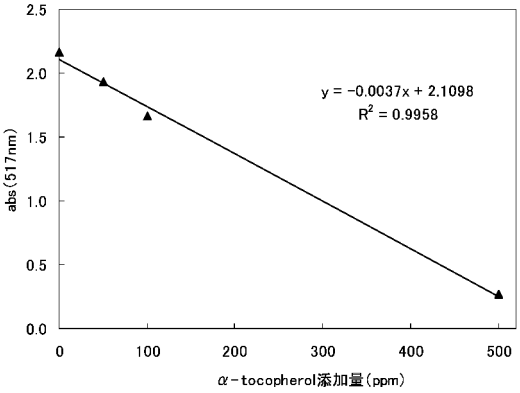
第14図　フォーリン・デニス法におけるケルセチン標準品濃度と吸光度（700 nm）の関係



第13図　アスパラガス粗抽出物のHPLCクロマトグラム（検出波長：UV 354 nm）



第15図　フォーリン・デニス法によるアスパラガス粗抽出物中の総ポリフェノール含量の測定（発色反応終了直後のマイクロプレートの状態）



第16図　DPPHラジカル捕捉活性の測定におけるα-トコフェロール濃度と反応液の吸光度（517 nm）の関係

フェノール含量の測定は，本研究において確立した改良フォーリン・デニス法で行うこととした。

次にα-トコフェロールのDPPHラジカル捕捉活性の分析精度について述べる。添加したα-トコフェロール濃度と反応後の溶液の吸光度を第16図に示した。このように，0～500 ppmの範囲で直線的な負の相関関係（決定係数＝0.996）が認められた。

2）ルチン含量・総ポリフェノール含量の品種間差

アスパラガス若茎のルチン含量は，最も高かった‘Guelph Millennium’の155.0 mg/100 g fwから，最も低かった‘NJ1064’の76.3 mg/100 g fwまで幅広く，品種間で有意差も認められた(第5表)。しかし多くの品種においてルチ

第5表　アスパラガス若茎中[z]のルチン及び総ポリフェノール含量

品種・系統名	ルチン含量 mg/100g fw	総ポリフェノール含量 mg quercetin/100g fw
Guelph Millennium	155.0 a	102.6 a
KA1617	114.2 b	94.9 ab
JWC1	113.5 b	90.2 abc
Pasific2000	106.9 bc	85.4 bcd
Grande	102.9 bcd	80.8 bcd
Andreas	101.7 bcd	82.1 bcd
0008G2	100.3 bcd	83.2 bcd
Welcome	99.8 bcd	79.4 bcd
Apollo	94.3 bcd	79.4 bcd
Purple Passion	93.2 bcd	81.7 bcd
NJ953	92.8 bcd	84.1 bcd
Jersey Giant	92.4 bcd	79.5 bcd
Atlas	91.2 bcd	78.4 cd
NJ978	89.1 bcd	80.2 bcd
NJ1016	88.8 bcd	92.9 ab
UC157	88.2 bcd	79.9 bcd
Gijilim	88.2 bcd	82.4 bcd
NJ977	83.1 cd	79.1 bcd
Pasific Purple	80.7 cd	74.7 d
NJ1064	76.3 d	77.1 cd

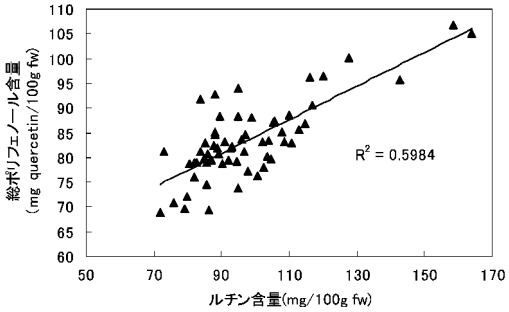
異なる文字間はTukeyの方法（P＜0.05）による検定で有意差あり

[z] 長野県　野菜花き試験場圃場の国際品種比較試験圃場にて2004年4月30日に収穫

ン含量は90～110 mg/100 g fw程度の範囲に収まっていた。

一方,総ポリフェノール含量についてみると,ルチン含量が最も高かった‘Guelph Millennium’が102.6 mg quercetin/100 g fwで最も高かった。また含量が最も低かったものは,ルチン含量が最も低かった‘NJ1064’で,77.1 mg quercetin/100 g fwであった。その他の品種についてみると,総ポリフェノール含量は品種間で有意差が認められたものの,ルチンほど含量に大きな差はなく,多くの品種において80～90 mg quercetin/100 g fw程度の範囲に収まっていた(第5表)。

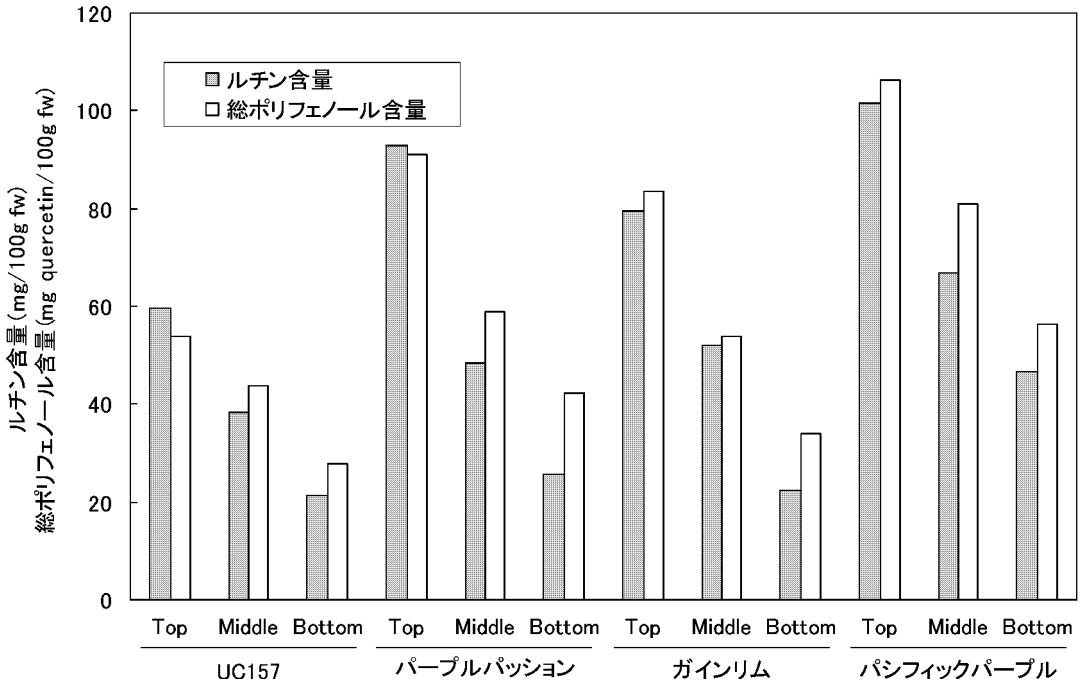
各品種のルチン含量と総ポリフェノール含量の関係をみると,決定係数が0.598(相関係数0.774)で,有意な相関関係が認められた(第17図)。このことはアスパラガス若茎頭部のポリフェノール類の中で,ルチンが主要なもののひとつであることを示唆しているものと思われる。



第17図　各品種におけるルチン含量と総ポリフェノール含量の関係

3)ルチン及び総ポリフェノール含量の部位間差

福島県農業試験場で2003年4月22日に収穫された‘UC157’,‘ガインリム’,‘パープルパッション’及び‘パシフィックパープル’の各品種について,若茎の部位別にルチン含量及び総ポリフェノール含量を分析した。供試したすべての品種において,ルチン,総ポリフェノールとも頭部が最も多く,ついで中央部,基部の順であった(第18図)。Chinら(2002)[24],鈴木ら



第18図　アスパラガス若茎におけるルチン含量及び総ポリフェノール含量の部位間差
24 cmの若茎をTop,Middle,Bottom各8 cmの部位に分けて測定した
(栽培地:福島県農業試験場)

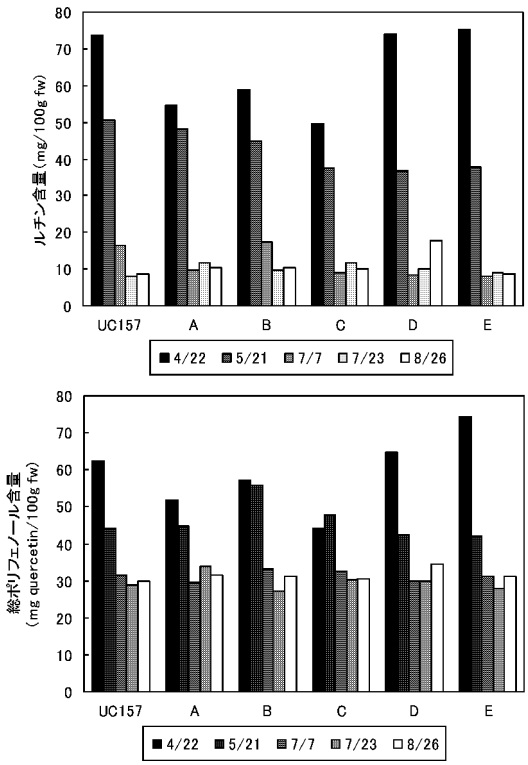
(2004)[63] も，ルチン含量は頭部が最も高く，中央部，基部の順であると報告しており，本研究の分析においても，これらの報告と同様の傾向が認められた。

Wang ら(2002)[53] は，サポニン類のひとつであるプロトディオシンの若茎中の濃度について，その部位間差を測定し，プロトディオシンは若茎頭部において最も濃度が低く，基部が最も高いことを報告した。本研究ではルチン以外のポリフェノール類，例えばカフェ酸やフェルラ酸などのフェノールカルボン酸類も含めた総量として部位間差を検討するために総ポリフェノール含量を測定したが，総ポリフェノール含量はルチン含量とほぼ同様の分布を示した。前節では，アスパラガス若茎の頭部においてルチンが主要なポリフェノールのひとつであることを明らかにしたが，本節で総ポリフェノール含量の分布がルチンとほぼ同様の傾向を示したことは，若茎全体で考えても，プロトディオシンのような特殊な分布を示すポリフェノール化合物は存在しないか，あってもきわめて少量であり，ルチンが主要なポリフェノールであることを示している。しかし，フェノールカルボン酸類もルチンと同様の分布をしている可能性もあり，さらに，今回の測定方法では個々の物質の含量を分別測定できないため，この点を明らかにすることは不可能である。今後は HPLC や MALDI-TOF MS[63] を利用するなど，他の分析方法を試みる必要があると思われる。

4）ルチン，総ポリフェノール含量及び DPPH ラジカル捕捉活性の季節変化

福島農業試験場で収穫された ‘UC157’ 及び育成系統 5 系統（A～E）について，ルチン及び総ポリフェノール含量の季節変動について検討した。ルチン含量はいずれの系統でも 4 月 22 日が 49.4～75.4 mg/100 g fw で，すべての系統において最も含量が高く，5 月 21 日は 36.9～50.5 mg/100 g fw と，各系統とも 4 月と比較してやや減少した。立茎後の 7 月 7 日には 8.0～17.4 mg/100 g fw，7 月 23 日では 8.1～11.7 mg/100 g fw，8 月 26 日には 8.6～17.7 mg/100 g fw を示し，特に立茎後の収穫物においてルチン含量が春先と比較して大きく減少する傾向が認められた（第 19 図）。

一方，総ポリフェノール含量は，4 月 22 日が 44.0～74.5 mg quercetin/100 g fw，5 月 21 日が 44.2～55.6 mg quercetin/100 g fw，立茎後の 7 月 7 日が 29.4～33.2 mg/100 g fw，7 月 23 日が 27.2～34.0 mg quercetin/100 g fw，8 月 26 日が 29.8～34.5 mg quercetin/100 g fw を示し，春先が最も値が高く，その後ルチンと同様に減少する傾向が認められた。しかし，7 月以降はいずれの系統もルチンほど急速には減少せず，30 mg quercetin/100 g fw 程度で安定していたことから，ルチンはアスパラガスの主要なポリフェノールであるが，フェノールカルボ



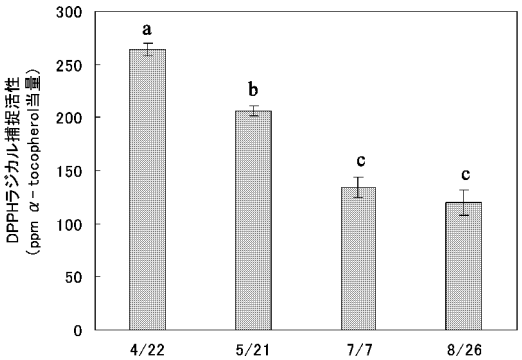
第 19 図　アスパラガス育成系統におけるルチン及び総ポリフェノール含量の季節変動（栽培地：福島県農業試験場）
A：‘MW500W’×‘ウエルカム’，B：‘ウエルカム’×（‘MW500W’×‘ガインリム’同系交配後代），C：‘MW500W’×（‘MW500W’×‘ガインリム’同系交配後代），D：‘信濃ヨーデル’×‘ガインリム’同系交配後代，E：‘信濃ヨーデル’×‘ガインリム’同系交配後代

ン酸類やフラボノイド類などの，ルチン以外のポリフェノールもある程度存在し，それらの物質はルチン含量が低下した夏場でも比較的豊富に含まれていたものと考えられる。

次に，DPPH ラジカル捕捉活性の季節変動を‘UC157’を材料に検討した結果，4月22日が264.0 ppm α-tocopherol 当量で最も高く，その後徐々に減少した（第20図）。DPPH ラジカル捕捉活性の減少は，ルチン及び総ポリフェノールの減少傾向と良く一致していたが，7月，8月に活性がルチン含量ほどは急激に減少していなかった。これらのことから，DPPH ラジカル捕捉活性にはルチンをはじめとして複数のポリフェノール類が関与しているものと思われる。

C．ルチン及び総ポリフェノール含量の作型及び収穫物の規格による差異

日本におけるアスパラガス栽培は，1980年代までは北日本や長野などの冷涼地における露地栽培とハウス半促成栽培が中心で，国産アスパラガスが市場に出回るのは3月から7月と限られていた。このため他の時期においては，1～3月は中南米，3～5月は北米，9月～12月は南半球産の輸入品が占めていた。しかし，1990年代に開発された立茎栽培[5]が広島・香川・佐賀・長崎といった西南暖地から普及し始め，現在では露地立茎栽培，ハウス立茎栽培，露地雨よけ立茎栽培など作型が分化して，国産アスパラガスは1月下旬から11月下旬まで収穫可能となり，市場に国産アスパラガスが長期間流通するようになってきている。



第20図　アスパラガス若茎粗抽出物のDPPHラジカル捕捉活性の季節変動（品種：UC157）
異なる文字間にはTukeyの方法（P＜0.05）で有意差あり（栽培地：福島県農業試験場）

前節において，アスパラガスのルチンや総ポリフェノール含量に品種間差や季節変動があることが明らかになったが，このように多くの作型が分化し，収穫期間が長くなった場合の機能性成分含量の作型による差や，作型ごとの季節変動についてはほとんど報告がない。フラボノイドは，植物の太陽光中の紫外線に対する防御物質であると考えられており，光強度を変化させたり，紫外線照射を行ったりすることによってフラボノイド含量が変動することが知られている。このため，光強度に大きく差がある露地栽培とハウス栽培でも，ルチンや総ポリフェノール含量に差があることが考えられる。これらに関する知見を持つことは，経営戦略上重要な意味を持つと思われる。そこで本節では，露地立茎栽培とハウス立茎栽培におけるルチン及び総ポリフェノール含量の作型による差及びその季節変動を調査した。

一方，鈴木ら(2004)[63]は，アスパラガスのルチン含量は植物体における器官や組織によって大きく差があることを報告した。ルチンは，若茎においては表皮付近の組織に多く存在し，髄部組織では検出されなかった。このことから，同じ重量で比較した場合には，太い若茎よりも細い若茎の方が表皮の占める割合が多いことから相対的にルチン含量が多いことが考えられる。そこで本節では，若茎の太さ（規格）ごとにルチン及び総ポリフェノール含量を調査し，若茎の太さと機能性成分含量の関連について検討した。

a．材料及び方法

1）植物材料

長野県野菜花き試験場の圃場にて露地立茎栽培及びハウス立茎栽培された4年生の‘ウエルカム’，‘ガインリム’及び‘パープルパッション’の，収穫されて24 cmに調製された若茎のうち，L規格（基部の太さが14～20 mm程度）のものを材料とした。分析には，2004年4月30日，5月24日，6月28日，7月26日に収穫された若茎を用いた。また，若茎の太さと成分含

量の関連を調べる実験では，2004 年 8 月 30 日に露地及びハウス立茎栽培圃場において収穫され，長さ 24 cm に調製された露地立茎栽培とハウス立茎栽培の‘ウエルカム’の若茎を基部の太さによってＳ（8 mm 未満），Ｍ（8 ～14 mm 未満），Ｌ(14～20 mm 未満），２Ｌ(20 mm 以上）に分類し，ルチン及び総ポリフェノール含量の分析に供した。

２）ルチン及びポリフェノール類の抽出

凍結した若茎から頭部の 0 ～ 8 cm の切片を調製し，80％メタノールを用いてＩ－１－(2)と同様の方法で抽出操作を行い，得られた抽出液及び純水で 5 倍希釈したものをそれぞれルチン及び総ポリフェノール含量の分析試料とした。

３）ルチン及びポリフェノール類の分析

と同様の方法で，ルチン含量は HPLC を用いて，総ポリフェノール含量はフォーリン・デニス法によって定量分析を行った。

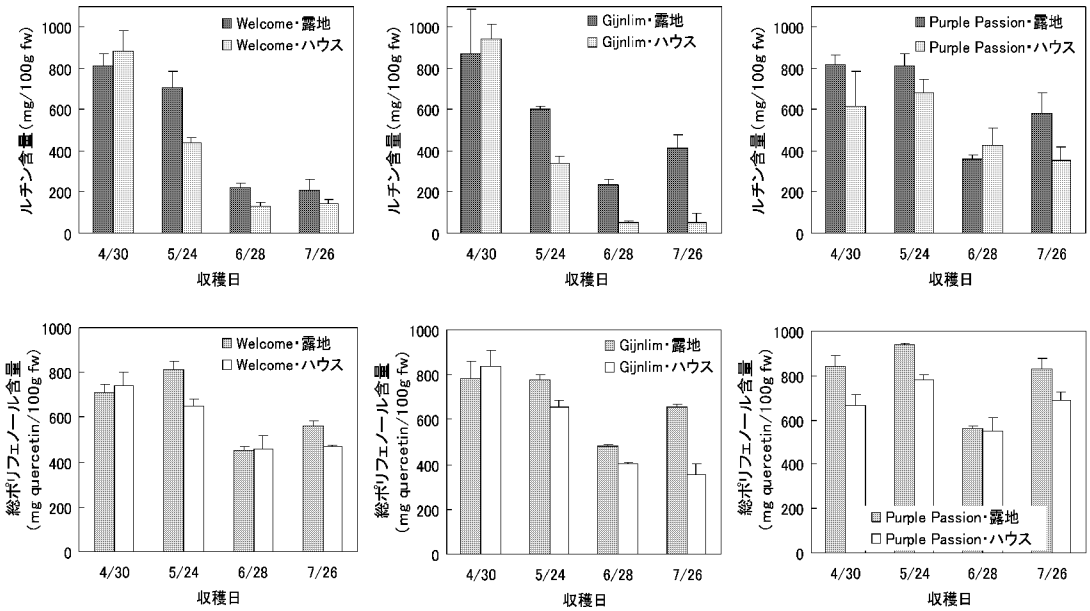
４）DPPH ラジカル捕捉活性の測定

太さ規格別の試料については，Ａ－ａ－４）と同様の方法を用いて抽出試料の DPPH ラジカル捕捉活性を測定した。処理に用いた試料はルチン含量の分析に用いた抽出液と同一のものとした。

ｂ．結果及び考察

１）露地またはハウス栽培におけるルチン及び総ポリフェノール含量の季節変動

4 月 30 日の試料では，各品種のルチン含量は露地栽培で 80.9～87.4 mg/100 g fw，ハウス栽培では 61.8～94.5 mg/100 g fw で，作型による明確な差は認められなかった。5 月 24 日は，露地が 60.0～81.0，ハウスが 34.4～67.9 mg/100 g fw の値を示し，6 月 28 日は，露地が 22.5～35.8，ハウスが 5.3～42.5 mg/100 g fw の値を示し，‘パープルパッション’以外の品種では，常に露地栽培の方がハウス栽培よりもルチン含量が高い傾向を示した。7 月 26 日は，‘ガインリム’と‘パープルパッション’では含量が前月よりも増加したが，ハウス栽培ではそのような傾向は認められず，露地栽培とハウス栽培における含量の差が広がった（第 21 図）。総ポリフェノール含量についてみると，4 月 30 日は，露地栽培が 70.9～84.1 mg quercetin/100 g fw，ハウス栽培が 66.6～83.8 mg quercetin/100 g fw の値を示し，ルチンと同様にこの時期には露地栽培とハウス栽培の間に明確な含量の差は認められなかった。その後は，5 月 24 日は各品種ともやや露地栽培の方が多くなったが，



第 21 図　露地またはハウス栽培におけるアスパラガス若茎中のルチン及び総ポリフェノール含量の季節変動（栽培地：長野県野菜花き試験場（2004 年））

6月28日は露地とハウスの間でほとんど差が認められなかった。7月26日は‘ガインリム’と‘パープルパッション’において，露地栽培の総ポリフェノール含量がルチンと同様に前月に示した値よりも増加して，露地とハウスとの差が広がった（第21図）。

以上のことから，ルチン及び総ポリフェノール含量について，露地栽培とハウス栽培を比較すると，立茎前の収穫にあたる4月下旬頃には，露地栽培とハウス栽培による含量の差はほとんどなく，立茎した後にルチンにおいては含量差が広がる傾向にあることがわかった。これには光環境が大きく関わっているものと考えられる。露地栽培とハウス栽培では光環境が大きく異なる。ハウス栽培では，フィルムによって常にある程度光が遮られている。また，立茎した場合には，一般的にハウス栽培において茎葉が旺盛に生育する場合が多い。このため，立茎した茎葉の根元で収穫される若茎は，露地栽培よりも弱い光しかあたらないことになる。前述のようにフラボノイドは光に対する防御物質であるとされていることから，栽培方法による光強度の差がルチン含量に反映されたものと考えられる。4月30日において露地栽培とハウス栽培の差がみられなかったことは，春先で若茎のルチン含量が豊富で，かつバラツキが大きかったこと，立茎前で，露地栽培とハウス栽培における光強度にそれほど差がなかったことが要因であると思われる。

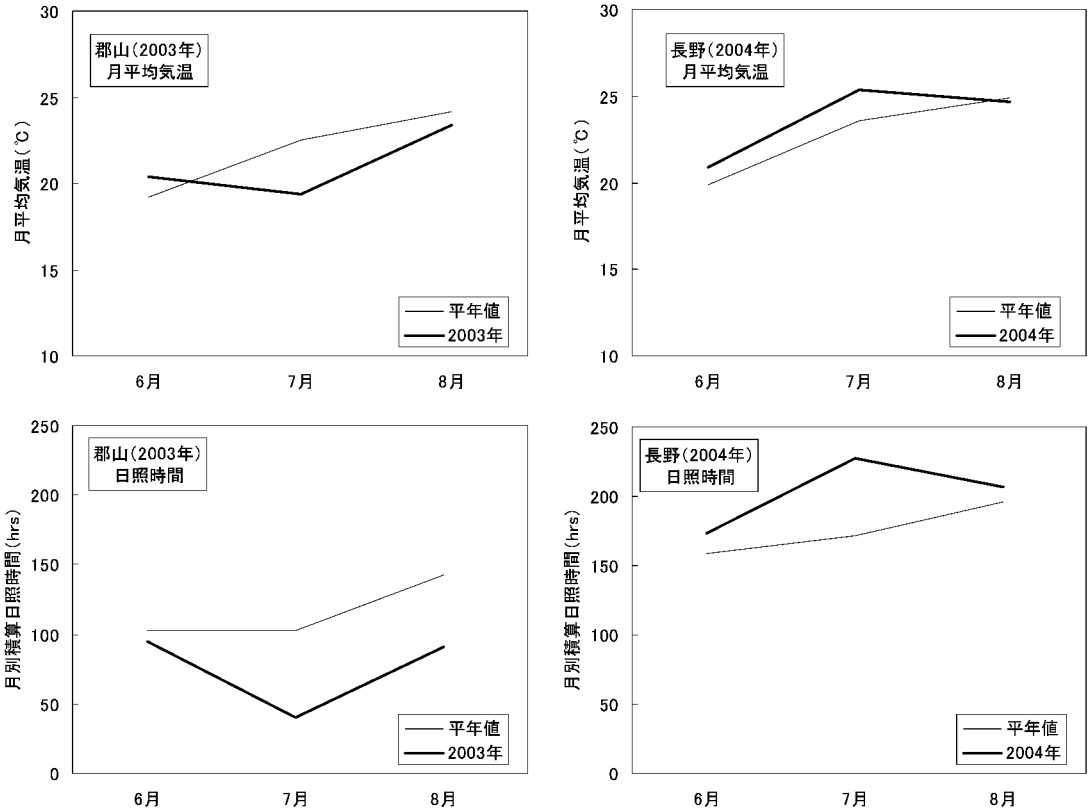
前節における，福島農業試験場にて露地立茎栽培された試料（調査年度：2003年）のルチン含量及び総ポリフェノール含量の季節変動の調査では，ルチン含量，総ポリフェノール含量とも春先から一様に減少する傾向であった。一方，本節の試料（調査年度：2004年）では，露地栽培において7月26日にルチン含量及び総ポリフェノール含量が前月の値よりも高くなったものが多かった。甲村ら(2004)[60]は光条件がアスパラガスのポリフェノール含量や抗酸化活性に及ぼす影響について，光強度が強いほどポリフェノール含量が多く，抗酸化活性が強かったことを報告している。第22図に福島（郡山市）の2003年6月～8月の月平均気温及び月毎積算日照時間，並びに長野（長野市）の2004年6月～8月の月平均気温及び月毎積算日照時間を示した。気象データと成分含量の変動の関連をみると，福島の材料を供試した2003年は冷夏で，7月，8月の日照時間が少なかったことからルチン及びポリフェノール含量が春先から一様に減少を続けたものと推測される。一方，長野の試料を供試した2004年は酷暑で，7月，8月の日照時間が多かったことが，ルチン及び総ポリフェノール含量が夏場に再び増加した要因になったものと推測される。

アスパラガスのルチン含量や総ポリフェノール含量に対して，栽培方法，とりわけ栽培方法による光環境が大きく影響していることが明らかとなったことから，充分な機能性成分含量を確保するためには，特にハウス栽培において株元の採光条件を考慮した作型の開発が必要であると考えられる。

2）太さ規格におけるルチン及び総ポリフェノール含量及びDPPHラジカル捕捉活性

太さ規格ごとのルチン含量のみると，露地栽培ではSサイズが29.0 mg/100 g fwと最も高い値を示した。次いでMサイズが22.9 mg，Lサイズが19.1 mg，2Lサイズが6.8 mg/100 g fwで，有意差が認められた（第23図）。一方ハウス栽培では，Sサイズが18.2 mg/100 g fwで最も含量が多く，Mサイズが10.7 mg，Lサイズが9.6 mg，2Lサイズが6.5 mg/100 g fwと，露地同様茎が細いほど含量が多い傾向を示した。しかしその差は露地栽培よりは小さく，Mサイズ，Lサイズ，2Lサイズの間には有意差は認められなかった。露地とハウスの比較では，2Lサイズでは有意差が認められなかったが，それ以外は露地栽培においてルチン含量が有意に高い傾向を示した。

総ポリフェノール含量をみると，露地栽培ではMサイズが74.9 mg quercetin/100 g fwで最も多く，Sサイズが68.9 mg，Lサイズが63.1 mg，2Lサイズが57.7 mg quercetin/100 g fwであった。区によって有意差が認められ，2L区がやや少ない傾向であったが，全体的にみてルチンほどの大きな差はなかった(第23図)。



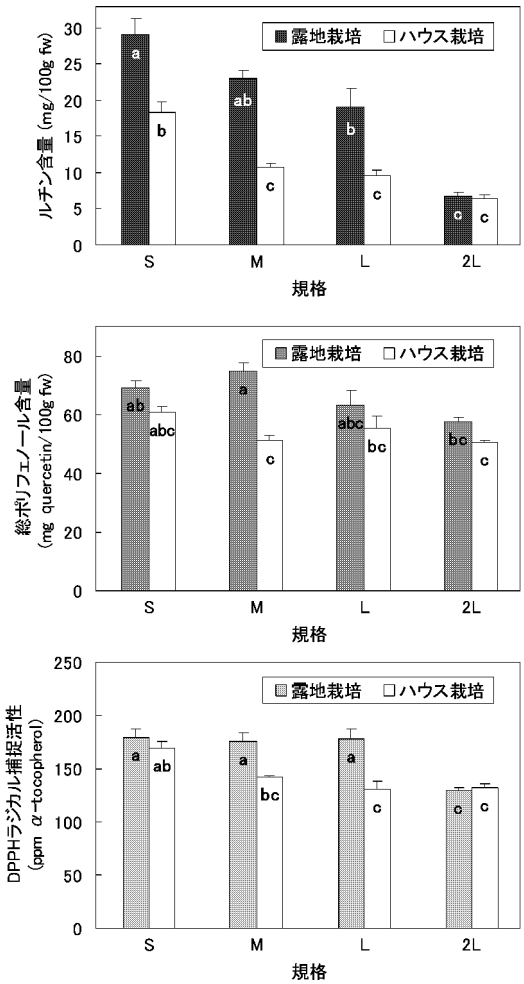
第22図　郡山（2003年）及び長野（2004年）における6～8月の平均気温と月毎積算日照時間及びそれぞれの地点の平年値（アメダス情報データベースより抜粋）

ハウス栽培についてはSサイズが60.9 mg quercetin/100 g fwでもっとも多く，Mサイズが51.1 mg/Lサイズが55.2 mg，2Lサイズが50.5 mg quercetin/100 g fwで，いずれの区の間にも有意差は認められなかった。露地栽培とハウス栽培を比較すると，Mサイズのみがハウス栽培に対して総ポリフェノール含量が有意に多かったが，それ以外のサイズについては，露地栽培の方が若干多い傾向ではあったが，ハウス栽培との間に有意差は認められなかった。

DPPHラジカル捕捉活性についてみると，露地栽培のSサイズ，Mサイズ，Lサイズ及びハウス栽培のSサイズがそれぞれ179.5，175.1，178.8及び169.5 ppm α-tocopherol当量でほぼ同等の活性を示した。露地栽培の2Lサイズでは129.6 ppmで露地栽培の中ではこのサイズだけが有意に活性が低く，ハウス栽培ではMサイズ，Lサイズ及び2Lサイズがそれぞれ141.8，130.3，131.8 ppm α-tocopherol当量で，露地栽培と比較して有意に活性が低かった（第23図）。

ルチン含量のサイズ別の変動をみると，同じ重量当たりで比較した場合，茎が細い方がルチン含量が多いという傾向が明瞭に認められた。この傾向は露地栽培区でより明確であった。これは，フラボノイドが表皮組織に偏在しているため，茎が細い方が重量あたりの表皮組織の割合が多いことが原因であると思われる。また露地栽培の方がハウス栽培よりも受光体勢が良好であるため，サイズごとの含量の差がより明確になったと考えられる。

これに対し，総ポリフェノール含量は若茎が細いほど，また露地栽培の方がやや高い傾向は示したが，ルチン含量ほどサイズ及び栽培方法による差がなかった。ルチンも総ポリフェノール含量の測定時には含まれてしまうため，測定



第23図　若茎の太さ規格におけるルチン含量，総ポリフェノール含量及びDPPHラジカル捕捉活性
グラフ毎に異なる文字間にはTukeyの方法（P<0.05）による有意差あり

値に影響は及ぼしたが，ルチン以外のポリフェノール類が若茎の髄部組織にも存在していることを示していると思われる。

また，抗酸化活性の指標であるDPPHラジカル捕捉活性のサイズ及び作型による変動は，ルチン含量の変動の傾向よりも，むしろ総ポリフェノール含量の変動の傾向をより反映していた(第23図)。これは前述のUC157におけるルチン含量・総ポリフェノール含量とDPPHラジカル捕捉活性の季節変動の結果から推測されたように，アスパラガスの抗酸化活性がルチンなどのフラボノイド類だけではなく，その他のポリフェノール類の影響も強く受けていることを示唆していると思われる。

D．アスパラガス粗抽出物の低比重リポタンパク（LDL）抗酸化活性

リポタンパクは，血しょう中に存在する脂質とタンパク質の複合分子で，その比重によって高比重（HLD)，低比重（LDL)，超低比重（VLDL）などに分類されている。このうちLDLは，食物から取り込まれたコレステロールや，肝臓で合成されたコレステロールと結合し，それらを各組織へ運搬する役目を担っている。HDLは逆に各組織で過剰となったコレステロールを肝臓へ戻す働きをしている。

LDLの酸化変性がアテローム型動脈硬化の大きな要因になっていることが最近の研究で明らかになってきている[47]。食生活や生活習慣の乱れによって生体内の脂質が過剰になると，血しょう中のLDLが増加し，逆にHDLは減少することが知られている。血しょう中で過剰となったLDLは血管内に滞留しやすくなり，活性酸素やラジカルなどによる酸化修飾を受けやすい状態になる。酸化修飾を受けたLDLは変性し(酸化変性)，生体で異物として認識されるようになり，血液中のマクロファージに捕食される。酸化変性LDLを際限なく捕食したマクロファージは肥大して破裂し，泡沫細胞と呼ばれる状態になり，血管壁と組織の境界に集積する。このため血管壁が炎症を起こしたり，狭まったりすることで血流が滞る状態となる。これがアテローム性動脈硬化である。

生体内では，通常脂溶性のビタミンE（α-トコフェロール）と，水溶性のビタミンC（アスコルビン酸）が血しょう中の主要な抗酸化物質で，LDLやリン脂質の酸化変性に対する防御作用を担っていることが知られている[16]。最近の研究で，ネギ属植物[48]，ブドウ種子[49]，キョウチクトウ(ラフマ)[64]，オーツ麦[65]などの植物の抽出物や，カテキン化合物，フラボノール化合物，アントシアニジンなどのフラボノイド類[50,66]及びクロロゲン酸やカフェ酸などのフェノールカルボン酸[46]といった植物に含まれるさまざまなファイトケミカルがLDLの抗酸化作用を有

することが報告されている。また，フラボノイドを摂取した際の吸収・代謝に関する研究も進んできており，腸管からフラボノイドが血しょう中に取り込まれ，血しょう中で抗酸化活性を示す状態で存在することが報告されている[67]。こうしたことから，植物を摂取し，植物由来のファイトケミカルによって動脈硬化をはじめとした生活習慣病を予防することについての関心が非常に高まってきている。

前節までの結果から，アスパラガスにはルチンが品種や季節による変動はあるものの，10～100 mg/fw 程度と比較的豊富に含まれることが明らかになり，さらにルチン以外にも抗酸化活性を示すポリフェノールの存在が示唆され，DPPH ラジカル捕捉活性も認められた。ルチン自体はさまざまな生理活性を持つことが報告されているが，アスパラガスの抽出物について LDL の抗酸化活性に関する報告はない。しかしアスパラガス中のルチンをはじめとするファイトケミカルによる LDL の抗酸化活性は充分に期待できると考えられる。

そこで本節では，アスパラガスの粗抽出物が LDL の抗酸化活性を示すかを検討し，さらに，活性の品種及び茎色による差，さらにルチンやポリフェノール含量との関連について検討を行った。

a．材料及び方法

1）植物試料の調製

長野県野菜花き試験場の圃場で栽培されている定植 4 年目のグリーン品種‘ウエルカム’，‘ガインリム’，ムラサキ品種‘パープルパッション’の，5 月 14 日に収穫し，長さ 24 cm に調製したＬサイズ（基部の直径が 20 mm 程度）若茎を試料とした（第 24 図）。また，北海道喜茂別町でホワイト栽培されている‘ガインリム’の 2 Ｌサイズ（基部の直径が 25 mm 程度）を 6 月 17 日に収穫し，17 cm に調製したものをホワイトアスパラガスの試料とした。収穫した若茎はただちにビニール袋に入れて－30℃のディープフリーザーで抽出処理を行うまで冷凍保存した。

冷凍した若茎を 100 g 秤量し，適量の 80％メタノールとともに 2 分間，氷冷下でホモジナイズした。ホモジナイズ後 80％メタノールで 1 L

第 24 図　ムラサキ，ホワイト及びグリーンアスパラガスの若茎

にメスアップし，ガラス容器に移して室温で 4 日間抽出した。部位別の比較試験には‘ウエルカム’の若茎を頭部・中央部・基部の各 8 cm に等分し，それぞれを細断後部位ごとに秤量し，w/v で 10 倍量の 80％メタノールで上記と同様の抽出処理を行った。抽出後ブフナー漏斗を用いて，ADVANTEC ＃1 濾紙で濾過し，通過液をロータリーエバポレータで濃縮・乾固した。乾固した後に粗抽出物の重量を測定し，これを 80％エタノール 50 ml に定溶し，粗抽出物溶液とした。この粗抽出物溶液を保管し，アッセイを行う際に適宜希釈して使用した。

2）ルチン及び総ポリフェノール含量の定量並びに DPPH ラジカル捕捉活性の測定

粗抽出物溶液中のルチン及び総ポリフェノール含量の定量並びに DPPH ラジカル捕捉活性の測定は，A－a－2）～4）で示した方法によって行った。

3）LDL 抗酸化アッセイ

a）Cu^{2+} イオンによる LDL の酸化変性処理

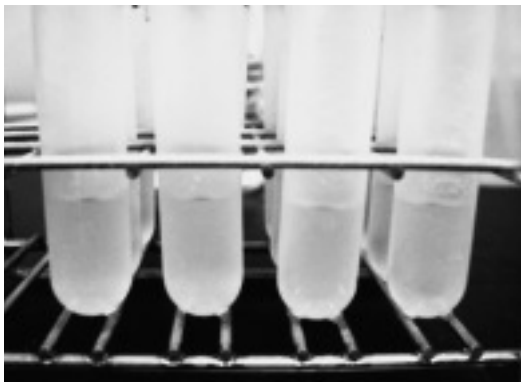
LDL 抗酸化アッセイは，Kim ら（2000）[64] の方法をもとに行った。粗抽出物溶液を pH7.4 に調整した 150 mM NaCl 含有 0.1 M リン酸バッファー（以下 PBS）で，所定濃度に希釈した。LDL 溶液はヒト血清由来の市販品を用いた。CALBIOCHEM 製の LDL 溶液（2 mg protein／バイアル）を PBS で 2 日間，5 ℃の条件下にて透析した後，PBS で 0.2 mg protein/ml に調整したものを用いた。2 ml のエッペンドルフチューブに，LDL 溶液 800 μl（最終濃度 1.6

mg protein/ml)，抽出物希釈液100 μl及び酸化剤として50または100 μM $CuSO_4$溶液100 μlを加えて37°Cのウオーターバスでインキュベートした。サンプルブランクとして抽出物希釈液をPBS 100 μlに置き換えたものと，コントロールとして抽出物希釈液と$CuSO_4$溶液をPBS 200 μlに置き換えたものも調整し，同様にインキュベートを行った。処理開始1，3，6時間後にインキュベートした試験液200 μlを採取し，TBARS法で酸化LDLの生成量を測定した。

b）TBARS（チオバルビツール酸反応生成物）法による酸化LDLの定量

TBARS法はYagiら(1976)[68]の方法をもとに行った。この方法は，酸化変性を受けたLDLが選択的にチオバルビツール酸（TBA）と反応して，赤色の蛍光物質であるTBARS（チオバルビツール酸反応生成物）を生成することを利用した定量法である（第25図）。

混合試料液200 μl，0.67%チオバルビツール酸(TBA) 1.5 ml，20%トリクロロ酢酸(TCA) 1.5 mlを混合し，沸騰水中で60分間反応させ，酸化LDLとTBAを反応させた。リファレンス試料として，0，5，10 nmolの1,1,3,3-tetraethoxy propane溶液も同様の処理を行った。60分経過後，流水で冷却し，3,000 Gで10分間遠心分離を行った。遠沈後の上清を1 cmの石英セルに移し，日立F-2000蛍光分光光度計を用いて，励起光515 nm，測定波長533 nmで混合試料液の蛍光強度を測定した。既知量の1,1,3,3-tetraethoxy propaneから生成されるTBARSをリファレンス試料として検量線を作成し，酸化LDLとTBAが反応して生成されるTBARSの生成量をMDA（マロンジアルデヒド）当量として算出した。品種及び茎色の比較試験では，LDL抗酸化活性の強さを，サンプルブランクのMDA生成量MDA*b*，酸化処理を行っていないLDLのMDA生成量をMDA*c*，抽出物（サンプル）添加区のMDA生成量をMDA*s*として，以下の計算式によってLDL抗酸化活性として表記した。



第25図　TBARS法の様子
（赤色の蛍光物質が生成した状態）

$$\text{LDL抗酸化活性（\%）} = (1-(\text{MDA}s-\text{MDA}c)/(\text{MDA}b-\text{MDA}c))\times 100$$

c）実験1　LDL抗酸化活性に及ぼすアスパラガス粗抽出物の処理量の影響

本実験は，アスパラガス粗抽出物がLDL抗酸化活性を示すかどうかを検討することを目的として行った。

LDL-PBS溶液(1.6 mg protein/ml，以下すべての実験に共通）に‘ウエルカム’の粗抽出物を最終濃度で0，1，10，50，200 mg fw当量加え，Cu^{2+}イオンを最終濃度が10 μMになるように100 μMの$CuSO_4$溶液を添加してLDLの酸化変性処理を行った。処理開始1，3，6時間後に試験液から200 μlずつ採取し，試験液中の酸化LDLの生成量をTBARS法によって測定した。

d）実験2　LDL抗酸化活性に及ぼすアスパラガス粗抽出物量及びCu^{2+}イオン濃度の影響

実験2は，品種比較試験に最適な粗抽出物の処理量及びCu^{2+}イオン濃度の組合せを検討することを目的として行った。

LDL-PBS溶液に‘ウエルカム’の粗抽出物を，最終濃度で0，50100 mg fw当量添加し，$CuSO_4$溶液をCu^{2+}イオンが5，10 μM(いずれも最終濃度）で添加してLDL酸化変性処理を行った。

処理開始3時間後の試験液中の酸化LDL生

成量をTBARS法によって測定し，各試験区における処理開始3時間後におけるLDL抗酸化活性を2）の計算式にしたがって算出した。

a）実験3　LDL抗酸化活性の品種及び茎色による差

実験3は，LDL抗酸化活性の品種及び茎色による差を検討することを目的として行った。

LDL-PBS溶液に‘ウエルカム’，グリーン栽培の‘ガインリム’（以上2品種はグリーン品種），‘パープルパッション’(ムラサキ品種)，ホワイト栽培の‘ガインリム’の若茎全体からの粗抽出物25及び50 mg fw当量を加えた。Cu^{2+}イオン濃度は最終濃度で5 μMとし，LDL抗酸化活性の品種及び茎色による差について検討した。実験2と同様に，各区における処理3時間後のLDL抗酸化活性をb）で示した計算式によって算出した。

b．結果及び考察

1）ルチン・総ポリフェノール含量及びDPPHラジカル捕捉活性の品種及び茎色による差

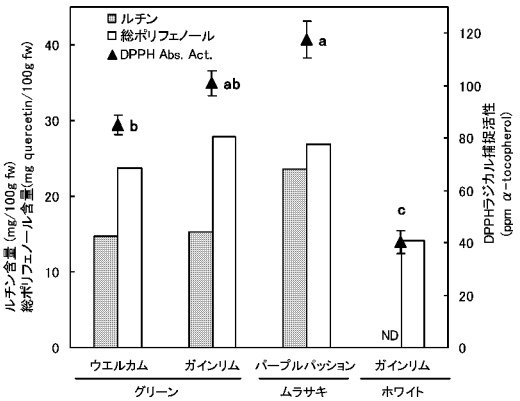
グリーン2品種，ムラサキ，ホワイトで比較すると，ルチン含量は‘パープルパッション’が23.57 mgで一番高く，次いでグリーン栽培の‘ガインリム’，‘ウエルカム’で，ホワイト栽培の‘ガインリム’では検出されなかった。総ポリフェノール含量はグリーン栽培の‘ガインリム’が27.83 mgで一番高く，ほぼ差がなく‘パープルパッション’，次いで‘ウエルカム’で，ホワイト栽培の‘ガインリム’は他のものに比べ低い値を示した（第6表）。

一方，DPPHラジカル捕捉活性を品種タイプ別に比較すると，‘パープルパッション’が最も高く，次いでグリーン栽培の‘ガインリム’，‘ウエルカム’，ホワイト栽培の‘ガインリム’の順で，有意差が認められた。またDPPHラジカル捕捉活性の品種及び茎色による差異は，ルチン含量及び総ポリフェノール含量の品種タイプ別の変動と比較すると，両者の中間的な変動を示しており，DPPHラジカル捕捉活性がルチンやその他のポリフェノールの，いずれからも影響も受けていることが示唆された（第26図）。

2）アスパラガス粗抽出物のLDL抗酸化活性

a）粗抽出物の添加量とLDL抗酸化活性の関係（実験1）

‘ウエルカム’の粗抽出物を添加しなかった区（サンプルブランク）では，インキュベート時間が長くなるにしたがってTBARSの生成量が増加し，3時間後には27.6 nmol，6時間後には30.9 nmol MDA/mg proteinとなった。これに対し，粗抽出物を添加した場合では，1 mg fw



第26図　品種・茎色ごとのルチン含量及び総ポリフェノール含量とDPPHラジカル捕捉活性の関係
異なる文字間にはTukeyの方法（$P<0.05$）で有意差あり

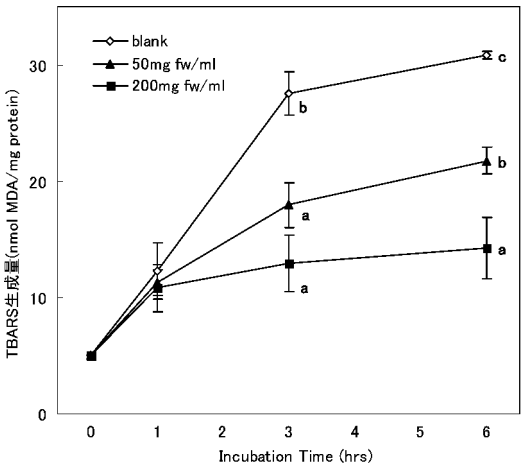
第6表　品種及び若茎色によるルチン及び総ポリフェノール含量の差異

茎色	品種名	ルチン含量 (mg/100g fw)	総ポリフェノール含量 (mg quercetin/100g fw)
グリーン	ウエルカム	14.7	23.6
グリーン	ガインリム	15.3	27.8
ムラサキ	パープルパッション	23.6	26.9
ホワイト	ガインリム	ND[z]	14.2

[z] 検出されず

当量及び10 mg fw当量ではサンプルブランクとほとんど変らず，抗酸化活性は認められなかった（データ省略）が，50 mg fw当量を添加した場合のTBARS生成量は，3時間後に18.0 nmol，6時間後は21.8 nmol MDA/mg proteinであった。200 mg fw当量を添加した場合では，3時間後に12.9 nmol，6時間後は14.3 nmol MDA/mg proteinのTBARS生成量を示した（第27図）。これらの区では，それぞれの時間毎にTBARS生成量にサンプルブランクとの間に有意差が認められた。また6時間後では50 mg fw当量区と100 mg fw当量区の間にも有意差が認められた。

以上のことから，アスパラガスの粗抽出物溶液は*in vitro*という限定的な条件ではあるが，LDL抗酸化活性を示すことが明らかとなった。さらにこの活性は，一定量以上の量において濃度依存的に高くなることが明らかとなった。アスパラガスの抽出物がLDL抗酸化活性を示すという報告は過去になく，本研究が初めての報告となる。



第27図　LDL抗酸化活性に及ぼすアスパラガス若茎粗抽出物の処理量の影響（品種：ウエルカム）異なる文字間にはTukeyの方法（P＜0.05，3時間後，6時間後はそれぞれ独立して検定）による有意差あり

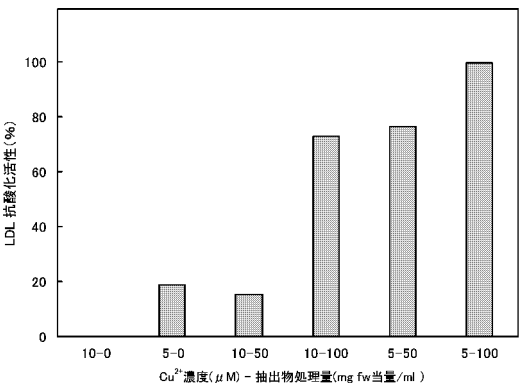
b）Cu^{2+}イオン濃度，アスパラガス若茎粗抽出物処理量とLDL抗酸化活性の関係（実験2）

酸化変性処理3時間後における，Cu^{2+}濃度が10 μMでアスパラガス粗抽出物を加えない区をサンプルブランクとして，各区のTBARSの生成量から算出したLDL抗酸化活性を第28図に示した。粗抽出物を添加しない場合，Cu^{2+}濃度は5 μMの方がLDLの酸化変性が10 μMよりも20%ほど抑制された。これは，抗酸化剤が存在しない条件下では，5 μMよりも10 μMの方がLDLの酸化変性が早く進むことを示している。

粗抽出物を添加した場合，Cu^{2+}濃度5 μMでは抽出物量50 mg fw当量で76.2%，100 mg fw当量で99.3%のLDL抗酸化活性を示した。Cu^{2+}濃度10 μMでは，粗抽出物量を50 mg fw当量で15.1%，100 mg fw当量添加した区では73.0%の活性を示した。

Cu^{2+}濃度が10 μMの場合には，酸化剤の濃度が高すぎ，粗抽出物を添加しても抗酸化剤としての効力を十分に発揮できないと考えられた。一方Cu^{2+}濃度が5 μMの場合には抽出物量が100 mg fw当量の場合，逆に抗酸化剤としての粗抽出物濃度が高すぎ，品種や部位間の比較的活性の差が小さいと思われるものを比較する試験には不向きであると考えられた。

以上の結果から，アスパラガスのLDL抗酸化活性の品種や部位間の比較試験には，Cu^{2+}濃



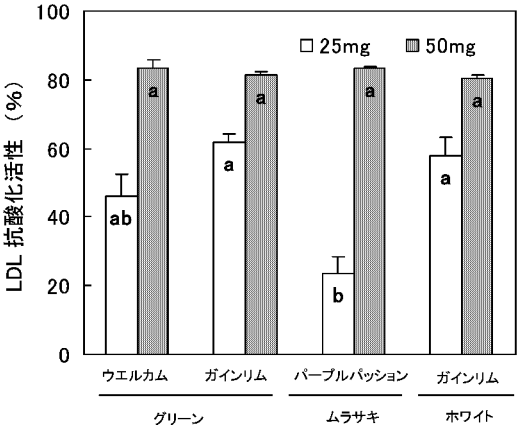
第28図　LDL抗酸化活性に及ぼすCu^{2+}濃度及びアスパラガス若茎粗抽出物量の影響（品種：ウエルカム）

度 5 μM，抽出物量は 50 mg fw 当量程度が適当であると考えられた。

c）品種及び茎色による LDL 抗酸化活性の差（実験 3）

LDL 酸化処理開始 3 時間後における，各品種の LDL 抗酸化活性を第 29 図に示した。抽出物の添加量が 50 mg fw の場合，供試したすべての品種が 80.3～83.5％の高い活性を示した。25 mg fw 当量における LDL 抗酸化活性は，‘ウエルカム’（グリーン）が 45.9％，‘ガインリム’（グリーン）が 62.1％，‘パープルパッション’（ムラサキ）が 23.6％，‘ガインリム’（ホワイト）が 57.7％で，品種間で活性に有意差が認められた。しかし，実験 1 では，粗抽出物量が 10 mg fw 当量では活性はまったく見られなかった。また実験 2 及び本実験では 50 mg fw 当量で各品種とも高い活性を示した。これらのことを考えると，25 mg fw 当量で見られた活性の品種間差はそれほど大きいものではなく，むしろアスパラガスの粗抽出物は茎の色や品種にかかわらず LDL 抗酸化活性を示すと考えられる。ルチンをほとんど含まず，総ポリフェノール含量も比較的少なかったホワイトアスパラガスが，グリーンやムラサキの品種と同等の LDL 抗酸化活性を示したことが非常に興味深い。

Vinson（1995）[50] らは，植物に含まれる種々のフラボノイドやフェノールカルボン酸の純品について LDL 抗酸化活性を測定した。この報告によると，ルチンは LDL 抗酸化活性を示すものの，純品ではアグリコンであるケルセチンよりも活性が弱かった。一方，カフェ酸やクロロゲン酸などのフェノールカルボン酸類のいくつかはケルセチンと同等の LDL 抗酸化活性を示すことを報告している。本研究では，ホワイトアスパラガスではルチンは検出されなかったものの，フォーリン・デニス法による測定で一定量のポリフェノール類を含んでいることが示された。したがって，ホワイトアスパラガス粗抽出物の LDL 抗酸化活性には，フェノールカルボン酸などの少量で強い活性を示す物質の関与が示唆された。



第 29 図　LDL 抗酸化活性の品種・茎色による差異なる文字間には Tukey の方法（P＜0.05　各処理量毎に独立して検定）による有意差あり

第IV章　総 合 考 察

A．アスパラガス一代雑種の効率的採種法

アスパラガスは雌雄異株でほぼ完全に他殖性であるため，ヘテロ性が強く，品質（外観品質や内生成分）や収量性の個体間差が大きいことが育種上の問題であった[7]。アスパラガスの近代的な育種の歴史は，選抜した優良個体をオープンな圃場で集団選抜するという方法から始まった（‘メリーワシントン 500 W’ が代表的な品種）。その後，こうした育種上の欠点を補うため，優良な雄株と雌株を選抜し，それぞれを組織培養によって増殖して得たクローン株を両親にする，いわゆる一代雑種による品種育成が盛んとなった。ただ，アスパラガスの場合自殖がきわめて困難なため，一代雑種といっても純系の両親を交雑した F 1 品種とは異なるものである。一代雑種育種で育成された品種では ‘UC157’，‘ウエルカム’ が代表的であり，‘UC157’ はアメリカ，オーストラリア，日本をはじめ世界中で広く栽培されている。

一代雑種による育種が盛んになる一方で，栽培上雄株の方がさまざまな点で有利であることが明らかとなったため[25,26]，近年では Sneep ら（1953）[27] が提唱した，超雄株（Super male）を用いた全雄一代雑種の育成が盛んとなった。アメリカやオランダで盛んに育成が進められており，日本でも最近数品種が品種登録され[69]，現在では世界中で 10 種類を超える全雄品種が商

業生産されているものと思われる。全雄一代雑種品種では‘ガインリム’が代表的な品種であり,収量性に優れるため,世界中で栽培が広がっている。

こうしたことから，今後期待される機能性成分含量を増強した品種の育成を行う際には，品質や収量の安定性を確保するため，全雄一代雑種品種か，少なくとも一代雑種品種である必要があると思われる。このため第二章ではアスパラガス全雄一代雑種の効率的な採種法の確立のために必要と思われる基礎的知見についてさまざまな検討を行った。

B．花粉の効率的な保存法及び交配適期

試験交配や組合せ検定の際に，保存花粉を利用することが可能であれば，交配時期を分散させることができ，交配労力の軽減や，作成組合せ数の増大に貢献するものと思われる。アスパラガスの花粉保存に関する過去の研究では，いずれも花から葯や花粉を保存する前に単離していたが，本研究の結果，労力をかけて花粉や葯を花から取り出して保存する必要はなく，花のまま容器に入れて低温・低湿条件で保存することで，少なくとも１シーズンの交配可能期間を通して保存可能であることがわかった。使用する際には100 μmの金属メッシュ上ですりつぶすことで簡単に交配に供する事が可能で，さらに保存花粉は生花から採種した花粉と同等の交配能力を有することが明らかとなった。

アスパラガスの交配能力は，本試験を遂行した北海道においては６月中旬から７月下旬が高く，盛夏の暑い時期に一時的に低下した。これは，夏季には隔離ハウス内は外気よりもさらに高温となることから，交配した花粉の活性が低下したり，花粉管伸長が不充分になったり（雄株の交配能力の低下),雌蕊の活性自体も高温の影響を受けて低下したりする（雌株の交配能力の低下）ことが原因であると思われる。また９月以降に交配した場合,着果はみられるものの,種子数や種子重が減少することがわかった。これは，種子が登熟する時期に気温が低くなりすぎたため，果実及び種子が登熟不良になることが原因であると考えられる。

以上のことから，人工交配を行う場合，花のまま冷蔵庫で保存した花粉を利用することが可能であり，その交配適期は北海道の場合６月中旬から７月下旬であることが明らかとなった。一方で，交配自体は６月～９月初旬までを通して可能であることから，組合せ数を確保したい場合には期間を通して交配を行うことが可能であると思われる。ただし，夏秋季の交配においては，採種量や種子の品質が低下することを考慮する必要がある。

本研究で得られたこれらの結果は試験交配の労力軽減と試験組合せ数の増大に貢献できるものであると考える。

C．ミツバチをポリネーターに利用する効率的な大量採種法

一代雑種品種の育成が完了し，市販向けの種子を大量に採種する際には，隔離圃場や隔離ハウスを用い，昆虫をポリネーターとして採種を行うのが一般的であると思われる。

本研究の結果から，アスパラガスの訪花昆虫は通常の栽培圃場においてもセイヨウミツバチが主要であり，またセイヨウミツバチによって交配した種子の品質は，徒手による人工交配と比較して大きな差はなかった。すなわち，大規模商業採種の際のポリネーターとして，セイヨウミツバチが問題なく使用できることが確認された。

一方，セイヨウミツバチをポリネーターとして利用する際に，雌雄比の設定が採種量に重大な影響を及ぼすことが考えられる。本研究では雌雄比３：１，５：１及び７：１について検討を行ったが，この中では雌株の系統を問わず３：１または５：１の場合に比較的採種量が多く，７：１では少なかった。また雌雄比が３：１及び５：１では，株の生育が旺盛なほど株当たり採種量が多い傾向がみられたが，７：１ではその傾向がはっきりしなかった。

これらのことを考えると，雌雄比が３：１から５：１においては，雄株が相対的に多いことから交配される花粉量が充分に確保されるため，雌株の生育が旺盛な（茎が大きく，それにともなって花の数が多い状態）ほど採種量が増えるが，雌雄比が７：１になると雄株が少ないために花粉が不足し，雌株のすべての花に行き

渡る量の花粉が確保できなかったものと思われる。このため，隔離ハウスで訪花昆虫をポリネーターとして大量採種を行う場合，ポリネーターはセイヨウミツバチが適当で，雌雄比を３：１から５：１とすることで，効率的に大量採種を行うことが可能であると思われる。

ただ，今回供試した雌雄合計４種類の系統を比べると，その生育や着花数にそれぞれ差がかなりある様子が観察できた。本試験において雌株の系統間で採種量は大きく異なり，また最適な雌雄比も系統によって若干差があったことから，商業的な採種を行う際にはその親株の性質をよく見極めた上で雌雄比を適切に設定する必要があると思われる。

今回の隔離ハウスの各区画は，それぞれの面積が小さく，ミツバチの巣箱からの距離が十分確保できていなかった。晴天の日には区画の南側にミツバチが多数とどまっている様子が確認できた。このため，ある程度面積が広くないと，ミツバチが自由に飛び回れないことが考えられ，こうしたことが採種量に影響した可能性もある。

さらに大規模な隔離圃場やハウスにおける最適な雌雄比については，今後大面積での追試を行って確認することが必要であると考えられる。ミツバチが行動に制約を受けずに飛び回った場合，分配される花粉の量が増えることで雌雄比を大きくできる可能性もある。

また系統間で着生する花の数が異なっている様子が観察できた。よって，採種に供する系統によって，最適な雌雄比が異なってくる可能性も考えられる。こうした点についても今後も引き続き検討が必要であると思われる。

D．アスパラガスの生理活性機能（抗酸化活性）

第三章では，アスパラガス若茎に含まれる生理活性物質，特に抗酸化活性を示す物質に着目した。特に抗酸化活性を示す物質が多数同定されているポリフェノール類とその中でもアスパラガスに豊富に含まれるとされているルチンについて，その品種間差，作型，収穫物の規格による差及び季節変動について体系的な調査と分析を行った。これまでにこうした体系的な研究は報告されておらず，本研究が最初の報告である。

ａ．アスパラガス若茎中のルチン及び総ポリフェノール含量の品種間差及び作型・規格での変動とその要因

長野県野菜花き試験場で栽培されている20品種の調査では，若茎頭部における春先のルチン含量は，最小から最高で約75～150 mg/100 g fw と，品種間差があったものの，多くの品種では90～110 mg/100 g fw を示した。また，総ポリフェノール含量については80 mg～100 mg quercetin/100 g fw 程度の値を示し，ルチンよりは品種間差は小さい傾向であった。福島県農業試験場で栽培された４品種の調査から，ルチン及び総ポリフェノール含量の部位間差を比較すると，供試した品種すべてで頭部＞中央部＞基部であり，Chin ら（2002）[24]，Wang ら（2004）[53]，鈴木ら（2004）[63] の報告と同様の結果であった。長野県野菜花き試験場における，３品種による作型間の比較では，ルチン含量は春先の一時期を除き，ほとんどの場合でハウス栽培よりも露地栽培の方が多い傾向があった。また総ポリフェノール含量についても，春先以外は露地栽培の方が多い傾向であったがルチン含量ほどの大きな差はなかった。また，収穫物の規格別の調査では，ルチン含量は規格や栽培方法で大きな差があった。露地栽培の場合には若茎の太さによる差が大きく，細いものほどルチン含量が多く，太くなるにしたがってルチン含量は少なくなった。一方，ハウス栽培も同様の傾向ではあったが，露地栽培よりもその差は少なかった。また総ポリフェノール含量における差も全体的にはルチン含量と傾向は似ていたが，規格や栽培方法による差はそれほど大きくなかった。

季節変動については，2003年に福島農業試験場の材料で，2004年には長野県野菜花き試験場の材料を用いて調査した。ルチン含量については，春先がもっとも含量が多く，立茎栽培後に急速に低下する，という傾向はどちらも同様であった。ただ，2004年の調査では６月末に一度大きく減少したものの７月末の調査で再び増加した。これはルチン含量の季節変動が，例えば貯蔵根内の同化産物蓄積量や茎の成長速度と

いった単純な内生的な要因だけではなく，光環境や温度，土壌水分といった外的な要因の影響も受けていることを示唆している。今のところどの要因が決定的な役割を持っているかは不明であるが，甲村ら（2004）[60]が指摘したように，光環境が比較的大きな要因であることは間違いないと思われる。ルチンをはじめとするフラボノイド化合物は植物の表皮組織や花弁などに多く存在することが知られており，紫外線からの植物の防御物質で，強光条件やUV照射によってルチン含量，アントシアニン含量や総ポリフェノール含量が変化することが報告されている[70,71,72]。2003年は冷夏で日照時間が少なかったことから，主に内生的な要因と立茎によって夏場の若茎が日陰で生育したことからルチン含量が一様に減少し，2004年は酷暑で日照時間が多かったため，特に露地栽培のもので内生的な減少要因を，外的な光環境などの増加要因が上回ったためにルチン含量が夏場に上昇したものと考えられる。

一方，総ポリフェノール含量についてもルチンと同じように春先に高く，夏場に向けて減少するという傾向は同様であったが，30〜40 mg quercetin/100 g fw程度のポリフェノール類は季節を問わず常に存在していた。Ⅳ節におけるホワイトアスパラガスの総ポリフェノール含量が約40 mg quercetin/100 g fwであることを考えると，ルチンの存在によらず，この程度のポリフェノール類がアスパラガスには常に含まれるものと推測される。

アスパラガスに含まれるルチンと総ポリフェノールの関係を見ると，ルチンの品種間差や部位間差，さらに規格間差や季節変動と総ポリフェノール含量の変動は，ほとんどの場合傾向が一致していた。しかし，夏場に大きくルチンが減少した際に一定量のポリフェノール類が検出されること，ホワイトアスパラガスにも夏場のグリーンアスパラガスとほぼ同程度のポリフェノール類が検出されることなどを考えると，ルチンがアスパラガスの主要なポリフェノールのひとつであることは間違いないが，それ以外に存在するポリフェノール類も決して無視できない量含まれていることが推測された。ルチン以外のフラボノイドや，その他のポリフェノール化合物については，Hartungら（1999）[51]が根の抽出物から複数のフェノールカルボン酸を同定しているが，若茎にそれらがどの程度の量分布しているかについては明らかになっていない。こうした物質の生理活性も期待されることから，今後さらにルチン以外のフラボノイドやフェノールカルボン酸についてもその同定・品種間差や季節変動の調査が必要であると思われる。

以上のことから，アスパラガスの主要なポリフェノールのひとつであるルチンは一般に，春先に，しかも若茎の頭部に多く存在し，その含量には品種間差があることがわかった。また太い若茎と細い若茎では，重量あたりでは細いものの方がその含量が多く，露地栽培とハウス栽培では一般的に露地栽培の方が含量が多いことがわかった。また，ルチン含量の多少には，品種間差が認められるほか，同化産物蓄積量などの内生的要因及び光環境などの外的要因も大きく関わっているということが明らかになった。

b．アスパラガスの抗酸化活性

フラボノイド類などのポリフェノール化合物が植物の抗酸化活性に貢献していることは広く報告されており，植物由来のポリフェノール化合物とラジカル捕捉活性やSOD活性ではタマネギのケルセチン配糖体[73]をはじめとするフラボノールや，チャに含まれるカテキン類[74,75]などのフラバノールと抗酸化活性，さらに生理活性や疾病予防作用との関係が指摘されている。本研究ではアスパラガスの生理活性として，抗酸化活性に着目し，アスパラガス抽出物のDPPHラジカル捕捉活性及び動脈硬化を予防するという観点から着目されているLDL抗酸化活性について検討した。

本研究における一連の実験結果から，アスパラガスの粗抽出物にはDPPHラジカル捕捉活性が認められた。さらに，この活性はルチン含量や総ポリフェノール含量と密接な関係があること，とりわけ総ポリフェノール含量と関わりが深いことが示唆された。さらに，アスパラガスの粗抽出物が，品種や茎の色にかかわらず，LDL抗酸化活性を示すことが示された。アスパ

ラガスではこれまでLDLに対する抗酸化活性が報告された例はなく，今回こうした活性を有することが明らかになったことは意義があると思われる。DPPHラジカル捕捉活性はルチン及び総ポリフェノール含量のどちらとも関連があることが示唆されたが，LDL抗酸化活性に関しては，ルチンを含まないホワイトアスパラガスの粗抽出物も有色の品種と同等の抗酸化活性を示すという，非常に興味深い結果が得られた。

Kimら(2000)[64]は，キョウチクトウの水溶性抽出物のLDL抗酸化活性に，クロロゲン酸やエピガロカテキンなど数種類のフェノール性化合物が大きな役割を演じていることを報告している。また，Vinsonら（2001)[50]は，ポリフェノール及びフェノール性化合物の純品を用いてLDL抗酸化活性を調査し，それらの多くにLDLに対する抗酸化活性があり，さらに化合物の種類によってその活性は著しく異なることを報告した。こうしたことから，アスパラガスのLDL抗酸化活性には主要なポリフェノールであるルチンが関与していると思われるが，それ以外にもまだ同定されていない別の物質が関与している可能性も否定できない。Youngら（1984, 1985)[76,77], Millerら(1991)[52], Hartungら（1999)[51]がアスパラガスに含まれていることを報告した，カフェ酸，フェルラ酸などのフェノールカルボン酸類が関与している可能性は充分考えられるが，現時点でこの活性物質は同定できていないため，今後さらに検討していく必要があると思われる。

c．アスパラガスの機能性と育種への応用

アスパガスに豊富に含まれ，抗酸化活性を有するルチンをはじめとするフラボノイド類が，ヒトが摂食した際にどのように吸収･代謝され，生体内で機能性成分として働くのかを解明することは機能性野菜として本当に有用かどうかを解明する上できわめて重要であると思われる。最近まで，フラボノイドがヒトに及ぼす生理活性については，疫学調査によってフラボノイドを多く含む植物を摂取することが心疾患や動脈硬化などの血液性の生活習慣病に関してそのリスクを軽減することや[14,15,78]，*in vitro*での実験で抗酸化活性やガン細胞に対する増殖の抑制[44]やアポトーシスの誘導効果[45]が示されてきたに過ぎず，経口摂取したフラボノイドが生体内でどのように吸収・代謝されて抗酸化活性を発揮するのかについてはほとんど解明されていなかった。これは摂取されたフラボノイドがどのような形で腸管から血液中に取り込まれるかが解明されていなかったことや，血しょう中の微量なフラボノイド化合物を定性・定量分析する手段がなかったことが主な理由である。

しかし最近の分析機器のめざましい発展によって，微量な成分の定性・定量が可能となったことから，1990年代の後半からフラボノイドの腸管からの吸収と代謝についての研究が進んできており，その機構が徐々に明らかになってきている。1990年代後半までは，フラボノイド配糖体は，ヒトの消化器官ではβ-グルコシド結合を加水分解する機構がほとんどないことから，大腸細菌叢のβ-グルコシダーゼによってアグリコンとなって大腸から吸収され[79]，その後グルクロン酸や硫酸による胞合体や，水酸基のメチル化などの代謝を受けると考えられていた。しかし，Hollmanら(1996)[73]がケルセチンのグルコース配糖体（ケルセチン-4′-グルコシド，quercetin-3,4′-ジグルコシド）を含むタマネギ（フライドオニオン）を摂取したヒトの被験者の血しょう中において，ケルセチン代謝物の濃度が摂取後3時間以内というきわめて短期間のうちに濃度が上昇すること，並びにケルセチン代謝物は比較的長く血中に存在し，半消失時間（半減期）は17時間に及ぶことを報告したことから，ケルセチン配糖体は小腸でも吸収・代謝されること，吸収されたケルセチン代謝物（胞合体）は血しょう中に長くとどまるという考え方が支持されるようになった。Hollmanら（1997，1999)[80,81]はさらに，タマネギ，リンゴ（以上は植物体として）及びルチンのサプリメントを被験者が摂取した実験や，ケルセチン-グルコシド及びルチンの純品を摂取した実験の結果，タマネギ由来や純品のケルセチン-グルコシドは短期間で吸収されるが，リンゴに含まれるケルセチン-ガラクトシド，ケルセチン-アラビノシドなどの配糖体やルチン（ケルセチン-ルチノシド）では血しょう中のケルセチン代謝物濃

度の上昇が遅れることを報告した。また Crespy ら(2002)[82] は，ケルセチンのアグリコンがラットの胃からわずかな割合ではあるが吸収・代謝されることを報告した。Erlund ら(2000)[83] は，ケルセチン（アグリコン）とルチンの純品をヒトに経口摂取させ，ケルセチン代謝物の血しょう中の濃度を経時的に測定する実験を行い，アグリコンを摂取した場合には摂取後2～5時間で血中濃度が最高となり，ルチンを摂取した場合には摂取後6～7.5時間でケルセチン代謝物の濃度が最高になること，血しょう中に取り込まれて消失するトータルのケルセチン代謝物の量はケルセチンアグリコンとルチンとで大きな差がないことを報告した。

フラボノイド配糖体の消化管からの吸収機構の研究も進んできている。Day ら(1998)[84] らはヒトの小腸及び肝臓に存在する β-グルコシダーゼ活性を持つ酵素がフラボノイド配糖体を *in vitro* で加水分解すること，その活性に基質特異性があり，アグリコンと配糖体の組合せによって分解できないものもあることを報告した。また Nemeth ら(2003)[85] は，ヒトの小腸上皮細胞に β-グルコシダーゼ活性を持つ酵素が複数（LPH，CBG）存在することを報告し，さらに細胞膜に存在するグルコーストランスポーターの一種 SGLT-1 が，フラボノイドのグルコシドを特異的に小腸細胞内へ運搬することを報告した。Moon ら(2001)[86]，Mullen ら(2002)[87]，Gee ら(2004)[88] はラットを用いて，経口摂取したケルセチン-グルコシドの吸収・代謝産物の同定を行い，血しょう中においてケルセチンはアグリコンや配糖体の状態では存在しておらず，モノ-グルクロニド，ジ-グルクロニド，モノ-グルクロニド-モノサルフェート，メチルケルセチン-モノグルクロニド，メチルケルセチン-モノグルクロニド-モノサルフェートなど，さまざまな形で胞合体化されて存在していることを報告した。Manach ら（1998）[67]，Morand ら（1998）[89]，Day ら(2000)[90]，Shirai ら(2001)[91]，Moon ら（2001）[86] は，ケルセチン配糖体が吸収・代謝された後の種々のケルセチン-グルクロニドやケルセチン-サルフェートが，LDL 抗酸化活性や，脂質抗酸化活性，DPPH ラジカル捕捉活性，キサンチンオキシダーゼ阻害活性などさまざまな抗酸化活性を示すことを報告した。

これらの最近の研究から，フラボノイド，特にケルセチンとその配糖体の摂取・吸収・代謝に関して以下のようにまとめられる。すなわち，1）アグリコンあるいはグルコース配糖体の場合，小腸上皮のグルコーストランストランスポーターと β-グルコシダーゼの働きによって小腸から比較的短時間のうちに吸収され，グルクロン酸，硫酸による胞合あるいはメチル化されて血しょう中に取り込まれる。2）グルコース以外の糖が結合した配糖体は小腸では吸収されず，大腸細菌叢の β-グルコシダーゼの働きによって加水分解を受けた後にアグリコンとして吸収され，胞合体化またはメチル化されて血しょう中に取り込まれる。3）配糖体の糖の種類によって取り込まれるまでの時間は大きく異なるが，フラボノイドとしてのトータルの吸収量には配糖体による差は少なく，血しょう中での存在形態もアグリコンのグルクロニド，サルフェート，メチルグルクロニド，メチルサルフェートと同一である。4）フラボノイドの胞合体は血しょう中で抗酸化活性を有する状態で存在している。

これらのことにより，ケルセチンやルチンが動脈硬化や心疾患に対して疫学的に予防効果を示したことのメカニズムを説明できうるものと考える。このため，ルチンなどのポリフェノールを豊富に含むグリーンアスパラガスやムラサキアスパラガスは，その抗酸化活性により動脈硬化や心疾患・脳血管疾患などを予防する効果を有する機能性野菜として期待できると言えるであろう。さらにルチンなどのポリフェノールを多く含む系統を選抜し，これらを多く含む一代雑種を育成することで，植物体のポリフェノール含量を高め，その上に光環境をはじめとする栽培環境を改善することによって，それらの含量をさらに高めることも可能であると思われる。また，ルチンを含まず，ポリフェノール含量も低かったホワイトアスパラガスが，LDL 抗酸化活性という生理活性を有することが確認された。これまでホワイトアスパラガスは糖類以外の成分についてはビタミン，アミノ酸など

いずれもグリーンアスパラガスよりも含量が少なく，栄養面ではグリーンに劣るとされていた[1]。しかし，本研究において，少量で強いLDL抗酸化活性を示す成分の存在が示唆されたことから，ホワイトアスパラガスも機能性野菜として充分期待できると思われる。

岡本ら(2003)[54]は，タマネギに含まれるケルセチン配糖体について，含量の品種間差が遺伝的形質であると推定されること，ケルセチン配糖体含量が多い系統と少ない系統を交配すると，後代におけるケルセチン含量は両親の中間の含量を示すことを報告している。アスパラガスについてはこうした検討が充分には行われていないため，今後はアスパラガスにおける機能性成分の遺伝様式の検討が必要であると思われる。また光環境がアスパラガスのルチンや総ポリフェノール含量にどのような影響を及ぼすかの系統だった検討，春先から含量が徐々に低下するのを栽培方法の改善によってどの程度防げるかの検討，ホワイトアスパラガスの抗酸化物質の同定とその吸収・代謝機構の解明も必要であると思われる。

本研究の成果から，アスパラガスにおける機能性育種について，新たな手法を提唱できると考える。すなわち，ルチン含量及び総ポリフェノール含量の高い系統を選抜し，保存花粉を利用して効率的に一代雑種系統の作出を行う。さらにそれらから有望な一代雑種を選抜した後に，隔離ハウスにおいてポリネーターとしてミツバチを利用した効率的な大量採種を行う，という手法である。この手法によって機能性成分含量が高い一代雑種品種を育成することで，輸入品との差別化につながり，国産アスパラガスの競争力の向上に貢献できるものと期待される。

摘　　要

アスパラガス（*Asparagus officinalis* L.）はユリ科の多年生作物で，世界中で広く栽培されている。日本においては，生産者は価格が安い輸入品との競合によって厳しい状況にさらされており，海外からの輸入品に対抗するための高品質な品種の育成が望まれている。アスパラガスは雌雄異株で他殖性であるため，交配した場合に遺伝的な変異が多く，収量や品質の安定性が低いことが知られている。このため，品種の育成には，優良な親系統の選抜とクローン培養技術を組み合わせた一代雑種育種が用いられてきた。しかし，一代雑種の採種方法についての系統だった研究はほとんど行われておらず，効率的な採種法の確立が求められていた。一方，アスパラガスには，さまざまな生理活性を持つことが知られているフラボノイドの一種，ルチンをはじめ，多くのポリフェノール類が含まれており，「機能性野菜」として注目されている。しかし，アスパラガスの生理活性機能に関する研究はまだ始まったばかりで，ルチンの品種間差や季節変化，ルチン以外の成分の生理活性及び含量などの知見は充分に得られていない。これらの知見を得ることは，生理活性機能を向上させた一代雑種の効率的な採種を可能とし，国産アスパラガスの輸入品に対する競争力を高める上できわめて重要である。

本研究は，アスパラガスの生理活性機能の向上を目的とした育種を行う際に必要な，一代雑種の効率的な大量採種方法の確立を図り，さらに生理活性物質のルチン及び総ポリフェノール含量について，品種間差，季節変動及び栽培法による含量の変動について検討した。また，アスパラガスの生理活性を評価するため，若茎粗抽出物の抗酸化活性評価試験を行った。

A．アスパラガス一代雑種の効率的採種法に関する基礎的研究

a．花粉の効率的な保存法及び交配適期

試験的に多数の交配組合せを作出する際に必要な技術として，アスパラガスの花粉の保存法について検討した。その結果，花粉は，花の状態で容器に入れ，5℃・低湿条件下で保存することで，交配可能な期間（約3か月間）を通して保存可能であることがわかった。使用する際には金属メッシュ上ですりつぶすことで簡単に交配に供する事が可能であり，保存花粉は生花から採種した花粉と同等の交配能力を維持した。また，アスパラガスの交配能力は，北海道においては雄株，雌株とも6月中旬から7月下

旬が高く，盛夏に一時的に低下した。これは，夏の高温下では花粉の授精能力が低下したり，雌蕊の活性が低下したりすることが原因であると思われた。また9月以降に交配した場合，着果はみられるものの，種子数や種子重が減少することがわかった。

b．ミツバチを花粉媒介者（ポリネーター）として利用した効率的な大量採種法

圃場における訪花昆虫の調査の結果，北海道におけるアスパラガスの主要な訪花昆虫はセイヨウミツバチであった。セイヨウミツバチをポリネーターとして利用して交配を行った結果，得られた種子の品質に問題はなく，隔離ハウスで効率的な大量採種が可能であることがわかった。最適な雌雄比について３：１，５：１及び７：１について検討を行ったところ，雌雄比が３：１及び５：１において採種量が高かった。雌株の生育と株当たり採種量の関係を雌雄比毎に比較した結果，７：１では雄株からの花粉の供給が少ないことが，採種量が低いことの要因と考えられたため，最適な雌雄比は３：１ないし５：１であると考えられた。

B．アスパラガスの生理活性機能に関する基礎的研究

a．若茎中のルチン及び総ポリフェノール含量の品種間差，作型・規格による差及び季節変動

アスパラガス20品種について，若茎中のルチン及び総ポリフェノール含量の品種間差を検討した結果，ルチン含量及び総ポリフェノール含量には品種により有意差が認められた。また，ルチン及び総ポリフェノール含量の部位間差を検討した結果，含量は頭部＞中央部＞基部であった。作型間の比較では，ルチン含量は春先を除き，露地栽培の方がハウス栽培よりも多い傾向があった。また総ポリフェノール含量についても，春先以外は露地栽培の方が多い傾向であったが，ルチン含量ほどの大きな差はなかった。若茎の太さ規格別に同様の調査を行った結果，細いものほどルチン含量が多く，太くなるにしたがってルチン含量は少なくなった。総ポリフェノール含量については，規格や栽培方法による差はルチン含量ほど大きくなかった。ルチン及び総ポリフェノール含量の季節変動について調査した結果，どちらも春先がもっとも含量が多く，立茎後（７月以降）に低下する，という傾向であった。ルチンが夏場に大きく減少するのに対し，総ポリフェノール含量の減少はルチンほど急速ではなかった。これらのことからアスパラガスのルチン及びポリフェノール類の含量には品種間差があり，さらにその含量には遺伝的要因や栄養状態などの内生的要因の他に，栽培条件や光環境などの外的要因も深く関わっていることが明らかとなった。

b．アスパラガスの抗酸化活性

アスパラガスのヒトに対する生理活性について，抗酸化活性について着目し，粗抽出物のDPPHラジカル捕捉活性及び動脈硬化予防と関連があるとして注目されているLDL抗酸化活性について検討した。その結果，アスパラガスの粗抽出物にはDPPHラジカル捕捉活性が認められた。また，活性の変動は，ルチン及び総ポリフェノール含量の季節変動及び品種間差の傾向とよく一致したことから，この活性がルチンなどのポリフェノール類と密接な関係があることがわかった。さらに，アスパラガスの粗抽出物が，品種や茎の色にかかわらず，LDL抗酸化活性を示すことが示された。LDL抗酸化活性に関しては，ルチンを含まないホワイトアスパラガスの粗抽出物も有色の品種と同等の抗酸化活性を示すという興味深い結果が得られた。また，アスパラガスではこれまでLDLに対する抗酸化活性が報告された例はなく，本研究でこうした活性を有することが明らかになったことは意義があると思われる。

本研究の成果から，アスパラガスにおける機能性育種について，新たな手法を提唱できると考える。すなわち，ルチン含量及び総ポリフェノール含量の高い系統を選抜し，保存花粉を利用して効率的に一代雑種系統の作出を行う。さらにそれらから有望な一代雑種を選抜した後に，隔離ハウスにおいてポリネーターとしてミツバチを利用した効率的な大量採種を行う，という手法である。この手法によって機能性成分含量が高い一代雑種品種を育成することで，輸

入品との差別化につながり，国産アスパラガスの競争力の向上に貢献できるものと期待される。

謝　　辞

本論文をとりまとめるにあたり，北海道大学大学院農学研究科　教授　大澤勝次博士には丁寧なご指導・ご助言を頂くとともに綿密なご校閲を賜った。また，同教授　増田　清博士，北海道大学北方生物圏フィールド科学センター教授　荒木　肇博士，北海道大学大学院農学研究科　助教授　松浦英幸博士には，貴重なご校閲を賜った。ここに謹んで深く感謝の意を表する。

本研究の遂行にあたり，北海道大学大学院農学研究科　助手　鈴木　卓博士には，実験計画立案やとりまとめに関して多大なご助言を賜った。また元北海製罐株式会社　缶詰研究所　所長　佐藤滋樹氏，同　田中光幸博士，北海製罐株式会社　部長　渡邊和彦氏，同　主任　井上信久氏には，北海製罐株式会社入社以来，アスパラガスの育種の研究に関するご指導，ご助言及び暖かい激励を賜った。また，農研機構　野菜茶業研究所　生産システム研究チーム　浦上敦子博士，元　北海道農業試験場　野菜研究室長　伊藤喜三男博士には雌系統の提供及びミツバチの貸与をしていただいた他，実験手法やとりまとめに関し貴重なご助言を賜った。また，元　社団法人　植物情報物質研究センター　理事長　水谷純也博士には，植物機能性成分の評価手法や分析技術について貴重なご指導・ご助言を賜った。また，社団法人　植物情報物質研究センター　理事長　角田英男博士には，実験のご指導の他，北海道大学大学院農学研究科社会人博士課程への進学をお勧めいただき，このような論文をとりまとめる機会を与えて頂いた。これらの方々に心より感謝の意を表する。また，福島県農業試験場　育種班　主任研究員園田高広博士，長野県野菜花き試験場　野菜科研究員　元木　悟氏，北海道立上川農業試験場研究員　植野玲一郎氏には，共同研究者として，実験材料の提供を頂いた上，実験方法や結果のとりまとめに関しご助言を賜った。心より感謝の意を表するとともに，今後とも日本から世界的に競争力を持つアスパラガスを育成していくために，より一層協力関係を強固にしていくことを切に願う。

広島県立農業研究センター　生物工学科　甲村浩之博士，神奈川県農業総合研究所　佐藤達雄博士，九州大学大学院　農学研究科　尾崎博士，北海道大学大学院　農学研究科　技官　笠井　登氏，北海道大学北方生物圏フィールド科学センター　技官　田村春人氏には，研究の進め方や実験手法などについて貴重なご助言や暖かい励ましを頂戴した。心から感謝の意を表する。

本研究を遂行するにあたり，元北海製罐　缶詰研究所　研究員　熊谷美智枝氏，元北海製罐缶詰研究所　研究員　後藤　司氏，元社団法人　植物情報物質研究センター研究員　柳谷智香子氏，元社団法人　植物情報物質研究センター研究員　栗本成敬氏，社団法人　植物情報物質研究センター　研究員　吉田知明氏，北海道大学大学院　農学研究科　前川健二郎氏には研究の共同実施者として，栽培管理，交配，採種，データ解析，抽出及び分析においてともに汗を流して頂いた。今回の研究はこうした方々の助力なしには決して成し遂げられなかった。ここに深く感謝の意を表する。

引 用 文 献

1）沢田英吉．1962．蔬菜生産技術５．アスパラガス．誠文堂新光社

2）Benson, B. L. 2002. Update of the world's asparagus production areas, spear utilization and production periods. Acta Hort. 589 (Proceedings of the 10th international asparagus symposium); 33-40

3）永井　信．1985．北海道のアスパラガスの栽培技術．小餅昭二編．農業技術普及協会刊行

4）前田智雄・岸田幸也．2004．アスパラガス．地域特産物の生理機能・活用便覧；30-37．㈱サイエンスフォーラム刊

5）伊藤悌右，今中義彦，長谷川繁樹，船越建明．1994．西南暖地におけるグリーンアス

パラガスの栽培に関する研究　第1報　収穫と株養成を平行させる母茎留茎栽培の収量性について．広島農技セ研報．60；35-45
6）Sato, T. and S. Motoki. 2002. Past and present Japanese asparagus production and marketing. Acta Hort. 589 (Proceedings of the 10th international asparagus symposium); 41-47
7）Ozaki, Y., T. Kurahashi, T. Tashiro and H. Okubo. 1999. Carbamate-induced flowering in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) seedlings: optimization of treatment and cultivar variation in flowering response and pollen germination. Euphytica. 110; 77-83
8）Marcellán, O. N. and E. L. Camadro. 1996. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. Sci. Hort. 67; 101-104
9）園田高広．2003．北海道大学大学院農学研究科　博士論文
10）Sonoda, T., H. Iwamura, A. Uragami and M. Ohwada. 2003. Development of a rapid method for identifying asparagus super-males using N- (4-chloro-2-trifluoromethylphenyl)-N'- propoxyacetamidine to induce flowering. Euphytica. 127; 169-174
11）重本直樹・甲村浩之．2002．パーティクルガン法によるアスパラガスの形質転換．広島県農技セ研究報告．72；11-17
12）Kakuta, H., T. Maeda, M. Akiyama, R. Hashimoto, Y. Horikawa. 2002. Transient gene expression in maize and asparagus pollen using magnetic particles by particle gun. Acta Hort. 589 (Proceedings of the 10th international asparagus symposium); 329-334
13）Hertog, M. G., E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Eldery Study. Lancet. 342; 1007-1011
14）Arai, Y., S. Watanabe, M. Kimira, K. Shimoi R. Mochizuki and N. Kinae. 2000. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese woman and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. J. Nutr. 130(9); 2243-2250
15）Hirvonen, T., P. Pietinen, M. Virtanen, M.-L. Ovaskainen, S. Hakkinen, D. Albanes and J. Virtamo. 2001. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. Epidemiology. 12(1); 62-67
16）二木鋭雄，島崎弘幸，美濃　真．1994．抗酸化物質　フリーラジカルと生体防御．学会出版センター刊
17）長友昌広．1997．サカタ交配　ベーターリッチ．蔬菜の新品種13；146財団法人日本園芸生産研究所編．誠文堂新光社．
18）望月龍也．1994．高色素遺伝子を利用したトマトの高ビタミンC系統の作出．Gamma Field Symposia．33；75-90
19）南　峰夫・北林広巳・堀井朝運・氏原暉雄．2000．普通ソバ高ルチン含有品種「サンルチン」の開発．食品工業．43(6)；19-24
20）Tsushida, T., M. Suzuki and M. Kurogi. 1994. Evaluation of antioxidant activity of vegetable extracts and determination of some active compounds. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 41(9); 611-618
21）鈴木建夫，石川宣子，目黒　照．1983．食品中のアンジオテンシンI変換酵素阻害能について．農化誌．57(11)；1143-1146
22）Hellerstein, H. K., J. L. Orbison, S. Rodbard, M. Wilburne and L. N. Katz. 1951. The effect of rutin in experimental malignant hypertension. Am Heart J. 42(2); 271-83
23）Deeds, F. and J. F. Couch. 1948. Rutin in green asparagus. Food Research 13; 378
24）Chin, C. K., S. A. Garrison, C. T. Ho, M. T. Huang. 2002. Functional elements

from asparagus for human health. Acta Hort. 589 (Proceedings of the 10th international asparagus symposium); 223-241

25) Ellison, J. H. and D. F. Scheer. 1959. Selecting superior asparagus plant on basis of earliness. Porc. Amer. Soc. Hort. Sci. 72; 353-359

26) Ellison, J. H., D. F. Scheer and J. J. Wagner. 1960. Asparagus yield as related to plant vigor, earliness and sex. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 75; 411-415

27) Sneep J., 1953. The significance of andromonoecy for the breeding of *Asparagus officinalis* L. Euphytica 2: 89-95

28) Ellison, J. H. and J. J. Kinelski. 1985. 'Jersey Giant', an all-male asparagus hybrid. Hortscience. 20(6); 1141

29) Ellison, J. H. and J. J. Kinelski. 1986. 'Green Wich', a male asparagus hybrid. Hortscience. 21(5); 1249

30) Ellison J. H., S. A. Garrison and J. J. Kinelski. 1990. Male asparagus hybrids: 'Jersey Gem', 'Jersey General', 'Jersey King', 'Jersey Knight', and 'Jersey Titan'. Hortscience 25: 816-817

31) 沢田英吉，田村　勉，八鍬利郎，原田　隆，今河　茂，山本茂雄，佐藤滋樹，山吹一芳．1983．アスパラガスにおける雄性系統の育成に関する研究(第１報)．北海道大学農学部邦文紀要．23；41-49

32) 八鍬利郎，原田　隆，笠井　登．1983．アスパラガスにおける雄性系統の育成に関する研究（第２報）雄性系統における花の発育と果実着生について．北海道大学農学部邦文紀要．13(4)；564-570

33) Snope, A. J. and J. H. Ellison. 1964. Storage of asparagus pollen under various conditions of temperature, humidity and pressure. J. am. Soc. Hort. Sci. 83; 447-452

34) 稲葉　彰．1983．北海道大学農学部果樹・蔬菜園芸学講座　卒業論文

35) 前田智雄，園田高広，浦上敦子，野呂美智枝，田中光幸，伊藤喜三男．1995．アスパラガス全雄一代雑種系統の採種（第１報）花粉の保存条件と保存期間が種子生産に及ぼす影響．園学雑．64（別１）；236-237

36) Greco, C. F., P. Banks and P. G. Kevan. 1995. Foraging behavior of honey bees (Apis Mellifera) on asparagus (Asparagus officinalis). Proc. Entomol. Soc. Ontario. 126(0); 37-43

37) Huyskes. J. A., 1959. The value of comparative tests of progenies from open-pollinated female asparagus plants. Euphytica 8: 141-144

38) 石黒嘉門．1959．ゆり科野菜の採種．四．アスパラガス．花卉蔬菜　採種園芸．志佐誠　編．朝倉書店刊；86-89．

39) Dell' Agli, M., Busciala A. and Bosisio E. 2004. Vascular effects of wine polyphenols. Cardiovasc Res. 63(4); 593-602.

40) Mangiapane, H., J. Thomson, A. Salter, A. Brown, G. D. Bell and D. A. White. 1992. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. Biochem. Pharmacol. 43(3); 445-450

41) Griffith Jr., J. Q., J. F. Couch and M. A. Lindauer. 1944. Effect of rutin on increased capillary fragility in man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 55; 228-229

42) Hellerstein, H. K., J. L. Orbison, S. Rodbard, M. Wilburne and L. N. Katz. 1951. The effect of rutin in experimental malignant hypertension. Am Heart J. 42(2); 271-83

43) Deschner, E. E., J. Ruperto, G. Wong and H. L. Newmark. 1991. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. Carcinogenesis. 12(7); 1193-1196

44) Yang, K., S. A. Lamprecht, Y. Liu, H. Shinozaki, K. Fan, D. Leung, H. Newmark, V. E. Steele, G. J. Kelloff and M. Lipkin. 2000. Chemoprevention studies of

the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. Carcinogenesis. 21(9); 1655-1660

45) Wenzel, U., S. Kuntz, M. D. Brendel and H. Daniel. 2000. Dietary flavone is a potent apotosis inducer in human colon carcinoma cells. Cancer research. 60; 3823-3831

46) Yamanaka, N., O. Oda and S. Nagao. 1997. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid on Cu^{2+}-induced low density lipoprotein oxidation. FEBS Letters. 405; 186-190

47) Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum. 1989. Beyond cholesterol-Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. The New England. J. Med. 320(14); 915-924

48) Higuchi, O., K. Tateshita and H. Nishimura. 2003. Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human low-density lipoprotein (LDL) oxidation in vitro. J. Agric. Food Chem. 51(24); 7208-7214

49) Vinson, J. A., J. Proch and P. Bose. 2001. MegaNatural® gold grapeseed extract; *In vitro* antioxidant and *in vivo* human supplementation studies. J. Medicinal food. 4(1); 17-26

50) Vinson J. A., Y. A. Dabbagh, M. M. Serry and J. Jang. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. J. Agric. Food Chem. 43; 2800-2802

51) Hartung, A. C., M. G. Nair and A. R. Putnam. 1990. Isolation and characterization of phytotoxic compounds from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) roots. J. Chemical Ecology. 16(5); 1707-1718

52) Miller, H. G., M. Ikawa and L. C. Peirce. 1991. Caffeic acid identified as an inhibitory compound in asparagus root filtrate. Hortscience. 26(12); 1525-1527

53) Wang, M., Y. Tadmor, Q. L. Wu, C. K. Chin S.A. Garrison and J. E. Simon 2003. Quantification of protodioscin and rutin in asparagus shoots by LC／MS and HPLC methods. J. Agric. Food Chem. 51; 6132-6136

54) 岡本大作，野口裕司，室　崇人，森下昌三．2003．タマネギにおけるケルセチン配糖体含量の遺伝的変異．園学雑．72(別２)．486

55) Kawai S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa and M. Yano. 1999. Antiproliferative effects of the readily extractable fractions prepared from various citrus juices on several cancer cell lines. J. Agric. Food Chem. 47(7); 2509-2512

56) 瀧川重信，石井現相．1997．ビタミンUの定量法の確立と貯蔵キャベツにおけるその品種間差異．園学雑．66（別１）；548

57) 瀧川重信，遠藤千絵，野田高弘，山内宏昭．2002．キャベツ幼殖物のビタミンU含量と品種間差異．園学雑．71（別２）；159

58) 吉川敏一編、1998．フラボノイドの医学．講談社

59) Folin, O. and W. Denis. 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. J. Biol. Chem. 22(2); 305-308

60) 甲村浩之，渡邊弥生，武藤徳男．2004．日照条件がアスパラガスの若茎の色，ポリフェノール含量および抗酸化活性に及ぼす影響．園学雑．73（別２）；432

61) Yokoyama, K., Y. Kikuchi and H. Yasueda. 1998. Overproduction of DnaJ in Escherichia coli improves *in vivo* solubility of the recombinant fish-derived transglutaminase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(6); 1205-1210

62) 桑原秀明．1985．果汁中のポリフェノール定量におけるアスコルビン酸の影響．長野

県食品工業試験場研究報告．13；49-53
63) 鈴木　卓，前田智雄，大澤勝次，P. Sporns．2004．アスパラガス組織に含まれる Rutin の MALDI-TOF MS を用いた定量．園学雑．73（別２）；434
64) Kim, D. W., T. Yokozawa, M. Hattori, S. Kadota and T. Namba. 2000. Inhibitory effects of aqueous extract of *Apocynum venetum* leaves and its constituents on Cu^{2+}-induced oxidative modification of low density lipoprotein. Phytother. Res. 14; 501-504
65) Handelman, G. J., G. Cao, M. F. Walter, Z. D. Nightingale, G. L. Paul, R. L. Prior and J. B. Blumberg. 1999. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. J. Agric. Food Chem. 47; 4888-4893
66) Safari, M. R. and N. Sheikh. 2003. Effects of flavonoids on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. Prpstaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty acids 69; 73-77
67) Manach. C., C. Morand, V. Crespy, C. Demigne, O. Texier, F. Regerat and C. Remesy. 1998. Quercetin recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. FEBS Letters, 426; 331-336
68) Yagi, K. 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem. Med. 15; 217-219
69) 園田高広，金山貴明，鈴木誉子，林　有子．2004．全雄一代雑種アスパラガス‘ハルキタル’の育成．園学雑．73 別２；431
70) Merzlyak, M. N. and O. B. Chivkunova. 2000. Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. J. Photochem. Photobiol. B. 55 (2-3); 155-163
71) Kreft, S., B. Strkelj, A. Gaberscik and I. Kreft. 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. J. Exper. Bot. 53 (375); 1801-1804
72) Yaginuma, S., T. Shiraishi and K. Igarashi. 2003. Developmental transition of the flavonoid contents in safflower leaves during stress-loaded cultivation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(8); 1691-1698
73) Hollman, P. C. H., M. V. D. Gaag, M. J. B. Mengelers, J. M. P. Van Trijp, J. H. M. De Vries and M. B. Katan. 1996. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. Free Radical Biol. Med. 21(5); 703-707
74) Tijburg, L. B. M., S. A. Wiseman, G. W. Meijer and J. A. Weststrate. 1997. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. Atherosclerosis. 135; 37-47
75) Lee, M.-J., P. Maliakal, L. Chen, X. Meng, F. Y. Bondoc, S. Prabhu, G. Lambert, S. Mohr and C. S. Yang. 2002. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin -3- gallete by humans: formation of different metabolites and individual variability. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 11; 1025-1032
76) Young, C. C. 1984. Autointoxication in root exudates of *Asparagus officinalis* L. 1984. Plant and Soil. 82; 247-253
77) Young, C. C. and T. C. Chou. 1985. Autointoxication in residues of Asparagus officinalis L. Plant and Soil. 85; 385-393
78) Hertog, M. G., D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A.

Menotti, S. Nedeljkovic, et al. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Arch. Intern. Med. 155(4); 381-386

79) Schneider, H., A. Schwiertz, M. D. Collins and M. Blaut. 1999. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. Arch. Microbiol. 171; 81-91

80) Hollman, P. C. H., J. M. P. Van Trijp, M. N. C. P. Buysman, M. V. D. Gaag, M. J. B. Mengelers, J. H. M. De Vries and M. B. Katan. 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. FEBS Letters, 418; 152-156

81) Hollman, P. C. H., M. N. C. P. Bijsman, Y. V. Gameren, E. P. J. Cnossen, J. H. M. De Vries and M. B. Katan. 1999. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Rad. Res. 31; 569-573

82) Crespy, V., C. Morand, C. Besson, C. Manach, C. Demigne and C. Remesy. 2002. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from rat stomach. J. Agric. Food Chem. 50; 618-621

83) Erlund, I., T. Kosonen, G. Alfthan, J. Maenpaa, K. Pettunen, J. Kenraali, J. Paratainen and A. Aro. 2000. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. Eur. J. Clin. Pharmacol. 56; 545-553

84) Day, A. J., M. S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M. J. C. Rhodes, M. R. A. Morgan and G. Williamson. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β-glucosidase activity. FEBS Letters. 436; 71-75

85) Németh K., G. W. Plumb, J.-G. Berrin, N. Juge, R. Jacob, H. Y. Naim, G. Wlliamson, D. M. Swallow and P. A. Kroon. 2003. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur. J. Nutr. 42; 29-42

86) Moon. J.-H., T. Tsushida, K. Nakahara and J. Terao. 2001. Identification of quercetin 3-*O*-β-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. Free Radical Biol. Med. 30(11); 1274-1285

87) Mullen, W., B. A. Graf, S. T. Caldwell, R. C. Hartley, G. G. Duthie, C. A. Edwards, M. E. J. Lean and A. Crozier. 2002. Determination of flavonols metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-Radiocounting and Tandem Mass Spectrometry following oral ingestion of [2-^{14}C] Quercetin-4'-glucoside. J. Agric. Food Chem., 50; 6902-6909

88) Gee, J. M., M. A. Wroblewska, R. N. Bennett, F. A. Mellon and I. Johnson, 2004. Absorption and twenty-four-hour metabolism time-course of quercetin-3-*O*-glucoside in rats, in vivo. J. Sci. Food Agric. 84; 1341-1348

89) Morand, C., V. Crespy, C. Manach, C. Besson, C. Demigne and C. Remesy. 1998. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. Am. J. Phisiol. 275; 212-219

90) Day, A. J., Y. Bao, M. R. A. Morgan and G. Williamson. 2000. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect of biological activity. Free Radical Biol. Med. 29(12); 1234-1243

91) Shirai, M., J.-H Moon, T. Tsushida, and J. Terao. 2001. Inhibitory effect of a quercetin metabolite, quercetin-3-*O*-β-D-glucuronide, on lipid peroxidation in liposomal. J. Agric. Food Chem. 49; 5602-

5608
92) Edenharder, R. and D. Grünhage. 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in salmonella typhimurium TA102. Mutation research. 540; 1-18

（受付：2005.8.30　受理：2005.10.7）

Summary

Relationship between food and human health is a major concern in these days. Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) has been noticed recently to contain antioxidative compounds and to show antioxidative capacity. On the other hand, in the breeding asparagus, all-male hybrids are getting popular all over the world because the male offers a number of advantages over the female. The objectives of this study are to obtain the knowledge which would be fundamentals of breeding super male hybrids of asparagus, focusing on antioxidant contents and antioxidative capacity.

To improve the seed production of all-male asparagus hybrids, pollen storage conditions, seasonal changes in hybridization ability, differences in quality between hand-pollinated and insect-pollinated seeds, and the ratio of male to female plants for insect pollination were examined. The viability of stored asparagus pollen was maintained for at least one month at 5°C. High temperature (30°C) caused a loss of viability within a few days. Both whole flowers and separated anthers with shed pollen were suitable for preservation. Hybridization ability seemed relatively high from mid June to early July in Hokkaido. In mid summer, this ability was markedly reduced. Average seed weight became lighter as the hybridization date got later. No significant difference was observed between hand-pollinated and insect (honey-bee) -pollinated seeds. The optimum ratio of female to male plants for insect pollination seemed to be between 3:1 and 5:1. This knowledge will be useful for the seed production of all-male asparagus hybrids by both hand-pollinated and insect-pollinated hybridization.

Differences in varieties and seasonal changes of rutin and total polyphenols contents on some cultural conditions of mother-fern culture were determined in order to obtain the basic knowledge about antioxidative activities of asparagus. Significant differences were observed both in rutin and total polyphenols contents among 20 varieties. Rutin contents of the spears varied from 76.3 to 155.0mg/100g fw. Total polyphenols contents varied from 77.1 to 102.6mg quercetin/100g fw. The differences became smaller, however, when mother stalks had grown in July. DPPH radical absorbing activity was also getting weaker in summer. Rutin contents showed greater range of seasonal change than that of polyphenols contents and DPPH radical absorbing activity. The comparison between the two years investigations of 2003 and 2004 showed the different patterns of the seasonal change of rutin and polyphenols contents. Rutin and polyphenols contents had constantly decreased from April to August in 2003, whereas they increased again in July 2004. However, this re-increase was only observed in the outdoor spears. These results might be due to the difference in weather condition in summer of these years. Outdoor spears generally showed greater contents of rutin and polyphenols than those of greenhouse spears except early spring harvest. These results suggest that not only rutin but also combination or synergism of antioxidative polyphenols might contribute to the antioxidative activity of asparagus, and the weather and

cultural condition, especially light condition, might have great influence on rutin and polyphenols contents.

The antioxidation capacities of green 'Welcome', green and white 'Gijnlim', and purple, 'Purple passion' asparagus spears were evaluated. Analyses of rutin and total polyphenols, and assays of DPPH radical absorbing and low-density lipoprotein (LDL) antioxidation were conducted. Varietal differences associated with the colors of spears were observed both in the amounts of rutin, total polyphenols and in DPPH radical absorbing activities, although not in LDL antioxidation activities. DPPH radical absorbing activities seemed to be affected by both rutin and other polyphenolic compounds. However, LDL antioxidation activities were likely to be influenced more by other polyphenolic compounds than by rutin. Total polyphenol content showed a fairly close relationship with rutin content, DPPH radical absorbing activity and LDL antioxidation activity. To determinate total polyphenol content using the Folin-Denis' method seemed to be useful for selecting the breeding lines that show high antioxidative capacities.

From the results of this study, a new method for the functional breeding of asparagus could be advocated. This method consists of following steps; 1) finding the varieties, lines or even single plant show high rutin and polyphenols contents or show high antioxidative capacities; 2) making hybrids using the stored pollen; 3) choosing the appropriate hybrid to be a commercial variety; 4) performing seed production in a greenhouse using honeybees as pollinators. Such the kind of hybrid which shows high antioxidative capacity has competitiveness both in fresh food market and worldwide seed market.