

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18380190  
 研究課題名（和文） 水生野菜エンサイの機能性を高める原因別汚濁淡水浄化体系の構築  
 研究課題名（英文） Construct the system of purifying eutrophic water by enhancing the functionality of aquatic vegetable, *Ipomoea aquatica* Forsk.  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：高垣 美智子（Takagaki Michiko）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・園芸学研究科・准教授  
 研究者番号：00206715

研究成果の概要：エンサイは他の野菜に比べ機能性成分が多く、赤軸系統が青軸系統より豊富に含まれていた。この機能性成分は、肝臓障害の発症や、がん細胞の増殖を抑制した。また、エンサイ草生水路での試験では、25℃以下で生育が抑制されたが、生育速度に関わらず水中の硝酸態窒素濃度を 0.3-0.5ppm 程度まで低下させたことから、多面的な淡水浄化植物として利用が可能であることが示唆された。水路の堆積物には豊富な窒素が含まれており、育苗培土としての利用が可能である。また、青色光下で花芽分化は抑制、生育は促進されることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	2,000,000	600,000	2,600,000
19年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
20年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	10,100,000	3,030,000	13,130,000

研究分野：熱帯農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境浄化、硝酸態窒素、水路堆積物、河川水、機能性成分、光条件、花芽分化

## 1. 研究開始当初の背景

東南アジアなど熱帯亜熱帯地域の水辺に自生し食用とされるエンサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk) は、夏季に収穫可能な貴重な野菜とされる。また、その旺盛な生育量から高い養分吸収能力、すなわち河川等の水質浄化への利用が可能であることが予想された。

## 2. 研究の目的

淡水浄化の原因として畜産廃棄物や肥料成分由来のものは、窒素成分が多いこと、

生活排水由来のものは、リンが多いことが分かっている。これらの吸収に関する基礎資料を集めると同時に、環境変化がエンサイの生育や代謝系に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

(1) エンサイに含まれる機能性成分含量と季節変動、効能を明らかにする。

(2) エンサイの生育に適した温度条件の解明とそれに伴う養分吸収能力を明らかにし、水質浄化作物としての導入方法を検討する。

(3) エンサイの花芽形成機構に関与す

る光環境要因を明らかにし、より効率的な栽培管理方法を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1)エンサイの食品としての機能性

##### ①総ポリフェノール含量

フォーリン・チオカルト法で測定した。

##### ②in vitroにおける抗酸化性

凍結乾燥した試料に80%EtOHを加え、遠心分離後、上清を用いた。抗酸化能はDPPHラジカル補足能を測定し評価した。検量線にはTroloxを標準物質として用いた。

##### ③in vivoにおける抗酸化性

ICR雄マウスに凍結乾燥したエンサイ粉末を餌に添加し、13日間自由摂取させた。その後四塩化炭素の注射により生体内の酸化を誘導した。

##### ④ガン細胞増殖抑制作用

ガン細胞として、ヒト急性前骨髄性白血病細胞(HL-60)を用いた。粉末にしたサンプルに80%エタノールを加え80℃の温浴上で60分間加熱した。遠心分離後、上清を分離後、エタノールを揮発させた。これにPBSを加えて溶解させ、粗抽出液とした。滅菌後のサンプルは-20℃にて冷凍保存し、使用時に目的の希釈倍率になるようにPBS(-)で希釈して実験に用いた。また今回の実験では、この粗抽出液の原液を「×1」とし、以下希釈倍率ごとに「×2～×16」と表記した。生細胞数の検定は、MTT assayで求めた。MTT assayは3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)が生細胞のミトコンドリア内の脱水素酵素の働きで青色のホルマザンに変わることを利用して生細胞数の検定をする手法である。マイクロプレートリーダーで波長550nmの吸光度を測定した。

#### (2)エンサイ草生水路における水質浄化

##### ①エンサイ栽培による水質浄化試験

2006 9/21-12/28の期間、国際農研熱帯・島嶼研究拠点内(沖縄県、石垣島)の野外に設けた実験用水路でエンサイ(品種: Ton Pai Bai Yao, Serm Sri Seed company, Thailand)を供試し試験をした。水路は、幅1m、長さ50m、水深25cmで、河川水(NO<sub>3</sub>-N: 0.43-0.76ppm)を常時流し、水路を5つのブロックに分けて栽培した(図1)。

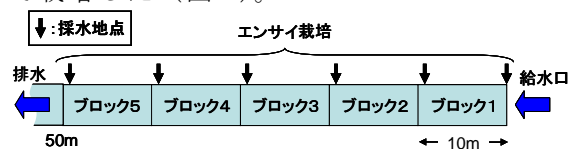


図1 エンサイを栽培した草生水路と採水地点の模式図

栽培期間中、およそ14日間隔でブロックごとのエンサイを株元から刈り取り、乾物重を測定した。また、刈り込み前日に水路入り口と各ブロック末端において水路水を採水し、紫外吸光度法によりNO<sub>3</sub>-N濃度を分析した。また、各ブロックの水温・気温はサーミスタで連続測定した。

##### ②水路堆積物を用いた育苗試験

2006 4/11に4年間エンサイ(品種: 同上)を栽培した上記水路の堆積物を採取した。温室内で風乾後4月24日に堆積物と粗粒砂とを混合し、堆積物の含有割合が0, 25, 50, 75, 100%からなる5種類の培地(0区、25区、50区、75区、100区)と、対象区として市販の育苗培土(みのり培土: JA)を用いた。直径6cmのポリエチレンポットに各培地を入れて、コマツナ(品種: 八丁)は播種、トウガラシ(石垣島在来)は苗を移植して、生育を比較した。また、2008 6/9に再度各ブロックの上流部と下流部の2箇所ずつから堆積物を採取し、乾物重、窒素・炭素の含有率を測定した。

#### (3)エンサイの花芽形成に関わる光環境要因の解明

##### ①光質がエンサイの生育、花芽形成に与える影響

2007 10/2-12/2(第1回調査)、2008 1/21-3/21(第2回調査)の期間、日本大学生物資源科学部圃場内にある人工光人工気象室および自然光人工気象室においてエンサイ(台湾産エンサイ青軸系統)を供試し試験をした。人工気象室内の環境は気温30℃一定、二酸化炭素濃度及び湿度は自然状態とした。生育のそろったエンサイを頂点から約30cmの位置で刈り取り、それらを直径12cmのポリエチレンポットに挿した植物体を実験に用いた。実験は人工光人工気象室において行い、光質処理は青色、緑色、赤色の蛍光灯にて行った(青 469-472nm、緑 520-524nm、赤 623-626nm)(図2)。



図2

光量は植物体の頂端部が  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  となるよう調節した。1日16時間の照射を5、10、15、20日間処理した後、後自然光人工気象室にて自然日長条件下で栽培し、草丈、葉数、SPAD値、花芽着生節、開花までの日数を測定した。個体数は各区5個体とした。

#### ②光強度がエンサイの花芽形成に与える影響

2008 11/30-12/30の期間、上記と同様の自然光人工気象室においてエンサイ(品種:同上)を供試し試験をした。人工気象室内の環境は気温  $25^{\circ}\text{C}$  一定、二酸化炭素濃度及び湿度は自然状態とし、植物育成用ランプ  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  を用い15時間日長条件下で栽培した。このエンサイの新芽部分の上位5節を残し切り取り、切り取った植物体の最下節が土中に入るように挿し植えし、同じく植物育成用ランプを用いて照射処理をした。処理区は10、12、14時間明期を設け、その中で光量をそれぞれ50、100、 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  区とし、草丈、葉数、SPAD値、花芽形成節、花芽形成までの日数を調査し比較した。個体数は各区20個体とした。

### 4. 研究成果

#### (1)エンサイの食品としての機能性評価

総ポリフェノール含量は、青軸系統のものに比較して、赤軸系統が高い値を示した(図3)。アントシアニン含量も赤軸系統が高い値を示した。

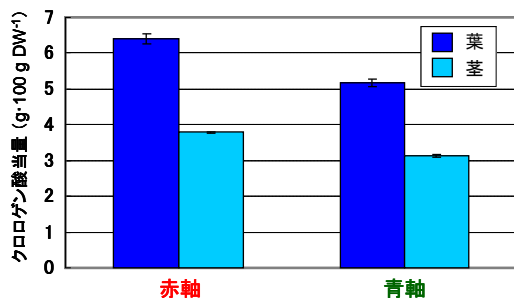


図3 総ポリフェノール含量の系統間差異 (7月25日収穫分)

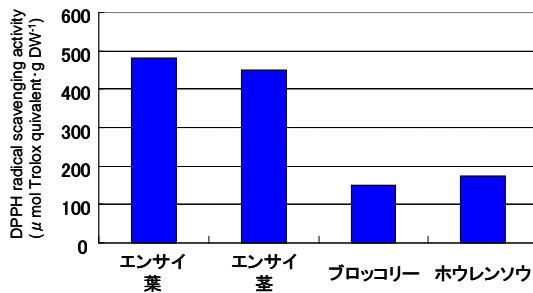


図4 エンサイとブロッコリー、ホウレンソウのDPPHラジカル消去活性の比較

夏(7月)、秋(9~10月)、冬(11月)に収穫した試料の総ポリフェノール含量等を測定した結果、総ポリフェノール含量は葉においては夏、秋で若干高い値を示した。

*in vitro* における抗酸化性の評価を行った結果、DPPHラジカル消去活性は葉、茎ともブロッコリー、ほうれん草に比し高い値を示した(図4)。しかしながら、青軸系統と赤軸系統の間での大きな差は見られなかった。

*in vivo* における抗酸化性の評価を動物実験によって行った。四塩化炭素誘発肝障害マウスに対する抑制効果を調べ、生体内でのエンサイの抗酸化機能についての系統間差異を検討した。

四塩化炭素を投与した群は酸化の指標である肝臓TBA値が有意に増加した。赤軸系統投与群は対照群に比し有意に肝臓TBA値を減少させ、*in vivo* でも抗酸化能を示した(図5)。

さらに、エンサイ青軸系統と赤軸系統の植物体内成分からポリフェノールを含む画分を抽出し、それをマウスに経口投与後、四塩化炭素で急性肝炎を誘発させて、肝障害予防効果を検討した。その結果、ポリフェノールを含む画分成分には、強い肝臓障害発症抑制作用が認められた。特に赤軸系統からの抽出物は、微量の投与で効果を示した。

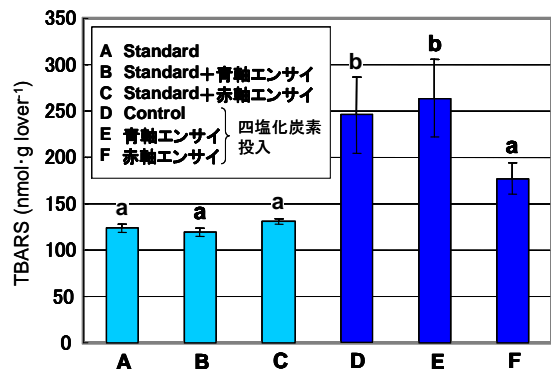


図5 四塩化炭素の投与とエンサイ給餌がマウスの肝臓中TBARS濃度に与える影響

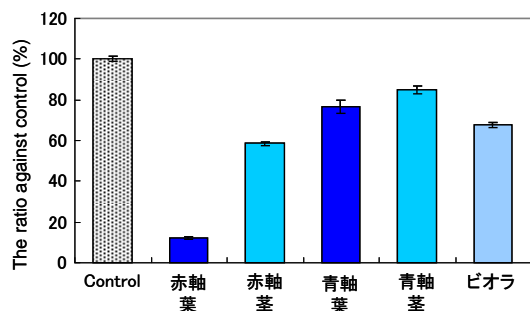


図6 抽出物の添加がHL-60細胞増殖に及ぼす影響

### ガン細胞増殖抑制作用

これまでに機能的に見られたポリフェノールを含む分画成分をヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL-60 の培養液に添加したところ、細胞の増殖を強く抑制し、アポトーシスを誘導した。特に赤軸系統のものに強い効果が見られた (図 6)。

そこで、赤軸系統の葉抽出物で、添加量を変えて観察したところ、用量反応が見られた (図 7)。

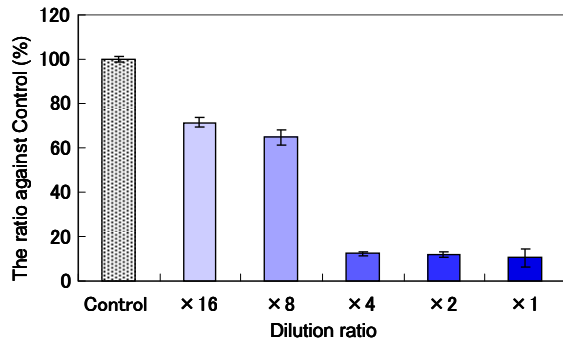


図 7 赤軸系統からの抽出物濃度が HL-60 細胞増殖に及ぼす影響

### (2) エンサイ草生水路での水質浄化

#### ① エンサイ栽培による水質浄化試験

図 8 に栽培期間中の日平均気温、水温と、各ブロックの乾物重から求めた各生育期間における平均生育速度の推移を示す。エンサイは 25℃ 以上の環境では生育が良好であったが、20℃ 以下では生育がほぼ停止した。

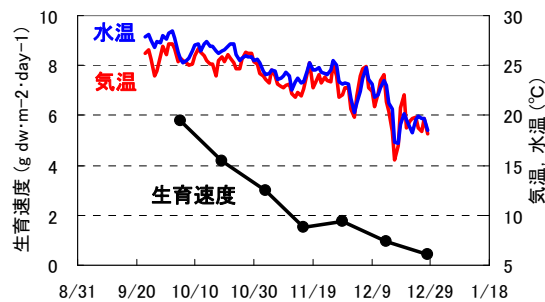


図 8 エンサイ草生水路における生育速度と水路の気温、水温の推移

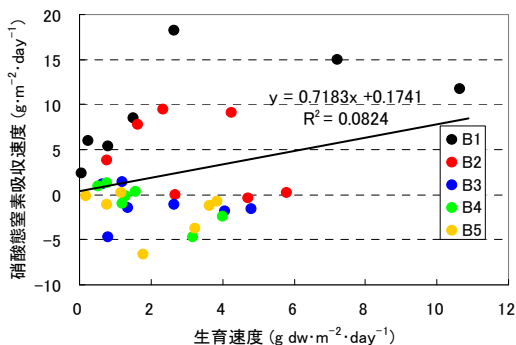


図 9 エンサイの生育速度と硝酸態窒素吸収速度との関係

一方、図 9 に示した様に、水路全体での生育速度と硝酸態窒素吸収速度の間に関係性は見られず、水路末端の硝酸態窒素濃度は 0.29-0.55ppm で推移した。また、硝酸態窒素濃度が 0.35ppm 前後の低濃度になる水路下流のブロック 2-5 では、吸収速度の値がマイナスとなったことから、下流部ではエンサイによる硝酸態窒素の吸収速度が水路堆積物等からの水中への窒素放出速度に比べ低かったと推察される。これらより、エンサイは生育速度に関わらず硝酸態窒素濃度を 0.29-0.55ppm まで低下させるが、0.35ppm 前後の低濃度では逆に水路堆積物からの窒素放出により濃度が上昇する傾向にあったため、安定した水質浄化には水路堆積物の回収とその利用方法の検討が必要と考えられた。

#### ② 水路堆積物を用いた育苗試験

水路堆積物から水中への窒素放出を防ぐためには、堆積物の回収が必要となる。そこで堆積物を育苗培土として利用することを検討した。

堆積物と粗粒砂との混合率を変えた培地を作成し、コマツナとトウガラシの育苗試験を行った。その結果、堆積物を 50% 以上混合した培地では両作物とも市販の育苗培土と同程度の生育を示し、またその肥効は市販の育苗培土に比べ長期間観察された。

体積、乾物重、含有窒素率から堆積物中の窒素含有量を求めた結果、水路全体では平均  $1441 \pm 141 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  であり、C/N 比はどの地点から採集したものも 13 前後であった。これらより、堆積物には作物の生育にとって十分な量の窒素を理想的な C/N 比で含有しており、これを粗粒砂と混合することで、土壌の物理性を改善すれば育苗培土として利用することが十分可能であることが示唆された。

### (3) エンサイの花芽形成に関わる光環境要因の解明

#### ① 光質がエンサイの生育、花芽形成に与える影響

赤色、青色、緑色の光質処理が草丈・葉数を比較したところ、青色区で有意に高い値を示した。このことから、青色光はエンサイの生育を旺盛にする効果があると考えられた。同時に青色照射区では花芽形成数が少なく、最短開花日数も遅れたため (表 1)、花芽形成・発達に対して抑制的な効果があると考えられる。また、処理区間に SPAD 値の差は見られなかったことから、本実験では光量及び栄養条件に差はなかったと考えられた。このことからハウスや植物工場内でエンサ



イの周年栽培を行う場合に、青色光を照射することによって花芽形成の抑制が可能となり、生育を旺盛にできることが示唆された。

②光強度がエンサイの花芽形成に与える影響

光量を 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  の 3 水準としたところ、花芽形成は 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  処理の 5 節目以上でのみ確認された (表 2、図 10)。また、草丈は 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  処理で有意に短くなり、SPAD 値と節数も光量の減少に伴い減少した (表 2)。これらより、エンサイは 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  以下の光量では花芽を形成しないことが明らかとなった。

ただ、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  以下の処理区では光量不足から光合成速度が低下して、生育不良を起こしている可能性があり、それが花芽形成に関与したことも示唆される。したがって、光強度による花芽形成の制御には、生育不良を生じさせない 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  以上の光強度で検討する必要がある。

表1 照射光質、日数とそれに伴う花芽形成数

処理 日数	光質	節番号														花芽 合計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
5	青	-	-	-	-	-	1	2	3	4	3	1	1	-	-	15
	緑	-	-	-	-	1	2	3	5	5	4	2	2	1	1	26
	赤	-	-	-	2	1	-	5	3	3	3	1	1	-	-	19
10	青	-	-	-	-	-	1	-	2	2	3	3	-	-	11	
	緑	-	-	-	2	2	2	3	3	3	3	1	-	-	22	
	赤	-	-	-	-	2	2	4	3	3	2	1	-	-	17	
15	青	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2	
	緑	-	-	-	1	-	1	3	3	3	-	-	-	-	11	
	赤	-	-	-	-	-	2	3	4	1	-	-	-	-	10	
20	青	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	緑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	赤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	

表2 照射光量とそれに伴う各節位の花芽形成数

光量 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	下位からの節数											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	2	1	8	6	4	6	2	1

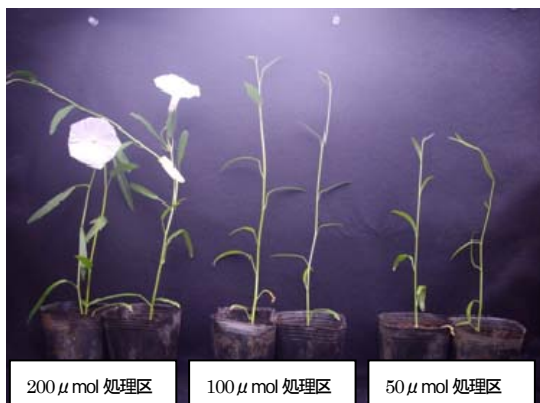


図 10 光量が処理 28 日目の開花に及ぼす影響

表3 光量が草丈、SPAD、花芽形成節数に及ぼす影響

光量 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	草丈 (cm)	SPAD	節数
50	29.8 <sup>b</sup>	29.1 <sup>c</sup>	7.6 <sup>c</sup>
100	48.2 <sup>a</sup>	35.4 <sup>b</sup>	9.1 <sup>b</sup>
200	52.4 <sup>a</sup>	41.6 <sup>a</sup>	10.9 <sup>a</sup>

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

M. Takagaki, Y. Shimoda, T. Padarane, K. Ohyama and K. Ozawa, Improving Water Quality by Using Plants, with Water Convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) as a Model, Acta Horticulture, 797: 455-460, 2008, 有

[学会発表] (計 5 件)

①奥山洋大・高垣美智子・中村乾・小沢聖、エンサイを用いた草生水路の水質浄化能力、農業気象学会 2007 年春季大会講演要旨:12、2007

②石淵豊人、葛西絵美、藤巻めぐみ、高垣美智子、倉内伸幸、真田宏夫、江頭祐嘉合、水生野菜エンサイの抗酸化能と季節による総ポリフェノール量の変動、日本栄養・食糧学会誌, 61:2, 55, 2008

③M. Takagaki, Y. Shimoda, T. Padarane, K. Ohyama and K. Ozawa, Improving Water Quality by Using Plants, with Water Convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) as a Model, ISHS IW on Greenh. Environ. Control & Crop Production in Semi-arid Regions, Tucson, USA, 2008

④佐々木大、倉内伸幸、高垣美智子、光質がエンサイの花芽形成に及ぼす影響、熱帯農業研究、2(別 1):3-4、2009

⑤奥山洋大、高垣美智子、小沢聖、エンサイを栽培した水路の堆積物を利用した育苗試験、熱帯農業研究、2(別 1):107-108、2009

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高垣美智子 (TAKAGAKI MICHIKO)  
千葉大学・園芸学研究科・准教授  
研究者番号: 00206715

(2) 研究分担者

江頭祐嘉合 (EGASHIRA YUKARI)  
千葉大学・園芸学研究科・教授  
研究者番号: 80213528

小沢聖 (OZAWA KIYOSHI)

国際農林水産業研究センター・熱帯・島嶼研究拠点・プロジェクトリーダー  
研究者番号: 40360391

倉内伸幸 (KURAUCHI NOBUYUKI)

日本大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 00256835

(3) 連携研究者

丸尾 達 (MARUO TORU)

千葉大学・園芸学部・准教授

研究者番号：20143266