

< 2 > 新規産業開発研究

< 2 - b > 地域産業育成探索 / 実証研究

小テーマ：農業 バイオテクノロジー を利用した高機能素材の開発

テーマリーダー：静岡県農業試験場 研究技監 牧野孝宏

研究従事者：静岡県農業試験場

加藤公彦、青島洋一、袴田哲司、中村明弘、伊予住浩幸、松浦英之

研究の概要

生物工学的基礎技術に最新の光情報計測技術を組合せ、機能性物質を迅速にスクリーニングできる新しい技術を開発することにより機能性物質の探索や高機能性植物の作出を行う。さらに、動物細胞を用いた農産物の機能性の評価を行う。

研究の独自性・新規性

生物より発生する極微弱光を検出することにより物質の機能性を評価する方法の開発は、研究例が少なく新規性が高い研究である。また、近赤外線分析とコンピューター解析により食品のアレルゲン性を評価する方法も、新しい試みである。動物細胞を用いた農産物の機能性の評価は新規性には欠けるが、静岡県の特産野菜をターゲットにするので、独自性がある研究である。

研究の目標

極微弱光の検出により物質の機能性を評価する方法の開発では、まず、極微弱光の発生原因を明らかにする。次に、植物に病害抵抗性を誘導する物質の検出や物質が持つ抗酸化能及びマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツのスクリーニング方法の開発を行う。近赤外線分析とコンピューター解析により食品のアレルゲン性を評価する方法の開発では、コムギについて評価方法を確立し、それを用いて実際に評価する。動物細胞を用いた農産物の機能性の評価では、メロンの機能性について明らかにする。

平成12～14年度にかけて、次の研究項目を実施した。

- 1．バイオフォトンの発生メカニズムの解析（青島洋一）
 - 1 - 1 バイオフォトンが強く発生する生化学反応系の検索
 - 1 - 2 バイオフォトン発生と強く関連する遺伝子発現現象の検索
- 2．バイオフォトンを利用した植物病害抵抗性関連素材の開発（伊予住浩幸）
 - 2 - 1 バイオフォトン検出用サンプルの前処理条件の決定
 - 2 - 2 新規全身的獲得抵抗性誘導物質スクリーニングのための基礎データ収集
- 3．抗酸化能等の機能性のバイオフォトンを利用した判定技術の確立
(袴田哲司、加藤公彦)
 - 3 - 1 マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの選抜早期検定方法の開発 遅延蛍光を利用した方法
 - 3 - 2 抗酸化能のバイオフォトンを利用した判定技術の開発
- 4．コムギにおける低アレルゲン性品種の選抜技術の開発（中村明弘）
 - 4 - 1 近赤外分光法及びイムノアッセイによる低アレルゲン性コムギの選抜
 - 4 - 2 植物分野での複雑系データの処理技術の確立
- 5．県特産農産物の機能性評価（松浦英之）
 - 5 - 2 県特産野菜の高血圧予防効果の実証
 - 5 - 3 県特産農産物の抗酸化能評価

研究小課題名：1. バイオフィオンの発生メカニズムの解析
研究項目：1-1. バイオフィオンが強く発生する生化学反応系の検索

担当者：青島 洋一

協力・分担関係：

研究期間：平成12年度～14年度

1 目的

バイオフィオン測定技術は、植物機能の効果的な評価手法への応用が期待されている。この技術を有効に活用していくためには、フォンの発生要因を明らかにする必要がある。ここでは、エリシター（キトサン）の処理により誘導されるサツマイモの生体防御反応を、実験系として用いた。この防御反応は、多くの酵素が関与する連鎖反応系であるため、主要な酵素反応をシャーレ内で再現して、フォン発生との関連性について試験を行った。

2 方法

(1) 各酵素と基質を10mM 磷酸緩衝液(pH5.2-7.5)に溶解後、混合溶液5ml を60mm 径ポリスチレンシャーレに入れた。ただちにそれをフォンカウンターPCX-100(浜松ホトニクス製)にセットし、25℃で測定を開始した。

供試した酵素(反応基質)

フェニルアラニンモノオキシゲナーゼ(フェニルアラニン),ペルオキシダーゼ(エフェリルアルコール),リボキシゲナーゼ(リノール酸),キチナーゼ(エフリングリコルキチン),グルカナーゼ(エフリングリコルキチン),NADPHオキシダーゼ,NOシンターゼ(L-アルギニン),硝酸レダクターゼ(亜硝酸ナトリウム)

(2) 試験(1)の結果、フォン発生のみられたペルオキシダーゼ(POD)及びリボキシゲナーゼ(LOX)について、フォン発生と活性酸素やラジカル発生との関連を調べるため、活性酸素検出試薬(ルミノール)及びラジカル捕捉剤(タイロン)の影響を調査した。

(3) POD反応で発生するラジカルの種類を特定するため、電子スピン共鳴装置(ESR)を用いて解析を行った。

3 結果の概要・要約

(1) *in vitro*反応試験の結果、LOX,POD反応の際に、強いフォン発生がみられた(図1、2)。

(2) この2種類の酵素反応によるフォン発生は、ルミノール添加により著しく増大し、タイロン添加により抑制された(図3、4)。従って、これらの酵素反応によるフォン発生は、活性酸素やラジカル関連物質生成が、深く関与した現象であると考えられた。

(3) POD反応時、強いフォン発生がみられた検体をESRにより解析した結果、6本の強いピークが確認された(図5)。これは、炭素3分子以上の有機ラジカルの発生を、示唆するものである。

以上の結果、病害応答反応時に活性が高まる2種類の酵素反応がフォン発生に関連し、反応により発生する有機ラジカル物質がフォン発生の原因であると考えられた。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

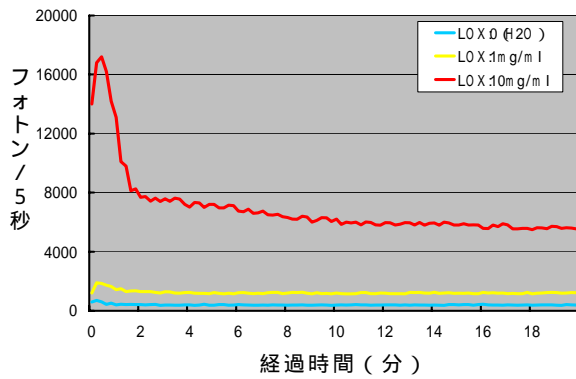


図1 LOX 反応におけるバイオフィオンの発生
基質 (2mM リノール酸) 25

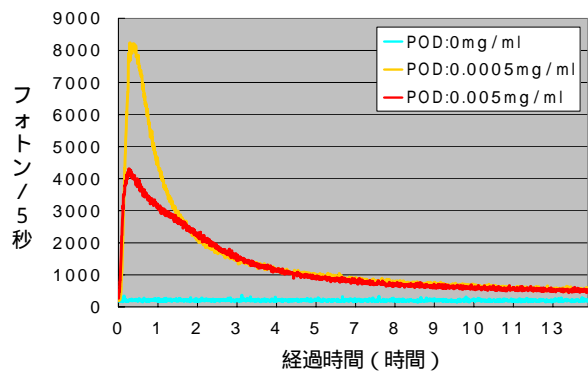


図2 POD 反応におけるバイオフィオンの発生
基質 (0.2mM コニフェリルアルコール) 25

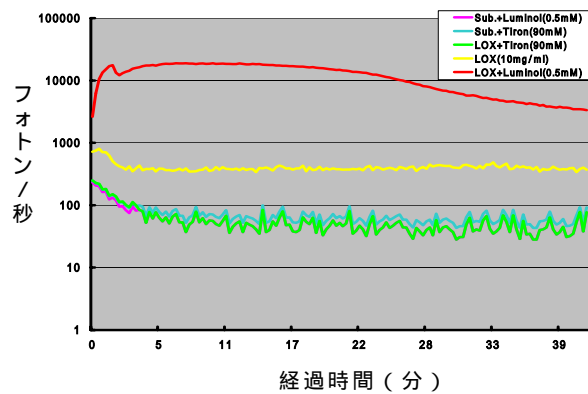


図3 LOX 反応時の光子発生に対するルミノール
及びタイロンの効果

Sub.: 基質、Tiron: タイロン、Luminol: ルミノール

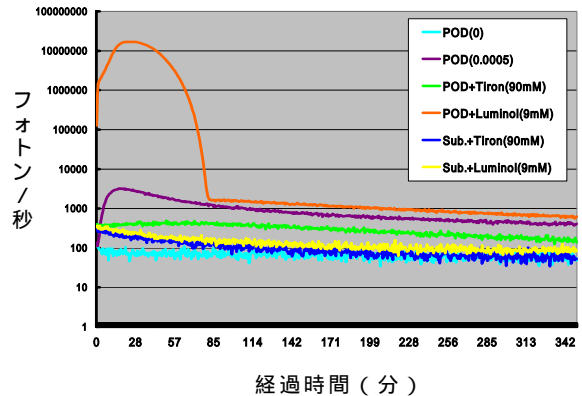


図4 POD 反応時の光子発生に対するルミノール
及びタイロンの効果

Sub.: 基質、Tiron: タイロン、Luminol: ルミノール

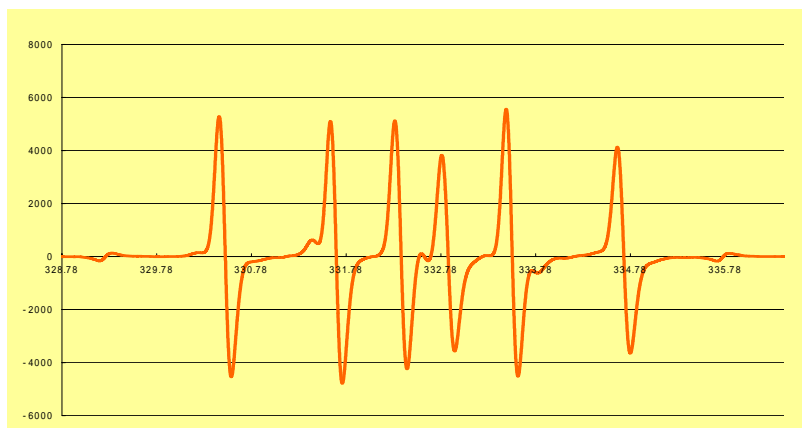


図5 電子スピン共鳴装置によるラジカルの検出
POD 反応の際、強い光子発生 (約 7,000counts/sec.) のみられた検体について測定

5 今後の課題と将来展望

バイオフィトン測定技術の応用研究を進める。例えば、植物内在性有用機能 (PODなどの酵素活性) の簡便・効率的評価手法や有用微生物の選抜法などへの応用が考えられる。

研究小課題名：1. バイオフィオンの発生メカニズムの解析
研究項目：1-2 バイオフィオン発生と強く関連する遺伝子発現現象の検索

担当者：青島洋一

協力・分担関係：

研究期間：平成12年度～14年度

1 目的

バイオフィオン測定技術を有効活用していくためには、フォトンの発生要因を明らかにする必要がある。シャーレ内での試験では、病害応答反応時に活性が高まる2種類の酵素(POD及びLOX)がフォトン発生に関連することが認められた。そこで、植物体でこの2種類の酵素がバイオフィオン発生と強く関連するかを調査した。

2 方法

POD及びLOXが植物体内でのフォトン発生と関連するか明らかにするため、酵素溶液、基質溶液、酵素反応阻害剤及びラジカル捕捉剤を添加し、発光に対する影響について解析した。

(1) 酵素溶液の添加試験

サツマイモスライス(直径46mm,厚さ5-6mm)にLOX, LOX+PLA(各0~10mg/ml), POD(0~0.5mg/ml)を各々300 μ l処理後、ポリスチレンシャーレに入れフォトン発生量を測定した。

(2) 酵素反応基質の添加試験

サツマイモスライスにキトサン溶液(0.2%)を添加後、フォトンカウンターにセットして、フォトン発生量の測定を開始した。測定開始の4~7時間後にフォトン発生量が増加し始めた時点で、LOX反応基質としてリノール酸(終濃度2mM)、POD反応基質としてコニフェリルアルコール(終濃度0.2mM)を各々添加し、更に測定を継続した。

(3) 酵素反応阻害剤及びラジカル捕捉剤の添加試験

(2)と同様に測定開始の4~7時間後、LOX反応阻害剤としてカフェイン酸(1mM)、POD反応阻害剤としてメタバナジン酸ナトリウム(50 μ M)、ラジカル捕捉剤としてタイロン(100mM)を各々添加し、更に極微弱光発生量を測定した。

3 結果の概要・要約

(1) 酵素溶液添加試験

LOX酵素溶液を添加することによりin vitro試験と同様に、植物体においても強い発光現象がみられた。特にLOX単独処理よりもホスホリパーゼ(PLA)を同時に添加する方が、発光量は多かった。一方、POD酵素溶液の処理は、LOX処理と比較して強い発光は見られなかった(図1)。

(2) 酵素反応基質添加試験

リノール酸を添加することで、キトサン添加に起因するフォトン発生ピークが高まった。一方コニフェリルアルコールを添加しても、ピーク時の発光量はほとんど変化がみられなかった(図2、3)。

(3) 酵素反応阻害剤及びラジカル捕捉剤添加試験

カフェイン酸溶液を添加したところ、キトサン添加に起因するフォトン発生ピークは抑制された(約9,500cps. 約3,500cps.)。またメタバナジン酸ナトリウムを添加しても発生ピークは抑えられるものの(約11,000cps. 約7,500cps.) カフェイン酸ほど抑制効果はみられなかった(図4, 5)。またラジカル捕捉剤タイロンを添加しても、フォトン発生は著しく阻害された(図4)。

以上の結果、特にLOXがフォトン発生に及ぼす影響が大きかった。これらの酵素反応はラジカル関連物質の生成を伴ない、このラジカル関連物質が、フォトン発生に影響を及ぼすと考えられた。しかし、POD及びLOX反応阻害剤によりサツマイモスライスにおいて、キトサン添加に由来するフォトン発生を完全には抑えることができなかった。従って、これら以外にもフォトン発生に影響を及ぼす要因の存在が、考えられた。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

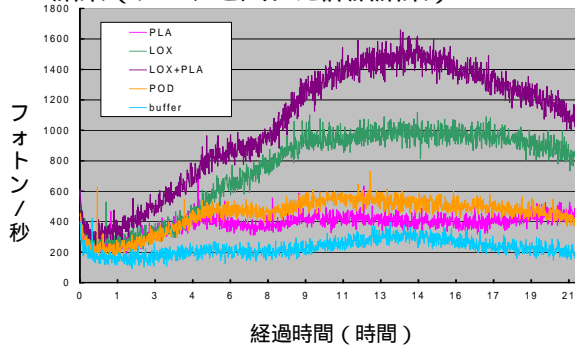


図1 PLA・LOX 及び POD 反応におけるバイオフィオトンの発生

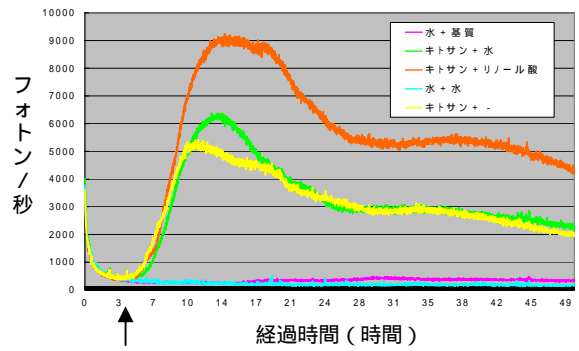


図2 キトサン添加に起因する光子発生に及ぼす LOX 反応基質の影響 (基質処理)

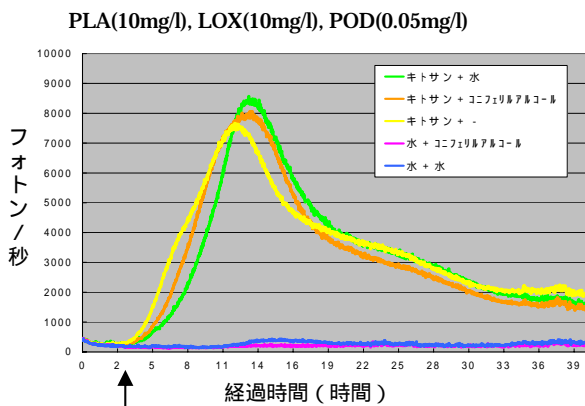


図3 キトサン添加に起因する光子発生に及ぼす POD 反応基質の影響 (基質処理)

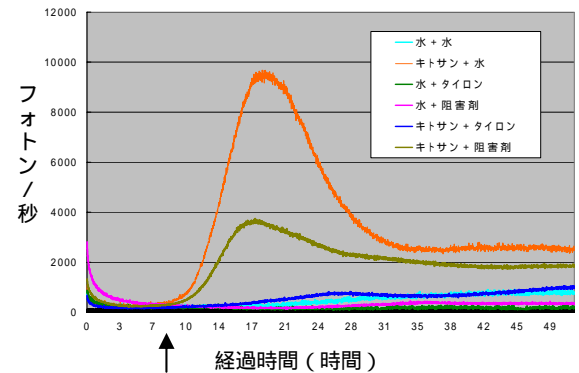


図4 キトサン添加に起因する光子発生に及ぼす LOX 反応阻害剤及びラジカル捕捉剤の影響 (処理)
反応阻害剤: カフェイン酸

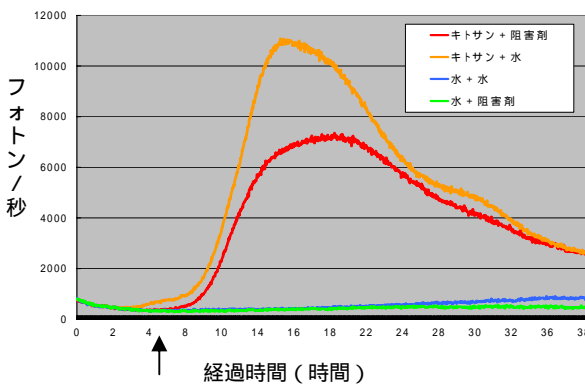


図5 キトサン添加に起因する光子発生に及ぼす POD 反応阻害剤及びラジカル捕捉剤の影響 (処理)
反応阻害剤: メタバナジン酸ナトリウム

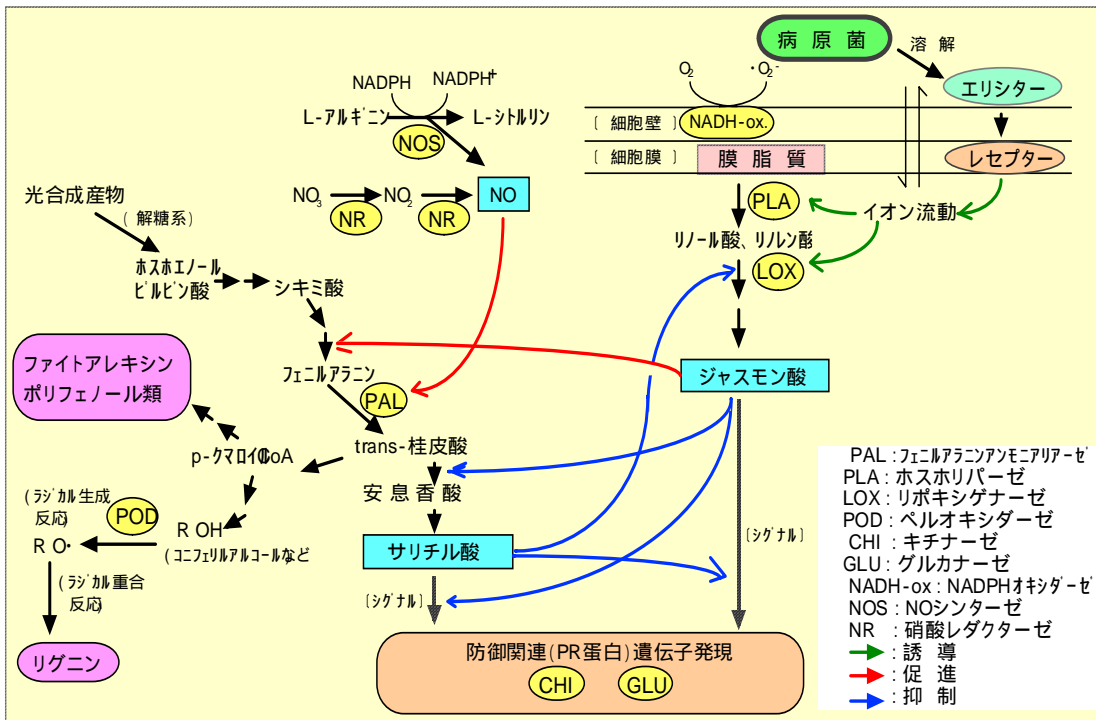
5 今後の課題と将来展望

植物体からの光子発生要因として、NADPHオキシダーゼについて検討を行う。

バイオフィトン測定技術の応用を目指した研究を進める。

- 植物内在性有用機能(PODなどの酵素活性)の簡便・効率的評価手法、有用微生物の選抜法など。

植物細胞における病原菌感染防御反応



研究小課題名： 2 バイオフィトンを利用した植物病害抵抗性関連素材の開発
研究項目： 2-1 バイオフィトン検出用サンプルの前処理条件の決定
担当者： 伊代住浩幸 協力・分担関係： クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス
研究期間： 平成12年度～14年度

1. 目的

植物のバイオフィトン発生パターンを指標に、植物に（全身的）病害抵抗性を誘導する物質を、効率よく選別する方法を開発する。ここでは、均一性が高く、大量スクリーニングに向く試料として懸濁培養細胞を使用し、測定に好適な細胞種とその前処理条件について検討した。

2. 方法

(1) 供試植物細胞

イネ科：ケンタッキーブルーグラス（品種：ジェロニモ、草地研処方シバ用培地）

トウモロコシ（品種：パイオニア、UM培地） イネ（品種：金南風、UM培地）

ナス科：タバコ（品種：Bright Yellow 2、改変タバコ用MS培地）

ウリ科：キュウリ（品種：ときわ光3P、改変キュウリ用MS培地）

(2) 培養条件の設定

100mlの培養液に2～10gの細胞を投入して、暗黒下、25℃、120rpmで振とう培養し、経時的に細胞の量と細胞塊の状態を確認した。同時に、病害抵抗反応の信号物質であるサリチル酸（SA）、ジャスモン酸（JA）及び対照として蒸留水（DW）を添加して、極微弱発光量をフォトンカウンター（MSPC）で調査した。

(3) 極微弱光測定条件

イネ及びタバコで、回転式サンプル台で測定中に培養細胞が振とうされる条件と、固定式サンプル台で細胞が静止したままの条件で、発光パターンを比較した。

3. 結果の概要・要約

(1) イネは5g以上、タバコは2g以上の細胞を7～9日間培養することで1mm未満の均一な細胞集塊（タバコは細胞塊を形成しない）として5倍以上に増殖し、大量使用に適した。しかし、ケンタッキーブルーグラス、トウモロコシ、キュウリでは、均一な細胞集塊を得られず、10g以上を加えても2～3倍に増殖するのに2週間程度必要で、増殖法に改良を要すると考えられた。

(2) イネ、タバコは、2週間以上培養すると細胞の老化が進み、蒸留水（DW）処理のベースラインに乱れを生じた（図1）。

(3) イネでは、固定式よりも細胞が振とうされる回転式サンプル台での測定で、ベースラインが安定する上、発光量の変化が明瞭になった（図2）。しかしタバコでは固定式、回転式ともに良好な結果が得られた。

(4) 好適な培養期間の細胞を好適な機器で測定することにより、それぞれの植物細胞でSA及びJAの処理で安定した発光パターンが認められた（図3）。

以上より、イネ、タバコ等の細胞を使用することにより、均一かつ大量増殖が容易で、安定した発光が得られるバイオフィトン検出系が得られた。

4. 結果

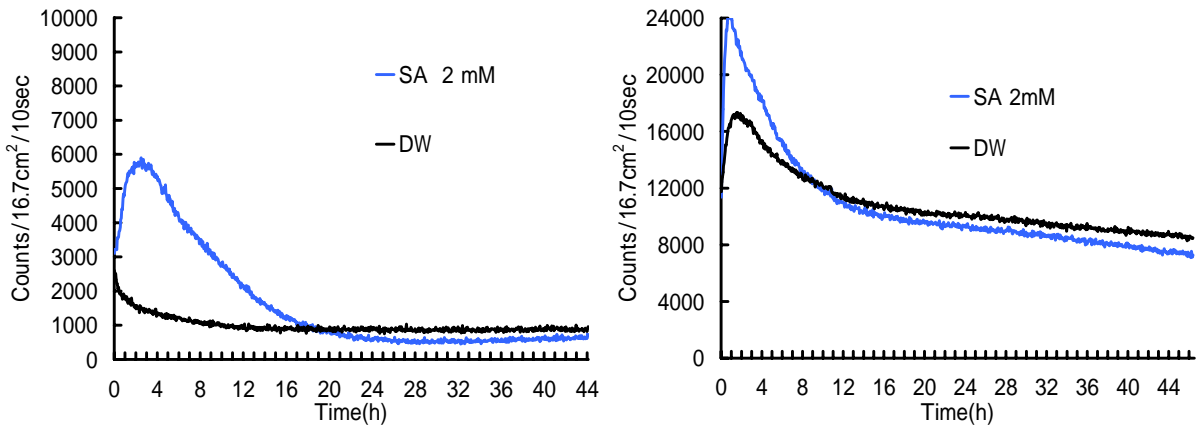


図1 培養期間による発光の違い (イネ培養細胞) 左: 7日間 右: 15日間 MSPC で測定

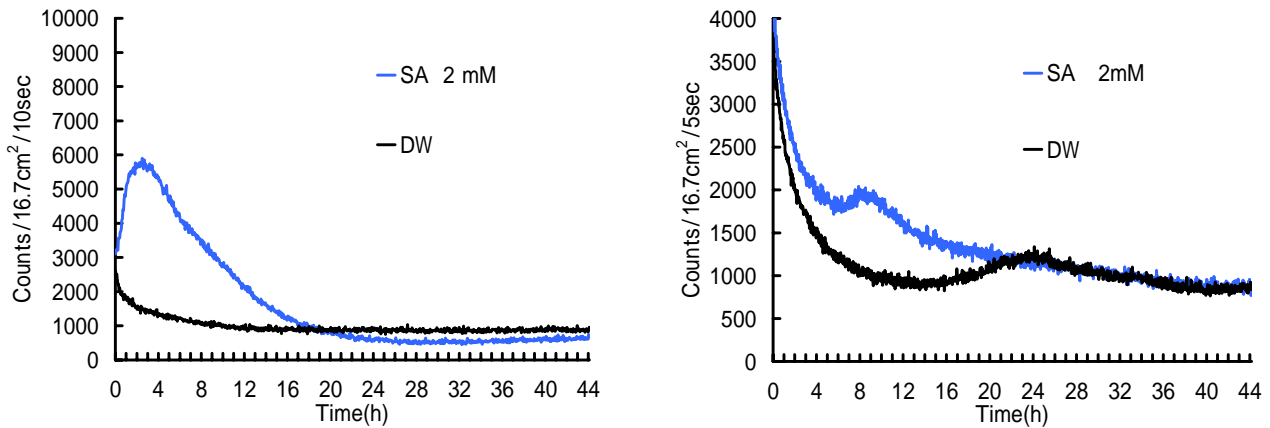


図2 測定時のサンプル振とうの有無による発光の違い (イネ培養細胞)
左 MSPC (回転式サンプル台) 右 PCX-100 (固定式サンプル台)

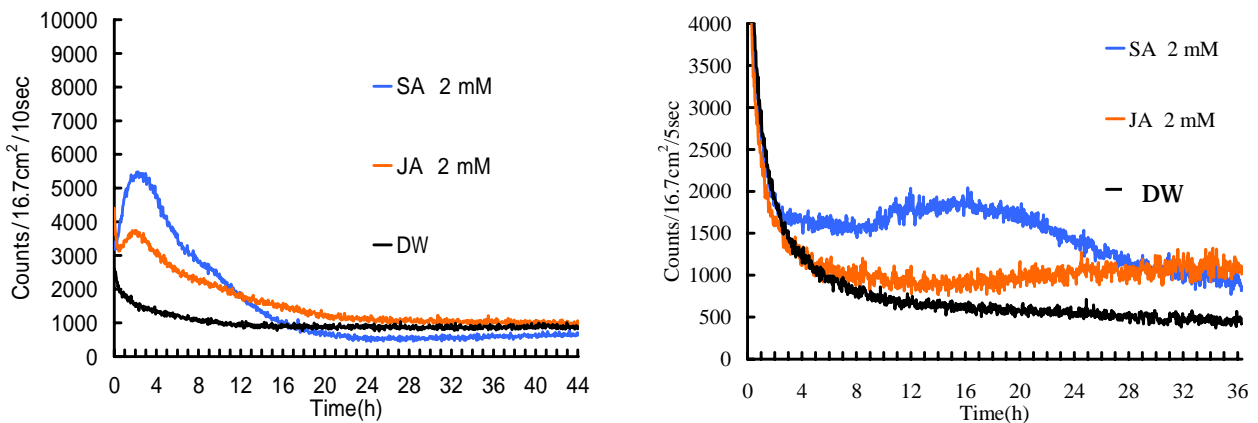


図3 好適条件における発光パターン 左: イネ培養細胞 右: タバコ培養細胞

イネは一週間培養物を 23、MSPC で測定。タバコは一週間培養物を 25、PCX-100 で測定。

5. 今後の課題と将来展望

- (1) イネ以外の主要作物や果樹でも培養細胞を使用したバイオフィトン検出系を検討する。
- (2) 細胞の変異に備えて、良好な反応を示す元株の長期安定保存方法を確立する。

研究小課題名： 2 バイオフィトンを利用した植物病害抵抗性関連素材の開発
研究項目： 2-2 新規全身的獲得抵抗性誘導物質スクリーニングのための基礎データ収集
担当者： 伊代住浩幸 協力・分担関係： クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス
研究期間： 平成12年度～14年度

1. 目的

植物からのバイオフィトン発生パターンを指標に、植物に全身的獲得抵抗性を誘導する物質を効率よく選別する方法を開発する。ここでは、懸濁培養細胞に、再現性の高い応答発光を誘導するエリシター (Elicitor) に着目し、この応答発光に対する影響を指標に効率的に全身的獲得抵抗性誘導物質を選別する方法について検討した。

2. 方法

(1) 懸濁培養細胞の調整

イネ (品種：金南風、UM 培地) タバコ (品種：Bright Yellow 2、タバコ用 MS 培地) の懸濁培養細胞を 25℃、暗所、120rpm で振とう培養した。静置後、上清を除いてから一定量を採り、測定に供した。

(2) 被験物質の添加

蒸留水で終濃度の倍に調整したものを細胞懸濁液に等量加え混和した。対照は蒸留水 (DW) を用いた。

全身的獲得抵抗性を誘導する物質：Acibenzolar-s-methyl (ASM)、Probenazole 他

一般農薬 (全身的獲得抵抗性を誘導しないもの。)

単独処理で強く発光誘導する物質：キャプタン (Captan)、TPN (Chlorothalonil) 他

単独処理で発光誘導しない物質：チオファネートメチル剤 (Thiophanate-methyl)

(3) 前処理時間の検討

抵抗性誘導の関連代謝経路の活性化を待つため、抵抗性誘導物質の処理後、MSPC で測定しながら 4、8 及び 12 時間維持した。

(4) エリシターの添加と応答発光の評価

細胞にエリシター物質 (ここでは、植物に病害抵抗反応と応答発光をあわせて誘導するものを指す) を添加し、直後から測定を再開し、DW 前処理対照区との間で応答発光パターンを比較した。今回は *Phoma* sp. の培養濾液をエリシターとして供試した。

3. 結果の概要・要約

(1) イネ、タバコの懸濁培養細胞において、既存の代表的な抵抗性誘導物質の前処理により、対照処理に比べてエリシター応答発光が顕著に増強された (図 1)。

(2) 一般殺菌剤で強い発光を引き起こすものは、エリシター応答発光を抑制する傾向にあった (図 2 左)。また、一般殺菌剤で強い発光を引き起こさないものは、応答発光が対照と大差ない傾向にあった (図 2 右)。

(3) 最も応答発光が増強される前処理時間は、4 時間処理であるものや (図 3 左。他 ASM など)、12 時間まで上がったもの (図 3 右。他ジャスモン酸など) など、様々であったが、供試した全ての抵抗性誘導物質で、4 時間の前処理と、それに続く 2 - 4 時間程度の応答発光の測定で明瞭な発光の増強が確認できた。

以上より、エリシター応答発光の増強を指標に、数時間で全身的抵抗性誘導物質を選別出来る可能性が示唆された。

4. 結果

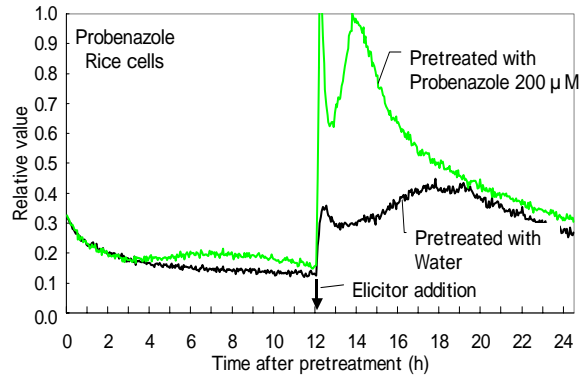
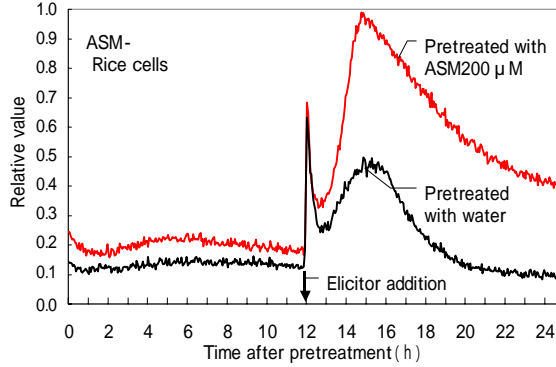


図1 代表的な全身的病害抵抗性誘導物質によるエリシター応答発光の増強

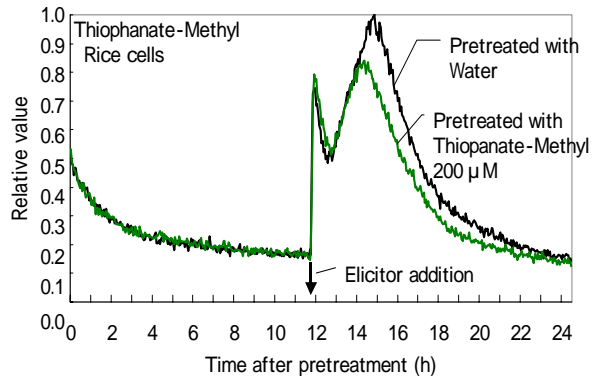
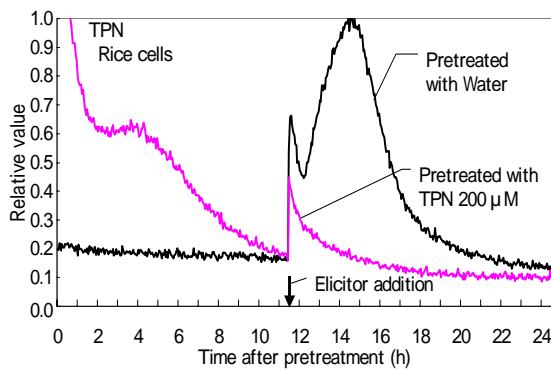


図2 抵抗性を誘導しない物質による前処理のエリシター応答発光への影響

左：単独処理で、強い発光を誘導するもの 右：単独処理で発光を誘導しないもの

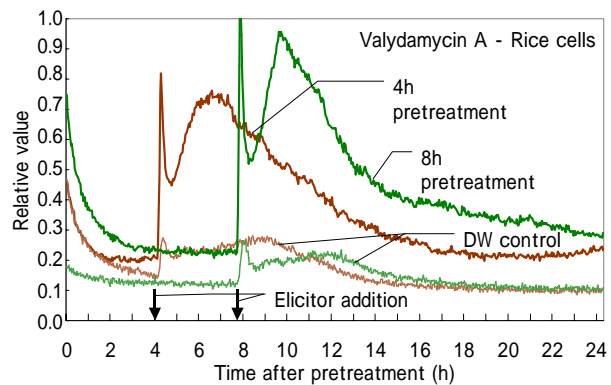
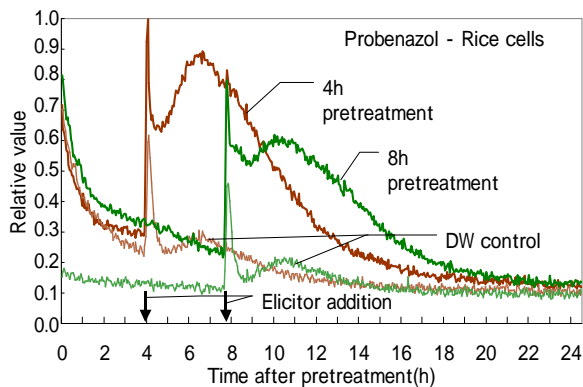


図3 抵抗性誘導物質の前処理時間の長さとのエリシター応答発光増強の関係

5. 今後の課題と将来展望

- (1) エリシター応答の増強と全身的抵抗性誘導の関連を遺伝子発現及び代謝物生成で確認(実施中)。
- (2) 協力企業(クミアイ化学、日本曹達)所有の新規骨格を持つ抵抗性誘導物質を供試し、スクリーニング方法の妥当性を検証する(実施中)。
- (3) 現在のエリシターよりも物質的に安定で、同等以上の発光誘導能を有するものを探索する。
- (4) 他の主要作物でも同様の検出系を確立する。

研究小課題名：3 抗酸化能等の機能性のバイオフィトンを利用した判定技術の確立。

研究項目：3-1 マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの選抜早期検定方法の開発 遅延発光を利用した方法

担当者： 袴田哲司

協力・分担関係：浜松ホトニクス

研究期間：平成 12 年度～14 年度

1. 目的

遅延発光は植物の状態を反映し、健全度等の測定に応用できるものとして期待されている。これを利用して、日本の樹病の中で最大の被害をもたらしているマツノザイセンチュウ病に対するクロマツの抵抗性個体を選抜する技術を開発する。

2. 方法

- (1)クロマツ切片からの遅延発光 センチュウに対するクロマツの抵抗性母樹と感受性母樹から得られた切片にマツノザイセンチュウを接種し、遅延発光 (DL) を測定した。
- (2) 遅延発光と切枝による抵抗性評価 クロマツ 7 個体の当年枝を 2 つに分割し、その上部は試験管内に水挿しし、センチュウを接種した後の病徴程度 (表 1) を調査した。これにより、クロマツのセンチュウ抵抗性を評価した。下部の切片は表面を削り、センチュウを接種した後に、DL の測定を行った。DL とセンチュウ抵抗性との相関を解析した。
- (3) 遅延発光と苗木による抵抗性評価 クロマツ苗木 14 個体から切片を切り出し、表面を削り、センチュウを接種した後に、DL の測定を行った。苗木の主軸にセンチュウを接種し、病徴程度を調査した。これらの調査結果に基づき DL とセンチュウ抵抗性との相関解析を行った。
- (4) 遅延発光とクロロフィル クロマツの若枝、当年枝、及び当年枝の木部の遅延発光を測定した後、クロロフィル含量を測定した。

3. 結果の概要・要約

- (1)クロマツ切片の遅延発光比は抵抗性木に比べて感受性木の方が早い時期に低下した(図 1)。遅延発光はクロマツの抵抗性を反映していると推測された。
- (2)遅延発光比と切枝の病徴との間に相関が認められた(図 2)。さらに DL 比と苗木の切枝の病徴との間にも相関が認められた(図 3)。両実験ともに、最後まで生存した個体の遅延発光比が高かった。これらのことから、遅延発光によりクロマツの抵抗性を判別できることが明らかになった。
- (3)DL の値とクロロフィル含量との間に高い相関が認められた(図 4)。DL はクロロフィルに由来するものと考えられた。遅延発光によるクロロフィルの迅速な評価が可能であるため、植物に対する応用性が高いと考えられた。

4. 結果 (データ等を入れた詳細結果)

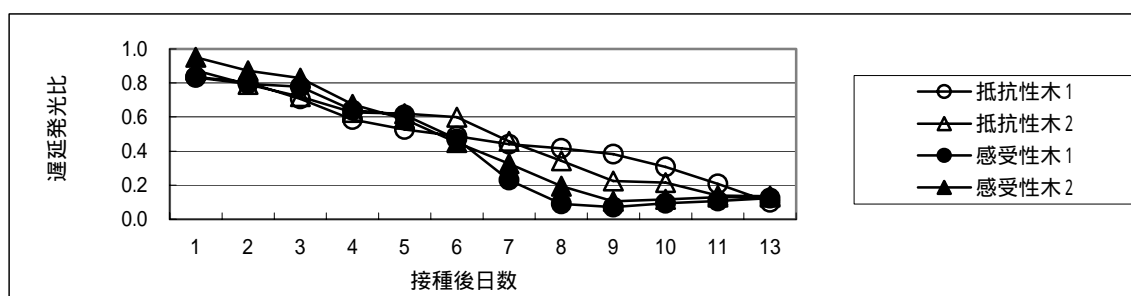


図 1 マツノザイセンチュウを接種したクロマツ切片の遅延発光比

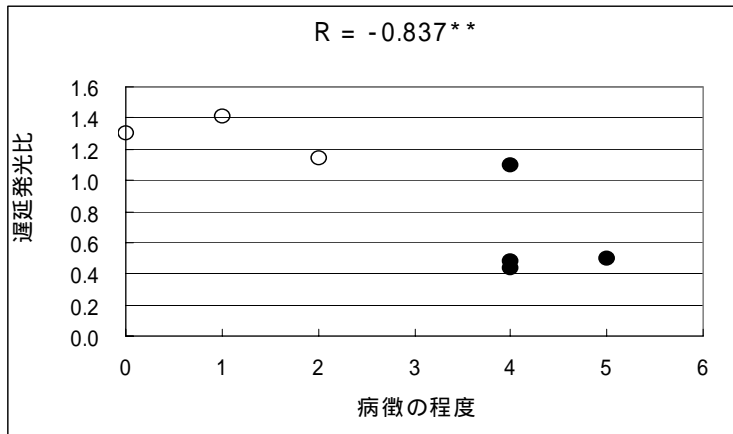


図2 クロマツ切片の遅延発光比と切枝の病徴との関係



遅延発光は7日後測定
 病徴は全体の枯れ程度が半分を越えた時点(20日後)で調査
 接種35日後に生存した個体
 接種35日後に枯損した個体

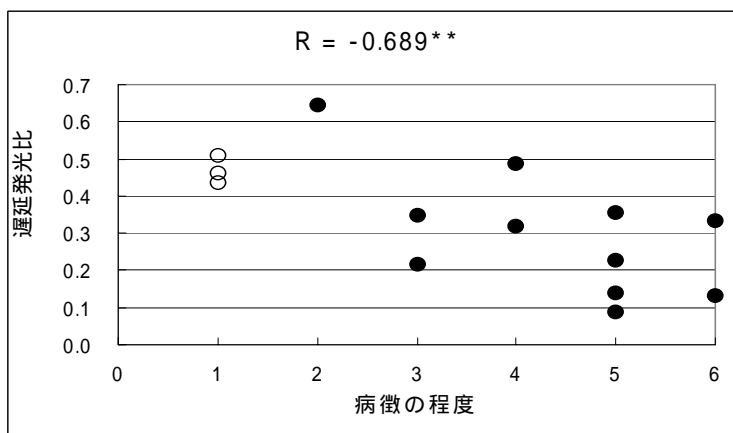


図3 クロマツ切片の遅延発光比と苗木の病徴との関係



遅延発光は7日後測定
 病徴は全体の枯れ程度が半分を越えた時点(36日後)で調査
 接種50日後に生存した個体 接種50日後に枯損した個体

表1 切枝と苗木の病徴判定

指数	病徴程度
0	なし
1	わずか
2	少し
3	半分以下
4	半分
5	半分以上
6	全体

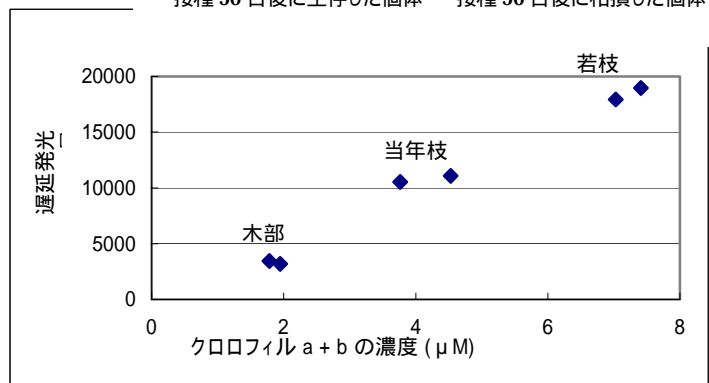


図4 クロマツ切片の遅延発光量とクロロフィル濃度との関係

5. 今後の課題と将来展望

現段階では本方法を用いてセンチュウ抵抗性個体を選抜しても、選抜した個体がすべて抵抗性であるとは限らない。そこで、より選抜精度を高め、実際の事業に利用したい。

研究小課題名：3 抗酸化能等の機能性のバイオフィトンを利用した判定技術の確立。
 研究項目：3-1 マツザイセンチュウ抵抗性クロマツの選抜早期検定方法の開発 バイオフィトンを利用した方法
 担当者：袴田哲司 協力・分担関係：浜松ホトニクス
 研究期間：平成 12 年度～14 年度

1. 目的

バイオフィトンは生体の代謝に基づき発生すると考えられている。クロマツのマツノザイセンチュウに対する抵抗性とバイオフィトン発生との関係を明らかにし、基礎的な研究方法を確立する。さらに、バイオフィトンを利用して、抵抗性系統の早期選抜技術を開発する。

2. 方法

- (1) センチュウの各種処理によるバイオフィトンの発生 クロマツ切片に生きているセンチュウ、冷凍死したセンチュウ、高温死したセンチュウ、センチュウ懸濁液の上澄液、蒸留水を処理してバイオフィトンを測定した。
- (2) 樹種別のバイオフィトン発生 マツ類およびスギにセンチュウを接種して、バイオフィトンを測定した。
- (3) ラジカル増感剤及び消去剤の影響 クロマツ切片にセンチュウ、ルミノール、タイロンを処理してバイオフィトンを測定した。
- (4) バイオフィトンと切枝による抵抗性評価 8本のクロマツ当年枝を2つに分割し、その上部は試験管内に水挿しし、センチュウを接種した後の枯れの程度（7段階の指数で判定）を調査した。また、下部の切片は表面を削り、センチュウを接種した後に、バイオフィトンの測定を行った。

3. 結果の概要・要約

- (1) 生きたセンチュウとクロマツとの相互作用によるのみ、バイオフィトンの発生が観察された（図1）。
- (2) スギ、テダマツ、バージニアマツ、リギダマツではバイオフィトンの発生は少なかった。クロマツ品種の「津屋崎」「三崎」「夜須」「川内」ではバイオフィトンの発生が認められた。また、バイオフィトンの発生は温度の影響を強く受けた（図2）。
- (3) 数十分後のピークはルミノールで高まり、タイロンで抑えられた。しかし、数十時間後のピークはルミノールで高まらなかった（図3）。したがって、数十分後のバイオフィトンの発生は感染初期反応による活性酸素種由来だと推測された。数十時間後の発生は活性酸素種由来だとは考えられなかった。
- (4) バイオフィトンの発生量のピーク時間と切枝の病徴との間に相関が認められた（図4）。この結果から、ピーク時間は抵抗性と関係することが明らかになった。バイオフィトンの発生ピークの測定によりクロマツの抵抗性を判別できると考えられた。

4. 結果（データ等を入れた詳細結果）

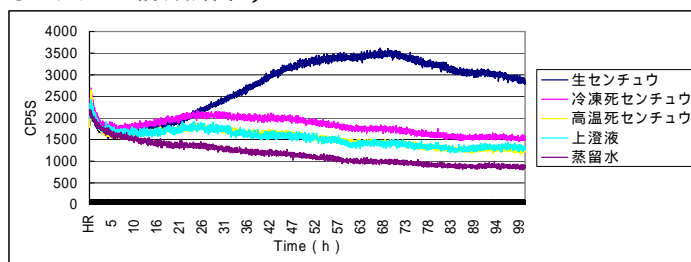


図1 クロマツとマツノザイセンチュウの相互作用によるバイオフィトンの発生

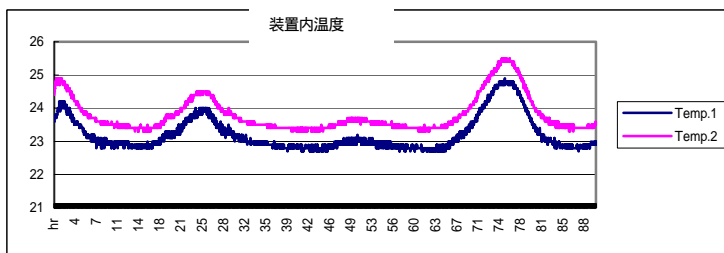
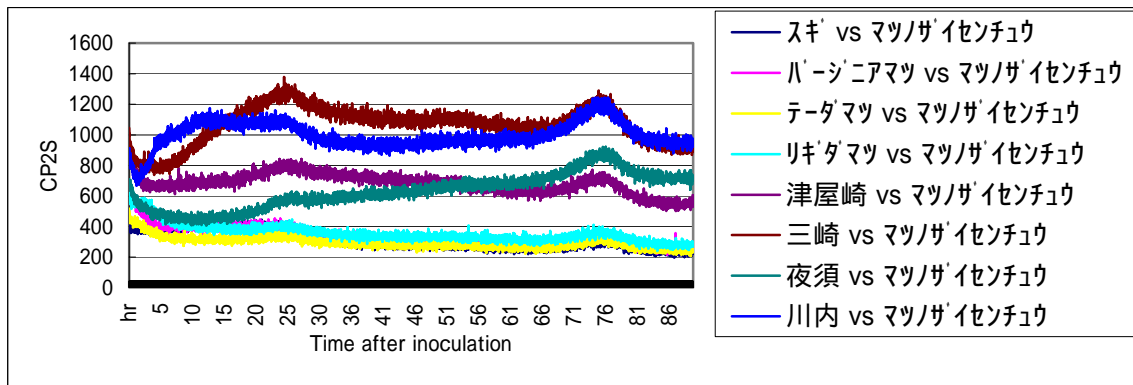


図2 マツ類、スギにマツザイセンチュウを接種した場合のバイオフィオンの発生と装置内温度

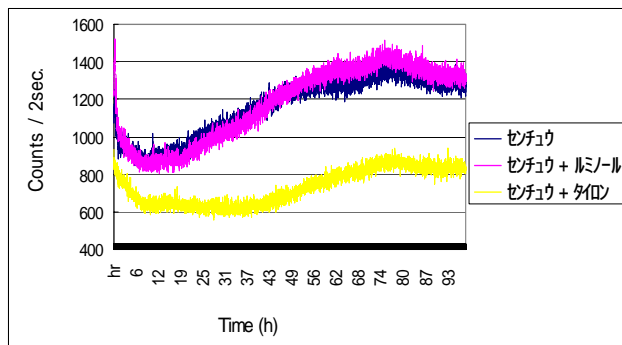
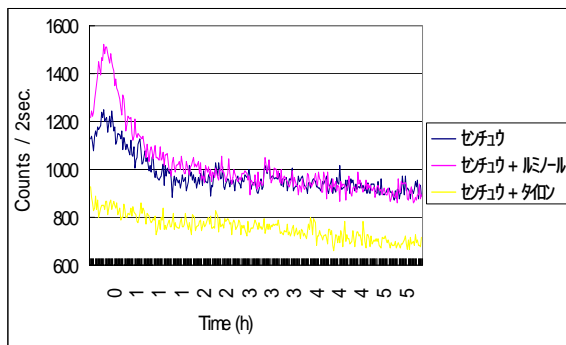
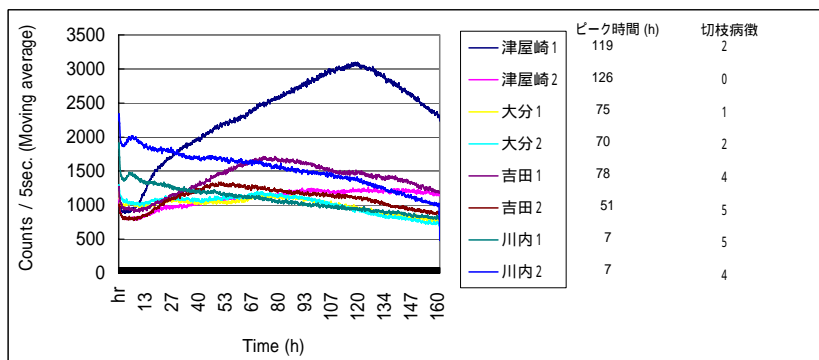


図3 セチュウを接種したクロマツ切片から発生するバイオフィオンに対する、ルミノール、タロンの影響

図4 クロマツのマツザイセンチュウ抵抗性とバイオフィオンの発生ピーク時間との関係



ピーク時間と切枝の病徴との相関係数

- 0.766*

5. 今後の課題と将来展望

バイオフィオンの波長組成を調べることにより、質的な解析を行う。

マツノザイセンチュウ病だけでなく、さまざまな植物の病原体に対する抵抗性を判別できる可能性がある。

研究小課題名：3 抗酸化能等の機能性のバイオフィトンを利用した判定技術の確立
研究項目：3-2 抗酸化能のバイオフィトンを利用した判定技術の開発

担当者：加藤公彦

協力・分担関係：浜松ホトニクス

研究期間：平成12年度～14年度

1 目的

生体より発生するバイオフィトンは、生命科学現象の結果生じていると考えられる。細胞が酸化状態におかれるとその状態の変化がバイオフィトンの発生の増大をもたらす。酸化状態におかれた細胞に抗酸化剤を投与すると、その働きによりバイオフィトンの発生を抑制することが期待される。その原理を利用し、抗酸化物質の生細胞を用いた評価系の確立を試みる。

2 方法

予備試験により、細胞内でのラジカル物質誘起剤として、パラコートを選定した。100 μ Mのパラコート液にタバコの葉を浮かべることにより、タバコの葉より発生するバイオフィトンが比較的安定して増加した。既知の抗酸化剤としてアスコルビン酸とカテキンを用いた。100mMのアスコルビン酸または10mMのカテキン溶液に直径4.5cmの円形に切り取ったタバコの葉を減圧浸漬し、葉の細胞間隙に抗酸化剤を入れた。処理葉をパラコート液に浮かべバイオフィトンをホトンカウンターにより測定した。

3 結果の概要・要約

- (1)タバコの葉をパラコート処理するとバイオフィトンの発生は2日後には約2000 counts/10secになったが、アスコルビン酸の前処理によりそれを約半分に抑制できた(図1)。アスコルビン酸を前処理した葉の測定終了時の状態は、コントロールに比較しパラコートによるダメージが軽減されていた。
- (2)カテキンもアスコルビン酸と同様に、パラコート処理により生ずるバイオフィトンの発生増加を抑制できた(図2)。
- (3)以上より、抗酸化物質をタバコの葉に前処理し、それをパラコート処理することにより、抗酸化能を評価できる可能性が得られた。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

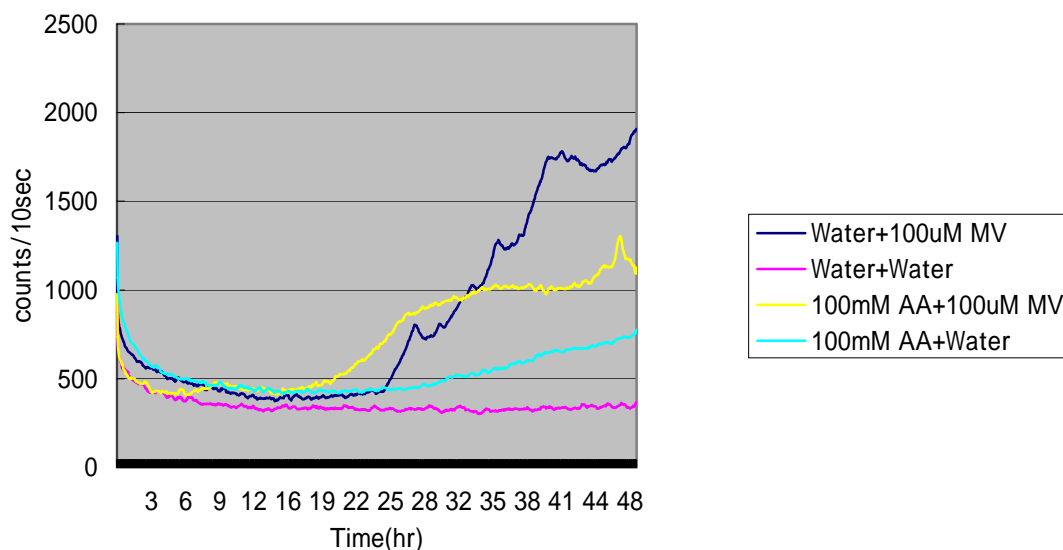


図1 アスコルビン酸の抗酸化作用

MV ; パラコート、AA ; アスコルビン酸

減圧浸せき時の溶液名 + タバコの葉を浮かべた溶液

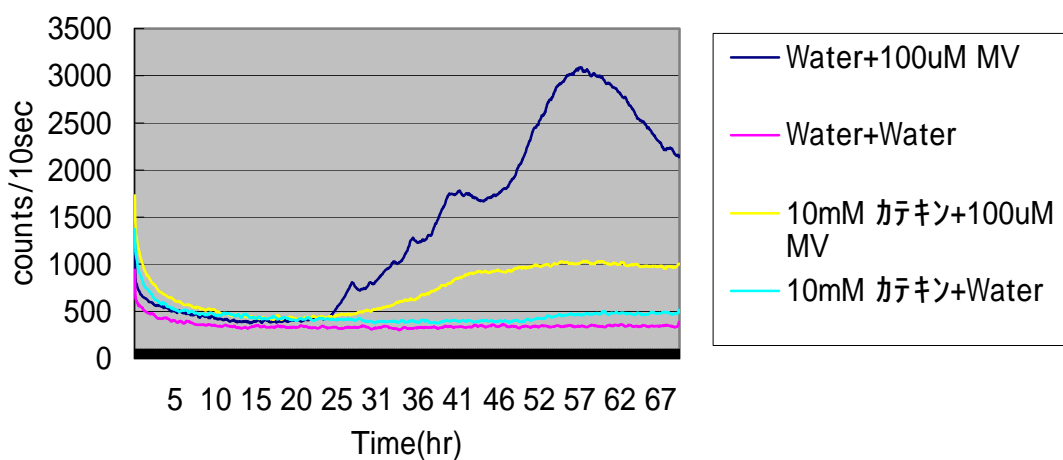


図2 カテキンの抗酸化作用

MV ; パラコート

減圧浸せき時の溶液名 + タバコの葉を浮かべた溶液

5 今後の課題と将来展望

抗酸化物質の処理濃度が比較的高濃度でないとは有効でなく、この点を改善しなければならない。

研究小課題名：4 ムギにおける低アレルゲン性品種の選抜技術の開発

研究項目：4-1 近赤外分光法及びイムノアッセイによる低アレルゲン性コムギの選抜

担当者：中村明弘

協力・分担関係：独立行政法人農業生物資源研究所

研究期間：平成 12 年度～14 年度

1 目的

日常摂取する食品に対してアレルギー症状を起こす人口が近年、増加傾向にある。摂取によって重篤な結果に至る可能性がある原材料のなかには、コムギが指定されている。

そこで、独立行政法人農業生物資源研究所の協力により国内外のコムギを収集し、それらのアレルゲン含量について ELISA 法によって調査した。さらに、コムギの近赤外吸光スペクトルをコンピューター解析することにより、アレルゲン含有量を予測する方法を検討した。

2 方法

(1)供試品種

コムギ 324 品種（普通、リベット、ポーランド、一粒系、栽培エンマー、クラブ、マカロニ、スペルタコムギ）

(2)アレルゲン含量の測定

コムギ 1 粒を 4M 尿素- Tris-HCl buffer (pH8.6) 5ml 中で一昼夜振とう抽出し、遠心分離して測定に供した。Direct ELISA 法により、アレルゲン含量を調査した。使用した試薬は下記に示した。発色後に FL600 (BIO-TEK 製) を用いて吸光値 (450nm, 630nm) を測定し、強力粉抽出物 (1mg/ml) を対照として ELISA 値 (RV) を計算した。Blocking 剤 - ブロックエース (大日本製薬製)・一次抗体 - コムギアレルギー患者血清・二次抗体 - ビオチン化ヤギ抗ヒト IgE 抗体・三次抗体 - ストレプトアビジン POD・発色剤 - OPD 錠 (WAKO 製) 30% H_2O_2 (WAKO 製) 0.1M クエン酸 Buffer (pH5.0)

(3)Inhibition ELISA 法による患者血清の分析

アレルゲンであるグルテニン、グリアジン及び γ -アミラーゼインヒビターに 5ml の抽出液を加えて一晩振とう抽出した。その 400 μ l を患者血清 100 μ l に加えて 2 時間 25℃ に保持し、遠心分離後、一次抗体として上記の ELISA に使用した。

(4)近赤外吸光 (NIR) スペクトルの測定とデータ解析

近赤外分光装置 (BRAN+ROUBBE 製) を用いて 174 品種の NIR スペクトルを測定した。決定木分析 (Clementine6.0.2, SPSS 製) を用いて、NIR スペクトルから ELISA 値 (RV) が予測可能か検討した。

3 結果の概要・要約

(1)血清にアレルゲンを添加した場合、 γ -アミラーゼインヒビターが最も抗体に対す影響が大きく、ついでグルテニン、グリアジンの順で抗体価が減少した (図 1)。

(2)原産国あるいはその種子の生産地を用い、それぞれを番号で仮に命名し、表 1 にまとめた。直接それぞれのグループ間を比較できないが、グループ 2 の MEXICO-2、グループ 5 の ECUADOR-5、グループ 6 の ITALY-6 等は、同一グループ内の分布からみて特に低い値を示しており、低アレルゲン含量の品種として有望であると思われる。

(3)決定木分析の結果、訓練データでは予測 A クラス中に含まれる実測 A クラスの割合 (純度) が 82%だったが、検証データでは 46%だった (表 2)。

以上の結果、アレルゲン含量が低いと思われるコムギが数品種見つかった。また、精度は十分ではないが、NIRスペクトルから非破壊でコムギの低アレルゲン個体を判別できる可能性が得られた。

4 結果 (データ等を入れた詳細結果)

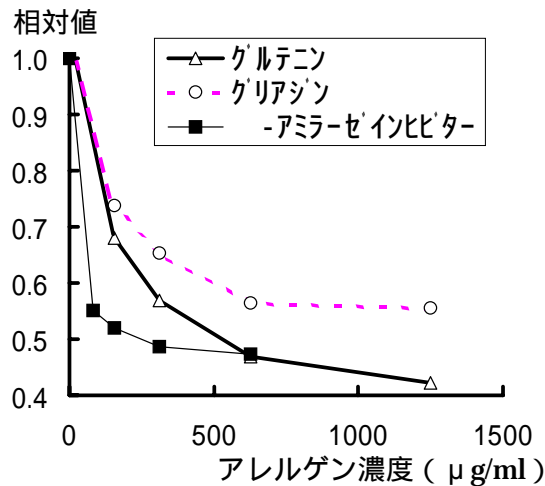


図1 アレルゲン添加による患者血清の抗体価の減少
無処理血清の ELISA 値を 1 とした場合の相対値

表1 各測定グループ中の低含量上位 2 品種と最高含量品種(H)

	Group 1	RV	Group 2	RV	Group 3	RV
1	静岡-1	1.22	MEXICO-2	0.88	AUSTRALIA-3	1.59
2	福島-1	1.27	UNKNOWN-2	1.23	YUGOSLAVIA-3	1.70
H	滋賀-1	2.76	ECHIOPIA-2	3.41	U.K.-3	4.65
	Group 4	RV	Group 5	RV	Group 6	RV
1	THAILAND-4	1.84	ECUADOR-5	1.07	ITALY-6	1.13
2	HIROSHIMA-4	1.87	CHINA-5	1.17	AUSTRIA-6	1.55
H	CHIBA-4	3.99	IRAQ-5	3.99	ZIMBABWE-6	3.39
	Group 7	RV	Group 8	RV	Group 9	RV
1	LEBANON-7	1.54	BRAZIL-8	1.21	THAILAND-9	1.92
2	MEXICO-7	1.87	YUGOSLAVIA-8	1.23	GERMANY-9	1.98
H	OKAYAMA-7	4.32	PAKISTAN-8	2.45	IWATE-9	4.87
	Group 10	RV	Group 11	RV		
1	KAGOSHIMA-10	2.23	CANADA-10	1.40		
2	U.K.-10	2.36	YUGOSLAVIA-10	1.40		
H	INDIA-10	6.25	GERMANY-10	4.09		

表2 決定木分析によるコムギアレルゲンの予測 (左: 訓練 右: 検証)

n=311	予測クラス					
	A	B	C	D	E	
実測	A	40	2	5	1	1
ク	B	8	58	8	6	2
ラ	C	1	12	69	4	2
ス	D	0	4	10	37	4
	E	0	2	8	0	27
全体の精度(74%)、予測 A の純度(82%)						

n=64	予測クラス					
	A	B	C	D	E	
実測	A	6	2	5	0	0
ク	B	2	9	8	0	3
ラ	C	5	7	9	0	1
ス	D	0	4	3	0	0
	E	0	0	0	0	0
全体の精度(38%)、予測 A の純度(46%)						

A: 1.5 未満 B: ~2.0 未満, C: ~2.5 未満, D: ~3.1 未満, E: 3.1 以上

5 今後の課題と将来展望

各グループから低含量品種を選抜し、まとめてELISA分析をして比較する。その中の低含量品種について、他品種と比べてどの成分が少ないのかを電気泳動等で検証する。

研究小課題名：4 ムギにおける低アレルギー性品種の選抜技術の開発

研究項目：4-2 植物分野での複雑系データの処理技術の確立

担当者：中村明弘 協力・分担関係

研究期間：平成 12 年度～14 年度

1. 目的

近赤外分光法はスペクトルの解析手法（ケモメトリックス）の発達とともに、非破壊で物質の内容成分を測定する方法として確立されてきた。本課題では、放射線突然変異の中から低アレルギー性を効率的に選抜する方法として近赤外分光法の利用を検討したが、従来法である PLS 回帰分析（partial least squares regression）では十分な精度が得られなかった。

そこで、データマイニングソフトウェアによって近赤外吸収（NIR）スペクトルと ELISA 法によるアレルギー含量の関係を解析し、アレルギー含量の少ないコメを近赤外分光装置で自動選抜するための予測アルゴリズムを検討した。

2. 方法

(1) アレルギー含量予測のための解析方法の検討

試料：X線照射した‘コシヒカリ’の M2 世代種子（n=560）

アレルギー含量分析法：Direct ELISA 法

NIR スペクトルの測定：近赤外分光装置 CTC-3（静岡製機製）

データの前処理と解析：NIR スペクトルの msc 処理、二次微分処理、無処理間で結果を比較

PLS 回帰分析：Unscrambler7.5（CAMO 製）

ニューラルネットワーク（NN）分析、決定木分析：Clementine6.0.2（SPSS 製）

(2) 米粒の測定部位の違いが NIR スペクトルに与える影響をルールに取り入れる方法の検討

試料：X線照射した‘コシヒカリ’の M2 世代種子（n=119）

アレルギー含量分析法：Direct ELISA 法

NIR スペクトルの測定：近赤外分光装置 CTC-3 で一粒を 5～50 回繰り返し測定し、一粒から複数のスペクトルデータを取得

データの前処理及び解析：計 3053 のサンプルデータをランダムに 3:2 に分割し、前者を訓練用、後者を検証用とし、全部で 30 のデータセットを作成

決定木分析：Clementine6.0.2、IntelligentMiner2.1.3（IBM 製）

3. 結果の概要・要約

(1) PLS 回帰分析、NN 分析によって数値予測する手法を検討したが、検証データではほとんど正しい予測ができなかった（図 1, 2）

(2) 同じデータで決定木分析を行い、訓練結果のうち予測 A クラスの純度が高くなったルールを選択したが、検証データでは A と予測できるルールは得られなかった（表 1）

数値予測は訓練データに対してオーバーフィッティングし、検証データではほとんど予測不可能であった。しかし、決定木分析によるクラス分類ならば予測できる可能性があったため、精度を向上させるために NIR スペクトルの測定方法について検討した。

(3) NIR スペクトルを複数回測定し、解析に利用できるサンプル数を増やして Clementine と IntelligentMiner で予測結果を比較したところ、Clementine で訓練した場合に、検証データにおける全体の精度は 48%だが、予測 A クラスの純度が 100%であるルールが得られた（表 2）

- (4) Clementine のセット 9 のルールでは、決定木の最初の分岐で 1500nm (NH 基) の波長を選択するなど、タンパク質由来の吸収波長、コメのアレルゲンとされる α -amylase inhibitor の吸収波長とかなり一致していた (図 3, 表 3)。
- (5) IntelligentMiner のセット 10 のルールでは、最初の分岐の 1612nm やその他の波長がタンパク質の強い吸収波長と異なるものが多かった。また、 α -amylase inhibitor の強い吸収と一致した 1930nm 付近は、水分の強い吸収波長 (1940nm) に近いため判断基準として適当でないと思われる (図 3, 表 3)。

今回の分析では、Clementine による予測の方がよい結果だった。ただし、全体の精度は約 50% でまだ低いため、さらに精度を良くするための方法を検討するとともに、未知試料に対しての精度を検討する必要がある。

4. 結果 (データ等を入れた詳細結果)

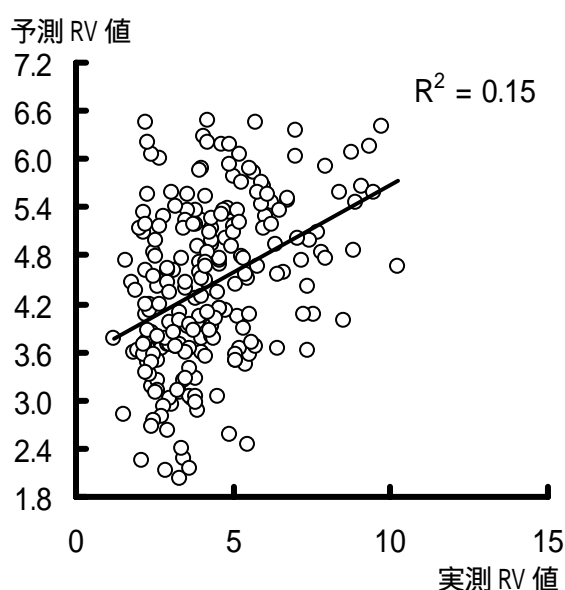


図 1 PLSR による予測の検証結果

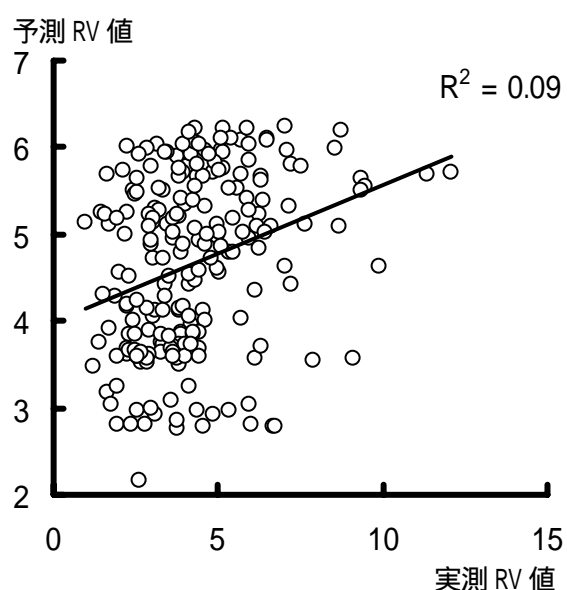


図 2 NN 分析による予測の検証結果

表 1 決定木分析による予測結果 (左表: 訓練 右表: 検証)

n=342		予測クラス				
		A	B	C	D	E
実測クラス	A	5	0	1	1	2
	B	0	51	6	1	4
	C	0	0	83	5	4
	D	1	4	2	98	2
	E	0	3	0	4	65
全体の精度 (88%)、予測 A の純度 (83%)						

n=218		予測クラス				
		A	B	C	D	E
実測クラス	A	0	2	1	5	1
	B	2	7	7	18	12
	C	0	8	16	17	9
	D	1	8	15	30	17
	E	0	10	9	10	13
全体の精度 (30%)、予測 A の純度 (0%)						

A: 1.8 未満, B: ~2.9 未満, C: ~4.0 未満, D: ~5.7 未満, E: 5.7 以上

表2 NIR 繰り返し測定データによる予測の検証結果

(左表: Clementine の Set 9、右表: IntelligentMiner の Set10)

n=1242		予測クラス				
		A	B	C	D	E
実測クラス	A	5	0	5	5	7
	B	0	207	74	89	35
	C	0	79	182	82	23
	D	0	54	73	134	25
	E	0	30	38	29	66
全体の精度(48%)、予測Aの純度(100%)						

n=1257		予測クラス				
		A	B	C	D	E
実測クラス	A	4	3	5	13	6
	B	0	219	77	49	28
	C	1	82	232	65	32
	D	0	87	75	106	15
	E	0	30	44	22	62
全体の精度(50%)、予測Aの純度(80%)						

A:1.1 未満, B: ~1.8 未満, C: ~2.1 未満, D: ~2.4 未満, E:2.4 以上

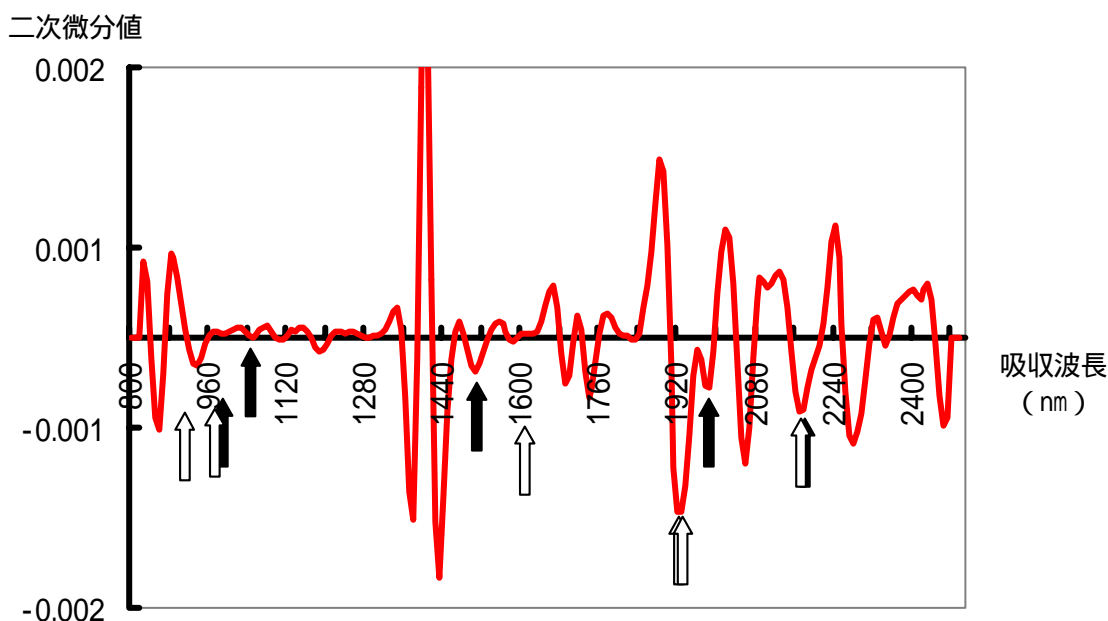


図3 -アミラーゼインヒビターの二次微分スペクトルと予測に用いられた吸収波長

←: Clementine ⇐: IntelligentMiner

表3 決定木で判断基準となった波長の最初の分岐からの距離と化学的帰属の比較

(引用元: 近赤外分光法入門 岩元ら、左表: Clementine 右表: IntelligentMiner)

距離	波長	化学的帰属
1	1500	NH(1500)
2	992	starch(990)
3	1036	RNH ₂ (1030), oil(1037)
4	1980	protein(1980)
5	2184	protein(2180), HC=CH(2190)

距離	波長	化学的帰属
1	1612	=CH ₂ (1620)
2	928	oil(928)
3	1928	CONH(1920), H ₂ O (1940)
4	972	ROH, H ₂ O(972)
5	2176	protein (2180)
6	1932	CONH(1920), H ₂ O (1940)

5. 今後の課題と将来展望

全体の精度はまだ不十分だが予測Aクラスの純度の高いルールが得られ、とりあえず連続分析できる目処がたった。

研究小課題名：5 県特産農産物の機能性評価

研究項目：5-2 県特産野菜の高血圧予防効果の実証

担当者：松浦 英之

協力・分担関係：

研究期間：平成12年度～14年度

1. 目的

近年、消費者の健康志向の高まりから、農産物に含まれる健康に寄与する機能性成分が注目を集めている。一方で野菜の消費はここ数年横這い状態にあり、県内特産野菜の粗生産額も、平成3年をピークに漸減しつつある。

そこで、本県特産農産物の新たな需要の創出と県民生活の充実を目的に県産主要農産物の機能性を評価する。ここでは、高血圧予防効果が報告されている -アミノ酪酸 (GABA) の温室メロン果実内での変動と、温室メロン果汁を動物に強制投与した場合の血圧に及ぼす影響を調査した。

2. 方法

(1)温室メロン果実中のGABAの変動

場内温室で温室メロン‘アールスフェボリット’を栽培し、収穫した果実を試験に供した。茎葉等から果実に供給されるアミノ酸の形態を明らかにするために、収穫直後の果柄部（茎葉側）から溢泌液を採取し、アミノ酸濃度を測定した。また、果実内のGABAの分布を明らかにするために、収穫直後の果実から、図2に示した部位の搾汁液を採取し、GABA濃度の比較を行った。さらに、収穫後の追熟過程における果実内のGABA含量の変化を明らかにするために、果実を20の恒温室に静置し、2日毎にそれぞれの果実の花痕部から搾汁液を採取し、GABA濃度を測定した。

(2)温室メロン果汁の強制投与がラットの血圧に及ぼす影響

温室メロン12果から搾汁液を採取し、全量を混合したのち遠心分離して沈殿物を取り除いた。その後、約30mlずつに分注して凍結保存し、試験果汁とした。この試験果汁を解凍した後、0.22 μ mのメンブレンフィルターでろ過し、高血圧自然発症ラット (SHR/Izm SPF：1群雄5匹) にテフロン製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与は、生後12週齢から開始し、体重1kg当たり試験果汁10mlの割合で毎日2回に分けて行った。また、対照として、蒸留水を同量強制投与する群を設けた。血圧測定は、非観血式血圧計を用いて行った。なお、試験果汁のGABA濃度は823 μ g/mlであり、1日当たりのGABA投与量は8.23mg/kg体重であった。

3. 結果の概要・要約

(1)温室メロン果実中の GABA の変動

果梗部溢泌液に含有されるアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン及びアラニンが多く、GABAはグルタミン酸の百分の1程度であることから、GABAは果実内で生産されていることが示唆された(図1)。温室メロン果実中の部位別 GABA 濃度は、可食部果肉では外果皮付近よりも胎座に近接する内果皮で明らかに高かった(図2)。垂直方向には、果梗部で低く、赤道部、果頂部方向にいくにしたがって高くなった。さらに、可食部ではないが、種子周辺で GABA 濃度が極端に高かった。収穫後のアミノ酸濃度は、主要なアミノ酸(グルタミン、アスパラギン酸、アラニンなど)が漸減するのに対し、GABA 濃度は収穫8日後にピークとなった(図4)。この時期は、果実硬度が0.4kgを示した収穫6日後の可食適期をやや過ぎたあたりであった(図3)。

以上から、GABAは果実内で生産され、収穫後も濃度が上昇することが示唆された。また、その生産部位は、極端にGABA濃度の高いことから種子周辺と推察された。

(2)温室メロン果汁の強制投与がラットの血圧に及ぼす影響

温室メロン果汁を高血圧自然発症ラットに強制投与したところ、対照群と比べ投与開始2週間後で収縮期血圧が13mmHg低く、5週間後でも5mmHg低くなり、血圧上昇を抑制する傾向が認められた。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

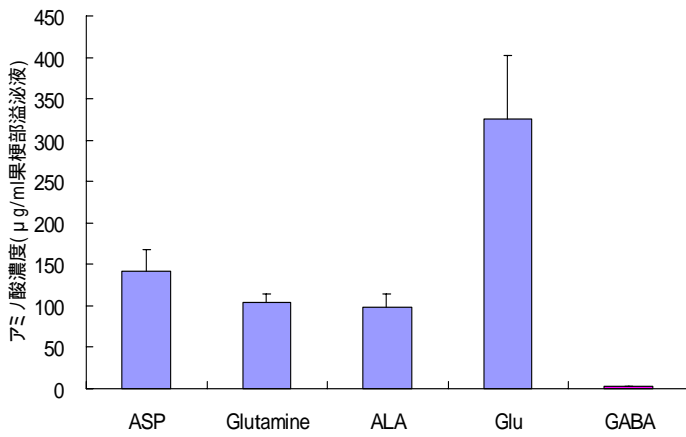


図1 収穫直後の果柄溢泌液の主要アミノ酸濃度

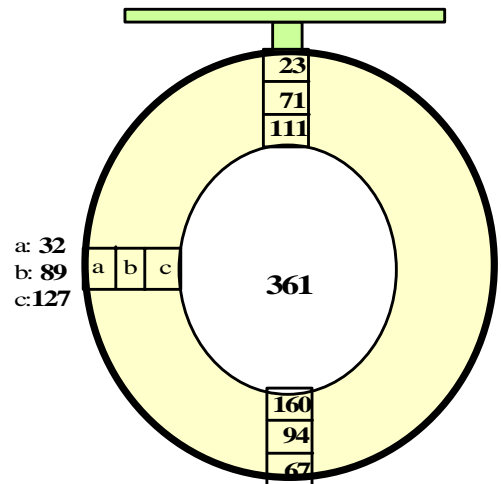


図2 GABA濃度の果実内相対比

図中の数字は赤道部の平均値を100とした相対値

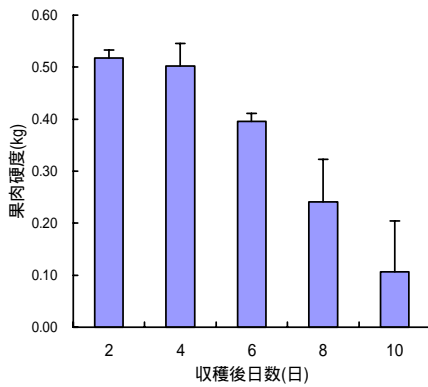


図3 試験に使用した温室メロン果実の硬度変化

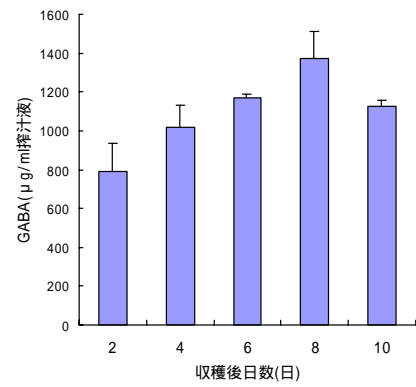


図4 収穫後の果実花痕部のGABA濃度変化

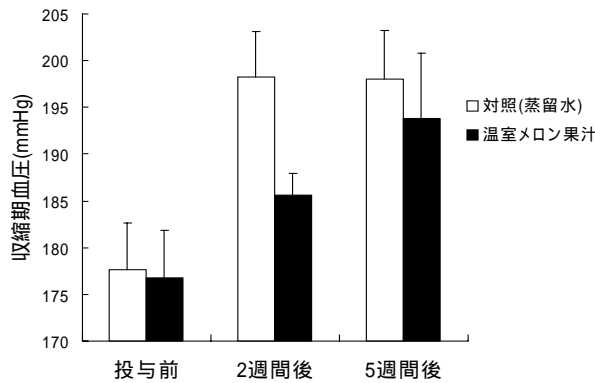


図5 温室メロン果汁投与による高血圧自然発症ラットの収縮期血圧の変化

5 今後の課題と将来展望

ラット等を用いた温室メロン果汁の長期投与試験を行う。
 温室メロン果実内での GABA 生成酵素(GAD)活性等を調査し、蓄積機構解明を試みる。
 動物細胞培養系により、県特産農産物の機能性検索を行う。

研究小課題名：5 県特産農産物の機能性評価

研究項目：5-3 県特産農産物の抗酸化能評価

担当者：松浦 英之

協力・分担関係：

研究期間：平成12年度～14年度

1 目的

バイオフィトン指標として、農産物が持つ抗酸化能を動植物細胞を用いて直接評価する実験系を開発する。ここでは、マウス黒色肉腫細胞 B16 (B16 melanoma) を用いた抗酸化能評価系を検討した。

2 方法

(1) B16細胞の培養

B16 melanoma (JCRB0202, HSRRBから分譲) から特にメラニン産生能の高いB16-1G5をクローニングし、試験に供した。FCSを10%含むDMEM培地中でB16-1G5細胞 (以下B16細胞) を、0.5、1.0または 1.5×10^5 の密度に調整し、60mm プラスチックシャーレに播種し、2～3日間予備培養して以下の試験に用いた。

(2) 発光測定

プラスチックシャーレで予備培養した細胞の培地を新しいものに交換し、抗酸化物質 (没食子酸、アスコルビン酸、エピガロカテキンガレート、カロテン及びビタミンE) を加えた。さらに、細胞に影響を及ぼさない濃度のルシジェニン (0.2mM) を添加した後、温度37℃、炭酸ガス濃度5%の条件で、細胞からの発光をフォトンカウンター (MSPC, 浜松ホトニクス) で測定した。

(3) 活性酸素種

B16細胞を培養しているシャーレから培地の一部を静かにとり、スピントラップ剤 (10% DMPO) と混合して供試液とした。電子スピン共鳴装置 (ESR)(JA-FA100, JEOL)を用い、供試液中に存在するラディカルの同定を行った。

3 結果の概要・要約

(1)細胞がコンフルエントな状態になると、発光は一旦減少するが、その後鋭くかつ強い発光ピークが観察された(図1内のC)。これは、細胞がシャーレの底から急激に剥がれ、細胞死に至る時期と一致した。抗酸化物質の没食子酸添加により、コントロールに比べ濃度依存的にこの発光が減じた(図1)。同様に、エピガロカテキンガレート、カロテン及びビタミンEの添加でも発光の抑制が観察された(図省略)。一方、アスコルビン酸の添加では、濃度依存的に発光が減少する傾向が見られたが、0.2mM以下の低濃度ではコントロールと比べその強度は強かった。播種細胞密度を上げると、また、予備培養の期間が延びると、この発光のピークは出現までの時間が短くなった(図省略)。

(2)コンフルエント後の急激な細胞死に伴う発光が起きている時点では、培地中にはヒドロキシラディカルのみが検出された(図2)。

(3)この発光は、 O_2^- に特異的に反応するルシジェニンによって増感されるが、ESR測定では培地中にはヒドロキシラディカルのみ生成が観察された。このことから、この発光は、B16細胞が細胞死に至る時にその細胞内に生じる活性酸素種 (特に O_2^-) に起因するものと推察された。没食子酸、エピガロカテキンガレートなどの抗酸化物質の添加は、その物質の抗酸化性により活性酸素種を捕集することになり、その結果、発光強度が減少したと考えられた。この抗酸化能評価方法は生きた細胞内での反応に基づくため、溶液内での試薬または酵素の反応系を用いる現在の抗酸化能評価方法よりも優れていると考えられる。本方法では、アスコルビン酸のプロオキシダント的な挙動も検出できており、このことは本方法の有効性を示すものである。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

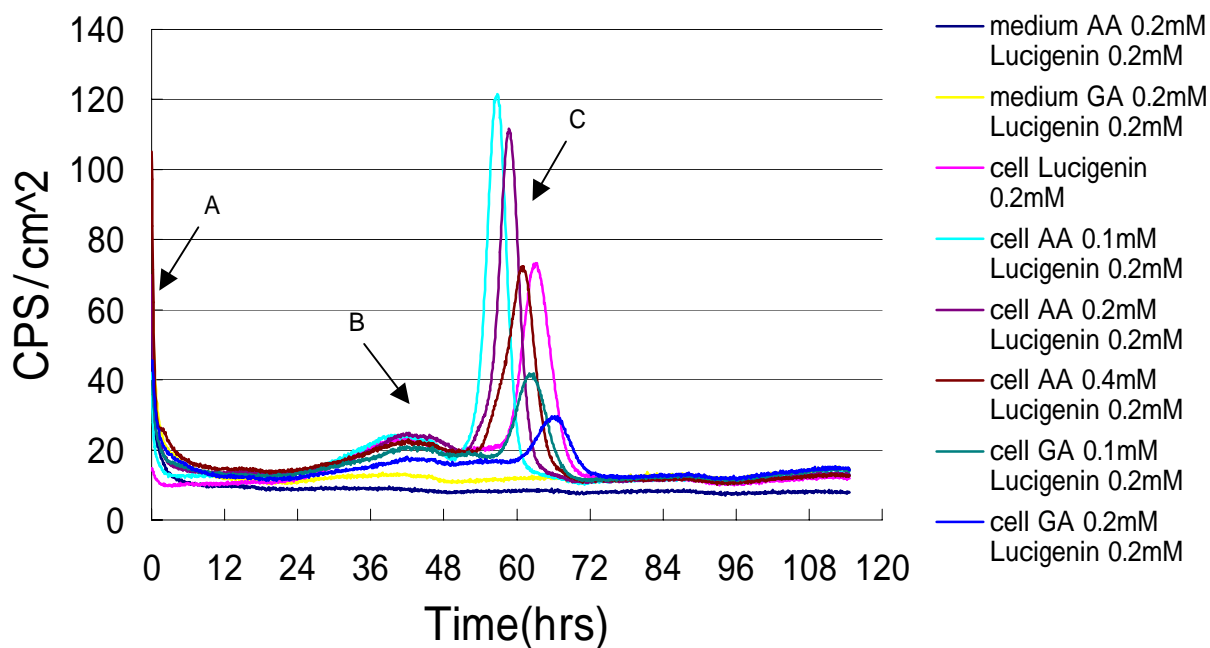


図1 B16細胞のルシジェニン添加時の発光に及ぼす抗酸化物質の影響

AA : アスコルビン酸、GA : 没食子酸、Lucigenin : ルシジェニン、Medium : 細胞なし

1.5 × 10⁵ cellsで播種後、2日間予備培養を行い、培地交換とともに供試試薬および

ルシジェニンを添加して、フォトンカウンタ (MSPC) により測定を行った。

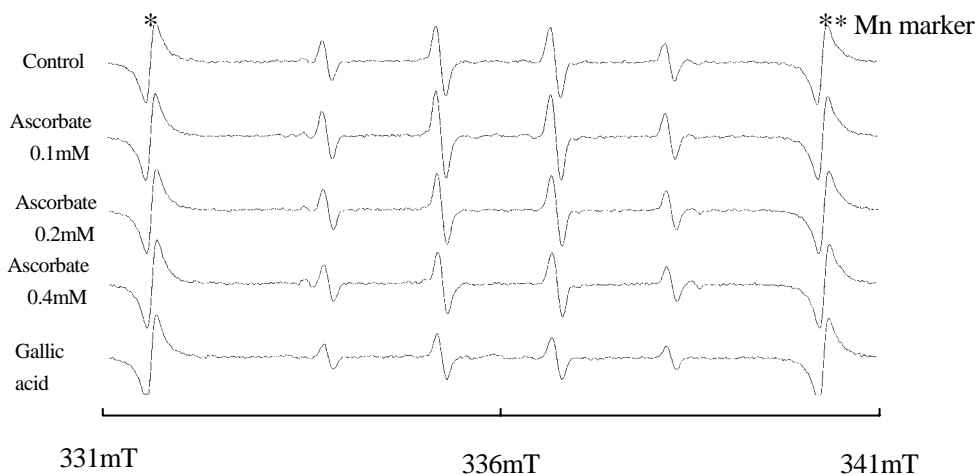


図2 コンフルエント後の急激な細胞死に伴う発光が起こっている時点の培地中のラディカル (ESRスペクトラム)

5 今後の課題と将来展望

開発した抗酸化能評価系が適用できる条件を明らかにし、農産物の抗酸化能評価への応用を試みる。