

令和5年度 高知県立大学大学院 博士論文

食用カンナ葉含有成分の化学的・栄養学的特性
—発酵処理に伴う変化に着目して—

Chemical and nutritional characteristics of
edible canna leaf content.
-Focus on changes associated with fermentation
treatment.

人間生活学研究科
博士後期課程

氏名 生川 卓弘

令和5年度 高知県立大学大学院 博士論文

食用カンナ葉含有成分の化学的・栄養学的特性
—発酵処理に伴う変化に着目して—

Chemical and nutritional characteristics of
edible canna leaf content.
-Focus on changes associated with fermentation
treatment.

人間生活学研究科

博士後期課程

学籍番号 21G504

氏名 生川 卓弘

指導教員 渡邊浩幸 教授

論文要旨

食用カンナ葉含有成分の化学的・栄養学的特性－発酵処理に伴う変化に着目して－

生川 卓弘

【背景・目的】

食用カンナ (edible canna: EC) は、ショウガ目カンナ科の多年草であり、未開発な植物資源として小規模栽培されている。葉面積指数が他の植物と比較して顕著に高いものの、EC 茎葉部に関する報告は限定されている。本研究では、近年、種々の機能が付加されることが報告されている発酵に着目し、EC 葉部、及び乳酸発酵物の 80%メタノール抽出物 (MEECL) を調製し、化学的・栄養学的特徴とそれらの発酵による変化、発酵前後の MEECL の抗肥満作用、及び抗アレルギー作用の違いについて明らかにすることを目的とした。

【方法】

- (1) 成分評価：EC 葉部、及び MEECL を用い、栄養成分、HPTLC によるフェノール性化合物とアミノ化合物の定性、総ポリフェノール量、抗酸化能、総遊離アミノ酸量、HPLC によるポリフェノール、及び遊離アミノ酸の同定と定量を行った。
- (2) 抗肥満作用の評価：非発酵 EC 葉部抽出物 (N-MEECL)、及び発酵 EC 葉部抽出物 (F-MEECL) を用いた。

In vitro：消化酵素の阻害活性を評価した。

In vivo：マウス (C57BL/6J 雄 4 週齢) を使用し、体脂肪蓄積量、糞中脂質排泄量、脂肪酸異化代謝の指標として β 酸化酵素遺伝子発現量の測定を実施した。

- (3) 抗アレルギー作用の評価：

In vitro：N-MEECL、及び F-MEECL、さらにメカニズム解析のために、ポリフェノール構造を破壊するラッカーゼを作用させた N-MEECL、及び F-MEECL、さらに 5 種のポリフェノールと 20 種のアミノ酸、及び 1 種のイミノ酸の脱顆粒抑制試験を実施した。

In vivo：マウス (ICR 雄 7 週齢) を使用し、アレルギー症状主観的評価スコア、直腸温の変化、耳介浮腫を指標として評価した。

【結果】

- (1) 成分評価：EC 葉は、他の野菜類と比較して、タンパク質含量が多く、アミンやアルカロイドは存在しなかった。MEECL の総ポリフェノール含量、及び抗酸化能は、他の野菜の数十倍を示した。発酵によりポリフェノール量及び抗酸化能は低下したが、遊離アミノ酸量は増加した(第 2 章)。

(2) 抗肥満作用の評価：

In vitro：N-MEECL、及び F-MEECL とともに α -グルコシダーゼ阻害活性、及びリパーゼ阻害活性を有するが、F-MEECL ではこれら酵素阻害活性は低下した。

In vivo：N-MEECL 食、F-MEECL 食において、脂肪蓄積抑制、糞中脂質排泄促進作用は、発酵の有無に関わらず認められなかった（第 3 章）。

(3) 抗アレルギー作用の評価：

In vitro では N-MEECL、及び F-MEECL で脱顆粒抑制効果が確認され、発酵により強度は増強した。ラッカーゼ処理後を行うことで、脱顆粒抑制効果は減弱した。EC 葉に含まれる 5 種のポリフェノール及び 7 種のアミノ酸に脱顆粒抑制効果がみられた。

In vivo では、F-MEECL で有意なアレルギー症状の低下が認められた(第 4 章)。

【考察】

MEECL は、消化酵素を阻害する効果があるものの、抗肥満作用を発揮することはなかった。一方、MEECL は、抗アレルギー作用を有し、EC 葉の発酵処理でその効果が増強した。抗即時型アレルギー反応を示す脱顆粒抑制効果は、MEECL に含まれるアミノ酸による効果だけでは説明できず、EC 葉に含まれるポリフェノールの乳酸発酵過程で生成する分解物も関与すると考えられた。

Abstract

Chemical and nutritional characteristics of edible canna leaf content.
: Focus on change associated with fermentation treatment.

Takahiro Narukawa

【Introduction】

Edible canna (EC) is a perennial herb of the ginger order Zingiberales and Cannaceae family, cultivated on a small scale as an underexplored plant resource. Although it exhibits a considerably high leaf area index compared with that of other plants, studies focusing on the EC stem and leaf parts remain scarce. In this study, we focused on fermentation, which adds various functionalities in recent years. We prepared 80% methanol extract of EC leaves and 80% methanol extract of lactic acid fermented EC leaves (MEECL) to elucidate their chemical and nutritional characteristics and their changes in resulting from fermentation, the anti-obesity and anti-allergic effects of MEECL before and after fermentation, and differences in their functional properties.

【Methods】

- (1) Component Evaluation: We quantified nutritional components of EC leaves, the total polyphenol content and antioxidant capacity of EC leaves and MEECL, and total free amino acid of MEECL. Additionally, we qualitatively assessed the phenolic and amino compounds using HPTLC. We quantified and identified the polyphenols and free amino acids using HPLC.
- (2) Anti-obesity Effect Evaluation: We used non-fermented EC leaf extract (N-MEECL) and fermented EC leaf extract (F-MEECL) for evaluation. For the in vitro experiments, in enzyme inhibitory activities. For the in vivo experiments, in 4-week-old male C57BL/6J mice, measuring body fat accumulation, fecal lipid excretion, and β -oxidation enzyme-related gene expression levels as indicators of fatty acid metabolism.
- (3) Anti-Allergic Effect Evaluation: For the in vitro experiments, we conducted degranulation inhibition tests for N-MEECL, F-MEECL, for further mechanistic analysis, for N-MEECL and F-MEECL with laccase treatment, which disrupts polyphenol structure, as well as five polyphenols in the EC leaves, 20 amino acids, and one imino acid. For the in vivo experiments, we used Institute of Cancer Research mice who were male and 7-week-old to evaluate subjective scores of allergic symptoms, changes in rectal temperature, and ear swelling as indicators.

【Results】

(1) Component Evaluation: EC leaves exhibited a higher protein content than other vegetables, and we detected no amines or alkaloids. The total polyphenol content and antioxidant capacity were several times higher in MEECL than in other vegetables. Fermentation reduced both the polyphenol content and antioxidant capacity, while it increased the free amino acid levels (Chapter 2).

(2) Anti-obesity Effect Evaluation:

Concerning the *in vitro* results, both N-MEECL and F-MEECL exhibited α -glucosidase and lipase inhibitory activities, although these inhibitory activities were reduced in F-MEECL. In our *in vivo* experiments, we observed that the N-MEECL and F-MEECL dietary intake did not significantly affect fat accumulation inhibition or fecal lipid excretion promotion before and after fermentation (Chapter 3).

(3) Anti-allergic Effect Evaluation:

Concerning the *in vitro* results, both N-MEECL and F-MEECL demonstrated degranulation inhibition effects, the intensity of which was enhanced by fermentation. After the laccase treatment, the degranulation inhibition effect was weakened. Five polyphenols and seven amino acids in the EC leaves exhibited degranulation inhibition effects. In our *in vivo* experiments, we observed a significant reduction in allergic symptoms upon F-MEECL intake (Chapter 4).

【Discussion】

Although MEECL inhibited the digestive enzymes, it did not exert any anti-obesity effect. In contrast, MEECL displayed an anti-allergic effect, enhanced by EC leaf fermentation. The degranulation inhibitory effect, which is indicative of an anti-immediate allergic reaction, cannot be explained solely by the amino acids contained in MEECL, but may be due to degradation products formed during the lactic acid fermentation of the polyphenols contained in the EC leaves.

目 次

第1章 序論	1
第1節 研究の背景	1
第1項 食用カンナとは	1
第2項 発酵とは	2
第3項 乳酸菌	2
第4項 ポリフェノールとは	3
第5項 ポリフェノールの機能性	4
第6項 たんぱく質源	4
第2節 研究目的と意義	5
第1項 研究目的	5
第2項 研究の意義	5
第2章 EC 葉部の化学的・栄養学的特徴解析	6
第1節 研究試料	6
第1項 試料の採取	6
第2項 乳酸菌による発酵	6
第3項 MEECL の調製	6
第4項 MEECL の HCl による加水分解物の調製	6
第2節 EC 葉部の成分分析	7
第1項 一般成分の分析	7
(1) 水分含量の定量	7
(2) たんぱく質の定量	7
(3) 脂質の定量	7
(4) 総無機質の定量	7
(5) 炭水化物量の算出	7
第2項 High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) による MEECL 含有成分の定性	8
第3項 EC 新鮮葉及び MEECL に含まれるポリフェノールの種類と量	8
(1) EC 新鮮葉及び MEECL の総ポリフェノール含量の測定	8
(2) EC 新鮮葉及び MEECL の DPPH ラジカル捕捉活性の測定	9
(3) MEECL に含まれるポリフェノールの同定と定量(HPLC)	9
第4項 MEECL に含まれる遊離アミノ酸の種類と量	9
(1) 総遊離アミノ酸の定量	9

	(2) MEECL に含まれる遊離アミノ酸の同定と定量(HPLC)	10
第3節	結果	10
第1項	一般成分	10
第2項	HPTLC による MEECL 含有成分	11
	(1) 展開溶媒(アセトン:トルエン:ギ酸=3:3:1)	11
	(2) 展開溶媒(n-ブタノール:酢酸:水=4:1:2)	11
	(3) 展開溶媒(フェノール:水=4:1)	12
第3項	ポリフェノールの種類と量	13
	(1) EC 新鮮葉に含まれる総ポリフェノール含量	13
	(2) MEECL に含まれる総ポリフェノール含量	14
	(3) EC 新鮮葉の DPPH ラジカル捕捉活性	15
	(4) MEECL の DPPH ラジカル捕捉活性	15
	(5) MEECL に含まれるポリフェノールの種類と量	16
第4項	遊離アミノ酸の種類と量	17
	(1) MEECL 及びその加水分解物に含まれる総遊離アミノ酸量	17
	(2) MEECL 及びその加水分解物に含まれる遊離アミノ酸の種類と量	17
第4節	考察	18
第3章	MEECL の機能性 (抗肥満作用)	19
第1節	肥満研究の背景	19
第1項	肥満の現状	19
第2項	肥満の原因	20
第3項	肥満の合併症	20
第4項	抗肥満作用のメカニズム	21
	(1) 消化酵素阻害	21
	(2) 褐色脂肪細胞による熱産生	22
	(3) β -酸化亢進	22
第5項	抗肥満作用を持つ食材の意義	23
第2節	MEECL の抗肥満機能に関する研究の目的	23
第3節	方法 (<i>in vitro</i>)	23
第1項	消化酵素阻害活性の測定	23
	(1) MEECL の α -グルコシダーゼ阻害活性の測定	23
	(2) MEECL のリパーゼ阻害活性の測定	24
第4節	方法 (<i>in vivo</i> : 動物実験)	24
第1項	実験動物	24
第2項	飼育期間	24

第3項	実験飼料	24
第4項	解剖	25
第5項	糞便中の脂質含有量の測定	25
	(1) 糞便中のトリグリセリド量の測定	26
第6項	血清生化学因子の解析	26
	(1) 血清グルコース濃度の測定	26
	(2) 血清トリグリセリド濃度の測定	26
	(3) 血清総コレステロール濃度の測定	26
第7項	肝臓中脂質含量の測定	26
	(1) 肝臓中のトリグリセリド量の測定	26
	(2) 肝臓中のコレステロール量の測定	27
第8項	定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現の検討	27
	(1) RNA 抽出	27
	(2) 逆転写反応	27
	(3) リアルタイム PCR	28
第5節	結果 (<i>in vitro</i>)	28
第1項	消化酵素阻害活性	28
	(1) MEECL の α -グルコシダーゼ阻害活性(基質:マルトース)	28
	(2) MEECL の α -グルコシダーゼ阻害活性(基質:スクロース)	29
	(3) MEECL のリパーゼ阻害活性	30
第6節	結果 (<i>in vivo</i> : 動物実験)	30
第1項	飼料摂取量	30
	(1) 飼育期間中の総摂取飼料量	30
	(2) 飼育期間中の総摂取エネルギー量	30
第2項	糞便排泄への影響	31
	(1) 糞便採取日の飼料摂取量	31
	(2) 糞便採取日の摂取脂質量	31
	(3) 糞便採取日の脂質由来の摂取エネルギー量	31
	(4) 糞便量	32
	(5) 糞便中のトリグリセリド量	32
	(6) トリグリセリド排泄率	32
第3項	体重への影響	32
	(1) 体重増加量への影響	32
第4項	体脂肪蓄積への影響	34
	(1) 副睾丸脂肪蓄積への影響	34
	(2) 腎周囲脂肪蓄積への影響	34

	(3) 腸間膜脂肪蓄積への影響	35
	(4) 内臓脂肪蓄積への影響	35
第5項	血清生化学因子への影響	36
	(1) 血清グルコース濃度	36
	(2) 血清トリグリセリド濃度	36
	(3) 血清総コレステロール濃度	37
第6項	肝臓への影響	37
	(1) 肝臓重量への影響	37
	(2) 肝臓中のトリグリセリド量への影響	38
	(3) 肝臓中のコレステロール量への影響	38
第7項	肝臓の各種遺伝子発現への影響	39
	(1) 肝臓中の MCAD 遺伝子発現への影響	39
	(2) 肝臓中の ACOX1 遺伝子発現への影響	39
第7節	考察	40
第4章	MEECL の機能性 (抗アレルギー作用)	41
第1節	アレルギー研究の背景	41
第1項	アレルギーの現状	41
第2項	衛生仮説	42
第3項	アレルギー反応の機序	42
第4項	食物アレルギー	43
第5項	抗アレルギー作用を持つ食材の意義	43
第2節	MEECL の抗アレルギー機能に関する研究の目的	44
第3節	方法 (<i>in vitro</i>)	44
第1項	細胞培養	44
	(1) 培地作成	44
	(2) 細胞培養	44
第2項	ラッカーゼ処理	44
第3項	細胞毒性試験	44
第4項	抗アレルギー活性の評価	45
第4節	方法 (<i>in vivo</i>)	46
第1項	実験動物	46
第2項	飼育期間	46
第3項	実験飼料	46
第4項	動物実験	47
第5項	アレルギーモデルマウスの作製	47

第6項	解剖	48
第7項	アレルギー症状の解析	48
第5節	結果 (<i>in vitro</i>)	48
第1項	細胞毒性試験	48
第2項	β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制試験	49
	(1) MEECL 及びその加水分解物の脱顆粒抑制作用	49
	(2) ラッカーゼ処理前後における MEECL の脱顆粒抑制作用	50
	(3) MEECL 含有ポリフェノールの脱顆粒抑制作用	50
	(4) 各種遊離アミノ酸の脱顆粒抑制作用	51
第6節	結果 (<i>in vivo</i> : 動物実験)	51
第1項	体重への影響	51
	(1) 体重増加への影響	51
第2項	アレルギー症状への影響	52
	(1) アレルギー症状主観評価スコア	52
	(2) 直腸温の変化	53
	(3) OVA 投与後耳介厚	53
第3項	盲腸への影響	54
	(1) 盲腸重量	54
	(2) 盲腸 pH	54
第4項	脾臓への影響	55
	(1) 脾臓重量	55
第7節	考察	55
第5章	総合考察・期待されること	58
第1節	食材としての EC の可能性	58
第2節	EC 葉部が持つ可能性・期待できること	58
結語		58
謝辞		59
引用・参考文献		59

第1章 序論

第1節 研究の背景

第1項 食用カンナとは

食用カンナ(edible canna: EC)は、ショウガ目カンナ科の大型の多年草である。中南米がその起源であり、古くは紀元前 2500 年頃から利用されている¹⁾。その後、アジアやアフリカ等の熱帯・亜熱帯地方を中心に伝播し、現在でも未開発な植物資源として小規模栽培にされている。

野生型の多くは湿った林地の林縁に生育し、林地の奥深くでは生育せず、栽培型も多湿な土壌を好む。熱帯や亜熱帯地域の温暖な環境を好み、気温が9℃以上で正常に生育する。また、貯水細胞を有し、雨季と乾季がはっきりとしたサバンナ気候にも適応できる。日本でも栽培されており、比較的温暖で降水量が多く、日照時間が長い高知県は特に EC の栽培に適した地域と言える。

EC の地上部である茎葉部は、草高が約 3m にも達し、楕円形で長さ 15~50 センチ、幅 7~18 センチの分岐のない葉を茎に対して斜めにつけ、LAI (Leaf Area Index) は最大 12 を超える²⁾。葉の色は一般的に赤紫色を帯びている。地下部である根茎部は地下に横に広がり、デンプンを蓄積する³⁾。

主に根茎部がデンプン源として家庭消費用として食される。ベトナムでは麺の原料として、中国ではアルコール飲料にも加工され、商業的にも利用されている。一部の東南アジアの地域では洗濯用の糊としても利用されている⁴⁾。茎葉部はアフリカや南米の一部で、サイレージやリウマチの治療薬、解熱剤として利用されている⁵⁾。

EC に関する研究は主に根茎部に焦点が当てられており、そのデンプン含有量はキャッサバに匹敵し、77%を超えるものの、消化率は低いこと⁶⁾、血糖値の改善効果や腸内細菌の多様性を高めること⁷⁾、加熱により硬さが増し、砂糖添加により弾力が増すこと⁸⁾等が報告されている。一方、茎葉部に関する研究は限定されている。

本研究では、栽培に適した環境である高知県産の EC 葉を実験試料とし、EC 葉部およびその抽出物 (MEECL) の化学的・栄養学的特徴の解析、MEECL の機能性 (抗肥満作用、抗アレルギー作用) について検討した。

EC の茎葉部については十分な知見がないため、深く探究するよりも広範な研究を優先し、研究を行った。

第2項 発酵とは

微生物（主にカビ、酵母、細菌）が有機物を分解する反応のうち、ヒトにとって有益な変化をもたらすものを発酵といい、有害な場合を腐敗という。発酵により生成した食品を発酵食品という。日本では、みそ、しょうゆ、清酒、漬物、納豆、ヨーグルト、紅茶等の発酵食品があり、私たちの食生活に欠かせないものとなっている。世界中でも様々な文化に根付いており、中東から欧州地域では、チーズ、ヨーグルトなど動物性原料由来の乳発酵食品が多く、東アジアから東南アジア地域では、植物性素材や水産物を用いた多彩な発酵食品が存在している⁹⁾。発酵のメリットとして、食品に風味や香りを与え、保存性を向上させる効果がある。また、発酵は食品の栄養価を向上させたり、消化しやすくしたりする働きもある。

発酵食品の歴史は古く、世界では紀元前 5,000 年頃、日本では奈良時代から利用され始めたと言われている¹⁰⁾。17 世紀末にアントニ・ファン・レーウェンフック (Antonie van Leeuwenhoek, 1632-1723, オランダ) は、微生物を発見し、19 世紀中頃、ルイ・パスツール (Louis Pasteur, 1822-1895, フランス) は、発酵が微生物によって起こることを明らかにした。これらが発酵に関する研究が進む契機となり、現在では食品産業だけでなく、医薬品の製造¹¹⁾、有害物質の分解¹²⁾、染料の製造等にも応用されている。

発酵食品の機能性として、抗炎症作用¹³⁾、抗腫瘍作用¹⁴⁾、抗肥満作用¹⁵⁾、抗アレルギー作用¹⁶⁾、ストレス抑制作用¹⁷⁾、認知機能維持作用¹⁸⁾等が報告されている。また、発酵前後での比較をし、栄養価の向上¹⁹⁾、抗肥満作用²⁰⁾、抗アレルギー作用²¹⁾、消化吸収率の向上及び抗炎症作用²²⁾が報告されている。

そこで、本研究では、非発酵 EC 葉部メタノール抽出物 (N-MEECL) および乳酸菌による発酵 EC 葉部メタノール抽出物 (F-MEECL) を用い、発酵前後の成分変化と機能性 (抗肥満作用、抗アレルギー作用) について検討を行うこととした。

第3項 乳酸菌

乳酸菌は、カタラーゼ陰性であり、芽胞を形成せず、運動性がなく、グラム陽性の桿状または球状の細菌の総称である。これらの微生物は、消費した糖から 50%以上の乳酸を産生する²³⁾特徴を持っており、生成した乳酸は、pH を低下させ、食中毒菌の増殖を抑制するほか、アルコールと反応し、エステルを生成することで良い香りをもたらす。広く自然界に分布し、ヒトや動物の消化管内、植物、土壌、発酵食品中に存在し、ヨーグルトやチーズなどの乳製品のほか、

野菜のつけもの、みそ、しょうゆ等の製造に用いられる。Lactobacillus 属、Lactococcus 属、Streptococcus 属、Leuconostoc 属、Pediococcus 属の一部の乳酸菌株は、プロバイオティクスとして認識されている。プロバイオティクスは、「腸内常在菌のバランスを変えることにより宿主に保健効果を示す生きた微生物、またはそれを含む食品」と定義され²⁴⁾、感染性病原体に対する保護、免疫調節作用、抗アレルギー作用、抗肥満作用、抗酸化作用、ビタミン・ミネラルの生体利用率向上、抗不安作用など、さまざまな健康増進効果を含む副産物を生成する²⁵⁾。また、これらの菌株は、有益な細菌群を増やし、腸管上皮のバリア機能を高め、サイトカイン産生を調節することで、腸内細菌叢組成の不均衡を調整する²⁶⁾。食品中に含まれる有害物質（細菌毒素、マイコトキシン、農薬、重金属、フィチン酸塩、シュウ酸塩、青酸生成配糖体）から食品を無害化する過程にも乳酸菌が関与することが明らかになっている²⁷⁾。

第4項 ポリフェノールとは

ポリフェノールは、植物が紫外線や乾燥、塩分、温度（高温、低温）などのストレスに応答して生成される二次代謝産物であり²⁸⁾、植物の生存には不可欠な成分である。1つの植物には複数種類のポリフェノールが存在し、特に植物の表面である果皮や葉部に多く含まれ、苦味や渋味を有し、害虫からの生体防衛に寄与している。同時に、色素成分としての機能も備えている。ただし、苦味や渋味は食味を損なう要素であり、飲料の苦味や渋味を軽減するために、ポリフェノール酸化酵素であるラッカーゼを使用する手段がとられることもある。

ポリフェノールは共通して芳香族環と少なくとも1つ以上のヒドロキシル基を持っており、現在までに8,000種類以上の化合物が同定されている。化学構造によって分類され、一般的にジフェニルプロパン骨格(C6-C3-C6)を持つフラボノイドと非フラボノイド（フェノール酸、スチルベン、リグナン）に分類される。4,000種類以上の化合物が同定されているフラボノイドには、フラボン、フラボノール、フラバノン、イソフラボン、アントシアニンなどが含まれる²⁹⁾。ポリフェノールの多くは、糖質と結合し、配糖体として存在するほか、有機酸と結合したり、互いに結合して重合体となったりすることもある。食事由来の摂取源は主に植物性食品であり、野菜、果物、豆類、穀類、コーヒー、お茶、赤ワインなどが挙げられ、1日当たりの摂取量は、0.1~1.0gが推奨されている³⁰⁾。ポリフェノールは、1990年代のフレンチ・パラドックス仮説以降注目を集め、過去30年間で機能性に関する多くの研究が発表されている。

第5項 ポリフェノールの機能性

ポリフェノールは、心血管疾患、脳血管疾患、がん、糖尿病など、世界や日本で主要な死因となっている疾患の罹患率を低下させる可能性があり、またはその進行を抑えることが知られている³¹⁾。代表的なポリフェノールであるフラボノイドの習慣的な摂取は、全原因死亡率と逆相関することが報告されている³²⁾。認知症、衰弱、骨折・転倒といった介護が必要になる原因に対しても、ポリフェノールが認知機能維持、骨格筋委縮の抑制、骨粗鬆症予防などの効果を示すことが報告されている³³⁾。また、抗アレルギー³⁴⁾、抗炎症³⁵⁾、抗肥満³⁶⁾、抗菌³⁷⁾、抗疲労³⁸⁾、視覚機能維持³⁹⁾など、機能性に関する多くの報告もある。これらの機能性に基づき、日本ではポリフェノールが特定保健用食品や機能性表示食品の関与成分として広く用いられています。これらの機能性は、ポリフェノール自体が持つ抗酸化作用に関連していると考えられている。

ポリフェノールを摂取する際、吸収率は0.3～43%の幅広い範囲⁴⁰⁾があり、また吸収されても体内で代謝されることにより、抗酸化能が失われる⁴¹⁾ことがある。それにもかかわらず、多くの機能性が報告されていることから、ポリフェノールを豊富に含む食品を摂取することが健康維持に寄与すると考えられている。

日本は65歳以上が人口の29.0%を占め、世界と比較しても極めて高い「超高齢社会」に突入している⁴²⁾。しかし、平均寿命と健康寿命には大きな乖離（女性12.07年、男性8.73年（2019年））が見られ⁴³⁾、不健康な状態で生活する期間が存在する。この背景から、高齢者のQOLの向上と医療費削減のために、「健康寿命の延伸」は急務な課題となっており、科学的根拠を持つ保健機能食品がその解決に一役買うことが期待されている。

第6項 たんぱく質源

たんぱく質「Protein」の語源は、古代ギリシャ語の「Proteios」（最も重要なもの）に由来している。人体では約15%を占め、摂取されたたんぱく質はアミノ酸に分解・吸収後、体たんぱく質（筋肉、臓器、酵素、ホルモン、抗体など）を合成するために欠かせない栄養素である。たんぱく質を多く含む食品は、硬い食品が多く、口腔機能が低下した高齢者は摂取が困難となり、栄養摂取量が不足しやすい⁴⁴⁾傾向がある。また、加齢とともにたんぱく同化抵抗性が上昇⁴⁵⁾することもたんぱく質不足の一因となる。たんぱく質不足は身体機能や免疫力の低下につながり、認知機能の低下⁴⁶⁾やフレイル出現リスクの増加⁴⁷⁾、感染症リスクの増加⁴⁸⁾にも影響が及ぶ。

先進国の食生活は、たんぱく質の摂取が動物性食品に傾斜しているが、これには環境への負荷が大きい側面もある。動物性たんぱく質の生産には、家畜のエサとなる多量の飼料（牛肉と鶏肉をそれぞれ 1kg 生産するためには、牛肉には 12kg、鶏肉には 5kg 飼料が必要）⁴⁹⁾となる。これには大規模な農地、水、エネルギーが必要⁵⁰⁾となる。また、牛肉の生産は、温室効果ガスであるメタンを発生する⁵¹⁾。2050 年には、世界人口は 97 億人に達し、世界規模で食料供給を排出する⁵²⁾可能性が指摘されており、特にたんぱく質不足が懸念されており⁵³⁾、動物性たんぱく質ではなく、新規植物性たんぱく質を探索し、その消費量を増加させることが、持続可能な生活を営むためにも注目されている。植物性たんぱく質は、動物性たんぱく質と比較し、脂質が少なく、食物繊維や微量栄養素（ビタミン、ミネラル）が豊富であり、動物性たんぱく質の一部を植物性たんぱく質に置き換えることで死亡リスクが低下する⁵⁴⁾との報告もある。一方、植物性タンパク質は必須アミノ酸含量が低く、リジンやメチオニンなどの特定のアミノ酸が 1 つ以上欠乏していることが多いという問題点もある⁵⁵⁾。これらの事実から、バランスの取れた食事において、たんぱく質源を多様化し、特に植物性たんぱく質を適切に摂取することが望まれる。

第 2 節 研究目的と意義

第 1 項 研究目的

本研究では、未知である生の EC 葉部及びその抽出物の化学的・栄養学的特徴、発酵後の EC 葉部及び MEECL の化学的・栄養学的特徴の変化、生及び発酵後の MEECL の抗肥満効果及び抗アレルギー効果について解析することで、生及び発酵後の EC 葉部の食材としての可能性・有用性について明らかにすることを目的とした。

第 2 項 研究の意義

EC 葉部含有成分及び発酵による変化、EC 葉部の機能性（抗肥満作用、抗アレルギー作用）の有無、また、発酵による機能性の変化が明らかになる。

第2章 EC 葉部の化学的・栄養学的特徴解析

第1節 研究試料

第1項 試料の採取

EC は、高知県土佐町にて、坂田信夫商店によって 5 月上旬に定植され、栽培・管理し、9 月に葉を採取した。採取後、直ちに 500ppm の次亜塩素酸ナトリウムを含む洗剤を用いて洗い、その後、流水で十分にすすいで、一晚乾燥させた。なお、採取した EC 葉は、栽培過程において、全ての種類の農薬を使用しなかった。

第2項 乳酸菌による発酵

3×10cm 程度の大きさにカットした EC の葉を樽に敷き詰め、その上に乳酸菌 (LAB) (サンエイラクト、サンエイ糖化株式会社) を接種し、葉 3kg に対し 4.5g の LAB を使用した。内部の空気を抜き重石を載せ、室温を約 35°C に保ちながら 25 日間発酵させた。

第3項 MEECL の調製

水分を測定した発酵および非発酵 EC 葉は、水分含量を考慮して、最終抽出溶媒濃度として 80% となるようにメタノールを加え、ポリトロンホモジナイザー (CB-15T、株式会社エフエムアイ) を使用して粉碎した。さらに、ガーゼ (ソフトガーゼ 2 号、白十字株式会社) を用いてろ過した後、遠心分離機 (KUBOTA 商事株式会社) を使用して遠心分離 (3,000rpm、5 分間) し、上清を回収した。回収した抽出液は、ロータリーエバポレーター (REN-1、IWAKI) を用いて減圧濃縮後、凍結乾燥機 (FDU-830、東京理化学器械株式会社) を使用して凍結乾燥させた。

第4項 MEECL の HCl による加水分解物の調製

非発酵 EC 葉部抽出物 (N-MEECL) 及び発酵 EC 葉部抽出物 (F-MEECL) 約 6mg をスクリーキャップ付試験管に量り取った。試料秤量後、6N HCl 0.5mL を加え、超音波洗浄機 (ASU-10、アズワン社製) に 1~2 分入れた後、定温乾燥機 (DO-450F、アズワン株式会社) を使用し、100°C で 24 時間反応させた。その後、

真空デシケーターを用い、残存した HCl を除去した。

第 2 節 EC 葉部の成分分析

第 1 項 一般成分の分析

(1) 水分含量の定量

水分含量の定量は、定温乾燥器 (D0-450F、iuchi 社製) を用いて、105°C における乾燥減量法で 24 時間乾燥して測定した。

(2) たんぱく質の定量

たんぱく質の定量は、ケルダール法に従い、EC 葉中央部 (約 3 g) を量り取り、分解促進剤 (KJELTABS-ECO (株) アクタック、Cu 不含) を 1 錠添加し、硫酸を 20mL 添加して、加熱分解した。およそ 6 時間後冷却し、ケルダール蒸留 (KjelFlex K-360 BUCHI、877Titrino plus Metrohm) を行って、自動滴定装置 877 Titrino Plus (メトロームジャパン株式会社) を使用して滴定を行い、窒素量を測定した。たんぱく質換算係数 6.25 を使用し、100g あたりのたんぱく質量を算出した。

(3) 脂質の定量

脂質の定量は、ソックスレー抽出法に従い、EC 葉中央部 (約 3 g) を量り取り、ソックスレー抽出装置 (Extraction System B-811、BUCHI) を使用して食品中の脂質をあらかじめ恒量を求めた受器に抽出した。エーテル除去後、受器の重量を測定して脂質重量を計算し、100g あたりの脂質量を算出した。

(4) 総無機質の定量

総無機質量の定量は、EC 葉中央部 (約 3 g) をあらかじめ恒量を求めたるつぼに量り取り、250°C で 2 時間、その後、550°C で 24 時間、加熱して灰化した。冷却後、るつぼの重量を測定して無機質量を求め、100g あたりの無機質量を算出した。

(5) 炭水化物量の算出

炭水化物は、差し引き法で算出した。

第2項 High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) に

よる MEECL 含有成分の定性

N-MEECL 及び F-MEECL 6.2mg をメタノール：ジメチルスルホキシド：蒸留水（6：6：1、v/v/v）100 μ L に溶解させ、試料溶液とした。HPTLC は Kieselgel 60 プレート（20cm×10cm、厚さ 0.20mm、MERCK 社製）を使用し、展開溶媒はトルエン：アセトン：ギ酸（3：3：1、v/v/v）、n-ブタノール：酢酸：水（4：1：2、v/v/v）、フェノール：水（4：1、v/v）を用いて展開した。スポットの検出は、フェノール性水酸基や、フラン環を有する化合物の検出にバニリン-塩酸試薬を、フェノール化合物の検出に塩化鉄(III)試薬を、 α アミノ基（アミノ酸）化合物の検出にニンヒドリン試薬、およびアルカロイドやアミン化合物の検出にドラーゲンドルフ試薬を噴霧後、定温乾燥機（D0-450F、アズワン株式会社）を使用し、加温した（110°C、10分）。加水分解物（N-MEECL 及び F-MEECL）は、6.2mg をメタノール：ジメチルスルホキシド：蒸留水（6：6：1、v/v/v）100 μ L に溶解させ、試料溶液とし、展開溶媒として n-ブタノール：酢酸：水（4：1：2、v/v/v）、フェノール：水（4：1、v/v）、スポットの検出は、各種検出試薬を噴霧後、110°Cで、10分間、加温した。

第3項 EC 新鮮葉及び MEECL に含まれるポリフェノールの種類と量

(1) EC 新鮮葉及び MEECL の総ポリフェノール含量の測定

発酵および非発酵 EC 葉約 2.0g を量り取り、クロロホルム 10mL、5%メタリン酸溶液 20mL を加えて、ポリトロンホモジナイザー（T10 basic ULTRA-TURRAX[®]、IKA）を用いてホモジナイズした。その後、5%メタリン酸溶液で 35mL に定容し、室温で 10分静置し、遠心分離（3,000rpm、10分間）した。水層、およびクロロホルム層を回収し、それらをさらに遠心分離（10,000rpm、10分間）し、試料溶液とした。MEECL は 1mg/mL の濃度となるように DMSO で溶解し、試料溶液とした。それぞれの試料溶液は、総ポリフェノール含量、DPPH ラジカル捕捉活性の測定に用いた。総ポリフェノール含量の測定は市販のフェノール試薬（富士フィルム和光純薬、大阪）を用いたフォーリン・チオカルト法⁴¹⁾により測定した。試料溶液 0.5mL に 0.4M 炭酸ナトリウム水溶液 0.4mL、フェノール試薬 0.2mL および蒸留水 2.9mL を加えて混和し、室温で 10分間静置後、遠心分離（3,000rpm、10分間）し、得られた上清の吸光度（760nm）を、紫外可視分光光度計（UV-1280、株式会社島津製作所）を用いて測定した。標準品としてクロロ

ゲン酸（東京化成工業社）を標準物質として検量線を作成し、これを基にポリフェノール量（クロロゲン酸相当量）を算出した。

(2) EC 新鮮葉及び MEECL の DPPH ラジカル捕捉活性の測定

試料は、総ポリフェノール含量測定時と同様に調製した。DPPH ラジカル捕捉活性の測定は DPPH 法⁴²⁾により測定した。試料溶液 0.50mL に 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 0.5mL、メタノールに溶解した 0.3mM DPPH 溶液 3.0mL を加えて混和し、室温暗所で 20 分放置後、遠心分離 (3,000rpm、10 分間) し、得られた上清の吸光度 (517nm) を紫外可視分光光度計を用いて測定した。L-アスコルビン酸（富士フイルム和光純薬株式会社）を標準物質として用いて検量線を作成し、これを基に（L-アスコルビン酸相当量）を算出した。

(3) MEECL に含まれるポリフェノールの同定と定量 (HPLC)

ポリフェノールの同定と定量は試料にメタノールを加えて、超音波処理 (15 分) し、疎水性 PTFE メンブレンフィルター (株式会社島津ジーエルシー) を用いて濾過した後、HPLC 分析を行った。HPLC 装置は、システムコントローラー: SCL-10A、ポンプ: LC-10AD、デカッサー: DGU-20A、カラムオーブン: CTO-10A、検出器: SPD-10A (株式会社島津製作所) を使用した。カラムは、逆相 HPLC カラム、150×4.6mm I.D. (CAPCELL PARC18 UG120 S-5、株式会社大阪ソーダ) を使用し、カラム温度を 40°C、流量を 0.8mL/分とした。移動相として、クロロゲン酸およびネオクロロゲン酸の分析には、アセトニトリル: 0.4%ギ酸水溶液 (7:93、w/w)、ピセアタンノール、ケルセチンおよびルチンの分析には、メタノール: 0.85%リン酸水溶液 (4:6、w/w) を使用した。検出は、ピセアタンノール 306nm、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸 326nm、ケルセチン、およびルチン 370nm でそれぞれ行った。N-MEECL 及び F-MEECL に含まれるポリフェノールの同定は、保持時間から判断した。

第 4 項 MEECL に含まれる遊離アミノ酸の種類と量

(1) 総遊離アミノ酸の定量

N-MEECL、F-MEECL 及びその加水分解物 1.0g を量り取り、2.0mL の蒸留水に溶解させたものを試料溶液とした。試料溶液 300 μ L にニンヒドリン溶液 300 μ L を加え混和し、沸騰水浴中で 15 分間浸漬し、反応を停止させた後、急冷後メチルセルソルブ 4.5mL を加え混和し、吸光度 (570nm) を、紫外可視分光光度計を用いて測定した。L-ロイシン（富士フイルム和光純薬株式会社）を標準物質として用いて検量線を作成し、これを基に総遊離アミノ酸量（L-ロイシン当量）を

算出した。

(2) MEECLに含まれる遊離アミノ酸の同定と定量(HPLC)

遊離アミノ酸の同定と定量は試料に蒸留水を加えて、超音波処理(10分)し、疎水性PTFEメンブレンフィルター(株式会社島津ジーエルシー)を用いて濾過した後、HPLCによる分析を行った。HPLC装置は、Amino Acid Analyzer L-8900(株式会社日立ハイテクノロジーズ)を使用した。さらに、以下の条件で分析を行った。カラム：イオン交換樹脂 80×4.6mm I.D. (2622SC-PF、株式会社日立ハイテクノロジーズ)、カラム温度：20～85℃、流量：0.25mL/分、移動相：生体液分析法用緩衝液 PF セット(関東化学株式会社)、検出：プロリン 440nm、その他のアミノ酸：570nmとした。N-MEECL、F-MEECL およびその加水分解物に含まれる遊離アミノ酸の同定は、保持時間から判断した。

第3節 結果

第1項 一般成分の測定

生のEC葉および発酵EC葉の100gあたりの一般成分を表1に示した。生のEC葉は、水分は82.9 ± 1.4g、たんぱく質は4.2 ± 0.7g、脂質は0.5 ± 0.1g、炭水化物は9.9 ± 1.3g、無機質は2.5 ± 0.3gであった。発酵EC葉は、水分は82.2 ± 0.7g、たんぱく質は4.6 ± 0.3g、脂質は0.8 ± 0.0g、炭水化物は9.9 ± 1.3g、無機質は2.5 ± 0.2gであった。

表1. EC新鮮葉100gあたりの一般成分

(単位:g/100g新鮮葉)			
	非発酵	発酵	p値
水分	82.9 ± 1.4	82.2 ± 0.7	0.544
たんぱく質	4.2 ± 0.7	4.6 ± 0.3	0.385
脂質	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1*	<0.05
炭水化物	9.9 ± 1.3	9.9 ± 1.3	0.999
総無機質	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.2	0.865

値は、平均 ± 標準偏差 (n=3)、t検定：* P<0.05

第2項 HPTLCによるMEECL含有成分

(1) 展開溶媒 (アセトン：トルエン：ギ酸=3：3：1)

展開溶媒としてアセトン、トルエン、ギ酸を用いた HPTLC の結果を図 1-1 に示した。バニリン塩酸試薬発色は、N-MEECL では原点から上にわずかな発色が見られたが、F-MEECL ではほとんど発色が見られなかった。塩化鉄(Ⅲ)試薬発色は、N-MEECL では原点から上部にかけて発色が濃くなったが、F-MEECL ではわずかな発色しか見られなかった。ニンヒドリン試薬発色は、N-MEECL、F-MEECL ともに上に発色がみられ、発色は F-MEECL でより強かった。また、ドラーゲンドルフ試薬発色は、発酵前後とも発色は見られなかった。

これらの結果から、N-MEECL には、フェノール化合物、アミノ酸が存在し、F-MEECL では、フェノール化合物が消失し、アミノ酸の量が非発酵よりも増えたことを意味する。

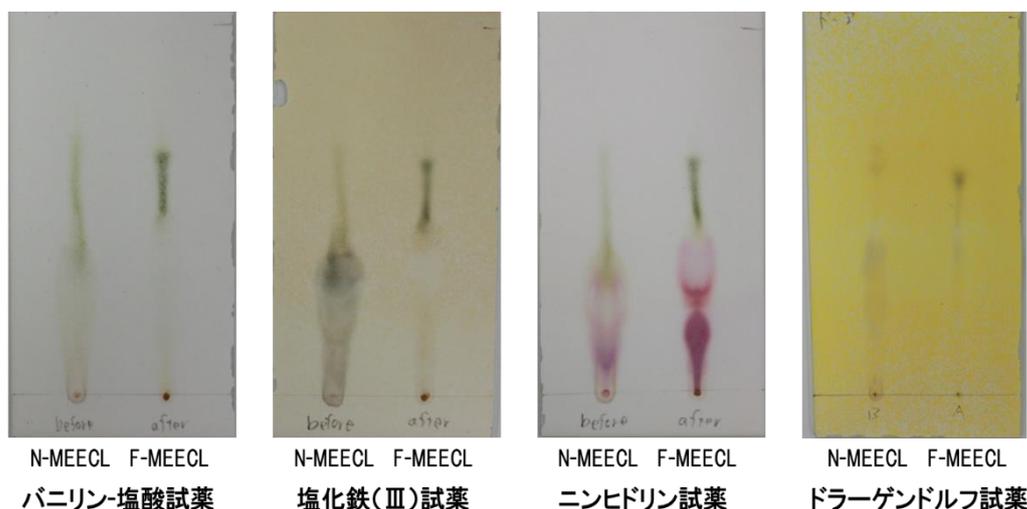


図 1-1HPTLC：発酵の有無による比較 展開溶媒 (アセトン：トルエン：ギ酸=3：3：1)

(2) 展開溶媒(n-ブタノール：酢酸：水=4：1：2)

展開溶媒としてn-ブタノール、酢酸、水を用いた HPTLC の結果を図 1-2 に示した。バニリン塩酸試薬発色は、N-MEECL では原点から中間にかけてわずかな発色が見られたが、F-MEECL ではほとんど発色が見られなかった。塩化鉄(Ⅲ)試薬発色は、N-MEECL では原点から中間にかけて発色が濃くなったが、F-MEECL ではわずかな発色しか見られなかった。ニンヒドリン試薬発色では N-MEECL、F-MEECL ともに原点から中間にかけて発色が見られた。また、発酵したことにより発色が濃くなった。ドラーゲンドルフ試薬発色では、N-MEECL、F-MEECL とも発色は見られなかった。

これらの結果から、N-MEECL には、フェノール化合物、アミノ酸が存在し、

F-MEECL では、フェノール化合物が消失し、アミノ酸の量が非発酵よりも増えたことを意味する。

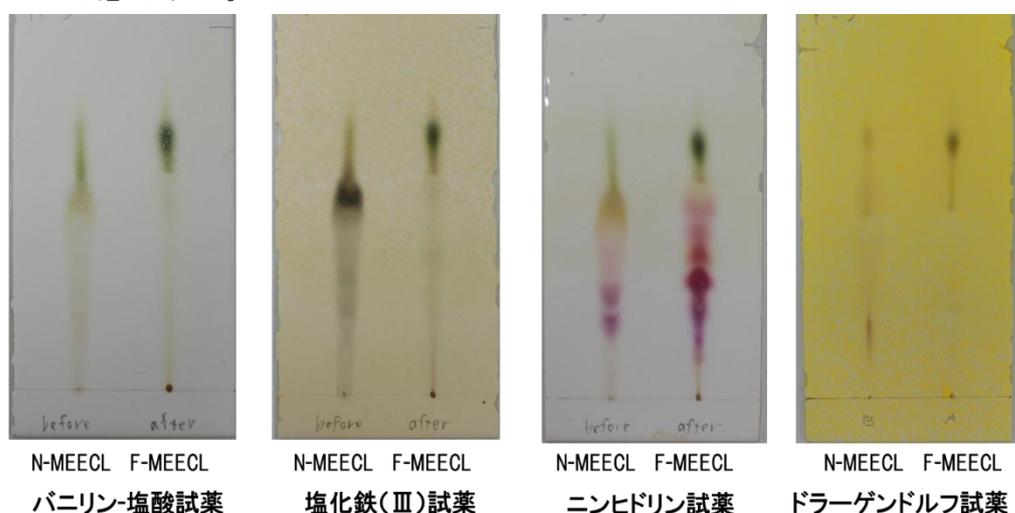


図 1-2 HPTLC：発酵の有無による比較 展開溶媒 (n-ブタノール：酢酸：水=4：1：2)

(3) 展開溶媒(フェノール：水=4：1)

展開溶媒としてフェノール、水を用いた HPTLC の結果を図 1-3 に示した。バニリン塩酸試薬発色では、N-MEECL は、原点から中間にかけてわずかな発色が見られたが、F-MEECL ではほとんど発色が見られなかった。塩化鉄(Ⅲ)試薬発色により N-MEECL では原点から中間にかけて発色が濃くなったが、F-MEECL ではわずかな発色しか見られなかった。また、加水分解による変化はみられなかった。ニンヒドリン発色では N-MEECL、F-MEECL とともに原点から中間にかけて発色が見られた。F-MEECL は N-MEECL と比べ、わずかに発色が濃くなり、加水分解によりさらに発色が濃くなった。ドラーゲンドルフ試薬発色では、N-MEECL、F-MEECL とともに発色は見られなかった。

これらの結果から、N-MEECL には、フェノール化合物、アミノ酸が存在し、F-MEECL では、フェノール化合物が消失し、アミノ酸の量が非発酵よりも増えたことを意味する。

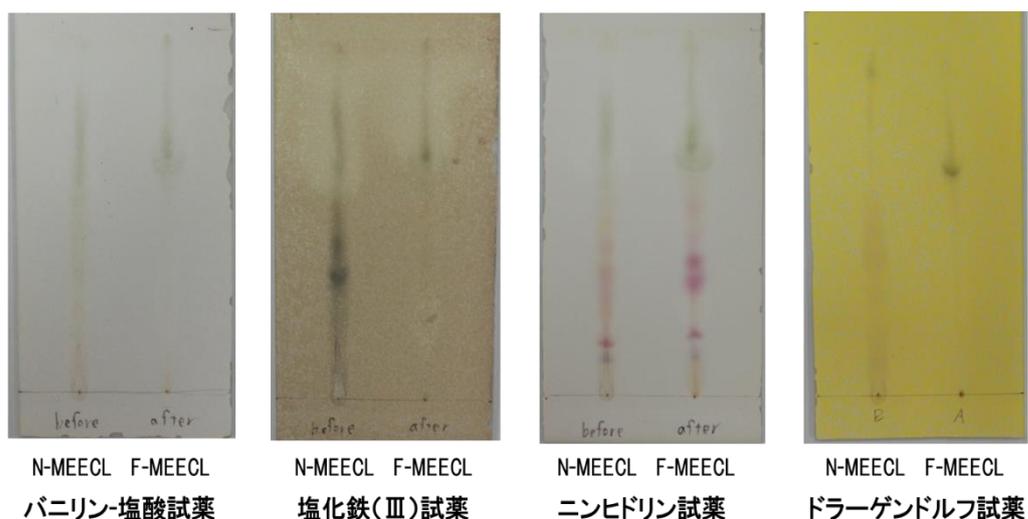


図 1-3 HPTLC：発酵の有無による比較 展開溶媒（フェノール：水＝4：1）

第3項 ポリフェノールの種類と量

(1) EC 新鮮葉に含まれる総ポリフェノール含量

非発酵 EC 葉の総ポリフェノール含量は、新鮮葉 100 g 当たり、水抽出画分 1568.2 ± 11.3mg、クロロホルム抽出画分 66.1 ± 3.2mg であった(図 2)。一方、乳酸発酵 25 日後の EC の総ポリフェノール含量は、新鮮葉 100 g 当たり、水抽出画分 48.0 ± 4.7mg、クロロホルム抽出画分 26.9 ± 1.6mg であった。

なお、発酵の経時的な総ポリフェノール量の変化は、水抽出画分は 3 日後に 469.0 ± 27.6mg、9 日後は 176.1 ± 0.9mg、18 日後では 49.3 ± 3.3mg と時間が経つにつれて減少し、発酵前と比較して 3.1%にまで減少した。クロロホルム抽出画分は、乳酸発酵 3 日後に 47.5 ± 4.1、9 日後は 28.4 ± 0.8mg、18 日後では 27.8 ± 3.3mg と発酵 9 日後以降はほぼ変化しなくなった。また、発酵前と比較して 40.7%へと減少した。

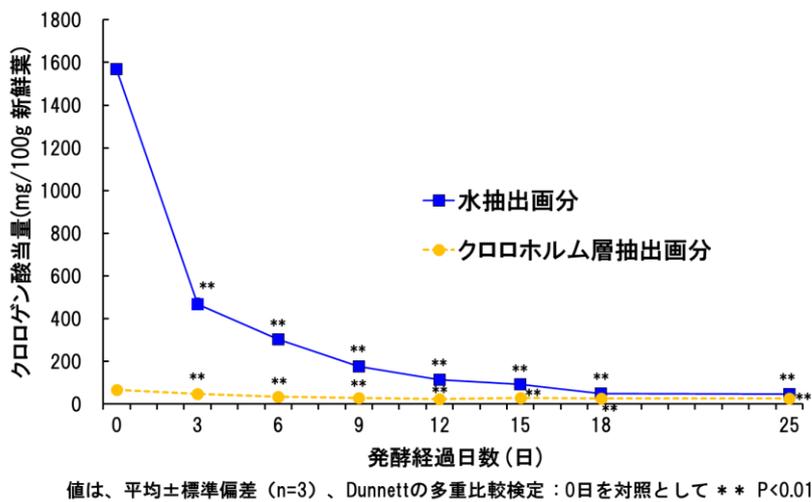


図 2. EC 新鮮葉の総ポリフェノール量の乳酸発酵による経時的変化

(2) MEECL に含まれる総ポリフェノール含量

N-MEECL の総ポリフェノール含量は、MEECL 1g 当たり、 255.1 ± 3.4 (mg/g) であった(図 3)。F-MEECL の総ポリフェノール含量は、 67.5 ± 0.1 (mg/g) であった。発酵前と比較して発酵後には、26.5%に減少した。

なお、ニラとほうれん草を用いて同様に 80%メタノール抽出物を調製してポリフェノール量を測定した結果、ニラでは、 9.5 ± 0.2 (mg/g)ほうれん草では、 17.6 ± 0.2 (mg/g)の結果が得られた。

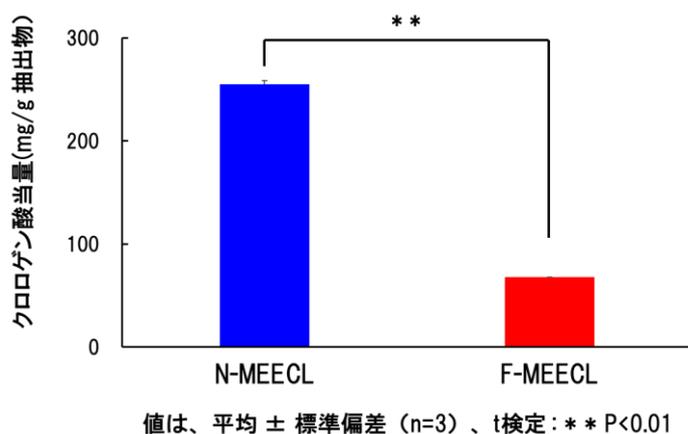
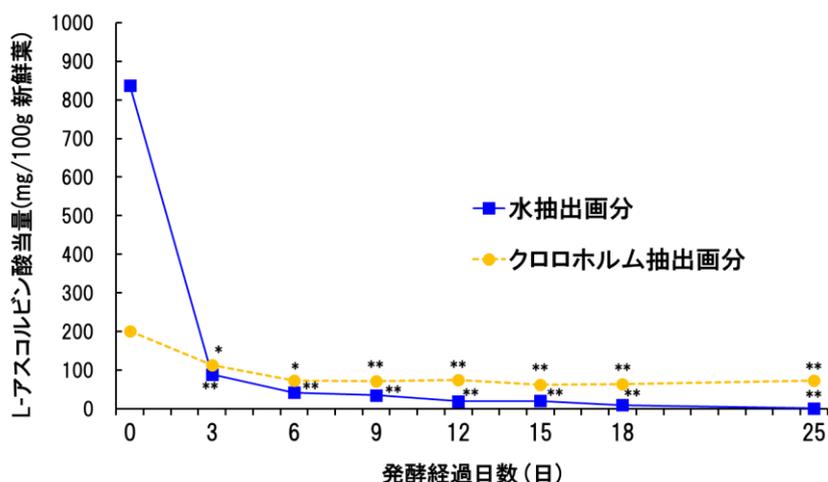


図 3. MEECL の総ポリフェノール量 (非発酵・発酵との比較)

(3) EC 新鮮葉の DPPH ラジカル捕捉活性

発酵前の EC 葉の抗酸化能 (L-アスコルビン酸 (ASA) 当量) は、新鮮葉 100 g 当たり、水抽出画分 837.2 ± 3.9 (mg/g) ASA、クロロホルム抽出画分 200.3 ± 0.8 (mg/g) ASA であった (図 4)。一方、乳酸発酵 25 日後の EC 葉の抗酸化能、新鮮葉 100 g 当たり、水抽出画分 0.7 ± 0.3 mg、クロロホルム抽出画分 73.4 ± 5.1 mg であった。なお、発酵の経時的な抗酸化能の変化は、水抽出画分は 3 日後に 89.1 ± 4.4 mg、6 日後は 42.0 ± 2.6 mg、9 日後は 35.0 ± 3.8 mg、18 日後では 9.2 ± 8.6 mg と最初の 6 日間で大きく減少し、その後ゆるやかに減少し、発酵 25 日目では、発酵前と比較して 0.1% にまで減少した。一方、クロロホルム抽出画分は、乳酸発酵 3 日後に 113.3 ± 0.7 mg、6 日後は 73.0 ± 0.1 mg、9 日後は 72.1 ± 7.2 mg、18 日後では 63.5 ± 7.7 mg と水抽出画分と同様、6 日間で大きく減少し、その後ゆるやかに減少し、発酵 25 日目では、発酵前と比較して 36.6% まで減少した。また、発酵 3 日以降は、クロロホルム抽出画分の方が水抽出画分よりも DPPH ラジカル捕捉活性は高値となった。



値は、平均±標準偏差 (n=3)、Dunnettの多重比較検定: 0日を対照として * P<0.05, ** P<0.01

図 4. EC 新鮮葉の DPPH ラジカル捕捉活性の乳酸発酵による経時的変化

(4) MEECL の DPPH ラジカル捕捉活性

N-MEECL の抗酸化能 (L-アスコルビン酸 (ASA) 当量) は、MEECL 1 g 当たり、 65.6 ± 0.0 (mg/g) ASA であった (図 5)。F-MEECL の抗酸化能は、 18.1 ± 0.4 (mg/g) であった。発酵前と比較して 27.6% に減少した。

なお、ニラとほうれん草を用いて同様に 80%メタノール抽出物を調製して抗酸化能を測定した結果、ニラでは、 1.4 ± 0.0 (mg/g)、ほうれん草では、 1.4 ± 0.0 (mg/g)、の結果が得られた。

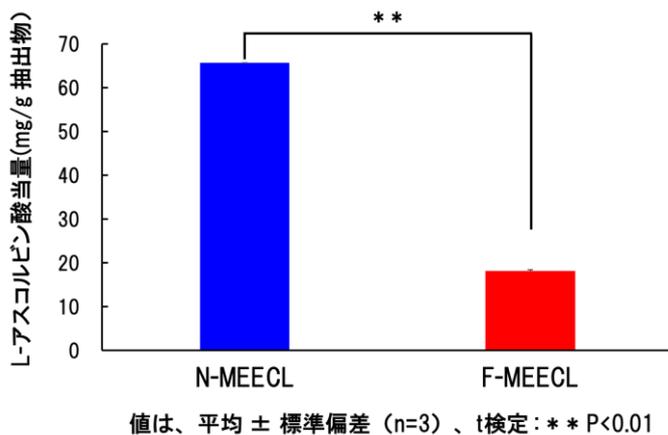


図 5. MEECL の DPPH ラジカル捕捉活性 (非発酵・発酵との比較)

(5) MEECL に含まれるポリフェノールの種類と量

N-MEECL、および F-MEECL に含まれる各種ポリフェノール量の分析結果を図 6 に示した。非発酵では、多い順に、抽出物 100g 当たりルチン 1872.1 ± 61.3 mg、クロロゲン酸 175.0 ± 10.6mg、ケルセチン 136.4 ± 3.5mg、ピセアタンノール 90.3 ± 4.9mg、ネオクロロゲン酸 69.0 ± 5.9mg であった。乳酸発酵後では、多い順にピセアタンノール 67.2 ± 0.6 mg、クロロゲン酸 4.8 ± 0.1mg、ネオクロロゲン酸 2.0 ± 0.4 mg であり、ケルセチン、ルチンはほとんど含まれなかった。ピセアタンノールは発酵により発酵前の 75%に減少し、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸も発酵前の約 3%に減少した。

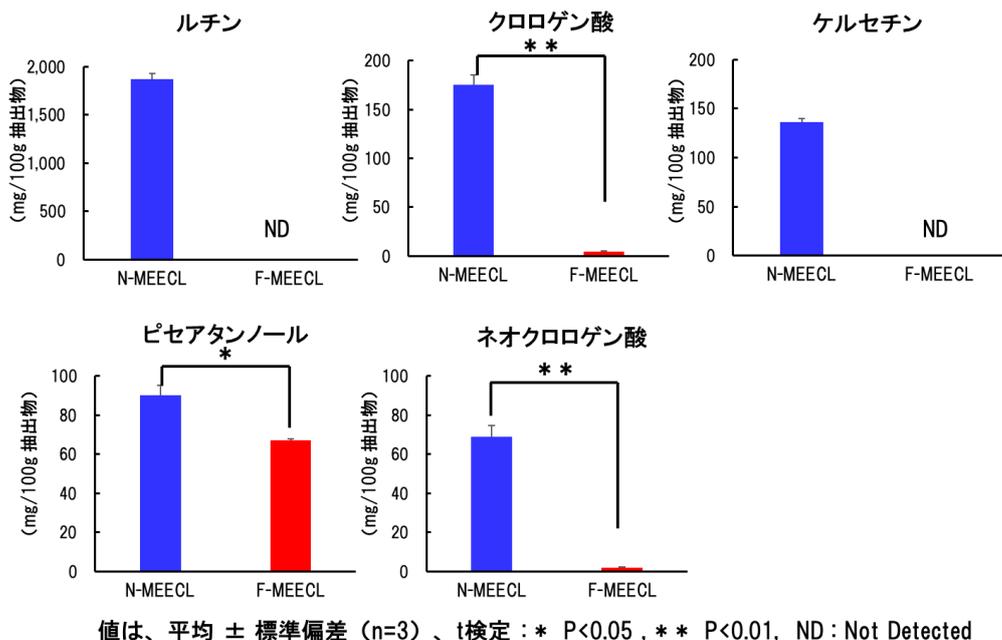


図 6. MEECL ポリフェノールの組成と量

第4項 遊離アミノ酸の種類と量

(1) MEECL 及びその加水分解物に含まれる総遊離アミノ酸量

N-MEECL、F-MEECL、N-MEECL 加水分解物、および F-MEECL 加水分解物に含まれる総遊離アミノ酸量の結果を図7に示した。各抽出物 100 g 当たり、N-MEECL は 8.5 ± 1.1 mg、F-MEECL は 9.4 ± 0.4 mg、N-MEECL 加水分解物は 13.5 ± 0.8 mg、F-MEECL 加水分解物は 14.8 ± 0.4 mg であった。発酵により約 10%、加水分解により 57~59% 総遊離アミノ酸量は増加した。

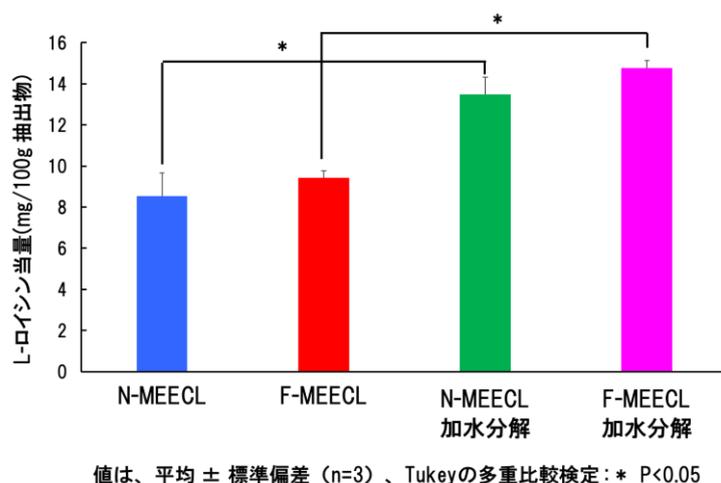


図7. MEECL に含まれる総アミノ酸量

(2) MEECL 及びその加水分解物に含まれる遊離アミノ酸の種類と量

各種遊離アミノ酸含量の分析結果を図8に示した。発酵により Gly、Ala、Leu、Ile、Glu、Tyr、Pro 含量が増加し、Ser、Asn、Trp 含量が減少した。加水分解により Gly、Glu、Asp 含量が増加し、Asn 含量が減少した。Asn が加水分解されて Asp が生成した。

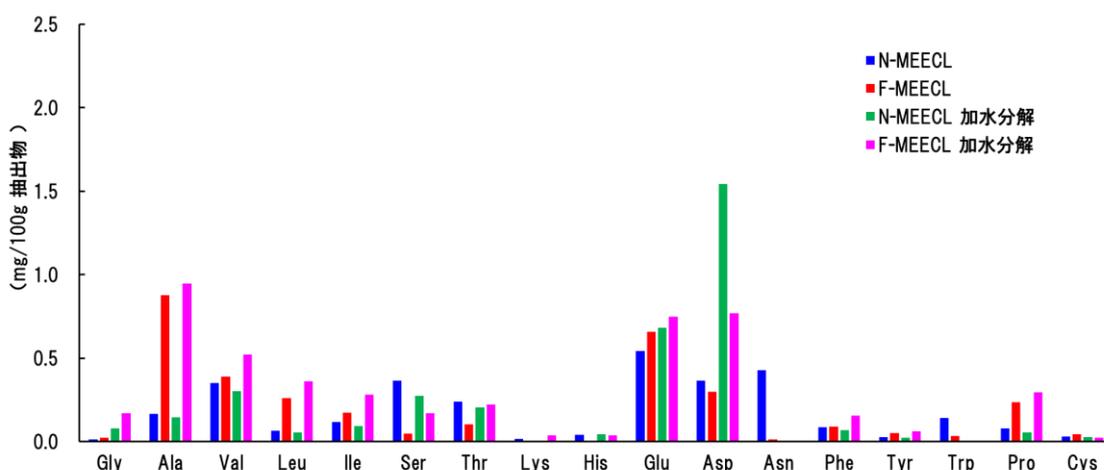


図 8. MEECL およびその加水分解物に含まれる遊離アミノ酸組成と量

第 4 節 考察

EC 葉部の栄養分析の報告は、ほとんどない。Jun らは、台湾産カンナの素タンパク質を乾物 100 当たり 8.9~11.8%、総灰分は、14.5~18.0%と報告している⁵⁶⁾。本研究の結果では、粗タンパク質は、非発酵葉で 24.6%、発酵葉で 25.8%、総灰分は、非発酵葉で 14.6%、発酵葉で 14.0%であった。Jun らの報告と比較して、粗タンパク質含量が高い結果を示した。この違いは、品種、産地、土壌、施肥の違い等が考えられる。一方、Okonwu らの報告⁵⁷⁾では、新鮮葉 100g 当たりで示しているが、カンナ葉のタンパク質含量は、4.6%であり、他の成分も我々の結果と同様の値を示している。

なお、タンパク質含量としては、アサツキ、菜花、豆苗、ブロッコリー、とうもろこし、タケノコのタンパク質含量⁵⁸⁾を超える高い含量あり、EC 葉部のタンパク質補給源としての価値も無視できない。

HPTLC による定性分析の結果から、MEECL には、非発酵の場合、フェノール性化合物の存在を示し、発酵によってフェノール性化合物は消失することが示された。また、MEECL には、アミノ酸の存在も認め、アミノ酸量は、発酵によって増加することが示された。なお、MEECL には、アミンやアルカロイドの存在が否定され、食用としての安全性も確保されることが示唆された。

本研究においては、EC 葉部に含まれる総ポリフェノール量および抗酸化能は、水抽出画分とクロロホルム抽出画分の両方を評価した。

EC 葉部中の総ポリフェノール量は、水抽出画分に溶出される化合物がほとんどで、非発酵 EC 葉部では、水抽出画分に 96.0%、クロロホルム抽出画分に 4.0%が存在した。EC 葉部の総ポリフェノール量の 2 種の抽出画分の結果から、MEECL

中の総ポリフェノールは、水溶性画分由来であると推定される。なお、野菜のうち、ニラとほうれん草の 80%メタノール抽出物の総ポリフェノール量と比較すると、MEECL 中の総ポリフェノール量がいかに多いかが理解できる。

N-MEECL に含まれる各種ポリフェノールのうち、ケルセチンとルチンは、乳酸発酵の過程でほぼ全部が分解されて残存せず、クロロゲン酸とネオクロロゲン酸は、僅かに残存していた。ピセアタンノールは、発酵の過程で 25%程度減少した。ピセアタンノールは、分子内に 4 つの水酸基を持ち、スチルベン骨格を持つポリフェノールの一つである。他の 4 種のポリフェノールと比較して、ピセアタンノールは乳酸菌により分解されにくいことが考えられた。

5 種類の発酵前の各種ポリフェノール重量の合計量に対する残存する各種ポリフェノール量の合計量は、3.2%であった。先に述べたように、N-MEECL 中の総ポリフェノールが発酵後の F-MEECL には、発酵前の量の 26.5%に減少した。この結果は、N-MEECL 中のポリフェノールとして、HPLC で同定した 5 種のポリフェノール以外にも、重量としておよそ 23%相当量の何らかのポリフェノールが存在することを意味する。

MEECL に含まれる化合物として、我々は、遊離アミノ酸に着目した。L-ロイシンを標準として測定した MEECL 中の遊離アミノ酸量は、発酵前と比較して、発酵後には 10%程度の増加が認められた。一方、N-MEECL および F-MEECL の遊離アミノ酸量は、加水分解前と比較して、加水分解後には 57~59%の増加が認められた。加水分解によって増加したアミノ酸は、ペプチドとして存在していたことが示唆された。

第3章 MEECL の機能性（抗肥満作用）

第 1 節 肥満研究の背景

第 1 項 肥満の現状

世界保健機関（WHO）は、肥満を「健康を損なう可能性のある異常または過剰な脂肪蓄積」と定義している。一般的に、肥満の判定は、[体重(kg)/身長(m²)]の計算によって求める体格指数（BMI : Body Mass Index）が用いられる。1830 年代にベルギーの数学者、社会学者によって開発され、現在でも肥満と肥満率の測定値として広く使用されている。WHO の区分では欧米人の疫学調査より BMI ≥ 30 を肥満、BMI ≥ 25 を過体重と判定している。肥満および過体重の者は、世界成人人口の 27.5%、子供の 47.1%であり、大人の 4 人に 1 人、子供の 2 人に 1 人が肥満および過体重に相当する⁵⁹⁾。1975 年には 1 億 500 万人しかい

なかった肥満の成人が、2014年には6億4100万人に達したと推定されており、40年間で約6倍になっている⁶⁰⁾。また、過体重と肥満は世界の死亡率において重要な危険因子の一つであり、肥満に関連する死亡者数は世界全体で少なくとも年間280万人に達する世界的にも深刻な公衆衛生問題の一つである⁶¹⁾。日本人にWHOの区分を適用すると、肥満は4.6%に過ぎない⁶²⁾。しかし、高血圧、脂質異常症、糖尿病とBMIの関連を調査した結果、 $20 \leq \text{BMI} < 24$ に対し、高血圧、高TG血症、低HDL-C血症のオッズ比が2倍になるのは、それぞれ約25、27、29⁶³⁾であり、WHOでは肥満の前段階である過体重でも合併症のリスクが高い。これらのことから、日本では $\text{BMI} \geq 25$ を肥満と定義している。令和元年度国民健康・栄養調査によると、20歳以上の日本人の肥満人口は、男性33.0%、女性22.3%と推計されている⁶²⁾。

第2項 肥満の原因

原因は多岐にわたり、過食などの単一の原因に帰結するのではなく、様々な環境要因や遺伝的要因により、肥満は引き起こされる。主な原因は、過食を含む食生活の乱れや運動不足である。日本では、1970年代に食の欧米化が急速に進み、脂肪エネルギー比率が20%を超えた以降、肥満者が急増している⁶⁴⁾。また、朝食や夕食の欠食、就寝前の飲食により肥満の発生率上昇する^{65,66,67)}ことが報告されている。運動不足は、消費エネルギーの減少の観点からも肥満の要因となる。WHOによる調査によると、世界人口の28%以上が運動不足であると報告されている⁶⁸⁾。新型コロナウイルス(Covid-19)パンデミックの際のロックダウン政策やステイホームは、世界中の活動レベルの低下に影響を与えた。さらに、運動不足は消費エネルギーの約30%を占める活動代謝を減少させるだけでなく、筋肉量を減少させ、基礎代謝の減少をもたらす。また、脂肪酸酸化酵素(ヒドロキシアシル CoA デヒドロゲナーゼ: HADH)、及び脂肪酸トランスポーター(SLC25A20)の遺伝子発現量の低下を引き起こし⁶⁹⁾、体内に貯蔵された脂肪分解が低下する。その他、睡眠不足によるグレリン濃度上昇に伴う食欲亢進⁷⁰⁾、自律神経機能低下による熱産生能の低下、薬の副作用、心理的ストレス、等⁷¹⁾も肥満の原因となる。

第3項 肥満の合併症

肥満は、脂肪組織に脂肪が過剰に蓄積した状態である。脂肪組織は、単なるエネルギーの貯蔵庫と考えられてきたが、食物摂取、グルコース処理、インスリン感受性、熱産生、免疫応答の調節など、全身のエネルギーの恒常性の調節

に重要な役割を果たしている⁷²⁾。ヒトを含めた哺乳動物には褐色と白色の2種類の脂肪細胞が存在する。多房性の小型脂肪滴を含み、ミトコンドリアが豊富な褐色脂肪細胞は、貯蔵した脂質を積極的に分解し、エネルギーを産生するとともに熱を産生し、体温調節、エネルギー消費、体脂肪の調節に寄与する。一方、単房性の大型脂肪滴を含み、ミトコンドリアが少ない白色脂肪細胞は、内臓や皮下など全身にみられ、エネルギーを中性脂肪として蓄積し、飢餓への備えとする。さらには、アディポサイトカインを分泌する巨大な内分泌産生臓器であることが明らかになっている。アディポサイトカインを分泌することで、糖・脂質代謝、動脈壁の恒常性を維持するのに重要な役割を担っている。しかし、脂肪の蓄積、特に内臓脂肪に過度な蓄積が起こると、脂肪細胞が肥大・増殖し、アディポサイトカインの分泌異常が起こる。アディポサイトカインは一般的に脂肪細胞の蓄積と正の相関を示し、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、線溶系調節因子 (PAI-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、レジスチン、レプチンなどの様々な炎症性アディポサイトカインを分泌する。これらの過度な分泌により糖尿病、高血圧症、動脈硬化症といった生活習慣病発症するリスクが上昇する。一方、良性のアディポサイトカインの一つであるアディポネクチンは脂肪細胞の蓄積と負の相関を示し、アディポネクチンの分泌低下がさらに身体にとって、好ましくない方向へと進ませる。

近年、急速な高齢化に伴い、同時に肥満者が増加することで、疾病全体に占める2型糖尿病、脂肪性肝疾患、高血圧、心筋梗塞、脳卒中、認知症、変形性関節症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、がん（乳がん、大腸がん、前立腺がんなど）などの病気の罹患率を高め⁷³⁾、生活の質と寿命の低下を招いている。また、肥満は、うつ病や自尊心の低下といった心理的問題を引き起こすこともある⁷⁴⁾。このように肥満は、身体的・精神的変化だけでなく、重篤で生命を脅かす可能性のある症状を引き起こす可能性がある。

第4項 抗肥満作用のメカニズム

(1) 消化酵素阻害

白色脂肪細胞における中性脂肪の蓄積は、グルコースと遊離脂肪酸の取り込みにより開始される。そのため、糖質や脂質の消化吸収を抑制することが重要である。この抑制手段の一つが消化酵素阻害である。食品中の糖質は主にデンプンや二糖類であり、デンプンは唾液や膵液に含まれる α -アミラーゼにより二糖類のマルトースにまで分解され、小腸粘膜上で単糖類にまで分解された後、吸収される。ラクトースやスクロースなどの二糖類も同様に小腸粘膜上で単糖類に分解後、吸収される。これら二糖類を単糖類に分解する酵素を α -グルコ

シダーゼという。α-グルコシダーゼ活性を抑制することで、糖質の消化吸収率を低下する。また、食品中の脂質の大部分を占める中性脂肪は、胆汁の働きにより乳化された後、リパーゼの働きによりエステル結合が切断され、モノアシルグリセロールと脂肪酸に分解後、吸収される。リパーゼ活性を抑制させることで、脂質の消化吸収率を低下する。消化酵素の阻害は、抗肥満材としての天然物の潜在的な有効性を判断するために最も広く研究されているメカニズムの一つで、α-グルコシダーゼ阻害剤であるアルカボースの投与による脂肪サイズの減少や脂肪酸合成酵素アセチル CoA カルボキシラーゼ活性の低下が報告されている⁷⁵⁾。また、代表的な消化酵素阻害薬オルリスタットはリパーゼ阻害薬として、食品医薬品局に認可されている⁷⁶⁾。

(2) 褐色脂肪細胞による熱産生

褐色脂肪細胞は脂肪を分解することにより熱を産生し、体温調節、全身エネルギー消費、体脂肪調節に寄与している。褐色脂肪細胞による熱産生は、寒冷刺激により、温度感受性 (TRP) チャネルで信号を受け取ることにより開始する。その情報が脳へと伝わり、交感神経の活動亢進し、ノルアドレナリンが放出される。ノルアドレナリンが脂肪組織上のβアドレナリン受容体に結合することで、ホルモン感受性リパーゼの働きにより脂肪酸が遊離し、熱産生の基質となると同時に熱産生タンパク質 (uncoupling protein 1: UCP1) を活性化し、熱産生が起こる。寒冷刺激以外にも、リポ多糖や内因性発熱物質 (IL-1β) の投与や拘束ストレスにより熱産生が誘発される⁷⁷⁾。また、唐辛子の辛味成分カプサイシン、ショウガに含まれるパラドール、茶カテキン等の食品成分摂取により、褐色脂肪細胞の熱産生が亢進する⁷⁸⁾ことが報告されており、特定の食品成分摂取による抗肥満への寄与が期待されている。

(3) β-酸化亢進

β-酸化は、肝臓や骨格筋において、脂肪酸をエネルギーに変換する過程であり、血糖値がある程度低下したときに起こる。脂肪組織はアドレナリンやグルカゴンなどのホルモンからシグナルを受け取り、ホルモン感受性リパーゼが活性化され、脂肪組織内の中性脂肪がグリセロールと脂肪酸に分解される。グリセロールは糖新生の材料となり、脂肪酸はアシル CoA に変換され、カルニチンと結合し、アシルカルニチンに変換され、最終的にミトコンドリアやペロキシソームに入り、再びアシルCoAに変換される。ここで、大量のアセチルCoAが生成され、クエン酸回路や電子伝達系を経て、最終的にATPが生成される。肥満患者は、β-酸化が低下している⁷⁹⁾こと、また、脂肪細胞におけるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT1) 等、β-酸化関連遺伝子の発現過

剩により、肥満における中性脂肪を減少させる⁸⁰⁾ことが報告されている。近年、ポリフェノールやプロバイオティクスに β -酸化の亢進作用が示唆されており、抗肥の改善に寄与することが期待されている⁸¹⁾。

第5項 抗肥満作用を持つ食材の意義

薬剤による肥満の治療には、多くの副作用が見られる。近年、食品機能成分として、消化酵素阻害、 β -酸化亢進作用を有するポリフェノールが注目されている。肥満予防には、抗肥満作用を有する食材の継続的な摂取が有効であると考えられている。そのため、副作用のリスクが大きくなり、抗肥満作用を有する食品を探索する意義は大きい。

第2節 MEECL の抗肥満機能に関する研究の目的

抗肥満に関する機能性を明らかにするために、MEECL を用い、*in vitro* において α -グルコシダーゼ及びリパーゼ阻害試験、*in vivo* で体重変化量、糞中脂質、血清生化学因子、肝臓中脂質、 β -酸化遺伝子発現量を指標に評価し、抗肥満作用の有無及びそのメカニズムを解明することを目的とした。

第3節 方法 (*in vitro*)

第1項 消化酵素阻害活性の測定

(1) MEECL の α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

0.1M マレイン酸緩衝液 (pH6.0) 300 μ L、ジメチルスルホキシドに溶解させた N-MEECL、F-MEECL およびその加水分解物 10 μ L (濃度 75mg/mL)、250mM マルトース、又はスクロース 100 μ L を混合し、これにラット空腸由来の粗 α -グルコシダーゼ画分 50 μ L を添加し、37°C で 30 分間反応させた後、沸騰水浴中に 2 分 30 秒間浸漬し、反応を停止させた。対照として、MEECL の代わりにジメチルスルホキシドを用いた。反応後に生成したグルコースの定量は、グルコース CII-テストワコー (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて行った。反応液 8 μ L を取り、これに発色液を含む緩衝液 150 μ L を添加して、30°C で 5 分間反応後、吸光度 (505nm) を、紫外可視分光光度計 (UV-1280、株式会社島津製作所) を用いて測定した。

(2) MEECL のリパーゼ阻害活性の測定

リパーゼ阻害活性の測定は、ブタ腭リパーゼ（ナカライテスク）およびリパーゼキット S（大日本住友製薬社）を使用した。測定方法は製造者の説明書を一部改変して行った。ジメチルスルホキシドに溶解させた N-MEECL、F-MEECL およびその加水分解物 10 μ L（濃度 10mg/mL）15 μ L、125mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5 に溶解した酵素溶液（ブタ腭リパーゼ 0.5mg/mL）8 μ L、発色液（5、5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）を含む緩衝液）50 μ L、基質液（三酪酸ジメルカプロール、ドデシル硫酸ナトリウムを含む）5 μ L を加え混和後、遮光下にて 30°C で 30 分間反応させた。その後、反応停止液 100 μ L を添加し、反応を停止させた。ブランクは、反応停止液を加えた後に基質液を添加した。吸光度（412nm）を、紫外可視分光光度計（UV-1280、株式会社島津製作所）を用いて測定した。

第 4 節 方法（*in vivo*:動物実験）

第 1 項 実験動物

本研究は、高知県立大学動物実験委員会の承認（承認番号 第 2021-4 号）を得た。動物実験は、高知県立大学動物実験規定に則して行った。動物実験室は、室温 24 \pm 2 °C、湿度 55 \pm 3 %、12 時間の明暗サイクル（明期は AM7:00~PM7:00、暗期は PM7:00~AM7:00）で管理した。ブリーダーより導入したマウスは、MF 飼料（オリエンタル酵母工業）と飲水（水道水）を自由摂取させ、3 日間予備飼育し健全な動物を用いた。実験動物は、7 週齢の C57BL/6J 雄マウス（日本エスエルシー株式会社）を用いた。

第 2 項 飼育期間

飼育開始から解剖まで 48 日飼育した。飼育終了時の解剖は、絶食せずに行った。

第 3 項 実験飼料

実験飼料は、脂肪量を 40%とした高脂肪高シヨ糖食(HF)に非発酵カンナ葉抽出物を 1.0%(1.0%N)又は発酵カンナ葉抽出物を 1.0%(1.0%F)を添加した。対照として、AIN93G を基本とし、脂肪量を 7%とした低脂肪食(LF)、又は HF を与えた。AIN93G（普通食）を基本とし、1.0%の非発酵 MEECL 及び発酵 MEECL を添加し、それぞれ 1.0 %N 食、1.0 %F 食とした。飼料投与は、各群の毎日の摂取カロリー

一を同じようにし、水は自由摂取とした（表 2）飼料原料には、カゼイン（日本配合飼料株式会社）、L-シスチン（和光純薬工業株式会社）、コーンスターチ（株式会社丸三）、ショ糖（第一糖産業株式会社）、デキストリン（三晶株式会社）、とうもろこし油（ビタミン E フリー）（タマ生化学株式会社）、ラード（株式会社 ADEKA）、セルロースパウダー（オリエンタル酵母工業株式会社）、AIN-93G ミネラル混合（オリエンタル酵母工業株式会社）、AIN-93 ビタミン 重石酸コリン含有（オリエンタル酵母工業株式会社）、第三ブチルヒドロキノン（和光純薬工業株式会社）を用いた。

表 2. 飼料組成 (%)

飼料原料	AIN93G (LF)	AIN93G (HF)	1.0%N	1.0%F
食用カンナ葉抽出物	—	—	1	1
ミルクカゼイン	20	20	20	20
L-シスチン	0.3	0.3	0.3	0.3
コーンスターチ	63.1986	—	—	—
スクロース	—	13	13	13
デキストリン	—	17.1986	16.1986	16.1986
とうもろこし油	7	10	10	10
ラード	—	30	30	30
セルロースパウダー	5	5	5	5
AIN-93Gミネラル混合	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93Gビタミン混合	1	1	1	1
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
合計	100	100	100	100

第 4 項 解剖

飼育最終日に、絶食せずにイソフルランの吸入麻酔下において、心臓採血により脱血死させた。その後、肝臓、腎周囲脂肪、副睾丸周囲脂肪、腸間膜脂肪、盲腸を採取した。各臓器は、分析まで、-30°Cで保存した。

第 5 項 糞便中の脂質含有量の測定

飼育 43 日目に各群 8 匹のマウスが 24 時間に排泄した糞便を採取した。凍凍結乾燥させた糞便の一部をホモジナイザー（ヤマト科学株式会社 T10 basic）により均質化し、Folch ら⁸²⁾の方法に準じて、クロロホルム：メタノール（2：1）で脂質を抽出した。抽出溶媒を留去後、トリトン X-100 を 10%含むイ

ソプロパノールに溶解し、脂質成分を測定した。

(1) 糞便中のトリグリセリド量の測定

糞便中のトリグリセリド量は、トリグリセライド E-テストワコーを用いて測定した。測定原理は、Glycerol-3-phosphate Oxidase・N-Ethyl-N-3,5-dimethoxyaniline sodiumsalt (GPO・DASO) 法による。

第 6 項 血清生化学因子の解析

飼育期間終了後、イソフルランによる吸引麻酔下において、ヘパリン処理をした注射針とシリンジを用いて心臓採血を行った。得られた血液を $1,500\times g$ で 10 分間遠心分離し、血生を調製した。

(1) 血清グルコース濃度の測定

血清グルコース濃度は、グルコース CII-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。測定原理は、ムタロターゼ・glucose oxidase (GOD) 法による。

(2) 血清トリグリセリド濃度の測定

血清トリグリセリド量は、トリグリセライド E-テストワコーを用いて測定した。測定原理は、Glycerol-3-phosphate Oxidase・N-Ethyl-N-3,5-dimethoxyaniline sodiumsalt (GPO・DASO) 法による。

(3) 血清総コレステロール濃度の測定

血清コレステロール量は、コレステロール E-テストワコーを用いて測定した。測定原理は、コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法による。

第 7 項 肝臓中脂質含量の測定

採取した肝臓の一部をホモジナイザー（ヤマト科学株式会社 T10 basic）により均質化し、Folch ら⁸²⁾の方法に準じて、クロロホルム：メタノール（2：1）で脂質を抽出した。抽出溶媒を留去後、トリトン X-100 を 10%含むイソプロパノールに溶解し、脂質成分を測定した。

(1) 肝臓中のトリグリセリド量の測定

肝臓中のトリグリセリド量は、トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬

工業株式会社) を用いて測定した。測定原理は、GPO・DASO 法による。

(2) 肝臓中のコレステロール量の測定

肝臓中のコレステロール量は、コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。測定原理は、コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法による。

第 8 項 定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現の検討

(1) RNA 抽出

RNA は、PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) で抽出した。すなわち、組織片 100mg に対して、2-メルカプトエタノールを 18 μ L 混合した Lysis Buffer を 1.8mL 加えホモジナイズした後、2,600 \times g、室温、5 分間遠心分離し、上清 1.5mL を回収した。回収した上清液に対して、70%エタノールを 1.5mL 加え、よく混合した。スピナーカートリッジに混合液を 600 μ L 加え、12,000 \times g、室温、15 秒間遠心分離し、カラムを通過した液は廃棄した。この操作は、混合液が無くなるまで繰り返した。その後、スピナーカートリッジに Wash Buffer1 を 700 μ L 加え、12,000 \times g、室温、15 秒間遠心分離し、カラムを通過した液は廃棄した。スピナーカートリッジを新しいコレクションチューブに移し替えた後、99.5%エタノールで調整した Wash Buffer2 を 500 μ L 加え、12,000 \times g、室温、15 秒間遠心分離し、カラムを通過した液は廃棄した。この操作は、2 回行った。12,000 \times g、室温、1 分遠心分離し、カラムを乾燥させ、スピナーカートリッジをリカバリーチューブに移し替えた。RNase-free water を 100 μ L 加え、1 分静置した後、12,000 \times g、室温、2 分遠心分離し、RNA 溶液を得た。

(2) 逆転写反応

得られた RNA 溶液から、PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて逆転写を行って cDNA を作成した。基本的な反応液の組成を以下に示す。

- 5 \times PrimeScript Buffer : 2 μ L
- PrimeScript RT Enzyme Mix I : 0.5 μ L
- Oligo dT Primer : 0.5 μ L
- Random 6 mers : 2 μ L
- RNase Free dH₂O : 1 μ L

上記の試薬を混合し、Master Mix を調製した。PCR チューブに Master Mix を

6 μ L と RNA 溶液を 5 μ L 加え、混合しスピンドウンを行った。37°C で 15 分間逆転写反応を行った後、85°C で 5 秒間処理して逆転写酵素を不活化し、cDNA 溶液を得た。

(3) リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、5' -ヌクレアーゼ法に基づき、Probe qPCR Mix (TaKaRa) を用いて行った。モニタリング試薬として、TaqMan[®]プローブ (Thermo Fisher Scientific) を用いて各遺伝子の発現量を定量した。基本的な反応液の組成を以下に示す。

- Probe qPCR Mix : 10 μ L
- ROX Reference Dye : 0.4 μ L
- 滅菌精製水 : 6 μ L
- TaqMan[®]プローブ : 0.8 μ L

上記の試薬を混合し、Master Mix を調製する。PCR チューブに Master Mix を 17.2 μ L と cDNA 溶液を 2 μ L 加え、混合しスピンドウンを行う。その後、7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、95°C (30 秒間) の初期変性を行い、95°C (5 秒間)、60°C (31 秒間) のアニーリングを 44 サイクル行う。得られた結果は、内部標準として用いたアクチンで補正し、各種遺伝子の発現量を比較する。以下に使用する TaqMan[®]プローブを示す。

- MCAD : Mm00431611_m1
- ACOX1 : Mm00443579_m1

第 5 節 結果 (*in vitro*)

第 1 項 消化酵素阻害活性

(1) MEECL の α -グルコシダーゼ阻害活性 (基質 : マルトース)

MEECL およびその加水分解物の基質をマルトースとしたときの α -グルコシダーゼ阻害活性を図 9 に示した。N-MEECL、F-MEECL およびその加水分解物の α -グルコシダーゼ阻害率は、75mg MEECL/mL のとき、N-MEECL は 25.24 \pm 0.22%、N-MEECL 加水分解物は 14.04 \pm 0.95%、F-MEECL は 13.47 \pm 0.36%、F-MEECL 加水分解物は 6.90 \pm 0.18%であった。発酵により約 50%、加水分解により約 50% α -グルコシダーゼ阻害率は低下した。

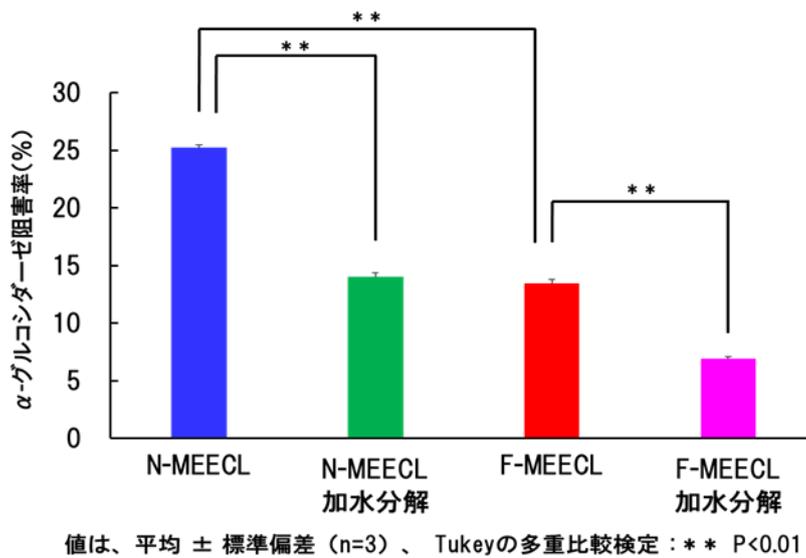


図9. MEECLの α -グルコシダーゼ阻害活性 (基質: マルトース)

(2) MEECLの α -グルコシダーゼ阻害活性 (基質: スクロース)

MEECL およびその加水分解物の基質をスクロースとしたときの α -グルコシダーゼ阻害活性を図10に示した。N-MEECL、F-MEECL およびその加水分解物の α -グルコシダーゼ阻害率は、75mg MEECL/mL のとき、N-MEECLは42.5 ± 1.0%、N-MEECL加水分解物は20.9 ± 1.1%、F-MEECLは21.4 ± 0.4%、F-MEECL加水分解物は10.8 ± 0.8%であった。発酵により約50%、加水分解により約50% α -グルコシダーゼ阻害率は低下した。

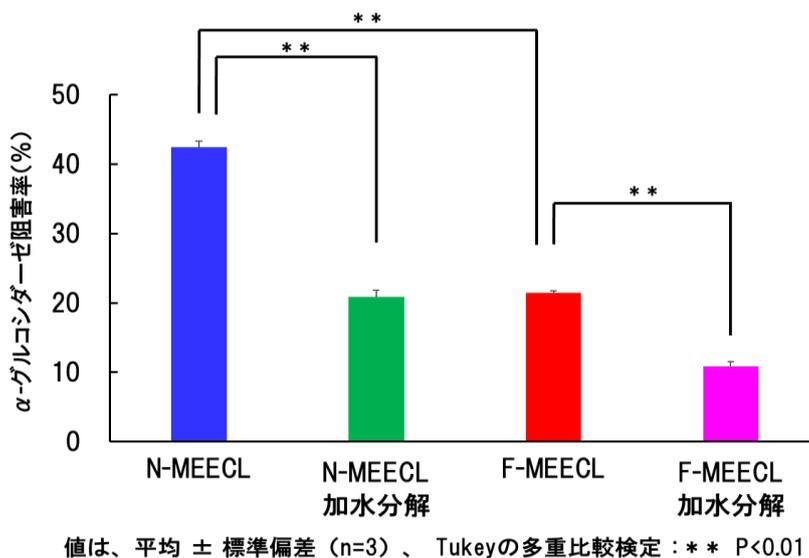


図10. MEECLの α -グルコシダーゼ阻害活性 (基質: スクロース)

(3) MEECL のリパーゼ阻害活性

MEECL およびその加水分解物のリパーゼ阻害活性を図 11 に示した。N-MEECL、F-MEECL およびその加水分解物の α -グルコシダーゼ阻害率は、10mg MEECL/mL のとき、N-MEECL は $61.0 \pm 2.2\%$ 、N-MEECL 加水分解物は $12.2 \pm 0.4\%$ 、F-MEECL は $38.9 \pm 1.2\%$ 、F-MEECL 加水分解物は $6.6 \pm 0.5\%$ であった。発酵により約 40%、加水分解により約 80% リパーゼ阻害率は低下した。

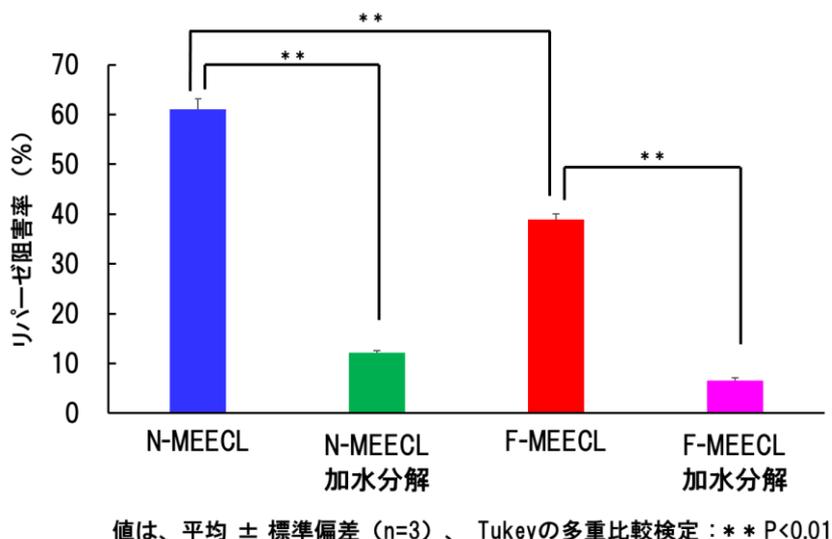


図 11. MEECL のリパーゼ阻害活性

第 6 節 結果 (*in vivo*:動物実験)

第 1 項 飼料摂取量

(1) 飼育期間中の総摂取飼料量

48 日の飼育期間における飼料の総摂取量は、1 匹当たり、LF 食では、208 g、HF 食、1.0%N 食、および 1.0%F 食では、147 g であった(表 3)。

(2) 飼育期間中の総摂取エネルギー量

48 日の飼育期間における飼料の総エネルギー量は、1 匹当たり、LF 食では、823kcal、HF 食、1.0%N 食、および 1.0%F 食では、823kcal であった(表 3)。

表 3. 飼育期間中の摂取飼料

	LF	HF	1.0%N	1.0%F
摂取飼料量 (g/匹/48日)	208	147	147	147
摂取エネルギー量 (kcal/匹/48日)	823	823	823	823

各値は、1匹あたりの平均値

第 2 項 糞便排泄への影響

(1) 糞便採取日の飼料摂取量

糞採取日の飼料摂取量は、1 匹当たり、LF 食では、4.68 g、HF 食、1.0%N 食、および 1.0%F 食では、3.30 g であった(表 4)。

(2) 糞便採取日の摂取脂質量

糞採取日の脂質摂取量は、飼料摂取量から計算して、1 匹当たり、LF 食では、0.33 g、HF 食、1.0%N 食、および 1.0%F 食では、1.32 g であった(表 4)。

(3) 糞便採取日の脂質由来の摂取エネルギー量

糞採取日の脂質摂取量は、脂質 1g あたり 9kcal として計算すると、飼料摂取量から、1 匹当たり、LF 食では、2.97kcal、HF 食、1.0%N 食、および 1.0%F 食では、11.88kcal であった(表 4)。

表 4. 糞便採取日の摂取飼料

	LF	HF	1.0%N	1.0%F
糞便採取日の摂取飼料量 (g/匹/日)	4.68	3.30	3.30	3.30
糞便採取日の摂取脂質量 (g/匹/日)	0.33	1.32	1.32	1.32
糞便採取日の脂質由来の 摂取エネルギー量(kcal/匹/日)	2.97	11.88	11.88	11.88

各値は、1匹あたりの平均値

(4) 糞便量

凍結乾燥後の糞の重量から、一日当たりの糞便量は、1 匹当たり、LF 食では、0.2571 g、HF 食では、0.0911 g、1.0%N 食では 0.1356 g、1.0%F 食では、0.1372 g であった(表 5)。

(5) 糞便中トリグリセリド量

糞便中の脂質に含まれるトリグリセリド量は、LF 食では、0.29mg、HF 食では、0.18mg、1.0%N 食では、0.14mg、1.0%F 食では、0.35mg であった(表 5)。

(6) トリグリセリド排泄率

糞便中の脂質に含まれるトリグリセリド排泄率は、0.09%、HF 食では、0.01%、1.0%N 食では、0.01%、1.0%F 食では、0.03%であった(表 5)。

表 5. 糞便中の脂質量と排泄率

	LF	HF	1.0%N	1.0%F
糞便量 (g/匹/日)	0.2571	0.0911	0.1356	0.1372
糞便中トリグリセリド量 (mg/匹/日)	0.29	0.18	0.14	0.35
トリグリセリド量 (%)	0.09	0.01	0.01	0.03

各値は、1匹あたりの平均値

第 3 項 体重への影響

(1) 体重増加量への影響

図 12 にマウスの体重変化について結果を示した。試験開始後 8 日頃から HF 食、1.0% N 食、1.0% F 食の体重増加が大きくなった。その後、31 日目頃より、HF 群の体重増加がさらに大きくなった。

図 13 に、試験開始日から試験最終日までの体重増加量を示した。1.0% N 食、および 1.0% F 食が HF 食と比較して僅かに低値を示したが、有意ではなかった。

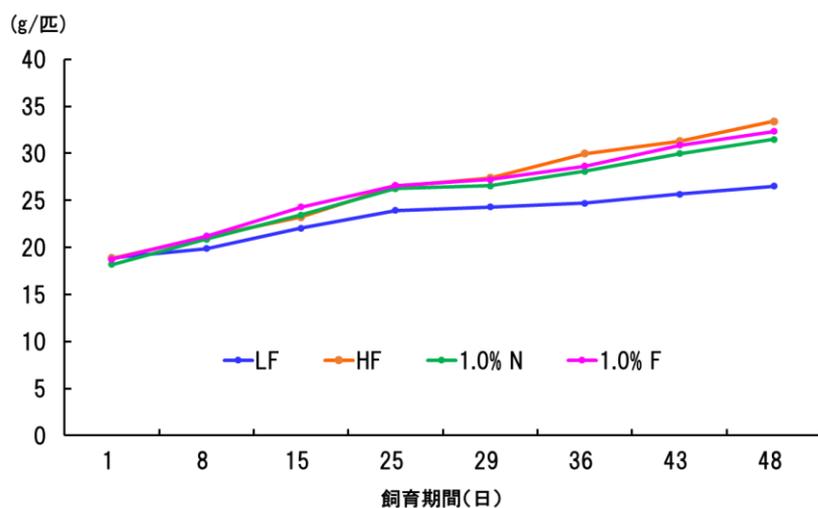


図 12. 飼育期間中の体重変化

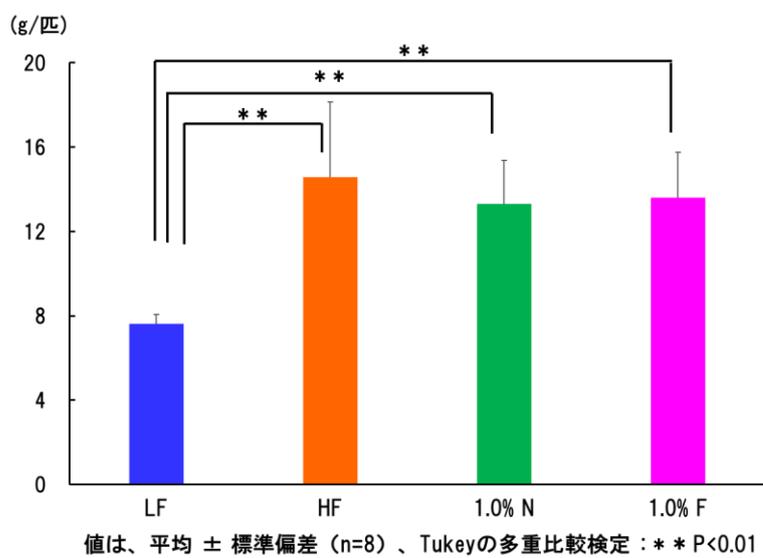


図 13. 体重増加量への影響

第4項 体脂肪蓄積への影響

(1) 副睾丸脂肪蓄積への影響

LF食と比較して、HF食、1.0% N食、及び1.0% F食で有意に高値となった(図14)。

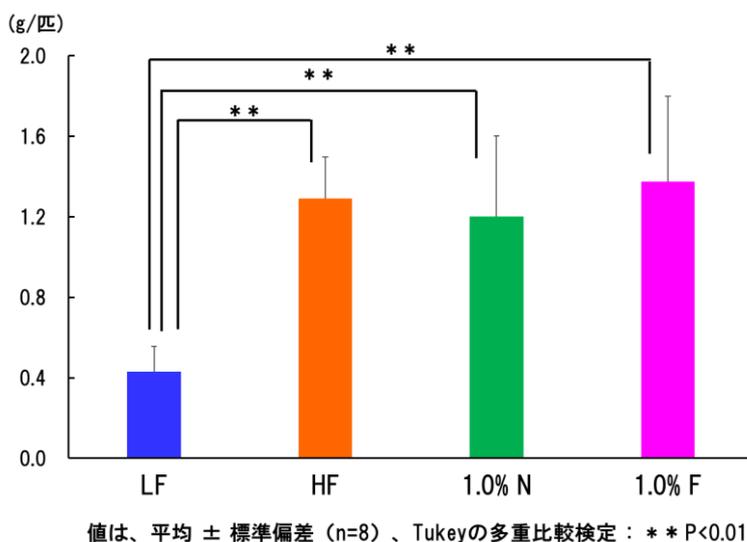


図14. 副睾丸脂肪蓄積への影響

(2) 腎周囲脂肪蓄積への影響

LF食と比較して、HF食、1.0% N食、及び1.0% F食で有意に高値となった(図15)。HF食、1.0% N食、及び1.0% F食の間には、有意差は認められなかった。

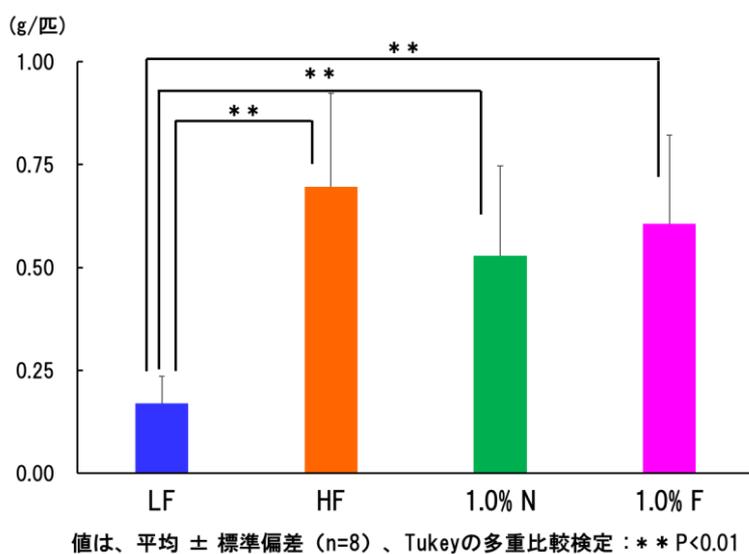


図15. 腎周囲脂肪蓄積への影響

(3) 腸間膜脂肪蓄積への影響

LF食と比較して、HF食、1.0% N食、及び1.0% F食で有意に高値となった(図16)。HF食、1.0% N食、及び1.0% F食の間には、有意差は認められなかった。

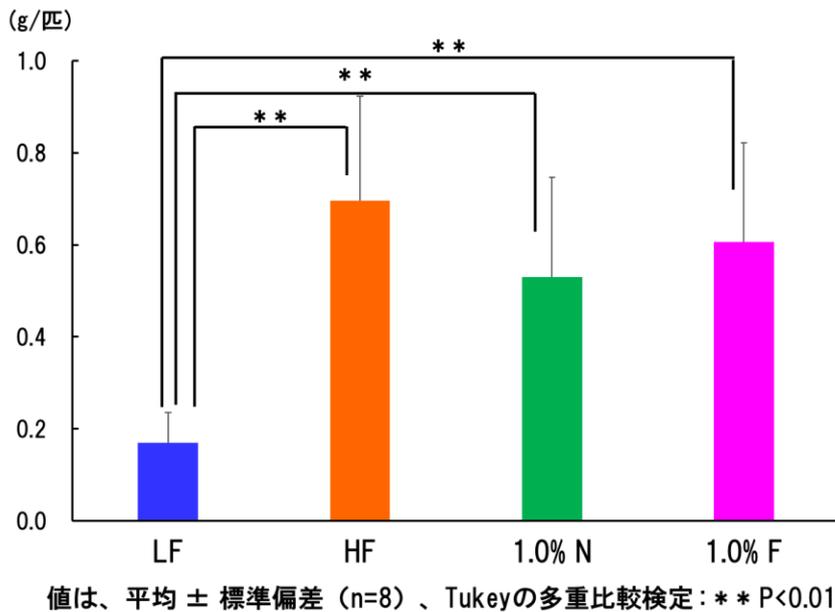


図 16. 腸間膜脂肪蓄積への影響

(4) 内臓脂肪蓄積への影響

LF食と比較して、HF食、1.0% N食、及び1.0% F食で有意に高値となった。また、HF食と比較して1.0% N食で有意に低値を示した(図17)。

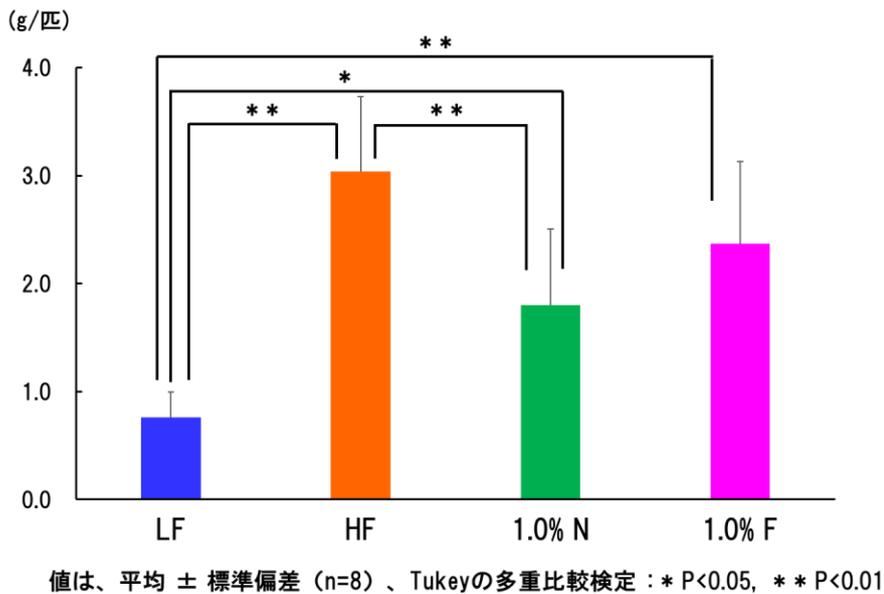


図 17. 内臓脂肪蓄積への影響

第5項 血清生化学因子への影響

(1) 血清グルコース濃度への影響

血清グルコース濃度については、4群間に有意な差は認められなかった（図18）。

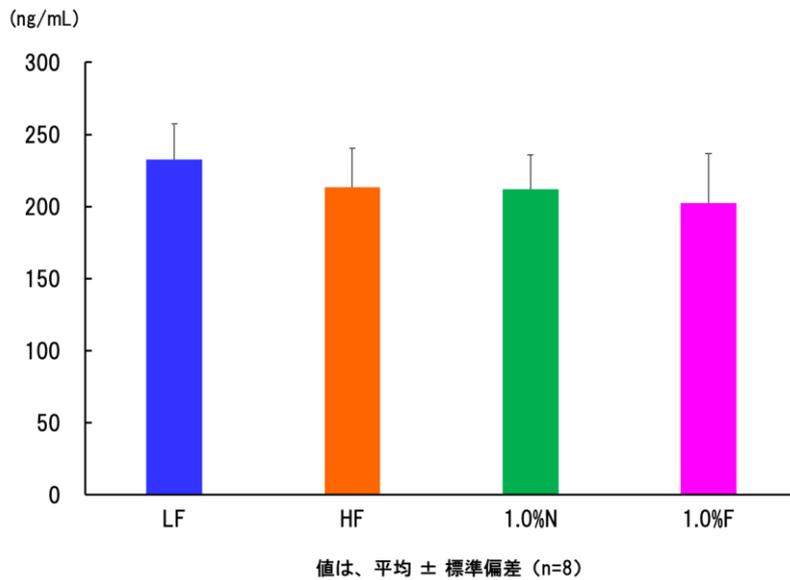


図18. 血清グルコース濃度

(2) 血清トリグリセリド濃度への影響

血清トリグリセリド濃度は、LF食と比較して、HF食、及び1.0%F食で有意に高値を示した（図19）。

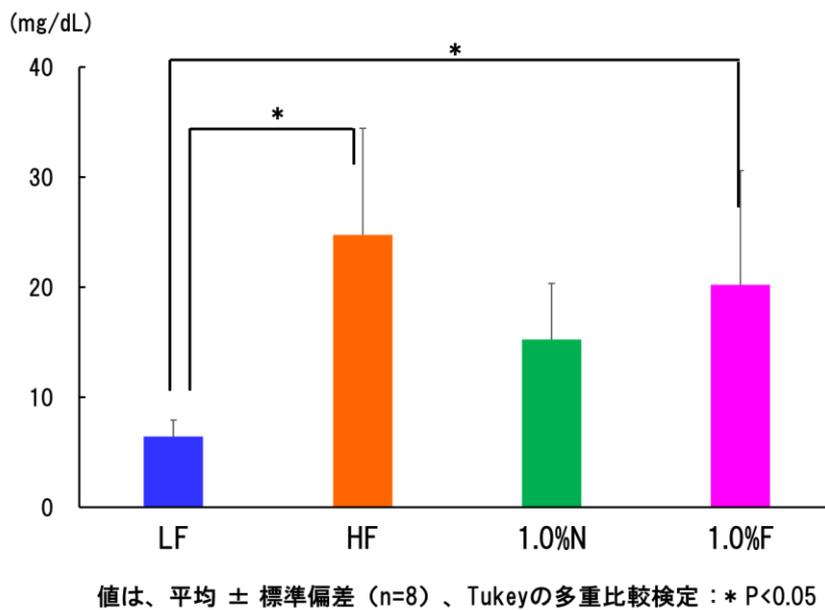


図19. 血中トリグリセリド濃度

(3) 血清総コレステロール濃度への影響

血清総コレステロール濃度は、LF 食と比較して、HF 食、及び 1.0% N 食で有意に高値を示した (図 20)。

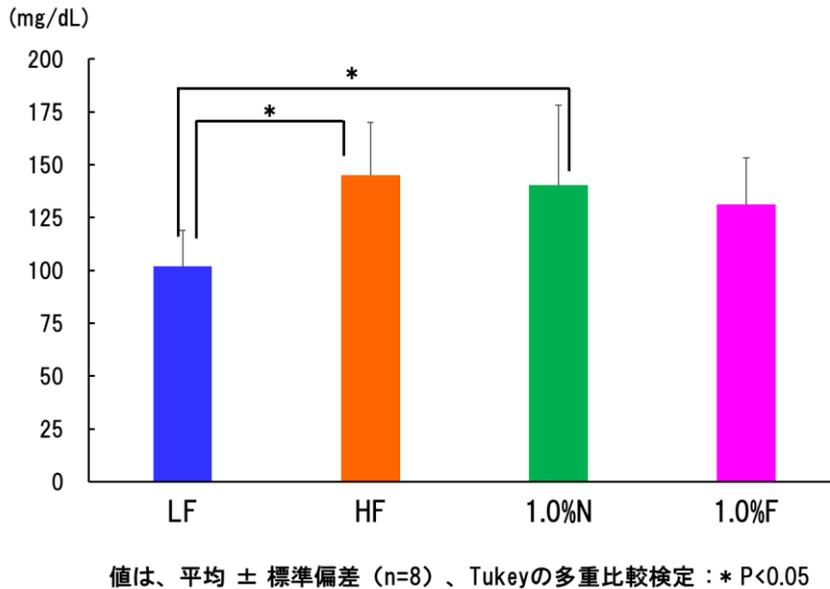


図 20. 血清総コレステロール濃度

第 6 項 肝臓への影響

(1) 肝臓重量への影響

肝臓重量は、LF 食と比較して、HF 食、1.0% N 食、及び 1.0% F 食で有意に高値となった (図 21)。

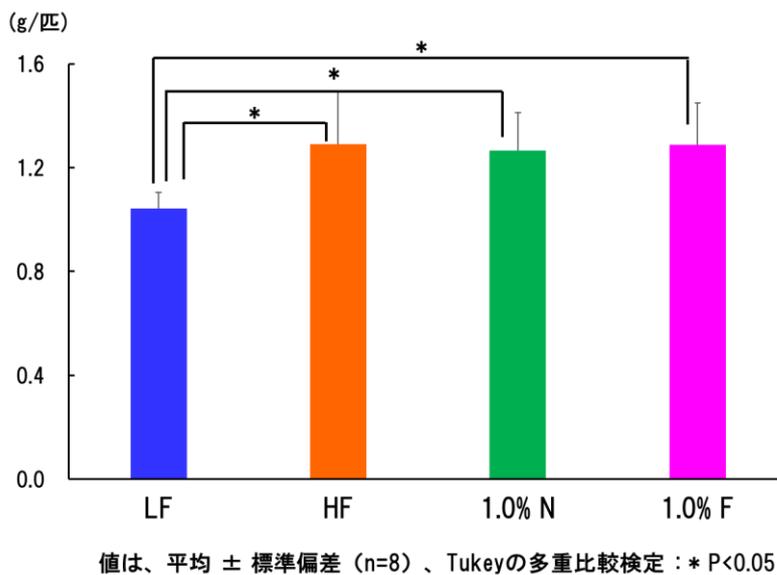


図 21. 肝臓重量への影響

(2) 肝臓中のトリグリセリド量への影響

肝臓中のトリグリセリド量は、LF 食と比較して、HF 食、及び 1.0% F 食で有意に高値となった (図 22)。

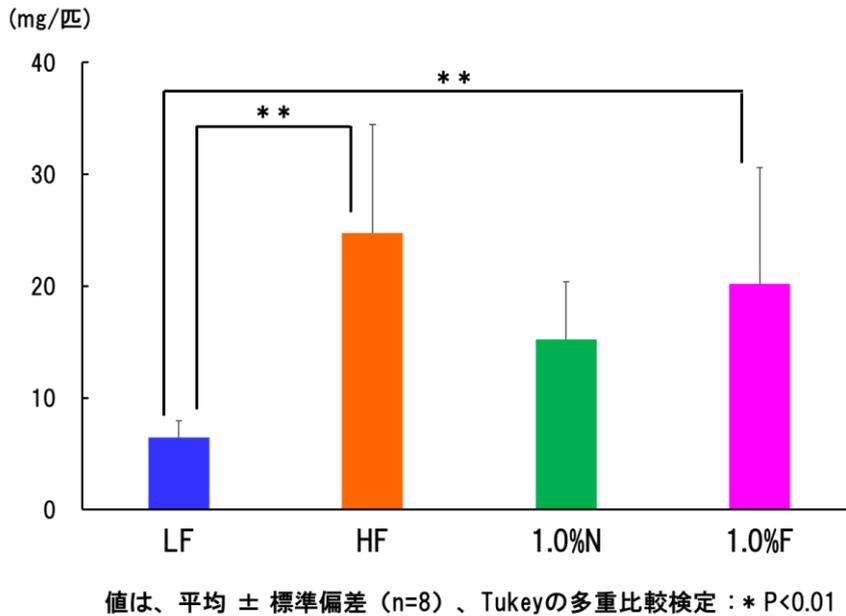


図 22. 肝臓中のトリグリセリド量への影響

(3) 肝臓中のコレステロール量への影響

肝臓中のコレステロール量は、4 群間における有意差は、認められなかった (図 23)。

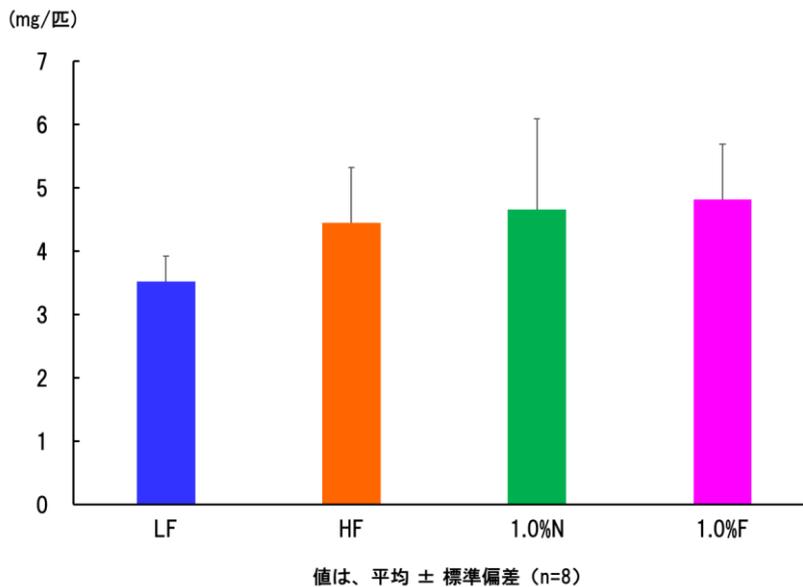
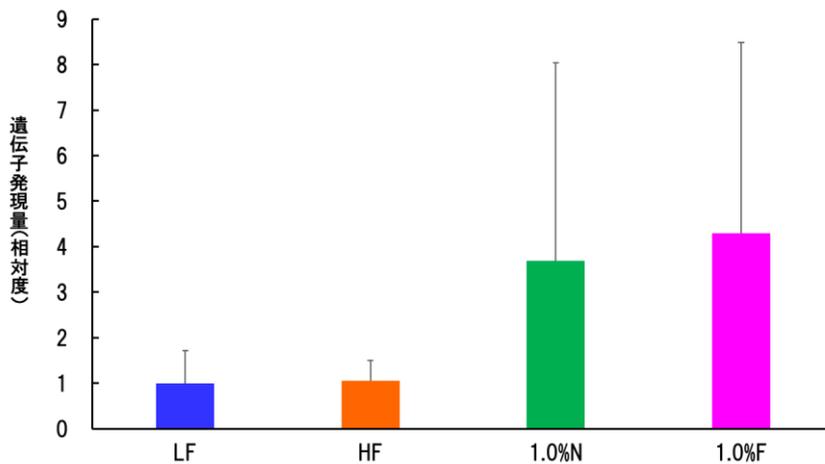


図 23. 肝臓中のコレステロール量への影響

第7項 肝臓の各種遺伝子発現への影響

(1) 肝臓中の MCAD 遺伝子発現への影響

肝臓中の MCAD 遺伝子発現量は、LF 食、及び HF 食と比較して、1.0% N 食、及び 1.0% F 食で上昇する傾向にあったが、いずれも有意な差ではなかった (図 24)。

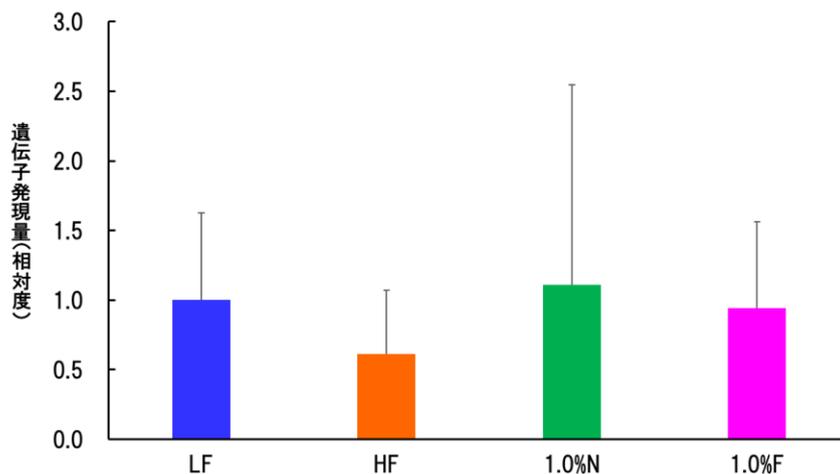


値は、平均 ± 標準偏差 (n=8)

図 24. 肝臓中の MCAD 遺伝子発現への影響

(2) 肝臓中の ACOX1 遺伝子発現への影響

肝臓中の ACOX1 遺伝子発現量は、LF 食と比較して、HF 食で低下する傾向を示し、HF 食と比較して、1.0% N 食、及び 1.0% F 食で上昇する傾向にあったが、いずれも有意な差ではなかった (図 25)。



値は、平均 ± 標準偏差 (n=8)

図 25. 肝臓中の ACOX1 遺伝子発現への影響

第7節 考察

抗肥満のメカニズムには、緒言で述べたように、消化管における栄養素の吸収抑制や体内における熱の産生や脂肪酸の異化代謝（分解）が関係している。そこで、MEECL について、消化管における評価から行った。

in vitro の実験から、MEECL には、 α -グルコシダーゼ阻害活性とリパーゼ阻害活性を有することが明らかにされた。一方、発酵処理した F-MEECL のそれらの消化酵素の阻害活性は低下した。また、塩酸による加水分解により、N-MEECL と F-MEECL の α -グルコシダーゼ阻害活性とリパーゼ阻害活性ともに、活性が低下した。このことは、発酵処理していない、N-MEECL は、消化管における糖質や脂質の消化阻害を引き起こし、肥満を予防できる可能性を示唆する。

そこで、N-MEECL と F-MEECL を高脂肪高ショ糖食に添加してマウスに与えた。

体重変化では、1.0% N 食、及び 1.0% F 食で体重増加抑制の傾向がみられたが、有意な差ではなかった。各種体脂肪についても、1.0% N 食、及び 1.0% F 食のマウスでは、HF 食との差は認められなかった。このことは、N-MEECL と F-MEECL には、体重増加抑制や体脂肪蓄積抑制効果が無いものと判断される。

種々のポリフェノール類が、リパーゼ阻害活性を示すことが知られている⁸³⁾。また、ポリフェノール類には、 α -グルコシダーゼを有するものが知られている⁸⁴⁾。

これらの消化酵素の阻害を示す素材は、肥満や糖尿病の予防や治療に利用することが報告されている。酵素阻害のメカニズムとして、Martinez-Gonzalez らは、リパーゼや α -グルコシダーゼのタンパク質構造における活性部位にポリフェノールが結合することで、これらの酵素の活性を阻害示すことを認めている⁸⁵⁾。

本研究において、in vitro で認められたリパーゼ阻害活性について、マウスの糞便中の脂質量を解析して評価した。マウスの糞中には、飼料中の脂質となる食用油（トリグリセリド）が、微量に存在する程度であった。このことは、in vitro で認められたリパーゼ阻害活性が、in vivo には、反映されなかったことを意味する。その理由として、MEECL の酸性下による分解が考えられる。in vitro の結果で示したように、N-MEECL 及び F-MEECL は、塩酸で加水分解することで、 α -グルコシダーゼやリパーゼの阻害活性が顕著に低下した。in vivo における MEECL のマウスへの投与試験では、胃内の低 pH にさらされることで、消化酵素阻害活性が消失したのかも知れない。

MEECL の体内での抗肥満の効果について、さらに血清分析、肝臓の状態、肝臓における脂肪酸酸化分解酵素（ β 酸化）を指標に評価した。血清生化学的因子として、血清グルコース濃度、トリグリセリド濃度、及び総コレステロール

濃度に注目すると、いずれの因子とも HF 食と比較して、N-MEECL、F-MEECL ともに、有意な差は認められなかった。これらの因子に対する 2 種の MEECL の影響は認められなかった。

肝臓重量、及び肝臓におけるトリグリセリド量やコレステロール量についても、HF 食と比較して、N-MEECL、F-MEECL ともに、有意な差は認められなかった。また、肝臓における β 酸化酵素遺伝子発現量のうち、MCAD と ACOX1 を評価したが、1.0% N 食、及び 1.0% F 食では、HF 食と比較して上昇する傾向を示すが、有意な差ではなかった。このことは、N-MEECL および F-MEECL は、肝臓における僅かな β 酸化酵素の亢進を引き起こしていることが示唆された。

第4章 MEECL の機能性（抗アレルギー作用）

第 1 節 アレルギー研究の背景

第 1 項 アレルギーの現状

アレルギーとは、食物や薬剤、花粉、ほこりなど、通常は体に大きな害を与えない物質に対して、過剰な免疫反応が引き起こされることである。このような免疫反応の異常によって生じる症状の総称がアレルギーである。花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなど症状は多様で、軽度な場合は、自然に軽快することがほとんどではあるが、重度な場合は、呼吸困難やアナフィラキシー症状が生じることがあり、対処が遅れると命に関わることがある。先進国において、約 10%の人が食物アレルギーを、30～50%の人が何らかのアレルギーを持っている⁸⁶⁾。日本においても 2 人に 1 人がアレルギーを持っていると推定されており、特に先進国において増加している。治療法には、アレルギーの原因物質からの回避、抗ヒスタミン薬やステロイドを含む薬物療法、免疫療法などがある。しかし、アレルギーは慢性疾患で、完全に治癒することは難しく、根治的治療法や予防法が未だ確立されていない。また、倦怠感、眠気、学校や仕事でのパフォーマンスの低下⁸⁷⁾、いじめやからかいを受けやすい⁸⁸⁾、保護者での不安感上昇⁸⁹⁾等が報告され、本人だけでなく、まわりの方の QOL も著しく低下させる。患者やその家族は、長期にわたり精神的、肉体的、経済的な負担がかかることになる。

第2項 衛生仮説

アレルギーの発症要因として、遺伝要因のほかに環境要因が挙げられる。1989年英国の疫学者 Strachan は衛生環境が改善した結果アレルギーは増加するという「衛生仮説」を提唱して以来、この仮説に基づく検証がなされてきた。一例として、花粉症の有病率は兄弟の数が多いほど少ない⁹¹⁾、幼児期の保育園通園は、小児期の喘息やアレルギー性鼻炎発症が減少する⁹²⁾、農家の子どもはアレルギー性鼻炎、喘息発症率が低い⁹³⁾が報告されている。このような文明が発達して衛生環境が整うことが先進国のアレルギー疾患罹患者の割合を増加させる一因になっている可能性がある。衛生仮説は、免疫細胞の司令塔ヘルパーT細胞(Th1細胞、Th2細胞)の細胞バランスから考えられたものである。Th1細胞は細菌やウイルスに対する免疫・防御機構を担い、Th2細胞は寄生虫に対する防御を担い、過剰になるとアレルギーを惹起する。ヒトはTh2細胞が優位な状態で生まれるため、きれいな環境で育つことで、Th2細胞優勢の状態が続く。そのことが、発展途上国ではアレルギーがそれほど問題とはされないが先進国で大きな問題とされる理由の一つであると考えられている。

第3項 アレルギー反応の機序

アレルギーとは、本来生体にとって無害な抗原(アレルゲン)に対して、異常な免疫反応を起こすことである。アレルギーは、I～IV型に分類されるが、大半は花粉症、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、食物アレルギーに代表されるI型アレルギーである。アレルギー発症メカニズムは、アレルゲンが体内に侵入することにより、マクロファージなどの抗原提示細胞がその情報をナイーブT細胞に提示し、Th2細胞への分化が起こる。Th2細胞はインターロイキン4を分泌することによりB細胞に抗体をつくるよう指令を出し、IgE抗体が大量に産生される。これらIgE抗体は血液中を流れ皮膚や粘膜に存在する肥満細胞や好塩基球の表面に結合し、再度侵入したアレルゲンにすぐ反応できるよう待機する。これを感作の成立という。このときに肥満細胞や好塩基球は細胞膜上にFC ϵ RI受容体を発現する。再度アレルゲンが侵入すると、抗原特異的IgE抗体との結合により、架橋されることにより、チロシンキナーゼの活性化、MAPKのリン酸化、細胞内へのカルシウム流入、ジアシルグリセロール濃度の上昇が起こり、肥満細胞や好塩基球からヒスタミン、 β -ヘキソサミニダーゼ、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサンなどアレルギー誘引因子が放出され、血管の拡張、血管透過性の上昇を起こる。それに続き、肥満細胞由来のTNF- α をはじめとするサイトカインによって免疫細胞が反応局所に動員され

ることによる症状が発症する。

第4項 食物アレルギー

I型アレルギーに分類される食物アレルギーは、原因食物を摂取した後、免疫学的機序により、皮膚・粘膜・消化器・呼吸器などのアナフィラキシー反応など生体に悪影響を及ぼす症状が惹起される現象である。我が国における食物アレルギーの有病率は、乳児で1～10%、幼児で約5%、学童期以降が1.5%程度であることが報告されている。我が国における食物アレルギーの主な原因食品として、乳幼児において、鶏卵、牛乳および小麦が多く、学童期から成人で新たに発症する食物アレルギーは、甲殻類・果物類・魚類・ソバ・ピーナッツが多い⁹⁴⁾

乳児から幼児早期の食物アレルギーは、その後加齢とともに80～90%が耐性獲得する。これは、乳幼児期の消化能力が未発達であることが関係している。アレルゲンとなるものは主にたんぱく質由来で、たんぱく質が消化不十分で小腸から吸収されることで、異物と認識される。このことが、乳児や幼児期に食物アレルギー有病率が高いことの理由とされている。年齢とともに耐性が獲得されることから、治療としては一般的には抗原食物を完全に除去する方法や、摂取しても症状が出ない量まで摂取可能とする方法などがとられている。食物アレルギーを持つ小児では、約40%が複数の食品による食物アレルギーを持っており、食物アレルギーの除去食として2種類以上の食物や牛乳を除去した場合、同世代の子どもと比べて成長が損なわれる⁹⁵⁾こと、食物アレルギーの数が多いほど、栄養素摂取量が低下する⁹⁶⁾ことが報告されている。自然に耐性が獲得されるのが待たれるが、すべてで耐性が得られるわけではなく、特に、乳幼児期以降に発症した症例に関しては、一生、アレルギーと付き合いしていく必要がある。

第5項 抗アレルギー作用を持つ食材の意義

抗アレルギー効果を有する食材は、副作用がなく、アレルギー症状の緩和や予防が可能となる。また、小児の食物アレルギーの除去食による成長への悪影響を回避させることができる。そのため、抗アレルギー効果を持つ食品を探索する意義は大きい。

第2節 MEECLの抗アレルギー機能に関する研究の目的

抗アレルギーに関する機能性を明らかにするために、MEECLを用い、*in vitro*において脱顆粒抑制試験、*in vivo*でアナフィラキシー反応の主観評価、耳介浮腫の程度、直腸温の変化、臓器重量等を指標に評価し、抗アレルギー作用の有無及びそのメカニズムを解明することを目的とした。

第3節 方法(*in vitro*)

第1項 細胞培養

(1) 培地作成

非働化した10%牛胎児血清(FBS)と1%抗生物質-抗真菌剤混合溶液(ナカライテスク)を含むLow glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, ナカライテスク)を増殖培地とした。

(2) 細胞培養

ラット好塩基球性白血病細胞(RBL-2H3)は、理化学研究所バイオリソース研究センター細胞材料開発室から提供いただいた。RBL-2H3を37℃、5%CO₂インキュベータ中で培養・培地交換を行い、90%コンフルエントの時点で、継代を行った。

第2項 ラッカーゼ処理

N-MEECLおよびF-MEECL0.5mgを量り、5.0mgラッカーゼを0.01M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)0.5mLで溶解させた酵素溶液を加え、55℃で24時間反応させた。反応停止として、90℃の湯浴中で10分間浸漬させた。非酵素群として、ラッカーゼを含まない0.01M酢酸ナトリウム緩衝液0.5mLにより抽出物を溶解させた。その後、凍結乾燥し、抗アレルギー活性の評価に用いた。

第3項 細胞毒性試験

N-MEECL、F-MEECL及びその加水分解物の細胞毒性の影響を排除するため、細胞生存率をWST-8法⁹⁷⁾により検討した。ラット好塩基球白血病細胞株(RBL-2H3細胞、理化学研究所バイオリソース研究センター)を用い、細胞の培養は10%ウシ胎児血清(FBS)、100U/mLペニシリン、及び100µg/mLストレプトマイ

インシンを含む DMEM 培地を用いて CO₂ インキュベータ (37°C、5%CO₂) 内で行った。96 穴マイクロプレートに 2.5×10⁵cells/mL に調整した RBL-2H3 細胞懸濁液を 100 μL ずつ播種した後、0~600 μg/mL の濃度に調整した各抽出物を含む培養液を添加した。24 時間培養後、WST-8 試薬を 10 μL ずつ加えて 2 時間静置し、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定して細胞毒性を評価した。

第 4 項 抗アレルギー活性の評価

抗アレルギー活性の評価は、ラット好塩基球白血球細胞株 (RBL-2H3 細胞、理化学研究所 バイオリソース研究センター) からの β-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制を指標に比較検討した。β-ヘキソサミニダーゼは、ヒスタミンと同様に抗原刺激により早期に脱顆粒され、その放出はヒスタミンと平行であると考えられているため、抗アレルギー物質探索の指標としてヒスタミンおよび β-ヘキソサミニダーゼが用いられる。

96 ウェルマイクロプレートに 2.5×10⁵cells/mL で細胞を播種し、一晚培養した。一晚後、培地を除去し抗 DNP-IgE 抗体 (YAMASA corporation) を 50 ng/mL 含む培地 100 μL に交換して 18 時間培養した。その後、培地を除去し細胞を MT buffer で 1 回洗浄した。MT buffer で溶解したサンプル溶液を 100 μL 添加し、10 分間プレインキュベーションさせた。その後、抗原として DNP-HSA (25 μg/mL、SIGMA 社) を各ウェルに 10 μL 加え、さらに 2 時間インキュベーションさせた。サンプルを含まない MT buffer で同様に反応させたものをコントロールとした。また、抗 DNP-IgE 抗体を含まない継代培地で培養し、サンプルを含まない MT buffer を添加し、同様に反応させたものをブランクとした。10 分間氷冷後、培養上清を細胞外液として 50 μL を 96 ウェルプレートに移した。余剰の溶液を well から除き 0.1 % Triton X-100/MT buffer を 120 μL/well で添加後、超音波装置で細胞破碎することで細胞内液を得た。細胞内液 50 μL を 96 ウェルプレートに移し、37°C で 5 分間加温後、100 μL の 0.1 mol/L citrate buffer (pH 4.5) に溶解した 3.3 mmol/L p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (SIGMA 社) を加え、37°C で 25 分間 β-ヘキソサミニダーゼを作用させた。反応溶液に 100 μL の 2.0 mol/L glycine buffer (pH 10.4) を加えて反応を停止後、プレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を測定した。

β-ヘキソサミニダーゼ遊離率は、以下の式にて求めた。

$$\beta\text{-ヘキソサミニダーゼ遊離率 (\%)} = \frac{\text{放出量}}{\text{放出量} + \text{細胞内残存量}} \times 100$$

脱顆粒抑制作用は、IC₅₀ を用いて評価した。

第4節 方法(*in vivo*:動物実験)

第1項 実験動物

本研究は、高知県立大学動物実験委員会の承認（承認番号 第2023-2号）を得た。動物実験は、高知県立大学動物実験規定に則して行った。

動物実験室は、室温 24 ± 2 °C、湿度 55 ± 3 %、12時間の明暗サイクル（明期はAM7:00~PM7:00、暗期はPM7:00~AM7:00）で管理した。ブリーダーより導入したマウスは、MF 飼料（オリエンタル酵母工業）と飲水（水道水）を自由摂取させ、3日間予備飼育し健常な動物を用いた。実験動物は、3週齢の ICR (Slc:ICR) 系雌マウス（日本エスエルシー株式会社）を用いた。

第2項 飼育期間

飼育開始から解剖まで37日飼育した。飼育終了時の解剖は、絶食せずに行った。

第3項 実験飼料

実験飼料は、AIN93G（普通食）を基本とし、1.0%の非発酵 MEECL 及び発酵 MEECL を添加し、それぞれ 1.0%N 食、1.0%F 食とした。飼料投与は、各群の毎日の摂取カロリーを同じようにし、水は自由摂取とした（表6）飼料原料には、カゼイン（日本配合飼料株式会社）、L-シスチン（和光純薬工業株式会社）、コーンスターチ（株式会社丸三）、食用油（ビタミンEフリー）（タマ生化学株式会社）、セルロースパウダー（オリエンタル酵母工業株式会社）、AIN-93G ミネラル混合（オリエンタル酵母工業株式会社）、AIN-93 ビタミン 重石酸コリン含有（オリエンタル酵母工業株式会社）、第三ブチルヒドロキノン（和光純薬工業株式会社）を用いた。

表 6. 飼料組成 (%)

飼料原料	AIN93G (普通食)	1.0%N	1.0%F
食用カナナ葉抽出物	—	1	1
ミルクカゼイン	20	20	20
L-シスチン	0.3	0.3	0.3
コーンスターチ	63.1986	62.1986	62.1986
食用油	7	7	7
セルロースパウダー	5	5	5
AIN-93Gミネラル混合	3.5	3.5	3.5
AIN-93Gビタミン混合	1	1	1
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014
合計	100	100	100

第 4 項 動物実験

予備飼育の後、マウスの平均体重がほぼ均等になるよう非感作群と感作群に分けた。実験飼料は、コントロールとして AIN93G 食（普通食）を用い、N-MEECL 及び F-MEECL を飼料中に 1.0 %添加したものを比較した。

飼育開始日から 10 日目までは、AIN93G 食（普通食）を自由摂取させた。感作群マウスは、飼育開始から 3 日目と 11 日目に感作作業を行うことでアレルギーモデルマウスを作成した。

飼育 11 日目から、感作群は AIN93G 普通食を与えるコントロール群 (CONT : n = 10)、N-MEECL を与える 1.0 %N 食 (1.0 %N-MEECL 食 : n = 10)、F-MEECL を与える 1.0 %F 食 (1.0 % F-MEECL 食 : n = 10) に分けた。また、非感作群は AIN93 普通食を与えた (非 CONT : n = 11)。

第 5 項 アレルギーモデルマウスの作製

アレルギーマウス作成のために、感作作業として、卵白アレルギーモデルマウスは水酸化アルミニウムアジュバントとオボアルブミン (OVA) 混合液の腹腔内投与を行った。0.67 mg/mL OVA 溶液と水酸化アルミニウムアジュバントを 3 : 1 の比で混合した溶液を腹腔投与し、マウスを感作させた。非感作群は、PBS と水酸化アルミニウムアジュバントを 3 : 1 の比で混合した溶液を腹腔投与した。飼育開始から 3 日目にアジュバント混合液をオボアルブミン投与量とし

て 5µg/g 体重となるようにマウスの腹腔に注射した。さらに飼育開始から 11 日目に同様の処理を行い、合計 2 回の感作を行った。

第 6 項 解剖

飼育最終日に、絶食せずにイソフルランの吸入麻酔下において、心臓採血により脱血死させた。その後、脾臓、大腸、盲腸を採取した。臓器は、分析まで、-30 °C で保存した。

第 7 項 アレルギー症状の解析

アレルギー症状の解析では、OVA 溶液の経口強制投与により行って、アナフィラキシーの誘導を行った。抗原投与量は 6mg/匹とした。

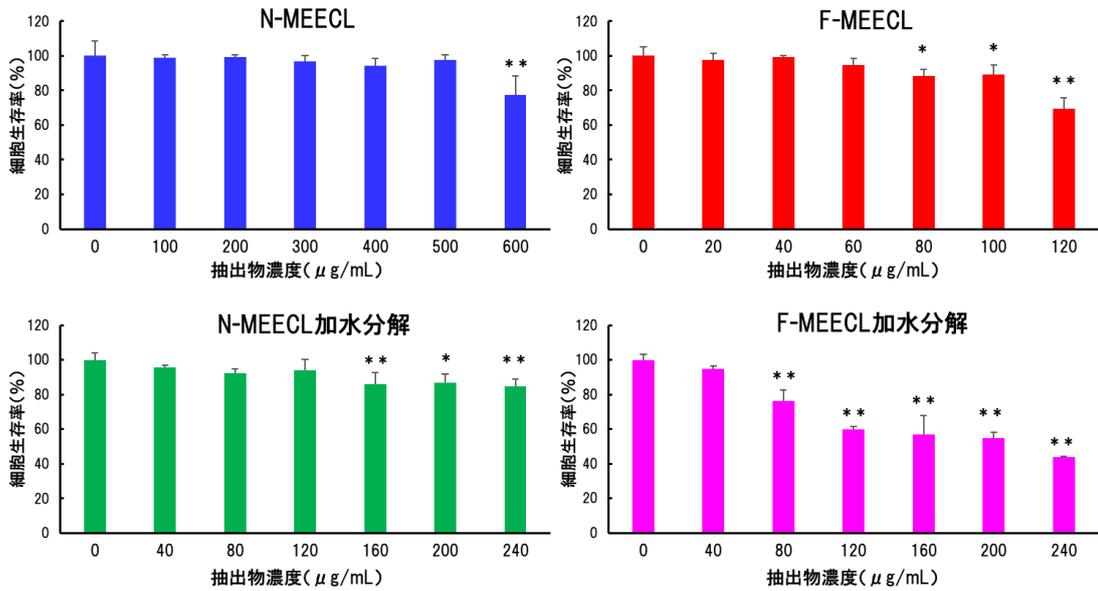
アナフィラキシーショックの解析は、直腸温の測定、ショック症状の観察、炎症反応の評価について行った。直腸温は、マウス用体温測定プローブ (AX-K04746-100 株式会社エーアンドデイ) を接続したマウス用体温測定器 (AD-1687 株式会社エーアンドデイ) を用いて抗原経口投与前と抗原経口投与後 5 分後、15 分後、30 分後に測定し、温度変化を比較した。

抗原経口投与 30 分後のマウスのアレルギー症状を Li ら⁹⁸⁾ によるアレルギー症状の 5 段階評価を観察し、スコア化した。

第 5 節 結果 (*in vitro*)

第 1 項 細胞毒性試験

N-MEECL、F-MEECL はそれぞれ 600µg/mL、80µg/mL で有意に細胞毒性を示した。また、N-MEECL 加水分解物、F-MEECL 加水分解物はそれぞれ 160µg/mL、80µg/mL で有意に細胞毒性を示した。これらの結果を考慮し、抗アレルギー活性の評価は、N-MEECL は 500µg/mL、F-MEECL は 60µg/mL、N-MEECL 加水分解物は 120µg/mL、F-MEECL 加水分解物は 40µg/mL を最大濃度とした。



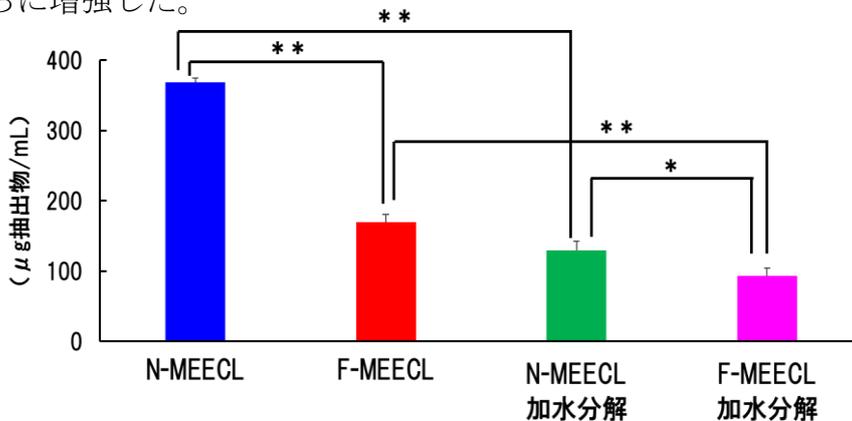
値は、平均±標準偏差 (n=3)、Dunnettの多重比較検定：抽出物濃度0 μg/mLを対照として * P<0.05, ** P<0.01

図 26. MEECL および抽出物加水分解物の細胞毒性

第 2 項 β-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性試験

(1) MEECL 及びその加水分解物の脱顆粒抑制作用

N-MEECL、F-MEECL およびその加水分解物の脱顆粒抑制作用について IC₅₀ を用いて比較した結果を図 27 に示した。IC₅₀ はそれぞれ N-MEECL 368.4 ± 6.5 μg/mL、F-MEECL 169.9 ± 11.0 μg/mL、N-MEECL 加水分解後 129.8 ± 12.3 μg/mL、F-MEECL 加水分解後 93.1 ± 11.5 μg/mL であった。発酵により脱顆粒抑制作用は、有意に増強した。また、加水分解を行った試料では、抑制作用はさらに増強した。

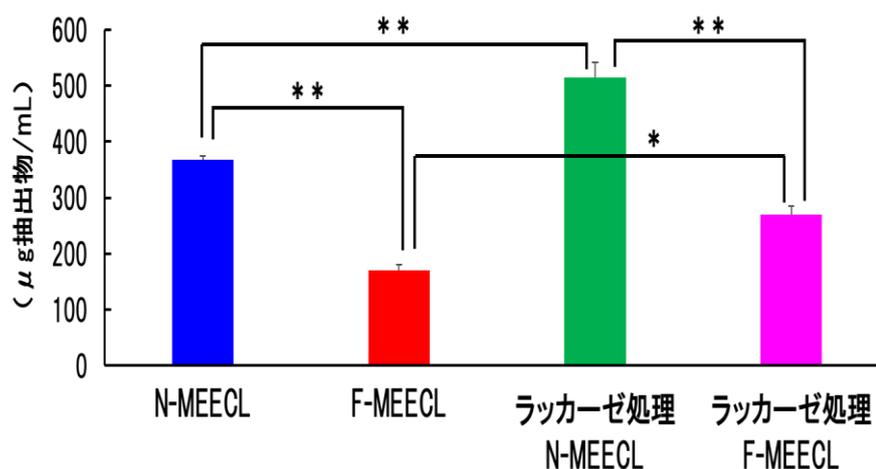


値は、平均 ± 標準偏差 (n=3)、Tukeyの多重比較検定：* P<0.05, ** P<0.01

図 27. MEECL および抽出物加水分解物の脱顆粒抑制作用 (IC₅₀)

(2) ラッカーゼ処理前後における MEECL の脱顆粒抑制作用

N-MEECL、F-MEECL とラッカーゼ処理後の脱顆粒抑制作用について IC₅₀ を用いて比較した結果を図 28 に示した。IC₅₀ はそれぞれ N-MEECL 368.4 ± 6.5 μg/mL、F-MEECL 169.9 ± 11.0 μg/mL、N-MEECL ラッカーゼ処理後 514.0 ± 28.3 μg/mL、F-MEECL ラッカーゼ処理後 270.7 ± 15.1 μg/mL であった。非発酵、発酵ともラッカーゼ処理により脱顆粒抑制作用は低下した。



値は、平均 ± 標準偏差 (n=3)、Tukeyの多重比較検定：* P<0.05, ** P<0.01

図 28. MEECL とラッカーゼ処理後の脱顆粒抑制作用 (IC₅₀)

(3) MEECL 含有ポリフェノールの脱顆粒抑制作用

MEECL 含有ポリフェノールの脱顆粒抑制作用について IC₅₀ を用いて比較した結果を表 8 に示した。EC 葉に含まれるポリフェノール 5 種はすべて脱顆粒抑制作用を示した。作用の強い順に、ピセアタンノール、ケルセチン、ネオクロロゲン酸、クロロゲン酸、ルチンであった。

表 8 各種ポリフェノールの脱顆粒抑制作用 (IC₅₀)

(単位: μg/mL)	
ピセアタンノール	5.9 ± 0.2
ケルセチン	14.6 ± 0.5
ネオクロロゲン酸	67.9 ± 0.6
クロロゲン酸	69.0 ± 3.4
ルチン	119.6 ± 3.8

値は、平均 ± 標準偏差 (n=3)

(4) 各種遊離アミノ酸の脱顆粒抑制作用

各種遊離アミノ酸の脱顆粒抑制作用について IC₅₀ を用いて比較した結果を表 7 に示した。遊離アミノ酸のうち、脱顆粒抑制作用を示したものは 8 種であった。作用が強い順に、Met、Ser、His、Tyr、Phe、Leu、Asn、Pro であった。

表 7. 各種アミノ酸の脱顆粒抑制作用 (IC₅₀)

					(単位: $\mu\text{g/mL}$)
Gly	—	Lys	—	Phe	536.8 \pm 23.5
Ala	—	Arg	—	Tyr	500.5 \pm 28.6
Val	—	His	276.6 \pm 5.9	Trp	—
Leu	558.6 \pm 10.5	Glu	—	Pro	886.6 \pm 28.3
Ile	—	Asp	—	Met	132.9 \pm 8.8
Ser	223.8 \pm 21.7	Gln	—	Cys	—
Thr	—	Asn	570.4 \pm 2.6	Cys-Cys	—

※ ー: 検出せず
値は、平均 \pm 標準偏差 (n=3)

第 6 節 結果 (*in vivo*)

第 1 項 体重への影響

(1) 体重増加量への影響

図 29 に、試験開始日からマウスの体重変化についての結果を示した。各群間で有意な差は見られなかった。

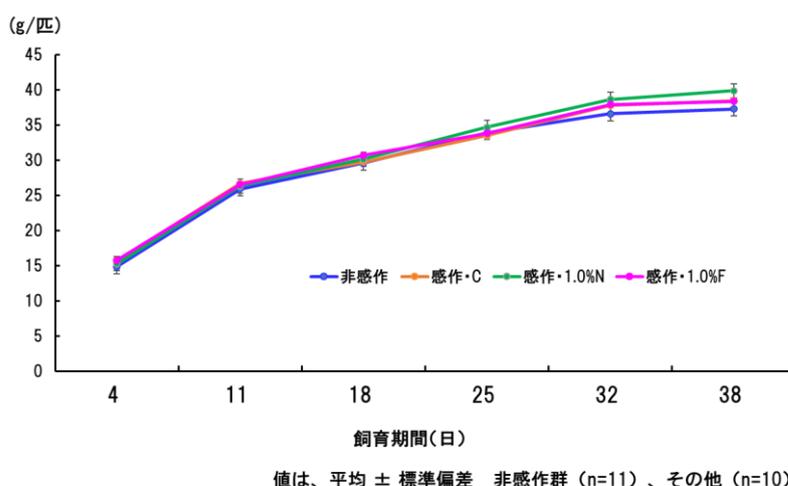


図 29. 飼育期間中の体重変化

図 30 に試験開始日から試験最終日までの体重増加量を示した。OVA による感作後においても、各群間で有意な差は見られなかった。

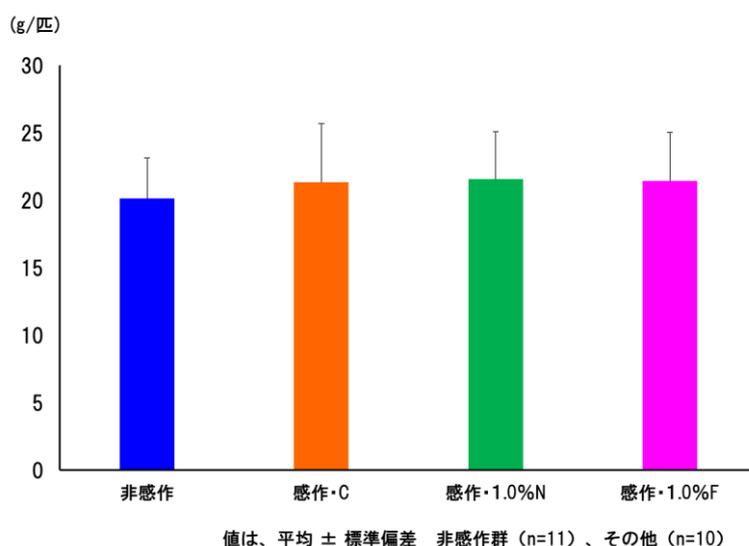


図 30. 飼育期間中の体重増加量への影響

第 2 項 アレルギー症状への影響

(1) アレルギー症状主観的評価スコア

飼育最終日に OVA 経口投与した 30 分後のアレルギー症状主観評価スコアの結果を図 31 に示した。非感作群と比較して、感作群コントロール、感作群・N-MEECL 添加群で有意にスコアが高かった。また、感作群コントロールと比較して感作群・F-MEECL 添加群でスコアが有意に低かった。

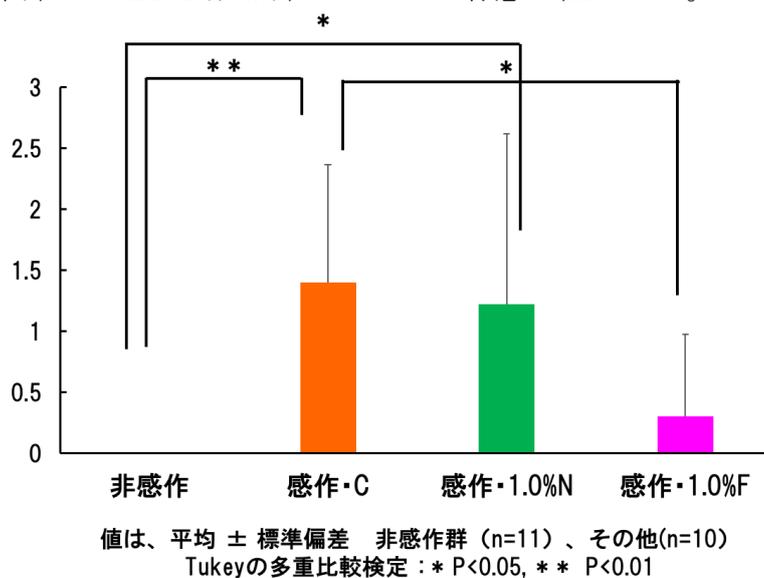


図 31. OVA 経口投与 30 分後のアレルギー症状主観評価スコア

(2) 直腸温の変化

OVA 経口投与後のマウスの直腸温の変化を図 32 に示した。OVA 経口投与 30 分後、感作群・N-MEECL 添加群と比較して、感作群・F-MEECL 添加群は有意に高値となった。

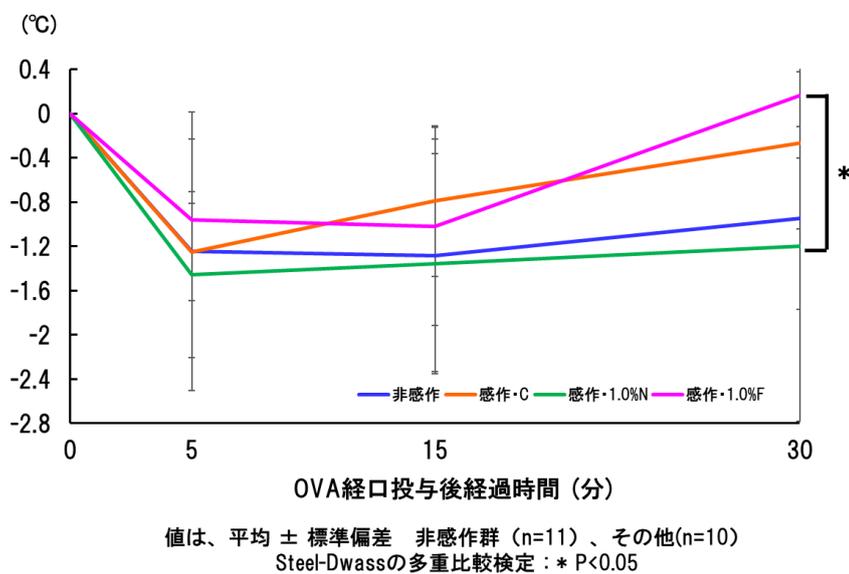


図 32. OVA 経口投与後の直腸温の変化

(3) OVA 投与後耳介厚

OVA 投与 30 分後の耳介厚は、感作群コントロールと比較して、感作群・F-MEECL 添加群で有意に低値となった(図 33)。

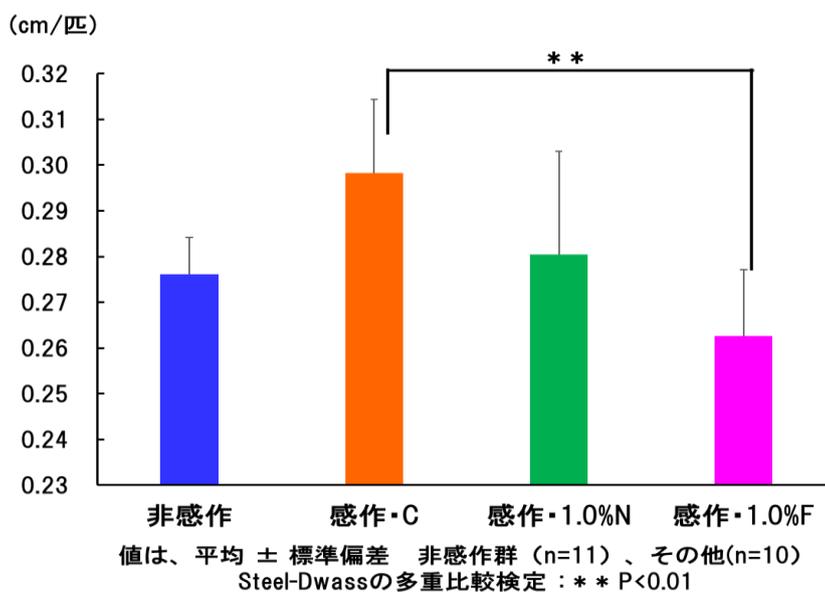


図 33. OVA 経口投与 30 分後の耳介厚

第3項 盲腸への影響

(1) 盲腸重量

盲腸重量は、非感作群と比較して、感作群・F-MEECL 添加群で有意に高値となった (図 34)。

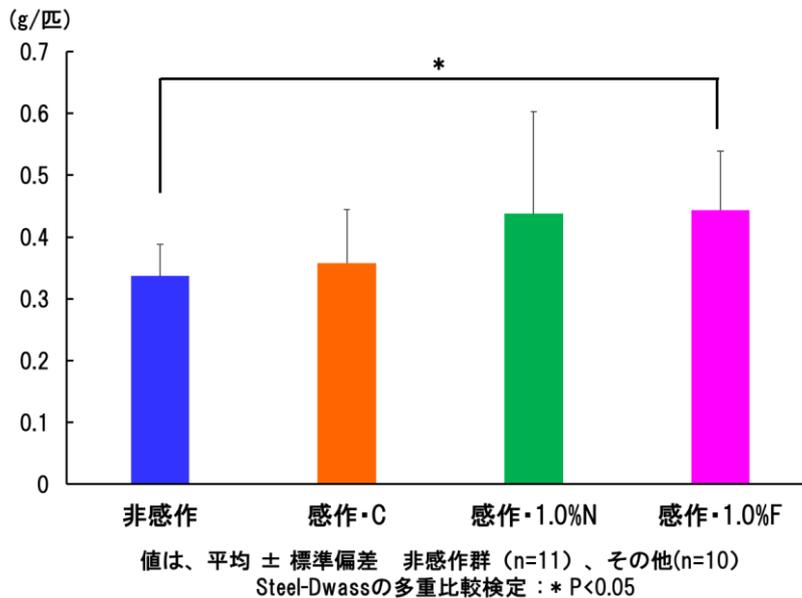


図 34. 盲腸重量への影響

(2) 盲腸 pH

盲腸 pH については、4 群間に有意な差は認められなかった (図 35)。

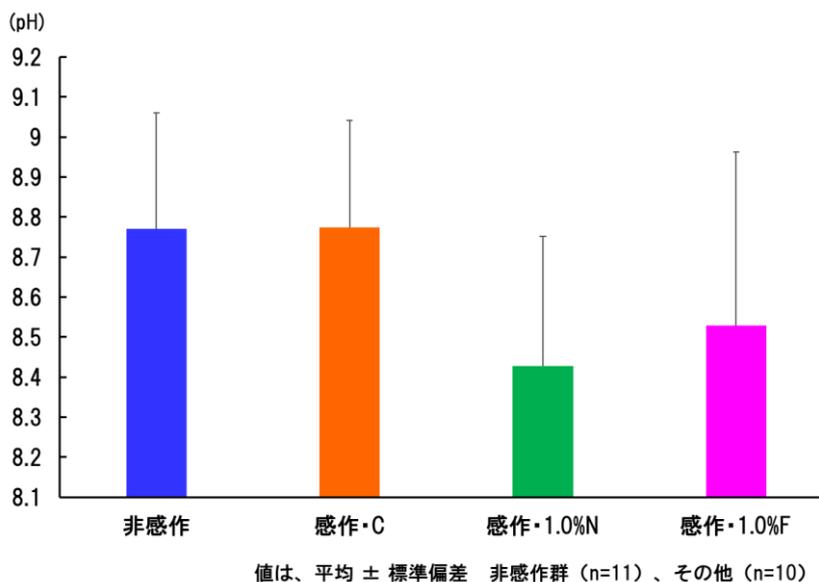


図 35. 盲腸 pH への影響

第4項 脾臓への影響

(1) 脾臓重量

脾臓重量については、4群間に有意な差は認められなかった（図36）。

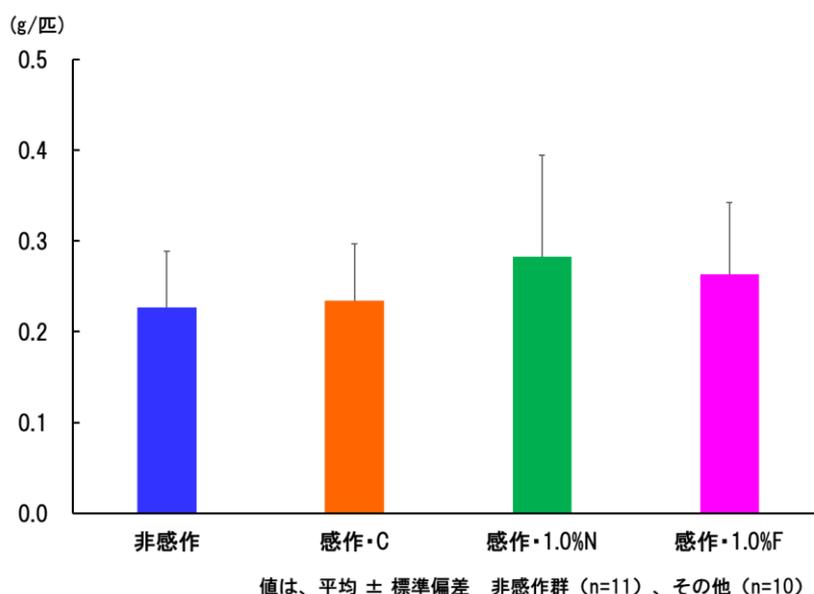


図36. 脾臓重量への影響

第7節 考察

MEECL の機能性として、抗アレルギー効果の指標となるマスト細胞モデルであるラット好塩基球白血球細胞による脱顆粒抑制作用について検討した。F-MEECL の IC_{50} は、N-MEECL の IC_{50} と比較して、顕著に小さな値となり、発酵によって脱顆粒抑制作用が強まったことが示された。一方、5種のポリフェノールの標品を使用した脱顆粒抑制作用は、ピセアタンノールで最も強く、ケルセチン、ネオクロロゲン酸、クロロゲン酸、ルチンの順であった。しかし、HPLCによる各種ポリフェノール含量測定の結果では、発酵後には、ピセアタンノール以外のポリフェノールは、存在しなかった。このことは、MEECL は、発酵前と発酵後とでは、脱顆粒抑制作用に対する効果を示す化合物が異なっていることが推測される。

ラッカーゼは、4つの銅イオンが結合した活性中心を有するポリフェノール酸化酵素である。リグニン中のフェノール単位の酸化分解能に優れ、ワインや果実飲料中のポリフェノールの除去、排水中の染料の脱色など工業的利用もされている⁹⁹⁾。本研究では、MEECL のポリフェノールを分解除去することを目的

にラッカーゼを作用させた。MEECL にラッカーゼを作用させた場合、N-MEECL、F-MEECL とともに、 IC_{50} が上昇したが、脱顆粒抑制作用は残存した。このことは、MEECL の脱顆粒抑制作用は、ポリフェノールとポリフェノール以外の化合物による効果であることが示唆された。

なお、本研究で HPLC による同定を行った 5 種のポリフェノールの脱顆粒抑制作用については、先行研究の結果、次のように報告されていた。Matsuda らは、ケルセチンとピセアタンノールは、脱顆粒抑制作用を有することを構造活性相関として示している¹⁰⁰⁾。Park らは、ルチンやケルセチンを含む 6 種類のフラボノイドの脱顆粒抑制作用を報告している。Huang らは、クロロゲン酸が脱顆粒を促進することを報告している¹⁰¹⁾。しかし、Tang らは、クロロゲン酸処理において、酸性化することで脱顆粒を促進することを見出し、クロロゲン酸処理液を中性化させることで、脱顆粒促進がなくなることを報告している¹⁰²⁾。一方、RBL-2H3 とは異なるマスト細胞 (KU812 cells) を使用して、クロロゲン酸の脱顆粒抑制作用が報告されている¹⁰³⁾。すなわち、RBL-2H3 を使用したクロロゲン酸の脱顆粒抑制作用は、我々の報告が初めてとなる。なお、ネオクロロゲン酸の脱顆粒に関する先行研究は認められなかった。

MEECL に含まれる化合物として、我々は、遊離アミノ酸に着目した。L-ロイシンを標準として測定した MEECL 中の遊離アミノ酸量は、発酵前と比較して、発酵後には 10% 程度の増加が認められた。一方、N-MEECL および F-MEECL の遊離アミノ酸量は、加水分解前と比較して、加水分解後には 57-59% の増加が認められた。発酵によって増加したアミノ酸やイミノ酸のうち、ロイシン、チロシン、プロリンは、脱顆粒抑制作用を示す化合物である。発酵後の EC 葉部メタノール抽出物の IC_{50} は、発酵前の IC_{50} の 46% へと低下している。しかし、発酵後には 5 種のポリフェノールのうち、4 種のポリフェノールが著しく減少しており、各種アミノ酸の脱顆粒に対する IC_{50} の値の大きさから考えても、増加した分のアミノ酸による脱顆粒抑制作用の増強作用に匹敵するとは考えにくい。また、N-MEECL および F-MEECL の加水分解後にも脱顆粒抑制作用の IC_{50} が減少している。こちらも、加水分解で増加したアミノ酸による IC_{50} への寄与は考えられない。つまり、発酵や加水分解で低下した MEECL の IC_{50} には、発酵過程や加水分解過程において、何らかの化合物の生成によっても引き起こされたものと考えられる。

なお、本研究で各種アミノ酸およびイミノ酸の脱顆粒抑制作用を示しているが、20 種類のアミノ酸と 1 種類のイミノ酸による脱顆粒効果を示したのは本研究が初めてである。

乳酸菌 (LAB) は、野菜や乳製品の発酵スターターとして使用されてきた。食品の酸味や風味に影響を与える。LAB は乳酸、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラ

クトシダーゼなどの酵素を産生する。LAB を用いて生物変換された代表的な物質として、マイナージンセノサイド、 γ -アミノ酪酸、エクオール、アグリコン、生理活性イソフラボン、ゲニステイン、ダイゼインなどが報告されている^{104, 105})。今後、ECに含まれる5種のポリフェノールのLABによる発酵変換物質の同定を行う必要がある。また、LABによる変換基質として、ECに含まれる5種のポリフェノール以外のポリフェノールを検討し、種々の脱顆粒抑制化合物の開発の可能性を提案したい。

マウスを使用して、*in vivo*におけるMEECLの抗アレルギー効果を評価した。N-MEECLとF-MEECLは、OVA感作マウスの生育に影響することはなかった。あらかじめ、2回のOVA感作後のOVAに対する食物アレルギーの症状の度合いを評価した。OVA経口投与30分後のアレルギー症状主観評価スコアの結果で示したように、感作群コントロールと比較して、感作群・F-MEECL添加群で有意なアレルギー症状の低下が認められた。

アレルギー症状を示すマウスは、体温低下が著しい。本研究結果では、感作群コントロールと比較して、EC抽出物による体温低下抑制効果は認められなかった。

アレルギー症状を示すマウスは、全身に浮腫を引き起こす。そこで、OVA経口投与30分後のアレルギー症状を呈する時間に耳介厚を測定したが、感作群コントロールと比較して、感作群・F-MEECL添加群で耳介の有意な浮腫抑制効果が認められた。

食物アレルギー抑制効果は、全身的な免疫反応を表す組織脾臓と小腸における免疫寛容の入り口となる消化管に関係する効果を調べることで、MEECLの抗アレルギー効果のメカニズムを明らかにすることができる。免疫寛容とは、体内に入った食品など、からだの維持に必要な成分には過敏な免疫反応を起こさないという現象である。そこで、消化管の一部である盲腸の状態を4種のマウスで比較した。感作群コントロールと比較して、感作群・F-MEECL添加群において、盲腸の重量が重くなっていた。このことは、食餌に添加したF-MEECLを摂取することで、腸内細菌が増殖して盲腸重量が増加したことを示唆する。一般に、盲腸内pHは、腸内細菌数が増えることで低下するが、本研究において、N-MEECL及びF-MEECLの摂取により、盲腸内pHの低下傾向は認められたが、有意ではなかった。

脾臓については、全ての感作群のマウスの重量と比較しても差はなかった。

第5章 総合考察

第1節 食材としての EC の可能性

本研究において、EC 葉含有成分として、非発酵、発酵後ともにアミンやアルカロイドの存在が否定され、生鮮食品及び発酵食品としての EC 葉部の可能性が示唆された。成分分析から、他の野菜よりタンパク質含量が多く、植物性タンパク質の供給源となる可能性が見出された。高齢化が進む現代社会において、EC 葉は、サルコペニアやフレイルの予防に寄与する食材として期待される。また、乳酸発酵させた EC 葉においては、強い抗アレルギー効果が確認された。今後、先進国の増加に伴い予想されるアレルギー疾患の増加に対する一つの選択肢となる可能性がある。

第2節 EC 葉部が持つ可能性・期待できること

EC 葉部には、発酵により膨大な量のポリフェノールと非常に強力な抗酸化能を有した。抗酸化物質を多く含む食品の摂取は、総死亡、循環器疾患死亡リスクの低下に關与¹⁰⁶⁾する報告があり、EC 葉の摂取が寿命の延伸に寄与する可能性がある。また、EC 葉には強力な抗アレルギー作用を有し、発酵によりさらに増強した。今後、EC に含まれる 5 種のポリフェノールの LAB による発酵変換物質の同定を行う必要がある。また、LAB による変換基質として、EC に含まれる 5 種のポリフェノール以外のポリフェノールを検討し、種々の脱顆粒抑制化合物の開発の可能性を提案することで、高知県が栽培に適した環境である EC 葉の有効利用が期待できる。

結語

本研究では、栽培に適した環境である高知県産の EC 葉を実験の試料とし、近年、種々の機能性付加が報告されている発酵に着目し、EC 葉部(非発酵、発酵)および MEECL の化学的・栄養学的特徴の解析、MEECL の機能性(抗肥満作用、抗アレルギー作用)について検討した。なお、EC 葉に関する知見は限定されていたため、深く探究するよりも広範な研究を優先し、研究を行った。

研究の新規性として、EC 葉の栄養組成、EC 葉、及び MEECL の膨大なポリフェノール含量と非常に強力な抗酸化能、MEECL の抗アレルギー作用と発酵による増強、及びイミノ酸を含むアミノ酸 21 種の脱顆粒抑制作用である。EC 葉には

抗アレルギー作用があり、その関与成分としてアミノ酸、ポリフェノール及びポリフェノールの分解物が考えられた。

謝辞

本学で研究に取り組む上で、快く指導教官を引き受けてくださいましたこと、恵まれた研究環境を与えて頂きましたこと、また、研究に取り組む姿勢や論理的思考、実験手技など、研究活動全てにおいて、一から御指導御鞭撻を賜りました主研究指導教員の渡邊浩幸先生に、謹んで御礼を申し上げます。多大なる時間を割いて下さり、感謝してもしきれません。ならびに、それぞれの専門分野の立場からご助言を賜りました副指導教員の大村誠先生、三浦要一先生、宮上多加子先生、西内章先生に厚く御礼を申し上げます。また、ECの栽培にあたり、2年間にわたり、栽培を管理していただきました株式会社坂田信夫商店、研究開発部の都築雅史様、矢野哲様、高橋永様に深く感謝申し上げます。そして、ラッカーゼを提供していただきました、北見工業大学の佐藤利次教授に心より感謝申し上げます。実験を行うにあたり、実験手技や実験に関する考え方の助言をくださった竹本和仁助教にも心より御礼を申し上げます。実験の実施に際して、井治賢希さん、山根悠太さん、TIAN GANLINさん、是澤明里さん、LUO HAOさん、小山智久助教、金光拓磨さん、三澤伶輔さんの協力を頂きました。ありがとうございました。

引用・参考文献

1. Ugent D, Pozorski S, Pozorski T, New evidence for ancient cultivation of *Canna edulis* in Peru, *Econ. Bot.*, **38**(4), 417-432, 1984.
2. 恋田彩加, 田中守, 食用カンナの食品・栄養学的価値と利用実態, 生物機能開発研究所紀要, 21, 64-71, 2021.
3. 田中伸幸, 井ノ内直良, 小山鐵夫, 未開発の澱粉源植物・食用カンナとその澱粉, **211**(4), 319-325, 2006.
4. Tanaka N. Economic Botanical Notes on Edible *Canna* (Cannaceae) in South Vietnam, *J. Jpn. Bot.*, 73(6), 319-324, 1998.
5. H. M. Burkill, The useful plants of West tropical Africa ed., 2. Vol. 1, *Royal Botanic Gardens, Kew*, 1985.

6. Aprianita A, Vasiljevic T, Bannikova A, Kasapis S, Physicochemical properties of flours and starches derived from traditional Indonesian tubers and roots, *J. Food Sci. Technol.*, **51**(12), 3669–3679, 2014.
7. Zhang C, Ma S, Wu J, Luo L, Qiao S, Li R, Xu W, Wang N, Zhao B, Wang X, Zhang Y, Wang X, A specific gut microbiota and metabolomic profiles shifts related to antidiabetic action: The similar and complementary antidiabetic properties of type 3 resistant starch from *Canna edulis* and metformin, *Pharmacol. Res.*, **159**, 104985, 2020.
8. 渡邊浩幸, 松尾菜穂, 山根悠太, 彼末富貴, 食用カンナの茹で加熱に及ぼす要因解析, 高知県立大学紀要 健康栄養学部編, 68, 1-7, 2018.
9. 河野一世, 柴田英之, 日本食からみる発酵食品の多様性と日本人の健康一肥満を中心に, *日本調理科学会誌*, **43**(2), 131-135, 2010.
10. 齋藤勝裕, 「発酵」のことが一冊でまるごとわかる, 15-16, ベレ出版, 2022.
11. Nielsen J, Tillegreen CB, Petranovic D, Innovation trends in industrial biotechnology, *Trends Biotechnol.*, **40**(10), 1160-1172, 2022.
12. Petrova P, Arsov A, Tsvetanova F, Parvanova-Mancheva T, Vasileva E, Tsigoriyna L, Petrov K, The Complex Role of Lactic Acid Bacteria in Food Detoxification, *Nutrients*, **14**(10), 2038, 2022.
13. Burton K. J., Rosikiewicz M, Pimentel G, Bütikofer U, von Ah U, Voirol M. J., Croxatto A, Aeby S, Draï J, McTernan P. G., Greub G, Pralong F. P., Vergères G, Vionnet N, Probiotic yogurt and acidified milk similarly reduce postprandial inflammation and both alter the gut microbiota of healthy, young men, *Br J Nutr*, **117**(9), 1312-1322, 2017.
14. Ohara M, Lu H, Shiraki K, Ishimura Y, Uesaka T, Katoh O, Watanabe H, Inhibition by long-term fermented miso of induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in CD (SD) rats, *Oncol. Rep.*, **9**(3), 613-616, 2002.
15. Kim E. K., An S. Y., Lee M. S., Kim T. H., Lee H. K., Hwang W. S., Choe S. J., Kim T. Y., Han S. J., Kim H. J., Kim D. J., Lee K. W., Fermented kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients, *Nutr Res*, **31**(6), 436-443, 2011.
16. Xiao J. Z., Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Miyaji K, Iwatsuki K, Togashi H, Enomoto K, Enomoto T,

- Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial, *Clin Exp Allergy*, **36**(11), 1425-1435, 2006.
17. Kato-Kataoka A, Nishida K, Takada M, Kawai M, Kikuchi-Hayakawa H, Suda K, Ishikawa H, Gondo Y, Shimizu K, Matsuki T, Kushiro A, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Miyazaki K, Kuwano Y, Rokutan K, Fermented Milk Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota Preserves the Diversity of the Gut Microbiota and Relieves Abdominal Dysfunction in Healthy Medical Students Exposed to Academic Stress, *Appl Environ Microbiol*, **82**(12), 3649-3658, 2016.
 18. Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, Hamidi GA, Salami M, Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial, *Front Aging Neurosci*, **8**, 256, 2016.
 19. Thompson H. O., Önning G, Holmgren K, Strandler H. S., Hultberg M, Fermentation of Cauliflower and White Beans with *Lactobacillus plantarum* - Impact on Levels of Riboflavin, Folate, Vitamin B₁₂, and Amino Acid Composition, *Plant Foods Hum Nutr.*, **75**(2), 236-242, 2020.
 20. Kwak C. S., Park S. C., Song K. Y., Doenjang, a fermented soybean paste, decreased visceral fat accumulation and adipocyte size in rats fed with high fat diet more effectively than nonfermented soybeans, *J Med Food.*, **15**(1), 1-9, 2012.
 21. Kim S. H., Seong G. S., Choung S. Y., Fermented *Morinda citrifolia* (Noni) Alleviates DNCB-Induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice through Modulating Immune Balance and Skin Barrier Function, *Nutrients.*, **12**(1), 249, 2020.
 22. Yan H, Jin J. Q., Yang P, Yu B, He J, Mao X. B., Yu J, Chen D. W., Fermented soybean meal increases nutrient digestibility via the improvement of intestinal function, anti-oxidative capacity and immune function of weaned pigs, *Animal.*, **16**(6), 100557, 2020.
 23. 立垣愛郎, 乳酸菌の健康機能, *全人的医療*, **17**(1), 8-19, 2018.
 24. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault M. C., Cummings J. H., Franck A, Gibson G. R., Isolauri E, Moreau M. C., Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *Br J Nutr*, **80**(S1), S147-

- 171, 1998.
25. Mathur H, Beresford T.P., Cotter P.D., Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates, *Nutrients.*, **12**(6), 1679, 2020.
 26. Chen Q, Wang H, Wang G, Zhao J, Chen H, Lu X, Chen W, Lactic Acid Bacteria: A Promising Tool for Menopausal Health Management in Women, *Nutrients.*, **14**(21), 4466, 2022.
 27. Petrova P, Arsov A, Tsvetanova F, Parvanova-Mancheva T, Vasileva E, Tsigoriyna L, Petrov K, The Complex Role of Lactic Acid Bacteria in Food Detoxification, *Nutrients.*, **14**(10), 2038, 2022.
 28. Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B, Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress, *Molecules*, **24**(13), 2452, 2019.
 29. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P, Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability, *Nutrients.*, **13**(1), 273, 2021.
 30. Bojarczuk A, Dzitkowska-Zabielska M, Polyphenol Supplementation and Antioxidant Status in Athletes: A Narrative Review, *Nutrients.*, **15**(1), 158, 2022.
 31. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M, Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols, *Int J Mol Sci*, **19**(3), 686, 2018.
 32. Taguchi C, Kishimoto Y, Fukushima Y, Kondo K, Yamakawa M, Wada K, Nagata C, Dietary intake of total polyphenols and the risk of all-cause and specific-cause mortality in Japanese adults: the Takayama study, *Eur J Nutr*, **59**(3), 1263-1271, 2020.
 33. Alway S.E., Bennett B.T., Wilson J.C., Edens N.K., Pereira S.L, Epigallocatechin-3-gallate improves plantaris muscle recovery after disuse in aged rats. *Exp. Gerontol.*, **50**, 82-94, 2014.
 34. Akiyama H, Sato Y, Watanabe T, Nagaoka MH, Yoshioka Y, Shoji T, Kanda T, Yamada K, Totsuka M, Teshima R, Sawada J, Goda Y, Maitani T, Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models, *FEBS Lett.*, **579**(20), 4485-4491, 2005.
 35. Inaba H, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Kou Y, Ohtake Y, Amano A, Identification of Hop Polyphenolic Components Which Inhibit Prostaglandin E2 Production by Gingival Epithelial Cells Stimulated

- with Periodontal Pathogen, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**(3), 527-530.
36. Boccellino M, D'Angelo S, Anti-Obesity Effects of Polyphenol Intake: Current Status and Future Possibilities, *Int J Mol Sci*, **21**(16), 5642, 2020.
37. Vestergaard M, Ingmer H, Antibacterial and antifungal properties of resveratrol, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **53**(6), 716-723, 2019.
38. Chen X, Liang D, Huang Z, Jia G, Zhao H, Liu G, Anti-fatigue effect of quercetin on enhancing muscle function and antioxidant capacity, *J. Food Biochem.*, **45**(11), e13968, 2021.
39. 小川健二郎, 原英彰, ビルベリー由来アントシアニンが目に与える機能性-ヒト臨床試験と機能性表示食品-, *岐阜薬科大学紀要*, **65**, 20-27, 2016.
40. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am J Clin Nutr*, **81**(1Suppl), 230S-242S, 2005.
41. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P, Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability, *Nutrients*, **13**(1), 273, 2021.
42. 内閣府, 令和5年版高齢社会白書, 2023.
43. 厚生労働省, 令和4年版厚生労働白書, 2022.
44. 本川佳子, 高齢期の栄養ケア-歯科と栄養の連携-, *日本老年歯科医学会誌*, **34**(1), 81-85, 2019.
45. Katsanos C.S., Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe R.R., Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids, *Am J Clin Nutr*, **82**(5), 1065-1073, 2005.
46. Lee L, Kang S.A., Lee H.O., Lee B.H., Park J.S., Kim J.H., Jung I.K., Park Y.J., Lee J.E., Relationships between dietary intake and cognitive function level in Korean elderly people, *Public Health*, **115**(2), 133-138, 2001.
47. Beasley J.M., LaCroix A.Z., Neuhaus M.L., Huang Y, Tinker L, Woods N, Michael Y, Curb J.D., Prentice R.L., Protein intake and incident frailty in the Women's Health Initiative observational study, *J Am Geriatr Soc*, **58**(6), 1063-1071, 2010.
48. Marcos A, Nova E, Montero A, Changes in the immune system are conditioned by nutrition, *Eur J Clin Nutr*, **57**(Suppl1), S66-69,

- 2003.
49. Emily S.C., Paul C.W., James S.G., Jonathan A.F., Redefining agricultural yields: from tonnes to people nourished per hectare, *Environ Res. Lett*, **8**(3), 34015, 2013.
 50. Gardner C.D., Hartle J.C., Garrett R.D., Offringa L.C., Wasserman A.S., Maximizing the intersection of human health and the health of the environment with regard to the amount and type of protein produced and consumed in the United States, *Nutr Rev*, **77**(4), 197–215, 2019.
 51. Cusack D.F., Kazanski C.E., Hedgpeth A, Chow K, Cordeiro A.L., Karpman J, Ryals R, Reducing climate impacts of beef production: A synthesis of life cycle assessments across management systems and global regions, *Glob Chang Biol*, **27**(9), 1721–1736, 2021.
 52. Ray D.K., Mueller N.D., West P.C., Foley J.A., Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050, *PLoS One*, **8**(6), e66428, 2013.
 53. Hayes M, Food Proteins and Bioactive Peptides: New and Novel Sources, Characterisation Strategies and Applications, *Foods*, **7**(3), 38, 2018.
 54. Budhathoki S, Sawada N, Iwasaki M, Yamaji T, Goto A, Kotemori A, Ishihara J, Takachi R, Charvat H, Mizoue T, Iso H, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group, Association of Animal and Plant Protein Intake With All-Cause and Cause-Specific Mortality in a Japanese Cohort, *JAMA Intern Med*, **179**(11), 1509–1518, 2019.
 55. Pinckaers P.J.M., Trommelen J, Snijders T, van Loon L.J.C., The Anabolic Response to Plant-Based Protein Ingestion, *Sports Med*, **51**(Suppl1), 59–74, 2021.
 56. Jun H., Jo I., Hwangbo S., Lee J., Imai K., Feeding Value and In situ Digestibility of Edible Canna for Silage, *Plant Prod. Sci.*, **9**(4), 408–414, 2006.
 57. Okonwu K, Ariaga A, Nutritional evaluation of various parts of *Canna indica* L., *Annu. Res. Rev. Biol.*, **11**(4), 1–5, 2016.
 58. Office for Resources, Policy Division Science and Technology Policy Bureau, Standard Tables of Food Composition in Japan, 2020.
 59. The GBD 2013 Obesity Collaboration, Global, regional, and national

- prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013, *Lancet*, **384**(9945), 766–781, 2014.
60. NCD Risk Factor Collaboration, trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants, *Lancet*, **387**(10026), 1377–1396, 2016.
 61. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, *World Health Organ Tech Rep Ser*, **894**, 1–253, 2000.
 62. 厚生労働省, 令和元年国民健康・栄養調査結果の概要.
 63. 吉池信男, 西信雄, 松島松翠, 伊藤千賀子, 池田義雄, 檜原英俊, 吉永英世, 小倉浩, 井上修二, Body Mass Index に基づく肥満の程度と糖尿病, 高血圧, 高脂血症の危険因子との関連 : 多施設共同研究による疫学的検討, *日本肥満学会誌*, **6**(1), 4–17, 2000.
 64. 山北満哉, 内田博之, 川村堅, 本間隆之, 小田切陽一, 日本人成人の肥満者割合および脂肪エネルギー比率の年次推移に対する年齢-時代-コホートの影響, *日本公衆衛生雑誌*, **61**(8), 371–384, 2014.
 65. Ma X, Chen Q, Pu Y, Guo M, Jiang Z, Huang W, Long Y, Xu Y, Skipping breakfast is associated with overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis, **14**(1), 1–8, 2020.
 66. Yamamoto R, Tomi R, Shinzawa M, Yoshimura R, Ozaki S, Nakanishi K, Ide S, Nagatomo I, Nishida M, Yamauchi-Takihara K, Kudo T, Moriyama T, Associations of Skipping Breakfast, Lunch, and Dinner with Weight Gain and Overweight/Obesity in University Students: A Retrospective Cohort Study, *Nutrients*, **13**(1), 271, 2021.
 67. Xiao Q, Garaulet M, Scheer F.A.J.L., Meal timing and obesity: interactions with macronutrient intake and chronotype, *Int J Obes*, **43**(9), 1701–1711, 2019.
 68. Ludwig D.S., Ebbeling C.B., The Carbohydrate–Insulin Model of Obesity: Beyond “Calories In, Calories Out”, *JAMA Intern Med*, **178**(8), 1098–1103, 2018.
 69. Lammers G, Poelkens F, van Duijnhoven N.T., Pardoel E.M., Hoenderop J.G., Thijssen D.H., Hopman M.T., Expression of genes involved in fatty acid transport and insulin signaling is altered by physical inactivity and exercise training in human skeletal muscle, *Am J*

- Physiol Endocrinol Metab*, **303**(10), E1245-1251, 2012.
70. Chaput JP, McHill AW, Cox RC, Broussard JL, Dutil C, da Costa BGG, Sampasa-Kanyinga H, Wright KP Jr., The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity, *Nat Rev Endocrinol*, **19**(2), 87-97, 2023.
 71. Masood B, Batool Zaidi S.A., Alam S, Mir S Causes of obesity: a review, *Clin Med*, **23**(4), 284-291, 2023.
 72. Cohen P, Kajimura S, The cellular and functional complexity of thermogenic fat, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **22**(6), 393-409, 2021.
 73. Purnamasari D, Badarsono S, Moersadik N, Sukardji K, Tahapary D.L., Identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults: Clinical practice guidelines of the obesity clinic, Wellness Cluster Cipto Mangunkusumo Hospital, Jakarta, Indonesia. *JAFES*, **26**(2), 117-21, 2011.
 74. Blüher M, Obesity: global epidemiology and pathogenesis, *Nat Rev Endocrinol*, **15**(5), 288-298, 2019.
 75. Maury J, Issad T, Perdereau D, Gouhot B, Ferré P, Girard J, Effect of acarbose on glucose homeostasis, lipogenesis and lipogenic enzyme gene expression in adipose tissue of weaned rats, *Diabetologia*, **36**(6), 503-509, 1993.
 76. Heck A.M., Yanovski J.A., Calis K.A., Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity, *Pharmacotherapy*, **20**(3), 270-279, 2000.
 77. 齊藤昌之, 褐色脂肪組織による熱産生と体温・体脂肪調節-ヒトでの知見を中心に-, *心身医学*, **60**(3), 210-216, 2020.
 78. Saito M, Yoneshiro T, Matsushita M, Activation and recruitment of brown adipose tissue by cold exposure and food ingredients in humans. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab*, **30**(4), 537-547, 2016.
 79. Fritzen A.M., Lundsgaard A.M., Kiens B, Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise, *Nat Rev Endocrinol*, **16**(12), 683-696, 2020.
 80. Malandrino M.I., Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir J.F., Valcarcel L, Escoté X, Gómez-Serrano M, Peral B, Salvadó L, Fernández-Veledo S, Casals N, Vázquez-Carrera M, Villarroya F, Vendrell J.J., Serra D, Herrero L, Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride

- accumulation and inflammation, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **308**(9), E756-769, 2015.
81. Huo Y, Zhao G, Li J, Wang R, Ren F, Li Y, Wang X, Bifidobacterium animalis subsp. lactis A6 Enhances Fatty Acid β -Oxidation of Adipose Tissue to Ameliorate the Development of Obesity in Mice, *Nutrients*, **14**(3), 598, 2022.
 82. Folch J., Lees M., Stanley H. S. G., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**(1), 497-509, 1957.
 83. Martinez-Gonzalez AI, Alvarez-Parrilla E, Díaz-Sánchez ÁG, de la Rosa LA, Núñez-Gastélum JA, Vazquez-Flores AA, Gonzalez-Aguilar GA, In vitro Inhibition of Pancreatic Lipase by Polyphenols: A Kinetic, Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking Study, *Food Technol Biotechnol.* , **55**(4), 519-530, 2017.
 84. Hossain U, Das AK, Ghosh S, Sil PC, An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications, *Food Chem Toxicol.*, **145**, 111738, 2020.
 85. Martinez-Gonzalez AI, Díaz-Sánchez ÁG, Rosa LA, Vargas-Requena CL, Bustos-Jaimes I, Alvarez-Parrilla AE, Polyphenolic Compounds and Digestive Enzymes: In Vitro Non-Covalent Interactions, *Molecules*, **22**(4), 669, 2017.
 86. Wang X.D., Zheng M, Lou H.F., Wang C.S., Zhang Y, Bo M.Y., Ge S.Q., Zhang N, Zhang L, Bachert C, An increased prevalence of self-reported allergic rhinitis in major Chinese cities from 2005 to 2011, *Allergy.*, **71**(8), 1170-1180, 2016.
 87. Dass K, Petrusan A.J., Beaumont J, Zee P, Lai J.S., Fishbein A. Assessment of sleep disturbance in children with allergic rhinitis, *Ann Allergy Asthma Immunol*, **118**(4), 505-506, 2017.
 88. Shedden A, Assessment of sleep disturbance in children with allergic rhinitis, *Treat Respir Med*, **4**(6), 439-446, 2005.
 89. Fong A.T., Katelaris C.H., Wainstein B.K., Bullying in Australian children and adolescents with food allergies, *Pediatr Allergy Immunol*, **29**(7), 740-746, 2018.
 90. Beken B, Celik V, Gokmirza Ozdemir P, Sut N, Gorker I, Yazicioglu M, Maternal anxiety and internet-based food elimination in suspected food allergy, **30**(7), 752-759, 2019.

91. Strachan D.P., Hay fever, hygiene, and household size, *BMJ*, **299**(6710), 1259-1260.
92. Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE, Age of entry to day nursery and allergy in later childhood, *Lancet*, **353**(9151), 450-454, 1999.
93. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M, Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization, *Clin Exp Allergy*, **30**(2), 194-200, 2000.
94. 池田友久, 食とアレルギーをめぐる話題最前線, *JAS 情報誌*, 53(4), 22-25, 2018.
95. Hobbs C.B., Skinner A.C., Burks A.W., Vickery B.P., Food Allergies Affect Growth in Children, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **3**(1), 133-134, 2015.
96. Kim J, Kwon J, Noh G, Lee SS, The effects of elimination diet on nutritional status in subjects with atopic dermatitis, *Nutr Res*, **7**(6), 488-494, 2013.
97. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H, Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin, *Methods Mol. Biol.*, **1601**, 1-17, 2017.
98. Li X.M., Schofield B.H., Huang C.K., Kleiner G.I., Sampson H.A., A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**(2), 206-214, 1999.
99. Hildén K, Hakala TK, Lundell T, Thermotolerant and thermostable laccases, *Biotechnol. Lett.*, 31(8), 1117-1128, 2009.
100. Matsuda H, Nakamura S, Yoshikawa M, Degranulation Inhibitors from Medicinal Plants in Antigen-Stimulated Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Cells, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*, **64**(2), 96-103, 2016.
101. Huang F, Zhang XY, Zhang LY, Li Q, Ni B, Zheng XL, Chen AJ, Mast cell degranulation induced by chlorogenic acid, *Acta. Pharmacol. Sin.*, **31**(7), 849-854, 2010.
102. Tang JM, Liu J, Wu W, Studies on the Degranulation of RBL-2H3 Cells Induced by Traditional Chinese Medicine Injections, *Chin. Med.*, **3**(4), 200-208, 2012.
103. Nagata J, Matsuzoe T, Akamine Y, Maeda G, Inhibitory Effects of Traditional Okinawan Vegetable Methanol Extracts and Their Primary Constituents on Histamine Release from Human Basophilic KU812

- cells, *Food Sci. Technol. Res.*, **24**(2), 321-327, 2018.
104. Lee NK, Paik HD, Bioconversion Using Lactic Acid Bacteria: Ginsenosides, GABA, and Phenolic Compounds, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(5), 869-877, 2017.
105. Gaur G, Gänzle MG, Conversion of (poly)phenolic compounds in food fermentations by lactic acid bacteria: Novel insights into metabolic pathways and functional metabolites, *Curr. Res. Food Sci.*, **6**, 100448, 2023.
106. Kashino I, Mizoue T, Serafini M, Akter S, Sawada N, Ishihara J, Kotemori A, Inoue M, Yamaji T, Goto A, Iwasaki M, Noda M, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group, Higher Dietary Non-enzymatic Antioxidant Capacity Is Associated with Decreased Risk of All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Japanese Adults, *J Nutr*, **149**(11), 1967-1976, 2019.