

New Food Industry

New food indust. 61 (3): 2019.

3

■ 静水圧処理の葉物野菜への利用

～ほうれん草のみずみずしさ回復と短時間で一夜漬け作り～

■ 健康長寿社会を実現するための次世代型健康機能性米の開発

■ 胚芽納豆の血栓およびガン予防への期待

■ 味覚受容体の機能解析で見えてくる生体における味覚の役割

■ 食成分であるポリアミンによる健康長寿の背景 (2)

— ポリアミン代謝と遺伝子メチル化, および One carbon metabolism について —

—香りと機能、个性的な胡麻素材を揃えました—

(胡麻リグナンの企画製品へ)

■ 胡麻リグナン(セサミン等)が2～数倍の黒胡麻

- ・種苗登録申請中(ミャンマー産)
- ・セサミンの実測値約0.9～1.0% ・規格値:リグナン0.8%以上



●スナック、シリアルバー、菓子等へ



■ リグナンリッチ黒ごまペースト、マイクロパウダー

リグナン黒胡麻を焙煎してペースト、または凍結粉碎化(マイクロパウダー)した原料です。



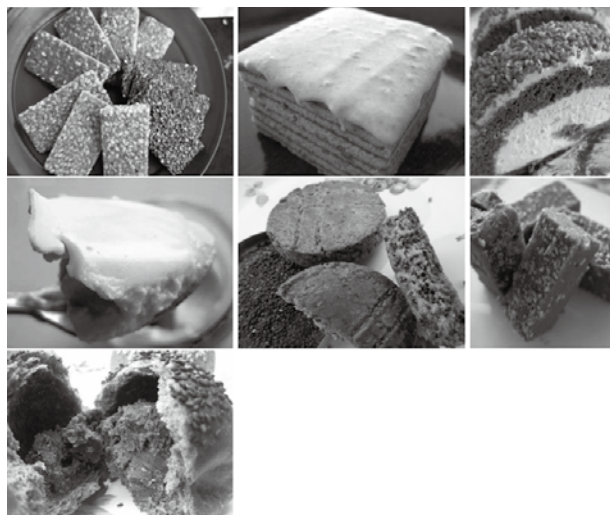
- セサミン実測値0.8%以上
- 黒ごまヨーグルトドリンク、プディング、ゼリー、胡麻ドレッシングへ
(ペーストは焙煎後、数回粉碎した滑らかさが特徴です。同製法は豆乳飲料、プディングに実績があります。)

■ リグナンリッチ黒ごま油(リグナン値1.5%以上)

- ・セサミンの実測値約1.2～1.7%、セサモリン約0.6%
- サプリメントカプセル、ドレッシング、スナックへ
- ・リグナンリッチオイル100%のカプセルOEM 供給も可能です。

■ 胡麻クランチのOEM供給

・2018年7月に「胡麻おやつ研究会」を発足



- ・胡麻を使用した市販のおやつ、スナックの情報を発信。
- ・胡麻リグナン、セサミン等の表示を推奨。
- ・間食を通じて胡麻の利用を提案。

わだまんサイエンス

社 〒604-0845 京都市中京区烏丸御池上る二条殿町 546
TEL / 075-222-7318 FAX / 075-222-0318
<http://www.wadaman-s.com/>

論 文

□ 静水圧処理の葉物野菜への利用

～ほうれん草のみずみずしさ回復と短時間での一夜漬け作り～

High hydrostatic pressure treatment for recovery of spinach freshness and shortening of pickle preparation

..... 川底 瑠華, 清水 昭夫 159

□ 健康長寿社会を実現するための次世代型健康機能性米の開発

..... 赤間 一仁, 西川 彰男, 二川 健 167

□ 胚芽納豆の血栓およびガン予防への期待

..... 須見 洋行, 内藤 佐和, 矢田貝 智恵子, 丸山 眞杉 177

□ 味覚受容体の機能解析で見えてくる生体における味覚の役割

..... 日下部 裕子 182

□ 食成分であるポリアミンによる健康長寿の背景 (2)

ー ポリアミン代謝と遺伝子メチル化, および One carbon metabolism について ー

..... 早田 邦康 189

解 説

□ ニジマス用飼料の炭水化物源-5

..... 酒本 秀一 219

□ グルテンフリー穀物食品と飲料 新解説グルテンフリーパンについて-1

..... 菅瀬口 正晴, 竹内 美貴, 中村 智英子 231

漢方の効能

- (5) 七味唐辛子について

Shichimi togarashi (Mixed-Cayenne-Pepper)

..... 北村 雅史 217

連載

- デンマーク通信 デンマークの生クリーム

..... Naoko Ryde Nishioka 242

- 野山の花 — 身近な山野草の食効・薬効 —

アミガサユリ *Fritillaria thunbergii* Miq.

(=*F. verticillata* Willd. ver. *thunbergii* (Miq.) Baker) (ユリ科 Liliaceae)

..... 白瀧 義明 244

製品紹介

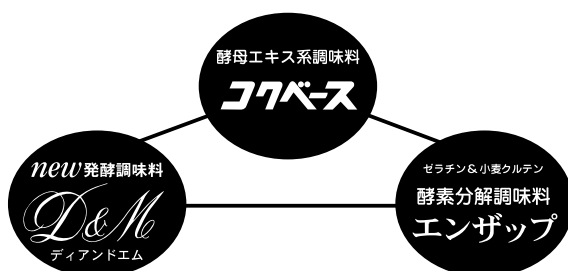
- ◆ 消費者向け商品『スマート生活応援サプリ』シリーズ第2弾

柑橘ポリフェノール素材使用の『へすべり美人®』発売

..... 株式会社 林原 前付 4

おいしさと健康に真剣です。

酵素分解調味料なら
大日本明治製糖へ



新発売! 乳製品にベストマッチな調味料

コクベス

ラクティックイーストエキス

乳加工品・製パン・製菓・チーズ・バターへの
コクづけ、味や風味の底上げなど、ユニークな
特長がある乳糖酵母エキスです。



大日本明治製糖株式会社

食品事業部

〒103-0027 東京都中央区日本橋1-5-3 日本橋西川ビル7F TEL (03) 3271-0755

消費者向け商品『スマート生活応援サプリ』シリーズ第2弾 柑橘ポリフェノール素材使用の『へすぺり美人[®]』発売

このたび、NAGASE グループの株式会社林原（本社：岡山県岡山市北区 代表取締役社長：安場直樹）は、消費者向け商品『スマート生活応援サプリ』シリーズの第2弾製品として、柑橘ポリフェノール素材（糖転移ヘスペリジン）を使用した『へすぺり美人[®]』を2019年1月29日に新発売をしました。

※糖転移ヘスペリジンとは？

みかんやゆずなどの柑橘類に多く含まれるポリフェノールの一種であるヘスペリジンの水溶性を、林原独自の糖転移技術で高めた素材です。1989年に、世界で初めて、ヘスペリジンにグルコースを結合させることに成功し、水溶性とともに、体内への吸収性も向上させました。



商 品 名	へすぺり美人 [®]
内 容 量	30粒（740mg/粒）
商品の特長	水なしで美味しく食べられ、継続していただきやすいタブレットです。
商品サイズ	160mm × 100mm
包 装 形 態	アルミチャック袋
小 売 希 望 価 格	2,000 円（税込）
賞 味 期 限	2 年
販 売 方 法	通信販売林原 e-shop（web 通販ショップ） http://www.hayashibara-eshop.jp/ TEL. 0120-05-8848（受付 / 平日 9:00 ～ 17:00）

静水圧処理の葉物野菜への利用 ～ほうれん草のみずみずしさ回復と 短時間で一夜漬け作り～

High hydrostatic pressure treatment for recovery of spinach freshness and shortening of pickle preparation

川底 瑠華 (KAWASOKO Ruka) 清水 昭夫 (SHIMIZU Akio)*

* 創価大学理工学部共生創造理工学科

Key Words : 静水圧処理 みずみずしさ回復 葉物野菜 成分変化 食品加工

High hydrostatic pressure treatment for recovery of spinach freshness and shortening of pickle preparation

Ruka Kawasoko, Akio Shimizu*

*Department of Science and Engineering for Sustainable Innovation,
Faculty of Science and Engineering, Soka University

Key Words: hydrostatic pressure, recovery of freshness, leafy vegetable, change of nutrient content, food processing

Abstract

Hydrostatic pressure processing was used to recover the freshness of a leafy vegetable. The freshness of shriveled spinach was recovered at low hydrostatic pressure (+0.04~+0.2 MPa) within a short period of time (1~5 min) at room temperature. During this process, the spinach nutrient content, such as potassium, did not change. Interestingly, the strongly shriveled spinach, which could not be restored to freshness using the conventional 50°C washing, could be restored by the hydrostatic pressure processing. In addition, spinach damage caused by the hydrostatic pressure was investigated based on appearance and potassium concentration. The results showed that 10-min hydrostatic pressure processing did not damage spinach at pressures up to +150 MPa, which is the pressure at which enzymes are inactivated and the tertiary structure of proteins is denatured. As another application of low hydrostatic pressure, the possibility of shortening the preparation time of overnight pickles was investigated. The same effect of salt penetration from dip treatment for 18 h under atmospheric pressure was achieved by +1.0 MPa hydrostatic pressure processing for 0.5 h. These results demonstrate the potential of low hydrostatic pressure treatment for use in restoring leafy vegetable freshness and shortening pickling time in general households.

*To whom correspondence should be addressed.

Department of Science and Engineering for Sustainable Innovation,
Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi, Hachioji, Tokyo, 192-8577, Japan
Tel/Fax : +81-42-691-2317 E-mail : shimizu@soka.ac.jp

1. 緒言

近年、人口の増加にともない食料の生産・消費・廃棄量が急増している。世界では生産されている食料の3分の1、量にして年間約13億トンが廃棄されており、日本ではそれにともなう廃棄物の処理に年間約2兆円もの経費を投入しているという報告もある¹⁾。そのため、食料の廃棄量をいかに減らすかということが一つの課題である。中でも葉物野菜は萎びやすく、食べられる状態であっても廃棄してしまうことがある。そこで、家庭レベルで簡単にみずみずしさを回復する方法として50℃洗い²⁾がよく知られている。この方法は温度を48～52℃程度のお湯に野菜を数分漬けることでみずみずしさが回復するというものである。我々は様々な分野への静水圧処理の利用を研究している。1987年に林が高圧力の食品加工への応用を提唱したことをはじめとして、これまで国内外問わず様々なグループが静水圧処理の食品への応用研究をしている³⁻⁶⁾。そして、それらの研究は主に殺菌や付加価値という目的で数百MPaの適用が試みられており、すでに利用された商品が販売されているものもある⁷⁾。一方、我々は+0.1 MPa程度の家庭でも利用できる可能性がある圧力領域でレタスのみずみずしさが回復することを確認している^{8,9)}。しかし、他の葉物野菜も同様にみずみずしさが回復するか、あるいは成分は処理により変わるのかといった詳しいことは分かっていない。

そこで、本研究ではほうれん草を用い、みずみずしさが回復する静水圧を決定するとともに、50℃洗いとの比較を行う。次に、成分変化の指標としてほうれん草中に多く含まれ検出が容易で短時間で検出可能なカリウムを用い、みずみずしさの回復と成分変化の関係を調べることを目的とする。さらに、タンパク質は加熱と同様に加圧でも変性することが知られているので広範囲で温度および圧力を変化させ、ほうれん草がどのような温度あるいは圧力までダメージを受けていない状態を保つことができるのかを調べ、葉物野菜への静水圧の影響の基礎的知

見を得ることを目的とする。また、浸漬水を純水ではなく塩を加えた水を用いて、静水圧処理により常圧に比べ塩がどの程度効果的に入っていくか、“一夜漬け”づくりの時間短縮の可能性についても調べた。

2. 実験

2-1. 試料

ほうれん草はスーパーで販売しているものを購入し、見た目が新鮮で大きさが同じようなものをできるだけ選んで使用した。

みずみずしさ回復実験のために用いた萎びさせたほうれん草は、購入後のほうれん草を1日、3日および1週間程度冷蔵保存(4℃)することで調整した。新鮮な(みずみずしい)ものは葉の葉柄の部分を持った時に葉身の部分までまっすぐ立つが萎びてくると曲がる。本研究では葉の葉身部分が葉柄部分につく程度までになったものを萎びた状態としてみずみずしさ回復実験に用いた。

2-2. みずみずしさ回復実験

みずみずしさ回復方法として50℃洗いと静水圧処理の2つの方法を用いた。

ほうれん草は数枚の葉を組み合わせ約6gになるようにした。カリウム量を定量するために電子天秤で正確に質量を記録しておいた。このほうれん草を100gの超純水を入れたナイロンポリ袋(アスクワークス)に入れシーラー(FS-300, アスクワークス)で封をして用いた(図1)。



図1 水の入ったビニール袋にほうれん草を入れた状態

以下，“ナイロンポリ袋に入れたほうれん草”はこの状態のほうれん草を示すものとする。

50℃洗いは50±1℃に制御したお湯を入れたビーカー内に“ナイロンポリ袋に入れたほうれん草”を入れ、3, 5, 10分間処理した。

静水圧処理においてはまず水を入れたステンレス製の内容量295 mLの円筒型(Φ50×150 mm)圧力容器に水を入れ、その中に“ナイロンポリ袋に入れたほうれん草”を入れた。次にこの圧力容器を電動式の送液ポンプ(分析用のHigh Performance Liquid Chromatography用ポンプ)につないで加圧した。温度はあえて制御せず室温20～25℃で行った。また、0.1 MPaは常圧、1気圧であるため0.1 MPaで加圧したと表記すると常圧処理ととらえられる可能性がある。そのため静水圧処理では加えた圧力ということが明確に分かるように+を付けてあらわすことにする。

2-3. 加熱・静水圧処理

加熱処理は循環式恒温槽(ヤマト科学株式会社BU150S)およびマントルヒーター(大科電気株式会社)を用い常圧下で20～100℃の温度範囲で行った。

静水圧処理は圧力範囲により2つの装置を用いた。+4.0 MPa以下の低圧は2-2項に示したみずみずしさ回復実験に用いた装置。+50 MPa以上の高圧側はすでに谷内ら¹⁰⁾により報告されている装置と同様のものを用い、最大+365 MPaまで加圧した。ただし、高圧容器の部分は葉物野菜が入るように内容量295 mLの円筒型(Φ50×150 mm)圧力容器を用いた。

加熱処理の時に用いたビーカー内の水および静水圧処理の時の圧力容器内の水はすべてRO(Reverse Osmosis)水を使用した。

2-4. カリウム量の定量

ほうれん草中のカリウム量は、処理後のほうれん草に1%塩酸(和光純薬工業株式会社083-01095 1 mol/L塩酸を調製したもの)30 mLを加え、ミキサー(マジックプレット デラックス、

Shop Japan)を用い約1分間破碎した。次に、遠心分離機(KUBOTA 5200)を用い、1300×g(3000 rpm)で10分間遠心分離し、上澄み液と残渣に分けた。分離した上澄み液をコンパクトカリウム計(LAQUA-K-11, HORIBA)でカリウム量を測定した。処理後に浸漬水中に溶出したカリウム量は浸漬水を直接コンパクトカリウム計で測定して求めた。

ほうれん草中に含まれるカリウム量は葉により異なる。そこで、カリウム残留率は各実験ごとに上記の方法でほうれん草中のカリウム量と浸漬水中のカリウム量の絶対値を求め、ほうれん草中と浸漬水中のカリウム量の和に対するほうれん草中のカリウム量の比から求めた。定量実験はn=2, 3で行った。

2-5. KCl 溶液の調製

塩化カリウム(和光純薬工業株式会社 163-03545)を超純水に溶かし、ほうれん草に含まれるカリウム量を1とした時の0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 15倍のKCl溶液を調製した。

3. 結果

3-1. 萎びたほうれん草のみずみずしさ回復条件および成分変化

3-1-1. 50℃洗いと静水圧処理の比較

1日, 3日および約1週間冷蔵庫内で静置し萎びさせたほうれん草を50℃の湯に3分間浸した。その結果, 1日および3日間萎びさせたほうれん草は葉身の淵の部分などにわずかにみずみずしさ回復効果が確認されたが(図2a), 約1週間萎びさせたほうれん草は回復しなかった(図2b)。また, 処理時間を5, 10分と長くしてもみずみずしさ回復効果は3分間処理と同程度であった。

静水圧処理は3日間萎びさせたほうれん草を用い, 室温で種々の圧力(+0.02～+0.60 MPa)および処理時間(1～15分)で行った。評価は3つの状態に分類した。

×: みずみずしさ回復効果がなかった状態。

○: 葉柄部分を持ったときみずみずしい状態と

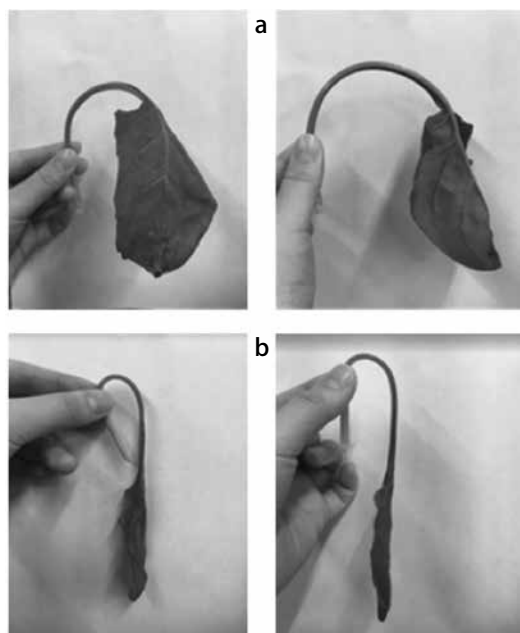


図2 50℃洗い前(左)と3分処理後(右)
a: 1日または3日間萎びさせたほうれん草
b: 1週間萎びさせたほうれん草

同じ適度な硬さの状態。

●: みずみずしい状態に比べ水が入りすぎて色が少し薄くなるとともに過度に硬くなった状態(図3)。

得られた結果を表1にまとめた。その結果、+0.02 および +0.04 MPa で1, 2, 5分間処理ではみずみずしさ回復効果は得られなかった。しかし、+0.04 MPa でも15分間処理すると新鮮

表1 3日間萎びさせたほうれん草に対する静水圧処理後のみずみずしさ回復

処理圧力 (MPa)	処理時間 (min)			
	1	2	5	15
常圧	×	×	×	×
0.02	×	×	×	×
0.04	×	×	×	○
0.06	○	○	○	
0.08	○	○	○	
0.10	○	○	○	
0.20	○	○	○	
0.40	○	●	●	
0.60	●	●	●	

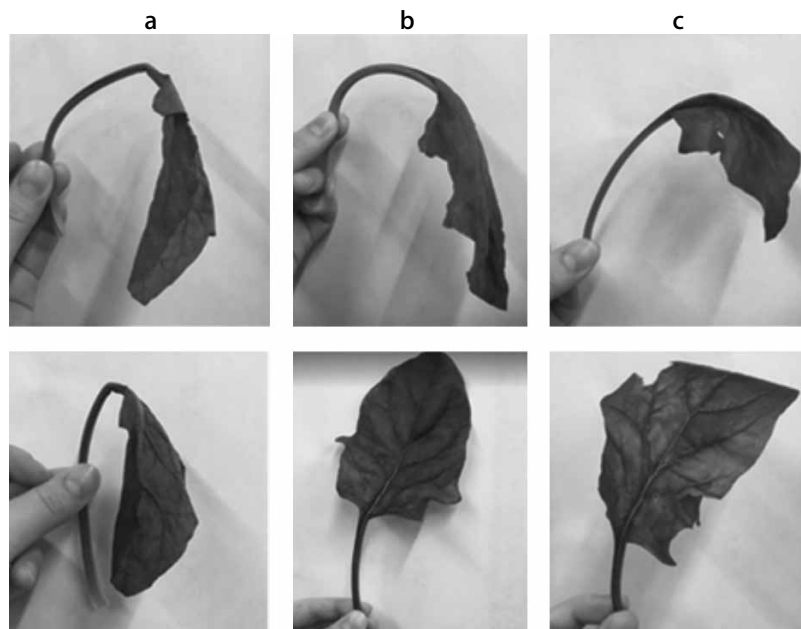


図3 静水圧処理前(上)と処理後(下)

- a: × みずみずしさ回復効果がなかった状態
b: ○ 葉柄部分を持ったときみずみずしい状態と同じ適度な硬さの状態
c: ● みずみずしい状態に比べ水が入りすぎて色が少し薄くなるとともに過度に硬くなった状態

なものと同程度まで回復した。さらに、高い圧力 +0.06 ~ +0.20 MPa で 1, 2, 5 分の静水圧処理では、新鮮なほうれん草と同程度までみずみずしさ回復効果が得られた。それ以上の静水圧処理では水が入り過ぎ、色が少し透明になるとともに過度に硬くなることがわかった。また、圧力が高くなるとより短時間で効果が認められ、時間が長くなるとより低圧での効果が認められた。これらは松浦ら⁸⁾により示されたレタスの結果と同様であった。ここでは写真等は示さないがレタスの時と同様に、●：みずみずしい状態に比べ水が入りすぎて色が少し薄くなるとともに過度に硬くなった状態のものは処理後に空気中で放置しておくとき水分が少しずつ蒸発していき、みずみずしい状態に戻ることが確認された。当然、そのままさらに放置しておくとき萎びた状態となった。

さらに、1 日および約 1 週間萎びさせたほうれん草においても条件を +0.06 ~ +0.2 MPa で 1, 2, 5 分間に絞って静水圧処理をした。当然のことながら 1 日萎びさせたほうれん草はこの条件でみずみずしさ回復効果が見られた。また、50℃洗いではみずみずしさ回復効果が得られなかった約 1 週間萎びさせたほうれん草でもみずみずしさが回復するという結果が得られた。

以上の結果より、50℃洗いではみずみずしさを回復が得られなかった萎びたほうれん草でも静水圧処理でみずみずしさ回復効果が得られた。したがって、静水圧処理は室温付近の温度であまり温度の事を気にせず、+0.06 ~ +0.2 MPa 程度の低い圧力で 50℃洗いよりも高いみずみずしさ回復効果が得られる可能性が示唆された。海で言えば水深 10 m で約 +0.1 MPa 圧力がかかるので、水深 6 m から 20 m の深さでみずみずしさが回復する計算になる。

3-1-2. 静水圧処理後のほうれん草中に含まれるカリウムの残留率

みずみずしさが回復する圧力条件において成分変化を調べるために、+ 0.1 ~ + 1.0 MPa で処理してカリウム残留率を調べた。その結果、

みずみずしさが回復した条件ではカリウム残留率が $97.5 \pm 1.0\%$ であり、ほうれん草中のカリウムは浸漬水に溶出しないことがわかった。本研究ではカリウムのみを調べたが、他の水溶性成分も同様の傾向が得られると予測される。さらに疎水性成分はもともと水には溶けにくいいため溶出する可能性は極めて低いと考えられる。以上の結果から、静水圧処理では単にほうれん草内に水が入っていくだけでほうれん草内の成分は処理前とほとんど変わらないことが示唆された。

ここまで、静水圧処理によるみずみずしさの回復条件および 50℃洗いとの比較を詳しく示した。つぎに、それではどの程度の圧力をかけると見た目が変わってしまうのか、カリウムが溶出してしまうのか、みずみずしさが回復した条件よりさらに高い圧力で静水圧処理し影響を調べた。ここで、使用するほうれん草は萎びた状態ではなく新鮮な状態のものをを用いて行った。

3-2. ほうれん草中に含まれるカリウムの残留率および見た目に対する温度および圧力の影響

3-2-1. 常圧、水中におけるほうれん草中のカリウム量の温度および時間依存

図 4 に常圧下 10 分間処理で、20℃ ~ 100℃ の範囲で 20℃ 間隔でカリウム残留率の温度依存を示した。その結果、40℃ まではカリウム

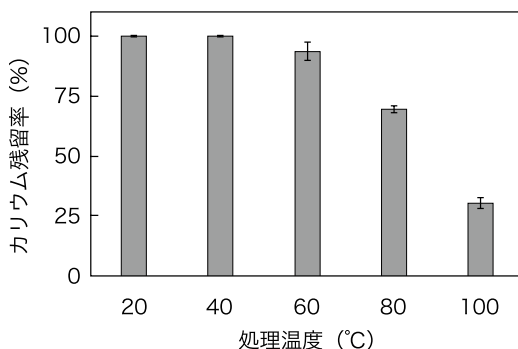


図 4 ほうれん草中のカリウム残留率の温度依存 (常圧 10 分処理) (n = 3)

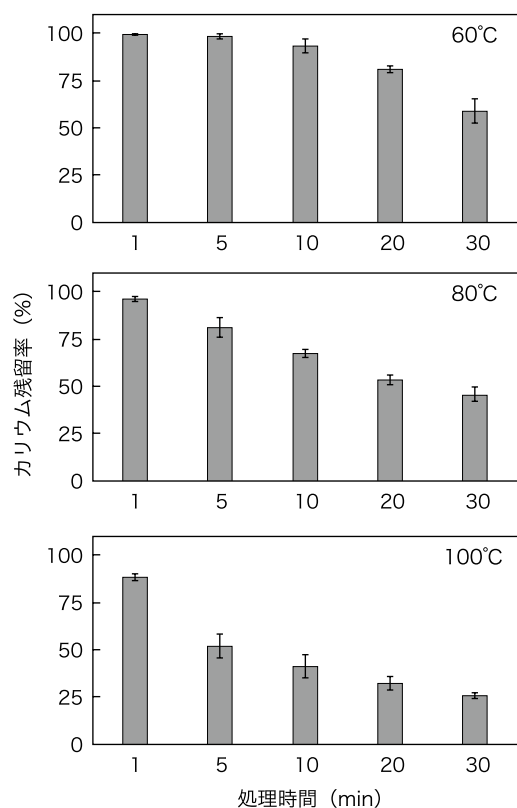


図5 常圧下 60, 80, 100℃ で加熱処理後のカリウム残留率の処理時間依存 (n = 3)

が100%残留しており、見た目も新鮮なみずみずしい状態を保持していた。一方、60℃以上ではカリウム残留率の減少が認められ、温度上昇にともなってカリウム残留率は減少していった。カリウム残留率に対応して見た目はゆでた状態のように変化した。さらに、10分間処理でカリウム残留率の減少が観測された60～100℃において処理時間1～30分でカリウム残留率の時間依存を調べた(図5)。その結果、60℃では30分間処理しても50%を割ることはなかったが80℃では30分、100℃ではわずか5分で50%と100℃で急激に時間が短縮される結果が得られた。また、室温で120分まで処理してみたがカリウムは全く溶出しなかった。

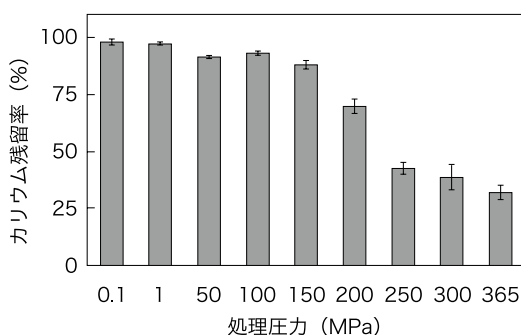


図6 静水圧処理後のほうれん草中のカリウム残留率の圧力依存(室温 10分処理) (n = 3)

3-2-2. 室温の水中におけるほうれん草中のカリウム量の圧力依存

+0.1 MPa から+365 MPa まで10分間静水圧処理後のカリウム残留率の処理圧力依存を図6に示した。+0.1 MPa ではカリウム残留率の減少は確認されず、見た目の変化も観察されなかった。また、+1.0～+150 MPa では水が過度に入り硬化した状態になったがカリウム残留率の減少はほとんど見られなかった。見た目は+150 MPa を超えたあたりから少しずつゆでたような状態になり、+200 MPa を超えると完全に見た目はゆでたものと同様になった。カリウム残留率も+150 MPa を超えると急激に減少し、+250 MPa 以上の処理ではほぼ一定値30%程度に減少する結果が得られた。したがって+150 MPa の静水圧処理は、ほうれん草の組織に影響をおよぼすしきい値であることが確認された。この圧力はG.Roxらの圧力プローブ分析を用いて高静水圧が新鮮な赤キャベツの細胞に与える影響を調べた研究と同様であることがわかった¹¹⁾。

以上、加熱と静水圧がほうれん草のカリウム残留率と見た目におよぼす影響を調べた結果、10分間処理の場合、温度では60℃、静水圧では+150 MPa がほうれん草の組織に影響をおよぼすしきい値であることが明らかとなった。

3-3. 浸漬する溶液の KCl 濃度を変えた時のほうれん草中へのカリウム浸透量と処理時間と処理圧力の影響

3-3-1. 室温・常圧でのほうれん草中へのカリウム浸透量の浸漬水中の KCl 濃度依存 (18 時間浸漬)

これまで、浸漬水に超純水を用いてほうれん草内に元々含まれるカリウムが温度・圧力・時間でどのように変化するか調べてきた。ここでは逆に浸漬水にカリウムを加えて加圧するとほうれん草内に入っていくか調べた。これは、常圧に比べ加圧により短時間で入れば一夜漬けの漬物を短時間で作ること等の応用につながる可能性がある。厳密には塩 (NaCl) を使うべきだとは考えるが本研究では一連の流れとしてカリウムをモニターすることにした。そこで、まず、常圧で一夜漬けを意識して室温・18 時間処理で浸漬水中のカリウム量とほうれん草中の KCl 濃度の関係を調べた。処理後のほうれん草は浸漬水から取り出し数回振ることでほうれん草の表面についている浸漬水を振り落とし、カリウム量の測定をした。図 7 に浸漬水中のカリウム量をほうれん草 1 g 中に含まれるカリウム量の 15 倍の KCl 濃度まで調べた結果を示した。図 7 より、ほうれん草中のカリウム量は浸漬水中の KCl 濃度に比例して増加することがわかった。

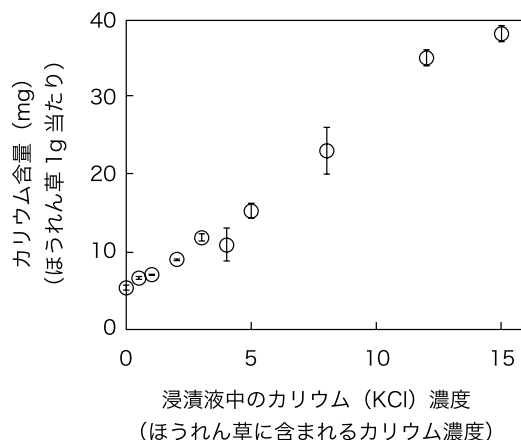


図 7 浸漬時間 18 時間におけるほうれん草中のカリウム量と浸漬水中の KCl 濃度の関係 (n = 2)

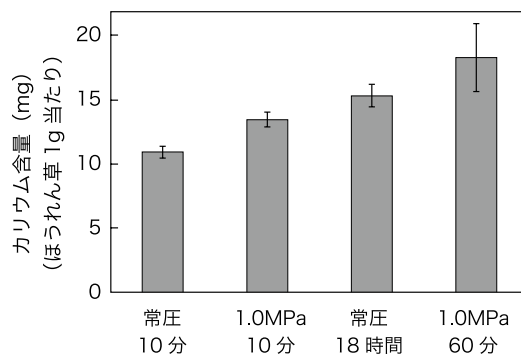


図 8 ほうれん草中に含まれるカリウム量の 5 倍量の濃度の KCl 水溶液に浸漬したときの各条件で処理後のほうれん草中のカリウム量 (n = 2)

3-3-2. 室温でほうれん草中へのカリウム浸透量に対する圧力依存 (浸漬水中の塩 KCl 濃度 0 ~ 5 倍)

3-3-1 項で浸漬水中の KCl 濃度とほうれん草中に浸透するカリウム量が比例することがわかったので浸漬液中の KCl 濃度が新鮮なほうれん草 1 g 中に含まれる値の 5 倍の条件で加圧の影響を調べた。比較のために常圧では 10 分間処理と 18 時間の 2 条件、加圧は +1.0 MPa の条件で 10 分と 60 分間処理の 2 条件、合わせて 4 条件の結果を比較した。図 8 に処理後のほうれん草中に含まれるカリウム量が少ない順に並べた結果を示した。その結果、一夜漬けを仮定

した常圧・18 時間より +1.0 MPa・60 分の方がより多くカリウムが浸透することがわかった。+1.0 MPa・10 分と 60 分間処理の値から比例計算してみると +1.0 MPa では約 30 分の処理で常圧・18 時間処理と同等のカリウム浸透量を得られることがわかった。したがって、わずかに +1.0 MPa の低圧でも短時間で非常に効率的に浸透させる効果があることが認められた。

4. 結言

萎びたほうれん草を室温付近で温度をあまり気にせず圧力範囲 +0.06 ~ +0.2 MPa, 処理時間 1, 2, 5 分で静水圧処理するとみずみずしさを回復させられることが確認された。また、この結

果は本研究室の松浦や山崎により調べられたレタス等の結果と同様であることがわかった。したがって、静水圧処理は萎びた葉物野菜のみずみずしさ回復に広く使える技術であることが示唆された。一方、これまで広く知られている50℃洗いでは十分なみずみずしさ回復効果が得られないような1週間おいて萎びた状態のほうれん草でも静水圧処理では回復させられることが本研究で明らかとなった。また、M.D.Santosらは、室温付近の可変（制御されていない）温度条件下での高圧保存の可能性を示唆しているが、本研究ではこの可能性を支持する結果が得られた¹²⁾。したがって、温度制御を厳密にする必要がない点、50℃洗いでは回復できないような萎びたほうれん草でもみずみずしさを回復させられる点では静水圧処理が勝る可能性が高い。しかし、50℃洗いはどの家庭でも簡単に利用できる技術であるのに対して、静水圧処理は専用の装置が必要で今後家庭でも使えるような安価で操作性の良い製品を作る必要がある。

みずみずしさを静水圧で回復させられる条件

で成分（カリウム量）変化を調べたところ変化はなく、浸漬水に純水を用いる場合、静水圧処理では成分を溶出させることなく単に水を浸透させ、みずみずしさを回復させていることが示された。

加熱と高静水圧処理でほうれん草の見た目とカリウム量を10分間処理で調べたところ、温度では60℃、圧力では150 MPaでの処理がほうれん草の組織に影響をおよぼすきい値であることが明らかとなった。

最後に、一夜漬けのモデルとして浸漬水に高濃度のKCl溶液を用いて処理したほうれん草中のカリウム量を調べた結果、常圧で18時間と同様の効果がわずか+0.1 MPaの静水圧で30分程度処理することで達成できることが示された。

以上のようにこれまで食品への圧力の利用の多くは数百 MPa の高圧であったが、本研究で+1.0 MPa 程度の非常に低い圧力で萎びた葉物野菜のみずみずしさ回復や短時間で一夜漬けができるなど静水圧を利用した食品処理の新たな可能性も期待される結果が得られた。

参考文献

1. 消費者庁：食品ロス削減関係参考資料（平成30年6月21日版）
http://www.caa.go.jp/policies/policy/consumer_policy/information/food_loss/efforts/pdf/efforts_180628_0001.pdf
2. 50℃洗いと低温スチームing <http://www.steaming-cook.com/category/1520459.html>
3. 林力丸：食品への高圧利用．さんえい出版（京都），1989．
4. K.Yamamoto: Food processing by high hydrostatic pressure. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **81**(4): 672-679. 2017.
5. 毛利信男：新しい高圧力の科学．株式会社講談社（東京），2003．
6. 重松亨，西海理之：進化する食品高圧加工技術—基礎から最新の応用事例まで．株式会社エヌ・ティー・エス（東京），2013．
7. 高圧技術の産業化 越後製菓株式会社 <https://www.echigoseika.co.jp/enjoy/high-pressure-technology/07.php>
8. 松浦周作，山崎礼子，清水昭夫：静水圧処理によるレタスの鮮度回復に関する研究，第57回高圧討論会講演要旨集．2016．
9. 山崎礼子：魚のすり身の保存性・有用成分に対する高静水圧処理および葉物野菜の鮮度回復に対する低い圧力での静水圧処理の効果．創価大学修士論文．2014．
10. 谷内正博，清水昭夫：高圧力処理による香辛料の熟成期間短縮に関する研究，*New Food Industry*. **49** (12): 2007.
11. G.Rux, O.Schlüter, M.Geyer, *et al.*: Characterization of high hydrostatic pressure effects on fresh produce cell turgor using pressure probe analyses, *Postharvest Biology and Technology* **132** (4): 188-194. 2017.
12. M.D.Santos, R.P. Queiros, L.G. Fidalgo, *et al.*: Preservation of a highly perishable food, watermelon juice, at and above room temperature under mild pressure (hyperbaric storage) as an alternative to refrigeration, *LWT-Food Science and Technology* **62**: 901-906. 2015.

連絡先： ☎ 192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

創価大学理工学部共生創造理工学科 清水昭夫

Tel & Fax 042-691-2317 e-mail shimizu@soka.ac.jp

健康長寿社会を実現するための 次世代型健康機能性米の開発

赤間 一仁 (AKAMA Kazuhito)¹ 西川 彰男 (NISHIKAWA Akio)¹ 二川 健 (NIKAWA Takeshi)²

¹ 島根大学 学術研究院農生命科学系, ² 徳島大学 大学院医歯薬学研究部生体栄養学分野

Key Words : 健康寿命・高血圧・廃用性筋萎縮・GABA・Cblin

はじめに

日本は超高齢化社会である。2015 年の高齢化率（65 歳以上の人口比率）は 26.6% と世界第 1 位であり、第 2 位のイタリア（22.4%）を 4% 以上も引き離している¹⁾。国民の平均寿命は男性が 80.2 歳、女性が 86.6 歳と毎年伸びてはいるが、健康寿命は男性では 9 年、女性では 12 年も短い¹⁾。この差は過去 10 年以上ほとんど縮まってはいない。これは高齢者の多くが長期間介護を受けながら最晩年を迎えていることを意味する。要介護の老人数は 2006 年には 320 万人であり、2015 年には 435 万人と 10 年余りの間に 100 万人以上も増加している²⁾。介護に至る要因として、脳卒中、認知症、老衰、関節疾患、骨折などが上げられる。言うまでもなく、医療・介護費は毎年増加しており、国の財政悪化に拍車を掛けている。これからは限られた予算の中で予防医学を中心とした対策を推進することが強く求められており、食を通して健康の維持を計る「医食同源」の考えが大きなヒントになる。要介護の要因を食生活から予防・低減する機能性食材が開発できれば、高齢者の健康寿命を延ばせるだけでなく、QOL（生活の質）の改善や医療介護費の大幅な削減もまた期待できる。

コメの消費はピーク時に 118 kg/ 年（1962 年）であったが、現在は 54 kg/ 年（2016 年）と半

分以下に落ち込んでいる³⁾。しかし、平均すると国民 1 人当たり 1 日約 150 g（1 合）は摂取しており、依然として重要な食材であることには変わりがない。もしコメ 1 合に健康機能性成分を十分に富化できれば、持続的な摂取により安定した効果が期待できる。日本では健康機能性成分やワクチン成分をコメに富化させた遺伝子組換えイネの開発が活発に進められてきており⁴⁾、技術的な問題は克服されている。コメは室温での保存性、輸送性に優れており、栽培技術が高度に確立されているために安価に供給できる。長期間保存しても成分が大きく分解・低下することはない。

それではどのような機能性成分が対象となるであろうか？非タンパク質態のアミノ酸の一種である γ -アミノ酪酸（GABA）は生活習慣病の予防、ストレス緩和、学習機能・認知症の改善など優れた効能を持つことから、健康機能性成分として広く認知されている⁵⁾。また、'Cblin' は宇宙生物学の研究から生まれた新しい機能性ペプチドである。筋力の低下を回復するにはリハビリ以外に有効な治療法は知られていないが、Cblin の摂取は寝たきりなどによって生じる廃用性筋萎縮が原因の筋力低下を防止する効果があることがマウスを用いた試験により確かめられている⁶⁾。

本稿ではこれらの機能性成分を含有するコメ

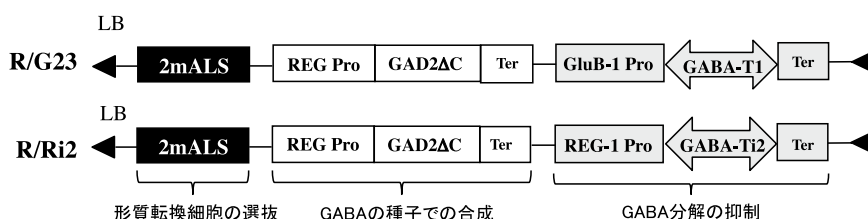


図1 イネ形質転換に用いたベクターの構造

文献 14) より改作

の開発の現状と二つの成分を併せ持つ新しいコメの開発の可能性について解説したい。

GABA 強化米の開発

1. 研究開発の目的と戦略

GABA は植物が様々なストレスを受けることで細胞内に急速に蓄積することが知られている⁷⁾。GABA の細胞内での合成はグルタミン酸を基質とした脱炭酸反応による。この反応を触媒するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) は、細胞内 GABA 含有量を決定する重要な酵素である。興味深いことに、植物の GAD は一般にその C 末端部分に Ca^{2+} /カルモジュリン結合ドメイン (CaMBD) を持ち、ストレスに応答した細胞内 Ca^{2+} イオンの上昇に伴って、 Ca^{2+} /CaM が GAD-CaMBD に結合して酵素活性が高まる⁸⁾。このような調節は細菌や動物の GAD にはない。筆者らはイネ GAD の活性調節に関わる知見を元にして、タンパク質工学的な改変をイネ GAD に施し、その酵素活性の飛躍的増大が起こることを報告した。さらに、分子育種学的手法により種子特異的な発現と組み合わせることで、コメに高濃度 GABA を含有する組換え日本晴イネ系統株を作出することに成功した。このコメを高血圧症のモデルラットに経口投与と試験を行なった結果、GABA 高含有米は週齢の進行に伴う血圧上昇を抑える効果があることをすでに報告した。これら一連の研究成果は 2010 年発行の本誌で解説している⁹⁾。

以降、遺伝子組換え作物に対する社会的受容 (PA) に配慮し、食の安心・安全 (形質転換のための選抜マーカーとして細菌由来の抗

生物質耐性遺伝子ではなく、イネ由来の遺伝子 *mALS*: 改変アセト乳酸合伝酵素遺伝子を採用¹⁰⁾と消費者の良食味志向 (代表的な品種であるコシヒカリを親株として使用) を念頭に置き、より高濃度の GABA を含有する健康機能性米 (イネの GABA 分解経路の分子生物学的な知見を元にして¹¹⁾、分解酵素の発現抑制の試み) を開発したので報告する。

2. イネ形質転換による GABA 強化米の作出

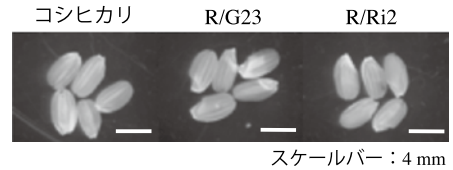
コメに GABA を高濃度に蓄積させるために、予備実験の結果を基にしてイネ胚グロブリン遺伝子 (REG) 由来のプロモーターを選択し、これを改変 *GAD2ΔC* 遺伝子に連結した。また、GABA の分解を抑制するために、GABA の異化酵素である GABA アミノ基転移酵素 (GABA-T) を RNA レベルで抑える RNAi カセットを構築してベクターに組み込んだ。形質転換が起きた細胞をマイルドに選抜するために、イネ由来の *mALS* を用いた (図 1)。この遺伝子が組み込まれた細胞は特定の除草剤に対する耐性を選抜の過程でのみ獲得する。以上より、イネ染色体 DNA に組み込まれるベクター部分は遺伝子導入に用いるアグロバクテリウムの T-DNA の境界配列 (RB と LB) を除いて全てイネの遺伝子由来である。形質転換はコシヒカリの胚盤由来カルスを用いて行った¹²⁾。いずれかのベクターを運ぶアグロバクテリウムを感染後に約 1 ヶ月間除草剤ピリミノバックで選抜し、耐性カルスを再生培地に移植してシュート (芽) を誘導した。再生シュートは PCR で選抜を行い、最終的に 20 系統を確立した¹³⁾。

粒数が十分な T_1 世代 (種子の世代) からそ

れぞれ6粒の玄米を粉碎して遊離アミノ酸を抽出し、簡便法により GABA 濃度を測定した。その結果、分析した約半数の系統でコシヒカリ玄米の GABA 濃度 (2 ~ 3 mg/100g) の3倍から100倍以上の GABA 含有が観察された¹³⁾。成長した苗は土に移植し、島根大学に設置してある特定網室 (約40平米) で栽培した。イネは開花から50日後に収穫を行い各種調査・分析を行った。個体ごとに形質を調査した結果、コシヒカリとランダムに選んだ組換えイネでは調査項目 (乾重量、桿長、穂長、分げつ数、穂の数、登熟歩合、千粒重) で有意な差は観察されなかった。

T₁世代のイネは5月にその苗を土に移植後、9月下旬から10月に掛けて収穫し、T₂世代の玄米重量と GABA 含量を調べた。図2に示すように、選抜した2系統の玄米で GABA 含量が100g当たりでそれぞれ184mg, 122mgとコシヒカリ GABA の60 ~ 100倍であった。粒ごとの玄米重量は R/G23 系統ではコシヒカリと差はなく、R/Ri2 はやや低下していた。

実用化を念頭に置いた場合、蓄積した GABA が長期間の保存によっても安定的に維持されていることは重要である。T₃世代の種子は9月下旬から10月に掛けて収穫し、玄米を精米後



GABA ^a	2.0 ± 1.0	184 ± 36	122 ± 35
重量 ^b	20.0 ± 1.9	19.5 ± 1.6	17.5 ± 1.5

図2 コメ (T₂) の形態と GABA 含量・重量
^amg/100g 玄米 ^bmg/粒

に室温で1年間保存した。この間、GABA を含めていくつかの遊離アミノ酸の動態を経時的に調べた。図3に示すように、Ala や Glu のように減少するものも見られたが、組換えの2系統とも GABA の減少は見られず、R/G23 は、500 mg/100g, R/Ri2 は 100 mg/100g 前後であった。これは通常の白米に含まれる GABA 濃度の実に約50 ~ 250倍に相当する。長期間安定的に GABA を維持できたこととして、GABA 分解系を抑制する効果が考えられる。

T₄世代の栽培は、島根大学の特定網室と委託栽培サービス (インプラント・イノベーションズ (株)) を利用した韓国の隔離圃場 (4月 ~ 10月)¹⁴⁾ の2カ所で行った。まず、特定網室で栽培したイネから収穫したコメ (T₄世代) の遊離アミノ酸はコシヒカリを含む3系統か

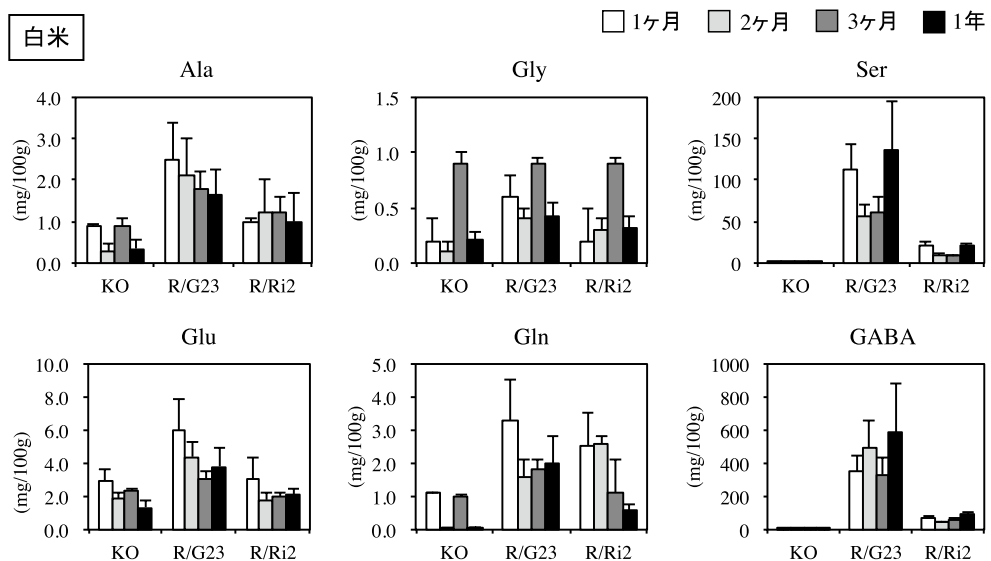


図3 コシヒカリ (KO) と組換えの白米 (T₃) に含まれる遊離アミノ酸の経時的調査

表1 韓国隔離圃場で栽培した非組換えコシヒカリと組換えコシヒカリ (R/G23) の白米 (T₄) の遊離アミノ酸

アミノ酸	非組換えコシヒカリ	組換えコシヒカリ	比
	(mg/kg 白米)	(mg/kg 白米)	
Ala	10.8 ± 1.1	21.8 ± 4.6 *	2.0
Gly	4.9 ± 0.0	5.6 ± 0.2 **	1.1
Val	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5
Leu	3.8 ± 0.0	4.0 ± 0.2	1.1
Ile	0.5 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.3
Ser	8.3 ± 0.9	212.9 ± 27.7 **	25.8
pro	1.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2 *	1.8
Asn	12.7 ± 5.5	4.7 ± 2.1	0.4
Asp	22.3 ± 5.1	20.8 ± 0.0	0.9
Met	7.1 ± 0.2	7.0 ± 0.1	1.0
Glu	31.7 ± 10.9	31.2 ± 2.1	1.0
Phe	2.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1 *	1.1
Gln	8.8 ± 0.4	11.8 ± 0.1 **	1.3
Lys	6.0 ± 0.7	6.3 ± 0.1	1.1
His	7.6 ± 0.7	7.9 ± 1.2	1.0
Tyr	8.2 ± 0.2	8.2 ± 0.2	1.0
Trp	9.2 ± 0.2	9.5 ± 0.1	1.0
Cys	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.3
GABA	15.4 ± 2.2	694.5 ± 76.8 *	45.0
合計	162.9 ± 28.9	1054.5 ± 116.2 **	6.5

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (対非組換え) 文献 14) より改作

らそれぞれ4株を抽出し、GABAを含むタンパク質態のアミノ酸を定量した。前年度の測定結果と同様に、GABAはいずれの系統共に極めて高い値を示した。100 gの玄米で、コシヒカリ、R/G23、R/Ri2ではそれぞれ0.7 mg, 965 mg, 210 mgであった。白米ではそれぞれ約半分の含量であった。タンパク質態のアミノ酸ではSerがT₃世代と同様に高い値を示した。一方、韓国隔離圃場の栽培のコメは収穫後に半年間種籾を低温室に保存し、非組換えのコシヒカリと組換えコシヒカリ (R/G23 系統) の玄米を精米してGABAを含む遊離アミノ酸の分析を行った (表1)。GABA含量はコシヒカリで1.5 mg/100 g、R/G23で69.4 mg/100 gであり、特定網室で収穫したものに比べて大幅に低下していた。この傾向はGABAだけでなく、他のタンパク質態の遊離アミノ酸でも同様の傾向が見られた。栽培環境の違いがコメ中の遊離アミノ酸含量に影響

表2 韓国隔離圃場で栽培したコシヒカリと形質転換イネの精白米の食品成分分析 (/100 g)

分析項目	コシヒカリ ^a	R/G23 ^b	R/Ri2 ^c
水分 (g)	11.5	11.5	11.5
タンパク質 (g)	7.2	7.8	8.0
脂質 (g)	1.1	1.1	1.3
灰分 (g)	0.6	0.6	0.6
炭水化物 (g)	79.6	79.0	78.6
エネルギー (kcal)	3.57	3.57	3.58
ナトリウム (mg)	1.3	2.4	1.3
鉄 (mg)	0.48	0.39	0.39
カルシウム (mg)	5.6	4.9	5.0
カリウム (mg)	105	102	103
マグネシウム (mg)	51.8	48.0	42.6
亜鉛 (mg)	2.66	2.47	2.10
チアミン (ビタミン B ₁) (mg)	0.17	0.09	0.09
ビタミン B ₆ (mg)	0.17	0.16	0.16
ビタミン E (α-トコフェロール) (mg)	0.6	0.2	0.2

文献 14) より改作 ^a No. 12000429001-01 (certificated by Food Analysis Technology Center, Osaka Japan)^b No. 12000429001-02 (certificated by Food Analysis Technology Center, Osaka Japan)^c No. 12000429001-03 (certificated by Food Analysis Technology Center, Osaka Japan)

表3 ラット混合飼料に含まれる GABA 量の測定

製造した混合飼料	(ラット投与飼料名)	GABA 濃度 (mg/kg)
0.25% R/G23 含有飼料	(低濃度 GABA 米)	N.D.
2.5% R/G23 含有飼料	(高濃度 GABA 米)	5.1±0.1
2.5% KO 含有試飼料	(コシヒカリ対照米)	N.D.
2.5 mg/100g GABA 添加含有飼料	(精製 GABA 添加米)	12.8±1.7

したものと考えられる。

生育特性について、穂数、登熟歩合、千粒重など主要な調査項目ではいずれの栽培環境でも組換えイネと非形質転換イネの間に有意な差はみられなかった。種子内で *GAD24C* を過剰発現させることが植物体の生育や登熟には影響しないことを野外実験で検証することができた。野外栽培したイネの白米の成分分析を日本食品分析センター（大阪支所）に依頼して行った結果、基礎成分、ミネラル、ビタミン類の項目で野生型コシヒカリと大きな差は見られなかった（表2）。

3. 混合飼料の作製と動物試験¹⁴⁾

GABA は動物において抑制性の神経伝達物質であるだけでなく、腎臓機能の改善、血管の拡張、抗利尿ホルモンの分泌抑制などを介して血圧を下げる効果も持つ¹⁵⁾。高血圧ラットを用いた従来の実験では、ラットの体重 kg 当たり 0.5 mg GABA を含む餌を毎日投与することで血圧上昇を抑えられることが報告されている¹⁶⁾。表1に示すように、韓国の隔離圃場で栽培した米（コシヒカリと R/G23 系統）の GABA 含量は白米 kg 当たりでコシヒカリが 15 mg、R/G23 が 694 mg であった。R/G23 白米を 0.25%、或いは 2.5% を標準飼料に添加した混合飼料をオリエンタル酵母（株）に依頼して作製した。負のコントロールとして、2.5% のコシヒカリを添加した飼料

を、正のコントロールとして、飼料に 25 mg/kg の濃度で精製 GABA を添加したものを同時に作製した。試験の前にこれら飼料に含まれる GABA 濃度を測定した結果、高濃度 GABA 米では 5.1 mg/kg、精製 GABA 添加米では 12.8 mg/kg であった（表3）。これに対して、低濃度 GABA 米とコシヒカリのコントロール米では GABA が検出限界（0.1 mg/kg 以下）を下回り検出されなかった。5 週齢のオス本態性高血圧自然発症ラット（SHR/Ncr1Cr1j）は 1 週間標準飼料（MF）で馴化後に、4 群（n=8）に分けて 9 週間に渡って混合飼料を自由給餌した。図4に示すように、いずれの群でも血圧は徐々に上昇したが、実験の進行と共に 4 群の間で血圧差が観察された。コシヒカリを添加したコントロール米投与群が最も高く、次に低濃度 GABA 米投与群であり、高濃度 GABA 米群と精製 GABA 添加米群は 5 週目以降にコントロール米投与群と有意差が見られ、その血圧

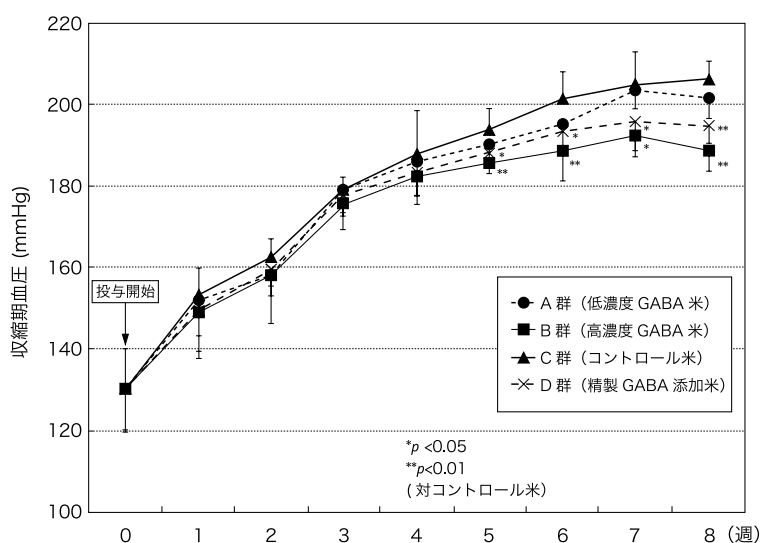


図4 高血圧ラット (SHR) を用いた投与試験 文献 14) より改作

差は拡大した。8週目で高GABA米群とコントロール米群とを比較して、約20 mmHgの血圧上昇の抑制効果が観察された。精製GABA添加米群ではGABA濃度がより高いにも関わらず、10 mmHg程度の降下作用であった。このことから、GABA強化米において連動して上昇した遊離アミノ酸などGABA以外の米成分が血圧降下に関与している可能性がある。日本晴のGABA強化米を用いて行った投与試験でもすでに同様の結果が得られている¹⁷⁾。同じ投与試験をSHRの親株であるWKYを用いて5週間行った。血圧の推移に関し、4つの投与群間(n=5)で1週目の低濃度GABA米投与群を除いて有意差はみられず、精製GABAのみならず米由来のGABAもまた正常血圧に対する降圧作用がないことが検証された。

Cblin 米の開発

1. 筋合成と筋萎縮のメカニズム

宇宙空間や寝たきり状態による筋肉への負荷が低下し、筋萎縮が進行する「廃用性筋萎縮」のメカニズムが近年明らかにされた。寝たきりや無重力環境下では、運動器(骨や筋)の成長を促進するIGF-1(Insulin-like Growth Factor-1)シグナルは弱められ、その下流に位置するリン酸化酵素であるAktなどが活性化されない。この結果、リン酸化されない転写因子FOXOは核内に移行し、様々な筋萎縮関連遺伝子の転写を高める(図5)¹⁸⁾。中尾らは萎縮した筋肉ではユビキチンリガーゼの一種であるCbl-bが顕著な発現上昇を示すことを明らかにし、Cbl-bがIGF-1シグナルの弱화에深く関与することを突き止めた¹⁹⁾。筋萎縮時にはCbl-bタンパク質の発現が増大するのに対して、IGF-1シグナルの重要な伝達因子であるIRS-1(Insulin

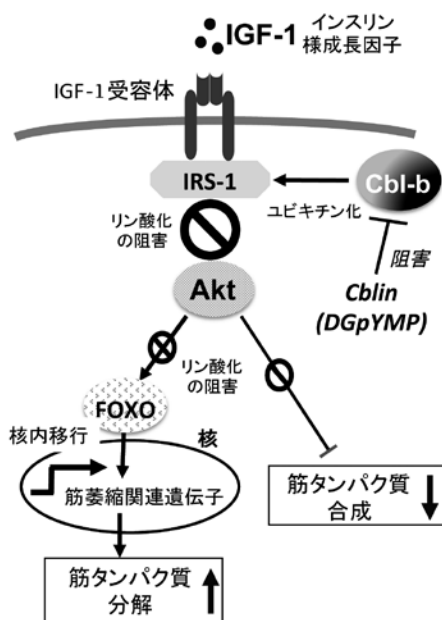


図5 筋萎縮のメカニズムとCblinの作用

文献18)より改作

Receptor Substrate-1)は減少を示した¹⁹⁾。このことから、Cbl-bはIRS-1のユビキチン化と分解を促進することで、IGF-1シグナルを遮断し、筋タンパク質の分解を強く誘導すると結論づけられた(図5)。IRS-1のチロシンリン酸化部位を中心に合成したオリゴペプチドを無細胞のユビキチン化アッセイ系を用いてスクリーニングした結果、チロシン(Y)残基がリン酸化されたDGpYMP(またはDGYMP)のペプタマーペプチド(図5: Cbl-b阻害活性を持つことからCblinと命名)は強いユビキチン化阻害作用を持つことが分かった¹⁹⁾。

脊椎動物のIRS-1アミノ酸配列を比較すると、驚いたことに、Cblin配列(DGYMP)が高度に保存されていることが分かった(図6)。このことは水生動物から哺乳動物に至るまで、IGF-1シグナルはIRS-1を介して筋肥大と筋萎

ツメガエル	-----ANHKD	DGYMP	MSPGVAPVS---	TKTNDYMP	MSPKSVSAPQQI	INP--RW	403
ゼブラフィッシュ	-----GPDHKD	DGYMP	MLPGVAPATP-	TTKSSDYMP	MSPKSVSAPQQI	INP--RQ	606
ヒト	GHHRPDSSTL	HTDDGYMP	MSPGVAPVPS	SGRKGSGDYMP	MSPKSVSAPQQI	INPIRRHP	656
マウス	GHHRPDTSNL	HTDDGYMP	MSPGVAPVPS	NRKNGDYMP	MSPKSVSAPQQI	INPIRRHP	652
	*.*****	*.*****	*.*****	*.*****	*.*****	*.*****	*

図6 脊椎動物IRS-1のアミノ酸配列の比較

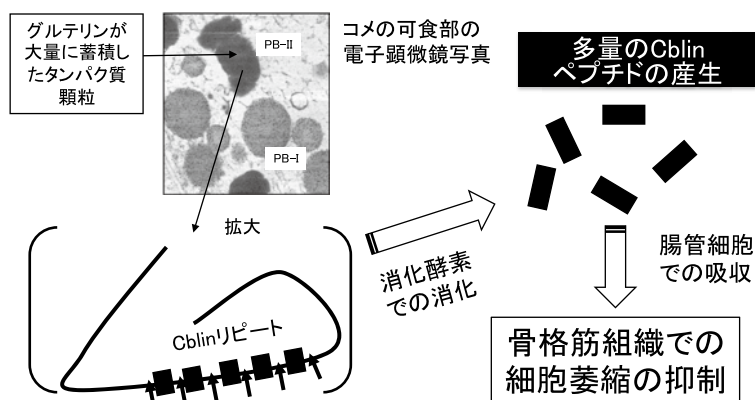


図7 コメ中へのCblinの蓄積、摂食によるCblinペプチドの派生と筋萎縮の抑制

縮の両方を制御している可能性を示唆する。

2. コメを用いたCblinの合成とCblinペプチドによる筋萎縮抑制の可能性

ペプチド合成は極めて高価であり、かつペプチドの経口投与では吸収前に分解されてしまう。機能性ペプチドをコメ貯蔵タンパク質の一部として合成できれば、単に薬としてではなく、ご飯として毎日普通に食することで効果が期待できる。イネ貯蔵タンパク質の集積過程に関する基礎研究成果と種子特異的な高発現プロモーターの利用により、機能性タンパク質を安定的にコメ中に蓄積させる系は確立している²⁰⁾。これら基盤成果からスギ花粉症の元となる花粉抗原エpiteope²¹⁾やインスリン分泌に関わるGLP-1ペプチド²²⁾などが貯蔵タンパク質に組み込まれ、作出したコメを動物臨床試験に供した結果、期待される効果が報告されている。これらの知見をまとめると、Cblinをイネグルテリンタンパク質に組み込めば、コメ中のタンパク質顆粒PB-IIへ集積され、難消化性のPB-Iと異なり、摂食後に消化酵素によって徐々に分解され腸管細胞から吸収され、骨格筋組織で機能性を発揮することが期待される(図7)。

3. Cblinペプチドを筋組織に効率的にデリバリーするための戦略

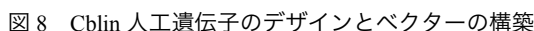
コメ中で合成された機能性ペプチドの効果を高めるため、ノボキニン²³⁾やラクトスタチン²⁴⁾

ではQRスパーサーを挟んでそれぞれ3回と6回繰り返した構造がデザインされ、いずれも動物試験において効果が認められている。筆者らはCblinペプチドを効率良く筋組織にデリバリーするために、WQスパーサーを挟んだ15回の反復したCblinペプチドをコードする人工遺伝子を構築した(WQ336と呼ぶ)(図8A)。あえてアルギニン(R)を避けたのは塩基性アミノ酸残基ではCbl-bとの結合を干渉する可能性があったからである。WQ336をコードする遺伝子は大腸菌発現ベクターに組み込み、融合タンパク質を合成・精製した。融合タンパク質をキモトリプシンまたはパンクレアチンで消化し、15-20 kDaのペプチドを逆相クロマトグラフィーにより分離した結果、Cblin様ペプチド(QDGYMPW)と同一の保持時間を持つペプチドを得ることができた。派生したCblin様ペプチドを*in vitro*でユビキチン化アッセイに供した結果、Cbl-bを介したIRS-1のユビキチン化はCblin様ペプチドにより阻害された。このことから、WQ336の消化産物はCbl-bの阻害剤とし働くことがはっきりした。

4. Cblinをコメに高含有するイネの作出

WQ336をコードする人工遺伝子は二つの異なるイネ貯蔵タンパク質グルテリン(GluA-2とGluB-4)遺伝子に組み込まれ、それぞれGluA-2::WQ336とGluB-4::WQ336とした。さらに、GluA-2とGluB-4の可変領域をWQ336

B. Cblinをコメで発現させるためのベクターの構造



5. 動物を用いた Cblin 米の経口投与試験

重量を求めた。この結果、非形質転換米を含む餌では1週間の投与試験により筋断面積が神経切除していない肢に比べて、20%も減少していた。一方、Cblin米を配合した餌では切除していない一方の肢の筋断面積と差が見られなかった。

②マウスを用いた試験⁶⁾: 6週齢のマウス(♂, n=3)に対して, 1週間の予備飼育後に普通飼料(カゼイン食)とカエルと同様に, 普通飼料とコメ粉(Cblin 米または非組換え米)を1:1で混ぜた餌をそれぞれ2週間与えた。飼料を与えてから1週間後に片方の後肢を神経切除し, その6日後に骨格筋の分析を行なった。この結果, 普通飼料と非組換えコメ混合飼料の投与群ではいずれもコントロールとしたもう一方の肢の筋湿重量に比べて20%の減少が見られた。これに対し, Cblin 米投与群ではその減少が有意に抑えられていた。また, 筋断面積の比較でも筋細胞の萎縮は抑制されていた。分子レベルの解析では, Cblin 米投与群で IRS-1 の分解は抑えられ, 筋萎縮関連遺伝子の発現も減少していた。以上より, Cblin 米の経口投与によって, ツメガエルと同様に廃用性筋萎縮を有意に抑制することが判明した。

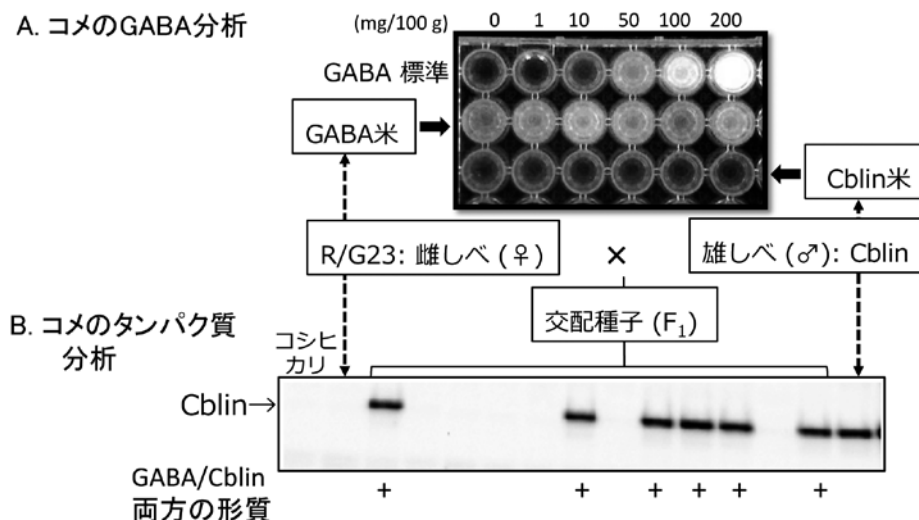


図9 交配による GABA と Cbclin の両方の形質を持つコメの作出

おわりに

高 GABA と Cbclin 含有の両方の形質を持つコメの開発に向けて

開発したコシヒカリを親株にした GABA 強化米はヒト (体重 60 kg) に換算した場合、一日茶碗一杯 (約 0.5 合 = 75g) のご飯を毎日食することで血圧調整作用を始めとして、生活習慣に由来する種々の症状やストレスの緩和、認知症の予防にも効果が期待できる。2009 年に作出した GABA 強化米系統イネ (R/G23 系統) は 2018 年の時点で 10 世代目になった。毎年コメの遊離アミノ酸分析を行っており、安定した GABA 蓄積を継続して確認している。一方、現在までに開発した Cbclin 含量が最も高い米は玄米 100 g 当りで約 160 mg の Cbclin 含有タンパク質を含んでいると計測されている。骨格筋萎縮を予防するタイズタンパク質のような既存の機能性食材を元にして計算すると²⁵⁾、1 日 1.5 ~ 2 合程度の摂食により筋萎縮抑制効果が期待される。

高齢者の健康寿命を延ばしうる新食材の開発のため、安定した形質を示す GABA 強化米系統イネ R/G23 (♀) と Cbclin 米系統イネ (♂) の掛け合わせを実施した (図 9A)。得られた F₁ 雑種種子を半分に分け、胚乳のみを含む半粒か

らタンパク質を抽出し、抗 Cbclin 抗体を用いてウエスタン解析を行なった。この結果、GABA 強化米から Cbclin タンパク質を検出することができた (図 9B)。世代を進めて次世代の種子 (F₂) を得ている。今後導入遺伝子の DNA レベルの解析を行い、GABA 形質および Cbclin 形質について遺伝子型がいずれもホモ系統のものを選抜する予定である。さらにホモ系統イネの育成を進めて、安定的に GABA と Cbclin を高含有する米系統イネを確立する。

ゲノム編集技術は作物の品種改良において用いられ始めてはいるものの²⁶⁾、高濃度 GABA 米や Cbclin 米のように画期的な形質を有する作物の開発には至っておらず、少なくとも機能性ペプチドを始めとして本来作物が持たない成分を可食部に蓄積させる上では、遺伝子組換え技術が優れていると言える。遺伝子組換え作物の商業栽培が始まってから 20 年以上が経過したが、幸いこの間に健康被害がでたという報告はなく、食品としての安全性はしっかりと担保されている²⁷⁾。

今後、このような次世代型の健康機能性米の認識と普及が進み、健康長寿社会を実現する一助になることを願ってやまない。

文 献

1. 平成 29 年版高齢社会白書（全体版）- 内閣府：https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2017/html/zenbun/s1_1_5.html
2. 平成 30 年版高齢社会白書（全体版）- 内閣府：https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2018/html/zenbun/s1_2_2.html
3. 農林水産省ホームページ：http://www.maff.go.jp/j/seisan/kikaku/pdf/data01.pdf
4. 高野誠：遺伝子組換えによる機能性米の開発。遺伝 **70**: 301-306, 2016.
5. 横越英彦：ストレスと GABA。静岡，静岡新聞，2007.
6. 井田くるみ，赤間一仁，二川健他：コメから宇宙へ-unloading による筋萎縮を克服する。実験医学 **35**, 1530-1533, 2017.
7. Kinnnersley A.M.: Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**: 479-509, 2000.
8. Baum G., Chen Y., Arazi T., *et al.*: A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem.* **268**: 19610-19617, 1993.
9. 赤間一仁：GABA を高濃度に含む健康機能性米。New Food Industry **51**: 16-26, 2009.
10. Okuzaki A., Shimizu T., Kaku K., *et al.*: A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice. *Plant Mol. Biol.* **64**: 219-224, 2007.
11. Shimajiri Y., Ozaki K., Kainou K. *et al.*: Differential subcellular localization, enzymatic properties and expression patterns of γ -aminobutyric acid transaminases (GABA-Ts) in rice (*Oryza sativa*). *J. Plant Physiol.* **170**: 196-201, 2013.
12. Wakasa Y., Ozawa K., Takaiwa F.: Agrobacterium-mediated transformation of a low glutelin mutant of 'Koshihikari' rice variety using the mutated-acetolactate synthase gene derived from rice genome as a selectable marker. *Plant Cell Rep.* **26**: 1567-1573, 2007.
13. Shimajiri Y., Oonishi T., Ozaki K. *et al.*: Genetic manipulation of the γ -aminobutyric acid (GABA) shunt in rice: overexpression of truncated glutamate decarboxylase (GAD2) and knockdown of γ -aminobutyric acid transaminase (GABA-T) lead to sustained and high levels of GABA accumulation in rice kernels. *Plant Biotechnol. J.* **11**: 594-604, 2013.
14. Kowaka E., Shimajiri Y., Akama K. *et al.*: Field trial of GABA-fortified rice plants and oral administration of milled rice in spontaneously hypertensive rats. *Transgenic Res.* **24**: 561-569, 2015.
15. 茅原紘，杉浦友美：近年の GABA 生理機能研究 - 脳機能改善作用，高血圧作用を中心に -。食品と開発 **36**: 4-6, 2001.
16. 辻啓介，市川富夫，田辺伸和他：紅麴抽出物と γ -アミノ酪酸の高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用。栄養学雑誌 **5**: 285-291, 1992.
17. Akama K., Kanetou J., Shimosaki S., *et al.*: Seed-specific expression of truncated OsGAD2 produces GABA-enriched rice grains that influence a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Transgenic Res.* **18**: 865-876, 2009.
18. Sandri M., Sandri C., Gilbert A. *et al.*: Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**: 399-412, 2004.
19. Nakao R., Hirasaka K., Goto J. *et al.*: Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol. Cell Biol.* **29**: 4798-4811, 2009.
20. Takaiwa F.: Transgenic rice seed as a nutraceutical delivery system. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. **2**: 1-9, 2007.
21. Takagi H., Hiro T., Yang L. *et al.*: A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 17525-17530, 2005.
22. Sugita K., Endo-Kasahara S., Tada Y. *et al.*: Genetically modified rice seeds accumulating GLP-1 analogue stimulate insulin secretion from a mouse pancreatic beta-cell line. *FEBS Lett.* **579**: 1085-1088, 2005.
23. Onishi K., Matoba N., Yamada Y. *et al.*: Optimal designing of β -conglycinin to genetically incorporate RPLKPW, a potent anti-hypertensive peptide. *Peptides* **25**: 37-43, 2004.
24. Wakasa Y., Tamakoshi C., Ohno T. *et al.*: The hypocholesterolemic activity of transgenic rice seed accumulating lactostatin, a bioactive peptide derived from bovine milk β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 3845-3850, 2011.
25. Abe T., Kohno S., Yama T. *et al.*: Soy glycinin contains a functional inhibitory sequence against muscle-atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b. *Int. J. Endocrinol.* **2013**: 907565, 2013.
26. 刑部祐里子，刑部敬史：植物でのゲノム編集 - 分子育種の新技术を目指した最新展開。実験医学 **34**: 3356-3362, 2016.
27. 小島正美編：誤解だらけの遺伝子組み換え作物。東京，エネルギーフォーラム，2015.

連絡先： 〒690-8504 島根県松江市西川津町 1060
 国立大学法人 島根大学 生物資源科学部生命科学科
 大学院自然科学研究科農生命科学専攻
 Tel: 0852-32-6431 E-mail: akama@life.shimane-u.ac.jp

胚芽納豆の血栓およびガン予防への期待

須見 洋行 (SUMI Hiroyuki)¹ 内藤 佐和 (NAITO Sawa)¹ 矢田貝 智恵子 (YATAGAI Chieko)¹
丸山 眞杉 (MARUYAMA Masugi)²

¹ 倉敷芸術科学大学生命科学部 ² 宮崎大学医学部

Key Words : 納豆菌 ナットウキナーゼ ビタミン K₂ ポリアミン 胚芽大豆 大豆イソフラボン
エクオール

要旨

乳ガン, 前立腺ガンの予防に大豆のイソフラボンが関与することはよく知られている。大豆イソフラボンのほとんどが胚芽に含まれており, 胚芽で作られた胚芽納豆には, 若返りに関係するとされるポリアミン類が一般の納豆の10倍以上多く, 血栓溶解に関係するナットウキナーゼ活性, さらにビタミン K₂ の含有量もはるかに優れていることが分かった。

大豆はイソフラボンを多く含む食品である¹⁾ (表1)。イソフラボンは, 大豆の成長過程で作られ, そのほとんどは胚芽に含まれている。イソフラボンのうちダイゼインやゲニステインは, 特にエストロゲン作用を有しており, ダイゼインは体内で腸内細菌によりガン予防に働くエクオールに代謝される²⁾。しかしながら, エクオールが体内で産生されるか否かは, 近年, 個人の代謝能によるものであり, 日本ではエクオールを生産できる人は約50%であることが報告されている²⁾。

このような現状において, エクオールを腸内で産生させる食品や直接摂取するエクオールの商品開発などが進んでいる。我々は, イ

ソフラボンを多く含む胚芽に着目し, 納豆菌で発酵させることで, イソフラボンだけではなく, ポリアミンやビタミン K₂ などを高含量含み, さらにナットウキナーゼ活性の高い新規納豆の開発を試みた。

材料および方法

大豆胚芽は加藤製油(株)より購入, 納豆菌(*Bacillus subtilis natto*) スターターは宮城野菌を使用した。大豆胚芽納豆は, 蒸煮した大豆胚芽に納豆菌を植菌し, 41℃, 24時間のインキュベーションで作製したものをを用いた。

フィブリン平板法

フィブリン平板法には, 例えば胚芽納豆の場合, 粉末にした後, その10 gをイオン交換水で100 mLにメスアップし, 遠心分離後の上清を試料として用いた。

フィブリン平板³⁾は, 0.5% フィブリンノーゲン溶液 (0.17 M ホウ酸 - 生食

表1 大豆および発酵食品中のイソフラボン濃度¹⁾

	ダイジン	ゲニステチン	ダイゼイン	ゲニステイン
大豆	1630	2130	92	178
テンペ	163	268	1063	2580
味噌	480	362	483	1120
納豆	1270	1185	183	127

乾燥大豆 1gあたりの HPLC 分析による含有量 (μg) を示す。

緩衝液, pH7.8) 10 mL と 50 U/mL のトロンビン 500 μ L を用いて作製し, 試料 30 μ L をのせ, 37℃ でインキュベーションし, 24 時間後に生じる溶解面積 (長径 $\times$ 短径: mm^2) を測定した。

合成基質法

合成基質 I (Bz-Ile-Glu- (OR) -Gly-Arg-pNA: 積水メディカル, S-2222) を用いて分解活性 (力価) を測定した。合成基質は DMSO に溶解し 5×10^{-3} M のものを用いた。0.17 M ホウ酸 - 生食緩衝液 (pH7.8) を用いた反応系 1.0 mL に対し 0.1 mL 使用し, 37℃, 1 分間に 1 μ mol の pNA が生成する酵素活性をナットウキナーゼ 1 国際単位 (IU: International Unit) とした^{4, 5)}。また, 合成基質 II (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA: Sigma) を用いて同様に活性を測定し, 合成基質 I の活性と比較した⁴⁾。

ビタミン K₂

ビタミン K が白金 - アルミナ触媒でヒドロキノン体に還元され蛍光化することを利用して, HPLC 法で測定した⁶⁾。97% エタノールを展開溶媒とし, カラムは ODS- II ($\phi 4.6 \times 250$ mm) を, 触媒カラムは白金 - アルミナ ($\phi 4.0 \times 10$ mm) を用いて, 蛍光検出器で励起波長 320 nm, 蛍光波長 430 nm, 40℃, 流速 0.7 mL/min で操作した。

アミン類

ポリアミンおよびジアミンは HPLC 法⁷⁾ で測定した。50 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (2 mM のフタルアルデヒドおよび *N*-アセチル-L-システイン含む) を展開溶媒とした。カラムは Shodex Asahipak ODP-50 4D ($\phi 4.6$ mm $\times$ 150 mm) を用いて, 蛍光検出器で励起波長 330 nm, 蛍光波長 430 nm, 40℃, 流速 0.5 mL/min で操作した。

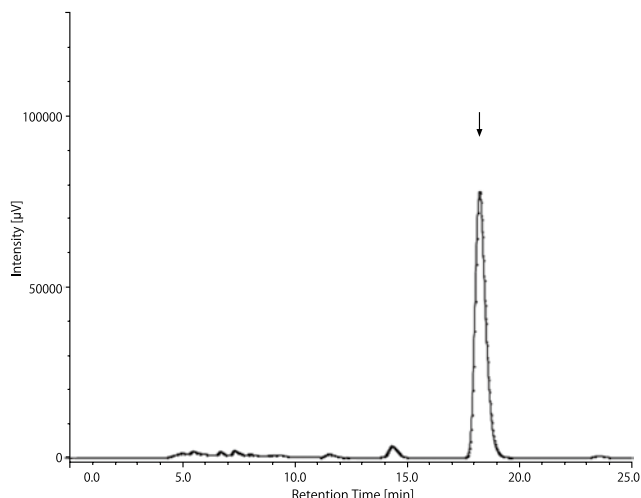


図1 胚芽納豆のビタミン K₂
矢印はメナキノン-7のピークを示す。

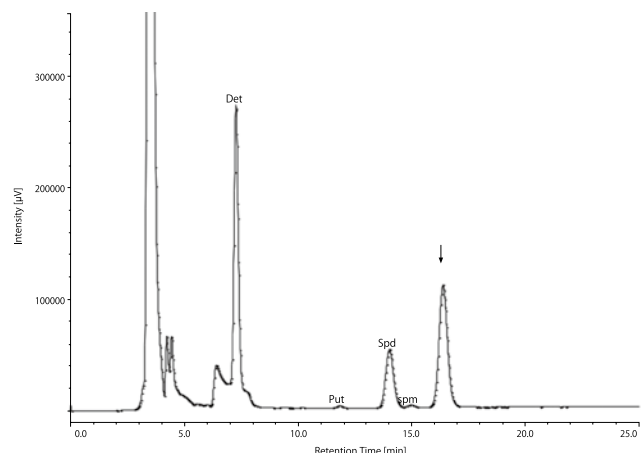


図2 胚芽納豆のポリアミン含量
カダベリンのピーク (矢印) が高まっていた。

結果

胚芽納豆の血栓溶解活性は一般の納豆並みに強く, また, 50℃ 熱乾燥させたものは, 非乾燥に比べ約 2.5 倍であった。

ビタミン K₂ も, 一般納豆に比べ約 3 倍高含量であることが分かった (図 1)。

アミン類も一般納豆の約 10 倍以上であり, しかも総アミン量 (約 75 mg/100 g) のほとんど (約 50 mg/100 g) を占めていたのがジアミンであるカダベリンであることが分かった (図 2)。

なお, これらの値はこれまで我々が分析して

表2 胚芽納豆の機能性成分

	ナットウキナーゼ力価 (IU/g)	ビタミン K ₂ (μg/100g)	ポリアミン (カダベリンを含む) (mg/100g)
胚芽納豆	1.48	2,800	75.00 (50.14)
一般納豆 (鑑評会：n=98)	1.03±0.53	905±284	5.64±2.50

全て湿重量 (wet wt.) 換算値での比較。

きた全国納豆鑑評会で受賞した納豆よりも高く、特にポリアミン (ジアミン) 含量は顕著であった (表2)。

考察

大豆胚芽を用いた麹菌あるいは乳酸菌による効率的なアグリコン型イソフラボンの精製方法が既に確立されているが、本研究では、イソフラボンだけでなく、その他の機能成分に富んだ優れた食品となることが明らかになった。なお、胚芽納豆の熱乾燥物はニオイも少なく、また粉末化したものは扱いやすいため、各種加工食品への利用が期待できるものである。

この研究発案のきっかけとなったのが「黒千石発芽納豆」の機能成分分析をする機会を得たことである。以下、その概略を紹介しよう。

大豆を水に浸漬して発芽させると、特に栄養価の高い黒千石大豆では Glu, Arg, Ala および γ-アミノ酸量が増加した (BML フードサイエンス調査) (図3)。

この発芽大豆納豆 (黒千石) と未発芽大豆納豆の分析値を比較したところ、表3に示すように発芽大豆納豆のナットウキナーゼ力価は1.33 IU/gと非常に高まっていることが分かった。なお、合成基質Ⅰに対する活性が合成基質Ⅱに対する活性を上回る結果となり (Ⅰ / Ⅱ =

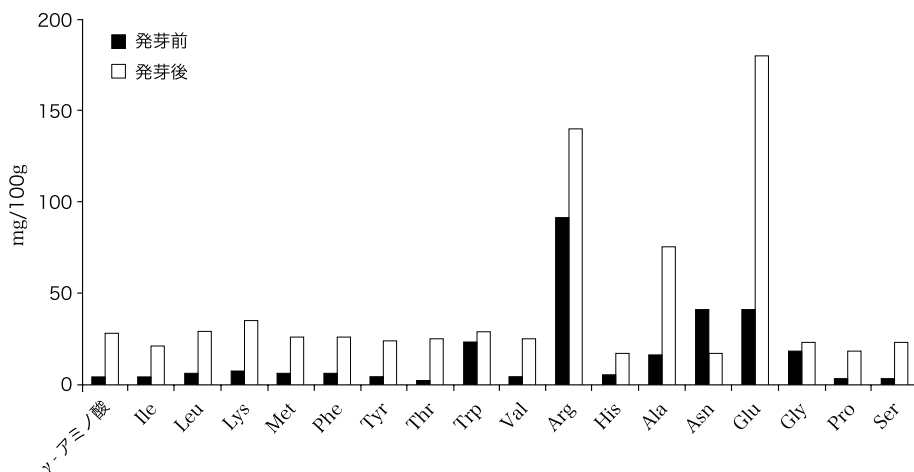


図3 発芽大豆によるアミノ酸の増加

表3 発芽納豆の機能成分

	ナットウキナーゼ力価 (IU/g)	ビタミン K ₂ (μg/100g)	ポリアミン (mg/100g)
発芽大豆納豆	1.33±0.51	689±217	13.24±1.91
未発芽大豆納豆	0.64±0.21	519±30	7.90±0.62

全て湿重量 (wet wt.) 換算値での比較。

表 4 大豆の健康影響のエビデンスレベル²⁾

作用	Natural Standard 2005, USA	SNIJ	物質	濃度
1. タンパク質	A		タンパク質	
2. 高コレステロール血症 LDL コレステロール血症 高脂血症	A		タンパク質, イソフラボン	30 ~ 50g 大豆タンパク質
3. 小児下痢症	B		大豆食物繊維	
4. 更年期ほてり 更年期片頭痛	B C	A B	イソフラボン	50 ~ 75mg イソフラボン
5. 乳がん予防	C	A	イソフラボン	
6. 前立腺がん予防	C	A	イソフラボン	
7. 結腸がん予防	C		イソフラボン	
8. 心血管疾患予防	C	B	イソフラボン	40 ~ 80mg イソフラボン
9. ネフローシス	C			
10. 骨粗鬆症	C	A	イソフラボン	60 ~ 80mg イソフラボン
11. 肥満	C		大豆食品	
12. 2 型糖尿病	C			7g 大豆食物繊維
13. 認知症, 記憶改善	C		イソフラボン? ペプチド?	

評価は上から A, B, C の順に高いことを示す。

約 2.0), この酵素がナットウキナーゼであることを示している。

ビタミン K₂ はいずれのサンプルでも検出され、発芽大豆では約 689µg/100g であった。

また、ポリアミンは、発芽大豆納豆の方がはるかに高く (約 13.24 mg/100 g), 中でもプトレシンは約 3 倍, スペルミンは約 2 倍, スペルミジン は約 1.5 倍に増えていた。

発酵で生じるナットウキナーゼは各種疾患の予防に働くことで注目されている^{8,9)}。

大豆の投与効果では、特にガン予防について米国 Natural Standard の判定と, SNIJ (Soy

Nutrition Institute Japan) 臨床試験結果があり (表 4)²⁾, 共にイソフラボンに強い効果が示唆されている。

本研究の一部は「黒千石発芽納豆」を調整した株式会社豆蔵の本間照蔵氏の協力によるものであり, 誌面をもって感謝の意を表す。

今後, 日本の食を豊かにしている大豆とその発酵技術によって, 我が国の, さらに世界の人々の健康を支える研究成果が世に出ることを期待する。

参考文献

1. H. Sumi and C. Yatagai: Soy in Health and Disease Prevention, Taylor & Francis, pp251-278, 2005.
2. 渡邊昌：第1章がん予防，大豆と日本人の健康，2-12, 渡邊昌監修，幸書房，2014.
3. H. Sumi, H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, H. Muraki: A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean in food of the Japanese diet, *Experientia*, **43**:1110-1111, 1987.
4. 須見洋行：納豆の研究法，158-160，恒星社厚生閣，2010.
5. 須見洋行：ナットウキナーゼの合成アミドに対する基質特異性，並びにキニン産生能（血圧降下，循環改善），和光純薬時報，**78**: 8-10, 2010.
6. H. Sumi: Accumulation of vitamin K (menaquinone-7) in plasma after ingestion of natto and natto bacilli (*B. subtilis natto*), *Food Sci. Technol. Res.*, **5**: 48-50, 1999.
7. K. Saito, M. Horie, N. Nose, K. Nakagomi and H. Nakazawa: Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization, *Anal. Sci.*, **8**: 675-680, 1992.
8. 須見洋行，内藤佐和，矢田貝智恵子，大杉忠則，柳澤泰任，丸山眞杉，野呂剛弘：納豆鑑評会における優秀製品（平成21～25年）は機能成分が多い—ナットウキナーゼ力価，ビタミンK₂およびポリアミン含量について—，*New Food Industry*, **59**: 23-31, 2017.
9. 須見洋行，矢田貝智恵子，茶竹俊行，森本幸生，柳澤泰任，満尾正，井上浩義，丸山眞杉：ナットウキナーゼによる血栓溶解並びに疾病予防，*Food Style* **21**, **22**: 43-47, 2018.

連絡先：倉敷芸術科学大学
 矢田貝研究室
 電話：086-440-1074
 Email: dr.h.sumi@gmail.com

味覚受容体の機能解析で見えてくる 生体における味覚の役割

日下部 裕子 (KUSAKABE Yuko)*

* 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

Key Words：味覚受容体 基本五味 甘味料 大脳皮質味覚野 大脳皮質前頭連合野

はじめに

2000年に世界で初めて味覚受容体が発見されてから、もうすぐ20年の時間が経とうとしている。かなりの時間が経ったと思う一方で、味覚受容体がわかっていても解決されない事象もたくさん存在しており、発表されている知見は一見ばらばらのようにも見える。そこで、本稿では、2000年以降に味覚受容体を利用して示された知見について紹介し、嗅覚との比較や全身の生理機能における味覚の位置づけを通して、味覚が生体にとってどのような役割を持つのか、どうして味覚という感覚を私たちが持っているのかについて考えてみたい。

1. 味物質の種類と味質の種類

味覚と嗅覚は化学物質を受容するという点で共通する感覚で、しばしば化学感覚というカテゴリーで一緒に扱われる。しかしながら、味覚と嗅覚では生理的な役割がかなり異なっていることが以前よりわかっていた。それぞれの受容体が同定され、その機能解析が進むにつれ、その違いはより明確になったといえよう。

化学物質は数十万あると言われている。それぞれが何らかの味と香りを有していることだろう。香りは数千、数万種類あり、ユリの香り、醤油の香りといったように、その香りから想起されるものの名前と結び付けられている。一

方、味はどうだろうか？味は基本五味と正確には味という定義からは外れる辛味、えぐ味、渋味といった十種類程度に集約される。基本味は甘味、うま味、苦味、酸味、塩味の5つからなるとされている。糖分は甘味として、アミノ酸は主にうま味として感知されるが、これらはエネルギー源となる体に必要な成分である。一方、植物に主に含まれるアルカロイドやフムロンは苦味として感知される。薬理作用を持つアルカロイドの多くは、疎水性で、少量では薬理作用を持つものの、大量に摂取すると体に害になるものが多いといった特徴を持つ。pHの低いものは、酸味として感知される。果物に含まれるクエン酸や、酢・ビネガーの主成分である酢酸などが代表的であり、クエン酸のように体に必要なものと、腐敗物に含まれるギ酸、酪酸のように忌避すべきものがある。ミネラル類は塩味、苦味、酸味といった味として感知される。十種類程度に集約された味は、もっと大きく分ければ好ましい味と忌避すべき味に分類される。この後の項でも触れるが、味覚を生じる場所は口腔内で、口に入れたものを飲み込むべきか吐き出すべきかを判断するためであることを反映しているのではなかろうか。

2. 味覚受容体の性質 嗅覚との比較

現在までに、一通りの基本味の受容体が同定

されている。受容体の種類、構造機能、発現部位など、味覚受容体と嗅覚受容体とは異なる点が多い。また、生体における味覚と嗅覚の役割の違いが、受容体の差に反映されているのではないかと筆者は考えている。

まず、受容体の種類であるが、味覚受容体は甘味受容体が1種類、苦味受容体が25種類、酸味受容体が候補を含め2種類、うま味受容体が候補を含め3種類、塩味受容体が候補を含め2種類同定されている¹⁻³⁾。これに辛味受容体2種類を入れてもせいぜい30数種類である。一方、嗅覚受容体はヒトでは350種類が機能するとされている⁴⁾。味覚と嗅覚の受容体の数に圧倒的な差があることが分かるだろう。さらに、これらの発現部位の在り方が全く異なっている。嗅覚受容体は1つの嗅神経細胞に1つの嗅覚受容体が発現しており、単純に考えるとヒトでは350種類、異なる嗅覚受容体を保有する細胞が存在することになる。一方、味覚受容体は、味蕾と呼ばれる細胞集合体の中にある味細胞に発現するが、甘味を受容する細胞、苦味を受容する細胞、のように、味質に対応した受容体が発現している。わかりやすいのが苦味を受容する細胞で、この細胞には25種類の苦味受容体が共に存在していることが示唆されている⁵⁾。味細胞で受容された信号は味神経へと伝達されるわけだが、どの苦味受容体で受容しても同じ苦味応答する神経に伝達されることになり、味覚受容体の数よりもさらに少ない種類の信号として集約される。酸味の受容体も候補は二つあるが、どちらも同じ種類の細胞に局在することが示されている^{2,6)}。

味覚受容体の味物質に対する結合様式も、味覚は情報を集約し、嗅覚は物質を別個に認識するという性質に合致したものになっている。多くの物質を受容する受容体としては甘味受容体とその代表例である。糖類、アミノ酸、合成甘味料と甘味料は多様な構造を持ち、多種類存在しているが、受容体は1種類しか同定されていない。甘味受容体を培養細胞に発現させて応答を測定する実験から、1種類の甘味受容体がこ

れら多くの甘味料を受容していることは確認されており、これらの甘味の信号が同じ受容体を介して伝達されることを示している。うま味受容体も1つの受容体が複数のアミノ酸や核酸を受容することが明らかになっており、基本的に情報が集約される性質を持つことが分かる。嗅覚受容体も1つの受容体が多く物質を受容するが、情報を集約するのではなく、350よりはるかに多い香り物質に対応するためのものになっている。香り物質は、1つの物質が多くの受容体に結合する。その結合パターンが物質ごとに異なっており、パターンの違いが香りの違いを反映している。味物質でも甘味受容体と苦味受容体に結合するものがあるが、それは甘くて苦い味になるだけである。香りがパターンであることを示す実験としては、バニラとシナモンとライムの香りを混ぜて同時に嗅ぐとコーラの香りを感じられるというものがある。香りを足し合わせると、足し算になるのではなく、別物になる、すなわち嗅覚は集約されるのではなく個別に識別する感覚であることがわかる。

嗅覚受容体と味覚の受容体は、構造にも大きな違いがある。香り物質はその多くが揮発性で親油性である。味物質は親水性のものと親油性のものがある。また、電解質と非電解質のものがあり、構造的に幅広い物質を受容している。受容体構造はこれらを反映するものになっている。350種類もある嗅覚受容体は、すべて細胞膜外領域が小さいタイプのGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。細胞膜外領域が小さいタイプのGPCRに結合する物質は、親油性であることが多く、香り物質の親油性とよく一致している。一方、味覚受容体はさまざまな構造をとる(図1)。

糖分やアミノ酸は親水性のものや非電解質であるものが多く、それを結合する甘味およびうま味の受容体は、細胞膜外が大きいタイプのGPCRである。一方、苦味物質は親油性のものが多く、受容体は嗅覚受容体と似た細胞膜外領域が小さいタイプのGPCRである。さらに水素イオンやナトリウムイオンなどの電解質が

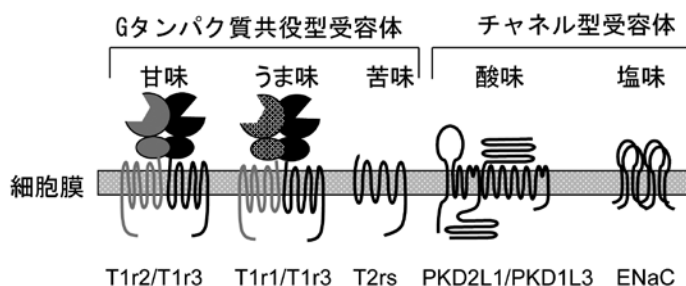


図1 基本味の受容体構造

主となる酸味や塩味の受容体は GPCR ではなくイオンチャネルである。水素イオンやナトリウムイオンが結合することにより開口するイオンチャネルが受容を担っている。受容体タイプの GPCR とイオンチャネルは伝達の仕方が大きく異なる。受容体タイプの情報伝達は、刺激物質が細胞内に流入せず、刺激物質と受容体が結合したという情報が細胞内に伝達され、神経に情報を伝達するためのイオンチャネルが開口する。

一方、イオンチャネル型の受容体は刺激によりチャネルが開口し、イオンそのものが細胞内に流入し、それをきっかけに、神経への情報伝達を引き起こす電位変化が起きる。受容体タイプの情報伝達は、刺激物を細胞に入れないことで細胞が傷害を引き起こすことから守る一方で、情報伝達は伝言ゲームのようにするため少し遅くなる。一方、チャネルによる情報伝達は開口と同時に電位変化が引き起こされるため、情報伝達のスピードは速い。体感として、酸っぱさやしょっぱさを感知するスピードが甘味やうま味よりも速いことを多くの人が感じており、その原因がこのような受容体構造の差にあると考えられる。

3. 全身における味覚受容体の役割

味覚受容体が発現している細胞の可視化は、全身に味覚受容体がどのように分布しているかを明らかにした（図2）。Magolskee らが示すように、甘味受容体とそれに関わる情報伝達分子が腸に存在してブドウ糖を体内に取り

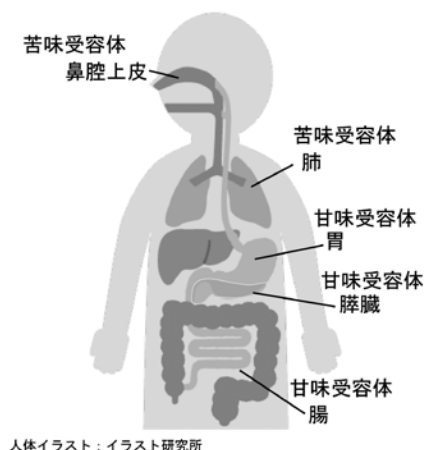


図2 口腔内以外の味覚受容体の局在

込む役割を持つグルコーストランスポーターと連動して糖分の吸収を制御するのに関わっていることが示唆されている⁷⁾。また、胃の中で食欲亢進ペプチドであるグレリンを分泌する細胞にも甘味受容体の存在が確認されている⁸⁾。舌を含む口腔も消化器官の一つでもあることから考えると、この分布はそれほど驚くことではないだろう。興味深いのは、消化器官以外の器官にも味覚受容体が発現していることである。例えば、鼻粘膜や肺に苦味受容体が存在していることが確認されている⁹⁾。これらは、体外からの細菌の侵入に対する防御機能と考えられている。体内に入ってくるものが益になるか害になるかを判断するという意味においては、消化器官における味覚受容体の役割と類似するのかもしれない。

4. 甘味受容体を利用した甘味料の再評価

ここまで、味覚受容体が、脳における認知や味覚以外の生理現象にどのように関わるかを示してきた。もちろん味覚受容体がどのように味を認識するかが、味覚受容体の研究の本筋であり、こちらも飛躍的に進展している。甘味受容体における種々の甘味物質の認識部位、味覚修飾物質の作用機序、遺伝による苦味感受性の差と野菜の好き嫌いとの関係など、今まで現象として観察されていた事象が味覚受容体を用いて説明できるようになった。筆者らも、甘味受容

体を用いて、高甘味度甘味料の性質や甘味を脳で認識するまでに起こることに関する解析を進めてきたので、ここで紹介したい。

高甘味度甘味料は、よく「ショ糖の何百倍の甘さ」といった表現で甘味度が示される。これは、高甘味度甘味料の甘味度の測定方法が、ある一定の濃度ショ糖溶液を基準として、それと同等の甘さになる高甘味度甘味料の濃度を官能評価で決めることに起因する（図3）。一方、一般に、受容体とそれに結合する物質の関係を明らかにする場合は、用量反応曲線で示される。

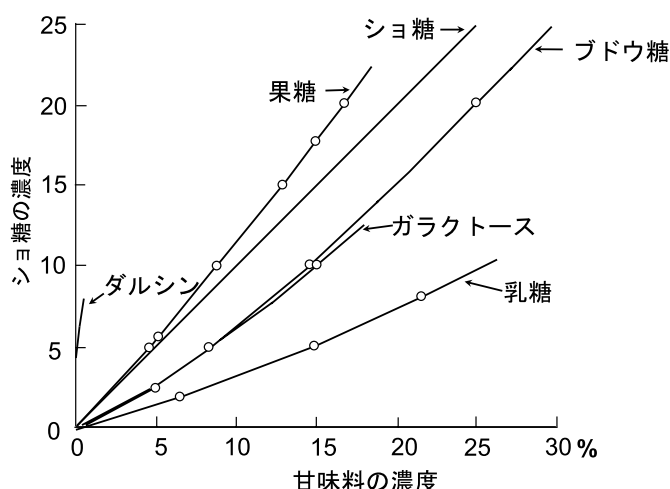


図3 従来の甘味度評価方法

基準のショ糖溶液と同等の甘さになる甘味料の濃度を調べる方法

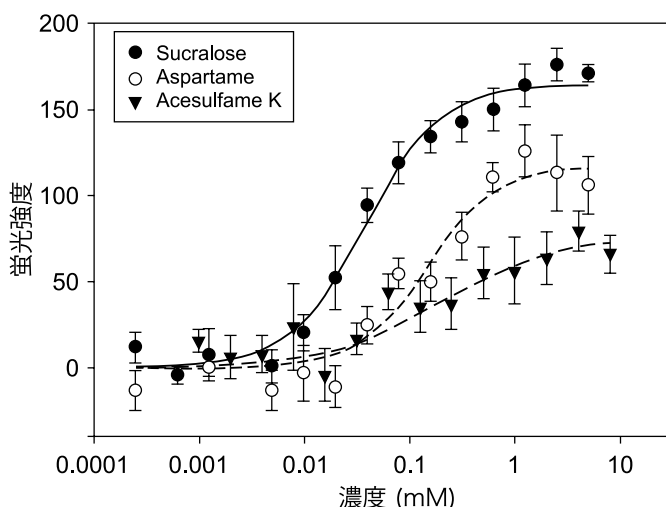


図4 味覚受容体を用いた甘味料の評価
閾値（横軸）よりも強さ（縦軸）が異なることがわかる

る。甘味の場合は、横軸に閾値の濃度、縦軸に甘味度といえよいかもかもしれない。そこで、筆者らはヒト味覚受容体遺伝子を導入した培養細胞に3種類の高甘味度甘味料（スクラロース、アスパルテム、アセスルファム K）を様々な添加して、甘味受容体の応答を測定し、それぞれの甘味料について濃度-容量曲線を作成した（図4）。グラフの応答強度について、最大値の1/2の強度をもたらし濃度を EC_{50} というが、これは閾値と相関すると考えられる。図が示すように、3種類の甘味料は閾値においては大きな差は観察されないが、縦軸を見ればわかるように甘味度については大きな差が観察される。従来の評価方法で表現すれば、いずれも「ショ糖の数百倍」という表現になってしまうことを考えると、用量反応曲線での甘味料評価の方がより適切に甘味料の性状を評価できるものと思われる。さて、図4のように培養細胞に導入した甘味受容体での評価は、官能評価の結果とどのような関係にあるのだろうか。筆者は、舌の表面から脳に至る情報の伝達経路という観点も含めてこの関係の解析を行った。図4で示した甘味受容体の応答は、舌の上で起こ

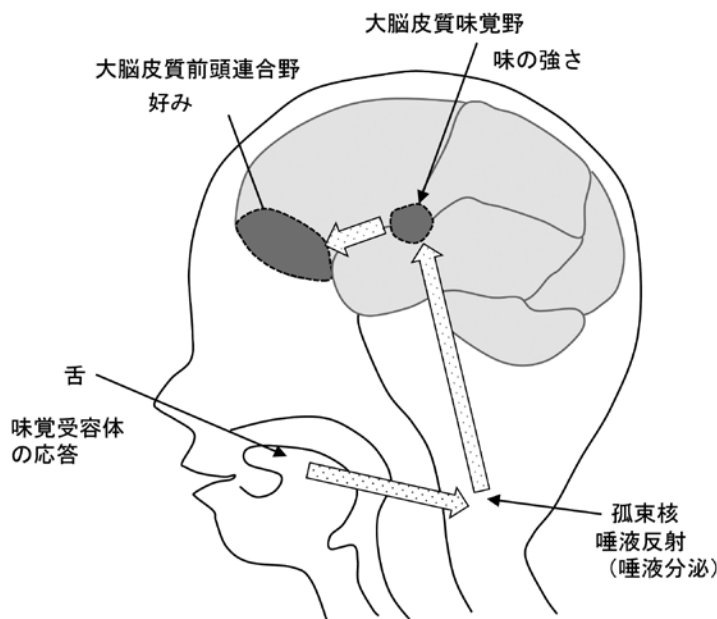


図5 味覚情報伝達と官能評価・生理応答測定の関係

る現象に近い。一方、官能評価で味の質や強さを評価するのは大脳皮質味覚野（第一次味覚野）になる。また、総合的なおいしさの評価は大脳皮質前頭連合野（第二次味覚野）になる（図5）。さらに、筆者は、舌から脳への情報伝達の中継地としての孤束核に着目した。舌の上で受容された情報は、味神経を通過して孤束核に入力される。孤束核は延髄の中にあり、味覚刺激による唾液分泌、いわゆる味覚反射を司っている。そこで、孤束核における応答の強さを推定するために味覚刺激による唾液分泌も解析の対象とした。

ここで、唾液分泌について概説しておきたい。唾液は様々な刺激によって分泌されるが、大きく分けて条件反射と無条件反射に分けられる（図6）。条件反射はいわゆる「パブロフの犬」で、

経験によって後天的に獲得されるもので、嗅覚、視覚情報や、想起することなどにより唾液が分泌される。一方、無条件反射は脳を介さず脊髄反射によって分泌され、生まれつき備わっている機能である。無条件反射を引き起こすものとしては、咀嚼、伸展や温度差などの機械刺激に加えて味覚刺激も含まれる。以上のことを踏まえ、甘味受容体で評価した3種類の高甘味度甘味料を10秒間口に含んだ後に飲み込み、その後50秒間に分泌される唾液分泌量と味の強さおよび嗜好を評価する官能評価結果の比較解析を行い、甘味刺激の入力が、唾液量や知覚（甘味強度と嗜好）といった出力とどのような関係にあるかを調べた（図7）。

その結果、甘味受容体で示された応答強度の関係（スクラロース>アスパルテム>アセスルファムK）は、大きくその関係を変えることなく唾液分泌と甘味強度に反映されることが示された。一方、甘味受容体の応答、唾液分泌量、応答強度は、嗜好とは相関が観察されなかった。おいしいと唾液が分泌される、と一般的には言われているが、嗜好性による唾液分泌量への影響は観察されなかった。味覚刺激による唾

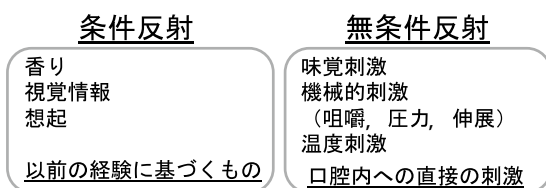


図6 唾液分泌の種類

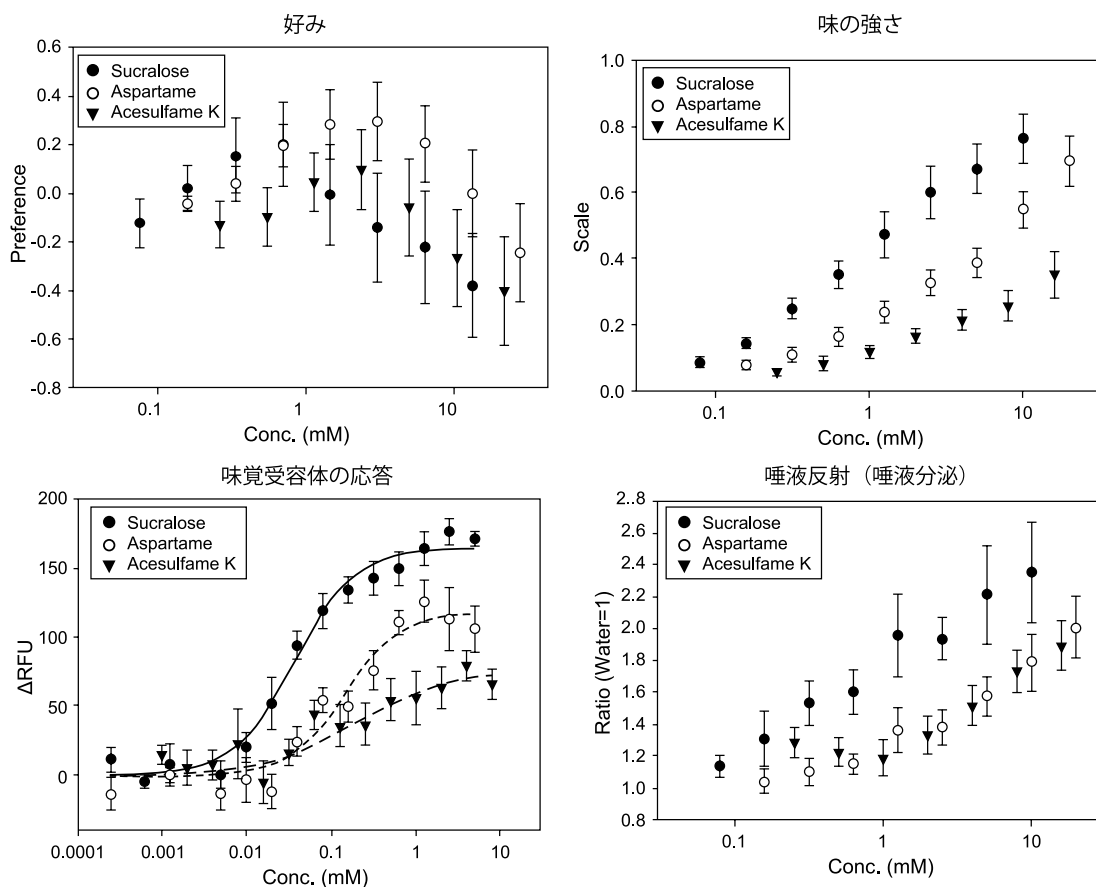


図7 甘味料の官能評価と生理応答測定

液反射は脳を介さないが、嗜好性による唾液分泌は脳を介して起こる。

今回の実験で、嗜好性が甘味刺激による唾液分泌に大きく影響しなかったということは、やはり味覚刺激による唾液分泌の大半が感情を介さない反射であることを示している。知覚と生理応答の関係は複雑で、安易な結論を出すのは危険かもしれないが、以上の結果より、舌の上で味物質と味覚受容体が結合した結果生じた信号は、大きく修飾されることなく孤束核を介して第一次味覚野まで伝達されると考えている。よって、甘味料だけを溶解した溶液の甘味の強さを官能評価で評価した結果は、甘味料と味覚受容体の関係を反映したものと考えても大きな問題はないと思われる。筆者の実験は、他の味や香りを添加したものではない。他の味や香り

は別の細胞で受け取られ、別の神経で伝達される。今回の実験は一つの情報伝達系だけに焦点を絞った結果得られたものであり、複数の情報伝達の統合過程で起こることについては、今後取り組んでいく必要がある。また、糖類や糖アルコールについては、甘味を感じられる濃度が10 mM以上と高く、培養細胞に影響を与えてしまうため、応答測定を行うことができなかった。ショ糖とキシリトールについて、唾液分泌と甘味強度の関係の解析を行うことはできており、高甘味度甘味料の場合と同様、双方の相対関係は保存されていることが示されている。よって、高甘味度甘味料と糖・糖アルコールの甘味情報伝達の間に大きな差は存在しないものと思われる。

おわりに

味覚の研究は、他の感覚研究と比較して遅れている部分が多い。原因は様々あるが、普段感じる「味」の曖昧さも、その理由の一つであろう。私たちが食べ物を口に入れた時に受容する感覚は味だけではない。香りが生じ、食べ物の硬さ柔らかさ、温度、量などの物性を感じる。それを象徴するように、日常用語としての「味」は純粹に味覚だけを指す場合と、口腔内で感じた感覚すべてを総括して「味」と呼ぶ場合がある。特に味と香りは口腔内で同時に感じられるので、その弁別が難しい。今回紹介した味覚受容体の同定により、味覚受容体だけを取り出して利用できるだけでなく、味覚受容体を壊し

た動物を作出して実験できるようにもなった。他の感覚を排除した実験結果を集めて、改めて感じるのは、味覚が消化機能に最も近い感覚であること、先天的な作用が比較的多いこと、他の感覚に影響を受けやすいことである。大雑把でありながら、拒否しなければならないものは断固として飲み込ませない、そのような本質が本稿で紹介した事象に反映されていると思う。食品のフレーバーや品質全体のおいしさを評価する場合に、「味」という言葉を味覚だけに対して使っているか、評価している味は他の感覚に影響されていたり混同していたりしていないか、時々立ち止まって考えていただければ幸いである。

参考文献

1. Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJP: Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* **139**: 234-244, 2009.
2. Tu YH, Cooper AJ, Teng B, *et al.*: An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science* **359**: 1047-1050, 2018.
3. Go Y, Satta Y, Takenaka O, Takahata N: Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* **170**: 313-326, 2005.
4. Niimura Y, Nei M: Evolutionary changes of the number of olfactory receptor genes in the human and mouse lineages. *Gene* **346**: 23-28, 2005.
5. Adler E, Hoon MA, Mueller KL, *et al.*: A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **100**: 693-702, 2000.
6. Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, *et al.*: The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem Senses*. **33**: 243-254, 2008.
7. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, *et al.*: Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**:15069-15074, 2007.
8. Hass N, Schwarzenbacher K, Breer H: T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res* **339**: 493-504, 2010.
9. Lee RJ1, Cohen NA: Bitter and sweet taste receptors in the respiratory epithelium in health and disease. *J Mol Med (Berl)* **92**: 1235-1244, 2014.

連絡先： 〒 305-8642 つくば市観音台 2-1-12

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
食品健康機能研究領域 感覚機能解析ユニット

Tel/Fax: 029-838-7317 E-mail: ykusa@affrc.go.jp

食成分であるポリアミンによる健康長寿の背景 (2)

ー ポリアミン代謝と遺伝子メチル化, および One carbon metabolism について ー

早田 邦康 (SODA Kuniyasu) ¹

¹ 自治医科大学大学院教授・循環器病臨床医学研究所所長

Key Words: ポリアミン スペルミン メチル化 DNA LFA-1 ITGAL One carbon metabolism

6. DNA メチル化に関与する栄養素とその代謝物質, および関連する酵素活性

DNA のメチル化とは, DNMT (数種類の DNMT の中で, 特に DNMT1, DNMT3a および DNMT3b) が, SAM から供給されるメチル基を DNA の 4 つの塩基の一つであるシトシンに付与して 5-メチルシトシン (Methylcytosine) にすることである。ポリアミン合成に必須の物質である SAM はメチオニンと ATP からメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (Methionine adenosyltransferase) の作用で作られる。メチオニンは必須アミノ酸の一つで, 蛋白質の生合成に使用される。SAM は, DNA メチル化を含む多くのメチルトランスフェラーゼ反応におけるメチル基の供与体であり, メチル基が供与された後は S-アデノシルホモシステイン (S-adenosyl-l-homocysteine (SAH)) になる。SAH は, DNMT, 特に DNMT1 の酵素活性を抑制するが¹⁹⁰⁻¹⁹²⁾, Adenosylhomocysteinase の作用で素早く加水分解されてホモシステインとアデノシンに変換される。ホモシステインはメチオニンへ再利用されるか, システインに変換される。ホモシステインはメチオニンシンターゼ (Methionine synthase) もしくは 5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase) あるいはベタイン・ホモシステイン・メチルトランスフェラーゼ (Betaine-

homocysteine methyltransferase)¹⁹³⁾ によってメチオニンに変換される。メチオニンシンターゼはビタミン B₁₂ とともに Methyltetrahydrofolate から供給されるメチル基をホモシステインに付与して S-メチオニンに変換する。同様に, ベタイン・ホモシステイン・メチルトランスフェラーゼはベタインからメチル基をホモシステインに付与して S-メチオニンを形成する。また, ホモシステインとシステインは, 中間産物のシスタチオニンを介して相互に変換され, これは Transsulfuration pathway と呼ばれる。シスタチオニン β-シンターゼ (Cystathionine β-synthase) は, ホモシステインに作用してシスタチオニンと H₂O へ変換する。シスタチオニンはシスタチオニン γ リアーゼ (Cystathionine γ-lyase) の作用を受けて, システインに変換される。シスタチオニン β-シンターゼとシスタチオニン γ リアーゼが酵素活性を発揮する際には, ビタミン B₆ を必要とする。

SAM とプトレシンはポリアミン合成に必須の物質である。スペルミジンの合成の際には, dcSAM から供給されるアミノプロピル基がプトレスシンに付与されてスペルミジンが合成され, 同様にスペルミジンに付与されてスペルミンが合成される。dcSAM は AdoMetDC の酵素活性によって SAM から変換されるが, dcSAM は DNMT を強力に抑制することが指摘されて

いる¹⁹⁴⁾。dcSAMはポリアミン合成に必要なアミノプロピル基を供与した後は、メチルチオアデノシン (Methylthioadenosine (MTA)) に変換される。MTAは、MTAフォスホリラーゼ (MTA phosphorylase (MTAP)) の作用をうけて 5-methylthioribose-1-phosphate とアデニン (Adenine) に変換されるが、これらの物質はそれぞれメチオニンとプリンに代謝される。

ヒトにおいては、アルギニンは、体内での必要量を食品から供給しなければならない必須アミノ酸に分類される。アルギニンは、肉類、ナッツ類、豆類や魚介類などの食品中に多く含まれる。L-オルニチンはL-アルギニンから体内で作られるが、尿素回路 (Urea cycle) (もしくはオルニチン回路 (ornithine cycle)) において重要な役割を果たしており、豆類や魚介類などの食品中に多く含まれる。ポリアミン (スペルミジンおよびスペルミン) とその前駆体であるプトレスシンを多量に含む食品は“4. 食品中に含まれるポリアミンとその活性”の章に記載している。メチオニンは必須アミノ酸に分類され、野菜、果物、豆類、ナッツや肉などに豊富に含まれる。SAMは、アデノシンとメチオニンとから生体内で合成される生体内物質であり、SAMがメチル基を付与した後にできるSAHはホモシステインへと変換される。ホモシステインもアミノ酸であり、メチオニンおよびシステインへ変換される。この際には、ビタミンB₆、ビタミンB₁₂、葉酸などが必要とされる。システインは食品中にも含まれるが体内でも合成されるアミノ酸である。ホモシステインからメチオニンに変換される際には、ベタインはメチル基供与体として必要とされるが、これも食品にも含まれる。このように食品中に含まれる多くの成分がDNAメチル化に関与しており、食事内容によってDNAメチル化に大きな影響が及ぶことが示唆される。実際に食事内容を変化させることによって (脂肪、タンパク質、エネルギー制限)、メチル化を含めた遺伝子修飾の状態に変化が加わることが報告されている^{161, 163, 195-199)}。

上記の代謝経路を考慮すると、栄養素や食事内容がDNAメチル化に影響を与える可能性としては以下の二つが考えられる。

(1) メチル化に必要なメチル供与体の量を変化させる。

(2) DNMTの活性を変化させる。

(1) メチル化に必要なメチル供与体の量を変化させる：

遺伝子にメチル基を供与するメチル供与体を増加させる手段を考えるうえで、近年 One-carbon metabolism が注目を集めてきた。遺伝子メチル化と密接な関係のあるこの代謝経路においては、多くの食成分が含まれている。この代謝経路においてメチル基の供与を増加させる理論的な手段は、ホモシステインからメチオニンへの転換を促進させることである。高ホモシステイン血症は、脳血管疾患²⁰⁰⁻²⁰³⁾、それ以外の様々な心臓血管疾患²⁰⁴⁻²⁰⁸⁾、アルツハイマー病や認知症など²⁰⁹⁻²¹¹⁾、さらには骨折²¹²⁻²¹⁴⁾などのような様々な疾病の発症の危険因子であることが明らかにされ、さらにはこれらの疾患と関係した死亡率とも関係のあることが明らかにされてきた²¹⁵⁾。ホモシステインからメチオニンへの変換にはビタミンB₆やB₁₂、葉酸が必須である (図4)。よってこれらの欠乏は、高ホモシステイン血症を誘発することになる。実際に高ホモシステイン血症の患者に、ビタミンB₆やB₁₂および葉酸を投与することによってホモシステイン濃度が低下することが報告されている²¹⁶⁻²²⁰⁾。血液中のホモシステインは内皮細胞の障害を誘発し、血管内での炎症を誘発し、結果として動脈硬化を促進するように作用する。葉酸は、ホモシステインの有する炎症誘発作用や血管内皮細胞の障害を抑制するように作用するので^{207, 221)}、ビタミン投与によるホモシステインの低下は血管に対する悪影響を抑制する可能性があると考えられてきた。ホモシステインを低下させる試みは、実際に高ホモシステインが誘発する様々な障害に対して好ましい結果をもたらすことが報告されている^{216, 222, 223)}。しかしながら、他の多くの研究や、研究をま

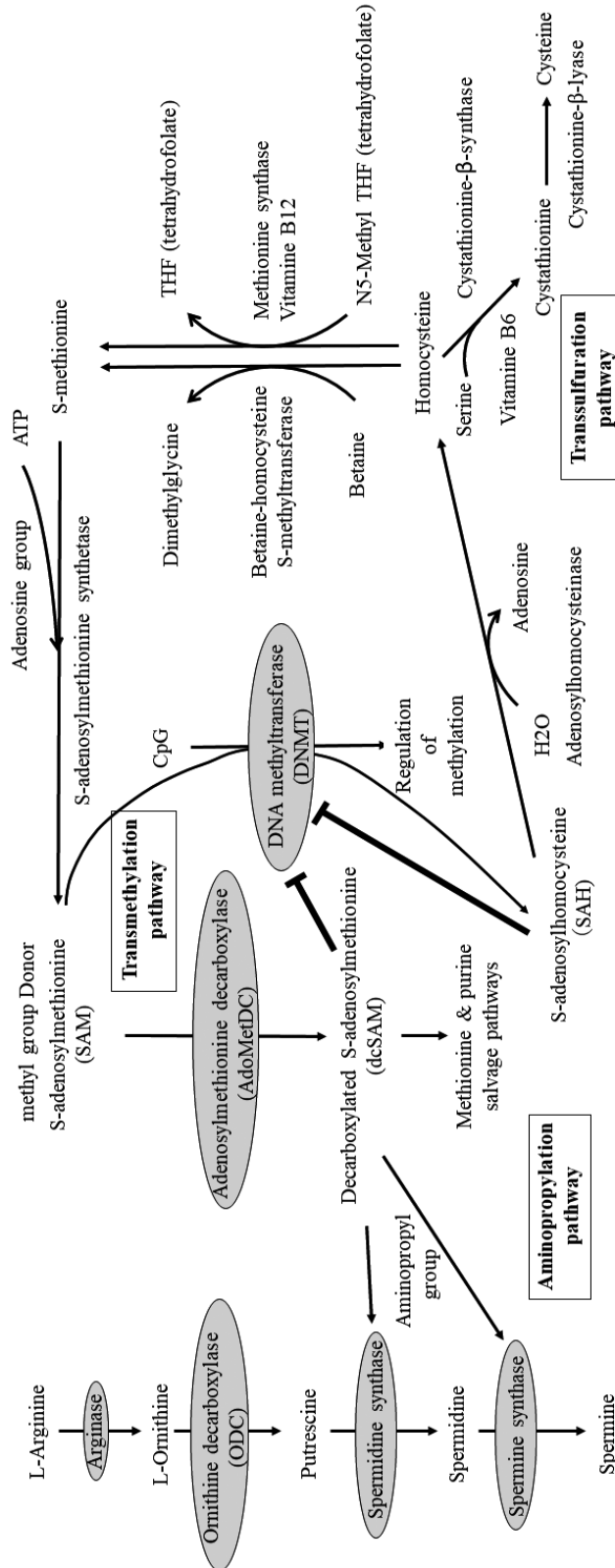


図4 ポリアミン代謝 (左), DNA メチル化 (中央), one-carbon metabolism (右)

メチル基の供給源である SAM は AdoMetDC の作用をうけて dcSAM になり, dcSAM はポリアミン合成系にアミノプロピル基 (Aminopropyl group) を供給する (Aminopropylation pathway)。一方, メチル基をシトシンに付与した SAM は, SAH (S-adenosylhomocysteine) になる (Transmethylation pathway)。dcSAM と SAH は DNMT (DNA methyltransferase) の活性を抑制する。One carbon metabolism とは, 葉酸代謝とメチオニン代謝を含む代謝経路 (図右側) で, 代謝に関連する栄養素には葉酸, ビタミン B12 および 6, メチオニンが含まれ, SAM はこの代謝産物である。Transsulfuration 経路 (図右下) とは, メチオニンサイクルの中間代謝産物であるホモシステインがシタチオンへと変換される代謝経路である。

とめた解析研究（メタ解析）では、ビタミン B 群投与によってホモシステインを低下させる治療は、脳卒中予防^{219, 220, 224, 225)}、心筋梗塞予防^{219, 220, 225-229)}、認知機能²³⁰⁻²³²⁾、もしくは様々な疾患の予防²³³⁻²³⁵⁾に対して効果が認められなかったことが報告されている。

ホモシステインからメチオニンへの変換を促進する治療は、ホモシステインを減少させてホモシステインによる炎症の誘発と内皮細胞の機能障害を軽減する^{221, 236)}。それと同時に、メチル基の供給源であるメチオニンの増加が期待できる。メチル基供与体の増加は、メチル基の供与を潤沢にし、DNA のメチル化の状態を維持することにつながる可能性がある^{223, 237-240)}。また、高ホモシステイン血症によって誘発される慢性炎症が促進因子となる慢性疾患は、DNA メチル化異常とも密接な関係のあることがわかっている²⁴¹⁻²⁴⁶⁾。これらのことから、ホモシステインの低下を試みる治療は遺伝子メチル化にも影響を及ぼしている可能性がある。しかし、老化や加齢に伴って増加する疾患の予防に対して必ずしも良好な結果をもたらさないという事実は、ホモシステインからメチオニンへの変換によるメチル基の供給によっても、これらの病態を改善できるほど十分に DNA メチル化に影響を及ぼしているわけではないことが推測される²⁴⁷⁻²⁴⁹⁾。同様のことは、ホモシステインの濃度を低下させる作用のあるレスベラトロールを用いる検討でも報告されている。すなわち、レスベラトロールは、メチオニンを多量に含んだ餌で飼育したマウスのホモシステイン濃度を低下させ^{250, 251)}、癌細胞の DNA メチル化状態に影響を及ぼすことが報告されている²⁵¹⁻²⁵³⁾。しかしながら、多くの検討にも関わらず、レスベラトロールは老化に関連する病理学的変化を改善することはできず、哺乳類の寿命を延長することができないことが報告されている²⁷⁻³³⁾。

ホモシステインを減少させる試みの理論的背景には、ホモシステインからメチオニンへの変換、さらにはメチオニンから SAM への変換を

促進してメチル基の供給を増加させることにあ
る。ところが、メチオニンを投与するとミトコ
ンドリア内での活性酸素の産生を増加させて、
酸化ストレスを増大させて^{236, 254-256)}、様々な
障害と有害な変化を誘発する²⁵⁷⁻²⁵⁹⁾。これらの
生理活性は、メチオニンあるいは SAM の過剰
な増加による変化であると考えられる。このよ
うなメチル基の増加による DNA メチルへの影
響には不明な点もあるが、メチオニンや SAM
の増加により DNA メチル化の状態が変化する
ことはわかっている^{121, 257, 260-263)}。

メチル基の供給源であるメチオニンを減少さ
せることは、メチル化に必要なメチル基の不足
を誘発して DNA のメチル化状態の維持に不利
益に作用するように思われる。しかし、メチオ
ニン制限はミトコンドリアの活性酸素の生産を
減少させて、ミトコンドリア DNA に対する障
害を軽減させることが報告されている²⁶⁴⁻²⁶⁷⁾。
一方、食品中のメチル基の制限も DNA メチル
化状態に影響を及ぼすことがわかっている。メ
チル基の欠乏によって DNA 全体、もしくはい
くつかの遺伝子が脱メチル化を生じることが報
告されている^{268, 269)}。さらに、短期間（あく
までも長期間ではなく一時期）のメチオニン制
限は DNA 全体のメチル化を変化させ²⁷⁰⁾、化
学発癌によって引き起こされる腫瘍の発生を抑
制し²⁷¹⁾、哺乳類を含む動物の寿命を延長する
ことも報告されている^{270, 272-274)}。非常に面白
いのは、高齢マウスにメチオニン制限餌を投与
したところ、メチル化の状態が若年マウスのメ
チル化の状態に類似してきたという報告がある
ことである²⁶⁸⁾。これらのことから、一時的な
短時間のメチオニン制限による寿命延長の重要
な機序の一つとして、遺伝子メチル化への影響
が挙げられる。

(2) DNMT の活性を変化させる：

ホモシステインの慢性的な濃度上昇は、そ
の代謝の上流に存在する SAH の増加を誘発す
る²⁷⁵⁾（図 4）。SAH は DNMT の活性化に関与
する部位に高い親和性を示し^{192, 276)}、DNMT に

対する強い抑制作用を発揮する^{190, 191)}。SAH 濃度に対する SAM 濃度の比率は“メチル化インデックス”と呼ばれており、メチル化に関連する指標とされてきた。ホモシステインの濃度上昇や SAM/SAH 比の低下は、DNA メチル化へ影響を及ぼし、結果として心臓血管疾患などの病態に関与する可能性がある²⁷⁷⁻²⁷⁹⁾。一方、高ホモシステインの低下を目指した治療が生活習慣病の病態を改善することができないのは、遺伝子発現を変化させるために必要な遺伝子メチル化への影響を持続的、かつ十分に生じさせることができていないためと思われる。見方を変え、DNMT を抑制する作用のある SAH を十分に、かつ持続的に低下させることができないためかもしれない (図 4)。

DNMT の活性は dcSAM 濃度や dcSAM/ SAM 比と密接に関係している^{194, 280)}。SAM はメチル基を供与し、DNMT を活性化作用を有するが、dcSAM は DNMT を抑制する^{280, 281)}。ODC を分解する Antizyme という酵素を活性化させるか、ODC 活性を選択的に抑制する α -d, l-difluoromethylornithine 塩酸塩 (DFMO) を投与することによって細胞内ポリアミン濃度が低下し、dcSAM 濃度が上昇する^{194, 280, 282, 283)}。同時に、ODC の抑制によって生じた dcSAM 濃度の増加は、DNMT タンパク量を減少させて活性を低下させ、DNA 全体の脱メチル化を誘発することが報告されている^{280, 281, 284)}。

私たちの最新の研究では、DFMO によって Jurkat 細胞の ODC 活性を抑制すると、dcSAM の濃度と dcSAM/SAM 比が上昇し、DNMT 1, 3a および 3b 活性を抑制することを確認した (図 5 左)。興味深いことに、dcSAM 濃度の上昇は DNMT (1, 3a, 3b ともに) タンパクの量には変化を及ぼさなかった。ODC 活性を抑制した状態で、Jurkat 細胞にスベルミンを加えると、AdoMetDC が抑制されて dcSAM 濃度が減少し、dcSAM/SAM 比が低下し、DNMT 3a および 3b (とくに 3b) が再活性化された (図 5 右)。しかしながら、DNMT 1 はスベルミンによって再活性化されなかった。通常培養の Jurkat 細胞に

スベルミンだけを加えた場合でも、AdoMetDC 活性が抑制され dcSAM 濃度が減少した。同様に、他の研究者からも、メチル基の供与体濃度を変化させることによって DNMT3a と 3b の発現が変化することが報告されている²⁸⁵⁾。

我々は、DNA を特定の塩基配列の部位で切断する制限酵素である NotI を用いて DNA メチル化に及ぼすポリアミンの影響を検討した。NotI が切断する塩基配列部分にはシトシンが含まれており、シトシンがメチル化されていると NotI は DNA を切断できない。ODC 活性を抑制した細胞では、dcSAM 濃度が増加して DNMT 活性が低下した。DNMT 活性の抑制は、DNA メチル化機構の機能低下による DNA 全体の脱メチル化を思い浮かべさせる。しかし、実際には高メチル化が進行する部位もあることがわかった。すなわち、ポリアミン合成の低下によって、DNA の多くの部位では脱メチル化が誘発され、同時に別の多くの部位では高メチル化が誘発されるという結果で、高齢者や高齢動物の遺伝子で認められる異常メチル化と呼ばれる状態になった^{45, 47)}。

ポリアミン合成を抑制した細胞に細胞外からスベルミンを投与すると dcSAM 濃度が低下して DNMT が活性化する。すると、ポリアミン不足によって誘発された異常メチル化が抑制された。このように、DNMT の酵素活性の変化によって脱メチル化される部位と高メチル化される部位が存在する。このことから、加齢とともに生じるポリアミン合成酵素活性の低下によって、脱メチル化によって増加するタンパクと高メチル化によって減少するタンパクが存在することになる。加齢にともなう異常メチル化という状態が、生活習慣病の進行にかかわるタンパク、たとえば LFA-1、をコードする遺伝子の脱メチル化と、生活習慣病の抑制にかかわるタンパクをコードする遺伝子の高メチル化を生じ、その結果生活習慣病が進行するという理論的な考えと一致する現象であった。重要なのはポリアミン不足によって発生した異常メチル化という状態は、癌を含めた様々な生活習慣病

高ポリアミン食によるスベルミンの上昇の影響

ポリアミン合成能低下の影響

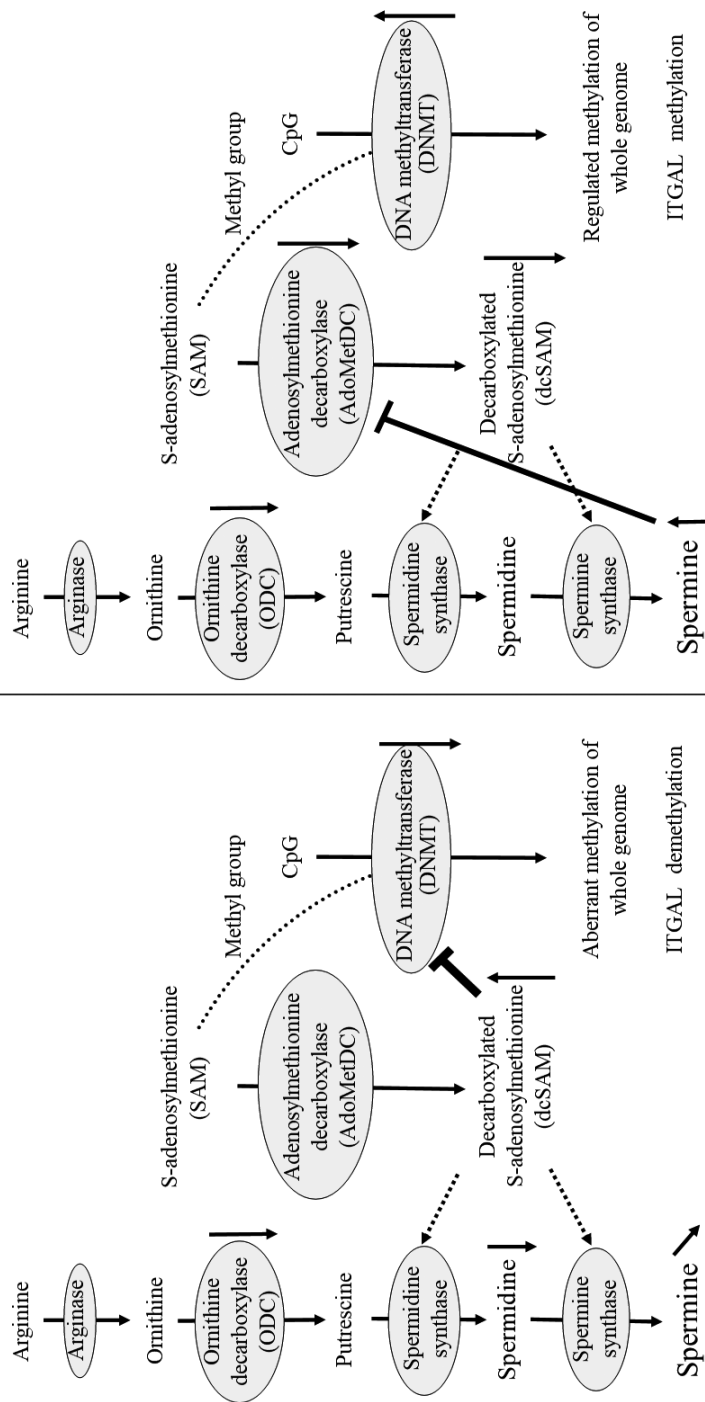


図5 ODCの抑制と細胞外からのスベルミン供給の影響

左図) 加齢による ODC 活性抑制状態を再現した細胞では、スベルミンとスベルミジン合成に必要なアミノプロピル基の供給が不要となり、アミノプロピル基の供給元である dcSAM 濃度が上昇する。増加した dcSAM は、DNMT の活性を抑制し、DNA 全体の異常メチル化と LFA-1 プロモーターである ITGAL の脱メチル化を生じさせて LFA-1 蛋白量を増加させる。

右図) 細胞外からスベルミンが供給されると、細胞内のスベルミン濃度が上昇し、さらにスベルミンの分解によって生じるスベルミジンも増加して、dcSAM から供給されるアミノプロピル基が不要になる。その結果、AdoMetDC が抑制されて dcSAM 濃度の低下を生じ、結果として DNMT (特に DNMT3a および 3b) が活性化される。DNMT の活性化は、ポリアミン不足によって生じた DNA 全体の異常メチル化を改善し、ITGAL (LFA-1 タンパク質のプロモーター) には高メチル化を生じさせて、LFA-1 蛋白量を減少させる。

や老化の原因と考えられていることである。そして、この異常メチル化はスペルミンの供給によって打ち消される。

7. 加齢とポリアミン代謝と DNA メチル化, および老化との関係

加齢は ODC 活性の低下²⁸⁶⁾, および DNMT の活性低下^{133, 287, 288)}, LFA-1 をコードする ITGAL の脱メチル化によって生じる LFA-1 タンパクの増加^{19, 97, 289)}を伴う。DNMT 活性の低下は, DNA の多くの部位の脱メチル化と他の多くの部位の高メチル化を誘発し異常メチル化と呼ばれる状態を伴うことが報告されている^{47, 136, 290-294)}。実際に, 通常の餌で長期間飼育した高齢マウスの DNA は異常メチル化(脱メチル化の進行とメチル化の進行)の状態であった⁴⁷⁾。しかし, 合成ポリアミン加えて大豆の3倍程度にポリアミン濃度を調整した高ポリアミン餌で飼育した高齢マウスの DNA のメチル化状態を検討すると, 通常の餌で飼育した高齢マウスに認められた異常メチル化は認められなかった⁴⁷⁾。マウスでの検討で認められた変化, すなわち高ポリアミン餌を摂取したマウスの血中スペルミン濃度が有意に上昇し, 加齢に伴う遺伝子の異常メチル化が抑制されるという所見は, 細胞レベルでの我々の検討で認められたポリアミン合成低下によって生じる DNA 異常メチル化がスペルミン供給によって抑制されるという所見⁴⁵⁾とよく一致していた。

ポリアミン代謝の変化によって誘発される DNA メチル化の変化が双方向に生じる所見は, LFA-1 のプロモーター領域 (ITGAL) でも同様に認められた。ポリアミン合成阻害した Jurkat 細胞の ITGAL 領域の遺伝子を大腸菌に導入して増殖させ, メチル化状態を詳細に検討した。すると, DFMO でポリアミン合成を阻害した細胞では, 免疫細胞の LFA-1 の発現に関与するプロモーター領域の脱メチル化が生じて LFA-1 タンパクが増加した。DFMO を加えた細胞にスペルミンを加えると, DFMO で脱メチル化した部位が高メチル化を生じて, LFA-1 タン

パクが減少した^{124, 295)}。ITGAL のその他の領域でも, 同様の変化が観察された。すなわち, DFMO によって脱メチル化が進行する部位と, 高メチル化が進行する部位が存在した。ところが, スペルミンによってこれらの部位のメチル化の変化はほぼ反転し, 通常細胞のメチル化状態に戻った。DNMT は DNA のメチル化を制御する酵素であるが, DNMT の活性低下によってメチル基の付与が減少して DNA 全体の脱メチル化が生じるわけではなく, 異常メチル化とよばれる状態を誘発することが分かった²⁹⁶⁾。

これまで, 老化の進行や生活習慣病の発症と進行を抑制に寄与すると考えられる様々なポリアミンの生理活性が報告されている。さらに我々は, DNA メチル化状態の制御に重要な役割を果たすことを発見し, 高ポリアミン食による老化や生活習慣病の発症を抑制する生理学的背景であると考えている。マウスの餌と同様に, 食品中にはスペルミジンがスペルミンより多く含まれる。また, これまでの研究でスペルミジンとスペルミンは消化管からそのまま吸収されることがわかっている。このことから, 高ポリアミン食の摂取によってスペルミジンが上昇するのではないかと当初考えたが, 実際には違った。当初行った少数 (6~9 匹) のマウスでの検討では, 高ポリアミン餌が血中スペルミジンおよびスペルミンを上昇させた。しかし, その後, マウスの数を増やして検討したところ, 血中スペルミジンが上昇するマウスも認められたが, 統計学的な差がなく, スペルミン濃度のみが有意に上昇した。高ポリアミン餌で飼育したマウスでは, 老化に関連する病理学的変化の進行や LFA-1 タンパク量の上昇, さらには加齢とともに生じる DNA 異常メチル化の進行が抑制され, 寿命が延長した^{46, 47, 95)}。我々の最も新しいヒトに対する介入試験では, 一年間の高ポリアミン納豆の摂取によって, 血中スペルミン濃度が上昇し, LFA-1 タンパク量が減少することを確認している⁹⁷⁾。しかし, この検討でも血中スペルミジン濃度の上昇は認められなかった。

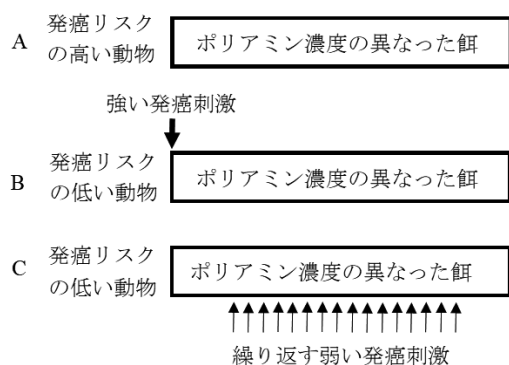


図6 ポリアミンと発癌実験

8. ポリアミンによる発癌抑制の可能性

老化もしくは加齢とともに発癌のリスクが増大する²⁹⁷⁾。また、老化とともに生じるDNAのメチル化の変化は癌細胞で認められるメチル化の変化と共通点のあることがわかっている²⁹⁸⁻³⁰¹⁾。表1で示すようポリアミンの様々な生理活性は、発癌抑制に寄与すると考えられる。ところが、これまでの報告ではポリアミンが発癌を促進すると考えられるような多くの研究成果が報告されている。しかし、これらの検討では、発癌に係る遺伝子異常が存在するか（図6A）、発癌物質に暴露した細胞や動物が用いられている（図6B）。地球上の大半のヒトは、出生時に発癌リスクは有しておらず、また一度に強い発癌物質にさらされることもない。通常、出生後には出生地で受け継がれている食事を摂取し、少しずつ様々な種類の微弱な発癌刺激を受けながら徐々に老化が進行する。出生地の食習慣によって食品から摂取するポリアミン量は大きくことなることは前述した。そこで、ヒトのこのような環境と類似の実験系を作成した（図6C）。すなわち、BALB/cマウスをポリアミン濃度の異なる餌で飼育し、その後弱い発癌刺激を繰り返した（週一回20mg/kgBWの1,2-demethylhydrazineを12週間連続投与）。すると、合成ポリアミンを加えて大豆の3倍程度のポリアミン濃度に調整した餌を食べ続けたマウスでは、通常ポリアミン濃度の餌を食べ続けたマウスより大腸内の腫瘍の発生率が低かつ

た⁴⁷⁾。同様の結果は城西大学のグループからも報告されている。彼らは、その当時ポリアミンが発癌を促進するという仮説のもとに実験を計画し、ポリアミン濃度の異なる餌で飼育したラットに低用量（85mg/kgBW）の2-amino-1-methyl-6-phenylimidazoleを8日間連続で投与した。ところが、高ポリアミン餌で飼育したラットでは乳癌の発症がむしろ低下する傾向にあった³⁰²⁾。

ODCは、癌原遺伝子の下流に存在し、癌原遺伝子の活性化によってODCも活性化する³⁰³⁻³⁰⁵⁾。そのために、ODCと発癌との関係が数多く検討されていた。そして、多くの研究では、細胞にODC遺伝子を過剰発現させることで、ポリアミン濃度が増加すると同時に、発癌が促進されることが示されてきた³⁰⁶⁻³¹²⁾。しかしながら、発癌におけるODCの役割に関するこれらの検討のほとんどでは、発癌リスクの高い細胞を用いて検討している。すなわち、遺伝子異常を有する動物が発癌刺激後の動物などの発癌リスクの高い動物から採取した細胞や発癌に関連する遺伝子を導入した細胞などが用いられている。ところが、正常細胞にODC遺伝子を導入しても癌化しないことも報告されている³¹³⁻³¹⁵⁾。ODCの活性化は腫瘍の発生と関連があるが、細胞外からのポリアミンの供給による細胞内ポリアミン濃度の上昇は、ODCを抑制することが報告されている³¹⁶⁻³¹⁸⁾。理論的にも、正常な恒常性を備えた正常細胞では、細胞外からのポリアミンの細胞内への流入はODC活性を抑制することが理解できる。その中でも、スペルミンは最も強力にODC活性を抑制する⁹⁸⁾。ポリアミン濃度の高い餌で飼育したマウスの腸粘膜細胞のODC活性を測定したところ、高ポリアミン餌を食べたマウスではODC活性が抑制されることが報告されている⁹⁶⁾。

ポリアミン摂取と発癌との関係を検討した疫学調査では、ポリアミン摂取量が多いと、大腸ポリープ発生のリスクの高い患者においてポリープの発生を促進することが報告された³¹⁹⁾。しかし、同じ研究グループが、腫瘍発

症のリスクの低いボランティアを対象にした検討では, ポリアミン摂取量の増加はポリープの発生を抑制する傾向が認められたと報告している³²⁰⁾。これらの結果は, 発癌リスクの高い動物ではポリアミン摂取量の増加によって発癌が促進されるという結果と, 発癌リスクの低い動物に高ポリアミン餌を投与した後に徐々に発癌刺激を加える実験で, ポリアミン摂取が大腸癌や乳癌の発生を抑制したという結果と極めて類似している^{88, 107)}。同時に高ポリアミン食の食習慣のある地域では乳癌と結腸癌の発生率が低値であるという疫学調査の結果とも一致している¹⁴⁻¹⁷⁾。

9. 将来の展望

ポリアミンによる生活習慣病の発症や老化の進行の抑制に寄与すると考えられる生理活性を図7に示す。これまでのアンチエイジングに関する膨大な研究成果を考察すると, 単独の遺伝子発現や細胞内シグナルの活性化では寿命延長や生活習慣病抑制を達成できるとは考えにくい¹⁷²⁾。代わりに, 近年の研究成果によって, 寿命や生活習慣病におけるエビジェネティクスの役割が大きく取り上げられるようになった^{132, 169, 185, 321-326)}。これまでに記述してきた内容から, 老化の進行抑制や生活習慣病発症の抑制を達成するうえでは, 加齢とともに低下する DNMT 活性を維持することによ

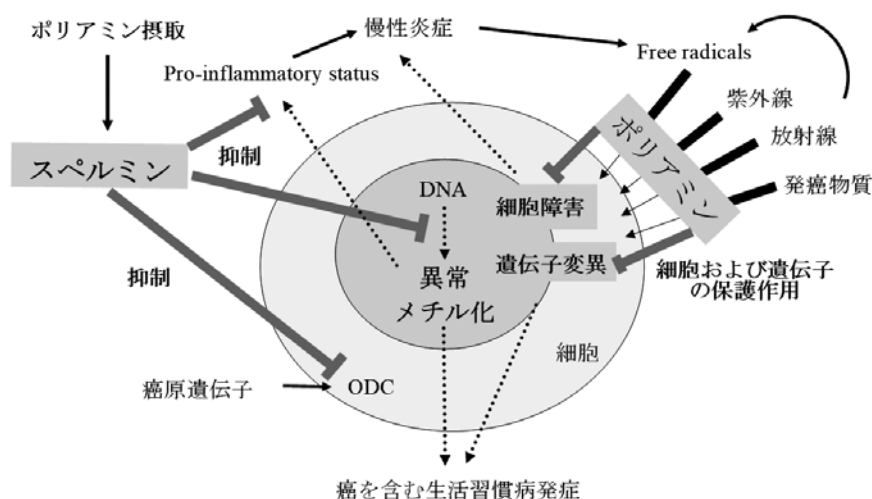


図7. 老化の進行や生活習慣病発症の病態におけるポリアミンの役割

ポリアミン摂取量の継続的な増加によって血中スperlミン濃度が上昇する。細胞外から流入したスperlミンはスperlミン/スperlミン N1ーアセチルトランスフェラーゼ (SSAT) およびアセチルポリアミン酸化酵素 (APAO) の作用を受けてスperlミジンになる。ポリアミン (スperlミンとスperlミジン) は細胞および遺伝子保護作用を有する。細胞外から細胞内に常にスperlミンが供給されると, ネガティブ・フィードバック機構によって ODC と AdoMetDC 活性が抑制される。ODC は癌原遺伝子の下流に存在するので, その抑制は細胞にとって発癌抑制に結びつく可能性がある。また, AdoMetDC は SAM から dcSAM への変換を促進するので, その活性を抑制すると dcSAM が減少する。dcSAM は DNMT 活性を抑制するので, その減少によって DNMT が活性化される。DNMT の活性化はメチル化制御機構を活性化し, 遺伝子の異常メチル化を抑制する。慢性炎症を誘発する LFA-1 の増加は DNA 全体の異常メチル化に随伴するが, スperlミンは DNA 全体の異常メチル化を抑制するとともに LFA-1 プロモーター領域に高メチル化を生じさせ, LFA-1 タンパクを減少させて慢性炎症を抑制する作用を発揮する。さらに, 老化や生活習慣病発症の原因と考えられる慢性的な刺激は, 体内での変性した物質を増加させる原因となるが, ポリアミンによる外的刺激に対する細胞の保護作用はこれらの産生を抑制し, 慢性炎症の誘発物質を減少させる。

て加齢や生活環境によって生じる遺伝子の異常メチル化の発生を抑制することが重要であるといえる。

高ポリアミン食を数か月から1年間にわたって継続摂取することによって徐々に血中スペルミン濃度が上昇する。短期間の高ポリアミン食の摂取ではポリアミン濃度が上昇しないことは、細胞内ポリアミン濃度の恒常性が極めて厳密に制御されていることを示していると思われる。このような長期間を必要とする変化は、遺伝子メチル化に係る酵素活性や物質濃度に持続的に作用し、遺伝子メチル化を抑制することによって老化や生活習慣病の発症を抑制していると思われる。老化の進行や生活習慣病の発症が慢性炎症と酸化ストレスが原因であることを考慮すると、強力な抗炎症作用を有し、さまざまな有害刺激から細胞や遺伝子を保護するポリアミンの生理活性は生活習慣を抑制する上で重要な活性であると考えられる。スペルミンによる異常メチル化の抑制はLFA-1の高メチル化とタンパクの減少を伴う。このことは、体内での慢性炎症の誘発を抑制する。興味深いことに、ポリアミンが抑制する炎症とDNA異常メチル化は、両者ともに生活習慣病発症

と密接な関係がある^{44, 327-330}。

スペルミン濃度の上昇によって生じるメチル化が変化する遺伝子と、加齢によってメチル化の変化が生じる遺伝子がすべて同定されているわけではない。さらに、これまでの研究で報告されているDNMT3に対する活性への影響に関して、タンパク量への影響なのか酵素活性そのものに対する影響なのかを明確にする必要がある。以前に報告したように、加齢によるLFA-1タンパク量が増加する細胞とスペルミンによってLFA-1のタンパク量が増加する細胞の種類は異なるように思われた^{19, 97}。このことは、加齢によって生じる遺伝子メチル化の変化が生じる遺伝子すべてに対してスペルミンが拮抗して作用するわけではないことを推測させる。時間経過とともに老化は確実に進行するものの、生活習慣病の一部は抑制可能であるという現実をよく反映しているように思われる。今後の研究によって、スペルミンがメチル化に影響を及ぼす遺伝子、またその細胞の種類などを特定することによって、歴年齢とともに生物学的年齢を診断することが可能になり、生活習慣病の改善に対して寄与できると確信している。

参考文献

1. Soda, K.; Kano, Y.; Chiba, F., Food Polyamine and Cardiovascular Disease--an Epidemiological Study. *Glob J Health Sci* 2012, **4**, 170-178, Available online: <https://pdfs.semanticscholar.org/ce5d/7f06fb6be7bf20fcaa24e36f781ff9792483.pdf#search=%27Food+polyamine+and+cardiovascular+disease+an+epidemiological+study%27>.
2. Nagata, C.; Wada, K.; Tamura, T.; Konishi, K.; Goto, Y.; Koda, S.; Kawachi, T.; Tsuji, M.; Nakamura, K., Dietary Soy and Natto Intake and Cardiovascular Disease Mortality in Japanese Adults: The Takayama Study. *Am J Clin Nutr* 2017, **105**, 426-431, DOI. 10.3945/ajcn.116.137281.
3. Erdman, J. W., Jr., Aha Science Advisory: Soy Protein and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals from the Nutrition Committee of the Aha. *Circulation* 2000, **102**, 2555-9, Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076833>.
4. Trock, B. J.; Hilakivi-Clarke, L.; Clarke, R., Meta-Analysis of Soy Intake and Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**, 459-71, DOI. 10.1093/jnci/djj102.
5. Wu, A. H.; Yu, M. C.; Tseng, C. C.; Pike, M. C., Epidemiology of Soy Exposures and Breast Cancer Risk. *Br J Cancer* 2008, **98**, 9-14, DOI. 10.1038/sj.bjc.6604145.
6. Kim, M. K.; Kim, J. H.; Nam, S. J.; Ryu, S.; Kong, G., Dietary Intake of Soy Protein and Tofu in Association with Breast Cancer Risk Based on a Case-Control Study. *Nutr Cancer* 2008, **60**, 568-76, DOI. 10.1080/01635580801966203.

7. Spector, D.; Anthony, M.; Alexander, D.; Arab, L., Soy Consumption and Colorectal Cancer. *Nutr Cancer* 2003, **47**, 1-12, DOI. 10.1207/s15327914nc4701_1.
8. Oba, S.; Nagata, C.; Shimizu, N.; Shimizu, H.; Kametani, M.; Takeyama, N.; Ohnuma, T.; Matsushita, S., Soy Product Consumption and the Risk of Colon Cancer: A Prospective Study in Takayama, Japan. *Nutr Cancer* 2007, **57**, 151-157, DOI. 10.1080/01635580701274475.
9. Yang, G.; Shu, X. O.; Li, H.; Chow, W. H.; Cai, H.; Zhang, X.; Gao, Y. T.; Zheng, W., Prospective Cohort Study of Soy Food Intake and Colorectal Cancer Risk in Women. *Am J Clin Nutr* 2009, **89**, 577-583, DOI. 10.3945/ajcn.2008.26742.
10. Yan, L.; Spitznagel, E. L.; Bosland, M. C., Soy Consumption and Colorectal Cancer Risk in Humans: A Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**, 148-158, DOI. 10.1158/1055-9965.EPI-09-0856.
11. Sofi, F.; Abbate, R.; Gensini, G. F.; Casini, A., Accruing Evidence on Benefits of Adherence to the Mediterranean Diet on Health: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Clin Nutr* 2010, **92**, 1189-1196, DOI. 10.3945/ajcn.2010.29673.
12. Estruch, R., *et al.*, Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med* 2018, **378**, e34, DOI. 10.1056/NEJMoA1800389.
13. Kris-Etherton, P.; Eckel, R. H.; Howard, B. V.; St Jeor, S.; Bazzarre, T. L.; Nutrition Committee Population Science, C.; Clinical Science Committee of the American Heart, A., Aha Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-Style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation* 2001, **103**, 1823-1825, DOI. 10.1161/01.CIR.103.13.1823.
14. Benetou, V.; Trichopoulou, A.; Orfanos, P.; Naska, A.; Lagiou, P.; Boffetta, P.; Trichopoulos, D.; Greek, E. c., Conformity to Traditional Mediterranean Diet and Cancer Incidence: The Greek Epic Cohort. *Br J Cancer* 2008, **99**, 191-195, DOI. 10.1038/sj.bjc.6604418.
15. Couto, E., *et al.*, Mediterranean Dietary Pattern and Cancer Risk in the Epic Cohort. *Br J Cancer* 2011, **104**, 1493-9, DOI. 10.1038/bjc.2011.106.
16. Trichopoulou, A.; Bamia, C.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D., Conformity to Traditional Mediterranean Diet and Breast Cancer Risk in the Greek Epic (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) Cohort. *Am J Clin Nutr* 2010, **92**, 620-625, DOI. 10.3945/ajcn.2010.29619.
17. Fung, T. T.; Hu, F. B.; McCullough, M. L.; Newby, P. K.; Willett, W. C.; Holmes, M. D., Diet Quality Is Associated with the Risk of Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer in Postmenopausal Women. *J Nutr* 2006, **136**, 466-472, DOI. 10.1093/jn/136.2.466.
18. Stepanova, M.; Rodriguez, E.; Bircerdinc, A.; Baranova, A., Age-Independent Rise of Inflammatory Scores May Contribute to Accelerated Aging in Multi-Morbidity. *Oncotarget* 2015, **6**, 1414-1421, DOI. 10.18632/oncotarget.2725.
19. Soda, K.; Kano, Y.; Nakamura, T.; Kasono, K.; Kawakami, M.; Konishi, F., Spermine, a Natural Polyamine, Suppresses LFA-1 Expression on Human Lymphocyte. *J Immunol* 2005, **175**, 237-45, DOI. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.237>
20. Ferrucci, L.; Corsi, A.; Lauretani, F.; Bandinelli, S.; Bartali, B.; Taub, D. D.; Guralnik, J. M.; Longo, D. L., The Origins of Age-Related Proinflammatory State. *Blood* 2005, **105**, 2294-2299, DOI. 10.1182/blood-2004-07-2599.
21. Franceschi, C.; Campisi, J., Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014, **69** Suppl 1, S4-9, DOI. 10.1093/gerona/glu057.
22. Balmir, F.; Staack, R.; Jeffrey, E.; Jimenez, M. D.; Wang, L.; Potter, S. M., An Extract of Soy Flour Influences Serum Cholesterol and Thyroid Hormones in Rats and Hamsters. *J Nutr* 1996, **126**, 3046-53, DOI. 10.1093/jn/126.12.3046.
23. Sacks, F. M.; Lichtenstein, A.; Van Horn, L.; Harris, W.; Kris-Etherton, P.; Winston, M., Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health: An American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. *Circulation* 2006, **113**, 1034-1044, DOI. 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171052.
24. Song, T.; Lee, S. O.; Murphy, P. A.; Hendrich, S., Soy Protein with or without Isoflavones, Soy Germ and Soy Germ Extract, and Daidzein Lessen Plasma Cholesterol Levels in Golden Syrian Hamsters. *Exp Biol Med*

- (Maywood) 2003, **228**, 1063-1068, DOI. 10.1177/153537020322800912.
25. Baur, J. A., *et al.*, Resveratrol Improves Health and Survival of Mice on a High-Calorie Diet. *Nature* 2006, **444**, 337-342, DOI. 10.1038/nature05354.
 26. Mancuso, R.; del Valle, J.; Modol, L.; Martinez, A.; Granado-Serrano, A. B.; Ramirez-Nunez, O.; Pallas, M.; Portero-Otin, M.; Osta, R.; Navarro, X., Resveratrol Improves Motoneuron Function and Extends Survival in Sod1(G93a) Als Mice. *Neurotherapeutics* 2014, **11**, 419-432, DOI. 10.1007/s13311-013-0253-y.
 27. Pearson, K. J., *et al.*, Resveratrol Delays Age-Related Deterioration and Mimics Transcriptional Aspects of Dietary Restriction without Extending Life Span. *Cell Metab* 2008, **8**, 157-168, DOI. S1550-4131(08)00182-4.
 28. Miller, R. A., *et al.*, Rapamycin, but Not Resveratrol or Simvastatin, Extends Life Span of Genetically Heterogeneous Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011, **66**, 191-201, DOI. 10.1093/gerona/glq178.
 29. Staats, S.; Wagner, A. E.; Kowalewski, B.; Rieck, F. T.; Soukup, S. T.; Kulling, S. E.; Rimbach, G., Dietary Resveratrol Does Not Affect Life Span, Body Composition, Stress Response, and Longevity-Related Gene Expression in Drosophila Melanogaster. *Int J Mol Sci* 2018, **19**, DOI. 10.3390/ijms19010223.
 30. Johnson, A. A.; Riehle, M. A., Resveratrol Fails to Extend Life Span in the Mosquito Anopheles Stephensi. *Rejuvenation Res* 2015, **18**, 473-478, DOI. 10.1089/rej.2015.1670.
 31. Kaeblerlein, M., *et al.*, Substrate-Specific Activation of Sirtuins by Resveratrol. *J Biol Chem* 2005, **280**, 17038-17045, DOI. 10.1074/jbc.M500655200.
 32. Burnett, C., *et al.*, Absence of Effects of Sir2 Overexpression on Lifespan in C. Elegans and Drosophila. *Nature* 2011, **477**, 482-485, DOI. 10.1038/nature10296.
 33. Strong, R., *et al.*, Evaluation of Resveratrol, Green Tea Extract, Curcumin, Oxaloacetic Acid, and Medium-Chain Triglyceride Oil on Life Span of Genetically Heterogeneous Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013, **68**, 6-16, DOI. 10.1093/gerona/gls070.
 34. Ernst, I. M.; Pallauf, K.; Bendall, J. K.; Paulsen, L.; Nikolai, S.; Huebbe, P.; Roeder, T.; Rimbach, G., Vitamin E Supplementation and Lifespan in Model Organisms. *Ageing Res Rev* 2013, **12**, 365-375, DOI. 10.1016/j.arr.2012.10.002.
 35. Cook, N. R.; Albert, C. M.; Gaziano, J. M.; Zaharris, E.; MacFadyen, J.; Danielson, E.; Buring, J. E.; Manson, J. E., A Randomized Factorial Trial of Vitamins C and E and Beta Carotene in the Secondary Prevention of Cardiovascular Events in Women: Results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* 2007, **167**, 1610-1618, DOI. 10.1001/archinte.167.15.1610.
 36. Yan, J.; Fujii, K.; Yao, J.; Kishida, H.; Hosoe, K.; Sawashita, J.; Takeda, T.; Mori, M.; Higuchi, K., Reduced Coenzyme Q10 Supplementation Decelerates Senescence in Samp1 Mice. *Exp Gerontol* 2006, **41**, 130-140, DOI. 10.1016/j.exger.2005.11.007.
 37. Lee, C. K.; Pugh, T. D.; Klopp, R. G.; Edwards, J.; Allison, D. B.; Weindruch, R.; Prolla, T. A., The Impact of Alpha-Lipoic Acid, Coenzyme Q10 and Caloric Restriction on Life Span and Gene Expression Patterns in Mice. *Free Radic Biol Med* 2004, **36**, 1043-57, DOI. 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.015.
 38. Miller, E. R., 3rd; Pastor-Barriuso, R.; Dalal, D.; Riemersma, R. A.; Appel, L. J.; Guallar, E., Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Ann Intern Med* 2005, **142**, 37-46, DOI. 10.7326/0003-4819-142-1-200501040-00110.
 39. Vivekananthan, D. P.; Penn, M. S.; Sapp, S. K.; Hsu, A.; Topol, E. J., Use of Antioxidant Vitamins for the Prevention of Cardiovascular Disease: Meta-Analysis of Randomised Trials. *Lancet* 2003, **361**, 2017-2023, DOI. 10.1016/S0140-6736(03)13637-9.
 40. Hsieh, C. C.; Lin, B. F., Opposite Effects of Low and High Dose Supplementation of Vitamin E on Survival of Mrl/Lpr Mice. *Nutrition* 2005, **21**, 940-8, DOI. 10.1016/j.nut.2004.11.021.
 41. Selman, C.; McLaren, J. S.; Meyer, C.; Duncan, J. S.; Redman, P.; Collins, A. R.; Duthie, G. G.; Speakman, J. R., Life-Long Vitamin C Supplementation in Combination with Cold Exposure Does Not Affect Oxidative Damage or Lifespan in Mice, but Decreases Expression of Antioxidant Protection Genes. *Mech Ageing Dev* 2006, **127**, 897-904, DOI. 10.1016/j.mad.2006.09.008.
 42. Morley, A. A.; Trainor, K. J., Lack of an Effect of Vitamin E on Lifespan of Mice. *Biogerontology* 2001, **2**, 109-112, Available online: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1011589218219.pdf#search=%27Lack+of>

- +an+Effect+of+Vitamin+E+on+Lifespan+of+Mice%27
43. Huang, W. Q.; Yi, K. H.; Li, Z.; Wang, H.; Li, M. L.; Cai, L. L.; Lin, H. N.; Lin, Q.; Tzeng, C. M., DNA Methylation Profiling Reveals the Change of Inflammation-Associated Zc3h12d in Leukoaraiosis. *Front Aging Neurosci* 2018, **10**, 143, DOI. 10.3389/fnagi.2018.00143.
 44. Irvin, M. R., *et al.*, Metabolic and Inflammatory Biomarkers Are Associated with Epigenetic Aging Acceleration Estimates in the Goldn Study. *Clin Epigenetics* 2018, **10**, 56, DOI. 10.1186/s13148-018-0481-4.
 45. Kano, Y.; Soda, K.; Konishi, F., Suppression of Lfa-1 Expression by Spermine Is Associated with Enhanced Methylation of Itgal, the Lfa-1 Promoter Area. *PLoS One* 2013, **8**, e56056, DOI. 10.1371/journal.pone.0056056
 46. Soda, K.; Dobashi, Y.; Kano, Y.; Tsujinaka, S.; Konishi, F., Polyamine-Rich Food Decreases Age-Associated Pathology and Mortality in Aged Mice. *Exp Gerontol* 2009, **44**, 727-732, DOI. 10.1016/j.exger.2009.08.013.
 47. Soda, K.; Kano, Y.; Chiba, F.; Koizumi, K.; Miyaki, Y., Increased Polyamine Intake Inhibits Age-Associated Alteration in Global DNA Methylation and 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Tumorigenesis. *PLoS One* 2013, **8**, e64357, DOI. 10.1371/journal.pone.0064357
 48. Powers, D. C.; Morley, J. E.; Flood, J. F., Age-Related Changes in Lfa-1 Expression, Cell Adhesion, and Pha-Induced Proliferation by Lymphocytes from Senescence-Accelerated Mouse (Sam)-P/8 and Sam-R/1 Substrains. *Cell Immunol* 1992, **141**, 444-456, DOI. 10.1016/0008-8749(92)90162-I.
 49. Pallis, M.; Robins, A.; Powell, R., Quantitative Analysis of Lymphocyte Cd11a Using Standardized Flow Cytometry. *Scand J Immunol* 1993, **38**, 559-564, DOI. 10.1111/j.1365-3083.1993.tb03241.x.
 50. Okumura, M.; Fujii, Y.; Takeuchi, Y.; Inada, K.; Nakahara, K.; Matsuda, H., Age-Related Accumulation of Lfa-1high Cells in a Cd8+Cd45rahigh T Cell Population. *Eur J Immunol* 1993, **23**, 1057-1063, DOI. 10.1002/eji.1830230512.
 51. Chiricolo, M.; Morini, M. C.; Mancini, R.; Beltrandi, E.; Belletti, D.; Conte, R., Cell Adhesion Molecules Cd11a and Cd18 in Blood Monocytes in Old Age and the Consequences for Immunological Dysfunction. *Preliminary Results. Gerontology* 1995, **41**, 227-34, DOI. 10.1159/000213686.
 52. Alonso-Arias, R.; Moro-Garcia, M. A.; Lopez-Vazquez, A.; Rodrigo, L.; Baltar, J.; Garcia, F. M.; Jaurrieta, J. J.; Lopez-Larrea, C., Nkg2d Expression in Cd4+ T Lymphocytes as a Marker of Senescence in the Aged Immune System. *Age (Dordr)* 2011, **33**, 591-605, DOI. 10.1007/s11357-010-9200-6.
 53. Sandmand, M.; Bruunsgaard, H.; Kemp, K.; Andersen-Ranberg, K.; Pedersen, A. N.; Skinhoj, P.; Pedersen, B. K., Is Ageing Associated with a Shift in the Balance between Type 1 and Type 2 Cytokines in Humans? *Clin Exp Immunol* 2002, **127**, 107-114, DOI. 10.1046/j.1365-2249.2002.01736.x.
 54. Yu, M.; Li, G.; Lee, W. W.; Yuan, M.; Cui, D.; Weyand, C. M.; Goronzy, J. J., Signal Inhibition by the Dual-Specific Phosphatase 4 Impairs T Cell-Dependent B-Cell Responses with Age. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, **109**, E879-88, DOI. 10.1073/pnas.1109797109.
 55. Franceschi, C.; Bonafe, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G., Inflamm-Aging. An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000, **908**, 244-254, DOI. 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.
 56. Flesher, D. L.; Sun, X.; Behrens, T. W.; Graham, R. R.; Criswell, L. A., Recent Advances in the Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol* 2010, **6**, 461-479, DOI. 10.1586/eci.10.8.
 57. Agrawal, A.; Sridharan, A.; Prakash, S.; Agrawal, H., Dendritic Cells and Aging: Consequences for Autoimmunity. *Expert Rev Clin Immunol* 2012, **8**, 73-80, DOI. 10.1586/eci.11.77.
 58. Prasad, S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B., Age-Associated Chronic Diseases Require Age-Old Medicine: Role of Chronic Inflammation. *Prev Med* 2012, **54** Suppl, S29-37, DOI. 10.1016/j.ypmed.2011.11.011.
 59. O'Connor, J. C.; McCusker, R. H.; Strle, K.; Johnson, R. W.; Dantzer, R.; Kelley, K. W., Regulation of Igf-I Function by Proinflammatory Cytokines: At the Interface of Immunology and Endocrinology. *Cell Immunol* 2008, **252**, 91-110, DOI. 10.1016/j.cellimm.2007.09.010.
 60. de Luca, C.; Olefsky, J. M., Inflammation and Insulin Resistance. *FEBS Lett* 2008, **582**, 97-105, DOI. 10.1016/j.febslet.2007.11.057.
 61. La Ferla, K.; Reimann, C.; Jelkmann, W.; Hellwig-Burgel, T., Inhibition of Erythropoietin Gene Expression Signaling Involves the Transcription Factors Gata-2 and Nf-Kappab. *FASEB J* 2002, **16**, 1811-1813, DOI.

- 10.1096/fj.02-0168fje.
62. Sprague, A. H.; Khalil, R. A., Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol* 2009, **78**, 539-552, DOI. 10.1016/j.bcp.2009.04.029.
63. Munoz-Canoves, P.; Scheele, C.; Pedersen, B. K.; Serrano, A. L., Interleukin-6 Myokine Signaling in Skeletal Muscle: A Double-Edged Sword? *FEBS J* 2013, **280**, 4131-4348, DOI. 10.1111/febs.12338.
64. Fulop, T.; Larbi, A.; Pawelec, G., Human T Cell Aging and the Impact of Persistent Viral Infections. *Front Immunol* 2013, **4**, 271, DOI. 10.3389/fimmu.2013.00271.
65. Pawelec, G., Immunosenescence: Role of Cytomegalovirus. *Exp Gerontol* 2014, **54**, 1-5, DOI. 10.1016/j.exger.2013.11.010.
66. Ferioli, M. E.; Ceruti, G.; Comolli, R., Changes in Rat Liver Ornithine Decarboxylase Activity During Ageing and Effect of Stimulation by Dexamethasone. *Exp Gerontol* 1976, **11**, 153-156, Available online: [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(76\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0531-5565(76)90026-7).
67. Yoshinaga, K.; Ishizuka, J.; Evers, B. M.; Townsend, C. M., Jr.; Thompson, J. C., Age-Related Changes in Polyamine Biosynthesis after Fasting and Refeeding. *Exp Gerontol* 1993, **28**, 565-572, DOI. 10.1016/0531-5565(93)90045-F.
68. Janne, J.; Raina, A., On the Stimulation of Ornithine Decarboxylase and Rna Polymerase Activity in Rat Liver after Treatment with Growth Hormone. *Biochim Biophys Acta* 1969, **174**, 769-772, DOI. 10.1016/0005-2787(69)90310-4.
69. Bedford, M. R.; Smith, T. K.; Summers, J. D., Effect of Dietary Ornithine on Renal and Hepatic Polyamine Synthesis. *Ann Nutr Metab* 1988, **32**, 265-270, DOI. 10.1159/000177462.
70. Schleiffer, R.; Duranton, B.; Gosse, F.; Hasselmann, M.; Raul, F., Blood Polyamine Levels after Oral Ornithine Load, a Diagnostic Marker of Hyperproliferative Premalignant and Malignant Stages in a Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 2000, **24**, 542-548.
71. Teixeira, D.; Santaolalia, M. L.; Meneu, V.; Alonso, E., Dietary Arginine Slightly and Variably Affects Tissue Polyamine Levels in Male Swiss Albino Mice. *J Nutr* 2002, **132**, 3715-3720, DOI. 10.1093/jn/132.12.3715
72. Laitinen, S. I.; Laitinen, P. H.; Hietala, O. A.; Pajunen, A. E.; Piha, R. S., Developmental Changes in Mouse Brain Polyamine Metabolism. *Neurochem Res* 1982, **7**, 1477-1485, DOI. 10.1007/BF00965090.
73. Das, R.; Kanungo, M. S., Activity and Modulation of Ornithine Decarboxylase and Concentrations of Polyamines in Various Tissues of Rats as a Function of Age. *Exp Gerontol* 1982, **17**, 95-103, DOI. 10.1016/0531-5565(82)90042-0.
74. Zhang, M., *et al.*, Spermine Inhibits Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Mononuclear Cells: A Counterregulatory Mechanism That Restrains the Immune Response. *J Exp Med* 1997, **185**, 1759-1768, DOI. 10.1084/jem.185.10.1759.
75. Gillis, S.; Kozak, R.; Durante, M.; Weksler, M. E., Immunological Studies of Aging. Decreased Production of and Response to T Cell Growth Factor by Lymphocytes from Aged Humans. *J Clin Invest* 1981, **67**, 937-42, DOI. 10.1172/JCI110143.
76. Soda, K., Anti-Aging by Polyamine.(in Japanese) *Food style 21* 2006, **10**, 43-54, Available online: <http://www.natto.or.jp/thesis/01polyamine/07.html>.
77. Eisenberg, T., *et al.*, Induction of Autophagy by Spermidine Promotes Longevity. *Nat Cell Biol* 2009, **11**, 1305-1314, DOI. 10.1038/ncb1975.
78. Soda, K., The Mechanisms by Which Polyamines Accelerate Tumor Spread. *J Exp Clin Cancer Res* 2011, **30**, 95, DOI. 10.1186/1756-9966-30-95.
79. Weiss, T. S.; Bernhardt, G.; Buschauer, A.; Thasler, W. E.; Dolgner, D.; Zirngibl, H.; Jauch, K. W., Polyamine Levels of Human Colorectal Adenocarcinomas Are Correlated with Tumor Stage and Grade. *Int J Colorectal Dis* 2002, **17**, 381-387, DOI. 10.1007/s00384-002-0394-7.
80. Upp, J. R., Jr.; Saydjari, R.; Townsend, C. M., Jr.; Singh, P.; Barranco, S. C.; Thompson, J. C., Polyamine Levels and Gastrin Receptors in Colon Cancers. *Ann Surg* 1988, **207**, 662-669, Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1493553/>
81. Gallezio, C.; Colombatto, S.; Modica, R., Free and Acetylated Polyamines as Markers of Oral Cavity Tumors.

- Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994, **77**, 167-171, DOI. 10.1016/0030-4220(94)90280-1.
82. Becciolini, A.; Porciani, S.; Lanini, A.; Balzi, M.; Cionini, L.; Bandettini, L., Polyamine Levels in Healthy and Tumor Tissues of Patients with Colon Adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 1991, **34**, 167-173.
83. Loser, C.; Folsch, U. R.; Paprotny, C.; Creutzfeldt, W., Polyamines in Colorectal Cancer. Evaluation of Polyamine Concentrations in the Colon Tissue, Serum, and Urine of 50 Patients with Colorectal Cancer. *Cancer* 1990, **65**, 958-966, DOI. 10.1002/1097-0142(19900215)65:4<958::AID-CNCR2820650423>3.0.CO;2-Z
84. Elworthy, P.; Hitchcock, E., Polyamine Levels in Red Blood Cells from Patient Groups of Different Sex and Age. *Biochim Biophys Acta* 1989, **993**, 212-216, DOI. 10.1016/0304-4165(89)90166-9.
85. Cipolla, B. G.; Havouis, R.; Moulinoux, J. P., Polyamine Contents in Current Foods: A Basis for Polyamine Reduced Diet and a Study of Its Long Term Observance and Tolerance in Prostate Carcinoma Patients. *Amino Acids* 2007, **33**, 203-212, DOI. 10.1007/s00726-007-0524-1.
86. Nishibori, N.; Fujihara, S.; Akatuki, T., Amounts of Polyamines in Foods in Japan and Intake by Japanese. *Food Chem.* 2006, **100**, DOI. 10.1016/j.foodchem.2005.09.070.
87. Nishimura, K.; Shiina, R.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K., Decrease in Polyamines with Aging and Their Ingestion from Food and Drink. *J Biochem* 2006, **139**, 81-90, DOI. 10.1093/jb/mvj003.
88. Soda, K.; Mogi, S.; Shiina, M.; Kawabata, N., The Polyamine Content in Various Foods on a Calorie Basis. *J Food Nutr* 2017, **4**, 029, Available online: <http://jacobsublishers.com/the-polyamine-content-in-various-foods-on-a-calorie-basis/>.
89. Uda, K.; Tsujikawa, T.; Fujiyama, Y.; Bamba, T., Rapid Absorption of Luminal Polyamines in a Rat Small Intestine Ex Vivo Model. *J Gastroenterol Hepatol* 2003, **18**, 554-559, DOI. 10.1046/j.1440-1746.2003.03020.x
90. Bardocz, S.; Brown, D. S.; Grant, G.; Pusztai, A., Luminal and Basolateral Polyamine Uptake by Rat Small Intestine Stimulated to Grow by Phaseolus Vulgaris Lectin Phytohaemagglutinin in Vivo. *Biochim Biophys Acta* 1990, **1034**, 46-52, DOI. 0304-4165(90)90151-L.
91. Bardocz, S.; Duguid, T. J.; Brown, D. S.; Grant, G.; Pusztai, A.; White, A.; Ralph, A., The Importance of Dietary Polyamines in Cell Regeneration and Growth. *Br J Nutr* 1995, **73**, 819-28.
92. Cipolla, B.; Guilli, F.; Moulinoux, J. P., Polyamine-Reduced Diet in Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer (Hrpe) Patients. *Biochem Soc Trans* 2003, **31**, 384-387, DOI. 10.1042/bst0310384.
93. Nishimura, K.; Araki, N.; Ohnishi, Y.; Kozaki, S., Effects of Dietary Polyamine Deficiency on Trypanosoma Gambiense Infection in Rats. *Exp Parasitol* 2001, **97**, 95-101, DOI. 10.1006/expr.2000.4588
94. Sarhan, S.; Knodgen, B.; Seiler, N., The Gastrointestinal Tract as Polyamine Source for Tumor Growth. *Anticancer Res* 1989, **9**, 215-223.
95. Soda, K.; Kano, Y.; Sakuragi, M.; Takao, K.; Lefor, A.; Konishi, F., Long-Term Oral Polyamine Intake Increases Blood Polyamine Concentrations. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009, **55**, 361-366, DOI. JST.JSTAGE/jnsv/55.361.
96. Brodal, B. P.; Eliassen, K. A.; Ronning, H.; Osmundsen, H., Effects of Dietary Polyamines and Clofibrate on Metabolism of Polyamines in the Rat. *J Nutr Biochem* 1999, **10**, 700-708, Available online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286399000583>
97. Soda, K.; Uemura, T.; Igarashi, K.; Fukui, T., Increased Polyamine Intake by Being Adherent to Traditional Japanese Diet Increases Blood Spermine Levels and Inhibits Pro-Inflammatory Status –an Interventional Study-. unpublished, manuscript in preparation.
98. Yuan, Q.; Ray, R. M.; Viar, M. J.; Johnson, L. R., Polyamine Regulation of Ornithine Decarboxylase and Its Antizyme in Intestinal Epithelial Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **280**, G130-8, DOI. 10.1152/ajpgi.2001.280.1.G130.
99. Eisenberg, T., *et al.*, Cardioprotection and Lifespan Extension by the Natural Polyamine Spermidine. *Nat Med* 2016, **22**, 1428-1438, DOI. 10.1038/nm.4222.
100. Ding, S.; Jiang, J.; Yu, P.; Zhang, G.; Zhang, G.; Liu, X., Green Tea Polyphenol Treatment Attenuates Atherosclerosis in High-Fat Diet-Fed Apolipoprotein E-Knockout Mice Via Alleviating Dyslipidemia and up-Regulating Autophagy. *PLoS One* 2017, **12**, e0181666, DOI. 10.1371/journal.pone.0181666.
101. Ferraresi, A.; Phadngam, S.; Morani, F.; Galetto, A.; Alabiso, O.; Chiorino, G.; Isidoro, C., Resveratrol Inhibits IL-

- 6-Induced Ovarian Cancer Cell Migration through Epigenetic up-Regulation of Autophagy. *Mol Carcinog* 2017, **56**, 1164-1181, DOI. 10.1002/mc.22582.
102. Park, D.; Jeong, H.; Lee, M. N.; Koh, A.; Kwon, O.; Yang, Y. R.; Noh, J.; Suh, P. G.; Park, H.; Ryu, S. H., Resveratrol Induces Autophagy by Directly Inhibiting Mtor through Atp Competition. *Sci Rep* 2016, **6**, 21772, DOI. 10.1038/srep21772.
103. Tang, L.; Yang, F.; Fang, Z.; Hu, C., Resveratrol Ameliorates Alcoholic Fatty Liver by Inducing Autophagy. *Am J Chin Med* 2016, **44**, 1207-1220, DOI. 10.1142/S0192415X16500671.
104. Zhang, J.; Wang, J.; Xu, J.; Lu, Y.; Jiang, J.; Wang, L.; Shen, H. M.; Xia, D., Curcumin Targets the Tfeb-Lysosome Pathway for Induction of Autophagy. *Oncotarget* 2016, **7**, 75659-75671, DOI. 10.18632/oncotarget.12318.
105. Pucciarelli, S.; Moreschini, B.; Micozzi, D.; De Fronzo, G. S.; Carpi, F. M.; Polzonetti, V.; Vincenzetti, S.; Mignini, F.; Napolioni, V., Spermidine and Spermine Are Enriched in Whole Blood of Nona/Centenarians. *Rejuvenation Res* 2012, **15**, 590-595, DOI. 10.1089/rej.2012.1349.
106. Watanabe, S.; Sato, S.; Nagase, S.; Shimosato, K.; Ohkuma, S., Effects of Methotrexate and Cyclophosphamide on Polyamine Levels in Various Tissues of Rats. *J Drug Target* 1999, **7**, 197-205, DOI. 10.3109/10611869909085502.
107. Binh, P. N. T.; Soda, K.; Kawakami, M., Mediterranean Diet and Polyamine Intake: Possible Contribution of Increased Polyamine Intake to Inhibition of Age-Associated Disease. *Nutrition and Dietary Supplements* 2011, **3**, 1-7, DOI. 10.2147/NDS.S15349.
108. Fukui, T.; Soda, K.; Takao, K.; Rikiyama, T., Physiological Intracellular Spermine Concentration Changes Activate DNA Methyltransferase 3a and 3b and Affect Gene Methylation. unpublished, manuscript in preparation.
109. Bestor, T.; Laudano, A.; Mattaliano, R.; Ingram, V., Cloning and Sequencing of a Cdna Encoding DNA Methyltransferase of Mouse Cells. The Carboxyl-Terminal Domain of the Mammalian Enzymes Is Related to Bacterial Restriction Methyltransferases. *J Mol Biol* 1988, **203**, 971-983, DOI. 0022-2836(88)90122-2.
110. Garcea, R.; Daino, L.; Pascale, R.; Simile, M. M.; Puddu, M.; Ruggiu, M. E.; Seddaiu, M. A.; Satta, G.; Sequenza, M. J.; Feo, F., Protooncogene Methylation and Expression in Regenerating Liver and Preneoplastic Liver Nodules Induced in the Rat by Diethylnitrosamine: Effect of Variations of S-Adenosylmethionine:S-Adenosylhomocysteine Ratio. *Carcinogenesis* 1989, **10**, 1183-1192, DOI. 10.1093/carcin/10.7.1183
111. Kucharski, R.; Maleszka, J.; Foret, S.; Maleszka, R., Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees Via DNA Methylation. *Science* 2008, **319**, 1827-1830, DOI. 10.1126/science.1153069.
112. Wang, L.; Shangguan, S.; Xin, Y.; Chang, S.; Wang, Z.; Lu, X.; Wu, L.; Niu, B.; Zhang, T., Folate Deficiency Disturbs Hsa-Let-7 G Level through Methylation Regulation in Neural Tube Defects. *J Cell Mol Med* 2017, **21**, 3244-3253, DOI. 10.1111/jcmm.13228.
113. Toriyama, M.; Toriyama, M.; Wallingford, J. B.; Finnell, R. H., Folate-Dependent Methylation of Septins Governs Ciliogenesis During Neural Tube Closure. *FASEB J* 2017, **31**, 3622-3635, DOI. 10.1096/fj.201700092R.
114. Degroote, S.; Hunting, D.; Takser, L., Periconceptional Folate Deficiency Leads to Autism-Like Traits in Wistar Rat Offspring. *Neurotoxicol Teratol* 2018, **66**, 132-138, DOI. 10.1016/j.ntt.2017.12.008.
115. Fekete, K.; Berti, C.; Cetin, I.; Hermoso, M.; Koletzko, B. V.; Decsi, T., Perinatal Folate Supply: Relevance in Health Outcome Parameters. *Matern Child Nutr* 2010, **6** Suppl 2, 23-38, DOI. 10.1111/j.1740-8709.2010.00261.x.
116. Li, W.; Li, Z.; Li, S.; Wang, X.; Wilson, J. X.; Huang, G., Periconceptional Folic Acid Supplementation Benefit to Development of Early Sensory-Motor Function through Increase DNA Methylation in Rat Offspring. *Nutrients* 2018, **10**, DOI. 10.3390/nu10030292.
117. Jin, C., *et al.*, Methyl Donors Dietary Supplementation to Gestating Sows Diet Improves the Growth Rate of Offspring and Is Associating with Changes in Expression and DNA Methylation of Insulin-Like Growth Factor-1 Gene. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2018, DOI. 10.1111/jpn.12933.
118. Steegers-Theunissen, R. P.; Obermann-Borst, S. A.; Kremer, D.; Lindemans, J.; Siebel, C.; Steegers, E. A.; Slagboom, P. E.; Heijmans, B. T., Periconceptional Maternal Folic Acid Use of 400 Microg Per Day Is Related to Increased Methylation of the Igf2 Gene in the Very Young Child. *PLoS One* 2009, **4**, e7845, DOI. 10.1371/journal.pone.0007845.
119. Cooper, W. N., *et al.*, DNA Methylation Profiling at Imprinted Loci after Periconceptional Micronutrient

- Supplementation in Humans: Results of a Pilot Randomized Controlled Trial. *FASEB J* 2012, **26**, 1782-1790, DOI. 10.1096/fj.11-192708.
120. Joubert, B. R., *et al.*, Maternal Plasma Folate Impacts Differential DNA Methylation in an Epigenome-Wide Meta-Analysis of Newborns. *Nat Commun* 2016, **7**, 10577, DOI. 10.1038/ncomms10577.
121. Pauwels, S.; Ghosh, M.; Duca, R. C.; Bekaert, B.; Freson, K.; Huybrechts, I.; S, A. S. L.; Koppen, G.; Devlieger, R.; Godderis, L., Dietary and Supplemental Maternal Methyl-Group Donor Intake and Cord Blood DNA Methylation. *Epigenetics* 2017, **12**, 1-10, DOI. 10.1080/15592294.2016.1257450.
122. Pauwels, S.; Ghosh, M.; Duca, R. C.; Bekaert, B.; Freson, K.; Huybrechts, I.; Langie, S. A. S.; Koppen, G.; Devlieger, R.; Godderis, L., Maternal Intake of Methyl-Group Donors Affects DNA Methylation of Metabolic Genes in Infants. *Clin Epigenetics* 2017, **9**, 16, DOI. 10.1186/s13148-017-0321-y.
123. Kochmanski, J.; Marchlewicz, E. H.; Cavalcante, R. G.; Sartor, M. A.; Dolinoy, D. C., Age-Related Epigenome-Wide DNA Methylation and Hydroxymethylation in Longitudinal Mouse Blood. *Epigenetics* 2018, DOI. 10.1080/15592294.2018.1507198.
124. Zhang, Z.; Deng, C.; Lu, Q.; Richardson, B., Age-Dependent DNA Methylation Changes in the Itgal (Cd11a) Promoter. *Mech Ageing Dev* 2002, **123**, 1257-1268, DOI. S0047637402000143.
125. Nguyen, A.; Leblond, F.; Mamarbachi, M.; Geoffroy, S.; Thorin, E., Age-Dependent Demethylation of Sod2 Promoter in the Mouse Femoral Artery. *Oxid Med Cell Longev* 2016, **2016**, 8627384, DOI. 10.1155/2016/8627384.
126. Avrahami, D., *et al.*, Aging-Dependent Demethylation of Regulatory Elements Correlates with Chromatin State and Improved Beta Cell Function. *Cell Metab* 2015, **22**, 619-632, DOI. 10.1016/j.cmet.2015.07.025.
127. Takasugi, M.; Hayakawa, K.; Arai, D.; Shiota, K., Age- and Sex-Dependent DNA Hypomethylation Controlled by Growth Hormone in Mouse Liver. *Mech Ageing Dev* 2013, **134**, 331-337, DOI. 10.1016/j.mad.2013.05.003.
128. Thalheim, T.; Herberg, M.; Galle, J., Linking DNA Damage and Age-Related Promoter DNA Hyper-Methylation in the Intestine. *Genes (Basel)* 2018, **9**, DOI. 10.3390/genes9010017.
129. Khalil, H.; Tazi, M.; Caution, K.; Ahmed, A.; Kanneganti, A.; Assani, K.; Kopp, B.; Marsh, C.; Dakhallallah, D.; Amer, A. O., Aging Is Associated with Hypermethylation of Autophagy Genes in Macrophages. *Epigenetics* 2016, **11**, 381-388, DOI. 10.1080/15592294.2016.1144007.
130. Gale, C. R.; Marioni, R. E.; Harris, S. E.; Starr, J. M.; Deary, I. J., DNA Methylation and the Epigenetic Clock in Relation to Physical Frailty in Older People: The Lothian Birth Cohort 1936. *Clin Epigenetics* 2018, **10**, 101, DOI. 10.1186/s13148-018-0538-4.
131. Ciccarone, F., *et al.*, Age-Dependent Expression of Dnmt1 and Dnmt3b in PbmcS from a Large European Population Enrolled in the Mark-Age Study. *Aging Cell* 2016, **15**, 755-765, DOI. 10.1111/ace.12485.
132. Issa, J. P., Aging and Epigenetic Drift: A Vicious Cycle. *J Clin Invest* 2014, **124**, 24-29, DOI. 10.1172/JCI69735.
133. Oliveira, A. M.; Hemstedt, T. J.; Bading, H., Rescue of Aging-Associated Decline in Dnmt3a2 Expression Restores Cognitive Abilities. *Nat Neurosci* 2012, **15**, 1111-1113, DOI. 10.1038/nn.3151.
134. Maegawa, S.; Hinkal, G.; Kim, H. S.; Shen, L.; Zhang, L.; Zhang, J.; Zhang, N.; Liang, S.; Donehower, L. A.; Issa, J. P., Widespread and Tissue Specific Age-Related DNA Methylation Changes in Mice. *Genome Res* 2010, **20**, 332-340, DOI. 10.1101/gr.096826.109.
135. Bolund, A. C. S.; Starnawska, A.; Miller, M. R.; Schlunssen, V.; Backer, V.; Borglum, A. D.; Christensen, K.; Tan, Q.; Christiansen, L.; Sigsgaard, T., Lung Function Discordance in Monozygotic Twins and Associated Differences in Blood DNA Methylation. *Clin Epigenetics* 2017, **9**, 132, DOI. 10.1186/s13148-017-0427-2.
136. Bell, J. T., *et al.*, Epigenome-Wide Scans Identify Differentially Methylated Regions for Age and Age-Related Phenotypes in a Healthy Ageing Population. *PLoS Genet* 2012, **8**, e1002629, DOI. 10.1371/journal.pgen.1002629.
137. de, F. C. L. A. J., *et al.*, Long-Term Air Pollution Exposure, Genome-Wide DNA Methylation and Lung Function in the Lifelines Cohort Study. *Environ Health Perspect* 2018, **126**, 027004, DOI. 10.1289/EHP2045.
138. Nwanaji-Enwerem, J. C., *et al.*, Impacts of the Mitochondrial Genome on the Relationship of Long-Term Ambient Fine Particle Exposure with Blood DNA Methylation Age. *Environ Sci Technol* 2017, **51**, 8185-8195, DOI. 10.1021/acs.est.7b02409.
139. Chen, R.; Meng, X.; Zhao, A.; Wang, C.; Yang, C.; Li, H.; Cai, J.; Zhao, Z.; Kan, H., DNA Hypomethylation

- and Its Mediation in the Effects of Fine Particulate Air Pollution on Cardiovascular Biomarkers: A Randomized Crossover Trial. *Environ Int* 2016, **94**, 614-619, DOI. 10.1016/j.envint.2016.06.026.
140. Wang, C., *et al.*, Possible Mediation by Methylation in Acute Inflammation Following Personal Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *Am J Epidemiol* 2018, **187**, 484-493, DOI. 10.1093/aje/kwx277.
141. Panni, T., *et al.*, Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Fine Particulate Matter Air Pollution in Three Study Populations: Kora F3, Kora F4, and the Normative Aging Study. *Environ Health Perspect* 2016, **124**, 983-990, DOI. 10.1289/ehp.1509966.
142. Ward-Caviness, C. K., *et al.*, Long-Term Exposure to Air Pollution Is Associated with Biological Aging. *Oncotarget* 2016, **7**, 74510-74525, DOI. 10.18632/oncotarget.12903.
143. Maghbooli, Z., *et al.*, Air Pollution During Pregnancy and Placental Adaptation in the Levels of Global DNA Methylation. *PLoS One* 2018, **13**, e0199772, DOI. 10.1371/journal.pone.0199772.
144. Meyer, K. F.; Verkaik-Schakel, R. N.; Timens, W.; Kobzik, L.; Plosch, T.; Hylkema, M. N., The Fetal Programming Effect of Prenatal Smoking on Igf1r and Igf1 Methylation Is Organ- and Sex-Specific. *Epigenetics* 2017, **12**, 1076-1091, DOI. 10.1080/15592294.2017.1403691.
145. Drake, A. J., *et al.*, In Utero Exposure to Cigarette Chemicals Induces Sex-Specific Disruption of One-Carbon Metabolism and DNA Methylation in the Human Fetal Liver. *BMC Med* 2015, **13**, 18, DOI. 10.1186/s12916-014-0251-x.
146. Bauer, M.; Fink, B.; Thurmann, L.; Eszlinger, M.; Herberth, G.; Lehmann, I., Tobacco Smoking Differently Influences Cell Types of the Innate and Adaptive Immune System-Indications from Cpg Site Methylation. *Clin Epigenetics* 2015, **7**, 83, DOI. 10.1186/s13148-016-0249-7.
147. O'Hagan, H. M., *et al.*, Oxidative Damage Targets Complexes Containing DNA Methyltransferases, Sirt1, and Polycomb Members to Promoter Cpg Islands. *Cancer Cell* 2011, **20**, 606-619, DOI. 10.1016/j.ccr.2011.09.012.
148. Vaz, M., *et al.*, Chronic Cigarette Smoke-Induced Epigenomic Changes Precede Sensitization of Bronchial Epithelial Cells to Single-Step Transformation by Kras Mutations. *Cancer Cell* 2017, **32**, 360-376 e6, DOI. 10.1016/j.ccell.2017.08.006.
149. Zhang, Y.; Elgizouli, M.; Schottker, B.; Holleczeck, B.; Nieters, A.; Brenner, H., Smoking-Associated DNA Methylation Markers Predict Lung Cancer Incidence. *Clin Epigenetics* 2016, **8**, 127, DOI. 10.1186/s13148-016-0292-4.
150. Steenaard, R. V.; Ligthart, S.; Stolk, L.; Peters, M. J.; van Meurs, J. B.; Uitterlinden, A. G.; Hofman, A.; Franco, O. H.; Dehghan, A., Tobacco Smoking Is Associated with Methylation of Genes Related to Coronary Artery Disease. *Clin Epigenetics* 2015, **7**, 54, DOI. 10.1186/s13148-015-0088-y.
151. Gao, X.; Zhang, Y.; Saum, K. U.; Schottker, B.; Breitling, L. P.; Brenner, H., Tobacco Smoking and Smoking-Related DNA Methylation Are Associated with the Development of Frailty among Older Adults. *Epigenetics* 2017, **12**, 149-156, DOI. 10.1080/15592294.2016.1271855.
152. Gao, X.; Zhang, Y.; Breitling, L. P.; Brenner, H., Relationship of Tobacco Smoking and Smoking-Related DNA Methylation with Epigenetic Age Acceleration. *Oncotarget* 2016, **7**, 46878-46889, DOI. 10.18632/oncotarget.9795.
153. Ligthart, S., *et al.*, Tobacco Smoking Is Associated with DNA Methylation of Diabetes Susceptibility Genes. *Diabetologia* 2016, **59**, 998-1006, DOI. 10.1007/s00125-016-3872-0.
154. Liu, C., *et al.*, A DNA Methylation Biomarker of Alcohol Consumption. *Mol Psychiatry* 2018, **23**, 422-433, DOI. 10.1038/mp.2016.192.
155. Sharp, G. C., *et al.*, Maternal Alcohol Consumption and Offspring DNA Methylation: Findings from Six General Population-Based Birth Cohorts. *Epigenomics* 2018, **10**, 27-42, DOI. 10.2217/epi-2017-0095.
156. Denham, J.; O'Brien, B. J.; Harvey, J. T.; Charchar, F. J., Genome-Wide Sperm DNA Methylation Changes after 3 Months of Exercise Training in Humans. *Epigenomics* 2015, **7**, 717-731, DOI. 10.2217/epi.15.29.
157. Barres, R.; Yan, J.; Egan, B.; Treebak, J. T.; Rasmussen, M.; Fritz, T.; Caidahl, K.; Krook, A.; O'Gorman, D. J.; Zierath, J. R., Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle. *Cell Metab* 2012, **15**, 405-411, DOI. 10.1016/j.cmet.2012.01.001.
158. Maejima, H.; Kanemura, N.; Kokubun, T.; Murata, K.; Takayanagi, K., Exercise Enhances Cognitive Function

- and Neurotrophin Expression in the Hippocampus Accompanied by Changes in Epigenetic Programming in Senescence-Accelerated Mice. *Neurosci Lett* 2018, **665**, 67-73, DOI. 10.1016/j.neulet.2017.11.023.
159. Ronn, T., *et al.*, A Six Months Exercise Intervention Influences the Genome-Wide DNA Methylation Pattern in Human Adipose Tissue. *PLoS Genet* 2013, **9**, e1003572, DOI. 10.1371/journal.pgen.1003572.
160. Barres, R.; Kirchner, H.; Rasmussen, M.; Yan, J.; Kantor, F. R.; Krook, A.; Naslund, E.; Zierath, J. R., Weight Loss after Gastric Bypass Surgery in Human Obesity Remodels Promoter Methylation. *Cell Rep* 2013, **3**, 1020-1027, DOI. 10.1016/j.celrep.2013.03.018.
161. Hahn, O., *et al.*, Dietary Restriction Protects from Age-Associated DNA Methylation and Induces Epigenetic Reprogramming of Lipid Metabolism. *Genome Biol* 2017, **18**, 56, DOI. 10.1186/s13059-017-1187-1.
162. Cole, J. J., *et al.*, Diverse Interventions That Extend Mouse Lifespan Suppress Shared Age-Associated Epigenetic Changes at Critical Gene Regulatory Regions. *Genome Biol* 2017, **18**, 58, DOI. 10.1186/s13059-017-1185-3.
163. Kim, C. H.; Lee, E. K.; Choi, Y. J.; An, H. J.; Jeong, H. O.; Park, D.; Kim, B. C.; Yu, B. P.; Bhak, J.; Chung, H. Y., Short-Term Calorie Restriction Ameliorates Genomewide, Age-Related Alterations in DNA Methylation. *Aging Cell* 2016, DOI. 10.1111/ace.12513.
164. Dhingra, R.; Nwanaji-Enwerem, J. C.; Samet, M.; Ward-Caviness, C. K., DNA Methylation Age-Environmental Influences, Health Impacts, and Its Role in Environmental Epidemiology. *Curr Environ Health Rep* 2018, DOI. 10.1007/s40572-018-0203-2.
165. Austin, M. K.; Chen, E.; Ross, K. M.; McEwen, L. M.; MacIsaac, J. L.; Kobor, M. S.; Miller, G. E., Early-Life Socioeconomic Disadvantage, Not Current, Predicts Accelerated Epigenetic Aging of Monocytes. *Psychoneuroendocrinology* 2018, **97**, 131-134, DOI. 10.1016/j.psyneuen.2018.07.007.
166. Li, J., *et al.*, Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Accelerated DNA Methylation Aging. *Environ Health Perspect* 2018, **126**, 067005, DOI. 10.1289/EHP2773.
167. Ramos, R. B.; Fabris, V.; Lecke, S. B.; Maturana, M. A.; Spritzer, P. M., Association between Global Leukocyte DNA Methylation and Cardiovascular Risk in Postmenopausal Women. *BMC Med Genet* 2016, **17**, 71, DOI. 10.1186/s12881-016-0335-x.
168. Li, H.; Guo, Z.; Guo, Y.; Li, M.; Yan, H.; Cheng, J.; Wang, C.; Hong, G., Common DNA Methylation Alterations of Alzheimer's Disease and Aging in Peripheral Whole Blood. *Oncotarget* 2016, **7**, 19089-19098, DOI. 10.18632/oncotarget.7862.
169. Marioni, R. E., *et al.*, DNA Methylation Age of Blood Predicts All-Cause Mortality in Later Life. *Genome Biol* 2015, **16**, 25, DOI. 10.1186/s13059-015-0584-6.
170. Watson, C. T.; Roussos, P.; Garg, P.; Ho, D. J.; Azam, N.; Katsel, P. L.; Haroutunian, V.; Sharp, A. J., Genome-Wide DNA Methylation Profiling in the Superior Temporal Gyrus Reveals Epigenetic Signatures Associated with Alzheimer's Disease. *Genome Med* 2016, **8**, 5, DOI. 10.1186/s13073-015-0258-8.
171. Horvath, S., DNA Methylation Age of Human Tissues and Cell Types. *Genome Biol* 2013, **14**, R115, DOI. 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
172. Lopez-Otin, C.; Blasco, M. A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G., The Hallmarks of Aging. *Cell* 2013, **153**, 1194-1217, DOI. 10.1016/j.cell.2013.05.039.
173. Cruickshanks, H. A., *et al.*, Senescent Cells Harbour Features of the Cancer Epigenome. *Nat Cell Biol* 2013, **15**, 1495-1506, DOI. 10.1038/ncb2879.
174. Kresovich, J. K., *et al.*, Promoter Methylation of Pgc1a and Pgc1b Predicts Cancer Incidence in a Veteran Cohort. *Epigenomics* 2018, **10**, 733-743, DOI. 10.2217/epi-2017-0141.
175. Perna, L.; Zhang, Y.; Mons, U.; Holleczeck, B.; Saum, K. U.; Brenner, H., Epigenetic Age Acceleration Predicts Cancer, Cardiovascular, and All-Cause Mortality in a German Case Cohort. *Clin Epigenetics* 2016, **8**, 64, DOI. 10.1186/s13148-016-0228-z.
176. Meliso, F. M.; Micali, D.; Silva, C. T.; Sabedot, T. S.; Coetzee, S. G.; Koch, A.; Fahlbusch, F. B.; Noushmehr, H.; Schneider-Stock, R.; Jasiulionis, M. G., Sirt1 Regulates Mxd1 During Malignant Melanoma Progression. *Oncotarget* 2017, **8**, 114540-114553, DOI. 10.18632/oncotarget.21457.
177. Joyce, B. T., *et al.*, Prospective Changes in Global DNA Methylation and Cancer Incidence and Mortality. *Br J Cancer* 2016, **115**, 465-472, DOI. 10.1038/bjc.2016.205.

178. Nishida, N., *et al.*, Hepatic DNA Methylation Is Affected by Hepatocellular Carcinoma Risk in Patients with and without Hepatitis Virus. *Dig Dis* 2015, **33**, 745-750, DOI. 10.1159/000439098.
179. Ianov, L.; Riva, A.; Kumar, A.; Foster, T. C., DNA Methylation of Synaptic Genes in the Prefrontal Cortex Is Associated with Aging and Age-Related Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci* 2017, **9**, 249, DOI. 10.3389/fnagi.2017.00249.
180. Spiers, H.; Hannon, E.; Wells, S.; Williams, B.; Fernandes, C.; Mill, J., Age-Associated Changes in DNA Methylation across Multiple Tissues in an Inbred Mouse Model. *Mech Ageing Dev* 2016, **154**, 20-23, DOI. 10.1016/j.mad.2016.02.001.
181. Kananen, L.; Marttila, S.; Nevalainen, T.; Jylhava, J.; Mononen, N.; Kahonen, M.; Raitakari, O. T.; Lehtimäki, T.; Hurme, M., Aging-Associated DNA Methylation Changes in Middle-Aged Individuals: The Young Finns Study. *BMC Genomics* 2016, **17**, 103, DOI. 10.1186/s12864-016-2421-z.
182. Jin, L., *et al.*, Genome-Wide DNA Methylation Changes in Skeletal Muscle between Young and Middle-Aged Pigs. *BMC Genomics* 2014, **15**, 653, DOI. 10.1186/1471-2164-15-653.
183. Svane, A. M., *et al.*, DNA Methylation and All-Cause Mortality in Middle-Aged and Elderly Danish Twins. *Genes (Basel)* 2018, **9**, DOI. 10.3390/genes9020078.
184. Levine, M. E., *et al.*, An Epigenetic Biomarker of Aging for Lifespan and Healthspan. *Aging (Albany NY)* 2018, **10**, 573-591, DOI. 10.18632/aging.101414.
185. Chen, B. H., *et al.*, DNA Methylation-Based Measures of Biological Age: Meta-Analysis Predicting Time to Death. *Aging (Albany NY)* 2016, **8**, 1844-1865, DOI. 10.18632/aging.101020.
186. Christiansen, L.; Lenart, A.; Tan, Q.; Vaupel, J. W.; Aviv, A.; McGue, M.; Christensen, K., DNA Methylation Age Is Associated with Mortality in a Longitudinal Danish Twin Study. *Aging Cell* 2016, **15**, 149-154, DOI. 10.1111/ace.12421.
187. Lin, Q.; Weidner, C. I.; Costa, I. G.; Marioni, R. E.; Ferreira, M. R.; Deary, I. J.; Wagner, W., DNA Methylation Levels at Individual Age-Associated CpG Sites Can Be Indicative for Life Expectancy. *Aging (Albany NY)* 2016, **8**, 394-401, DOI. 10.18632/aging.100908.
188. Lu, S.; Niu, Z.; Chen, Y.; Tu, Q.; Zhang, Y.; Chen, W.; Tong, W.; Zhang, Z., Repetitive Element DNA Methylation Is Associated with Menopausal Age. *Aging Dis* 2018, **9**, 435-443, DOI. 10.14336/AD.2017.0810.
189. Hannum, G., *et al.*, Genome-Wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell* 2013, **49**, 359-367, DOI. 10.1016/j.molcel.2012.10.016.
190. Ponnaluri, V. K. C.; Esteve, P. O.; Ruse, C. I.; Pradhan, S., S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Participates in DNA Methylation Inheritance. *J Mol Biol* 2018, **430**, 2051-2065, DOI. 10.1016/j.jmb.2018.05.014.
191. Esteve, P. O.; Terragni, J.; Deepti, K.; Chin, H. G.; Dai, N.; Espejo, A.; Correa, I. R., Jr.; Bedford, M. T.; Pradhan, S., Methyllysine Reader Plant Homeodomain (Phd) Finger Protein 20-Like 1 (Phf2011) Antagonizes DNA (Cytosine-5) Methyltransferase 1 (Dnmt1) Proteasomal Degradation. *J Biol Chem* 2014, **289**, 8277-8287, DOI. 10.1074/jbc.M113.525279.
192. Cohen, H. M.; Griffiths, A. D.; Tawfik, D. S.; Loakes, D., Determinants of Cofactor Binding to DNA Methyltransferases: Insights from a Systematic Series of Structural Variants of S-Adenosylhomocysteine. *Org Biomol Chem* 2005, **3**, 152-161, DOI. 10.1039/b415446k.
193. Zhang, B.; Denomme, M. M.; White, C. R.; Leung, K. Y.; Lee, M. B.; Greene, N. D.; Mann, M. R.; Trasler, J. M.; Baltz, J. M., Both the Folate Cycle and Betaine-Homocysteine Methyltransferase Contribute Methyl Groups for DNA Methylation in Mouse Blastocysts. *FASEB J* 2015, **29**, 1069-1079, DOI. 10.1096/fj.14-261131.
194. Frostesjo, L.; Holm, I.; Grahn, B.; Page, A. W.; Bestor, T. H.; Heby, O., Interference with DNA Methyltransferase Activity and Genome Methylation During F9 Teratocarcinoma Stem Cell Differentiation Induced by Polyamine Depletion. *J Biol Chem* 1997, **272**, 4359-4366, DOI. 10.1074/jbc.272.7.4359.
195. Zhang, Y.; Wang, H.; Zhou, D.; Moody, L.; Lezmi, S.; Chen, H.; Pan, Y. X., High-Fat Diet Caused Widespread Epigenomic Differences on Hepatic Methylome in Rat. *Physiol Genomics* 2015, **47**, 514-523, DOI. 10.1152/physiolgenomics.00110.2014.
196. Altobelli, G.; Bogdarina, I. G.; Stupka, E.; Clark, A. J.; Langley-Evans, S., Genome-Wide Methylation and Gene Expression Changes in Newborn Rats Following Maternal Protein Restriction and Reversal by Folic Acid. *PLoS*

- One* 2013, **8**, e82989, DOI. 10.1371/journal.pone.0082989.
197. Yoon, A.; Tammen, S. A.; Park, S.; Han, S. N.; Choi, S. W., Genome-Wide Hepatic DNA Methylation Changes in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutr Res Pract* 2017, **11**, 105-113, DOI. 10.4162/nrp.2017.11.2.105.
198. Choi, S. W.; Tammen, S. A.; Liu, Z.; Friso, S., A Lifelong Exposure to a Western-Style Diet, but Not Aging, Alters Global DNA Methylation in Mouse Colon. *Nutr Res Pract* 2015, **9**, 358-363, DOI. 10.4162/nrp.2015.9.4.358.
199. van Straten, E. M.; Bloks, V. W.; Huijckman, N. C.; Baller, J. F.; van Meer, H.; Lutjohann, D.; Kuipers, F.; Plosch, T., The Liver X-Receptor Gene Promoter Is Hypermethylated in a Mouse Model of Prenatal Protein Restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010, **298**, R275-282, DOI. 10.1152/ajpregu.00413.2009.
200. Kamat, P. K.; Vacek, J. C.; Kalani, A.; Tyagi, N., Homocysteine Induced Cerebrovascular Dysfunction: A Link to Alzheimer's Disease Etiology. *Open Neurol J* 2015, **9**, 9-14, DOI. 10.2174/1874205X01509010009.
201. Xie, J. C.; Lin, Y. Y.; Liu, X. H.; Zhao, Y. C.; Ma, X. Y.; Yu, J.; Liu, X. Y.; Zhao, Y. X., Homocysteine Is Associated with Exaggerated Morning Blood Pressure Surge in Patients with Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2018, DOI. 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.032.
202. Snyder, H. M., *et al.*, Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia Including Alzheimer's Disease. *Alzheimers Dement* 2015, **11**, 710-717, DOI. 10.1016/j.jalz.2014.10.008.
203. Okura, T.; Miyoshi, K.; Irita, J.; Enomoto, D.; Nagao, T.; Kukida, M.; Tanino, A.; Kudo, K.; Pei, Z.; Higaki, J., Hyperhomocysteinemia Is One of the Risk Factors Associated with Cerebrovascular Stiffness in Hypertensive Patients, Especially Elderly Males. *Sci Rep* 2014, **4**, 5663, DOI. 10.1038/srep05663.
204. Shah, H.; Jan, M. U.; Altaf, A.; Salahudin, M., Correlation of Hyper-Homocysteinemia with Coronary Artery Disease in Absence of Conventional Risk Factors among Young Adults. *J Saudi Heart Assoc* 2018, **30**, 305-310, DOI. 10.1016/j.jsha.2018.04.002.
205. Catena, C.; Colussi, G.; Nait, F.; Capobianco, F.; Sechi, L. A., Elevated Homocysteine Levels Are Associated with the Metabolic Syndrome and Cardiovascular Events in Hypertensive Patients. *Am J Hypertens* 2015, **28**, 943-50, DOI. 10.1093/ajh/hpu248.
206. Catena, C.; Colussi, G.; Url-Michitsch, M.; Nait, F.; Sechi, L. A., Subclinical Carotid Artery Disease and Plasma Homocysteine Levels in Patients with Hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2015, **9**, 167-175, DOI. 10.1016/j.jash.2014.12.020.
207. Choi, J. W.; Lee, M. H.; Fujii, T.; Fujii, N.; Moon, Y., Association of the Urine Homocysteine/Creatinine Ratio to Proinflammatory Cytokine, Natural Anticoagulant, and Nitric Oxide Levels in Cerebrovascular Disease. *Ann Clin Lab Sci* 2014, **44**, 461-465, Available online: <http://www.annclinlabsci.org/content/44/4/461.long>
208. Schaffer, A.; Verdoia, M.; Cassetti, E.; Marino, P.; Suryapranata, H.; De Luca, G.; Novara Atherosclerosis Study, G., Relationship between Homocysteine and Coronary Artery Disease. Results from a Large Prospective Cohort Study. *Thromb Res* 2014, **134**, 288-293, DOI. 10.1016/j.thromres.2014.05.025.
209. Miwa, K.; Tanaka, M.; Okazaki, S.; Yagita, Y.; Sakaguchi, M.; Mochizuki, H.; Kitagawa, K., Increased Total Homocysteine Levels Predict the Risk of Incident Dementia Independent of Cerebral Small-Vessel Diseases and Vascular Risk Factors. *J Alzheimers Dis* 2016, **49**, 503-513, DOI. 10.3233/JAD-150458.
210. Jadavji, N. M.; Farr, T. D.; Lips, J.; Khalil, A. A.; Boehm-Sturm, P.; Foddiss, M.; Harms, C.; Fuchtemeier, M.; Dirnagl, U., Elevated Levels of Plasma Homocysteine, Deficiencies in Dietary Folic Acid and Uracil-DNA Glycosylase Impair Learning in a Mouse Model of Vascular Cognitive Impairment. *Behav Brain Res* 2015, **283**, 215-226, DOI. 10.1016/j.bbr.2015.01.040.
211. Kamat, P. K.; Kyles, P.; Kalani, A.; Tyagi, N., Hydrogen Sulfide Ameliorates Homocysteine-Induced Alzheimer's Disease-Like Pathology, Blood-Brain Barrier Disruption, and Synaptic Disorder. *Mol Neurobiol* 2016, **53**, 2451-2467, DOI. 10.1007/s12035-015-9212-4.
212. Alvarez-Sanchez, N.; Alvarez-Rios, A. I.; Guerrero, J. M.; Garcia-Garcia, F. J.; Rodriguez-Manas, L.; Cruz-Chamorro, I.; Lardone, P. J.; Carrillo-Vico, A., Homocysteine Levels Are Associated with Bone Resorption in Pre-Frail and Frail Spanish Women: The Toledo Study for Healthy Aging. *Exp Gerontol* 2018, **108**, 201-208, DOI. 10.1016/j.exger.2018.04.019.
213. McLean, R. R.; Jacques, P. F.; Selhub, J.; Tucker, K. L.; Samelson, E. J.; Broe, K. E.; Hannan, M. T.; Cupples, L. A.; Kiel, D. P., Homocysteine as a Predictive Factor for Hip Fracture in Older Persons. *N Engl J Med* 2004, **350**,

- 2042-2049, DOI. 10.1056/NEJMoa032739.
214. van Meurs, J. B., *et al.*, Homocysteine Levels and the Risk of Osteoporotic Fracture. *N Engl J Med* 2004, **350**, 2033-2041, DOI. 10.1056/NEJMoa032546.
215. Shi, Z.; Guan, Y.; Huo, Y. R.; Liu, S.; Zhang, M.; Lu, H.; Yue, W.; Wang, J.; Ji, Y., Elevated Total Homocysteine Levels in Acute Ischemic Stroke Are Associated with Long-Term Mortality. *Stroke* 2015, **46**, 2419-2425, DOI. 10.1161/STROKEAHA.115.009136.
216. Shankle, W. R.; Hara, J.; Barrentine, L. W.; Curole, M. V., Cerefolinnac Therapy of Hyperhomocysteinemia Delays Cortical and White Matter Atrophy in Alzheimer's Disease and Cerebrovascular Disease. *J Alzheimers Dis* 2016, **54**, 1073-1084, DOI. 10.3233/JAD-160241.
217. Dawson, S. L.; Bowe, S. J.; Crowe, T. C., A Combination of Omega-3 Fatty Acids, Folic Acid and B-Group Vitamins Is Superior at Lowering Homocysteine Than Omega-3 Alone: A Meta-Analysis. *Nutr Res* 2016, **36**, 499-508, DOI. 10.1016/j.nutres.2016.03.010.
218. Mazza, A.; Cicero, A. F.; Ramazzina, E.; Lenti, S.; Schiavon, L.; Casiglia, E.; Gussoni, G., Nutraceutical Approaches to Homocysteine Lowering in Hypertensive Subjects at Low Cardiovascular Risk: A Multicenter, Randomized Clinical Trial. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016, **30**, 921-927.
219. Toole, J. F.; Malinow, M. R.; Chambless, L. E.; Spence, J. D.; Pettigrew, L. C.; Howard, V. J.; Sides, E. G.; Wang, C. H.; Stampfer, M., Lowering Homocysteine in Patients with Ischemic Stroke to Prevent Recurrent Stroke, Myocardial Infarction, and Death: The Vitamin Intervention for Stroke Prevention (Visp) Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2004, **291**, 565-575, DOI. 10.1001/jama.291.5.565.
220. Study of the Effectiveness of Additional Reductions in, C., *et al.*, Effects of Homocysteine-Lowering with Folic Acid Plus Vitamin B12 Vs Placebo on Mortality and Major Morbidity in Myocardial Infarction Survivors: A Randomized Trial. *JAMA* 2010, **303**, 2486-2494, DOI. 10.1001/jama.2010.840.
221. Cui, S.; Li, W.; Wang, P.; Lv, X.; Gao, Y.; Huang, G., Folic Acid Inhibits Homocysteine-Induced Cell Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Mol Cell Biochem* 2018, **444**, 77-86, DOI. 10.1007/s11010-017-3232-5.
222. Park, J. H.; Saposnik, G.; Ovbiagele, B.; Markovic, D.; Towfighi, A., Effect of B-Vitamins on Stroke Risk among Individuals with Vascular Disease Who Are Not on Antiplatelets: A Meta-Analysis. *Int J Stroke* 2016, **11**, 206-211, DOI. 10.1177/1747493015616512.
223. Cui, S.; Li, W.; Lv, X.; Wang, P.; Gao, Y.; Huang, G., Folic Acid Supplementation Delays Atherosclerotic Lesion Development by Modulating Mcp1 and Vegf DNA Methylation Levels *in Vivo* and *in Vitro*. *Int J Mol Sci* 2017, **18**, DOI. 10.3390/ijms18050990.
224. Zeng, R.; Xu, C. H.; Xu, Y. N.; Wang, Y. L.; Wang, M., The Effect of Folate Fortification on Folic Acid-Based Homocysteine-Lowering Intervention and Stroke Risk: A Meta-Analysis. *Public Health Nutr* 2015, **18**, 1514-1521, DOI. 10.1017/S1368980014002134.
225. Group, V. T. S., B Vitamins in Patients with Recent Transient Ischaemic Attack or Stroke in the Vitamins to Prevent Stroke (Vitatops) Trial: A Randomised, Double-Blind, Parallel, Placebo-Controlled Trial. *Lancet Neurol* 2010, **9**, 855-865, DOI. 10.1016/S1474-4422(10)70187-3.
226. Nigwekar, S. U.; Kang, A.; Zoungas, S.; Cass, A.; Gallagher, M. P.; Kulshrestha, S.; Navaneethan, S. D.; Perkovic, V.; Strippoli, G. F.; Jardine, M. J., Interventions for Lowering Plasma Homocysteine Levels in Dialysis Patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2016, CD004683, DOI. 10.1002/14651858.CD004683.pub4.
227. Marti-Carvajal, A. J.; Sola, I.; Lathyrus, D.; Dayer, M., Homocysteine-Lowering Interventions for Preventing Cardiovascular Events. *Cochrane Database Syst Rev* 2017, **8**, CD006612, DOI. 10.1002/14651858.CD006612.pub5.
228. Clarke, R., *et al.*, Effects of Homocysteine Lowering with B Vitamins on Cognitive Aging: Meta-Analysis of 11 Trials with Cognitive Data on 22,000 Individuals. *Am J Clin Nutr* 2014, **100**, 657-666, DOI. 10.3945/ajcn.113.076349.
229. Lonn, E., *et al.*, Homocysteine Lowering with Folic Acid and B Vitamins in Vascular Disease. *N Engl J Med* 2006, **354**, 1567-77, DOI. 10.1056/NEJMoa060900.
230. Stott, D. J., *et al.*, Randomized Controlled Trial of Homocysteine-Lowering Vitamin Treatment in Elderly Patients

- with Vascular Disease. *Am J Clin Nutr* 2005, **82**, 1320-6, DOI. 10.1093/ajcn/82.6.1320.
231. Kang, J. H.; Cook, N.; Manson, J.; Buring, J. E.; Albert, C. M.; Grodstein, F., A Trial of B Vitamins and Cognitive Function among Women at High Risk of Cardiovascular Disease. *Am J Clin Nutr* 2008, **88**, 1602-1610, DOI. 10.3945/ajcn.2008.26404.
 232. Andreeva, V. A.; Kesse-Guyot, E.; Barberger-Gateau, P.; Fezeu, L.; Hercberg, S.; Galan, P., Cognitive Function after Supplementation with B Vitamins and Long-Chain Omega-3 Fatty Acids: Ancillary Findings from the Su.FoI.Om3 Randomized Trial. *Am J Clin Nutr* 2011, **94**, 278-286, DOI. 10.3945/ajcn.110.006320.
 233. Stone, K. L.; Lui, L. Y.; Christen, W. G.; Troen, A. M.; Bauer, D. C.; Kado, D.; Schambach, C.; Cummings, S. R.; Manson, J. E., Effect of Combination Folic Acid, Vitamin B6, and Vitamin B12 Supplementation on Fracture Risk in Women: A Randomized, Controlled Trial. *J Bone Miner Res* 2017, **32**, 2331-2338, DOI. 10.1002/jbmr.3229.
 234. Garcia Lopez, M.; Bona, K. H.; Ebbing, M.; Eriksen, E. F.; Gjesdal, C. G.; Nygard, O.; Tell, G. S.; Ueland, P. M.; Meyer, H. E., B Vitamins and Hip Fracture: Secondary Analyses and Extended Follow-up of Two Large Randomized Controlled Trials. *J Bone Miner Res* 2017, **32**, 1981-1989, DOI. 10.1002/jbmr.3189.
 235. Ntaios, G., *et al.*, The Effect of Folic Acid Supplementation on Carotid Intima-Media Thickness in Patients with Cardiovascular Risk: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Int J Cardiol* 2010, **143**, 16-19, DOI. 10.1016/j.ijcard.2009.01.023.
 236. Gomez, J.; Sanchez-Roman, I.; Gomez, A.; Sanchez, C.; Suarez, H.; Lopez-Torres, M.; Barja, G., Methionine and Homocysteine Modulate the Rate of Ros Generation of Isolated Mitochondria *in Vitro*. *J Bioenerg Biomembr* 2011, **43**, 377-86, DOI. 10.1007/s10863-011-9368-1.
 237. Yang, Z.; Yang, H. M.; Gong, D. Q.; Rose, S. P.; Pirgozliev, V.; Chen, X. S.; Wang, Z. Y., Transcriptome Analysis of Hepatic Gene Expression and DNA Methylation in Methionine- and Betaine-Supplemented Geese (*Anser Cygnoides Domesticus*). *Poult Sci* 2018, DOI. 10.3382/ps/pey242.
 238. Zhang, H. P.; Wang, Y. H.; Ma, S. C.; Zhang, H.; Yang, A. N.; Yang, X. L.; Zhang, M. H.; Sun, J. M.; Hao, Y. J.; Jiang, Y. D., Homocysteine Inhibits Endothelial Progenitor Cells Proliferation Via Dnmt1-Mediated Hypomethylation of Cyclin A. *Exp Cell Res* 2018, **362**, 217-226, DOI. 10.1016/j.yexcr.2017.11.021.
 239. McNeil, C. J.; Beattie, J. H.; Gordon, M. J.; Pirie, L. P.; Duthie, S. J., Differential Effects of Nutritional Folic Acid Deficiency and Moderate Hyperhomocysteinemia on Aortic Plaque Formation and Genome-Wide DNA Methylation in Vascular Tissue from Apoe^{-/-} Mice. *Clin Epigenetics* 2011, **2**, 361-368, DOI. 10.1007/s13148-011-0022-x.
 240. Dawson, H.; Collins, G.; Pyle, R.; Deep-Dixit, V.; Taub, D. D., The Immunoregulatory Effects of Homocysteine and Its Intermediates on T-Lymphocyte Function. *Mech Ageing Dev* 2004, **125**, 107-110, DOI. 10.1016/j.mad.2003.11.013.
 241. Elmasry, K.; Mohamed, R.; Sharma, I.; Elsherbiny, N. M.; Liu, Y.; Al-Shabrawey, M.; Tawfik, A., Epigenetic Modifications in Hyperhomocysteinemia: Potential Role in Diabetic Retinopathy and Age-Related Macular Degeneration. *Oncotarget* 2018, **9**, 12562-12590, DOI. 10.18632/oncotarget.24333.
 242. Badiga, S.; Siddiqui, N. R.; Macaluso, M.; Johanning, G. L.; Piyathilake, C. J., Homocysteinemia Is Associated with a Lower Degree of PbmC Line-1 Methylation and a Higher Risk of Cln 2c in the U.S. Post-Folic Acid Fortification Era. *Nutr Cancer* 2016, **68**, 446-455, DOI. 10.1080/01635581.2016.1152388.
 243. Li, J. G.; Barrero, C.; Gupta, S.; Kruger, W. D.; Merali, S.; Pratico, D., Homocysteine Modulates 5-Lipoxygenase Expression Level Via DNA Methylation. *Aging Cell* 2017, **16**, 273-280, DOI. 10.1111/acer.12550.
 244. Pushpakumar, S.; Kundu, S.; Narayanan, N.; Sen, U., DNA Hypermethylation in Hyperhomocysteinemia Contributes to Abnormal Extracellular Matrix Metabolism in the Kidney. *FASEB J* 2015, **29**, 4713-4725, DOI. 10.1096/fj.15-272443.
 245. Yang, A., *et al.*, Homocysteine Activates Autophagy by Inhibition of Cfr Expression Via Interaction between DNA Methylation and H3k27me3 in Mouse Liver. *Cell Death Dis* 2018, **9**, 169, DOI. 10.1038/s41419-017-0216-z.
 246. Yang, A., *et al.*, Reciprocal Regulation between Mir-148a/152 and DNA Methyltransferase 1 Is Associated with Hyperhomocysteinemia-Accelerated Atherosclerosis. *DNA Cell Biol* 2017, **36**, 462-474, DOI. 10.1089/

dna.2017.3651.

247. Chamberlain, J. A., *et al.*, Dietary Intake of One-Carbon Metabolism Nutrients and DNA Methylation in Peripheral Blood. *Am J Clin Nutr* 2018, DOI. 10.1093/ajcn/nqy119.
248. Craig, P. M.; Moon, T. W., Methionine Restriction Affects the Phenotypic and Transcriptional Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) to Carbohydrate-Enriched Diets. *Br J Nutr* 2013, **109**, 402-412, DOI. 10.1017/S0007114512001663.
249. Takumi, S.; Okamura, K.; Yanagisawa, H.; Sano, T.; Kobayashi, Y.; Nohara, K., The Effect of a Methyl-Deficient Diet on the Global DNA Methylation and the DNA Methylation Regulatory Pathways. *J Appl Toxicol* 2015, **35**, 1550-6, DOI. 10.1002/jat.3117.
250. Koz, S. T.; Etem, E. O.; Baydas, G.; Yuce, H.; Ozercan, H. I.; Kuloglu, T.; Koz, S.; Etem, A.; Demir, N., Effects of Resveratrol on Blood Homocysteine Level, on Homocysteine Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Cognitive Dysfunctions in Rats. *Brain Res* 2012, **1484**, 29-38, DOI. 10.1016/j.brainres.2012.09.026.
251. Ma, S. C.; Zhang, H. P.; Jiao, Y.; Wang, Y. H.; Zhang, H.; Yang, X. L.; Yang, A. N.; Jiang, Y. D., Homocysteine-Induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Occurs Via Pten Hypermethylation and Is Mitigated by Resveratrol. *Mol Med Rep* 2018, **17**, 5312-5319, DOI. 10.3892/mmr.2018.8471.
252. Maugeri, A.; Barchitta, M.; Mazzone, M. G.; Giuliano, F.; Basile, G.; Agodi, A., Resveratrol Modulates Sirt1 and Dnmt Functions and Restores Line-1 Methylation Levels in Arpe-19 Cells under Oxidative Stress and Inflammation. *Int J Mol Sci* 2018, **19**, DOI. 10.3390/ijms19072118.
253. Medina-Aguilar, R., *et al.*, Methylation Landscape of Human Breast Cancer Cells in Response to Dietary Compound Resveratrol. *PLoS One* 2016, **11**, e0157866, DOI. 10.1371/journal.pone.0157866.
254. Zanatta, A.; Cecatto, C.; Ribeiro, R. T.; Amaral, A. U.; Wyse, A. T.; Leipnitz, G.; Wajner, M., S-Adenosylmethionine Promotes Oxidative Stress and Decreases Na(+), K(+)-ATPase Activity in Cerebral Cortex Supernatants of Adolescent Rats: Implications for the Pathogenesis of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Deficiency. *Mol Neurobiol* 2018, **55**, 5868-5878, DOI. 10.1007/s12035-017-0804-z.
255. Sanz, A.; Caro, P.; Ayala, V.; Portero-Otin, M.; Pamplona, R.; Barja, G., Methionine Restriction Decreases Mitochondrial Oxygen Radical Generation and Leak as Well as Oxidative Damage to Mitochondrial DNA and Proteins. *FASEB J* 2006, **20**, 1064-1073, DOI. 10.1096/fj.05-5568com.
256. Gomez, J.; Caro, P.; Sanchez, I.; Naudi, A.; Jove, M.; Portero-Otin, M.; Lopez-Torres, M.; Pamplona, R.; Barja, G., Effect of Methionine Dietary Supplementation on Mitochondrial Oxygen Radical Generation and Oxidative DNA Damage in Rat Liver and Heart. *J Bioenerg Biomembr* 2009, **41**, 309-321, DOI. 10.1007/s10863-009-9229-3.
257. Yang, A. N., *et al.*, High-Methionine Diets Accelerate Atherosclerosis by Hhcy-Mediated Fbp4 Gene Demethylation Pathway Via Dnmt1 in Apoe(-/-) Mice. *FEBS Lett* 2015, **589**, 3998-4009, DOI. 10.1016/j.febslet.2015.11.010.
258. Su, W.; Zhang, H.; Ying, Z.; Li, Y.; Zhou, L.; Wang, F.; Zhang, L.; Wang, T., Effects of Dietary L-Methionine Supplementation on Intestinal Integrity and Oxidative Status in Intrauterine Growth-Retarded Weanling Piglets. *Eur J Nutr* 2017, DOI. 10.1007/s00394-017-1539-3.
259. Aissa, A. F.; Amaral, C. L. D.; Venancio, V. P.; Machado, C. D. S.; Hernandez, L. C.; Santos, P.; Curi, R.; Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G., Methionine-Supplemented Diet Affects the Expression of Cardiovascular Disease-Related Genes and Increases Inflammatory Cytokines in Mice Heart and Liver. *J Toxicol Environ Health A* 2017, **80**, 1116-1128, DOI. 10.1080/15287394.2017.1357366.
260. Miousse, I. R., *et al.*, Short-Term Dietary Methionine Supplementation Affects One-Carbon Metabolism and DNA Methylation in the Mouse Gut and Leads to Altered Microbiome Profiles, Barrier Function, Gene Expression and Histomorphology. *Genes Nutr* 2017, **12**, 22, DOI. 10.1186/s12263-017-0576-0.
261. Parrish, R. R.; Buckingham, S. C.; Mascia, K. L.; Johnson, J. J.; Matyasik, M. M.; Lockhart, R. M.; Lubin, F. D., Methionine Increases Bdnf DNA Methylation and Improves Memory in Epilepsy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015, **2**, 401-416, DOI. 10.1002/acn3.183.
262. Shojaei Saadi, H. A.; Gagne, D.; Fournier, E.; Baldoceda Baldeon, L. M.; Sirard, M. A.; Robert, C., Responses of Bovine Early Embryos to S-Adenosyl Methionine Supplementation in Culture. *Epigenomics* 2016, **8**, 1039-1060, DOI. 10.2217/epi-2016-0022.

263. Wright, K. N., *et al.*, Methyl Supplementation Attenuates Cocaine-Seeking Behaviors and Cocaine-Induced C-Fos Activation in a DNA Methylation-Dependent Manner. *J Neurosci* 2015, **35**, 8948-8958, DOI. 10.1523/JNEUROSCI.5227-14.2015.
264. Maddineni, S.; Nichenametla, S.; Sinha, R.; Wilson, R. P.; Richie, J. P., Jr., Methionine Restriction Affects Oxidative Stress and Glutathione-Related Redox Pathways in the Rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013, **238**, 392-399, DOI. 10.1177/1535370213477988.
265. Liu, G., *et al.*, Methionine Restriction on Oxidative Stress and Immune Response in Dss-Induced Colitis Mice. *Oncotarget* 2017, **8**, 44511-44520, DOI. 10.18632/oncotarget.17812.
266. ing, Y.; Yun, J.; Guoyao, W.; Kaiji, S.; Zhaolai, D.; Zhenlong, W., Dietary L-Methionine Restriction Decreases Oxidative Stress in Porcine Liver Mitochondria. *Exp Gerontol* 2015, **65**, 35-41, DOI. 10.1016/j.exger.2015.03.004.
267. Sanchez-Roman, I.; Gomez, A.; Perez, I.; Sanchez, C.; Suarez, H.; Naudi, A.; Jove, M.; Lopez-Torres, M.; Pamplona, R.; Barja, G., Effects of Aging and Methionine Restriction Applied at Old Age on Ros Generation and Oxidative Damage in Rat Liver Mitochondria. *Biogerontology* 2012, **13**, 399-411, DOI. 10.1007/s10522-012-9384-5.
268. Sanchez-Roman, I., *et al.*, Forty Percent Methionine Restriction Lowers DNA Methylation, Complex I Ros Generation, and Oxidative Damage to Mtdna and Mitochondrial Proteins in Rat Heart. *J Bioenerg Biomembr* 2011, **43**, 699-708, DOI. 10.1007/s10863-011-9389-9.
269. Pogribny, I. P.; Basnakian, A. G.; Miller, B. J.; Lopatina, N. G.; Poirier, L. A.; James, S. J., Breaks in Genomic DNA and within the P53 Gene Are Associated with Hypomethylation in Livers of Folate/Methyl-Deficient Rats. *Cancer Res* 1995, **55**, 1894-901, Available online: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/55/9/1894.long>
270. Mattocks, D. A.; Mentch, S. J.; Shneyder, J.; Ables, G. P.; Sun, D.; Richie, J. P., Jr.; Locasale, J. W.; Nichenametla, S. N., Short Term Methionine Restriction Increases Hepatic Global DNA Methylation in Adult but Not Young Male C57bl/6j Mice. *Exp Gerontol* 2017, **88**, 1-8, DOI. 10.1016/j.exger.2016.12.003.
271. Nicken, P.; Empl, M. T.; Gerhard, D.; Hausmann, J.; Steinberg, P., Methionine Restriction Inhibits Chemically-Induced Malignant Transformation in the Balb/C 3t3 Cell Transformation Assay. *Food Chem Toxicol* 2016, **95**, 196-202, DOI. 10.1016/j.fct.2016.07.014.
272. Johnson, J. E.; Johnson, F. B., Methionine Restriction Activates the Retrograde Response and Confers Both Stress Tolerance and Lifespan Extension to Yeast, Mouse and Human Cells. *PLoS One* 2014, **9**, e97729, DOI. 10.1371/journal.pone.0097729.
273. Orgeron, M. L.; Stone, K. P.; Wanders, D.; Cortez, C. C.; Van, N. T.; Gettys, T. W., The Impact of Dietary Methionine Restriction on Biomarkers of Metabolic Health. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014, **121**, 351-376, DOI. 10.1016/B978-0-12-800101-1.00011-9.
274. Orentreich, N.; Matias, J. R.; DeFelice, A.; Zimmerman, J. A., Low Methionine Ingestion by Rats Extends Life Span. *J Nutr* 1993, **123**, 269-274, DOI. 10.1093/jn/123.2.269.
275. James, S. J.; Melnyk, S.; Pogribna, M.; Pogribny, I. P.; Caudill, M. A., Elevation in S-Adenosylhomocysteine and DNA Hypomethylation: Potential Epigenetic Mechanism for Homocysteine-Related Pathology. *J Nutr* 2002, **132**, 2361S-2366S, DOI. 10.1093/jn/132.8.2361S.
276. Hoffman, D. R.; Marion, D. W.; Cornatzer, W. E.; Duerre, J. A., S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocystein Metabolism in Isolated Rat Liver. Effects of L-Methionine, L-Homocystein, and Adenosine. *J Biol Chem* 1980, **255**, 10822-10827, Available online: <http://www.jbc.org/content/255/22/10822.long>
277. Adaikalakoteswari, A., *et al.*, Vitamin B12 Insufficiency Induces Cholesterol Biosynthesis by Limiting S-Adenosylmethionine and Modulating the Methylation of Srebf1 and Ldlr Genes. *Clin Epigenetics* 2015, **7**, 14, DOI. 10.1186/s13148-015-0046-8.
278. Chang, P. Y.; Lu, S. C.; Lee, C. M.; Chen, Y. J.; Dugan, T. A.; Huang, W. H.; Chang, S. F.; Liao, W. S.; Chen, C. H.; Lee, Y. T., Homocysteine Inhibits Arterial Endothelial Cell Growth through Transcriptional Downregulation of Fibroblast Growth Factor-2 Involving G Protein and DNA Methylation. *Circ Res* 2008, **102**, 933-941, DOI. 10.1161/CIRCRESAHA.108.171082.
279. Van Hecke, M. V.; Dekker, J. M.; Nijpels, G.; Teerlink, T.; Jakobs, C.; Stolk, R. P.; Heine, R. J.; Bouter, L.

- M.; Polak, B. C.; Stehouwer, C. D., Homocysteine, S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine Are Associated with Retinal Microvascular Abnormalities: The Hoorn Study. *Clin Sci (Lond)* 2008, **114**, 479-487, DOI. 10.1042/CS20070275.
280. Yamamoto, D.; Shima, K.; Matsuo, K.; Nishioka, T.; Chen, C. Y.; Hu, G. F.; Sasaki, A.; Tsuji, T., Ornithine Decarboxylase Antizyme Induces Hypomethylation of Genome DNA and Histone H3 Lysine 9 Dimethylation (H3K9me2) in Human Oral Cancer Cell Line. *PLoS One* 2010, **5**, e12554, DOI. 10.1371/journal.pone.0012554.
281. Tsuji, T.; Usui, S.; Aida, T.; Tachikawa, T.; Hu, G. F.; Sasaki, A.; Matsumura, T.; Todd, R.; Wong, D. T., Induction of Epithelial Differentiation and DNA Demethylation in Hamster Malignant Oral Keratinocyte by Ornithine Decarboxylase Antizyme. *Oncogene* 2001, **20**, 24-33, DOI. 10.1038/sj.onc.1204051
282. Pegg, A. E.; Wang, X.; Schwartz, C. E.; McCloskey, D. E., Spermine Synthase Activity Affects the Content of Decarboxylated S-Adenosylmethionine. *Biochem J* 2011, **433**, 139-144, DOI. 10.1042/BJ20101228.
283. Shantz, L. M.; Holm, I.; Janne, O. A.; Pegg, A. E., Regulation of S-Adenosylmethionine Decarboxylase Activity by Alterations in the Intracellular Polyamine Content. *Biochem J* 1992, **288** (Pt 2), 511-518, DOI. 10.1042/bj2880511
284. Papazafiri, P.; Osborne, H. B., Effect of Alpha-Difluoromethylornithine on DNA Methylation in Murine Erythroleukaemic Cells. Relationship to Stimulation of Induced Differentiation. *Biochem J* 1987, **242**, 479-483, DOI. 10.1042/bj2420479
285. Poomipark, N.; Flatley, J. E.; Hill, M. H.; Mangnall, B.; Azar, E.; Grabowski, P.; Powers, H. J., Methyl Donor Status Influences Dnmt Expression and Global DNA Methylation in Cervical Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016, **17**, 3213-22, Available online: <http://journal.waocp.org/?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:27509954&key=2016.17.7.3213>
286. Minois, N.; Carmona-Gutierrez, D.; Madeo, F., Polyamines in Aging and Disease. *Aging (Albany NY)* 2011, **3**, 716-732, DOI. 10.18632/aging.100361
287. Casillas, M. A., Jr.; Lopatina, N.; Andrews, L. G.; Tollefsbol, T. O., Transcriptional Control of the DNA Methyltransferases Is Altered in Aging and Neoplastically-Transformed Human Fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2003, **252**, 33-43, Available online: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1025548623524.pdf#search=%27Transcriptional+Control+of+the+DNA+Methyltransferases+Is+Altered+in+Aging+and+Neoplastically+Transformed+Human+Fibroblasts%27>
288. Lopatina, N.; Haskell, J. F.; Andrews, L. G.; Poole, J. C.; Saldanha, S.; Tollefsbol, T., Differential Maintenance and De Novo Methylating Activity by Three DNA Methyltransferases in Aging and Immortalized Fibroblasts. *J Cell Biochem* 2002, **84**, 324-34, DOI. 10.1002/jcb.10015.
289. Lu, Q.; Kaplan, M.; Ray, D.; Ray, D.; Zacharek, S.; Gutsch, D.; Richardson, B., Demethylation of Itgal (Cd11a) Regulatory Sequences in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002, **46**, 1282-1291, DOI. 10.1002/art.10234.
290. Perez, R. F.; Tejedor, J. R.; Bayon, G. F.; Fernandez, A. F.; Fraga, M. F., Distinct Chromatin Signatures of DNA Hypomethylation in Aging and Cancer. *Aging Cell* 2018, **17**, e12744, DOI. 10.1111/accel.12744.
291. Zeng, Q.; Chen, X.; Ning, C.; Zhu, Q.; Yao, Y.; Zhao, Y.; Luan, F., Methylation of the Genes Rod1, Nlr5, and Hkr1 Is Associated with Aging in Hainan Centenarians. *BMC Med Genomics* 2018, **11**, 7, DOI. 10.1186/s12920-018-0334-1.
292. Florath, I.; Butterbach, K.; Muller, H.; Bewerunge-Hudler, M.; Brenner, H., Cross-Sectional and Longitudinal Changes in DNA Methylation with Age: An Epigenome-Wide Analysis Revealing over 60 Novel Age-Associated CpG Sites. *Hum Mol Genet* 2014, **23**, 1186-1201, DOI. 10.1093/hmg/ddt531.
293. McClay, J. L., *et al.*, A Methylome-Wide Study of Aging Using Massively Parallel Sequencing of the Methyl-CpG-Enriched Genomic Fraction from Blood in over 700 Subjects. *Hum Mol Genet* 2014, **23**, 1175-1185, DOI. 10.1093/hmg/ddt511.
294. Alisch, R. S.; Barwick, B. G.; Chopra, P.; Myrick, L. K.; Satten, G. A.; Conneely, K. N.; Warren, S. T., Age-Associated DNA Methylation in Pediatric Populations. *Genome Res* 2012, **22**, 623-632, DOI. 10.1101/gr.125187.111.
295. Richardson, B. C., Role of DNA Methylation in the Regulation of Cell Function: Autoimmunity, Aging and

- Cancer. *J Nutr* 2002, **132**, 2401S-2405S, DOI. 10.1093/jn/132.8.2401S
296. Hatazawa, Y., *et al.*, Reduced Dnmt3a Increases Gdf5 Expression with Suppressed Satellite Cell Differentiation and Impaired Skeletal Muscle Regeneration. *FASEB J* 2018, **32**, 1452-1467, DOI. 10.1096/fj.201700573R.
297. de Magalhaes, J. P., How Ageing Processes Influence Cancer. *Nat Rev Cancer* 2013, **13**, 357-365, DOI. 10.1038/nrc3497.
298. Johnson, K. C.; Houseman, E. A.; King, J. E.; Christensen, B. C., Normal Breast Tissue DNA Methylation Differences at Regulatory Elements Are Associated with the Cancer Risk Factor Age. *Breast Cancer Res* 2017, **19**, 81, DOI. 10.1186/s13058-017-0873-y.
299. Galamb, O., *et al.*, Aging Related Methylation Influences the Gene Expression of Key Control Genes in Colorectal Cancer and Adenoma. *World J Gastroenterol* 2016, **22**, 10325-10340, DOI. 10.3748/wjg.v22.i47.10325.
300. Okuchi, Y.; Imajo, M.; Mizuno, R.; Kamioka, Y.; Miyoshi, H.; Taketo, M. M.; Nagayama, S.; Sakai, Y.; Matsuda, M., Identification of Aging-Associated Gene Expression Signatures That Precede Intestinal Tumorigenesis. *PLoS One* 2016, **11**, e0162300, DOI. 10.1371/journal.pone.0162300.
301. Lin, Q.; Wagner, W., Epigenetic Aging Signatures Are Coherently Modified in Cancer. *PLoS Genet* 2015, **11**, e1005334, DOI. 10.1371/journal.pgen.1005334.
302. Wada, H.; Wada, U. F.; Mano, H.; Higashiguchi, M.; Haba, R.; Watanabe, S.; Udaka, S., Effects of Dietary Polyamines on the Promotion of Mammary Tumor in Rats. *Journal of Health Science* 2002, **48**, 376-80, DOI. 10.1248/jhs.48.376
303. He, T. C.; Sparks, A. B.; Rago, C.; Hermeking, H.; Zawel, L.; da Costa, L. T.; Morin, P. J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W., Identification of C-Myc as a Target of the Apc Pathway. *Science* 1998, **281**, 1509-1512, Available online: <http://science.sciencemag.org/content/281/5382/1509.full>
304. Bello-Fernandez, C.; Packham, G.; Cleveland, J. L., The Ornithine Decarboxylase Gene Is a Transcriptional Target of C-Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**, 7804-7808, Available online: <http://www.pnas.org/content/90/16/7804.long>
305. Pena, A.; Reddy, C. D.; Wu, S.; Hickok, N. J.; Reddy, E. P.; Yumet, G.; Soprano, D. R.; Soprano, K. J., Regulation of Human Ornithine Decarboxylase Expression by the C-Myc.Max Protein Complex. *J Biol Chem* 1993, **268**, 27277-27285, Available online: <http://www.jbc.org/content/268/36/27277.long>
306. Shukla-Dave, A., *et al.*, Ornithine Decarboxylase Is Sufficient for Prostate Tumorigenesis Via Androgen Receptor Signaling. *Am J Pathol* 2016, **186**, 3131-3145, DOI. 10.1016/j.ajpath.2016.08.021.
307. Auvinen, M.; Paasinen, A.; Andersson, L. C.; Holttä, E., Ornithine Decarboxylase Activity Is Critical for Cell Transformation. *Nature* 1992, **360**, 355-358, DOI. 10.1038/360355a0.
308. Erdman, S. H.; Ignatenko, N. A.; Powell, M. B.; Blohm-Mangone, K. A.; Holubec, H.; Guillen-Rodriguez, J. M.; Gerner, E. W., Apc-Dependent Changes in Expression of Genes Influencing Polyamine Metabolism, and Consequences for Gastrointestinal Carcinogenesis, in the Min Mouse. *Carcinogenesis* 1999, **20**, 1709-1713, DOI. 10.1093/carcin/20.9.1709
309. Megosh, L.; Halpern, M.; Farkash, E.; O'Brien, T. G., Analysis of Ras Gene Mutational Spectra in Epidermal Papillomas from K6/Odc Transgenic Mice. *Mol Carcinog* 1998, **22**, 145-149, DOI. 10.1002/(SICI)1098-2744(199807)22:3<145::AID-MC1>3.0.CO;2-K.
310. Moshier, J. A.; Malecka-Panas, E.; Geng, H.; Dosescu, J.; Tureaud, J.; Skunca, M.; Majumdar, A. P., Ornithine Decarboxylase Transformation of Nih/3t3 Cells Is Mediated by Altered Epidermal Growth Factor Receptor Activity. *Cancer Res* 1995, **55**, 5358-5365, Available online: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/55/22/5358.full.pdf#search=%27Ornithine+Decarboxylase+Transformation+of+Nih%2F3t3+Cells+Is+Mediated+by+Altered+Epidermal+Growth+Factor+Receptor+Activity%27>
311. Shantz, L. M.; Pegg, A. E., Ornithine Decarboxylase Induction in Transformation by H-Ras and Rhoa. *Cancer Res* 1998, **58**, 2748-2753, Available online: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/13/2748.full-text.pdf>
312. Holttä, E.; Sistonen, L.; Alitalo, K., The Mechanisms of Ornithine Decarboxylase Deregulation in C-Ha-Ras Oncogene-Transformed Nih 3t3 Cells. *J Biol Chem* 1988, **263**, 4500-4507, Available online: <http://www.jbc.org/content/263/9/4500.full.pdf#search=%27The+Mechanisms+of+Ornithine+Decarboxylase+Deregulation+in+CHaRas%27>

313. Clifford, A.; Morgan, D.; Yuspa, S. H.; Soler, A. P.; Gilmour, S., Role of Ornithine Decarboxylase in Epidermal Tumorigenesis. *Cancer Res* 1995, **55**, 1680-1686, Available online: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/55/8/1680.long>
314. Hibshoosh, H.; Johnson, M.; Weinstein, I. B., Effects of Overexpression of Ornithine Decarboxylase (Odc) on Growth Control and Oncogene-Induced Cell Transformation. *Oncogene* 1991, **6**, 739-743.
315. O'Brien, T. G.; Megosh, L. C.; Gilliard, G.; Soler, A. P., Ornithine Decarboxylase Overexpression Is a Sufficient Condition for Tumor Promotion in Mouse Skin. *Cancer Res* 1997, **57**, 2630-2637, Available online: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/57/13/2630.full.pdf#search=%27%EF%81%AC+Ornithine+decarboxylase+overexpression+is+a+sufficient+condition+for+tumor+promotion+in+mouse+skin%27>.
316. Ito, K.; Kashiwagi, K.; Watanabe, S.; Kameji, T.; Hayashi, S.; Igarashi, K., Influence of the 5'-Untranslated Region of Ornithine Decarboxylase Mrna and Spermidine on Ornithine Decarboxylase Synthesis. *J Biol Chem* 1990, **265**, 13036-13041, Available online: <http://www.jbc.org/content/265/22/13036.long>
317. Kashiwagi, K.; Ito, K.; Igarashi, K., Spermidine Regulation of Ornithine Decarboxylase Synthesis by a Gc-Rich Sequence of the 5'-Untranslated Region. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **178**, 815-822, DOI. 10.1016/0006-291X(91)90964-9
318. Lovkvist, E.; Stjernborg, L.; Persson, L., Feedback Regulation of Mammalian Ornithine Decarboxylase. Studies Using a Transient Expression System. *Eur J Biochem* 1993, **215**, 753-759, DOI. 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18089.x
319. Vargas, A. J.; Wertheim, B. C.; Gerner, E. W.; Thomson, C. A.; Rock, C. L.; Thompson, P. A., Dietary Polyamine Intake and Risk of Colorectal Adenomatous Polyps. *Am J Clin Nutr* 2012, **96**, 133-141, DOI. 10.3945/ajcn.111.030353.
320. Vargas, A. J.; Ashbeck, E. L.; Wertheim, B. C.; Wallace, R. B.; Neuhouser, M. L.; Thomson, C. A.; Thompson, P. A., Dietary Polyamine Intake and Colorectal Cancer Risk in Postmenopausal Women. *Am J Clin Nutr* 2015, **102**, 411-419, DOI. 10.3945/ajcn.114.103895.
321. Huidobro, C.; Fernandez, A. F.; Fraga, M. F., Aging Epigenetics: Causes and Consequences. *Mol Aspects Med* 2013, **34**, 765-81, DOI. 10.1016/j.mam.2012.06.006.
322. Maeda, M., *et al.*, High Impact of Methylation Accumulation on Metachronous Gastric Cancer: 5-Year Follow-up of a Multicentre Prospective Cohort Study. *Gut* 2017, **66**, 1721-1723, DOI. 10.1136/gutjnl-2016-313387.
323. Hai, Z.; Zuo, W., Aberrant DNA Methylation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2016, **456**, 69-74, DOI. 10.1016/j.cca.2016.02.026.
324. Maegawa, S., *et al.*, Age-Related Epigenetic Drift in the Pathogenesis of Mds and Aml. *Genome Res* 2014, DOI. 10.1101/gr.157529.113.
325. Borghini, A.; Cervelli, T.; Galli, A.; Andreassi, M. G., DNA Modifications in Atherosclerosis: From the Past to the Future. *Atherosclerosis* 2013, **230**, 202-209, DOI. 10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.038.
326. Vlaming, H.; van Leeuwen, F., Crosstalk between Aging and the Epigenome. *Epigenomics* 2012, **4**, 5-7, DOI. 10.2217/epi.11.113.
327. Nojima, M.; Iwasaki, M.; Kasuga, Y.; Yokoyama, S.; Onuma, H.; Nishimura, H.; Kusama, R.; Yoshida, T.; Tsugane, S., Correlation between Global Methylation Level of Peripheral Blood Leukocytes and Serum C Reactive Protein Level Modified by Mthfr Polymorphism: A Cross-Sectional Study. *BMC Cancer* 2018, **18**, 184, DOI. 10.1186/s12885-018-4089-z.
328. Iwaya, C.; Kitajima, H.; Yamamoto, K.; Maeda, Y.; Sonoda, N.; Shibata, H.; Inoguchi, T., DNA Methylation of the Klf14 Gene Region in Whole Blood Cells Provides Prediction for the Chronic Inflammation in the Adipose Tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, **497**, 908-915, DOI. 10.1016/j.bbrc.2017.12.104.
329. Fang, G.; Zhang, Q. H.; Tang, Q.; Jiang, Z.; Xing, S.; Li, J.; Pang, Y., Comprehensive Analysis of Gene Expression and DNA Methylation Datasets Identify Valuable Biomarkers for Rheumatoid Arthritis Progression. *Oncotarget* 2018, **9**, 2977-2983, DOI. 10.18632/oncotarget.22918.
330. Kan, S.; Wu, J.; Sun, C.; Hao, J.; Wu, Z., Correlation between Rage Gene Promoter Methylation and Diabetic Retinal Inflammation. *Exp Ther Med* 2018, **15**, 242-246, DOI. 10.3892/etm.2017.5378.

漢方の効能

Efficacy of traditional medicine “KAMPO”

(5) 七味唐辛子について

Shichimi togarashi (Mixed-Cayenne-Pepper)

北村 雅史 (KITAMURA Masashi)*

* 城西大学 薬学部薬科学科 生薬学研究室

読者の皆さんは「薬味」というと何を思い浮かべるでしょうか？マグロにはワサビ、カツオにはショウガ、サンマには大根おろし、うどんにはネギ・・・食べ物を思い浮かべるだけで付け合わせる薬味が想像できるのではないのでしょうか。このように、薬味は風味を良くし、食欲を増進させるために日本の食文化と密接に関わってきました。薬味は料理に加える香辛料や野菜を指しますが、単に料理を美味しくいただくという目的だけでなく、抗酸化作用、抗菌作用、消化促進作用、整腸作用、発汗作用などそれぞれ特徴的な作用を有していることが「薬」を冠する理由ではないかと考えられます。今回、たくさんの薬味の中から「七味唐辛子」に注目し、紹介したいと思います。

七味唐辛子は唐辛子を含む7種類の素材を混合した日本特有の混合香辛料であり、その歴史は江戸時代まで遡ります。1625年(寛永2年)、からしや徳右衛門が漢方薬にヒントを得て、唐辛子に種々の材料を混合したものが七味唐辛子の由来だと言われております。また、七味は現在では「しちみ」と呼ばれておりますが、この呼び方は関西の呼び名であり、元々関東では「なないろ」と呼ばれていたそうです。東京・浅草の「やげん堀・中島商店」、長野・善光寺「八幡屋磯五郎」、京都・清水「七味屋本舗」の三軒が江戸時代から続く老舗として有名です。現在、七味唐辛子と使用される7種類の素材は唐辛子以外に決まったものではなく、一般的に、陳皮、胡麻、麻の実、けしの実、山椒、紫蘇、生姜などが配合され、唐辛子の量により大辛、中辛、小辛に分類されます。構成素材の役割について簡単にお話しします。唐辛子は蕃椒とも呼ばれます。「蕃」は外国という意味で、中南米を原産としており、食欲増進作用や体を温める作用があります。陳皮、山椒、生姜、紫蘇には健胃作用があります。胡麻は滋養強壮作用があり、独特の風味を持ち、食感を良くします。麻の実には麻子仁(マシニン)とも呼ばれ、便通を良くする働きがあります。けしの実にはタンパク質、ミネラルが豊富です。さて、漢方薬では生薬の組み合わせにより様々な薬効を発揮しています。漢方処方を構成する生薬は「君臣佐使」という組み合わせで説明ができます。処方の中心の生薬を君薬と呼び、機能を補強する生薬を臣薬と呼びます。補助や調和などを目的に使用される生薬は佐薬・史薬と呼びます。この「君臣佐使」に七味唐辛子を当てはめると、唐辛子が「君薬」、陳皮、山椒、生姜、紫蘇が「臣薬」、胡麻、麻の実、けしの実が「佐薬・史薬」といったところでしょうか。唐辛子の食欲増進作用や体を温める作用を中心として、臣薬の持つ体を温める作用や健胃作用により唐辛子の作用を増強・補強し、佐薬・史薬で全体を整えていることが窺えます。江戸時代から現在まで長く愛されていた背景には、七味唐辛子の持つ味や香りの良さだけでなく、漢方医学体系の理論を取り入れた産物であることが理由としてあるのかもしれません。

七味唐辛子は配合が自由である点や食品として美味しさを追求する点が漢方薬と異なる特徴といえます。この特徴が、様々な地方でオリジナル七味唐辛子を生み出す背景となりました。現在では、全国各地でオリジナル七味唐辛子が作られており、オンラインで簡単に手に入れることもできます。

例えば、山椒の香りを強くした山椒七味唐辛子、ゆずを配合したゆず七味唐辛子、唐辛子を焙煎した黒七味唐辛子などが販売されています。一風変わったものでは、ニンニクやわさびが入った七味唐辛子もあります。七味唐辛子の材料は比較的簡単に手に入りますので、オリジナルの七味唐辛子を作ってご家庭で楽しむこともできます。一味唐辛子を基本として、オリエンタル調にシナモンパウダーやクミンパウダーを加えたり、西洋風にフェネルなどのハーブを加えてみても良いかもしれません。ハバネロチョコレートというお菓子が販売されておりますので、味は保証いたしませんがいちいちチョコレートを加えた七味唐辛子も面白いかもしれないですね。七味唐辛子の販売は材料を並べて客の好みに合わせた配合をしたそうです。この際、材料に関するユニークな口上が人気を博したそうです。客を魅了するパフォーマンスはSNS映えを狙って販売する現代のお店の先駆けかもしれません。



連絡先：城西大学 薬学部薬科学科 生薬学研究室
〒 350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1
TEL：049-271-8089 (内線 8512)
E-mail:kitamura@josai.ac.jp

ニジマス用飼料の炭水化物源－5

酒本 秀一 (SAKAMOTO Shuichi)

連絡先：email：si290347-5313@tbz.t-com.ne.jp

Key Words：ニジマス用飼料 炭水化物源 全粒トウモロコシ α 化トウモロコシ 成長 飼料効率 タンパク質効率 魚体蓄積率 消化吸収率 糞 水質汚濁

特定の企業や個人が大量の水を使用して汚し、そのまま排水するのが許される時代ではない。給餌養殖は水を汚す事業として周りから厳しい目で見られている。給餌養殖で水を汚す主な原因は残餌と糞であった。残餌は食べ残しを出さない給餌法を採れば解決出来る。残餌が無くなれば製品の生産コストも下がって利益が増えるので、周りから色々いわれなくても事業者自らが積極的に取り組んで来ており、ほぼ問題無いレベルに達しているのではないかと思われる。もう一つの原因である糞を減らすには如何すれば良いのであろう。糞に含まれる主な物は飼料原料由来の骨質や不消化の炭水化物などである。骨質は養魚飼料の主原料である魚粉に由来するので、灰分含量の少ない魚粉を使用するのが最も簡単な方法である。ところが魚粉の品質は年々低下しており、灰分含量が次第に高くなっているのが現状である。何らかの処理によって骨質の消化吸収率を他成分並みに高くするのは難しいと思われるので、骨質を減らすためには他原料との大きさや重さの違いを利用して篩別や分級等によって取り除くしか方法が無いのではないかと思われる。これはコストの点で実用的でない。そこで魚粉の使用量を減らすための研究が進められ、養魚飼料に合成タウリンが利用出来るようになって魚粉の使用量もか

なり減らせるようになって来た。近い将来魚粉を使用しなくても十分な飼育成績が得られる飼料が開発出来れば、骨質の問題は解決出来るであろう。これで全て解決かという、そうは行かない。魚粉の使用量は減らせても養魚飼料にタンパク質は一定量必要なので、他のタンパク質源、主として脱脂大豆粕などの植物性タンパク質源の使用量が増えざるを得ない。植物性タンパク質源には相当量の不消化炭水化物も含まれているのが一般的なので、魚粉由来の骨質を減らせても、今度は不消化炭水化物の量が増える事が問題になる。

植物性タンパク質源については別の機会に譲るとして、今回は不消化炭水化物を多く含み、養魚飼料への配合割合も高い飼料用小麦粉の問題について検討する。

小麦粉を使用した場合より糞の量を減らし、しかも魚の飼育成績も改善するには小麦粉の代わりに何を使用すれば良いのであろう。これまでの試験¹⁻⁴⁾結果から「小麦粉より消化吸収率が高く、炭水化物含量も多い原料で、脂質も多ければさらに良い。」ことが分かっている。もちろん価格も小麦粉と同等か、それ以下であることが望ましい。色々の原料をスクリーニングした結果、中白糠（酒糠）、マイロ、全粒トウモロコシ、 α 化トウモロコシ等が候補に挙がつ

た。中白糠^{1,4)}とマイロ³⁾については既に報告したので、今回は全粒トウモロコシと α 化トウモロコシについて説明する。

全粒トウモロコシ（エクストルーダー飼料）

全粒トウモロコシは生原料なのでハードペレット飼料では消化吸収率が低くて利用出来ない。よって、飼料はエクストルーダー飼料とした。また、試験はニジマスの成魚と稚魚に分けて行った。以下それぞれについて報告する。

成魚試験

1. 材料と方法

1-1. 試験飼料

炭水化物源には小麦粉（フスマに近い低品質の飼料用小麦粉）と全粒トウモロコシ（以下 IC と略記）を用いた。表 1 に試験飼料の組成と分析値を示す。炭水化物源が全量小麦粉である対照区、小麦粉の半量と全量を IC で代替した 50% 代替区、100% 代替区の 3 試験区を設定した。エクストルーダー処理を行うと β 澱粉の α 化が起こって、炭水化物の消化吸収率が改善されることを既に確認している⁵⁾ので、

表 1 試験飼料の組成と分析値

代替率 (%)	0	50	100
魚粉 (%)	49	49	49
小麦粉	27	13.5	
全粒トウモロコシ		13.5	27
脱脂大豆粕	14	14	14
ミートミール	2	2	2
ビタミン・ミネラル混合	2	2	2
大豆油	2	2	2
魚油（外割 %）*	4	4	4
水分 (%)	7.63	8.81	8.29
タンパク質	46.2	44.3	42.6
脂質	14.2	14.5	15.1
灰分	10.2	9.15	8.74
炭水化物	19.2	21.0	25.6
Cal/100g	351.0	349.7	357.5
C/P 比	7.60	7.89	8.39

*アフターコーティング

飼料はエクストルーダー飼料とした。エクストルーダー飼料の製造法は成書⁶⁾を参照して欲しいが、ごく簡単に説明すると以下の様になる。原料を混合、粉碎した後バレル内に蒸気を吹き込みながらさらに混合する。次にエクストルーダーで高温高湿高圧下で混練し、原料中に微小な空気粒を含ませると共に澱粉を α 化させる。次にエクストルーダー先端の小さな穴から吐出させた飼料を高速カッターで切断してペレット状に成形する。この時急に圧力が下がるので、飼料に混入していた空気粒が膨大し、内部に空気を含む嵩比重が小さくて軽い飼料になる。最後にバンド式乾燥機で熱風乾燥する。このような製造工程なので、ビタミン C の崩壊や油の酸化が危惧される。よって表には書いてないが、ビタミン C を 0.05%、抗酸化剤のエトキシキン を 0.005% 添加してある。なお、魚油は飼料の乾燥後 5% 量をスプレーコーティングした。

IC による小麦粉の代替率が高くなるに従ってタンパク質と灰分が減少し、脂質と炭水化物含量が高くなる。また、カロリー・タンパク質比（C/P 比：カロリー含量をタンパク質含量で除した値）も次第に高くなるが、カロリー含量は不規則に動いた。これはタンパク質の減少量と脂質、炭水化物の増加量、それぞれの成分が持つカロリー量との関係による。カロリー量はタンパク質 4、脂質 9、炭水化物 2Cal/g の値を用いて計算で求めた。

小麦粉のみの飼料に比べて IC を添加した飼料はやや膨化の程度が大きく、軽かった。但し、飼料を投与した時の沈降性に問題は無く、何れの飼料も 100% 沈下した。

1-2. 飼育試験

水容量 200L の屋外角型コンクリート水槽を 1 飼料当たり 2 面用いた。各水槽に平均体重 65g のニジマス成魚を 5Kg 収容し、11 月 8 日から翌年の 1 月 11 日まで 2 カ月間飼育した。水温 14℃、給餌は日に 2 回（午前 1 回、午後 1 回）、給餌率は改変ライトリッツ給餌率であった。

1-3. 調査項目

以下の方法に従って生残率，増重量，飼料効率，タンパク質効率，魚体の肥満度と臓器体重比，背肉の色などを調べた。さらに全魚体，背肉，肝臓の成分分析を行ない，分析結果から飼料成分の魚体蓄積率を求めた。

生残率

飼育試験開始時と終了時の尾数から生残率（終了時尾数×100/開始時尾数）を求めた。

増重量

終了時の総魚体重から開始時の総魚体重を減じ，さらに死魚の総体重を補正して増重量を求めた。

飼料効率

増重量×100/給餌量の式で求めた。

タンパク質効率

増重量×100/給与タンパク質量の式で求めた。

肥満度と臓器体重比

開始時と終了時に各区から10尾ずつサンプリングし，個体別に体重と尾叉長を測定して肥満度（体重×100/尾叉長³）を求めた。次に解剖して内臓（心臓と腎臓以外の全ての臓器を含む）体重比，DL（腹腔内脂肪蓄積組織）体重比，肝臓体重比を求めた。

全魚体の分析

開始時と終了時に各区から10尾ずつサンプリングし，区毎にまとめて全魚体の分析サンプルとした。フードプロセッサーで破碎し，ホモジナイザーで均一化した後分析に供した。水分，タンパク質，脂質，灰分は定法で分析した。

背肉と肝臓の分析

魚体測定と解剖に供した魚から背肉と肝臓を各尾等量ずつ採取し，区毎にまとめて一般成分の分析に供した。背肉の成分は部位によってかなり異なるので，背鰭の下で，側線より上の部分と場所を決めて採取した。

血漿の分析

開始時と終了時に各区から10尾ずつサンプリングし，FA100麻酔下でヘパリン処理した1mLプラスチック注射筒を用いてキュービエ氏管から採血した。血液は区毎にプールし，

3000rpmで15分間遠心分離して血漿を採取した。半自動分析機を用いて魚の健康状態を反映するとされているグルコース（Glu），総コレステロール（T・Cho），トリグリセライド（TG），総タンパク質（T・Pro）含量およびアルカリ性フォスファターゼ（ALP）活性を測定した。

飼料成分の魚体蓄積率

試験飼料の分析値と給餌量，開始時と終了時の魚体成分分析値などから，投与された飼料成分のうち何％が魚体に蓄積されたかを求めた。

肉色の測定

トウモロコシを飼料に添加すると肉が黄色くなるので，ニジマス用飼料にトウモロコシは使用出来ないとする説が有る。トウモロコシを用いると本当に肉が黄色になるのかを確認するため，飼育試験終了時に各区から20尾ずつサンプリングし，背肉部の色を色彩色差計（MINOLTA CR-100）を用いてLab表色系で測色した。Lab表色系では，L値が大きい程明度が高く，白っぽい色であることを示す。a値は（+）側では数値が大きい程赤の度合い，（-）側では緑の度合いが大きい。b値は（+）側では黄色の度合い，（-）側では青の度合いが大きい。測色時には肉にラップを被せて測定するのであるが，この時に肉とラップの間に空気を入れたり，ラップに皺を寄せたりしないように注意しなくてはならない。

2. 結果

2-1. 飼育成績

表2に各区2水槽分の結果をまとめて示す。各区共1尾の死魚も出ず，生残率に区間差は無かった。図1，2に示す様にICによる代替率が高くなるに従って増重量，飼料効率，タンパ

表2 飼育試験の結果

代替率 (%)	0	50	100
生残率 (%)	100	100	100
増重量 (kg)	8.65	8.90	9.31
給餌量 (kg)	8.67	8.67	8.67
飼料効率 (%)	99.8	102.7	107.4
タンパク質効率 (%)	215.8	232.0	252.0

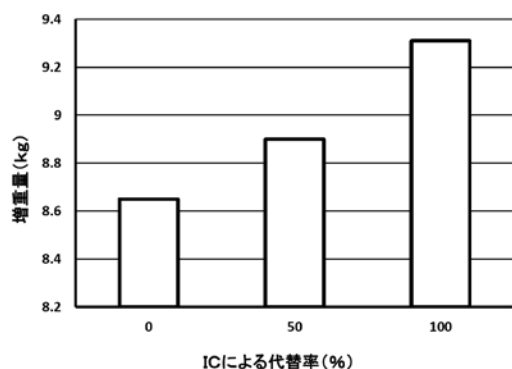


図1 ICによる代替率と増重量

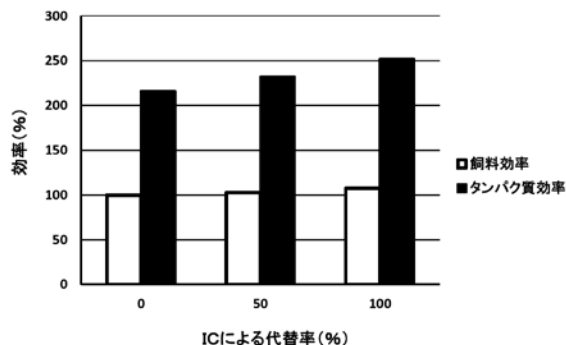


図2 ICによる代替率と飼料効率, タンパク質効率

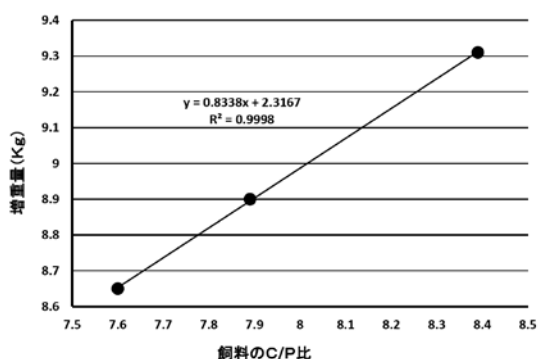


図3 飼料のC/P比と増重量

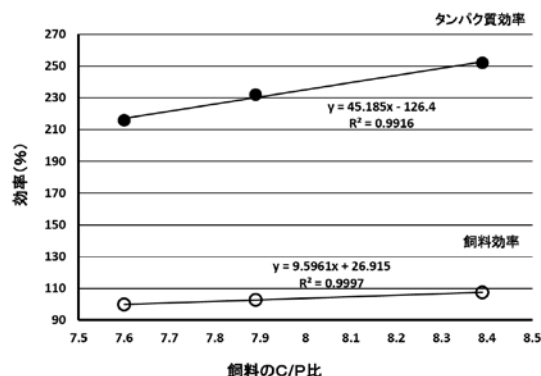


図4 飼料のC/P比と飼料効率, タンパク質効率

ク質効率共に高くなっていた。飼料のタンパク質、脂質、炭水化物、カロリー含量およびC/P比と増重量、飼料効率、タンパク質効率との関係を調べたところ、何れもC/P比との間で最も強い相関を示すことが分かった。図3にC/P比と増重量、図4にC/P比と飼料効率、タンパク質効率との関係を示す。C/P比が高くなるに従って増重量、飼料効率、タンパク質効率も高くなっていた。相関係数は何れも1に近く、非常に強い正の相関であった。

以上の結果から、ICによる小麦粉の代替は飼育成績に著しい改善効果があることが分かった。

2-2. 魚体測定と解剖の結果

表3に結果を示す。終了時には何れの区も開始時より肥満度、内臓体重比、肝臓体重比が小さくなっていたが、DL体重比は大きくなっていた。終了時の各区間比較では、肥満度に違いはなかったが、内臓、DL、肝臓体重比は何れもICによる代替率が高くなるに従って大きく

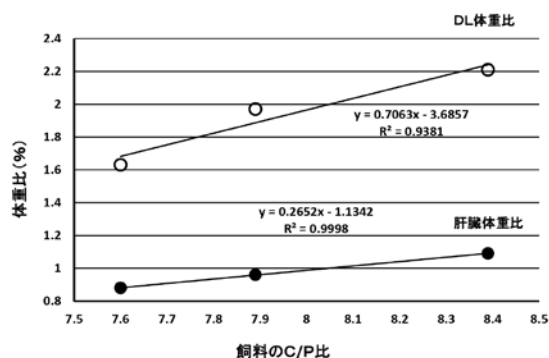


図5 飼料のC/P比とDL体重比, 肝臓体重比

表3 魚体測定と解剖の結果

時期 代替率 (%)	開始時	終了時		
		0	50	100
体重 (g)	67.4	115.6	120.8	117.4
尾叉長 (cm)	17.5	21.5	21.7	21.7
肥満度	1.25	1.16	1.18	1.15
内臓体重比 (%)	10.1	8.79	9.18	9.40
DL体重比 (%)	1.60	1.63	1.97	2.21
肝臓体重比 (%)	1.44	0.88	0.96	1.09

なっていた。内臓体重比から DL 体重比を引くと、何れの区もほぼ同じ値を示すので、内臓体重比の増加は DL 体重比の増加によっていた。これは代替率が高くなるに従って腹腔内に蓄積脂質が増える事を意味している。肝臓体重比も

大きくなっているが、肝臓は脂質の蓄積組織であると同時にグリコーゲンの蓄積組織でもあるので、何れによる肥大であるかは、この結果のみでは分らない。図5に示す様に、DL 体重比、肝臓体重比共に飼料の C/P 比と強い正の相関を有していた。

表4 全魚体の分析値

時期 代替率 (%)	開始時	終了時		
		0	50	100
水分 (%)	74.9	73.9	74.0	73.8
タンパク質	16.5	16.8	16.9	16.7
脂質	6.29	7.10	7.67	8.01
灰分	2.58	2.42	2.23	2.29
タンパク質(%乾物)	65.7	64.4	65.0	63.7
脂質	25.1	27.2	29.6	30.5
灰分	10.3	9.27	8.58	8.74

2-3. 全魚体の分析値

表4に分析結果を示す。開始時と終了時で水分とタンパク質含量に違いは無かったが、何れの区でも脂質は増加し、灰分はやや減少していた。終了時の各区分比較では、水分、タンパク質、灰分含量に明確な違いは無かったが、脂質は代替率が高くなるに従って増えていた。

2-4. 背肉と肝臓の分析値

表5に結果を示す。背肉では開始時と終了時で水分に違いは無かったが、タンパク質と灰分は減少し、脂質は増加していた。終了時の各区分比較では、タンパク質と灰分に区間差は認められなかったが、脂質は代替率が高くなるに従って増えていた。

肝臓では終了時に水分が減少し、タンパク質と脂質が増えていた。終了時の各区分比較では、水分、タンパク質、脂質、灰分共に代替率が高くなるに従って減少していた。今回はグリコーゲン含量を測定していないので断言は出来ないが、図6, 7に示す様に肝臓のタンパク質、脂質

表5 背肉と肝臓の分析値

時期	開始時	終了時		
代替率 (%)		0	50	100
背肉				
水分 (%)	78.8	78.5	78.6	79.0
タンパク質	18.9	19.8	19.7	19.3
脂質	0.86	0.67	0.70	0.70
灰分	1.41	1.54	1.61	1.55
タンパク質 (% 乾物)	89.2	92.1	92.1	91.9
脂質	4.06	3.12	3.27	3.33
灰分	6.65	7.16	7.52	7.38
肝臓				
水分 (%)	79.7	77.5	76.7	75.8
タンパク質	14.2	16.6	16.2	14.3
脂質	2.90	3.27	3.00	2.46
灰分	1.73	1.73	1.58	1.38
タンパク質 (% 乾物)	70.0	73.8	69.5	59.1
脂質	14.3	14.7	12.9	10.3
灰分	8.52	7.69	6.78	5.70

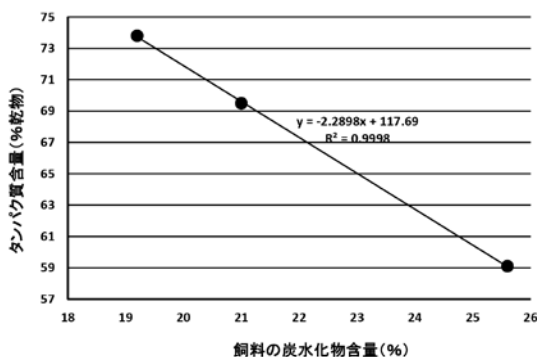


図6 飼料の炭水化物含量と肝臓のタンパク質含量

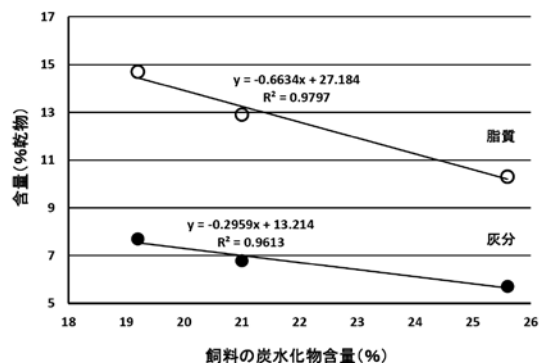


図7 飼料の炭水化物含量と肝臓の脂質、灰分含量

表 6 血漿成分の分析値

時期 代替率 (%)	開始時	終了時		
		0	50	100
Glu (mg/dL)	159	125	135	158
T・Cho (mg/dL)	203	380	434	409
TG (mg/dL)	158	343	353	256
T・Pro (g/dL)	2.5	4.1	4.3	3.7
ALP (IU/L)	131	408	430	452

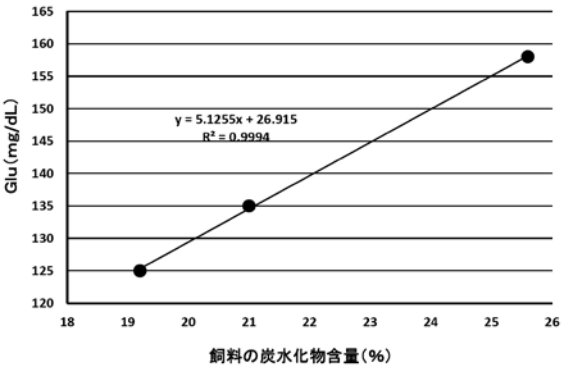


図 8 飼料の炭水化物含量と血漿の Glu 含量

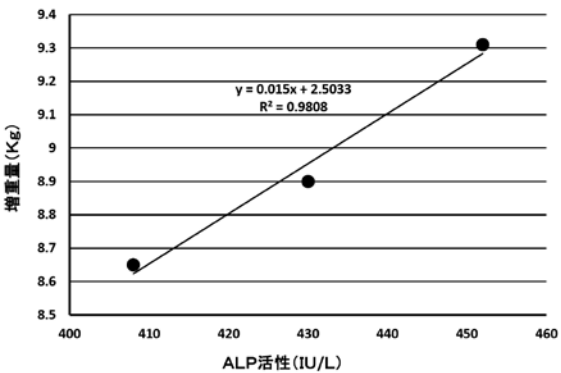


図 9 血漿の ALP 活性と増重量

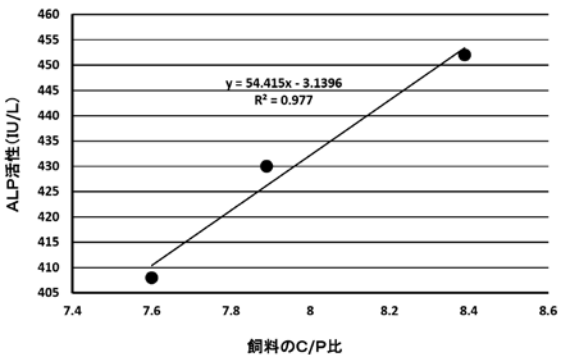


図 10 飼料の C/P 比と血漿の ALP 活性

および灰分含量は飼料の炭水化物含量との間に強い負の相関が認められたので、代替率が高くなるに従って肝臓のグリコーゲン含量が多くなったことが原因であろうと考えた。

以上の結果から、小麦粉の IC による代替率が高くなるに従って肝臓体重比が大きくなったのは、グリコーゲンの蓄積が主因で、全魚体の脂質含量が多くなったのは、腹腔内へ脂質の蓄積量が増えたのと肉部の脂質含量が増えたのが主因であると判断した。

2-5. 血漿成分の分析値

表 6 に結果を示す。IC による代替率が高くなるに従って Glu 含量と ALP 活性は高くなったが、T・Cho、TG、T・Pro 含量はバラツキが大きく、一定の傾向は示さなかった。図 8 に示す様に、Glu 含量は飼料の炭水化物含量と非常に強い正の相関を示したので、血漿の Glu 含量は飼料の炭水化物含量の影響を強く受けていることと、IC の炭水化物が効率よく消化吸収されていることが分かった。図 9 に ALP 活性と増重量の関係、図 10 に飼料の C/P 比と ALP 活性の関係を示す。この二つの図から、ALP 活性が魚の成長状態を判断するのに良い指標であることと、魚の成長は飼料の C/P 比に規定される部分が多い⁷⁾ 事が分かった。

2-6. 飼料成分の魚体蓄積率

表 7 に結果を示す。代替率が高くなるに従って飼料のタンパク質、脂質、灰分、カロリーの何れも魚体への蓄積率が高くなっていった。図 11 から飼料成分は脂質>カロリー≧タンパク質>灰分の順に多く魚体に蓄積されていることが分かった。特に脂質の蓄積率が著しく高かった。これは体内で炭水化物から脂質へ転換される部分がかかなり有ること

表 7 飼料成分の魚体蓄積率

代替率 (%)	0	50	100
タンパク質 (%)	37.8	41.4	42.7
脂質	56.0	64.1	71.8
灰分	20.9	21.2	25.8
カロリー	39.6	44.6	45.7

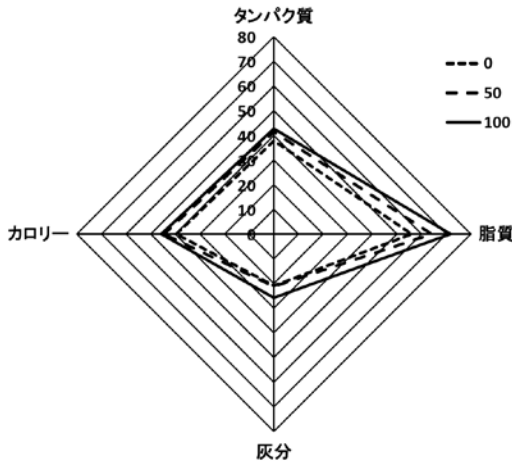


図 11 IC による代替率と飼料成分の魚体蓄積率

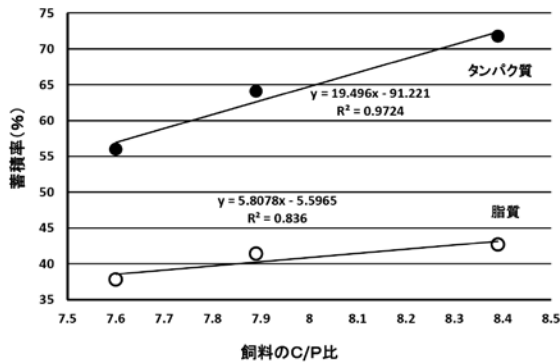


図 12 飼料の C/P 比とタンパク質、脂質の魚体蓄積率

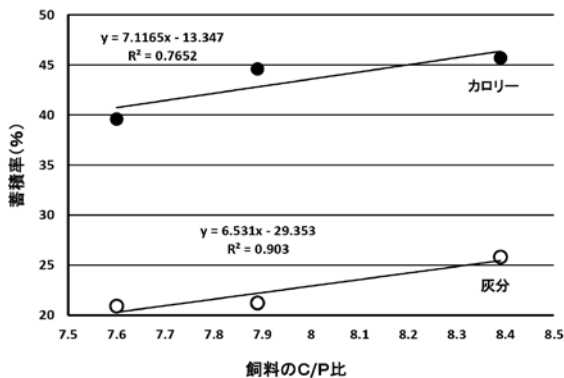


図 13 飼料の C/P 比と灰分、カロリーの魚体蓄積率

表 8 背肉の測色結果

代替率 (%)	0	50	100
L	46.7	46.9	47.1
a	0.3	0.3	0.1
b	0.3	0.4	-0.2

や、脂質や炭水化物がエネルギー源として利用されるためにタンパク質がエネルギー源として利用される割合が減少し、タンパク質の蓄積率が高くなること等を示している。また、灰分の蓄積率も高くなっているが、この結果は前報⁵⁾と同じであり、 α 化した澱粉の増加によって飼料の消化管通過速度が遅くなり、無機質の吸収率が上昇したり、無機質の吸収にグルコースの共存が必要であることなどを示しているのかも知れない。

図 12, 13 に示す様に、それぞれの飼料成分の魚体蓄積率は飼料の C/P 比と正の相関が認められた。

2-7. 背肉の色

表 8 に測色結果を示す。L, a, b 特に a と b の値から、飼料に全粒トウモロコシを 27% 添加して 2 カ月程度ニジマス成魚を飼育しても肉が黄色に着色することは無いことが分かった。但し、1 年も 2 年もの長期間飼育すれば多少着色する可能性は否定出来ない。

3. 要約

- ・小麦粉を IC で代替する率が高いほど魚の成長、飼料効率、タンパク質効率などの飼育成績が改善された。

- ・魚の成長、飼料効率、タンパク質効率は飼料の C/P 比と強い正の相関を示した。

- ・IC による代替率が高くなるに従って内臓と肝臓の体重比が大きくなった。内臓は腹腔内蓄積脂質の増加、肝臓はグリコーゲンの蓄積が主因であった。

- ・代替率が高くなるに従って全魚体の脂質含量が多くなったが、これは DL と肉部の脂質の増加が関与していた。

- ・肝臓では代替率が高くなるに従って水分、タンパク質、脂質および灰分含量共に少なくなったが、これはグリコーゲンの蓄積が原因であると思われた。

- ・血漿の Glu 含量は飼料の炭水化物含量を反映し、ALP 活性は魚の成長を反映していた。

- ・代替率が高くなるに従って飼料のタンパク

質、脂質、灰分、カロリーの魚体蓄積率が高くなった。

・飼料成分では、脂質＞カロリー≧タンパク質＞灰分の順に魚体蓄積率が高かった。これは炭水化物から脂質への転換、脂質と炭水化物によるタンパク質の節約効果を反映しているものと思われた。

・ICを27%添加した飼料でニジマス成魚を2カ月間飼育しても肉が黄色に着色することは無かった。

・以上の結果から、ICによる小麦粉の代替には大きなメリットがあると判断した。

稚魚試験

1. 材料と方法

1-1. 試験飼料

成魚試験に用いた飼料をクランブルにして用いた。従って試験飼料の組成と分析値は表1と同じである。クランブルは飼料をクランブラーで破碎し、篩で必要な大きさの飼料を集めることによって調製した。

1-2. 飼育試験

水容積38.4Lの塩ビ製水路型水槽⁸⁾に平均体重0.9gのニジマス稚魚を100尾ずつ収容した。水温14℃で11月8日から12月15日の1カ月余り飼育した。給餌は日に3回(午前1回、正午1回、午後1回)で、給餌率は改変ライトリッツ給餌率であった。

1-3. 調査項目

生残率、増重量、飼料効率、タンパク質効率および飼料成分の魚体蓄積率を成魚試験と同じ方法で調べた。なお、全魚体の分析には飼育試験終了時に生残していた魚全てを用いた。

2. 結果

2-1. 飼育成績

表9に結果を示す。飼育試験終了間際にIHN(Infected Hematopoietic Necrosis: 伝染性造血器壊死症)^{9, 10)}が

発生したため、各区共死魚が出たが、被害は軽度であった。代替率が高い区ほど生残率が高く、ICによる小麦粉の代替で魚の抗病性が高くなっている可能性が考えられた。成長と飼料効率に区間差は認められなかったが、タンパク質効率は代替率が高くなるに従って改善された。図14に示す様に、飼料のC/P比とタンパク質効率の間に非常に強い正の相関が認められた。

2-2. 全魚体の分析値

表10に結果を示す。代替率が高くなるに従って水分とタンパク質が僅かに減少し、脂質は明確に、そして灰分は僅かに増加してい

表9 飼育試験の結果

代替率 (%)	0	50	100
生残率 (%)	82	92	95
増重量 (g)	105.9	105.2	107.2
給餌量 (g)	96.0	96.0	96.0
飼料効率 (%)	110.3	109.5	111.7
タンパク質効率 (%)	238.6	247.5	262.0

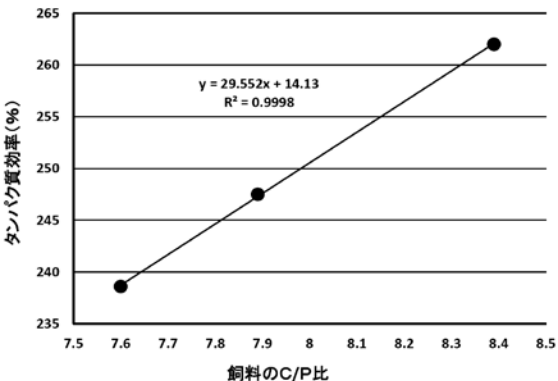


図14 飼料のC/P比とタンパク質効率

表10 全魚体の分析値

時期	開始時	終了時		
代替率 (%)		0	50	100
水分 (%)	81.1	78.0	77.9	77.5
タンパク質	13.0	13.7	13.7	13.7
脂質	3.96	5.75	5.90	6.22
灰分	2.11	2.08	2.12	2.16
タンパク質(%乾物)	68.8	62.3	62.0	60.9
脂質	21.0	26.1	26.7	27.6
灰分	11.2	9.45	9.59	9.60

た。図 15, 16 に示す様に、これらの成分含量の変化は飼料の C/P 比との間に強い相関が認められた。

2-3. 飼料成分の魚体蓄積率

表 11 に結果をまとめて示す。成魚同様代替率が高くなるに従って飼料のタンパク質、脂質、灰分およびカロリーの魚体蓄積率も高くなっていった。また、図 17 に示す様にそれぞれの蓄積率は脂質>カロリー>タンパク質>灰分の順に高かったが、これも成魚と同じであった。

タンパク質、脂質、カロリーの蓄積率は成魚の方が高いが、灰分は稚魚の方が高かった。これは稚魚の方がエネルギー代謝が活発なので、タンパク質、脂質、炭水化物などがエネルギー源として利用される部分が大きいためであろう。稚魚の方が灰分の蓄積率が高いのは、稚魚の方が骨の化骨化が活発に行われていることによるのでであろう。図には示さないが、飼料成分の魚体蓄積率も飼料の C/P 比と強い正の相関が認められた。

3. 要約

- ・小麦粉の IC による代替によって稚魚でも成魚同様の効果が認められた。
- ・代替率が高くなるに従って生残率とタンパク質効率が高くなった。
- ・代替率が高くなるに従って全魚体の脂質と灰分含量が高くなり、タンパク質含量はやや低くなった。
- ・代替率が高くなるに従って飼料のタンパク質、脂質、灰分およびカロリーの魚体蓄積率が高くなり、高くなる順番も成魚と同じであった。
- ・稚魚ではタンパク質、脂質、カロリーの蓄積率が成魚より低かったが、これは稚魚の方がエネルギー代謝が活発で、これらの成分がエネルギー源として利用される率が高いためであろう。
- ・稚魚では灰分の蓄積率が成魚より高かったが、これは稚魚の方が骨の化骨化が活発に行われているためであろう。

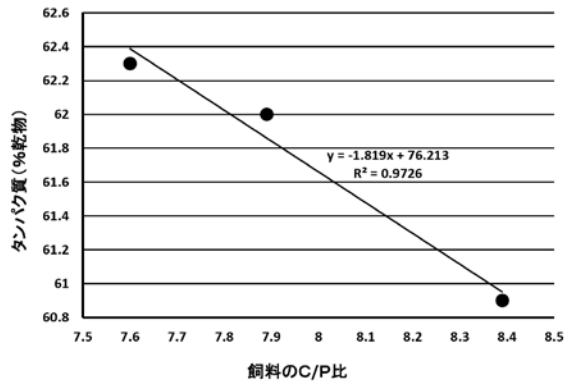


図 15 飼料の C/P 比と全魚体のタンパク質含量

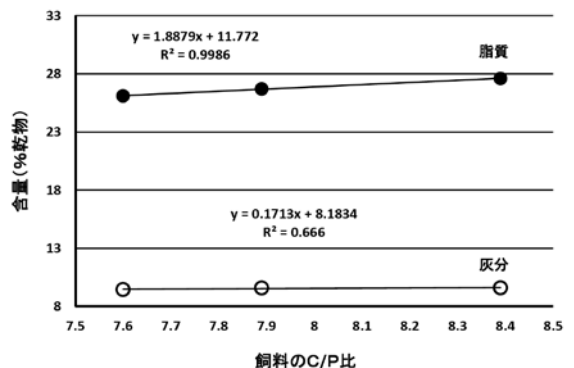


図 16 飼料の C/P 比と全魚体の脂質、灰分含量

表 11 飼料成分の魚体蓄積率

代替率 (%)	0	50	100
タンパク質 (%)	34.1	35.3	37.5
脂質	55.3	56.9	59.8
灰分	22.3	25.5	28.1
カロリー	38.1	39.1	40.6

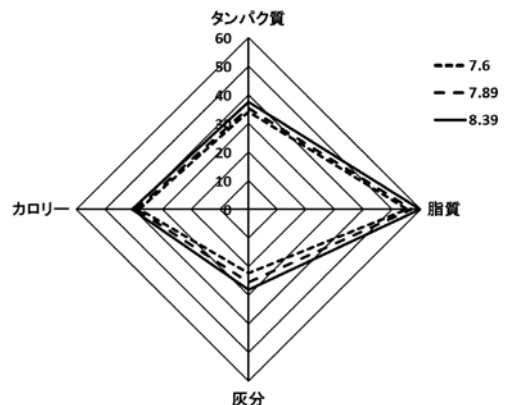


図 17 飼料の C/P 比と飼料成分の魚体蓄積率

α化トウモロコシ（ハードペレット飼料）

エクストルーダー飼料は製造工程で澱粉のα化が起こるので全粒トウモロコシが利用出来るが、ハードペレット飼料ではα化は殆ど起こらないので利用出来ない。ハードペレットに利用出来るトウモロコシを探したところ、α化トウモロコシ（加熱圧扁トウモロコシ）が利用可能ではないかと思われた。よって、本試験ではニジマス稚魚の消化吸収率試験を通じ、α化トウモロコシがハードペレット飼料の炭水化物源として利用出来るか否かを判断した。なお、α化トウモロコシとは加熱圧扁することによって澱粉をα化すると共に扁平化して消化吸収を良くした物である。主として家畜用飼料に用いられている。

1. 材料と方法

供試炭水化物源としてα化トウモロコシ、対照として中白糠を用いた。中白糠はこれまでの試験¹⁻⁴⁾で養魚用飼料の炭水化物源として最も優れた物であることを明らかにしてある。表12に中白糠とα化トウモロコシの分析値を示す。タンパク質、脂質、灰分およびカロリー含量は中白糠の方が高く、炭水化物含量はα化トウモロコシの方が多い。α化トウモロコシの脂質含量が全粒トウモロコシより少ないのは、加熱圧扁時に脂質が搾出されることによるのであろう。分析値からは中白糠の方が養魚用飼料の原料として優れているように思えるが、消化吸収率も含めて考えなくてはならない。

消化吸収率測定用飼料は魚粉 66%、炭水化物源 30%、ビタミン・ミネラル混合 4%の

単純な配合にした。この飼料に消化吸収率測定用の内部標準物質として酸化クロムを外割で0.1%添加した。飼料はハードペレットクランブルとし、以下の手順に従って調製した。原料を混合、粉碎し、小型のペレットマシンでハードペレットに成型する。棚式乾燥機で送風乾燥した後クランブラーで破碎する。篩を用いて必要な大きさの飼料のみを集め、試験飼料とした。

60L容角型透明プラスチック水槽の側面を魚を落ち着かせるために黒色ビニールで覆った水槽に平均体重8.3gのニジマス幼魚を30尾収容し、水温15.3～16.1℃で飼育した。一週間市販の飼料で予備飼育して魚を環境に馴致させた。その後3日間試験飼料を与え、4日目から採糞を開始した。排泄された糞を短時間内にサイホンで回収した。採糞は10日間続けて行い、10日分の糞を一緒にして分析サンプルとした。なお、給餌後水槽底の残餌や夜間に排泄されていた古い糞をサイホンで除去し、消化吸収率測定用の糞と混じらない様に注意した。

飼料と糞中のクロム量は古川ら¹¹⁾の湿式定量法、水分は105℃での強熱乾燥法、タンパク質はセミマイクロケルダール法、炭水化物は塩酸分解法²⁾で測定した。これらの値から、飼料全体、タンパク質および炭水化物の見かけの消化吸収率¹²⁾を求めた。

2. 結果

表13に結果を示す。タンパク質の消化吸収率は両区で殆ど同じ値を示したが、飼料全体と炭水化物の消化吸収率はα化トウモロコシ区の方が高い値を示した。特に炭水化物の消化吸収率はα化トウモロコシ区の方が著しく高かった。既に小麦粉より中白糠の方が飼料全体と炭水化物の消化吸収率が高いことを報告¹⁻⁴⁾し

表12 炭水化物源の分析値

炭水化物源	中白糠	α化トウモロコシ
水分 (%)	13.0	7.71
タンパク質	14.1	8.74
脂質	4.08	2.64
灰分	2.17	1.42
炭水化物	60.9	71.2
Cal/100g	214.9	201.2

表13 飼料成分の消化吸収率

炭水化物源	中白糠	α化トウモロコシ
全体 (%)	78.4	81.5
タンパク質	94.5	94.4
炭水化物	74.6	87.5

である。その中白糠より α 化トウモロコシの方が飼料全体と炭水化物の消化吸収率が高いのであるから、小麦粉を α 化トウモロコシで代替することによって消化吸収率が著しく高くなり、飼育成績が改善されると共に糞の量が減って水の汚れも軽減されることが容易に推測出来る。また、炭水化物の消化吸収量が多い原料(炭水化物含量が多く、消化吸収率も高い原料)の方が飼育成績も良いことが分かっている。よって、中白糠よりも α 化トウモロコシの方が良い成績を示すことが考えられるが、タンパク質や脂質も飼育成績に大きな影響を及ぼす⁴⁾ので、直接両者を比較してからでないと断言は難しい。

以上の結果から、 α 化トウモロコシはハードペレット飼料の場合でも優れた炭水化物源になり得、小麦粉を代替する価値があると判断した。

3. 要約

- ・ α 化トウモロコシは飼料がハードペレットの場合でもニジマスによる炭水化物の消化吸収率が著しく高く、優れた炭水化物源である。

- ・小麦粉を α 化トウモロコシで代替することによって飼育成績と糞による水の汚れを改善できる可能性が高い。

考察

今回報告した飼育試験と消化吸収率測定試験の結果によって、全粒トウモロコシと α 化トウモロコシはニジマス用飼料の炭水化物源とし

て優れた原料であることが証明出来た。また、全粒トウモロコシはエクストルーダー飼料に、 α 化トウモロコシはハードペレット飼料に用いると、稚魚から成魚まで全てのサイズの魚に利用出来ることが分かった。

全粒トウモロコシと α 化トウモロコシは飼料全体と炭水化物の消化吸収率が小麦粉より遥かに高く、糞の量も少なくなるので、環境汚染の軽減にも役立つことが考えられた。

小麦粉を炭水化物源としたエクストルーダー飼料と、小麦粉の全量を全粒トウモロコシで代替したエクストルーダー飼料の両者を約1ヶ月間ニジマス成魚の養殖池に投与して比較してみたところ、以下のことが分かった。

両飼料の嗜好性に差は無く、全粒トウモロコシ飼料の方が給餌後の水の濁りがやや少なく、池底の糞の堆積量も少なかった。小麦粉を使用した飼料の糞に比べて全粒トウモロコシを使用した飼料の糞はフワフワして軽かったので、池底に沈下せずに流出した部分が多かったことも原因の一つであろうが、糞の量が少なかったことも大きく関与していると思われた。

この様に全粒トウモロコシあるいは α 化トウモロコシを使用した飼料でニジマスを飼育すると、飼育成績が改善されると共に糞の量が少なくなるので、水の汚れも軽減出来る。この結果はニジマスのみでなく他魚種にも共通であろうと思われるので、全粒トウモロコシと α 化トウモロコシは養魚飼料用原料として有望であると考えられる。

文 献

1. 酒本秀一：ニジマス用飼料の炭水化物源 -1. *New Food Industry*, **60**(10): 46-56. 2018.
2. 酒本秀一：ニジマス用飼料の炭水化物源 -2. *New Food Industry*, **60**(11): 30-41. 2018.
3. 酒本秀一：ニジマス用飼料の炭水化物源 -3. *New Food Industry*, **60**(12): 49-57. 2018.
4. 酒本秀一：ニジマス用飼料の炭水化物源 -4. *New Food Industry*, **61**(2): 107-120. 2019.
5. 酒本秀一：ニジマス用飼料，アユ用飼料の適切な α 化澱粉添加量. *New Food Industry*, **60**(9): 65-80. 2018.
6. 北村佐三郎：飼料，魚類の栄養と飼料（荻野珍吉編，新水産学全集 No.14），恒星社厚生閣，東京，247-306. 1980.
7. 酒本秀一：アマゴ用飼料 -1. 成長段階別至適カロリー / タンパク質比（CP 比）. *New Food Industry*, **54**(11): 56-66. 2012.
8. 酒本秀一，糟谷健二：魚類の細菌感染症に対するブドウ種子抽出物と β -1,3/1,6- グルカンの予防効果. *New Food Industry*, **53**(7): 26-40. 2011.
9. 吉水守：伝染性造血器壊死症（IHN）. 新魚病図鑑（畑井喜司雄，小川和夫監修），緑書房，東京，14. 2006.
10. 吉水守：サケ科魚類および淡水魚のウィルス病. 改定・魚病学概論（小川和夫，室賀清邦編），恒星社厚生閣，東京，36-42. 2012.
11. 古川厚，塚原宏子：養魚飼料消化吸收試験の指標物質としての酸化クロムの湿式定量法について，日本水産学会誌，**32**(2): 502-506. 1960.
12. 吉中禮二：タンパク質・魚・貝・海藻の栄養機能 - 日本型食事のすすめ - （吉中禮二著），恒星社厚生閣，東京，53-68. 1993.

白石カルシウムの炭酸カルシウム

炭 酸
カルシウム
とは？

古くから食品に使用されている
安全性・吸収性に優れたカルシ
ウム源です。
用途も栄養強化はもちろんのこと、
練製品の弾力増強などの品質改
良、粉体の流動性向上・固
結防止といった加工助剤などそ
の目的は多彩です。

分散性・混合性に優れたものや、飲料用として
沈殿を抑制したタイプ等、品揃えております。

一般の栄養強化には「ホワイトン」

機能を求めるならば「コロカルソ」

飲料用には、スラリー状の「カルエッセン」

詳細につきましては弊社営業担当に
お気軽にお尋ねください。

 **白石カルシウム株式会社**

食品部：東京都千代田区岩本町1-1-8 TEL03-3863-8913
本 社：大阪府北区中之島2-2-7 TEL06-6231-8265

グルテンフリー穀物食品と飲料

新解説グルテンフリーパンについて－1

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1,2}

竹内 美貴 (TAKEUCHI Miki)³ 中村 智英子 (NAKAMURA Chieko)³

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会会長, ³ 神戸女子短期大学

Key Words: グルテンフリー セリアック病

本論文「グルテンフリー穀物食品と飲料, 新解説グルテンフリーパン－1」は, “Gluten-Free Cereal Foods and Beverages” (Edited by E. K. Arendt and F.D. Bello) 2008 by Academic Press (ELSEVIER), の第13章 Gluten-free breads by E. K. Arendt の一部を翻訳し紹介するものである。

紹介

セリアック病の効果的治療法は食生活からグルテンを除くことであり, そうすれば健全な生活を送ることが出来る。しかしながらパンを作る際に, グルテン除去をすると, 製パン調製前段階でドウの組織は液状のバッテリーになる。その結果, パンはぼろぼろに崩れてしまうテクスチャーとなり, 色も品質も貧弱で美味しくないパンとなる (Gallagher *et al.*, 2004a)。グルテンは小麦粉に存在するタンパク質の主構造形成タンパク質であり, 製パンにおける小麦粉の性質に重要な役割をしており, ドウに粘弾性を与え, 良好なガス保持能と良好なクラム構造を多くのベーカリー食品に与える (Gallagher *et al.*, 2004a, Moore *et al.*, 2004)。最近, グルテンフリーベーカリー食品をマーケットで多く見かけるが, 低品質で貧弱な食感とフレーバーが特徴である。 (Arendt *et al.*, 2002)。これらの問題は製粉, 製パン技術者両者に大きな技術的問題を与え, グルテンフリー焼き物の生産にグルテンに変わるものを探すことを要求した。グルテンフリーパンは, グルテンの粘弾性を真似る重合化物質を製パンドウに要求した (Toufeili *et al.*,

1994)。グルテンフリーパンの生産には, 主にデンプン, 牛乳タンパク質のようなタンパク質をベースとする成分が含まれるものである。さらにハイドロコロイドをグルテンフリーの基本になる粉の中に入れてグルテンの粘弾性を真似る事ができ, さらに改良されたテクスチャ, 口腔内感覚, 感受性, シェルフライフの改良が出来た (Ylimaki *et al.*, 1991; Haque and Morris, 1994, Gujral *et al.*, 2003a, 2003b; Gallagher *et al.*, 2003, 2004a; Moore *et al.*, 2004, 2006, 2007a; Sivaramakrishnan *et al.*, 2004; McCarthy *et al.*, 2005; Ahborn *et al.*, 2005; Lazaridou *et al.*, 2007)。

グルテンフリー食事

人生すべての中で, グルテン摂取の拒否がセリアック病にとっては基本治療となる。時にグルテンフリー食事のことを患者が“薬の選択”と呼ぶのは, この栄養治療が生命にとり厳格なグルテンフリー食事のことだからである (Kupper, 2005)。グルテンフリー食の全体的なゴールは, グルテンをさけたバランスのとれた食事の採用を通して健康の回復と保持に到着

する事である。進行中の食事には医師と栄養士両方による家族と患者への教育が要求される。はっきりしたグルテンフリー食事の承諾は簡単ではなく、それははっきりした食事がセリアック病を持つ患者を社会的に分離するようになる可能性があり、さらに栄養的にビタミン B、カルシウム、ビタミン D、鉄、アミン、マグネシウム、繊維不足を導きだすようになる可能性があるためである。

世界中、どんな成分がグルテンフリーを作るのかという認識された意見に関して大きな議論がある。多分、カナダでラベルされる“グルテンフリー”は、1 kg 当たり 20mg 以下のグルテンのスタンダードを示しているが、他の国では 200mg/kg を用いたり、さらに加工食品がグルテンフリーになるという事からダブルスタンダードを示したり、全くグルテンフリーが望ましいとする国もある。最近の Codex Alimentarius Standard for “Gluten-free Foods” は 1976 年の Codex Alimentarius Commission によるものを採用した。この文面ではグルテンは貯蔵タンパク質と定義され、一般に小麦、トリテケル、ライ麦、大麦、あるいはオート麦に見出される。グルテンフリーの定義は 1990 年代にレビューされグルテンフリーの意義はステップ 7 へと続き、一方 Codex Committee は許容レベルの設置に対する化学的根拠に基づくための研究をまち、その研究法を明らかにした (Codex Alimentarius Commission, 2003)。グルテンフリー食品は以下の様な食品として記述される；(a) 小麦あるいは Triticum 種例えばスペルト、カント、デュラム小麦、ライ麦、大麦、オート麦、あるいはそれらの雑種からなるもので、全てプロラミンを含まないものとする、あるいはそれでできたものでもグルテンレベルは 20mg/kg を超えないこと；あるいは (b) 小麦、ライ麦、大麦、オート麦、スペルトあるいはそれらの雑種でグルテンフリーのものでそのグルテンレベルが 200mg/kg を超えないものとする；あるいは (c) 前述の (a) と (b) で示された 2 つの混合で 200mg/kg を超えないレベルのもの。

この標準のグルテンとは、小麦、ライ麦、大麦、オート麦、あるいはその雑種、およびそれら派生物からのタンパク質区分と定義され、さらに水と 0.5mol/L NaCl に溶解、それに対しある人は不耐性である。

世界中でグルテンフリーの食品表示のことに関し問題があるが、それは正確な毒プロラミン量がセリアック病をもつ各個人で、その小腸粘膜にダメージを与える事なく消えてゆく量が十分に決まっていないからである (Thompson 2000)。Codex Commission による ELISA 法の認可と、進行中の許容レベルに関する研究結果から、Commission は“グルテンフリー”定義の修正方向に動きつつある。

ベーカリー加工食品中のグルテンの役割

小麦粉による製パン性の品質は、グルテンタンパク質の量、質の両方に基づくものであることがこれまで知られて来た。グルテンタンパク質は全小麦タンパク質の 80-85% を占め、小麦の貯蔵タンパク質の大部分である (図 13.1)。それは種子貯蔵タンパク質のプロラミンの区分に入る (Shewry and Halford, 2002)。グルテンタンパク質は殆ど水に溶けず、あるいは希塩類溶液にも溶けない。グルテンのタンパク質は、機能的に 2 つの明確なグループに区別される；単一のグリアジンとポリメライズした (抽出可能および抽出不能) グルテニンである (Lindsay と Skerritt, 1999)。普通、グリアジンとグルテニンは小麦中でほぼ等量に認められる。グルテンはユニークなアミノ酸構造をもち、Glu/Gln と Pro でアミノ酸残基の 50% 以上の量に相当

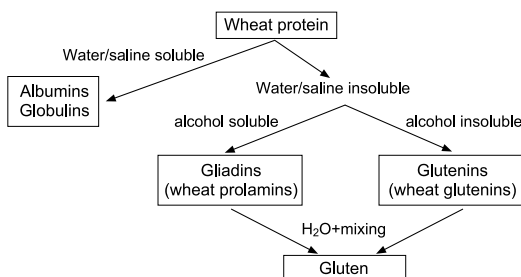


図 13.1 小麦タンパク質の成分

する (Eliasson and Larsson 1993; Lasztity, 1995)。グルテンの低水溶性は低 Lys, Arg, Asp 残基含量のためで、それはともにすると全アミノ酸残基の 10% 以下である。グルテン中、約 30% のアミノ酸残基は疎水的で、その残渣は大きく疎水的相互作用によって会合するタンパク質に寄与し、さらに脂質や他の非極性物質との結合に寄与する。高グルタミンとハイドロキシアミノ酸 (～ 10%) 含量のグルテンは、水—結合性の性質にも関係ある。さらにグルタミンとグルテンポリペプチドの水酸基の間の水素結合は、凝集性—結合性の性質に寄与する。cysteine と cystine 残基は全アミノ酸残基のうちの 2-3% に相当し、ドウ形成の間これらの残基は SH-SS 交換反応が進みグルテンタンパク質の大きな重合化を示す。一般に受け止められているのは、小麦の製パン品質はグルテンタンパク質の存在とその性質に関係のあるということである。グリアジン区分は粘度に寄与し小麦ドウの伸張性に関与すると考えられている (Pomeranz, 1988; Don *et al.*, 2003a, 2003b)。小麦グルテンのグルテニン区分はずっと考えられてきたことは、ドウの弾性と力強さに関係していると考えられてきた (MacRitchie, 1980; Xu *et al.*, 2007)。ドウ中のグリアジンとグルテニンの総対比はドウの物理化学的性質に影響を与え、グルテニンの相対的な比率の高いほどドウの力に大きなインパクトを与える (MacRitchie, 1987)。

さらに小麦グルテンは食品以外の多くの物にも応用され、例えばグルテンベースのフィルム、カビで生化学的に分解されるプラスチック等である。SH-SS 交換反応で、大きく重合化する能力のために、ドウ形成の間グルテニンは大きくドウの弾性に寄与する。また、それらのユニークな構造と機能的性質のために、製パンにおいて大きくこの技術的性質を模倣し、最終的には変更のできる成分を見いだすチャレンジが必要である。

グルテンタンパク質の機能的が、製パン品質にとり中心であることは明らかである。分画、再構成実験は、製パン性の違いは明らかに

グルテンタンパク質によって決まることを示す (Veraverbeke and Delcour, 2002)。小麦粉による製パンは小麦粉タンパク質含量と直線的に関係があり、ここではグルテンタンパク質含量であるが、このタンパク質区分は、穀粒タンパク質含量増加とともに非グルテンタンパク質区分よりもずっと増加するからである (Hoseney, 1994)。粉を水とともに練り / 攪拌すると、グルテンタンパク質は粘弾性のあるドウの形成を可能とし、それが、発酵で出来たガスをホールディングする事を可能とし、オープンライズの結果、ベーキングの後、典型的なパンの固定した多孔質構造を作る。ドウのレオロジー的性質は製パン性に不可欠であり、大きく小麦グルテンタンパク質によってきまるが、グルテンタンパク質マトリックスと他の粉成分との相互作用 [(例えば粉脂質 (Eliasson and Larsson, 1993) と、アラビノキシラン (Goesaert *et al.*, 2005) と、非グルテンタンパク質 (Veraverbeke and Delcour, 2002) と)] はレオロジーの性質に影響する。小麦グルテンのレオロジー的性質は、酸化剤、還元剤、あるいは脂質・乳化剤、あるいはヘミセルロースなどの添加で、グルテンタンパク質の相互作用を変化させ修正することができる (Veraverbeke and Delcour, 2002; Goesaert *et al.*, 2005)。

加工食品で受け入れられる唯一最も重要なファクターは官能的性質であり、それは食品から受けるテクスチュア、味、色、香り、刺激物質等、化学的、物理的刺激に対する総合的な反響である (Forde and Delahunty, 2004)。一般に、楽しい物と思われる食品は楽しくないと考えられる食品を超えて選ばれる。セリアック病患者のくさびとなる治療法とは、グルテンを含む食品を終生にわたってさける食事のことである。セリアック病患者にとって必要なユニークな栄養面と官能的要求性を満たすグルテンフリー食品の生産に必要な技術には、グルテンに変わるものとして、デンプン、乳製品、ガム、ハイドロコロイド、他の非グルテンタンパク質等があり、それらによってグルテンフリーベーカリー

食品の構造、口腔内感覚、受け入れられるもの、そして保存性の改良を進める。

グルテンフリーパンの成分

グルテンフリーパンの生産に利用されるグルテンフリー粉の各種については、他章でトピックスとして扱われ、そのためここでは議論しない。次のセクションからグルテンフリー仕込み上、最も大切な成分を特に紹介し討論する。

デンプン

デンプンの物理的性質

デンプンは最も重要な貯蔵多糖類であり、多くの植物中最も典型的成分である。デンプンは炭水化物の中でもユニークな存在であるのは、本来不連続半結晶状の粒で相対的に密着した不溶物であり冷水中でわずかに水を吸うためである。デンプンには幾つかのユニークな性質があり、多くの食品適応の中でその機能性をきめ、特にベーカリー食品の中では穀物ベース食品のテクスチャ、外観とその全体の受け入れに貢献する (Mare and Andon, 2002)。その構造と物理化学的性質については、詳しくレビューされている (Parker and Ring, 2001; Eliasson and Gudmundsson, 2006)。

殆どのデンプン粒はアミロース、アミロペクチンの混合物からなる。アミロースは本質的には直線の成分で、 α (1,4)-結合 D-グルコシルピラノース単位からなり、500-600 グルコース残基の範囲で重合化したものである。対称的にアミロペクチンの方は非常に大きく、高度に分枝した多糖体で重合化の範囲は 3×10^5 から 3×10^6 グルコース単位である。それらは α (1,4)-結合 D-グルコシルピラノース残基の鎖であり、 α (1,6)-結合による内部結合している。アミロース/アミロペクチン比率はデンプンの種類によって異なり、典型的なものはアミロースとアミロペクチンは各 25-28% と 72-75% である。しかしながらある特異的遺伝子タイプのトウモロコシ、大麦、米デンプンではアミロース含量が増加し (高アミロース、あるいはアミロースデ

ンプンで 70% アミロースまで有する)、あるいはアミロペクチン含量が増加する (ワキシデンプンで 99 ~ 100% アミロペクチン含量) ものがある (Goesaert *et al.*, 2005)。

デンプンは異なったサイズ (形) の細胞内水不溶性粒として存在しており、それは植物起原による (Moon and Giddings, 1993)。顕著なデンプン粒区分 (約 8%) は製粉時に損傷を受ける。この機械的な粒構造のダメージはデンプンの性質に大きく影響を与える (Hoseney, 1994)。損傷デンプンは高度に水を吸収する力があり、より酵素分解を受けやすい。室温で十分に水があれば、デンプン粒はその乾物重量の 50% まで水分を吸収でき、次に乾燥でオリジナルサイズへもどすことが出来る (BeMiller and Whistler, 1996)。デンプン懸濁液が水中である特異的温度以上に加熱されると、分子オーダーで分解がすすみ、結晶性を失ない不可逆的粒の膨潤へと進む。このプロセスを糊化とよぶ。非結晶域の加熱と加水は、これらの域での分子移動、アミロペクチン二重ラセン構造の解離、結晶性の溶解を容易にする (Tester and Debon, 2000)。糊化過程はまた限界デンプン溶解性 (主にはアミロースの溶出) と結びついており、それはデンプン懸濁液の粘度を増加させる。さらに加熱すると、糊化温度以上になり、膨潤と溶出が続き、溶解した巨大分子 (主にはアミロース) 連続相、膨潤した不連続非結晶デンプン粒、あるいは残渣が形成される (BeMiller and Whistler, 1996; Tester and Debon, 2000; Eliasson and Gudmundsson 2006)。

デンプンの糊が冷却されると、デンプン多糖類はより複雑に再会合し結晶状態になる。この過程を老化という。2つのデンプンポリマー、アミロースとアミロペクチンのデンプン老化の動力学にはかなり違いがある (Hug-Iten *et al.*, 2003)。6% 以上デンプン濃度では、二重ラセン構造がアミロース分子間でみられるが、糊化、ペースト化の間、可溶化し、連続的ネットワークを作る。数時間後、これらの二重ラセン構造は非常に安定な結晶ゲル構造を作る。短ア

ミロペクチン側鎖の再結晶化は、糊化デンプンあるいは残基中でずっとゆっくり（数日～数週間）進む（Miles *et al.*, 1985）。そこでアミロースの老化は大変な初期のデンプンゲルのかたさにおこしを、一方アミロペクチンの老化は長時間かけてデンプンシステム中のゲル構造形成と結晶化をおこす（Miles *et al.*, 1985）。デンプン老化は、pH、塩、砂糖、脂質を含む多くの条件と物質によって影響を受ける（Eliasson and Gudmundsson, 2006）。アミロースの重要な性質はその中に多くのものを、特に極性脂質を取り込み、ラセン複合体を作ることである。アミロースは左周りのシングルラセンは脂質の炭化水素をその中心の空間に取り込む。極性脂質の存在がデンプンの性質に大きく影響を与え、特にその糊化と老化の性質に影響を与える（BeMiller and Whistler, 1996; Eliasson and Gudmundsson 2006）。

製パンに於けるデンプンの役割

ドウの調製中、デンプンは約45%の水を吸収し、それがドウ連続マトリックスの充填内容物として働くと考えられている（Bloksma, 1990）。一方、Eliasson and Larsson (1993) は、ドウはタンパク質とデンプンの2連続的ネットワークと考えている。最近の研究で、Larsson and Eliasson (1997) は小麦ドウのレオロジックな性質がデンプン粒表面の特異的な性質によって影響されると報告している。

ベーキングの加熱、水分、時間のコンビネーションによりデンプン粒は糊化するが（例えばそれは膨らみ、一部可溶化し）、しかしまだそれらの粒は1個ずつ粒を保持している（Hug-Zten *et al.*, 2001）。2つのデンプンポリマーアミロースとアミロペクチンは再び混合し、少量のアミロースは粒中の内相中に染みこむ。このアミロースの一部は、添加およびもともとある小麦極性脂質と複合体をつくり取り込む。相分離により、アミロースとアミロペクチンは粒内部では均一に分布しない（Hug-Iten *et al.*, 2001）。冷えると、可溶化したアミロースは連続した

ネットワークを作り、そこには膨潤そして変形したデンプン粒が取りまみ、互いに結び合う。その素早い老化のために、アミロースはパンの不可逆な構造要素となり初期のパン容積の決定要因である（Eliasson and Larsson, 1993）。貯蔵中、パンはその新鮮さを失い、老化し、クラストはかたくなり、クラムもよりかたくなり弾性を失わない、さらに水分とフレーバーを失なう（Hoseney, 1994）。老化で水はクラムからクラストに移り、そして2つの成分はガラス質、ゴム質へ変換し、その結果、クラストは柔らかく、皮のようになる（Eliasson and Larsson, 1993）。かたさとおふれやすさの増加はエージング中のクラムの典型的な変化として観察される。デンプン区分アミロペクチンとアミロースとの再組織化と、ポリマーオーダー増加によるデンプンネットワークのかたさの増加は、エージング中の重要な変化である。水の移動とアミロペクチンの老化は、特に二重ラセン構造と結晶域の形成はエージング中のパン老化にとり第1の要因であると考えられている（Zobel and Kulp, 1996; Gray and BeMiller, 2003; Hug-Iten *et al.*, 2003）。しかしながら、粒中心部でおこるアミロースのオーダーの揃った構造形成も粒をかたくすることに寄与であろう（Hug-Iten *et al.*, 2003）。そこでデンプン粒中でアミロペクチン-リッチ域とアミロース-リッチ域の分子再組織化のできた結果、デンプン粒のかたさ増加になり、結晶域間が結ばれた構造的ネットワーク形成はクラムのかたさ形成に寄与する。Hug-Iten *et al.*, (2003) は、また水素結合によるクロスリンクの形成と2つのポリマー間のもつれがパンの機械的性質に影響すると提案した。エージング中、グルテン-デンプン相互作用がある程度クラムのかたさに関与することが提案された（Every *et al.*, 1998）。しかし、Ottenhof and Farhat (2004) は、グルテンの存在がアミロペクチン老化の動力学とその老化程度に影響するというどんな顕著な証拠もないと結論している。相互作用は多分、グルテンとアミロペクチンの熱力学的相反性のためにありそうもない（Tolstoguzov, 1997）。

乳成分

グルテンを他のタンパク質、例えば乳タンパク質に置き換えることはグルテンフリー食品の品質改良する一つの手だてである。しかしながら、高ラクトース含量の乳成分をグルテンフリーパンに入れる事は小腸絨毛への大きなダメージを持つセリアック病の患者にとってに都合良くないのだが、それは彼らが正常なら絨毛で生産される酵素ラクターゼを持ってないからである (Ortolani and Pastorello, 1997)。Murray (1999) によると、約 50% のセリアック病を持つ人がラクトース不耐性である。にもかかわらず、いくらかの研究はグルテンフリーシステムに乳タンパク質の混入を行っており、それはこれらがグルテンに似た機能を有するからである。乳タンパク質はネットワーク形成ができ、良好な膨張の性質を示す；それらには高度の機能性があり、さらにそれらの多能のためグルテンフリー食品生産にそのまま用いる事ができる (Gallagher *et al.*, 2003)。乳成分は今日、栄養面、機能面の両方の価値のあること、例えばそれらによりフレーバー、テクスチャ改良、パン老化の低下をすることでベーカリー食品に用いられている (Cocup and Sanderson, 1987; Mannie and Asp 1999; Kenny *et al.*, 2001; Gallagher *et al.*, 2003)。最近グルテンフリーパンの容積、外観、

食感の改良が、乳成分モルキン、脱塩ホエイ粉、スキนมilk粉プレッサー、スキนมilk粉、カゼインナトリウム、あるいは分離ミルktanパク質の添加で行われた (Gallagher *et al.*, 2003)。もう一つの研究では、(Moore *et al.*, 2004) が市販のグルテンフリー粉で焼いたグルテンフリーパンとグルテンフリー成分に乳製品を入れたもの、入れないもので焼いたグルテンフリーパンの研究した。その研究では明らかに乳成分の入ったパンは最も品質がよく、小麦パンに最も近いものができた。乳成分含むパンの高品質は、乳成分のグルテンに似たネットワーク形成能によるものであった (図 13.2)。

概して乳成分はグルテンフリー食品の品質を決めるキーファクターである (Nunes *et al.*, 2007)。Plate 13.1 に示すように、低ラクトース粉添加、カゼインナトリウム、ミルktanパク質、分離ホエイタンパク質あるいは濃縮ホエイタンパク質の添加でパンを作り、はっきりした違いが見えた。

これまでのところ進められた研究から、次のことが結論されるが、乳成分は確かに栄養的な価値とともに全体的グルテンフリー食品の改良をする。しかしながら不可欠なことは、グルテンフリー食品にはラクトースフリーあるいは少なくとも低ラクトース含量レベルの乳成分を使

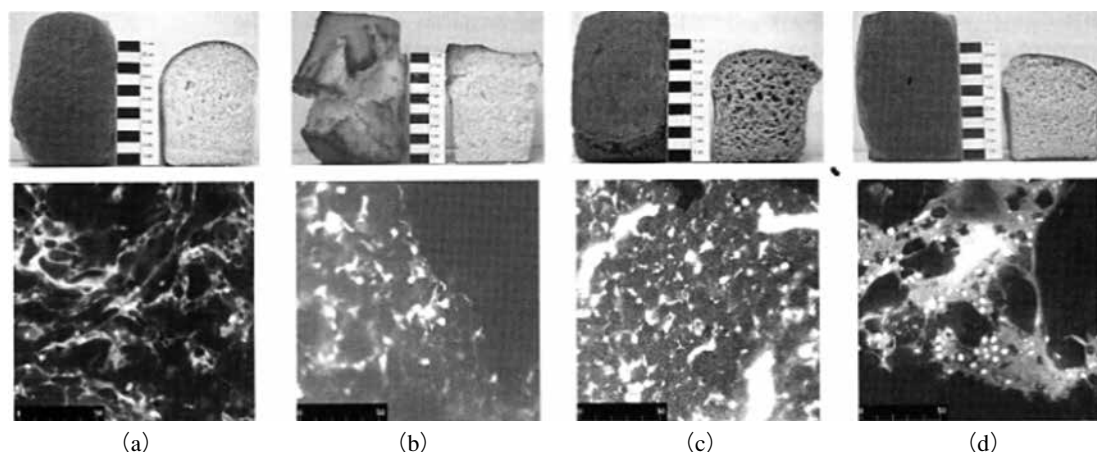


図 13.2 コントロールとしてコムギパン(a)とグルテンフリーパン[市販のグルテンフリー粉によるパン(b)、ミルク無しレシピ(c)、ミルク入りレシピ(d)]。

パン外観と共焦点レーザー走査型顕微鏡構造 (—: 50μm)

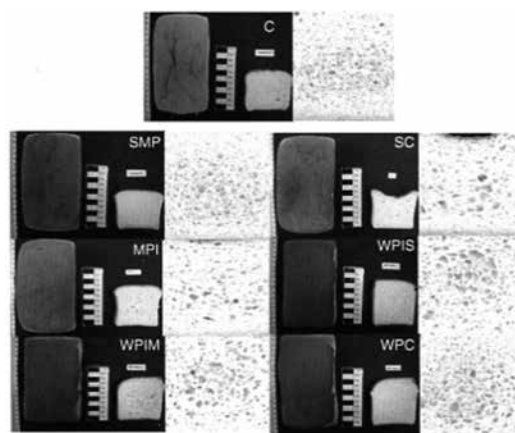


Plate 13.1 低ラクトースミルク粉のグルテンフリーパン品質への影響

コントロールパン (c), スキンミルク粉 (SMP), カゼインナトリウム (SC), 分離ミルク粉 (MPI), 分離ホエータンパク質・スプレードライ (WPIS), 分離ホエータンパク質・膜技術 (WPIM), 濃縮ホエータンパク質 (WPC)。

用することである。さらに、乳成分にはいろいろな大きな性質の違いもあるが、成分の違いだけではなく、それらが作られた加工方法の違いにも注意をする必要が有る。

大豆

大豆は、植物分類上の Fabaceae 科に属し、“legumes”あるいは“pulses”として知られる。この植物の科の種類はタンパク質含量が特徴的に高いが、しかし S-含有アミノ酸に不足している (Belitz and Grosch, 1987)。大豆は多くの特徴をもち、機能食品に興味深い成分を示している。大豆イソフラボンは骨組織にプラスの効果のある事が知られ、そこでそれらは機能食品に用られて、骨粗鬆症のリスク低下、低濃度リポタンパク質の酸化防止、肺ガンの予防が報告されている。大豆粉、および大豆食品はグルテンフリー食品の構造的機能の改良同様タンパク質含量の増加に用いられて来た。例えば (Sanchez *et al.*, 2002) は、0.5% 大豆添加のグルテンフリー仕込みでクラムグレインスコア、パン容積、パン全体のスコアが上昇する事を見出した。

Moore *et al.*, (2004) は、大豆はグルテンフ

リーパン品質（例えば、大豆混入はグルテンフリーパンの栄養的、水吸収能の増加）へのポジティブなインパクトのあることを見出した。しかしながら殆どの最近の European Union directives によると、大豆は高アレルギー成分 (Fernandez-Rivas and Ballmer-Weber, 2007) としてリストに述べられ、グルテンフリー食品への利用は注意深く考える必要がある。

卵

卵は単に栄養的価値を増加させるために食品に添加されるだけではなく、色の変化、フレーバー、さらに食品の乳化性を強化するために添加し、ホイップ性 / 起泡性 (泡)、さらに凝固性 / 糊化性を改良させる (Mine, 2002)。卵黄は乳化剤のレシチンを含むリン脂質同様、油溶性ビタミン A, D, E, K を多く含む。栄養的には、卵は脂質、タンパク質、金属特に鉄の良い供給源である。しかしながら卵には約 240mg のコレステロールが含まれ、それは卵黄である。このためコレステロール制限ある人々はより少ない全卵を普通摂取する。ある焼き物、例えばケーキでは、卵成分はバター中の脂質の乳化性、安定性等の多くの機能を示す。Jonagh *et al.*, (1968) の研究は、卵アルブミンのようなタンパク質がデンプン粒と結合する事を示した。

Kato *et al.*, (1990) は、卵タンパク質が強い粘着性フィルムを形成し、泡の安全性に不可欠であることを示した (図 13.2)。グルテンフリーパンシステムでは、卵タンパク質は粘性溶液を形成し、フィルム状連続的タンパク質構造は小麦グルテンに似て共焦点レーザー走査型顕微鏡を使って観察する事が出来る (Moore *et al.*, 2004)。このフィルムのようなタンパク質構造は、トランスグルタミナーゼを使ってよりはっきりさせることができ (Moore *et al.*, 2006)、その酵素はタンパク質架橋結合を作り、グルテンフリーパンの品質を増加させる事に用いられてきた (Renzetti *et al.*, 2007)。卵粉のポジティブな効果が明確なことは、トランスグルタミナーゼ添加せずにグルテンフリーパンシステムでフィ

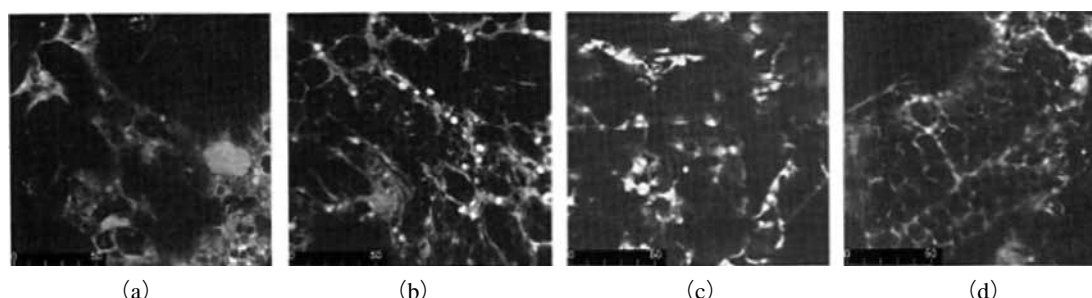


図 13.3 グルテンフリーパンの共焦点レーザー走査型顕微鏡写真

卵コントロールパン (a), 卵を 1U transglutaminase/g protein 処理 (b), スキンミルク粉 (SMP) コントロールパン (c), SMP を 10U transglutaminase/g protein 処理 (d)。(—; 50 μ m)

ルム形成が卵粉が存在するときのみ見られる事からわかる (図 13.3)。非常に僅かのグループの研究であるが、限られた利用データから、卵がグルテンフリー食品形成に価値ある成分である事を示した。唯一の問題は、卵を含むグルテンフリー食品の加工上出てくるややこしい問題同様にコストの問題である。

ハイドロコロイド

ハイドロコロイドの製パン性における機能

ハイドロコロイドには、植物、動物、微生物、さらに合成品の親水性ポリマーがあり、普通多くの水酸基を持ち、多電荷物質である。それらは広く用いられ、食材の機能的性質をコントロールするのに用いられている (Williams and Phillips 2000)。それらは一般にデンプン含有食品に用いられるが、それは食品系の受け入れに望ましい効果のあるためである。ハイドロコロイドは添加剤として広く次の目的で用いられる (i) 食品テクスチャと粘弾性改良 (Armero and Collar, 1996a, 1996b); (ii) デンプンの老化を低下 (Davidou *et al.*, 1996); (iii) 水吸収剤; (iv) 脂質交換剤の機能; (v) 貯蔵中、食品の全体の品質にまで広げ; さらに (vi) またグルテンフリーパン形成のグルテン代替としての機能 (Toufeili *et al.*, 1994; Gurkm, 2002)。ハイドロコロイドはその高い水保持能により、食品の連続的な冷凍-解凍サイクルを行う際の安定性を与える (Lee *et al.*, 2002)。また各食品で脂

肪の代替物として好ましい機能も示す (Albert and Mittal 2002)。たとえハイドロコロイドが 1% 以下の濃度であっても、食品のテクスチャ、感覚を刺激する性質にははっきりと影響する。

ベーキング産業では、ハイドロコロイドは製パン改良剤として重要性が増しており、幾つかの研究はこの分野でのポテンシャルの展開を薦めている。カルボキシメチルセルロース (CMC) とグアガムがライ小麦に添加され、パン品質改良に用いられた (Mettler and Seibel, 1995)。さらに Rosell *et al.* (2001) は、発酵中小麦ドウ安定性の改良が、ハイドロコロイドのアルギン酸ナトリウム、 κ -カラギーナン、キサンタンガム、あるいはハイドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) の添加によって得ることを報告した。ハイドロコロイドはアルギン酸以外、水分保持能、水分活性同様に比容積の増加もした。さらにテクスチャの研究から、 κ -カラギーナンあるいは HPMC の添加はパンクラムのかたさを低下させた。著者らは κ -カラギーナン、HPMC が製パン適性に改良剤として効果的であると結論している。より初期の Davidou *et al.*, (1996) の研究から、ローストビンガム、キサンタンガム、アルギン酸もそれらのコロイドによるソフト化の効果があり、それはまず第一にローストビンガムの場合には高い水保持能のあるためである。キサンタンガム、アルギン酸の場合には、ソフト効果はグルテン-デンプン相互作用を邪魔するためであった。小麦パ

ンでは Collar *et al.*, (2001) が α -アミロースや乳化剤との相互作用と同様, CMC と HPMC のドウと製パン性への添加効果を研究した。この場合, 主には HPMC で, ソフト効果は水保持能とアミロペクチン老化の阻止可能性によるためであった。著者らは次のように結論した。HPMC はデンプンに優先的に結合し, そのときデンプン-グルテン相互作用の阻害が起こると。グアガムもまたソフト化効果を示すが, それはグアガムがデンプンに優先的に結合するため, 多分アミロペクチンの老化を阻害することによって引き起こされるためであらう (Collar *et al.*, 2001)。

ハイドロコロイドの親水の性質は, また水の引き離しを阻害し, 冷蔵中ポリマー会合を阻止する。最近, HPMC による阻害効果は一部焼いたパンの冷凍温度で貯蔵中に認められ, 完全に焼いた場合, パンの容積改良とクラムのソフト化が示された (Barcenas *et al.*, 2004; Barcenas and Rosell, 2005, 2006)。HPMC はパンの硬化速度を低下し, アミロペクチンの老化も遅らせた。低温電顕 (Cryo-scanning electron microscopy) は HPMC 鎖とパンクラム成分間の親密な相互作用を示した (Barcenas and Rosell, 2006)。ローカストビンガムで調製したパンは, 水分をずっと大きく保持し, コントロールに比べ柔らかくなった (Sharadanant and Khan, 2003)。Guarda *et al.*, (2004) は, 新鮮なパン品質とパン老化へのハイドロコロイド (アルギン酸ナトリウム, キサンタン, κ -カラギーナン, HPMC) の効果の評価を行った。各ハイドロコロイドはそれぞれの効果を示した。HPMC は, 比容積インデックス, 幅/高さ比, クラムのかたさを改良した。さらに外観, 香り, 匂い, クランチネス (噛み砕き安さ), 全体的好感度) を良くした。ハイドロコロイドは全体的にパン貯蔵中の水分ロスを減らし, アルギン酸, HPMC は抗老化効果がある。ある研究では (Sharadanant and Khan, 2003; Barcenas *et al.*, 2004), κ -カラギーナンは一部焼いた冷凍パンでは効果的改良剤ではなかった。

ハイドロコロイドは, 糊化-ゼラチン化プロセス, 即ちデンプンのペーストの性質を大きく修正するのに用いられた。選ばれたハイドロコロイド (グアガム, ペクチン, アルギン酸, κ -カラギーナン, キサンタン, HPMC) の小麦粉のペースト化性質, ゲル化の性質に与える影響は, Rojas *et al.*, (1999) によって評価された。ペースト温度へのアルギン酸添加の最も大きな効果は, デンプン糊化開始温度を低下させることであり, 逆に, ベーキング中, デンプンの酵素基質としての利用性が増加することになる。キサンタンとペクチンは調理安定性を増加し, 一方, κ -カラギーナンおよびアルギン酸は調理安定性変化には効果ない。アミロース-脂質複合体の形成は, κ -カラギーナン, アルギン酸, ペクチンで起こりやすくなり, キサンタン, HPMC では僅かに影響受けるだけであった。老化の低下を見ると, κ -カラギーナンは貯蔵中のソフト化, かたさの遅延, 両方に最も都合の良いハイドロコロイドであった。

ハイドロコロイドとグルテンフリーパン

グルテンフリーパンでの, グルテン置き換えは大きな技術的チャレンジであるが, それはグルテンが不可欠な構造を持つタンパク質のため数々のパンの外観, クラム構造に関係するからである。最近, デンプン, 乳成分あるいはまた, ハイドロコロイドをグルテンフリー粉ベース (米やコーン粉) に取り込ませることに関心が登っており, それでパンドウ中グルテンの粘弾性の性質を真似るものであり, その結果, 構造, 口腔内食感, 好感度, シェルフライフの改良がこれらのもので得られた (Toufeili *et al.*, 1994; Gallagher *et al.*, 2003, 2004a, 2004b; Moore *et al.*, 2004, 2006; Ahlborn *et al.*, 2005; McCarthy *et al.*, 2005)。これらの研究で, 多くのハイドロコロイドは高品質のグルテンフリーパンを生産するために研究され, そこには HPMC, CMC, メチルセルロース, β -グルカン, サイリウムガム, ローストビンガム, グアガム, キサンタンが用いられた。

幾つかのハイドロコロイドの改良効果, 例えば HPMC, CMC, ローストビンガム, グアガム, κ -カラギーナン, キサンタン, β -グルカン, サイリウムが Haque and Morris (1994), Gallagher *et al.*, (2004a), Morre *et al.*, (2004, 2006) により報告された。Rosell *et al.*, (2001) によると, ハイドロコロイドはドウのデベロップメントを改良し, ドウの粘度増加でガス保持力を改良し, その結果パン容積が増加する。しかしながら McCarthy *et al.*, (2005) は, コメ粉, ポテトデンプン, ミルクタンパク質からなるグルテンフリーパンベースに HPMC レベルをあげるとパン容積のわずかの減少が起こると報告した。最適の仕込みは, 2.2%HPMC と 79% 水を含むものである。Haque and Morris (1994) は, 米パンを作る時 HPMC とサイリウム (オオバコ) のコンビネーションをグルテンフリー仕込みに用いると良いパン容積を示したが, ポリマーだけ入れたのではパン容積の増加は低下した。さらに容積はあるハイドロコロイド濃度までは増加したがポリマー濃度をそれ以上上げるとパン容積は低下した。

ある最近の研究から Lazaridou *et al.*, (2007) は, ペクチン, CMC, アガロース, キサンタン, 大麦 β -グルカンのグルテンフリーパンのドウレオロジーへの影響を評価した。弾力性とドウ変形への抵抗性は, キサンタン > CMC > ペクチン > アガロース > β -グルカンの順であった。パン品質への影響のタイプとその程度も用いた特異的ハイドロコロイドとその濃度によった。彼らはパンの容積がハイドロコロイド濃度を 1% レベルまであげると増加することを観察したが, ただしキサンタン, ペクチンは各コントロールサンプルに比べて例外だった。しかしハイドロコロイド濃度を 1-2% に増加すると, ペクチン以外はパン容積の低下が観察された。ペクチン仕込みのパン容積では, コントロールに対し顕著に増加した。キサンタン 1% 含むグルテンフリーパンはパン容積は変化しないが, 2% ではパン容積は低下した (Lazaridou *et al.*, 2007)。この仕込みは用いた全ての調製のうち最も容積

の低いものであった。同様に Haque and Morris (1994) は米粉パンへのキサンタンの混入の影響を認め, さらに Schober *et al.*, (2005) はグルテンフリーパンがソールガムを変えてキサンタンにし, そのレベルをあげると容積の低下することを観察した。

パン品質の物理化学的パラメーターの重要性は多孔性と弾力性にある (Lazaridou *et al.*, 2007)。グルテンフリーパンの高多孔性は 1% 濃度 CMC, β -グルカンで認められ, ペクチンでは 2% で認められた。一方, パンの多孔性は 2% キサンタンで最も低くなった。Wang *et al.*, (1998) は, β -グルカンの小麦パンへの取り込みで, ドウ中の気室の安定化と気室合体阻止を起こし, クラムグレインの改良の起こる事を観察した。他方, 2% キサンタンを含むパンの多孔性は最も低くなる。Lazaridou *et al.*, (2007) は, 多孔性に加えて気室の均一なサイズ分布はパンの品質にとりまた, 重要であると言った。ある仕込みでアガロース (1%), あるいは β -グルカン (1%) 含むようなものでは, 多孔性値の大きな違いにもかかわらず, パンの外観, 内部構造は両サンプルともかなりの数の気室の不均一性を示し, それは逆にクラム構造の均一性にも影響し, その結果パン品質に影響する (Lazaridou *et al.*, 2007)。CHC, ペクチン, キサンタンを 2% レベルで供給すると, パンのクラム弾力性に高い値の示すことが出来た。クラストの L 値 (ライトネス) の増加が β -グルカン (1%) 添加で認められ, 一方クラムの白さはキサンタンを仕込みに入れる事で認められた。

消費者パネル (未訓練者) によって官能評価をすると, グルテンフリーパンに 2% CMC 入ったものが大変に受け入れられた。コントロール仕込みと比較して, クラムのかたさ (加圧試験) はペクチン (2%), CMC (2%), アガロース (1 および 2%), あるいは β -グルカン (1%) 添加しても顕著には増加しなかった。一方, キサンタン (1, 2%), あるいは β -グルカン (2%) 添加はクラムかたさに効果があった。グルテンフリーパンにキサンタンを供給すると, かたさに

最も大きな増加があり、それは貯蔵中の A_w 値の大きな低下と一致した。Schober *et al.*, (2005) は、キサンタンガムをソールガムのグルテンフリーパンに添加するとクラムかたさの増加することも報告した。Biliaderis *et al.*, (1997) によると、ハイドロコロイドのデンプン構造と機械的性質への添加効果は、2つの相反する現象によるものからくる；デンプン粒の膨潤が低下した結果、かたさの増加と粒からアミロースの溶出の低下；膨潤粒の中でデンプン粒内部-粒接触の阻害によりデンプンの構成ネットワークの弱体化である。Lazaridou *et al.*, (2007) は、これらのファクターのコンビネーションがパン構造の機械的性質への全体効果を決めると結論した。この効果は、グルテンフリーパンの仕込みに用いられる各特異的ハイドロコロイドに基づくものである。

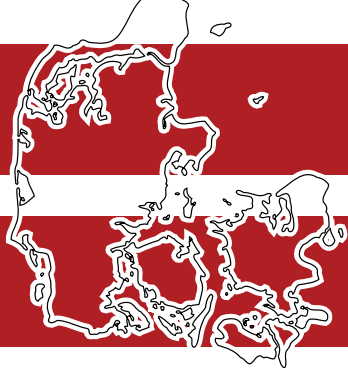
以上のことから、ハイドロコロイドの性質と機能性には大きくばらつきがあるが、その元の違いと化学的な構造の違いによるものであることは明らかである。ハイドロコロイド機能性における高度の違いは、その起原と加工方法による (Rojas *et al.*, 1999, Guarda *et al.*, 2004)。セルロース誘導体 (メチルセルロース, CMC, HPMC) はセルロースの化学修飾で得られるが、それは均一な特性を確保する (Guarda *et al.*, 2004)。このハイドロコロイドは親水基のため高い水保持能をもち、発酵中にシステム内に界面効果を持ち込み、製パン中にゲルネットワーク形成と言った添加的效果を示す。

メチル、ハイドロキシプロピル基のセルロー

ス鎖への添加は、ポリマーに高表面活性を与え、さらに溶液状態、温度変化の間、ユニークな水和-脱水と特性を与える。メチルセルロース, CMC あるいは HPMC のネットワーク構造がベーキング中にでき、ドウ中の粘度増大、拡張する気室の界面の強化に供し、ベーキング中のガス保持の増加、その結果パン容積の増加となる (Bell 1990)。HPMC 中の疎水-親水バランスは、乳化剤として機能し、クラムグレインを強化し、クラム中の水分含量を増加する (Bell, 1990)。CMC はタンパク質と相互作用が進みやすく、一方 HPMC はデンプンと結合しやすい (Collar *et al.*, 2001)。CMC とペクチンは顕著にグルテンフリーパンの容積、多孔性、弾性増加を示す。小麦デンプンの糊化特徴は大きくハイドロコロイド添加で修飾され、さらにその効果のひろがりにはハイドロコロイドの化学構造によっている。キサンタン、ペクチンは調理安定性を増やし、一方 κ -カラギーナンは主にアミロース-脂質複合体形成に影響する (Rojas *et al.*, 1999)。

全体的にハイドロコロイドの効果は小麦パン、あるいはグルテンフリーパンに疑いものなくハイドロコロイドによるものであり、その化学構造、抽出プロセス、化学修飾、ハイドロコロイドのドウ形成時の添加量、および小麦パン、グルテンフリーパン成分との相互作用に基づくものである。

参考文献は次号 “新解説グルテンフリーパンについて-2” にまとめた。



デンマークの生クリーム

デンマークは酪農産業が盛んな国ですが、酪農製品の中でも、今回は生クリームにまつわる食文化を紹介したいと思います。

デンマークのチーズなどは日本のスーパーでもよく見かけますが、デンマークは酪農が盛んな国で、世界市場へ輸出をしている製品も少なくありません。デンマーク国内市場を見てみても、バターやチーズなどは、毎日の生活に欠かせない商品で、スーパーなどでは、品数豊富に取り揃えられています。

さて、生クリームですが、これも日々の生活で、いろいろな場面に登場する酪農製品です。その登場頻度は日本よりもかなり多いのではないのでしょうか。まず、スーパーなどで生クリームを買う際に気づくことですが、その種類とサイズが豊富です。生クリームは、脂肪分 38% のものを piskefløde(ホイップするクリームという意味) という名称で売っています。また色々なブランドがあるだけではなく、サイズは 250mL、500mL、1 リットルと揃っています。日本では、250mL が主流なので、500mL や 1 リットルの生クリームを見ると、その大きさにやや違和感を感じてしまうほどです。生クリームは、健康志向の強いデンマーク人にしてみれば、健康にはあまりお勧めできない食材ですが(脂肪分が高いため)、料理やお菓子にはやっぱり欠かせない食材なので、スーパーでの陳列も充実しているのでしょう。

アメリカなどでは、スプレー缶タイプのホイップクリームが普及しており、むしろ生クリームをホイップすること自体少ないようですが、ここデンマークではその逆で、スプレー缶タイプのホイップクリームを家庭で使うことはほとんどありません。「手作り」が好きなデンマーク人だからなのでしょう。

生クリームを使う場面についてですが、例えばコーヒー屋さんで飲むココアや、アイスクリーム屋さんで買うアイスクリームのトッピングにホイップクリームは欠かせません。また、チョコレートケーキなどに添えるホイップクリームもあれば、パンケーキ(クレープのような薄い生地のパンケーキが主流)やワッフルにトッピングすることもよく見かけます。ちなみに、日本でいうショートケーキの生クリームのデコレーションは、こちらではあまり見かけません。ショートケーキに相当する、スポンジを層にしてフルーツなどを飾るケーキはありますが、生クリームで、きっちりとムラなく、きれいにスポンジを覆い、絞り袋に入れてデコレーションすることは、主流ではないようです。デンマーク流のショートケーキは、カスタードクリームをホイップクリームと同量混ぜ、それをケーキの間に挟むレシピが多いようです。なお、その際のホイップクリームには砂糖は入れません。日本ではホイップクリーム自体に砂糖を入れて甘くすることが多いですが、こちらでは砂糖を混ぜることはむしろ少なく、甘いものというよりは、クリーミーさ(脂肪分っぽさとも言うのでしょうか)を味わうことに重点が置かれているように感じます。

その他、デンマークならではの生クリームを使ったスイーツといえば、rødgrød med fløde と Risalamande は外せません。rødgrød med fløde は、直訳すると「赤いお粥に生クリーム」となるのですが、いちごなどをジャム状にしたものに、生クリームをかけて食べる夏の風物詩デザートです。デンマークでは、夏にいちごなどのベリー系の果物が旬を迎えるので、それを使ったデザー



Risalamande クリスマスに登場するお米と生クリームのデザート



Risalamande にはさくらんぼソースをかけて食べる

トが夏によく食されます。ややヘルシーに食べたい時は、生クリームを牛乳に置き換えて食べる人もいるようですが、やっぱり脂肪分の高い生クリームで食べると美味しいものです。また、Risalamande は、クリスマスのデザートに欠かせないスイーツで、お米を牛乳で炊き、それと生クリーム、アーモンドのみじん切りなどと混ぜて食べます。お米と生クリームの組み合わせが美味しく、お腹にすっきりくるデザートです。



Risalamande クリスマスに登場するお米と生クリームのデザート

お菓子やスイーツに欠かせない、生クリームを紹介しましたが、食事にもよく登場します。ソースに生クリームを入れてコクを出したり、スープに生クリームを加えてクリーミーにしたりと様々です。最近の健康志向ブームの影響で、今後生クリームの消費が減少するかどうかはわかりませんが、今のところデンマークの日々のいろいろな場面で、生クリームを使った食材を目にする機会は日本よりもはるかに多いように感じます。

野山の花

— 身近な山野草の食効・薬効 —

城西大学薬学部 白瀧 義明 (SHIRATAKI Yoshiaki)

アミガサユリ *Fritillaria thunbergii* Miq. (=*F. verticillata* Willd. ver. *thunbergii* (Miq.) Baker) (ユリ科 Liliaceae)

連絡先：城西大学薬学部生薬学教室
shiratak@josai.ac.jp

ようやく、寒さも緩み、春の気配が漂う弥生、早々と土中から顔を出すのがアミガサユリ（編笠百合）です。本植物は中国を原産とし、今ではいくつもの種が観賞用として栽培される高さ 30 ～ 80cm の多年草で、葉は長さ約 10cm、3 ～ 5 枚輪生し、線状披針形で無柄、上部の葉は先端が鍵型に曲がり、花は数個を茎頂に下向きにつけ、花被片は淡黄緑色で 6 個、花径約 3cm の鐘状花で、内側に黒紫色の網目状斑紋があり、夏には茎葉とも枯れてしまいます。和名は花の形を、虚無僧のかぶる「深編笠」や、お姫様やお遍路さんがかぶる「編み笠」にたとえたもので、埼玉県小川町には、「笠山」（標高 837m）とよばれる編み笠にととてもよく似た山容の山があり、登山者にととても人気です。地下にある鱗茎は 2 枚が貝状に相対していて、鱗片が割れて中から球根が出てくる様子を、母が子供を抱く姿にたとえてバイモ（貝母）とよばれます。また、2 個の鱗片は、クリに似ていることから、古くは「ハハクリ」とよばれていました。

鱗茎を剥がし、水洗いしながら外側のコルク皮を捨て、日干し、または石灰を塗って乾燥させた鱗茎は、バイモ（貝母、*Fritillariae Bulbus*）といい、鎮咳、去痰、排膿などを目的に^{じいんしほうとう}滋陰至宝湯、^{せいはいとう}清肺湯、^{とうきばいもくじんがんりょう}当归貝母苦参丸料などの漢方処方に用いられます。成分としては、鱗茎にステロイドアルカロイドの peimine (verticine), peiminosite, peiminine, peiminone などが報告されています。これらのアルカロイドには血圧降下作用が報告されていますが、一方、心筋を侵す作用があることから注意が必要です。中国に産する生薬のバイモには何種類もの *Fritillaria* 属植物を基原とするものがあり、それぞれ^{せつばいも}浙貝母、^{せんばいも}川貝母などとよばれ、そのうちアミガサユリを基原とするものは浙貝母



写真1 アミガサユリ



写真2 笠山（埼玉県小川町）



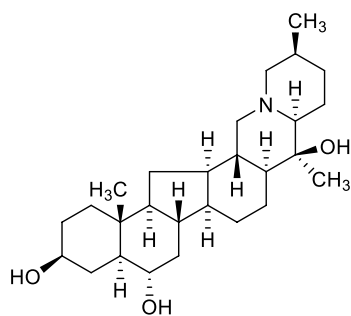
写真3 クロユリ



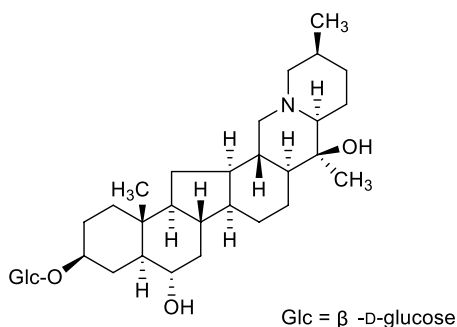
写真4 生薬: バイモ (貝母)

といい、日本でも奈良県などで栽培され、^{やまとばいも}大和貝母ともよばれています。また、生薬のバイモは鎮咳、去痰などを目的に用いられてきましたが、同名の生薬でも熱感があって痰のとれにくい咳嗽には浙貝母を用い、元気のない肺燥の咳嗽には川貝母を用いとされています。

有名な高山植物にクロユリ *F. camschatcensis* がありますが、アミガサユリと同属です。クロユリは不吉な花とされていますが、クロユリにまつわる「黒百合伝説」を一つ紹介すると、戦国（安土桃山時代）の武将、佐々成政〔(1536年（1539年説あり）～1588年）には「早百合（さゆり）」

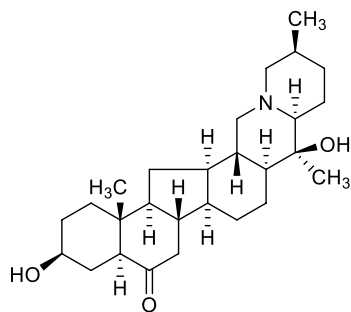


peimine (verticine)

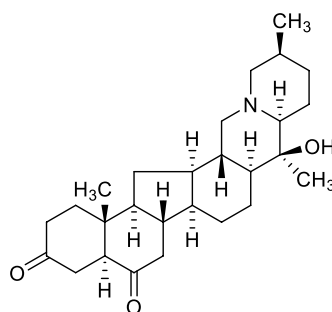


peiminoside

Glc = β -D-glucose



peiminine



peiminone

図1 成分の構造式

と言う美しい側室がいたとされ、成政はこの早百合を深く寵愛していました。それが嫉妬を招き、ある時、「早百合のお腹の中にいる子どもは成政の子ではない」と言う噂が流れ、成政はこれを聞いて大いに怒り、早百合を神通川の川沿で殺してしまったそうです。早百合は死ぬとき、「已成政、此の身は此処に斬罪せらるる共、怨恨は悪鬼と成り数年ならずして、汝が子孫を殺し尽し家名断絶せしむべし」と叫び、また、「立山に黒百合の花が咲いたら、佐々家は滅亡するであろう」と呪いの言葉を残して死んだとも言います。今も富山県富山市礪波町には、佐々成政の愛妾・早百合が榎の下で斬られたと伝わる場所近くに、「早百合観音祠堂」や「礪波さくら」の碑があり、また、富山市五福の「呉服山長光寺」には早百合の家系の墓もあります。

<http://www.newfoodindustry.com/>

ニューフードインダストリー 第61巻 第 3 号

印刷 平成 31 年 2 月 25 日
発行 平成 31 年 3 月 1 日
発行人 渡邊 力
編集人 今西 和政
発行所 エヌエフアイ合同会社
〒185-0012 東京都国分寺市本町3-7-23-302
TEL : 042-312-0836 (代表)
FAX : 042-312-0845
振込先: 三井住友銀行 国分寺支店 普通2312814
多摩信用金庫 国分寺支店 普通3073817
ゆうちょ銀行 〇一九店 当座0324817

印刷所 株式会社メイク
定 価 本体2,000円 + 税 (送料100円)

e-mail: newfood@newfoodindustry.com