日本食品保蔵科学会誌

VOL. 43　NO. 3

会　　長　高井　陸雄　　副　会　長　太田　英明　　小宮山美弘　　早坂　　薫
編集委員長　太田　英明
編 集 委 員　稲熊　隆博　　井上　茂孝　　今堀　義洋　　恩田　　匠　　竹永　章生
古庄　　律　　松田　茂樹　　宮本　敬久

＜報　　文＞
碁石茶に含まれる抗酸化成分の解明 ……（103）
／島村智子・柏木丈拡・松本結香
吉次香菜子・平岡あゆみ・山添智香子・森山洋憲
大石雅夫・宮村充彦・受田浩之

食用植物中のニコチアナミン量と冷蔵保存および調理による変化 ……（111）
／高良健作・長嶺　伸・安次嶺稜弥
宮城一菜・和田浩二

＜研究ノート＞
リンゴ‘秋映’の葉とらず栽培の優位性ならびに
　果実の「柔さ」に関与する品質要因について ……（119）
／深井洋一・佐久間淳

＜技術報告＞（英文）
黒糖摂取が人の心理的ストレスに及ぼす影響 ……（123）
／高橋　誠・金城由希子・上地俊徳・広瀬直人
水　雅美・侯　徳興・和田浩二

＜講　　座＞
HACCP教育講座（15）　HACCP導入率向上のための取組み ……（133）
／丸山純一

＜文献抄録＞ ……（139）
＜会　　告＞ ……（140）

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 43 NO. 3 (2017)

<Article> (Japanese)

Elucidation of Antioxidant Compounds in Goishi Tea
SHIMAMURA Tomoko, KASHIWAGI Takehiro, MATSUMOTO Yuka,
YOSHITSUGU Kanako, HIRAOKA Ayumi, YAMAZOE Chikako, MORIYAMA Hironori,
OHISHI Masao, MIYAMURA Mitsuhiko and UKEDA Hiroyuki ..... (103)

Quantification of Nicotianamine Content in Edible Plants:
A Comparative Study under Fresh, Cold Storage, and Cooking Conditions
TAKARA Kensaku, NAGAMINE Shin, ASHIMINE Ryoya,
MIYAGI Kazuna and WADA Koji ..... (111)

<Research Note> (Japanese)

The Advantage of Cultivation without Leaf-Pluck and
the Factors Affecting the "Softness" of Apples of 'AKIBAE'
FUKAI Yoichi and SAKUMA Atsushi ..... (119)

<Technical Report> (English)

Effects of Oral Intake of Noncentrifugal Cane Brown Sugar,
Kokuto, on Mental Stress in Humans
MAKOTO Takahashi, YUKIKO Kinjo, SHUNTOKU Uechi, NAOTO Hirose,
MASAMI Mizu, HOU De-Xing and KOJI Wada ..... (123)

<Serialization Lecture> (Japanese)

Action for HACCP Introduction Rate Improvement
MARUYAMA Junichi ..... (133)

碁石茶に含まれる抗酸化成分の解明

島村智子[*1§]・柏木丈拡[*1]・松本結香[*1]
吉次香菜子[*1]・平岡あゆみ[*1]・山添智香子[*1]・森山洋憲[*2]
大石雅夫[*3]・宮村充彦[*4]・受田浩之[*5]

＊1　高知大学農林海洋科学部
＊2　高知県工業技術センター
＊3　大豊町役場
＊4　高知大学医学部附属病院薬剤部
＊5　高知大学地域連携推進センター

Elucidation of Antioxidant Compounds in Goishi Tea

SHIMAMURA Tomoko[*1§], KASHIWAGI Takehiro[*1], MATSUMOTO Yuka[*1], YOSHITSUGU Kanako[*1], HIRAOKA Ayumi[*1], YAMAZOE Chikako[*1], MORIYAMA Hironori[*2], OHISHI Masao[*3], MIYAMURA Mitsuhiko[*4] and UKEDA Hiroyuki[*5]

＊1　*Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, 200 Otsu, Monobe, Nankoku, Kochi　783–8502*
＊2　*Kochi Prefectural Industrial Technology Center, 3992–3 Nunoshida, Kochi　781–5101*
＊3　*Otoyo Town Office, 231 Takasu, Otoyo, Kochi　789–0392*
＊4　*Department Pharmacy, Kochi Medical School Hospital, 185–1 Kohasu, Oko-cho, Nankoku, Kochi　783–8505*
＊5　*Center for Regional Collaboration, Kochi University, 2–17–47 Asakura-Honmachi, Kochi　780–8073*

Goishi tea, a post-fermented tea, is produced in Otoyo town in Kochi Prefecture, Japan. It is produced by two-step aerobic-anaerobic fermentation process. In this study, we attempted to elucidate the major antioxidant compounds in Goishi tea. Liquid-liquid partitioning and various types of column chromatography were used to obtain the unknown antioxidant compounds in Goishi tea. Subsequently, pyrogallol and *t*–3, *t*–4–dihydroxycyclohexane–*r*–1–carboxylic acid were newly identified as antioxidant compounds by using IR, LC-MS, and NMR analyses. The pyrogallol content in Goishi tea was 11.9 mg/g dry weight and its contribution to the O_2^- scavenging activity of Goishi tea was 28.2%. From these results, pyrogallol was determined to be one of the main antioxidant compounds in Goishi tea. Additionally, the change in pyrogallol content during Goishi tea production was investigated. The pyrogallol content increased during steaming and aerobic fermentation (days 1–5), then gradually decreased during the final stage of aerobic fermentation (day 6), anaerobic fermentation, and sun-drying; indicating that pyrogallol was formed mainly during aerobic fermentation. In the future, we intend to investigate the relationship between pyrogallol and the reported food functionalities of Goishi tea, such as its inhibitory effects on hypercholesterolemia, atherosclerosis, and diet-induced obesity.

（Received Dec. 5, 2016；Accepted Feb. 9, 2017）

Key words：*Goishi tea, post-fermented tea, antioxidant activity, antioxidant compound, pyrogallol*
碁石茶，後発酵茶，抗酸化活性，抗酸化成分，ピロガロール

茶はその製法により，不発酵茶（緑茶），半発酵茶（烏龍茶），発酵茶（紅茶），後発酵茶に分類される。このうち，半発酵茶と発酵茶は茶葉の内在酵素により茶カテキンなどを酸化させて製造されるものであり，ここで

＊1　〒783–8502　高知県南国市物部乙200
§　Corresponding author, E-mail：tomokos@kochi-u.ac.jp
＊2　〒781–5101　高知県高知市布師田3992–3
＊3　〒789–0392　高知県長岡郡大豊町高須231
＊4　〒783–8505　高知県南国市岡豊町小蓮185–1
＊5　〒780–8073　高知県高知市朝倉本町２丁目17–47

いう「発酵」は茶発酵と呼ばれるもので微生物が関与する通常の発酵とは区別される。一方，後発酵茶は微生物発酵によって作られる茶であり，好気性のカビで発酵させる好気的発酵茶，空気を遮断して嫌気性菌で発酵させる嫌気的発酵茶，さらに好気的発酵と嫌気的発酵を組み合わせて製造する二段階発酵茶の３つに分類される。好気的発酵茶のプーアル茶（中国），嫌気的発酵茶のミエン（タイ）などが世界的に広く知られている。日本では，好気的発酵茶のバタバタ茶（富山県），嫌気的発酵茶の阿波晩茶（徳島県），二段階発酵茶の石鎚黒茶（愛媛県），碁石茶（高知県）が生産されている。

碁石茶は高知県長岡郡大豊町で生産されている伝統的な茶である。その製法は独特で，まず枝ごと茶葉を刈り取り，それを桶に入れて約２時間蒸す。その後，枝を取り除いて堆積し，ムシロで覆いカビ付け（好気的発酵）を約１週間行う。好気的発酵終了後，茶葉を桶に詰めて重石を載せ，嫌気的発酵を約２週間行う。この間に，乳酸発酵が進み，碁石茶特有の酸味が生じる。発酵終了後，茶葉を細断し，２日ほど天日で乾燥して製品とする。

碁石茶製造は400年以上の長い歴史をもつといわれ，その風味特性[1)]や微生物特性[2),3)]に関する研究はなされていたが，生体調節機能に関する知見は乏しい状況にあった。そこで，2005年に大豊町碁石茶協同組合，大豊町，高知県，高知大学の産学官機関が連携した共同研究を開始し，これまでに，碁石茶の抗酸化活性[4)]，高脂血症，および動脈硬化症予防効果[5)]，メタボリックシンドローム，および肥満の予防効果[6)]などを明らかとしている。また，大豊町の中学生を対象とし，碁石茶飲用によるインフルエンザ感染予防効果についての検証を実施し，碁石茶の飲用によりインフルエンザの感染率が有意に低下することを報告した[7)]。上記のように，碁石茶の生体調節機能は種々明らかとなったが，その関与成分については不明なままであった。そこで本研究では，碁石茶中の抗酸化成分の解明に取り組んだ。

実 験 方 法

１．試　薬

SOD Assay Kit-WSTは同仁化学研究所製を使用した。ガロカテキン，ピロガロールは和光純薬工業製を用いた。スーパーオキシドジムスターゼ（SOD，ウシ赤血球由来，3000 units/mg）はSigma社製を用いた。その他の試薬は，特別な記載がない限り，特級試薬を使用した。また，すべての実験において蒸留水をAuto Pure WQ501（ヤマト科学製）に通して処理した比抵抗18MΩ・cmの超純水を用いた。

２．碁石茶試料

実験に用いた碁石茶は，大豊町碁石茶協同組合に所属する生産農家より供与いただいた。製造工程ごとの茶葉の採取は，生葉，蒸し後，好気的発酵１～６日目，嫌気的発酵後，天日干し後（製品）の段階で行った。

３．スーパーオキシドアニオン（O_2^-）消去活性測定

本研究では，抗酸化活性の指標としてスーパーオキシドアニオン（O_2^-）消去活性を測定した。O_2^-消去活性は，SOD Assay Kit-WSTの測定方法に従って測定した。ただし，反応時間は10分とした。測定サンプルはロータリーエバポレーターで減圧濃縮後，超純水に溶解した。測定は３回繰り返し，各試料の50%阻害濃度（IC_{50}）を求めた。試料のIC_{50}とSODのIC_{50}が等しいとみなし，各試料のO_2^-消去活性を乾燥茶葉当たりのSOD等価活性（units/mg d.w.）として示した。

４．碁石茶抽出液の分画

（１）酢酸エチル層　ミキサーで粉砕した茶葉３gに沸騰水200mlを加え，５分間抽出を行った。その後，ろ紙とメンブレンフィルター（孔径0.45μm）でろ過した抽出液を以下の分画操作に供した（Fig. 1）。

碁石茶抽出液４lをエバポレーターにて濃縮乾固後，固形物重量で５%濃度になるように超純水に溶解した。その後，分液ロートにて酢酸エチルで抽出し，水層と酢酸エチル層を得た。その後，酢酸エチル層（1.65 g）をODSオープンカラム（300mm×25mm i.d.）にアプライし，30%メタノール（MeOH）溶出画分（1.37 g），50% MeOH溶出画分（0.14 g），100% MeOH溶出画分（0.04 g）を得た（Fig. 1）。

（２）水　層　液液分配で得られた碁石茶水層541mgを陽イオン交換Sep-pak（Sep-pak® Plus Acell Plus CM Cartridge: Waters製）にアプライし，超純水10mlで溶出したものを中性/酸性画分とした。その後，７Mアンモニア水10mlで溶出したものを濃縮乾固後，超純水で定容したものを塩基性/両性画分（0.21mg）とした。中性/酸性画分の全量を濃縮せずに，陰イオン交換Sep-pak（Sep-pak® Plus Acell Plus QMA Cartridge: Waters製）にアプライし，超純水10ml，次いで20Mギ酸10mlで溶出し，濃縮乾固後，超純水で定容したものを，それぞれ中性画分（106mg），酸性画分（54mg）とした。中性画分106mgをODS Sep-pak（Sep-Pak® Plus C_{18} cartridge Waters製）にアプライし，水，20% MeOH，40% MeOH，100% MeOH各10mlで溶出した。その結果，中性水溶出画分（41mg），中性20% MeOH溶出画分（21mg），中性40% MeOH画分（31mg），中性100% MeOH溶出画分（10mg）の４画分を得た（Fig. 1）。

５．抗酸化成分の単離と構造解析

酢酸エチル層30% MeOH溶出画分中の抗酸化成分のHPLCによる単離は下記の条件で行った。HPLC装置：L-6200 Intelligent Pump, L-4000UV detector, D-2500 Chromato Integrator,（Hitachi製），CTO-10AC VP（Shimadzu製），〈HPLC条件A〉HPLCカラム：Phenomenex Synergi 4μ MAX-RP 80Å（250mm×4.6mm i.d., Phenomenex製），カラム温度：40℃，溶媒：25% MeOH/H_2O，流速：3.0ml/min，検出波長：280nm。〈HPLC条件B〉HPLCカラム：Phenomenex Synergi 4μ MAX-

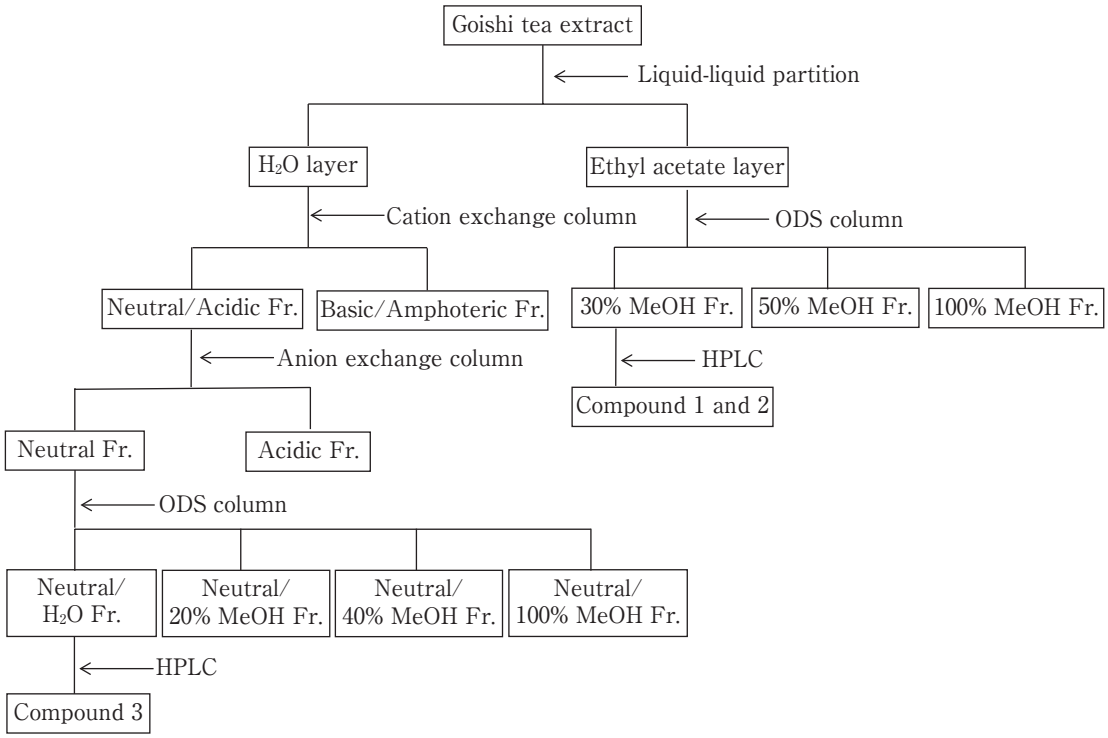

Fig. 1　Fractionation of Goishi tea

RP 80Å（250㎜×4.6㎜ i.d., Phenomenex製），カラム温度：40℃，溶媒：10%アセトニトリル/H_2O，流速：3.0mℓ/min，検出波長；280nm。

水層中性水溶出画分中の抗酸化成分のHPLC分析，および単離は以下の条件で行った。HPLC装置：SCL-10 AVP, LC－10 ADVP, CTO－10 AC VP, DGU－12 A（Shimadzu製），875-UV intelligent UV/VIS（Jasco製），HPLCカラム：COSMOSIL Packed Column 5 C_{18}-MS-II（250㎜×10㎜ i.d.，ナカライテスク製），カラム温度：40℃，溶媒：3％ MeOH/H_2O，流速：3.0mℓ/min，検出波長：254nm。

単離した化合物の構造解析は下記の機器，ならびに条件で行った。IR分析にはIR Prestige-21（Shimadzu製）を使用し，拡散反射法により測定した。LC-MS分析には，PU-1580（Jasco製），Finnigan LCQ Duo（Thermo Quest製），MS route JMS-600W（JEOL製）を使用し，以下の条件で質量を推定した：HPLCカラム；Phenomenex Synergi 4μ MAX-RP 80Å（150㎜×2.0㎜ i.d., Phenomenex製），カラム温度；40℃，溶媒；0.1%ギ酸を含む10%アセトニトリル，流速；0.15mℓ/min，イオン化法；ESI，キャピラリー電圧；20V，キャピラリー温度；250℃。NMR分析にはJNM-AL 400，およびJNM-ECX 500（JEOL製）を使用し，測定条件は以下の通りとした：^{1}H-NMR；400MHz，または500 MHz，^{13}C-NMR；100MHz，または125MHz，溶媒；重メタノール（CD_3CD），または重水（D_2O）。内部標準：TMS。スピンパターンは，s（singlet），d（doublet），t（triplet），m（multiple）で記した。カップリング定数はHzで示した。

化合物 1（gallocatechin）：IR 3364cm^{-1}（OH）；LC-MS（ESI negative）m/z：305［M-H］$^-$；^{1}H-NMR δH：（CD_3 CD）：2.50（1H, H4a, dd, J＝16.1, 5.1Hz），2.79（1H, H4b, dd, J＝16.1, 7.8Hz），3.95（1H, H3, ddd, J＝7.8, 7.1, 5.1Hz），4.52（1H, H2, d, J＝7.1Hz），5.85（1H, H 8, d, J＝2.0Hz），5.91（1H, H6, J＝2.0Hz），6.39（2H, H2' and 6', s）；^{13}C-NMR δC（CD_3CD）：28.1（C4, CH_2），68.7（C3, CH），82.8（C2, CH），95.4（C8, CH），96.2（C6, CH），100.6（C4a, CH），107.1（C2' and 6', CH），131.4（C1', C），134.0（C4', C），146.7（C3' and 5', C），156.7（C8a, C），157.4（C5, C），157.7（C7, C）。

化合物 2（pyrogallol）：IR 3381cm^{-1}（OH）；LC-MS（ESI negative）m/z：125［M-H］$^-$；^{1}H-NMR δH（CD_3 CD）：6.34（2H, H4 and 6, d, J＝7.6Hz），6.50（1H, H 5, dd, J＝8.4, 7.6Hz）；^{13}C-NMR δC（CD_3CD）：106.2（C4 and 6, CH），120.1（C5, CH），134.0（C2, C），146.7（C1 and 3, C）。

化合物 3（t－3, t－4－dihydroxycyclohexane－r－1－carboxylic acid）：IR3389cm^{-1}（COOH），1766cm^{-1}（C=O）；LC-MS（ESI negative）m/z：159［M-H］$^-$；^{1}H-NMR δH（D_2O）：1.48（1H, H6a, dddd, J＝11.7, 11.7, 11.7, 4.1Hz），1.62（1H, H5a, m），1.68（1H, H2a, m），1.72（1H, H5b, m），1.94（1H, H6b, m），2.03（1H, H2b, m），2.60（1H, H1, tt, J＝11.5, 4.1Hz），3.67（1H, H4, ddd, J＝10.8, 4.1, 2.8Hz），4.01（1H, H3, m, J＝2.2 Hz）；^{13}C-NMR（D_2O）25.9（CH_2, C6），26.4（CH_2, C5），32.9（CH_2, C2），36.8（CH_2, C1），68.4（CH, C4），70.4

(CH, C3), 181.3 (C=O, C7)

6．化合物2のアセチル化

化合物2のアセチル化は以下の手順で行った。化合物2をピリジン1 mℓに溶解した後，無水酢酸1 mℓを添加し，常温にて一晩反応させた。超純水5 mℓを添加して反応を停止させ，分液ロートにて酢酸エチル4 mℓで3回抽出した。得られた酢酸エチル層を濃縮乾固させた後，重クロロホルムにて溶解し，NMR分析に供した。

アセチル化化合物2：^{1}H-NMR δH ($CDCl_3$)：2.26 (6H,acetyl-1*O* and 3*O*, s), 2.27 (3H, acetyl-2*O*, s), 7.08 (2H, H4 and 6, d, J = 7.6Hz), 7.23 (1H, H5, dd, J = 8.8, 7.6Hz)；^{13}C-NMR δC ($CDCl_3$)：20.2 (acetyl-2*O*, CH_3) 20.7 (acetyl-1*O* and 3*O*, CH_3), 120.6 (C 4and 6, CH), 125.9 (C5, CH), 134.6 (C2, C), 143.4 (C 1 and 3, C), 166.9 (acetyl-1*O* and 3*O*, C=O), 167.8 (acetyl-2*O*, C=O)

結果と考察

1．碁石茶抽出液，および分画物のO_2^-消去活性

碁石茶の抗酸化活性（O_2^-消去活性，1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl（DPPH）ラジカル消去活性）は緑茶と同等程度に高く，烏龍茶，紅茶，プーアル茶と比較して有意に高いことが報告されている[5]。また，一般的に緑茶の抗酸化活性にはカテキン類の寄与が大きいが，私たちは過去の研究において，碁石茶の抗酸化活性に対するカテキン類（カテキン，エピカテキン，エピカテキンガレート，ガロカテキン，ガロカテキンガレート，エピガロカテキン，エピガロカテキンガレート），および没食子酸の寄与の程度は小さく，上記のカテキン類以外の抗酸化成分の存在の可能性について報告した[4]。そこで本研究では，碁石茶中の主要抗酸化成分の解明を目的とした研究を実施した。

碁石茶抽出液，および分画物のO_2^-消去活性測定を行った（Fig. 1）。その結果，碁石茶抽出液のSOD等価活性は30.6units/mg d.w.，液－液分配により得た水層は10.6 units/mg d.w.，酢酸エチル層は17.3units/mg d.w.のSOD等価活性を示した。

2．酢酸エチル層中の抗酸化成分の同定

酢酸エチル層をODSオープンカラムにて30% MeOH画分，50% MeOH画分，100% MeOH画分に分画した（Fig. 1）。各溶出画分のO_2^-消去活性測定の結果，そのSOD等価活性は30% MeOH画分，50% MeOH画分でそれぞれ，21.6units/mg d.w.，0.137units/mg d.w.であった。一方，100% MeOH画分にO_2^-消去活性は認められなかった。このことから，酢酸エチル層中の主要抗酸化成分は30% MeOH画分に溶出したことが明らかとなった。

酢酸エチル層30% MeOH画分をHPLC条件Aにて分析したところ，そのクロマトグラム上には5つの主要なピークが認められた（Fig. 2）。これを保持時間に従ってFr. 1～9に分画し，各画分のO_2^-消去活性測定を行った。

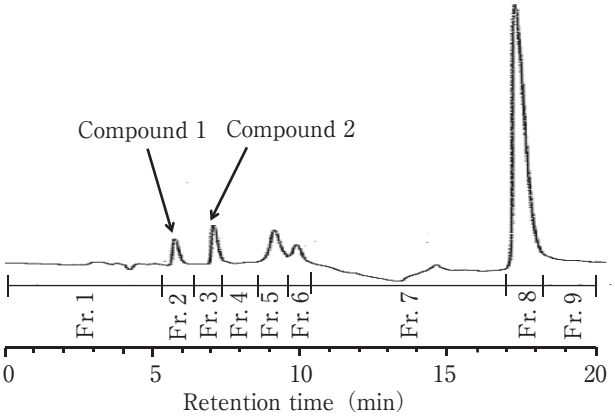

Fig. 2　HPLC profile of 30% MeOH fraction of ethyl acetate layer

茶葉3 g相当の30% MeOH画分（139mg）の分画を行った際の各Fr.の収量とSOD等価活性は下記の通りであった：Fr. 1 (9.96mg, 0.255units/mg d.w.), Fr. 2 (16.0mg, 1.72units/mg d.w.), Fr. 3 (19.6mg, 3.28units/mg d.w.), Fr. 4 (2.20mg, 0.598units/mg d.w.), Fr. 5 (6.49mg, 0.488units/mg d.w.), Fr. 6 (5.23mg, 0.161units/mg d.w.), Fr. 7 (6.01mg, 0.163units/mg d.w.), Fr. 8 (25.1mg, 0.542units/mg d.w.), Fr. 9 (1.63mg, n.d.)。測定の結果より，Fr. 2とFr. 3が他のFr.と比較して高いO_2^-消去活性を示すことが明らかとなり，これらの画分中に主要抗酸化成分が含まれていると判断した。

（1）Fr. 2に含まれる化合物1　Fr. 2に含まれる抗酸化成分を化合物1とし，HPLC条件Bにて分取し，IR, LC-MS, NMRスペクトルによる構造解析を行った。IRスペクトルにおいて，3364cm^{-1}に吸収を示したことから，化合物1は水酸基をもつことが明らかとなった。加えて，LC-MS分析の結果，ネガティブモードでm/z 305に分子イオンピークが認められたため，化合物1の分子量は306であると推定された。化合物1（10.5mg）を重メタノールに溶解し，^{1}H-，および^{13}C-NMR分析に供した。既報のNMRスペクトル[8),9)]との比較からガロカテキンであると推定した。最終的に，化合物1とガロカテキン標品のHPLCクロマトグラムでの保持時間の一致を確認し，化合物1をガロカテキンと同定した（Fig. 3（1））。

ガロカテキンは，私たちの過去の研究において碁石茶中での存在を確認し，製造工程中の含量変化，ならびに抗酸化活性についても報告済である[4]。

（2）Fr. 3に含まれる化合物2　Fr. 3に含まれる抗酸化成分を化合物2とし，HPLC条件Bにて分取し，IR, LC-MS, NMRスペクトルによる構造解析を行った。IRスペクトルにおいて，化合物2は3381cm^{-1}に吸収を示したことから，水酸基をもつことが明らかとなった。続いて，LC-MS分析を行った結果，ネガティブモードで$[M-H]^-$と推定されるm/z125が認められたため，化合

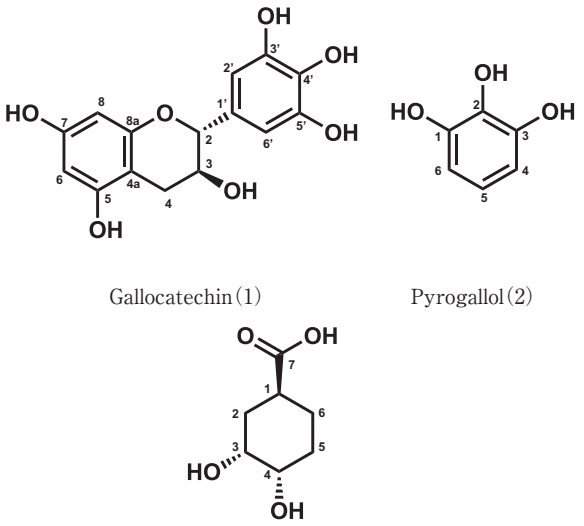

Fig. 3　Structure of Active Compounds

物2の分子量は126であると推定した。

化合物2（100㎎）を重メタノールに溶解しNMR分析に供した。^{13}C–NMRでは，sp^{2}領域にメチン炭素2種，四級炭素2種の計4種のシグナルが認められた。一方で^{1}H–NMRにおいて6.34ppm（2H），および6.50ppm（1H）のシグナルはそれぞれ，ダブレット（7.6Hz），ダブルダブレット（8.4，7.6Hz）のカップリングを示したことから，これらの水素は芳香族環のオルト位で隣り合っていることが判明した。以上のことから，この構造中には対称構造を持った1,2,3置換ベンゼン環が存在すると予測された。この化合物2をアセチル化したところ3個のアセチル基が導入されたことから，水酸基が3個存在することが明らかとなった。以上のことから，分子式は$C_6H_6O_3$（不飽和度4）と予測された。134.0ppmと146.7ppmの4級炭素のシグナルはそのケミカルシフトから水酸基が結合していると考えられた。これらの情報から，化合物2はピロガロールであると推察された。化合物2とピロガロール標品のHPLCクロマトグラムでの保持時間の一致を確認し，化合物2をピロガロールと同定した（Fig.3（2））。

田中ら[10]は，日本産後発酵茶中の発酵代謝物について調べ，碁石茶中に約14㎎/g d.w.のピロガロールが含まれることを報告している。また，碁石茶中のピロガロールは脱炭酸酵素の働きにより没食子酸から生成したものと推察されている[10]。しかしながら，碁石茶の抗酸化活性とピロガロールの関連について扱った報告は見当たらなかったことから，本研究では，改めて碁石茶中のピロガロールの定量を行い，碁石茶のO_2^-消去活性に対するピロガロールの寄与について調べた。

HPLC分析の結果，本研究で用いた碁石茶抽出液1㎖当たり178㎍のピロガロールが含まれていることが判明した。これは，乾燥茶葉1g当たり11.9㎎の含量に相当し，田中らの報告した値[10]と同程度であった。また，過去の報告では，カテキン類の中で最も含量の大きかったガロカテキンでも7.69㎎/g d.w.であったことから，ピロガロールが碁石茶中の主要成分の一つである可能性が高いと考えられた[4]。

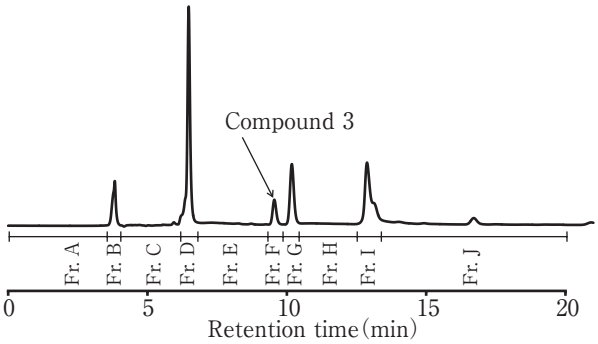

Fig. 4　HPLC profile of neutral／H_2O fraction of H_2O layer

続いて，ピロガロール標品のO_2^-消去活性を測定したところ，そのSOD等価活性は726units/㎎であった。この結果より，ピロガロールのSOD等価活性は，カテキン（C）（553units/㎎），エピカテキン（547units/㎎），エピカテキンガレート（449units/㎎），エピガロカテキン（332units/㎎），ガロカテキン（375units/㎎），没食子酸（361units/㎎）より高く，エピガロカテキンガレート（1833units/㎎）より低いことが判明した[11),12)]。

上記の結果をもとに，碁石茶抽出液のO_2^-消去活性に対するピロガロールの寄与率を算出したところ，その値は28.2%となった。碁石茶のO_2^-消去活性に対するカテキン類7種（カテキン，エピカテキン，エピカテキンガレート，エピガロカテキン，エピガロカテキンガレート，ガロカテキン，ガロカテキンガレート）と没食子酸の寄与率の合計は，約5%と非常に小さいことが明らかとなっている[4]。それに対して，今回抗酸化物質として同定したピロガロールの碁石茶のO_2^-消去活性に対する寄与率は非常に大きかったことから，ピロガロールが碁石茶中の主要抗酸化成分の一つであると判断した。

3．水層中の抗酸化成分の同定

水層を陽イオン交換Sep–pakおよび，陰イオン交換Sep–pakを用いて中性，酸性，塩基性/両性画分の3つの画分に分画し，O_2^-消去活性を測定した。その結果，中性画分（4.86units/㎎ d.w.），酸性画分（2.47units/㎎ d.w.）が高い活性を示した。一方，塩基性/両性画分（0.0010units/㎎ d.w.）は非常に低い活性しか示さなかった。最も高いO_2^-消去活性を示した中性画分（106㎎）をODS Sep–pakにアプライし，水，20% MeOH，40% MeOH，100% MeOHで順次溶出した。各画分のO_2^-消去活性を測定した結果，水溶出画分（1.86units/㎎ d.w.）が最も高い活性を示し，次いで20% MeOH溶出画分（0.70units/㎎ d.w.），40% MeOH溶出画分（0.15units/㎎ d.w.）

となった。一方，MeOH溶出画分にはO_2^-消去活性は認められなかった。最も高い活性を示した水層中性水画分をHPLC分析に供したところ，5つの主要なピークが認められた（Fig. 4）。保持時間に従ってFr. AからJの10画分に分画しO_2^-消去活性を測定した。その結果，Fr. A（0.18units/mg d.w.），Fr. F（0.16units/mg d.w.），Fr. H（0.22units/mg d.w.），Fr. I（1.75units/mg d.w.），Fr. J（1.74units/mg d.w.）のみが活性を示した。Fr. A, Fr. H, Fr. JにはHPLC分析において明確なピークが検出されなかったことから，Fr. FおよびFr. Iについて検討を行った。Fr. Iに含まれる化合物は標品とのHPLCの保持時間，およびNMRのケミカルシフトの比較から，ピロガロールと没食子酸であることが明らかとなった。そこで，Fr. Fに含まれる抗酸化成分を化合物3とし各種機器分析に供し構造の決定を試みた。

（1）Fr. Fに含まれる化合物3　IR分析において，化合物3は3389cm^{-1}（COOH），および1766cm^{-1}（C=O）に吸収を示したことから，分子中にカルボキシル基を有することが明らかとなった。続いて，LC–MS分析の結果，ネガティブモードで*m/z*159に分子イオンピークが認められたため，化合物3の分子量は160であると推定された。また，^{13}C–NMRにおいて，3つのメチレン炭素，3つのメチン炭素，カルボニル炭素のシグナルが観測され，そのうち2つのメチン炭素はケミカルシフト（68.4 ppm，70.4ppm）から酸素と結合していると考えられた。また，^{1}H–NMRの結果より，合計9 Hのシグナルが観測され，推定分子量を考慮すると，分子式は$C_7H_{12}O_4$（不飽和度2）であると決定した。^{1}H–^{1}H–COSYの解析により平面構造は3,4–dihydroxycyclohexanecarboxylic acidと考えられた。各置換基の立体配置を検討したところ^{1}H–NMRにおいて1位の水素のシグナル（2.60ppm）が11.5Hzでトリプレットにカップリングしていたことから，1位の水素はシクロヘキサン環のアキシャル位に位置していることが明らかになった。同様に4位の水素（3.67ppm, ddd, J＝10.8，4.1，2.8Hz）もアキシャル位であると考えられた。一方，3位の水素はアキシャル–アキシャルカップリング定数（8～12Hz）を示さないことから，エクァトリアル位に配置していると考えた。^{1}H–NMRのケミカルシフトを文献値[13]と比較した結果，良好な一致を示した。以上の結果より，化合物3の構造を*t*–3，*t*–4–dihydroxycyclohexane–*r*–1–carboxylic acidと決定した（Fig. 3（3））。本化合物が茶葉中に含まれているという報告はこれまでなされていない。一方，乳酸菌（*Lactobacillus plantarum*）を播種し，製造されたサイレージ中で見出されており，キナ酸から本化合物への還元反応を触媒する酵素が*L. plantarum*より単離されている[14),15)]。碁石茶製造中の嫌気的発酵段階では，*L. plantarum*が主要な微生物として同定されていることから[3)]，茶葉に含まれるテオガリンなどのキナ酸誘導体が，*L. plantarum*の代謝により化合物3（*t*－3，*t*－4－dihydroxycyclohexane－*r*－1－carboxylic acid）へと変換されたと推察された。

化合物3の碁石茶中の含量は1.42mg/g d.w.，O_2^-消去活性は97.0units/mgであった。この結果をもとに化合物3の碁石茶のO_2^-消去活性への寄与率を求めたところ，0.45%とごく僅かであることが判明した。

4．碁石茶製造工程中のピロガロールの消長

碁石茶中の主要抗酸化成分であることが判明したピロガロールの製造工程中の含量の変化について調べた。製造工程ごとの茶葉の採取は，生葉，蒸し後，好気的発酵1～6日目，嫌気的発酵後，天日干し後（製品）の段階で行い，各抽出溶液中のピロガロール含量（mg/g d.w.）を調べた（Fig. 5）。測定の結果，ピロガロール含量はカビ付けを行う好気的発酵段階中に徐々に増加し，好気的発酵5日目で最大（20.2mg/g d.w.）となった。その後，嫌気的発酵，天日干しと工程が進むにつれて減少する傾向を示した。

発酵茶中に認められるピロガロールは，ガロタンニンがタンナーゼの作用により加水分解されて没食子酸が生成し，その没食子酸に脱炭酸酵素が作用して生成されると考えられている[16)]。また，田中ら[10)]の報告では，嫌気的発酵のみを経て製造される阿波晩茶よりも，好気的発酵の後に嫌気的発酵を経て製造される碁石茶と石鎚黒茶の方がより高いピロガロール含量を有することが示されている。本研究においても，碁石茶中のピロガロール含量は好気的発酵中に著しく増加したことから，抗酸化成分の生成に対して好気的発酵段階の重要性が示唆された結果となった。また，好気的発酵段階の後期から天日干し段階までのピロガロールの減少は，ピロガロールの酸素への曝露が原因と推察された。そこで実際に好気的発酵段階において，堆積した茶葉を上部，中部，下部に分けて採取し，各部位のピロガロール量を調べた。その結果，好気的発酵段階1日目から5日目のいずれにおいても，ピロガロール量は上部＜中部＜下部の順で多くなったことから，脱炭酸酵素の作用により生成したピロガロールが，酸素への曝露が少ない箇所でより多く残存していることが示された。

茶中でのピロガロールの存在，ならびにその機能性についての報告は現時点ではほとんどなされていない。一方で，微生物が製造に関与しない緑茶中にはピロガロールは含まれないが，ヒト試験において緑茶摂取後の尿中，あるいは紅茶摂取後の血漿にピロガロールが検出されるとの報告がなされている[10),17),18)]。これは，小腸においてエピカテキンガレート，エピガロカテキンガレートなどガレート型カテキンから生じた没食子酸が，さらにピロガロールへと代謝されたものと考えられている[19)]。したがって，ヒトの体内において，ピロガロールがカテキン誘導体として何らかの機能性に関与している可能性は高いと推察された。また，碁石茶をはじめとする後発酵茶は，不発酵茶，半発酵茶摂取時の小腸内におけるカテキ

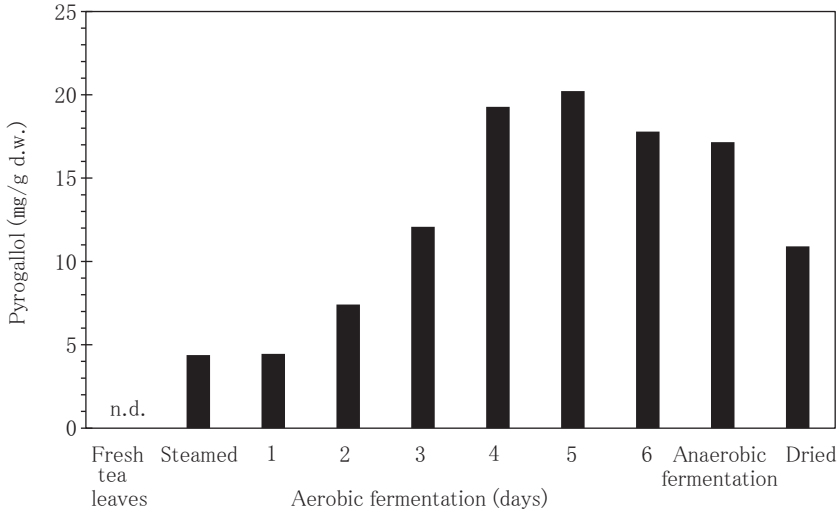

Fig. 5　Change in pyrogallol content during Goishi tea production

ン類の代謝を予めその製造中で再現し，カテキン類代謝物の含量を高めた茶とみなすことができると考えられた。

今後は，これまで確認されている碁石茶の各種生体調節機能と本研究において主要抗酸化成分であることが判明したピロガロールとの関連について追究する予定である。

要　　約

本研究では，高知県長岡郡大豊町で生産されている二段階発茶の碁石茶に含まれる抗酸化成分の解明に取り組んだ。各種手法による分画と構造解析の結果，抗酸化活性(O_2^-消去活性)を示す新たな含有成分として，ピロガロールと*t*–3,*t*–4–dihydroxycyclohexane–*r*–1–carboxylic acidを同定した。このうち，ピロガロールの碁石茶のO_2^-消去活性に対する寄与率は28.2%と高かったことから，ピロガロールを碁石茶に含まれる主要抗酸化成分の一つと判断した。さらに，ピロガロールが碁石茶製造の好気的発酵工程中に生成し，嫌気的発酵段階，ならびに天日干し工程を経ても残存していることを明らかとした。今後は，主要抗酸化成分であることが判明したピロガロールと碁石茶の各種機能性との関連について調べる予定である。

謝　辞　本研究に試料提供のご協力をいただきました大豊町碁石茶協同組合の皆様に心より感謝申し上げます。また，本研究は科学研究費補助金（23500959）の助成を受けたものです。

文　　献

1）加藤みゆき・田村朝子・大森正司・難波敦子・宮川金二郎・西村　修・亀田　弥：碁石茶製造における風味成分の変化とその特徴，家政誌，**28**，527～532（1994）

2）田村朝子・加藤みゆき・大森正司・難波敦子・宮川金二郎：後発酵茶に存在する微生物の特徴，家政誌，**45**，1095～1101（1994）

3）岡田早苗・高橋尚人・小原直弘・内村　泰・小崎道雄：碁石茶の発酵に関与する微生物，食科工，**43**，1019～1027（1996）

4）島村智子・松浦理太郎・森山洋憲・竹田匠輝・受田浩之：碁石茶製造工程におけるカテキン含量とスーパーオキシドアニオン消去活性の変化，食科工，**55**，640～644（2008）

5）宮村充彦・森山洋憲・邑田修三・横田淳子・吉岡三郎・宅間大祐・浜田篤秀・西岡　豊：コレステロール負荷家兎における後発酵茶「碁石茶」の高脂血症及び動脈硬化抑制効果，薬学雑誌，**128**，1037～1044（2008）

6）Yokota, J., Jobu, K., Yoshioka, S., Kashiwagi, T., Shimamura T., Moriyama H., Murata S., Ohishi M., Ukeda, H. and Miyamura, M.: The influence of Goishi tea on adipocytokines in obese mice, *Food. Chem*., **138**, 2210～2218（2013）

7）Yoshioka, S., Ju–ngam, T., Jobu, K., Yokota, J., Ohishi, M., Ukeda, H. and Miyamur, M.: The protective effects of Goishi tea against Influenza infection, *Jpn. Pharmacol. Ther*., **41**, 705～509（2013）.

8）Rösch, D., Krumbein, A. and Kroh, L. W.: Antioxidant gallocatechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn（*Hippophaë rhamnoides*）pomace, *Eur. Food Res. Technol*., **219**, 605～613（2004）

9）Mohammed A. E.–S. I.: Phytoconstituents and the study of antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of Rhus tripartita growing in Egypt, *J. Pharm. Phyto*., **4**, 276～281（2015）

10）田中　隆・永井沙知・四位拓也・松尾洋介・河野

功：茶カテキン腸内細菌代謝産物1,3-ジフェニルプロパン-2-オール類とピロガロールの日本産後発酵茶からの分離と定量，日食化誌，**18**，6～11（2011）

11）Nanjo, F., Mori, M., Goto, K. and Hara, Y.: Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **63**, 1621～1623（1999）

12）Yoshiki, Y., Kahara, T., Okubo, K., Sakabe, T. and Yamasaki, T.: Superoxide-and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activities of soyasaponin β g related to gallic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **65**, 2162～2165（2001）

13）Whiting, G. C. and Coggins, A.：(−) -3^{t}, $4^{t}-$ Dihydroxycyclohexane $-1^{c}-$ carboxylate, a new quinate metabolite of *Lactobacillus plantarum, J. Sci. Fd. Agric*., **24**, 897～904（1973）

14）Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K. and Schnürer, J.: Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage, *Appl. Environ. Microbiol*., **73**, 5547～5552（2007）

15）Whiting, G. C. and Coggins, R. A.: A new nicotinamide-adenine dinucleotide-dependent hydro-aromatic dehydrogenase of *Lactobacillus plantarum* and its role in formation of (−) *t*-3, *t*-4-dihydroxycyclohexane-*c*-1-carboxylate, *Biochem. J*., **141**, 35～42（1974）

16）Li, M., Kai, Y., Qiang, H. and Dongying, J.: Biodegradation of gallotannins and ellagitannins, *J. Basic Micribiol*., **46**, 68～84（2006）

17）Roowi, S., Stalmach, A., Mullen, W., Lean, M. E., Edwards, C. A. and Crozier, A.: Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans, *J. Agric. Food Chem*., **58**, 1296～1304（2010）

18）Van der Pijl, P. C., Foltz, M., Glube, N. D., peters, S. and Duchateau, G. S. M. J. E.: Pharmacokinetics of black tea-derived phenolic acids in plasma, *J. Funct. Foods*, **17**, 667～675（2015）

19）Schantz, M., Erk, T. and Richling, E.: Metabolism of green tea catechins by the human small intestines, *Biotechnol. J*., **5**, 1050～1059（2010）

（平成28年12月5日受付，平成29年2月9日受理）

食用植物中のニコチアナミン量と冷蔵保存および調理による変化

高 良 健 作*§・長 嶺　伸*・安次嶺稜弥*
宮 城 一 菜*・和 田 浩 二*

＊　琉球大学農学部

Quantification of Nicotianamine Content in Edible Plants: A Comparative Study under Fresh, Cold Storage, and Cooking Conditions

TAKARA Kensaku*§, NAGAMINE Shin*, ASHIMINE Ryoya*,
MIYAGI Kazuna* and WADA Koji*

＊　*Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus*, 1 *Senbaru, Nishihara, Okinawa　903–0213*

In this work, nicotianamine content in 142 plant parts of 79 edible plants species was quantified by high-performance liquid chromatography, with pre-column derivatization using 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. The change in nicotianamine content in vegetables during cold storage and cooking process was also investigated. Of the 142 plant part studied, nicotianamine was detected in 138 parts. The highest amount of nicotianamine was found in soybean seeds, 289.7μg g^{-1} FW, followed by snow pea seeds, 232.1μg g^{-1} FW. In a comparison of the nicotianamine content present in different parts of the bean plant belonging to *Fabaceae* family, the seedpod was found to contain a significantly lesser amount than the seed part. Two squashes, of the *Cucumis* family, the Kabocha squash seed and Butternut squash seed were also rich in nicotianamine content, which was found to be 149.6μg g^{-1} FW and 137.7μg g^{-1} FW, respectively. Furthermore, seeds of the White Sapote fruit had a relatively high nicotianamine content of 52.58μg g^{-1} FW. In the other four samples of this fruit, either nicotianamine was present in a significantly lesser amount or it could not be detected. The residual percentage of nicotianamine after a period of one week in cold storage was almost the same when compared to fresh samples. A comparison of four cooking methods of three vegetables revealed that the residual nicotianamine content dramatically decreased by 24.3% in beans during the boiling process, in contrast to raw kidney beans. On the other hand, the residual nicotianamine content was nearly the same or changed very little（103.2%－86.7%） in all tested samples after microwaving.

（Received Dec. 1, 2016；Accepted Feb, 20, 2017）

Key words：*nicotianamine, edible plant, cold strage, cooking, HPLC*
ニコチアナミン，食用植物，冷蔵保存，調理，HPLC

メタボリックシンドロームの予防として健康日本21（第二次）では野菜や果物摂取量の増加は国家的目標の一つに位置付けられ，同時に高血圧治療ガイドライン2014においても野菜・果物の積極的摂取が指導項目に含まれるなど，野菜および果物の積極的な摂取は高血圧症の予防や治療の上で食塩の制限とともに欠かせないものとなっている。野菜や果物に含まれる成分としてカリウムは食塩感受性高血圧にとっては降圧作用が認められ[1]，またγ－アミノ酪酸は交感神経を抑制することで血圧の低下に有効とされる[2]。

野菜や果物の降圧作用に関する先駆的な研究はアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害活性をターゲットとした探索が鈴木ら[3]により開始され，マメ類，果実類など一部の野菜や蕎麦に阻害活性が認められ，その阻害物質は加熱調理に安定な低分子化合物と報告している。その後，モロヘイヤ[4]，アシタバ[5]，ハヤトウリ[6]などの野菜のACE阻害活性物質としてニコチアナミンが分離され，さらに，植物性食品のニコチアナミン含量がACE阻害活性に相関があることが報告されている[7]。ACEは強力な昇圧ホルモンであるアンジオテンシンⅡを生成す

＊　〒903–0213　沖縄県中頭郡西原町千原１番地
§　Corresponding author, e-mail：k-takara@agr.u-ryukyu.ac.jp

る酵素であり，この酵素の阻害によって降圧効果がもたらされる。しかしながら，熱帯性野菜や果物を含む食用植物のニコチアナミンの網羅的定量はこれまで行われておらず，機能性食品開発の点で期待されている。そこで本研究では食用植物の網羅的ニコチアナミンの定量を部位別に行うとともに，冷蔵保存や加熱調理における安定性について調べた。

実 験 方 法

1．実 験 材 料

本研究で用いた食用植物は2015年３月から2016年６月の期間において沖縄本島中南部の農産物直売所やスーパーマーケットで購入した。全ての購入材料の産地は沖縄県産で，新鮮な材料を選択した。

2．材料の調製

33科79種の食用植物は入手後，材料を部位に切り分けてニコチアナミン定量測定に用いた（Table１）。このとき実験試料が均一になるよう，果実類，根菜類，野菜，イモ類は縦方向に８等分に切断し，各部分が均一に採取されるよう縮分して測定に供した。果実類は外果皮，中果皮，内果皮，胎座，種子に，マメ類はサヤと種子に，ウリ類は外果皮，中果皮，内果皮および種子に，葉菜類は茎，葉柄，葉身または内葉，外葉に分けたが，部位別に調製することが困難なものは地上部，葉，全果などとして測定に供した。測定はn＝４で行った。

3．冷 蔵 保 存

ニガウリ，ヨウサイ，およびクリカボチャの３種の野菜を冷蔵保存に用いた。ニガウリ果実は縦方向に４等分し，両端３㎝と種子および胎座を取り除き，このうち1/4を０日目の定量用試料に供した。残りはポリエチレンの袋に入れて口を封じ，冷蔵日数が２，５および７日目ごとに定量試料に供した。ヨウサイ（１束，約200ｇ）は一部の約30ｇを０日目の試料に供し，残りを濡らした新聞紙に包み，さらにポリエチレンの袋に入れて口を封じ，冷蔵日数が２，６，および８日目にその一部（約30ｇ）を測定試料に供した。クリカボチャ果実は縦方向に切断し，一部分はヘタ，外皮，種子，胎座を切除した果肉を０日目の測定に用いた．残りはポリエチレンの袋に入れて口を封じ，冷蔵日数が２，５および９日目ごとに縦方向に切り分け，０日目同様に切除した果肉を使用した。冷蔵保存実験にはいずれも家庭用冷蔵庫（SHARP, SJ-17J，冷蔵室内容量120ℓ，庫内温度10.5±4.5℃）を用いた。

4．調 理 野 菜

ニガウリ，インゲンマメ，およびクリカボチャの３種を加熱調理に用いた。調理項目および試料調製はChuahらの方法[8]を参考にし，茹で，電子レンジ，炒め，および揚げの４通りの調理を調理前の野菜と実験試料が均一になるよう以下の通り調製した。ニガウリは果実の両端部の３㎝と種子および胎座を切除した果肉を１辺が１㎝角，クリカボチャはヘタ，外皮，種子および胎座を切除後，１辺が１㎝角に，またインゲンマメは１㎝幅に切断した後，部位が偏らないよう５つに等分した。それぞれの調理条件は予備実験で各野菜の最適加熱時間を決定し，その条件をもとに４通りの調理を行った。茹で調理は直径16㎝のアルミ製の鍋でIHクッキングヒーター（アイリスオーヤマ，IHK-700，700W）にて30分加熱した後，野菜と茹で汁を回収した。電子レンジ（National, NE-EZ２）調理は出力500Wで１分間加熱した。炒め調理はIHクッキングヒーターを用い，直径16㎝のフライパンにナタネ油を引き，鍋の表面温度が140℃に到達した時点で各野菜を入れ，直ちに弱火に設定しニガウリおよびカボチャは３分30秒，インゲンマメは焦げやすかったため３分それぞれ加熱した。揚げはIHクッキングヒーターで直径16㎝の鍋にナタネ油を深さ２㎝まで入れ，油の温度が170℃に到達した時点でそれぞれの野菜を投入し，調理中の油温を170℃に保った。調理時間はニガウリとカボチャを３分30秒，インゲンマメは２分30秒とした。揚げ調理後の野菜はペーパータオルにより余分な油を除去した。調理後の野菜と茹で汁，さらに未調理の野菜試料はそれぞれ凍結乾燥後にニコチアナミン測定試料に供した。測定はn＝３で行い，測定結果はそれぞれの野菜の未調理試料のニコチアナミン量を100％とする残存率で表した。

5．試料液の調製

生の植物材料はそれぞれ４個ずつ分取し，冷蔵保存および加熱調理後に凍結乾燥した粉末材料は，３つずつ分取してそれぞれ秤量後，試料重量の1.0～71.6倍の精製水を加えてブレンダー（WARING），ホモジナイザー（IKA, T18）または乳鉢で，それぞれが均一になるよう摩砕した。摩砕液は15,000×gで20分間遠心分離（Hitachi Koki, himac CT15RE）し，上清を得た。この上清は，あらかじめメタノールと水でコンディショニングを行った逆相系カートリッジ（ADVANTEC, DISPO COLUMN C18H050）に通液し，脂溶性成分を吸着除去した。このカートリッジ通液を試料液とした。

6．9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride（FMOC-Cl）法によるニコチアナミンのHPLC定量

Wadaら[9]とKakeiら[10]の方法を一部改良して，9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride（FMOC-Cl）によるHPLCプレカラム誘導体化検出（FMOC法）により試料液中のニコチアナミンを定量した。1.5mℓマイクロチューブに50mℓの試料液を入れ，これに1.0Mホウ酸緩衝液（pH8.0）を100mℓ，1.0Mホウ酸緩衝液（pH8.0）に溶解した50mMEDTA-2Na溶液を100mℓ加えた。これにアセトニトリルで溶解した50mMFMOC-Clを50μℓ添加し，この溶液を60℃で15分加熱し，これに５％ギ酸溶液を100μℓ加えた後，15,000×ｇで５分間遠心分離した上清をHPLC分析に供した。HPLC分析は蛍光検出器RF-20Aを接続したProminence HPLCシステム（島津

Table 1 Nicotianamine content of edible plants and their parts

Family	Japanese name	Scientific name	common name	Part used	Nicotianamine (μg/g FW)	±SD
Abelmoschus	okura（maru）	*Abelmoschus esculentus*	okra	seed	47.57	7.17
				exocarp	26.33	11.15
	okura（gokaku）			seed	41.57	4.94
				exocarp	20.22	1.58
Anacardiaceae	mango	*Mangifera indica* Linn.	mango	flesh	4.31	0.12
Annonaceae	atemoya	*Annona squamosa* L. x *A. cherimola* Mill.	atemoya	flesh	7.66	1.47
Apiaceae	uikyoh	*Foeniculum vulgare* Mill.	fennnel	leaf blade	25.61	3.22
				leaf stalk	4.08	0.27
	coriander	*Coriandrum sativum* L.	coriander	leaf blade	13.49	3.29
				leaf stalk	0.50	0.05
	shima-ninjin	*Daucus carota* subsp. *sativus*	yallow carrot	hypocotyl	25.48	1.25
				root peel	11.44	1.34
	ninjin	*Daucus carota* subsp. *sativus*	carrot	hypocotyl	13.94	6.88
				root peel	13.01	4.50
	botanbofu	*Peucedanum japonicum* Thunb.	−	leaf blade	67.99	6.01
				leaf stalk	20.52	6.30
Araceae	satoimo	*Colocasia esculenta*（L.） Schott	taro	rhizome	1.91	0.39
	ta-imo	*Colocasia esculenta* Schott var. aquatilis Kitamura	taro	leaf blade	8.56	1.32
				stem	6.86	5.64
				rhizome	5.01	0.28
Asteraceae	gobou	*Arctium lappa* L.	burdock	root	14.17	0.26
	shokuyougiku	*Chrysanthemum* x *morifolium* Ramat.	chry santhemum	flower	12.51	1.23
	suizennjina	*Gynura bicolor*（Willd.） DC.	Okinawan spinach	leaf stalk, stem	8.73	0.48
				leaf blade	3.41	0.05
	nishiyomogi	*Artemisia indica* Willd. var. *orientalis*	Japanese mugwort	above-ground	12.54	1.99
	hosobawadan	*Crepidiastrum lanceolatum*	−	above-ground	10.51	1.11
	retasu	*Lactuca sativa* L.	lettuce	inner leaf	17.21	1.04
				outer leaf	9.14	2.78
Basellaceae	akazakazura	*Anredera cordifolia*	Madeira vine	propagule	5.19	0.22
Brassicaceae	karashina	*Brassica juncea* var. *cernua* Jorb. et Hem.	leaf mustard	leaf blade	28.82	0.10
				leaf stalk	11.01	0.49
	komatsuna	*Brassica rapa* var. *perviridis*	komatsuna	leaf blade	16.85	1.44
				leaf stalk	9.29	0.09
	kohrurabi	*Brassica oleracea* var. *gongylodes*	kohlrabi	whole	6.41	0.28
	hakusai	*Brassica rapa* var. *pekinensis*	Chinese cabbage	inner leaf	43.14	9.46
				outer leaf	14.30	3.80
	burokkori	*Brassica oleracea* var. *italica*	brocolli	flower bud	37.05	10.19
				leaf stalk	26.23	2.86
Bromeliaceae	painappuru	*Ananas comosus* L.	pineapple	flesh	2.16	0.11
Cactaceae	doragon-furutsu	*Hylocereus undatus*	pitaya, white	seed, endocarp	3.48	0.26
	doragon-furutsu	*Hylocereus costaricensis*	pitaya, purple	seed, endocarp	3.22	0.27
Caricaceae	papaiya	*Caricapapaya* Linn.	papaya	riped seed	25.69	0.72
				riped mesocarp	10.83	0.40
				unriped mesocarp	6.11	0.66
Chenopodium	fudansou	*Beta vulgaris* ssp. *cicla* ver. *cicla*	chard	leaf blade	7.94	2.44
				leaf stalk	5.59	0.50
Convolvulaceae	satsuma-imo	*Ipomoea batatas* L.	sweet potato	tuber	21.68	1.79
	yaeyamakazura	*Ipomoea batatas* L.	sweet potato leaf	leaf blade	15.07	6.73
				leaf stalk	9.40	7.31
	yousai	*Ipomoea aquatica* Forsk	water spinach	leaf stalk	12.24	0.41
				leaf blade	10.40	0.59
				stalk	6.45	0.14

(Continuation)

Family	Japanese name	Scientific name	common name	Part used	Nicotianamine (μg/g FW)	±SD
Cucumis	kaigua	*Cyclanthera pedata* (L.) Schrad.	caigua	placenta, exocarp	10.18	1.60
				placenta, seed	9.54	1.03
	kyuri	*Cucumis sativus* L.	cucumber	fruit, whole	7.25	0.96
				peel	6.38	0.75
	kuri-kabocha	*Cucurbita maxima* Duch.	kabocha squash	seed	149.61	4.58
				exocarp	100.08	14.15
				endocarp	95.64	6.38
				mesocarp	90.51	14.34
	goya	*Momordica charantia* L. var. *pavel*	bitter gourd	seed	31.91	3.21
				endocarp	20.70	0.61
				epicarp	10.89	1.59
	shima-kabocha	*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.	butternut squash	seed	137.70	3.28
				exocarp	107.02	3.82
				endocarp	89.36	13.76
				mesocarp	48.41	1.62
	suika	*Citrullus lanatus*	water melon	seed	25.98	2.46
				endocarp	15.92	0.67
				mesocarp	12.89	1.15
	tougan	*Benincasa hispida* Cogn.	wax gourd	endocarp	37.28	1.42
				mesocarp	7.33	0.13
	hayato-uri	*Sechium edule* Sw.	chayote	seed	137.87	13.05
				fruit, except seed	7.49	0.51
	hechima	*Luffa cylindrica* (L.) Roem.	sponge gourd	endocarp, seed	13.81	0.25
				mesocarp	6.98	0.18
	makuwa-uri	*Cucumis melo* var. *makuwa*	oriental melon	endocarp	43.60	0.85
				seed	41.94	3.73
				mesocarp	4.84	0.18
	meron	*Cucumis melo* L.	melon	endocarp	34.34	2.08
				seed	33.58	1.30
				mesocarp	6.46	0.47
	moui	*Cucumis melo* var. *conomon*	cucumber	seed	22.51	1.05
				endocarp	11.63	0.52
				mesocarp	1.93	0.07
Dioscoreaceae	yamu-imo	*Dioscorea alata* L.	purple yam	rhizome	3.63	0.21
Fabaceae	ingen-mame	*Phaseolus vulgaris* L.	kidney bean	grain, unripe	187.61	10.51
				seed pod	25.49	1.11
	ingen-mame Bikkuri-janbo	*Phaseolus vulgaris* L.	kidney bean	grain, unripe	175.49	15.04
				seed pod	18.95	1.28
	uzura-mame	*Phaseolus vulgaris* L.	mottled kidney bean	grain, unripe	230.50	8.14
				seed pod	9.47	0.64
	kinusaya	*Pisum sativum* L.	snow pea	grain, unripe	232.09	4.71
				seed pod	75.94	0.83
	kuro-mame	*Glycine max* (L.) Merr. ver. Black Jet	soy bean	seed	289.65	13.40
				seed pod	84.01	10.32
	sikaku-mame	*Psophocarpus tetragonolobus*	winged bean	seed	93.36	3.05
				seed pod	41.94	0.26
	jyuroku-sasage	*Vigna unguiculata* ver. *sesquipedalis*	yard long bean	seed	107.22	4.65
				seed pod	27.45	1.79
	nata-mame	*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.	sword bean	seed	132.55	2.44
				seed pod	63.56	2.84
Liliaceae	ao-negi	*Allium fistulosum* L.	Welsh onion	leaf top	71.62	10.40
				leaf blade, leaf sheath	61.69	6.82
				bulb, root	31.05	0.49
				leaf sheath	5.25	0.62
	shima-rakkyou	*Allium chinense* G. Don	shallot	bulb, leaf sheath	9.20	0.91
	tama-negi	*Allium cepa* L.	onion	leaf	20.79	0.56
	nira	*Allium tuberosum* Rottler ex Spreng.	Chinese chive	leaf blade, leaf sheath	48.98	1.32
	ninniku	*Allium sativum* L.	garlic	leaf	29.48	1.16

(Continuation)

Family	Japanese name	Scientific name	common name	Part used	Nicotianamine (μg/g FW)	±SD
Malpighiaceae	aserora	*Malpighia emarginata* Sessa & Moc. ex DC.	acerola	seed	15.33	1.18
				fruit, except seed	10.03	0.21
Malvaceae	rozeru	*Hibiscus sabdariffa* Linn.	roselle	sepal	10.65	0.28
Musaceae	sima-banana	*Musa acuminata*	banana	fruit, expect epicarp	0.87	0.12
				epicarp	0.58	0.01
Myrtaceae	banjirou	*Psidium guajava* Linn.	guava, white	mesocarp	nd	nd
				exocarp	nd	nd
				endocarp, seed	nd	nd
	banjirou	*Psidium guajava* Linn.	guava, red	exocarp	3.32	0.63
				mesocarp	2.87	1.95
				seed	7.27	3.05
Oxalidaceae	gorensi	*Averrhoa carambola* Linn.	starfruit	fruit, whole	nd	nd
Passifloraceae	passhonn-frutsu	*Passiflora edulis* Sims	passion fruit	flesh and seed	50.84	1.90
Piperaceae	hihatsumodoki	*Piper retrofractum* Vahl	Balinese long pepper	leaf blade	14.52	1.52
Poaceae	kuro-kome	*Oryza sativa* subsp. *javanica*	black rice	seed, whole	7.05	0.62
	yangukohn	*Zea mays* L.	corn, young	grain	2.45	0.05
Portulacaceae	sibiran	*Talinum fruticosum*	Ceylon spinach	stem, leaf stalk	1.52	0.10
				leaf blade	6.24	0.08
Rhamnaceae	indo-natsume	*Ziziphus mauritiana* Lam.	Chinese apple	fruit	19.42	5.31
Rubiaceae	yaeyamaaoki	*Morinda citrifolia* L.	noni	fruit, whole	11.05	0.91
Rutaceae	shiikuwasa	*Citrus depressa* Hayata	shikuwasa	seed	44.41	0.70
				peel	14.32	0.32
				juice	3.48	0.19
	howaitosapote	*Casimiroa edulis* La Llave et Lex.	white sapote	seed	52.58	9.17
				pericarp	9.98	0.68
Sapotaceae	kanisuteru	*Pouteria campechiana* (H.B.K.) Baehni	canistel	mesocarp	81.59	7.95
Solanacea	kidachi-tougarashi	*Capsicum frutescens* L.	chili pepper	fruit	44.97	1.09
	tomato	*Solanum lycopersicum*	tomato	exocarp, mesocarp	20.21	0.47
				placenta, seed	17.01	0.27
	nasu	*Solanumm elongena* L.	eggplant	epicarp	13.09	0.82
				fruit, expect epicarp	9.59	0.53
Xanthorrhoeaceae	akinowasuregusa	*Hemerocallis fulva* L. var.*sem pervirens*	daylily	leaf	45.86	0.57

製作所）で，以下の条件で行った。カラムはDevelosil ODS-SR-3（3.0×150㎜，野村化学），プレカラムはopti-guard 1 ㎜ C18（Optimize Technologies）を用い，カラム温度35℃，流速0.4㎖/minで溶出した。移動相は0.5%ギ酸溶液（A液）とアセトニトリル（B液）を用い，分析0分を20%Bとし，その後14分で100%Bまで直線的に増加させた。分析試料はオートサンプラーを用いて2 μℓ導入し，溶出液は励起波長266㎚，蛍光波長305㎚で検出した。この条件により2分子のFMOCと蛍光誘導体化したニコチアナミンは13分付近に選択的で高感度に検出できる。定量は外標準法とした。すなわちニコチアナミン（Toronto Research Chemicals）を標準品に使用して，ピーク面積から作成した検量線をあらかじめ作成し，試料液中のニコチアナミン量を新鮮重量g当たりのμgに換算した。

7．統 計 処 理

ニコチアナミン量の測定値は多重比較検定法(Tukey-Kramer）法により有意差（$p<0.05$または$p<0.01$）を検定した。

実験結果および考察

1．ニコチアナミン定量法

先の研究では生体アミノ酸分析システム[11),12)]を用いたニコチアナミンの分析例があるが，*o*－フタルアルデヒドによる蛍光ラベル化するポストカラム誘導体化蛍光検出法[6),7)]で検出感度や分析時間の点で改善された。一方，誘導体にせず直接定量した例では，イオン交換能を併せ持ったODSカラム分離の後MS/MSで検出した例[13)]，や親水性HILICカラム分離の後にMSで検出した例[14)]がある。そこで私たちは先にニコチアナミンの直接定量法をHILICカラム分離とESI-MS/MSによる検出を検討した。しかしながら，夾雑物の多い試料液の場合ではニコチアナミンの感度が低下するイオンサプレッションが観察された（データ未記載）。そこでニコチアナミンを誘導体化する分析法に変更し，FMOC-Clによるラベル化を選択した。本法では抽出液中のニコチアナミンは2分子のFMOC-Clと瞬時に安定な蛍光誘導体を形成し，またODSカラムへの保持が強く，選択的で高感度定量が可能となった[9),10)]。なお本研究では蛍光検出器を接続した汎用型

HPLCで多種試料のニコチアナミン定量を行った。

2．新鮮食用植物のニコチアナミン量

Table 1に新鮮食用植物79種，142試料のニコチアナミン量を新鮮重量g当たりで示した。ニコチアナミンは138の試料で検出され，上位をマメ科（*Fabaceae*）種子が占め，クロマメ種子（289.7μg），キヌサヤ種子（232.1μg），ウズラマメ種子（230.5μg）などで顕著であった。伊澤ら[15]によるとマメ類のなかでもインゲンマメ属（*Phaseolus*），エンドウ属（*Pisum*），ダイズ属（*Glycine*）はササゲ属（*Vigna*）より有意にニコチアナミン含量が多かったと報告している。今回の分析においても同様の傾向が認められ，ササゲ属のジュウロクササゲ種子（107.22μg）はその他のインゲン属，エンドウ属およびダイズ属より低値となった。なお若莢を食する熱帯アジア原産のシカクマメは種子（93.36μg）および莢（41.94μg）にニコチアナミンの存在が認められ，マメ類のニコチアナミンは莢よりも種子に有意に高含有していることがわかった。

マメ科に続いてニコチアナミン含有量の上位を占めていたものは，ウリ科（*Cucumis*）でクリカボチャ種子（149.61μg），ハヤトウリ種子（137.87μg），シマカボチャ種子（137.70μg）であり，種子以外の果実部位に比べてニコチアナミン含量が有意に高かった（n＝9，$p<0.01$）。一方，カボチャでは，種子以外の外果皮や中果皮にも他の試料よりニコチアナミンが多く，ニコチアナミンの給源として最も優れていると考えられた。また，本研究により初めてメロンやスイカにもニコチアナミンの存在が確認された。なおニガウリ果肉のニコチアナミン含量を，林ら[6]は15μg/gFW，伊澤ら[7]は22.0mg/dry100 g（水分含量95%で換算すると11μgに相当）と報告しており，今回のニガウリ外果皮の10.89μgとよく一致した。

葉菜類ではユリ科（*Lillaceae*）のアオネギ（葉身＋葉鞘61.69μg）やニラ（葉身＋葉鞘，48.98μg），アブラナ科のハクサイ（内葉43.14μg），ブロッコリー（花蕾37.05μg），カラシナ（葉身28.82μg）に多く認められ，伊澤ら[7]の結果とほぼ一致した。葉菜類を部位別で比較したところ，アオネギは葉先の葉身上部（71.62μg）が最も含量が高く，葉身下部（61.69μg），さらに下部の葉鞘部（5.25μg）でニコチアナミン含量が低い結果となった。ヒルガオ科（*Ipomoea*）のヨウサイでは茎（6.45μg）が葉鞘部（5.25μg）より高く，同じくヒルガオ科のヤエヤマカズラでは葉身（15.07μg）が葉柄（9.4μg）より多く認められた。さらにコマツナにおいても葉身（16.85μg）が葉柄（9.29μg）より高かった。これらの結果から葉菜類ではニコチアナミン含量は，葉身＞葉柄＞葉鞘＞茎であると推察された。一方でハクサイでは内葉（43.14μg）が外葉（14.30μg）より高く，レタスも内葉（17.21μg）が外葉（9.14μg）より高かったことから，結球する葉菜類ではニコチアナミンの含量は，内葉＞外葉と部位で異なる傾向が観察された。

対照的に，熱帯性の野菜・果物であるバショウ科（*Musaceae*）のシマバナナ，セリ科（*Apiaceae*）のコリアンダーの葉柄では1μg以下，さらにカタバミ科（*Oxalidaceae*）のスターフルーツ果実やフトモモ科（*Myrtaceae*）グアバ白色果実の3試料では検出限界以下だった。

ニコチアナミンは高等植物体では必須の物質と考えられ，鉄などの金属イオンを錯体化して各部位へ輸送すると推察されている。実際ニコチアナミンを激減させた形質転換タバコでは花や種子へ金属が十分に供給されず不稔になる[16]。また，イネ科植物でもニコチアナミン合成酵素（NAS）を高発現させることで種子中の鉄や亜鉛含量が増加することが認められている[17]。本研究によってニコチアナミンが特に種子や葉身における金属輸送で重要な役割を担っていることが示された。なおマメ類の種子でニコチアナミンが高含有している理由については，NAS活性やニコチアナミンと二価鉄との錯体化合物のトランスポーターなどの関与が想定されるが，詳細は不明である。一方で，ニコチアナミンは強力なACE阻害活性があることが知られ，ACE阻害効果による血圧上昇抑制や，さらにアルツハイマー型認知症の改善効果について報告がある[14]。本研究による網羅的な食用植物のニコチアナミン定量により日常的なニコチアナミンの摂取量の算出がおおよそ可能となった。

3．冷蔵保存および加熱調理による変化

野菜は調理直前まで一般的に冷蔵で保蔵することが多いが，保冷においては植物体の呼吸や水分の蒸散が起き，また調理においては成分の流出や加熱によって残存量に大きな違いが生じることが予想されている。特に水溶性成分はそれが顕著であることが知られる[18]。

そこで実際に3種類の野菜を用いて冷蔵保存と加熱調理による影響を調べた。その結果，ニガウリ，ヨウサイ，およびクリカボチャの3種の野菜では多少の増減はある

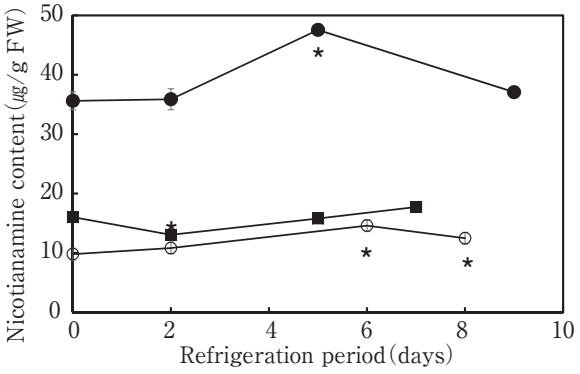

Fig. 1　Change in nicotianamine content in vegetables during storage in a refrigerator

● Kabocha squash, ■ Bitter gourd, ○ Water spinach.
Each value is expressed as the mean ± SD（$n=3$ to 4）and * indicates values that are the significantly different compared to Day 0（$p<0.05$）.

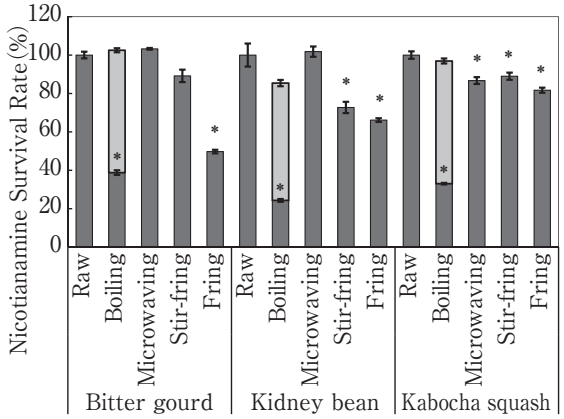

Fig. 2 Nicotianamine survival rate by four cooking process in three vegetables

Each value is expressed as the mean ± SD（n＝3）and values that are significantly different from each raw vegetable（$p<0.05$）are indicated by an asterisk（*）. The light-grey colored for the boiling experiment show the nicotianamine content of the broth after boiling.

が，いずれの野菜において冷蔵保存中のニコチアナミン含量に大きな変化はなかった。このことからニコチアナミンは1週間程度の冷蔵保存では植物体中で安定に存在することがわかった（Fig.1）。なお長期的な冷蔵，冷凍保存での安定性，さらには追熟が進行する果物類については今後の検討課題である。

ヘチマ，インゲンマメ，およびクリカボチャの3種の野菜を4通りの加熱調理を行ったところ，インゲンマメ，カボチャ，ニガウリの茹で調理でそれぞれ24.3%，33.0%，および38.8%と著しく減少した（Fig.2）。なお，このときの茹で汁のニコチアナミン量を定量したところ，それぞれの未調理野菜のニコチアナミンの61.1%，63.8%，および63.7%に相当し，これを野菜に残存した量と合わせると，インゲンマメで85.4%，カボチャで96.8%，ニガウリで102.5%のニコチアナミン量となった。この結果は水溶性のニコチアナミンが，茹で調理で容易に損失することを裏付けるもので，ニコチアナミンが納豆や醤油，味噌の製造時に大豆煮汁へほとんど排出した報告[12]とよく一致した。一方，ニコチアナミンの残存率で比較すると，いずれの野菜も，茹で＜揚げ＜炒め＜電子レンジとなり，電子レンジのマイクロ波照射加熱は未調理と比較し86.7%から103.2%の残存率であった。なおヘチマ，シカクマメ，およびカボチャを85℃，120分煮込んだ場合でも調理前と比べニコチアナミン総量がほぼ変わりがなく（データ未記載），煮込み料理で損失したニコチアナミンは比較的安定して煮汁に残存することが推察された。しかしながら，ニコチアナミンはアミノ基を有することから，メイラード反応に関与することが予想され，色調変化やフレーバーなどへの影響については今後の検討課題である。

要　約

食用植物79種，142部位のニコチアナミンを9-fluorenylmethoxycarbonyl chlorideを用いたプレカラム誘導体化法による高速液体クロマトグラフィーで定量した。さらに冷蔵保存および加熱調理した時の野菜中ニコチアナミン含量の変化も調べた。その結果，ニコチアナミンが136部位で検出され，このうち最も含量が高かったのはクロマメ種子（289.7μg/g新鮮重）で，キヌサヤ種子（232.1μg/g新鮮重）がそれに続いた。マメ科では種子部に比べサヤ部でニコチアナミン含量が著しく低かった。またウリ科ではクリカボチャ種子（149.61μg/g新鮮重），シマカボチャ種子（137.70μg/g新鮮重）で含有量が高く，いずれもカボチャであった。果物類ではホワイトサポテ種子（52.58μg/g新鮮重）でニコチアナミン含量が高かった。一方，4試料はニコチアナミンが検出されなかった。3種の野菜を1週間冷蔵したところ，ニコチアナミン量はいずれの野菜も大きな変化はなかった。また野菜3種のニコチアナミン量の残存率を4通りの調理法で処理した結果，インゲンマメを茹で調理した時に残存率が24.3%と最も低くなり，茹で調理ではいずれの野菜も含有量が大きく減少した。一方，電子レンジによる調理は86.7%から103.2%と残存率が高かった。

謝　辞　予備実験で用いた精製ニコチアナミンを木元幸一東京家政大学教授，並びに青柳康夫女子栄養大学教授より提供して頂きました。ここに感謝申し上げます。なお本研究は，農林水産省委託プロジェクト研究「地域の農林水産物・食品の機能性発掘のための研究開発」の補助を受けて行った。

文　献

1）吉村　学，高橋伯夫，中西　正：ナトリウム，カリウム，カルシウム，マグネシウムの昇圧・降圧機序と高血圧食事療法，栄養学雑誌，**49**（2），53～62（1991）

2）Vemulapalli, S. and Barletta, M.: The role of the sympathetic nervous system in the cardiovascular effect of systemically administered gamma-aminobutyric acid. *Arch. Int. Phamacodyn. Ther*. **267**, 46～58（1984）

3）鈴木建夫・石川宣子・目黒　熙：食品中のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害能について，日農化会誌，**57**（11），1143～1146（1983）

4）Kimoto, K., Kuroda, Y., Saito, Y., Yamamoto, J., Murakami, T. and Aoyagi, Y.: Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from Morokheiya（*Corchorus olitorius*）. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **4**（3），223～226（1998）

5）Shimizu, E., Hayashi, A., Takahashi, R., Aoyagi,

Y., MURAKAMI, T. and KIMOTO, K.: Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitor form Ashitaba（*Angelica keiskei*）on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **45**, 375～383（1999）

6）林あつみ・中山知子・青柳康夫・木元幸一：ハヤトウリからのニコチアナミン単離精製とその定量法の確立，日食科工誌，**52**（4），154～159（2005）

7）伊澤華子・青柳康夫：植物性食品のニコチアナミン含量とアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性，日食科工誌，**59**（7），348～353（2012）

8）CHUAH, A. M., LEE, Y. C., YAMAGUCHI, T., TAKAMURA H., YINM, L. J. and MATOBA, T.: Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chem*. **111**, 20～28（2008）

9）WADA, Y., YAMAGUCHI, I., TAKAHASHI, H., MORI, S. and NISHIZAWA, N. K.: Highly Sensitive Quantitative Analysis of Nicotianamine Using LC/ESI-TOF-MS with an Internal Standard. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **71**, 435～441（2007）

10）KAKEI, Y., TAMAGUCHI, I., KOBAYASHI, T., TAKAHASHI, M., NAKANISHI, H., YAMAKAWA, T. and NISHIZAWA, N. K.: A highly sensitive, quick and simple quantification method for nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid from minimum samples using LC/ESI-TOF-MS achieves functional analysis of these components in plants. *Plant Cell Physiol*., **50**, 1988～1993（2009）

11）木下恵美子・山越　純・菊池　護：醤油中の血圧降下物質について，醸協，**89**（2），126～130（1994）

12）竹中哲夫・村山崇志・竹中陽子：大豆煮汁からのニコチアナミンの単離と加熱処理による変動，日食科工誌，**56**（1），6～13（2009）

13）YAMAGUCHI, H. and UCHIDA, R.: Determination of nicotianamine in soy sauce and other plant-based foods by LC-MS/MS, *J. Agr. Food Chem*., **60**, 10000～10006（2012）

14）高田　晃：カボチャでアルツハイマー病改善，ニコチアナミンによる記憶改善とその作用解明，浦上財団研究報告書，**18**，24～30（2011）

15）伊澤華子・吉田　望・白貝紀江・青柳康夫：豆類のニコチアナミン含量とアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害活性，日食科工誌，**55**（5），253～257（2008）

16）TAKAHASHI, M., TERADA, Y., NAKAI, I., NAKANISHI, H., YOSHIMURA, E., MORI, S. and NISHIZAWA, N. K.: Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development, *Plant Cell*, **15**, 1263～1280（2003）

17）MASUDA, H., USUDA, K., KOBAYASHI, T., ISHIMARU, Y., KAKEI, Y., TAKAHASHI, M. HIGUCHI, K., NAKANISHI, H., MORI S. and NISHIZAWA, N. K.: Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene *HvNAS* 1 increase iron and zinc concentrations in rice grains, *Rice*, **2**, 155～166,（2009）

18）斎藤芳枝・細田裕子・畑山富子：野菜の貯蔵中におけるアミノ酸および糖の変化について，東京家政大学研究紀要，**15**，33～41（1975）

19）渡邊智子・鈴木亜夕帆・熊谷昌士・見目明継・竹内昌昭・西牟田守・萩原清和：植物性食品に含まれる栄養素の調理による変化率の算定と適用，栄養学雑誌，**62**（3），171～182（2004）

（平成28年12月1日受付，平成29年2月20日受理）

リンゴ‘秋映’の葉とらず栽培の優位性ならびに果実の「柔さ」に関与する品質要因について

深井洋一[*1†§]・佐久間　淳[*2]

＊1　元一般社団法人長野県農村工業研究所
†　現所属：㈱クルークダイニング
＊2　京都工芸繊維大学繊維学系

The Advantage of Cultivation without Leaf-Pluck and the Factors Affecting the “Softness” of Apples of ‘AKIBAE’

FUKAI Yoichi[*1†§] and SAKUMA Atsushi[*2]

＊1　*Agricultural Technology Institute of Nagano Farmers' Federation, 787−1 Suzaka, Suzaka, Nagano　382−0084*
†　*Cloocdining Co., Ltd., 670−5, Toyooka, Suzaka, Nagano　382−0021*
＊2　*Division of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto　606−8585*

Cultivation of apples of ‘AKIBAE’ without leaf-pluck is suggested to be significantly different from the traditional cultivation methods and thought to reduce labor hours.

Cultivation without leaf-pluck resulted in higher sugar content (without Shadow light Brix), and improved the fruit quality, as determined using non-destructive analytical techniques.

We found a strong correlation between the softness of the fruit and the starch index when adjusted for parameters such as fruit maturity, pH, acidity, and hardness. The pH and acidity were negatively correlated, while a positive correlation was observed between the hardness of inner flesh and outer softness. Thus, the hardness of inner flesh as a variable had a strong effect on the objective variable, outer softness.

(Received Aug. 25, 2016；Accepted Jan. 26, 2017)

Key words：*apple, cultivation, softness, quality factor, physicochemical factor*
リンゴ，栽培，柔さ，品質要因，物理化学的因子

近年では，農業生産者の高齢化と後継者不足が深刻な問題になっている。わが国を代表する果実であるリンゴにおいても，同様の問題を抱え，栽培管理として剪定，摘果，摘葉等の多くの作業を伴うため生産者の負担となっているのが現状である。栽培管理の省力化には，摘葉の効果である着色管理を省いた「葉とらずリンゴ」[1]の栽培が行われているが，葉陰により着色が劣ることから，外観を重視する現行の流通には適合し難いために，その生産は限定されたものになっている。しかし，2015年に環太平洋戦略的経済連携協定（TPP）が合意され，果実およびその加工品についても他国との競争にさらされる現実に直面することになり，栽培過程において省力化・低コスト化が図られ，さらに食味品質が伴えば，競争力強化の栽培方法になる可能性を秘めている。

「葉とらずリンゴ」に関しては，栽培方法[1)~3)]および市場性[4)]に関する調査報告がある。一方，慣行の摘葉処理について，摘葉時期やその程度がリンゴの果実品質に及ぼす影響を調べた多くの報告[5)~8)]があるが，これらの中では「葉とらず」の影響も比較していることになる。

本調査では，長野県オリジナル品種のリンゴ3兄弟の中で，品種‘秋映’を供試し，同一圃場の中で慣行の摘葉栽培法と葉とらず栽培を設置して，作業時間の省力性

＊1　〒382−0084　長野県須坂市大字須坂787− 1
†　〒382−0021　長野県須坂市大字豊丘670− 5
§　Corresponding author, E-mail : fukai@cloocdining.co.jp
＊2　〒606−8585　京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町

を検証した。また野外での収穫場面での非破壊測定を想定して，既報[9]と同様に，弾性係数・ヤング率という物理学理論による「柔さ」について，多数点（230果）に渡る調査を行い，硬度の関係および食味に関わる物理化学的因子を明らかにするとともに，「柔さ」からの果実品質の予測を検討したので報告する。

実 験 方 法

1．調 査 圃 場

JAながの飯綱支所管内，飯綱町倉井の小林孝英氏所有の約30 a の‘秋映’のわい化樹（6年生）リンゴ園の中に，圃場として試験区の葉とらず栽培および慣行区（摘葉）の各3樹を設置した。

2．調 査 方 法

（1）作業時間　慣行区の摘葉作業を平成27年9月16日および9月28日の2回実施し，試験区の葉とらず栽培では行わない作業時間を計測した。

（2）果実の品質調査　平成27年10月8日に葉とらず栽培（試験区）および摘葉栽培（慣行区）を収穫した。非破壊調査は，各230果について果実重，着色指数は果実表面色カラーチャートにより，最淡色を1，最濃色を5として5段階で判定した。糖度（Brix）は非破壊糖度計（N-1，㈱メカトロニクス製）により，陽光面および陰光面を測定した。柔さは既報[9]と同様に，柔さ計測装置（㈱堀内電機製作所製SoftMeasure・5Nタイプ）により果実の外周を測定した。

分析調査は，その内の試験区と慣行区の各10果について，デンプン指数はヨウ素溶液によるヨード・デンプン反応による染色の程度について，完全消失を1～完全染色を5として5段階で判定した。既報[9]と同様に調製した果汁について，pHはpHメータ（㈱堀場製作所，F-52），糖度はデジタル屈折計（㈱アタゴ，RX-5000α），酸度は滴定酸度法により行った。硬度も既報[9]と同様に，果実の外周および果肉断面（以下，果肉と表記）について，レオメータ（不動工業㈱：NRM-2010J-CW）により測定した。

各実験のデータは，平均値および標準偏差で示しスチューデントのt検定を行った。無相関の検定および重回帰式はExcel統計解析アドインソフトを用いた。

実験結果および考察

1．作業時間の省力性

作業時間の省力性を検証したところ，葉とらず栽培（試験区）は，葉摘み作業がなく，摘葉（慣行区）との間に有意差があり省力性を認めた。10 a 当たりで39時間余りの作業時間が省力されることがわかった（表1）。着色管理に要する時間の全国平均は63.2時間[10]であり，本調査結果とは作業時間に差がある。これは普通樹と本調査のわい化樹の特性である，密植し樹高を低く仕立て，集約的に栽培することで作業効率を向上[11]させる栽培樹法の違いに起因している。

リンゴの栽培管理のうち，着色管理としての摘葉は，年間栽培管理作業の20%以上を占め，収穫作業と並行するため生産者への負担が指摘[1]されており，摘葉の省略は作業時間の省力性への効果は大きいことが示された。

摘葉における作業性は，摘葉時間（秒/枚/人）と1果当たりの摘葉数の間には高い負の相関（$r = -0.908$）が明らかにされている[6]。摘葉時期については，収穫前60日および40日が果実品質に悪影響を及ぼすのに対して，20日前は着色改善が図られ樹体への影響が少ないとする報告[7]がある。また，近年では葉摘み作業の摘葉剤による代用の検討もされており，落葉後の葉果比を60にして着果量を制限することで，着色の良好な果実となり，労働時間が60%削減されるとしている[12]。

2．果実品質に及ぼす影響

葉とらず栽培は，非破壊測定において着色指数が低く，Brixは陽光面が高く陰光面が低い有意差を認めた（表2）。分析調査では陽光面および果汁のBrixが葉とらず栽培は有意に高く，酸度が低いことが示された（表3）。また，有意差を認めないが葉とらず栽培は，デンプン指数，硬度，柔さが低い傾向であった。葉とらず栽培は，Brixでは非破壊の陰光面が低くなったが，果汁におけるBrixが高いことから果実全体の糖度は高まることが示唆された。これらの葉とらず栽培に認められた着色ムラおよび糖度の増加については栽培技術[1]，消費者評価[4]の視点で符合する報告がある。

3．相関性の検証

得られた分析結果について，その分析項目間の相関関係を調べるために，無相関を検討した（表4）。

正相関はデンプン指数–酸度，Brix陽光面–Brix果汁，酸度–硬度（外周・果肉），果肉–柔さ，負相関はBrix陽光面–着色指数，pH–酸度，pH–硬度（外周・果肉）であった。特に熟度に関わるデンプン指数，pH，酸度，硬度，柔さにおいては有意差が顕著であり，pH－酸度の負相関，果肉硬度－柔さの正相関の相関係数が高かった。

既報[9]では，長野県産リンゴの‘シナノゴールド’を5か月間経時的に貯蔵して，果肉の硬度および柔さの高い相関（0.916，$p < 0.05$）を認めており，本調査結果と符合している。柔さについて表面部の果皮を押さえて果実内部の果肉の食感の情報が得られるのは，押込試験における圧子への試料からの反作用の力が試料内部の作用によって顕れるという作用・反作用の法則に起因していると推察[13]している。

なお，表2および表3の柔さ測定値の標準偏差は，硬度と比べると高くなっている。このことについて，非破壊でモノの柔さを表す物性値であるヤング率（kPa）は，理論的には応力とひずみの比によって定義されるものであるが，荷重値で評価する硬度（kg）と比べて，微妙な食感を評価できる一方で，感度が高い故にバラつきが生

表 1　慣行栽培の葉摘み作業時間

葉摘み	作業時間	作業果数	作業効率	作業時間	備考
	（秒）	（個）	（秒/果）	（10a/時間）	
1 回目	1,451	230	6.3	21.0	9 月16日
2 回目	1,251	230	5.4	18.1	9 月28日
計	2,702	460	5.9	39.2	

注）脚立使用。
10 a 当たりの作業時間は果数を12,000として算出。
葉とらず栽培（試験区）では，葉摘み作業がない（0 時間）。
作業時間の慣行区と試験区に有意差を認めた（$p<0.05$）。

表 2　葉とらず栽培の果実品質に及ぼす影響（非破壊）

栽培区分		果実重（g）	着色指数	Brix		柔さ（kPa）
				陽光	陰光	
試験区	平均値	278	4.8	15.1	13.7	12,770
	標準偏差	26.7	0.5	1.5	1.4	4,095
慣行区	平均値	273	5.0	14.2	14.3	12,058
	標準偏差	41.5	0.1	1.6	1.3	3,962
有意差		ns	**	**	**	ns

注）ns：有意差なし，*：$p<0.05$，**：$p<0.01$
n＝230

表 3　葉とらず栽培の果実品質に及ぼす影響

栽培区分		果実重（g）	着色指数	デンプン指数	pH	Brix			酸度	硬度（kg）		柔さ
						陽光	陰光	果汁	（%）	外周	果肉	（kPa）
試験区	平均値	282	4.8	1.9	3.5	14.8	12.8	14.6	0.45	7.7	8.5	11,300
	標準偏差	25.5	0.6	0.4	0.1	1.5	2.2	0.6	0	0.6	0.4	4,717
慣行区	平均値	291	5.0	2.1	3.5	13.7	13.6	13.8	0.49	7.8	8.6	13,177
	標準偏差	41.3	0.0	0.4	0.1	0.9	1.3	0.5	0.1	0.8	0.8	2,695
有意差		ns	ns	ns	ns	*	ns	**	*	ns	ns	ns

注）ns：有意差なし，*：$p<0.05$，**：$p<0.01$
n＝10

表 4　相関関係

単相関		果実重	着色指数	デンプン指数	pH	糖度			酸度	硬度	
						陽光	陰光	果汁		外周	果肉
着色指数		−0.256									
デンプン指数		0.015	−0.016								
pH		0.257	−0.114	−0.363							
Brix	陽光	−0.049	−0.544*	0.296	−0.144						
	陰光	−0.169	0.040	−0.080	0.178	−0.022					
	果汁	−0.228	0.159	−0.128	−0.033	0.528*	0.027				
酸度		−0.140	−0.003	0.699**	−0.776**	0.145	−0.131	−0.206			
硬度	外周	0.019	0.167	0.407	−0.509*	0.009	−0.337	−0.102	0.476*		
	果肉	−0.435	−0.186	0.280	−0.601**	0.299	−0.345	−0.046	0.604**	0.322	
柔さ		−0.145	−0.187	−0.044	−0.413	0.001	−0.206	−0.251	0.342	0.122	0.777**

注）無相関の検定　*：5％，**：1％
n＝20

じている。一方の物理的に穴を開ける手法である果肉硬度は，測定値の安定性は高いが，相対的に感度が低く微妙な違いは表し難いといえる。両者は表4が示すように1％危険率で有意な相関（0.777，$p<0.01$）を認めており，感度を抑えてバラつきの少ない柔さシステムの開発を課題としながらも，非破壊で測定できる柔さ計測システムの利用価値は大きいと判断している。

4．柔さに関わる重回帰式

野外における収穫場面での活用を想定し，非破壊による柔さ計測からの果実品質との関係を明らかにするために，目的変数を柔さ（Y），説明変数をその他の分析項目として，増減法により重回帰式を算出して検討した。

Y＝1.192果肉硬度－0.292デンプン指数
＋0.406果実重－0.243Brix陽光面
＋0.245Brix陰光面＋2.5E－15
（重相関係数：0.911，$p<0.01$）

重回帰式は，果肉硬度の関与が大きいことが示された。

リンゴの非破壊計測については，青森県ではリンゴ収穫適期の判断方法として，着色過程を定量的にとらえることによる簡易モニタリングシステムの指標化[3]を葉とらず栽培も含めた圃場を設置して検討している。このことにより熟練した優秀な農業者のノウハウを情報通信技術により共有化することを目指している。また，岩手県では，葉とらずリンゴの非破壊選果機を利用した出荷対応方法として外観品質の3段階による選別基準設定[2]の検討を行っている。

本調査に使用した圃場は南面の斜用地で受光に恵まれた立地である。日射量が高い樹では葉とらずの果実の糖度に及ぼす影響が大きいことも報告[2]されている。また，藤田ら[8]は，3年間‘ふじ’の同一樹で行った調査（各区30果）において，最初の2年間は，糖度および蜜入り程度で葉とらず栽培が摘葉と比べて有意に高くなるが，3年目では差異がないとする結果を示している。このように，葉とらずリンゴの食味品質には，地形や気象変動等による年次間差の影響を受けることも考慮すべき要因である。

要　約

リンゴの葉摘みを省略した外観にとらわれない葉とらず栽培により生産された‘秋映’について，作業時間の省力性を検証したところ，葉とらず栽培は，葉摘み作業がなく，慣行栽培との間に有意差があり省力性を認めた。果実の品質に及ぼす影響は，葉とらず栽培は，非破壊測定および分析調査から糖度が高い有意差（Brix陰光面を除く）を認める等，果実品質が向上する傾向がみられた。分析項目間の相関関係では，熟度に関わるデンプン指数，pH，酸度，硬度，柔さの相関が顕著であり，特にpH−酸度の負相関，果肉硬度－柔さの正相関の相関係数が高かった。非破壊による柔さを目的変数とする重回帰式を算出し，果肉硬度の関与が強いことを明らかにした。

謝　辞　本調査は，公益財団法人中央果実協会の平成27年度果実加工需要対応産地育成事業（加工専用果実生産支援事業）による成果の一部である。

本調査の遂行にあたり，ご助言並びにご協力を頂きました長野県果樹試験場，全農長野・生産販売部営業課，ながの農業協同組合・ながの北部アグリサポートセンター，リンゴ生産者・小林孝英氏の各位に感謝の意を表します。

文　献

1）小野浩司：リンゴの「葉とらず栽培」における樹体構成法と樹相診断技術，農業および園芸，**82**（2），245～251（2007）
2）小野浩司・河田道子：葉とらずりんごにおける非破壊選果機利用技術，東北農業研究，**581**，153～154（2005）
3）加藤　幸・森奈緒子・佐藤江里子・土居良一・溝口　勝・岸　知彦：簡易モニタリングシステムによるリンゴ収穫適期の判断方法，農業農村工学会大会講演会講演要旨集（福岡），pp.792～793（2011）
4）中村哲也・丸山敦史・矢野佑樹：葉取らず・無袋・有袋リンゴの消費者評価―色・糖度・価格についての比較分析―，共栄大学研究論集，**10**，63～79（2012）
5）鈴木　宏・久米靖穂・松井　巌：早期落葉がリンゴ樹の生育と果実品質に及ぼす影響，秋田県果樹試研究報告，**18**，1～14（1987）
6）増田哲男・中本陽一・藤澤弘幸・猪俣雄司・別所英男・工藤和典：リンゴ‘ふじ’の摘葉作業における作業性，園芸学雑誌，**73**（別2），314（2004）
7）大場誠司・菊地秀喜・千葉佳朗・佐藤　寛：摘葉時期がリンゴ「ふじ」の樹体生育と果実品質に及ぼす影響，園芸学会雑誌，**65**（別2），134～135（1996）
8）藤田知道：摘葉の有無および時期がリンゴ‘ふじ’の果実品質に及ぼす影響：園芸学研究，**13**（別1），263（2014）
9）深井洋一・佐久間淳：リンゴの貯蔵経過に伴う‘食感’「柔さ」の変動と関与する食味特性，日本食品保蔵科学会，**42**，197～200（2016）
10）農林水産省：平成19年品目別経営統計，大臣官房統計部経営・構造統計課ホームページ（http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/noukei/hinmoku/index.html）
11）松浦克彦：わい性台リンゴの樹形改造が樹体生長および果実の収量と品質に及ぼす影響，兵庫県農技総セ研報（農業），**57**，32～36（2009）
12）岩波　宏・守谷（田中）友紀・花田俊男・本多親子・和田雅人：リンゴにおける摘葉剤を用いた高品質果実の省力生産方法，園芸学研究，**15**（1），29～37（2016）
13）佐久間淳：食感の数値データ化のための触診メカニズムによる計測システム実用化，食品と容器，**55**（11），702～707（2014）

（平成28年8月25日受付，平成29年1月26日受理）

Effects of Oral Intake of Noncentrifugal Cane Brown Sugar, Kokuto, on Mental Stress in Humans

MAKOTO Takahashi*1, YUKIKO Kinjo*2, SHUNTOKU Uechi*1, NAOTO Hirose*3, MASAMI Mizu*4, HOU De-Xing*5 and KOJI Wada*1§

*1 *Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903–0213*
*2 *United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University, 1–21–24 Korimoto, Kagoshima 890–8580*
*3 *Regional Agricultural System Section, Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, 820 Makabe, Itoman, Okinawa 901–0336*
*4 *Product Development Division, Mitsui Sugar Co. Ltd., Nihonbashi, 36–2 Hakozaki-Cho, Tokyo 103–8423*
*5 *Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1–21–24 Korimoto, Kagoshima 890–8580*

We investigated the inhibitory actions of oral noncentrifugal cane brown sugar (Kokuto) on mental stress in healthy subjects. When the subjects orally consumed 5 g of Kokuto before a 15-min Uchida-Kraepelin psychodiagnostic test (pre-task group), the salivary levels of stress biomarkers, including chromogranin A, *α*-amylase, secretory immunoglobulin A, dehydroepiandrosterone, and testosterone, were lower at 5 min after the test compared with those in the control group. However, Kokuto intake after the stress task (post-task group) showed little inhibitory effects. Subjective ratings for mental state using the visual analog scale were significantly lower in the pre-task group than in the control group, while the post-task group showed no significant differences. Moreover, Profile of Mood States scores showed a positive influence on the five negative mood states, which consequently improved vigor, in the pre-task group. These results suggest that oral intake of 5 g of Kokuto may efficiently suppress mental stress.

(Received Oct. 27, 2016 ; Accepted Mar. 1, 2017)

Key words: *brown sugar, mental stress, anti-stress, kraepelin psychodiagnostic test, saliva*
黒糖，心理的ストレス，抗ストレス，クレペリン精神検査法，唾液

Stress is a common and unavoidable state in humans, and excessive stress influences physiological homeostasis and, consequently, mental and physical health. Stress is closely associated with psychological disorders, including depression, anxiety, and cognitive impairment[1], and is also directly or indirectly linked to the pathology of numerous diseases, such as tumorigenesis, cardiovascular disturbances, and neuronal degeneration of the central nervous system (CNS)[2),3]. A good diet, the use of supplements such as γ-amino butyric acid (GABA) and theanine, and adequate intake of sugar and caffeine are potential therapeutic strategies for a healthy life[4)~7)].

Noncentrifugal cane brown sugar is a valuable nutritional byproduct of sugarcane. It is synthesized by evaporation of the water and is well known by many different names worldwide, such as Panela in Latin America, jaggery in South Asia, and Kokuto in Japan. Noncentrifugal cane brown sugar includes various components in addition to sugar, including fats and waxes, organic acids, phenolic compounds, Maillard reaction products (MRPs), and amino acids such as GABA ; these are responsible for the unique taste, aroma, and food functionality[8)]. Here, we focused on the potential antistress properties of noncentrifugal cane brown sugar (Kokuto). Two main body systems are involved in the stress response, the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic-adrenal-medullary (SAM) axis[2)]. Stress-related brain distress is initiated by stress-related substances ; these include cortisol (Cort), dehydroepiandrosterone (DHEA), and testosterone (TS), which act through the HPA axis[9)~11)], and chromogranin A (Cg-A), α-amylase (Amy), and secretory immunoglobulin A (sIg-A), which act through the SAM axis[12)~14)]. The levels of these stress markers are generally measured in the

§ Corresponding author, E-mail : kojiwada@agr.u-ryukyu.ac.jp

saliva[15] as an efficient and noninvasive method for assessing mental stress. In the present study, we assessed the effects of oral Kokuto intake before a stress task on CNS activities after the task by measuring salivary Cort, DHEA, TS, Cg-A, Amy, and sIg-A levels in healthy subjects. We also subjectively evaluated the mental state of the participants using visual analogue scale (VAS) and Profile of Mood States (POMS) scores.

Materials and Methods

1. Subjects

Thirteen healthy subjects (four males, nine females; age, 22-39 years) participated in the experiment. Pregnant women and subjects with chronic and current illness; a history of psychiatric or medical illness; medication use; metabolic, hormonal, or intestinal disease; irregular diet or deviant eating habits; excessive use of alcohol, cigarettes, coffee, and/or drugs; aversion to sugar-rich products; and any discomfort with blood collection procedures were excluded after assessment of these parameters using health and lifestyle questionnaires. All subjects were nonsmokers and did not use drugs, and they were additionally restricted from alcohol intake from 2 days before the experiment until the end of the experiment. This study was approved by the Medical Research Ethics Committee of the University of the Ryukyus (Okinawa, Japan) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All subjects provided written informed consent for participation.

2. Mental stress task

The Uchida-Kraepelin psychodiagnostic test was selected because it can be simultaneously administered to a large group of individuals as a simple workload test and has been employed in other human studies[16),17)]. The test is widely used to evaluate mental stress and fatigue because of its test-retest reliability and validity[18)]. The subjects were instructed to perform the task as quickly and as accurately as possible, within 15 min.

3. Measurement of salivary stress biomarkers

Saliva specimens were collected from the subjects by the passive drool technique (Salimetrics, State College, PA, USA). For passive drool collection, the subjects were made to sit comfortably and saliva was allowed to accumulate in the oral cavity and flow into a wide-mouth polypropylene tube. Using this technique, 1 ㎖ of saliva was collected and temporarily stored on ice, followed by centrifugation at 16,000 g for 5-min at 25℃. We could not collect saliva from two of the 13 subjects because of a defect in secretion. The supernatant was divided into aliquots and stored at −30℃ until assay. Salivary Cort, DHEA, TS, Cg-A, Amy, and sIg-A levels were assayed in triplicate using a commercially available kit (Cort, DHEA, TS, and sIg-A, Salivary EIA Kit, Salimetrics, PA, US; Amy, Salivary α-amylase assay kit, Salimetrics; Cg-A, YK 070 Human Chromogranin A EIA, Yanaihara Institute Inc., Shizuoka, Japan) according to the manufacturers' instructions.

4. Subjective assessment

VAS and POMS were used for subjective assessment of mood state. VAS is a 100-mm bipolar line that measures a characteristic across a continuum[19)]. The subjects marked a spot on the line, which represented their subjective appraisal of stress perception. The scale was anchored from 0 (No stress) to 100 (Extreme stress). The scores were determined by measurement of the distance from the left end to the mark using a ruler. Mood changes were evaluated using two parallel, shortened paper versions of POMS (Success bell, Hiroshima, Japan), with a scale ranging from "strongly disagree" to "strongly agree"[20)]. POMS comprises six different mood state subscales, including tension, depression, anger, fatigue, and confusion as negative mood states and vigor as a positive mood state.

5. Test sample

Commercial noncentrifugal cane brown sugar, Kokuto (Taramajima Kokuto, Kakinohana Co. Ltd., Okinawa, Japan), was used in this study. The Kokuto was crushed into powder by a crushing machine, dissolved in purified water to achieve a concentration of 10 wt%, and used as the test sample. The subjects orally consumed 50 ㎖ of this solution, which provided 5 g of Kokuto.

6. Experimental design

This was an open-trial, placebo-controlled study. The subjects participated in three experimental sessions, approximately 2 h per day, which were separated by a 1-week rest period to prevent the subject from getting used to the mental stress task. Fig. 1 shows the time schedule of the mental stress task. First, the subjects were asked to sit for 40 min to ease their psychological stress levels

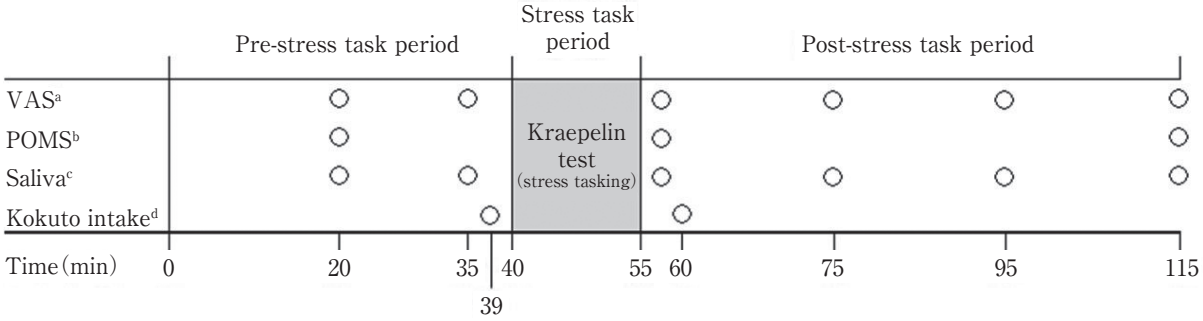

Fig. 1 Time schedule of the mental stress task with or without Kokuto intake

a : Visual analog scale
b : Profile of Mood States
c : Saliva collection for stress marker assays
d : Kokuto is administrated 1 min before (pre-task group) and 5 min after the Kraepelin test (post-task group)
Water intake instead of the Kokuto solution is the control condition.
The subjects underwent the Uchida–Kraepelin psychodiagnostic test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period).

(pretask period). Then, they underwent the Uchida-Kraepelin psychodiagnostic test for 15 min (stress task period), followed by a 60-min rest period (post-task period). In each session, the Kokuto solution was administered 1 min before task initiation (pre-task group) or 5 min after task completion (post-task group), followed by intraoral rinsing with 50 mℓ of purified water. A control experiment was also conducted with 50 mℓ of purified water instead of the Kokuto solution intake. Saliva samples were collected at approximately 20 and 35 min during the pre-task period and approximately 55, 75, 95, and 115 min during the post-task period. VAS scores were obtained at the same time points, while POMS scores were obtained within 3 min after the first, third, and sixth saliva collections.

7. Statistical analysis

All results are expressed as means ± standard errors. After initiation of the experiments, the reference points (100% as relative value) were respectively set at 20 min for the pre-task group and at 55 min for post-task group, and the time course of changes in the six salivary stress biomarkers of each group compared with each reference point was also evaluated using Tukey's post hoc tests. Differences were considered significant at $^{*}P<0.05$ or $^{**}P<0.01$ (vs. each reference point).

With regard to VAS and POMS values, differences between the control and pre- and post-task groups were analyzed by Student's t-test. Differences were considered significant at $^{*}P<0.05$ or $^{**}P<0.01$ (vs. control group).

Results and Discussion

We determined the effects of Kokuto intake on mental stress in healthy subjects by evaluating stress in a group that consumed Kokuto 1 min before the mental stress task (pre-task group) and a group that consumed Kokuto 5 min after task completion (post-task group).

1. Influence of Kokuto intake on salivary stress biomarkers

Fig. 2 shows the changes in salivary stress biomarker levels in the control and pre-task groups. At 5 min after the stress task, all salivary biomarkers showed higher levels than those at reference point in the control group. In particular, the relative values of Cg-A, Amy, and slg-A, which reflect the function of the SAM axis, were considerably increased to more than 160%. Although the relative values of Cort, DHEA, and TS, which reflect the function of the HPA axis, were slightly decreased to less 130% in response to acute mental stress, the levels of these biomarkers increased during the post-task period. These results suggest that the 15-min Kraepelin test induced acute stress that particularly affected the SAM axis through CNS, indicating that the task used in this study was psychologically and physiologically stressful. On the other hand, all salivary biomarker levels in the pre-task group were lower than those in the control group throughout the experiment. The secretion of salivary Cg-A showed the maximum suppression (40.7%) at 5 min after the task, followed by Amy

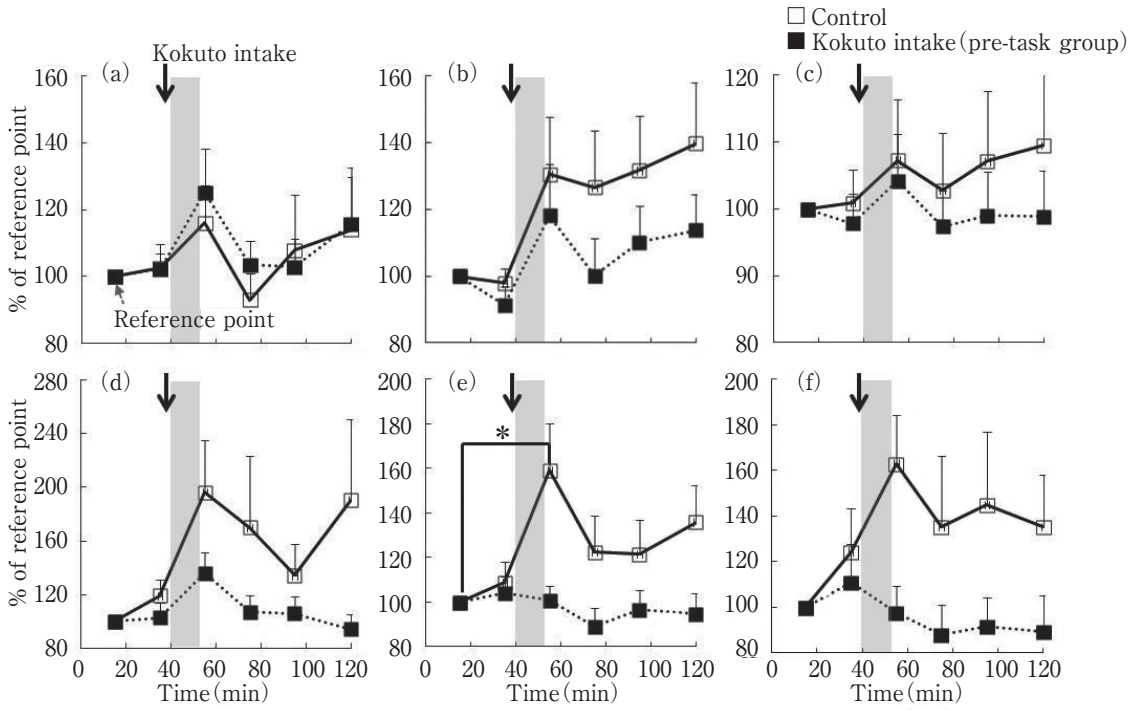

Fig. 2 Effects of oral Kokuto intake before a stress task on six salivary stress markers, namely Cort (a), DHEA (b), TS (c), Cg-A (d), Amy (e), and sIg-A (f), before and after the task.
Each value is expressed as mean ± standard error (n = 11).
$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (vs reference point)
The subjects underwent the Uchida–Kraepelin psychodiagnostic test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period).
Solid arrow represents the time of Kokuto intake.

(36.7%), sIg-A (28.3%), DHEA (9.5%), and TS (2.8%). However, Cort was not suppressed after the task. These findings suggested that oral Kokuto intake before a stress task influences the human CNS in a relatively short time and has inhibitory effects on mental stress.

In contrast, salivary Cort, TS, Cg-A, and Amy levels of both the post-task and control groups after the stress task showed no significant differences compared with each reference point (Fig. 3). However, DHEA in the post-task group was significantly higher level at 60 min after the task than the reference point, and the level showed 26.2% increasing compared with the control. In addition, sIg-A levels in the post-task group decreased by a maximum of 26.7% compared with those in the control group at 20 and 40 min after the task, while the levels were similar in the control and post-task groups at 60 min after the task. Although the cause of the changes in DHEA and sIg-A levels of the post-task group is unclear, these results imply a little effects of Kokuto intake on stress in humans, and that Kokuto intake after a stress task might not play a role in mental stress inhibition.

Factors that could have influenced CNS in the pre-task group include the following: carbohydrates, including sucrose, glucose, and fructose; GABA; and taste and aroma originating from MRPs. Glucose, the basic form of carbohydrates, is the primary source of metabolic energy for the brain, and increased neural activity associated with cognitive performance and increased mental demand have been found to be associated with increased glucose utilization by the brain[4]. In addition, glucose increases plasma levels of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5HT), which plays a role in mood disorders[21] and has marked stimulatory effects on the HPA and SAM axes responses to stress[22),23]. The Kokuto solution used in our study comprised 92.25% carbohydrates, with sucrose forming the major component (over 90%) and glucose and fructose forming minor components (less than 10%). Following Kokuto intake, blood glucose, primarily the metabolic byproduct of sucrose, may increase 5HT levels in the blood. 5HT, in turn,

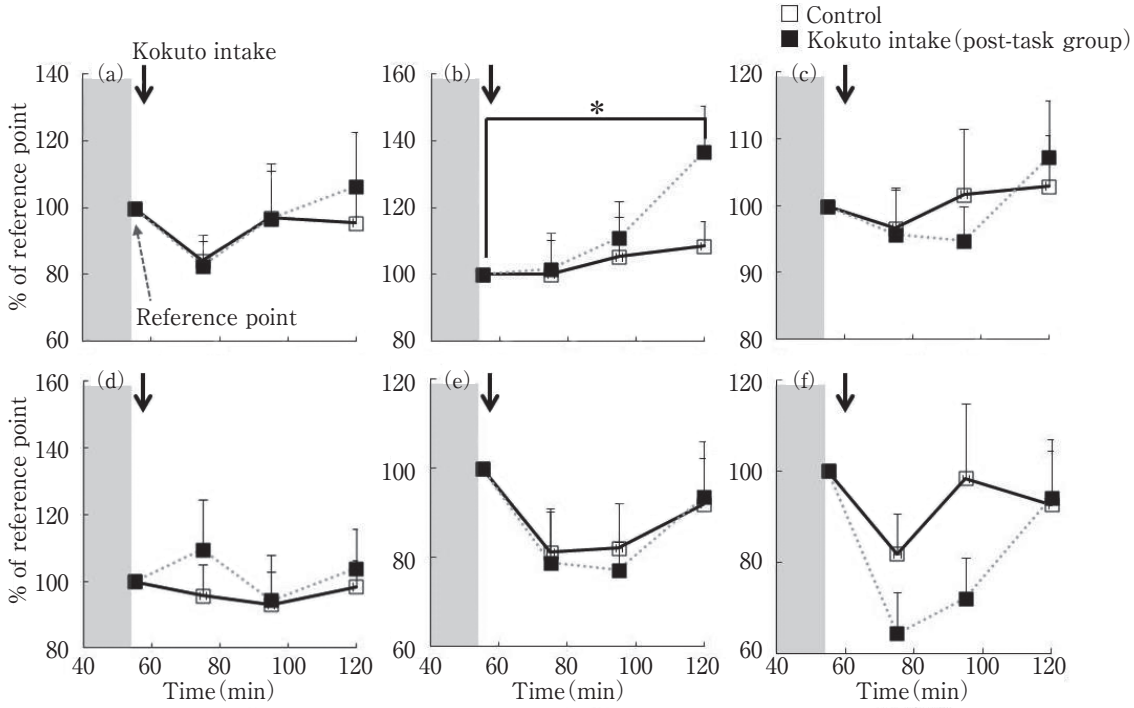

Fig. 3 Effects of oral Kokuto intake after a stress task on six salivary stress markers, namely Cort (a), DHEA (b), TS (c), Cg-A (d), Amy (e), and sIg-A (f), after the task.
Each value is expressed as mean ± standard error (n = 11).
$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (vs reference point)
The subjects underwent the Uchida–Kraepelin psychodiagnostic test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period).
Solid arrow represents the time of Kokuto intake.

causes a neurological interaction that suppresses not only DHEA and TS through the HPA axis but also Cg-A, Amy, and sIg-A through the SAM axis, by way of negative feedback[24]. However, the results for the post-task group oppose this mechanism. In addition, Kokuto showed a relatively fast-acting anti-stress effect at approximately 15 min after intake. The effects of carbohydrates on performance seem to depend on the rate and extent of the postprandial rise and fall in blood glucose (indicated by the glycemic index or GI). For instance, in a study by BENTON *et al*.[25], memory performance in humans and rats improved 150-210 min after the intake of low-GI carbohydrates compared with that after the intake of high-GI carbohydrates. In another study, improvements in performance were observed 120-220 min after the consumption of carbohydrate-rich food sources, a time when blood glucose levels have already returned to baseline levels[26]. This does not support a direct synchronized relationship between blood glucose levels and performance ; rather, it indicates that other mechanisms may be responsible for the findings in our study.

GABA is also known for its involvement in CNS. Several animal experiments have demonstrated that the administration of GABA increased the concentration of plasma growth hormone and the rate of protein synthesis in the brain[27], improved several brain functions such as memory and the capability to study, and decreased the blood pressure of rats with spontaneous hypertension[28]. The effects of orally administered GABA on human CNS activities were also recently reported. FUJIBAYASHI *et al*.[29] suggested that 30 mg of GABA increased the overall CNS and parasympathetic nervous system activities and consequently induced relaxation effects. NAKAYAMA *et al*.[30] found that the intake of GABA-enriched chocolate (28 mg) before an arithmetic stress task led to recovery to a normal state of Cg-A level from a stressful state 30 min after intake of the GABA chocolate. Moreover, Cg-A levels measured after the task in the group that consumed GABA-enriched chocolate remained unchanged. Therefore, GABA was considered to have stress-inhibitory effects. However, the GABA content in the Kokuto

solution used in our study was 3.5 ㎎/100 g (data not shown) ; this corresponds to approximately 0.175 ㎎ of GABA (contained in 5 g of Kokuto). Because the intake of GABA in this study was 171-fold lower than that in the abovementioned studies, GABA alone is unlikely to have inhibited stress in the pre-task group.

A large amount of MRPs is formed upon thermal processing of Kokuto via non-enzymatic reactions between reducing sugars and amino acids, and the diversity of MRPs gives rise to the characteristic brown color, taste, and aroma[8]. The complex mechanism of chemosensory olfactory perception recognizes volatile aromatic compounds with great accuracy and sensitivity. Taste and smell are interconnected; 80%–90% of perceived food taste is actually attributed to the sense of smell. Therefore, the flavor of foods is one of the most important factors determining the quantity and frequency of food consumption, because aromatic compounds, even at very low concentrations, are accurately remembered for a long time[31]. One study on MRPs contained in bread showed that olfactory signals conveyed via the olfactory bulb to distinct brain areas from the volatile MRPs may elicit not only emotional and behavioral responses but also metabolic responses[32]. In our previous study, a total of 37 volatile flavored components were identified in Kokuto, including 12 MRPs, 10 acids, and eight alcohols[8]. The MRPs included pyrazine, pyranone, pyrrole, furanone, and furan components, and stimuli arising from these MRPs through the olfactory bulb probably reflected suppression of the HPA and SAM axes, which were in an activated state during the stress task[33]. Although there is evidence that carbohydrates, GABA, and MRPs in Kokuto may play a role in controlling the HPA and SAM axes, the precise mechanism underlying the influence of oral Kokuto on the neurons within our brain and the subsequent suppression of salivary stress biomarker levels remains clear. Therefore, it is necessary to further investigate the effects of carbohydrates, GABA, and MRPs in Kokuto on salivary stress biomarker levels.

In our study, the intake of Kokuto before the stress task resulted in lower salivary levels of DHEA, TS, Cg-A, Amy, and sIg-A compared with the lack of intake. Although our study is barely comparable with other studies in terms of design, our results suggest that the oral intake of Kokuto may positively modulate mental stress in humans.

2. Influence of oral Kokuto intake on subjective ratings for mental state

To subjectively evaluate the influence of Kokuto intake on stress, the psychological status of the healthy subjects included in our study was assessed using VAS and POMS. Fig. 4 shows changes in the VAS scores of the 13 subjects. In the control group, the VAS scores showed a remarkable increase immediately after the stress task and a decrease to the baseline score within 60 min thereafter. On the other hand, VAS scores in the pre-task group were significantly lower than those in the control group at 20, 40, and 60 min after the stress task ($P<0.05$, Fig. 4-(A)), while there were no significant differences between the post-task and control groups (Fig. 4-(B)). Similarly, POMS scores for depression and confusion were significantly lower in the pre-task group than in the control group after the stress task ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively, Fig. 5-(A)). In addition, feelings of tension and

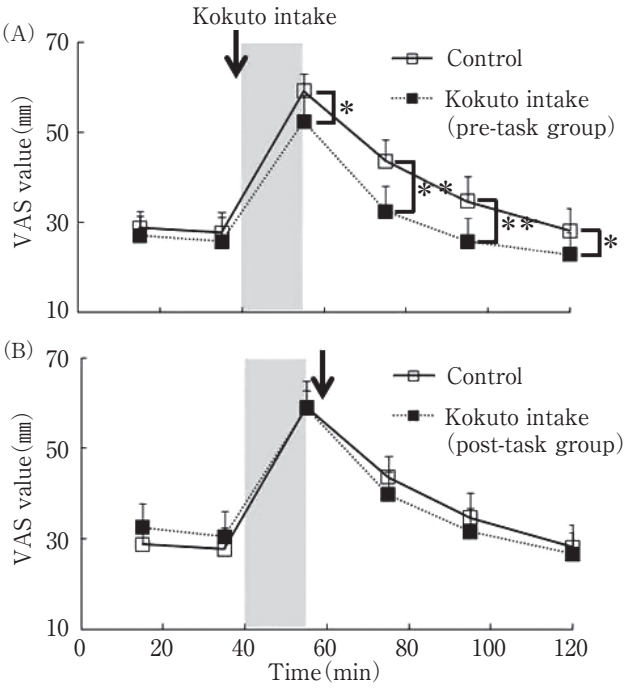

Fig. 4 Subjective stress changes after a mental stress task as assessed using the visual analog scale

Oral Kokuto intake 1 min before (pre-task ; A) and 5 min after the Kraepelin test (post-task ; B).
Each value is expressed as mean ± standard error (n = 13). $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ (vs control)
The subjects underwent the Uchida-Kraepelin psychodiagnostic test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period).
Solid arrow represents the time of Kokuto intake.

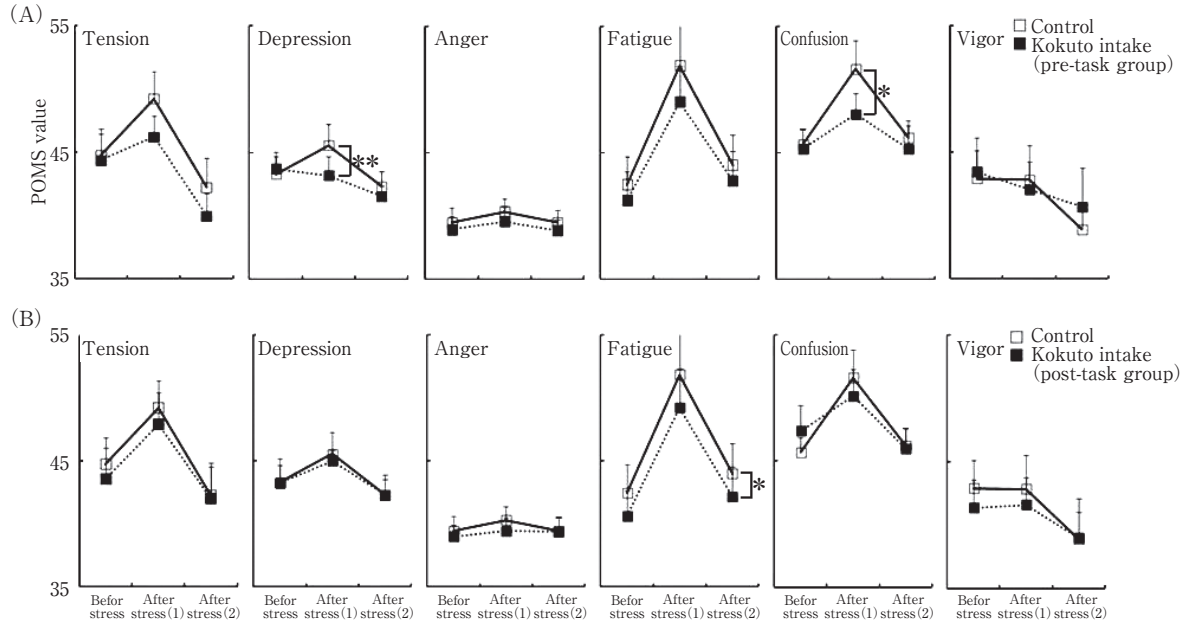

Fig. 5 Changes in mood states after a mental stress task as assessed using the Profile of Mood States

Kokuto intake 1 min before (pre-task ; A) and 5 min after the Kraepelin test (post-task ; B).
After stress (1) and (2) represent the first and last POMS assessments, respectively, after the Kraepelin test.
Each value is expressed as mean ± standard error (n = 13).
$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (vs control)

fatigue were also decreased in the pre-task group compared with those in the control group immediately and at 60 min after the stress task. Furthermore, inhibition of the positive mood state of vigor was suppressed in the pre-task group compared with that in the control group at 60 min after the task (Fig. 5-(A)). On the other hand, POMS scores for all mood states except fatigue were similar in the post-task and control groups throughout the experiment and were equivalent in the two groups at 60 min after the stress task (Fig. 5-(B)). These findings suggest that Kokuto intake before a stress task decreases the negative effects of acute mental stress, represented by tension, depression, fatigue, and confusion, and suppresses any inhibition of vigor, although intake after a stress task does not show these effects. Recent studies have investigated the correlation between the secretion of salivary stress biomarkers and subjective ratings for mental state obtained using VAS and/or POMS. For instance, salivary Cort levels in healthy subjects clearly increased after the Trier social stress test ; these increased levels were associated with an increase in VAS scores for negative moods and gradually decreased thereafter, with a decrease in VAS scores[34]. Moreover, healthy subjects stressed by the Uchida-Kraepelin psychodiagnostic test showed that GABA intake significantly decreased salivary Cg-A levels along with VAS scores and POMS scores for tension, depression, anger, and fatigue[12]. Similarly, we also observed that the magnitude of the salivary DHEA, TS, Cg-A, Amy, and sIg-A responses in the pre- and post-task groups in our study was likely to be associated with that of subjective ratings for mental state ; the VAS and POMS scores may justify the anti-stress effects of Kokuto intake in the pre-task group.

Although further investigation is required to determine the components of Kokuto except carbohydrates, GABA, and MRPs that suppress salivary stress biomarkers, our present findings show that 5 g of Kokuto intake before a stress task can suppress not only salivary stress biomarkers, including DHEA, TS, Cg-A, Amy, and slg-A, but also mental stress represented by feelings of tension, depression, fatigue, and confusion, consequently improving vigor.

Conclusions

We evaluated the effects of oral Kokuto intake on mental stress in healthy subjects and found that oral intake of this noncentrifugal brown sugar before the Uchida-Kraepelin psychodiagnostic test

suppressed the salivary levels of stress biomarkers, including DHEA, TS, Cg-A, Amy, and sIg-A, at 5 min after the test, while the lack of intake or intake after the test showed no such effects. These inhibitory effects may be related to the improvement in mood states, as indicated by the VAS and POMS scores, although further studies are required to clarify the mechanism underlying the influence of Kokuto on neurons within the human brain and the subsequent suppression of mental stress. In conclusion, Kokuto may have great potential for use as an effective inhibitor of mental stress, particularly feelings of depression and confusion.

Acknowledgements This work was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 26350095) from Japan Society for the Promotion of Science and a special grant for Okinawa promotion No. 66.

References

1) Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M.C., Wakabayashi, C. and Kunugi, H. : Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **39**, 112～119 (2012)

2) Papadopoulos, A. S. and Cleare, A. J. : Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*, **8**, 22～32 (2012)

3) Steptoe, A. and Kivimaki, M. : Stress and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol*., **9**, 360～370 (2012)

4) Benton, D., Parker, P.Y. and Donohoe, R. : The supply of blood glucose to the brain and cognitive functioning. *J. Biosoc. Sci*., **28** 463～479 (1996)

5) Ataka, S., Tanaka, M., Nozaki, S., Mizuma, H., Mizuno, K., Tahara, T., Sugino, T., Shirai, T., Kajimoto, Y., Kuratsune, H., Kajimoto, O. and Watanabe, Y. : Effects of oral administration of caffeine and D-ribose on mental fatigue. *Nutrition*, **24**, 233～238 (2008)

6) Yoto, A., Murao, S., Motoki, M., Yokoyama, Y., Horie, N., Takeshima, K., Masuda, K., Kim, M. and Yokogoshi, H. : Oral intake of γ-aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system during stressed condition induced by mental tasks. *Amino Acids*, **43**, 1331～1337 (2012)

7) Unno, K., Tanida, N., Ishii, N., Yamamoto, H., Iguchi, K., Hoshino, M., Takeda, A., Ozawa, H., Ohkubo, T., Juneja, L.R. and Yamada, H. : Anti-stress effect of theanine on students during pharmacy practice : positive correlation among salivary α-amylase activity, trait anxiety and subjective stress. *Pharmacol. Biochem. Behav*., **111**, 128～135 (2013)

8) Asikin, Y., Kamiya, A., Mizu, M., Takara, K., Tamaki, H. and Wada, K. : Changes in the physicochemical characteristics, including flavor components and Maillard reaction products, of non-centrifugal cane brown sugar during storage. *Food Chem*., **149**, 170～177 (2014)

9) Dickerson, S. S. and Kemeny, M. E. : Acute stressors and cortisol responses : a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol. Bull*., **130**, 355～391 (2004)

10) Oberbeck, R., Benschop, R.J., Jacobs, R., Hosch, W., Jetschmann, J.U., Schurmeyer, T.H., Schmidt, R. E. and Schedlowski, M. : Endocrine mechanisms of stress-induced DHEA secretion. *J. Endocrinol. Invest*., **21**, 148～153 (1998)

11) Kraemer, W.J. and Ratamess, N.A. : Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Medicine*, **35**, 339～361 (2005).

12) Kanehira, T., Nakamura, Y., Nakamura, K., Horie, K., Horie, N., Furugori, K., Sauchi, Y. and Yokogoshi, H. : Relieving occupational fatigue by consumption of a beverage containing γ-amino butyric acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **57**, 9～15 (2011)

13) Rohleder, N., Nater, U.M., Wolf, J.M., Ehlert, U. and Kirschbaum, C. : Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase : an indicator of sympathetic activity? *Ann. N. Y. Acad. Sci*., **1032**, 258～263 (2004)

14) Ring, C., Harrison, L.K., Winzer, A., Carroll, D., Drayson, M. and Kendall, M. : Secretory immunoglobulin A and cardiovascular reactions to mental arithmetic, cold pressor, and exercise : effects of alpha-adrenergic blockade. *Psychophysiology*, **37**, 634～643 (2000)

15) Izawa, S., Shirotsuki, K., Sugaya, N., Ogawa, N., Suzuki, K. and Nomura, S. : The application of saliva to an assessment of stress : procedures for collecting and analyzing saliva and characteristics of salivary substances. *Jap. J. Comp. Alter. Med*., **4**,

91～101 (2007) (in Japanese)
16) Higadshi, T., Sone, Y., Ogawa, K., Kitamura, Y. T., Saiki, K., Sagawa, S., Yanagida, T. and Seiyama, A. : Changes in regional cerebral blood volume in frontal cortex during mental work with and without caffeine intake: functional monitoring using near infrared spectroscopy. *J. Biomed. Opt*., **9**, 788～793 (2004)
17) Li, G.Y., Ueki, H., Kawashima, T., Sugataka, K., Muraoka, T. and Yamada, S. : Involvement of noradrenergic system in performance on continuous task requiring effortful attention. *Neuropsychobiology*, **50**, 336～344 (2004)
18) Kuraishi, S., Kato, M. and Tsujioka, B. : Development of the Uchida-Kraepelin psychodiagnostic test. *Psychologia*, **1**, 104～109 (1957) (in Japanese)
19) Aitken, R. C. : Measurement of feelings using visual analogue scales. *Proc. R. Soc. Med*., **62**, 989～993 (1969)
20) Welsh, R. S., Davis, J. M., Burke, J. R. and Williams, G. : Carbohydrates and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc*., **6**, 723～731 (2002)
21) Cryan, J. F. and Leonard, B.E. : 5-HT 1 A and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response. *Hum. Psychopharmacol*., **15**, 113～135 (2000)
22) Fuller, R. W. : Serotonergic stimulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Neuroendocrinology*, **32**, 118～127 (1981)
23) Maninger, N., Wolkowitz, O.M., Reus, V.I., Epel, E. S. and Mellon, S. H. : Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front. Neuroendocrinol*., **30**, 65～91 (2009)
24) Van West, D., Van Den Eede, F., Del-Favero, J., Souery, D., Norrback, K.F., Van Duijn, C., Sluijs, S., Adolfsson, R., Mendlewicz, J., Deboutte, D., Van Broeckhoven, C. and Claes, S. : Glucocorticoid receptor gene-based SNP analysis in patients with recurrent major depression. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 620～627 (2006)
25) Benton, D., Ruffin, M. P., Lassel, T., Nabb, S., Messaoudi M., Vinoy, S., Desor, D. and Lang, V. : The delivery rate of dietary carbohydrates affects cognitive performance in both rats and humans. *Psychopharmacology*, **166**, 86～90 (2003)
26) Markus, C.R. : Interaction between food, stress and mood, In: Wadson, D., Dodds, F. (eds), Performance Functional Foods, (Woodhead Publishing Ltd., Cambridge) 5～17 (2003)
27) Tujioka, K., Ohsumki, M., Horie, K., Kim, M., Hayase, K. and Yokogoshi, H. : Dietary c-aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **55**, 75～80 (2009)
28) Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M. and Kawasaki, T. : Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **71**, 165～173 (2007)
29) Fujibayashi, M., Kamiya, T., Takagaki, K. and Moritani, T. : Activation of autonomic nervous system activity by the oral ingestion of GABA. *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci*., **61**, 129～133 (2008) (in Japanese)
30) Nakamura, H., Takishima, T., Kometani, T. and Yokogoshi, H. : Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with c-aminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. *Int. J. Food Sci. Nutr*., **60**, 106～113 (2009)
31) Breer, H. : The sense of smell: reception of flavors. *Ann. N. Y. Acad. Sci*., **1126**, 1～6 (2008)
32) Kagami, K., Onda, K., Oka, K. and Hirano, T. : Suppression of blood lipid concentrations by volatile Maillard reaction products. *Nutrition*, **24**, 1159～1166 (2008)
33) Sebekova, K., Klenovics, K.S., Boor, P., Celec, P., Behuliak, M., Schieberle, P., Heidland, A., Palkovits, M. and Somoza, V. : Behaviour and hormonal status in healthy rats on a diet rich in Maillard reaction products with or without solvent extractable aroma compounds. *Physiol. Behav*., **105**, 693～701 (2012)
34) Izawa, S., Sugaya, N., Kimura, K., Ogawa, N., Yamada, K.C., Shirotsuki, K., Mikami, I., Hirata, K., NAGANO, Y. and Nomura, S. : An increase in salivary interleukin-6 level following acute psychosocial stress and its biological correlates in healthy young adults. *Biol. Psychol*., **94**, 249～254 (2013)

黒糖摂取が人の心理的ストレスに及ぼす影響

高橋　誠[*1]・金城由希子[*2]・上地俊徳[*1]・広瀬直人[*3]
水　雅美[*4]・侯　徳興[*5]・和田浩二[*1]
＊1　琉球大学農学部
（〒903-0213　沖縄県中頭郡西原町千原１）
＊2　鹿児島大学大学院連合農学研究科
（〒890-8580　鹿児島県鹿児島市郡元１-21-24）
＊3　沖縄県農業研究センター
（〒901-0336　沖縄県糸満市真壁820番地）
＊4　三井製糖㈱
（〒103-8423　東京都中央区日本橋箱崎町36－２）
＊5　鹿児島大学農学部
（〒890-8580　鹿児島県鹿児島市郡元１-21-24）

本研究では，黒糖の摂取における人の心理的ストレスの抑制効果について検証した。唾液中のストレスマーカーの測定では，クレペリンテストを用いたストレス負荷前に５gの黒糖を摂取した場合でのみ，コントロールと比較して，唾液中ストレスマーカー（DHEA，テストステロン，アミラーゼ，CgAおよびIgA）の分泌が抑制されたが，ストレス負荷後の摂取では抑制効果を示さなかった。一方，負荷前に黒糖を摂取した場合でのみ，VAS値の低下を示した。ストレスPOMS試験についても同様に，５種類のネガティブ因子は，コントロールと比較して低い値を示すとともに，ポジティブ因子（活力）については高い値を示した。しかし，ストレス負荷後に黒糖を摂取した場合では，VASおよびPOMSの値にコントロールとの違いが認められなかった。従って，ストレス負荷前の黒糖摂取は，ストレス低減効果に影響を与えることが示唆された。

（平成28年10月27日受付，平成29年３月１日受理）