

和歌山農産物の健康効果

Health Benefits of Specialty Agricultural Products from Wakayama

河野良平^{1,2)} 奥野祥治³⁾ 中村美砂^{1,2)} 宇都宮智子⁴⁾ 宇都宮洋才^{1,2,4)}

¹⁾ 大阪河崎リハビリテーション大学：大阪府貝塚市水間 158 番地（〒 597-0104）

²⁾ 大阪河崎リハビリテーション大学大学院

³⁾ 和歌山工業高等専門学校：和歌山県御坊市名田町野島 77（〒 644-0023）

⁴⁾ うつのみやレディースクリニック：和歌山県和歌山市美園町 5 丁目 4 番 20（〒 640-8331）

Ryohei Kono^{1,2)}, Yoshiharu Okuno³⁾, Misa Nakamura^{1,2)}, Tomoko Utsunomiya⁴⁾, Hirotohi Utsunomiya^{1,2,4)}

¹⁾ *Osaka Kawasaki Rehabilitation University : 158 Mizuma, Kaizuka-city, Osaka 597-0104, Japan*

²⁾ *Graduate School of Osaka Kawasaki Rehabilitation University*

³⁾ *National Institute of Technology, Wakayama Collage : 77 Noshima, Nada, Gobo, Wakayama 644-0023, Japan*

⁴⁾ *Utsunomiya Ladies Clinic: 5-4-20 Misono, Wakayama-city, Wakayama 640-8331, Japan*

要旨：果物、野菜、スパイスなどの植物性食品はそれらがもつ天然物質による作用により、様々な健康効果を発揮する。健康に有益な植物性食品は機能性食品とも呼ばれ、健康長寿のために関心が高まっている。和歌山県は植物性食品である農産物の生産が盛んであり、ウメ、ミカン、モモ、柿、山椒、ジャバラなどの生産量は全国でも上位に位置する。本稿では、特に心血管疾患、骨粗鬆症、アレルギー、不妊症および疲労に対する、これらの農産物の健康効果を我々の研究を中心に紹介する。

キーワード：食品、健康、疾病予防

ABSTRACT : Plant foods such as fruits, vegetables, and spices, exert various health benefits due to the effects of their natural compounds. Plant foods that are beneficial to health are also called 'functional foods', and interest in them is increasing in relation to attaining healthy longevity. Wakayama Prefecture is one of Japan's leading producers of agricultural products, with production volumes of Japanese plum/apricot (*Prunus mume*), Satsuma mandarin orange (*Citrus unshiu*), peach (*Prunus persica*), Japanese persimmon (*Diospyros kaki*), Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*), and Jabara (*Citrus × jabara* Tanaka) among the highest in Japan. This article focuses on our research on the health benefits of these agricultural products, especially on cardiovascular disease, osteoporosis, allergies, infertility and fatigue.

Key words : food, health, disease prevention

¹⁾ 河野良平 Ryohei Kono

E-mail : konor@kawasakigakuen.ac.jp

受付日 2022 年 9 月 13 日 受理日 2022 年 10 月 19 日

Received Sep. 13, 2022. Accepted Oct. 19, 2022.

1. はじめに

日本では食の欧米化に伴い生活習慣病が増加し社会的な問題となっている。生活習慣病には循環器疾患、糖尿病、がんなどが含まれ、いずれも食事や運動などの生活習慣が深く関与する。それでもなお日本人は欧米人と比較して長寿であることから、近年、海外では日本食が健康長寿の要因として注目されている。我々は関西西南部に位置する和歌山県の農産物に着目し、ヒトの健康に対する食品の機能性について研究してきた。和歌山県は本州最南端に位置し温暖な気候であることから果物の栽培に適しており果樹王国と呼ばれる。農林水産省の作況調査によると、2021年度に和歌山県で栽培された農産物の収穫量を他都道府県と比較すると、ウメ（1位）、ミカン（1位）、柿（1位）、ジャバラ（1位）、山椒（1位）、モモ（5位）となっており、果物の栽培が盛んであることがわかる。この中でもウメ（*Prunus mume* 英名：Japanese apricot）は日本や中国で薬として扱われてきた歴史があるが、その根拠となる研究はほとんど行われていなかった。これまで我々のウメの研究で明らかとなったのは、ウメに含まれるシリングレシノールによる胃がんの原因となるピロリ菌の運動阻害作用¹⁾や、ウメ摂取によるヒトへのピロリ菌の感染抑制作用²⁾から、胃がん予防効果が期待できること、ラットを対象にした研究により糖尿病予防効果が期待できること³⁾、などが挙げられる。本稿では、ウメを含む和歌山県産農産物が有する種々の疾患に対する効果、特に心血管疾患、骨粗鬆症、アレルギー、不妊症および疲労に対する効果を我々の研究報告を中心に紹介する。

2. 心血管疾患予防効果（モモ、ウメ、柿）

アンジオテンシン II (AngII) は血行動態を維持するために不可欠な血管収縮性ホルモンであるが、血管の酸化ストレスや炎症の因子でもあり、高血圧、アテローム性動脈硬化症、心不全などの心血管疾患に直接影響することが示されている⁴⁾。このため、アンジオテンシン II の働きを直接的あるいは間接的に調整することで血圧の上昇を抑え、アテローム性動脈硬化症の抑制や心臓肥大、血管炎症の改善が期待できると考えられている。例えば、柿 (*Diospyros kaki*) にはフラボノイドやアントシアニン、カテキンなどの生理活性物質が含まれ、それらの抗酸化作用や抗炎症作用により心血管疾患予防効果が期待されている⁵⁾。我々の研究からもモモやウメに心血管疾患予防効果が期待できることを報告してきたのでここで紹介する。まず、ラット大動脈由来血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells; VSMC) を用いて、AngII 刺激によるシグナル伝達が抑制されるような農産物成分の探索を行ったところ、和歌山県産であるモモ (*Prunus persica*) の果肉からメタノールにより成分を抽出し、それを濃縮して得られた

メタノール抽出物をさらに水、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルで転溶して得られたモモの酢酸エチル抽出物 (PEA) に抑制効果を見出した⁶⁾。

AngII 受容体サブタイプの AngII タイプ 1 (AT1) 受容体は、VSMC などの心臓血管系で発現する。AngII が AT1 に結合すると複雑なシグナル伝達が引き起こされる⁷⁾。その 1 つが、VSMC の肥大と遊走を引き起こす上皮成長因子受容体 (EGFR) と Rho キナーゼ (ROCK) の活性化である。AngII によるこれらの EGFR および ROCK の活性化は、VSMC における EGFR およびミオシンホスファターゼ標的サブユニット -1 (MYPT1) のリン酸化状態から評価できる⁸⁾。この AngII 誘導シグナル伝達では、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が引き起こされる。そこで、AngII 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に対するモモ成分の効果を調べるために、カルシウム蛍光指示薬 Fluo-3AM を VSMC に取り込ませ、AngII 刺激により惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡によりリアルタイム観察した。その結果、PEA に、AngII 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇抑制効果が濃度依存的に認められた (図 1)。さらに、AngII 刺激による EGFR と MYPT1 のリン酸化への効果をウエスタンブロット法により解析した結果、どちらのリン酸化も PEA により抑制されていた。また、AngII 刺激はプロテインキナーゼ C を介して NADPH を活性化し活性酸素種 (ROS) の産生を誘導する。ROS は EGFR のリン酸化などのシグナル伝達に関与するが、高血圧下では高濃度に産生され、VSMC の酸化ストレスに繋がることが知られている。よって、AngII 刺激による ROS の産生を抑制することは心血管疾患を予防する上で重要となる。実際に、VSMC を AngII で刺激すると ROS の産生が確認されたが、PEA で処理した VSMC では ROS の産生が抑制されていた (図 2)。以上のことから、PEA は AngII 刺激による VSMC の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や ROS の産生抑制を介して EGFR や MYPT1 のリン酸化を抑制することが明らかとなった。すなわち、モモに含まれる成分が AngII の関与する心血管疾患の予防に有用である可能性が示唆された。この報告の後、PEA に含まれる活性物質のスクリーニングを進め、最終的にプロトカテアルデヒド (3,4-Dihydroxybenzaldehyde) に PEA と同様の効果があることを実験的に特定した (未報告)。Moon らによると中国医学の伝統的なハーブであるシソ科植物の丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) の根から得られたプロトカテアルデヒドが血小板由来成長因子 (PDGF) 刺激による VSMC の増殖と遊走を抑制する効果が報告されており、その作用も抗酸化作用によるものと示唆されている⁹⁾ ことから、PEA の効果はプロトカテアルデヒドによる可能性が高いことが示唆される。また、このプロトカテアルデヒドはモモと同じバラ科サクラ族に分類されるウメ (*Prunus mume*) にも含まれており^{10,11)}、ウメにも動脈硬化予防効果が期待される。実際に、過去の研究では

ウメの果汁を加熱濃縮した梅肉エキスには AngII 刺激による VSMC の細胞増殖シグナルを抑制することが明らかとなっている¹²⁾。以上から、モモおよびウメには心血管疾患を予防する効果が期待される。

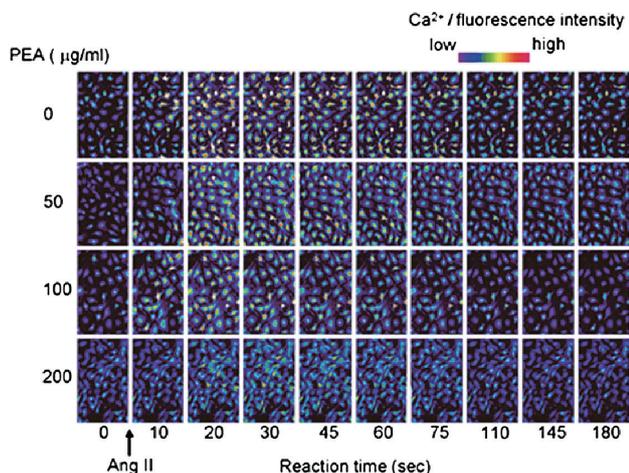


図1 共焦点レーザー顕微鏡で観察した AngII 刺激による VSMC 細胞内 Ca^{2+} 変化⁶⁾

VSMC 細胞を AngII のみで刺激した場合には時間と共に一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇 (右上指示色が Ca^{2+} 濃度を表す) が見られるが、モモ酢酸エチル抽出物 (PEA) で細胞を処理すると細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は抑制された。矢印は AngII で刺激した時間を表す。

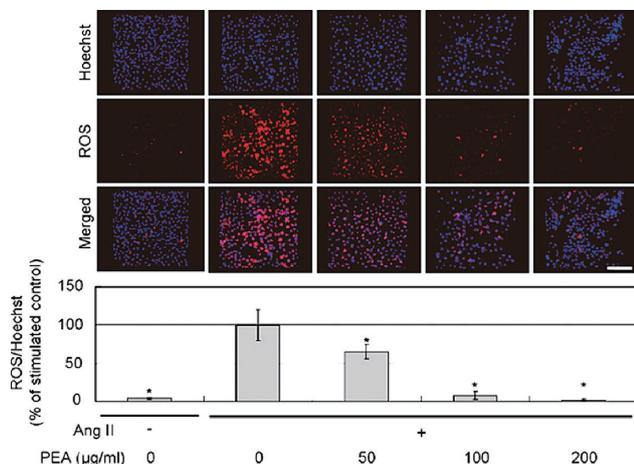


図2 共焦点レーザー顕微鏡で観察した AngII 刺激による VSMC 細胞内 ROS に対する PEA の効果⁶⁾

赤: ROS、青: Hoechst33342 で蛍光染色した。ROS は活性酸素種を、Hoechst は細胞の核を染色する。AngII 刺激により ROS が発生するが、PEA により抑制されることがわかる。

3. 骨粗鬆症予防効果 (ウメ、ミカン)

骨粗鬆症は骨密度や骨質の低下によって引き起こされ、骨折のリスクを高める。高齢者における骨折は、その治療中に活動量が低下することで体力・筋力の低下に繋がり、寝たきりになるなどの原因となるため、医療・リハビリテーション・介護領域では骨粗鬆症の予防は非常に重要で

ある。骨組織では骨リモデリングと呼ばれる骨形成と骨吸収が絶えず起こっており、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって制御されている¹³⁾。骨粗鬆症の治療では破骨細胞の活動を抑制することにより、骨量の減少を防ぐ方法があるが、多くの骨粗鬆症患者では治療を受ける前にすでに骨量が減少していることが多い。そのため破骨細胞の活性を阻害するのではなく、骨芽細胞を活性化させ、骨形成を増加する方法が研究されは始めている。食品由来の天然物質による骨芽細胞の分化促進に関する研究では、天然の多糖類であるキトサンが、骨芽細胞の増殖と分化、石灰化を促進すること¹⁴⁾ やイソフラボンであるグリシテインが骨芽細胞の分化を促進させること¹⁵⁾ が報告されている。和歌山が生産量1位であるミカンには閉経後の女性において骨粗鬆症のリスクを軽減することが報告されており、その関与成分は β クリプトキサンチンであると考えられている¹⁶⁾。我々も同様にウメの骨芽細胞に対する効果を調査し、ウメにも骨芽細胞に対する分化促進作用があることを明らかにしてきたので紹介する¹⁷⁾。

ウメは様々な形態に加工されて食される。例えば、梅干や梅酒、梅ジュース、梅肉エキスなどが挙げられる。梅肉エキスはウメの果汁を加熱濃縮することで得られる。梅肉エキスの水分量は加熱濃縮により果実や果汁に比べて少なく、成分が濃縮されており、培養細胞を用いた試験に容易に取り入れることができることから、まず我々はこの梅肉エキスに着目して骨芽細胞への効果を調査した。骨芽細胞にはマウス頭蓋冠由来 MC3T3-E1 細胞を用いた¹⁸⁾。MC3T3-E1 細胞は、培養培地中に分化誘導試薬として β グリセロフォスフェート、アスコルビン酸、デキサメタゾン を添加し長期培養することで、骨芽細胞へと分化し骨分化マーカーであるアルファリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇がみられるようになる。そこで梅肉エキスを分化誘導試薬と共に培養培地中に添加して7日間培養後、ALP 活性を測定した結果、梅肉エキスの水溶性抽出物 (PWF) には $100 \mu\text{g/mL}$ で ALP 活性を約 30% 上昇させることを見出した (図3)。また、PWF は分化初期における細胞増殖も濃度依存的に増加させた。さらに、骨芽細胞分化の後期段階では ALP 活性の上昇に続いてカルシウム沈着による石灰化が確認できるようになるため、分化誘導 14 日目にアリザリンレッド S により石灰化部を染色し顕微鏡により観察したところ、PWF 添加により石灰化面積が増加することが明らかとなった (図4)。

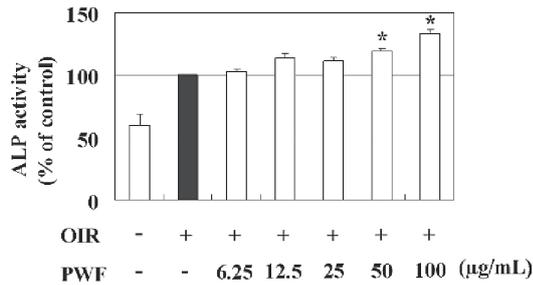


図3 MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化による ALP 活性の上昇¹⁷⁾

分化誘導試薬 (OIR) のみで細胞を7日間培養し骨芽細胞へと分化させた場合と比較して、PWF を添加した場合には ALP 活性の上昇が認められた。PWF により骨芽細胞への分化が促進されたことがわかる。*p<0.05

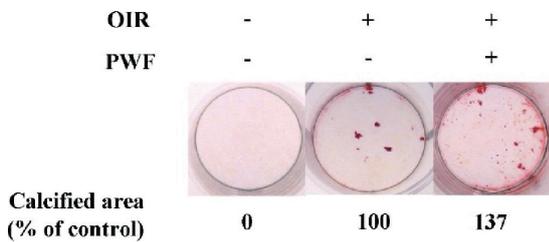


図4 MC3T3-E1 細胞の石灰化に対する PWF の効果¹⁷⁾

分化誘導試薬 (OIR) のみで細胞を14日間培養した場合と比較して、PWF を添加した場合には石灰化面積の増加が認められた。赤 (アリザリンレッド S) で染色された場所が石灰化された部分である。

骨芽細胞分化促進のメカニズム解明のために、骨芽細胞分化初期のマーカーである、骨形成タンパク質-2 (BMP-2)、オステオポンチン (OPN)、RUNX2、およびI型コラーゲン (Col) の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR によって調べた。BMP は、骨芽細胞の増殖および分化において主要な役割を果たす因子の1つであり、骨形成の強力な刺激因子である。BMP のうち BMP-2 はオステオカルシンや ALP などの骨形成遺伝子の発現を誘導する¹⁹⁾。OPN は骨のリモデリングに作用する細胞外マトリックスタンパク質であり、ALP の発現を調節し、骨芽細胞の初期分化の引き金として作用する可能性があることが報告されている²⁰⁾。リアルタイム RT-PCR の結果、これらの BMP-2 と OPN の遺伝子発現が PWF によって促進されたことが明らかとなった (図5)。したがって、PWF は BMP-2 や OPN の発現促進を介して ALP 活性を上昇させ骨芽細胞の分化、石灰化を促進することが示唆される。

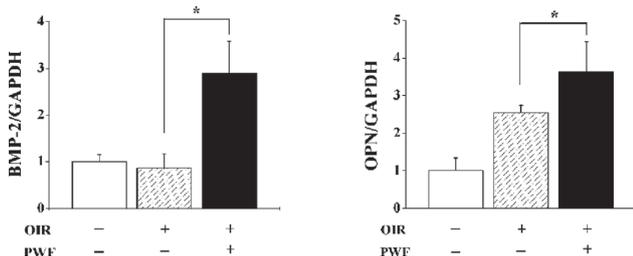


図5 骨関連遺伝子発現への PWF の効果¹⁷⁾

PWF は BMP-2 や OPN の遺伝子発現 (mRNA) を高める。それぞれの mRNA レベルはハウスキーピング遺伝子 GAPDH で補正した。*p<0.05

次に、ウメの摂取と骨粗鬆症の関係を明らかにするために、和歌山県内に在住の男性 327 名 (19 ~ 89 歳、平均 48.6 ± 13.4 歳)、女性 201 名 (20 ~ 86 歳、平均 57.7 ± 13.8 歳) の協力を得て、ウメの摂取頻度についてのアンケート調査と身体測定、骨密度測定を実施した²¹⁾。和歌山県はウメの生産量が日本一であり、和歌山県南部の地域住民の梅干摂取量や摂取頻度は他地域と比較して圧倒的に高いことから、ウメのヒトの健康に対する影響を調査することに適している。そこで、梅干の摂取頻度が「毎日3個以上」、「毎日1~2個」、「週に3~4個」、「週に1~2個」、「食べない」のいずれに該当するかを回答してもらった。骨密度は、超音波骨密度測定装置 (ELK CORPORATION 製 CM-200) を用いて踵骨の骨内超音波伝導速度を測定し、20 ~ 44 歳の骨密度の平均値に対する割合を表す YAM (Young Adult Mean) 値を指標として、80%以上を正常、70 ~ 80%を骨密度低下、70%未満を骨粗鬆症疑いと評価した。解析の結果、高齢者にあたる 61 ~ 81 歳の男性 (59 名) では、梅を「食べない」と回答したグループの平均 YAM 値が、68.3 ± 6.3%で骨粗鬆症疑いとされる 70%を下回り、梅を摂取しているグループと比較して低く、特に「週に1~2個」の回答者の 83.2 ± 3.8%に比べて有意に低かった (p<0.05) (図6) ことから、ウメの摂取が骨密度維持に有効である可能性が示唆された。しかし、男性のその他の梅摂取群や女性では YAM 値に有意な差は認められなかった。これは対象人数が少ないこと、例えば毎日3個以上摂取群では全体の2%の人数と少ないこと、が影響しているかもしれない。しかし、食べない群に比べて、いずれの群でも YAM 値は高い傾向にあった。

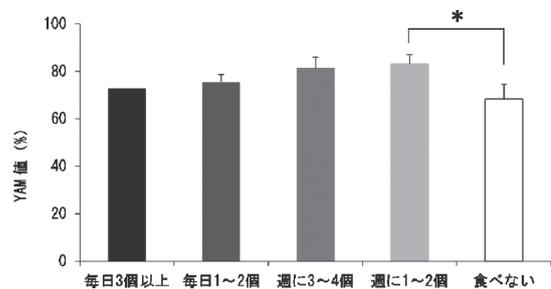


図6 高齢者男性 (61~81 歳) の梅の摂取頻度と YAM 値²¹⁾
YAM 値: Young Adult Mean (*p<0.05)

骨芽細胞はオステオカルシン (OCN) を分泌するが、この OCN は糖脂質代謝のみならず、脳に作用し脳の発達と認知機能に関連していることが明らかとなってきている²²⁾。OCN は、主に非カルボキシル化形態で、血液脳関門 (BBB) を通過して脳幹、視床、視床下部に蓄積し、

これらの領域のニューロンと特異的に結合して、さまざまな神経伝達物質の合成とシグナル伝達に影響を与える。マウスでは母親の OCN が胎盤を通過し子の行動、学習、記憶に有益な役割を果たすこと²³⁾や、老齢マウスにおいて OCN が認知機能回復に有効であること²⁴⁾などが示されている。そこで、ウメと OCN 産生の関連性を明らかにするために、ヒトおよび培養細胞を対象に研究を実施した²⁵⁾。まず、完熟南高梅の種を除去した果肉からメタノール抽出によりウメ果実抽出物を得た。続いてメタノールを除去濃縮後、水に溶解し、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルで転溶した。すべての分画物で骨芽細胞の ALP 活性への効果を調べ、酢酸エチル抽出物に ALP 活性上昇効果が認められたため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより酢酸エチル抽出物の分画を進め、すべての分画物で骨芽細胞に対する ALP 活性上昇効果を調べ、複数の分画に ALP 活性上昇作用が認められた (図 7)。ALP 活性上昇作用の効果が高かった分画物を複数選択し、骨芽細胞を分画物と共に培養後、培地中に分泌される OCN を ELISA 法により定量したところ、いくつかの分画物で OCN の上昇作用が見られた (図 8)。さらに、大阪府貝塚市地域在住の 60 歳以上の高齢者 (平均年齢 74.5 ± 5.3 、男性 15 名、女性 58 名) を対象としてウメの摂取習慣、身体組成、血清 OCN レベルを調査し、ウメの摂取頻度を低中高の 3 群に分けた分散分析により、血清 OCN 値に有意差が認められた ($p=0.0036$) (図 9)。また、有意差は認められなかったものの骨密度の YAM 値 (男女平均) はウメ摂取習慣がある場合に高値を示す傾向が見られた。以上から、ウメの摂取は骨芽細胞の分化促進だけでなく、骨芽細胞からの OCN の分泌促進作用を有する可能性が示唆され、ウメの骨粗鬆症予防効果だけでなく、OCN 産生促進作用を介した認知機能低下予防効果にも期待が持たれる。活性成分の特定には至っておらず、活性成分の特定が今後の課題である。また、対象人数を増やすことが、より正確な知見を得るためにも重要である。

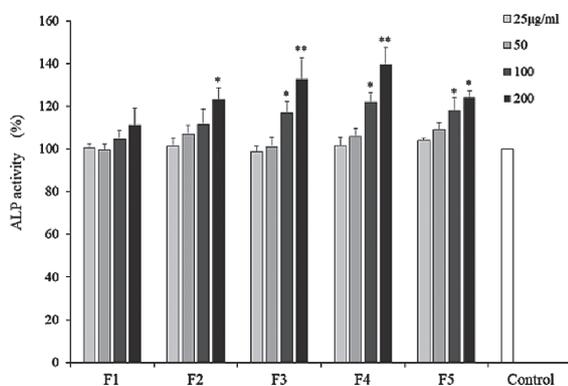


図 7 ウメ果実抽出物の分画物が MC3T3-E1 の ALP 活性に及ぼす効果²⁵⁾

ウメ果実抽出物の全分画物でアッセイし、強い ALP 活性上昇効果の見られた分画物 F4 の類似分画物 F1 ~ F5 の ALP 活性への影

響を調べた。F1 ~ F5 いずれも ALP 活性上昇作用が見られ、骨芽細胞分化促進効果を有することがわかる。 $*p<0.05$, $**p<0.001$

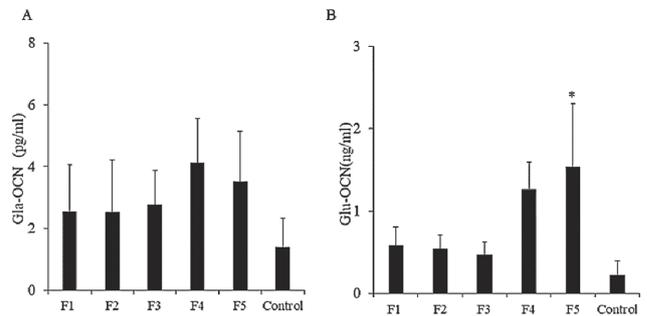


図 8 ウメ果実抽出物の分画物が MC3T3-E1 の OCN 産生に及ぼす効果²⁵⁾

(A) Gla-OCN: カルボキシル化 OCN、(B) Glu-OCN: 非カルボキシル化 OCN
ウメ果実抽出物により OCN 産生が上昇傾向にあり、特に F5 は非カルボキシル化 OCN の産生を有意に上昇させた。 $*p<0.05$

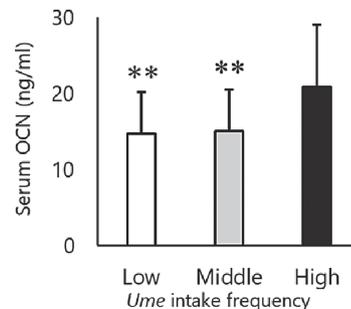


図 9 ウメ摂取頻度と血中 OCN 濃度²⁵⁾

梅干の摂取量がよく食べる (毎日 1 粒以上) 場合を高摂取群、ときとき食べる (週 2 ~ 3 粒) 場合を中摂取群、ほとんど食べない (週 2 粒以下または食べない) 場合を低摂取群とした。 $**p<0.001$

4. 抗アレルギー作用 (ウメ、山椒、ジャバラ)

I 型アレルギーに分類される花粉症は 30 ~ 40 代に多く、日本人の 2 ~ 4 人に 1 人が発病しているといわれている。食物アレルギーや、アトピー性皮膚炎、気管支喘息も花粉症同様に I 型アレルギーに分類され、これら I 型アレルギー疾患患者数は増加の一途を辿り日本だけでなく世界的に大きな問題となっている。その症状と程度はさまざま、花粉症など慢性的で生活の質に関わるものから、生命を脅かす重篤なものまで多岐にわたる。アレルギー疾患の発症には生活環境など外的要因と体質など内的要因の双方が関わり、発症予防と重症度の軽減は医学的に重要である。その様な背景から、食品の抗アレルギー作用に関する研究がいくつか行われており、お茶のカテキン²⁶⁾や和歌山県北山村を原産地とする柑橘であるジャバラのナリルチン²⁷⁾が花粉症を予防するといった報告がある。我々はジャバラ同様に和歌山県が生産量 1 位の山椒²⁸⁾とウメ²⁹⁾に着目し抗アレルギー作用について研究してきたので紹介する。

ウメに関しては、和歌山県の梅農家が飼うアレルギー症状を有するペットであるイヌに、ウメの種を粉末化したものを餌に混ぜて食べさせるとアレルギー症状が改善した、という話を聞き、ウメには何らかの抗アレルギー成分が含まれるのではないかと考え研究を開始した。まず、梅の摂取頻度とアレルギー症状の関連性を調査するために、健康な紀南地域住民を対象としたパイロット研究を行った。梅の生産地域である田辺市で2013年に開催された地域社会活動に参加した689人に対して2014年12月にアンケート調査表を送付した。2015年3月までに、586人の参加者（男性297人、女性289人、回収率84%）からの回答が得られた。アンケートでは、「梅干しをどのくらいの頻度で摂取しているか」、「アレルギー症状があるか（特定の季節の鼻炎を含む）」などの項目に回答してもらった。最終的に、回答に不備があった参加者（n=23）を除外した後、563名（男性288名、女性275名）のデータを分析した。アンケート調査の解析では、解析対象者を梅の摂取頻度により3群分けし、梅を毎日1粒以上摂取しているグループを高摂取群、梅を毎日1粒未満摂取しているグループを中摂取群、梅を週2粒未満または摂取しないグループを低摂取群として解析した。また、アレルギー疾患の罹患率には性差があることが知られているため男女別で解析した。アレルギー症状の有無における梅摂取頻度のオッズ比（OR）と95%信頼区間（95%CI）を多変量ロジスティック回帰分析（年齢層別、病気の有無（アレルギー疾患を除く）、投薬の有無（抗アレルギー薬を含む）の調整を含む）を用いて計算した。解析の結果、毎日1粒以上の梅干を摂取している高摂取群の女性は、アレルギーの症状に関して有意に低いオッズ比（OR）を示した（OR：0.49、95%CI：0.25-0.97）。

我々は、ウメ摂取がアレルギー発症を抑制した可能性があると考えて、ウメの抗アレルギー作用を明らかにするために、I型アレルギー反応の実験モデルであるマウスの皮膚受動アナフィラキシー（PCA）反応に対するウメ投与の効果調べた。PCA反応はマウス耳介にDNP（ジニトロフェニル）-IgE抗体を投与し感作したマウスに、経口ゾンデによりウメ抽出物を投与した後、尾静脈よりエバンスブルー色素（EB）と抗原としてDNP付加BSA（ウシ血清アルブミン）を投与して惹起した。アレルギー反応により血管透過性が亢進し耳介がEBにより青くなるので、抗原投与30分後に安楽死ののち耳介から生検パンチで耳組織を採取した。さらに耳組織を染色後観察あるいはEB抽出してマスト細胞の脱顆粒について調べた。その結果、ウメ抽出物の経口投与により、PCA反応が抑制され、組織病理学的観察によりマスト細胞の脱顆粒が抑制されていることが判明した（図10）。

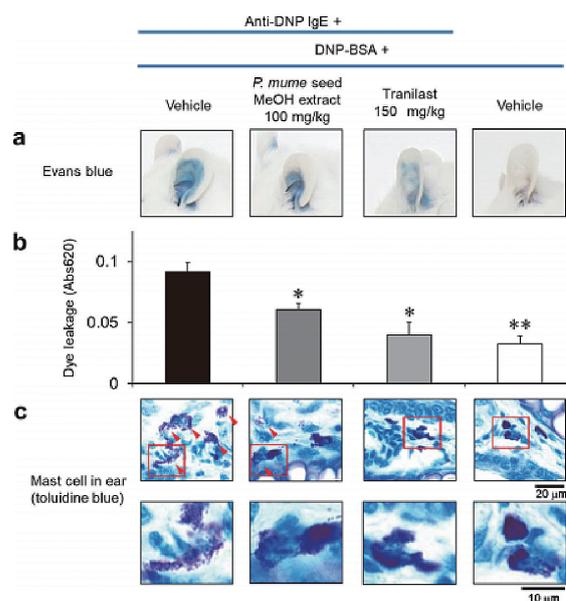


図10 ウメの皮膚受動アナフィラキシー（PCA）反応抑制効果²⁹

(a) PCA 反応による EB 溶出の様子、(b) EB 溶出液の吸光度、(c) 耳介中のマスト細胞染色像、赤矢印：脱顆粒したマスト細胞。IgE 感作マウスでは抗原（DNP-BSA）刺激により血管透過性が亢進し EB の溶出が見られるが、ウメ抽出物投与により抑制されることが、耳介の写真と EB 吸光度からわかる。組織観察からは赤矢印のマスト細胞が脱顆粒した細胞であり、ウメ投与により脱顆粒が抑制されていた。最下段画像は赤粋の拡大である。*P. mume* seed MeOH extract: ウメ抽出物、Tranilast: 抗アレルギー薬、* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

脱顆粒とは、マスト細胞の細胞表面上に発現する FcεRI 受容体に IgE 抗体が結合し、抗原に暴露されると IgE 抗体と架橋が形成され、くしゃみやかゆみを引き起こすヒスタミンなどの化学伝達物質が放出されるアレルギーに関与する現象である³⁰。ウメによりこの脱顆粒が抑制されたことから、マスト細胞として抗アレルギー研究に広く利用されている、ラット好塩基球性白血球細胞 RBL-2H3³¹ を使用し、脱顆粒に伴い放出される βヘキソサミニダーゼ活性を脱顆粒の指標としてウメに含まれる抗アレルギー物質の探索とその作用機序の解明を進めた。脱顆粒は動物実験と同様に DNP-IgE により RBL-2H3 細胞を感作し、試験サンプル存在下で DNP-BSA 刺激により惹起した。最終的に脱顆粒を抑制するウメ由来の物質として、プロトカテクアルデヒド、バニリン、シリンガ酸、*p*-クマル酸、リオニレシノールをエレクトロスプレーイオン化質量分析法（ESI-MS）および核磁気共鳴法（NMR）により同定した（図11）。これらの物質は RBL-2H3 のみならず BALB/c 系統雄性マウスの骨髄細胞を分化誘導して得た骨髄由来マスト細胞においても脱顆粒を抑制することを見出した。すなわち株化細胞のみならず正常マスト細胞でも上記物質は脱顆粒抑制効果を示した。走査型電子顕微鏡で細胞表面の状態を確認すると脱顆粒にともなう細胞膜の波打ち現象である膜ラフリング³²もウメ由来成分により抑制されて

いた。以上から、ヒト研究より、ウメの摂取頻度が高かった集団ではアレルギー症状を訴えた人の割合が低く、特に女性において、毎日1粒以上の梅干を摂取している場合にアレルギー有病率が有意に低いこと、動物実験からウメ摂取によりマスト細胞の脱顆粒の抑制されること、細胞実験からは脱顆粒反応を抑制する物質5種が関与していることを明らかにした。ウメの日常的な摂取(毎日1粒以上)による抗アレルギー作用が期待される。

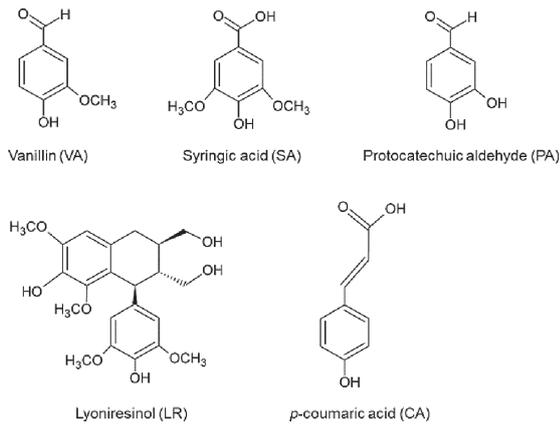


図 11 ウメに含まれる脱顆粒抑制物質の化学構造²⁹⁾

Vanillin: バニリン, Syringic acid: シリンガ酸, Protocatechuic aldehyde: プロトカテクアルデヒド (3, 4-DHBA と同物質), Lyoniresinol: リオニレシノール, p-coumaric acid: p-クマル酸

山椒 (*Zanthoxylum piperitum*) は漢方薬や香辛料として日本をはじめとするアジア諸国で利用されてきた。山椒に含まれる主要な辛味、しびれ成分である Hydroxy-*a*-sanshool (サンショール) にはわずかに IgE 介在性脱顆粒を抑制することが報告されている³³⁾。我々はより強力な脱顆粒抑制成分が山椒に含まれると考え、ウメと同様の研究を実施した²⁸⁾。RBL-2H3 を使用し IgE 介在性脱顆粒を抑制する物質の探索を進め、活性分画か NMR 分析により最終的に 1-acetoxy-7-hydroxy-3, 7-dimethylocta-2E, 5E-diene (ZP1) and 8-hydroxygeranyl acetate (ZP2) を単離、同定した(図 12)。これらはサンショールよりも強い脱顆粒抑制作用を示した。次に、脱顆粒抑制作用の作用機序を解明するために、シグナル伝達の重要なパートを担う細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を捉えるためのカルシウムイメージングを実施した。抗 DNP-IgE 抗体で感作した RBL-2H3 にカルシウム指示薬を導入し、脱顆粒の前に起こる細胞内 Ca²⁺ 上昇を共焦点レーザー顕微鏡でモニターした。抗原刺激の前に ZP1 または ZP2 を培地中に添加することで、抗原刺激による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が抑制されたため、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇よりも上流のシグナルを抑制することが考えられた。実際に、タンパク質リン酸化解析から、ZP1 と ZP2 は細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇よりも上流のシグナルである Lyn のリン酸化を抑制することが判明した。一方で、細胞内に Ca²⁺ を強制的に流入させるカ

ルシウムイオノフォア A23187 で刺激すると、IgE 介在性脱顆粒と同様に脱顆粒が生じるが³⁴⁾、この場合には事前に ZP1 および ZP2 を培地中に添加しておいても細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は抑制されなかったが、脱顆粒は抑制した。したがって、ZP1 と ZP2 は細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇後のシグナル伝達も抑制することが示唆された。形態学的観察からは、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇後に起こると考えられる、顆粒と細胞膜が融合する際に発生する細胞膜波打ち現象の膜ラフリングが ZP1 および ZP2 により抑制されることが分かった(図 13)。生体レベルでの調査として、マウスにおける PCA 反応に対する ZP1 と ZP2 の効果も調査し、ZP1 および ZP2 経口投与により PCA 反応の抑制、マウス耳介中のマスト細胞の脱顆粒の抑制が認められた(図 14)。以上より、山椒にはサンショール以外に強い脱顆粒抑制物質が含まれ抗アレルギー作用が期待される。

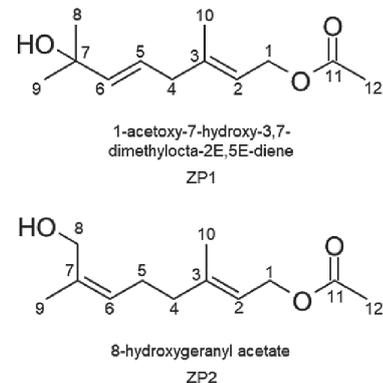


図 12 山椒に含まれる脱顆粒抑制物質²⁸⁾

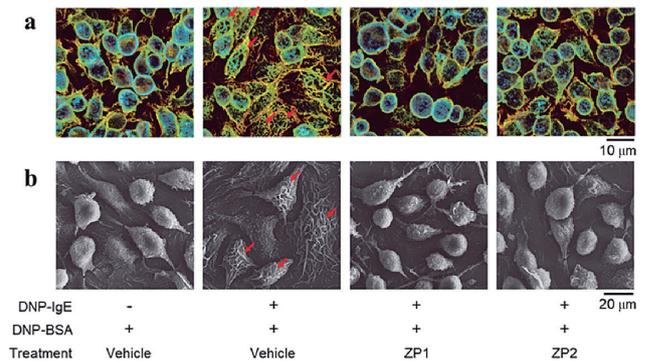


図 13 RBL-2H3 細胞の IgE 介在性脱顆粒時の形態²⁸⁾

(a)細胞骨格アクチンを蛍光免疫染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞の厚み情報を持つ画像である。厚みの差が色の差として表れている。(b)SEM 画像 IgE 感作細胞 (DNP-IgE+) を抗原で刺激 (DNP-BSA+) すると脱顆粒に伴う細胞膜波打ち現象である膜ラフリング (赤矢印) が観察されるが、山椒成分 ZP1 または ZP2 により膜ラフリングが抑制されることがわかる。

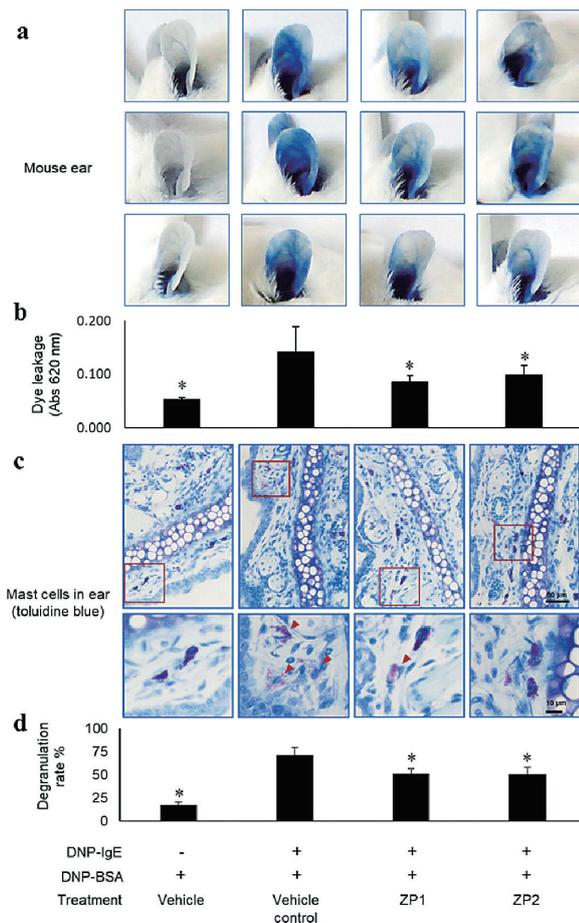


図 14 山椒成分 ZP1 および ZP2 の

皮膚受動アナフィラキシー (PCA) 反応抑制効果²⁸⁾

(a) PCA 反応による EB 溶出の様子、(b) EB 溶出液の吸光度、(c) 耳介中のマスト細胞染色像、(d) c の画像より算出したマスト細胞の脱顆粒率 (%)

赤矢印：脱顆粒したマスト細胞

ZP1 または ZP2 投与により脱顆粒が抑制される。*p<0.05

5. 不妊症予防効果 (ウメ)

晩婚化に伴い、不妊治療患者の高齢化が進んでいる。不妊の主な原因は加齢に伴う卵巣の老化による卵子数の減少、卵子の質の低下である。卵の発育と密接に関係している顆粒膜細胞は卵巣で卵子を包み込むように卵胞を形成し、卵母細胞の成長に関与する³⁵⁾。加齢に伴い増加することが知られる活性酸素種による酸化ストレスは³⁶⁾、顆粒膜細胞のアポトーシスを誘導し卵の質を低下させ、不妊症の原因の一つとされる³⁷⁾。したがって、酸化ストレスを軽減して顆粒膜細胞を保護することは不妊治療に有効であると考えられる。過去の研究では、ウメを塩漬けして得られる上清の梅酢を脱塩濃縮加工した梅酢由来エキス (ウムリン®、紀州ほそ川創薬、和歌山) をニワトリの餌に混ぜて摂取させると、卵の質が向上することが報告された³⁸⁾。これはウメに含まれる抗酸化作用によると考えられた。この成果を生かして紀州うめたまごが販売されることとなった。これらの研究を基に、ヒトでは生殖補助医療 (ART) 反復不成功の難治性不妊患者に対してサプリメント製剤として用いられる DHEA (dehydroepiandrosterone) と梅酢由来エキス (ウムリン) が投与され、受精率が有意に上昇して高い妊娠率が得られたことも報告された³⁹⁾。これもウメに含まれる何らかの成分が抗酸化作用を示したことによると考えられた。そこで、ヒト巣顆粒膜細胞株 COV434 細胞を使用し、梅に含まれる酸化ストレスに対して有効な生理活性物質を探索し、その効果について検討した⁴⁰⁾。

COV434 細胞の培地中に過酸化水素を添加することで COV434 細胞に酸化ストレスを与えるとアポトーシスによる細胞死が誘導された。この酸化ストレスを与える際に、培地中にウメ成分も添加することで細胞死が抑制される効

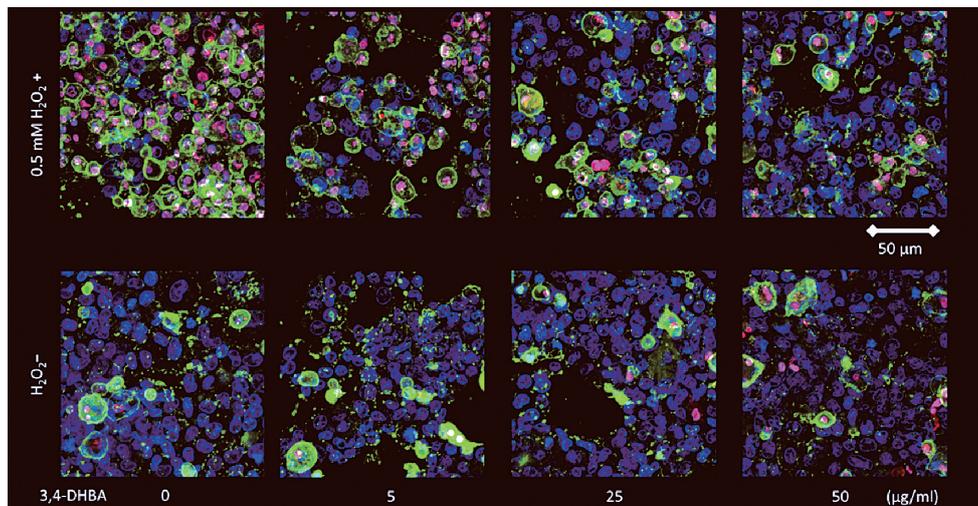


図 15 ウメ成分プロトカテクアルデヒドの顆粒膜細胞 COV434 に対する酸化ストレス誘発アポトーシス抑制効果⁴⁰⁾

COV434 を蛍光染色して観察した。青は細胞の核 (hoechst33342)、緑はアポトーシス細胞 (Annexin V)、赤は死細胞 (propidium iodide) を表す。プロトカテクアルデヒド (3,4-DHBA) により酸化ストレス (過酸化水素: H₂O₂) によるアポトーシスが抑制されていることがわかる。

果を指標にして活性成分を探索した。その結果、過酸化水素によるアポトーシスを予防するウメ由来成分としてプロトカテクアルデヒド (3,4-Dihydroxybenzaldehyde, (3,4-DHBA)) を NMR 法により同定した。このプロトカテクアルデヒドは抗アレルギー作用の項で記載したようにマスト細胞の脱顆粒も抑制する。過酸化水素による酸化ストレスによって細胞死が誘導され細胞生存率 20% 程度となるところ、プロトカテクアルデヒドはその細胞死を抑制し、50 μ g/ml の濃度ではコントロールと比較して約 70% の生存率を示した。また、アポトーシス細胞で活性の増加がみられるカスパーゼ活性をプロトカテクアルデヒドは濃度依存的に抑制した。さらに細胞毒性も抑制し、細胞生存率を増加させた。形態学的観察下においても酸化ストレスによる COV434 細胞のアポトーシスが、プロトカテクアルデヒドによって抑制されることが判明した (図 15)。また、COV434 細胞からは女性ホルモンであるエストラジオール (E2) が分泌されるが、その E2 分泌量はプロトカテクアルデヒドによって増加した。さらに詳細を調べると、E2 産生に関わる遺伝子である SF-1 (Steroidgenic factor 1) の遺伝子発現量もプロトカテクアルデヒドによって増加した。以上より、ウメに含まれるプロトカテクアルデヒドが酸化ストレスを軽減し顆粒膜細胞を保護するだけでなく、顆粒膜細胞を活性化しホルモン分泌を高める可能性が示唆された。このプロトカテクアルデヒドによる作用がウメによる不妊症予防効果の要因の一つであると考えられる。

6. 疲労感軽減効果 (ウメ)

日常生活である家事や労働、運動により起こる肉体的・精神的な疲労は QOL の低下や作業効率の低下を招くことから、疲労予防や疲労回復が健康や生活の維持に重要である。疲労回復には十分な休養をとることや食事によりエネルギーや栄養素を摂取することなどが効果的である。ウメに豊富に含まれるクエン酸には病的な疲労とは異なる主観的な疲労感を軽減する効果がある。日常生活で疲労を感じやすい健康者 24 名を対象に、クエン酸 (2700mg/日) を 8 日間連続投与すると、プラセボ群と比較して、VAS (視覚的アナログ尺度) 評価による主観的疲労感の軽減傾向がみられ、また、精神作業効率を客観的に図る装置である脳年齢計 ATMT (Advanced Trail Making Test) を用いた精神作業効率の測定では、クエン酸摂取群において、有意な作業効率の上昇がみられたことが報告されている⁴¹⁾。また、日常生活で疲労を感じやすい健康者 625 名を対象とした WEB 調査では、クエン酸 (2700mg/日) を 28 日間連続投与すると、プラセボ群と比較して、VAS 評価による主観的疲労感に有意な緩和作用が見られ、摂取を継続するほど、その作用は顕著であることが示された⁴²⁾。さらに、健康者 18 名を対象にクエン酸 (2700mg/日) を 8 日間経口投与した後に運動を負荷した試験でも、クエン酸摂取群

において VAS 評価による主観的疲労感が有意に低値を示している⁴³⁾。したがって、クエン酸を 2700mg 摂取することは日常生活や運動後の疲労感を軽減することがわかる。ただし、クエン酸 2700mg を梅干で考えると、梅干 1 粒 (大粒のもので可食部 15g) 当たり 400 ~ 600mg 程度しか含まれず、梅干で 2700mg のクエン酸量を摂取するには梅干を 5 ~ 7 粒の摂取が必要であり、塩分や梅干摂取量そのものが多くなることから、現実的ではなかった (ただし現在、クエン酸 2700mg を梅干 2 粒で摂取できるように加工した梅干を和歌山県企業と共同開発し販売も行われている)。そこで我々は、より低用量のクエン酸でも疲労感軽減効果が期待できるのではないかと考え試験を実施した。

健康成人男性 12 名を 2 つのグループに分けクエン酸 1000mg 含有飲料またはプラセボ飲料を運動直前に摂取させ自転車エルゴメーターを用いて日常生活で受ける負担に相当するような低負荷運動を実施させた。運動中の血中乳酸値や血糖値、運動前後の疲労感調査 (VAS 検査) や体調に関連するアンケート調査等を実施し、クエン酸 1000mg 摂取により運動後の疲労感がプラセボ群よりも軽減されることが明らかとなった (図 16)⁴⁴⁾。体調に関するアンケート調査では、「全身がだるい」、「眠い」という項目において、プラセボ群よりもクエン酸群の方が体調スコアで有意に「あてはまらない」という結果となり、VAS 検査の結果である疲労感の軽減効果と一致する内容であった。また、図 17 に示すように、クエン酸 1000mg 群では、運動中 15 分の血中乳酸値変化率はプラセボ群と比較して有意に低値であったことから、クエン酸を運動直前に摂取することによって血中乳酸の上昇が抑制された、あるいは、血中乳酸の利用が促進されたことが考えられた。いずれにせよ、疲労の指標となる乳酸値が低いことから、クエン酸が疲労を予防していると考えられる。以上からクエン酸 1000mg であっても疲労感を軽減する効果が認められ、梅干 2 粒の摂取でも同様の効果が期待される。我々はこのような成果をもとに、梅干や梅飲料に機能性関与成分クエン酸による疲労感軽減効果を商品に表示できる機能性表示食品の届出サポートを行い、地域活性化に貢献している。

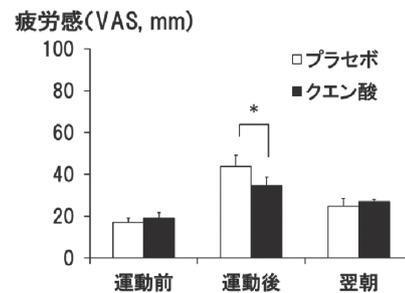


図 16 VAS 調査によるクエン酸摂取群またはプラセボ摂取群の疲労感評価⁴⁴⁾

運動後の疲労感がクエン酸摂取群において有意に低値を示したことから、クエン酸摂取により疲労感が軽減されることがわかる。
*P<0.05

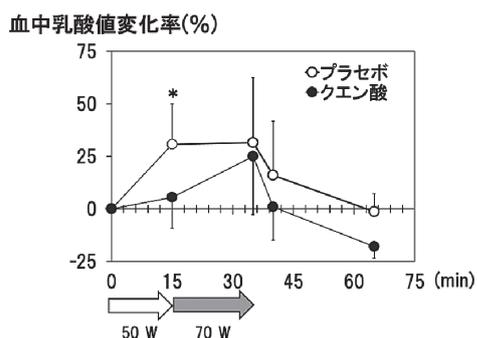


図 17 運動による血中乳酸値の変化⁴⁴⁾

血中乳酸値は運動前の乳酸値を基準とした変化率で表した。50Wの運動強度の運動および70Wの運動強度の運動を実施した後、65分までの乳酸値を測定し、すべての時間でクエン酸摂取群の方が血中乳酸値は低値を示した。クエン酸を運動前直前に摂取することによって血中乳酸の上昇が抑制された、あるいは、血中乳酸の利用が促進されたことが考えられる。

7. おわりに

和歌山県の特産農産物が有する健康に対する機能性を紹介してきたように、植物性食品には様々な健康増進効果が期待できると思われる。ただし、健康に良いからと言って食べすぎるのは過剰摂取による悪影響、例えば糖質の摂りすぎによる肥満などを招くので、適切な量を摂取する必要がある。また、食品の機能性を発揮するために必要な摂取量も明らかにして、用量を守らなければ効果も期待できない。食品の健康維持や疾病予防の効果をヒト対象に明らかにするだけでなく、その機能性関与成分や作用機序の解明を細胞または実験動物を用いて解明しなければ、本当の意味での健康食品や機能性食品とはなり得ない。特定保健用食品や機能性表示食品はこれらのエビデンスを必要としていることから、細胞レベルからヒトまでを対象にした研究が今後も重要である。食品の健康に対する効果は食品と疾患の組み合わせの数だけ存在し、その可能性は無限大であると言える。未だ特定されていない機能性に関与する天然成分はまだ多く存在し、研究に終わりは見えない。

参考文献

- Miyazawa M, Utsunomiya H, Inada K, et al. : Inhibition of *Helicobacter pylori* Motility by (+)-Syringaresinol from Unripe Japanese Apricot. *Biol Pharm Bull*, 29(1):172-3, 2006.
- Enomoto S, Yanaoka K, Utsunomiya H, et al. : Inhibitory effects of Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold et Zucc.; Ume) on *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis. *Eur J Clin Nutr*, 64(7):714-9.
- Utsunomiya H, Yamakawa T, Kamei J, Kadonosono K, Tanaka S-I : Anti-hyperglycemic effects of plum in a rat model of obesity and type 2 diabetes, Wistar fatty rat. *Biomedical Research*, 26(5):193-200, 2005.
- Dzua V : Mechanism of protective effects of ACE inhibition on coronary artery disease. *Eur Heart J*, 19:J2-6, 1998.
- Butt MS, Sultan MT, Aziz M, et al. : Persimmon (*diospyros kaki*) fruit: Hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI J*, 14:542-61, 2015.
- Kono R, Okuno Y, Nakamura M, et al. : Peach (*Prunus persica*) extract inhibits angiotensin II-induced signal transduction in vascular smooth muscle cells. *Food Chem*, 139(1-4):371-6, 2013.
- Touyz RM, Schiffrin EL : Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacol Rev*, 52:639-72, 2000.
- Ohtsu H, Higuchi S, Shirai H, et al. : Central Role of Gq in the Hypertrophic Signal Transduction of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology*, 149(7):3569-75, 2008.
- Moon CY, Ku CR, Cho YH, Lee EJ : Protocatechuic aldehyde inhibits migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and intravascular thrombosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 423(1):116-21, 2012.
- Kono R, Nakamura M, Nomura S, et al. : Biological and epidemiological evidence of anti-allergic effects of traditional Japanese food ume (*Prunus mume*). *Sci Rep*, 8(1), 2018.
- Kono R, Nomura S, Okuno Y, et al. : 3, 4-Dihydroxybenzaldehyde derived from *Prunus mume* seed inhibits oxidative stress and enhances estradiol secretion in human ovarian granulosa tumor cells. *Acta Histochem Cytochem*, 47(3):103-12, 2014.
- Utsunomiya H, Takekoshi S, Gato N, et al. : Fruit-juice concentrate of Asian plum inhibits growth signals of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II. *Life Science*, 72:659-67, 2002.
- Manolagas SC : Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21(2):115-37, 2000.
- Yamada S, Ohara N, Hayashi Y : Mineralization of matrix vesicles isolated from a human osteosarcoma cell line in culture with water-soluble chitosan-containing medium. *J Biomed Mater Res*, 66A(3):500-6, 2003.
- Yoshida H, Teramoto T, Ikeda K, Yamori Y : Glycitein effect on suppressing the proliferation and stimulating the differentiation of osteoblastic

- MC3T3-E1 cells. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 65(5):1211-3, 2001.
- 16) Sugiura M : Nutritional Epidemiologic Survey of the Relationship between Satsuma Mandarin Intake and the Risk for Lifestyle-related Diseases : Mikkabi Prospective Cohort Study. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 61(8):373-81, 2014.
- 17) Kono R, Okuno Y, Inada KI, et al. : A prunus mume extract stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(10):1907-11, 2011.
- 18) Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *Journal of Cell Biology*, 96(1):191-8, 1983.
- 19) Luppen CA, Smith E, Spevak L, Boskey AL, Frenkel B : Bone Morphogenetic Protein-2 Restores Mineralization in Glucocorticoid-Inhibited MC3T3-E1 Osteoblast Cultures. *J Bone Miner Res*, 18:1186-97, 2003.
- 20) Liu Y-K, Uemura T, Nemoto A, et al. : Osteopontin involvement in integrin-mediated cell signaling and regulation of expression of alkaline phosphatase during early differentiation of UMR cells. *FEBS Lett*, 420:112-6, 1997.
- 21) Nomura S, Nakamura M, Kono R, et al. : Relationship between frequency of Prunus mume intake and body composition. *日本未病システム学会雑誌*, 21(2):162-6, 2015.
- 22) Shan C, Ghosh A, Guo X, et al. : Roles for osteocalcin in brain signalling: implications in cognition- and motor-related disorders. *Mol Brain*, 12(1):23, 2019.
- 23) Oury F, Khrimian L, Denny CA, et al. : Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. *Cell*, 155(1):228-41, 2013.
- 24) Khrimian L, Obri A, Ramos-Brossier M, et al. : Gpr158 mediates osteocalcin's regulation of cognition. *Journal of Experimental Medicine*, 214(10):2859-73, 2017.
- 25) Nomura S, Kono R, Imaoka M, et al. : Traditional Japanese apricot (Prunus mume) induces osteocalcin in osteoblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 86(4):528-34, 2022.
- 26) Masuda S, Maeda-Yamamoto M, Usui S, Fujisawa T : "Benifuuki" Green Tea Containing O-Methylated Catechin Reduces Symptoms of Japanese Cedar Pollinosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *63:211-217*, 2014.
- 27) 湊口信也, 大野康, 舟口祝彦 他 : スギ花粉症の症状とQOLに対する「じゃばら」果汁の効果. *臨床免疫・アレルギー科*, 50(3):360-4, 2008.
- 28) Kono R, Nomura S, Okuno Y, et al. : Two Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*) fruit-derived compounds attenuate IgE-mediated allergic response in vitro and in vivo via inhibition of mast cell degranulation. *Eur J Pharmacol*, 885:173435, 2020.
- 29) Kono R, Nakamura M, Nomura S, et al. : Biological and epidemiological evidence of anti-allergic effects of traditional Japanese food ume (*Prunus mume*). *Sci Rep*, 8(1):11638, 2018.
- 30) Moon TC, Befus AD, Kulka M, Lacy P, Redegeld FA : Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunol*, 5:00569, 2014.
- 31) Siraganian RP, McGivney A, Barsumian EL, Crews FT, Hirata F, Axelrod J. Siraganian, et al. : - 1982 - Variants of the rat basophilic leukemia cell line for the study of histamine release. *Fed Proc*, 41:30-4, 1982.
- 32) Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD : IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2):S73, 2010.
- 33) Wang X, Kageyama-Yahara N, Hayashi S, Yamamoto T, Kadowaki M : Sphingosine kinase-1-dependent and -independent inhibitory effects of *Zanthoxyli Fructus* to attenuate the activation of mucosal mast cells and ameliorate food allergies in mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2012.
- 34) Wightman RM, Troyer KP, Mundorf ML, Catahan R : The Association of Vesicular Contents and Its Effects on Release. *Ann N Y Acad Sci*, 971(1):620-6, 2002.
- 35) van den Hurk R, Zhao J : Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63(6):1717-51, 2005.
- 36) Dröge W : Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1):47-95, 2002.
- 37) Devine PJ, Perreault SD, Luderer U : Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biol Reprod*, 86(2):27-8, 2012.
- 38) 伊丹哲哉, 香川高士, 細川清 他 : ニワトリの産卵性および卵質に及ぼす脱塩濃縮梅酢の影響. *日本家禽学会誌*, 42(2):J209-2016, 2005.
- 39) 宇都宮智子, 宇都宮洋才, 山本晶子 : ART 反復不成功, 難治性不妊患者に対する dehydroepiandrosterone・脱塩濃縮梅酢投与での ART 治療成績向上の可能性について. *日本受精着床学会誌*, 31(1):61-4, 2014.

-
- 40) Kono R, Nomura S, Okuno Y, et al. : 3, 4-Dihydroxybenzaldehyde derived from Prunus mume seed inhibits oxidative stress and enhances estradiol secretion in human ovarian granulosa tumor cells. *Acta Histochem Cytochem*, 47(3):103-12, 2014.
 - 41) Kajimoto O, Mieda H, Hiramatsu M, et al. : Effect of a Drink Containing Lemon Citric Acid on People Frequently Feeling Fatigue. *Jpn Pharmacol Ther*, 35:809-19, 2007.
 - 42) Kajimoto O, Mieda H, Hiramatsu M, et al. : The Internet Investigation about the Attenuation of Fatigue Feeling by Taking a Drink Containing Lemon Citric Acid. *Jpn Pharmacol Ther*, 35:821-8, 2007.
 - 43) Sugino T, Aoyagi S, Shirai T, Kajimoto O : Effects of Citric Acid and L-Carnitine on Physical Fatigue. *J Clin Biochem Nutr*, 41:224-30, 2007.
 - 44) Kono R, Nomura S, Tokuda A, et al. : Effects of Citric Acid Oral Intake before Low Intensity Exercise on Blood Lactic Acid and Feeling of Fatigue -A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Cross-over Study-. *Jpn Pharmacol Ther*, 45(3):395-403, 2017.