

トレハロースの開発とその応用

福田 恵温

Development and Application of Trehalose

Shigeharu FUKUDA

Abstract

The bacterium *Arthrobacter* sp. Q36, isolated from soil, showed an ability to produce trehalose from maltooligosaccharides and starch. Two novel enzymes, malto-oligosyltrehalose synthase (MTSase, EC 5.4.99.15) and malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase (MTHase, EC 3.2.1.141) were isolated and the production mechanism of trehalose was cleared. By the simultaneous reaction of these two enzymes, isoamylase and cyclomaltodextrin glucanotransferase on starch, the yield of trehalose reached to more than 85%. Trehalose shows many excellent properties to improve food quality. The hydration function of trehalose is applied to prevent food damage due to moisture and freezing. This sugar has an inhibitory effect on starch retrogradation and protein denaturation. Experiments using an ovariectomized mouse model of osteoporosis suggested that ingesting trehalose might be effective in preventing osteoporosis. In addition to their application to foods, trehalose is a useful ingredient for cosmetic and pharmaceutical products.

Key words : trehalose, glycosyltransferase, glass transition temperature

キーワード : トレハロース, 糖転移酵素, ガラス転移温度

1. はじめに

筆者は株式会社・林原において40数年にわたり、微生物酵素の検索、新規糖質の開発研究に従事してきた。ここでは画期的な製法と評価されたトレハロースの新規製法の開発経緯、およびトレハロースの食品物性に及ぼす機能とその食品分野への応用について紹介したい。

2. トレハロースとは

砂漠の植物（マリカタヒバ）が乾季をじっと耐える時¹⁾、あるいはネムリユスリカの幼虫が水のない環境になると体内にトレハロースを合成し、ガラス状態で乾燥から組織を保護している（Cryptobiosis / 無代謝状態）と言われている²⁾。また寒冷環境で大腸菌や酵母はトレハロースを合成

することにより低温ストレスに対する防御機構を備えていることが分かっている³⁾。

トレハロース (α -D-Glucopyranosyl-1, 1- α -D-glucopyranoside: α , α -Trehalose) はグルコースの還元基どうしが α , α -1, 1 結合した非還元性二糖であり, 細菌・酵母などの微生物, キノコ・海草・昆虫などの動植物に広く存在する天然糖質の一つである (図1)。

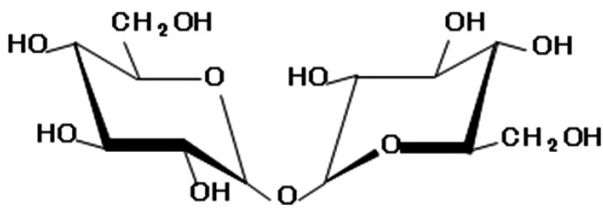


図1 トレハロースの化学構造

また, タンパク質の安定化や凍結・乾燥からの細胞保護作用など, 極めて魅力的な性質を有する糖質であることから, 食品・化粧品・医薬品への用途が期待されていた。しかし1992年当時, トレハロースは酵母から抽出・精製されていたため, 価格が1 kg当たり数万円と極めて高く, 有用性は認識されながらも実際にはなかなか使うことができなかった。微生物による発酵法や酵素を用いた製法も検討されていたが, 生成率, コストの面で実用化されていなかった。

3. トレハロース生成酵素の開発

同じグルコースから構成されており, 大量にしかも安価なデンプンを原料にトレハロースを製造することができれば, 低価格のトレハロースが供給可能となる。それは我々糖質研究者の夢でもあった。しかし当時「デンプンからトレハロースを作ることはできない」と言われていた。その理由として, 「 α -1, 4 結合を α , α -1, 1 結合に繋ぎ変えるのは立体化

学的に不可能である」, さらに, 「反応性に富む還元基どうしが結合したトレハロースの結合エネルギーは高く, α -1, 4 結合からなるデンプンのような低エネルギー結合物から生成するはずがない, 熱力学的にも不可能である」と考えられていた。事実, 同じく還元末端どうしが結合したスクロースの結合エネルギーは, α -1, 4 結合に比べてかなり高いことが分かっていた。

しかし我々は微生物のもつ無限の可能性に期待し, 土壌微生物より α , α -1, 1 結合を生成する酵素の検索を行った。その結果, *Arthrobacter*属の菌体内に α -1, 4-グルカンからトレハロースを生じる反応系を見出した⁴⁾。詳細に調べたところ, α -1, 4-グルカンから反応中間体を経てトレハロースが生成していることが分かった。中間体は α -1, 4-グルカンの還元末端側がトレハロースに変換されたマルトオリゴシルトレハロースであった。すなわち, トレハロースの生成は, 還元末端の α -1, 4 結合グルコース残基を α , α -1, 1 結合に変換するマルトオリゴシルトレハロース生成酵素/MTSase ((1 \rightarrow 4)- α -D-glucan 1- α -D-glucosylmutase; malto-oligosyltrehalose synthase: EC 5. 4. 99. 15) と, 生成したマルトオリゴシルトレハロースのトレハロース部分の α -1, 4 結合を特異的に加水分解するトレハロース遊離酵素/MTHase (4- α -D-[(1 \rightarrow 4)-

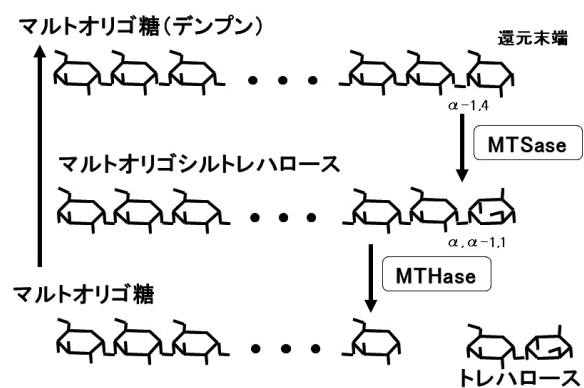


図2 MTSase, MTHaseによるトレハロースの生成機構

α -D-glucanotrehalose trehalohydrolase; maltotriol-trehalose trehalohydrolase; EC 3. 2. 1. 141) の共同反応によることが分かった (図2)。

MTSaseはグルコース鎖長が3以上のマルトオリゴ糖に作用し、対応するマルトオリゴシルトレハロースを生成する。本酵素はスクロースからイソマルチュロースを生成するイソマルチュロース合成酵素 (EC 5. 4. 99. 11) と同様の分子内転移反応を触媒することから、Mutaseに分類された。一方、MTHaseは α -1, 4 グルコシド結合を加水分解し、生成物が α -アノマーであることから α -アミラーゼの一種と考えられるが、マルトオリゴ糖やアミロースなどの α -グルカンにはほとんど作用せず、マルトオリゴシルトレハロースに特異的に作用する酵素である。

前記2つの酵素によるトレハロース生成系は、*Arthrobacter*属以外に古細菌の一種である*Sulfolobus*属や、*Brevibacterium*属、*Micrococcus*属、*Rizobium*属など広く細菌類に存在することが分かり、細菌における一つのトレハロース合成系と考えられる⁴⁾。*Arthrobacter* sp. Q36株由来酵素⁵⁾、および*Sulfolobus acidocaldarius* ATCC33909由来耐熱性酵素遺伝子⁶⁾をクローニングし塩基配列を解析した結果、MTSase (tre Y)、MTHase (tre Z) とイソアミラーゼ遺伝子 (tre X) が染色体上で近接して存在していることがわかった。しかもこれら遺伝子は終始コドンを含む4塩基が重複しており、トレハロースオペロンを形成していると考えられた。

アミノ酸配列について類縁酵素との相同性を比較すると、MTSase、MTHaseともにトレハロース関連酵素よりむしろ、 α -アミラーゼファミリーに類似していることが分かった。この知見をもとに、 α -アミラーゼファミリーに共通に保存されている触媒残基相当アミノ酸を部位特異的変異処理すると、活性が消失することを確認した。

MTSaseの立体構造は小林らが解析しており、活

性部位近傍が α 、 α -1, 1糖転移活性発現に特有な構造を示していると考えられた⁷⁾。一方、MTHaseについてはFeeseらが報告しており、やはり特異的な構造をしていることが分かっている⁸⁾。

4. トレハロースの製法検討

我々は上記酵素系以外に、分子内転移反応によりマルトースを直接トレハロースに変換するトレハロース生成酵素 (maltose α -D-glucosyltransferase; trehalose synthase; EC 5. 4. 99. 16) も*Pimelobacter*属や*Thermus*属の細菌中に見出している⁹⁾。いずれも新規酵素として認定され、新しいEC番号が付与された。

トレハロースの製法を検討するにあたり、いくつかの方法が考えられた (図3)。前記トレハロース生成酵素やトレハロースホスホリラーゼを用いる系では、いったん高純度のマルトースを製造する必要があり、さらにこれらの酵素によるトレハロースへの変換は平衡反応であるため、トレハロースの生成率が60%程度とあまり高くないなどの理由により検討を断念した。

一方、MTSase、MTHaseを用いた反応系は転移反応と加水分解反応の繰り返しであり、デンプンからのトレハロース生成率が極めて高いことから、こ

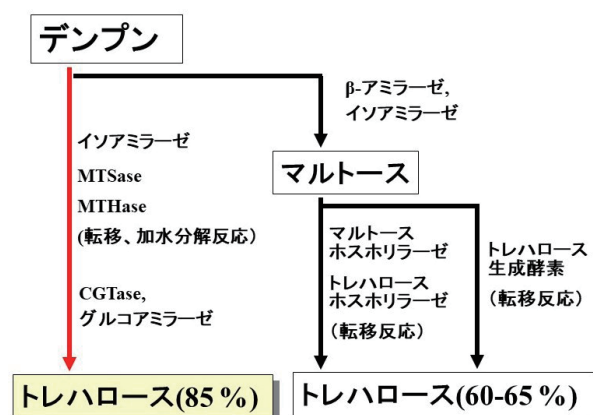


図3 デンプンからのトレハロース製造法

表1 トレハロース生産酵素の性質

菌株	<i>Arthrobacter</i> Q36	<i>Sulfolobus</i> <i>acidocaldarius</i>	<i>Arthrobacter</i> S34
反応温度	45~46 °C	75 °C	52 °C
反応pH	6.5	5.5	5.6
使用量(単位/g)	4	4	2
トレハロース生成率	82 % ~	82 % ~	85 % ~
他の酵素使用量(単位)	1000	300	300
生産性	×1 倍	—	×5~10 倍

の酵素系を採用することにした。用いる酵素としては*Sulfolobus*属由来MTSase, MTHaseが耐熱性に優れ、糖化反応には有利であるが、微生物の生育や酵素生産性が低いなど培養上の問題点、さらにはトレハロースの収率がやや低いなど工業的な生産には適していなかった。

Arthrobacter Q36株は酵素生産能が高く、当初トレハロースの生産に用いていたが¹⁰⁾、糖化温度が45 °Cと低く、トレハロース生成率の高いものの工業製造用酵素としてはやや不安定であった。その後単離した*Arthrobacter* S34株由来酵素はQ36株と比べて糖化温度が10 °C 高く、しかも至適pHが低いため同時に作用させるイソアミラーゼとの相性も良く、生産性はQ36株の10倍以上と考えられた(表1)¹¹⁾。本菌株をNTG変異処理による育種、培養条件の検討により、両酵素の生産量を数千倍に高めることができた。

さらにデンプンからトレハロースを効率よく生産するために種々の検討が加えられた。用いるデンプン種は安価なトウモロコシやタピオカ由来のデンプンが適していた。デンプンの高温液化に耐熱性 α -アミラーゼを、またデンプンの分岐構造を加水分解する目的でイソアミラーゼを併用した。さらに反応の後期に基質となりにくいオリゴ糖が蓄積するため、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ/CGTase ((1 \rightarrow 4)- α -D-glucan:(1 \rightarrow 4)- α -D-glucan 4- α -D-[(1 \rightarrow 4)- α -D-glucano]-transferase (cyclizing); cyclodextrin

glucanotransferase; EC 2. 4. 1. 19) の不均化反応を利用して低分子オリゴ糖を高分子化させ、再度基質として利用できるようにした。また、反応終期にわずかに残るグルコシルトレハロースをグルコアミラーゼによりトレハロースとグルコースに分解した。以上のような種々酵素の組み合わせにより、デンプンからトレハロースを85%以上含む反応液を得ることができた(図3)。この反応液はほとんどがトレハロースとグルコースであり、しかもトレハロースは結晶化が容易なため、高収率で高純度結晶トレハロース(98%以上)を回収し製品化することができた¹⁰⁾。1 kg当たり約300円と、従来の100分の1の価格で1994年に上市された。

5. トレハロースの食品物性における機能、および食品への応用

表2に示したようにトレハロースは非還元性であり、熱、酸に対して安定なため加熱工程による分解・着色(メイラード反応)がほとんどない。従って他の食品成分の変性への影響も極めて少ない。また2含水結晶は湿度に対しても安定であることから、水が存在する環境に対し補完的に働き、食品の水分活性を低下させて保湿性を高める作用、保存・日持ち向上、冷凍・冷蔵による離水防止作用を示す。また、

表2 トレハロースの物理化学的性質

項目	性質
融点	97.0 °C (含水結晶)
	210.0 °C (無水結晶)
ガラス転移温度	107.0 °C (スクロース: 70 °C)
水に対する溶解性	68.9 g/100 g (20 °C)
	140.1 g/100 g (50 °C)
	602.9 g/100 g (90 °C)
吸湿性	RH90 %以下で非吸湿性
甘味度	スクロースの38 %
pH安定性	99 %以上 (pH3.5-10, 100 °C, 24 時間)
熱安定性	99 %以上 (120 °C, 90 分)
メイラード反応	着色なし (100 °C, 90 分)

表3 トレハロースの機能と食品用途

機能	主な用途
デンプン老化抑制	米飯、麺、パン、焼き菓子、和菓子
保水性	ゼリー、ムース、ホイップクリーム
タンパク質変性抑制	卵加工品、乳加工品、肉加工品、プリン
脂質変敗抑制	焼き菓子、畜肉加工
加熱・加工時の風味改善	レトルト食品、焼き菓子
冷凍時の組織保護	冷凍食品、アイスクリーム、氷菓
低甘味性	和菓子、洋菓子、氷菓
果物、野菜の褐変・変形抑制	農産物加工、ジャム
結晶性	グレーズ、ソフトキャンデー
ガラス化能	パイ生地、ビスケット、クッキー、米菓
矯味・矯臭	飲料（豆乳、青汁、アミノ酸）、調味料

トレハロースは単糖や他の二糖類（スクロース、マルトース）と比較して高いガラス転移温度を示すことが特徴である。

食品のおいしさを表すパラメーターとして、テクスチャー・食感といった食品物性、味・香りの影響、おいしさの持続、賞味期限の延長効果などが挙げられる。我々はトレハロースの発売開始以来、20年にわたってトレハロースの物性、応用開発や種々生理機能について調べてきた。そのなかで食品への応用に関しての機能性を見出し、表3に各機能とその食品への応用例を示した。基本的にはトレハロースに特徴的な物理化学的性質、すなわち水和力の高さ、結晶性、高いガラス転移温度、氷結晶成長抑制効果に起因している。以下、主な応用例について述べる。

(1) デンプン老化抑制効果

デンプンを含む食品は低温に保存、あるいは保存時間とともにデンプンの老化により硬化、パサつきなど品質の劣化が起こる。図4に示したようにトレハロースはスクロース、マルトースなどの二糖、その他オリゴ糖のなかでデンプン老化抑制効果が特に高いことが分かっている。トレハロースは和菓子を中心にパン、麺類などデンプンを含む食品の柔らかさを保つ目的に最も広く利用されている¹²⁾。また、炊飯時に2%程度のトレハロースを添加しておくと、低温時における米の硬化が抑えられ、チルド流通のおにぎり、米飯の凍結にも用いることができる。

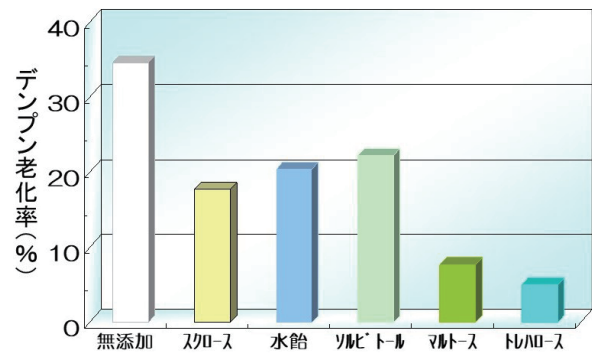


図4 各種糖質のデンプン老化抑制効果

澱粉溶液(2%)と12%の各糖質溶液を等量混合・糊化した後、4℃で保存し12時間後の濁度の増加を老化率とした

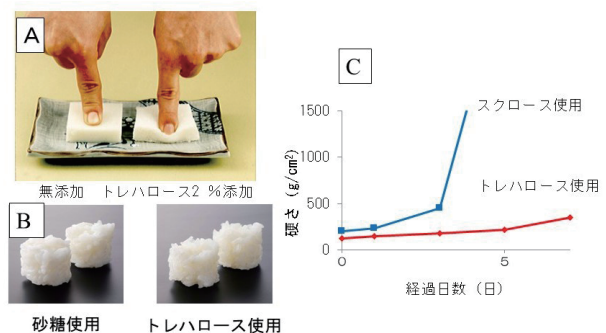


図5 トレハロースのデンプン老化抑制効果

A: 餅米に対し2%のトレハロースを加えて蒸し、枠をついた、室温保存3日目の状態。
 B: スクロースあるいはトレハロースを2%加えて炊飯し、-20℃で1ヶ月保存後、自然解凍した。
 C: 餅粉100に対してスクロースあるいはトレハロースを80加え、蒸して餅生地を作り、4℃にて冷蔵保存。レオメーターにてプランジャー(φ15mm)が4mm進入した時の荷重を硬さとして測定。

図5Cに示したように、トレハロースを使用することにより餅の柔らかさを保つ効果が高くなり、品質保持期間の延長にも有効である。

老化はデンプンの直鎖構造であるアミロース部分中の水分子が抜け、アミロースどうしが水素結合により会合することによって起こる。トレハロースはデンプン鎖中に分散している水分子と入れ代わることにより、アミロース間の水素結合生成を阻害し、デンプンの老化を抑えるのではないかと考えられている。

(2) タンパク質変性抑制効果

タンパク質は加熱により変性し、凝固・硬化する。トレハロースはタンパク変性を抑制する効果を有しており、卵を加熱処理する際にトレハロースを添加しておくことで、ふっくらとしたスクランブルエッグを調製することができる。鶏肉のから揚げや牛豚挽き肉を用いたハンバーグも同様に固くなりすぎないなど、各種タンパク質性食品の熱変性抑制効果を発揮する。

スクロース、ソルビトール、マルトースにもタンパク質変性抑制効果が認められているが、トレハロースが最も強い抑制効果を示す(図6)。

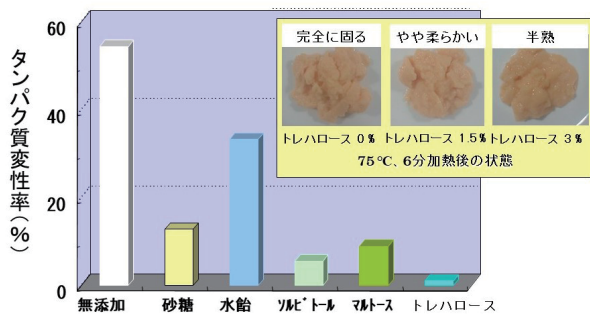


図6 種々糖質のタンパク質変性防止効果

(卵白に各糖質を5%加えて-20℃で5日間保存し、解凍後の濁度の比を変性率とした)

(3) 保水性

トレハロースは水分子との相互作用が比較的強く、保水性を保つ効果を示す。食品の水分を安定的に保ち、保存による離水や乾燥を抑えることが可能であり、できたてのフレッシュ感やしっとり感を保つことができる。水分を多く含むゼリー、ムース、スポンジケーキやホイップクリームなどに応用されている。

(4) 冷凍時の組織保護(氷結晶成長抑制)効果

豆腐やプリンなどタンパク質を多く含む食品を凍結すると氷結晶の成長により組織が破壊され、「す」が形成される。その後解凍すると、離水により元の形を保持できなくなる。図7-Bに示したプリン凍

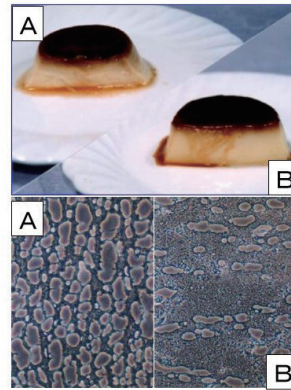


図7 トレハロースの氷結晶成長抑制効果

甘味度が同等の2種カスタードプリン(A:スクロース12%, B:トレハロース18%+スクロース5%)を凍結させた後、解凍した。上は解凍後の写真、下は組織の電子顕微鏡写真像。

結時の組織の電子顕微鏡写真では、トレハロースを含むプリンで氷結晶の成長が抑制され、組織の破壊が抑えられていることが分かる。

トレハロースは水和力が強いいため、タンパク質分子の周囲に形成されている安定な水分子の層にすみやかに入り込み、水分子と入れ換わると考えられる。従って、凍結してもタンパク質分子周囲の氷結晶の成長がトレハロース分子の存在により抑えられるため^{13, 14)}、タンパク質本来の構造が保護され、解凍しても離水が起こりにくいと推測されている。

(5) 矯味・矯臭作用、風味改善効果

糖質は甘味料としてだけでなく、えぐみ、苦味を抑えたり、不快な臭いを抑えたりする目的で料理に使われている。一般に糖質は味の改善や臭いの抑制作用を有しているが、トレハロースも矯味・矯臭効果を示す。とくに豆乳や青汁、疎水性アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシンなど)の苦みを抑制することが分かっており、飲料の呈味改善目的で使われている。苦みの抑制、塩味の増強効果は官能試験のみならず、味覚センサーを用いても同様の結果が得られている。

(6) 結晶化, ガラス化の応用

かつお節はもともと柔らかい魚肉であるが、いったんかつお節に加工した後はいつまでもその形状や硬さが変わらず保持される。ガラス化状態の特徴を示す典型例であるが、キャンディ、スナック菓子、クッキー、ビスケットなどいずれもガラス化を応用した食品である。これらの食品を製造する際にはガラス化転移温度が高い物質を用いたほうが、より安定的に品質を保つことができる。トレハロースのガラス化転移温度は一般的に利用されている糖質のなかでは最も高く(表2)、クッキーやスナック菓子のクリスピー感(サクサク感)を保持したり、キャンディの吸湿抑制などに効果的である。このように、トレハロースを用いて効率よくガラス化することにより、高温・冷凍・乾燥・多湿などの環境ストレスへの耐性が付与され、食感が保たれる。

6. トレハロースの化学構造と物理的特性

これまで述べてきたようにトレハロースは物性面において種々の機能を発揮することが分かっている。これはトレハロースのもつ強い水和作用による水の構造化にあると考えられている。種々食品成分分子周辺の水が構造化することにより界面のエントロピーが低下する。それに伴い食品の構造はパッキング密度を増大させ、水との接触面積を減らしてデ

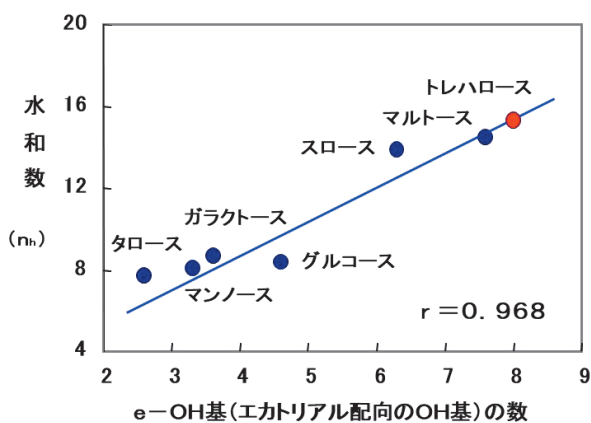


図8 糖の水和力・e-OH基数と水和数

ンプン老化と同様の現象が起こる。エカトリアル水酸基の多い糖ほど水のクラスター構造にはまりやすいと考えられており、トレハロースの水酸基は全てエカトリアルであることから水和特性の強い糖であることが分かる(図8)^{15, 16)}。

一方、トレハロースのガラス化転移温度はマルトースやスクロースより高い。これはトレハロースがその周囲の水分子を強く構造化していることを意味する。このようにトレハロースの水和作用はその分子構造からも支持されている。

水分含量が多い環境では水和数の多さ、すなわち食品中の水分をトレハロースが拘束することにより柔らかさの保持に繋がっている。一方、水分が低い環境ではスクロースなどと比べて安定なガラス状態を形成しやすいため、固さを保持する機能が高いのではないかと考えられる。

7. トレハロースの生理機能

井上らはチューリップ花茎をトレハロースで処理すると花卉の老化離脱が4日遅れ、花卉の老化抑制に有効であることを見出した¹⁷⁾。トレハロースは細胞伸長には影響しないが、花卉のイオン漏出を抑制し、組織の代謝活性を維持する機能を有していることが示された。またWinglerらは、シロイヌナズナの発芽過程にトレハロースを添加すると根、子葉の成長が抑制されることを見出した¹⁸⁾。これはトレハロースによりApL3 (ADP-Glucose Pyrophosphorylase) 遺伝子の発現が誘導され、発芽時の成長よりむしろデンプン合成を促している結果であると考えられる。このことは植物界においても、トレハロースが種々の生理機能を発揮する可能性を示している。

組織安定化作用を化粧品、医薬品に応用する試みがなされている。ヒト皮膚線維芽細胞を水分がほとんど存在しない乾燥環境で培養すると、トレハロー

スが存在する場合、スクロース、マルトースに比べて細胞生存率が最も高く、またその効果は濃度依存的であった¹⁹⁾。すなわち、トレハロースは乾燥による細胞の生体膜破壊を防ぐ効果を示すことが確認された。松本らも同様にヒト角膜細胞を用いて、マルトースや市販点眼薬よりトレハロースの方が、乾燥からの細胞保護作用が強いことを報告している²⁰⁾。

Croweらは、エンドサイトーシスにより血小板にトレハロースを取り込ませ、凍結乾燥させることに成功した。そして2年間の保存期間を経た後でも、90%の血小板を回収することができた²¹⁾。

一方、和田らは臨床臓器移植に用いられている臓器保存液 (Euro Collins液) の改良を検討した。グルコースをトレハロースに置き換えることにより肺機能の維持に有効であることを見出し、ET-Kyoto (extracellular-type trehalose-containing Kyoto) 液を開発した。この保存液はすでにヒトの肺移植に用いられている²²⁾。

また、新井らは卵巣を摘出した骨粗しょう症モデ

ルにおいて、トレハロースの経口投与により大腿骨の骨密度減少が抑制されることを示した。トレハロースの摂取によりIL-6などの炎症性サイトカインの産生が抑えられ、その結果として破骨細胞の誘導が抑制されたのではないかと考えられる²³⁾。

さらに、貫名らは遺伝性疾患であるハンチントン病の動物モデルにおいて、疾患に特徴的な大脳萎縮、運動機能低下がトレハロースの飲水投与により改善されることを見出した²⁴⁾。トレハロースの経口投与により神経疾患の改善が数多く報告されている²⁵⁾。

またKaplonらは、ヒトが12週間にわたりトレハロースを経口摂取することにより心血管疾患の発症リスクが低下することを報告している²⁶⁾。

これら種々疾患に対するトレハロースの作用機構はまだ明らかではないが、トレハロースがオートファジーを促進することと関連している可能性がある²⁷⁾。

トレハロースのもつ生理機能に関しては、別の機会に整理して報告したい。

(引用文献)

- 1) Watanabe M., et al., *J. Exp. Biol.*, **205**, 2799-2802 (2002)
- 2) Zentella R., et al., *Plant Physiol.*, **119**, 1473-1482 (1999)
- 3) Kandror O., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 9727-9732 (2002)
- 4) K. Maruta et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1829 (1995)
- 5) K. Maruta et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **1289**, 10 (1996)
- 6) K. Maruta et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **1291**, 177 (1996)
- 7) M. Kobayashi et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **55**, 931 (1999)
- 8) MD. Feese et al., *J. Mol. Biol.*, **301**, 451 (2000)
- 9) T. Nishimoto et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2189 (1995)
- 10) 杉本利行ら, 日本農芸化学会誌, **72**, 915 (1998)
- 11) T. Yamamoto et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 141 (2001)
- 12) 竹内叶, *New Food Industry*, **40**, 1 (1998)
- 13) Uchida T., et al., *J. Cryst. Growth*, **299**, 125-135 (2007)
- 14) Kawai H., et al., *Cryobiology*, **29**, 599-606 (1992)
- 15) 櫻井実, 井上義夫, 生物物理, **37**, 326-330 (1997)
- 16) 櫻井実ほか, 食品工業, **41**, 64-72 (1998)

- 17) M. Inoue, *Cryobiol. Cryotechnol.*, **45**, 51 (1999)
- 18) A. Wingler et al., *Plant Physiology*, **124**, 105 (2000)
- 19) 竹内叶, 伴野規博, *Fragrance J.*, **26**, 39 (1998)
- 20) T. Matuo, *Br. J. Ophthalmol.*, **85**, 610 (2001)
- 21) W. F. Wolkers et al., *Cell Preservation Technol.*, **1**, 175 (2003)
- 22) F. Chen et al., *Transplant Proc.*, **36**, 2812 (2004)
- 23) C. Yoshizane et al., *Nutr. Res.*, **20**, 1485 (2000)
- 24) M. Tanaka et al., *Nature Med.*, **10**, 148 (2004)
- 25) S. D. Portbury et al., *J. Alzheimer's Disease*, **60**, 549 (2017)
- 26) R. E. Kaplon et al., *AGING*, **8**, 1167 (2016)
- 27) 新井紀江, *BIO INDUSTRY*, **34**, 1 (2017)