

なたまめ茶に含まれるコンカナバリンA およびカナバリンの免疫学的検出に関する研究

山内大輔*・須藤慶太**

(*兵庫県立大学大学院理学研究科,
**株式会社ライフ・サイエンス研究所/フォーデイズ株式会社/東京農工大学)

(令和4年6月9日受付, 令和5年2月1日受理)

Immunological analysis of concanavalin A and canavalin in sword bean teas

Daisuke Yamauchi*, Keita Sutoh**

* Department of Life Science, University of Hyogo, 2167, Shosha, Himeji-shi, Hyogo, 671-2280

** Life Science Institute Co.Ltd./Fordsays Co.Ltd./Tokyo University of Agriculture
and Technology, 2-24-16, Nakacho, Koganei-shi, Tokyo, 184-8588

*〒671-2280 兵庫県姫路市書写2167

**〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16 東京農工大学小金井キャンパス

Seeds of sword bean (*Canavalia gladiata*), a leguminous plant, is rich in proteins and cannot be eaten raw because the seed contains toxins, such as concanavalin A (ConA) and canatoxin. Therefore, the seeds are soaked, boiled, rinsed, and pounded before using them as a protein ingredient. Also, the seeds have been utilized as a natural medicine. Recently, it was reported that consuming sword bean tea alleviates allergic rhinitis symptoms. Because ConA is a known mitogen of T-cell lymphocytes, the protein may be involved in the alleviation. Therefore, we examined the detection of ConA in the extracts of sword bean teas. We prepared sword bean tea from the embryos collected after removing seed coats from the seeds immersed in water. We analyzed the proteins in the tea extract during the production process using polyacrylamide gel electrophoresis. Immunoblotting with antibodies against ConA or canavalin, a major seed storage protein, was conducted to detect the protein in the tea extract. Our result indicated that the extractable protein amount decreased after heating during the processing phase. As described above, the extracts of commercially available sword bean teas were also examined with electrophoresis and immunoblotting. The results indicated that a lower amount of ConA was detected in the tea but not canavalin.

1. 緒 言

種子には無胚乳種子と有胚乳種子があり、マメ科植物はほとんどが無胚乳種子で、胚の子葉に貯蔵物質が蓄積されている。その種子を食料や飼料として利用する目的で、さまざまなマメ科植物が広く世界中で栽培されている。なたまめ (*Canavalia gladiata*) は、アジアや熱帯地域で栽培され、食用に利用されている¹⁾。その種子中

の子葉はタンパク質に富んでいるが、コンカナバリンA (ConA) およびカナトキシン等が含まれているので、生食には向かないことから、加熱した後に水に晒したり、発酵させたり等の処理を行ってから食用にされている。これに加えて、生薬としても利用されている。近年では焙煎して、季節性アレルギー対策のお茶としても飲まれており、市販もされている^{2,3)}。

お茶は、チャ (*Camellia sinensis*) の葉や茎を原料と

した嗜好品で、多くの生理的機能があることが知られている。例えば、緑茶にはカテキンが含まれていて、抗菌性、抗アレルギー作用および抗がん作用等の効果があることが知られている⁴⁾。豆類は食用に広く用いられることなどが報告されているが、それを用いたお茶も知られている。その中でもよく知られているのが、ダイズ (*Glycine max*) の種子を用いた黒豆茶である。黒豆は、大豆の中で種皮が黒色の品種群である⁵⁾。その種子を浸水後煎ってから熱湯を注いで、飲用にする。近年の研究では、その種皮に含まれるポリフェノールが薬効の主体であることが明らかにされつつある⁵⁾。それ以外にも、マメ科種子を用いたお茶としては、ハブ茶もよく知られている。このお茶は、本来ハブソウ (*Senna occidentalis*) が原材料であるが、現在は近縁のエビスグサ (*Senna obtusifolia*) が使われている⁶⁾。他には、カワラケツメイ (*Cassia mimosoides*) の根を除いた部分を用いたハマ茶も飲まれている⁷⁾。これら以外にも最近、なたまめを用いたお茶も飲まれている。前述のように、なたまめの種子は生薬として古来より利用されているが、日本ではその未熟なさを福神漬けとして食べることに加えて、あまり我々にはなじみがない植物である。なたまめ茶が飲まれている理由の一つとしてアレルギー性鼻炎の症状緩和があげられる^{2, 3)}。

なたまめの種子成分に関する記載については、これまでの論文や図鑑等でも誤っていることがある。主要な種子貯蔵タンパク質であるカナバリニンおよび ConA と、アミノ酸であるカナバニンの誤った表記が散見される⁸⁾。いわゆる jack bean と呼ばれるタチナタマメ (*Canavalia ensiformis*) からは酵素精製の代表例であるウレアーゼが単離されたことで、かつては教科書でもよく取り上げられていた⁹⁾。この種子には、糖結合タンパク質レクチンの一つである ConA が多量に含まれている¹⁾。この糖結合タンパク質は、いくつかの生理活性をもっている。その一つとして、細胞表面の糖鎖に結合して、リンパ球 T 細胞の細胞分裂を引き起こすマイトジェンの活性を示すことが知られている¹⁰⁾。また、カナバリニンは、タチナタマメの主要な種子貯蔵タンパク質で、ConA と同様に精製され、その立体構造が決定されたタンパク質として知られている¹¹⁾。これらがタンパク質であるのに対して、カナバニンは非タンパク質アミノ酸であり、タンパク質

合成を阻害する作用を有する¹²⁾。そのタンパク質合成阻害を介して、カナバニンが抗菌性を示すことも知られている。

ナタマメはタチナタマメと同じ属であり、近縁種である。我々は、ナタマメ種子の ConA とカナバリニンは、水に不溶性の性質を示すグロブリン画分に含まれることを以前示した¹³⁾。それぞれの抗体を用いた研究により、種子形成過程で合成・蓄積が起こることも明らかにした¹⁴⁾。それらのタンパク質は、合わせると種子タンパク質の 30% くらいを占めている。各々のタンパク質のアミノ酸配列も、それらをコードする cDNA の塩基配列からわかっている^{15, 16)}。ConA のもつ T 細胞マイトジェンという生理活性から、なたまめ茶のアレルギー性鼻炎の症状改善等に関与しているのではないかと推測している。そこで、本研究ではこれまでの知見を活用して、なたまめ種子の胚の部分を用いたなたまめ茶(抽出液)や市販のなたまめ茶(抽出液)に含まれている ConA とカナバリニンについて調べた。

2. 方 法

(1) 材 料

1999年に東京都立大学南大沢キャンパスの実験農場で収穫されたナタマメの種子を冷蔵庫で保存した。この種子より、以下に示すような手順でなたまめ茶(抽出液)を作った。それに加えて、市販のものも用いた。それらの原材料は表1に示した。

(2) なたまめ茶(抽出液)の調製

なたまめ種子を30分間吸水させた後に種皮を除き、取り出した胚の部分乾燥させた。次に、ジューサーミキサーで粉砕し、その粉砕物をフライパンで色が変わるまで加熱した。この粉砕物 3 g を、市販のお茶パックに入れて使用した。フライパンによる加熱の影響を調べるために、前述のジューサーミキサーによる粉砕物も同様に市販のお茶パックに入れて使用した。市販のなたまめ茶では、量を合わせるためにパックから出して、市販のお茶パックに入れて使用した。なたまめ茶のパックを、90℃に加熱した蒸留水に5分間浸した。得られたお茶(抽出液)の一部からタンパク質の定量を行った。その残りのお茶を凍結乾燥により粉末にした後、その一部(0.25 g)に

表1 市販されているなたまめ茶の原材料および1パック(3g)からの抽出液が含むタンパク質量

会社	原材料	タンパク質 (mg)
A	なたまめ(種子・さや)	300.9 ± 37.5
B	なたまめ全草, 黒豆, 鳩麦, くず草, 赤芽柏	106.1 ± 7.5
C	なたまめ全草, 鳩麦, 黒豆, 赤芽柏, 桑の葉	106.6 ± 6.4
D	なたまめ全草, 鳩麦, 黒豆, 赤芽柏, 桑の葉, 熊笹, 桑の葉	117.5 ± 9.8

3回の抽出実験を行って、その平均値と誤差を求めた。ただしA社については、1パック5gであったので、3gだけ取り出して抽出した。原材料のなたまめ全草については、B社は種子、さや、つる葉であると説明があるが、C社とD社はその詳細について記載はない。

蒸留水 1 mL を加えて溶解し、電気泳動用試料とした。

(3) タンパク質の定量

タンパク質の定量は、Pieace BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用した。

(4) 種子タンパク質の抽出

なたまめ種子は、4℃で一晩吸水させた後、種皮を除いた胚に 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl を加えて乳鉢と乳棒ですり潰した後、その全量を遠心管に移し、10,000×g, 20分間の遠心をした。その上清を集めて、それを種子タンパク質粗抽出液とした。

(5) ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析

試料にサンプルバッファーと2-メルカプトエタノールを加えて沸騰水で加熱した後、Tris-Tricine を緩衝液に用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE, 15%ゲル) を行った¹⁷⁾。分子量マーカーには、プレジジョン Plus プロテインプレステインドスタンダード Dual Extra (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いた。タンパク質の検出には、クマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した。

(6) 抗体による種子貯蔵タンパク質の検出

SDS-PAGE を行った後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) フィルターに転写して行った。ConA またはカナバリンを検出する抗血清として、各精製タンパク質をウサギに免疫して得た血清を用いた¹⁴⁾。カナバリンに対する抗体を精製するために、前述の抗血清からカナバリンを結合させたアガロースゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行った¹⁴⁾。抗体の反応したタンパク質の検出には、ABC キット (Vector Laboratories, Inc.)、および DAB 検出キット (Vector Laboratories, Inc.) を使用した。

3. 結果と考察

(1) なたまめ茶 (抽出液) の含む ConA およびカナバリンの免疫プロットを用いた検出

市販のなたまめ茶では、その原材料になたまめ全草と記載のあるものが多い (表 1)。その効果に関する論文では、なたまめの種子成分に注目されていることから^{2, 3)}、ここでは種子を用いたお茶 (抽出液) を作ることにした。

種子に水を吸わせた後に種皮を取り除き、胚の部分のみを用いた。種皮は固いので、次に粉碎する際にミキサーの刃に絡んで作業が進みにくいことや、種皮にはほとんどタンパク質が含まれないことから、種皮を除くことにした。次に、胚の粉碎物を加熱してから、熱湯で抽出して得られたなたまめ茶 (抽出液) に含まれる ConA について検出を試みた。加えて、種子貯蔵タンパク質として多量に含まれるカナバリンについても、ConA と比較す

るために検出を行った。豆を利用したお茶では、一般的に吸水させた種子を焙煎して作るが、その加熱によりタンパク質の変性が起こると考えられた。そこで、加熱前のジューサーミキサーによる粉碎物からも抽出して、その成分も調べた。種子貯蔵タンパク質である ConA とカナバリンについて、それらの泳動パターンと比較するために、1 M NaCl を含む緩衝液で抽出した種子タンパク質粗抽出液も準備した。なたまめ茶 (抽出液) のタンパク質には低分子のポリペプチドが多かったので、Tris-Tricine 緩衝液の 15%ゲルを分離に使用した。抗体を用いた免疫学的手法により、ConA とカナバリンの検出を試みた。ここでは分子量マーカーにはプレジジョン Plus プロテインプレステインドスタンダード Dual Extra を用いたので、その説明書に従って検出されたポリペプチドの分子質量 (単位: ダルトン Da) を表示した。カナバリンは、48 kDa のポリペプチドの 3 量体のタンパク質である。その分解物として、24 kDa のポリペプチドが少量存在する¹³⁾。ConA の主要成分は 30 kDa ポリペプチドであるが、その合成における前駆体ポリペプチドの分断と再結合という特殊な過程を経て 30 kDa ポリペプチドは合成される¹⁸⁾。この切断過程で生じた低分子 (24 ~ 9 kDa) のポリペプチドを含んでいる¹⁴⁾。

まず、CBB 染色による泳動パターンの比較を行うと、同じタンパク質量でも、加熱前の試料と加熱後ではカナバリンの 48 kDa ポリペプチドや ConA の 30 kDa ポリペプチドが少ないことが見て取れた (図 1 a)。

次に免疫プロットの結果であるが、抗カナバリン抗体を用いると、種子タンパク質抽出液には、主要な 48 kDa ポリペプチドと少量の 24 kDa ポリペプチドが検出された (図 1 b)。加熱前の試料では、カナバリンの主要な 48 kDa ポリペプチドが同じタンパク質量でも少ない量ながら検出された。その理由として、湯で抽出しているので、NaCl が含まれていないために抽出量が低いと推測された。加熱して抽出した試料では、そのバンドはより薄くなっていることで、加熱により抽出量がさらに減少していると推測された。抗 ConA 抗体を用いると、種子タンパク質には、ConA の主要な 30 kDa ポリペプチドに加えて、25 kDa から 9 kDa にかけての位置に低分子量のポリペプチドが検出された (図 1 c)。加熱前の試料では、30 kDa ポリペプチドも少し減少していたが、それ以上に 25 kDa から 9 kDa にかけての位置の低分子量のポリペプチドのバンドが薄くなっていた。加熱して抽出した試料では、加熱前と比較して、どのポリペプチドの量もさらに減少していた。

これらのことより、カナバリンは水に溶けにくいグロブリンであるため、抽出されにくいことに加え、加熱して作ったなたまめ茶 (抽出液) ではその量が減少していることから、加熱によるタンパク質の変性で、さらに水に溶け出しにくくなっていると推測された。一方、ConA でも同様に、種子タンパク質抽出液、加熱前、加

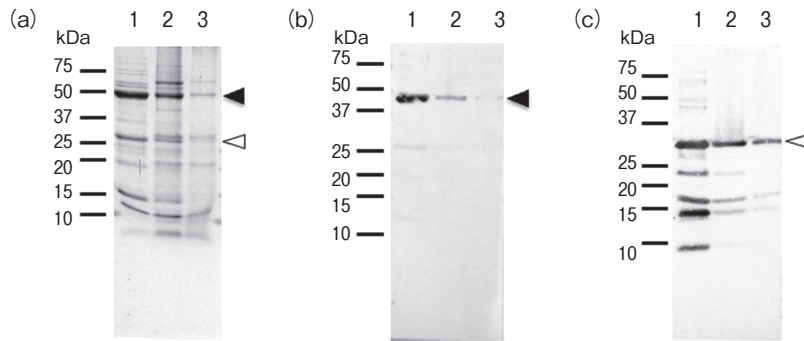


図1 自家製造過程におけるなたまめ茶（抽出液）の含むタンパク質成分の免疫学的分析

(a) CBB 染色。(b) 抗カナバリリン抗体による検出。(c) 抗 ConA 抗体による検出。

レーン 1：種子タンパク質抽出液，レーン 2：加熱前の試料からの抽出液，レーン 3：加熱後の試料からの抽出液。

◀：カナバリリンの主要な 48 kDa ポリペプチド，◁：ConA の主要な 30 kDa ポリペプチド。

サイズマーカーを泳動パターンに左側に示した。

熱後の順に ConA ポリペプチドの量が低下しているのが認められた。しかしながら，加熱後もかなりの量の ConA が含まれていることがこの結果より示された。加熱されても，ConA はカナバリリンより低分子であるので，熱変性を受けにくいのではないかと推測された。

(2) 市販のなたまめ茶（抽出液）の含む ConA およびカナバリリンの免疫ブロットを用いた検出

入手可能で，販売されている 4 社のなたまめ茶を用いた（表 1）。A 社のなたまめ茶の原材料には，種子・さや以外のものは使用されていない。B 社の製品は最もよく知られているが，その原材料にはなたまめ全草と表示があり，種子とさや以外につる葉が使用され，さらに，鳩麦，黒豆，赤芽柏，桑の葉も使用されている。市販されているなたまめ茶の中で入手しやすいものは，なたま

め以外の材料を用いていることが多い。そこで，B 社と似たような原材料である C 社と D 社のなたまめ茶（抽出液）についても分析を行った。4 社のお茶 3 g について，100 mL の熱湯で 5 分間煮沸し，それらの抽出されたタンパク質含量を求めた（表 1）。その結果，タンパク質含量はどの製品も 100 mg 以上であった。

CBB によるゲル染色によって，B～D 社については分子量 10 kDa の大きさのペプチドが主要な成分であることがわかった（図 2 a）。A 社が他の 3 社と異なっている理由として，A 社は種子とさやを使用しているのに対し，他社はなたまめ全草や赤芽柏と桑の葉等が含まれているので，これらの成分由来のペプチドによることがその差異の原因と考えられた。

抗体を用いた免疫学的手法により，カナバリリンと ConA の検出を試みた。カナバリリンについては，何も精

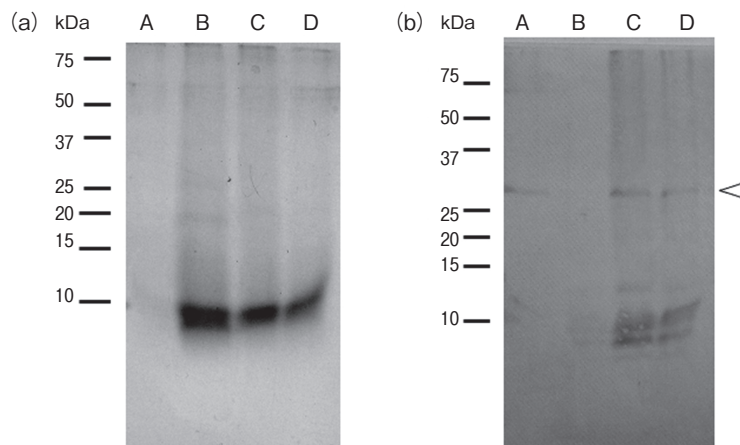


図2 市販されているなたまめ茶（抽出液）の含むタンパク質成分の免疫学的分析

(a) 市販なたまめ茶（抽出液）のタンパク質を電気泳動したゲルの CBB 染色。(b) 市販なたまめ茶（抽出液）タンパク質への抗 ConA 抗体によるポリペプチドの検出。

レーン A～D：表 1 の A～D の試料に対応するタンパク質（300 μg）を電気泳動した。

◁：ConA の主要な 30 kDa ポリペプチド。

サイズマーカーを泳動パターンに左側に示した。

製カナバリン抗体と反応する明瞭なポリペプチドのバンドが検出されなかった（結果は示さない）。一方、ConA 抗体では、B 社では検出されなかったが、他社の製品からは 30 kDa の ConA 主要ポリペプチドと思われるバンドが検出された（図 2 b）。それ以外に、15 kDa 以下に低分子量のポリペプチドも複数のバンドとして、C 社と D 社では検出された。同じようなバンドは、B 社でも検出されたが、A 社の製品では検出されなかった。したがって、なたまめ以外の原材料由来の ConA に類似したタンパク質の存在もしくは該当する位置には、太く濃いポリペプチドのバンドがあるので、それに対する非特異的な反応による可能性が考えられた。以上の結果から、市販のなたまめ茶（抽出液）の中にも、ごく少量ながら ConA が含まれていることが示唆された（図 2 b）。自作のなたまめ茶の製造過程で、焙煎による加熱を含む加工中になたまめの種子貯蔵タンパク質は変性を受け、抽出量が低下していると推測されたが、同様なことが市販のものでもその製造過程で起こったため、今回用いた 4 社のうちの 3 社の抽出液中には微量の ConA しか検出できなかったと考えられた。

なたまめ茶（抽出液）には、アレルギー症状の緩和を引き起こすことが知られている。なたまめ茶（抽出液）を飲むことで体内には ConA が取り込まれ、免疫系への働きかけ等が起っている可能性も考えられる。その理由として、ConA はリンパ球の T 細胞を刺激して細胞分裂を誘導するマイトジェンとして作用するからである¹⁰⁾。加えて、小腸には特殊な腸管上皮細胞の M 細胞があり、この細胞が腸内免疫に関与して腸内の細菌などを積極的に取り込んでいるので、ConA のような高分子物質も体内へと取り込まれると推定される¹⁹⁾。ConA 自体には毒性があることも知られており、体内に取り込まれると肝細胞で障害が起こる危険性があるが²⁰⁾、少量であれば、免疫に関わる細胞に働きかけてアレルギー症状を緩和させるのかもしれない。このような作用を見出すために、熱変性した ConA やペプチダーゼなどによって断片化した ConA 等の免疫系への影響等を調べてから、実証化する必要があるのかもしれないが、やはり ConA は毒性を示すタンパク質であるため、それ自体を活用するのは難しいのではないかと思う。ところで、マメ科植物の種子による中毒の原因物質としてレクチンが疑われる事例がある²¹⁾。テレビ番組で白インゲン豆を用いたダイエットレシピが紹介され、それを誤った調理方法で摂取した者が中毒を起こしたのだが、加熱が不十分であることが原因であった。なたまめ茶（抽出液）を自作した場合、焙煎による加熱をしないとかなりの量の ConA が抽出されたことから、十分に焙煎したり、お茶の濃さに注意したりするべきであろう。

4. 要 約

ナタマメ (*Canavalia gladiata*) はマメ科の栽培植物で、

アジアや熱帯地域で栽培され、食用に利用されている。その種子はタンパク質に富んでいるが、コンカナバリン A (ConA) およびカナトキシン等が含まれていることから、加熱した後に水に晒す等の処理を行ってから食用にされており、生食には向かない。また、その種子は生薬としても利用されている。近年は、なたまめから作られたお茶（なたまめ茶）が市販され、季節性アレルギーの症状緩和に効果があることから飲まれている。ConA は、リンパ球 T 細胞へのマイトジェン活性を示すことが知られており、なたまめ茶に含まれる ConA の作用によるアレルギー症状緩和への関与が考えられる。

そこで、なたまめ茶（抽出液）に含まれる ConA の検出を行った。まず、我々は水を吸わせたナタマメ種子から種皮を除いて取り出した胚よりなたまめ茶（抽出液）を作り、その製造過程でのタンパク質成分の変化を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動や ConA および主要な種子貯蔵タンパク質カナバリンに対する抗体を用いた分析によって調べた。その結果、調べた 2 種類のタンパク質の抽出液に含まれる量は、加熱により減少していくことが示された。加えて、市販のなたまめ茶 4 製品の抽出液についても分析した。その結果から、それらのお茶のタンパク質にはカンバリンは検出されなかったが、微量ながらも ConA が含まれているものがあることが示された。

利益相反

本研究に関して開示すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) Sridhar KR, Seena S: Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* — A comparative study, *Food Chemistry*, 99, 267–288 (2006)
- 2) 前野沢郎, 岩澤崇仁, 清水隆麿, 塚原清彰: 「薩摩刀豆なたまめ茶」の 8, *応用薬理* 84, 83–88 (2013)
- 3) Najima M, Munekata M, Soeda Y: Efficacy of natamame tea containing canavanine on the nasal condition and halitosis in healthy Japanese — Two randomized, double-blind, placebo-controlled studies —, *Medical Consultation & New Remedies*, 53, 401–412 (2016)
- 4) 立花宏文: 緑茶カテキン受容体 67LR を介したカテキンの機能性発現機構, *日薬理誌*, 132, 145–149 (2008)
- 5) 吉田正: 大豆の新規機能性成分の開発: 黒大豆種皮ポリフェノールとピニトール, *日本食品科学工学会誌*, 60, 534–539 (2013)
- 6) 伊沢凡人, 会田民雄: 薬草図鑑: カラー版, 家の光協会, 東京, p. 214–215 (1999)
- 7) 人見英里, 磯村裕佳, 三浦由紀子: 山口県産地産カワラケツメイ茶の機能性, *山口県立大学看護栄養学部紀要*, 5, 57–62 (2012)
- 8) 小学館食材図典編集部: 食材図典, 小学館, 東京, p. 231 (1995)
- 9) 丸山工作: 大学の生物学 生化学 (三訂版), 裳華房, 東京, p. 27–46 (1993)

- 10) Sharon N, Lis H/ 山本一夫, 小浪悠紀子 訳: レクチン第2版, 丸善出版, 東京 (2006)
- 11) Ko T-P, Ng JD, McPherson A: The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*), *Plant Physiol*, 101, 729-744 (1993)
- 12) Volcani BE, Snell EE: The effects of canavanine, arginine, and related compounds on the growth of bacteria, *J Biol Chem*, 174, 893-902 (1948)
- 13) Yamauchi D, Minamikawa T: In vivo studies on protein synthesis in developing seeds of *Canavalia gladiata* D.C., *Plant Cell Physiol*, 27, 1033-1041 (1986)
- 14) Yamauchi D, Minamikawa T: Synthesis of canavalin and concanavalin A in maturing *Canavalia gladiata* seeds, *Plant Cell Physiol*, 28, 421-430 (1987)
- 15) Yamauchi D, Nakamura K, Asahi T, Minamikawa T: cDNAs for canavalin and concanavalin A from *Canavalia gladiata* seeds: Nucleotide sequence of cDNA for canavalin and RNA blot analysis of canavalin and concanavalin A mRNAs in developing seeds, *Eur J Biochem*, 170, 515-520 (1988)
- 16) Yamauchi D, Nakamura K, Asahi T, Minamikawa T: Nucleotide sequence of cDNA for concanavalin A from *Canavalia gladiata* seeds, *Plant Cell Physiol*, 30, 147-150 (1989)
- 17) Schägger H: Tricine—SDS-PAGE, *Nat Protoc*, 1, 16-22 (2006)
- 18) Carrington DM, Auffret A, Hanke DE: Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A, *Nature*, 313, 64-67 (1985)
- 19) 大野博司: 特殊な腸管上皮細胞, M細胞の生物学, 生化学, 83, 13-22 (2011)
- 20) Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G: Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor, *Hepatology*, 21, 190-198 (1995)
- 21) 平林淳: 糖鎖とレクチン, 日刊工業新聞社, 東京, p.104-106 (2016)