主要産地のウンシュウミカンに含有されるβ-クリプトキサンチン量の 品種群間差およびその糖度との関連について

久永絢美・吉岡照高・杉浦 実^{a*}

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域
424-0292 静岡市清水区興津中町

Differences in Beta-cryptoxanthin Content among Various Kinds of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marcow.) Harvested in Major Production Centers of Japan and the Relationship with Sugar Content

Ayami Hisanaga, Terutaka Yoshioka and Minoru Sugiura^{a*}

Okitsu Citrus Research Station, Institute of Fruit and Tea Science, NARO, Okitsunaka-cho, Shimizu, Shizuoka 424-0292

Abstract

The satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow.) is one of the most eaten domestic fruits in Japan, and it is rich in β-cryptoxanthin (β-CRX). Recent studies suggested that β-CRX has bone-health benefits. The satsuma mandarin produced in Mikkabi, Shizuoka Prefecture, was accepted for the first time among fresh agricultural products as a “Food with functional nutrient claims.” However, there are very few data concerning the differences among production areas and/or varieties in the β-CRX content and associations with fruit quality. In this study, we measured the β-CRX content of various kinds of this fruit harvested in major production centers and examined its relationship with the sugar content. As the results, we found that the cultivar with the lowest β-CRX content was *gokuwase*; the *wase*, *nakate*, and *okute* cultivars have similar levels of β-CRX. Furthermore, the β-CRX content is significantly and positively correlated with the sugar content in all production areas and varieties.

Key Words : carotenoid, foods with function claims, fruit quality, varietal difference

キーワード : 品種間差, 果実品質, カロテノイド, 機能性表示食品

緒 言

β-クリプトキサンチンは日本のウンシュウミカン（以下、ミカン）に特徴的に多く含まれているカロテノイド色素の一種である。我々はこれまで、ミカンを食べる習慣を有する日本人の血中β-クリプトキサンチン値は欧米人と比べて顕著に高いことを見出してきた（Sugiura ら, 2002; Sugiura ら, 2004）。現在、国内主要ミカン産地である静岡県浜松市北区三ヶ日町の住民を対象にした栄養疫学調査（三ヶ日町研究）を継続的に行っているが、調査開始時の血中β-クリプトキサンチンレベルが高い者では、骨粗しょう症や2型糖尿病、動脈硬化症などの生活習慣病の発症リスクが有意に低下することをこれまでに見出している（Sugiura ら, 2012; Sugiura ら, 2015a, b; Sugiura ら, 2016a, b; Nakamura ら, 2016）。

一方、日本国内では2015年度より消費者庁において、機能性表示食品制度が開始した（消費者庁, 2015a）。本制度では、事業者の責任でその科学的根拠を示すことで一定のヘルスクレームの表示が可能になり、またサプリメントや加工食品だけでなく生鮮農産物もその対象となっている。ミカンではこれまでに蓄積されているβ-クリプトキサンチンの機能性研究の成果をもとに、2015年9月に生鮮農産物では初めて、JAみっかびの“三ヶ日みかん”が骨の健康維持に役立つ機能性表示食品として登録された。

機能性表示食品では、1日当たりの摂取目安量を示すとともにその機能性関与成分の含有量を表示しなくてはならないが、サプリメントや加工食品とは異なり、特に生鮮農産物では品種や栽培条件、さらには栽培地域、収穫時期などの影響で機能性関与成分の含有量にばらつきが生じることが予想される。しかしながら、全国で栽培出荷されている様々なミカン品種のβ-クリプトキサンチン含有量が産地間や品種群間でどのように異なるか詳細に調べた報告例は皆無である。一方、これまでにミカン果実中のβ-クリプトキサンチン含有量が糖度と有意に関連することが報告されており（濱崎・大城, 2003）、現在ミカンの等級選別

2017年12月28日 受付. 2018年4月18日 受理.

* Corresponding author. E-mail: msugiura@dwc.doshisha.ac.jp

^a 現在：同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科 602-0893
京都市上京区今出川通寺町西入

の重要な指標である糖度（Brix 値）を近赤外線光センサーによる非破壊選果機で全数検査することにより、糖度が一定基準より低いミカン規格外として除外することで、機能性表示の対象となる商品のβ-クリプトキサンチン含有量を担保している。しかしながら、これらの知見は濱崎と大城の知見に限られており（濱崎・大城，2003）、他の産地のミカンについての知見はほとんどない。

そこで本研究では、産地間や品種群間でのβ-クリプトキサンチン含有量のばらつきを明らかにし、機能性表示食品としての届出を行ううえで必要なβ-クリプトキサンチン含有量の保証について一定の目安となる知見を得ることを目的として、国内の主要なミカン産地4県で生産されている極早生・早生・中生・晩生の各品種群でのβ-クリプトキサンチン含有量を分析し、産地間あるいは品種群間による差を調査するとともに、β-クリプトキサンチン含有量と果実品質（糖度）との関連性について検討した。

材料および方法

1. 分析果実のサンプリング

国内の主要なミカン産地である、東海・近畿・四国・九州地方の4県（A県～D県）で生産出荷されている極早生・早生・中生あるいは晩生品種についてそれぞれ2015年の最盛期にサンプリングを行った。サンプリングは、極早生品種群では9月下旬から10月中旬、早生品種群では11月上旬から中旬、また中生・晩生品種群では12月上旬から中旬にかけてサンプリングを行った。なお各農協でのサンプリング段階では具体的な各品種の割合までは把握できていないが、各県での主要な品種名を第1表に示した。各果実サンプルは非破壊選果機が導入されている選果場において、等級別に出荷されたものを入手した。また各県について複数の農協からサンプリングを行った。なお極早生品種に限られた地域でしか生産されていない県については1農協からのサンプリングとした。また1農協で県内産ミカンの過半数を占める県については1農協からのサンプリングとした。国内の各産地・農協で収穫されるミカン

第1表 試験に供したウンシュウミカン果実の品種

品種群	品種名	サンプリング時期
極早生	高林	10月上旬
	ゆら早生	9月下旬～10月中旬
	日南1号	10月中旬
	肥のあけぼの	10月上旬
	豊福早生	10月上旬
早生	宮川早生	11月上旬～中旬
	興津早生	11月上旬～中旬
中生・晩生	南柑20号	12月上旬
	青島	12月上旬～中旬
	林	12月中旬

は、様々な品質管理のもと複数の等級（糖度や外観の質を基本とした選果）で出荷されているため、基本的に上位階級から下位階級のものまで、生果として生産出荷されているすべての等級を分析の対象とした。また各等級のミカンは基本的に最も出荷量の多い中心階級のもの（極早生品種ではSサイズ（果実の直径が55 mm以上61 mm未満）、早生や中生・晩生品種では主にMサイズ（同61 mm以上67 mm未満））を用いたが、A県では比較的大玉な晩生品種である「青島温州」が主力品種であったため、L（同67 mm以上73 mm未満）～2L（同73 mm以上80 mm未満）サイズなど他の産地の晩生ミカンに比べて大玉階級のものを対象とした。

各果実サンプルは入手後すぐに全果重（g）を測定し、外果皮を剥皮した後に維管束などをできるだけ除去し、じょうろの膜を含む状態を可食部として、β-クリプトキサンチンの分析に供した。それぞれの果実サンプルは、ホモジナイザー（IKA T25 digital ULTRA-TURRAX®, IKA, 大阪）を用いて粉碎し、得られた果実ホモジネート液を用いて、直ちにデジタル式糖度計（ATAGO PAL-1, (株)アタゴ, 東京）で糖度（Brix 値）を測定するとともに、HPLC分析試料とした。

2. 果実中のβ-クリプトキサンチン含有量の分析

ウンシュウミカン果実100 g中に含有されるβ-クリプトキサンチン量（mg・100 gFW⁻¹）の分析はHPLC（1260 Infinity LC, アジレントテクノロジー(株), 東京）により実施した。ガラス製の遠心管にホモジネートしたサンプルとピログロールを入れた後、エタノールを加えてホモジナイザーで粉碎した。次に60%水酸化カリウム溶液を加え、30分間56°Cでケン化処理を行った。ケン化処理を完了した遠心管に、1%塩化ナトリウムとヘキサン（0.1%ジブチルヒドロキシトルエン（以下、BHT）含有）を加え、ボルテックスミキサーで混合抽出を行った。遠心分離により分かれた上層（有機層）を回収し、さらにヘキサンによる抽出を3回行った。回収した有機層をエバポレーターで減圧除去し（40°C以下）、*t*-ブチルメチルエーテル（以下、TBME）：メタノール（以下、MeOH）（0.1% BHT, 1% 酢酸アンモニウム含有）（1:1）溶液に溶解し、HPLC試料溶液とした。HPLCのカラムはC30カラム（YMC Carotenoid S3μ 4.6 mm×100 mm i.d., (株)ワイエムシィ, 京都）を用いた。溶離液はA液（MeOH/アセトニトリル（以下、MeCN）/H₂O 7:1:2）とB液（TBME/MeOH 9:1）の2種を用い、流速は1.0 mL・min⁻¹、A液:B液=77.5:22.5から分析開始20分後にはA液:B液=20:80となるようにグラジエント溶出を行った。検出波長は450 nmを用いた。HPLC分析のための検量線は、標品（β-Cryptoxanthin ((3R)-β,β-Caroten-3-ol), 和光純薬工業(株), 大阪）をヘキサンで溶解し、光路長が1 cmの石英セルを用いて449 nmでの吸光度を測定し、比吸光係数（2400）と測定した吸光度を用いて、次式によりβ-クリプトキサンチン濃度を算出して作

成した.

$$\beta\text{-クリプトキサンチン} (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) \\ = (\text{吸光度} \times 10000) / 2400$$

濃度の異なる3種類の標品溶液により検量線を作成した. 分析開始から12.8分後に溶出されるピークを β -クリプトキサンチンと同定した.

本分析方法の再現性は, 濃度の異なる6サンプルを5回抽出分析行った結果から, その変動係数は, 2.4%~4.5% (平均3.4%) であることを確認した.

3. 統計解析

統計解析はSPSS ver 12.0J (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて行った. データはすべて平均 $\pm$ 標準偏差で示した. 糖度や β -クリプトキサンチン含有量の品種間での比較はBonferroniの多群間比較検定を行った. 糖度 (Brix 値) と果実中 β -クリプトキサンチン含有量との回帰分析においては, Spearman の単相関分析を行った.

結 果

1. 各産地における品種ごとにみた糖度と β -クリプトキサンチン含有量

各産地から収集した果実サンプルの全果実重 (g), 可食部重 (g), 糖度 (Brix 値), および β -クリプトキサンチン含有量 ($\text{mg} \cdot 100 \text{gFW}^{-1}$) を第2表に示した. いずれの産地においても, 早生品種群および中生・晩生品種群では極早生品種群に比べて糖度と β -クリプトキサンチン含有量は有意に高くなっていた. C県では中生品種の β -クリプトキサンチン含有量が早生品種よりも有意に高く, D県では晩生品種よりも早生品種の方が有意に高かった. これに対し, A県とB県, またすべての産地を統合した場合の早生と中生・晩生品種群間では β -クリプトキサンチン含有量にいずれも有意な差は認められなかった.

2. 糖度 (Brix 値) と β -クリプトキサンチン含有量との関係

糖度と β -クリプトキサンチン含有量の単相関解析を行ったところ, いずれの品種群またいずれの産地のミカンでも有意な相関関係が認められ, 国内主要4県のすべてのミカンを統合すると, $r=0.688$ ($p<0.001$) であった (第1図および第2図). さらにそれぞれの県別に品種群ごとに糖

第2表 産地別・品種群別にみたウンシュウミカンの果実重量, 糖度および β -クリプトキサンチン含有量 ($\text{mg} \cdot 100 \text{gFW}^{-1}$)

産地県	品種	n	果実重 (g) ^z		糖度 (°Brix) ^z			β -クリプトキサンチン ($\text{mg} \cdot 100 \text{gFW}^{-1}$) ^z		
A 県	極早生	70	97.0	(12.7)	10.2	(0.8)	a ^y	1.30	(0.36)	a ^y
	早生	70	102.9	(10.5)	11.5	(0.9)	b	2.04	(0.34)	b
	晩生	420	170.1	(57.5)	12.1	(1.1)	bc	1.97	(0.33)	b
	Total	560	152.5	(58.6)	11.8	(1.2)		1.89	(0.41)	
B 県	極早生	80	101.0	(8.3)	11.5	(1.2)	a ^y	1.75	(0.32)	a ^y
	早生	80	98.1	(8.4)	11.7	(1.0)	a	1.96	(0.28)	b
	中生・晩生	80	90.4	(8.3)	11.9	(1.1)	b	1.97	(0.28)	b
	Total	240	96.5	(9.4)	11.7	(1.1)		1.89	(0.31)	
C 県	極早生	210	92.8	(22.9)	10.1	(1.0)	a ^y	1.40	(0.25)	a ^y
	早生	270	97.3	(8.7)	11.4	(1.1)	b	1.81	(0.26)	b
	中生	285	92.0	(8.3)	11.6	(1.3)	b	1.94	(0.36)	bc
	Total	765	94.1	(14.2)	11.1	(1.3)		1.75	(0.37)	
D 県	極早生	120	95.8	(8.5)	11.2	(0.9)	a ^y	1.69	(0.40)	a ^y
	早生	120	106.0	(10.4)	12.6	(1.0)	b	2.33	(0.30)	b
	晩生	110	114.5	(11.0)	12.2	(0.9)	bc	2.12	(0.30)	bc
	Total	350	105.2	(12.5)	12.0	(1.1)		2.04	(0.43)	
極早生 (A–D 県)		480	95.5	(17.0)	10.6	(1.2)	a ^x	1.51	(0.37)	a ^x
早生 (A–D 県)		540	100.1	(10.0)	11.7	(1.2)	b	1.97	(0.35)	b
中生・晩生 (A–D 県)		895	131.3	(54.5)	12.0	(1.2)	bc	1.98	(0.34)	b
Total		1915	113.5	(42.1)	11.6	(1.3)		1.86	(0.40)	

^z データはすべて平均値 (標準偏差) で示す

^y 各県での同一列の異なる英文字は Bonferroni 検定 (5%) で有意差のあることを示す

^x 同一列の異なる英文字は Bonferroni 検定 (5%) で有意差のあることを示す

第1図 品種群別にみた国内主要産地におけるミカンの糖度とβ-クリプトキサンチン含有量の散布図

第2図 産地別にみた国内主要産地におけるミカンの糖度とβ-クリプトキサンチン含有量の散布図

度とβ-クリプトキサンチン含有量の相関分析を行ったところ、多くの産地ではいずれの品種群においても糖度とβ-クリプトキサンチン含有量は有意な正の相関が認められたが、B県の中生・晩生品種群またD県の晩生品種群で有意な相関は認められなかった（データ省略）。一方、今回調査分析した果実では、β-クリプトキサンチン含有量と糖度はいずれも果実重量と有意な相関は認められなかった。

考 察

本研究において、国内の主要なミカン産地の果実サンプルを用いたβ-クリプトキサンチン含有量の調査から、いずれの産地においても、早生品種群、中生・晩生品種群では極早生品種群に比べて糖度とβ-クリプトキサンチン含有量は有意に高く、また一部の産地における中生や晩生品種群を除くと多くの産地のミカンやいずれの品種群のミ

カンでも β -クリプトキサンチン含有量は糖度と有意に正相関することを明らかにした。これらの結果から、機能性表示食品として販売する際には、近赤外線光センサーによる非破壊選果機で全数検査することにより、糖度が一定基準より低いミカンを規格外として除外することにより、機能性表示の対象となる商品の β -クリプトキサンチン含有量を担保することがいずれの産地でも可能であることが考えられる。

またA県およびB県では、早生品種群と中生・晩生品種群とに β -クリプトキサンチン含有量に有意な差は認められなかったが、C県の中生品種群は早生品種群よりも有意に高く、これに対してD県では逆に晩生品種群よりも早生品種群の方が β -クリプトキサンチン含有量は高かった。早生品種と中生・晩生品種とで β -クリプトキサンチン含有量の差が地域によって異なる原因は不明であるが、糖度の結果でも同様の傾向がみられた。各地域での栽培方法は不明であるものの、シートマルチ栽培等により、より高糖度なミカン栽培が可能になったためにD県における早生品種群での β -クリプトキサンチン含有量も増加したのではないかと考えられる。

果実中の β -クリプトキサンチン含有量はいずれの産地のミカンあるいはいずれの品種群のミカンにおいても糖度と有意に正相関していたが、それぞれの県で品種群別に糖度と β -クリプトキサンチン含有量の相関分析を行ったところ、B県の中生・晩生品種群、またD県の晩生品種群で有意な相関は認められなかった（データ省略）。その理由として、層別化解析したことにより検体数が減り統計学的な検出力が低下したこと、あるいはB県の中生・晩生品種群やD県の晩生品種群でのミカン果実における糖度が他の産地のものと比べると比較的均質で分布の幅が小さかったためと考えられる。しかしながら、糖度と β -クリプトキサンチン含有量の相関関係は有意ではないものの、いずれも β -クリプトキサンチンを高含有しており、ばらつきを考慮しても機能性表示食品として必要な β -クリプトキサンチン量を担保できると考えられる。また本研究の結果から、分析対象とする果実の糖度が低いものから高いものまで幅広く分布しているほど、糖度と β -クリプトキサンチン含有量の相関係数は高くなることが推察された。

一方、糖度と β -クリプトキサンチン含有量の相関分析を行った濱崎と大城の先行研究では、相関係数が0.90で本研究の結果と比べて極めて高い相関関係が報告されている（濱崎・大城、2003）。しかしながら、濱崎と大城の先行研究では、極早生から早生、晩生、貯蔵品種まで様々な品種を対象に研究試験圃場内で露地栽培からマルチ栽培、またコンテナ栽培など様々な栽培条件で収穫された果実を分析対象としており、さらには果実の未成熟段階から成熟段階まで3段階でサンプリングしたものをすべて統合して糖度と β -クリプトキサンチン含有量との相関分析を行っている。そのため実際には市場に流通しない糖度の低い果

実から高糖度の果実までを均等に幅広く分析対象にしているため、糖度と β -クリプトキサンチン含有量に極めて高い相関関係が認められたのではないかと考えられる。また今回の研究では、各品種群で様々な品種をまとめて分析対象としたが、それぞれの品種で個別に β -クリプトキサンチン含有量のばらつきや糖度との相関関係を解析することで、例えば早生品種でもどのような品種で特に β -クリプトキサンチンと糖度との相関が強く認められるのかが明らかになると考えられ、今後さらに調査研究する必要がある。

また今回の研究ではいずれの産地における品種も最盛期にサンプリングを行ったが、各品種が市場に流通する期間は短いものでは極早生では2週間程度、早生や晩生品種の長いものでも1か月程度となっている。これらの出荷期間中、シーズンのはじめと終わりでどの程度の差違があるかは不明である。出荷時期による β -クリプトキサンチン含有量の変動については今後さらに検証する必要がある。また本調査研究は単年度での調査結果であるため、一般化するためには複数年次に渡った調査分析が必要である。さらには他の産地のミカン、また貯蔵ミカンや施設で栽培されたハウスミカンについても検証する必要がある。

現在、機能性表示食品として受理登録されているミカンでは毎日3mgの β -クリプトキサンチンを摂取することで骨の健康維持に役立つとされており、3mgの β -クリプトキサンチンを摂取するためのミカンの推奨摂取量を270g（可食部としてMサイズのミカンおよそ3個）としている（消費者庁、2015b）。今回分析した各産地のミカンにおいても、早生や中生・晩生品種群ではすべての果実で機能性表示食品として必要な可食部90g当たり1mg以上の β -クリプトキサンチン量を含有しており、いずれの産地のミカンでも機能性表示食品としての届出が可能と考えられる。一方、産地によっては極早生品種でのミカン果実中の β -クリプトキサンチン含有量が90g当たり1mgを下回るものもあり、これらの産地の極早生ミカンについては、秀品や優品などの等級の高い（糖度の高い）ミカンに限れば機能性表示食品としての届出は可能と考えられる。

摘 要

近年、消費者庁で新たな食品表示法が施行され、生鮮農産物も機能性表示食品の対象になった。ウンシュウミカンは日本国内で最も良く食される国産果実の一つであり、 β -クリプトキサンチンを多く含む。そのため、機能性表示食品としての期待が高い。本研究において、国内主要産地のウンシュウミカンに含まれる β -クリプトキサンチン含有量を各品種群で調査し、果実品質（糖度）との関連について検証を行った。その結果、ウンシュウミカン果実中の β -クリプトキサンチン含有量は極早生品種群で最も低かった（ $1.51 \pm 0.37 \text{ mg} \cdot 100 \text{ gFW}^{-1}$ ）。一方、早生（ $1.97 \pm 0.35 \text{ mg} \cdot 100 \text{ gFW}^{-1}$ ）や中・晩生（ $1.98 \pm 0.34 \text{ mg} \cdot 100 \text{ gFW}^{-1}$ ）品種

群では極早生品種群に比べて有意に高く、これらの品種群では同程度のβ-クリプトキサンチンが含有されていた。また果実中のβ-クリプトキサンチン含有量はいずれの産地・品種群のミカンであっても糖度と有意に正相関することが明らかとなった。今後、各産地での機能性表示食品としての表示が期待される。

謝 辞 本調査研究は、平成27年度補正予算「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」（平成28～30年度）、および全国柑橘消費拡大協議会からの委託研究の一部として行われた。ここに深謝の意を表する。

引用文献

- 濱崎 櫻・大城 晃. 2003. ウンシュウミカンの果肉に含まれるβ-クリプトキサンチン量に対する栽培方法や貯蔵の影響. 静岡柑試研報. 32: 1-6.
- Nakamura, M., M. Sugiura, K. Ogawa, Y. Ikoma and M. Yano. 2016. Serum β-cryptoxanthin and β-carotene derived from Satsuma mandarin and brachial-ankle pulse wave velocity: The Mikkabi cohort study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 26: 808-814.
- 消費者庁. 2015a. 食品関連事業者の方へ「機能性表示食品制度」が始まります！〈<http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin1443.pdf>〉.
- 消費者庁. 2015b. 機能性表示食品の届出情報（商品名：三ヶ日みかん）〈<https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc02/?recordSeq=0IKO41603310760101>〉.
- Sugiura, M., M. Kato, H. Matsumoto, A. Nagao and M. Yano. 2002. Serum concentration of β-cryptoxanthin in Japan reflects the frequency of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) consumption. *J. Health Sci.* 48: 350-353.
- Sugiura, M., H. Matsumoto, M. Kato, Y. Ikoma, M. Yano and A. Nagao. 2004. Multiple linear regression analysis of seasonal changes in the serum concentration of β-cryptoxanthin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 50: 196-202.
- Sugiura, M., M. Nakamura, K. Ogawa, Y. Ikoma and M. Yano. 2012. High serum carotenoids associated with lower risk for bone loss and osteoporosis in post-menopausal Japanese female subjects: Prospective cohort study. *PLOS ONE* 7: e52643.
- Sugiura, M., M. Nakamura, K. Ogawa, Y. Ikoma and M. Yano. 2015a. High serum carotenoids associated with lower risk for developing type 2 diabetes among Japanese subjects: Mikkabi prospective cohort study. *BMJ Open Diabetes Res. Care* 3: e000147.
- Sugiura, M., M. Nakamura, K. Ogawa, Y. Ikoma and M. Yano. 2015b. High serum carotenoids associated with lower risk for metabolic syndrome and its components among Japanese subjects: Mikkabi prospective cohort study. *Br. J. Nutr.* 114: 1674-1682.
- Sugiura, M., M. Nakamura, K. Ogawa, Y. Ikoma and M. Yano. 2016a. High vitamin C intake with high serum β-cryptoxanthin associated with lower risk for osteoporosis in post-menopausal Japanese female subjects: Mikkabi cohort study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 62: 185-191.
- Sugiura, M., M. Nakamura, K. Ogawa, Y. Ikoma and M. Yano. 2016b. High serum carotenoids are associated with lower risk for developing elevated serum alanine aminotransferase among Japanese subjects: Mikkabi prospective cohort study. *Br. J. Nutr.* 115: 1462-1469.