

野菜・果物未利用部位から抽出した食物繊維の
新規機能に関する研究

岩田 恵美子

目次

	頁
第1章 緒言	1
第2章 ビフィズス菌増殖作用を有する未利用部位食物繊維のスクリーニング	7
1 食物繊維の抽出と糖組成の分析	7
(1) 実験材料	7
(2) 方法	7
1) 試料の調製	7
2) 糖組成の分析	9
(3) 結果	9
1) 野菜や果物の未利用部位に含まれる食物繊維の収量	9
2) 食物繊維の糖組成	9
2 ビフィズス菌増殖作用を有する食物繊維のスクリーニング	11
(1) 実験材料	11
(2) 方法	15
1) ビフィズス菌の培養	15
2) 統計処理	16
(3) 結果	16
3 考察	16
第3章 温州みかんアルベド由来総食物繊維摂取によるラットへの生理的効果	22
1 アルベドTDF混合飼料摂取時のラットに対する影響	22
(1) アルベドTDF摂取によるラット飼料摂取量、体重、臓器重量に対する影響	22
1) 実験動物と飼料	22
2) 方法	22
3) 結果	24

(2) 盲腸内細菌叢に対するアルベドTDFの影響	28
1) 実験材料	28
2) 方法	28
3) 結果	29
(3) アルベドTDFの摂取が盲腸内アンモニア量および短鎖脂肪酸濃度に及ぼす影響	29
1) アンモニアの定量	29
①実験材料	29
②方法	29
2) 短鎖脂肪酸の定量	31
①実験材料	31
②方法	31
3) 結果	32
(4) 血糖値と肝臓、血清中の脂質に対するアルベドTDFの影響	32
1) 実験材料	32
2) 方法	32
3) 結果	34
2 アルベドSDFが膵臓由来リパーゼの酵素反応に与える影響	34
(1) 実験材料	34
(2) 方法	34
(3) 結果	36
3 考察	36

第4章	L-アラビノースの摂取がラット盲腸内細菌叢に及ぼす影響	40
1	L-アラビノース摂取による飼料摂取量、体重、臓器重量への影響	40
(1)	実験材料	40
(2)	方法	40
(3)	結果	41
2	盲腸内細菌叢に対するL-アラビノースの影響	41
(1)	実験材料	41
(2)	方法	41
(3)	結果	45
3	L-アラビノースの摂取が盲腸内アンモニア量および短鎖脂肪酸濃度に及ぼす影響	45
(1)	アンモニアの定量	45
1)	実験材料	45
2)	方法	45
(2)	短鎖脂肪酸の定量	45
1)	実験材料	45
2)	方法	45
(3)	結果	47
4	血清脂質に対するL-アラビノース摂取の影響	47
1)	実験材料	47
2)	方法	47
3)	結果	47
5	考察	47
第5章	結論	52
	引用文献	56
	謝辞	66

Summary

To evaluate the effect of dietary fiber (DF) on bifidobacteria growth, DF was extracted from inedible parts of vegetables and fruits. Rats were fed a diet containing extracted DF, and the bifidobacteria growth was assessed.

DF was extracted from taro and Chinese yam peels, pea pod, broad bean pod, broad bean testa, and Mikan (Japanese mandarin orange: *Citrus unshiu*) albedo. For evaluating bifidobacteria growth, *Bifidobacterium longum* JCM1217 (JCM1217) and *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 (JCM1254) were incubated in a medium containing DF extracted from each of the aforementioned vegetables and fruits. The highest increase in bacterial count after 48h, compared with the count at 0 h, was observed in a medium containing total DF (TDF) extracted from Mikan albedo. After a 48-h incubation period, JCM1217 and JCM1254 count showed a 8082- and 1023-fold increase, respectively, compared with that observed at 0 h. The medium containing TDF extracted from Chinese yam showed a 1117-fold increase in the JCM1217 count, which was the second highest value. When the sugar composition of these DFs was investigated, Mikan albedo was found to contain mostly arabinose, whereas Chinese yam largely contained mannose and galactose. Given that the highest increase in bacterial count was seen in TDF extracted from Mikan albedo, rats were fed on a diet containing 1% TDF extracted from Mikan albedo for 4 weeks. Intestinal microflora was immediately incubated after rat dissection. Therefore, although the bifidobacteria count in the control group containing cellulose instead of TDF was below the detection limit, the bifidobacteria detection rate and count in the Mikan albedo TDF group had markedly increased. Serum triacylglycerol (TG) concentrations were significantly lower, but fecal lipid excretion was significantly higher in the Mikan albedo TDF group than in the control group. The addition of Mikan albedo soluble DF significantly inhibited the activity of pancreatic lipase in vitro (>50%). Because TDF extracted from Mikan albedo mostly contained arabinose, it was hypothesized that feeding the rats on arabinose produced the same effect. Hence, rats were fed on a diet containing 1% L-arabinose for 4 weeks. Bifidobacteria count apparently increased upon ingestion of L-arabinose. Compared with the control group, the L-arabinose group showed a significant increase

in the amount of ammonia as well as acetate and propionate concentrations in cecal content. Furthermore, compared with the control group, the L-arabinose group showed a significant decrease in serum cholesterol concentration and an increase in the water content of feces.

Albedo TDF contained not only arabinose but also other sugars such as xylose and galactose. Therefore, these results indicate that arabinose plays a primary role in stimulating bifidobacteria growth.

We demonstrated that consumption of albedo TDF increased bifidobacteria count in the cecum of rats and decreased serum TG concentration. DF that possessed these two physiological functions has been absent in the food for specified health use. Thus, the new function of DF was discovered in this study.

第1章 諸言

腸内細菌叢は宿主の健康と密接に関っているとされている¹⁾。ヒトの大腸から排泄される糞便の中には乾燥重量1gあたり 10^{12} 個もの菌が生息し、約500の異なる細菌種が生息していると推定される。腸内細菌叢は個人やライフステージによってさまざまであり²⁾、食習慣や生活習慣によって大きな影響を受ける³⁾。その中でLactobacilliのような乳酸産生菌

(Lactic acid-producing bacteria (LAB))やBifidobacteriaは病原性細菌に対する抵抗性や血液中のアンモニア濃度の低下、免疫力を高めるなどの作用を持っている。プロバイオティクスやプレバイオティクスのような機能性食品を摂取する目的は、主にヒト腸管内にBifidobacteriaやLABのような微生物を増加させることである。

プロバイオティクスは「腸内細菌のバランスを改善することで宿主に有益な保健効果をもたらす生きた微生物」⁴⁾や、「宿主に保健効果を示す生きた微生物を含む食品」⁵⁾と定義されている。プロバイオティクスとして用いられている微生物には乳酸菌やビフィズス菌がある。乳酸菌では*Lactobacillus acidophilus*や*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus casei*などがあり、*Lactobacillus gasseri* OLL2716株には胃潰瘍や十二指腸潰瘍を引き起こす原因菌であるピロリ菌(*Helicobacter pylori*)を減少させる効果があり、そのメカニズムが報告されている⁶⁾。また、ビフィズス菌では*Bifidobacterium longum*や*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium infantis*などがあり、*Bifidobacterium longum* BB536株にはスギ花粉による花粉症を軽減する効果が報告されている^{7,8)}。

しかし、胃酸や胆汁酸の影響により健康な成人の胃、十二指腸、空腸では微生物の生存率が非常に低下する⁹⁾。そのため、この消化管上部の過酷な状況から生菌を保護する目的で腸溶性カプセルに入れて投与する方法が報告されている¹⁰⁾。また、プロバイオティクスとして用いられる微生物は消化管上部でも生存可能であることが条件の一つにとり上げられている¹¹⁾が、生きた微生物を摂取した場合、腸管まで到達できる生菌数は大幅に減少することが考えられる。

プレバイオティクスは「難消化性の食物成分で、特定の腸内細菌の増殖と代謝活動を選択的に促進し、しかも健康の保持増進に有効なもの」¹²⁾と定義されており、この効果を持つものは、ほとんどがオリゴ糖や食物繊維である。プレバイオティクスとして報告されているものには、オリゴ糖ではラクトスクロース、フラクトオリゴ糖、大豆オリゴ糖、コーヒーマンノオリゴ糖、ラクツロースなどがあり、食物繊維では構造が明らかになっているものとして、イヌリンや人工的に合成されたポリデキストロースなどがある。このようなプレバイオティクスは消化酵素の影響をほとんど受けることなく腸管内へと到達し、ビフィズス菌やLABのような宿主に対して有用な腸内細菌の増殖に利用される。プレバイオティクスの主な生理活性については、イヌリンではがん細胞の増殖抑制作用¹³⁾や乳酸菌の増加など¹⁴⁾が報告されている。主なものについて Table 1 に示した。

腸内細菌叢を改善し、宿主がより健康的な生活を送るには、プロバイオティクスの摂取も重要ではあるが、腸内常在菌の中でビフィズス菌や乳酸菌を選択的に増殖させることが出来るプレバイオティクスの摂取が重要であると考えられる。天然の食品から抽出された食物繊維でプレバイオティクス活性を持つものとして、ゴボウやチコリ、キクイモなどに含まれるイヌリンや、サイリウム²³⁾、小麦全粒粉^{24,25)}、アラビアガム²⁶⁾、大麦由来β-グルカン²⁷⁾などが報告されている。

また、食物繊維を多く含むものとして野菜や果物そして海藻類があげられる。その中でも野菜や果物のような農産物は冷凍や缶詰などに加工されて販売されているものが多く、このような工場からは年間1.9万トン（平成22年度）もの廃棄物が排出されている。一部は肥料や飼料として再生利用されているが、排出量の6割以上は処分されている²⁸⁾。しかし、これまでにジュースの搾汁残渣^{29,30)}やコーヒーの抽出粕³¹⁾など、廃棄されるものを起源とする食物繊維にビフィズス菌増殖効果や腸内細菌による資化性が報告されている。そのため、現在処分されているものの中にもプレバイオティックな作用を持つ食物繊維が多数含まれていると考えられる。

Table 1 . Effects of prebiotics.

Dietary fiber	
Inulin	reduces the proliferation of cancer cell ¹³⁾ increases total anaerobe and lactobacilli ¹⁴⁾
Polydextrose	modulation of the microbiota ¹⁵⁾
Oligosaccharides	
Fructooligosaccharides	immunomodulatory effect ¹⁶⁾ regulate the functions of the intestines ^{17, 18)}
Galactooligosaccharides	immunomodulatory effect ^{16, 19)}
Lactulose	immunomodulatory effect ²⁰⁾ improves the quality of life in ulcerative colitis patient ²¹⁾
Xylooligosaccharides	regulate the functions of the intestines ¹⁸⁾
Arabinoxylan - oligosaccharides	reduce the cancer cell proliferation ²²⁾

これらのことから、食物繊維を多く含み、その構造や活性について報告が少ない野菜や果物の未利用部位として、ヤマイモとサトイモの皮、エンドウのさや、ソラマメのさやと種皮、そして温州みかんのアルベド（外皮の内側やじょうのう膜に付着している白い筋の部分）に着目した。これらは大量に廃棄されているもので食物繊維含量の多いものや、可食部が皮とともに廃棄され、かつ有用成分の存在が報告されているものである。たとえば、ヤマイモやサトイモには可食部にムチンが含まれており、このムチンには粘膜を保護する作用があり、胃腸の調子を整える効果がある。またエンドウやソラマメは、さや付きの場合の廃棄率がそれぞれ 55%³²⁾と 80%³³⁾と非常に多く、その形状から食物繊維が豊富に含まれていることが予想される。

温州みかんの果皮は陳皮として漢方薬にも利用されている。一般に柑橘系の搾りかす（果皮、じょうのう膜を含む）にはペクチンやヘスペリジンなどの生理活性のある成分が存在する。オレンジジュースの搾りかすに含まれるアルベドにはすでにプレバイオティクスの効果があることが報告されている³⁰⁾。しかし、特に加工を必要とせずに摂食することができる温州みかんのアルベドの効果についての報告はない。

本研究は、これらの野菜や果物の未利用部位から抽出した総食物繊維にプレバイオティック効果があるかを調べ、新規プレバイオティクスの開発を行うことを目的とした。

まず、試験管内でのビフィズス菌の増殖促進効果を調べた。そして最も増殖率の高かった温州みかんアルベドを飼料に混合してラットに摂取させ、盲腸内細菌叢への影響を調べた。本研究にプレバイオティクス効果の指標としてビフィズス菌を用いた理由は、ラットの盲腸内に生息しているビフィズス菌の菌数が検出限界以下^{34, 35, 36)}と非常に少数であり、プレバイオティクスの効果が判定しやすいためである。一方、乳酸菌はラットの常在細菌であり³⁷⁾、Wistar Hannover GALAS ラットの盲腸内に多数存在する^{34, 36)}ため、プレバイオティクスの効果を判定しにくいことから今回は利用しなかった。

さらに、温州みかんアルベドの構成糖のうち最も含有率の高かったアラビノースを飼料

に1%となるように混合し、ラットに摂取させたときの盲腸内細菌叢に対する効果を調べた。このアラビノースはL型で細胞壁のヘミセルロースの成分としてとうもろこしの外皮（コーンファイバー）から抽出されたものを用いたが、コーンファイバーに含まれるヘミセルロースの部分水解物であるアラビノキシランには、腸内細菌叢を改善する作用があることが報告されている³⁸⁾。さらに、アラビノースはビフィズス菌によって利用可能な糖であることが報告されている（Table 2）³⁹⁾。ヒトのビフィズス菌では *B. infantis*, *B. breve* 以外の8種類の菌はいずれもアラビノースを資化することができる種である。しかし、アラビノース摂取による腸内細菌叢への影響は知られておらず、これを明らかにするためラット盲腸内細菌叢に与える効果について検討した。

Table 2. Differential characteristics of *Bifidobacterium* species.³⁹⁾

Species	Ribose	Arabinose	Xylose	Fructose
<i>B. adolescentis</i>	A	A	A	A
<i>B. angulatum</i>	A	A	A	A
<i>B. animalis</i>	—	A	A	A
<i>B. asteroides</i>	A	A	A	A
<i>B. bifidum</i>	—	—	—	A
<i>B. boum</i>	—	—	—	A
<i>B. breve</i>				
<i>ss breve</i>	A	—	—	A
<i>ss parvulorum</i>	A	—	—	A
<i>B. catenulatum</i>	A	A	A	A
<i>B. choerinum</i>	—	—	—	A
<i>B. coryneforme</i>	A	A	A	A
<i>B. cuniculi</i>	—	A	A	—
<i>B. dentium</i>	A	A	A	A
<i>B. gallicum</i>	A	A	A	A
<i>B. gallinarum</i> ^a	—	A	A	A
<i>B. globosum</i>	A	A	A	A
<i>B. indicum</i>	—	—	—	A
<i>B. infantis</i>				
<i>ss infantis</i>	A	—	—	A
<i>ss lactentis</i>	+	—	A	A
<i>ss liberorum</i>	A	—	A	A
<i>B. longum</i>	A	A	A	A
<i>B. magnum</i> ^b	—	A	A	A
<i>B. minimum</i>	—	—	—	—
<i>B. pseudocatenulatum</i>	A	A	A	A
<i>B. pseudolongum</i>	A	A	A	A
<i>B. pullorum</i>	—	A	A	A
<i>B. subtile</i>	—	—	—	—
<i>B. suis</i>	—	A	A	A
<i>B. thermophilum</i>	—	—	—	A

A, pH below 5.5; +, pH 5.5 ~ 5.9 or weak; —, negative.

^a Cell size of *B. gallinarum* smaller than other *Bifidobacterium*.

^b Cell size of *B. magnum* larger than other *Bifidobacterium*.

第2章 ビフィズス菌増殖作用を有する未利用部位食物繊維のスクリーニング

この章では野菜や果物の未利用部位から総食物繊維を抽出し、ビフィズス菌増殖作用を有する総食物繊維を見出すことを目的とした。用いたビフィズス菌種は *Bifidobacterium longum* と *Bifidobacterium bifidum* の2菌種で、これらは成人のヒト腸内でよく検出されるものである⁴⁰⁾。ポジティブコントロールとしてラクツロースを加えた培地で培養したときよりも菌数の増加率が高いものを、ビフィズス菌増殖作用のある食物繊維とした。

なお、プレバイオティクスであるラクツロースは Fig. 1 に示すように、ガラクトースとフルクトースの β -1,4-結合体でヒトの消化酵素では分解されない糖である。

1 食物繊維の抽出と糖組成の分析^{34, 41)}

(1) 実験材料

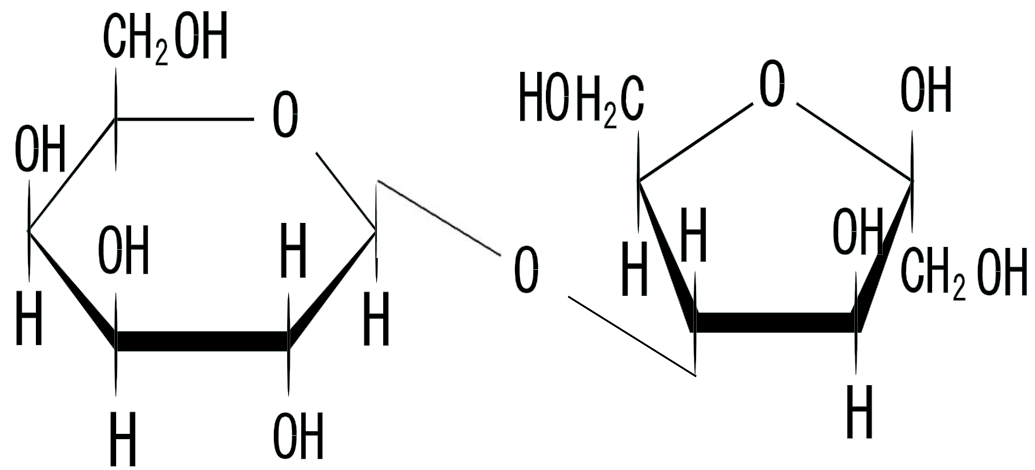
温州みかん（和歌山県産）、エンドウ（和歌山県産）、ソラマメ（鹿児島県産）、サトイモ（愛媛県産）とヤマイモ（北海道産）を用いた。これらの材料は市内小売店から購入した。

(2) 方法

1) 試料の調製

温州みかんアルベドは外皮の内側やじょうのう膜から手作業で採取した。サトイモとヤマイモはピーラーでむいた皮を用いた。ソラマメの種皮は、さやから取り出したソラマメを沸騰水浴中で加熱し、冷却後豆から取り除いた。

これらの試料は、真空凍結乾燥機（共和真空技術、RLE-102）を用いて凍結乾燥後、ミルで粉碎し、0.8 mmのメッシュに通した。そのあと、Prosky 法⁴²⁾に則って食物繊維の抽出を行い、さらに、Prosky 変法⁴³⁾を用いて水溶性と不溶性の食物繊維の抽出を行った。それぞれ重量を測定し、結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。



4-*O*-β-D-Galactopyranosyl-D-fructose

Fig. 1 . Structure of lactulose.

2) 糖組成の分析

総食物繊維の糖組成は Englyst の方法⁴⁴⁾に準じて行った。まず、抽出した食物繊維にトリフロロ酢酸を加えて加水分解をした後、水素化ホウ素ナトリウムを加えて還元を行い、糖アルコールにした。その後、無水酢酸を加えてアセチル化を行った。アルジトールアセテート化した後はクロロホルムに溶解し、GC-MS を用いて分析を行った。

組成分析には水素炎検出器が付属しているガスクロマトグラフ GC-14B (島津製作所) を用い、カラムは SPTM-2380 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, スペルコ)、データ解析には C-R8A (島津製作所) を用いた。カラム温度は 190 °C から 235 °C まで 4 °C/分 で昇温させた。注入口と検出口の温度はそれぞれ 240 °C と 290 °C とした。移動相であるヘリウムの流速は 1 mL/分 とし、スプリット比は 1 : 50 とした。

ピークの同定には GC-MS (5975C VL MSD, 6890N Network GC system 装備, アジレント) を用いた。測定結果は平均値 ± 標準偏差で示した。

(3) 結果

1) 野菜や果物の未利用部位に含まれる食物繊維の収量

食品中の未利用部位から抽出した乾物 100 g あたりの総食物繊維、不溶性食物繊維、水溶性食物繊維の量を Table 3 に示した。総食物繊維量はサトイモの皮 67.5 g、ヤマイモの皮 18.8 g、エンドウさや 39.9 g、ソラマメさや 57.1 g、ソラマメ種皮 66.6 g、温州みかんアルベド 52.3 g であった。総食物繊維に含まれる水溶性食物繊維の割合はサトイモの皮 22.0%、ヤマイモの皮 22.9%、エンドウさや 4.6%、ソラマメさや 13.8%、ソラマメ種皮 16.8%、温州みかんアルベド 35.2% であった。

2) 食物繊維の糖組成

アルジトールアセテート化後のトータルイオンクロマトグラムとアラビノースのマスス

Table 3 . Dietary fibers in 100g dried inedible parts of vegetables and fruits.

	TDF*(g)	IDF*(g)	SDF*(g)
Peel of Taro	67.5 ± 3.8	52.7 ± 3.0	14.9 ± 0.8
Peel of Chinese yam	18.8 ± 2.4	14.5 ± 1.8	4.3 ± 0.5
Pea pod	39.9 ± 2.1	38.1 ± 2.0	1.8 ± 0.1
Broad bean pod	57.1 ± 4.0	49.2 ± 3.5	7.9 ± 0.6
Broad bean testa	66.6 ± 8.2	55.4 ± 6.8	11.2 ± 1.4
Albedo of Mikan	52.3 ± 5.2	33.9 ± 3.3	18.4 ± 2.7

Each value (mean±SD) is the amount of DF extracted from 100g of dried sample.

* TDF = Total Dietary Fiber (IDF+SDF), IDF = Insoluble Dietary Fiber, SDF = Soluble Dietary Fiber.

ペクトルをそれぞれ Fig. 2, Fig. 3 に示した。アルジトールアセテートを行う際、まず糖が還元されて1位のアルデヒド基(-CHO)が-CH₂OH基となり、その後、無水酢酸を用いてアセチル化を行った。Fig. 3 のマススペクトラムに示すように、C-C間の開裂により生じた m/z 73 (CH₂OAc)をはじめ、C-C-C間の開裂に由来する対イオン m/z 145, 217, 289 が検出されたことから、アルジトールアセテート化したL-アラビノースと同定された。その他のイオン m/z 85, 115, 157, 187 は上述のフラグメントの二次的な開裂により生じたものと考えられる。

抽出した食物繊維に含まれる糖組成は Table 4 に示した。食物繊維に含まれる主要な構成糖としてキシロースを含むものが多かったが、ヤマイモにはマンノースやガラクトースが、温州みかんアルベドにはアラビノースが多く含まれていた。サトイモの皮のみにリボースが検出され、フコースは検出されず、他の食物繊維とは組成が異なっていた。

また、本研究では、糖の分析にアルジトールアセテート化を用いたため、中性糖のみの分析となり、ガラクトuron酸を初めとする酸性糖の分析はできなかった。

2 ビフィズス菌増殖作用を有する食物繊維のスクリーニング^{34, 41)}

(1) 実験材料

Bifidobacterium longum JCM 1217 株 (JCM1217 株) と *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254 株 (JCM1254 株) は理化学研究所バイオリソースセンター筑波研究所より購入した。培養に用いる液体培地にはペプトンと酵母エキスを使用し、培地に混合する食物繊維には第2章の1で調製した温州みかんのアルベド、エンドウのさや、ソラマメのさやと種皮、サトイモの皮とヤマイモの皮由来総食物繊維を用いた。

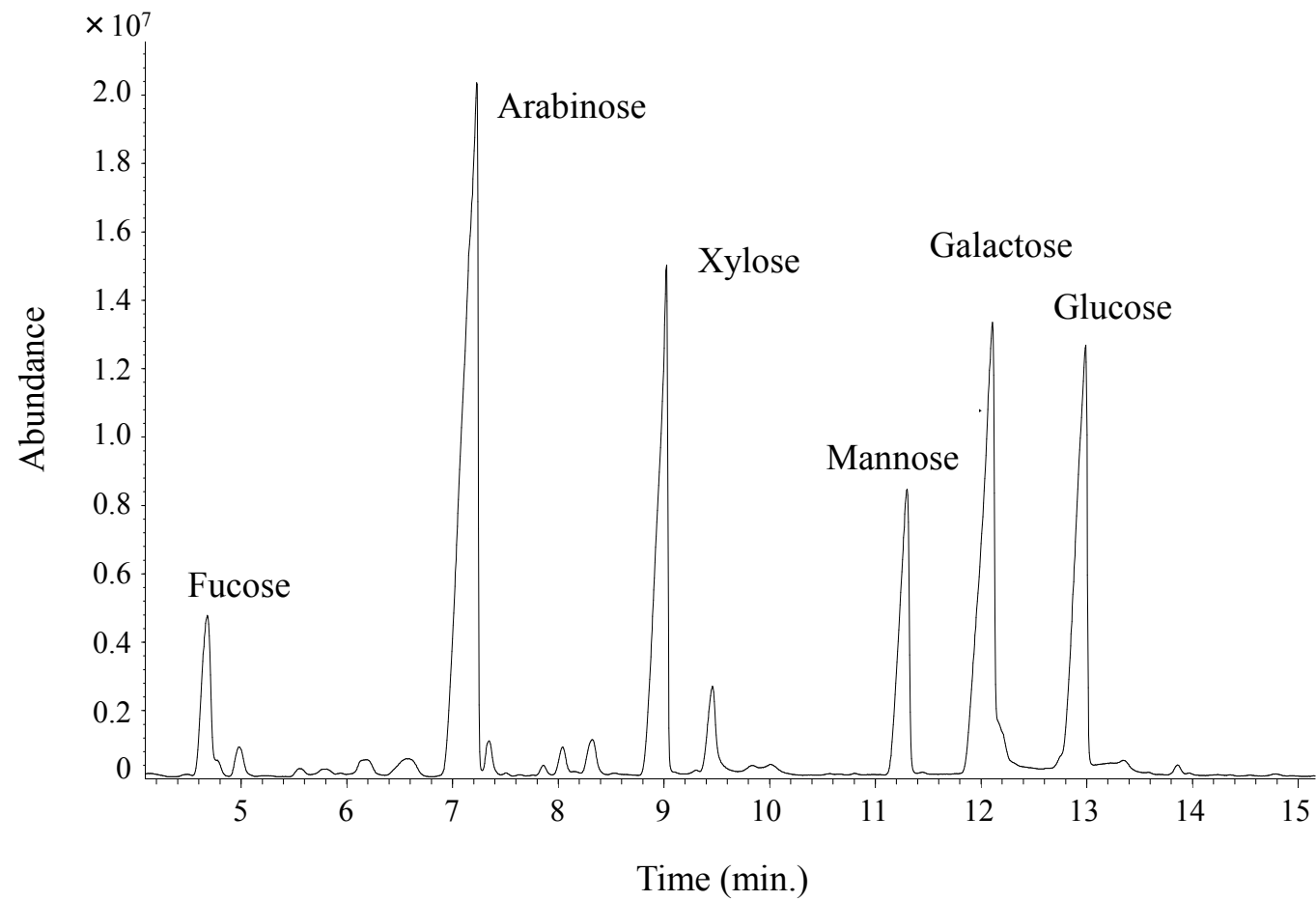


Fig. 2 . Total ion chromatogram of alditolacetylated sugars of albedo TDF.

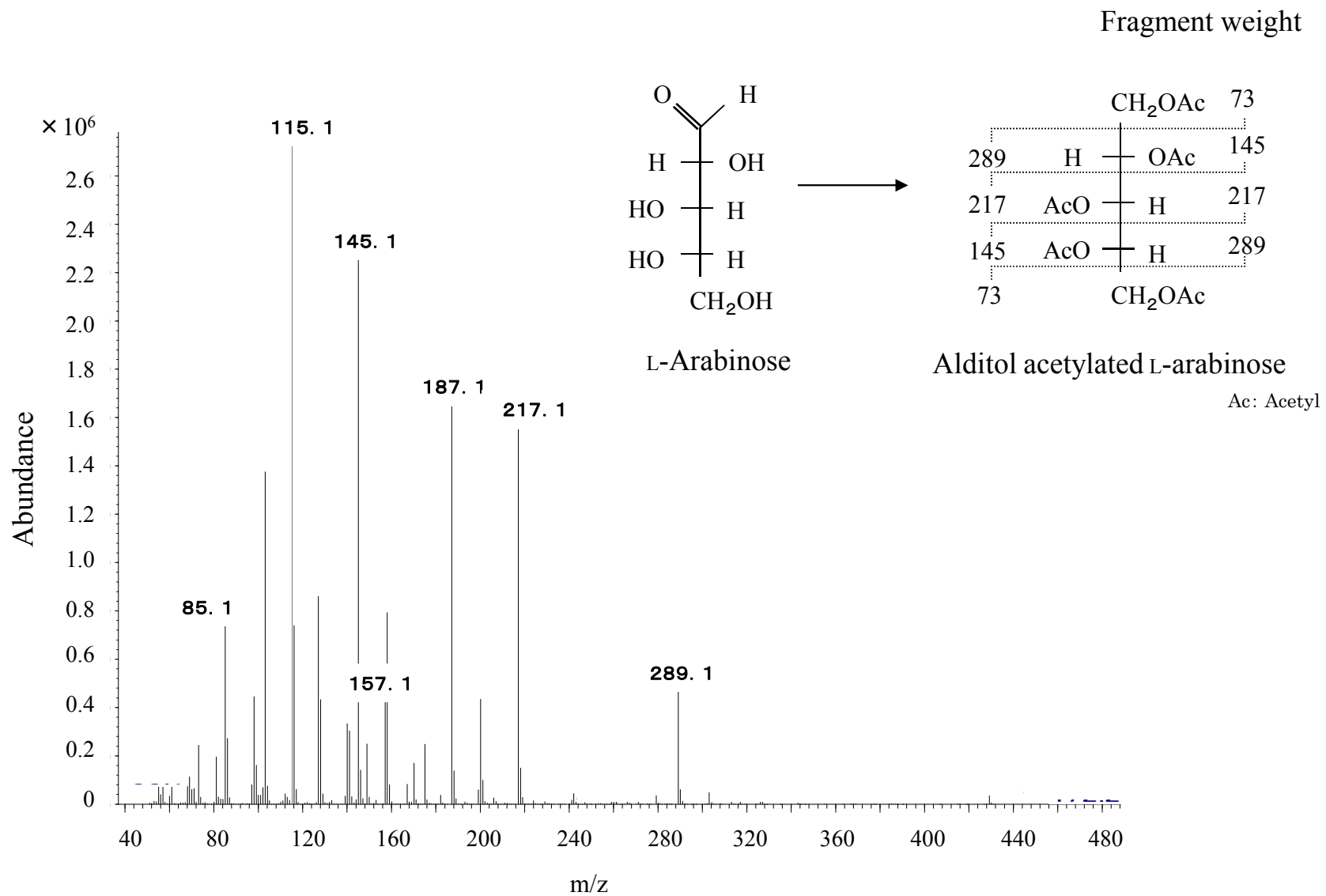


Fig. 3 . Mass spectrum of alditol acetylated L-arabinose.

Table 4 . Composition ratios (%) to total sugar weight.

	Peel of Taro	Peel of Chinese yam	Pea pod	Broad bean pod	Broad bean testa	Albedo of Mikan
Fucose	n.d.	4.1	10.5	0.3	0.7	6.4
Ribose	27.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Arabinose	19.8	8.0	6.7	2.6	3.8	37.2
Xylose	32.0	13.6	65.3	75.1	57.5	18.3
Mannose	4.1	36.1	5.2	4.5	4.2	8.1
Galactose	13.0	26.0	7.2	12.5	8.4	16.1
Glucose	3.3	12.3	5.2	5.1	25.5	14.0
Galacturonic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

After alditol acetylation, sugar composition analysis was carried out with the gas chromatograph GC-14B. Then each peak was identified by GC-MS.

(2) 方法

1) ビフィズス菌の培養

前培養にはペプトンと酵母エキスをそれぞれ1%含む培地(1% PY 培地)を用い、本培養には0.5% PY 培地に各総食物繊維を0.5%となるように混合した培地を用いた。本培養を行う際のポジティブコントロールとして0.5% PY 培地にラクツロースを0.5%含む培地を準備した。培地に含まれる糖の濃度を0.5%と低く設定したのは、菌の生育による急激なpHの低下を抑え、菌の死滅を防ぐためである。

JCM1217株とJCM1254株について、まず前培養を行った後、その中から一定量を採取して本培養用培地に添加して培養を行った。

具体的には、標準濁度液であるMcFarland⁴⁵⁾の中からMcFarland 2と同程度の濁度となるように加える菌量を調整して、本培養開始時0時間の菌数が毎回ほぼ一定となるようにした。こうして調整した菌液はビフィズス菌菌数として1mlあたり 10^4 個前後に相当する。

ビフィズス菌培養のための操作は嫌氣的条件下で行うため、グローブボックス内に窒素ガスを充填して行った。グローブボックス内の残存酸素濃度はoxygen gas meter OX-94G(理研計器)を用いて測定した。そして、嫌気培養はガスパック嫌気システム(BBL)を用いて行った。

各菌株の培養条件は前培養ではJCM1217株、JCM1254株ともに37℃、48時間の嫌気培養を行い、本培養は37℃でJCM1217株は48時間、JCM1254株は72時間の嫌気培養を行った。

ビフィズス菌増殖効果のある食物繊維をスクリーニングするために、本培養を行った際、各菌株の増殖率を比較した。本培養開始0時間と終了時(JCM1217株は48時間後、JCM1254株は72時間後)の菌数を求めるために、それぞれの培養液をGAM寒天培地(日水製薬)に塗布し、37℃、48時間の嫌気培養を行いコロニーのカウントを行った。増殖率は培養終了時の菌数を培養開始時の菌数で割ることで求めた。ポジティブコントロールと

して用いたラクツロースの増殖率と比較して、同じものもしくは増加したものをビフィズス菌増殖効果のある食物繊維とした。

2) 統計処理

実験結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の有意差検定は t - 検定を用い、危険率 5% 以下を有意とした。統計解析ソフトは SPSS Ver 17.0 を使用した。

(3) 結果

JCM1217 株と JCM1254 株について、各総食物繊維を混合した培地で培養を行った際の増殖率と、ポジティブコントロールとして用いたラクツロースの増殖率との割合を Table 5 に示した。温州みかんアルベド、ヤマイモの皮、エンドウのさや由来総食物繊維をそれぞれ添加した培地で、両株共に増殖促進効果が認められた。最も増殖率が高かったのが温州みかんアルベドを添加したもので JCM1217 株を培養したときの 8082 であり、これはラクツロースを添加したものの増殖率と比べて 26 倍となった。しかし、JCM1217 株の培養でサトイモの皮とソラマメ種皮をそれぞれ混合した培地では菌数が減少し、JCM1254 株の培養ではサトイモの皮を混合した培地で菌数が減少したため、増殖率は 0 となった。

3 考察

プレバイオティクスの効果を有する食物繊維を野菜や果物の未利用部位から見出すために、ヤマイモとサトイモの皮、エンドウのさや、ソラマメのさやと種皮、そして温州みかんのアルベドを試料として選び、総食物繊維、不溶性食物繊維、水溶性食物繊維の抽出を行い、総食物繊維に含まれる糖組成を明らかにした。そして、ビフィズス菌増殖効果のあるものをスクリーニングするために JCM1217 株と JCM1254 株を用いて培養実験を行い、その増殖率を求めた。特に、JCM1217 株は *Bifidobacterium longum* の標準株であり、JCM1254

Table 5 . Effects of dietary fibers on the growth of *Bifidobacterium longum* JCM1217 and *Bifidobacterium bifidum* JCM1254.

	growth rate*	
	JCM 1217	JCM1254
Lactulose	307	157
Mikan albedo	8082	1023
Peel of taro	0 **	0 **
Peel of Chinese yam	1117	340
Pea pod	579	252
Broad bean pod	427	— ***
Broad bean testa	0 **	— ***

* The number of bacteria after incubation / the number of bacteria before incubation.

** The number of bacteria was decreased during the incubation.

*** not determined.

株とともに、ヒト腸内から分離された株であることが報告されている⁴⁶⁾。

プロバイオティクスの代表として *Lactobacillus* が知られているが、*Lactobacillus* はラットの常在細菌であり³⁷⁾、Wistar Hannover GALAS ラットの盲腸内に多数存在する^{34, 36)}ため、プロバイオティクスの効果を判定しにくいことから今回は利用しなかった。

まず、6種類の試料から総食物繊維、不溶性食物繊維、水溶性食物繊維を抽出した。

Table 3 に示したように、乾燥重量 100 g あたりの総食物繊維量は、サトイモの皮が最も多く 67.5 g であった。最も少なかったのはヤマイモの皮の 18.8 g であった。イモ類はピーラーで皮をむいているため、試料を得る際に可食部が付着する。可食部の総食物繊維量とどれだけ差があるのか食品成分表の数値^{47, 48)}をもとに乾物 100 g あたりに換算したところサトイモは 14.5 g、ヤマイモは 5.7 g となった。今回抽出したサトイモの皮には可食部と比べて 4.5 倍の総食物繊維が含まれており、ヤマイモの皮には約 3 倍量含まれていた。ヤマイモは可食部の食物繊維含量が少なかったことと皮が非常に薄いことから、未利用部位から得られた食物繊維量が少なかったと考えられる。

次に、6種類すべての食物繊維を用いて JCM1217 株と JCM1254 株の培養実験を行った。5 ml の培地に 0.5% の各総食物繊維を添加して嫌気培養を行いその増殖率を求めた。

JCM1217 株の培養にサトイモの皮とソラマメ種皮の総食物繊維をそれぞれ混合させた場合、Table 5 のように培養開始時の菌数より培養後の菌数が減少した。これらには JCM1217 株が利用できる食物繊維が非常に少なかったか含まれていなかったと考えられる。反対に最も増殖率が高かったのは温州みかんのアルベドで、8082 倍に菌数が増殖した。2 番目はヤマイモの皮で 1117 倍増殖し、次いでエンドウのさや 570 倍、ソラマメのさや 427 倍であった。

JCM1254 株の培養にサトイモの皮由来総食物繊維を添加した場合も、JCM1217 株の培養と同様に培養開始時の菌数より培養後の菌数が減少した (Table 5)。最も増殖率が高かったのは温州みかんのアルベドで、その増殖率は 1023 倍となった。以上のことから温州みかん

アルベドが JCM1217 株と JCM1254 株の両株に高い増殖率を与えることが示された。

増殖率にこのような差がみられた原因を推察するために、それぞれの食物繊維に含まれる糖組成を比較した。

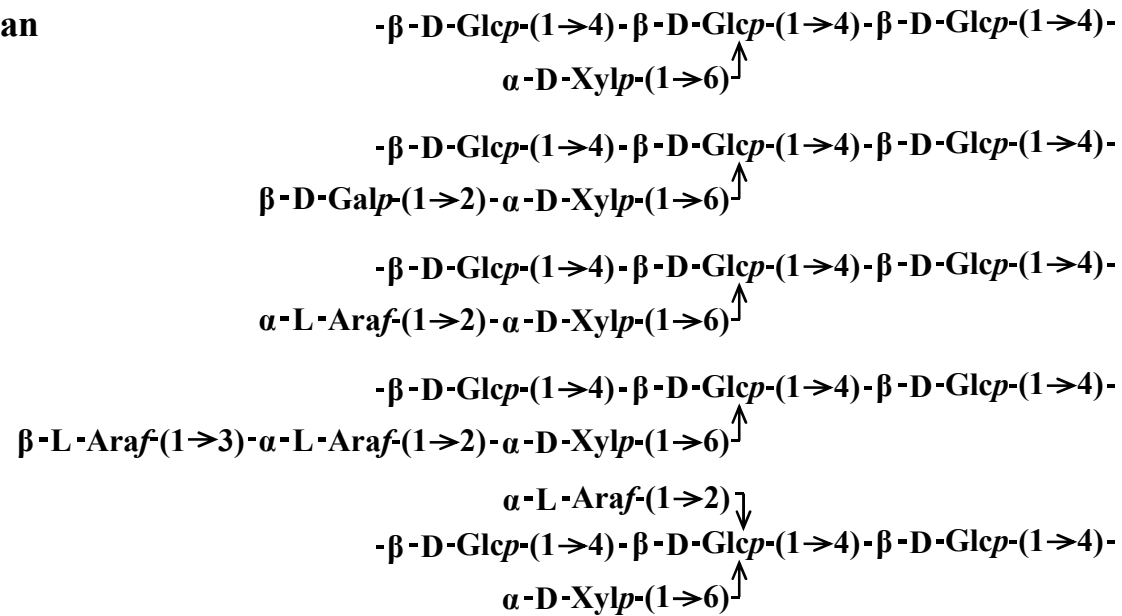
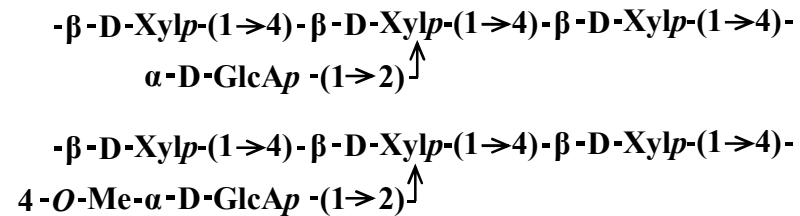
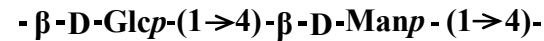
Table 4 で示した 6 種類の試料の中で、豆類であるエンドウのさや、ソラマメのさやと種皮にはキシロースが多く含まれていた。それ以外に特徴的であったのはエンドウのさやにはフコースが多く含まれ、ソラマメのさやにはガラクトース、種皮にはグルコースが多く含まれていた。イモ類のサトイモとヤマイモの皮を比較するとまったく異なる組成であることが明らかとなった。サトイモの皮にはリボースが含まれており、フコースが検出限界以下であった。リボースが含まれている植物は非常に少なく、pearl millet (*Pennisetum typhoides*) (トウジンビエ：トウモロコシに似たイネ科の一年草) や quinoa (*Chenopodium quinoa*) (キノア：アカザ科の一年草、アンデス地方原産の穀物)⁴⁹⁾にみられる程度である。このリボースの存在は今回用いた他の 5 種類の食物繊維と大きく異なる点であった。ヤマイモの皮にはマンノース、ガラクトースの順番で多く含まれていた。温州みかんアルベドの糖組成はアラビノースが最も多く、次にその約半分の量でキシロースとガラクトース、グルコースがほぼ同量含まれていた。

キシロースを多く含むオリゴ糖の摂取により盲腸内容物中のビフィズス菌が顕著に増加したとの報告³⁸⁾や、アラビノオリゴ糖を代謝するビフィズス菌が報告⁵⁰⁾されている。また、ビフィズス菌にはアラビノシダーゼが含まれている⁵¹⁾ことから、温州みかんのアルベドに含まれる食物繊維がビフィズス菌にとって資化されやすかったと考えられる。

本研究で用いた 6 種類の試料について中性糖の分析を行った結果、キシロースを含むものが多かったが、温州みかんアルベドにはアラビノースが多く含まれていた。したがって、抽出された食物繊維は細胞壁の構成成分であるヘミセルロースの一種を含んでいると思われる。

ヘミセルロースはセルロースやペクチンのように化学構造をもとに定義された分類では

なく、さまざまな構造を有する多糖類が知られている。トマトに存在するヘミセルロースとして報告されている構造式⁵²⁾を Fig. 4 に示した。キシログルカン、キシラン、グルコマンナンなどが明らかにされている。Table 4 に示した糖の組成はこれらのヘミセルロース成分に類似していた。

Xyloglucan**Xylan****Glucomannan**Fig. 4. Hemicelluloses chemical structure.⁵²⁾

第3章 温州みかんアルベド由来総食物繊維摂取によるラットへの生理的効果

JCM1217株とJCM1254株を用いた培養で最も増殖率の高かった温州みかんアルベド由来総食物繊維（アルベドTDF）をラットに摂取させ、腸内細菌叢の変動や生理学的な影響を検討した³⁴⁾。

1 アルベドTDF混合飼料摂取時のラットに対する影響

(1) アルベドTDF摂取によるラット飼料摂取量、体重、臓器重量に対する影響

1) 実験動物と飼料

4週齢雄性 Wistar Hannover GALAS (BrlHan: WIST) と、予備飼育時に使用した固形飼料 CE-2 は日本クレアより購入した。精製飼料についてはオリエンタル酵母より購入したものを使用した。精製飼料に混合したアルベドTDFは第2章の1で調製したものをを用いた。

2) 方法

ラットは室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 5\%$ 、照明時間 12 時間/日 (7:00~19:00) の条件下で、個別ケージで飼育した。固形飼料 CE-2 を用いた4日間の予備飼育の後、平均体重が同じになるように飼料組成によりアルベドTDF群とコントロール群の2群に分け、1群6匹とした。

飼料組成は Table 6 に示した。コントロール群にはセルロースを5%混合し、1%のアルベドTDFを配合する場合はセルロースの一部を置き換えた。飲料水は水道水を与え、飼料と共に自由に摂取させた。体重と飼料摂取量は週3回測定した。

4週間の飼育の後、17時間絶食させて解剖を行った。ペントバルビタールナトリウム (66 mg/kg) による麻酔下で腹部大静脈より採血し、遠心分離機 (クボタ、5420) で 3000 rpm、15 分の遠心分離を行い、血清を得た。脱血後、臓器 (肝臓、盲腸) と脂肪 (後腹膜、腸間膜、腎周囲) を摘出し秤量した。盲腸は、内容物を均一にした後、細菌叢を調べるために

Table 6 . The composition of diets.

	w/w %	
	Control group	Albedo TDF group
Casein	25.0	25.0
α -Cornstarch	39.9	39.9
Corn oil	6.0	6.0
Sucrose	20.0	20.0
Cellulose	5.0	4.0
Albedo TDF	0.0	1.0
AIN93 mineral mixture	3.0	3.0
AIN93 vitamin mixture	1.0	1.0
Choline chloride	0.1	0.1
Total	100.0	100.0

The mineral and vitamin mixtures were prepared according to AIN-93G formula.

0.5 g 採取し、その後 pH メーター（堀場製作所、D-21）で直接盲腸内 pH の測定を行った。盲腸から全ての内容物を取り除いて生理食塩水 20 ml に溶解し、残った盲腸壁の重量を測定した。肝臓、血清、盲腸内容物は分析を行うまで -20°C で冷凍保存した。

糞便重量は解剖前の 3 日間、毎日一定時間に採取し重量を測定した。その後、 105°C で 17 時間にわたり乾燥させた後、重量を測定し糞便乾燥重量を求めた。脂質含量は乾燥糞便をミルで粉碎し、Folch et al.の方法⁵³⁾で抽出を行い、溶媒を蒸発乾固させた後、重量を測定して求めた。

実験結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。群間の有意差検定は t - 検定を用い、危険率 5% 以下を有意とした。統計解析ソフトは SPSS Ver17.0 を使用した。

なお、本実験は神戸女子大学動物実験研究倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号 130）。

3) 結果

飼育時の体重変化は Fig. 5 に示すように両群に全く差が認められなかった。一日あたりの体重増加量や飼料摂取量、飼料効率はいずれもコントロール群とアルベド TDF 群の間で有意な差はなかった (Table 7)。盲腸内容物重量はコントロール群と比べてアルベド TDF 群で有意に減少した。腹腔内脂肪重量は両群で差が認められず、肝臓重量はアルベド TDF 群で増加する傾向があった。

アルベド TDF の摂取により、糞便に含まれる水分含有率が上昇する傾向がみられたが、有意な差ではなかった (Table 8)。糞便重量は湿重量と乾燥重量共に有意な差はなく、アルベド TDF の摂取によりわずかに減少する傾向がみられた。

糞便中に含まれる総脂質の割合 (%) はアルベド TDF 群でコントロール群と比べて有意に増加した。しかし、実際に排泄された糞便中の脂質量はアルベド TDF 群で増加したが有意差は認められなかった (Table 8)。飼育期間中、両群ともに下痢は観察されなかった。

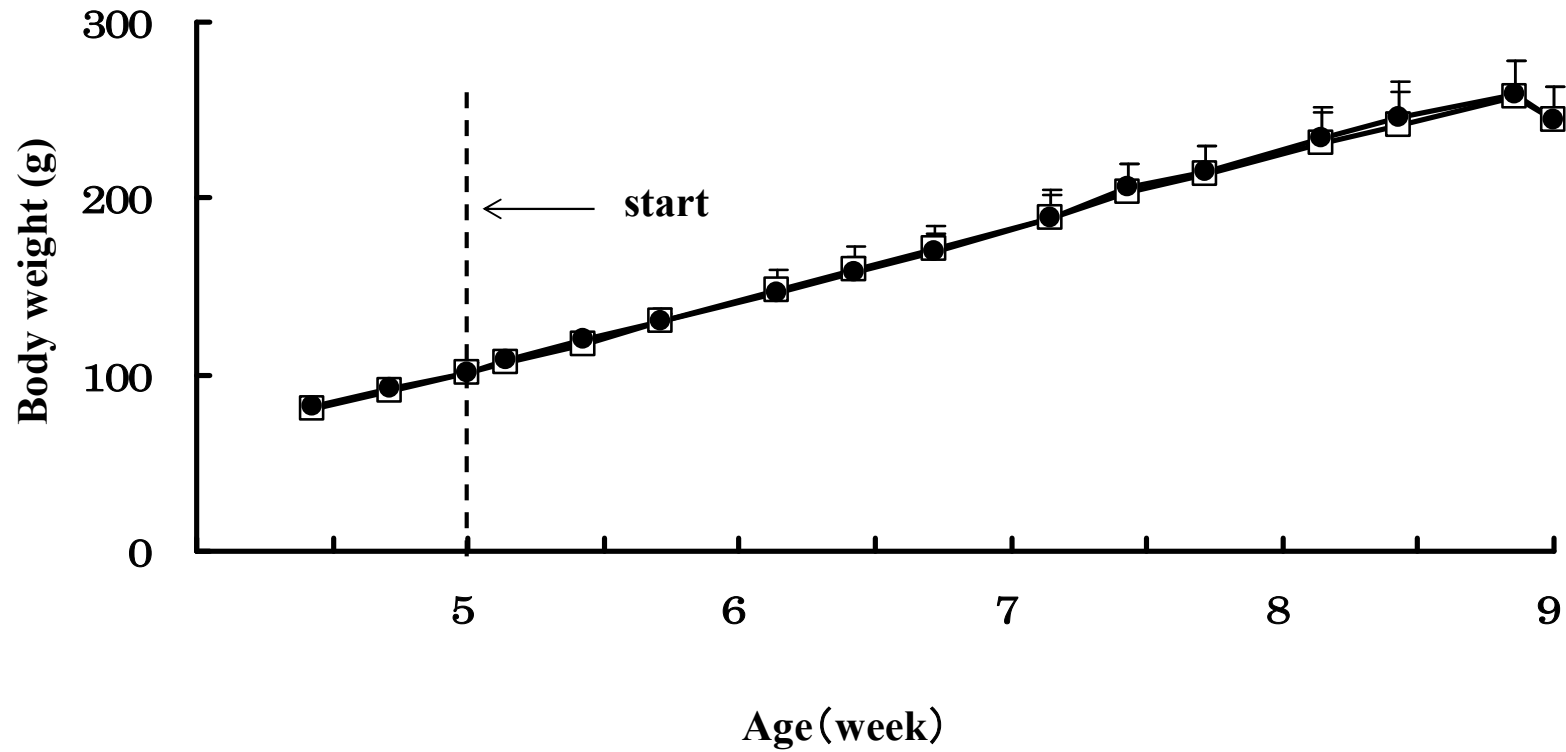


Fig. 5 . Effect of albedo TDF on body weight gain.

Each value is mean \pm SD (control group : n=6, albedo group : n=6) .

Start : It is a day which began to take in experimental diet.

—□— Control group —●— Albedo TDF group

Table 7 . Effects of albedo TDF on body weight gain, food intake, food efficiency, weight of cecum, liver weight and intra-abdominal fat.

	Control		Albedo TDF	
BW gain, g/d	5.81	± 0.76	5.87	± 0.60
Food intake, g/d	17.80	± 1.34	17.92	± 1.44
Food efficiency*	0.33	± 0.02	0.33	± 0.01
Cecum, g	2.50	± 0.54	2.02	± 0.29
Cecal wall, g	0.70	± 0.10	0.77	± 0.11
Content of cecum, g	1.81 ^a	± 0.48	1.25 ^b	± 0.34
pH of cecum content	7.04	± 0.22	6.99	± 0.12
Liver weight, g	7.58	± 0.91	7.98	± 0.58
Intra-abdominal fat weight, g ^{**}	7.52	± 3.27	7.43	± 1.76

Each value is mean ±SD (control group : n=6, albedo TDF group : n=6).

* BW gain / food intake

** Intra-abdominal fat weight contained white adipose tissue around the intestine and the kidneys.

The *t*-test was conducted.

Different superscripts mean significant (p<0.05).

Table 8 . Effects of albedo TDF on lipid content in the feces.

	Control			Albedo TDF		
Fecal wet weight (g/3days)	4.09	±	0.48	3.67	±	0.34
Fecal dry weight (g/3days)	3.60	±	0.49	3.08	±	0.31
water content, %	12.0	±	3.4	15.9	±	4.7
Total lipid (mg/3days)	102	±	41	144	±	25
Lipid content, % of wet weight	2.5 ^a	±	0.9	4.0 ^b	±	0.7

Each value is mean ±SD (control group : n=6, albedo TDF group : n=6).

The *t* test was conducted.

Different superscripts mean significant (p<0.05).

(2) 盲腸内細菌叢に対するアルベド TDF の影響

1) 実験材料

盲腸内細菌叢培養を行う際の非選択培地として、BL 寒天培地は日水製薬製、TS 寒天培地は BBL 製のものを用いた。選択培地として、Enterobacteriaceae 用に日水製薬製の DHL 寒天培地、Lactobacilli 用に Difco 社製の MRS 寒天培地を用いた。

2) 方法

光岡らの方法⁵⁴⁾を部分的に変更した培養法を用いた。摘出した盲腸から盲腸内容物 0.5g を採取して 4.5 ml の嫌気性検体希釈液 (KH₂PO₄, Na₂HPO₄, L-システイン塩酸塩, Tween 80, 寒天) に懸濁し、解剖直後に培養実験を行った。嫌气的条件を維持するため、グローブボックス内に窒素ガスを充填し、その中で実験操作を行った。残存酸素濃度は oxygen gas meter OX-94G (理研計器) を用いて測定した³⁵⁾。嫌気性検体希釈液に懸濁した盲腸内容物はさらに段階希釈を行い、非選択培地と選択培地に塗布しそれぞれの培地に適した培養を行った。TS 寒天培地と DHL 寒天培地は好气的条件下で、37℃、24 時間の培養を行い、BL 寒天培地と MRS 寒天培地は嫌气的条件下で、37℃、48 時間の培養を行った。嫌気培養はガスパック嫌気システムを用いて行った。培養後、各培地上に確認できるコロニー数のカウントを行った。さらに、嫌気培養を行った BL 寒天培地と MRS 寒天培地上のすべてのコロニーについて、一部を採取して BL 寒天培地に塗布して好気培養 (好気テスト) を行った。

細菌群の同定は培養終了後、コロニー形態、菌形態の観察を行い、グラム染色、好気テストの結果を、基準となる株と比較した。

菌数は盲腸内容物 1 g あたりの常用対数で表し、結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の有意差検定は t - 検定を用い、危険率 5%以下を有意とした。統計解析ソフトは SPSS Ver 17.0 を使用した。

3) 結果

アルベド TDF 群とコントロール群の盲腸内容物の細菌叢を調べたところ総菌数に変化は見られなかった (Table 9)。Bifidobacteria はコントロール群のすべてのラットでは検出限界以下であったが、アルベド TDF 群ではほとんどのラットから検出された。Streptococci はアルベド TDF 群で検出率が低下する傾向があり、Enterococci はコントロール群と比べてアルベド TDF 群で菌数が減少する傾向があった。Streptococci と Enterococci、Bifidobacteria 以外は菌数、検出率ともにほとんど同じであった。即ち、主要な乳酸産生菌である Lactobacilli の増殖には影響を与えなかった。この結果から、ラットではアルベド TDF の給餌が Streptococci や Enterococci の増殖に負の影響を及ぼすものの、Bifidobacteria の増殖を強く引き起こすことが明らかとなった。

(3) アルベド TDF の摂取が盲腸内アンモニア量および短鎖脂肪酸濃度に及ぼす影響

1) アンモニアの定量

①実験材料

盲腸内容物は解剖時に生理食塩水に溶解し、 -20°C で冷凍保存したものを用いた。アンモニア濃度の測定には市販のキット (アンモニア テストワコー, 和光純薬工業) を用いた。

②方法

操作方法はアンモニア テストワコーの手順に従ったが、除タンパクの方法を以下のように改変した³⁶⁾。

生理食塩水に懸濁した盲腸内容物 1 mL に 2%過塩素酸 4 mL を加え、5 分間タッチミキサーで攪拌した後、3500 rpm で 5 分間の遠心分離を行い上清の回収を行った (ア)。沈殿物に 2%過塩素酸を 2 mL 加え、同様に攪拌した後遠心分離を行った。この上清を上清 (ア) と混合し、この操作を 2 回繰り返した。回収した上清を 18000 rpm で 20 分間の遠心分離を行い、

Table 9 . Effects of albedo TDF on microflora in the cecum content.

	Log CFU / g of wet weight			
	Control		Albedo TDF	
Enterobacteriaceae	8.5±0.4	(100)	8.4±0.5	(100)
Lactobacilli	9.1±0.5	(100)	9.2±0.6	(100)
Bacteroidaceae	9.8±0.5	(100)	9.7±0.7	(100)
Eubacteria	8.2±0.7	(83)	8.2±0.5	(83)
Streptococci	7.6±0.8	(83)	7.5±0.7	(33)
Peptococcaceae	8.7±1.4	(50)	8.5±1.1	(83)
Enterococci	9.3	(17)	6.3	(17)
Bifidobacteria	n.d.	(0)	7.5±0.8	(83)
Total	10.0±0.5		10.1±0.6	

Each value is mean ±SD (control group : n=6, albedo TDF group : n=6).

Figures in parentheses are % of detection rate.

n.d. represents < 2.3 (log CFU).

The *t*-test was conducted.

Bacterial analysis was carried out with the method of partly modified Mitsuoka's method.

上清を回収し2%過塩素酸にて10 mLに定容してサンプルとした。

測定結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の有意差検定はt - 検定を用い、危険率5%以下を有意とした。統計解析ソフトはSPSS Ver 17.0を使用した。

2) 短鎖脂肪酸の定量

①実験材料

盲腸内容物は解剖時に生理食塩水に溶解し、 -20°C で冷凍保存したものを用いた。

②方法

生理食塩水に懸濁した盲腸内容物1 mLに、内部標準物質としてジエチル酪酸10倍希釈液（ジエチル酪酸100 μL に900 μL のギ酸を加えたもの）を1 μL 加え、50% H_2SO_4 を1滴加えて酸性とした。この溶液にt-ブチルメチルエーテル1 mLを加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、3500 rpmで5分間遠心分離を行った。その上清を別の試験管にとり、脱水のために塩化カルシウム1粒を加え分析を行うまで冷蔵保存を行った。

分析には水素炎検出器が付属しているガスクロマトグラフGC-14B（島津製作所）を用い、カラムはNucol（30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm 、スペルコ）、データ処理にはC-R8A（島津製作所）を用いた。カラム温度は 90°C から 200°C まで $4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で昇温させた。注入口と検出口の温度はそれぞれ 200°C と 220°C とした。移動相であるヘリウムの流速は1 mL/分とし、スプリット比は1 : 10とした。

実験結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の有意差検定はt - 検定を用い、危険率5%以下を有意とした。統計解析ソフトはSPSS Ver 17.0を使用した。

3) 結果

測定したもののうち、短鎖脂肪酸のプロピオン酸と吉草酸がアルベド TDF 添加により、有意に減少した(Table 10)。アンモニア量や、短鎖脂肪酸の中でも酢酸や酪酸などの他の有機酸は、コントロール群と比べてアルベド TDF 群では量が低くなる傾向が見られた。コントロール群で検出されていたイソカプロン酸はアルベド TDF 群では検出限界以下であった。

(4) 血糖値と肝臓、血清中の脂質に対するアルベド TDF の影響

1) 実験材料

肝臓と血清は、解剖時に採取し-20℃で冷凍保存したものをを用いた。

トリアシルグリセロール、総コレステロール、リン脂質の濃度の測定にはそれぞれ市販のキット (Triglyceride E-Test Wako, Total Cholesterol E-Test Wako and Phospholipid C-test Wako, 和光純薬工業) を用いた。

血糖値は市販のキット (Glucose C2 Test Wako, 和光純薬工業) を用いて測定した。

2) 方法

肝臓については前処理として総脂質の抽出を Folch et al.の方法⁵³⁾に準じて行い、得られた総脂質を *t*-butanol : methanol : triton X-100 (50:25:25, v/v) に溶解した。

肝臓から抽出した総脂質と血清を用い、トリアシルグリセロール、総コレステロール、リン脂質の濃度の測定をそれぞれのキットの手順に従って行った。

血糖値もキットの手順に従って測定を行った。

測定結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の有意差検定は *t* - 検定を用い、危険率 5% 以下を有意とした。統計解析ソフトは SPSS Ver 17.0 を使用した。

Table 10 . Effects of albedo TDF on ammonia level and concentration of SCFA in the cecum contents.

	Control		Albedo TDF	
ammonia, mg	0.5	± 0.1	0.4	± 0.1
SCFA, μmol				
acetate	47.2	± 19.9	38.2	± 4.5
propionate	12.8 ^a	± 2.5	9.9 ^b	± 1.4
isobutyrate	2.7	± 0.2	0.8	± 1.3
butyrate	5.9	± 1.6	4.2	± 0.7
isovalerate	1.7	± 0.2	1.6	± 0.4
valerate	1.7 ^a	± 0.3	1.2 ^b	± 0.2
isocaproate	0.3	± 0.6	n.d.	
caproate	0.6	± 0.9	0.4	± 0.2
Total	72.9	± 21.1	56.0	± 6.3

Each value is mean ±SD (control group : n=6, albedo TDF group : n=6).

The *t*-test was conducted. Different superscripts mean significant (p<0.05).

n.d. represents under the detection limit.

3) 結果

血糖値は、アルベド TDF 群でコントロール群よりわずかに高かったが有意な差ではなかった (Table 11)。

血清中のトリアシルグリセロール濃度はアルベド TDF 群で有意に減少した。

肝臓中のトリアシルグリセロール濃度について両群に有意差はなく、アルベド TDF 群でわずかに減少がみられた。

コレステロール濃度は血清、肝臓ともに両群に有意差はなかったが、アルベド TDF 群においてコントロール群より、血清ではわずかに上昇し、肝臓ではわずかに低下する傾向があった。

血清と肝臓に含まれるリン脂質はコントロール群とアルベド TDF 群の間で有意な差は認められなかった。

2 アルベド SDF が膵臓由来リパーゼの酵素反応に与える影響

(1) 実験材料

豚膵臓由来のリパーゼ (豚リパーゼ)、タウロコール酸ナトリウム (TCA-Na)、NEFA C-Test Wako、そしてその他の試薬はすべて特級のを和光純薬工業から購入した。

酵素反応に添加した温州みかんアルベド由来水溶性食物繊維 (アルベド SDF) は第 2 章の 1 で調製したものをを用いた。

(2) 方法

リパーゼ活性はトリオレインから遊離するオレイン酸の割合を測定することによって示した⁵⁵⁾。

基質溶液のエマルジョンは TCA-Na (0.83 mg/mL) を溶解させた 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 3 mL とトリオレイン 160 mg を混合して 60 分間超音波処理を行った。その中

Table 11. Effects of albedo TDF on lipid parameters of serum and liver.

		Control		Albedo TDF	
Serum glucose concentration, mg/dL		101.5	± 25.3	114.7	± 25.8
	Triacylglyceride	62.2 ^a	± 19.1	39.8 ^b	± 13.2
Serum	Cholesterol	70.0	± 21.1	74.2	± 21.5
	Phospholipid	117.6	± 14.6	119.8	± 14.3
Liver	Triacylglyceride	7.0	± 1.1	6.6	± 3.0
	Cholesterol	2.0	± 0.2	1.8	± 0.3
	Phospholipid	13.0	± 0.8	12.3	± 0.9

Each value is mean ±SD (control group : n=6, albedo TDF group : n=6) .

The *t*-test was conducted.

Different superscripts mean significant (p<0.05).

に 3 mL の TCA-Na を加えたあとアルベド由来水溶性食物繊維（アルベド SDF）を 40 mg、80 mg になるように混合し、さらに超音波処理を 60 分間行った。この混合液 2 mL に 0.1 mg/mL の腓リパーゼを 0.2 ml (0.108 U) 加えて 37 °C、30 分反応させた。遊離されたオレイン酸は NEFA C-Test Wako を用いて測定した。

測定結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の有意差検定は t - 検定を用い、危険率 5 %以下を有意とした。統計解析ソフトは SPSS Ver 17.0 を使用した。

(3) 結果

トリオレインを用いた反応においてアルベド SDF の添加が腓リパーゼ活性の低下を引き起こした。6 mL の基質溶液にアルベド SDF を 40 mg 添加した場合には酵素の作用に影響が見られなかったが、80 mg 添加したときには、添加しなかったものと比べて酵素活性が約 50%に有意に低下した (Table 12)。

3 考察

JCM1217 株と JCM1254 株の増殖率が最も高かったアルベド TDF をラットに摂取させる実験を行った。

食物繊維の過剰摂取は下痢を誘発するため、ラットの飼料に混合したアルベド TDF は 1%とし、少量の添加による盲腸内細菌叢への効果を調べた。アルベド TDF 群とコントロール群のラットで、飼育中の体重増加量や飼料摂取量に有意差はなく、腹腔内脂肪や肝臓重量にも差が認められなかった (Table 7)。しかし、盲腸内容物重量はアルベド TDF の摂取により有意に低下していた。この実験ではアルベド TDF には約 35%の水溶性食物繊維が含まれている。アルベド TDF を飼料に 1%となるように混合する際、セルロースを同量減少させて、アルベド TDF と置き換える方法をとっている。これまでに Hillman らは、通常食にペクチンやリグニンを添加しても排便湿重量に有意差はないが、不溶性食物繊維である

Table 12 . Inhibition of pancreatic lipase activity by albedo SDF.

Additive amount of SDF (mg)	0	40	80
Activity (%)	100 ^a	95 ^a ± 28	47 ^b ± 19

Lipase activity was determined by measuring the rate of oleic acid released from triolein in the presence or absence of SDF (40, 80mg).

The released oleic acid level was determined by using the commercial kit as described in the “Materials and Methods”.

Each value is the mean ± SD for 3 replicates.

The *t*-test was conducted.

Different superscripts mean significant (p<0.05).

α -セルロースを添加すると有意に増加することを報告している⁵⁶⁾。本研究でみられた盲腸内容物重量の低下は、不溶性食物繊維の摂取量が減少したことが影響していると考えられる。盲腸内細菌叢への効果についてはアルベド TDF の添加により、*Bifidobacteria* の菌数と検出率が大幅に増加し、*Enterococci* の菌数が減少する傾向がみられた。*Bifidobacteria* の検出率の増加は *in vitro* での培養実験の結果がそのまま反映され、アルベド TDF の摂取によりビフィズス菌が増殖しやすい条件になったと考えられる。

本実験では、さらに血糖値や血清と肝臓中の脂質の測定も行った。その結果、アルベド TDF 群で血清中のトリアシルグリセロール濃度だけが有意に低下していた (Table 11)。これまでに、アルベド TDF と同様にビフィズス菌増殖活性をもつ難消化性の糖質であるオリゴフラクトースを摂取することで、リポタンパク質である VLDL の分泌が低下するとの Kok らの報告⁵⁷⁾がある。Kok らはオリゴフラクトースの摂取により血清中のインスリン濃度が低下し、脂肪酸合成酵素の活性が抑制されることで VLDL が減少することと、さらに肝臓での脂肪酸合成が抑制されるために、血清と肝臓の両方のトリアシルグリセロールとリン脂質の濃度が減少することを明らかにしている。

しかし、本研究ではアルベド TDF 群での血糖値や、肝臓と血清中のリン脂質濃度に差がなかった。今回はインスリンの濃度を測定していないが、血糖値が低下していなかったことから、インスリン濃度にも影響がなかったことが推察される。そのため、インスリンによって活性が促進される脂肪酸合成酵素の活性にも影響が現れず、血清中のトリアシルグリセロールの低下が VLDL 分泌の低下によるものではないと考えられる。また、アルベド TDF 群の糞便中の総脂質濃度が有意に高くなっているため、吸収されずに排泄されたと考えられる。これらの原因を明らかにするため、豚膵臓由来のリパーゼを用いた酵素反応にアルベド SDF を添加する実験を行った。

柑橘類のじょうのう膜に含まれるペクチンが膵リパーゼ活性を阻害するという報告⁵⁸⁾があるため、温州みかんアルベドから Prosky 変法⁴³⁾を用いて水溶性食物繊維を抽出し、これ

を加えて腓リパーゼ活性の測定を行った。その結果、6 mL の基質溶液に 80 mg の水溶性食物繊維を添加した時に、約 50% の活性が低下した。ラクトスクロースを用いて同様の実験が行われており、基質溶液にラクトスクロースを 120 mg 混合した場合に約 40% の活性が抑制され、それが最大であったとの報告⁵⁵⁾があることから、本研究ではこれよりも強いアルベド水溶性食物繊維の腓リパーゼ活性阻害効果が示されたことになる。

一方、分子量 300000 以上のペクチン質ではさらに強い阻害活性が示されている⁵⁸⁾が、今回は中性糖の分析を行ったためガラクトロン酸を検出することができず、また構造解析を行っていないため、アルベド水溶性食物繊維に含まれるペクチン質の含有量とその構造は不明である。

ヘミセルロースが腓リパーゼ活性に及ぼす影響については小麦ふすまでも報告がある⁵⁹⁾。小麦ふすまは総食物繊維 42.5% のうち、セルロースが 10.8%、ヘミセルロースが 28.4%、リグニンが 3.3% からなり、粒を細かく処理するほどリパーゼの活性が強く阻害される。この場合、小麦ふすまとリパーゼそのものが結合することで酵素活性が阻害されると報告されている。今回の実験ではアルベド SDF を用いた。不溶性食物繊維を加えたアルベド TDF を利用すればさらに強い阻害活性が見られる可能性があるが、不溶性食物繊維を混合することで反応生成物であるオレイン酸量の測定が適切に行えないため、今回は実験を見送った。

さらに、腓リパーゼ活性を阻害する物質を摂取することで糞便中に排泄される脂質量が増加するという報告もある^{60,61)}。今回の実験でもアルベド TDF 群の糞便中の総脂質濃度が有意に高くなった。

これらのことから血清中のトリアシルグリセロールの低下は、アルベド TDF の摂取により、腓リパーゼ活性が阻害されることで、飼料中の脂質の吸収が抑制されて糞便中に排泄されたためであると推察した。

第4章 L-アラビノースの摂取がラット盲腸内細菌叢に及ぼす影響

ラット盲腸内細菌叢にビフィズス菌増殖促進効果をもたらした温州みかんアルベドに含まれる糖の中で、もっとも多く含まれていたアラビノースが腸内細菌叢にどのような効果をもたらすかを検討した³⁶⁾。

1 L-アラビノース摂取による飼料摂取量、体重、臓器重量への影響

(1) 実験材料

4週齢雄性 Wistar Hannover GALAS (Br/Han: WIST) は日本クレアから購入した。予備飼育に使用した固形飼料 CE-2 は日本クレアより購入した。精製飼料についてはオリエンタル酵母より購入したものを使用した。L-アラビノースは三和澱粉工業のものを用いた。

(2) 方法

飼育環境については前章と同様の条件で行った。固形飼料 CE-2 による7日間の予備飼育の後、平均体重が同じになるように飼料組成によりアラビノース群とコントロール群の2群に分け、1群7匹とした。

飼料組成については大崎らの方法⁶²⁾を参考に調製した。コントロール群にはセルロースを5%混合し、アラビノース群にはL-アラビノースを1%配合して、セルロースの一部を置き換えた。飲料水は水道水を与え、飼料と共に自由に摂取させた。体重と飼料摂取量は週3回測定した。4週間の飼育の後、18時間前から絶食を行い、エーテル麻酔をかけて解剖を行った。開腹後は腹部大静脈より採血を行い、脱血後、盲腸、脂肪（後腹膜、腸間膜、腎周囲）を摘出し秤量した。盲腸は前章と同様に処理を行い、盲腸内容物は分析を行うまで -80°C で冷凍保存した。糞便重量とその水分含量についても前章と同様の操作を行った。

本実験は神戸女子大学動物実験研究倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号27）。

測定結果は平均値 ± 標準偏差で示した。群間の有意差検定は t - 検定を用い、危険率 5% 以下を有意とした。統計解析ソフトは SPSS-11.5J を使用した。

(3) 結果

飼育時の体重変化は Fig. 6 に示すように両群にほとんど差が認められなかった。飼料摂取量はアラビノース群で有意に低下していたが、体重増加量と飼料効率については両群の間に有意な差は認められなかった (Table 13)。盲腸重量と盲腸壁重量、盲腸内容物重量すべてにおいてコントロール群に対してアラビノース群で有意に増加していた。盲腸内 pH と腹腔内脂肪重量については両群で差が認められなかった。

糞便重量は両群共に差が認められないが、糞便中の水分含量はアラビノース群で増加する傾向にあった。糞便乾燥重量はコントロール群と比べてアラビノース群で有意に低下した (Table 14)。

2 盲腸内細菌叢に対する L-アラビノースの影響

(1) 実験材料

盲腸内細菌叢培養を行う際の非選択培地として、BL 寒天培地は日水製薬製、TS 寒天培地は BBL 製を用いた。選択培地として、Enterobacteriaceae 用に日水製薬製の DHL 寒天培地、Lactobacilli 用に Difco 製の MRS 寒天培地、さらに Clostridium 用に日水製薬製の CW 寒天培地を用いた。

(2) 方法

培養法と実験操作は前章と同様に行った。用いた培地は前章のものに Clostridium 選択培地である CW 寒天培地(日水製薬)を加え、37 °C で 48 時間の嫌気培養を行った。CW 寒天培地については、好気テストも加えた。細菌群の同定は前章と同様に行った。

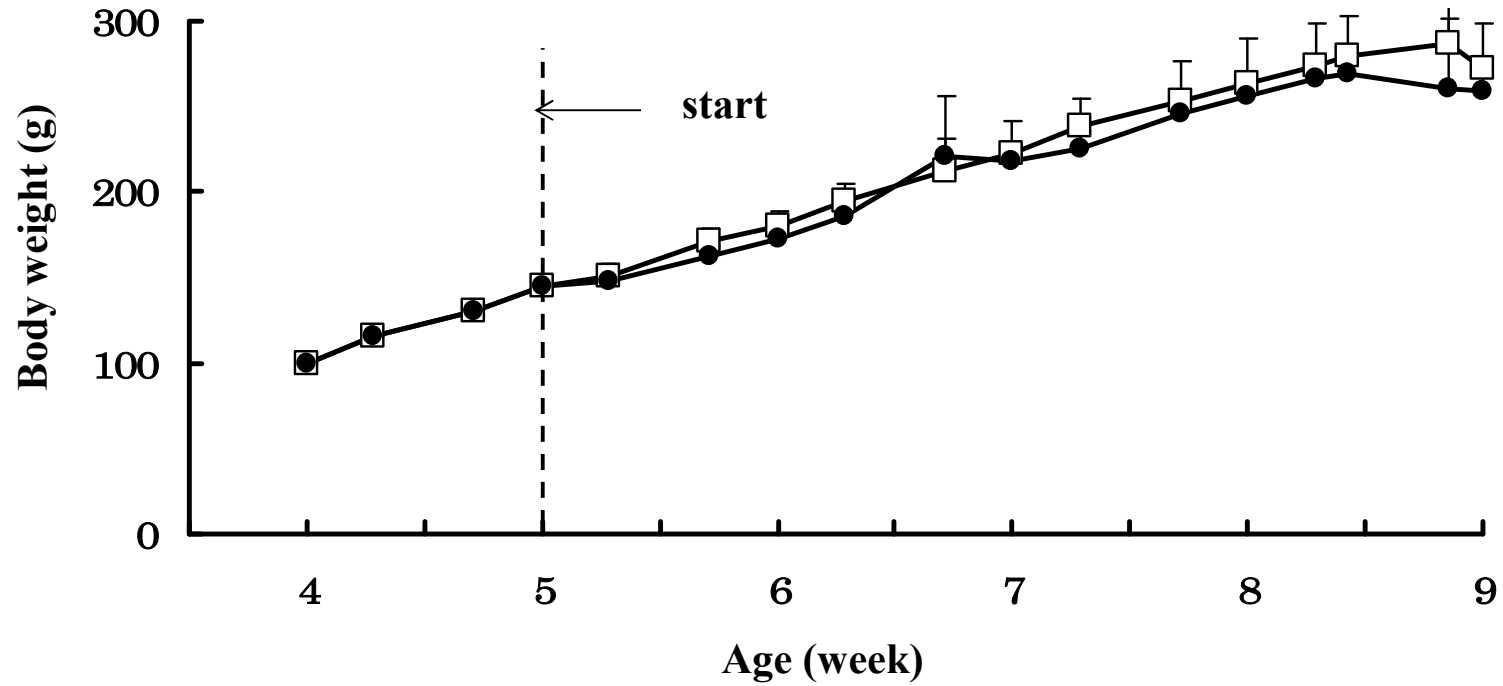


Fig. 6 . Effect of L-arabinose on body weight gain.

Each value is mean \pm SD (control group : n=7, arabinose group : n=7) .

Start : It is a day which began to take in experimental diet.

—□— Control group —●— Arabinose group

Table 13 . Effects of L-arabinose on BW gain, food intake, food efficiency, intra abdominal fat weight and cecum.

	Control		Arabinose	
BW gain, g/d	5.07	± 0.83	4.67	± 0.22
Food intake, g/d	24.83 ^a	± 2.20	22.47 ^b	± 0.90
Food efficiency*	0.20	± 0.03	0.21	± 0.01
Cecum, g	2.37 ^a	± 0.42	4.58 ^b	± 1.38
Cecal wall, g	0.88 ^a	± 0.10	1.18 ^b	± 0.27
Content of cecum, g	1.49 ^a	± 0.45	3.40 ^b	± 1.15
pH of cecum content	6.76	± 0.36	6.56	± 0.25
Liver weight, g	6.34	± 0.53	6.29	± 0.61
Kidneys weight, g	1.58	± 0.15	1.45	± 0.16
Intra-abdominal fat weight, g ^{**}	16.27	± 6.50	11.61	± 3.34

Each value is mean ±SD (control group : n=7, arabinose group : n=7).

*BW gain/food intake

**Intra-abdominal fat weight contained white adipose tissue around the intestine and the kidneys.

The *t*-test was conducted. Different superscripts mean significant (p<0.05).

Table 14 . Effects of L-arabinose on water content in the feces.

	Control	Arabinose
Fecal wet weight (g/3days)	6.58 ± 0.77	5.86 ± 1.11
Fecal dry weight (g/3days)	5.39 ^a ± 0.71	4.35 ^b ± 0.56
water content, %	18.1 ± 7.8	24.7 ± 22.0

Each value is mean ±SD (control group : n=7, arabinose group : n=7) .

The *t*-test was conducted. Different superscripts mean significant (p<0.05).

(3) 結果

アラビノース群とコントロール群の盲腸内容物の細菌叢を検索したところ、総菌数に変化は認められなかった (Table 15)。Staphylococci、Clostridia はアラビノース群で検出率が上昇する傾向があった。Bifidobacteria はコントロール群のすべてのラットで検出限界以下であったが、アラビノース群ではすべてのラットから検出された。

3 L-アラビノースの摂取が盲腸内アンモニア量および短鎖脂肪酸濃度に及ぼす影響

(1) アンモニア定量

1) 実験材料

盲腸内容物は解剖時に生理食塩水に溶解し、 -80°C で冷凍保存したものを用いた。アンモニアの測定には市販のキット (アンモニア テストワコー, 和光純薬工業) を用いた。

2) 方法

操作方法はアンモニア テストワコーの手順に従い、除タンパクの方法は前章と同様に行った。

(2) 短鎖脂肪酸の定量

1) 実験材料

盲腸内容物は解剖時に生理食塩水に溶解し、 -80°C で冷凍保存したものを用いた。分析機器については前章と同様のものを用いた。

2) 方法

実験操作は前章と同様に行った。

Table 15 . Effects of L-arabinose on microflora in the cecum content.

	log CFU/g of wet weight			
	Control		Arabinose	
Enterobacteriaceae	8.4	± 0.9	(100)	8.4 ± 1.0 (100)
Lactobacilli	8.3	± 1.0	(100)	8.4 ± 0.6 (100)
Staphylococci	7.5	± 1.1	(29)	8.2 ± 1.0 (86)
Bacteroidaceae	9.8	± 0.3	(100)	9.7 ± 0.3 (100)
Eubacteria	8.5	± 0.2	(29)	8.7 (14)
Peptococcaceae	9.2	± 0.6	(86)	9.4 ± 0.6 (100)
Bifidobacteria	n.d.		(0)	9.4 ± 0.5 (100)
Clostridia	7.2	± 1.0	(43)	8.2 ± 1.1 (86)
Total	10.0	± 0.4		10.2 ± 0.3

Each value is mean ±SD (control group : n=7, arabinose group : n=7) .

Figures in parentheses are % of detection rate.

n.d. represents < 2.3 (log CFU).

The *t*-test was conducted.

Bacterial analysis was carried out with the method of partly modified Mitsuoka's method.

(3) 結果

アラビノース群の盲腸に含まれるアンモニア量はコントロール群と比べて有意に増加していた (Table 16)。短鎖脂肪酸の濃度に関しては酢酸、プロピオン酸がアラビノース群で有意に増加したが、吉草酸、カプロン酸はアラビノース群で有意に低下した。コントロール群で検出されていたイソカプロン酸はアラビノース群では検出限界以下であった。

4 血清脂質に対する L-アラビノース摂取の影響

1) 実験材料

血清は解剖時に採取し、 -20°C で冷凍保存したものをを用いた。

トリアシルグリセロール、総コレステロールの測定にはそれぞれ市販のキット (Triglyceride E-Test Wako and Total Cholesterol E-Test Wako, 和光純薬工業) をを用いた。

2) 方法

トリアシルグリセロール、総コレステロールの測定はそれぞれキットの手順に従って行った。

3) 結果

アラビノース群のトリアシルグリセロール濃度はコントロール群と比べて減少する傾向がみられた (Table 17)。コレステロール濃度はアラビノース群で有意に低下した。

5 考察

アラビノースの添加量は大崎らの方法⁶²⁾を参考に1%とした。これ以上の投与は下痢を誘発する可能性があるためである。

L-アラビノースの添加により、盲腸内細菌叢の中でビフィズス菌の検出率が大幅に増加

Table 16 . Effects of L-arabinose on ammonia level and concentration of SCFA in the cecum contents.

	Control			Arabinose		
ammonia, mg	1.4 ^a	±	0.3	3.0 ^b	±	0.9
SCFA, μmol						
acetate	70.3 ^a	±	15.1	101.7 ^b	±	33.4
propionate	26.1 ^a	±	5.0	41.1 ^b	±	12.6
isobutyrate	4.6	±	0.6	4.3	±	0.7
butyrate	13.1	±	2.0	10.9	±	4.7
isovalerate	5.0	±	0.7	5.3	±	1.0
valerate	6.2 ^a	±	1.1	4.1 ^b	±	1.0
isocaproate	1.2	±	2.2		n.d.	
caproate	5.0 ^a	±	1.1	3.1 ^b	±	0.2
Total	131.5	±	22.3	170.5	±	47.0

Each value is mean ±SD (control group : n=7, arabinose group : n=7) .

The *t*-test was conducted. Different superscripts mean significant (p<0.05).

n.d. represents under the detection limit.

Table 17 . Effects of L-arabinose on lipid parameters of serum.

	mg/dL	
	Control	Arabinose
Triacylglyceride	115.9 ± 24.9	94.5 ± 11.9
Cholesterol	66.9 ^a ± 10.3	54.1 ^b ± 10.3

Each value is mean ±SD (control group : n=7, arabinose group : n=7).

The *t*-test was conducted. Different superscripts mean significant (p<0.05).

した。L-アラビノースは難吸収性の糖で⁶³⁾、スクラーゼ阻害作用を持つこと⁶⁴⁾が報告されており、L-アラビノースを含むスクロースを投与すると消化吸収されなかったスクロースが盲腸や結腸に残存していること⁶⁵⁾も調べられている。また、L-アラビノースは多くの腸内細菌によって利用可能な糖であること³⁹⁾からも、消化と吸収を免れたスクロースとL-アラビノースが盲腸内に入りビフィズス菌が増殖しやすい環境が整ったためと考えられる。L-アラビノースの投与により盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の中では、酢酸やプロピオン酸が有意に増加し、吉草酸、カプロン酸は有意に減少しているが、全体的な量としては増加する傾向が見られた。さらにアンモニア量がコントロール群と比べて有意に増加していた。盲腸内での検出率が増加したビフィズス菌は糖を代謝して酢酸や乳酸を産生する。他にも、バクテロイデス (*Bacteroides*) は糖を代謝して主にコハク酸やプロピオン酸、酢酸を生成し、ユウバクテリウム (*Eubacterium*) などは酢酸や酪酸を生成する⁶⁶⁾。したがって、酢酸とプロピオン酸の増加はビフィズス菌などの糖を利用する腸内細菌によってL-アラビノースとスクロースが発酵されたためと推定される。

また、酪酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸が大腸の粘膜細胞を増殖させるとの報告⁶⁷⁾があることから、アラビノース群で増加傾向にある短鎖脂肪酸が盲腸のエネルギー源となったことと、盲腸内容物の増加で盲腸自体が大きくなったために、盲腸壁重量が有意に増加したと考えられる。コントロール群と比べて重くなった盲腸壁から剥離した古い細胞がタンパク源となり腸内細菌によって利用され、結果としてアラビノース群のアンモニア量が有意に増加したと考えられる。

今回の実験では、アラビノース群の血清中コレステロール濃度が有意に低下した。すでに、発酵生産物のプロピオン酸が増加すると総コレステロール値を下げるとの報告⁶⁸⁾や、酢酸とプロピオン酸の摂取が血清コレステロールを低下させるとの報告⁶⁹⁾がある。本研究での盲腸内容物中の酢酸とプロピオン酸濃度がアラビノース群で有意に増加したことが、血清中コレステロール濃度の低下につながったと考えられ、すでに報告されているものと

同様のメカニズムによると考えられる。

L-アラビノースの摂取によって、コントロール群と比べて飼料摂取量が有意に低下していた。しかし、体重増加は順調であり、飼料効率にも差が認められなかった。さらに、肝臓や腎臓重量に差がなかったことから、藤井らの報告⁷⁰⁾と同様にL-アラビノースの摂取が健康に悪影響を示さないことが確認できた。

今回の実験結果から、L-アラビノースの摂取により腸内細菌叢に含まれるビフィズス菌が増加することと血清コレステロール濃度が低下することが示された。

第5章 結論

従来から腸内細菌の増殖と関係があるのは水溶性食物繊維であり、不溶性食物繊維は関係しないとされており⁷¹⁾、不溶性食物繊維が腸内細菌叢に影響を与えるとの報告⁷²⁾は、わずかしかない。そこで本研究では野菜や果物の未利用部位から抽出した総食物繊維を用いて、まず試験管内でビフィズス菌増殖効果を明らかにし、その上でラット盲腸内細菌叢への影響を調べた。

まず、第2章ではヤマイモとサトイモの皮、エンドウのさや、ソラマメのさやと種皮、そして温州みかんアルベドの6種類の食品の未利用部位から Prosky 法を用いて水溶性と不溶性の食物繊維からなる総食物繊維の抽出を行った。それぞれ0.5%になるようにPY培地に混合したが、液体培地に不溶性食物繊維を混合したことで、培地は濁りと沈殿を有していたため、菌の生育は吸光度の測定ではなく生菌数を測定することで判定した。*B. longum* JCM1217株、*B. bifidum* JCM1254株の培養を行い、その増殖促進効果を調べた結果、2株共に最も増殖率が高かったのが温州みかんアルベドから抽出した総食物繊維であった。

この食物繊維の特徴として、アラビノースが多く含まれていることが明らかとなった。*B. longum* はアラビノシダーゼを有しており^{51, 73)}、さらに食物繊維から遊離してきたアラビノースを炭素源として生育することが出来ること⁷⁴⁾から、アラビノースを多く含む温州みかんアルベド由来食物繊維を資化しやすかったと考えられる。

これまでに報告されているプレバイオティクス活性のある多くの野菜・果物未利用部位由来の難消化性糖質は食物繊維を酵素処理や加水分解を行って得られたものである^{29, 30, 31, 38, 75)}。本研究の総食物繊維を用いたビフィズス菌増加の研究は初めての試みであり、ビフィズス菌増加活性のある食物繊維の発見につながった。

第3章ではビフィズス菌増殖効果が最も高かったアルベドTDFを飼料に1%混合して(アルベドTDF群)28日間ラットに摂取させる実験を行った。盲腸内細菌叢への効果や生理学的な影響を、飼料中に食物繊維としてセルロースのみを含むコントロール群と比較して調

べた。その結果、盲腸内細菌叢に含まれるビフィズス菌の検出率がコントロール群では0%で、アルベド TDF 群では83%であった。ラットの保有する主要なビフィズス菌菌種は *B. animalis*³⁹⁾であるが、この菌がアラビノシダーゼを有するとの報告⁷³⁾があり、アルベド TDF からアラビノースを遊離して炭素源として利用したため、ビフィズス菌の検出率が上昇したと思われる。

さらに、アルベド TDF 群において、血清トリアシルグリセロール濃度が有意に低下した。これについてはアルベドに含まれる水溶性食物繊維（アルベド SDF）が試験管内での腓りパーゼ活性を50%阻害し、飼料中のトリアシルグリセロールの吸収が抑制されたためであることが示唆された。また、ラット糞便中の総脂質濃度はアルベド総食物繊維添加群で有意に増加した。これらのことから、血清中のトリアシルグリセロールの低下はアルベド総食物繊維の摂取によって飼料中の脂質が消化吸収されずに排泄されたことが原因であると考えられた。腓りパーゼや胆汁脂質を小麦ふすまが吸着するとの報告があり、その活性はキシランやペクチンに比べて非常に強い。アルベド TDF は、不溶性食物繊維の含量が高くアラビノースやキシロース含量が高かったことから、その本態はヘミセルロースであると予想される点で小麦ふすまに似ている⁵⁹⁾。本実験においても、アルベド TDF に腓りパーゼや基質である脂質（トリオレイン）の吸着が起こっている可能性も考えられる。

このように温州みかんアルベド TDF は、ビフィズス菌増加と腓りパーゼ活性の阻害による脂質排泄促進という全く異なる2つの活性を有することが明らかとなった。

第4章では、アルベド TDF の主要な構成糖であるアラビノースを摂取したときのラットの盲腸内細菌叢に対する効果を調べた。L-アラビノースは難吸収性の糖であること⁶³⁾や、スクラーゼ阻害活性を持つこと⁶⁴⁾が報告されている。さらに、L-アラビノースを含むスクロースの摂取により消化吸収されなかったスクロースが盲腸や結腸に残存していること⁶⁵⁾も報告されている。今回の実験ではL-アラビノースを飼料中に1%となるように混合してラットに摂取させた。このアラビノース群の盲腸内細菌叢中のビフィズス菌検出率が、コン

コントロール群と比べて大幅に増加した。L-アラビノースが多くの腸内細菌によって利用可能な糖であり³⁹⁾、さらに多くのビフィズス菌種にも利用されることが報告されている (Table 2)。また、ビフィズス菌は炭水化物を発酵させて ATP を産生するため、多くの糖質分解酵素を有している^{76, 77, 78)}ことがゲノム解析から示されている。アラビノース摂取によって盲腸内に存在するビフィズス菌が増加したのは、消化と吸収を免れたスクロースと L-アラビノースが盲腸内に到達し、ビフィズス菌が増殖しやすい環境が整ったためと考えられる。

解剖直前の 3 日間の排便量は L-アラビノースの摂取により減少する傾向があった。糞便中の水分含量は増加する傾向がみられた。しかし、これらは有意な差ではなく、明確な排便促進効果は認められなかった。

第 3 章と第 4 章の結果から、アルベド TDF の摂取時にはみられなかった血清コレステロール濃度の低下が L-アラビノースの摂取時に観察された。一方で、盲腸内容物中のプロピオン酸濃度がコントロール群と比べてアルベド TDF 群で有意に低下したが、アラビノース群では有意に増加していた。さらに、酢酸の濃度もアルベド TDF 群では有意差が認められなかったが、アラビノース群ではコントロール群と比べて有意に増加していた。これまでに、プロピオン酸は総コレステロール値を下げるとの報告⁶⁸⁾がある。また、酢酸とプロピオン酸の摂取が血清コレステロールを低下させるとの報告⁶⁹⁾もある。本実験でのアラビノース群での血清コレステロール濃度の低下は L-アラビノースが腸内細菌によって利用され増加したプロピオン酸と酢酸の作用によるものと考えられるが、盲腸内で増殖したビフィズス菌の中にコレステロール低下効果を有する株が含まれていた可能性も除外できない。

アルベド TDF 摂取時には観察されなかった血清コレステロール低下効果が L-アラビノースの摂取により観察されたことから、アラビノースの代謝が効果を発揮していると考えられ、アルベド総食物繊維の摂取量を増やすことができるなら L-アラビノース添加時と同様の効果が得られる可能性がある。

本研究では、食物繊維のスクリーニングを行う際に、2 種のビフィズス菌を用いて試験管

内での増殖効果を検討し、温州みかんのアルベド TDF にビフィズス菌増殖活性があるという発見に至った。さらに温州みかんのアルベド TDF に腓リパーゼ活性の阻害による脂質の吸収を抑制する作用があることも明らかにした。

野菜や果物の未利用部位には様々な食物繊維が含まれており、有効利用が望まれている。今後、さらにビフィズス菌増殖効果と血清トリグリセリド低下効果など、生活習慣病関連の症状を改善する効果を持つ新たな食物繊維を開拓していきたいと考えている。

引用文献

- 1) 光岡知足: ヒトの健康における腸内フローラの役割, 腸内フローラの生態と役割, (編) 光岡知足, 学会出版センター, 東京, 1990, 1-29.
- 2) Saito Y, Hamanaka Y, Saito K, Takizawa S, Benno Y: Stability of species composition of fecal bifidobacteria in human subjects during fermented milk administration. *Curr Microbiol.* 44: 368-373, 2002.
- 3) Benno Y, Suzuki K, Suzuki K, Narisawa K, Bruce WR, Mitsuoka T: Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol Immunol.* 30: 521-532, 1986.
- 4) Fuller R: Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 66: 365-378, 1989.
- 5) Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I: Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 80: S147-171, 1998.
- 6) Fujimura S, Watanabe A, Kimura K, Kaji M: Probiotic Mechanism of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain against *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 50:1134- 1136, 2012.
- 7) Odamaki T, Xiao JZ, Iwabuchi N, Sakamoto M, Takahashi N, Kondo S, Iwatsuki K, Kokubo S, Togashi H, Enomoto T, Benno Y: Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season and influence of probiotic intake. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 17: 92-100, 2007.
- 8) Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Iwatsuki K, Kokubo S, Togashi H, Enomoto K, Enomoto T: Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 [corrected] in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 16: 86-93, 2006.

- 9) Bezkorovainy A: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr.* 2001. 73: 399S-405S, 2001.
- 10) 河野麻美子, 吉野智恵, 松浦洋一, 浅田雅宣, 河原有三: ビフィズス菌および乳酸菌含有腸溶性カプセルの摂取が健常人の排便回数, 便性状に及ぼす影響. *腸内細菌学雑誌.* 18: 87-92, 2004.
- 11) 辨野義己: 腸内細菌の全容解明とプロバイオティクスの機能研究, *日本食生活学会誌.* 16: 194-199, 2005.
- 12) Gibson GR, Roberfroid MB: Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 125: 1401-1412, 1995.
- 13) Bindels LB, Porporato P, Dewulf EM, Verrax J, Neyrinck AM, Martin JC, Scott KP, Buc Calderon P, Feron O, Muccioli GG, Sonveaux P, Cani PD, Delzenne NM: Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *Br J Cancer.* 107: 1337-1344, 2012.
- 14) Slavin J, Feirtag J: Chicory inulin does not increase stool weight or speed up intestinal transit time in healthy male subjects. *Food Funct.* 2: 72-77, 2011.
- 15) Herfel TM, Jacobi SK, Lin X, Fellner V, Walker DC, Jouni ZE, Odle J: Polydextrose enrichment of infant formula demonstrates prebiotic characteristics by altering intestinal microbiota, organic acid concentrations, and cytokine expression in suckling piglets. *J Nutr.* 141: 2139-2145, 2011.
- 16) Vos AP, Knol J, Stahl B, M'Rabet L, Garssen J: Specific prebiotic oligosaccharides modulate the early phase of a murine vaccination response. *Int Immunopharmacol.* 10: 619-625, 2010.
- 17) Sabater-Molina M, Larqué E, Torrella F, Zamora S: Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J Physiol Biochem.* 65: 315-328, 2009.

- 18) Passariello A, Terrin G, Marco G, Cecere G, Ruotolo S, Marino A, Cosenza L, Tardi M, Nocerino R, Canani RB: Efficacy of a new hypotonic oral rehydration solution containing zinc and prebiotics in the treatment of childhood acute diarrhea: a randomized controlled trial. *J Pediatr.* 158: 288–292, 2011.
- 19) 佐藤岳治, 中村泰之, 小澤修: ガラクトオリゴ糖がマウスの免疫系に与える影響. *日本栄養・食糧学会誌.* 61: 79-88, 2008.
- 20) Fleige S, Preissinger W, Meyer HH, Pfaffl MW: The immunomodulatory effect of lactulose on *Enterococcus faecium* fed preruminant calves. *J Anim Sci.* 87: 1731-1738, 2009.
- 21) Hafer A, Krämer S, Duncker S, Krüger M, Manns MP, Bischoff SC: Effect of oral lactulose on clinical and immunohistochemical parameters in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study. *BMC Gastroenterol.* 7: 36-46, 2007.
- 22) Femia AP, Salvadori M, Broekaert WF, François IE, Delcour JA, Courtin CM, Caderni G: Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) reduce preneoplastic lesions in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). *Eur J Nutr.* 49: 127-132, 2010.
- 23) Elli M, Cattivelli D, Soldi S, Bonatti M, Morelli L: Evaluation of prebiotic potential of refined psyllium (*Plantago ovata*) fiber in healthy women. *J Clin Gastroenterol.* 42: S174-S176, 2008.
- 24) Costabile A, Klinder A, Fava F, Napolitano A, Fogliano V, Leonard C, Gibson GR, Tuohy KM: Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr.* 99: 110-120, 2008.
- 25) Carvalho-Wells AL, Helmholz K, Nodet C, Molzer C, Leonard C, McKevith B, Thielecke F, Jackson KG, Tuohy KM: Determination of the in vivo prebiotic potential of a

- maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. *Br J Nutr.* 1353-1356, 2010
- 26) Calame W, Weseler AR, Viebke C, Flynn C, Siemensma AD: Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *Br J Nutr.* 1269-1275, 2008.
- 27) Turunen K, Tsouvelakidou E, Nomikos T, Mountzouris KC, Karamanolis D, Triantafyllidis J, Kyriacou A: Impact of beta-glucan on the faecal microbiota of polypectomized patients: a pilot study. *Anaerobe.* 403-406, 2011.
- 28) 農林水産統計 食品循環資源の再生利用等実態調査結果, 農林水産省大臣官房統計部, (平成 24 年 8 月 31 日公表)
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyunkan_sigen/pdf/zyunkan_sigen_10_.pdf
(平成 25 年 2 月 2 日収載)
- 29) 高橋義宣, 増田康之, 杉本正裕, 江成宏之: りんごペクチンオリゴ糖の整腸作用. *日本食品科学工学会誌.* 55: 455-460, 2008.
- 30) Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W, Yadhav MP, Gibson GR, Rastall RA: In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Appl Environ Microbiol.* 71: 8383-8389, 2005.
- 31) 浅野一朗, 中村保幸, 星野宏充, 青木敬司, 藤井繁佳, 井村直人, 飯野久和: コーヒーマンナン由来マンノオリゴ糖の腸内細菌資化性. *日本農芸化学会誌.* 75: 1077-1083, 2001.
- 32) 日本食品標準成分表, 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会編, 全国官報販売協同組合, 2010, 74-75.

- 33) 日本食品標準成分表, 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会編, 全国官報販売協同組合, 2010, 84-85.
- 34) Iwata E, Hotta H, Goto M: Hypolipidemic and bifidogenic potentials in the dietary fiber prepared from Mikan (Japanese mandarin orange: *Citrus unshiu*) albedo. *J Nutr Sci Vitaminol.* 58: 175-180, 2012.
- 35) Takamine K, Hotta H, Degawa Y, Moriura S, Kida K: Effect of dietary fiber prepared from sweet potato pulp on ceecal fermentation products and microflora in rats. *J Appl Glycosci.* 52: 1-5, 2005.
- 36) 岩田恵美子, 出川洋子, 澤谷幸, 竹山杏奈, 大窪亜由美, 八木真知子, 堀田久子, 辨野義己: L-アラビノース添加スクロースのラット盲腸内ビフィズス菌菌数に及ぼす影響. *栄養学雑誌* 65: 249-254, 2007.
- 37) 光岡知足: 腸内菌の世界, 叢文社, 東京, 1980, 28.
- 38) 出川洋子, 柴沼清, 高野勝, 辨野義己: コーンファイバー分解オリゴ糖投与によるラットの生理学的性状および盲腸内細菌叢に及ぼす影響. *日本食品科学工学会誌.* 53: 48-54, 2006.
- 39) 光岡知足: 腸内フローラ研究における細菌分類学の意義, 腸内フローラの分類と生態, (編) 光岡知足, 学会出版センター, 東京, 1992, 1-34.
- 40) Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H: Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4506-4512, 1999.
- 41) Iwata E, Hotta H, Goto M: The screening method of a bifidogenic dietary fiber extracted from inedible parts of vegetables. *J Nutr Sci Vitaminol.* 55: 385-388, 2009.

- 42) Prosky L, Asp N-G, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland B F: Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. J Assoc Off Anal Chem. 58: 677-679, 1985.
- 43) Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I: Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. J Assoc Off Anal Chem. 71: 1017-1023, 1988.
- 44) Englyst H, Wiggins HS, Cummings JH: Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. Analyst. 107: 307-318, 1982.
- 45) 松永清輝: 菌量(数)測定法, 図説 臨床検査法 細菌・真菌学, (編) 三輪谷俊夫, 医歯薬出版, 東京, 1982, 240-244
- 46) Sakata S, Kitahara M, Sakamoto M, Hayashi H, Fukuyama M, Benno Y: Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. Int J Syst Evol Microbiol. 52: 1945-1951, 2002.
- 47) 日本食品標準成分表, 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会編, 全国官報販売協同組合, 2010, 48-49.
- 48) 日本食品標準成分表, 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会編, 全国官報販売協同組合, 2010, 50-51.
- 49) Oshodi AA, Ogungbenle HN, Oladimeji MO: Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamum radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) flours. Int J Food Sci Nutr. 50: 325-331, 1999.

- 50) Suzuki Y, Tanaka K, Amano T, Asakura T, Muramatsu N: Utilization by intestinal bacteria and digestibility of arabino-oligosaccharides in vitro. *J Japan Soc Hort Sci.* 73: 574-579, 2004.
- 51) Fujita K, Sakamoto S, Ono Y, Wakao M, Suda Y, Kitahara K, Suganuma T: Molecular cloning and characterization of a beta-L-Arabinobiosidase in *Bifidobacterium longum* that belongs to a novel glycoside hydrolase family. *J Biol Chem.* 286: 5143-5150, 2011.
- 52) Lahaye M, Quemener B, Causse M, Seymour GB: Hemicellulose fine structure is affected differently during ripening of tomato lines with contrasted texture. *Int J Biol Macromol.* 51: 462-470, 2012.
- 53) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226: 497-50, 1957.
- 54) Mitsuoka T, Ohno K, Benno Y, Suzuki K, Namba K: The fecal flora of men. IV. Communication: Comparison of the newly developed method with the old conventional method for the analysis of intestinal flora (author's transl). *Zentralbl Bakteriolog Orig A.* 234: 219-233, 1976.
- 55) Mizote A, Taniguchi Y, Takei Y, Koya-Miyata S, Kohno K, Iwaki K, Kurose M, Oku K, Chaen H, Fukuda S: Lactosucrose inhibits body fat accumulation in rats by decreasing intestinal lipid absorption. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73: 582-587, 2009.
- 56) Hillman L, Peters S, Fisher A, Pomare EW: Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *Br J Nutr.* 50: 189-195, 1983.
- 57) Kok N, Roberfroid M, Robert A, Delzenne N: Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br J Nutr.* 76: 881-890, 1996.
- 58) Edashige Y, Murakami N, Tsujita T: Inhibitory effect of pectin from the segment membrane of citrus fruits on lipase activity. *J Nutr Sci Vitaminol.* 54: 409-415, 2008.

- 59) Lairon D, Lafont H, Vigne JL, Nalbone G, Léonardi J, Hauton JC: Effects of dietary fibers and cholestyramine on the activity of pancreatic lipase in vitro. *Am J Clin Nutr.* 42: 629-638, 1985.
- 60) Carrière F, Renou C, Ransac S, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, De Caro A, Fleury A, Sanwald-Ducray P, Lengsfeld H, Beglinger C, Hadvary P, Verger R, Laugier R: Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281: G16-28, 2001.
- 61) Tsujita T, Takaichi H, Takaku T, Sawai T, Yoshida N, Hiraki J: Inhibition of lipase activities by basic polysaccharide. *J Lipid Res.* 48: 358-365, 2007.
- 62) Osaki S, Kimura T, Sugimoto T, Hizukuri S, Iritani N: L-arabinose feeding prevents increases due to dietary sucrose in lipogenic enzymes and triacylglycerol levels in rats. *J Nutr.* 131: 796-799, 2001.
- 63) Schutte JB, De Jong J, Van Weerden EJ, Tamminga S: Nutritional implications of L-arabinose in pigs. *Br J Nutr.* 68: 195-207, 1992.
- 64) Seri K, Sanai K, Matsuo N, Kawakubo K, Xuc C, Inoue S: L-Arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. *Metabolism.* 45: 1368-1374, 1996.
- 65) 讚内和子, 世利謙二, 井上修二: ラットにおけるショ糖の消化吸収およびエネルギー代謝に対する L-アラビノースの抑制作用. *日本栄養・食糧学会誌.* 50: 133-137, 1997.
- 66) Macfarlane GT, Gibson GR: Microbiological aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel. *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, (ed.) Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T, Cambridge Univ. Press, UK, 1995, 87-105.

- 67) Sakata T: Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr.* 58: 95-103, 1987.
- 68) 海老原清:食物繊維の生理作用と短鎖脂肪酸(3). *臨床栄養.* 81: 254-255, 1992.
- 69) Hara H, Haga S, Kasai T, Kiriyama S: Fermentation products of sugar-beet fiber by cecal bacteria lower plasma cholesterol concentration in rats. *J Nutr.* 128: 688-693, 1998.
- 70) 藤井信, 畑添牧郎, 候徳興, 真田宏夫, 大崎繁満, 檜作進: ラットの血清脂質、脂肪組織重量、盲腸重量及び盲腸有機酸含量に対するL-アラビノースの効果. *J Appl Glycosci.* 47: 355-361, 2000.
- 71) Sembries S, Dongowski G, Jacobasch G, Mehrländer K, Will F, Dietrich H: Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br J Nutr.* 90:607-615, 2003.
- 72) Rudi K, Zimonja M, Aasen IM, Knutsen SH, Sahlstrøm S: Novel 16S rRNA gene analyses reveal new in vitro effects of insoluble barley fibres on the human faecal microbiota. *Lett Appl Microbiol.* 48: 433-439, 2009.
- 73) O'Brien M, Mitsuoka T: *Bifidobacterium* および関連腸内菌の新同定法の試み, 腸内フローラの分類と生態, (編) 光岡知足, 学会出版センター, 東京, 1992, 181-192.
- 74) Pastell H, Westermann P, Meyer AS, Tuomainen P, Tenkanen M: In vitro fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *J Agric Food Chem.* 57: 8598-8606, 2009.
- 75) Mandalari G, Nueno Palop C, Tuohy K, Gibson GR, Bennett RN, Waldron KW, Bisignano G, Narbad A, Faulds CB: In vitro evaluation of the prebiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73: 1173-1179, 2007.

- 76) Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F: The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 14422-14427, 2002.
- 77) Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, Lapidus A, Rokhsar DS, Lebrilla CB, German JB, Price NP, Richardson PM, Mills DA: The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proc Natl Acad Sci U S A. 105: 18964-18969, 2008.
- 78) Loquasto JR, Barrangou R, Dudley EG, Roberts RF: The complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subspecies *animalis* ATCC 25527^T and comparative analysis of growth in milk with *B. animalis* subspecies *lactis* DSM 10140^T. J Dairy Sci. 94: 5864-5870, 2011.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始熱心にご指導ご鞭撻を頂きました神戸女子大学大学院家政学
研究科 堀田久子教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文をご精読いただき、数々のご助言とご指導を賜りました山本勇教授に深謝いたします。

本論文で用いた試料に関して様々のご助言を頂きました、後藤昌弘教授に心より感謝いたし
ます。

また、腸内細菌の培養法についてご助言をいただきました独立行政法人理化学研究所 イノ
ベーション推進センター 辨野特別研究室 辨野義己博士に深謝いたします。

L-アラビノースのご提供を頂きました三和澱粉工業株式会社、盲腸内容物の分析をご協力い
ただきました 三和澱粉工業株式会社 研究開発部 出川洋子さんに心より感謝いたします。

堀田研究室の院生はじめ学生の皆さん、実験動物の世話や解剖、試料の分析など、多くのご
協力を心より感謝いたします。