

Table 4 The Vmax ,Km and Ki values of disaccharidases in the small intestinal brush-border membrane by tagatose or fructose.

	V <sub>max</sub> <sup>a)</sup>	Km <sup>b)</sup>	Ki <sup>b)</sup>	
			Tag	Fru
Sucrase	21.0	12.7	8.31	8.39
Trehalase	15.5	5.7	11.69	10.49
Lactase	9.0	7.2	21.33	9.04

a)  $\mu$  mol/mg-protein/hr, b)mM

### アルカリホスファターゼ活性

アルカリホスファターゼ活性は、十二指腸 (Duodenum) で最も高い活性値を示した。その他の部位は低い傾向にあった。食餌組成による活性の影響は、フルクトース群において高い値を示しが、タガトース含量の違いによる活性値の変動はほとんど見られなかった (Fig. 6)。

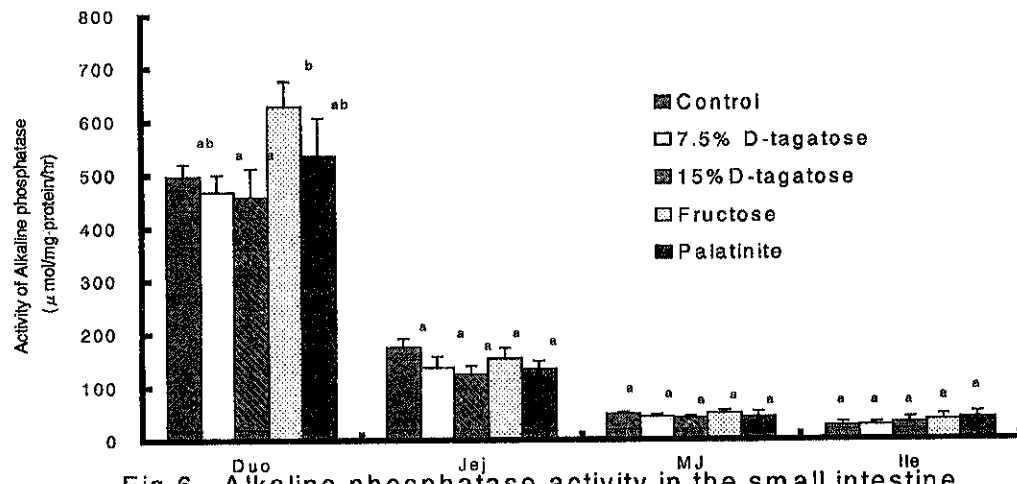


Fig.6 Alkaline phosphatase activity in the small intestine

Values are mean  $\pm$  SE. The values not sharing a common superscript letter are

### 組織湿重量、盲腸内容物及び糞重量

盲腸、結腸の湿重量を測定した結果、盲腸の湿重量はタガトース 15%群が最も重く、次いでパラチニット 7.5%群が重かった。タガトース 15%群、パラチニット 7.5%群に関しては、他群と比較すると約 2 倍の重量だった。タガトース 7.5%群では、パラチニット 7.5%群を除く対照群との差は見られなかった。結腸の湿重量に関しては、有意差は認められなかった。その他の臓器に関しては、各群ごとの差はなかった。次に、盲腸・結腸の内容物重量を Table 5 に示した。内容物重量は、盲腸ではタガトース含有量が多い 15%群の方が重くなり、有意差が認められた。結腸では有意とは言えないが、タガトース 15%群において重い傾向が見られた。対照群と比較すると、盲腸の内容物では、タ

ガトース 15%群においては、約 3 倍の重量で、有意な差が見られた。

Table 5 Weights in cecum and colon content

Group	(g)	
	Cecum	Colon
Cellulose	1.7±0.2a	1.2±0.3a
Tagatose7.5%	2.2±0.2a	0.5±0.2a
Tagatose15%	5.3±1.3b	1.4±0.7a
Fructose	1.5±0.1a	0.6±0.2a
Palatinit	1.9±0.3a	0.8±0.4a

Values are mean ±SE. The values not sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05)

糞の乾燥重量を第 2 週目に観察した結果、タガトースの増大とともに、糞重量は減っていったが、セルロース群を除く対照群と比較し、有意差は認められなかった。セルロース群は、他の群に比べ約 2 倍糞重量が増えていた。また糞の状態は、タガトース含有量が増えるにつれて下痢の症状が見られ、色も白色に近い茶色であった。

#### 盲腸内容物の短鎖脂肪酸

盲腸の発酵最終産物である短鎖脂肪酸を HPLC 法で測定した濃度（盲腸 1g 当たりの mg 濃度）及び総量の比較を行った。Fig. 7 に盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の濃度を示した。

対照群である、セルロース 7.5%群では酢酸が最も高く、プロピオン酸、酪酸の順に次いだ。、パラチニット 7.5 %群の短鎖脂肪酸の濃度は、酪酸が最も多く、酢酸、プロピオン酸の順に次いだ。タガトース 7.5%、15%群においては、酪酸と酢酸量がほぼ同じで最も高く、次いでプロピオン酸、乳酸の順に高い値を示した。タガトースの含量が多い 15%群の方が、各短鎖脂肪酸、有機酸の濃度は低い値を示していた。フルクトース 7.5 %群においては、酢酸が最も高く、次いでプロピオン酸、酪酸の順に高い値を示した。乳酸量は相対的に低い値であった。

酪酸では、タガトース 7.5%群、パラチニット 7.5%群ではいずれも 1.2mg/g 以上で有意に高い値を示した。タガトース 15%群においてはセルロース、フルクトース 7.5%群と同様な値になった。酢酸では、セルロース、パラチニット 7.5%群、タガトース 7.5%群、ではいずれも 1.0mg/g 前後と特に差は見られなかったが、フルクトース 7.5%群においては、2.0mg/g 前後と他の 4 群に比べ、高い値を示した。タガトース 15%群では、0.5mg/g 前後と、有意に低い値が認められた。プロピオン酸は対照群、タガトース 7.5%、15%群、いずれも 0.5mg/g 前後で、差は見られなかった。乳酸はセルロース、フルクトース 7.5%群、タガトース 7.5、15%群いずれも 0.2mg/g 前後を示し差は見られなかったが、パラチニット 7.5%群では 0.4mg/g 以上で、他の 4 群に比べ最も高い値を示した。

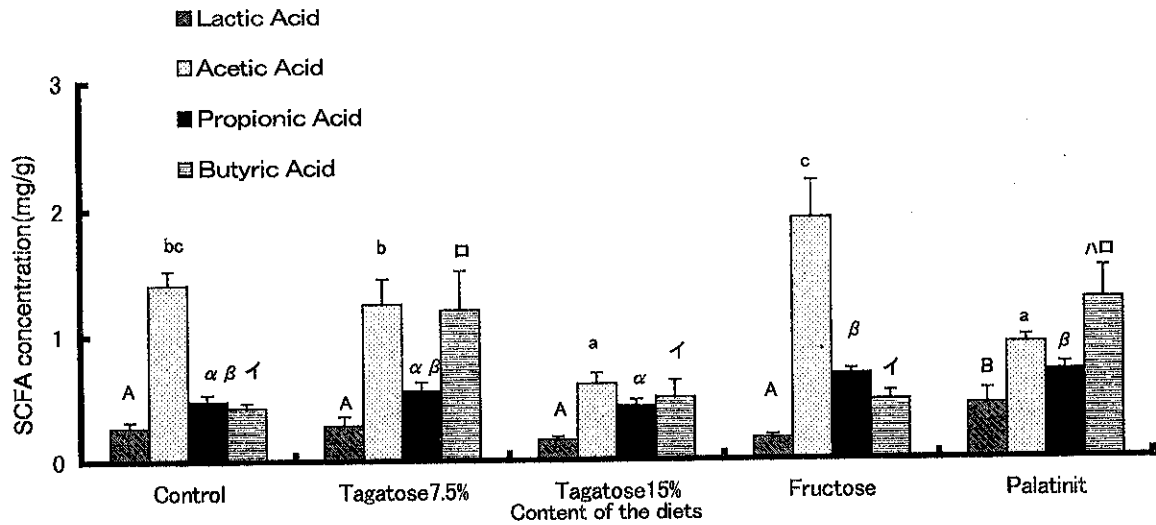


Fig.7 SCFA concentration in cecum of rats fed diets containing tagatose or several carbohydrates

Values are mean±SE. The values not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05)

一方、Fig. 8 に示すように盲腸内の総量も濃度と同様の傾向で、対照群であるセルロース 7.5%群は酢酸、酪酸、プロピオン酸、乳酸の順に次いだ。パラチニット 7.5%群は、酪酸の量が最も多く、次いで酢酸、プロピオン酸、乳酸の順であった。タガトース 7.5%、15%群においては、酢酸と酪酸がほぼ同じで最も高く、次いでプロピオン酸、乳酸の順であった。フルクトース 7.5%群では、酢酸が最も多く、プロピオン酸、酪酸、乳酸の順であった。盲腸内容物を全体的に見ると、対象群とタガトース 7.5%群を比較した場合には総量の差がほとんど見られなかったが、タガトース 15%を比較したときには、総量は他の 4 群に比べて、極めて高い値を示した。以上の結果より、短鎖脂肪酸の盲腸での生成は、タガトースを比較的多量に摂取した場合に、高くなることが認められた。

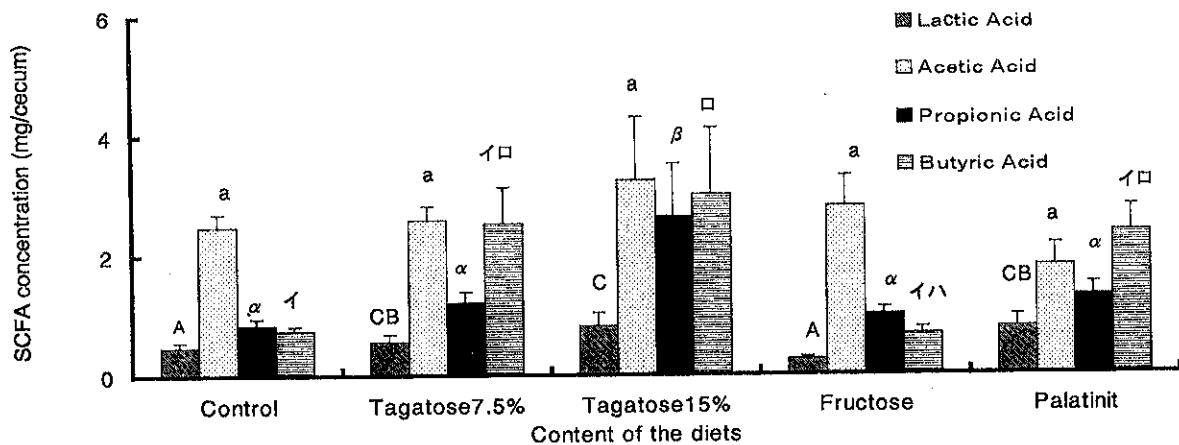


Fig.8 Total SCFA in cecum of rats fed diets containing tagatose or several carbohydrates

Values are mean±SE. The values not sharing a common superscript letter are significantly different (p<0.05)

## ソルベステリン摂取のビタミンA利用に及ぼす影響

### 体重変化及び摂食量

AIN-93 組成のビタミンA 欠乏飼料によりラットを3週間飼育したところ体重、摂食量ともにほぼ順調に増加した。そこで Table. 1 に示すように、ビタミンA を補給し対照として大豆油の含量比を 16Cal%に調整した合成食、大豆油の含量比を 5Cal%としソルベステリンの含量比を 0、1、2.5、5、7.5 重量%に変化させた合成食で15日間飼育し、体重及び摂食量の変化を観察した。

体重の変化はすべての群において大きな差は見られなかったが、対照群ではやや大きい傾向にあった (Fig. 9)。摂食量は試験食に変えた直後、ソルベステリン摂取量 5、7.5%では減少傾向にあったが、飼育終了時にはいずれの群においても大きな差は見られなかった。各臓器の湿重量を測定した結果、特に大きな差は見られなかったが、ソルベステリン含量が増えるにつれ小腸湿重量が大きくなった。

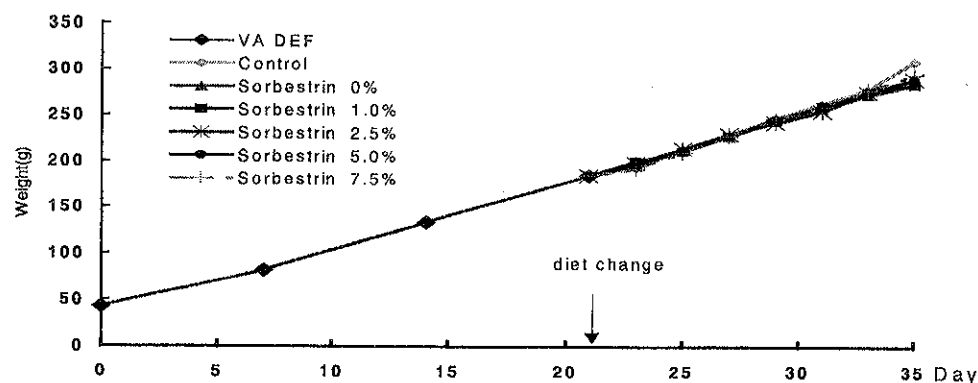


Fig.9 Changes in body weight(g)

### 血漿脂質

コレステロール濃度はリン脂質と同様に食餌群間での大きな差は見られなかった (Fig. 10)。トリグリセリド濃度はビタミンA 欠乏状態時では低く、ビタミンA 補給後はいずれの群においても上昇した。また、個体差は大きいものの対照群とソルベステリン摂取群間において有意差は見られなかった (Fig. 11)。

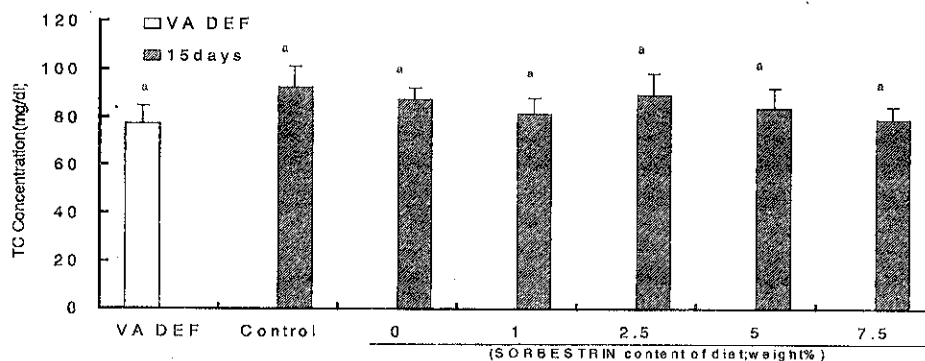


Fig.10 Plasma total cholesterol concentration in vitamin A deficient rats fed SORBESTRIN. Values are mean  $\pm$  SEM. The values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

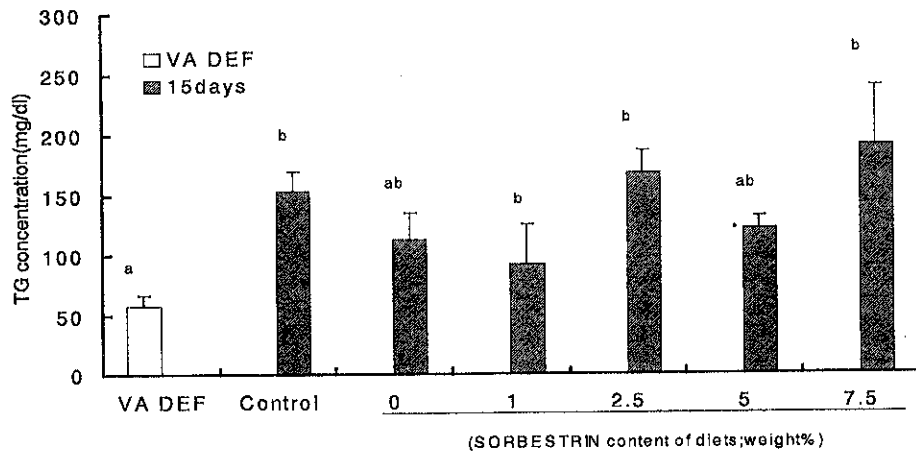


Fig.11 Plasma triglyceride concentration in vitamin A deficient rats fed SORBESTRIN  
Values are mean  $\pm$  SEM. The values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### 血漿レチノール及び血漿 RBP

血漿レチノール濃度はビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後はいずれの群も増加した。ソルベステリン摂取群においては 0%群でやや低い値を示したが、その他群間での大きな差は見られなかった (Fig. 12)。

血漿 RBP 濃度はレチノールと同様ビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後は著しく増加した。対照群と比較すると、ソルベステリン摂取群の血漿 RBP 濃度は若干低い値を示したが、ソルベステリン摂取群間での大きな差は見られなかった (Fig. 13)。

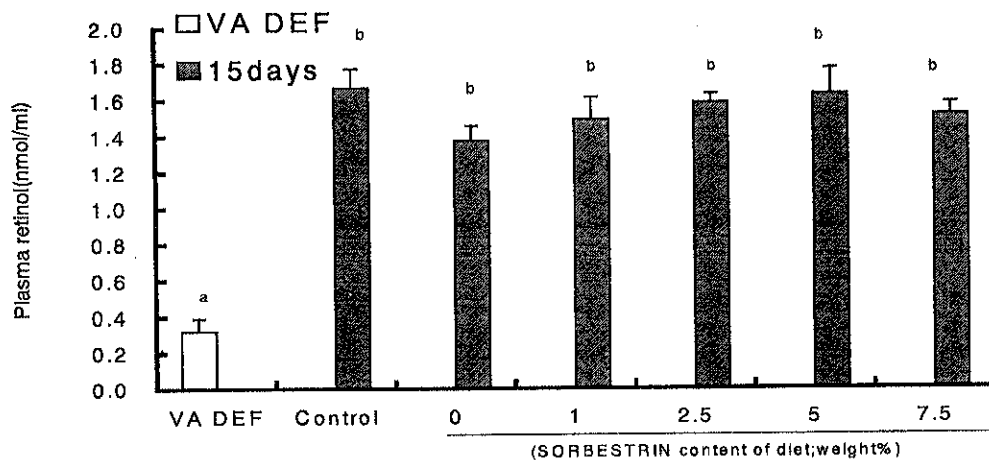


Fig.12 Plasma retinol concentration in vitamin A deficient rats fed SORBESTRIN  
Values are mean  $\pm$  SEM. The values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

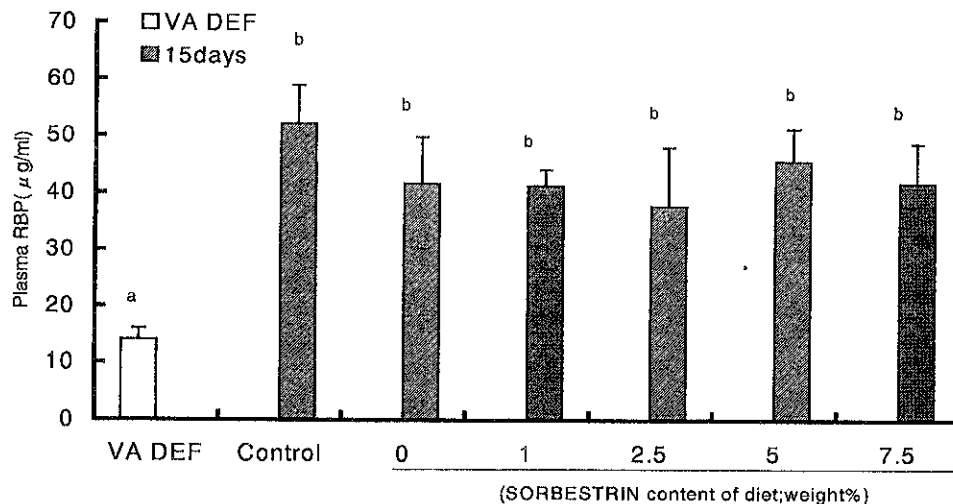


Fig.13 Plasma RBP concentration in vitamin A deficient rats fed SORBESTRIN  
Values are mean  $\pm$ SEM. The values not sharing a common superscript letter are significantly different( $p < 0.05$ ).

#### 肝臓レチノイド及び肝臓 RBP

肝臓 RBP はビタミン A 欠乏状態時では高く、ビタミン A 補給後は急激に減少した。しかし、ソルベステリン 5.0、7.5%はその他の群のものと比較すると値が少し高いため、肝臓からの RBP の分泌が少ないと考えられる (Fig. 14)。

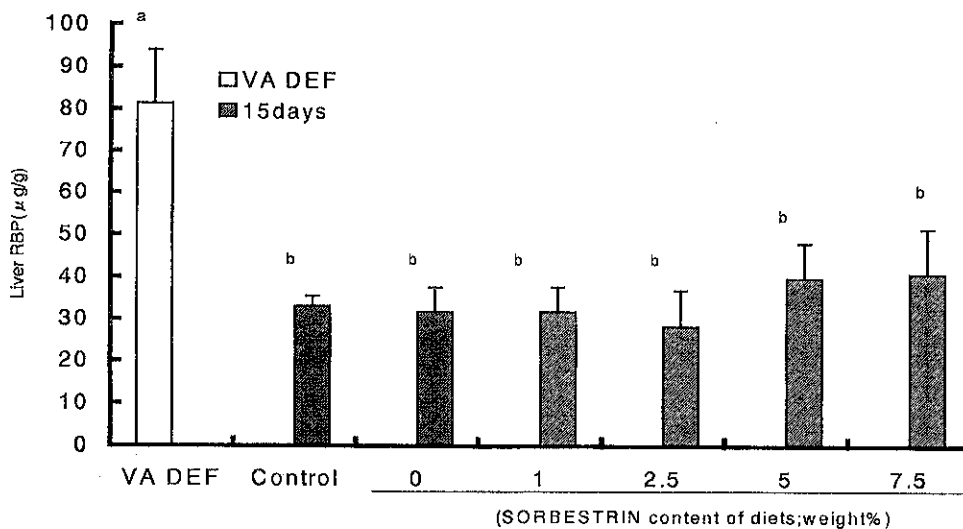


Fig.14 Liver RBP concentration in vitamin A deficient rats fed SORBESTRIN  
Values are mean  $\pm$ SEM. The values not sharing a common superscript letter are significantly different( $p < 0.05$ ).

Fig. 15 に示すように肝臓ビタミン A のうち、レチノールはビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後はいずれの群においても増加した。しかし、ソルベステリン含量が増加するにつれ肝臓レチノール濃度は低くなり、ソルベステリン 7.5%群では対照群のほぼ半分の値まで減少していた。

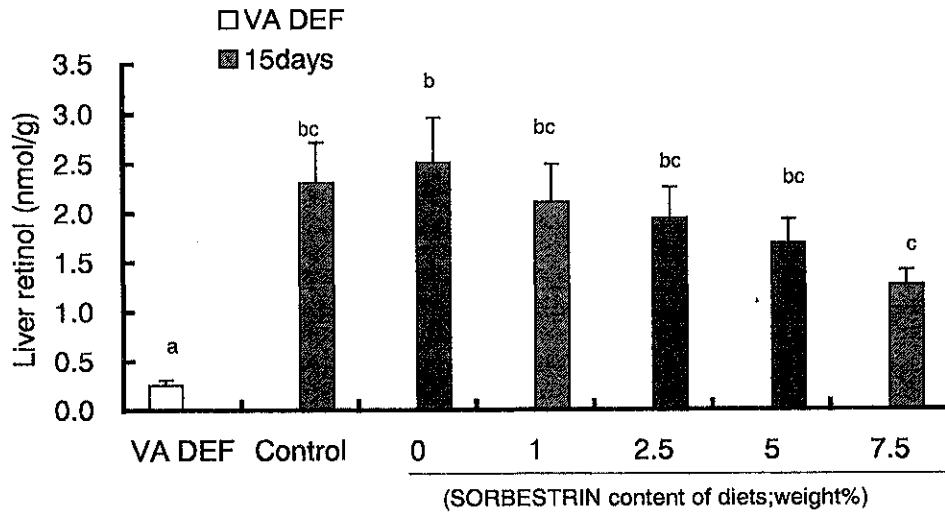


Fig.15 Liver retinol concentration in vitamin A deficient rats fed SORBESTRIN  
 Values are mean  $\pm$ SEM. The values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

レチニルエステルにおいてもレチノールと同様にビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後はいずれの群においても増加した。また、ソルベステリン 5.0、7.5% 群では欠乏状態時よりは増大したが、その他の群のものよりも低い値を示した。対照群、ソルベステリン 1%、2.5% 群において差はほとんど見られなかった (Fig. 16)。ソルベステリン摂取によりビタミン A の吸収及び利用性が低下しているものと思われる。

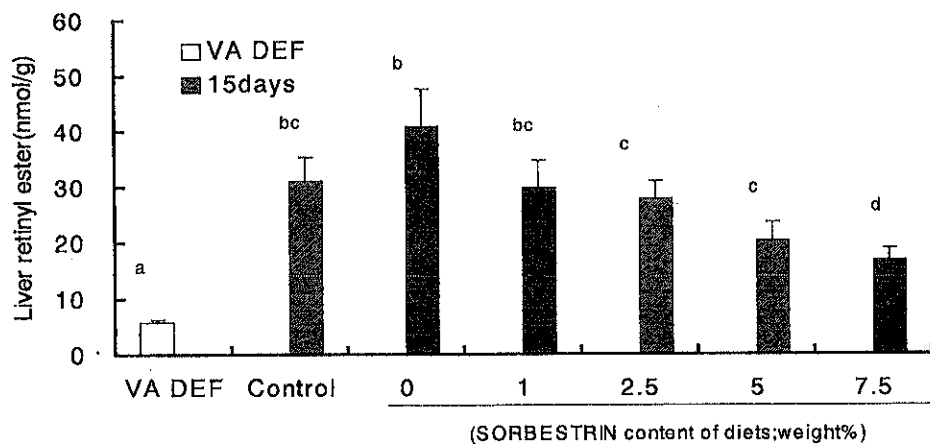


Fig.16 Liver retinyl ester concentration in vitamin A deficient rats fed SORBESTRIN  
 Values are mean  $\pm$ SEM. The values not sharing a common superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 【 考 察 】

消費者の健康志向に後押しされ、我が国でも食品の低カロリー訴求が市場で成功を納めるようになった。我が国で低カロリー食品が成功を納めるようになった背景には、素材開発や技術向上があったことも見逃せない。

タガトースは、現在デンマークの乳業会社であるMDフーズにより、チーズ生産時のホエーから工業的に作られたケトヘキソースで、天然由来、非う蝕性、低カロリーのバルク甘味料である。カロリーが砂糖の半分以下であることから、糖尿病に有用な糖と言われている(1, 2)。しかし、その摂取による消化管への影響は明らかになっていない。そこで、タガトースの摂取による小腸消化酵素に及ぼす影響を調べ、さらに生体利用性についても検討した。また、タガトースは、スクロースなど他の二糖類と同時に摂取した場合、その活性を阻害するとも言われている。そこで、小腸刷子縁膜消化酵素を用い、タガトースの糖類水解作用への阻害についても調べ、検討した。

体重増加においては、すべての群について有意な差はみられなかったが、タガトース 15%群において、体重増加の程度は低くなった。他の糖類については、ほとんど体重変化が見られなかったことにより、タガトース含量の多い食餌では体重の増加が低くなるということが明らかになった。しかし、生体利用性は低いが、低カロリー食品素材として多量の利用に問題が残る。また、タガトース 15%群のラットは激しい下痢をしているラットもあり、食餌摂取量も低く一見健康状態は悪いものと思われた。

血漿脂質においては、トリグリセライド濃度は、タガトース含有量が増えるにつれて、低くなるという傾向がみられ、タガトースの摂取による影響が出るものと考えられる。総コレステロール濃度、リン脂質濃度は、食餌群間での差に大きな変化は見られなかった。

小腸の消化酵素については、小腸前半部以降では、タガトース含量による活性の変動はあまり見られなかった。トレハラーゼ活性も、小腸前半部で最も高い活性値を示した。スクラーゼ活性、トレハラーゼ活性ともに、十二指腸において、タガトース含量の増大に伴い、活性値の上昇が見られた。よって、十二指腸においては、タガトース摂取によるスクラーゼ活性、トレハラーゼ活性に影響を及ぼすと考えられるが、小腸前半部以降については食餌組成の違いによる活性への影響はほとんど見られなかった。アルカリホスファターゼ活性は、十二指腸で最も高い活性値を示した。その他の部位の活性値は低い傾向にあった。タガトース含量の違いによる活性値の変動はほとんど見られなかったため、タガトース摂取によるアルカリホスファターゼ活性への影響はないものと考えられる。

小腸刷子縁水解酵素の活性阻害については、Lineweaver-Burk plot により、ミカエリス定数 ( $K_m$  値)、阻害定数 ( $K_i$  値)、最大反応速度 ( $V_{max}$  値) を求めて検討した。 $K_m$  は基質定数ともよばれ、酵素と基質の親和性を表す大切なパラメーターで、 $K_m$  が小さいほど、基質は酵素に結合しやすく離れにくい、つまり親和性が高いことになる。阻害の研究は、酵素反応の機構や活性部位の構造を研究する上で重要な手がかりを与える。そのためには、まず阻害剤による阻害の形式を求め、阻害剤と酵素の結合の強さを表す阻害定数  $K_i$  を求める。阻害定数  $K_i$  は、酵素阻害剤結合物の解離定数として定義される。本研究において、タガトースならびにフルクトースを阻害剤とした酵素



反応において、スクロースを基質とした時の阻害定数 $K_i$ はミカエリス定数 ( $K_m$ ) よりも小さい値となり、基質であるスクロースよりも、阻害剤のタガトース、フルクトースに結合しやすいということが明らかになった。トレハロース、ラクトースについては、阻害定数 $K_i$ は、ミカエリス定数 ( $K_m$ ) に比べ、かなり高い値を示していることからトレハロース、ラクトースに対するタガトースならびにフルクトースの阻害作用は低いといえる。しかし、タガトースならびにフルクトースの阻害作用については、まだ検討の余地があり、さらに研究を深める必要があるといえる。

排泄糞重量においては、タガトース群についてはタガトース含有量の増大とともに、糞重量は減っていた。糞の状態は、タガトース 15%については、激しい下痢の症状が見られ、その症状は長いもので一週間ほど続いた。パラチニット群の初期糞重量は少ないものであったが、しかしこれは 3 日ほどで回復していた。糞の色はタガトース群は、やや色の濃い茶色で、フルクトース群、パラチニット群は茶色、対照群については、白っぽい茶色であった。タガトースは小腸で完全に消化されないため、大腸に届き短鎖脂肪酸 (SCFA) を生成し、下痢などの症状を引き起こしたと考えられる。

大腸の内容物への影響においては、対照群と比較して、タガトース 7.5%、15%群は、盲腸の内容物重量は重くなった。特に、15%群ではセルロース群と比較して、約 3 倍の重量になり、有意差がみられた。これは、タガトース 15%群の腸内で発酵が異常に高くなり、かさが増し盲腸内容物重量が大きくなったためと考えられる。盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度、総量においては各群顕著に差が見られた。特に、タガトース 15%群の酪酸量は、対照群に比べて多く、酪酸以外の短鎖脂肪酸量も有意に高い結果となった。タガトース含量が多いと、短鎖脂肪酸量が増えることから、食品成分の組み合わせも重要であると考えられる。セルロース群に比べタガトース 7.5%群では、濃度での変化は見られなかった。しかし盲腸内容物量が増加していたため、短鎖脂肪酸総量は増大した。タガトース 15%群では、短鎖脂肪酸濃度は低下し、総量は増大していた。濃度の低下の原因として、盲腸の異常発酵により盲腸内容物が水分を多く含んでいたことが考えられる。総量が増大したのは、盲腸内容物重量が非常に重く、また多くの短鎖脂肪酸が発酵、生成されたためと考えられる (20-22)。

以上の結果から、タガトースの摂取は少量では問題はないが、比較的多量に摂取した場合、小腸での吸収能力を超えたタガトースが盲腸に到達し、盲腸での発酵が盛んになされることが明らかとなり、消化管機能への影響が現れることが判明した。そのため、タガトースの摂取については、その有効利用範囲を慎重に検討しなければならないと言える。

ソルベステリンは、まだ実用はされていないが、過剰なカロリー摂取を避けるための有効な手段になるとも考えられる。しかし、その摂取による脂溶性の栄養素への影響や安全性は詳細には明らかになっていない。そこで、ビタミンA欠乏動物を作成し、血液中及び肝臓中のビタミンA、RBP 濃度などを測定してソルベステリン摂取によるビタミンAの利用性への影響を調べるため、ソルベステリンの含量比を 0、1、2.5、5、7.5 重量%に変化させた合成食で 15 日間飼育し、ソルベステリン摂取の影響を観察した。

餌の摂食量及び体重の変化はすべての群において大きな差は見られなかったが、対

照群ではやや大きい傾向にあった。各臓器の湿重量は特に大きな差は見られなかったがソルベステリン含量が増えるにつれ小腸が大きくなっていた。血漿レチノール濃度及び RBP については、ビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後はいずれの群も著名に増加した。食餌群間での大きな差は見られなかった。肝臓 RBP はビタミン A 欠乏状態時では高く、ビタミン A 補給後は急激に減少した。ソルベステリン 5%、7.5% はその他の群のものと比較すると値が少し高いため、肝臓からの RBP の分泌が少ないと考えられた。肝臓のビタミン A のうち、レチノールはビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後はいずれの群においても著名に増加した。しかし、ソルベステリン含量が増加するにつれレチノール濃度は低くなり、ソルベステリン 7.5% 群では対照群のほぼ半分まで減少していた。レチニルエステルはレチノールと同様にビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後はいずれの群においても増加した。ソルベステリン 5.0、7.5% 群では欠乏状態時よりは増大したが、その他の群のものよりも低い値を示した。ソルベステリン 5%、7.5% ではビタミン A の吸収及びその生体利用性が低下していると考えられる。血漿レチノール及び RBP では餌の違いによる差はほとんど見られなかったが、肝臓においてはソルベステリン含量が増えるにつれ吸収抑制が見られた。これらのことから、ソルベステリンの摂取は 2.5% 以下であればビタミン A の吸収についての影響は少ないものと考えられる。

以上の結果から、糖脂肪酸エステルであるソルベステリンを比較的多い量を摂取した場合、消化吸收されずに大腸まで到達するため、脂肪あるいは脂溶性のビタミンなどの生体利用性にとってマイナスの作用があることが判明した。ソルベステリンに性質の似たオレストラにおいても、脂溶性物質の吸収に干渉する可能性を持っており、脂溶性ビタミン、その他の栄養素等へ対する研究より、加工食品への使用時には余分のビタミンを加えることが推奨されている(10, 23)。それゆえ、ソルベステリンの食品への利用については、その有効利用範囲を慎重に検討する必要がある。

## 【要約】

### ①タガトースの安全性評価

D-タガトースは、ラクトースから酵素反応によりガラクトースを経て生成されたフルクトースの立体異性体であるケトヘキソースでありアイスクリームや焼き菓子などさまざまな料理に代替可能とされる新開発食品素材である。しかし、未だ一般の食品として使用許可はなく安全性についての研究は少ない。そこで、タガトースを含む合成飼料を用いてラットを飼育し、消化管機能への影響を検討した。

タガトース 15% 群のラットには下痢の症状が見られ、また、盲腸内容物重量も重くなった。いずれの群も小腸消化酵素活性の変動は見られなかった。しかし、タガトースは二糖類水解酵素への阻害作用を持つことが明らかになった。盲腸内の短鎖脂肪酸を測定した結果、セルロース群に比べタガトース 7.5% 群で変化は見られなかったが、盲腸内容物量が増加していたため短鎖脂肪酸総量は増大した。タガトース 15% 群においては、短鎖脂肪酸濃度は低下していたが短鎖脂肪酸総量は、盲腸内容物が水分を多く含み大きく増大したため、他の群に比較して高い値を示した。小腸での吸収能力を超えたタガトースが盲腸に到達し、盲腸での発酵が盛んになされたためと考えられる。

比較的多量にタガトースを摂取した場合に、消化管発酵機能への影響が現れることが明らかになった。

## ②ソルベステリンの安全性評価

ソルベステリンを摂取した場合の脂溶性ビタミンのひとつビタミン A の生体利用性について低レベルでの影響をさらに検討した。

血漿レチノール及びRBPについてレチノール濃度はビタミン A 欠乏状態時では低く、ビタミン A 補給後 15 日間でいずれの群も著明に増加した。血漿RBP濃度もレチノールと同じくビタミン A 欠乏状態時で低く、ビタミン A 補給後 15 日間で著しく増加した。一方、肝臓レチノイド及びRBPの場合には、RBP はビタミン A 欠乏状態時で高く、ビタミン A 補給後 15 日間で急激に減少した。しかし、ソルベステリン 5, 7.5%群では 0%群に比較して高い値を示し、肝臓からのRBP分泌が少ないものと考えられた。肝臓のビタミン A のうち、レチノールはいずれの群もビタミン A 補給後著明に増大した。しかし、ソルベステリン 5 及び 7.5%群では 0%に比較すれば増大したがその程度は小さいものであった。レチニルエステルも、レチノールと同じパターンを示した。ソルベステリン摂取によりビタミンAの吸収性が低下しているものと思われる。

この傾向はソルベステリンが多くなるほど顕著であり、2.5%群までは影響ないが、少なくとも5%からは脂溶性であるビタミン A の利用性は抑制されることが明らかになった。

## 参考文献

- 1) Bertelsen H, Jensen BB, Buemann B , D-tagatose--a novel low-calorie bulk sweetener with prebiotic properties., World Rev Nutr Diet;85:98-109(1999)
- 2) Buemann B, Toubro S, Astrup A , D-Tagatose, a stereoisomer of D-fructose, increases hydrogen production in humans without affecting 24-hour energy expenditure or respiratory exchange ratio., J Nutr Sep;128(9):1481-6(1998)
- 3) Life Sciences Research Office:Evaluation of the health aspects of caprenin, FASEB report prepared for The Procter & Gamble,1-37(1991)
- 4) Klemann,P.L.,Aji,K.,Chrysam,M.M.,D'Amelia et.al.:Random nature of triacylglycerols produced by the catalyzed interesterification of short- and long-chain fatty acid triglycerides, J. Agrc. Food Chem, 42, 442-446(1994)
- 5) Smith,E.R.,Finley,W.J. and Leveille,A.G.:Overview of SALATRIM, a family of low-calorie fats, J. Agrc. Food Chem, 42,432-434(1994)
- 6) 藤原和彦:油脂代替物,蔗糖脂肪酸ポリエステルについて,澱粉科学, 39,33-40(1992)
- 7) Lucca,P.A., Tepper,B.J.: Fat replacers and the functionality of fat in foods, Trends in Food Sci.Tech.,5,12-19(1994)
- 8) 菅野道廣:低カロリー植物性脂肪-サラトリム,食品工業(5),67-72(1996)
- 9) Finley,J.W.,Klemann,L.P.,Leveille,G.A. et.al.:Caloric availability of SALATRIM

- in rats and humans, *J. Agr. Food Chem.*, 42,495-499(1994)
- 10) John C.Peter,Kenneth D.Lawson etc. : Assessment of the Nutritional Effects of Olestra,a Nonabsorbed Fat Replcement:Introduction and Overview *J.Nutr.* 127: 1593S-1546S,(1997)
  - 11) John W.Finley、 Gilbert A.Leveille, :主要栄養成分の代替成分 最新栄養学 第7版 木村修一、小林修平 翻訳監修 建帛社 P567~582 (1997)
  - 12) Reeves,G.P.,Nielsen,H.F. and Fahey,C.G.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents, *J.Nutr.*123,1939-1951(1993)
  - 13) Dahlqvist,A.: Method for assay of intestinal disaccharidases, *Anal. Chem.*, 7,18-25(1964)
  - 14) Eicholz,A.:*Biochim.Biophys.Acta*,135,475(1969)
  - 15) Lowrry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L.,andRanball,R.:*J.Biol.Chem.*, 193,265(1951)
  - 16) Wada,A.,Bonoshita,M.,Tanaka,T. and Hibi,K.:A study of a reaction system fororganic acid analysis using a ph indicator as post-column reagent, *J.Chromatogr.*,291,111-118(1984)
  - 17) Cullum ME, Zile MH. Quantitation of biological retinoids by high-pressure liquid chromatography: primary internal standardization using tritiated retinoids. *Anal. Biochem.*,53:23-32(1986).
  - 18) Ikegami S, Zile MH. Plasma vitamin A in nephrectomized rats. *Nutr. Res.*, 12:265-277(1992).
  - 19) Goda T, Yasutake H, Takase S, : Detary fat regulates scellular retinor-binding protein II gane expression in rat jejunum. *Biochim. Biophs. Acta* 1200 : 34-40 (1994)
  - 20) Bergaman. E.N. : Energy contributions of volatile fatty acidsfrom the gastro-intestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 7, P567-583. (1990)
  - 21) 坂田隆、市川宏文: 短鎖脂肪酸の生理活性, *日本油化学会誌*, 46, 143-150(1997)
  - 22) Voedingsraad,: The energy value of sugar alcohols; recommendations of the Committee on polyalcohols.,*Netherland Nutrition Council, The Hague.*(1987)
  - 23) Prince,D.M. and Welschenbach,M.A.: Olestra:a new food additive, *J. Am. Diet Assoc.* 98,565-569(1998)

低カロリー食品素材の長期摂取による生活習慣病関連指標の消長に関する研究

池上幸江:大妻女子大学  
 山田和彦:国立健康・栄養研究所  
 西宗 高弘:武蔵丘短期大学  
 岡崎 英規:武蔵丘短期大学  
 柳本 行雄:生活科学研究所  
 森田 茂 :生活科学研究所

【研究目的】

生活習慣病の予防などを目的に導入が検討されている低カロリー脂肪ソルベステリン(主成分ソルビトールオレイン酸エステル)は、摂取カロリーを抑制する事によって肥満を予防するという予期された効果以外に、高齢になるまで長期に摂取を継続する事によって、血清脂質や糞便組成にどんな影響を与えるかを生活習慣病関連指標として実験的に検討した。

なお、前年度研究のラット化学発癌実験の病理組織学的検討結果を併せて報告する。

【研究方法】

ソルベステリンはカルター フードサイエンス(株)より分与を受けた。Guar gumはネオソフトG(lot805271)を使用した。ラットはSprague-Dawley系♂で体重約50gのSPFラット(チャールズリバー)を埼玉実験動物より購入した。飼料のカゼイン、コーンオイル、ビタミン混合物、ミネラル混合物は日本クレア(株)より購入した。投与飼料の内容は表1に示した。 $\beta$ -glucuronidase及び $\beta$ -glucosidaseの活性はそれぞれのp-nitrophenyl誘導体を基質に用いて、リン酸緩衝液pH7.2中、37°C10分間反応し、402nmの吸光度で測定した。1,2-dimethylhydrazine2HClは東京化成、中性緩衝ホルマリン液は和光純薬、PBSはBiowhittakerより購入した。

実験群として次のC、G、Sの3群を設定した。

Exp. Group	Injection	Number of ♂ rat	Sorbestrin %	Guar gum %	Corn oil %
C	DMH	26	0	0	10
	Saline	4			
G	DMH	26	0	12	9
	Saline	4			
S	DMH	26	12	0	9
	Saline	4			

発癌剤の投与は、1,2-ジメチルヒドラジン(PBS)に溶解したものを1群26匹の体重約50gの雄性ラットに対し、体重Kg当り20mgを毎週1回皮下に注射し、実験開始後12週間投与した。各群4匹は生理食塩水を同様に注射した。33週間各組成の飼料と水を自由摂取させて、恒温恒湿(23℃、55%)、12時間照明で飼育した。33週間飼育後、エーテル麻酔下断頭屠殺し、胃から直腸までを切除、生理食塩水洗浄の後、各臓器の長さや重さの測定と腫瘍病変部位の計数を行い、組織切片の病理学的検査のため中性緩衝ホルマリン液で固定した。病理組織学的検査にはパラフィン包埋後、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、鏡検した。飼育期間中は毎週1回体重を測定し、1日あたりの飼料摂取量と糞便重量を10、20、30の各週に測定した。C、G、Sの3群に与えた飼料の組成は表1の通りである。

表1 飼料組成

	% by wt (% of total energy)		
	C	G	S
Dextrose	60.1784(56.4)	52.8486(56.1)	52.8486(56.1)a
Casein	24.0(22.5)	21.1(22.4)	21.1(22.4)b
Corn oil	10.0(21.1)	9.0(21.5)	9.0(21.5)c
Sorbestrin	0.0	0.0	12.0d
Guar gum	0.0	12.0	0.0
AIN-93G Mineral mix.	4.0	3.5	3.5
AIN-93 Vitamin mix.	1.2	1.0	1.0
L-cystine	0.34	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.28	0.25	0.25
t-butylhydroquinone	0.0016	0.0014	0.0014
Total	100.0000	100.0000	100.0000
Caloric density (kcal/g)	4.27	3.77	3.77

0 calorie for Sorbestrin was assumed. When the value is 1Kcal/g, the %ages of other nutrients are a54.4, b21.7, c20.8, d3.1.

### 【研究結果及び考察】

#### 1. ラットの成長等への影響

各実験群の体重増加、臓器重量、盲腸内容物重量、盲腸pH、を表2に、摂食量、糞便重量を表3に示した。飼料は自由摂取としたが飼料の組成の違いによる成長への影響(表2 Body weight gain)は明らかで、食物繊維もソルベステリンも投与しなかったC群だけは体重増加が多く、投与2群間で明確な差は無かった。原因として投与飼料の重量当りカロリー含量の違い(表1)、摂食量の差、糞便排泄量の差(表3)が考えられる。従ってソルベステリンには食物繊維(G群)と同様に摂取カロリーの抑制による肥満予防的な用途の可能性が考えられる。しかし、糞便中の総脂質濃度(図1)を測定すると、ソルベステリン群(S群)では対照群に比べ非常に高濃度の脂質が排泄されていた。この糞便から推定すると、腸内環境

は著しく脂質濃度の高いものと考えられ、脂溶性物質と腸管上皮細胞との相互作用の確率はかなり上昇しているものと推定される。

表2 飼料群別の体重増加、臓器重量、盲腸pH、盲腸内容物重量

	C	G	S
number of rats	23	19	24
Body weight			
Initial (g)	49 ± 0	49 ± 0	49 ± 0
Final (g/33 weeks)	747 ± 21a	560 ± 19b	534 ± 15b
Gain (g/33weeks)	698 ± 21a	511 ± 19b	485 ± 15b
Organ weight (final)			
Small intestine (g)	6.28 ± 0.28a	7.74 ± 0.32b	6.50 ± 0.20a
Cecum (g)	0.90 ± 0.04a	2.50 ± 0.19b	0.76 ± 0.03c
Colon (g)	2.07 ± 0.21a	3.10 ± 0.36b	2.59 ± 0.21
Cecal contents (g)	2.09 ± 0.10a	5.62 ± 0.55b	3.20 ± 0.19c
Cecal pH	7.5 ± 0.1a	7.3 ± 0.0b	7.2 ± 0.0b

Values are mean ± S.E. . Statistically significant differences were observed among a, b and c (p<0.05).

表3 摂食量、糞便重量

	C	G	S
Food intake (g/day)			
10th wk	22.8 ± 0.9a	19.3 ± 0.7b	17.7 ± 0.9b
20th wk	23.0 ± 0.8a	20.4 ± 0.5b	19.1 ± 0.7b
30th wk	21.6 ± 0.6	20.3 ± 1.1	20.4 ± 0.9
Fecal wet wt (g/day)			
10th wk	1.3 ± 0.1a	2.8 ± 0.2b	2.0 ± 0.2c
20th wk	1.5 ± 0.1a	3.1 ± 0.2b	2.3 ± 0.2c
30th wk	1.4 ± 0.1a	2.9 ± 0.2b	2.1 ± 0.1c
Fecal dry wt (g/day)			
10th wk	0.9 ± 0.1a	1.7 ± 0.1b	1.5 ± 0.1b
20th wk	1.0 ± 0.1a	1.8 ± 0.1b	1.7 ± 0.1b
30th wk	0.9 ± 0.0a	1.5 ± 0.1b	1.6 ± 0.1b

Values are mean ± S.E. . Statistically significant differences were observed among a, b and c (p<0.01).

表4 ラット血清脂質に対するソルベステリン投与の影響 (mg/dl)

	C	G	S
Total cholesterol	115 ± 6a	61 ± 4b	68 ± 4b
Triglyceride	193 ± 20a	90 ± 9b	89 ± 7b
Phospholipid	174 ± 13a	98 ± 6b	119 ± 5c

Values are mean ± S.E. . Statistically significant differences were observed among a, b and c (p<0.05).

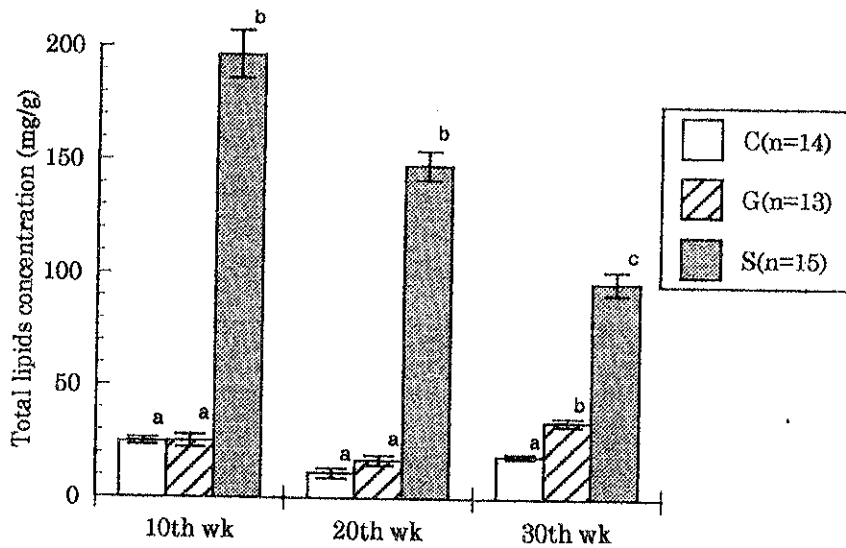


図1 糞中総脂質濃度

Values are mean  $\pm$  S.E.

Statistically significant differences are observed among a, b and c ( $p < 0.01$ ).

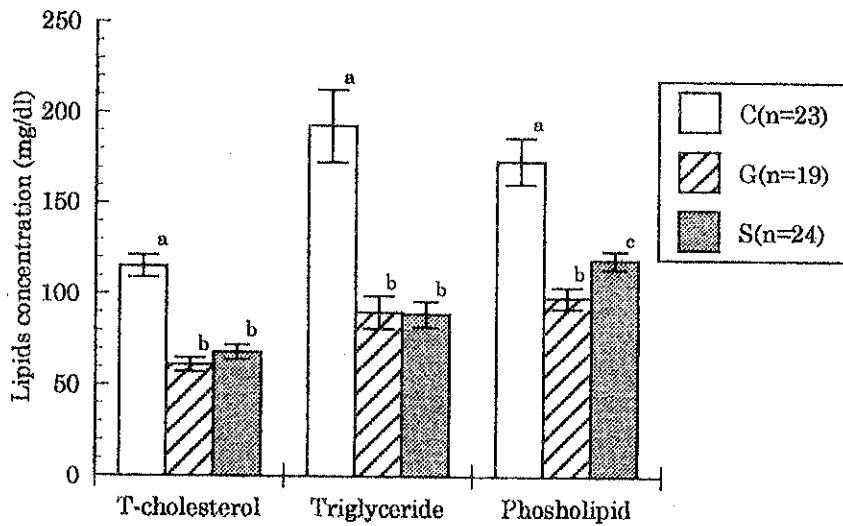


図2 血清脂質濃度

Values are mean  $\pm$  S.E.

Statistically significant differences are observed among a, b and c ( $p < 0.05$ ).

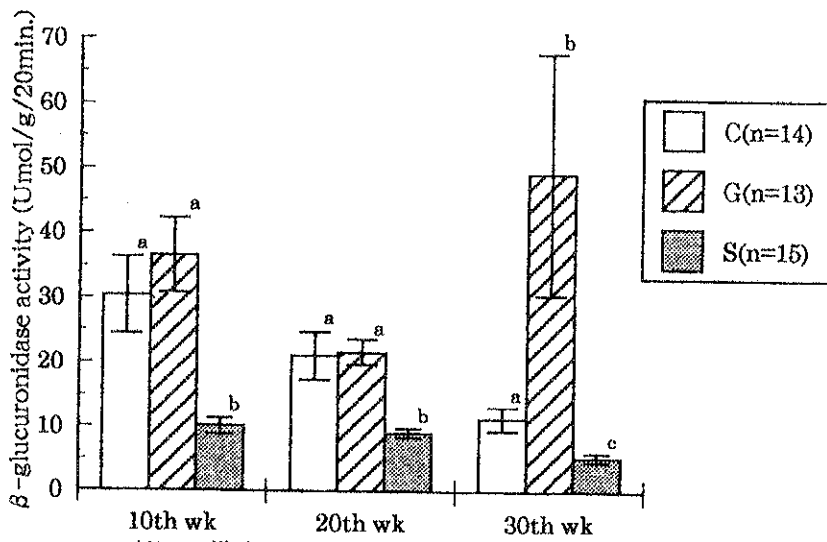


図3 糞中 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性

Values are mean  $\pm$  S.E.

Statistically significant differences are observed among a, b and c ( $p < 0.05$ ).



## 2. ソルベステリン投与の血清脂質への影響

33週飼育後のラット血清脂質は図 2 及び表 4 に示すごとく、ソルベステリンの投与(S群)によって有意に対照C群(食物繊維もソルベステリンも投与しない群)よりも低値を示した。其の水準はGuar gumを投与した群(G群)とほぼ同じレベルであった。この結果から、高脂血症の予防にもソルベステリンの利用の可能性が考えられる。又、腸内環境が脂質濃度の高いもの(図1)で糞便の外見上は未消化のソルベステリンがそのまま排泄されているような状況でも、血清コレステロールレベルは食物繊維(グアガム)を摂取した状態に近く、過度に低下する事はなかった。表3の結果からも糞便の増量による排便促進や大腸癌の予防効果など、食物繊維で好ましいとされる効果に類似のものがソルベステリンに期待できる可能性が考えられた。

## 3. 化学発癌剤の投与による腫瘍発生数へのソルベステリンの影響

ソルベステリンに大腸癌の予防効果が期待できるかを検討する実験の一環として、発癌に関連すると考えられている $\beta$ -glucuronidase及び $\beta$ -glucosidaseの活性を飼育全期間にわたって測定した。ソルベステリン投与群では $\beta$ -glucuronidaseの活性はイニシエーション相当の期間(DMH投与期間)のみならず、全ての期間において有意に低値を示し(図 3)、 $\beta$ -glucosidaseの活性もグアガム投与群に比べて低値を示した(図 4)。Guar gum投与群では $\beta$ -glucosidase活性が、C群に比べ有意に上昇し(図 4)、 $\beta$ -glucuronidase活性も30週において有意に上昇していた(図 3)。これらの結果からソルベステリン投与群で二次胆汁酸の生成は抑制される傾向にあると考えられ、Guar gum投与群ではその逆の傾向が示唆された。事実、糞中の二次胆汁酸を測定したところ図 5に示した様に対照群に比べ全ての測定週でソルベステリン投与群は明らかに低値であった。Guar gum投与群では二次胆汁酸の濃度が非常に低い事から腸内細菌の内、良性のフローラの増加が多く見られたと推定される。これに関連して盲腸内容物の短鎖脂肪酸を測定すると乳酸、酢酸、プロピオン酸の総量がグアガム群のみ有意に増加していた(表5)。

表5 Effect of sorbestrin on rat organic acids in cecum

( $\mu$ mol/cecum)	C	G	S
acetic acid	59.2 $\pm$ 3.0a	175.0 $\pm$ 14.6b	77.4 $\pm$ 4.3c
propionic acid	17.4 $\pm$ 1.2a	42.1 $\pm$ 5.4b	19.9 $\pm$ 1.9a
n-butyric acid	12.0 $\pm$ 2.8	18.7 $\pm$ 3.3	12.6 $\pm$ 1.8
lactic acid	11.9 $\pm$ 1.4a	21.2 $\pm$ 4.4b	9.5 $\pm$ 1.2a
( $\mu$ mol/g cecal contents)			
acetic acid	19.6 $\pm$ 0.8	22.1 $\pm$ 1.1a	19.4 $\pm$ 0.6b
propionic acid	5.8 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.4
n-butyric acid	4.1 $\pm$ 0.9	2.4 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.5
lactic acid	3.9 $\pm$ 0.4a	2.7 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.3b

Values are mean  $\pm$  S.E.

Statistically significant differences are observed among a, b and c ( $p < 0.05$ ).

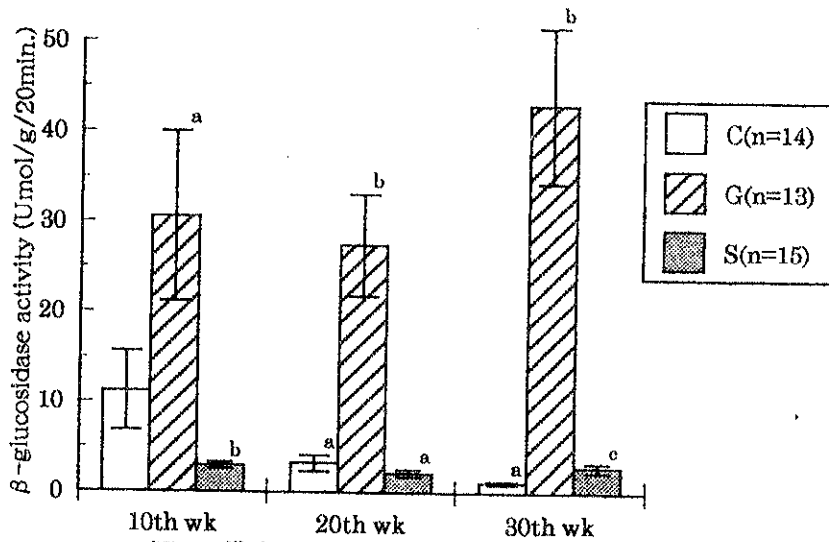


図4 糞中 $\beta$ -グルコシダーゼ活性

Values are mean  $\pm$  S.E.

Statistically significant differences are observed among a, b and c ( $p < 0.01$ ).

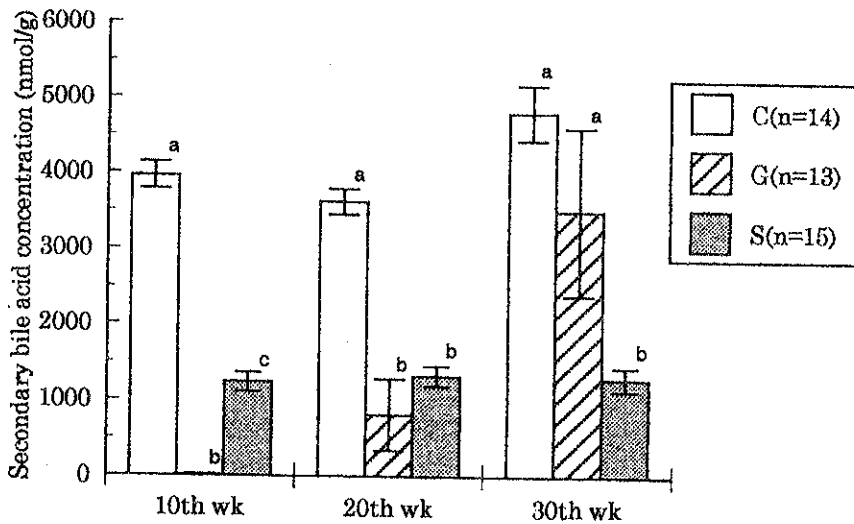


図5 糞中二次胆汁酸濃度

Values are mean  $\pm$  S.E.

Statistically significant differences are observed among a, b and c ( $p < 0.05$ ).

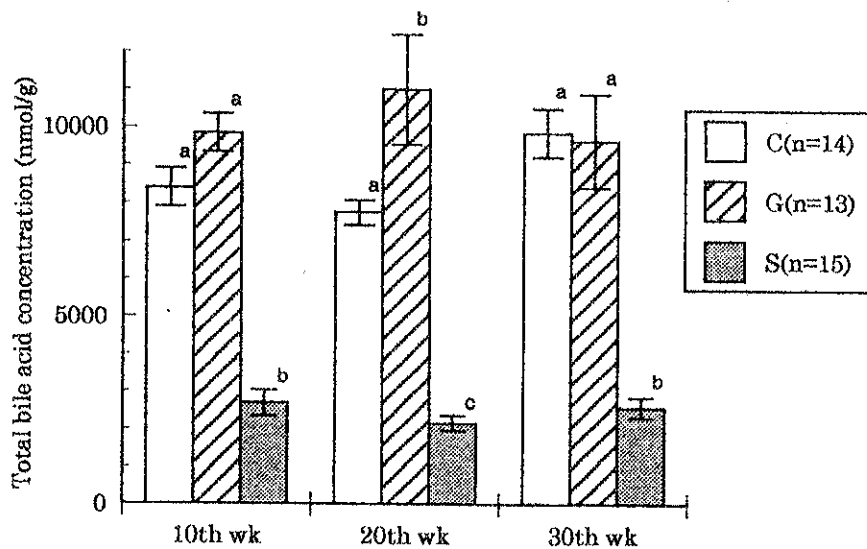


図6 糞中総胆汁酸濃度

Values are mean  $\pm$  S.E.

Statistically significant differences are observed among a, b and c ( $p < 0.05$ ).

糞中の総胆汁酸濃度及び量(表11)を測定したところ、図6のごとくソルベステリン投与群で明らかに低かった。ソルベステリン類似の低カロリー脂肪の摂取が、人の胆汁の分泌を天然脂肪の摂取に比べて抑制することも報告されているので(Maas, M.I.M. et al. 1998 Am.J.Clin.Nutr. 68, 1272-5)、この点からも大腸癌の発癌抑制効果が期待された。

次に、腫瘍組織の病理組織学的検査の結果は表6、表7の通りであった。これをラット大腸の腫瘍発生率で示すと表8の結果であり、腺腫についての発生率は表9に示した。最近ではラット大腸癌の化学発癌においてもヒト大腸癌と同様にaberrant cryptic foci ⇒ adenoma ⇒ adenocarcinoma順列に従って癌遺伝子の変異あるいは癌抑制遺伝子の変異が蓄積していくという研究結果が報告されている(Jacoby, R.F. et al. 1992 Carcinogenesis 13, 45-9. Vivona, A.A. et al. 1993 Carcinogenesis 14, 1777-81. DeFilippo, C. et al. 1998 Br J Cancer 77, 2148-51. Suzuki, M. et al. 1999 Mol Carcinog 24, 232-7)。そこで我々の実験結果についても、adenomaの段階で留まっている病変をadenocarcinomaに至った固体と合わせて集計し、飼料の影響を検討するために、腺腫+腺癌の発生率を表10に示した。更に、腺腫の発生率を図7に、腺腫+腺癌の発生率を図8に示した。

表8 ラットの大腸腫瘍発症率

	adenoma	adenocarcinoma	adenoma+adenocarcinoma
C (n=23)	9/23(39.1%)	2/23 (8.7%)	11/23(47.8%)
G (n=19)	13/19 (68.4%)	0/19(0.0%)	13/19(68.4%)
S (n=24)	19/24(79.2%)	0/24(0.0%)	19/24(79.2%)
C* (n=4)	0/4(0.0%)	1/4(25.0%)	1/4(25.0%)
G* (n=4)	0/4(0.0%)	0/4(0.0%)	0/4(0.0%)
S* (n=3)	1/3(33.3%)	0/3 (0.0%)	1/3 (33.3%)

\*Saline injected rats .

表9 大腸におけるDMH投与ラットの腺腫数

	No. of adenoma/rat	No. of adenoma/tumor-bearing rat
C	0.5 ± 0.2 (n=23)	1.3 ± 0.2 (n=9)
G	2.2 ± 0.7*(n=19)	3.2 ± 0.9*(n=13)
S	2.1 ± 0.4*(n=24)	2.7 ± 0.5 (n=19)

Values are mean ± S.E. \* p<0.05 vs C group.

表10 大腸における DMH投与ラットの腺腫+腺癌数

	No. of adenoma+adenocarcinoma /rat	No. of adenoma+adenocarcinoma /tumor-bearing rat
C	0.7 ± 0.2 (n=23)	1.5 ± 0.2 (n=11)
G	2.2 ± 0.7*(n=19)	3.2 ± 0.9 (n=13)
S	2.1 ± 0.4*(n=24)	2.7 ± 0.5 (n=19)

Values are mean ± S.E. \* p<0.05 vs C group.

表6 病理検査結果 (小腸)

Rat NO.	腺癌	腺腫	Rat NO.	腺癌	腺腫	Rat NO.	腺癌	腺腫
C-1	0	0	G-1			S-1	0	0
C-2			G-2	0	0	S-2	0	0
C-3	0	0	G-3	0	0	S-3	0	0
C-4	0	0	G-4	0	0	S-4	0	0
C-5	0	0	G-5	0	0	S-5	0	0
C-6	0	0	G-6			S-6	0	0
C-7	0	0	G-7	0	0	S-7	0	0
C-8	0	0	G-8	0	0	S-8	0	0
C-9	0	0	G-9	0	0	S-9	0	0
C-10	0	0	G-10	0	0	S-10	0	0
C-11	0	0	G-11	0	0	S-11		
C-12			G-12			S-12	0	0
C-13	0	0	G-13			S-13	0	0
C-16	0	0	G-16	0	0	S-16		
C-17	0	0	G-17			S-17	0	0
C-18	0	1	G-18	0	0	S-18	0	0
C-19	0	0	G-19	0	0	S-19	0	0
C-20	0	0	G-20	0	0	S-20	0	0
C-21			G-21	0	0	S-21	0	0
C-22	0	0	G-22	0	0	S-22	0	1
C-23	2	0	G-23	0	0	S-23	0	0
C-24	0	0	G-24			S-24	0	0
C-25	0	0	G-25	0	0	S-25	0	0
C-26	0	1	G-26	0	0	S-26	0	0
C-27	0	0	G-27			S-27	0	0
C-28	0	0	G-28	0	0	S-28	0	0
Σ	2	2	Σ	0	0	Σ	0	1
Mean	0.09	0.09	Mean	0.00	0.00	Mean	0.00	0.04
S.E.	0.09	0.06	S.E.	0.00	0.00	S.E.	0.00	0.04

C-14	0	0	G-14	0	0	S-14	0	0
C-15	0	0	G-15	0	0	S-15	0	0
C-29	0	0	G-29	0	0	S-29	0	0
C-30	0	0	G-30	0	0	S-30		
Mean	0.00	0.00	Mean	0.00	0.00	Mean	0.00	0.00

	途中死亡
--	------