

## 【要 約】

### (1) 老齢ラットの肝機能・循環機能におよぼす被験食材の影響

老齢ラットにおいても、有意な肝臓酵素誘導が認められたが、若齢ラットほど著明ではなかった。また、血管や心臓にも著しい影響は示さなかったが、ノルアドレナリンの収縮反応に対しては有意な増強作用を示した。

### (2) 生活習慣病ラットにおよぼす被験食材の影響（基礎データとしての神経伝達物質の変化）

生活習慣病ラットの胸腺重量はSHRおよびWKYに比べ有意な減少が認められるとともに、蛋白当たりのアセチルコリン量の減少が認められた。脳中コリンおよびアセチルコリンも、生活習慣病ラットの小脳および大脳皮質において有意な減少が認められた。

### (3) 若齢ラットの摘出胸部大動脈に対する被験食材の比較

7種の被験食材はそれぞれ著明な弛緩反応を示し、その効力の強さは①杜仲茶>②茶カテキン>③イチョウ葉エキス>④ブラジル産プロポリスa>⑤イソフラボン>⑥中国産プロポリス>⑦ブラジル産プロポリスbの順であった。

## 【研究成果】

### 学会発表

ラット摘出大動脈に対する種々な健康食品の弛緩作用

第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 24-26 日

ラットの血圧に及ぼすプロポリスの影響

第 76 回日本薬理学会年会、2003 年 3 月 24-26 日

イチヨウ葉エキスによるトルブタミドの血糖降下作用に及ぼす影響

日本薬学会第 123 回年会、2003 年 3 月 27-29 日

ラットにおける糖尿病治療薬トルブタミドとイチヨウ葉エキスの相互作用に関する検討

第 24 回日本臨床薬理学会年会、2003 年 12 月 11-12 日

### 誌上発表

Interaction of *Ginkgo biloba* extract (GBE) with hypotensive agent, nifedipine, in rats

*In vivo*, 17, 409-412 (2003)

ラット循環機能に対するピクノジェノールとブドウ種子エキスの 2 週間反復摂取の影響

日本食品化学学会誌, 10(3), 127-132 (2003)

Pretreatment of *Ginkgo biloba* extract weakens hypnosis action of phenobarbital and its plasma concentration in rats

*Journal of Pharmacy and Pharmacology*, in press (2003)

Induction and recovery of hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with *Ginkgo biloba* extract.

*Food and Chemical Toxicology*, in press (2004)

ラットにおける糖尿病治療薬トルブタミドとイチヨウ葉エキスの相互作用に関する検討

臨床薬理, 35: 209S (2004)

## 特定保健用食品素材の安全性評価手法の検索

分担研究者 江頭 祐嘉合 千葉大学園芸学部

### 【研究目的】

特定保健用食品は、厚生労働省が安全性を確認し、認可した食品であり、その安全性は微生物を用いた変異原性試験、正常ラット、ビーグル犬を用いた短期・長期の毒性試験、小核試験、血圧、心拍数試験等で確認されている。しかし、生体側の感受性など応答力の変化が予想される状態、例えば疾病にかかっている状態での安全性に関しては報告が少ない。食品の安全性を考える場合、生体側の脆弱性つまり応答力、感受性が変化している場合の安全性を試験することは重要である。そこで本研究では、昨年引き続き実験モデル動物としてラットを用い、糖尿病時、腎臓障害時の特定保健用食品素材または健康食品が生体に及ぼす影響を検討した。特定保健用食品素材として、広く使われているフラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラクチュロースを使用した。また健康食品として新聞やタウン誌広告に頻繁に広告されている(1) アガリクスを使用した。腎臓障害時の実験においてはカルシウムの影響についても検討した。

ポリ(モノ)フェノールは抗酸化性をはじめとする様々な生理機能性があることより健康食品素材としてよく用いられている。しかしその代謝や吸収は複雑なためあまり明らかにされていない。しかし健康食品素材として用いる場合その代謝や吸収を知ることは安全性を考える上でも必要である。そこで健康食品として市販されており、生体調節機能があるフェルラ酸の代謝について検討した。フェルラ酸は *in vitro* における抗酸化モデル、DPPHラジカル捕捉系実験、リノール酸自動酸化系実験、ミクロソーム脂質過酸化系実験において比較的強い抗酸化活性を示し(2、3)、構造が比較的単純で研究を進めやすいため選択した。

以上まとめると本年度は次の2項目について検討した。

本研究は

- 1) 特定保健用食品素材および健康食品素材が糖尿病、腎臓障害時のラットへ及ぼす影響
- 2) フェルラ酸の代謝および吸収について検討した。

## 【研究方法】

<研究 1>特定保健用食品素材および健康食品素材が糖尿病、腎臓障害時のラットへ及ぼす影響

### 1) 動物実験および飼育方法

研究 1 および研究 2 とも Wistar 系雄ラット（日本クレア）を用いた。ラットは室温  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  の環境下で飼育し、一定期間予備飼育後、実験に供した。飼料および水は自由に摂取させた。人工照明を用い 12 時間明(7:00-19:00)12 時間暗(19:00-7:00)とした。動物実験に際しては、千葉大学園芸学部動物実験指針および NIH ガイドライン (4) にそって十分な配慮のもとで行った。

### 2) 実験材料および方法

実験 1 では糖尿病、実験 2 では腎臓障害時における各種特定保健用食品素材(各種オリゴ糖)および健康食品素材(アガリクス (実験 1) またはカルシウム (実験 2)) の投与効果について検討した。

#### 1. 実験材料

試験試料として、フラクトオリゴ糖 (Fo、和光純薬)、ラクチュロース (Lac、森永乳業 (株))、イソマルトオリゴ糖 (Iso、和光純薬)、アガリクス (Ag、アイ・エム・ビー (株)) を用いた。Ag は *Agaricus Blazei* Murill を乾燥後粉碎し、ペレットにしたものである。AG は糖質 31.6% (うち  $\beta$  グルカン 10.2 %) のものを用いた。各種オリゴ糖は純度 95% 以上のものを用いた。AG は飼料調製時に乳鉢で粉末にしてから用いた。実験 2 で用いたカルシウムは炭酸カルシウム (食品添加物用、和光純薬) を用いた。

#### 2. 実験方法

実験 1 : 実験には 6 週齢 Wistar 系雄ラットを用いた。基礎食 (CE-2 (ペレット食)、日本クレア (株)) で 1 週間の予備飼育後、1 群 (標準 (Std) 群、 $n=6$ ) を除く他のラットにストレプトゾトシン水溶液 (10mg/ml, 0.05M クエン酸緩衝液, pH4.5) を調製し、80mg/Kg 体重を腹腔内に注射した。Std 群は滅菌した生理食塩水を同様に注射した。飼料は全ての群に Std パウダー食 (表 1) を自由摂取させた。16 日目にラットの尾静脈より採血し、血清グルコース濃度 (血糖値) を測定した。採血前の 16 時間は絶食させた。糖尿病の程度を等しくするため、血糖値の平均値がほぼ等しくなるように 5 群 (対照 (Cont) 群、Lac 群、Fo 群、Iso 群、Ag 群) のグループに分けた ( $n=6$ )。本試験開始後 10 日間実験飼料 (表 1、全てパウダー食) を自由摂取させた。実験飼料は A I N-93 の飼料組成に基づき調製した。オリゴ糖は、ラットが下痢をおこさない量を考慮し、各群飼料中 5% 添加した。Ag はヒトへの投与量 (アイ・エム・ビー (株) は 3 g/1 日推奨) の 10 倍を考慮し添加量を決定し、飼料中 1% 添加した。試験試料の添加による差はコーンスターチで調整した。本実験で用いたオリゴ糖はショ糖とほぼ同程度ないしやや優れた安定性をもつものではあるが、安定性を考慮し、これらオリゴ糖および Ag を添加した飼料を調製した後は、 $-25^\circ\text{C}$  のフリーザーに保存し、実験飼料は毎日新鮮なものを与えた。本飼育開始後 10 日目に、ネンブタール麻酔下で下大静脈より採血した。絶食は採血前 16 時間行った。

血液は、血清を分離後、血糖値はグルコースBテストワコー(グルコースオキシダーゼ法)、総コレステロール値はコレステロールEテストワコー(コレステロールオキシダーゼ法・3.5・ジメトキシ-N・エチル-N・(2'-ヒドロキシ-3'-スルホプロピル)・アニリンナトリウム法)、アルブミン値と総タンパク濃度はA/G Bテストワコー(ビウレット法)、血清クレアチニン濃度はクレアチニンテストワコー(Jaffe法)を用いて測定した。これらの測定キットは全て和光純薬工業のものを用いて行った。

## 実験 2

実験には3週齢 Wistar 系雄ラットを用いた。基礎食(CE-2(ペレット食)、日本クレア(株))で3日間の予備飼育後、24日間アデニン食(アデニン硫酸塩0.75%を含むAIN-93に基づく飼料)で飼育した。24日目に尾静脈採血を行い、血清尿素窒素を測定した。この値をもとに群分け(対照(Cont)群、イソマルトオリゴ(Iso)糖群、ラクチュロース(Lac)群、カルシウム(Cal)群; n=6)を行い、試験飼料を10日間与え飼育した。オリゴ糖群の飼料は飼料中5%のオリゴ糖を、カルシウム群は3%の炭酸カルシウムを含み、添加量の差はスターチで補正した。群分け10日目にネンブタール麻酔下で心臓より採血した。血清中のクレアチニン、尿素窒素、血液中のアンモニアを測定した。測定試薬のクレアチニンテストワコー、尿素窒素Bテストワコー、尿酸Cテストワコー、アンモニアテストワコーは和光純薬工業より購入した。

表1 飼料組成(%) (実験1)

	Std・Cont群	オリゴ糖群	Ag群
カゼイン	20	20	20
L-シスチン	0.3	0.3	0.3
ショ糖	10	10	10
デキストリン	13.2	13.2	13.2
大豆油	7	7	7
セルロース	5	5	5
ミネラル混合(AIN-93)	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合(AIN-93)	1	1	1
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25
t-ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014
試験試料	0	5	1
αコーンスターチ	100%になるようにコーンスターチで調整		

・Std群: 標準群、Cont群: 対照群

・試験試料

オリゴ糖群: ラクチュロース(Lac)、フラクトオリゴ糖(Fo)、イソマルトオリゴ糖(Iso)

Ag群: アガリクス群

## 統計処理

全てのデータは、平均値と標準誤差(SE)で示した。統計処理は分散分析を行い、平均値の差の検定はTukeyの多重比較法を用いた。危険率は5%とした。ただし実験1の初体

重および初体重の影響を受ける成長結果のデータ（屠体重、臓器重量のみ）に関しては有意差検定を行わなかった。また実験1における薬剤を投与していないStd群のデータは統計処理から除外した。

### 【実験結果および考察】

#### 実験1 糖尿病時に及ぼす健康食品素材の影響

本飼育期間中における成長結果を表2に示す。試験食に切り替えてからの10日間、糖尿病群の体重増加量は、Fo群以外は減少したが、各群間で有意差は認められなかった。飼料摂取量はLac群が対照群より有意に低い値を示した（ $P < 0.05$ ）。屠体重に対する盲腸重量比はLac群とFo群が他群に比し有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。肝臓重量比は、各群間で有意な差は認められなかった。Std群に比し糖尿病群は臓器の肥大が認められた。

血液成分の値を表3に示す。血糖値は各群間で有意な差はみられなかった。血清コレステロール値は、Fo群がIso群より有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。A/G比、クレアチニン濃度は、各群間で有意な差は認められなかった。

今回の研究結果より使用した健康食品素材は糖尿病を増悪させないと思われる。一方、糖尿病時においてIso群の血清総コレステロール値はFo群に比し有意に低い値を示した。高コレステロール血症時においてIso群の血清トリグリセリド値はFo群より有意に低い値を示した。Wangらは透析を受けている腎臓障害の患者にIsoを経口投与したところ血清総コレステロール値と血清トリグリセリド値が有意に減少したと報告している（5）。IsoはFoやLacと同じビフィズス菌増殖因子活性を有する食品素材であるが、Fo、Lacと異なり構成糖に脂質代謝に影響を与えるフラクトースを含まないこと、これらの疾病により栄養成分の吸収能が変化することなどが関与しているのかもしれない。またIso群はFo群やLac群に比し盲腸肥大が観察されないことより、腸内における発酵産物であるプロピオン酸、酪酸、酢酸などの有機酸の組成や含量が脂質代謝に影響を与えているのかもしれない。

表2 成長結果（実験1）

	Std	Cont	Lac	Fo	Iso	Ag
初体重 (g)	310±4	228±6	212±5	214±5	218±4	223±4
体重増加量 (g/10日)	28.5 ± 1.7	-5.00±4.62	-6.00 ± 1.71	1.17 ± 3.41	-12.0±2.1	-12.8±7.5
飼料摂取量 (g/10日)	184±5	312±14 <sup>a</sup>	235±12 <sup>b</sup>	298±6	300±11	266±31
内臓摘出屠体重 (g)	266±4	165±6	150±4	156±7	152±5	156±9
肝臓 (%) <sup>1)</sup>	3.88 ± 0.10	5.61±0.08	5.96±0.13	5.91 ± 0.12	5.61±0.11	5.54±0.10
腎臓 (%) <sup>1)</sup>	0.822 ± 0.015	1.57±0.05	1.67±0.03	1.63 ± 0.04	1.63±0.05	1.64±0.04
盲腸 (%) <sup>1)</sup> <sup>2)</sup>	1.13 ± 0.15	3.95±0.41 <sup>c</sup>	7.77 ± 0.45 <sup>d</sup>	6.50 ± 0.87 <sup>d</sup>	3.74±0.39 <sup>c</sup>	3.36 ± 0.39 <sup>c</sup>

平均値±標準誤差(n=6)

Std:標準群、Cont:対照群、Lac:ラクチュロース群、Fo:フラクトオリゴ糖群、Iso:イソマルトオリゴ糖群、Ag:アガリクス群

1) 臓器重量/内臓摘出屠体重×100

2) 盲腸重量は内容物込みの重さ

a: Lac 群と有意差あり (P<0.05)

b: Cont 群と有意差あり (P<0.05)

c: Lac 群,Fo 群と有意差あり (P<0.05)

d:Cont 群,Iso 群,Ag 群と有意差あり (P<0.05)

表 3 血液成分値 (実験 1)

	Std	Cont	Lac	Fo	Iso	Ag
本試験開始時：グルコース濃度 (mg/dl)	98.2±7.7	299±56	299±55	300±56	301±58	300±60
解剖時：グルコース濃度 (mg/dl)	139±32	472±33	527±23	454±49	515±18	462±40
総コレステロール濃度 (mg/dl)	48.4±2.1	50.8±7.0	60.7 ± 6.2	71.5 ± 6.1 <sup>a</sup>	41.5 ± 3.8 <sup>b</sup>	47.3 ± 6.1
アルブミン濃度 (g/dl)	3.35 ± 0.05	2.86 ± 0.06	3.15 ± 0.11	3.00 ± 0.08	2.89 ± 0.03	2.92 ± 0.04
総タンパク質濃度 (g/dl)	5.30 ± 0.10	4.75 ± 0.09 <sup>c</sup>	5.18 ± 0.11 <sup>d</sup>	4.66 ± 0.09 <sup>c</sup>	4.61 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.70 ± 0.10 <sup>c</sup>
A/G 比	1.77 ± 0.14	1.55 ± 0.10	1.56 ± 0.10	1.83 ± 0.10	1.72 ± 0.15	1.65 ± 0.07
クレアチニン濃度 (mg/dl)	0.703 ± 0.025	0.725 ± 0.033	0.673 ± 0.069	0.624 ± 0.043	0.607 ± 0.07	0.623 ± 0.054

平均値±標準誤差(n=6)

Std:標準群、Cont:対照群、Lac:ラクチュロース群、Fo:フラクトオリゴ糖群、Iso:イソマルトオリゴ糖群、Ag:アガリクス群

a: Iso 群と有意差あり (P<0.05)

b:Fo 群と有意差あり (P<0.05)

c:Lac 群と有意差あり (P<0.05)

d:Cont 群,Fo 群,Iso 群,Ag 群と有意差あり (P<0.05)

## 実験 2 腎臓障害時に及ぼす健康食品素材の影響

本飼育期間中における成長結果を表 4 に示す。試験食に切り替えてからの 10 日間、体重増加量は、Iso 群で減少し、Cal 群で増加したが、各群間で有意差は認められなかった。飼料摂取量も各群間で有意差は認められなかった。Cal 群の肝臓と腎臓重量は対照群より有意に高い値を示した (P<0.05)。屠体重に対する肝臓および腎臓重量比も Cal 群は対照群に比し有意に高い値を示した (P<0.05)。

血中クレアチニンの値を図 1 に示す。Cal 群は Iso 群より有意に高い値を示した (P<0.05)。

血清尿素窒素濃度は Cal 群は他群に比し有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (図 2)。血中アンモニア濃度は、各群間で有意な差は認められなかった (図 3)。血清尿素窒素は Lac 群が他群に比し有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (表 4)。

以上の結果から腎臓障害ラットにおいて栄養機能食品であるカルシウムは腎臓肥大および血清尿素窒素の上昇がみられ腎臓機能障害時の摂取は摂取量等考慮する必要があると思われる。これは他のミネラルとのバランスが崩れたことに起因するのかもしれない。一方ラクチュロースは腎臓重量、血清尿素窒素などには影響を与えなかったが血清尿酸値が上昇したので、今後他の血液成分を測定し腎臓機能への影響を検討する必要があると思われる。

表 4 成長結果と血清尿酸値

	Cont	Iso	Lac	Cal
初体重(g)	45.17±1.3	48.33±0.63	51.00±0.55	50.17±0.41
体重増加量(g)	63.83±2.05	56.67±2.2	61.17±2.60	75.67±2.41
屠体重(g)	84.17±1.6	79.17±1.9	82.17±1.89	93.67±1.85
肝臓重量(g)	3.62±0.07a	3.85±0.88a	4.58±0.090ab	5.08±0.16b
腎臓重量(g)	2.64±0.080a	2.80±0.55a	2.87±0.041a	3.86±0.089b
飼料摂取量(g)	295.90±8.48	294.96±7.12	305.83±8.60	320.63±8.08
肝臓/屠体	0.04±0.00a	0.05±0.00ab	0.06±0.00b	0.05±0.0012b
腎臓/屠体	0.03±0.00a	0.04±0.00ab	0.04±0.00ab	0.04±0.0014b
血清尿酸(mg/dl)	0.80±0.20a	1.20±0.52a	6.35±0.90b	1.72±1.75a

Cont:対照群、Iso:イソマルトオリゴ糖群、Lac:ラクチュロース群、Cal:カルシウム群  
異なるアルファベット間で有意差あり ( $P < 0.05$ )

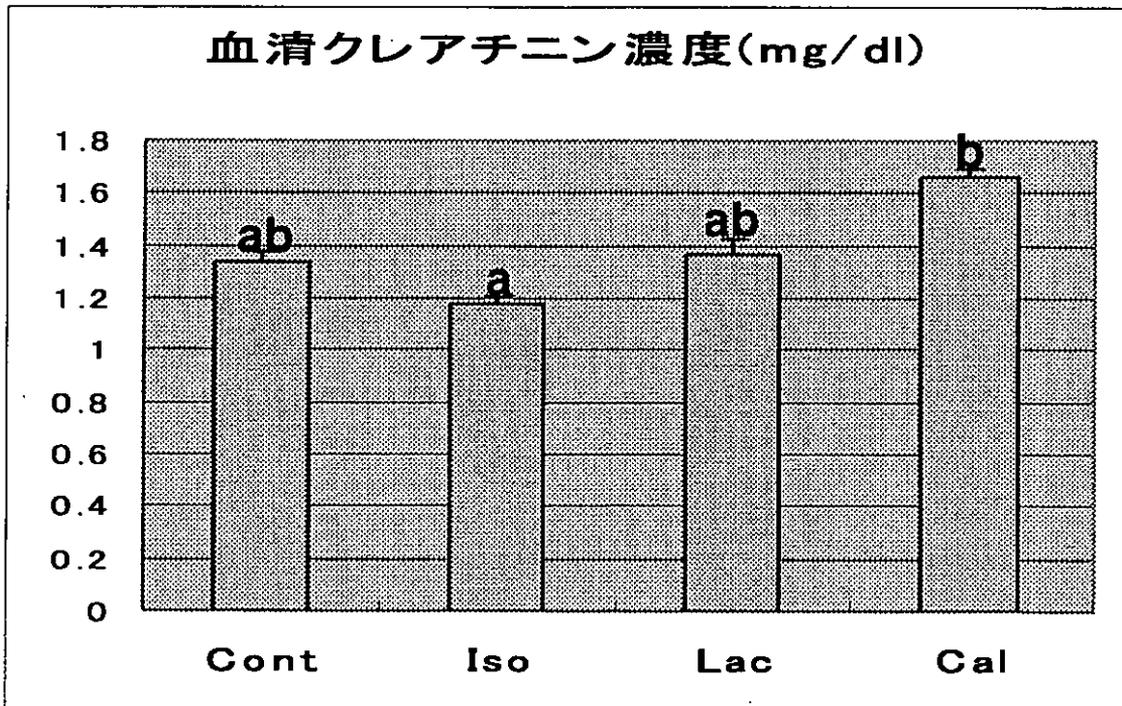


図1 血清クレアチニン濃度                      Cont:対照群、Iso:イソマルトオリゴ糖群、Lac:ラクチュロース群、Cal:カルシウム群、異なるアルファベット間で有意差あり (P<0.05)

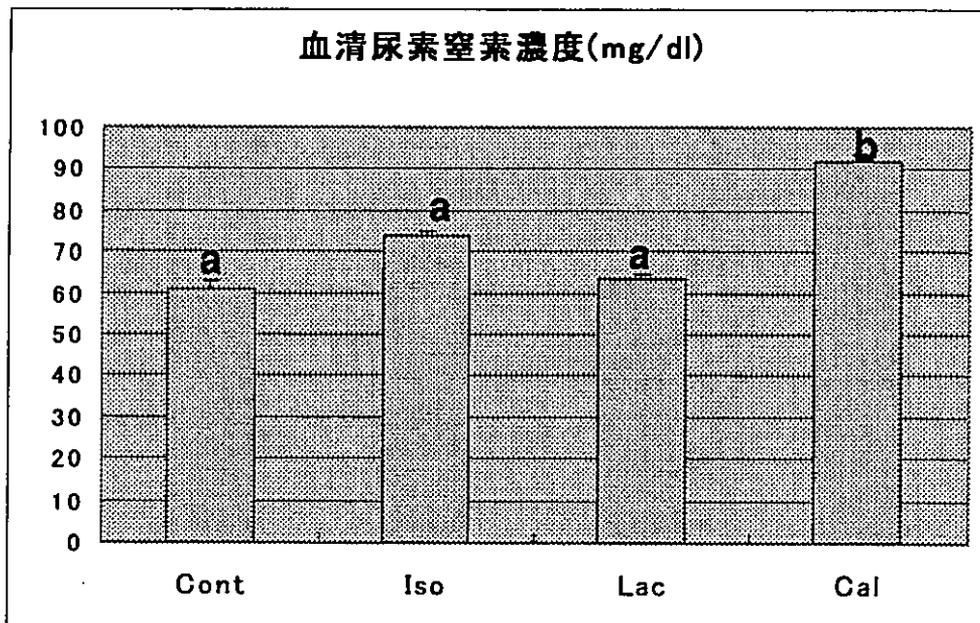


図2 血清尿素窒素濃度  
Cont:対照群、Iso:イソマルトオリゴ糖群、Lac:ラクチュロース群、Cal:カルシウム群  
異なるアルファベット間で有意差あり (P<0.05)

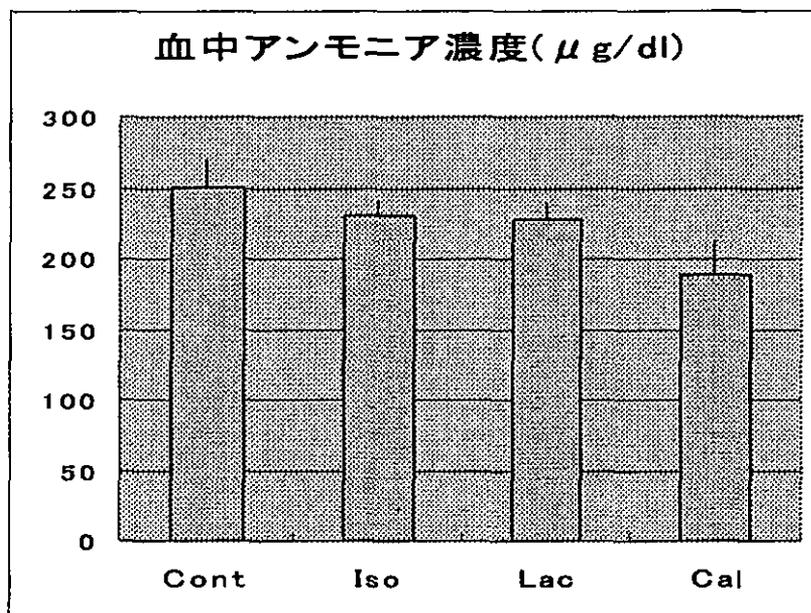


図3 血中アンモニア濃度

Cont:対照群、Iso:イソマルトオリゴ糖群、Lac:ラクチュロース群、Cal:カルシウム群

### 〈研究2〉フェルラ酸の代謝および吸収

フェルラ酸はタケノコや穀類細胞壁に多量に存在し抗酸化性を示すポリ(モノ)フェノールである。また健康食品素材として市販されている。フェルラ酸にアラビノースが1つ結合したフェルラ酸配糖体は *in vitro* における抗酸化モデル、DPPH ラジカル捕捉系実験、リノール酸自動酸化系実験、ミクロソーム脂質過酸化系実験において比較的強い抗酸化活性が示された。しかし、フェルラ酸およびフェルラ酸配糖体が体内に吸収されどのように代謝されるのか明らかではない。本研究では、フェルラ酸およびフェルラ酸を含有する高分子多糖類アラビノキシランを主成分とするものと、低分子のフェルラ酸配糖体をラットに経口投与し、血液・尿中でのフェルラ酸濃度および代謝産物について検討した。

#### 【実験方法】

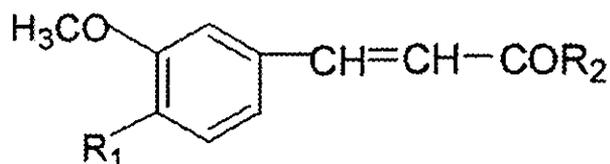
##### 1. 実験試料

FA：フェルラ酸（和光純薬より購入）

FAX<sub>n</sub>：フェルラ酸含有アラビノキシラン（高分子）を主成分とし、少量のオリゴ糖を含む（千葉大学園芸学部食品栄養学研究室で調製）

FAA：フェルラ酸にアラビノースが1分子がついたもの（千葉大学園芸学部食品栄養学研究室で調製）

をそれぞれ用いた。



FA :	$R_1=R_2=OH$
FA-Glucuronide:	$R_1=OC(CH_2O)_4COOH, R_2=OH$
or/and	$R_1=OH, R_2=OC(CH_2O)_4COOH$
or/and	$R_1=R_2=OC(CH_2O)_4COOH$
FA-sulfate:	$R_1=OSO_3H, R_2=OH$
FA-sulfoglucuronide:	$R_1=OSO_3H, R_2=OC(CH_2O)_4COOH$

## 2. 動物実験

7週齢の Wistar 系雄ラットを用い、環境に馴化させるため4日間予備飼育を行った。そして基本飼料を10日間投与した。基本飼料投与後、8日目に9群に分け (n=4) (平均体重 274 ± 8g)、70 μmol FA/(ラットの体重 kg あたり)となるように、FA, FAA, FAXn (in 2mL Water) を胃ゾンデを用い、経口投与した。対照群は水を投与した。投与後、経時的に血液 (尾静脈)、尿、糞を採取し、測定に供した。血液は血漿を分離し、尿はろ紙でろ過し、測定まで -30°C で保存した。

## 3. 血漿、尿中の遊離 FA および FA 誘導体の測定

試料 (血漿、尿) 中の遊離 FA および FA 誘導体の測定は、試料を酵素で加水分解した後、HPLC 法で行った。50 μl の試料を 0.1 倍量の酢酸で pH5.0 にした後、2 mM の salicylic acid 水溶液 (内部標準) を 10 μl 加えた。この溶液に、5 μl の水と 0.43 mL のエタノール HCl (50 mM HCl/1L エタノール) を混合し、遠心分離 (10,000g X 10min, 4°C) した。10 μl の上清を HPLC 分析に供した (遊離 FA の分析)。FA 誘導体の測定は、5 μl 酵素溶液 (in 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0)) を試料溶液に添加し、窒素ガスを充填し、37°C で血漿は 2.5 時間、尿は 12 時間インキュベートした。この反応溶液から、遊離 FA 抽出法と同様にエタノール HCl で抽出し、HPLC 分析を行った。酵素は FA-スルホグルクロニドの測定は β-glucuronidase H 2 型 (500 units の β-glucuronidase と 25 units の sulfatase) を用いた。FA-グルクロニドは β-glucuronidase B1 型 (500 units の β-glucuronidase) を用いた。FA-スルフィドは β-glucuronidase H2 型と 10mg D-saccharic acid 1,4-lactone (β-glucuronidase inhibitor) を用いた。

## 4. 糞中の総 FA 量の測定

Shibiya の方法で前処理した。糞は凍結乾燥後粉碎し、ここから 0.05g の試料を 0.5M NaOH

を窒素下で 60°C で 2.5 時間抽出した。これに HCl を加え pH3.5 にし、酢酸エチルで抽出した。そしてエバポレーターで濃縮し、溶媒に溶かし、HPLC 分析に供した。

## 5. HPLC 分析

HPLC 分析の条件は以下の通り行った。

Pump: L-7100 Intelligent pump (Hitachi Co.,Ltd.,Tokyo,Japan), Column: Nova-pak C18 column( 4.6mmX250mm, Waters, US), Detector: L-4200 UV-vis detector (Hitachi Co.,Ltd.,Tokyo,Japan), Absorbance: 320nm, Mobile Phase: solvent A (20% methanol in 5mM HCl) and solvent B (acetonitrile) linear gradient (0% to 15% in 10min → 25% in the next 5 min)、Flow rate: 1.0mL/min

## 6. 統計処理

統計処理は分散分析を行い、平均値の差の検定は Tukey の多重比較法を用いた。危険率は 5% とした。

## 【研究結果および考察】

### 1. 血漿中の遊離 FA と FA 代謝産物 (表 5)

血漿中、尿中には遊離 FA と 3 種類の FA 誘導体 (FA-スルホグルクロニド、FA-グルクロニド、FA-スルフィド抱合体) がみられた。FA はスルフィドおよびグルクロニドといった形で存在すると思われる。

FA および FAA を経口投与した後のラット血漿中の FA および FA 代謝産物濃度の経時的変化を表 5 に示した。FA-スルホグルクロニドは FA 投与群では 7-8 割を占め、FAA 群では約 6 割を占めていた。FA 群は投与 15 分後に最大値に達し、FAA 群は 30 分後に最大値に達し時間とともに徐々に減少した。FA 群の遊離 FA は投与 15 分までは 2 番目に含量が高いが 30 分後にはすぐに消失した。FA-グルクロニドは投与 60 分までは濃度は変化しなかった。FAA 群の FA-グルクロニドは 2 番目に濃度が高く、経時変化は、FA-スルホグルクロニドと類似しており、濃度はあまり変化しなかった。FA-スルフィドは全実験を通じて濃度が低かった。

### 2. FA の Pharmacokinetic と糖エステル (図 4)

水を投与した群では血漿中に総 FA は検出されなかった。血漿中の総 FA 濃度は FA 群は 15 分、FAA 群は 30 分で最大に達し、その後減少した (図 4)。FA 群の FA 濃度は約 120 分で素早く消失した。FAA 群は徐々に減少し、240 分で 8.3 μM であった。FAXn 群は試料投与後、20 時間目に微量の総 FA が検出された (データは示していない)。

### 3. 尿中の FA 及びその誘導体の排泄 (図 5)

尿中の総 FA 含量を図 5 に示す。FA 群、FAA 群は試料投与後、6 時間まで尿への排泄が急増し、10 時間後には排泄量が一定した。FAXn 群は、26 時間後に排泄量が一定した。

0-6 時間、6-16 時間における尿中の FA 誘導体は、FA-スルホグルクロニドが大部分を占め、次に FA-グルクロニドが 2 番目に多かった (データは示していない)。この結果は血漿中の FA 誘導体のパターンと一致していた。遊離 FA と FA-スルフィドは非常に低い値を示した。

尿および糞中への総 FA の排泄量は、FA 群では、FA 投与後 40 時間以内に投与量の 72% の FA および FA 誘導体が尿に排泄された。FA と等量の FA を含む FAA 群は 54%、FAXn 群は 14% 尿に排泄された。FAXn 群では投与量の 20% の FA が糞中に排泄された。しかし、FA 群、

FAA 群の糞中への FA の排泄は対照群（水投与）と有意な差はなかった。

以上の結果から FA および FAA は体内に素早く吸収され、その主要代謝産物は FA-スルホグルクドニドであることが明らかとなった。

**Table 5** Plasma concentrations of free ferulic acid (FA) and its metabolites determined by HPLC in rats administered FA or 5-O-feruloyl-L-arabinofuranose (FAA) containing equimolar amounts of FA (70  $\mu\text{mol}$  FA/kg body)<sup>1</sup>

	Time after administration, <i>min</i>				
	5	15	30	60	120
	<i><math>\mu\text{mol/L}</math></i>				
<b>FA</b>					
Free FA	25.3 $\pm$ 10.1 (34%) <sup>a</sup>	16.4 $\pm$ 7.4 (14%) <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 0.4 (5%) <sup>b</sup>	0.4 $\pm$ 0.3 (1%) <sup>b</sup>	0.0 <sup>2</sup> $\pm$ 0.0 (0%) <sup>b</sup>
FA-sulfate	3.5 $\pm$ 1.9 (5%) <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 2.7 (6%) <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 1.1 (5%) <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.7 (4%) <sup>a,b</sup>	0.3 $\pm$ 0.1 (6%) <sup>b</sup>
FA-glucuronide	3.3 $\pm$ 3.2 (4%) <sup>a,b</sup>	9.1 $\pm$ 3.3 (8%) <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 2.6 (15%) <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 1.7 (23%) <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.6 (13%) <sup>b</sup>
FA-sulfoglucuronide	41.9 $\pm$ 9.5 (58%) <sup>b</sup>	77.5 $\pm$ 18.3 (71%) <sup>a</sup>	45.0 $\pm$ 7.3 (76%) <sup>b</sup>	22.8 $\pm$ 11.3 (72%) <sup>b</sup>	4.1 $\pm$ 3.6 (81%) <sup>c</sup>
<b>FAA</b>					

			(3%) <sup>a</sup>	(2%) <sup>a,b</sup>	(0%) <sup>b</sup>
FA-sulfate	— <sup>3</sup>	0.7 ± 0.4 (4%) <sup>a</sup>	0.5 ± 0.4 (2%) <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 (3%) <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 (4%) <sup>a</sup>
FA-glucuronide	—	5.3 ± 0.9 (29%) <sup>b,c</sup>	7.9 ± 0.5 (35%) <sup>a</sup>	6.8 ± 1.6 (41%) <sup>a,b</sup>	3.4 ± 0.7 (35%) <sup>c</sup>
FA-sulfoglucuronide	—	11.7 ± 1.7 (63%) <sup>a,b</sup>	13.6 ± 1.4 (60%) <sup>a</sup>	8.9 ± 2.6 (54%) <sup>b,c</sup>	6.4 ± 2.0 (61%) <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Values are means ± SD, *n* = 4. Means in a row without a common letter differ, *P* < 0.05. (%), percentage of the concentration of free FA or its metabolites to that of total FA.

<sup>2</sup> When concentration of free FA was below the detection limit (<0.3 μmol/L plasma), it was calculated as 0 μmol/L.

<sup>3</sup> Not determined.

(*J Nutr.* 2003 ;133(5):1355-61 Zhao Z, Egashira Y, Sanada H)

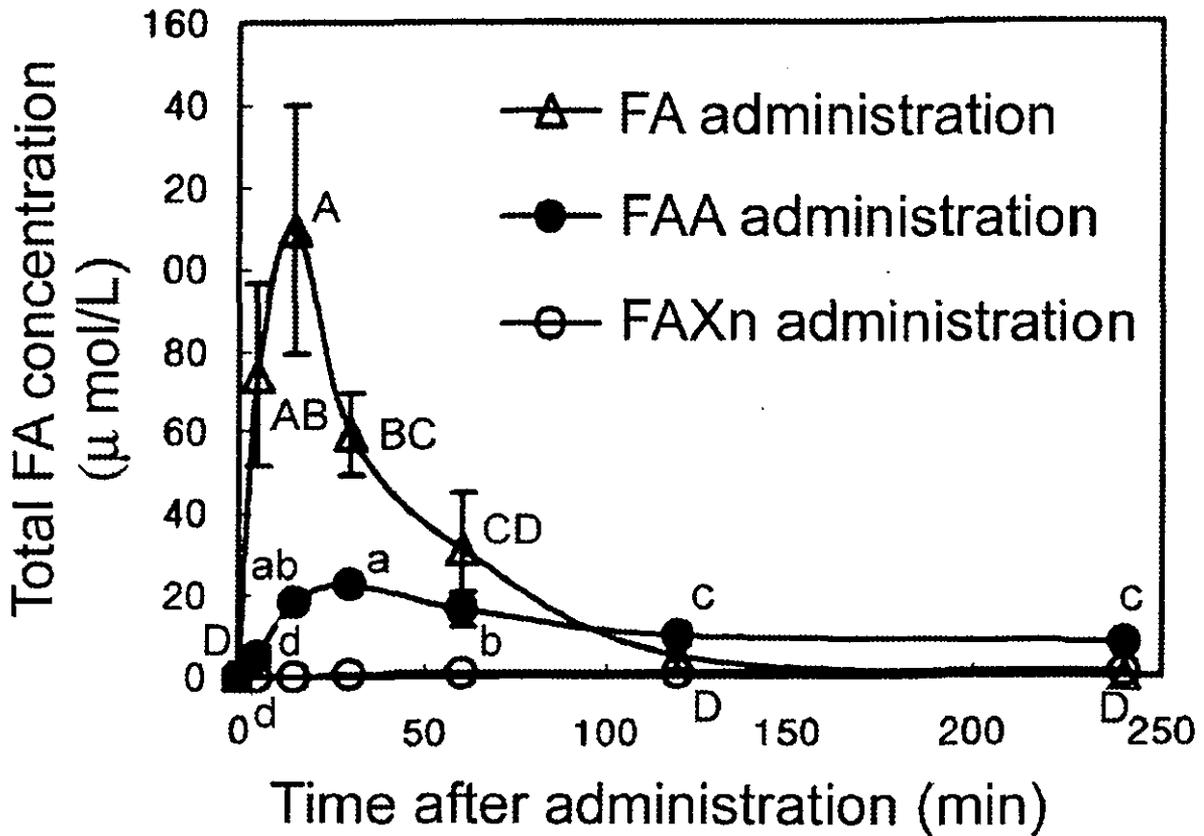


FIGURE 4 Plasma concentration of total ferulic acid (FA) in rats administered FA, 5-*O*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAA) or feruloyl-arabinoxylan (FAXn) containing equimolar amounts of FA (70  $\mu\text{mol}$  FA/kg body). Values are means  $\pm$  SD,  $n = 4$ . Means without common uppercase (FA administration) or lowercase (FAA administration) letters differ,  $P < 0.05$ . (J Nutr. 2003;133(5):1355-61 Zhao Z, Egashira Y, Sanada H)

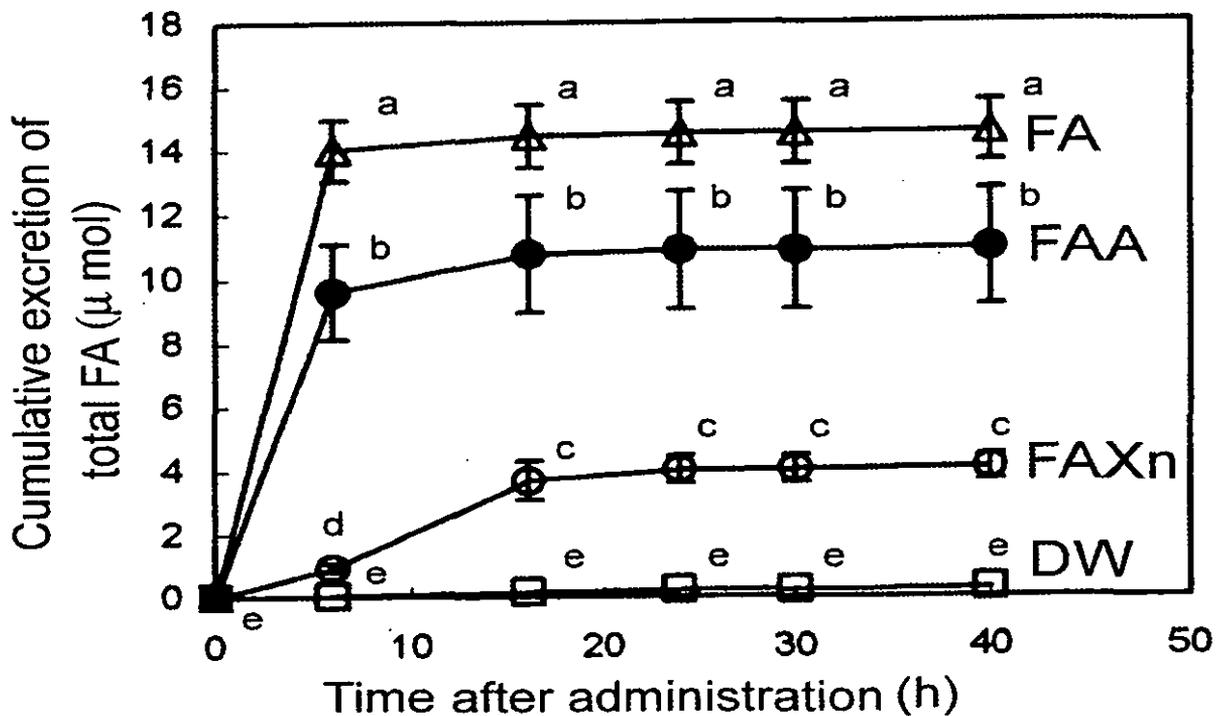


FIGURE 5 Cumulative urinary excretion of total ferulic acid (FA) in rats administered FA, 5-*O*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAA) or feruloyl-arabinoxylan (FAXn) containing equimolar amounts of FA (70 μmol FA/kg body). Distilled water (DW, 2 mL) was administered as control. Urine was collected by use of metabolic cages 0–6, 6–16, 16–24, 24–30 and 30–40 h after administration. Values are means ± SD, *n* = 4. Means within each group without a common letter differ, *P* < 0.05.

(*J Nutr.* 2003 ;133(5):1355-61 Zhao Z, Egashira Y, Sanada H)

### 【要約】

#### 1. 研究概要

特定保健用食品素材および健康食品素材が糖尿病時、腎臓障害時のラットに及ぼす影響を検討した。特定保健用食品素材としてフラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラクチュロースを、健康食品素材としてアガリクスを使用した。その結果これらの健康食品素材は糖尿病を増悪させなかった。一方、腎臓障害ラットにおいて栄養機能食品であるカルシウムは腎臓肥大および血清尿素窒素の上昇がみられ腎臓機能障害時の摂取は摂取量等考慮する必要があると思われる。

ポリフェノールの一種フェルラ酸の代謝を検討した結果、フェルラ酸およびその誘導体 FAA は体内に素早く吸収され、その主要代謝産物は FA・スルホグルクドニドであることが明らかとなった。

#### 2. 研究目的

本研究の目的は、疾病時に特定保健用食品素材、健康食品素材を摂取した時の安全性を検

討することである。一昨年度に安全性を検討するための評価手法を検索、確立したので、本年度も昨年度に引き続き疾病時における食品素材の影響を検討した。さらに代謝についての研究報告が少ないにもかかわらず販売数の多いポリフェノールの代謝および吸収について検討した。今年度の研究課題は以下の2点である。

I. 糖尿病時および腎臓障害時の特定保健用食品素材（イソマルトオリゴ糖、ラクチュロース）、健康食品素材（アガリクスあるいはカルシウム）の成長および血液成分に及ぼす影響。

II. 抗酸化性を有するフェノール性化合物フェルラ酸の吸収および代謝に関する検討。

### 3. 研究方法

本研究で行った実験の主な方法は次のとおりである。

血糖値はグルコースオキシダーゼ法、総コレステロール値はコレステロールオキシダーゼ法・3,5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2'-ヒドロキシ-3'-スルホプロピル)-アニリンナトリウム法、アルブミン値と総タンパク濃度はビウレット法、血清クレアチニン濃度は Jaffe 法で測定した。

ポリ（モノ）フェノールであるフェルラ酸の測定は試料を酵素で加水分解した後、HPLC 法で行った。

### 4. 研究結果

1) 糖尿病時、各試料間で体重増加量、肝臓重量比に有意な差はみられなかった。血糖値、A/G 比、クレアチニンは各群間で有意な差はみられなかった。今回の測定項目に関して糖尿病を増悪させる食品素材はみられなかった。

2) 腎臓障害時、カルシウム群で肝臓、腎臓の肥大、血清尿素窒素の有意な上昇が見られた。ラクチュロース群で有意な血清尿酸値の上昇が観察された。

3) ポリ（モノ）フェノールの一種フェルラ酸の代謝を検討した結果、フェルラ酸およびその誘導体 FAA は体内に素早く吸収され、その主要代謝産物は FA-スルホグルクドニドであることが明らかとなった。

### 【引用文献】

1) 池上幸江：厚生科学研究：平成十二年度新開発食品等の安全性の確保に関する研究報告書, P6 (2000)

2) Ohta, T. et al.: *J. Agric Food Chem.*, 42, 653 (1994)

3) Ohta, T. et al.: *J. Agric Food Chem.*, 45, 1644 (1997)

4) National Research Council: Guide for Care and use of laboratory animals. NIH publication No.85-23(rev.), (1985), U.S. Government Printing office, Washington, DC.

5) Wang, HF, et al.: *J. Ren. Nutr.*, 11, 73 (2001)

【謝辞】本研究報告をまとめるにあたり研究にご協力頂いた趙氏、野口氏、橋本氏に深謝いたします。

# 食物繊維のエネルギー評価に関する研究

## —ヒトにおける24時間呼気水素ガス排出ならびにヒト糞便培養による食物繊維の発酵分解性の検討—

分担研究者 奥 恒行 県立長崎シーボルト大学看護栄養学部  
研究協力者 中村禎子 県立長崎シーボルト大学看護栄養学部

### 1. 研究目的

食物繊維は消化されないために大腸に移行し、腸内細菌によって発酵分解を受けて短鎖脂肪酸、炭酸ガス、水素ガス、メタンガスなどに代謝され、一部は菌体成分として利用される(図1)<sup>1)</sup>。生成された短鎖脂肪酸は大腸から吸収されてそれぞれの組織において酸化され、エネルギーを産生する。このため、有効エネルギー量はゼロ kcalではなく、また消化性糖質のエネルギー量4 kcal/gでもなく、0~4 kcal/gの間にあることが考えられる。しかしながら、難消化性糖質である食物繊維のエネルギー評価法は確立されておらず、また、この分野における海外の研究は極めて乏しい。

加工食品には健康増進法の栄養成分表示制度に基づいて、エネルギーをはじめ主要成分表示が義務付けられている。しかし、食物繊維を含めた難消化性糖質のエネルギー評価法が確立されていないために、食品関係法律の改正によって、食物繊維のエネルギー評価が異なるために食物繊維含有加工食品のエネルギー表示に混乱を来している。一方、FAO/WHO合同のCordex委員会においても、加工食品の栄養機能表示や栄養機能強調表示において食物繊維のエネルギー値が問題となるために、そのエネルギー評価が課題として取り上げられ、議論が開始されている。

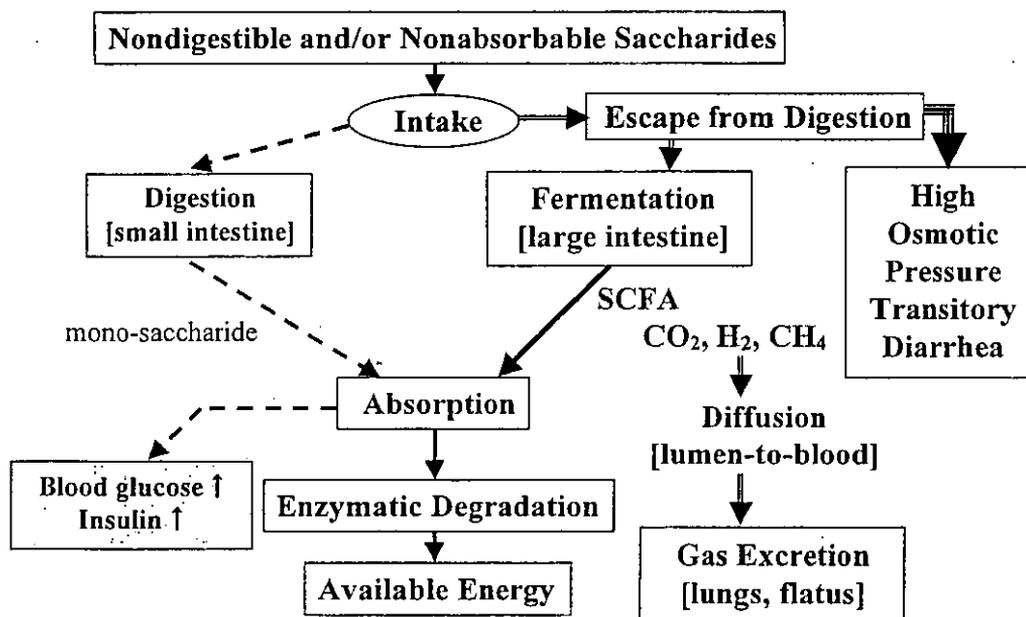


Fig. 1. The pathway of energy production and intestinal gas excretion from nondigestible and/or nonabsorbable saccharides

平成14年度の本研究では、各種食物繊維素材の有効エネルギーを推算するため必須である発酵分解性を検討するために、ヒトに各種食物繊維素材を摂取させ、8時間にわたって呼気を採取し、水素ガス排出量を測定した<sup>2)</sup>。しかしながら、食物繊維は高分子であるために摂取8時間後は発酵分解がまだ持続しており、8時間のデータでは食物繊維の有効エネルギー量を評価するには信頼性に乏しいことが明らかになった。

そこで、平成15年度においては、得られたデータの信頼度を高めるために食物繊維摂取後24時間にわたって呼気を経時的に採取し、水素ガス排出量から発酵分解性を推定して各食物繊維素材の有効エネルギー量の評価を試みた。さらに、ヒト糞便を用いて嫌気的条件下で培養実験を行い、生成される短鎖脂肪酸(以下SCFAs)量ならびに反応液pHの経時変化などから、発酵分解性を推定した。このヒト糞便培養による発酵分解性の検討は、ラットなど動物の糞便を使用しても可能であるが<sup>3)</sup>、ヒトと動物では腸内細菌叢が著しく異なるため<sup>4)</sup>、培養によって生成される短鎖脂肪酸の種類や程度もヒトとは異なり、得られたデータをヒトに外挿することは非常に難しい。また、ヒト糞便培養において生成される短鎖脂肪酸濃度や培養液pHの変化から推定した発酵分解性と、呼気水素ガス排出量から推定した発酵分解性との整合性が認められれば、ヒト糞便培養実験は比較的簡便に行うことができるので、食物繊維の発酵分解性を評価する上で有力な方法と成り得る。本研究では*in vivo*ならびに*in vitro*における発酵性を比較し、エネルギー評価の整合性を検討した。

## 2. 実験材料および方法

### 1) 人を対象とした呼気採取実験

#### (1) 被験者の属性

被験者は、本研究の目的、実験内容、試験物質摂取による下痢誘発や異常な胃腸症状の発生等について十分説明し、実験への協力を承諾した消化器疾患をもたない健康成人女性9名を対象とした。これらの被験者の中から、ある種の食物繊維素材を摂取する被験者を無作為に抽出し、1人5-6種類の試験物質を摂取させた。このため、それぞれの食物繊維素材によって対象となった被験者は異なる。被験者の属性は表1のとおりである。

**Table 1. Characteristics of the subjects**

Age (y)	21.8±0.6
Height (cm)	156.6±4.5
Weight (kg)	49.3±6.4
BMI	20.1±2.4

Data are expressed mean and S.D. (n=9).

#### (2) 試験物質の性状と特徴

試験物質には、水溶性食物繊維素材としてすでに市販されているグルコマンナン、

グアーガム酵素分解物、低分子化アルギン酸ナトリウム、ポリデキストロース、難消化性デキストリンを使用した。非水溶性食物繊維素材としてセルロース、湿熱処理ハイアミロースデンプンを使用した。さらに対照として難消化性オリゴ糖であるフラクトオリゴ糖を用いた。フラクトオリゴ糖は、胃酸による分解はほとんどなく、小腸で消化吸収されずに大腸に到達して、腸内細菌によって完全に発酵分解され、呼気中に水素ガスを排出する<sup>5)</sup>。また、フラクトオリゴ糖のエネルギー換算係数は、奥らおよび徳永らによって、すでに2kcal/gと定められている<sup>6,7)</sup>。いずれの試験物質も粉末または粒子状で、実験に用いた各種食物繊維素材の特徴は以下の通りである。

グルコマンナン（商品名：プロポールA、こんにゃくいも抽出物、清水化学、広島県）は水との親水性が非常に強く、保水性がきわめて高い<sup>8)</sup>。分子量は原料のこんにゃくいもの種類によって異なるが、天然の難消化性多糖の中では最大の分子量である。今回使用したグルコマンナンは分子量1,000,000以上で、D-グルコース：D-マンノース=1：1.6の割合で、 $\beta$ -1,4結合したものである。

グアーガム酵素分解物（商品名：サンファイバーPG、太陽化学、三重県）の純度はAOAC法により80%、分子量は約20,000で、食物繊維としての特性が失われず、低粘性である。本研究に用いたグアーガムは西パキスタン西インドのインダス河流域の乾燥地帯に生育するマメ科グアーの種子胚乳部から得られる。マンノースを主鎖とするガラクトマンナン多糖で、ガラクトースとマンノースの構成比は約1：2である。天然のグアーガムは平均分子量が100～200万と非常に高く<sup>9)</sup>、きわめて高粘性であるため、食品素材としての用途は限定される。このため特別な加水分解酵素で部分的に加水分解して小分子化したものが用いられている。

低分子化アルギン酸ナトリウム（商品名：ソルギン顆粒、カイゲン、大阪市）は分子量50,000（40,000～70,000）であり、水溶性食物繊維に分類されている。ほとんどのアルギン酸は褐藻類（コンブ、カジメ、アラメなど）から抽出される<sup>10,11)</sup>。D-マンヌロン酸からなる直鎖状のブロック、L-グルロン酸からなる直鎖状のブロック、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸が $\beta$ -1,4結合で交互に結びついた直鎖状のブロックが見出されている。遊離のアルギン酸は水に不溶であるがナトリウム塩にすると水溶性になる。

ポリデキストロース（商品名：ライテス、ダニスコジャパン、東京都）はグルコースを主な原料とし、グルコースとソルビトールおよびクエン酸を89：10：1の割合で混合し、高温（135～300℃）、高真空下で縮重合反応させた合成多糖に属する新食品素材である<sup>12)</sup>。構造は1,2-、1,3-、1,4-および1,6-の各グルコシド結合を含む複雑な分岐構造を持っている。我が国では飲料などに幅広く利用されている。今回用いたポリデキストロースは、酵素重量法によってポリデキストロース中の食物繊維に該当する分子量の大きいものの含有率は75%、平均分子量は1,200である。

難消化性デキストリン（商品名：ファイバーゾル2、松谷化学工業、大阪市）は、通常の酵素分解デキストリンと異なり、デンプンの $\alpha$ -1,4と $\alpha$ -1,6グルコシド結合以外に $\alpha$ -1,2や $\alpha$ -1,3グルコシド結合を含んでいる。低分子量の水溶性食物繊維で低粘性であるため、各種飲料をはじめ、菓子類やデザート類などに幅広く利用されている<sup>13)</sup>。今回用いた難消化性デキストリンは、AOAC法による純度85～95%（平均93.73%）である。