

氏 名(本籍)	星 清 子
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 4 8 6 号
学位授与年月日	平 成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学位論文題目	難消化性糖類の消化管におよぼす栄養生理的影響に関する研究 —特に, 消化管サイズと機能におよぼす大腸内発酵産物の影響—
論文審査委員(主査)	教授 古川 勇 次 教授 藤 本 健四郎 教授 大久保 一 良

論文内容要旨

序 論

近年、健康を維持するうえで、食物繊維摂取の重要性が認識されるようになったのは、多くの疫学的調査から食物繊維摂取量の不足と糖尿病、胆石、大腸癌、虚血性心疾患などの非感染性疾患の罹患率の高さとの間に強い相関が示されてから、これらの疾病を予防する効果が食物繊維に期待されるようになったからである。

食物繊維の定義として、「ヒトの消化酵素によって消化されない食品成分の総体」が現在のところ受け入れられている。したがって、食物繊維に分類される食品成分は多種多用であり、それぞれ特有の物理・化学的特性（水可溶・不溶性、粘稠性、抱水性、イオン吸着性、非イオンの吸着性など）を持っており、それらの特性が食物繊維の生理的効果の種類ならびに作用と密接に関係している。そして、食物繊維、いわゆる難消化性の糖の生理的効果の発現の場はおもに消化管腔内であり、消化管との物理的、化学的相互作用を介して消化管機能（内容物の消化管内移動速度、栄養素の消化、吸収など）の調節、消化管腔内の内部環境（pH、水分量、腸内細菌叢）の調節などに影響を与えることにより効果を示すと考えられている。特に、水可溶性の難消化性の多糖やオリゴ糖には大腸内で微生物の栄養源になるものが多い。

難消化性の糖が大腸において腸内細菌により利用された場合、主に二酸化炭素、メタン、水素などのガスと酢酸、プロピオン酸、 n -酪酸などの短鎖脂肪酸に代謝される。最近、短鎖脂肪酸はpHを低下させるなど大腸内の環境を変化させるだけでなく、大腸における水、ミネラルの吸収、大腸の運動、小腸および大腸の上皮細胞の増殖、さらに膵外分泌、脂質代謝への影響など、さまざまな生体の機能を変化させる生理的な刺激物質としての機能があることが認められている。難消化性の糖の多彩な生理作用の一部は、大腸内で産生される短鎖脂肪酸の生理的な作用である可能性がある。

一方、難消化性の多糖（特に水溶性の多糖）やオリゴ糖をラットの食餌に加えると、発酵部位である盲腸、結腸が大きくなることは多くの研究者が観察している現象である。しかし、この現象の発現機構および生体にとっての意義は現在のところ明らかになっていない。そして、大きくなった盲腸や結腸に、しばしばアトニー（弛緩症）が観察される。このことは、これらの糖の生理作用の有用性ばかりが賛美されている中で、生体に対するネガティブな作用として検討されなければなら

ない問題のあることを示している。消化管内発酵の場である大腸内の環境変化や大腸の形態的、機能的変化の発現機構を明らかにすることは、整腸作用、腸内腐敗物生産抑制、あるいはミネラルの吸収におよぼす影響など難消化性の糖の多彩な生理的作用機構の実体を明らかにするために重要な課題の1つである。

本研究はラットを用いて、数種の難消化性の多糖およびオリゴ糖について、これらの糖の消化管サイズおよび機能に与える影響を検討することを目標として行われた。この研究の過程で大腸内での発酵産物、特に短鎖脂肪酸をはじめとする有機酸が、難消化性の糖の作用機構を説明する上で重要な位置を占めることを明らかにすることができた。

第1章 オリゴ糖および非デンプン性多糖の消化性と大腸内発酵性

小腸での消化、吸収を免れた糖、いわゆる難消化性の糖は、大腸において腸内細菌によって、二酸化炭素、メタン、水素などのガス、酢酸、プロピオン酸、酪酸のような短鎖脂肪酸をはじめとする有機酸および細菌の菌体成分に代謝される。そこで、本章では、2種のヘテロオリゴ糖と数種の非デンプン性多糖について、それらが難消化性の糖であるか否か、大腸内微生物発酵の基質として利用され得る糖であるか否かを検討した。

第1節 オリゴ糖および非デンプン性多糖の人工消化試験 (*in vitro*)

糖の消化試験はヒトの消化過程を想定した条件 (Table 1) で行った。即ち、唾液 α -アミラーゼによる加水分解、人工胃液 (HCl-KCl 緩衝液) による酸加水分解、膵液 α -アミラーゼによる加水分解および小腸粘膜局在酵素による加水分解の4ステップである。

(1) オリゴ糖の消化性

消化性オリゴ糖であるシュクロースと同じくアルドースとフルクトースが α, β -1,2結合した2種のヘテロオリゴ糖の消化性を検討した。試料として用いたガラクトシルシュクロースはフルクトース転移酵素作用によってシュクロースからラクトースにフルクトースを転移して生成した三糖類である。同様に、キシロシルフルクトシドはシュクロースからキシロースにフルクトースを転移して生成した二糖類である。

Table 1 Digestive conditions of saccharides in vitro

Digestive origin	Substrate	Buffer condition (%)	Dasage* (U/g)	Temperature (°C)
Human saliva α -amylase (SIGMA TYPE IX-A)	9.0	45 mM Na-Maleate 0.9 mM CaCl ₂ (pH 6.0)	80	37
Artificial gastric juice	1.5	16.7 mM HCl-KCl (pH 1.0~2.2)		37
Porcine pancreas α -amylase (boehringer mannheim)	0.9	45 mM Na-Maleate 0.9 mM CaCl ₂ (pH 6.6)	200	37
Rat intestinal acetone powder (SIGMA)	0.9	45 mM Na-Maleate 0.9 mM CaCl ₂ (pH 6.6)	43	37

* The hydrolytic activity of one unit was reducing power of 1 μ mol glucose equivalent at 37 °C for 1min.

ガラクトシルシュクロースとキシロシルフルクトシドは唾液および唾液 α -アミラーゼによって消化されなかった。一方、人工胃液 (pH 1.0~2.2 の HCl-KCl 緩衝液) では約 2~4% が加水分解され、小腸粘膜酵素によって約 15% が消化された。このことから、摂取したガラクトシルシュクロースとキシロシルフルクトシドの約 80% が大腸に達すると推測され、これらは難消化性のオリゴ糖であることを確認した。

(2) 非デンプン性多糖の消化性

非デンプン性多糖の試料として、①天然素材から単離した多糖としてグルコマンナンおよびグァーガム、②シュクロースを基質に糖転移酵素の作用によりフルクトース部分を重合させて生成したポリフラクタン、③減圧下加熱縮合でグルコースを重合し生成したポリデキストロース、④グァーガムを酵素により低分子化したグァーガム部分加水分解物、⑤イヌリンを酢酸で部分的に加水分解し低分子化したイヌリン分解物を用いた。

グルコマンナン、グァーガム、ポリフラクタンおよびポリデキストロースは口腔から小腸までの消化過程で消化されなかった。イヌリンの部分加水分解物は唾液、唾液 α -アミラーゼおよび小腸粘膜局在酵素によって消化されなかったが、人工胃液 (pH 1.0~2.2 の HCl-KCl 緩衝液) で部分的に加水分解された。このことから、グルコマンナン、グァーガム、ポリフラクタンおよびポリデキ

ストロースは難消化性の多糖であり、イヌリンの部分加水分解物は部分消化性の多糖であることを確認した。

第2節 オリゴ糖および非デンプン性多糖の大腸内発酵性 (*in vitro*)

前節で難消化性を確認したオリゴ糖および多糖の大部分は、小腸で消化、吸収されず、大腸に達するものと推測した。そこで、これらの大腸内発酵における基質としての利用性をグルコースおよびシュクロースを対照にバッチ培養法で検討した。発酵基質としての利用性は、主たる代謝産物である短鎖脂肪酸をはじめとする有機酸の生成量を測定することによって評価した。

大腸内微生物として、ブタの盲腸内容物由来の洗浄菌体を用いた。二酸化炭素ガスで飽和させた重炭酸緩衝液中でそれぞれの糖を基質として、37℃で24時間静置培養し、経時的に有機酸生成量を測定した。

その結果、実験に供した全て糖は大腸内発酵の基質として利用され、酢酸、プロピオン酸およびn-酪酸を主体とする有機酸が速やかに生成した。それぞれの基質から生成した有機酸量 (g/g 糖質) は24時間の培養で、グルコース 0.63、シュクロース 0.67、ガラクトシルシュクロース 0.59、キシロシルフルクトシド 0.62、グルコマンナン 0.59、グアーガム 0.43、グアーガム部分加水分解物 0.59 およびポリデキストロース 0.30 であった (Fig. 1)。

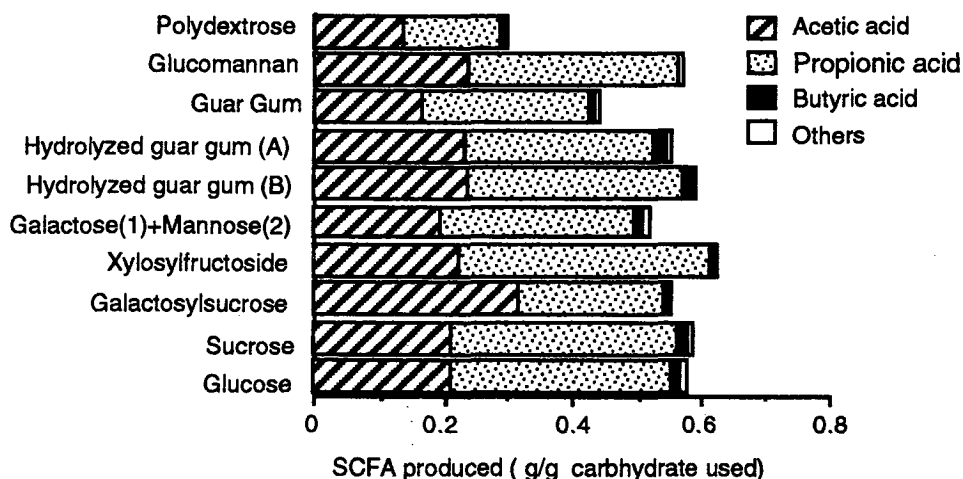


Fig. 1 Effect of a various carbohydrates on production of short-chain fatty acid (SCFA) from these carbohydrates in batch cultures using pig cecal bacteria of incubation for 24 h.

第3節 ラットにおける難消化性糖類のみかけの消化吸収率 (*in vivo*)

上記の実験において、実験に供した糖が難消化性であること、大腸に達した糖の半分以上が大腸発酵の基質として利用され、酢酸、プロピオン酸およびn-酪酸のような短鎖脂肪酸に変換されることを生体外のモデル実験で確認した。そこで、本節では、ポリデキストロース、ポリフラクタンおよびイヌリン部分分解物溶液をラットに経口投与して、これらの糖の投与後3日間の糞中排泄量、および3日後の消化管内残存量を測定して、みかけの消化吸収率を求めた。

その結果、ポリデキストロース、ポリフラクタンおよびイヌリン部分加水分解物のみかけの消化吸収率はそれぞれ、約75%、86%、98%であった。なお、ポリデキストロースは消化管内移動速度が遅く、3日目の盲腸に約5%が残存していた。

第2章 ラットの消化管サイズに及ぼす難消化性糖類の影響

難消化性の糖の摂取によって、消化管が形態的变化を示すことはよく知られている。特に、難消化性で腸内細菌による消化を受けやすい多糖やオリゴ糖では盲腸や結腸が大きくなる。この現象の発現機構については、盲腸や結腸に流入した未消化物の組成や物理・化学的性状と密接な関係があると考えられるが、現在のところ不明確なところが多い。そこで、難消化性の糖摂取によって消化管サイズが変化する発現機構を知る一環として、第1節では水不溶性多糖と水可溶性多糖、および高粘性ゾル形成多糖と低粘性多糖について、さらに第2節では、構成糖ならびに結合様式が同一で重合度の異なる多糖について、第3節では同じ結合様式で構成糖が異なるオリゴ糖について、それぞれ物理・化学的性状による影響の差異を比較検討した。

第1節 水不溶性多糖類と水可溶性多糖類、および高粘性ゾル形成多糖類と低粘性多糖類の比較

水不溶性多糖類としてセルロース、水可溶性で低粘性の多糖類としてポリデキストロース、ポリフラクタンおよびイヌリン部分加水分解物、水可溶性で高粘性のゾルを形成する多糖類としてグルコマンナンを各5%食餌に加え21日間飼育した。

その結果、ポリデキストロース、ポリフラクタンおよびイヌリン部分分解物のような低粘性の難

消化性で水可溶性多糖類は、ラットの盲腸のサイズを変え、高粘性のグルコマンナンは盲腸だけではなく、小腸の重量も増大させることが分かった。一方、セルロースのような水不溶性の多糖類はこのような作用のないことが分かった。ここで注目すべき現象は、盲腸内容物重量を増加させるものは盲腸の組織重量に著明な変化を示すということである。

次いで、ラットの盲腸の内容物および組織重量を顕著に増大させたポリデキストロースとグルコマンナンを選び、これらの糖摂取による盲腸サイズおよび内容物の変化を経日的に観察した。

その結果、ポリデキストロース群とグルコマンナン群は実験食飼育開始から7日目まで、盲腸組織重量が直線的に増加（約1.6倍）し、28日目までこれを維持した（Fig. 2）。しかし、内容物の変化は両群で異なった。すなわち、グルコマンナン群では28日間に内容物重量が約3倍、有機酸濃度が2～3倍に増加した。一方、ポリデキストロース群では組織の増加が7日で止まっているのに、内容物が28日間で約6倍まで増加し続けた。このような組織重量の増加率以上の極度の内容物重量の増加は盲腸壁が薄く伸びたことを意味する。なお、ポリデキストロース群の盲腸内容物有機酸濃度はグルコマンナン群とは逆に減少した。

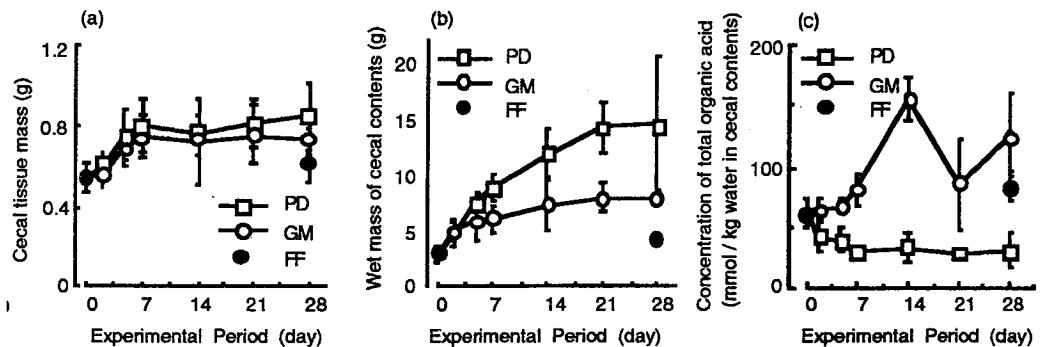


Fig. 2 Changes in (a) the mass of cecal tissue, (b) of cecal contents and (c) the concentration of total organic acid.

Results are means \pm SD for 5-7 rats per group. Data were analysed by two-way ANOVA examining the effects of diet and experimental period.

(a) Effects were significant for diet ($p < 0.05$) and experimental period ($p < 0.001$) but not for their interaction.

(b) Effects were significant for diet ($p < 0.001$) and experimental period ($p < 0.001$) and their interaction ($p < 0.01$).

(c) Effects were significant for diet ($p < 0.001$) and experimental period ($p < 0.001$) and their interaction ($p < 0.001$).

Group abbrevia used: PD, polydextrose group; GM, glucosaccharin group; FF, fiber-free group.

第2節 同一の構成糖ならびに結合様式からなる重合度の異なる多糖類の
ラット消化管サイズおよび盲腸内環境変化におよぼす影響

本節ではグァーガム（高粘性ゾル形成多糖類）とグァーガムを酵素によって部分的に加水分解したグァーガム部分加水分解物（低粘性多糖類）をラットに投与して、前節までと同様に、これらの多糖類が消化管のサイズにおよぼす影響を比較検討した。

その結果、無繊維群に比べて、グァーガム群では小腸と盲腸の組織重量が増大したのに対して、グァーガム部分加水分解物群では盲腸の他に結腸+直腸の組織重量も増大した (Fig. 3)。盲腸の内容物量はグァーガム群もグァーガム部分加水分解物群も無繊維群の2.5~3倍に増大した。盲腸内容物の水分量も増加した。盲腸の内容物量の対数に対する組織重量の対数の比（相対成長^{※1}）はグァーガム群で0.64、グァーガム部分加水分解物群で0.84であった。このことは、グァーガム群では盲腸の内容物が増しても盲腸壁の厚さが変わらず、一方、グァーガム部分加水分解物群では盲腸壁が厚くなっていることを意味する。

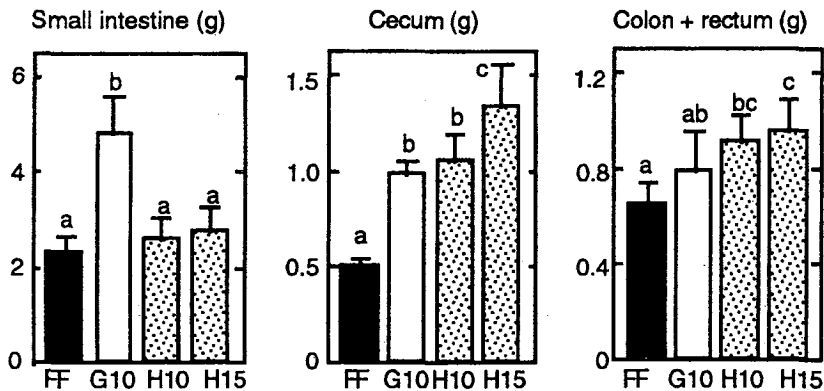


Fig. 3 Effect of guar gum and enzymatically hydrolyzed guar gum on tissue mass of digestive tract in rats. Results are mean \pm SD (n=6-7). Columns with different index letters differed significantly ($p < 0.05$) by Tukey's honestly significant difference multiple comparisons test. Group abbreviations used: FF, Fiber-free group; G10, 10% guar gum group; H10, 15% enzymatically guar gum group; 15H, 15% guar gum group.

^{※1}相対成長について：盲腸組織重量の変化は面積の変化と仮定すると2乗の変化と考えられる。一方、内容物は体積の変化と仮定すると3乗の変化である。従って、面積と体積が等調の変化であるならば、それぞれの対数の比は2/3、すなわち、0.67となると仮定できる。盲腸組織重量の対数/内容物重量の対数比の絶対数が0.67以上であれば、盲腸組織の厚さが増し、それ以下であれば、薄くなっていると推測される。

さらに、内容物を分析した結果、グアーガム群およびグアーガム部分加水分解物群の盲腸内容物のpHは無繊維群よりも低く、有機酸濃度が高かった。また、グアーガム群の盲腸内容物の有機酸はコハク酸濃度が高く、グアーガム部分加水分解物群ではL-乳酸濃度が高いことが特徴的であった（Fig. 4）。盲腸内容物の水素イオン濃度と総有機酸の酸当量濃度の間に正の相関があり（ $r^2=0.880$ 、 $P<0.001$ ）、グアーガム群ではコハク酸が、グアーガム部分加水分解物群ではL-乳酸濃度の増加が盲腸内容物のpHの低下に強く貢献していることが示唆された。

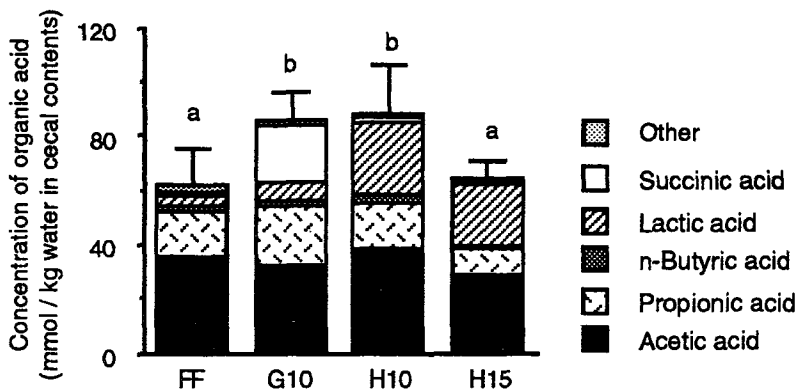


Fig. 4 Effect of guar gum and enzymatically hydrolyzed guar gum on cecal concentration of organic acid. Results for cecal concentration of total organic acid are mean \pm SD (n=6-7). Columns with different index letters differed significantly ($p<0.05$) by Tukey's honestly significant difference multiple comparisons test. Group abbreviations used: FF, fiber-free group; G10, 10% guar gum group; H10, 10% enzymatically hydrolyzed guar gum group; H15, 15% enzymatically hydrolyzed guar gum group.

第3節 同一結合様式からなる構成糖の異なるオリゴ糖のラットの消化管サイズおよび盲腸内環境変化におよぼす影響

ガラクトシルシュクロースはラクトースとフルクトース、キシロシルフルクトシドはキシロースとフルクトースからなるシュクロースと同じアルドシルフルクトシドである。これらの構成糖の異なるオリゴ糖がラットの消化管サイズおよび盲腸内環境変化におよぼす影響を消化性オリゴ糖のシュクロースと比較検討した。

その結果、ガラクトシルシクロース群では盲腸重量が、また、キシロシルフルクトシド群では小腸および大腸（盲腸、結腸+直腸）の重量が無繊維群に比べて増大した。特に、キシロシルフルクトシド群の盲腸の変化が著しく、組織重量は無繊維群の約2倍、内容物重量は約2.7倍、内容物の水分は約3.1倍に増大（Fig. 5）した。

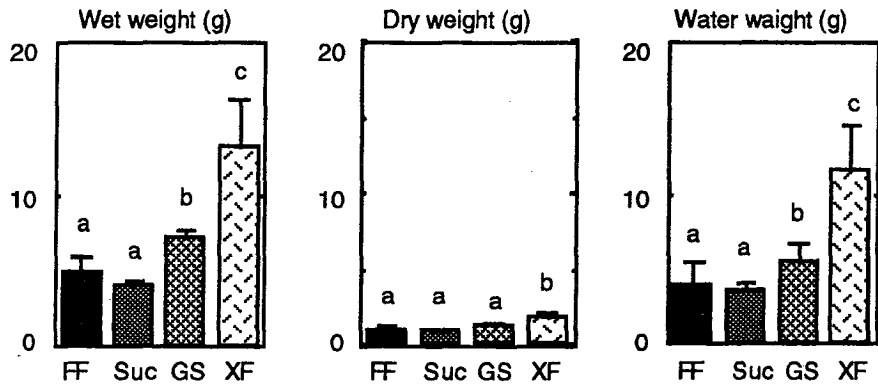


Fig. 5 Effect of galactosylsucrose and xylosylfructoside on wet mass, dry mass and water mass of cecal contents in rats.

Results are mean \pm SD (n=6~7). Columns with different index letters differed significantly ($p < 0.05$) by Tukey's honestly significant difference multiple comparisons test.

Group abbreviations used: FF, Fiber-free group; Suc, sucrose group; GS, galactosylsucrose group; XF, xylosylfructoside group.

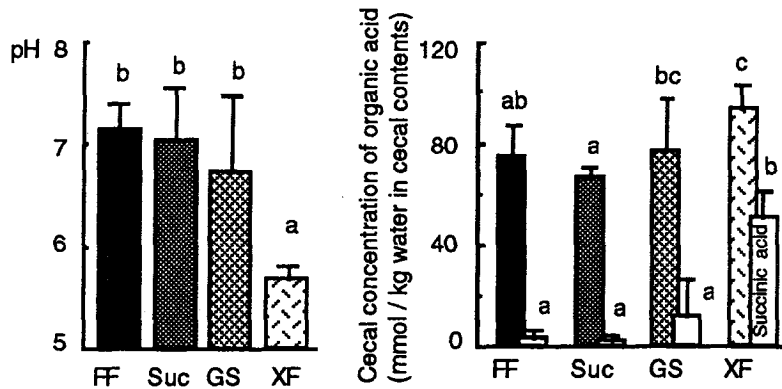


Fig. 6 Effect of galactosylsucrose and xylosylfructoside on cecal pH and cecal concentration of total organic acid and succinic acid in rats.

Results are mean \pm SD (n=6~7). Columns with different index letters differed significantly ($p < 0.05$) by Tukey's honestly significant difference multiple comparisons test.

Group abbreviations used: FF, Fiber-free group; Suc, sucrose group; GS, galactosylsucrose group; XF, xylosylfructoside group.

さらに、この内容物のpHが著しく低く（pH 5.5～5.9）、総有機酸濃度の約半分を占める高濃度のコハク酸が検出された（Fig. 6）。尚、シュクロース群の消化管各部の重量、盲腸内容物重量および内容物のpH、有機酸濃度は無繊維群と差がなかった。このような盲腸重量の変化と盲腸内の環境との関連を検討し、以下の結果を得た。

盲腸内容物の水素イオン濃度と総有機酸の酸当量濃度との間には正の相関があり（ $r^2=0.823$ 、 $P<0.0001$ ）、コハク酸が盲腸内容物のpHの低下に強く関与していることが示唆された。前節の結果とこのことから、コハク酸、乳酸などのような短鎖脂肪酸以外の有機酸濃度の増加が盲腸内容物のpHを低くする作用の主役をなしていることが明らかとなった。また、盲腸の内容物量と水素イオン濃度（ $r^2=0.832$ 、 $P<0.001$ ）、ならびにコハク酸濃度との間（ $r^2=0.782$ 、 $P<0.001$ ）にも正の相関があった。さらに、盲腸の組織重量と有機酸濃度との間にも正の相関（ $r^2=0.605$ 、 $P<0.001$ ）があり、多重回帰分析を行った結果、盲腸の組織重量の増大にコハク酸の影響があることが示唆された。

第3章 ラット消化管サイズおよび機能に及ぼす難消化性糖類 の影響の発現機構の検討

第2章で、水可溶性で難消化性の糖の摂取はラットの消化管のサイズを変化させ、特に盲腸の重量を増大させることを示した。この現象は、小腸での消化、吸収を免れた糖が大腸に達し、腸内細菌の発酵基質となって産生された有機酸の組成、あるいは濃度と深い関わりがあることを示した。特に、盲腸の組織および内容物の増大ならびにpHの低下にコハク酸の関与が示唆された。また、これまでの実験において、難消化性の糖摂取によって大きくなった盲腸は、肉眼的にアトニー（弛緩症）が観察された。このような症状は、難消化性の糖によるサイズの変化のみならず大腸の機能低下を予測させる。そこで、消化管サイズおよび機能におよぼす影響を、難消化性の糖溶液、または腸内細菌による主たる代謝産物である有機酸溶液を盲腸内に直接投与する方法を用いて、その作用機構を検討することにした。本章では、小腸の末端部分をつなぎかえて、体外から直接盲腸内に試験糖溶液を投与できるように手術を施したラット（回腸瘻孔ラット）を用いた。

第1節 消化管サイズおよび盲腸の運動におよぼすグァーガム部分加水分解物、ポリデキストロースおよびキシロシルフルクトシドの盲腸直接内投与の影響

これまでの成績のなかで、特に興味深い3種類の糖、すなわち、グァーガム部分加水分解物、ポリデキストロースおよびキシロシルフルクトシドについて、これらの糖を非経口的に、小腸を介さないでラットの盲腸に直接投与した場合の盲腸内環境変化と消化管各部位のサイズ変化を検討した。さらに、消化管の機能評価の一環として、特に影響の著しい盲腸について、その腸管運動性を検討した。

(1) 消化管サイズおよび盲腸内環境の変化

無繊維食で飼育し、餌由来の発酵基質を少なくして短鎖脂肪酸の産生を抑制しておいた回腸瘻孔ラットの盲腸内にグァーガム部分加水分解物、ポリデキストロースおよびキシロシルフルクトシドの10%溶液を1日3回(1:00、9:00、17:00)、毎回3mlづつ、30日間投与した。対照群の回腸瘻孔ラットには毎回疑似投与のみで、溶液を注入しなかった。

その結果、盲腸組織重量は糖溶液投与群で対照群のそれぞれ約2倍となった。盲腸内容量はグァーガム部分加水分解物群とポリデキストロース群では対照群の約2.7倍、キシロシルフルクトシド群では約1.4倍に増大し、それぞれ内容物のpHも低かった。グァーガム部分加水分解物群とキシロシルフルクトシド群の盲腸内容物有機酸濃度は高く、高濃度のL-乳酸とコハク酸が検出された。この有機酸濃度は、第2章での経口投与した場合よりもさらに高濃度であった。そしてグァーガム部分加水分解物を経口投与した場合、乳酸発酵が主であったが、本実験ではコハク酸が主となった。この組織重量の増大にコハク酸とn-酪酸の影響が示唆された。一方、ポリデキストロース群では、第2章の結果と同様に、有機酸濃度が低かった。

この実験は、1日3回という間欠的な糖投与であり、連続的に盲腸に難消化性の糖が流入する経口投与の場合と大きく条件が異なる。しかし、経口投与の場合と同様に、盲腸組織重量の増大に有機酸の関与が示されたことから、難消化性糖類の消化管サイズ(特に盲腸および結腸+直腸)におよぼす影響は、これらの糖が盲腸内発酵の基質として、盲腸に流入して有機酸が生成されることで発現することが明らかとなった。

(2) 盲腸の運動におよぼす影響

実験に先立ち、盲腸の運動性の評価方法を検討した。本研究では、回腸瘻孔ラットを用いて、消化管を体外に取り出すことなく、生体位 (in vivo) で盲腸の運動性評価を試みた。血圧トランスデュースーを用いた圧変動測定を応用して測定した盲腸の内圧変動を盲腸の収縮とした。実験は、上述の実験で試験糖溶液を投与してから3週間目のラットを用いた。運動性は単位時間あたりの平均圧変動幅 (cm H₂O)、運動率 (収縮期の割合)、運動係数 (変動幅×運動率) を求め評価した。

その結果、それぞれの群の運動係数は対照群>キシロシルフルクトシド群>グァーガム部分加水分解物群、ポリデキストロース群の順であった。糖投与群の運動係数の低値は、運動率の低下によるものであった。これは、これまで肉眼的に観察した盲腸のアトニーを裏付けるものと考えられる。

第2節 消化管サイズおよび盲腸の運動におよぼす有機酸盲腸内直接投与の影響

難消化性の糖による消化管サイズおよび運動性への影響は、大腸でこれらの糖が基質となって産生される有機酸が重要な要因になっている可能性が示唆された。そこで、この有機酸の作用を更に解明するために、回腸瘻孔ラットに有機酸を盲腸内に直接投与することによって、消化管のサイズおよび運動性におよぼす影響を検討した。

本研究において、消化管とくに盲腸のサイズおよび環境変化が顕著であったラットの盲腸内容物はコハク酸濃度が高く (50~100 mmol/kg 盲腸内容物の水)、pHが低い (pH 5.5~6) ことが特徴であった。コハク酸に消化管サイズおよび消化管運動に影響をおよぼす作用があると仮定すると、その作用機構として以下の3点が考えられる。1) 盲腸内のpHを低下させ、2) pHを低下させることによって、短鎖脂肪酸の吸収を促進し、短鎖脂肪酸の消化管上皮細胞増殖促進作用を増強する。あるいは3) コハク酸自体に生理作用がある。これらの推測のもとにTable 2に示した8種類の試験溶液投与群を設け、短鎖脂肪酸、コハク酸、pHを要因とする3元配置分析 (2×2×2) を行った。

(1) 消化管サイズにおよぼす影響

高浸透圧溶液の大腸内投与は水の分泌や粘液の分泌を促進することが知られている。そこで、盲腸内の生理的浸透モル濃度の範囲 (300~360 mosmol/kg水) 以内に各試験溶液を調製して (表2; 実験1)、1日2回 (9:00、20:00)、毎回3mlを36日間、盲腸内に投与した。

Table 2 Composition of infused solution via the ileal fistula.

Group	pH	SCFA mix.*	Succinic	NaHCO ₃	NaOH	HCl	NaCl	Osmolar	
<Experiment 1>		(mmol/L)						(mosmol/L)	
1	7.0	90	50	10	180	0	0	340	
2	7.0	90	0	10	85	0	72.5	340	
3	7.0	0	50	10	92	0	89	340	
4	7.0	0	0	10	0	0.8	159.6	340	
5	5.5	90	50	10	143	0	18.5	340	
6	5.5	90	0	10	68	0	81	340	
7	5.5	0	50	10	68	0	101	340	
8	5.5	0	0	10	0	8.5	155.8	340	
<Experiment 2>		(mmol/L)						(mosmol/L)	
1	7.0	180	90	5	354	0	0	634	
2	7.0	180	0	5	179	0	132.5	634	
3	7.0	0	90	5	214	0	294	634	
4	7.0	0	0	5	0	0.5	311.75	634	
5	5.5	180	90	5	294.4	0	29.8	634	
6	5.5	180	0	5	151	0	146.5	634	
7	5.5	0	90	5	140	0	197	634	
8	5.5	0	0	5	0	4.3	310	634	

*SCFA mixture (mmol/L); <Exp.1> acetic acid 50, propionic acid 10, n-butyric 30
<Exp.2> acetic acid 100, propionic acid 20, n-butyric 60.

その結果、pH 7の試験溶液群の盲腸組織重量は短鎖脂肪酸の投与によって増大した。しかし、pH 5.5の試験溶液群の盲腸組織重量は短鎖脂肪酸、コハク酸のいずれの要因によっても影響されなかった。一方、内容物の重量は、pHに関わりなく、コハク酸の投与によって増大した。しかし、盲腸組織および内容物の増加量は、経口的に難消化性の糖を摂取した場合に比べて、わずかなものであった。

次いで、この条件をできるだけ連続的条件に近づけるため、試験溶液の酸濃度、および投与回数を増やし、1日あたりの酸投与量を3倍にして検討した。試験溶液(表2;実験2)を1日3回(1:00、9:00、17:00)、毎回3mlを20日間投与した。

その結果、短鎖脂肪酸の存在、pHのいずれの要因に関わらず、コハク酸投与によって盲腸の組織重量が増大した(Fig. 7)。

有機酸を間欠的に投与するこの実験条件は、大腸内で有機酸の産生が連続的に行われる条件と大きく異なる。しかし、投与量および投与回数を増やすことで、pHとは独立的にコハク酸の影響が

確認された。このことから、コハク酸の作用は単に水素イオンを増加させるだけではなく、コハク酸自体が盲腸のサイズの変化に作用する1つの要因となっていることが示唆された。

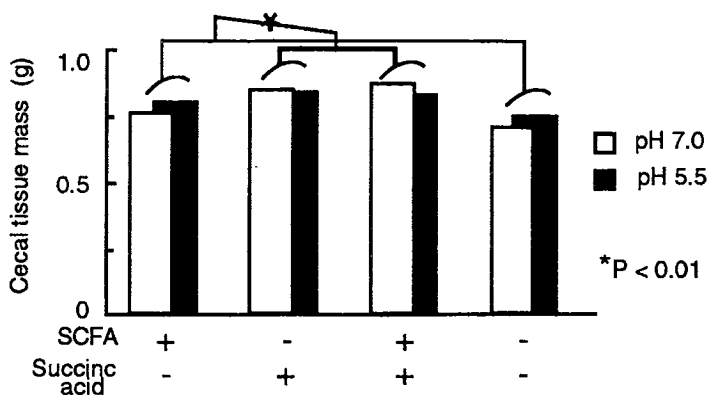


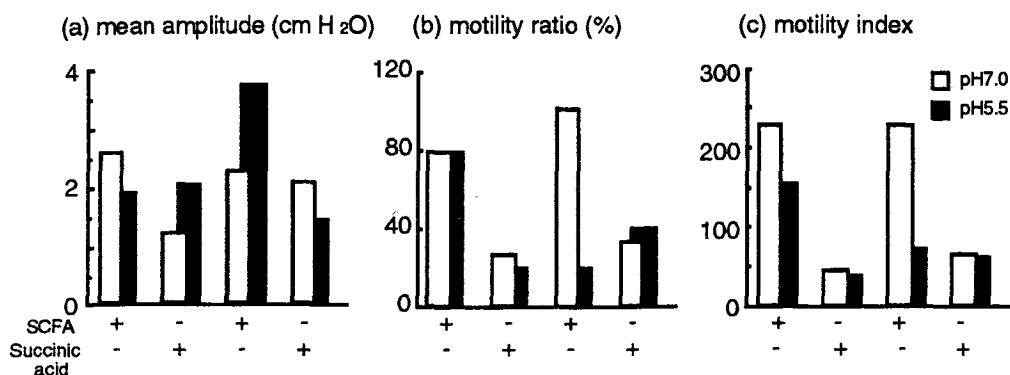
Fig.7 Effect of short chain fatty acids (SCFA), succinic acid and pH on the tissue mass of the cecum in rats fed fiber-free diet and infused thrice daily with experimental solution (was shown Table 2, Experiment 2) for 20 days. Effects were significant for succinic acid ($p < 0.001$) by 3-way analysis of variance, but not for SCFA and PH. The 3-way interaction (SCFA \times Succinic acid, SCFA \times pH, Succinic acid \times pH and SCFA \times Succinic acid \times pH) was not significant ($p > 0.05$).

(2) 盲腸の運動におよぼす影響

上述の実験1のラットを用いて、試験液投与の3～4週間目にかけて、盲腸の運動を測定した。

その結果、短鎖脂肪酸を含まない溶液の投与では平均圧変動幅、運動率が低下し、この影響は投与溶液のpHを5.5にすることによって、さらに増強された。また、短鎖脂肪酸の有無に関わらず、コハク酸を含むpH5.5の条件の溶液投与で著しく運動性が低下した (Fig. 8)。

これらの結果から、キシロシルフルクトシドやグァーガムのような糖を摂取したラットの盲腸内の環境、すなわち、pHが低く、短鎖脂肪酸濃度が低く、そしてコハク酸濃度が高い環境は、著しく盲腸の運動を抑制する条件であることが明らかとなった。また、ポリデキストロースを摂取したラット盲腸の内容物のようにpHが低く、有機酸濃度が低い場合も盲腸の運動を抑制する環境であることが分かった。



ANOVA table of a 3-factor of variance

Factor	P value		
	mean amplitude	motility ratio	motility index
SCFA	0.0031	0.0001	0.0001
Succinic	NS	0.0045	NS
pH	NS	0.0138	0.0248
SCFA × Succinic	NS	NS	NS
SCFA × pH	NS	0.0193	0.0462
Succinic × pH	0.004	0.0055	NS
SCFA × Succinic × pH	NS	0.0435	NS

Fig. 8 Effect of short chain fatty acids (SCFA), succinic acid and pH on the cecal motility in rats fed fiber-free diet and infused thrice daily with experimental solution (was shown Table 2, experiment 2) for 21-28 days.

The mean amplitude of the contractions were recorded as changes in intraluminal pressure (cm H₂O) on the cecum. The motility ratio was indicated the ratio of the contraction periods. The motility index was indicated as mean amplitude × motility ratio.

第 4 章 総合的考察

本研究では、グルコマンナン、グァーガム、グァーガム部分加水分解物、ポリデキストロースおよびオリゴ糖 2 種（ガラクトシルシュクロースとキシロシルフルクトシド）などの水可溶性の糖を主な試料として、消化管のサイズおよび機能におよぼす難消化性糖類の影響について比較検討した。

生体への影響の検討に先立って、試料として用いた上記の糖が難消化性の糖であることを生体外のモデル実験において確認した。さらに、これらの糖は腸内細菌の代謝によってその半分以上が短鎖脂肪酸に変換される糖であることをバッチ培養法を用いて確認した。例外として、ポリデキストロースを発酵の基質とした場合の短鎖脂肪酸の生成量は他の糖の場合の約半分で、比較的発酵され

にくい糖であることが分かった（第1章）。

上述の難消化性で易発酵性の糖の摂取よって、特に、ラットにおいて主たる発酵の部位である盲腸の組織と内容物重量が増大した。このような盲腸のサイズの変化は難消化性の糖を摂取してから短期間（2～5日）で観察された（第2章）。

糖の種類によって程度は異なるが、大きくなった盲腸の内容物は水分が多く、pHが低く、コハク酸や乳酸のような有機酸の濃度が高かった。内容物のpHの低下にはコハク酸や乳酸の関与が示唆された。盲腸内で産生された酢酸、プロピオン酸およびn-酪酸のような短鎖脂肪酸の大部分は大腸の上皮細胞で吸収される。また、これらの酸には炭酸水素イオンの分泌を促進する作用が知られている。一方、コハク酸や乳酸の吸収機構は未知の部分が多いが、非常に吸収されにくい盲腸内に蓄積しやすい酸と考えられている。さらに、コハク酸や乳酸には炭酸水素イオンの分泌を促進する作用は知られていない。従って、コハク酸や乳酸の産生が高くなると大腸内のpH緩衝能が低下し、よりpHの低下を促進するものと推測される（第2章）。

盲腸の組織重量の増大にコハク酸の関与が示唆された。コハク酸の作用機構として、盲腸内のpHを低下させることによって、短鎖脂肪酸の吸収を促進し、短鎖脂肪酸の大腸上皮細胞の増殖促進効果を増長している可能性とコハク酸自体に盲腸組織のサイズを変化させる生理作用がある可能性、の2点が推測された。そこで、コハク酸を直接盲腸に投与してその作用機構を検討した結果、水素イオン濃度の増加によってではなく、コハク酸自体に盲腸のサイズを変化させる作用があることが明らかとなった（第3章）。

また、pHが低く、短鎖脂肪酸濃度が低く、そしてコハク酸濃度が高い盲腸内の環境は盲腸の運動を抑制する条件であることが推測された。盲腸の運動性の低下は、盲腸から内容物の流出を遅らせる可能性があり、盲腸内容物を増大させる作用機構の1つと考えられた（第3章）。

この作用機構で説明できない糖として、ポリデキストロースがある。この糖も盲腸の組織および内容物重量を増大させたが、他の試験糖にくらべて盲腸の組織重量に対する内容物重量が大きく、盲腸壁が薄く伸びた状態が観察された（第2章）。この内容物は有機酸濃度が低く、内容物の有機酸濃度が低いにも関わらずpHが低かった。pHの低下は、ポリデキストロースの重合末端にクエン酸が結合しているため、ポリデキストロースそのものが水素イオンを解離している可能性が推測された。また、ポリデキストロースは腸内細菌による発酵速度が遅いため（第1章2節）、未分解のポ

リデキストロースが多量に盲腸内に残り（第1章3節）、結果として盲腸内の短鎖脂肪酸の濃度が希釈されたと考えられる。そして、短鎖脂肪酸の濃度が低いため、盲腸の運動が低下し（第3章1節、2節）、盲腸内容物の滞留時間が長くなった（第1章3節）ための現象と説明することができる。

以上のことから、消化管サイズおよび機能におよぼす難消化性の糖の影響は、糖が大腸内の細菌によって代謝されて産生された有機酸を介して発現することが確認された。そして、ポリデキストロースのように大腸内の細菌によって比較的利用されにくい糖と、速やかに分解、代謝されるその他の水溶性の糖とでは発現機構が異なることを明らかにした。特に、本研究ではコハク酸が、消化管のサイズおよび機能におよぼす難消化性糖類の作用機構の一要因であることを明らかにした。

生体にとってこのような消化管のサイズの変化がどのような意義を持つものかは明らかではない。しかし、盲腸内で短鎖脂肪酸の産生量が少ない食事形態はもちろんのこと、盲腸内発酵がコハク酸発酵にシフトするような難消化性の糖の大量摂取は著しく大腸内のpHを低下させることになり、盲腸（ヒトでは近位結腸に相当する）の運動性を低下させる。また、他の大腸の機能を低下させる可能性もあり、生体にとってネガティブな作用もあわせ持つということを認識する必要がある。

要 約

本研究では、ラットの消化管のサイズおよび機能に及ぼす難消化性で易発酵性の糖の影響を検討し、以下の知見を得た。

消化と発酵

- 1) グルコマンナン、グァーガム、グァーガム部分加水分解物、ポリデキストロース、ガラクトシルシュクロースおよびキシロシルフルクトシドは難消化性で発酵性の糖であることを確認した。
- 2) それぞれの糖の半分以上が大腸内の細菌によって、短鎖脂肪酸に変換された。

消化管サイズ

- 3) 水溶性で易発酵性の難消化性糖はラットの盲腸のサイズを大きくした。
- 4) グルコマンナン、グァーガム、グァーガム部分加水分解物、ガラクトシルシュクロースおよびキシロシルフルクトシドは盲腸の組織および内容物重量を増大させた。

5) グルコマンナンおよびグァーガムのような高粘性の多糖は、盲腸の他に小腸の組織重量も増大した。

6) ポリデキストロースは盲腸の内容物量を著しく増大し、盲腸の組織を薄く引き伸ばした。

盲腸と大腸内発酵産物

7) 盲腸で産生される有機酸の組成および量は糖構成、重合度さらに盲腸への流入速度（投与方法）によって異なった。

8) 盲腸内の pH は、コハク酸や乳酸のような短鎖脂肪酸以外の有機酸の産生によって低下した。

9) コハク酸には盲腸の組織重量を増大させる作用があることを明らかにした。

盲腸の運動性

10) ポリデキストロース、グァーガム部分加水分解物、およびキシロシルフルクトシドは盲腸の運動を低下させた。

11) 短鎖脂肪酸を含まない溶液の盲腸内投与は平均圧変動幅、運動率を低下させた。この影響は投与溶液の pH を 5.5 にすることによって、さらに増強された。

12) 短鎖脂肪酸の有無に関わらず、コハク酸を含む pH 5.5 の条件の溶液の盲腸内投与は著しく盲腸の運動率を低下させた。

以上の結果より、ラットの消化管のサイズおよび機能におよぼす難消化性の糖の影響は、糖が盲腸内で代謝され、有機酸が産生されることによって発現し、産生された有機酸の種類や量によって修飾されることが示唆された。

論文審査の要旨

本論文は、各種の難消化性糖類のラット消化管のサイズと機能におよぼす影響を、大腸内における糖類の発酵性、発酵によって生成する短鎖脂肪酸、有機酸の種類と量、pH変化などにより解析し、以下のように取りまとめたものである。

I. 難消化性糖類の消化性と大腸内発酵性を *in vitro* の実験で検討し、グルコマンナン (GM)、グアーガ (G)、グアーガム部分加水分解物 (H)、ポリデキストロール (PD)、ガラクトシルシュクロース (GS)、キシロシルフルクトシド (XF) は難消化性で、易発酵性の糖であることを確認し、さらに、それぞれの糖の半量以上が大腸内細菌によって短鎖脂肪酸に変換されることを認めた。

II. 消化管サイズ特に、盲腸の組織および内容物重量におよぼす難消化性糖類の影響を検討し、次のように分類できることを示した。①水可溶性の糖はラットの盲腸サイズを増大させること。②盲腸の組織および内容物重量の両者を増大させる糖は、GM、G、H、GS、XFであったこと。③盲腸と共に小腸の組織重量も増大させるものは、GM、Gのような粘性の高い糖であったこと。④盲腸の内容物量が著しく増大し、組織重量の増大が比較的少ない糖は PD で、この場合、盲腸組織は薄く引き伸ばされた形態を示したこと。

III. 盲腸内および大腸内発酵生成物を糖の種類別に詳しく分析し、盲腸サイズの増大との関連の要因を解析した。この場合、糖の投与は経口投与の他に、盲腸内への直接投与を行った。直接投与には、手術により作成したラット (回腸ろう瘻孔ラット) を用いた。その結果、糖構成や重合度などの違いにより、産生する有機酸の組成と量が異なること、コハク酸や乳酸のような有機酸が多い場合に pH が低下することを明らかにした。この知見をもとに、短鎖脂肪酸、各種有機酸、炭酸水素ナトリウムなどからなる各種 pH の試験溶液を調製し、回腸瘻孔ラットに直接投与し、コハク酸が盲腸組織重量の増大に強く関与していることを示した。

IV. 難消化性糖類による盲腸機能の変化を運動性の変動で観察し、盲腸サイズの増大との関連を明らかにした。この場合、種々の試験溶液を回腸瘻孔ラットに投与し、その内圧変動から盲腸の運動性を経時的に求め、短鎖脂肪酸が少なく、pH の低い溶液での盲腸運動は低下すること、さらに、短鎖脂肪酸の有無にかかわらず、コハク酸を含み、pH の低い溶液では盲腸の運動性が著しく低下することを観察した。

これらの知見から、ラットの消化管サイズおよび機能におよぼす難消化性糖類の影響として、糖が盲腸内で腸内細菌により代謝され、発酵により有機酸、特に、コハク酸が産生されることによって pH が低下し、短鎖脂肪酸の吸収が促進され、大腸上皮細胞の増殖、特に、盲腸組織重量の増大が起こることを明らかにした。

本研究は、難消化性糖類の多彩な生理作用の中で、特に、ネガティブな生理作用の実態を明らかにしたもので、栄養学の新しい研究分野にアプローチした新規性の高い労作である。本成果は今後広く植物繊維の研究とその応用に活用できるものである。よって、審査委員一同は博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。