

<b>氏名</b>	岩田 惠美子
<b>学位の種類</b>	博士(食物栄養学)
<b>学位記番号</b>	家博乙第8号
<b>学位授与の年月日</b>	平成25年9月23日
<b>学位授与の要件</b>	学位規則第4条第2項該当 家政学研究科 食物栄養学
<b>論文題目</b>	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
<b>論文審査委員</b>	主査 教授 山本 勇 副査 教授 瀬口 正晴 副査 教授 後藤 昌弘 副査 鳴門教育大学大学院 准教授 西川 和孝

## 論文内容の要旨

### <背景・目的>

腸内細菌叢は、宿主の健康と密接にかかわっているとされており、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はこのような微生物を増加させることを目的に摂取されている。しかし、胃酸や胆汁酸の影響により胃などの消化管上部では微生物の生存率が非常に低下し、腸管まで到達できる生菌数は大幅に減少する。一方でプレバイオティクスはほとんどが難吸収性の糖質や食物繊維であり、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、LAB や Bifidobacteria のような腸内細菌に利用される。そのため、プレバイオティクスの摂取がより効果的であると考え、腸管内に生息するこのような微生物を増殖させることができる新規プレバイオティクスを開拓するために、野菜や果物の未利用部位に含まれる食物繊維に着目し、その生理学的な影響についても合わせて検討を行った。

### <方法>

ヤマイモやサトイモの皮、エンドウのさやとソラマメのさやと種皮、温州みかんのアルベドから Prosky 法を用いて総食物繊維(Total dietary fiber:TDF)の抽出を行い、糖組成の分析を行った。これらの TDF を 0.5%含む PY 培地を作製し、*Bifidobacterium longum* JCM1217 株(JCM1217 株)と

*Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株(JCM 1254 株)を培養した。2 株共に増殖率が最も高かった温州みかんアルベド由来 TDF(アルベド TDF)を、飼料に 1%混合してラット(Wistar Hannover GALAS 雄性 4 週齢)に 4 週間摂取させた。その後、盲腸内細菌叢への影響や盲腸内短鎖脂肪酸(Short Chain Fatty Acid:SCFA)の測定、血清と肝臓および糞便中の脂質量と血糖値の測定を行った。次に、アルベド TDF に最も多く含まれるアラビノースに着目し、アルベド TDF と同様に飼料に混合してラットに摂取させた。

#### <結果>

JCM 1217 株と JCM 1254 株の増殖促進効果を調べた結果、温州みかんアルベド、ヤマイモの皮、エンドウのさや由来 TDF をそれぞれ添加した際、両株共に増殖促進効果が認められた。糖組成の分析の結果、両株共に最も増殖率の高かった温州みかんアルベド TDF(アルベド TDF)はアラビノースを多く含んでいた。

アルベド TDF を飼料に 1%混合し 4 週間ラットに摂取させた結果、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%であったが、アルベド TDF 群では 83%となった。さらに、コントロール群と比べて血清トリアシルグリセロール(TG)濃度が有意に低下し、ラット糞便中(解剖前 3 日間)の脂質含有率が有意に増加した。アルベドに含まれる水溶性食物繊維を添加して腓リパーゼ活性の測定を行った結果、80mg の添加で 0mg と比べて活性が約 50%阻害された。

L-アラビノースを飼料中に 1%混合してラットに摂取させた結果、コントロール群と比べて盲腸内容物、盲腸壁重量が有意に増加するとともに、盲腸内細菌叢中のビフィズス菌検出率が大幅に増加した。盲腸内容物中の SCFA では、酢酸やプロピオン酸が有意に増加し、吉草酸、カプロン酸が有意に減少した。そして盲腸内容物中のアンモニア量は有意に増加した。また、血清中コレステロール値は有意に低下した。

#### <結論>

野菜や果物の未利用部位から抽出した TDF にビフィズス菌増殖活性に差があることが明らかとなり、更に最も増殖効果の高かったアルベド TDF の摂取により盲腸内に存在するビフィズス菌の検出率が増加することが明らかとなった。アルベド TDF による血清 TG 濃度の低下は、アルベドに含まれる水溶性食物繊維が腓リパーゼ活性を阻害し、消化吸収されなかった脂質が糞便中に排泄されたことによると考えられた。また、アルベド TDF の構成糖の中で最も多いアラビノースの摂取により、盲腸内のビフィズス菌の菌数を有意に増殖させたことから、アルベド TDF に含まれる構成糖の中で、アラビノースがビフィズス菌増殖効果を有していることが明らかとなった。

今回、アルベド TDF にはビフィズス菌増殖効果と血清 TG 濃度低下効果があることが明らかとなった。このように野菜や果物の未利用部位に、新たな利用価値が存在したことから更なる利用の可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、農産物加工場などで廃棄されている野菜や果物の未利用部位に含まれている食物繊維のうち温州みかんのアルベド食物繊維に、人の健康に有益なビフィズス菌の増殖を促進するプレバイオティク効果を見出し、アルベド食物繊維の摂取がラットに及ぼす生理的な効果、及び、アルベド食物繊維の主要な構成糖であるL-アラビノースの摂取がラットの生理に及ぼす影響について5章にわたって述べたものである。

尚、本論文は、査読付き雑誌に掲載された次の論文の研究を中心にしてまとめられたものである。栄養学雑誌 65: 249-254 (2007)、J. Nutr. Sci. Vitaminol. 55: 385-388 (2009)、J. Nutr. Sci. Vitaminol. 58: 175-180 (2012)。

第1章では、本研究の背景や目的とその成果の可能性について説明している。腸内細菌叢は宿主の健康と密接に関わっているが、特に乳酸菌やビフィズス菌は種々の糖を分解して乳酸や酢酸を産生し腸内を弱酸性に保つことにより腐敗菌の増殖や病原菌の感染を抑制し、胆汁酸排泄促進効果や血液中のアンモニア濃度の低下効果を示し、さらに免疫増進を誘導するなど、様々な働きを有している。このように宿主の健康に有益な効果をもたらす特定の腸内細菌の増殖と代謝活動を選択的に促進させることのできる食物繊維をプレバイオティクスと定義し、その発見や開発の研究が進められていること。野菜や果物には種々の食物繊維が含まれているが、野菜や果物の食用とされない未利用部位は廃棄されており農産物加工場での廃棄物発生量は年間1.9万トン(平成22年度)あり、その中で6割以上が利用されずに処分されていること。このような背景に基づいて、野菜や果物の未利用部位の食物繊維に着目してプレバイオティク効果を見出し、その摂取による生理的な影響について明らかにすることを研究の目的としたこと、それが出来た場合には、廃棄物処分量を減少させる一助になることと併せて、農産物の利用に新しい方向を与えるなどの可能性が広がることなどを述べている。

第2章では、野菜や果物の未利用部位から prosky 法を用いて総食物繊維を抽出し、糖組成の分析を行い、続いて *Bifidobacterium longum* JCM 1217 株 (JCM1217 株) と *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 株 (JCM1254 株) の2菌種を用いて抽出された食物繊維のビフィズス菌増殖活性を調べている。

エンドウのさや、ソラマメのさやと種皮、ヤマイモとサトイモの皮、温州みかんのアルベドから抽出した総食物繊維の糖組成(中性糖)の分析では、キシロース含有率の高い試料が多かった。その中で、温州みかんアルベドにはL-アラビノースが最も多く、乾燥試料中に約40%含まれており、その次に含有率が高かったのはキシロースやガラクトース、グルコースでL-アラビノースの約半量であった。ビフィズス菌増殖活性を調べた結果、JCM1217株とJCM1254株

の増殖率(培養終了後菌数/培養開始時菌数)が共に最も高かったのは温州みかんアルベドであり、JCM 1217 株の増殖率は、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べて約 26 倍高く、JCM1254 株の増殖率は約 6.5 倍高かった。このようにして、温州みかんアルベド由来の総食物繊維にビフィズス菌増殖促進作用があることを見出すに至り、動物実験による食物繊維の機能に関する生理学的な検討に進んでいる。

第 3 章ではビフィズス菌の増殖率が最も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) を飼料に混合して摂取したときのラットに与える生理的な効果を検討している。アルベド TDF を 1%、セルロースと置き換えて飼料に混合してラット(Wistar Hannover GALAS) に摂取させた結果、アルベド TDF 群のラットでは血清トリグリセリド濃度が有意に低下すること、さらに、アルベド水溶性繊維(アルベド SDF)に膵リパーゼ阻害活性があることが明らかにされた。これらの原因は、糞便中の総脂質濃度(糞便湿重量中%)がアルベド TDF 群で有意に増加していたことから、飼料中の脂質が消化吸収されなかったことであると結論しているのは適切といえる。さらに、盲腸内細菌叢中のビフィズス菌がアルベド TDF を含まないコントロール群ではすべてのラットで検出限界以下であったのに対し、菌数と検出率がアルベド TDF 群で大幅に増加する結果となった。このことは、プレバイオティク効果として注目し得るものである。

第 4 章では温州みかんアルベドに含まれる糖の中で最も多く含まれていた L-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ている。純粋培養の細菌による糖の分解活性の有無はよく研究されているが、腸内細菌叢に与える糖の効果の研究は多くなく、L-アラビノースの腸内細菌層に与える影響に関する研究はこれまで無かった。

L-アラビノースを 1%、セルロースと置き換えて飼料に混合してラット(Wistar Hannover GALAS)に摂取させると、盲腸内細菌叢中のビフィズス菌が増加し、盲腸内短鎖脂肪酸の酢酸とプロピオン酸の濃度が有意に増加し、そして血清コレステロール濃度が有意に低下する結果が得られた。L-アラビノースが難吸収性の糖でスクラーゼ阻害活性を持つことから、ビフィズス菌の増加と盲腸内短鎖脂肪酸の酢酸とプロピオン酸濃度の有意な増加は、消化吸収を免れた飼料中のスクロースと吸収されなかった L-アラビノースがビフィズス菌を始めとする腸内細菌によって盲腸内で発酵されたためと考えられる。そして血中コレステロール濃度の有意な低下は、腸内細菌叢による糖の発酵で生成したプロピオン酸が盲腸で吸収され、肝臓でのコレステロール合成に阻害的に影響を与えたためと考えられる。

この研究は温州みかんアルベドの食物繊維の主要な構成糖が L-アラビノースであることから発想されているが、見出された効果は特定の糖の摂取によって起こる腸管の機能への糖の作用と腸内細菌叢による糖の代謝産物がもつ生理作用が合わさって現れたもので、糖の摂取の影響を特徴付けるものであり、価値ある研究といえる。

第5章では本研究の結論が述べられている。本研究は野菜や果物の未利用部位から抽出した総食物繊維（TDF：不溶性と水溶性食物繊維からなる）の摂取により腸内細菌叢にあたる影響とその生理的効果を明らかにし、さらにそのTDFに多く含まれていたL-アラビノースの摂取による腸内細菌叢に与える影響を調べたものである。エンドウのさや、ソラマメのさやと種皮、サトイモとヤマイモの皮、温州ミカンのアルベドから抽出されたTDFの中で、JCM 1217株とJCM1254株の2菌種ビフィズス菌増殖活性の高いものはアルベドからのTDFであった。

そのアルベドTDFを飼料に混合してラットに摂取させた結果、盲腸内細菌叢のビフィズス菌の菌数と検出率が大幅に増加し、さらに血清トリグリセリド濃度が有意に低下することが見出された。そして、アルベドTDFに多く含まれていたL-アラビノースを摂取したすべてのラットからビフィズス菌が検出され、さらに血清コレステロール濃度が有意に低下する結果を得た。

ビフィズス菌がアラビノシダーゼを有し、L-アラビノースを炭素源として増殖できることから、アルベドTDFからL-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考えられる。アルベドTDFの摂取による血清トリグリセリド濃度の低下はアルベドSDFの腓リパーゼ阻害活性によるものであることを示す結果を得ており、また、L-アラビノース摂取群のラット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合成阻害作用によるものと説明している。

本研究により、果物の未利用部位として大部分が廃棄されている温州みかんアルベドの総食物繊維にビフィズス菌増殖活性と腓リパーゼ活性の阻害作用による脂質の吸収抑制という2つの異なる生理活性があることが明らかにされた。このことは、これまでに大部分が廃棄されていた野菜・果物の非可食部位に新たな利用価値が存在することを示しており、さらなる利用に可能性を広げるものと言えそうである。

以上のように、本論文の目標である、野菜・果物の非可食部の食物繊維にプレバイオティク効果を見出し、その摂取による生理的な影響を明らかにすること、は十分に達成されていると考えられる。さらに、研究テーマの設定が学位に対して妥当なものであり、論文作成に当たっての問題意識と研究方法が明確に示されていること、ラットを用いる実験で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ていること（承認番号27号及び130号）、研究に際して具体的な分析・考察が為されており、学術論文として完成していること、先行研究や資料が適切に取り扱われており、当該研究分野における研究の水準に到達していること、当該研究領域の理論的見地または実証的見地から見て、新規性、創造性が認められること、などから、本論文は博士（食物栄養学）の学位論文に相当すると判断される。

#### 試験の結果又は学力の確認の要旨

学位申請者の岩田恵美子は平成15年度より平成21年度まで本学の研究助手として、その後も引き続き助手として研究を続けてきた研究者である。語学力については平成22年度に行わ

れた英語の筆記試験に合格している。

この度の学位論文審査願（乙）に基づき、平成 25 年 6 月 8 日に、公開博士論文発表会に先立って論文審査委員会により、口頭試験を実施した。その結果、博士論文に関する十分な知識と背景となる基礎的、理論的な応答を確認した。

#### **公開博士論文討論発表会の結果**

平成 25 年 6 月 27 日、論文審査委員会主催により学位論文の公開討論発表会を C 館 318 教室において開催した。研究科の教員、大学院生が多数出席の下で論文内容の発表（40 分）とそれに対する口頭試問（40 分）を行った。試問は、実験の方法、結果の評価方法、嫌気性細菌の取り扱い、論文の訂正すべき箇所、など幅広く本質的な試問が 26 項目出され、口頭での回答に加え、1 週間後に別紙の文書でも補足して適切な回答が得られた。これらのことより、当該領域における博士としての十分な知識を修得し、適切なプレゼンテーション能力を有していることが確認された。

#### **総合結果**

平成25年7月16日、主査、副査3名による論文審査委員会を開催した。学位論文の審査結果、試験の結果、および公開博士論文討論発表会の結果を総合して審議したところ、全員一致で提出された論文は博士（食物栄養学）の学位に相当するものと判断した。