

学 位 論 文 題 名

食物繊維によるアマランス（食用赤色 2 号）

毒性阻止効果に関する研究

学位論文内容の要旨

ヒトの消化酵素で消化されない食品成分の総体と定義される食物繊維は、これまでの実験的研究から以下のような効果が実証されている。すなわち、1) コレステロール投与時の血中コレステロール上昇抑制効果、ないし無投与時の血中コレステロール低下効果 2) 耐糖性の改善とインシュリン分泌の節約効果 3) 胆石形成の抑制効果 4) 大腸癌の発生率抑制効果 5) 飼料中の有害物質の毒性抑制効果などである。

5) の効果は、化学物質の大量摂取時に生ずる毒性に対する効果で、日常生活ではほとんど遭遇しない現象ではあるが、この効果の発現様式を明らかにすることは、食物繊維の新しい栄養学的意義を解明する糸口と考えられる。著者はこのような観点から、ラットのアマランス（食用赤色 2 号, Am）大量投与時の食物繊維による毒性阻止効果をモデルとし、効果の発現機構を解明する研究に着手した。

炭水化物源にショ糖を、タンパク質源に25%カゼインを用い、その他の栄養素を十分量含む精製飼料に Am を 4 ないし 5 % 添加してラットに投与すると、激しい下痢と著しい成長抑制を起こす（以下便宜上 Am 毒性と呼ぶ）。しかし、各種の野菜食物繊維を Am と同時に 3 - 10 % 添加すると、Am 毒性はほぼ完全に阻止される。この効果に関して、様々な角度から検討を加え、以下の点を明らかにした。なお本研究では、主としてごぼうの水・エタノール抽出残渣を主な食物繊維源（gobo dietary fiber, GDF）として用いた。えられた結果は以下のようである。

1. 食物繊維の効果の範囲と限界

各種の食品添加物、薬物、栄養素等の大量投与で生ずる毒性に対して、GDF を同時に摂取させたときの効果を調べ、GDF は各種アミノ酸やビタミン A 等の栄養素の過剰毒性に対しては無効であった。また、各種の緩下剤に対しても無効であった。他の研究者の結果と総合すると、難吸収性で比較的大量の投与で成長抑制を生ずる物質に対しては有効であるが、吸収されやすく、

かつ少量で強い代謝障害を起こす物質、及び消化管機能に障害を及ぼす物質に対しては無効であった。

2. 毒性阻止効果の種依存性

ラットで観察された現象をニワトリひな（以下ひな）で追試したが、ひなの場合、飼料炭水化物源が単糖や二糖類のとき6%ものAmを添加しても成長抑制が起きず、とうもろこしデンプン飼料のときのみ有意に成長が抑制された。この毒性は、5%GDFを同時に添加しても全く改善されなかった。つまり、ひなでは炭水化物源によりAm毒性の程度が著しく異なること、またひなではラットと異なり、GDFの効果がみられないことも明らかになった。

3. 毒性阻止効果における食物繊維の水中沈定体積（settling volume, SV）の重要性

GDFの構成成分を分画、調製し、それらの物理化学的性質と毒性阻止効果の関連性を調べた。ホロセルロースなど阻止活性の強い画分にはAm吸着能は全くみられなかった。比較に用いた活性炭は強いAm吸着能を示したが、ラットのAm毒性に対しては無効であった。食物繊維の効果はAmの吸着作用で説明できなかった。一方、各種画分の生理効果は、それらのSVと密接な相関を示し、SVの高い画分ほど強い生理効果を示した。この結果をもとに、GDFでも粒度を小さくしてSVを下げると、生理活性も弱くなることが確認された。これらの事実から、消化管腔内で占める食物繊維の容積がこの効果を支配している主な要因であると判定した。

4. Amによる栄養素の利用阻害作用

Amの腹腔投与で生じた成長抑制はGDF摂取によって改善されなかった。一方、GDFのAm毒性阻止効果は、盲腸と結腸を切除したラットでも確認できた。これらの事実から、この現象が小腸腔内で発現するものであると断定した。そこで、栄養素の消化吸収に及ぼすAm、およびGDFの影響が必然的に機構解明の焦点になった。実際、飼料タンパク質（カゼイン）の消化率はAm添加時に明らかに低下するが、GDFの同時添加でこれが有意に改善されていた。

更に、消化吸収の全段階、すなわち腔内消化（トリプシンによるカゼイン消化）、膜消化（空腸粘膜スクラーゼ及びジペプチダーゼ活性）、膜輸送（空腸反転サックによる $[^{14}\text{C}]$ L-バリンの能動輸送）に及ぼすAmの影響を*in vitro*で検討した。この結果、Amによるタンパク質消化率の低下は、消化吸収の全段階に対する活性の非特異的阻害作用が重なって生ずることが明らかとなった。しかし、一連の*in vitro*の消化吸収試験系にGDFを添加しても、阻害を阻止しえなかった。

5. 毒性阻止効果における食物繊維の役割

In situ 空腸灌流法による消化吸収試験でも、Amによる栄養素の消化吸収阻害が認められた。

しかし、この系でも GDF の効果は依然観察できなかった。ただし、基質溶液の灌流速度を遅くした場合には、Am を含む基質でも吸収量が有意に増加することを観察した。すなわちスクロース (15 mmol/L) と、グリシルグリシン (30 mmol/L) を含む基質溶液の灌流速度を毎時 2.2 mL から 0.6 mL に減速すると、吸収量は Am 共存下でも前者で 1.8 倍、後者で 2 倍に各々増加した。これらの事実より、小腸腔内移動速度の制御が、全動物のタンパク質消化率に対する GDF の改善効果を説明する一番妥当な要因と考えるに至った。

6. 小腸腔内移動速度に及ぼす食物繊維の影響

そこで、非吸収性マーカー (Cr-EDTA) を回腸瘻口施術ラットに投与し、その 50% が排泄される時間 (TT_{50}) を測定した結果、口から回腸末端間の TT_{50} は、Am 投与時に半減すること、しかし、10% GDF の同時添加でこれが再び正常化されることが明らかとなった。

以上の研究から、まず Am による成長抑制は、Am 自身の消化吸收活性に対する阻害作用と、これによる小腸腔内移動速度の亢進が重なって起こる栄養素の消化吸收阻害が原因と推定した。GDF は、Am による消化吸收阻害を直接阻止できないが、小腸腔内移動速度の亢進を正常化することにより栄養素の消化吸收量を高めることができ、これがひいては成長回復に結びついていると推定した。

7. 小腸粘膜剥離説に対する反証

Am 毒性の主要因として、小腸粘膜の剥離作用を唱える研究者もいる。5% Am 単独添加群で、空腸粘膜酵素 (スクラーゼ、アルカリフォスファターゼ) の活性が低下することをその論拠にしている。ただし、2 日間絶食させたラットに各被験飼料を再投与し、4 日後に測定した空腸セグメント当たりの酵素活性を比較している。この方法に準じ、絶食前後と再摂食 2 週間後のスクラーゼ活性の経時変化を調べた結果、絶食で 50% ほど減少したスクラーゼレベルは再摂食後回復に向かうものの、Am 単独添加群では投与初期に回復が遅れることを認めた (にもかかわらず Am 投与前の初期レベル以下には減少しなかった)。つまり剥離説の論拠であった Am 投与初期のスクラーゼ活性の低下は、投与前の絶食に起因していることが判明した。実際、Am 投与後の空腸粘膜を走査型電子顕微鏡で観察しても、剥離を示唆する形態変化は確認できなかった。これら一連の実験に基づいて、著者は GDF による小腸腔内移動速度の正常化が、Am 毒性の阻止効果のもっとも妥当な説明であると考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 桐 山 修 八

副 査 教 授 水 谷 純 也

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

本論文は、218ページの和文論文で、表35、図19、写真23、引用文献129を含み、8章で構成されている。別に参考論文14編が添えられている。

本研究は、ラットのアマランス（食用赤色2号、Am）大量投与毒性に対する食物繊維の阻止効果をモデルに、その機構解明を目的としたもので、食物繊維による毒性制御機構の研究の先駆けとなったものである。本研究でえられた成果を要約すると以下のとおりである。

1. 食物繊維の効果の範囲と限界： 本研究での食物繊維源としては、主にごぼうの水・エタノール抽出残渣（78%の食物繊維を含む粒径1mm以下の乾燥粉末、以下GDF）を食物繊維試料として用いている。GDFはAmの他に食用赤色102号、黄色4号、黄色5号、青色1号（各5%）投与時の成長制御に対しても明らかな回復効果を示したが、メチオニン（3%）、ビタミンA（500万IU）、デオキシコール酸（1%）等の大量投与による成長制御には無効であった。よって食物繊維は、難吸収性で、比較的大量の投与で成長制御を起こす物質には有効であるが、易吸収性、かつ少量で代謝障害を起こす物質の毒性に対しては無効であることを示し、これが消化管腔内で起こる現象であることを明らかにした。

2. 毒性阻止効果の種依存性： 同様の飼料条件でニワトリひな（以下ひな）を用い追試した結果、単糖、二糖類を炭水化物源とした飼料では、Am毒性は起こらなかったが、とうもろこしデンプン飼料では、有意な成長低下が生じた。しかし5%GDFを同時添加しても、この成長抑制は阻止できなかった。ひなでは炭水化物源によりAm毒性の現れ方がラットとは著しく異なり、また食物繊維の生理的役割も異なることが明らかとなった。

3. 毒性阻止効果の発現と食物繊維の水中沈定体積（settling volume, SV）の重要性： 以下幼若ラットを用い食物繊維の毒性阻止機構を追求している。GDF構成画分を調製し、それらの生理効果と物理化学的性質との関係を調べた結果、阻止効果を有する画分のAm吸着能はいずれも極めて弱かった。また、比較に用いた活性炭は強いAm吸着能を持っていたが、Am毒性阻止能は全くなかった。したがって、食物繊維の効果はAmの吸着作用では説明できない。一方、各GDF画分の生理効果は、それらのSVと密接な相関性のあることを示し、SVの大きな

画分ほど強い毒性阻止活性があることを初めて見いだした。この結果とともに、同一試料（GDF）でも粒度を小さくしてSVを下げると、生理活性も有意に弱くなることを実証した。これらの事実から、消化管腔内で占める食物繊維の容積がもっとも重要な要因であると主張している。

4. 毒性阻止効果における食物繊維の役割： Amの腹腔投与で生じた成長抑制はGDFの経口投与で改善されなかった。一方、GDFのAm毒性阻止効果は、盲腸と結腸を全摘したラットでも確認できた。これらの事実から、この現象が小腸腔内で発現するものであると断定した。実際、飼料タンパク質（カゼイン）の消化率はAm添加時に15%から19%の範囲で低下するが、GDFでこれが有意に改善されることを突き止めた。しかしGDFは、*in vitro*の系における腔内消化、膜消化、及び膜輸送に対するAmの活性阻害を阻止できなかった。Amの消化吸收阻害は、麻酔下でラット空腸に基質を灌流する方法（*in situ*）でも確認されたが、この際、灌流速度を遅くするとAm存在下でも吸収量が有意に増加することを見いだした。これらの事実より、小腸腔内移動速度の制御が、GDFによるタンパク質消化率改善の要因と考えられるに至った。そこで、非吸収性マーカー（Cr-EDTA）を回腸瘻口施術ラットに投与し、この50%が排泄される時間（ TT_{50} ）を測定した。その結果、口から回腸末端間の TT_{50} は、Am投与時に半減すること、一方、10%、GDFの同時添加でこれが再び正常化されることを実証した。

5. 小腸粘膜剥離説に対する反証： Am毒性の主要因が小腸粘膜の剥離によるとする研究者もいる。5%Am単独添加群で、空腸粘膜酵素（スクラーゼ、アルカリフォスファターゼ）の活性が低下することをその論拠にしている。ただし、2日間絶食させたラットに各被験飼料を再投与し、4日後に測定した空腸セグメント当たりの酵素活性を比較している。この方法に準じ、絶食前後と再摂食2週間後のスクラーゼ活性を調べた結果、絶食で50%ほど減少したスクラーゼレベルは再摂食後回復に向い、Am単独添加群では投与初期に回復が遅れることを認めた。つまり剥離説の主要な根拠であったAm投与初期のスクラーゼ活性の低下は、投与前の絶食に起因していることが判明した。実際、Am投与後の空腸粘膜を走査型電子顕微鏡で観察しても、剥離を示唆する形態変化は確認できなかった。これらのことから、今のところGDFによる小腸腔内移動速度の正常化が、Am毒性阻止効果のもっとも妥当な説明であると主張している。

以上、毒性阻止効果における食物繊維のSVの重要性を実証しただけでなく、これが小腸腔内移動速度の制御因子となって生理効果を発現している可能性を見いだしたことは食品栄養学に新しい分野を開いたもので、高く評価される。

よって、審査員一同は、別に行った最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者、武田秀敏は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。