

学位論文題名

Estrogen 欠乏動物の難消化性糖類摂取による
カルシウム吸収促進作用の解析

学位論文内容の要旨

骨粗鬆症は日本において約 1,000 万人の罹患患者が推定されており、人口の急速な高齢化とともに、その数は今後さらに増加すると推察されている。骨粗鬆症は、“組織学的に骨の質的な変化なしに正常に石灰化された骨の量が減少した病態”と定義されており、骨量の減少は骨の力学的な脆弱性をもたらす骨折増加の要因となる。骨粗鬆症が閉経後の女性に多く見られることから、estrogen 欠乏が閉経後骨粗鬆症の重要な因子であると考えられている。また骨粗鬆症の臨床はすでに発生した骨折の治療ではなく、その防止が主目的となっており、21 世紀の国民健康づくり運動「健康日本 21」（厚生労働省推進）においても、骨粗鬆症は生活習慣病の中でも特に食生活との関連が深いとされ、骨粗鬆症に対する栄養素レベルのリスクファクターとしてカルシウム (Ca) 摂取不足が取り上げられている。

本研究は、骨粗鬆症の予防になりうる機能成分を探索することを目的として、骨粗鬆症の予防や治療薬の開発に用いられる代表的なモデル動物である卵巣摘出 (OVX) ラットを用いて研究を行った。難消化性糖類とは、ヒトの消化酵素で消化されない食品成分であり、近年では、難消化性糖類のヒトの健康に対する有効性が解明されている。そこで種々の難消化性糖類摂取による Ca 吸収促進作用の評価を行い、なかでも強い Ca 吸収促進作用が示された難消化性二糖類 difructose anhydride III (DFAIII, di-D-fructofuranosyl 1,2':2,3' anhydride) に関しては、Ca 吸収促進作用部位の検討、長期摂取による骨代謝への影響、ビタミン D と estrogen 欠乏の相互作用を解析した。

1. 飼料中の Ca レベルが estrogen 欠乏ラットの Ca 吸収に与える影響

Ca レベルが異なる 4 種の飼料 (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 g Ca/kg diet) を、OVX と擬手術 (Sham) ラットに摂食させ、Ca 吸収に与える影響を検討した。その結果 2.0 g、3.0 g Ca/kg diet 摂取群で OVX ラットの正味 Ca 吸収率は Sham ラットに比べ低下し、OVX によって Ca 吸収低下を起こすかどうかは、飼料中の Ca レベルに依存することが明らかになった。また正味 Ca 吸収量と骨重量、骨ミネラル含有量の変化が 3.0 g と 4.0 g の Ca/kg diet 食群間で見られなかったことから、3.0 g Ca/kg diet レベルがラットの Ca 最小必要量であると評価し、このレベルでは OVX による Ca 吸収率の低下が最大になることを明らかにした。

2. 種々の難消化性糖類摂取による Ca 吸収促進作用の解析

骨粗鬆症の予防になりうる機能成分を探索することを目的として、OVX ラットに DFAIII、難消化性オリゴ糖である raffinose、そして水溶性大豆食物繊維 (WSSF, water-soluble soybean fiber) を摂取させ、Ca 吸収促進作用を評価した。その結果、これらすべての難消化性糖類摂取は OVX ラットにみられる Ca 吸収障害を回復させた。特に DFAIII は 1.5% という低レベルでも Ca 吸収を促進させることが示され、強い Ca 吸収促進作用を持つことが明らかになった。

3. DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用に及ぼす小腸・大腸部位の寄与

in vitro, *in situ* の研究で、DFAIII は小腸と大腸の双方で Ca 吸収を促進していることが示されているが、*in vivo* では確認されていない。また、estrogen 欠乏状態での Ca 吸収促進作用機序に関しても、詳細な解析は行なわれていない。そこで、広範囲大腸切除手術を行なった OVX ラットを用いて、小腸、大腸における DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用機序の検討を行なった。その結果 DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用には大腸が関与していることが示され、さらに小腸でも DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用は発揮されているが、*in vivo* では小腸 transit time の短縮によりその作用は減弱されていることが明らかになった。

4. DFAIII の長期摂取による Ca 吸収及び骨代謝の促進

OVX による骨強度の低下や骨量減少に対し、DFAIII が有効に作用するかどうかは不明な点も多くある。そこで、OVX ラットにおける Ca 吸収と骨代謝の関係を明らかにすることを目的とし、OVX ラットの Ca 吸収不全を誘導した後、2 ヶ月間という長期間にわたって DFAIII を摂取させ、骨代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、DFAIII の長期摂取は、骨中ミネラルとコラーゲンの濃度を増加させ、OVX による骨量減少を完全に回復させた。DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用がこれらの有益な影響に関係していることが示された。

5. DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用に及ぼす estrogen とビタミン D 欠乏の影響

高齢者に見られるビタミン D (VD) 欠乏による Ca 吸収障害に着目した。VD が Ca 吸収に及ぼす作用として、活性型 VD である $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が消化管での Ca 能動輸送に関与していること、さらに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はタイトジャンクションの化学的構造を変化させることにより、上皮細胞間輸送による Ca 吸収を促進させることが報告されている。DFAIII は Ca の上皮細胞間輸送を促進することが明らかになっているが、VD には上記のように上皮細胞間輸送へも作用していることから、DFAIII が能動輸送と上皮細胞間輸送の Ca 吸収が抑制されている条件で、Ca 吸収を促進するかどうかは明らかではない。そこで、VD または estrogen 欠乏、さらに VD と estrogen の双方が欠乏した状態で、DFAIII 摂取による Ca 吸収と骨ミネラル含量の変化を評価した。その結果、DFAIII の摂取は estrogen 欠乏による Ca 吸収障害を完全に回復させたが、VD 欠乏による Ca 吸収障害は、部分的な回復にとどまった。VD 欠乏によってタイトジャンクションが関与する上皮細胞間輸送での Ca 吸収が低下した状態では、DFAIII による促進作用が弱まったものと思われる。

総括すると、DFAIII、raffinose、WSSF 摂取は estrogen 欠乏による Ca 吸収障害を回復さ

せた。特に DFAIII は小腸と大腸の両方で Ca 吸収を促進した。長期にわたる DFAIII の摂取は estrogen による骨量減少を完全に回復させ、さらに VD 欠乏による Ca 吸収障害に対しても DFAIII の有効性が示された。本研究で得られた基礎データは、骨粗鬆症の予防・治療用の食品素材開発のために提供できるものと思われる。DFAIII に関しては、ヒトでの有効性が確認され、サプリメントとしてすでに商品化されている。raffinose や WSSF についても、今後より詳細な作用機構の解析とともに、ヒトでの有効性の確認がなされることを期待する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 博
副 査 教 授 浅 野 行 蔵
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 助 教 授 石 塚 敏

学 位 論 文 題 名

Estrogen 欠乏動物の難消化性糖類摂取による カルシウム吸収促進作用の解析

本論文は、121 頁からなる和論文であり、図 20 と表 38 を含み、参考論文 5 編が添えられている。

骨粗鬆症は日本において約 1,000 万人の罹患患者が推定されており、人口の急速な高齢化とともに、その数は今後さらに増加すると推察されている。骨粗鬆症が閉経後の女性に多く見られることから、estrogen 欠乏が閉経後骨粗鬆症の重要な因子であると考えられている。また骨粗鬆症の臨床はすでに発生した骨折の治療ではなく、その防止が主目的となっており、骨粗鬆症に対する栄養素レベルのリスクファクターとしてカルシウム (Ca) 摂取不足が取り上げられている。そこで本研究では、骨粗鬆症の予防になりうる機能成分を探索することを目的として、骨粗鬆症の予防や治療薬の開発に用いられる代表的なモデル動物である卵巣摘出 (OVX) ラットを用いて、種々の難消化性糖類摂取による Ca 吸収促進作用の評価を行い、なかでも強い Ca 吸収促進作用が示された難消化性二糖類 difructose anhydride III (DFAIII, di-D-fructofuranosyl 1,2' :2,3' anhydride) に関しては、Ca 吸収促進作用部位の検討、長期摂取による骨代謝への影響、ビタミン D と estrogen 欠乏の相互作用を解析し、以下のような結果を得ている。

1. 飼料中の Ca レベルが estrogen 欠乏ラットの Ca 吸収に与える影響

Ca レベルが異なる 4 種の飼料 (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 g Ca/kg diet) を、OVX と擬手術 (Sham) ラットに摂食させ、Ca 吸収に与える影響を検討した。その結果 2.0 g、3.0 g Ca/kg diet 摂取群で OVX ラットの正味 Ca 吸収率は Sham ラットに比べ低下し、OVX による Ca 吸収率の低下は、飼料中の Ca レベルに依存することを確認した。

2. 種々の難消化性糖類摂取によるCa吸収促進作用の解析

骨粗鬆症の予防になりうる機能成分を探索することを目的として、OVX ラットに DFAIII、難消化性オリゴ糖である raffinose、そして水溶性大豆食物繊維 (WSSF, water-soluble soybean fiber) を摂取させ、Ca 吸収促進作用を評価した。その結果、これらすべての難消化性糖類摂取は OVX ラットにみられる Ca 吸収障害を回復させた。特に DFAIII は 1.5% という低レベルでも Ca 吸収を促進させることが示され、強い Ca 吸収促進作用を持つことが明らかになった。

3. DFAIII 摂取によるCa吸収促進作用に及ぼす小腸・大腸部位の寄与

in vitro, *in situ* の研究で、DFAIII は小腸と大腸の双方で Ca 吸収を促進していることが示されているが、*in vivo* では確認されていない。また、estrogen 欠乏状態での Ca 吸収促進作用機序に関しても、詳細な解析は行なわれていない。そこで、広範囲大腸切除手術を行なった OVX ラットを用いて、小腸、大腸における DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用機序の検討を行なった。その結果、DFAIII は小腸と大腸の双方で Ca 吸収を促進させることを確認した。

4. DFAIII の長期摂取によるCa吸収及び骨代謝の促進

OVX ラットにおける Ca 吸収と骨代謝の関係を明らかにすることを目的とし、長期間にわたって DFAIII を摂取させ骨代謝に及ぼす影響を検討した結果、DFAIII の長期摂取は、骨中ミネラルとコラーゲンの濃度を増加させ、OVX による骨量減少を完全に回復させることを明らかにした。

5. DFAIII 摂取によるCa吸収促進作用に及ぼすestrogenとビタミンD欠乏の影響

高齢者に見られるビタミン D (VD) 欠乏による Ca 吸収障害に着目し、VD または estrogen 欠乏、さらに VD と estrogen の双方が欠乏した状態での DFAIII 摂取による Ca 吸収促進作用を評価した。その結果、DFAIII の摂取は estrogen 欠乏による Ca 吸収障害を完全に回復させ、VD 欠乏による Ca 吸収障害は部分的に回復させることが示された。

本論文は、難消化性オリゴ糖である DFAIII、raffinose、および大豆水溶性繊維の摂取が estrogen 欠乏による Ca 吸収障害を回復させることを明らかにした。さらに DFAIII は小腸と大腸の双方で Ca 吸収を促進させ、estrogen 欠乏による骨量減少を完全に回復させること、また VD 欠乏による Ca 吸収障害に対しても有効であることを明らかにした。これらの結果は、骨粗鬆症の予防、治療用の食品素材開発のために提供できる基礎データであり、高く評価できる。

よって、審査員一同は、三田村理恵子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。