



Title	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
Author(s)	武田, 秀敏
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第4115号
Issue Date	1992-06-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3089298
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49809
Type	doctoral thesis
File Information	000000251731.pdf



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

武田 秀敏

①

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

武田 秀敏

も く じ

第 1 章	緒 論	
1.1	食物繊維研究の歴史的背景	1
1.2	食物繊維の毒性阻止効果に関する 研究の経過	4
1.3	Ershoffの研究の意義と限界	7
1.4	本研究の目的と進め方	9
第 2 章	食物繊維の毒性阻止効果の範囲と限界	
2.1	A m, Tween 60, あるいは鉱物油毒性に対 する GDF 同時投与の影響	10
2.2	その他の毒性に対する食物繊維の阻止効果 の検索	28
第 3 章	有害物質の単独, および GDF 同時投与に対する被 験動物間の成長応答の差異	
3.1	ラットとニワトリひなの A m 毒性の発現に 及ぼす炭水化物源の影響	43
3.2	ひなの成長に及ぼす各種食用色素の影響	52
3.3	ひなの A m 毒性に対する GDF 同時投与の 影響	56

第 4 章	A m 毒性阻止効果における食物繊維の物理化学的性質の重要性	
4.1	GDFの成分組成と形態	61
4.2	食物繊維の物理化学的諸性質と生理効果との関連性について	64
4.3	非水溶性食物繊維のSVによる生理効果の予測	77
4.4	水溶性と非水溶性食物繊維によるAm毒性阻止効果の比較	89
第 5 章	腸内容物の状態, 消化管粘膜の形態, およびタンパク質利用に及ぼす影響	
5.1	Am腹腔投与ラットの成長に及ぼすGDFのGDFの影響	95
5.2	盲腸内容物の状態と消化管粘膜の形態に及ぼすAmならびにGDF同時投与の影響	99
5.3	盲腸・回腸切除ラットの成長に及ぼすAm単独, あるいはGDF同時投与の影響	109
5.4	無タンパク質飼料中へのAm単独添加, あるいは食物繊維同時添加の影響	115
5.5	タンパク質消化率, および生物価に及ぼす影響	119
5.6	アミノ酸混合飼料へのAm単独添加, およびGDF同時添加の影響	127
第 6 章	小腸の消化吸収活性, ならびに上部消化管の移	

動時間に及ぼす A m 単独及び GDF 同時投与の影響	
6.1 腔内消化, 膜消化, 膜輸送 (<i>in vitro</i>) に及ぼす A m 単独あるいは GDF 同時投与の影響	131
6.2 <i>In situ</i> 灌流空腸の消化吸収能に及ぼす A m, ならびに GDF の影響	144
6.3 口 - 小腸末端間の移動時間に及ぼす A m 単独投与, あるいは GDF 同時投与の影響	150
第 7 章 空腸粘膜剝離説に対する反証	
7.1 A m 投与ラットのスクラーゼの活性応答に及ぼす投与前絶食の影響	158
7.2 A m 投与停止後の消化吸収活性, および成長応答について	167
7.3 灌流空腸からのスクラーゼ, 及び DNA の流出に及ぼす A m, Tween 60 あるいはデオキシコール酸の影響	173
8 章 結論	180
参考文献	191
本研究に関連する論文発表	212
略語一覧	216
謝辞	218

第 1 章 緒 論

1.1 食物繊維研究の歴史的背景

私たちが日常摂取する食品には、栄養素の他、無数の非栄養素も含まれている。特に植物性食品の細胞壁成分は、そのほとんどが食物繊維である。また人類がこれまで摂ったことのなかった種々の食品添加物や環境汚染物質が、もはや食品の恒常成分になっていると言っても過言ではない。

これら非栄養素もまた、栄養素同様、生体に何かしかの影響を与えずにはいない。したがって、非栄養素の生理機能を明らかにすることも、栄養学の重要な研究領域である。しかしこの分野の研究が始まったのは、栄養学全体の歴史から見れば比較的最近のことである。必須栄養素を見つけ、その生理効果や必要量を明らかにすることが研究の主流であった時代に、非栄養素が研究の対象になりにくかったのは当然かもしれない。

本研究で扱う食物繊維についても、便秘の緩和効果以外の栄養学上の有効性が認識され出したのは、1950年代に入ってからであった。1954年、Walkerら(1)は、南アフリカでの疫学的資料と同地の食物調査から、現地人に心臓病や動脈硬化症が少ないのは彼らの食物構成、すなわち低脂肪、高食物繊維摂取と関連していることに気づいた。ちなみに同年、Ershoff(2)は、グルコアスコルビン酸の大量投与により生ずるマウスの著しい成長遅延が、

植物残渣の同時添加でほぼ完全に回復することを報告している。

この後、ペクチン(3)、植物ガム類(4)、コンニャクマンナン(5)等の水溶性食物繊維による食餌性血中コレステロールの上昇抑制効果が発見された。さらに70年代に入ってから、BurkittとTrowell(6,7)により現代西欧病に対する食物繊維仮説が提唱されたことを見逃すことはできない。

長年、アフリカで医療活動を行っていた彼らは、南アフリカでのWalkerの研究に刺激されて、西欧諸国で普通に見られる大腸ガン、大腸憩室病、糖尿病、胆石、動脈硬化症、虚血性心臓疾患等の非感染性疾患が、食物繊維の多い未精製な食物を摂っているアフリカ人の間ではほとんど見られないことを確認した。もっとも、西欧諸国でも、高度に精製された食品を摂るようになる以前(二百数十年前)までは、そうした病気は希であったという。そして膨大な疫学的資料から、現代西欧病は”食物繊維欠乏症”であるという結論に達した。実際、食物繊維による胆石の予防効果(8)、耐糖性の改善効果(9)、大腸ガン発生率の抑制効果(10)等が、実験的に相次いで明らかにされた。こうして食物繊維が栄養学の一つの焦点となるにつれ、その栄養学的な意義が一般にも認識されるようになった。

この間、前出のErshoffは1954年以来、アルファアルファ残渣、野菜残渣、ガム類に、各種食品添加物や化学物質の大量投与毒性¹に対する阻止効果があることを精力的に

報告し続け(12-24)ていた。しかし、こうした効果は食物繊維に固有のものでありながら、作用機構等に関するその後の研究の発展はみられなかった。

脚注1 "毒性"について。この用語は記述上便宜的に用いているものであるが、国際的に受け入れられているものである。もちろん、毒性学上の基準によれば動物の生理的調節が回復可能な作用、例えば腸内細菌叢の変化や、非吸収性物質の大量投与による下痢作用、体重増加率の低下などは、厳密には毒性作用とはみなさないことになっている(1)。したがって、ここで扱う物質が毒性学の定義でいう"毒物"に当たらないことは桐山が既に断っている(2)。つまり本論文でいう"毒性"や、"毒性阻止効果"は、正確には、食用色素等の大量投与による成長遅延と、その改善効果ということである。

- 1 川端俊治「新訂 加工食品と食品衛生」新思潮社、1984、pp 102-164
- 2 桐山修八、"食餌性有害物質の毒性阻止作用"
「食物繊維」印南 敏・桐山修八編 第一出版、1982、pp 193-215

1.2 食物繊維の毒性阻止効果に関する研究の経過

Table 1-1には、Ershoffが20数年にわたって調べた各種化学物質や食品添加物の大量投与毒性に対する食物繊維の阻止効果を年代順に示した。なお、この種の研究のさきがけとなったのは、WoolleyとKrampitz(25)の研究であった。彼らは、グルコアスコルビン酸をマウスの精製飼料に5%添加すると、著しい成長遅延や脱毛など、ビタミンCやK欠乏に類似した症状を現すが、予め牧草粉末を10%添加しておくこと、この毒性が現れないことを観察していた。グルコアスコルビン酸飼料にビタミンCやKを補足しても効果は見られなかったにもかかわらず、彼らは牧草粉末に含まれる未知栄養素がビタミンC欠乏を防ぐのであろうと考えた。

この実験を再試したErshoff(2)は、グルコアスコルビン酸毒性が、アルファルファ粉末の他、セルロース(Solka-floc)²でもある程度改善することを見いだした。この結果から彼は、アルファルファの粗繊維も効果に多少寄与しているであろうが、効果の本体はアルファルファ中に含まれる単一か複数の防御因子であろうと考え、先の研究者の結論を追認した。そしてセルロースについては、これ自体に効果があるのではなく、腸内細菌が有効成分をつくるのに望ましい腸内環境を提供するのであろうと考えた。

脚注2 木材から調製した繊維素の商品名(Pfizer社)。組成の15%は、ヘミセルロースや非セルロース系物質とされている。

Table 1-1 Anti-toxic activity of dietary fiber on various chemicals reported by Ershoff

Chrono-logical order	Chemical and its dietary level (%)	Anti-toxic material	Literature
1954	Glucoscorbic acid (4)	Oven dried alfalfa Cellulose powder	2
1958	Mineral oil (8, in fat-free diet)	Alfalfa meal Alfalfa residue Defatted alfalfa Cellulose powder	12
1959	Tween 60 (7.5-15) Myrj 52 (7.5, 10)	Alfalfa meal Dried orchard grass Sodium alginate et al.	13
1959	Thyroid (0.5) Iodinated casein (0.5)	Alfalfa meal Alfalfa residue Cellulose powder	14
1960	Tween 20 (15,20)	Alfalfa meal Alfalfa residue Cellulose powder	15
1972	Sodium cyclamate (5)	Alfalfa meal, Wheat bran, Cellulose powder Desiccated kelp et al.	19
1974	Amaranth (Food & Cosmetic Red No. 2) (5)	Alfalfa meal, Pectin Parsley powder Cellulose et al.	20

In addition, Ershoff reported that severity of toxicity caused by DBH (2,5-di-*tert*-butylhydroquinone (0.2% in diet)(16) and incidence of ovarian and/or uterine tumors induced by ethylestradiol (20 mg/kg diet)(17) were less in rats fed with a stock diet which was rich in plant food residue than those in rats fed with a purified diet and that mortality and pathological changes in the periodontal and dentinal tissues in mice dosed total body X-irradiation (six weekly exposures of 200 R each) (18) were also less when fed a stock diet than when fed a purified diet.

そこで有効成分を特定するため、アルファルファの水抽出残渣や、搾り汁、灰分、既知栄養素等でアスコルビン酸毒性に対する阻止効果の比較も試みている(11)。その結果、アルファルファの水抽出残渣でのみ効果がみられたことから、既知の栄養素とは明らかに異なる防御因子が、この中に残っていると推測した。ちなみにこの因子は、動物がストレスに曝されたとき、成長や生理機能を維持するのに必須な成分であるとも述べている。1972年の報告(19)でも同様の記述がみられ、依然、低分子の未知有効成分の存在を信じていたことがうかがえる。

しかし、サイクラミン酸ナトリウムや、Tween 60の毒性阻止効果を扱った1975年の報告(22)からは、それまで植物残渣、あるいはbulkと記述していたのを、dietary fiber(食物繊維)と明記するようになっただけでなく、食物繊維そのものの効果に言及している。またこの中で、各種植物残渣の他、ペクチン、カルボキシメチルセルロース(CMC)、植物ガム質等の水溶性食物繊維も有効であり、粘性の強いCMCほど効果が強いことも見いだしている。食物繊維の物理化学的性質にも着目し始め、アマランス³(食用赤色2号,以下Amと略)毒性に対する効果を再検討した結果(23)、食物繊維による色素の吸着説を唱えるに至った。しかしこの結論は、食物繊維の吸着能を実測した結果からではなく、コレスチラミン(陰イオン交換樹脂)

脚注3 Aamaranth, trisodium salt of 1-(4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid.

に食物繊維と同様の阻止効果があったことから類推したものであった。

1.3 Ershoffの研究の意義と限界

Ershoffは、前述のとおり食物繊維による有害化学物質の毒性阻止効果が、食物繊維の栄養効果であることを不動のものとした点で大きな功績を果たした。しかし、研究の進め方に関しては、以下に述べるような限界があったと考えられる。

① 生理効果の評価方法の不備

彼は、もっぱら体重増加量や、生存率だけを指標として生理効果を調べた(もつとも、期間中の動物の行動や形態的变化については述べているが)。たとえば、毎週後の体重増加量の記録はあるが、飼料摂取量についての記録は一切ない。化学物質の種類によっては、成長抑制の現れ方が異なると予想され、日々の体重変化を観察していれば毒性の性質もある程度推測できるが、Ershoffの報告からは飼育途中の成長の変化を知ることができない。また飼料効率を測定すれば、成長抑制が単なる飼料摂取量の減少に起因しているものなのか、それとも栄養素自体の利用低下によるものかをある程度判断できるが、飼料摂取量の記録がないのでこれも不明である。

こうした初歩的な栄養学的関心を払わなかったために、個々の化学物質の毒性の発現様式の相違を見落としていたようである。こうした不備が、ひいては食物繊維の効

果の範囲と限界を理解するうえで大きな障害になっていたように思える。

② 生理効果におよぼす食物繊維の物性の違いについての関心の低さ

Ershoff(23)は、サイクラミン酸ナトリウムや、Am毒性に対しては、食物繊維の他、コレスチラミン(陰イオン交換樹脂)も有効であることを見いだした。この結果から、食物繊維の効果はこれら化学物質の吸着作用によるものであろうと推測した。しかし、サイクラミン酸ナトリウムや、Amに対する食物繊維の吸着作用を実測した形跡は、その後の報告でも見あたらない。結局、陰イオン交換樹脂の効果から、食物繊維の作用を類推したにすぎなかった。

食物繊維の毒性阻止効果に関してErshoffは、研究開始からほぼ20年間、アルファアルファ中の未知有効成分の存在を信じていた。その後、ようやく食物繊維の物性に着目するようになったが、物性を実際に調べる作業は行わなかった。このため、多くの現象を観察していながら毒性の発現様式の相違や、食物繊維の阻止効果の仕組みに関するデータの蓄積はほとんどない。また、一連の阻止効果を報告し続けている間、彼の結果を追試したり、メカニズムの解明を試みる研究者は現れなかった。

1.4 本研究の目的と進め方

そこで著者は、Ershoffの観察した現象を説明することが、食物繊維の栄養的意義を明らかにする一つのアプローチと考え、本研究を開始した。本研究は、ラットと、実験によってはニワトリひなで行った食物繊維の栄養学に関する基礎的研究に属するものである。これら動物に、全栄養素を十分含んだ精製基本飼料と、これに各種の化学物質を単独に添加したもの(対照飼料)、あるいは化学物質と食物繊維を同時に添加したもの(被験飼料)を投与し、このときの成長応答をはじめとする生理的応答を比較する方法で研究を進めた。なお、実験によっては、無脂肪飼料や、低タンパク質飼料を基本飼料とした。

研究の順序は目次に示した通りであるが、まずErshoffの研究から、Amと、流動パラフィン(鉱物油)、それにTween 60の過剰投与毒性に対する阻止効果の追試作業から着手した。次いで、食物繊維による毒性阻止効果の範囲と限界について検討した。これ以後Am毒性を中心に、毒性の発現様式、ならびに阻止効果のしくみについて、*in vivo*, *in situ*, および *in vitro* の各レベルで検討を行った。なお食物繊維試料には、市販のものも用いたが、主にゴボウから調製した水、エタノール抽出残渣を用いた。

第 2 章 食物繊維の毒性阻止効果の範囲と限界

2.1 A m, Tween 60, あるいは鉱物油毒性に対する GDF 同時投与の影響

緒言

Ershoffは、食物繊維源に専らアルファルファを用いたが、本研究では日本人がよく摂取し、かつ食物繊維に富んでいるゴボウを選び、この水、アルコール抽出残渣を食物繊維試料(Gobo Dietary Fiber;以下 GDFと略)として用いた。まず、彼の研究の中から鉱物油(流動パラフィン)(12)、Tween 60(13)、及び A m(20)を選び、これらの大量投与毒性に対する食物繊維の阻止効果を、GDFで追試する作業から始めた。

既に永井ら(26)は、5% GDFの同時添加により A m 毒性を阻止できることをラットで確認していたので、ここでは効果の発現に要する GDFの添加レベルを検討した。また

A mと Tween 60については、ペアーフィーディング法により群間の飼料摂取量を等しくしたときの成長応答も調べた。

実験方法

食物繊維の調製 GDFは、ゴボウから以下の方法で調製した。マーケットから購入した新鮮なゴボウの可食部を水洗して皮を剥いた後、大まかに裁断し、流水と共にデ

イスポーザー (ISE IN-SINK-ERATOR, Model 333ss, Div. Emerson Electric Co., Racine, WI) で細かく砕いた。低分子の糖質や、他の水溶性物質を除くために洗浄液が透明になるまで流水で十分にすすいだ後、水分を遠心除去した。次いで99%エタノールを加えて抽出と脱水を2回繰り返した後、風乾した。得られた乾物(生ゴボウからの収率は約4%)は、1mmの円孔ふるいを付けたWiley millで粉碎して用いた。なお、GDFの構成成分の組成や形態については、第4章で述べた。

実験動物 実験動物には、Wistar系雄ラット(徳島実験動物研究所、徳島)を用いた。ラットは入荷後、12時間の明(8時-20時)暗(20時-8時)サイクルの照明設備のある室内(23±2℃)に移し、床がステンレス網の引出し式個別ケージに収容した。

25% カセイン-ショ糖からなる精製標準飼料で3~7日間予備飼育した後、体重により個別ケージに組分け、飼育実験に入った。飼料は、前日の残りを捨て、毎朝新鮮なものを水と共に自由に与えた。この間、体重と飼料摂取量は毎日記録した。実験開始時の初体重とその幅は、実験毎にTableやFigureの脚注に示した。以後、全実験を通してラットの系、供給元、基本飼料の組成、給餌方法は、特に述べない限りここに述べた方法に準じた。

飼料の調製 Table 2-1に示す組成の精製飼料を基本飼料とした。この基本飼料に4ないし5%のAmを添加したものを対照飼料、AmとGDF等の被験物質を同時に添加し

Table 2-1. Composition of basal diet of rat

Ingredient	Amount
	g/100 g of diet
Casein ¹	25.0
Corn oil ²	5.0
Mineral mixture ³	4.0
Vitamin mixture ⁴	1.0
Choline chloride ⁵	0.2
Vitamin E granule ⁶	0.05
Sucrose	to make 100

- 1 Lactic casein, purchased from New Zealand Dairy Board, Wellington.
- 2 Just prior to preparing the diet, retinyl palmitate and ergocarciferol were mixed with corn oil to provide 6,000 IU and 600 IU, respectively, in kg diet.
- 3 The mineral mixture contained (in g /kg): CaCO_3 , 11.72; NaCl , 9.65; KH_2PO_4 , 13.72; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.99; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.37; $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.17; (in mg/Kg diet) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 62.4; ZnCl_2 , 56.8; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.82; $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.84; Na_2SeO_3 , 0.59; KIO_3 , 0.56. This mix was essentially the same as the mineral mixture-2 formulated by Ebihara, Imamura and Kiriyama (27), with exception of omitting the following trace elements: $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaF , $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, SnSO_4 , NH_4VO_3 .
- 4 This was identical with Harper's mixture (28) with sucrose as a diluent.
- 5 Added as a 50% solution in 50% ethanol.
- 6 Trade name is "Juvera granule", purchased from Eisai Co., Tokyo. It contained 200 mg of all-*rac*- α -tocopheryl acetate per gram.

たものを試験飼料と呼ぶことにした。AmやGDFの添加は、スクロースと置き換えるか、等量の基本飼料と置き換えて行った。

得られたデータはt-検定、あるいは分散分析の後、Duncan(29)のmultiple range testにより群間の有意差($P < 0.05$)検定を行った。

【実験1】毒性阻止効果の発現に必要な飼料中GDFレベルの検討

スクロースに置き換えてAmを5%添加した対照飼料と、これにGDFを1%, 2%, 3%, 5%, 10%と順次添加した試験飼料を用意し、GDFの添加レベルと成長回復の関係を調べた。

【実験2】Am毒性、およびGDFの毒性阻止効果に対する栄養素摂取量の影響

(シリーズ1) ペアーフィーディング下の成長応答 5%Am対照群に、基本飼料群と5%GDF同時添加群をペアーフィーディングさせて成長を比較した。なおペアーフィーディングに際しては、AmやGDFを除いた実質の摂取栄養素量が等しくなるように、基本飼料は前日に対照群が摂取した飼料の95%、試験飼料は同じく105.5%に相当する量を与えて14日間飼育した。

(シリーズ2) 強制投与時の成長応答 ペアーフィーディング法では、摂取量の少ない群(対照)とペアーを組ませるため、被験群は、与えられた一日の飼料を早々と摂取し終える。つまり対照群は、一日中飼料をnibblingしている

のに対し、被験群は、meal feedingに類似した摂取パターンになる。そこでシリーズ2では、強制投与方法により各群の栄養素摂取量を一定にして再検討した。この方法では、群間の栄養素摂取量を一定に保ち、なおかつ摂取パターンの相違を生ずることなしに栄養素供給量を任意に設定することができる。

投与に先立ち、4 gの基本飼料を等量の水に懸濁し、体重約150 gのラットに1日4回(7時, 12時, 17時, 22時)カニューレで胃に強制投与して7日間予備飼育した。その後ラットを3群に分け、基本飼料、これに4%Amを添加した対照飼料、及び4%Amと7.5%GDFを同時添加した被験飼料の3種を、予備飼育のときと同様にして14日間強制投与した。なおAmとGDFは非栄養素なので、対照飼料は、基本飼料の1.04倍、被験飼料は基本飼料の1.13倍量投与して三者からの栄養素供給量を等しくなるようにした。この間、水は自由に与えた。

【実験3】 Tween 60投与ラットの成長に及ぼすGDF同時投与の影響

飼料には基本飼料、15% Tween 60対照飼料、それに7.5%GDFを同時添加した試験飼料の3種を用いた。Tween 60や、GDFの添加は基本飼料に置き換えて行った。すなわち対照飼料は、基本飼料:Tween 60を85:15の割合で、またGDF同時添加飼料は、基本飼料:Tween 60:GDFを、77.5 : 15 : 7.5 の割合で配合した。

群の内訳は、3種飼料を水と共に自由にあたえた群と、

基本飼料とGDF同時添加飼料を、前出の対照群にペアフィーディングさせた2群を含む計5群であった。なおペアフィーディングに際しては、Tween 60やGDFを除いた実質の摂取栄養素量が等しくなるように、基本飼料は対照群が前日に摂取した飼料の85%、試験飼料は同じく109.7%に相当する量を与えた。

【実験4】 鉱物油投与ラットの成長におよぼすGDF-ホロセルロース、あるいはコンニャクマンナンの影響

ここでは、基本飼料中の5%とうもろこし油を、すべてスクロースで置き換えた無脂肪飼料をまず調製した。ついで流動パラフィン(炭素数15~20, 半井化学薬品, 京都)を、無脂肪飼料に7.5%添加(スクロース置換)したものを対照飼料とし、この対照飼料にGDFホロセルロース、コンニャクマンナン(清水化学, 三原市, 以下KMと略)、それにとうもろこし油を各々5%添加して試験飼料とした。なお、ホロセルロース(30)とは、GDFを希酢酸溶液下で亜塩素酸処理して得た脱リグニン分画である。以上の5種飼料に、基本飼料(Table 2-1)を含めた計6種飼料を水とともに自由に与えて28日間飼育し、成長応答を調べた。

結果

実験1 Table 2-2には、5%Am対照飼料にGDFを順次添加したときの体重増加量の変化を示した。基本飼料群は、約7.8 g/日の速度で直線的な成長を示したのに対し、

Table 2-2. Effect of dietary level of gobo dietary fiber (GDF) on the body weight gain of rats fed a purified diet containing 5% amaranth (experiment 1)⁽⁶²⁾

Diet	Average body weight gain for		
	7 days	14 days	21 days ¹
	g	g	g
Basal diet	47 ± 1.4 ^{a,2}	104 ± 2.6 ^a	161 ± 3.6 ^a
Basal diet + 5% Amaranth ³	10 ± 3.3 ^b	55 (42,67) ⁴	96 (83,109)
Basal diet + 5% Amaranth + 1% GDF ⁵	17 ± 4.9 ^b	41 ± 8.0 ^b	79 ± 12.9 ^b
Basal diet + 5% Amaranth + 2% GDF	35 ± 4.2 ^c	70 ± 4.7 ^c	119 ± 5.7 ^c
Basal diet + 5% Amaranth + 3% GDF	40 ± 4.3 ^{ac}	82 ± 5.5 ^{cd}	133 ± 8.6 ^{cd}
Basal diet + 5% Amaranth + 5% GDF	46 ± 2.8 ^{ac}	96 ± 3.9 ^{ad}	151 ± 2.7 ^d
Basal diet + 5% Amaranth + 10% GDF ⁶	55 ± 2.3 ^d	117 ± 4.1 ^e	178 ± 4.6 ^e

- 1 Average initial body weight, 64.2 g each (range:53 to 74 g).
- 2 Mean ± SEM; values not sharing a common superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).
- 3 Food Red No. 2, trisodium salt of 1-(4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid (Food Red No. 2), purchased from San-Ei Chemical Industries, Ltd., Osaka.
- 4 The figures in parenthesis indicate individual weight gains of animals survived.
- 5 Dietary fiber prepared from "gobo", the roots of edible burdock (*Arctium lappa* L.) purchased from a local dealer.
- 6 Average initial body weight was different only in this group: 75 g and 72 to 76 g, respectively.

A m 対照群では 5 日程成長の止まった状態が続いた。そして 2 週目に入って同群の 5 匹中 3 匹が死亡したが、生存ラットの成長抑制はこの後比較的軽くなった。また飼育期間中激しい下痢を起こし、2 週目頃から肛門部に炎症が現れるようになった。

一方 GDF 添加各群では、まず 1% の添加で生存率が 100% に改善され、体重は GDF 添加レベルの上昇につれて増加した。たとえば A m 対照群のラットが死亡し始める直前 (10 日目) の体重増加量で比較した場合、2% 添加で有意な成長回復が見られるようになり、3% 添加で基本飼料群と等価の成長速度を示すまでに回復した。下痢も GDF の添加レベルに相応して緩和された。Fig. 2-1 には、GDF の添加レベルと成長回復率の関係を示した。なお成長回復率とは、対照群の体重増加量を基準 (0%) とし、GDF 添加群の体重増加量が基本飼料群のそれにまで完全回復した場合を 100% として表したものである。Fig. 2-1 から明らかのように、両者は対数回帰 ($Y = -53.9 + 84.0 \log X$, $r=0.96$) に従う高い相関を示した。

GDF による成長回復は、同時に飼料効率の改善も伴っていた。たとえば、A m や GDF 等の非栄養素を除いた正味の栄養素摂取量に基づいて計算した飼料効率は、基本飼料群の 0.61 に対し、5% A m 対照群では 0.19 と著しく低下した。しかしこの低下は 3% GDF の同時添加により、0.58 まで有意に改善された。

Fig. 2-2 は 5% A m 対照飼料と、5% GDF 同時添加飼料で

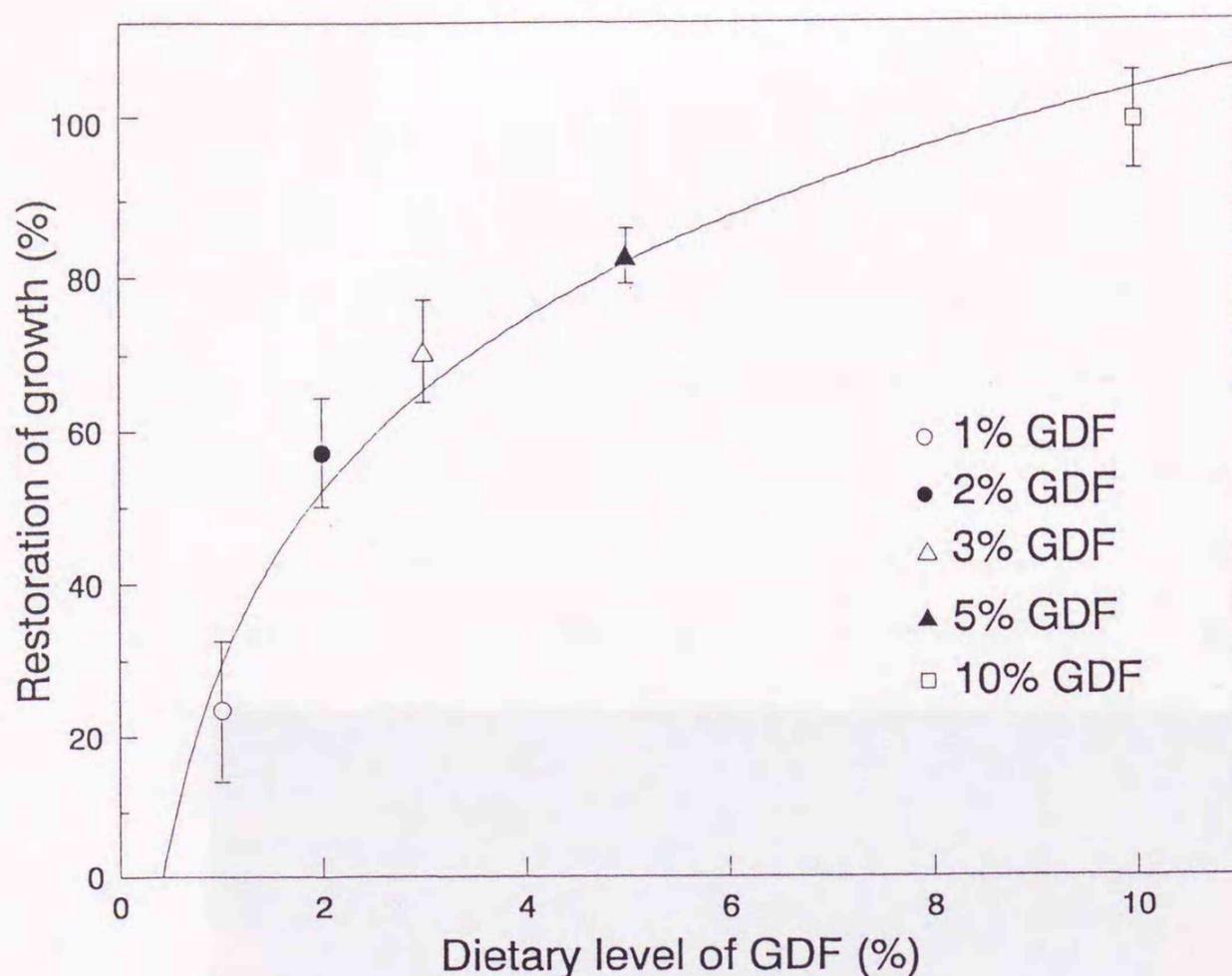


Figure 2-1. Correlations between the dietary level of GDF and the growth restoration of rats fed a purified basal diet containing 5% amaranth (Food Red No. 2)(*experiment 1*)⁶². The restoration of growth (%) is expressed as follows: (difference in body weight gains between rats fed with amaranth plus GDF and those fed with amaranth alone) X 100/(difference in body weight gains between rats fed the basal diet and the same diet with amaranth. The composition of the basal diet is shown in table 2-1. GDF refers to gobo dietary fiber, which was prepared from the roots of edible burdock, (*Arctium lappa* L.). Each point is the mean of rats fed the basal diet with 5% amaranth plus GDF at the following dietary levels: ○ , 1% ; ● , 2% ; △ , 3% ; ▲ , 5% ; □ , 10% , and vertical bars represent standard error of the mean. A logarithmic curve was obtained with the following equation: $Y = 32.6 + 86.9 \log X$ ($r = 0.98$). Where Y is protective activity expressed as growth restoration and X is the level (%) of GDF supplemented.



Figure 2-2. The rat on the left received the purified basal diet containing 5% amaranth (Food red No. 2). The rat on the right received the basal diet containing 5% amaranth plus 5% GDF (*experiment I*)⁽¹²⁵⁾. Photograph was taken after 21 days of feeding.

21日間飼育したラットを示したものである。A m 対照ラット(左)は、明らかな成長遅延が認められる他、A m を含む下痢便が肛門部周辺を汚してこれを毛づくろいするため、体表面に色素の汚れや脱毛が目立つ。一方、GDF 同時添加飼料を摂取したラット(右)は、結果的に対照ラット以上にA m を摂取したにもかかわらず、体重が完全に回復し、健全な状態であることが外見からも確認できる。

実験2(シリーズ1) GDFによる成長回復効果が、栄養素摂取量が等しい条件下でも再現するかどうかをペアーフィーディング法により調べた。Table 2-3(シリーズ1)から明らかなように、A m 対照群は、基本飼料群より明らかに成長が遅延したが、GDFの同時添加群でこれが有意に改善された。つまり、A m による飼料効率の低下は、単なる飼料摂取量の低下に起因ものではないこと。そしてGDFは、栄養素自体の利用改善をとおして成長を回復させることが明らかとなった。

(シリーズ2) 強制投与法により、各飼料からの栄養素供給量を一定にして飼育したときの体重変化をTable 2-3(シリーズ2)に示した。14日間の3種飼料からの栄養素供給量はどれも224 gであったが、この量は、自由摂取時に対照群ラットが同じ期間中に摂取した量の約1.6倍に相当していた。このように栄養素供給量を増やしてもA m 添加対照群では、途中2匹が死亡した。また生存ラットの平均成長速度は、基本飼料群のそれより約25%ほどであるが有

Table 2-3. The amounts of diet and nutrient fraction consumed and body weight gain of rats subjected to pair-feeding or forced-feeding with three kinds of diets for 14 days (*experiment 2*)^(48,115)

Diet	Amount of diet eaten		Net nutrient fraction consumed	Body weight gain for	
	Absolute	Relative		7 days	14 days
	g/14 days	%	g/14 days	g	g
[series 1] ¹ Basal diet	137±3.3 ^{a,2}	95	137±3.3 ^a	19±2.9 ^a	57±2.3 ^{a(4)} ³
Basal diet + 5% Amaranth	144±4.3 ^a	100	137±4.1 ^a	10±3.6 ^b	35±6.0 ^{b(4)}
Basal diet + 5% Amaranth + 5% GDF	152±4.5 ^b	105.5	137±4.1 ^a	19±3.3 ^a	57±2.4 ^{a(4)}
[series 2] ⁴ Basal diet	224	100.0	224 ⁵	38±4.1 ^a	61±5.7 ^a
Basal diet + 4% amaranth	233	104.2	224	21±4.2 ^b	41±2.9 ^{b(3)}
Basal diet + 4% amaranth + 7.5% GDF	253	113.0	224	41±2.9 ^a	64±2.0 ^a

1 Average initial body weight (n=5), 64.0 g (range: 54 to 71 g).

2 Mean±SEM; values not sharing a common superscript letter are significantly different within a column ($P < 0.05$). Statistical comparisons were made within each experimental series.

3 The figures in parentheses indicate the number of rats survived on which the data were based: since one rat in the control diet-fed group died on day 9, each partner in the other groups was dropped out of the calculation of the final body weight gain.

4 Prior to this series, rats weighing about 140 g were accustomed to forced-feeding by intubation of aqueous suspension containing 8 g basal diet into the stomach 4-times (0700, 1200, 1700, 2200) a day for 7 days.

5 Rats in each group were intubated to supply equal amounts of nutrients from respective diets in the same manner as that used for the training period.

意に減少した。しかし、7.5%GDFの同時投与により生存率が100%に回復しただけでなく、成長は基本飼料群と等しい速度にまで回復した。

実験3 Tween 60毒性と、これに対するGDFの効果をTable 2-4に示した。まず、自由摂取群間の成長応答に着目すると、15%Tween 60対照群の20日後の体重増加量は、基本飼料群のその40%程に過ぎなかった。飼料摂取量も、約半分に減少した。また、5%Am添加時と同様、下痢便が実験期間中続き、盲腸重量は有意に増加していた。このため、盲腸重量を控除した体重増加量、ならびに飼料効率は明らかに低下した。一方7.5%GDF同時添加群では、飼料摂取量、体重増加量とも有意に増加し、いずれも基本飼料群のそれに匹敵するまでに回復した。なお、盲腸湿重量を控除した最終体重で比較してもこの傾向は変わらなかった。

次に、Tween 60対照群に基本飼料をペアーフィーディングさせた場合には、両者の体重増加量に差がなくなった。つまり、Amの場合と異なり、Tween 60による成長遅延は主に飼料摂取量の低下によるものであることが明らかとなった。GDF同時添加飼料をペアーフィーディングさせた場合、体重増加量は対照群よりやや好転したものの、有意な成長改善は認められなかった。なお同群の飼料効率は、明らかに改善されていた。

実験4 Table 2-5には鉍物油毒性と、これに対するGDFホロセルロース、ならびにKMの添加効果を示した。

Table 2-4. Effect of feeding Tween 60 with or without gobo dietary fiber (GDF) on body weight gain when fed *ad libitum* or pair-fed (*experiment 3*) (122)

Group	Diet	Feeding method	Nutrient intake ¹	Body weight ²	Food efficiency ³	Cecum weight
— g/20 days —				g		
A	Basal diet	<i>ad libitum</i>	369±14 ^{a,4}	164±4.5 ^a	0.446±0.01 ^a	3.0±0.1 ^a
B	Basal diet + 15% Twn ⁵	<i>ad libitum</i>	181±12 ^b	65±6.9 ^b	0.322±0.03 ^b	5.9±0.2 ^b
C	Basal diet + 15% Twn + 7.5% GDF	<i>ad libitum</i>	293±6.0 ^c	159±3.0 ^a	0.505±0.01 ^c	10.8±1.1 ^c
D	Basal diet	Pair-fed to group B	181±12 ^b	69±7.8 ^b	0.367±0.02 ^b	2.1±0.4 ^a
E	Basal diet + 15% Twn + 7.5% GDF	Pair-fed to group B	181±12 ^b	88±7.1 ^b	0.425±0.01 ^a	10.2±1.1 ^c

1 Food intake not containing non-nutritive dietary supplements (Tween 60 and GDF).

2 Average initial body weight, 72.0 ± 0.89 g.

3 Food efficiency (g gain/g intake), it was calculated on the basis of the final body weight not including the cecum and on the food intake which is the amount of nutrients fraction in the diet consumed.

4 Mean ± SEM (*n*=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (*P*<0.05).

5 Tween 60 (polyoxyethylene sorbitan monostearate).

無脂肪飼料群の28日後の体重増加量は、基本飼料群のそれより13%程であるが有意に減少していた。この飼料に7.5%鉱物油を添加したとき、体重増加量は無脂肪群のわずか35%に過ぎなかった。著しい成長遅延の他、同群の全ラットに、体表から脂質が漏出する症状(脂漏症)が認められた(Fig.2-3)。

一方、5%GDFホロセルロースを鉱物油と同時に添加した場合に、成長は無脂肪群の約64%にまで有意に改善された。同群では、脂漏症の程度も緩和されていた(Fig.2-3)。5%KM群でも成長改善の兆しはみられたが、有意差を生ずる程の効果は得られなかった。なお、5%とうもろこし油添加群では、無脂肪群の体重増加量の93%に達するほぼ完全な回復を示した。言い換えれば、とうもろこし油を含んだ飼料中では、この鉱物油毒性は起こらないということになる。

考察

Ershoff(20)は、5%Am毒性に対してセルロース(5%)、アルファルファ粉末(5%)、ペクチン(10%)、パセリ粉末(10%)、クレソン粉末(10%)、全粒小麦粉(20%)、ごま(20%)で阻止効果を観察している。また永井ら(26)は、ゴボウの他、たけのこ、もやし、にんじんの食物繊維(5%)も同様にAm毒性に対して有効であることを観察した。

また今回のGDFの添加レベルと回復効果の関係から(Table 2-2)、Am毒性に対するGDFの有効最小レベルは3%

Table 2-5. Effect of mineral oil with or without dietary fibers on food intake, body weight gain and food efficiency of rat fed a fat free diet (*experiment 5*)

Diet	Food intake	Body weight gain ¹	Food efficiency ²	Cecum weight	Epidermis fat pads
	— g/28 days —			g	g
Basal diet	514±2 ^{a,3}	237± 9.9 ^a	0.46±0.01 ^a	3.2±0.3 ^{ab}	5.25±0.43 ^a
Basal diet + 7.5% MO ⁴	511±26 ^a	208± 3.8 ^{ab}	0.41±0.02 ^b	9.4±1.1 ^c	3.03±0.15 ^b
Fat-free diet	497±24 ^a	195± 5.9 ^b	0.39±0.01 ^b	3.1±0.1 ^{ab}	4.11±0.25 ^c
Fat-free diet + 7.5% MO	383±30 ^b	74±14 ^d	0.19±0.02 ^d	2.8±0.8 ^a	0.74±0.21 ^e
Fat-free diet + 7.5% MO + 5% GDF-holo ⁵	472±17 ^{ac}	131± 9.6 ^c	0.28±0.01 ^c	2.8±0.3 ^a	1.83±0.31 ^d
Fat-free diet + 7.5% MO + 5% KM ⁶	409±15 ^{bc}	96± 7.2 ^d	0.23±0.01 ^d	5.2±1.0 ^b	1.00±0.10 ^e

1 Average initial body weight, 64 g (range: 49 to 81 g)

2 Calculated according to the equation, g gain/g intake.

3 Mean ± SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).

4 Mineral oil (liquid paraffin having 15 to 20 of carbon chain length), purchased from Nakarai Chemicals, Ltd. Kyoto.

5 Refers to GDF-holocellulose which was prepared from GDF with sodium chlorite in dilute acetic acid medium (30).

6 Konjac mannan which is native and water-soluble form obtained from the tubers of *Amorphophallus konjac* K.Koch, and which was kindly supplied by Shimizu Kagaku Kenkyusho, Mihara.



Figure 2-3. The rat on the right received a fat-free diet containing 7.5% mineral oil (*experiment 4*). The rat on the left received the same diet supplemented with 5% GDF-holocellulose. Photograph was taken after 28 days of feeding. Holocellulose was prepared from GDF with sodium chlorite in dilute acetic acid medium (30).

前後で、5%の添加でこの効果がほぼ平衡に達することが明らかとなった。

次にペアーフィーディング法、あるいは強制投与法による飼育実験から、Am対照群の成長遅延は、単に摂取量の低下に起因するものではなく、栄養素自体の利用が低下するために起こることが明らかとなった。またこの条件でもGDFの有効性が確認されたことから、GDFによる成長回復が、栄養素自体の利用改善を通して現れることが明らかとなった。

一方、Tween 60による成長遅延は、ペアーフィーディング法では確認できなかった(Table 2-4)。したがって Tween 60による成長遅延は、飼料摂取量の減少が主な要因と考えられ、GDFの効果は、飼料摂取量の回復によるところが大きい。なおGDF同時添加群の飼料効率が、Tween 60対照群よりも有意に改善されていたのは、GDFの腸内発酵によって生ずる短鎖脂肪酸等がエネルギー不足を改善した結果かもしれない。

以上、本節ではErshoffの観察した現象をGDFで確認することができた。それに加えて、有害化学物質の種類により、毒性の発現様式に違いのあることもわかった。つまりGDFで改善される成長遅延は、単に飼料摂取量の減少に起因するタイプと、栄養素自体の利用低下を伴うタイプに分類することができる。なお鉱物油毒性は、栄養素(とうもろこし油)の添加によっても改善される点で、Am毒性や Tween 60毒性と異なる機構によって生ずるも

のと考えられ、本研究の対象からは除いた。

2.2 その他の毒性に対する食物繊維の阻止効果の検索

緒言

Ershoffは、各種の有害物質に対する食物繊維の毒性阻止効果を調べたが、有害な物質間の生理作用の違いを比較検討していない。それぞれ構造の異なる有害化学物質は、当然生物学的影響も異なると予想されるので、アルファルファ粉末で効かなかった有害物質もあったと推測される。しかし、そうした物質の種類や性質についての記述も見あたらない。

食物繊維は、どのようなタイプの毒性に対して有効なのであろうか。本節ではいくつかの異なるタイプの毒性に対する食物繊維の添加効果を検討し、この種の効果が及ぶ範囲と限界について検討した。

実験方法

【実験5】栄養素の過剰投与毒性に対するGDF同時投

与の影響

栄養素と言えども、単独に過剰投与した場合には強い毒性を発現する。ここではグリシン、メチオニン等のアミノ酸過剰毒性(31)と、ビタミンA過剰毒性(32)に対するGDFの添加効果を検討した。

(シリーズ1) グリシン, およびL-メチオニン過剰毒性に対するGDFの影響 本実験では, 糊化とうもろこしデンプンを炭水化物源とする7%低カゼイン飼料を, 基本飼料に用いた{なお塩類混合の組成は, 本実験に限りHarper(28)の報告に従った}. これに5%グリシン,あるいは3%L-メチオニンを各単独に添加したものを対照飼料とし, 各々の対照飼料にさらに5%GDFを同時添加したものを試験飼料として用いた. アミノ酸やGDFの添加は, スクロースに置き換えて行った. ラットは予備飼育した後, 1群5匹として個別ケージに組み分け, 飼料と水を自由に与えて14日間飼育した.

(シリーズ2) ビタミンA過剰投与毒性に対するGDF同時投与の影響 基本飼料に500万IUのビタミンA(酢酸レチノールとして1.72 mg/kg diet)を添加した対照飼料, そして等量のビタミンAと5%GDFを同時添加した両飼料を水と共に自由に与えて成長を比較した. なお酢酸レチノールは, 5%とうもろこし油に添加して配合した.

【実験6】緩下剤の過剰投与毒性に対するGDFの影響

A mの5%投与により, ラットは激しい下痢を起こすが, GDFの同時投与によりこれが著しく改善される(実験1). GDFによる成長回復は, 一見, 下痢の改善と関連しているようにもみえる. そこで, ひまし油とセンナ末の2種の緩下剤を用いて下痢を誘発させ, この飼料にGDFを同時添加したときの下痢の緩和作用と成長回復の関係について検討した.

なお緩下剤は、作用機序によっていくつかに分類されるが、ひまし油は構成脂肪酸中リシノール酸 (linoleic acid) の小腸運動の刺激により、またセンナは大腸運動の刺激により瀉下作用を発揮するとされている(33)。

(シリーズ1) ひまし油過剰投与毒性に対するGDF添加の影響 50 g前後のラット15匹を基本飼料で5日間予備飼育した後、5匹ずつ3群に組分け、基本飼料、5%ひまし油添加対照飼料、それに5%ひまし油と5%GDFを同時添加した被験飼料の各々を水と共に自由に与えて21日間飼育した。なお、ひまし油(関東化学、東京)やGDFの添加は、スクロースに置き換えて行い、ひまし油の添加レベルは、2週目以降15%に増やした。

(シリーズ2) センナ末の過剰投与毒性に対するGDF添加の影響 センナ末(ウチダ和漢薬(株), Lot No. 152530, 東京)を基本飼料に2%添加した対照飼料と、これにさらに5%GDFを同時に添加した飼料を、成熟ラット(体重 272-386 g)に、水と共に自由に与えて成長を比較した。

【実験7】デオキシコール酸毒性に対する各種食物繊維の影響

デオキシコール酸ナトリウム(sodium deoxycholate, 以下DOCと略)の大量投与は、消化管粘膜が剥離し(34)、栄養素の吸収障害を起こす(35)ことが報告されている。ここでは、DOC毒性を例に消化管毒性に対する食物繊維の添加効果を検討した。具体的には、基本飼料、1%DOC添加対照飼料、これに各食物繊維(GDF, キトサン, KM, カルボキ

シメチルセルロース(CMC)}を各々7.5%添加した被験飼料を調製し、これら飼料に対するラットの成長応答を比較した。

21日間の飼育実験終了後、空腸粘膜上皮の形態を調べるため、ラットを断頭により殺し、速やかに開腹して空腸を取り出した。基本飼料群、対照群、GDF同時添加群の任意のラットから各々一定部位(幽門部より15 cm遠位側)の空腸を採取して反転し、所定の方法(36)に従って標本作製した後、粘膜表面を走査型電子顕微鏡(S-500A型、日立製作所、東京)で観察した。

結果

実験5(シリーズ1) アミノ酸過剰毒性に対するGDFの効果
をFig. 2-4に示した。14日後の体重増加量は、7%低カゼイン飼料に5%グリシンを添加した群で基本飼料群より55%減少し、3%L-メチオニンの添加群では初体重よりも減っていた。後者は、投与開始時の体重が7日後に16%程減少し、その後成長が完全に止まってしまった。低タンパク質飼料で現れるこれらアミノ酸の過剰毒性は、いずれもGDFの同時添加では回復しなかった。

(シリーズ2) Fig. 2-5には、ビタミンAの過剰毒性に対するGDFの影響を示した。ラットの必要量のほぼ800倍量に相当する過剰量(500万IU)のビタミンAもまた著しい成長遅延を生じ、途中死亡するラットさえ現れた。5%GDFの同時投与は、当初成長をやや改善するようにみえたが、同群の最終体重は対照群と変わらなかった。

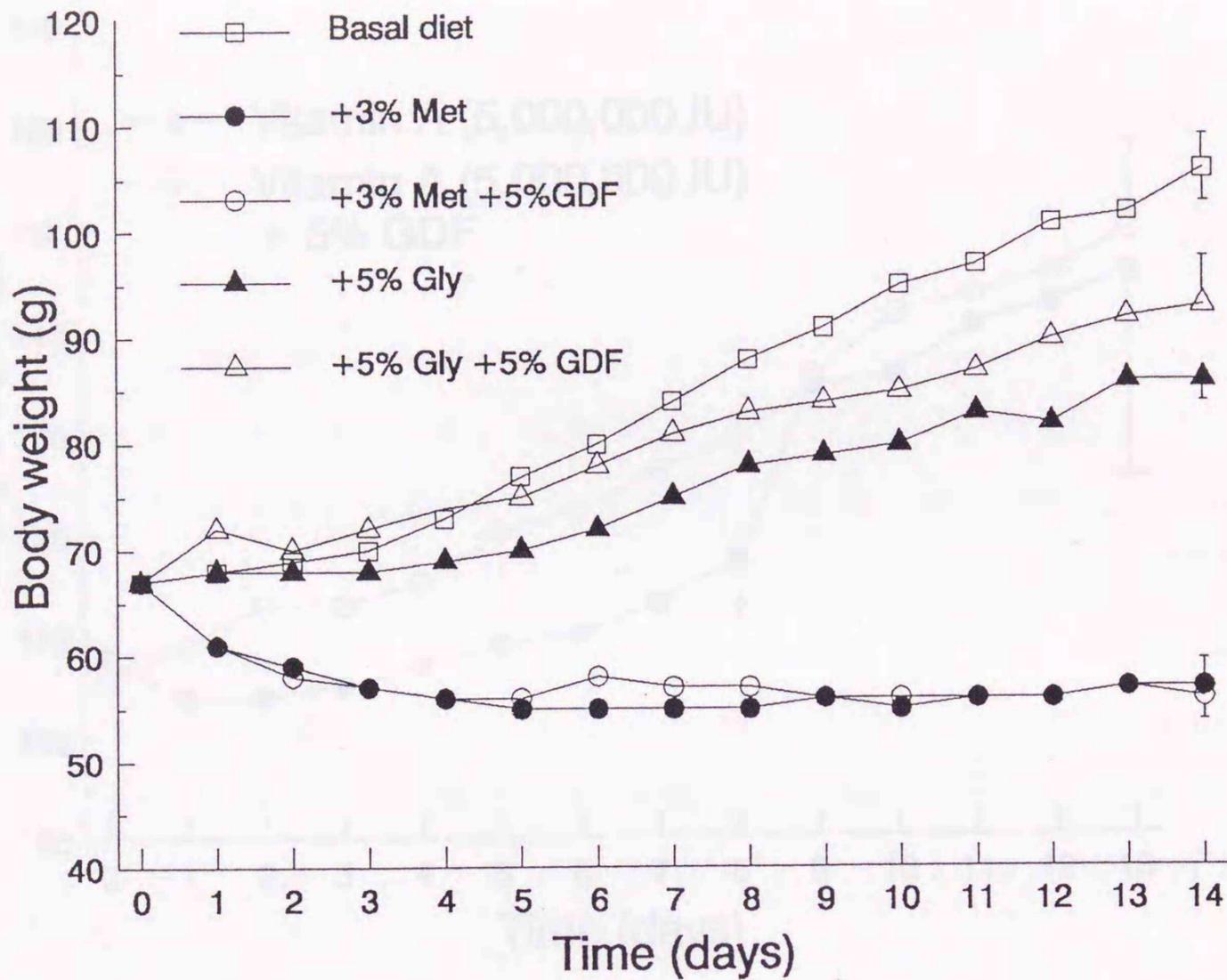


Figure 2-4. Change in body weight of rats fed a 7% casein-sucrose diet containing excess glycine (5%) or L-methionine (3%) (*experiment 5, series I*)⁽⁷⁹⁾. Symbols: \square , 7% casein basal diet; \blacktriangle , the basal diet containing 5% glycine; \triangle , the basal diet containing 5% glycine plus 5% GDF; \bullet , the basal diet containing 3% L-methionine; \circ , the basal diet containing 3% L-methionine plus 5% GDF. GDF refers to gobo dietary fiber, which was prepared from the roots of edible burdock, (*Arctium lappa* L.). Each point is the mean of 5 rats and the vertical bars represent standard error of the mean.

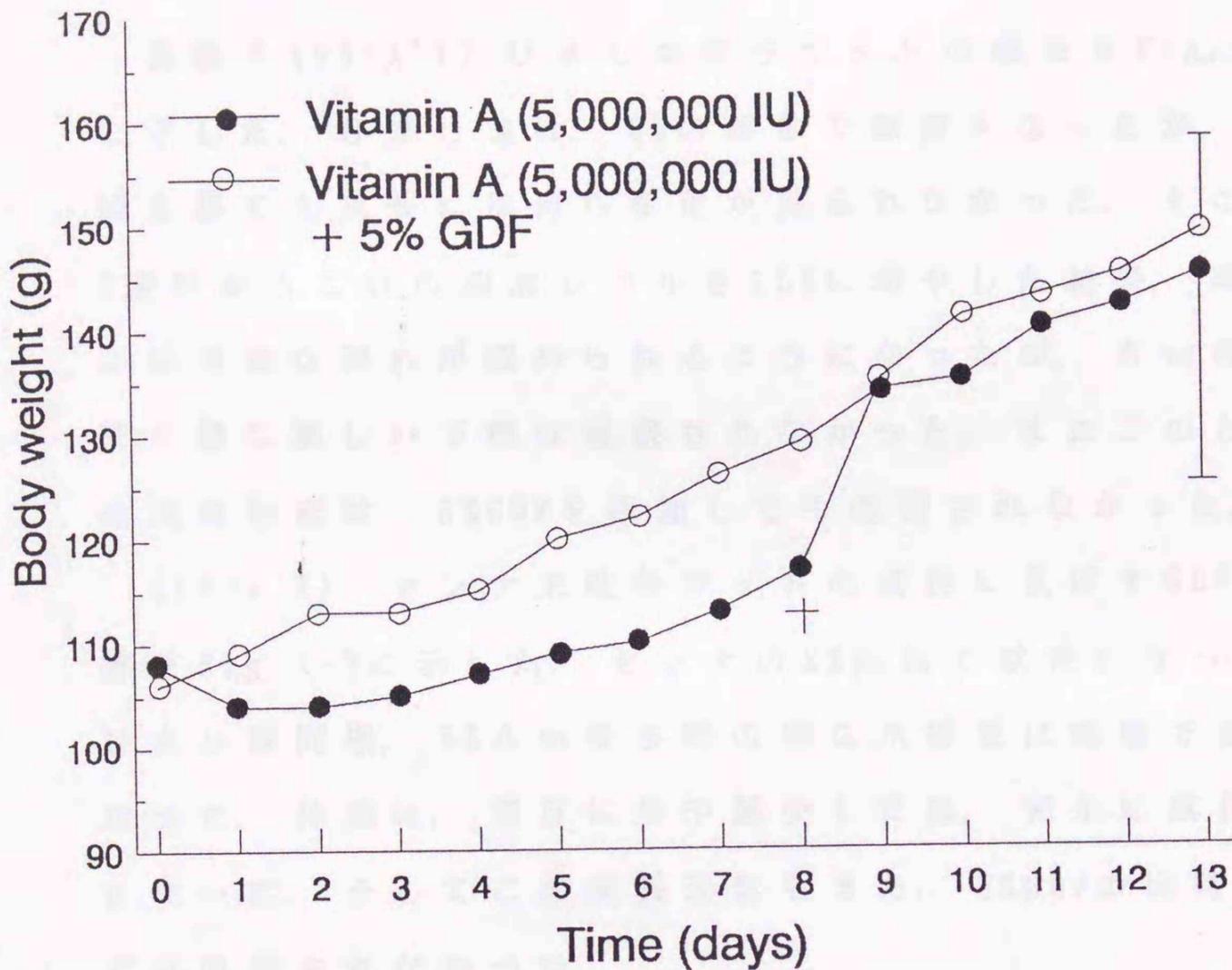


Figure 2-5. Change in body weight of rats fed a large amount of retinol with or without 5% GDF(*experiment 5, series 2*)⁽⁸⁷⁾. Eight male rats weighing about 108 g were divided into 2 groups and fed a purified basal diet containing 5,000,000 IU of Vitamin A as retinyl acetate (●) and the same diet supplemented with 5% GDF (○). One of 4 rats fed with retinol alone died on the way of the experimental feeding as indicated by cross. GDF refers to gobo dietary fiber prepared from the roots of edible burdock, (*Arctium lappa* L.). Vertical bars represent standard error of the mean.

実験 6 (シリーズ 1) ひまし油投与ラットの成長を Fig. 2-6 に示した。ひまし油は、5%の添加で軟便となったが、1週間を経ても成長には何ら変化が見られなかった。そこで、2週目からこれの添加レベルを15%に増やした結果、成長には有意な遅れが認められるようになったが、Am投与時の様な激しい下痢は観察されなかった。またこのときの成長遅延は、5%GDFを添加しても改善されなかった。

(シリーズ 2) センナ末投与ラットの成長に及ぼすGDFの影響を Fig. 2-7 に示した。センナの2%添加で軟便になったが、ひまし油同様、5%Am投与時の様な水様便は観察できなかった。体重は、翌日にやや減少した後、完全に成長が止まった。そしてこの成長遅延もまた、5%GDFの同時投与では改善されなかった。

実験 7 Table 2-6には、1%DOC投与ラットの成長におよぼす各種食物繊維(7.5%)の影響を示した。DOCは、1%の投与レベルで下痢を起こした他、飼料摂取量は基本飼料群の53%に、体重増加量は43%にそれぞれ減少した。

キトサンは、陰イオン交換能をもつので(37)、もしこれがDOCを吸着するならば、DOC毒性を阻止できるかもしれないと予想した。また水溶性食物繊維(KM, CMC)は、拡散抑制作用(38)があるので、これによるDOCの吸収抑制効果を期待してそれぞれ用いたわけであるが、体重増加量から判断する限り、いずれも期待したような効果は得られなかった。むしろ、キトサンとKM群は6匹中2匹が、またCMC群では同じく3匹が死亡し、これら試料はDOC毒

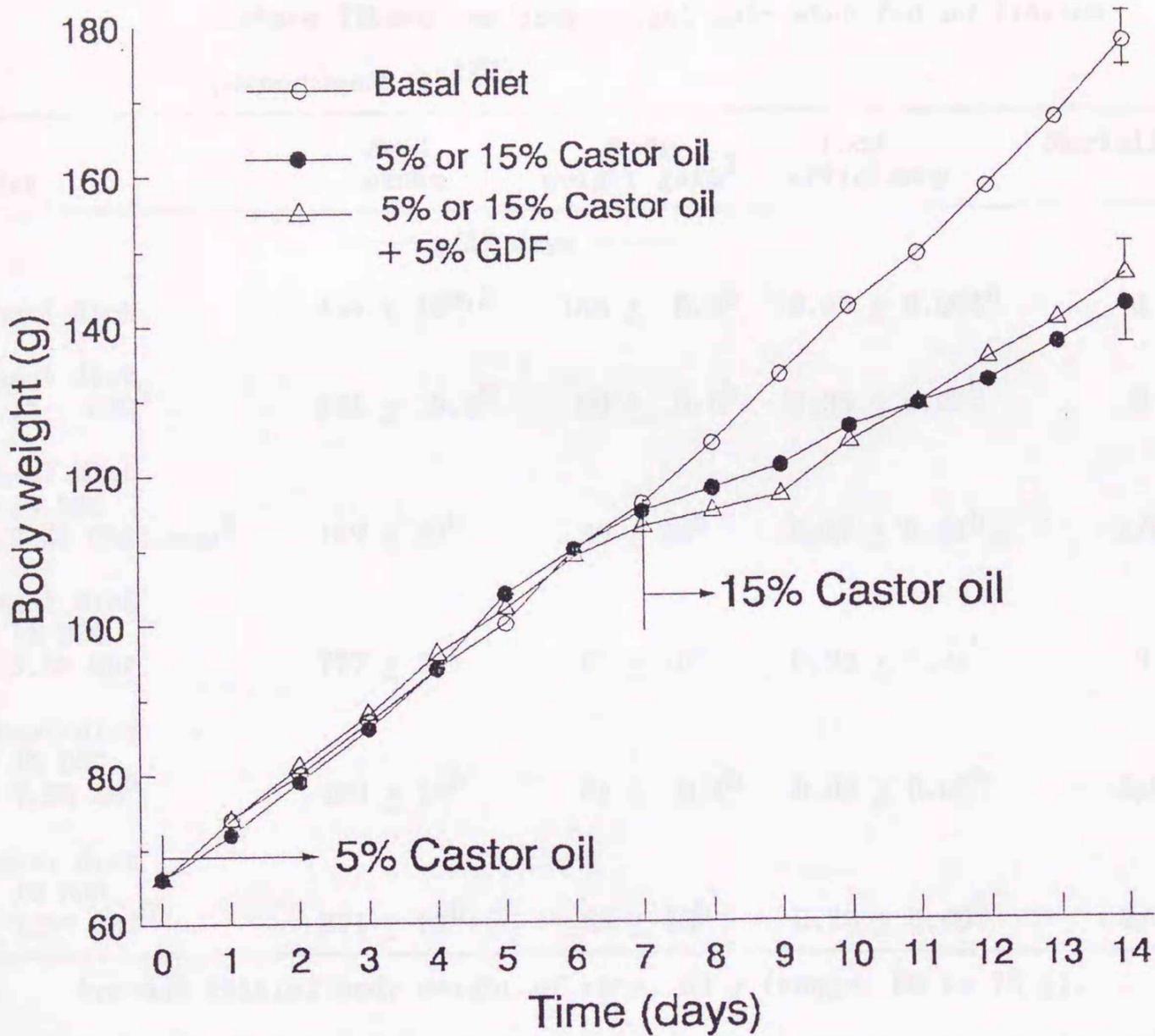


Figure 2-6. Change in body weight of rats fed castor oil with or without 5% GDF (experiment 6, series I)⁽⁸⁷⁾. Eighteen male rats weighing about 66 g were divided into 3 groups of 6 animals and fed a purified basal diet (○), the basal diet containing 5 or 15% castor oil (●) and the basal diet containing castor oil plus 5% GDF (△). Dietary level of 5% castor oil was increased to 15% level after 7 days of feeding. GDF refers to gobo dietary fiber, which was prepared from the roots of edible burdock, (*Arctium lappa* L.). The vertical bars represent standard error of the mean.

Table 2-6. Effect of feeding sodium deoxycholate with or without various dietary fibers on body weight gain when fed *ad libitum* (experiment 6)⁽¹²²⁾

Diet	Food intake	Body weight gain ¹	Food efficiency	Mortality
	— g/21 days —			
Basal diet	354 ± 14 ^{a,2}	158 ± 5.4 ^a	0.45 ± 0.004 ^a	0
Basal diet + 1% DOC ³	191 ± 9.9 ^b	68 ± 6.6 ^b	0.35 ± 0.02 ^b	0
Basal diet + 1% DOC + 7.5% Chitosan ⁴	169 ± 32 ^b	39 ± 24 ^b	0.17 ± 0.11 ^b	2/6
Basal diet + 1% DOC + 7.5% GDF	177 ± 13 ^b	61 ± 10 ^b	0.33 ± 0.04 ^b	0
Basal diet + 1% DOC + 7.5% KM ⁵	188 ± 14 ^b	61 ± 8.1 ^b	0.32 ± 0.02 ^b	2/6
Basal diet + 1% DOC + 7.5% CMC ⁶	271 ± 27 ^b	65 ± 16 ^b	0.28 ± 0.05 ^b	2/6

1 Average initial body weight of rats, 69 g (range; 66 to 76 g).

2 Mean ± SEM(n=6); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).

3 Refers to sodium deoxycholate.

4 Deacetylated product from chitin, kindly supplied by Kyowa Oil and Fat Co., Chiba.

5 Konjac mannan which is native and water-soluble form obtained from the tubers of *Amorphophallus konjac* K.Koch, and which was kindly supplied by Shimizu Kagaku Kenkyusho, Mihara.

6 Refers to sodium carboxymethylcellulose, purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka.

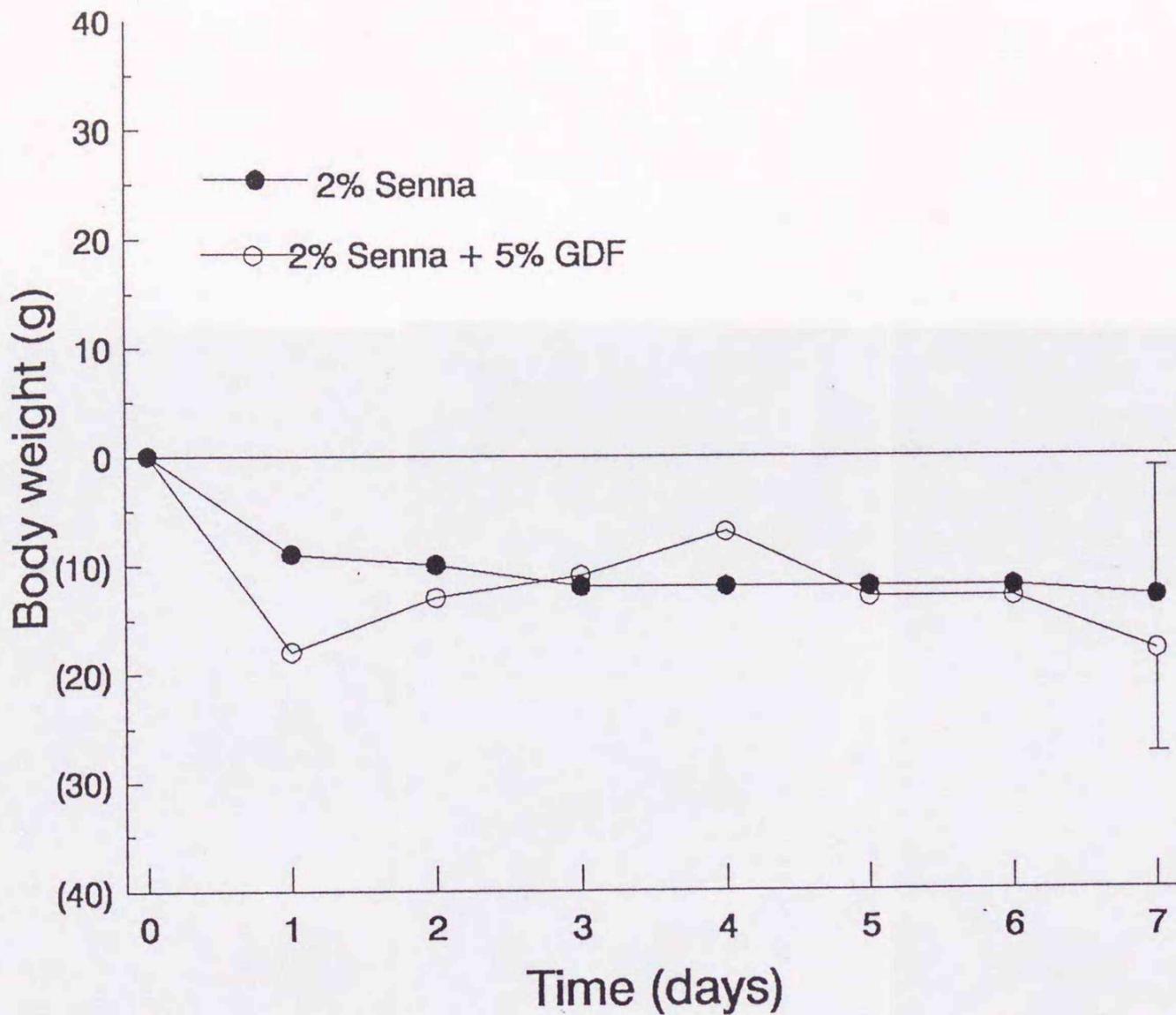


Figure 2-7. Change in body weight of rats fed 2% senna with or without 5% GDF (experiment 6, series 2)⁽⁸⁷⁾. Six male rats weighing about 311 g were divided into 2 groups of 3 rats and fed a purified basal diet containing 2% senna (●) or the same diet supplemented with 5% GDF (○). GDF refers to gobo dietary fiber, which was prepared from the roots of edible burdock, (*Arctium lappa* L.). The vertical bars represent standard error of the mean.

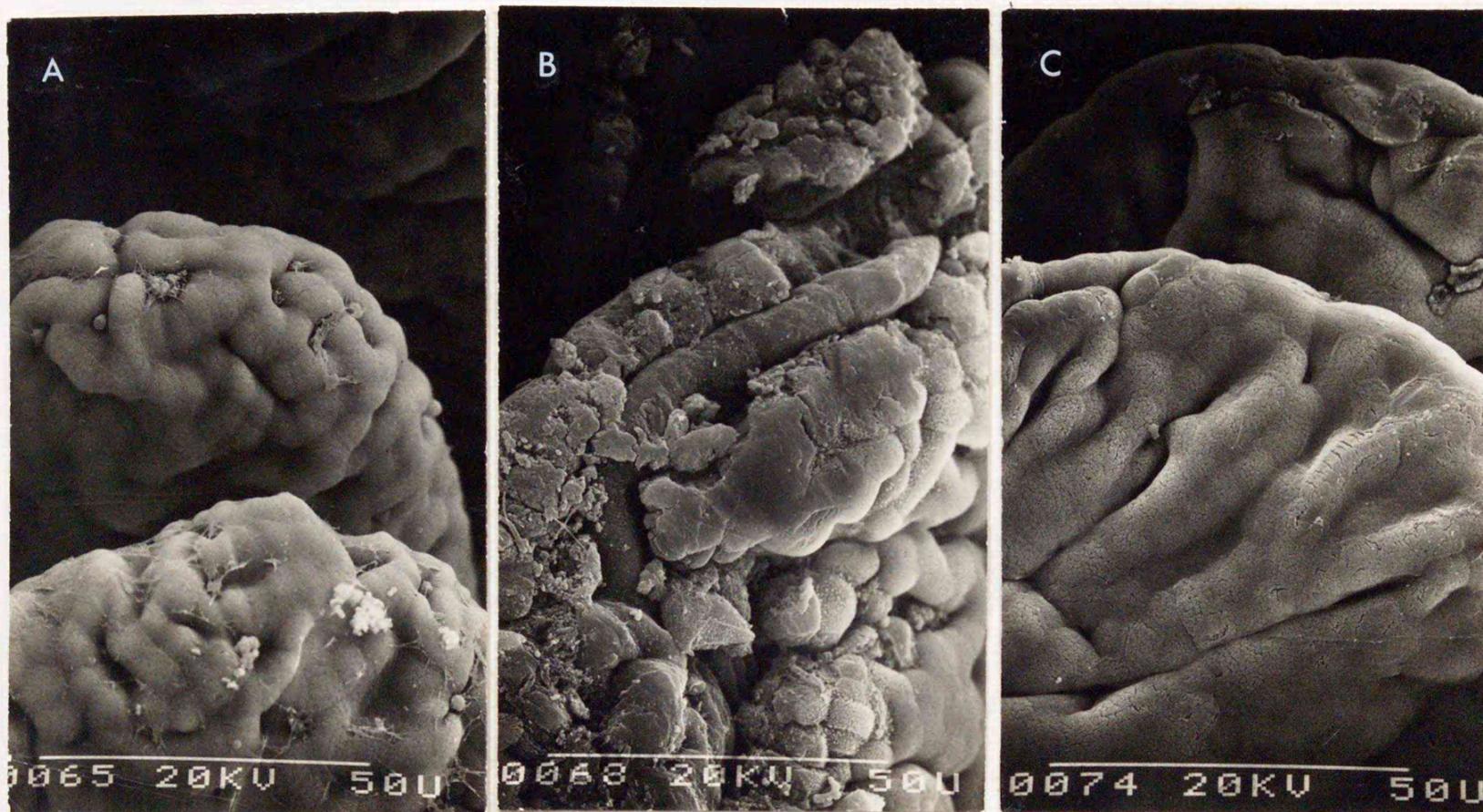


Figure 2-8a,b,c. Scanning electron micrographies of rat jejunum after feeding the basal diet (A), basal diet containing 1% DOC (B) and basal diet containing 1% DOC plus 7.5% GDF (C) for 21 days (*experiment 7*)⁽¹²²⁾.

Micrograph form of rat fed basal diet supplemented with 1% DOC suggest that epithelial cells nearby the top of the villi were exfoliated and exposed their lateral surfaces. A white line in each photograph is comparable to 50 u in length. DOC refers to sodium deoxycholate.

性をむしろ強める傾向さえ見られた。

次に空腸粘膜の走査電顕像を Fig. 2-8a~c に示した。

1%DOCを21日間単独投与した対照群で、絨毛先端部の上皮細胞が脱落し、基底膜らしい部分の露出しているのが観察された (Fig. 2-8b)。なお、GDF同時添加群では対照群ほどの際立った形態的变化はみられなかったものの、成長には何ら回復効果が認められなかった。

考察

永井ら (39) は、ブチルヒドロキシアニソール (1.2%)、デヒドロ酢酸 (0.1, 0.2 および 1%)、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (1%)、カドミウム (75 ppm) の毒性に対する各種野菜食物繊維の添加効果を調べたが、いずれの毒性に対しても無効であった。一方桐山ら (40, 41) は、PCB (0.1%) と DDT (0.02%) の毒性に対する食物繊維の効果を調べたが、やはり無効であった。吸収率が高く、微量で強い生理作用を持つものには概ね無効といえる。

また本実験から、食物繊維はアミノ酸やビタミン A の過剰毒性に対しても無効であったが、過剰投与に伴う諸種の代謝性障害に対しても同様と考えられる。一方カドミウム、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウムなどは、消化管粘膜の破壊や、消化吸収障害を起こすことが知られている (33, 42, 43)。食物繊維は、このように消化管粘膜に後遺傷害を起こす消化管毒に対しても無効と判断される。Table 2-7には、

Table 2-7 Fecal excretion and median lethal dose (LD₅₀) of various food additives and chemicals

Chemical and its dietary level (%)	Pro- tective effect	Fecal excretion(%) /dose/kg body weight or whole animal	LD ₅₀ (oral dose)/kg body weight	Litera- ture
Amaranth (Food Red No.2) (5)	+	17.8/50 mg/rat	>10 g (mouse)	44
Brilliant blue (Food Blue No.1) (5)	+	96/200 mg/rat	>2 g (rat)	44
New cocchine (Food Red No.102) (5)	+	30/1.2 g/kg b.wt. (rat)	>8 g (rat)	44
Sunset yellow (Food Yellow No.5) (5)	+	0.8/100 mg/rat	10 g (rat)	44
Sodium cyclamate (5)	+	10-40/5-500 mg/rat	17 g (rat)	44
Tween 80 (15)	+		25 g (rat)	42
PCB (0.1)	-		0.5 mg (rat) ¹	45
DDT (0.02)	-		400 mg	43
Dehydroacetic acid (0.2)	-	95.5/500 mg/kg b.wt. (rabbit)	1 g (rat)	44
<i>tert</i> -Butylhydroxy- anisol (1-3)	-	97-100/400 mg/kg b.wt. (rat)	2 g (rat)	44
Sodium alkylbenzene sulfonate	-		1.22 g (rat)	42
Erythrosine (Food Red No.3) (3)	-	55-72/500 mg/kg b.wt (rat)	5.8-9.4 g (rat)	44
Rose bengale (Food Red No.105) (2.5)	-		6.48 g (mouse)	44
Glycine (5, in 8% casein diet)	-		3.24 g (chick) ²	44
L-Methionine (3, in 8% casein diet)	-		4.33 g (rat) ²	44
Chenodeoxy cholate	-		60 mg (rat) ¹	46

1 Indicated maximum no-effect level (MNL) since data for LD₅₀ were not available

2 Values obtained by intraperitoneal injection.

食物繊維の添加により回復する物質と、そうでない物質について、それらの糞中排泄率とLD₅₀を示した。

そこで成長を抑制する原因物質のうち、食物繊維を同時添加しても抑制が軽減されない物質を敢えて分類すると次のようになる。

- (a) 易吸収性で、しかも極微量で作用する本来の毒物、P C B, D D T 等。
- (b) 大量投与による体内代謝障害が原因で成長抑制が生ずるもの、アミノ酸過剰毒性、ビタミンA過剰毒性等。
- (c) 消化管粘膜の傷害を起こし、その機能に後遺障害をもたらすもの、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、カドミウム等。

ひまし油やセンナ末は、5% A m に匹敵する成長遅延を起こす投与レベルでも、A m 投与時のような下痢は観察できなかった。A m の下痢は、これら薬物による消化管運動の亢進を介して起こるものとは異なるようである。なお Table 2-7 に示した LD₅₀ 値の多くは、市販の固形飼料に被験物質を添加するやり方で調べられている。固形飼料中には、3.5-4.0% 前後の粗繊維が含まれており(47)、食物繊維に換算すればこれの数倍量になると推定される。したがって、有害物質によっては毒性がでにくい食餌条件下で LD₅₀ を調べているものもあると考えられる。しかし、今日でも精製飼料を用いて毒性試験を行う動きはないと言う(国立衛生研究所、義平邦利氏、私信)。また Table 2-7 には、一部食用色素の糞中排泄量も示したが、腸内細

菌による分解も著しいので(44), 糞中に検出されなかったすべてが体内に吸収されたと見なすことはできない。

次に, 食物繊維で阻止できる有害物質は, 鉱物油を除いて一般に水溶性が高く, したがって吸収率が低く, 大量の投与でようやく成長遅延を起こすのが特徴である。また吸収された後, 体内で及ぼす作用も弱いものと予想される。実際, 5% A m 飼料の経口投与時に摂取される A m の約 1/3 相当量を, 毎日直接腹腔に投与しても, 成長抑制は意外に弱かった(第 5 章)(48)。なお, 鉱物油毒性は, 食物繊維の他に, 食用油脂一般の添加によっても回復するので(49, 50), 前出の毒性と性質が異なるものと思われる。

最後に, 食物繊維の同時添加により成長が回復する例をさらに詳しく分類すると, (1)動物性食物繊維でのみ成長が回復するもの, (2)単なる摂取量増加により成長が回復するもの, (3)飼料効率の改善により成長が回復するもの, の三つに分けられる。(1)は, 既に説明したように, キトサンの吸着作用に基づく食用 105 号毒性阻止効果があげられる。(2)の例は, GDF の Tween 60 毒性阻止効果にみられるように (Table 2-4), ペアーフィーディング時には GDF の効果が現れない場合である。(3)の例は, A m 毒性阻止効果に見られるように, ペアーフィーディングの条件下でも, 明らかな成長改善が認められる場合である。つまり(3)は, (1)や(2)とは性質が異なり, 食物繊維の効果のしくみが未だ不明の現象ということが出来る。

第3章 有害物質の単独，およびGDF同時投与に対する被 験動物間の成長応答の差異

3.1 ラットとニワトリひなのAm毒性の発現に及ぼす炭 水化物源の影響

緒言

Ershoffをはじめとして，これまで食物繊維のAm毒性阻止効果に関する研究は，被験動物に専らラットを，そしてスクロースを炭水化物源とする精製飼料を用いて進められてきた。他の実験動物における成長応答や，毒性発現に及ぼす炭水化物源の影響等，基礎的資料は非常に乏しい。ここではラットとニワトリひな（以下ひなと略）を用い，まず両者のAm毒性の発現に及ぼす炭水化物源の影響を検討した。

実験方法

【実験8】ラットのAm毒性に及ぼす炭水化物源の影響

飼料 ラットの基本飼料は，Table 2-1に示した通りである。炭水化物源には，生とうもろこしデンプン（以下デンプンと略），スクロース，麦芽糖，ブドウ糖（何れも食品グレード）を用いた。Am（5%）や，GDF（5%）の添加は，等量の基本飼料と置き換えて行った。

動物の扱い 離乳直後のラットを，炭水化物源の異なる

る各基本飼料で3~5日間予備飼育して用いた。試験は、各炭水化物飼料グループ毎にグループ分けし、被験飼料を2ないし3週間自由に与えて成長を記録した。飼育実験終了後、ラットはネムブタール(sodium pentobarbital, Abbott Laboratories, North Chicago, Ill.)麻酔下心臓採血により殺して盲腸を摘出し、その湿重量を測定した。

【実験9】ひなのAm毒性に及ぼす炭水化物源の影響
飼料 Table 3-1にひなの基本飼料の組成を示した。

用いた炭水化物の種類は、実験8と同様である。

動物の扱い ひなは、ふ化直後の白色レグホン系雄ひな(B-300 strain, Babcock Industries, NY)をふ化場(工藤舎孵卵場, 松山市)から購入して用いた。1日齢のひなを、網底の電熱式育雛器(幅, 60cm x 奥行き, 39 cm x 高さ, 25 cm)に12羽ずつ収容し、炭水化物の異なる各基本飼料を与えて2週間予備飼育した。この間、育雛器内の温度を35℃から徐々に下げて本試験の飼育温度(23℃)に馴らした。

この後、個別ケージに移して各群を6羽ずつ2群に分け、そのうちの1群には引続き基本飼料を、残りの1群には6%Amを含む同飼料を21日間与えた。体重と飼料摂取量は、毎日記録した。飼育終了後、ひなはクロロホルム蒸気で殺し、盲腸を摘出して内容物ごとの湿重量を測定した。

結果

実験 8 Table 3-2には、各炭水化物飼料に A m を単独に、あるいは GDF と同時投与したラットの成長等を示した。炭水化物の異なる基本飼料間で比較した場合(シリーズ 1)、スクロース、麦芽糖及びブドウ糖群間に体重増加量の差はなかった。なお、ブドウ糖群の飼料摂取量はスクロース群よりも増加したため、同群の飼料効率はスクロース群よりも低い値を示した。

これまでの実験においてスクロース飼料で観察した A m 毒性は、ブドウ糖や麦芽糖、あるいはデンプンを用いた場合でも同様に現れた。すなわち、投与期間を通じての激しい下痢、飼料摂取量の減少(30%~37%程度)、及び成長速度の減少(44%~61%)が炭水化物源に関わりなく認められた。特に、デンプン飼料では、飼料摂取量が54%ほど減少し、体重増加量は基本飼料群のその15%に留まった(Table 3-2, シリーズ 2)。こうした A m の害作用は、投与初期により強く現れ、ブドウ糖と麦芽糖群の5匹中1匹が、スクロース群の5匹中2匹が投与の1週間以内に死亡した。一方、5% A m と5% GDF を同時添加した場合、何れの糖類でも飼料摂取量と、体重増加量が元通りにほぼ完全に回復した。しかし、デンプン飼料では完全回復までには至らなかった。Table 3-2に示したように、GDFによる成長回復が飼料効率の改善を伴っていた点でも、既にスクロース飼料で観察した結果(Table 2-3)と一致していた。

5% A m 投与ラットの盲腸は、何れも有意に肥大し、流

Table 3-1. Composition of basal diet for chick⁽¹²⁶⁾

Constituents	%
Casein ¹	20
L-Arginine HCl ²	1
DL-Methionine ³	0.4
Glycine ²	1
Corn oil ⁴	5
Mineral mixture ⁵	7.2
Vitamin mixture ⁶	1
Choline chloride ⁷	0.2
Vitamin E granules ⁸	0.05
Carbohydrate ⁹	to make 100

- 1 Lactic casein, purchased from New Zealand Dairy Board, Wellington.
- 2 Crystalline amino acids were kindly provided by Ajinomoto Co., Tokyo.
- 3 Purchased from Kohkin Chemical Co., Osaka.
- 4 Just prior to preparing the diet, retinyl palmitate and ergocarciferol were mixed with corn oil to provide 5,000 IU each in kg diet.
- 5 The mineral mixture was essentially identical with that of the mixture formulated by Spivey Fox and Briggs⁽⁵¹⁾ that contained the following ingredients : (g/kg diet). $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 390; CaCO_3 , 202; KH_2PO_4 , 179; NaCl , 135; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 84.3; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4.94; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.30; ZnCl_2 , 2.081; (mg/kg diet) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 217; KIO_3 , 140; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 69.9; $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 17.5; NaSeO_3 , 3.05.
- 6 The vitamin mixture was identical with those of Calvert et al⁽⁵²⁾.
- 7 Added as a 50% solution in 50% ethanol.
- 8 Trade name is "Juvera granule", purchased from Eisai Co., Tokyo. It contained 200 mg of all-*rac*- α -tocopheryl acetate per gram.
- 9 Corn starch, maltose, Sucrose and glucose were used.

Table 3-2. Effect on body weight gain, food intake and food efficiency of rats of feeding amaranth with or without GDF in basal diets containing various types of carbohydrates (*experiment 8*)^{1, (126)}

Dietary carbohydrate	Body weight gain	Food intake	Food efficiency ²	Cecum weight ³
	g/14 days			g
[Series 1] Sucrose diet	101 ± 6.0 ^{a,4}	211 ± 9.1 ^a	0.46 ± 0.03 ^a	1.96 ± 0.26 ^a
Sucrose diet + 5% amaranth(3) ⁵	57 ± 3.8 ^b	149 ± 5.3 ^b	0.35 ± 0.02 ^b	8.01 ± 0.37 ^b
Sucrose diet + 5% amaranth + 5% GDF	106 ± 4.5 ^a	230 ± 4.2 ^{ac}	0.48 ± 0.01 ^a	5.53 ± 0.68 ^c
Maltose diet	108 ± 2.5 ^a	235 ± 2.9 ^c	0.45 ± 0.02 ^{ac}	2.65 ± 0.17 ^a
Maltose diet + 5% amaranth(4)	38 ± 5.0 ^c	156 ± 1.3 ^b	0.21 ± 0.03 ^d	7.00 ± 0.46 ^b
Maltose diet + 5% amaranth + 5% GDF	99 ± 3.5 ^a	234 ± 7.8 ^c	0.45 ± 0.02 ^{ac}	4.75 ± 0.33 ^c
Glucose diet	98 ± 5.0 ^a	251 ± 5.4 ^{cd}	0.38 ± 0.02 ^{bc}	2.24 ± 0.27 ^a
Glucose diet + 5% amaranth(4)	38 ± 3.1 ^c	156 ± 9.8 ^b	0.18 ± 0.03 ^d	11.23 ± 0.57 ^d
Glucose diet + 5% amaranth + 5% GDF	97 ± 4.9 ^a	261 ± 6.0 ^d	0.39 ± 0.01 ^{bc}	5.19 ± 0.46 ^c
[Series 2] Corn starch diet ⁶	108 ± 2.2 ^a	266 ± 5.6 ^a	0.41 ± 0.01 ^a	- ⁷
Corn starch diet + 5% amaranth	16 ± 6.9 ^b	123 ± 5.7 ^b	0.12 ± 0.05 ^b	-
Corn starch diet + 5% amaranth + 5% GDF	87 ± 3.7 ^c	200 ± 6.4 ^c	0.43 ± 0.01 ^c	-

1 Average initial body weights were 70 g (range 52.2 to 81.2 g) in series 1, and 71 g (67 g to 76 g) in series 2. The rats were preliminarily fed with the respective basal diets for several days, during which time no statistically significant difference in body weight was observed among

the groups.

- 2 This value is expressed as g gain/ g of food intake, and the values for rats fed with the diets containing such non-nutritive fractions as amaranth and GDF were calculated on the basis of food intake not containing the amount of non-nutritive fractions consumed.
- 3 This means the cecal wet weight including all its contents.
- 4 Mean \pm SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).
- 5 The figure in parentheses means the number of rats which survived and on which data are based when this number was less than the original number per group (5 rats per group).
- 6 Refers to raw corn starch.
- 7 The cecum was not available from these rats.

動性の内容物で満たされていた。特に、ブドウ糖飼料に添加した場合の肥大は著しく、5倍強に増大していた。

しかし5%GDFの同時添加で、何れの盲腸肥大も有意に緩和された。したがって、GDFの成長改善効果は、最終体重から盲腸重量を差し引いて再計算しても依然明瞭であった。

実験9 4種炭水化物飼料の各々に、6%のAmを添加したときのひなの成長をTable 3-3に要約した。まず予備飼育(14日)の間、スクロース群は、デンプン群より成長がやや遅かった。このため、実験開始時の初体重はデンプン群より小さく、その後21日間の体重増加量も、スクロースはデンプンよりやや劣っていた。

次に、各炭水化物飼料への6%Am添加は、ひなでも激しい下痢を招いた。しかしスクロース飼料へのAm添加は、ひなの成長に全く影響しなかった。飼料摂取量にも変動はなかった。ブドウ糖飼料や麦芽糖飼料では、Amにより成長速度が若干低下したが、統計的な差は見られなかった。Amによる成長遅延は、デンプン飼料でのみ現れ、摂取量で17%、体重増加量で30%ほどの減少を示した。それにもかかわらず、飼料効率には変動がなかった。

考察

ラットでは、何れの炭水化物飼料でもAm添加により常に成長が遅延し、5%GDFの補足で常に有意な成長回復が認められた(Table 3-2)。したがってAmは、ブドウ糖、麦芽糖、デンプンの何れの飼料においても、スクロース

Table 3-3. Effect on the body weight gain, food intake and food efficiency of chicks of feeding amaranth in basal diets containing various types of carbohydrates (*experiment 9*)⁽¹²⁶⁾

Diet	Initial body weight ¹	Body weight gain	Food intake	Food efficiency ²
	g	g/21 days		
[Series 1] Sucrose diet	126 ± 3.3 ^a	236 ± 17 ^a	582 ± 28 ^{ab,3}	0.40 ± 0.01 ^a
Sucrose diet + 6% amaranth		238 ± 13 ^a	611 ± 24 ^b	0.41 ± 0.01 ^a
Corn starch diet	135 ± 1.1 ^b	260 ± 13 ^a	623 ± 24 ^a	0.42 ± 0.03 ^a
Corn starch diet + 6% amaranth		184 ± 19 ^b	519 ± 31 ^b	0.38 ± 0.02 ^a
[Series 2] Glucose diet	139 ± 2.9 ^a	269 ± 23 ^a	681 ± 21 ^a	0.39 ± 0.02 ^a
Glucose diet + 6% amaranth		225 ± 15 ^a	694 ± 13 ^a	0.34 ± 0.01 ^a
Maltose diet	134 ± 3.5 ^a	257 ± 18 ^a	692 ± 9 ^a	0.37 ± 0.02 ^a
Maltose diet + 6% amaranth		220 ± 9.7 ^a	621 ± 17 ^b	0.38 ± 0.02 ^a

- 1 The chicks were acclimatized by feeding with the respective carbohydrate diets for 14 days after hatching, they were then subdivided into 2 groups of 6 birds and fed with the test diets.
- 2 This value is expressed as g gain/g of food intake. The amount of amaranth consumed in the groups given 6% amaranth was subtracted from the food intake since it was a non-nutritive fraction.
- 3 Mean±SEM (n=6); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$). Comparisons are made within each experimental series.

飼料の場合と同様の様式で害作用が発現し、また同様にしてGDFがその毒性を阻止していると考えられることができる。

一方ひなの場合、A mによる成長遅延は、単糖や少糖類が炭水化物源の場合には全く起こらないか、非常に弱かった(Table 3-3)。唯一、デンプン飼料にA mを添加したときのみ、有意な成長の遅れが認められた。つまりひなは、A mの大量負荷に対する抵抗性がラットよりも著しく強いことが明らかとなった。これは、おそらく両者の消化管機能の違いに由来していると思われる。

たとえばZafriraとEugenia(53)は、タンパク消化の際のひなの盲腸の栄養的意義を力説している。彼らは、8週齢のひなの飼料を加熱大豆飼料から生大豆飼料に変えたときの盲腸のタンパク質分解活性の変化を調べ、後者の飼料で盲腸のタンパク質分解能が上昇することを見出した。加えて、盲腸の無いひなに生大豆飼料を与えた場合には、疑似手術したひなよりも体重増加量、飼料効率、窒素保留率が少ないことも観察した。これらの結果から彼らは、盲腸でのタンパク質分解や窒素吸収は、小腸で阻害されたタンパク質分解を部分的に補っていると結論している。

また鳥類では、消化粥の砂嚢への逆流が立証されている。Belly Shachafら(54)は、胆管に留置したカニューレを通して注入した放射性同位元素(^{99m}Tc -diethyl-triamino-pentaacetic acid)はその40%が砂嚢に出現し、砂嚢中の同位元素の50%が消失するのに20分も要したと

報告している。この機能上の特性も、ひなのAm毒性に対する抵抗性に関係していると思われる。なぜなら膵酵素を含む消化粥が十二指腸から砂嚢へ還流している間、食物の消化が進行しているからである。

ところで、炭水化物源にデンプンを用いた場合には、ひなでもAmによる成長抑制が現れた(Table 3-3)。したがってデンプンは、Am存在下では単糖や二糖類より利用されにくいことが示唆される。デンプンの場合、小腸粘膜刷子縁上での終末消化に先だち、膵アミラーゼによる腔内消化を受けなければならない。したがってデンプンの消化吸收過程は、少糖類や単糖のそれよりも長い時間を要し、その間、Amによる阻害をうけることになる。実際、デンプンからのブドウ糖吸収は、食餌性ブドウ糖よりも遅れることをRiesenfeldら(55)がひなで観察している。低消化性のデンプンが食餌タンパク質の消化率を下げることもよく知られているので(56-58)、Amによるデンプンの利用低下は、ひいては、食餌性カゼインの利用を妨げていた可能性もある。

3.2 ひなの成長に及ぼす各種食用色素の影響

緒言

実験9の結果から、ひなではスクロース飼料に6%Amを添加しても成長は全く影響を受けなかった。この現象は、Amのときだけ起こるのか、それとも他の食用色素

にもあてはまるのであろうか。この問題は、食用色素間の生理作用の違いを調べるうえで重要と考えられる。そこで、辻田ら(59)が既にラットで調べた5種食用色素を、スクロース飼料に添加し、このときの成長応答をひなで再検討した。

実験方法

【実験10】 飼料 用いた食用色素とその飼料中添加レベルは、次の通りであった。erythrosine(食用赤色3号, E S と略)6%, rose bengale(食用赤色105号, R B と略)3%, brilliant blue(食用青色1号, B B と略)6%, new cocchine(食用赤色102号, N C と略)6%, sunset yellow(食用黄色5号, S Y と略)6%の計5種(いずれも三栄化学工業, 大阪)。各食用色素の添加は、等量の基本飼料と置き換えて行った。

飼育方法 一日齢のひなを、ひな用基本飼料(Table 3-1)で7日間予備飼育した後、6羽ずつ6群に組分けた。各群のひなは、番号を付けたテープを足に貼って識別し、床がステンレス網のケージ(幅, 60 cm x 奥行き, 39 cm x 高さ, 25 cm)に収容してグループ飼いした。飼料は、毎朝新鮮なものを水と共に自由に与え、グループ毎の飼料摂取量を記録した。体重は、毎日記録した。

結果

実験10 A m以外の5種食用色素をスクロース飼料に添加したときの成長応答を(Fig. 3-1)に示した。BB, NC, SY(各6%投与)も, A m同様, 激しい下痢を引き起こしたが, 成長には全く影響がなかった。もちろん, 飼料摂取量にも何ら変化がなかった。

しかし, RBは他の半分(3%)の添加レベルにもかかわらず, 投与直後から成長低下を招き, 2週目に入って群内のすべてのひなが死亡した。またESの6%投与は, 死亡するひなは見られなかったものの, 著しい成長遅延を起こした。14日後の同群の体重増加量は, 基本飼料群のそれより約65%減少し, 同じく飼料摂取量は, 約16%の減少を示した。

考察

辻田ら(59)は, ラットの基本飼料(25%カゼイン-スクロース飼料)へES, BB, NC, SY, それにtartrazine(食用黄色No.4, TZ), indigo carmine(食用青色2号, IG)を各々単独に, あるいは5%GDFと同時に添加し, 成長への影響を調べている。それによれば, ラットの場合IGを除いていずれも有意な成長阻害を認めている。そして, ES毒性を除けば, いずれの毒性もGDFの同時添加により阻止されることを観察している。ES毒性は5%GDFの添加ではまったく効果がみられなかった。またGDFは, ラットのRB毒性(2.5%)に対しても無効であったが, この毒性は,

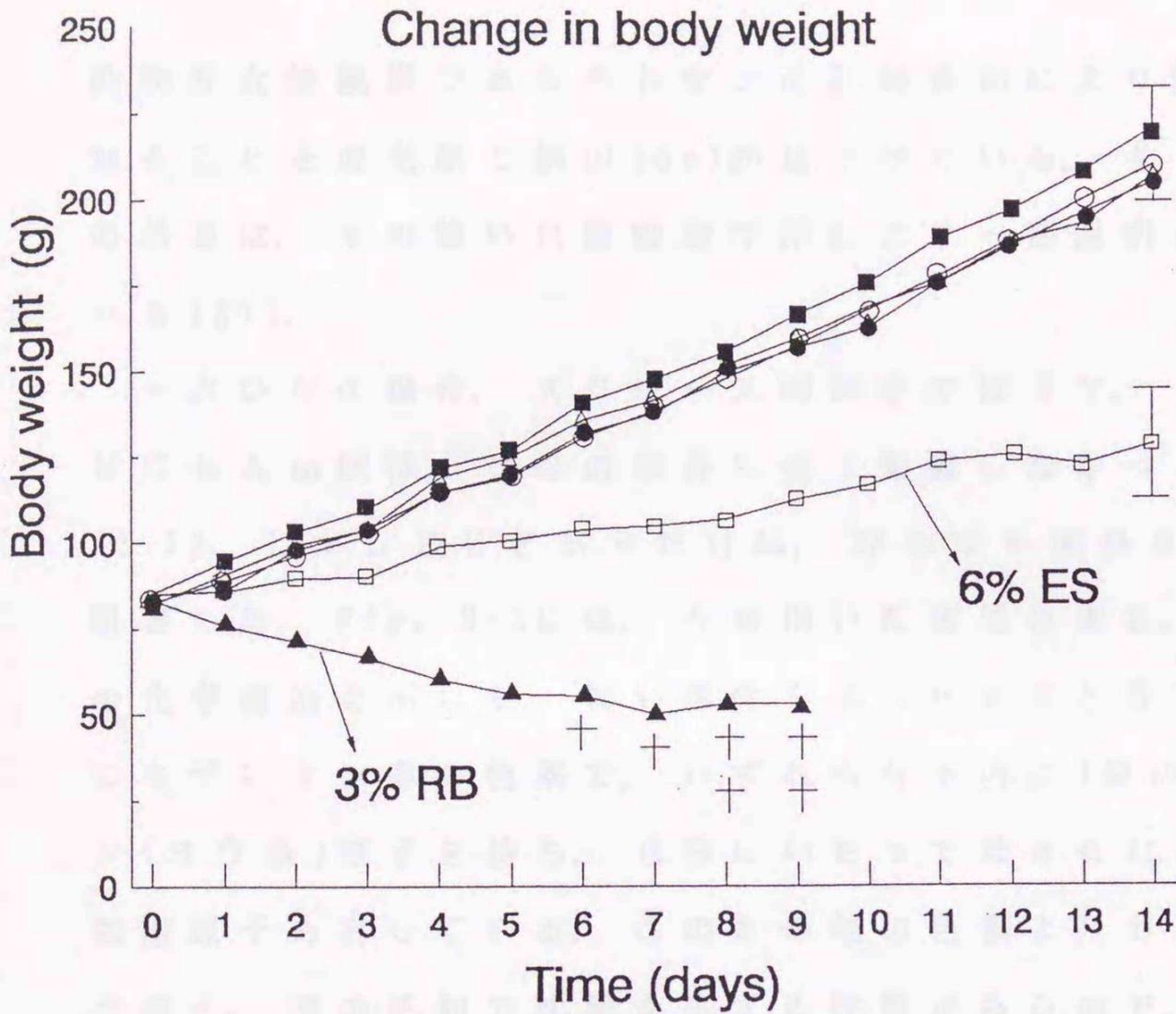


Figure 3-1. Change in body weight of chicks fed a purified basal diet containing various food colors (*experiment 10*)⁽⁸⁷⁾. Thirty-six male chicks (Single Comb White Leghorn, B-300 strain, Babcock Industries, Ithaca, NY) aged 2 weeks after hatching were divided into 6 groups and fed respective diets for 14 days. Symbols: \circ , Basal diet; \bullet , 6% brilliant blue (Food Blue No. 1, BB); \triangle , 6% new coccine (Food Red No. 102, NC); \blacktriangle , 3% rose bengale (Food Red No. 105, RB); \blacksquare , 6% sunset yellow (Food Yellow No. 5, SY); \square , 6% erythrosine (Food Red No. 3, ES). All of 6 chicks fed a purified basal diet containing 3% RB died during the course of the study as indicated by crosses. There were no changes in growth rates of chicks fed 6% BB 6% NC and 6% SY with exception of 6% ES. Body weight gain of chicks fed 6% ES was reduced by about 65% with statistically significant difference. Vertical bars represent standard error of the mean.

動物性食物繊維であるキトサンの同時添加により阻止されることを海老原と桐山(60)が見つけている。キトサンの効果は、その強い色素吸着作用により一部説明されている(37)。

一方ひなの場合、スクロース飼料中ではS Y, B B, N CもA m同様、ひなの成長に全く影響しなかった(Fig. 3-1)。しかしE SとR Bだけは、ひなでも成長を著しく阻害した。Fig. 3-2には、今回用いた食用色素と、A mの化学構造を示した。強い毒性を示したE SとR Bは共にキサンテン系の色素で、いずれも分子内に4個のハロゲン(ヨウ素)原子を持ち、R Bにいたってはさらに4個の塩素原子も有している。このため他の色素よりも疎水性が高く、酸の添加で沈澱を生ずる性質があるので、定量法に応用されている(61)。両色素は、こうした性質により脂質二重層から成る細胞膜に結合したり、また吸収率も高く(これは投与後、血清が着色することからも明らかである)、体内代謝レベルの障害を引き起こしている可能性が強い。したがって、この種の毒性は、GDFでは阻止しえないと予想される。

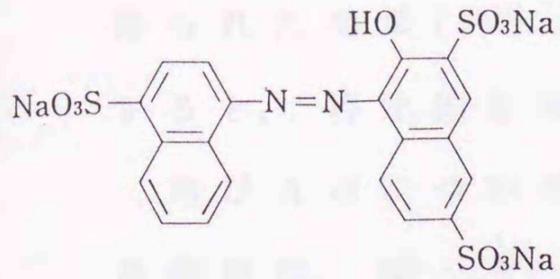
3.3 ひなのA m毒性に対するGDF同時投与の影響

緒言

スクロース飼料中ではA mの他、N C, B B, S Yもひなの成長に全く影響しないことがわかった。では、同

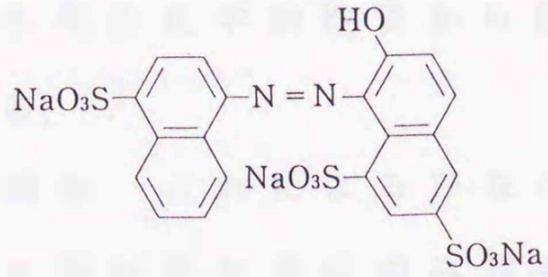
Food Red No. 2

Amaranth



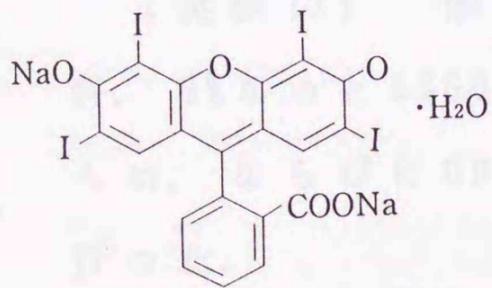
Food Red No. 102

New coccine



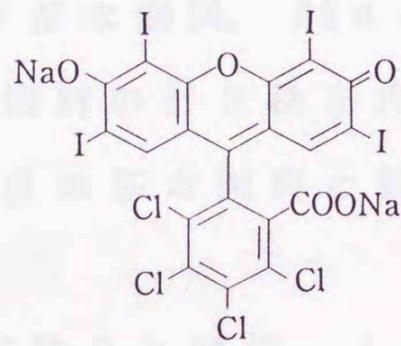
Food Red No. 3

Erythrosine



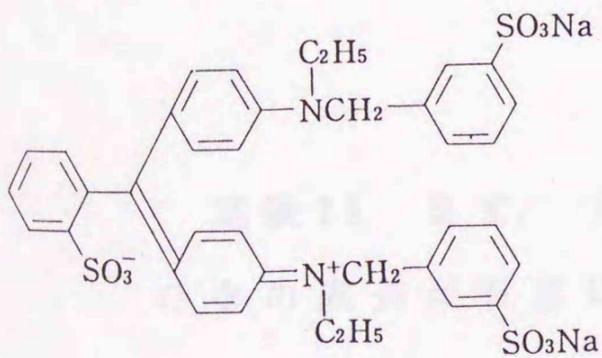
Food Red No. 105

Rose bengale



Food Blue No. 1

Brilliant blue



Food Yellow No. 5

Sunset yellow

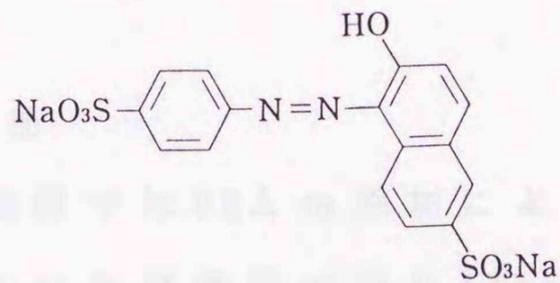


Figure 3-2. Chemical structure of various food additives tested.

飼料中に E S と R B を添加したときのひなの成長抑制は、GDFの同時添加により阻止できるのであろうか。ラットで得られた結果(59)と、両食用色素の化学的性質から類推すると、否定的な印象を与える。

再び A m について着目した場合、これによるひなの成長遅延は、唯一デンプン飼料を用いたときにのみ現れた。そこでまず、このときの成長遅延が GDF の同時添加により改善されるかどうかを検討した。

実験方法

【実験 11】 飼料 デンプン基本飼料，6% A m 対照飼料，6% A m と 5% GDF の同時添加飼料の計 3 種を用意した。A m，ならびに GDF の添加は等量の基本飼料と置き換えて行った。

飼育方法 ひなの飼育は，実験 9 と同様，1 日齢のひなをデンプン飼料で 7 日間予備飼育した後，6 羽ずつ 3 群に組分けて，グループ飼育(6 羽/ケージ)した。飼料は，水と共に自由に与え，体重は毎日記録した。

結果

実験 11 まず，デンプン飼料では 6% A m 添加により，ひなの成長が有意に遅れることを再確認できた (Table 3-4)。しかし，この成長遅延は 5% GDF を同時添加しても全く改善されず，ラットと対照的な違いを示した。また，飼料効率の面でも GDF の有効性は何等見られなかった。一

Table 3-4. Effect on body weight gain, food intake and food efficiency of chicks of feeding amaranth with or without GDF in a corn starch diet (*experiment 11*)⁽¹²⁶⁾

Diet	Body weight gain ¹	Food intake	Food efficiency ²	Cecum weight ³
	— g/14 days —			g
Corn starch diet	141 ± 7.4 ^{a,4}	262 ⁵	0.54 ⁵	0.80 ± 0.06 ^a
Corn starch diet + 6% amaranth	80 ± 7.1 ^b	194	0.41	1.26 ± 0.19 ^a
Corn starch diet + 6% amaranth + 5% GDF	79 ± 8.9 ^b	190	0.42	1.32 ± 0.2 ^a

- 1 Average initial body weight of chicks, 80 g (range; 64 to 92 g).
- 2 This value is expressed as g gain/g of food intake.
- 3 Cecal wet weight containing all its contents.
- 4 Mean ± SEM(n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).
- 5 Average of 5 birds housed in a cage.

方、盲腸湿重量は、Am対照群でさえ、有意な肥大はみられなかった。

考察

成長速度から判断する限り、GDF(5%)はひなのAm毒性に対してなんら効果のないことが明らかとなった(Table 3-4)。ラットのAm毒性は、3%以上のGDFで有意に阻止されるので(Table 2-2)(62)、5%GDFは有効性を発揮するに十分なレベルと考えられる。なぜひなでは、GDFの効果が現れないのか、今のところ説明できない。この種の効果を動物間で広範に検索してみることにより、進化の過程で食物繊維の有効性が現れてくる段階が明らかになるかもしれない。

本研究では、食物繊維による毒性阻止効果の機構解明を主眼としたので、以後ラットでの現象をモデルに研究を進めた。

第4章 Am毒性阻止効果における食物繊維の物理化学的性質の重要性

4.1 GDFの成分組成と形態

緒言

GDFは、破碎ゴボウを水と、エタノールで順次洗浄した残渣の乾燥粉末である。その栄養効果を検討する場合には、予め成分組成を明らかにしておく必要がある。またGDFは、各種の細胞壁成分からなる構造物でもあるので、その形態を観察しておくことも、生理効果との関連性を調べるうえで重要と思われる。そこで本節では、これらの点について検討した。

方法

【実験12】GDFの成分組成の分析

粗タンパク質はKjeldahl法により、粗脂肪はSoxhlet抽出器を用いてエーテル抽出法により、そして水分は105℃恒量法により測定した。細胞壁成分のうち、ヘミセルロースとセルロースは、Van Soest(63,64)の方法に従ってNDFとADF、それにacid resistant ligninを測定した後、これらを基に算出した。すなわち、NDFとADFの収量の差をヘミセルロース量とし、ADFとacid resistant ligninの差をセルロースとした(65)。またペクチンは、0.3%のヘキサメタリン酸水溶液で抽出する方法(66)によ

り測定した。

【実験13】走査型電子顕微鏡によるGDF, およびGDFホロセルロースの形態観察

GDFと, これのホロセルロースを直接金蒸着した後, 走査型電子顕微鏡(scanning electron microscope, 以下SEMと略, HHS-2型, 日立製作所, 東京)で観察した。

結果と考察

実験12 Fig. 4-1にGDFの成分組成を示した。全体(100%)から粗タンパク質, 粗脂肪, 灰分, それに水分量を除くと, 約78%となる。デンプンや少糖類の含有量は無視できる量と考えられるので, これがほぼGDFの食物繊維量と考えることができる。GDFの生ゴボウからの収率は, 4.2~4.5%であったので, 食物繊維としては3.2~3.5%に相当する。この値は, 地方衛生試験所全国協議会(67)が, 酵素・重量法(68)により測定したゴボウの食物繊維量(3.58%)とほぼ一致する。

食物繊維の成分組成をみると, セルロース, ペクチン, リグニン, ヘミセルロースの順であった。村上ら(69)は, 臭化アセチル-氷酢酸溶液を用いるMorrison法(70)によりゴボウのリグニン含量を測定し, 乾物量当たり7~8%と報告している。これに比べるとGDF中のリグニン(10.6%)はやや多いが, 分析方法や収穫時期の相違によるのかもしれない。一方, 有塚ら(71)は同様の方法で甜菜食物繊維の組成を調べているが, それに比べるとGDFはリグニ

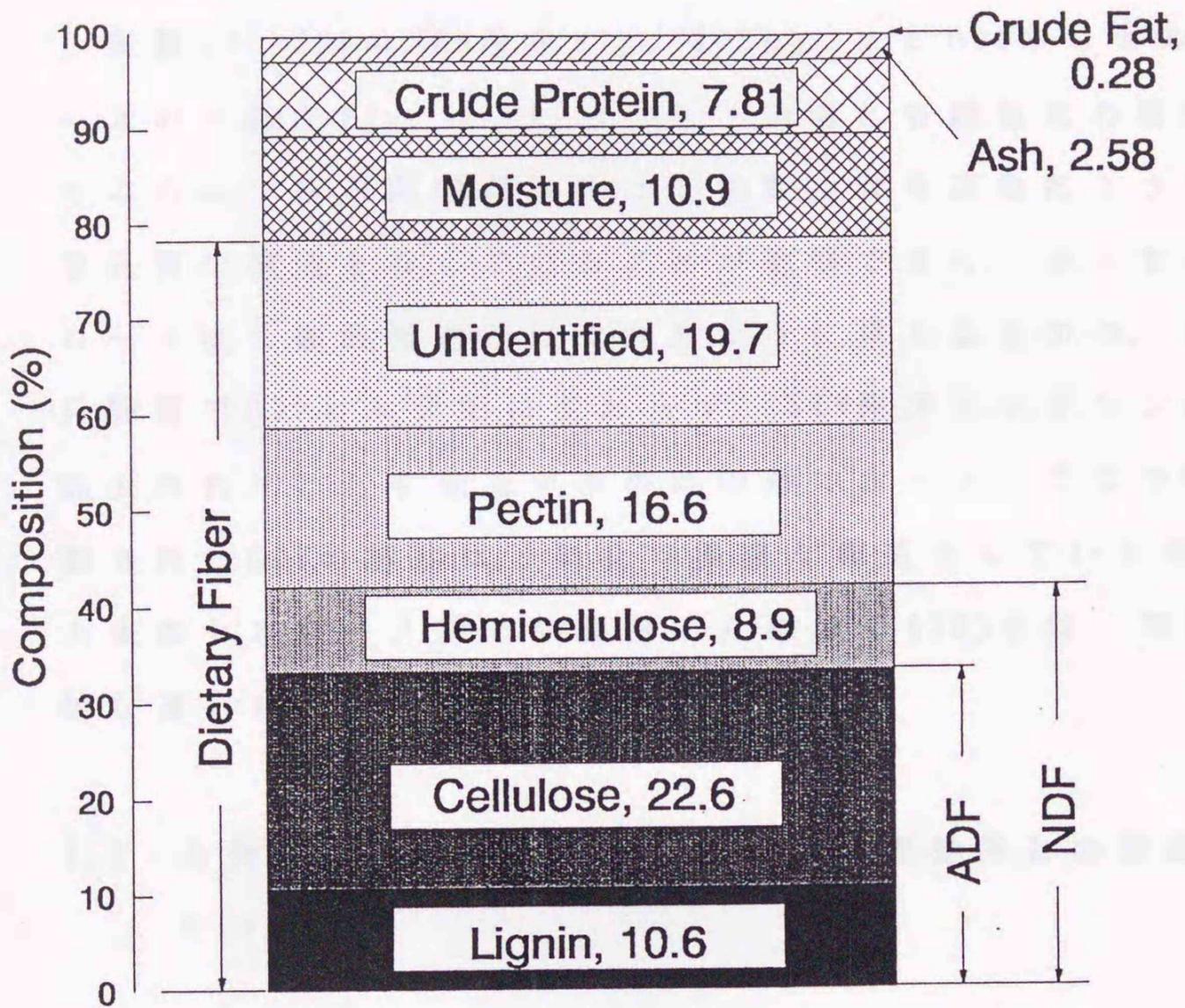


Figure 4-1. Components of dietary fiber sample prepared from gobo, the roots of edible burdock (*Arctium lappa* L.) (experiment 12)⁽¹²⁷⁾. Pectin was determined by the method using hexametaphosphate (66). Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid resistant lignin were determined by the method of Van Soest (63,64). Hemicellulose and cellulose contents were calculated from the difference of NDF and ADF, and ADF and acid resistant lignin (65).

ンが多く、ヘミセルロースの割合が少ないという特徴がある。

実験13 GDFのSEM像をFig. 4-2に、またGDFホロセルロースのそれをFig. 4-3に示した。両者とも維管束の断面とみられ、通道組織が集まって無数の管を束ねたような多孔質な構造を有していることが観察できた。ホロセルロースは、繊維構造がほぐれたように見えるものの、出発物質のGDFと本質的に変わらず、SEM像からリグニンが除去されたことを確認するのは困難であった。ここで観察されたGDFの構造は、無孔で緻密な構造をしていた綿花由来のセルロース粉末や製粉こんにやく(72)とは、対照的な違いを示していた。

4.2 食物繊維の物理化学的諸性質と生理効果との関連性について

緒言

GDFは、前節で示したように組成の面でも構造の面でも単一体ではなく、植物組織に一般に見られるセルロース、ヘミセルロース、リグニン等の各種高分子物質から成る複雑な構造体である。そこで生理効果は、ある特定の成分、ないしは複数の成分が構成する特定の構造、あるいは食物繊維の物理化学的性質の何れかに関係していると思われる。

こうした疑問は、GDFの構成成分を単離し、各々の生理



Figure 4-2. Scanning electron micrography of GDF⁽⁷²⁾.



Figure 4-3. Scanning electron micrography of GDF-holocellulose⁽⁷²⁾.

活性を調べることである程度解明できる。しかし、植物組織中の高分子物質を無傷の状態に単離することは、技術的に不可能に近い。そこで、今日知られている化学的手法で、大まかに成分の異なる画分数種を調製し、それらのAm毒性阻止活性を比較した。なお、市販のセルロース粉末、リグニン、及び活性炭も同時に比較した。活性炭は、食品成分ではないので食物繊維の定義に当てはまらないが、その強い色素吸着作用に注目して用いた。

実験方法

各種GDF分画の調製 ここではGDFから粗繊維(73)、ホロセルロース(30)、NDF(63)、ADF(64)の水不溶性試料を調製した。粗繊維は、分析方法(1.25%濃度の硫酸と水酸化ナトリウムの各水溶液で30分順次煮沸した後の残渣から、灰分を除いたもの)により定義された成分であり、今日の食品成分表で示す“繊維質”に相当する。またホロセルロースは、希酢酸溶液下で亜塩素酸によりリグニンを分解除去した残渣に相当する。ADFの主成分は、セルロース、およびリグニンと見なされている(65)。またNDFは、植物組織中のタンパク質を抽出除去した残渣とされるが、一部ペクチン質も除去される(65)。

この他市販のセルロース粉末(100~200メッシュ、原料は綿花、東洋ろ紙、東京)、リグニン(東京化成工業、東京)、活性炭粉末、(和光純薬工業、大阪)も用意した。

【実験14】食物繊維試料の保水性，水中沈定体積，およびAm吸着能の測定

ここではGDF分画や，市販試料の生理効果を調べるのに先立ち各被験試料の保水性，水中沈定体積(settling volume in water, SV)，それにAm吸着能を測定した。

保水量の測定 食物繊維の保水量を測定する試みは，既に何件か報告されているが，その中でMcConnellら(74)の測定値がよく引用される。彼らは，下痢便から水分を遠心分離(214,000 xG)するのに要する遠心力を負荷し，それでもなお食物繊維が保持している水分を，健康人の糞便中に含まれる食物繊維の保水量と見なした。しかし，食物繊維は大腸に流入して活発な水分吸収を受ける以前，とくに小腸上部では，その内孔や壁孔に多量の自由水を含んだ状態で移動していると考えられる。また構造上も，組成上も不均一な種々の植物組織に，画一的に14,000 x Gの遠心力を負荷した場合，試料によってはマクロな構造的変化を招くおそれがある。したがって，McConnellらの想定した保水量が，必ずしも生理的保水量を反映しているとは考えにくい。

ここでは，土壌の保水性を測定する方法(75)を応用し，静置状態における試料の最大抱水量(water holding capacity, WHC)を測定した。すなわち，底に24メッシュのステンレス網を張ったポリエチレン製の円筒ふるい(深さ3 cm X 直径6 cm)を用意し，底面の大きさに切ったろ紙を円筒内のステンレス網上に敷き，これに1.00 g前後

の乾燥試料を正確に秤取した。平らな容器にこの円筒ふるいを入れ、試料の表面まで浸るように、十分量の脱イオン水を静かに加えた。

試料への水分吸着が平行に達した後(12時間後)、円筒ふるいを取り出し、滴下する過剰水分を除くため10分間ろうと上に静置した後、円筒ふるいの水滴を拭き取り秤量した。この重量から、予め測定しておいた円筒ふるいと抱水ろ紙、それに採取した試料重量を差し引いて乾燥試料1 g当たりのWHCを求めた。

SVの測定 土壌の沈定体積を測定する方法(76)を応用して、食物繊維試料が抱水して平衡に達したときの体積を測定した。すなわち、風乾試料1.00 gを100 mL容のナス型フラスコにはかり取り、約70 mLの脱イオン水を加えた後、発泡が止まるまでこれを流水ポンプで脱気した。その後、全量を100 mL容のメスシリンダーに移し、水位を一定にして静置した。24時間後、試料の占める沈定体積(mL/g 乾物量)を読み取った。

Am吸着量の測定 風乾試料500 mgを20 mLの三角フラスコにはかり取り、これに濃度の異なるAm水溶液(20, 50, 200, 500, 1000 ppm)を各々20 mL加え、37℃で24時間振とう放置した。この後、3000 rmpで10分間遠心分離し、上清の一部を取って適度に希釈し、520 nmで比色定量した。試料へのAm吸着量は、吸着反応前後のAm濃度の差から求めた。なお、試料中の微小粒子は、比色定量の際に吸光度に干渉するので、予め水洗、デカンテー

ションを繰り返して微小粒子を除去した試料を調製して用いた。

【実験15】 G D F分画，ならびに市販試料の A m 毒性
阻止活性の比較

動物実験とその扱い 従来通り， Table 2-1に示した精製基本飼料に5%の A m を添加したものを対照飼料とし， A m と各被験物質(5%)を同時添加したものを被験飼料として用いた。実験動物と，その飼育方法は第2章1節で述べたとおりである。 A m ならびに被験試料の添加は，スクロースに置き換えて行った。なお，被験試料が多いため，飼育実験は2回に分けて行った。

結果

実験 14 G D Fから調製した各分画の G D Fに対する収率は，以下の通りであった(%)：粗繊維，26.2；ホロセルロース，70.8； A D F，33.2； N D F，42.1。次に，各試料の W H C， S V， A m 吸着能を Table 4-1に示した。なお，各被験試料1 g 当りの S V を比較した様子を， Fig. 4-4にも示した。 Fig. 4-4から概観できるように，物理化学的性質は試料間で著しく異なっていた。

たとえば G D Fホロセルロースは，セルロースの8倍の W H C と，10倍の S V を有していた。また A D Fと粗繊維は，出発物質の G D Fより W H C， S V とともに劣っていたのに対し，逆に N D Fとホロセルロースは，出発物質よりも高い値を示した。なお Fig. 4-5には，各試料の W H C と S V の関係を示したが，

Table 4-1. Water-holding capacity, settling volume in water and capacity to bind amarant of various fractions prepared from GDF with reference to cellulose powder and activated charcoal (experiment 14)^{1, (62)}

Test substance	WHC ²	SV ³	Amounts of amarant adsorbed at the concentration of		
			20 ppm	50 ppm	200 ppm
	g water/ g fiber	mL/g fiber	mg amarant adsorbed/g fiber		
Cellulose powder ⁴	3.7	5.0	0.13	0.20	0.20
Activated charcoal ⁵	5.3	7.5	1.72	4.60	16.8
ADF ⁶	8.5	9.0	1.64	4.18	9.15
Crude fiber ⁷	9.1	15.0	0.39	0.08	0.63
GDF ⁸	13.2	23.0	0.20	0.35	0.35
NDF ⁹	17.3	28.5	0.38	0.12	0.63
Holocellulose ¹⁰	28.0	47.0	-0.01	-0.16	-1.48

1 The methods and units used here are indicated in the text.

2 Water-holding capacity determined under the natural acceleration of gravity.

3 Settling volume in water.

4 Purchased from Toyo Roshi Co., Ltd., Tokyo. This was a preparation from cotton fiber (100 to 200 mesh) and composed of alpha cellulose, 98 to 99%; beta cellulose, 0.3 to 1.0%; pentosan, 0.3 to 1.0%; ash, 0.07; and nitrogen, 0.07% after the manufacturer's information.

5 Purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo.

6 Acid-detergent fiber prepared from GDF by the method of Van Soest (64).

7 Crude fiber prepared from GDF by the method of AOAC (73).

8 Dietary fiber prepared from "gobo", the roots of edible burdock (*Arctium lappa* L.) purchased from a local dealer.

9 Neutral-detergent fiber prepared from GDF by the method of Van Soest (63).

10 Delignified product of GDF with sodium chlorite in dilute acetic acid medium (30).

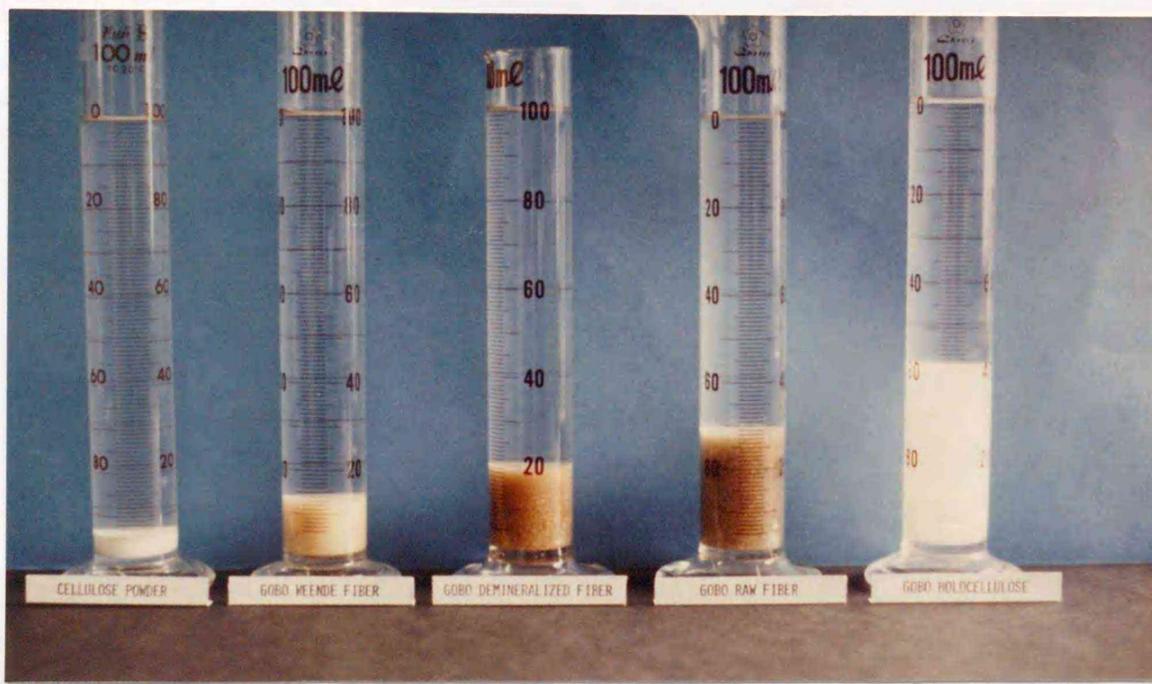


Figure 4-4. Settling volume in water of various dietary fiber samples⁽⁷²⁾. The method of Middleton and Byers (72) developed to determine the erosional behavior of soil was applied to the determination of SV values of dietary fibers. One gram of air-dried sample was shaken intermittently with 70 ml of deionized water placed in a 100 mL round-bottomed flask under reduced pressure for 24 hours in order to facilitate the penetration of water into the interstices of the sample. The contents were transferred to a 100 mL graduated cylinder quantitatively and the volume (SV) of layer formed by dietary fiber was read after sedimentation equilibrium was attained at room temperature (24 hours).

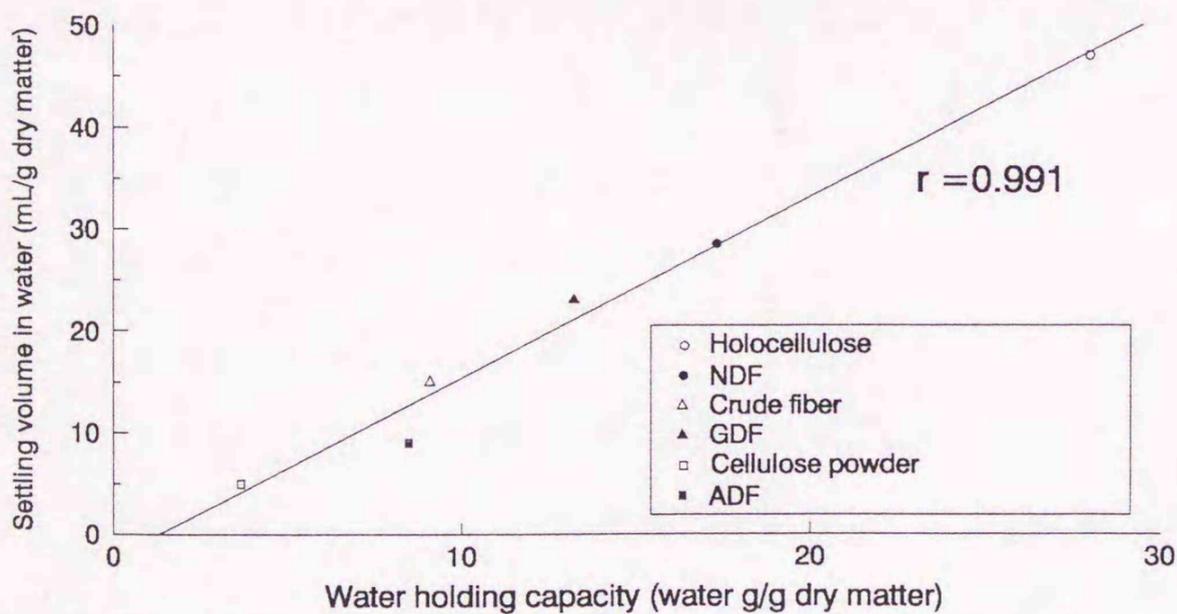


Figure 4-5. Correlation between the water holding capacity (WHC) and settling volume in water of dietary fibers (*experiment 14*)⁽⁷²⁾. Dietary fiber was examined for WHC under the natural acceleration of gravity: One gram of air-dried sample was placed on a filter paper fitted in a polyethylene container (6 cm in diameter and 3 cm in depth) with 24 mesh wire bottom of stainless steel. After the container with the sample was placed in a larger dish containing a sufficient amount of water to immerse the sample for 12 hours, it was removed and allowed to stand for 10 minutes to drain excess water, and then weighed after blotting the adherent water on the wall. By subtracting the weight of the container fitted with a moistened filter paper and the weight of sample applied (1 g) from the final weight of the container with wet sample, WHC was obtained. WHC was determined in the same manner described in the legend to Fig. 4-4.

両者は一次回帰式によく従っていた。

一方、バッチ法により測定した各試料のA m吸着量は、予想通り活性炭がもっとも強く、A m濃度の上昇につれて直線的に増加した(Table 4-1)。ADFも低濃度(20 ppm)では、活性炭に匹敵する吸着量を示したが、高濃度(200 ppm)では飽和現象が現れた。この両者を除いた他の試料の吸着量は、いずれの濃度でもごく僅かで、ホロセルロースにいたっては、A mの吸着作用を全く示さなかった。

実験 15 次に、各被験試料のA m毒性阻止効果を調べた結果をTable 4-2に示した。21日後のA m対照群の体重増加量は、シリーズ1で基本飼料群より44%、シリーズ2で52%の減少を示した。これに対し、5%の添加レベルで最も強い毒性阻止効果を示したのはホロセルロースであった。

NDFも、GDFの効果をやや上回っていたのに対し、粗繊維は、GDFと同程度の効果であった。一方ADF、セルロース粉末、活性炭には終始効果が見られず、むしろ活性炭群では17日目に5匹中1匹が死亡した。またリグニン群では、A m対照群より強い毒性が現れ、5匹中2匹が死亡した他、生存ラットの体重増加量も対照群より劣っていた。

Fig. 4-6には、各被験物質のA m毒性阻止活性と、それらのS Vの関係を示したものである。A m対照群の成長速度が実験の度ごとに多少変動するので、被験物質の生理効果は、成長の回復率で表した。同図に見られるように、各被験物質のS V値と成長回復率の間には、対数回帰に従う相関が見られた。

Table 4-2. Effect of various fractions from GDF and cellulose powder, activated charcoal and lignin at 5% level on the growth of rats fed a purified diet containing 5% amaranth (*experiment 15*)⁽⁶²⁾

Diet	Average body weight gain		
	7 days	14 days	21 days
[Series 1] ¹	g	g	g
Basal diet	45±1.7 ^{a,2}	106±3.7 ^a	165±6.5 ^a
Basal diet + 5% Amaranth (control)	16±1.9 ^b	47±2.8 ^b	79±7.2 ^b
Control + 5% GDF	34±3.2 ^c	85±4.7 ^c	134±4.3 ^{cd}
Control + 5% holocellulose ³	46±2.3 ^a	99±3.3 ^a	146±4.3 ^c
Control + 5% CF ⁴	37±2.5 ^c	84±4.4 ^c	130±4.7 ^d
Control + 5% cellulose powder ⁵	16±1.5 ^b	46±4.3 ^b	81±6.4 ^b
Control + 5% activated charcoal ⁶	30±1.0 ^{c(4)} ⁷	60±3.2 ^{d(4)}	90±3.2 ^{b(4)}
[Series 2] ⁸			
Basal diet	46±2.4 ^{a,2}	109±4.8 ^a	168±5.5 ^a
Basal diet + 5% Amaranth (control)	19±4.9 ^b	58±5.9 ^b	94±9.5 ^b
Control + 5% GDF	48±1.5 ^a	102±2.7 ^{ac}	162±5.7 ^a
Control + 5% NDF ⁹	43±3.4 ^a	94±4.2 ^c	146±8.0 ^a
Control + 5% ADF ¹⁰	31±2.8 ^b	71±1.2 ^b	107±3.6 ^b
Control + 5% lignin ¹¹	-2±2.1 ^c	32 (26,37) ⁸	37 (26,48)

1 Average initial body weight, 64.8 g (range: 55 to 76 g).

2 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter are significantly different (*P*0.05).

3 See footnote No. 10 to Table 4-1.

4 See footnote No. 7 to Table 4-1.

5 See footnote No. 4 to Table 4-1.

6 See footnote No. 5 to Table 4-1.

7 The value in parentheses on this line indicates the number of rats which survived and on which data are based when this number was less than the original number per group (5 rats per group).

8 Average initial body weight, 65.2 g (range: 50 to 80 g).

9 See footnote No. 9 to Table 4-1.

10 See footnote No. 6 to Table 4-1.

11 Alkaline lignin purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo.

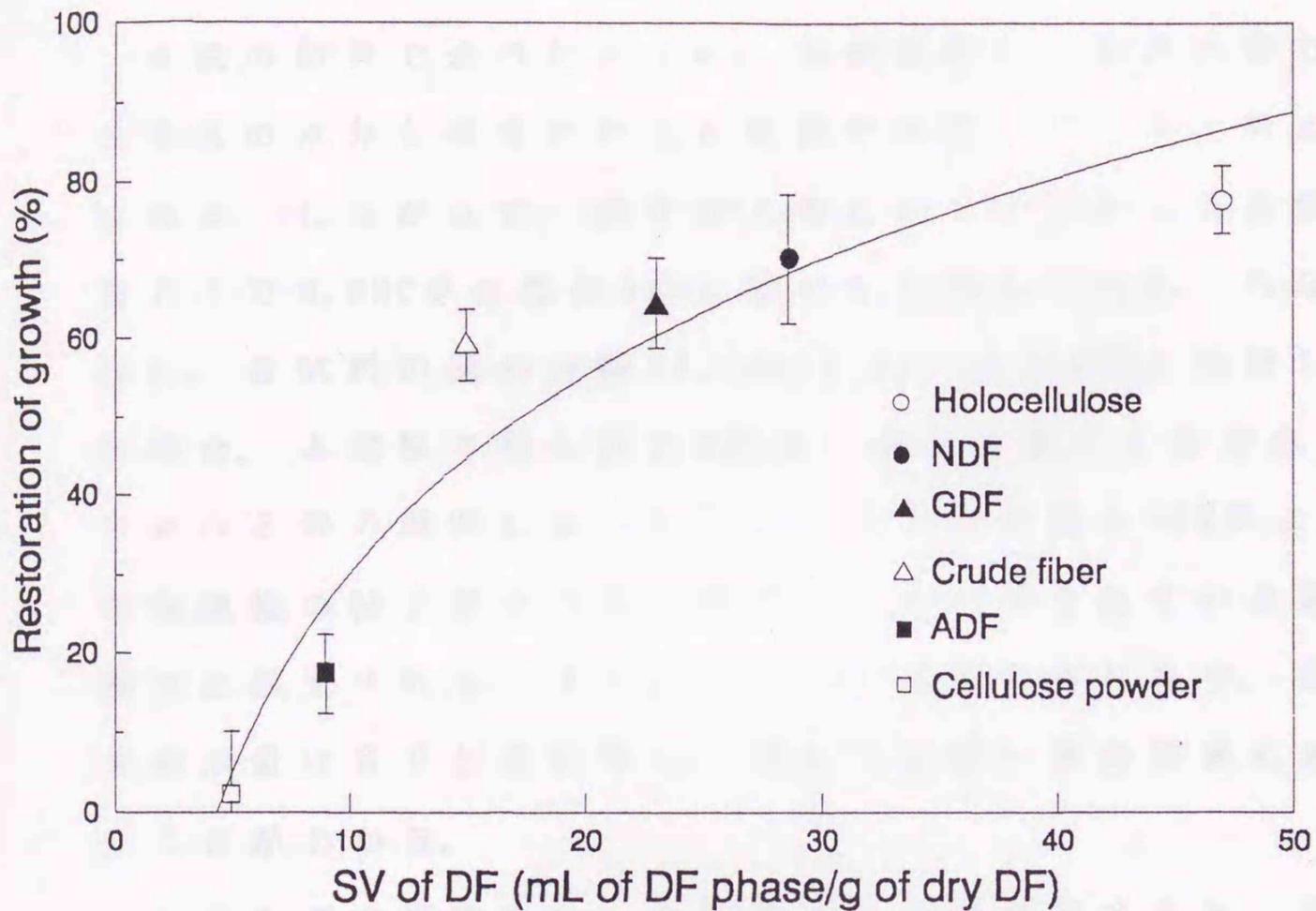


Figure 4-6. Correlation between settling volume (SV) of dietary fibers and their protective activity against amaranth toxicity (*experiment 16*)⁽⁶²⁾.

Protective activity of dietary fibers was expressed by the restoration of growth (%) that was calculated in the same manner described in the legend to figure 2-2. Value of SV for various dietary fibers was obtained by the method described in the legend to figure 4-4. Symbols: ○, GDF-holocellulose; ●, neutral-detergent fiber of GDF; △, crude fiber of GDF; ▲, GDF; □, cellulose powder; ■, acid-detergent fiber of GDF. Each point is the mean of 5 rats and vertical bars represent standard error of the mean. A logarithmic curve was obtained with the following equation: $Y = -53.9 + 84.0 \log X$ ($r = 0.96$). Where Y is protective activity expressed as growth restoration and X is SV value of dietary fibers supplemented.

考察

本説の緒言で述べたように、食物繊維は上部消化管では多量の水分を抱きかかえた状態で移動していると考えられる。したがって、消化管上部においてはむしろ自然重力下でのWHCが生理的WHCに近いとも考えられる。ちなみに、各試料の遠心分離(1,500 X g)によるWHCと比較した場合、本実験で得られたWHCは、遠心分離によるものの2から3倍の範囲にあった(72)。最大抱水量の50%以上は、食物繊維の粒子間や内孔、壁孔にトラップされている遊離水と推定される。またFig. 4-5に見られるとおり、最大抱水量はS Vと正比例し、両者は表裏一体の関係にあることがわかる。

ところで本実験から、食物繊維を化学処理すると、成分的な変化のみならず、その物理化学的性質も変化することが明らかとなった。たとえばADFと粗繊維のS Vは、出発物質のGDFより減少し、逆にNDFとホロセルロースでは増加した(Table 4-1)。つまり、植物細胞壁からペクチンやヘミセルロースが除去されると、一般に膨潤性が低下し、逆にタンパク質やリグニンが除去されると膨潤性が強まることを示唆している。

おそらく、細胞壁中で組織の固定に役だっているタンパク質や、繊維構造の間隙を埋めているリグニンが除去されたために、構造がほぐれて水分子が浸透しやすくなったためと思われる(77)。ちなみに、ほぼ純粋なセルロース粉末の保水性やS Vが小さいのは、緻密で単調な表

面構造(72)に加え、セルロース分子が固くミセル構造をとっている(77)ために水分子が浸入しにくいものと思われる。

食物繊維のA m毒性阻止効果を、その物理化学的性質との関係からみた場合、まず食物繊維によるA mの吸着作用ではこの効果を説明できないことが明らかとなった。予想したように活性炭のA m吸着能は、どの食物繊維試料よりも大きかった(Table 4-1)。しかしこの時の最大吸着量(16.8 mg/g)から推定しても、5%添加時の吸着量は飼料中A mの1%に満たないし、実際生理効果はまったく認められなかった(Table 4-2)。逆に、最も生理効果の強かったホロセルロースには、A m吸着能が全く見られなかった(Table 4-1)。これらの結果は、コレスチラミンのA m毒性阻止効果から、食物繊維のA m吸着作用を類推した Ershoff(23)の説を否定するものである。

注目すべきは、各分画間のS Vの違いがそれらの生理効果の差に対応していた点である。たとえば植物繊維質の本体と考えられていたセルロースはA m毒性に対し無効であったが(Table 4-2)、これはその低いS V値と対応していたし、ホロセルロースの有効性はその高いSV値と対応していた。Ershoff(11-13, 20)は、セルロースが常にアルファルファより効果が弱いことを観察していたが、両者の物性の違いに気づかなかつたために、生理活性をアルファルファ中の未知有効成分に求めたのかもしれない。

4.3 非水溶性食物繊維のSVによる生理効果の予測

緒言

前節から、食物繊維のAm毒性阻止効果は、その成分組成よりも、保水性ないしは膨潤性と関係し、これらの値が高い試料ほど強い生理効果を示した。そこで本節ではこの現象を確認する目的で、種類の異なる食物繊維の生理効果を、そのWHCないしはSVから予測しうるかどうかについて検討した。

実験方法

【実験16】飼料中食物繊維の相対SV値による生理効果の調節

本章第2節で、5%セルロース粉末はAm毒性に対して無効であることを明らかにした。セルロース粉末の弱い生理活性が、その低WHC、ないしは低SV値に起因しているならば、飼料中の添加レベルを増やしてWHC、ないしSVの総量をGDFのそれと等しくすれば、セルロースでもGDFと等価の生理効果を発揮するはずである。そこで、4%Am添加対照飼料に、セルロースを10%添加した飼料と、GDFを3%添加した飼料で成長回復効果を比較検討した。

相対SV (relative settling volume, RSV)と総SV (total settling volume, TSV)の算出 RSV値は、各食物繊維に固有のSV値に、飼料中添加レベルを掛けて求めた。たとえば、Table 4-1に示した各試料に固有のSV

に、添加レベルを掛けた相対WHCは、10%セルロース添加時で50 mL(5.0 X 10) g/100 g dietとなり、3%GDF添加時で69 mL(23.0 X 3) g/100 g dietとなる。また同様にして算出した相対WHCは前者で37 g/100 g, 後者で39.6 g/100 gであった。

また実験によってはTSVも算出した。これは、試験期間中に摂取した被験飼料から供給されたSVの総量を表し、RSVに飼料摂取量を掛けて求めた。

【実験17】SVと生理効果に及ぼす食物繊維の粒度の影響

SV値が本効果発現の主要因ならば、実験16とは逆に、有効な食物繊維でも粒度を機械的に破碎してSV値をセルロース程度に下げていった場合、生理効果もいずれ消失するはずである。ここでは、粒度の異なる4種のGDF試料を用意し、SV及び生理効果に及ぼす食物繊維試料の粒度の影響を3回に分けて調べた。この他、比較のために発泡スチロールの効果についても検討した。

食物繊維試料とその調製 ここではGDFを粉碎して粒度の異なる4試料を調製し、各々番号を付けて区別した。まずGDF-1は、1 mmの円孔ふるいを備えたWiley millに通した乾燥粉末であり、GDF-2は、GDF-1を100メッシュ(Tyler, 目開き149 μ)のふるいにかけて通過した分画である。GDF-3は、GDF-1と同様にして調製したもので、粒度もGDF-1と同じであるが、別のゴボウ原料から得られたものである。

GDF-4, GDF-5は, いずれもGDF-3を出発物質として調製した。まずGDF-4は, GDF-3の一部を取ってメノー播潰機に入れ, その全量が200メッシュ(Tyler, 目開き74 μ)のふるいを通るまで繰り返し粉碎したものである。次にGDF-5は, GDF-3の一部を取って超低温粉碎装置(リンレックスミルLX-0型, ホソカワミクロンkk)で粉碎した微粉末である。画像分析装置(Texture Analyse System, Leits, 西独)による測定から, GDF-5の平均粒径は12 μ であった。このようにして成分組成は等しくて粒度だけが異なる3種試料(GDF-3, -4, -5)を調製した。

この他, 前出のセルロース粉末(綿花から調製したものの, 東洋ろ紙製, 100~200 mesh)と, 出発物質(GDF-3)の粒度分布は変えずに成分組成だけを変えた試料(ホロセルロース, 粒径<1 mm)も用いた。また, 食物繊維ではないが, 発泡スチロール粉末(発泡度60の発泡スチロール塊を1 mmの円孔ふるいを備えたWiley millに通して粉碎したものの)も比較のために用いた。各被験物質のSVの測定は, 前述の通りであるが, 発泡スチロール粉末は撥水性であり, 水に沈まないためそのままの状態での体積を測定した。また, 各試料のSV値に基づきRSVも算出した。

結果

実験16 Table 4-3には、10%セルロースと3%GDFで、毒性阻止効果の等価性を調べた結果を示した。5%の添加レベルでは無効であったセルロースも、添加レベルを10%に上げてRSVを高めた場合には、有意な成長回復効果を示した。しかも、同群の成長速度は、3%GDF群と統計的に差がなく、10%セルロースの回復効果が3%GDFと等価であることを示していた。3週後の平均飼料効率も、両群ほぼ等しかった。

実験17 GDFの粒度が、そのSV値と毒性阻止効果におよぼす影響をTable 4-4に示した。3回の試験で得られた体重増加量ならびに成長回復率を、試験毎に、RSV値の小さい順に示している。また毒性阻止効果は、対照群の体重増加量が実験により多少変動するので、成長回復率(第2章1節参照)でも表した。

シリーズ1では、1 mmの円孔ふるいを通過した全量(GDF-1)と、これから149 μ 以下の粒径のものにふるい分けたGDF-2の両者で毒性阻止効果を比較した。SV値でGDF-1より40%ほど小さいGDF-2の成長回復率は、GDF-1のそれよりも約20%ではあるが有意に減少した(Table 4-4, シリーズ1)。

GDF-4は、出発物質であるGDF-3の粒径をその半分以下(74 μ 以下)にまで小さくしたもので、SV値は元の18.5 mL/gから10 mL/gに低下(約45%の減少)していた(Table 4-4シリーズ2)。これの成長回復効果は、GDF-3のわずか70%ほどであり、シリーズ1のGDF-2(20%減)より一層の低下を示した

Table 4-3. Comparative effect of concurrent feeding of 3% GDF or 10% cellulose powder on the body weight gain of rats fed a purified diet containing 4% amaranth (*experiment 16*)⁽⁶²⁾

Diet	No. of rats ¹	Average body weight gain for		
		7 days	14 days	21 days
		g	g	g
Basal diet	5	42±2.8 ^{a,2}	95±3.8 ^a	148±3.7 ^a
Basal diet + 5% Amaranth (control)	6	15±2.1 ^b	57±3.9 ^b	99±7.1 ^b
Control + 3% GDF ³	5	40±3.1 ^a	90±4.2 ^{ac}	142±6.0 ^{ac}
Control + 10% cellulose powder ⁴	5	31±2.1 ^c	78±5.9 ^c	129±7.1 ^c

1 Average initial body weight, 65.0 g (range: 53 to 75 g).

2 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter are significantly different (P<0.05).

3 See footnote No. 8 to Table 4-1.

4 See footnote No. 4 to Table 4-1.

Table 4-4. Effect of particle size and settling volume in water of dietary fiber on growth restoration of rats fed a purified diet containing 4 or 5% amaranth (*experiment 17*)⁽⁸²⁾

	Particle size of DF	Specific SV of D F ¹	Relative SV of DF in diet ²	Body weight gain	Percent restoration of growth ³
[Series 1] ⁴	μ	mL/g sample	mL/100 g diet	g/21 days	%
Basal diet	-	-	-	161 \pm 3.6 ^{a,5}	100
Basal diet + 4% amaranth (control) ⁶	-	-	-	58 \pm 17(3) ^{b,7}	0
Control + 5% GDF-2 ⁸	<149	13.5	67.5	140 \pm 7.2 ^c	79.6 \pm 7.0 ^a
Control + 5% GDF-1 ⁹	<1,000	23.0	115	161 \pm 1.3 ^a	99.6 \pm 1.3 ^b
[Series 2] ¹⁰					
Basal diet	-	-	-	160 \pm 2.7 ^a	100
Basal + 5% Powdered polystyrene foam ¹¹	<1,000	9.5	47.5	152 \pm 3.9 ^a	-
Basal + 5% amaranth (control)	-	-	-	95 \pm 9.2(5) ^b	0
Control + 5% cellulose ¹²	74-149	5.0	25.0	84, 132 (2)	-22, 57 (2)
Control + 5% Powdered polystyrene foam ¹¹	<1,000	9.5	47.5	125 \pm 1.7 ^c	45.5 \pm 2.8 ^a
Control + 5% GDF-4 ¹³	<74	10.0	50.0	134 \pm 4.4 ^{cd}	60.0 \pm 6.7 ^a
Control + 5% GDF-3 ¹⁴	<1,000	18.5	92.5	149 \pm 5.0 ^{ad}	84.7 \pm 6.9 ^b
[Series 3] ¹⁵					
Basal diet	-	-	-	160 \pm 6.8 ^a	100
Basal + 4% amaranth (control)	-	-	-	91 \pm 2.2(5) ^b	0
Control + 3.5% GDF-5 ¹⁶	12	7.0	24.5	133 \pm 7.7 ^{cd}	60.6 \pm 11.2 ^{ac}
Control + 5% Cellulose ¹²	74-149	5.0	25.0	104 \pm 6.3 ^b	18.1 \pm 9.1 ^b
Control + 3.5% GDF-3 ¹⁴	<1,000	18.5	64.8	152 \pm 4.8 ^{ac}	88.2 \pm 7.0 ^a
Control + 1.5% holocellulose ¹⁷	<1,000	44.0	66.0	125 \pm 5.9 ^d	49.8 \pm 8.6 ^c

1 SV: settling volume (mL/g) occupied by 1 g of air-dried dietary fiber placed in water filled in a graduated cylinder. The volume was read off by naked eyes after 24 hr-equilibration to water. The volume of powdered polystyrene foam was determined as such in a cylinder not containing water.

2 Relative SV (RSV) of dietary fiber incorporated into a diet was calculated as follows: [specific SV (mL/g) of each dietary fiber] X [its dietary level (%)]. RVS corresponds to the SV value of dietary fiber contained in 100 g of diet.

- 3 Percent restoration of growth (%) is expressed as follows: (difference in body weight gains between rats fed the test and control diets) X 100 / (difference in b. wt. gains between rats fed basal and control diets).
- 4 Average initial body weight was 71 g (range; 60 to 77 g), each group consisted of 5 animals.
- 5 Mean \pm SEM; values not sharing a common superscript letter within a column in each series are significantly different ($p < 0.05$).
- 6 Food Red No. 2, trisodium salt of 1-(4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid, purchased from San-ei Chemical Industries, Osaka.
- 7 The values in parentheses indicate the number of animals which survived and on which data are based when this number was less than the original number per group.
- 8 GDF-2 was a fraction of GDF-1 having particle size smaller than 149 μ .
- 9 GDF-1 was prepared from the roots of edible burdock (*Arctium lappa* L.), powdered in a Wiley mill equipped with a 1 mm diameter pore sieve.
- 10 Average initial body weight was 64 g (range; 57 to 72 g), each group consisted of 5 animals except for the control and control + 5% cellulose diet groups which consisted of 6 animals each.
- 11 A lump of polystyrene foam was powdered with a Wiley mill equipped with a 1 mm diameter pore sieve. Resultant powder was used for comparison although not dietary fiber by definition.
- 12 A preparation from cotton fiber (purchased from Toyo Roshi Co., Tokyo).
- 13 A part of GDF-3 was ground in an agate mortar until entire sample passed through a wire-mesh sieve with openings of 74 μ .
- 14 GDF-3 was prepared by the same manner as that for the preparation of GDF-1, but harvested season and district were different.
- 15 Average initial body weight was 67 g (range: 61 to 75 g), each group consisted of 6 animals, except for the group received the control diet which contained 7 animals.
- 16 To obtain GDF-5, GDF-3 was ground as small as possible in frozen state with liquid nitrogen. The resultant material had mean particle size of 12 μ as determined by Texture Analyze System (Leits, West Germany). We asked Drs. K.Yamada and K.Itoh of Nippon Reizo Co., Tokyo, for this preparation.
- 17 Prepared from GDF by delignification with sodium chlorite in diluted acetic acid

が、生理効果が無くなる程ではなかった。一方、SV値が最も小さいセルロース粉末(5.0 mL/g)では、成長の回復効果がみられなかったばかりか、2週目に入って5匹中3匹が死亡した。

食物繊維試料のSVが毒性阻止効果の指標になるならば、化学組成が全く異なり、微生物学的にも殆ど不活性な疎水性の発泡スチロールでも、GDFに匹敵するSVさえあれば十分効果を発揮するはずである。ここでは、この点についても検討した。その結果、発泡スチロールによる回復効果は、これとSV値のほぼ等しいGDF-4と統計的に差がなく、等価であった。なお、発泡スチロール粉末を基本飼料へ単独添加した群の成長は、基本飼料群のそれとほとんど変わらず、これ自体の成長への影響は何ら認められなかった(Table 4-4, シリーズ²)。

GDF-3を、液体窒素凍結下で粉碎する超低温粉碎装置に通すと、平均粒径が12 μ の微粉末(GDF-5)が得られ、そのSV値は7.0 mL/gにまで低下した(Table 4-4, シリーズ³)。粒径の最も小さいこのGDF-5は、全く効果が見られなかった5%セルロース飼料のRSV値(25 mL/100 g diet)と等しくなるように、これを3.5%添加(RSV; 24.5 mL/100 g diet)して両者の生理効果を比較した。その結果、GDF-5の成長回復率はGDF-3のそれより有意に低下したものの、セルロース程には低下せず、GDFは依然効果を保持していた(Table 4-4, シリーズ³)。

一方、GDF-3の脱リグニン分画であるホロセルロースの

SV値は、原料(GDF-3)の2倍強の値に(44 mL/g)達した。したがって、ホロセルロースは、GDF-3の半分の添加レベルで両者のRSV値がほぼ一致する。しかしホロセルロースの生理効果は、わずか1.5%の添加で有効性を発揮したものの、GDF-3と等価の成長回復率を示すまでには至らなかった。

Figure 4-7は、シリーズ1-3を通して各個体毎(n=5i)に得られた成長回復率と、TSVの関係をプロットしたものである。なお先にも述べたが、TSVとは摂取飼料から供給されたSVの総量を表し、計算(3週間の飼料摂取量 X RSV)から求めた。図の曲線は、対数回帰式($Y = -135 + 90.7 \log X$)から得られたもので、食物繊維は、その成分、粒度、飼料中添加レベルが異なっても、一定レベルのSVが供給されれば有効性を発揮することが概ね確認された。

考察

実験16で、10%セルロースは、2週目以降3%GDFと統計的に等価の生理効果を示したものの(Table 4-3)、依然、3%GDFより弱い傾向を示した。今回、相対WHC(g/g乾燥試料 X 飼料中添加レベル)が等しくなるように、両者の添加レベルを調製したわけであるが、RSV値の比較では、10%セルロースの方が3%GDFより3割程不足していた。10%セルロースの回復効果が3%GDFよりやや弱かったのは、このためかもしれない。したがって、WHCよりもSVの方が生理的に大きな役割を担っていると考え、実験17では、

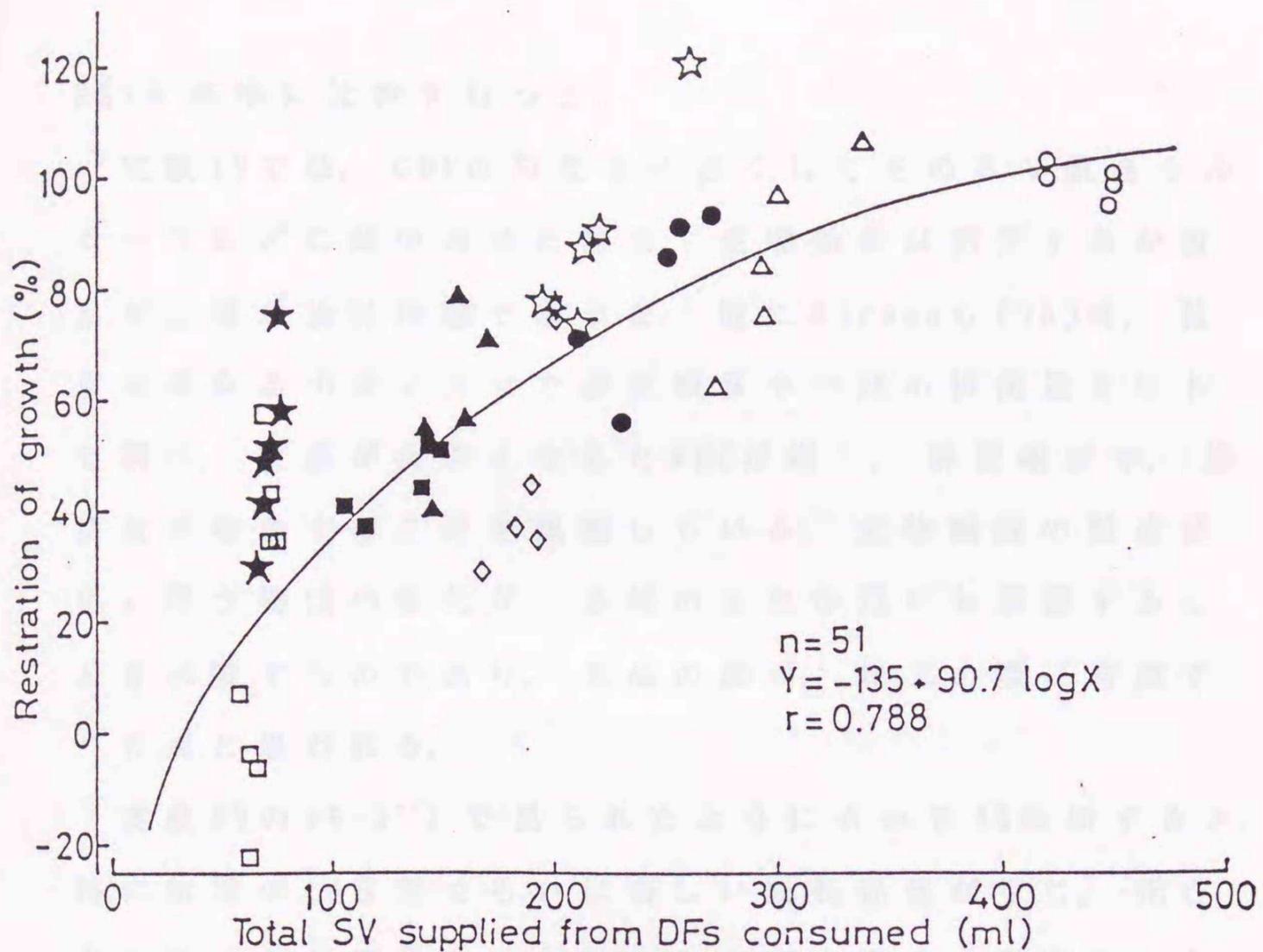


Figure 4-7. Correlation between the total SV supplied from dietary fibers consumed and growth-restoration of rats fed a purified diet containing 4 or 5 % amaranth (Food Red No. 2) (*experiment 17*)⁽⁸²⁾. A logarithmic curve with following equation was given when percent restoration of growth (see legend to figure 2-2) was plotted against total SV supplied from dietary fiber consumed {SV of each dietary fiber (mg/g)} X {its intake for 21 days (g)}; $Y = -105 + 97.2 \log X$ ($r = 0.828$). Each point represents the value obtained from individual rat of groups given the following test diets: ○ ,5% GDF-1; ● ,5% GDF-2; △ ,5% GDF-3; ▲ ,5% GDF-4; ☆ ,3.5% GDF-3; ★ ,3.5% GDF-5; □ , 5% cellulose; ■ ,5% polystyrene foam; ◇ ,1.5% holocellulose. The logarithmic curve suggests that total SV of dietary fiber in diet consumed is a factor determining its protective activity and there is a requirement of SV to attain the protective effect.

RSVを基準に比較を行った。

実験17では、GDFの粒度を小さくしてそのSV値をセルローズほどに減少させた場合、生理効果は消失するか否かが主要な検討課題であった。既にKirwanら(78)は、粒度の異なる小麦フスマで排便頻度や一回の排便量をヒトで調べ、粒度が大きくなるとWHCが増し、排便頻度や、排便量が増加することを観察している。食物繊維の粒度変化に伴う物性の変化が、各種の生理作用にも影響することを示唆するものであり、食品の調理、加工の際に考慮すべき点と思われる。

実験17のシリーズ1で見られたようにAmを4%添加すると、特に初期の14日間ぐらいは著しい成長遅延が生じ、死亡するラットも現れる。このときの死亡率や、生存ラットの成長遅延の程度は、シリーズ2の5%投与時よりも著しかった。ラットの供給元(徳島実験動物研究所, 徳島), 系統(Wistar系), 基本飼料組成(25%カゼイン-スクロース飼料), その他の飼育条件は同じでも実験毎にこうした変動は、しばしば観察される(62, 79, 80, 81)。生存さえ危い飼料条件のときラット間で応答の幅が大きくなるためであるが、ロット毎に異なるAmの純度の影響も考えられる。

ところで、食物繊維試料を粒度の違いでふるい分けた場合に、構成成分のかたよりを生ずる可能性があり、シリーズ1のGDF-1とGDF-2の生理効果の差は、そのような相違に由来した疑いもある。そこで、シリーズ2以降では出発物質の一部を取り、そのすべてが目的のふるいを通るまで

粉碎して構成成分のかたよりをなくした。それでも粒度を小さくしてSV値を下げると、生理効果は明らかに弱くなることが再現された。また発泡スチロール粉末でも、十分有効であることがわかった (Table 4-4, シリーズ 2)。

つぎに各種食物繊維の成長回復効果と、それらの摂取により供給されたTSVとの関係は、直線回帰式よりも対数回帰式に従っていた (Figure 4-7) (82)。これは、生理効果にはプラトーに達するレベルがあることを考えれば当然かもしれない。したがって、成長回復効果が平衡に達するときの飼料中SV量 (RVS) は、毒性阻止効果のためのSV必要量とみなすこともできる。

もっとも、RSV値が等しくても一致した生理効果が得られなかった試料もいくつか見られた。たとえば3.5%GDF-5と5%セルロース粉末は、ほぼ等しいRSV値を有するにもかかわらず、生理効果は等価ではなく (Table 4-4, シリーズ 3), 前者の効果が大きかった。同様に, 3.5% GDF-3と1.5%ホロセルロースも、RSV値が等しいにもかかわらず、生理効果は前者の方が大きかった。こうした相違は、有塚ら (83) の食物繊維の物性に関する観察事実と関係しているのかもしれない。

有塚ら (83) は、食物繊維試料にプロテアーゼやリパーゼを作用させるとSV値が大幅に増加することを見出した。それによれば、本研究で用いたGDFはまだタンパク質や脂質を含んだ粗製の試料なので、これらが消化管腔内を移動する際には、消化酵素の作用をうけて物性が変化する

可能性がある。つまり、RSV値の等しい試料間で等価の効果が得られなかったのは、消化管腔内(*in vivo*)では両試料間のSVが必ずしも一致していなかったためかもしれない。同一RSVを与えるように調製したセルロース添加飼料とGDF添加飼料の間で、毒性阻止効果は後者が高かったのもそのためと推定される。実際、各食物繊維を酵素処理するとSV値が2-3倍に増し、この*in vivo* SV値の増加に伴って、処理前のそれよりも生理効果(A m毒性阻止効果)が高くなるという結果を得ている(83)。

4.4 水溶性と非水溶性食物繊維によるA m毒性阻止効果の比較

緒言

前節で、A m毒性阻止効果における物理化学的性質、とりわけSVの重要性を明らかにした。しかしこの結論は、非水溶性食物繊維に限られている。水溶性食物繊維もまた有効であるとするれば、どのような物理的性質がその生理効果を支配しているのであろうか。そこで本節では、水溶性食物繊維を含め、GDF以外の各種非水溶性食物繊維について、A m毒性阻止効果を検索した。

実験方法

【実験18】 被験試料 水溶性食物繊維には、KM(清水化学, 三原市), CMC(和光純薬工業, Na塩, 大阪), 寒天(片山化学工業, 大阪), それに水溶性高分子としてポリ

エチレングリコール(片山化学工業, 重合度 450, PEGと略)を用いた。

非水溶性食物繊維には, 食用コンニャクの凍結乾燥粉末(前述のKMをアルカリ凝固させて調製), セファデックス G-200(Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala), 及び粘土鉱物のイモゴライト(84)(愛媛大学農学部逸見助教授より恵与して頂いた)を用いた。なお, GDFも比較のために用いた。

飼料と動物の飼育方法 Table 2-1に示した基本飼料, 5%Am対照飼料, 及び被験物質の3%同時添加飼料を用意した。Amや被験試料の添加は, スクロースに置き換えて行った。なお8種被験物質の動物試験は, 2回に分けて行った。

飼育方法は第2章1節で述べた通りである。すなわち, 体重50g前後の雄ラットを, 基本飼料で3ないし5日間予備飼育した後, 個別ケージに組分け(5匹/群), 毎朝新鮮な飼料を水と共に自由に与えて3週間飼育した。この間, 体重と飼料摂取量を毎日記録した。

結果

実験18(シリーズ1) Table 4-5は, 4%Am投与ラットの成長遅延に対するGDF, KM, PEG, CMCの回復効果を調べたものである。被験試料を同時添加した群のうち, GDFとCMC群で有意な成長回復が認められた。CMC群では, 途中1匹が死亡したが, この直前(10日目)の平均体重の比較

Table 4-5. Effect of water-soluble and -insoluble dietary fibers, and inorganic and organic polymers on the body weight gain of rats fed a purified diet containing 4% amaranth (*experiment 18*)⁽⁷⁹⁾

Diet	Average body weight gain for		
	7 days	14 days	21 days
	g	g	g
[Series 1] ¹ Basal diet	42±2.8 ^{a,2}	95±3.8 ^a	148±3.7 ^a
Basal diet + 3% Amaranth (control) ³	15±2.1 ^b	57±3.9 ^{b(4)} ⁴	99±7.1 ^{b(4)}
Control + 3% GDF ⁵	40±3.1 ^a	90±4.2 ^a	142±6.0 ^a
Control + 3% edible konnyaku ⁶	31±1.8 ^c	72±3.6 ^c	119±1.7 ^c
Control + 3% agar-agar ⁷	25±3.4 ^{cd}	70±2.9 ^c	117±2.8 ^c
Control + 3% Sephadex G-200 ⁸	38±2.2 ^a	88±1.5 ^{a(4)}	140±3.1 ^{a(4)}
Control + 3% imogolite ⁹	20±2.1 ^{bd}	61±4.5 ^{bc}	105±8.9 ^{bc}
[Series 2] ¹⁰ Basal diet	42±2.2 ^{a,2}	97±4.7 ^a	153±4.7 ^a
Basal diet + 5% Amaranth (control) ³	18±1.7 ^{bc}	55±5.0 ^{b(4)} ⁴	98±10.4 ^{b(4)}
Control + 3% GDF ⁵	41±3.5 ^a	82±6.5 ^{acd}	131±7.6 ^c
Control + 3% konjac mannan ¹¹	26±3.0 ^c	63±5.1 ^{bd}	105±9.5 ^{bc}
Control + 3% PEG ¹²	9±4.2 ^{b(4)}	27 (1)	61 (1)
Control + 3% CMC ¹³	36±3.0 ^a	82±3.0 ^{c(4)}	131±3.2 ^{c(4)}

1 Average initial body weight, 65 g (range: 51 to 71 g).

2 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05). Comparisons are made within each series.

3 Food Red No. 2, purchased from San-ei Chemical Industries, Ltd., Osaka.

4 The value in parentheses indicates the number of rats which survived and on which data are based when this number was less than the original

number per group (5 rats per group).

5 See footnote No. 8 to Table 4-1.

6 The solution of native konjac mannan was coagulated by mixing with Na_2CO_3 solution, boiled in water to demineralize, lyophilized and powdered by Wiley mill.

7 Purchased from Katayama Chemical Industries, Ltd., Osaka.

8 Purchased from Pharmacia Fine Chemicals AB, Upsala, Sweden.

9 A sort of clay minerals, which was kindly supplied by Dr. T. Henmi, Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Ehime University.

10 Average initial body weight, 65 g (range: 51 to 71 g).

11 Native and water-soluble form obtained from the tubers of *Amorphophallus Konjac* K. Koch, which was kindly supplied by Shimizu Kagaku Kenkyusho, Mihara, Hiroshima.

12 Polyethyleneglycol (degree of polymerization, 450), purchased from Katayama Chemical Industries, Ltd., Osaka.

13 Carboxymethylcellulose, purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka.

でも依然有意に回復していた。KM群でも回復の兆しはあったが、有意差を示すほどではなかった。PEG群では、対照群より更に強い毒性が現れ、21日後の生存ラットは5匹中僅か1匹で、生存ラットの体重増加量も対照群より38%ほど減少した。

(シリーズ2) Table 4-6にはGDFの他、セファデックス G-200、食用コンニャク、寒天、イモゴライトによる成長回復効果を示した。被験群の体重増加量は、GDFとセファデックス G-200が最大で、次いで食用コンニャク、寒天の順でいずれもAm対照群に対して有意な効果であった。なお、セファデックス G-200群では、CMC群同様に成長の遅い1匹が途中死亡したが、死亡出現前(10日目)の比較でもやはり有意に高かった。

考察

成長回復に必要なGDFの添加レベルが3%であったことから(62)、本実験ではGDFの効果の発現に必要な最小レベルで被験試料の効果を比較した。この方が、飼料間の有効性の差が鋭敏に出ると考えたからである。予想通り、試料の毒性阻止活性の差は鋭敏に現れ、KMは5%添加時には有効であったが(26)、3%では効果が見られなくなった(Fig. 4-5)。しかし、CMCは有効であったことから、食物繊維が非水溶性か、水溶性かはそれらの生理効果を支配する本質的な差ではないと考えられる。

次に、本実験で用いた非水溶性試料のSV値 (mL/g

乾物量)を測定したところ、セファデックス G-200(粒径 40~120 μ), 36; GDF(粒径<1 mm), 23; イモゴライト(粒径<1 mm), 15; 食用コンニャク(粒径<1 mm), 12であった。一方、対照群のラットが死亡し始める直前(10日目)の各群の体重から計算した成長回復率(%)は、セファデックス G-200, 82 ± 10 ; GDF, 95 ± 8 ; イモゴライト, 42 ± 11 ; 食用コンニャク, 68 ± 4 であった。概ね S V 値の小さい試料ほど回復効果も劣る傾向は、ここでも確認された。また、CMCや KM のような水溶性食物繊維の場合、その水溶液の示す粘稠性が生理的に重要な役割を有していると推察される。

セファデックス G-200群は、成長の回復が見られるにも関わらず、途中死亡するラットが見られた。この原因は、今のところ明らかでないが、死亡ラットを剖検すると盲腸が異常に肥大していることから、これら試料による異常発酵が一因かもしれない。

第 5 章 消化管内容物の状態, 消化管粘膜の形態, およ びタンパク質利用に及ぼす影響

5.1 A m 腹腔投与ラットの成長に及ぼすGDFの影響

緒言

第 2 章で, GDFは体内代謝レベルの毒性に対しては無効であると結論した。翻せば, A m の場合, 消化管腔内で生ずる何らかの障害が成長遅延の原因ということになる。まずこの点を確認する目的で, A m を消化管を経ずにラットの腹腔に直接投与した場合の毒性の程度と, これに対する飼料中GDFの効果を検討した。

実験方法

【実験 19】飼料と飼育方法 飼料には基本飼料 (Table 2-1) と, これに 5%GDF を単独添加したものを用意した。ラットは, 1 群 5 匹として 4 群に組分け, うち 3 群には基本飼料を, 残り 1 群には 5%GDF 飼料を水とともに自由に与えた。A m は, Krebs-Ringer のリン酸緩衝液 (KRPB, pH, 7.2) 1 mL 中に 62.5 mg を含む溶液として, 1 日 2 回 (9 時, 15 時), 基本飼料群と 5%GDF の単独添加群に腹腔注射した。投与量は, はじめの 7 日間は 187.5 mg/日, 2 週目の 7 日間は 93.75 mg/日であった。基本飼料を与えた残り 2 群のうちの 1 群には, 腹腔投与操作の対照として, A m 溶液と等容量の KRPB を腹腔注射した。

結果

実験19 14日間の体重増加量、飼料摂取量等を Table 5-1に示した。この間に腹腔投与した A m の総量は、約 2 g/ラットであった。この量は、14日間の自由摂取時に 4% A m 対照飼料(約 10 g/日)から摂取する A m 量の 35%に相当していた。予想したように、腹腔投与の場合に下痢は観察されなかったが、尿は赤く着色し、大量に投与された A m の大部分は未代謝のまま直接排泄されているようであった。

なお、誤ってカニューレを気管に挿入する事故により、A m 投与を受けた基本飼料群、ならびに 5%GDF 添加群の各々 2 匹が死亡した。生存ラットの体重増加量で比較した場合、A m の腹腔投与群は、KRPBのみを投与した群より約 30%程であるが有意に減少していた。また飼料摂取量は、約 22%の減少であった。

次に、5%GDFの単独添加群に A m を腹腔投与した場合、同量の A m を腹腔投与した基本飼料群より体重増加量、飼料摂取量ともやや増加したが、何れも有意な差は認められなかった (Table 5-1)。

Table 5-1. Effect of intraperitoneal injection with an amaranth solution on body weight gain, food intake and food efficiency in rats fed a basal diet with or without added GDF (*experiment 19*)⁽⁴⁸⁾

Diet	No. of rats survived for 21 days ¹	Treatment ²	Body weight gain g/21 days	Food intake g/21 days	Net food efficiency
Basal diet	5	Not treated	157± 3.7 ^{a,3}	315± 5.1 ^a	0.50±0.05 ^a
Basal diet	5	KRPB, ⁴ i.p.	155± 3.2 ^a	312± 7.7 ^a	0.50±0.011 ^a
Basal diet	3	KRPB+Am, ⁵ i.p.	110±13.7 ^b	243±20.6 ^b	0.45±0.017 ^b
Basal diet + 5% GDF ⁶	3	KRPB+Am, i.p.	125± 8.6 ^b	261± 5.4 ^b	0.48±0.002 ^b

1 Average initial body weight, 69.0 g (range; 64 to 73 g).

2 One half milliliters of Krebs-Ringer phosphate buffer with or without added amaranth (62.5 mg amaranth/mL) were intraperitoneally injected twice daily for the first week and 0.75 mL, for the last two weeks. The amounts of amaranth dosed were roughly comparable to those assumed to be absorbed when 10-15 g of the control diet were consumed daily.

3 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).

4 Refers to Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.2).

5 Refers to amaranth, dissolved in KRPB at the concentration of 62.5 mg/mL.

6 Refers to gobo dietary fiber, which was prepared from the roots of edible burdock, (*Arctium lappa* L.).

考察

腹腔投与時のラットのLD₅₀は、1 g/kg 体重とされている(44)。本実験の経口投与量(1週目187.5 mg/日)は、体重当たりに換算するとこれの2.7倍に相当する。しかし、誤って気管にカニューレを挿入する事故で死亡したラットを除けば、Amそのものにより死亡するラットはみられなかった。Amの純度、動物の系、飼料組成、飼育環境等が、LD₅₀値の変動要因としてあげられる。

ところで著者らが(48)、4%Am対照飼料投与時の糞中Am排泄量から求めたAmの吸収率は、第1週目で約50%、第2週目以降やや低下して約47%であった。腸内細菌によるAmの分解も考慮する必要があるから、実質的なAm吸収率はもっと低いと予想されるが、概ねこの値に従えば、4%Am対照飼料の経口投与(約10 g摂取/日)時に吸収されるAm量は、200 mg/日と見積もることができる。この量は、本実験で腹腔投与したAm量(1週目187.5 mg/日)にほぼ相当する。もし吸収後のAmが毒性の主要因ならば、経口投与時と同程度の成長遅延が起こると予想されるレベルである。

しかし、Am腹腔投与ラットの成長速度は、経口投与時のそれ(約2.5 g/日)(48)の約2倍に相当していた。飼料効率の低下の程度も比較的小さかった。つまり成長に関する限り、吸収後の体内Amは消化管レベルのAmほど深刻な影響を及ぼさないといえる。このときの成長遅延は、高濃度のAmが大量に投与されたことによる一時的

な飼料摂取量の低下によるところが大きい。

もつとも、体内のA mが何等の影響も及ぼさない訳ではない。たとえば新村(44)はその著書の中で、肝臓のカタラーゼ、コハク酸脱水素酵素、およびアゾ基還元酵素等の活性がA mにより増加する研究を紹介している。また肝臓中ビタミンAレベルについては、これを低下せるとする研究もあるが、最近の研究では確認されていないという。ちなみに、発ガン性、変異源性、催奇形性も調べられているが、概ね白と判定されている(44)。

本研究で扱っているA mの大量投与による成長抑制に関しては、ほぼ消化管腔内での現象と考えることができる。また食餌性のGDFは、A mの腹腔投与で生じた成長遅延には目ざましい改善効果を示さなかったことから(Table 5-1)、GDFの有効性発現の場合も消化管腔内であると推測される。

5.2 盲腸内容物の状態と消化管粘膜の形態に及ぼすA m ならびにGDF同時投与の影響

緒言

これまでの実験から、A m毒性はほぼ消化管腔内で生ずる何らかの障害が原因と推定した。そこでまず気づくことは、A m対照群では常に盲腸が肥大する点である。肥大の原因を調べることも、消化管腔内での障害を明らかにする一つの手がかりになると考え、まずA m対照群

や、GDF同時添加群の盲腸内容物の状態を調べた。次いで盲腸肥大と飲水量との関係についても検討した。さらに、消化管粘膜の形態に及ぼすAmの影響についても検討するため、Am投与ラットの胃、十二指腸、結腸部の粘膜上皮を走査型電子顕微鏡(SEM)により比較観察した。

実験方法

【実験20】盲腸内容物の水分量とpHの変化について
基本飼料、5%Am添加対照飼料、5%GDF同時添加飼料の3種を、離乳直後のラットに水とともに自由に与えて21日間飼育した。飼育終了後、ネンブタール麻酔下で開腹して盲腸の入り口(回盲バルブ)と、出口(結腸の入り口)の部分を結紮した後、盲腸を切り離した。摘出した盲腸はまず湿重量(W_1)を測り、ついで切開して内容物を純水で洗い出した後の組織重量(W_2)を測定した。内容物の湿重量は、両者の差($W_1 - W_2$)から求めた。

洗い出した内容物は、100 mLに定容した後、pHメーター(F-7ss型、日立-堀場、東京)でpHを測定し、ついで水分を蒸散させ、105℃のオーブン内で恒温に達するまで乾燥した。このときの重量を内容物の乾燥重量とし、湿重量と乾燥重量の差から内容物の水分量を求めた。

【実験21】飼料と水の摂取パターンの変化について

実験20で、盲腸内容物中の水分量に著しい差がみられたことから、実験20と同様の3群(なおAmレベルは、4%)を設け21日間の飼料と水分摂取量の関係を調べた。また、

投与開始から24時間内の飼料の摂取パターンも調べた。
水分摂取量は、吸口まで完全に水を満たした目盛り付き
試験管をケージに取り付け、減少量を毎日記録した。

【実験22】SEMによる消化管粘膜の形態観察

実験21で用いたのと同様の3種飼料を、水とともに14
日間与えたラットについて比較観察を行った。ラットは
断頭後直ちに開腹し、胃、十二指腸、結腸の一定部位を
摘出して37℃の生理食塩水で内容物を洗浄除去した後、
観察試料に用いた。観察試料は、所定の方法(36)に従っ
て固定した後、腸管粘膜の表面をSEM(HHS-2型、日立
製作所、東京)により観察した。

結果

実験20 Table 5-2には、盲腸の内容物量と、内容物中
水分量およびpHに及ぼすAm単独、あるいはGDF同時投与
の影響を示した。Am対照群の内容物量は、湿重量では
基本飼料群の3倍強にも達し、このほとんどは水分量の
増加によるものであった。GDF群の盲腸も有意に肥大して
いたが、湿重量、水分量とも対照群よりむしろ有意に少
なく、水分の割合(%)は基本飼料群の状態まで改善された。

またAm投与の結果、盲腸内容物のpHは有意に低下
していた。これに対してGDF群では、改善される傾向がみ
られたが、基本飼料群よりなお有意に低かった。

実験21 Fig. 5-1には、投与開始から24時間までの3
種飼料の摂取パターンを示した。Am対照飼料を与えた

Table 5-2. Effect of feeding amaranth with or without GDF on the nature of cecal contents of rats¹ (*experiment 20*)⁽⁸⁰⁾

Diet	Characteristics of cecal content				
	Wet weight	Dry weight	Moisture	pH	
	g	g	g	%	
Basal diet	1.75±0.15 ^{a,2}	0.32±0.02 ^a	1.44±0.13 ^a	81.6±1.0 ^a	7.06±0.16 ^a
Basal diet + 5% amaranth	5.66±0.40 ^b	0.70±0.07 ^b	4.97±0.33 ^b	87.8±0.5 ^b	6.29±0.05 ^b
Basal diet + 5% amaranth + 5% GDF	3.44±0.20 ^c	0.59±0.03 ^b	2.85±0.17 ^c	82.9±0.4 ^a	6.62±0.03 ^c

- 1 Average initial body weight was 64 g (range : 54 to 72 g) and final body weight of each group was as follows (grams), basal diet, 163; basal diet + 5% amaranth, 113; basal diet + 5% amaranth + 5% GDF, 157, respectively. Above data were based on the last day of feeding period of 21 days.
- 2 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05).

Table 5-3. Effect of feeding amaranth with or without GDF on the water consumption and the ratio of water consumption to food consumption of rats¹ (*experiment 21*)⁽⁸⁰⁾

Diet	Body weight gain	Food consumption	Water consumption	Water consumed/food consumed
	g/21 days	g/21 days	g/21 days	
Basal diet	125±8.4 ^{a,2)}	270±12.7 ^a	285±16.6 ^a	1.1±0.06 ^a
Basal diet + 4% amaranth	58±3.5 ^{b(3)} ³	190± 6.9 ^{b(3)}	380±32.2 ^{b(3)}	2.0±0.12 ^{b(3)}
Basal diet + 4% amaranth + 5% GDF	114±8.4 ^a	279±13.0 ^a	387±15.6 ^b	1.4±0.10 ^c

- 1 Average initial body weight, 78 g (range : 71 to 87 g), experimental period was 21 days.
- 2 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05).
- 3 Figures in parentheses indicate the number of rats survived and on which data are based when this number was less than the original number (5 animals) per group.

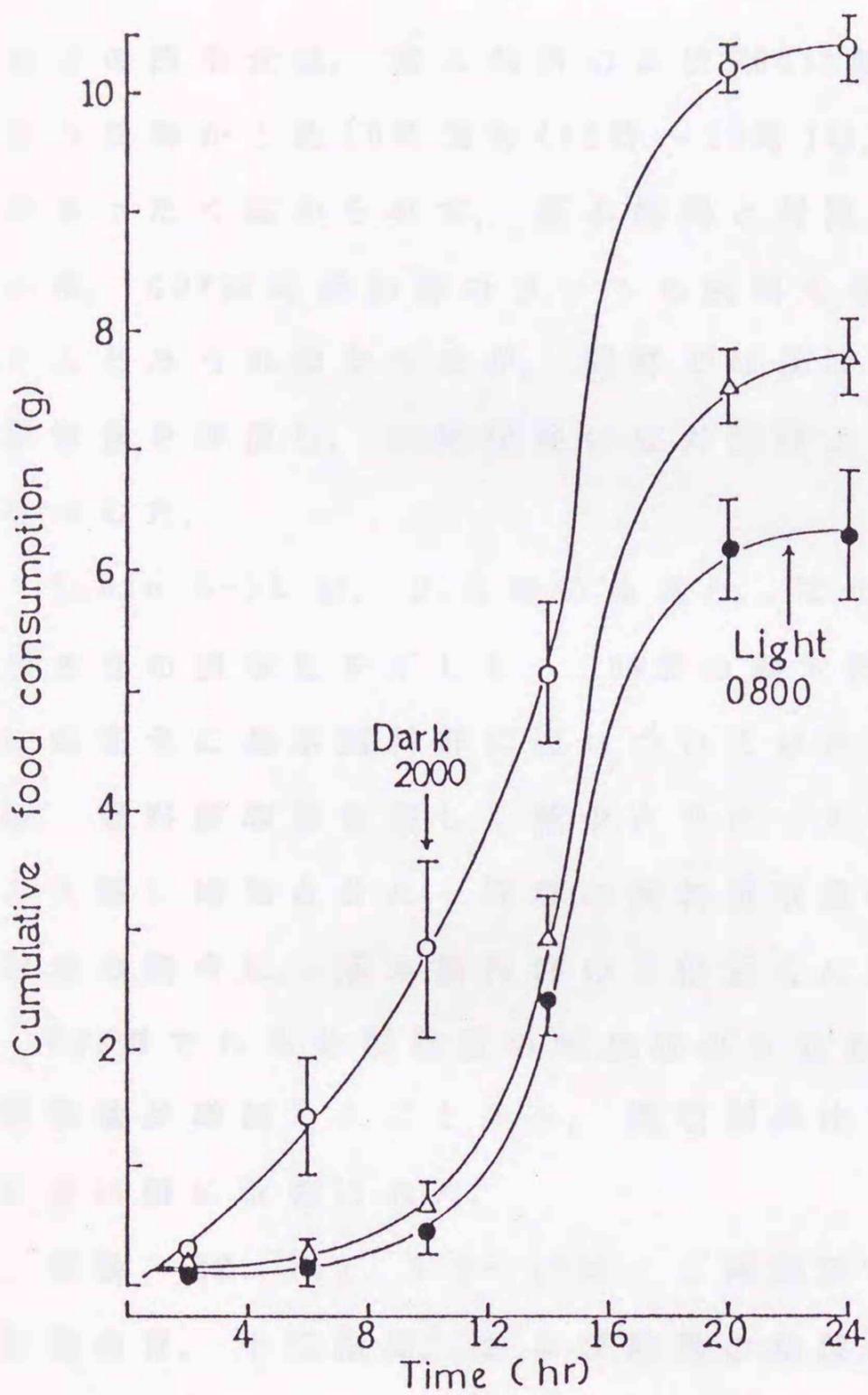


Figure 5-1. Cumulative food consumption of rats fed the basal diet (O), basal diet containing 4% amaranth (●) and basal diet containing 4% amaranth plus 5% GDF (Δ) for first 24 hours of the feeding (*experiment 21*)⁽⁸⁰⁾. Average initial body weight of rats was 78 g (range; 71 to 87 g). Each point is the mean of 5 rats and the vertical bars represent standard error of the mean.

初日の摂取量は、基本飼料のほぼ60%に低下した。とくに投与直後から約10時間程(10時~20時)は、飼料への接触がまったく認められず、基本飼料と対照的であった。この間、GDF同時添加群のラットも飼料を摂取した形跡はほとんどみられなかったが、同群では夜間に入って急速に摂取量を回復し、24時間後には対照群よりも有意な増加を示した。

Table 5-3には、21日後の体重と、この間の飼料、および水分の摂取量を示した。GDF群の飼料摂取量は、21日後には完全に基本飼料群に追いついていた。次にAmの添加は、飼料摂取量を著しく減少させた一方で、水分摂取量を大幅に増加させた。同群の飼料摂取量に対する水分摂取量の割合は、基本飼料群の2倍近くに達した。

GDF群でも水分摂取量の増加はみられたが、同群は飼料摂取量が増加したことから、摂取飼料比では基本飼料群に近い値に改善された。

実験 22 Fig. 5-2~12は、3種飼料を14日間投与した後の胃、十二指腸、および結腸の粘膜表面をSEMにより観察したものである。胃と十二指腸については、より高倍率の領域でも観察したが、粘膜組織の損傷等、本質的な形態的变化は認められなかった。結腸についても同様であったが、杯細胞からの粘液小滴(mucus droplet)とみられる分泌がAm摂取の2群でやや増加しているようであった。

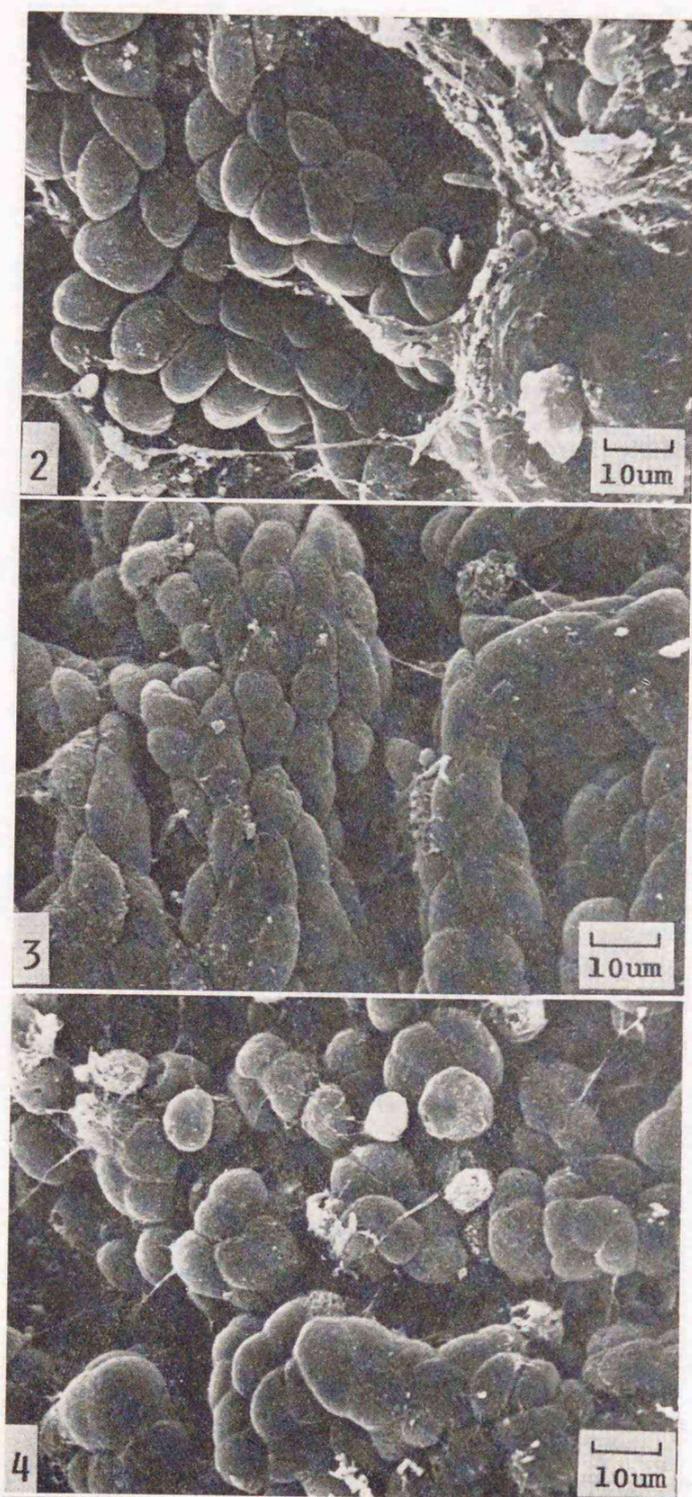


Figure 5-2,3,4. Scanning electron micrographies of surface of the stomach from a rat fed the basal diet (fig.5-2), basal diet containing 5% amaranth (fig.5-3) or basal diet containing 5% amaranth plus 5% GDF (fig.5-4) (*experiment 22*)⁽⁸⁰⁾. There were no differences in gastric mucosal morphology among three groups.

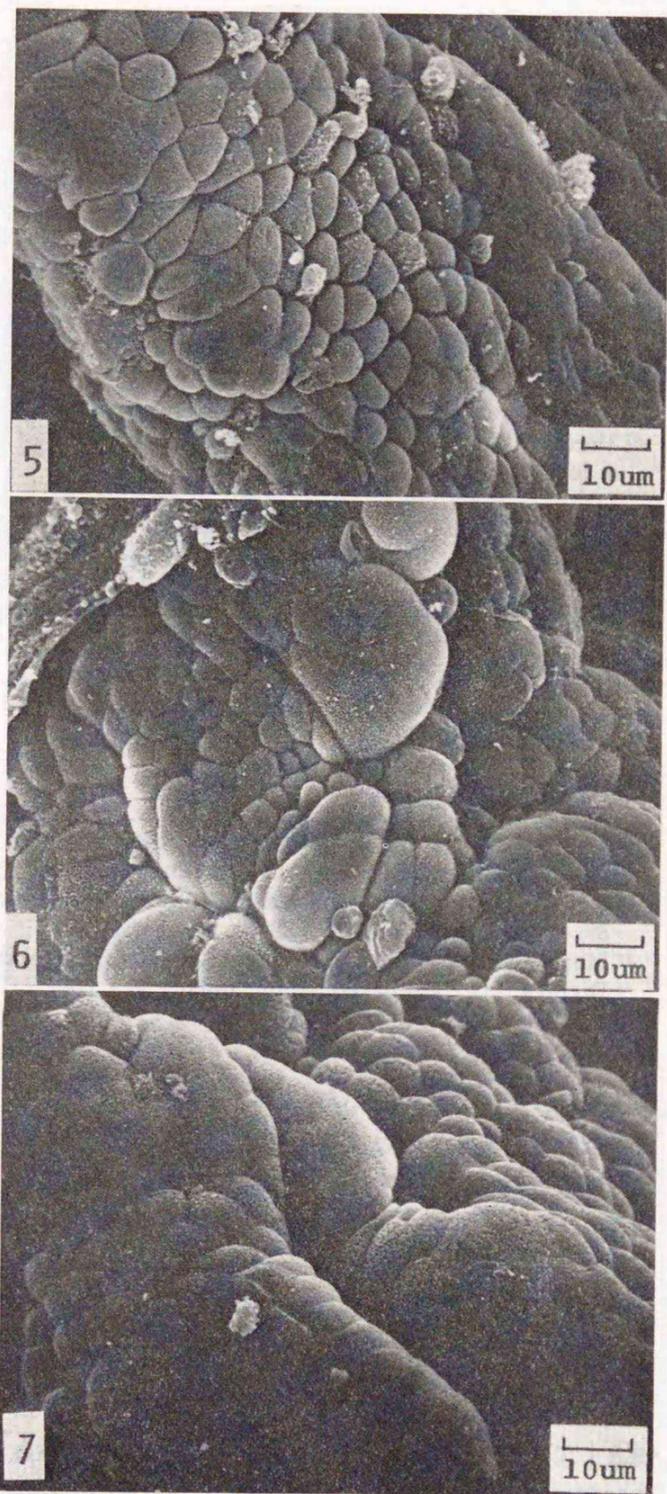


Figure 5-5,6,7. Scanning electron micrographies of surface of the duodenum from a rat fed the basal diet (fig.5-5), basal diet containing 5% amaranth (fig.5-6) or basal diet containing 5% amaranth plus 5% GDF(fig.5-7)(*experiment 22*)⁽⁸⁰⁾. The microvilli on the epithelial cells are also normal in appearance in all groups.

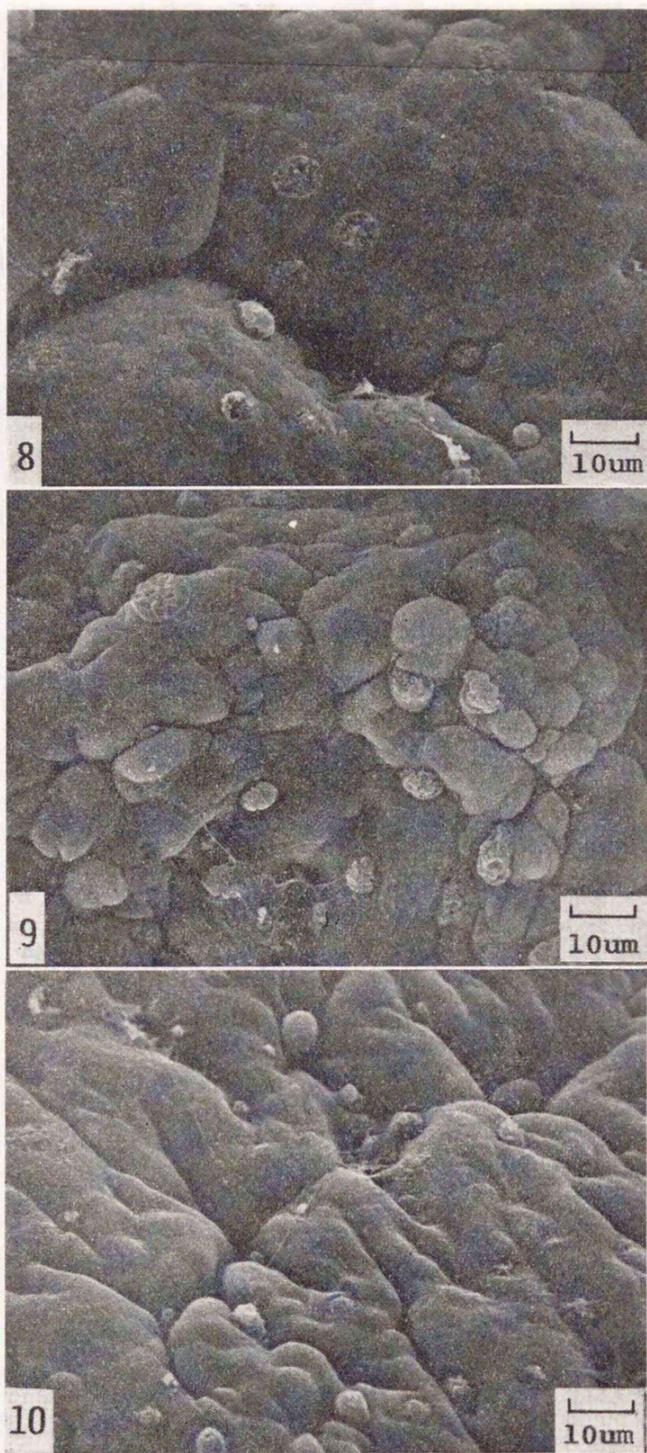


Figure 5-8,9,10. Scanning electron micrographies of surface of the colon from a rat fed the basal diet (fig.5-8), basal diet containing 5% amaranth (fig.5-9) or basal diet containing 5% amaranth plus 5% GDF(fig.5-10)(*experiment 22*)⁽⁸⁰⁾.

More mucus droplets appear to exist in the colonic mucosal membranes from rat fed with amaranth and amaranth plus GDF.

考察

A m 投与により盲腸湿重量は、基本飼料群の3倍強に達し、そのほとんどが水分量の増加によるものであった (Table 5-2)。また、GDFの同時添加は、A mによる盲腸肥大を緩和することも明らかとなった。したがって、盲腸重量を控除した実質的な最終体重で体重増加量を算出した場合、A mによる成長の遅れは一層明瞭であった。そしてGDFによる成長回復が、腸内容物の増加による見かけ上のものではないことも明瞭であった。

ところでA mによる盲腸肥大は、難吸収性のA m自身と、これによる消化吸収障害で生じた未吸収栄養素が協同して腸内浸透圧を上昇させ、ひいては水分吸収が障害され下痢症状を引き起こしたものと考えられる。つまり、A m投与による下痢は浸透圧性のものであると推定され、A m対照群でみられる水分摂取量の増加は、下痢にともなう脱水症状の反映とみることができる。

また、盲腸内容物のpHが低下したのは、未吸収栄養素が大量に盲腸内に流入した結果、腸内発酵が活発になり、これにより生じた揮発性脂肪酸を中心とした有機酸が腸内pHを低下させているものと考えられる。GDFの同時添加により盲腸内pHがわずかながら基本飼料群のそれに近づいたのは、これにより栄養素の利用が改善され、盲腸内に流入する未吸収栄養素(発酵基質)が減ったためかもしれない。

次にSEM観察から、A m投与による腸粘膜組織の損

傷を裏付けるような形態的な変化は胃，十二指腸，結腸のいずれの部位においても認められなかった (Fig. 5-2~12)。つまり，Amにより腸内容物の状態に変化が起こり，慢性的な下痢症状が続いても，腸粘膜に剥離等の損傷は起こっていないとみることができる。しかし，結腸部で杯細胞からの粘液小滴とみられる分泌物が増加していた。タンニン酸投与時に糞中のムコ多糖類が増加するように (85)，Amも腸内粘質物を増加させ，糞中窒素排泄を増やす一因となっている可能性がある。

5.3 盲腸・回腸切除ラットの成長に及ぼすAm単独，あるいはGDF同時投与の影響

緒言

Ershoff(19)は，アルファアルファ粉末の各種有害物質に対する毒性阻止効果の有効性を，当初その中の未知成分に求めた。彼は，この未知成分は通常，腸内細菌か，宿主の組織で合成される量で足りているが，激しい下痢を起こすような食事(ストレス)条件ではこれが不足すると考えた。彼の仮説によればAm毒性は，未知成分の欠乏症と言うことになる。しかし本研究から，天然の食物繊維以外に，CMC(Table 4-5)(79)や発泡スチロール粉末(Table 4-4)(82)までも有効なことからすると，未知有効成分の可能性は非常に小さい。むしろ食物繊維のもつ物性が生理的により重要な役割を担っていることは既に第4章で

述べた。

しかし、食物繊維の効果が腸内細菌の作用を介して発現している可能性も、依然残っている。たとえば Ershoff (2)は、セルロースも弱いながら毒性阻止効果を有することを観察してるが、これはセルロース自体の効果よりも、これにより腸内細菌が未知有効成分を合成するのに都合のよい腸内環境に変わったためと考えた。この説によれば、食物繊維の S V 値と生理効果がよく相関するのは、S V 値の高い食物繊維ほど腸内環境を改善する力が強いと考えることもできる。この効果における腸内細菌の関与の有無を、実験的に明らかにする必要がある。

そこで、腸内細菌の主な棲息部位である盲腸と、結腸を切除した動物で食物繊維の効果を調べることにより、有効性発現に際しての盲腸・結腸の役割を明らかにしようと試みた。

実験方法

【実験 23】 ラットの回腸・直腸吻合手術 回腸・直腸の吻合術は、Lambert(86)の術式を応用して行った。要約すると、体重約 200 g の雄ラットを術前 16 時間絶食させた後、ネンブタール(ペンタバルビタールナトリウム, Abbott Laboratories, North Chicago, Ill.)の腹腔注射(0.05 mg/100 g 体重)により麻酔した。腹部の毛を剃り、正中線より切開して開腹した後、回盲バルブに対して 1 cm 近位側と、肛門に対して約 5 cm 近位側の 2ヶ所で腸管を切断

した。回腸近位側断端と直腸断端の開口部同士を、No. 8-0の絹糸で断続縫合により吻合した。不用となった盲腸と結腸は、同部位に通じる腸間膜血管(動, 静脈)を結紮した後、除去した。

施術対照ラットには、同様に麻酔して開腹した後、回盲バルブから約1 cmのところでは回腸を切断し、直ちに両端を同様の術式で吻合する疑似手術をおこなった。腸内容物が吻合部位から漏出しないように、術後12時間、引き続き絶食させた。その後、基本飼料を与えながら12日から17日間の回復期を設けた。なお術後3日間、体重100 g当たり10 μ Lのマイシリン[®]ル(フ[®]ロカイソ[®]ニシリンGと硫酸ハイ[®]ロスト[®]ブ[®]トマイソ[®]の混合物、明治製菓、東京)を筋肉注射した。20匹の回直腸吻合ラットのうち3匹は、体重が回復しなかったため実験から除いた。

5匹の疑似手術ラットを含めて順調に回復した22匹のラットを4群に組分けた。疑似手術ラットには基本飼料を、回直腸吻合術を受けた残りの3群には、基本飼料、4%Am対照飼料、7.5%GDF同時添加飼料の各々を14日間、水とともに自由に与え成長を記録した。

結果

実験23 回直腸吻合ラットの回復期における成長速度は、施術対照ラットのその約74%であった。しかしこの後の飼育実験では、14日間の両群の成長速度に差が見られなくなった(Fig. 5-11)。この結果から、回直腸吻合ラ

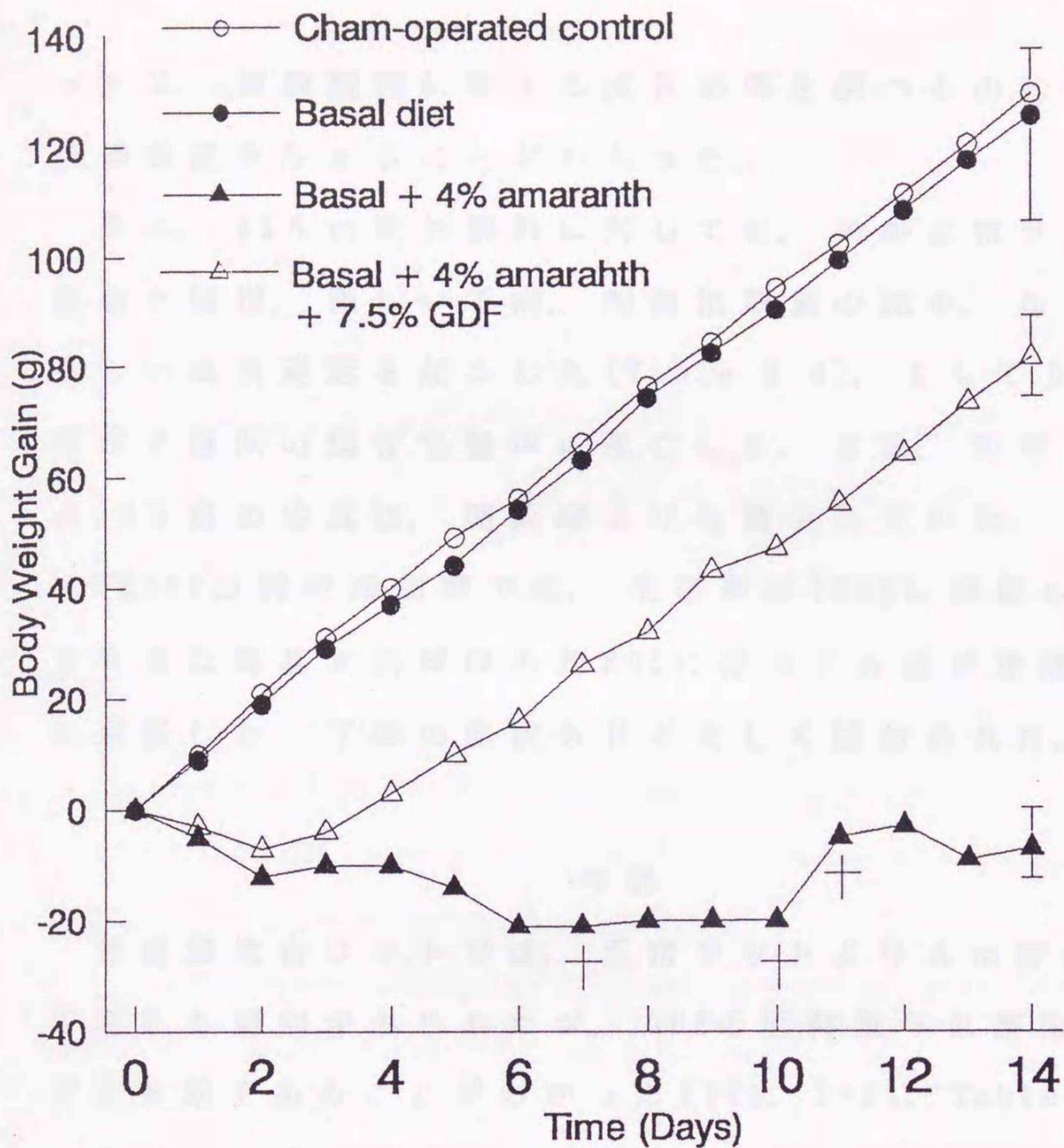


Figure 5-11. Change in body weight gain of ileorectostomized rats fed the basal diet (●), basal diet containing 4% amaranth (▲) and basal diet containing 4% amaranth plus 5% GDF (△) (experiment 23)⁽¹²⁸⁾. Symbol of (○) denotes the sham-operated rats which fed the basal diet as a control of surgical procedure. After a recovery period of 12 to 17 days, ileorectostomized rats weighing about 212 g (range: 163 to 258 g) were examined for growth responses to the experimental diets. Three of 6 rats fed the basal + 4% amaranth diet died during the course of the study as indicated by crosses. Vertical bars represent standard error of the mean.

ットは、被験飼料に対する成長応答を調べるのに十分な成長速度を与えることがわかった。

次に、4% A m 添加飼料に対しては、先の正常ラットの場合と同様、激しい下痢、飼料摂取量の減少、ならびに著しい成長遅延を起こした (Table 5-4)。そして6匹中3匹が2週間の飼育実験中に死亡した。また、生存ラットの14日後の体重は、開始時よりも減少していた。一方、7.5% GDFの同時添加群では、生存率が100%に回復した他、3日目以降基本飼料群の約80%に相当する成長速度で順調に回復した。下痢の症状も目ざましく緩和された。

考察

回直腸吻合ラットでは、正常ラットより A m 毒性が強く現れる傾向がみられたが、GDFの同時投与は施術ラットでも有効であることがわかった (Fig. 5-11, Table 5-4)。したがってこの効果に、盲腸・結腸自身の働きや、そこに生息する腸内細菌は関与していないと考えることができる。3種抗生物質を添加しても、GDFの効果が消しえないことを観察しているが(87)、これもここでの結論を裏付けている。

一方 Takajiら(88)は、胃の全摘手術を行ったラットで、ここで用いたのと同様の3種飼料に対する成長応答を既に調べている。それによれば、GDFの A m 毒性阻止効果はこれらのラットでも、依然認められている。したがって GDFの有効性発現の場は、小腸腔内と断定できる。

Table 5-4. Food intake, body weight gain, food efficiency and mortality when 4% amaranth was fed with or without 7.5% GDF to the ileorectostomized rats (*experiment 23*)⁽²⁸⁾

Diet	Rat ¹	No. of rats	Food intake g/14 days	Net food efficiency ²	Mortality %
Basal diet	Sham	5	366 ± 8.5 ^{a,3}	0.35 ± 0.01 ^a	0
Basal diet	IRS ⁴	5	360 ± 15 ^a	0.34 ± 0.05 ^a	0
Basal diet + 4% amaranth	IRS	6	190 ± 23 ^b	-0.03 ± 0.02 ^b	50
Basal diet + 4% amaranth + 7.5% GDF	IRS	6	301 ± 8.5 ^c	0.27 ± 0.02 ^c	0

- 1 Average initial body weight, 212 g (range: 163 to 258 g).
- 2 Calculated on the basis of nutrient intake not containing such non-nutritive fraction as amaranth and GDF.
- 3 Mean ± SEM; values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).
- 4 IRS refers to rats subjected to ileorectostomy.

5.4 無タンパク質飼料中へのA m単独添加,あるいは食物繊維同時添加の影響

緒言

これまでの結果からA mは, 上部消化管, 特に小腸部で栄養素と同時に存在するときはその害作用を発現すると考えられる。つまりA mは, 小腸上部で栄養素の消化吸收阻害を起こし, ひいてはその利用を悪化させている可能性が強い。タンパク質は成長速度を大きく支配する食餌因子の一つなので, A m投与時の著しい成長遅延は, これによるタンパク質の利用阻害が主な原因なのかもしれない。

したがって, もし消化管にタンパク質が存在しなければ, A m添加による成長への影響は認められないか, 非常に小さいと予想される。そこで無タンパク質飼料を用意し, これにA mを添加したときの成長応答を調べることにより上述の可能性を検討した。

実験方法

【実験24】 飼料 無タンパク質飼料は, 基本飼料(Table 2-1)のタンパク質源(25%加水)をすべてスクロースで置換して調製した(protein-free, 以下PF飼料)。本実験に限って, 食物繊維源には甜菜から得たBeet Dietary Fiber(BDF, 日本甜菜製糖, 帯広)(71)を用いた。BDFはGDFと同等のA m毒性阻止能を有することがわかっている

からである(71)。食物繊維やA mの添加は、等量のP F飼料と置き換えて行った。

飼育方法 体重約200 gのラット30匹を6匹ずつに組分けし、①P F飼料、②P F飼料+7.5%BDF、③P F飼料+5%A m、④P F飼料+5%A m+7.5%BDF、⑤P F飼料+5%A m+3%カゼインの、計5種の飼料を水と共に3週間自由に与えた。

結果

実験24 Table 5-5には、P F飼料にA mを単独に、あるいは各被験物質と同時に添加したときの体重変化を示した。まず、P F飼料中に5%A mを添加した群(A m対照群)の体重は、始めの1週間、P F群と同様に推移した。その後、A m対照群の体重の低下はP F群より若干大きかった。なお体重は、盲腸重量を差し引いた重さで表したが、A m対照群の最終体重は、P F群より9 g(6%)劣る程度であった。このようにA mは、25%カゼイン飼料中では死亡するラットが現れるほどの毒性を示した(Table 2-2)のと対照的に、無タンパク質飼料中ではその影響が非常に弱かった。

ちなみに、A m対照飼料に3%カゼインを補足した場合に、体重はP F群まで回復した。またA m対照飼料に、さらに7.5%BDFを同時添加した場合にも、3%カゼイン程ではないが、体重減少の加速が緩和される傾向を示した。

Table 5-5. Effect of feeding amaranth with or without beet dietary fiber (BDF) on food intake and body weight of rats fed a protein free diet containing sucrose as a carbohydrate source for 21 days¹ (experiment 24)⁽¹¹⁵⁾

Diet	Food intake ²	Final body weight	Cecum weight ³	Body weight gain ⁴
	g/21 days	g	g	g/21 days
Protein-free	189 ± 5.4 ^{ab,5}	152 ± 3.4 ^{abc}	1.7 ± 0.1 ^a	-49.2 ± 2.4 ^{ab}
Protein-free + 7.5% BDF ⁶	181 ± 8.8 ^b	160 ± 2.0 ^a	2.8 ± 0.2 ^{ab}	-40.8 ± 4.1 ^b
Protein-free + 5% amaranth	197 ± 5.2 ^{ab}	144 ± 2.8 ^c	3.6 ± 0.5 ^b	-58.5 ± 2.4 ^a
Protein-free + 5% amaranth + 7.5% BDF	190 ± 10.4 ^{ab}	150 ± 0.3 ^{bc}	6.3 ± 0.8 ^c	-57.5 ± 2.7 ^a
Protein-free + 5% amaranth + 3% casein	209 ± 7.0 ^a	157 ± 5.0 ^{ab}	4.0 ± 0.8 ^b	-44.7 ± 3.0 ^b

1 Average initial body weight, 199 g (range: 182 to 218 g).

2 The amount of nutrient fraction of the diet consumed (not containing non-nutritive supplements).

3 Wet weight containing all its contents.

4 Body weight loss was calculated by subtracting initial body weight from the final body weight not involving cecal weight.

5 Mean ± SEM (n=6): values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05).

6 Refers to beet dietary fiber, which was prepared from the roots of beet, (*Beta vulgaris* L. var. *rapa*. DUMORT.)

考察

本節の緒言で推定したように、タンパク質を含まない飼料中では、同量の A m を添加しても成長への影響は非常に小さかった (Table 5-5) し、死亡するラットもみられなかった。したがって、25%カゼイン飼料中で起こる A m 毒性は、これによる食餌性タンパク質の利用障害が主要因と断定できる。

これに加えて、A m は内因性物質、例えば膵臓から分泌される消化酵素や、消化管粘膜から自然脱落する上皮細胞の再利用をも妨げている可能性がある。なお A m 添加により更に減少した体重は、3%カゼインの補足により添加前の状態 (P F 対照飼料群) まで回復するので、A m による内因性物質の損失量は、3%の食餌性カゼイン量に相当するものと推定される。

また 7.5%BDF だけの添加でも、A m による体重減少の加速を阻止する傾向が見られたが、用いた BDF には乾物量当り約 9%の粗タンパク質が含まれていたもので、この一部が利用されているのかもしれない。たとえば Saunders (89) は、小麦フスマ中の粗タンパク質 (約 10%) の 68% が可消化性であることをラットで調べている。しかし、BDF 中の窒素は牛の rumen 内でも利用不能とされる (有塚 勉氏談) ので、食物繊維そのものによる効果の可能性も否定できない。

5.5 タンパク質消化率, および生物価に及ぼす影響

緒言

前節までの実験から, 食事性の A m は主に消化管上部で, 栄養素, とりわけ食餌タンパク質の利用や, 内因性物質の再利用を阻害していると結論した。そこで, 全動物におけるタンパク質消化率, ならびに生物価の測定を行った。摂取タンパク質の利用に及ぼす A m, および GDF の影響を観察できれば, 小腸内での両者の作用を知る大きな手がかりにもなる。

実験方法

【実験 25】 飼料と動物の扱い 飼料には基本飼料 (Table 2-1), 4% A m 対照飼料, 4% A m + 5% GDF 同時添加飼料の 3 種に加え, 5% GDF 単独添加飼料, それに無タンパク質飼料の計 5 種類を用意した。また, この実験に際しては, 下痢便でもこれを尿と分離して採取できるように, 固定型代謝ケージを自作して用いた (Fig. 5-12)。

50 g 前後の雄ラットを基本飼料で 7 日間予備飼育した後, 通常の個別ケージ内から固定型代謝ケージに移した。固定ケージに慣らすため, さらに 5 日間基本飼料を与えて予備飼育した。この後, ラットを 5 匹ずつ 5 群に組分け (平均初体重, 111 g), 各飼料を水とともに自由に与え, 21 日間飼育した。各週の終わり 3 日間, 尿と糞を分別採取した。採取した便は, 水を加えてホモジナイズして一

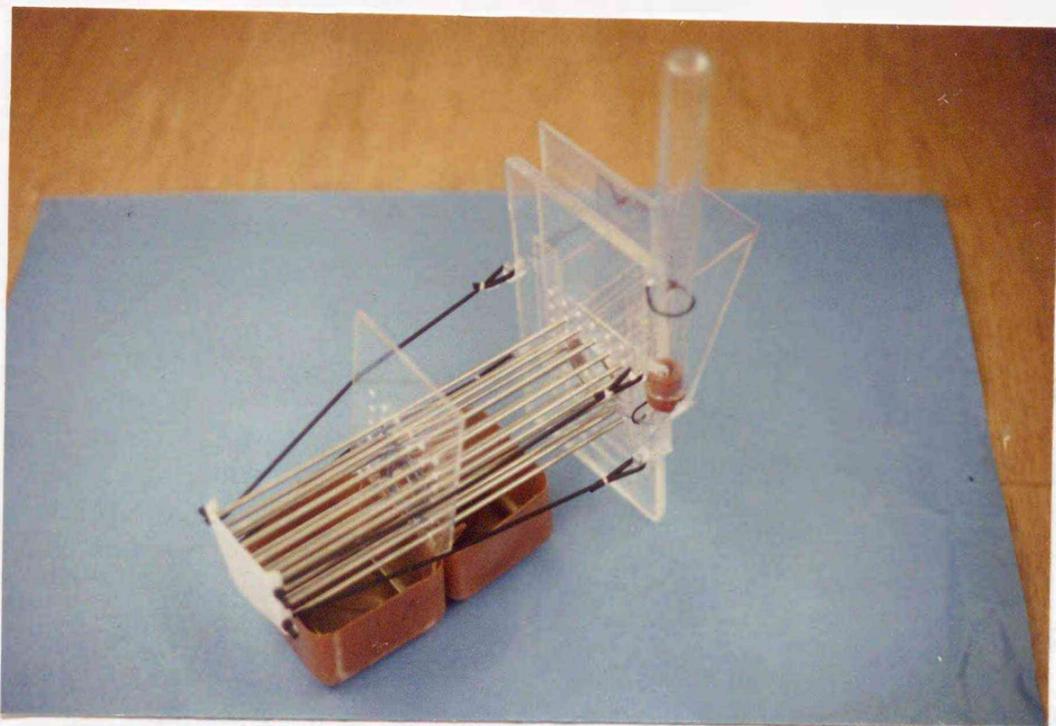


Figure 5-12. A restrainable metabolism cage used for nitrogen balance study (*experiment 22*). This restrainable cage was devised by H.Takeda and J.Tsujita to collect diarrheal stool quantitatively during a prolonged feeding period. Growth rate of rats housed in these cages was about 70% of that attained in usual nonrestraining cages when fed a purified basal diet (see fig. 5-13).

定量とし、その一部をとって窒素ならびに A m の分析に用いた。

窒素ならびに A m の測定 飼料、糞、および尿中の窒素量は、セミマイクロケルダール法により測定し、タンパク質消化率、ならびに生物価(90)を求めた。A m 1 g 当り 29.4 mg の窒素を検出したが、この量は、A m 分子(MW, 604.48)中のアゾ基(分子量の 2.3%)にほぼ相当していた。そこで、A m を含む飼料と、糞の試料中窒素量は、個別に A m 量も測定し、これに由来する窒素量を差し引いて補正した。なお飼料ならびに糞中 A m の測定は、水抽出して適当に希釈した後、比色定量(520 nm)により行った。

結果

実験 25 固定ケージに収容したときの成長速度は、通常の個別ケージに収容して基本飼料を与えたときのほぼ 70%であった(Fig. 5-13)。それでも通常ケージで飼育したときと同様、各飼料の特性が成長応答によく現れていた。Table 5-6には、タンパク質消化率と生物価を各週毎に示した。

基本飼料群のタンパク質消化率は、3週間一貫して 99%に近い値を示し、5%GDFの単独添加群では、わずか数%であるが低下する傾向が見られた。一方、4%A m 対照群では、タンパク質消化率が基本飼料より 16%から 19%も低下した。ところが 5%GDFの同時添加群では、タンパク質消化率が有意に改善された。

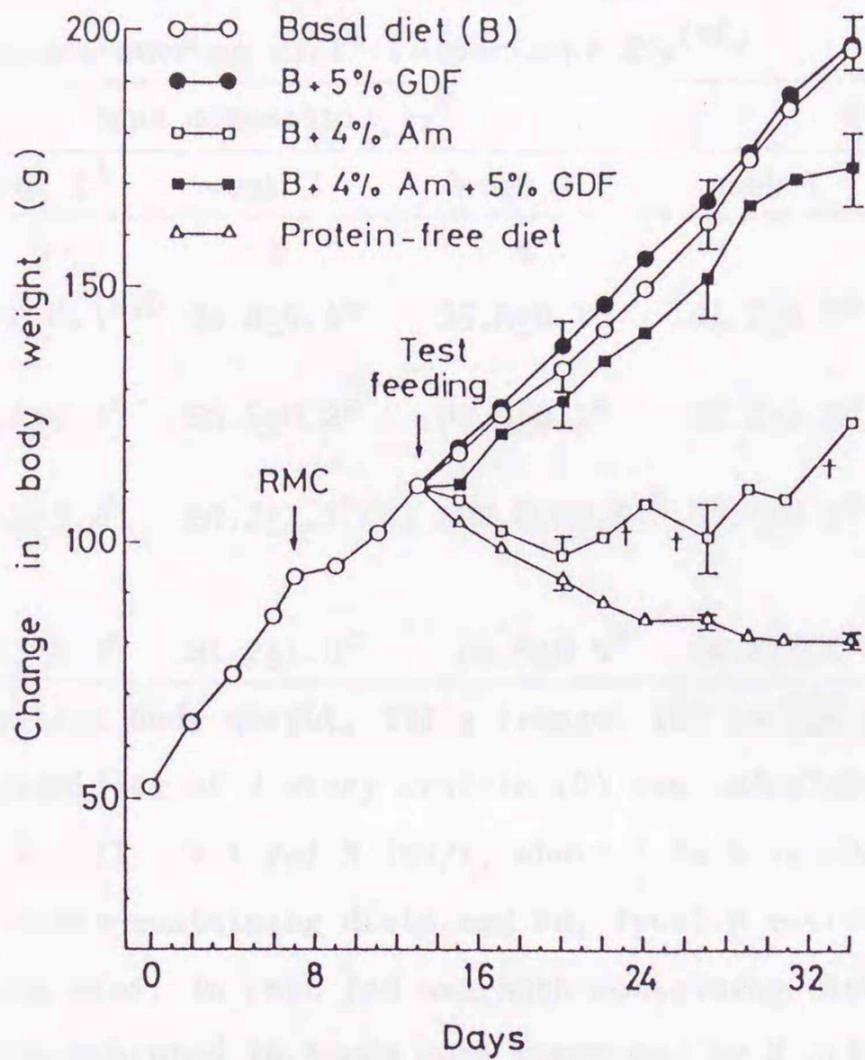


Figure 5-13. Change in body weight of rats fed various diets in restrainable metabolism cages (*experiment 25*)⁽¹²⁶⁾. Twenty-five weanling male rats were fed *ad libitum* a 25% casein-sucrose based diet in usual suspended cages for the initial 7 days. On the day indicated by an arrow RMC, all the animals were transferred to restrainable metabolism cages and continued to be fed the same diet for 6 days to accustom them to the new condition. They were then divided into 5 groups of 5 rats and fed *ad libitum* respective experimental diets for further 21 days. Symbols: \circ , basal diet; \bullet , basal diet containing 5% GDF; \square , basal diet containing 4% amaranth; \blacksquare , basal diet containing 4% amaranth plus 5% GDF; \triangle , protein-free diet. During the experimental feeding period, body weight and food intake were recorded daily and urine and feces were collected for the last 3 days of each week during which time their body weight was not recorded. Three of 5 rats fed with 4% amaranth died during the course of the study as indicated by crosses. Each point is the mean of 5 rats and the vertical bars represent standard error of the mean.

Table 5-6. True digestibility and biological value of dietary protein when amaranth and GDF were added singly or in combination to a purified casein-sucrose diet¹ (*experiment 25*)⁽⁴⁸⁾

Diet	True digestibility ²			Biological value ³		
	week 1 ⁴	week 2	week 3	week 1	week 2	week 3
	%	%	%			
Basal diet	98.8±0.1 ^{a,5}	98.8±0.4 ^a	98.8±0.1 ^a	61.7±3.3 ^a	64.7±1.9 ^a	63.1±2.2 ^a
Basal diet + 5% GDF	95.8±0.5 ^{ac}	98.3±0.2 ^a	96.4±0.1 ^a	65.2±1.8 ^a	67.1±3.3 ^a	62.4±3.4 ^a
Basal diet + 4% Am ⁶	80.2±3.8 ^b	84.2±2.7 ^b (3)	(83.0,83.8) ⁷	49.6±4.1 ^b	47.9±3.9 ^b	(53.6,53.7)
Basal diet + 4% Am + 5% GDF	89.3±2.3 ^c	91.2±1.0 ^c	86.8±0.9 ^b	64.4±3.4 ^a	68.9±4.3 ^a	54.6±3.1 ^a

- 1 Average initial body weight, 111 g (range: 103 to 124 g).
- 2 True digestibility of dietary protein (D) was calculated by the following equation: $D = (I - F + F_0) \times 100 / I$, where I is N intake; F, fecal N excretion when fed casein-containing diets and F₀, fecal N excretion when fed a protein-free diet. In rats fed amaranth-containing diets, the amounts of N ingested and excreted in feces were corrected by N originating from amaranth which was detectable with the Kjeldahl method.
- 3 Biological values were calculated from the following equation: $(I - F + F_0 - U + U_0) \times 100 / I - F + F_0$, where U and U₀ are urinary N excretions in rats fed casein-containing and protein-free diets, respectively. Other abbreviations are the same as those stated above for the calculation of true digestibility. Average fecal and urinary N excretions in rats fed a protein-free diet were as follows: week 1, 18.6±2.0 and 225±37.4 mg/3 days; week 2, 13.7±0.7 and 115±21.0 mg/3 days; and week 3, 14.8±1.2 and 108±18.8 mg/3 days, respectively.
- 4 Urine and feces were collected for the last 3 days in each week and analyzed for the nitrogen.
- 5 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05).
- 6 Refers to amaranth (Food Red No. 2).
- 7 The figures in parentheses indicate the number of rats survived and on which data are based when this number was less than the original number per group or individual values when survivors were only two.

次に生物価は、基本飼料群でほぼ60～65の範囲にあり、5%GDFの単独添加群でやや上昇する傾向が見られた。そして4%Amの添加は、生物価をも有意に低下させた。なお同群では途中3匹が死亡したので、3週目まで生存したラットで比較した場合、生物価は基本飼料群のそれより依然有意に低かった。これに5%GDFを同時添加した群では生物価が有意に改善された。たとえば、4%Am対照群で死亡するラットが現れる以前のデータ(7日目)で比較した場合、同群の生物価は、基本飼料群のそれと差がなくなった。

Table 5-7には、Am自体の吸収率を示したが、4%Am対照飼料中Amの吸収率は約50%前後であった。一方、5%GDF同時添加群におけるAm吸収率は、対照群より低下していた。しかし同群では飼料摂取量が増加したため、吸収されたAmの絶対量は対照群と変わらなかった。

考察

RadomskiとMellinger(91)は、Am(50 mg)をラットに経口投与すると、アゾ基が還元的に開裂切断され、生成物(1-amino-4-naphthalenesulfonic acidと、1-amino-2-hydroxy-3,6-naphthalenedisulfonic acid)が尿中に出現することを見いだしている(Fig.5-14参照)。またこのAm量から誘導される量に相当する18.5 mgの分解生成物(1-amino-4-naphthalene sulfonic acid)を経口投与した場合に、Am投与時とほぼ等量の同物質が尿中に排泄

Table 5-7. Effect of the concurrent feeding of 5% GDF on the apparent amaranth absorption¹ (*experiment 25*)⁽⁴⁸⁾

Diet	Apparent amaranth absorption ²		
	1 week	2 weeks	3 weeks
	%	%	%
Basal diet + 4% amaranth	50.4±3.2 ^{a,3}	46.8±0.8 ^{a(3)} ⁴	(46.2, 44.4)
Basal diet + 4% amaranth + 5% GDF	33.4±1.1 ^b	28.2±2.1 ^b	27.0±0.5 ^a

- 1 Average initial body weight was 111 g (range: 103 to 124 g).
- 2 Dietary content and fecal excretion of amaranth were determined colorimetrically at 520 nm and the apparent absorption was calculated by the difference between the ingested and excreted. Bacterial degradation of amaranth was neglected.
- 3 Mean±SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05).
- 4 See footnote 6 to Table 5-6.

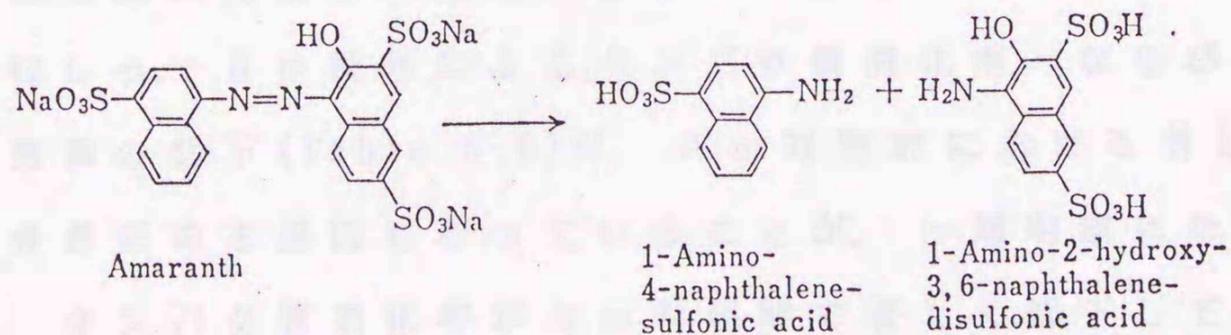


Figure 5-14. Metabolic pathway of amaranth⁽⁴⁴⁾

されることも観察した。彼らは、この結果から A m は腸内微生物によりアミンに分解された後、吸収されると結論した。もっともアゾ色素は、肝臓ホモジネートによっても切断され脱色することから(92)、肝臓にもアゾ基還元系があり、解毒する作用のあることが明らかにされている。ちなみにこの還元には、NADPHが使われる(44)。

しかしアゾ基の還元的開裂能は、高等動物よりも腸内細菌の方がはるかに勝っている(92,93)ので、本実験でも腸内通過時、及び分析までの貯蔵期間中に A m が腸内細菌により少なからず分解されたものと思われる。おそらく、実質的な A m 吸収率は得られた値(約50%)よりも低いと推定される。

ところで A m 吸収率は、GDFの同時添加により有意に低下した(Table 5-4)。GDFの効果は、一見、これにより A m の吸収が抑えられるためともみることが出来る。しかし GDF同時添加群では、飼料摂取量が増加しているので体内に吸収された A m の絶対量は対照群と差がない。既述のように(5章1節)、A m を腹腔投与しても成長はさほど抑制されなかった(Table 5-1)ことから考えても、吸収後の A m は成長抑制の主要因ではない。

むしろ、A m 投与によるタンパク質消化率、ならびに生物価の低下(Table 5-6)が、A m 対照群における著しい成長遅延の主要因になっていることが、一層明瞭になった。タンパク質消化率が A m 対照群で著しく低下していたことは、各種腔内消化酵素の活性や、粘膜刷子縁上の

消化・吸収活性が阻害されている可能性を示唆している。また生物価の低下は、摂取量低下に伴うエネルギー不足が主要因と思われる。

GDFを基本飼料に単独添加するとタンパク質消化率をやや低下させる傾向がみられた(Table 5-6)。しかし、Am対照飼料にGDFを添加した場合には、むしろ消化率の低下を有意に改善したし、また生物価もこれにより改善された。したがって、摂取量の増加に伴う供給エネルギーの増加と、タンパク質消化率の改善が相乗して生物価を好転させているものと思われる。これがひいては体重回復につながっていると推測される。

5.6 アミノ酸混合飼料へのAm単独添加、およびGDF同時添加の影響

緒言

タンパク質消化率は、Am投与時に有意に低下することが明確となった。この事実は、Amが小腸腔内のタンパク質消化酵素の活性や、刷子縁膜の消化・吸収活性を阻害している可能性を強く示唆している。実際、Am (10^{-3} M)はトリプシン活性 (*in vitro*)を阻害することが報告されている(94)。

そこでとりあえず、消化管腔内でのタンパク質消化に及ぼすAmの影響を全動物レベルで検討した。すなわち、もしプロテアーゼ活性の阻害が、消化率低下の主要因と

なっているのであれば、腔内消化を経ずに利用できるアミノ酸混合物を唯一のタンパク質源にした場合、Am毒性は軽減されるはずである。ここでは、この点について検討した。

実験方法

【実験26】 飼料と飼育方法 基本飼料には、従来の25%カゼインをタンパク質源とする飼料(Table 2-1)と、アミノ酸混合物をタンパク質源とする飼料を用意した。アミノ酸混合は、RogersとHarper(95)の混合組成に準じて調製し、これをタンパク質源として18.5%加えた。なお、炭水化物源には従来通りスクロースを用いた。対照飼料は、各基本飼料に4%Amを添加し、また試験飼料は、4%Amと5%GDFを同時に添加して調製した。計6種の飼料を水とともに自由に与え、14日間の成長実験を行った。

結果

実験26 Table 5-8には、25%カゼインと、18.5%アミノ酸混合物をタンパク質源にしたときの結果を示した。アミノ酸基本飼料は、カゼイン基本飼料よりも15%程の成長の遅れを示した。一方、4%Am添加時の成長遅延は、カゼイン飼料で強く現れ(54%の遅れ)、アミノ酸飼料でやや弱かった(43%の遅れ)が、両者の成長遅延は、何れも5%GDFの同時添加によりほぼ完全に回復した。つまりGDFの効果は、タンパク質源の違いによる影響を受けなかった。

Table 5-8. Effect of feeding amaranth with or without GDF on body weight gain and net food efficiency of rats fed a diet containing casein or amino acid mixture (AA) as a protein source¹ (*experiment 26*)⁽⁴⁸⁾

Diet	Dietary protein source ²	Body weight gain g/14 days	Net food efficiency
Basal diet	Casein	114±6.2 ^{a,3}	0.51±0.01 ^a
Basal diet + 4% amaranth	Casein	52±7.4 ^b	0.36±0.04 ^b
Basal diet + 4% amaranth + 5% GDF	Casein	96±4.0 ^c	0.54±0.03 ^a
Basal diet	AA	97±4.2 ^c	0.47±0.02 ^c
Basal diet + 4% amaranth	AA	55±2.7 ^b	0.37±0.03 ^b
Basal diet + 4% amaranth + 5% GDF	AA	95±6.8 ^c	0.47±0.04 ^a

1 Average initial body weight, 76.0 g (range: 61 to 83 g).

2 Dietary protein source of each basal diet was 25% casein or 18.5% amino acid mixture (AA). The amino acid composition of AA2 was identical with the mixture used by Rogers and Harper (95) on which a maximal growth rate was attained in rats. Sucrose was used as a sole carbohydrate source.

3 Mean±SEM (n=5), values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).

考察

本節の実験から、A mによる成長遅延はアミノ酸混合物を用いた場合にやや弱くなったものの、ほぼカゼインと同程度の毒性が発現した。したがって、A mによるタンパク質利用率の低下は、腔内消化の阻害だけでは説明できず、むしろ膜消化や、膜輸送の段階での阻害がより大きな比重を占めていると考えなければならない。

また第3章1節で、A m毒性は、ブドウ糖飼料でもスクロースでも同程度に現れた (Table 3-1)。この結果もまた、A mがスクロースの終末膜消化と同時に、吸収細胞に取り込まれる段階をも阻害していることを示唆するものである。

第6章 小腸の消化吸収活性, ならびに上部消化管の移動速度に及ぼす A m 単独及び GDF 同時投与の影響

6.1 腔内消化, 膜消化, 膜輸送 (*in vitro*) に及ぼす A m 単独あるいは GDF 同時投与の影響

緒言

A m は, 食餌タンパク質の消化率を明らかに低下させた (51). 一方で, タンパク質源をカゼインからアミノ酸混合物に変えても, A m 毒性は依然改善されなかった (77). これらの結果から A m は, 腔内消化のみならず, 終末消化の段階も阻害している可能性が強い. そこでタンパク質が消化吸収されるまでの全段階, すなわち腔内消化, 膜消化, 膜輸送の各段階に及ぼす A m の影響を *in vitro* で検討した.

実験方法

試薬ならびに被験物質: 本節の実験 27~29 で用いた試薬は, 次のとおりであった. カゼイン (Hammarsten's, Merck, Darmstedt), グリシルグリシンならびにグリシル-L-ロイシン (和光純薬, 大阪), L-[U-¹⁴C]バリン (純度 97-98%, 比活性 10 mCi/mmole, Amersham, Buckinghamshire), 牛膵臓トリプシン (Sigma Chemical Co., St Louis), グルコースオキシダーゼ (GOD-PAP, Boehringer Mannheim, Mannheim); 陰イオン交換樹脂 (Dowex 2 X 8,

C1- 型, 200-400 メッシュ, 室町化学工業, 東京), セルロース粉末(綿纖維由来 alpha-cellulose 98-99%, 100-200 mesh, 東洋ろ紙, 東京), Am (アマランス, 食用赤色 2 号), Es (エリスロシン, 食用赤色 3 号), Nc (ニューコクシン, 食用赤色 102 号), Rb (ロースベーンカール, 食用赤色 105 号), Ar (アソットレット, 食用赤色 106 号), Bb (ブリーヤットブルー, 食用青色 1 号), Ig (インジゴカーミン, 食用青色 2 号), Sy (サソットイエロー, 食用黄色 5 号), (以上, 三栄化学工業, 大阪). 以下のものは, 製造元より恵与して頂いた. L-バリン(味の素, 東京), キトサン(協和油脂, 千葉), ジメチルジアルキルアンモニウムクロライド(商品名 Arquard 2C-75, 以下 DDAC と略, ライオン油脂, 東京).

【実験 27】カゼインのトリプシン消化に及ぼす Am ならびに GDF の影響

基質の調製と酵素反応 ここではカゼインのトリプシン消化を例に, タンパク質の腔内消化に及ぼす Am の影響を調べた. トリプシン活性の測定は, 基本的に Kunitz (96) の方法と同様に行った. 要約すると, 1 mL のトリプシン溶液 {KRPB, pH 7.2, 100 mL にトリプシン (14, 100 BAEE 単位/mg タンパク質) 2 mg を加えて調製} に, Am (0-9 mg/mL) を単独に, あるいは GDF (90 mg/flask) と同時に添加した溶液を 1 mL 加えて酵素溶液を調製した. 反応は, 37°C で 3 分間温度平衡させたこの酵素溶液に, 同じく温度平衡させた基質溶液 (0.05 mol/L リン酸緩衝液に 2% カゼインを含む) を加えて反応を開始した. 5 分後, 2

mLの1 N塩酸を加えて反応を止め、引き続き1時間振とう放置した。

反応液の分析 反応液を遠心し、上清2 mL中のFolin-Ciocalteu試薬(FC)陽性物質を比色定量した。活性は、反応開始前に塩酸を加えた盲検を対照とし、750 nmにおける吸光度をチロシン当量で表した。なお、反応液中にAmを含む検体については、これを除去するために2 mLの上清に720 mgの精製陰イオン交換樹脂(Dowex 2X8)を加えてよく振り混ぜ、Amを同樹脂に吸着させてから比色を行った。この処理は、FC反応陽性物質の測定に影響を与えなかった。

【実験28】空腸スクラーゼ及びジペプチダーゼ活性に及ぼすAm投与の影響

ここではAmを投与して4時間後、および21日後の膜酵素活性を、小腸反転リングを用いるUgolevら(97)の方法を改良して検討した。

(シリーズ1) 飼育方法 1日3時間のmeal feedingで2週間予備飼育し、短時間に飼料を摂取できるように訓練したラットに、各々5 gの3種被験飼料(基本試料, 5%Am対照飼料, 5%Am+5%GDF同時添加飼料)を一斉に与えた。4時間後、断頭により殺し、空腸粘膜の酵素活性を測定した。

空腸反転リングの調製 断頭後、直ちに小腸を摘出して十二指腸部(幽門から約15 cm)を除去し、遠位側約15 cmの空腸部に生理食塩水を流入し消化管内容物を洗い出

した。次いで粘膜を反転したのち、2 cmの長さに切り、3本の空腸リングを得た。うち一本は、Am無添加条件での酵素活性の測定に、一本は基質溶液にAmを添加したときの活性測定に、残りは盲検(基質無添加)に用いた。

酵素反応 スクロース(58 mmol/L)とグリシル-L-ロイシン(15.9 mmol/L)を含むKRPBを基質溶液とし、この5 mLをErlenmeyerフラスコに入れて37℃に加温した。これに反転リングを投入して酸素ガスを充填した後、恒温槽中で10分間振とうして反応を行った。基質溶液にAm(25 mg/mL)を添加した場合も、同様にして反応させた。その後反応液を沸騰水中に2分間浸漬して反応を止め、冷却、遠心(3,000 rpm)後、上清を適当に希釈して分析に供した。

反応液の分析 スクララーゼ活性は、生成するグルコースをグルコースオキシダーゼ法(98)により、またジペプチダーゼ活性は、反応希釈液をフィルター(Millipore GSWP 02500, 0.22 μ m, Millipore Co., Bedford, Mass.)でろ過した後、基質から生成したグリシンと、L-ロイシン量をアミノ酸自動分析装置(KLA-5型, 日立製作所, 東京)により分離定量した。なおAmを含む反応液は、3%DDACのクロロホルム溶液を加えて攪はんし、AmをDDACに吸着させてこれをクロロホルム層に回収して除去した後、水層を同様にして分析した。この処理によるグルコース、あるいはアミノ酸回収率への影響はなかった。

(シリーズ2) 飼育方法 離乳直後のラットに3種被験飼

料を水とともに自由に与えて21日間飼育した。この後断頭により殺し、シリーズ1と同様に空腸粘膜の酵素活性を測定した。

【実験29】 L-バリンの空腸部能動輸送に及ぼす A m の影響

近位側空腸における L-バリン輸送を、Wilsonと Wiseman(99)の方法に従って調べた。

空腸反転サックの調製 体重約200gに達したラットを断頭により殺し、直ちに腸管膜を切り離して小腸を摘出した。幽門から15 cm(ほぼ十二指腸部)を除いた小腸を4等分し、最も近位側の1/4を実験に用いた。まず、生理食塩水で腸内容物を洗い出した後、粘膜側を外側に反転し、4 cmずつのセグメントに分割した。各セグメントの一端を結紮し、他端から L-バリン(1 mmol/L)とグルコース(0.1% W/V)を含む緩衝液約1 mLと、酸素ガス約0.05 mLを注入した後、結紮して密封した。

反応操作 このようにして作成した反転サックを、 ^{14}C (0.01 μCi L-[U- ^{14}C])で標識した L-バリン(1 mmol/L)を含む溶液20 mL中に入れ、37°Cで30分振とう放置した。また、放射性バリン培養液に A m(50 mg/mL)を単独に、あるいは A mと GDF(50 mg/mL)を同時に添加したものも用意し、同様にして反応させた。なお、予備実験の結果から、粘膜側の放射性バリンが漿膜側(サック内)に取り込まれる速度は、60分まで一定であった。

反応液の分析 反応終了後、サックを取り出して50 mL

の生理食塩水中で4回(計200 mLで)連続してすすぎ、表面に付着している放射活性を除去した。まず内容液ごとのサック重量を測定し、次いでサック内の溶液を試験管に移し、空になったサック重量を再度測定してサック内の液量を正確に求めた。サック内(漿膜側)、外(粘膜側)の放射活性や、組織内酸可溶性分画の放射活性は、0.5 mLの試料溶液を10 mLの液体シンチレーション溶液と混合し、液体シンチレーションカウンター(LSC-607型, Aloka, 東京)で測定した。なおクエンチングは、内部標準法により補正した。

活性の表し方 能動輸送した ^{14}C -バリンの量は、漿膜側(サック内)に移動した総量と、サックの実効重量当たりの両者で比較し、DPM(degradation per minute)で表した。組織のトリクロル酢酸可溶性分画に取り込まれた放射活性は、反応中に吸収されたバリンの一部と見なした。また、反応開始時の放射活性と、組織内酸可溶性分画、粘膜側、漿膜側の各々で回収された放射活性との差は、異化されたか、組織タンパク質に取り込まれたバリンと見なした。

A mで着色した分析試料は、3%DDACのクロロホルム溶液を加えてA mをクロロホルム層に抽出した後、水層を同様にして測定した。なお、DDAC処理後のL-バリン回収率は98%であった。

結果

実験 27 Table 6-1には、トリプシンによるカゼイン消化 (*in vitro*)の結果を示した。基質溶液中わずか 1 mg/mLの A m 添加により、トリプシン活性は無添加時の 73%に低下し、5 mg/mLの濃度では 50%以下に低下した。しかし、それ以上 A m 濃度を高くしても、以後の活性低下は数パーセントに過ぎず、活性阻害はほぼ平衡に達した。次に、A m を含む基質溶液に GDF (90 mg/flask) を同時添加したときのトリプシン活性も示したが、GDF は何れの A m 濃度においてもこれによる活性阻害を緩和できなかった。

実験 28 (シリーズ 1) Table 6-2には、5 g の各飼料を投与して 4 時間後の空腸スクラーゼ、およびジペプチダーゼ活性と、反応系に A m を添加したときの両酵素の活性変化を示した。まず 5% A m 対照群のスクラーゼ活性は、基本飼料群と比べてやや低下していたが、有意な差は認められなかった。ジペプチダーゼについても同様に、摂取 4 時間後の酵素活性でみる限り、両酵素量に A m 投与の影響はみられなかった。

しかし酵素反応系に 25 mg/mL の A m を添加した場合には、何れの群でもスクラーゼで約 30%、ジペプチダーゼで約 70%もの阻害がみられた。つまり酵素活性で判断する限り、空腸粘膜に存在する酵素量は A m を摂取しても変化しないが、測定時に A m が共存するとこれら酵素の活性は著しく阻害されることが明らかとなった。

Table 6-1. Effect of the addition of amaranth alone or amaranth plus GDF to incubation medium on *in vitro* trypsin activity¹ (experiment 27)⁽⁸¹⁾

Final concentration of amaranth added	Addition of GDF to assay ² medium ²	Trypsin activity	
		Tyrosine equivalent produced	Relative
mg/mL medium		μmoles/5 min	%
No addition	-	3.6 ± 0.01 ^{a,3}	100
1	-	2.7 ± 0.00 ^b	73.8 ± 0.7 ^b
5	-	1.7 ± 0.01 ^c	48.1 ± 0.2 ^c
10	-	1.7 ± 0.01 ^c	47.5 ± 0.7 ^c
No addition	-	3.3 ± 0.01 ^{a,3}	100
10	-	1.5 ± 0.02 ^c	46.3 ± 0.7 ^c
20	-	1.4 ± 0.01 ^{cd}	42.9 ± 1.8 ^{cd}
30	-	1.4 ± 0.01 ^d	42.2 ± 1.6 ^d
No addition	-	3.6 ± 0.01 ^a	100
1	+	2.9 ± 0.02 ^e	80.6 ± 0.7 ^e
5	+	1.7 ± 0.01 ^c	48.0 ± 0.3 ^c
10	+	1.7 ± 0.02 ^c	48.4 ± 0.5 ^c
No addition	-	3.3 ± 0.01 ^{a,3}	100
10	+	1.7 ± 0.02 ^b	50.4 ± 0.7 ^c
20	+	1.5 ± 0.01 ^c	45.7 ± 0.9 ^c
30	+	1.5 ± 0.02 ^{cd}	45.5 ± 1.2 ^{cd}

1 The trypsin activity was assayed with casein as a substrate by a modification of the Kunitz's method (96). The activity was expressed as tyrosine equivalent of Folin-Ciocalteu positive substances liberated into acid-soluble fraction for 5 minutes.

2 Gobo dietary fiber (GDF) was prepared from gobo, the roots of edible burdock (*Arctium lapp* L.). Ninety milligrams of GDF was added to the incubation medium.

3 Mean+SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter are significantly different (P<0.05).

Table 6-2. *In vitro* sucrase and dipeptidase activities remaining in everted jejunal rings prepared 4 hours after meal-feeding 5 g of each diet, as measured in the absence or presence of added amaranth in the incubation medium¹ (*experiment 28, series 1*)⁽⁸¹⁾

Diet	Addition of amaranth to the medium ²	Sucrase activity ³	Dipeptidase activity ⁴	
		Glucose produced	Glycine produced	L-Leucine produced
————— μ moles/2 cm jejunum/10 min —————				
Basal diet	-	6.4 \pm 0.5 ^{a,5}	12.7 \pm 1.5 ^a	12.5 \pm 1.7 ^a
Basal diet + 5% amaranth	-	5.8 \pm 0.4 ^a	10.4 \pm 1.5 ^a	10.1 \pm 1.4 ^a
Basal diet + 5% amaranth + 5% GDF	-	6.7 \pm 0.4 ^a	10.7 \pm 0.9 ^a	10.5 \pm 1.0 ^a
Basal diet	+	4.2 \pm 0.1 ^b	2.6 \pm 0.2 ^b	2.2 \pm 0.2 ^b
Basal diet + 5% amaranth	+	4.0 \pm 0.3 ^b	3.1 \pm 0.2 ^b	2.7 \pm 0.3 ^b
Basal diet + 5% amaranth + 5% GDF	+	4.7 \pm 0.3 ^b	2.6 \pm 0.3 ^b	2.3 \pm 0.2 ^b

1 Rats weighing about 120 g were trained by meal-feeding a basal diet for 3 hours once daily for 2 weeks. After dividing into 3 groups of 5 rats, they were fed 5 g of each experimental diet indicated in the table, killed by decapitation 4 hours after feeding and three everted jejunal rings of 2 cm long were prepared and assayed. There were no differences in body weight between groups (147 ± 2 g).

2 The final concentration of amaranth when added to the incubation medium was 25 mg/mL.

3 Sucrase activity was expressed as μ moles of glucose liberated when the 2 cm everted jejunal ring was incubated for 10 minutes at 37 °C in the medium containing sucrose (58 mM).

4 Dipeptidase activity was expressed as μ moles of glycine and L-leucine liberated when the 2 cm everted jejunal ring was incubated for 10 minutes at 37 °C in the medium containing glycyl-L-leucine (15.9 mM).

5 Mean+SEM (n=5); values not sharing a common superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

(シリーズ^{*}2) Table 6-3には, シリーズ^{*}1と同様の3種飼料を21日間, 自由摂取させた後の両酵素活性を示した。この場合, A m対照群に著しい成長遅延が現れることは既に繰り返し述べた通りである。それにも関わらず, A m投与に対するスクラーゼ, ならびにジペプチダーゼの活性応答は, 投与4時間後のそれ(Table 6-2)とまったく変わらなかった。すなわち両酵素の残存量は, A mを投与して21日後でも変化がみられず, 酵素反応系にA mを加えたときにのみ, 活性は顕著に阻害された。

実験29 Table 6-4には, 粘膜からの放射性L-バリンの能動輸送に及ぼすA m (50 mg/mL)の影響を示した。ここでは漿膜側(サック内)と, 組織の酸可溶性分画で検出されたものの両者を合わせた量を, 能動輸送された量として表した。

L-バリンの取り込みは, 50 mg/mLのA mの共存により約1/3に減少した。組織重量当りの比較でも, 50%以上の減少であった。ちなみに, L-バリンの能動輸送に対するA mの阻害は, セルロース, キトサン, GDFのいずれの添加(50 mg/mL)によっても阻止できなかった。

考察

*In vitro*での消化試験で, A m (5 mg/mL)はトリプシン消化を50%も阻害することを観察した(Table 6-1)。ちなみに伊藤ら(100)は, 合成基質(*N*-benzoyl-L-arginine amide)を用いてトリプシンのアミダーゼ活性に及ぼす食

Table 6-3. Sucrase and dipeptidase activities in the proximal jejunum from rats fed three kinds of diets for 21 days, when assayed with or without amaranth added to the incubation medium¹ (*experiment 28, series 2*) (81)

Diet	Body weight gain g/21 days	Addition of amaranth to incubation medium ²	Activity of	
			sucrase ³ Glucose liberated	dipeptidase ³ Glycine liberated
			μ moles/2 cm jejunal ring/10 min	
Basal diet	160 \pm 6.8 ^{a,4} (6) ⁵	-	6.9 \pm 0.6 ^a	28.2 \pm 1.0 ^a
		+	5.0 \pm 0.3 ^b	3.9 \pm 0.3 ^b
Basal diet +4% amaranth	91 \pm 2.2 ^b (5)	-	7.6 \pm 0.2 ^a	16.0 \pm 3.3 ^a
		+	5.5 \pm 0.2 ^b	3.3 \pm 0.1 ^b
Basal diet + 4% amaranth + 5% GDF	152 \pm 4.8 ^b (6)	-	7.7 \pm 0.5 ^a	17.9 \pm 1.3 ^a
		+	5.3 \pm 0.2 ^b	3.9 \pm 0.2 ^b

- 1 Average initial body weight, 67 g (range: 61 to 77 g).
- 2 Final concentration of amaranth in the incubation medium was 25 mg/ml.
- 3 Sucrase and dipeptidase activities were expressed as μ moles of glucose and glycine liberated when the 2 cm everted jejunal ring was incubated for 10 minutes at 37 °C in the medium containing sucrose (58 mM) and glycy-L-leucine (15.9 mM).
- 4 Mean \pm SEM (n=6); values not sharing a common superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).
- 5 Number of animals used for determination of sucrase and dipeptidase activities.

Table 6-4. Effect of amaranth added singly or combination with various dietary fibers to the incubation medium on L-[U-14C]valine transport in the everted sacs from rat proximal jejunum¹ (experiment 29) (81)

Addition to the incubation medium ²	No. of sacs	Total radioactivity transported			A+B/100 mg sac ⁴	Total radioactivity remaining in the mucosal fluid ⁵
		to the serosal fluid (A)	to acid-soluble fraction in the sac tissue (B) ³	A + B		
		dpm	dpm	dpm	dpm	dpm
No addition	10	1,851±119 ^{a,6}	1,505±401 ^a	3,355±401 ^a	1,012±106 ^a	8,716±490 ^a
Amaranth	10	851±127 ^{bc}	576± 80 ^{bc}	1,427±185 ^b	442± 43 ^b	12,127±560 ^b
Amaranth + cellulose ⁷	10	876±109 ^b	549± 69 ^{bc}	1,370±156 ^b	427± 32 ^b	10,348±260 ^c
Amaranth + GDF ⁸	10	580± 46 ^c	585± 37 ^b	1,165± 58 ^b	428± 31 ^b	9,787±309 ^{ac}
Amaranth + chitosan ⁹	9	742± 55 ^b	378± 49 ^c	1,121± 17 ^b	426± 17 ^b	10,543±295 ^c

¹ Average initial body weight of rats used here (n=10), 181±2 g. Five everted jejunal sacs were made from the proximal jejunum of each rat and distributed at random over the respective treatments.

² Incubation medium (mucosal fluid, 5 mL) containing cold L-valine (1 mM) was labeled with 0.01 µCi of L-[U-14C]valine. Total radioactivity as determined at the beginning was 13,200 dpm/5 mL/flask. Amaranth and dietary fiber of 250 mg each were added to 5 mL of the incubation medium before the experiment started. Incubation time was 30 minutes.

³ Represents the total radioactivity incorporated in the trichloroacetic acid-soluble reaction of effective sac tissue cut off both ends ligated.

⁴ Represents the value converted into the wet effective sac/100 mg tissue.

⁵ Possible volume changes during the incubation were neglected.

⁶ Mean ± SEM; values not sharing a common superscript letter are significantly different (P<0.05).

⁷ Cellulose powder (100 to 200 mesh), purchased from Toyo Roshi Co., Tokyo. This was a preparation from cotton fiber (100 to 200 mesh) and composed of alpha cellulose, 98 to 99%; beta cellulose, 0.3 to 1.0%; pentosan, 0.3 to 1.0%; ash, 0.07; and nitrogen, 0.07% after the manufacturer's information.

⁸ See footnote No. 7 to table 6-3.

⁹ Kindly supplied by Kyowa Oil and Fat Co., Chiba, Japan.

用色素の影響も調べているが、キソテン系の色素(たとえばES, RB)はこの酵素反応も強く阻害することを示した。

本実験でAmは、空腸粘膜スクラーゼやジペプチダーゼの活性も阻害することを観察した(Table 6-2, 3)。全動物の消化管腔内でAmはどれくらいの濃度に達するのであろうか。Am対照飼料を自由に与えた場合、ラットは飼料のほぼ2倍量に相当する水分を摂取する(Table 5-3)(80)。仮に5%Am対照飼料を4g摂取したとすれば、胃内Am濃度は25 mg/mLと概算できる。さらに胃液、膵液によっても希釈されるが、Amは各種酵素の活性を十分阻害しうる濃度で、小腸を通過していると考えられる。

一方、空腸粘膜刷子縁上のスクラーゼやジペプチダーゼの活性(空腸2cm当り)には、Am投与4時間後も、21日後でも変動がなかった(Table 6-2, 3)。Amを投与しても酵素量は減少しないことがわかる。つまり、消化吸收機能は正常に維持されているので、飼料中からAmが除去されれば、直ちに栄養素吸収は回復すると予想される。ちなみに田中と岡原(101)は、phloxine(赤色104号)、acid violet 6BN(何れも 10^{-3} M)は、*in vitro*でのロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)活性を強く阻害するが、これらの溶液(5×10^{-3} M)を1 mL/体重100 g/日の用量で、3か月間連続して経口投与してもラットの空腸粘膜LAP活性は、何れの色素群でも無投与群と変わらないことを既に報告している。

ところで、*in vitro*でのトリプシン消化やL-バリンの

能動輸送系にGDFをA mと同時に添加しても、GDFはA mの阻害作用を阻止できなかった(Table 6-1, 6-4)。GDFにA mを吸着する作用がない(Table 4-1)(62)ことを考えれば、当然かもしれない。

6.2 *In situ*灌流空腸の消化吸収能に及ぼすA m, ならびにGDFの影響

緒言

A mは、*in vitro*測定条件で腔内消化、膜消化、膜輸送の何れの活性に対しても阻害作用を及ぼすことが判明した(第6章1節)。GDFは、これら*in vitro*の実験系ではなんら効果を発揮しないこともわかった。ここでは生理的により全動物に近い消化吸収系で両者の影響を調べる目的で、麻酔下の動物で空腸灌流実験を行い、消化管通過時の栄養素の消化吸収に及ぼすA mおよびGDFの影響を検討した。さらに、栄養素が消化管を通過する速度と消化吸収量の関係についても調べた。

実験方法

【実験 30】灌流空腸からのスクロース、グリシルグリシンの吸収に及ぼすA m単独、及びGDF同時添加の影響

動物の扱い 基本試料で予備飼育した体重約200 gの雄ラットを、試験前24時間絶食させた。その後、ネムブタ

ールの腹腔注射(5 mg/100 g 体重)により麻酔して開腹し、幽門から約15 cmの位置より遠位側に、連続する3つのセグメント(各5 cm)を設けた。各セグメントの両端にテフロンチューブ(近位側内径 0.5 mm, 遠位側内径 3.0 mm, Phicon Fuji-Systems, 東京)を結紮して固定し、37 °Cの生理食塩水を5 mLずつ2回注入して内容物を洗い出した。続いて緩衝液10 mLを、輸液ポンプ(Harvard Apparatus, Millis, Mass.)で各々の近位側から20分間予備灌流(0.125 mL/min)した。なお腹壁をクリップで一時的に止め、灌流中、腹部は閉じておいた。

灌流液と灌流の方法 この後、緩衝液中にスクロース(15 mmol/L)とグリシルグリシン(30 mmol/L)を含む基本灌流液、これにAm(25 mg/mL)を添加した対照灌流液、さらに同量のAmとGDF(20 mg/mL, 200 mesh以下)を同時に添加した試験灌流液の計3種を、任意のセグメントに毎時2.5 mLの速度で一斉に灌流した。なおGDFを含むシリンジは、これが沈澱して流出口が詰まらないように、シリンジ内にアクロバットスターラーを入れて常時攪はんしておいた。

回収灌流液の分析 2時間(計5 mL)の灌流を終了した後、空腸セグメントの腔内に残る灌流液は、緩衝液で洗い出して回収灌流液と混合した。これを50 mLに定容した後、残存するスクロースとグリシルグリシン量を測定した。スクロースは酸加水分解した後、グルコース量をグルコースオキシダーゼ法により測定した。またグリシル

グリシンは、前出のアミノ酸自動分析装置により直接定量した。A mを含む試料は、3%DDACを含むクロロホルム溶液を用いて先に述べた要領で前処理を行った後、分析を行った。

【実験 31】空腸からのスクロース、グリシルグリシンの吸収に及ぼす灌流速度の影響

ここでは、栄養素の移動速度と空腸の消化吸収量の関係を空腸灌流法 (*in situ*)により検討した。

灌流方法 ラット空腸の灌流は、実験 30で述べた方法と同様に行った。ただし空腸は、2セグメント(各5 cm)に分け、1本は毎時2.2 mLの速度で、残り1本は毎時0.6 mLの速度で各々全量2.0 mLを灌流した。灌流液中の基質濃度、ならびにA m濃度は実験 28と同様であった。

実験結果

実験 30 Table 6-5には、麻酔下のラット空腸をスクロースとグリシルグリシンを含む基質溶液で灌流したときの両基質の消化吸収量を示した。まずスクロースの消化吸収量は、25 mg/mLのA mにより無添加時の約60%まで有意に減少した。グリシルグリシンの消化吸収量も、スクロースとほぼ同程度に減少した。

また、20 mg/mLのGDFをA mと同時に灌流しても、A mの消化吸収阻害は全く改善されなかった。

実験 31 Table 6-6は、空腸の消化吸収量に及ぼす灌流速度の影響を示したものである。この実験から、A m

Table 6-5. Effect of the addition of amaranth alone or amaranth plus GDF to a basal perfusate on the absorption of sucrose and glycyglycine from the proximal jejunum perfused *in situ* in anesthetized rats¹ (*experiment 30*)⁽⁸¹⁾

Addition to perfusate ²	No. of segments perfused	Absorption of	
		Sucrose ³	Glycyglycine ³
mg/mL medium		$\mu\text{moles}/5 \text{ min}$	%
No addition	10	$27.7 \pm 1.8^{\text{a},4}$	$61.3 \pm 3.6^{\text{a}}$
Amaranth	10	$16.3 \pm 1.9^{\text{b}}$	$36.5 \pm 5.0^{\text{b}}$
Amaranth + GDF	10	$16.0 \pm 1.9^{\text{b}}$	$37.9 \pm 3.1^{\text{b}}$

- 1 Average body weight of rats used, 217 ± 12 g.
- 2 Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital and the abdominal cavity was opened. Six small incisions were made on the antimesenteric borders of the proximal jejunum to make three sequential 5 cm-segments at the 1 cm-intervals in one rat. The loops were initially irrigated with saline to remove any residual intraluminal matter. Silicon tubings were inserted in both the proximal and distal incisions in respective segments and secured by ligations. Three segments were concurrently perfused at the same rate (2.5 mL/hour) with 3 kinds of solution: five mL of Krebs-Ringer phosphate buffer containing sucrose (15 mM) and glycyglycine (30 mM) were perfused through the segment for 2 hours with or without single addition of 125 mg amaranth or combined addition of 125 mg amaranth plus 100 mg GDF per 5 mL of the perfusate. The GDF sample used here had mean particle size of 12μ , that was ground as small as possible in frozen state with liquid nitrogen.
- 3 Absorption of sucrose and glycyglycine was assessed from the amount of remaining substrates: sucrose was determined as glucose after acid-hydrolysis of the recovered perfusate and glycyglycine, as itself by an automatic amino acid analyzer.
- 4 Mean \pm SEM; values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 6-6. Effect of perfusion rate on the absorption of sucrose and glycyglycine in the segmental proximal jejunum perfused with added amaranth *in situ* in anesthetized rats¹ (*experiment 31*)⁽⁸¹⁾

Perfusion rate ²	Absorption of	
	sucrose ³	glycyglycine ³
	umoles substrate absorbed/5 cm jejunum	
2.0 mL/54 minutes (2.2 mL/hour)	27.7 ± 1.8 ^{a,4}	61.3 ± 3.6 ^a
2.0 mL/200 minutes (0.6 mL/hour)	16.3 ± 1.9 ^b	36.5 ± 5.0 ^b

- 1 Average body weight of rats used, 216 ± 8.6 g.
- 2 Two milliliters of Krebs-Ringer phosphate buffer containing sucrose (15 mM) and glycyglycine (30 mM) together with amaranth (25 mg/mL) were perfused through 5 cm segment of the proximal jejunum at different rates.
- 3 See footnote 3 to Table 6-5.
- 4 Mean±SEM (n=6); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05).

を添加した基質であっても灌流速度を遅くすると基質の消化吸収量が有意に増加することがわかる。たとえば灌流速度を毎時2.2 mLから約1/3に減速したとき、消化吸収量はスクロースで180%、グリシルグリシンでは204%に増加した。

考察

A m は、消化吸収に関わる一連 (*in vitro*) の反応系のみならず、灌流空腸を用いた *in situ* での実験でも *in vitro* の系と同様の阻害効果を示した。一方 GDF を *in vitro* や、*in situ* の系に同時添加しても A m の阻害作用を阻止する兆しは全く見られなかった。したがって、*in vitro* や *in situ* の実験系には、全動物レベルでみられる GDF の効果に関わる何か決定的な生理的因子が欠落していると考えなければならない。

実験 31 の結果は、GDF の作用を解明する糸口を示しているようにみえる。つまり、灌流速度を遅くして空腸の通過に十分な時間を確保すれば、A m を含む基質でも消化吸収量が増加した。この事実は、消化管内の通過時間も栄養素の吸収利用を支配する重要な因子であることを示すと同時に、GDF が A m の活性阻害を直接阻止できなくとも、これにより小腸部の通過が遅延すれば消化吸収量は改善される可能性があることを示している。

したがって A m 対照基質と GDF 同時添加基質の両者を空腸灌流しても、依然 GDF の有効性が現れなかった (Table

6-5)のは、両者が全動物の上部消化管を移動する際の速度差を無視し、同一速度で灌流したことに原因があるのかもしれない。盲腸・結腸を全摘した回直腸吻合施術ラットでも、GDFの効果が発現したこと(Table 5-1)も、GDFの毒性阻止効果における小腸の重要性を暗示している。またSVの高い食物繊維試料ほど強い生理効果を発揮すること(Fig.4-3)は、消化管腔内で占める食物繊維の容積が小腸移動速度の制御因子になっている状況証拠といえる。

6.3 口-小腸末端間の移動時間に及ぼすAm単独投与、あるいはGDF同時投与の影響

緒言

前節で、GDFはAmを含む消化粥の小腸内移動速度の制御を通してその有効性を発揮していると推測した。そこで本節では、小腸移動速度に焦点をあて、これにAmやGDFが実際どの程度影響しているかを検討した。

消化管内容物の移動速度に及ぼす影響を調べるには、いくつかの問題がある。まず、用いるマーカ自身の影響があってはならない。また消化管内での挙動は、マーカが水溶性か非水溶性かにより、さらにマーカの比重により摂食物と同じ挙動をとらないことがある(102)。さらに移動速度は消化管各部位で異なっているので、各部位の移動速度を測定するには消化管をいくつかに分割し、そこを通過したマーカ量を経時的に測定する必要

がある。しかし、この方法は膨大な数の実験動物と労力を必要とする(103,104)。

このような理由で本実験では、まず非吸収性の水溶性マーカーとしてCr-EDTAを選んだ。また、以上の諸実験から、小腸腔内での現象であることが明らかであるので、ラットの回腸に瘻孔を設置する手術を行い、上部消化管(口→回腸末端)の移動時間を測定し比較した。

実験方法

【実験 32】 回腸瘻孔手術 ここでは、小腸を通過した内容物を体外で回収できるように、Lambert(86)の術式を応用してラットに回腸瘻孔術を試みた。要約すると、体重260 g前後のラットを、回直腸吻合施術に際して述べた(第5章3節)要領でまず開腹した。次いで回盲接合部から約1 cm近位側の位置で回腸を切断し、近位側断端を腹壁に開けた約5 mmの穴を通して体外に露出し、開口部を腹壁に縫合して固定した。次いで、開口部にゴムチューブ(長さ10 mm, 径4 mm)を挿入してこれを固定し、内容物が体表面に広がらないように処置した。

一方、不用になった盲腸以降の消化管のうち、盲腸は切除し、結腸はその断端を縫合して閉鎖し、そのまま腹腔内に留置した。手術後は、ラットが回腸瘻孔部に自由に接触できないように固定ケージに収容し、回復までの間(最大15日)、基本飼料を与えて飼育した。

飼料と投与方法 基本飼料, 4%Am対照飼料, 10%GDF

同時添加飼料の3種飼料を調製した。また、非吸収性のマーカーとして、Cr-EDTAをBinertsら(105)の方法により調製し、乾燥粉末として各飼料に0.5%添加して用いた。

24時間絶食させた9匹の施術ラットに、マーカーを含むAm対照飼料を1時間だけ与え、その後はマーカーを含まない同飼料を23時間にわたって与えた。投与開始から24時間内に回腸瘻孔から排泄された内容物を、1時間ごとに集めた。この後、ラットには基本飼料を3日間与えて消化管内に残存するマーカーを排泄させた後、GDF同時添加飼料、基本飼料の順で同様の試験を繰り返した(Fig. 6-1参照)。

Crの分析 回収した排泄物中Cr-EDTAの測定は、Kimら(106)の方法を応用して行った。要約すると、同一時間帯に回収した回腸瘻孔排泄物は、飼料毎にプールしてホモジナイズし、定容、遠心(15,000 X g)後、上清中のCr-EDTAを原子吸光光度計(AA-640-12型、島津製作所、京都)により測定した。飼料中のCrは、脱イオン水でCr-EDTAを抽出した後、同様にして分析した。排泄物、および飼料に添加したCr-EDTAの回収率は、96~107%であった。

口-回腸末端間の移動時間は、クロムの排泄量を投与後の経過時間に沿って累積したグラフから関数式(対数回帰式)を求め、これから非吸収性マーカー(Cr-EDTA)の50%が排泄されるのに要する時間(transit half time; TT_{50})を算出した。

結果

実験 32 Figure 6-2は、回腸瘻孔から排泄されたCr-EDTAを経時的に累積したものであるが、各飼料ともマーカ-の排泄パターンは、対数曲線に沿っていた。そこで各飼料毎に対数式を求め、その式から摂取マーカ-の50%が排泄される時間、すなわち TT_{50} を算出すると、基本飼料が17.9時間、Am対照飼料が8.12時間、10%GDF同時添加飼料が18.2時間であった。ちなみに、各被験飼料の24時間内における摂取量(単位 g)は、基本飼料, 35.1; 4%Am対照飼料, 20.7; 10%GDF同時添加飼料, 20.9であった。

マーカ-が回腸瘻孔から出始める時間は、基本飼料投与時で2時間後であったが、Am対照飼料とGDF同時添加飼料投与時には1時間以内に摂取マーカ-の各々0.17%と0.43%が排泄された。なおAm対照飼料投与時には、その後マーカ-の排泄が急速に増加した。この結果、同飼料の TT_{50} は基本飼料投与時の約半分に減少した。しかし、GDFを同時添加した場合には、 TT_{50} が再び増加し、Amによる TT_{50} の大幅な短縮が正常化した。

考察

回腸瘻孔ラットの基本飼料投与時の TT_{50} は、17.9時間であったが、この値は、他の研究者(103,104)が消化管各部位を分割して測定した(マーカ-として ^{91}Y ,あるいは ^{85}Sr で標識したミクロスフェア-を使用)口-回腸末端までの通過時間と比較するとかなり大きい。盲腸・結腸を

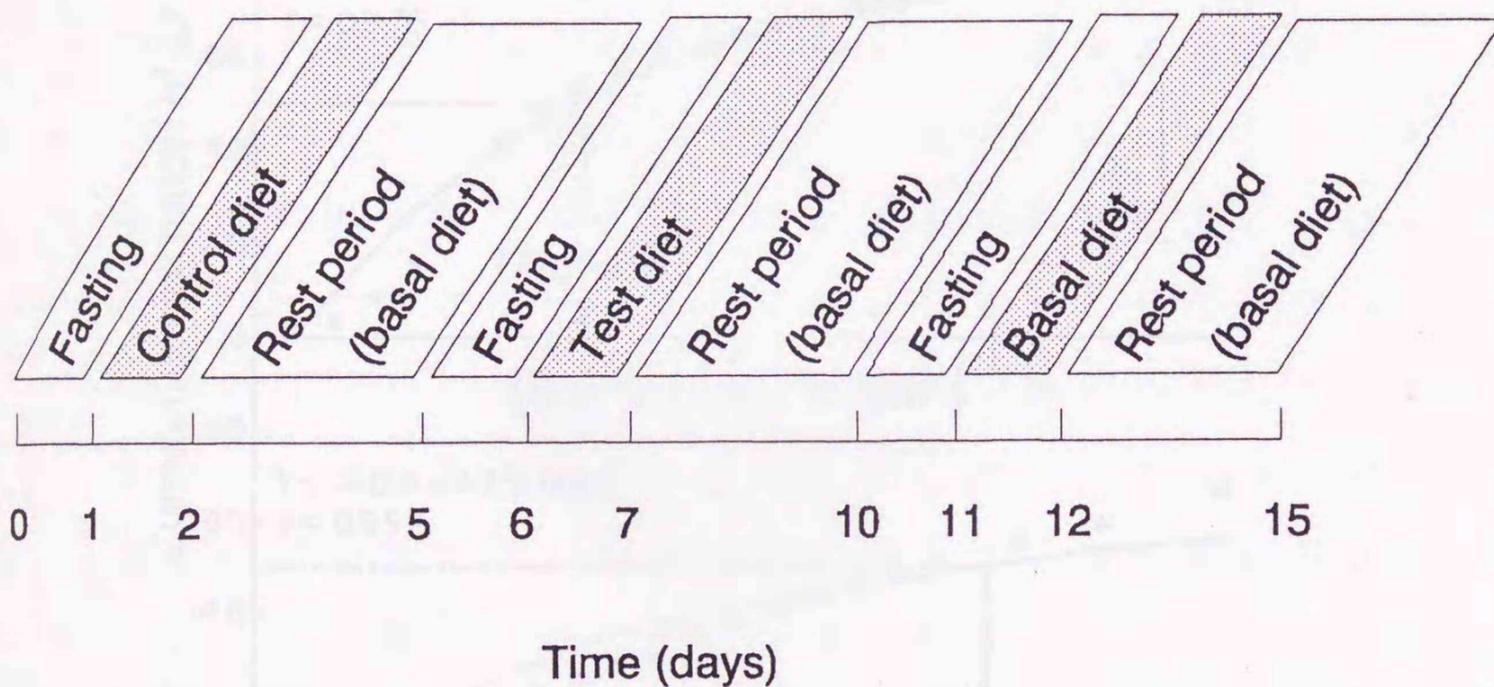


Figure 6-1. Feeding schedule for transit time measurements in ileostomized rats (*experiment 32*)⁽¹²⁸⁾. Hatched areas indicate the experimental feeding period and excreta collection period. Nonabsorbable water-soluble marker (Cr-EDTA) was incorporated at a 0.5% level into each experimental diet which was fed only for the first one hour.

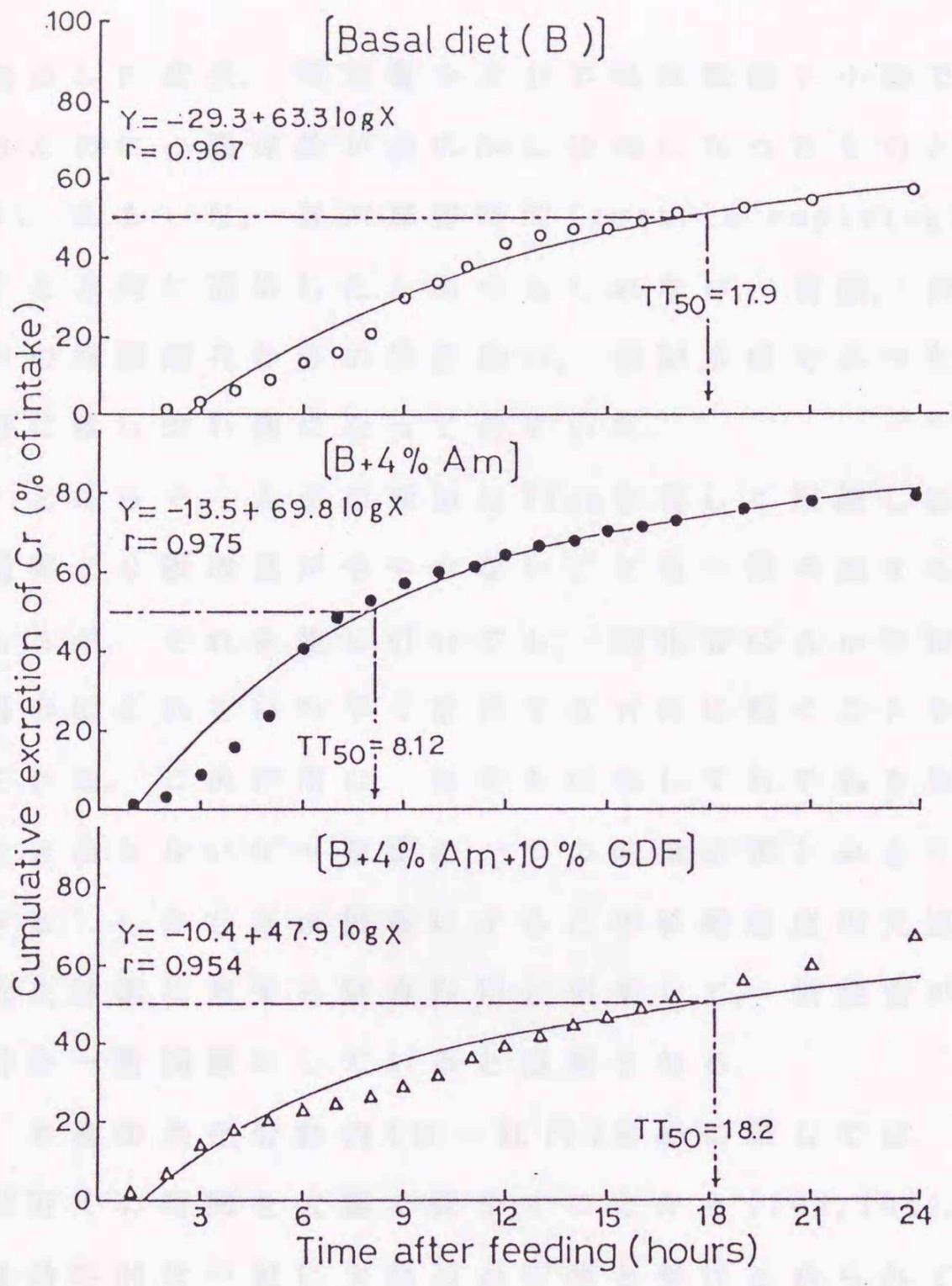


Figure 6-2. Cumulative excretion of Cr in ileostomized rats (*experiment 32*) (128). The time necessary for excreting 50% of the marker (TT_{50}) was calculated from each equation of the curve obtained by plotting cumulative excretion of Cr versus time. The curves of the top, middle and bottom were obtained when fed the basal diet, the control diet and test diet, respectively. Excreta collected from individual rat within the same collection period was combined for each diet and analyzed for Cr.

摘出した結果、電解質や水分の吸収機能を小腸で代償するために小腸運動が適応的に緩慢になったものと思われる。あるいは、胃内滞留時間 (gastric emptying) が遅延する方向に適応したためかもしれない。実際、回復期間中の回腸瘻孔からの排泄物は、当初水様であったが、次第に軟らかい塊になってきていた。

ところで、A m の添加は TT_{50} を著しく短縮した。基本飼料より摂取量がやや少ないことも一部考慮する必要があるが、それを差し引いても、消化管は A m を投与した場合にこれをいち早く排泄する方向に働くことを示唆している。この作用は、異物を摂取してもそれを口からは吐き出せないゲッ菌類の一つの防衛応答とみることもできる。しかし A m 摂取によるこの移動速度の亢進作用は、消化酵素に対する阻害作用と相乗して、栄養素の吸収利用を一層困難にしていると推測される。

食物の消化管腔内 (口 - 肛門) 移動に際しては、その 8 割近くの時間を大腸で費やすことから (103, 104)、消化管通過時間は一般に大腸通過時間と受けとめられている (107)。そして食物繊維がこの時間を短縮させることは、ヒト (107) や動物 (108) で繰り返し調べられている。しかし、上部消化管の移動に及ぼす食物繊維の影響を調べた研究は比較的少ない。研究例が少ないものの、消化管上部の移動は、食物繊維によりむしろ遅延するという点では一致している (109, 110)。たとえば Bueno ら (109) は、犬の胃 - 小腸間の移動時間はグアーガム (5, 10 g/L) の投与

により有意に遅れることを報告している。また Brownら (110)は、グアーガム、セルロース、小麦フスマの各々6%を飼料とともに投与したラットで同様の結果を得ている。

本実験の結果は、Amを投与した特殊な条件ながら、食物繊維が上部消化管の通過を遅らせる点で他の研究者の報告と概ね一致する。以上の結果から、前節の *in situ*による実験で予測したGDFの作用が、全動物の消化管内で実際に起こっている可能性が強くなった。つまり、GDFはAmによる消化吸収活性の阻害は阻止できないが、消化管上部の移動速度を遅くすることにより、栄養素の消化吸収量を増やしていると考えることができる。

GDFによる上部消化管移動時間の正常化は、gastric emptyingを遅延させるためなのか、それとも小腸腔内の移動を遅延させるためなのか、あるいは両者への作用が協同して生じるものなのか、残念ながら今のところ断定できない。ここで用いたのと同様の3種飼料を meal feedingで訓練したラットに各々3 gずつ与え、3時間後に殺して胃内残存窒素量を測定する方法により、便宜的にgastric emptyingを調べたところ(80)、4%Am対照群の胃内残存窒素量は基本飼料群のそれよりも有意に減少していた。Amによる上部消化管移動時間の短縮に、gastric emptyingの促進も一部関与しているようである。今後、gastric emptyingに対する作用と、小腸腔内の移動に対する作用を個別に検討する必要があると考えている。

第7章 空腸粘膜剝離説に対する反証

7.1 A m 投与ラットにおける空腸粘膜スクラーゼの活性 応答に及ぼす絶食の影響

緒言

著者らの研究に刺激されて、木村ら(111)は別の角度から食物繊維の毒性阻止効果に関する機構解明の研究に着手した。彼らは2日間絶食させたラットに精製基本飼料、5% A m 対照飼料、そして対照飼料に5% GDF、あるいは5%大豆おから粉末を同時添加した飼料を投与し、3日後に空腸粘膜のスクラーゼ、およびアルカリフォスファターゼ活性を測定している。その結果、A m 対照群の両酵素活性は、基本飼料群のそれらより有意に低下していることを観察した。この報告のなかでかれらは、これら空腸粘膜酵素の活性低下は、A m による小腸粘膜の剝離が原因であると結論した。ちなみにGDFや、おから粉末を同時添加した群の酵素活性には低下がみられなかったことから、食物繊維は、A m の剝離作用から消化管粘膜を保護しているものと考えた。

この説は、本研究から導いた食物繊維による小腸移動速度の制御説と明らかに異なっている。そこでまず、木村らが剝離説を導いた実験について、再試験を兼ねて詳細な検討を加えた。

実験方法

A m は、投与して4時間後でも、あるいは21日後でも空腸スクラーゼの活性を変動させないことは既に第6章1節で明らかにした。木村ら(111)は著者と同様の飼料を用いながら、なぜ異なった結果を得たのであろうか。動物の飼育方法にその原因が隠されているように思われる。彼らは、被験飼料の投与に先立ちラットを予め2日間絶食させている。そこで絶食が、投与後の酵素活性にどう影響するかを前出の被験飼料を用いて調べ、得られた結果を非絶食ラット(実験34)のそれと比較検討した。

【実験33】絶食ラットの空腸粘膜スクラーゼ活性に及ぼす A m 投与の影響

動物の扱い 基本飼料で予備飼育した体重約103 gのラット64匹を、8匹ずつ8群に分け、3日間絶食させた。うち1, 2群は、それぞれ絶食の前と後に殺して絶食に伴う空腸スクラーゼ、ジペプチダーゼ活性の変化を調べた。残り6群の48匹を16匹ずつ3群に組分け、基本飼料、5% A m 対照飼料、5% GDF 同時添加飼料の3種飼料を水とともに自由に与えた。投与3日目に、各群の半分のラットを殺し、残り半分は14日後に殺した。

酵素活性の測定 ラットは、断頭後直ちに開腹して小腸を取り出し、第6章1節で述べた方法に従って空腸反転リングを作製し、同様にしてそのスクラーゼ活性を測定した。また空腸粘膜ホモジネートも調製し、タンパク質量、およびスクラーゼ活性を次のように測定した。ま

ず空腸セグメント(2 cm)の粘膜組織をカバーグラスでかきとり、KRP緩衝液を加えてガラスホモジナイザーで均質化した後25 mLに定容し、これを酵素液として用いた。予め加温しておいた2.5 mLの基質溶液(116 mMのスクロースを含むKRP緩衝液)と、同量の酵素液を加えて振とうしながら10分間反応させた。直ちに、沸騰水中に浸漬して反応を止め、反応液中の生成グルコースを、先に述べた(第6章1節)方法により測定した。タンパク質量は、Lowry法(112)により測定した。

【実験34】非絶食ラットの空腸粘膜スクラーゼ活性に
及ぼすAm投与の影響

動物の扱い 体重約67 gのラット28匹を、基本飼料で5日間予備飼育した後、7匹ずつ4群に組み分けた。第1群は、被験飼料投与前のスクラーゼ活性を測定するために、実験開始直前に断頭により殺した。残り3群は、各々の飼料(基本飼料、5%Am対照飼料、5%Am+5%GDF同時添加飼料)を自由に与え、3日後に殺した。

酵素活性の測定 各時点でのスクラーゼ活性は、第6章1節で述べた方法に従い、空腸反転リングを用いて測定した。

結果

実験33 Table 7-1には、3種被験飼料を、3日間絶食したラットに投与したときの成長ならびに酵素活性の変化を示した。またFig. 7-1には、空腸粘膜ホモジネート中

Table 7-1. Change in body weight, food intake, mucosal protein content and sucrase activity of the jejunum when experimental diets were fed to rats fasted for 3 days (experiment 33) (127)

	Initial	After feeding fasted rats with the following diets for						
		3 days			14 days			
		Basal(B)	B+5% Am ¹	B+5%Am+5%GDF ²	Basal(B)	B+5% Am	B+5%Am+5%GDF	
Body weight (g)	127 ±3.5 ^{a,3}	102 ±3.5 ^b	132 ±2.0 ^{ac}	102 ±1.9 ^b	129 ±2.9 ^a	231 ±5.7 ^d	147 ±8.2(7) ^{c,4}	217±4.1 ^e
Food intake (g)	-	-	40.7±1.4 ^a	24.1±2.1 ^b	35.8±1.6 ^{ab}	260 ±7.1 ^c	152 ±6.6(7) ^d	277 ±4.3 ^c
Mucosal protein (mg/2 cm jejunum) ⁵	10.5±0.48 ^{ad}	7.25±0.36 ^b	12.1±0.44 ^c	9.33±0.38 ^a	11.7±0.43 ^{cd}	17.1±0.45 ^e	16.5±0.65(7) ^e	17.5±0.63 ^e
Sucrase activity (µmol/2 cm jejunum) ⁶	3.94±0.75 ^{ac}	2.12±0.20 ^b	4.15±0.20 ^a	3.21±0.22 ^c	3.81±0.33 ^{ac}	4.69±0.41 ^{ad}	5.49±0.26(7) ^d	4.71±0.27 ^{ad}

1 Abbreviation of amaranth (Food Red No. 2); trisodium salt of 1-(4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid.

2 Dietary fiber prepared from the roots of Gobo, edible burdock (*Arctium lappa* L.).

3 Mean±SEM ($n=8$); values not sharing a common superscript letter within a line are significantly different ($P<0.05$).

4 The figure in parentheses indicates the number of rats which survived and on which data are based when this number was less than the original number per group.

5 Mucosal protein of 2 cm jejunum which was obtained from second 15 cm segment from the pylorus.

6 This means the activity of everted jejunal ring, details of the procedure are described in Materials and Methods in this text.

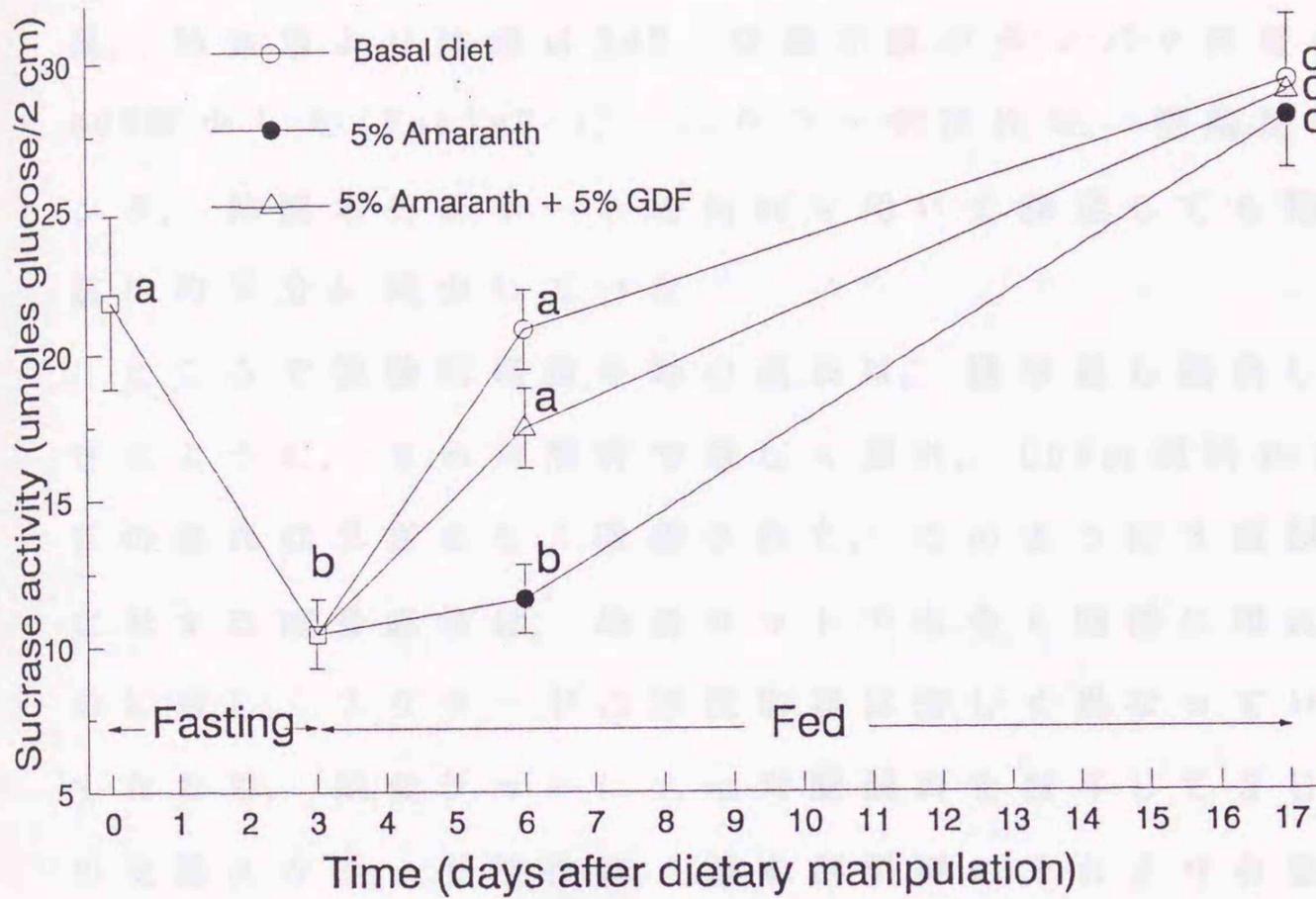


Figure 7-1. Time-course change in sucrase activity of jejunal mucosal homogenate from rats fasted for 3 days and then fed 3 different diets for up to 14 days (experiment 33)⁽¹²⁷⁾. Diets are as follows: \square , fasted; \circ , basal diet; \bullet , basal + 5% amaranth diet; \triangle , basal + 5% amaranth + 5% dietary fiber from Gobo (GDF), the roots of edible burdock (*Arctium lappa* L.). Vertical bars represent standard error of the mean of 8 rats. Values not sharing a common alphabetical letter differ significantly ($p < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test (23). These data indicate that 3 days' fasting itself decreased jejunal sucrase level to 50% of initial level, and that although amaranth fed-rats delayed to regain the sucrase level at early stage of feeding, they had the same sucrase level as that of rats fed either the basal diet or the basal diet containing 5% amaranth plus 5% GDF after 14 days.

スクラーゼの活性変化を示した。まず3日間絶食させた結果、絶食前より体重は20%、空腸粘膜のタンパク質量は30%減少した(Table 7-1)。スクラーゼ活性は、空腸反転リング、粘膜ホモジネートの何れを用いて測定しても絶食前の約半分に減少していた。

ところで被験飼料投与時の成長は、繰り返し観察してきたように、Am対照群で著しく遅れ、GDFの同時添加でこの遅れは目ざましく改善された。このように3種飼料に対する成長応答は、絶食ラットでも全く同様に現れたのに対し、スクラーゼの活性応答は著しく異なっていた。すなわち、絶食ラットにAm対照飼料を投与して3日目の空腸スクラーゼ活性は、基本飼料群のそれより有意に低下していた。しかし14日後には、依然著しい成長遅延が続いているにもかかわらず、同群のスクラーゼ活性は、基本飼料群のそれに匹敵するレベルまで回復した(Fig. 7-1)。空腸粘膜のタンパク質量も全く同様の傾向を示した(Table 7-1)。

ちなみに、投与開始から3日後のGDF同時添加群の空腸スクラーゼ活性、および粘膜タンパク質量は、いずれも基本飼料群とAm対照群の中間に位置し、14日後には両レベルとも基本飼料群のレベルに集束した。つまり、GDF同時添加群では、絶食時に低下した空腸粘膜のタンパク質やスクラーゼ活性が、Am対照群よりも早く絶食前のレベルに回復することがわかった。

実験34 Table 7-2には、実験33で用いた3種飼料を非絶食ラットに与えたときのスクラーゼ応答を示した。3種飼料に対する体重の変化は絶食ラットのそれと同様のパターンを示したが、Am対照飼料を投与して3日後の空腸スクラーゼ活性、ならびに粘膜タンパク質量には、全く低下が認められず、絶食ラットの実験結果(Fig. 7-1)と著しく異なった応答を示した。つまり、スクラーゼ活性が基本飼料群のそれよりも低下するのは、予めラットを絶食させたときにのみ見られる現象であることが明らかとなった。

考察

木村ら(111)は、ラットを予め2日間絶食させてから各被験飼料を与え、4日後に殺して酵素活性を測定している。本研究でも、絶食させたラットに3種被験飼料を与えた場合には、木村らの観察結果を確認することができた(Fig. 7-1)。しかし絶食前からAm投与14日後まで、全期間のスクラーゼ活性の経時的変化を見れば、この間の変化を粘膜剥離説で説明するのは困難であることに気づく。

たとえば、剥離説によるならば絶食の有無に関わらずAm投与時には常にスクラーゼ活性の低下が観察されるはずである。ところが、絶食を経ずにAmを投与した場合には、4時間後(Table 6-2)、3日後(Table 7-2)、21日後(Table 6-3)の何れの時点でもスクラーゼ活性に変動

Table 7-2. Changes in body weight, food intake, mucosal protein content and sucrase activity of the jejunum when experimental diets were fed for 3 days to non-fasted rats (*experiment 34*)⁽¹²⁷⁾

	Initial	After feeding diets for 3 days		
		Basal(B)	B+5% Am ¹	B+5%Am+5%GDF ²
Body weight (g)	67.2±1.8 ^{a,3}	86.4±2.4 ^b	66.0±2.7 ^a	82.4±2.4 ^b
Food intake (g/3 days)	-	33.7±1.5 ^a	21.0±1.8 ^b	32.0±0.9 ^a
Mucosal protein ⁴ (mg/2 cm segment)	11.7±0.35 ^{ab}	11.5±0.43 ^{ab}	10.5±0.61 ^a	12.6±0.44 ^b
Sucrase activity ⁵ (μmol/2 cm jejunum)	4.67±0.42 ^a	4.24±0.34 ^a	4.40±0.20 ^a	5.03±0.48 ^a

- 1 Abbreviation of amaranth (Food Red No. 2); trisodium salt of 1-(4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid.
- 2 Dietary fiber prepared from the roots of Gobo, edible burdock (*Arctium lappa* L.)
- 3 Mean ± SEM (n=7); values not sharing a common superscript letter within a line are significantly different (P<0.05).
- 4 Mucosal protein of 2 cm jejunum which was obtained from second 15 cm segment from the pylorus.
- 5 Sucrase activity determined with everted jejunal ring was expressed as μmoles of glucose produced when 2 cm segment of the everted jejunum was incubated with 5 mL medium containing 58 mmol/L sucrose for 10 min.

は認められなかった。活性低下は、唯一絶食ラットに A m を投与し、しかも投与の初期(3日後)にしか観察できなかった。

剝離説には、次のような矛盾点もある。もし A m で小腸粘膜が剝離するならば、スクラーゼ活性の低下は、A m 投与を止めない限り続くはずである。しかし、A m 対照群のスクラーゼ活性が基本飼料群のそれより低下していたのは投与3日目だけで、14日後には、依然として続いている著しい成長遅延にも関わらず、基本飼料群のレベルまで回復した。しかも、A m 投与3日後のスクラーゼ活性は、投与開始直前の活性と比べると、全く低下していないのである。木村らは、もし投与開始時の酵素活性も測定してそれとの比較を行っていたなら、A m を投与してもスクラーゼ活性は低下しないことに気づいたはずであり、剝離説とは異なった結論に達していたであろう。

A m 対照飼料に対するスクラーゼ活性の応答が、絶食ラットと非絶食ラットで異なる点については、投与開始前のスクラーゼレベルの違い(Table 7-1, 7-2)でわかるように、両者の栄養状態の相違に起因していると結論できる。消化管粘膜は代謝回転が速いので(2-3日)、絶食、再摂取により同部位のタンパク質量が著しく変動することは早くから知られている(113)。この変動は、細胞数自体の変化を伴っていることが粘膜上皮のDNA量の変化から解明されている(114)。

したがって、絶食により減少した酵素タンパク質の回復が、再摂取する飼料の栄養価に影響されることは十分ありえる。絶食を経た A m 対照群で、投与初期のスクラーゼ活性が基本飼料群より低い原因として、A m が共存するとタンパク質をはじめとする栄養素の利用が低下するので (Table 5-6)、腸粘膜等のようにタンパク質が変動しやすい部位では酵素量の回復が一過性に遅れると考えるのが合理的である。また GDF 同時添加群のスクラーゼレベルが A m 対照群のそれを上回っているのは、同群では栄養素自体の利用が改善されるため、A m 対照群よりも早く低栄養から回復することを反映しているに過ぎない。

7.2 A m 投与停止後の消化吸収活性、および成長応答について

緒言

実験 33, 34 から、絶食ラットに A m を投与した場合に現れるスクラーゼ活性の低下は、絶食で減少した酵素量の回復が一時的に遅れるためであると結論した。しかしもし、空腸粘膜が剥離するような傷害が起こるとすれば、A m 投与を停止した後も消化吸収機能に何らかの後遺的障害が現れると考えられる。

ここではこのような角度から、A m 投与後の空腸の消化吸収能、および A m 投与を停止した後の成長応答を調べることにより、剥離説の可能性を更に検討した。

実験方法

【実験35】 A m 投与後のラット空腸の消化・吸収能

動物の扱い 体重約103 gのラットを6匹ずつ3群に分け、実験33で用いた3種飼料を与えた。消化・吸収能に対する体重差の影響を除くため、基本飼料群とGDF同時添加群は、A m 対照群と成長速度が等しくなるように、摂取量を制限して14日間飼育した。

飼育実験終了後、第6章2節で述べたように、灌流用空腸セグメント(5 cm)を2本作製し、麻酔下でスクロース(75 μmol)とグリシルグリシン(150 μmol)を含む5 mLのKRPBを、37.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で灌流した。回収灌流液中の残存基質量を同じく第6章2節で述べた方法により分析し、灌流前後の基質の濃度差からこれらの消化・吸収量を求めた。

【実験36】 A m 投与停止後の成長応答について

A m が消化管粘膜の剥離等の傷害を及ぼした場合、A m 投与を停止しても上皮細胞が再生するまでのしばらくの間、栄養素の利用低下が続くと予想される。ここでは、A m 投与による“後遺症”の有無をA m 投与停止後の成長応答から検討した。

動物の扱い 体重約50 gの雄ラットを、基本飼料で10日間飼育した。この後、5% A m 対照飼料を5日間、水とともに自由にあたえた。その後、再び基本飼料に戻して10日間飼育し、この間の成長速度を、A m 対照飼料投与前の10日間のそれと比較した。

結果

実験35 Table 7-3には、先の実験で用いた3種飼料を14日間投与した後、空腸セグメントの消化・吸収能を空腸灌流法により調べた結果を示した。なお、体重の違いによる消化・吸収への影響を除くために、基本飼料群とGDF同時添加群は飼料摂取量を制限して、Am対照飼料群と成長速度が等しくなるように飼育した。

その結果、基本飼料は、Am対照飼料よりも22%少ない量で、またGDF同時添加飼料は、18%少ない量で対照群と等量の体重増加が得られた。ところでスクロースやグリシルグリシンの吸収能は、3群間に大きな変動が認められず、5%Amを14日間投与し続けても空腸粘膜の消化・吸収能は正常に維持されていることを示していた。

実験36 Figure 7-2には、基本飼料で10日間飼育した後、Am対照飼料を5日間投与し、この後再び基本飼料にスイッチしたときの成長を示した。対照飼料で得られた成長速度は -2.7 ± 0.7 g/日で日増しに体重は減少した。しかしその後基本飼料に切り換えると成長は直ちに回復に向かい、その後10日間の平均成長速度は 8.2 ± 0.4 g/日であった。この速度は、Am投与前の10日間のそれ(6.9 ± 0.2 /日)よりもむしろ有意に高かった。飼料摂取量も同様で、Am投与前(12.6 ± 0.4 /日)よりも、投与後(17.4 ± 0.4 /日)でむしろ有意に増加していた。これらのことから、飼料からAmを取り除くと、成長は直ちにcatch upすることがわかった。

Table 7-3. Digestion-absorption capacity *in situ* of the perfused jejunal segment for sucrose and glycyglycine in rats fed 3 different diets by adjusting to attain the same growth rate for 14 days^{1,2} (*experiment 35*)⁽¹²⁷⁾

Diet	Nutrient intake for 14 days	Body weight	Absorption of	
			Sucrose	Glycyglycine ³
	g	g	μmoles substrate disappeared / 5 cm jejunum segment	
Basal diet	118 ± 1.2 ^{a,4}	127 ± 3.4 ^a	29.3 ± 2.8 ^a	80.6 ± 9.3 ^a
Basal diet + 5% amaranth ⁵	151 ± 4.8 ^b	125 ± 4.8 ^a	30.6 ± 4.3 ^a	77.4 ± 6.8 ^a
Basal diet + 5% amaranth + 5% GDF ⁶	124 ± 3.8 ^a	128 ± 3.2 ^a	30.4 ± 4.0 ^a	77.1 ± 5.1 ^a

1 Initial body weight, 103 g (range; 96 g to 110 g).

2 Food intakes of rats fed the basal and basal + 5% amaranth + 5% GDF diets were adjusted to attain the same growth rate as that of rats fed the basal + 5% amaranth diet *ad libitum* in order to eliminate any possible effects of difference in body weight on digestion-absorption capacity.

3 Digestion-absorption capacity was evaluated from the difference in the concentrations of these substrates in the medium before and after perfusion. Details of the jejunal perfusion procedure are given in the text.

4 Mean ± SEM (n=7); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different (P<0.05).

5 See footnote No. 1 to table 7-1.

6 See footnote No. 2 to table 7-1.

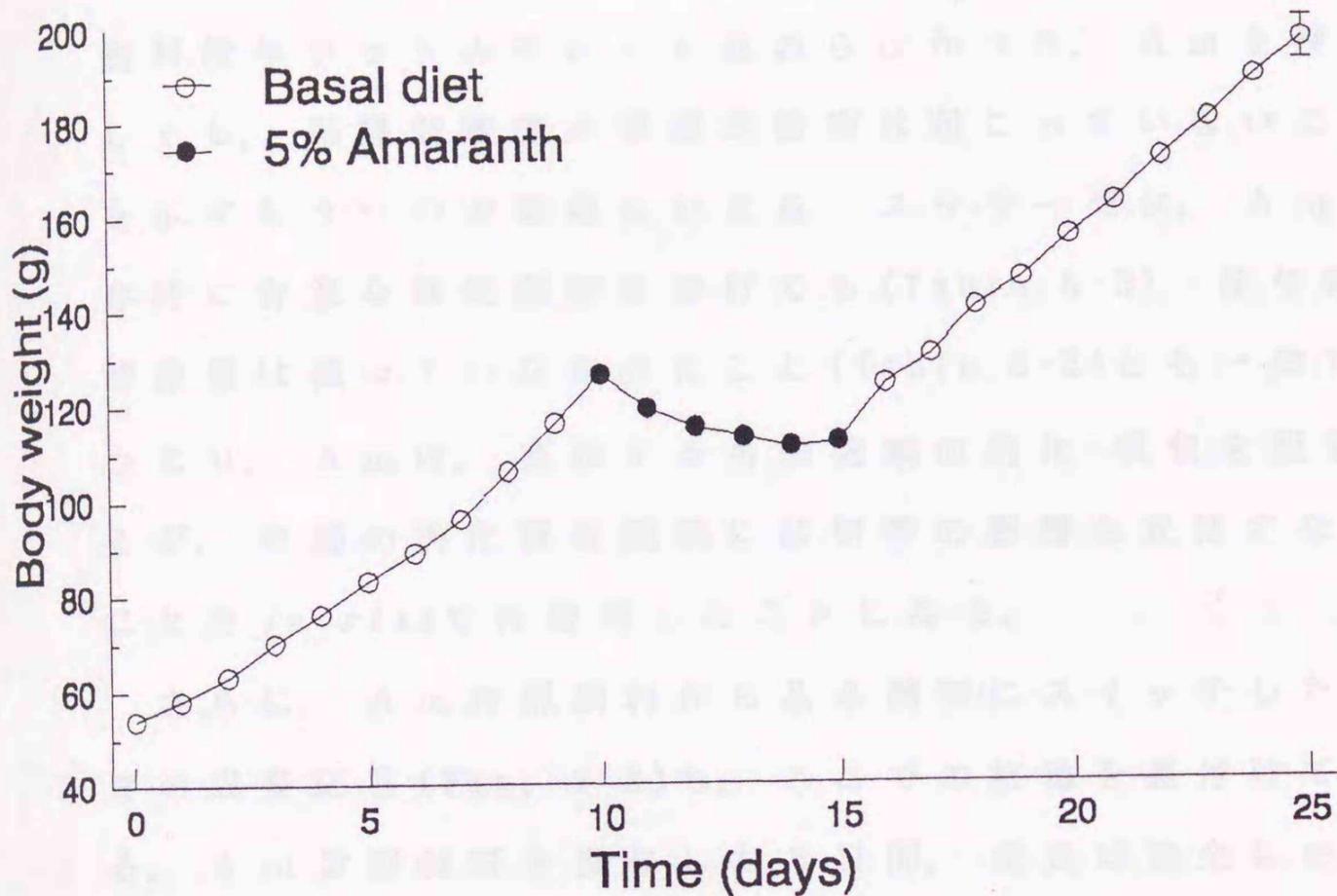


Figure 7-2. Change in body weight of rats fed the 25% casein-sucrose basal diet (-○-) before and after feeding of 5% amaranth (-●-) for 5 days (experiment 36)⁽¹¹⁵⁾. Average initial body weight was 51 g (range; 44 to 60 g). Each point is the mean of 8 rats and the vertical bars represent standard error of the mean. As shown in this figure, average growth rate of rats fed the basal diet after feeding of 5% amaranth was rather higher than that before the amaranth-feeding, indicating that the amaranth toxicity does not continue after cessation.

考察

空腸灌流実験の結果 (Table 7-3), A m を 14 日間投与しても空腸のスクロース, グリシルグリシン吸収能は基本飼料投与ラットのそれらと変わらなかった。A m を投与しても, 粘膜剥離等の後遺的傷害は起こっていないことを示すもう一つの証拠といえる。スクラーゼは, A m 共存時に有意な活性阻害を受けても (Table 6-2), 投与後の酵素量は減っていなかったこと (Table 6-2) と一致する。つまり, A m は, 共存する各栄養素の消化・吸収を阻害するが, 空腸の消化吸收機能には何等の影響も及ぼさないことを *in situ* で再確認したことになる。

さらに, A m 対照飼料から基本飼料にスイッチしたときの成長応答 (Fig. 7-2) も, ここでの結論を裏付けている。A m 対照飼料を投与した 5 日間, 成長は完全に止まってしまったにも関わらず, 基本飼料に戻すと A m 投与前よりも高い成長速度を達成した。ビタミン A の過剰投与 (1,500 万 IU) 時には, このような catch up growth は観察できなかった (115)。このタイプの毒性は, 代謝レベルの障害に起因しているためである。したがって A m 毒性は, A m が栄養素とともに消化管を通過するときだけに生ずる一過性のものであり, 消化管機能や体内代謝機能に対する後遺的な障害により発現するものではないという推定は本実験でも支持された。

7.3 灌流空腸からのスクラーゼ、及びDNAの流出に及ぼすAm, Tween 60あるいはデオキシコール酸の影響

緒言

木村ら(111)は、やはり2日間絶食させたラットに被験飼料を投与し、4日後に殺して空腸の酵素活性を測定する方法で、Amの他、ポリエチレングリコール(PEG)4000(10%)と、Tween 20(10%)も投与し、これら物質のスクラーゼ活性に及ぼす影響も調べた。その結果、Am投与時と同様の活性応答を、PEG 4000とTween 20投与時にも観察した。そしてこれら物質の毒性についても、Am同様に剥離説を唱えた。

さらに木村ら(116,117)は、同様の方法で各種の界面活性剤や緩下剤の毒性についても検討した。その中で、2%タウロコール酸ナトリウム(NaTC)、0.5%デオキシコール酸ナトリウム(DOC)、2.5%ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LBS)の投与による酵素活性の低下は、GDF(10%)の同時添加で阻止できないことを観察したが、これら毒性もまた小腸粘膜の剥離に起因すると結論した。なお、これら物質に対してGDFが無効な理由については触れていない。

また木村ら(118)は、前出の界面活性剤に加えて、ドテシルスルホン酸ナトリウム(DS)等の界面活性剤を麻酔下のラット空腸に灌流する実験を行い、回収灌流液中のス

クラーゼや、アルカリフォスファターゼの活性が、正常時の数倍に上昇することを観察した。こうした結果も、小腸粘膜酵素の流出、ないしは粘膜の剥離を裏付けるものであるという。

そこで粘膜剥離の程度と、その生理的影響を検討するため、Tween 60とDOCの両界面活性剤、及びA mの溶液で空腸を灌流し、回収灌流液中に流出するスクラーゼ量とDNA量、さらに灌流後の消化管粘膜中に残存するスクラーゼ量に及ぼすこれら物質の影響を検討した。

実験方法

【実験37】 動物の扱い 体重350 g前後の雄ラットを24時間絶食させた後、ネムブタールの腹腔注射(5 mg/100 g 体重)により麻酔して開腹し、空腸灌流のための手術を第6章2節で述べた方法で行った。手術では、幽門から約15 cm遠位側の位置から下方へ約20 cmの空腸部を10 cmずつに2分割し、2つのセグメントを作った。そして各セグメントの両端にテフロンチューブを結紮して固定し、37℃の生理食塩水を5 mLずつ2回流入して内容物を洗い出した後、10 mLのKRPBを輸液ポンプ(Harvard Apparatus, Millis Mass)で20分間予備灌流(0.125 mL/min)した。その後、一方のセグメントには引き続き上記の緩衝液を、もう一方のセグメントには、各被験物質を含む緩衝液を各々80分間灌流した。この間、両セグメントを灌流した液を連続して集め、10 mLに定容した後、そ

のなかのDNA量ならびにスクラーゼ活性を測定した。用いた各被験物質とその濃度は次のとおりであった。Tween 60, (1.5%); A m, (0.5%); DOC, (0.038%)。

酵素活性ならびにDNAの測定 スクラーゼ活性は、4%のシュクロースを含む基質溶液2 mL中に同量の回収灌流液を加えて37℃で20分反応させた後、沸騰水中に保って反応を止め、生成グルコースをグルコースオキシダーゼ法(98)により測定した。なお、灌流液中にA mを含む場合には、これによるスクラーゼ活性の阻害を消去するため、625 mg/flaskの陰イオン交換樹脂(コレスチラミン)を加えて酵素反応を行った。またDNAの定量は、Butronの変法(119)により行った。灌流終了後、両セグメントを摘出して灌流に使用した実効空腸の長さを測定した。この後、反転して空腸粘膜(2 cm)をかきとってホモジナイズし、その中のスクラーゼ活性、ならびにDNA量を上述の要領で測定した。

結果

実験37 ラット空腸に緩衝液のみ、あるいはこれに各被験物質を加えて灌流した後、回収灌流液中で検出されたスクラーゼ量を、残存量と同時にTable 7-4に示した。また、このときのDNAの流出量と残存量の関係も同Tableに示した。なおスクラーゼは、2 cmのセグメント当りの活性で表した。また灌流した実効空腸の長さは、平均9.8 cmで(8.5~13.0 cmの範囲)あったが、残存量と流出

Table 7-4. Effects of Tween 60, amaranth and DOC on release of sucrase and DNA from the perfused rat jejunum¹ (*experiment 37*) (129)

Perfusate	Sucrase activity		Amount of DNA	
	Released into perfusate ²	Remained in perfused segment ³	Released into perfusate	Remained in perfused segment
	$\mu\text{mol glucose}/2 \text{ cm}/10 \text{ min}$		$\text{nmol deoxyribose}/2 \text{ cm}$	
[Series 1] KRP-buffer	0.21 \pm 0.02 ^{a,4}	13.4 \pm 1.0 ^a	10.6 \pm 2.1 ^a	1230 \pm 200 ^a
KRP-buffer + 0.038% DOC ⁵	0.47 \pm 0.07 ^b	12.1 \pm 1.3 ^a	21.7 \pm 4.0 ^b	936 \pm 47 ^a
[Series 2] KRP-buffer	0.23 \pm 0.04 ^a	16.6 \pm 2.0 ^a	11.2 \pm 2.2 ^a	1090 \pm 50 ^a
KRP-buffer + 0.5% amaranth	0.22 \pm 0.02 ^a	18.5 \pm 2.9 ^a	9.8 \pm 0.9 ^a	1110 \pm 60 ^a
[Series 3] KRP-buffer	0.20 \pm 0.03 ^a	18.0 \pm 1.8 ^a	8.1 \pm 1.7 ^a	1120 \pm 30 ^a
KRP-buffer + 1.5% Tween 60	0.19 \pm 0.04 ^a	18.5 \pm 1.6 ^a	13.7 \pm 2.1 ^a	1080 \pm 120 ^a

1 Rats weighing about 350 g were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital injection and the abdominal cavity was opened. Four small incisions were made on the antimesenteric borders of the proximal jejunum to produce two sequential 10-cm segments per rat, one of which was perfused with 10 mL of Krebs-Ringer phosphate (KRP-buffer, pH 7.2) at a rate of 0.1 mL/min and the other was done with the same perfusate containing each test material.

2 Activity of sucrase which was released from the mucosal epithelium and appeared in the recovered perfusate.

3 Sucrase activity of mucosal homogenate of the perfused jejunum.

4 Mean \pm SEM (n=6); values not sharing a common superscript letter within a column are significantly different ($P < 0.05$). Comparisons are made within each experimental series.

5 Refers to sodium deoxycholate.

量は、比較しやすいように灌流空腸2cm当たりで表した。

その結果、0.5% Am,あるいは1.5% Tween 60溶液を空腸に灌流した後の回収液中スクラーゼ活性と、DNA量は、緩衝液のみを灌流したときのそれらと変わらなかった(シリーズ^{*} 2)。なお、DOC灌流時のスクラーゼ、およびDNA流出量は、緩衝液単独のときの2倍強に有意に増加した(シリーズ^{*} 3)。しかし両者の流出量は、腸粘膜の残存量に対してわずか数パーセントに過ぎない量であった。このため、DOC灌流時でさえも、腸粘膜全体の残存量に有意な減少をもたらすほどの影響はなかった。

考察

各被験物質の灌流濃度は、摂取水分や消化管腔内に分泌される消化液による希釈も考慮して、飼料中レベルの1/10に設定した。まず、Am(0.5%)の灌流時にスクラーゼの流出はまったく観察されなかった。またTween 60(1.5%)は、木村らのそれに(2.0%)ほぼ相当する濃度であったが、彼らの観察結果を確認できなかった。木村らは、2%Tween 60の溶液を灌流するとスクラーゼの流出が正常時の約3倍に増加することを観察した(118)。しかし、2%Tween 60の灌流で流出したスクラーゼが、腸粘膜中全スクラーゼのどれくらいに相当するかは触れていない。このため、Tween 60の灌流で流出したスクラーゼが個体の消化吸収能力にどの程度の影響を及ぼすのか彼らのデータでは推測できない。

DOCに関しては、これの腸管灌流により粘膜酵素の流出が増加することは既にVasseurら(120)により報告されている。また、これの腸管灌流によりDNAの流出が起こることを示したGulliksonら(121)の結果を確認することもできた。DOC灌流時にスクラーゼの流出増加と並行してDNAの流出量も増加することは(Table 7-4)、粘膜細胞の破片のみならず、上皮細胞ごと剥離することを示唆するものである。実際、1%DOCを21日間経口投与したラットの空腸粘膜を走査型電顕で観察すると、上皮細胞が脱落して基底膜が露出している個体もいた(Fig. 2-8a~c)(122)。

しかし、DOC灌流後の空腸粘膜に残存するスクラーゼ量は、減少していなかったし、DNAの残存量についても同様であった(Table 7-4)。また、1%DOCの投与(21日間)により空腸粘膜の剥離が形態的に確認できたときですら、空腸のスクラーゼ活性に差は見られなかった(122)。注目すべきことは、明らかな剥離作用を有するDOC毒性に対して食物繊維は無効な点である(Table 2-8)。

木村らが剥離説に至る過程には、二重の見落としがあるように思える。第一は既に指摘したように、ラットの扱いにある。被験飼料の投与に先立ち、ラットを2日間絶食させるために、初期活性が大幅に減少する。したがって、再摂取4日後の酵素活性は、絶食で減少した酵素量の回復速度が各飼料間で異なることを示しているに過ぎない。Amや界面活性剤の投与によりスクラーゼ量が減少することを証明するためには(111)、少なくとも投与

直前と投与4日後の活性を比較すべきであると考える。

もう一点は、各被験物質を全動物に摂取させたときの酵素活性の低下を、一律に剥離作用と結論したことにある。このため、食物繊維で阻止できるタイプの剥離(Am, Tween 20, Tween 60による)と阻止できないタイプの剥離(DOC, LBS等による)を想定せざるをえない混乱に陥っている(118)。

Tween 60毒性に関しては、これの1.5%濃度のもとでもグルコース吸収には影響がなかった(122)。また、基本飼料群を15%Tween 60対照群にペアーフィーディングさせた場合には両者の成長速度に差がなかった(Table 2-4)。

Tween 60対照群では、Am投与時ほど栄養素の利用が低下しないからである。ちなみにChowらは(123)、Tween 60を5%投与したラットの消化管組織や糞の潜血反応を調べているが、なんら異常は見られなかったと報告している。これらの結果は、Tween 60の大量投与による成長遅延が、主に摂取量低下によるものであり、消化管粘膜の剥離や、これに伴う機能障害に起因するものではないことを裏付けている。

第 8 章

結 論

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効果が実証されている。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作用、ないし無投与時の血中コレステロール低下作用。2) 耐糖性の改善とインシュリン分泌節約効果。3) 胆石の形成抑制効果。4) 大腸癌の発生率抑制効果。5) 有害物質の毒性制御効果。

これら効果が次々と明らかになるにつれ、食物繊維は健康を維持するのに必須な食事成分であることが、ようやく一般にも認識されるようになってきた。研究の進展につれ、食物繊維は消化管のほぼ全域で作用し、各部位に対する作用の栄養的役割もわかってきている。一方、食物繊維の種類により栄養効果が異なっていたり、生理効果に著しい違いがあることも研究の当初から知られていた。より正確な定義の問題を含め、食物繊維には、依然未解明な現象や問題も残っている。

(5)の効果は、実生活上、ほとんど起こりえない化学物質の投与レベルで生ずる毒性に対してみられるものであるが、この効果の発現様式を明らかにすることも、食物繊維の栄養学的意義を解明する一つのアプローチと考えられる。著者はこのような観点から、この種の効果を精力的に報告した Ershoff(11-24)の実験をモデルとして、効果の発現機構を解明する研究に着手した。

炭水化物源にスクロースを、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、アマランス(食用赤色2号, 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遅延を起こす。しかし、各種の野菜食物繊維(おもにゴボウ)を、Amと同時に3-10%添加すると、Amの害作用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た。なお本研究では、ゴボウの水・エタノール抽出残渣を主な食物繊維試料(GDF)として用いた。

まず、毒性阻止効果の範囲と限界を検討するために、各種の化学物質や薬物、微量栄養素をラットに大量投与して成長遅延を起こし、これら飼料にGDFを同時添加したときの成長応答を調べた。その結果、GDFはアミノ酸やビタミンA等の微量栄養素の過剰投与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概ね無効であった。他の研究者の結果と合わせて概観すると、難吸収性で比較的大量の投与で生ずる毒性に対しては有効であるが、吸収され易く、少量で強い代謝障害を引き起こす物質や、消化管機能に障害を及ぼす毒性に対しては、概ね無効と推定された。

次に、被験動物間の生理効果の違いを調べる目的で、ラットで観察された現象がニワトリひな(以下ひな)にも現れるかどうかを、各種の炭水化物を用いて検討した。その結果、ラットはスクロース以外に、生とうもろこしデンプン、麦芽糖、あるいはブドウ糖の何れを用いても

A m 毒性が発現し、何れも GDF の同時添加で阻止された。しかしひなの場合、単糖や二糖類飼料に 6% A m を添加しても成長遅延は全く、ないしはほとんど起こらず、とうもろこしデンプン飼料に添加したときにのみ有意な成長遅延が現れた。そしてこの成長遅延は、5% GDF の同時添加でも全く回復しなかった。つまり、ひなは A m 毒性が現れ難く、また毒性が現れても GDF で阻止できない点でラットと異なっていた。

GDF を化学的方法で処理してこれから ADF, NDF, ホミセルロース, 粗繊維等の非水溶性分画を調製し、市販のセルロース粉末やリグニン、それに活性炭も加えてそれらの生理効果の強さを 5% の添加レベルで比較した。その結果、繊維質の本体と思われているセルロース粉末には全く効果がなかった。また、リグニンはむしろ毒性を強めた。一方 GDF の分画では、ホミセルロースがもっとも強い効果を発揮した。NDF も有効であったが、ADF は無効であった。以上のことから、GDF 中のセルロースとヘミセルロースの複合体が効果の中心的役割を担っていると推定された。

これら成分は難消化性のため、本来の構造を保持した状態で消化管腔内を移動し、そしてほとんどそのままの状態ですら生理効果を発揮していると考えられる。したがって GDF の効果は、その物理化学的性質と関係している可能性が強い。そこで各分画の保水性、水中沈定体積 (settling volume, SV)、それに A m 吸着能を測定した。予想されたように、活性炭は著しく強い A m 吸着能を有してい

たが、ラットの A m 毒性はこれの添加によって軽減されなかった。逆に、有効分画の A m 吸着能は何れも極めて弱かった。これによってまず、食物繊維による A m の吸着説には根拠のないことが明らかになった。

一方、各分画の S V と防御活性の間には密接な相関のあることが判明した。たとえば、ホロセルロース分画の優れた生理効果が、その著しく高い S V と関係していることが示唆された。同時に、腸管腔内で一定の容積に達すればどのようなタイプの食物繊維でも、効果を発揮しうることを示唆していた。実際、5%レベルで無効であったセルロース粉末でも、飼料中で GDF と等しい S V を占めるようにその添加量を増やした場合には、GDF と等価の生理効果を発揮した。また、セファデックス G-200 や、発泡スチロール(発泡度 60)粉末も有効であった。逆に、GDF でもその粒度を小さくして S V 値を低下させた場合には、生理効果が明らかに弱くなった。

これら一連の結果から、GDF の効果は特定の構成成分による直接的作用によるものではなく、その組織構造と結び付いた物理的性質(主に S V)によるものと推測された。なお、水溶性の C M C, K M にも効果が見られたが、これら多糖類の場合、その粘性が生理効果と関係しているものと推測される。

次に、A m 毒性の特徴について検討した。まず群間の栄養素摂取を等量にしても、A m 対照群で有意に成長が遅延し、GDF の同時添加群でそれが改善されることをペア

ーフィーディング法，ならびに強制投与法で確認した。つまり，A mによる成長遅延は，単なる摂取量の減少にとどまらず，栄養素自体の利用率の低下に起因していることが判明した。また，A mを腹腔に投与したときの成長への影響は意外に小さく，毒性の主要因は消化管腔内における障害にあると考えられた。ちなみに，A mの腹腔投与による成長遅延は，食餌性GDFで改善されなかった。したがって，GDFの有効性も消化管腔内で発現すると考えた。

そこで，ラットに盲腸と結腸を全摘する回直腸吻合手術を行い，GDFの有効性発現に関わる消化管部位を特定する作業を行った。その結果，GDFのA m毒性阻止効果はこの回直腸吻合手術ラットの成長応答にも再現され，その有効性は，盲腸と結腸以外で発揮することが明らかとなった。GDFの効果は，胃を全摘したラットでも現れることが既に明らかにされていたので，GDFの有効性は，小腸腔内で発現するものと断定した。

したがって，栄養素の消化吸収に及ぼすA m，およびGDFの影響が必然的に機構解明の焦点となった。そこでまずA m対照群，ならびにGDF同時添加群のタンパク質(カゼイン)消化率と生物価を調べた。なお，A m投与対照群では下痢便になり，通常の代謝ケージでは糞と尿の分離採取が困難であったので，下痢便を正確に採取できる固定ケージを独自に作製して用いた。その結果，タンパク質消化率はA mにより15%から19%の範囲で有意に低下す

ることがわかった。さらにカゼインの生物価も A m 投与時に低下した。そしてこれらの低下は、5% GDFの同時添加により何れも有意に改善されることを観察した。

そこで消化吸収の全段階、すなわち腔内消化、膜消化、膜輸送にわたって、A mの影響を *in vitro*で検討した。まず、トリプシンによるカゼイン消化は、基質溶液中わずか1 mg/mLの A mで、無添加時の73%に低下し、5 mg/mLの濃度では半分以下に低下した。なお A mによるトリプシン活性の阻害は、反応基質に GDFを添加しても全く阻止できなかった。

次に、*in vitro*の膜消化系に A m (25 mg/mL)を添加した場合、スクラーゼで約30%、ジペプチダーゼで70%の活性阻害を受けた。さらに空腸反転サックによる放射性L-バリンの能動輸送に及ぼす A m (30 mg/mL)の影響も調べたが、A mはバリンの吸収細胞への取り込みを34%ほど阻害した。この阻害もまた、何れのタイプの食物繊維(50 mg/mLで添加)でも阻止できなかった。つまり A m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じているものであった。そして *in vitro*での消化吸収実験に関する限り、GDFの同時添加はいかなる有効性も認められなかった。

空腸灌流法による消化吸収試験でも、A mによる栄養素の消化吸収阻害を確認できた。しかし、灌流液に GDFを同時添加しても、依然有効性は現れなかった。ただし、基質溶液の灌流速度を遅くした場合には、A m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。たとえば、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A m共存下でもスクロースで1.8倍、グリシルグリシンで2倍に各々増加した。このように、全動物レベルでの実験においてのみ観察される食物繊維のA m毒性阻止効果の発現機構を説明するためには小腸腔内移動速度の制御がもっとも妥当な要因と考えるに至った。

つまり小腸移動速度も栄養素の利用を左右する大きな因子であり、とりわけ消化吸收活性が阻害されている状況では重要な生理的意義を持つようになると考えた。たとえば消化・吸収段階のすべてが50%も抑制されていても食物繊維が小腸腔内移動速度を遅らせるならば、その間に栄養素の消化吸收が改善されるからである。

GDFは、試験管内での消化試験や、空腸の灌流実験ではその有効性が現れず、唯一全動物の消化管を移動するときのみ効果が現れること。盲腸・結腸を全摘してもGDFの効果は消失しないこと。SVの大きい食物繊維試料ほど、強い毒性阻止効果を示すこと。これらはみな、GDFの効果はA m投与ラットの腸腔内移動速度の制御を通して発現する傍証となる。

そこで小腸腔内移動速度に及ぼすA mならびにGDFの影響を調べるのが次の中心課題となった。その一環として、非吸収性マーカー(Cr-EDTA)を回腸瘻孔施術ラットに投与

し、その50%が排泄されるのに要する時間(TT₅₀)を測定した。その結果、TT₅₀は基本飼料で17.9時間、4%A m添加対照飼料で8.12時間、そして10%GDF同時添加飼料で18.2時間であった。口から回腸末端までの移動時間は、A m投与で約55%と大幅に減少したわけであるが、これが10%GDFの同時添加で再び正常化することが明らかとなった。なお口→回腸移動時間には胃内滞留時間(gastric emptying)も関与している。したがって、これと小腸腔内移動時間の差が協同した結果とも考えられるので、将来、純粹に小腸内移動速度のみを測定する必要があると考えている。

ところでA mにより小腸の移動が亢進した場合、A m自身による消化吸収過程の阻害に加えて、栄養素の吸収利用は一層悪化すると推測される。一方全動物レベルにおいてGDFは、A m投与ラットの小腸腔内移動時間を延長することによって消化吸収量を回復させる可能性が一層強くなった。

しかし、A m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%A m対照群で、空腸粘膜スクラーゼやアルカリホスファターゼ活性の低下が観察されたことをその論拠にしている。なお、これら酵素活性の測定は、2日間絶食させたラットに各被験飼料を再与し、4日後に測定した値を比較している。そこで、この方法に準じてラットを飼育し、この間のスクラーゼレベルの変化を経時的に調べてみた。

その結果、絶食させると空腸セグメント当りのスクラーゼ活性は50%も減少すること。各飼料を投与して3日後、各群のスクラーゼレベルは回復に向かうものの、Am添加対照飼料群だけは、依然として低いレベルにあることを見いだした。しかし、投与前の初期活性と比べた場合、それ以下には減少していなかった。そして投与14日後、依然著しい成長遅延にも関わらず、Am対照群のスクラーゼは基本飼料群のそれに匹敵するレベルまで回復した。

Amにより空腸粘膜が剥離し、そこに局在する酵素群が減少するために吸収不全が起こるとする説は、その論拠を失ったことになる。つまり、Am投与に対する絶食ラットのスクラーゼ応答は、絶食で減少したスクラーゼレベルの回復がAm投与の初期に一時的に遅れることを観察したに過ぎないと結論できる。

これに加えて先の研究者らは、2%Tween 60の溶液を空腸に灌流するとスクラーゼの流出が正常時の約3倍に増加することを示し、Amによる空腸粘膜の剥離説をさらに展開した。そこでTween 60, Am, DOCの空腸灌流実験を行い、スクラーゼやDNAの流出に及ぼすこれら物質の影響も調べた。その結果、DOC灌流時にスクラーゼならびにDNAの流出量は明らかに増加したが、Tween 60とAmの灌流時には、両生体成分の流出増加は確認できなかった。ちなみに著者らは、15%Tween 60投与による成長抑制が主に飼料摂取量の減少によって生ずることをpair feeding法で明らかにしている。先の研究者らは、Tween

60 毒性と A m 毒性の発現様式が異なることを見過ごしたようである。

ところで本研究で導き出された仮説は、少なくともニワトリひなの A m 毒性には当てはまらなかった。食物繊維の栄養的役割をより広範な動物で比較するなら、進化の過程における食物繊維の栄養学的位置付けができるようになるかもしれないと考えている。また、A m 以外にも栄養素の利用が阻害される食餌条件は無数にある。その各々に対して食物繊維の影響を検討することは、本仮説を検証する重要な作業でもある。この一環として本論文では扱わなかったが、カゼインを 120℃ で 24 時間オートクレーブして消化性を低下させたタンパク質を調製し、これに対する食物繊維の添加効果を検討してみた。

その結果、ペアーフィーディングによるラットの成長速度から判定する限り、大根由来の食物繊維 (RDF) は、加熱損傷カゼインの利用をほぼ 50% ほど改善した (124)。しかし、オープン (120℃, 24 時間) で加熱損傷させたカゼインや、乾熱加熱 (120℃, 3 時間) により褐変反応を起こした脱脂粉乳を与えたラットの成長は、RDF を添加しても改善されなかった。食物繊維による低消化性タンパク質の利用改善は、それらのすべてに共通する現象とは断定できないようである。しかし一部の劣化タンパク質は、食物繊維の同時摂取によりその利用が改善されることを示した点は見逃せない。将来、食品の加工や調理の過程で生ずるタンパク質の損傷を、食物繊維の同時摂取によ

り栄養的に修復する手段が見つかるかもしれない。

冒頭で述べたように、A_m毒性はその投与レベルから想像しても実生活上まず起こり得ないものである。しかし、各種の食品添加物や微量の環境汚染物質が、もはや食品の恒常成分になっていることも事実である。無添加食品や無農薬農産物が望ましいことは言うまでもないが、それらだけをえりすぐった食生活は実際には不可能に近い。そこで、同時にとる食品成分によりその害作用を阻止できれば栄養学的に有力な予防手段となる。この面において、本研究の現実的意義は小さくないと考える。本研究を契機に、食物繊維研究の新しい局面が切り開かれれば幸いである。

参考文献

- 1 A.R.P. Walker & V.B. Arvidsson. Fat intake, serum cholesterol concentration and atherosclerosis in the South African Bantu. I. Low-fat intake and the age trend of serum cholesterol concentration in the South African Bantu. *J. Clin. Invest.*, 33, 1358-1365 (1954)
- 2 B.H. Ershoff. Protective effects of alfalfa in immature mice fed toxic doses of glucoascorbic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 87, 134-136 (1954).
- 3 A.F. Wells and B.H. Ershoff. Beneficial effects of pectin in prevention of hypercholesterol in cholesterol-fed rats. *J. Nutr.*, 74, 87-92 (1961).
- 4 B.H. Ershoff and A.F. Well. Effects of gum guar locust bean gum and carrageenan on liver cholesterol of cholesterol-fed rats. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 110, 580-582 (1962).
- 5 S. Kiriyama, Y. Okazaki and A. Yoshida. Hypocholesterolemic effect of polysaccharides and polysaccaride-rich foodstuff in cholesterol-fed rats. *J. Nutr.*, 97, 382-388 (1969).

- 6 D.P.Burkitt. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 28,3-13 (1971).
- 7 D.P.Burkitt and H.C.Trowell (ed). 「Refined carbohydrate foods and disease; Some implications of dietary fibre」 Academic Press London (1975).
- 8 F.Bergman and W. van der Linden. Effect of dietary fibre on gallstone formation in hamsters. *Z. Ernaehrungswiss*, 14,217 (1975).
- 9 D.J.A.Jenkins, A.R.Leeds, T.M.S.Wolever, D.V.Goff, K.G.M.M.Alberti, M.A.Gassull and T.D.R.Hockaday. Unabsorbable carbohydrates and diabetes; Decreased post-prandial hyperglycemia. *Lancet*, 2,172 (1976).
- 10 T.A.Barbolt and R.Abraham. The effect of bran on dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 157, 656-659 (1978).
- 11 B.H.Ershoff. Beneficial effects of alfalfa and other succulent plants on glucoascorbic acid toxicity in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95,656-659 (1957).
- 12 B.H.Ershoff and H.J.Hernandez. An unidentified factor in alfalfa which counteracts mineral oil toxicity in the rat and mouse. *J. Nutr.*,

- 65, 575-588 (1958).
- 13 B.H. Ershoff and H.J. Hernandez. Beneficial effects of alfalfa meal and other bulk-containing or bulk-forming materials on symptoms of Tween 60 toxicity in the immature mouse. *J. Nutr.*, 69, 172-178 (1959).
- 14 B.H. Ershoff, H.J. Hernandez and Joan M. Muckenthaler. Beneficial effects of the plant residue factor on the survival of thyrotoxic rats. *J. Nutr.*, 67, 381-396 (1959).
- 15 B.H. Ershoff. Beneficial effects of alfalfa meal and other bulk-containing or bulk-forming materials on the toxicity of non-ionic surface active agents in the rat. *J. Nutr.*, 70, 484-490 (1960).
- 16 B.H. Ershoff. Comparative effects of a purified and stock diet on DBH (2,5-di-tert-butylhydroquinone) toxicity in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 362-365 (1963).
- 17 B.H. Ershoff. Effects of diet on pituitary tumor induction by estrogens. *Exp. Med. Surg.* 22, 28-32 (1964).
- 18 B.H. Ershoff, G.S. Bajwa, J.B. Field and L.A. Bavetta. Comparative effects of purified diets and a natural food stock ration on the

- tumor incidence of mice exposed to multiple sublethal doses of total-body X-irradiation. *Cancer research*, 29, 780-788 (1969).
- 19 B.H.Ershoff. Comparative effects of a purified and stock ration on sodium cyclamate toxicity in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 141, 857-862 (1972).
- 20 B.H.Ershoff and E.W.Thurston. Effect of diet on amaranth (FD & C Red No. 2) toxicity in the rat. *J. Nutr.*, 104, 937-942 (1974).
- 21 B.H.Ershoff and W.E.marsha. Protective effect of dietary fiber in rats fed toxic doses of sodium cyclamate and polyoxyethylene sorbitain monosterarate (Twen 60). *J. Food Sci.*, 40, 357-361 (1975).
- 22 B.H.Ershoff and W.E.Marshall. Protective effects of dietary fiber in rats fed toxic doses of sodium cyclamate and polyoxyethylene sorbitain monostearate (Tween 60). *J. Food Sci.*, 40, 357-361 (1975).
- 23 B.H.Ershoff. Proteictive effects of cholestyramine in rats fed a low-fiber diet containing toxic doses of sodium cyclamate or amaranth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 152, 253-256 (1976).

- 24 B.H.Ershoff. Effects of dietary carbohydrate on sodium cyclamate toxicity in rats fed a purified, low-fiber diet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 154, 65-68 (1977).
- 25 D.W.Woolley and L.O.Krampitz. Production of a scurvy-like condition by feeding of a compound structurally related to ascorbic acid. *J. Exp. Med.*, 78, 333-339 (1943).
- 26 永井 鞆江, 今村 裕一, 海老原 清, 桐山 修八. 各種野菜残渣およびコンニャクマンナンによる食用赤色2号の毒性阻止効果ならびに塩混合組成の影響, 栄養と食糧, 31, 161-170 (1978).
- 27 K.Ebihara, Y.Imamura and S.Kiriyama. Effect of dietary mineral composition on nutritional equivalency of amino acid mixtures and casein in rats. *J. Nutr.*, 109, 2106-2116, (1979).
- 28 A.E.Harper. Amino acid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.*, 68, 405-418 (1959).
- 29 柴田 寛三, 生物統計学序説, 創文社, 東京, 1974, pp.64-78.
- 30 芝本 武夫(代表). 林産化学実験書(第三版), 産業図書, 東京, 1965, pp.91-110.
- 31 A.E.Harper, N.J.Benevenga and R.M.Wohlhueter. Effects of ingestion of disproportionate

- amounts of amino acids, *Physiol Rev.*, 50, 478-558 (1970).
- 32 H.F. DeLuca, Volume 2 "The Fat-Soluble Vitamins" Handbook of Lipid Research, ed by D.J. Hanahan, Plenum Press, NY, 1978, p. 29.
- 33 菅野盛夫. 消化器系作用薬 「最新薬理学」講談社サイエンテフィク, 東京, 1990. 藤野澄子, 斎藤秀哉, 菅野盛夫編, pp. 267-279.
- 34 S.P. Lamabadusuriya, E. Guiraldes and J.T. Harries. Influence of mixtures of taurocholate, fatty acids, and monolein on the toxic effects of deoxycholate in rat jejunum in vivo. *Gastroenterology*, 69, 463-469 (1975).
- 35 M. Gracey, J. Papadimitriou, M. Burke, J. Thomas and G. Bower. Effects on small-intestinal function and structure induced by feeding a deconjugated bile salt. *Gut*, 14, 519-528 (1973).
- 36 永谷 隆. 走査電子顕微鏡の生物試料作製技術について. SEMテクニカルデータ(シートNo.3)日立製作所計測事業部(東京) 1973.
- 37 海老原 清, 桐山修八. キトサンの食用赤色105号毒性阻止作用の機構について. 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 171 (1981).
- 38 K. Ebihara, R. Masuhara and S. Kiriyama. Major determinants of plasma glucose-flattening

- activity of a water-soluble dietary fiber:
Effects of konjac mannan on gastric emptying
and intraluminal glucose-diffusion. *Nutr. Rep.
Int.*, 23, 1145-1156 (1981).
- 39 永井 鞠江, 海老原 清, 今村ひとえ, 佐伯好隆, 平
尾彦, 桐山修八. 難消化性多糖類による食品添加物
並びに汚染物質の毒性制御効果の検索, 第31回日本
栄養・食糧学会総会講演要旨集, p.120 (1977).
- 40 S. Kiriyama, M. Banjo and H. Matsushima.
A failure to prevent absorption of
polychlorinated biphenyls by concurrent
feeding of pectin or konjac mannan in the rats.
Nutr. Rep. Int., 10, 151-162 (1974).
- 41 桐山修八, 井上幸子, 町中紀子, 吉田 昭. P C B,
D D Tなどの生理作用と非栄養的多糖類摂取の影響
について. 栄養と食糧, 26, 15-25 (1973).
- 42 井上勝也. 生活の中の洗剤・活性剤, 研成社, 東京,
1978, pp208-250.
- 43 中村秀夫監訳. 中毒ハンドブック, 廣川書店, 東京,
1979, pp103-146.
- 44 新村壽夫. 食品添加物の生化学と安全性, 地人書館,
東京, 1980, pp121-264.
- 45 川城 巖, 六訂食品衛生学, 光生館, 東京, 1980,
pp118-121.
- 46 岩崎守男, 関戸祥三郎, 上野 , 細野仁一, 石田

- 泰江, 二宮健二. Chenodeoxycholic Acid の毒性研究 (第 2 報), 応用薬理, 15, 961-974 (1978).
- 47 日本クレア(株), DIETS, 1984.
- 48 H. Takeda, J. Tsujita, K. Ebihara and S. Kiriyama. Decreased protein utilization in amaranth toxicity and its amelioration by the concurrent feeding of dietary fiber in rats. *Nutr. Rep. Int.*, 24, 481-497 (1981).
- 49 K. Bacon, S. Lassen, S. M. Greenberg, J. W. Mehl and H. J. Jr. Deuel. The influence of ingested mineral oil upon the development of an essential fatty acid deficiency in the rat. *J. Nutr.*, 47, 383-398 (1952).
- 50 B. H. Ershoff and S. M. Greenberg. Comparative effects of dietary fat and dextrin on mineral oil toxicity in the mouse. *Am. J. Digest. Dis.*, 21, 363-365 (1954).
- 51 M. R. Spivey fox and G. M. Briggs. Salt mixtures for purified type diets III, An improved salt mixture for chicks. *J. Nutr.*, 72, 243-250 (1960).
- 52 C. C. Calvert, K. C. Klasing and R. E. Austic. Involvement of food intake and amino acid catabolism in the branched-chain amino acid antagonism in chicks. *J. Nutr.*, 112, 629-635 (1982).

- 53 N.Zafrira and A.Eugenia. Role of the cecum in the utilization of raw soybean in chicks. *J.Nutr.*, 80,299-304 (1963).
- 54 D.Belly Shachaf, J.Baron and S.Hurwits. Retrograde movement of digesta in the duodenum of the chick: Extent, frequency, and nutritional implications. *J.Nutr.*, 108,1485-1490 (1978).
- 55 G.Riesenfeld, D.Sklan, A.Bar, U.Eisner and S.Hurwitz. Glucose absorption and starch digestion in the intestine of the chicken. *J.Nutr.*, 80,299-304 (1963).
- 56 C.Vet-Oy. Effect of carbohydrate on utilization of protein and lysine by rats. *J.Nutr.*, 78,21-27 (1962).
- 57 C.Nageswara Rao and B.S.Narasinga. Influence of starches from different sources on protein utilization in rats. *Br.J.Nutr.*, 40,1-8 (1978).
- 58 S.E.Fleming and J.R.Vose. Digestibility of raw and cooked starches from legume seeds using the laboratory rat. *J.Nutr.*, 109,2067-2075 (1989).
- 59 J.Tsujita, H.Takeda, K.Ebihara and S.Kiriyama. Comparision of protective activity of dietary fiber against the toxicities of various food

- colors in rats. *Nutr. Rep. Int.*, 20, 635-641 (1979).
- 60 海老原 清, 桐山修八. 食用色素による成長阻害に対しての動物性 dietary fiber (DF)-キチン, キトサンの改善効果. 第33回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, p117, (1979).
- 61 石館守三, 谷村顕雄監修. 食品添加物公定書解説書(第五版), 廣川書店, 東京, 1987, pp. D-461~D-481.
- 62 H. Takeda and S. Kiriyama. Correlation between the physical properties of dietary fibers and their protective activity against amaranth toxicity in rats. *J. Nutr.*, 109, 388-396 (1979)
- 63 P. J. Van Soest. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 46, 825-829 (1963).
- 64 P. J. Van Soest. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 46, 829-835 (1963).
- 65 P. J. Van Soest and R. W. McQueen. The chemistry and estimation of fibre; Symposium on "fibre in human nutrition". *Proc. Nutr. Soc.*, (1973), 32, 123-130 (1973).
- 66 農林省農林水産技術会議事務局監修. 作物分析法委

- 員会編：栽培植物分析測定法，養賢堂，東京，1976，
pp.302-341.
- 67 地方衛生研究所全国協議会．食物纖維成分表，第一
出版，東京(1989).
- 68 L.Prosky, N-G.Asp, I.Furda, J.W.Devries,
T.F.Schweizer and B.F.Harland. Determination
of total dietary fiber in food and food
products: Collaborative study. *J.Assoc.Off.
Anal.Chem.*, 68,677 (1985).
- 69 村上浩紀，竹山祥子．切断による蔬菜可食部リグニ
ンの増加．*栄養と食糧*，31,91-94 (1978).
- 70 I.M.Morrison, A semi-micro method for the
determination of lignin and its use in
predicting the digestibility of forage crops.
J.Sci.Food,Agric., 23,455 (1972)
- 71 有塚 勉，田中勝三郎，桐山修八．コレステロー
ル無添加飼料時のラットの脂質代謝に及ぼすビート
ファイバーの影響．*日本栄養・食糧学会誌*，
42,295-304 (1989)
- 72 武田秀敏，桐山修八分担．"食物繊維の物理化学的性
質" 印南 敏・桐山修八「食物繊維」第一出版，東
京，1982，pp.57-79.
- 73 W.Horwitz (ed). Official methods of analysis
of the association of official analytical
chemists (ed. 10). Association of Official

- Analytical Chemists, Washington, 1965, PP 332-334.
- 74 A.A. McConnell, M.A. Eastwood and W.D. Mitchell. Physical characteristics of vegetable foodstuffs that could influence bowel function *J. Sci. Food Agric.*, 25, 1457-14644 (1974).
- 75 京都大学農芸化学教室編. 農芸化学実験書(新改版) 第1巻, 産業図書, 東京, 1973, p. 267.
- 76 H.E. Middleton and H.G. Byers. The settling volume of soil. *Soil Sci.*, 37, 15-27 (1934).
- 77 D.A.T. Southgate. "The chemistry of dietary fiber". in: *Fiber in Human Nutrition*, (G.A. Spiller & R.J. Amen, ed), Plenum Press, New York, 1976, pp. 31-72.
- 78 W.O. Kirwan, A.N. Smith, A.A. McConnell, W.D. Mitchell and M.A. Eastwood. Action of different bran preparations on colonic function. *Br. Med. J.*, 4, 187-189 (1974).
- 79 武田秀敏, 海老原 清, 林 芳文, 桐山修八. 食用赤色2号あるいはアミノ酸過剰毒性に対する各種食物繊維(dietary fiber)の影響. *農化*, 53, 291-297 (1979).
- 80 武田秀敏, 海老原 清, 桐山修八. ラットの腸内容物と消化管粘膜の形態に及ぼすアマランスならびに食物センイ同時添加の影響. *農化*, 55, 125-132

- (1981).
- 81 H. Takeda, J. Tsujita, T. Emoto, K. Ebihara and S. Kiriyama. Nutritional significance of dietary fiber in counteracting the amaranth-toxicity in rats. a possible explanation of the mechanism. *Nutr. Rep. Int.*, 25, 169-187 (1982).
- 82 武田秀敏, 桐山修八. 食物繊維の水中沈定体積とアマランス毒性阻止効果に及ぼす粒度の影響. *農化*, 65, 171-176 (1991).
- 83 有塚勉, 武田秀敏, 桐山修八. 酵素処理によるピートファイバーの水中沈定体積の変化とアマランス毒性阻止能との関係. 第44回日本栄養・食糧学会総会, 講演要旨集, 1990, p. 52.
- 84 T. Henmi and K. Wada. Surface acidity of imogolite and allophane. *Clay Minerals*, 10, 231-245 (1974).
- 85 S. Mitjavila, C. Lacombe, G. Garrera and R. Derache. Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. *J. Nutr.*, 107, 2113-2121 (1977).
- 86 R. Lambert. Surgery of the intestine. In: *Surgery of the Digestive System in the Rat*, (Translated into English by B. Juline), Charles C Thomas Publisher, Springfield, IL. 1965, pp. 389-467.

- 87 武田秀敏, 桐山修八. 動物の成長応答からみた食物繊維の毒性阻止効果の特徴. 今治明德短期大学研究紀要, 第19集, 61-71 (1991).
- 88 高治大介, 水田 昭, 海老原 清, 桐山修八. 盲腸あるいは胃を切除した白ネズミの大腸ガン発生率およびアマランス毒性に及ぼす食物センイ摂取の影響. 日本農芸化学会昭和57年度大会, 講演要旨集, 1982, p.48.
- 89 R.M.Saunders. The significance of protein as a component of dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 960-961 (1980).
- 90 L.R.Njaa. A shortened version of the Mitchell method for determination of the biological value of protein. *Br. J. Nutr.*, 13, 137-142 (1959).
- 91 J.L.Radomski and T.J.Mellinger, The absorption fate and excretion in rats of the water-soluble azo dyes, FD & C Red No.2, FD & C Red No.4, and FD & C Yellow No.6. *J. Pharmac. Exp. Therap.*, 136, 259 (1962).
- 92 A.J.Ryan, J.J.Roxon and A.Sivayavirojana. Bacterial azo reduction: a metabolic reaction in mammals. *Nature*, 219, 854-855 (1968).
- 93 J.J.Roxon, A.J.Ryan and S.E.Wright. Reduction of water-soluble azo dyes by intestinal

- bacteria. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 5, 367-369 (1967).
- 94 伊藤利之, 池沢広郎, 石坂音治. 食品添加物と消化酵素作用(第2報) 着色料とトリプシン その1. 衛生化学 15, 253-257 (1969).
- 95 Q.R.Rogers and A.E.Harper. Amino acid diets and maximal growth in the rat. *J.Nutr.*, 87, 267-273 (1965).
- 96 M.Kunitz, Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J.Gen.Physiol.*, 30, 291-310 (1947).
- 97 A.M.Ugolev, A.A.Gruzdlov, P.De Laey, V.V.Egorova, N.N.Iezuitova, G.G.Koltushkina, N.M.Timofeeva, E.Ch.Tulyaganova, V.A.Tsvetkova M.Yu.Chernyakhovskaya and G.G.Shcherbakov. Substrate interactions on the intestinal mucosa: A concept for the regulation of intestinal digestion. *Br.J.Nutr.*, 34, 205-219 (1975).
- 98 P.Trinder. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, 6, 24-27 (1969).
- 99 T.H.Wilson and G.Wiseman. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to

- the serosal surface. *J. Physiol.*, 123, 116-125 (1954)
- 100 伊藤利之, 池沢広郎, 石坂音治. 食品添加物と消化酵素作用(第3報) 着色料とトリプシン その2. 衛生化学 16, 134-137 (1970).
- 101 田中慶一, 岡原國男. 食品添加物の消化器系に及ぼす影響(第1報). 食衛誌, 14, 234-238 (1973).
- 102 W.D. Mitchell and M.A. Eastwood, Dietary fiber and colon function. in "Fiber in Human Nutrition" ed. by G.A. Spiller and R.J. Amen. Plenum Press, New York, 1976. pp185-206.
- 103 C.S. Marcus and F.W. Lengemann. Use of radioyttrium to study food movement in the small intestine of the rat. *J. Nutr.*, 76, 179-182 (1962).
- 104 F. Varga. Transit time changes with age in the gastrointestinal tract of the rat. *Digestion*, 14, 319-324 (1976).
- 105 W.T. Binnerts, A.T. Vant Klooster and A.M. Frens. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. *Vet. Rec.*, 82, 470 (1968).
- 106 K. Kim, N.J. Benevenga and R.H. Grummer. Estimation of the fraction of the lactose in a high lactose diet available for fermentation

- in the cecum and colon of the rat. *J. Nutr.*, 108, 79-89 (1978).
- 107 J.H. Cummings. Diet and transit through the gut, in "Dietary fibre" (Third Kellogg Nutrition Symposium) Ed. by K.W.Heaton. John Libbey, London, 1977. 99.83-95.
- 108 T.A.Barbolt and R.Abraham. The effect of bran on dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in the rat. *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.*, 157, 656-659 (1978).
- 109 L.Bueno, F.Praddaude, J.Fioramonti and Y.Ruckebush. Effect of dietary fiber on gastrointestinal motility and jejunal transit time in dogs. *Gastroenterology*, 80.701-707 (1981).
- 110 N.J.Brown, J.Worlding, R.D.E.Rumsey and N.W.Read. The effect of guar gum on the distribution of a radiolabelled meal in the gastrointestinal tract of the rat. *Br.J.Nutr.*, 59, 223-232 (1988).
- 111 T.Kimura, H.Furuta, Y.Matsumoto and A.Yoshida. Ameliorating effect of dietary fiber on toxicities of chemicals added to a diet in the rat. *J.Nutr.*, 110, 513-521 (1980).
- 112 O.H.Lowry, N.J.Rosenbrough, A.L.Farr and R.J.Randall. Protein measurement with the Folin

- phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 113 J.S. Ju and E.S. Nasset. Changes in total Nitrogen content of some abdominal viscera in fasting and realimentation. *J. Nutr.*, 68, 633-645 (1959).
- 114 J.P.A. McManus and K.J. Isselbacher. Effect of fasting versus feeding on the rat small intestine. Morphological, biochemical and functional differences. *Gastroenterology*, 59, 214-221 (1970).
- 115 武田秀敏, 桐山修八. ラットの成長応答にみられるアマランス(食用赤色2号)の大量投与毒性の特徴, 農化, 65, 1083-1088 (1991).
- 116 T. Kimura, E. Iwata, K. Watanabe and A. Yoshida. Effect of several chemicals added to a diet on intestinal enzyme activities of rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 26, 483-496, (1980).
- 117 T. Kimura, E. Iwata, K. Watanabe and A. Yoshida. Effects of several detergents and dietary fiber added to a diet on intestinal sucrase activity in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 27, 389-392 (1981).
- 118 T. Kimura, H. Imamura, K. Hasegawa and A. Yoshida. Mechanisms of toxicities of some detergents

- added to a diet and of the ameliorationg
effect of dietary fiber in the rat.
J. Nutr. Sci. Vitaminol., 28, 483-489 (1982).
- 119 K. Butron. A study of the conditions and
mechanism of the diphenylamine reaction for
the colorimetric estimation of
deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62, 315
(1956).
- 120 M. Vasseur, G. Ferard and A. Pousse. Rat
intestinal brush border enzymes release by
deoxycholate in vivo. *Pfuger Arch.*, 373, 133-
138 (1978).
- 121 G.W. Gullikson, W.S. Cline, V. Lorenzson, L. Benz,
W.A. Olsen and P. Bass. Effects of anionic
surfactants on hamster small intestinal
membrane structure and function: relationship
to surface activity. *Gastroenterology*, 73, 501-
511 (1977).
- 122 武田秀敏, 松本 博, 桐山修八. Tween 60あるいは
デオキシコール酸投与ラットの成長および小腸粘膜
の消化吸収機能と形態に及ぼす食物繊維同時摂取の
影響. *農化*, 62, 749-756 (1988).
- 123 B.F. Chow, J.M. Burnett, C.T. Ling and L. Barrows.
Effects of basal diets on the response of rats
to certain dietary non-ionic surface-active

- agents. *J. Nutr.*, 49, 563-577 (1953).
- 124 武田秀敏, 中島 昭, 桐山修八. 食物繊維による加熱損傷カゼインの利用改善効果. *農化*, 60, 927-933 (1986).
- 125 武田秀敏. 白ネズミならびにニワトリヒナの飼料中食用赤色2号および食物繊維同時添加の影響. *聖カタリナ女子短期大学紀要*, 第16号, 152-166 (1983).
- 126 H. Takeda and S. Kiriyama. Difference between rats and chicks in the protective effect of dietary fiber against amaranth toxicity. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1299-1305, 1991.
- 127 H. Takeda and S. Kiriyama. Effect of Feeding amaranth (Food Red No. 2) on the jejunal sucrase and digestion-absorption capacity of the jejunum in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 受付番号, 91-35 (印刷中, Vol. 37, 12号掲載予定) 1991.
- 128 H. Takeda, A. Nakajima and S. Kiriyama. Beneficial effect of dietary fiber on upper gastrointestinal transit time in rats suffered from toxic doses of amaranth (Food Red No. 2). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 受付番号, 1-384 (印刷中, Vol. 56, 5号掲載予定) 1992.
- 129 武田秀敏, 松本 博, 桐山修八. ラット空腸からのスクラーゼおよびDNAの流出に及ぼすTween 60,

食用赤色 2 号 (アマランス), デオキシコール酸ナトリウムの影響. 農化, 62, 757-759 (1988).

H. Takada and H. Shirayama (1979)

Correlations between the physical properties of dietary fibers and their protective activities against atherosclerosis in rats. *J. Atheroscler.* 100, 308-320.

J. Tsujita, H. Takada, I. Shihara and H. Shirayama (1979)

Correlations of protective activities of dietary fibers against the toxicity of various food additives in rats. *Brit. J. Nutr.* 41, 425-438.

高田亨也, 藤野真治, 杉山信久 (1979)

食用赤色 2 号 (アマランス) のラットに与える食料添加物の毒性に対する保護作用 (dietary fiber) の研究. 日本農芸化学会誌, 63, 281-287.

H. Takada, J. Tsujita, I. Shihara and H. Shirayama (1981)

Decreased protein utilization in atherosclerotic animals and its amelioration by the concurrent ingestion of dietary fiber in rats. *Brit. J. Nutr.* 45, 451-467.

高田亨也, 藤野真治, 杉山信久 (1981)

食料添加物のラットに与える食料添加物の毒性に対する保護作用 (dietary fiber) の研究. 日本農芸化学会誌, 63, 281-287.

本研究に関連する論文発表(年代順)

- 1 H.Takeda and S.Kiriyama (1979)
Correlation between the physical properties of dietary fibers and their protective activity against amaranth toxicity in rats. *J. Nutri.*, 109, 388-396.
- 2 J.Tsujita, H.Takeda, K.Ebihara and S.Kiriyama (1979)
Comparison of protective activity of dietary fiber against the toxicities of various food colors in rats. *Nutr. Rep. Int.*, 20, 635-642.
- 3 武田秀敏, 海老原清, 林 芳文, 桐山修八 (1979)
食用赤色 2 号あるいはアミノ酸過剰毒性に対する各種食物繊維(Dietary fiber)の影響. 日本農芸化学会誌, 53, 291-297.
- 4 H.Takeda, J.Tsujita, K.Ebihara and S.Kiriyama (1981)
Decreased protein utilization in amaranth toxicity and its amelioration by the concurrent feeding of dietary fiber in rats. *Nutr. Rep. Int.*, 24, 481-497.
- 5 武田秀敏, 海老原清, 桐山修八 (1981)
ラットの腸内容物の状態と消化管粘膜の形態に及ぼすアマランスならびに食物セニイ同時添加の影響 日本農芸化学会誌, 55, 125-132.

- 6 H. Takeda, K. Emoto, J. Tsujita T. Ebihara and S. Kiriyama (1982)
Nutritional significance of dietary fiber in counteracting the amaranth-toxicity in rats: A possible explanation of mechanism. *Nutr. Rep. Int.*, 25, 169-187.
- 7 武田秀敏 (1983)
白ネズミならびにニワトリヒナの飼料中食用赤色2号添加および食物繊維同時添加の影響. 聖カタリナ女子短期大学紀要, 第16号, 152-166.
- 8 水田 昭, 武田秀敏 (1983)
回直腸吻合ラットおよび回腸瘻孔設置ラットの成長と小腸部での内容物移動速度. 松山東雲短期大学研究論集, 第14巻, 121-127.
- 9 武田秀敏 (1984)
食物繊維の同時摂取による低消化率タンパク質の利用改善効果. 聖カタリナ女子短期大学紀要, 第17号, 196-203.
- 10 武田秀敏, 中島 昭, 桐山修八 (1986)
食物繊維による加熱損傷カゼインの利用改善効果. 日本農芸化学会誌, 60, 927-933.

- 11 武田秀敏, 松本 博, 桐山修八 (1988)
Tween 60 あるいはデオキシコール酸投与ラットの成長及び小腸粘膜の消化吸収機能と形態に及ぼす食物繊維同時摂取の影響. 日本農芸化学会誌, 62, 749-756.
- 12 武田秀敏, 松本 博, 桐山修八 (1988)
ラット空腸からのスクラーゼおよびDNAの流出に及ぼすTween 60, 食用赤色2号(アマランス), デオキシコール酸ナトリウムの影響. 日本農芸化学会誌, 62, 757-759.
- 13 武田秀敏, 桐山修八 (1991)
食物繊維の水中沈定体積とアマランス毒性阻止効果に及ぼす粒度の影響. 日本農芸化学会誌, 65, 171-176.
- 14 H. Takeda and S. Kiriyama (1991)
Difference between rats and chicks in the protective effect of dietary fiber against amaranth toxicity.
Agric. Biol. Chem., 55, 1299-1305.
- 15 武田秀敏, 桐山修八 (1991)
ラットの成長応答にみられるアマランス(食用赤色2号)の大量投与毒性の特徴. 日本農芸化学会誌, 65, 1083-1088.

16 武田秀敏, 桐山修八 (1991)

動物の成長応答からみた食物繊維の毒性阻止効果の特徴

今治明德短大学紀要, 第19集, 61-72.

17 H. Takeda and S. Kiriyama (1991)

Effect of Feeding amaranth (Food Red No. 2) on the jejunal sucrase and digestion-absorption capacity of the jejunum in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 受付番号, 91-35 (印刷中, Vol. 37, 12号掲載予定).

18 H. Takeda, A. Nakajima and S. Kiriyama (1992)

Beneficial effect of dietary fiber on upper gastrointestinal transit time in rats suffered from toxic doses of amaranth (Food Red No. 2). *Biosci. Biotech. Biochem.* 受付番号, 1-384 (印刷中, Vol. 56, 4号掲載予定).

略語一覧

本論文では、次の略語を用いた。本文中、これらの使用に当たっては最初に説明を付したが、ここに整理して示した。

A m : Amaranth (食用赤色 2 号), trisodium salt of 1-(4-sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid. $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$,
分子量, 604.48

A D F : acid detergent fiber

B D F : beet dietary fiber (ビート食物繊維)

B B : brilliant blue(食用青色 1 号)

C M C : carboxymethylcellulose

D O C : sodium deoxycholate

D D A C : dimethyldialkylammoniumchloride

D D T : dichlorodiphenyltrichloroethane

D N A : deoxyribonucleic acid

D P M : degradation per minute

E S : erythrosine(食用赤色 3 号)

F C : Folin-Ciocalteu

G D F : gobo dietary fiber

I G : Indigo carmine (食用青色 2 号)

K M : konjac mannan

K R P B : Krebst-Ringer phosphate buffer

L A P : leucine aminopeptidase

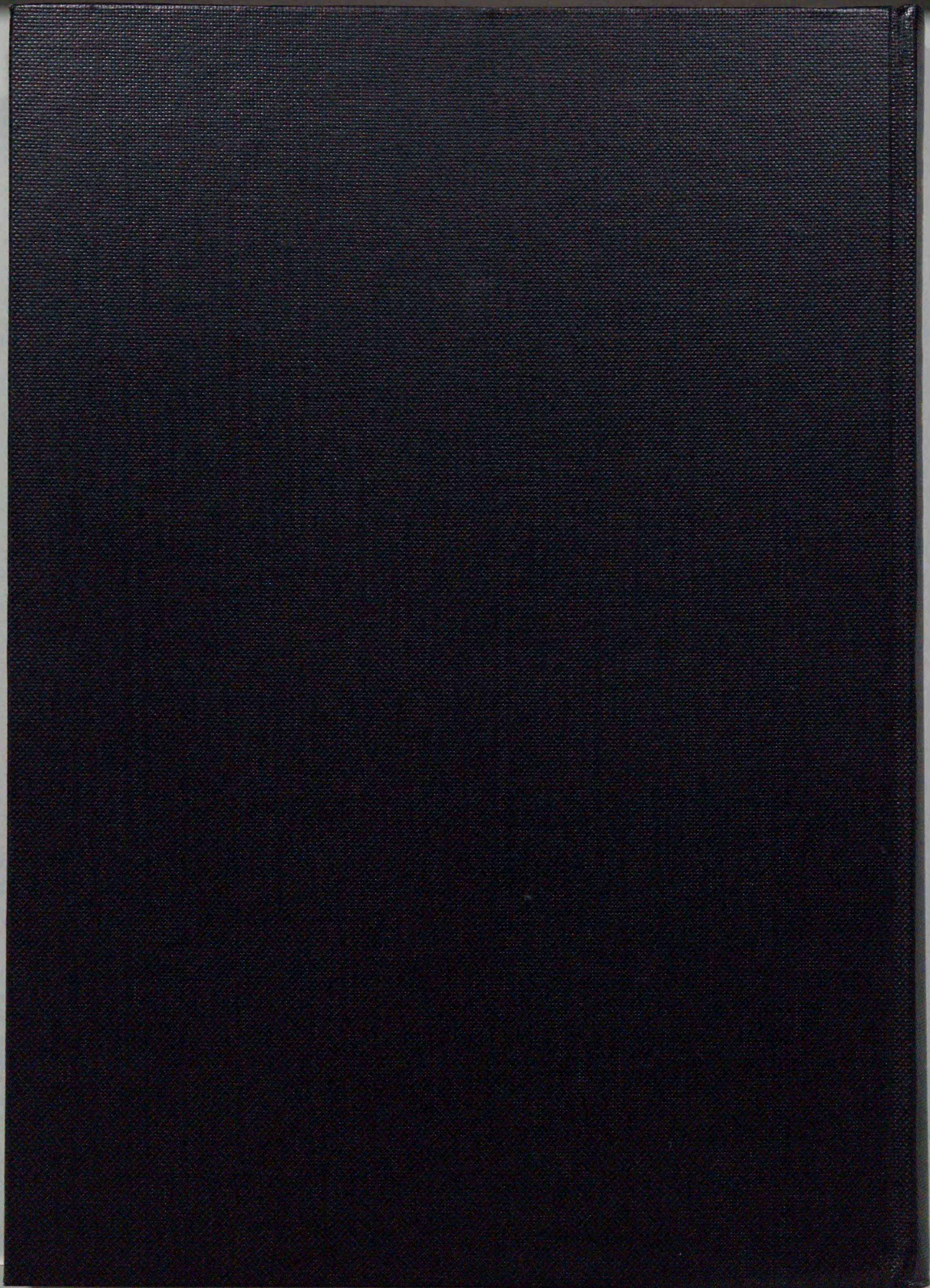
L B S : laurylbenzenesulfonate

- L D₅₀ : median lethal dose
- M N L : maximum no-effect level
- N a T C : Sodium Taurocholate
- N C : new cocchine(食用赤色 1 0 2 号)
- P C B : polychlorinated biphenyl
- P F : pretein free
- P E G : polyethylenegylycol
- R B : rose benngal(食用赤色 105号)
- R D F : radish dietary fiber (大根食物纖維)
- R S V : relative settling volume
- S E M : scanning electron micrography
- S Y : sunset yellow(食用黄色 5 号)
- S V :settling volume
- T T₅₀ : transit half time
- T w e e n 2 0 : polyoxyethylene sorbitan mono-
laurate
- T w e e n 6 0 : polyoxyethylene sorbitan mono-
stearate
- T w e e n 8 0 : polyoxyethylene sorbitan mono-
oleate
- T Z : tartrazine (食用黄色 4 号)
- W H C : water holding capacity

謝 辞

本研究の多くは、桐山修八教授(現北海道大学農学部教授)が愛媛大学農学部在職中、密接な指導の下で活発な議論をとおして進行したものであります。その成果を本論文として記録できたことについて、先ずは同教授に謹んでお礼を申し上げます。また本研究に際し、終始適切なご助言を賜り、今日に至っても惜しみない援助を頂いております海老原 清・愛媛大学農学部教授に深謝いたします。施術ラットの実験にあたり、実地にご指導、ご協力をして頂いた中島(水田) 昭・松山東雲短期大学助教授にも厚くお礼申し上げます。愛媛大学在学中、本研究の一部にご協力して頂いた辻田純二、松本 博、山川義裕、林芳文の諸氏に感謝いたします。また、本研究の継続にあたり、ご援助と便宜を与えて下さいました上妻久恵・聖カタリナ女子短期大学前理事長、ならびに山本達郎・今治明德短期大学学長に厚くお礼申し上げます。

最後に本論文の作成にあたり、ご校閲とご助言を賜りました千葉誠哉、ならびに水谷純也・北海道大学農学部教授に厚くお礼申し上げます。



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19

