



Title	カルシウム吸収を促進する新規食品素材の開発
Author(s)	渡邊, 治
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第5567号
Issue Date	2001-03-23
DOI	https://doi.org/10.11501/3182441
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51506
Type	doctoral thesis
File Information	000000400030.pdf



カルシウム吸収を促進する新規食品素材の開発

農芸化学専攻 食品栄養学講座

渡 邊 治

①

博士論文

カルシウム吸収を促進する 新規食品素材の開発

2001 年

北海道大学大学院 農学研究科博士後期課程

農芸化学専攻 食品栄養学講座

渡邊 治

目 次

第1章 序 論	1
第2章 実験に関する一般事項	6
2-1 実験動物	7
2-2 飼 料	7
2-3 出納試験期間中の採糞	7
2-4 解 剖	7
2-5 分析方法	9
第3章 水溶性食物繊維のリン酸化および in vitro における機能性の検討	17
3-1 目 的	18
3-2 方 法	18
3-3 結果及び考察	21
3-4 まとめ	25
第4章 過週齢ラットにおけるカルシウム吸収に対するリン酸化グァーガム 加水分解物摂取の影響	37
4-1 目 的	38
4-2 方 法	38
4-3 結果及び考察	39
4-4 まとめ	45

第5章 盲腸摘出ラットを用いたカルシウム吸収に対するリン酸化グアーガム

加水分解物摂取の影響 59

5-1 目的 60

5-2 方法 60

5-3 結果及び考察 62

5-4 まとめ 68

第6章 卵巣摘出ラットにおけるリン酸化グアーガム加水分解物摂取による

カルシウム吸収・骨強度などに対する影響 85

6-1 目的 86

6-2 方法 87

6-3 結果及び考察 89

6-4 まとめ 95

第7章 総括 114

参考文献 119

参考論文リスト 129

謝辞 130

Abbreviations

CCX	cecectomized
CPP	casein phosphopeptide
EDTA	ethylenediamine -N,N,N',N'- tetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycol -bis (β -aminoethyl ether) -N,N,N',N'- tetraacetic acid
G-6-P	glucose-6-phosphate
GGH	guar gum hydrolysate
HPLC	high performance liquid chromatograpy
NMR	nuclear magnetic resonance
OVX	ovariectomized
P-GGH	phosphorylated GGH

第1章

序 論

カルシウムは、1.4~2.2%とミネラルの中で最も生体に多く含まれており、その99%はリン酸カルシウムの形で骨格中に存在し、骨の成熟とともに結晶型のヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) として骨の強度に寄与している(1-3)。カルシウムが十分に存在することにより骨は硬く、強くなり、体重を支えることが可能となる。逆にカルシウムが不足することにより骨密度が低くなり、現在問題となっている骨粗鬆症などの疾病が引き起こされる。またカルシウムの残り1%は血液や組織に分布している。血液中のカルシウム濃度は10 mg/dl 前後に保たれており、この濃度が変動することにより個々の生体機能に異常をきたす。これを防ぐため骨形成と骨吸収が起こる。これには副甲状腺ホルモンと甲状腺ホルモンのカルシトニンが拮抗的に働いている。さらに細胞内のカルシウム濃度は、筋肉の収縮と弛緩、血液凝固、神経伝達、生体膜の物質輸送と分泌、細胞内情報伝達など種々の機能発現に関与している。このように生体、生命維持にとってカルシウムは必要不可欠な元素である。

では、現状におけるカルシウムの摂取状況はどうであろうか。厚生省の発表する「国民栄養調査結果」によると、平成10年度において、日本人1人あたりの所要量は男性で609 mg、女性で612 mgであるのに対し、平均充足率は男性で96%、女性で90%でしかない。特に女性の15~19歳で73%、20~29歳で78%、30~39歳で80%と大きく不足している。同様に男性でも15~39歳で85~89%である。この様に「飽食」と言われる現代においてもカルシウムの摂取不足は深刻な問題である。このようなカルシウム不足は正常なカルシウムの生体調節の元では「骨粗鬆症」を引き起こす原因となるとともに、前段で述べた生体ホルモンのアンバランスを誘発する。この問題の解決には、骨量を骨折閾以下に

減らさないために、摂取カルシウム量を増やすことが最も重要である。日本では穀類、野菜類、海草類、小魚などからカルシウムを摂取することが多いが、日本の土壌中にはカルシウム成分が少なく、またこの様な食物群ではカルシウムの利用率が低いため、これらからのカルシウム摂取だけでは不十分である。すなわち、健康な生体を考える上では、カルシウムの摂取量を増やすだけでなく、生体がより利用しやすい形で摂取することが大切である。

ここでカルシウムの吸収について簡単に触れておく。食品中のカルシウムは大半が不溶性で、摂取されたカルシウムは胃で可溶化され、小腸で吸収される。通常の場合では、大腸の寄与は低いと考えられている。小腸での吸収は、小腸上部（十二指腸）では主として能動輸送が、下部（回腸）では受動輸送システムが働いている。この吸収に際しては回腸が主要部位であるという報告も幾つかある(4,5)。腸管におけるカルシウムの吸収は、様々な物質に影響を受けている。例えば、活性型ビタミンDは消化管における能動輸送、受動輸送の両方に関与している(4-6)。それ以外にも糖アルコール(7)、オリゴ糖(8,9)、リン酸化オリゴ糖(10)、カゼインホスホペプチド(CPP)(11-14)などがカルシウムの吸収亢進物質としてあげられる。逆に吸収を抑制する物質として、フィチン酸(15,16)、ヤシウ酸(17)、リン(18)などが報告されている。

一方、食物繊維は人体において消化吸収されないために非栄養素としてのカテゴリーに長い間分類されていた。しかし古代ギリシャ以来、欧米では小麦フスマが緩下剤効果を有することは知られていた。また Walker(19)は南アフリカでの研究から原住民に心臓疾

患、動脈硬化症が少ない理由として、低脂肪・高繊維の食餌にあるとしている。さらに Cleave (20) は精製炭水化物食品が糖尿病や心臓病など多くの西洋型疾病の原因であると主張している。一方、日本でも戦後、食事の欧米化によって、食物繊維の摂取量が減少し、この傾向は現在でも続いている (21-25)。欧米型疾病の発症率の増加と食物繊維の摂取量が負の相関関係を示すことも報告されており、現在、多くの疾病の予防に食物繊維が重要な役割を果たしているとの認識がなされている。

ミネラル、特にカルシウムの吸収に対する食物繊維摂取の影響に関しては、数多くの報告がなされているが、その結果は、カルシウム吸収を促進する (26,27)、影響を与えない (28-31)、カルシウム吸収を抑制する (32-35) と様々である。これら結果の差異は、摂取させた食物繊維の性質の差異に起因すると考えられる。

当研究室でのこれまでの研究において、食物繊維摂取によるミネラルの利用性に関しては肯定的な結果が多く (36-39)、特に水溶性食物繊維であるグアガム加水分解物 (GGH) について多くの知見が蓄積されている。GGH は主として盲腸発酵の結果、大腸でのカルシウム吸収を亢進すると考えられている。

またカルシウム吸収を促進する物質としては前述の CPP が知られているが (11-14,40)、CPP はその分子中に存在するホスホセリンが 3~4 分子集まって形作っているリン酸基クラスターが小腸下部でのカルシウムのリン酸塩形成を阻止し、吸収されやすい形に保つことによりカルシウムの吸収を亢進すると言われている (41-43)。

以上より、カルシウム吸収を促進する新規食品素材として水溶性食物繊維の基本機能に

着目し、この食物繊維にリン酸基を導入してリン酸基クラスターを形成することが出来れば、CPP の様にカルシウムのリン酸塩形成を阻止し、小腸下部での吸収率を高めるとともに、食物繊維が元来持っていた発酵性により大腸での吸収の亢進作用、さらに水溶性食物繊維の持つ整腸作用などの機能性も期待できると考えた。

これらを踏まえ、本研究では GGH に化学的手法によりリン酸基を導入し、in vitro でのリン酸カルシウム形成阻害能を調べるとともに、ラットによる in vivo でのカルシウム吸収亢進能の有無、さらには骨粗鬆症などのカルシウム不足が起因となる疾病の予防・改善の可能性について研究することを目的とした。

第2章

実験に関する一般事項

2-1 実験動物

実験には日本エスエルシー株式会社より購入した Sprague-Dawley (SD) 系の雄ラットまたは雌ラットを用いた。ラットは個別のステンレスゲージで飼育した。飼育室は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 60、摂食量を測定した。飼料は毎日新しいものを与え、水は 3 日に 1 回取り替えた。トレーの新聞紙は 2 日に 1 回取り替えた。

この研究は、「北海道大学動物実験委員会」によって是認され、「北海道大学における動物実験に関する指針」に従って実験動物を行った。

2-2 飼料

標準飼料 (25% Casein diet) の組成を Table 2-1 に示した。また標準飼料を作成する際に必要なミネラルマクロ、ミネラルミクロ、ビタミンの各混合物の組成を Table 2-2~2-4 に示した。試験飼料の組成については各実験により異なるのでそのつど記述する。なお、試験飼料の作成に際しては脱ミネラル処理を行った器具を用いた。方法は 4 N 硝酸で洗浄した後、脱塩水で数回すすいだ。

2-3 出納試験期間中の採糞

ステンレスゲージの下にカルシウムを含まない紙 (らくがきちょう ; コクヨ) を敷き、連続する 3 日間の糞を採取した。採取した糞は袋 (ユニパック B-4 ; 生産日本社) に入れ、 -40°C で凍結した後、24 時間凍結乾燥 (FREEZE DRYER VD-80 ; TAITEC) した。

2-4 解剖

1) 麻酔

50 mg/ml のペントバルビタールナトリウム溶液（ネンブタール注射液；大日本製薬）の腹腔内投与（0.08 ml/100 g body weight）で行った。

2) 採血

翼付静注針（21 G×3/4；テルモ）を用いて腹部大動脈から採血した。氷冷下で放置した後、3,000 rpm（05PR-22；日立工機）で10分間遠心分離した。血清をエッペンチューブ（M・C チューブ：マース）に移し、分析まで-40°Cで凍結保存した。

3) 盲腸

周囲に付着している脂肪を取り除いた後、全湿重量を測定。続いて盲腸内容物を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）で洗い出し、分析まで-40°Cで凍結保存した。その後、壁についた余分な水分をキムタオルを用いてふき取り、壁重量を測定した。なお、摘出後、アルミホイルで包み、液体窒素中で瞬間凍結させ、-40°Cのフリーザーで保存し、後日、解凍して内容物を取り出しても差し支えはない。

4) 回腸・結腸

摘出後、全湿重量を測定。内容物は生理食塩水（使用量は10 ml以下とした）を用いて栄研チューブ（滅菌丸底スピッツ；栄研器材）に採取し、分析まで-40°Cで凍結保存した。なお回腸は、第4章、第6章の実験においては回腸末端から約10 cm、第5章の実験においては回腸全体を摘出、分析に用いた。

5) 大腿骨

左大腿骨は採取後、生理食塩水を含ませたキムワイプで骨を包み、袋（ユニパック B-4；生産日本社）に入れ、4°Cで冷蔵保存し、後日骨強度測定用として分析に用いた。右大腿骨は採取後、袋（ユニパック B-4）に入れ分析まで-40°Cで凍結保存し、後日乾重量とミネラルの測定用として分析に用いた。

2-5 分析方法

1) ミネラル分析

ミネラル分析に使用する器具のすべては付着しているミネラルを完全に除去するために、使用に際して脱ミネラル処理を行った。方法は4 N 硝酸の入った水槽中で数回器具を洗浄し、その後蒸留水で5回、脱塩水で3回すすいだ。ただし、4 N 硝酸によってそれ自身が溶けるおそれのある金属製の器具等については、蒸留水と脱塩水での処理のみを行った。

① 血漿中カルシウム濃度の測定

凍結保存しておいた血清を氷冷下で解凍し、キレート発色法（*o*-cresolphthalein complexone 法）に 8-hydroxyquinoline を添加する変法（44,45）に従ったカルシウム測定キット（カルシウムC-テストワコー；和光純薬）を 1/2 スケールで使用して測定した。

② 糞中カルシウム濃度の測定

凍結乾燥後保存しておいたサンプルを小型の乳鉢と乳棒で細かく粉碎。約 0.1 g を精秤し、耐熱性の 30 ml リム付（目盛り付）試験管入れ、沸石と混酸（16 N 硝酸：6N 過塩素酸=3：1（volume））約 5 ml を一緒に入れてヒーティングブロックで湿式灰化した。室温で放冷後、0.1 N 塩酸で 15 ml にメスアップして攪拌。この希釈液 0.5 ml と 50,000 ppm

塩化ストロンチウム溶液 0.5 ml、0.1 N 塩酸 4 ml を混合・攪拌して原子吸光分光光度計 (AA6400F ; 島津製作所) でカルシウム濃度を測定した。

③消化管内容物中のカルシウム測定

凍結保存しておいたサンプルを目盛り付き試験管を用いて 15 ml (回腸、結腸) または 20 ml (盲腸) にメスアップし、これをホモジスターラー (EYELA, MINI D.C. STIRRER MDC-S、東京理化器械) でホモジナイズした。

a) 総カルシウム量

ホモジナイズしたサンプル 1 ml を 30 ml 目盛り付き試験管に入れ、沸石と約 5 ml の混酸を加えて湿式灰化した。放冷後、0.1 N 塩酸で 15 ml にメスアップした。この溶液 1 ml に 0.1 N 塩酸 3.5 ml と 50,000 ppm 塩化ストロンチウム溶液 0.5 ml を加えて、原子吸光分光光度計でカルシウム濃度を測定した。

b) 可溶性カルシウム量

ホモジナイズしたサンプル約 5 ml を遠心分離 (15,000 rpm、10 分、4°C) した。この上清 1.25 ml に 0.1 N 塩酸 1.25 ml と 1 N 過塩素酸 (10,000 ppm 塩化ストロンチウムを含む) 2.5 ml を加えて一晩放置し、翌日、攪拌後、遠心分離 (3,000rpm、15 分) した。この上清 1 ml に 0.1 N 塩酸 3.5 ml と 50,000 ppm 塩化ストロンチウム溶液 0.5 ml を加えて、原子吸光分光光度計でカルシウム濃度を測定した。

④右大腿骨中カルシウム濃度の測定

凍結保存しておいたサンプルを凍結乾燥した。その後 30 ml 目盛り付き試験管に右大腿骨 1 本と沸石、混酸約 5 ml を加えて湿式灰化した。室温で放冷後、0.1 N 塩酸で 15 ml に

メスアップした。この希釈液 50 μ l と 0.1 N 塩酸 4.45 ml、50,000 ppm 塩化ストロンチウム溶液 0.5 ml を混合して原子吸光分光光度計でカルシウム濃度を測定した。

⑤試験飼料中のカルシウム分析

試験飼料 1 g を精秤し 50 ml のメスフラスコに入れ、0.1 N 塩酸でメスアップした。5～10 分超音波処理した後、この溶液 2.5 ml に 1 N 過塩素酸（10,000 ppm 塩化ストロンチウムを含む）2.5 ml を加えて攪拌後、一晩放置した。翌日遠心分離（3,000 rpm、10 分）の後、上清 0.5 ml に 50,000 ppm 塩化ストロンチウム溶液 0.45 ml と 0.1 N 塩酸 4.05 ml を加えて攪拌した。この溶液のカルシウム濃度を原子吸光分光光度計により測定した。

2) 消化管内容物の pH の測定

ホモジナイズした消化管内容物を遠心分離（3,000 rpm、10 分）した後、その上清を氷冷下、pH メーター（HM-50V、電極：GST-5421C；東亜電波工業）にて測定した。

3) 骨強度測定

左大腿骨を万能引張試験器（AGS-500A；島津製作所、第 4 章に使用）またはレオメーター（RE-3305；ヤマデン、第 5、6 章に使用）を用いて測定した。測定条件は次の通りとした。

AGS-500A：ロードセル 500 kgf（SBL-500K-350）

ロードレンジ 20

プランジャースピード 10 mm/min

RE-3305：ロードセル 20 kgf

プランジャースピード 0.5 mm/sec

4) 消化管内容物中の短鎖脂肪酸量の測定

ホモジナイズした消化管内容物 1 ml をエッペンチューブに入れ、直ちに内部標準物質としてクロトン酸 200 μ l を加えて攪拌した。遠心分離 (15,000 rpm、10 分、4°C) した後、上清 1 ml を 12 ml のリム付試験管に入れ、クロロホルムを約 1 ml 加えた。ボルテックスで激しく攪拌して長鎖の脂肪酸などをクロロホルム層に移行させた。その後さらに遠心分離 (3,000 rpm、10 分、4°C) した。

上清約 0.5 ml をエッペンチューブに分取し、これを -40°C で凍結した (10 分位でよい)。その後解凍し、遠心分離 (15,000 rpm、10 分、4°C) した後、上清約 200 μ l をバイアルに入れて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

5) データの算出法

①見かけのカルシウム吸収率の算出

Apparent Calcium Absorption (%) =

$$100 \times [(\text{Ca intake} - \text{Ca excretion in feces}) / (\text{Ca intake})]$$

Ca intake : 出納試験期間中の Ca 摂取量 (mg)

Ca excretion : 出納試験期間中の糞中 Ca 量 (mg)

②カルシウム可溶化率の算出

Solubility of calcium in the ileal (or cecal or colonic) contents (%) =

$$100 \times [(\text{soluble calcium in the ileal (or cecal or colonic) contents}) / (\text{total})]$$

calcium in the ileal (or cecal or colonic) contents)]

soluble calcium : 各内容物中の可溶性カルシウム量 (mg)

total calcium : 各内容物中の総カルシウム量 (mg)

6) データの統計処理法

全ての測定項目について、分散分析 (analysis of variance, ANOVA) で検定後、群間の比較を Duncan's Multiple Range Test (46) を用いて有意水準 5% ($P < 0.05$) で検定した。

Table 2-1 Composition of basal diet (25% Casein diet)

	/1kg diet
Casein ¹	250 g
Sucrose	645 g
Corn oil ²	50 g
Mineral mixture, Macro ^{3,4}	38 g
Mineral mixture, Micro ^{3,5}	2 g
Vitamin mixture ⁶	10 g
Vitamin E granule ⁷	1 g
Choline bitartrate	4 g

1. Lactic Casein (ALACID™ ; New Zealand Dairy Board, Wellington, New Zealand)
2. Mixed with 0.2 ml of Chocla A (Eisai Co., Tokyo) which contained retinyl palmitate and 0.05 ml of Chocla D (Eisai Co., Tokyo) which contained ergocalciferol to provide 6,000 IU and 800 IU, respectively, just prior to preparing the diet.
3. The mineral mixture was prepared based on the AIN-76 Workshop held in 1989 (47).
4. This composition showed in Table 2-2.
5. This composition showed in Table 2-3.
6. The vitamin mixture was prepared in accordance with the AIN-76 mixture (48) except that menadione (49) and L-ascorbic acid (50) were adjusted to 1 and 50 mg/kg diet, respectively. This composition showed in Table 2-4.
7. Juvela granule (Eisai Co., Tokyo) which contained 200 mg of DL- α -tocopherol acetate per gram.

Table 2-2 Composition of mineral mixture (macro)¹

	/1kg mixture
KIO ₃	0.014 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.62 g
MnSO ₄ ·5H ₂ O	1.15 g
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	4.16 g
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	4.31 g
Fe(C ₆ H ₅ O ₇)·7H ₂ O	16.64 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100.08 g
NaCl	237.28 g
CaCO ₃	292.63 g
KH ₂ PO ₄	343.12 g

Table 2-3 Composition of mineral mixture (micro)¹

	/100g mixture
Na ₂ SeO ₃	21.90 mg
NH ₄ VO ₃	28.70 mg
Co(CH ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O	42.27 mg
SnSO ₄	95.02 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	126.09 mg
CrCl ₃ ·6H ₂ O	128.11 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	202.50 mg
Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O	208.22 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	220.50 mg
NaF	300.55 mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10,119.10 mg
NaCl	88,507.04 mg

Table 2-4 Composition of vitamin mixture¹

	/1kg mixture
L-Ascorbic acid (V.C)	5,000 mg
Nicotinic acid (Niacin)	3,000 mg
Calcium pantothenate	1,600 mg
Pyridoxine hydrochloride (V.B6)	700 mg
Thiamine hydrochloride (V.B1)	600 mg
Riboflavin (V.B2)	600 mg
Folic acid	200 mg
2-Methyl-1,4-naphtoquinone (V.K3)	100 mg
D-Biotin (V.H)	20 mg
Cyanocobalamine (V.B12)	1 mg
Sucrose ²	to make 1 kg

1. Sucrose 以外は全て和光純薬工業株式会社の試薬を用いた
2. 日本甜菜製糖株式会社

第3章

水溶性食物繊維のリン酸化および in vitro における機能性の検討

3-1 目的

カルシウム吸収を促進する食品成分としては CPP が知られている。CPP は乳タンパク質であるカゼインの消化過程で生成され、分子中のセリンがリン酸化されたホスホセリン残基を含んでいる (43,51) このホスホセリンが数残基でクラスターを形成することによってカルシウムが食品中のリン酸と結合して不溶性塩であるリン酸カルシウムになるのを防ぎ、吸収されやすい状態に保つことが知られている。

一方、近年注目を集めている食品成分として「食物繊維」がある。それまで栄養的価値がほとんどなくカルシウムなどのミネラルの吸収を阻害するものという認識であった。しかし糖尿病や結腸ガンとの関連 (50-55) やミネラル吸収阻害の要因 (16,56-58) が解明されてきた現在、「第六の栄養素」としての認識も広まり、多彩な食物繊維素材が市場に出回っている。

このようなことから、多くの機能性・生理作用を持つ食物繊維にリン酸基を導入し、さらにクラスターを形成させることが出来れば、食物繊維が持つ上記のような機能性にカルシウムの吸収亢進作用を付加した新規食品素材が開発できると考えた。

この研究では、数ある食物繊維素材の中から多くの生理学的効果が報告され当研究室においても多くの知見がある GGH に着目し、これに有機化学的手法を用いてリン酸基を導入することを目的とした。さらに GGH が CPP のようにリン酸カルシウム沈殿の形成阻害作用があるかどうかについて、in vitro でその効果を試験した。

3-2 方法

1) GGH のリン酸化

使用した水溶性食物繊維は GGH である。これは西パキスタン、西インドのインダス河流域の乾燥地帯に生育するマメ科グァー (*Cyamopsis tetragonolobus*) の種子胚乳部から得られる多糖類 (平均分子量 20,000) を、 β -1,4-マンナーゼ (EC 3.3.1.78) で酵素処理し、部分的に加水分解して低分子化・低粘度化したものである (59)。グァーガムの構造式は Fig. 3-1 に示す。

リン酸化の方法は Sung ら (60) の大豆蛋白質のリン酸化を参考にした。

GGH 粉末 10 g を蒸留水に溶解し、全量を 100 ml として 10% (w/v) GGH 水溶液とした。この時冷水には溶解しづらいので、ホモジナイザー (EXCEL-AUTO HOMOGENIZER、日本精機) を用いて温水に溶解した。これを 5 分間沸騰、またはそのまま次の行程に用いた。次に粉末メタリン酸ナトリウム (関東化学) をホモジナイザーを用いて GGH 水溶液に溶解し、3.75、7.5、15、22.5、40% (w/v) 溶液を作成した。この溶液を 45°C または 90°C で 0、1、2、4 または 8 時間攪拌し反応させた。この反応行程中、溶液の pH は 16.7 M 水酸化ナトリウムで 12.5 に合わせた。反応は Fig. 3-2 の様に推測できる。反応終了後、反応溶液を透析分子量 8,000 の透析膜を用いて 24 時間透析して未反応のメタリン酸ナトリウムを除去した。その後、凍結乾燥機で粉末化してリン酸化 GGH (P-GGH) を得た。なお、反応溶液をスケールアップした場合は、透析膜の代わりに循環型限外濾過装置 (透析分子量 10,000、ミリコン・カセットシステム、ミリポア社) を用いた。合成した P-GGH の推定構造式を Fig. 3-3 に示す。

P-GGH のリン酸化度 (リン含有量) は P-GGH を湿式灰化した後、*p*-methylaminophenol 還元法 (61,62) に従った無機リン測定用キット (ホスファ C-

テストワコー；和光純薬工業）を用いて測定した。

2) P-GGHによるリン酸カルシウム沈殿の形成阻害作用

P-GGH、GGH および CPP（生化学用、和光純薬工業）を pH 7 の 20 mM リン酸バッファー 50 ml に 0~100 mg 溶解した。これに最終濃度 5 mM になるように塩化カルシウムを添加し、37°C で 1 時間静置した。この溶液を遠心分離（1,000×g、5 分間）して上清を得、原子吸光分光光度計（Z-6100、日立製作所）で上清中のカルシウム濃度を測定し、沈殿形成阻害率を求めた。

3) P-GGH とカルシウムイオンの会合状態について

・電気伝導度の測定

P-GGH（5 mg）、およびカルシウムのキレート剤であるエチレンジグリコール-ビス（β-アミノエチルエーテル）-N,N,N',N'-四酢酸（EGTA）（63）（20 mg）を蒸留水 50 ml に溶解した。これに最終濃度 0~5 mM になるように塩化カルシウムを添加し、37°C で 1 時間静置した。この溶液を電気伝導度計（Conductivity meter、DS-15、堀場製作所）を用いて測定した。

・イオン濃度の測定

P-GGH、CPP およびグルコース 6 リン酸（G-6-P）を蒸留水 49 ml にそれぞれ 0、10、20、50、100 mg 溶解した。これに最終濃度で 5 mM となるように 0.5 M 塩化カルシウムを 1 ml 添加し、37°C で 1 時間静置した。この溶液をイオン濃度計（Expandable IonAnalyzer EA940、Orion Research, Inc.）を用いて溶液中のカルシウムイオン濃度を測定した。

・ P-GGH の ^{31}P -NMR におけるイオン濃度の効果

P-GGH および CPP の 2.5% 溶液に塩化カルシウムを最終濃度で 1、10 または 100 μM になるように添加し、 37°C で 1 時間静置した。ここから 500 μl を NMR チューブに入れ、NMR 装置 (JNM-270、日本電子) を用いて ^{31}P -NMR を測定した。測定条件は、プロトンノイズデカップリング照射下、109.25 MHz、データポイントは 4096、繰り返し時間 1.773 sec.、温度 23.5°C であった。またケミカルシフト標準は H_3PO_4 溶液を 0.00 ppm とした。

3-3 結果及び考察

リン酸化に対するメタリン酸量の影響

GGH のリン酸化に対するリン酸基ドナーとしてのメタリン酸量の影響と合成された P-GGH のリン酸カルシウム沈殿形成阻害作用 (カルシウムの可溶化作用) を Fig. 3-4 に示した。

添加するメタリン酸の量を増やすことによって導入されるリン酸基の量も増加している。ただし Fig. 3-4 ではわかりづらいがメタリン酸量を GGH 10 g に対して 22.5 g 以上にした場合のリン酸基導入量の増加が鈍くなり、また合成した P-GGH のカルシウム可溶化率の上昇も同様に鈍くなっていた。

リン酸基は、Fig. 3-2 に示したように、おそらく GGH の 6 位にある水酸基と反応しているものと思われるが、2 位や 3 位の水酸基へのエステル化も考えられる。このため反応しうる水酸基が分子内に存在する限り、メタリン酸の量を増やすことによりリン酸基の導入量は上がる。しかし、GGH やメタリン酸の立体構造や分子サイズを考慮に入

れると、添加したメタリン酸量に比例して導入量が増えるわけではないと考えられる。添加量が増えれば増えるほど、その立体障害やイオン反発により、添加したメタリン酸量に占める導入量は減少していくと思われる。このため、メタリン酸添加量の対効果を考えた場合、GGH 1 に対してメタリン酸 1.5 が妥当であると考えられる。

リン酸化に対する反応温度の影響

リン酸化に対する反応温度の影響を Fig.3-5 に示した。

ここではメタリン酸添加前に GGH 溶液を 5 分間沸騰させる処理の有無と、反応温度について検討した。反応温度 45°C で 5 分間沸騰処理を行ったものと同温度で沸騰処理を行わなかったものでは、沸騰処理を取り入れた方が明らかに導入されたリン酸基が多くなっていた。これは沸騰処理により GGH の立体構造が一部デンプンの α 化に相当するような変化を受け、本来分子内部などに存在していた 6 位水酸基などが分子表面に現れ、その結果、メタリン酸と反応する機会が増えたものと推測できる。また、反応温度自体も 45°C より 90°C の方が立体構造をほぐす意味および反応速度の増大において、リン酸基導入に対して有利であると考えられる。そのためリン酸基導入だけを考えるのであれば、より高い温度で反応を行った方が導入量は増えると思われるが、今回はリン酸基を導入しつつ、元来の GGH の性質を可能な限り残したいため、構造変化を最小限にとどめる目的、5 分間沸騰+反応温度 45°C という条件を最適なものとした。

リン酸化に対する反応時間の影響

リン酸基導入量に対しての反応時間の影響については Fig. 3-6 に示した。

反応時間が4時間まではリン酸基の導入が進むが、それ以上は殆ど反応が進んでいなかった。これは前項まで述べているように、メタリン酸の量や反応温度などの条件が一定である限り導入されるリン酸基の量も限界があり、反応時間をいくら長くとっても立体障害等で反応が進まないことを示していると考えられる。

P-GGHによるカルシウムの沈殿形成阻害

P-GGH、GGH および CPP によるリン酸カルシウムの沈殿形成阻害作用を Fig. 3-7 に示した。

この実験に用いた P-GGH の反応条件は GGH 1 に対してメタリン酸 1.5、メタリン酸添加前に 5 分間沸騰させ、反応温度を 45°C、反応時間を 4 時間とした。これにより得た P-GGH の分子内リン含有量は 1.01 mol/kg であった。また CPP の分子内リン含有量は 1.11~1.30 mol/kg であった。Fig. 3-7 を見ると、反応前の GGH は添加量を増やしても可溶性カルシウム量に変化がないのに対して、リン酸基を導入した P-GGH は CPP と変わらないカルシウム塩の沈殿形成阻害能を示していた。CPP に比べると P-GGH は分子内リン含有量がやや低いものにも関わらず同様の性質を示すことから、P-GGH では導入されたリン酸基がカルシウム塩の沈殿形成を防止し得るクラスターを形成しているものと推測できる。これはまた、ピロリン酸やホスホセリン 1 分子ではカルシウム可溶化能を持っていないことから推測できる。P-GGH のリン酸基量と非不溶化カルシウム量のモル比 (Ca^{2+}/Pi) は 2.33~13.11 であり、仮にクラスターとして 3 残基のリン酸基で 1 原子のカルシウムをキレート化しているとするともル比は 6.99~39.33 となり、単純な化学結合等による沈殿形成の阻害とは考えにくい。

P-GGH とカルシウムの相互作用

P-GGH とカルシウムの相互作用について、電気伝導度を Fig. 3-8 に、イオン濃度を Fig. 3-9 に、 ^{31}P -NMR の結果を Fig.3-10 に示した。

Fig. 3-8 を見ると、 CaCl_2 水溶液の電気伝導度が P-GGH や EGTA を添加することにより 0.5~1 mM 分程度値が下がっていることがわかる。電気伝導度は溶液中での遊離のイオンによって左右されるため、カルシウムイオンのキレート剤である EGTA を添加することにより CaCl_2 -EGTA 水溶液の電気伝導度が、キレートされたカルシウムイオンの分だけ下がったのであろう。このことから考えると、同様の挙動を示した P-GGH がカルシウムイオンのキレート剤として働いていることの可能性が示唆される。さらに、Fig. 3-9 において P-GGH 濃度を上昇させるに従い、カルシウムイオン濃度は CPP 同様低下している。イオン濃度計は遊離のイオン濃度（この場合は Ca^{2+} ）を測定しているので、P-GGH を添加することにより遊離のイオンが減少していることがわかる。また、Fig. 3-7 の P-GGH によるカルシウムの沈殿形成阻害率と合わせて考えると、P-GGH によって減少したイオン濃度の分だけカルシウムの非不溶化が起こっていることがわかる。同様の挙動を示す CPP がカルシウムに対してキレート効果を持つことが報告されている (41)。これらより P-GGH のカルシウム沈殿形成阻害能もそのキレート効果による可能性が推測できる。ただ 20 mg の EGTA がキレートするカルシウムと 5 mg の P-GGH 中のリン酸基が非不溶化するカルシウムのモル比 (Ca^{2+} -EGTA/ Ca^{2+} -P-GGH) は 10.82 であり、上記同様リン酸基 3 分子でカルシウムを非不溶化していると仮定するとモル比は 32.45 となり、やはり単純なキレート結合では説明できない。これらの点については

以下の結果から 1 つの可能性が推察できる。

Fig. 3-10 において、CPP、P-GGH とともに添加量を増やすとピーク幅がブロードになり、ついには消失している。内藤ら (14,42) や Kitts と Yuan (43) は CPP によるこのような現象を、分子中のリン酸基と大量の Ca^{2+} が PO_4^{3-} と無関係に非常な速さで結合と解離を繰り返していることによるため、と述べている。これらのことから P-GGH がその導入されたリン酸基によって多数の Ca^{2+} と弱いキレート錯体を形成・解離することによってカルシウムの見かけ上の可溶化を促進し、結果として多量のカルシウムイオンを非不溶化の状態に保つ原因となっているのではないだろうか。

3-4 まとめ

本章では、リン酸基クラスターを分子内に持つ CPP をモデルとして、水溶性食物繊維にリン酸基を導入することにより、カルシウムのリン酸塩沈殿の形成阻害作用を持つ新規物質の合成およびその効果についての検討を目的とした。

結果として、GGH を基本骨格として分子内に 1.01 mol/kg (約 6 残基あたり 1 個) のリン酸基を含み、リン酸カルシウム沈殿の形成阻害作用持つ水溶性食物繊維を得ることに成功した。また、P-GGH の持つカルシウム塩の沈殿形成阻害作用は、導入されたりん酸基がカルシウムイオンとキレート錯体を形成することによりリン酸カルシウムの沈殿となることを防いでいることが推測された。

一方、内藤らは、CPP とカルシウムイオンの結合定数を測定した結果 10^4 M^{-1} 程度であり、二価のキレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の $10^{10\sim 11} \text{ M}^{-1}$ 、あるいはカルシウム結合タンパクであるカルモジュリンの $10^{6\sim 8} \text{ M}^{-1}$ にくらべてはるかに低

く、このような比較的弱いカルシウムイオンの結合性が、リガンドとしての CPP から遊離して輸送系に取り込まれるのに好都合であると述べている (43)。

このため、同じ挙動を示す P-GGH においても今後結合定数を測定することにより、同じようなことが明らかになるかもしれない。

以上より、*in vitro* におけるカルシウム塩の沈殿形成阻害作用が確かめられた合成 P-GGH が、実際、ラットを用いた *in vivo* でカルシウム吸収を亢進する作用を有しているのかについて、次章より検討する。

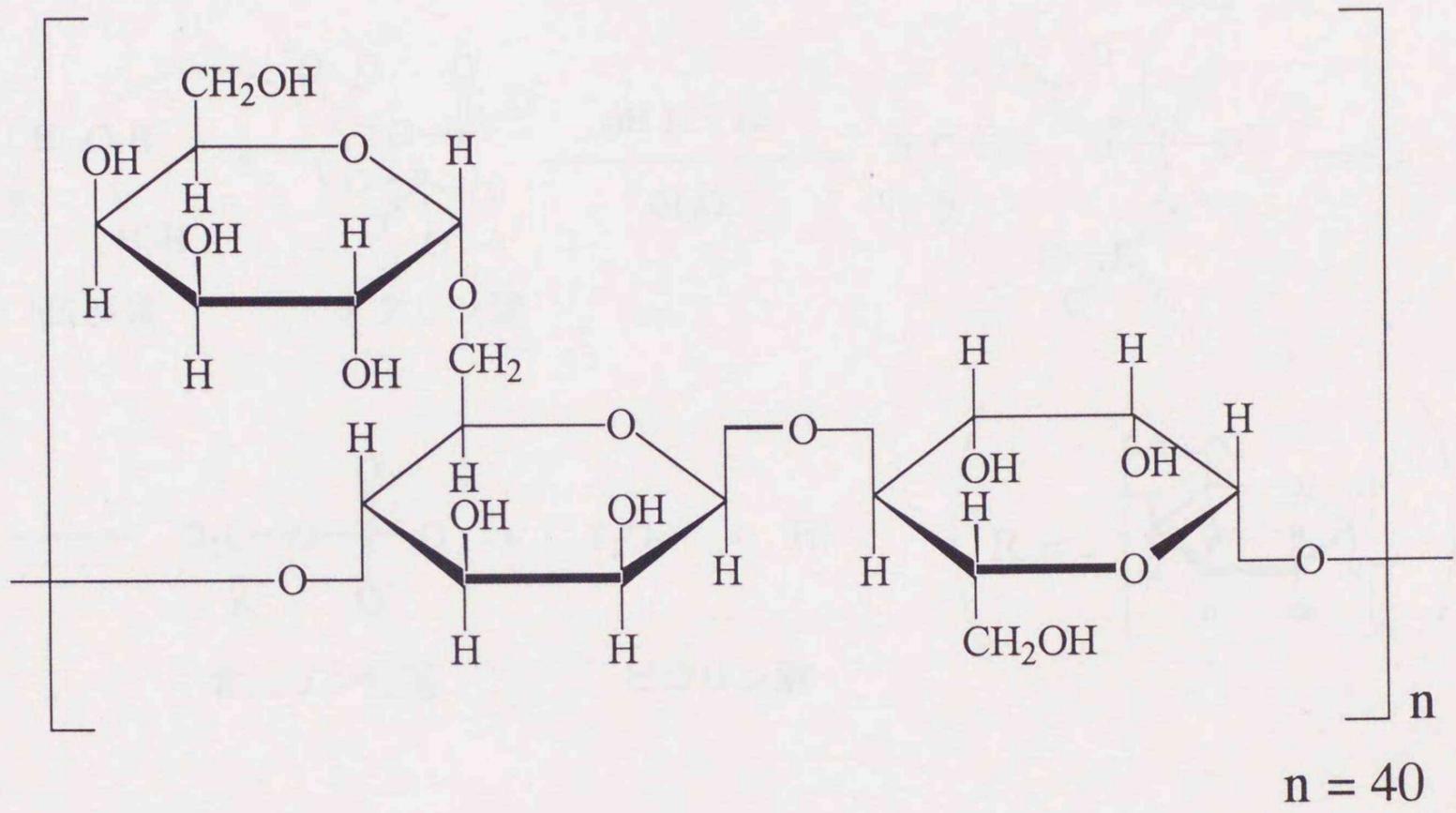


Fig. 3-1 Guar Gum (グアーガム) の部分構造式

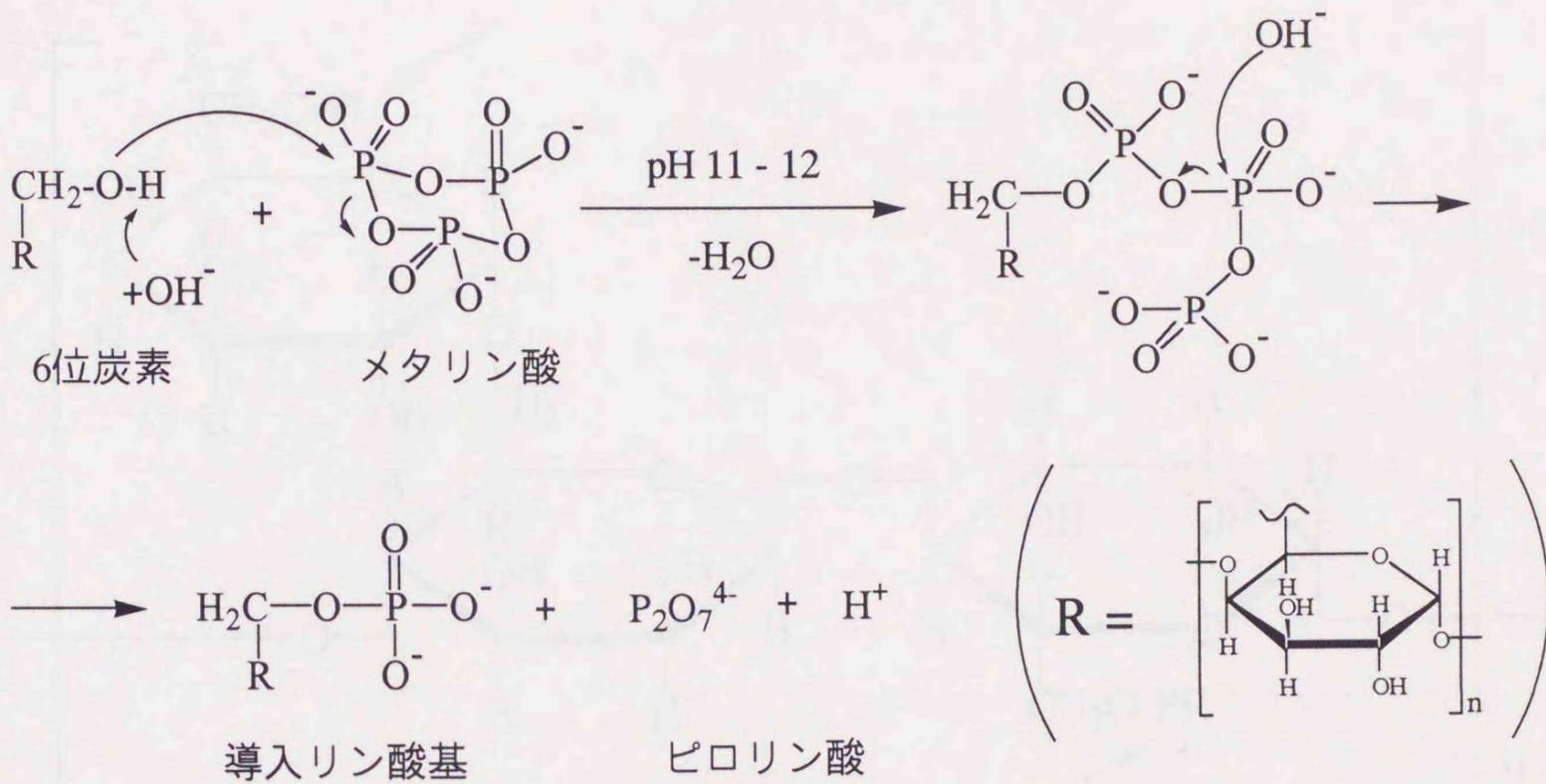


Fig. 3-2 メタリン酸と糖鎖の反応式

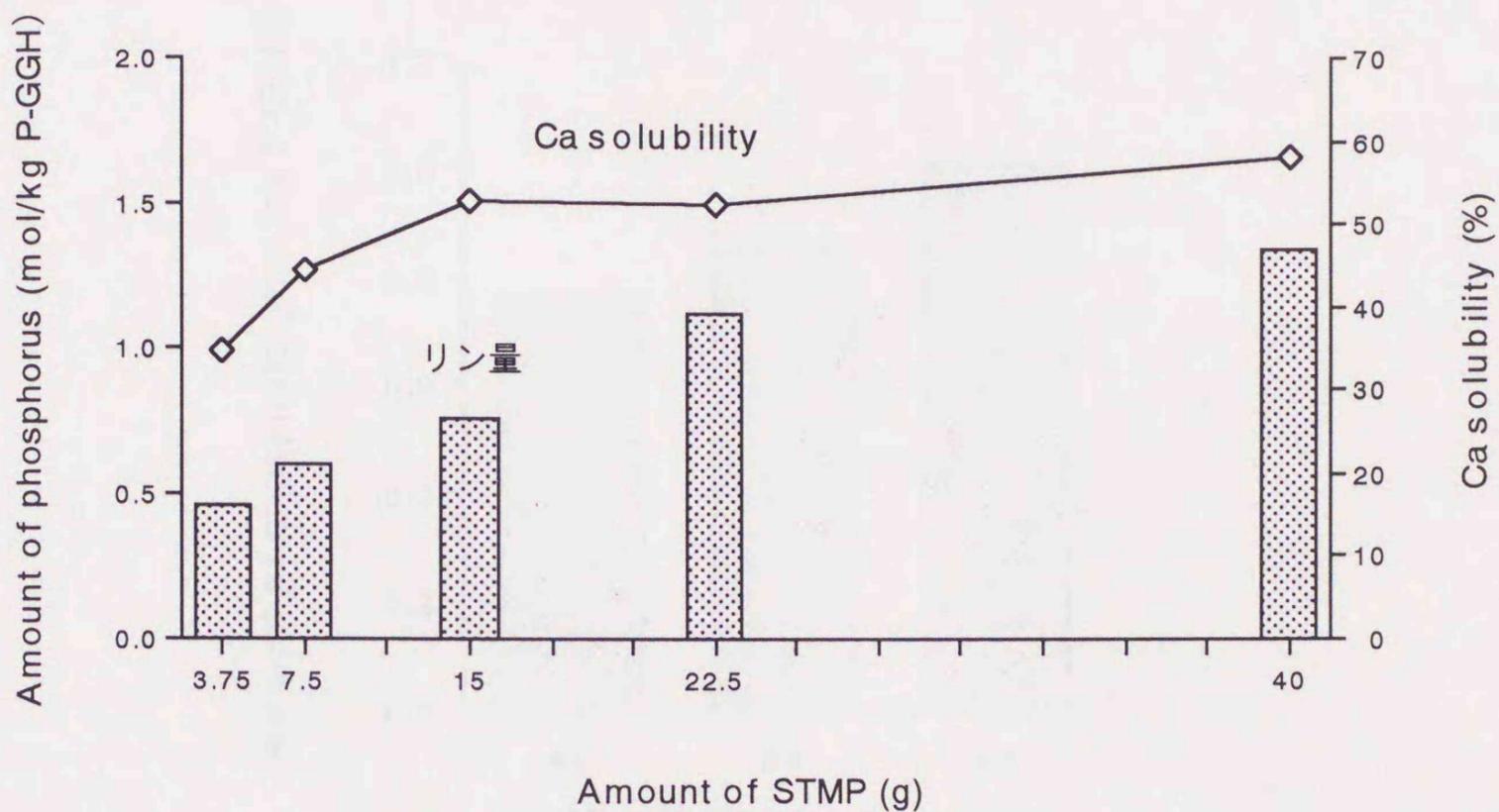


Fig. 3-4 リン酸化に対するメタリン酸の影響

10%GGH 溶液に対してメタリン酸を 3.75、7.5、15、22.5、40%になるように添加したときの分子内導入リン酸量およびそれぞれの反応物のカルシウム可溶化率。メタリン酸量以外の反応条件は、反応温度 45°C、反応時間 4 時間。沈殿形成阻害率は 50 ml のリン酸緩衝液に P-GGH を 10 mg 溶解して、そこに 5 mM (最終濃度) の CaCl₂ を添加し、上清中のカルシウム量を測定。

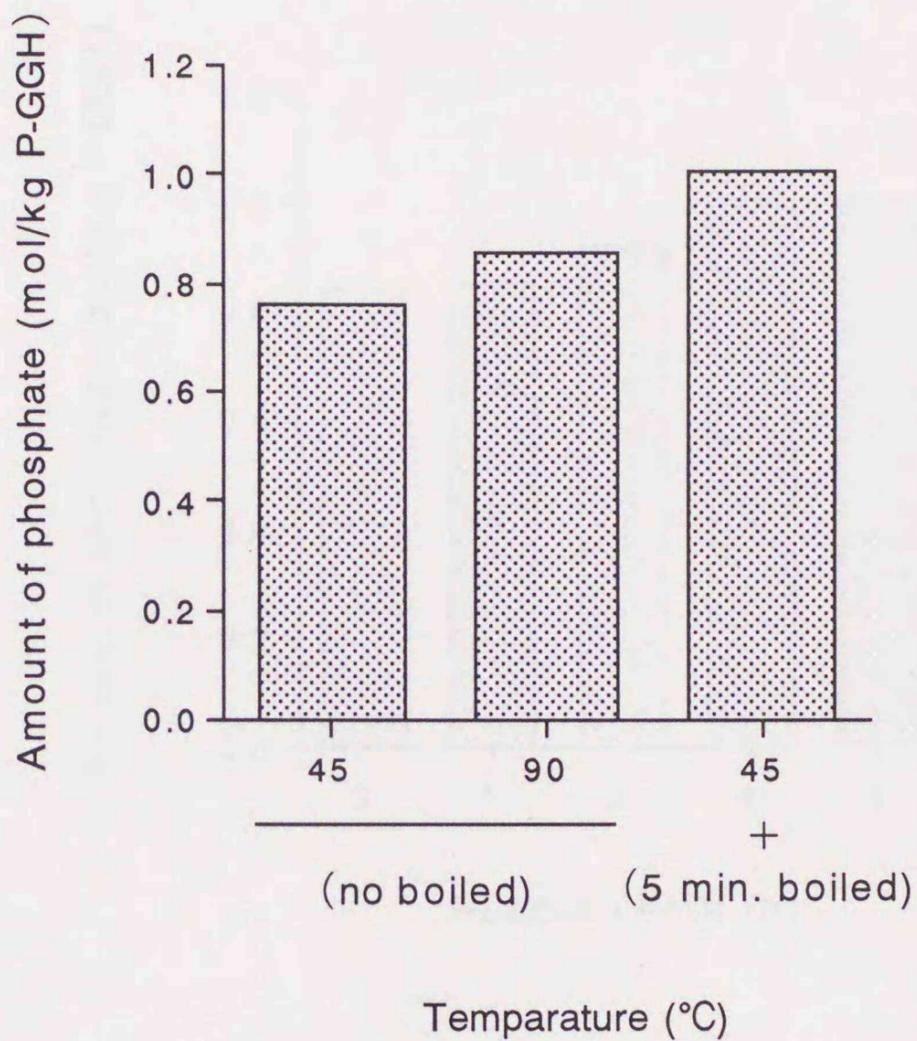


Fig. 3-5 リン酸化に対する反応温度の影響

温度を 45°C (左)、90°C (左)、および反応液を 5 分間沸騰させた後 45°C で反応させたときの分子内導入リン酸量。温度以外の反応条件は、メタリン酸量は GGH 10 g に対して 15 g、反応時間は 4 時間。

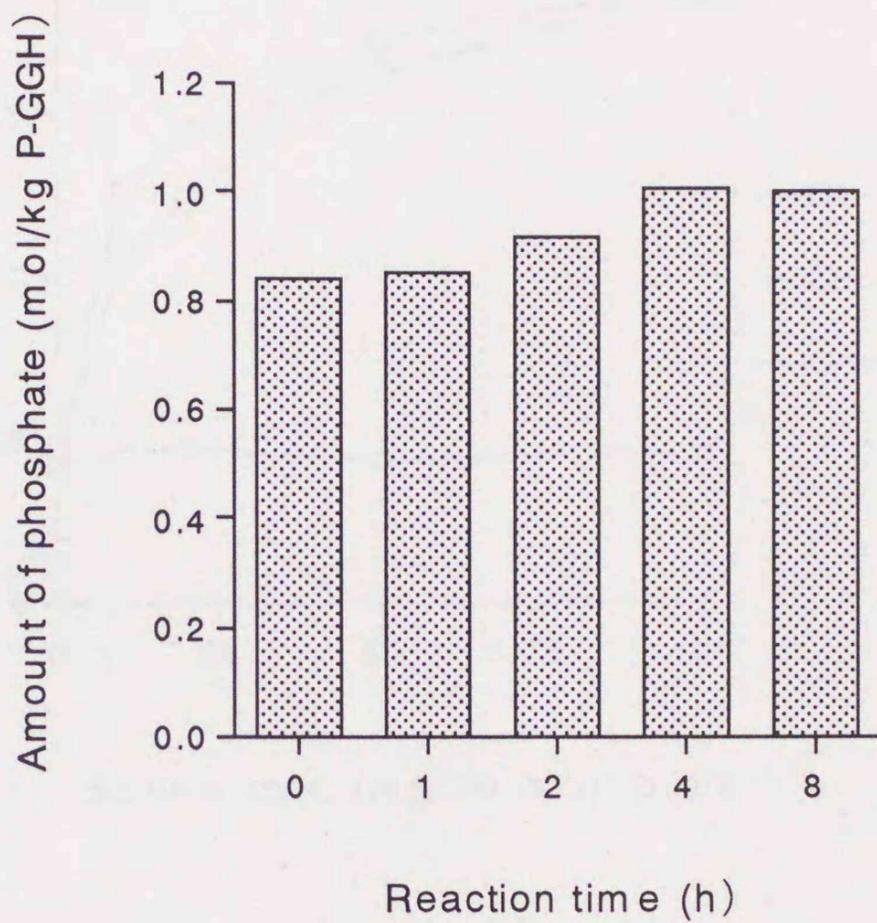


Fig. 3-6 リン酸化に対する反応時間の影響

反応時間を 0、1、2、4、8 時間としたときの分子内導入リン酸量。時間以外の反応条件はメタリン酸量は GGH 10 g に対して 15 g、反応温度は 5 分間沸騰させた後 45°C で反応させた。

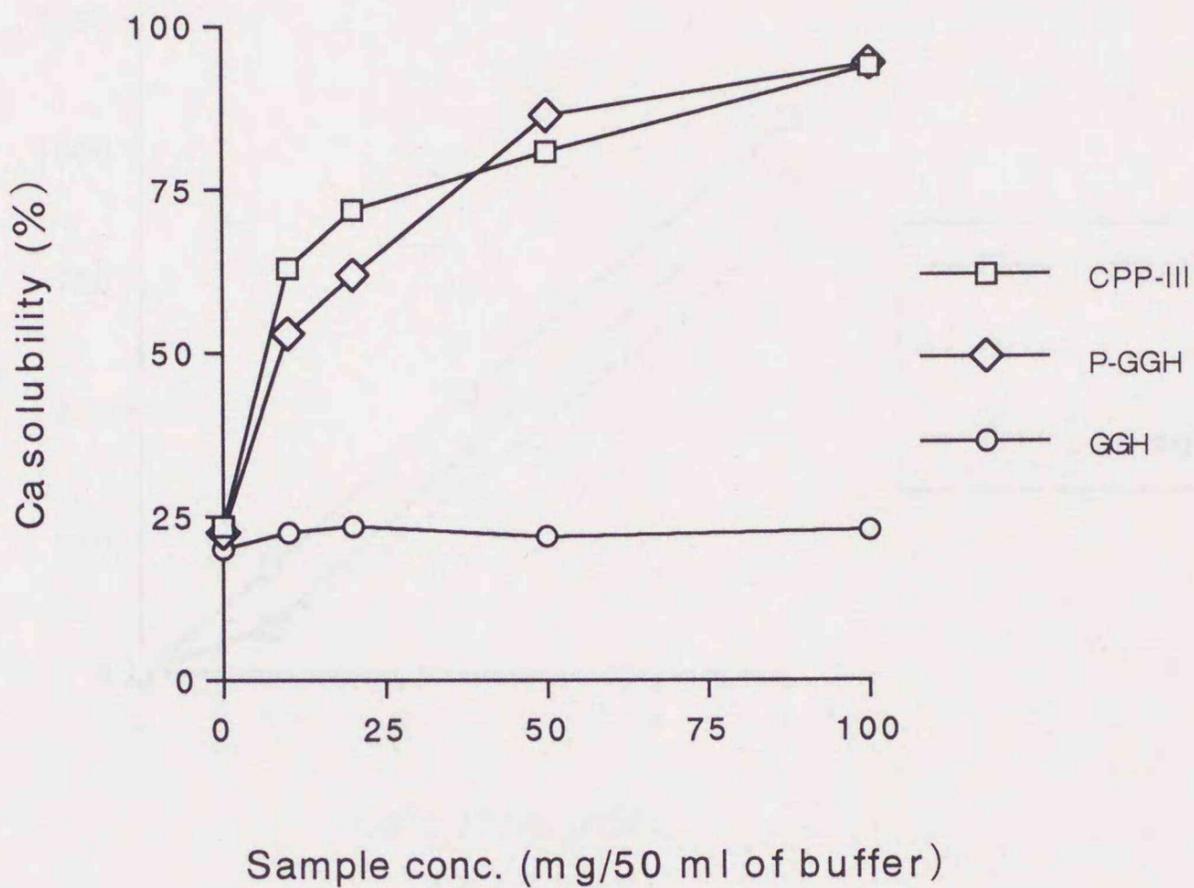


Fig. 3-7 GGH、P-GGH、CPP のカルシウム可溶化に対する影響

50 ml の 20 mM リン酸緩衝液に試料を 0、10、20、50、100 mg 溶解し、そこに最終濃度で 5 mM となるように CaCl_2 水溶液を添加。37°C、1 時間静置したのち、遠心分離で得た上清を原子吸光法で上清中のカルシウム量を測定。

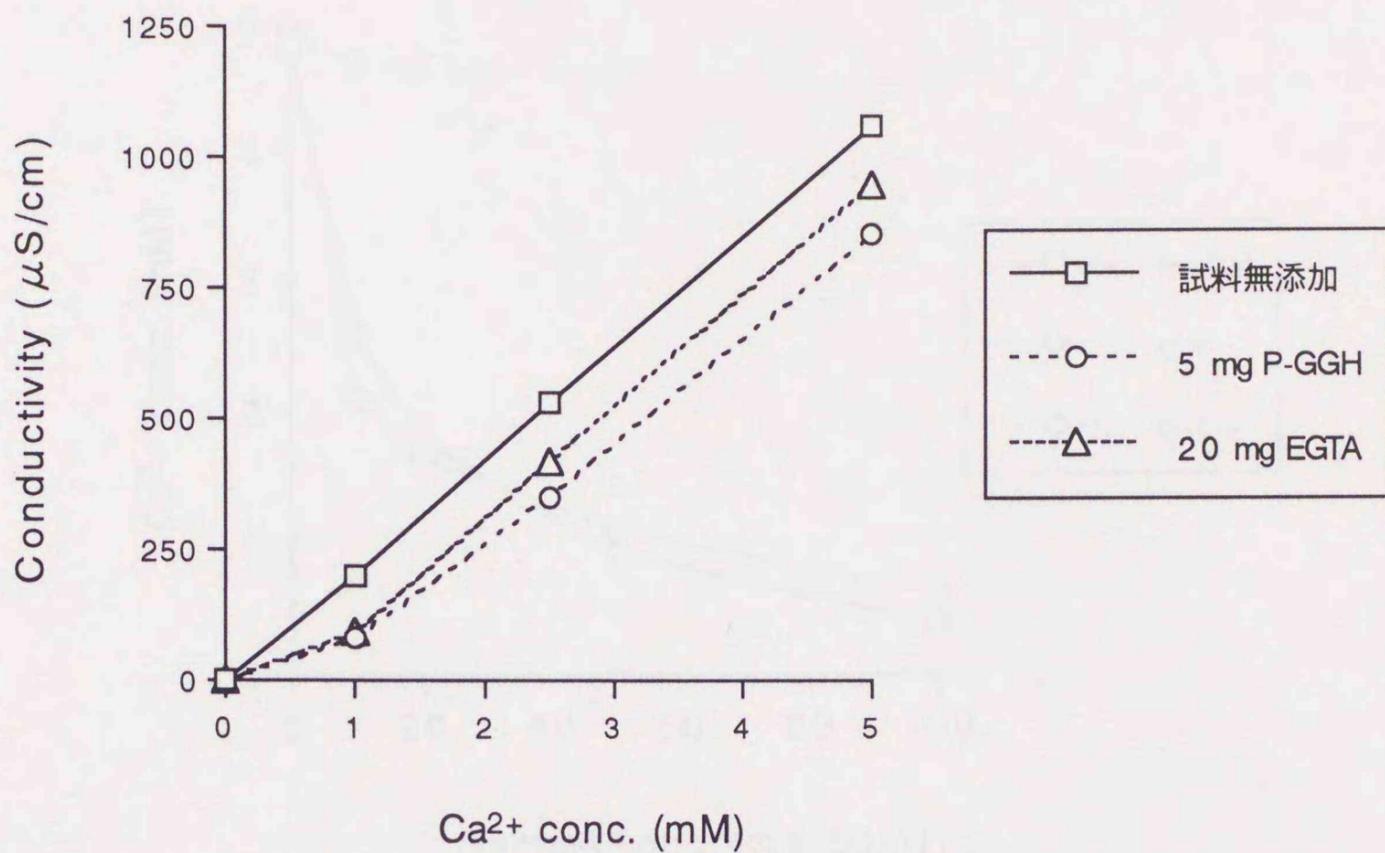


Fig. 3-8 CaCl₂ 水溶液の電気伝導度

5 mg の P-GGH および 20 mg の EGTA を 50 ml の蒸留水に溶解し、これに 5 mM (最終濃度) の CaCl₂ を添加。これを 37°C、1 時間で静置後、電気伝導度を測定。

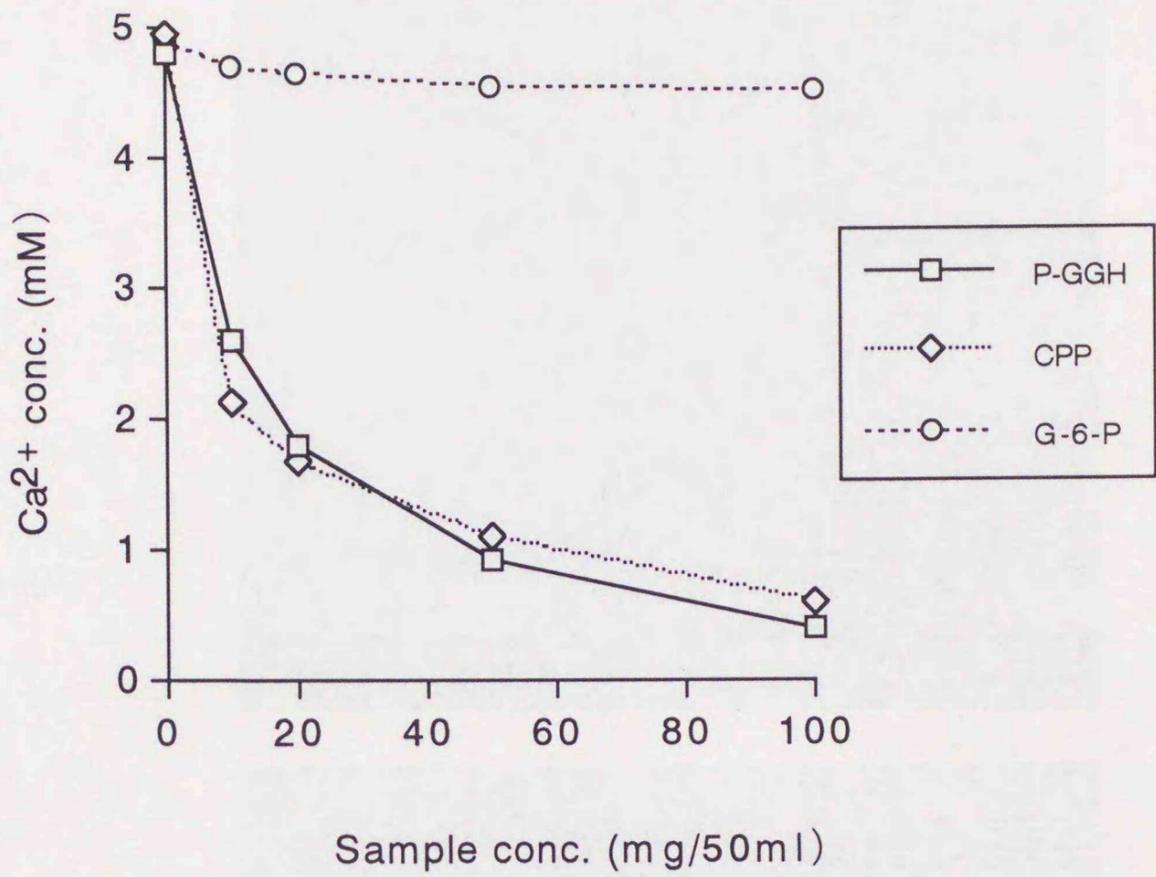
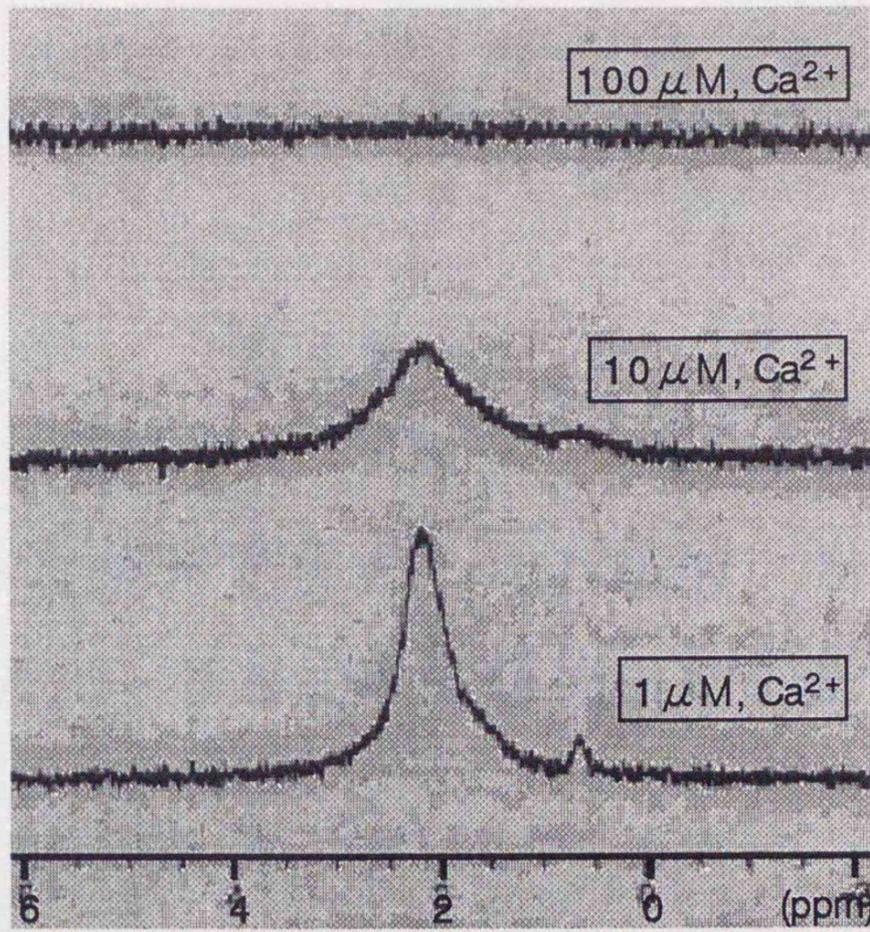


Fig. 3-9 CaCl₂ 溶液の Ca²⁺ イオン濃度に対する試料濃度の影響

CPP 2.5 %



P-GGH 2.5 %

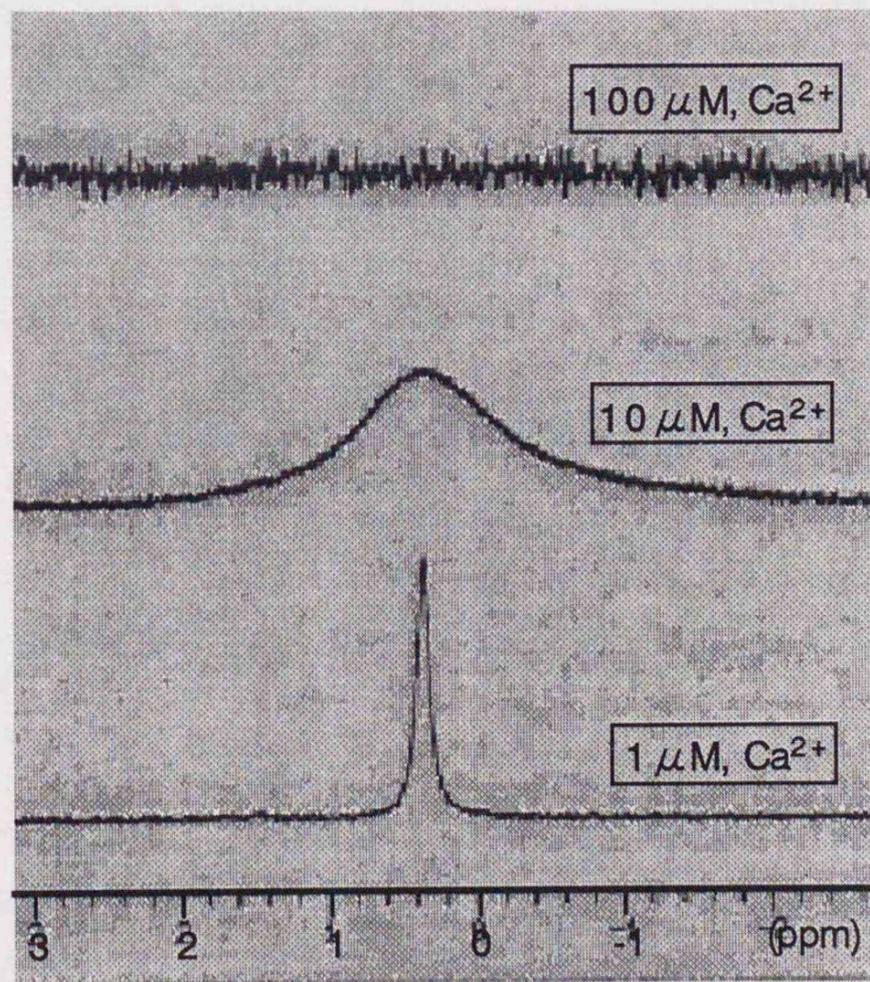


Fig. 3-10 CPP および P-GGH の ^{31}P -NMR スペクトルにおける Ca^{2+} の濃度効果

第4章

過週齡ラットにおけるカルシウム吸収に対する リン酸化グアーガム加水分解物摂取の影響

4-1 目的

第3章で合成した P-GGH は in vitro において CPP 同様の機能性を発現する事を確かめた。しかし in vitro でカルシウムの吸収亢進作用を示し、リン酸カルシウムの沈殿形成阻害作用が認められても in vivo では統計的有意差を示さなかったリン酸化糖についての報告も幾つかある (10,64)。そこで in vivo での効果を検討するため P-GGH とその合成基質となった GGH をそれぞれ食餌中に添加して、ラットにおけるカルシウム吸収への影響を調べた。

4-2 方法

1) 実験動物: SD 系雄ラット (9 週齢、初期体重 300 g 前後) を 18 匹用いた。

2) 試験飼料、およびスケジュール

7 日間、標準飼料で予備飼育後、体重により 6 匹×3 群に群分けし、以下の試験飼料で 14 日間飼育後、屠殺した。

・コントロール食 (無繊維食)	Control Group
・グァーガム分解物 5% 添加食	GGH Group
・リン酸化グァーガム分解物 5% 添加食	P-GGH Group

試験飼料の組成は、Table 4-1 に記載した。

試験飼料中のカルシウムレベルは 0.45% (4.5 g/kg diet) とした。食物繊維の添加は 5% (50 g/kg diet) とし、またカルシウムの出納試験を行うにあたり、水溶性食物繊維の摂取によるラットの下痢を防止するために結晶セルロースを試験飼料 1 kg あたり 50 g (5%) 添加した。

実験スケジュールは、Fig.4-1 に記載した。

- ・ 試験飼育開始後、5-7 および 12-14 日目を出納期間とし、採糞を行った。
- ・ 14 日目に屠殺し、腹部大動脈血、肝臓、腎臓、回腸・盲腸・結腸内容物、左右大腿骨を採取した。

3) 分析項目

血液はカルシウム濃度を、糞、右大腿骨はカルシウム量の測定に用いた。左大腿骨は骨強度測定に用い、回腸、盲腸、結腸内容物は、総カルシウム量、可溶性カルシウム量、短鎖脂肪酸量、pH の測定に用いた。腎臓と肝臓は重量を測定した。

4-3 結果及び考察

ラットの体重、摂食量などについて

ラットの体重、摂食量、肝臓重量、腎臓重量を Table 4-2 に示した。またラット体重の経日変化を Fig. 4-2 に示した。

Fig.4-2 に示すとおり、すべての群のラットは順調に成長した。群間の初期体重、最終体重に統計的有意差はなく、試験期間の摂食量も群間に統計的有意差はなかった (Table 4-2)。さらに肝臓重量、腎臓重量においても群間での統計的有意差は認められなかった。以上の結果より、P-GGH はラットの成長に対して影響を与えないことが確かめられた。

出納試験期間の糞重量

出納試験期間採取した糞重量を Table 4-3 に示した。1st period、2nd period 両方にお

いて Control 群と比較して GGH 摂取群で糞重量が高値を示し、特に 2nd period においては有意に高値を示していた。また P-GGH 摂取群では Control 群と比較して有意差はなかったが、飼育期間が進むに従って糞重量が増加していた。

消化管（小腸）において酵素で分解されず、結果として吸収されない食物繊維を摂取した場合、糞重量が増加するという事実は過去に報告されており（65）、また摂取した食物繊維の大腸（盲腸）での発酵性によって糞排泄量は左右されると思われる。今回得られた P-GGH において GGH と比較して糞重量が低値を示したことは、GGH にリン酸基を導入したことによって構造が変化し、盲腸発酵の過程に時間がかかるようになり有意差はないがわずかに低下した摂食量と相まって、今回のような結果になったのかもしれない。

見かけのカルシウム吸収率

出納試験における見かけのカルシウム吸収率を Fig.4-3 に示した。

1st period では、Control 群と GGH 群に対して P-GGH 群において有意に高値を示した。GGH などの発酵性の高い水溶性食物繊維を摂取することによってカルシウム吸収が上昇することはすでに報告されている（66,67）が、今回の実験では Control 群との間に有意差は出なかった。これは実験に用いたラットの週齢と関係があるのかもしれない。今回 P-GGH が GGH より高いカルシウム吸収亢進作用を示したことは、GGH の持つ高発酵性に加え、第3章で確かめられた P-GGH の *in vitro* におけるリン酸カルシウム沈殿形成阻害能が *in vivo* でも効果を失わずに腸管内でカルシウムを吸収しやすい状態で保っていたため、摂取したカルシウムを効率よく吸収できたのではないかと考えら

れる。しかしながら、2nd period での見かけのカルシウム吸収は3つの群間において有意差は認められなかった。これはおそらく P-GGH の摂取により消化管内の可溶性カルシウム量が増加し、1st period において生体必要量と比べて過剰のカルシウム吸収が起こった結果、2nd period の吸収機構においてダウンレギュレーションが起こり、結果としてカルシウムの吸収量が減少し、群間での差が消失したと考えられる。これは Control 群や GGH 群と比較して P-GGH を摂取した群の消化管内（回腸内）でのカルシウム非不溶化率が高いにも関わらず、2nd period での見かけのカルシウム吸収が群間において有意差がないことから推測できる（Table 4-4）。

血漿中のカルシウム濃度

血漿中のカルシウム濃度を Fig.4-4 に示した。

血漿中のカルシウム濃度は様々なカルシウム調節ホルモンの働きによって非常に厳密に恒常性が維持されており（約 10 mg/dl）（68）、多少のカルシウム吸収の増減では変動はしない。つまりホルモンバランスの異常などが起こらない限り、例えば本実験のような条件下では変化は観察されないと思われる。実際、実験結果における群間の有意差は認められなかった。

大腿骨中のカルシウム量および大腿骨強度

右大腿骨中のカルシウム量を Fig.4-5 に、また左大腿骨強度を Fig.4-6 に示した。

カルシウム量は Control 群や GGH 群に比べて P-GGH 群において有意に高くなった。

これは骨中カルシウム量が体内のカルシウムの 99% を占めることから、出納試験の 1st

period においてカルシウム吸収が上昇した結果、P-GGH 群の骨中にカルシウムがより多く蓄積されたためであると考えられる。

骨強度については、GGH 群と P-GGH 群において Control 群と比較して高値な傾向を示しているが、群間に有意差は出なかった。

各消化管中のカルシウム動態

回腸、盲腸、結腸内容物中の総カルシウム量、可溶性カルシウム量およびカルシウムの非不溶化率を Table 4-4 に示した。

回腸内容物中の可溶性カルシウム量とカルシウムの非不溶化率を見ると、Control 群や GGH 群と比較して P-GGH 群において有意に高値を示した。カルシウムの吸収を亢進する物質として知られている CPP は、回腸での非不溶性カルシウム量を増加させる結果、腸管でのカルシウム吸収を亢進することが報告されている (69)。P-GGH を与えたラットにおいてカルシウム吸収が亢進されたことも CPP の場合と同じく、P-GGH の分子中のリン酸基の影響によるものと考えられる。CPP は消化酵素による分解をほとんど受けなため小腸内で生成した CPP は小腸下部に蓄積し、これがカルシウムを腸内で吸収されやすい可溶性状態に保っていると考えられている。同じように P-GGH も小腸における消化酵素の影響を受けない食物繊維であるために P-GGH は消化管内においてもカルシウム塩の沈殿形成阻害能をより強く保持しているものと考えられる。

各消化管壁と内容物重量および pH

回腸、盲腸および結腸それぞれの壁重量、内容物重量および内容物の pH を Table 4-

5 と 4-6 に示した。

壁重量は盲腸において GGH 群、P-GGH 群で Control 群より有意に高値を示したが、回腸、結腸においては有意差は無かった。内容物重量は回腸、盲腸および結腸の全てにおいて P-GGH 群で Control 群と比べて有意に高値を示し、GGH 群においても盲腸で高値を示した。

GGH や P-GGH のような水溶性食物繊維を摂取した場合に消化管内容物の重量が増加することは、糞重量の増加と同じように考えることができる。今回は P-GGH 群と Control 群において糞重量では有意差が見られなかったが内容物重量では有意に P-GGH 群で高かった。これはおそらく P-GGH が高発酵性を有しながら、その発酵過程に時間がかかるとい性質であるため、消化管内での滞留時間が長くなり、結果として糞重量が少ないのに内容物重量が多いという結果になったのではないだろうか。盲腸壁の重量の増加は内容物の増加と、次項で述べる短鎖脂肪酸の作用であると考えられる。短鎖脂肪酸は盲腸粘膜細胞の増殖を亢進することが報告されており (70)、本実験においても高発酵性の GGH と P-GGH の摂取により短鎖脂肪酸の生成が大きく増加していたことがわかっている。また、酸の生成の結果、特に盲腸内容物の pH が Control 群と比較して GGH 群や P-GGH 群において有意に低くなっていた。さらに導入したリン酸基の存在自体により P-GGH は GGH より酸性を示すことも確認された (pH7 の 20 mM リン酸緩衝液 50 ml に GGH または P-GGH を 100 mg 溶解したときの pH はそれぞれ 7.00 と 6.61 であった)。

幾つかの報告 (39,71) にも見られるように、このような盲腸の重量増加に伴う吸収面積の増加が、P-GGH によるカルシウムの吸収を亢進する一つの原因になっている可

能性も考えられる。

盲腸および結腸内の有機酸濃度

盲腸および結腸内の有機酸濃度を Table 4-7 に示した。

盲腸内容物中の有機酸濃度を見ると、GGH 群は Control 群と比べて測定したすべての物質で有意に高値を示した。P-GGH 群では Control 群と比べてプロピオン酸とコハク酸の生成量が高値を示し、GGH 群ほどではないにしても短鎖脂肪酸を含めた有機酸の生成は有意に高値を示した。これらの結果から P-GGH が GGH には劣るものの高い発酵性を有していることがわかる。

水溶性食物繊維の持つ作用（機能性）は、その発酵産物であるところの短鎖脂肪酸を含む有機酸の作用に負うところがある。カルシウムの吸収促進効果に関しても盲腸重量の増加による吸収面積の拡大（前述）のほか、短鎖脂肪酸を含む有機酸の生成による盲腸内の酸性化とそれに伴うカルシウムの非不溶化があげられる。消化管内のカルシウムはその大部分が不溶性の塩を形成しておりそのままでは吸収されることは難しいが、カルシウムが非不溶化されることにより吸収が亢進される。

しかし今回の実験では P-GGH より発酵性が高い GGH を摂取させた群においてカルシウムの吸収亢進は認められなかった。これは P-GGH によるカルシウムの非不溶化部位が回腸であったのに対し、GGH の発酵によるカルシウムの非不溶化部位が盲腸であったことが関係しているのかもしれない。また GGH と比較して発酵性で劣る P-GGH の内容物の pH が GGH の値と殆ど変わらないのは、劣っている分 P-GGH 自体の酸性多糖として性質が影響していると考えられる。

4-4 まとめ

本章では、成長期を過ぎて成体となった過週齢ラットを用いて P-GGH がカルシウムの吸収を亢進するかについて検討した。

その結果、P-GGH を摂取させた群において Control 群や GGH 群と比較してカルシウムの吸収が亢進した。しかし発酵性の高い GGH 群において Control 群との間で有意差が無かった。水溶性食物繊維の発酵産物である短鎖脂肪酸（を含む有機酸）がカルシウム吸収に対して影響を与えないということは考えにくいので、成長期の若齢ラットと比較して過週齢ラットでは消化管下部（盲腸）でのカルシウム吸収に影響が出にくいのではないだろうか。

それに対して P-GGH は GGH と同様な盲腸発酵も行われるが、それよりも導入されたリン酸基クラスターによる小腸下部でのカルシウムの非不溶化が、CPP 同様、カルシウム吸収に大きな影響を与えているのではないだろうか。

この点を明らかにするために、次の実験ではカルシウム要求性の高い若齢のラットを用いることや P-GGH を与えることに対する盲腸発酵の影響を盲腸切除ラットを用いて実験することにより P-GGH の機能をさらに検討した。

Table 4-1. 試験飼料の組成 (/kg diet)

	Control diet	GGH diet	P-GGH diet
Casein	237.5 g	225.0 g	225.0 g
Sucrose	612.7 g	580.5 g	580.5 g
Corn oil	47.5 g	45.0 g	45.0 g
Mineral mixture, Macro	36.1 g	34.2 g	34.2 g
Mineral mixture, Micro	1.9 g	1.8 g	1.8 g
Vitamin mixture	9.5 g	9.0 g	9.0 g
Vitamin E granule	0.9 g	0.9 g	0.9 g
Choline bitartrate	3.8 g	3.6 g	3.6 g
Cellulose ¹	50.1 g	50.0 g	50.0 g
GGH	—	50.0 g	—
P-GGH	—	—	50.0 g

1 : 結晶セルロース (アビセルPH102 ; 旭化成工業株式会社)
 特に注釈のないものは、第2章の記載を参照のこと。

Table 4-2. 飼育に伴う各種重量

	No. of rats	Initial Body Weight	Final Body Weight	Food Intake
	n	g	g	g / 14 days
Control	6	337.0 ± 4.8	387.6 ± 8.2	293.3 ± 12.1
GGH	6	337.7 ± 5.0	385.6 ± 10.7	300.7 ± 15.8
P-GGH	6	336.4 ± 7.6	381.4 ± 8.4	281.0 ± 9.4
ANOVA P value		NS	NS	NS

	No. of rats	Liver Weight	Kidney Weight
	n	g	g
Control	6	16.87 ± 0.34	2.75 ± 0.08
GGH	6	16.49 ± 0.65	2.81 ± 0.05
P-GGH	6	15.36 ± 0.55	2.62 ± 0.06
ANOVA P value		NS	NS

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

NS: no significant difference between any values.

Table 4-3. 出納試験期間の摂食量および糞乾燥重量

	Food Intake for Balance Periods		
	No. of rats	1st Period	2nd Period
	n	g / 3days	g / 3days
Control	6	21.4 ± 0.7	19.40 ± 0.7 b
GGH	6	20.7 ± 0.7	21.80 ± 0.7 a
P-GGH	6	20.3 ± 0.6	18.90 ± 0.5 b
ANOVA <i>P</i> value		N.S.	<i>P</i> = 0.011

	Feces Dry Weight		
	No. of rats	1st Period	2nd Period
	n	g / 3days	g / 3days
Control	6	4.47 ± 0.36 ab	4.02 ± 0.26 b
GGH	6	4.75 ± 0.26 a	5.20 ± 0.23 a
P-GGH	6	3.84 ± 0.19 b	4.40 ± 0.21 b
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> = 0.094	<i>P</i> = 0.009

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 4-4. 消化管内容物中の可溶性、総カルシウム量およびカルシウム可溶化率

	No. of rats n	Soluble Ca ($\mu\text{mol/g}$ of contents)	Total Ca ($\mu\text{mol/g}$ of contents)	Ca solubility (%)
Ileum				
Control	6	54.0 \pm 9.2 b	262.2 \pm 48.8	21.2 \pm 1.8 b
GGH	6	52.7 \pm 5.0 b	204.7 \pm 20.8	26.4 \pm 2.1 b
P-GGH	6	87.4 \pm 11.6 a	231.7 \pm 10.6	37.4 \pm 4.1 a
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> = 0.025	NS	<i>P</i> = 0.003
Cecum				
Control	6	24.6 \pm 3.1 ab	190.3 \pm 9.1 a	12.8 \pm 1.2 b
GGH	6	44.6 \pm 10.6 a	172.7 \pm 19.5 ab	26.8 \pm 7.4 a
P-GGH	6	7.0 \pm 0.9 b	147.7 \pm 5.7 b	4.7 \pm 0.7 b
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> = 0.003	<i>P</i> = 0.094	<i>P</i> = 0.009
Colon				
Control	6	152.9 \pm 37.6 a	555.3 \pm 125.7 a	29.0 \pm 3.6 a
GGH	6	35.2 \pm 6.9 b	193.6 \pm 39.8 b	19.7 \pm 4.1 a
P-GGH	6	10.7 \pm 1.6 b	137.0 \pm 25.0 b	8.8 \pm 1.6 b
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.003	<i>P</i> = 0.002

Values are means \pm standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 4-5. 消化管内容物のpH

	No. of rats	ileum	cecum	colon
Control	6	6.49 ± 0.16 ab	6.36 ± 0.06 a	6.49 ± 0.07 a
GGH	6	6.61 ± 0.06 a	5.51 ± 0.08 b	6.09 ± 0.08 b
P-GGH	6	6.29 ± 0.09 b	5.46 ± 0.13 b	5.83 ± 0.06 c
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> = 0.154	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 4-6. 各消化管壁および消化管内容物重量

	No. of rats	Wall weight						
		ileum		cecum		colon		
		n	g	g	g	g	g	
Control	6	0.698	± 0.049	1.306	± 0.067	b	0.836	± 0.037
GGH	6	0.693	± 0.063	1.939	± 0.149	a	0.924	± 0.027
P-GGH	6	0.677	± 0.069	2.077	± 0.138	a	0.897	± 0.018
ANOVA <i>P</i> value		NS		<i>P</i> = 0.001		NS		

	No. of rats	Contents weight								
		ileum		cecum		colon				
		n	g	g	g	g	g			
Control	6	0.16	± 0.04	b	2.29	± 0.07	c	0.67	± 0.13	b
GGH	6	0.25	± 0.03	ab	4.59	± 0.55	b	1.08	± 0.14	ab
P-GGH	6	0.32	± 0.05	a	8.60	± 0.79	a	1.49	± 0.35	a
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> = 0.038		<i>P</i> < 0.001		<i>P</i> = 0.068				

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 4-7. 盲腸および結腸内容物中の有機酸量

No. of rats	Control n = 6	GGH n = 6	P-GGH n = 6	<i>P</i>
Cecum				
Amount (μmol / contents)				
Acetate	72.9 \pm 9.6 b	133 \pm 17 a	85.8 \pm 10.3 b	0.012
Propionate	21.8 \pm 2.6 b	99.6 \pm 23.1 a	99.9 \pm 19.5 a	0.009
Butyrate	9.26 \pm 1.45 b	34.5 \pm 7.5 a	3.20 \pm 1.55 b	< 0.001
Isovalerate	0.84 \pm 0.21 b	1.96 \pm 0.50 a	0.39 \pm 0.26 b	0.017
Total SCFA	105 \pm 13 b	269 \pm 41 a	189 \pm 28 ab	0.005
Lactate	0.00 \pm 0.00	3.47 \pm 0.92	7.97 \pm 5.75	0.274
Succinate	1.23 \pm 0.22 b	81.9 \pm 21.4 a	53.9 \pm 20.8 a	0.015
Colon				
Amount (μmol / contents)				
Acetate	11.9 \pm 3.1 ab	16.6 \pm 2.1 a	6.08 \pm 1.70 b	0.023
Propionate	2.19 \pm 0.50 b	14.1 \pm 2.8 a	7.30 \pm 2.37 b	0.005
Butyrate	1.45 \pm 0.41 a	3.14 \pm 0.64 a	0.16 \pm 0.10 b	< 0.001
Isovalerate	0.02 \pm 0.02	0.26 \pm 0.18	0.00 \pm 0.00	0.157
Total SCFA	15.6 \pm 4.0 b	34.1 \pm 5.2 a	13.5 \pm 4.1 b	0.010
Lactate	0.00 \pm 0.00	0.48 \pm 0.26	0.86 \pm 0.63	0.332
Succinate	0.70 \pm 0.34 b	11.1 \pm 8.3 a	4.32 \pm 4.03 ab	0.399

Each value is the mean \pm SE. Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

Total SCFA is the sum of acetate, propionate, butyrate, and isovalerate.

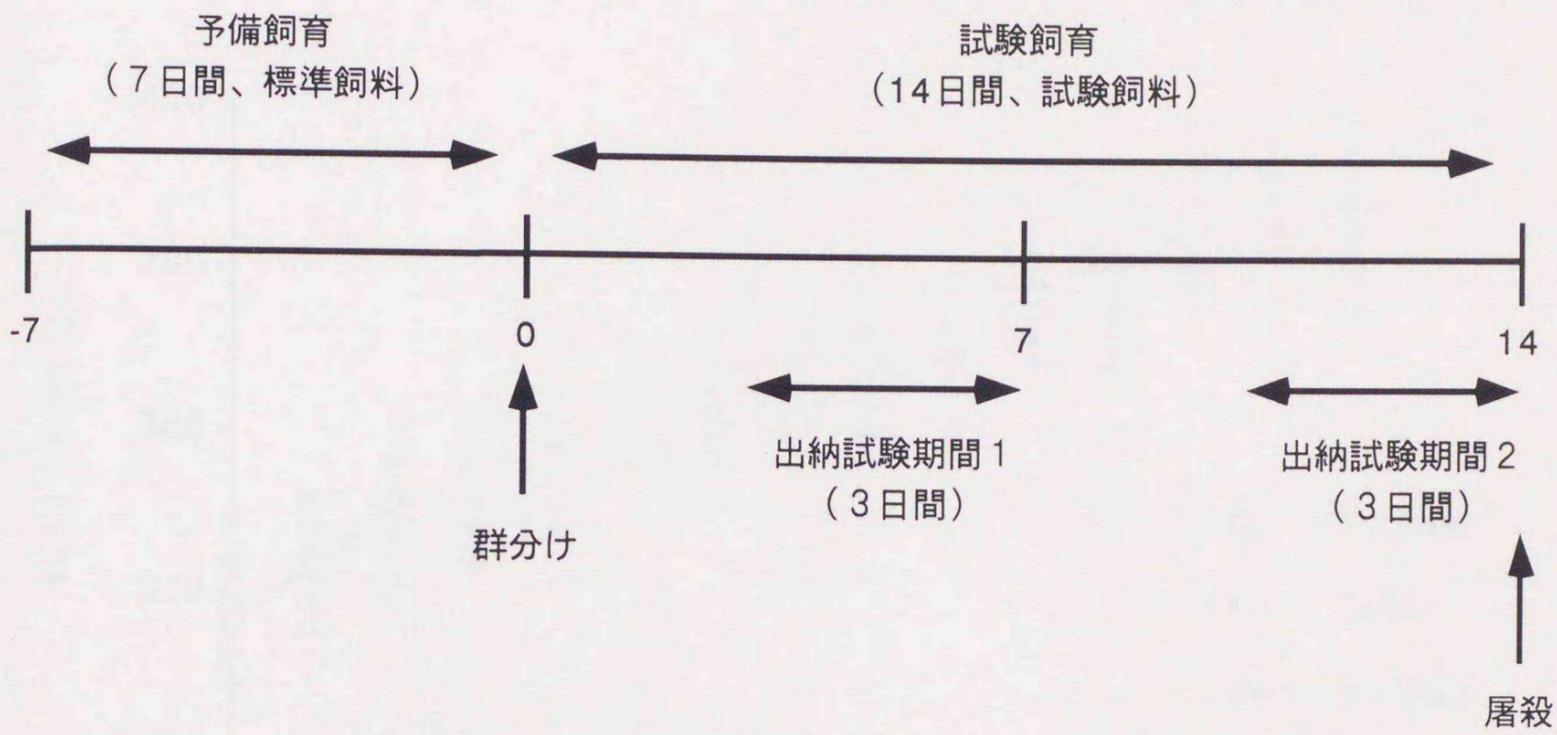


Fig.4-1 実験スケジュール

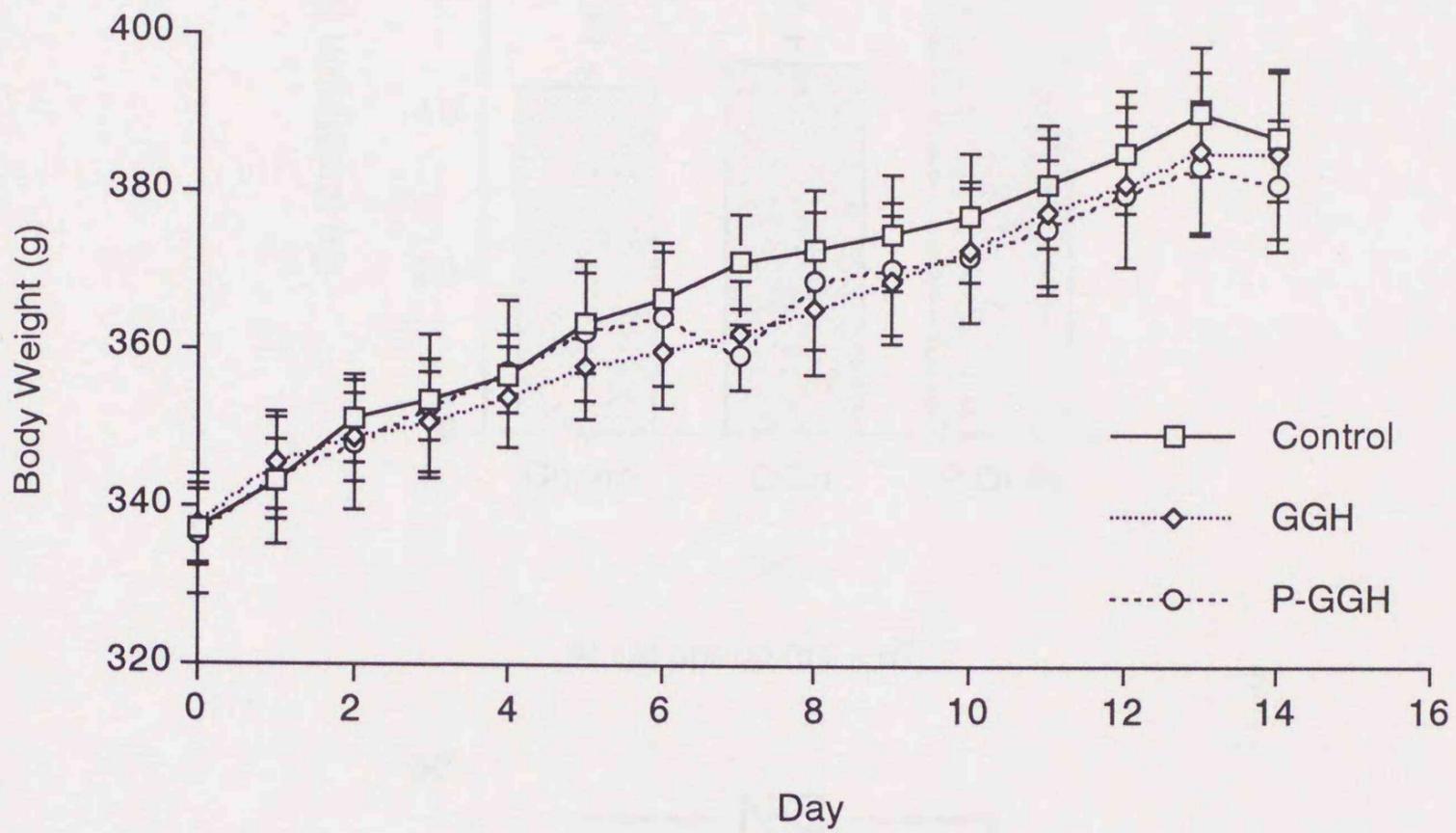
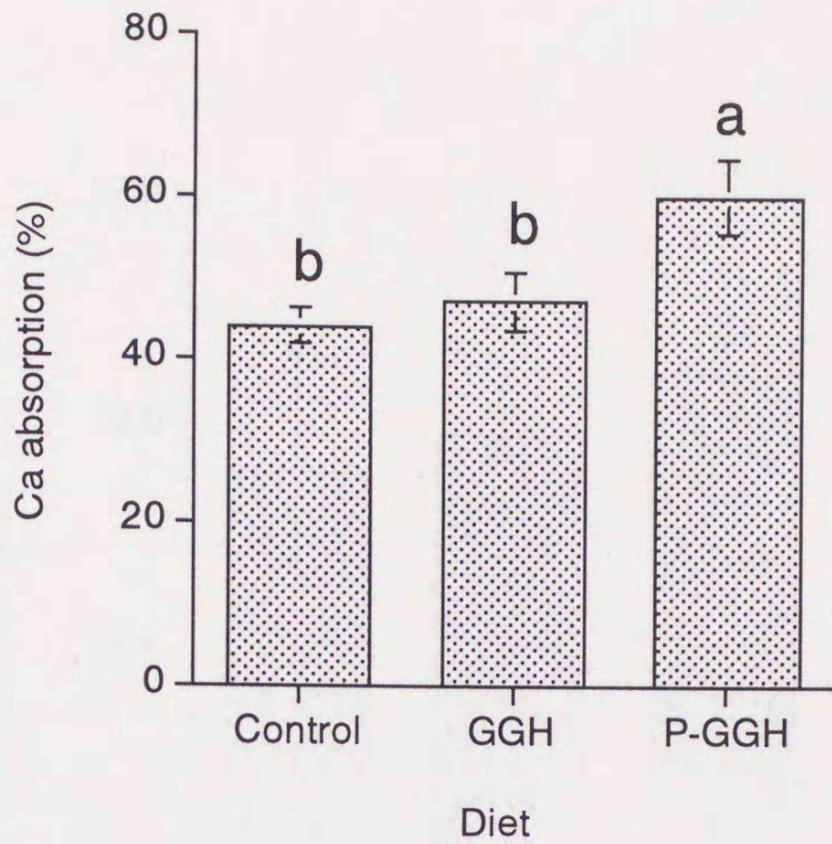
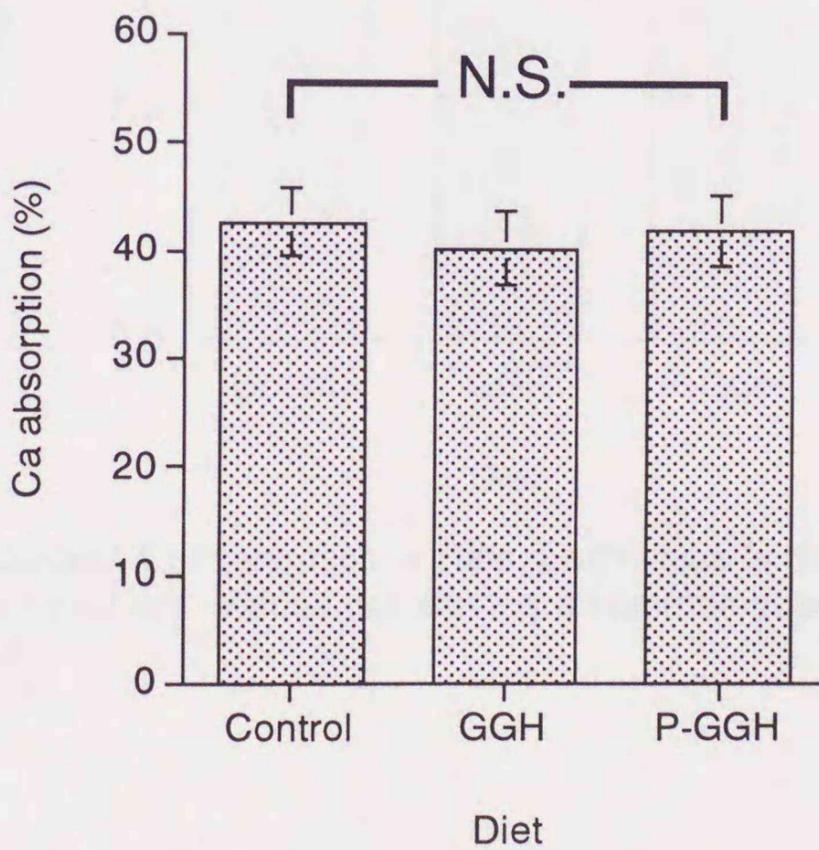


Fig.4-2 試験期間中の体重増加



A: 1st period (d4 – d7)



B: 2nd period (d11 – d14)

Fig.4-3 Apparent Calcium Absorption in Rats. Each value is the mean for six rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

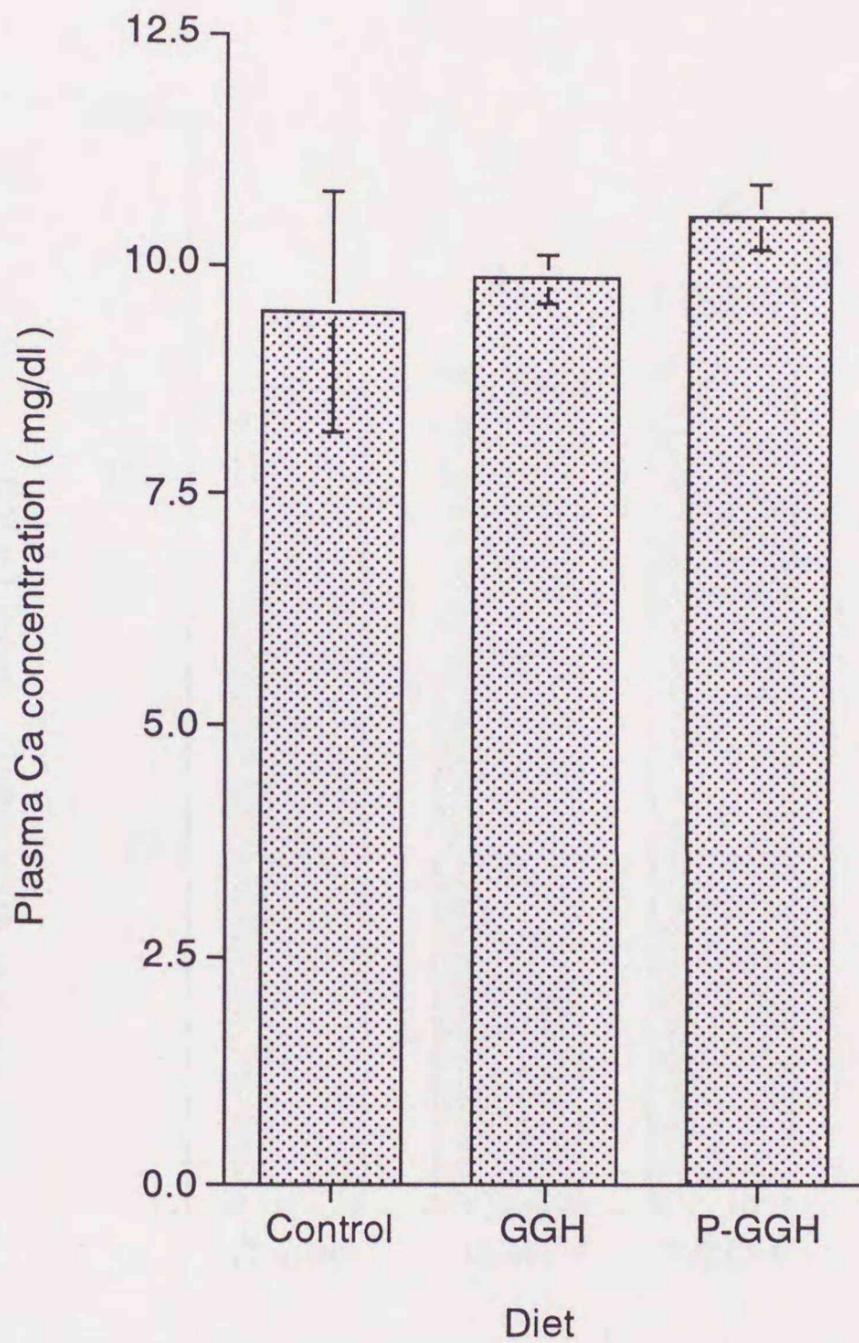


Fig.4-4 Plasma Calcium Concentration in Rats. Each value is the mean for six rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

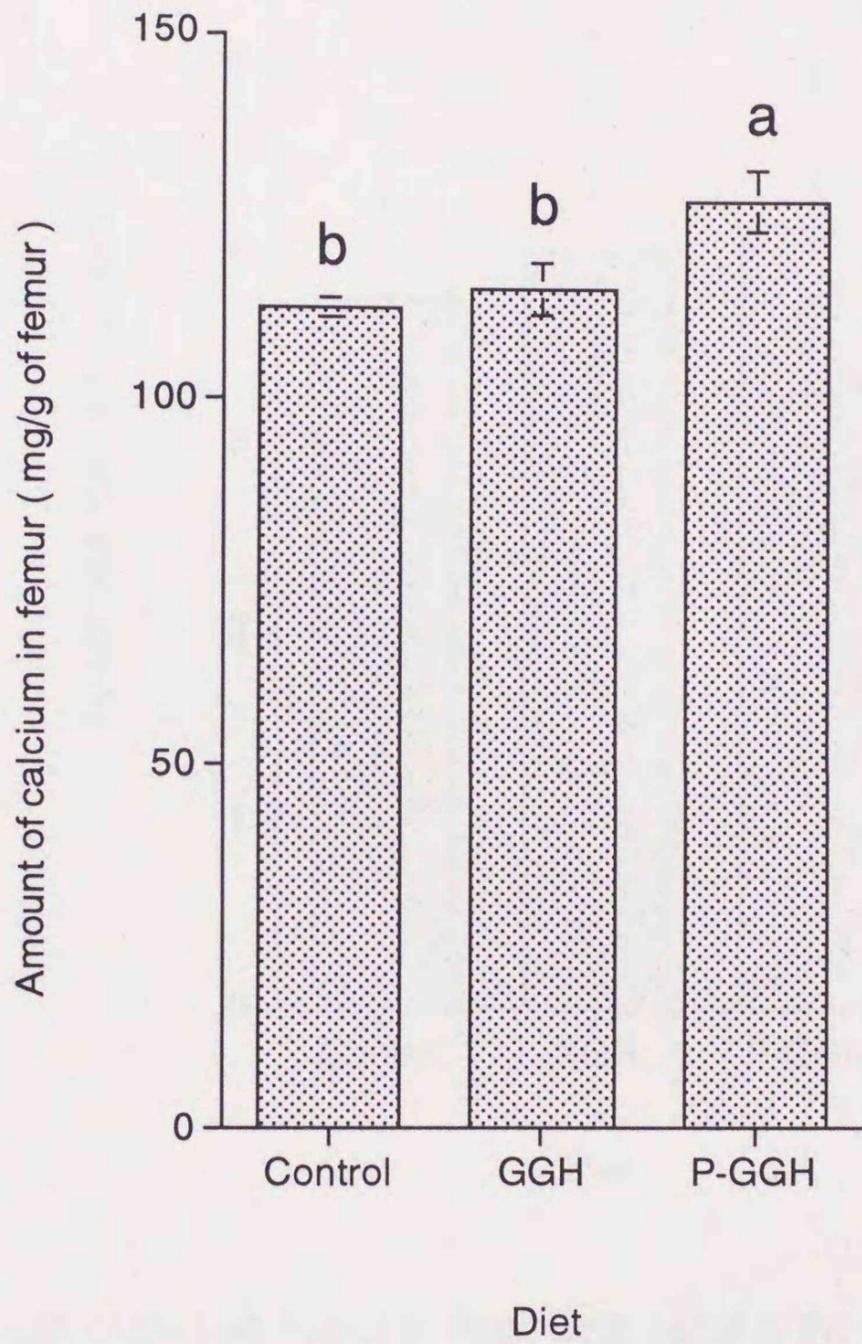


Fig.4-5 Amount of Calcium in Femur in Rats. Each value is the mean for six rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

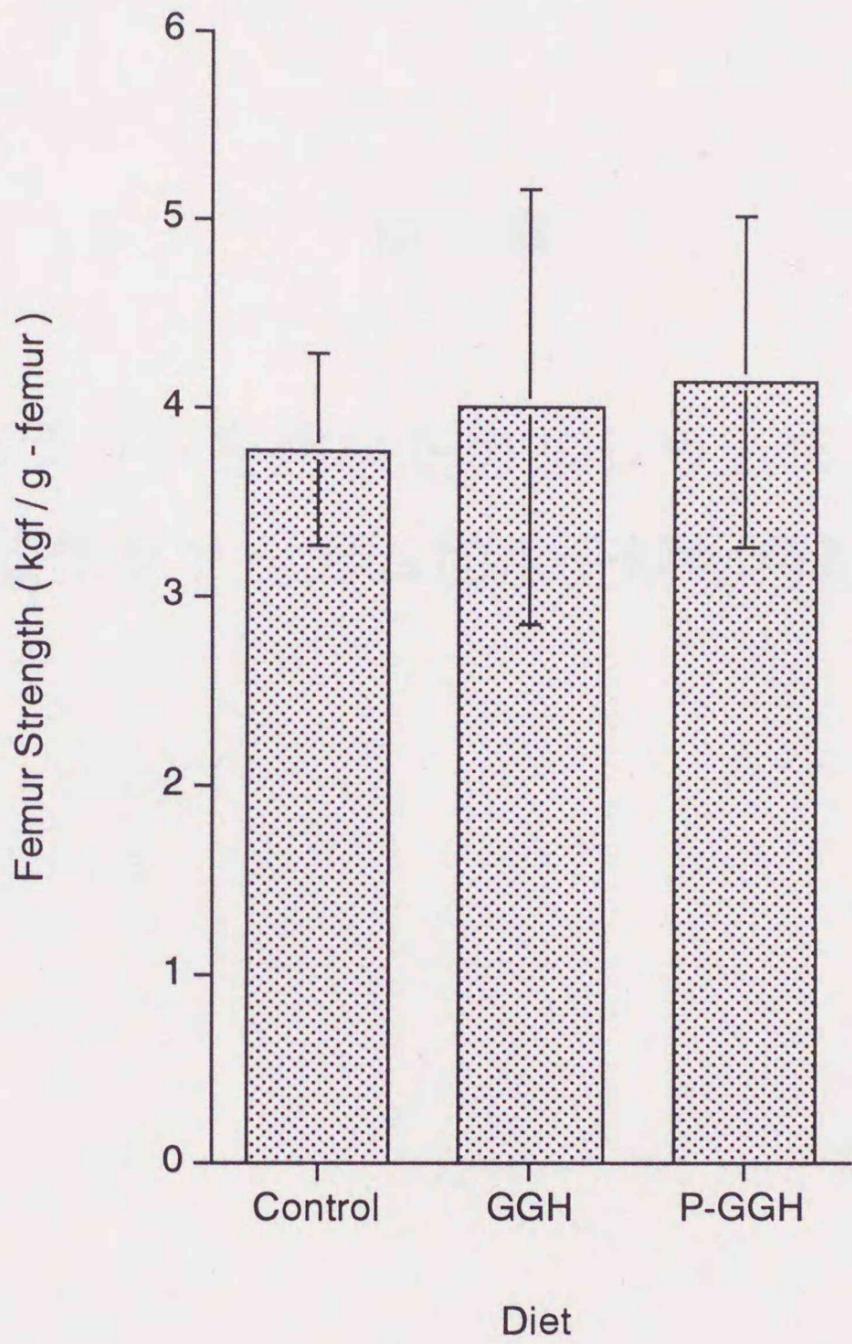


Fig.4-6 Strength of the Left Femur in Rats. Each value is the mean for six rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

第5章

盲腸摘出ラットを用いたカルシウム吸収に対する リン酸化グァーガム加水分解物摂取の影響

5-1 目的

第4章では P-GGH が in vivo においても 1st period でカルシウム吸収を亢進することを示した。そして P-GGH が小腸下部（回腸）においてカルシウムの非不溶化を促進していること、また盲腸において GGH ほどの発酵性はないもののプロピオン酸、コハク酸を中心に発酵性を持っていることが確かめられた。プロピオン酸は酢酸とともにカルシウム吸収への関与が示唆される短鎖脂肪酸であり（72）、P-GGH によるカルシウム吸収の亢進がリン酸基クラスターによるカルシウムの非不溶化なのか盲腸発酵によるものなのか前章の結果だけでは検討することは不可能である。

このためこの章では盲腸切除（CCX）ラットを用いて、盲腸発酵の影響のない系での P-GGH のカルシウム吸収亢進能を調べるとともに、その機構について検討した。

5-2 方法

1) 実験動物：SD 系雄ラット（5 週齢、初期体重 100 g 前後）を 42 匹用いた。

2) 試験飼料、およびスケジュール

7 日間、標準飼料で予備飼育後、体重により 24 匹（盲腸切除用）と 18 匹（偽手術用）に群分けして施術した。5 日間を回復期間として標準飼料で飼育した（CCX、1 匹死亡）。盲腸切除群、偽手術群ともに下記の 3 群（CCX : n=8 (Control は n=7)、Sham : n=6) に群分けし、試験期間を 10 日間とした。

- | | |
|----------------------|---------------|
| ・コントロール食（無繊維食） | Control Group |
| ・グァーガム分解物 5% 添加食 | GGH Group |
| ・リン酸化グァーガム分解物 5% 添加食 | P-GGH Group |

試験飼料の組成は、Table 5-1 に記載した。

試験飼料中のカルシウムレベルは 0.45% (4.5 g/kg diet) とした。食物繊維の添加は 5% (50 g/kg diet) とし、またカルシウムの出納試験を行うにあたり、水溶性食物繊維の摂取によるラットの下痢を防止するために結晶セルロースを試験飼料 1 kg あたり 50 g (5%) 添加した。

実験スケジュールは、Fig.5-1 に記載した。

- ・ 試験飼育開始後、3-5 および 8-10 日目を出納期間とし、採糞を行った。
- ・ 10 日目に屠殺し、腹部大動脈血、回腸・盲腸・結腸内容物、左右大腿骨を採取した。

た。

3) 手術法

・ 盲腸摘出手術

ラットにネンブタール注射液 (0.08 ml/100 g body weight) を腹腔内投与して麻酔をする。麻酔が完全にかかったら、ラットの四肢をガムテープでプラスチック板に固定し、下腹部 (開腹部位) の体毛を石鹼水で浸して剃刀で剃毛する。消毒目的で 70%エタノールを開腹部位に噴霧し、軽くふき取る。大ばさみで正中線に沿って皮膚を切り開く。中ばさみを皮膚と腹筋の間に入れ、はさみを開くようにして皮膚を腹筋から剥離する。中ばさみで、正中線に沿って腹筋を切り開く。綿棒で盲腸を腹腔内から引っ張り出す。このとき金属器具で腹腔内に触れないこと。縫合糸で盲腸と他消化管の接続部 (回腸から結腸までが 1 本の管になるように) を緩く結紮し、閉塞していないかを確認後、きつく結紮する。小ばさみで結紮部位の盲腸側を切断し、盲腸を切除する。このとき結紮した縫合糸を切らないように気を付ける。綿棒で切断面をきれいにした後、マイシリン (マ

イシリンゾル明治；明治製菓株式会社）を切断面および術部周辺に数滴滴下する。腸を腹腔内に戻し、腹筋を縫合して縫合部にシノミン（シノミン末；塩野義製薬株式会社）をふりかける。皮膚をミュッヘル縫合針（ミヘル縫合針小；夏目製作所）で閉じ、手術を終了。ラットを保温器に移し、麻酔覚醒後ケージに戻す。

・偽手術

手順は盲腸摘出手術とほぼ同じ。盲腸を引っ張り出したら切除せずに腹腔内に戻す。あとは同じ手順。

なお手術に際して、ピンセットやはさみなどはヒビテン液（5%ヒビテン液；ゼネカ薬品株式会社）を薄めたもの（容器のふた 2~3 杯をバットに入れて脱塩水で薄める）で消毒。綿棒や脱脂綿はオートクレーブで滅菌しておく。

4) 分析項目

糞、右大腿骨はカルシウム量の測定に、左大腿骨は骨強度測定に用い、回腸、盲腸、結腸内容物は、総カルシウム量、可溶性カルシウム量、短鎖脂肪酸量、pH の測定に用いた。

5-3 結果及び考察

ラットの体重、摂食量、糞重量について

ラットの体重、試験期間中の摂食量は Table 5-2 に示した。また出納試験期間中の摂食量、糞重量は Table 5-3 に示した。

初期体重、最終体重、体重増加量はすべて群間における統計的有意差は認められなかった。また試験期間を通しての摂食量および出納試験期間中の摂食量にも群間での統計

的有意差は見られなかった。これらの結果から、第4章の結果と同じくGGHやP-GGHの摂取がラットの成長に対して影響を与えないことが確認された。

しかし盲腸切除を施した場合、GGHおよびP-GGH摂取群では摂取したGGH、P-GGHがほとんど資化されずに糞中に排泄されるために、出納試験期間の糞重量は1st periodのGGH、P-GGH摂取群でCCXラットがShamラットと比較して有意に増加し、2nd periodにおいてもGGH摂取群でCCXラットがShamラットと比較して有意に増加、またP-GGH摂取群でもCCXラットが高い傾向が見られた。

見かけのカルシウム吸収率

見かけのカルシウム吸収率はFig. 5-2に示した。

1st periodでのカルシウム吸収率は、GGH摂取-ShamラットとP-GGH摂取群（CCX及びShamラット）においてControl食摂取群とGGH摂取-CCXラットと比較して有意に高値を示した。しかし2nd periodにおけるカルシウム吸収率は、全ての群において統計的有意差は認められなかった。

今回の実験において、GGH摂取-Shamラットのカルシウム吸収がControl食摂取-Shamラットに対して有意に高値を示したことは第4章の実験結果と異なる点である。第4章においてControl食群に対してGGH摂取群で差が出なかったのはラットの週齢にあるのではないかと仮定した。今回の実験は、この仮定を裏付ける結果であると考えられるだろう。また、GGH摂取-CCXラットのカルシウム吸収がGGH-Shamラットに対して有意に低値でControl摂取群と差がなかったことは、GGH摂取によるカルシウム吸収の亢進に盲腸が寄与していることが確かめられたと言って良いと思われる。こ

これは当研究室のこれまでの研究 (38) や Younes ら (73) の報告の結果を支持するものである。また 2nd period における統計的有意差の消失は第 4 章でも示唆したように、カルシウム吸収機構のダウンレギュレーションの影響が考えられる。

各消化管内容物中のカルシウムの非不溶化率

回腸、盲腸 (CCX ラットを除く) および結腸内容物中の総カルシウム量、可溶性カルシウム量およびカルシウム非不溶化率を Table 5-4 から 5-6 に示した。

総カルシウム量は、回腸において全ての群で統計的有意差は示されなかったが、結腸において Control 食摂取群が GGH 摂取群や P-GGH 摂取群と比較して有意に高値であった。可溶性カルシウム量は、回腸において P-GGH 摂取 Sham ラットで GGH 摂取群や Control 食摂取群と比べて有意に高く、また P-GGH 摂取 CCX ラットにおいても高い傾向が見られた。盲腸においては全ての群で有意差はなく、結腸においては P-GGH 摂取群で有意に低い、また低い傾向が見られ、またそれぞれの群で CCX ラットと比較して Sham ラットで有意に高いか、高い傾向を示した。カルシウムの非不溶化率は、回腸において P-GGH 摂取群で有意に高かった。また盲腸では GGH 摂取群で僅かではあるが有意に高値を示した。結腸では逆に P-GGH 摂取群で低い傾向を示し、それぞれの群で CCX ラットと比較して Sham ラットで有意に高いか、高い傾向を示した。

回腸における P-GGH 摂取群でのカルシウム非不溶化の上昇は、第 4 章での実験結果を支持するものと考えられる。P-GGH のように分子内にリン酸基クラスターを持った CPP が回腸でのカルシウム非不溶化を亢進することによりカルシウムの吸収を促進していることを考えると、第 4 章で述べたように P-GGH によるカルシウムの吸収亢進作

用もリン酸基クラスターによるカルシウムの非不溶化にあると考えることが出来る。また CCX の結果、結腸が盲腸発酵の過程を補償するということを Ohta らは報告しており (66)、後述する結腸内容物重量の結果と合わせて考えると、今回の実験においても結腸発酵が若干行われていたと思われるが、それは結腸におけるカルシウムの非不溶化を促進するものでは無かったことがわかる。

各消化管の重量および内容物の pH

回腸、盲腸 (CCX ラットは除く) および結腸の壁重量を Table 5-8 に、内容物の重量を Table 5-9 に、内容物の pH を Table 5-7 に示した。

内容物の pH は、回腸では Control 食摂取群や GGH 摂取群と比較して P-GGH 摂取群で低い傾向を示した。盲腸では GGH 摂取群と P-GGH 摂取群で Control 食摂取群に比べて有意に低値を示した。また結腸では盲腸と同様に GGH 摂取群と P-GGH 摂取群で有意に低くなっていた。

内容物重量は、回腸では統計的有意差は認められなかった。盲腸では Control 食摂取群と比較して GGH 摂取群および P-GGH 摂取群において有意に増加していた。また結腸では、全ての群で CCX ラットが Sham ラットと比較して有意に増加していたが、摂取した食事による違いは認められなかった。

壁重量は、回腸では GGH 摂取群で Sham ラットに比べて CCX ラットで有意に高く、また Control 食摂取群と P-GGH 摂取群でも CCX ラットの方が高い傾向を示した。盲腸では Control 食摂取群と比較して GGH 摂取群および P-GGH 摂取群において有意に増加していた。結腸では全ての群にわたって CCX ラットの壁が Sham ラットより有意に

増加していた。

盲腸切除によって結腸壁重量や結腸内容物重量が増加したのは、前項で触れたように結腸発酵が起こったからではないだろうか。鈴木（74）は同様に盲腸切除ラットにおける結腸重量（壁、消化管共）の増加を報告している。盲腸における GGH や P-GGH の発酵が CCX では欠如したために結腸での内容物の増加、それに伴う壁重量の増加があったと考えられる。事実、Sham ラットにおける盲腸の観察では、発酵性成分である GGH や P-GGH の発酵によると思われる内容物重量の増加や壁重量の増加が見られた。しかしこれだけでは Control 食摂取 CCX ラットの壁と内容物重量の増加を説明できない。これについて鈴木は無繊維食（Control 食）に含まれる内因性の発酵基質の存在を示唆している。このことから Control 食内のなんらかの発酵基質が Control 食摂取群での数値増加の原因であると考えられる。

回腸重量の増加については太田（75）が幼若ラットの大腸摘出により全摘出で対照と比較して回腸重量の増加、半摘出で対照と全摘出の中間の成長を観察したこと、原因については粘膜内酵素活性の変動などの可能性を報告している。今回の結果を見ても内容物重量に統計的有意差がないことから、回腸重量の増加は、おそらく消化管切除による内因性物質の刺激の変化ではないかと思われる。

盲腸および結腸内容物中の有機酸量

盲腸内容物中の有機酸量を Table 5-10 に、結腸内容物中の有機酸量を Table 5-11 にそれぞれ示した。

盲腸内容物中の有機酸量では、全ての測定項目で GGH 摂取群が Control 食摂取群や

P-GGH 摂取群と比べて有意に高値であった。また統計的有意差はないものの、酢酸とイソ吉草酸を除いて、Control 食摂取群と比較して P-GGH 摂取群で高い傾向を示した。プロピオン酸に関しては GGH 摂取群同様、Control 食摂取群に対して P-GGH 摂取群で有意に高かった。

結腸内容物中の有機酸量では、Control 食摂取群と GGH 摂取群の総短鎖脂肪酸量（酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ吉草酸の和）が Sham ラットに比べて CCX ラットで有意に高値を示し、P-GGH 摂取群も統計的有意差はないものの CCX ラットで高い傾向を示した。これは酢酸の発酵生産量に由来するものであった。

盲腸での GGH の発酵性、それに伴う内容物や壁の重量増加、pH の低下などはすでに前述しており、P-GGH 群の結果と合わせていままでの実験内容を支持する結果となっている。結腸では CCX ラットにおいて若干の結腸発酵が起こっていることが観察された。しかし、結腸発酵に起因するカルシウム吸収の亢進が見られないことから、少なくとも今回の実験程度の期間（回復期+実験飼育期で 15 日間）で起こる結腸発酵は、結腸における生理作用の一部（壁重量の増大、内容物重量の増加など）に影響を及ぼすが、カルシウム吸収に対して影響は与えないと思われる。また盲腸発酵が GGH>P-GGH>Control 食であるにもかかわらず、カルシウム吸収の亢進作用が P-GGH>GGH>Control 食であったことを考えると、GGH のカルシウム吸収亢進作用には盲腸発酵が大きく関与している（27,38）と思われるが、P-GGH によるカルシウム吸収亢進作用での盲腸発酵依存度は高くないと思われる。このことから P-GGH が回腸でのカルシウムの非不溶化を亢進することでカルシウムの吸収を促進していることが推測される。

大腿骨中のカルシウム濃度および大腿骨強度

大腿骨強度を Fig. 5-3 に、大腿骨中のカルシウム濃度を Fig. 5-4 に示した。

大腿骨中のカルシウム濃度は GGH 摂取群の Sham ラットと P-GGH 摂取群で Control 食摂取群と GGH 摂取群の CCX ラットと比較して有意に高かった。この結果は 1st period の出納試験結果に似ており、吸収亢進されたカルシウムがリン酸カルシウムの形で骨中に蓄積されたことを示唆しているのかもしれない。

大腿骨強度も同様の傾向を示しているが、統計的有意差は認められなかった。これはおそらく、カルシウム吸収による骨強度への影響は今回のような短期間（10 日間）では現れにくいのではないだろうか。Kishimoto ら（10）は 14 日間の飼育実験で、カルシウム吸収で有意差は認められたが骨強度に差は認められなかったと報告している。これより、骨強度に対して影響が表れるためには長期間にわたるカルシウム吸収の変化が必要であることが示唆される。

5-4 まとめ

この章では、第 4 章で確認された P-GGH のラットにおけるカルシウム吸収亢進作用が、盲腸発酵での短鎖脂肪酸生成の結果によるという GGH のもともと持っている機能性由来なのか、または P-GGH 特有の作用なのかについて盲腸切除ラットを用いて検討した。

出納試験の 1st period より、Control 食と比較すると GGH、P-GGH はカルシウムの吸収を亢進すること、GGH では CCX によりその吸収亢進作用が消失すること、しかし P-GGH では CCX においてもカルシウムの吸収亢進作用が認められたことから、P-GGH

の基質となった GGH では、そのカルシウム吸収亢進作用が盲腸発酵によるものであるのに対して、P-GGH の吸収亢進作用は盲腸発酵に影響を受けないことが確認された。そしてこのことは、P-GGH が CPP のように、主に小腸下部におけるカルシウムの非不溶化率を高めることにより、カルシウムの吸収を促進していることを示唆しているものと思われる。

今後は、現在問題となっている骨粗鬆症の予防・症状改善に対して P-GGH がどの程度有効であるかについて、閉経後骨粗鬆症のモデルと考えられる卵巣摘出ラットを用いて、カルシウム吸収、骨強度などの面から検討していく必要があると思われる。

Table 5-1. 試験飼料の組成 (/kg diet)

	Control diet	GGH diet	P-GGH diet
Casein	237.5 g	225.0 g	225.0 g
Sucrose	612.7 g	580.5 g	580.5 g
Corn oil	47.5 g	45.0 g	45.0 g
Mineral mixture, Macro	36.1 g	34.2 g	34.2 g
Mineral mixture, Micro	1.9 g	1.8 g	1.8 g
Vitamin mixture	9.5 g	9.0 g	9.0 g
Vitamin E granule	0.9 g	0.9 g	0.9 g
Choline bitartrate	3.8 g	3.6 g	3.6 g
Cellulose ¹	50.1 g	50.0 g	50.0 g
GGH	—	50.0 g	—
P-GGH	—	—	50.0 g

1 : 結晶セルロース (アビセルPH102 ; 旭化成工業株式会社)

特に注釈のないものは、第2章の記載を参照のこと。

Table 5-2. 飼育に伴う各種重量

		No. of rats	Initial Body Weight	Final Body Weight	Body Weight Gain
		n	g	g	g / 10 days
Control	CCX	7	172.1 ± 2.7	256.3 ± 2.6	84.2 ± 2.2
	Sham	6	176.8 ± 5.6	260.8 ± 7.2	84.1 ± 3.1
GGH	CCX	8	168.5 ± 3.6	250.0 ± 6.7	81.5 ± 4.5
	Sham	6	177.0 ± 5.7	260.3 ± 11.7	83.3 ± 6.5
P-GGH	CCX	8	168.7 ± 3.8	247.9 ± 6.2	79.2 ± 3.1
	Sham	6	178.5 ± 6.8	255.2 ± 8.1	76.7 ± 3.8
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			NS	NS	NS
Operation (B)			NS	NS	NS
A × B			NS	NS	NS

		No. of rats	Food Intake
		n	g / day
Control	CCX	7	19.7 ± 0.4
	Sham	6	19.1 ± 0.3
GGH	CCX	8	19.4 ± 0.9
	Sham	6	19.9 ± 1.1
P-GGH	CCX	8	18.5 ± 0.8
	Sham	6	18.8 ± 0.6
ANOVA <i>P</i> value			
Diet (A)			NS
Operation (B)			NS
A × B			NS

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 5-3. 出納試験期間の摂食量及び糞乾燥重量

		No. of rats n	Food Intake for Balance Periods	
			1st Period g / 3days	2nd Period g / 3days
Control	CCX	7	56.4 ± 0.9	62.8 ± 2.6
	Sham	6	54.1 ± 1.4	62.0 ± 1.4
GGH	CCX	8	55.1 ± 4.3	61.0 ± 2.4
	Sham	6	57.7 ± 4.0	64.9 ± 3.9
P-GGH	CCX	8	50.6 ± 2.6	59.2 ± 3.4
	Sham	6	53.0 ± 1.9	61.9 ± 2.6
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			NS	NS
Operation (B)			NS	NS
A × B			NS	NS

		No. of rats n	Feces Dry Weight	
			1st Period g / 3days	2nd Period g / 3days
Control	CCX	7	4.40 ± 0.12 bc	4.62 ± 0.18 b
	Sham	6	3.57 ± 0.09 c	3.95 ± 0.11 b
GGH	CCX	8	5.62 ± 0.39 a	5.78 ± 0.40 a
	Sham	6	4.36 ± 0.48 bc	4.52 ± 0.27 b
P-GGH	CCX	8	4.96 ± 0.25 ab	5.09 ± 0.45 ab
	Sham	6	3.60 ± 0.16 c	4.38 ± 0.50 b
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			<i>P</i> = 0.005	<i>P</i> = 0.077
Operation (B)			<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.006
A × B			<i>P</i> = 0.646	<i>P</i> = 0.670

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 5-4. 回腸内容物中の可溶性、総カルシウム量およびカルシウム可溶化率

		No. of rats	Soluble Ca	Total Ca
		n	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	($\mu\text{mol/g}$ of contents)
Control	CCX	7	238.1 \pm 49.0 b	941.3 \pm 79.3
	Sham	6	234.3 \pm 34.9 b	933.6 \pm 74.3
GGH	CCX	8	258.5 \pm 21.7 b	960.0 \pm 78.1
	Sham	6	252.3 \pm 46.8 b	984.9 \pm 150.1
P-GGH	CCX	8	327.0 \pm 35.7 ab	951.8 \pm 123.7
	Sham	6	395.1 \pm 19.5 a	1111.0 \pm 57.3
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			<i>P</i> = 0.003	<i>P</i> = 0.646
Operation (B)			<i>P</i> = 0.524	<i>P</i> = 0.484
A \times B			<i>P</i> = 0.520	<i>P</i> = 0.683

		No. of rats	Ca solubility
		n	(%)
Control	CCX	7	25.7 \pm 4.7 b
	Sham	6	24.5 \pm 2.3 b
GGH	CCX	8	27.3 \pm 0.8 b
	Sham	6	26.5 \pm 3.5 b
P-GGH	CCX	8	35.4 \pm 2.6 a
	Sham	6	35.9 \pm 2.2 a
ANOVA <i>P</i> value			
Diet (A)			<i>P</i> = 0.002
Operation (B)			<i>P</i> = 0.837
A \times B			<i>P</i> = 0.958

Values are means \pm standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 5-5. 盲腸内容物中の可溶性、総カルシウム量およびカルシウム可溶化率

	No. of rats n	Soluble Ca ($\mu\text{mol/g}$ of contents)	Total Ca ($\mu\text{mol/g}$ of contents)
Control	6	10.5 \pm 1.4	131.9 \pm 9.7 a
GGH	6	9.2 \pm 1.5	78.3 \pm 6.8 b
P-GGH	6	10.4 \pm 0.7	128.2 \pm 10.2 a
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> = 0.739	<i>P</i> = 0.001

	No. of rats n	Ca solubility (%)
Control	6	8.1 \pm 1.1 b
GGH	6	11.5 \pm 1.0 a
P-GGH	6	8.3 \pm 0.6 b
ANOVA <i>P</i> value		<i>P</i> = 0.036

Values are means \pm standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 5-6. 結腸内容物中の可溶性、総カルシウム量およびカルシウム可溶化率

		No. of rats	Soluble Ca	Total Ca
		n	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	($\mu\text{mol/g}$ of contents)
Control	CCX	7	23.2 \pm 3.5 b	193.2 \pm 9.5 a
	Sham	6	35.9 \pm 3.2 a	229.2 \pm 14.8 a
GGH	CCX	8	18.9 \pm 6.6 bc	133.6 \pm 15.0 b
	Sham	6	21.9 \pm 2.3 b	143.1 \pm 19.7 b
P-GGH	CCX	8	7.7 \pm 0.4 c	108.8 \pm 9.4 b
	Sham	6	9.9 \pm 0.3 c	114.8 \pm 5.7 b
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001
Operation (B)			<i>P</i> = 0.034	<i>P</i> = 0.088
A \times B			<i>P</i> = 0.303	<i>P</i> = 0.479

		No. of rats	Ca solubility
		n	(%)
Control	CCX	7	12.2 \pm 1.8 ab
	Sham	6	15.6 \pm 0.7 a
GGH	CCX	8	12.6 \pm 2.3 abc
	Sham	6	16.7 \pm 2.5 a
P-GGH	CCX	8	7.5 \pm 0.7 c
	Sham	6	8.8 \pm 0.5 bc
ANOVA <i>P</i> value			
Diet (A)			<i>P</i> < 0.001
Operation (B)			<i>P</i> = 0.043
A \times B			<i>P</i> = 0.690

Values are means \pm standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 5-7. 消化管内容物のpH

		No. of rats	ileum	cecum	colon
Control	CCX	7	6.77 ± 0.07 a		6.69 ± 0.01 a
	Sham	6	6.79 ± 0.12 a	7.21 ± 0.04 a	6.83 ± 0.04 a
GGH	CCX	8	6.74 ± 0.08 ab		6.36 ± 0.07 b
	Sham	6	6.68 ± 0.09 ab	6.09 ± 0.06 b	6.03 ± 0.06 c
P-GGH	CCX	8	6.51 ± 0.03 bc		6.01 ± 0.06 c
	Sham	6	6.27 ± 0.10 c	6.03 ± 0.06 b	6.04 ± 0.02 c
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001
Operation (B)			<i>P</i> = 0.188		<i>P</i> = 0.188
A × B			<i>P</i> = 0.310		<i>P</i> < 0.001

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 5-8. 回腸、盲腸及び結腸壁重量

		No. of rats	ileum	cecum	colon
		n	g	g	g
Control	CCX	7	0.946 ± 0.070 ab		1.448 ± 0.079 a
	Sham	6	0.835 ± 0.072 b	0.668 ± 0.028 b	0.883 ± 0.042 b
GGH	CCX	8	1.120 ± 0.106 a		1.482 ± 0.110 a
	Sham	6	0.820 ± 0.051 b	1.086 ± 0.035 a	0.919 ± 0.068 b
P-GGH	CCX	8	0.965 ± 0.043 ab		1.710 ± 0.214 a
	Sham	6	0.799 ± 0.068 b	1.007 ± 0.078 a	0.911 ± 0.064 b
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			<i>P</i> = 0.432	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.471
Operation (B)			<i>P</i> = 0.003		<i>P</i> < 0.001
A × B			<i>P</i> = 0.436		<i>P</i> = 0.536

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 5-9. 回腸、盲腸及び結腸内容物重量

		No. of rats	ileum	cecum	colon
		n	g	g	g
Control	CCX	7	0.39 ± 0.03		1.58 ± 0.15 ab
	Sham	6	0.42 ± 0.09	2.00 ± 0.11 b	0.68 ± 0.08 c
GGH	CCX	8	0.49 ± 0.11		2.15 ± 0.39 a
	Sham	6	0.55 ± 0.05	5.29 ± 0.50 a	0.72 ± 0.18 c
P-GGH	CCX	8	0.55 ± 0.05		1.93 ± 0.18 a
	Sham	6	0.40 ± 0.06	4.94 ± 0.58 a	1.04 ± 0.14 bc
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			<i>P</i> = 0.682	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.282
Operation (B)			<i>P</i> = 0.253		<i>P</i> < 0.001
A × B			<i>P</i> = 0.495		<i>P</i> = 0.430

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 5-10. 盲腸内容物中の有機酸量

	Control n = 6	GGH n = 6	P-GGH n = 6	P
Acetate	56.9 ± 8.1 b	149 ± 15 a	15.1 ± 3.0 b	< 0.001
Propionate	15.1 ± 1.3 b	36.5 ± 8.5 a	36.4 ± 4.8 a	0.016
Butyrate	5.06 ± 1.08 b	39.0 ± 8.3 a	12.1 ± 2.7 b	< 0.001
Isovalerate	0.62 ± 0.29 ab	1.24 ± 0.22 a	0.37 ± 0.17 b	0.059
Total SCFA	77.7 ± 10.2 c	225 ± 21 a	118 ± 6 b	< 0.001
Lactate	0.65 ± 0.15 b	5.03 ± 0.85 a	1.69 ± 0.47 b	< 0.001
Succinate	1.39 ± 0.56 b	130 ± 36 a	12.7 ± 3.2 b	< 0.001

Each value is the mean ± SE. Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

Total SCFA is the sum of acetate, propionate, butyrate, and isovalerate.

Table 5-11. 結腸内容物中の有機酸量

	Control n = 7	GGH n = 8	P-GGH n = 8
Ceectomized			
Acetate	34.6 ± 5.4 a	35.9 ± 6.4 a	16.0 ± 1.4 b
Propionate	4.98 ± 1.55	5.48 ± 3.36	3.92 ± 1.01
Butyrate	2.84 ± 1.26	2.21 ± 0.95	0.44 ± 0.44
Isovalerate	0.17 ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Total SCFA	42.5 ± 6.9 a	43.6 ± 9.8 a	20.4 ± 2.6 b
Lactate	5.79 ± 2.04 b	16.7 ± 2.5 a	3.19 ± 0.76 b
Succinate	20.6 ± 3.3 ab	20.6 ± 4.0 abc	10.6 ± 3.0 abcd

	Control n = 6	GGH n = 6	P-GGH n = 6
Sham			
Acetate	13.1 ± 2.8 b	20.1 ± 5.3 b	13.5 ± 3.5 b
Propionate	2.66 ± 0.68	9.76 ± 3.75	5.01 ± 1.14
Butyrate	0.00 ± 0.00	1.89 ± 1.25	0.23 ± 0.23
Isovalerate	0.05 ± 0.05	0.06 ± 0.06	0.02 ± 0.02
Total SCFA	15.9 ± 3.5 b	31.7 ± 8.7 ab	18.8 ± 4.8 b
Lactate	0.00 ± 0.00 b	5.68 ± 2.53 b	0.65 ± 0.32 b
Succinate	0.31 ± 0.11 d	25.4 ± 13.9 a	1.94 ± 0.54 bd

	P value		
	Diet (A)	Operation (B)	A × B
Acetate	0.020	0.001	0.124
Propionate	0.228	0.594	0.378
Butyrate	0.147	0.123	0.249
Isovalerate	0.353	0.478	0.719
Total SCFA	0.039	0.022	0.203
Lactate	< 0.001	< 0.001	0.064
Succinate	0.015	0.093	0.105

Each value is the mean ± SE. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

Total SCFA is the sum of acetate, propionate, butyrate, and isovalerate.

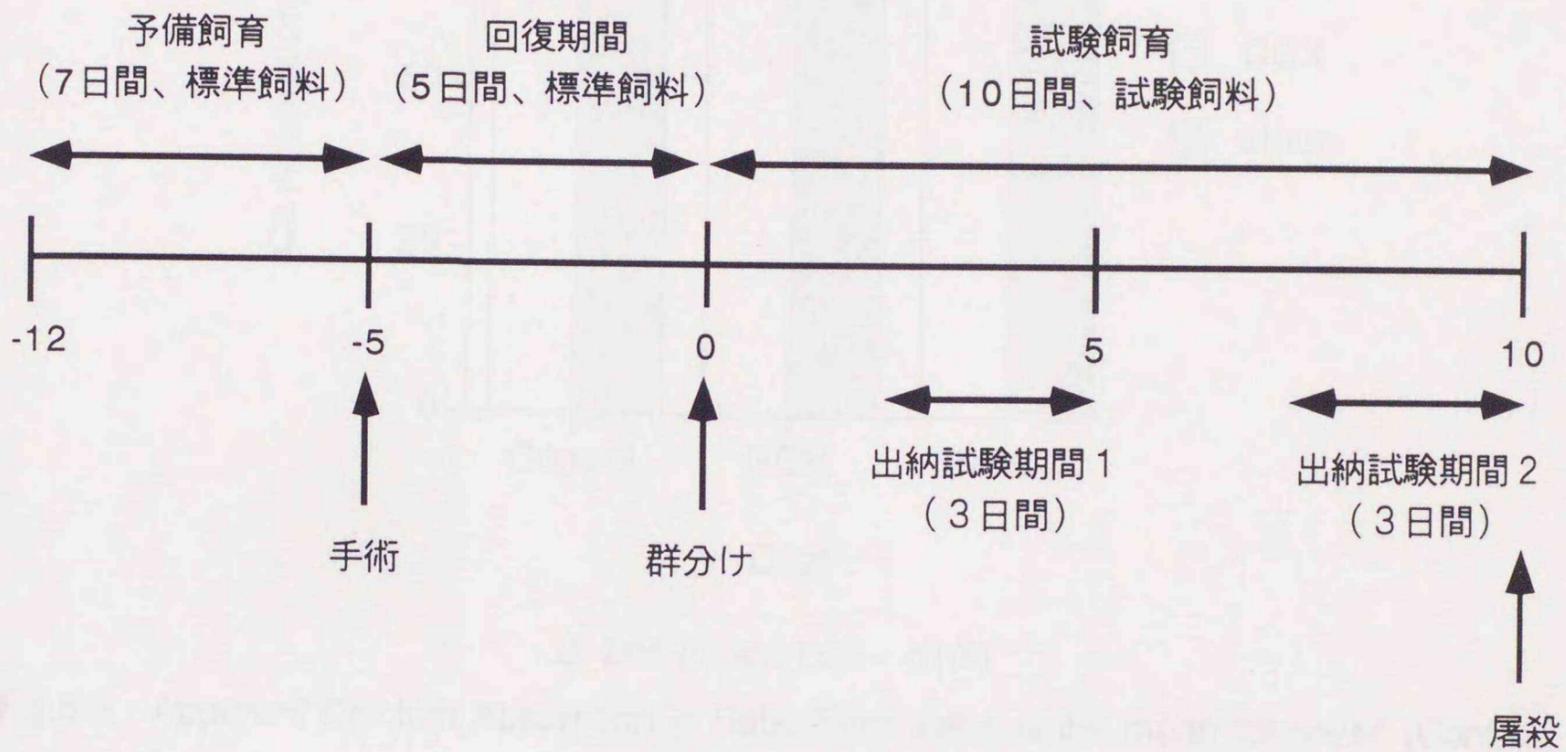
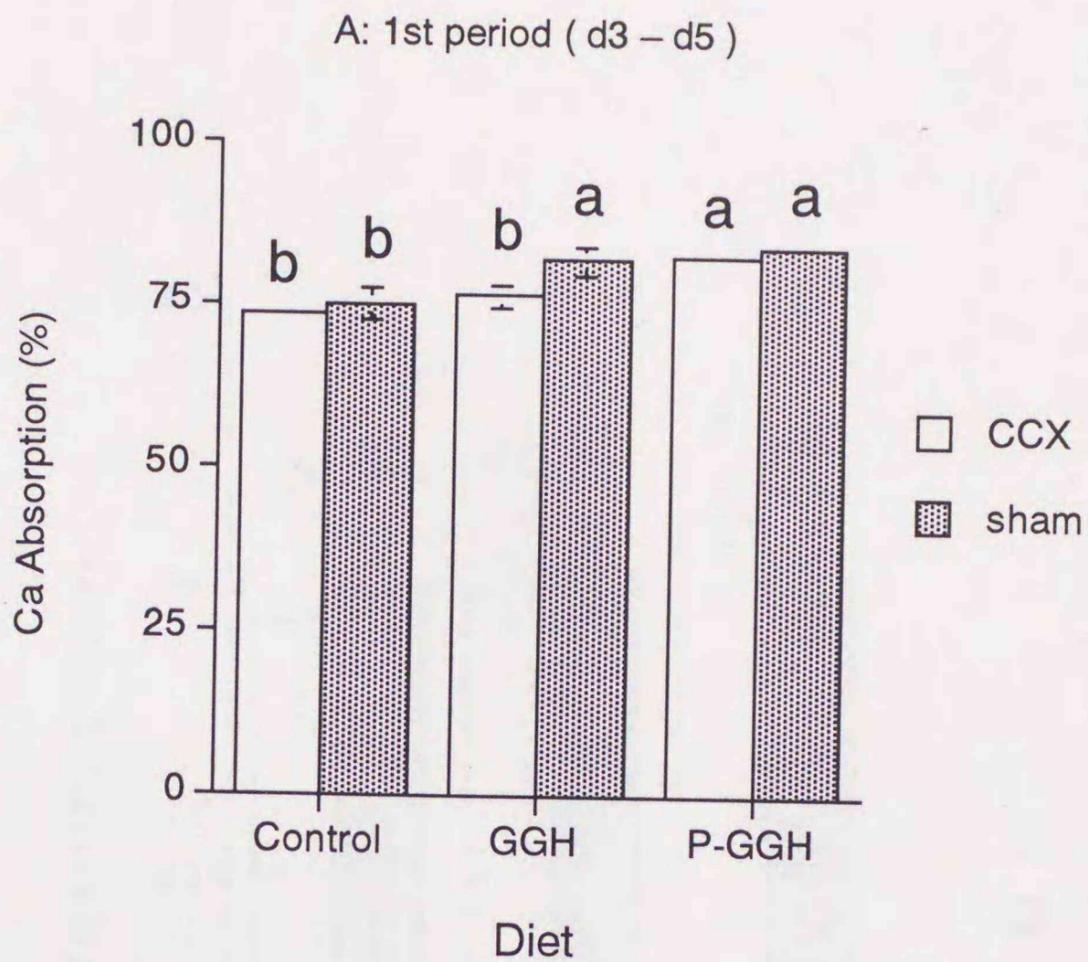
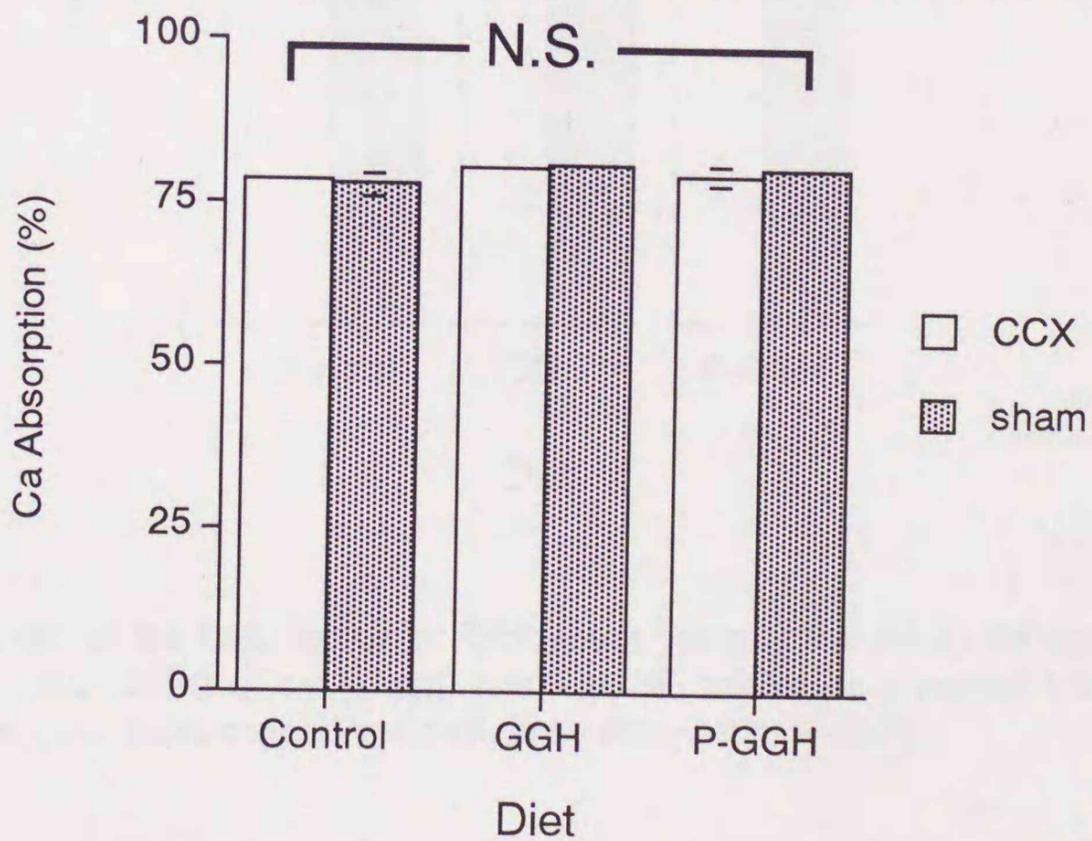


Fig. 5-1 実験スケジュール



B: 2nd period (d8 – d10)

Fig.5-2 Apparent Calcium Absorption in Rats. Each value is the mean for seven (Control-



CCX), eight (other CCX) or six (sham) rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

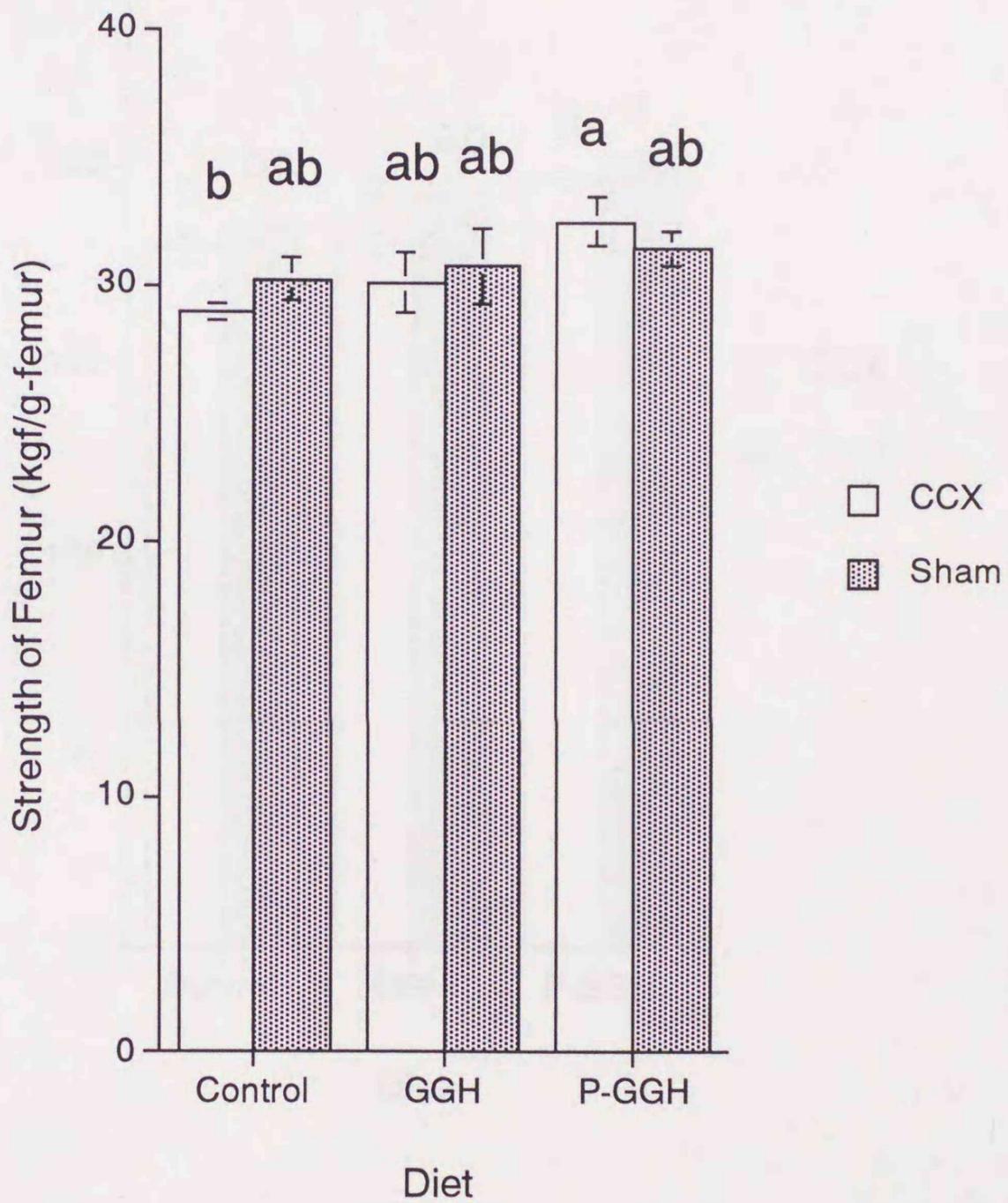


Fig.5-3 Strength of the Left Femur in Rats. Each value is the mean for seven (Control-CCX), eight (other CCX) or six (sham) rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

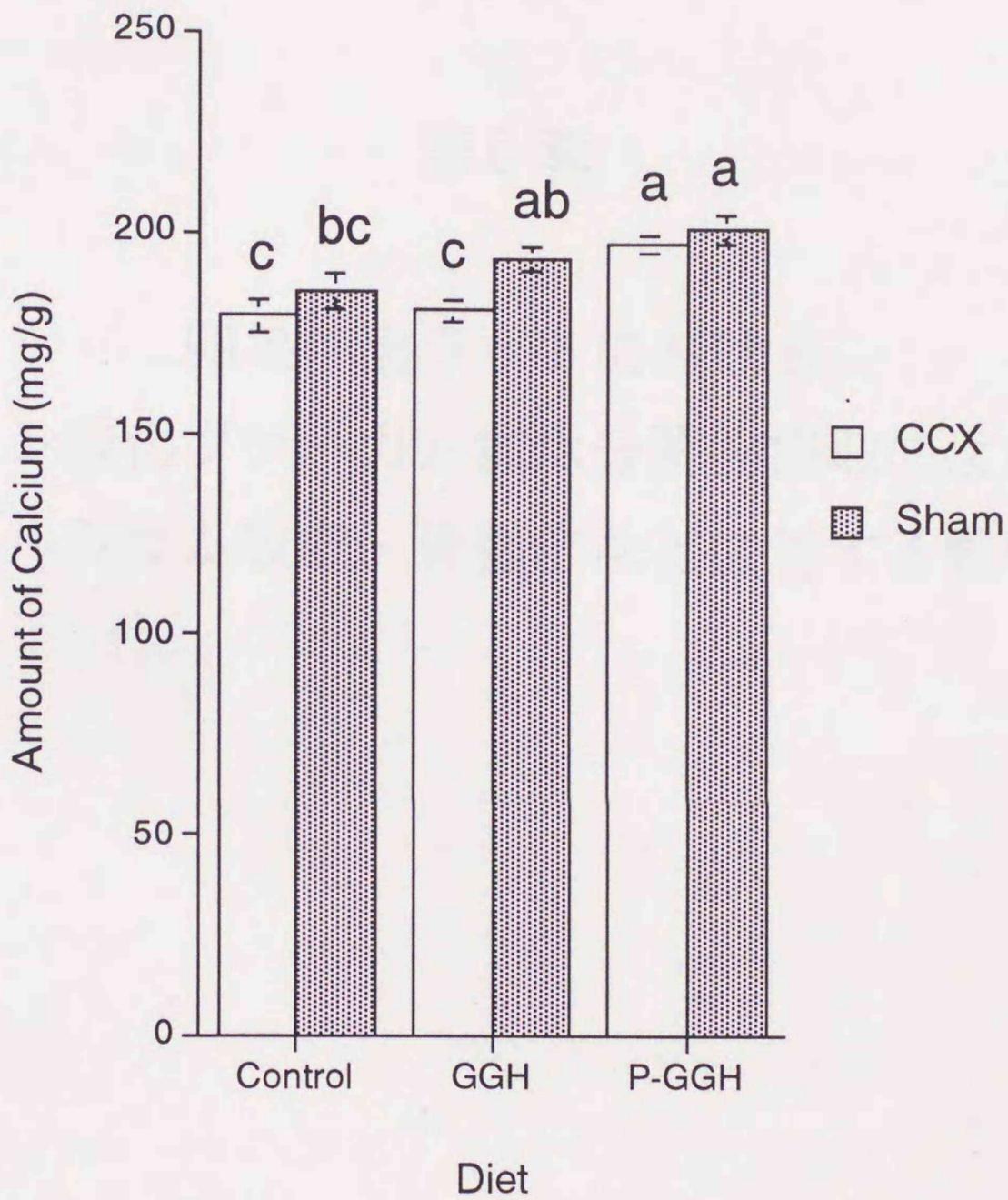


Fig.5-4 Amount of Calcium in Femur in Rats. Each value is the mean for seven (Control-CCX), eight (other CCX) or six (sham) rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

第6章

卵巣摘出ラットにおける リン酸化グァーガム加水分解物摂取による カルシウム吸収・骨強度などに対する影響

6-1 目的

第1章で述べたとおり、カルシウム量の低下に伴う疾病はいろいろ考えられる。そのような疾病の中で最も問題であり、また関心が高いものに骨粗鬆症があげられる。

骨粗鬆症とは、骨組織の生化学的組成は正常であるが単位体積当たりの骨量が減少する代謝性骨疾患のことを指し、中年以降の女性に特に多く腰痛や骨折を伴う。骨皮質は薄く髓腔拡大、骨質は多孔性でもろく骨折しやすい特徴がある。骨粗鬆症は原発性である閉経後骨粗鬆症または老人性骨粗鬆症と、原因の明らかな続発性骨粗鬆症に分けられる。一般的に骨粗鬆症といえば前者をさす。この原因は解明されていないが、いずれにしても骨組織の破骨細胞による骨吸収（Caの放出）が、骨芽細胞による骨生成を上回っていることによって起こる。老年期では、腸管でのCa吸収の低下（76,77）、Ca吸収を増加させるビタミンDの低下（76-80）、甲状腺から分泌されて骨吸収を抑制したり骨芽細胞に作用して骨形成を促進するカルシトニンの分泌低下（80-83）などが起こり、さらに閉経後の女性では、骨形成作用のあるエストロゲンが欠乏することにより（76,79,82,84,85）、一層骨粗鬆症が進行するものと考えられる。

いずれにせよ、生体におけるカルシウム不足が骨粗鬆症を引き起こすことには間違いはない。このため、骨粗鬆症の予防・改善における最も有効な手だてはカルシウムの十分な供給とカルシウムの利用率を高めることである。

この章での目的は、前章まででカルシウムの吸収亢進作用が確かめられたP-GGHによって骨粗鬆症の症例の予防が可能であるかどうかについて、閉経後骨粗鬆症のモデルである卵巣摘出ラット（OVXラット）（86-89）を用いて、P-GGHを与えることにより、そのカルシウム吸収、骨強度等の変化を観察した。

6-2 方法

1) 実験動物：SD系雌ラット（5週齢、初期体重100g前後）を54匹用いた。

2) 試験飼料、およびスケジュール

7日間、標準飼料で予備飼育後、体重により30匹（卵巣摘出用）と24匹（偽手術用）に群分けして施術した。5日間を回復期間として標準飼料で飼育した（OVX、1匹死亡）。卵巣摘出群、偽手術群ともに下記の3群（OVX：n=10（Controlはn=9）、Sham：n=8）に群分けし、試験期間を6週間とした。

- | | |
|--------------------|---------------|
| ・コントロール食（無繊維食） | Control Group |
| ・グアーガム分解物5%添加食 | GGH Group |
| ・リン酸化グアーガム分解物5%添加食 | P-GGH Group |

試験飼料の組成は、Table 6-1-1に記載した。

試験飼料中のカルシウムレベルは0.2%（2g/kg diet）とした。食物繊維の添加は5%（50g/kg diet）とし、またカルシウムの出納試験を行うにあたり、水溶性食物繊維の摂取によるラットの下痢を防止するために結晶セルロースを試験飼料1kgあたり50g（5%）添加した。

実験スケジュールは、Fig.6-1に記載した。

・試験飼育開始後、5-7、12-14、26-28 および 40-42 日目を出納期間とし、採糞を行った。

・42日目に屠殺し、腹部大動脈血、腎臓、卵巣、回腸・盲腸・結腸内容物、左右大腿骨を採取した。

3) 手術法

・ 卵巣摘出手術

ラットにネンブタール注射液 (0.08 ml/100 g body weight) を腹腔内投与して麻酔をする。麻酔が完全にかかったら、ラットを側位でプラスチック板に置き、肋骨から大腿部のほぼ中心 (開腹部位) の体毛を石鹼水で浸して剃刀で剃毛する。消毒目的で 70% エタノールを開腹部位に噴霧し、軽くふき取る。大ばさみで皮膚および皮下脂肪を切り開く。中ばさみを皮膚と筋層の間に入れ、はさみを開くようにして皮膚を筋層から剥離する。中ばさみで、筋層約 1 cm を切り開く。これで腹腔内に白色の脂肪組織が認められる。この脂肪組織をリングピンセットでそっと摘み、体外に引き出す。このときその中に赤紅色の卵巣が確認できる (直径 2~3 mm、ぶどうの房状)。縫合糸で卵巣上部の血管 (脂肪を一塊にする) および下部の卵管 (子宮との接合部にある半透明の管状組織) の部位で結紮する。小ばさみで結紮部位 2 カ所を切断し、卵巣を摘出する。このとき結紮した縫合糸を切らないように気を付ける。綿棒で切断面をきれいにした後、マイシリン (マイシリンゾル明治; 明治製菓株式会社) を切断面および術部周辺に数滴滴下する。体外に引き出した脂肪組織を腹腔内に戻し、筋層を縫合して縫合部にシノミン (シノミン末; 塩野義製薬株式会社) をふりかける。皮膚をミュッヘル縫合針 (ミヘル縫合針小; 夏目製作所) で閉じる。次いで、もう一方の卵巣を同様の手順で摘出する。これで手術を終了。ラットを保温器に移し、麻酔覚醒後ケージに戻す。

・ 偽手術

手順は卵巣切除手術とほぼ同じ。卵巣を引っ張り出したら切除せずに腹腔内に戻す。あとは同じ手順。

なお手術に際して、ピンセットやはさみなどはヒビテン液（5%ヒビテン液；ゼネカ薬品株式会社）を薄めたもの（容器のふた 2~3 杯をバットに入れて脱塩水で薄める）で消毒。綿棒や脱脂綿はオートクレーブで滅菌しておく。

4) 分析項目

血液はカルシウム濃度を、糞、右大腿骨はカルシウム量の測定に用いた。左大腿骨は骨強度測定に用い、回腸、盲腸、結腸内容物は、総カルシウム量、可溶性カルシウム量、短鎖脂肪酸量、pH の測定に用いた。子宮は重量の測定に用いた。なお、子宮重量は OVX の成功度合いの尺度として測定し、その結果 Control 食群 1 匹、GGH 食群 3 匹、P-GGH 食群 3 匹を OVX 失敗と見なして統計処理から外した。

6-3 結果及び考察

ラットの体重、摂食量、糞重量について

体重、摂食量および子宮重量を Table 6-2 に、また出納試験期間中の摂食量および糞重量を Table 6-3-1、6-3-2 に示した。

子宮重量において食餌の種類に関係なく OVX 群と Sham 群の間で明らかな統計的有意差が認められた。この結果より OVX 群に対する卵巢摘出手術が成功しており、エストロゲンに代表される卵巢ホルモンが欠乏した疑似閉経後骨粗鬆症モデルが形成できたことが示唆される。

体重増加量は OVX 群で Sham 群に比べて有意に高くなっており、また 6 週間通しての摂食量はそれぞれの食餌で OVX 群が Sham 群に比べて高い傾向が見られた。体重増加量の P-GGH 摂取 Sham 群で低くなっている他は、食餌の違いによる有意差は認めら

れなかった。ラットは性別の違いによって摂食量や成長の度合いが異なり雄が雌の倍近くになることもあることから、ラットに OVX を施すことによって卵巢ホルモンが欠乏し、雌ラットの雄化があったと考えられる。

摂食量の経時的な変化は出納試験期間における摂食量 (Table 6-3-1、6-3-2 それぞれ上段) を見るとわかる。1 週目で GGH 食、P-GGH 食において Sham 群に比べて OVX 群で摂食量が有意に多くなっているのが観察されたが、4 週目になると P-GGH 摂取 Sham 群においてのみ観察され、6 週目ではまったく差が無くなってしまっていた。これは加齢による摂食量の減少 (90-92) と OVX 群の雄化による一時的なエネルギーの過剰摂取が落ち着いたことに起因していると考えられる。

出納試験期間中の糞重量は、それぞれの週において Control 食群と比較して P-GGH 摂取群や GGH 摂取群が高い傾向にあった。これは第 4 章でも述べたように食物繊維摂取に起因する糞重量の増加であろう。また OVX 群が Sham 群に比べて高い傾向にあるのは、食餌摂取量の違いに起因していると考えられる。

見かけのカルシウム吸収率

見かけのカルシウム吸収率を Fig. 6-2-1 (週 (日) 別) と 6-2-2 (経日変化) に示した。

第 1 週と第 2 週の結果を見ると、明らかな違いは認められなかった。これは第 4 章や第 5 章の出納試験とは反する結果であったが、おそらく食事中のカルシウムレベル (第 4、5 章では 0.45%、今回は 0.2%) が影響したものと考えられる。すなわち、カルシウム要求量の高い時期 (成長期) に食餌性カルシウムレベルが低いために利用率 (吸収量) が高まり、その結果、高い吸収率で落ち着いたために群間の有意差が認められなか

ったのではないだろうか。第4週や第6週では、特に Control 食摂取ラットの吸収率の低下が OVX 群、Sham 群に関係なく顕著に見られた。これは通常に加齢による吸収率の低下によるものと思われる。GGH 摂取ラットでは、Control 食摂取ラットほどではないが、OVX 群で吸収率の低下が見られた。P-GGH 摂取ラットでは、経日的な吸収率の低下は認められるが他の食餌群と比較して明らかに低下の度合いは緩やかであり、また OVX 群と Sham 群のあいだに有意差は認められないことから、P-GGH の摂取によってエストロゲン欠乏によるカルシウム吸収の低下と、加齢によるカルシウム吸収の低下を防止することが可能であると考えられる。

血漿中カルシウム濃度

血漿中カルシウム濃度を Table 6-2 に示した。

全ての群において統計的有意差はなく、前章までの結果と同じであった。

各消化管内容物中のカルシウムの非不溶化率

回腸、盲腸及び結腸の内容物中総カルシウム量、非不溶性カルシウム量及びカルシウムの非不溶化率を Table 6-4 から 6-6 に示した。

回腸においては総カルシウム量に有意差はないものの可溶性カルシウム量で P-GGH 摂取群で高値を示した結果、P-GGH 摂取群でのカルシウムの非不溶化率が他の食餌群と比較して有意に高くなった。盲腸においては Control 食摂取群の総カルシウム量が高値を示したが可溶性カルシウム量が Control 食摂取、GGH 摂取で変わらないため、結果として GGH 摂取群のカルシウムの可溶性が高くなった。結腸では、Control 食、GGH

食、P-GGH 食の順に総カルシウム量、可溶性カルシウム量とも少なくなっていたため、結果としてカルシウムの非不溶化率は P-GGH でやや低い他は有意差が認められなかった。

P-GGH 摂取によって回腸での非不溶性カルシウム量が増加し、カルシウムの非不溶化率が高値を示すことは前章の実験までで確認されていることであり、今回もそれらの結果を支持する結果となった。また GGH 摂取ラットの盲腸でのカルシウム非不溶化率の高さも前章までの結果を支持するものであり、後述する内容物中の pH や有機酸量から考えて盲腸発酵によるものと思われる。

なおカルシウムの非不溶化率（利用率）や吸収率は食物繊維の種類に依存するという報告（27,93-95）にもあるように、今回の実験において食餌による違いは認められたが、OVX、Sham 間における非不溶化率には大きな違いは認められなかった。

各消化管の重量および内容物の pH

消化管内容物の pH を Table 6-7 に、各消化管壁の重量を Table 6-8 に、消化管内容物の重量を Table 6-9 にそれぞれ示した。

pH に関しては、回腸内容物においては統計的有意差は認められなかった。盲腸においては GGH 及び P-GGH 摂取群で Control 食摂取群と比較して有意に低くなっていた。また結腸においては GGH 摂取群においてやや低い値を示した。GGH や P-GGH 摂取群の盲腸において pH が低下することは、前章までの実験結果や後述する有機酸量から考えて、GGH や P-GGH 由来の有機酸によると考えられる。結腸における pH の傾向は、盲腸発酵で作られた有機酸によって低 pH 化した内容物の流入の結果であると考えられ

る。

消化管壁重量は、回腸と結腸においては統計的有意差は認められなかったが、盲腸壁において Control 食摂取群と比較して GGH や P-GGH を摂取した群で有意に増加していた。また同様に消化管内容物も回腸と結腸においては統計的有意差は認められなかったが、盲腸内容物で GGH 及び P-GGH を摂取した群で Control 食と比較して明らかに増加していた。これらは前章でも述べているように発酵性の高い食物繊維類を摂取したときに観察される現象であり、今回の実験においても前章までと同様に GGH や P-GGH を摂取したラットにおいて盲腸発酵に起因した盲腸壁肥大および盲腸内容物の増加があったと考えることが出来る。

盲腸および結腸内容物中の有機酸量

盲腸内容物中の有機酸量を Table 6-10 に、結腸内容物中の有機酸量を Table 6-11 にそれぞれ示した。

盲腸内容物では、GGH 摂取群が Control 食摂取群と比較して、イソ吉草酸を除き全ての有機酸で有意に高く、また P-GGH 摂取群も Control 食摂取群と比べて殆どの有機酸で高値を示していた。また結腸内容物では、Control 食摂取群と P-GGH 摂取群とでは、その有機酸量に統計的有意差は確認できなかった。GGH 摂取群はそれらと比較してやや高い有機酸量を示していた。

GGH の盲腸部位での高い発酵性は前章までの結果からも明らかである。これにより盲腸壁重量や内容物重量の増加、内容物 pH の低下などが起こっていると考えられる。生産された有機酸は酢酸が多めの傾向を示した。しかし第 4 章ではプロピオン酸発酵が

主体の結果であり、また第5章では酢酸発酵が主体の結果であった。今回はどちらかと言えば全体的に発酵量が多かったと言った結果であり、それぞれの章で統一した結果とはならなかった。しかしGGH（グアガムを含む）はこれまでの報告でも酪産発酵が主体（96）、プロピオン酸発酵が主体（97）、酪産の他酢酸発酵も進んでいる（98）という様に統一した結果が得られていないのが現状である。原因の一つに腸内細菌叢があると思われるが、よく分からない点であるため今後の研究の検討課題の一つとしたい。P-GGHは発酵性はあるがGGHより劣るという点で前章までの結果を踏襲している。またプロピオン酸の発酵生産が比較的高いことも特徴である。このようにGGHとP-GGHで発酵パターンが異なることについては、リン酸基の導入過程における反応において、その立体構造等が変化していることを物語っているのかもしれない。しかしP-GGHにおいても発酵性が失われなかったために、pHの低下や盲腸壁重量、盲腸内容物重量の増加が引き起こされたと考えることが出来る。

結腸においてはP-GGHはまったく発酵性は認められなかった。しかしGGHにおいては若干有機酸の上昇が観察されている。前章（第5章）のような盲腸を切除した条件下では結腸における発酵現象は数多く報告されているが、normalラットにおけるグアガム摂取による結腸発酵も幾つか報告はある（99）。今回は結腸発酵が起こったのか、盲腸から有機酸が流入したのかの判断を付けることは難しい。また前章までの発酵パターンとも異なっていることなどから有機酸発酵についてはまだ検討の余地が残っていると考え、今後の検討課題としたい。

大腿骨中のカルシウム濃度を Fig. 6-3 に、大腿骨強度を Fig. 6-4 に示した。

カルシウム濃度は、Control 食摂取ラットと GGH 摂取ラットで OVX 群の方が有意に低い値を示した。しかし P-GGH 摂取ラットにおいては手術の有無はカルシウム濃度に影響を与えなかった。また、Sham 群の GGH 摂取ラットと P-GGH 摂取ラットの間には有意差は認められなかったが、基本的傾向として P-GGH > GGH > Control 食という順でカルシウム濃度が高くなっていた。大腿骨強度は統計的に有意ではないが、カルシウム濃度と同様の傾向を示していた。

Control 食摂取ラットにおいて Sham 群が OVX 群よりカルシウム濃度も骨強度も高い値を示したことは、この実験による閉経後の骨粗鬆状態のモデリングというねらいの一つが成功していることを示している。そして GGH や P-GGH を摂取することによってカルシウム濃度や骨強度が上昇するという結果、特に P-GGH を摂取することによってカルシウム濃度がほぼ改善されたということは、P-GGH がエストロゲン欠乏によるカルシウム吸収や骨カルシウム量の低下に対して十分効果があると考えることが出来る。

なお骨強度に対しては OVX、低カルシウム食の影響が Sham 群と比べて現れてくるのには 6~12 週かかるという報告 (100) もあり、今回は飼育期間がやや短かったために差が出にくかったのかもしれない。

6-4 まとめ

本章では、P-GGH 摂取による骨粗鬆症モデルへの病症改善効果について検討を行った。

結果より、P-GGH の摂取はカルシウムの吸収率を上昇させ、骨へのカルシウムの沈

着を促進し、骨強度を増加させた。GGH を摂取することによっても同様の現象は認められるが、P-GGH 摂取に起因するこれらの現象は、OVX 群内での改善・上昇に留まらず、Sham 群の数値レベルまでの改善・回復が観察された。これは P-GGH の摂取が骨粗鬆症の症状改善に効果があることを意味していると考えられる。これらの現象・効果については Fig. 6-2-1 や 6-2-2 から推測できるように、P-GGH の摂取は加齢やエストロゲン欠乏によるカルシウム吸収率の低下を緩和することにより、骨強度等を改善していると言える。第 1 章の序論で述べたようにカルシウム吸収は能動輸送と受動輸送からなっており、P-GGH の摂取においては回腸でのカルシウムの非不溶化率を上げ、受動輸送を亢進するものと考えられる。このため加齢などによりカルシウムの吸収力や骨形成と骨吸収のバランスが崩れても、カルシウムの体内への供給が十二分に行われるために、通常より疾病の進行が緩和されるのではないだろうか。

この様に、食物 (P-GGH) の摂取によって疾病の進行を改善出来ることを証明できたことは大変意義があると思われる。

Table 6-1-1. 試験飼料の組成 (/kg diet)

	Control diet	GGH diet	P-GGH diet
Casein	237.5 g	225.0 g	225.0 g
Sucrose	612.7 g	580.5 g	580.5 g
Corn oil	47.5 g	45.0 g	45.0 g
Ca free mineral mixture, Macro ¹	36.1 g	34.2 g	34.2 g
Mineral mixture, Micro	1.9 g	1.8 g	1.8 g
Vitamin mixture	9.5 g	9.0 g	9.0 g
Vitamin E granule	0.9 g	0.9 g	0.9 g
Choline bitartrate	3.8 g	3.6 g	3.6 g
Cellulose ²	50.1 g	50.0 g	50.0 g
GGH	—	50.0 g	—
P-GGH	—	—	50.0 g

1 : Table 6-1-2を参照

2 : 結晶セルロース (アビセルPH102 ; 旭化成工業株式会社)

特に注釈のないものは、第2章の記載を参照のこと。

Table 6-1-2. Ca free mineral mixture, Macroの組成

	/1kg mixture
KIO ₃	0.02 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.88 g
MnSO ₄ ·5H ₂ O	1.64 g
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	5.92 g
Fe(C ₆ H ₅ O ₇)·7H ₂ O	23.67 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	142.35 g
NaCl	337.49 g
KH ₂ PO ₄	488.04 g

Table 6-2. 飼育に伴う各種重量

		No. of rats	Initial Body Weight	Final Body Weight	Body Weight Gain
		n	g	g	g / 6 weeks
Control	OVX	8	156.0 ± 3.4	276.3 ± 2.2 a	123.2 ± 2.3 a
	Sham	8	153.9 ± 2.6	262.5 ± 6.3 b	100.3 ± 4.1 b
GGH	OVX	7	155.9 ± 3.2	274.5 ± 4.5 a	123.8 ± 2.0 a
	Sham	8	155.3 ± 4.0	260.8 ± 6.1 b	97.8 ± 3.3 b
P-GGH	OVX	7	156.1 ± 3.0	279.0 ± 2.0 a	121.0 ± 1.9 a
	Sham	8	155.3 ± 3.0	246.7 ± 6.6 b	85.3 ± 5.3 c
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			NS	<i>P</i> = 0.728	<i>P</i> = 0.039
Operation (B)			NS	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001
A × B			NS	<i>P</i> = 0.408	<i>P</i> = 0.186

		No. of rats	Food Intake	Uterine Weight	Plasma Ca Concentration
		n	g / 6 weeks	g / 100 g - B.W.	mg / dl
Control	OVX	8	684.0 ± 9.6 ab	0.027 ± 0.001 b	10.41 ± 0.50
	Sham	8	670.4 ± 16.9 bc	0.170 ± 0.018 a	10.27 ± 0.50
GGH	OVX	7	705.6 ± 2.5 a	0.025 ± 0.002 b	10.61 ± 0.72
	Sham	8	664.5 ± 8.3 bc	0.185 ± 0.015 a	10.46 ± 0.48
P-GGH	OVX	7	701.0 ± 2.4 a	0.027 ± 0.001 b	10.41 ± 0.88
	Sham	8	647.7 ± 13.8 c	0.204 ± 0.027 a	10.05 ± 0.36
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			<i>P</i> = 0.585	<i>P</i> = 0.550	NS
Operation (B)			<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001	NS
A × B			<i>P</i> = 0.178	<i>P</i> = 0.569	NS

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-3-1. 出納試験期間の摂食量及び糞乾燥重量 (第1週、第2週)

		No. of rats n	Food Intake for Balance Periods	
			1st Week g / 3days	2nd Week g / 3days
Control	OVX	8	46.4 ± 1.9 bc	52.4 ± 1.0 ab
	Sham	8	49.3 ± 1.7 abc	49.6 ± 2.1 ac
GGH	OVX	7	53.0 ± 1.9 a	54.0 ± 0.1 ab
	Sham	8	46.2 ± 2.2 c	50.6 ± 1.5 ab
P-GGH	OVX	7	51.3 ± 0.8 ab	54.1 ± 0.1 a
	Sham	8	45.8 ± 1.4 c	44.0 ± 2.0 d
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			<i>P</i> = 0.602	<i>P</i> = 0.087
Operation (B)			<i>P</i> = 0.033	<i>P</i> < 0.001
A × B			<i>P</i> = 0.017	<i>P</i> = 0.031

		No. of rats n	Feces Dry Weight	
			1st Week g / 3days	2nd Week g / 3days
Control	OVX	8	2.60 ± 0.24 c	2.80 ± 0.20 cd
	Sham	8	2.76 ± 0.17 bc	2.64 ± 0.11 d
GGH	OVX	7	3.60 ± 0.32 a	3.71 ± 0.20 a
	Sham	8	3.25 ± 0.24 abc	3.33 ± 0.17 ab
P-GGH	OVX	7	2.97 ± 0.11 abc	3.20 ± 0.12 bc
	Sham	8	3.38 ± 0.30 ab	2.63 ± 0.10 d
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			<i>P</i> = 0.014	<i>P</i> < 0.001
Operation (B)			<i>P</i> = 0.719	<i>P</i> = 0.006
A × B			<i>P</i> = 0.301	<i>P</i> = 0.440

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-3-2. 出納試験期間の摂食量及び糞乾燥重量 (第4週、第6週)

		No. of rats n	Food Intake for Balance Periods	
			4th Week g / 3days	6th Week g / 3days
Control	OVX	8	45.5 ± 0.1 a	43.5 ± 1.0
	Sham	8	43.7 ± 1.1 a	38.3 ± 4.5
GGH	OVX	7	45.4 ± 0.2 a	44.3 ± 0.6
	Sham	8	44.3 ± 0.5 a	43.8 ± 0.8
P-GGH	OVX	7	45.2 ± 0.1 a	45.3 ± 0.2
	Sham	8	40.5 ± 1.8 b	41.4 ± 1.6
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			<i>P</i> = 0.094	NS
Operation (B)			<i>P</i> = 0.003	NS
A × B			<i>P</i> = 0.153	NS

		No. of rats n	Feces Dry Weight	
			4th Week g / 3days	6th Week g / 3days
Control	OVX	8	2.85 ± 0.07	2.67 ± 0.12 b
	Sham	8	2.88 ± 0.19	2.57 ± 0.16 b
GGH	OVX	7	3.12 ± 0.18	2.97 ± 0.14 ab
	Sham	8	2.78 ± 0.12	3.19 ± 0.13 a
P-GGH	OVX	7	2.98 ± 0.05	3.25 ± 0.15 a
	Sham	8	2.89 ± 0.24	2.90 ± 0.20 ab
ANOVA <i>P</i> value				
Diet (A)			NS	<i>P</i> = 0.008
Operation (B)			NS	<i>P</i> = 0.543
A × B			NS	<i>P</i> = 0.192

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-4. 回腸内容物中の可溶性、総カルシウム量およびカルシウム可溶化率

		No. of rats	Soluble Ca	Total Ca	Ca solubility
		n	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	(%)
Control	OVX	8	14.4 \pm 3.5 b	134.1 \pm 11.0	10.5 \pm 1.9 b
	Sham	8	16.2 \pm 1.8 b	136.0 \pm 8.4	12.0 \pm 1.1 b
GGH	OVX	7	15.0 \pm 2.9 b	129.1 \pm 13.5	11.9 \pm 1.8 b
	Sham	8	16.9 \pm 2.1 ab	139.1 \pm 12.1	12.1 \pm 1.1 b
P-GGH	OVX	7	23.9 \pm 2.2 a	146.0 \pm 14.8	16.7 \pm 1.2 a
	Sham	8	22.8 \pm 1.4 a	134.0 \pm 7.5	17.0 \pm 0.6 a
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			<i>P</i> = 0.001	NS	<i>P</i> < 0.001
Operation (B)			<i>P</i> = 0.650	NS	<i>P</i> = 0.501
A \times B			<i>P</i> = 0.754	NS	<i>P</i> = 0.850

Values are means \pm standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-5. 盲腸内容物中の可溶性、総カルシウム量およびカルシウム可溶化率

		No. of rats	Soluble Ca	Total Ca	Ca solubility
		n	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	(%)
Control	OVX	8	10.3 \pm 1.7	76.3 \pm 4.2 a	11.0 \pm 1.9 b
	Sham	8	12.3 \pm 1.9	84.6 \pm 7.6 a	11.5 \pm 1.1 b
GGH	OVX	7	10.3 \pm 1.8	43.1 \pm 8.5 b	21.8 \pm 4.1 a
	Sham	8	7.7 \pm 2.1	40.9 \pm 11.4 b	16.4 \pm 3.1 ab
P-GGH	OVX	7	7.6 \pm 1.5	50.0 \pm 2.6 b	18.9 \pm 2.7 ab
	Sham	8	8.2 \pm 1.1	51.2 \pm 2.6 b	13.0 \pm 1.9 ab
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			NS	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.019
Operation (B)			NS	<i>P</i> = 0.582	<i>P</i> = 0.108
A \times B			NS	<i>P</i> = 0.796	<i>P</i> = 0.427

Values are means \pm standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-6. 結腸内容物中の可溶性、総カルシウム量およびカルシウム可溶化率

		No. of rats	Soluble Ca	Total Ca	Ca solubility
		n	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	($\mu\text{mol/g}$ of contents)	(%)
Control	OVX	8	10.2 \pm 4.3 a	97.9 \pm 8.7 ab	10.0 \pm 3.8 ab
	Sham	8	11.0 \pm 1.9 ab	109.1 \pm 17.6 a	10.2 \pm 1.4 ab
GGH	OVX	7	6.7 \pm 1.5 ab	77.1 \pm 25.0 abc	11.3 \pm 2.1 ab
	Sham	8	7.1 \pm 1.8 ab	53.2 \pm 20.5 c	15.8 \pm 2.1 ab
P-GGH	OVX	7	4.7 \pm 0.6 ab	54.1 \pm 9.0 bc	9.4 \pm 0.7 b
	Sham	8	3.7 \pm 0.9 b	48.1 \pm 13.7 c	8.5 \pm 1.4 b
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			<i>P</i> = 0.026	<i>P</i> = 0.013	<i>P</i> = 0.273
Operation (B)			<i>P</i> = 0.440	<i>P</i> = 0.546	<i>P</i> = 0.878
A \times B			<i>P</i> = 0.753	<i>P</i> = 0.559	<i>P</i> = 0.291

Values are means \pm standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

Table 6-7. 消化管内容物のpH

		No. of rats	ileum	cecum	colon
Control	OVX	8	6.75 ± 0.19	6.72 ± 0.04 a	6.10 ± 0.21 ab
	Sham	8	6.73 ± 0.13	6.45 ± 0.19 a	6.34 ± 0.06 a
GGH	OVX	7	6.55 ± 0.20	5.72 ± 0.18 b	5.87 ± 0.14 b
	Sham	8	6.76 ± 0.11	5.74 ± 0.19 b	5.85 ± 0.13 b
P-GGH	OVX	7	6.38 ± 0.12	5.70 ± 0.10 b	6.05 ± 0.02 ab
	Sham	8	6.52 ± 0.08	5.70 ± 0.15 b	6.05 ± 0.08 ab
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			NS	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> = 0.020
Operation (B)			NS	<i>P</i> = 0.828	<i>P</i> = 0.474
A × B			NS	<i>P</i> = 0.907	<i>P</i> = 0.522

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-8. 回腸、盲腸及び結腸壁重量

		No. of rats	ileum	cecum	colon
		n	g/100 g - B.W.	g/100 g - B.W.	g/100 g - B.W.
Control	OVX	8	0.746 ± 0.182	0.337 ± 0.013 c	0.355 ± 0.020
	Sham	8	0.701 ± 0.087	0.376 ± 0.041 bc	0.371 ± 0.014
GGH	OVX	7	0.676 ± 0.064	0.516 ± 0.046 a	0.376 ± 0.026
	Sham	8	0.608 ± 0.031	0.460 ± 0.020 ab	0.387 ± 0.014
P-GGH	OVX	7	0.775 ± 0.109	0.492 ± 0.045 a	0.336 ± 0.014
	Sham	8	0.617 ± 0.042	0.480 ± 0.038 a	0.385 ± 0.011
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			NS	<i>P</i> = 0.001	NS
Operation (B)			NS	<i>P</i> = 0.748	NS
A × B			NS	<i>P</i> = 0.434	NS

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-9. 回腸、盲腸及び結腸内容物重量

		No. of rats	ileum	cecum	colon
		n	g / 100 g - B.W.	g / 100 g - B.W.	g / 100 g - B.W.
Control	OVX	8	0.18 ± 0.06	0.85 ± 0.05 b	0.11 ± 0.05
	Sham	8	0.18 ± 0.02	0.91 ± 0.09 b	0.14 ± 0.03
GGH	OVX	7	0.15 ± 0.04	1.76 ± 0.15 a	0.19 ± 0.04
	Sham	8	0.23 ± 0.07	1.55 ± 0.14 a	0.19 ± 0.06
P-GGH	OVX	7	0.18 ± 0.04	1.83 ± 0.12 a	0.17 ± 0.05
	Sham	8	0.23 ± 0.03	1.53 ± 0.10 a	0.23 ± 0.07
ANOVA <i>P</i> value					
Diet (A)			NS	<i>P</i> < 0.001	NS
Operation (B)			NS	<i>P</i> = 0.121	NS
A × B			NS	<i>P</i> = 0.286	NS

Values are means ± standard errors. Values not sharing a common superscript are significantly different at *P* < 0.05.

NS: no significant difference between any values.

Table 6-10. 盲腸内容物中の有機酸量 ($\mu\text{mol}/\text{content}$)

	Control n = 8	GGH n = 7	P-GGH n = 7
Ovariectomized			
Acetate	58.8 \pm 6.2 c	220 \pm 66 a	98.8 \pm 14.4 bc
Propionate	21.4 \pm 2.5 c	81.5 \pm 16.9 a	57.9 \pm 10.4 ab
Butyrate	5.88 \pm 1.33 b	24.3 \pm 8.5 a	12.4 \pm 2.5 ab
Isovalerate	2.19 \pm 0.32 ab	2.13 \pm 0.70 ab	2.79 \pm 0.65 a
Total SCFA	88.3 \pm 9.2 c	338 \pm 74 a	172 \pm 25 bc
Lactate	3.24 \pm 0.22 b	20.5 \pm 7.3 a	5.43 \pm 1.08 b
Succinate	1.65 \pm 0.63 b	4.57 \pm 0.83 ab	8.19 \pm 4.62 ab

	Control n = 8	GGH n = 8	P-GGH n = 8
Sham			
Acetate	65.1 \pm 3.5 c	183 \pm 32 ab	70.3 \pm 8.3 c
Propionate	27.2 \pm 5.8 c	67.5 \pm 9.5 ab	41.5 \pm 4.5 bc
Butyrate	5.19 \pm 0.59 b	24.5 \pm 7.1 a	14.4 \pm 1.8 ab
Isovalerate	1.54 \pm 0.33 ab	0.64 \pm 0.43 b	1.05 \pm 0.50 b
Total SCFA	99.1 \pm 8.8 c	276 \pm 40 ab	127 \pm 14 c
Lactate	1.93 \pm 0.74 b	16.2 \pm 3.3 a	4.11 \pm 0.38 b
Succinate	6.43 \pm 1.12 b	20.2 \pm 7.3 a	3.60 \pm 0.84 b

	<i>P</i> value		
	Diet (A)	Operation (B)	A \times B
Acetate	< 0.001	0.360	0.677
Propionate	< 0.001	0.310	0.473
Butyrate	< 0.001	0.985	0.938
Isovalerate	0.518	0.004	0.551
Total SCFA	< 0.001	0.315	0.618
Lactate	< 0.001	0.427	0.885
Succinate	0.027	0.241	0.142

Each value is the mean \pm SE. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

Total SCFA is the sum of acetate, propionate, butyrate, and isovalerate.

Table 6-11. 結腸内容物中の有機酸量 ($\mu\text{mol}/\text{content}$)

	Control n = 8	GGH n = 7	P-GGH n = 7
Ovariectomized			
Acetate	1.35 \pm 1.09 b	6.73 \pm 3.14 a	1.68 \pm 0.82 b
Propionate	7.14 \pm 2.93 b	20.9 \pm 6.1 a	5.46 \pm 1.41 b
Butyrate	0.00 \pm 0.00 b	0.22 \pm 0.18 b	0.00 \pm 0.00 b
Isovalerate	0.03 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Total SCFA	8.52 \pm 3.98 b	29.0 \pm 8.6 a	7.14 \pm 2.14 b
Lactate	0.30 \pm 0.30 b	1.34 \pm 0.57 a	0.00 \pm 0.00 b
Succinate	0.66 \pm 0.44	0.50 \pm 0.25	0.24 \pm 0.16
	Control n = 8	GGH n = 8	P-GGH n = 8
Sham			
Acetate	2.52 \pm 0.93 a	7.48 \pm 3.09 a	2.24 \pm 0.90 b
Propionate	11.4 \pm 4.7 ab	19.2 \pm 5.6 a	5.71 \pm 1.17 b
Butyrate	0.36 \pm 0.36 b	2.49 \pm 1.24 a	0.00 \pm 0.00 b
Isovalerate	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.03 \pm 0.03
Total SCFA	14.3 \pm 5.9 ab	29.2 \pm 9.6 a	7.97 \pm 2.07 b
Lactate	0.31 \pm 0.31 b	1.49 \pm 0.59 a	0.13 \pm 0.13 b
Succinate	2.62 \pm 1.93	5.12 \pm 2.92	0.18 \pm 0.13
	P value		
	Diet (A)	Operation (B)	A \times B
Acetate	0.004	0.723	0.938
Propionate	0.005	0.7905	0.780
Butyrate	0.026	0.098	0.176
Isovalerate	0.579	0.911	0.225
Total SCFA	0.039	0.022	0.203
Lactate	0.003	0.767	0.981
Succinate	0.221	0.100	0.345

Each value is the mean \pm SE. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

Total SCFA is the sum of acetate, propionate, butyrate, and isovalerate.

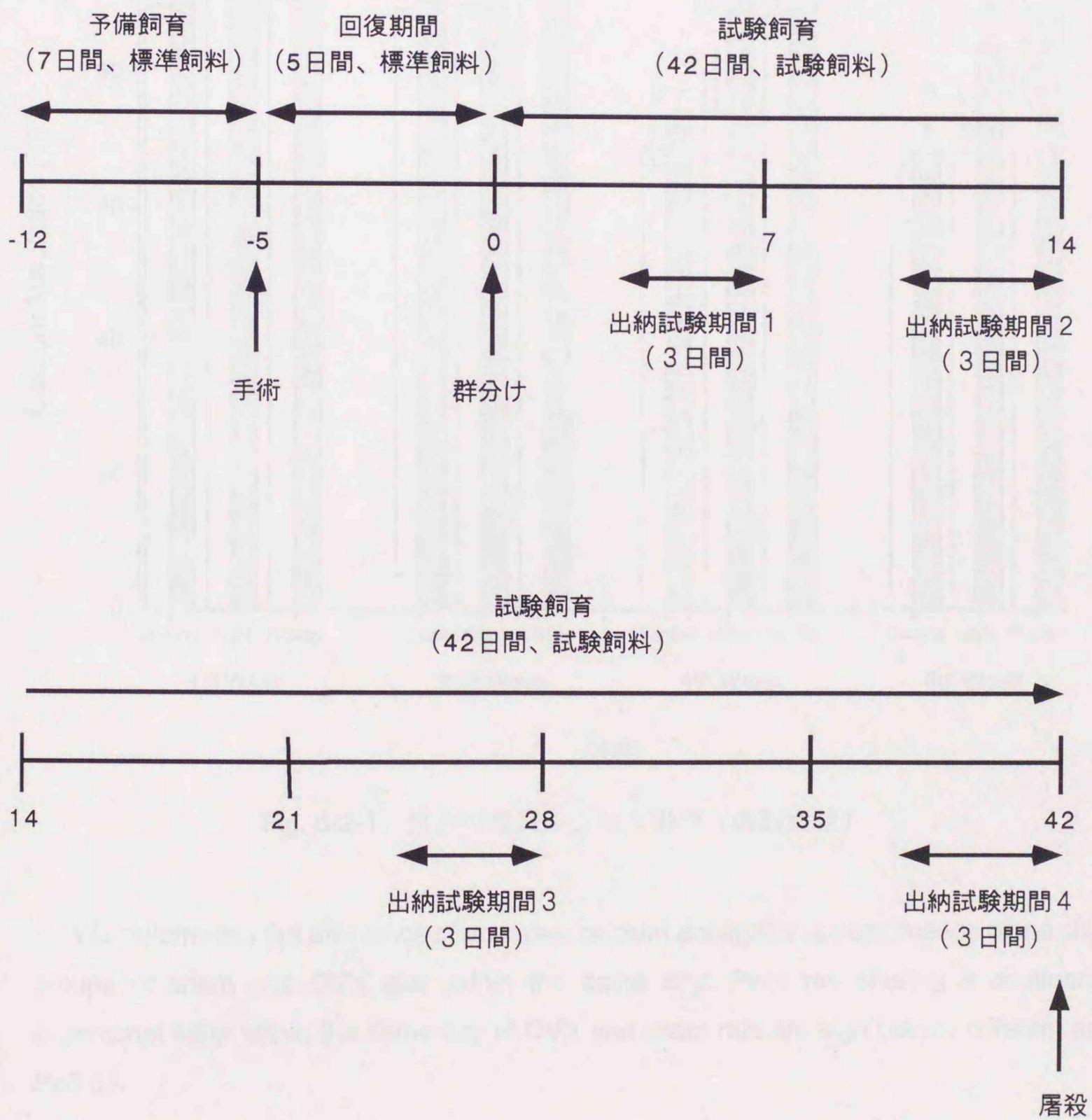


Fig. 6-1 実験スケジュール

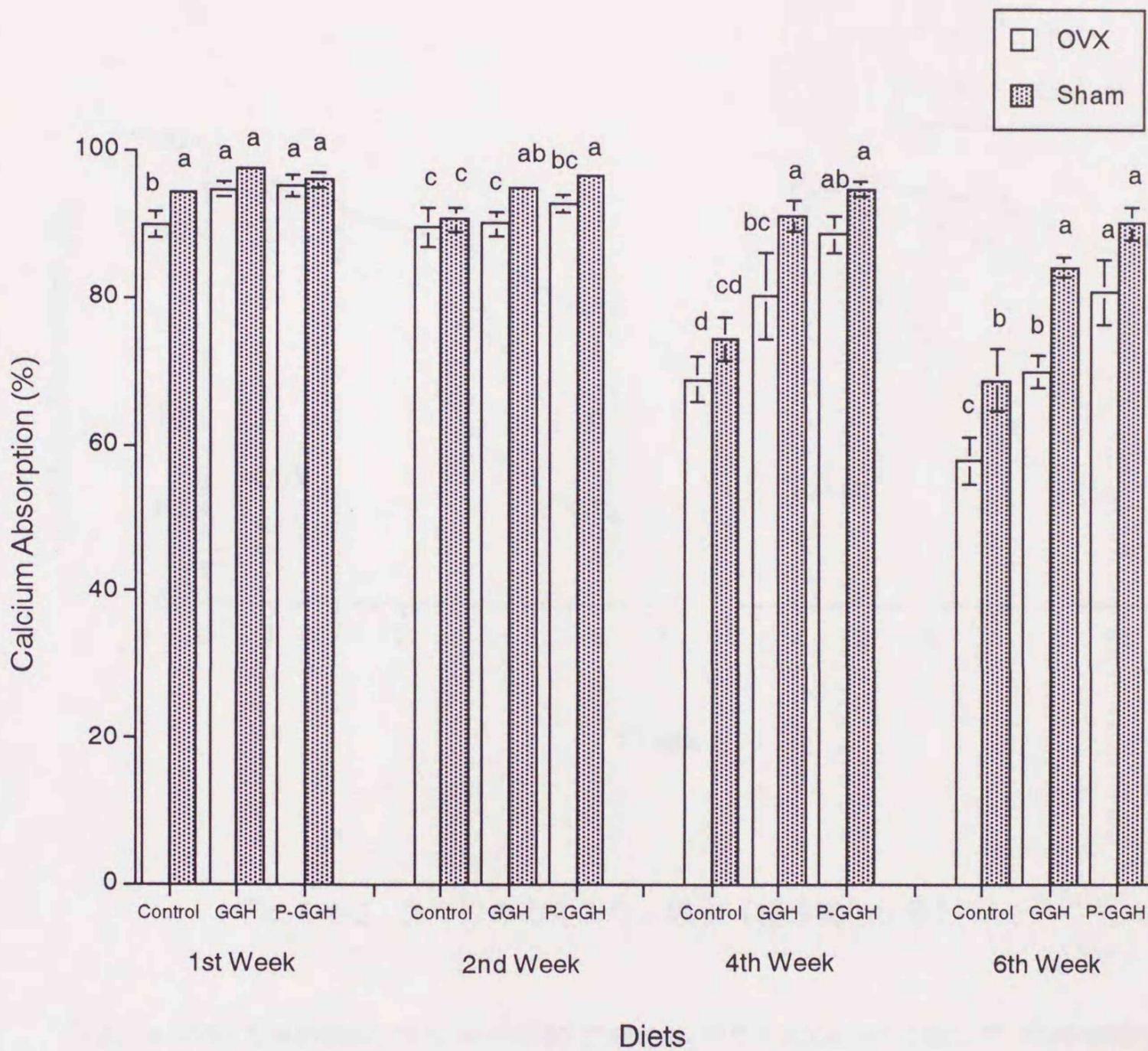


Fig. 6-2-1 見かけのカルシウム吸収 (週別比較)

We determined the difference of apparent calcium absorption among means of the six groups of sham and OVX rats within the same day. Plots not sharing a common superscript letter within the same day of OVX and sham-rats are significantly different at $P < 0.05$.

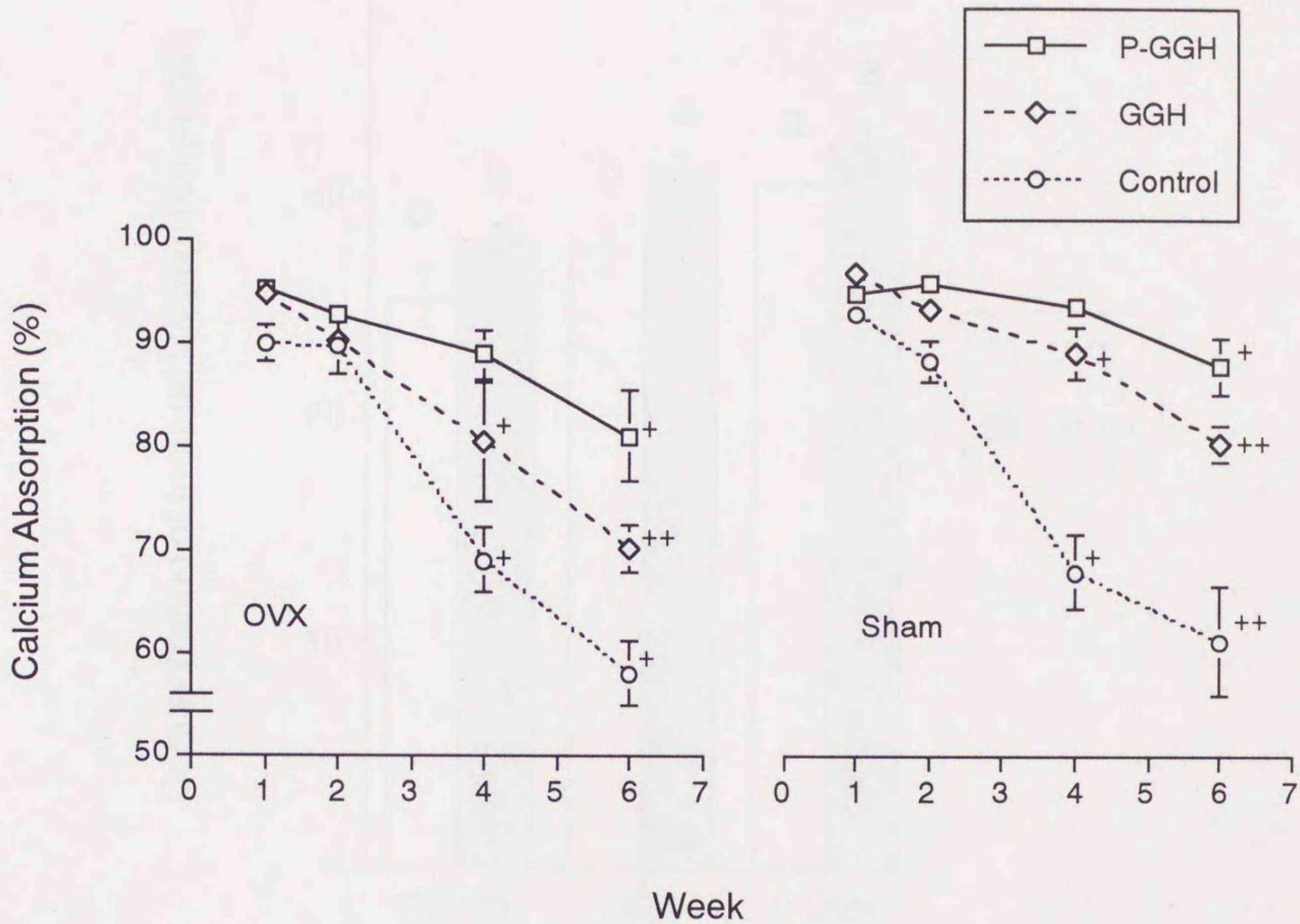


Fig. 6-2-2 見かけのカルシウム吸収（経日変化比較）

Graphs show the results of time-based changes in the apparent calcium absorption in OVX and sham operated rats for the first week (d4-d7), second week (d11-d14), fourth week (d25-d28), and sixth week (d39-d42). Each value is the mean for eight (Control-OVX, and all-Sham) or seven (GGH and P-GGH-OVX) rats with SE shown as a vertical bar. “+” shows a significant difference from the first week within the same group at $P < 0.05$.

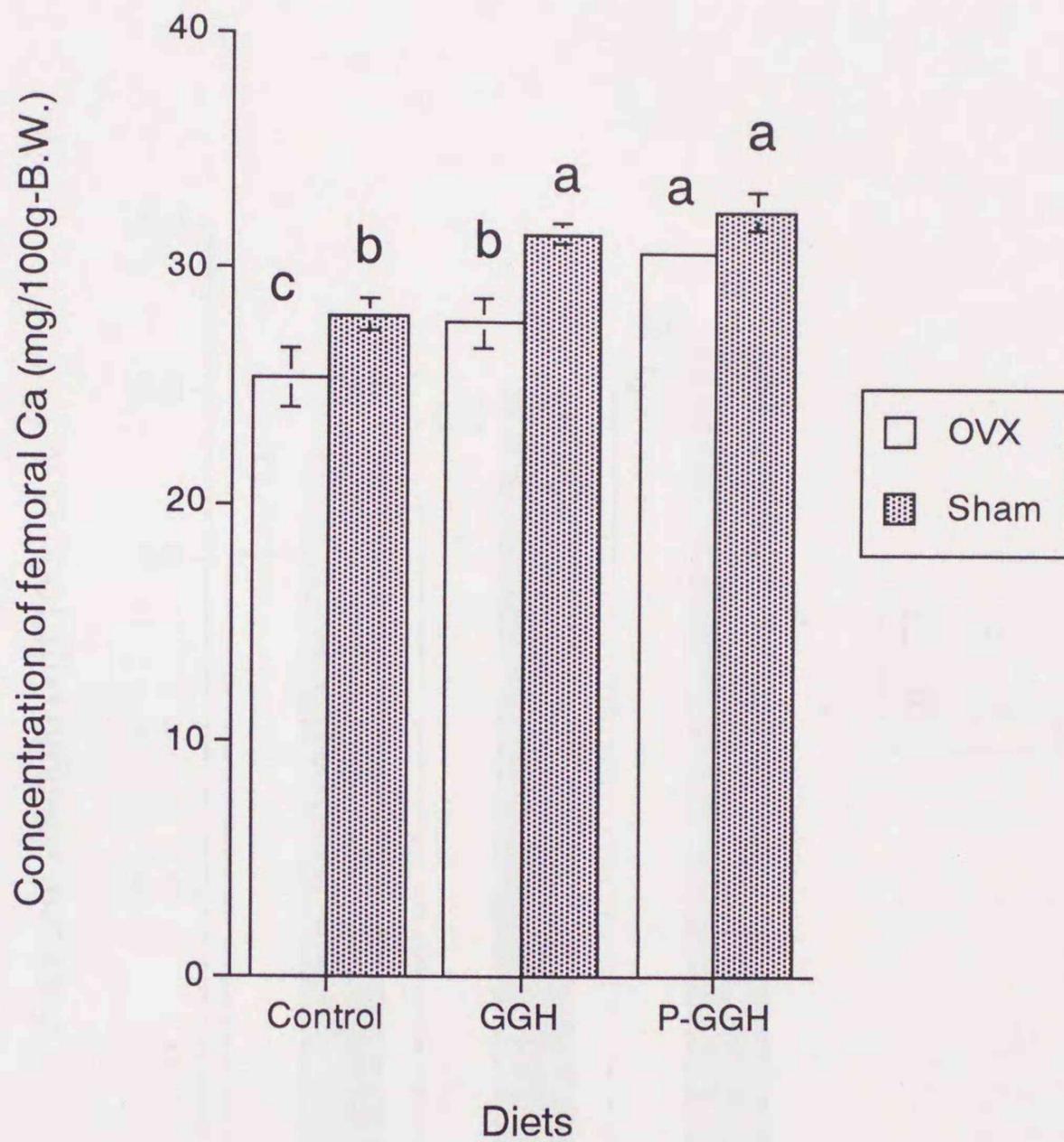


Fig. 6-3 Concentration of Calcium in Femur in Rats. Each value is the mean for eight (Control-OVX, and all-Sham) or seven (GGH and P-GGH-OVX) rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

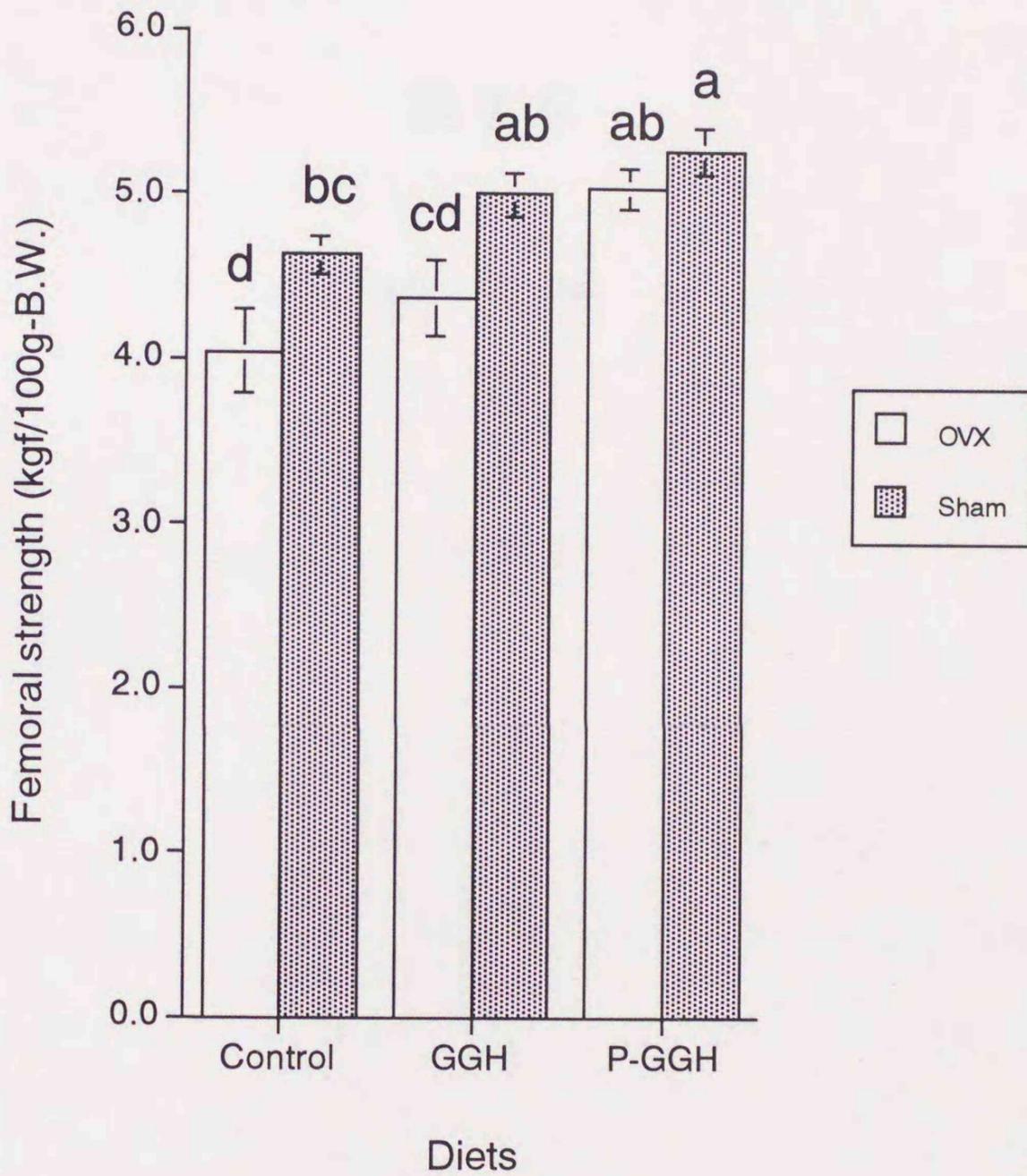


Fig.6-4 Strength of the Left Femur in Rats. Each value is the mean for eight (Control-OVX, and all-Sham) or seven (GGH and P-GGH-OVX) rats with SE shown as a vertical bar. Values not sharing a common superscript are significantly different at $P < 0.05$.

第7章

総括

序論でも述べたように、この研究の目的は以下の点であった。

- 1 水溶性食物繊維を元にリン酸基を導入することにより、CPP を上回るカルシウム吸収亢進作用（カルシウム塩の沈殿形成阻害作用）を持たせる。
- 2 In vivo でのカルシウム吸収亢進作用の確認。
- 3 リン酸化食物繊維の作用機能の解明、推察。

これらについて以下のようなことがわかった。

1について

本研究室で知見のあった GGH を元にメタリン酸を添加することによって P-GGH を得ることが出来た。方法は合成条件を色々試した結果、10% (w/v) の GGH 水溶液を 5 分間沸騰させた後、GGH に対して 1.5 倍量のメタリン酸ナトリウムを添加し、45°C で 4 時間攪拌。この時 pH を 12.5 とした。その後、透析もしくは限外濾過で分子量 8,000~10,000 以下の低分子物質や未反応メタリン酸を除去して、溶液を凍結乾燥にかける。この方法によって得られた P-GGH は CPP と同程度のリン酸カルシウム沈殿の形成阻害作用を示した (Fig. 3-7)。

なお、この合成方法は「カルシウム吸収を促進する多糖類食品素材およびその製造方法 (特願平 10-353968)」として特許出願中である。

2について

10 週齢のラットに Control 食、GGH 食、P-GGH 食を与えたところ、P-GGH 食においてカルシウム吸収が上昇し (Fig. 4-3 A)、骨中カルシウム量が増加した (Fig. 4-5)。これ

により P-GGH が in vivo においてもカルシウムの吸収を亢進する作用があることがわかった。これに伴い、回腸におけるカルシウムの非不溶化が P-GGH において高く (Table 4-4)、また盲腸内有機酸量も GGH 程ではないが高い発酵を見せ (Table 4-7)、pH も低かった (Table 4-5)。

これらの結果だけでは P-GGH によって起こるカルシウムの吸収亢進が小腸下部において起こっているのか、GGH のように盲腸発酵が主原因なのかが判断できなかった。そこで第 5 章で盲腸切除ラットを用いた実験を行った結果、Sham 群では GGH 食ラットも P-GGH 食ラットも同様に Control 食に対して有意にカルシウム吸収が亢進したのに対して、CCX 群では P-GGH ラットで吸収亢進に変化がなかったのに対して GGH ラットでは吸収亢進が認められなかった (Fig. 5-2 A)。これにより P-GGH による吸収亢進に盲腸発酵が関与していないことが確認され、その結果、小腸下部におけるカルシウムの非不溶化が主要因であることがわかった。

これらの結果を受けて第 6 章では P-GGH が閉経後骨粗鬆症の病症改善に効果があるかどうかについて OVX ラットを用いて実験した。その結果、P-GGH は経日的なカルシウム吸収量の減少や骨カルシウム量などについてある程度の病症進行抑制効果を示すとともに、エストロゲン欠乏によるカルシウムの吸収量の減少も改善傾向を示した (Fig. 6-2-1, 6-2-2)。

以上の結果より、P-GGH は in vitro のみならず in vivo においても十分なカルシウム吸収亢進作用を有すると考えられる。

3について

P-GGH が小腸下部においてカルシウムを非不溶化することによりカルシウムの吸収を亢進することは明らかである。このカルシウム非不溶化の機構のヒントになるのが、第3章で述べたように P-GGH と同様の挙動を示し P-GGH のモデルとした CPP の働きである。内藤 (41) や内藤ら (42)、また Kitts と Yuan (43) は CPP がカルシウムをキレートすることによりリン酸カルシウムとして沈殿するのを防ぎ、また比較的弱い結合定数が吸収亢進に有利であることを報告している。P-GGH も電気伝導度 (Fig. 3-8) やイオン濃度 (Fig. 3-9) の結果より P-GGH-Ca²⁺ のキレート錯体の形成によってカルシウムを非不溶化状態にしている可能性が考えられる。

以上、一連の実験において明らかになったことであるが、また一方様々な問題が浮かび上がってきている。第一に P-GGH の構造である。第3章において CPP 同様にカルシウム非不溶化能があるので分子内でリン酸基クラスターを形成していると推察しているが、実際に確認したわけではない。CPP がカルシウムを非不溶化するのは分子内のホスホセリンクラスターの存在であり、P-GGH においても GGH にはカルシウム非不溶化能はなく、またリン酸基が1分子や2分子では非不溶化能がないことからリン酸基クラスターの存在を推察しているだけである。このため、P-GGH の分子構造を直接的に確認することが今後重要である。方法としてはX線回折や各種 NMR などの構造解析の手法を用いることが必要となるであろう。

第二に非不溶化機構の更なる解析である。様々な状況から P-GGH と Ca²⁺ がキレート錯体を形成していると推察したが、Carver らはシクロスポリン A と Ca²⁺ や Mg²⁺ が錯体を形成すること (101) を、また Lukes らはエチレンジアミン四 (メチレン-フェニルホスフ

イン酸)と Ca^{2+} などが錯体を形成することやその安定度定数を NMR や電位差滴定法を用いて明らかにしている (102)。このような手法を用いることによって P-GGH と Ca^{2+} の結合状態をよりクリアに解明できるかもしれない。

またこの他に、P-GGH およびカルシウムの濃度と吸収の相互関係や、P-GGH のリン酸基導入量と吸収速度の関係、他のミネラル成分との相互作用 (他のミネラルの影響)、他の栄養素の影響など細かな条件の解析を進める必要がある。これらは Caco-2 を用いた培養細胞系での実験が望ましく、この系の確立も今後の課題である。

本研究は、CPP のホスホセリンによるリン酸基クラスターに着目し、水溶性食物繊維にリン酸基を導入することにより当初の計画通りリン酸カルシウム沈殿の形成阻害作用、さらに *in vivo* でのカルシウム吸収亢進作用を付加する事に成功した。これはカルシウム吸収を促進する新規食品素材の開発という一面のみならず、腸管におけるカルシウムの吸収機構解明という分野においても非常に興味深いものであり、ここで得られた知見は今後の研究において意義深いものであると考えられる。

- 1) 内藤 博、野口 忠、栄養化学 農芸化学全書、養賢堂、1989
- 2) 小原哲二郎、細谷憲政、簡明食辞林、樹村房、1985
- 3) 内藤 博 他、新栄養化学、朝倉書店、1993
- 4) Karbach U., Paracellular calcium transport across the small intestine. *J. Nutr.*, 122, 672-677, 1992
- 5) Uno H., Izawa Y., Koyama T., Makita T., Sugiyama M., and Urakawa N., Disorders of bone metabolism caused by small bowel resection in rats. *Gastroenterol Jpn.*, 25, 693-699, 1990
- 6) Campos M.S., Lopez-aliaga I., Barrionuevo M., Lisbona F., and Coves F., Nutritive utilization of calcium in rats: Effects of dietary fat components and vitamin D3 on intestinal resected rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 511-521, 1989
- 7) Goda T., Yamada M., Takasa S., and Hosoya N., Effect of maltitol intake on intestinal calcium absorption in the rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 277-286, 1992
- 8) Chonan O., Matsumoto K., and Watanuki M., Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 236-239, 1995
- 9) Ohta A., Osakabe N., Yamada K., Saito Y., and Hidaka H., Effects of fluc tooligosaccharides and other saccharides on Ca, Mg and P absorption in rats. *日本栄養・食糧学会誌*, 46, 123-129, 1993
- 10) Kishimoto M., Kamasaka H., Murakami A., Kawaguchi M., Matsuura T., Okada S., and Ichikawa T., Effect of phosphorylated oligosaccharide from potato-starch on calcium absorption in rats. *日本栄養・食糧学会誌*, 51, 67-72, 1998
- 11) Lee Y.S., Noguchi T., and Naito H., Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acids mixture; the role of casein phosphopeptides, *Br. J. Nutr.*, 49, 67-76, 1983
- 12) Sato R., Noguchi T., and Naito H., The necessity for the phosphate portion of casein molecules to enhance Ca absorption from the small intestine. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2415-2417, 1983
- 13) Sato R., Noguchi T., and Naito H., Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium

- absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, 67-76, 1986
- 14) Sato R., Shindo M., Gunshin H., Noguchi T., and Naito H., Characterization of phosphopeptide derived from bovine β -casein: an inhibitor to intraintestinal precipitation of calcium phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1077, 413-415, 1991
 - 15) Sasson A., Etzion Z., Shany S., Berlyne G.M., and Yagil R., Growth and bone mineralisation as affected by dietary calcium, phytic acid and vitamin D. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 72, 43-48, 1982
 - 16) Graf E., and Eaton J.W., Dietary phytate and calcium bioavailability. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 275, 51-62, 1985
 - 17) Benway D.A., and Weaver C.M., Assessing chemical form of calcium in wheat, spinach, and kale. *J. Food Sci.*, 58, 605-608, 1993
 - 18) Pastoor F.J.H., Van't Klooster A.T., Mathot J.N.J.J., and Beynen A.C., Increasing phosphorus intake reduces urinary concentrations of magnesium and calcium in adult ovariectomized cats fed purified diets. *J. Nutr.*, 125, 1334-1341, 1995
 - 19) Walker A.R.P., and Arvidsson U.B., 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-, 1954
 - 20) Cleave T.L., The neglect of natural principles in current medical practice. *J. Roy. Nav. Med. Serv.*, 42, 55-, 1956
 - 21) 太田昌徳、大腸癌患者食生活の検討—秤量法による実測調査—、*日本大腸肛門病学会誌*、40, 741-746, 1987
 - 22) Tsuji, K., and Mori, B., Disease patterns in Japan and changes in dietary fiber consumption, *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*, ed. By Spiller, G.A., and Chem, D., 383-386, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A., 1988
 - 23) 地方衛生研究所全国協議会編、食物繊維成分表、第一出版、東京、1990
 - 24) Yamaguchi, M., Diet and colon cancer. *栄養学雑誌*, 54, 71-78, 1996

- 25) Tamura, Y., Sato, T., and Munakata, A., 大腸がんと潰瘍性大腸炎. *臨床と研究*, 75, 1675-1679, 1998
- 26) Remesy C., Levrat M.A., Demigne C., and Behr S.R., Fiber fermentability in the rat cecum and its physiological consequences. *Nutr. Res.*, 12, 1235-1244, 1992
- 27) Lopez H.W., Guy C., Messenger A., Levrat M.A., Demigne C., and Remesy C., Effects of soluble corn bran arabinoxylans on cecal digestion, lipid metabolism, and mineral balance (Ca, Mg) in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 10, 500-509, 1999
- 28) Shah B.G., Malcolm S., Belonje B., Trick K.D., Brassard R., and Mongeau R., Effect of dietary cereal brans on the metabolism of calcium, phosphorus and magnesium in a long term rat study. *Nutr. Res.*, 10, 1015-1028, 1990
- 29) Spencer H., Norris C., Derler J., and Osis D., Effect of oat bran muffins on calcium absorption and calcium, phosphorus, magnesium and zinc balance in men. *J. Nutr.*, 121, 1976-1983, 1991
- 30) O'brien K.O., Allen L.H., Siu-caldera M.L., Quatromoni P., Perez A., Holick M.F., Vieira N.E., and Yergey A.L., High fiber diets slow bone turnover in young men but have no effect on efficiency of intestinal calcium absorption. *J. Nutr.*, 123, 2122-2128, 1993
- 31) Nickel K.P., Nielsen S.S., Smart D.J., Mitchell C.A., and Belury M.A., Calcium Bioavailability of vegetarian diets in rats: Potential application in a bioregenerative life-support system. *J. Food Sci.*, 62, 619-621, 631, 1997
- 32) Oku T., Konishi F., and Hosoya N., Mechanism of inhibitory effect of unavailable carbohydrate on intestinal calcium absorption. *J. Nutr.*, 112, 410-415, 1982
- 33) Radha V., and Geervani P., Utilisation of protein and calcium in adult women on cereal-legume diets containing varying amounts of fibre. *Nutr. Rep. Int.*, 30, 859-864, 1984
- 34) Trinidad T.P., Wolever T.M.S., and Thompson L.U., Availability of calcium for absorption in the small intestine and colon from diets containing available and unavailable carbohydrates: an in vitro assessment. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 47, 83-88, 1996

- 35) Vanhoof K., and De Schrijver R., Availability of minerals in rats and pigs fed non-purified diets containing inulin. *Nutr. Res.*, 16, 1017-1022, 1996
- 36) Hara H., Suzuki T., Kasai T., Aoyama Y., and Ohta A., Ingestion of guar-gum hydrolysate partially restores calcium absorption in the large intestine lowered by suppression of gastric acid secretion in rats. *Br. J. Nutr.*, 81, 315-321, 1999
- 37) Hara H., Suzuki T., Kasai T., Aoyama Y., and Ohta A., Ingestion of guar gum hydrolysate, a soluble fiber, increases calcium absorption in totally gastrectomized rats. *J. Nutr.*, 129, 39-45, 1999
- 38) Hara H., Nagata M., Kasai T., and Ohta A., Increases in calcium absorption with ingestion of soluble dietary fibre, guar-gum hydrolysate, depend on the caecum in partially nephrectomized and normal rats. *Br. J. Nutr.*, 76, 773-784, 1996
- 39) Suzuki T., Hara H., Kasai T., and Tomita F., Effects of Difructose Anhydride III on Calcium Absorption in Small and Large Intestines of Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 837-841, 1998
- 40) 川野貴之、ラットでのカゼインホスホペプチド (CPP) 及びカゼインのカルシウム吸収における効果、平成7年度 北海道大学大学院農学研究科 修士論文、1996
- 41) 内藤博、カゼインの消化時生成するホスホペプチドのカルシウム吸収促進機構、*日本栄養・食糧学会誌*、39, 433-439, 1986
- 42) 内藤博、佐藤隆一郎、遠藤順紀、野口忠、カゼインホスホペプチド (CPP) と Ca イオンの相互作用について、*必須アミノ酸研究*、125, 27-28, 1990
- 43) Kitts D.D., and Yuan Y.V., Caseinphosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.*, 3, 31-35, 1992
- 44) Gitelman, H.J., An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.*, 18, 521-531, 1967
- 45) 金井泉、金井正光、「臨床検査法提要」第29版、金原出版、477-484, 1983
- 46) Duncan, D.B., Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11, 1-42, 1955
- 47) Reeves, P.G., AIN-76 diet: Should we change the formulation? *J. Nutr.*, 1081-1082, 1989
- 48) American Institute of Nutrition, Report of the American Institute of Nutrition ad hoc

- Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.*, 1340-1348, 1977
- 49) American Institute of Nutrition, Second report of the ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.*, 1726, 1980
 - 50) Harper, A.E., Amino acid balance and imbalance. 1. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.*, 405-418, 1959
 - 51) 葛西隆則、タンパク質の化学的・酵素的修飾による新しい機能性の発現—食品の立場から—、*バイオサイエンスとインダストリー*、54, 483-488, 1996
 - 52) 印南敏、伸びる栄養補助食品の現状と今後の課題、*食品加工技術*、18, 103-111, 1998
 - 53) Ferguson L.R., and Harris P.J., Particle size of wheat bran in relation to colonic function in rats. *Lebensm Wiss. Technol.*, 30, 735-742, 1997
 - 54) 山村恵彦、益子まり、吉永陽子、山村行夫、食生活とガン、*聖マリアンナ医科大学雑誌*、17, 12-18, 1989
 - 55) 辻啓介、食物繊維と健康、*日本家政学会誌*、38, 79-82, 1987
 - 56) Kamao M., Tsugawa N., Nakagawa K., Kawamoto Y., Okano T., Fukui K., Takamatsu K., Kuwata G., and Imai M., Absorption of calcium, magnesium, phosphorus, iron and zinc in growing male rats fed diets containing either phytate-free soybean protein isolate or casein. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 46, 34-41, 2000
 - 57) Greger J.L., Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *J. Nutr.*, 129, 1434s-1435s, 1999
 - 58) Yamamoto K., Kumagai H., Sakiyama T., Song C-M., and Yano T., Inhibitory activity of alginates against the formation of calcium phosphate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 90-93, 1992
 - 59) 印南敏、桐山修八編、改訂新版 食物繊維、第一出版、p30-p31, 1995
 - 60) Sung H.Y., Chen H.J., Liu T.Y., and Su J.C., Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. *J. Food Sci.*, 48, 716-721, 1983
 - 61) Drewes, P.A., *Clin. Chim. Acta.*, 39, 81-88, 1972
 - 62) 金井泉、金井正光、「臨床検査法提要」第29版、金原出版、484-487, 1983
 - 63) Galzigna L., Domergue N., and Previero A. A synthetic calcium-chelating L-glutamyl-L-serine phosphate (Glu-Ser.P) enhances calcium absorption in the rat. *J. Pept. Res.*,

52, 15-18, 1998

- 64) Uchida M., Kamasaka H., Matsuura T., Okada S., and Ichikawa T., Effect of phosphorylated oligosaccharides on calcium absorption in rats. *J. Appl. Glycosci.*, 43, 535-540, 1996
- 65) Wang Y., Funk M.A., Garleb K.A., and Chevreau N., The effect of fiber source in enteral products on fecal weight, mineral balance, and growth rate in rats. *J. Parenteral & Enteral Nutr.*, 18, 340-345, 1994
- 66) Ohta A., Ohtsuki M., Baba, S., Takizawa T., Adachi, T., and Kimura, S., Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 64, 316-323, 1994
- 67) Chonan O. and Watanuki M., Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 41, 95-104, 1995
- 68) 松本俊夫, 骨・カルシウム代謝の調節系と骨粗鬆症、羊土社, 1994
- 69) Kitts D.D., Yuan Y.V., Nagasawa T., and Moriyama Y., Effect of casein, casein phosphopeptides and calcium intake on ileal ⁴⁵Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.*, 68, 765-781, 1992
- 70) Sakata T., Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br. J. Nutr.*, 58, 95-103, 1987
- 71) Yajima T. and Sakata T., Influences of short-chain fatty acids on the digestive organs. *Bifidobacteria Microflora*, 6, 7-14, 1987
- 72) Trinidad T.P., Wolever T.M.S. and Thompson L.U., Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 574-578, 1996
- 73) Younes H., Demigne C., and Remesy C., Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *Br. J. Nutr.*, 75, 301-314, 1996
- 74) 鈴木卓弥、水溶性食物繊維によるカルシウム吸収亢進作用の検討、平成9年度 北

海道大学大学院農学研究科 修士論文、1998

- 75) 太田実、幼若ラットにおける大腸全摘及び半切後の病態に関する実験的研究、*日本小児外科学会誌*、19, 995-1012, 1983
- 76) Okumura H., Vitamin D in osteoporosis. *Pharma. Med.*, 5, 25-29, 1987
- 77) Shioi J., and Morii H., Molecular mechanism of syndrome and disease state. Internal secretion and metabolism. Primary disease and syndrome. Osteoporosis. *Mol. Med.*, 35, 442-443, 1998
- 78) Mizuno K., Special issue: Osteoporosis. Calcitonin pharmaceuticals. *医薬ジャーナル*, 29, 1143-1146, 1993
- 79) Fujita T., Calcium and osteoporosis. *病態生理*, 14, 425-430, 1995
- 80) Inaba M., Vitamin D and osteoporosis. Roles of vitamin D in osteoporosis crisis. Secondary osteoporosis and diabetes mellitus. *Clin. Calcium*, 6, 296-300, 1996
- 81) Ohnishi T., and Morimoto S., Calcitonin and osteoporosis. *Pharma. Med.*, 5, 35-39, 1987
- 82) Wiita B., Osteoporosis: Causes and consequences. *Curr. Sci.*, 68, 446-450, 1995
- 83) Stern P.H., Mechanism of thyroid hormone-induced osteoporosis. *AD Rep.*, 29, 1997
- 84) Jeal W., Barradell L.B., and Mctavish D., Alendronate. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in postmenopausal osteoporosis. *Drugs*, 53, 415-434, 1997
- 85) Sagraves R., Estrogen therapy for postmenopausal symptoms and prevention of osteoporosis. *J. Clin. Pharmacol.*, 35, 2S-10S, 1995
- 86) Kishi M., Fukaya M., Tsukamoto Y., Nagasawa T., Nishizawa N., and Takehana K., Enhancing effect of dietary vinegar on the intestinal absorption of calcium in ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 905-910, 1999
- 87) O'loughlin P.D., and Morris H.A., Oophorectomy in young rats impairs calcium balance by increasing intestinal calcium secretion. *J. Nutr.*, 124, 726-731, 1994
- 88) Gennari C., and Agnusdei D., Calcitonin, estrogen and the bone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 37, 451-455, 1990
- 89) Krishnamra N., Limlomwongse L., and Soogaroon P., Calcium metabolism in relation

- to chronic ethanol ingestion deficiency in rat. *Endocrinol. Jpn.*, 30, 707-713, 1983
- 90) Blanton C.A., Horwitz B.A., and McDonald R.B., Neurochemical alterations during age-related anorexia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 221, 153-165, 1999
 - 91) Hetherington M.M., Taste and appetite regulation in the elderly. *Proc. Nutr. Soc.*, 57, 625-631, 1998
 - 92) Munro H.N., Nutrient needs and nutritional status in relation to aging. *Drug-Nutr. Interact.*, 4, 55-74, 1985
 - 93) Claye S.S., Idouraine A., and Weber C.W., In-vitro mineral binding capacity of five fiber sources and their insoluble components for magnesium and calcium. *Food Chem.*, 61, 333-338, 1998
 - 94) Younes H., Levrat M-A., Demigne C., and Remesy C., Relationship between fermentations and calcium in the cecum of rats fed digestible or resistant starch. *Ann. Nutr. Metab.*, 37, 311-319, 1993
 - 95) Kunkel M.E., Roughead Z.K., Acton J.C., and Gagne C.M., Effects of fiber constituents and fibrous food residues on calcium and phosphorus absorption in rats. *Nutr. Rep. Int.*, 29, 735-743, 1984
 - 96) Weaver G.A., Tangel C.T., Krause J.A., Alpern H.D., Jenkins P.L. Parfitt M.M., and Stragand J.J., Dietary guar gum alters colonic microbial fermentation in azoxymethane-treated rats. *J. Nutr.*, 126, 1979-1991, 1996
 - 97) Levrat M-A., Moundras C., Younes H., Morand C., Demigne C., and Remesy C., Effectiveness of resistant starch, compared to guar gum, in depressing plasma cholesterol and enhancing fecal steroid excretion. *Lipids*, 31, 1069-1075, 1996
 - 98) Tulung B., Remesy C., and Demigne C., Specific effects of guar gum or gum arabic on adaptation of cecal digestion to high fiber diets in the rat. *J. Nutr.*, 117, 1556-1561, 1987
 - 99) Todd P.A., Benfield P., and Goa K.L., Guar gum. A review of its pharmacological properties, and use as a dietary adjunct in hypercholesterolaemia. *Drugs*, 39, 917-928, 1990
 - 100) Kubo T., Shiga T., Yoshioka M., Honjo H., Urabe M., Hirasawa Y., Hashimoto J.,

Kitajima I., and Semba I., Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 68, 197-202, 1999

101) Carver J.A., Rees N.H., Turner D.L., Senior S.J., and Chowdhry B.Z., NMR studies of the Na^+ , Mg^{2+} , and Ca^{2+} complexes of cyclosporin A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 22, 1682-1684, 1992

102) Lukes I., Hermann P., and Pech P., Potentiometric and NMR study of ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis [methylene (phenylphosphinic)] acid and its complexing properties. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 54, 653-662, 1989

参考論文リスト

- 1) Watanabe O., Hara H., and Kasai T., Effect of a phosphorylated guar gum hydrolysate on increased calcium solubilization and the promotion of calcium absorption in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 160-166, 2000
- 2) Watanabe O., Hara H., Aoyama Y., and Kasai T., Increased intestinal calcium absorption from the ingestion of a phosphorylated guar gum hydrolysate independent of cecal fermentation in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 613-616, 2000
- 3) Watanabe O., Hara H., Aoyama Y., and Kasai T., Improving effect of feeding with a phosphorylated guar gum hydrolysate on calcium absorption impaired by ovariectomy in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press

特許出願

渡邊治、浅野行蔵、原博、葛西隆則

「カルシウム吸収を促進する多糖類食品素材およびその製造方法」

(特願平 10-353968、公開番号 157186)

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院農学研究科農芸化学専攻食品栄養学講座前教授で現食品機能化学講座教授の葛西隆則博士、また本論文の後校閲と適切な御教示を賜りました同専攻食品栄養学講座教授の青山頼孝博士、並びに食品機能化学講座助教授の川端潤博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の細部にわたり御指導、御助言を頂きました上に、御校閲を賜りました同専攻食品栄養学講座助教授の原博博士に心から感謝いたします。また、終始御助言を頂きました同講座助手の石塚敏博士に厚く感謝いたします。特に、この分野について素人同然であった私を根気強くここまで引っ張ってきて下さった原先生には重ねて感謝の意を表します。

骨強度の分析に際して機器の使用で便宜を図っていただいた藤女子大学人間生活学部食物栄養学科教授の知地英征博士に厚く感謝いたします。

さらに、研究を進める上で御協力を頂きました同講座事務補助員の須田佐知子さん、阿部紗希子さん、この論文をまとめる上で色々御助言を頂きました峰尾仁博士、西隆司博士、比良徹博士、同じミネラルグループの三田村さん、林さん、藤木君、並びに院生、学生の皆様に御礼を申し上げます。そして特に実際の実験方法など、私が博士課程に入学してから今まで本当に手取り足取り教えて頂いた博士課程の志賀一希君に心から感謝の意を表します。また CPP を含めカルシウム吸収について詳しく教えてくれた元同講座大学院生で現明治乳業株式会社研究員の鈴木卓弥君に感謝の意を表します。

社会人ドクターとして北大へ通うことに理解を示してくれた北海道立食品加工研究センターの高田勝次元所長、中井和夫前所長、斉藤国和所長、東京理科大学を卒業して北大に知り合いのいない私に葛西先生を紹介して下さった清水條資副所長、北大へ通うことに対しての諸問題を解決していただいた佐藤芳博元総務係長、北大で実験することによってこなせなくなった分の業務をフォローしていただいた加工食品部前部長で現北海道大学大学院農学研究科応用菌学講座助教授の浅野行蔵博士、本堂正明現加工食品部長、畜産食品科の井上貞仁科長、川上誠現生物工学科研究員、阿部茂研究員をはじめ食加研の全ての職員に感謝いたします。

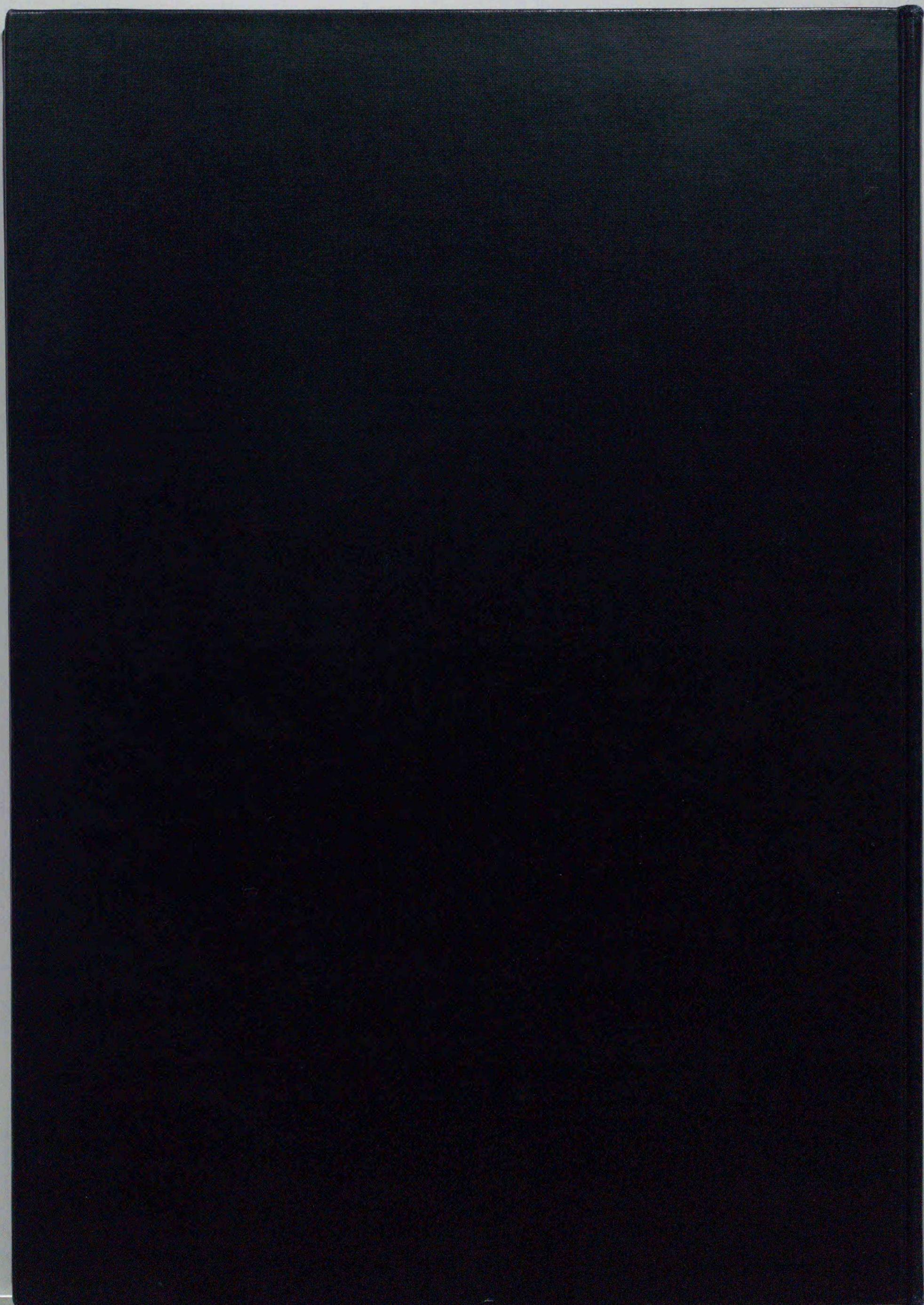
そして私に研究の面白さ、素晴らしさを教えて下さり、研究という世界へ進

むきっかけを与えて下さった元東京理科大学工学部応用生物科学科教授の故廣瀬敬之博士、元同助手の故長谷川伸一博士に謹んで感謝の意を表します。

一度は諦めていた学位取得でしたが、三十を前にして再び学校へ行くことに対して精神的、金銭的に支え続けてくれた父宏、母洋子、姉佐藤千代子、そして私の横にいて挫けそうになる私を支え続けてくれて更にラットの飼育・餌作りまで手伝ってくれた妻美紀に対して、語り尽くせないほどの感謝の気持ちでいっぱいです。

そして、本実験のために尊い命を捧げてくれた $125 + \alpha$ 匹のラットたちに感謝するとともに、心から御冥福をお祈りいたします。

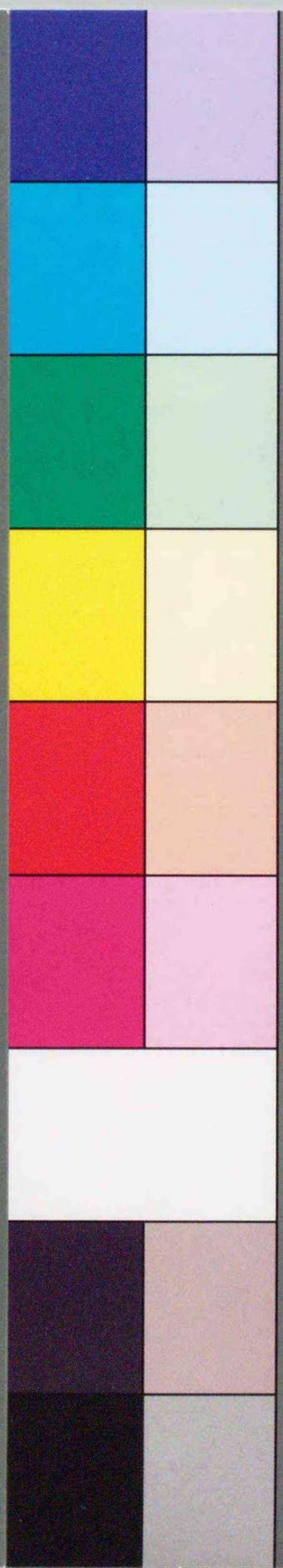
21世紀の幕開けに
渡邊 治



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

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak