

難消化性糖類摂取による肥満関連因子の
改善作用に関する研究

秋山 隆

緒言	1
第一章：通常摂食マウスにおける難消化性糖類の生理作用に及ぼす影響	
第一節：難消化性糖類の基本的生体指標に及ぼす影響	5
第二節：(1) 呼吸代謝及び直腸温に及ぼす各種難消化性糖類の影響	13
(2) 盲腸内容物に与える影響	21
第三節：本章の小括及び考察	25
第二章：マウスのエネルギー代謝に及ぼす各種難消化性糖類の改善効果に関する検討	
第一節：呼吸代謝、直腸温及び盲腸内容物に与える影響	28
第二節：脂質代謝及びインスリン抵抗性に与える影響	41
第三節：本章の小括及び考察	45
第三章：肥満誘導マウスにおける難消化性糖類の改善機構に関する検討	
第一節：二種類の難消化性糖類がエネルギー代謝に与える影響	47
第二節：盲腸内容物の短鎖脂肪酸組成に与える影響	66
第三節：糞中胆汁酸及び UCP-1 遺伝子発現に与える影響	69
総括	73
謝辞	76
参考文献	77

本論文で使用した略語一覧

(AG); agar

(BA); bile acid

(BAT); interscapular brown adipose tissue

(cAMP); cyclic Adenosine monophosphate

(CE); cellulose

(CEL); cellulose low fat diet

(CH); chitosan

(CS); clestimide

(CT); computed tomography

(CYP7A1); cholesterol 7 α -hydroxylase

(D2); type 2 iodothyronine deiodinase

(DF); dietary fiber

(FFA); free fatty acids

(FO); fructo-oligosaccharide

(FXR); farnesoid X receptor

(GLP-1); glucagon-like peptide-1

(GO); galacto-oligosaccharide

(GPCR); G protein-coupled receptor

(GPPR43); G-protein-coupled receptor 43

(HFD); high fat diet

(HDLc); high density lipoprotein cholesterol

(HOMA-IR); homeostasis model assessment insulin resistanse

(IDS); indigestible saccharide

(IN); inulin

(INH); inulin high molecule type

(INL); inulin low molecule type

(ITF); inulin-type fructans

(LDLc); low density lipoprotein cholesterol

(MetS); metabolic syndrome

(PPAR γ); peroxisome proliferator-activated receptors γ

(RF); raffinose

(RQ); respiratory quotient

(SCFA); short-chain fatty acids

(SHP); short heterodimer partner

(SREBP-1c); sterol regulatory element binding protein-1c

(STZ); streptozotocin

(TBA); total bile acids

(T3); Triiodothyronine

(TC); total cholesterol

(TG); triglyceride

(TGR5/M-Bar); G protein-coupled receptor 5 / membrane-type receptor

for bile acids

(UCP1); uncoupling protein 1

(VLDL); very low density lipoprotein

(VO₂); oxygen consumption

(WAT); white adipose tissue

緒言

近年、生活習慣病の患者数は増加している。その疾患群は高血圧、脂質異常症（高脂血症）、糖尿病等の生活習慣により引き起こされる疾患の総称である。また、予防医学的見地からメタボリックシンドローム（MetS）の概念が提唱され[1, 2]、診断基準が発表されるに至った[3]。MetSは、動脈硬化発症の危険性が高い疾病概念であり、虚血性心疾患による死を3～4倍増加させる[4]。MetSの原因は、飽食と身体活動の低下による内臓脂肪の蓄積と、それを基盤にしたインスリン抵抗性及び糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧に代表される危険因子が集積することによる。肥満は、過剰な熱量の食物摂取で、主として内臓脂肪の集積により引き起こされる。それは、生活習慣の乱れによって発生し、やがて死に至る重篤な疾患を引き起こす最大の原因と言える。2011年、日本に於いては、MetSの状態とその予備群を含めて、成人の男性：約50%、女性：約20%を占める[5]。その背景には、食生活の変化や運動習慣の減少による影響がある。

食事内容の変化の面では、近年、日本人の食生活は大きく変化し、食事内容の欧米化により、脂質摂取量が増加してきている。また、エネルギー摂取量のみならず、エネルギー摂取量に占める三大栄養素の均衡は、健康な食生活を送るために重要と考えられている[6]。タンパク質

（Protein）、脂肪（Fat）及び炭水化物（Carbohydrate）由来のエネルギー量が食事に占める割合は「PFCバランス」として表わされている。その範囲は年齢によって異なるが、日本人成人では概ね Protein13-20%、Fat20-30%、Carbohydrate50-65%とする目標量が示されている[7]。平

成 24 年度の国民健康・栄養調査によると、エネルギー摂取量の平均値は、男女共に漸減傾向である [8]。一方、脂肪エネルギー摂取比率が 30%以上の成人の割合が、男性 20%、女性 28%で、脂肪の過剰摂取状態である。脂肪の過剰摂取は肥満や脂質異常症を引き起こし、脂肪の多い食事の後に血中に中性脂肪が長く停滞することは、血管内皮を障害して動脈硬化を促進することが示唆されている [9]。加えて、日本は急速に進行している高齢化社会とライフスタイルの欧米化により、糖尿病の罹患率も急激に増加している。厚生労働省「平成 24 年国民健康・栄養調査結果の概要」によると、糖尿病が強く疑われる人は約 950 万人、糖尿病の可能生が否定できない人は約 1100 万人、合わせて 2050 万人と推定された [8]。2 型糖尿病の発症は、過食及び運動不足による肥満状態の継続がインスリン抵抗性を惹起せるためとされる [10]。

食生活を含めた生活習慣が発症に強く関与する疾患群を「生活習慣病」と呼ぶ様に政策上の用語として決められた。それらの発症を減少させる為には、MetSを早期に発見し、肥満を解消し、各疾患にも早期から介入することが、一次予防として重要である。しかし、適度な運動の継続や脂肪及び糖質過多に偏らない食生活の実践とその継続は、現代の生活環境、ライフスタイルにおいては、その効果的な変容の実現は困難である。MetSを改善する有効な食品成分としては、ポリフェノール、植物ステロール、カツオや乳由来ペプチド、中鎖脂肪酸を含有するトリアシルグリセロールや食物繊維(DF)等が挙げられる [11, 12]。それ等の中で、特に過去において食事からの摂取量が確保されていた食事の中のDFが注目されている。食品成分の中でDFは、ヒトの消化酵素では消化できないものの総称である。この成分の作用は、物理的、化学的な性質と腸管内での発

酵生成物により、種々の有用な生理的機能が消化管内で発揮されることである。それら生理的機能とは、満腹感を覚えて過食を抑制、栄養素の吸収抑制、血糖上昇抑制、血清コレステロールの低下、食物の消化管通過時間の短縮、糞量の増加そして、ヒトに有益な腸内細菌の増殖を促進させることである。また、DFを含んだ包括的な用語として、ルミナコイド (Luminacioid) が、DFを含むあらゆる難消化性物質の包括的な学術用語として提案され[13]、DFの明らかにされていない生理機能について、研究の更なる展開に期待されている。これらは、ヒトの小腸内で消化・吸収されにくく、消化管を介して健康の維持に役立つ生理作用を発揮する食品成分とされる。甘味料等にも利用される難消化性糖類 (IDS: indigestive saccharide) もこの範疇に分類されるが、それらの生理効果の詳細は未解明の部分が多い。

2008年より日本では「特定健診・特定保健指導」が開始され、40歳～74歳までの公的医療保険加入者全員が健診対象となった。これによって、MetS予備群の早期診断と保健指導による改善効果が期待されたが、その有効性は十分に証明されていない[14]。MetSと診断されることだけでは、日常食生活の行動変容を促す動機付けは不十分、且つ困難なことを示していると言える。肥満の改善・予防の実践と継続という点に於いて、エネルギー出納の点からみると、運動は食事制限に比べて、努力に対する代償が低い。MetSの予防又は改善に対応した食事内容は未だ確立されていないが、DFの供給源として穀類、豆類、野菜、果実類の摂取量を増加させることが、冠動脈疾患の低下との関連が報告されていることから、良いとされる[15]。しかし、現代人の食生活では継続的且つ有効な摂取量の確保は難しく、より簡便で継続可能な、日常の食生活に加えることだ

けで **MetS** の改善に繋がる食品成分の摂取とサプリメント等その利用方法の開発が期待される。

そこで本研究では、難消化性糖類摂取による肥満関連因子改善作用の可能性について着目し、**DF** サプリメントとしての有用性を明らかにすることを目的とした。

第一章：通常摂食マウスにおける難消化性糖質の生理作用に及ぼす影響

第一章では、マウスに各種難消化性糖類を摂食させ、基本的生体指標や直腸温、呼吸代謝計測を中心としたエネルギー代謝調節に及ぼす影響を検討した。

第一節：難消化性糖類の基本的生体指標に及ぼす影響

第一節では、マウスに各種IDSを摂食させ、摂食量、体重、脂肪組織重量や空腹時血糖値等の基本的生体指標に及ぼす影響について検討した。

使用したIDS素材

① イヌリン (Inulin)

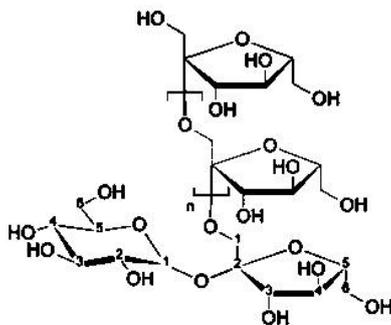


Figure 1.

糖の構造をなす[16] (Fig. 1)。

当研究では、下記の2種類のイヌリンを使用した。イヌリン高分子タイプ (Inulin high molecule type : INH) とイヌリン低分子タイプ (Inulin low molecule type : INL) である。

INHとしての使用品は、Orafti HP (DKSH ジャパン株式会社)である。

本品は、チコリ由来のイヌリンを、精製した粉末で、低分子部分を除去したものである。 β -1,2 位結合した Fructose のオリゴ糖及び多糖類の混合物で、イヌリン 99.5%以上、単糖及び二糖類 0.5%以下（いずれも固形物中）。Fructose 重合度：F10 を含む（参考値）。固形分 $97 \pm 1.5\%$ 。INL としての使用品は、Orafti P-95 (DKSH ジャパン株式会社)である。本品は、チコリ由来のイヌリンを、部分加水分解し、精製した粉末で、 β -1,2 位結合した Fructose のオリゴ糖が主体である。Fructose 重合度として 17 以上のもも含まれる。フラクトオリゴ糖 93.2%以上、単糖及び二糖類 6.8%以下（いずれも固形物中）。Fructose 重合度：F2～F4 を含む（参考値）。固形分 $97 \pm 1.5\%$ 。

② フラクトオリゴ糖 (Fructo-oligosaccharide)

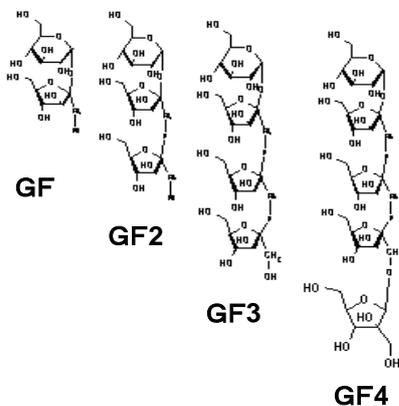


Figure 2.

フラクトオリゴ糖 (FO) はヤーコンイモに比較的多く含有され、玉葱、牛蒡にも含まれ、D-グルコースが α -1,2 結合を伴った 2～4 個のフラクトース単位が β -1,2 結合で直鎖状に配列 (GF2～GF4) した構造を主体とした難消化性のオリゴ糖である (Fig. 2)。

FO は、ショ糖を原料として微生物が産生するフラクトシルトランスフェラーゼ (フラクトース転移酵素、 β -fructo-franosidase) を作用させ、合成される。使用品は、メイオリゴP (株式会社明治フードマテリア)である。本品は、Fructose 重合度：F2～F4 を含む (参考値) である。

③ ラフィノース (Raffinose)

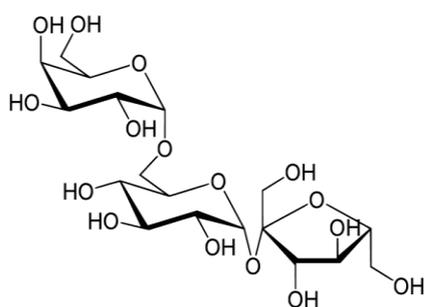


Figure 3.

ラフィノース (RF) は、甜菜 (*Beta vulgaris ssp. Vulgaris*: ヒユ科フダンソウ属の二年生の植物、別名は砂糖大根) から抽出、精製される。キャベツ、ブロッコリーやアスパラガス等広く含有される。

α -D-galactopyranosyl-(1→6)- α -glucopyranosyl-(1→2)- β -D-fructofuranoside 構造の三糖類を主体とした難消化性のオリゴ糖である (Fig. 3)。

使用品は、明治ビートオリゴ糖 FP (株式会社明治フードマテリア) である。

④ ガラクトオリゴ糖 (Galacto-oligosaccharide)

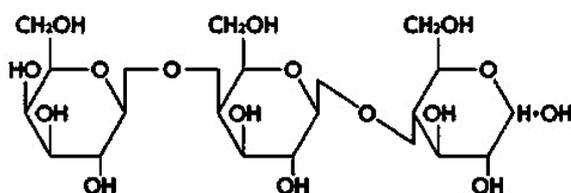


Figure 4.

ガラクトオリゴ糖 (GO) は、ガラクトースを主成分とするオリゴ糖の総称。

4-Galactosyl-lactose [Ga

l(Gal) n -Glu($n=1\sim 3$: β -1,4 結合)]を主体とし、2~6 個のガラクトースが結合したものを示す、難消化性のオリゴ糖である (Fig. 4)。ガラクトオリゴ糖は、乳糖を原料として β -ガラクトシダーゼで反応させ生成される。使用品は、カップオリゴ P (日新製糖株式会社) である。

実験方法

実験動物と飼育方法

実験動物として、6週齢の C57BL/6J 雌性マウス（東京実験動物株式会社）を用いた。飼育は恒温恒湿度（温度： $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度：45 - 50%）、12時間明暗サイクル（明期：7:00-19:00）の環境下で行い、個別ケージを用い、水は自由摂取させ、飼料は自由摂食とした。摂食量は毎日、体重は毎週測定した。

1週間の予備飼育の後、マウスは6群に分け、セルロース-低脂肪食を基本群（CE）とし、IDS は各群 2% 添加し、INH 添加群（INH）、INL 添加群（INL）、FO 添加群（FO）、RF 添加群（RF）及び GO 添加群（GO）の全6群（n=8）とした。飼料構成を（Table 1）に示す。各飼料投与後 14 週目に、ペントバルビタール（ソムノペンチル®、共立製薬株式会社）による麻酔下で下大静脈から全採血、各組織の摘出を行った。

尚、本研究は科学的、動物愛護及び環境保全並びに動物実験を行う教員・学生等の安全確保の観点から、動物実験等の実施方法等を定めた「城西大学動物実験規定」に従い、動物実験委員会による研究計画の審査に基づく学長承認を得て実施した。

Table 1. Composition of experimental diets

Abbreviation	CE	INH	INL	FO	RF	GO
Component: Gram(%)						
Casein	25.00	←	←	←	←	←
Corn starch	32.25	←	←	←	←	←
Sucrose	20.00	←	←	←	←	←
Soybean oil	6.00	←	←	←	←	←
Cellulose powder	11.95	←	←	←	←	←
AIN-93 Mineral mixture	3.50	←	←	←	←	←
AIN-93 Vitamin mixture	1.00	←	←	←	←	←
L-Cystine	0.30	←	←	←	←	←
Inulin high molecule		2.00				
Inulin low molecule			2.00			
Fructo-oligosaccharide				2.00		
Raffinose					2.00	
Galacto-oligosaccharide						2.00
Fat energy, kcal/100g (%)	60.7 (17.5)	59.5 (17.3)	←	←	←	←
Carbohydrate energy, kcal/100g (%)	194.9 (56.0)	194.9 (56.5)	←	←	←	←
protein energy, kcal/100g (%)	92.3 (26.5)	90.5 (26.2)	←	←	←	←
Total energy, kcal/100g (%)	347.9 (100)	344.9 (100)	←	←	←	←

脂肪組織重量測定

解剖時に肩甲骨間褐色脂肪組織（BAT）、子宮周辺、卵巣周辺及び腎臓周辺の白色脂肪組織（WAT）をそれぞれ採取し、速やかに重量を測定した。計量後、 -30°C で保管した。

Computed tomography による腹部の体脂肪測定

各飼料投与後、13週目にペントバルビタールによる麻酔下で体脂肪重量をX線CT（Computed tomography）装置（ALOKA社製：LaTheta LCT-100A）を用いて測定した。マウスを仰臥位にさせ、走査部位は腰椎（Lumbar）L1～L5とした【17】。測定が終了次第、直ちにマウスを電気敷物上で温めて蘇生させた後、それぞれ個別ケージに戻した。

空腹時血糖測定

血糖値の上昇を確認する目的で、群分け後12及び13週にマウス尾静

脈から採血を行い、空腹時血糖を測定した。Bayer 社製 BREEZE2 (enzymatic electrode 法) を用いた。絶食時間は 15~17 時間とした。

統計解析

データの記載は平均値±SE で表した。エネルギー代謝に関して、CE 群と任意の 2 群間の平均値の検定は、t 試験を適応した。2 群の平均値の違いを比較する場合は、先ず等分散性の検定を行った。等分散の場合は t 検定を、等分散ではない場合は Welch の検定を行った。その他の測定項目に関しては、CE 群と各試験群の検定は Dunnett 検定を行った。検定の有意水準は、両側 ($P<0.05$)とした。これ等の検定は、StatMate3 ソフトウェア (株式会社アトムズ) を用いて行った。

結果及び考察

摂取量、摂取熱量、体重増加量及び脂肪組織重量

摂取量、摂取熱量及び体重増加量 (Table 2)、次に白色脂肪組織 (WAT) 及び褐色脂肪組織 (BAT)の重量 (Table 3) に各群大きな違いは認められなかった。

Table 2. Body weight gain, total food intake and energy intake

	CE	INH	INL	FO	RF	GO
Body weight gain (g)	7.2±0.4	7.4±0.8	6.4±0.8	7.8±0.7	8.1±1.0	7.7±0.6
Total food intake (g)	346.3±3.4	356.4±7.5	352.3±4.8	357.8±5.3	358.8±5.8	360.4±5.7
Total energy intake (kcal)	1204.8±11.7	1240.0±26.1	1215.0±16.7	1233.7±18.2	1237.0±20.1	1242.5±19.6

Body weight gain, total food and energy intake for 14 weeks (n=8). Each value is the mean ±SE. The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE. The significant difference was not shown between these data as a result of the test.

Table 3. Adipose tissue weight

(g/100g body weight)	CE	INH	INL	FO	RF	GO
Brown adipose tissues	0.50±0.05	0.54±0.03	0.43±0.03	0.55±0.06	0.42±0.04	0.43±0.04
Perrituerine adipose tissues	1.23±0.04	1.21±0.04	1.27±0.06	1.19±0.02	1.20±0.04	1.24±0.03
Perovary adipose tissues	0.63±0.06	0.59±0.09	0.60±0.10	0.70±0.12	0.76±0.13	0.74±0.04
Perrirenal adipose tissues	0.50±0.05	0.49±0.07	0.51±0.08	0.44±0.06	0.49±0.09	0.57±0.05

Adipose tissue weight for 14 weeks (n=8). Data are expressed as g/100g body weight. Each value is the mean ±SE. The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE. The significant difference was not shown between these data as a result of the test.

Computed tomography による腹部の体脂肪測定

内臓脂肪重量(C)の平均値は、CE 群と IDS 各群間では、統計学的有意性は認められなかったが、CE 群 (平均 1.8) に比べ IDS 各群 (平均 2.4～2.9) は高値を示した (Fig. 5 (C))。

総脂肪重量(A)の平均値に関しても、内臓脂肪重量(C)同様に、CE 群と IDS 各群間では、統計学的有意性は認められなかったが、CE 群 (平均 3.3) に比べ IDS 各群 (平均 4.1～4.8) は高値を示した (Fig. 5 (A))。

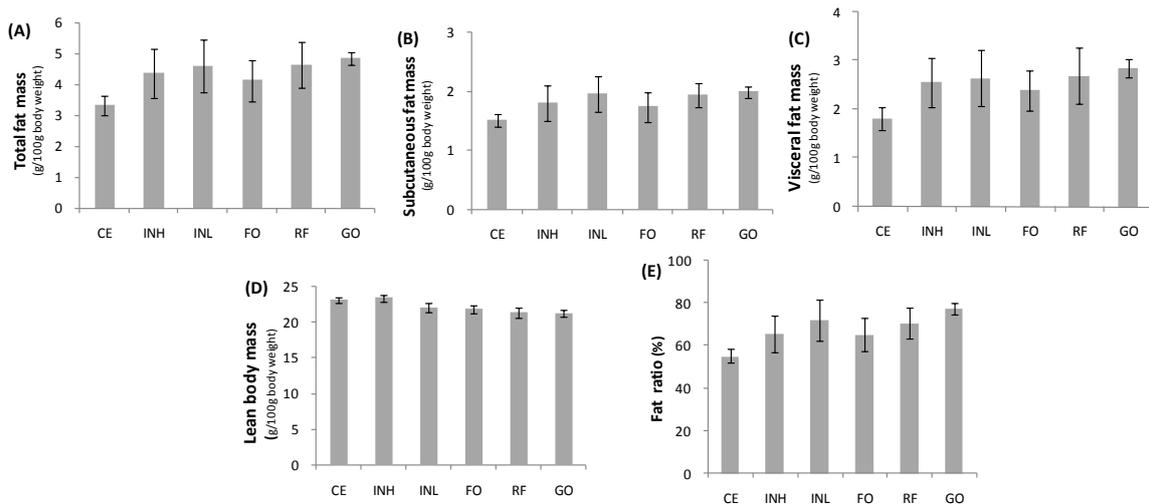


Figure 5. Computed Tomography (CT)-based body composition analysis

(A) Total fat mass, (B) subcutaneous fat mass, (C) visceral fat mass, (D) lean body mass, and (E) fat ratio of each mice after 14 weeks on test diet. As (A) to (D), it is a weight per weight of 100g. (E) Fat ratio = [(A)/(A) + (D)] × 100. Each value represents mean ±SE (n=8). The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE. The significant difference was not shown between these data as a result of the test.

これらの結果から、IDS が腸内細菌の発酵基質となり、発酵で生じた短鎖脂肪酸（SCFA）が生体のエネルギー基質として作用し、結果として体脂肪の利用が低下していると推測された。脂肪蓄積抑制効果は認められなかった。

空腹時血糖

各群間で空腹時血糖に差はなかった（Fig. 6）。本実験の IDS 摂食条件においては空腹時血糖値に与える影響は認められなかった。

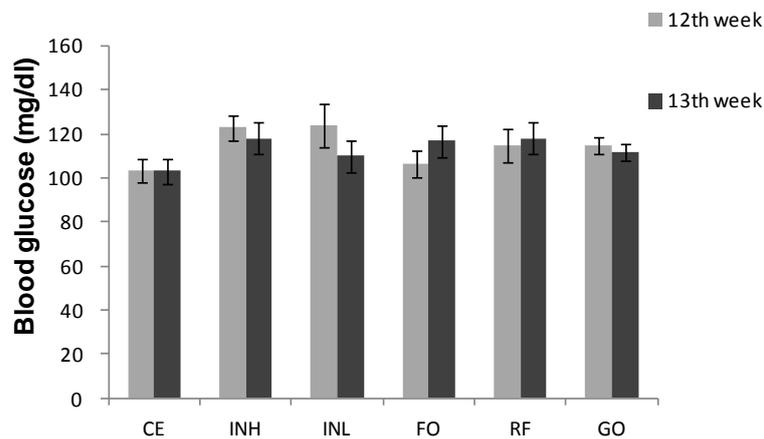


Figure 6. Fasting blood glucose

Each value is the mean \pm SE (n=8). The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE. The significant difference was not shown between these data as a result of the test.

第二節

第一節で、低脂肪摂食条件下で、IDS を摂食させると、IDS がエネルギー基質として利用されていることが推測された。第二節：(1) では、呼吸代謝及び体温への影響について検討した。第二節：(2) では、新たにマウスを飼育して盲腸内容物重量、盲腸内容物 pH に与える影響を検討した。

第二節：(1) 呼吸代謝、直腸温等に及ぼす各種難消化性糖類の影響

実験方法

使用した IDS 素材、実験動物及び飼育方法

第一節の解析に用いた IDS 素材及び実験動物を、以下の測定に用いた。

直腸温計測

群分け後 4 週目から直腸温度の測定を行った。測定条件として、マウスの安静時を見計らい、飼育室内でケージから出し、速やかに計測した。基本的に二人で行った。使用温度計は、Physitemp BAT-12R, (RET-3 マウス専用 probe) を使用し、Bhat 等[18]の方法に準じて行った。プローブを肛門より ≥ 20 mm 目安に挿入して (潤滑剤にオリーブ油使用)、測定値が安定したところを直腸温とし、体温の指標とした。測定前に 6 時間絶食させ、15~17 時の間に測定した。計測準備期間を設けてマウスを十分に計測に慣らした。データは、各 IDS 摂食開始後の 10~13 週間の測定値 (各群 n=8 ,13~15 回測定) を基に、それぞれ平均値を求めた。次

いで、それらのデータを基に、各群の平均値±SE 値を求めた。

エネルギー代謝計測

群分け後 5 週目から夜間を中心に、暗期のみ 12 時間給餌(19:00 - 7:00)させ、酸素消費量 (VO₂) 及び呼吸商 (RQ) について代謝測定装置 (Muromachi 社製: MK-5000RQ) を用いて測定した。計測時の設定は、2.0ℓ/min の気体流量、3 分毎の間隔で連続した 18 時間以上の計測とした。計測に関して、各群 8 匹ずつチャンバーに収容させた。マウスの慣れが必要と考え、マウスハウスを入れて計測前 2 時間以上環境に慣れさせた。計測後、再びそれぞれの個別ケージに戻した。この操作を同一群で 7 回行い、後半 5 回の計測値をデータとして用いた。使用したデータは夜間 12 時間+前後 3 時間とした。

統計解析

統計解析は第一節と同様の手法で行った。

結果及び考察

直腸温計測

直腸温の平均値は、CE 群と比較し INH 群間では統計学的有意性は認められなかったが、CE 群 (平均 36.5) と比較し INH 群 (平均 36.7) の差が一番大きく、その他の IDS 各群 (平均 36.6~36.7) は高値を示した。(Fig. 7)。それぞれのマウスは、飼育環境が同一で 1 匹毎に同容積のケージ内で飼育期間を過ごしていることから、個体によって運動量の差による発

熱の差は、摂取する IDS の種類に由来するそれと比較して少ないと考える。それらことから、IDS の消化管内での発酵が、消化管の運動を亢進させたことが要因であると推測した。CE 群は、発酵基質となり難いセルロースを用いた。そこに 2%の各種 IDS を添加して摂食させると、平均値として 0.2℃前後高くなる傾向が観察された。

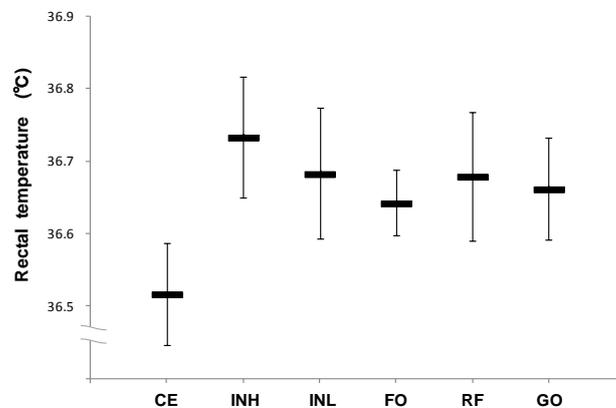
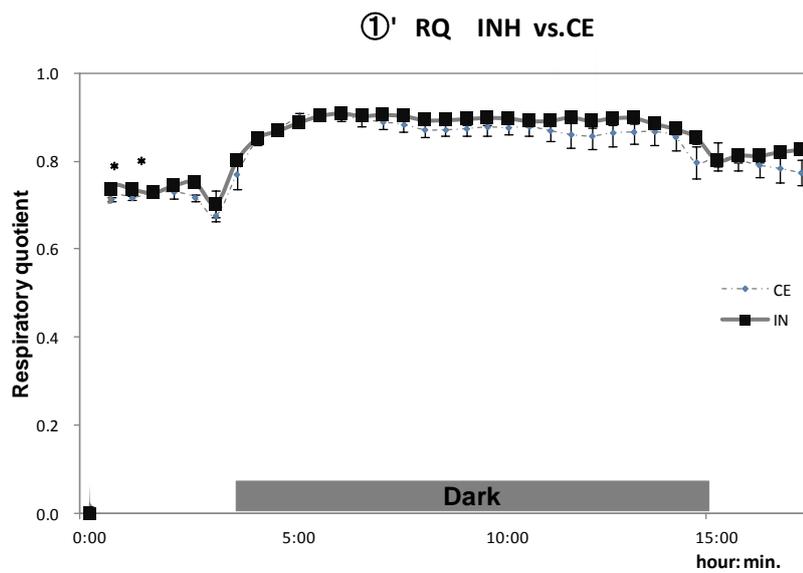
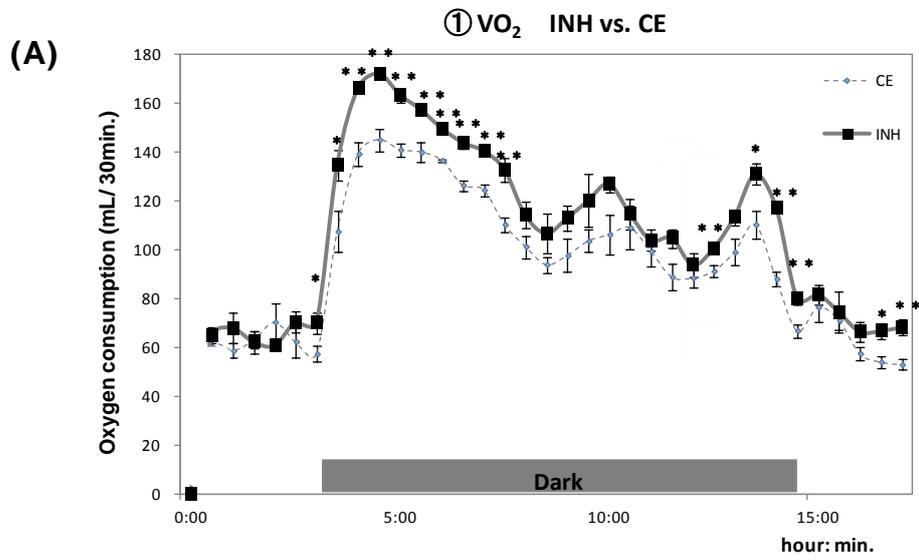


Figure 7. Rectal temperature

Each value is the mean \pm SE. The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE. The significant difference was not shown between these data as a result of the test.

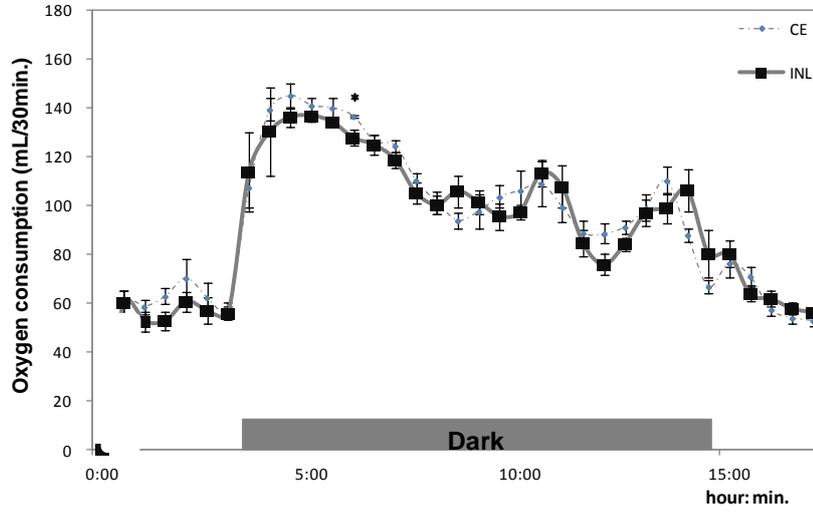
エネルギー代謝計測

VO₂ は、CE 群と比較して、INH 群、GO 群及び FO 群が上昇した。これらの IDS 群はエネルギー代謝を亢進させた。一方、低分子タイプである INL はその効果が認められなかった。RQ は各 IDS 群で差は認められなかった (Fig. 8 (A)~(E))。直腸温との結果と合わせて、IDS が腸内細菌の発酵基質となり、生じた SCFA が生体のエネルギー源となり、その利用が亢進しているためと推測した。

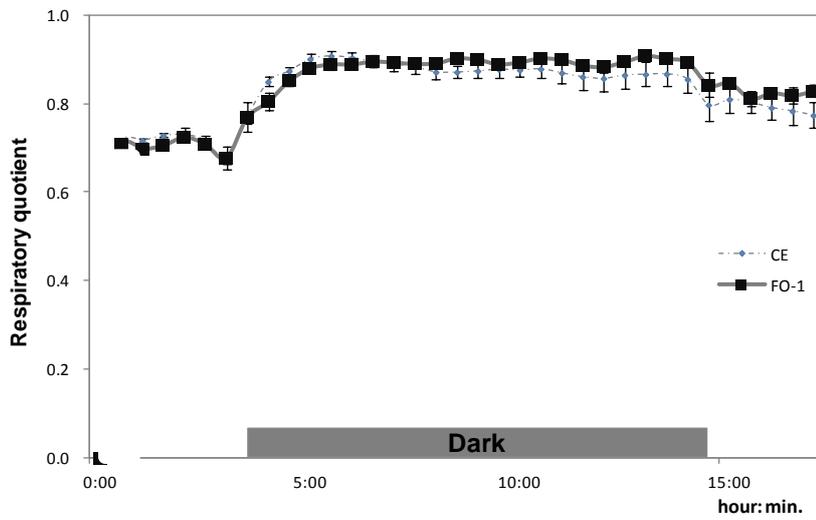


(B)

② VO₂ INL vs. CE

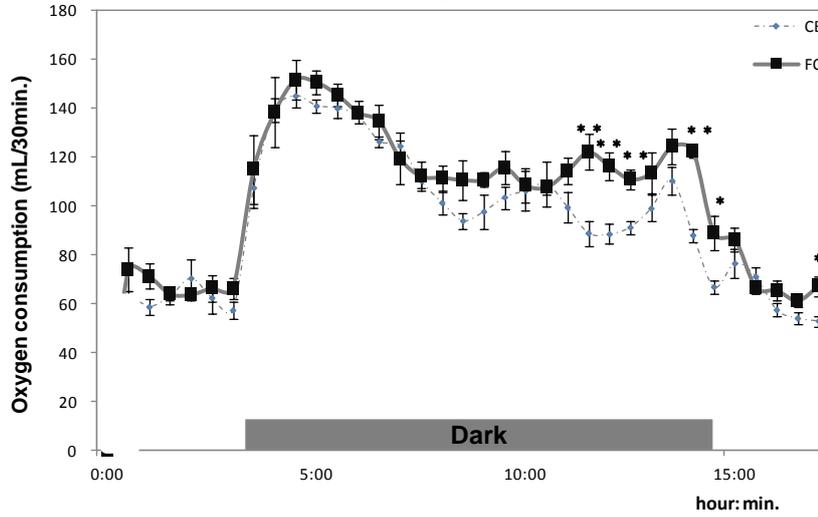


②' RQ INL vs. CE

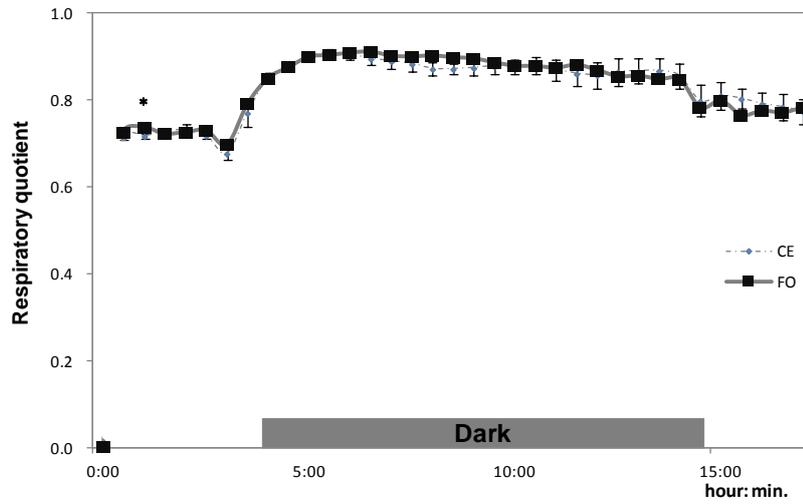


(C)

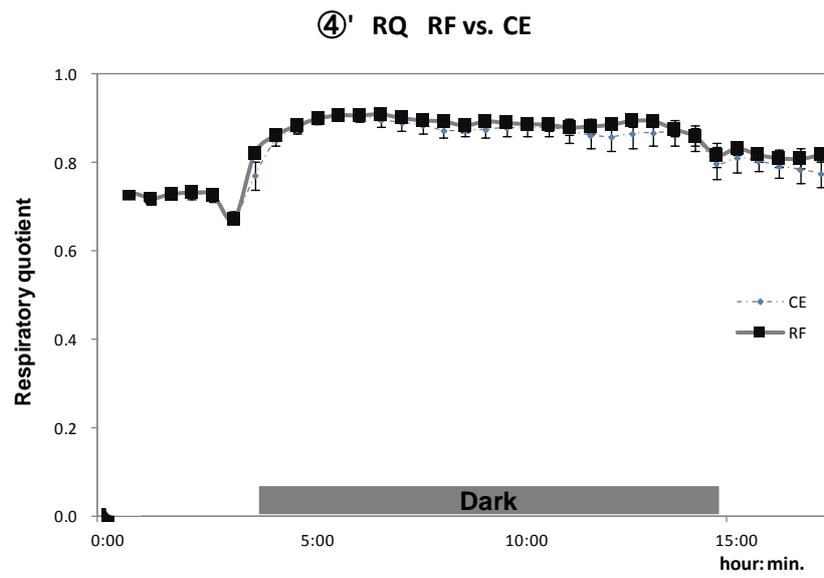
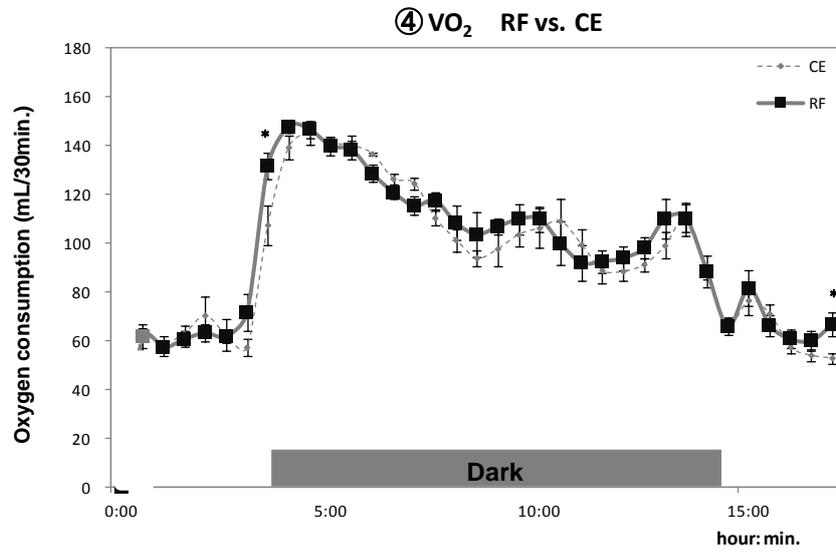
③ VO₂ FO vs. CE



③' RQ FO vs. CE



(D)



(E)

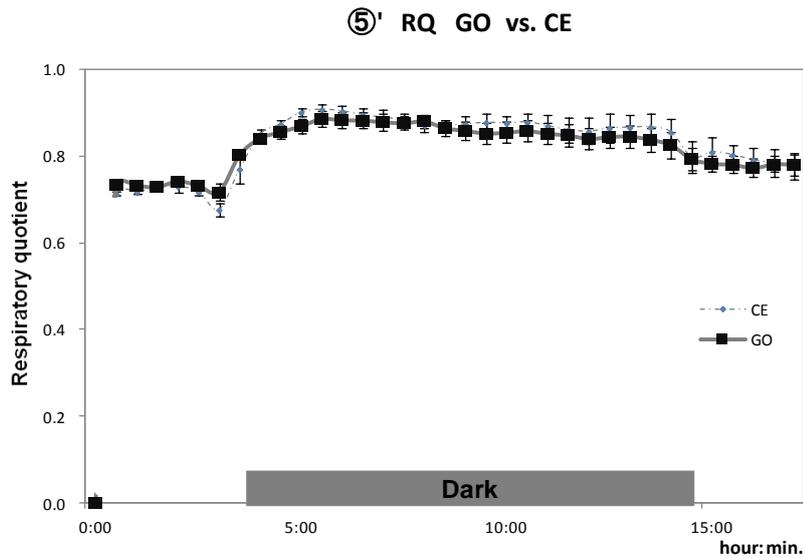
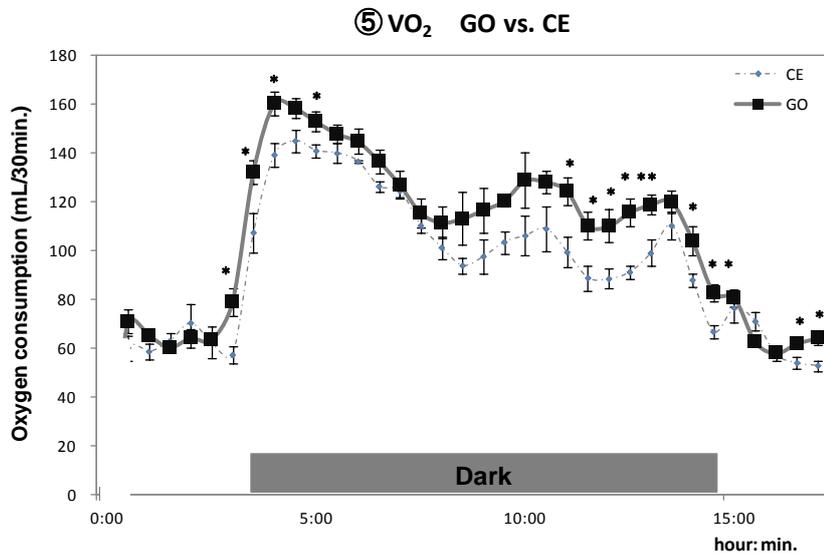


Figure 8. Oxygen consumption and respiratory quotient in every 30 minutes

(A) INH vs. CE, (B) INL vs. CE, (C) FO vs. CE, (D) RF vs. CE, (E) GO vs. CE, Each value is the mean \pm SE. Comparisons of two groups were performed by Students t-test, a respective test meal group was examined to CE. and significant differences are indicated as * and ** at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

第二節：(2) 盲腸内容物に与える影響

第二節：(1) では、各種 IDS を摂食させた群で、直腸温の上昇傾向がみられ、IN の発酵は他の IDS と比較して高い傾向で、比較的高分子である INH が発酵を受け易い結果を得た。VO₂ は、INH、GO 及び FO 群で上昇し、エネルギー代謝を亢進させた。一方、分子量が低い INL はその効果が認められなかった。また、第一節では各 IDS 群において内臓脂肪が増加傾向であったことから、腸内細菌の発酵により、IDS がエネルギー基質として利用されていることが推測された。ここでは、第一節と同摂食条件 (Table 1) で短期間 (3 週) 摂食させ、盲腸、盲腸内容物重量とその pH への影響について検討した。

実験方法

実験動物と飼育方法

実験動物として、6 週齢の C57BL/6J 雌性マウス (東京実験動物株式会社) を用いて 3 日の予備飼育の後、6 群に分けた。飼育室内の環境および給水、摂食条件については第一節と同一である。3 日後、マウスは第一節と同じ飼料構成 (Table 1) で同条件の群を設けた (n=3)。群分け 3 週終了時に、ペントバルビタール (ソムノペンチル®、共立製薬株式会社) による麻酔下で下大静脈から全採血、各組織の摘出を行った。

尚、本研究は科学的、動物愛護及び環境保全並びに動物実験を行う教員・学生等の安全確保の観点から、動物実験等の実施方法等を定めた「城西大学動物実験規定」に従い、動物実験委員会による研究計画の審査に基づく学長承認を得て実施した。

盲腸重量、盲腸内容物重量及び盲腸内容物 pH

盲腸重量、盲腸内容物重量及びその pH を測定（純水で 3 倍希釈溶解後に測定）した[19]。

統計解析

統計解析は第一章第一節と同様の手法で行った。

結果及び考察

摂食量、エネルギー摂取量、体重増加量及び脂肪組織重量

総摂取量及び総摂取熱量の平均値は、CE 群と比較して、INH 群を除く IDS 各群では有意に増加した (Table 4)。この結果は、第一節の 14 週飼育と比較して増加幅が大きい。

体重増加量の平均値は、CE 群 (平均 0.8) と IDS 各群間 (平均 1.1~2.2) では統計学的有意性は認められなかったが、INH 群 (平均 2.2) が最も高値を示した。

Table 4. Body weight gain, total food and energy intake

	CE	INH	INL	FO	RF	GO
Body weight gain (g)	0.8±0.3	2.2±0.1	1.6±0.8	0.3±0.2	1.3±0.1	1.1±0.1
Total food intake (g)	73.2±2.5	75.9±1.2	80.8±0.1*	80.7±0.8*	81.1±1.7*	83.1±2.8**
Total energy intake (kcal)	254.6±8.6	264.1±4.1	281.2±0.4*	280.8±2.7*	282.1±6.0*	289.0±9.8**

Body weight gain, total fed and energy intake for 3 weeks (n=3). Each value is the mean ±SE. The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE and significant differences are indicated as * and ** at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

BAT 重量の平均値は、CE 群と比較して、IDS 各群間では統計学的有意性は認められなかった。

WAT 重量の平均値は、CE 群 (平均 1.64)と比較して、IDS 各群間では統計学的有意性は認められなかったが、INH 群 (平均 2.29)及び RF 群 (平均 2.47)は高値を示した (Table 5)。

Table 5. Adipose tissue weight

(g/100g body weight)	CE	INH	INL	FO	RF	GO
Brown adipose tissues	0.59±0.04	0.46±0.03	0.48±0.02	0.43±0.03	0.52±0.09	0.46±0.02
White adipose tissues	1.64±0.16	2.29±0.36	1.85±0.21	1.69±0.15	2.47±0.37	1.75±0.12

White adipose tissues weight are the value which totaled the white adipose tissue weight of periuterine, perovary, and perirenal, respectively. Adipose tissue weight for 3 weeks (n=3). Data are expressed as g/100g body weight. Each value is the mean ±SE. The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE. The significant difference was not shown between these data as a result of the test.

盲腸重量、盲腸内容物量及び盲腸内容物 pH

盲腸重量の平均値は、CE 群 (平均 0.36)と比較して INL 群は有意に高値を示したが、その他の IDS 各群間 (平均 0.43~0.46)では統計学的有意性は認められなかったが、高値を示した。

盲腸内容物量の平均値は、CE 群 (平均 0.59)と比較して、IN 両群は有意に高値を示し、その他の IDS 投与各群 (平均 1.21~1.37)では統計学的有意性は認められなかったが、高値を示した。

盲腸内容物 pH の平均値は、CE 群 (平均 8.4)と比較して、IDS 各群間では統計学的有意性は認められなかったが、IN 両群 (平均 8.2)及び FO (平均 8.1)は低値を示した (Table 6)。

Table 6. Cecum weight, cecal contents and pH of cecal contents

	CE	INH	INL	FO	RF	GO
Cecum weight	0.36±0.03	0.46±0.05	0.58±0.04 [*]	0.45±0.08	0.52±0.01	0.43±0.03
Cecal contents	0.59±0.12	1.41±0.09 [*]	2.00±0.39 ^{**}	1.37±0.06	1.24±0.09	1.21±0.26
pH of Cecal contents	8.4±0.3	8.2±0.1	8.2±0.2	8.1±0.2	8.4±0.1	8.3±0.2

Above data for 3 weeks (n=3). Cecum and are Cecal contents weight expressed as g/100g body weight. pH of Cecal contents (five times dilute with water). Each value is the mean ±SE. The data were performed by Dunnett's multiple comparison test. A respective test meal group was examined to CE and significant differences are indicated as ^{*} and ^{**} at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

これらの結果から、盲腸内容物 pH の低下は盲腸内容物量の増加に伴うことが考えられ、これは短鎖脂肪酸（SCFA）産生の亢進の結果と推測された。

第三節：本章の小括及び考察

第一節では、マウスに各種 IDS を摂食させ、摂食量、体重、脂肪組織重量や空腹時血糖値等の基本的生体指標に及ぼす影響について検討した。その結果、IDS 摂取各群が、摂食量の差に比較して内臓脂肪量が増傾向であった。このことは、IDS が腸内細菌の発酵基質となり、発酵で生じた SCFA がエネルギー基質として作用し、結果として体脂肪の利用が低下していると推察された。

第二節（１）では、直腸温、呼吸代謝計測を中心にしたエネルギー代謝調節に及ぼす影響を検討した。INH、GO 及び FO の摂取は VO_2 を上昇させエネルギー代謝を亢進させることを見出した。直腸温の平均値は INH 群で最も高値を示した。

第二節（２）では、腸内細菌による発酵の状態を確認する為に、盲腸内容物重量とその pH を測定した。その結果、盲腸内容物重量については、IN 両群では有意に高値を示し、その他の IDS 各群間では統計学的有意性は認められなかったが、高値を示した。盲腸内容物 pH については、IN 両群及び FO 群では、統計学的有意性は認められなかったが、低値を示した。

直腸温の測定に関して、外部からの体温測定部位として、食道と直腸があるが、 0.1°C 単位の精度を求められる計測では、直腸温が小腸内腔温に近く、運動時には食道温は変化の幅が大きいとされる [20]。また、直腸温はより正確な体温を反映させ、体温の指標とされ、次の報告がある。Suzuki 等は発熱時に疲労回復が遅延するモデルマウスを作成し、Herb 飲料の効果を直腸温の変化で評価した [21]。また Mizuno 等は、ニンニク抽出製剤による抹消循環の改善作用を、マウスの直腸温度の回復を冷却

部位の微小循環の回復とみなして評価した [22]。

当研究の飼育条件から、IDS 摂食の有無が直腸温の上昇に影響を与えていたと考えた。その為、IDS の消化管内での発酵が、消化管の運動を亢進させたことが要因であると推測した。また、INH や一部の IDS 群で VO_2 が上昇し、エネルギー代謝を亢進させた。一方、低分子である INL はその効果が認められなかった。IN は発酵基質である。エネルギー代謝が亢進したことは、発酵性基質としての利用が亢進されたことによるものと考えた。しかし、分子量の違いが盲腸内容物の pH に影響を及ぼすかについては、結果が得られていない。

イヌリンはヒトの上部消化管の加水分解に抵抗があるため、大腸に達した際に始めて腸内微生物の基質となり発酵による分解を受ける。この発酵によって約半分が腸内細菌のエネルギー源として利用され、他は殆ど SCFA に代謝される。その結果、排便重量や水分含量の増加、排便頻度が上昇するとされた [23]。また、腸内 pH の低下に基づくミネラル成分可溶化による吸収促進、腸管機能の活性化、免疫応答の刺激があることが多数報告されている [24, 25]。それら報告から、大腸内の有益な菌の増殖や活動を促進する IDS を摂取することで、腸内細菌を改善しようという考え方が提案され、プレバイオテックス (Prebiotics) と定義されている。Gibson 等は、IN 及び 3 種類の IDS (FO、GO 及びラクチュロース) をプレバイオテックスとして定義した [26]。高脂肪、砂糖無しで摂食させた肥満マウスで生じる bifidobacteria の減少は、イヌリン型フラクタン (ITF : inulin-type fructans) の投与でその減少が緩和される。それらイヌリンは、宿主に有益な効果を持ち、消化管内で bifidobacteria の増殖を促進するが故にプレバイオテックスとみなされている [27]。

当研究では、IDS 素材の違いによる発酵の程度を盲腸内容物 pH で比較した。IN は易発酵性基質である。CE 群と比較して統計学的有意性は認められなかったが、IN 両群及び FO 群は低値を示した。しかし、マウスの個体差、個体による摂食量の差、飼育期間及び飼育条件等が結果に大きく影響するため、これらを考慮して次の実験に反映させていくものとした。

本章では、マウスの各種難消化性糖類を摂食が、エネルギー代謝を亢進させることを初めて見出した。INH の摂取による直腸温と VO_2 の上昇は、腸内細菌の INH 発酵により産出した SCFA が、エネルギー基質として利用された結果と考えられた。低脂肪食条件下では、IDF 摂食による抗肥満効果はみられなかったが、IDF による毒性もみられなかった。

第二章：マウスのエネルギー代謝に及ぼす各種難消化性糖類の改善効果に関する検討

第一章の結果により、INHの摂取による直腸温と VO_2 の上昇は発酵によるものと考えられた。ヒトがMetS状態となることは、食生活から考えると、脂肪の過剰摂取やそのエネルギー比の上昇に起因すると考えられる。そこで第二章では、高脂肪食で肥満誘導させたマウスにIDSを摂食させ、直腸温、呼吸代謝計測を中心にしたエネルギー代謝調節、インスリン抵抗性及び血清脂質についての影響を検討した。

第一節：呼吸代謝、直腸温及び盲腸内容物に与える影響

第一節では、高脂肪食で肥満誘導させたマウスにIDSを摂食させ、直腸温、呼吸代謝計測を中心にしたエネルギー代謝調節についての影響を検討した。

使用したIDS素材

日本人は、海藻類を食品として多く利用し、それが健康維持に有益な食品である認識がされている。海藻の主要成分であるDFの効果として、食品中の変異原生物質等に作用して、その吸収を低下させる効果があるとされる[28]。当研究では、紅藻類に存在する主要抽出物の「寒天」の吸収抑制効果に着目し、それを用いることとした。

一方、キトサンに関しては、高脂肪摂食マウスにおいて、高分子のキチン・キトサンは、食餌性脂肪を腸からの吸収を阻害させることによって、部分的に血清脂質の低下と抗肥満作用があるとした報告[29]、また、

糖尿病誘発マウスにおいて、低分子キトサンは、随時グルコース値の低下や抗肥満作用に効果を示す報告[30]がされた。当研究ではキトサンの吸収抑制効果に着目し、高分子キトサンを用いることとした。

① 寒天 (Agar)

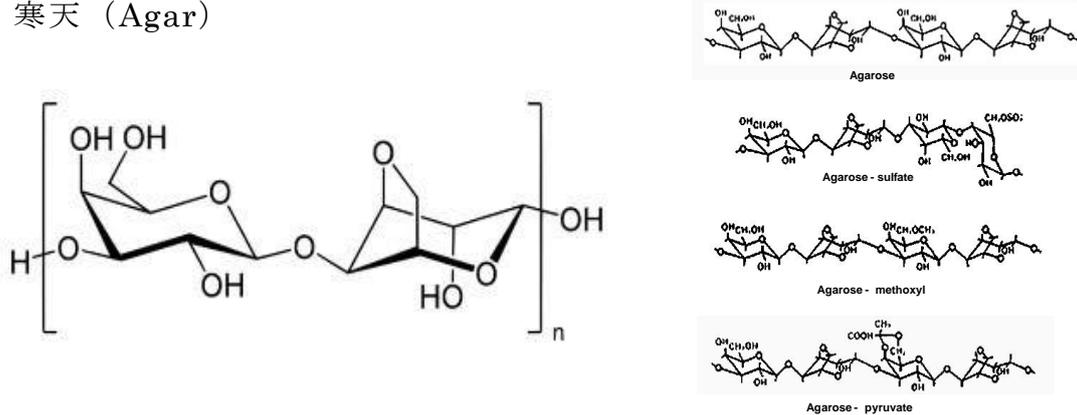


Figure 9.

Ager (AG) の原料は紅藻類で、天草やオリゴノリ等から製造される。Agarose は AG の主要なゲル化成分であり、約 70% を占め、ゲルの強度に関わる。AG の基本構造は 1→3 結合 β -D-ガラクトースと 1→4 結合 3,6-アンヒドロ- α -L-ガラクトースの交互結合から成る。AG は Agarose (中性多糖) として繊維の部分とアガロペクチン (酸性多糖) から成る。アガロペクチンはアガロースに部分的に硫酸基、メトキシル基、ピルビン酸基等を含む (Fig. 9)。

当研究では、伊奈寒天 S-6 (伊奈食品工業株式会社) を使用した。本品は、ゼリー強度 $530\sim 930\text{g/cm}^2$ (1.5%濃度) である。

② キトサン (Chitosan)

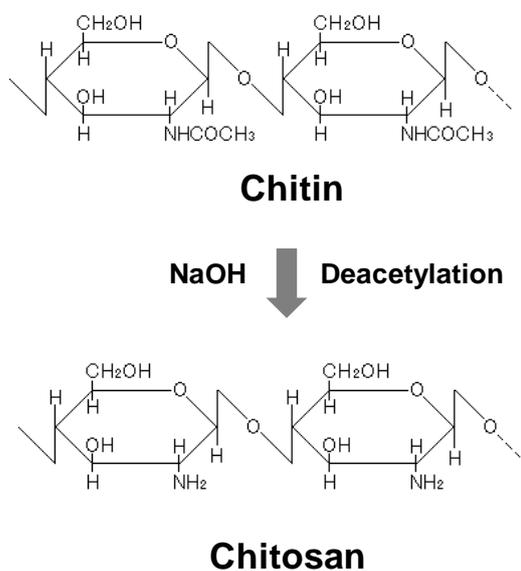


Figure 10.

キチン(Chitin)はN-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β -1,4結合で直鎖状に多数結合 (Mw 100万以上) した多糖である。キトサン (CH) は、キチンの脱アセチル化したもので、D-グルコサミン (2-amino-2-deoxy-D-glucose) が β -1,4結合で直鎖状に多数結合した多糖である (Fig. 10)。CHは部

分的に (10~20%) アセチル基を含んでいるものも CH と称する。

当研究では、コーヨーキトサン FM-80 (甲陽ケミカル株式会社) を使用した。本品は、脱アセチル化度 80% 以上処理品、重量平均分子量 (Mw) 2.05×10^6 である。分析条件 (GPC 分子量測定カラム : Shodex OHPak SB-805HQ+SB-806HQ+SB-G、温度 : 40°C、移動相 : 0.5M AcOH/AcNa、検出器 : RI、流量 : 1.0mL/min、標品 : プルラン Mw5900~788000 Shodex、キトサンオリゴ糖 : Mw1204、生化学バイオビジネス)

③ イヌリン (Inulin)

第二章で使用した IDS 素材は、第一章で使用したイヌリン高分子タイプ (INH) を用いた。以下、INH を “IN” と表記する。

実験方法

実験動物と飼育方法

実験動物として、6週齢の C57BL/6J 雄性マウス（東京実験動物株式会社）を用いて、低脂肪食（LFD：Low Fat diet）（n=8）を投与する群を 2% セルロース-Low Fat diet (CEL)とした。他のマウスには、高脂肪食（HFD：High-Fat diet）を与えた。HFD 摂食マウスは 7 週間、肥満を誘導させた。飼育室内の環境および給水、摂食条件については第一章と同一である。

7 週間後、肥満マウスは 5 群に分け、2% HFD を HFD 基本群（CE）とした。IDS は各群 2% 添加し、AG 添加群（AG）、CH 添加群（CH）及び IN 添加群（IN）の全 5 群（n=8）を設定した。CEL 群は LFD 対象群、CE 群は HFD 対象群とした。飼料構成を（Table 7）に示す。各飼料投与後、11 週目に、ペントバルビタール（ソムノペンチル®、共立製薬株式会社）による麻酔下で下大静脈から全採血、各組織の摘出を行った。

尚、本研究は科学的、動物愛護及び環境保全並びに動物実験を行う教員・学生等の安全確保の観点から、動物実験等の実施方法を定めた「城西大学動物実験規定」に従い、動物実験委員会による研究計画の審査に基づく学長承認を得て実施した。

Table 7. Composition of experimental diets

Abbreviation Component: Gram(%)	CEL	CE	AG	CH	IN
Casein	20.5	29.9	←	←	←
Corn starch	34.47	16.92	←	←	←
Sucrose	33.81	12.22	←	←	←
Soybean oil	2.45	3.38	←	←	←
Lard	1.97	30.78	←	←	←
Cellulose powder	2.0	2.0			
Agar			2.0		
Chitosan				2.0	
Inulin					2.0
AIN-93 Mineral mixture	3.5	3.5	←	←	←
AIN-93 Vitamin mixture	1.0	1.0	←	←	←
L-Cystine	0.3	0.3	←	←	←
Fat energy, kcal/100g (%)	12.2	59.5	←	←	59.1
Carbohydrate energy, kcal/100g (%)	67.7	20.4	←	←	21
protein energy, kcal/100g (%)	20.1	20.1	←	←	19.9
Total energy, kcal/100g (%)	377.5	548.1	←	←	551.9

Computed tomography による腹部の体脂肪測定

郡分け後、10週目にペントバルビタールによる麻酔下で体脂肪量を、第一章と同様の手法で行った。

エネルギー代謝計測

第一章と同様の手法で行った。計測の操作を同一群で7回行い、後半3回の計測値をデータとして用いた。VO₂データの算出に関して、マウスの体重並びに表面積の影響を可能な限り除外する為に、体重 (kg)^{0.75} で除した[31, 32]。使用したデータは夜間12時間+前後2時間とした。

直腸温計測

第一章と同様の手法で行った。計測データは、各IDS摂食開始後の8~10週の測定値(各群 n=8、10回測定)を基にそれぞれ平均値を求めた。次いで、それらのデータを基に各群の平均値±SE値を求めた。

盲腸重量、盲腸内容物重量及び盲腸内容物 pH

盲腸内容物重量とその pH の測定は第一章と同様の手法で行った。

統計解析

データの記載は平均値±SE で表した。統計解析は多重比較として Tukey 検定を行った。検定の有意水準は、両側 ($P<0.05$)とした。これ等の検定は StatMate3 ソフトウェア(株式会社アトムズ)を用いて行った。

結果及び考察

摂食量、エネルギー摂取量、最終体重、体重増加量及び脂肪組織重量

摂食量及び摂取熱量は、CEL 群と比較して CE 群は有意に低下した。IDS 添加各群間では差は認められなかった (Fig. 11)。LFD と HFD の比較では、摂取熱量の低下は摂食量の低下に対して少ないといえる。

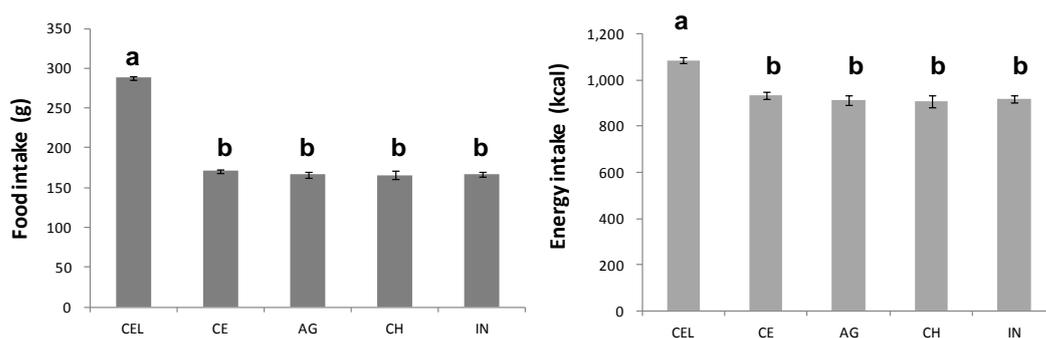


Figure 11. Food intake and energy intake

Each value is the mean ±SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different letters are significantly different, $P<0.05$.

最終体重は、CEL 群と比較して IN 群は有意に高値を示し、統計学的な差は認められなかったが IDS 添加各群は高値を示した。

体重増加量は、CEL 群と比較して CE 群は有意に低値を示した。HFD 各群間においては、CE 群と比較して IN 群は有意に高値を示し、AG 群及び CH 群は高値を示した (Fig. 12)。

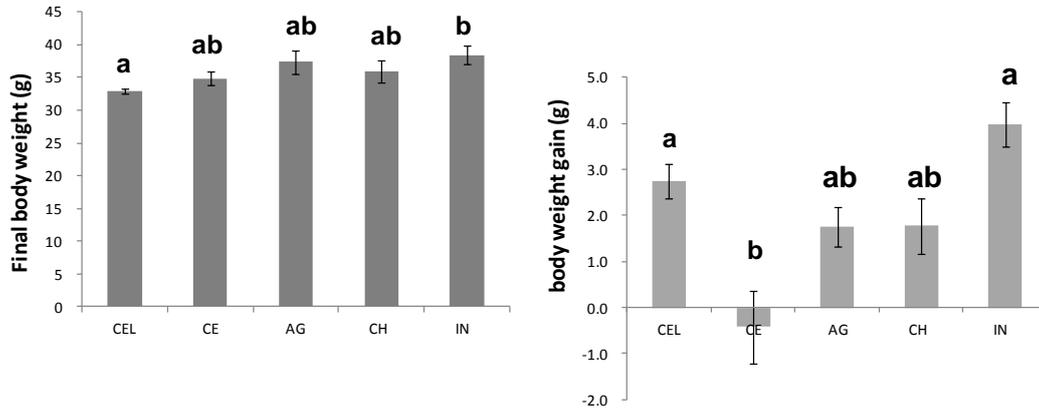


Figure 12. Final weight and body weight gain

Each value is the mean \pm SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

BAT 重量に各群差は認められなかった。WAT 重量は CEL 群と比較して CE 群間の差は認められなかった。HFD 各群間においては、CE 群と比較して IN 群は有意に高値を示し、統計学的な差は認められなかったが AG 群及び CH 群は高値を示した (Table 8)。

Table 8. Adipose tissue and hepatic weight

(g/100g body weight)	CEL	CE	AG	CH	IN
Brown adipose tissues	0.63 \pm 0.04	0.60 \pm 0.05	0.69 \pm 0.09	0.61 \pm 0.05	0.70 \pm 0.05
Epididymal adipose tissues	3.64 \pm 0.14 ^a	3.78 \pm 0.29 ^a	4.65 \pm 0.34 ^{ab}	4.28 \pm 0.20 ^{ab}	4.89 \pm 0.22 ^b
Liver	4.83 \pm 0.11 ^a	4.27 \pm 0.12 ^b	4.25 \pm 0.08 ^b	4.10 \pm 0.08 ^b	4.14 \pm 0.09 ^b

Above data after dissection (n=8). Data are expressed as g/100g body weight. Each value is the mean \pm SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different superscripts are significantly different, $P < 0.05$.

Computed tomography による腹部の体脂肪測定

内臓脂肪組織量は、CEL 群と CE 群を比較して統計学的な差は認められなかったが、高値を示した。HFD 各群間比較では、CE 群と比較して IN 群は有意に高値を示し、統計学的な差は認められなかったが IDS 添加各群は高値を示した (Fig. 13 (C))。

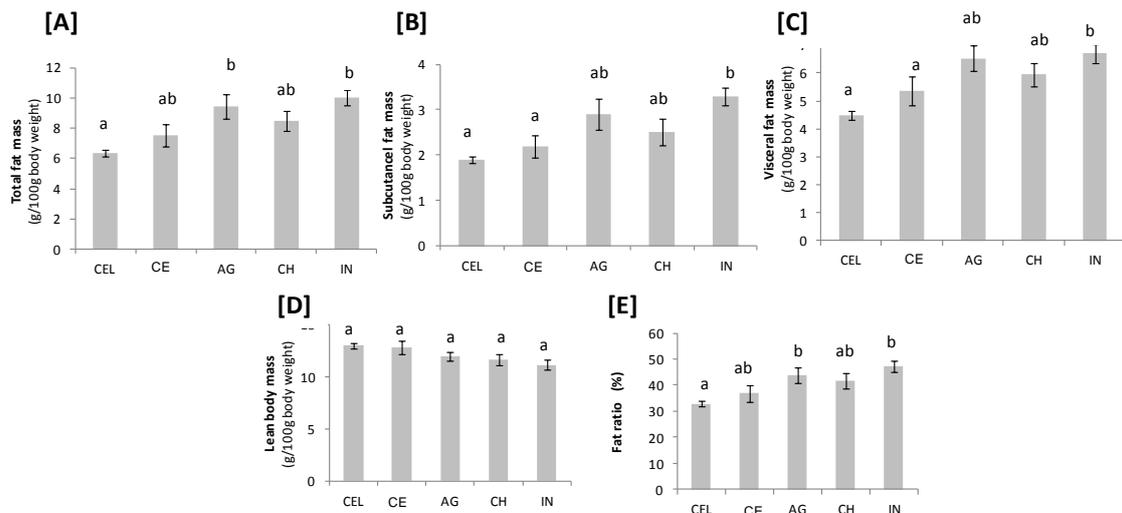


Figure 13. Computed Tomography (CT)-based body composition analysis

(A) Total fat mass, (B) subcutaneous fat mass, (C) visceral fat mass, (D) lean body mass, and (E) fat ratio of each mice after 11 weeks on test diet. As (A) to (D), it is a weight per weight of 100g. (E) Fat ratio = [(A)/(A)+ (D)] × 100. (Each groups: n=8). Each value represents mean ± SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

体重増加量と内臓脂肪量の結果から、HFD 摂食条件下では、LFD 摂食同様、IDS が腸内細菌の発酵基質となり発酵で生じた SCFA がエネルギー基質として作用し、結果として体脂肪の利用が低下していると推察された。

盲腸重量、盲腸内容物重量及び盲腸内容物 pH

(Table 9) に盲腸重量、盲腸内容物重量及び盲腸内容物 pH を示す。

盲腸重量の平均値は、各群間では統計学的有意性は認められなかったが、HFD 群間では、CE 群 (平均 0.26) に比べ IN 群 (平均 0.33) が高値を示した。

盲腸内容物重量の平均値は、CEL 群と比較して CE 群は有意に低値を示した。HFD 群間では、CE 群 (平均 0.35) に比べ IDS 添加各群 (平均 0.42~0.49) 間では統計学的有意性は認められなかったが、高値を示した。この結果から、盲腸内容物重量は HFD 摂食では減少し、IDS を添加することにより、高値となることが考えられた。

盲腸内容物 pH の平均値は、CEL 群と比較して CE 群間では統計学的有意性は認められなかった。HFD 群間では、CE 群 (平均 7.8) と比較して IN 群 (平均 7.3) は有意に低下し、AG 群 (平均 7.6) については統計学的有意性は認められなかったが、低値を示した。この結果から、盲腸内容物 pH は、LFD と HFD に影響されず、IN の摂食により低下した。

IN の摂取により、盲腸内容物量の平均値は高値を示し、盲腸内容物 pH の平均値は低下が認められた。このことから、IN の摂取では腸内発酵が活発になることで、SCFA 産生が増加していると考えられた。

Table 9. Cecum weight, cecal contents and pH of cecal contents

	CEL	CE	AG	CH	IN
Cecum weight	0.28±0.02	0.26±0.05	0.29±0.01	0.29±0.01	0.33±0.02
Cecal contents	0.54±0.04 ^a	0.35±0.04 ^b	0.49±0.05 ^{ab}	0.46±0.03 ^{ab}	0.42±0.03 ^{ab}
pH of Cecal contents	7.9±0.06 ^a	7.8±0.12 ^a	7.6±0.09 ^a	7.8±0.05 ^a	7.3±0.08 ^b

Above data after dissection (n=8). Cecum and are Cecal contents weight expressed as g/100g body weight. pH of Cecal contents (3-fold dilute with water). Each value is the mean ±SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different superscripts are significantly different, $P < 0.05$.

エネルギー代謝計測

VO₂は、30分毎の累計VO₂として示した (Fig. 14 [A]~[D])。CEL群とCE群に差は認められなかった (Fig. 14 [A])。LFDとHFD間に差が認められないことは、摂取熱量の差の影響が少なかった為と考えられる。HFD群間では、CE群と比較してCH群が高値を示し (Fig. 14 [C])、一方でAG群は低値を示し (Fig. 14 [B])、IN群について差は認められなかった (Fig. 14 [D])。暗期12時間の累計VO₂に関しても、30分毎の累計VO₂と同様の傾向であった (Fig. 15)。

30分毎の平均RQ (Fig. 16) から、低脂肪食であるCEL群は確実に1に近づき、糖質の利用が亢進していることが観察された。しかし、高脂肪化により、全体としてRQが0.9以下まで低下することが確認された。更に、CE群と比較しCH群は低値を示した [夜間始め3:30から6:30にかけて3時間の平均RQ値に関して、(CE群の平均値) - (CH群の平均値) = 0.013~0.023の範囲であった。]。このことから、CHは脂肪を燃焼する傾向で、脂質代謝の亢進が考えられた。暗期12時間RQの平均値は、CEL群と比較してCE群は有意に低下した。HFD群間では、CE群 (平均0.80)と比較しCH群 (平均0.78)は低値を示し、一方でAG群 (平均0.82)及びIN群 (平均0.82)は高値を示した (Fig. 17)。

これらの結果から、INの摂取において、30分毎の累計VO₂はCE群と差はなく、暗期12時間RQの平均値は高値を示し、糖質の利用が亢進している可能性が示された。しかしながら、このRQの上昇はSCFA利用亢進の結果であると考えられた。一方、CHの摂取は、VO₂が高値を示し、12時間累積VO₂についても、高値を示した。RQの平均値は低値を示したことから、脂質代謝の亢進が考えられた。

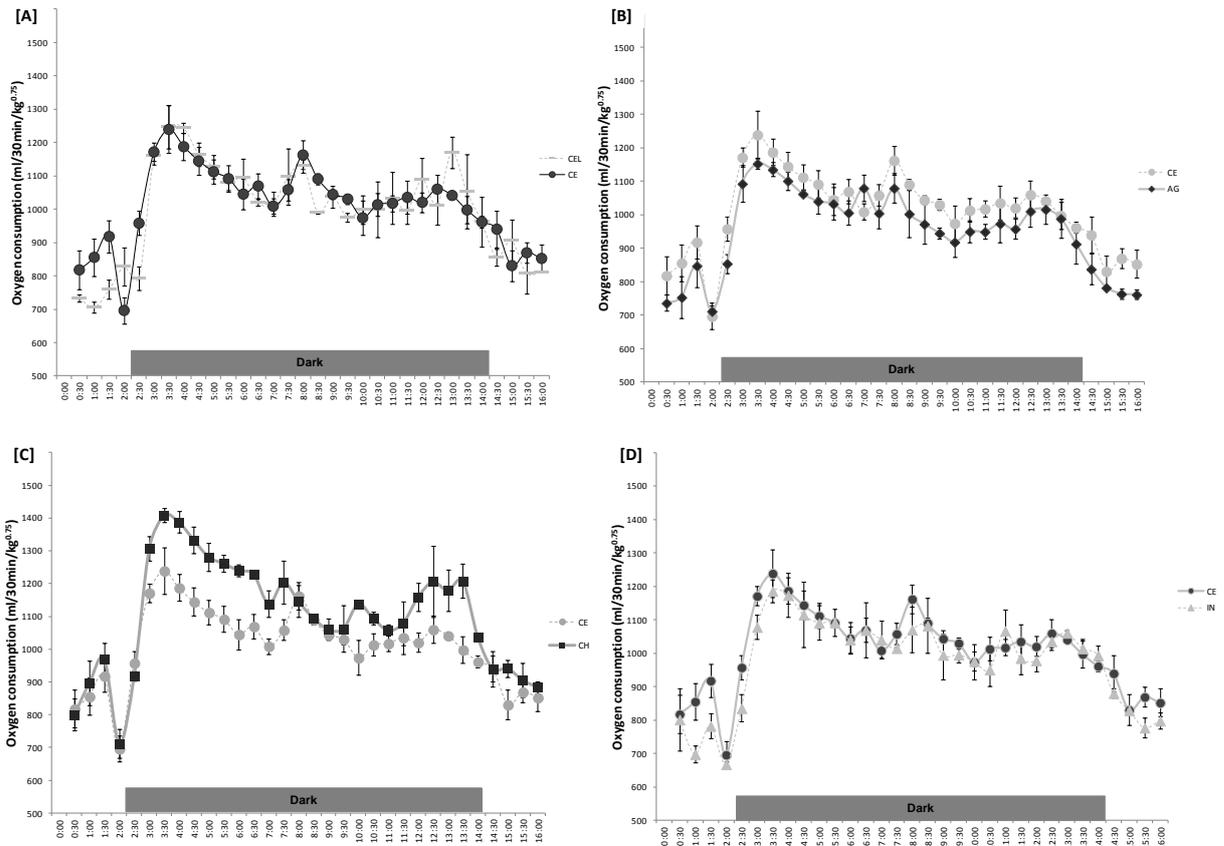


Figure 14. Oxygen consumption in every 30 minutes
 [A] CE vs. CEL, [B] AG vs. CE, [C] CH vs. CE, and [D] IN vs. CE.
 Each value is the mean \pm SE.

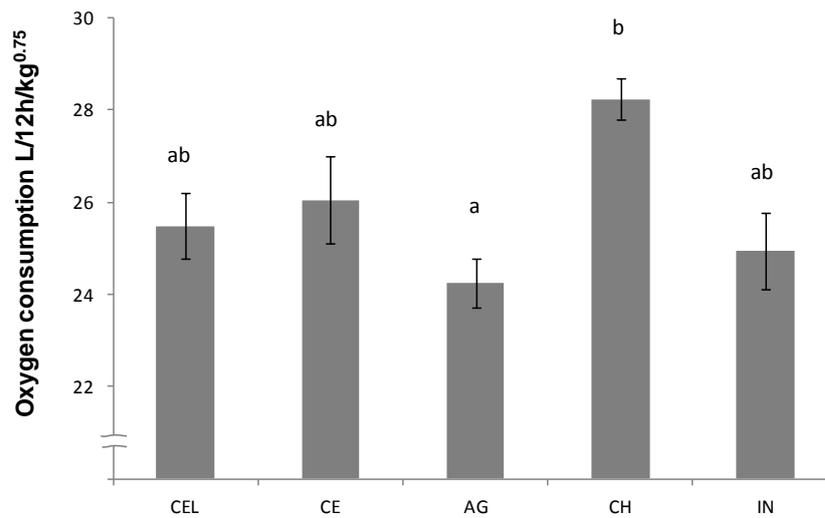


Figure 15. VO₂ : Accumulated oxygen consumption of 12 hours

Each value is the mean \pm SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

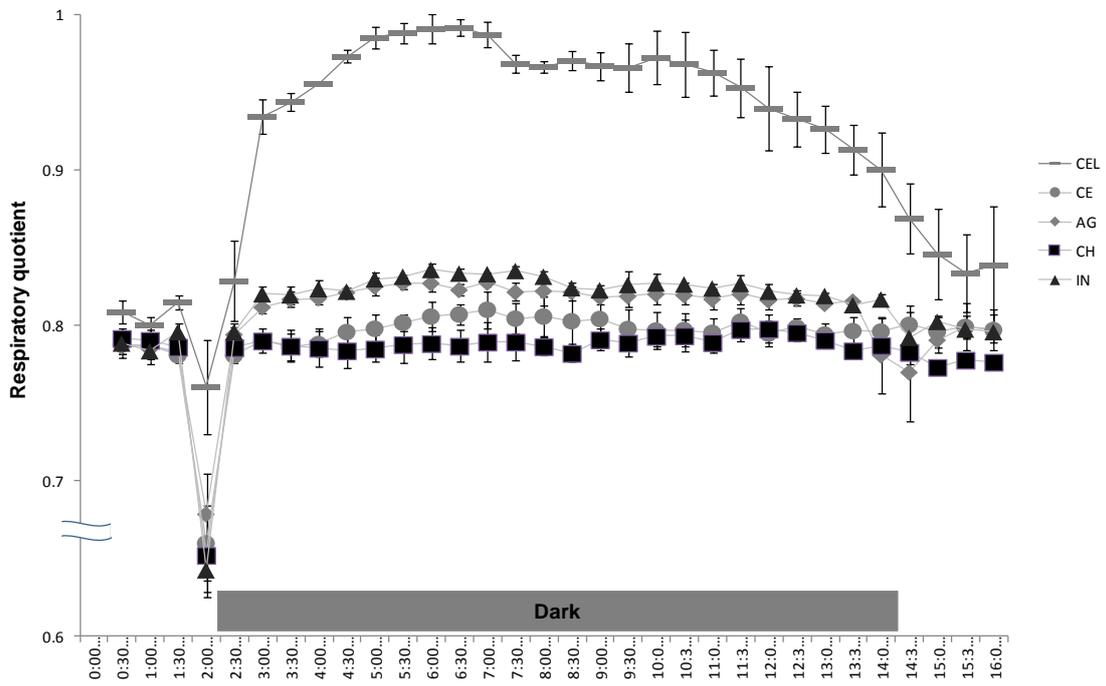


Figure 16. Respiratory quotient in every 30 minutes

Each value is the mean \pm SE.

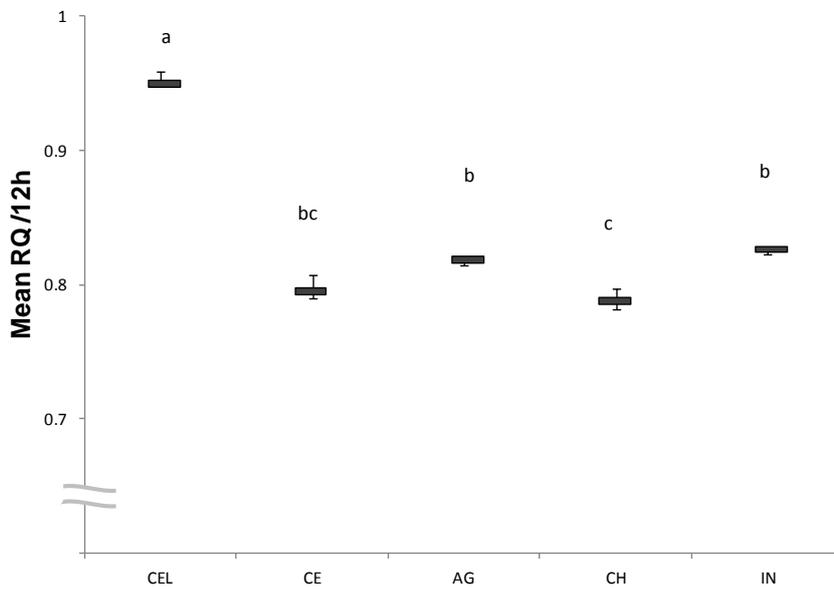


Figure 17. Mean respiratory quotient of 12 hours

Each value is the mean \pm SE. Tukey's test, and values with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

直腸温計測

直腸温の平均値は、CEL 群と比較して CE 群は有意に高値を示した。統計学的な有意性は認められなかったが CE 群 (平均 36.0) と比較し、AG 群 (平均 35.9) 及び IN 群 (平均 35.9) は高値を示した。HFD 群間では統計学的有意性は認められなかった (Fig. 18)。これらの結果から、直腸温の平均値は、LFD に比較して HFD は高値を示した。HFD 摂食条件では、IDS を添加することで直腸温の上昇はみられなかった。これは、HFD 摂食による直腸温上昇効果の影響が強い為、IDS の効果が見えなくなることによるものと考えられた。

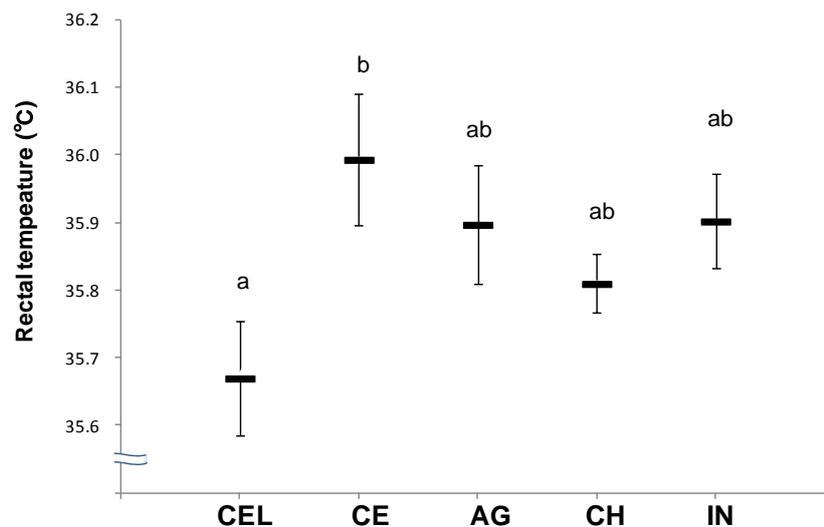


Figure 18. Rectal temperature

Each value is the mean \pm SE. Tukey's test, and values with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

第二節：脂質代謝及びインスリン抵抗性に与える影響

第二節では、脂質代謝及びインスリン抵抗性への影響についての影響を検討した。

実験方法

空腹時血清グルコース、インスリン及び HOMA-IR

群分け後、8 及び 9 週目にマウスの尾静脈から採血を行い、血清グルコース：酵素法（和光純薬工業：Glucose C II test-wako）と血清インスリン：ELISA 法（Shibayagi: Insulin-mouse RTU）をそれぞれ定量した。インスリン抵抗性の恒常性モデル評価として、The homeostasis model assessment insulin resistance (HOMA-IR) 値を次の算式で求めた。

[HOMA-IR = 空腹時血清インスリン(μ U/mL) \times 空腹時血清グルコース (μ U/mL) / 405][33]。絶食時間は 10~11 時間とした。

血清脂質

血清中の総コレステロール (TC)、中性脂肪 (TG)、HDL コレステロール (HDLc) 及び遊離脂肪酸 (FFA) はそれぞれ、和光薬工業：Cholesterol E、TG E、HDLc、NEFA C 及び TBA test-wako を用いて定量した。尚、LDL コレステロール (LDLc) については、Friedewald 等の計算式 [LDLc = TC - HDL - (TG/5)] を用いて算出した [34]。

統計解析

統計解析は第一節と同様の手法で行った。

結果及び考察

空腹時血清グルコース、インスリン及び HOMA-IR

IDS 摂食 8 週目におけるグルコースの平均値は、全ての群間で統計学的有意性は認められなかった (Fig. 19 [A], [B])。9 週目について、HFD 群間では、統計学的有意性は認められなかったが CE 群 (平均 126) と比較して IN 群 (平均 108) は低値を示した (Fig. 19 [B])。

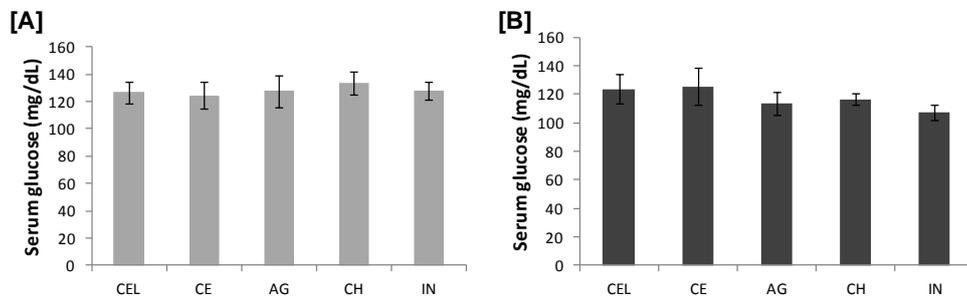


Figure 19. Serum glucose

[A]: The 8th week, [B]: the 9th week, respectively. Each value is the mean \pm SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and the significant difference was not shown between these data as a result of the test.

IDS 摂食 8 週目の血清インスリン値は、CEL 群に対して CE 群は有意に上昇し、HFD 投与群間では、CE 群と比較して、CH 群及び IN 群は有意に低下した (Fig. 20 [A])。9 週目では更にその傾向が強くなり、CE 群と比較して、CH 群、IN 群及び AG 群も有意に低下した (Fig. 20 [B])。

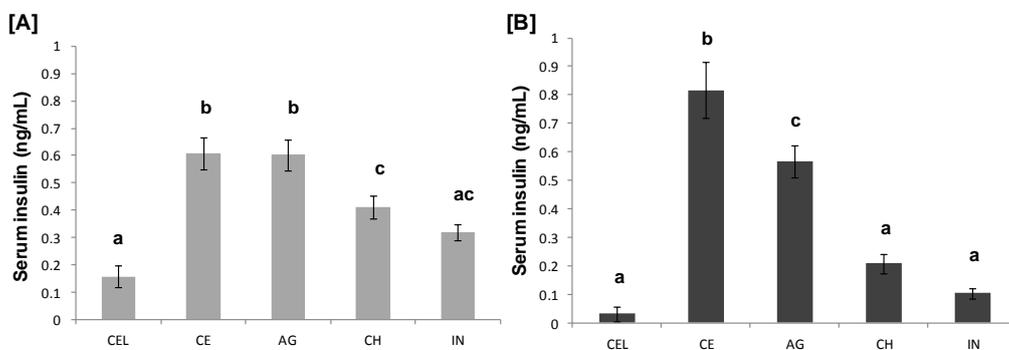


Figure 20. Serum insulin

[A]: The 8th week, [B]: the 9th week, respectively. Each value is the mean \pm SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

HOMA-IR は、血清インスリン値とほぼ同様の傾向を示した (Fig. 21 [A], [B])。

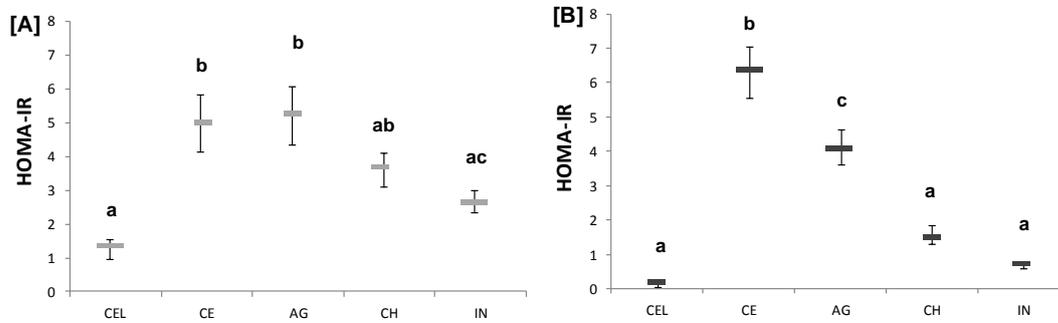


Figure 21. HOMA-IR

[A]: The 8th week, [B]: the 9th week, respectively. Each value is the mean \pm SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different letters are significantly different, $P < 0.05$.

これらの結果から、HFDによってインスリン抵抗性が惹起され、CH及びINの摂取により、HFDの摂食によって上昇したインスリン抵抗性を改善することが示唆された。

血清脂質

血清脂質の平均値は、HDLcを除いて、CEL群と比較してCE群間に統計学的有意性は認められなかった。HFD群間では、TC及びHDLcに関して、CE群と比較し統計学的有意性は認められなかったが、AG群及びCH群で高値を示した（[A] TC；CE群（平均66）、AG群（平均97）及びCH群（平均119）。[D] HDLc；CE群（平均66）、AG群（平均97）及びCH群（平均87））。一方、TGに関して、HFD群間では、CE群（平均55）と比較し統計学的有意性は認められなかったが、CH群（平均48）が低値を示した（Fig. 22）。

これらの結果から、血清脂質の平均値については、一定した傾向が観察できなかった。

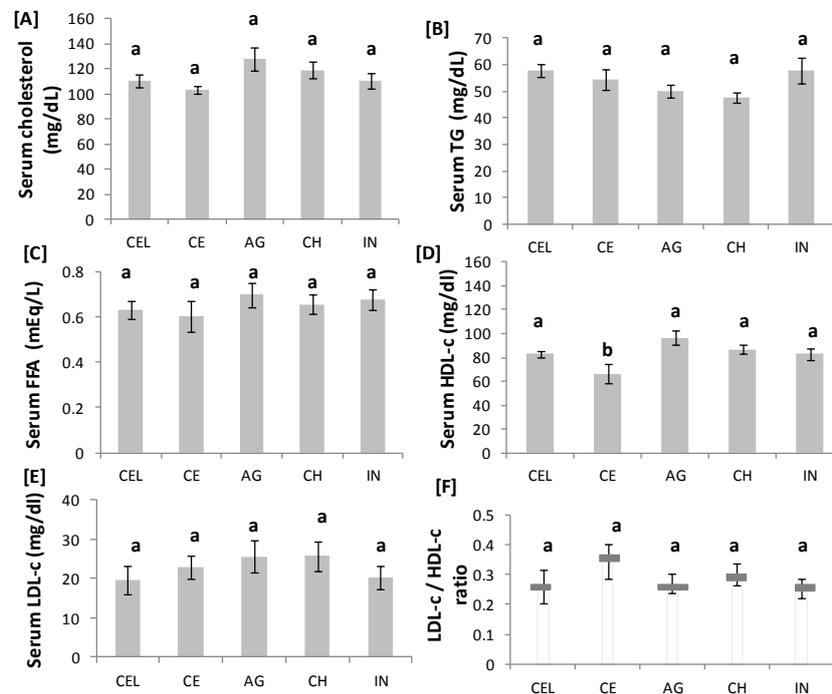


Figure 22. Serum lipids

[A]: Serum cholesterol, [B]: serum TG, [C]: serum FFA, [D]: serum HDL-cholesterol, [E]: serum HDL-cholesterol and [F]: LDL/HDL. Each value represents mean \pm SE. Comparisons of all groups were performed by Tukey's-test, and values with different letters are significantly different.

第三節：本章の小括及び考察

第一節では、高脂肪食で肥満誘導させたマウスに IDS を摂食させ、直腸温、呼吸代謝計測を中心にしたエネルギー代謝調節についての影響を検討した。その結果、IN 摂取は腸内細菌叢の代謝が活発となり、生成した SCFA が下部消化管でエネルギーとして利用されることにより、蠕動運動が活発になることを見出した。一方、CH 摂取は、何らかのメカニズムによって、脂質利用を上昇させることでエネルギー代謝を亢進させると考えられた。

第二節では、糖質代謝、脂質代謝についての影響を検討した。その結果、CH 群及び IN 群の血清インスリン濃度と HOMA-IR の低下傾向が観察された。これらの IDS の摂取により、インスリン抵抗性が改善された。

ヒトが MetS 状態となることは、食生活の変化から考えると、脂肪の過剰摂取と脂肪エネルギー比の上昇に起因するといわれる[9]。DF 素材としてキトサンは、その構成糖である D-グルコサミンアミノ基に由来する陽電荷を有することに加えて希酸に溶解し粘性の高い溶液となることが特徴である。それらの性質が小腸で発揮され、DF として栄養素の吸収抑制として働く。キトサンは動物[35-38]やヒト[39]で血中 TC や血圧降下作用、動脈硬化等の進行に対する改善効果が多数報告されている。イヌリンの動物とヒトへの報告では、合成されたイヌリン 5%を高脂肪・高糖食に添加した飼料を摂食させたラットにおいて、体重、血糖値及び肝臓脂質が低下し、ヒトに於いても血糖低下させた[40]。イヌリンのヒトへの報告では、健常男性 12 名（平均 23.3 歳）を対象とした臨床試験において、IN 含有シリアル（9 g イヌリン含有）を 4 週間摂取させたところ、血清 TC 及び TG が減少し、腸内細菌環境が改善した[41]。また、血漿中

フェリチン濃度 $25 \mu\text{g/L}$ 未満の女性 32 名 (18~40 歳、スイス) を対象とした二重盲検クロスオーバー無作為化プラセボ比較試験において、イヌリン平均 20.2 g/日 を 4 週間摂取させたところ、便の pH の低下、ビフィズス菌や乳酸塩の増加が認められた [42]。以上の報告は、イヌリンは腸で水分を吸収するとゲル状になり、同時に摂取した糖質の吸収を抑える働きを持ち、腸内で有用な腸内細菌の基質となり、腸内環境を整える効果を持ち、減量を目的とした食品等に広く利用されていることを示すものである。

本章では、HFD 摂食条件下において、CH の摂取は、脂質利用を上昇させることによりエネルギー代謝を亢進させることが示された。一方、IN の摂取は腸内細菌叢による代謝が活発となり、IN の発酵産物としての SCFA がエネルギー源となり、腸の蠕動運動が活発になることを見出した。また、CH と IN は、インスリン抵抗性を改善させた。

これらのことから、IDS の種類によって、MetS に対する改善効果が異なることが考えられた。

第三章：肥満誘導マウスにおける難消化性糖類の改善機構に関する検討

第一章及び第二章では、IN が腸内細菌叢の代謝を促進し、エネルギー代謝を亢進させることを示した。また、HFD 摂食条件において、CH の摂取は、脂質利用を上昇させることにより、エネルギー代謝を亢進させることを示した。しかしながら、その詳細は明らかではない。

そこで第三章では、肥満関連因子の改善作用を有す食品成分の影響を、食餌誘導性肥満マウスに於けるエネルギー代謝について、CH と IN の影響を検討し、その作用機構を探ることを目的とした。

第一節：二種類の難消化性糖類がエネルギー代謝に与える影響

第一節では、CH と IN の飼料への含有率を変えて、食餌誘導性肥満マウスに於けるエネルギー代謝に関して CH と IN の影響を検討する。また、作用機構を探る目的で、コレステミド (CS) を血中コレステロール低下に関するコントロール標品として用いるものとした。

使用した IDS 素材及び標品

① キトサン (Chitosan)

第二章で使用した IDS と同一の素材を使用する。

② イヌリン (Inulin)

第二章で使用した IDS と同一の素材を使用する。第一章で使用したイヌリン高分子タイプ (INH) を用いた。

③ コレスチミド : (colestimide)

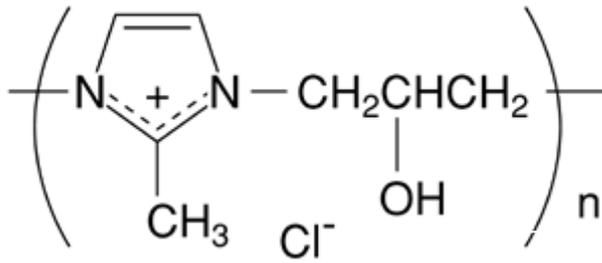


Figure 23.

陰イオン交換樹脂であるコレスチミド (Fig. 23) は、胆汁酸の腸肝循環を阻害し、臨床的にコレステロールを低下させ

る薬剤である [43]。ポジティブ・コントロールとしての標品とした。

使用品は、田辺三菱製薬株式会社より提供されたものである。

実験方法

実験動物と飼育方法

6 週齢の C57BL/6J 雄性マウス (東京実験動物株式会社) に 9 週間、HFD を与えて肥満を誘導させた。飼育室内の環境および給水、摂食については第一章及び第二章と同条件である。その後、肥満マウスを次の 6 群に分けた。2% セルロース-HFD を HFD 基本群 (CE) とした。IDS は各群 2% または 4% 添加し、2% CH 添加群 (CH)、4% CH 添加群 (CH4)、2% IN 添加群 (IN)、4% IN 添加群 (IN4) 及び 2% (CS) の全 6 群 (n=8) とした。CE と CS は対象及びポジティブ・コントロール群とした。飼料構成を (Table 10) に示す。

飼料投与後、13 週目に、ペントバルビタール (ソムノペンチル®、共立製薬株式会社) による麻酔下で下大静脈から全採血、各組織の摘出を行った。

尚、本研究は科学的、動物愛護及び環境保全並びに動物実験を行う教員・学生等の安全確保の観点から、動物実験等の実施方法等を定めた「城

西大学動物実験規定」に従い、動物実験委員会による研究計画の審査に基づく学長承認を得て実施した。

Table 10. Composition of experimental diets

Component: Gram(%)	CE	CH	CH4	IN	IN4	CS
Casein	30.00	←	←	←	←	←
Corn starch	5.83	←	5.42	5.83	5.42	5.83
Sucrose	23.31	←	21.72	23.31	21.72	23.31
Soybean oil	3.28	←	←	←	←	←
Lard	30.78	←	←	←	←	←
Cellulose powder	2.00					
Colestimide						2.00
Chitosan		2.00	4.00			
Inulin				2.00	4.00	
AIN-93 Mineral mixture	3.50	←	←	←	←	←
AIN-93 Vitamin mixture	1.00	←	←	←	←	←
L-Cystine	0.30	←	←	←	←	←
Tributylhydroquinone	0.0014	←	←	←	←	←
Fat energy, kcal/100g (%)	58.9	←	59.7	58.4	58.8	58.9
Carbohydrate energy, kcal/100g (%)	21.1	←	20.0	21.7	21.2	21.1
protein energy, kcal/100g (%)	20.0	←	20.3	19.9	20.0	20.0
Total energy, kcal/100g (%)	551.1	←	543.5	554.9	551.3	551.1

臓器重量、盲腸内容物重量、盲腸内容物 pH 及び糞採取

解剖時に WAT、BAT 及び肝臓の重量を測定した。盲腸内容物重量とその pH の測定は第一章第二節と同様の手法で行った。糞の採取は、群分け後 9~12 週間個別に採取し、真空凍結乾燥した後、計量、 -30°C で保管した。CE、CH4 及び IN4 は (n=8)、CS 及び IN2 は (n=7)、CH2 は (n=5) をデータとして用いた。

腹部の体脂肪重量測定

群分け後、13 週目にペントバルビタールによる麻酔下で体脂肪量を、第一章と同様の手法で行った。CE、CH4 及び IN4 は (n=8)、CS 及び IN は (n=7)、CH は (n=5) をデータとして用いた。

エネルギー代謝計測

第一章と同様の手法で行った。計測に関して、各群 7 匹ずつチャンバに収容させた。計測の操作を同一群 (n=7) で 7 回行い、後半 3 回の計測値をデータとして用いた。VO₂データの算出に関しての処理法も第二章と同手法である。使用したデータは夜間 12 時間 + 前後 2 時間とした。

血清脂質

血清中の TC については、(和光薬工業:Cholesterol E)、血清中の総胆汁酸 (total bile acid: TBA) は、(和光薬工業: TBA test-wako) をそれぞれ用いて定量した。CE、CH4 及び IN4 は (n=8)、CS 及び IN2 は (n=7)、CH2 は (n=5) をデータとして用いた。

空腹時血清グルコース、インスリン及び HOMA-IR

群分け後、9 及び 12 週目に尾から採血を行った。絶食時は 10~11 時間とした。血清グルコース: 酵素法 (和光純薬工業: Glucose C II test-wako) と血清インスリン: ELISA 法 (Shibayagi: Insulin-mouse RTU) を用いて、それぞれ定量した。インスリン抵抗性の恒常性モデル評価として、HOMA-IR は第二章と同様に算出した。各群 n=7 をデータとして用いた。

統計解析

データの記載は平均値 ± SE で表した。各群間の平均値の比較については次に示す。まず、当実験の試験系が成立していることの確認の為に、CE と CS 群間の t 検定を行った。検定の有意水準は、両側 ($P < 0.05$) と

した。次に、CE と各試験群 Dunnet 検定を行った。検定の有意水準は、両側 ($P<0.05$) とした。これ等の検定は SAS9.2 (SAS Institute Japan Ltd.) を用いて行った。

結果及び考察

体重増加曲線と各実験の概要を示した (Fig. 24)。

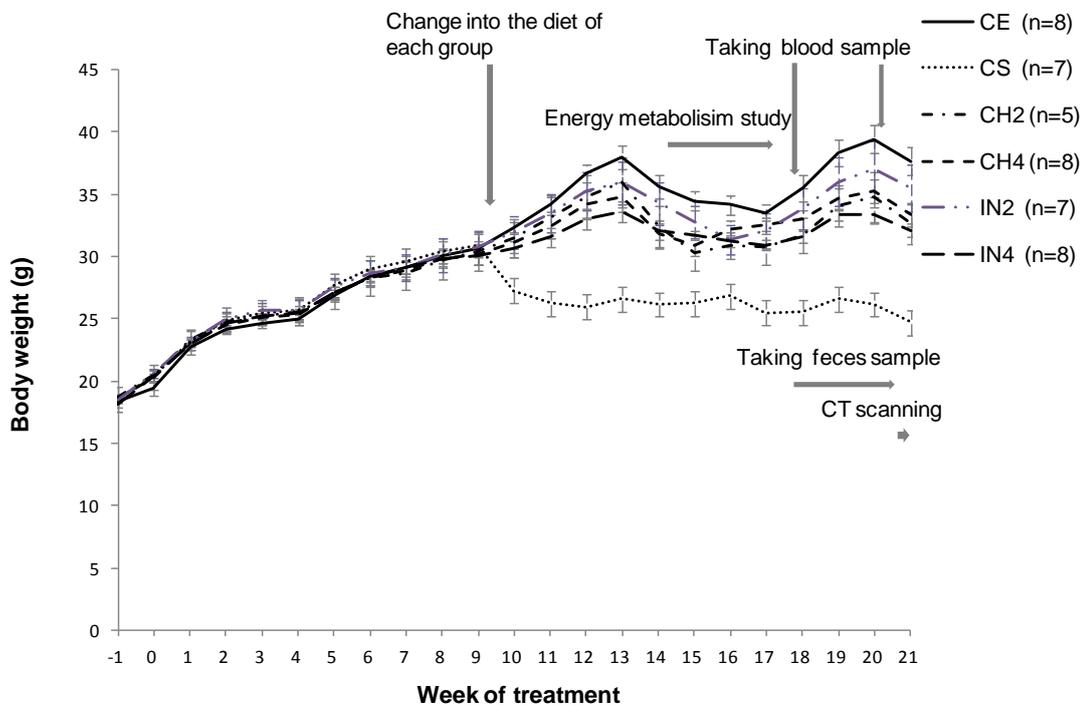


Figure 24. Body weight gain and general description of the experiments

Data are means±SE

当研究では、CS 群をコレステロール低下のポジティブ・コントロールと設定し、CE 群と IDS 各群との比較を主とした。

摂食量、総熱量摂取、体重増加量

自由摂食とした結果、総摂食量は CE 群と比較し CS 群は有意に低値を

示したが、IDS 各群間では統計学的有意性は認められなかった (Fig. 25)。

総熱量摂取 (体重 100g 換算値) は、CE 群と比較し CS 群は有意に高値を示し、CH 両群及び IN4 群についても有意に高値を示した (Fig. 26)。この結果は、100g の体重になる為にどれだけの摂取量が必要かを換算して示したものであり、CS 群は最も多い飼料を必要とし、次いで CH 両群、IN4、IN 群の順となる。

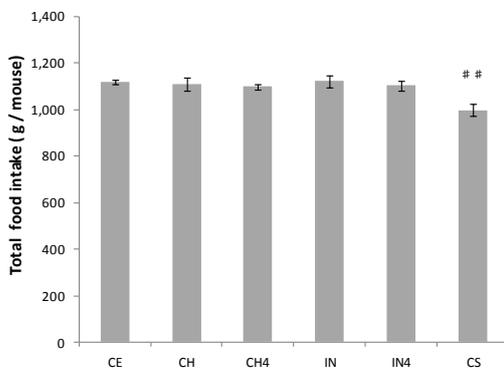


Figure 25. Total food intake

$p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons). Each value is the mean \pm SE.

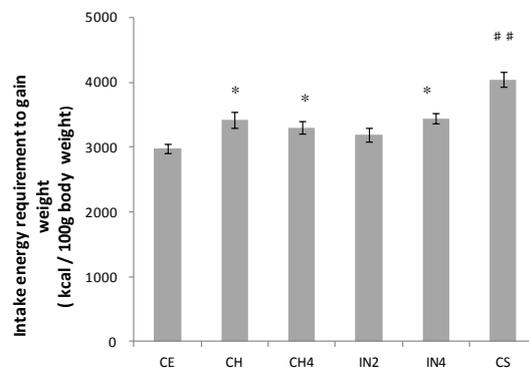


Figure 26. Intake energy requirement to gain weight

$p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons). Each value is the mean \pm SE.

体重増加量の平均値は、CE 群と比較して CH 両群及び IN4 群は有意に低値を示した (Fig. 27)。CH 両群及び IN4 群は有意に低値を示した。CE 群 (平均 2.3) と比較して、IN 群 (平均 4.8) は統計学的有意性が認められなかったが、低値を示した。総熱量摂取の結果を合わせると、キトサンは少ない添加量でも体重減少に効果があることを示した。

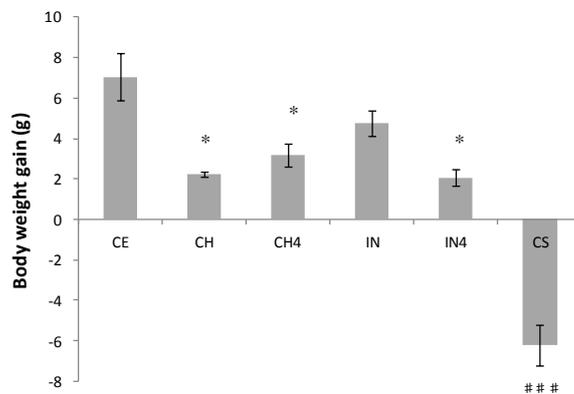


Figure 27. Body weight gain

$p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons). Each value is the mean \pm SE.

糖尿病病態誘発ラットに 8.3×10^5 D のキトサンを 10 週間摂食させると、5 及び 7%摂食群で体重が有意に低下した報告で、キトサンは消化管内で食物繊維としての効果があり、HOMA-IR と血漿 TC と TG の低下、更に血漿 GLP-1 の上昇が、小腸で脂質吸収を減少させることに加えて大腸内で腸内細菌叢の組成や発酵の変化をもたらすと推察した [38]。当研究においても、食物繊維としての吸収遅延による効果があったものと推察した。

Kobayashi 等は 2 型糖尿病モデルマウスに対して高脂肪食にコレステリド添加の有無の影響を調べた。その結果、食事誘導性肥満と脂肪肝は摂食量を減らすこと無しに、コレステリド添加によって著しく改善されたと報告した [44]。当研究では、体重増加量は CE 群に比べ CS 投与群で有意に低値を示した。試験食開始前直後から体重は激減し、飼育終了時まで、極端な痩せの状態が継続した。コレステリドは、陰イオン交換能が高く、胆汁酸を吸着することで、小腸の再吸収を阻害してする。脂質の吸収を阻害し、その結果、体重の減少を示したと推察する。しかし、

小腸において、TGの吸収阻害の程度は未解明である。従って今後、糞便中へのTG排泄量を比較するものとする。

Computed tomographyによる腹部体脂肪重量 解剖後の脂肪組織重量

CTによる測定結果を示す (Fig. 28)。内臓脂肪量は、CE群と比較しCS群は有意に低値を示し、IDS各群についても有意に低値を示した。

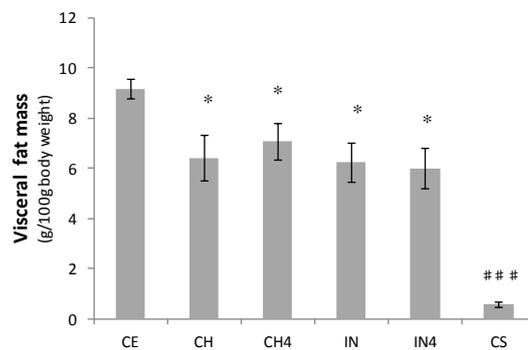


Figure 28. Visceral fat mass

$p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons). Each value is the mean \pm SE.

腹部の脂肪は内臓脂肪と皮下脂肪に大別される。これらの脂肪集積場所による違いをCT測定で検討した。CTによる内臓脂肪の測定条件は、後述の報告に基づき行った。性腺周辺の脂肪組織は内臓脂肪量とみなした報告[45]。また、マウス(n=45)をCTで測定した報告では、全体の脂肪量の走査値と腹部(腰椎L1~L5)の採取した脂肪量の相関は高値($R=0.99$)を示した[17]。これらのことから、腰椎L1~L5のCTによる走査は、精巣上体脂肪重量を内臓脂肪重量の代表値として考えられており、体全体の脂肪量を反映させていると言える。

Table 11. Adipose tissues and hepatic weight

(g)	CE	CH	CH4	IN	IN4	CS
(n)	(8)	(5)	(8)	(7)	(8)	(7)
Epididymal adipose tissues	6.44±0.63	4.08±0.22 [*]	4.54±0.46 [*]	4.38±0.57 [*]	3.64±0.51 [*]	0.70±0.09 ^{###}
Brown adipose tissues	0.35±0.03	0.34±0.02	0.29±0.01	0.35±0.02	0.37±0.01	0.27±0.01 [#]
Liver	3.83±0.15	4.15±0.16	3.86±0.10	4.03±0.17	4.16±0.13	4.18±0.10

Above data after dissection. Data are expressed as g/100g body weight. Each value is the mean ±SE. Independent Student's *t*-test was applied for pair comparisons, and *Dunnnett's* test was performed for multiple comparisons. The level of statistically significant difference was set at $p < 0.05$ [#], $p < 0.05$ and ^{###} $p < 0.001$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

本研究の結果から、内臓脂肪量は、CE 群と比較し CS 群は有意に低く、IDS 各群も有意に低かった (Fig. 28)。また、精巣上体白色脂肪組織の重量においても同様の結果となった (Table 11)。IDS の種類による差は認められなかった。以上のことから、IDS、CS 群はエネルギー摂取量が多いにも関わらず、脂肪の蓄積抑制を伴う体重増加抑制効果を示すことが明らかとなった。

エネルギー代謝

VO₂ に関して、CE 群と比較して CH4 群 (Fig. 29 (A)) 及び IN4 群 (Fig. 29 (C)) は大きく上昇し、CS 群 (Fig. 29 (E)) 及び CH 群 (Fig. 29 (D)) は上昇傾向であった。夜間 12 時間の累積 VO₂ 値について、CE 群に比べ、CH4 群と IN4 群は有意に増加した (Fig. 30)。

30 分毎の平均 RQ 値は、CE 群と比較し CS 群は大きく上昇した。CH4 群は夜間後半に平均値として低値を示した [夜間始め 10:00 から 12:00 にかけて 2 時間の平均 RQ 値に関して、(CE 群の平均値) - (CH4 群の平均値) = 0.004 ~ 0.007 の範囲であった。] (Fig. 31)。夜間 12 時間の平均 RQ 値は、CE 群と比較し CS 群は有意に高値を示した (Fig. 32)。

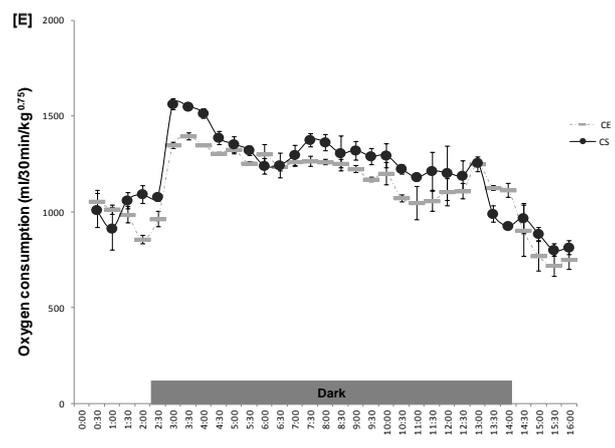
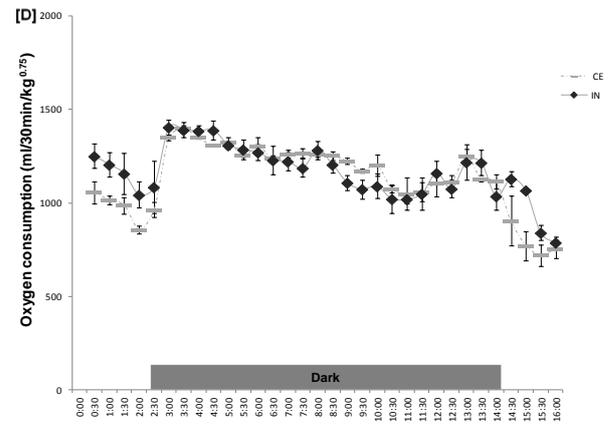
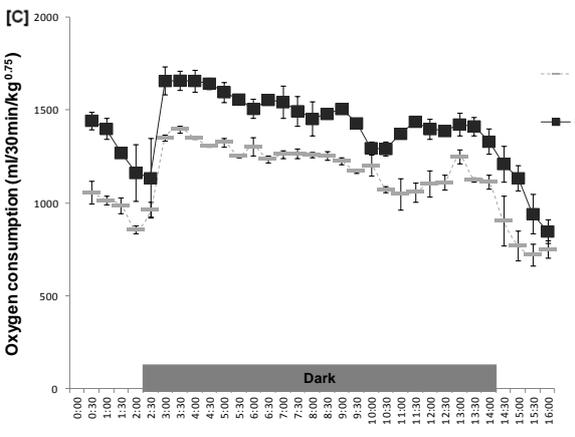
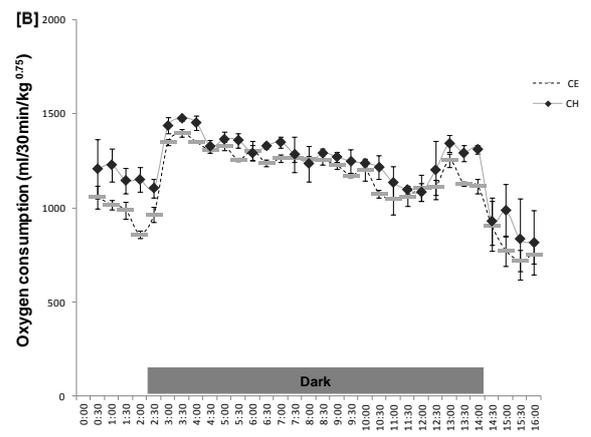
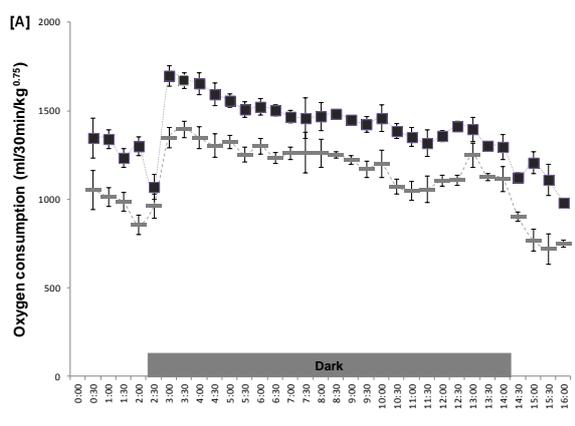


Figure 29. Oxygen consumption in every 30 minutes

[A]: CH4 vs. CE, [B]: CH vs. CE, [C]: IN4 vs. CE, [D]: IN vs. CE and [E]: CE vs. CS. The mean of the measured value for 7-9 weeks showed. Experiments were conducted in triplicate as 7 animals. Data are represented as the mean \pm SE of 3 independent experiments.

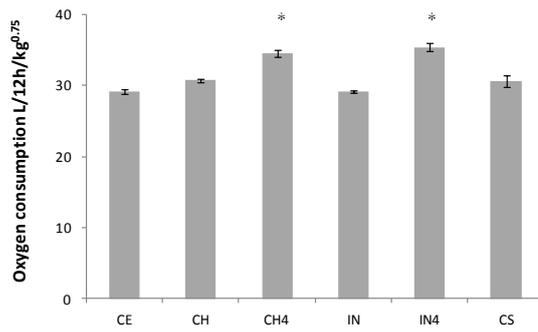


Figure 30. Accumulated oxygen consumption of 12 hours

Each value is the mean \pm SE. * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

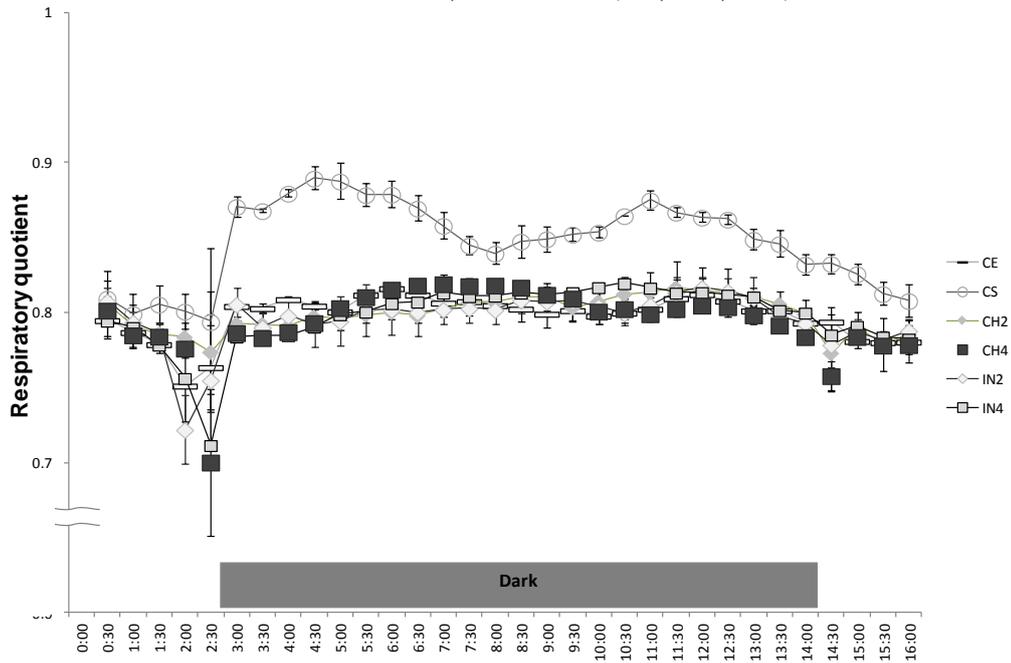


Figure 31. Respiratory quotient in every 30 minutes

The mean of the measured value for 7-9 weeks showed. Experiments were conducted in triplicate as 7 animals. Data are represented as the mean \pm SE of 3 independent experiments.

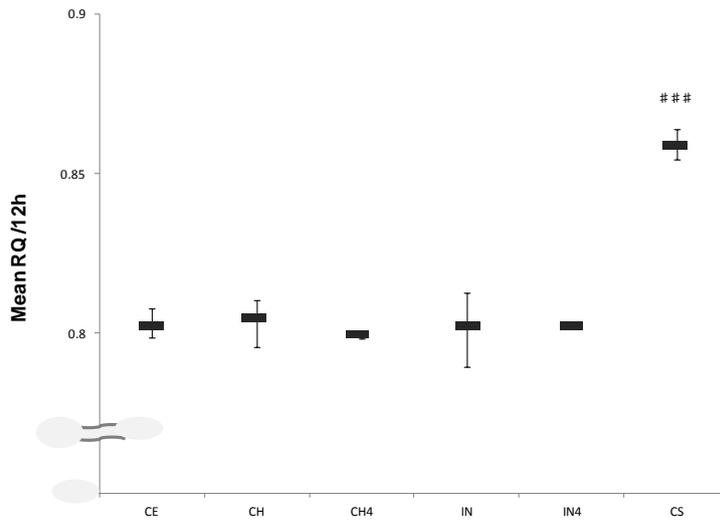


Figure 32. Mean respiratory quotient of 12 hours.

Data are mean \pm SE ### $P < 0.001$ control versus positive control (pair comparisons, t-test).
 ** $P < 0.01$ control versus control (multiple comparisons, Dunnett's test)

BAT を構成する褐色脂肪細胞は、体熱産生に特化した細胞である。褐色脂肪細胞は貯蔵している脂肪滴から脂肪酸を遊離し、それを酸化・分解したエネルギーをミトコンドリアに存在する UCP-1 によって、熱として放散する [46]。

Watanabe等 はマウスの実験で、高脂肪食にBAを添加すると、エネルギー産生遺伝子の発現亢進、エネルギー消費を誘発すると報告した [47]。BA合成はFXR-SHP経路を介したBA合成律速酵素CYP7A1の発現制御により巧妙に制御されている。また、肝臓においてBAによりFXRを介し転写活性阻害作用のある核内受容体SHPの発現が亢進し、発現レベルでSREBP-1cが制御され、脂肪酸合成遺伝子の発現を低下させ、肝臓でのTG合成を抑制し、血中へのVLDL分泌を低下し、その結果、血中TGは低下すると報告した [48]。次に、彼等は、BAがマウスBATやヒト筋肉の細胞表面のBAをリガンドとするGPCR (TGR5/M-Bar)に作用し細胞内cAMP濃度を増加させ、甲状腺ホルモン変換酵素D₂の発現、活性を亢進させ、その結果、細胞内、活性化甲状腺ホルモンT₃濃度が増加し、エネルギー産生遺伝子の発現亢進、エネルギー消費を誘発すると報告した [47]。これらの報告から、BAは食事の脂質をミセル化するという本来の役割のみならず、摂食と同調するシグナル分子として、生体内エネルギー恒常性に重要な役割を果たしていると考えられる。つまり、BAは、BA→TGR5/M-Bar→cAMP→D₂経路により、エネルギー消費に重要な臓器の細胞内T₃濃度を増加させエネルギー消費に関する遺伝子発現を誘発し、エネルギー消費を高めている (Fig. 33)。更に、Watanabe等 は、MetSモデルマウスにコレステリドを投与することにより、代謝への影響を評価した。その結果、肝臓でBA生合成の誘導を促し、一次BAが増加し、そ

れらがシグナル伝達され、BAを投与した時と同様にBAT中で熱産生を誘導した結果、肥満と糖尿病を改善すると報告した[49]。

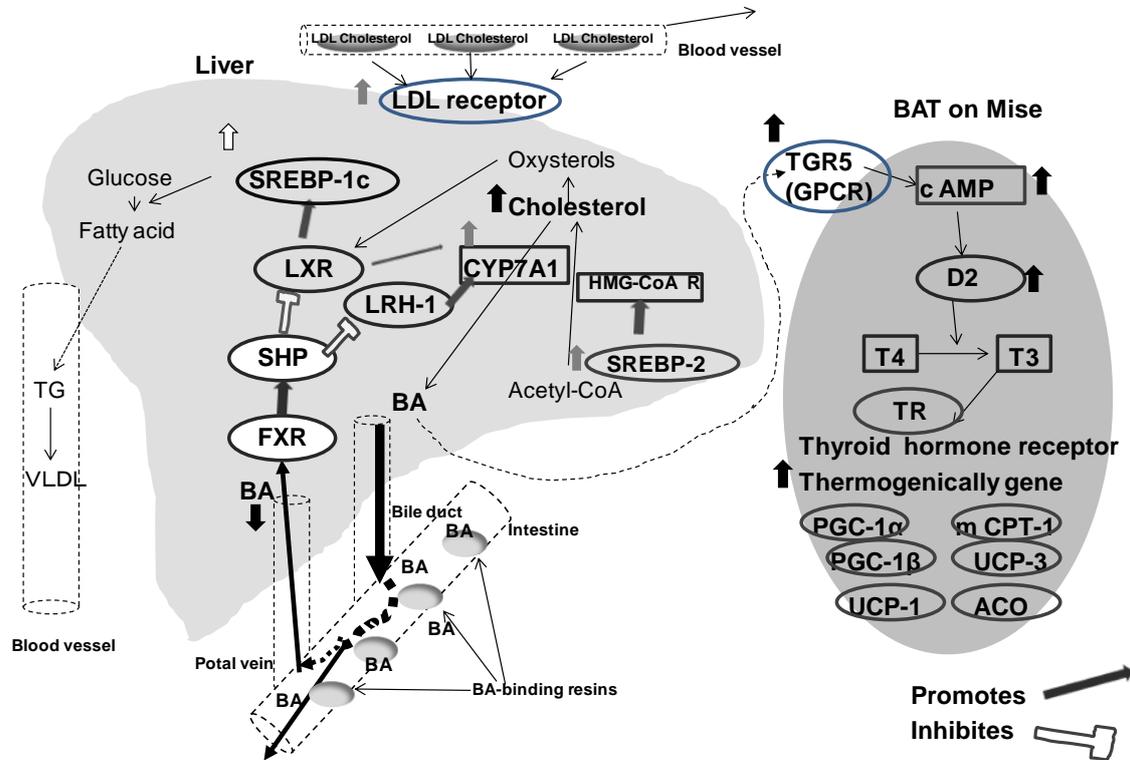


Figure 33. BA as signalling molecules regulates TG biosynthesis and energy expenditure

当研究では、夜間の VO_2 値に関して、CE群と比較してCH4群 (Fig. 29 (A)) 及びIN4 (Fig. 29 (C)) は大きく上昇し、CS群 (Fig. 29 (E)) 及びCH群 (Fig. 29 (B)) は上昇した。これらのことから、キトサンは、CSと同様に陽電荷を有することから、BAの腸肝循環の障害を介した体脂肪燃焼機構が、エネルギー消費を高めている可能性が考えられた。

一方、イヌリンについては、IN4群が上昇した。Takemura等によると、BAは消化管内で乳酸菌等 probiotics の成長と残存のストレス要因である。高脂肪食は肝臓でのBA生合成を高め、排泄量も増加させる。その為、BA濃度の増加は probiotics の生存数を減少させる。しかし、HFD摂食マウスにイヌリンを投与すると、probiotics の生存率を上昇させるこ

とを示した[50]。当研究において、IN添加量を増加したIN4の摂食条件は、易発酵性基質としてエネルギー源となり、腸の蠕動運動を活発化させることにより、VO₂を上昇させさせ、エネルギー代謝を亢進させたと推測する。prebiotics等の糖質を基質した結腸内細菌による主な代謝産物は短鎖脂肪酸である。また、食物繊維は小腸で消化吸収されずに大腸に到達すると、そこで腸内細菌によって発酵され、短鎖脂肪酸が生成される[51, 52]。短鎖脂肪酸は、宿主のエネルギー源として利用される以外にも、肝臓での脂質代謝、腸管運動の刺激、消化管ホルモンの分泌等、宿主機能を多様に調節する腸内因子として機能している[53]。

30分毎の平均RQ値は、CE群と比較しCS群は大きく上昇し、一方、CH4群は夜間後半に平均値として低値を示した (Fig. 31)。CS群のマウスは他の群に比べ、極度に瘠せて体脂肪量が少ないことから、糖質をエネルギー源とする傾向が亢進したことによると考えられる。CH4群はやや脂質を熱量とする傾向がみられた。夜間の平均RQ値は、CE群と比較しCS群は有意に高いが、IDS投与各群間に差は認められなかった (Fig. 32)。

血清脂質

血清TCの平均値は、CE群 (平均90.0)と比較して、IDS各群間では統計学的有意性は認められなかったが、CH群 (平均69.5)、CH4群 (平均69.3)及びCS群 (平均66.9)で低値を示した (Fig. 34)。

血清総胆汁酸 (TBA)の平均値は、CE (平均1.57)と比較して、IDS各群間では統計学的有意性は認められなかったが、CS (平均3.11)及びCH4群 (平均2.37)で高値を示した (Fig. 35)。これらの結果から、キトサンは、BAの腸肝循環の阻害を介した体脂肪燃焼機構が惹起され、エネルギー消

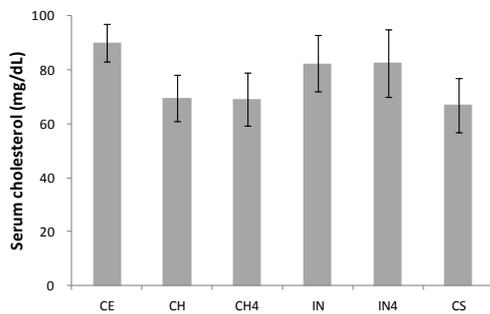


Figure34. Serum total cholesterol
Each value is the mean \pm SE.
* $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

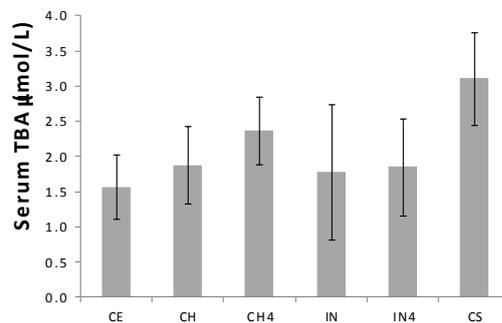


Figure35. Serum total bile acid
Each value is the mean \pm SE.
* $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

費を高めている可能性が考えられた。

Maezaki 等[54]は、健常成人男性 8 名に対してキトサンを一日に 3～6g 摂取させ検討した結果、血清 TC は有意に低下し、血清 HDLc が有意に上昇することを示した。また、キトサン投与により、一次 BA であるコール酸及びケノデオキシコール酸の糞便中排泄が有意に増加し、摂取を中止すると減少すると報告した。また、Kobayashi 等は 2 型糖尿病モデルマウスに高脂肪食にコレステリド添加によって、高血糖、高脂血症は有意に改善され、インスリン抵抗性を低減させ、糞中への胆汁酸と脂質排泄は有意に上昇させ、肝臓の SHP 遺伝子の発現が低下することを示した[44]。SHP は脂肪酸の生合成と糖新生の遺伝子と同様、多様な代謝経路における脂質代謝関連遺伝子の発現性を調節する。また、高脂肪摂食マウスで、イヌリンの添加は、脂肪組織の分化に関連した PPAR γ 、SCFA 受容体の一つである GPR43 の過剰発現を減少させることの報告がある[27]。

盲腸内容物量及び盲腸内容物 pH

盲腸内容物量は、CE 群と比較し CS 群は有意に高く、IDS 群において

は IN4 群が有意に高値であった (Fig 36)。

盲腸内容物 pH は、CE 群と比較し CS 群は有意に高く、IN 両群で有意に低値を示した (Fig. 37)。

これ等の結果から、イヌリンは消化管内で発酵基質として機能していることがここでも示された。コレスチミドは胆汁酸の腸肝循環を阻害し、血中 TC を低下させる薬剤である。その為、食餌中の脂質が吸収されにくくなり、盲腸内容物の増加と共に体重増加量の減少 (Fig. 27) 並びに血清 TC の平均値が低値を示した (Fig. 34) ことに繋がったものと推測した。

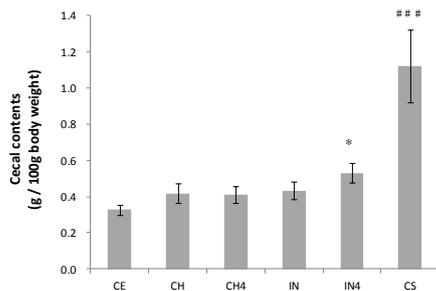


Figure 36. Cecal contents
$p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

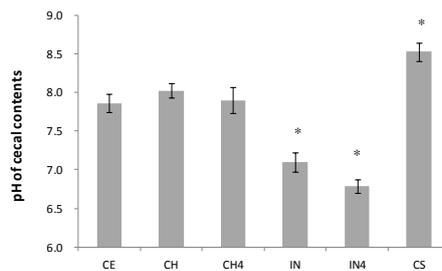


Figure 37. pH of cecal contents
$p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

当研究では、盲腸重量は CE 群と比較し CS 群は有意に高値を示し、IDS 各群も有意に高値を示した (Fig. 38)。

コレスチミドは胆汁酸の腸肝循環を阻害し、臨床的にコレステロールを低下させる薬剤である。その為、脂質が吸収されにくくなり、CS 群は盲腸重量及び糞量について有意に高値を示し (Table 39)、結果として、体重増加量の減少 (Fig. 27) に繋がったものと考え

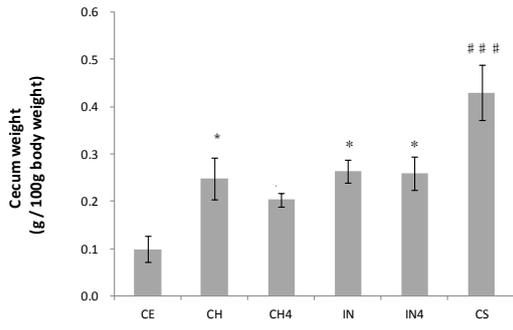


Figure 38. Cecum weight

$p < 0.05$ and ### $p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

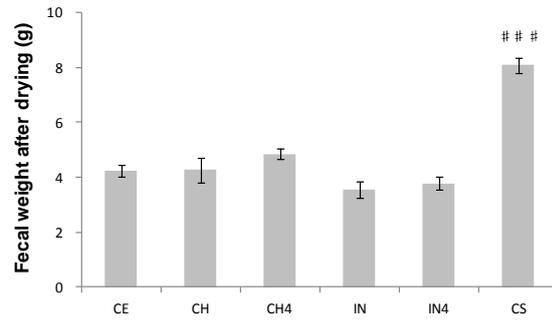


Figure 39. Fecal weight after drying

$p < 0.05$ and ### $p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), * $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

空腹時血清グルコース、インスリン値及び HOMA-IR

空腹時血清グルコースの平均値は、CE 群と比較し CS 群は有意に低値を示した。IDS 各群間では統計学的有意性は認められなかったが、IDS 各群は低値を示した [9 週目; CE 群 (平均 176) と比較して CH 群 (平均 121)、CH4 群 (平均 164)、IN 群 (平均 133) 及び IN4 群 (平均 164)、12 週目; CE 群 (平均 192) と比較して CH 群 (平均 158)、CH4 群 (平均 144)、IN 群 (平均 163) 及び IN4 群 (平均 145)] (Fig. 40)。

血清インスリンの平均値は、CE 群と比較し CS 群は有意に低値を示し、IDS 添加群は 12 週目の IN4 群で有意に低値を示した (Fig. 41)

HOMA-IR の平均値は、CE 群と比較し CS 群及び IN4 群は有意に低値を示し、IDS 各群間では統計学的有意性は認められなかったが、CH 両群

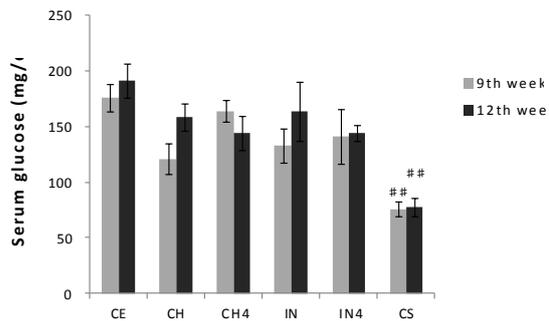


Figure40. Serum glucose

Each value is the mean \pm SE. Dunnett's test was performed within the same week, respectively, $p < 0.05$ and $## p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

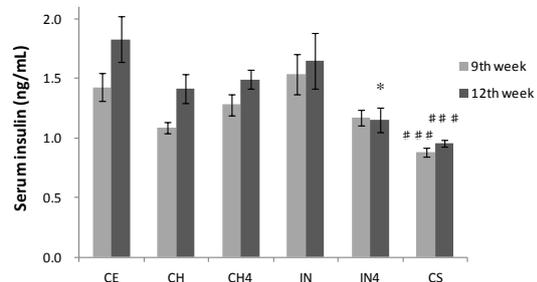


Figure41. Serum insulin

Each value is the mean \pm SE. Dunnett's test was performed within the same week, respectively, $p < 0.05$ and $## p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), $* p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

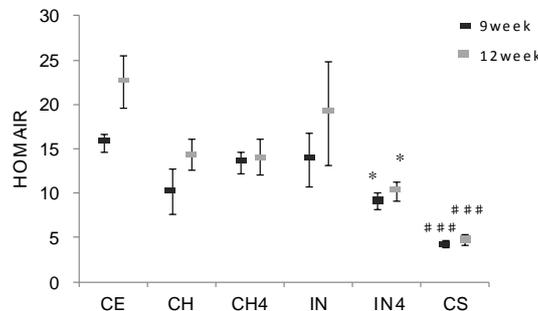


Figure42. HOMA-IR

Each value is the mean \pm SE. Dunnett's test was performed within the same week, respectively, $p < 0.05$ and $## p < 0.01$ control versus positive control (pair comparisons), $p < 0.05$ versus control (multiple comparisons).

は低値を示した [9週目; CE群 (平均 15.7)と比較して CH群 (平均 8.2)、CH4群 (平均 13.3)及び IN群 (平均 13.8)、12週目; CE群 (平均 22.6)と比較して CH群 (平均 14.4)、CH4群 (平均 14.1)及び IN群 (平均 19.0)] (Fig. 42)。

これ等の結果から、INに次いでCHはCS程ではないが、血糖調節改善効果のあることが示された。

イヌリンタイプのフルクタンは、腸管内腔および結腸粘膜表面の両方において、ビフィズス菌及び乳酸菌の成長を刺激する。動物に於いて、イヌリン供給は粘膜障壁に prebiotics の栄養効果を示唆した [55]。

P. B. Sung は Jerusalem Artichoke イヌリンを STZ 誘導糖尿病ラットに経口投与すると有意に血糖値を低下させ、血清脂質に関しては、TG、TC 及び LDLc 低下させ、HDLc 有意に上昇させたと報告した [56]。

当研究では、空腹時グルコースの平均値について、CE群と比較しCS群は有意に低く、IDS各群は低値を示した (Fig. 40)。インスリンの平均値に関しては同様の結果であるが、IN4群の12週目で有意に低値を示した (Fig. 41)。HOMA-IRの平均値は、CE群と比較しCS群、IN4群は有意に低く、CH両群は低値を示した (Fig. 42)。これ等の結果から、インスリン抵抗性の改善に関してはキトサンも低下傾向を示すものの、イヌリンの効果がより大きいことを示した。

第二節：盲腸内容物の短鎖脂肪酸組成に与える影響

イヌリンが消化管内で発酵基質として機能していることが示されたことを受け、第二節では盲腸内容物の短鎖脂肪酸組成に与える影響を検討した。

実験方法

盲腸内容物の短鎖脂肪酸の定量

前処理法及び分析方法は全て Tsukahara 等の方法に準拠した [57]。基本的に 0.3g の盲腸内容物を DW で 3 倍希釈（盲腸内容物重量に応じて、この割合で希釈調整）した後、過塩素酸処理をして除タンパクし、フィルター濾過をして HPLC 分析した。分析結果は希釈補正した。

① 前処理

−30℃保存した盲腸内容物を解凍後、遠心分離（15000×g, 10min, 4℃）を行い、タンパクを沈殿させた後、上清を 0.45 μm のコスモナイスフィルターW(水系：ナカライテスク)で濾過し、減圧下で脱気して炭酸ガスを除去した。そのサンプルの 5 μL を分析に供した。

② オン排除高速液体クロマトグラフィー

有機酸分析システムは LC-10AD ポンプ(島津製作所)と Waters431 電気伝導度計、Waters Organic Acid Column (7.8mm×30mm×2 本)、カラムヒーターモジュール、同コントローラーからなる。移動相は HPLC 用蒸留水(和光純薬)に p-トルエンスルホン酸を 5mM になる様に加え、0.45 μm のメンブレンフィルター (Cellulose Acetate：東洋濾紙) で濾過して用いた。ポストカラム反応相は HPLC 用蒸留水 (和光純薬) にそ

それぞれ 5mM p-トルエンスルホン酸、20mM Bis-Tris、100 μ M EDTA (free acid) になるように加えたものを用いた。それぞれ 0.8 mL の流速で供給した。カラム温度は 45°C に設定した。電気伝導計の検出条件はベース電圧 2000mV、感度 0.01 とした。成分の同定は CBM-20A (島津製作所) データモジュールで行った。CE 群、CS 群、CH4 群及び IN4 群からランダムに選び、分析に供しデータとした (n=5)。

結果及び考察

当研究において、盲腸内容物量は、IN4 群が有意に高値を示し (Fig. 36)、その pH は、IN 両群で有意に低値を示した (Fig. 37) ことから、IN は消化管内で発酵基質として機能していることが明らかになった。そこで、盲腸内容物中の有機酸を測定した。その結果、IN4 群では、酪酸や発酵の中間代謝物である乳酸が有意に高値を示した (Fig. 43)。

これ等の結果から、IN は腸内細菌による発酵を受け、発酵により産生された酪酸と乳酸が蠕動運動等のエネルギーとして利用され、基礎代謝を亢進させているものと推察された。

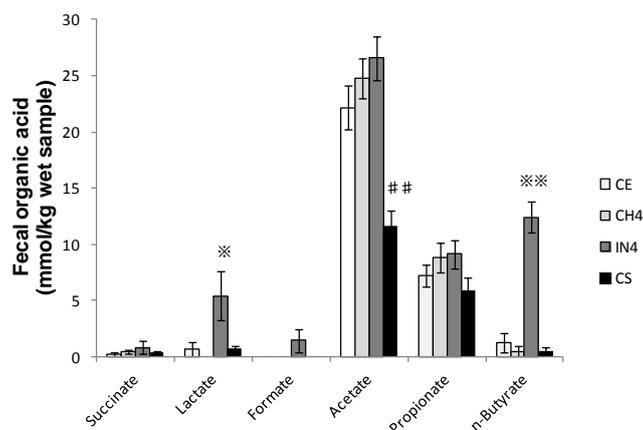


Figure 43. Fecal organic acid acid

Data are mean \pm SE. (n=5)

p<0.01 control versus positive control (pair comparisons, t-test)

*** p<0.01 control versus control (multiple comparisons, Dunett's test)

* p<0.05 control versus control (multiple comparisons, Dunett's test)

Ushida 等によると、13 週齢雌性マウスにアラビアガム 1%を 180 日間飲水させると、腸間 WAT の減少、腎周辺 WAT の脂肪球を縮小させた。血中のプロピオン酸とコハク酸は増加し、血中 TC は減少、FFA は増加した。この FFA の増加が β 3-アドレナリン受容体を刺激し、TNF- α 遺伝子発現を下方修正させたことによるものと推測した[58]。 β 3-アドレナリン受容体の刺激は、細胞内 TG から FFA を遊離させ、UCP-1 に直接作用し、ATP 産生を経ずに、直接熱へと変換・散逸消費され、体脂肪減少作用に必須である[59]。また Kimura 等は、腸内細菌による SCFA 産生に伴う GPR43 の活性化は、ブドウ糖や脂肪酸などのエネルギー源を脂肪組織に取り込んで脂肪の蓄積を抑制し脂肪組織の増大を防ぐことで、結果的に体全体のインスリン感受性及びエネルギー利用効率を上昇させ、肥満を防ぐ機能を有することを明らかにした[60]。これらの知見から、本研究において、腸内細菌により産生された SCFA がエネルギー代謝に GPR43 を介した機構が、内臓脂肪の減少に繋がった一要因である可能性が考えられるが、データは得られていない。今後の検討課題とする。

第三節：糞中胆汁酸及び UCP-1 遺伝子発現に与える影響

第一節の結果から、CH は CS と同様に陽性の電荷をもつことから、シグナル分子として BA が作用し、エネルギー消費を高めている可能性が推測された。第三節では、その作用機構を探ることを目的とした。

実験方法

(1) 糞中の総胆汁酸定量

分析に用いた糞は、採取後 -30°C で凍結保存した。使用時に、 10°C 次いで常温にて解凍し、粉砕機にて粉砕した。粉砕後、1mm 目開きメッシュで篩後、均一な標品とした。

標品 100mg を 15mL 容量チューブに入れ、90%エタノール（特級試薬）で 13mL に定容し、詮をして良く混合し、ヒーティングブロックを使用し、 $80^{\circ}\text{C}/60$ 分加熱させた[44, 61]。放冷後、遠心分離($15000 \times g$, 10min, 室温)し、上清を別のチューブに分け -30°C で保存した

上清液を 10°C 次いで室温に放置し、 $26 \mu\text{L}$ を 96wel に分注し、 37°C で乾固させた。その後、 $40 \mu\text{L}$ のメタノール（特級試薬）で溶解した。その後、[和光薬工業: TBA test-wako] を用いて総胆汁酸を定量した。

CE、CH₄ 及び IN₄ は (n=8)、CS 及び IN₂ は (n=7)、CH₂ は (n=5) をデータとした。

(2) 褐色脂肪組織中の UCP-1 遺伝子発現 (RT - PCR 法)

解剖時に採取した BAT は、RNA 変性阻害剤である TRIzol® Reagent (invitrogen™) に浸漬させ、直ちに液体窒素で処理し、-80°C で保管した。分析時には、TRIzol® Reagent 中でホモジナイザーを用いて破碎した。Total RNA は TRIzol の RNA preparation manual に従って抽出した。抽出した total RNA は、分光光度計 (Nano Drop 1000: ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いて定量した。Total RNA は 1 サンプルあたりを 1 µg 含むように調整し、Superscript First - Strand System (invitrogen) を用いて逆転写酵素反応 (Reverse Transcription: RT) 法を行い、Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて cDNA を作製した。RT は 50°C 60 分間、85°C 5 分間、4°C ∞ の条件で行った。PCR 反応は常法に従い、Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて (Table 12) の条件で行った。遺伝子は熱産生に関与する UCP-1 を PCR 増幅した。得られた PCR 産物を 2% アガロース (TAKARA) ゲルにて 50 V で 10 分間電気泳動した後、100 V で 20 分間電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液に 15 分間浸透させた。その後、GelDoc EZ Imager (BIO - RAD) を用いて泳動画像を撮影し、Image Lab 3.0 (BIO - RAD) を用いて画像解析、明度を数値化した。標準遺伝子は β - アクチンとした。この PCR 産物の示す明度に対する UCP-1 遺伝子の PCR 産物の示す明度

Table 12. Experimental condition for PCR

Gene	Sequence (5' → 3')		Product size (bp)	Annealing (°C / s)	Extension (°C / m)	Cycles
	Foward	Reverse				
<i>β-actin</i>	ggacctgacagactaccta	gttgccaatagtgatgacct	208	58 / 30	72 / 2	23
<i>Ucp-1</i>	tacacggggacctacaatgc	gcagaaaagaagccacaaacc	370	60 / 30	72 / 3	19

の相対値を算出し、UCP-1 の mRNA 発現量とし比較した。

結果及び考察

血中及び糞中胆汁酸への影響を検討した。当研究で、血清 TBA の平均値は、CE 群と比較して CS 群及び CH4 群で高値を示した (Fig. 35)。

糞中 TBA は、CE 群と比較し CS 群で有意に高く、CH 両群、IN 両群の順で有意に高値であった (Fig. 44)。この結果から、肝臓で BA の生合成が亢進しているのではないかと考えた。

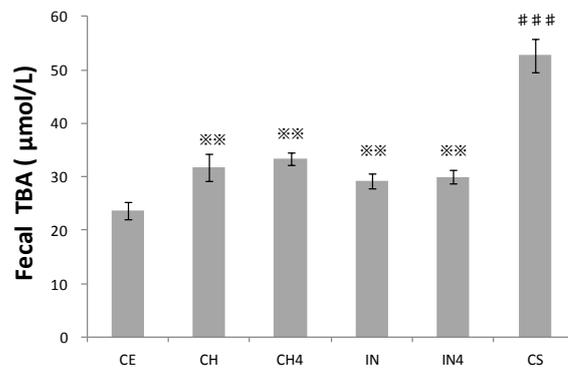


Figure 44. Fecal total bile acid

Data from 8 mice each in CE, CH4, and IN4 groups, 7 mice each in CS and IN2 groups, and 5 mice in the CH2 group were used. Data are mean \pm SE ### p <0.001 control versus positive control (pair comparisons, t-test). ** p <0.01 control versus control (multiple comparisons, Dunnett's test)

そこで、BA を介したエネルギー亢進作用メカニズムの一つとして提唱されている褐色脂肪組織 (BAT) の UCP-1 遺伝子相対発現量を検討した。その結果、CE 群 (平均 1.0) と比較し統計学的有意性は認められなかったが、CH 群 (平均 1.74)、IN4 群 (平均 1.67) 及び CS 群 (平均 1.39) において高値を示した (Fig. 45)。

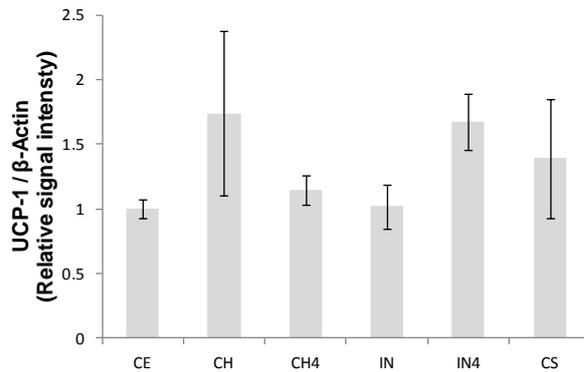


Figure 45. UCP-1/β-Actin Relative signal intensity

Data, CE=7, CH=5, CH4=8, IN=7, IN4=7
Data are mean ± SE

これらの結果より、BA の腸肝循環が阻害されることにより、肝臓でのコレステロール合成ならびにそれに連動する BA の生合成が亢進し、血中の BA 濃度が高まり、BA を介した脂肪燃焼機構が惹起され体脂肪燃焼を上昇させたと推測されたが、実験結果として明確な結論を得るには至らなかった。また、一方で IDS 摂取による食餌性 TG の吸収抑制が体脂肪蓄積を抑制、内臓脂肪を減少させたことも関与しているものと推測された。

本研究でキトサンがコレステリド同様の作用であることを証明する為には、更なる検討が必要である。それらは、肝臓の BA 合成律速酵素 CYP7A1 や脂肪酸合成遺伝子 SREBP-1c、また BAT の甲状腺ホルモン変換酵素 D2 や UCP-1 以外のエネルギー産生遺伝子の発現を検討することが挙げられる。

総括

本研究は、難消化性糖類摂取による肥満関連因子の改善作用を目的に実験を行った。

マウスに各種難消化性糖類を摂食させ、基本的生体指標や直腸温、呼吸代謝計測を中心としたエネルギー代謝調節に及ぼす影響を検討した。この結果、INの摂取による直腸温と VO_2 の上昇は発酵によるものと考えられた。

次に、MetS状態となることは、食生活の視点から考えると、脂肪の過剰摂取やそのエネルギー比の上昇によるものと考えられる。そこで、高脂肪食で肥満誘導させたマウスにIDSを摂食させ、直腸温、呼吸代謝計測を中心としたエネルギー代謝調節、インスリン抵抗性及び血清脂質についての影響を検討した。この結果、高脂肪食摂食条件において、CHの摂取は、脂質をエネルギーとしての利用を上昇させることによりエネルギー代謝を亢進させることが示された。一方、INの摂取は腸の蠕動運動を刺激した上で、短鎖脂肪酸の生成量が増加、酸素消費量を上げ、エネルギー代謝を亢進させることが示された。また、CHとINは、インスリン抵抗性を改善させた。これらのことから、IDSの種類によって働きがことなることが判明した。

次に、肥満関連因子の改善作用を有す食品成分の影響を検討する為に、食餌誘導性肥満マウスに於けるエネルギー代謝に関してCHとINの影響を検討し、その作用機構を探ることを目的とした。その結果、INは腸内細菌により産生された酪酸、乳酸の産生がエネルギー基質として利用され、エネルギー代謝を亢進させることを見出した。また、褐色脂肪組織

の UCP-1 遺伝子の相対発現量を検討した結果、CE 群に比べ CH 群、IN4 群、CS 群において平均値として高値を示した。これ等の結果から、BA の腸肝循環が阻害されることにより、肝臓でのコレステロール合成ならびにそれに連動する BA の生合成が亢進し、血中の BA 濃度が高まり、BA を介した脂肪燃焼機構が惹起され体脂肪燃焼を上昇させたと推測されたが、実験結果として明確な結論を得るには至らなかった。また一方で IDS 摂取による食餌性 TG の吸収抑制が体脂肪蓄積を抑制、内臓脂肪を減少させたことも関与しているものと推測された。

本研究に基づき、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. イヌリンは、腸管内において易発酵性の難消化性糖質であり、発酵産物がエネルギー源となり、腸の蠕動運動を活発化させることにより、酸素消費量を上昇させ、エネルギー代謝を亢進させることを見出した。また、DF としての作用により、インスリン抵抗性の改善があることを見出した。

2. キトサンは、脂質代謝を亢進させた。BA の腸肝循環の阻害を介したエネルギー代謝亢進、BA による BAT の UCP-1 遺伝子発現亢進が関与している可能性と同時に TG の吸収抑制により内臓脂肪を減少が推測されたが、明確な結論は得られなかった。またこれらの IDF は、高脂肪食摂取条件下でインスリン抵抗性の改善効果があることを見出した。

以上から、IDS の種類によって作用機構は異なることが明らかとなり、摂取する難消化性糖類を選択することで、効率的に抗肥満効果を得ることができる可能性が示めされた (Fig. 46)。

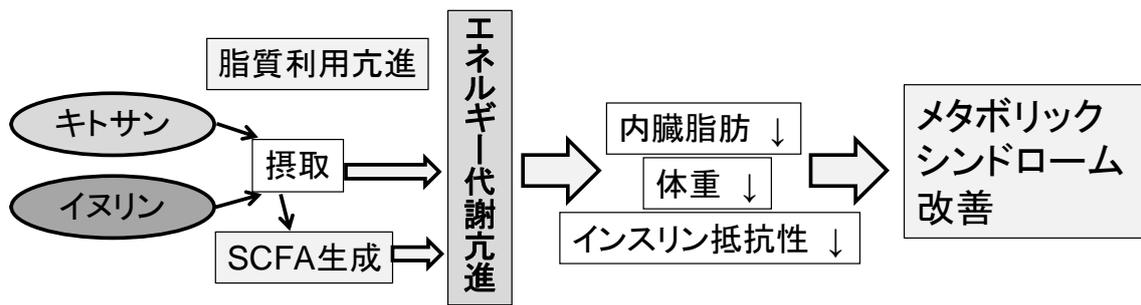


Figure 46. キトサンとイヌリン摂取による肥満関連因子の改善作用

生体におけるエネルギー消費は、体内のエネルギー恒常性を維持する上で、エネルギー摂取に劣らず重要である。理想的には、食欲を損なうことなく、エネルギー消費を促進する食品を摂取することにより、体内の酸素消費量を高めてエネルギーの摂取と消費の均衡を保つことが重要であると考えられる。キトサンとイヌリン摂食によるエネルギー代謝の上昇と空腹時血糖の低下は、これら IDS が MetS の予防に貢献出来ることを示すことができた。

今後、本研究の知見が、ヒトにとってより簡便で継続可能な、MetS の予防に繋がるサプリメント等その利用方法の開発に役立てることを期待するものである。

謝辞

本研究に際し、素晴らしいテーマを与えていただくとともに終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部機能性食品科学講座 和田政裕教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始有益なご指導、ご助言を賜りました城西大学薬学部機能性食品科学講座 古旗賢二准教授ならびに中谷祥恵助手に感謝の意を表します。

本学位論文の作製にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学薬学部分子栄養学講座 松本明世教授並びに城西大学薬学部臨床栄養学講座 中島啓教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、統計解析に関して助言を賜りました城西大学薬学部薬科学科 寺尾哲客員教授に深謝の意を表します。

本研究に際し、胆汁酸の分析に関して助言を賜りました城西大学薬学部食毒性学講座 清水純講師に感謝の意を表します。

本研究を進めるに際し、ご協力をいただきました城西大学薬学部機能性食品科学講座 尾島孝政氏、穴沢司氏、村尾司氏ならびに大日方麗亜氏に感謝の意を表します。

最後に、実験遂行に際してご助言並びに多大なご協力をいただきました城西大学薬学部機能性食品科学講座 徳永宏紀氏、小野寺秀晃氏、藤波裕徳氏、中島大斗氏、清水達夫氏ならびに関連諸氏に心から感謝の意を表します。

参考文献

- [1] Y. Matsuzawa, Pathophysiology and Molecular Mechanisms of Visceral Fat Syndrome: The Japanese Experience. *Diabetes/Metabolism Reviews*. 13, 3-13 (1997)
- [2] 伊藤裕, *Clinical Trend* メタボリックドミノとは--生活習慣病の新しいとらえ方. *日本臨床*. 61, 1837-1843 (2003)
- [3] 松沢佑次, 池田康夫, 片山茂裕, 北徹, 久木山清貴, 清野裕, 藤田敏郎, メタボリックシンドロームの定義と診断基準. *日本内科学会雑誌*. 94, (2005)
- [4] H. M. Lukka, D. E. Laaksonen, T. A. Lakka, L. K. Niskanen, E. Kumpusalo, J. Tuomilehto, and J. T. Salonen, The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 288, 2709 (2002)
- [5] 厚生労働省, 第45表 メタボリックシンドローム(内蔵脂肪症候群)の状況(性・年齢過給別) (2011)
- [6] W. H. Organization, Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, *Diamond Pocket Books (P) Ltd.*, (2003)
- [7] 厚生労働省, 日本人の食事摂取基準(2015年版)の概要. p15 (2014)
- [8] 厚生労働省, 平成24年国民健康・栄養調査結果の概要. (2012)
- [9] Ceriello, C. Taboga, L. Tonutti, L. Quagliaro, L. Piconi, B. Bais, R. Ros, and E. Motz, Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial

- dysfunction and oxidative stress generation. *Circulation*. 106, 1211-8 (2002)
- [10] Y. Seino, K. Nanjo, N. Tajima, T. Kadowaki, A. Kashiwagi, E. Araki, C. Ito, N. Inagaki, Y. Iwamoto, M. Kasuga, T. Hanafusa, M. Haneda, K. Ueki, and The Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus, Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*. 1, 212-228 (2010)
- [11] 寺尾純二, メタボリックシンドロームと機能性食品. *Functional Food*. 1, 23-27 (2007)
- [12] 山田和彦、松村泰弘, 健康・栄養食品アドバイザーズスタッフ・テキストブック, 第一出版, (2006)
- [13] S. Kiriya, K. Ebihara, S. Ikegami, S. Innami, Y. Katayama, and F. Takehisa, Searching for the definition, terminology and classification of dietary fiber and the new proposal from Japan. *Journal of Japanese Association of Dietary Fiber Research*. 10, 11-23 (2006)
- [14] N. Ikeda, E. Saito, N. Kondo, M. Inoue, S. Ikeda, T. Saitoh, K. Wada, A. Stickley, K. Kota, T. Mizoue, M. Noda, H. Iso, Y. Fujino, T. Sobue, S. Tsugane, M. Naghavi, M. Ezzati, and K. Shibuya, What has made the population of Japan healthy ? *The Lancet*. 378, 1094-1105 (2011)
- [15] T. Teramoto, Dietary Management in Japan Atherosclerosis Society (JAS) Guidelines for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases in Japanese —2012 Version— subtitle_in_Japanese. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 71, 3-13 (2013)

- [16] K. R. Niness, Inulin and oligofructose: What are they? *J Nutr.* 129, 1402S-1406S (1999)
- [17] Y. K. Luu, S. Lublinsky, E. Ozcivici, E. Capilla, J. E. Pessin, C. T. Rubin, and S. Judex, In vivo quantification of subcutance and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model. *Medical Engineering Physics.* 31, 34-41 (2009)
- [18] A.-S. Bhat, S. K. Tandan, D. Kumar, V. Krishna, and V. R. Prakash, Interaction between inhibitors of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase in Brewer's yeast induced pyrexia in mice: an isobolographic study. *European journal of pharmacology.* 511, 137-142 (2005)
- [19] K. Kawakami, I. Makino, T. Asahara, I. Kato, and M. Onoue, Dietary galacto-oligosaccharides mixture can suppress serum poenol and p-cresol levels in rats fed tyrosine diet. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51, 182-186 (2005)
- [20] C. Byrne, and C. L. Lim, The ingestible telemetric body core temperature sensor: a review of validity and exercise applications. *British journal of sports medicine.* 41, 126-133 (2007)
- [21] M. Suzuki, D. Kawasaki, N. Inoue, H. Oka, N. Miura, and T. Kurimoto, The enhancing effect of CEPIE Herb Drink on recovery from fatigue in yeast-induced pyrexia mice. *Japanese Pharmacology and Therapeutics.* 35, 723 (2007)
- [22] I. Mizuno, Improvement of Peripheral Blood Circulation in Mouse and Human with Aged Garlic Extract Preparation Combined with Ginseng,

- Oriental Bezoar, Antler Velvet, Cuscuta Seed and Epimedium Herb. *Oyo Yakuri/Pharmacometrics*. 67, 371-378 (2004)
- [23] M. B. Roberfroid, Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*. 93, 13-26 (2005)
- [24] O. Murphy, Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition*. 85, S47-S53 (2001)
- [25] F. Guamer, Role of intestinal flora in health and disease. *Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*. 22, 14-19 (2007)
- [26] G. R. Gibson, Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin. *The Journal of Nutrition*. 129, 1438S-1441s (1999)
- [27] E. M. Dewulf, P. D. Cani, A. M. Neyrinck, S. Possemiers, A. V. Holle, G. G. Muccioli, L. Deldicque, L. B. Bindels, B. D. Pachikian, F. M. Sohet, E. Mignolet, M. Francaux, Y. Laronbdelle, and N. M. Delzenne, Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR γ -related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J Nutritional Biochemisity*. 22, 712-722 (2011)
- [28] I. Ohkawa, and T. Suzuki, Desmutagenic Effect of *Laminaria japonica*, a Traditional Marine Foodstuff of Japan. *Food Hygiene and Safety Science* 33, 593-598 (1992)
- [29] L. Han, Y. Kimura, and H. Okuda, Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International journal*

- of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity. 23, 174-179 (1999)
- [30] K. Hayashi, and M. Ito, Antidiabetic action of low molecular weight chitosan in genetically obese diabetic KK-Ay mice. *Biological and pharmaceutical bulletin*. 25, 188-192 (2002)
- [31] P. J. Scarpace, M. Matheny, and E. Borst, Themogenesis and mitochondrial GDP binding with age in response to the novel agonist CGP-12177A. *Am J Physiol*. 262, E185-190 (1992)
- [32] M. Maris, L. Overbergh, C. Gysemans, A. Waget, A. Cardzo, K, E. Verdrengh, J. Cunba, P, M, T. Gotoh, M. Cnop, D. Eizirik, L, R. Burcelin, and C. Mathieu, Deletion of C/EBP homologous protein (Chop) in C57Bl/6 mice dissociates obesity from insulin resistance. *Diabetologia*. 55, 1167-1178 (2012)
- [33] Y. Fukuchi, M. Hiramitsu, M. Okuda, S. Hayashi, N. Yuka, T. Osawa, and M. Naito, Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by up-regulation of mRNA levels of the enzymes involved in β -oxidation in mouse white adipose tissue. *J Clin Biochem Nutr*. 43, 201-209 (2008)
- [34] W. T. Friedewald, R. I. Levy, and D. S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 18, 499-502 (1972)
- [35] M. Sugano, T. Fujikawa, Y. Hiratsuji, and Y. Hasegawa, Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats *Nutrition reports international*. 18, 531-536 (1978)

- [36] T. Miura, M. Usami, Y. Tsuura, H. Ishida, and Y. Seino, Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin-induced diabetic mice. *Bio Pharm Bull* 18, 1623-1625 (1995)
- [37] H. T. Yao, and M. T. Chiang, Effect of chitosan on plasma lipids, hepatic lipids, and fecal bile acid in hamsters. *Journal of Food and Drug Anal.* 14, 183-189 (2006)
- [38] Y. H. Hsieh, H. T. Yao, R. S. Cheng, and M. T. Chiang, Chitosan reduces plasma adipocytokines and lipid accumulation in liver and adipose tissues and ameliorates insulin resistance in diabetic rats. *Journal of medical food.* 15, 453-460 (2012)
- [39] E. Wuolijoki, T. Hirvela, and P. Ylitalo, Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 21, 357-61 (1999)
- [40] T. Wada, J. Sugatani, E. Terada, M. Ohguchi, and M. Miwa, Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53, 1246-1253 (2005)
- [41] F. Brighenti, M. C. Casiraghi, E. Canzi, and A. Ferrari, Effect of consumption of a ready-to-eat breakfast cereal containing inulin on the intestinal milieu and blood lipids in healthy male volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 53, 726-33 (1999)
- [42] N. Petry, I. Egli, C. Chassard, C. Lacroix, and R. Hurrell, Inulin modifies the bifidobacteria population, fecal lactate concentration, and fecal pH but

- does not influence iron absorption in women with low iron status. *Am J Clin Nutr.* 96, 325-31 (2012)
- [43] M. S. Brown, and J. L. Goldstein, A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232, 34-47 (1986)
- [44] M. Kobayashi, H. Ikegami, T. Fujisawa, K. Nojima, Y. Kawabata, S. Noso, N. Babaya, M. Itoi-Babaya, K. Yamaji, Y. Hiromine, M. Shibata, and T. Ogihara, Prevention and treatment of obesity, insulin resistance, and diabetes by bile acid-binding resin. *Diabetes.* 56, 239-47 (2007)
- [45] S. Gesta, M. Bluher, Y. Yamamoto, A. Norris, W. J. Berndt, S. Kalisch, J. Boucher, C. Lewis, and R. C. Kahn, Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceeding of the national academy of sciences of the united states of america.* 103, 6676-6681 (2006)
- [46] S. Rousset, M.-C. Alves-Guerra, J. Mozo, B. Miroux, A.-M. Cassard-Doulcier, F. Bouillaud, and D. Ricquier, The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes.* 53, S130-S135 (2004)
- [47] M. Watanabe, S. M. Houten, C. Matak, M. A. Christoffolete, B. W. Kim, H. Sato, N. Messaddeq, J. W. Harney, O. Ezaki, T. Kodama, K. Schoonjans, A. C. Bianco, and J. Auwerx, Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 439, 484-9 (2006)
- [48] M. Watanabe, S. M. Houten, L. Wang, A. Moschetta, D. J. Mangelsdorf, R. A. Heyman, D. D. Moore, and J. Auwerx, Bile acids lower triglyceride

- levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest.* 113, 1408-18 (2004)
- [49] M. Watanabe, K. Morimoto, S. M. Houten, N. Kaneko-Iwasaki, T. Sugizaki, Y. Horai, C. Mataka, H. Sato, K. Murahashi, E. Arita, K. Schoonjans, T. Suzuki, H. Itoh, and J. Auwerx, Bile acid binding resin improves metabolic control through the induction of energy expenditure. *PLoS One.* 7, e38286 (2012)
- [50] N. Takemura, M. Hagio, S. Ishizuka, H. Ito, T. Morita, and K. Sonoyama, Inulin prolongs survival of intragastrically administered *Lactobacillus plantarum* No. 14 in the gut of mice fed a high-fat diet. *Journal of Nutrition.* 140, 1963-1969 (2010)
- [51] J. H. Cummings, Short chain fatty acids in the human colon. *Gut.* 22, 763-779 (1981)
- [52] J. H. Cummings, E. W. Pomare, W. J. Branch, C. P. Naylor, and G. T. Macfarlane, Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 28, 1221-7 (1987)
- [53] S.-i. Karaki, R. Mitsui, H. Hayashi, I. Kato, H. Sugiya, T. Iwanaga, B. Furness, John, and A. Kuwahara, Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res.* 324, 353-360 (2006)
- [54] Y. Maezaki, K. Tsuji, Y. Nakagawa, Y. Kawai, M. Akimoto, T. Tsugita, W. Takekawa, A. Terada, H. Hara, and T. Mitsuoka, Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57, 1439-1444 (1993)

- [55] F. Guarner, Studies with inulin-type fructans on intestinal infections, permeability, and inflammation. *J Nutr.* 137, 2568S-2571S (2007)
- [56] P. B. Sung, Effect of oral administration of jerusalem artichoke inulin on reducing blood lipid and glucose in STZ-induced diabetic rats. *J Animal and Veterinary Advance.* 10, 2501-2507 (2011)
- [57] T. Tsukahara, N. Matsukawa, S. Tomonaga, R. Inoue, K. Ushida, and K. Ochiai, High-sensitivity detection of short-chain fatty acids in porcine ileal, cecal, portal and abdominal blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Animal Science Journal.* 85, 494-498 (2014)
- [58] K. Ushida, H. Hatanaka, R. Inoue, T. Tsukahara, and G. O. Phillips, Effect of long term ingestion of gum arabic on the adipose tissues of female mice. *Food Hydrocolloids.* 25, 1344-1349 (2011)
- [59] K. Inokuma, Y. Okamatsu-Ogura, A. Omachi, Y. Matsushita, K. Kimura, H. Yamashita, and M. Saito, Indispensable role of mitochondrial UCP1 for antiobesity effect of beta3-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290, E1014-21 (2006)
- [60] I. Kimura, K. Ozawa, D. Inoue, T. Imamura, K. Kimura, T. Maeda, K. Terasawa, D. Kashihara, K. Hirano, and T. Tani, The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature communications.* 4, 1829 (2013)
- [61] T. Tokunaga, T. Oku, and N. Hosoya, Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat. *Journal of nutritional science and vitaminology.* 32, 111-121 (1986)