

実エンドウの莢のオートクレーブ抽出物による血清脂質改善効果

稲垣佳映

目次

	頁
第 1 章 序論	1
1-1 食品廃棄物の低減に向けて	1
1-2 食品廃棄部分の生理活性	3
1-3 実エンドウ (<i>Pisum sativum L.</i>) の莢についての研究	6
第 2 章 本研究の構成	8
第 3 章 実エンドウの莢の生理的効果やその特性	10
3-1 実験方法	10
1) 実エンドウの莢のオートクレーブ抽出物 (AE) の調製と組成分析	10
2) ラットの飼育と解剖	10
3) 血糖値, 血清中脂質, 肝臓中脂質の測定	14
4) 糞便中脂質と胆汁酸含量の測定	14
5) AE 及び AE 由来食物繊維のリパーゼ活性の測定	15
6) AE 及び AE 由来食物繊維のコレステロール吸着作用の測定	16
7) FISH 法による bifidobacteria の検索	17
8) bifidobacteria 菌株の培養	18
9) 統計処理	20
3-2 結果	21
1) AE の調製と組成分析	21

2) AE 摂取がラットの成長に及ぼす影響	21
3) 血糖値, 血清中脂質, 肝臓中脂質に対する AE の影響	24
4) 糞便中脂質と胆汁酸含量に対する AE の影響	24
5) AE 及び AE 由来食物繊維がリパーゼの活性に与える影響	29
6) AE 及び AE 由来食物繊維のコレステロール吸着作用	31
7) FISH 法による bifidobacteria の検出	31
8) AE の bifidobacteria 菌株に対する増殖促進効果	31
第 4 章 考察	35
引用文献	41
謝辞	52

第1章 序論

1-1 食品廃棄物の低減に向けて

野菜や果物の種、皮、切れ端は、日常的にゴミとして環境に廃棄されてきた。しかし、これらの試料は食物繊維やポリフェノールが多く含まれ¹⁻¹³⁾、加工の方法を工夫することでヒトに役立つ製品として利用することができる。このような天然資源の消費を抑制し、環境への負荷を低減する循環型社会の形成の施策の1つとして、平成12年に食品リサイクル法（農林水産省・環境省）が施行された¹⁴⁾。その趣旨は「食品の売れ残りや食べ残しにより、又は食品の製造過程において大量に発生している食品廃棄物について、発生抑制と減量化により最終的に処分される量を減少させるとともに、飼料や肥料等の原材料として再生利用するため、食品関連事業者（製造、流通、外食等）による食品循環資源の再生利用等を促進する。」である。

食品を製造する段階で廃棄されている部分は、主に飼料や肥料、油脂や油脂製品、エタノール、メタン、炭化製品（燃料及び還元剤としての用途）として再生利用されている。しかし、再生利用の取り組みにもかかわらず、食品由来の廃棄物等は平成25年度において、約2,800万トンであり、うち可食部分と考えられる量（いわゆる食品ロス）は、約630万トンと推測されている¹⁵⁾。

食品ロスを減らすため、業種別（食品製造業、食品卸売業、食品小売業、外食産業）に再生利用等実施率が設定され、平成27年7月にはこれらの目標値が改正された¹⁶⁾。特に食品製造業については、これまで85%の目標値であったのに対し、平成31年度までに95%と設定された。また、消費者庁では食品ロス削減のための「食品のムダをなくそうプロジェ

クト」が起ち上げられ,「消費者庁のキッチン」として野菜の茎や皮を使った料理レシピも掲載されている¹⁷⁾。すなわち,これまで以上に食品廃棄物の再利用や工夫が必要と考えられる。

1-2 食品廃棄部分の生理活性

食物繊維やポリフェノールの生理活性に着目し、廃棄部分の機能性を検討した研究は、ここ数年増え続けている。以下に、廃棄部分の食物繊維やポリフェノールに着目した研究論文を紹介する。

ピーナッツの皮を用いた研究では、食物繊維やポリフェノールが小腸でのコレステロール吸収を抑制し、血清及び肝臓コレステロールの低下と糞便胆汁酸排泄を促進することが報告されている^{1,2)}。また、その皮に含まれるエピカテキンは、胆汁酸ミセルへのコレステロール溶解性を下げる³⁾。

玉ねぎの皮は、盲腸内pHを低下させ、短鎖脂肪酸量を増やすことにより腸内細菌叢を改善させ⁴⁾、特にケルセチンは、ヒトにおいて2型糖尿病により上昇したLDLコレステロール濃度を下げる⁵⁾。

イチゴの搾りかすに含まれるポリフェノールの1つであるプロアントシアニジンは、腸内短鎖脂肪酸を増加させるとの報告がある⁷⁾。

柑橘類の果皮による報告は多く、温州みかん果皮のエタノール抽出物は、2型糖尿病における高血糖や脂肪肝を改善し⁸⁾、柑橘類に含まれるフラボノイド類のヘスペリジンやナリンギンは血清や肝臓脂質の上昇を抑制する^{9,18,19)}。柑橘類に関する脂質改善効果のメカニズムの1つとしては、フラボノイド類と **peroxisome proliferator-activated receptor**

(**PPAR**) ファミリーの関連性が明らかにされてきた^{10,11,20,21)}。

野菜や果物の皮や茎といった廃棄部分には食物繊維も多く含まれる。リンゴ搾りかすの食物繊維は、腸内で酢酸やプロピオン酸のような短鎖脂肪酸を増加させ、腸内環境を改善

する¹²⁾。食物繊維は、水溶性食物繊維 (Soluble Dietary Fiber ; SDF) と不溶性食物繊維 (Insoluble Dietary Fiber ; IDF) に分類される。特にSDFは、糞便中のトリグリセリドやコレステロールなどの糞便脂質の排泄を促す^{13,22,23)}。グアガム、ペクチンといったSDFは、腸を刺激することにより糞便脂質を排泄させ、結果として肝臓での3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) リダクターゼや7 α -hydroxylase (CYP7A1) の活性を誘発することによりコレステロール合成や胆汁酸合成を促進することが明らかにされている²⁴⁻²⁶⁾。

一方、IDFは、糞便のカサを増すことにより糞便量を増加させる²⁶⁾。さらに、イナゴマメのIDF中に結合しているポリフェノールには、血清脂質改善効果も報告されている²⁷⁾。IDFのヘミセルロースは植物の細胞壁に多く存在するが、小麦に含まれるヘミセルロースは、エムデン-マイヤーホフ経路²⁸⁾を通じてプロピオン酸や酢酸のような短鎖脂肪酸の生産を活発にし、胆汁酸の吸収と代謝を変え、LDLレセプターを活性化することで肝臓のコレステロール合成を阻害する²⁹⁾。

また、食物繊維やポリフェノールの体内での影響には、肝臓でのコレステロール合成阻害だけでなく、腸内での腓リパーゼ活性阻害¹³⁾やコレステロールの吸着活性³⁰⁾による糞便への脂質排泄促進がある。さらに腸管からのコレステロール吸収を抑制する³⁰⁻³³⁾ことで、糞便脂質排泄を促進する結果、血中及び肝臓のコレステロール値が低下する。

廃棄部分に含まれる難消化性糖質の中にはbifidobacteriaが好んで利用するオリゴ糖があり、シコクビエのふすまに含まれるキシロオリゴ糖は、bifidobacteria増殖促進効果³⁴⁾を有

し、*Bifidobacterium bifidum* MB107 や*Bifidobacterium bifidum* MB109のような *bifidobacteria*は腸内のコレステロールを資化することも明らかにされている³⁵⁾。

以上、述べたように食品廃棄物中に含まれる食物繊維やポリフェノールは、血中及び肝臓脂質低下効果や *bifidobacteria* 増殖促進効果を示し、健康補助食品としての可能性を持つことから、これらを含む廃棄物をヒトに活用することができれば、ヒトの健康だけでなく廃棄物の減少につながると考えられる。

1-3 実エンドウ (*Pisum sativum L.*) の莢についての研究

実エンドウは、マメ科のエンドウ (*Pisum sativum L.*) が完熟前に収穫されるやわらかい豆であり、その種子はグリーンピース (**Green-peas**) と呼ばれる³⁶⁾。実エンドウは日本中で多く生産されており、消費されている。2014年における農林水産省の作物統計調査の報告によると、収穫量は6,700トンである³⁷⁾。

実エンドウの莢は種子を覆い、種子中の子葉や胚軸を保護する役割を持つ³⁸⁾。さらに莢には、タンパク質、デンプンや食物繊維のような多糖類、ビタミン、カルシウムや銅、亜鉛、鉄、マンガン、カリウム、マグネシウムのようなミネラルも存在し³⁸⁻⁴⁰⁾、生理活性成分であるプロトカテキ酸やクマル酸のようなポリフェノールも含まれている³⁸⁾。

実エンドウは、糞便への胆汁酸排泄を促し、肝臓ではHMG-CoAリダクターゼやLDLレセプターの活性を促進する結果、血漿コレステロール濃度を低下させる⁴¹⁾。また、実エンドウのタンパク質は、胆汁酸合成の律速酵素であるCYP7A1の発現量を増やすことで胆汁酸合成や糞便への胆汁酸排泄を促し、さらに胆汁酸排泄を補償するため、Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2) やHMG-CoAリダクターゼ、LDLレセプターの遺伝子発現量を増加させる⁴²⁾。

前述したようなコレステロール低下効果の報告以外にも新たな品種開発のための実エンドウの部分別によるミネラル量の測定³⁹⁾についても報告されている。

多くの場合、実エンドウを食品として食べるのは中身の種子 (グリーンピース) の部分であり、周りの莢はあまり食べられることはない。さらに実エンドウの廃棄率は55%であり、廃棄される割合は半分以上を占める。よって、年間収穫量と廃棄率から考えると、年

間約 3,700 トンが廃棄されていると推測される。このように、一般的にはヒトに食されることのない莢であるが、種子が成長する段階において疾病や病原体から種子を守る保護機能に加えて、活発な光合成をすることにより、種子の成長に必要なエネルギー源を合成する場としての役割も担っている⁴³⁾。即ち、莢にはタンパク質と食物繊維やデンプンなどの多糖類が含まれて、ビタミンやミネラルも豊富である^{39,40)}。莢の半分以上は食物繊維であり、多く検出されるキシロースはキシランやキシログルカン、セルロースと強く結合しているキシロガラクトキサン由来である。さらに不溶性食物繊維の糖組成は、ほとんどがグルコースとキシロースであり、少量のガラクトースも含む⁴⁴⁾。グルコースやキシロースは、多数結合することにより、キシランやキシログルカンを構成する。また、これまでの報告から莢に含まれる食物繊維は、ヒト糞便中の *bifidobacteria* 増殖促進効果を有する⁴⁵⁾ことが知られており、キシロオリゴ糖が *bifidobacteria* の成長を強めることから活性の本態は、キシロオリゴ糖であると推測される。ヘミセルロースはプロピオン酸や酢酸のような短鎖脂肪酸を生産することにより、コレステロール合成を阻害する²⁹⁾。実エンドウの莢には、ポリフェノールであるフラボノイド配糖体とフェノール酸が含まれ、それらは抗酸化活性を持つ⁴⁶⁾。このように実エンドウの莢の抗酸化活性は、確認されている⁴⁶⁾が、摂取した場合のヒトや動物に対する生理活性は調べられていない。実エンドウの莢に含まれる食物繊維やポリフェノールが体内で健康増進に効果的な生理活性作用を示せば、これまで廃棄されていた莢の再利用に道が開かれると考え、実エンドウの莢を研究材料とした。

第2章 本研究の構成

本研究の目的は、実エンドウの莢の有効利用である。第1章に示したように実エンドウの莢の活性は報告されているが、摂取した場合のヒトや動物に対する影響については報告がない。

これまでの研究で、実エンドウの莢から **Prosky 法**⁴⁷⁾によって抽出した食物繊維を用いて動物実験を行った。食物繊維を1%と3%含有する飼料群を設定し、ラットに摂取させると **Control** 群と比較して3%飼料群において有意な血清コレステロール濃度低下と糞便中胆汁酸量の増加を認めた(稲垣佳映, 平成22年度修士論文)。さらに、先行研究の野菜の非可食部分から抽出した食物繊維の **bifidobacteria** 増殖促進効果のスクリーニングにおいて実エンドウの莢由来の食物繊維は、**bifidobacteria** 増殖促進効果を有した⁴⁵⁾。これらの報告は、実エンドウの莢由来の食物繊維がラットの血清脂質改善と腸内の **bifidobacteria** 増殖促進効果を有する可能性を示している。

本研究の目的である食品由来の廃棄物の有効利用と実エンドウの莢のもつ生理活性を発揮させ、食品へと応用するためには **Prosky 法**⁴⁷⁾では時間もコストもかかりすぎる。そのため、莢から食物繊維とポリフェノールを同時に抽出できてかつ **Prosky 法**⁴⁷⁾よりも短時間で抽出できるオートクレーブ抽出法を用いて試料を調製した。⁴⁸⁾

まず、実エンドウの莢の凍結乾燥物と莢のオートクレーブ抽出物 (**Autoclaved Extract ; AE**) の組成を分析した結果⁴⁸⁾, **AE** は食物繊維とポリフェノールが両方含まれ、中でも **SDF** は莢の凍結乾燥物に比べ、多く含有していた。そこで、この **AE** を添加した飼料をラットに与えた。実験では、体重変化や臓器重量、糞便重量、血清・肝臓・糞

便中脂質を測定した⁴⁸⁾。実験の結果、AE 群では有意な血清中脂質低下と糞便中総脂質排泄量の増加が認められた。

その原因を追究するために *in vitro* で AE や AE 中の SDF (AE-SDF)、AE 中の IDF (AE-IDF) を用いてリパーゼ活性の阻害やコレステロール吸着活性の検討を行った⁴⁸⁾。リパーゼ活性の阻害は、食物繊維やポリフェノールの両方で報告がある^{13,49)}。また実エンドウの莢のメタノール抽出物でリパーゼ活性の阻害作用が報告されていることから⁵⁰⁾、本研究では AE と AE からメタノール抽出でポリフェノールを除いた AE (AE which Removed Polyphenol ; AERP) 及び AE-SDF で検討を行った⁴⁸⁾。その結果、全ての試料においてリパーゼ活性の阻害が認められた。

さらに、コレステロール吸着活性に関しては、AE 及び AE-IDF で有意な吸着活性が認められた。リパーゼ活性の阻害作用と同様にコレステロールの吸着活性については、食物繊維やポリフェノールでいくつか報告されている³⁰⁻³³⁾。

先行研究で実エンドウの莢の食物繊維は、*bifidobacteria* 増殖促進効果を有する⁴⁵⁾ことから、さらに AE の *bifidobacteria* 増殖促進効果を検討するためにラットの盲腸内容物を用いて FISH 法により実験を行った。その結果、AE は *bifidobacteria* 増殖促進効果を有することが明らかとなり、*bifidobacteria* の種類によってその効果が異なるかどうかの検討も加えた。

これらの結果に基づいて、体内において生理的活性を示した食品廃棄物である実エンドウの莢が、新規な健康補助食品として活用できる可能性を検討した。

第3章 実エンドウの莢の生理的効果やその特性

3-1 実験方法

1) 実エンドウの莢のオートクレーブ抽出物 (AE) の調製と組成分析⁴⁸⁾

実エンドウ『ウスイ』(*Pisum sativum* L.) は、JA 和歌山から購入した。実エンドウから種子を取り除いた後、莢を凍結乾燥後に粉碎して篩にかけ、0.5 mm 以下のサイズの粒子を集めた。さらに、粉末にした凍結乾燥莢 100 g に 2 L の蒸留水を加えて 120°C、30 分オートクレーブ抽出した後、抽出液をろ紙 (Advantec, No.1) で濾過した。濾液を再び凍結乾燥し、ミキサーで粉碎し、これを AE とした。

AE の構成成分を、還元糖は DNS 法⁵¹⁾、タンパク質は Lowry 法⁵²⁾、総脂質は Folch 法⁵³⁾、食物繊維は Prosky 法⁴⁷⁾、ビタミン C はヒドラジン法⁵⁴⁾を用いて測定した。

総ポリフェノールはフォリンチオカルト法⁵⁵⁾で測定し、標準物質として没食子酸 (gallic acid) を用いたため、データは全て没食子酸当量で表した。

タンパク質の測定の際、Lowry 法⁵²⁾で使用するフォリンチオカルト試薬がポリフェノールにも反応するため得られたタンパク含量から総ポリフェノール含量を差し引いた。

2) ラットの飼育と解剖⁴⁸⁾

4 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットと市販の固形飼料である CE-2 は、日本クレア (東京) より購入した。精製飼料については、オリエンタル酵母工業株式会社 (東京) より購入した。精製飼料に混合した AE は第 3 章 3-1 の実験方法の 1) で調製したものをを用いた。CE-2 での 3 日間の予備飼育の後、精製飼料での飼育は 28 日間行った。

動物実験は、神戸女子大学動物研究倫理委員会の承認を経て、神戸女子大学動物室利用内規に従って行った。ラットは、温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 1\%$ 、明暗周期 12 時間サイクル (7:00 a.m.オン, 7:00 p.m.オフ) の条件下で、個別ケージにて飼育した。予備飼育終了後、Table 1 に示すように 3 群に分けた。

AIN-93G⁵⁶⁾を基準とした飼料を Control 食とした。一方、高ショ糖の摂取で、ラットの血中脂質濃度が上昇することが報告されている⁵⁷⁾。そこで本研究では、ポジティブコントロールとしてスクロース 25%とした飼料を HS (High Sucrose) 食とし、さらに HS 食に AE を 3%添加した HS+AE 食を設定した。HS 食及び HS+AE 食のスクロース及び AE は Control 食のコーンスターチと置き換えて飼料の成分調整を行った。AE をセルロースではなくコーンスターチと置き換えたのは、試料分析結果から AE 中に 50%以上の還元糖が含まれ、食物繊維は 10%程度であったためである (後述)。

水と飼料は自由摂取とし、体重と飼料摂取量は週 3 回測定した。また、解剖 4 日前から糞便重量を測定し、採取した。

解剖は 18 時間絶食の後、29 日目に行った。本研究は、2011 年にペントバルビタールナトリウム (66 mg/kg) の単独麻酔で開始したが、それ以後、本剤の単独投与による麻酔は不適切との報告があったため⁵⁸⁾、2013 年以降はイソフルランとペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の併用投与に切り替えた。麻酔下で腹部大静脈より採血し、3,000 rpm, 15 分間遠心分離を行い、血清を得た。脱血後、臓器 (肝臓と盲腸) と生殖器周囲脂肪を摘出し、秤量した。肝臓は、重量を測定し、肝臓脂質測定用として生理食塩水 20 mL に懸濁した。

盲腸は内容物を均一にした後、pHメーター（堀場製作所，D-21）で直接盲腸内 pH の測定を行った。盲腸内容物 0.2 g をクリーンベンチ内で外部からの細菌の混入に注意して滅菌スパーテルで採取し，1.8 mL の嫌気性検体希釈液に懸濁した。残りの内容物も取り除き，生理食塩水 20 mL に溶解し，残った盲腸壁の重量を測定した。

血清，肝臓，盲腸内容物は分析を行うまで - 20°C で冷凍保存した。解剖前に採取された糞便は，105°C で 17 時間，乾燥させた後，重量を測定し糞便乾燥重量と糞便中水分含量を求めた。その後，乾燥糞便はミルで粉碎し，測定時まで - 20°C で保存した。

Table 1. Composition of the diets [w/w (%)]

	Control	HS	HS + AE
Casein	20.0	20.0	20.0
α -Cornstarch	52.9	37.9	34.9
Corn oil	7.0	7.0	7.0
Sucrose	10.0	25.0	25.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0
AIN93 mineral mixture ^a	3.5	3.5	3.5
AIN93 vitamin mixture ^a	1.0	1.0	1.0
L-Cysteine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
AE	0.0	0.0	3.0

a: The mineral and vitamin mixtures were prepared according to the AIN-93G formula.⁵⁶⁾

HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods, HS + AE: HS containing AE.

3) 血糖値，血清中脂質，肝臓中脂質の測定⁴⁸⁾

血清と肝臓は - 20°C で冷凍保存したものをを用いた。血糖値，血清トリグリセリド及び総コレステロール濃度の測定は，それぞれの市販のキット（Glucose C II Test Wako, Triglyceride E-Test Wako, Total Cholesterol E-Test Wako, 和光純薬工業株式会社，大阪）を用いた。

肝臓は，総脂質の抽出を Folch 法⁵³⁾に準じて前処理し，得られた総脂質を秤量した後，t-butanol : methanol : triton X-100（50:25:25，容積比）に溶解した。肝臓のトリグリセリド，総コレステロール濃度はそれぞれのキットの手順に従って測定した。

4) 糞便中脂質と胆汁酸含量の測定⁴⁸⁾

- 20°C に保存した乾燥糞便中の総脂質量を Folch 法⁵³⁾に従って抽出した。得られた脂質は，肝臓と同様に t-butanol : methanol : triton X-100（50:25:25，容積比）に溶解した。トリグリセリド，コレステロールの定量はそれぞれのキットの手順に従って行った。

胆汁酸の分析は，乾燥糞便 100 mg にエタノール 15 mL を加え，熱水中で 1 時間還流を行った後，35 mL の遠心管に上澄みのエタノール画分を集め，窒素ガスで乾固した。これを 3 回繰り返した後，集めたエタノール画分を別のガラス試験管に移し変えるため，蒸留水とエタノールの 1 : 4 の割合の溶液で洗浄し，溶液は窒素ガスで乾固した。乾固した残渣を 2 mL ずつのエタノール／蒸留水／ヘプタン／ジエチルエーテル（1 : 1 : 1 : 1，容量比）に分配し，ヘプタン／エーテル層を分離して蒸発乾固した。これを 2 回繰り返した後，再び窒素ガスで乾固した。2 N NaOH 1.5 mL と蒸留水 0.5 mL を加えて溶解し，

123°C, 240 min でオートクレーブ処理により, 脱抱合を行った。石油エーテル 4 mL, ヘキサン 4 mL を順に加え, 攪拌後に石油エーテル層とヘキサン層の中性脂肪を取り除いた。その後, 2 N HCl で pH を酸性にしてジエチルエーテルで抽出を 2 回行い, 蒸留水で 4~5 回水洗した。遠心分離 (3,000 rpm, 1 min) により, 完全に水層とエーテル層を分離した後, エーテル層を窒素ガスで乾固した。これをメタノール 200 μ L に溶かし, 胆汁酸測定用とした。胆汁酸測定には, TBA テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪) を使用した。

5) AE 及び AE 由来食物繊維のリパーゼ活性の測定⁴⁸⁾

ブタ膵臓由来のリパーゼ (膵リパーゼ) (ナカライテスク, 京都), タウロコール酸ナトリウム (TCA - Na) (和光純薬工業株式会社, 大阪), NEFA C Test Wako (和光純薬工業株式会社, 大阪), その他の試薬も全て特級のものを和光純薬工業及びナカライテスク株式会社から購入した。リパーゼの基質は, トリオレイン (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。酵素反応には, ①AE, ②AERP, ③AE-SDF の 3 種類の試料を添加してリパーゼ活性に及ぼす影響を調べた。

リパーゼ活性は, トリオレインから遊離するオレイン酸の割合を測定することにより示した¹³⁾。基質溶液のエマルジョンは, タウロコール酸ナトリウム (0.83 mg/mL) を溶解させた 0.01 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4) 3 mL とトリオレイン 160 mg を混合して 5 分間×2 回の超音波処理を行った。さらに 3 mL のタウロコール酸ナトリウム含有トリス - 塩酸緩衝液を加え, 同様に超音波処理により完全にトリオレインを緩衝液に攪拌させ

た。この反応液 2 mL に 0.1 mg/mL の腓リパーゼを 0.2 mL (0.108 U) 加えて 37°C, 30 分間反応させた。遊離してきたオレイン酸は, NEFA C-Test Wako を用いて測定した。

①AE, ②AERP, ③AE-SDF を基質溶液に加えるときは, それぞれ 40 mg, 80 mg になるように混合し, 再び超音波処理によって基質溶液を懸濁した。

6) AE 及び AE 由来食物繊維のコレステロール吸着作用の測定⁴⁸⁾

タウロコール酸ナトリウム, 卵黄由来ホスファチジルコリン, 塩化ナトリウム, リン酸ナトリウム, コレステロール, その他の試薬 (和光純薬株式会社, 大阪) は全て特級を使用した。コレステロールミセル溶液は, タウロコール酸ナトリウム 6.6 mM, 卵黄由来ホスファチジルコリン 0.6 mM, 塩化ナトリウム 132 mM, リン酸ナトリウム 15 mM, コレステロール 0.5 mM を 24 時間, 37°C で超音波処理することにより調製した³⁰⁾。AE-SDF, AE-IDF は, Prosky 法⁴⁷⁾に従って抽出した。本研究の試料分析結果によると, AE 1 g に対して AE-SDF は約 100 mg, AE-IDF は約 50 mg が含まれていた。そこでコレステロールミセル溶液 7 mL には, AE を①1,000 mg, ②2,000 mg, AE-SDF を③100 mg, ④200 mg, AE-IDF を⑤50 mg, ⑥100 mg の 6 種類を混合し, 37°C, 2 時間保温し, 続いて 8,400 rpm, 10 分間, 遠心分離して, 上清をろ紙 (size < 1.6 µm ;GF/A, GEヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京) で濾過した後, 濾液中のコレステロール量は, Cholesterol E Test Wako を用いて測定した。

7) FISH 法による bifidobacteria の検出⁴⁸⁾

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Fluorescent *In Situ* Hybridization; FISH) 法は、分子生物学的方法の 1 つであり、染色体・細胞・組織などから核酸を抽出することなく、形態を保持したまま核酸の特定部位に相補的な蛍光標識プローブをハイブリダイゼーションさせて検出する方法である⁵⁹⁾。本研究では、bifidobacteria や clostridia の rRNA 配列に反応する特異的 DNA オリゴヌクレオチドを cyanin3 (Cy3) で修飾したプローブを用い、また全ての菌を計測するため、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を併用した。DAPI は、DNA に対して強力に結合するため、菌の種類を問わず染色することができる。先行研究では、莢由来食物繊維を含む培地で bifidobacteria の増殖が認められた⁴⁵⁾ ため、本研究では AE 摂取ラットの盲腸内容物中でも bifidobacteria の増殖が起こるのか検討した。

実験材料はラット盲腸内容物を用いた。プローブは Bifi53 と Erec482 を用いた^{60,61)}。微生物の総数の計測は DAPI 染色 (同仁化学研究所, 熊本) を用いた。菌特異的 16S rRNA に対応した DNA オリゴヌクレオチドに Cy3 を結合させたプローブは Sigma 社 (USA) から購入した。

FISH 法による同定は、高田らの方法を改変して行なった⁵⁹⁾。盲腸内容物 0.2 g は、嫌気性検体希釈液 1.8 mL に懸濁した溶液とガラスビーズ 5 g が入った滅菌済み遠心管の中に入れ、9 倍量の PBS (Phosphate buffered saline) 溶液と攪拌した後、ろ紙 (Whatman, No.1) で濾過して一晩放置した。濾液は 3 倍量の PFA

(Paraformaldehyde) 溶液を加え、ボルテックスミキサーでよく混和した後、マイクロチューブに小分けにして - 80°C に保存した。保存溶液 10 μ L を MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社, 大阪) 上に広げた。室温で 1 時間, 40°C で 15 分間乾燥させた後, 10 分間 96% エタノールに浸漬した。ハイブリダイゼーション溶液 10 μ L をスライドガラス上の乾燥した盲腸内容物溶液に添加し, カバーガラスを載せた。ハイブリダイゼーションは, 15~20 時間, 40°C で加湿チャンバー内で行った。終了後, スライドガラスを洗浄溶液 (50 mM NaCl, 4 mM Tris-HCl, 0.02 mM EDTA) 中に浸漬した。カバーガラスが自然に外れるのを待った後, カバーガラスを外し, スライドガラスを 20 分間保持した。スライドガラスを蒸留水に浸漬し, 40°C で乾燥させた。DAPI 溶液の 4 μ L を, スライドガラス上に滴下し, カバーガラスをのせた。市販のマニキュア (ニトロセルロースによる接着作用) でカバーガラスの縁をシールした後, 顕微鏡で観察した。顕微鏡は, U-REL-T 装置と組み合わせた BX53 蛍光顕微鏡 (オリンパス, 東京) を用いた。蛍光ラベルされた細菌数の測定は, 数計測ソフト WinProof ver.6.4 (三谷商事, 大阪) を用いた。測定中の退色を防止するために蛍光退色防止剤 (BIOTIUM, USA) を用い, 15 視野観察した。計算は総菌数に対する bifidobacteria 及び clostridia の比を求めた。

8) bifidobacteria 菌株の培養

B. bifidum JCM 1254 (JCM1254 株) と *B. longum subsp. infantis* JCM 1222

(JCM1222 株) 及び *B. longum subsp. longum* JCM 1217 (JCM1217 株) は, 理化学研究所バイオリソースセンター筑波研究所より購入した。培養に用いる培地には, ペプト

ンと酵母エキスを使用し、培地に混合する抽出物は第3章3-1の実験方法の1)で調製したAEを用いた。PY培地はペプトンと酵母エキスを等量含む培地であるが、前培養では1% PY培地を用い、本培養では0.5% PY培地へAEが0.5%となるように混合した。本培養を行う際にポジティブコントロールとして0.5% PY培地に既知のプレバイオティクスであるラクツロースを0.5%含む培地を調製した。菌の生育による急激なpHの低下を抑え、菌の死滅を防ぐために、培地に含まれる糖の濃度を低く設定した。

JCM1254株とJCM1222株及びJCM1217株について、まず前培養を行った後、その中から一定量を採取し、本培養培地に添加して培養を行った。具体的には、濁度標準懸濁液であるMcFarland⁶²⁾の中からMcFarland 2と同程度の濁度となるように加える菌量を調製し、本培養開始時0時間の菌数が毎回ほぼ一定となるようにした。こうして調製した菌液はbifidobacteriaの菌数として1 mL当たり 10^4 個前後に相当する。bifidobacteria培養のための操作は嫌気的条件下で行うため、グローブボックス内に窒素ガスを充填して行った。グローブボックス内の残存酸素濃度はoxygen gas meter OX-94G（理研計器株式会社、東京）を用いて測定した。嫌気培養はガスパック嫌気システム（BD, USA）を用いて行った。各菌株の前培養は、JCM1254株、JCM1222株ともに37°C、48時間の嫌気培養を行い、本培養も同条件で嫌気培養を行った。

bifidobacteriaの増殖を促進する効果の有無を調べるため、本培養を行った際の各菌株の増殖率を次のようにして比較した。本培養開始0時間と終了時の菌数を求めるため、それぞれの培養液をGAM寒天培地（日水製薬株式会社、東京）に塗布して、同条件の嫌気培養を行い、コロニーカウントを行った。増殖率は、培養終了時の菌数を培養開始時の菌

数で割ることで求めた。ポジティブコントロールとして用いたラクツロースによる増殖率と比較して有意に増加した場合、AE は特異的増殖促進効果を持つとした。

9) 統計処理

全ての実験結果は3回以上行い、平均値±標準偏差で示した。凍結乾燥莢とAEの試料分析及びbifidobacteria各菌株に対する増殖促進効果についてはt-検定を用い、その他全ての結果は3群間で比較するため、Tukey検定を用い、有意水準5%とした。統計解析ソフトは、SPSS Version 21 (IBM SPSS 21, Inc. USA, 2012) を使用した。

3-2 結果

1) AE の調製と組成分析

実エンドウの莢には、食物繊維やポリフェノールが含まれている^{38-40,48)}ことが知られている。多くのフェノール化合物は、多糖類やタンパク質に結合し⁶³⁾、それらを酵素法で抽出すると収量に 100 倍の差があるのに対し³⁸⁾、オートクレーブ抽出は、安定した収量を得ることが可能である(32.5±0.07 g/100g)⁴⁸⁾。さらにオートクレーブ抽出では酸やアルカリ、有機溶媒を使用することなく食物繊維やポリフェノールを同時に得ることができるため、のちの食品への展開にも適している。以上のことから実エンドウの凍結乾燥莢をオートクレーブ抽出し、抽出液を凍結乾燥させて AE の組成を分析した (Table 2)。凍結乾燥莢と AE を比較すると、AE では AE-IDF とポリフェノールが有意に減少したが、AE-SDF は有意に増加した。還元糖やタンパク質、脂質、シトステロール量には有意差はなかった。

2) AE 摂取がラットの成長に及ぼす影響

AE を摂取することが、体重増加量や臓器重量に影響するかどうかを調べた。飼育期間中、全ての群で下痢は観察されなかった。体重変化は Fig.1 に示すように 3 群の間に有意差は認められなかった。また飼料摂取量、肝臓重量、盲腸重量に関しても有意差は認められなかった。結果より AE は、体重増加や臓器重量に影響を与えないことが明らかとなった。

Table 2. The composition of lyophilized pea pods and AE

Components	Lyophilized pea pod	AE
Reducing sugar	335.0 ± 52.3	528.8 ± 89.3
Protein	51.6 ± 5.9	32.5 ± 12.0
Total lipids	33.3 ± 23.1	12.0 ± 2.1
Sitosterol	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3
Polyphenol (mg of GAE ^a)	114.4 ± 0.4	17.6 ± 14.0*
Vitamin C	1.8 ± 0.1	0.2 ± 0.2*
Soluble dietary fiber	8.1 ± 0.7	91.7 ± 0.8*
Insoluble dietary fiber	292.0 ± 7.3	48.7 ± 1.8*

(mg / g dry matter)

Values are means ± SD (n=3). T test was conducted.

*Asterisk indicated significance, compared with lyophilized pea pod ($p < 0.05$).

AE: Autoclaved extract of pea pods.

a: Gallic acid equivalence.

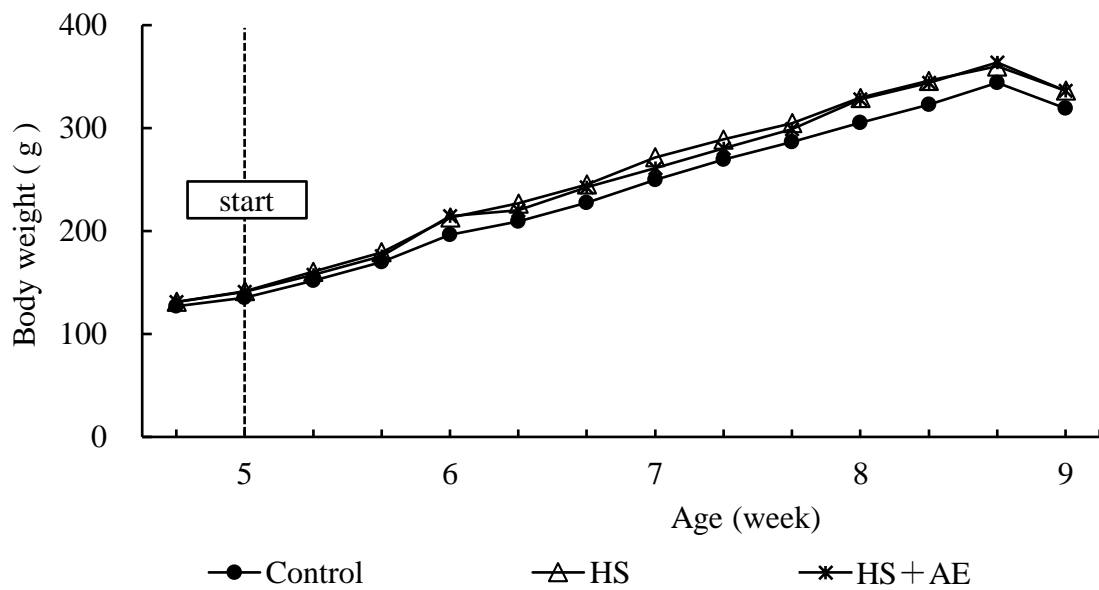


Fig.1. Effect of AE on the body weight gain.

Body weight of each group was weighed three times a week.

Values are mean \pm SD.

(Control group : n=5, HS group : n=5, HS+AE group : n=5.)

HS: high sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods, HS+AE: HS containing AE.

Start: It is a day which began to take the experimental diet.

3) 血糖値, 血清中脂質, 肝臓中脂質に対する AE の影響

AE が血糖値, 血清中脂質, 肝臓中脂質に影響を与えるかを調べた。血糖値 (Fig. 2) は, 3 群間 (Control 群, HS 群, HS+AE 群) での有意差は認められなかった。血清中のトリグリセリド濃度 (Fig. 3) は HS 群と比較して HS+AE 群で有意に低下し, 総コレステロール濃度 (Fig. 4) は HS 群と比較して HS+AE 群と Control 群で有意に低下した。

肝臓の総脂質量 (Fig. 5), トリグリセリド量 (Fig. 6), 総コレステロール量 (Fig. 7) に関して 3 群間の有意な差は認められなかった。結果から, AE は血糖値や肝臓中脂質には影響を与えないが, 血清中脂質には影響を与えることが明らかとなった。

4) 糞便中脂質と胆汁酸含量に対する AE の影響

血清中脂質が低下した要因として, AE による糞便中の脂質や胆汁酸の排泄促進が推測されるため糞便中の脂質含量と胆汁酸量を調べた (Table 3)。AE の摂取によって糞便量, 水分量 (%) に 3 群間の差はなかった。糞便中総脂質量 (mg) は, HS 群と比べ HS+AE 群では有意に増加した。さらに, 糞便全体を占める総脂質量 (%) も HS 群に比べ, 有意に増加した。Control 群と比較してトリグリセリド量 (%) も有意に増加したが, コレステロール量 (%) は増加傾向を示した。また, 胆汁酸排泄量 (μg) には有意な差は認められなかった。この結果から, HS+AE 群では糞便中総脂質排泄量が増加したことが明らかとなった。

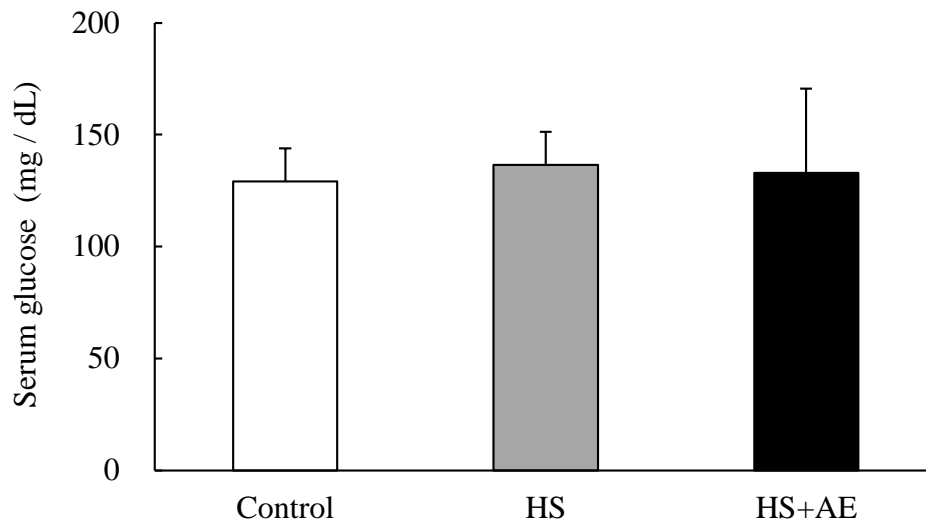


Fig.2. Effect of AE on serum glucose levels.
 Values are mean \pm SD (n = 5).
 Tukey's test was conducted.
 HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods,
 HS + AE: HS containing AE.

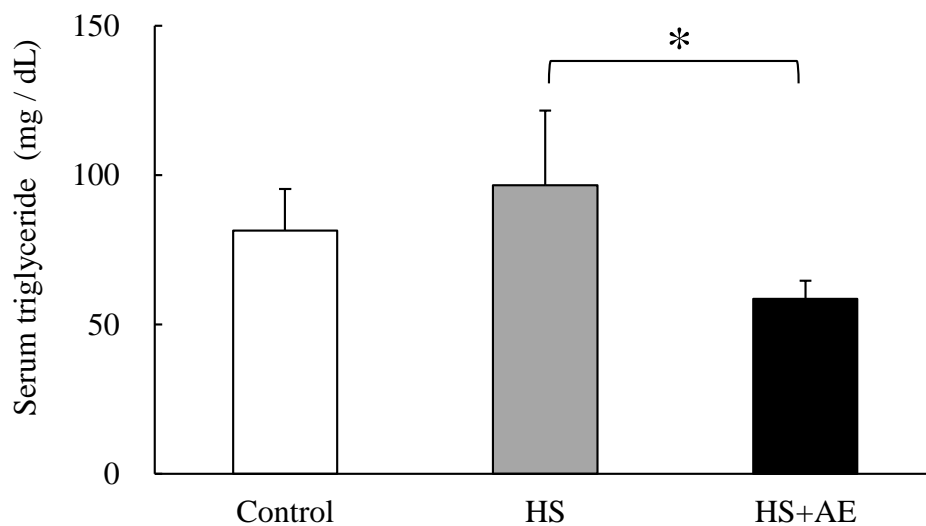


Fig.3. Effect of AE on serum triglyceride levels.
 Value are mean \pm SD (n = 5).
 Tukey's test was conducted. *Asterisk denotes significance at $p < 0.05$.
 HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods,
 HS + AE: HS containing AE.

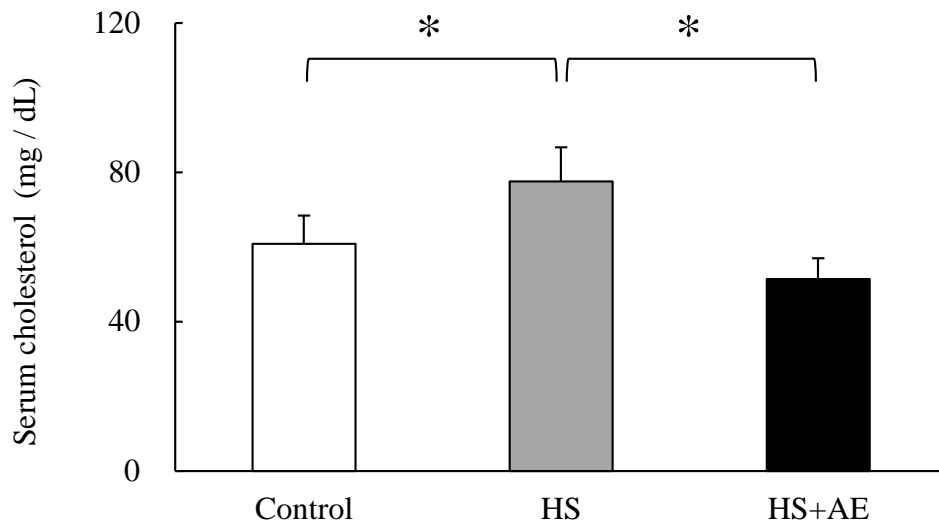


Fig.4. Effect of AE of pea pods on serum cholesterol levels.

Values are mean \pm SD (n = 5).

Tukey's test was conducted. *Asterisk denotes significance at $p < 0.05$.

HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods,

HS + AE: HS containing AE.

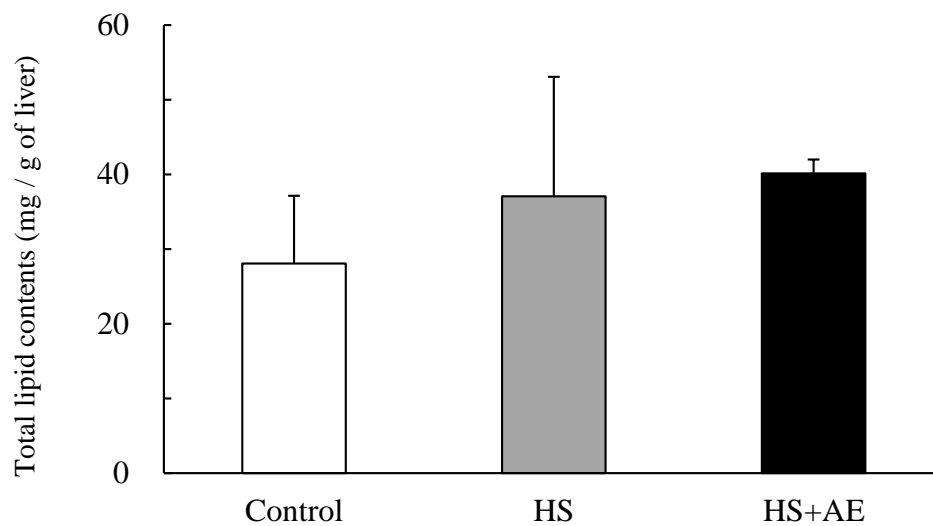


Fig.5. Effect of AE on total lipid contents of liver.

Value are mean \pm SD (n = 5).

Tukey's test was conducted.

HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods,

HS + AE: HS containing AE.

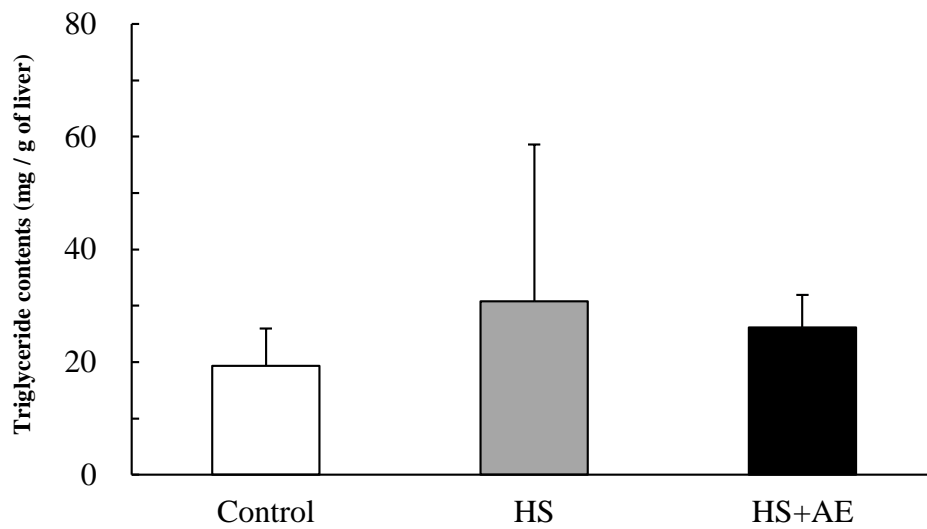


Fig.6. Effect of AE on triglyceride contents of liver.

Values are mean \pm SD (n = 5).

Tukey's test was conducted.

HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods,

HS + AE: HS containing AE.

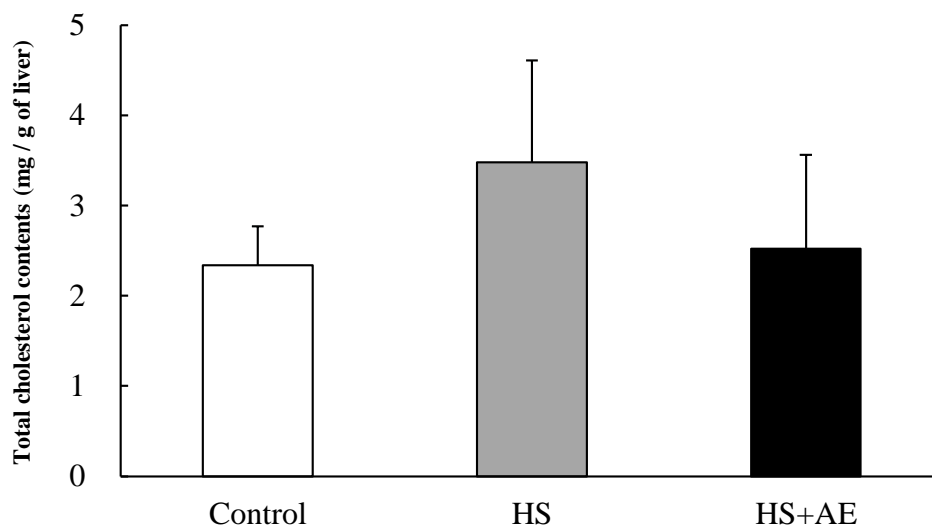


Fig.7. Effect of AE on total cholesterol contents of liver.

Values are mean \pm SD (n = 5).

Tukey's test was conducted.

HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods,

HS + AE: HS containing AE.

Table 3. Effect of AE on the feces profile.

Feces profile	Groups		
	Control	HS	HS+AE
Fecal wet weight , g/3 day	6.87±1.34	6.85±1.86	6.64±0.90
Fecal water contents, % of wet weight	22.4±3.44	21.43±7.80	20.07±3.21
Total bile acid , µg/3 day	236±96.2	168±57.2	178±45.9
Total lipid , mg/3 day	356±93.0 ^{ab}	319±80.5 ^a	488±117 ^b
Total lipid, % of wet weight	5.21±1.08 ^{ab}	4.73±0.81 ^a	7.55±2.24 ^b
Triglyceride, % of wet weight	0.45±0.13 ^a	0.58±0.15 ^{ab}	0.69±0.08 ^b
Cholesterol, % of wet weight	0.33±0.07	0.43±0.14	0.62±0.23 [*]

Values are mean ± SD (n = 5). Tukey's test was conducted.

Different superscript means significance ($p < 0.05$).

* p value versus control was $p=0.059$.

HS: high sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods, HS + AE: HS containing AE.

5) AE 及び AE 由来食物繊維がリパーゼの活性に与える影響

ラットを使った *in vivo* の実験では、**HS+AE** 群は **HS** 群に比べて有意に血清脂質が低下した (**Fig. 3**)。さらに、**HS+AE** 群の糞便中総脂質量が増加した (**Table 3**)。これらの結果から **AE** による血清脂質低下の要因は、腸内でのリパーゼ活性阻害によるトリグリセリドと **AE** によって吸着されるコレステロールの糞便への排泄量が増加するためと予想し、リパーゼ活性阻害及びコレステロール吸着力の *in vitro* における実験を行った。酵素反応系で **AE** 無添加と **AE** 添加を比べて、添加によってリパーゼ活性が低下した。**AE**、**AERP**、**AE-SDF** をそれぞれ **40 mg** 添加した場合、全ての試料においてリパーゼ活性阻害 (%) に有意差は認められなかった。しかし、**80 mg** 添加した場合には **AE** **40%**、**AERP** **70%**、**AE-SDF** **60%** の有意なリパーゼ活性阻害が認められた (**Fig. 8**)。また、**AERP** で活性阻害は上昇したため、ポリフェノールはリパーゼ活性阻害を有していないと考えられる。結果から、**AE** はリパーゼ活性阻害があり、その要因の主な成分はポリフェノールではなく **AE-SDF** であることが示唆された。

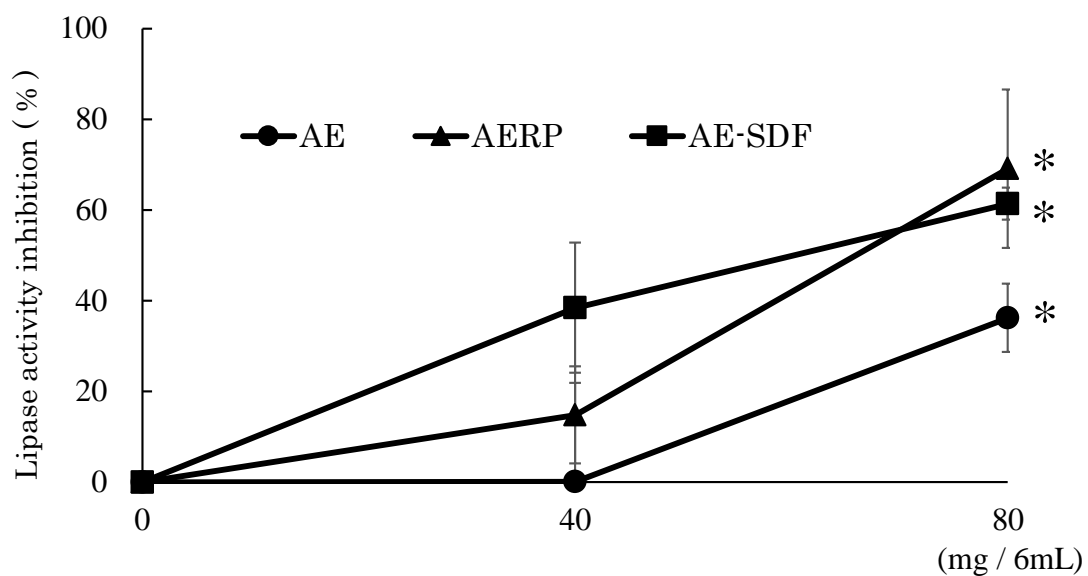


Fig. 8. Effect of AE on lipase activity *in vitro*.

Inhibition of lipase activity was determined as the reduction of activity induced by AE. Experiments were repeated more than three times.

*Asterisks denote significant differences versus 0 mg/6 mL ($p < 0.05$).

AE: Autoclaved extract of pea pods, AERP: AE which removed polyphenol, AE-SDF: Soluble dietary fiber from AE.

6) AE 及び AE 由来食物繊維のコレステロール吸着作用

in vitro のコレステロール吸着実験では、コレステロール添加溶液の AE 無添加と比べて、AE 2,000 mg 添加によってミセル中のコレステロール量が有意に減少した。さらに AE-SDF では有意な減少はみられなかったが、AE-IDF 100 mg 添加ではコレステロール量は、有意に減少した (Fig. 9)。

結果から AE はコレステロール吸着作用があり、その主な成分は AE-IDF であると考えられた。

7) FISH 法による bifidobacteria の検索

盲腸内の bifidobacteria と clostridia の菌数において AE の摂取によって HS+AE 群の bifidobacteria が総菌数に占める割合は、HS 群よりも有意に増加した (Table 4)。一方、clostridia の総菌数は減少傾向を示した。

結果から、AE は bifidobacteria 増殖促進効果を有することが明らかとなった。

8) AE の bifidobacteria 菌株に対する増殖促進効果

7)の実験結果から、AE は盲腸内で bifidobacteria の増殖を促進することが明らかとなった。そこで、bifidobacteria 菌株の種類によって AE の増殖促進効果に違いが見られるのかどうか in vitro で検討した (Table 5)。今回は、ヒトの腸内に存在する *B. bifidum* JCM 1254 と *B. longum subsp. infantis* JCM 1222, *B. longum subsp. longum* JCM 1217 を用いて増殖促進が見られるかどうか検討した (Table 5)。

ポジティブコントロールとしたラクツロースに対し、AE は JCM1254 株で有意な増殖促進を示した。しかし、JCM1222 株、JCM1217 株には有意な増殖促進を示さなかった。この結果から AE は特定の *bifidobacteria* 菌種に対して増殖を促進することが明らかになった。

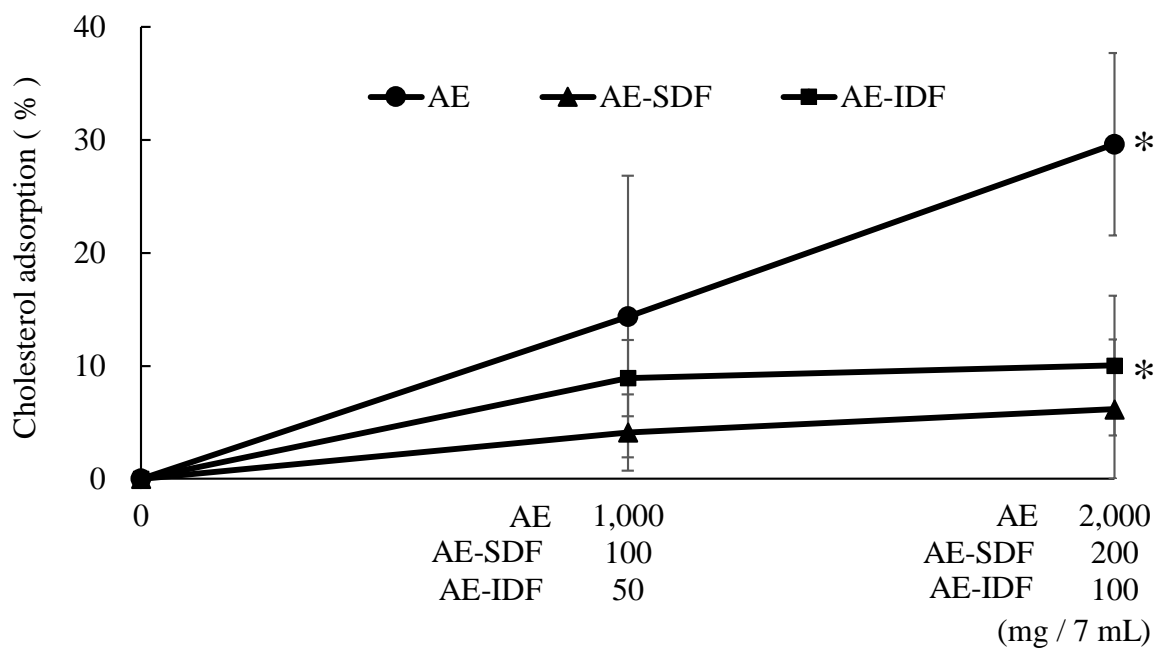


Fig.9. Effect of AE on cholesterol adsorption *in vitro*.

A cholesterol micellar solution was prepared, and cholesterol adsorption experiments with AE, AE-SDF, or AE-IDF were conducted.

*Asterisks denote significant differences versus 0 mg/7 mL ($p < 0.05$).

AE: Autoclaved extract of pea pods, SDF: Soluble dietary fiber from AE, IDF: Insoluble dietary fiber from AE.

Table 4. Effect of AE on Bifidobacteria and Clostridia in the cecum

Cy3/DAPI	Groups		
	Control	HS	HS + AE
Bifidobacteria	0.186±0.046 ^a	0.178±0.050 ^a	0.239±0.053 ^b
Clostridia	0.234±0.056	0.223±0.050	0.215±0.043

Values are mean ± SD (n=3/group). Tukey's test was conducted.

Different superscript means significance ($p < 0.05$).

Cy3/DAPI: Bifidobacteria or Clostridia / Total microbiota

HS: High sucrose, AE: Autoclaved extract of pea pods,

HS + AE: HS containing AE.

Table 5. Effect of AE on the growth *Bifidobacterium longum* JCM1217 and *Bifidobacterium infantis* JCM1222, *Bifidobacterium bifidum* JCM1254.

	Growth rate*		
	JCM 1217	JCM 1222	JCM 1254
Lactulose	3.3 ± 2.5	114.6±103.1	24.2±10.5 ^a
AE	10.7 ± 18.5	34.0±58.9	295.6±162.4 ^b

*The number of bacteria after incubation / the number of bacteria before incubation.

Tukey's test was conducted.

Different superscript means significance ($p < 0.05$).

AE: Autoclaved extract of pea pods.

第4章 考察

本研究の目的は、実エンドウの莢を有効利用し、さらに莢のオートクレーブ抽出物が新規な健康補助食品として活用できるか検討することにある。そのため AE 摂取による健康増進効果についてラットを次の3群に分けて実験を実施し、検討した。AIN-93Gを基準とした飼料を与えた群を Control 群とし、血清脂質を上昇させる高ショ糖 (HS) 食を与えたラットの HS 群と HS 食に AE を添加した HS+AE 群の3群を設定した。

AE は糖分析の結果ではグルコースを 90% 含んでいることから、グルコースで構成された難消化性多糖のレジスタントグルカン (RGM) の論文⁶³⁾と飼料添加濃度について比較した。ヒトの場合、RGM の下痢を引き起こす最大無作用量は、0.9 g/kg BW であると報告され、さらに RGM 5% の添加では、1 匹のラットが死亡し解剖すると盲腸の肥大が見られた⁶⁴⁾。ラットの RGM の最大無作用量は、体重から考え 0.3 g/300 g (ラットの平均体重) と計算できる。ラットは 1 日当たり平均 30 g の飼料を摂取するため、AE 3% の添加では 1 日当たり 0.9 g の AE を摂取している。この量は前述の RGM の最大無作用量より多く、約 3 倍量である。しかし、他の報告では試料の添加量が食物繊維やポリフェノール単体の添加では 0.1~1%^{5,8)}、抽出物のような混合物では 3~10%^{1,4,6)}と幅広く設定され、いずれも下痢は起こしていない。本研究では、試料分析の結果から AE は食物繊維だけでなく、還元糖や様々な物質が含まれている混合物であり、ポリフェノールもわずかであるが含まれていた。飼料 100 g 当たりの AE 添加量を 3% としたのは、食物繊維同様にポリフェノールの過剰摂取は下痢を引き起こすことが知られている⁶⁵⁾ことや AE が精製成分ではなく混合物であることを考慮したからである。

実験期間中、全ての群で体重変化や飼料摂取量に関して差はなく、また下痢も起こらなかった。さらに解剖時には生殖器周囲脂肪、肝臓、盲腸の重量及び盲腸内 pH に関する有意差は認められなかった。

本研究で、血清トリグリセリドとコレステロール濃度は HS 群と比べて HS+AE 群では有意に上昇が抑制されていた。食物繊維は、糞便として総脂質や胆汁酸を排泄することで結果として血中脂質を低下させる^{22,25)}。本研究では、HS 群に比べて HS+AE 群の糞便中胆汁酸排泄量は差がなかったが、糞便中総脂質排泄量は有意に増加した。この結果から、血清脂質濃度は糞便中総脂質排泄量の増加によって低下したと考えられる。しかし、糞便中のトリグリセリド量と総コレステロール量には有意な増加は認められなかった。そのため、糞便中の総脂質量、トリグリセリド量、総コレステロール量を糞便重量当たりの割合 (%) で表し、再び 3 群間の比較を行った。その結果、糞便中トリグリセリド量 (%) は Control 群と比べて HS+AE 群で有意に糞便重量当たりの含量が増加を示した。さらに、糞便中総コレステロール量 (%) は、Control 群に比べて HS+AE 群で糞便重量あたりの含量が増加傾向 ($p=0.059$) を示した。このことから AE による血清中脂質の上昇抑制は、糞便からの排泄と関わりがあることが示唆された。

リパーゼは、トリグリセリドを加水分解するため、活性が阻害されると糞便中へのトリグリセリド量は増加すると推測されることから AE によるリパーゼ活性阻害作用について検討した。試験管内のリパーゼ活性阻害実験で、AE-SDF と AERP では、AE を添加していないリパーゼ活性と比べて 40%以上の活性阻害を示した。この結果より活性阻害のメカニズムは明らかではないが、リパーゼ活性阻害は AE よりも AERP の方が高く、食物繊維が

関係すると考えられた。AERP が、リパーゼ活性阻害を示した理由として AE 中の食物繊維の中でも含有量の高い AE-SDF の濃度が相対的に上昇したことによると考えられる。SDF やポリフェノールは、リパーゼ活性阻害を持つという報告がある^{13,49)}。Slanc らは、実エンドウ (*Pisum sativum*) の莢のメタノール抽出物が試験管内でリパーゼ活性阻害を示し、抽出物からポリフェノールを取り除いた後の抽出物はコントロールと比べて活性阻害が 40%未満であったと報告している⁵⁰⁾。実エンドウ (*Pisum sativum*) を含む全ての植物は、フェノール酸を含んでおり⁶³⁾、莢にもポリフェノールが含まれているが、AERP で活性阻害を持ったことから AE 中のポリフェノールはリパーゼ活性阻害を示さないと示唆された。その理由としてオートクレーブ抽出によってポリフェノール骨格が壊れ、構造が変化したことが考えられる⁶⁶⁾。

食物繊維、特に SDF やポリフェノールはコレステロールや胆汁酸塩を沈殿させることが報告されている³⁰⁻³³⁾。本研究では、試験管内で AE はコレステロールを吸着した。第 3 章 3-1 の実験方法の 6)のコレステロール吸着作用の実験では、2,000 mg の AE によって 30% 以上のコレステロールが吸着された。また、AE-IDF 100 mg がコレステロールを有意に吸着したため、AE-IDF がコレステロールを吸着していると推測した。一般的には水分を含んだ SDF の粘りによってコレステロールを吸着する⁶⁸⁾が、本研究では AE-IDF が有意なコレステロール吸着活性を示したことから、AE-IDF はコレステロール排泄を促進すると考えられる。

オートクレーブ処理によって大麦や小麦ふすまに含まれるアミノ酸やグリコシル化合物の含量は変化する^{68,69)}。また、脱穀大麦はオートクレーブしていないサンプルに比べてオ

オートクレーブしたサンプルで相対粘度が増加する⁶⁸⁾。このことにより、今回の実験でも AE-IDF でコレステロール吸着作用がみられたのはオートクレーブによって AE-IDF の粘性も増加したのではないかと考えられる。

今回の実験では、SD ラットは 1 日に平均として 30 g の実験食を摂取しており、ラットが AE を 1 日 0.9 g 摂取すると、AE-SDF は 90 mg、AE-IDF は 45 mg を摂取していることになる。In vitro の実験で AE-IDF がコレステロールを有意に吸着した結果と比較すると、不十分な量であるが、AE の摂取を継続することで腸管内の AE-IDF がコレステロールを吸着することにより糞便中へ排泄することができると考えられる。

また、本研究で、3 群を比較して体重や飼料摂取量に有意差は認められなかった。これらの結果から AE が成長や飼料摂取に影響を与えないと言える。

第 3 章 3-2 の実験結果の 1) から AE は植物ステロールの 1 つであるシトステロールを含んでいることが明らかになった。シトステロールは *Pisum sativum* の種子と莢に含まれることが報告されている⁷⁰⁾。植物ステロールやスタノールは、腸でのコレステロール吸収を阻害することによって血中や肝臓のコレステロール低下をもたらすことが証明されており、 β -シトステロール (0.4 mM) は、腸溶液モデルでコレステロールの溶解度を 43% 低下させることができる⁷¹⁾。AE 1 g にはシトステロールがおおよそ 1 mg 含まれ、この量は 2.5 mM に相当するため、腸管内のコレステロールの溶解度は低下し、糞便中へのコレステロール排泄は増加すると推測される。しかし、HS+AE 群の糞便中総コレステロール排泄は有意な増加を示さなかったため、シトステロールの関与は少ないと考えられる。

AE は、盲腸内の *bifidobacteria* を増加させる働きを持つ。*bifidobacteria* は、ヒトの健康に有益であることが知られており、*bifidobacteria* によって血清コレステロールが低下するとの報告もある⁷²⁾。AE の糖分析の結果では、キシロースが得られた (2.5 ± 0.61 mg/g)。キシロオリゴ糖は、プレバイオティクス活性を持つことが示されている³³⁾。また、*in vitro* の実験で *bifidobacteria* は、コレステロールを添加した培地においてコレステロールを資化することにより、培地中のコレステロール濃度の低下をもたらしている³⁵⁾。この実験で血清コレステロール濃度が低下したにもかかわらず、糞便中総コレステロール量が有意に増加しなかったのは、*bifidobacteria* がコレステロールを炭素源として資化したと推測される。

これまでの結果から、AE が混合物であるため血清中脂質低下の特異的な因子を特定することは難しい。また、この実験では肝臓中脂質量や糞便中胆汁酸量には有意な差は得られなかった。そのため、AE による HMG-CoA リダクターゼの阻害や CYP7A1 活性による胆汁酸生成への影響については調べなかった。

AE のポリフェノール含量は、凍結乾燥莢と比べて減少したが、AE-SDF 含量は 10 倍以上も増加した。一方、同じように凍結乾燥莢で動物実験を行ったが、脂質低下効果は得られなかった（データは示さず）。このことから、実エンドウの莢はオートクレーブ抽出をすることにより、生物学的活性を持つと考えられる。しかし、前述のように実エンドウの莢にはポリフェノールが含まれており、ポリフェノールには今回の実験同様にリパーゼ活性阻害やコレステロール吸着活性を持つものも存在する^{30,31,68)}。今回の実験では、 120°C 、30 分でオートクレーブ抽出を行ったため、ポリフェノールの構造が変化して様々な活性を示さなくなったと考えられる。実エンドウの莢の食物繊維とポリフェノールの 2 つの活性を上

手く引き出すには、今回のオートクレーブ抽出よりも両方を効率よく抽出できる時間と温度の検討が必要である。

本研究で、実エンドウの莢のオートクレーブ抽出物は、血清中のトリグリセリドや総コレステロール濃度をコントロールすることができる活性を持つことを明らかにした。さらに、糞便への総脂質やトリグリセリドの有意な排泄増加、有意ではないが総コレステロールの排泄を増加させ、盲腸内容物中で *bifidobacteria* の増殖を引き起こすことも明らかとなった。

以上の結果から、実エンドウの莢のオートクレーブ抽出物は新規な健康補助食品として活用できる可能性があると考えられる。

引用文献

- 1) Tamura T, Inoue N, Shimizu-I A, Tadaishi M, Takita T, Arai S and Mura K: Serum cholesterol reduction by feeding a high-cholesterol diet containing a lower-molecular-weight polyphenol fraction from peanut skin.
Biosci Biotechnol Biochem **76**: 834-837, 2012
- 2) Shimizu-I A, Udagawa H, Kobayashi-H K, Mura K, Tokue C, Takita T and Arai S: Hypocholesterolemic effect of peanut skin and its fractions: A case record of rats fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 205-208, 2009.
- 3) Tamura T, Inoue N, Ozawa M, Shimizu-I A, Arai S, Abe N, Koshino H and Mura K: Peanuts-skin polyphenols, procyanidin A1 and epicatechin - (4 β →6) - epicatechin (2 β →O→7, 4 β →8) - catechin, exert cholesterol micelle-degrading activity in vitro.
Biosci Biotechnol Biochem **77**: 1306-1309, 2013
- 4) Roldan-M E, Krath B N, Poulsen M, Binderup M-L, Nielsen T H, Hansen M, Barri T, Langkilde S, Pilar C M and Sanchez-M C: Effects of an onion by-product on bioactivity and safety markers in healthy rats. *Br J Nutr* **102**: 1574-1582, 2009
- 5) Kim J, Cha Y-J, Lee K-H and Park E: Effect of onion peel extract supplementation on the lipid profile and antioxidative status of healthy young women: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover trial. *Nutr Res Pract* **7**: 373-379, 2013
- 6) Yuji K, Sakaida H, Kai T, Fukuda N, Yukizaki C, Sakai M, Tsubouchi H and Kataoka H: Effect of dietary blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) leaves on serum

- and hepatic lipid levels in rats. *J Oleo Sci* **62**: 89-96, 2013
- 7) Kosmala M, Zdunczyk Z, Kolodziejczyk K, Klimczak E, Juskiewicz J and Zdunczyk P: Chemical composition of polyphenols extracted from strawberry pomace and their effect on physiological properties of diets supplemented with different types of dietary fibre in rats. *Eur J Nutr* DOI **10**: 1007/s00394-013-0557-z, 2013
- 8) Park H J, Jung U J, Cho S J, Jung H K, Shim S and Choi M S: Citrus unshiu peel extract ameliorates hyperglycemia and hepatic steatosis by altering inflammation and hepatic glucose- and lipid-regulating enzymes in db/db mice. *J Nutr Biochem* **24**: 419-427, 2013
- 9) Lim D W, Lee Y and Kim Y T: Preventive effects of Citrus unshiu peel extracts on bone and lipid metabolism in OVX rats. *Molecule* **19**: 783-794, 2014
- 10) Kim S H, Hur H J and Yang H J: Citrus junos Tanaka peel extracts antidiabetic effects via AMPK and PPAR- γ both in vitro and in vivo in mice fed a high-fat diet. *Evid Based Complement Alternat Med* **8**: 921912, 2013
- 11) Ding X, Fan S, Lu Y, Zhang Y, Gu M, Zhang L, Liu G, Guo L, Jiang D, Lu X, Li Y, Zhou Z and Huang C: Citrus ichangensis peel extract exhibits anti-metabolic disorder effects by the Inhibition of PPAR γ and LXR signaling in high-fat diet-induced C57BL/6 mouse. *Evid Based Complement Alternat Med* **10**: 678592, 2012

- 12) Sembries S, Dongowski G, Jacobasch G, Mehrlander K, Will F and Dietrich H:
Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on
intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br J Nutr* **90**: 607-615, 2003
- 13) Iwata E, Hotta H and Goto M: Hypolipidemic and bifidogenic potentials in the
dietary fiber prepared from Mikan (Japanese mandarin orange: *Citrus unshiu*)
albedo. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **58**: 175-180, 2012
- 14) 農林水産省, 食品リサイクル法関連 (平成12年法律第116号, 平成13年5月1日施行)
<http://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syokuhin/>
- 15) 農林水産省, 食品廃棄物等の利用状況等 (平成 25 年度推計)
http://www.env.go.jp/recycle/food/h25_flow.pdf
- 16) 農林水産省, 食品廃棄物等の再生利用等の目標について (平成 27 年 7 月公表)
http://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syokuhin/s_info/saiseiriyo_mokuhyou.html
- 17) 消費者庁, 食べもののムダをなくそうプロジェクト (平成 24 年 10 月 17 日設
立) http://www.caa.go.jp/adjustments/index_9.html
- 18) Chanet A, Milenkovic D, Deval C, Potier M, Constans J, Mazur A, Bennetau-P C,
Morand C and Bérard A M: Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically
affects atherosclerosis development diet-induced hypercholesterolemia in mice.
J Nutr Biochem **23**: 469-477, 2012

- 19) Iio A, Ohguti Y and Nozawa Y: Hesperetin upregulates ABCA1 expression and promotes cholesterol efflux from THP-1 macrophage. *J Nat Prod* **75**: 563-566, 2012
- 20) Mulvihill E E and Huff M W: Protection from metabolic dysregulation, obesity, and atherosclerosis by citrus flavonoid: activation of hepatic PGC1 α -mediated fatty acid oxidation. *PPAR Res* **9**: 857142, 2012
- 21) Goldwasser J, Cohen P Y, Yang E, Balaguer P, Yarmush ML and Nahmias Y: Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPAR α , PPAR γ , LXRA. *PLoS One* **5**: e12399, 2010
- 22) Cho L J, Lee C and Ha T Y: Hypolipidemic effect of soluble fiber isolated from seeds of *Cassia tora* Linn. In rats fed a high-cholesterol diet. *J Agric Food Chem* **55**: 1592-1596, 2007
- 23) Kim M and Shin H K: The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentrations and fecal lipid excretion in rats. *J Nutr* **128**: 1731-1736, 1998
- 24) Chen H-L, Haack V S, Janecky C W, Vollendorf N W and Marlett J A: Mechanisms by which wheat bran and oat bran increase stool weight in humans. *Am J Clin Nutr* **68**: 711-719, 1998
- 25) Moundras C, Behr S R, Remesy C and Demigne C: Fecal losses of sterols and bile

- acids induced by feeding rats guar gum are due to greater pool size and liver bile acid secretion. *J Nutr* **127**: 1068-76, 1997
- 26) Nishina P M and Richard A F: The effects of dietary fiber feeding on cholesterol metabolism in rats. *J Nutr* **120**: 800-805, 1990
- 27) Ruiz-R B, Quintela J C, de la Fuente E, Haya J and Perez-Olleros L: Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods Hum Nutr* **65**: 50-56, 2010
- 28) Edited by Cummings J H, Rombeau J L and Sakata T Cambridge: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Cambridge University Press, p.90-91, 1995
- 29) Adam A, Levrat-V M-A, Lopez H W, Leuillet M, Demigne C, and Remesy D: Whole wheat and triticale flours with differing viscosities stimulate cecal fermentations and lower plasma and hepatic lipids in rats. *J Nutr* **131**: 1770-1776, 2001
- 30) Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F and Sugano M: Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta* **1127**: 141-146, 1992
- 31) Lilya V, Zahari V, Borislava D, Slavka T, Nikolai D and Simeon S: Mechanisms of cholesterol and saturated fatty acid lowering by *Quillaja saponaria* extract, studied by *in vitro* digestion model. *Food Funct* **6**: 1319-1330, 2015

- 32) Hu G and Yu W: Binding of cholesterol and bile acid to hemicelluloses from rice bran. *Int J Food Sci Nutr* **64**: 461-466, 2013
- 33) Nsor-Atindana J, Zhong F and Joseph Mothibe K: *In vitro* hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao L.*) shells. *Food Funct* **3**: 1044-1050, 2012
- 34) Manisseri C and Gudipati M: Prebiotic activity of purified xylobiose obtained from ragi (*Eleusine coracana*, Indaf-15) bran. *Indian J Microbiol* **52**: 251–257, 2012
- 35) Bordoni A, Amaretti A, Leonardi A, Boschetti E, Danesi F, Matteuzzi D, Roncaglia L, Raimondi S and Rossei M: Cholesterol-lowering probiotics: in vitro selection and in vivo testing of bifidobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 8273-8281, 2013
- 36) 菅原龍幸, 井上四郎 編, 新版 原色食品図鑑, 建帛社 **p134**, 1996
- 37) 政府統計の総合窓口, 平成26年産野菜生産出荷統計, (2015年12月2日公表)
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001141603>
- 38) Duenas M, Estrella I and Hernandez T: Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum L.*). *Eur Food Res Technol* **219**: 116-123, 2004
- 39) Sankaran R P and Grusak M A: Whole shoot mineral partitioning and accumulation in pea (*Pisum sativum*). *Front Plant Sci* doi:10.3389/fpls, 2014
- 40) Mateos-A I, Redondo-C A, Villanueva-S M-J, Zapata-R M-A and Tenorio-S M-D: Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of

- functional compounds. *LWT-Food Science and Technology* **43**: 1467-1470, 2010
- 41) Martin J M, Rittot M. de Abreu M C, Lansa M J, Vigas-Cerspo A M, Alimedia J A, Freire J B and Bento O P: Dietary raw peas (*Pisum sativum* L.) reduce plasma total and LDL cholesterol and hepatic esterified cholesterol in intact and ileorectal anastomosed pigs fed cholesterol-rich diets. *J Nutr* **134**: 3305-3312, 2004
- 42) Spilemann J, Sranl G I and Eder K: Dietary pea protein stimulates bile acids excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **92**: 683-693, 2008
- 43) Bennett E J, Robetts J A and Wagstaff C: The role of the pod in seed development: strategies for manipulating yield. *New Phytol* **190**: 838-853, 2011
- 44) Mateos-A I, Redondo-C A and Villanueva-S M-J: Broad bean and pea by-products as sources of fibre-rich ingredients: potential antioxidant activity measured in vitro. *J Sci Food Agric* **92**: 697-703, 2012
- 45) Iwata E, Hotta H and Goto M: The screening method of a bifidogenic dietary fiber extracted from inedible parts of vegetables. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **55**: 385-388, 2009
- 46) Babbar N, Singh O H, Kaur S S and Kumar B V: Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residue and their

- evaluation as natural sources of antioxidants. *J Food Sci Technol* **51**: 2568-2575, 2014
- 47) Prosky L, Asp N G, Furda I, deVries J W, Schweizer T F, and Furda I: Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products, interlaboratory study. *J AOAC Int* **71**: 1017, 1988
- 48) Inagaki K, Nishimura Y, Iwata E, Manabe S, Goto M, Ogura Y and Hotta H: Hypolipidemic effect of the autoclaved extract prepared from pea (*Pisum sativum* L.) pods in vivo and in vitro. *J Nutr Sci Vitaminol* **62**: 322-329, 2016
- 49) Mineo S, Noguchi A, Nagakura Y, Kobori K, Ohta T, Sakaguchi E and Ichiyanagi T: Boysenberry polyphenol suppressed elevation of plasma triglyceride level in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **61**: 306-312, 2015
- 50) Slanc P, Doljak B, Kreft S, Lunder M, Janes D and Strukelj B: Screening of selected food and medical plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytother Res* **23**: 874-877, 2009
- 51) Gusakov A V, Kondratyeva E G and Sinitsyn A P: Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *Int J Anal Chem* **10**: 1155-1158, 2011
- 52) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L and Randall R J: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951

- 53) Folch J, Lees M and Sloane S G H: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**: 497-509, 1957
- 54) Roe J H and Mills M B: The determination of kicketo-1-gulonic acid, dehydro-1-ascorbic acid, and 1-ascorbic acid in the same tissue extract by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. *J Biol Chem* **174**: 201-208, 1948
- 55) Brat P, George S, Bellamy A, Chaffaut LD, Scalbert A, Mennen L, Arnault N and Amiot M J: Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J Nutr* **136**: 2368–2373, 2006
- 56) Reeves P G, Nielsen F H and Fahey G C JR: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final reports of American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**: 1939-1951, 1993
- 57) Yang M-H, Wang C-H and Chen H-L: Green, oolong and black tea extracts modulate lipid metabolism in hyperlipidemia rats fed high-sucrose diet. *J Nutr Biochem* **12**: 14-20, 2001
- 58) Flecknell P: Laboratory animal anaesthesia 3rd Ed. Academic press, 2010
- 59) 高田敏彦, 松本一政, 田中隆一郎: 腸内フローラの解析 - 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 - 腸内細菌学雑誌 **18**: 141-146, 2004
- 60) Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M and Benno Y: Diversity of the *Clostridium cocoides* group in human fecal microbiota as determined by 16S rRNA gene library. *FEMS Microbiol Lett* **257**: 202-207, 2006

- 61) Takada T, Matsumoto K and Nomoto K: Development of multi-colon FISH method for analysis of seven Bifidobacterium species in human feces. *J Microbiol Methods* **58**: 413-421, 2004
- 62) 松永清輝: 菌量 (数) 測定法, 図説 臨床検査法 細菌・真菌学, (編) 三輪谷俊夫, 医歯薬出版, 東京, 240-244, 1982
- 63) Klepacka J, Gujska E and Michalak J: Phenolic compounds as cultivar- and variety-distinguishing factors in some plant products. *Plant Foods Hum Nutr* **66**: 64-69, 2011
- 64) Bito H, Hamaguchi N, Hirai H and Ogawa K: Safety evaluation of a newly-developed dietary fiber: resistant glucan mixture. *J Toxicol Sci* **41**(1): 33-44, 2016
- 65) Méité S, Bahi C, Yéo D, Datté J Y, Djaman J A and N'guessan D J : Laxative activities of *Mareya micrantha* (Benth.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) leaf aqueous extract in rats. *BMC Complement Altern Med* **10**: 7, 2010
- 66) Fischer Ulrike A., Carle Reinhold and Kammerer Dietmar R: Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chem* **1**:138 (2-3), 2013
- 67) Daou C and Zhang H: Functional and physiological properties of total, soluble, and insoluble dietary fibres derived from defatted rice bran. *J Food Sci Technol* **51**: 3878–3885, 2014

- 68) Branton S L, Lott B D, May J D, May J D, Hedin P A, Austin F W, Latour M A and Days E J: The effect of nonautoclaved and autoclaved water-soluble wheat extracts on the growth of *Clostridium perfringens*. *Poult Sci* **75**: 335-338, 1996
- 69) Campbell G L, Classen H L and Balance G M: Gamma irradiation treatment of cereal grains for chick diet. *J Nutr* **116**: 560-569, 1986
- 70) Schrick K, Cordova C, Li Grace, Murray L and Fujioka S: A dynamic role for sterols in embryogenesis of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **72**: 465-475, 2011
- 71) Matsuoka K, Kase A, Matsuo T and Ashida Y: Competitive solubilization of cholesterol/cholesteryl oleate and seven species of sterol/stanol in model intestinal solution system. *J Oleo Sci* **64**: 783-791, 2015
- 72) Lee D, K, Jang S, Baek E H, Kim M J, Lee K S, Shin H S, Chung M J, Kim J E, Lee K O and Ha N J: Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids Health Dis* **8**: 21, 2009

謝辞

学位論文をまとめるにあたり多くのご指導とご支援を賜りました，神戸女子大学大学院家政学研究科の堀田久子教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文をご精読いただき，数々のご助言とご指導を賜りました小倉嘉夫教授に深謝いたします。

本論文に関して様々のご助言を頂きました，山本勇教授に心より感謝いたします。

また，堀田研究室の院生はじめ学生の皆さん，実験動物の世話や解剖，試料の分析など，多くのご協力に心より感謝いたします。